

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500057

(P2005-500057A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/02</b>	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 31/702</b>	A 6 1 K 31/702	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 38/43</b>	A 6 1 K 39/395	D 4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 114 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-521773 (P2003-521773)	(71) 出願人	502107469 バイオティ セラピーズ コーポ フィンランド国、エフアイエヌー2052 0 トゥルク、テキストカトゥ 6
(86) (22) 出願日	平成14年8月16日 (2002.8.16)	(74) 代理人	100116838 弁理士 渡邊 潤三
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月16日 (2004.2.16)	(72) 発明者	サーリネン, ユハニ フィンランド国、エフアイエヌー0037 0 ヘルシンキ、エルヤクセンティエ 3
(86) 国際出願番号	PCT/FI2002/000674	(72) 発明者	ヘリン, ヤリ フィンランド国、エフアイエヌー0168 0 ヴァンター、アスキストンティ 2ベ ー
(87) 国際公開番号	W02003/016464		
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		
(31) 優先権主張番号	20011664		
(32) 優先日	平成13年8月17日 (2001.8.17)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌特異的オリゴ糖配列およびその用途

## (57) 【要約】

本発明は、癌細胞によって特異的に発現されるオリゴ糖配列を開示する。本発明は、LacdiNAc構造を含む癌特異的オリゴ糖鎖の存在を生物学的試料中に検出し、該糖鎖の存在を指標として、癌の検出を行う方法に関する。本発明は、該オリゴ糖鎖または該オリゴ糖鎖に結合する結合性物質を包含する抗原性物質、診断剤、医薬組成物および癌ワクチンを提供する。また、本発明は癌の治療方法にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式 (I) :



(式中、 $x$  および  $y$  は各々独立に 0 または 1 の整数であり、Sac1 は NeuNAc<sub>3</sub> または NeuNAc<sub>6</sub> である。)

で表されるオリゴ糖配列の存在を生物学的試料中に検出することを特徴とする、生物学的試料を用いて癌を診断する方法。

## 【請求項 2】

以下の工程 (a) または工程 (b) を包含することを特徴とする、請求項 1 に記載の診断方法。 10

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

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

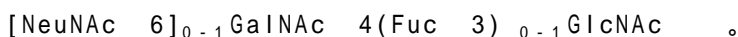
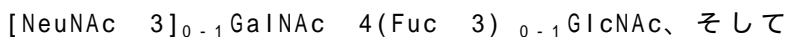
該画分中の該オリゴ糖配列の存在を指標として、該生物学的試料中の癌の存在を検出する。

## 【請求項 3】

該結合性物質が、オリゴ糖配列である GalNAc<sub>4</sub>GlcNAc またはその誘導体に特異的であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。 20

## 【請求項 4】

該結合性物質が、下記式からなる群より選ばれる少なくとも一種のオリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。



## 【請求項 5】

該結合性物質が、アプタマー、ペプチドまたはタンパク質であることを特徴とする、請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の診断方法。 30

## 【請求項 6】

該タンパク質が、抗体、酵素、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項 5 に記載の診断方法。

## 【請求項 7】

該生物学的試料が、血液試料または血清試料であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。

## 【請求項 8】

該オリゴ糖配列を、血液試料または血清試料中の分泌糖タンパク質から検出することを特徴とする、請求項 7 に記載の診断方法。

## 【請求項 9】

該糖タンパク質が、マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質ファミリー、前立腺特異的抗原、カリクレイン 2、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンおよび癌胎児性抗原からなる群より選ばれる糖タンパク質であることを特徴とする、請求項 8 に記載の診断方法。 40

## 【請求項 10】

該オリゴ糖配列の存在を、質量分析法および/またはグリコシダーゼ酵素を用いる方法によって検出することを特徴とする、請求項 2 ~ 9 のいずれかに記載の診断方法。

## 【請求項 11】

請求項 2 ~ 6 のいずれかで定義されている結合性物質を包含する、癌または癌の型の診断に用いる診断剤。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 のいずれかで定義されている結合性物質を用いて、癌または癌の型の診断用の診断剤を製造する方法。

【請求項 13】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を、化学的または生化学的に合成した多価の形態で含んでいることを特徴とする、ヒトの免疫感作に用いる抗原性物質。

【請求項 14】

請求項 13 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を製造する方法。

【請求項 15】

請求項 13 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、血清、好ましくはヒトの血清から抗体を精製する方法。 10

【請求項 16】

請求項 13 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、抗体の検出および/または定量を行う方法。

【請求項 17】

式 (I) で表されるオリゴ糖配列を少なくとも一種含む多価またはオリゴ価の非免疫原性結合体。

【請求項 18】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を含む少なくとも一種のオリゴ糖鎖に対する抗体、癌細胞における LacdiNAc 生合成を阻害する物質および請求項 17 の非免疫原性結合体からなる群より選ばれる少なくとも一種を包含する、癌治療用医薬組成物。 20

【請求項 19】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を含むオリゴ糖鎖を包含する、癌治療用医薬組成物。

【請求項 20】

医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドを更に包含することを特徴とする、請求項 18 または 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 18 ~ 20 のいずれかの医薬組成物を、治療を必要とするヒトまたは動物の患者に投与する癌の治療方法にして、癌細胞の転移能または増殖能を低下させるか、腫瘍または癌を排除するのに十分な量の該医薬組成物を用いることを特徴とする治療方法。 30

【請求項 22】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に対するヒト抗体または人体に適応させた抗体を、ヒトまたは動物の患者に投与し、癌細胞の転移能または増殖能を低下させるか、腫瘍または癌を排除することを特徴とする、癌の治療方法。

【請求項 23】

該抗体は、血清から精製されたものであることを特徴とする、請求項 22 に記載の癌の治療方法。

【請求項 24】

該抗体によって、毒性物質が腫瘍または癌をその標的とすることを特徴とする、請求項 22 または 23 に記載の癌の治療方法。 40

【請求項 25】

癌細胞における LacdiNAc 生合成を特異的な阻害剤によって阻害し、癌細胞の転移能および悪性度を低下させることを特徴とする治療方法。

【請求項 26】

免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者を治療するための、請求項 20 ~ 25 のいずれかに記載の治療方法。

【請求項 27】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌ワクチン。

## 【請求項 28】

医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドを更に包含することを特徴とする、請求項 27 に記載の癌ワクチン。

## 【請求項 29】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に結合する物質であって、アプタマー、酵素、人体に適応させた抗体またはペプチドであることを特徴とする、オリゴ糖鎖結合性物質。

## 【請求項 30】

下記式 (II) :



10

(式中、

Y は非炭水化物スペーサーまたはグリコシド結合していない末端結合体であり、

n は各々独立に 0 または 1 であり、

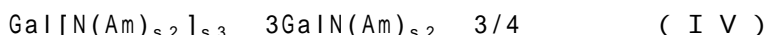
X はラクトシル残基、ガラクトシル残基、N - アセチルラクトサミニル残基、マンノシル残基、Man<sub>2</sub>残基、Man<sub>3</sub>残基、Man<sub>3</sub>GlcNAc残基、Man<sub>4</sub>GlcNAc残基、N - アセチルグルコサミニル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、好ましくはラクトシル残基、ガラクトシル残基、マンノシル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、好ましい態様においては、X はマンノシル残基であり、OS は X に 2 -、4 - または 6 - 結合、好ましくは 2 - 結合しており、

他の好ましい態様においては、X はラクトシル残基または N - アセチルラクトサミニル残基であり、OS は X の Gal 残基に 3 - または 6 - 結合しているか、X はガラクトシル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、OS は X に 3 - または 6 - 結合している。) 20

で表される抗原性エピトープ構造を包含することを特徴とする、癌治療用医薬組成物。

## 【請求項 31】

下記式 (IV) :



30

(式中、

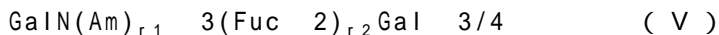
Am はアミン基の誘導残基であるが、但し、Am はアセチル (Ac) 基またはイミド基ではなく、好ましくは GalN 残基とカルボン酸を形成するアミド基、例えば、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含むシクロヘキサンラジカルのアミドなどの環状アミド、および安息香酸のアミド基のような芳香族炭化水素のアミド基であり、

s<sub>2</sub> および s<sub>3</sub> は各々独立に 0 または 1 の整数である。) 30

で表される炭水化物。

## 【請求項 32】

下記式 :



40

(式中、

r<sub>1</sub> および r<sub>2</sub> は各々独立に 0 または 1 の整数であり、

Am はアミン基の誘導残基であるが、但し、Am はアセチル (Ac) 基またはイミド基ではなく、好ましくは GalN 残基とカルボン酸を形成するアミド基、例えば、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含むシクロヘキサンラジカルのアミドなどの環状アミド、および安息香酸のアミド基のような芳香族炭化水素のアミド基である。) 40

で表される炭水化物。

## 【請求項 33】

GalN 誘導體、特に lacdiNac 構造およびその類似体を製造する方法にして、末端ヘキソサミンを受容体として下記式 (III) で表されるグリコシル基転移反応を行うことを包含する製造方法。

50

SAC-供与体 + GaIN 3/4 SACyxGaIN 3/4 ( I I I )

[ 式中、

y は - または - 結合であり、

x は各々独立して 3 位、4 位または 6 位の結合位置を表し、

GaIN 3/4 は、ヘキソース、ヘキソサミンまたはヘキソサミン誘導体、好ましくは Gal、GaIN、GalNAc、Glc、GlcN または GlcNAc、に 3 - または 4 - 結合している非還元末端 GalN を表し、

SAC はシアル酸または下記式で表される糖残基を表す。

$\text{Hex}(A)_{s_1}[\text{N}(\text{Ac})_{s_2}]_{s_3}$

( 式中、Hex は Gal または Glc であり、 $s_1$ 、 $s_2$  および  $s_3$  は各々独立に 0

10

または 1 の整数であり、但し  $s_1$  が 1 である場合には、 $s_3$  は 0 である )

上記式中の  $s_1$  が 1 である場合には、SAC で表される構造はヘキスロン酸構造、好ましくは GlcA、を含み； $s_3$  が 1 であり、且つ、 $s_2$  が 1 である場合には、SAC で表される構造は GlcNAc または GalNAc を含み；そして、 $s_2$  が 0 である場合には、SAC で表される構造は GaIN または GlcN を含んでいる。]

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ある種の癌細胞、腫瘍および他の悪性組織が特異的に発現するオリゴ糖配列に関する。本発明は、癌特異的オリゴ糖配列と結合する試薬を製造するための方法だけでなく、癌特異的オリゴ糖配列を検出するための方法も開示する。また、本発明は、上記オリゴ糖配列およびそれに結合する試薬を用いた、癌および悪性腫瘍の診断方法にも関する。さらに本発明は、オリゴ糖配列およびそれに結合する試薬を用いた、癌および悪性腫瘍の治療方法にも関する。

20

【背景技術】

【0002】

種々の癌細胞または癌化組織は、同種の細胞や組織の非悪性グリコシル化産物とは異なるオリゴ糖配列を発現する。公知のまたは推測される癌関連オリゴ糖構造の例としては、次のオリゴ糖構造が挙げられる：糖脂質構造、例えばグロボ - H ( Fuc 2Gal 3GalNAc 3Gal 4Lac Cer )、ガングリオシドである GM 1 ( Gal 3GalNAc 4(NeuNAc 3)Lac Cer ) または GD 2 ( GalNAc 4(NeuNAc 8NeuNAc 3)Lac Cer )；ルイス型フコシル化構造、例えばルイス a および x ( Gal 3/4(Fuc 4/3)GlcNAc )、ルイス y ( Fuc 2Gal 4(Fuc 3)GlcNAc )、シアリルルイス x ( NeuNAc 3Gal 4(Fuc 3)GlcNAc ) およびポリラクトサミン鎖中でのこれらの組み合わせ；ならびに O - グリカンコア構造、例えば T - 抗原 ( Gal 3GalNAc Ser/Thr-タンパク質 )、Tn - 抗原 ( GalNAc Ser/Thr-タンパク質 ) またはシアリル Tn - 抗原 ( NeuNAc 6GalNAc Ser/Thr-タンパク質 )。非ヒト型の構造、例えば N - グリコリルノイラミン酸、が癌に存在するとも示されている。癌においては、関連するオリゴ糖構造およびその特異性について十分に確立されている症例はわずかであり、これらの構造の中には、正常な細胞および組織に存在するものもあることから、癌には単に高濃度で存在しているだけだと考えられる。しかしながら、治療を目的とした用途においては、完全な癌特異性が必ずしも必要ではないと考えられる。

30

40

【0003】

LacdiNAc ( GalNAc 4GlcNAc ) 型グリコシル化産物は、ヒト組織には一般的に提示されていないが、しかしながら、LacdiNAc 型糖配列は、ヒト以外の多くの動物、ウシ糖タンパク質、ヒト糖タンパク質ホルモン ( Manzella *et al.*, 1997 ) およびヒトグリコデリン ( glycodeilin ) タンパク質 ( van den Eijnden *et al.*, 1997 ) から見出されている。一般的に、この構造は無脊椎動物や初期発生に関連すると考えられる。数種の変異型 LacdiNAc は、ヒト胎児腎臓 293 細胞が発現したタンパク質から見出されている ( Do *et al.*, 1997 )。近年、本発明者らは、トランスフェクトされた繊維芽細胞から得た LacdiNAc を基本とする構造について発表した ( Saarinen *et al.*, 1999 )。この研究においては、グリコシル

50

化が癌に関連するのか、繊維芽細胞のアデノウイルス由来EIA-プロモーター配列のトランスフェクトに関連するのことは示しておらず、EIA-プロモーターはグリコシル基転移酵素の遺伝子発現を調節してグリコシル化を修飾する場合がある。LacdiNAc型糖類は、ボーズ (Bowes) メラノーマ細胞の組織型プラスミノゲンアクチベーターにおいて、他の構造と共に見出されたが、これらは“神経系関連”構造であると考えられた (Jaques *et al.*, 1996)。これらの先の研究は、固形腫瘍から誘導した細胞系からの類似のオリゴ糖構造の検出についても記載している (Do *et al.*, 1997; Jaques *et al.*, 1996; Saarinen *et al.*, 1999)。しかしながら、細胞間の接触が変わると (例えば固形腫瘍を単一細胞に分離すると)、炭水化物および他の表面抗原は通常変化する。さらに、細胞系の細胞はおそらく遺伝学的に修飾されており、それゆえに単一細胞として培養することが可能となる。細胞表面のグリコシル化は、細胞系または組織の分化状態に非常に特異的であり、細胞または組織の種類にも特異的である。したがって、本明細書に記載した従来技術には、単一癌細胞または固形腫瘍組織の天然のグリコシル化状態について記載されていない。しかしながら、細胞の種類または分化状態とグリコシル化との潜在的な相互関係は、癌細胞および腫瘍の型判定 (typing) に癌抗原を用いることを可能にする。

10

#### 【0004】

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

癌ワクチン： 米国特許第5,102,663号は、9-OAc NeuNAc 8NeuNAc 3Lac-Cer (GD3) に対する抗体の産生を刺激または増強するための、9-OAc GD3を包含する組成物を開示する。

20

米国特許第5,660,834号は、Tn (GalNAc -Ser/Thr) 抗原またはシアリル-Tn (NeuNAc 6GalNAc -Ser/Thr) 抗原から実質的になるムチン型糖タンパク質を含有する医薬組成物およびそれをアジュバンドとともに用いて癌細胞の増殖速度を低下させる方法を開示する。これと同じムチン配列に関する発明が、他の特許にも開示されている：米国特許第5,747,048号 (ヒトに対するアジュバンド療法) および米国特許第5,229,289号。

米国特許第6,083,929号は、伸長1型鎖スフィンゴ脂質 (Gal 3GlcNAc) を腫瘍関連組成物として開示し、更にそれをアジュバンドとともに用いた医薬組成物を開示する。

治療用抗体： 米国特許第4,851,511号は、ジシアロシルルイス a - 構造 (NeuNAc 3Gal 3(Fuc 4)[NeuNAc 6]GlcNAc) に結合するモノクローナル抗体、診断試験キット、抗体を産生するハイブリドーマ、マーカー分子および抗体と結合した抗腫瘍剤を開示する。

30

米国特許第4,904,596号は、NeuNAc 3Gal 4(Fuc 3)GlcNAc 3Gal 4(Fuc 3)GlcNAc 3LacCerで表される構造に結合するモノクローナル抗体、ハイブリドーマ、診断方法および抗腫瘍剤、免疫調整剤または分化誘導剤にカップリングした抗体を開示する。

米国特許第5,874,060号は、ルイス y - 抗原 (Fuc 2Gal 4(Fuc 3)GlcNAc) を認識する人体に適応させた抗体を開示する。

米国特許第6,025,481号は、ルイス b - 抗原を認識する、人体に適応させた抗体をコードする核酸分子を開示する。ルイス b - 構造 (Fuc 2Gal 3(Fuc 4)GlcNAc-) の発現は、癌細胞では増加している。米国特許第5,795,961号は、さらに抗ルイス b 抗体も開示する。

40

#### 【0005】

診断方法： 米国特許第4,725,557号は、タンパク質結合抗原であるFuc 3Gal-、Fuc 4Gal-およびFuc 6Gal-、これらの構造を認識する抗体、癌関連炭水化物の結合を検出する方法ならびに診断キットを開示する。抗体はヒト消化器系の癌細胞に結合する。

米国特許第5,059,520号は、癌の診断に用いることのできる、血液型 A - 抗原 (GalNAc 3(Fuc 2)Gal -) を認識する数種のモノクローナル抗体を開示する。

米国特許第5,171,667号は、フコシル化2型ラクトサミン (-Gal 4(Fuc 3)GlcNAc -) に対する抗体およびそれを用いた癌の診断方法を開示する。

米国特許第5,173,292号は、癌に特異的な構造である、Gal-グロボシド (Gal 3GalNAc 3Gal 4LacCer) に結合するモノクローナル抗体を開示する。

50

米国特許第6,090,789号および5,708,163号は、Fuc 2Gal 3GalNAc 3Gal 4LacCer (グロボH、MBr1、乳腫瘍関連抗原) 結合体およびその類似体の合成、ならびにそれらを包含する医薬組成物を開示する。米国特許第5,679,769号は、糖ペプチドに結合したアスパラギンの合成を開示する。米国特許第5,543,505号は、細菌である *Helicobacter pylori* に結合する合成化合物を開示する。

米国特許第5,902,725号および6,203,999号は、前立腺特異的抗原上の少なくともトリアンテナリー (triantennary) オリゴ糖の分析による前立腺特異的癌の検出を開示する。抗体またはレクチン PHA-L を検出に用いる。これらの特許は、細胞系から得た癌型 P S A に存在するトリアンテナリー N - グリカン をクロマトグラフィーによって特徴付けている。

10

#### 【0006】

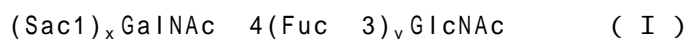
従来技術には、比較的大きな N - グリカン構造を含むフコシル化 lacdiNAc を包含する医薬組成物 (EP 特許第0565241号) およびコア 2 型 O - グリカン構造を包含する医薬組成物 (EP 特許第0919563号) に関する開示がある。これらの組成物は、セレクトイン仲介細胞接着の阻害を目的としており、EP 第0919563号では、セレクトイン仲介細胞接着の阻害による転移の阻害も目的としている。しかしながら、本発明は、本発明のオリゴ糖エピトープを、抗体を含めた特異的認識分子の標的とする方法に関する。具体的には、本発明は、診断および治療に用いる抗体を誘導するのに適切な抗原性を有する結合体および組成物に関する。本発明は、特異的抗体による認識において最適なサイズのオリゴ糖配列を包含する医薬組成物に関する。最適なオリゴ糖エピトープは、末端 lacdiNAc 構造のみを含むものか、末端オリゴ糖配列と一種または二種の単糖残基を含むものである。

20

#### 【0007】

##### 発明の概要

本発明は、癌細胞によって特異的に発現されるオリゴ糖配列を開示する。本発明は、下記式 (I) :



(式中、x および y は各々独立に 0 または 1 の整数であり、Sac1 は NeuNAc 3 または NeuNAc 6 である。)

で表される癌特異的配列を含むオリゴ糖鎖の存在を生物学的試料中に検出し、該配列の存在を指標として、癌の検出および / または癌の型判定を行う方法に関する。本発明は、多価の形態で該オリゴ糖鎖を含む抗原性物質を提供し、さらに該オリゴ糖鎖または該オリゴ糖鎖に結合する結合性物質を包含する診断剤、医薬組成物および癌ワクチンを提供する。また、本発明は癌の治療方法にも関する。

30

##### 発明の詳細の説明

いくつかの lacdiNAc (GalNAc 4GlcNAc) 型構造が分泌タンパク質、例えば糖タンパク質ホルモンから見出されている。ヒトの糖タンパク質ホルモンにおいては、通常 lacdiNAc は、ホルモンの機能に重要であると考えられる 4sulfo-GalNAc 4GlcNAc-配列に修飾されているが、いくつかの異型が分泌 lacdiNAc 構造に存在する。糖タンパク質ホルモンは希少な可溶性タンパク質であり、一般的に比較的小さく、グリコシル化部位をほとんど有していないため、採りうる lacdiNAc 構造が非常に限定されている。ヒトのグリコシル化に関する多くの構造研究がこの 30 年の間に行われているが、ヒトの膜結合性の非分泌タンパク質における lacdiNAc 配列の構造は特徴付けられていない。

40

#### 【0008】

細胞内分泌マーカーとしての lacdiNAc 構造の役割は報告されており、同じ報告は、lacdiNAc 構造は M D C K 細胞の膜タンパク質に提示されていないことを明確に記述している (Ohkura, *et al.* 2001)。分泌タンパク質において特徴付けられた lacdiNAc 構造のヒトの癌との関連は示されていない。癌による異常発現産物である lacdiNAc 構造ならびに特に希少なその異型であるフコシル化体およびシアリル化体は、正常な組織では発現されないため、このような構造の認識に基づく癌の処置および治療が有効な可能性は非常に高い。限られた量の正常組織にのみ提示されているか、低い密度で正常の組織および / または血清に

50

存在する炭水化物を用いる方法は、診断方法および治療方法として成功している。

【0009】

効果的な癌の処置のために診断および治療を組み合わせる方法

本発明で得られたデータは、本願で開示する lacdiNAc 構造が、癌細胞に提示されている炭水化物構造を認識する診断方法および治療方法に有用であることを示している。グリコシル化のパターンは、組織間、腫瘍間、更には個々の患者間でも変化するので、本発明は、特に腫瘍から異常な炭水化物構造をスクリーニングし、特定の患者の癌が特異的に発現するグリコシル化の形態に対応した個別の治療を提供するための方法に関する。具体的には、本発明は、特に腫瘍または癌の試料に存在する、本願で開示する lacdiNAc 構造のグリコシル化産物をスクリーニングし、本発明の lacdiNAc 標的治療を用いて、（特に腫瘍、悪性化した組織または細胞に特異的に提示された）特定の癌関連グリコシル化産物を有する患者を治療する方法に関する。

10

【0010】

本発明者らは、lacdiNAc が正常な組織上の細胞表面マーカーではないことを証明するために、効果的な質量分析法で複数の正常な組織のスクリーニングを行った。本発明の研究過程において、以下の事柄が判明した。

- (i) lacdiNAc 配列は、単細胞癌（例えば白血病）および固形腫瘍の両方に存在する；
- (ii) lacdiNAc 配列は、正常な組織上で多数観察されることはなかった；
- (iii) lacdiNAc 配列は、癌細胞の形質膜または膜結合タンパク質、ならびに分泌タンパク質の両方に存在し、細胞表面に組み込まれた lacdiNAc 配列は、癌診断、免疫療法および癌の lacdiNAc 配列の認識に基づく他の治療のための標的となる；そして
- (iv) 癌細胞表面に提示された lacdiNAc 配列は、治療および診断用の特異的抗体によって認識することができる。これらの構造は、細胞表面上に有効な形態で存在し、他の細胞表面成分によって被覆されていない。

20

【0011】

白血病細胞を単細胞癌細胞のモデルとして選んだ。白血病細胞は血液癌における単細胞癌細胞の代表例である。可溶性標的タンパク質は、非悪性腫瘍細胞に関する構造比較データが存在するものを選んだ。癌細胞上の LacdiNAc 配列の異常発現を示すために、メタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) を白血病細胞 (U-937) から単離し、N-グリコシド結合グリカン を N-グリコシダーゼ F で遊離させた。グリカン画分をトリヒドロキシアセトフェノンマトリックス中で MALDI-TOF MS を用いて分析したところ (図 1A)、無視できるほど少量のシアル酸残基の開裂が見られた。帰属された単糖組成を、続くグリコシダーゼ処理で推定された構造と共に表 1 に示す。MALDI-TOF MS によるオリゴ糖の分析は比較的計量的であることが示されているので、各成分の相対的な存在量も示す。最も多量に存在するグリカン種を、 $(\text{Hex})_5(\text{HexNAc})_4(\text{Fuc})_3$  の  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  に帰属した。典型的な N-グリカン構造はわかっているので、仮にこの構造をトリフコシル化ジアンテナリー複合体型グリカンとして帰属した。他の主要なグリカン種は、シアリル化、ジフコシル化ジアンテナリー複合体型グリカン、および 1 つのアンテナに末端単糖として Gal の代わりに GalNAc を有する (いわゆる LacdiNAc 構造を有する) トリフコシル化ジアンテナリー複合体型グリカンとして同定した。一連のグリコシダーゼ処理によって示されるように、これらの帰属は正しいことが判った。比較のために、非悪性白血球細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ MMP-9 の構造も決定したところ、このタンパク質には lacdiNAc 配列は含まれていなかった (Rudd P *et al.*, 1999)。

30

40

【0012】

本発明は、U-937 細胞誘導 MMP-9 が、その N-グリカンの大きな画分 (およそ 30%) に LacdiNAc 構造を有することを示す。LacdiNAc 構造の存在は、二種の独立した方法、すなわち完全糖ペプチドの LC-ESI MS だけでなく、遊離した N-グリカンの MALDI-TOF MS 分析でも証明された。構造の帰属は、さらに一連のグリコシダーゼ処理によって確認した。本研究で用いた方法の有効性は、合成オリゴ糖と公知の天然の構造体の両方を用いたいくつかのアプローチで立証されている。

50

## 【0013】

正常な組織から得た lacdiNAc構造の質量分析法によるスクリーニング

ヒトの胃、肺および結腸を含むいくつかの非悪性組織の膜タンパク質試料を、上記のように質量分析法で分析した。N-結合型またはO-結合型の lacdiNAc配列は観察されなかった。従来技術にも、ヒトの正常な膜タンパク質と癌の膜タンパク質のいずれかに提示されている lacdiNAcに関する報告はない。

## 【0014】

固形腫瘍上の lacdiNAc構造の分析

本発明は、lacdiNAc-配列がヒトの固形腫瘍に提示されていることも初めて示す。本願の実施例の1つは、ヒト喉頭癌の試料から得た lacdiNAc構造の特徴づけを示す。

10

## 【0015】

形質膜試料から得た lacdiNAc構造の特徴づけ

本発明は、癌における、形質膜型の lacdiNAc発現タンパク質にも関する。マトリックスメタロプロテアーゼMMP-9は、膜結合型で存在することも知られており(Koivunen *et al.*, 1999)、これは本発明における癌の診断および免疫療法に用いる理想的な標的を形成する。他の一つの例として、メラノーマ関連膜の二種の異なる試料のグリコシル化産物を分析した。特有のN-グリカン構造を含む多量の種々の lacdiNAc型オリゴ糖配列が、膜結合性の糖タンパク質に見出された。グリコシル化膜タンパク質は、細胞および組織の表面に提示されていることが知られている。

20

## 【0016】

本発明で示した癌に特異的な欠陥

本発明は、癌細胞の新規な欠陥を開示する。分泌タンパク質と関連する希少な構造は、通常 lacdiNAc構造を発現しないタンパク質上に発現される。さらに、グリコシル化の不全は、より異常なシアリル化体、フコシル化体およびGalNAcの4位の通常の硫酸化を欠いた異型を誘導する。癌に対する一般的な知見によると、癌細胞においては細胞内機構が乱されている。ゴルジ装置のこのような欠陥によって種々の細胞型における非常に特異的なグリコシル化が生じ、その結果が明かに上記のような問題を誘導する。可溶性タンパク質における癌を示す異常なグリコシル化産物の存在は、明かに癌の診断に有用であり、膜と結合した癌グリコシル化産物の存在によって可溶性タンパク質そのものが治療に有用となる。

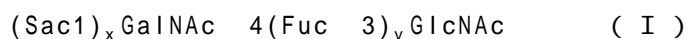
30

## 【0017】

上述のように、癌抗原の存在について、白血病細胞系U-937細胞の分泌MMP-9タンパク質、固形腫瘍および膜調製物を検討した。白血病細胞系の単一細胞は、単一細胞癌白血病との妥当な関連性を示すモデルであるとも考えられる。LacdiNAc-構造が固形腫瘍から得られ、それが膜結合性であるという知見は、グリコシル化産物を発現する固形腫瘍に対する治療において、癌グリコシル化産物が有用であることを示す。

## 【0018】

本発明は、下記式(I)で表される LacdiNAc構造が癌特異的抗原であることを示す。



(式中、xおよびyは各々独立に0または1の整数であり、Sac1はNeuNAc<sub>3</sub>またはNeuNAc<sub>6</sub>である。)

40

細胞結合型のMMP-9が知られていることから(Koivunen *et al.*, 1999)、本発明は、癌細胞および腫瘍組織から癌抗原を直接検出する方法に関する。しかしながら、癌抗原は、癌細胞および腫瘍組織から検出される以外にも、本明細書で説明するように、癌細胞または組織から誘導された分泌糖タンパク質から検出される場合がある。このような癌特異的タンパク質としては、プロテアーゼ、ホルモンまたは分泌ムチン型糖タンパク質が挙げられる。

## 【0019】

本発明は、癌抗原は糖タンパク質から検出できることを示し、この現象は悪性転換の際に上向き調節されることが知られている。癌関連糖タンパク質と推定されるものには癌抗原が存在するという知見は、初期の癌に対するより確実な診断手法を提供すると考えられる

50

。このような好ましい癌関連タンパク質の例には、マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質ファミリーに属するタンパク質（例えばMMP-9）、前立腺特異的抗原、カリクレイン2、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンおよび胎児性癌抗原が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0020】

LacdiNAc型の癌特異的オリゴ糖は、GalNAc 4GlcNAc-オリゴ糖配列を含んでいる。この配列は、癌細胞のオリゴ糖結合体の一部である。オリゴ糖配列は以下に示す配列のように置換することもでき、これらも癌細胞に提示されていることが知られている：GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc-、NeuNAc 3GalNAc 4GlcNAc-、NeuNAc 6GalNAc 4GlcNAc-、NeuNAc 3GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc-またはNeuNAc 6GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc-。癌オリゴ糖エピトープが単独でシアル酸およびフコースの両方を含む場合は、その構造は NeuNAc 3GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc- となる。癌細胞が硫酸化に必要なスルフトランスフェラーゼを有する場合には、LacdiNAc配列は、例えば4位のGalNAcが硫酸化もされていてもよい。LacdiNAc型配列は、癌細胞または組織の糖タンパク質配列の一部であってもよく、例えばLacdiNAc型配列は糖タンパク質のN-結合グリカン中のマンノース残基に 2 -、 4 - または 6 - 結合しているか、LacdiNAc型配列は糖タンパク質のN-結合グリカン中のマンノース残基に 2 - 結合している。

10

#### 【0021】

フコシル化LacdiNAc糖類は、ルイス型癌関連オリゴ糖との相似性を示す。ルイス型癌関連オリゴ糖は正常な組織にも多量に存在するものの、ルイス型癌関連オリゴ糖の認識が弱いヒト抗体が産生される有望な理由は、ルイス型癌関連オリゴ糖とフコシル化LacdiNAc糖類との潜在的な弱い交差反応性である。

20

#### 【0022】

本発明は、細胞または組織の悪性化を、癌特異的グリコシル化産物を指標として検出する方法に関する。このような検出は、本願で開示する癌特異的オリゴ糖配列に特異的に結合する分子によって行うことができる。好ましい分子は、アプタマー、レクチン、遺伝子工学的に作製したレクチン、抗体、モノクローナル抗体、抗体の断片、LacdiNAc-構造を認識する酵素（例えばグリコシダーゼやグリコシル基転移酵素）および遺伝子工学的に作製したそれらの異型である。標識した細菌、ウイルスまたは細胞、あるいは重合体の表面であって、LacdiNAc構造を認識する分子を有するものを検出に用いることができる。オリゴ糖配列は、エンドグリコシダーゼ酵素によって癌細胞から遊離することができる。また、オリゴ糖配列をプロテアーゼ酵素により糖脂質として遊離することができる。オリゴ糖またはその誘導体を遊離させるための化学的方法の具体例には、糖脂質の音波分解法（otsonolysis）、および糖タンパク質からオリゴ糖を遊離させるためのβ-脱離法（beta-elimination）またはヒドラジン分解法（hydrazinolysis method）が含まれる。その他の方法としては、糖脂質画分の単離が挙げられる。癌特異的オリゴ糖配列に特異的に結合する結合性物質は、細胞表面上の該配列の分析に用いることもできる。該配列は、例えば糖結合体あるいは遊離のおよび/または単離したオリゴ糖画分として検出することができる。種々の形態の該配列の分析に用いることができる方法としては、NMR分光法、質量分析法およびグリコシダーゼ分解法が挙げられる。特に、特異性に限定のある方法を用いる場合には、少なくとも二種の分析法を用いることが好ましい。

