

(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2005-500535

(P2005-500535A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574	GO 1 N 33/574	2 G O 4 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	4 C O 7 6
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 5
A 6 1 K 47/36	A 6 1 K 39/395	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 107 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-521371 (P2003-521371)	(71) 出願人	502107469 バイオティ セラピューズ コーブ フィンランド国、エフアイエヌー2052 O トゥルク、テキストカトゥ 6
(86) (22) 出願日	平成14年8月20日 (2002.8.20)	(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19日 (2004.2.19)	(72) 発明者	ナトゥネン, ヤリ フィンランド国、エフアイエヌー0017 O ヘルシンキ、メリトゥリンカトゥ 6 セー 18
(86) 国際出願番号	PCT/FI2002/000681	(72) 発明者	テネベリ, スサン スウェーデン国、エスー43063 ヒン ドス、ペーエル 1639
(87) 国際公開番号	W02003/016915		
(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	20011671		
(32) 優先日	平成13年8月20日 (2001.8.20)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍特異的オリゴ糖配列およびその用途

(57) 【要約】

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

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍特異的末端 N - アセチルグルコサミン残基を含む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を遊離させて、該生物学的試料から遊離したオリゴ糖構造を含む画分を生成し、そして該画分中の該オリゴ糖配列の存在を指標として、該生物学的試料中の癌の存在を検出する。

10

【請求項 3】

該結合性物質が、下記式 (I) で表される少なくとも一種の N - グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。



(式中、

r_1 、 r_2 、 r_3 、 r_4 、 r_5 および r_6 は各々独立に 0 または 1 の整数であるが、 r_1 と r_2 の少なくとも一方は 1 であり、

GN は GlcNAc であるが、

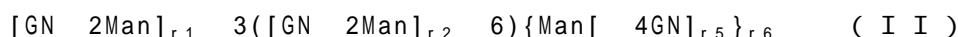
但し、 r_1 と r_2 が共に 1 である場合には、下記 (i) ~ (iv) からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式 (I) に加えることができる：

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

20

【請求項 4】

該結合性物質が、下記式 (II) で表される少なくとも一種の N - グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 3 に記載の診断方法。



(式中、

r_1 、 r_2 、 r_5 および r_6 は各々独立に 0 または 1 の整数であるが、 r_1 と r_2 の少なくとも一方は 1 であり、

GN は GlcNAc であるが、

但し、 r_1 と r_2 が共に 1 である場合には、下記 (i) ~ (iv) からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式 (II) に加えることができる：

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

30

40

【請求項 5】

該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 3 に記載の診断方法。

GlcNAc 2Man、GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、

GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、

GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、

GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、

GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man、GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc、

50

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

【請求項 6】

該結合性物質が、下記式 (I I I) で表される少なくとも一種の O - グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。

$[GlcNAc\ 3]_{s_1}[Gal\ 3]_{s_2}(\{[GlcNAc\ 3]_{s_3}Gal\ 4\}_{s_4}GlcNAc\ 6)_{s_5}GalNAc\ (I\ I\ I)$
 (式中、 s_1 、 s_2 、 s_3 、 s_4 および s_5 は各々独立に 0 または 1 の整数であるが、式 (I I I) で表される末端オリゴ糖配列が少なくとも一種の非還元末端 GlcNAc - 残基を有するために、下記条件の少なくとも一種を満足する： s_1 は 1 である； s_5 、 s_3 および s_4 は共に 1 である；そして s_5 は 1 であるが、 s_3 と s_4 は 1 である。)

【請求項 7】

該オリゴ糖配列が、タンパク質結合 GlcNAc またはその誘導体であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。

【請求項 8】

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

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

【請求項 9】

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末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 2 に記載の診断方法。

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

【請求項 10】

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 ~ 9 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 11】

該タンパク質が、抗体、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項 10 に記載の診断方法。

【請求項 12】

請求項 2 ~ 11 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 13】

請求項 2 ~ 9 のいずれかで定義されている末端オリゴ糖配列を、化学的または生化学的に合成した多価の形態で含んでいることを特徴とする、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

20

30

40

50

【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、抗体の検出および定量のいずれかまたは両方を行う方法。

【請求項 17】

請求項 2 ~ 9 のいずれか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結合する結合性物質を包含する、癌治療用医薬組成物。

【請求項 18】

該結合性物質が抗体であることを特徴とする、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 2 ~ 9 のいずれか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包含する、癌治療用医薬組成物。 10

【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 17 ~ 19 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 2 ~ 9 のいずれか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結合する結合性物質を、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ためにヒトまたは動物の患者に投与することを特徴とする治療方法。

【請求項 22】

請求項 2 ~ 9 のいずれかで定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に対する抗体を、結合性物質として用いる癌の治療方法。 20

【請求項 23】

該抗体が、ヒト抗体または人体に適応させた抗体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 または 23 に記載の癌の治療方法。

【請求項 25】

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 ~ 24 のいずれかに記載の癌の治療方法。 30

【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 21 ~ 25 のいずれかに記載の治療方法。

【請求項 27】

請求項 2 ~ 9 のいずれかで定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌ワクチン。

【請求項 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】

請求項 2 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、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。 40

【請求項 30】

請求項 2 ~ 9 のいずれかで定義されているオリゴ糖配列と化合物を接触させる工程、および

該化合物と該オリゴ糖配列との結合の有無を検出する工程

を包含する、癌または腫瘍に特異的な治療剤または診断剤を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

種々の腫瘍は、同種の細胞や組織の非悪性グリコシル化産物とは異なるオリゴ糖配列を発現する。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GM1 (Gal 3GalNAc 4(NeuNAc 3)Lac Cer)やGD2 (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)やシアリル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、が癌に存在することも示されている。癌においては、関連するオリゴ糖構造およびその特異性について十分に確立されている症例はわずかであり、これらの構造の中には、正常な細胞および組織に存在するものもあることから、癌には単に高濃度で存在しているだけだと考えられる。

【0003】

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

【0004】

半合成糖脂質であるGlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Lac Cerに対する複数のモノクローナル抗体が作製されており、これらの抗体は培養結腸癌細胞系および腫瘍から得た糖脂質を認識することが示されている (Holmes et al., 1991)。しかしながら、抗体は複数の構造を認識し、結合データは矛盾した。さらに、糖脂質は全ての抗体によっては認識されることはなく、癌細胞または腫瘍から得た糖脂質構造を特徴付けるには至らなかった。従って、腫瘍上の末端GlcNAc構造の存在は確立されなかった。他の研究には、GlcNAc 3Lac Cerに対するモノクローナル抗体の製造に関する記載がある (Nakamura et al., 1993)。この抗体による上記の五糖構造の認識も弱かった。さらにこの抗体は、ヒト由来の細胞系で

10

20

30

40

50

はないCOS-1細胞上のプロテアーゼ感受性エピトープを認識した。上記のいずれの研究に示された免疫化プロトコールも、糖の多価結合体に対して誘導された抗体反応については記載されておらず、免疫化は糖脂質によるものである。

【0005】

通常、ヒト血清中には末端GlcNAc構造を認識する多量の抗体が存在する。末端Gal 3Gal 4GlcNAc-構造を認識する天然の抗体のクラスもある。Gal 抗原はヒトに天然には存在しないが、天然の抗体が、例えばGalNAc 3Gal 4GlcNAc、GalNAc 3Gal 4GlcNAc および GlcNAc 3Gal 4GlcNAcといった構造に結合することも近年報告されている (Teneberg et al., 1996)。X2-構造であるGalNAc 3Gal 4GlcNAcはヒト組織に提示されている正常な抗原であり、GalNAc 3Gal 4GlcNAc および Gal 3Gal 4GlcNAcといった構造は、正常な組織や癌化組織からは報告されていない。このように、末端GlcNAc構造が腫瘍抗原であるという本願の知見は、天然の抗体の実際の機能が、末端GlcNAc構造を含む癌の予防である可能性を示している。

10

【0006】

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

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

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

20

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

【0007】

従来技術としては、キトビオース-マンノース三糖を認識する、腫瘍の診断用抗体および治療用抗体がDE 38 07 594 A1に記載されている。この特許出願は、抗体以外にも、異なる末端構造を有する複数のN-グリカンも開示しており、その中には、非還元末端N-アセチルグルコサミンを有するものもある。望ましい構造のいくつかは、後に正常なグリカンであり、癌特異的構造ではないと特徴付けられた。この出願は、癌の分野に有用な構造を開示し、請求しているが、望ましいグリカンがどのような構造のものかは出願明細書からは明らかではない。GlcNAc残基が 2、4 および 6 - 結合できることが示されているが、本発明はこのような通常は見られない構造に関するものではない。

30

【0008】

別の特許出願であるW0 00/21552は、ウシ下顎腺ムチンから単離した複数の通常は見られないO-グリカン構造を請求している。上記の構造の中には、例えば、GlcNAc 6GalNAc 6GalNAc および GalNAc 3(GlcNAc 6)GalNAcのように末端GlcNAc-残基を有するものもある。本発明は2個のGalNAc残基を有するこれらの構造に関するものではない。上記特許出願は、上記構造を癌に関連する抗原として用いる潜在的な治療用途の可能性に関する記載を含む。しかし、上記構造がウシ癌に関連することは示されておらず、ウシ正常下顎腺分泌物に存在することしか示されていない。さらに、この構造がヒト組織に存在する可能性はほとんどない。それはグリコシル化反応は種特異的でヒトとウシの間では異なっており、グリコシル基転移酵素およびグリコシル化の反応方式がウシとヒトにおいては異なるためである。ヒトゲノムも公知であるが、上記特許出願で請求されているウシ構造の合成に関連する可能性のあるグリコシル基転移酵素は製造されておらず、特徴づけもされていない。現時点では、請求されている6種の新規なグリコシル基転移酵素のいずれもがヒトまたはヒト癌(あるいはウシ癌)について報告されていない。さらに、いかなるウシグリコシル化産物も詳細に特徴づけられているヒト唾液腺ムチンには見出されていない。

40

【0009】

発明の概要

50

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

【0010】

発明の詳細の説明

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

【0011】

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

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

これらの欠陥は、糖タンパク質および糖脂質中に複数の通常は見られない末端エピトープを生じる。本発明は上記三種のグループに属するオリゴ糖エピトープに関する。本発明は、正常な - ガラクトシル化オリゴ糖配列を有する三種類のグリカン鎖の全てに普遍的に存在する、類似した欠陥に始めて着目した。末端 - 結合 GlcNAc は末端構造として存在する。この構造は、末端 GlcNAc-残基を直接修飾するための、1,4(3)-Gal-残基転移酵素反応を含む酵素反応の欠陥を示し、その一方で、末端構造を分解することのできるゴルジ経路における増加したグリコシダーゼ活性を示す。しかしながら、三種の炭水化物における欠陥の普遍性は、ゴルジ装置の機構がかなり乱れているので、ゴルジ経路の後期に位置する末端修飾酵素が腫瘍細胞の発現する全グリカンを効果的に修飾できないことを示す。さらに、本発明は以下について開示する：

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

タンパク質結合 N - アセチルグルコサミンは、一般的に、いわゆる O - GlcNAc-構造の一部

として細胞内に存在する。本発明者らは、タンパク質結合 N - アセチルグルコサミンの強い過剰発現に着目した。過剰発現によって、ヒト腫瘍は細胞表面に O - 結合 GlcNAc によるいくつかの標識さえも有することとなる。

【0012】

末端 - 結合 GlcNAc は、上記グループ 1 ~ 3 の全てに共通だが、末端近傍の構造は、腫瘍や癌の診断または治療において認識されなければならない構造に影響を与えることが判明した。本発明は、特に末端 GlcNAc と三種の欠陥オリゴ糖配列グループにおいて末端 GlcNAc の近傍に位置する少なくとも一つの単糖残基を有する末端オリゴ糖配列を用いた、治療剤および診断剤に関する。また、本発明は、ポリラクトサミンの非還元末端 - GlcNAc オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖、O - グリカンまたは N - グリカンに関する。

10

【0013】

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

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

GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc Asn

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

20

$[GN\ 2Man]_{r_1}\ 3([GN\ 2Man]_{r_2}\ 6)\{Man[4GN[4(Fuc\ 6)GN]_{r_4}]_{r_5}\}_{r_6}$ (I)

(式中、

r_1 、 r_2 、 r_3 、 r_4 、 r_5 および r_6 は各々独立に 0 または 1 の整数であるが、 r_1 と r_2 の少なくとも一方は 1 であり、

30

GN は GlcNAc であるが、

但し、 r_1 と r_2 が共に 1 である場合には、下記 (i) ~ (iv) からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式 (I) に加えることができる：

(i) 一つの GN Man が、一つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、(ii) 一つの GN 2Man が Man に縮められている、(iii) Man 6 残基および Man 3 残基からなる群より選ばれる少なくとも一種が GN 6 または GN 4 で置換されている、および (iv) Man 4 が GN 4 で置換されている；そして

{ } は主鎖に存在するか存在しない基を表し、() は分岐鎖を表す。)

【0014】

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

40

【0015】

より好ましいオリゴ糖配列は、下記式 (II) で表される構造である。

$[GN\ 2Man]_{r_1}\ 3([GN\ 2Man]_{r_2}\ 6)\{Man[4GN]_{r_5}\}_{r_6}$ (II)

(式中、

r_1 、 r_2 、 r_5 および r_6 は各々独立に 0 または 1 の整数であるが、 r_1 と r_2 の少なくとも一方は 1 であり、

GN は GlcNAc であるが、

50

但し、 r_1 と r_2 が共に1である場合には、下記 (i) ~ (iv) からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式 (I I) に加えることができる：

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

【0016】

さらに好ましい態様においては、GNはGlcNAcであるが、但し、 r_1 と r_2 が共に1である場合には、下記 (i) および (ii) からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式 (I I) に加えることができる：

(i) 1つのGN Manが、1つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、および (ii) 1つのGN 2ManがManまたはMan 6-残基に縮められている。最も好ましい態様においては、全てのGNがGlcNAcである。

【0017】

伸長されていない構造としては、以下のオリゴ糖配列が好ましい：

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

【0018】

より好ましいN - グリカン型オリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

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

【0019】

最も好ましいN - グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

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

【0020】

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

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

【0021】

10

20

30

40

50

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

$[GlcNAc\ 3]_{s_1}[Gal\ 3]_{s_2}(\{[GlcNAc\ 3]_{s_3}Gal\ 4\}_{s_4}GlcNAc\ 6)_{s_5}GalNAc\ (III)$
 (式中、 s_1 、 s_2 、 s_3 、 s_4 および s_5 は各々独立に0または1の整数であるが、式(III)で表される末端オリゴ糖配列が少なくとも一種の非還元末端GlcNAc - 残基を有するために、下記条件の少なくとも一種を満足する： s_1 は1である； s_5 、 s_3 および s_4 は共に1である；そして s_5 は1であるが、 s_3 と s_4 は共に0である。)

【0022】

より好ましいO - グリカン構造としては、下記式(IV)で表される少なくとも一種の構造が挙げられる：

$[GlcNAc\ 3]_{s_1}[Gal\ 3]_{s_2}(GlcNAc\ 6)_{s_5}GalNAc\ (IV)$
 (式中、 s_1 、 s_2 および s_5 は各々独立に0または1の整数であるが、 s_1 と s_5 の少なくとも一方は1である。)

【0023】

好ましいO - グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

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

【0024】

さらに好ましいO - グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

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

【0025】

最も好ましいO - グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

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

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

本発明は、ヒト腫瘍に提示されるポリ - N - アセチルラクトサミン型構造中の末端N - アセチルグルコサミン(GlcNAc)の存在を開示する。上記構造は、検討した四つのヒト副腎腫のうちの一つから多量に見出されたのが初めである。腫瘍の糖脂質画分は、特異的な放射性標識*Escherichia coli*株とパーメチル化した試料のFAB - 質量分析法によって、末

10

20

30

40

50

端 N - アセチルグルコサミンを含むと特徴付けられた。糖脂質画分は、特異的なレクチンを用いて検出することのできる末端 N - アセチラクトサミンも含んでいた。正常な腎臓由来糖脂質を細菌でスクリーニングしたところ、末端 GlcNAc は対応の正常組織には存在しないことが判明した。これは複数の他の対照組織にも存在しないことから明らかである。本発明の一つの態様は、腫瘍由来の末端 N - アセチルグルコサミン残基を有する少なくとも一種のオリゴ糖配列の検出または単離に関する。

【0029】

本発明において、単離または検出される腫瘍特異的構造としては、以下の糖配列が挙げられる：GlcNAc 3Gal、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc、GlcNAc 6Gal、GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal、GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc、GlcNAc 6Gal、そして GlcNAc 6Gal 4GlcNAc。10

上記糖配列は、ポリ - N - アセチラクトサミン鎖の一部であるため、ポリ - N - アセチラクトサミン鎖は少なくとも一種の末端 - 結合 GlcNAc を含んでいる。

【0030】

さらに好ましい態様においては、本発明は、次に示される非 6 - 結合含有直鎖状ポリラクトサミン配列に関する：GlcNAc 3Gal、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc、そして GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4GlcNAc。

【0031】

別の態様においては、本発明は、次に示される 6 - 結合含有非分岐ポリラクトサミン配列に関する：GlcNAc 6Gal、GlcNAc 6Gal 4GlcNAc、そして GlcNAc 6Gal 4GlcNAc 3Gal 4GlcNAc。20

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

4. タンパク質結合 N - アセチルグルコサミン

本発明者らは、喉頭、胃、結腸および肺などの腫瘍に由来する、タンパク質結合 GlcNAc 残基を特徴付けた。本明細書は、腫瘍においてはタンパク質結合 GlcNAc の過剰発現が普遍的であることを示す。新規な N - グリカン型腫瘍抗原も新規なグリコシル基転移法によって腫瘍の組織片から特異的に検出されたが、対応する正常組織や非悪性化組織からは、全く検出されないか少量しか検出されなかった。タンパク質結合 GlcNAc の分析により、種々の形態のタンパク質結合 GlcNAc の存在が示された。30

【0035】

具体的な態様においては、本発明は、本願で定義した治療剤や診断剤における - 結合 N - アセチルグルコサミン単糖残基 (GlcNAc) の用途、および GlcNAc を包含する医薬組成物に関する。大部分の腫瘍細胞は、 - 脱離法 (-elimination) によって遊離させることができる O - グリカン様 GlcNAc を有する。40

【0036】

本発明の好ましい態様は、本発明で定義した診断剤や治療剤における、次の O - グリコシド構造の用途に関する。

GlcNAcSer および / または GlcNAcThr

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

【0037】

本発明のより好ましい態様においては、アミノ酸であるセリン (Ser) 残基およびスレオニン (Thr) 残基は、ペプチドまたはペプチド結合体の一部であるかアミノ基および / ま50

たはカルボン酸基から誘導される。

【0038】

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

【0039】

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

10

【0040】

他の一つの好ましい態様においては、本発明で説明する用途に用いるために、GlcNAc Serおよび/またはGlcNAc Thr、即ち、GlcNAc Xを、本明細書で説明する多価の担体に結合する。GlcNAc Xは予防接種に有用な担体に結合していることが好ましく、本明細書で説明する炭水化物担体に結合していることが最も好ましい。

【0041】

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

20

【0042】

本発明のオリゴ糖配列を表す一般構造

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

30

40

【0043】

本明細書において、N-結合型、O-結合型およびポリラクタミン型のオリゴ糖配列と関連して記載した本発明の末端GlcNAcオリゴ糖鎖の用途は、いずれも本願で開示する単糖構造であるタンパク質結合GlcNAcおよびその誘導体にも適用される。

【0044】

希少な種類のガングリオシド型またはガラクトシル型のグロボシドも、腫瘍特異的末端GlcNAcとして用いることができる。いくつかの組織では末端Gal 4GlcNAc 3/6構造が糖

50

脂質コアに結合されており、本発明で説明する低ガラクトシル化条件においては、末端GlcNAcを形成することができる。

【0045】

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

【0046】

本明細書において「オリゴ糖配列」または「オリゴ糖」という用語には、本願で開示するタンパク質結合GlcNAcおよびその誘導体も含まれる。

【0047】

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

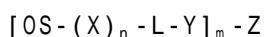
【0048】

特異的な結合性物質のコンビナトリアルケミストリーライブラリーは、結合性分子を探索するために用いることができる。糖結合性のタンパク質、抗体またはレクチンは生物工学的に作製することができ、例えば、ファージディスプレイ法によって本発明の構造に対して特異的な結合性物質を製造することができる。標識した細菌または細胞、あるいは重合体の表面であって、本発明の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腫瘍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もできる。オリゴ糖またはその誘導体を遊離させるための化学的方法の具体例には、糖脂質の音波分解法（osonolysis）、および糖タンパク質からオリゴ糖を遊離させるためのβ-脱離法（beta-elimination）またはヒドラジン分解法（hydrazinolysis method）が含まれる。その他の方法としては、糖脂質画分の単離が挙げられる。腫瘍特異的オリゴ糖配列に特異的に結合する結合性物質は、細胞表面上の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。

【0049】

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

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、本願で開示する腫瘍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、

OSはヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖であり、

Lは酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子であり、

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

Yはスペーサー基または末端結合体、例えばセラミド脂質部またはZへの結合部であり、Zはオリゴ価または多価の担体である。) ;そして

2) 免疫応答活性化物質と共に多価結合体で動物またはヒトを免疫する。

オリゴ糖配列は免疫応答活性化物質に多価の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。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。

【0050】

抗体産生または予防接種は、腫瘍特異的オリゴ糖配列の類似体または誘導体によっても達成されうる。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-アルキル基を含む化合物が挙げられる。

