

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5523313号
(P5523313)

(45) 発行日 平成26年6月18日 (2014. 6. 18)

(24) 登録日 平成26年4月18日 (2014. 4. 18)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/726 (2006. 01)	A 6 1 K 31/726	
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006. 01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395	E
請求項の数 52 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-515279 (P2010-515279)	(73) 特許権者	505307563
(86) (22) 出願日	平成20年7月3日 (2008. 7. 3)		チルドレンズ ホスピタル アンド リサ ーチ センター アット オークランド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オー 克蘭ド 52エヌディー ストリート 747
(65) 公表番号	特表2010-532389 (P2010-532389A)		
(43) 公表日	平成22年10月7日 (2010. 10. 7)	(74) 代理人	100149294
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/069232		弁理士 内田 直人
(87) 国際公開番号	W02009/006613	(74) 代理人	100137512
(87) 国際公開日	平成21年1月8日 (2009. 1. 8)		弁理士 奥原 康司
審査請求日	平成23年6月29日 (2011. 6. 29)	(72) 発明者	モエ, グレゴリー, アール. アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94 502, アラメダ, スチューベン ウェイ 42
(31) 優先権主張番号	60/958, 391		
(32) 優先日	平成19年7月3日 (2007. 7. 3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ポリシアル酸誘導体、製造方法、ならびにがん抗原産生の増強およびターゲティングにおける使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脱N-アセチルシアル酸抗原を有するがん細胞の脱N-アセチル化抗原を増加させるための医薬の製造におけるポリシアル酸誘導体を含む組成物の使用であって、前記ポリシアル酸誘導体が、実質的に非酸化で、精製されており、(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチルシアル酸残基を含むものである、使用。

【請求項 2】

前記がん細胞が神経芽腫細胞、白血病細胞または黒色腫細胞である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記細胞が対象に存在する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記組成物が注入または局所注射によって投与されるものである、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

前記組成物ががん細胞を除去するための外科的介入の前に投与されるものである、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 6】

10

20

前記組成物ががん細胞を除去するための外科的介入の時点または後に投与されるものである、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 7】

前記組成物が、免疫療法、がん化学療法または放射線療法の少なくとも 1 つと組み合わせられる、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 8】

脱 N-アセチルシアル酸抗原を有する細胞に対する抗体の結合を促進するための医薬の製造におけるポリシアル酸誘導体を含む組成物の使用であって、前記組成物が前記細胞上の前記抗原の量を増加させるものであり、前記ポリシアル酸誘導体が、実質的に非酸化で、精製されており、(i) N-アセチルシアル酸および脱 N-アセチルシアル酸残基の混合物、ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱 N-アセチルシアル酸残基を含むものであり、前記組成物が前記抗原に特異的な抗体の前記細胞への結合を促進するために有効である、使用。

10

【請求項 9】

前記細胞に対する前記抗体の結合が細胞に対して細胞傷害性である、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記抗体が結合体を含む、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 11】

前記結合体が検出可能な標識または細胞傷害性薬物を含む、請求項 10 に記載の使用。

20

【請求項 12】

前記細胞ががん細胞である、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 13】

対象における脱 N-アセチルシアル酸抗原を有する細胞に対する抗体を誘発するための医薬の製造における抗原を含む免疫原性組成物の使用であって、前記の抗原を含む免疫原性組成物が、前記細胞による前記抗原の発現を増大させるものであり、前記抗原が、(i) N-アセチルシアル酸および脱 N-アセチルシアル酸残基の混合物、ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱 N-アセチルシアル酸残基を有し、実質的に非酸化で、精製されたポリシアル酸誘導体を含むものであり、前記免疫原性組成物が、前記対象における、前記細胞に特異的に結合する抗体の産生を誘発するのに有効である、使用。

30

【請求項 14】

脱 N-アセチルシアル酸抗原を有するがん細胞の生存能を低下させるための医薬の製造におけるポリシアル酸誘導体を含む組成物の使用であって、前記ポリシアル酸誘導体が還元端および非還元端を有し、前記ポリシアル酸誘導体が、(i) N-アセチルシアル酸および脱 N-アセチルシアル酸残基の混合物、ならびに(ii) 前記非還元端においてエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性である脱 N-アセチルシアル酸残基を含む、実質的に非酸化で、精製されたオリゴ糖である、使用。

【請求項 15】

前記がん細胞が神経芽腫細胞、白血病細胞または黒色腫細胞である、請求項 14 に記載の使用。

40

【請求項 16】

前記ポリシアル酸誘導体が α (2 $\rightarrow$ 8) および α (2 $\rightarrow$ 9) から選択されるグルコシド結合により連結された脱 N-アセチルシアル酸および N-アセチルシアル酸の少なくとも 1 つの二量体を含む、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 17】

前記ポリシアル酸誘導体が 2 $\sim$ 10 の重合度を有する、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

前記ポリシアル酸誘導体が 2 $\sim$ 5 の重合度を有する、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 19】

50

前記ポリシアル酸誘導体が 2 ～ 4 の重合度を有する、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 20】

前記ポリシアル酸誘導体が 2 の重合度を有する、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 21】

前記混合物が 10 % ～ 60 % の量の脱 N－アセチルシアル酸残基を含む、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 22】

前記ポリシアル酸誘導体がポリシアル酸誘導体鎖当たり 1 つの脱 N－アセチルシアル酸残基を有する、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 23】

前記ポリシアル酸誘導体が結合体を含む、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 24】

前記非還元端脱 N－アセチルシアル酸が、前記ポリシアル酸誘導体の非還元端において脱 N－アセチルシアル酸抗原を形成するように、グリコシド結合を介して隣接 N－アセチルシアル酸に連結している、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 25】

前記脱 N－アセチルシアル酸がノイラミン酸であり、前記 N－アセチルシアル酸が N－アセチルノイラミン酸である、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 26】

前記ノイラミン酸および前記 N－アセチルノイラミン酸の少なくとも 1 つが少なくとも 1 つの O－アセチル化基を含む、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 27】

前記ポリシアル酸が大腸菌 (*Escherichia coli*) K1、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 血清グループ B および髄膜炎菌血清グループ C からなる群から選択される細菌の莢膜多糖ホモポリマーから得られる、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 28】

前記細胞が対象に存在する、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 29】

規定の重合度およびエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱 N－アセチル残基を有する、実質的に非酸化で、分離ポリシアル酸誘導体を製造する方法であって、

(i) 異なる重合度、(ii) N－アセチル残基および脱 N－アセチル残基の異なる混合物、ならびに (iii) 非還元端 N－アセチルシアル酸残基をそれぞれが有するポリシアル酸誘導体の混合物を含む溶液を提供する段階、

前記溶液をイオン交換クロマトグラフィーにかけて、画分を生成する段階、ならびに

1 つまたは複数の前記画分から、規定の重合度およびエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱 N－アセチル残基を有するポリシアル酸誘導体を分離し、それにより実質的に非酸化で分離ポリシアル酸誘導体を製造する段階を含む、方法。

【請求項 30】

前記イオン交換クロマトグラフィーが陰イオン交換クロマトグラフィーである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記分離ポリシアル酸誘導体が 2 ～ 10 の重合度を有する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

請求項 29 により製造される分離ポリシアル酸誘導体。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の分離ポリシアル酸誘導体を含む医薬組成物。

【請求項 34】

実質的に非酸化であり、(i) N－アセチルシアル酸および脱 N－アセチルシアル酸残

10

20

30

40

50

基の混合物、ならびに (i i) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を含む分離ポリシアル酸誘導体を含み、非還元端N-アセチルシアル酸残基を有するポリシアル酸を実質的に含まない、組成物。

【請求項 3 5】

前記分離ポリシアル酸誘導体が α (2 $\rightarrow$ 8) および α (2 $\rightarrow$ 9) から選択されるグルコシド結合により連結された脱N-アセチルシアル酸およびN-アセチルシアル酸の少なくとも1つの二量体を含む、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記分離ポリシアル酸誘導体が 2 $\sim$ 10 の重合度を有する、請求項 3 4 に記載の組成物。

10

【請求項 3 7】

前記分離ポリシアル酸誘導体が 2 $\sim$ 5 の重合度を有する、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記分離ポリシアル酸誘導体が 2 $\sim$ 4 の重合度を有する、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記分離ポリシアル酸誘導体が 2 の重合度を有する、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記非還元端脱N-アセチルシアル酸残基がグリコシド結合を介してN-アセチルシアル酸残基に連結している、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記混合物が 10 % $\sim$ 60 % の量の脱N-アセチルシアル酸残基を含む、請求項 3 4 に記載の組成物。

20

【請求項 4 2】

前記分離ポリシアル酸誘導体がポリシアル酸誘導体鎖当たり 1 つの脱N-アセチルシアル酸残基を有する、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記分離ポリシアル酸誘導体が結合体を含む、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記脱N-アセチルシアル酸がノイラミン酸であり、前記N-アセチルシアル酸がN-アセチルノイラミン酸である、請求項 3 4 に記載の組成物。

30

【請求項 4 5】

前記ノイラミン酸および前記N-アセチルノイラミン酸の少なくとも1つが少なくとも1つのO-アセチル化基を含む、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記分離ポリシアル酸誘導体が大腸菌 (*Escherichia coli*) K1、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 血清グループ B および髄膜炎菌血清グループ C からなる群から選択される細菌の莢膜多糖ホモポリマーから得られる、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

ポリシアル酸誘導体を含む凝集体を製造する方法であって、
実質的に非酸化で、精製されたポリシアル酸誘導体を凝集体を形成するように凝集条件下におく段階を含み、
前記ポリシアル酸誘導体が (i) N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物、このとき前記脱N-アセチル残基が前記混合物の 10 % $\sim$ 80 % を含むものである混合物、ならびに (i i) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性である非還元端脱N-アセチルシアル酸残基を含むものである、方法。

40

【請求項 4 8】

前記凝集条件が加熱または凝集賦形剤の添加である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記加熱が 30 $^{\circ}$ C $\sim$ 70 $^{\circ}$ C である、請求項 4 7 に記載の方法。

50

【請求項 50】

前記凝集賦形剤が水酸化アルミニウムである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記凝集体が粒子である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記粒子が顕微鏡的である、請求項 51 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

10

本出願は、参照により全体として本明細書に組み込まれている、2007年7月3日に
出願した米国特許仮出願第60/958,391号の優先権を主張するものである。

連邦政府による資金提供を受けた研究の記載

本発明は、国立アレルギー・感染症研究所および国立衛生研究所により授与された補助
金（第A164314号）のもとに政府の支援によりなされた。政府は本発明に一定の権
利を有する。

本開示は、ポリシアル酸誘導体、組成物、それらの製造方法および使用に関する。

【背景技術】

【0002】

がん免疫療法の1つの目的は、腫瘍細胞上で独特に発現し、かつ／または過剰発現する
抗原を特定することである（Carterら、Endocrine-Related Cancer、2004年、11巻、659頁）。これらの特性を示す抗原は、治療上投与
するワクチンにより誘発される抗体またはモノクローナル抗体および抗体結合体の標的と
して用いることができる。がん細胞において独特に発現または相対的に過剰発現する抗原
と反応性である抗体は、がん細胞の成長および／または転移を制限することができる。そ
のメカニズムとしては、抗体依存性細胞傷害（antibody dependent
cellular cytotoxicity）（ADCC）、抗体依存性細胞傷害（a
ntibody dependent cytotoxicity）（ADC）または補
体依存性細胞毒性（CDC）などが挙げられる（Carterら、Endocrine-
Related Cancer、2004年、11巻、659頁）。さらに、細胞表面抗
原と反応性である抗体は、細胞表面抗原に結合した後にエンドサイトーシスによるインター
ナリゼーションを受けることができる。したがって、抗体への細胞傷害性薬物または毒
素の結合は、がん細胞に試薬を特異的に向ける手段となり得る。

20

30

【0003】

多くのヒト腫瘍が脱N-アセチル残基を含むポリα（2→8）N-アセチルノイラミン
酸の誘導体を独特に発現または過剰発現することがマウスモノクローナル抗体であるSE
AM3を用いて示された（Moeら、Infect. Immun.、2005年、73巻
、2123頁）。SEAM3は、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を含む
ポリα（2→8）N-アセチルノイラミン酸に結合する。SEAM3は、細胞内および細
胞表面上のこの抗原の発現を検出するのに用いることができ、抗原を発現する腫瘍細胞に
対する機能活性を有する。

40

シアル酸は、9炭素の酸性糖であるノイラミン酸のNおよび／またはO置換誘導体であ
る（Varki A.、Glycobiology、1992年、2巻、25頁）。ヒト
において、該糖は、各種の細胞表面糖タンパク質および糖脂質の末端に位置し、多くの生
物学的過程において重要な役割を有する。がんにおいて、転移し得る細胞は、それらの細
胞が血流に入ることを促進する可能性がある、より大量のシアル酸修飾糖タンパク質をし
ばしば有する。また、腫瘍細胞のシアル酸は正常細胞と異なる形で修飾されていることが
長年にわたって認識されている（Hakamori、Cancer Res.、1996
年、56巻、5309頁、Dall'Olio、Clin. Mol. Pathol.、1
996年、49巻、M126頁、KimおよびVarki、Glycoconj. J.、

50

1997年、14巻、569頁)。例えば、シアル酸およびその誘導体の発現パターンの変化は、がんなどの異常な細胞過程のマーカーとして用いられている(O'Kennedyら、Cancer Lett.、1991年、58巻、91頁、Vedralovaら、Cancer Lett.、1994年、78巻、171頁、およびHorganら、Clin. Chim. Acta.、1982年、118巻、327頁、およびNarayanan S.、Ann. Clin. Lab. Sci.、1994年、24巻、376頁)。

【0004】

正常細胞では異常であると考えられているが、がん細胞には存在する1つのシアル酸誘導体は、脱N-アセチルシアル酸である(Hanaiら、J. Biol. Chem.、1988年、263巻、6296頁、Manziら、J. Biol. Chem.、1990年、265巻、1309頁、Sjobergら、J. Biol. Chem.、1995年、270巻、2921頁、Chamasら、1999年、Cancer Res.、59巻、1337頁、およびPopaら、Glycobiology、2007年、17巻、367頁)。

特異抗体により認識されるシアル酸誘導体および該誘導体の発現のレベルは、*in vitro*および*in vivo*で操作することができる。マンノサミンの誘導体を供給することによってヒト細胞における特定のシアル酸誘導体の発現を操作することが最も多かった(Bertozziら、「Chemical Glycobiology」Science(2001年)、291巻、2357~2364頁)。例えば、外因性N-プロピオニルマンノサミンを供給することによって、N-プロピオニルポリシアル酸(N-PrPSA)-破傷風トキソイド結合体ワクチンによる免疫処置によって誘発される抗N-PrPSAモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体により検出することができるN-PrPSA誘導体の産生がもたらされることが示されている(Zouら、J. Biol. Chem.、2004年、279巻、25390頁)。

【0005】

真核細胞は、細胞外源からシアル酸の他の前駆体であるN-アセチルノイラミン酸の生合成を獲得することによって、内部シアル酸生合成の遮断を補償することができることも示された(Oetkaら、Eur. J. Biochem.、2001年、268巻、4553頁)。細胞は、食作用によってN-グリコシルシアル酸含有複合糖質からN-グリコリルシアル酸などのシアル酸誘導体も獲得することができる(Bardorら、J. Biol. Chem.、2006年、280巻、4228頁)。エンドサイトーシス小胞がリソソームと融合するとき、インターナライズされた複合糖質上に存在するシアル酸がN-アシルノイラミン酸に加水分解されることが示唆された。次いで、遊離N-アシルノイラミン酸は、特異的輸送タンパク質により最初に細胞質に、次に核に輸送され、そこで最終的にシアル酸トランスフェラーゼ基質であるCMP-N-アシルノイラミン酸に変換される(Bardorら、J. Biol. Chem.、2006年、280巻、4228頁)。

【0006】

文献

目的とするアミノ糖、誘導体および関連文献は、次の米国特許、第4,021,542号、第4,062,950号、第4,175,123号、第4,216,208号、第4,254,256号、第4,314,999号、第4,656,159号、第4,713,374号、第4,797,477号、第4,803,303号、第4,840,941号、第4,914,195号、第4,968,786号、第4,983,725号、第5,231,177号、第5,243,035号、第5,264,424号、第5,272,138号、第5,332,756号、第5,667,285号、第5,674,988号、第5,759,823号、第5,962,434号、第6,075,134号、第6,110,897号、第6,274,568号、第6,407,072号、第6,458,937号、第6,548,476号、第6,697,251号、第6,680,054

号、第6, 936, 701号および第7, 070, 801号に、また、次の参考文献、AngataおよびVarki、Chem. Rev.、2002年、102巻、439頁、Hakamori、Cancer Res.、1996年、56巻、5309頁、Dall'Olio、Clin. Mol. Pathol.、1996年、49巻、M126頁、KimおよびVarki、Glycoconj. J.、1997年、14巻、569頁、Hanaiら、J. Biol. Chem.、1988年、263巻、6296頁、Manziら、J. Biol. Chem.、1990年、265巻、1309頁、Sjobergら、J. Biol. Chem.、1995年、270巻、2921頁、Chamasら、Cancer Res.、1999年、59巻、1337頁、Popaら、Glycobiology、2007年、17巻、367頁、Kayserら、J. Biol. Chem.、1992年、267巻、16934頁、Kepplerら、Glycobiology、2001年、11巻、11R頁、Luchanskyら、Meth. Enzymol.、2003年、362巻、249頁、Oetkeら、Eur. J. Biochem.、2001年、268巻、4553頁、Collinsら、Glycobiology、2000年、10巻、11頁およびBardorら、J. Biol. Chem.、2005年、280巻、4228頁に報告されている。

10

【0007】

抗体SEAM3は、Moeら、Infect. Immun.、2005年、73巻、2123頁に報告されている。水素化ホウ素ナトリウム反応および関連事項は、Hiranoら、Connect Tissue Res、1975年、3巻、73頁、Shimamuraら、Arch Biochem Biophys、1984年、232巻、699頁およびDjanashviliら、Chem Eur J、2005年、11巻、4010頁などの様々な参考文献に報告されている。

20

様々な参考文献がシアル酸前駆体、誘導体、抗原および使用について報告している（Zouら、J. Biol. Chem.、2004年、279巻、25390頁、Oetkeら、Eur. J. Biochem.、2001年、268巻、4553頁、Bardorら、J. Biol. Chem.、2006年、280巻、4228頁、Bertozziら、「Chemical Glycobiology」Science（2001年）、291巻、2357～2364頁）。米国特許出願公開第2007/0010482号、2006年12月22日に出願された米国特許出願第11/645, 255号、国際公開第2006/002402号および2006年12月22日に出願されたPCT出願番号PCT/US2006/04885号も参照のこと。

30

【発明の概要】

【0008】

本発明は一般的に、組成物およびそれらの製造の方法、ならびに哺乳類細胞の脱N-アセチルシアル酸抗原の増加における使用およびそのような細胞上のdeNAcシアル酸抗原の増加を利用する方法を含む使用に関する。

1つの実施形態において、該方法は、細胞を有効な量の本明細書で述べる組成物と接触させることにより哺乳類細胞、特にがん細胞の表面上の抗原を増加させることを含み、細胞への抗体の結合を促進するため、ならびに、特に抗原に対する抗体を誘発するのに必要とするより高い濃度で適用するときに、細胞の生存能を直接低下させるために用いることができる。

40

また、本明細書で開示する免疫原性組成物を用いることによって、deNAcシアル酸抗原を有する対象の細胞に対する抗体を誘発する方法を提供する。

【0009】

本明細書で開示する組成物は、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を含み、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある分離ポリシアル酸誘導体を含む。これらの組成物はまた、脱N-アセチル残基が富化された非還元端を有するポリシアル酸誘導体、ならびにそのような誘導体が富化されている組成物を含む。組成物はさらに、N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物ならびにエキソノイラ

50

ミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を有する実質的に非酸化の分離ポリシアル酸誘導体を含み、組成物は、非還元端N-アセチルシアル酸残基を有するポリシアル酸を実質的に含まない。組成物は、本明細書で開示する分離ポリシアル酸誘導体の凝集体も含み、可変鎖長を有するポリシアル酸誘導体の凝集体が富化されている組成物ならびに規定された重合度を有するポリシアル酸誘導体の凝集体の組成物などがある。

組成物を製造する方法は、(i) N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有するポリシアル酸誘導体を含む、第1の組成物をエキソノイラミニダーゼで処理する段階、ならびに(ii) 第1の組成物からエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体を分離する段階を含み得る。他の製造方法は、(i) N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有する脱N-アセチル化ポリシアル酸を含む第1の組成物を準備する段階、(ii) 脱N-アセチル化ポリシアル酸を再アセチル化して、部分的に再アセチル化されたポリシアル酸を含む第2の組成物を得る段階、および(iii) 第2の組成物からエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体を分離する段階を含む。他の製造方法は、該誘導体を凝集条件に曝露して凝集体を形成させることにより、分離ポリシアル酸誘導体の凝集体を形成させ、凝集体を分離する段階を含む。組成物を製造するさらなる方法は、(i) 異なる重合度、N-アセチル残基および脱N-アセチル残基の異なる混合物、ならびに非還元端N-アセチルシアル酸残基をそれぞれが有するポリシアル酸誘導体の混合物を含む溶液を準備する段階、(ii) 該溶液をイオン交換クロマトグラフィーにかけて、画分を得る段階、ならびに(iii) 1つまたは複数の画分から規定の重合度およびエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を有するポリシアル酸誘導体を分離する段階を含む。

【0010】

本明細書で開示する組成物および方法は、本明細書で開示するポリシアル酸誘導体が細胞に外部から適用することができ、取り込まれ、腫瘍細胞に認められるが、正常細胞には認められない実質的に完全な抗原として細胞表面上に提示されるという所見を利用している。この特性は、本開示の組成物が、細胞に外部から適用または対象に投与したときに分解に対して思いがけなく安定であるという所見から広がっている。

本明細書で開示する組成物および方法は、細胞表面上の完全な抗原の量が、エキソノイラミニダーゼによる分解を受けやすく、かつ／または脱N-アセチル残基が富化された非還元端が欠けている従来のポリシアル酸組成物と比較して、著しく増加しているという所見も利用することもできる。本明細書で開示する組成物および方法は、細胞によって提示される抗原の量の増加が、エキソノイラミニダーゼによる分解を受けやすく、かつ／または脱N-アセチル残基が富化された非還元端が欠けている従来のポリシアル酸組成物と比較して、抗体の新規な標的が大きい特異性および選択性で結合することを可能にするだけでなく、抗原を発現する細胞に対する対象における免疫応答も増大させることができるという所見も利用することもできる。本明細書で開示する組成物および方法は、ポリシアル酸誘導体の凝集体が、対応する非凝集誘導体と比較してより容易に細胞に取り込まれ、細胞表面上に発現するという所見も利用することもできる。本明細書で開示する組成物および方法は、実質的に非酸化で、精製されたポリシアル酸誘導体を製造し、特性を評価することができ、より小さい誘導体より長い誘導体と同様に大きい活性を示し、最小の誘導体が有効な活性に必要な最小限の特徴を含むことが示唆されるという所見も利用することもできる。

【0011】

したがって、本開示の方法および組成物は、細菌感染症およびがんの治療および／またはは予防を含む多くの適用分野に用いることができる。

したがって、本開示の1つの態様において、脱N-アセチルシアル酸抗原を有するがん細胞をポリシアル酸誘導体を含む有効な量の組成物を接触させて、前記細胞の脱N-アセチルシアル酸抗原の量を増加させる段階を含む、がん細胞の脱N-アセチル化抗原を増加

10

20

30

40

50

させる方法を提供し、前記ポリシアル酸誘導体は、実質的に非酸化で、精製されており、
(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物、ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチルシアル酸残基を含む。

関連実施形態において、がん細胞は、脱N-アセチルシアル酸エпитープを提示し、いくつかの実施形態において、神経芽腫細胞、白血病細胞または黒色腫細胞である。さらなる関連実施形態において、抗原は、脱N-アセチルシアル酸エピトープを含む。関連実施形態において、細胞は対象に存在し、前記接触は、前記対象に有効な量の前記組成物を投与することを含む。関連実施形態において、投与は、注入または局所注射による。投与は、がん細胞を除去するための外科的介入の前、がん細胞を除去するための外科的介入時または後であってよく、かつ／または対象への免疫療法、がん化学療法または放射線療法の少なくとも1つを伴ってよい。

【0012】

他の態様において、本開示は、脱N-アセチルシアル酸抗原を有する細胞を、前記細胞上の前記抗原の量を増加させるように、ポリシアル酸誘導体を含む有効な量の組成物と接触させる段階を含み、前記ポリシアル酸誘導体は実質的に非酸化で、精製されており、(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチルシアル酸残基を含んでおり、そして前記細胞を前記抗原に対して特異的な抗体と接触させて、前記細胞に対する前記抗体の結合を促進する段階を含む、脱N-アセチルシアル酸抗原を有する細胞に対する抗体の結合を促進する方法を提供する。関連実施形態において、細胞への抗体の結合は、前記細胞による前記抗体の取込みを促進する。関連実施形態において、抗原は、脱N-アセチル化シアル酸エピトープを含む。いくつかの実施形態において、前記細胞への抗体の結合は、細胞に対して細胞傷害性である。抗体は、前記抗原の脱N-アセチル化シアル酸エピトープに対して特異的であってよく、特定の実施形態においてSEAM3モノクローナル抗体である。

関連実施形態において、細胞はがん細胞である。関連実施形態において、抗原は、細胞分裂中に細胞外でアクセスできる細胞である。さらなる実施形態において、抗体は、例えば、結合体が検出可能な標識または細胞傷害性薬物（例えば、毒素）を含む場合の結合体として提供することができる。

【0013】

他の態様において、本開示は、対象における脱N-アセチルシアル酸抗原を有する細胞に対する抗体を誘発する方法であって、前記細胞による前記抗原の発現を増大させるように、抗原を含む有効な量の免疫原性組成物を対象に投与する段階を含み、前記抗原が、(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチルシアル酸残基を有する実質的に非酸化で、精製されたポリシアル酸誘導体を含み、前記投与が、前記細胞に特異的に結合する前記対象における抗体の産生を誘発するのに有効である、方法を提供する。関連実施形態において、細胞への抗体の結合は、細胞傷害性である。さらなる関連実施形態において、抗体は、脱N-アセチル化シアル酸エピトープに対して特異的である。関連実施形態において、細胞は、がん細胞である。関連実施形態において、抗原は、細胞分裂中に細胞外でアクセスできる。

他の態様において、本開示は、がん細胞の生存能を低下させるように、前記細胞をポリシアル酸誘導体を含む有効な量の組成物と接触させる段階を含み、前記ポリシアル酸誘導体が還元端および非還元端を有し、前記ポリシアル酸誘導体が、(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物ならびに(ii) 前記非還元端においてエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性である脱N-アセチルシアル酸残基を含む実質的に非酸化で、精製されたオリゴ糖である、がん細胞の生存能を低下させる方法を提供する。関連実施形態において、ポリシアル酸誘導体の細胞内取込みは、がん細胞に対して細胞傷害性である。関連実施形態において、がん細胞は、神経芽腫細胞、白血病細胞