30

40

#### 【0023】

質量分析法は、試料中に存在する、少なくとも一種の本発明の癌特異的オリゴ糖配列を検出するための好ましい方法である。式（I）で表されるオリゴ糖配列を含む画分からHexNAc-HexNAc-断片を検出するために質量分析走査法（mass spectrometric scanning method）を用いることが特に好ましい。

#### 【0024】

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

50

1) 本願で開示するオリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を多価の形態で含んでいる結合体を、化学的または生化学的に合成する。多価の結合体は、例えば、本願で開示する癌特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖(OS)が、そのC1位の還元末端からスパーサー基(Y)を介して、所望により単糖またはオリゴ糖残基(X)をさらに介して、オリゴ価または多価の担体(Z)に原子(L)によって結合している、下記式(II)で表される構造を形成する:



(式中、

mは1より大きい整数であり、

nは各々独立に0または1であり、

Lは酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子であり、

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

Yはスパーサー基または末端結合体、例えばセラミド脂質部またはZへの結合部であり; 上記式(II)で表される好ましい構造は、次の特徴のいずれか一つを満足する: オリゴ糖鎖(OS)はシアリル化されている、Xは少なくとも一つのマンノース残基またはN-アセチルガラクトサミン残基を含む、及びZは炭水化物材料、例えば多糖を包含する); そして

2) 免疫応答活性化物質と共に多価結合体で動物またはヒトを免疫する。

オリゴ糖鎖は免疫応答活性化物質に多価の形態で結合していることが好ましく、結合体は単独、またはさらなる免疫応答活性化物質と共に免疫に用いる。より好ましい態様においては、オリゴ糖結合体を、少なくとも一種のアジュバンド分子と共に抗体産生生物に注射または粘膜投与する。抗体産生のためには、オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体をタンパク質、例えばBSA、スカシガイ(keyhole limpet)ヘモシアニン、リポペプチド、ペプチド、細菌の毒素、ペプチドグリカンまたは免疫活性多糖の一部、あるいは他の抗体産生活性化分子に多価の形態で結合する。当業界で知られている慣習的な抗体産生法で抗体を誘導するために、多価結合体をアジュバンド分子と共に動物に注射することができる。また、本発明の抗原性物質は、ヒトを免疫するための物質と関連して上述した、式(I)で表される末端オリゴ糖配列を化学的または生化学的に合成した多価の形態で含むものであることが好ましい。より好ましくは、抗原性物質は、末端NeuNAc 3または末端NeuNAc 6を含む(すなわち、式(I)においてXが1である)か、糖配列がマンノースまたはN-アセチルガラクトサミンに結合する(例えば、式(II)においてXがManまたはGalNAcである)。

【0025】

本発明は、本発明のオリゴ糖配列を含む一価および/またはオリゴ価の抗原性結合体にも関する。一価の抗原性結合体は抗原性脂質構造、例えば本願に記載した方法や公知の方法で抗体産生を誘導することの可能なセラミド、合成脂質または細菌型の脂質を含んでいてもよい。

【0026】

特に本発明は、最適なサイズの抗原性エピトープおよびそれを包含する医薬組成物の用途に関する。抗体は通常、少数の単糖残基からなるエピトープしか効果的に認識することができない。また、小さなエピトープはより経済効率の高い合成が可能のため、このような構造を用いることが好ましい。

【0027】

好ましい最適な抗原性エピトープは下記式(II)で表される構造を含む:



(式中、

Yは非炭水化物スパーサーまたはグリコシド結合していない末端結合体であり、

nは各々独立に0または1であり、

Xはラクトシル残基、ガラクトシル残基、N-アセチルラクトサミニル残基、マンノシル

10

20

30

40

50

残基、 $\text{Man}_2$ 残基、 $\text{Man}_3$ 残基、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 残基、 $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ 残基、N - アセチルグルコサミン残基またはN - アセチルガラクトサミン残基であり、好ましくは、Xはラクトシル残基、ガラクトシル残基、マンノシル残基またはN - アセチルガラクトサミン残基である)。

好ましい態様においては、Xはマンノシル残基であり、OSはXに 2 -、4 - または 6 - 結合、さらに好ましくは 2 - 結合している。他の好ましい態様においては、Xはラクトシル残基またはN - アセチルラクトサミン残基であり、OSはXのGal残基に 3 - または 6 - 結合しているか、Xはガラクトシル残基またはN - アセチルガラクトサミン残基であり、OSはXに 3 - または 6 - 結合しており；さらに好ましくは、XはGal残基またはGalNAc残基であり、OSはXに 3 - または 6 - 結合しているか、Xはラクトシル残基であり、OSはXのGal残基に 3 - または 6 - 結合しており；最も好ましくは、XはGal残基であり、OSはXに 3 - 結合しているか、Xはラクトシル残基であり、OSはXのGal残基に 3 - 結合しているか、XはGalNAc残基であり、OSはXに 6 - 結合している。より好ましい態様においては、上記の最適な抗原エピトープ中のオリゴ糖配列はフコースを含まない。

10

20

30

40

50

#### 【0028】

$\text{Man}_2$ 残基、 $\text{Man}_3$ 残基、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 残基および $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ 残基は、オリゴ糖配列である $\text{Man}_3\text{Man}$ 、 $\text{Man}_6\text{Man}$ 、 $\text{Man}_3(\text{Man}_6)\text{Man}$ 、 $\text{Man}_3(\text{Man}_6)\text{Man}$ または $\text{Man}_3(\text{Man}_6)\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ あるいはこれらのハイブリッド型の構造を含むN - グリカンコア構造の好ましい部分を示す。付加されたMan残基は、いずれかの非還元末端Man残基、好ましくは $\text{Man}_6$ 分岐鎖に結合し、本発明のオリゴ糖配列は該分子の他の分岐鎖に結合する。

#### 【0029】

好ましい態様においては、次の構造を含む最適な抗原性エピトープを用いる：OS  $2\text{Man}$ 、OS  $2\text{Man}_3\text{Man}$ またはOS  $2\text{Man}_6\text{Man}$ 。これらは、本研究の初めに見つかったN - グリカンlacdiNAcの部分エピトープである。別の態様においては、癌細胞のグリコシル化には欠陥があるため、上記と類似の最適抗原性エピトープであるOS  $3\text{Gal}$ およびOS  $3\text{GalNAc}$ 、特にOS  $6\text{Gal}$ およびOS  $6\text{GalNAc}$ を含むO - グリカン型lacdiNAcおよび部分ラクトサミン型lacdiNAcは、免疫や、これらの構造を有する腫瘍に対する本願で開示する他の用途に有用である。このような腫瘍は、lacdiNAc型オリゴ糖分泌機能と、ラクトサミンおよび/またはムチン産生との組み合わせによって特徴付けられる。

#### 【0030】

癌特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を、血清、好ましくはヒトの血清、から抗体を精製するために固定することができる。癌特異的オリゴ糖配列を、好ましくは多価の結合体として、癌特異的オリゴ糖配列に結合する抗体の検出および/または定量、例えば癌の診断のための酵素免疫測定法(ELISA)やアフィニティークロマトグラフィーによる分析にも用いることができる。

#### 【0031】

抗体産生または予防接種は、癌特異的オリゴ糖配列の類似体または誘導体によっても達成されうる。N - アセチル基を含むオリゴ糖配列の単純な類似体としては、修飾されたN - アセチル基、例えばN - プロパノイル基などのN - アシル基を含む化合物が挙げられる。本発明は、本発明の癌特異的オリゴ糖配列に対する特異的な類似体の製造にも関する。

#### 【0032】

さらに、癌特異的オリゴ糖配列に対するヒト抗体または人体に適応させた抗体を、腫瘍や癌を破壊したり、その増殖能を低下させるために用いることができる。ヒト抗体は、癌特異的オリゴ糖配列に対する天然のヒト抗体の耐性を高めた類似体でもよい。このような類似体は、組換え遺伝子工学および/または生物学によって製造することができ、ヒト抗体の断片または最適化した誘導体などが挙げられる。精製した天然の抗腫瘍抗体は予想されるいかなる副作用も生じることなくヒトに投与することができ、標準的な輸血の際にこのような抗体は移植されている。これは、癌特異的構造が正常の組織または細胞に提示されておらず、且つ、血液型抗原とは異なり、個体差がないとした条件下では確実であり、

本発明の癌特異的オリゴ糖配列には血液型のような多様性は知られていない。本願の他の一つの態様においては、種特異的動物抗体を特定の動物の腫瘍または癌に対して用いる。特異的な人体適応抗体を遺伝子工学および生物工学で製造することも可能であり、人体に適応させた抗体の製造方法は、例えば米国特許第5,874,060号および第6,025,481号に記載されている。人体に適応させた抗体はヒト抗体の配列を模倣するように設計されるので、ヒトの患者に投与した際に、動物抗体のように免疫系によって拒絶されることはない。癌の増殖能を低下させたり癌を破壊するための方法は、一般的に固形腫瘍および癌細胞の両方に適用可能であることが知られている。いかなるヒト癌特異的抗原、好ましくはオリゴ糖からなる抗原を認識する精製した天然のヒト抗体を、腫瘍または癌の増殖能を低下させたりそれを破壊するために用いることが可能であることも知られている。他の一つの好ましい態様においては、種特異的動物抗体を特定の動物の腫瘍または癌に対して用いる。

10

#### 【0033】

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

20

#### 【0034】

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

#### 【0035】

免疫抑制剤療法は、例えば、腎臓、心臓、肝臓または肺の移植の際の拒絶反応を抑制するために、臓器移植と共に実施する。このような療法を実施している間に現れる腫瘍は通常は良性であるが、貴重な移植臓器の損失をしばしば引き起こす。腫瘍または癌に特異的な抗原に対する抗体の産生能は、免疫系に見られる個体差によって異なる場合がある。癌から生還したヒトは、特に多量の天然の抗癌抗体を保有している場合がある。

30

#### 【0036】

##### 癌に対する治療的ターゲティングを行うための他の方法

診断物質の場合と同様に、癌に対する治療的ターゲティングに用いる物質としては、抗体、抗体断片や人体に適応させた抗体以外にも、多くの薬剤が利用可能であることが知られている。癌に対するターゲティングには、非免疫原性の許容される物質を用いることが特に好ましい。癌に結合するターゲティング物質の例には、癌を破壊または抑制する特異的な毒性、細胞溶解性または細胞調節性の薬剤も含まれる。癌に対する治療的ターゲティングに用いる非抗体分子は、本発明の癌特異的オリゴ糖配列に特異的に結合する分子を包含することが好ましく、このような結合性の分子 (即ちオリゴ糖鎖結合性物質) としては、はアプタマー、レクチン、遺伝子工学的に作製したレクチン、LacdiNAc-構造を認識する酵素 (例えばグリコシダーゼやグリコシル基転移酵素) および遺伝子工学的に作製したそれらの異型が挙げられる。標識した細菌、ウイルスまたは細胞、あるいは重合体の表面であって、その構造を認識する分子を有するものも癌に対する治療的ターゲティングに用いることができる。本願で開示する癌結合性非抗体物質は、癌を標的とする、癌に対して活性を示すプロドラッグ、あるいはプロドラッグを癌を破壊したり抑制する活性化毒性物質に変換する酵素または他の物質の標的とするために用いることもできる。

40

50

## 【0037】

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

10

## 【0038】

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

20

30

## 【0039】

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

40

## 【0040】

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

## 【0041】

50

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

#### 【0042】

本発明のオリゴ糖配列は、グリコシル基転移酵素によって酵素的に合成するか、あるいはグリコシダーゼまたはトランスグリコシダーゼによって触媒されるトランスグリコシル化反応で合成することができる(文献としてErnst *et al.*, 2000を参照)。これらの酵素の特異性および補因子の必要性については改良することができる。修飾された特定の酵素を用いてより効率よく合成することもでき、例えば、グリコシル基転移反応を触媒するが、グリコシダーゼ反応は触媒しない酵素を得ることができる。本発明で開示する糖類および糖結合体またはそれらと類似した化合物の有機合成も知られている(Ernst *et al.*, 2000)。炭水化物材料を天然の原料から単離して、化学的または酵素学的に修飾して本願で開示する化合物とすることができる。種々の反芻動物の乳から天然のオリゴ糖を単離することができる。グリコシル化酵素を発現するトランスジェニックな生物、例えばウシや微生物も糖の製造に用いることができる。本発明のオリゴ糖配列は、所望により担体と共に、患者の癌の治療に適当な医薬組成物に加えることができる。本発明によって治療することのできる病態の例としては、本発明の癌特異的オリゴ糖を少なくとも一種発現している腫瘍からなる癌が挙げられる。治療可能な癌の症例は、患者から得た生物学的試料中に癌特異的オリゴ糖配列の存在を検出することによって発見することができる。該試料としては、例えば生検材料または血液試料が挙げられる。

#### 【0043】

LacdiNAc生合成に対する特異的な阻害剤によって、本願で開示する癌抗原の形成を阻害することができる。このような阻害剤としては、供与ヌクレオチドであるUDP-GalNAcの類似体を用いることができる。グリコシル基転移酵素に対する阻害性類似体を製造する方法は公知である。阻害剤は、LacdiNAcを合成するGalNAc-転移酵素に特異的であることが好ましい。

#### 【0044】

また、実質的に非抗原性である、化学的および/または酵素学的に合成したオリゴ糖または多価の、本発明の癌特異的オリゴ糖配列の結合体は、癌細胞の接着および/または増殖の防止に用いることができる。それは、結合体が抗原性を有するが故に、抗体によって循環血液から阻害性オリゴマーまたはポリマーの消失が達成される。本発明の抗原性物質の例は上記した。非抗原性多糖結合体は、式(II)(但し、式中のX、YおよびZは免疫原性ではないものとする)にしたがって構築することができる。結合体の分子量は50キログルトン(kDa)未満であることが好ましく、10kDa未満であることがさらに好ましい。本発明のオリゴ糖配列は、非タンパク質担体に結合することもできる。その場合、癌特異的オリゴ糖配列を非免疫原性多糖に結合することが好ましく、結合体の分子量が10kDa未満であることが最も好ましい。

#### 【0045】

セレクチンと炭水化物との相互作用は癌転移を仲介するので、LacdiNAc型グリコシル化産物によって転移性癌細胞の標的が血管内皮上に存在するセレクチン含有部位となる場合があり、そのような部位の構造は、強力なセレクチンリガンドとして知られている(Grinnell *et al.*, 1994; Jain *et al.*, 1998)。LacdiNAc糖類は、Dell *et al.* (1995)に考察されているように、免疫応答から自らを保護することのできる免疫調節活性を有する。末端GalNAc残基は、肝臓のアシアロ糖タンパク質レセプターを癌細胞の標的とすることもできる(Yang *et al.*, 2000)。癌細胞におけるLacdiNAc生合成を阻害することによって、癌の転移能および悪性度を低下させる。本発明は特に、癌細胞の転移能を阻害するための、

LacdiNAc生合成の阻害に関する。最適な抗原性エピトープは、転移阻害剤としては設計されていない。正常な免疫系および白血球機能にも必要なセレクチン仲介細胞接着を阻害しないように、ワクチン型のアプローチにおいては、非常に少量のLacdiNAc構造を使用する。

【0046】

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

【0047】

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

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

癌特異的オリゴ糖または本発明の癌特異的オリゴ糖を特異的に認識する化合物を診断または型の同定に用いる場合、例えば、オリゴ糖または化合物はプローブやテストスティックに含まれていてもよく、所望により、テストキットの一部を構成してもよい。このようなプローブやテストスティックが、癌患者から得た抗体を包含する試料あるいは患者の癌細胞または癌組織と接触すると、癌陽性試料の成分はプローブまたはテストスティックに結合し、試料から取り出されてさらに分析される。

【0051】

本願において「癌」とは、「腫瘍」または「癌細胞」を意味する。「腫瘍」は、固形の多細胞腫瘍組織を意味する。さらに、本願において「腫瘍」は、前悪性状態の組織であって、固形腫瘍に分化し、癌に特異的な特徴を有するものを意味する。本願において「腫瘍」という用語は、白血病のような単一細胞癌、培養した癌細胞、またはそのような細胞のクラスターを意味するものではない。本願において「癌細胞」という表現は、腫瘍内の細胞、単一癌細胞（例えば白血病細胞）またはその他のいかなる種類の悪性細胞をも意味し、悪性細胞は癌または腫瘍に分化するもので、癌の特徴または癌特異的な特徴を有するものである。

【0052】

LacdiNAc構造およびフコシル化LacdiNAc構造並びにそれらの類似体の酵素学的合成

末端LacdiNAcエピトープは、多量の 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼ（例えば市販のウシ乳ガラクトシルトランスフェラーゼ）および受容体に対して過剰モル量のUDP-GalNAcを用いて合成することができる。例えば、UDP-GalNAcとGlcNAc 3Gal 4Glcを比較的多量の 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼと共にNyame *et al.* (2000)の記載のようにインキュベートすると、GalNAc 4GlcNAc 3Gal 4Glcが得られる。

【0053】

上記の反応は、UDP-GalNAcから効率的にGalNAcを転移することのできる新規な組換え型ガラクトシルトランスフェラーゼによって行うこともできる（Ramakrishnan *et al.*, 2001）。

【0054】

GalNAc 4GlcNAcエピトープまたはそのシアリル化誘導体（NeuNAc 3GalNAc 4GlcNAc）を数種類の 3 - フコシルトランスフェラーゼによってフコシル化することが可能であり、例えば、Bergwerff *et al.* (1993)の記載と実質的に同様にヒト乳から得たフコシルトランスフェラーゼによってフコシル化したり、フコシルトランスフェラーゼV Iによってフコシル化することができる。

【0055】

10

20

30

40

50

### 新規なGalN誘導体、特にlacdiNAc構造およびそれらの誘導体の製造

本発明は、酵素学的合成の新規な経路にも関する。これらの経路は、lacdiNAc構造、関連構造およびそれらの類似体の製造に *in vitro* で用いることができる。ヘキソサミンに対するグリコシダーゼ反応およびグリコシダーゼ反応に用いるヘキソサミン供与体については、従来技術に記載がある。本発明は、通常、末端Gal残基やGalNAc残基などを含む受容体構造を使用する種々のグリコシル基転移酵素のための受容体として、末端ヘキソサミン、特にガラクトサミンおよびGalN 4Glc(NAc)末端構造を用いる方法に関する。

#### 【0056】

上記の反応はこれまで報告されておらず、負に電位を帯びたヌクレオチド糖供与体の近傍に存在する正に電位を帯びたアミン基が反応を阻害していると考えられていた。電荷を帯びたアミノ基は、受容体の2位の水酸基を必要とする酵素による認識を阻害するか、または酵素の活性部位に対する望ましくない不可逆的結合を生じるとも考えられていた。本発明は、新規なグリコシル基転移酵素反応が可能であり、このような反応は哺乳類のグリコシル基転移酵素によっても可能であることを初めて開示する。グリコシダーゼ触媒反応と比較して、グリコシル基転移酵素反応は、通常、一对の供与体および受容体物質から一種類の生成物のみを形成するといった特異性を示すが、一方、グリコシダーゼ触媒によるグリコシル基転移反応は、一般的に数種類の生成物を生じる。

10

#### 【0057】

以前から、Gal受容体を用いる酵素に強制的にGalNAcを使用させることによって、lacdiNAc誘導体は合成されていた。このような方法の収率は一般的に非常に低い。ある種の転移酵素を用いた反応の中には、末端GalNAcを用いた反応よりも効率の悪いものもあるが、アミン基の存在は、天然Gal/GalNAc配列のアミン誘導体または類似体の特異的な合成を可能にする。

20

#### 【0058】

新規な反応は、悪性腫瘍または疾患に関連する新規な抗原性構造の潜在的な生合成経路も明らかにした。このような抗原性構造は正常な組織からは特徴付けることのできないものである。特に、新規な血液型関連抗原は、天然のグリコシル化酵素によって製造されている。

#### 【0059】

好ましい反応としては、末端ヘキソサミン（より好ましくはガラクトサミン）の3位、4位または6位に対するグリコシル基転移反応が挙げられ、ガラクトサミンの3位または6位に対する反応が更に好ましく、ガラクトサミンの3位に対する反応が最も好ましい。好ましい反応の具体例には、次の反応が含まれる： 3 - シアリルトランスフェラーゼ反応、 6 - シアリルトランスフェラーゼ反応、 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ反応、 3 - N - アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ反応、 3 - ガラクトサミニルトランスフェラーゼ反応、 3 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ反応、 6 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ反応、 3 - N - アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ反応および 3 - グルクロニルトランスフェラーゼ反応。最も好ましい反応は 3 - シアリルトランスフェラーゼ反応、 3 - ガラクトサミニルトランスフェラーゼ反応および 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ反応である。

30

40

#### 【0060】

好ましい合成反応は下記式 ( I I I ) で表される反応である。



[式中、

y は - または - 結合であり、

x は各々独立して3位、4位または6位の結合位置を表し、

GalN 3/4は、ヘキソース、ヘキソサミンまたはヘキソサミン誘導体、好ましくはGal、GalN、GalNAc、Glc、GlcNまたはGlcNAc、に 3 - または 4 - 結合している非還元末端GalNを表し、好ましい態様においては、GalN 4は非還元末端構造 (GalN 4GlcNAcまたはGalN 4Glc) の一部である、例えば、GalN 4GlcNAc 3Gal 4Glcであり、

50

SACはシアル酸または下記式で表される糖残基を表し、



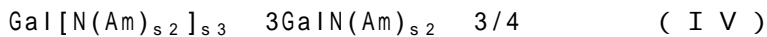
(式中、HexはGalまたはGlcであり、 $s_1$ 、 $s_2$ および $s_3$ は各々独立に0

または1の整数であり、但し $s_1$ が1である場合には、 $s_3$ は0である)

上記式中の $s_1$ が1である場合には、SACで表される構造はヘキサロン酸構造、好ましくはGlcA、を含み； $s_3$ が1であり、且つ、 $s_2$ が1である場合には、SACで表される構造はGlcNAcまたはGalNAcを含み；そして、 $s_2$ が0である場合には、SACで表される構造はGalNまたはGlcNを含んでいる。]

#### 【0061】

さらに、本発明は下記式(IV)で表される新規な炭水化物に関する。



(式中、

Amはアミン基の誘導残基であるが、但し、Amはアセチル(Ac)基またはイミド基ではなく、好ましくはGalN残基とカルボン酸を形成するアミド基、例えば、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含むシクロヘキサンラジカルのアミドなどの環状アミド、および安息香酸のアミド基のような芳香族炭化水素のアミド基であり、

$s_2$ および $s_3$ は各々独立に0または1の整数である。)

アセチル基は天然のオリゴ糖配列に存在するので、上記式で表される類似体においては好ましくない。また、嵩高いイミド基(例えばフタルイミド基)は、類似体の立体構造を必要以上に変えてしまう大きな官能基であるために好ましくない。

#### 【0062】

さらに好ましい炭水化物としては、次の末端オリゴ糖配列が挙げられる： $\text{Gal}[\text{N}(\text{Am})_{s_2}]_{s_3}$ 、 $3\text{GalN}(\text{Am})_{s_2}$ 、 $4\text{GlcNAc}$ および $\text{Gal}[\text{N}(\text{Am})_{s_2}]_{s_3}$ 、 $3\text{GalN}(\text{Am})_{s_2}$ 、 $4\text{Glc}$ 。最も好ましい末端オリゴ糖配列としては、次の配列が挙げられる： $\text{Gal}$ 、 $3\text{GalN}(\text{Am})_{s_2}$ 、 $4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}$ 、 $3\text{GalN}(\text{Am})_{s_2}$ 、 $4\text{Glc}$ 、 $\text{Gal}$ 、 $3\text{GalN}$ 、 $4\text{GlcNAc}$ および $\text{Gal}$ 、 $3\text{GalN}$ 、 $4\text{Glc}$ 。

#### 【0063】

新規な炭水化物は、特に抗原として使用したり、免疫に用いるのに有用である。希少な、大部分が非天然または病原性関連の炭水化物は、関連構造も認識する抗体の製造を誘導するための免疫原として有用である。アミン含有炭水化物は、更なる類似体を製造するための出発物質や、グリコシダーゼの基質および/または阻害剤の候補物質、動物のまたは植物のレクチンに結合する天然オリゴ糖配列の類似体の候補物質として有用でもある。

#### 【0064】

本発明は、UDP-GalNをまず受容体(例えばGlcNAc、グルコースあるいは非還元末端のGlcNAcまたはグルコース)に転移する反応と、同じ反応容器内でUDP-GalNのGalNを受容体の3位、4位または6位、好ましくは3位または6位、最も好ましくは3位、に修飾する反応の二つを組み合わせた反応にも関する。他の反応の組み合わせにおいては、二種のグリコシル基転移酵素を使用することで、主要な反応系中でUDP-GalNの合成も同時に行うことができる。反応に用いるためのUDP-GalNを *in situ* で製造する方法はすでに報告されている。

#### 【0065】

本発明においては、GalN1-リン酸およびUDP-GlcからUDP-GalNを作製する単純な方法が好ましい。IacdiNAc型構造の合成に関する好ましい態様には、ヘキソサミンのN-アセチル化によってN-アセチルヘキソサミンを得る反応(例えばGalNからGalNAcを得る反応)が含まれる。

#### 【0066】

好ましい態様においては、N-アセチルヘキソサミンまたはヘキソースを含有するオリゴ糖の類似体が製造され、IacdiNAc類似体が製造されることがより好ましい。本発明は、ヘキソサミンのアミン誘導体の製造にも関し、ヘキソサミンの好ましいアミン類似体または誘導体には、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含

10

20

30

40

50

むシクロヘキサンラジカルのアミドなどの環状アミド、および安息香酸のアミド基のような芳香族炭化水素のアミド基が含まれる。

【0067】

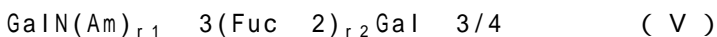
好ましい態様においては、ヘキソサミンはグリコシル基転移酵素によってヘキソサミンに転移され、より好ましくはガラクトサミンがガラクトサミンに転移され、さらに好ましくは、GalN 3GalN 4GlcNAcが形成される。この物質はアミノ基の誘導によってGalNAc 3GalNAc 4GlcNAcまたは本発明で定義した類似体にさらに修飾することができる。

【0068】

別の態様においては、UDP-GalNを - ガラクトシルトランスフェラーゼまたは - GalNAcトランスフェラーゼ、好ましくは 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼによって、Gal - 10  
-末端を有する受容体に転移する。アミン基は、N - アセチル基または誘導アミン基を含む類似体にさらに誘導することができる。このような方法で得られる生成物の例としてはGalNAc 3Gal 4GlcNAc、GalN 3Gal 4GlcNAc、GalNAc 3(Fuc 2)Gal 4、GalN 3(Fuc 2)Gal 4、GalNAc 3(Fuc 2)Gal 3、GalN 3(Fuc 2)Gal 3、GalNAc 3(Fuc 2)Gal 4GlcNAcおよびGalN 3(Fuc 2)Gal 4GlcNAcが挙げられ、これらはヒトA / B血液型抗原の末端構造および類似体に相当する。

【0069】

さらに本発明は、下記式 ( V ) で表される新規な炭水化物に関する。



(式中、

r 1 および r 2 は各々独立に 0 または 1 の整数であり、  
Am はアミン基の誘導残基であるが、但し、Am はアセチル ( Ac ) 基またはイミド基ではなく、好ましくはGalN残基とカルボン酸を形成するアミド基、例えば、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含むシクロヘキサンラジカルのアミドなどの環状アミド、および安息香酸のアミド基のような芳香族炭化水素のアミド基である。) 20

アセチル基は天然のオリゴ糖配列に存在するので、上記式で表される炭水化物においては好ましくない。また、嵩高いイミド基 (例えばフタルイミド基) は、類似体の立体構造を必要以上に変えてしまう大きな官能基であるために好ましくない。

【0070】

さらに好ましい炭水化物としては、以下の末端オリゴ糖配列が挙げられる：

GalN 3Gal 4GlcNAcおよびGalN 3Gal 4Glc；

GalN 3(Fuc 2)Gal 4GlcNAcおよびGalN 3(Fuc 2)Gal 4Glc；

GalNAc 3(Fuc 2)Gal 4GlcNAcおよびGalNAc 3(Fuc 2)Gal 4Glc；ならびに

GalNAc 3Gal 4GlcNAcおよびGalNAc 3Gal 4Glc。

最も好ましい炭水化物としては、以下の末端オリゴ糖配列が挙げられる：

GalNAc 3(Fuc 2)Gal 4GlcNAcおよびGalNAc 3(Fuc 2)Gal 4Glc；ならびに

GalNAc 3Gal 4GlcNAcおよびGalNAc 3Gal 4Glc。

【0071】

新規な炭水化物は、特に抗原として使用したり、免疫に用いるのに有用である。希少な、大部分が非天然または病原性関連の炭水化物は、関連構造も認識する抗体の製造を誘導するための免疫原として有用である。アミン含有炭水化物は、更なる類似体を製造するための出発物質や、グリコシダーゼの基質および / または阻害剤の候補物質、動物のまたは植物のレクチンに結合する天然オリゴ糖配列の類似体の候補物質として有用でもある。 40

【0072】

本発明は、特に本発明で開示する新規な物質を用いた免疫方法ならびに本発明で開示する物質に結合するレクチンおよび抗体のスクリーニング方法に関する。具体的には、本発明は、血液型抗原に結合する抗体や関連した抗体の特異性を判断するためのスクリーニングに関する。

【0073】

本発明は、特に口腔癌の診断および/または治療に関し、該口腔癌としては、本発明のオリゴ糖配列を発現する喉頭癌または白血病型の癌が好ましい。また、本発明は、特に本願で開示する lacdiNAc 構造をその表面に発現する全ての種類の癌に対する、本発明の治療にも関する。他の一つの好ましい態様においては、本発明は、通常 lacdiNAc 配列を含むタンパク質を発現および分泌する組織の癌の治療に関し、そのような組織としては糖タンパク質ホルモン分泌組織が挙げられる。

【0074】

糖脂質および炭水化物の命名は、IUPAC - IUB 生化学命名委員会の推奨する命名法 (Carbohydrate Res. 1998, 312, 167; Carbohydrate Res. 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 29) に従った。

10

【0075】

Gal、Glc、GlcNAc および NeuNAc は D 型であり、Fuc は L 型であり、全ての単糖残基はピラノース環構造であるものとする。グルコサミンは GlcN と示し、ガラクトサミンは GalN と示す。グリコシド結合は略記で示す場合と正式名称で示す場合とあり、NeuNAc 残基の 3 および 6 結合はそれぞれ 2 - 3 および 2 - 6 結合と同じである。1 - 3、1 - 4 および 1 - 6 結合はそれぞれ 3、4 および 6 と略することができる。ラクトサミン、N - アセチルラクトサミンまたは Gal 3/4GlcNAc は、1 型構造残基 Gal 3GlcNAc および 2 型構造残基 Gal 1-4GlcNAc のいずれかを示し、シアル酸は N - アセチルノイラミン酸または NeuNAc であり、Lac はラクトースを示し、Cer はセラミドを示す。SA はシアル酸、例えば NeuNAc を示す。本発明の癌関連二糖配列である GalNAc 4GlcNAc は lacdiNAc または Lac diNAc と略す。

20

【0076】

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

【発明を実施するための最良の形態】

【0077】

実施例 1

MMP-9 の分析方法

MMP-9 の単離

一連の CM - セルロース (CM - 52) クロマトグラフィーと続く DEAE/RED セファロース クロマトグラフィーによって、U-937 細胞から MMP-9 を単離した (Saarinen *et al.*, 1999)。

30

【0078】

MMP-9 の 4 - ビニルピリジンアルキル化

MMP-9 の濃縮・脱塩を、Poros<sup>TM</sup> R2 カラム (2.1 × 150 mm) を用い、アセトニトリルの直線グラジエント (0.1% トリフルオロ酢酸溶液、15 分間で 3 ~ 100%) で溶出する逆相クロマトグラフィー (RP - HPLC) で行った。クロマトグラフィーは流速 1 ml / 分で行い、MMP-9 の溶出を 214 nm における紫外線吸収度でモニターした。溶出した MMP-9 は真空乾燥し、以下のアルキル化に付した。MMP-9 試料を 6 M グアジン塩酸と 2 mM EDTA を含む 0.5 M トリス (pH 7.5) 溶液 80 μl に溶解し、5 μl の 0.6 M DTT を添加して還元し、室温で 20 分間インキュベートした。還元後、1 μl の 4 - ビニルピリジンを加え、続いて室温で 15 分間アルキル化反応を行った。反応は 5 μl の 0.6 M DTT を添加することで停止し、アルキル化した MMP-9 を得た。得られたアルキル化した MMP-9 は上述のように RP - HPLC で直ちに脱塩した。

40

【0079】

トリプシン消化

2.5 μl (100 pmol) のアルキル化 MMP-9 を真空乾燥し、40 μl の 1.66 ng / μl トリプシン (シーケンシング用グレード、Promega 社製) 含有 50 mM 二炭酸アンモニウム緩衝液に溶解した。消化は 37 °C で一晩行った。

【0080】

50

### 質量分析法

MALDI-TOF MSは、波長が337nmの窒素レーザーを備えたBiflex飛行時間型装置（ドイツ国、Bruker Franzen Analytik社製）で行った。総MMP-9 N-グリカンのみならず、NDVシアリダーゼ反応産物も、リニア型の陽イオン遅延引き出しモード（linear positive ion delayed extraction mode）において、2, 4, 6-トリヒドロキシアセトフェノン（Fluka Chemie AG社製、3mg/ml、溶媒はアセトニトリル/20mMクエン酸ジアンモニウム水溶液（容量比は1:1））をマトリックスとして分析した。*C. perfringens*のシアリダーゼおよびフコシダーゼ処理で得たグリカンは、リフレクター型の陽イオン遅延引き出しモード（reflector positive ion delayed extraction mode）において、2, 5-ジヒドロ安息香酸（10mg/ml）をマトリックスとして分析した。スペクトルは、デキストラン5000（Fluka Chemie AG社製）を用いて外部補整した。