【0051】

GlcNAc₃Gal₄GlcNAcに結合する抗体の産生に用いることができる類似体としては、Hex(NAc)₀₋₁Gal₃GlcNAc₄やHex(NAc)₀Gal₃GlcNAc₄(式中、Hexはヘキソースであり、好ましくはGalまたはGlcである)などの配列が含まれる。類似体には、上記式中のGlcNAcが類似の異性体、例えばManNAcで置換された分子も含まれる。

【0052】

本発明によると、抗体を血清、好ましくはヒトの血清から精製するために腫瘍特異的オリゴ糖配列を用いることができる。通常、ヒト血清には末端GlcNAc構造を認識する抗体が大量に存在する。末端Gal₃Gal₄GlcNAc構造を認識する天然抗体のクラスも存在する。Gal₁抗原はヒトに天然には存在せず、天然抗体が*in vitro*の構造物であるGalNAc₃Gal₄GlcNAc、GalNAc₃Gal₄GlcNAcおよびGlcNAc₃Gal₄GlcNAcにも結合することが近年示された(Teneberg *et al.*, 1996)。X₂-構造であるGalNAc₃Gal₄GlcNAcは、ヒト組織に提示される正常な抗原であるが、GalNAc₃Gal₄GlcNAc構造およびGal₃Gal₄GlcNAc構造はヒトの正常組織および癌組織からは見出されていない。このように、末端GlcNAc-構造が腫瘍抗原であるという本発明の知見は、天然抗体の実際の機能が癌の予防および末端GlcNAc-構造を有する腫瘍の破壊の両方である可能性を示した。腫瘍特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体(例えば類似の異性体)は、血清、好ましくはヒトの血清、から抗体を精製するために固定することもできる。本発明は、本発明の腫瘍特異的オリゴ糖配列に強固に結合する天然のヒト抗体に関する。

【0053】

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

【0054】

さらに、腫瘍特異的オリゴ糖配列に対するヒト抗体または人体に適応させた抗体を、腫瘍や癌を破壊したり、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、腫瘍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/または生物工学によって製造することができ、ヒト抗体の断片または最適化した誘導体などが挙げられる。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

10

20

30

40

50

にこのような抗体は移植されている。これは、腫瘍特異的構造が正常の組織または細胞に提示されておらず、且つ、血液型抗原とは異なり、個体差がないとした条件下では確実にあり、末端GlcNAcを含む構造には血液型のような多様性は知られていない。本願の他の一つの態様においては、種特異的動物抗体を特定の動物の腫瘍または癌に対して用いる。特異的な人体適応抗体を遺伝子工学および生物工学で製造することも可能であり、人体に適応させた抗体の製造方法は、例えば米国特許第5,874,060号および第6,025,481号に記載されている。人体に適応させた抗体はヒト抗体の配列を模倣するように設計されるので、ヒトの患者に投与した際に、動物抗体のように免疫系によって拒絶されることはない。癌の増殖能を低下させたり癌を破壊するための方法は、固形腫瘍および広義の意味における癌細胞の両方に適用可能であることが知られている。いかなるヒト癌特異的抗原、好ましくはオリゴ糖からなる抗原を認識する精製した天然のヒト抗体を、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

【0055】

本発明によると、腫瘍特異的オリゴ糖配列に対するヒト抗体または人体に適応させた抗体、あるいは腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する、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) (例えばドキソルビシン (Arap et al., 1998))、毒性タンパク質または放射線化学薬剤などの腫瘍の破壊に有効な物質が挙げられる。このような療方は、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または腫瘍結合性抗体は、例えば、いわゆる「ADEPT-アプローチ」において、腫瘍に対して活性を示すプロドラッグ、あるいはプロドラッグを腫瘍または癌を破壊したり抑制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

【0056】

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

30

【0057】

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

40

【0058】

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

50

【0059】

腫瘍に対する治療的ターゲティングを行うための他の方法

診断用物質の場合と同様に、癌または腫瘍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。癌または腫瘍に対するターゲティングには、非免疫原性の許容される物質を用いることが特に好ましい。癌または腫瘍に結合するターゲティング物質の例には、癌または腫瘍を破壊または抑制する特異的な毒性、細胞溶解性または細胞調節性の薬剤も含まれる。癌または腫瘍に対する治療的ターゲティングに用いる非抗体分子は、本発明の癌特異的オリゴ糖配列または腫瘍特異的オリゴ糖配列に特異的に結合する分子を包含することが好ましく、このような結合性の分子（即ちオリゴ糖鎖結合性物質）としては、

10 はアプタマー、レクチン、遺伝子工学的に作製したレクチン、末端GlcNAc-構造を認識する酵素（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または腫瘍に対する治療的ターゲティングに用いることができる。本願で開示する癌結合性非抗体物質または腫瘍結合性非抗体物質は、癌または腫瘍を標的とする、癌または腫瘍に対して活性を示すプロドラッグ、あるいはプロドラッグを癌または腫瘍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も用いることもできる。

【0060】

グリコシル基転移酵素による末端GlcNAcを有する腫瘍抗原のターゲティング

本発明は特に、癌細胞または腫瘍に、修飾された単糖誘導体を転移させる新規な治療方法または診断方法に関する。本発明は、毒性物質、標識物質、薬剤または免疫学的に活性のある炭水化物と、転移酵素によって認識される受容体構造を有する、患者の病原性細胞の表面との間に共有結合を生じさせるための、以下の工程を包含する方法を開示する：

- (i) 毒性物質、標識物質、薬剤または免疫学的に活性のある炭水化物を、転移酵素の供与分子と結合させて結合体を得、そして
- (ii) (a) 得られた結合体および所望により転移酵素を腫瘍の治療のために患者に投与する、または
- (b) 腫瘍の診断のために、得られた結合体を腫瘍試料に接触させて、結合体からなる標識を検出する。
- 20
- 30

【0061】

グリコシル基転移酵素によって転移される単糖誘導体は、グリコシド結合したヌクレオチド残基も有する。単糖誘導体は、二位の修飾物（2-modified）、例えばUDP-ガラクトサミンのアミド誘導体が好ましい。治療または診断のための単糖誘導体としては、下記式で表されるものが好ましい：



（式中、

Sは所望により結合しているスペーサー基であり、

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

40 プロドラッグを遊離させる物質である。）

【0062】

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

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

使用する酵素は、二位修飾単糖を効果的に転移させるように工学的に改変したガラクトシルトランスフェラーゼを用いることが好ましい。また、例えば、動物から得た類似の特異性を有する天然のGalNAc/GlcNAc-転移酵素を用いることもできる。

本発明は、特に、UDP-GalN-スペーサー-ビオチンおよび修飾ガラクトシルトランスフェ

50

ラーゼと共に組織をインキュベートすることによって、ビオチンで腫瘍組織を標識する方法に関する。

【0063】

別の態様においては、本発明は下記の工程からなる診断方法に関する：

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

【0064】

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

10

【0065】

抗体、好ましくは動物から得た抗体の胃腸器系疾患関連分野および食品関連分野での用途
本発明は特に、本発明の腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する物質および抗体を用いた、患者、好ましくはヒトの患者、の胃腸器系疾患の治療方法に関する。ヒトの胃腸器系で用いる治療用の抗体は、動物によって産生された抗体、例えば家畜（具体的には家畜用反芻動物であるウシ、ヒツジ、ヤギまたはスイギュウなど）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、動物を腫瘍特異的炭水化物結合体によって免疫することができる。本発明は、ヒトの胃腸器系の腫瘍の抑制または破壊に用いることができる、他の許容される物質、好ましくは食品として許容されるタンパク質にも関し、このような物質の具体例には、腫瘍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腫瘍特異的オリゴ糖配列を認識する抗体を含む機能性食品および食品添加剤に関し、さらに本発明は、食品として許容される他の物質（特に胃腸器系に存在する腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合するレクチン）を用いた機能性食品または食品添加剤にも関する。

20

【0066】

腫瘍特異的末端GlcNAcに結合する結合性物質のスクリーニング

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

30

【0067】

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

【0068】

本発明の遊離オリゴ糖またはオリゴ糖結合体は、特異的な阻害剤としてアッセイ法にも用いることもできる。蛍光偏向の変化量（Fluorescence polararization difference）やNMRは、本発明のオリゴ糖配列に結合する結合性物質を液相からスクリーニングするための手法の例である。

40

【0069】

癌ワクチン

さらに、本発明によると、腫瘍特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体は、癌細胞または腫瘍細胞を抑制するか排除するための免疫応答を刺激するために、ヒトの癌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するわけではないが、腫瘍による負担を軽減させたり、癌患者の病態を安定化し、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、

50

免疫活性多糖、あるいはワクチン分子に対する免疫反応を活性化する他の分子に結合させることができる。癌ワクチンは、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、癌または腫瘍に対する治療方法において薬剤として使用することができる。このような方法は、ヒトの患者の治療に用いることが好ましい。また、この治療方法は、免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の癌または腫瘍の治療に用いることが好ましい。

【0070】

10

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

【0071】

20

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

【0072】

治療方法および診断方法の組み合わせ

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

1. 患者の腫瘍組織または癌組織のグリコシル化産物を分析し、
2. 一部が癌化した組織の正常なグリコシル化産物を分析し、そして
3. 患者の癌に本発明の腫瘍特異的オリゴ糖配列が存在するが、正常組織の細胞表面には該腫瘍特異的オリゴ糖配列が提示されていないか、微量しか提示されていない場合に、本発明の治療方法を実施する。

30

【0073】

腫瘍組織および正常な組織のグリコシル化には個体差があるので、本発明の腫瘍特異的構造の分析は、異常なグリコシル化構造と正常なグリコシル化構造とを組み合わせ分析することが有用であり、これは本願の実施例に示したデータによって明示される。腫瘍の近傍に位置する正常な組織は、腫瘍により分泌された物質で部分的に汚染されていることでもあるので、正常な組織のデータを分析する際には考慮したほうがよい。

40

【0074】

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本発明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10 kDa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

50

いることが好ましい。

【0075】

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（例えば糖ヌクレオチド供与体）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。種々の反芻動物や他の動物の乳から天然のオリゴ糖を単離することができる。グリコシル化酵素を発現するトランスジェニックな生物、例えばウシや微生物も糖の製造に用いることができる。

10

【0076】

本発明のオリゴ糖配列は、所望により担体と共に、患者の癌または腫瘍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、本発明の腫瘍特異的オリゴ糖配列を少なくとも一種発現している腫瘍からなる癌が挙げられる。治療可能な癌の症例は、患者から得た生物学的試料中に腫瘍特異的オリゴ糖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。

20

【0077】

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。

【0078】

本発明の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。

【0079】

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。

30

【0080】

本願において「患者」とは、本発明による治療を必要とするいかなる哺乳類も意味する。腫瘍特異的オリゴ糖または本発明の腫瘍特異的オリゴ糖を特異的に認識する化合物を診断または型の同定に用いる場合、例えば、オリゴ糖または化合物はプローブやテ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。

【0081】

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

40

【0082】

50

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

【0083】

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

【0084】

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型構造残基であるGal 3GlcNAcおよび2型構造残基である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。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】

【0085】

実施例1

細菌の培養および標識

GlcNAc認識GafDアドヘシンを発現している、組換えG-フィンブリエ発現 *Escherichia coli* (G-fimbriated *Escherichia coli*) IHE11088 (pRR-5) 株 (Rhen, M. et al., 1986) を、テトラサイクリン (25 μg/ml) および10 μlの [³⁵S]-メチオニン (400 mCi; 英国、リトルチャルフォント、Amersham Pharmacia Biotech社製) を含有するルリア培地中で37°Cで一晩培養した。細菌を遠心分離で回収してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH 7.2) で二回洗浄し、1 × 10⁹ CFU/mlになるようにPBSに再懸濁した。比活性は約100 CFU/cpmであった。

【0086】

*Erythrina cristagalli*由来レクチンの標識

*Erythrina cristagalli*由来のGal 4GlcNAc-結合レクチン (Teneberg et al., 1994) をVector Laboratories社 (カリフォルニア州、バーリングゲーム) から購入した。一つが100 μgの複数のタンパク質標本を¹²⁵Iで標識した。具体的には、Na¹²⁵I (100 mCi/ml; Amersham Pharmacia Biotech社製) とIODO-GEN試薬 (イリノイ州、ロックフォード、Pierce社製) を用いて、製造者のプロトコールに従って標識した。約5 × 10³ cpm/μgのタンパク質が得られた。

【0087】

グリコスフィンゴ脂質結合アッセイ

薄層クロマトグラムで分離したグリコスフィンゴ脂質に対する、放射性標識した細菌およびレクチンの結合を、公知の方法 (Teneberg et al., 1994; Hansson et al., 1985) に従って行った。グリコスフィンゴ脂質の薄層クロマトグラフィーは、アルミニウムで裏打ちしたシリカゲル60 HPTLCプレート (ドイツ国、ダルムシュタット、Merck社製) 上で、クロロホルム/メタノール/水 (容量比は60:35:8) を溶媒系として行っ

10

20

30

40

50

た。乾燥したクロマトグラムを、0.5% (w/v) ポリイソブチルメタクリレート (ウイコンシン州、ミルウォーキー、Aldrich Chem. Comp. Inc.社製) を含有するジメチルエーテル/n-ヘキサン (容量比は1:5) に1分間浸した。乾燥後、クロマトグラムを2% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) および0.1% (w/v) NaN_3 を含有するPBSに室温で2時間浸漬した。続いてクロマトグラムを、PBSで希釈した放射性標識細菌 ($2 \sim 5 \times 10^6$ cpm/ml) または放射性標識レクチンのBSA溶液 (2×10^3 cpm/ml) で被覆した。室温で2時間インキュベートし、PBSで繰り返し洗浄した。その後クロマトグラムをXAR-5 X線フィルム (ニューヨーク州、ロチェスター、Eastman Kodak社製) に12時間露光させた。

【0088】

10

実施例 2

末端GlcNAc構造の腫瘍特異性の説明

放射性標識したG-フィンプリエ発現 *Escherichia coli* を用いて薄層オーバーレイアッセイを行い、種々の腫瘍組織および正常な組織のスクリーニングを行った。*E. coli* IHE1 1088 (pRR-5) 株は、末端GlcNAc - 構造を特異的に認識する (Rhen, M. et al. 1986) 。結合活性のある糖脂質は、検討した四つの副腎腫である腫瘍の一つに由来する非酸性画分から検出された (図1) 。ここで検討した、ヒトの正常な腎臓由来の非酸性グリコスフィンゴ脂質からなる対応画分や対照組織には、上記結合は見られなかった。

【0089】

20

実施例 3

ヒトの副腎腫由来の末端GlcNAc - 構造の特徴づけ

ヒトの副腎腫である腫瘍に由来する非酸性グリコスフィンゴ脂質を分画し、薄層オーバーレイアッセイによってGlcNAc - 特異的G-フィンプリエ発現 *E. coli* (図1A) および末端Gal 4GlcNAc - 構造を認識する *Erythrina cristagalli* 由来レクチン (図2B) のそれぞれによる結合を分析した。二種の結合試薬のそれぞれに結合するグリコスフィンゴ脂質種の一部は重複している。このデータは、末端GlcNAc - 種の大部分がN-アセチルラクトサミン型非酸性グリコスフィンゴ脂質に存在することを示す。レクチン結合活性種とは重複しない末端GlcNAc - 種においては、その末端構造は、N-アセチルラクトサミンをGlcNAc (例えばGlcNAc 3Gal 3/4GlcNAc -) で誘導化したものである可能性が最も高く、拡散したバンドも、異性体であるGlcNAc 6Gal 3/4GlcNAc - の存在を示すと考えられる。この試料には、一つの糖脂質に末端GlcNAcおよびN-アセチルラクトサミンの両方が存在する希少な種も含まれていると考えられる。これは分岐構造、例えばGal 3/4GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 3/4GlcNAc - およびGlcNAc 3(Gal 3/4GlcNAc 6)Gal 3/4GlcNAc - の存在を示し、グリコスフィンゴ脂質のサイズ分布は、少なくとも二つの末端GlcNAc を有する脂質種の存在も示すと考えられる。*Erythrina cristagalli* 由来レクチンの結合は、ほとんどのラクトサミンがおそらく2型N-アセチルラクトサミン構造であるGal 4GlcNAcを含むことを示す。パーメチル化後の糖脂質をFAB質量分析法およびEI質量分析法によって部分的に分析したところ、末端HexNAcの存在を示し、さらに末端GlcNAcを含むもっとも小さい脂質種が五糖グリコスフィンゴ脂質であり、おそらくはラクト系またはネオラクト系であることを示した。また、七量体およびより大きな十五量体までの構造も観察された (図1) 。レクチンの結合は、ラクトサミンの大部分がおそらくは2型N-アセチルラクトサミン構造を有することを示す。

30

40

【0090】

実施例 4

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

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

ホルマリン固定化試料からグリカンを単離する前に、Manzi et al. (2000) の記載と実質的に同様のクロロホルム-メタノール抽出を行うことでタンパク質を濃縮した。糖タンパ

50

ク質の定量的抽出は、放射性標識標準糖タンパク質によって確認した（データは示さない）。ホルマリン固定化・パラフィン包埋試料からグリカン単離の前に、試料を脱パラフィン処理に付した。糖タンパク質試料から非還元的脱離法でグリカンを分離し、クロマトグラフィーにより精製した。

【0091】

MALDI-TOF MS

MALDI-TOF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。

【0092】

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：
 - 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、オリゴ糖中のGlcNAc 1-6Gal-Rを消化したが、GalNAc 1-4GlcNAc 1-3/6Gal-Rは消化しなかった；
 1, 4-ガラクトシダーゼ (*Streptococcus pneumoniae*由来、*E. coli*組換え体；米国、Calbiochem社製)は、オリゴ糖中のGal 1-4GlcNAc-Rを消化したが、Gal 1-3GlcNAc-Rは消化しなかった；
 - マンノシダーゼ (ナタマメ由来；英国、Glyko社製)は高マンノースN-グリカン類からなる混合物をMan₁GlcNAc₂N-グリカンコア三糖に転換した。対照の消化反応も分析用のエキソグリコシダーゼ反応と並行して行い、その結果も同様に分析した。

【0093】

UDP-GalN-ビオチンの合成

UDP-ガラクトサミン (UDP-GalN) を、UDP-Glcおよびガラクトサミン-1-リン酸からガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (E.C. 2.7.7.12；米国、Sigma社製)の作用により合成する。典型的な合成プロトコールを以下に示す。反応混合物は、10 mMのガラクトサミン-1-リン酸、20 mMのUDP-Glc、5 U/mlのガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、100 mMのNa-HEPES (pH 8.0)、5 mMのMgCl₂および5 mMのβ-メルカプトエタノールを含有する。反応容器を窒素雰囲気下、室温で3日間インキュベートし、その後、Maki *et al.* (2002)の記載と実質的に同様に、黒鉛化炭素のカラム (graphitised carbon column)を用いて糖ヌクレオチドを反応混合物から単離する。UDP-GlcおよびUDP-GalNを含有する糖ヌクレオチド混合物を、過剰モル量のスルフォスクシニミジル-6-(ビオチンアミド)ヘキサノエート (sulfo-NHS-LC-ビオチン；米国、Pierce社製)を含む50 mMのNH₄HCO₃中で、室温で2.5時間インキュベートする。生成物であるUDP-GalN-ビオチン (即ち、ウリジン5'-ジフオスフォ-N-(6-ビオチンアミドヘキサノイル)ガラクトサミン)をゲルろ過および逆層HPLCによって精製する。

【0094】

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

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

【0095】

10

20

30

40

50

UDP-[¹⁴C]Galによる組織片中の末端GlcNAc残基の標識

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

【0096】

10

実施例 5

肺腺癌試料由来の癌関連末端GlcNAc含有N - グリカン

腫瘍およびその周囲の健康な組織のホルマリン固定化試料を、肺腺癌の患者から調製した。腫瘍試料 (図3A) と健康組織の試料 (図3B) のそれぞれから単離した中性N - グリカン、具体的には、m/z 1485.48に観測される、[Hex₃HexNAc₄Fuc₁+Na]⁺イオン (計算値: m/z 1485.53) に対応するピークにおいて、有意な差が見られた。このグリカンのピークの相対強度は、健康な組織と比較して、腫瘍試料では6.1倍以上も増加した。さらに、m/z 1647.53に観測される、[Hex₄HexNAc₄Fuc₁+Na]⁺イオン (計算値: m/z 1647.59) に対応するピークは、腫瘍組織においてはより高いシグナル強度を有していた。 - N - アセチルグルコサミニダーゼ消化の際には (図3C)、2種のピークはそれぞれ、m/z 1079.18に観測される、[Hex₃HexNAc₂Fuc₁+Na]⁺イオン (計算値: m/z 1079.38) に対応するピーク、およびm/z 1444.24に観測される、[Hex₄HexNAc₃Fuc₁+Na]⁺イオン (計算値: m/z 1444.51) に対応するピーク、に完全に变化し、これは末端 - GlcNAc残基の存在を示す。ナタメ由来 - マンノシダーゼ消化の際には (図3D)、これらのピークはそれぞれ、m/z 755.19に観測される、[Hex₁HexNAc₂Fuc₁+Na]⁺イオン (計算値: m/z 755.27) に対応するピーク、およびm/z 1282.29に観測される、[Hex₃HexNAc₃Fuc₁+Na]⁺イオン (計算値: m/z 1282.45) に対応するピーク、にさらに变化した。しかしながら - N - アセチルグルコサミニダーゼ消化の前に - マンノシダーゼ消化を実施しても、2種のピークに影響を与えることはなく、これは、 - Man残基は末端 - GlcNAc残基に隣接して存在することを示している。さらに、もとの中性グリカン試料の 1, 4 - ガラクトシダーゼ消化によっ