胞または黒色腫細胞である。

【0014】

関連実施形態において、ポリシアル誘導体は、 α (2 $\rightarrow$ 8) および α (2 $\rightarrow$ 9) から選択されるグルコシド結合により連結された脱N-アセチルシアル酸およびN-アセチルシアル酸の少なくとも1つの二量体を含み、ポリシアル誘導体は、約2~10、約2~5、約2~4、および/または約2の重合度を有することができる。さらなる関連実施形態において、混合物は、約10%~60%の量の脱N-アセチルシアル残基を含む。関連実施形態において、ポリシアル誘導体は、ポリシアル酸誘導体鎖当たり約1つの脱N-アセチルシアル残基を有する。ポリシアル酸誘導体は、関連実施形態において結合体を含んでよい。さらなる関連実施形態において、非還元端脱N-アセチルシアル酸は、前記ポリシアル酸誘導体の非還元端において脱N-アセチルシアル酸抗原を形成するように、グリコシド結合を介して隣接N-アセチルシアル酸に結合している。関連実施形態において、脱N-アセチルシアル酸は、ノイラミン酸であり、N-アセチルシアル酸は、N-アセチルノイラミン酸である。関連実施形態において、ノイラミン酸および前記N-アセチルノイラミン酸の少なくとも1つは、少なくとも1つのO-アセチル化基を含む。さらなる関連実施形態において、ポリシアル酸は、大腸菌 (*Escherichia coli*) K1、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 血清グループBおよび髄膜炎菌血清グループCからなる群から選択される細菌の莢膜多糖ホモポリマーから得られる。関連実施形態において、前記細胞は対象に存在し、前記接触は、有効な量の前記組成物を前記対象に投与することを含む。

【0015】

他の態様において、本開示は、(i) 異なる重合度、(ii) N-アセチル残基および脱N-アセチル残基の異なる混合物、ならびに (iii) 非還元端N-アセチルシアル酸残基をそれぞれが有するポリシアル酸誘導体の混合物を含む溶液を準備する段階、前記溶液をイオン交換クロマトグラフィーにかけて、画分を得る段階、ならびに1つまたは複数の前記画分から規定の重合度およびエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を有するポリシアル酸誘導体を分離し、それにより前記分離ポリシアル酸誘導体を製造する段階を含む、規定の重合度およびエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を有する分離ポリシアル酸誘導体を製造する方法を提供する。関連実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーは、陰イオン交換クロマトグラフィーである。関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、約2~10、約2~5、約2~4、および/または約2の重合度を有する。関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、実質的に非酸化である。

関連実施形態において、前記分離ポリシアル酸誘導体の非還元端脱N-アセチルシアル酸残基は、グリコシド結合を介してN-アセチルシアル酸残基に結合している。関連実施形態において、グリコシド結合は、 α (2 $\rightarrow$ 8) および α (2 $\rightarrow$ 9) からなる群から選択される。さらなる関連実施形態において、混合物は、約10%~60%の量の脱N-アセチルシアル残基を含む。関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、ポリシアル酸誘導体鎖当たり約1つの脱N-アセチルシアル残基を含む。他の関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、結合体を含む。

【0016】

他の関連実施形態において、脱N-アセチルシアル酸は、ノイラミン酸であり、前記N-アセチルシアル酸は、N-アセチルノイラミン酸である。関連実施形態において、ノイラミン酸およびN-アセチルノイラミン酸の少なくとも1つは、少なくとも1つのO-アセチル化基を含む。関連実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、大腸菌K1、髄膜炎菌血清グループBおよび髄膜炎菌血清グループCからなる群から選択される細菌の莢膜多糖ホモポリマーから得られる。関連実施形態において、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有するポリシアル酸誘導体を含む第1の組成物をエキソノイラミニダーゼで処理することにより、ポリシアル酸誘導体の混合物を製造する。さらなる関連実施形態において、脱N-アセチル化ポリシアル酸を含む第1の組成物を再アセチル化して、N-

アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある、部分的に再アセチル化されたポリシアル酸を含む第2の組成物を得ることにより、ポリシアル酸誘導体の混合物を製造する。

他の態様において、本開示は、本明細書に開示する方法により製造される分離ポリシアル酸誘導体、ならびにそのような分離ポリシアル酸誘導体を含む医薬組成物を提供する。

【0017】

他の態様において、本開示は、分離ポリシアル酸誘導体を含む組成物を提供し、前記分離ポリシアル酸誘導体は、実質的に非酸化であり、(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル残基の混合物、ならびに(ii)エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を含み、前記組成物は、非還元端N-アセチルシアル酸残基を有するポリシアル酸を実質的に含まない。関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、 α (2 $\rightarrow$ 8) および α (2 $\rightarrow$ 9) から選択されるグルコシド結合により連結された脱N-アセチルシアル酸およびN-アセチルシアル酸の少なくとも1つの二量体を含む。関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、約2~10、約2~5、約2~4、および/または約2の重合度を有する。関連実施形態において、非還元端脱N-アセチルシアル酸残基は、グリコシド結合を介してN-アセチルシアル酸残基に結合している。関連実施形態において、混合物は、約10%~60%の量の脱N-アセチルシアル残基を含む。さらなる関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、ポリシアル酸誘導体鎖当たり約1つの脱N-アセチルシアル残基を有する。他の実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、結合体を含む。特定の実施形態において、脱N-アセチルシアル酸は、ノイラミン酸であり、前記N-アセチルシアル酸は、N-アセチルノイラミン酸であり、前記ノイラミン酸および前記N-アセチルシアル酸の少なくとも1つが少なくとも1つのO-アセチル化基を含むようであってよい。関連実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、大腸菌K1、髄膜炎菌血清グループBおよび髄膜炎菌血清グループCからなる群から選択される細菌の莢膜多糖ホモポリマーから得られる。特定の実施形態において、組成物は、ポリシアル酸誘導体の凝集体を含み、凝集体は、顕微鏡的粒子を含んでいてよい。

他の態様において、本開示は、実質的に非酸化で、精製されたポリシアル酸誘導体を凝集体を形成するように凝集条件下におく段階を含み、前記ポリシアル酸誘導体が(i) N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物(前記脱N-アセチル残基が前記混合物の約10%~80%を含む)ならびに(ii)エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性である非還元端を含む、ポリシアル酸誘導体を含む凝集体を製造する方法を提供する。関連実施形態において、凝集条件は、加熱(例えば、加熱は約30℃~70℃である)または凝集賦形剤(例えば、水酸化アルミニウム)の添加である。関連実施形態において、凝集体は、粒子、例えば、顕微鏡的粒子である。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】ポリシアル酸(コロミン酸)、再N-アセチル化ポリシアル酸誘導体(再N-アセチル化コロミン酸(ReAc))およびエキソノイラミニダーゼに対する抵抗性のあるポリシアル酸誘導体(エキソノイラミニダーゼに対する抵抗をもたせるために選択した再N-アセチル化コロミン酸(ReAc Sia))に細胞外で曝露したCHP-134神経芽腫細胞に対する無関連アイソタイプ適合対照mAb IgG2bおよびSEAM3の結合のフローサイトメトリー結果を示す図である。

【図2】ポリシアル酸(コロミン酸)、再N-アセチル化ポリシアル酸誘導体(再N-アセチル化コロミン酸(ReAc))およびエキソノイラミニダーゼに対する抵抗性のあるポリシアル酸誘導体(エキソノイラミニダーゼに対する抵抗をもたせるために選択した再N-アセチル化コロミン酸(ReAc Sia))に細胞外で曝露したジャーカット白血病細胞に対する無関連アイソタイプ適合対照mAb IgG2bおよびSEAM3の結合のフローサイトメトリー結果を示す図である。

【図3】ポリシアル酸(コロミン酸)、再N-アセチル化ポリシアル酸誘導体(再N-ア

セチル化コロミン酸 (ReAc)) およびエキソノイラミニダーゼに対する抵抗性のあるポリシアル酸誘導体 (エキソノイラミニダーゼに対する抵抗をもたせるために選択した再N-アセチル化コロミン酸 (ReAc Sia)) に細胞外で曝露したSK-MEL 28黒色腫細胞に対する無関連アイソタイプ適合対照mAb IgG 2bおよびSEAM3の結合のフローサイトメトリー結果を示す図である。

【図4】無誘導体 (なし)、ポリシアル酸 (コロミン酸 (Col))、再N-アセチル化ポリシアル酸誘導体 (再N-アセチル化コロミン酸 (ReAc)) およびエキソノイラミニダーゼに対する抵抗性のあるポリシアル酸誘導体 (エキソノイラミニダーゼに対する抵抗をもたせるために選択した再N-アセチル化コロミン酸 (ReAc Sia)) に細胞外で曝露したジャーカット、SK-MEL 28黒色腫およびCHP-134神経芽腫細胞に関する無関連アイソタイプ適合対照mAb IgG 2bおよびSEAM3の結合 (図4、パネルA) ならびに細胞の全蛍光 (図4、パネルB) のヒストグラムの形式での結果を示す図である。

【図5】トリトンX-100の非存在下 (図5、パネルAおよびB) または存在下 (図5、パネルCおよびD) でポリシアル酸誘導体 (図5、パネルAおよびC、コロミン酸) またはエキソノイラミニダーゼに対する抵抗性のあるポリシアル酸誘導体 (図5、パネルBおよびD、エキソノイラミニダーゼに対する抵抗をもたせるために選択した再N-アセチル化コロミン酸 (ReAc Sia)) に細胞外で曝露したSK-MEL-28黒色腫細胞へのSEAM3の結合に起因する共焦点顕微鏡により測定した細胞表面上の蛍光 (暗く染色された核を取り囲む淡灰色によりグレースケール図で表した、赤色染色により示す) を示す図である。

【図6】SEAM3または対照mAbの存在下で細胞を48時間培養した後のSDS-PAGEゲル上で分離された可溶性SK-MEL 28黒色腫細胞質ゾル細胞タンパク質中のマウス免疫グロブリン軽鎖の存在を検出するウェスタンブロットを示す図である。

【図7】0、1、2および6時間のアルカリ加水分解によるコロミン酸のHPAC-PADクロマトグラムを示す図である。

【図8】ReAc Sia誘導体と比較した1、2または6時間 (パネルA) あるいは10、20、40または60分間 (パネルB) のアルカリ加水分解により生成したコロミン酸誘導体と細胞を接触させた後のジャーカット細胞に対するSEAM3の結合に対する影響を示す棒グラフである。

【図9】40時間のインキュベーション後のジャーカット細胞の生存能に対する40分DeNAccol誘導体濃度の影響を示す図である。

【図10】酸加水分解40分DeNAccol誘導体のAECクロマトグラムを示す図である。文字は、プールされた画分を示す。

【図11】酸加水分解40分DeNAccolのAEC精製による選択した個々の画分のHPAC-PADクロマトグラム (マイクロタイタープレートウェルを各クロマトグラムの上に示す) を示す図である。オリゴマーの重合度 (Dp) 2~10を非精製誘導体のクロマトグラムの下に示す。

【図12】図10に示したプールした画分のHPAC-PADクロマトグラムを示す図である。プールし、透析し、凍結乾燥した後に、最初の画分中に存在していなかったより小さいオリゴマーが存在することから、より長いオリゴマーが加水分解してより短いオリゴマーが生成したことが示唆される。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本開示は、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性があり、ノイラミン酸残基が富化された合成ノイラミン酸含有ポリシアル酸 (PSA) を外部から供給することによって、脱N-アセチル化シアル酸がん細胞抗原をがん細胞において著しく増加させることができるという発見に基づいている。抗原であるポリα (2→8) またはα (2→9) N-アセチルノイラミン酸 (PSA) は、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を含む (すなわち、ノイラミン酸含有PSA)。ノイラミン酸含有PSAは、細胞によ

りモノマーに加水分解されずに、細胞により取り込まれ、完全なポリマー分子として輸送されて、表面発現複合糖質を生成すると思われる。これがヒト細胞において起こるメカニズムは知られていない。抗原はまた、細胞の核にかなりの程度に蓄積する。メカニズムにかかわりなく、P S A 誘導体は、細胞により取り込まれ、細胞の生存能をより低くし、脱N-アセチルシアル酸抗原を細胞表面上に提示するような形で処理される。本開示はまた、ノイラミン酸含有P S A 誘導体の凝集体が対応する非凝集誘導体と比較して容易に細胞により取り込まれ、細胞表面上に発現するという発見に基づいている。さらに、本開示は、ノイラミン酸含有P S A エピトープを認識する抗体であるS E A M 3の細胞によるインターナリゼーションが、合成抗原を外部から供給することによってもたらされる表面発現ノイラミン酸含有P S A 抗原の増加によって著しく増大するという発見に基づいている。本開示はまた、実質的に非酸化で、精製され、非還元端脱N-アセチル残基を有するより短い鎖長のP S A 誘導体が、そのような特徴を欠く対応するP S A 誘導体より著しく活性が高いという発見に基づいている。本開示は、そのようなP S A 誘導体およびそれらの製造の方法にさらに基づいている。

10

したがって、本発見は、がん細胞に認められるが、正常細胞には認められないシアル酸抗原の発現を増大させるための組成物および方法を提供する。これは、これらの細胞の免疫原性をより高くし、一般的に細胞の生存能を低下させ、かつ／または脱N-アセチルシアル酸抗原に対する特異的な抗体の結合を促進するのに有用であり得る。

【0020】

本発明および本発明の特定の具体例としての実施形態を記述する前に、本発明は記述する特定の実施形態に限定されず、したがって、もちろん変化し得ることを理解すべきである。本発明の範囲は添付する特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書で用いる用語は特定の実施形態を記述する目的のためのものであり、限定することを意図するものでないことも理解すべきである。

20

値の範囲を記載する場合は、文中で明記しない限り、対象範囲の上限と下限の間にある、下限の単位の10分の1までの各介在値、および記載範囲の他の任意の記載値もしくは介在値は、本発明の範囲内に含まれることが理解される。記載範囲の限界が具体的に除外されることを条件として、より小さい範囲に独立に含まれていてよいこれらのより小さい範囲の上および下限も本発明の範囲内に含まれる。記載範囲が限界の1つもしくは両方を含む場合には、含まれる限界の一方または両方を除く範囲も本発明に含まれる。

30

特に定義しない限り、本明細書で用いるすべての技術および科学用語は、本発明が属する分野の技術者により一般的に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書で述べるのと類似または同等の方法および材料は本発明の実施または試験にも用いることができるが、具体例としての方法および材料を次に述べる。本明細書で言及するすべての刊行物は、引用される刊行物に関連する方法および／または材料を開示し、述べるために、参照により本明細書に組み込まれている。

【0021】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いているように、単数形「a」、「an」および「the」は、文中で明記しない限り、複数の指示対象を含むことに注意しなければならない。したがって、例えば、「抗原 (an antigen)」への言及は複数のそのような抗原を含み、「ペプチド (the peptide)」への言及は1つまたは複数のペプチドおよび当業者に知られているその同等物への言及を含む、等である。

40

本明細書で述べる刊行物は、本出願の出願日の前のそれらの開示のためにのみ記載するものである。本明細書におけるいずれのものも、本発明が先行特許によってそのような刊行物に先行する資格を与えられないということの承認として解釈すべきでない。さらに、記載されている公表の日付は、独立に確認する必要がある実際の公表日と異なっている可能性がある。

【0022】

定義

組成物、そのようなものを含む製剤、そのよう組成物を製造し、使用する方法を述べる

50

場合、特に示さない限り、以下の用語は以下の意味を有する。後に下で定義する部分のいずれも様々な置換基で置換することができ、各定義はそのような置換された部分をそれらの範囲内に含めることを意図することも理解すべきである。

「アミノ糖」という用語は、ヒドロキシル基の代わりにアミノ基を含む糖またはサッカリドを意味する。N-アセチルグルコサミン、N-アセチルマンノサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルノイラミン酸およびシアル酸などのアミノを含む糖の誘導体は、一般的にアミノ糖の例である。

「類似体」という用語は、本開示の化合物と構造の類似性を有し、権利を主張かつ／または参照した化合物と同じまたは類似の有用性を示すと当業者が予想するであろうあらゆる化合物を制限なしに意味する。

10

ポリシアル酸誘導体に結合させた担体の状況において用いる「担体」という用語は、抗体または抗体フラグメントなどのペプチドまたはタンパク質担体を一般的に意味する。「担体」は、化合物の免疫原性を増大させるペプチドまたはタンパク質を含む。

【0023】

「細胞表面抗原」（または「細胞表面エピトープ」）という用語は、細胞分裂時に主として細胞外でまたは細胞外でのみアクセスできる抗原を含む、細胞の任意の細胞周期段階で細胞外でアクセスできる細胞の表面上の抗原またはエピトープを意味する。この状況における「細胞外でアクセスできる」は、細胞膜を透過性にする必要なしに、細胞外に供給される抗体が結合することができる抗原を意味する。

本明細書で用いる「化学療法」という用語は、がんの治療が特に問題となっている場合の疾患の治療における、薬剤（例えば、薬物、抗体等）、特に、がん細胞に選択的に破壊をもたらす薬剤の使用を意味する。

20

「結合」という用語は、目的とする1つの分子を目的とする第2の分子と隣接して結合させる、共有結合または非共有結合、通常は共有結合である化学結合を意味する。

【0024】

「脱N-アセチルシアル酸抗原」（「脱N-アセチル化シアル酸抗原」または「d e N A c S A 抗原」とも呼ぶ）という用語は、d e N A c シアル酸エピトープ（d e N A c S A エピトープ）を有するまたは模擬する化合物を意味し、エピトープは、シアル酸またはシアル酸誘導体の残基の二量体により最小限定義され、二量体は、Nアセチル化（例えば、アセチル化またはプロピオニル化）シアル酸残基またはシアル酸誘導体残基に隣接する少なくとも1つの脱N-アセチル化シアル酸残基を含む。脱N-アセチルシアル酸抗原の例は、本開示において記載しており、脱N-アセチル化多糖誘導体（「P S 誘導体」）、脱N-アセチル化ガングリオシドおよびシアル酸修飾タンパク質の脱N-アセチル化誘導体、特に、哺乳類細胞、特にヒト細胞、特にがん細胞、特にヒトがん細胞の細胞外表面でアクセスできるシアル酸修飾タンパク質を制限なく含む。d e N A c S A エピトープは、ナイセリア属菌、特に髄膜炎菌、特に髄膜炎菌グループBおよびC、ならびに大腸菌K1の多糖莢膜にも存在する。出発分子の誘導体（例えば、P S 誘導体またはガングリオシド誘導体）としてのd e N A c S A 抗原の記述は、脱N-アセチルシアル酸抗原の製造の方法に限定することを意味せず、具体例としてのd e N A c S A 抗原の構造を記述する都合のよい方法としての意味をもつことに注目されたい。

30

40

「誘導体」という用語は、本開示の化合物の構造由来の構造を有し、構造が本明細書に開示するものと十分に類似しており、権利を主張かつ／または参照した化合物と同じまたは類似の活性および有用性を示すと当業者が予想するであろう類似性に基づくあらゆる化合物を制限なしに意味する。

【0025】

本明細書に記載する化合物の「有効な量」という用語は、非致死性であるが、所望の効用をもたらすのに十分な化合物の量を意味することを意図する。例えば、抗d e N A c S A 抗体を発生させるために対象における免疫応答を誘発する場合、有効な量は、例えば、後に分離することができる抗体の産生（例えば、モノクローナル抗体の産生におけるような）を可能にするように、あるいは細菌に対する（例えば、ナイセリア属菌または大腸菌

50

K1によって引き起こされる疾患に対する予防的もしくは治療的免疫処置の状況におけるような)、またはd e N A c S Aエピトープによって特徴づけられるがんによる、対象における臨床的に意味のある免疫応答を可能にするように、有用な抗体反応を誘発する量である。一般的に標的細胞の生存能の低下をもたらすためには、有効量は、メカニズムにかかわらず、細胞の生存能を低下させるまたは殺滅する、あるいは対象における生存標的細胞の臨床的に意味のある減少をもたらす量である。下で指摘するように、必要とする正確な量は、対象の種、年齢および一般状態、治療する状態もしくは疾患の重症度、用いる個々の化合物、その投与方法などによって対象ごとに異なるであろう。したがって、正確な「有効量」を指定することは可能ではない。しかし、適切な有効量は、当業者により常用の実験のみを用いて決定することができる。

10

本明細書で用いている「富化された」という用語は、所望の特性または要素の割合の増加を有する化合物または組成物を意味する。例えば、非還元端において脱N-アセチル化について「富化されている」 α (2 $\rightarrow$ 8) オリゴシアル酸誘導体は、脱N-アセチル化残基が、非還元端を含む非還元端に唯一存在することを含む、主として存在する α (2 $\rightarrow$ 8) オリゴシアル酸誘導体である。組成物中の α (2 $\rightarrow$ 8) オリゴシアル酸誘導体の大部分(例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%までのより大きい割合)が非還元端、特に非還元端に脱N-アセチル化残基を有する場合、組成物は脱N-アセチル化非還元端を有する α (2 $\rightarrow$ 8) オリゴシアル酸誘導体が「富化」されている。

【0026】

20

「免疫療法」という用語は、疾患抗原に対する免疫応答を調節することによる疾患(例えば、ナイセリア属菌または大腸菌K1菌感染、がん)の治療を意味する。本出願の状況において、免疫療法は、抗体(例えば、モノクローナル抗体)の投与により、かつ/または対象における抗腫瘍抗原免疫応答を誘発する抗原の投与により、対象における抗菌および/または抗がん免疫応答をもたらすことを意味する。

細胞の「不活性化」という用語は、本明細書では細胞が後代を形成するための細胞分裂を不可能にさせられたことを示すために用いる。細胞は、それにもかかわらず刺激に対する応答および/または例えば、細胞表面分子(例えば、細胞表面タンパク質もしくは多糖)の産生を可能にするためのある期間の生合成の能力があつてよい。

本明細書で用いる「との併用で」という用語は、例えば、第1の療法を第2の療法の適用の全過程に適用する場合、第1の療法を第2の療法の適用と重複する期間適用する場合、例えば、第1の療法の適用が第2の療法の適用の前に始まり、第1の療法の適用が第2の療法の適用が終わる前に終わる場合、第2の療法の適用が第1の療法の適用の前に始まり、第2の療法の適用が第1の療法の適用が終わる前に終わる場合、第1の療法の適用が第2の療法の適用が始まる前に始まり、第2の療法の適用が第1の療法の適用が終わる前に終わる場合、第2の療法の適用が第1の療法の適用が始まる前に始まり、第1の療法の適用が第2の療法の適用が終わる前に終わる場合の使用を意味する。そのようなものとして、「併用で」も2つまたはそれ以上の療法の適用を伴う投薬計画を意味し得る。本明細書で用いる「との併用で」は、同じまたは異なる製剤で、同じまたは異なる経路により、同じまたは異なる剤形で適用することができる2つまたはそれ以上の療法の適用も意味する。

30

40

【0027】

「分離した」という用語は、化合物が本来はそれに付随する成分のすべてまたは一部から分離されていることを意味する。「分離した」は、製造(例えば、化学合成、組換え発現、培地など)中にそれに付随する成分のすべてまたは一部から分離されている化合物の状態も意味する。

「モノクローナル抗体」という用語は、均一な抗体集団を有する抗体組成物を意味する。この用語は、それが作製される方法によって限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子、ならびにF a b分子、F (a b ') 2フラグメント、F vフラグメント、フェージ上でディスプレイされる単鎖フラグメント可変部(s c F v)、抗体の抗原結合部分

50

と非抗体タンパク質を含む融合タンパク質、および親モノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製する方法は、当技術分野で知られており、下でより十分に述べる。

オリゴまたは多糖鎖の「非還元端」という用語は、非還元グリコシル残基を有する鎖の末端部分を意味する。

オリゴまたは多糖鎖の「還元端」という用語は、還元グリコース残基を有する鎖の末端部分を意味する。これは、糖の開鎖アルデヒドまたはケトン形と平衡であり得る鎖の末端である。

【0028】

「薬剤学的に許容できる」という用語は、生物学的にまたは他の点で望まれないことはない物質を意味する。該物質は、望まれない生物学的影響やそれが含まれている医薬組成物の他の成分のいずれかとの有害な態様の相互作用を引き起こすことなく、選択される活性な薬剤成分とともに個人に投与することができる医学的に許容できる品質および組成のものである。

本明細書で用いている「薬剤学的に許容できる賦形剤」という用語は、対象への目的とする化合物の投与のための薬剤学的に許容できる媒体となるあらゆる適切な物質を意味する。「薬剤学的に許容できる賦形剤」は、薬剤学的に許容できる希釈剤、薬剤学的に許容できる添加剤および薬剤学的に許容できる担体と呼ばれる物質を含み得る。

本明細書で同義で用いている「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、コード化および非コード化アミノ酸、化学的または生物学的に修飾されたまたは誘導体化されたアミノ酸、ならびに修飾ペプチド主鎖を有するポリペプチドを含み得る、あらゆる長さのアミノ酸の重合体を意味する。該用語は、異種アミノ酸配列を含む融合タンパク質、N末端メチオニン残基を有するまたは有さない異種および同種リーダー配列を含む融合体、免疫学的に標識されたタンパク質、検出可能な融合パートナーを含む融合タンパク質、例えば、融合パートナーとしての蛍光タンパク質、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等を含む融合タンパク質などを含むが、これらに限定されない融合タンパク質を含む。ポリペプチドは、あらゆるサイズのものであってよく、「ペプチド」という用語は、長さが8～50残基（例えば、8～20残基）であるポリペプチドを意味する。

【0029】

「精製した」という用語は、目的とする化合物が本来はそれに付随する成分から分離され、濃縮された形で提供される状態を意味する。「精製した」は、製造（例えば、化学合成、組換え発現、培地など）中にそれに付随し得る成分から目的とする化合物が分離され富化された形で提供された状態も意味する。一般的に、化合物が、天然で会合している、または製造中に会合している有機分子を含まずに、少なくとも50重量%～60重量%である場合に、化合物は実質的に純粋である。一般的に、製剤は、目的とする化合物が少なくとも75重量%、通常少なくとも90重量%、一般的に少なくとも99重量%である。実質的に純粋な化合物は、例えば、自然源（例えば、細菌）から抽出により、化合物を化学的に合成することにより、または精製と化学修飾の組合せにより得ることができる。実質的に純粋な化合物は、例えば、目的とする抗体に結合する化合物を有するサンプルを濃縮することによっても得ることができる。純度は、適切な方法、例えば、クロマトグラフィー、質量分析、HPLC分析などにより測定することができる。

「SEAM3反応性抗原」という用語は、モノクローナル抗体(mAb) SEAM3 (ATCC寄託番号HB-12170) が特異的に結合するエピトープを有する抗原を意味する。具体例としてのSEAM3反応性抗原は、実施例に記載する。

「重合度」またはDpは、平均的ポリマー鎖における反復単位の数意味する。鎖長は、モノマー単位で、分子量として、または両方で報告することができる。

【0030】

「対象」という用語は、任意の方法でポリシアル酸を含むヒト、哺乳動物および他の動物を含むことを意味する。「対象」、「宿主」、「患者」および「個体」という用語は、診断または治療が望まれるあらゆる哺乳類対象、特にヒトに言及するために本明細書で同

10

20

30

40

50

義で用いられる。他の対象は、ウシ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマなどを含んでよい。

本明細書で記述するがんの治療および診断の状況において、「対象」または「患者」は、がんが脱N-アセチルシアル酸抗原を発現するがん細胞を伴うものである場合に、腫瘍を有する、有することが疑われる、または発現する危険性がある対象に言及するために本明細書で同義で用いられる。そのような対象から得られるサンプルは、本開示の方法において用いるのに同様に適している。