10

#### 【0081】

エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量スペクトルは、ハイブリッド四重極型飛行時間型質量分析計 Micromass Q-TOF（英国、Micromass社製）を用いて得た。イオン化は、シリカキャピラリー針（内径：20μm、先端開口部：10μm、もう一方の末端から金で被覆されている）（New Objective Inc.社製）を備えたナノスプレーイオン源（2.2kVで作動）を通すことで達成した。

#### 【0082】

ナノフローLC/MSによるグリコシル化部位の決定

20

MMP-9をトリプシン処理して得たペプチド試料（1pmol）を、PepMapカラム（0.075×150mm、NAN75-15-03-C18-PM、LC Packings社製）を用い、アセトニトリルの直線グラジエント（0.1%ギ酸溶液、30分間で4~40%）で溶出するマイクロボア逆相クロマトグラフィーによって分離した。クロマトグラフィーは流速250nl/分で行い、214nmにおける紫外線吸収度を記録した。LCは、Micromass Q-TOF質量分析計に直接つないだ。質量分析計は、グリコシル化成分の同定を促進するために、低コーン電圧条件および高コーン電圧条件の両方でHPLC溶出液をスキャンするように、Carr et al. (1993)の報告に従って設定した。低コーン電圧のスキャンは、コーン電圧が35Vの条件でm/z 100~2500の質量数範囲をスキャンし、溶出成分の質量分析スペクトルを得た。高コーン電圧のスキャンは、コーン電圧が120Vの条件、具体的には、質量分析計へ導入する全てのイオンに高衝突励起ポテンシャルを適用する条件下で得た。これは、質量に基づく分離を行う前に、導入イオンの衝突によって誘導されるフラグメント化を生じる。高コーン電位のスキャンの際には、質量分析計はm/z 100~1000をスキャンするように設定した。次に、m/z 204.1（HexNAcのオキシニウムイオン）、m/z 292.15（Neu5Acのオキシニウムイオン）およびm/z 366.1（Hex-HexNAcのオキシニウムイオン）について再構成したクロマトグラムを作成することで、溶出した糖ペプチドに選択的なクロマトグラムを得た。

30

#### 【0083】

白血病細胞から得たLacdiNAc構造の分析

癌細胞上のLacdiNAc配列の異常発現を示すために、メタロプロテアーゼ-9（MMP-9）を白血病細胞（U-937）から単離し、N-グリコシド結合グリカンをN-グリコシダーゼFで遊離させた。グリカン画分をトリヒドロキシアセトフェノンマトリックス中でMALDI-TOF MSを用いて分析したところ（図1A）、無視できるほど少量のシアル酸残基の開裂が見られた。帰属された単糖組成を、以下のグリコシダーゼ処理で推定された構造と共に表1に示す。MALDI-TOF MSによるオリゴ糖の分析は、比較的計量的であることが示されているので、各成分の相対的な存在量も示す。最も多量に存在するグリカン種を、(Hex)<sub>5</sub>(HexNAc)<sub>4</sub>(Fuc)<sub>3</sub>の[M+Na]<sup>+</sup>に帰属した。典型的なN-グリカン構造はわかっているので、仮にこの構造をトリフコシル化ジアンテナリー複合体型グリカンとして帰属した。他の主要なグリカン種は、シアリル化、ジフコシル化ジアンテナリー複合体型グリカン、および1つのアンテナに末端単糖としてGalの代わりにGalNAcを有する（い

40

50

わゆるLacdiNAc構造を有する)トリフコシル化ジアンテナリー複合体型グリカンとして同定した。一連のグリコシダーゼ処理によって示されるように、これらの帰属は正しいことが判った。比較のために、非悪性白血球細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼMMP-9の構造も決定したところ、このタンパク質にはlacdiNAc配列が含まれていなかった(Rudd *et al.*, 1999)。

#### 【0084】

グリカンの構造的特徴づけを、一連のグリコシダーゼ処理をMALDI-TOF MSでモニターすることで行った。二種の妥当なNeu5Ac結合(2-3対2-6)を見分けるために、グリカン混合物をNDVノイラミニダーゼ、即ち、2-3ノイラミン酸に非常に特異的な酵素で処理した。その結果、部分開裂が観察され(図1B)、これはNDVシアリダーゼ活性に対して耐性であることが知られているSAの2-3GalNAc結合から生じたものであると考えられる。他の可能性としては、2-3結合SAおよび2-6結合SAの両方が混在していると考えられる。特異性の緩やかなノイラミニダーゼ(*Clostridium perfringens*)でN-グリカン画分を処理したところ、次のような変化が観察された(図1C):  $m/z$  2247.3、2287.9および2392.3のシグナルが消失し、 $m/z$  1809.70、1850.78、1891.75、1955.77および1996.79のシグナルが現れた。これらの結果は、正常なバイアンテナリーN-グリカンの異なるフコシル化体、アンテナの一つにLacdiNAc構造(GalNAc1-4GlcNAc)を有するバイアンテナリーN-グリカンおよびアンテナの両方にLacdiNAc構造を有する少量のN-グリカンの存在を示す。アーモンドの実由来の1-3(4)フコシダーゼ(アンテナから1-3(4)結合フコース残基を除くが、N-グリカンコアから1-6結合フコース残基を開裂しない酵素)で試料を処理したところ、1809.80、1850.78および1891.84のシグナル(強度:67%、27%および6%)が出現した。これらの結果は、およそ30%のグリカンが一つまたは両方のアンテナのいずれかにLacdiNAc配列を有することを示す。この結果は、下記のLC-ESI MSのデータとよく符合する。

10

20

30

40

#### 【0085】

U-937細胞からMMP-9を単離し、アルキル化し、さらにトリプシンで消化した。糖ペプチドを同定するために、MMP-9のトリプシン処理ペプチドのLC/MS分析を段階的なコーン電圧を用いて行い、総イオンのクロマトグラム(図2A)および糖ペプチドと考えられるものを示すクロマトグラム(図2B、CおよびD)の両方を得た。本研究で用いたクロマトグラフィーの条件(即ち、PepMap媒体を0.1%ギ酸-アセトニトリルで溶出する条件)においては、糖ペプチドの分離はペプチド部位とグリカン部位の両方の影響を受ける。より一般的に用いられるトリフルオロ酢酸-アセトニトリル系においては、糖ペプチドの分離は、ペプチド部位の特性にのみ支配される。その結果、糖ペプチドは23.1分および24.3分に溶出する二種の主要なピークとして得られた。

#### 【0086】

23.1分に溶出したものの質量スペクトルを図3Aに示し、図中のシグナルは全て複合型グリカン(表1参照)を有するグリコシル化ペプチドTrp<sup>116</sup>-Arg<sup>134</sup>に帰属することができる。このスペクトルの中で最も強度の高い $m/z$  1143.49のイオンを、(Hex)<sub>5</sub>(HexNAc)<sub>4</sub>(Fuc)<sub>3</sub>を有するTrp<sup>116</sup>-Arg<sup>134</sup>の[M+4H]<sup>4+</sup>に帰属する。24.3分に溶出したものの質量スペクトルを図3Bに示す。このスペクトルの中で最も強度の高い $m/z$  1179.54のイオンを、(Hex)<sub>5</sub>(HexNAc)<sub>4</sub>(Fuc)<sub>2</sub>(SA)<sub>1</sub>を有するTrp<sup>116</sup>-Arg<sup>134</sup>の[M+4H]<sup>4+</sup>に帰属する。

#### 【0087】

本発明は、U-937細胞誘導MMP-9が、そのN-グリカンの大きな画分(およそ30%)にLacdiNAc構造を有することを示す。LacdiNAc構造の存在は、二種の独立した方法、すなわち完全糖ペプチドのLC-ESI MSだけでなく、遊離したN-グリカンのMALDI-TOF MS分析でも証明された。構造の帰属は、さらに一連のグリコシダーゼ処理によって確認した。本研究で用いた方法の有効性は、合成オリゴ糖と公知の天然の構造体の両方を用いたいくつかのアプローチで立証されている。

50

## 【 0 0 8 8 】

以下のグリカンを用いた同様の実験については、実施例 2 に記載した：

喉頭癌由来のLacdiNAc配列含有シアリル化N - グリカン、および

LacdiNAc配列、シアリル - LacdiNAc配列およびフコシル - LacdiNAc配列を有するヒトメラノーマ細胞 ( R P M I - 7 9 3 2 および R P M I - 7 9 5 1 ) の膜タンパク質N - グリカン。

## 【 0 0 8 9 】

実施例 2

固形腫瘍およびメラノーマ細胞膜の分析

癌試料の出発材料

喉頭癌試料としては、外科的手術の際に集めた腫瘍試料をホルマリン固定したのものを用いた。グリカンを単離する前には、タンパク質をManzi *et al.* (2000)の記載と実質的に同様のクロロホルム - メタノール抽出を行うことで濃縮した。糖タンパク質の定量的抽出は、標準放射性標識糖タンパク質によって確認した ( データは示さない ) 。

## 【 0 0 9 0 】

クロロホルム - メタノール抽出タンパク質からのグリカンの単離

グリカンは、試料糖タンパク質から非還元的 - 脱離法によって分離し、クロマトグラフィーによって精製した。

## 【 0 0 9 1 】

ヒトメラノーマ細胞膜タンパク質の単離

ヒトメラノーマ細胞 ( R P M I - 7 9 3 2 および R P M I - 7 9 5 1 ) を室温でリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) で洗浄し、細胞培養皿から細胞をかきとり、遠心分離によって細胞を回収した。以下の精製工程は 0 ~ + 4 で行った。細胞を低浸透圧緩衝液 ( 2 5 m M トリス - H C l ( p H 8 . 5 ) ) でインキュベートした後にホモジナイザーで破碎し、そこに終濃度が 1 5 0 m M となるように N a C l を添加して等浸透圧緩衝液に戻した。細胞膜の塊から細胞核を低速遠心分離によって分離するが、分離は顕微鏡検査でモニターした。膜および細胞質ゾル材料を含む上清を、更に 4 0 , 0 0 0 g で遠心分離した。得られたペレット ( 膜調製物 ) を、 2 5 m M トリス - H C l ( p H 8 . 5 ) 、 1 5 0 m M N a C l および 1 % ( w / v ) トリトン X - 1 0 0 を含む界面活性剤緩衝液中でホモジナイズした。インキュベートした後、調製物を 1 0 0 , 0 0 0 g で遠心分離し、界面活性剤抽出膜タンパク質を含む上清を回収した。緩衝塩および界面活性剤を、Verostek *et al.* (2000) に従った寒冷アセトン沈殿法 ( cold acetone precipitation ) によって除去した。

## 【 0 0 9 2 】

膜タンパク質N - グリカンの単離

Nyman *et al.* (1998)の記載と実質的に同様の方法に従って、*Chryseobacterium meningosepticum* N - グリコシダーゼ F ( 米国、Calbiochem社製 ) を用いて膜糖タンパク質からN - グリカンを分離し、次いでVerostek *et al.* (2000)とPacker *et al.* (1998)の記載と実質的に同様に精製した。R P M I - 7 9 5 1 細胞から得たN - グリカンは、さらに 1 ) A G - 5 0 W 強カチオン交換材料カラムおよび 2 ) 水で膨潤させた C <sub>18</sub> シリカのカラムを通したが、R P M I - 7 9 3 2 細胞から得たN - グリカンに対しては、このような処理は行わなかった。いずれのN - グリカンも、Packer *et al.* (1998)の記載と実質的に同様に、黒鉛化炭素のカラム ( graphitised carbon column ) によってシアリル化画分と非シアリル化画分に分離した。

## 【 0 0 9 3 】

M A L D I - T O F M S

M A L D I - T O F 質量分析は、Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstationを用い、Saarinen *et al.* (1999)、Papac *et al.* (1996)およびHarvey(1993)の記載と実質的に同様に行った。

## 【 0 0 9 4 】

エキソグリコシダーゼ消化

全てのエキソグリコシダーゼ反応をNyman *et al.* (1998)およびSaarinen *et al.* (1999)の記載と実質的に同様に行い、結果はMALDI-TOF MSで分析した。使用した酵素とそれによって特徴付けられるオリゴ糖を用いた特異的な対照反応を以下に示す：Arthrobacter ureafaciensのシアリダーゼ (E. coli組換え体；英国、Glyko社製)は、オリゴ糖中のNeu5Ac 2-3Gal 1-4GlcNAc-RおよびNeu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc-Rの両方を消化した； - N - アセチルグルコサミニダーゼ (Streptococcus pneumoniae由来、E. coli組換え体；米国、Calbiochem社製)は、GlcNAc 1-6Gal-Rを消化したが、GalNAc 1-4GlcNAc 1-3/6Gal-Rは消化しなかった； - N - アセチルヘキソサミニダーゼ (ナタマメ由来；米国、Calbiochem社製)はGlcNAc 1-6Gal-RおよびGalNAc 1-4GlcNAc 1-3/6Gal-Rの両方を消化した；および 1,3/4 - フコシダーゼ (Xanthomonas sp.由来；米国、Calbiochem社製)は、Gal 1-4(Fuc 1-3)GlcNAc-Rを消化したが、Fuc 1-2Gal 1-3GlcNAc-Rは消化しなかった。対照の消化反応も分析用のエキソグリコシダーゼ反応と並行して行い、その結果も同様に分析した。

10

20

30

40

50

【0095】

## 結果

喉頭癌試料のLacdiAc含有シアリル化N - グリカン

喉頭癌試料のシアリル化グリカンは、Arthrobacter ureafaciens シアリダーゼによって効率的に脱シアリル化された。脱シアリル化はMALDI-TOF MSでモニターした(データは示さない)。脱シアリル化したグリカンは、はじめに、末端 - GlcNAc残基を特異的に加水分解するが - GalNAc残基は加水分解しない濃度の - N - アセチルグルコサミニダーゼを用いて消化した。更に - アセチルヘキソサミニダーゼを添加すると、一つのN - グリカンから二つのHexNAc残基が除去された。この結果は、 - N - アセチルグルコサミニダーゼの作用には耐性であるが、 - N - アセチルヘキソサミニダーゼで完全に消化されるGalNAc 1-4GlcNAc配列の存在を示した。 - N - アセチルヘキソサミニダーゼ消化の際には、 $m/z$  1850.38と $m/z$  1850.16に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$ ：1850.67)に対応するピークの相対シグナル強度は有意に減少した。同時に、 $m/z$  1444.30と $m/z$  1444.15に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$ ：1444.51)に対応するピークの相対シグナル強度は増加し、 $m/z$  1647.34と $m/z$  1647.19に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1647.59)に対応する不完全消化産物の相対シグナル強度は増加しなかった。検討中のLacdiAc含有N - グリカンのシアリル化体に対応する一つの観測されたピーク、具体的には、 $m/z$  2118.09のイオン( $[\text{NeuAc}_1\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1-\text{H}]^-$ ；計算値： $m/z$  2118.93)は、シアル酸残基を一つしか有していない。しかしながら、本願のデータは、もとの試料中に異なるシアリル化体が存在している可能性を排除することはできない。ここで重要なのは、多くの健康な組織から得た試料を同様に分析した場合には、LacdiAc含有グリカンの形跡が見つからなかったことである。

【0096】

ヒトメラノーマ細胞系RPMI - 7932およびRPMI - 7951の膜タンパク質由来脱シアリル化N - グリカン

膜結合シアリル化N - グリカンを包含するシアリル化N - グリカンは、Arthrobacter ureafaciens シアリダーゼで効率的に脱シアリル化された。脱シアリル化は、MALDI-TOF MSでモニターした(データは示さない)。脱シアリル化したN - グリカンは、はじめに、末端 - GlcNAc残基を特異的に加水分解するが - GalNAc残基は加水分解しない濃度の - N - アセチルグルコサミニダーゼを用いて消化した。更に - アセチルヘキソサミニダーゼを添加すると、いくつかのN - グリカンからHexNAc残基が除去された。以下に - N - アセチルヘキソサミニダーゼ感受性であるが、 - N - アセチルグルコサミニダーゼ非感受性の構造(構造A ~ E)を例示するが、上述の酵素はこれらの構造から同時に二つまたは四つのHexNAc残基のみを除去した。これらの結果をまとめると、下記の構造は、 - N - アセチルグルコサミニダーゼの作用には耐性であるが、 - N - アセチル

ヘキササミニダーゼで完全に消化されるGalNAc 1-4GlcNAc配列を含むことが示された。

【0097】

ヒトメラノーマ細胞系RPMI-7932の膜タンパク質由来LacdiNAc含有N-グリカン(図5~7)：

構造A． - N-アセチルヘキササミニダーゼ消化の際には、 $m/z$  1704.71に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1704.61)に対応するピークは、 $m/z$  1298.53に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1298.45)に対応するピークに変化した。一方、 $m/z$  1501.62に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1501.53)に対応する不完全消化産物の相対シグナル強度は増加しなかった。

10

構造B． - N-アセチルヘキササミニダーゼ消化の際には、 $m/z$  1850.73と $m/z$  1850.72に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1850.67)に対応するピークの相対シグナル強度は有意に減少した。同時に、 $m/z$  1444.59と $m/z$  1444.58に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1444.51)に対応するピークの相対シグナル強度も有意に増加した。一方、 $m/z$  1647.66に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1647.59)に対応する不完全消化産物の相対シグナル強度の増加は見られなかった。

構造C． - N-アセチルヘキササミニダーゼ消化の際には、 $m/z$  1891.78に観測される、 $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_6\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1891.69)に対応するピークは、 $m/z$  1079.47に観測される、 $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1079.38)に対応するピークおよび $m/z$  1485.65と $m/z$  1485.61に観測される、 $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1485.53)に対応するピークに完全に变化した。一方、計算値が $m/z$  1688.61の $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ または計算値が $m/z$  1282.45の $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ であると考えられる不完全消化産物の形跡は見られなかった。1,3/4-フコシダーゼ消化の際には、 $m/z$  1485.61に観測されるピークの一部は、 $m/z$  1339.52に観測される、 $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1339.48)に対応するピークに変化した。

20

構造D． - N-アセチルヘキササミニダーゼ消化の際には、 $m/z$  2215.85と $m/z$  2215.84に観測される、 $[\text{Hex}_5\text{HexNAc}_6\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  2215.80)に対応するピークの相対シグナル強度は有意に減少した。同時に、 $m/z$  1809.71と $m/z$  1809.67に観測される、 $[\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1809.64)に対応するピークの相対シグナル強度も有意に増加した。一方、不完全消化産物と考えられる $m/z$  2012.76に観測される、 $[\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  2012.72)に対応するピークの相対シグナル強度の増加は見られなかった。

30

【0098】

ヒトメラノーマ細胞系RPMI-7932の膜タンパク質由来LacdiNAc含有N-グリカン(図8~9)：

構造E． - ヘキササミニダーゼ消化の際には、 $m/z$  1501.52に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1501.53)に対応するピークは、 $m/z$  1095.36に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1095.37)に対応するピークに変化した。一方、 $m/z$  1298.48と $m/z$  1298.46に観測される、 $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3+\text{Na}]^+$ イオン(計算値： $m/z$  1298.45)に対応する不完全消化産物の相対シグナル強度の有意な増加は見られなかった。

40

【0099】

結論

本実施例の結果は、ヒト癌化組織はLacdiNAc配列を有する糖タンパク質を含有することを示す。より具体的には、本実施例の結果は、LacdiNAc含有シアリル化N-グリカンである

50

NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>5</sub>Fuc<sub>1</sub>は喉頭癌腫瘍試料の糖タンパク質として発現されていることを示す。さらに、本実施例の結果は、メラノーマ細胞系 R P M I - 7 9 3 2 の膜タンパク質由来シアリル化 N - グリカンの中には、LacdiNAc、シアリル - LacdiNAcおよび/またはフコシル - LacdiNAcを含有する構造がいくつも存在し、メラノーマ細胞系 R P M I - 7 9 5 1 の膜タンパク質由来シアリル化 N - グリカンの中には、シアリル - LacdiNAc含有 N - グリカンが存在することを示唆している。メラノーマ細胞系 R P M I - 7 9 3 2 の膜タンパク質由来脱シアリル化 N - グリカンである構造 C (即ちHex<sub>3</sub>HexNAc<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>)においては、単離したシアリル化 N - グリカンを Arthrobacter ureafaciens シアリダーゼで消化して N - グリカンを得ているので、少なくとも一つのLacdiNAc単位はもともとシアリル化されていた。同様に、メラノーマ細胞系 R P M I - 7 9 3 2 の膜タンパク質由来シアリル化 N - グリカンである構造 C においては、二つのLacdiNAc配列の少なくとも一つは N - グリカンコアの - マンノースの一つに - 結合していなければならない。さらに、1,3/4-フコシダーゼ消化によって、メラノーマ細胞系 R P M I - 7 9 3 2 の膜タンパク質由来シアリル化 N - グリカンである構造 C には、1,3-フコシル化LacdiNAc配列が存在することが明らかになった。他の構造においては、Hex-HexNAc配列の存在によって、上述の構造的特徴の帰属が妨げられた。メラノーマ細胞系 R P M I - 7 9 5 1 の膜タンパク質由来脱シアリル化 N - グリカンである構造 E (即ちHex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>)の単糖組成は、Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> N - グリカンコアにシアリル - LacdiNAc配列を有するハイブリッド N - グリカンの存在を示唆する。

10

20

30

40

50

### 【 0 1 0 0 】

#### 実施例 3

癌細胞および糖結合体上のGalNAc 1-4GlcNAc配列を認識する抗 - LacdiNAc抗体、ならびにその製造と特徴付けに用いる免疫原性オリゴ糖結合体

#### 抗体

抗 - LacdiNAc抗体は、免疫原性LacdiNAc結合体を用い、実験動物免疫学における標準的な方法、ファージディスプレイ法で行う抗体ライブラリーのスクリーニング、または他の公知の方法で製造する。モノクローナル抗体と考えられる使用した抗体は、LacdiNAcに対して特異的であり、これは特異的なオリゴ糖またはオリゴ糖結合体で被覆した E L I S A プレートを用いた E L I S A、あるいは特異的なオリゴ糖またはその結合体の認識を利用した他の適当な方法によって示される。LacdiNAc抗原に結合するが、対応するLacNAc類似体には結合しない抗体は、目的とする用途に適している。LacdiNAc抗原とLacNAc対照抗原とからなる特定のペアは、ネオ糖タンパク質または他の免疫原性結合体などの結合体の調製に適している。このようなペアの具体例としては、以下のペアが挙げられる。

GalNAc 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-R と Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-R、

GalNAc 1-4GlcNAc 1-6Gal 1-R と Gal 1-4GlcNAc 1-6Gal 1-R、

GalNAc 1-4GlcNAc 1-3GalNAc 1-R と Gal 1-4GlcNAc 1-3GalNAc 1-R、

GalNAc 1-4GlcNAc 1-6GalNAc 1-R と Gal 1-4GlcNAc 1-6GalNAc 1-R、

GalNAc 1-4GlcNAc 1-2Man 1-R と Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-R、

GalNAc 1-4GlcNAc 1-6Man 1-R と Gal 1-4GlcNAc 1-6Man 1-R、

GalNAc 1-4GlcNAc 1-4Man 1-R と Gal 1-4GlcNAc 1-4Man 1-R、そして

上記の本発明のエピトープに対応するシアリル化類似体および/またはフコシル化類似体。

(式中、Rは、例えば、ラクトース、全てのO - グリカン、全てのN - グリカン、全ての糖脂質のコア構造、および公知の方法によってオリゴ糖をネオ糖タンパク質または他の免疫原性担体に結合するために用いるスペーサーから選ばれるものである。)

### 【 0 1 0 1 】

#### 組織片におけるLacdiNAc配列の in situ の製造

対照組織を in situ LacdiNAc合成に付して、免疫組織化学または他の診断分野において正の対照 (positive control) として用いることができる。例えばRamakrishnan と Qasba (2002) に記載されているウシ乳酵素 Y 2 8 9 L 変異体に類似した変異型 - ガラクトシ

ルトランスフェラーゼを使用し、且つこの引例に記載の反応条件と実質的に同様の反応条件を用いることで、反応を促進することができる。GalNAc転移反応の前に、組織片を50 mM酢酸ナトリウム (pH 4.0) 中で、0.5 U/mlのナタマメ - ガラクトシダーゼ (英国、Glyko社製) と共に37 °Cで一晩インキュベートしてもよく、その後にはグリコシダーゼ反応溶液を組織片から洗い流す。こうすることによって、GalNAc転移酵素に対するさらなる受容部位を作ることができる。

#### 【0102】

免疫学的診断の分野における抗体の使用

LacdiNAc特異的抗体は、免疫組織化学、免疫学的診断、および標準的な免疫学的方法に基づく他の診断分野に用いることができる。

10

#### 【0103】

実施例 4

本発明のlacdiNAc構造を認識する抗体に対する細胞溶解活性を検出するためのin vitro溶解アッセイ

細胞表面にlacdiNAc構造を有するモデル癌細胞を80%集密的密度となるように回収し、HBS (ハンクスの平衡塩類溶液) で4回洗浄する。細胞の生存率はトレパンブルー染色で確認する。約200,000個の細胞を、その細胞表面に提示されている本発明のlacdiNAc構造に結合する抗体と共にインキュベートする。一方の細胞のセットには、ウサギ補体を最終希釈度が1:5になるように加え、他方の細胞のセットは、培地を添加して体積が同じになるように調整する。さらに細胞を37 °Cで1時間インキュベートする。最後に、ヨウ化プロピウム (propidium iodide) を終濃度が20 µg/mlになるように加え、細胞の色素取り込みを分析した。細胞はlacdiNAc結合抗体によって溶解するが、癌非結合性対照抗体では溶解しない。lacdiNAc構造は、抗体の認識および細胞溶解に利用できるように細胞表面に存在する。

20

#### 【0104】

実施例 5

#### 3 - シアリルトランスフェラーゼ反応の例

過剰モル量 (20 µmol) のCMP-NeuNAcおよび1 Uの3 - シアリルトランスフェラーゼ (ST3Gal III、ラット肝臓由来、Calbiochem社製) を、2.1 mlの2 mg/ml BSA含有50 mM MOPS - NaOH (pH 7.4) 中で、GalNAc4GlcNAc3Lac (5 µmol) と共に37 °Cで一晩インキュベートする。生成物であるNeuNAc3GalNAc4GlcNAc3Gal4Glcは量的に生成され、それをゲルろ過HPLC - クロマトグラフィーによって精製する。質量分析およびNMR分析によって、予想した構造が確認される。リニア型の陰イオンモードMALDI - TOF質量分析においては、生成物のピークがm/z 998.36に観測される。この生成物を所望により、3 - シアリル化LacdiNAcの類似体にN - アルキル化または誘導することもできる。3 - シアリル化lacdiNAcは、8 µlの無水酢酸を含む200 µlの1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中でGalNAcをGalNAcへN - アセチル化することで得られる。

30

#### 【0105】

#### 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ反応の例

GalNAc4GlcNAc3LacからのGal3GalNAc4GlcNAc3Lacの合成

UDP-Gal (3 µmol)、GalNAc4GlcNAc3Lac (1.5 µmol) および3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ (0.1 U、Calbiochem社製) を、500 µlの20 mM MgCl<sub>2</sub>含有100 mM MES緩衝液 (pH 7.0) 中で37 °Cでインキュベートする。生成物であるGal3GalNAc4GlcNAc3Gal4Glcは、ゲルろ過HPLC - クロマトグラフィーによって精製した。反応混合物は37 °Cで4日間インキュベートした。陽イオンモードのMALDI - TOF質量分析においては、予想された生成物のピークがm/z 891.2102に観測された。この生成物の構造は、NMR分光測定によって確認する。

40

#### 【0106】

50

## 実施例 6

二種のガラクトシルトランスフェラーゼによるGlcNAc 3LacからのGalN 3GalN 4GlcNAc 3Lacの合成およびin situ 供与体合成

5  $\mu$ mol GlcNAc 3Lac、10 mM GalN-1P (Sigma社製)、20 mM UDP-Glc、2.5 U ガラクトース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼ、0.5 U 1-4-ガラクトシルトランスフェラーゼおよび0.5 U 1-3-ガラクトシルトランスフェラーゼ(米国、カリフォルニア州、Calbiochem社製)を含む反応混合物を、5 mM MgCl<sub>2</sub>および5 mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを含有する0.1 M HEPES (pH 8.0) 1.0 ml 中でインキュベートする。反応混合物は37 °C で4日間インキュベートした。反応生成物を陽イオンモードのMALDI-TOF分析に付したところ、主要な生成物のピークがm/z 890.2349に観測された。生成物の構造はNMR分光測定によって確認する。

10

【0107】

【表1】

## MMP-9 グリカン、ピーク 23.10

帰属	m/z	Z	m (実測値)	m (計算値)	存在量 % (総糖量)*	LacDiNac%	MALDI 分析において 対応するシグナル (図 1A)**
Hex5HexNac4Fuc1	1070,201	4	4276,804	4276,812	10,1		
Hex4HexNac5Fuc1	1080,498	4	4317,992	4317,838	4,8	4,8	1956,01
Hex5HexNac4Fuc2	1106,763	4	4423,052	4422,87	13,4		1996,64
Hex4HexNac5Fuc2	1117,036	4	4464,144	4463,896	7,8	7,8	2101,96
Hex5HexNac4Fuc3	1143,247	4	4568,988	4568,928	21,2		2143,07
Hex4HexNac5Fuc3	1153,518	4	4610,072	4609,954	8,1	8,1	
					65,5	20,7	

## MMP-9 グリカン、ピーク 24.30

帰属	m/z	Z	m	存在量 % (総糖量)*	LacDiNac%
Hex5HexNac4SA1	1106,697	4	4422,788	2,9	
Hex5HexNac4Fuc1SA1	1143,008	4	4568,032	10,6	
Hex4HexNac5Fuc1SA1	1153,318	4	4609,272	3,1	3,1
Hex5HexNac4Fuc2SA1	1179,540	4	4714,16	13,7	
Hex4HexNac5Fuc2SA1	1189,780	4	4755,12	4,1	4,1
				34,5	7,2
			存在量の合計 (%)	100,0	27,9

\* 定量は LC/MS 分析に基づく

\*\* [M + Na]<sup>+</sup> イオンとして分析

## 【 0 1 0 8 】

## 参考文献

- Arap, W., Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. (1998) Science 279, 323-4.
- Bergwerff, A.A., van Kuik, J. A., Schiphorst, W. E. C. M., Koeleman, C. A. M., van den Eijnden, D.H., Kamerling, J. P., and Vliegenthart, J.F.G. (1993) FEBS Lett. 334, 133-138.
- Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Panico, M., Patankar, M., Oehringer, S., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M. and Clark, G. F. (1995) J. Biol. Chem. 270, 24116-24126.
- Do, K-Y, Do, S-I and Cummings, R. D. (1997) Glycobiology 7, 183-194. 10
- Grinnel, B. W., Hermann, R. B. and Yan, S. B. (1994) Glycobiology 4, 221-225.
- Harvey, D.J., et al. (1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7(7):614-9.
- Jain, R. K., Piskortz, C. F., Huang, B-G, Locke, R. D., Han, H-L, Koenig, A., Varki, A. and Matta, K. L. (1998) Glycobiology 8, 707-717.
- Jaques, A. J., Opdenakker, G., Rademacher, R. A., Dwek, R. A. and Zamze, S. E. (1996) Biochem. J. 316, 427-437.
- Koivunen E., Arap W., Valtanen H., Rainisalo A., Medina OP., Heikkila P., Kantor C., Gahmberg C. G., Salo T., Konttinen Y. T., Sorsa T., Ruoslahti E. and Pasqualini R. (1999) Nature Biotechnology 17(8):768-74.
- Manzella, S. M., Dharmesh, S. M., Cohick, C. B., Soares, M. J. and Baenziger, J. U. (1997) J. Biol. Chem. 272, 4775-4782. 20
- Manzi, A.E., et al. (2000) Glycobiology 10(7):669-89.
- Ramakrishnan, B., and Qasba P.K. (2002) J. Biol. Chem. 277, 20833-39.
- Rudd, P.M., Mattu, T.S., Masure, S., Bratt, T., van den Steen, P.E., Wormald, M. R., Kuester, B., Harvey, D.J., Borregard, N., Van Damme, J., Dwek, R.A. and Opdenakker, G. (1999) Biochemistry 38, 13937-13950.
- Nyame, K., Leppanen A.M., Bogitsh, B.J., and Cummings, R.D. (2000) Exp. Parasitol. 96, 202-212.
- Nyman, T.A., et al. (1998) Eur. J. Biochem. 253(2):485-93.
- Ohkura, T., Hara-Kuge, S., and Yamashita, K. (2001) Glyco XVI International Symposium on Glycoconjugates Aug 19-24, The Hague, The Netherlands, Abstract C20.3. abstract book page 79. 30
- Packer, N.H., et al. (1998) Glycoconj. J. 15(8):737-747.
- Papac, D.I., et al. (1996) Anal. Chem. 68(18):3215-23.
- Saarinen, J., Welgus, H. G., Flizar, C. A., Kalkkinen N. and Helin J. (1999) Eur. J. Biochem. 259, 829-840.
- van den Eijnden, D. H., Bakker, H., Neeleman, A. P., van den Nieuwenhof, I. M. and van Die I. (1997) Biochem Soc. Trans. 25, 887-893.
- Verostek, M.F., et al. (2000) Anal. Biochem. 278:111-122.
- Yang, Y., V. Hayden, T, Man, S. and Rice, K. G. (2000) Glycobiology 10, 1341-1345. 40

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 1 0 9 】

【 図 1 A 】遊離MMP-9 N - グリカンのMALDI - TOF分析。N - グリカンは完全なN - グリカンである。

【 図 1 B 】遊離MMP-9 N - グリカンのMALDI - TOF分析。N - グリカンはNDVノイラミニダーゼと共にインキュベートしたものである。

【 図 1 C 】遊離MMP-9 N - グリカンのMALDI - TOF分析。N - グリカンは、NDVノイラミニダーゼと共にインキュベートした後に、C. perfringens ノイラミニダーゼで処理したものである。