20

30

【0097】

実施例 6

癌試料における末端GlcNAc含有N - グリカンの出現

種々の腫瘍および健康な対照試料における上記構造の出現は、中性グリカン画分の単離と分析をMALDI-TOF MSとエキソグリコシダーゼ消化を行うことで検討した。検討した腫瘍 - 対照のペアは次の通りである: 七種の肺癌試料のペアおよび各一種の結腸癌、胃癌および喉頭癌のペア。分析の結果、全てのペアにおいて、m/z 1485.5に観測される2つの末端GlcNAcを含有するN - グリカンの相対的な存在量が、癌試料では上昇することが判明した。しかしながら、健康な組織と癌化組織の両方において、このグリカンエピトープの発現レベルに有意な個体差が存在した。表1に、単離した中性グリカン画分について、m/z 1485.5に観測されるN - グリカンの特異的な発現量をまとめた。

40

【0098】

実施例 7

UDP-GalN - ビオチンの合成

50

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

10

20

30

40

50

【0099】

実施例 8

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

脱パラフィンしたホルマリン固定化・パラフィン包埋組織片を、UDP- $[^{14}C]$ Galおよびウシ乳 1, 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼを用いて、「タンパク質結合構造の調製およびガラクトシルトランスフェラーゼによる標識のための材料と方法」の欄で記載したように放射性標識した。オートラジオグラフィーによって、腫瘍試料と健康組織の試料の間にはっきりとした差異が示され (図6)、肺腺癌試料においては、末端GlcNAc残基の量が非常に上昇していることが判明した。同様の結果は、「タンパク質結合構造の調製およびガラクトシルトランスフェラーゼによる標識のための材料と方法」の欄で記載したように、UDP-GalN - ビオチン試薬としてストレプトアビジン - FITCを用いた実験および蛍光顕微鏡観察からも得られた。重要なことは、癌細胞はこのビオチン化試薬で標識できることである。

【0100】

実施例 9

肺腺癌試料からの $[^{14}C]$ Gal標識オリゴ糖の単離

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

【0101】

肺腺癌から非還元的 - 脱離法により遊離させた材料のゲルろ過HPLCクロマトグラム (図7C)においては、総放射能の45%を含む幅広いピークが、移動相の容量 (void volume) (8 ml) と標準N - グリカンであるGal 1-4[GlcNAc 1-2Man 1-6(GlcNAc 1-

2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAc]の溶出時間との間で溶出した。この幅広いピークをプールし、強カチオン交換材料のカラムとC₁₈シリカのカラムに通したところ、すべての糖ペプチド材料は保持されたが、遊離のオリゴ糖は定量的に溶出された。プールした画分中のほぼ80%の放射能がカラムに保持され、これは幅広いピークは[¹⁴C]Gal標識グリカン部分が分離されていないアルカリ-遊離糖ペプチドと実際に対応することを示した。残りの放射能の大部分は、上記のN-グリカン構造に対応することが判明したが、他の標識オリゴ糖の存在を否定することはできなかった。総放射能の55%を含むゲルろ過HPLCクロマトグラムの大きなピークは、標準N-アセチルラクトサミン(LacNAc)と共に溶出した。

【0102】

実施例10

癌試料由来のタンパク質結合GlcNAc

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

【0103】

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

【0104】

実施例11

ヒト血清からの抗GlcNAc抗体の単離

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

【0105】

【表1】

10

20

30

40

種々の腫瘍試料およびその対照試料（健康な組織）に見られる、 m/z 1485.5に観測されるピークに相当する末端GlcNAc残基含有N-グリカンの、試料中に最も多量に存在するN-グリカンに対する存在量。

患者（試料）	m/z 1485.5に観測されるピークの相対的な存在量		
	腫瘍試料	健康な組織	
<u>肺癌</u>			
A	8 6	1 3	10
B (1)	1 0 9	6 7	
B (2)	1 0 1		
C (1)	3 5	1 8	
C (2)	2 2		
D (1)	1 8	1 0	
D (2)	1 4		
E	6 2	4 2	
F	3 2	2 7	20
G	2 3	1 2	
<u>結腸癌</u>			
H	3 2	0	
<u>胃癌</u>			
I	4 1	3 8	
<u>喉頭癌</u>			
J	6 7	1 5	30

【 0 1 0 6 】

参考文献

- Arap, W., Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. (1998) Science 279, 323-4.
- Ernst, B., Hart, G.W., and Sinay, P. (eds.) (2000) Carbohydrates in chemistry and biology, ISBN 3-527-29511-9, Wiley-VHC, Weinheim.
- Hanisch, F.-G., Koldovsky, U., and Borchard F. (1993) Cancer Res. 53, 4791-4796. 40
- Hansson, G.C., Karlsson, K.-A., Larson G., Stromberg, N., and Thurin, J. (1985) Anal. Biochem. 146, 158-63.
- Harvey, D.J., et al. (1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7(7):614-9.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Stoll, M., Kane, D.P., Cashmore, G.C., Carruthers, R.A., Feeney, J., and Feizi, T. (1989) Eur. J. Biochem. 186, 597-610.
- Holmes, E.H., and Greene, T.G. (1991) Arch. Biochem. Biophys. 288, 87-96.
- Hu, J., Stults, C.L.M., Holmes, E.H., and Macher, B.A. (1994) Glycobiology 4, 25 1-257.
- Nakamura, M., Tsunoda, A., Sakoe, K., and Saito, M. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 197 1025-1033. 50

- Manzi, A.E., *et al.* (2000) *Glycobiology* 10(7):669-89.
- Maki, M., *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269(2):593-601.
- Nyman, T.A., *et al.* (1998) *Eur. J. Biochem.* 253(2):485-93.
- Packer, N.H., *et al.* (1998) *Glycoconj. J.* 15(8):737-747.
- Ramakrishnan, B., and Qasba, P.K. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(23):20833-9.
- Papac, D.I., *et al.* (1996) *Anal. Chem.* 68(18):3215-23.
- Rhen M., Klemm P., and Korhonen T.K. (1986) *J. Bacteriol* 168, 1234-42.
- Symington, F.W, Hendersson, B.A., and Hakomori, S.-I. (1984) *Mol. Immunol.* 21, 877-882.
- Saarinen, J., *et al.* (1999) *Eur. J. Biochem.* 259(3):829-40. 10
- Teneberg, S., Lonroth, I., Torres Lopez, J.T., Galili, U., Olwegard Halvarsson, M., Angstrom, J., and Karl-Anders Karlsson (1996) *Glycobiology* 6, 599-609.
- Verostek, M.F., *et al.* (2000) *Anal. Biochem.* 278:111-122.
- Teneberg S, Angstrom J, Jovall P-A, and Karlsson K-A. (1994) *J. Biol Chem* 269, 8554-63.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 7 】

【図 1】 GlcNAc - 特異的 *E. coli* の菌体をオーバーレイして結合させた、薄層オーバーレイアッセイ後のオートラジオグラムであり、末端 GlcNAc 残基を有するオリゴ糖配列の腫瘍特異性を表すものである：副腎腫である腫瘍に由来する非酸性グリコフィンゴ脂質類（第一レーン）およびそれに対応する、正常な腎臓由来のグリコフィンゴ脂質画分（第二レーン）。 20

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

【図 3 A】 肺腺癌試料由来の中性グリカンの、リフレクター型の陽イオンモード MALDI - TOF マススペクトル。 30

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

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

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

【図 4 A】 UDP - ガラクトサミン合成反応後に精製した糖ヌクレオチドの、リニア型の陰イオンモード MALDI - TOF マススペクトル。 40

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

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

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

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

た。12 ~ 15分に得た画分をプールした。

【図7B】N-グリコシダーゼFで消化した肺腺癌試料に由来する、 $[^{14}\text{C}]$ Galで標識したオリゴ糖。Superdex Peptideカラムを用いたゲルろ過HPLCで回収した12 ~ 15分に得た画分(図10A)を、10 mMの NH_3 溶液で膨潤させたHypercarb 5uカラム(4.6 x 250 mm)(米国、Thermo Hypersil社製)を用い、流速0.7 ml/分、移動相のアセトニトリル濃度勾配が100分間で0 ~ 40%まで直線的に増加する条件下でHPLCに付した。各0.7 mlの画分を回収し、その放射能を測定した。

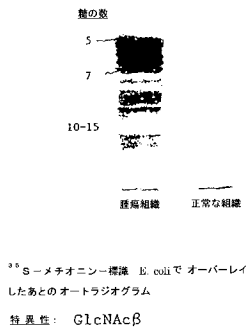
【図7C】肺腺癌試料から非還元的 - 脱離法によって遊離した、 $[^{14}\text{C}]$ Galで標識した標品。これを、50 mMの NH_4HCO_3 で膨潤させたSuperdex Peptide HR 10/30カラム(スウェーデン国、Pharmacia社製)を用い、流速1 ml/分の条件下でゲルろ過HPLCに付した。各1 mlの画分を回収し、その放射能を測定した。8 ~ 15分に溶出した画分(プール1)のみならず、15 ~ 18分に溶出した画分(プール2)もプールした。

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

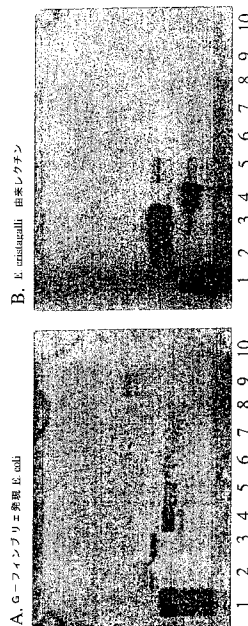
10

20

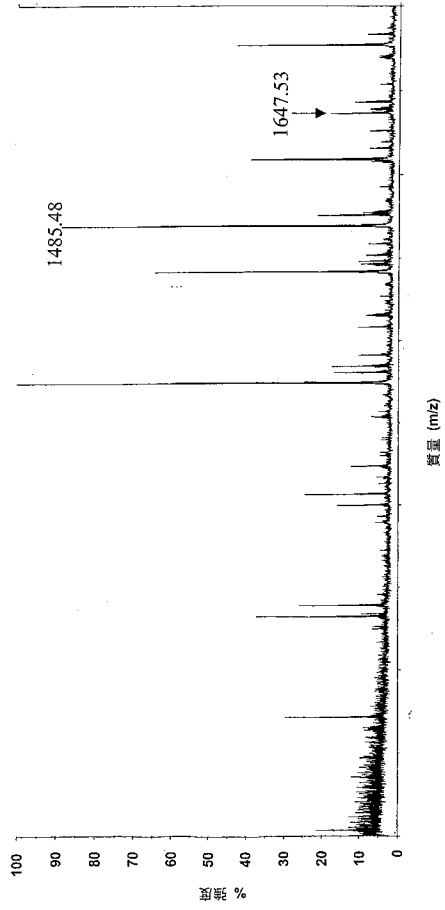
【図1】



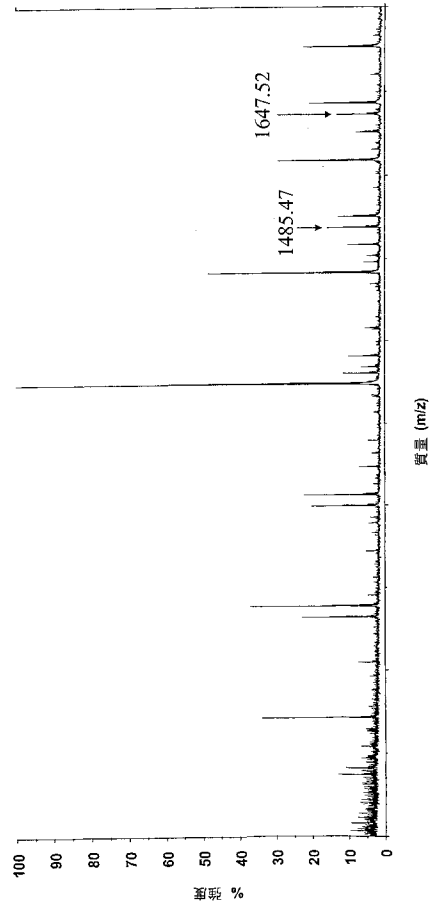
【図2】



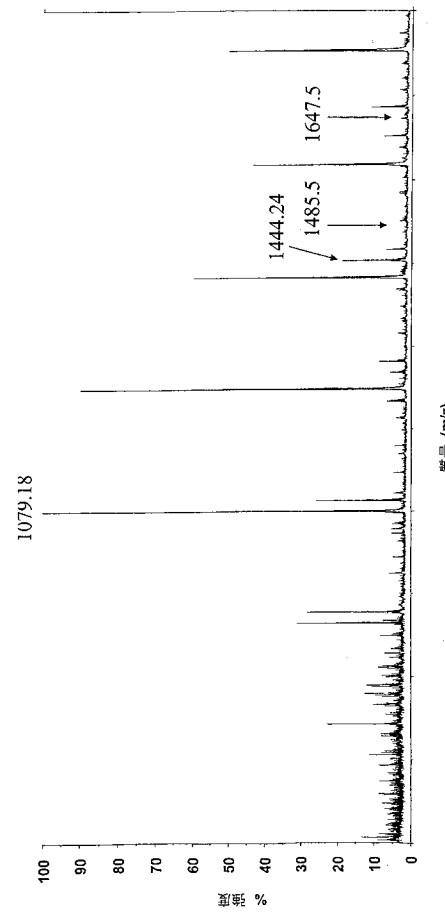
【 図 3 A 】



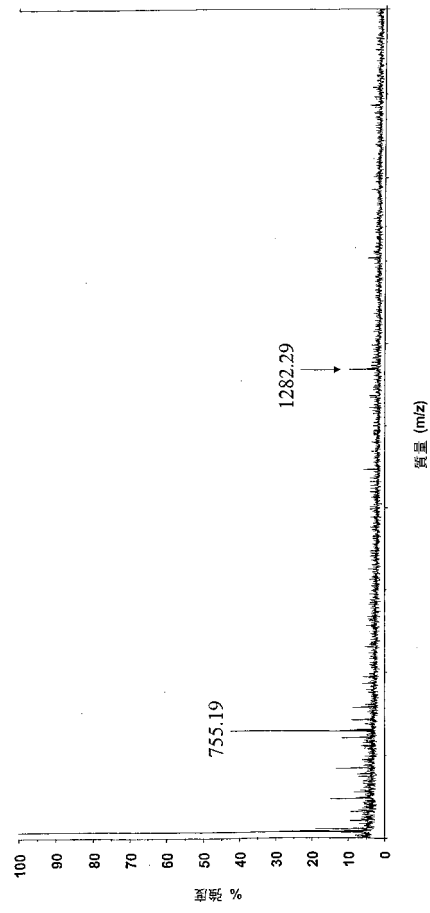
【 図 3 B 】



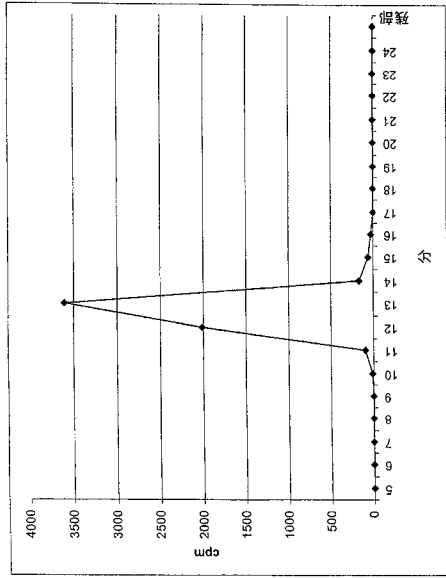
【 図 3 C 】



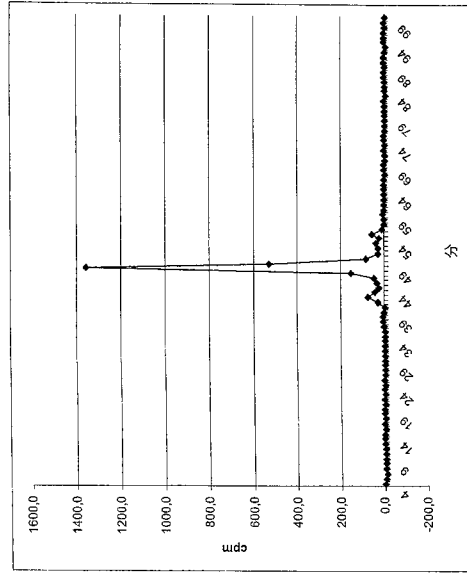
【 図 3 D 】



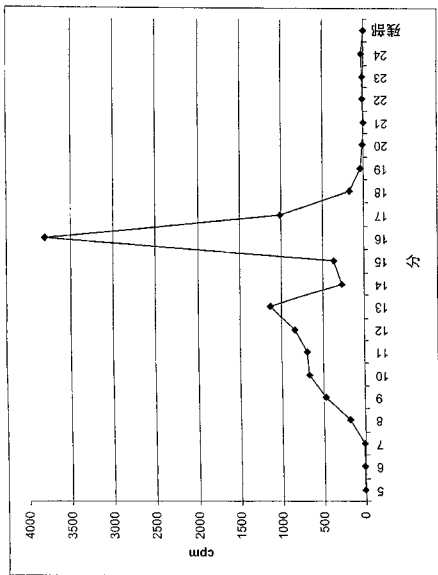
【 図 7 A 】



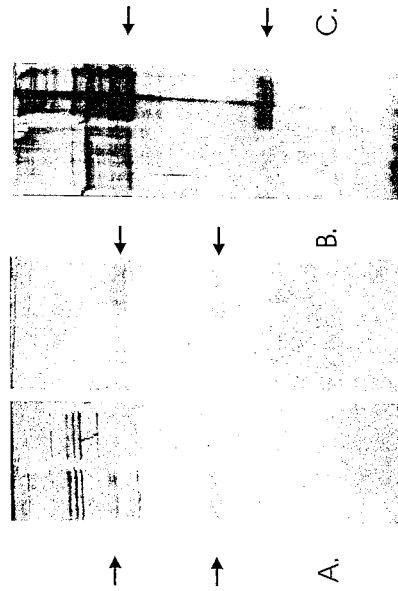
【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 8 】



【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 03/016915 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/574, C07H 5/06, A61K 39/00, A61P 35/00
- (21) International Application Number: PCT/02/00681
- (22) International Filing Date: 20 August 2002 (20.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20011671 20 August 2001 (20.08.2001) 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): NATUNEN, Jari [FI/FI]; Meriläinkatu 6 C 18, FIN-00170 Helsinki (FI). TENEBERG, Susann [SE/SE]; PL 1639, S-43063 Hinnås (SE). KARLSSON, Karl-Anders [SE/SE]; Nilssonberg 37, S-41143 Göteborg (SE). SATOMAA, Tero [FI/FI]; MaaKaari 6 A 11, FIN-00710 Helsinki (FI). HEISKANEN, Annamari [FI/FI]; Trumpettitie 8 F 93, FIN-00420 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), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, 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, SI, 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 (BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- 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.
- (74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB; Iso Roohertinkatu 4-6 A, FIN-00120 Helsinki (FI).



WO 03/016915 A1

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

(57) Abstract: The present invention describes oligosaccharide sequences, which are specifically expressed by human tumors. The present invention is related to a method of determining an oligosaccharide sequence, which comprises a tumor specific terminal N-acetylglucosamine residue, 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 comprising said oligosaccharide sequences in a polyvalent form and it further provides 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 03/016915

PCT/FI02/00681

1

Tumor specific oligosaccharide sequences and use thereof

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to oligosaccharide sequences, which are specifically expressed by human tumors. The present invention describes methods for the detection of the tumor specific oligosaccharide structures of the invention 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 binding to them for
10 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 tumors, cancers and malignancies.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

Various tumors 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 α 2Gal β 3GalNAc β 3Gal α 4Lac β Cer), gangliosides: GM1

20

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

25

Gal β 3GalNAc α Ser/Thr-Protein, Tn-antigen GalNAc α Ser/Thr-Protein or sialyl Tn-antigen NeuNAc α 6GalNAc α 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.

One report has indicated that structures with terminal GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc sequence are present in human leukaemia cells (Hu et al., 1994). The structures may also be equally

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

2

present on normal leukocytes. Thus, the relation of the finding to glycosylation patterns generally present in solid tumors was not indicated. This type of saccharide structures may be a part of rare normal glycosylations of human tissues: GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6 sequence linked on O-glycans is probably present on human gastric mucin. A study shows

5 that a monoclonal antibody recognizing GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6 sequence may possibly recognize similar structures on malignant tissues, such as mucinous ovarian neoplasms, pseudopyloric metaplasia of gallbladder and pancreatic epithelia, gastric differentiated carcinoma of stomach, gallbladder and pancreas, and on non-malignant

10 tissues, such as human amniotic fluid, but, however, the structures from malignant tissues were not characterized (Hanisch et al., 1993). The antibody did not recognize neoglycolipid structure GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4 nor carcinomas of lung, colorectum, endometrium or other organs. Another monoclonal antibody raised against testicular cells probably recognizes branched N-acetylactosamines such as

15 GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 4GlcNAc- (Symington et al., 1984). Terminal GlcNAc has also been reported from mucins of human foetal mucin (Hounsell et al., 1989). In normal tissues terminal GlcNAc may be present in minor amounts as biosynthetic intermediates in the biosynthesis of poly-N-acetylactosamines.