本明細書で用いる「がん細胞」は、例えば、異常な細胞成長、異常な細胞増殖、密度依存性成長阻害の喪失、足場非依存性成長能、免疫無防備非ヒト動物モデルにおける腫瘍成長および／または発生を促進する能力、および／または細胞トランスフォーメーションの適切な指標の1つまたは複数によって特徴づけることができる新生物形成細胞表現型を示す細胞を意味する。「がん細胞」は、本明細書では「腫瘍細胞」と同義で用いることがあり、固形腫瘍、半固形腫瘍、原発腫瘍、転移性腫瘍などのがん細胞を含む。

【0031】

本明細書で用いているように、「決定」、「測定」および「評価」ならびに「分析」という用語は、同義で用い、量的および定性的決定の両方を含む。

特許請求の範囲はあらゆる任意選択または代替要素を排除するように起草することができるがさらに指摘される。したがって、この陳述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連して「単に」、「のみ」などのような限定的な用語の使用、または「消極的な」限定の使用の根拠となることを目的とする。

本明細書で引用するすべての刊行物および特許は、あたかもそれぞれの個別の刊行物または特許が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示され、刊行物が引用されていることに関連して方法および／または材料を開示し、記述するために参照により本明細書に組み込まれているかのように、参照により本明細書に組み込まれている。刊行物の引用は、出願日の前のその開示のためのものであり、本発明が先行特許によってそのような刊行物に先行する資格を与えられないということの承認として解釈すべきでない。さらに、記載されている公表の日付は、独立に確認する必要がある実際の公表日と異なっている可能性がある。参照により本明細書に組み込まれている文書に示されている用語の定義が本明細書で明確に定義されている用語の定義と対立する限りにおいて、本明細書で述べる定義が支配する。

本発明をさらに記述するうえで、方法を最初により詳細に述べた後に、様々な特定の製造方法、方法において使用される可能性がある組成物、製剤、キットなどを概説し、方法および組成物が使用される代表的な適用例について考察する。

【0032】

細胞上の抗原を増加させる方法

上で要約したように、本開示は、哺乳類細胞上の脱N-アセチルシアル酸抗原を増加させる方法を提供する。該方法は、哺乳類細胞に対する抗体の結合の促進、哺乳類細胞に対する抗体の誘発に、ならびにそれを必要とする疾患または状態に罹患している宿主を治療する様々な方法における使用を含むより特定の適用分野に用いることができる（下でより詳細に述べるように）。

特色となる態様は、がん細胞上の抗原を増加させる方法における本開示のポリシアル酸誘導体の使用を含む。この方法は、細胞上の抗原の量を増加させるように、がん細胞を抗原を含む有効な量の組成物と接触させる段階を含む。抗原は、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体である（下でより詳細に述べる）。本方法に用いる特に重要な抗原は、組成物が、脱N-アセチル残基が富化されている非還元端を有するポリシアル酸誘導体が富化されているものである。特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、凝集体である。凝集体は、分子凝集体または顕微鏡的凝集体であってよい。特に重要な凝集体は、顕微鏡的粒子などの粒子である。これは、対応する非凝集誘導体と比較してより容易に細胞に取り込まれ、細胞表面上に発現することができる凝集体を含む。「対応する非凝集

誘導体」とは、参照箇所における凝集体に見いだされる同じ誘導体を意味する。凝集体については、下でより詳細に述べる。

【0033】

関連実施形態において、本方法に用いるポリシアル酸誘導体は、がん細胞の表面上に実質的に完全な抗原として発現するまたは発現することができる。これは、例えば、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を含むポリ α (2 $\rightarrow$ 8) またはポリ α (2 $\rightarrow$ 9) N-アセチルノイラミン酸、ならびに、ひいては脱N-アセチル化シアル酸エピトープを含む抗原を含む。目的とするがん細胞は、神経芽腫、白血病および黒色腫細胞などである。1つの実施形態において、細胞は、ヒトなどの対象に存在し、本開示のポリシアル酸誘導体を含む有効な量の組成物を対象に投与することによって抗原と接触させる。様々な製剤、投与経路および投与方法を下でより詳細に述べる。特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、上で述べ、また下でより詳細に述べるような、凝集体である。

本開示の他の方法は、哺乳類細胞に対する抗体の結合を促進することである。この方法は、細胞に対する抗体の結合を促進するように、上で示したように細胞上の抗原の量を増加させる段階、および次いで、細胞を抗原に対して特異的な抗体と接触させる段階を含む。この態様は、細胞に対する抗体の結合を増加させる、抗体を細胞に結合させて細胞による抗体の取込みを促進する、細胞による抗体の取込みを増加させるなどの種々の実施形態を含む。さらなる実施形態は、細胞に対する抗体の結合が細胞傷害性、すなわち、成長の阻止、アポトーシスの誘発および／または細胞死の誘発などの細胞に対して有毒である実施形態である。特定の実施形態において、抗体は脱N-アセチル化シアル酸エピトープに対して特異的である。この目的に適する抗体の例は、SEAM3である。

【0034】

本開示の方法に用いる抗体は、下でより詳細に述べるような、第1の分子と検出可能な標識、細胞傷害性薬物、免疫原性毒素などの毒素等の1つまたは複数の第2の分子との複合体であってよい。ここで再び、目的とする細胞は、神経芽腫、白血病および黒色腫細胞などのがん細胞が挙げられ、細胞は、*in vitro*または*in vivo*に存在してよい。

例えば、*in vitro*である場合、細胞は、培養細胞株などのような、その正常な環境から単離または分離された形であってよい。細胞が*in vitro*に存在する場合、細胞表面上の抗原の発現を促進するように、有効な量の抗原を細胞に外部から適用することができ、次いで、細胞に対する抗体の結合を促進するように有効な量を用いて抗体を細胞と接触させることができる。*in vitro*での結合が促進される条件は、調節することができ、例えば、様々な細胞培養検定および診断法（例えば、本明細書で述べるフローサイトメトリー、ELISAおよびウェスタンブロット検定など）、アフィニティ精製スキームなどにおいて通常のものであることも認識されるであろう。

*in vivo*である場合、細胞は、ヒトなどの対象に存在し、本開示のポリシアル酸誘導体を含む有効な量の組成物を対象に投与することにより抗原と接触させる。いくつかの実施形態において、抗体との接触も*in vitro*または*in vivo*であってよい。例えば、抗体を対象の細胞に外部から適用する場合、方法は、細胞に対する抗体の結合をもたらすように、有効な量の抗体を対象に投与することを含んでよい。あるいは、抗体は、下で述べるように対象によって誘発されるもの、または外部から適用され、内部で誘発されるという組合せを有し、ひいては、この方法で細胞の表面上の抗原との*in vivo*での接触をもたらすものであってよい。

【0035】

本開示はまた、対象における細胞に対する抗体を誘発する方法を含む。この方法は、対象における細胞による抗原の発現を増大させるように、抗原を含む有効な量の免疫原性組成物を対象に投与する段階を含む。この実施形態は、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体を含む抗原を用いる。この方法の固有の特徴は、上で述べ、また下でより詳細に述べるような、抗原がポリシアル酸誘導体の凝集体である場合である。投与は、細胞に

特異的に結合する対象における抗体の産生を誘発するのに有効である。1つの実施形態において、誘発された抗体の細胞への結合は、細胞傷害性であり、それにより、細胞成長を阻止し、アポトーシスを誘発し、かつ／または細胞死を誘発することがあり得る。一般的に、抗体は、脱N-アセチル化シアル酸エпитープに対して特異的であり、したがって、抗原は、脱N-アセチル化シアル酸エпитープを含む。特定の実施形態において、抗原は、神経芽腫、白血病または黒色腫細胞などのがん細胞の表面上に発現する。

さらなる方法は、がん細胞の生存能を低下させるための方法である。この方法は、がん細胞の生存能を低下させるように、がん細胞を本開示のポリシアル酸誘導体を含む有効な量の組成物と接触させる段階を含む。この実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、還元端および非還元端を有し、実質的に非酸化で、精製されたオリゴ糖である。実質的に非酸化で、精製されたオリゴ糖は、(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物、ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端における脱N-アセチルシアル酸残基を含む。特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体のがん細胞による細胞内取込みは、がん細胞に対して細胞傷害性である。細胞に対して細胞傷害性となる適用するポリシアル酸誘導体の有効な量は、ポリシアル酸誘導体の適用により生ずる抗原に対する抗体を誘発するのに必要とするよりも一般的に高い濃度であり、通常、協力して高分子量の複合体を形成するような、凝集体を形成する濃度である。特に重要な細胞は、神経芽腫、白血病または黒色腫細胞などのがん細胞が挙げられ、細胞は、*in vitro*または*in vivo*に存在してよい。

【0036】

製造方法および組成物

上で要約したように、本開示は、方法に用いるのに適するN-アセチルおよび脱N-アセチル残基を含む分離ポリ α (2 $\rightarrow$ 8) N-アセチルノイラミン酸組成物（すなわち、ノイラミン酸含有ポリシアル酸）を製造する方法を提供する。これは、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体、ならびに脱N-アセチル残基が富化された非還元端をさらに有するもの、ならびにそのようなポリシアル酸誘導体で富化された組成物を含む。本明細書で用いているように、また指定する場合を除いて、「ポリシアル酸」という用語は、 α (2 $\rightarrow$ 8) および α (2 $\rightarrow$ 9) ポリシアル酸を意味する。したがって、例えば、本発明のポリシアル酸誘導体としては、 α (2 $\rightarrow$ 8) または α (2 $\rightarrow$ 9) グリコシド結合を介して本質的に結合したシアルおよびノイラミン酸モノマーのポリマーを含むものが挙げられる。ポリシアル酸の1つまたは複数のシアルおよびノイラミン酸モノマーは、シアルおよび／またはノイラミン酸の部分的または完全にO-アセチル化されたモノマーのような、修飾されているか、または第2の分子に結合したものであってよい。組成物はまた、ポリシアル酸誘導体の凝集体、その上、それらの製造の方法を含む。

【0037】

製造の方法の1つの特徴は、N-プロピオニル基などの非天然部分の結合に一般的に重点を置くアプローチと異なり、様々な細菌およびがん細胞の表面上に独特に発現する抗原と類似する天然N-アセチル（例えば、シアル酸に認められるような）および脱N-アセチル（例えば、ノイラミン酸に認められるような）部分の混合物との誘導体を生成させるために本方法を用いることである。本方法の他の特徴は、本方法がエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体を生成させ、脱N-アセチル基が富化された非還元端を付与するための特定の実施形態に用いることができることである。本方法の他の態様は、ポリシアル酸誘導体の凝集体が対応する非凝集誘導体と比較してより容易に細胞に取り込まれ、細胞表面上に発現することである。本明細書で述べる組成物のこれらの様々な構造特性は、細胞への外部からの適用により認められる、細胞によって容易に取り込まれ、実質的に完全な抗原として細胞表面上に提示されるそれらの能力などの機能特性に独特に変換することができる。例えば、本開示のポリシアル酸誘導体への細胞の体外曝露後の細胞表面上の実質的に完全な抗原の出現は、実施例で例示するような様々な手法により対照との比較のもとで観察された。

特に、分離ポリシアル酸誘導体の製造について本明細書で考慮する特定の方法は、(i) 脱N-アセチル化ポリシアル酸を含む第1の組成物を準備する段階、(ii) 前記脱N-アセチル化ポリシアル酸を再N-アセチル化して、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有する部分的に再アセチル化されたポリシアル酸を含む第2の組成物を得る段階、および次いで(iii) 第2の組成物からエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体を分離する段階を含む。

【0038】

特に重要なポリシアル酸前駆体は、シアル酸のホモポリマー、例えば、コロミン酸などのホモポリマーであり、自然源から、または合成により得ることができる。他の実施形態において、ポリシアル酸前駆体は、髄膜炎菌または大腸菌K1のポリシアル酸、あるいは細菌ポリシアル酸の他の適切な源から得ることができる。したがって、選択する前駆体物質によって、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基を有利に選択することができる。例えば、1つの実施形態において、脱N-アセチル残基は、ノイラミン酸である。他の実施形態において、N-アセチル残基は、シアル酸である。他の実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、ノイラミン酸およびシアル酸のホモポリマーである。他の実施形態において、N-アセチルおよび/または脱N-アセチルノイラミン酸は、天然物質においてC7およびC8がO-アセチル化されている、髄膜炎菌血清グループCのポリシアル酸から得られるポリシアル酸前駆体の場合のように、1つまたは複数の位置においてO-アセチル化されている。この点に関しては、本開示は、最終生成物のアシル化のレベルの調節および、特に脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の所望の混合物を含むポリシアル酸誘導体を生成する能力を提供する。

これは、約10%~30%の脱N-アセチル残基、約70%~90%のN-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体、また場合によって、上記のような約10%~20%の割合の非天然N-アシル誘導体を得るように、ポリシアル酸前駆体を選択する関連実施形態を含む。いくつかの実施形態において、約10%~80%の脱N-アセチル残基、通常約10%~約60%を、また特定の実施形態において、ポリシアル酸鎖当たり約1、2、3、4または5つの脱N-アセチル残基を、また特定の実施形態において、ポリシアル酸鎖当たり約1つの脱N-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体を生成するように、ポリシアル酸前駆体を選択する。本開示はまた、グリコシド結合を介してN-アセチル残基およびN-アセチル基以外のN-アシル化残基から選択される残基に連結されている非還元端脱N-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体を生成するように選択されるポリシアル酸前駆体を含み、前記ポリシアル酸誘導体は、約2~10の重合度を有する、実質的に非酸化で、精製されたオリゴ糖である。

【0039】

関連実施形態において、本開示のポリシアル酸前駆体は、様々な非天然N-アシル基により修飾することもできる。例えば、ポリシアル酸前駆体は、細胞により発現される前駆体物質が脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の所望の混合物ならびに所望の量の非天然N-アシル基を含むような所望の比のマンノサミン誘導体（例えば、N-トリハロアシルマンノサミン）およびアシルマンノサミン（例えば、N-トリハロアセチルおよびN-アセチルマンノサム（mannosame））の混合物を増殖培地に添加した、細胞培養におけるポリシアル酸の生合成の産物であってもよい。例えば、特定の実施形態における前駆体物質は、約10%~30%の脱N-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体を生成するように選択する。他の例は、約10%~80%の脱N-アセチル残基、通常約10%~約60%の脱N-アセチル残基を、また場合によって、ポリシアル酸鎖当たり約1、2、3、4または5つの脱N-アセチル残基を、また特定の実施形態において、ポリシアル酸鎖当たり約1つの脱N-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体を生成するように、前駆体物質を選択する場合である。さらなる例は、グリコシド結合を介してN-アセチル残基およびN-アセチル基以外のN-アシル化残基から選択される残基に連結されている非還元端脱N-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体を生成するように、ポリシアル酸前駆体を選択し、前記ポリシアル酸誘導体は、約2~10の重合度を有する、オリゴシアル

酸を含む、実質的に非酸化で、精製されたマンノサミンである場合である。

該方法の再N-アシル化段階において、部分的再N-アシル化は、化合物の全残基に対して90%より少ない、85%より少ない、84%より少ない、80%より少ない、75%より少ない、70%より少ない、60%より少ない、55%より少ない、通常約10%、約15%、約16%、約20%、約25%、約30%、約40%または約45%のN-アセチル化残基を有するポリシアル酸誘導体の生成を可能にする。この点に関して、該方法は、所望のアシル化のレベルを有するポリシアル酸誘導体を得るように、最終生成物のアシル化のレベルの調節を可能にすることができる。一般的に、再アシル化は、アシル化試薬の量を制限することによって調節または妨げられる。上に示したように、目的とする特定の実施形態は、約10%~30%の脱N-アセチル残基を有するポリシアル酸誘導体である。

10

【0040】

ポリシアル酸誘導体が化合物の全残基（化合物は一般的に少なくとも10個または少なくとも20個の残基を含む）に対して90%より少ない、85%より少ない、84%より少ない、80%より少ない、75%より少ない、70%より少ない、60%より少ない、55%より少ないアミン保護残基、通常約10%、約15%、約16%、約20%、約25%、約30%、約40%または約45%のアミン保護残基（例えば、N-トリハロアシル化残基）を含むような所望の比のアミン保護基およびアシル基（例えば、トリハロアセチルおよびアセチル基）の混合物を用いた再N-アシル化を含む他のアプローチも可能である。この点に関して、本開示は、所望のアシル化のレベルを有するポリシアル酸誘導体を得るように、アミン保護基の除去の後の最終生成物のアシル化のレベルの調節を可能にし、遊離アミノ基による望まれない副反応を回避することを可能にする。アミン保護の除去により、脱保護残基における遊離アミンが生ずる。一般的に、脱N-アセチル残基の割合は、アミン保護試薬の量（例えば、トリハロアシル化試薬の量）を制限することにより調節される。ここで再び、特に重要な1つの実施形態は、脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の所望の混合物ならびに上で示したような所望の量の非天然N-アシル基を含むオリゴシアル酸誘導体の生成である。CMP-N-アシル化シアル酸類似体およびシアリルトランスフェラーゼも半合成アプローチに用いることができる（例えば、Wakarchukら（2008年）Glycobiology、18巻、177頁）。

20

特定の実施形態において、製造の方法の第1の組成物は、前駆体を脱N-アセチル化するのに適する条件下で、ポリシアル酸前駆体を強塩基（例えば、水酸化ナトリウム）による後続処理で、強還元剤（例えば、水素化ホウ素ナトリウム）で処理することによって得られる。強還元剤により還元端を非反応性アルコール形に変換し、続いて、強塩基による処理によりポリマーを脱N-アセチル化する。

30

【0041】

次いで、副生成物、副反応物などから所望の物質を分離するように、反応混合物を標準的方法（例えば、水中透析およびイオン交換後の凍結乾燥）により精製することができる。例えば、キャラクタリゼーションおよびリリース目的などのために、物質の品質およびポリシアル酸生成物中のシアル酸および脱N-アセチルシアル酸の量をこの時点に測定し（例えば、実施例で述べるようなレゾルシノール定量法により）、かつ／または下で述べるような、取り込まれ、細胞の表面上で抗原として発現するその能力について試験することができる。

40

エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるオリゴシアル酸誘導体の分離と組み合わせるとき、生成物は、所望の物質で富化され、細胞の表面上の抗原の含量を増加させるのに特によく適する。この方法により生成する特に重要な組成物は、脱N-アセチル残基が富化され、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端を有する分離ポリシアル酸誘導体ならびに脱N-アセチル残基が富化されている非還元端を有するポリシアル酸誘導体の混合物で富化されている組成物を含む。

例えば、第2の組成物からエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体を分離する製造の方法の段階は、一般的に部分的再アセチル化ポリシ

50

ル酸をエキソノイラミニダーゼに曝露し、次いで、所望のポリシアル酸誘導体を精製する段階を含む。特に重要なエキソノイラミニダーゼは、アルトロバクター・ウレアファシエンス (*Arthrobacter ureafaciens*) (SIALIDASE A (商標)、Prozyme、Hayward、CA) からのエキソシアリダーゼである。この点に関して、エキソノイラミニダーゼ (エキソシアリダーゼ) は、脱N-アセチルシアル酸残基を有する非還元端で終わるポリシアル酸 (すなわち、ノイラミン酸) または他の方法で化学的にブロックされたものを分解することはできない。したがって、ポリマー全体に位置する脱N-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体の製剤のエキソノイラミニダーゼによる消化では、エキソノイラミニダーゼが脱N-アセチル残基に遭遇するときを除いて、ポリシアル酸が分解される。その箇所では、ポリマーのさらなる分解は起こらない。また、分解されないポリシアル酸分子は、非還元端に脱N-アセチルシアル酸残基を有すると考えられる。あるいは、所望の物質は、末端ノイラミン酸残基などのエキソノイラミニダーゼによる分解が阻止される末端の非還元端に対して選択される条件下での誘導体の標準的精製により分離することができる。

【0042】

したがって、特定の実施形態において、製造の方法は、この目的のために適切な前駆体物質からエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある所望のポリシアル酸誘導体を直接生成させるのに用いることができる。この方法は、(i) N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有するポリシアル酸誘導体を含む第1の組成物をエキソノイラミニダーゼで処理する段階、および (ii) 第1の組成物から前記エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体を分離する段階を含む。前駆体物質を適切に選択し、かつ／またはN-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を含むように調製し、次いで、再アセチル化、アルデヒドおよびケトン副反応、望まれない架橋などの望まれない副反応ならびにエキソノイラミニダーゼ分解を受けやすい、あるいは物質の所望の特性を別の仕方に変化させるモノマーおよび中間体などの広範囲の他の望まれない混入物を避けるように、所望の生成物を精製し、分解生成物から分離する場合に、この方法は特に適している。この方法で、分離ポリシアル酸誘導体の比活性を非精製物質と比べて増大させることができ、細胞に外部から適用するときに細胞の表面の抗原の発現の増大などのより高い比活性の利点を活用することができる。「比活性」とは、外部から適用したポリシアル酸誘導体の単位量 (例えば、マイクログラム) 当たり所定の条件下で所定の時間に細胞の表面上に生成した抗原の量を意味するか、またはポリシアル酸誘導体の外部からの投与後に単位時間当たり消失したポリシアル酸誘導体 (または生成した生成物) の濃度と計算される。

特定の実施形態において、脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体の比活性は、エキソノイラミニダーゼ分解を受けやすいポリシアル酸より大きい。他の実施形態において、脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体の比活性は、非還元端再N-アセチル残基が富化されていないポリシアル酸より大きい。さらに他の実施形態において、脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸誘導体の比活性は、エキソノイラミニダーゼ分解を受けやすく、非還元端再N-アセチル残基が富化されていないポリシアル酸より大きい。理解できるように、本方法により製造される組成物は、特に相対的取込みおよび実質的に完全な抗原として細胞表面上のポリシアル酸抗原の提示に関して、他の誘導体について以前に観測されたより大きい比活性を有するポリシアル酸誘導体を生成する。

【0043】

他の特定の実施形態において、本開示の組成物は、(i) それぞれが異なる重合度、N-アセチル残基および脱N-アセチル残基の異なる混合物ならびに非還元端N-アセチルシアル酸残基を有するポリシアル酸誘導体の混合物を含む溶液を準備する段階、(ii) 溶液をイオン交換クロマトグラフィーにかけて画分を発生させる段階、および (iii)

1つまたは複数の画分から規定の重合度およびエキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を有するポリシアル酸誘導体を分離する段階により製造することができる。特定の態様において、ポリシアル酸誘導体の混合物は、非還元端N-アセチル基を有するポリシアル酸分子をさらに含む。いくつかの実施形態において、個々の画分における規定の重合度を有するポリシアル酸誘導体を分離するか、あるいは重要な所望の活性を有するポリシアル酸誘導体を含む選択される画分をプールすることにより、画分のプールを形成させる。特に重要なものとして挙げられるのは、本明細書で開示するイオン交換法により製造する分離ポリシアル酸誘導体であり、該分離ポリシアル酸誘導体は、(i) 約2~約10から選択される範囲内の重合度を有し、(ii) 分離ポリシアル酸誘導体を水溶液中の細胞に約0.01mM~約15mM、通常約0.5mM 10 ~約10mMの濃度で細胞外で適用するときにはジャークットT細胞白血病細胞の生存能を少なくとも約20%低下させるものであり、ここで生存能の低下は、誘導体に細胞外で曝露しない対照ジャークットT細胞白血病細胞を基準とするものである。

特定の実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーを約6.5~約10.0のpH範囲で行う。特定の実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーは、陰イオン交換クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、高pH陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAC)である。特定の実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、DEAE、TMAE、QAEまたはPEIを用いる。他の実施形態において、陰イオン交換クロマトグラフィーは、Toyopearl SuperQ650M、MonoQ、SourceQまたはFractogel 20 TMAEを用いる。重要な特定のイオン交換クロマトグラフィー法は、Q Sepharose (商標) Fast Flow (強陰イオン)、SP Sepharose (商標) Fast Flow (強陽イオン)、CM Sepharose (商標) Fast Flow (弱陽イオン)、DEAE Sepharose (商標) Fast Flow (弱陰イオン) および ANX Sepharose (商標) 4 Fast Flow (high sub) (弱陰イオン) (例えば、GE Healthcare Bio-Sciences Corp.、Piscataway、NJから入手可能) などの樹脂を用いる。特に重要なものとして挙げられるものは、Q Sepharose (商標) Fast Flowなどの強陰イオン交換体である。そのようなイオン交換カラムおよびシステム用のサンプル/ローディング緩衝および溶出系は、一般的に目的とする個々の化合物の分離 30 を分解するために選択する。

【0044】

Q Sepharose (商標) Fast Flow陰イオン交換樹脂用の一般的な緩衝系の例は、20mM ビスートリス緩衝液、pH8のサンプル/ローディング緩衝系、およびカラムの寸法などに応じて異なる流速で溶出させることができる20mM ビスートリス緩衝液中塩化ナトリウムの0M~0.2M勾配からなる溶出緩衝系である。目的とする脱N-アセチルおよびN-アセチルシアル酸材料を含むイオン交換画分は、パルスアンペロメトリー検出による高pH陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAC-PAD)により高感度で分析することができる(例えば、Townsend R. R.、(1995年)、Analysis of glycoconjugates using high-pH anion-exchange chromatography、J. Chromatog. Library、58巻、181~209頁、およびManzira、(1990年)、HPLC of sialic acids on a pellicular resin anion exchange column with pulsed amperometry、Anal. Biochem.、188巻、20~32頁)。分離された物質は、ゲルパーミエーション、サイズ排除、RP-HPLCなどの1つまたは複数の直交クロマトグラフィー技術によりさらに精製することができる。所望の場合、分離ポリシアル酸材料は、透析、凍結乾燥、晶出、製剤化などのような1つまたは複数のさらなる調製段階に供することができる。

上述のイオン交換および精製法は、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を

10

20

30

40

50

有するポリシアル酸誘導体を含む第1の組成物をエキソノイラミニダーゼで処理することによって生成するポリシアル酸誘導体の混合物について行うことができる。該方法は、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある部分的再アセチル化ポリシアル酸を含む第2の組成物を生成させるために、N-アセチル化ポリシアル酸を含む第1の組成物を再アセチル化することによって生成するような再アセチル化ポリシアル酸誘導体の混合物についても実施することができる。

【0045】

重要な特定の実施形態において、上述のイオン交換および精製法は、イオン交換精製に供する最初の材料中の副生成物を少なくするように、実質的に非酸化で、定義されている分離ポリシアル酸誘導体の製造および精製に適用される。例えば、ポリシアル酸の望まれない酸化は、イオン交換クロマトグラフィーにより分割し、所望の材料から分離することが困難であり得る複数の重複分解および副反応生成物を発生させる。したがって、「実質的に非酸化」は、ポリシアル酸誘導体が、正常な異性体または互変異性体平衡を除いて、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満の酸化サッカリド残基を、また通常約80%、約85%、約90%、約95%またはそれ以上の非酸化サッカリド残基を含むことを意味する。特に重要なものとして挙げられるものは、少数の副反応生成物を含む初期の生成物を発生させ、定義された長さのより小さいポリシアル酸誘導体および組成物の精製を容易にする総化学合成法である。

特定の実施形態において、実質的に非酸化で、定義されているポリシアル酸誘導体は、目的とするポリシアル酸前駆体物質の時間制御脱N-アセチル化および／または非酸化酸加水分解により生成させる。特色とする態様は、実質的に非酸化で、定義されているポリシアル酸誘導体の生成のための化学合成法であり、該方法は、(i)時間制御アルカリ加水分解の抑制により調製した部分的脱N-アセチル化ポリシアル酸の非酸化酸加水分解、または(ii)時間制御アルカリ加水分解の抑制およびその後の非酸化酸加水分解によるポリシアル酸の部分脱N-アセチル化を含む。