【図1D】遊離MMP-9 N-グリカンのMALDI-TOF分析。N-グリカンはNDVノイラミニダーゼと共にインキュベートした後に、*C. perfringens* ノイラミニダーゼ、次いでアーモンドの実由来のフコシダーゼで処理したものである。

【図2】トリプシン消化したMMP-9のLC-ESI/MS分析。Aは溶出したペプチドの全イオンを示すクロマトグラムであり、Bは $m/z$  204.1 (Hexのオキシニウムイオン)の抽出イオンのクロマトグラムであり、Cは $m/z$  292.1 (SAのオキシニウムイオン)の抽出イオンのクロマトグラムであり、Dは $m/z$  366.1 (Hex-HexNAcのオキシニウムイオン)の抽出イオンのクロマトグラムである。B、CおよびDは糖ペプチドと推定される消化産物を示す。

【図3A】MMP-9のトリプシン処理ペプチドのLC/MS分析。23.1分に溶出した糖ペプチドに対応するマススペクトルである。 10

【図3B】MMP-9のトリプシン処理ペプチドのLC/MS分析。24.3分に溶出した糖ペプチドに対応するマススペクトルである。

【図4A】喉頭癌試料由来シアリル化グリカンのリニア型の陰イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。

【図4B】喉頭癌試料由来シアリル化グリカンを*A. ureafaciens* シアリダーゼ消化および*S. pneumoniae* - N-アセチルグルコサミニダーゼ消化に付したものの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。

【図4C】喉頭癌試料由来シアリル化グリカンを*A. ureafaciens* シアリダーゼ消化、*S. pneumoniae* - N-アセチルグルコサミニダーゼ消化およびナタマメ - N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化に付したものの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。 20

【図5】メラノーマ細胞系RPMI-7932の膜タンパク質由来シアリル化N-グリカンを*A. ureafaciens* シアリダーゼ消化および*S. pneumoniae* - N-アセチルグルコサミニダーゼ消化に付したものの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。

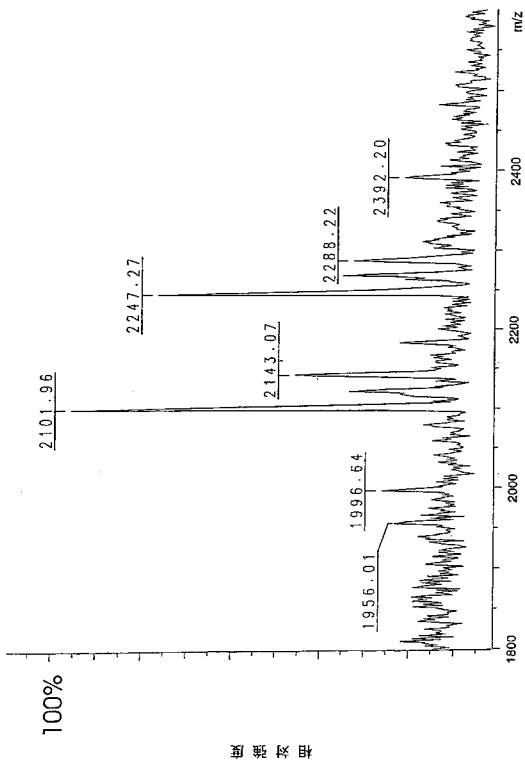
【図6】メラノーマ細胞系RPMI-7932の膜タンパク質由来シアリル化N-グリカンを*A. ureafaciens* シアリダーゼ消化、*S. pneumoniae* - N-アセチルグルコサミニダーゼ消化およびナタマメ - N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化に付したものの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。 30

【図7】メラノーマ細胞系RPMI-7932の膜タンパク質由来シアリル化N-グリカンを*A. ureafaciens* シアリダーゼ消化、ナタマメ - N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化および*Xanthomonas*種 1,3/4-フコシダーゼ消化に付したものの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。

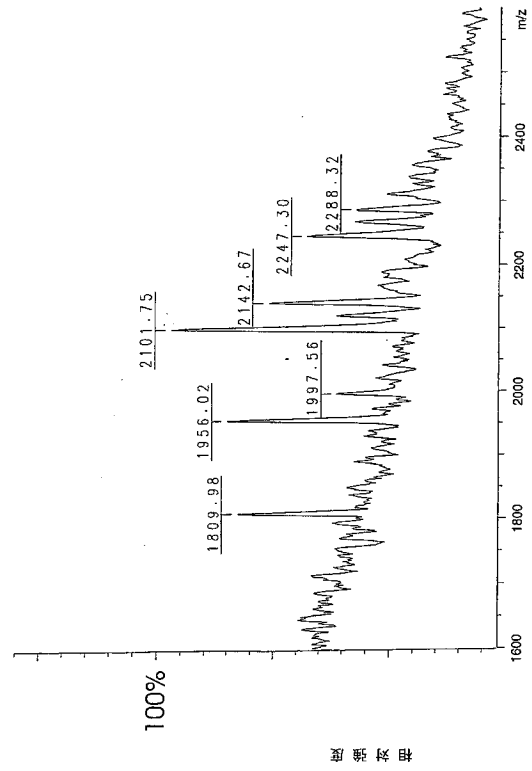
【図8】メラノーマ細胞系RPMI-7951の膜タンパク質由来シアリル化N-グリカンを*A. ureafaciens* シアリダーゼ消化および*S. pneumoniae* - N-アセチルグルコサミニダーゼ消化に付したものの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。

【図9】メラノーマ細胞系RPMI-7951の膜タンパク質由来シアリル化N-グリカンを*A. ureafaciens* シアリダーゼ消化、*S. pneumoniae* - N-アセチルグルコサミニダーゼ消化およびナタマメ - N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化に付したものの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマススペクトル。 40

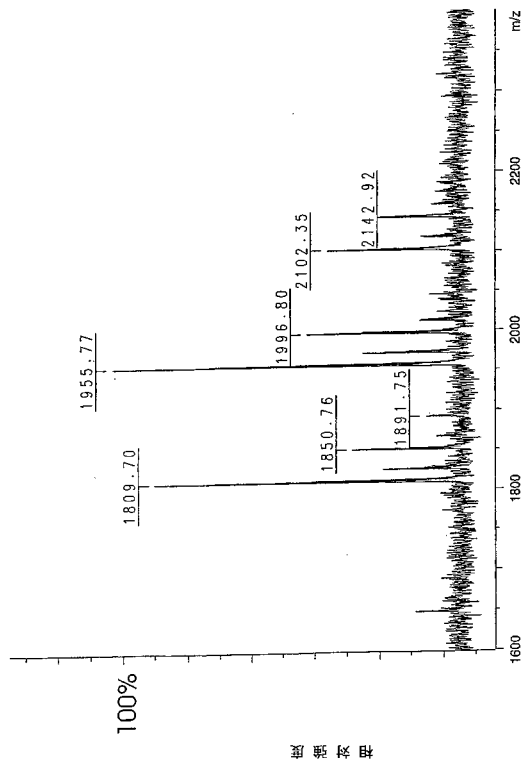
【 図 1 A 】



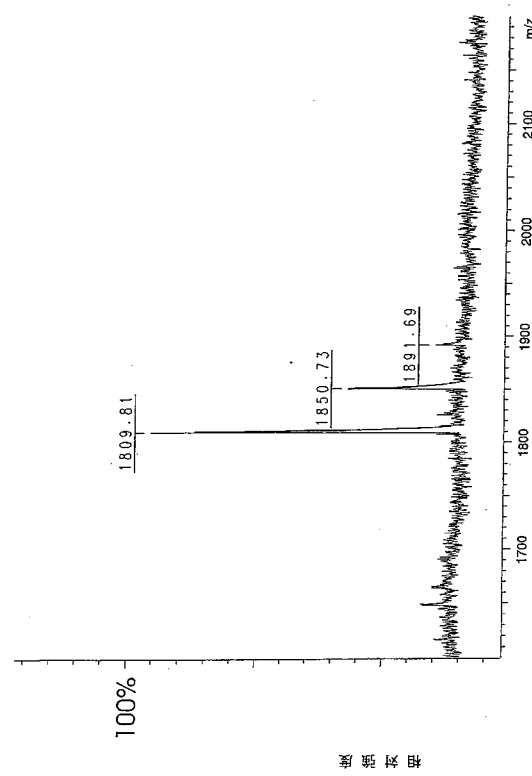
【 図 1 B 】



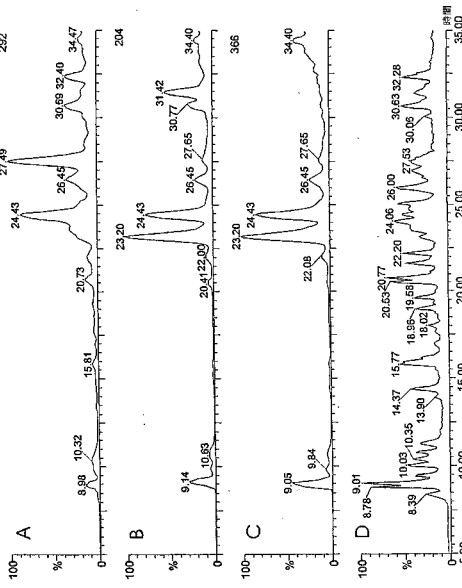
【 図 1 C 】



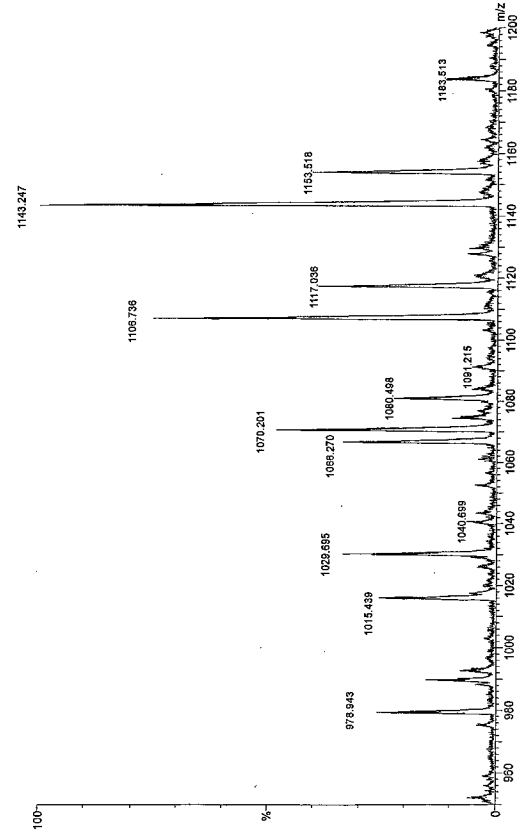
【 図 1 D 】



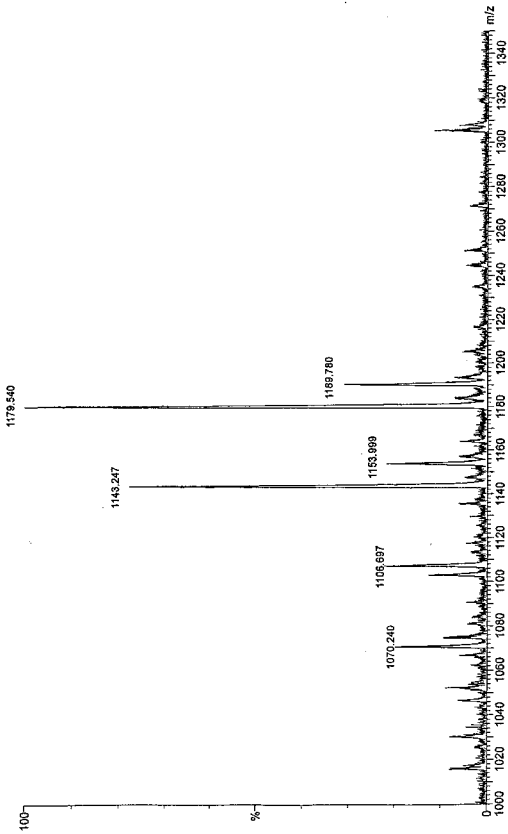
【 図 2 】



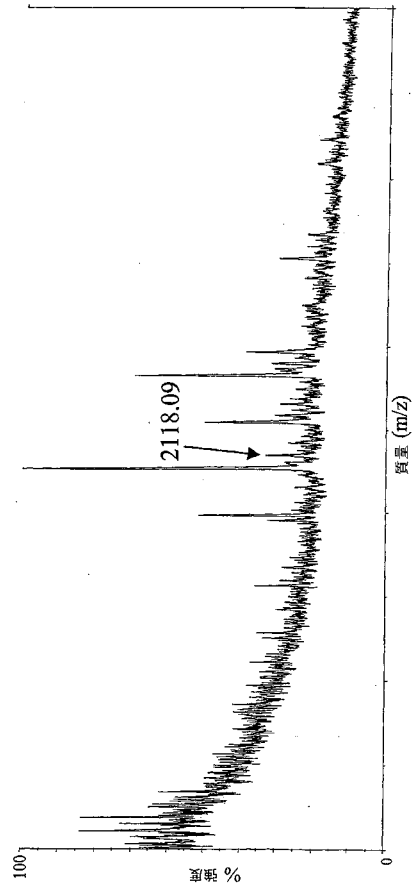
【 図 3 A 】



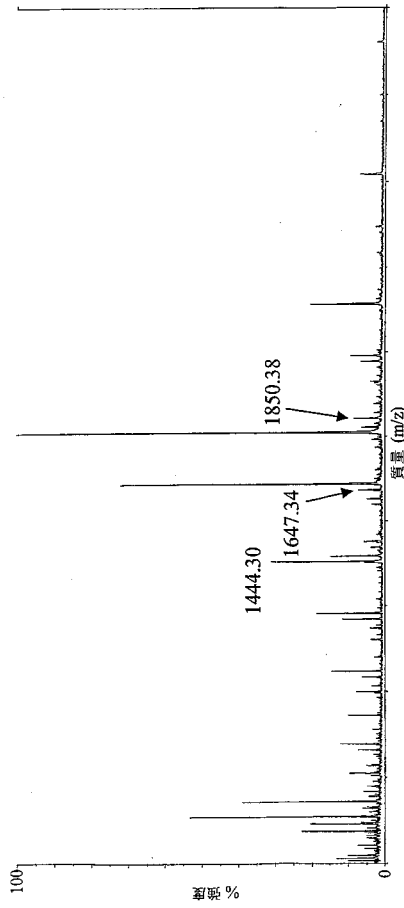
【 図 3 B 】



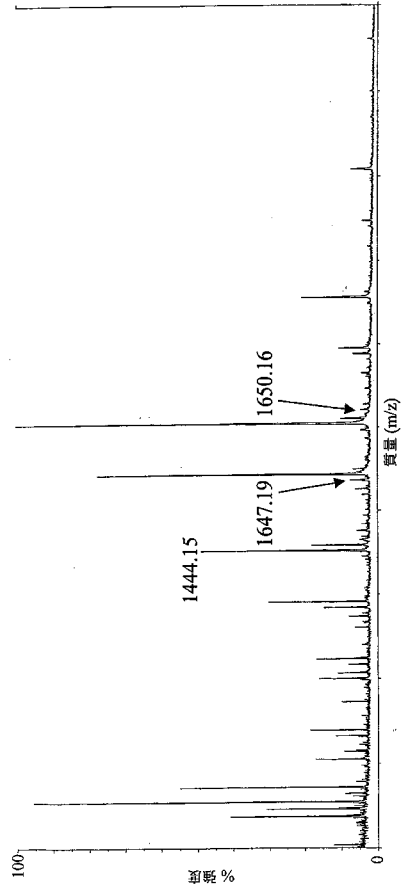
【 図 4 A 】



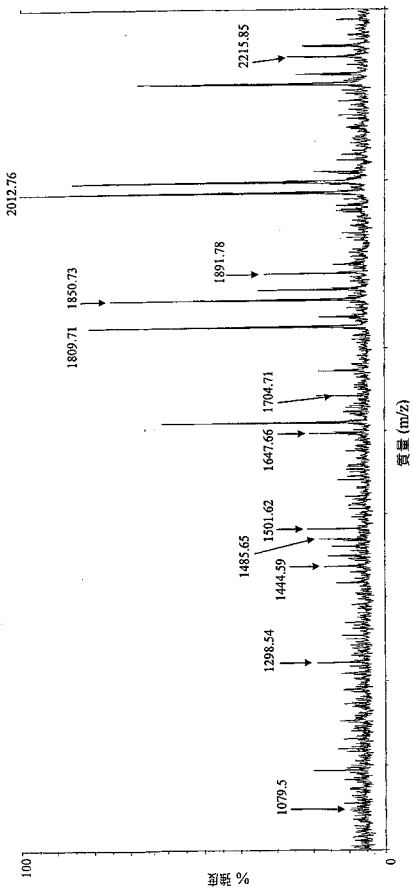
【 図 4 B 】



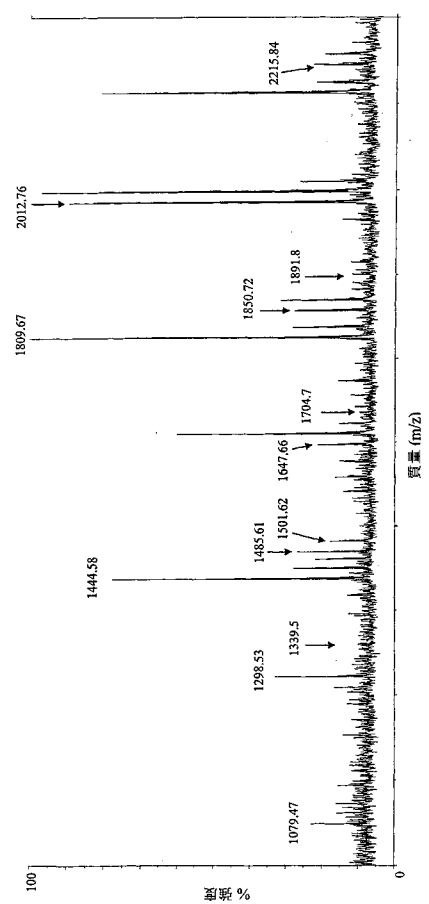
【 図 4 C 】



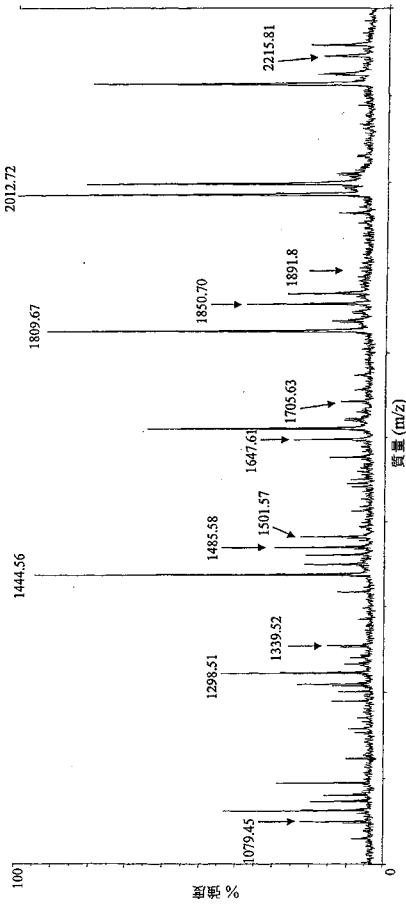
【 図 5 】



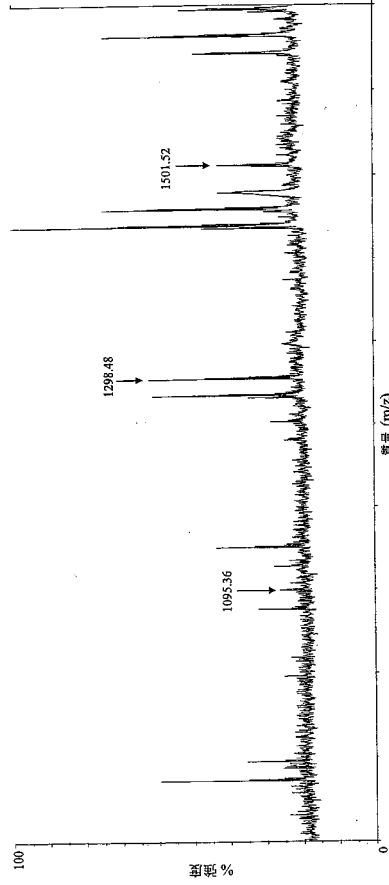
【 図 6 】



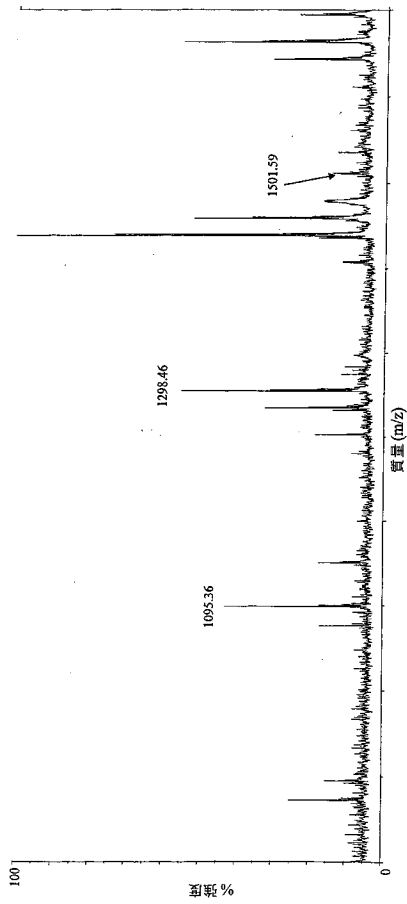
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/016464 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
- (21) International Application Number: PCT/FI02/00674
- (22) International Filing Date: 16 August 2002 (16.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
20011664 17 August 2001 (17.08.2001) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): CARBION OY [FI/FI], Viikinkaari 9, FIN-00710 Helsinki (FI).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): SAARINEN, Juhani [FI/FI]; Hiihtistenkuja 9 B 20, FIN-00500 Helsinki (FI). HELIN, Jari [FI/FI]; Askiontie 2B, FIN-01680 Vantaa (FI). SATOMAA, Tero [FI/FI]; Mankaari 6 A 11, FIN-00710 Helsinki (FI).
- (74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB; Iso Roobertinkatu 4-6 A, FIN-00120 Helsinki (FI).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/016464 A2

(54) Title: CANCER SPECIFIC OLIGOSACCHARIDE SEQUENCES AND USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention describes oligosaccharide sequences, which are specifically expressed by cancer cells. The present invention is related to a method of determining a cancer specific oligosaccharide sequence comprising LacdiNAc structure in a biological sample, the presence of said sequence in said sample being an indication of the presence of cancer. The present invention provides antigenic substances, diagnostic agents, pharmaceutical compositions and cancer vaccines comprising said oligosaccharide sequences or substances binding to said oligosaccharide sequences. The present invention is also related to methods for the treatment of cancer.

WO 03/016464

1

PCT/FI02/00674

*Cancer specific oligosaccharide sequences and use thereof*

## FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to oligosaccharide sequences, which are specifically expressed by certain cancer cells, tumours and other malignant tissues. The present invention describes methods to detect cancer specific oligosaccharide sequences as well as methods for the production of reagents binding to said oligosaccharide sequences. The invention is also directed to the use of said oligosaccharide sequences and reagents

10 binding to them for the diagnostics of cancer and malignancies. Furthermore, the invention is directed to the use of said oligosaccharide sequences and reagents binding to them for the treatment of cancer and malignancies.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Various cancer cells or tissues express oligosaccharide sequences which are different from the non-malignant glycosylation of the same cell or tissue type. Examples of the known or speculated cancer associated oligosaccharide structures include: glycolipid structures such as globo-H (Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Lac $\beta$ Cer), gangliosides: GM1

20 Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(NeuNAc $\alpha$ 3)Lac $\beta$ Cer, or GD2 GalNAc $\beta$ 4(NeuNAc $\alpha$ 8NeuNAc $\alpha$ 3)Lac $\beta$ Cer; Lewis-type fucosylated structures such as Lewis a and x Gal $\beta$ 3/4(Fuc $\alpha$ 4/3)GlcNAc, Lewis y Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc, sialyl-Lewis x NeuNAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc, and some combinations of these on polylactosamine chains; O-glycan core structures such as T-antigen

25 Gal $\beta$ 3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr-Protein, Tn-antigen GalNAc $\alpha$ Ser/Thr-Protein or sialyl Tn-antigen NeuNAc $\alpha$ 6GalNAc $\alpha$ Ser/Thr-Protein. Presence of non-human structures such as N-glycolyl-neuraminic acid in cancers has also been indicated. Association and specificity of oligosaccharide structures with regard to cancers have been well established only in few cases, some of the structures are present in normal cells and tissues and are possibly only

30 more concentrated in cancers. However, absolute cancer specificity is probably not always needed for therapeutic applications.

WO 03/016464

PCT/JP02/00674

2

LacdiNAc (GalNAc $\beta$ 4GlcNAc) -type glycosylations have not been found to be commonly present on human tissues. However, LacdiNAc-type saccharide sequences have been reported from many non-human animals, bovine glycoproteins, human glycoprotein hormones (Manzella et al., 1997) and human glycodelin protein, reviewed in van den Eijnden et al. (1997). Generally the structure seem to be associated with invertebrate animals and early development. Several LacdiNAc variants has been reported from proteins expressed in human embryonal kidney 293 cells (Do et al., 1997). Recently the inventors described LacdiNAc-based structures from transfected fibroblast cells (Saarinen et al., 1999). This study did not show if the glycosylation is related to cancer or to the transfection of the adenoviral E1A-promoter sequence to the cells as E1A-promoter may regulate the gene expression of glycosyltransferases and thereby modify the glycosylation. LacdiNAc type saccharides were also detected among other structures from tissue type plasminogen activator of Bowes melanoma cells, but these were considered to be "nervous system associated" structures (Jaques et al., 1996) The previous studies also describe the detection of similar oligosaccharide structures from cell lines derived from solid tumors (Do et al., 1997; Jaques et al., 1996; Saarinen et al., 1999). However, carbohydrate and other cell surface antigens usually change when contacts between cells are changed, for instance, when a solid tumor is divided to single cells. Besides, cells of cell lines are possibly genetically modified and only then cultured as single cells. Cell surface glycosylations are also very specific for the differentiation status of a cell line or tissue and they are specific for a cell or tissue type. Therefore prior art discussed herein do not describe the natural glycosylation status of a single cancer cell or solid tumor tissue. However, the potential correlations of the glycosylations with cell type or differentiation status allow the use of the cancer antigen(s) for the typing of cancer cells and tumors.

25

The following patents describe cancer antigens and their use for making antibodies for therapeutic and diagnostic uses and for cancer vaccines. The antigen structures are not related to saccharides of the present invention:

Cancer vaccines: US Patent No. 5,102,663 describes composition comprising 9-OAc NeuNAc $\alpha$ 8NeuNAc $\alpha$ 3Lac-Cer (GD3) for the stimulation or the enhancement of the production of antibodies against 9-OAc GD3.

US patent No. 5,660,834 describes pharmaceutical composition containing mucin type glycoprotein consisting essentially of Tn (GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) or sialyl-Tn antigens (NeuNAc $\alpha$ 6GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) and uses thereof with adjuvant to reduce cancer cell

WO 03/016464

3

PCT/JP02/00674

- growth rate. Inventions related to the same mucin sequences are also described in other patents: US 5,747,048 (adjuvant therapy for human) and US 5,229,289.
- US patent 6,083,929 describes extended type 1 chain sphingolipids (Gal $\beta$ 3GlcNAc) as tumour-associated compositions and pharmaceutical composition with an adjuvant.
- 5 Therapeutic antibodies: US patent No. 4,851,511 describes a monoclonal antibody that bind disialosyl Lewis a -structure NeuNAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3(Fuc $\alpha$ 4)[NeuNAc $\alpha$ 6]GlcNAc, diagnostic test kits, hybridomas producing antibodies, marker molecules and an antitumor drug conjugated with antibodies.
- 10 US patent No. 4,904,596 describes a monoclonal antibody that binds structure NeuNAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$ 3LacCer, hybridomas, diagnostics, and coupling of the antibody to an antitumor drug, an immunoregulatory agent or a differentiation inducing agent.
- US patent No. 5,874,060 describes humanized antibodies recognizing Lewis y-antigen
- 15 Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc.
- US patent No. 6,025,481 describes nucleic acid molecules encoding humanized antibodies recognizing Lewis b -antigen. The Lewis b -structure Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 3(Fuc $\alpha$ 4)GlcNAc-expression is increased in cancer cells. US 5,795,961 describes also anti-Lewis b antibodies.
- 20 Diagnostics: US patent No. 4,725,557 describes protein linked antigens Fuc $\alpha$ 3Gal-, Fuc $\alpha$ 4Gal- and Fuc $\alpha$ 6Gal-, and antibodies recognizing these structures, method of determining the cancer associated carbohydrate linkages and diagnostic kits. The antibodies bind cancer cells of human digestive system.
- 25 US patent No. 5,059,520 describes several monoclonal antibodies recognizing blood group A-antigen GalNAc $\alpha$ 3(Fuc $\alpha$ 2)Gal $\beta$ -, which may be used for cancer diagnostics.
- US patent No. 5,171,667 describes antibodies against fucosylated type 2 lactosamines (-Gal $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)GlcNAc $\beta$ -) and use thereof for cancer diagnostics.
- US patent No. 5,173,292 describes monoclonal antibodies binding to Gal-globoside,
- 30 Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4LacCer, which is a cancer specific structure.
- US patents Nos. 6,090,789 and 5,708,163 describe synthesis of Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4LacCer (Globo H, MBr1, breast tumor associated antigen) conjugates and analogs thereof, and pharmaceutical compositions containing the same. US

WO 03/016464

PCT/JP02/00674

4

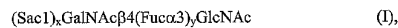
5,679,769 describes the synthesis of asparagines linked to glycopeptides. US 5,543,505 describes synthetic compounds which bind *Helicobacter pylori* bacteria.

US patents Nos. 5,902,725 and 6,203,999 describe the detection of prostate specific cancer by assaying at least triantennary oligosaccharides on prostate specific antigen. Antibody or  
5 lectin PHA-L is used for detection. The patents characterize chromatographically the presence of triantennary N-glycans on cancer form of PSA from a cell line.

The prior art describes fucosylated laciNacs containing relatively large N-glycan structures (EP0565241) and a core 2-type O-glycan structures (EP0919563) in  
10 pharmaceutical compositions. The compositions are aimed for inhibition of selectin mediated cell adhesion and in EP0919563 also for inhibition of metastasis by inhibiting selectin mediated cell adhesion. However, the present invention is directed to the use of the oligosaccharide epitopes according to the present invention as targets of specific recognition molecules, including antibodies. The present invention is specifically directed  
15 to suitable antigenic conjugates and compositions for inducing antibodies for diagnostics and therapies. The present invention is directed to pharmaceutical compositions comprising optimal size of oligosaccharide sequences for recognition by specific antibodies. The optimal oligosaccharide epitopes may comprise only the terminal lacinac structure or the terminal oligosaccharide sequence and one or two monosaccharide  
20 residues.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention describes oligosaccharide sequences, which are specifically  
25 expressed by cancer cells. The present invention is related to a method of determining an oligosaccharide sequence, which comprises a cancer specific sequence of Formula



30 wherein x and y are each independently 0 or 1 and Sac1 is NeuNAc $\alpha$ 3 or NeuNAc $\alpha$ 6, in a biological sample, the presence of said sequence in said sample being an indication of the presence and/or type of cancer. The present invention provides antigenic substances comprising said oligosaccharide sequences in a polyvalent form and it further provides diagnostic agents, pharmaceutical compositions and cancer vaccines comprising said

WO 03/016464

5

PCT/FI02/00674

oligosaccharide sequences or substances binding to said oligosaccharide sequences. The present invention is also related to methods for the treatment of cancer.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5

Figs. 1A, 1B, 1C and 1D. MALDI TOF MS analysis of liberated MMP-9 N-glycans. (1A) intact N-glycans; (1B) the N-glycans after incubation with NDV neuraminidase, followed with consecutive treatments with (1C) *C. perfringens* neuraminidase and (1D) Almond meal fucosidase.

10

Fig. 2. LC-ESI MS analysis of tryptic digest of MMP-9. Panel A) shows total ion chromatogram of eluting peptides; Panel B) shows extracted ion chromatogram of m/z .204.1 (Oxonium ion of Hex); Panel C) shows extracted ion chromatogram of m/z 292.1 (Oxonium ion of SA); and Panel D) shows extracted ion chromatogram of m/z .366.1

15

(Oxonium ion of Hex-HexNac). Panels B, C and D show putative glycopeptides.

Figs. 3A and 3B. LC/MS analysis of tryptic peptides from MMP-9. (3A) Mass spectrum corresponding to glycopeptides eluting at 23.1 minutes, (3B) mass spectrum corresponding to glycopeptides eluting at 24.3 minutes.

20

Figure 4A. Negative ion linear mode MALDI-TOF mass spectrum of larynx cancer sample sialylated glycans.

25

Figure 4B. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of larynx cancer sample sialylated glycans after *A. ureafaciens* sialidase and *S. pneumoniae*  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase digestions.

30

Figure 4C. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of larynx cancer sample sialylated glycans after *A. ureafaciens* sialidase, *S. pneumoniae*  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, and Jack bean  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestions.

Figure 5. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of RPMI-7932 melanoma cell line membrane protein sialylated N-glycans after *A. ureafaciens* sialidase and *S. pneumoniae*  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase digestions.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

6

Figure 6. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of RPMI-7932 melanoma cell line membrane protein sialylated N-glycans after *A. ureafaciens* sialidase, *S. pneumoniae*  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, and Jack bean  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestions.