Several monoclonal antibodies has been raised against a semisynthetic glycolipid

20 GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Lac β Cer, these antibodies were shown to recognize glycolipids from cultured colon cancer cell lines and tumors (Holmes et al., 1991). However, the antibodies recognized several structures and the binding data was contradictory. Moreover the glycolipids were not recognized by all of the antibodies and the glycolipid structures from cancer cells or tumors were not characterized. Therefore the

25 presence of terminal GlcNAc structures on tumors were not established. Another study showed production of a monoclonal antibody against GlcNAc β 3Lac β Cer (Nakamura et al., 1993). This antibody also weakly recognized the pentasaccharide structure described above. Moreover, the antibody recognized a protease sensitive epitope on COS-1 cells, which cell line is not of human origin. The immunization protocols of these studies did not

30 describe induced antibody responses against polyvalent conjugates of the saccharides, but immunization by glycolipids.

Normally there are large amounts of antibodies recognizing terminal GlcNAc structures in human serum. There are also a class of natural antibodies recognizing terminal

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

3

Gal α 3Gal β 4GlcNAc- structures. The Gal α antigen is not naturally present in man and recently it was also shown that the natural antibodies bind structures such as GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc, and GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc (Teneberg et al., 1996). The X2-structure, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc, is a normal antigen on human tissues and structures GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc and Gal α 3Gal β 4GlcNAc have not been described from normal or cancer tissues. Thus, the present finding that the terminal GlcNAc structure is a tumor antigen indicates that the actual function of the natural antibodies might be the prevention of cancers having terminal GlcNAc structures.

10 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:

15 Cancer vaccines: US patent Nos. 5,102,663; 5,660,834; 5,747,048; 5,229,289 and 6,083,929.

Therapeutic antibodies: US patent Nos. 4,851,511; 4,904,596; 5,874,060; 6,025,481 and 5,795,961.

20 Diagnostics: US patent Nos. 4,725,557; 5,059,520; 5,171,667; 5,173,292; 6,090,789; 5,708,163; 5,679,769; 5,543,505; 5,902,725 and 6,203,999.

In the prior art tumor diagnostic and therapeutic antibodies recognizing chitobiose-mannose trisaccharides has been described in DE 38 07 594 A1. The application also describes other N-glycans with numerous varying terminal structures some of which may also comprise non-reducing terminal N-acetyl glucosamine. Several of the desired structures have been later characterized as normal glycans and not cancer specific structures. The application claims to describe structures useful for cancer applications. However, it is not quite clear from the application what the structures of desired glycan are. It is indicated that the GlcNAc residues can be α 2, α 4, or α 6-linked. The present invention is not directed to such unusual structures.

Another patent application WO 00/21552 claims several unusual O-glycan structures isolated from bovine submaxillary mucin. Some of the structures such as

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

4

GlcNAc β 6GalNAc α 6GalNAc and GalNAc β 3(GlcNAc β 6)GalNAc comprise terminal GlcNAc-residues. Present invention is not directed to these structures comprising two GalNAc-residues. The application contains speculation about potential therapeutic use of the structures as antigens related to cancer. It has not been shown that the structures are related to bovine cancer but the structures are present in bovine normal submaxillary secretion. Moreover, it is even less probable that the structures would be present in human tissues, as the glycosylations are species specific and vary between human and bovine, so that glycosyltransferase and glycosylation profiles are different in bovine and human. The human genome is also known and glycosyltransferases which could be related to synthesis of the claimed bovine structures has not been produced and characterized. So far none of the six novel glycosyltransferases claimed has been described from human, or human cancer (nor from bovine cancer). Moreover, any bovine glycosylations has not been found from human salivary mucins which have been carefully characterized.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention describes oligosaccharide sequences, which are specifically expressed by human tumors. The present invention is related to a method of determining an oligosaccharide sequence, which comprises a tumor specific terminal N-acetylglucosamine residue, 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 comprising said oligosaccharide sequences in a polyvalent form and it further provides 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.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. An autoradiogram of a thin-layer assay after overlaying and binding of GlcNAc β -specific *E. coli* bacterium demonstrating the tumor specificity of the oligosaccharide sequences containing terminal GlcNAc residue: non-acidic glycosphingolipids from hypernephroma tumor (first lane) and corresponding glycosphingolipid fraction from normal kidney (second lane).

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

5

Figure 2. Thin-layer overlay assays A) using [³⁵S]-labelled, GlcNAc β -specific *E. coli* and B) [¹²⁵I]-labelled Gal β 4GlcNAc β -specific lectin from *Erythrina cristagalli*. Lanes 1-8: Subfractions of non-acid glycosphingolipids from human hypernephroma. Lane 9: Reference glycosphingolipid GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer. Lane 10: Reference glycosphingolipid globoside GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer.

Figure 3A. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of lung adenocarcinoma sample neutral glycans.

10 **Figure 3B.** Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of healthy lung sample neutral glycans.

Figure 3C. Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of lung adenocarcinoma sample neutral glycans after *S. pneumoniae* β -N-acetylglucosaminidase digestion.

15 **Figure 3D.** Positive ion reflector mode MALDI-TOF mass spectrum of lung adenocarcinoma neutral glycans after *S. pneumoniae* β -N-acetylglucosaminidase and jack bean α -mannosidase digestions.

20

Figure 4A. Negative ion linear mode MALDI-TOF mass spectrum of purified nucleotide sugars after UDP-galactosamine synthesis reaction.

25 **Figure 4B.** Negative ion linear mode MALDI-TOF mass spectrum of purified nucleotide sugars after the UDP-GalN-biotin synthesis reaction.

Figure 5. Structure of UDP-GalN-biotin, uridine 5'-diphospho-N-(6-biotinamidohexanoyl)galactosamine.

30 **Figure 6.** Autoradiography of [¹⁴C]Gal labelled lung adenocarcinoma (a.) and healthy lung tissue (b.) sections.

Figure 7A. [¹⁴C]Gal labelled oligosaccharides from N-glycosidase F digested lung adenocarcinoma sample. Glycans were subjected to gel filtration HPLC with a Superdex

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

6

Peptide HR 10/30 column (Pharmacia, Sweden) in 50 mM NH_4HCO_3 (pH about 8.3) at a flow rate of 1 ml/min. 1 ml fractions were collected and counted for radioactivity. Fractions at 12 - 15 min were pooled.

- 5 **Figure 7B.** [^{14}C]Gal labelled oligosaccharides from N-glycosidase F digested lung adenocarcinoma sample. The 12 - 15 min pool from Superdex Peptide gel filtration HPLC (Fig. 10A) was subjected to HPLC with a 4.6x250 mm Hypercarb 5u column (Thermo Hypersil, USA) in 10 mM NH_3 at a flow rate of 0.7 ml/min, with a linear gradient of 0 % to 40 % acetonitrile in the mobile phase in 100 minutes. 0.7 ml fractions were collected and counted for radioactivity.

- 10 **Figure 7C.** [^{14}C]Gal labelled material released by nonreductive β -elimination from lung adenocarcinoma sample. The material was subjected to gel filtration HPLC with a Superdex Peptide HR 10/30 column (Pharmacia, Sweden) in 50 mM NH_4HCO_3 at a flow rate of 1 ml/min. 1 ml fractions were collected and counted for radioactivity. Fractions at 8 - 15 min (pool 1) were pooled as well as at 15 - 18 min (pool 2).

- 15 **Figure 8.** Coomassie Blue stained reducing SDS-PAGE gels. Arrowheads indicate the position of IgG heavy and light chains, respectively. (A.) Serum from a person who had recovered from mucinous ovarian adenocarcinoma, GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Sepharose; left: 0.5 M GlcNAc elution, right: acidic elution. (B.) IgG from pooled human sera, GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Sepharose; left: 0.5 M GlcNAc elution, right: acidic elution. (C.) Silver stained gel of Serum from a person who had recovered from mucinous ovarian adenocarcinoma, Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Sepharose; left: 0.5 M GlcNAc elution, right: acidic elution.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- 20 Present invention is directed to terminal β -linked N-acetylglucosamine oligosaccharide chain structures and protein linked monosaccharide N-acetylglucosamine which are presented by human tumors. The present invention realizes specific defects in human tumors, which lead to cell surface and extracellular presentation of unusual carbohydrates comprising terminal N-acetylglucosamines. In general, the terminal GlcNAc-structures are very rare in human normal tissues. The expression of the structures are caused by two

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

7

factors. For the first the biosynthesis and degradation machinery in the tumor cells does not work properly. Many terminal structures in normal tissues comprise galactose on GlcNAc-residues, these structures are capped by sialic acids, blood group antigens and the like. The present data indicates that the cancer carbohydrates are exposed to unusual glycosidase activities and the defective glycosylation reactions by β 4- and possibly also by β 3-galactosyltransferases. Defects were observable in all 3 types of β -galactosylated oligosaccharide sequences. Secondly the intracellular targeting and quality control of glycosylation including glycoprotein and glycolipid structures seem to be defective. In normal cells the glycosylation is under quality control which recirculates underglycosylated proteins and glycolipids to complete the natural glycosylation, so that in normal cells the amount of the structures according to the invention are very rare on cell surfaces. In normal cells or tissues the oligosaccharide structures described by the invention are present in low amounts in human golgi apparatus, the known protein linked GlcNAc is considered almost exclusively as cytoplasmic and nuclear protein modification. The defects in organization of the golgi apparatus leads to partial cell surface expression of the tumor specific structures described by the present invention. In a specific embodiment the present invention is specifically directed to cell surface or tissue surface forms of the tumor associated GlcNAc-structures according to the invention. Even intracellularly overexpressed structures according to the present invention are directly useful for diagnostic applications.

The defects in galactosylation and presence of unusual glycosidase activities and loss of intracellular control lead to three types of tumor associated glycosylations:

1. incomplete, undergalactosylated protein linked N-glycans;
2. incomplete, undergalactosylated O-glycan core structures,
3. undergalactosylated polylectosamines, as exemplified by a poly-N-acetyllactosamine type glycolipid from human hypernephroma.

These defects lead to several unusual terminal epitopes on glycoproteins and glycolipids.

The present invention is directed to the three groups of oligosaccharide epitopes. The current invention notices for the first time similar general defect on all three types of glycan chains carrying normally β -galactosylated oligosaccharide sequences. Terminal β -linked GlcNAc is present as terminal structure. The structures indicate defects in enzymatic steps directly modifying the terminal GlcNAc-residues including β 1,4(3)-Gal-transferase reactions and on the other hand increased glycosidase activities in the Golgi-

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

8

pathway which could degradate terminal structures. However, the generality of the defect in the three types of carbohydrates would indicate that organization of the golgi apparatus is so disturbed that terminally modifying enzymes located in late golgi cannot effectively modify all glycans expressed by tumor cells.

5 Furthermore, present invention discloses

4. missdirected expression of protein linked N-acetylglucosamine monosaccharide on cancers and tumors.

The protein linked N-acetylglucosamine is in general present in so called O-GlcNAc-structures intracellularly. The inventors have noticed strong overexpression of the protein
10 linked N-acetylglucosamine. The over-expression leads to even some cell surface associated labeling of the O-linked GlcNAc on human tumors.

Though the terminal β -linked GlcNAc is common to the all three groups 1-3, it is realized that the subterminal structures have effect on the structures which should be recognized in
15 diagnostic or therapy of tumors or cancers. The present invention is specifically directed to therapeutic and diagnostic uses of terminal oligosaccharide sequences comprising the terminal GlcNAc and one to several neighboring monosaccharide residues in the three defective oligosaccharide sequence groups. The present invention is directed to the oligosaccharide sequences comprising nonreducing end terminal β -GlcNAc
20 oligosaccharide sequences on polylactosamines, or O-glycans or N-glycans.

1. Incomplete, undergalactosylated or degraded N-linked glycans

The inventors have characterized by mass spectrometry several N-glycan structures comprising terminal GlcNAc residues from tumors such as larynx, stomach, colon and
25 lung tumors. The present invention shows that the overexpression of the N-glycans on tumors is common. The novel N-glycan type tumor antigens were also detected specifically by novel glycosyltransferase methods from tissue sections of tumors but not or in lower amounts in corresponding normal or non-malignant tissues.

The present invention is directed to N-glycan structure

30 $\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 3(\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6)\text{Man}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 6)\text{GlcNAc}\beta \text{Asn}$
and oligosaccharide substructures thereof carrying non-reducing end protein or peptide linked terminal GlcNAc. Asn indicates asparagines amino acid directly linked to the protein in the natural antigen. The natural protein linked oligosaccharide sequence in tumor bound form should contain the reducing end $\text{GlcNAc}\beta \text{Asn-}$ structure to be used

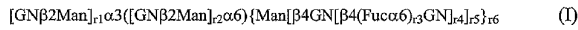
WO 03/016915

PCT/FI02/00681

9

according to the present invention and at least one of the branches carrying the terminal
GlcNAc β 2Man. When the N-glycan structure is used for making antigenic epitopes, the
present invention is directed to at least one of natural oligosaccharide sequence structures
and structures truncated from the reducing end of the N-glycan according to the Formula

5



wherein r1, r2, r3, r4, r5, and r6 are either 0 or 1,

with the proviso that at least r1 is 1 or r2 is 1.

10 GN is GlcNAc, with the proviso that when both r1 and r2 are 1, one GN β Man can be
further elongated with one or several other monosaccharide residues such as by galactose,
and/or one GN β 2Man can be truncated to Man, and/or Man α 6 residue and/or Man α 3
residues can be further substituted by GN β 6 or GN β 4, and/or Man β 4 can be further
substituted by GN β 4. {} indicates groups either present or absent in a linear sequence. ()
15 indicates branching.

The structures represent truncated forms of known N-linked glycan structures on human
N-glycans. Such structures are rare on normal tissues and therefore the structures are
suitable for immunodiagnosics.

20

A group of more preferred structures are represented
by formula:



25

wherein r1, r2, r5, and r6 are either 0 or 1,

with the proviso that at least r1 is 1 or r2 is 1.

GN is GlcNAc, with the proviso that when both r1 and r2 are 1, one GN β Man can be
further elongated with one or several other monosaccharide residues such as by galactose,
30 and/or one GN β 2Man can be truncated to Man, and/or Man α 6 residue and/or Man α 3
residues can be further substituted by GN β 6 or GN β 4, and/or Man β 4 can be further
substituted by GN β 4. In a more preferred embodiment GN is GlcNAc, with the proviso
that when both r1 and r2 are 1, one GN β Man can be further elongated one or several other

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

10

monosaccharide residues such as by galactose, and/or one GN β 2Man can be truncated to Man, and/or Man α 6-residue, and most preferably GN is GlcNAc.

The preferred non-elongated structures include:

- 5 GlcNAc β 2Man, GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man,
 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man, GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc,
 10 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc,
 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man, Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc,
 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 3Man,
 15 GlcNAc β 2Man α 3Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 3Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 6Man,
 GlcNAc β 2Man α 6Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 6Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 6Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc.
- 20 More preferred N-glycan oligosaccharide sequences include:
 GlcNAc β 2Man, GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man,
 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man,
 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc, Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man,
 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 3Man,
 25 GlcNAc β 2Man α 3Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 6Man,
 GlcNAc β 2Man α 6Man β 4GlcNAc.

And most preferred N-glycan oligosaccharide sequences include:

- GlcNAc β 2Man, GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man,
 30 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man,
 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc, Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man,
 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

11

2. Incomplete, undergalactosylated or degraded O-linked glycans

The inventors have also found out that O-glycans of tumors contain structures carrying terminal β -linked GlcNAc. The O-glycan specificity for tumor is demonstrated in the examples by describing specific natural cancer associated antibody from a person recovered from ovarian cancer and by absence of the antibody in pool of sera from persons without cancer background.

The present invention is also directed to human tumor specific O-glycan core structures comprising terminal β -linked GlcNAc residues, preferably with the provision that the O-glycan sequences do not comprise GalNAc-GalNAc sequence. The preferred O-glycan oligosaccharide sequences comprises at least one oligosaccharide sequence according to the formula:



wherein $s1$, $s2$, $s3$, $s4$ and $s5$ are independently 0 or 1, with the proviso that at least $s1$ is 1 or $s5$ is 1 and $s3$ and $s4$ are 1 or $s5$ is 1 and $s3$ and $s4$ are 0, so that the oligosaccharide sequence comprises at least one nonreducing end terminal GlcNAc β -residue.

More preferred O-glycan structures include at least one structure according to the formula:



wherein $s1$, $s2$, and $s5$ are independently 0 or 1, with the proviso that at least $s1$ is 1 or $s5$ is 1.

Preferred O-glycan oligosaccharide sequences include:

Gal β 3(GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GalNAc,
 GlcNAc β 3Gal β 3(Gal β 4GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc,
 GlcNAc β 3Gal β 3GalNAc, Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)GalNAc,
 GlcNAc β 6GalNAc, GlcNAc β 3GalNAc.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

12

More preferably O-glycan oligosaccharide sequences include:

Gal β 3(GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GalNAc,
GlcNAc β 3Gal β 3GalNAc, Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 6GalNAc and
GlcNAc β 3GalNAc.

5

Most preferred O-glycan sequences include Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc,
GlcNAc β 6GalNAc.

The present invention is specifically directed to human antibodies recognizing O-glycan
oligosaccharide sequence structures Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc, and/or GlcNAc β 6GalNAc
but not Gal β 3(Gal β 4GlcNAc β 6)GalNAc, and/or Gal β 4GlcNAc β 6GalNAc and
therapeutic and diagnostic uses of these as described by the present invention. In a
preferred embodiment the present invention is directed to human antibody recognizing
effectively oligosaccharide sequence Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc but not oligosaccharide
sequence Gal β 3(Gal β 4GlcNAc β 6)GalNAc. In preferred embodiment the human antibody
is natural antibody. In another embodiment the antibody is induced by a cancer vaccine. In
more preferred embodiments the human antibody is an IgG or IgA or IgM antibody, most
preferably a IgG antibody.

As separate embodiment the present invention is directed to uses of rare sialylated
variants of the O-glycan core structures such as GlcNAc β 3(NeuNAc α 6)GalNAc or
NeuNAc α 3Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc.

3. Poly-N-acetyllactosamine type sequences containin terminal GlcNAc β 3 and /or

GlcNAc β 6

The present invention describes the presence of terminal N-acetylglucosamine (GlcNAc)
on poly-N-acetyllactosamine type structures on human tumors. The structures were first
found in large amounts from a human hyper nephroma tumor in one out of four tumors
studied. The glycolipid fraction of the tumor was characterized to contain terminal N-
acetylglucosamines by a specific radiolabelled *Escherichia coli* strain and FAB-mass
spectrometry of permethylated sample. The glycolipid fraction also contained terminal N-
acetyllactosamines, which could be detected by using a specific lectin. Screening of
normal kidney glycolipids by the bacterium showed that the terminal GlcNAc was not

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

13

present in the corresponding normal tissue, as it was not present in several other control tissues. One embodiment of the present invention describes detection or isolation of an oligosaccharide sequence or oligosaccharide sequences comprising a terminal N-acetylglucosamine residue from tumor.

5

Following saccharide sequences are among the tumor specific structures to be isolated or detected: GlcNAc β 3Gal, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GlcNAc β 6Gal, GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal, GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 4GlcNAc, GlcNAc β 6Gal or GlcNAc β 6Gal β 4GlcNAc, the sequences are part of poly-N-acetyllactosamine chains so that the chains comprise at least one terminal β -linked GlcNAc.

10

In a more preferred embodiment the present invention is directed to non- β 6- containing linear poly lactosamine sequences: GlcNAc β 3Gal, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc.

15

In a separate embodiment the present invention is directed to β 6- containing non-branched poly lactosamine sequences: GlcNAc β 6Gal, GlcNAc β 6Gal β 4GlcNAc, GlcNAc β 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc.

20

A preferred group of poly-N-acetyllactosamine type sequences are β 3-, β 6-branched structures, GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal, GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 4GlcNAc, Gal β 4GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 4GlcNAc. Then branched structures resemble branched O-glycan structures.

Structures with type one N-acetyllactosamine, GlcNAc β 3Gal β 3GlcNAc, or GlcNAc β 6Gal β 3GlcNAc are also among the compounds within the scope of the invention.

25

4. Protein linked N-acetylglucosamine

The inventors have characterized protein linked GlcNAc residues from tumors such as larynx, stomach, colon and lung tumors. The present invention shows that the overexpression of the protein linked GlcNAc expression on tumors is common. The novel N-glycan type tumor antigens were also detected specifically by novel glycosyltransferase methods from tissue sections of tumors but not or in lower amounts in corresponding normal or non-malignant tissues. The analysis of the protein linked GlcNAc indicated presence of several forms of protein linked GlcNAc.

30

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

14

In a specific embodiment the present invention is directed according to the present invention to therapeutic, and diagnostic uses, and pharmaceutical compositions, comprising beta linked N-acetylglucosamine monosaccharide residue, GlcNAc β . Most of the tumors cells carry the O-glycan like GlcNAc releasable by β -elimination.

5

The present invention is in a preferred embodiment directed to the diagnostic and therapeutic uses according to the present invention using O-glycosidic structures GlcNAcSer and/or GlcNAcThr, wherein the hydroxyl groups serine and threonine residues are glycosidically linked to the GlcNAc residue. The serine (Ser) and threonine (Thr) amino acid residues are in a preferred embodiments parts of peptides or peptide conjugates or derivatized from amino- and/or carboxylic acid groups.

10

In another preferred embodiment the present invention is directed to the uses of GlcNAcX, wherein X is aglycon preferably mimicking serine or threonine amino acid residues described above.

15

In a preferred embodiment GlcNAc β Ser and/or GlcNAc β Thr, GlcNAc β X is linked to polyvalent carrier according to the present invention for uses described by the invention, preferably to a carrier useful for vaccination, and most preferably to a carbohydrate carrier as described by the present invention.

20

In another preferred embodiment GlcNAc α Ser and/or GlcNAc α Thr, GlcNAc α X is linked to polyvalent carrier according to the present invention, preferably to a carrier useful for vaccination, and most preferably to a carbohydrate carrier as described by the present invention.