【0046】

時間制御アルカリ加水分解によるポリシアル酸の部分脱N-アセチル化は、(i)前駆体を部分的に脱N-アセチル化するのに適する条件下でポリシアル酸前駆体を強塩基中で強還元剤で処理する段階を含み、処理は、ポリシアル酸の部分脱N-アセチル化の、分解が最小限の生成物を得るのに有効な期間にわたるものである。特定の実施形態において、処理期間は、約1時間またはそれ未満であり、一般的に、約10~50分、15~45分、20~40分の範囲などの1分きぎみの約5~55分の範囲にあり、通常約40分である。したがって、反応時間は、生成物の分解が最小限で、イオン交換クロマトグラフィーにより分離できる部分的脱N-アセチル化ポリシアル酸の所望の画分が得られるように選択することができる。この方法に適する強還元剤の例は、水素化ホウ素ナトリウム、シアノゲン水素化ホウ素ナトリウムなどである(すなわち、ほぼ強さの昇順がシアノゲン水素化ホウ素ナトリウム~トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム、トリセーブチル水素化ホウ素リチウムおよび水素化アルミニウムリチウムなどの電子を容易に失う(または供与する)試薬)。適切な強塩基の例は、水酸化ナトリウムである(すなわち、溶液のpHが14まで上昇するとき完全に加水分解する塩基であり、したがって、ほぼ強さの昇順が水酸化カリウム、水酸化バリウム、水酸化セシウム、水酸化ナトリウム、水酸化ストロンチウム、水酸化カルシウム、水酸化リチウムおよび水酸化ルビジウムなどの約13を超えるpKaを有する塩基)。反応は、適切な温度、通常約70℃~120℃、約80℃~110℃、より一般的に約90℃~100℃を選択することによっても促進することができる。そのように、アルカリ脱N-アセチル化は、ポリマー前駆体全体にわたる規定された量の脱N-アセチルシアル酸残基を含む脱N-アセチルポリシアル酸を得るため、また最小限の重複分解生成物を含む分離した画分を得るために種々の反応時間にわたり行わせることができる。さらに、時間制御部分アルカリ脱N-アセチル化法により、所望の量の脱N-アセチル残基、例えば、約25%~60%の脱N-ア

セチル残基を含むポリシアル酸誘導体を得ることができる。

【0047】

ポリシアル酸における脱N-アセチルシアル酸残基の還元端におけるグリコシド結合は加水分解に対して抵抗性があるが、該残基の非還元端における結合は抵抗性がないので、非還元端における脱N-アセチルシアル酸を含む鎖の画分を増加させるために、非酸化酸加水分解を行わせることができる。さらに、そのような非酸化条件下で酸加水分解反応を行うことによって、強酸または高濃度（10%）の酢酸の存在下で起こり得る多糖の酸化的損傷を最小限にすることができる。さらに、非酸化酸加水分解は、非還元端において脱N-アセチルシアル酸残基が富化されたより小さいオリゴシアル酸（またはオリゴ糖）誘導体の生成を促進する。この態様は、（i）ポリシアル酸前駆体または部分的脱N-アセチル化ポリシアル酸をポリシアル酸のグリコシド結合を選択的に加水分解できる酸性条件下で曝露する段階を含み、酸性条件は、溶存ガスを排気した（例えば、真空中で溶液を交互に凍結・解凍することにより）緩衝液などである。反応溶液の酸化環境をさらに低減するために、抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャーを反応混合物に加えてもよい。非酸化条件に加えて、酸性緩衝系は、一般的に酸を用いるポリシアル酸加水分解反応に適するもの、例えば、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.5などである。酸性条件のさらなる例としては、塩酸（例えば、20mM HCl）およびトリフルオロ酢酸（例えば、0.1M TFA）などがある。非酸化酸加水分解反応は、通常、約1~30時間、5~25時間、10~20時間、一般的に約15~18時間である、所定の最終用途に対する異なる期間行わせることができる。反応の制御の助けとするために反応温度を調節することもできる。適切な温度範囲の例は、約40℃~90℃、通常約50℃~70℃の温度範囲のような約25℃またはそれ以上である。そのように、非酸化酸加水分解法は、非還元端脱N-アセチル残基、および例えば、約2~20、通常約2~10の規定の重合度を有する生成物などの所望の重合度を有する長さがより短いポリシアル酸誘導体を得るのによく適している。

【0048】

したがって、本方法により製造される製品は、処理され、実質的に完全な抗原として細胞の表面上に提示される能力を付与するのに有用な特定の特徴を含む。これらの特徴の主なものは、上で示したように、脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の混合物を有し、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある分離ポリマーが富化された分離ポリマーまたは組成物である。したがって、抗原の提示を改善することができる1つの特徴には、材料自体の純度が含まれる。例えば、特定の実施形態において、本開示の製造方法の分離段階は、混入物が実質的になく、したがって、非富化対照と比較して所望の誘導体に富む製品を生成させることができる。これは、望ましい特性または要素の割合が高いポリシアル酸誘導体を含む。例えば、所望のポリシアル酸誘導体の分離は、目的とするポリシアル酸が所望の物質の大部分（例えば、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%を超えるまたは100%までのより大きい割合）である場合である。鎖の大部分がそれぞれ個別に脱N-アセチルおよびN-アセチル残基の混合物を含み、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性があり、また混合物がこれらの特徴および、例えば、非還元端における脱N-アセチル化残基（すなわち、非還元端脱N-アセチルシアル酸残基）を含む、脱N-アセチル残基が富化された非還元端を有するというさらなる特徴があるならば、これはもちろん、可変鎖長を有するポリシアル酸誘導体の混合物を含む。

再び、個別のアプローチによって、1つまたは複数の脱N-アセチル残基を有する非還元端、末端脱N-アセチル残基などの様々な有用な構造および関連機能特性を有するポリシアル酸誘導体を生成させることができる。上で述べたように、特に重要な脱N-アセチル残基は、ノイラミン酸であり、したがって、非還元端の末端は、ノイラミン酸であり得る。また上で述べたように、該方法は、非還元端が脱N-アセチル残基で富化されたポリシアル酸誘導体、ならびにノイラミンおよびシアル酸などのホモポリマーを製造するのに用いることができる。ポリシアル酸誘導体はまた、約10%~30%の脱N-アセチル残

基、あるいは特定の実施形態において、約10%～80%の脱N-アセチル残基、また一般的に、約10%～70%、約25%～65%、約40%～60%、約50%の収束までの脱N-アセチル残基、ならびに可変長のポリシアル酸誘導体鎖の混合物を含むポリシアル酸誘導体を含むように製造することができる。特定の実施形態において、本製造の方法は、ポリシアル酸誘導体鎖当たり約1、2、3、4または5つの脱N-アセチル残基を、また特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体鎖当たり約1つの脱N-アセチル残基を有するポリシアル酸を生成させるのに適している。さらに、本開示の製造方法は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21の重合度などの、約2～約20の重合度を有するオリゴシアル酸誘導体などの、特に短いポリシアル酸誘導体を得るために、規定の重合度を有するポリシアル酸誘導体を得るのに用いることができる。本開示の組成物は、これらの特徴を有するポリシアル酸誘導体を含む。

10

【0049】

特に重要な組成物は、実質的に非酸化であり、(i) N-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸残基の混合物、ならびに(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある非還元端脱N-アセチル残基を含む分離ポリシアル酸誘導体を含み、組成物は、非還元端N-アセチルシアル酸残基を有するポリシアル酸を実質的に含まない。組成物は「非還元端N-アセチルシアル酸残基を有するポリシアル酸を実質的に含まない」とは、約20%未満、約15%未満、約10%未満または約5%未満の非還元端N-アセチルシアル酸残基を、また通常、約80%、約85%、約90%、約95%またはより多い非還元端脱N-アセチル残基を含む組成物を意味する。

20

いくつかの実施例において、組成物の分離ポリシアル酸誘導体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20および21から選択される重合度などの約2～20の重合度を有する。特定の実施形態において、組成物の分離ポリシアル酸誘導体は、約2～10、約2～9、約2～8、約2～7、約2～6、約2～5、約2～4、約2～3または約2の重合度を有する。これは、重合度が約3～5、約3～6、約3～7、約3～8、約4～6、約4～8または約4～10の範囲にある特定の実施形態を含む。

【0050】

本明細書で開示する組成物の分離ポリシアル酸誘導体は、一般的に約10%～80%の脱N-アセチル残基、通常約10%～約60%の脱N-アセチル残基を、また場合によってポリシアル酸鎖当たり約1、2、3、4または5つの脱N-アセチル残基を、また特定の実施形態において、ポリシアル酸鎖当たり約1つの脱N-アセチル残基を含む。さらなる例は、グリコシド結合を介してN-アセチル残基およびN-アセチル基以外のN-アシル化残基から選択される残基に連結されている非還元端脱N-アセチル残基を含むことができる組成物の分離ポリシアル酸誘導体であり、ここで、ポリシアル酸誘導体は、実質的に非酸化で、精製されている。特に重要なものとして挙げられるのは、(i) 約2～約10から選択される範囲内の重合度を有し、(ii) 分離ポリシアル酸誘導体を水溶液中の細胞に約0.01 mM～約15 mM、通常約0.5 mM～約10 mMの濃度で細胞外で適用するときにジャーカットT細胞白血病細胞の生存能を少なくとも約20%低下させる分離ポリシアル酸誘導体を有する組成物であり、ここで生存能の低下は、誘導体に細胞外で曝露しない対照ジャーカットT細胞白血病細胞を基準とするものである。

30

40

【0051】

特定の実施形態において、該組成物の分離ポリシアル酸誘導体は、 α (2→8) および α (2→9) から選択されるグルコシド結合により連結された脱N-アセチルシアル酸およびN-アセチルシアル酸の少なくとも1つの二量体を含むことができる。該組成物の態様は、非還元端脱N-アセチルシアル酸残基がグリコシド結合を介してN-アセチルシアル酸残基に連結している、ポリシアル酸誘導体を含む。特色とする態様は、脱N-アセチルシアル酸がノイラミン酸であり、N-アセチルシアル酸がN-アセチルノイラミン酸である場合である。関連実施形態は、ノイラミン酸およびN-アセチルノイラミン酸残基の少

50

なくとも1つが少なくとも1つのO-アセチル化基を含む場合である。目的とする特定の
実施形態において、分離ポリシアル酸誘導体は、大腸菌K1、大腸菌K92、髄膜炎菌血
清グループB、髄膜炎菌血清グループC、軟性下痢菌 (*Haemophilus duc*
reyi)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejun*
i)、モラクセラ・カタラリス (*Moraxella catarrhalis*)、スト
レプトコッカス・アルガラクチエ (*Streptococcus algalactia*
e) およびパスツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*e)
から選択される細菌の莢膜多糖ホモポリマーから得られる。適するポリシアル酸材料をさ
らに用いることができる (Troy F.、*Sialobiology and the*
Polysialic Acid Glycotype: Occurrence, St
ructure, Function, Synthesis, and Glycopath
ology、4章、95~133頁、*In Biology of Sialic Ac*
ids、Abraham Rosenberg編、Springer、1995年)。
化合物の凝集体、および前記のものを含む組成物も重要である。

【0052】

他の実施形態は、1つまたは複数のポリシアル酸誘導体の凝集体を含む組成物を製造す
る方法、ならびに該方法により製造される組成物である。この方法は、凝集体を形成する
ように、ポリシアル酸誘導体を凝集条件に曝露する段階を含む。このように、上述の製造
の方法は、分離ポリシアル酸誘導体の凝集体を形成する段階をさらに含んでいてよい。凝
集条件の例としては、加熱、凝集を促進する賦形剤の添加などが挙げられる。

「凝集体」とは、分子の個々のモノマーの凝集複合体を含み、複合体の個々のモノマー
の分子量の倍数である複合分子量を有する粒子を意味する。例えば、ポリシアル酸誘導体
の1つまたは複数のモノマーの凝集体は、凝集モノマー複合体中の個々のモノマーの分子
量の10倍以上の粒子分子量を有する凝集複合体を含む。これは、約50000以上、約
250000ダルトン以上まで、500000ダルトン以上まで、750000ダルトン
以上まで、1000000ダルトン以上までの、例えば、標準的低倍率光学顕微鏡下 (例
えば、40倍) での光学顕微鏡観察により容易に見ることができる均一粒径を有する粒子
に至るまでの分子量を有する粒子を有する凝集体を含む。

したがって、凝集体は、分子または顕微鏡的粒子であってよい。顕微鏡的粒子の場合、
最適な凝集体は、例えば、1 μm ~20 μm 、通常、目的とする物質の曝露および取込み
のための標的とする細胞の直径に近い、それより小さい (例えば、細胞は直径が約1~
20 μm である)、平均凝集体径を変化させることによって選択することができる。非可
視分子粒子ならびに顕微鏡的粒子の場合、望ましい凝集体は、細胞による取込みおよびイ
ンターナライゼーションを測定することによって選択することができる。各場合に、ポリシ
アル酸誘導体の凝集体は、互いに、対照とおよび/または両方と比較したとき、非凝集誘
導体より十分に細胞によって取り込まれ、インターナライズされることができる。

【0053】

上で示したように、凝集体は、1つまたは複数のポリシアル酸誘導体の非凝集体を凝集
条件下で混合することにより、ポリシアル酸誘導体を凝集条件下で部分的に分解または部
分的に加水分解することにより、凝集賦形剤を用いてポリシアル酸誘導体の凝集体を形成
させることにより、あるいはその組合せにより、形成させることができる。「凝集条件」
とは、さもなければ可溶性の物質に溶液中で凝集物質を形成させる化学的物理的条件を意
味する。例えば、ポリシアル酸誘導体は、凝集体を形成するように、適切な時間 (例えば
、1時間から一夜) にわたって加熱することができる (例えば、30℃~70℃)。一般
的に、温度および曝露時間は、凝集体の所望の活性を消失させないと同時に、微生物の増
殖を低減または阻害する (例えば、汚染の可能性を低減する) ように選択する。

他の実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、ノイラミン酸などの脱N-アセチル残
基である非還元端を含み、凝集体は、誘導体を凝集条件に曝露することによって形成され
る。エキソノイラミニダーゼによる処理により、加熱するとき凝集して細胞により容易に
取り込まれる粒子を形成する非還元端脱N-アセチル残基が富化される。これは、非誘導

体化ポリシアル酸ならびに誘導体化ポリシアル酸を含むシアル酸の他のポリマーにも当てはまる。したがって、本開示はまた、ポリシアル酸またはポリシアル酸誘導体の凝集体を製造する方法を提供する。この方法は、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のあるポリシアル酸または非還元端を有するポリシアル酸誘導体を得るように、ポリシアル酸またはポリシアル酸誘導体をエキソノイラミニダーゼで処理する段階、エキソノイラミニダーゼ処理物質を凝集条件に曝露する段階、ならびに凝集体を分離する段階を含む。

【0054】

上で示したように、本開示の凝集体は、誘導体の凝集を促進することができる1つまたは複数の賦形剤の添加により形成されるポリシアル酸誘導体の凝集体も含む。特に重要なものとして挙げられるのは、水酸化アルミニウムなどの凝集を促進することができる物質である。

したがって、特に重要な組成物は、次の特性の1つまたは複数、また特定の実施形態においてすべてを有するポリマー鎖を含むポリシアル酸誘導体が富化されたものである。(i) N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物、(ii) エキソノイラミニダーゼによる分解に対する抵抗性、(iii) その中に存する1つまたは複数の脱N-アセチル残基を有する非還元端、(iv) それ自体が脱N-アセチル残基に富む非還元端、ならびに(v) 脱N-アセチル残基である末端非還元端。特に重要な組成物は、個別のポリシアル酸誘導体または異なるポリシアル酸誘導体の混合物の凝集体を含み、例えば、適切な対照と比較して細胞表面上に存在するポリシアル酸誘導体の量により評価される、対応する非凝集誘導体よりも良好に細胞により取り込まれ、細胞表面上に発現することができるポリシアル酸誘導体の凝集体を含むものである。

したがって、本開示の組成物は、本明細書で述べる方法のいずれかにより製造される分離ポリシアル酸誘導体を含むことができる。特に重要なものとして挙げられるのは、N-アセチルおよび脱N-アセチル残基の混合物を含み、エキソノイラミニダーゼによる分解に対して抵抗性のある分離ポリシアル酸誘導体を含む組成物、ならびにその中に存する1つまたは複数の脱N-アセチル残基を有する非還元端を有するポリシアル酸誘導体を含む組成物である。上でも示したように、目的とする他の組成物は、ポリシアル酸誘導体が脱N-アセチル残基が富化された非還元端を有するものである。

【0055】

目的とするさらなる組成物としては以下のものが挙げられる。1つの実施形態は、ポリシアル酸誘導体が可変長のポリシアル酸誘導体鎖の混合物を含む組成物である。他の実施形態において、組成物は、約10%~30%の脱N-アセチル残基を含むポリシアル酸誘導体を含む。目的とするさらなる組成物は、ノイラミン酸およびシアル酸のホモポリマーであるポリシアル酸誘導体を含む。特定の実施形態において、ノイラミン酸およびシアル酸のホモポリマーは、シアル酸の脱アセチル化ホモポリマーの部分的再アセチル化により製造される。これらの例において、目的のシアル酸の特定ホモポリマーは、コロミン酸(すなわち、髄膜炎菌血清グループBから得られる莢膜多糖)である。他の実施形態において、シアル酸のホモポリマーは、髄膜炎菌血清グループCの莢膜多糖から得られる。

上で示したように、ポリシアル酸誘導体の結合体は重要であり、したがって、本明細書で開示した製造方法は、第2の分子を結合する段階をさらに含んでよい。この態様において、分離ポリシアル酸誘導体を、保護基、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、脂質、炭水化物、核酸、検出可能な標識などの第2の分子に結合させる。他の分子に結合しているポリシアル酸誘導体の利点は、さらなる所望の特性を付与するために結合体の第2の分子の特性を利用すると同時に所望の活性を保持することができることなどである。例えば、ポリシアル酸誘導体は、溶解性、保存もしくは他の取扱特性、細胞透過性、半減期、特定の細胞(例えば、ニューロン、白血球など)または細胞位置(例えば、リソソーム、エンドソーム、ミトコンドリアなど)、組織もしくは他の身体位置(例えば、血液、神経組織、特定の臓器など)を標的とすることなどによる調節因子の放出および/または分布の助けとなるペプチド、ポリペプチド、脂質、炭水化物などの第2の分子に結合させるこ

10

20

30

40

50

とができる。他の例は、分析、追跡などのための色素、発蛍光団もしくは他の検出可能な標識またはリポーター分子の結合などである。より具体的には、本明細書で述べるポリシアル酸誘導体は、N-ラウロイル、N-オレオイルなどのN-脂肪アシル基、ドデシルアミン、オレオイルアミンなどの脂肪アミンなどを含む脂質部分の結合（例えば、米国特許第6,638,513号を参照）のような、ペプチド、ポリペプチド、色素、発蛍光団、核酸、炭水化物、脂質などの第2の分子に結合させることができる（例えば、還元または非還元端において）。

【0056】

結合体の他の特徴としては、結合体は、非結合型（*unconjugated*）ポリシアル酸誘導体と比べて毒性を低減させることなどを挙げることができる。さらなる実施形態において、結合体は、非結合型物質と比べてがん細胞を標的にする。さらなる例は、補完し、増強し、増大させ、または他の仕方でポリシアル酸誘導体とともに相乗作用的に働くことができる1つまたは複数の分子とポリシアル酸誘導体の結合体を含む。例えば、ポリシアル酸誘導体は、腫瘍の殺滅または除去をさらに促進するためにがん細胞の部位への送達のための結合した抗がん薬、例えば、抗増殖部分（例えば、VEGFアンタゴニスト、例えば、抗VEGF抗体）、毒素（例えば、抗がん毒素、例えば、リシン、シュードモナス外毒素Aなど）、放射性核種（例えば、⁹⁰Y、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、ホウ素中性子捕獲用¹⁰Bなど）、抗がん薬（例えば、ドキソルビシン、カリケアマイシン、マイタンシノイドDM1、オーリスタチン・カウペシタビン、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、イリノテルカンなど）を場合によって含むことができ、かつ／または薬物動態プロファイルの改善をもたらすために場合によって修飾することができる（例えば、ペグ化（*PEGylation*）、高グリコシル化などにより）。

結合体はまた、上で示したように、1つまたは複数の再N-アシル化残基を有するポリシアル酸誘導体を含む。例えば、特に重要な再N-アシル化残基は、アミノ保護基を含む。具体例としてのアミノ保護基は、カルバメート、アミド、N-アルキルおよびN-アリールアミン、イミン誘導体、エナミン誘導体、N-スルホニルなどを含むが、これらに必ずしも限定されない。さらなる具体例としてのアミノ保護基は、ホルミル、トリフルオロアセチル、フタリルおよびp-トルエンスルホニルなどのアシル型、ベンジルオキシカルボニル（*Cbz*）および置換ベンジルオキシカルボニル、1-（p-ビフェニル）-1-メチルエトキシカルボニルおよび9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（*Fmoc*）などの芳香族カルバメート型、*tert*-ブチルオキシカルボニル（*tBoc*）、エトキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニルおよびアリルオキシカルボニルなどの脂肪族カルバメート型、シクロペンチルオキシカルボニルおよびアダマンチルオキシカルボニルなどの環状アルキルカルバメート型、トリフェニルメチルおよびベンジルなどのアルキル型、トリメチルシランなどのトリアルキルシラン、ならびにフェニルチオカルボニルおよびジチアスクシノイルなどのチオール含有型を含むが、これらに必ずしも限定されない。アミノ保護基および保護アミン基は、例えば、C. B. ReeseおよびE. Haslam、「*Protective Groups in Organic Chemistry*」、J. G. W. McOmie編、Plenum Press、New York、N. Y.、1973年、それぞれ3および4章、ならびにT. W. GreeneおよびP. G. M. Wuts、「*Protective Groups in Organic Synthesis*」、第2版、John Wiley and Sons、New York、N. Y.、1991年、2および3章に記載されている。

【0057】

目的とする特定の実施形態は、第2の分子が免疫調節剤である場合である。「免疫調節剤」とは、免疫応答を直接的または間接的に変化させる分子を意味する。免疫調節剤の特定のクラスは、免疫応答を刺激またはその刺激を補助するものを含む。例としては、抗原ならびに毒素または破傷風トキソイドなどのその誘導体などの抗原担体などが挙げられる。他の実施形態は、1つまたは複数の免疫原性賦形剤を含むポリシアル酸誘導体組成物を含む。この実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、複合体化されていてよく、あるい

10

20

30

40

50

はされていなくてよい。他の例は、本開示のポリシアル酸誘導体を含むワクチン、抗がん治療剤として使用するための医薬組成物、ならびに抗体の産生のための該誘導体の使用などを含む。

したがって、本明細書で開示した非結合型および結合型ポリシアル酸誘導体は、多くの用途を有する。例えば、本開示のポリシアル酸誘導体は、脱N-アセチル化シアル酸（d e N A c S A）エピトープを有する対象におけるがん細胞の成長を阻害することなどの対象の治療のために様々な形で活用することができる細胞の表面上の抗原を生成させるのに用いることができる。「d e N A c S Aエピトープ」とは、（i）1つまたは複数の残基が脱N-アセチルノイラミン酸残基であるポリシアル酸に対する抗体との最大交差反応性を有し、（i i）特に非がん哺乳類細胞、例えばヒト細胞表面上に提示されたとき、正常ポリシアル酸に対する抗体との最小ないし無交差反応性を有する分子を意味する。したがって、最小のd e N A c S Aエピトープは、1つまたは両残基がC 5アミノ位置に遊離アミンを含むシアル酸残基の二糖であり、2つの残基のうちの1つが脱N-アセチル化されている場合、第2の残基はN-アセチル基を有する（しかし、いくつかの実施形態において、N-プロピオニル基でない）。この最小エピトープを定義する二糖単位は、還元端、非還元端、またはシアル酸残基のポリマー内（例えば、多糖内）にあってよい。特に重要なd e N A c S Aエピトープは、1つの残基がC 5アミノ位置に遊離アミンを含み（すなわち、脱N-アセチルシアル酸残基）、第2の残基がN-アセチル基を含む（すなわち、N-アセチルシアル酸残基）シアル酸残基の二糖であり、二糖の脱N-アセチルシアル酸残基が非還元端に存在する。

脱N-アセチル化残基は、N-アシル化残基を含むP S Aとの関連において、免疫原性であり、d e N A c S Aエピトープと反応性である抗体を誘発するが、ヒトP S A抗原との最小限の反応性を示すか、または検出できるほどの反応性を示さない。例えば、脱N-アセチル化Nm B多糖エピトープは、G r a n o f fら、1998年、J I m m u n o 1160巻、5028頁（抗N-P r N m B P S m A b）、米国特許第6, 048, 527号（抗Nm B抗体）および米国特許第6, 350, 449号（抗Nm B抗体）に記載されているマウス抗N-プロピオニル髄膜炎菌グループB（N-P r N m B）多糖m A b（モノクローナル抗体）、S E A M 3を用いて同定された。

【0058】

上で示したように、他の実施形態は、本開示のポリシアル酸誘導体の凝集体を含む組成物である。これは、凝集モノマー複合体中の個々のポリシアル酸誘導体の分子量の10倍以上の粒子分子量を有するポリシアル酸誘導体の凝集複合体を含む。これは、約50000以上、約250000ダルトン以上まで、500000ダルトン以上まで、750000ダルトン以上まで、1000000ダルトン以上までの、標準的低倍率光学顕微鏡下（例えば、40倍）で容易に見ることができる均一粒径を有する粒子に至るまでの分子量を有する粒子を有する凝集体を含む組成物を含む。特に重要なものとして挙げられるのは、分子または顕微鏡的粒子であってよい凝集体を含む組成物である。これは、約1 μ m～20 μ mの粒子直径を有する顕微鏡的粒子を含む組成物を含む。これはまた、がん細胞の直径に近いまたはそれより小さい粒子直径を有する顕微鏡的粒子を含む組成物を含む。したがって、凝集体組成物は、抗脱N-アセチルシアル酸抗原抗体への曝露後の細胞の成長の阻害によって測定されるような、対照および／または両方と互いに比較したとき非凝集誘導体よりも多く細胞によって取り込まれ、インターナライズされることができるポリシアル酸誘導体の凝集体を含む。凝集体組成物は、下でより詳細に述べるように、液体、粉末などとして製剤化することができる。

がんの治療の方法において、ポリシアル酸誘導体またはそのような誘導体を含む免疫原性組成物の投与により、ポリシアル酸誘導体に曝露したがん細胞の生存能の低下が促進される。これらの方法の利点は、ポリシアル酸誘導体が、例えば、細胞表面上のd e N A c S Aエピトープの量を増加させることによってd e N A c S Aエピトープを含むがん細胞に対して細胞傷害性である抗体の送達を直接的または間接的に促進することができることである。これは、ひいては対象自身の免疫系および／またはS E A M 3などの抗体に基づ

く療法の標的となり得る。他の利点は、本開示のポリシアル酸誘導体の細胞傷害性は、用量依存的であり得、したがって調節可能であることである。治療が適用可能ながん細胞の特定の例としては、黒色腫、白血病または神経芽腫細胞が挙げられる。