5

Figure 7. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of RPMI-7932 melanoma cell line membrane protein sialylated N-glycans after *A. ureafaciens* sialidase, Jack bean  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase, and *Xanthomonas sp.*  $\alpha$ 1,3/4-fucosidase digestions.

10

Figure 8. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of RPMI-7951 melanoma cell line membrane protein sialylated N-glycans after *A. ureafaciens* sialidase and *S. pneumoniae*  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase digestions.

Figure 9. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of RPMI-7951 melanoma cell line membrane protein sialylated N-glycans after *A. ureafaciens* sialidase, *S. pneumoniae*  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, and Jack bean  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestions.

## 20 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Several lacdiNAc (GalNAc $\beta$ 4GlcNAc) type sequences are known from secretory proteins such as glycoprotein hormones. In human glycoprotein hormones the lacdiNAc is usually modified to 4sulfo-GalNAc $\beta$ 4GlcNAc- sequences which are considered to be important for the hormone function, however, some heterogeneity exist in the secreted lacdiNAc-structures. The glycoprotein hormones are rare soluble proteins, relatively small in general and contain few glycosylation sites with quite limited selection of lacdiNAc structures. The lacdiNAc sequence has not been structurally characterized on human membrane-linked non-secreted proteins, though numerous structural studies of human glycosylations have carried out during last 30 years.

30

The role of lacdiNAc structures as an intracellular secretion marker has been demonstrated, the same report specifically states that lacdiNAc structures are not present on membrane proteins of MDCK cells (Ohkura, et al. 2001). The lacdiNAc structures

WO 03/016464

7

PCT/FI02/00674

characterized from secreted proteins have not been shown to be related to human cancer. The unusual expression of the lacdiNAc structures and especially rare fucosylated and sialylated variants thereof by cancers, but not on normal tissues, offer unusually good possibilities for cancer treatment and therapies based on the recognition of the structures.

5 Diagnostic and therapeutic success have obtained by carbohydrates which are present on limited amount of normal tissues or in low density on normal tissues and/or in serum.

Methods combining diagnostics and therapy for effective cancer treatment

10 The data of present invention shows that lacdiNAc structures according to the present invention are useful for use of diagnostic and therapeutic methods which recognize the carbohydrate structures on cancer cells. As the glycosylation patterns varies between tissues, between different types of tumors and even between individual patients, the present invention is specifically directed to methods to screen unusual carbohydrate structures from tumors and direct individual therapy against the forms of glycosylation

15 specifically expressed on the cancer of a specific patient. The present invention is specifically directed to the screening of lacdiNAc type glycosylations according to the present invention on tumor or cancer samples and using lacdiNAc targeting therapies according to the present invention for treatment of a patient who has the specific cancer associated glycosylation specifically on tumor or on malignant tissue or cells.

20 The inventors screened multiple normal tissues by effective mass spectrometric methods to verify that lacdiNAc is not cell surface marker on normal tissues. In the present invention it was found that

25 (i) the lacdiNAc sequence occur in cancers both on unicellular cancer such as leukaemia and on solid tumors,

(ii) the lacdiNAc sequence was not observable on multiple on normal tissues,

(iii) the lacdiNAc sequence is present both on plasma membrane or membrane associated proteins and

30 on secreted proteins of cancers, the integrated cell surface lacdiNAc sequences are targets for cancer diagnostics and immunotherapies and other therapies based to the recognition of the lacdiNAc sequences on cancers, and

(iv) the lacdiNAc sequences on cancer cell surfaces can be recognized by specific antibodies for therapy and diagnostics. The structures are available on cell surfaces and not covered by other cell surface components.

WO 03/016464

8

PCT/FI02/00674

Leukaemia cells were chosen as a model for unicellular cancer cells. The leukaemia cells represent the unicellular cancer cells in the blood cancers. The soluble target protein was chosen so that structural comparison data from non-malignant cells exists. To demonstrate abnormal expression of LactiNAc sequence on cancer cells metalloproteinase-9 (MMP-9) was isolated from leukaemia cells (U-937), and N-glycosidic glycans were liberated with N-glycosidase F. The glycan fraction was analyzed with MALDI-TOF MS in trihydroxyacetophenone matrix (Fig. 1A), which has been shown to cause negligible fragmentation of sialic acid residues. The assignment of the monosaccharide compositions as well as the proposed structures according to the subsequent glycosidase treatments are shown in Table 1. The relative abundances of the components are indicated as well, as oligosaccharide analysis in MALDI-TOF has been shown to be relatively quantitative. The most abundant glycan species was assigned to  $[M+Na]^+$  of  $(Hex)_3(HexNAc)_4(Fuc)_3$ . Knowing the typical N-glycan structures, we tentatively assigned this structure as a trifucosylated diantennary complex-type glycan. Other major species were identified as sialylated, difucosylated diantennary complex-type glycan, and trifucosylated diantennary complex-type glycan carrying GalNAc instead of Gal as a terminal monosaccharide (so called LactiNAc structure) in one antennae. These assignments were found to be correct, as shown by sequential glycosidase treatments. For comparison the matrix metalloproteinase MMP-9 structures in non-malignant white blood cells (leukocytes) have been determined, the protein did not contain lactiNAc sequences (Rudd P et al, 1999).

The present invention shows that U-937-cell derived MMP-9 carries LactiNAc structures in large fraction (approximately 30%) of its N-glycans. The presence of LactiNAc structures was verified by two independent methods, namely MALDI-TOF analysis of liberated N-glycans as well as LC-ESI MS of intact glycopeptides. The assignments of the structures were further confirmed by sequential glycosidase treatments. The methods used in this study have been verified by several approaches using both known natural structures as well as synthetic oligosaccharides.

#### Mass spectrometric screening of lactinac-structures from normal tissues

Membrane glycoprotein samples of several non-malignant tissues, including human stomach, lungs, and colon were analyzed mass spectrometric methods as described above.

WO 03/016464

9

PCT/FI02/00674

No N-linked or O-linked type lacdiNAc-sequences were observed. The prior art does not describe lacdiNac on human normal or cancer membrane proteins either.

Analysis of lacdiNAc structures on solid tumors

- 5 The present invention demonstrates also for the first time that lacdiNAc-sequences are present on human solid tumors. An example of the present inventions shows characterization of lacdiNAc structure from sample of cancer of human larynx.

Characterization of lacdiNAc sequences from plasmamembrane samples

- 10 The present invention is also directed to the plasmamembrane forms of lacdiNAc expressing proteins on cancers. The matrix metalloproteinase MMP-9 is also known to occur as membrane associated form (Koivunen et al., 1999), which according to present invention also form ideal target for cancer diagnostics and immune therapy. As another example, glycosylations of two different samples of melanoma related membranes were  
15 analyzed. Large amounts of various lacdiNAc-type oligosaccharide sequences were found on the membrane bound glycoproteins including unique N-glycan structures. The glycosylated membrane proteins are known to be presented on the surface of the cells and tissues.

20 Specific defect in cancer demonstrated by the present invention

- The present invention shows a novel defect in cancer cells. The rare structure associated with secretory proteins is expressed on proteins which normally do not express the lacdiNAc structures. Furthermore the failure in glycosylation induces more unusual sialylated, fucosylated, and variants without usual sulphation on position 4 of GalNAc. A  
25 general understanding about the cancers are that the intracellular organization of cancer cells is disturbed. Such errors in Golgi apparatus which produces very specific glycosylations on different cell types obviously leads to the problems described. Obviously presence of the cancer indicating abnormal glycosylations on soluble proteins is useful for cancer diagnostics, the presence of the cancer glycosylation associated with  
30 membranes makes these directly useful for therapeutics.

As described above the presence of cancer antigens was studied from secreted MMP-9 protein of leukaemia cell line U-937 from solid tumors, and from membrane preparations. The single cells of a leukemia cell line are also considered to be a reasonably relevant

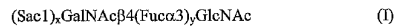
WO 03/016464

10

PCT/FI02/00674

model of single cell cancer leukaemia. Demonstration of the LacdiNAc-structures from solid tumors and being membrane associated shows the usefulness of the cancer glycosylation for therapies against solid tumors expressing the glycosylation.

5 The present invention shows that LacdiNAc structures according to Formula



10 wherein x and y are each independently 0 or 1 and Sac1 is NeuNAc $\alpha$ 3 or NeuNAc $\alpha$ 6, are cancer specific antigens. The invention is directed to the detection of the cancer antigens directly from cancer cells and tumor tissues as a cell-associated form of MMP-9 is known (Koivunen et al., 1999). However, the cancer antigens may, in addition to the detection from cancer cells and tumor tissues, be detected, as described herein, on a secreted glycoprotein derived from cancer cells or tissues. The cancer specific proteins can be proteinases, hormones or secreted mucin type glycoproteins.

15 The present invention shows that a cancer antigen can be detected from a glycoprotein, which is known to be upregulated upon malignant transformation. The presence of the cancer antigen on a putative cancer associated glycoprotein may provide a more reliable diagnostic tool of cancer in early phase. Examples of such preferred cancer associated proteins include, but are not limited to, members of matrix metalloproteinase protein family (e.g. MMP-9), prostate specific antigen, kallikrein 2, human chorionic gonadotrophin and carcinoembryonic antigen.

25 Cancer specific oligosaccharides of the LacdiNAc type contains GalNAc $\beta$ 4GlcNAc-oligosaccharide sequence. The sequence is a part of an oligosaccharide glycoconjugate of cancer cells. The oligosaccharide sequence can be substituted to sequence GalNAc $\beta$ 4(Fuca3)GlcNAc-, NeuNAc $\alpha$ 3GalNAc $\beta$ 4GlcNAc-, NeuNAc $\alpha$ 6GalNAc $\beta$ 4GlcNAc-, NeuNAc $\alpha$ 3GalNAc $\beta$ 4(Fuca3)GlcNAc-, or  
 30 NeuNAc $\alpha$ 6GalNAc $\beta$ 4(Fuca3)GlcNAc-, which were also indicated to be present on the cancer cells. If a single cancer oligosaccharide epitope contains both sialic acid and fucose the structure can be NeuNAc $\alpha$ 3GalNAc $\beta$ 4(Fuca3)GlcNAc-. The LacdiNAc sequence can also be sulphated, for instance, to position 4 of GalNAc, if the cancer cells contain a sulphotransferase needed for the modification. The LacdiNAc-type sequence(s) can be a

WO 03/016464

11

PCT/JP02/00674

part of a glycoprotein sequence of cancer cells or tissue, for instance, LacdiNAc type sequence is  $\beta$ 2-,  $\beta$ 4- or  $\beta$ 6-linked to a mannose residue in a N-linked glycan of a glycoprotein, or the LacdiNAc-sequence is  $\beta$ 2-linked to a mannose residue in a N-linked glycan of a glycoprotein.

5

The fucosylated LacdiNAc saccharides are analogous to Lewis type cancer associated oligosaccharides. Potential weak cross reactivity with fucosylated LacdiNAcs is a probable explanation for the production of human antibodies weakly recognizing Lewis type cancer associated oligosaccharides though these are present in large amounts also in

10

normal tissues.

The present invention also describes methods to detect malignancy of a cell or a tissue by detecting cancer specific glycosylations. The detection can be performed by molecules specifically binding to the cancer specific oligosaccharide sequences of the invention.

15

Preferably the molecules specifically binding to the cancer specific oligosaccharide sequences are aptamers, lectins, genetically engineered lectins, antibodies, monoclonal antibodies, antibody fragments, enzymes recognizing LacdiNAc-structure such as glycosidases and glycosyltransferase and genetically engineered variants thereof. Labelled bacteria, viruses or cells or other polymeric surfaces containing molecules recognizing the

20

structures can be used for the detection. Oligosaccharide sequences can also be released from cancer cells by endoglycosidase enzymes. Alternatively oligosaccharides can be released as glycopeptides by protease enzymes. Chemical methods to release oligosaccharides or derivatives thereof include, e.g., osonolysis of glycolipids and beta-elimination or hydrazinolysis methods to release oligosaccharides from glycoproteins.

25

Alternatively the glycolipid fraction can be isolated. A substance specifically binding to the cancer specific oligosaccharide sequences can also be used for the analysis of the same sequences on cell surfaces. Said sequences can be detected, e.g., as glycoconjugates or as released and/or isolated oligosaccharide fractions. The possible methods for the analysis of said sequences in various forms also include NMR-spectroscopy, mass spectrometry and glycosidase degradation methods. Preferably at least two analysis methods are used, especially when methods of limited specificity are used.

30

Mass spectrometry is a preferred method to determine the cancer specific oligosaccharide sequence or sequences according to the invention in a sample. Mass spectrometric

WO 03/016464

12

PCT/FI02/00674

scanning methods for the detection of HexNAc-HexNAc-fragments from a fraction containing oligosaccharide sequences according to Formula I are especially preferred.

The present invention is also directed to the use of cancer specific oligosaccharide antibodies recognizing the structures using following process: 1) producing synthetically or biosynthetically a polyvalent conjugate of an oligosaccharide sequence of the invention or an analogue or derivative thereof, the polyvalent conjugate being, for instance, according to the following structure: position C1 of reducing end terminal of the oligosaccharide sequence (OS) comprising the cancer specific terminal sequence of the invention is linked (-L-) to an oligovalent or a polyvalent carrier (Z), via a spacer group (Y) and optionally via a monosaccharide or oligosaccharide residue (X), forming a structure according to Formula

15 
$$[\text{OS} - (\text{X})_n - \text{L} - \text{Y}]_m - \text{Z} \quad (\text{II}),$$

where integer m has values  $m > 1$ , and n is independently 0 or 1; L is oxygen, nitrogen, sulfur or carbon atom, X is preferably lactosyl-, galactosyl-, poly-N-acetyl-lactosaminyl, or part of an O-glycan or an N-glycan oligosaccharide sequence, Y is a spacer group or a terminal conjugate such as a ceramide lipid moiety or a linkage to Z; preferably one of the following properties are present: the oligosaccharide sequence (OS) is sialylated, X comprises at least one mannose or N-acetylgalactosamine residue or Z comprises a carbohydrate material, such as a polysaccharide; 2) immunizing an animal or human with the polyvalent conjugate together with an immune response activating substance.

25 Preferably the oligosaccharide sequence is polyvalently conjugated to the immune response activating substance and the conjugate is used for immunization alone or together with an additional immune response activating substance. In a preferred embodiment the oligosaccharide conjugate is injected or administered mucosally to an antibody producing organism with an adjuvant molecule or adjuvant molecules. For antibody production the oligosaccharide or analogs or derivatives thereof can be polyvalently conjugated to a protein such as BSA, keyhole limpet hemocyanin, a lipopeptide, a peptide, a bacterial toxin, a part of peptidoglycan or immunoactive polysaccharide or to another antibody production activating molecule. The polyvalent conjugates can be injected to an animal with adjuvant molecules to induce antibodies by routine antibody production methods

WO 03/016464

13

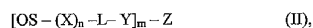
PCT/JP02/00674

known in the art. Preferably an antigenic substance of the invention comprises a terminal oligosaccharide sequence as defined in Formula I in a chemically or biochemically synthesized polyvalent form described above for immunization in human. More preferably the antigenic substance comprises terminal NeuNAc $\alpha$ 3 or NeuNAc $\alpha$ 6 (i.e. x=1 in Formula 5 I) or the saccharide sequence is linked to mannose or N-acetylgalactosamine (e.g. X is Man or GalNAc in Formula II).

The present invention is also directed to monovalent and/oligovalent antigenic conjugates of oligosaccharide sequences according to the present invention. Monovalent antigenic 10 conjugate may comprise an antigenic lipid structure, for example a ceramide, a synthetic lipid or a bacterial type of lipid which can induce antibody production as described by the invention and by methods known in the art.

The present invention is specifically directed to the use of optimal size antigenic epitopes and pharmaceutical compositions comprising these. Antibodies can usually recognize 15 effectively only epitopes of a few monosaccharide residues. Reduced size of the epitope is also preferred because of more cost effective synthesis of the structures.

Preferred optimal antigenic epitopes includes structures according to the Formula II 20



wherein Y is a non-carbohydrate spacer or a non-glycosidically linked terminal conjugate, n is 0 or 1 and X is lactosyl-, galactosyl-, N-acetyllactosaminyl, mannosyl-, Man<sub>2</sub>, Man<sub>3</sub>-, 25 Man<sub>3</sub>GlcNAc, Man<sub>4</sub>GlcNAc, N-acetylglucosaminyl-, or N-acetylgalactosaminyl. More preferably X is lactosyl-, galactosyl-, mannosyl-, or N-acetylgalactosaminyl. In a preferred embodiment the OS is  $\beta$ 2-, or  $\beta$ 4-, or  $\beta$ 6 linked to the mannosylresidue, most preferably  $\beta$ 2-. In a preferred embodiment the OS is  $\beta$ 3- or  $\beta$ 6-linked to galactosylresidue or N-acetylgalactosaminylresidue or Gal-residue of lactose or N-acetyllactosamine, more 30 preferably  $\beta$ 3- or  $\beta$ 6-linked to Gal or Gal of lactose or to GalNAc, and most preferably  $\beta$ 3-linked to Gal or Gal of lactose or  $\beta$ 6-linked to GalNAc. In a preferred embodiment the optimal antigenic epitopes as described above does not comprise fucose in the oligosaccharide sequence.

WO 03/016464

14

PCT/JP02/00674

Man<sub>2</sub>, Man<sub>3</sub>, Man<sub>3</sub>GlcNAc, Man<sub>4</sub>GlcNAc indicates preferably parts of N-glycan core structures comprising oligosaccharide sequences Man<sub>α</sub>3Man, Man<sub>α</sub>6Man, Man<sub>α</sub>3(Man<sub>α</sub>6)Man, Man<sub>α</sub>3(Man<sub>α</sub>6)Man, Man<sub>α</sub>3(Man<sub>α</sub>6)Man<sub>β</sub>4GlcNAc and hybrid type of structure wherein additional mannose is linked to either non-reducing terminal  
5 Man, preferably Man<sub>α</sub>6 branch, and the oligosaccharide sequence according to the present invention to the other branch of the molecule.

In a preferred embodiment optimal antigenic epitope comprising structures OS<sub>β</sub>2Man, OS<sub>β</sub>2Man<sub>α</sub>3Man, or OS<sub>β</sub>2Man<sub>α</sub>6Man are used. These are partial epitopes of the N-glycan lactiNAc primarily observed by the present invention. In a separate embodiment it  
10 is also realized that because of the glycosylation defects in cancer cells, O-glycan type lactiNAc and partial lactosamine type lactiNAcs comprising similar optimal antigenic epitopes OS<sub>β</sub>3Gal, OS<sub>β</sub>3GalNAc and especially OS<sub>β</sub>6Gal, OS<sub>β</sub>6GalNAc are useful for immunization and other uses according to the present invention against tumors comprising  
15 these structures. Such tumors are characterized by lactiNAc type secretory functions combined with lactosamine and or mucin production.

The cancer specific oligosaccharides or derivatives or analogs thereof can be immobilized for the purification of antibodies from serum, preferably from human serum. The cancer  
20 specific oligosaccharides, preferably as polyvalent conjugates, can also be used for the detection and/or quantitation of antibodies binding to these cancer specific oligosaccharides, for example, in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or affinity chromatography type assay formats for the diagnostics of cancer.

Antibody production or vaccination can be also achieved by analogs or derivatives of the cancer specific oligosaccharide sequences. Simple analogs of the N-acetyl-group containing oligosaccharide sequences include compounds with modified N-acetyl groups,  
25 for example, N-acyl such as N-propanoyl. The present invention is also directed for production of specific analogs for the cancer specific oligosaccharide sequences as described by the invention.  
30

Furthermore, it is possible to use human antibodies or humanized antibodies against the cancer specific oligosaccharide sequences to reduce the growth of or to destroy a tumor or cancer. Human antibodies can also be tolerated analogs of natural human antibodies

WO 03/016464

15

PCT/FI02/00674

against the cancer specific oligosaccharide sequences; the analogs can be produced by recombinant gene technologies and/or by biotechnology and they may be fragments or optimized derivatives of human antibodies. Purified natural anti-tumor antibodies can be administered to a human without any expected side effect as such antibodies are transferred during regular blood transfusions. This is true under conditions that the cancer specific structures are not present on normal tissues or cells and do not vary between individuals as blood group antigens do, however, such blood-group-like variations are not known for the cancer specific oligosaccharide sequences of the invention. In another embodiment of the invention species specific animal antibodies are used against a tumor or cancer of the specific animal. The production of specific humanized antibodies by gene engineering and biotechnology is also possible: the production of humanized antibodies has been described in US patents Nos. 5,874,060 and 6,025,481, for example. The humanized antibodies are designed to mimic the sequences of human antibodies and therefore they are not rejected by immune system as animal antibodies are, if administered to a human patient. It is realized that the method to reduce the growth of or to destroy cancer applies both to solid tumors and to cancer cells in general. It is also realized that the purified natural human antibodies recognizing any human cancer specific antigen, preferably an oligosaccharide antigen, can be used to reduce the growth of or to destroy a tumor or cancer. In another embodiment species specific animal antibodies are used against a tumor or cancer of the specific animal.

According to the invention human antibodies or humanized antibodies against the cancer specific oligosaccharides, or other tolerated substances binding the cancer specific oligosaccharides, are useful to target toxic agents to tumor or to cancer cells. The toxic agent could be, for example, a cell killing chemotherapeutics medicine, such as doxorubicin (Arap et al., 1998), a toxin protein, or a radiochemistry reagent useful for tumor destruction. Such therapies have been demonstrated and patented in the art. The toxic agent may also cause apoptosis or regulate differentiation or potentiate defence reactions against the cancer cells or tumor. In another embodiment of the invention species specific animal antibodies are used against a tumor or cancer of the specific animal. The cancer binding antibodies according to the present invention can also be used for targeting prodrugs active against cancer or enzymes or other substances converting prodrugs to active toxic agents which can destroy or inhibit cancer, for example in so called ADEPT-approaches.

The therapeutic antibodies described above can be used in pharmaceutical compositions for the treatment or prevention of cancer. The method of treatment of the invention can also be used when patient is under immunosuppressive medication or he/she is suffering from immunodeficiency.

Immunosuppressive medications are used, for instance, with organ transplantations to prevent rejection during kidney, heart, liver or lung transplantations. Malignancies arising during such therapies are in general benign, but they cause often the loss of the precious organ transplant. Capability of producing antibodies against the tumor or cancer specific antigens may vary according to individual differences in immune system. Persons who have survived from cancer may have especially high amounts of natural anti-cancer antibodies.

15 Other methods for therapeutic targeting of cancers

It is realized that numerous other agents beside antibodies, antibody fragments, humanized antibodies and the like can be used for therapeutics targeting cancers similarly with the diagnostic substances. It is specifically preferred to use non-immunogenic and tolerable substances to target cancer. The targeting substances binding to the cancer comprise also specific toxic or cytolytic or cell regulating agents which lead to destruction or inhibition of cancer. Preferably the non-antibody molecules used for cancer targeting therapies comprise molecules specifically binding to the cancer specific oligosaccharide sequences according to the present invention are aptamers, lectins, genetically engineered lectins, enzymes recognizing LacdiNAc-structure such as glycosidases and glycosyltransferase and genetically engineered variants thereof. Labelled bacteria, viruses or cells or other polymeric surfaces containing molecules recognizing the structures can be used for the cancer targeting therapies. The cancer binding non-antibody substances according to the present invention can also be used for targeting prodrugs active against cancer to cancers or enzymes or other substances converting prodrugs to active toxic agents which can destroy or inhibit cancer.

The present invention is specifically directed to the use of substances and antibodies binding to cancer specific oligosaccharide sequences according to the present invention for therapies in gastrointestinal tract of the patient, preferably in human patient. The

WO 03/016464

17

PCT/FI02/00674

therapeutic antibodies for use in human gastrointestinal tract may be antibodies produced by animals for example antibodies in milks of domestic animals, for example in milk of domestic ruminants such as cows, sheep, goat or buffalo or antibodies produced in hen eggs. The animals can be immunized by cancer specific carbohydrate conjugates as known in the art. The present invention is also directed to other acceptable, preferably food acceptable proteins which can be used in inhibition or destruction of cancers in human gastrointestinal tract, such substances include plant lectins which are specific for the cancer specific oligosaccharide sequences. The present invention is directed to functional foods and food additives containing antibodies recognizing the cancer specific oligosaccharide sequences according to the present invention in gastrointestinal tract, the present invention is also directed to the use of other food acceptable substances especially lectins binding to the cancer specific oligosaccharide sequences of gastrointestinal tract in functional foods or as food additives.

Furthermore according to the invention the cancer specific oligosaccharide sequences or analogs or derivatives thereof can be used as cancer vaccines in human to stimulate immune response to inhibit or eliminate cancer cells. The treatment may not necessarily cure cancer but it can reduce tumor burden or stabilize a cancer condition and lower the metastatic potential of cancers. For the use as vaccines the oligosaccharides or analogs or derivatives thereof can be conjugated, for example, to proteins such as BSA or keyhole limpet hemocyanin, lipids or lipopeptides, bacterial toxins such as cholera toxin or heat labile toxin, peptidoglycans, immunoreactive polysaccharides, or to other molecules, cells or cell preparations activating immune reactions against a vaccine molecule. A cancer vaccine may also comprise a pharmaceutically acceptable carrier and optionally an adjuvant. Suitable carriers or adjuvants are, e.g., lipids known to stimulate the immune response. The saccharides or derivatives or analogs thereof, preferably conjugates of the saccharides, can be injected or administered mucosally, such as orally or nasally, to a cancer patient with tolerated adjuvant molecule or adjuvant molecules. The cancer vaccine can be used as a medicine in a method of treatment against cancer. Preferably the method is used for the treatment of a human patient. Preferably the method of treatment is used for the treatment of cancer of a patient, who is under immunosuppressive medication or the patient is suffering from immunodeficiency.

WO 03/016464

18

PCT/FI02/00674

Furthermore it is possible to produce a pharmaceutical composition comprising the cancer specific oligosaccharide sequences or analogs or derivatives thereof for the treatment of cancer. Preferably the pharmaceutical composition is used for the treatment of a human patient. Preferably the pharmaceutical composition is used for the treatment of cancer, 5 when patient is under immunosuppressive medication or he/she is suffering from immunodeficiency. The methods of treatment or the pharmaceutical compositions described above are especially preferred for the treatment of cancer diagnosed to express the cancer specific oligosaccharide sequences of the invention. The methods of treatment or the pharmaceutical compositions can be used together with other methods of treatment 10 or pharmaceutical compositions for the treatment of cancer. Preferably the other methods or pharmaceutical compositions comprise cytostatics, anti-angiogenic pharmaceuticals, anti-cancer proteins, such as interferons or interleukins, or a use of radioactivity.

Use of antibodies for the diagnostics of cancer and for the targeting of drugs to cancer has 15 been described with other antigens and oligosaccharide structures (US 4,851,511; US 4,904,596; US 5,874,060; US 6,025,481; US 5,795,961; US 4,725, 557; US 5,059,520; US 5,171,667; US 5,173,292; US 6,090,789; US 5,708,163; US 5,902,725 and US 6,203,999). Use of cancer specific oligosaccharides as cancer vaccines has also been demonstrated with other oligosaccharide sequences (US 5,102,663; US 5,660,834; US 20 5,747,048; US 5,229,289 and US 6,083,929).

The substance according to the invention can be attached to a carrier. Methods for the linking of oligosaccharide sequences to a monovalent or multivalent carrier are known in the art. Preferably the conjugation is performed by linking the cancer specific 25 oligosaccharide sequences or analogs or derivatives thereof from the reducing end to a carrier molecule. When using a carrier molecule, a number of molecules of a substance according to the invention can be attached to one carrier increasing the stimulation of immune response and the efficiency of the antibody binding. To achieve an optimal antibody production, conjugates larger than 10 kDa carrying typically more than 10 30 oligosaccharide sequences are preferably used.

The oligosaccharide sequences according to the invention can be synthesized, for example, enzymatically by glycosyltransferases, or by transglycosylation catalyzed by a glycosidase enzyme or a transglycosidase enzyme, for review see Ernst et al., 2000. Specificities of the

WO 03/016464

19

PCT/FI02/00674

enzymes and their use of co-factors such as nucleotide sugar donors, can be engineered. Specific modified enzymes can be used to obtain more effective synthesis, for example, glycosynthase is modified to achieve transglycosylation but not glycosidase reactions. Organic synthesis of the saccharides and conjugates of the invention or compounds similar to these are known (Ernst et al., 2000). Carbohydrate materials can be isolated from natural sources and be modified chemically or enzymatically into compounds according to the invention. Natural oligosaccharides can be isolated from milks of various ruminants and other animals. Transgenic organisms, such as cows or microbes, expressing glycosylating enzymes can be used for the production of saccharides.

5

10 It is possible to incorporate an oligosaccharide sequence according to the invention, optionally with a carrier, in a pharmaceutical composition, which is suitable for the treatment of cancer in a patient. Examples of conditions treatable according to the invention are cancers in which the tumor expresses one or more of the cancer specific oligosaccharides described in the invention. The treatable cancer cases can be discovered

15 by detecting the presence of the cancer specific oligosaccharide sequences in a biological sample taken from a patient. Said sample can be, e.g., a biopsy or a blood sample.

It is possible to inhibit the formation of cancer antigens described in the invention by specific inhibitors of LacdiNAc biosynthesis. Such inhibitors maybe analogs of donor nucleotide UDP-GalNAc. Methods to produce inhibitory analogs for glycosyltransferases have been described in the art. Preferably the inhibitor has specificity towards LacdiNAc synthesising GalNAc-transferase.

20

Alternatively an essentially non-antigenic chemically and/or enzymatically synthesised oligo- or polyvalent conjugate of the cancer specific oligosaccharide sequences of the invention can be used to prevent the adhesion and/or growth of cancer cells. As the antigenicity of the conjugates would cause the removal of inhibitory oligomers or polymers from blood circulation by antibodies. Examples of antigenic substances of the invention have been described above. A non-antigenic polysaccharide conjugate can be constructed according to Formula II with the proviso that X, Y or Z are not immunogenic. Preferably the molecular weight of the conjugate is under 50 kilodaltons (kDa) and more preferably under 10 kDa. The oligosaccharide sequences of the invention can also be conjugated to a non-protein carrier. Preferably the cancer specific oligosaccharide

25

30

WO 03/016464

20

PCT/FI02/00674

sequence is conjugated to a non-immunogenic polysaccharide and most preferably the molecular weight of the conjugate is under 10 kDa.

5 As selectin carbohydrate interactions mediate cancer metastasis, the LacdiNAc-type glycosylations may target metastasing cancer cells to selectin containing sites on blood vessel endothelium as such structures are known to be potent selectin ligands (Grinnel et al., 1994; Jain et al., 1998). LacdiNAc saccharides have immunomodulatory activities which may protect them from immune response as discussed in Dell et al. (1995). The terminal GalNAc residues may also target cancer cells towards asialoglycoprotein  
10 receptors of liver (Yang et al., 2000). By preventing LacdiNAc-biosynthesis in cancer cells the metastatic potential and possibly the malignancy of the cancer is reduced. The present invention is especially directed to the prevention of lacdiNAc biosynthesis for prevention of metastatic potential of cancer cells. The optimal antigenic epitopes are not designed as metastasis inhibitors. The vaccine type approach uses really low amounts of  
15 lacdiNAc structures so that selectin mediated cell adhesion, which is necessary also for normal immune system and leukocyte function, is not prevented.

The pharmaceutical composition according to the invention may also comprise other substances, such as an inert vehicle, or pharmaceutically acceptable carriers, preservatives  
20 etc., which are well known to persons skilled in the art.

The substance or pharmaceutical composition according to the invention may be administered in any suitable way. Methods for the administration of therapeutic  
25 antibodies or vaccines are well-known in the art.

The term "treatment" used herein relates to both treatment in order to cure or alleviate a disease or a condition, and to treatment in order to prevent the development of a disease or  
30 a condition. The treatment may be either performed in a acute or in a chronic way.

The term "patient", as used herein, relates to any mammal in need of treatment according to the invention.

When a cancer specific oligosaccharide or compound specifically recognizing cancer specific oligosaccharides of the invention is used for diagnosis or typing, it may be

WO 03/016464

21

PCT/FI02/00674

included, e.g., in a probe or a test stick, optionally in a test kit. When this probe or test stick is brought into contact with a sample containing antibodies from a cancer patient or cancer cells or tissue of a patient, components of a cancer positive sample will bind the probe or test stick and can be thus removed from the sample and further analyzed.

5

In the present invention the term "cancer" means "tumor" or "cancer cells". The term "tumor" means solid multicellular tumor tissues. Furthermore the term "tumor" means herein premalignant tissue, which is developing to a solid tumor and has cancer specific characteristics. The term "tumor" is not referring herein to a single cell cancer such as a leukaemia or to cultured cancer cells or a cluster of such cells. The expression "cancer cells" means herein cells in tumor or single cancer cells such as leukaemia cells or any other type of malignant cells, which are developing to a cancer or tumor form and have cancer or cancer specific characteristics.

15 Enzymatic synthesis of laciNac structures and fucosylated laciNac structures and analogs thereof

Terminal laciNac epitope can be synthesized by using large amounts of  $\beta$ 4-galactosyltransferase (e.g. a commercially available bovine milk galactosyltransferase) and molar excess of UDP-GalNAc in comparison to the acceptor. For example incubations of  
20 UDP-GalNAc with GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc with relatively large amounts of  $\beta$ 4-galactosyltransferase as described in (Nyame, et al 2000) gives GalNAc $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc.

The reactions can also be performed by novel recombinant form of galactosyltransferase  
25 which can transfer GalNAc effectively from UDP-GalNAc (Ramakrishnan et al., 2001 ).