25

The present invention is also directed β -linked N-glycosidic analogs of the O-glycan type structures described above, for example GlcNAc β -Asn and peptide derivatives and analogs thereof. In biological samples such structures are formed by exoglycosidases or by endo-N-acetylglucosaminyltransferase.

General structures representing oligosaccharide sequences according to the invention

30

The oligosaccharide sequences of the invention can be a part of a glycolipid, a part of a glycoprotein, and/or a part of a N-acetylglucosamine chain. The tumor specific oligosaccharide sequences can also be a part of glycolipids, a part of N-linked glycans or O-linked glycans of glycoproteins. The tumor associated oligosaccharide sequences can also be directly linked to O-glycosidic GalNAc. Defects or changes in biosynthetic and/or

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

15

biodegradative pathways of tumors lead to the synthesis of the oligosaccharide sequences of the invention both on glycolipids and glycoproteins. Terminal N-acetylglucosamine means that the non-reducing end GlcNAc residue in an oligosaccharide chain is not substituted by any other monosaccharide. The term oligosaccharide sequence indicates that the monosaccharide residue/residues in the sequence are part of a larger glycoconjugate, which contains other monosaccharide residues in a chain, which may be branched, or natural substituted modifications of oligosaccharide chains. The oligosaccharide chain is normally conjugated to a lipid anchor or to a protein. In a preferred embodiment the oligosaccharide sequences according to the present invention are non-reducing terminal oligosaccharide sequences, which means here that the oligosaccharide sequences are not linked to other monosaccharide or oligosaccharide structures except optionally from the reducing end of the oligosaccharide sequence. The oligosaccharide sequence when present as conjugate is preferably conjugated from the reducing end of the oligosaccharide sequence, though other linkage positions which are tolerated by the antibody/binding substance binding can also be used. In a more specific embodiment the oligosaccharide sequence according to the present invention means the corresponding oligosaccharide residue which is not linked by natural glycosidic linkages to other monosaccharide or oligosaccharide structures. The oligosaccharide residue is preferably a free oligosaccharide or a conjugate or derivative from the reducing end of the oligosaccharide residue.

Uses described for the terminal GlcNAc oligosaccharide chain by the invention for the N-linked, O-linked and polylectosamine type oligosaccharide sequences described also apply to the monosaccharide protein linked GlcNAc and derivatives thereof as described.

Minor species of ganglio- or galactosylglobosides can also represent the tumor specific terminal GlcNAc: terminal Gal β 4GlcNAc β 3/ β 6 structures are linked to the glycolipid cores in some tissues and under low galactosylation conditions described by the invention terminal GlcNAcs can be revealed.

In another embodiment of the invention the tumor specific oligosaccharides are detected for the diagnostics of tumor.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

16

Term "oligosaccharide sequence" or "oligosaccharide" means herein also the protein linked GlcNAc and derivatives thereof as described.

5 Preferably the tumor specific oligosaccharide sequence is detected by a specific binding substance which can be an aptamer, lectin, peptide, or protein, such as an antibody, a fragment thereof or genetically engineered variants thereof. More preferably the specific binding substance is divalent, oligovalent or polyvalent. Most preferably the binding substance is a lectin or an antibody.

10 Specific binding combinatorial chemistry libraries can be used to search for the binding molecules. Saccharide binding proteins, antibodies or lectins can be engineered, for example, by phage display methods to produce specific binders for the structures of the invention. Labelled bacteria or cells or other polymeric surfaces containing molecules recognizing the structures can be used for the detection. Oligosaccharide sequences can also be released from tumor cells by endoglycosidase enzymes. Alternatively
15 oligosaccharides can be released by protease enzymes, such as glycopeptides. 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. Alternatively the glycolipid fraction can be isolated. A substance specifically binding to the tumor specific oligosaccharide sequences can also be used for
20 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.

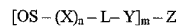
25

The present invention is also directed to the use of the tumor specific oligosaccharide sequences or analogs or derivatives thereof to produce polyclonal or monoclonal antibodies recognizing said structures using following process: 1) producing synthetically or biosynthetically a polyvalent conjugate of an oligosaccharide sequence of the invention
30 or analogue or derivative thereof, the polyvalent conjugate being, for instance, according to the following structure: position C1 of the reducing end terminal of an oligosaccharide sequence (OS) comprising the tumor 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 the following structure

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

17



where integer m have values $m > 1$ and n is independently 0 or 1; L can be oxygen,
 5 nitrogen, sulfur or a carbon atom; X is preferably lactosyl-, galactosyl-, poly-N-acetyl-
 lactosaminy], 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; 2)
 immunizing an animal or human with polyvalent conjugate together with an immune
 response activating substance. Preferably the oligosaccharide sequence is polyvalently
 10 conjugated to an 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
 15 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 known in the art.

20 Antibody production or vaccination can also be achieved by analogs or derivatives of the
 tumor specific oligosaccharide sequences. Simple analogs of the N-acetyl-group
 containing oligosaccharide sequences include compounds with modified N-acetyl groups,
 for example, N-alkyls, such as N-propanyl.

25 Analogs that can be used for the production of antibodies binding
 $\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$ include sequences $\text{Hex}(\text{NAc})_{0-1}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$,
 $\text{Hex}(\text{NAc})_{0-1}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$, where Hex is hexose, preferably Gal or Glc. The analogs
 may also comprise molecules where GlcNAc is replaced by a close isomer such as
 ManNAc.

30 According to the invention it is possible to use the tumor specific oligosaccharide
 sequences for the purification of antibodies from serum, preferably from human serum.
 Normally there are large amounts of antibodies recognizing terminal GlcNAc structures in
 human serum. There is also a class of natural antibodies recognizing terminal

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

18

Gal α 3Gal β 4GlcNAc structures. The Gal α antigen is not naturally present in human and recently it was shown that the natural antibodies also bind *in vitro* structures GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc, and GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc (Teneberg et al., 1996). The X2-structure, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc, is a normal antigen on human tissues and structures GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc and Gal α 3Gal β 4GlcNAc have not been described from human normal or cancer tissues. Thus, the present finding that the terminal GlcNAc-structure is a tumor antigen indicated that it is possible that the actual function of the natural antibodies is to prevent cancers and destroy tumors having terminal GlcNAc-structures. The tumor specific oligosaccharides or derivatives or analogs, such as a close isomer, can also be immobilized for the purification of antibodies from serum, preferably from human serum. The present invention is directed to natural human antibodies which bind strongly to the tumor specific oligosaccharide sequences according to the present invention.

The tumor specific oligosaccharide sequences can also be used for detection and or quantitation of the human antibodies binding to the tumor specific oligosaccharide sequences, for example, in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or affinity chromatography type assay formats. The detection of human antibodies binding to the tumor specific oligosaccharide sequences is preferably aimed for diagnostics of cancer, development of cancer therapies, especially cancer vaccines against the oligosaccharide sequences according to the present invention, and search for blood donors which have high amounts of the antibodies or one type of the antibody.

Furthermore, it is possible to use human antibodies or humanized antibodies against the tumor 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 against the tumor 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 man without any expected side effect as such antibodies are transferred during regular blood transfusions. This is true under conditions that the tumor 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 structures with terminal GlcNAc. In another embodiment of the invention species specific

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

19

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 tumor specific oligosaccharide sequences, or other tolerated substances binding the tumor specific oligosaccharide sequences, 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 or tumor binding antibodies according to the present invention can be also used for targeting prodrugs active against tumor or enzymes or other substances converting prodrugs to active toxic agents which can destroy or inhibit tumor or 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 or tumor. The method of treatment of the invention can also be used when patient is under immunosuppressive medication or he/she is suffering from immunodeficiency.

The terminal GlcNAc, or preferably GlcNAc β 3/6Gal β 4GlcNAc-type cancer or tumor glycosylation, may be more common in tumors occurring in patients suffering from

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

20

immunodeficient conditions, e.g., immunodeficiency causing diseases, such as AIDS, or immunodeficiency caused by immunosuppressive medication. Kaposi's sarcoma is a common cancer related to AIDS and 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. Some of the potential natural anticancer antibodies may probably also recognize following epitopes: GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc, and Gal α 3Gal β 4GlcNAc, which have been shown to be similar. The first structure, X₂, is more common in persons who belong to a rare variant of p-blood group, these persons may also have less antibodies recognizing GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc structure. Capability to produce antibodies against tumor or cancer specific antigens may vary according to individual differences in immune system. Persons who have recovered from cancer may have especially high amounts of natural anti-cancer antibodies.

15

A possible example from the antibody mediated immune reaction against tumor tissue is a total recovery from hypernephroma after surgery of the majority of the tumor. The oligosaccharide sequences with terminal GlcNAcs are potential targets of such immune response.

20

Other methods for therapeutic targeting of tumors

It is realized that numerous other agents beside antibodies, antibody fragments, humanized antibodies and the like can be used for therapeutic targeting of cancer or tumors similarly with the diagnostic substances. It is specifically preferred to use non-immunogenic and tolerable substances to target cancer or tumor. The targeting substances binding to the cancer or tumor comprise also specific toxic or cytolytic or cell regulating agents which leads to destruction or inhibition of cancer or tumor. Preferably the non-antibody molecules used for cancer or tumor targeting therapies comprise molecules specifically binding to the cancer or tumor specific oligosaccharide sequences according to the present invention are aptamers, lectins, genetically engineered lectins, enzymes recognizing the terminal GlcNAc-structures 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 or tumor targeting therapies. The cancer or tumor binding non-antibody

30

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

21

substances according to the present invention can also be used for targeting prodrugs against cancer or tumor to a cancer or tumor or for targeting enzymes or other substances converting prodrugs to active toxic agents which can destroy or inhibit cancer or tumor.

5 Targetting terminal GlcNAc-comprising tumor antigens
by glycosyltransferases

- The present invention is specifically directed to novel method to transfer a modified monosaccharide derivative on cancer cells or tumor for treatment or diagnostics. We disclose a method of generating a covalent bond between a toxic agent, label, drug or
- 10 immunologically active carbohydrate and the surface of a pathogenic cell of a patient, which surface comprises an acceptor structure recognized by a transferase enzyme, comprising the steps of
- conjugating said toxic agent, label, drug or immunologically active carbohydrate with a donor molecule of the transferase enzyme, and
 - 15 - (a) administering the conjugate obtained and optionally said transferase enzyme to the patient for the treatment of tumor
 - or (b), for tumor diagnostics, contacting the conjugate obtained to a tumor sample and detecting said label.
- 20 The monosaccharide derivatives to be transferred by glycosyltransferases also comprise a glycosidically linked nucleotide residue. The preferred monosaccharide derivatives are 2-modified such as
- Amide derivatives of UDP-galactosamine
- Preferred theraphautic or diagnostic monosaccharide derivative is
- 25 UDP-GalN[-S]-D,
- wherein
- S is an optional spacer group
- D is derivatizing group including molecular labels such as for example biotin or a fluorescent molecule including, or a toxic agent, prodrug or prodrug releasing substance as
- 30 described for other cancer or tumor targetting methods.
- The spacer is preferably flexible enough to allow the binding of the modified nucleotide monosaccharide to the transferase.
- A preferred monosaccharide derivative is UDP- N-(6-biotinamidohexanoyl)galactosamine.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

22

A preferred enzyme to be used is a galactosyltransferase which is engineered to transfer effectively 2-modified monosaccharides. Also natural GalNAc/GlcNAc-transferases with similar specificity from animals for example, may also be used.

5 The present invention is especially directed to method to label tumor tissue by biotin by incubating the tissue with UDP-GalN-spacer-biotin and a modified galactosyltransferase.

The present invention is in a separate embodiment directed to a diagnostic method in which

- 10 1. radiolabelled Gal is transferred from radiolabelled UDP-Gal to human tumor tissue by galactosyltransferase, preferably by β 4-galactosyltransferase and
2. the radioactivity incorporated to the tissue is used to determine amount of terminal GlcNAc residues on the tumor.

15 The methods using galactosyltransferases for labelling are effective for all types of terminal β -GlcNAc structures of the present invention.

Use of antibodies, preferably from animals, in gastrointestinal and food related applications

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

25 eggs. The animals can be immunized tumor 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 inhibition or destruction of tumors in human gastrointestinal tract, such substances includes plant lectins which are specific for the tumor specific oligosaccharide sequences. The present invention is directed to functional

30 foods and food additives containing antibodies recognizing the tumor specific oligosaccharide sequences according to the present invention in gastrointestinal tract, the present invention is directed also to the use of other food acceptable substances especially lectins binding to the tumor specific oligosaccharide sequences of gastrointestinal tract in functional foods or as food additives.

Screening of substances binding to the tumor specific terminal GlcNAcs

The present invention is specifically directed to the use of the tumor specific terminal-GlcNAc-oligosaccharide sequences for the screening of specific binders with regard to the structures. The screening allows finding of optimal binding substances for the tumor specific oligosaccharide sequences according to the present invention. The specific binders may be therapeutic or diagnostic antibodies or other molecules binding to the glycans as described by the present invention above.

The screening of the substances binding to the oligosaccharide sequences according to the invention may be performed in an enzyme linked immunoassays (so called ELISA-assays). Direct binding can be measured for example when either the binding substance or the terminal-GlcNAc-glycan structure is linked to a solid phase matrix.

Free oligosaccharides or oligosaccharide conjugates according to the present invention can be also used as specific inhibitors in the assays. Fluorescence polararization difference and NMR are examples of liquid phase methods to be used for screening of the substances binding to the oligosaccharide sequences according to the invention.

Cancer vaccines

Furthermore according to the invention the tumor specific oligosaccharide sequences or analogs or derivatives thereof can be used as cancer vaccines in man to stimulate immune response to inhibit or eliminate cancer or tumor 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 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 or tumor. Preferably the method is used for the treatment of a human patient. Preferably the method of treatment is used for the

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

24

treatment of cancer or tumor of a patient, who is under immunosuppressive medication or the patient is suffering from immunodeficiency.

5 Furthermore it is possible to produce a pharmaceutical composition comprising the tumor specific oligosaccharide sequences or analogs or derivatives thereof for the treatment of cancer or tumor. Preferably the pharmaceutical composition is used for the treatment of a human patient. Preferably the pharmaceutical composition is used for the treatment of cancer or tumor, 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 or tumor diagnosed to express the tumor specific oligosaccharide sequences of the invention. The methods of treatment or the pharmaceutical compositions can be used together with other methods of treatment 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.

10 Use of antibodies for the diagnostics of cancer or tumor and for the targeting of drugs to cancer or tumor has 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 5,747,048; US 5,229,289 and US 6,083,929).

25

Combination of the therapeutic and diagnostic methods

Present invention is specifically directed to analysis of abnormal and normal glycosylation structures from human tumors and cancers and use of the analytical information for the production of therapeutic antibodies or cancer vaccines according to the invention.

30 Present invention is specifically directed to treatment of cancer including following steps:

1. analysis of glycosylation of tumor or cancer tissue of a patient
2. analysis of normal glycosylation of the tissue containing the cancer
3. Use of the therapies according to the present invention if the patient has tumor specific oligosaccharide sequences according to the present invention in cancer but

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

25

does not have the tumor specific oligosaccharide sequences or has these in much lower extent on cell surfaces in the normal tissue.

The data in examples shows the usefulness of the combination of analysis of the tumor specific structures according to the invention, because there are individual variations in glycosylation of tumors and normal tissues. The normal tissue close to tumor may also be contaminated partially contaminated by materials secreted by tumor which may be taken to consideration when analyzing the normal tissue data.

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 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 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 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.

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 or tumor in a patient. Examples of conditions treatable according to the invention are cancers in which the tumor expresses one or more of the tumor specific

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

26

oligosaccharide sequences described in the invention. The treatable cancer cases can be discovered by detecting the presence of the tumor specific oligosaccharide sequences in a biological sample taken from a patient. Said sample can be a biopsy or a blood sample.

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

- The substance or pharmaceutical composition according to the invention may be
10 administered in any suitable way. Methods for the administration of therapeutic 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
15 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 tumor specific oligosaccharide or compound specifically recognizing tumor
20 specific oligosaccharides of the invention is used for diagnosis or typing, it may be 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.

- 25 In the present invention 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 tumor 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 present invention is preferably directed to primary human cancer samples. It is well known that glycosylations in cultivated cancer cells vary and are not in general relevant with regard to cancer. It is also known that transfections, cell culture media and dividing solid tumor to single cells may have dramatic effects for glycosylations. When
30 referring to therapies tumor specific oligosaccharides or oligosaccharide sequences

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

27

(possibly occasionally referred as cancer specific oligosaccharides/oligosaccharide sequences) are targeted for treatment of all kinds of cancers and tumors. The term cancer includes tumors.

- 5 The present invention is specifically directed to the treatment of all types of cancer or tumors expressing the tumor specific oligosaccharide sequences according to the present invention. Examples of preferred cancer types includes cancers of larynx, colon cancer, stomach cancer, ovarian cancer and lung cancer. These cancer types are especially preferred for the N-glycan type terminal GlcNAc related methods and compositions
- 10 according to the present invention. Lung cancer is a preferred target for the protein linked GlcNAc related methods and compositions according to the present invention. The O-glycan type substances are especially preferred for use in methods and compositions according to the present invention for ovarian cancer and mucinous carcinomas, especially for ovarian adenocarcinomas. In a preferred embodiment the terminal GlcNAc-structures
- 15 of poly-N-acetylactosamine type is used for therapy or diagnostics of hypernephroma cancers. The present invention is also specifically directed to the treatment according to the present invention for any type of cancer or tumor which has surface expression of the terminal GlcNAc-structures according to the present invention.
- 20 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

25 L-configuration, and that all monosaccharide units are in the pyranose form. Glucosamine 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-acetylactosamine or Gal $\beta 3/4$ GlcNAc

30 means either type one structure residue Gal $\beta 3$ GlcNAc or type two structure residue Gal $\beta 1-4$ GlcNAc, and sialic acid is N-acetylneuraminic acid or NeuNAc, Lac refers to lactose and Cer is ceramide.

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

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

28

EXAMPLES

EXAMPLE 1

5

Culturing and labelling of bacteria

The recombinant G-fimbriated *Escherichia coli* strain IHE11088 (pRR-5), expressing the GlcNAc-recognizing GafD adhesin (Rhen, M. et al., 1986), was cultured in Luria broth containing tetracyclin (25 µg/ml) and 10 µl [³⁵S]-methionine (400 mCi; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) at 37°C over night. The bacteria were harvested by centrifugation, washed two times with phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS), and resuspended in PBS to 1 x 10⁹ CFU/ml. The specific activities were approximately 100 CFU/cpm.

15

Labelling of Erythrina cristagalli lectin

The Galβ4GlcNAcβ-binding lectin from *Erythrina cristagalli* (Teneberg et al., 1994) was purchased from Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA. Batches of 100 µg protein were labelled with ¹²⁵I, using Na¹²⁵I (100 mCi/ml; Amersham Pharmacia Biotech), according to the IODO-GEN protocol of the manufacturer (Pierce, Rockford, IL).

20

Approximately 5 x 10³ cpm/µg protein was obtained.

Glycosphingolipid binding assays

Binding of radiolabeled bacteria and lectin to glycosphingolipids separated on thin-layer chromatograms was done as reported previously (Teneberg et al., 1994, Hansson et al., 1985). Thin-layer chromatography of glycosphingolipids was performed on aluminium-backed silica gel 60 HPTLC plates (Merck, Darmstadt, Germany), using chloroform/methanol/water 60:35:8 (by volume) as solvent system. Dried chromatograms were dipped for 1 min in diethylether/*n*-hexane 1:5 (by volume) containing 0.5% (w/v) polyisobutylmethacrylate (Aldrich Chem. Comp. Inc., Milwaukee, WI). After drying, the chromatograms were soaked in PBS containing 2% bovine serum albumin (BSA) (w/v), 0.1% NaN₃ (w/v) for 2 hr at room temperature. The chromatograms were subsequently covered with radiolabelled bacteria diluted in PBS (2-5 x 10⁶ cpm/ml) or radiolabelled lectin in BSA (2 x 10³ cpm/ml). Incubation was done for 2 hr at room temperature,

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

29

followed by repeated washings with PBS. The chromatograms were thereafter exposed to XAR-5 X-ray films (Eastman Kodak, Rochester, NY) for 12 hr.

EXAMPLE 2

5

Demonstration of tumor specificity of terminal GlcNAc structure.

Thin-layer overlay assays were performed with radiolabelled G-fimbriated *Escherichia coli* to screen various tumors and normal tissues. The *E.coli* strain IHE11088 (pRR-5) specifically recognizes terminal GlcNAc β -structures (Rhen, M. et al. 1986). Binding active glycolipids were found in non-acid fraction from one of four hypernephroma tumors studied (Fig 1). No binding was observed towards corresponding fraction of non-acid glycosphingolipids from human normal kidney or to other control tissues studied.

EXAMPLE 3

15

Characterizations of terminal GlcNAc β -structures from human hypernephroma

Non-acid glycosphingolipids from human hypernephroma tumor were fractionated and analysed by binding with the GlcNAc β -specific G-fimbriated *E.coli* (Fig.1A) and lectin from *Erythrina cristagalli* which recognizes terminal Gal β 4GlcNAc β -structures (Fig. 2B) by thin-layer overlay assay. The two binding reagents show partially overlapping glycosphingolipid binding species. The data indicates that the terminal GlcNAc-species are mostly present on N-acetylactosamine type non-acid glycosphingolipids. The terminal GlcNAc-species which do not have an overlap with lectin binding activity have most probably terminal structures where N-acetylactosamine is derivatized by GlcNAc such as GlcNAc β 3Gal β 3/4GlcNAc β -; diffuse bands probably also indicates the presence of an isomeric form GlcNAc β 6Gal β 3/4GlcNAc β -. The sample also appears to contain minor species where the terminal GlcNAc and N-acetylactosamine are present in the same glycolipid. This indicates the presence of branched structures such as Gal β 3/4GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)Gal β 3/4GlcNAc β - and GlcNAc β 3(Gal β 3/4GlcNAc β 6)Gal β 3/4GlcNAc β -; the size distribution of the glycosphingolipids probably also indicates species with two or even more terminal GlcNAcs. The binding of the *Erythrina cristagalli* lectin indicates that most of the lactosamine probably has the type two N-acetylactosamine structure Gal β 4GlcNAc. The

20

25

30

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

30

glycolipids were partially analyzed by FAB mass spectrometry and by EI mass spectrometry after permethylation, which showed presence of terminal HexNAc and that the smallest species with terminal GlcNAc is a pentasaccharide glycosphingolipid probably of lacto or neolacto series. Also 7-meric and larger structures up to 15-mer were observed (Fig. 1).