【0059】

関連実施形態において、治療を受ける対象はd e N A c S Aエピトープを有する。該エピトープは、がん細胞などの細胞内に存在するか、または細胞表面上で発現することができる。この態様は、d e N A c S Aエピトープを発現または提示する細胞が本開示のポリシアル酸誘導体による治療に対してより適用可能性が高くなり得る点が有用であり得る。例えば、細胞をポリシアル酸誘導体と接触させて、それらの表面上の脱N－アセチルシアル酸抗原を増加させ、それらを宿主の免疫系または免疫療法に対して「明らかに」することができ、もちろん誘導体は、例えば、エピトープの存在が検出できない時点で療法を開始する場合に脱N－アセチルシアル酸抗原に関して未経験である対象に投与することができ、したがって、限定することを意図しない。疾患の症状の最初の徴候の前、可能な疾患の最初の徴候時、あるいは検出可能なd e N A c S Aエピトープ（例えば、ガングリオシドまたは少なくとも部分的に脱N－アセチル化されている複合糖質）を有する原発がんおよび／またはがんの転移の診断の前または後に、ポリシアル酸誘導体療法を開始することも可能である。

10

他の実施形態は、ポリシアル酸誘導体療法と併用するd e N A c S Aエピトープのスクリーニングを含む。この方法において、ポリシアル酸誘導体を用いた治療を受ける、または治療に対する感受性について試験を受けている対象の細胞をd e N A c S Aエピトープの存在についてスクリーニングする。これは、エピトープに結合する抗体または抗体フラグメント（例えば、本開示のポリシアル酸誘導体に対して特異的な抗体、またはS E A M 3モノクローナル抗体（A T C C 寄託番号H B－1 2 1 7 0））を用いて達成することができる。一般のがん療法と同様に、このアプローチの利点は、そうでない個人と比較してポリシアル酸誘導体療法に対してより高度に反応する可能性がある細胞増殖疾患または病期を有する個人を選択することができることである。d e N A c S Aエピトープを有する細胞を有する対象を標的とする他の利点は、治療コースにわたる経過をモニターすることができ、投与計画、量などを含む療法をそれに応じて調節することができることである。

20

【0060】

投与経路（ポリシアル酸誘導体を身体と接触させる経路）は変化する可能性がある。ポリシアル酸誘導体の代表的な投与経路については下でより詳細に述べる。特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体を注入または局所注射により投与する。例えば、腫瘍が充実性腫瘍である場合、ポリシアル酸誘導体は、腫瘍床に隣接する部位または腫瘍床に投与することができる。ポリシアル酸誘導体はまた、がん細胞を除去するための外科的介入などの他の治療介入の前、その時またはその後に投与することができる。ポリシアル酸誘導体は、免疫療法、がん化学療法または放射線療法の少なくとも1つを対象に適用する、併用療法の一部として投与することもできる（下でより詳細に述べるように）。

30

一般的に本明細書で開示した方法は、有効な量のポリシアル酸誘導体をそれを必要とする対象に投与することを含み得る。特に、重要なポリシアル酸誘導体は、該化合物を本開示により有効な量で投与するとき、宿主のがん細胞の表面上の完全な抗原の量を増加させるものである。投与量は、投与の目的、治療を受ける個人の健康および身体的状態、年齢、治療を受ける個人の分類群（例えば、ヒト、ヒト以外の霊長類、霊長類など）、所望の解消の程度、ポリシアル酸誘導体組成物の製剤、治療臨床医による医学的状況の評価、ならびに他の関連因子によって異なる。量は、ルーチンの試験により決定することができる比較的広い範囲に入ると予想される。

40

【0061】

例えば、宿主のがん細胞の表面上の完全な抗原の量を増加させるために用いるポリシアル酸誘導体の量は、対象に対して不可逆的に有毒となりかねない量（すなわち、最大耐量）を超えない。他の例において、量は、毒性閾値の近くまたはそれを十分に下回るが、所望の濃度範囲内にあるか、または閾値用量程度に低い。したがって、がん細胞および／ま

50

たは細菌感染（例えば、ナイセリア属菌および／または大腸菌 K1）に対する免疫防御上および／または免疫療法上の免疫応答を誘発するためにポリシアル酸誘導体を使用することを含む実施形態において、投与するポリシアル酸誘導体の量は、がん細胞および／または細菌感染に対する対象における免疫防御上または免疫療法上の免疫応答を誘発するのに有効な量であり、そのような免疫応答に有効な量は、上に例示したものなどの様々な対象に固有の因子によって異なる可能性がある。抗 d e N A c S A 抗体反応を引き起こすためにポリシアル酸誘導体を投与する場合、誘発される抗体は、宿主由来のポリシアル酸への検出できる結合をほとんどまたはまったく伴わずに、標的抗原上の d e N A c S A エピトープの特異的結合をもたらすことができる。

個別の用量は、対象に対する測定可能な効果をもたらすのに必要な量より一般的に少なくなく、ポリシアル酸誘導体の吸収、分布、代謝および排泄（「A D M E」）に関する薬物動態および薬理に基づいて、また対象における組成物の生体内運命に基づいて決定することができる。これは、投与経路ならびに局所（主として局所的効果を得るために作用が望まれる部位に直接適用する）、経腸（消化管の一部に保持されているときに全身または局所効果を得るために消化管を経て適用する）または非経腸（全身または局所効果を得るために消化管以外の経路により適用する）適用について調節することができる用量の考慮を含む。例えば、ポリシアル酸誘導体の投与は、胃内の加水分解を避けるように、一般的に注射、しばしば静脈内、筋肉内、腫瘍内注射またはその組合せによるものである。

【0062】

対象の体内のポリシアル酸誘導体の動態およびその対応する生物学的活性は、目的とする標的に存在するポリシアル酸誘導体の画分と対照して評価することができる。例えば、一旦投与したポリシアル酸誘導体は、がん細胞およびがん組織などの標的細胞および組織に複合糖質の成分または物質を濃縮する他の生物学的標的として蓄積することができる。したがって、問題とする標的に時間の経過とともに蓄積するようにポリシアル酸誘導体を投与する投与計画は、より低い個別用量を考慮する戦略の一部であり得る。これは、i n v i v o でより緩やかに除去されるポリシアル酸誘導体の用量は i n v i t r o アッセイから計算される濃度と比較して低くすることができることも意味する（例えば、i n v i t r o での有効量は mM 濃度に近く、i n v i v o での mM 濃度より低い）。

例として、用量の有効量または投与計画は、細胞表面抗原への S E A M 3 の結合に対する所定のポリシアル酸誘導体の I C 5 0 から評価することができる（すなわち、S E A M 3 結合および細胞成長の阻害は細胞表面上に存在するポリシアル酸抗原に比例する）。「I C 5 0」とは、i n v i t r o で 5 0 % の阻害に必要な薬物の濃度を意味する。あるいは、有効量は、所定のオリゴシアル酸誘導体の E C 5 0 から判断することができる。「E C 5 0」とは、i n v i v o での最大効果の 5 0 % を得るのに必要な血漿濃度を意味する。

【0063】

一般的に、本明細書で開示したポリシアル酸誘導体に関して、有効量は、通常計算 I C 5 0 の 2 0 0 倍以下である。一般的に、投与するポリシアル酸誘導体の量は、計算 I C 5 0 より約 2 0 0 倍より少なく、約 1 5 0 倍より少なく、約 1 0 0 倍より少なく、多くの実施形態で約 7 5 倍より少なく、約 6 0 倍、5 0 倍、4 5 倍、4 0 倍、3 5 倍、3 0 倍、2 5 倍、2 0 倍、1 5 倍、1 0 倍より少なく、約 8 倍または 2 倍より少ない。1 つの実施形態において、有効量は、計算 I C 5 0 の約 1 倍～5 0 倍であり、時として計算 I C 5 0 の約 2 倍～4 0 倍、約 3 倍～3 0 倍または約 4 倍～2 0 倍である。他の実施形態において、有効量は、計算 I C 5 0 と同じであり、特定の実施形態において、有効量は、計算 I C 5 0 より大きい量である。

他の実施形態において、有効量は、計算 E C 5 0 の 1 0 0 倍以下である。例えば、投与するポリシアル酸誘導体の量は、計算 E C 5 0 より約 1 0 0 倍より少なく、約 5 0 倍より少なく、約 4 0 倍、3 5 倍、3 0 倍または 2 5 倍より少なく、多くの実施形態で約 2 0 倍より少なく、約 1 5 倍より少なく、約 1 0 倍、9 倍、9 倍、7 倍、6 倍、5 倍、4 倍、3 倍、2 倍または、1 倍より少ない。1 つの実施形態において、有効量は、計算 E C 5 0 の

10

20

30

40

50

約1倍～30倍であり、時として計算EC50の約1倍～20倍、または約1倍～10倍である。他の実施形態において、有効量は、計算EC50と同じであり、特定の実施形態において、有効量は、計算EC50より大きい量である。

有効量は、アッセイから、安全性ならびに漸増および用量設定試験、個々の臨床医・患者関係、ならびに本明細書に記載し、下の実験の項に示すような*in vitro*および*in vivo*試験から実験的に容易に決定することができる。

【0064】

ポリシアル酸誘導体を1つまたは複数の他の療法と併用して対象に投与することができる。例えば、ポリシアル酸誘導体組成物の投与以外の療法または処置を、ポリシアル酸誘導体と同時にその前または後の5時間またはそれ以上の時点まで、例えば、10時間、15時間、20時間またはそれ以上の時点までのいずれかの時点に適用することができる。特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体ならびに他の治療的介入は、例えば、ポリシアル酸誘導体を他の治療処置の前または後に投与する場合、連続的に投与または適用する。さらに他の実施形態において、ポリシアル酸誘導体と他の療法を同時に適用し、例えば、ポリシアル酸誘導体と第2の療法を同時に適用する場合、例えば、第2の療法が薬物であるとき、それは、ポリシアル酸誘導体とともに2つの別個の製剤として、または対象に投与する単一組成物に配合して投与することができる。上で示したように連続的または同時に投与するかどうかに関係なく、治療薬は、本開示の目的のために一緒または組み合わせられて投与されるとみなされる。

本方法に使用することができ、組成物中に存在することができるポリシアル酸誘導体は、対象におけるがん細胞の成長に影響を及ぼすことができる抗体を誘発するように適切な特異性および抗原性を有するものを含むが、これらに限定されない。したがって、そのような特異性を有するポリシアル酸誘導体は、望まれない副作用および毒性を最小限にすると同時に、がん細胞の細胞増殖を調節するという意図する最終結果を達成する助けとなる。言い換えれば、ポリシアル酸誘導体が標的細胞に対する免疫応答を誘発し、かつ／またはその成長を阻害することができる限り、用いるポリシアル酸誘導体は下の実施例の項で開示するものと同じである必要はない。したがって、当業者は、ポリシアル酸誘導体の活性に実質的に影響を及ぼすことなく、多くのポリシアル酸誘導体（下でより詳細に述べる）を調製することができることを認識するであろう。これは、薬剤学的に許容できる塩（例えば、塩酸、硫酸塩）、溶媒和物（例えば、混合イオン塩、水、有機物）、水和物（例えば、水）の組成物を含む。ポリシアル酸組成物の場合、それらは、そのプロドラッグの形（例えば、エステル、アセチル形）、アノマー（例えば、 α/β 変旋光）、互変異性体（例えば、ケト-エノール互変異性）および立体異性体（例えば、 β -D異性体）として提供される可能性がある。それは、アジュバント、担体などの1つまたは複数の免疫賦形剤を含む様々なポリシアル酸誘導体組成物、ならびにアジュバントまたは他の免疫原性賦形剤を本質的に含まない非免疫原性ポリシアル酸誘導体組成物も含む。

【0065】

本開示は、本明細書で開示したポリシアル酸誘導体のプロドラッグを含む。そのようなプロドラッグは、一般的に*in vivo*で必要な化合物に容易に変換できる化合物の機能的誘導体である。したがって、本明細書で開示した方法において、「投与」という用語は、具体的に開示されている化合物、または具体的に開示されていない可能性があるが、それを必要とする対象に投与した後に*in vivo*で指定の化合物に変換する化合物を投与することを含む。適切なプロドラッグ誘導体の選択および調製の通常の手順は、Wermuth、「Designing Prodrugs and Bioprecursors」、Wermuth編、The Practice of Medicinal Chemistry、第2版、561～586頁（Academic Press 2003年）に記載されている。プロドラッグとしては、*in vivo*で（例えば、ヒト体内で）加水分解して、本開示に適切な本明細書に記載する化合物を生ずるエステルが挙げられる。適切なエステル基は、各アルキルまたはアルケニル部分が6個以下の炭素原子を有する、薬剤学的に許容できる脂肪族カルボン酸、特にアルカン、アルケン、シクロアル

10

20

30

40

50

カンおよびアルカン二酸由来のものが制限なしに挙げられる。実例としてのエステルは、ギ酸エステル、酢酸エステル、プロピオン酸エステル、酪酸エステル、アクリル酸エステル、クエン酸エステル、コハク酸エステルおよびエチルコハク酸エステルなどである。オーアセチル化プロドラッグが特に重要である。

【0066】

所定のポリシアル酸誘導体またはその結合体が本開示による使用に適しているか否かは、下の実験の項で用いるような様々なアッセイを用いて容易に判断することができる。下の実験の項で述べるような細胞を用いるアッセイを用いて検討したとき、標的細胞の成長の阻害を促進する対象における免疫応答を、正常対照細胞と比較して少なくとも約2～10倍、通常少なくとも約50倍、時として少なくとも約100倍～200倍誘発する場合、一般的にポリシアル酸誘導体は、本明細書で開示した方法に使用するのに適している。特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体は、細胞に対する免疫応答（例えば、がん細胞のdeNAcSAエピトープを増強させ、本明細書で述べるような二次抗体またはSEAM3、および／または免疫系の1つもしくは複数の態様による殺滅に対してそれをより感受性にするることによる細胞傷害性）を発生させるとき、下の実験の項で述べる細胞に基づく検定で観察されるように、標的細胞（特定のがん細胞または細胞株）の生存能の低下を促進し（例えば、抗ポリシアル酸誘導体抗体を誘発することにより、かつ／またはがん細胞上のdeNAcSA抗原を増加させることにより）、標的細胞の成長を阻止し、かつ／または標的細胞のアポトーシスを誘発し、かつ／または細胞死を誘発するものである。

【0067】

これらと別に、より小さいポリシアル酸誘導体のいくつかは特徴づけがなされ、標準的化学合成を含む他の技術により調製することができることも理解されるであろう。例えば、そのようなポリシアル酸誘導体は、本明細書および実施例に記載するものを含む、当業者に知られている技術により従来通り調製することができる。様々な合成アプローチ、中間体、前駆体、分析ならびに結合体の合成および調製、診断などを記載している代表的参考文献は、その開示が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第4,315,074号、第4,395,399号、第4,719,289号、第4,806,473号、第4,874,813号、第4,925,796号、第5,180,674号、第5,246,840号、第5,262,312号、第5,278,299号、第5,288,637号、第5,369,017号、第5,677,285号、第5,780,603号、第5,876,715号、第6,040,433号、第6,133,239号、第6,242,583号、第6,271,345号、第6,323,339号、第6,406,894号、第6,476,191号、第6,538,117号、第6,797,522号、第6,927,042号、第6,953,850号、第7,067,623号および第7,129,333号を含んでいる。開示が参照により本明細書に組み込まれている、次の参考文献も参照のこと：「Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries」、Peter H. Seeberger編、Wiley-Interscience、John Wiley & Sons, Inc.、NY、2001年、Planteら、Science（2001年）、291巻（5508号）、1523頁、Marcauretteら、Glycobiology、2002年、12巻（6号）、69R～77R頁、Searsら、Science（2001年）、291巻、2344～2350頁、Bertozziら、Chemical Glycobiology（2001年）Science、291巻、2357～2364頁、MacCossら、Org. Biomol. Chem.、2003年、1巻、2029頁、Liangら、Science（1996年）、274巻（5292号）、1520頁、Kaysersら、J. Biol. Chem.、1992年、267巻、16934頁、Kepplerら、Glycobiology、2001年、11巻、11R頁、Luchanskyら、Meth. Enzymol.、2003年、362巻、249頁、Oetkeら、

Eur. J. Biochem.、2001年、268巻、4553頁および国際公開第1997/045436号。

【0068】

ポリシアル酸誘導体の薬剤学的に許容できる塩は、遊離酸を適量の薬剤学的に許容できる塩基で処理することにより調製することができる。代表的な薬剤学的に許容できる塩基は、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、水酸化第一鉄、水酸化亜鉛、水酸化銅、水酸化アルミニウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、リシン、アルギニン、ヒスチジンなどである。反応は、水中単独または不活性水混和性有機溶媒と混合した水中で約0℃～約100℃、また室温であってよい温度で行わせる。一般構造Iの化合物と用いる塩基とのモル比は、個々の塩について望ましい比となるように選択する。例えば、遊離酸出発物質のアンモニウム塩の調製については、出発物質を約1当量の薬剤学的に許容できる塩基で処理して、中性塩を得ることができる。カルシウム塩を調製する場合、約1/2モル当量の塩基を用いて中性塩を得るが、アルミニウム塩については、約1/3モル当量の塩基を用いる。

【0069】

製剤

本明細書で開示した治療の方法に用いられるポリシアル酸誘導体を含む医薬組成物も提供する。「ポリシアル酸誘導体組成物」という用語は、結合型ポリシアル酸誘導体または両方を含む、本開示のポリシアル酸誘導体を含む組成物を一般的に指すために便宜上本明細書で用いる。がん細胞の成長の抑制を促進するのに有用な組成物を特に考慮する。

例えば、薬剤学的に許容できる塩の形のポリシアル酸誘導体組成物は、上述のように、経口、局所または非経口投与用に製剤化することができる。特定の実施形態において、例えば、ポリシアル酸誘導体を液体注射剤として投与する場合（静脈内または組織中に直接投与する実施形態におけるような）、ポリシアル酸誘導体製剤は、調製済み剤形（ready-to-use dosage form）として、または薬剤学的に許容できる担体および賦形剤を含む再構成可能な貯蔵安定性粉末もしくは液体として提供する。

対象（例えば、ヒト対象）に投与するのに適するポリシアル酸誘導体を製造および製剤化する方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、ポリシアル酸誘導体は、有効な量のポリシアル酸誘導体ならびに薬剤賦形剤（例えば、生理食塩水）を含む医薬組成物中に提供することができる。医薬組成物は、他の添加剤（例えば、緩衝剤、安定化剤、保存剤など）を場合によって含んでいてよい。ポリシアル酸誘導体の有効な量は、がん細胞上の脱N-アセチルシアル酸抗原の増強および／またはそのような脱N-アセチルシアル酸抗原増強がん細胞に対する免疫応答の誘発をもたらすのに有効な量であり得る。他の実施形態において、ポリシアル酸誘導体の有効な量は、特にアジュバントとともに投与するとき、所望の期間にわたり対象における抗菌または抗がん反応をもたらすように、抗ポリシアル酸誘導体免疫応答をもたらす量である。治療の目的（例えば、細菌もしくは腫瘍負荷の減少、または免疫）は、様々な投与計画のもとでの単回投与または反復投与によって達成することができる。

【0070】

例として、ポリシアル酸誘導体組成物は、従来の薬剤学的に許容できる担体および賦形剤（すなわち、媒体）と混合し、水剤、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシェ剤、貼付剤などの形で用いることができるが、通常、ポリシアル酸誘導体は、注射剤として提供するものとする。そのような医薬組成物は、特定の実施形態において、約0.1～約90重量%の活性化合物、より一般的に約1～約30重量%の活性化合物を含む。医薬組成物は、トウモロコシデンプンもしくはゼラチン、乳糖、デキストロース、ショ糖、結晶セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸二カルシウム、塩化ナトリウムおよびアルギン酸などの一般的な担体および賦形剤を含んでいてよい。製剤に一般的に用いられる崩壊剤としては、クロスカルメロース、結晶セルロース、トウモロコシデ

ンブン、デンプングリコール酸ナトリウムおよびアルギン酸などがある。保存剤なども含めることもできる。

ポリシアル酸誘導体組成物は、水溶液、しばしば生理食塩溶液などの溶液であってよい、あるいは粉末の形で提供することができる、薬剤学的に許容できる賦形剤に混入して提供することができる。ポリシアル酸誘導体組成物は、薬剤用のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、マグネシウム、カルボネートなどの他の成分を含んでいてよい。組成物は、pH調整および緩衝剤、毒性調節剤などの生理的状态に近づけるために必要な薬剤学的に許容できる補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含んでいてよい。

10

【0071】

製剤中のポリシアル酸誘導体の濃度は、約0.1%、通常約2%未満または少なくとも約2%から20%～50%またはそれ以上（重量）まで変化してよく、選択される個々の投与方法および患者の必要に従って主として液体の容積、粘度などによって選択する。得られる組成物は、液剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、ゲル剤、クリーム剤、ローション剤、軟膏剤、エアゾール剤などの形であってよい。

一般的に、ポリシアル酸誘導体組成物の投与は、添加賦形剤を含むまたは含まない錠剤、固形、粉末状、液体、エアゾール状で、経口、口腔、鼻内、鼻咽頭、非経口、腸、胃、局所、経皮、皮下、筋肉内に、局所または全身的に組成物を投与することを含め、適切な経路により行う。非経口投与できる組成物を調製する実際の方法は、当業者には既知または明らかであり、Remington's Pharmaceutical Science、第18版、Mack Publishing Company、NY（1995年）のような刊行物により詳細に記述されている。

20

経口投与する場合、ポリシアル酸誘導体を消化から保護すべきことであることが認識される。これは一般的に、酸および酵素加水分解に対して抵抗性にするためにポリシアル酸誘導体を組成物と複合体化することにより、あるいはリポソームなどの適切に抵抗性の担体に包装することにより達成される。目的とする化合物を消化から保護する手段は、当技術分野でよく知られている。

【0072】

血清半減期を延長するために、注射するポリシアル酸誘導体制剤は、カプセル封入、リポソームの内腔に導入、コロイドとして調製することもでき、あるいは血清半減期の延長をもたらす他の従来の技術を用いることができる。例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng.、9巻、467頁（1980年）、米国特許第4,235,871号、第4,501,728号および第4,837,028号に記述されているように、リポソームを調製するのに様々な方法が利用可能である。製剤は、混合物としての、または連続的なポリシアル酸誘導体組成物の放出および投与のために放出制御または徐放性剤形で提供することもできる。

30

液体組成物は一般的に、例えば、懸濁化剤、保存剤、界面活性剤、湿潤剤、着香剤または着色剤を含むエタノール、グリセリン、ソルビトール、ポリエチレングリコールなどの非水溶媒、油または水などの適切な液体担体中化合物または薬剤学的に許容できる塩の懸濁液または溶液からなっている。あるいは、液体製剤は、再構成可能な散剤から調製することができる。

40

非経口投与したときに活性である本開示の化合物およびそれらの薬剤学的に許容できる塩は、筋肉内、硬膜下腔内または静脈内投与用に製剤化することができる。筋肉内または硬膜下腔内投与用の一般的な組成物は、油中、例えば、ラッカセイ油またはゴマ油中有効成分の懸濁液または溶液であろう。静脈内または硬膜下腔内投与用の一般的な組成物は、例えば、有効成分およびデキストロースもしくは塩化ナトリウムまたはデキストロースおよび塩化ナトリウムの混合物を含む滅菌等張水溶液であろう。他の例は、乳酸加リンゲル注射剤、デキストロース加乳酸リンゲル注射剤、Normosol-Mおよびデキストロース、Isolyte E、アシル化リンゲル注射剤などである。場合によって、共溶媒、

50

例えば、ポリエチレングリコール、キレート化剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸、および抗酸化剤、例えば、メタ重亜硫酸ナトリウムを製剤に含めることができる。あるいは、溶液を凍結乾燥し、投与直前に適切な溶媒で再構成することができる。

【0073】

直腸投与で活性である本開示の化合物およびそれらの薬剤学的に許容できる塩は、坐剤として製剤化することができる。一般的な坐剤は、一般的に有効成分とゼラチンまたはココアバターまたは他の低融点植物もしくは合成ワックスもしくは脂肪などの結合および／または滑沢剤とからなる。

局所投与で活性である本開示の化合物およびそれらの薬剤学的に許容できる塩は、経皮組成物または経皮送達用具（「貼付剤」）として製剤化することができる。そのような組成物は、例えば、裏当て（backing）、活性化化合物レザバー、制御膜、ライナーおよび接触粘着剤を含む。そのような経皮貼付剤は、制御された量の本開示の化合物の連続または不連続注入を行うために用いることができる。薬剤の送達のための経皮貼付剤の構成および使用は、当技術分野でよく知られている。例えば、その全体として参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5,023,252号を参照のこと。そのような貼付剤は、薬剤の連続、拍動性または必要に応じた送達用に構成することができる。

【0074】

目的とする特定の実施形態において、ポリシアル酸誘導体組成物は、単一製剤として投与する。それは、他の適切な化合物および担体を含む有効な量の他の薬剤とともに投与することもでき、また、他の実薬と併用することもできる。したがって、本開示は、薬剤学的に許容できる賦形剤を含む医薬組成物も含む。薬剤学的に許容できる賦形剤は、例えば、あらゆる適切な媒体、アジュバント、担体または希釈剤を含み、公衆が容易に入手できる。本開示の医薬組成物は、当技術分野でよく知られている他の活性薬をさらに含んでよい。

当業者は、本開示の製剤を対象または宿主、例えば、それを必要とする患者に投与する様々な適切な方法が利用可能であり、特定の製剤を投与するのに複数の経路を用いることができるが、特定の経路が他の経路より迅速かつ有効な反応をもたらす得ることを理解するであろう。薬剤学的に許容できる賦形剤も当業者によく知られており、容易に入手できる。賦形剤の選択は、個々の化合物により、また組成物を投与するのに用いる個々の方法により決定する。したがって、本開示の医薬組成物の様々な適切な製剤が存在する。以下の方法および賦形剤は、単に例示するものであり、限定するものではない。

本開示の製剤は、吸入により投与するエアゾール剤に調製することができる。これらのエアゾール剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの許容できる加圧噴射剤中に入れることができる。それらは、噴霧器または噴霧装置用などの非加圧製剤用の薬剤として調合することもできる。

【0075】

非経口投与に適する製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および製剤を意図するレシピエントの血液と等張性にする溶質を含み得る水性および非水性等張注射液剤、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、粘稠剤、安定化剤および保存剤を含み得る水性および非水性滅菌懸濁剤などがある。製剤は、アンプルおよびバイアルなどの単位用量または複数回分用量密封容器入りで提供することができ、使用直前に滅菌済み液体賦形剤、例えば、注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。準備なしの注射液剤および懸濁剤は、前述の種類の滅菌散剤、顆粒剤および錠剤から調製することができる。

局所投与に適する製剤は、有効成分に加えて、当技術分野で適切であることが知られているような担体を含むクリーム剤、ゲル剤、ペースト剤または泡剤として提供することができる。

坐剤も乳化基剤または水溶性基剤などの様々な基剤と混合することによって提供される。腔投与に適する製剤は、腔坐剤、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡剤として提供することができる。