The GalNAc $\beta$ 4GlcNAc epitope or its sialylated derivative NeuNAc $\alpha$ 3GalNAc $\beta$ 4GlcNAc can be fucosylated by several types of  $\alpha$ 3-fucosyltransferases, for example by fucosyltrasferases from human milk essentially as described in Bergwerff et al. 1993 or by  
30 fucosyltransferase VI.

Production of novel GalN derivatives, especially laciNac structures and analogs thereof

Present invention is also directed to novel pathways of enzymatic synthesis. These can be used in vitro for production of laciNac-structures, related structures and analogs. Prior art

WO 03/016464

22

PCT/FI02/00674

has described glycosidase reactions on hexosamines and use of hexosamine donors for glycosidase reactions. The present invention is directed to the use of terminal hexosamines especially galactosamine and GalN $\beta$ 4Glc(NAc)- terminal structures as acceptors for various glycosyltransferases which normally use acceptor structures comprising for  
5 example terminal Gal or GalNAc residue.

These reactions have not previously been described and the positive charge of amine group close to negatively charged nucleotide sugar donor could have prevented the reactions. The charged aminogroup could also prevent recognition by enzymes requiring  
10 hydroxyl group in 2-position of the acceptor or cause undesired irreversible binding to the active site of the enzyme. The present invention shows for the first time that the novel glycosyltransferase reactions are possible and that the reactions are possible even by mammalian glycosyltransferases. In comparison to glycosidase catalysed reactions the glycosyltransferase reactions are specific forming in general only one type of products  
15 from a pair of donor and acceptor substrates, while the glycosidase catalysed transglycosylation reaction yield in general several products.

Previously lacdiNAc derivatives have been synthesized by forcing the enzymes using Gal acceptors to use GalNAc. Yields in these methods are in general very poor. Some of the  
20 reactions with certain transferases may not be more effective than reactions with terminal GalNAc, but the presence of amine allows specific synthesis of amine derivatives or analogs of natural Gal/GalNAc sequences.

The novel reactions also reveal potential biosynthetic pathways to novel malignant or  
25 disease associated antigenic structures, which have not been characterized from normal tissues. Especially novel blood group related antigens are produced by natural glycosylation enzymes.

Preferred reactions include glycosyltransferase reactions to 3, 4, or 6 position of the  
30 terminal hexosamine, preferably galactosamine and more preferably to 3 or 6 position of the galactosamine and most preferably to 3-position of galactosamine. Preferred reactions include:  $\alpha$ 3-sialyltransferase reactions,  $\alpha$ 6-sialyltransferase reactions,  $\alpha$ 3-galactosyltransferase reactions,  $\alpha$ 3-N-acetylgalactosaminyltransferase reactions,  $\alpha$ 3-galactosaminyltransferase reactions,  $\beta$ 3-N-acetylglucosaminyltransferase reactions,  $\beta$ 6-N-

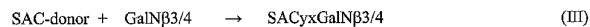
WO 03/016464

23

PCT/FI02/00674

acetylglucosaminylreactions,  $\beta$ 3-N-acetylgalactosaminylreactions,  $\beta$ 3-glucuronyltransferase reactions. Most preferred reactions include  $\alpha$ 3-sialyltransferase reactions,  $\alpha$ 3-galactosaminyltransfer reactions and  $\alpha$ 3-galactosyltransferase reactions.

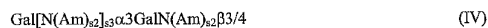
5 Preferred synthesis reactions are according to the formula



wherein y is  $\alpha$ - or  $\beta$ -linkage and independently x is linkage position 3, 4, or 6,

10 SAC is sialic acid, or  $\text{Hex}(\text{A})_{s1}[\text{N}(\text{Ac})_{s2}]_{s3}$  wherein Hex is Gal or Glc and  $s1$ ,  $s2$ ,  $s3$  are independently 0 or 1, with the proviso that when  $s1$  is 1, then  $s3$  is 0. When  $s1$  is 1, the SAC-structure comprises hexuronic acid structure, preferably GlcA. When  $s3$  is 1 and  $s2$  is 1, the SAC-structure is GlcNAc or GalNAc, and when  $s2$  is 0 the structure is GalN or GlcN. GalN $\beta$ 3/4 indicates nonreducing terminal GalN which is  $\beta$ 3- or  $\beta$ 4-linked to a  
 15 hexose or hexosamine or hexosamine derivative, preferably Gal, GalN, GalNAc, Glc, GlcN, or GlcNAc. In a preferred embodiment GalN $\beta$ 4 is part of non reducing terminal structure GalN $\beta$ 4GlcNAc or GalN $\beta$ 4Glc, for example GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc.

The present invention is further directed to novel carbohydrate substances according to the  
 20 formula



wherein Am is a derivatization residue of amine amine group, with the provision that Am  
 25 is not acetyl (Ac) or an imidogroup, preferably Am is carboxylic acid forming amide with the GalN residue such as formamide, propanoic acid amide, and other alkyl amides, and cyclic amides including amides of cyclohexane radical comprising carboxylic acid and amides with aromatic hydrocarbons, for example amides of benzoic acids. Acetyl group is not preferred for the analog substances as it is present in natural oligosaccharide  
 30 sequences, bulky imidogroups such as phtalimido-group are not preferred because of the large size of the group which would change too much the conformation of the analog.  $s2$ ,  $s3$  are independently 0 or 1.

WO 03/016464

24

PCT/FI02/00674

More preferred substances include terminal oligosaccharide sequences

$\text{Gal}[\text{N}(\text{Am})_2]_3\alpha 3\text{GalN}(\text{Am})_2\beta 4\text{GlcNAc}$  and  $\text{Gal}[\text{N}(\text{Am})_2]_3\alpha 3\text{GalN}(\text{Am})_2\beta 4\text{Glc}$

And most preferred terminal oligosaccharide sequences includes

$\text{Gal}\alpha 3\text{GalN}(\text{Am})_2\beta 4\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Gal}\alpha 3\text{GalN}(\text{Am})_2\beta 4\text{Glc}$ , and

5  $\text{Gal}\alpha 3\text{GalN}\beta 4\text{GlcNAc}$  and  $\text{Gal}\alpha 3\text{GalN}\beta 4\text{Glc}$ .

The novel substances are especially useful for use as antigens and immunization. The rare and mostly non-natural or pathogenesis related structures are useful immunogens which can be used for inducing production of antibodies which also recognize related structures.

10 Amine containing substances are also useful starting materials for production of further analogs, for testing as glycosidase substrates and/or inhibitors and testing as analogs of natural oligosaccharide sequences for binding of animal or plant lectins.

The present invention is also directed to combined reactions in which UDP-GalN is first transferred to acceptor, for example to GlcNAc or Glucose or non-reducing end terminal GlcNAc or glucose and in the same reaction vessel the GalN is modified to 3, 4, or 6-position, preferably to 3, or 6 position and most preferably to 3 position. In another combined reaction UDP-GalN is formed simultaneously in the same reaction with two glycosyltransferases. Methods to produce UDP-GalN in situ for the reaction have been

15

20 previously described.

The present invention preferably uses a simplified process in which UDP-GalN is generated from GalN1-phosphate and UDP-Glc. Preferred embodiment about synthesis of laciNAc -type structures include N-acetylation of the hexosamine preferably to N-acetylhexosamine such as GalN to GalNAc.

25

In a preferred embodiment, analogs of an N-acetylhexosamine or hexose comprising oligosaccharides are produced, preferably laciNAc analog products are desired. The present invention is also directed to production of amine derivatives of the hexosamine, preferred amine analogs or derivatives of hexosamine include amides such as formamide, propanoic acid amide, and other alkyl amides, and cyclic amides including amides of cyclohexane radical comprising carboxylic acid and amides with aromatic hydrocarbons, for example amides of benzoic acids.

30

WO 03/016464

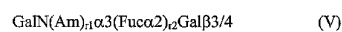
25

PCT/JP02/00674

In a preferred embodiment a hexosamine is transferred to a hexosamine by a glycosyltransferase, preferably galactosamine is transferred to galactosamine, most preferably the product GalN $\alpha$ 3GalN $\beta$ 4GlcNAc is formed, this product can be further modified to GalNAc $\alpha$ 3GalNAc $\beta$ 4GlcNAc or analogs according to the present invention by derivatization of aminogroups.

In a separate embodiment UDP-GalN is transferred by a  $\alpha$ -galactosyltransferase, or  $\alpha$ -GalNAc transferase, preferably by  $\alpha$ 3-galactosyltransferase, to Gal $\beta$ -terminal containing acceptor. The amine groups can be further derivatized to N-acetyl groups or analogs comprising derivatized amine group. Preferably products of the process are for example GalNAc $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc, GalN $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc, GalNAc $\alpha$ 3(Fuca2)Gal $\beta$ 4, GalN $\alpha$ (Fuca2)3Gal $\beta$ 4, GalNAc $\alpha$ 3(Fuca2)Gal $\beta$ 3, GalN $\alpha$ (Fuca2)3Gal $\beta$ 3, GalNAc $\alpha$ 3(Fuca2)Gal $\beta$ 4GlcNAc, GalN $\alpha$ (Fuca2)3Gal $\beta$ 4GlcNAc, which corresponds to human A/B-blood groups antigen terminal structures and analogs.

The present invention is further directed to novel carbohydrate substances according to the formula



wherein  $r1$  and  $r2$  are independently 0 or 1, Am is a derivatization residue of amine group, with the provision that Am is not acetyl (Ac) or an imidogroup, preferably Am is carboxylic acid forming amide with the GalN such as formamide, propanoic acid amide, and other alkyl amides, and cyclic amides including amides of cyclohexane radical comprising carboxylic acid and amides with aromatic hydrocarbons, for example amides of benzoic acids. Acetyl group is not preferred for the analog substances as it is present in natural oligosaccharide sequences, bulky imidogroups such as phthalimido-group are not preferred because of the large size of the group which would change too much the conformation of the analog.

More preferred substances includes terminal oligosaccharide sequences  
GalN $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc and GalN $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc  
GalN $\alpha$ 3(Fuca2)Gal $\beta$ 4GlcNAc and GalN $\alpha$ (Fuca2)3Gal $\beta$ 4Glc  
GalNAc $\alpha$ 3(Fuca2)Gal $\beta$ 4GlcNAc and GalNAc $\alpha$ (Fuca2)3Gal $\beta$ 4Glc

WO 03/016464

26

PCT/FI02/00674

GalNA $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc and GalNA $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc.

And most preferred substances includes terminal oligosaccharide sequences

GalNA $\alpha$ 3(Fuc $\alpha$ 2)Gal $\beta$ 4GlcNAc and GalNA $\alpha$ (Fuc $\alpha$ 2)3Gal $\beta$ 4Glc

GalNA $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc and GalNA $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4Glc.

5

The novel substances are especially useful for use as antigens and immunization. The rare and mostly non-natural or pathogenesis related structures are useful immunogens which can be used for inducing production of antibodies which also recognize related structures.

10 Amine containing substances are also useful starting materials for production of further analogs, for testing as glycosidase substrates and/or inhibitors and testing as analogs of natural oligosaccharide sequences for binding of animal or plant lectins.

Present invention is specifically directed to the use of novel substances according to the present invention for immunization, and for screening of binding of lectins and antibodies. The present invention is especially directed to screening of specificities of antibodies binding to blood group antigens and screening related antibodies.

20 The present invention is specifically directed to the diagnostic and/or treatment of oral cancers including preferably cancer of larynx and leukemia-type cancers which express oligosaccharide sequences according to the present invention. The present invention is also specifically directed to the treatment according to the present invention for any type of cancer which has surface expression of the lacdiNAc structures according to the present invention. In another preferred embodiment the present invention is directed to the treatment of cancers from tissues which normally express and secrete proteins comprising  
25 lacdiNAc sequences, such tissues include glycoprotein hormone secreting tissues.

Glycolipid and carbohydrate nomenclature is according to recommendations by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (Carbohydr. Res. 1998, 322:167; Carbohydr. Res. 1997, 297:1; Eur. J. Biochem. 1998, 257:29).

It is assumed that Gal, Glc, GlcNAc, and NeuNAc are of the D-configuration, Fuc of the L-configuration, and that all monosaccharide units are in the pyranose form. Glucosamine

WO 03/016464

27

PCT/FI02/00674

is referred as GlcN and galactosamine as GalN. Glycosidic linkages are shown partly in shorter and partly in longer nomenclature, the linkages  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 6 of the NeuNAc-residues mean the same as  $\alpha$ 2-3 and  $\alpha$ 2-6, respectively, and  $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-4, and  $\beta$ 1-6 can be shortened as  $\beta$ 3,  $\beta$ 4, and  $\beta$ 6, respectively. Lactosamine or N-acetyllactosamine or Gal $\beta$ 3/4GlcNAc means either type one structure residue Gal $\beta$ 3GlcNAc or type two structure residue Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, and sialic acid is N-acetylneuraminic acid or NeuNAc, Lac refers to lactose and Cer is ceramide. SA refers to sialic acid such as NeuNAc. The cancer associated disacchride sequence according to the invention, GalNAc $\beta$ 4GlcNAc, is referred as lacdiNAc or LacdiNAc.

The present invention is further illustrated in examples, which in no way are intended to limit the scope of the invention:

#### EXAMPLES

##### EXAMPLE I

###### Methods for analysis of MMP-9

###### *Isolation of MMP-9*

MMP-9 was isolated from U-937 cells by sequential CM-cellulose (CM-52) chromatography followed by DEAE/Red Sepharose chromatography (Saarinen et al, 1999).

###### *4-vinylpyridine alkylation of MMP-9*

MMP-9 was concentrated and desalted by reversed-phase chromatography (RP-HPLC) on a 2.1x150-mm Poros<sup>®</sup> R2 column by elution with a linear gradient of acetonitrile (3-100% in 15 min) in 0.1% trifluoroacetic acid. Chromatography was performed at a flow rate of 1 ml/min and elution was monitored by UV absorbance at 214 nm. The eluted MMP-9 was vacuum-dried and subjected to alkylation as follows: a sample was dissolved in 80  $\mu$ l of 6M guanidine hydrochloride, 2mM EDTA, 0.5M Tris pH 7.5, reduced by addition of 5  $\mu$ l of 0.6M DTT, and incubated for 20 minutes at room temperature. After reduction, 1  $\mu$ l of 4-vinylpyridine was added, followed by alkylation for 15 minutes at room temperature.

WO 03/016464

28

PCT/FI02/00674

The reaction was quenched by addition of 5  $\mu$ l of 0.6M DTT. The alkylated MMP-9 was immediately desalted by RP-HPLC, as described above.

*Trypsin digestion*

- 5 2.5  $\mu$ g (100 pmol) of alkylated MMP-9 was vacuum-dried and dissolved in 40  $\mu$ l of 50 mM ammonium bicarbonate buffer containing 1.66 ng/ $\mu$ l of trypsin (Promega sequencing grade). Digestion was performed overnight at 37 C.

*Mass spectrometry*

- 10 MALDI-TOF MS was performed on a Biflex (Bruker Franzen Analytik) time of flight instrument equipped with a nitrogen laser operating at 337 nm. The total MMP-9 N-glycans, as well as the results of the NDV sialidase reactions were analysed in the linear positive ion delayed extraction mode using 2,4,6-trihydroxyacetophenone (Fluka Chemie AG, 3 mg/ml in acetonitrile/20 mM aqueous diammonium citrate, 1:1, v/v ) as the matrix.
- 15 The C perfringens sialidase and the fucosidase treated glycans were analysed in the reflector positive ion delayed extraction mode using 2,5-dihydrobenzoic acid (10 mg/ml) as the matrix. The spectra were externally calibrated with dextran 5000 (Fluka Chemie AG).
- 20 Electrospray ionization (ESI) mass spectra were collected using a Micromass Q-TOF hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Micromass, UK). Ionization was accomplished by directing the LC eluent through a nanospray ion source equipped with a silica capillary needle 20  $\mu$ m i.d., 10  $\mu$ m tip opening, gold-coated from the distal end (New Objective Inc), operating at 2.2 kV.

25

*Localization of glycosylation sites by nanoflow LC/MS.*

A sample of MMP-9 tryptic peptides (1 pmol) was separated by microbore reversed-phase HPLC on a 0.075 x 150 mm PepMap column (NAN75-15-03-C18-PM, LC Packings) by elution with a linear gradient of acetonitrile (4-40% in 30 min) in 0.1% formic acid.

- 30 Chromatography was performed at a flow rate of 250 nl/min and the UV absorbance at 214 nm was recorded. LC was directly coupled to a Micromass Q-TOF mass spectrometer. The mass spectrometer was set to scan the HPLC eluent at both low and high cone settings to facilitate identification of the glycosylated components, as described previously (Carr *et al.*, 1993). A low cone scan was acquired with a cone voltage of 35 V, scanning over a

WO 03/016464

29

PCT/FI02/00674

- mass range of  $m/z$  100 to 2500, thus providing a mass spectrum of the eluting components. A high cone scan was acquired with a cone voltage of 120 V, which applies a high collisional excitation potential to all ions during their entry into the mass spectrometer. This leads to collision-induced fragmentation of the entering ions prior to mass separation.
- 5 During a high cone potential scan the mass spectrometer was set to scan from  $m/z$  100 to 1000. Reconstituted chromatograms were then created for 204.1 (oxonium ion of HexNAc) and  $m/z$  292.15 (oxonium ion of Neu5Ac) and  $m/z$  366.1 (oxonium ion of Hex-HexNAc), thus providing chromatograms selective for eluting glycopeptides.
- 10 Analysis of LacdiNAc structures from leukaemia cells  
To demonstrate abnormal expression of LacdiNAc sequence on cancer cells metalloproteinase-9 (MMP-9) was isolated from leukaemia cells (U-937), and N-glycosidic glycans were liberated with N-glycosidase F. The glycan fraction was analyzed with MALDI-TOF MS in trihyxroacetophenone matrix (Fig. 1A), which has been shown
- 15 to cause negligible fragmentation of sialic acid residues. The assignment of the monosaccharide compositions as well as the proposed structures according to the subsequent glycosidase treatments are shown in Table 1. The relative abundances of the components are indicated as well, as oligosaccharide analysis in MALDI-TOF has been shown to be relatively quantitative. The most abundant glycan species was assigned to
- 20  $[M+Na]^+$  of  $(Hex)_3(HexNAc)_4(Fuc)_3$ . Knowing the typical N-glycan structures, we tentatively assigned this structure as a trifucosylated diantennary complex-type glycan. Other major species were identified as sialylated, difucosylated diantennary complex-type glycan, and trifucosylated diantennary complex-type glycan carrying GalNAc instead of Gal as a terminal monosaccharide (so called LacdiNAc structure) in one antennae. These
- 25 assignments were found to be correct, as shown by sequential glycosidase treatments. For comparison the matrix metalloproteinase MMP-9 structures in non-malignant white blood cells (leukocytes) has been determined, the protein did not contain lacdiNAc sequences (Rudd et al, 1999).
- 30 Structural characterization of the glycans was performed by sequential glycosidase treatments, which were monitored by MALDI-TOF MS. To distinguish the two plausible Neu5Ac linkages ( $\alpha$ -3 vs.  $\alpha$ -6), the glycan mixture was treated with NDV neuraminidase, an enzyme strictly specific for  $\alpha$ -3-neuraminic acid. Partial cleavage could be observed (Fig. 1B) that may arise from SA  $\alpha$ -3GalNAc bond, which has been shown

WO 03/016464

30

PCT/FI02/00674

to resist the action of NDV sialidase. Other possibility is the presence of both  $\alpha$ 2-3 and  $\alpha$ 2-6 linked SA. Treatment of the N-glycan fraction with a broad specificity neuraminidase (*Clostridium perfringens*) resulted in following changes (Fig 1C): Signals at  $m/z$  2247.3, 2287.9, and 2392.3 disappeared, and signals appeared at  $m/z$  1809.70, 1850.78, 1891.75, 1955.77, and 1996.79. The results indicate the presence of differentially fucosylated forms of normal biantennary N-glycans, biantennary N-glycans carrying LacdiNAc structure (GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc) in one of the antennae, and a minor amount of N-glycans carrying LacdiNAc structure in both of the antennae. Treatment of the sample by Almond meal  $\alpha$ 1-3(4)fucosidase (which removes the  $\alpha$ 1-3(4) linked fucose residues from the antennae, but does not cleave the  $\alpha$ 1-6 linked fucose residue from the N-glycan core) led to appearance of signals at 1809.80, 1850.78, and 1891.84 (67%, 27% and 6% of intensity). These results indicate that approximately 30 % of the glycans carry LacdiNAc sequence in either one or both of the antennae. This result is well in accordance with the LC-ESI MS data presented below.

MMP-9 was isolated from U-937 cells, alkylated, and digested with trypsin. To identify the glycopeptides, we conducted an LC/MS analysis of tryptic peptides from MMP-9, using stepped cone voltages to obtain both the total ion chromatogram (Fig. 2A) and chromatograms showing potential glycopeptides (Fig. 2 B, C and D). It should be noted that in the chromatography setup used in this study (i.e. PepMap media run in 0.1% formic acid-acetonitrile), the separation of glycopeptides is affected by both the peptide moiety and the glycan moiety. In the more commonly used trifluoroacetic acid-acetonitrile system, the separation of the glycopeptides is dominated by the peptide moiety alone. This leads to elution of the glycopeptides as two major peaks eluting at 23.1 and 24.3 minutes.

The mass spectrum of the material eluting at 23.1 min is presented in Fig. 3A, and shows signals which could all be assigned to glycosylated peptide Trp<sup>116</sup>-Arg<sup>134</sup>, carrying complex-type glycans (see Table 1). The most intense ion in this spectrum at  $m/z$  1143.49 is assigned to  $[M+4H]^{4+}$  of Trp<sup>116</sup>-Arg<sup>134</sup>, carrying (Hex)<sub>5</sub>(HexNAc)<sub>4</sub>(Fuc)<sub>3</sub>. The mass spectrum of the material eluting at 24.3 min is presented in Fig. 3B. The most intense ion in this spectrum at  $m/z$  1179.54 is assigned to  $[M+4H]^{4+}$  of Trp<sup>116</sup>-Arg<sup>134</sup>, carrying (Hex)<sub>5</sub>(HexNAc)<sub>4</sub>(Fuc)<sub>2</sub>(SA).

The present invention shows that U-937-cell derived MMP-9 carries LacdiNAc structures in large fraction (approximately 30%) of its N-glycans. The presence of LacdiNAc structures was verified by two independent methods, namely MALDI-TOF analysis of liberated N-glycans as well as LC-ESI MS of intact glycopeptides. The assignments of the structures were further confirmed by sequential glycosidase treatments. The methods used in this study have been verified by several approaches using both known natural structures as well as synthetic oligosaccharides.

Sialylated N-glycans that contain LacdiNAc sequences from larynx cancer.

Human melanoma cell (RPMI-7932 and RPMI-7951) membrane protein N-glycans that contain LacdiNAc, sialyl-LacdiNAc, and fucosyl-LacdiNAc sequences.

## EXAMPLE II

### Analysis of solid tumor and melanoma cell membranes

*Cancer sample material.* The larynx cancer sample was a formalin-fixed tumor specimen collected during a surgical operation. Prior to glycan isolation, proteins were enriched by chloroform-methanol extraction essentially as described in (Manzi *et al.*, 2000). Quantitative extraction of glycoproteins was confirmed by radioactively labelled glycoprotein standards (not shown).

*Isolation of glycans from chloroform-methanol extracted proteins.* Glycans were detached from sample glycoproteins by non-reductive  $\beta$ -elimination and purified by chromatographic methods.

*Isolation of human melanoma cell membrane proteins.* Human melanoma cells (RPMI-7932 and RPMI-7951) were washed with phosphate buffered saline (PBS) at room temperature, scraped off from cell culture dishes, and collected by centrifugation. Thereafter, the purification process continued at +0 – +4 °C. The cells were incubated in hypotonic buffer, 25 mM Tris-HCl pH 8.5, broken by homogenisation, and brought back to isotonic buffer by the addition of NaCl to 150 mM. The nuclei were separated from the bulk of cell membranes by low-speed centrifugation, which was monitored by microscopy. The supernatant, containing the membranes and cytosolic material, was centrifuged at 40,000 g. The pellet (the membrane preparation) was homogenized in detergent buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 8.5, 150 mM NaCl, and 1 % (w/v) Triton X-100. After

WO 03/016464

32

PCT/FI02/00674

incubation, the preparate was centrifuged at 100,000 g and the supernatant, containing the detergent extracted membrane proteins, was collected. Buffer salts and the detergent were removed by cold acetone precipitation as in (Verostek *et al.*, 2000).

5 *Isolation of membrane protein N-glycans.* N-glycans were detached from membrane glycoproteins with *Chryseobacterium meningosepticum* N-glycosidase F (Calbiochem, USA) essentially as in (Nyman *et al.*, 1998) and purified essentially as in (Verostek *et al.*, 2000; Packer *et al.*, 1998). N-glycans from RPMI-7951 cells were additionally passed through columns of 1) AG-50W strong cation exchange material and 2) C<sub>18</sub> silica in water, 10 whereas N-glycans from RPMI-7932 cells were not. The N-glycans were separated into sialylated and non-sialylated fractions with graphitised carbon columns essentially as in (Packer *et al.*, 1998).

*MALDI-TOF MS.* MALDI-TOF mass spectrometry was performed with a Voyager-DE 15 STR BioSpectrometry Workstation, essentially as in (Saarinen *et al.*, 1999; Papac *et al.*, 1996; Harvey, 1993).

*Exoglycosidase digestions.* All exoglycosidase reactions were performed essentially as described in (Nyman *et al.*, 1998; Saarinen *et al.*, 1999) and analysed by MALDI-TOF 20 MS. The enzymes and their specific control reactions with characterised oligosaccharides were: *Arthrobacter ureafaciens* sialidase (recombinant, *E. coli*; Glyko, UK) digested both Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAc-R and Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAc-R in oligosaccharides; β-N-acetylglucosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*, recombinant, *E. coli*; Calbiochem, USA) digested GlcNAcβ1-6Gal-R but not GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-3/6Gal-R; 25 β-N-acetylhexosaminidase (Jack bean; Calbiochem, USA) digested both GlcNAcβ1-6Gal-R and GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-3/6Gal-R; α1,3/4-fucosidase (*Xanthomonas sp.*; Calbiochem, USA) digested Galβ1-4(Fuα1-3)GlcNAc-R but not Fuα1-2Galβ1-3GlcNAc-R. Control digestions were performed in parallel and analysed similarly to the analytical exoglycosidase reactions.

30

### Results

*LacdiNAc containing sialylated N-glycans from larynx cancer samples.* The sialylated glycans from larynx cancer samples were effectively desialylated with *Arthrobacter ureafaciens* sialidase. Desialylation was monitored by MALDI-TOF MS (not shown). The

WO 03/016464

33

PCT/FI02/00674

desialylated glycans were first digested with  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase at enzyme concentrations that specifically hydrolyse terminal  $\beta$ -GlcNAc residues but not  $\beta$ -GalNAc residues. The further addition of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase removed 2 HexNAc residues from one of the N-glycans, indicating the presence of a GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc sequence, which is resistant to the action of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase but is completely digested with  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase. Upon  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestion, the relative signal intensity of a peak at  $m/z$  1850.38/1850.16, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1850.67), was significantly decreased. Simultaneously, the relative signal intensity of a peak at  $m/z$  1444.30/1444.15, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1444.51), was increased, while there was no increase in the relative signal intensity of the incompletely digested form at  $m/z$  1647.34/1647.19, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1647.59). The one observed peak corresponding to a sialylated form of the LacdiNAc containing N-glycan in question, namely the ion at  $m/z$  2118.09 ( $[\text{NeuAc}_1\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1-\text{H}]^-$ ; calc.  $m/z$  2118.93), contains only one sialic acid residue. However, the present data cannot exclude the presence of differently sialylated forms in the original sample. Importantly, no evidence of LacdiNAc containing glycans could be obtained in similarly analysed samples from many healthy tissues.

20 *RPML-7932 and RPML-7951 human melanoma cell membrane protein desialylated N-glycans.* The sialylated N-glycans, comprising to membrane-associated sialylated N-glycans, were effectively desialylated with *Arthrobacter ureafaciens* sialidase. Desialylation was monitored by MALDI-TOF MS (data not shown). The desialylated N-glycans were first digested with  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase at enzyme concentrations that specifically hydrolyse terminal  $\beta$ -GlcNAc residues but not  $\beta$ -GalNAc residues. The further addition of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase removed HexNAc residues from some of the N-glycans. Below are the examples of the  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase sensitive and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase insensitive structures, from which the enzyme removed exclusively either 2 or 4 HexNAc residues at a time. Taken together, this indicates that these structures contain GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc sequences, which are resistant to the action of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase but are completely digested with  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase.

*LaediNAc containing N-glycans from RPMI-7932 human melanoma cell membrane proteins (Fig. 5. - 7.):*

- A. Upon  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestion, a peak at  $m/z$  1704.71, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1704.61), was transformed into a peak at  $m/z$  1298.53, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1298.45), while there was no increase in the relative signal intensity of the incompletely digested form at  $m/z$  1501.62, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1501.53).
- B. Upon  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestion, the relative signal intensity of a peak at  $m/z$  1850.73/1850.72, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1850.67), was significantly decreased. Simultaneously, the relative signal intensity of a peak at  $m/z$  1444.59/1444.58, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1444.51), was significantly increased, while there was no increase in the relative signal intensity of the incompletely digested form at  $m/z$  1647.66, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1647.59).
- C. Upon  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestion, a peak at  $m/z$  1891.78, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_6\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1891.69), was completely transformed into peaks at  $m/z$  1079.47, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1079.38), and  $m/z$  1485.65/1485.61, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1485.53), while no evidence could be found of the possible incompletely digested forms at calc.  $m/z$  1688.61  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_5\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  or calc.  $m/z$  1282.45  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ . Upon  $\alpha$ 1,3/4-fucosidase digestion, the peak at  $m/z$  1485.61 was partly transformed into a peak at 1339.52, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1339.48).
- D. Upon  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digestion, the relative signal intensity of a peak at  $m/z$  2215.85/2215.84, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_6\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  2215.80), was significantly decreased. Simultaneously, the relative signal intensity of a peak at  $m/z$  1809.71/1809.67, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1809.64), was significantly increased, while there was no increase in the relative signal intensity of the possible incompletely digested form at  $m/z$  2012.76, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  2012.72).

WO 03/016464

35

PCT/FI02/00674

*LacdiNAc containing N-glycan from RPMI-7932 human melanoma cell line membrane proteins (Fig. 8. - 9.):*

- E. Upon  $\beta$ -hexosaminidase digestion, a peak at  $m/z$  1501.52, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1501.53), was transformed into a peak at  $m/z$  1095.36, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1095.37), while there was no significant increase in the relative signal intensity of the incompletely digested form at  $m/z$  1298.48/1298.46, corresponding to the ion  $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3+\text{Na}]^+$  (calc.  $m/z$  1298.45).

#### Conclusions

- 10 The present results indicate that human cancerous tissue contains glycoproteins that carry LacdiNAc sequences. More specifically, the results show that a LacdiNAc containing a sialylated N-glycan, NeuAc<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>5</sub>Fuc<sub>1</sub>, is expressed on glycoproteins of a larynx cancer tumor specimen. Furthermore, the present results suggest the presence of several LacdiNAc, sialyl-LacdiNAc, and/or fucosyl-LacdiNAc containing structures among the sialylated N-glycans of RPMI-7932 melanoma cell membrane proteins, and the presence of a sialyl-LacdiNAc containing N-glycan among the sialylated N-glycans of RPMI-7951 melanoma cell membrane proteins. In structure C. of RPMI-7932 melanoma cell line membrane protein desialylated N-glycans, namely Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>, at least one of the LacdiNAc units is originally sialylated, as the N-glycans were obtained through
- 15 *Arthrobacter ureafaciens* sialidase digestion from isolated sialylated N-glycans. Similarly, in structure C. of RPMI-7932 melanoma cell line membrane protein sialylated N-glycans, at least one of the two LacdiNAc sequences must be  $\beta$ -linked to one of the  $\alpha$ -mannoses of the N-glycan core. Furthermore,  $\alpha$ 1,3/4-fucosidase digestion revealed the presence of  $\alpha$ 1,3-fucosylated LacdiNAc sequences in structure C. of RPMI-7932 melanoma cell line membrane protein sialylated N-glycans. In the other structures, the presence of Hex-
- 20 HexNAc sequences prevents these structure assignments. The monosaccharide composition of structure E. of RPMI-7951 melanoma cell line membrane protein desialylated N-glycans, Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>, suggests the presence of a hybrid N-glycan that has a sialyl-LacdiNAc sequence on a Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> N-glycan core.

30

## EXAMPLE III

Anti-LacdiNAc antibodies that recognize GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc sequences on cancer cells and glycoconjugates, and immunogenic oligosaccharide conjugates used to produce and

5 characterize them

*Antibodies.* Anti-LacdiNAc antibodies are produced by immunogenic LacdiNAc conjugates by standard methods in experimental animal immunology or screening antibody libraries by phage display or other methods known in the art. The used possibly monoclonal antibodies are shown to be specific towards LacdiNAc by ELISA with  
10 specific oligosaccharide or oligosaccharide conjugate coated ELISA plates, or any other suitable method that utilizes recognition of specific oligosaccharides or their conjugates. Antibodies that bind to the LacdiNAc antigen without binding to the respective LacNAc analog, are suitable for their intended use. The specific pairs of a LacdiNAc antigen and a LacNAc control antigen, suitable for conjugation as neoglycoproteins or other  
15 immunogenic conjugates, are for example as follows: GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-R and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-R, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Gal $\beta$ 1-R and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Gal $\beta$ 1-R, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-R and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-R, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc $\alpha$ 1-R and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc $\alpha$ 1-R, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-R and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-R,  
20 GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-R and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-R, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Man $\alpha$ 1-R and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Man $\alpha$ 1-R, and corresponding sialylated and/or fucosylated analogs of the abovementioned epitopes according to the invention, where R can be for example lactose, any O- or N-glycan or glycolipid core structure, or a spacer that is used for the conjugation of the oligosaccharide to the neoglycoprotein or any  
25 other immunogenic carrier by methods known in the art.