- 5 The binding of the lectins indicates that most of the lactosamine probably has the type two N-acetylglucosamine structure.

EXAMPLE 4

10 Materials and methods for protein linked structures and labeling by galactosyltransferase

Isolation of glycans from formalin-fixed or formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. Prior to glycan isolation from formalin-fixed samples, proteins were enriched by chloroform-methanol extraction essentially as described in (Manzi *et al.*, 2000).

- 15 Quantitative extraction of glycoproteins was confirmed by radioactively labelled glycoprotein standards (not shown). Prior to glycan isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded samples, the samples were deparaffinised. Glycans were detached from sample glycoproteins by non-reductive β -elimination and purified by chromatographic methods.

20

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

- 25 *Exoglycosidase digestions.* All exoglycosidase reactions were performed essentially as described in (Nyman *et al.*, 1998; Saarinen *et al.*, 1999) and analysed by MALDI-TOF MS. The enzymes and their specific control reactions with characterised oligosaccharides were: β -N-acetylglucosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*, recombinant, *E. coli*; Calbiochem, USA) digested GlcNAc β 1-6Gal-R but not GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3/6Gal-R; β 1,4-galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*, recombinant, *E. coli*; Calbiochem, USA) digested Gal β 1-4GlcNAc-R but not Gal β 1-3GlcNAc-R; α -mannosidase (Jack bean; Glyko, UK) transformed a mixture of high-mannose N-glycans to the Man₁GlcNAc₂ N-glycan core trisaccharide. Control digestions were performed in parallel and analysed similarly to the analytical exoglycosidase reactions.

Synthesis of UDP-GalN-biotin. UDP-galactosamine (UDP-GalN) is formed from UDP-Glc and galactosamine-1-phosphate by the action of galactose-1-phosphate uridylyltransferase (E.C. 2.7.7.12; Sigma, USA). A typical synthesis protocol is described below. The reaction mixture contains 10 mM galactosamine-1-phosphate, 20 mM UDP-Glc, 5 U/ml of galactose-1-phosphate uridylyltransferase, 100 mM Na-HEPES pH 8.0, 5 mM MgCl₂, and 5 mM β-mercaptoethanol. The reaction vessel is incubated at room temperature under nitrogen atmosphere for 3 days, after which nucleotide sugars are isolated from the reaction mixture with a graphitised carbon column essentially as in (Mäki *et al.*, 2002). The nucleotide sugar mixture, containing UDP-Glc and UDP-GalN, is incubated with a molar excess of sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate (sulfo-NHS-LC-biotin; Pierce, USA) in 50 mM NH₄HCO₃ at room temperature for 2.5 hours. The product, UDP-GalN-biotin, uridine 5'-diphospho-N-(6-biotinamidohexanoyl)galactosamine, is purified by gel filtration and reversed phase HPLC.

Labeling of terminal GlcNAc residues in oligosaccharides and tissue sections with UDP-GalN-biotin. N-(6-biotinamidohexanoyl)galactosamine can be transferred from UDP-GalN-biotin to a terminal GlcNAc containing acceptor with a recombinant β1,4-galactosyltransferase similar to the enzyme described in (Ramakrishnan and Qasba, 2002). In a typical procedure, an oligosaccharide acceptor such as GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, or deparaffinised formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections, are incubated at +37 °C with a reaction mixture containing 10 mM UDP-GalN-biotin, 160 U/l enzyme, 100 mM Tris-HCl, and 20 mM MnCl₂. After washing, the biotin groups are visualised by standard methods in the art, using streptavidin or avidin coupled reagents, for example streptavidin-FITC.

Labeling of terminal GlcNAc residues in tissue sections with UDP-[¹⁴C]Gal. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections were deparaffinised and incubated at +37 °C with a reaction mixture containing UDP-[¹⁴C]Gal, 200 U/l bovine milk β1,4-galactosyltransferase (Calbiochem, USA), 50 mM Na-MOPS pH 7.4, and 20 mM MnCl₂. After washing, the labelled sections were subjected to autoradiography. N-glycans were detached from the tissue sections with *Chryseobacterium meningosepticum* N-glycosidase F (Calbiochem, USA) essentially as in (Nyman *et al.*, 1998). Chromatography was performed as described in figure legends to Fig. 7A and 7B.

EXAMPLE 5

5 *Cancer-associated terminal GlcNAc containing N-glycans from lung adenocarcinoma samples.* Formalin-fixed samples, from tumor and surrounding healthy tissue, were obtained from a patient with lung adenocarcinoma. There was a significant difference between the neutral glycans isolated from the tumor sample (Fig. 3A) and the healthy tissue sample (Fig. 3B), namely a peak at m/z 1485.48, corresponding to the ion

10 $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ (calc. m/z 1485.53). The relative intensity of this glycan peak was elevated over 6.1 times in the tumor sample, as compared to healthy tissue. Furthermore, a peak at m/z 1647.53, corresponding to the ion $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ (calc. m/z 1647.59), had a higher signal intensity in the tumor sample. Upon β -N-acetylglucosaminidase digestion (Fig. 3C), the two peaks were completely transformed

15 into peaks at m/z 1079.18, corresponding to the ion $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ (calc. m/z 1079.38), and 1444.24, corresponding to the ion $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ (calc. m/z 1444.51), respectively, indicating the presence of terminal β -GlcNAc residues. Jack bean α -mannosidase digestion (Fig. 3D) further transformed these peaks into peaks at m/z 755.19, corresponding to the ion $[\text{Hex}_1\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ (calc. m/z 755.27), and

20 1282.29, corresponding to the ion $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_1+\text{Na}]^+$ (calc. m/z 1282.45), respectively. However, α -mannosidase digestion before the β -N-acetylglucosaminidase digestion did not affect the two peaks, indicating that the α -Man residues were subterminal to the β -GlcNAc residues. In addition, β 1,4-galactosidase digestion of the original neutral glycan sample completely transformed the peak at m/z 1647.5 into the

25 peak at m/z 1485.5, indicating the presence of a terminal Gal β 1-4GlcNAc unit. Taken together, the results suggest that the lung adenocarcinoma tumor sample contained highly elevated amounts of the complex N-linked glycan core structure GlcNAc β -Man α 1-6(GlcNAc β -Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc, and slightly elevated amounts of the mono- β 1,4-galactosylated (to GlcNAc) derivative of the former structure,

30 as compared to the surrounding healthy tissue.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

33

EXAMPLE 6

Occurrence of the terminal GlcNAc containing N-glycans in carcinoma samples. The occurrence of the abovementioned structures in various tumor and healthy control samples was studied by isolating and analysing the neutral glycan fractions by MALDI-TOF MS and exoglycosidase digestions. The analysed tumor-control pairs were: 7 lung cancer sample pairs, and one pair each of colon, stomach, and larynx cancer samples. It turned out that in every case the relative abundance of the two terminal GlcNAc containing N-glycan at m/z 1485.5, was elevated in the cancerous sample. However, there were significant individual differences in the expression levels of this glycan epitope both in the healthy state and in cancer. Table 1 summarizes the differential expression of the m/z 1485.5 N-glycan in relation to the bulk of the isolated neutral glycan fraction.

EXAMPLE 7

Synthesis of UDP-GalN-biotin. UDP-galactosamine was synthesized as described under Materials and Methods. The product was characterized by MALDI-TOF MS (obs. m/z 564.42 for $[C_{13}H_{25}N_3O_{16}P_2-H]^-$, calc. m/z 564.31; Fig. 4A) and the expected peak appeared in the mass spectrum one mass unit smaller than the peak of UDP-Glc (obs. m/z 565.37 for $[C_{13}H_{24}N_2O_{17}P_2-H]^-$, calc. m/z 565.29; Fig. 4A). The crude nucleotide sugar prepate was reacted with a biotinylation reagent, namely succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate. After the reaction, the expected product could be seen in the MALDI-TOF mass spectrum of the reaction mixture (obs. m/z 902.93 for $[C_{31}H_{50}N_6O_{19}P_2S-H]^-$, calc. m/z 903.76; Fig. 4B). UDP-Glc did not react at all with the biotinylation reagent. The synthesized UDP-GalN-biotin, uridine 5'-diphospho-N-(6-biotinamidohexanoyl)galactosamine, reacted with GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc and a recombinant β 1,4-galactosyltransferase similar to the enzyme described in (Ramakrishnan and Qasba, 2002). The product, [N-(6-biotinamidohexanoyl)galactosamine] β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, was characterized by MALDI-TOF MS (obs. m/z for $[M+Na]^+$ 1433.38, calc. m/z 1433.55). Taken together, the results indicate that the synthesized product has the expected structure (Fig. 5). The product was chromatographically purified to homogeneity.

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

34

EXAMPLE 8

Labeling of terminal GlcNAc residues in tissue sections with UDP-[¹⁴C]Gal and UDP-GalN-biotin. Deparaffinised formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections were radioactively labeled with UDP-[¹⁴C]Gal and bovine milk β 1,4-galactosyltransferase, as described under Materials and Methods. Autoradiography revealed a clear difference between the tumor and the healthy tissue samples (Fig. 6), indicating that there are highly elevated amounts of terminal GlcNAc residues in the lung adenocarcinoma sample. Similar results were also obtained by using the UDP-GalN-biotin reagent, as described under Materials and Methods, streptavidin-FITC, and fluorescence microscopy. Importantly, cancer cells could be labeled with this biotinylation reagent.

EXAMPLE 9

Isolation of [¹⁴C]Gal-labeled oligosaccharides from lung adenocarcinoma sample. After labeling of lung adenocarcinoma sample and surrounding healthy tissue sections with [¹⁴C]Gal as described above, the labeled oligosaccharides were isolated by N-glycosidase F digestion and nonreductive β -elimination. In the gel filtration chromatogram of the N-glycosidase F liberated glycans from lung adenocarcinoma (Fig. 7A), only one peak was visible and it coeluted with the N-glycan standards Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc and Gal β 1-4[GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc]. The peak was pooled and subjected to HPLC with a porous graphitized carbon column (Fig. 7B), where it was divided into one major and two minor peaks. The major peak, containing nearly all of the total radioactivity, coeluted with the N-glycan standard Gal β 1-4[GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc].

In the gel filtration HPLC chromatogram of the material liberated by nonreductive β -elimination from lung adenocarcinoma (Fig. 7C), a broad peak, containing 45 % of the total radioactivity, was found to elute between the void volume (at 8 ml) and the elution position of the N-glycan standard Gal β 1-4[GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc]. The broad peak was pooled and passed

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

35

through columns of strong cation exchange material and C₁₈ silica, which would retain all glycopeptidic material, but allow for quantitative elution of free oligosaccharides. Nearly 80 % of the radioactivity in the pooled fractions was retained in the columns, indicating that the broad peak indeed corresponded to alkali-liberated glycopeptides, from which the [14C]Gal labeled glycan moieties had not been detached. Major part of the remaining radioactivity was found to correspond to the N-glycan structure described above, but the presence of other labelled oligosaccharides could not be excluded. The major peak in the gel filtration HPLC chromatogram, containing 55 % of the total radioactivity, coeluted with an N-acetyllactosamine (LacNAc) standard.

10

EXAMPLE 10

Protein linked GlcNAc from cancer samples. Furthermore, in graphitized carbon column HPLC of the pooled fractions at 15 – 18 min, the major peak coeluted with LacNAc. This suggests that the sample contains base-labile GlcNAc monosaccharide-protein conjugates, most likely GlcNAc β -O-Ser/Thr units. Importantly, the amount of [14C]-labeled LacNAc was significantly (1.99 times) higher in the lung adenocarcinoma sample as compared to the surrounding healthy tissue sample.

20 Taken together, these results indicate that about half of the total radioactivity that can be liberated from UDP-[14C]Gal labeled lung adenocarcinoma sample tissue sections, represents the [14C]Gal labeled forms of the cancer-associated N-glycan GlcNAc β -Man α 1-6(GlcNAc β -Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc. Furthermore, it is evident that also in the UDP-GalN-biotin reaction, the label is transferred into the oligosaccharide structures characterized above.

25

EXAMPLE 11

Isolation of anti-GlcNAc antibodies from human serum. Human serum from a person who had recovered from mucinous ovarian adenocarcinoma, was passed through Sepharose columns that contained either GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α or Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α epitopes covalently coupled to the gel. After washing, the columns were firstly eluted with a buffer containing 0.5 M GlcNAc (specific elution), and secondly with acidic buffer (unspecific elution). As a control, an IgG preparation from pooled

30

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

36

human sera from healthy donors, i.e. persons who did not have a history of malignant diseases, was also subjected to the abovementioned chromatographical procedure. Reducing SDS-PAGE analysis was done to the collected fractions (Fig. 8). From the results it can be seen that two bands corresponding to proteins that had similar relative molecular weights to the heavy and light chains of an IgG standard, were eluted in the specific 0.5 M GlcNAc elution of GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Sepharose, but only in the serum sample of the person who had recovered from cancer. In contrast, no such specific elution could be detected in Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Sepharose chromatography of the two samples. According to their relative molecular weight, the specifically eluted proteins are likely to represent the heavy and light chain subunits of IgG or IgA, but not IgM human antibodies. The present results indicate the presence of elevated levels of terminal GlcNAc specific antibodies in serum of the person who had recovered from cancer, more specifically IgG and/or IgA antibodies that recognize the GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α glycan epitope.

15

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

37

Table 1. Relative abundances, against the most abundant N-glycans in the sample, of the terminal GlcNAc residues containing N-glycan peak at m/z 1485.5, of several tumor and healthy tissue control samples.

patient (sample)	relative abundance of the peak at m/z 1485.5:	
	tumor sample	healthy tissue
<u>lung cancer</u>		
A	86	13
B (1)	109	67
B (2)	101	
C (1)	35	18
C (2)	22	
D (1)	18	10
D (2)	14	
E	62	42
F	32	27
G	23	12
<u>colon cancer</u>		
H	32	0
<u>stomach cancer</u>		
I	41	38
<u>larynx cancer</u>		
J	67	15

References

- Arap, W., Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. (1998) *Science* 279, 323-4.
- Ernst, B., Hart, G.W., and Sinaý, P. (eds.) (2000) *Carbohydrates in chemistry and biology*, ISBN 3-527-29511-9, Wiley-VHC, Weinheim.
- 5 Hanisch, F.-G., Koldovsky, U., and Borchard F. (1993) *Cancer Res.* 53, 4791-4796.
- Hansson, G.C., Karlsson, K.-A., Larson G., Strömberg, N., and Thurin, J. (1985) *Anal. Biochem.* 146, 158-63.
- Harvey, D.J., *et al.* (1993) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7(7):614-9.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Stoll, M., Kane, D.P., Cashmore, G.C., Carruthers, R.A.,
- 10 Feeny, J., and Feizi, T. (1989) *Eur. J. Biochem.* 186, 597-610.
- Holmes, E.H., and Greene, T.G. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 87-96.
- Hu, J., Stuif, C.L.M., Holmes, E.H., and Macher, B.A. (1994) *Glycobiology* 4, 251-257.
- Nakamura, M., Tsunoda, A., Sakoe, K., and Saito, M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197 1025-1033.
- 15 Manzi, A.E., *et al.* (2000) *Glycobiology* 10(7):669-89.
- Mäki, M., *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269(2):593-601.
- Nyman, T.A., *et al.* (1998) *Eur. J. Biochem.* 253(2):485-93.
- Packer, N.H., *et al.* (1998) *Glycoconj. J.* 15(8):737-747.
- Ramakrishnan, B., and Qasba, P.K. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(23):20833-9.
- 20 Papac, D.I., *et al.* (1996) *Anal. Chem.* 68(18):3215-23.
- Rhen M., Klemm P., and Korhonen T.K. (1986). *J Bacteriol* 168, 1234-42 .
- Symington, F.W., Hendersson, B.A., and Hakomori, S.-I. (1984) *Mol. Immunol.* 21, 877-882.
- Saarinen, J., *et al.* (1999) *Eur. J. Biochem.* 259(3):829-40.
- 25 Teneberg, S., Lönnroth, L., Torres López, J.T., Galili, U., Ölwegård Halvarsson, M., Ångström, J., and Karl-Anders Karlsson (1996) *Glycobiology* 6, 599-609.
- Verostek, M.F., *et al.* (2000) *Anal. Biochem.* 278:111-122.
- Teneberg S, Ångström J, Jovall P-Å, and Karlsson K-A. (1994) *J Biol Chem* 269, 8554-63.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

39

What is claimed:

1. A method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence in said sample of an oligosaccharide sequence which comprises a tumor specific terminal N-acetylglucosamine residue.
- 5
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,
- 10 or
- (b) releasing the oligosaccharide structures of said biological sample by enzymatic or chemical methods to form a fraction containing free oligosaccharide structures from said sample, and
- 15 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.
3. The method according to claim 2, wherein said substance binding to said
- 20 oligosaccharide sequence is specific to one or several of the terminal oligosaccharide sequences of a N-glycan type structure according to the Formula



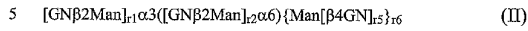
- 25 wherein r1, r2, r3, r4, r5, and r6 are either 0 or 1 with the proviso that at least r1 is 1 or r2 is 1; GN is GlcNAc, with the proviso that when both r1 and r2 are 1, one GNβMan can be further elongated with one or several other monosaccharide residues such as by galactose, and/or one GNβ2Man can be truncated to Man, and/or Manα6 residue and/or Manα3 residues can be further substituted by GNβ6 or GNβ4, and/or Manβ4 can be further
- 30 substituted by GNβ4.

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

40

4. The method according to claim 3, wherein said substance binding to said oligosaccharide sequence is specific to one or several of the terminal oligosaccharide sequences of a N-glycan type structure according to the Formula



wherein $r1$, $r2$, $r5$, and $r6$ are either 0 or 1, with the proviso that at least $r1$ is 1 or $r2$ is 1; GN is GlcNAc, with the proviso that when both $r1$ and $r2$ are 1, one GN β Man can be further elongated with one or several other monosaccharide residues such as by galactose, and/or one GN β 2Man can be truncated to Man, and/or Man α 6 residue and/or Man α 3 residues can be further substituted by GN β 6 or GN β 4, and/or Man β 4 can be further substituted by GN β 4.

5. The method according to claim 3, wherein said oligosaccharide sequence is

- 15
 GlcNAc β 2Man, GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man,
 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc,
 20 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man, GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc,
 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man, Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc,
 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 25 Man α 3(GlcNAc β 2Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 3Man,
 GlcNAc β 2Man α 3Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 3Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc,
 GlcNAc β 2Man α 3Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 6Man,
 GlcNAc β 2Man α 6Man β 4GlcNAc, GlcNAc β 2Man α 6Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc, or
 GlcNAc β 2Man α 6Man β 4GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc

30

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

41

6. The method according to claim 2, wherein said substance binding to said oligosaccharide sequence is specific to one or several of the terminal oligosaccharide sequences of a O-glycan type structure according to the Formula



wherein s1, s2, s3, s4 and s5 are independently 0 or 1, with the proviso that at least s1 is 1 or s5 is 1 and s3 and s4 are 1 or s5 is 1 and s3 and s4 are 1, so that the oligosaccharide sequence comprises at least one nonreducing end terminal GlcNAc β -residue.

10

7. The method according to claim 2, wherein said oligosaccharide sequence is protein linked GlcNAc or derivative thereof.

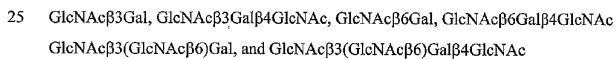
8. The method according to claim 6, wherein said oligosaccharide sequence is

15

Gal β 3(GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 6GalNAc, GlcNAc β 3Gal β 3(Gal β 4GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3Gal β 3GalNAc, Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)GalNAc, GlcNAc β 6GalNAc, and GlcNAc β 3GalNAc

20

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



10. The method according to any one of claims 2-9, wherein said substance binding to said oligosaccharide sequence is an aptamer, a peptide or a protein.

30

11. The method according to claim 10, wherein said protein is an antibody, a lectin, or a fragment thereof.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

42

12. Diagnostic agent comprising a substance as defined in any one of claims 2 – 11 for the diagnosis of cancer or a cancer type.
13. Antigenic substance comprising a terminal oligosaccharide sequence as defined in any one of claims 2-9 in a chemically or biochemically synthesized polyvalent form.
14. Use of the antigenic substance according to claim 13 or analogs or derivatives thereof to produce polyclonal or monoclonal antibodies.
- 10 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.
16. Use of the antigenic substance according to claim 13 or analogs or derivatives thereof for the detection and/or quantitation of antibodies.
- 15 17. A pharmaceutical composition comprising a substance binding to one or several of the oligosaccharide sequences containing a terminal oligosaccharide sequence as defined in any one of claims 2-9 for the treatment of cancer.
- 20 18. A pharmaceutical composition according to claim 17, wherein said substance is an antibody.
19. A pharmaceutical composition comprising oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in any one of claims 2-9 or analogs or derivatives thereof for the treatment of cancer.
- 25 20. The pharmaceutical composition according to any one of claims 17 -19 comprising a pharmaceutically acceptable carrier and optionally an adjuvant.
- 30 21. Method of treatment of cancer wherein a substance binding to one or several of the oligosaccharide sequences containing a terminal oligosaccharide sequence as defined in any one of claims 2-9 is administered to a human or animal patient to reduce the metastatic potential or the growth of cancer cells or to eliminate a tumor or cancer.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

43

22. Method of treatment of cancer wherein said substance is an antibody against the oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in any one of claims 2-9.