【0076】

各用量単位、例えば、スプーン一杯、テーブルスプーン一杯、錠剤または坐剤が1つもしくは複数のポリシアル酸誘導体を含むあらかじめ定めた量の組成物を含む、シロップ剤、エリキシル剤および懸濁剤などの経口または直腸投与用の単位剤形を提供することができる。同様に、注射または静脈内投与用の単位剤形は、滅菌水、生理食塩水または他の製剤学的に許容できる担体に溶解した溶液としての組成物にポリシアル酸誘導体を含んでいてよい。

「単位剤形」という用語は、本明細書で用いているように、ヒトおよび動物対象用の単位用量として適する物理的に別個の単位を意味し、各単位は、所望の効果をもたらすのに十分な量と計算されたあらかじめ定めた量の本開示の化合物を薬剤学的に許容できる希釈剤、担体または媒体とともに含む。本開示の新規な単位剤形に関する仕様は、用いる個々の化合物および達成されるべき効果、ならびに宿主における各化合物に関連する薬力学に依存する。

当業者は、用量レベルは、個別の化合物、送達媒体の性質などのとの関連で変化し得ることを容易に理解するであろう。所定の化合物の適切な用量は、当業者により様々な手段によって容易に決定される。

【0077】

場合によって、医薬組成物は、緩衝剤、界面活性剤、抗酸化剤、粘度調整剤、保存剤などの他の薬剤学的に許容できる成分を含んでいてよい。これらの成分のそれぞれは当技術分野でよく知られている。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第5,985,310号を参照のこと。

製剤に用いるのに適する他の成分は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Pub. Co.、第18版(1995年6月)に見いだすことができる。1つの実施形態において、シクロデキストリン水溶液は、デキストロース、例えば、約5%デキストロースをさらに含む。

有用性：具体例としての適用例および関連実施形態

本明細書で開示した化合物および方法は、様々な適用例に用いることができ、多くの適用例において、方法は、細胞の表面上の抗原／ポリシアル酸誘導体の発現の増大のような、少なくとも1つの細胞機能を調節し、あるいはがんまたは細菌細胞（例えば、ナイセリア属菌または大腸菌K1）上で生ずるようなdeNAcSAエピトープに結合する抗体を誘発するための対象の免疫処置におけるような免疫応答を調節している。

【0078】

少なくとも1つの細胞機能を調節する状況ならびに抗がん細胞抗体を誘発する状況において、本明細書で開示した方法および組成物は、細胞増殖障害の治療に用いることができる。したがって、代表的な治療適用例は、一般的に細胞増殖性疾患状態、例えば、がんおよび異常な細胞増殖付随状況によって特徴づけられる関連する状態の治療である。そのような疾患状態としては、がん／腫瘍性疾患および望まれない細胞増殖、例えば、過形成の存在によって特徴づけられる他の疾患などがある。示したように、細胞増殖障害としては、抗deNAcSA抗体またはその誘導体を用いて判断することができる、deNAcSAエピトープを異常に発現するものが挙げられる。

抗細菌抗体を誘発するために免疫応答を調節する状況において、本明細書で開示した方法および組成物は、deNAcSAエピトープを有するナイセリア属菌（例えば、髄膜炎菌、例えば、髄膜炎菌グループB）または大腸菌K1の莢膜多糖におけるようなdeNAcSAを有する細菌に対する免疫防御上および／または免疫療法上の免疫応答を誘発するのに用いることができる。この状況において、ポリシアル酸誘導体は、抗体反応を誘発することを可能にする形で投与する、例えば、免疫原性量で投与する、アジュバントとともに投与し、かつ／または担体ペプチドもしくはタンパク質との結合体として投与する。

【0079】

特に重要なものとして挙げられるのは、本明細書で述べるポリシアル酸誘導体に対する抗原結合特異性またはmAbSEAM3の抗原結合特異性を有する抗体である。特に重要なものとして挙げられるのは、deNAcSAエピトープに特異的に結合し、ヒトポリシ

10

20

30

40

50

アル酸に対する検出可能な結合をほとんどまたはまったく伴わない抗体である。そのような抗体の例としては、S E A M 3 軽鎖ポリペプチドの可変領域の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む軽鎖ポリペプチドならびに重鎖ポリペプチドの可変領域の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む重鎖ポリペプチドが挙げられる。そのような抗体としては、キメラ抗体、ヒト化抗体などがある。

「治療」とは、宿主を苦しめる状態に伴う症状の少なくとも改善が達成されることを意味し、ここで改善は、治療する状態に伴うパラメーター、例えば、症状の大きさの少なくとも低減を指す広い意味で用いられる。それとして、治療はまた、宿主がその状態または状態を特徴づける少なくとも症状をもはや経験しないような、病的状態またはそれに伴う少なくとも症状が、完全に抑制され、例えば、起こることが予防され、または止まり、例えば、終結している状況を含む。したがって、治療は、(i) 予防、すなわち、臨床症状を発現させないことなどの、臨床症状の発現のリスクを低減すること、例えば、有害な状態への疾患の進行を予防すること、(i i) 抑制、すなわち、例えば、腫瘍負荷を低減するように(その低減は検出可能ながん細胞の除去を含み得る)、臨床症状の発現もしくはさらなる発現を阻止すること、例えば、活動性疾患を緩和もしくは完全に抑制すること、および/または(i i i) 軽減、すなわち、臨床症状の後退をもたらすことを含む。

【0080】

様々な宿主を本明細書に開示した方法により治療することが可能である。一般的に、そのような宿主は「哺乳動物」または「哺乳類」であり、これらの用語は、肉食目(例えば、イヌおよびネコ)、げっ歯目(例えば、マウス、モルモットおよびラット)および霊長目(例えば、ヒト、チンパンジーおよびサル)を含む哺乳類綱内にある生物を記述するために広く用いられている。多くの実施形態において、宿主はヒトであるものとする。抗菌ワクチン接種法の状況において、特に重要なものは、ナイセリア属菌(例えば、髄膜炎菌、特に髄膜炎菌グループ B)または大腸菌 K 1 などの d e N A c S A エピトープを有する細菌による感染により引き起こされ得る疾患に対して感受性である宿主である。

本明細書に開示した方法は、数ある適用例のうちで特に、有効量のポリシアル酸誘導体組成物をそれを必要とする対象に投与する、細胞増殖性疾患状態の治療に用いることができる。治療は、例えば、疾患の症状の1つまたは複数の症状の予防または少なくとも改善、ならびにその完全な消失、ならびに疾患状態の逆転および/または完全な除去、例えば、治癒を含めるように、上で定義したように広く用いられている。

本開示の組成物は、治療上有効な量のポリシアル酸誘導体組成物、ならびに必要に応じて他の適合性のある成分を含んでよい。「治療上有効な量」とは、一連の同じまたは異なるポリシアル酸誘導体組成物の一部としての1回の投与での対象へのその量の投与が、がん細胞の脱 N-アセチルシアル酸抗原を増強し、かつ/または抗脱 N-アセチルシアル酸抗原抗体反応を誘発するのに有効であり、特に対象におけるがん細胞の成長を阻害するのに有効であることを意味する。そのような治療上有効な量のポリシアル酸誘導体組成物および/または抗ポリシアル酸誘導体抗体は、1つまたは複数の他の療法(例えば、免疫療法、化学療法、放射線療法等)との細胞の成長の協力的および/または相乗的な阻害を含む。下で示すように、治療上有効な量は、投与計画および対象の状態の診断分析(例えば、S E A M 3 抗体またはオリゴシアル酸誘導体に対して特異的な抗体を用いた細胞表面エピトープの存否のモニタリング)などに関連して調節することができる。

【0081】

上で述べたように、本明細書で開示した方法の状況における動物、特にヒトに対する投与量は、妥当な時間枠にわたる動物における予防または治療反応に影響を及ぼすのに十分なものであるべきであり、投与の目的、治療を受ける個人の健康および身体的状態、年齢、治療を受ける個人の分類群(例えば、ヒト、ヒト以外の霊長類、霊長類など)、所望の解消の程度、ポリシアル酸誘導体組成物の製剤、治療臨床医による医学的状況の評価、ならびに他の関連因子によって異なる。当業者は、用量は用いる個々の化合物の濃度(s t r e n g t h)、動物の状態および動物の体重、ならびに疾患の重症度および病期などの様々な因子に依存することも認識するであろう。用量の大きさは、個々の化合物の投与に

伴う可能性がある有害な副作用の存在、性質および程度によっても決定される。したがって、量は、比較的広い範囲にあるが、それにもかかわらず、上記のような対象の様々な特徴により常法により決定することができると予想される。

ポリシアル酸誘導体組成物（場合によって複合体化してよい）は、単独で用いるか、または他の療法（例えば、抗菌薬、他の抗がん薬など）と併用することができる。併用する場合、様々な組成物を同じまたは異なる製剤で提供することができる。異なる製剤で投与する場合、組成物は、同じまたは異なる投与計画で投与することができる（例えば、同時または異なる時点に（例えば、同じ日または異なる日に）、同じまたは異なる経路などで）。一般的に、ポリシアル酸誘導体組成物の投与は、下でより詳細に述べるように、連続的に、同時に、または混合として行うことができる。投与は、ポリシアル酸誘導体組成物の反復投与で、連続的であってよい。具体例としての投与計画は、下でより詳細に述べる。

10

【0082】

組成物はまた、疾患およびその合併症の発現を予防または少なくとも部分的に阻止するために疾患のリスクがある対象に投与することができる。例えば、対象が疾患の1つまたは複数の徴候または症状を示すが、それは確実な診断には不十分であり、かつ／または対象が疾患の可能性を増大させる条件に曝露された、または曝露される可能性がある場合、対象は「リスクがある」。例えば、ポリシアル酸誘導体組成物は、がんのリスクがある、がんを有する、または細胞表面d e N A c S A エピトープ（例えば、少なくとも部分的に脱Nーアセチル化されている細胞表面ガングリオシド）を有するがんの転移のリスクがある対象に投与することもできる。

20

ポリシアル酸誘導体組成物は、所望の最終結果（例えば、がん細胞の脱Nーアセチルシアル酸抗原の増強、抗体結合および／または産生によるがん細胞の成長の阻害）に必要と考えられる治療上有効な量を維持するために連続的にまたは重複して投与することができる。一般的に、各用量およびその投与のタイミングは、対象の健康が耐えられる量で一般的に提供し、上で示したI C 5 0および／またはE C 5 0に基づいてよい。したがって、量は所定の治療ごとに広く変化し得る。

【0083】

用量または療法に対する治療反応は、既知の方法によって測定することができる（例えば、細胞により提示される脱Nーアセチルシアル酸抗原の増加を評価することにより、最初の免疫処置の前後に患者から血清を入手することにより、および抗脱Nーアセチルシアル酸抗原抗体の変化を示すことなどにより）。投与は、最初の物質のクリアランスを可能にするためのウォッシュアウト期間を含め、その後に治療を休止または再開することができる。したがって、投与戦略はそれに応じて修正することができる。

30

1つの実施形態において、ポリシアル酸誘導体組成物を少なくとも1回、通常少なくとも2回投与し、またいくつかの実施形態において、2回を超える回数投与する。関連実施形態において、ポリシアル酸誘導体組成物を、投与計画および方針にのっとり化学療法と併用して投与する。他の実施形態において、ポリシアル酸誘導体組成物を投与計画および方針にのっとり免疫療法と併用して投与する。さらに他の実施形態において、ポリシアル酸誘導体組成物を投与計画および方針にのっとり放射線療法と併用して投与する。ポリシアル酸誘導体組成物の個々の各用量は、免疫療法、化学療法または放射線療法などの補足的療法の前、施行中または後に投与することができる。認識することができるように、ポリシアル酸誘導体組成物を用いる併用療法は、所定の最終的な必要について調節することができる。

40

【0084】

具体例としてのがん療法

ポリシアル酸誘導体組成物は、哺乳類対象、特にヒトにおける様々ながん療法（がんの予防および診断後がん療法を含む）に用いることができる。腫瘍を有する、有することが疑われる、または発現するリスクがある対象は、本明細書で述べる療法および診断を受けることが意図される。そのような対象から得られるサンプルは、本開示の方法において使

50

用するのに同様に適している。

より詳細には、本明細書で述べるポリシアル酸誘導体組成物は、例えば、がん細胞の脱N－アセチルシアル酸抗原の増加、例えば、細胞分裂中のように細胞表面上に存在する可能性がある総脱N－アセチルシアル酸抗原の増加を促進するために対象（例えば、ヒト患者）に投与することができる。これは、そのような投与の前と比較してがん細胞における脱N－アセチルシアル酸抗原の増加をもたらすように、本明細書で述べるようにポリシアル酸を対象に投与することによって達成することができる。

【0085】

がん療法ならびに細胞の脱N－アセチルシアル酸抗原を増加させることが望ましい他の療法の状況において、抗ポリシアル酸誘導体抗体を誘発するような方法でポリシアル酸誘導体を投与することを避けることが望ましいと思われる。したがって、いくつかの実施形態において、アジュバントを含まない組成物でポリシアル酸誘導体を投与し、かつ／または非免疫原性形のポリシアル酸誘導体を投与することが望ましいと思われる。

細胞の脱N－アセチルシアル酸抗原の増加は、細胞に対して細胞傷害性である（例えば、抗体自体の特性の結果としての（例えば、抗体結合による細胞のアポトーシスの誘導におけるような）抗脱N－アセチルシアル酸抗原抗体を用いる、かつ／または抗体に結合した細胞毒の送達による療法に活用することができる。例えば、細胞の脱N－アセチルシアル酸抗原を増加させることにより、細胞を抗脱N－アセチルシアル酸抗原抗体結合（例えば、SEAM3結合）について増強し、それにより、抗体媒介性がん細胞療法を増強することができる（例えば、がん細胞への細胞傷害性抗体の送達の増加の結果として）。そのような療法は、例えば、腫瘍サイズを減少させ、腫瘍負荷を減少させ、かつ／または患者における臨床的アウトカムを改善するためのがん療法に有用であり得る。

したがって、特にがん細胞が細胞外でアクセスできる細胞の表面上にdeNAcSAエピトープを提示している場合（例えば、少なくとも部分的に脱N－アセチル化したガングリオシドまたは他の複合糖質上のdeNAcSAエピトープ）、ポリシアル酸誘導体組成物を抗がん療法に有利に用いることができる。1つの実施形態において、がんは、SEAM3反応性抗原を提示するものである。SEAM3反応性抗原を提示するがんは、当技術分野で知られている方法によって確認することができる。検出および診断の具体例としての方法を下で述べる。

【0086】

いくつかの実施形態において、抗がん療法は、分裂中（複製中、増殖中）のがん細胞を特に対象とすることができる。下の実施例に示すように、オリゴシアル酸誘導体に対して産生された抗体は、SEAM3抗体により特異的に結合されるエピトープを有するがん細胞に対して特に有効であった。また、SEAM3抗体により結合される細胞外でアクセスできる抗原のレベルは、細胞分裂中に非分裂細胞と比べて増加し、SEAM3の結合が、細胞が後期に（前G0に）移ることを促進する。ほとんどのがんは同じ種類の正常細胞より速やかに分裂するので、SEAM3反応性抗原を有する細胞は、ポリシアル酸誘導体に基づくがん療法にとって魅力的である。また、本開示のポリシアル酸誘導体に対する、本明細書において特定する抗体は、SEAM3と比べて高い結合を示すことができ、したがって、SEAM3より大きい可能性がある臨床的ベネフィットとを有する可能性がある。

したがって、本開示は、SEAM3mAbにより認識されるエピトープを有するポリシアル酸誘導体組成物の投与を含む、がん細胞を対象とする抗がん療法を特に提供する。ポリシアル酸誘導体療法が特に適用可能ながんは、細胞増殖のマーカー（例えば、Ki-67抗原）を検査し、かつ／または分裂細胞におけるSEAM3により、あるいは本開示のポリシアル酸誘導体に対して特異的な抗体により結合されるdeNAcSAエピトープの存在／アクセシビリティを検査する（例えば、in vitroアッセイにおけるように）ことによって確認することができる。

【0087】

細胞表面でアクセス可能なdeNAcSAエピトープを有するがんは、少なくとも部分的に脱N－アセチル化されたガングリオシドおよび／またはdeNAcSAエピトープを

10

20

30

40

50

含むシアル酸修飾を有するタンパク質を有するものなどである。脱N－アセチル化ガングリオシドを有するがんが記載された。

正常ヒト組織における脱N－アセチルシアル酸残基の存在は一過性で、存在量は非常に低いと思われ、少数の血管、皮膚および結腸の浸潤性単核細胞に、また皮膚メラノサイトに中等度のレベルで認められる。それは、黒色腫、白血病およびリンパ腫などの異常細胞においてのみ優勢である。高レベルのd e N A c S A抗原（例えば、脱N－アセチルガングリオシド）の発現はがん細胞において主として起こるので、ポリシアル酸誘導体組成物による治療を用いて、細胞毒性を誘発することができ、腫瘍の成長を阻止することができる。さらに、ポリシアル酸誘導体組成物を治療的に用いて、他の組織におけるがん細胞の接着および浸潤をもたらし／予防することができる。例えば、S E A M 3反応性抗原の発現は、皮膚、膀胱（尿路上皮）、腎臓（尿細管上皮）、胃腺上皮の上皮細胞、肺マクロファージ、末梢神経内皮を含む正常組織において非常に低レベルで、骨格筋の弱い染色で検出することができる。これに対して、S E A M 3反応性抗原は、上で示したものに加えて、腎芽細胞腫ならびに胃、子宮および卵巣の腺癌などの腫瘍においては有意により高いレベルで検出することができる。

【0088】

d e N A c S Aエピトープを提示する具体例としてのがんとしては、脱N－アセチルシアル酸残基を含む脱N－アセチルガングリオシド（例えば、G M 2 α、G M 1 α、G D 1 β、G M 1 b、G D 1 c、G D 1 α、G M 3、G M 2、G M 1、G D 1 3、G T 1 3、G T 1 h α、G D 3、G D 2、G D 1 b、G T 1 b、G Q 1 b、G o m e g a 1 h α、G T 3、G T 2、G T 1 c、G Q 1 cおよびG P 1 c）を提示するがん細胞が挙げられる。特に重要なものとして挙げられるのは、少なくとも1つ残基が脱N－アセチル化されている、α2－8グリコシド結合により結合された2つまたはそれ以上のシアル酸残基を含むガングリオシド（例えば、G D 1 c、G T 1 3、G D 3、G D 1 b、G T 1 b、G Q 1 b、G o m e g a 1 h α、G T 3、G T 1 c、G Q 1 cおよびG P 1 c）である。いくつかの実施形態において、α2－8グリコシド結合により結合された2つまたはそれ以上のシアル酸残基を含むガングリオシドは、G D 3以外および／またはG M 3以外のガングリオシドである。いくつかの実施形態において、がんの標的は、脱N－アセチル化ガングリオシド上に存在するもの以外のd e N A c S Aエピトープ（例えば、シアル酸修飾タンパク質の脱N－アセチル化残基）である。

1つの実施形態において、ポリシアル酸誘導体組成物は、細胞分裂中に細胞外表面でアクセスできるS E A M 3反応性抗原を示すがんを含む、細胞表面上にS E A M 3反応性抗原を提示するがんを治療するのに用いることができる。

他の実施形態において、ポリシアル酸誘導体組成物は、細胞休止中に細胞外表面でアクセスできるS E A M 3および／またはD A 2反応性抗原を示すがんを含む、細胞表面上にd e N A c S Aエピトープを提示するがんを治療するのに用いることができる。

【0089】

d e N A c S Aエピトープおよび／またはS E A M 3反応性抗原は、非がん細胞と比較してがん細胞上で高レベルで発現する可能性があるが、これは、本明細書で開示する療法の制限となるものではないことを注意すべきである。例えば、がんが補給することができる細胞型（例えば、白血病およびリンパ腫におけるようなB細胞、T細胞または造血由来の他の細胞）に関連する場合、そのような細胞の枯渇による対象の障害は治療することができる（例えば、正常細胞の再増殖を刺激するための薬物、例えば、G M－C S F、E P Oなどにより）ので、正常細胞の成長の障害は許容することができる。

本明細書で考慮するがんに関する方法としては、例えば、ポリシアル酸誘導体療法の単独の使用または抗がんワクチンもしくは療法としてのd e N A c S A抗原との併用、ならびに抗がんワクチン（例えば、受動免疫による）もしくは療法におけるd e N A c S A抗原を用いて産生させた抗体の使用などがある。該方法は、癌腫、肉腫、白血病およびリンパ腫などの様々ながんを治療または予防する状況において有用である。

本明細書で開示した方法による療法が適用可能であり得る癌腫は、食道癌、肝細胞癌、

基底細胞癌（皮膚がんの一形態）、扁平細胞癌（様々な組織）、移行上皮癌（膀胱の悪性新生物）を含む、膀胱癌、気管支癌、大腸癌、大腸直腸癌、胃癌、肺の小細胞癌および非小細胞癌を含む、肺癌、副腎皮質癌、甲状腺癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、腎細胞癌、非浸潤性腺管癌または胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、骨原性癌、上皮癌および鼻咽頭癌を含むが、これらに限定されない。

【0090】

本明細書で開示した方法による療法が適用可能であり得る肉腫は、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、脊索肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫および他の軟組織肉腫を含むが、これらに限定されない。

10

本明細書で開示した方法による療法が適用可能であり得る他の固形腫瘍は、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、オリゴデンドログリオーマ、メナンジオーマ（menangioma）、黒色腫、神経芽腫および網膜芽腫を含むが、これらに限定されない。

本明細書で開示した方法による療法が適用可能であり得る白血病は、a) 慢性骨髄増殖性症候群（多能性造血幹細胞の腫瘍性障害）、b) 急性骨髄性白血病（多能性造血幹細胞または制限された系統細胞への分化能（restricted lineage potential）を有する造血幹細胞の腫瘍性転化）、c) B細胞CLL、T細胞CLL前リンパ球性白血病および有毛細胞白血病を含む、慢性リンパ球性白血病（CLL；免疫学的に未熟で、機能的に不適格な小リンパ球のクローン性増殖）およびd) 急性リンパ球性白血病（リンパ芽球の蓄積により特徴づけられる）を含むが、これらに限定されない。本明細書で開示した治療方法により治療することができるリンパ腫は、B細胞リンパ腫（例えば、バーキットリンパ腫）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫などを含むが、これらに限定されない。

20

【0091】

本明細書で開示した方法による治療が適用可能であり得る他のがんは、異型性髄膜腫（脳）、島細胞癌（膵臓）、髄様癌（甲状腺）、間葉腫（腸）、肝細胞癌（肝臓）、肝芽細胞腫（肝臓）、明細胞癌（腎臓）および縦隔神経芽腫などである。

本明細書で開示した方法を使用する治療が適用可能であり得るさらなる具体例となるがんは、神経外胚葉および上皮起源のがんを含むが、これらに限定されない。神経外胚葉起源のがんの例は、ユーイング肉腫、脊髄腫瘍、脳腫瘍、乳児のテント上（supratentorial）原始神経外胚葉腫、管状嚢胞癌、ムチン管状および紡錘細胞癌、腎臓癌、縦隔腫瘍、神経膠腫、神経芽腫ならびに青年および若年成人における肉腫を含むが、これらに限定されない。上皮起源の例は、小細胞肺癌、乳房、水晶体、結腸、膵臓、腎臓、肝臓、卵巣および気管支上皮のがんを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本明細書で開示した治療方法は黒色腫の治療を含まない（すなわち、がんは黒色腫以外である）。他の実施形態において本明細書で開示した治療、方法はリンパ腫の治療を含まない（すなわち、がんはリンパ腫以外である）。特定の実施形態において、本開示の方法を用いて、脱N-アセチルガングリオシドを発現することが知られている、黒色腫およびある種のリンパ腫を含むがん細胞を治療する。上で示したように、前駆ガングリオシドGM3およびGD3を過剰発現するがんは、細胞表面上に最大の量の脱N-アセチルガングリオシドも発現する可能性がある。

30

40

【0092】

他のがん療法との併用

ポリシアル酸誘導体組成物の治療的投与は、免疫療法、化学療法薬および手術（例えば、下でさらに述べるような）を含むが、これらに限定されない、追加の標準抗がん療法と併用または併用しないレジメンの一部としての投与を含み得る。

さらに、ポリシアル酸誘導体組成物の治療的投与は、抗がん療法による対象の治療後処置でもあり得る。ここで、抗がん療法は、例えば、手術、放射線療法、化学療法薬の投与

50

などであり得る。モノクローナル抗体、特に標的細胞の補体媒介殺滅および／または抗体依存性細胞毒性媒介殺滅をもたらすことができるモノクローナル抗体の使用は、d e N A c S A エピトープ（例えば、脱N－アセチルガングリオシド）を発現する細胞からなる原発腫瘍の同定の後に特に重要なものである（例えば、抗d e N A c S A エピトープ抗体（例えば、S E A M 3 または本開示のポリシアル酸誘導体に特異的な投与））。P S A 抗原／抗d e N A c S A エピトープ抗体を用いる免疫療法と併用して本開示のポリシアル酸誘導体組成物を用いるがん療法は、特に重要なものである（参照により本明細書に組み込まれている、米国出願番号第11／645,255号およびP C T 出願番号U S 2 0 0 6 / 0 4 8 8 5 0 ）。

例えば、ポリシアル酸誘導体組成物は、1つまたは複数の化学療法薬（例えば、シクロホスファミド、ドキソルビジン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン（C H O P）と併用して、かつ／または放射線療法と併用して、かつ／または外科的介入（例えば、腫瘍を除去するための前もしくは後手術）と併用して投与することができる。ポリシアル酸誘導体を外科的介入と併用する場合、ポリシアル酸誘導体組成物は、がん細胞を除去するための手術の前、その時点、または後に投与することができ、全身または手術部位に局所投与することができる。ポリシアル酸誘導体組成物（単独または上述の併用）は、全身（例えば、非経口投与による、例えば、静脈内経路による）または局所（例えば、局所腫瘍部位に、例えば、腫瘍内投与（例えば、固形腫瘍内、リンパ腫もしくは白血病における関係リンパ節内）、固形腫瘍供給血管内への投与等による）投与することができる。

【0093】

様々ながん療法のいずれかを本明細書で述べるポリシアル酸誘導体に基づく療法と併用することができる。そのようながん療法としては、手術（例えば、がん組織の外科的除去）、放射線療法、骨髄移植、化学療法、生物学的反応修飾物質療法および前記の特定の組合せなどが挙げられる。

放射線療法は、ビームなどの外部適用源から、または小放射線源の埋込みにより送達されるX線またはガンマ線を含むが、これらに限定されない。

化学療法薬は、がん細胞の増殖を低減する非ペプチド（すなわち、非タンパク質性）化合物であり、細胞傷害性薬物および細胞成長抑制薬を含む。化学療法薬の非限定的な例は、アルキル化剤、ニトロソ尿素、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、植物（ビンカ）アルカロイドおよびステロイドホルモンなどがある。

細胞増殖を低減するように作用する物質は、当技術分野で知られ、広く用いられている。そのような物質は、メクロレタミン、シクロホスファミド（C Y T O X A N（商標））、メルファラン（L－サルコリシン）、カルムスチン（B C N U）、ロムスチン（C C N U）、セムスチン（メチルーC C N U）、ストレプトゾシン、クロロゾトシン、ウラシルマスタード、クロルメチン、イフォスファミド、クロラムブシル、ピポブroman、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、デカルバジンおよびテモゾロミドを含むが、これらに限定されない、窒素マスタードなどのアルキル化剤、ニトロソ尿素、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキルおよびトリアゼンなどである。

代謝拮抗薬は、シタラビン（C Y T O S A R－U）、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル（5－F U）、フロクスウリジン（F u d R）、6－チオグアニン、6－メルカプトプリン（6－M P）、ペントスタチン、5－フルオロウラシル（5－F U）、メトトレキサート、10－プロパルギル－5,8－ジデアザ葉酸塩（P D D F、C B 3 7 1 7）、5,8－ジデアザテトラヒドロ葉酸（D D A T H F）、ロイコボリン、リン酸フルダラビン、ペントスタチンおよびゲムシタビンを含むが、これらに限定されない、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤などである。

【0094】

適する天然産物およびそれらの誘導体（例えば、ビンカアルカロイド、抗腫瘍抗生物質、酵素、リンフォカインおよびエピポドフィロトキシン）は、A r a－C、パクリタキセル（T A X O L（登録商標））、ドセタキセル（T A X O T E R E（登録商標））、デオキシコフォルマイシン、マイトマイシン－C、L－アスパラギナーゼ、アザチオプリン、

10

20

30

40

50

ブレキナル、アルカロイド、例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン等、ポドフィロトキシン、例えば、エトポシド、テニポシド等、抗生物質、例えば、アントラサイクリン、ダウノルビシン塩酸塩（ダウノマイシン、ルビドマイシン、セルビジン）、イダルビシン、ドキシフルビシン、エピルビシンおよびモルフォリノ誘導体等、フェノキシズンビシクロペプチド、例えば、ダクチノマイシン、塩基性糖ペプチド、例えば、ブレオマイシン、アントラキノングリコシド、例えば、プリカマイシン（ミトラマイシン）、アントラセネジオン、例えば、ミトキサントロン、アジリノピロロインドールジオン、例えば、マイトマイシン、大環状免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、FK-506（タクロリムス、プロGRAF）、ラパマイシン等、などを含むが、これらに限定されない。

10

他の抗増殖細胞傷害性薬物は、ナベルペン、CPT-11、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタビン、レロキサフィン、シクロホスファミド、イフォサミドおよびドロキサフィンである。

【0095】

抗増殖活性を有する微小管作用薬も使用に適しており、アロコルヒチン（NSC406042）、ハリコンドリノ（Halichondrin B）（NSC609395）、コルヒチン（NSC757）、コルヒチン誘導体（例えば、NSC33410）、ドルスタチン10（NSC376128）、マイタンシン（NSC153858）、リゾキシ（NSC332598）、パクリタキセル（TAXOL（登録商標））、TAXOL（登録商標）誘導体、ドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））、チオコルヒチン（NSC361792）、トリチルシステイン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン；エオプチロンA、エオプチロンB、ジスコデルモリド、エストラムスチン、ノコダゾールなどを含むが、これらに限定されない天然および合成エオプチロンを含むが、これらに限定されない。

20

使用に適するホルモン調節剤およびステロイド（合成類似体を含む）は、アドレノコルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、デキサメタゾン等、エストロゲンおよびプロゲステロン、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲステロール、エストラジオール、クロミフェン、タモキシフェン等、副腎皮質抑制薬、例えば、アミノグルテチミド、17 α -エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド（Flutamide）（ドロゲニル（Drogenil））、トレミフェン（Toremifene）（ファレストン（Fareston））およびZOLADEX（登録商標）を含むが、これらに限定されない。エストロゲンは、増殖および分化を刺激し、したがって、エストロゲン受容体に結合する化合物は、この活性を阻害するのに用いられる。コルチコステロイドは、T細胞の増殖を阻害する可能性がある。

30

【0096】

他の化学療法薬としては、金属錯体、例えば、シスプラチン（シス-DDP）、カルボプラチン等、尿素、例えば、ヒドロキシ尿素、およびヒドラジン、例えば、N-メチルヒドラジン、エピドフィロトキシン、トポイソメラーゼ阻害剤、プロカルバジン、ミトキサントロン、ロイコボリン、テガファーなどがある。問題とする他の抗増殖薬としては、免疫抑制薬、例えば、ミコフェノール酸、タリドミド、デソキシスベルグアリン、アザスポリン、レフルノミド、ミゾリビン、アザスピラン（SKF105685）、IRESSA（登録商標）（ZD1839、4-（3-クロロ-4-フルオロフェニルアミノ）-7-メトキシ-6-（3-（4-モルホリニル）プロポキシ）キナゾリン）などがある。

40

「タキサン」は、パクリタキセルならびに活性タキサン誘導体またはプロドラッグを含む。「パクリタキセル」（例えば、ドセタキセル、TAXOL、TAXOTERE（ドセタキセルの製剤）、パクリタキセルの10-デスアセチル類似体およびパクリタキセルの

50

3'N-デスベンゾイル-3'N-トートキシカルボニル類似体などの類似体、製剤および誘導体を含むと本明細書では理解すべきである）は、当業者に知られている技術を用いて容易に調製することができる（国際公開第94/07882号、国際公開第94/07881号、国際公開第94/07880号、国際公開第94/07876号、国際公開第93/23555号、国際公開第93/10076号、米国特許第5,294,637号、第5,283,253号、第5,279,949号、第5,274,137号、第5,202,448号、第5,200,534号、第5,229,529号および欧州特許第590,267号も参照）か、または例えば、Sigma Chemical Co.、St. Louis, Mo.を含む様々な商業的供給元から入手することができる（Taxus brevifoliaからのT7402、またはTaxus yannanes isからのT1912）。

10

【0097】

パクリタキセルは、パクリタキセルの化学的に入手できる一般的な形だけでなく、類似体および誘導体（例えば、上で示したようなTAXOTERE（商標）ドセタキセル）ならびにパクリタキセル結合体（例えば、パクリタキセル-PEG、パクリタキセル-デキストランまたはパクリタキセル-キシロース）も指すことを理解すべきである。

親水性誘導体および疎水性誘導体を含む様々な既知の誘導体も「タキサン」という語に含まれる。タキサン誘導体は、国際特許出願公開第99/18113号に記載されているガラクトースおよびマンノース誘導体、国際公開第99/14209号に記載されているピペラジノおよび他の誘導体、国際公開第99/09021号、国際公開第98/22451号および米国特許第5,869,680号に記載されているタキサン誘導体、国際公開第98/28288号に記載されている6-チオ誘導体、米国特許第5,821,263号に記載されているスルフェナミド誘導体、米国特許第5,415,869号に記載されているタキソール誘導体を含むが、これらに限定されない。それはさらに、国際公開第98/58927号、国際公開第98/13059号および米国特許第5,824,701号に記載されているものを含むが、これらに限定されない、パクリタキセルのプロドラッグを含む。

20

本開示の化合物による一部の個人の治療において、非悪性腫瘍細胞に対して救出薬とともに高用量療法を用いることが望ましいと思われる。そのような治療において、シトロラム因子、葉酸誘導体またはロイコボリンなどの、非悪性腫瘍細胞を救出できる薬剤を用いることができる。そのような救出薬は、当業者によく知られている。救出薬は、細胞機能を調節する本発明の化合物の能力を妨げないものなどである。

30

【0098】

本明細書で開示した方法および組成物を用いることができる特定の適用例は、その開示が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第2,512,572号、第3,892,801号、第3,989,703号、第4,057,548号、第4,067,867号、第4,079,056号、第4,080,325号、第4,136,101号、第4,224,446号、第4,306,064号、第4,374,987号、第4,421,913号、第4,767,859号、第3,981,983号、第4,043,759号、第4,093,607号、第4,279,992号、第4,376,767号、第4,401,592号、第4,489,065号、第4,622,218号、第4,625,014号、第4,638,045号、第4,671,958号、第4,699,784号、第4,785,080号、第4,816,395号、第4,886,780号、第4,918,165号、第4,925,662号、第4,939,240号、第4,983,586号、第4,997,913号、第5,024,998号、第5,028,697号、第5,030,719号、第5,057,313号、第5,059,413号、第5,082,928号、第5,106,950号、第5,108,987号、第4,106,488号、第4,558,690号、第4,662,359号、第4,396,601号、第4,497,796号、第5,043,270号、第5,166,149号、第5,292,731号、第5,354,753号、第5,382,582号、第5,6

40

50

98, 556号、第5, 728, 692号および第5, 958, 928号に記載されているものを含む。

【0099】

ポリシアル酸誘導体抗体反応の発生

本明細書で述べる、その結合体を含むポリシアル酸誘導体は、抗菌抗体反応を誘発するのに、また抗がん細胞抗体反応を誘発するのに用いることができる。一般的に、免疫は、賦形剤を添加したまたは添加しない錠剤、固形、粉末状、液体、エアゾール剤形で、局所または全身的に、すなわち、経口、鼻内、鼻咽頭、非経口、経腸、胃、局所、経皮、皮下、筋肉内に組成物を投与することなどのあらゆる適切な経路による投与によって達成される。非経口投与可能な組成物を調製する実際の方法は、当業者に知られまたは明らかであり、Remington's Pharmaceutical Science、第15版、Mack Publishing Company、Easton、Pennsylvania (1980年) のような刊行物により詳細に記載されている。

ポリシアル酸誘導体および本明細書で述べる関連化合物（例えば、結合体）は、経口投与するとき、消化から保護すべきであることが認識される。これは一般的に、酸および酵素加水分解に対して抵抗性にするためにポリシアル酸誘導体を組成物と複合体化することにより、あるいはリポソームなどの適切に抵抗性の担体に包装することにより達成される。目的とする化合物を消化から保護する手段は、当技術分野で知られている。

血清半減期を延長するために、注射する抗原性製剤は、カプセル封入、リポソームの内腔に導入、コロイドとして調製することもでき、あるいはペプチドの血清半減期の延長をもたらす他の従来の技術を用いることができる。例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng.、9巻、467頁 (1980年)、米国特許第4, 235, 871号、第4, 501, 728号および第4, 837, 028号に記述されているように、リポソームを調製するのに様々な方法が利用可能である。製剤は、混合物としての、または連続的な抗原性製剤の放出および投与のために放出制御または徐放性剤形で提供することもできる。

【0100】

組成物は、疾患およびその合併症の発現を予防または少なくとも部分的に阻止するために、適切な対象、例えば、ナイセリア疾患に罹患するリスクがある、またはdeNAcSAエпитープ（例えば、SEAM3反応性抗原に存在するような）を有するがんを発現するリスクがある対象に投与する。これを達成するのに十分な量は、「治療上有効な量」と定義される。治療での使用で有効な量は、例えば、抗原組成、投与方法、ならびにいずれかまたはすべてが臨床医の判断により修正することができる、対象の体重および一般健康状態などの様々な対象に特有のパラメーターに依存する。

抗原組成物の単回または反復投与用量は、患者が必要とし、かつ耐えられる用量および頻度、投与経路に応じて投与することができる。一般的に、免疫処置によって対象におけるポリシアル酸と有意に交差反応する検出可能な抗体が誘発されない（言い換えれば、宿主シアル酸に対する臨床的に意義がある自己抗体反応を誘発しない）という点において、このような免疫処置が有利であり得る場合、免疫処置は、対象における免疫応答を誘発するように行うものであり、髄膜炎菌ならびに大腸菌K1に対して殺菌性の抗体の産生および／またはがん細胞の増殖を阻害する抗体の産生を含むことができる。

特定の実施形態において、本明細書で述べる抗原組成物を連続的に投与する。最初に、免疫原的に有効な用量のポリシアル酸誘導体（担体と結合させてもよく、賦形剤を含んでも含まなくてもよい）を対象に投与する。初回量は、一般的に免疫応答（例えば、Bおよび／またはT細胞の活性化）を誘発するのに有効な量で投与する。最初の免疫処置に用いる量は、一般的に約0.001mg～約1.0mg/70kg患者、より一般的に約0.001mg～約0.2mg/70kg患者、通常約0.005mg～約0.015mg/70kg患者の範囲である。特に、抗原を体腔または臓器の内腔中などの隔離された部位（血流中ではない）に投与する場合、0.001～約10mg/患者/日の用量を用いることができる。実質的により高い用量（例えば、10～100mgまたはそれ以上

）が経口、鼻内または局所投与で可能である。

【0101】

ポリシアル酸誘導体の第1の抗原組成物を投与した後に、対象が初回投与への曝露により初回免疫を受けた後、治療上有効な用量の第2抗原組成物（例えば、ポリシアル酸誘導体、場合によって複合体化され、賦形物を含むまたは含まない）を対象に投与する。追加抗原は、患者の反応および状態に応じて、初回免疫処置の数日、数週間または数ヵ月後に投与することができる。

所望の免疫応答の存在は、既知の方法（例えば、最初の免疫処置の前後に個体から血清を入手し、例えば、免疫沈降試験、またはELISA、または殺菌検定、またはウェスタンブロット、またはフローサイトメトリー分析、または同様なものにより、上記のような患者の状態の変化を示すことにより）および／または第2の注射に対する免疫応答が第2の注射に用いた組成物で始めて免疫処置（例えば、初回免疫）を受けた対照対象の免疫応答より高いことを示すことによって判断することができる。初回免疫および／または第1の抗原組成物に対する免疫応答の存在は、以前の経験に基づいて、免疫応答および／または初回免疫が起こるのに十分である初回免疫処置後の期間—例えば、2、4、6、10または14週間待つことによっても推定することもできる。第2の抗原組成物の追加抗原用量は、免疫原の性質および免疫処置の経路に応じて、一般的に約0.001mg～約1.0mgの抗原である。

【0102】

特定の実施形態において、個体が初回免疫を受け、かつ／または第2の抗原組成物に対する免疫応答を開始した後に、治療上有効な用量の調製された第3の抗原組成物を対象に投与する。本明細書で開示した方法は、第4、第5または第6の抗原組成物を用いた第4、第5または第6またはそれ以上の追加免疫処置の適用も意図している。

対象は、髄膜炎菌もしくは大腸菌K1またはd e N A c S A エピトープ保有がんに対して免疫学的に感受性である可能性がある。免疫学的予防のため、ポリシアル酸誘導体を、疾患の症状の最初の徴候の前、または感染または疾患への可能なもしくは実際の曝露（例えば、ナイセリアもしくは大腸菌K1への曝露またはそれらによる感染による）の最初の徴候の時点に投与することができる。

受動免疫および他の抗体に基づく療法

さらに、本明細書で述べる方法を用いてポリシアル酸またはS E A M 3に対して産生させた抗体は、例えば、哺乳類対象における髄膜炎菌媒介性または大腸菌K1媒介性疾患を治療または予防するための受動免疫療法を提供するために用いることができる。特に、S E A M 3、または本開示によるポリシアル酸誘導体もしくはその結合体を用いて産生させた抗体は、髄膜炎菌または大腸菌K1疾患からの対象の受動的防護、またはがんの治療を可能にするように、対象への投与に適する医薬組成物で提供することができる。

【0103】

より具体的には、髄膜炎菌または大腸菌K1エピトープを認識する、S E A M 3などの免疫予防抗体は、感染または疾患が起こることを予防するために、または確定された疾患を有する患者における臨床的アウトカムを改善する（例えば、ショックのような合併症率の低下、死亡率の低下、または難聴などの罹患率の低下）ための療法として、対象（例えば、ヒト患者）に投与してナイセリア疾患に対する受動免疫を誘導することができる。抗体をがん療法を行うために投与する場合、抗体は、腫瘍の殺滅または除去をもたらすためにがん細胞を標的とする薬物、例えば、毒素（例えば、リシン）、放射性核種などの場合によって結合させることができる。

【0104】

診断

本明細書で開示したポリシアル酸誘導体は、様々な診断の場で用いることができる。特に、それらは、二次検出のための、または検出可能な標識を含む誘導体の結合体を用いることによる、がん細胞の表面上の検出可能な抗原の量を増加させるのに用いることができる。また、本開示の組成物による療法により適用可能な対象の特定を促進するために、d

10

20

30

40

50

e N A c S A エピトープと反応性の S E A M 3 などの抗体は、（参照により本明細書に組み込まれている、米国出願番号第 1 1 / 6 4 5 2 5 5 号および P C T 出願番号 U S 2 0 0 6 / 0 4 8 8 5 0 参照）に記載されているような免疫診断技術における抗 d e N A c S A エピトープ抗体を用いて細胞表面でアクセスできる d e N A c S A エピトープ（例えば、脱 N - アセチル化細胞表面ガングリオシドまたは複合糖質）を有する細菌感染またはがん細胞を有するまたは有することが疑われる対象から得られる生物学的サンプル中の d e N A c S A 抗原を検出するのに用いることができる。そのような診断は、本明細書で開示した療法が適用可能な患者を特定し、かつ／または療法に対する反応をモニターするのに有用であり得る。さらに、そのような診断は、宿主（例えば、哺乳類、特にヒト）ポリシアル酸に対して検出可能な結合をほとんどまたはまったく示さず、それにより、偽陽性結果のリスクの低減を可能にする抗体を備えることができる。本開示の診断態様は、臨床試験などならびに本開示の組成物の製品の製造およびリリース検定にも利用することができる。

10

簡単に説明すると、抗 d e N A c S A エピトープ抗体の抗原結合特異性は、この状況において、宿主由来の P S A に対する検出可能な結合をほとんどまたはまったく伴わず、それにより偽陽性結果の発生を低減させて、サンプル中のがん細胞または細菌細胞上の d e N A c S A エピトープの検出を促進するために利用することができる。そのような検出方法は、診断の状況において、抗体が d e N A c S A エピトープおよび／または S E A M 3 反応性抗原に特異的に結合する、ポリシアル酸誘導体に基づく療法に適する対象の特定、療法のモニタリング（例えば、療法に対する反応を追跡するため）などに用いることができる。

20

【0105】

適切な免疫診断技術は、*in vitro* および *in vivo*（撮像法）法を含むが、これらに必ずしも限定されない。方法が *in vitro* である場合、生物学的サンプルは、血液サンプル（全血、血清等を含む）、組織、全細胞（例えば、完全な細胞）および組織または細胞抽出物を含むが、これらに限定されない、d e N A c S A 抗原が存在する可能性があるサンプルであってよい。検定法は、競合、直接反応またはサンドイッチタイプ検定法などの様々な形をとり得る。具体例としての検定法は、ウェスタンブロット、凝集試験、E L I S A などの酵素標識および媒介免疫検定、ビオチン／アビジンタイプ検定、放射線免疫検定法、免疫電気泳動、免疫沈降などである。反応は、一般的に蛍光、化学発光、放射性、酵素標識もしくは色素分子などの検出可能な標識、あるいはサンプル中の抗原と抗体との複合体の形成またはそれと反応する抗体を検出する他の方法を含む。

30

検定法は、抗原－抗体複合体が結合している固相支持体から液相中の非結合抗体の分離を含むことができる。本開示の実施において用いることができる固相支持体としては、ニトロセルロース（例えば、膜またはマイクロタイターウェルの形の）、ポリ塩化ビニル（例えば、シートまたはマイクロタイターウェル）、ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズまたはマイクロタイタープレート）、フッ化ポリビニリデン、ジアゾ化紙、ナイロン膜、活性化ビーズ、磁気反応性ビーズなどの基材が挙げられる。

【0106】

固体支持体を用いる場合、固体支持体を通常最初に、成分が支持体に十分に固定化されるような適切な結合条件下で固相成分（例えば、抗 d e N A c S A エピトープ抗体）と反応させる。時として、支持体への固定化は、より良好な結合特性を有する、または抗体結合活性または特異性の有意な喪失を伴わずに支持体上の抗体の固定化を可能にするタンパク質に抗体を最初に結合させることによって増強することができる。適切な結合タンパク質は、ウシ血清アルブミン（B S A）などの血清アルブミン、スカシガイ（*keyhole limpet*）ヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミンおよび当業者によく知られている他のタンパク質などの巨大分子を含むが、これらに限定されない。抗体を支持体に結合させるのに用いることができる他の分子は、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸共重合体などである。ただし、抗体を固定化するのに用いる分子は、抗原に特異的に結合する抗体の能力に悪影響を及ぼさな

40

50

いこと。そのような分子およびこれらの分子を抗原に結合させる方法は、当業者によく知られている。例えば、Brinkley M. A.、Bioconjugate Chem. (1992年)、3巻、2～13頁、Hashidaら、J. Appl. Biochem. (1984年)、6巻、56～63頁、AnjaneyuluおよびStaros、International J. of Peptide and Protein Res. (1987年)、30巻、117～124頁を参照のこと。

固体支持体を固相成分と反応させた後、洗浄によってあらゆる非固定化固相成分を支持体から除去し、次いで、支持体結合成分をdeNAcSAエピトープを含むことが疑われる生物学的サンプルと適切な結合条件下で接触させる。洗浄して非結合リガンドを除去した後、二次バインダー部分を適切な結合条件下で加える。ここで、二次バインダーは、結合リガンドと選択的に結合することができる。次いで、二次バインダーの存否を当技術分野でよく知られている技術を用いて検出することができる。

10

【0107】

マイクロタイタープレートのウェルを本開示の抗deNAcSAエピトープ抗体で被覆した、ELISA法を用いることができる。deNAcSA抗原（例えば、脱N-アセチル化ガングリオシドなどのdeNAcSAエピトープを有する腫瘍抗原）を含む、または含むことが疑われる生物学的サンプルを被覆ウェルに加える。抗体を結合させるのに十分なインキュベーションの期間の後に、プレートを洗浄して非結合部分を除去し、検出できるように標識した二次結合分子を加える。二次結合分子を捕捉抗原と反応させ、プレートを洗浄し、二次結合分子の存否を当技術分野でよく知られている方法を用いて検出する。

20

所望の場合、生物学的サンプルからの結合deNAcSA抗原の存否は、抗体リガンドに対する抗体を含む二次バインダーを用いて容易に検出することができる。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはウレアーゼなどの検出可能な酵素標識に当業者に知られている方法を用いて容易に結合させることができる、多くの抗ウシ免疫グロブリン(Ig)分子が当技術分野で知られている。適切な酵素基質を用いて検出可能なシグナルを発生させる。他の関連実施形態において、競合型ELISA法を当業者に知られている方法を用いて実施することができる。

抗体とdeNAcSA抗原が沈降条件下で複合体を形成するような検定も溶液で行うことができる。例えば、抗体は、直接化学的または間接的カップリング法などの当技術分野で知られているカップリング技術を用いて固相粒子（例えば、アガロースビーズなど）に結合させることができる。抗体被覆粒子を適切な結合条件下でdeNAcSA抗原を含むことが疑われる生物学的サンプルと接触させて、沈降させ、洗浄および／または遠心分離を用いてサンプルから分離することができる粒子-抗体-deNAcSA抗原複合体の凝集体の形成をもたらす。反応混合物を、上で述べた免疫診断法などの多くの標準的な方法のいずれかを用いて分析して、抗体-抗原複合体の存否を判定することができる。

30

【0108】

診断検定に用いる試験サンプルは、血液サンプル（全血、血清などを含む）、組織、全細胞（例えば、完全な細胞）ならびに細胞を含む組織または細胞抽出物（例えば、組織、分離細胞など）、細胞溶解物（すなわち、非完全細胞を含むサンプル）を含むが、これらに限定されない、deNAcSA抗原が存在する可能性があるサンプルであってよく、各種類のサンプルは両方の種類の要素を含んでいてよい（例えば、細胞のサンプルは細胞溶解物を含んでいてよく、また逆の場合も同様である）。特にがん細胞の検出に関する実施形態のような、いくつかの実施形態において、完全な生細胞を含む、診断を受ける対象からのサンプルを用いて検定を行うことが望ましいと思われる。deNAcSA抗原の検出は、細胞の細胞外表面で評価することができ、また細胞分裂中にさらに評価することができる。

40

診断検定は、in situでも行うことができる。例えば、抗deNAcSAエピトープ抗体を検出可能なように標識し、deNAcSAエピトープの細胞表面発現によって特徴づけられるがんを有することが疑われる対象に投与し、結合した検出可能標識抗体を当技術分野で利用可能な撮像法を用いて検出する。

50

【0109】

本明細書で述べる診断検定は、対象がポリシアル酸誘導体に基づく療法を用いた療法が多かれ少なかれ適用可能な細菌感染またはがんを有するかどうかを判断するため、ならびに対象における治療の経過をモニターするために用いることができる。これはまた、他の併用療法（例えば、（参照により本明細書に組み込まれている、米国出願番号第11/645,255号およびPCT出願番号US2006/048850）に記載されているようなdeNAcSA抗原ワクチンおよび／または抗deNAcSA抗原抗体療法）の経過を評価するのに用いることができる。したがって、診断検定は、臨床医による療法および治療計画の選択を報知することができる。

方法が*in vitro*である場合、生物学的サンプルは、血液サンプル（全血、血清などを含む）、組織、全細胞（例えば、完全な細胞、すなわち透過化処理に供さなかった細胞）または細胞溶解物（例えば、組織サンプルの処理により得られるような）を含むが、これらに限定されない、SEAM3反応性抗原が存在する可能性があるサンプルであってよい。例えば、検定は、組織学的組織サンプル中の細胞上のSEAM3反応性抗原の検出を伴うことがあり得る。例えば、組織サンプルは、固定することができ（例えば、ホルマリン処理により）、また支持体（例えば、パラフィンに）に包埋して、または凍結非固定組織として提供することができる。

【0110】

SEAM3反応性抗原は、抗体、通常、SEAM3の抗原結合特異性を有するモノクローナル抗体（mAb）の特異的結合の検出によって検出できる。この実施形態において、SEAM3反応性抗原は、細胞分裂中を含む、細胞周期のあらゆる段階において細胞表面上に存在する可能性がある。注目すべきことは、場合によって、細胞分裂中にSEAM3反応性抗原を提示するがんが、細胞が休止している（すなわち、細胞分裂を受けない）ときに、より低いまたは検出できないレベルのSEAM3反応性抗原を示す可能性があることである。しかし、下の実施例で例示するように、SEAM3反応性抗原は、透過化試験細胞におけるSEAM3反応性抗原を検出することによって、非分裂細胞において検出することができる。正常細胞における抗体染色のパターンと異なる、SEAM3抗体（またはSEAM3の抗原結合特異性を有する抗体）による染色のパターンを示す試験がん細胞は、SEAM3反応性抗原を示すがん細胞として特定される。したがって、そのようながんは、SEAM3反応性抗原に特異的に結合する抗体（例えば、mAbSEAM3）による療法が適用可能である。

米国出願番号第11/645,255号およびPCT出願番号US2006/048850）に記載されている方法によりdeNAcSA抗原を用いた免疫処置により産生させた抗体を含む上述の検定試薬は、上述のような免疫検定を実施するために、適切な指示書および他の必要な試薬とともにキットで提供することができる。キットはまた、用いる個々の免疫検定によって、適切なラベルおよび他の包装済み試薬および材料（すなわち、洗浄緩衝液など）を含み得る。上述のものなどの標準的免疫検定は、これらのキットを用いて実施することができる。

【0111】

キットおよびシステム

上述のように、本開示の方法を実施するのに用いることができるキットおよびシステムも提供する。例えば、本開示の方法を実施するためのキットおよびシステムは、ポリシアル酸誘導体を含む1つまたは複数の医薬製剤を含んでいてよい。したがって、特定の実施形態において、キットは、1つまたは複数の単位用量として存在する単一医薬組成物を含んでいてよい。さらに他の実施形態において、キットは、2つまたはそれ以上の別個の医薬組成物を含んでいてよい。

このように、キットは、キットの意図する用途によって、ポリシアル酸誘導体および／またはそれに対して特異的な抗体などの、本明細書で述べる組成物、検定またはスクリーニング用の関連する適切な細胞、抗deNAcSAエピトープ抗体などのうちの1つまたは複数のものを含み得る。キットの他の任意選択の成分としては、ポリシアル酸誘導体お