*In situ generation of LacdiNAc sequences on tissue sections.* Tissue controls can be subjected to in situ LacdiNAc synthesis to serve as positive controls in immunohistochemistry or other diagnostic applications. The reaction can be facilitated for  
30 example by a mutant  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase similar to the bovine milk enzyme Y289L mutant described in (Ramakrishnan and Qasba, 2002) and by using reaction conditions essentially similar to ones described in the cited reference. Before the GalNAc transfer reaction, the tissue sections can be incubated with Jack bean  $\beta$ -galactosidase (Glyko, UK)

WO 03/016464

37

PCT/FI02/00674

at a concentration of 0.5 U/ml, in 50 mM sodium acetate pH 4.0, at +37 °C overnight, after which the glycosidase reaction solution is washed away from the sections. This will create additional acceptor sites for the GalNAc-transferase.

- 5 *Use of antibodies in immunodiagnostic applications.* The LacdiNAc specific antibodies can be used in immunohistochemistry, immunodiagnosics, and other diagnostic applications according to the standard immunological methods.

## EXAMPLE IV

10

In vitro lysis assay to detect cytolytic activity of the antibodies recognizing lacdiNAc structures according to the present invention.

- Model cancer cells comprising lacdiNAc structures on cell surface are harvested to 80 % confluent density and washed four times with HBSS (Hank's balanced salt solution). The viability of the cells is determined by trypan blue staining. Approximately 200 000 cells are incubated with antibodies binding the lacdiNAc-structures according to the present invention on the cell surfaces. Rabbit complement is added to one set of cells to a final dilution of 1:5 and the other set of cells is adjusted to same volume with incubation media. The cells are further incubated for 1 h at 37 degree of Celsius. Finally, propium iodide is added to final concentration of 20 mikrograms per milliliter and the cells are analyzed for dye uptake. The cells are shown to be lysed by the lacdiNAc binding antibodies but not by non-cancer binding control antibodies. The lacdiNAc structures are available for antibody recognition and cytolysis on cell surface.

25 EXAMPLE V

Example of  $\alpha$ 3-sialyltransferase reaction:

- Molar excess of CMP-NeuNAc (20 micromol) and  $\alpha$ 3-sialyltransferase (1 U, ST3Gal III, rat liver, Calbiochem) is incubated overnight at 37 degree of Celsius with GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Lac (5 micromol) in 2.1 ml 50 mM MOPS-NaOH pH 7.4 containing 2 mg/ml BSA. Product NeuNAc $\alpha$ 3GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc is formed quantitatively and purified by gel filtration HPLC-chromatography. Mass spectrometry and NMR-analysis confirmed the expected structure. MALDI-TOF mass spectrometry in negative linear mode revealed the product peak at  $m/z$  998.36. The products can be optionally N-

WO 03/016464

38

PCT/FI02/00674

alkylated or derivatized to an analog of  $\alpha$ 3-sialylated LacdiNAc.  $\alpha$ 3-sialylated lacdiNAc is obtained by N-acetylation of GalN to GalNAc by 8 microliters of acetic anhydride in 200 microliters of 1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

5 Examples of  $\alpha$ 3-galactosyltransferase reactions:

Synthesis of Gal $\alpha$ 3GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Lac from GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Lac

UDP-Gal (3micromol), GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Lac (1.5 micromol), and  $\alpha$ 3-galactosyltransferase (0.1 U, Calbiochem) is incubated at 37 degrees of Celsius in 500 microliters 100 mM MES buffer pH 7.0 containing 20 mM  $\text{MgCl}_2$ . Product

10 Gal $\alpha$ 3GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc was purified by gel filtration HPLC-chromatography.

The reaction was incubated at 37 degrees of Celsius for 4 days. MALDI-TOF mass spectrometry in positive ion mode revealed the expected product peak at  $m/z$  891.2102. The structure of the product is confirmed by NMR-spectrometry.

15 EXAMPLE VI

Synthesis of GalN $\alpha$ 3GalN $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Lac from GlcNAc $\beta$ 3Lac by two galactosyltransferases and in situ donor synthesis.

The reaction mixture containing 5 micromol of GlcNAc $\beta$ 3Lac, 10 mM GalN-1P (Sigma),

20 20 mM UDP-Glc, 2.5 U galactos-1-phosphate-uridylyltransferase, 0.5 U  $\beta$ 1-4-galactosyltransferase and 0.5 U  $\alpha$ 1-3-galactosyltransferase (Calbiochem, CA, USA) is incubated in 1.0 ml 0.1 M HEPES pH 8.0 containing 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. The reaction was incubated at 37 degrees of Celsius for 4 days. MALDI-TOF analysis of the reaction products in positive ion mode revealed major product peak at

25  $m/z$  890.2349. The structure of the product is confirmed by NMR-spectrometry.

WO 03/016464

PCT/JP02/00674

Table 1

MMP-9 glycans, peak 23.10		MMP-9 glycans, peak 24.30	
assignment	m/z	assignment	m/z
Hex5Hex1Nac4Fuc1	1070,201	Hex5Hex1Nac4SA1	1106,697
Hex5Hex1Nac3Fuc1	1080,438	Hex5HexNac4Fuc1SA1	1143,008
Hex5Hex1Nac2Fuc2	1106,783	Hex5HexNac3Fuc1SA1	1163,318
Hex5Hex1NacFuc3	1143,247	Hex5HexNacFuc2SA1	1179,540
Hex4Hex1Nac5Fuc3	1163,518	Hex4HexNac5Fuc3	1189,780
z	m (observed)	z	m
4	4276,804	4	4422,788
4	4317,992	4	4588,092
4	4423,052	4	4609,272
4	4464,144	4	4714,16
4	4569,988	4	4755,12
4	4610,072		
	m (calculated)		m
	4276,812		4421,849
	4317,838		4587,907
	4422,87		4608,964
	4463,868		4713,965
	4568,928		4754,962
	4609,964		
abundance % (of total)*	LacDNac%	abundance % (of total)*	LacDNac%
10.1	4.8	2.9	7.2
4.8	1956.01	10.6	2247.27
13.4	1996.64	3.1	2289.22
7.8	2101.95	13.7	
21.2	2143.07	4.1	
65.5	20.7	34.5	
		100.0	27.9

\*Quantification based on LC/MS analysis

\*\*Analysed as [M+Na]<sup>+</sup>

## References

- Arap, W., Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. (1998) *Science* 279, 323-4.
- 5 Bergwerff, A.A., van Kuik, J. A., Schiphorst, W. E. C. M., Koeleman, C. A. M., van den Bijnden, D.H., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J.F.G. (1993) *FEBS Lett.* 334, 133-138
- Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Panico, M., Patankar, M., Oehringer, S., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppälä, M. and Clark, G. F. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24116-24126.
- 10 Do, K.-Y., Do, S-I and Cummings, R. D. (1997) *Glycobiology* 7, 183-194.
- Grinnel, B. W., Hermann, R. B. and Yan, S. B. (1994) *Glycobiology* 4, 221-225.
- Harvey, D.J., *et al.* (1993) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7(7):614-9.
- Jain, R. K., Piskortz, C. F., Huang, B-G, Locke, R. D., Han, H-L, Koenig, A., Varki, A. and Matta, K. L. (1998) *Glycobiology* 8, 707-717.
- 15 Jaques, A. J., Opdenakker, G., Rademacher, R. A., Dwek, R. A. and Zamze, S. E. (1996) *Biochem. J.* 316, 427-437.
- Koivunen E., Arap W., Valtanen H., Rainisalo A., Medina OP., Heikkila P., Kantor C., Gahmberg C. G., Salo T., Kontinen Y. T., Sorsa T., Ruoslahti E. and Pasqualini R. (1999) *Nature Biotechnology* 17(8):768-74.
- 20 Manzella, S. M., Dharmesh, S. M., Cohick, C. B., Soares, M. J. and Baenziger, J. U. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 4775-4782.
- Manzi, A.E., *et al.* (2000) *Glycobiology* 10(7):669-89
- Ramakrishnan, B., and Qasba P.K. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 20833-39.
- Rudd, P.M., Mattu, T.S., Masure, S., Bratt, T., van den Steen, P.E., Wornald, M.R.,
- 25 Kuester, B., Harvey, D.J., Borregard, N., Van Damme, J., Dwek, R.A. and Obdenakker, G. (1999) *Biochemistry* 38, 13937-13950.
- Nyame, K., Leppänen A.M., Bogitsh, B.J., and Cummings, R.D. (2000) *Exp. Parasitol.* 96, 202-212
- Nyman, T.A., *et al.* (1998) *Eur. J. Biochem.* 253(2):485-93
- 30 Ohkura, T., Hara-Kuge, S., and Yamashita, K. (2001) *Glyco XVI International Symposium on Glycoconjugates Aug 19-24, The Hague, The Neatherlands, Astract C20.3.* abstract book page 79.
- Packer, N.H., *et al.* (1998) *Glycoconj. J.* 15(8):737-747
- Papac, D.I., *et al.* (1996) *Anal. Chem.* 68(18):3215-23

WO 03/016464

41

PCT/FI02/00674

- Saarinen, J., Welgus, H. G., Flizar, C. A., Kalkkinen N. and Helin J. (1999) *Eur. J. Biochem.* 259, 829-840.
- van den Eijnden, D. H., Bakker, H., Neeleman, A. P., van den Nieuwenhof, I. M. and van Die I. (1997) *Biochem Soc. Trans.* 25, 887-893.
- 5 Verostek, M.F., *et al.* (2000) *Anal. Biochem.* 278:111-122.
- Yang, Y., V. Hayden, T, Man, S. and Rice, K. G. (2000) *Glycobiology* 10, 1341-1345.

WO 03/016464

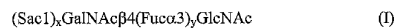
42

PCT/FI02/00674

What is claimed:

1. A method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence in said sample of an oligosaccharide sequence according to Formula

5



wherein x and y are each independently 0 or 1 and Sac1 is NeuNAc $\alpha$ 3 or NeuNAc $\alpha$ 6.

10 2. The method according to claim 1, wherein the determination comprises

(a) contacting said biological sample with a substance binding to said oligosaccharide sequence, and

determining the presence of a combination of said substance and said sample, the presence of said combination being an indication of the presence of cancer in said sample,

15

or

(b) releasing the oligosaccharide structures of said biological sample by enzymatic or chemical methods to form a fraction containing free oligosaccharide structures or conjugates from said sample, and

determining the presence of said oligosaccharide sequence in said fraction, the presence of said oligosaccharide sequence in said fraction being an indication of the presence of cancer in said sample.

20

3. The method according to claim 2, wherein said substance binding to said oligosaccharide sequence is specific to oligosaccharide sequence GalNAc $\beta$ 4GlcNAc or a derivative thereof.

25

4. The method according to claim 2, wherein said substance is specific to one or several of the following oligosaccharide sequences:

[NeuNAc $\alpha$ 3]<sub>0-1</sub>GalNAc $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)<sub>0-1</sub>GlcNAc or

30

[NeuNAc $\alpha$ 6]<sub>0-1</sub>GalNAc $\beta$ 4(Fuc $\alpha$ 3)<sub>0-1</sub>GlcNAc.

5. The method according to any one of the claims 2-4, wherein said substance binding to said oligosaccharide sequence is an aptamer, a peptide or a protein.

WO 03/016464

43

PCT/FI02/00674

6. The method according to claim 5, wherein said protein is an antibody, an enzyme, a lectin or a fragment thereof.
- 5 7. The method according to claim 2, wherein said biological sample is a blood or serum sample.
8. The method according to claim 7, wherein said oligosaccharide sequences are detected from a secreted glycoprotein.
- 10 9. The method according to claim 8, wherein said glycoprotein is a member of matrix metalloproteinase protein family, prostate specific antigen, kallikrein 2, human chorionic gonadotrophin or carcinoembryonic antigen.
- 15 10. The method according to any one of claims 2-9, wherein the presence of said oligosaccharide sequence is determined by the use of mass spectrometry and/or glycosidase enzymes.
- 20 11. Diagnostic agent comprising a substance as defined in any one of claims 2-6 for the diagnosis of cancer or a cancer type.
12. Use of a substance as defined in any one of claims 1-5 for the manufacture of a diagnostic agent for the diagnosis of cancer or a cancer type.
- 25 13. Antigenic substance comprising a terminal oligosaccharide sequence as defined in Formula I in claim 1 in a chemically or biochemically synthesized polyvalent form for immunization in human.
- 30 14. Use of the antigenic substance according to claim 13 or analogs or derivatives thereof to produce polyclonal or monoclonal antibodies.
15. Use of the antigenic substance according to claim 13 or analogs or derivatives thereof for the purification of antibodies from serum, preferably from human serum.

WO 03/016464

44

PCT/FI02/00674

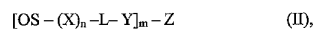
16. Use of the antigenic substance according to claim 13 or analogs or derivatives thereof for the detection and/or quantitation of antibodies.
- 5 17. A non-immugenic polyvalent or oligovalent conjugate comprising one or several oligosaccharide sequences according to Formula I in claim 1.
18. A pharmaceutical composition comprising an antibody against one or several of the oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in Formula I and/or a  
10 substance inhibiting L.acdiNac biosynthesis in cancer cells and/or the non-immunogenic conjugate according to claim 17 for the treatment of cancer.
19. A pharmaceutical composition comprising oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in Formula I or analogs or derivatives thereof for the  
15 treatment of cancer.
20. The pharmaceutical composition according to claim 18 or 19 comprising a pharmaceutically acceptable carrier and optionally an adjuvant.
- 20 21. Method of treatment of cancer wherein the pharmaceutical composition according to any one of claims 18-20 is administered to a human or animal patient in need of treatment in an amount sufficient to reduce the metastatic potential or growth of cancer cells or to eliminate a tumor or cancer.
- 25 22. Method of treatment of cancer wherein human antibodies or humanized antibodies against the oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in Formula I are administered to a human or animal patient to reduce the metastatic potential or growth of cancer cells or to eliminate a tumor or cancer.
- 30 23. Method of treatment according to claim 22 wherein said antibodies are purified from serum.
24. Method of treatment according to claim 22 or 23 wherein said antibodies target a toxic agent or toxic agents to a tumor or cancer.

WO 03/016464

45

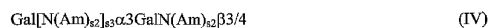
PCT/FI02/00674

25. Method of treatment wherein LacdiNAc biosynthesis is prevented in cancer cells by specific inhibitors in order to reduce the metastatic potential and malignancy of the cancer cells.
- 5
26. The method of treatment according to any one of claims 20-25 for the treatment of a patient who is under immunosuppressive medication or suffers from immunodeficiency.
27. A cancer vaccine comprising oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in Formula I or analogs or derivatives thereof.
- 10
28. The cancer vaccine according to claim 27 comprising a pharmaceutically acceptable carrier and optionally an adjuvant.
- 15
29. A substance binding to oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in Formula I, wherein said substance is an aptamer, an enzyme, a humanized antibody or a peptide.
30. A pharmaceutical composition comprising an antigenic epitope structure according to
- 20
- Formula



- wherein Y is a non-carbohydrate spacer or a non-glycosidically linked terminal conjugate,
- 25
- n is 0 or 1 and X is lactosyl-, galactosyl-, N-acetyllactosaminyl, mannosyl-, Man<sub>2</sub>, Man<sub>3</sub>-, Man<sub>3</sub>GlcNAc, Man<sub>4</sub>GlcNAc, N-acetylglucosaminyl-, or N-acetylgalactosaminyl, preferably X is lactosyl-, galactosyl-, mannosyl-, or N-acetylgalactosaminyl and OS is β2-, or β4-, or β6 linked to the mannosylresidue, more preferably OS is β2-; most preferably OS is β3- or β6-linked to galactosylresidue or N-acetylgalactosaminylresidue or Gal -
- 30
- residue of lactose or N-acetyllactosamine for the treatment of cancer.

31. A carbohydrate substance according to the formula



WO 03/016464

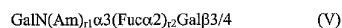
46

PCT/FI02/00674

wherein Am is a derivatization residue of amine amine group, with the provision that Am is not acetyl (Ac) or an imidogroup, preferably Am is carboxylic acid forming amide with the GalN residue such as formamide, propanoic acid amide, and other alkyl amides, and cyclic amides including amides of cyclohexane radical comprising carboxylic acid and amides with aromatic hydrocarbons, for example amides of benzoic acids; s2, s3 are independently 0 or 1.

32. A carbohydrate substance according to the formula

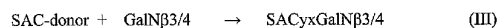
10



wherein r1 and r2 are independently 0 or 1, Am is a derivatization residue of amine group, with the provision that Am is not acetyl (Ac) or an imidogroup, preferably Am is carboxylic acid forming amide with the GalN such as formamide, propanoic acid amide, and other alkyl amides, and cyclic amides including amides of cyclohexane radical comprising carboxylic acid and amides with aromatic hydrocarbons, for example amides of benzoic acids.

33. A method for production of GalN derivatives, especially lactiNac structures and analogs thereof comprising performing a glycosyltransferase reaction with a terminal hexosamine as a acceptor, wherein said reaction is according to formula

25



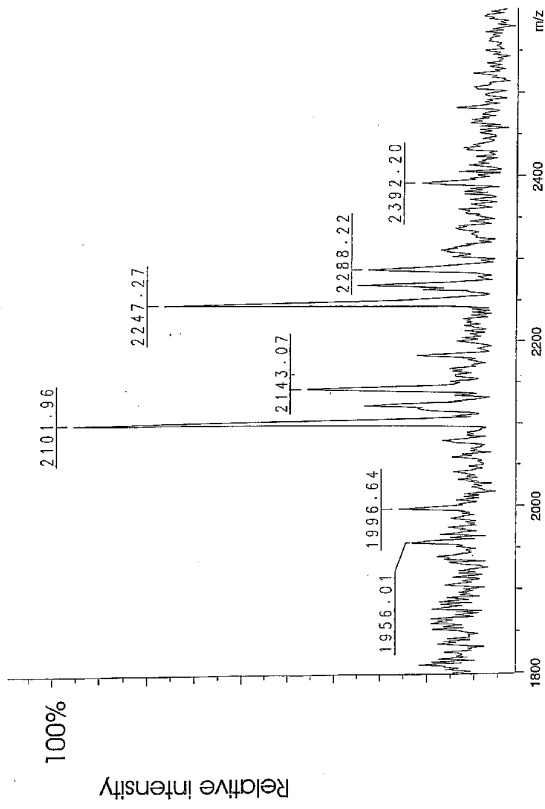
wherein y is  $\alpha$ - or  $\beta$ -linkage and x is independently linkage position 3, 4, or 6, SAC is sialic acid, or  $\text{Hex(A)}_{s1}[\text{N(Ac)}_{s2}]_{s3}$  wherein Hex is Gal or Glc and s1, s2, and s3 are independently 0 or 1, with the proviso that when s1 is 1, then s3 is 0; when s1 is 1, the SAC-structure comprises hexuronic acid structure, preferably GlcA; when s3 is 1 and s2 is 1, the SAC-structure is GlcNAc or GalNAc, and when s2 is 0, the structure is GalN or GlcN; GalN $\beta$ 3/4 indicates nonreducing terminal GalN which is  $\beta$ 3- or  $\beta$ 4-linked to a hexose or hexosamine or hexosamine derivative, preferably Gal, GalN, GalNAc, Glc, GlcN, or GlcNAc.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

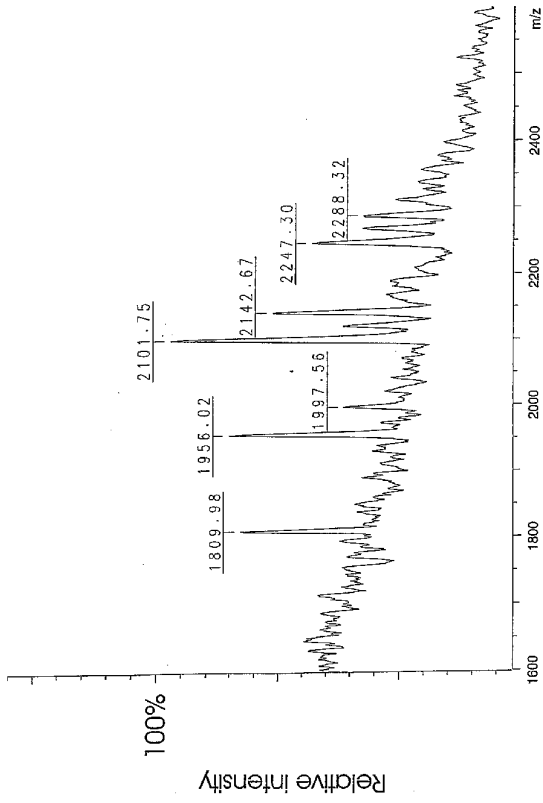
1/15

FIG. 1A



2/15

FIG. 1B

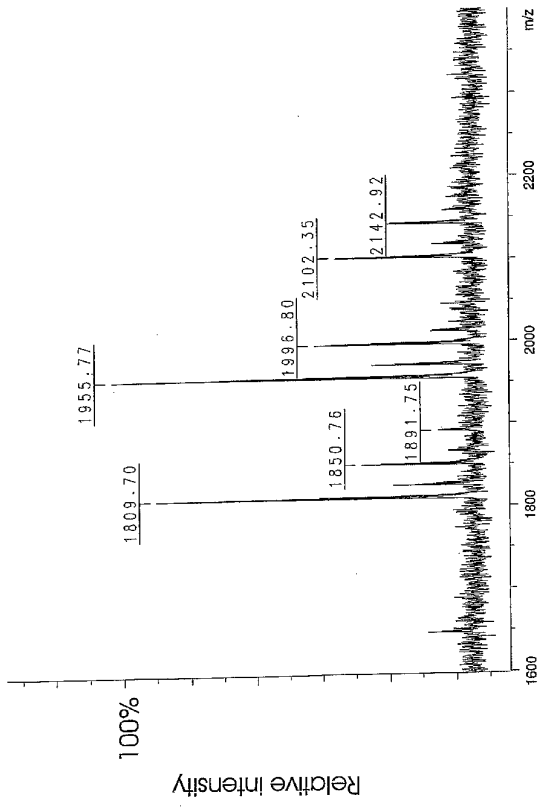


WO 03/016464

PCT/FI02/00674

3/15

FIG. 1C

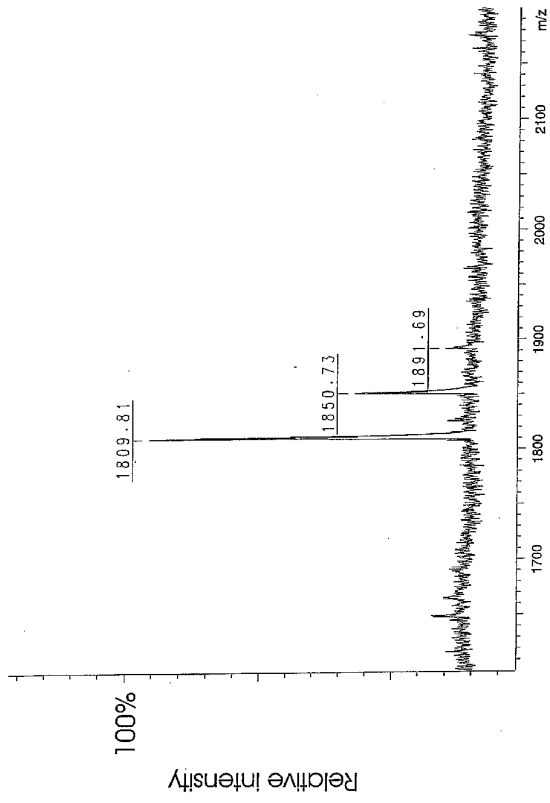


WO 03/016464

PCT/FI02/00674

4/15

FIG.1D

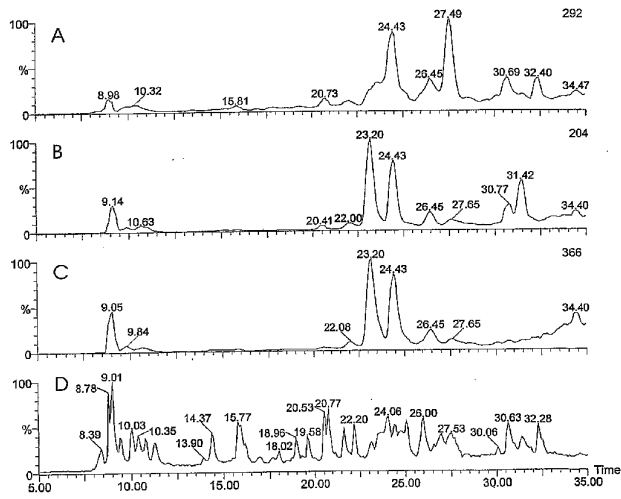


WO 03/016464

PCT/FI02/00674

5/15

FIG. 2



WO 03/016464

PCT/FI02/00674

6/15

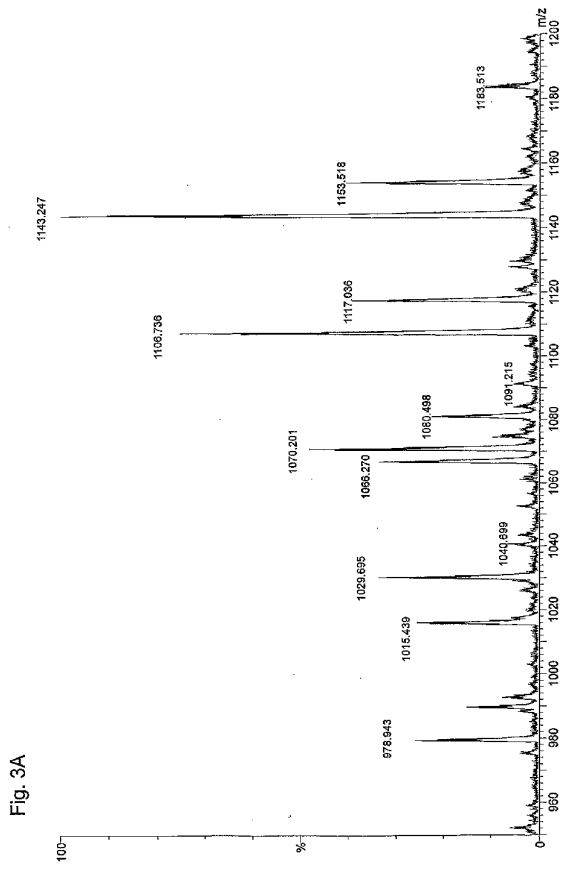
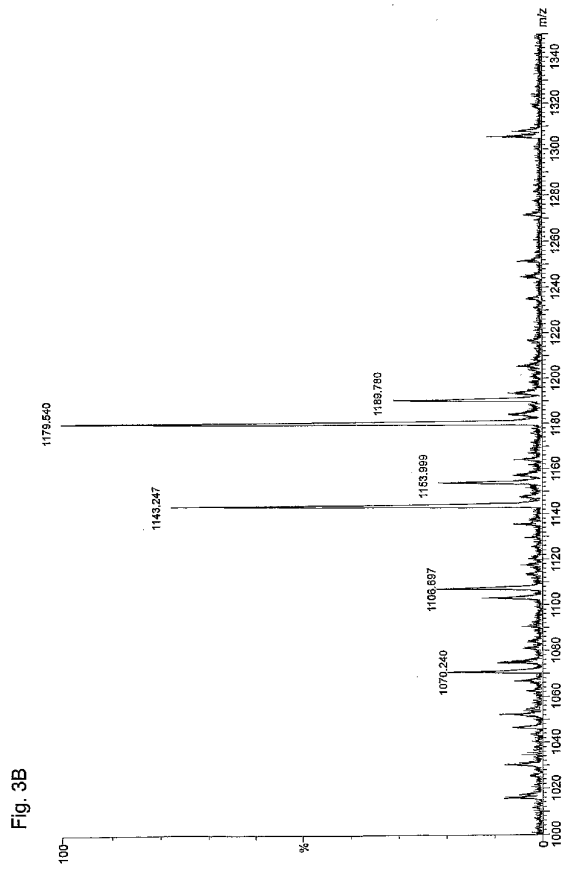


Fig. 3A

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

7/15



WO 03/016464

PCT/FI02/00674

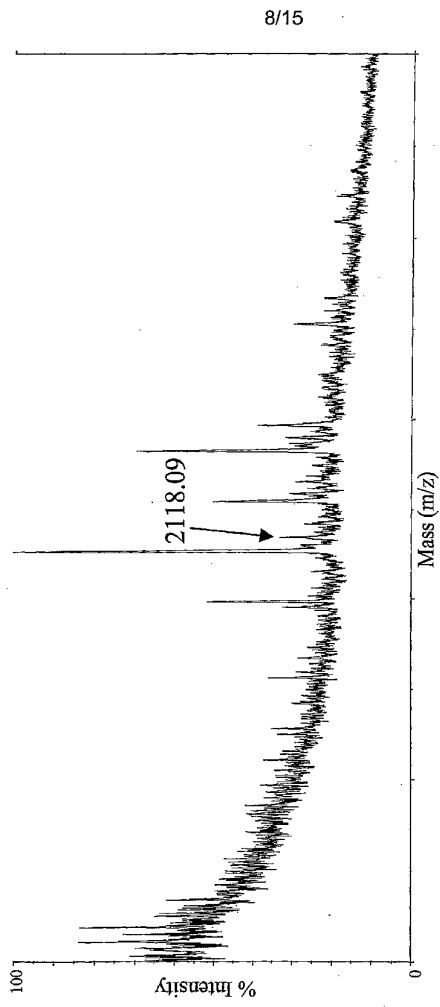


Figure 4A.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

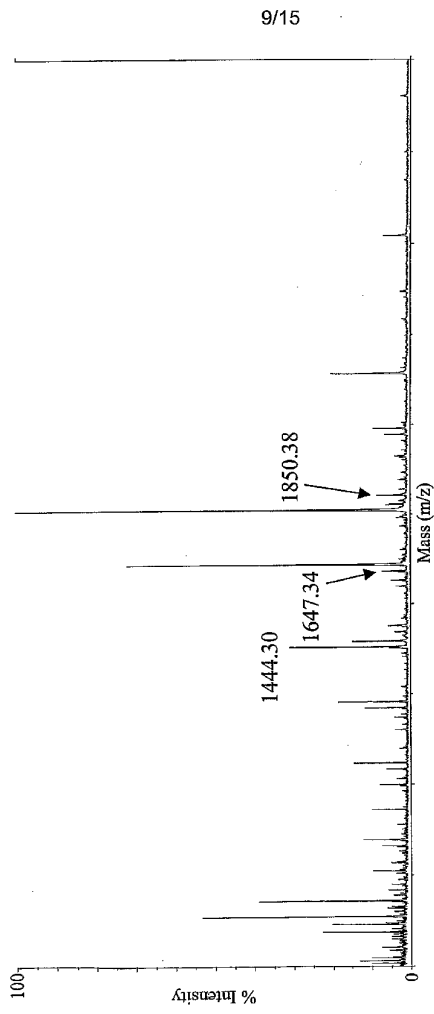


Figure 4B.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

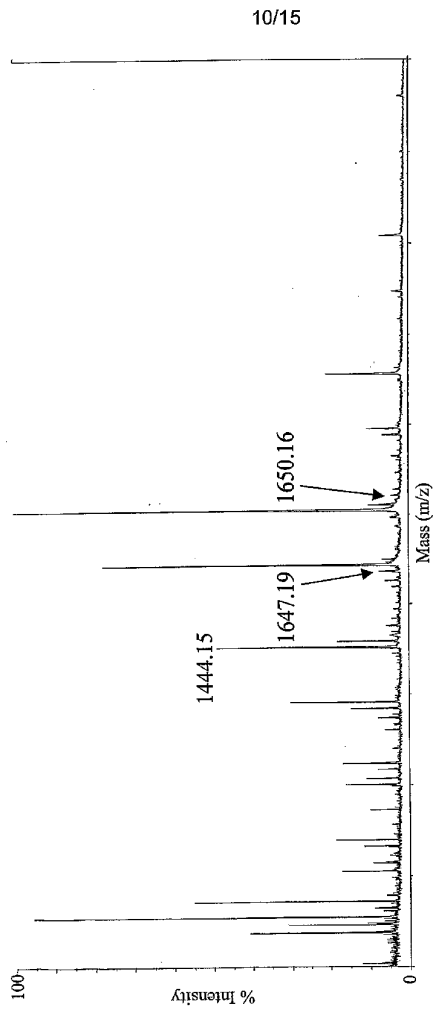


Figure 4C.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

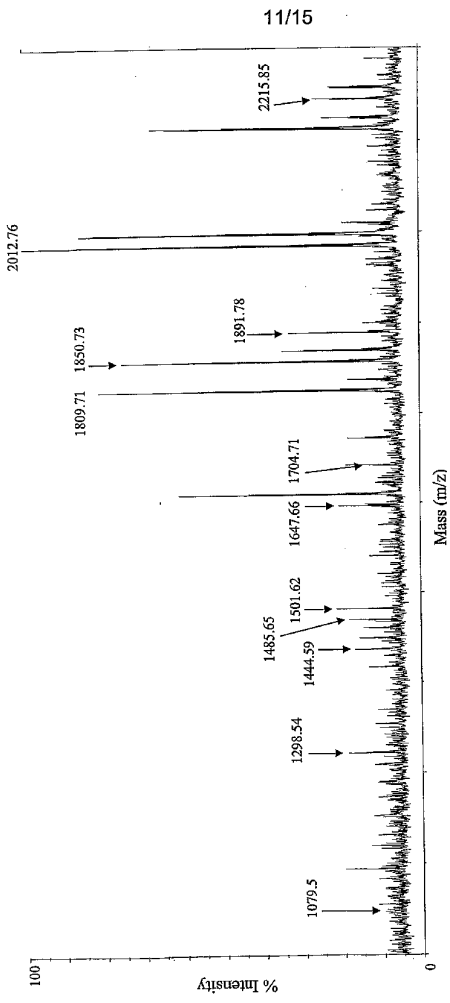


Figure 5.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

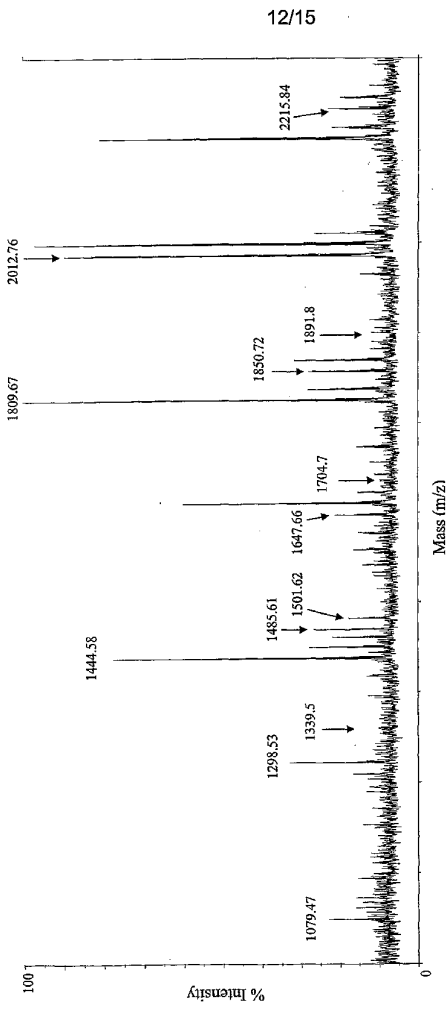


Figure 6.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

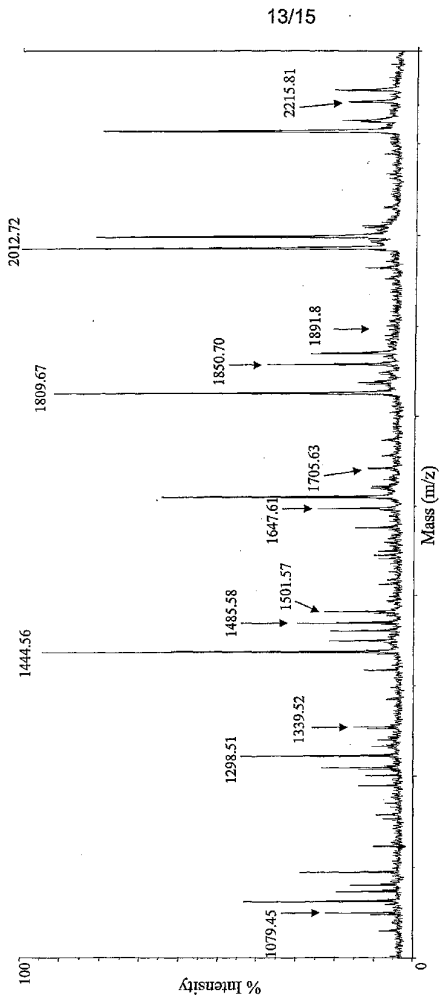


Figure 7.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

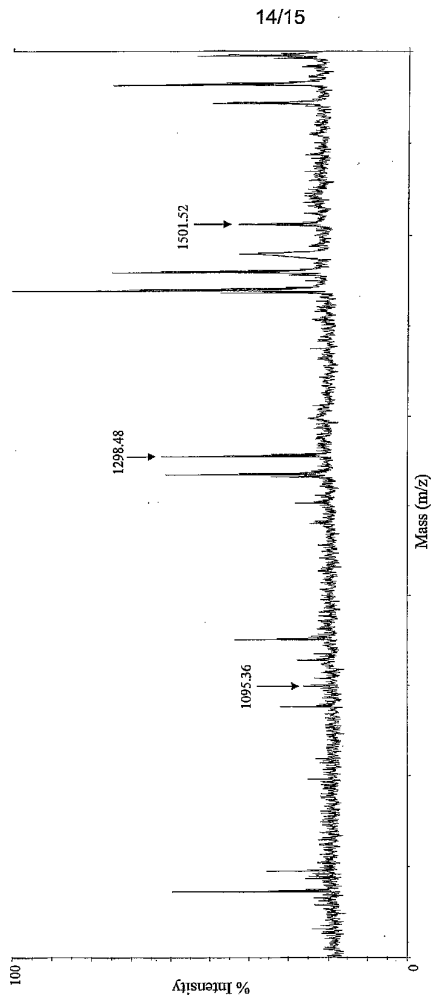


Figure 8.