5 23. The method of treatment according to claim 22 wherein said antibody is a human antibody or humanized antibody.

24. The method of treatment according to claim 22 or 23 wherein said antibody is purified from serum.

10

25. The method of treatment according to any one of claims 22-24 wherein said antibody target toxic agent or toxic agents to a tumor or cancer.

15 26. The method of treatment according to any one of claims 21-25 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 any one of claims 2-9 or analogs or derivatives thereof.

20 28. The cancer vaccine according to claim 27 comprising a pharmaceutically acceptable carrier and optionally an adjuvant.

29. A substance binding to oligosaccharide sequences containing a terminal sequence as defined in claim 2, wherein said substance is an aptamer, humanized antibody or peptide.

25

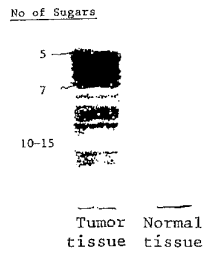
30. A method for identifying cancer or tumor specific therapeutics or diagnostic agents comprising the steps of contacting a compound with a oligosaccharide sequence as defined in any one of claims 2-9 and determining binding to said oligosaccharide sequence by said compound.

30

WO 03/016915

PCT/FD02/00681

1/14



Autoradiogram after overlaying with ³⁵S-methionine- labeled E.coli
Specificity: GlcNAc β

Figure 1.

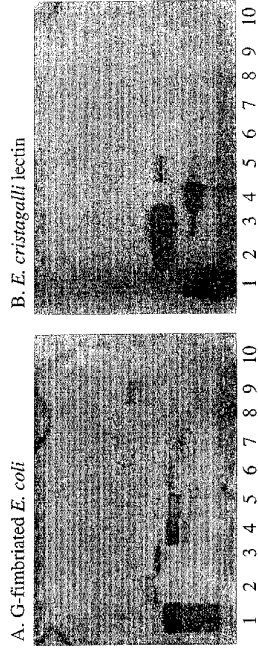


Figure 2.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

3/14

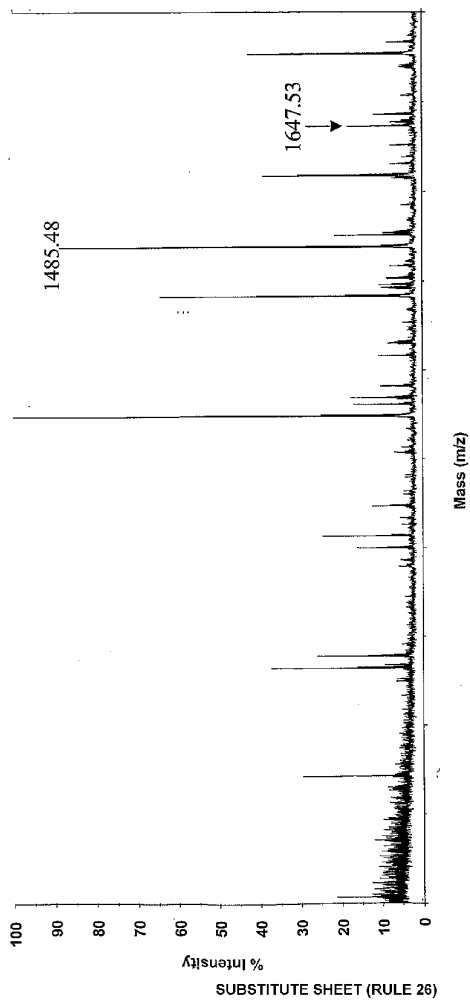


Figure 3A.

WO 03/016915

4/14

PCT/FI02/00681

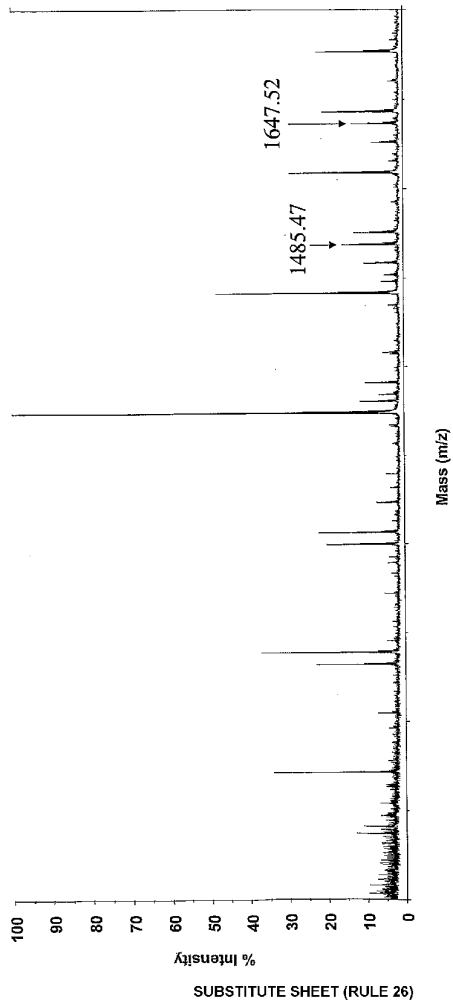


Figure 3B.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

5/14

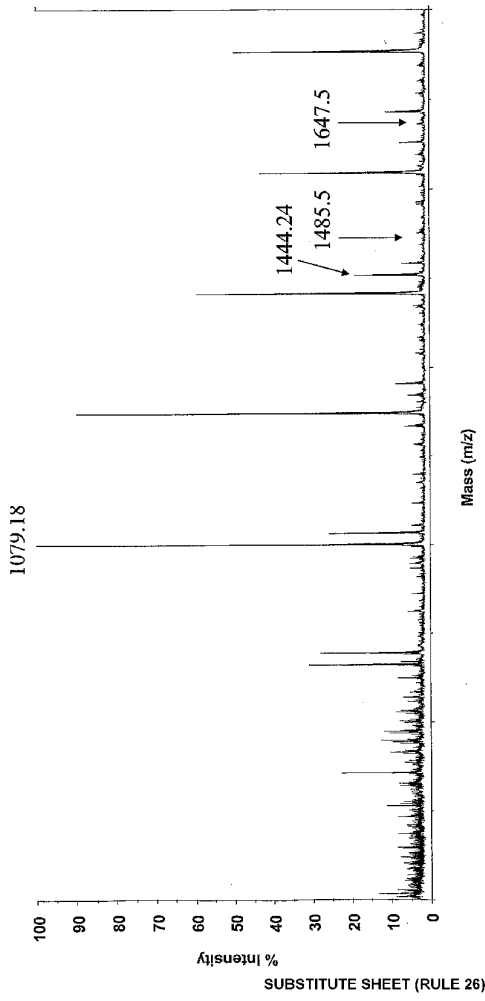


Figure 3C.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

6/14

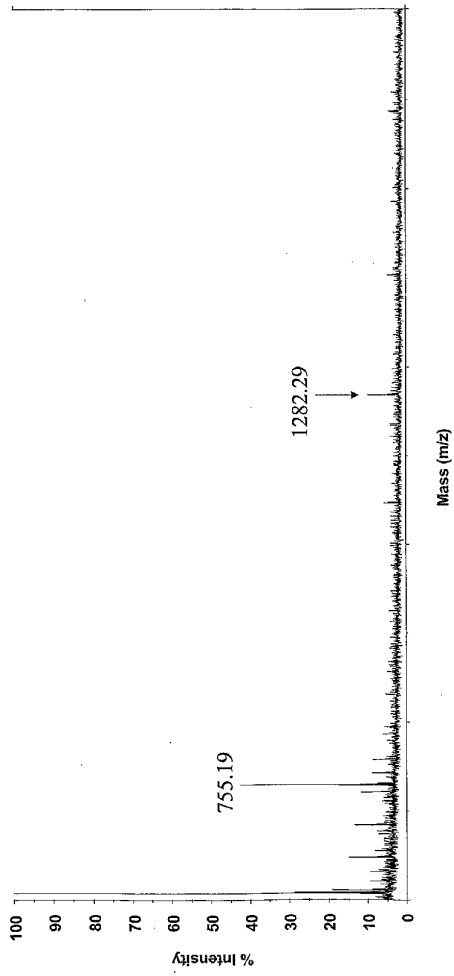
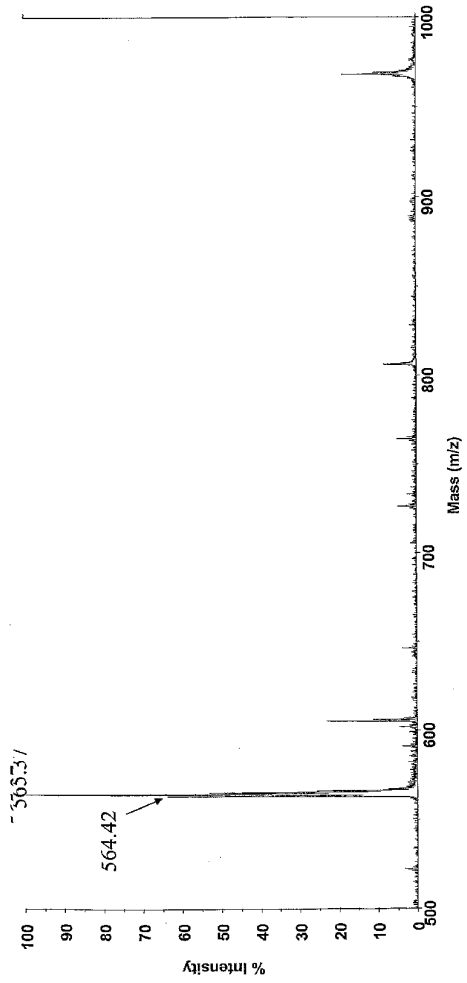


Figure 3D.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

7/14



SUBSTITUTE SHEET (RULE 28)

Figure 4A.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

9/14

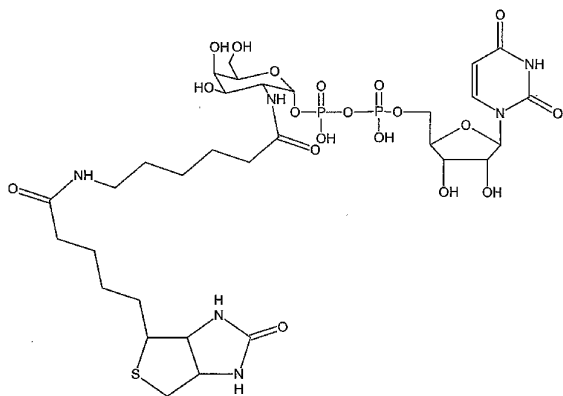


Figure 5.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

10/14

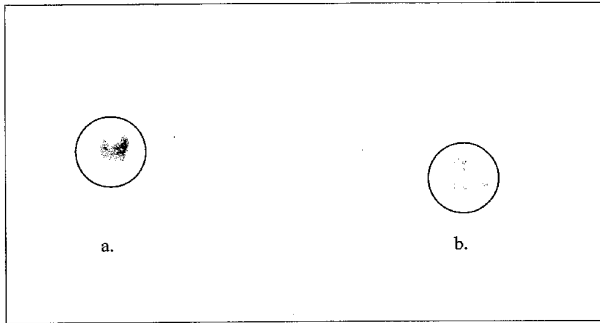


Figure 6.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

11/14

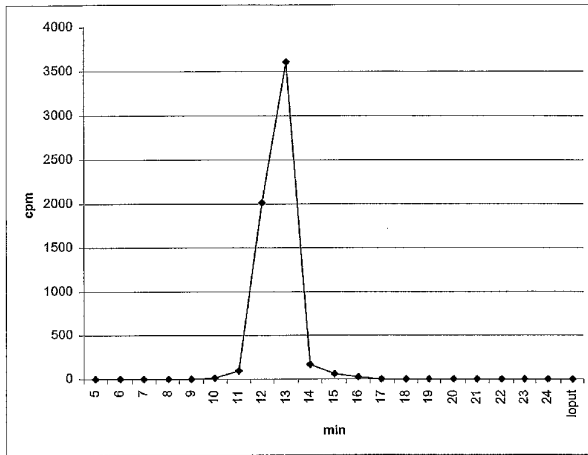


Figure 7A.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

12/14

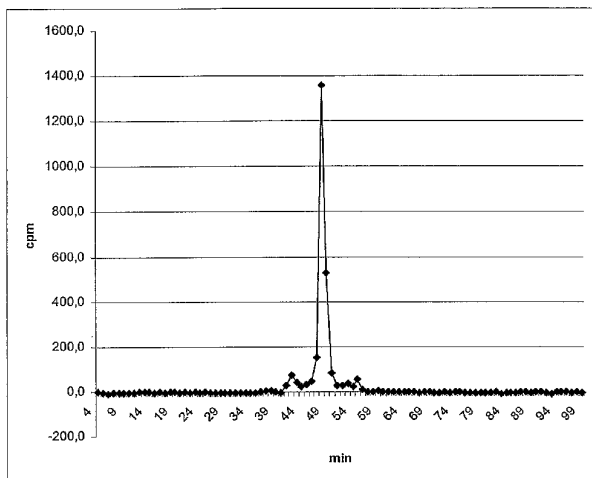


Figure 7B.

WO 03/016915

PCT/JP02/00681

13/14

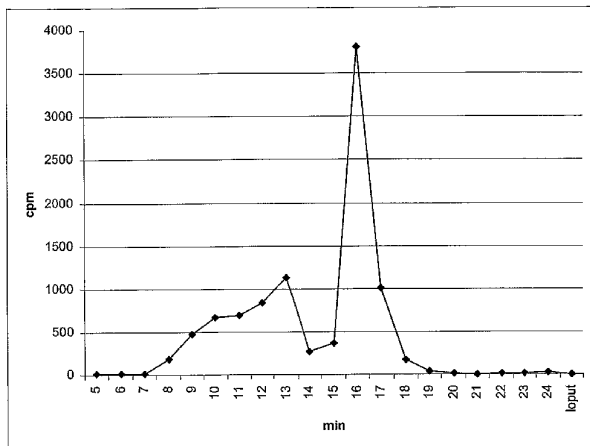


Figure 7C.

WO 03/016915

PCT/FI02/00681

14/14

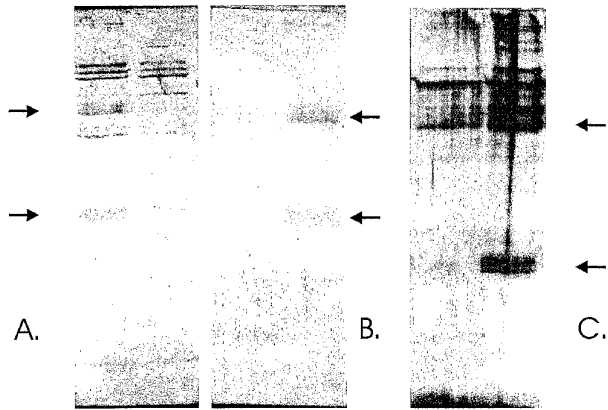


Figure 8.

【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)

REVISED VERSION

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/016915 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/574, C07H 5/06, A61K 39/00, A61P 35/00
- (21) International Application Number: PCT/FI2002/000681
- (22) International Filing Date: 20 August 2002 (20.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20011671 20 August 2001 (20.08.2001) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOTIE THERAPIES CORP. [FI/FI]; Tykistökatu 6, FIN-20520 Turku (FI).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): NATUNEN, Jari [FI/FI]; Meritullinkatu 6 C 18, FIN-00170 Helsinki (FI); TENEBERG, Susann [SE/SE]; PL 1639, S-43063 Hindås (SE); KARLSSON, Karl-Anders [SE/SE]; Nilssonsberg 37, S-41143 Göteborg (SE); SATOMAA, Tero [FI/FI]; Maakaari 6 A 11, FIN-00710 Helsinki (FI); HEISKANEN, Annamari [FI/FI]; Trumpettitie 8 E 93, FIN-00420 Helsinki (FI).
- (74) Agent: OY JALO ANT-WUORINEN AB; Iso Rooberinkatu 4-6 A, FIN-00120 Helsinki (FI).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, 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), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, 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, PH, 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 (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, PE, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the revised international search report: 5 February 2004
- (15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 06/2004 of 5 February 2004, Section II
- 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 2003/016915 A1

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

(57) Abstract: The present invention describes oligosaccharide sequences, which are specifically expressed by human tumors. The present invention is related to a method of determining an oligosaccharide sequence, which comprises a tumor specific terminal N-acetylglucosamine residue, 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 comprising said oligosaccharide sequences in a polyvalent form and it further provides 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12月15日(2003.12.15)

【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

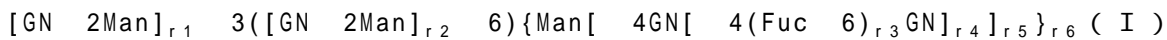
【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(I)で表されるN-グリカン型構造のヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の少なくとも一種に結合する結合性物質を用いた、ヒト癌の治療用の医薬組成物または栄養補助組成物の製造方法。



(式中、

r_1 、 r_2 、 r_3 、 r_4 、 r_5 および r_6 は各々独立に0または1の整数であるが、 r_1 と r_2 の少なくとも一方は1であり、

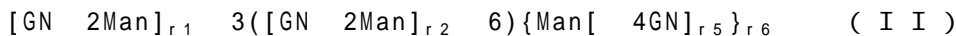
GNはGlcNAcであるが、

但し、 r_1 と r_2 が共に1である場合には、下記(i)~(iv)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式(I)に加えることができる：

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

【請求項2】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、下記式(II)で表されることを特徴とする、請求項1に記載の製造方法。



(式中、

r_1 、 r_2 、 r_5 および r_6 は各々独立に0または1の整数であるが、 r_1 と r_2 の少なくとも一方は1であり、

GNはGlcNAcであるが、

但し、 r_1 と r_2 が共に1である場合には、下記(i)と(ii)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式(II)に加えることができる：

(i) 1つのGN-Manが、1つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、および(ii) 1つのGN₂ManがManに縮められている。)

【請求項3】

ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合する該結合性物質が、ヒト抗体であることを特徴とする、請求項2に記載の製造方法。

【請求項4】

該ヒト癌が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項3に記載の製造方法。

【請求項5】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、該ヒト固形腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているものであることを特徴とする、請求項4に記載の製造方法。

【請求項6】

該組成物が、正常な組織と比較した際に、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められたヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項5に記載の製造方法。

【請求項7】

該ヒト固形腫瘍が、副腎腫、喉頭癌、結腸癌、胃癌、肺癌、卵巣癌または粘液性癌であることを特徴とする、請求項5に記載の製造方法。

【請求項 8】

該組成物が、免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の腫瘍を治療するためのものであることを特徴とする、請求項 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 1 に記載の製造方法。

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

【請求項 10】

請求項 2 で定義されている結合性物質を用いた、ヒト腫瘍またはヒト腫瘍の型の診断用の診断剤を製造する方法であって、該診断剤は、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合することを特徴とする製造方法。

【請求項 11】

診断に供される試料は、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から得たものであることを特徴とする、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

該ヒト腫瘍が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 13】

該ヒト固形腫瘍が、副腎腫であることを特徴とする、請求項 12 に記載の製造方法。

【請求項 14】

該ヒト固形腫瘍が、卵巣癌または肺癌であることを特徴とする、請求項 12 に記載の製造方法。

【請求項 15】

該ヒト固形腫瘍が、喉頭癌、結腸癌、胃癌または粘液性癌であることを特徴とする、請求項 12 に記載の製造方法。

【請求項 16】

該診断剤が、正常な組織と比較した際に、請求項 2 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められるヒト腫瘍の診断用であることを特徴とする、請求項 12 に記載の製造方法。

【請求項 17】

請求項 2 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を用いた、ヒト癌の治療用の医薬組成物または栄養補助組成物の製造方法。

【請求項 18】

該ヒト癌が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 17 に記載の製造方法。

【請求項 19】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているものであることを特徴とする、請求項 18 に記載の製造方法。

【請求項 20】

該ヒト腫瘍が副腎腫であることを特徴とする、請求項 19 に記載の製造方法。

【請求項 21】

該組成物が、正常な組織と比較した際に、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められたヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 19 に記載の製造方法。

【請求項 22】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、多価の形態、抗原性を示す形態、または抗原性を示す多価の形態であることを特徴とする、請求項 19 に記載の製造方法。

【請求項 23】

請求項 2 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を用いた、ヒト癌ワクチンの製造方法。

【請求項 24】

ヒトの患者から得た生物学的試料を用いて癌または腫瘍を診断する方法であって、該試料中の請求項 2 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の存在を指標として、腫瘍の表面のヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を検出することを包含する診断方法。

【請求項 25】

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である O - グリカン型構造の GlcNAc 3/ 6 含有ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合する結合性物質を用いた、ヒト癌の治療用の医薬組成物または栄養補助組成物の製造方法。

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

【請求項 26】

該結合性物質が、ヒト抗体であることを特徴とする、請求項 25 に記載の製造方法。

【請求項 27】

該ヒト癌が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 26 に記載の製造方法。

【請求項 28】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているものであることを特徴とする、請求項 27 に記載の製造方法。

【請求項 29】

該組成物が、正常な組織と比較した際に、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められたヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 28 に記載の製造方法。

【請求項 30】

該ヒト腫瘍が、副腎腫、喉頭癌、結腸癌、胃癌、肺癌、卵巣癌または粘液性癌であることを特徴とする、請求項 28 に記載の製造方法。

【請求項 31】

該組成物が、免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の腫瘍を治療するためのものであることを特徴とする、請求項 30 に記載の製造方法。

【請求項 32】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc または GlcNAc 6GalNAc であることを特徴とする、請求項 30 に記載の製造方法。

【請求項 33】

請求項 25 で定義されている結合性物質を用いた、ヒト癌またはヒト癌の型の診断用の診断剤を製造する方法。

【請求項 34】

該診断剤は、ヒト癌の細胞表面または組織表面に発現されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合することを特徴とする、請求項 33 に記載の製造方法。

【請求項 35】

該ヒト癌が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 34 に記載の製造方法。

【請求項 36】

該診断剤が、正常な組織と比較した際に、請求項 25 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められるヒト腫瘍の診断用であることを特徴とする、請求項 35 に記載の製造方法。

【請求項 37】

請求項 25 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を用いた、ヒト癌の治療用の医薬組成物または栄養補助組成物の製造方法。

【請求項 38】

該ヒト癌が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 37 に記載の製造方法。

【請求項 39】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているものであることを特徴とする、請求項 38 に記載の製造方法。

【請求項 40】

該組成物が、正常な組織と比較した際に、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められたヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 39 に記載の製造方法。

【請求項 41】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、多価の形態、抗原性を示す形態、または抗原性を示す多価の形態であることを特徴とする、請求項 39 に記載の製造方法。

【請求項 42】

請求項 25 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を用いた、ヒト癌ワクチンの製造方法。

【請求項 43】

ヒトの患者から得た生物学的試料を用いて癌または腫瘍を診断する方法であって、該試料中の請求項 25 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の存在を指標として、腫瘍または癌の表面のヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を検出することを包含する診断方法。

【請求項 44】

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である O - グリカン型構造の $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_6$ 含有ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合する結合性物質を用いた、ヒト癌の治療用の医薬組成物または栄養補助組成物の製造方法。

$\text{GlcNAc}_3\text{Gal}$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{Glc}$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{GlcNAc}$ 、
 $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{GlcNAc}_3\text{Gal}$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{Glc}$ 、
 $\text{GlcNAc}_6\text{Gal}$ 、そして $\text{GlcNAc}_6\text{Gal}_4\text{GlcNAc}$ 。

【請求項 45】

該結合性物質がヒト抗体であり、該ヒト癌が副腎腫、喉頭癌、結腸癌または肺癌であり、更に所望により、該組成物が、免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の腫瘍を治療するためのものであることを特徴とする、請求項 44 に記載の製造方法。

【請求項 46】

該結合性物質がヒト抗体であり、該ヒト癌がヒト固形腫瘍であり、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 44 に記載の製造方法。

$\text{GlcNAc}_3\text{Gal}$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{Glc}$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{GlcNAc}_3\text{Gal}$ 、
 $\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{GlcNAc}_3\text{Gal}_4\text{Glc}$ 、 $\text{GlcNAc}_6\text{Gal}$ 、そして
 $\text{GlcNAc}_6\text{Gal}_4\text{GlcNAc}$ 。

【請求項 47】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているものであることを特徴とする、請求項 46 に記載の製造方法。

【請求項 48】

該組成物が、正常な組織と比較した際に、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められたヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 47 に

記載の製造方法。

【請求項 49】

該ヒト腫瘍が、副腎腫、喉頭癌、結腸癌または肺癌であることを特徴とする、請求項 47 に記載の製造方法。

【請求項 50】

該組成物が、免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の腫瘍を治療するためのものであることを特徴とする、請求項 48 に記載の製造方法。

【請求項 51】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Galまたは GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4Glcであることを特徴とする、請求項 48 に記載の製造方法。

【請求項 52】

請求項 46 で定義されている結合性物質を用いた、ヒト腫瘍またはヒト腫瘍の型の診断用の診断剤を製造する方法であって、該診断剤は、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合することを特徴とする製造方法。

【請求項 53】

診断に供される試料は、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から得たものであることを特徴とする、請求項 52 に記載の製造方法。

【請求項 54】

該ヒト腫瘍が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 53 に記載の製造方法。

【請求項 55】

該診断剤が、正常な組織と比較した際に、請求項 44 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められるヒト腫瘍の診断用であることを特徴とする、請求項 54 に記載の製造方法。

【請求項 56】

請求項 44 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を用いた、ヒト癌の治療用の医薬組成物または栄養補助組成物の製造方法であって、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列は下記式からなる群より選ばれることを特徴とする製造方法。

GlcNAc 3Gal 4Glc、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal、
GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4Glc、GlcNAc 6Gal、そして
GlcNAc 6Gal 4GlcNAc 。

【請求項 57】

該ヒト癌が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 56 に記載の製造方法。

【請求項 58】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているものであることを特徴とする、請求項 57 に記載の製造方法。

【請求項 59】

該組成物が、正常な組織と比較した際に、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の発現または増幅された発現が認められたヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 58 に記載の製造方法。

【請求項 60】

該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、多価の形態、抗原性を示す形態、または抗原性を示す多価の形態であることを特徴とする、請求項 58 に記載の製造方法。

【請求項 61】

該ヒト固形腫瘍が、副腎腫、結腸癌または肺癌であることを特徴とする、請求項 46、54 および 57 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 62】

請求項 46 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列または請求項 44 で定義されている結合性物質を用いたヒト癌ワクチンの製造方法であって、該結合性物質を用いて製造したワクチンは、請求項 45 で定義されているヒト癌に対するワクチンであることを

特徴とする製造方法。

【請求項 6 3】

ヒトの患者から得た生物学的試料を用いて癌または腫瘍を診断する方法であって、該試料中の請求項 4 6 で定義されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の存在を指標として、腫瘍の表面のヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を検出することを包含する診断方法。

【請求項 6 4】

ヒト腫瘍特異的タンパク質結合GlcNAcまたはその誘導体に結合する結合性物質を用いた、ヒト癌の治療用の医薬組成物または栄養補助組成物の製造方法。

【請求項 6 5】

該ヒト癌がヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 6 4 に記載の製造方法。

【請求項 6 6】

該ヒト腫瘍特異的タンパク質結合GlcNAcが、該ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されているものであることを特徴とする、請求項 6 5 に記載の製造方法。

【請求項 6 7】

該組成物が、正常な組織と比較した際に、該ヒト腫瘍特異的タンパク質結合GlcNAcの発現または増幅された発現が認められたヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 6 6 に記載の製造方法。

【請求項 6 8】

該ヒト腫瘍またはヒト癌が、副腎腫、喉頭癌、結腸癌、胃癌、肺癌、卵巣癌または粘液性癌であることを特徴とする、請求項 6 6 に記載の製造方法。

【請求項 6 9】

該組成物が、免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の腫瘍を治療するためのものであることを特徴とする、請求項 6 8 に記載の製造方法。

【請求項 7 0】

請求項 6 4 で定義されている結合性物質を用いた、ヒト癌またはヒト癌の型の診断用の診断剤を製造する方法。

【請求項 7 1】

該診断剤は、ヒト癌の細胞表面または組織表面に発現されているヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合することを特徴とする、請求項 7 0 に記載の製造方法。

【請求項 7 2】

該ヒト癌が、ヒト固形腫瘍であることを特徴とする、請求項 7 1 に記載の製造方法。

【請求項 7 3】

該診断剤が、正常な組織と比較した際に、請求項 6 4 で定義されているヒト腫瘍特異的タンパク質結合GlcNAcの発現または増幅された発現が認められるヒト腫瘍の診断用であることを特徴とする、請求項 7 2 に記載の製造方法。

【請求項 7 4】

ヒトの患者から得た生物学的試料を用いて癌または腫瘍を診断する方法であって、該試料中の請求項 6 4 で定義されているヒト腫瘍特異的タンパク質結合GlcNAcの存在を指標として、腫瘍または癌の表面のヒト腫瘍特異的タンパク質結合GlcNAc構造を検出することを包含する診断方法。

【請求項 7 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 1、2 5、4 4 および 6 4 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 7 6】

該タンパク質が、抗体、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項 7 5 に記載の製造方法。

【請求項 7 7】

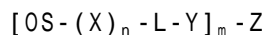
該タンパク質が、末端GlcNAc-構造を認識する酵素、好ましくはグリコシル基転移酵素またはその異型であることを特徴とする、請求項 7 6 に記載の製造方法。

【請求項 7 8】

該抗体がヒト抗体または人体に適応させた抗体であることを特徴とする、請求項 76 に記載の製造方法。

【請求項 79】

多価の形態のヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列が、下記式：



(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、

O S はヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖であり、

L は酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子であり、

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

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

Z はオリゴ価または多価の担体である。)

で表される多価結合体であって、該多価結合体においては、ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖 (OS) の C 1 位の還元末端からスペーサー基 (Y) を介し、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ことを特徴とする、請求項 22、41 および 60 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 80】

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更に包含することを特徴とする、請求項 1、25、44 および 64 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 81】

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 43 に記載の診断方法。

(a) 該生物学的試料を該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合する結合性物質と接触させ、そして

該ヒト腫瘍特異的末端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を遊離させて、該生物学的試料から遊離したオリゴ糖構造を含む画分を生成し、そして

該画分中の該ヒト腫瘍特異的末端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 82】

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 24 または 63 に記載の診断方法。

(a) 該生物学的試料を該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列に結合する結合性物質と接触させ、そして

該ヒト腫瘍特異的末端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腫瘍の存在を検出する、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を遊離させて、該生物学的試料から遊離したオリゴ糖構造を含む画分を生成し、そして

該画分中の該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列の存在を指標として、該生物学的試料中の腫瘍の存在を検出する。

【請求項 83】

癌または腫瘍の型を決定することを特徴とする、請求項 81 または 82 に記載の診断方法。

【請求項 84】

一部が癌化した組織から、自然の状態で存在するグリコシル化産物を検出することを特徴

とする、請求項 8 1、8 2 および 8 3 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 8 5】

癌化した組織および正常な組織の表面に存在するグリコシル化産物を検出することを特徴とする、請求項 8 4 に記載の診断方法。

【請求項 8 6】

該癌ワクチンが、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更に包含することを特徴とする、請求項 2 3、4 2 および 6 2 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 8 7】

該栄養補助組成物が、該ヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を認識する抗体を包含する機能性食品または食品添加剤であることを特徴とする、請求項 1、2 5、4 4 および 6 4 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 8 8】

該抗体が、乳または鶏卵中に産生されるものであることを特徴とする、請求項 8 7 に記載の製造方法。

【請求項 8 9】

末端GlcNAc構造を有するオリゴ糖配列に特異的に結合するヒト抗体を包含する、ヒト癌の治療用の医薬組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 02/00681		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC7: G01N 33/574, C07H 5/06, 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: G01N, C07H, 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, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CA-PLUS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	Eur.J. Biochem., Volume 236, 1996, Tamao Endo et al, "Comparative study of the sugar chains of alkaline phosphatases purified from rat liver and rat AH-130 hepatoma cells. Occurrence of fucosylated high-mannose-type and hybrid-type sugar chains", pages 579-590, see specially table 2 and last paragraph in the discussion	1-5,10-30		
A	--	6-9		
Y	British Journal of Cancer, Volume 83, no. 10, 2000, PJ Johnson et al: "Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms", pages 1330-1337, see specially, figure 1, G11	1-5,10-30		
A	--	6-9		
<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: <table border="0" style="width:100%"> <tr> <td style="width:50%"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width:50%"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report			
27 January 2003	28-01-2003			
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			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 02/00681
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Eur. J. Biochem., Volume 161, 1986, James W. Dennis et al, "Asn-linked oligosaccharides in lectin-resistant tumor-cell mutants with varying metastatic potential", pages 359-373, see specially table 4 and last column in the discussion	1-5,10-30
A	--	6-9
X	DE 3807594 A1 (REUTTER, WERNER), 21 Sept 1989 (21.09.89), see specially the claims	1-4,10-30
Y		1-5,10-30
A	--	6
X	Histochemical Journal, Volume 24, 1992, Boris E. Chechik et al, "Increased expression of highly branched N-linked oligosaccharides terminating in N-acetylglucosamine residues in neoplastic and sclerodermal chicken fibroblasts", pages 15-30	1-4,10-30
A	--	5-9
X	Molecular Immunology, Volume 24, No 8, 1987, Gail Nixon Volman et al, "Analysis of asparagine-linked oligosaccharide structures of chronic lymphocytic leukemia cells", pages 871-886, see specially table 5	1-4,10-30
A	--	5-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 02/00681
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Cancer Research, Volume 53, 1993, F-G. Hanisch et al, "Monoclonal Antibody 2B5 Defines a Truncated O-Glycan, GlcNAcB1-3GalB1-4GlcNAcB1-6 (GalNAc), on Mucins from Deep Gastric and Duodenal Glands as Well as Metaplasia and Neoplasia of Gastric Differentiation", pages 4791-4796, see specially second last, paragraph in the discussion	1-2,6,8, 10-30
A	--	3-5,7,9
X	Cancer Research, Volume 60, 2000, Marc Meichenin et al, "TK, a New Colon Tumor-associated Antigen Resulting from Altered O-Glycosylation", pages 5499-5507	1-2,6-8, 10-30
A	--	3-5,9
X	WO 0021552 A1 (UNIVERSITY TECHNOLOGY CORPORATION), 20 April 2000 (20.04.00), see specially the claims	1-2,6,10-30
A	--	3-5,7-9
X	Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 288, No 1, 1991, Eric H. Holmes et al, "Isolation and Fine-Structure Characterization of Four Monoclonal Antibodies Reactive with Glycoconjugates Containing Terminal GlcNAc Residues: Application to Aspects of Lacto-Series Tumor Antigen Biosynthesis", pages 87-96, see specially last sentence in the discussion	1-2,9,10-30
A	--	3-8
X	WO 02056893 A1 (CARBION OY), 25 July 2002 (25.07.02), see specially page 20, lines 1-10	1-2,9,10-30
A	--	3-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 02/00681

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 8904490 A1 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON), 18 May 1989 (18.05.89)	1-2,10-30
A	--	3-9
X	US 5605807 A (DENNIS), 25 February 1997 (25.02.97), see specially column 3, lines 10-31	1-2,10-30
A	--	3-9
X	Clinical Cancer Research, Volume 5, November 1999, Abdelhadi Rebbaa et al, "Expression of Bisecting GlcNAc in Pediatric Brain Tumors and Its Association with Tumor Cell Response to Vinblastine 1", page 3661 - page 3668	1-2,10-30
A	--	3-9
A	Clinical Cancer Research, Volume 3, 1997, David J. Cole et al, "Characterization of a Sustained-Release Delivery System for Combined Cytokine/Peptide Vaccination Using a Poly-N-Acetyl Glucosamine-based Polymer Matrix", pages 567-873	1-30
A	Glycobiology, Volume 8, No 8, 1998, Lillian Medina et al, "SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation", pages 383-391	1-30
P,A	Biochemica et Biophysica Acta, Volume 1537, 2001, Chad Slawson et al: "Increased N-acetyl-B-glycosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins", pages 147-157	1-30

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No.		
Information on patent family members				PCT/FI 02/00681		
30/12/02						
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
DE 3807594 A1	21/09/89	AT 90793 T	15/07/93			
		DE 3844628 C	19/05/93			
		DE 58904746 D	00/00/00			
		EP 0406259 A,B	09/01/91			
		SE 0406259 T3				
		JP 2693247 B	24/12/97			
		JP 3503281 T	25/07/91			
		US 5625037 A	29/04/97			
		WO 8908845 A	21/09/89			
WO 0021552 A1	20/04/00	AU 1443900 A	01/05/00			
WO 02056893 A1	25/07/02	FI 4998 U	19/07/01			
		FI 20010118 A,V	20/07/02			
WO 8904490 A1	18/05/89	AT 108025 T	15/07/94			
		CA 1314812 A	23/03/93			
		DE 3850501 D,T	24/11/94			
		EP 0386092 A,B	12/09/90			
		SE 0386092 T3				
		GB 8726271 D	00/00/00			
		JP 2701908 B	21/01/98			
		JP 3500925 T	28/02/91			
US 5605807 A	25/02/97	CA 1313496 A	09/02/93			
		US 5427914 A	27/06/95			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI02/00681
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.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 21-26 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see next sheet*	
2.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> 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.	<input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> 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	<input checked="" type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. application No.
PCT/FI02/00681

*
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.

**

According to PCT Rule 13.1, an application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Further according to PCT Rule 13.2, the requirement of unity of invention is fulfilled only when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding technical features. The special technical feature shall also define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the general state of the art.

Documents cited in the Invitation to Pay Additional Fees report, defining the general state of the art:

D1: WO 8904490.
D2: US 5605807.

Diagnosing cancer in a biological sample, comprising determining the presence of a terminal GlcNac is known to the art, see D1 (abstract, claim 4) and D2 (col. 3, lines 13-23). Therefore, it is considered that the independent claims 1-2 lack novelty and consequently, an a posteriori approach is motivated for determining lack of unity in this case.

The different inventions, with their special technical features are described in the following groups of claims:

Invention A) claims 3-5 and 10-30 (partially), concerns a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of a terminal N-glycan oligosaccharide sequence according to Formula I, Formula II or a oligosaccharide sequence according to any of the listed oligosaccharides of claim 5. It also concerns: diagnostic agents, pharmaceutical compositions, and use of antigenic substances.

...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI02/00681

Invention B) claims 6, 8 and 10-30 (partially), concerns a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of a terminal O-glycan oligosaccharide sequence according to Formula III. It also concerns: diagnostic agents, pharmaceutical compositions, and use of antigenic substances.

Invention C) claims 7 and 10-30 (partially), concerns a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of a terminal GlcNac linked to a protein. It also concerns: diagnostic agents, pharmaceutical compositions, and use of antigenic substances.

Invention D) claims 9 and 10-30 (partially), concerns a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of an terminal oligosaccharide sequence according to any of the listed oligosaccharides of claim 9. It also concerns: diagnostic agents, pharmaceutical compositions, and use of antigenic substances.

Invention A - Invention D lack a common technical feature that is not already known to the prior art.

A search for a new common concept of invention has failed. Therefore, the claims are considered to represent independent subject matter and the invention lacks unity.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 1/22	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 2/00	C 0 7 K 1/22	
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 2/00	
C 1 2 P 21/08	C 0 7 K 16/32	
G 0 1 N 30/00	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 30/00	E
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	S

(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 カールソン, カール - アンデシュ

スウェーデン国、エス - 4 1 1 4 3 イェーテボリ、ニルソンスバリ 3 7

(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 1 0 ヘルシンキ、マーカリー 6 アー 1 1

(72) 発明者 ヘイスカネン, アンナマリ

フィンランド国、エフアイエヌ - 0 0 4 2 0 ヘルシンキ、トゥルムペッティティエ 8 エー 9 3

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB03 BB20 CA26 CB01 DA30 DA37 DA78 FB03

4B064 AG26 AG27 DA01 DA13

4C076 BB11 CC06 CC07 CC27 EE30A FF11 FF68

4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB11 CC02 CC13 CC21 CC23 CC33

EE01 EE06 FF24

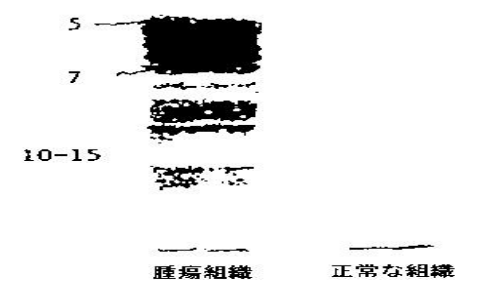
4H045 AA10 AA11 BA53 CA41 DA75 DA76 EA50

专利名称(译)	肿瘤特异性寡糖序列及其用途		
公开(公告)号	JP2005500535A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003521371	申请日	2002-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	Tessera公司生物在内比的合作社		
申请(专利权)人(译)	生物三通Serapyizu小屋		
[标]发明人	ナトウネンヤリ テネベリスサン カールソンカールアンデシュ サトマーテロ ヘイスカネンアンナマリ		
发明人	ナトウネン,ヤリ テネベリ,スサン カールソン,カール-アンデシュ サトマー,テロ ヘイスカネン,アンナマリ		
IPC分类号	A23L1/305 A61B A61K31/70 A61K38/17 A61K38/36 A61K38/45 A61K39/00 A61K39/385 A61K39/39 A61K39/395 A61K47/36 A61K47/48 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 C07H3/06 C07H5 /06 C07K1/22 C07K2/00 C07K16/18 C07K16/32 C12P21/08 C12Q1/02 G01N30/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K39/39558 A61K38/1709 A61K38/45 A61K39/00 A61K47/549 A61K2039/505 C07H3/06 C07K16 /18 C12Y204/00 G01N33/57469 G01N33/57492		
FI分类号	G01N33/574.B A61K39/00.H A61K39/39 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K47/36 A61K47/48 A61P35 /00 A61P37/02 C07K1/22 C07K2/00 C07K16/32 C12P21/08 G01N30/00.E G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA30 2G045 /DA37 2G045/DA78 2G045/FB03 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/DA01 4B064/DA13 4C076/BB11 4C076/CC06 4C076/CC07 4C076/CC27 4C076/EE30A 4C076/FF11 4C076/FF68 4C085/AA03 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC13 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/CC33 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA53 4H045 /CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	2001001671 2001-08-20 FI		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

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

糖の数



³⁵S-メチオニン-標識 E. coli で オーバーレイ
したあとのオートラジオグラム

特異性: GlcNAc β