WO 03/016464

PCT/FI02/00674

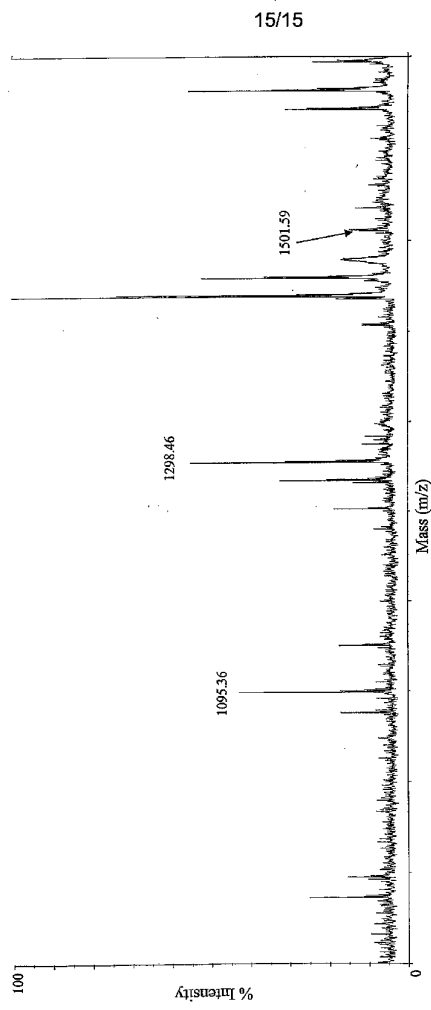


Figure 9.

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/016464 A3

- (51) International Patent Classification: C07H 5/06, G01N 33/574, A61K 39/00, A61P 35/00
- (21) International Application Number: PCT/1102/00674
- (22) International Filing Date: 16 August 2002 (16.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20011664 17 August 2001 (17.08.2001) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): CARBION OY [FI/FI], Viikinkaari 9, FIN-00710 Helsinki (FI).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DL, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE (utility model), EG, ES, FI (utility model), FR, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PG, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SAARINEN, Juhani [FI/FI], Hnttistenkuja 9 B 20, FIN-00300 Helsinki (FI); HEIJN, Jari [FI/FI], Askistonie 2B, FIN-01680 Vantaa (FI); SATOMAA, Tero [FI/FI], Maaikaari 6 A 11, FIN-00710 Helsinki (FI).

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report:  
22 May 2003

(74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB, Iso Roobertinkatu 4-6 A, FIN-00120 Helsinki (FI).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/016464 A3

(54) Title: CANCER SPECIFIC OLIGOSACCHARIDE SEQUENCES AND USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention describes oligosaccharide sequences, which are specifically expressed by cancer cells. The present invention is related to a method of determining an cancer specific oligosaccharide sequence comprising LacdiNAc structure in a biological sample, the presence of said sequence in said sample being an indication of the presence of cancer. The present invention provides antigenic substances, diagnostic agents, pharmaceutical compositions and cancer vaccines comprising said oligosaccharide sequences or substances binding to said oligosaccharide sequences. The present invention is also related to methods for the treatment of cancer.

## 【手続補正書】

【提出日】平成15年9月12日(2003.9.12)

## 【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】

下記式(I)：



(式中、 $x$ および $y$ は各々独立に0または1の整数であり、Sac1はNeuNAc<sub>3</sub>またはNeuNAc<sub>6</sub>である。)

で表されるオリゴ糖配列の存在を生物学的試料中に検出することを特徴とする、生物学的試料を用いて癌を診断する方法。

【請求項2】

以下の工程(a)または工程(b)を包含することを特徴とする、請求項1に記載の診断方法。

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

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

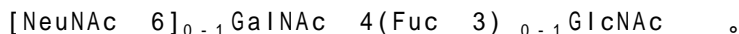
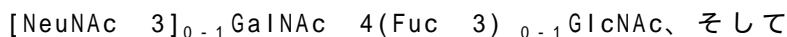
該画分中の該オリゴ糖配列の存在を指標として、該生物学的試料中の癌の存在を検出する。

【請求項3】

該結合性物質が、オリゴ糖配列であるGalNAc<sub>4</sub>GlcNAcまたはその誘導体に特異的であることを特徴とする、請求項2に記載の診断方法。

【請求項4】

該結合性物質が、下記式からなる群より選ばれる少なくとも一種のオリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。



【請求項5】

該結合性物質が、アプタマー、ペプチドまたはタンパク質であることを特徴とする、請求項2～4のいずれかに記載の診断方法。

【請求項6】

該タンパク質が、抗体、酵素、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項5に記載の診断方法。

【請求項7】

該生物学的試料が、血液試料または血清試料であることを特徴とする、請求項2に記載の診断方法。

【請求項8】

該オリゴ糖配列を、血液試料または血清試料中の分泌糖タンパク質から検出することを特徴とする、請求項7に記載の診断方法。

【請求項9】

該糖タンパク質が、マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質ファミリー、前立腺特異的抗原、カリクレイン2、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンおよび癌胎児性抗原からなる群より選ばれる糖タンパク質であることを特徴とする、請求項8に記載の診断方法。

## 【請求項 10】

該オリゴ糖配列の存在を質量分析法および/またはグリコシダーゼ酵素を用いる方法によって検出することを特徴とする、請求項 2 ~ 9 のいずれかに記載の診断方法。

## 【請求項 11】

該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれる末端オリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の診断方法。

NeuNAc 3GalNAc 4GlcNAc、  
NeuNAc 3GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc、  
NeuNAc 6GalNAc 4GlcNAc、そして  
NeuNAc 6GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc 。

## 【請求項 12】

ヒトの癌を診断するための、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の診断方法。

## 【請求項 13】

請求項 2 ~ 6 のいずれかで定義されている結合性物質を包含する、癌または癌の型の診断に用いる診断剤であって、該結合性物質は、請求項 11 で定義されているオリゴ糖配列に結合することを特徴とする診断剤。

## 【請求項 14】

請求項 2 ~ 6 のいずれかで定義されている結合性物質を用いて癌または癌の型の診断用の診断剤を製造する方法であって、該結合性物質は、式 (I) で表されるオリゴ糖配列に結合することを特徴とする方法。

## 【請求項 15】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を、化学的または生化学的に合成した多価の形態で含んでいることを特徴とする、ヒトの免疫感作に用いる抗原性物質。

## 【請求項 16】

請求項 15 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を製造する方法。

## 【請求項 17】

請求項 15 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、血清、好ましくはヒトの血清から抗体を精製する方法。

## 【請求項 18】

請求項 15 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、抗体の検出および/または定量を行う方法。

## 【請求項 19】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を少なくとも一種含む多価またはオリゴ価の非免疫原性結合体を用いて、癌治療用医薬組成物を製造する方法。

## 【請求項 20】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌治療用医薬組成物。

## 【請求項 21】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を含むオリゴ糖鎖を用いた、癌治療用医薬組成物の製造方法。

## 【請求項 22】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含む少なくとも一種のオリゴ糖鎖に対する抗体を包含する、癌治療用医薬組成物。

## 【請求項 23】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を含む少なくとも一種のオリゴ糖鎖に対する抗体を用いる癌治療用医薬組成物の製造方法。

## 【請求項 24】

該オリゴ糖鎖が請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含むことを特徴とする、請求項 22 に記載の製造方法。

## 【請求項 25】

式 ( I ) で表される末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を含むオリゴ糖鎖を用いた、癌治療用の免疫原性医薬組成物の製造方法。

## 【請求項 26】

該医薬組成物が、医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドを包含することを特徴とする、請求項 19、21 および 23 のいずれかに記載の方法あるいは請求項 20 または 22 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 27】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖あるいはその類似体または誘導体を包含し、好ましくは医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドを更に包含する癌ワクチン。

## 【請求項 28】

式 ( I ) で表される末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を含むオリゴ糖鎖を用いた、癌ワクチンの製造方法。

## 【請求項 29】

該オリゴ糖配列が、請求項 32 のマンノシル残基または N - グリカン構造に 2 - 結合していることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

式 ( I ) で表される末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に結合する結合性物質であって、アプタマー、酵素、人体に適応させた抗体またはペプチドであることを特徴とする、ヒトの癌の治療用物質。

## 【請求項 31】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に結合する物質であって、アプタマー、酵素、人体に適応させた抗体またはペプチドであることを特徴とする、オリゴ糖配列結合性物質。

## 【請求項 32】

下記式 ( I I ) :



(式中、

Y は非炭水化物スペーサーまたはグリコシド結合していない末端結合体であり、

n は各々独立に 0 または 1 であり、

X はラクトシル残基、ガラクトシル残基、N - アセチルラクトサミニル残基、マンノシル残基、Man<sub>2</sub>残基、Man<sub>3</sub>残基、Man<sub>3</sub>GlcNAc残基、Man<sub>4</sub>GlcNAc残基、N - アセチルグルコサミニル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、好ましくはラクトシル残基、ガラクトシル残基、マンノシル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、

OS は請求項 11 で定義されているオリゴ糖配列であり、

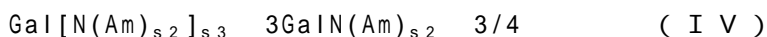
好ましい態様においては、X はマンノシル残基であり、OS は X に 2 - 、 4 - または 6 - 結合、好ましくは 2 - 結合しており、

他の好ましい態様においては、X はラクトシル残基または N - アセチルラクトサミニル残基であり、OS は X の Gal 残基に 3 - または 6 - 結合しているか、X はガラクトシル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、OS は X に 3 - または 6 - 結合している。)

で表される抗原性エピトープ構造を包含することを特徴とする、癌治療用医薬組成物。

## 【請求項 33】

下記式 ( I V ) :



(式中、

Am はアミン基の誘導残基であるが、但し、Am はアセチル (Ac) 基またはイミド基ではなく、好ましくは GalN 残基とカルボン酸を形成するアミド基、例えば、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含むシクロヘキサンラジカルの



以下の工程 ( a ) または工程 ( b ) を包含することを特徴とする、請求項 1 に記載の診断方法。

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

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

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

【請求項 3】

該結合性物質が、オリゴ糖配列である GalNAc 4GlcNAc またはその誘導体に特異的であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。

【請求項 4】

該結合性物質が、下記式からなる群より選ばれる少なくとも一種のオリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

[NeuNAc 3]<sub>0-1</sub>GalNAc 4(Fuc 3)<sub>0-1</sub>GlcNAc、そして  
[NeuNAc 6]<sub>0-1</sub>GalNAc 4(Fuc 3)<sub>0-1</sub>GlcNAc 。

【請求項 5】

該結合性物質が、アプタマー、ペプチドまたはタンパク質であることを特徴とする、請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 6】

該タンパク質が、抗体、酵素、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項 5 に記載の診断方法。

【請求項 7】

該生物学的試料が、血液試料または血清試料であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。

【請求項 8】

該オリゴ糖配列を、血液試料または血清試料中の分泌糖タンパク質から検出することを特徴とする、請求項 7 に記載の診断方法。

【請求項 9】

該糖タンパク質が、マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質ファミリー、前立腺特異的抗原、カリクレイン 2、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンおよび癌胎児性抗原からなる群より選ばれる糖タンパク質であることを特徴とする、請求項 8 に記載の診断方法。

【請求項 10】

該オリゴ糖配列の存在を質量分析法および/またはグリコシダーゼ酵素を用いる方法によって検出することを特徴とする、請求項 2 ~ 9 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 11】

該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれる末端オリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の診断方法。

NeuNAc 3GalNAc 4GlcNAc、  
NeuNAc 3GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc、  
NeuNAc 6GalNAc 4GlcNAc、そして  
NeuNAc 6GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc 。

【請求項 12】

ヒトの癌を診断するための、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 13】

請求項 2 ~ 6 のいずれかで定義されている結合性物質を包含する、癌または癌の型の診断に用いる診断剤であって、該結合性物質は、請求項 11 で定義されているオリゴ糖配列に結合することを特徴とする診断剤。

## 【請求項 14】

請求項 2 ~ 6 のいずれかで定義されている結合性物質を用いて癌または癌の型の診断用の診断剤を製造する方法であって、該結合性物質は、式 (I) で表されるオリゴ糖配列に結合することを特徴とする方法。

## 【請求項 15】

下記式からなる群より選ばれる末端オリゴ糖配列を、化学的または生化学的に合成した多価の形態で含んでいることを特徴とする、ヒトの免疫感作に用いる抗原性物質。

NeuNAc 3GalNAc 4GlcNAc、

NeuNAc 3GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc、そして

NeuNAc 6GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc 。

## 【請求項 16】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を、化学的または生化学的に合成した多価の形態で含んでいる抗原性物質を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を製造する方法。

## 【請求項 17】

請求項 16 で定義されている抗原性物質を用いて、血清、好ましくはヒトの血清から抗体を精製する方法。

## 【請求項 18】

請求項 16 で定義されている抗原性物質を用いて、抗体の検出および/または定量を行う方法。

## 【請求項 19】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を少なくとも一種含む多価またはオリゴ価の非免疫原性結合体を用いて、癌治療用医薬組成物を製造する方法。

## 【請求項 20】

下記式で表される末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌治療用医薬組成物。

NeuNAc 3GalNAc 4GlcNAc、

NeuNAc 3GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc、そして

NeuNAc 6GalNAc 4(Fuc 3)GlcNAc 。

## 【請求項 21】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を含むオリゴ糖鎖を用いた、癌治療用医薬組成物の製造方法。

## 【請求項 22】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含む少なくとも一種のオリゴ糖鎖に対する抗体を包含する、癌治療用医薬組成物。

## 【請求項 23】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を含む少なくとも一種のオリゴ糖鎖に対する抗体を用いる癌治療用医薬組成物の製造方法。

## 【請求項 24】

該オリゴ糖鎖が請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含むことを特徴とする、請求項 22 に記載の製造方法。

## 【請求項 25】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を含むオリゴ糖鎖を用いた、癌治療用の免疫原性医薬組成物の製造方法。

## 【請求項 26】

該医薬組成物が、医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドを包含することを特徴とする、請求項 19、21 および 23 のいずれかに記載の方法あるいは請求項 20 または 22 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 27】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖あるいはその類似体また

は誘導体を包含し、好ましくは医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドを更に包含する癌ワクチン。

【請求項 28】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を含むオリゴ糖鎖を用いた、癌ワクチンの製造方法。

【請求項 29】

該オリゴ糖配列が、請求項 32 のマンノシル残基または N - グリカン構造に 2 - 結合していることを特徴とする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

式 (I) で表される末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に結合する結合性物質であって、アプタマー、酵素、人体に適応させた抗体またはペプチドであることを特徴とする、ヒトの癌の治療用物質。

【請求項 31】

請求項 11 で定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に結合する物質であって、アプタマー、酵素、人体に適応させた抗体またはペプチドであることを特徴とする、オリゴ糖配列結合性物質。

【請求項 32】

下記式 (II) :



(式中、

Y は非炭水化物スパーサーまたはグリコシド結合していない末端結合体であり、

n は各々独立に 0 または 1 であり、

X はラクトシル残基、ガラクトシル残基、N - アセチルラクトサミニル残基、マンノシル残基、Man<sub>2</sub>残基、Man<sub>3</sub>残基、Man<sub>3</sub>GlcNAc残基、Man<sub>4</sub>GlcNAc残基、N - アセチルグルコサミニル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、好ましくはラクトシル残基、ガラクトシル残基、マンノシル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、

OS は請求項 11 で定義されているオリゴ糖配列であり、

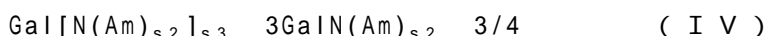
好ましい態様においては、X はマンノシル残基であり、OS は X に 2 - 、 4 - または 6 - 結合、好ましくは 2 - 結合しており、

他の好ましい態様においては、X はラクトシル残基または N - アセチルラクトサミニル残基であり、OS は X の Gal 残基に 3 - または 6 - 結合しているか、X はガラクトシル残基または N - アセチルガラクトサミニル残基であり、OS は X に 3 - または 6 - 結合している。)

で表される抗原性エピトープ構造を包含することを特徴とする、癌治療用医薬組成物。

【請求項 33】

下記式 (IV) :



(式中、

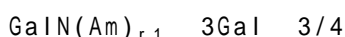
Am はアミン基の誘導残基であるが、但し、Am はアセチル (Ac) 基またはイミド基ではなく、好ましくは GalN 残基とカルボン酸を形成するアミド基、例えば、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含むシクロヘキサンラジカルアミドなどの環状アミド、および安息香酸のアミド基のような芳香族炭化水素のアミド基であり、

s<sub>2</sub> および s<sub>3</sub> は各々独立に 0 または 1 の整数である。)

で表される炭水化物。

【請求項 34】

下記式 :



(式中、

r<sub>1</sub> は 0 または 1 の整数であり、

A mはアミン基の誘導残基であるが、但し、A mはアセチル(A c)基またはイミド基ではなく、好ましくはGalN残基とカルボン酸を形成するアミド基、例えば、ホルムアミド、プロピオン酸アミド、他のアルキルアミド、カルボン酸を含むシクロヘキサンラジカルのアミドなどの環状アミド、および安息香酸のアミド基のような芳香族炭化水素のアミド基である。) )

で表される炭水化物。

【請求項35】

GalN誘導体、特にIacdiNac構造およびその類似体を製造する方法にして、末端ヘキソサミンを受容体として下記式(III)で表されるグリコシル基転移反応を行うことを包含する製造方法。



[式中、

yは - または - 結合であり、

xは各々独立して3位、4位または6位の結合位置を表し、

GalN<sub>3/4</sub>は、ヘキソース、ヘキソサミンまたはヘキソサミン誘導体、好ましくはGal、GalN、GalNAc、Glc、GlcNまたはGlcNAc、に3-または4-結合している非還元末端GalNを表し、

SACはシアル酸または下記式で表される糖残基を表す。



(式中、HexはGalまたはGlcであり、s<sub>1</sub>、s<sub>2</sub>およびs<sub>3</sub>は各々独立に0

または1の整数であり、但しs<sub>1</sub>が1である場合には、s<sub>3</sub>は0である)

上記式中のs<sub>1</sub>が1である場合には、SACで表される構造はヘキスロン酸構造、好ましくはGlcA、を含み；s<sub>3</sub>が1であり、且つ、s<sub>2</sub>が1である場合には、SACで表される構造はGlcNAcまたはGalNAcを含み；そして、s<sub>2</sub>が0である場合には、SACで表される構造はGalNまたはGlcNを含んでいる。]

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 02/00674
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C07H 5/06, G01N 33/574, A61K 39/00, A61P 35/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: C07H, G01N, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, WPI DATA, BIOSIS, CA-PLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E,X	WD 02077649 A1 (PRIMUM K.K.), 3 October 2002 (03.10.02)	1-30
	--	
X	EP 0919563 A2 (HEALTH RESEARCH, INC.), 2 June 1999 (02.06.99), see specially the claims	17,19-20
	--	
X	Experimental Parasitology, Volume 96, 2000, A. Kwame Nyame et al, "Antibody Responses to the Fucosylated LacdiNAc Glycan Antigen in Schistosoma mansoni-Infected Mice and Expression of the Glycan among Schistosomes", pages 202-210	11,13,19-20
	--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"Z" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
4 February 2003	05-02-2003	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Micael Oswald/BS Telephone No. +46 8 782 25 00	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FI 02/00674

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0017654 A1 (CUMMINGS, RICHARD, D.), 30 March 2000 (30.03.00) --	11,13,19-20
X	EP 0565241 A1 (ELI LILLY AND COMPANY), 13 October 1993 (13.10.93), see specially the claims --	19-20
Y	Eur. J. Biochem., Volume 259, 1999, Juhani Saarinen et al: "N-Glycan structures of matrix metalloproteinase-1 derived from human fibroblasts and from HT-1080 fibrosarcoma cells", page 829 - page 840, see specially discussion page 839 --	1-30
Y	Biochemistry, Volume 33, 1994, Kazuo Yamamoto et al: "Interaction of Immobilized Recombinant Mouse C-Type Macrophage Lectin with Glycopeptides and Oligosaccharides", page 8159 - page 8166, see specially figure 1, Oligosaccharide C. --	1-30
Y	US 5660834 A (KJELDEN ET AL), 26 August 1997 (26.08.97) --	1-30
Y	US 4904596 A (HAKOMORI), 27 February 1990 (27.02.90) --	1-30
Y	WO 9317033 A1 (THE BIOMEMBRANE INSTITUTE), 2 Sept 1993 (02.09.93)	13-30
A	--	1-12,31-33

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 02/00674

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Carbohydrate Letters, Volume 4, No. 2, 2001, Ekaterina V. Shipova et al, "Modified blood group a trisaccharide probes: Synthesis and Interaction with Antibodies", pages 85-90, see specially page 87 --	32
X	J. Exp. Med., Volume 150, 1979, William W. Young et al, "Production of monoclonal antibodies two distinct steric portions of the ganglio-N-triosylceramide (ASIALO GM2), pages 1008-1019 --	31-33
X	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 8, 1998, Gabi Baisch et al, "On the preparative use of recombinant B(1-3)galactosyl-transferase", pages 751-754 --	31,33
X	US 6187754 B1 (OHRLEIN), 13 February 2001 (13.02.01) --	31,33
A	Carbohydrate Research, Volume 306, 1998, Rafael F. Sala et al, "UDP-N-trifluoroacetylglucosamine as an alternative substrate in N-acetylglucosaminyltransferase reactions", pages 127-136, see specially page 129 --	31-33
A	Current Opinion in Biotechnology, Volume 10, 1999, Monica M Palcic, "Biocatalytic synthesis of oligosaccharides", pages 616-624 --	31-33
A	Biochemical Society transactions, Volume 23, 1995, D. H. Van den Eijnden et al, "Novel glycosylation routes for glycoproteins: the lacdiNAc pathway", pages 175-179 -- -----	31-33

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FI02/00674

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.: 21-26  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**see next sheet\***
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

**see next sheet\*\***

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FI02/00674

\*  
Claims 21-26 relate to methods of treatment of the human or animal body by therapy (Rule. 39.1.(iv)). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds.

\*\*  
The separate inventions are:

Invention A, claims 1-30, concerns a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of a Lactinac oligosaccharide sequence. It also concerns: diagnostic agents, pharmaceutical compositions, cancer vaccines and antigenic carbohydrate substances.

Invention B, claim 31 and 33, concerns a carbohydrate substance according to formula IV and a method for production of GalN derivatives according to formula III.

Invention C, claim 32, concerns a carbohydrate substance according to formula V.

Invention A relates mainly to methods for diagnosing and treatment of cancer. Invention B relates to a method for production of GalN derivatives and a carbohydrate substance. Invention C relates to a carbohydrate substance.

The only special technical feature these inventions have in common is Lactinac oligosaccharide sequence or Lactinac derivatives. Lactinac or Lactinac derivatives are well known to the art. The carbohydrate substances of claims 31 and 32 are so different from each other that no technical relationship or interaction is seen to be present so as to form a single general inventive concept. Therefore, these inventions are not so linked as to form a single general inventive concept as described in Rule 13.1 PCT. According to Article 34 (3) (a-c) and Rule 13.2, an international application shall relate to one invention only or to a group of inventions linked by one or more of the same or corresponding "special technical features", i.e. features that define a contribution which each of the inventions makes over the prior art.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No.	
				30/12/02	PCT/FI 02/00674
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 02077649 A1	03/10/02	NONE			
EP 0919563 A2	02/06/99	JP 11199596 A US 5972907 A	27/07/99 26/10/99		
WO 0017654 A1	30/03/00	AU 5928999 A US 6261788 B	10/04/00 17/07/01		
EP 0565241 A1	13/10/93	SE 0565241 T3 AT 137241 T AU 661762 B AU 3519993 A BR 9301136 A CA 2091521 A CN 1079967 A CY 1947 A CZ 9300390 A DE 69302317 D,T DK 565241 T ES 2088227 T FI 931086 A GR 3020406 T HK 132396 A HU 69613 A HU 9300687 D IL 105018 D JP 3171506 B JP 6025302 A MX 9301344 A NO 930890 A NZ 247105 A ZA 9301723 A	15/05/96 03/08/95 16/09/93 28/09/93 13/09/93 29/12/93 12/03/93 16/03/94 19/09/96 28/05/96 01/08/96 13/09/93 30/09/96 26/07/96 28/09/95 00/00/00 00/00/00 28/05/01 01/02/94 01/09/93 13/09/93 25/11/94 10/09/94		
US 5660834 A	26/08/97	AT 123066 T DE 68922806 D,T EP 0357767 A,B SE 0357767 T3 JP 2503387 T JP 2849683 B JP 3066741 B JP 11092400 A US 5229289 A US 5747048 A WO 8908711 A	15/06/95 29/02/96 14/03/90 18/10/90 20/01/99 17/07/00 06/04/99 20/07/93 05/05/98 21/09/89		
US 4904596 A	27/02/90	JP 62190074 A	20/08/87		
WO 9317033 A1	02/09/93	CA 2129987 A EP 0521692 A EP 0638085 A JP 6145190 A JP 7504222 T	02/09/93 07/01/93 15/02/95 24/05/94 11/05/95		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No.	
				30/12/02	PCT/FI 02/00674
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 6187754 B1	13/02/01	AU 1444697 A EP 0886639 A WO 9728174 A	22/08/97 30/12/98 07/08/97		

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395	C 1 2 P 19/26	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 19/26	C 1 2 Q 1/34	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/34	G 0 1 N 33/53	V
C 1 2 Q 1/37	G 0 1 N 33/574	Z
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/574	A 6 1 K 37/48	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 サトマー, テロ

フィンランド国、エフアイエヌ - 0 0 7 0 0 ヘルシンキ、ラエティエ 1 0 コー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 CA04 CA05 CA06 DA02 GA03 GA18 HA03  
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ67 QR15 QR16 QR48 QS10 QS12  
 QS28 QS36 QX04  
 4B064 AF21 AG27 CA10 CA20 CA21 CC24 DA05 DA14  
 4C084 AA02 AA07 AA17 BA03 DC01 ZB26  
 4C085 AA13 BB31 CC21 DD88 EE06  
 4C086 AA01 EA01 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	癌症特异性寡糖序列及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005500057A</a>	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003521773	申请日	2002-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	Tessera公司生物在内比的合作社		
申请(专利权)人(译)	生物三通Serapyizu小屋		
[标]发明人	サーリネンユハニ ヘリンヤリ サトマーテロ		
发明人	サーリネン,ユハニ ヘリン,ヤリ サトマー,テロ		
IPC分类号	A61K31/702 A61K38/00 A61K38/43 A61K39/00 A61K39/395 A61P35/00 C12N15/02 C12P19/26 C12P21/08 C12Q1/34 C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/57426 G01N33/57469 G01N2400/02		
FI分类号	C12N15/00.C A61K31/702 A61K39/00.H A61K39/395.D A61P35/00 C12P19/26 C12P21/08 C12Q1/34 C12Q1/37 G01N33/53.V G01N33/574.Z A61K37/02 A61K37/48		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/DA02 4B024 /GA03 4B024/GA18 4B024/HA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ67 4B063/QR15 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063 /QX04 4B064/AF21 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CA21 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA03 4C084/DC01 4C084/ZB26 4C085 /AA13 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE06 4C086/AA01 4C086/EA01 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26		
优先权	2001001664 2001-08-17 FI		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明公开了癌细胞特异性表达的寡糖序列。本发明涉及通过检测生物样品中含有LacdiNAc结构的癌特异性寡糖链的存在并使用糖链的存在作为指标来检测癌症的方法。本发明提供抗原物质，诊断剂，药物组合物和癌症疫苗，其包含与寡糖链或寡糖链结合的结物质。本发明还涉及治疗癌症的方法。

		(43) 公表日 平成17年1月6日 (2005. 1. 6)	
(5) Int. Cl. 7	FI	テーマコード (参考)	
C12N 15/02	C12N 15/00	C	4B024
A61K 31/702	A61K 31/702		4B063
A61K 38/00	A61K 39/00	H	4B064
A61K 38/43	A61K 39/395	D	4C084
A61K 39/00	A61P 35/00		4C085
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 114 頁) 最終頁に特	
(21) 出願番号	特願2003-521773 (P2003-521773)	(71) 出願人	502107469
(86) (22) 出願日	平成14年8月16日 (2002. 8. 16)		バイオティ セラピューズ コープ
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月16日 (2004. 2. 16)		フィンランド国、エフアイエヌ-205
(86) 国際出願番号	PCT/FI2002/000674		O トゥルク、テキストカトゥー 6
(87) 国際公開番号	W02003/016464	(74) 代理人	100116838
(87) 国際公開日	平成15年2月27日 (2003. 2. 27)		弁理士 渡邊 清三
(31) 優先権主張番号	20011664	(72) 発明者	サーリネン, ユハニ
(32) 優先日	平成13年8月17日 (2001. 8. 17)		フィンランド国、エフアイエヌ-003
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		O ヘルシンキ、エルヤクセンティエ
		(72) 発明者	ヘリン, ヤリ
			フィンランド国、エフアイエヌ-016
			O ヴァンター、アスキストンティ 2
			ー