よび／またはそれに対して特異的な抗体を投与するための、および／または診断検定を実施するための緩衝液などが挙げられる。キットの様々な成分が別個の容器中に存在してよく、あるいは、所望の通りに特定の適合性のある成分が1つの容器中にあらかじめ混合されていてよい。

【0112】

キットは、上の成分に加えて、本明細書で開示した方法を実施するための指示書をさらに含んでいてよい。これらの指示書は、様々な形でキットに存在してよく、そのうちの1つまたは複数のものがキット中またはキット上に存在してよい。これらの指示書が存在し得る1つの形態は、適切な媒体または基材、例えば、キットの包装中または包装上の添付文書等における、情報が印刷されている紙片上の印刷情報としてである。さらに他の手段は、情報が記録されたコンピュータで読取り可能な媒体、例えば、ディスク、CD等であろう。存在し得るさらに他の手段は、除去されたサイト (removed site) の情報にアクセスするためにインターネットを介して用いることができるウェブサイトアドレスである。都合のよい手段がキットに存在してよい。

特定の実施形態において、キットは、細胞増殖性疾患状態に罹患している宿主を治療するのに用いるために提供する。このキットは、ポリシアル酸誘導体を含む医薬組成物、ならびにがん細胞に対する免疫応答を促進するようにがん細胞の脱N-アセチルシアル酸抗原を増強し、かつ／またはがん細胞に対する抗脱N-アセチルシアル酸抗原抗体の結合を促進することにより、かつ／または抗脱N-アセチルシアル酸抗原免疫応答を誘発するため、例えば、deNAcSAエピトープを有するがん細胞に結合する抗体を誘発するために、ポリシアル酸誘導体の免疫原性形の投与を可能にすることにより、がん状態に罹患している宿主を治療する方法における医薬組成物の効果的な使用のための指示書を含む。そのような指示書は、適切な取扱特性、投与計画および投与方法などだけでなく、対象を脱N-アセチル化シアル酸 (deNAcSA) エピトープについて場合によってスクリーニングするための指示書をさらに含んでいてよい。この態様は、キットの施術者が、がんの種類および成長段階に対する治療のタイミングおよび期間を含む、ポリシアル酸誘導体および／またはそれに対して特異的な抗体による治療に対する対象の潜在的反応性を評価する助けとなり得る。したがって、他の実施形態において、キットは、SEAM3 (ATCC 寄託番号HB-12170) などの、がん細胞の細胞外でアクセスできる表面上の脱N-アセチル化シアル酸 (deNAcSA) エピトープを検出するための抗体または他の試薬をさらに含んでいてよい。他の実施形態において、キットは、発蛍光団などの検出可能な標識との結合体を含む1つまたは複数のポリシアル酸誘導体を含む。そのようなポリシアル酸誘導体は、in vitro (例えば、生検におけるように) またはin vivo (in situでの撮像法におけるように) でがん細胞を標識するのに有用であり得る。この場合、がん細胞における検出可能なシグナルの増加 (例えば、検出可能なポリシアル酸誘導体がほとんどまたはまったく取り込まれていない非がん細胞と比較して) をもたらすように、がん細胞が検出できるように標識されたポリシアル酸誘導体を取り込む。

【0113】

他の特定の実施形態において、deNAcSAエピトープ、例えば、細菌の多糖莢膜上のdeNAcSAエピトープを有する細菌 (例えば、ナイセリア属菌 (例えば、髄膜炎菌、特にグループB髄膜炎菌)、大腸菌K1) による感染の疾患または疾患の症状のリスクのあるまたは有する宿主の免疫処置用のキットを提供する。このキットは、ポリシアル酸誘導体および／またはそれに対して特異的な抗体を含む医薬組成物、ならびに細菌感染を有するまたはリスクのある宿主の免疫処置または治療における効果的使用に関する指示書を含む。そのような指示書は、適切な取扱特性、投与計画および投与方法などだけでなく、対象を脱N-アセチル化シアル酸 (deNAcSA) エピトープについて場合によってスクリーニングするための指示書をさらに含んでいてよい。この態様は、キットの施術者が、ポリシアル酸誘導体および／またはそれに対して特異的な抗体による免疫処置に対する対象の潜在的反応性を評価する助けとなり得る。したがって、他の実施形態において、キットは、SEAM3 (ATCC 寄託番号HB-12170) などの、がん細胞の細胞外

でアクセスできる表面上の脱N-アセチル化シアル酸 (d e N A c S A) エピトープを検出するための抗体または他の試薬をさらに含んでよい。

本明細書で用いている「システム」という用語は、本明細書で開示した方法を実施する目的のためにまとめられている単一または異なる組成物中に存在するポリシアル酸誘導体および／またはそれに対して特異的な抗体ならびに1つまたは複数の第2の治療薬の集合を意味する。例えば、まとめられ、対象に併用投与される別個に得られたポリシアル酸誘導体および／またはそれに対して特異的な抗体ならびに化学療法剤形は、本発明によるシステムである。

【実施例】

【0114】

以下の実施例は、本発明をさらに例示するものであり、その範囲を限定するものと解釈すべきではない。

本明細書に記載する実施例および実施形態は、例示目的のためのものにすぎず、それに照らしての様々な修正または変更は、当業者に示唆され、本出願の精神および範囲ならびに添付する特許請求の範囲内に含まれることが理解される。本明細書で引用したすべての刊行物、特許および特許出願は、これによって、すべての目的のためにそれらの全体として参照により組み込まれている。

非還元端脱N-アセチル残基が富化され、エキソノイラミニダーゼ分解に対して抵抗性のある合成脱N-アセチルシアル酸抗原 (ポリ α (2 $\rightarrow$ 8) N-アセチルノイラミン酸) の調製を実施例1~3で述べる。非富化またはエキソノイラミニダーゼ分解に対して抵抗性でない他のポリシアル酸材料を対照とした本材料の試験、ならびに様々ながん細胞への細胞外での曝露後に実質的に分解されずに取り込まれ、細胞表面上に提示されるそれらの能力を実施例4~5で述べる。実施例6では、合成抗原が抗体の結合だけでなく、細胞内へのその取込みも促進する能力を述べる。実施例7および8では、それぞれN-プロピオニルPSA抗原の調製およびSEAM3阻害検定を述べる。実施例9では、ポリシアル酸 (PSA) 誘導体 (およびオリゴシアル酸またはオリゴ糖 (OS) 誘導体と呼ばれるより短い鎖長のPSA誘導体) 中のN-アセチルシアル酸および脱N-アセチルシアル酸含量を測定する実例としての方法を述べる。実施例10では、時間制御アルカリ脱N-アセチル化による、脱N-アセチルシアル酸残基を含む規定のOS誘導体の製造を述べる。実施例11では、ジャーカットT細胞白血病細胞の生存能に対する実施例10に従って製造したOSの影響を述べる。実施例12では、PSA材料の時間制御脱N-アセチル化および非酸化加水分解による、非還元端脱N-アセチル残基が富化された規定のOS誘導体の製造を述べる。実施例13では、ジャーカット白血病細胞に対して細胞傷害性である実施例12に従って製造したOS誘導体の精製を述べる。

【0115】

(実施例1)

コロミン酸の脱N-アセチル化

コロミン酸 (100mg、Sigma-Aldrich Chemical Company、Saint Louis、MO) および10mgの水素化ホウ素ナトリウム (Sigma-Aldrich) を8.8mlの水に溶解した。水酸化ナトリウムの50% (重量/重量) の溶液 (1.2ml) を加え、溶液を混合し、テフロン製蓋付きのガラス製加水分解チューブ (Pierce Chemical Company、Rockford、IL) に入れ、90 $^{\circ}$ C~100 $^{\circ}$ Cに2時間加熱した。溶液を室温に冷却し、2M HClを加えて、溶液のpHを約8に低下させた。溶液を4Lの水中で2回透析し (1kDaカットオフ)、凍結乾燥した。

【0116】

(実施例2)

脱N-アセチル化コロミン酸の部分的再N-アセチル化

凍結乾燥脱N-アセチル化コロミン酸 (約80mg) を5mlの水に再懸濁し、2M NaOHでpHを8~9に調整した。無水酢酸 (Sigma-Aldrich) を攪拌し

10

20

30

40

50

ながら0.1mlずつ5回に分けて数時間にわたって加えた。溶液のpHをpH計でモニターし、pHを8～9に維持するために必要に応じて2M NaOHを加えた。反応の完結時に、凍結乾燥の前に溶液を透析した。再N-アセチル化コロミン酸は、レゾルシノール検定（実施例9参照）により測定したとき一般的に10%～30%の脱N-アセチル化残基を含む。

【0117】

（実施例3）

非還元端脱N-アセチルを含むPSAの富化

エキソノイラミダーゼSIALIDASE A（商標）（Prozyme、San Leandro、CA）による処理により、実施例2のPSA材料を非還元端脱N-アセチル残基について富化させた。実施例2からの凍結乾燥再N-アセチル化コロミン酸粉末（50mg）を2.5mlの50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7に再懸濁した。SIALIDASE A（商標）（10μl、1U/ml、Prozyme）を加え、溶液を透析チューブ（1kDaカットオフ）に移し、1Lの50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7中に入れ37℃で3～4日間放置した。酵素により放出されたN-アセチルノイラミン酸は透析膜を通過したが、酵素および脱N-アセチル残基における非還元端で終わるPSAは保持される。

あるいは、PSA材料を5.0mlの50mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.5に再懸濁した。シアリダーゼA（25ul、1U/ml）を加え、反応物を37℃で2日間放置した。その後、0.1M NaOHを室温で加え1時間放置し、反応を終結させ、次いで、氷AcOHで中和した。酵素により放出されたN-アセチルノイラミン酸を4Lの水に対する2回の透析（1kDaカットオフ）により除去した。

【0118】

（実施例4）

がん細胞におけるSEAM3反応性抗原の発現の増大

ノイラミン酸を含むPSA抗原（すなわち、PSAにおける脱N-アセチルノイラミン酸残基）の発現に対する実施例3からの外因性PSA誘導体の効果を試験した。細胞を誘導体の存在下で培養した後にCHP-134神経芽腫、ジャーカットT細胞白血病およびSK-MEL28黒色腫細胞をPSA誘導体に曝露したSEAM3に対する結合についてフローサイトメトリーにより試験した。SEAM3は、ノイラミン酸残基を含むPSAを特異的に認識する（参照により本明細書に組み込まれている、米国出願番号第11/645255号およびPCT出願番号US2006/048850）。

細胞（ウェル当たり約 10^5 個）を平底96ウェル組織培養プレート（Nunc、Thermo-Fisher）上で平板培養し、10mM（290Daの残基質量に基づく）コロミン酸（すなわち、大腸菌K1菌からのPSA莢膜多糖、Sigma-Aldrich）、SIALIDASE A（商標）で処理しなかった再N-アセチル化コロミン酸（「ReAc」）およびSIALIDASE A（商標）処理再N-アセチル化PSA（「ReAcSia」）を添加した増殖培地とともに結合を測定する前に24時間インキュベートした。細胞培養に加える前に、汚染微生物を不活性化するためにコロミン酸誘導体を56℃で1時間加熱した。

インキュベートした後、細胞を、96丸底プレート（Falcon）中に収集する前にトリプシン（SK-MEL-28）または細胞分散試薬（CDR、Guava Technologies、Hayward、CA）（CH-134）によりプレートから離脱させ（ジャーカット細胞は非付着性）、1000×gで5分間遠心分離し、氷冷1%（容積/容積）ホルムアルデヒドで固定した。20分後に、遠心分離（上）により細胞をペレットとし、3%（容積/容積）ヤギ血清のブロッキング溶液中で1時間インキュベートした。ブロッキング後、一次抗体を加え、4℃で一夜インキュベートした。ペレット化および氷冷PBS中再懸濁により細胞を2回洗浄した。二次抗体（FITC結合ヤギ抗マウスIgG（Fab）₂、Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA）を細胞とともに暗所で4℃で少なくとも1時間インキュベートした。さらに

一連の遠心分離および洗浄（3回）の後にGuava East Cyteフローサイトメーター（Guava Technologies）により結合を分析した。対照サンプルは、ベースライン蛍光を発生させるのに用いたアイソタイプ適合無関連抗体（Southern Biotech、Birmingham、AL）、またはSK-MEL28細胞の細胞により特異的に発現される抗原と反応性である陽性対照mAb（すなわち、抗GD3mAb R24（Axxora LLC製のMEL-1、San Diego、CA）で処理した。

【0119】

図1～4に示すように、SEAM3は、3つの細胞株のすべての表面に結合した。図4に示すように、SEAM3結合について陽性の細胞の割合は、細胞を再N-アセチル化コロミン酸（「ReAc」）またはSIALIDASE A（商標）処理再N-アセチル化PSA（「ReAc Sia」）とともにインキュベートしたときに、無誘導体（なし）またはコロミン酸（Col）と比較して増加する。実際、コロミン酸とのインキュベーションにより、SEAM3結合について陽性である細胞の割合は減少する（図4の上のパネル）。重要なことに、シアリダーゼ処理再N-アセチル化コロミン酸（ReAc Sia）とともにインキュベートした細胞の蛍光は、無誘導体、コロミン酸、または再N-アセチル化コロミン酸（ReAc）と比較して10～30倍増加しており（図4の下のパネル）、細胞表面上のSEAM3反応性ノイラミン酸含有PSAの量は、誘導体を外部から供給することによって著しく増加することが実証されている。

【0120】

（実施例5）

共焦点顕微鏡検査

外部から加えたSIALIDASE A（商標）で処理した再N-アセチル化PSA（「ReAc Sia」）が細胞により取り込まれ、複合糖質に組み込まれることを示すために、実施例3で述べたように調製したコロミン酸またはReAc SiaとともにインキュベートしたSK-MEL28細胞に対するSEAM3の結合を共焦点顕微鏡検査法により分析した。SK-MEL28細胞（約 10^5 個の細胞）を、ポリL-リシン（Nunc）で処理したマルチウェル顕微鏡スライド上で培養した。示したコロミン酸誘導体（2.5 mg/ml）とともに一夜インキュベートした後に、細胞をPBS緩衝液で緩やかに洗浄し、氷冷1%（容積/容積）ホルムアルデヒドで固定した。20分後に、非特異的結合を5%ヤギ血清の溶液で1時間ブロックする前に細胞をPBSで洗浄した。細胞内に存在するSEAM3反応性抗原の存在を観察するために、細胞を5%ヤギ血清中トリトン（Triton）X-100（0.5重量/容積%、Sigma）で1時間処理した。細胞をペレットとし、洗浄することにより、トリトンを除去した後、一次抗体を加え、4℃で一夜インキュベートした。Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546またはAlexa Fluor 633を結合させたアイソタイプ特異的二次抗体（ヤギにおいて産生された）を暗所で4℃で少なくとも1時間適用する前に（発蛍光団を結合させたすべての二次抗体はInvitrogen、Carlsbad、CAから入手した）、細胞を氷冷PBSで緩やかに連続洗浄した（少なくとも2回）。さらに緩やかに連続洗浄した後、DAPIを含む硬化封入剤（Vectra shield（商標）、Vector Laboratories、Burlingame、CA）を適用した。

【0121】

共焦点画像をカリフォルニア州バークレーのカリフォルニア大学生物学画像化施設（Biological Imaging Facility、University of California、Berkeley、CA）においてZeiss Meta 510 CLSM顕微鏡を用いて取得し、ImageJ Software（NIH）を用いて解析した。単独で適用した対照抗体および二次抗体を常法により用いてバックグラウンド蛍光を評価した。ガングリオシドGD3、R24に対して特異的な陽性対照mAbは、SK-MEL-28黒色腫細胞に対する結合について陽性であった（データは示さず）。

図5に共焦点顕微鏡により測定したSK-MEL-28黒色腫細胞に対するSEAM3

の結合に起因する細胞表面上の蛍光（グレースケール図における赤色染色は暗い核を取り囲む淡灰色によって表されている）。蛍光は細胞表面にわたって均一であり、視野内のすべての細胞はSEAM3の結合に伴う明るい蛍光を示している。図5のパネルAにコロミン酸のみとともにインキュベートした細胞を示し、図5のパネルBに細胞をシアリダーゼで処理した再N-アセチル化コロミン酸（「ReAcSia」）とともにインキュベートしたときのSEAM3結合の大きい増加を示す。図5のパネルCおよびDに界面活性剤トリトンX-100による処理によりmAbに対して透過性とした場合のそれぞれコロミン酸またはReAcSiaとともにインキュベートした細胞における細胞内SEAM3反応性抗原の存在を示す。共焦点顕微鏡検査法により明らかになった細胞内のSEAM3反応性抗原の存在の増加は、細胞をReAcSia誘導体と接触させることによって誘導体の細胞による取込みと細胞内小胞、ゴルジ複合体および核膜中に存在する複合糖質への組込みがもたらされることを示すものである。

【0122】

（実施例6）

モノクローナル抗体の取込み—SK-MEL28細胞によるSEAM3のインターナリゼーションの測定

この実験の目的は、細胞表面上に発現した抗原に結合したSEAM3が、エンドサイトーシスによりSEAM3が細胞によって取り込まれることをもたらすかどうかを確認することであった。上の実施例5で述べたように、SK-MEL28細胞を6ウェル組織培養プレート（Nunc）上で培養した。SEAM3（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、抗GD3mAb R24（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）ならびに無関連マウスIgG2bおよびIgG3アイソタイプ対照mAb（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Southern Biotech、Birmingham、AL）を細胞とともに48時間インキュベートした。次いで、付着細胞をPBS緩衝液で緩やかに3回洗浄し、最後にRIPA細胞溶解および抽出緩衝液（ $250\mu\text{l}$ 、Pierce Chemical Company、Rockford、IL）に懸濁し、 1ml プラスチックシリンジのプランジャーを用いて細胞と緩衝液を混合した。細胞/RIPA懸濁液を等容積の $2\times\text{SDS-PAGE}$ サンプル緩衝液と混合し、5分間煮沸し、タンパク質を4%～15% SDS-PAGE勾配ゲル（Bio-Rad、Richmond、CA）上で分離した。

分離されたタンパク質をBio-Rad半乾燥転移装置を用いてウェスタンブロット用ニトロセルロース膜に転移した。PBS緩衝液中5%無脂肪乾燥乳を用いて膜を1時間ブロックした後、HRP結合ウサギ抗マウスIgG、A、M二次抗体（Zymed、South San Francisco、CA）を同じPBS/5%乳ブロッキング緩衝液に加えた。膜を洗浄し、Western Lighting化学発光試薬（PerkinElmer、Waltham、MA）で顕色化した。IgG軽鎖が位置する約 15kDa ～約 35kDa の見かけの分子質量を有するゲルの領域を図6に示す。

ウェスタンブロットは、陰性対照無関連mAbの少量の取込み（IgG2b）または取込みなし（IgG3）の状態を示している。これに対して、SK-MEL28細胞によりインターナライズされることが示された（Iglesia-Bartolomeら、FEBS J、2006年、273巻、1744頁）R24および特にSEAM3のエンドサイトーシスは著しく増加した。したがって、SK-MEL28細胞の表面上に発現した抗原に対するSEAM3の結合は、mAbの細胞内への侵入を促進し、mAbに結合した細胞傷害性薬物および毒素の送達の手段を提供する。

【0123】

（実施例7）

ドデシルアミンN-プロピオニルポリシアル酸（NP r PSA）の調製

実施例1で述べたように調製したdeNAcPSA（ 50mg ）を水（ 5ml ）に懸濁し、 2M NaOHでpHを8～9に調整した。無水プロピオン酸（Sigma-Aldrich）を攪拌溶液に 0.1ml ずつ5回に分けて1時間にわたって加えた。 2M NaOHを加えてpHを8～9に維持した。反応混合物を上述のように水中で透析し、凍結

10

20

30

40

50

乾燥した。

NPrPSAの溶液(10mg/ml)を酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.5中1mM過ヨウ素酸ナトリウム(Sigma-Aldrich)により暗所で室温で30分間酸化した。エチレングリコール(Sigma-Aldrich)の水溶液を1%(容積/容積)の最終濃度まで加え、さらに溶液を30分間インキュベートすることによって過剰の過ヨウ素酸塩を分解した。溶液を水中で透析し、凍結乾燥した。

【0124】

上述のように調製した20mgの酸化NPrPSAを水(5ml)中で5μlのドデシルアミン(Thermo-Fisher)と混合した。pHを2M HClで8に調整し、混合物を3時間攪拌した。水素化シアノホウ素ナトリウム(5mg、Sigma-Aldrich)を加え、混合物を室温で24時間攪拌し、次いで、水中で3~5日間透析して過剰のドデシルアミンを除去した。ドデシルアミンNPr誘導体(PBS緩衝液中約1mg/ml)を4℃で保存した。

【0125】

(実施例8)

SEAM3阻害剤アッセイ

上の実施例7の選択されたドデシルアミンNPr誘導体をPBS緩衝液で1:200に希釈し、96ウェルマイクロタイタープレート(Immulon IHB、Dynatech、Chantilly、VA)のウェル当たり100μlを加えて、SEAM3結合の阻害剤の試験用のELISAプレートを調製した。プレートを検定に用いる前に4℃で一夜保存した。プレートをPBS緩衝液(5×)で洗浄し、1%(重量/容積)のウシ血清アルブミンを含むPBS緩衝液(Sigma、ブロッキング緩衝液)を用いて室温で1時間ブロックした。PSAおよびOS誘導体をプレート上でブロッキング緩衝液で希釈し、次いで、SEAM3をブロッキング緩衝液に加えた(ウェル当たり合計100μl)。プレートを4℃で一夜インキュベートした後、プレートをPBS緩衝液(5×)で洗浄し、ブロッキング緩衝液で希釈したウサギ抗マウスアルカリホスファターゼ結合抗体(Zymed、South San Francisco、CA)を加えた。さらに1時間インキュベートした後、プレートをPBS緩衝液で洗浄し(5×)、1mM MgCl₂を含む50mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH9中p-ニトロフェニルリン酸基質(Sigma-Aldrich)を加えることによって、結合抗体を検出した。室温で60分間のインキュベーションの後の405nmでの吸光度をBioRadモデル550マイクロタイタープレート・リーダー(Richmond、CA)を用いて測定した。

【0126】

(実施例9)

PSAおよびOS中のN-アセチルおよび脱N-アセチルシアル酸含量の定量

PSAまたはOS誘導体保存溶液またはカラム画分中のシアル酸および脱N-アセチルシアル酸の濃度を以下のように修正したSvennerholmレゾルシノール反応(Svennerholm L. (1957年)、Biochim. Biophys. Acta、24巻、604頁)により測定した。レゾルシノール作業試薬は、9.75mlの水、0.25mlの0.1MCuSO₄・5H₂O、10mlの20mg/mlレゾルシノール水溶液および80mlの濃HClを混合して調製した。レゾルシノール作業試薬(100μl)をポリプロピレン製の深ウェル(2ml)マイクロタイタープレート中でシアル酸もしくは脱N-アセチルシアル酸サンプル水溶液(50μgまでのシアル酸)または標準保存水溶液(100μl)と合わせた。プレートをプレートカバーで密封し、沸騰水浴中で30分間加熱した。室温に冷却した後、イソアミルアルコール(200μl)を加え、ピペットで混合した。相を分離し、上のイソアミルアルコール層を除去して清浄なマイクロタイタープレートに移した。100μlのイソアミルアルコール抽出液および下の水溶液を別個にポリスチレン製のマイクロタイタープレートに移し、495nmおよび580nmでの吸光度を測定した。

それぞれの標準曲線と比較してN-アセチルシアル酸の量を585nmでのイソアミル

アルコール画分の吸光度から求め、脱N-アセチルシアル酸の量を495nmでの水性画分の吸光度から求めた。N-アセチルシアル酸標準は、N-アセチルノイラミン酸（Sigma）であり、脱N-アセチルシアル酸標準は、アルカリ加水分解反応が2時間の代わりに6時間であったことを除いて、実施例1で述べたように調製した。シアル酸標準中で起こる脱N-アセチル化の量を測定することにより、検定の酸加水分解段階中に起こる脱N-アセチル化の量について脱N-アセチルシアル酸の量を補正した。

【0127】

（実施例10）

時間制御脱N-アセチル化によるOS誘導体の製造

脱N-アセチルシアル酸残基の非還元端が富化したPSAおよびOS誘導体の混合物の合成は、実施例3で述べており、酵素反応段階を用いる。以下に述べる化学合成法は、酵素を用いる必要はなく、少ない副生成物を含む生成物を生成し、規定のOS誘導体の精製を促進するものである。

コロミン酸（100mg）を2M水酸化ナトリウム中10mgの水素化ホウ素ナトリウムと混合し、実施例1で述べたようにガラス製加水分解チューブ中で90℃～100℃に加熱した。T=0、1、2および6時間にCarboPac PA200カラムを用いたパルスアンペロメトリー検出による高性能陰イオン交換クロマトグラフィー（HPLC-PAD）（カラム、GP40ポンプおよびED40電気化学検出器はDionex、Sunnyvale、CAから入手した）による分析のために1mlのアプリコットを採取した。カラムを0.5ml/分の流量で40分間にわたる93%緩衝液A（0.1M水酸化ナトリウム）7%緩衝液B（1酢酸ナトリウムを含む0.1M水酸化ナトリウム）から0%緩衝液Aおよび100%緩衝液Bへの勾配で溶出させた。図7に各時点（1：t=0、2：t=1時間、3：t=2時間、4：t=6時間）の反応混合物のHPLC-PADクロマトグラムを示す。より小さいオリゴ糖が初期に、より長い多糖が後に溶出する。各オリゴマーは、C2ケトンの水素化ホウ素ナトリウム還元により2つの鏡像異性体が生成するのでT=0にダブルレットとして出現する（クロマトグラム1）。時間の経過に伴う脱N-アセチル化の進行は、完全な脱N-アセチル化を有する各オリゴマーの単一ピークに最終的に転換する、1時間後の各オリゴマーの複数のピークの出現によって示される。2時間後に、オリゴマーのピークの間にピークとして出現するますます多くの分解生成物が生成している。

【0128】

アルカリ脱N-アセチル化の最適な時間を決定するために、各一部試料中の多糖がジャーカット細胞に対するSEAM3の結合を増加させる能力を実施例4で述べたフローサイトメトリー結合検定を用いて試験した。結合検定に用いる前に、一部試料のpHを2M HClで8に調整し、水中で透析し、凍結乾燥し、上述のように溶液（2.5mg/ml）を56℃に加熱することにより滅菌した。図8のパネルAは蛍光標識二次抗体により検出されたSEAM3結合に起因するジャーカット細胞の平均蛍光を示す棒グラフである。図8のパネルAに示すデータに基づいて、脱N-アセチル化の最適な時間は1時間またはそれ未満である。同じ実験を10、20、40および60分間の加水分解の後に採取した一部試料を用いて繰り返し、SEAM3結合を増加させる能力について試験した（実施例4）。図8のパネルBに示すように、40分間の脱N-アセチル化によって、SEAM3結の増加に最も活性が高い誘導体が生成した。この40分間の脱N-アセチル化の処置により、一般的にポリシアル酸含有物質の25%～65%脱N-アセチル化残基が生成した（例えば、実施例9に示したレゾルシノール検定により測定したとき、コロミン酸（NmBPSA）が35%、NmCPSAが56%）。

【0129】

（実施例11）

ジャーカットT細胞白血病細胞の生存能に対する時間制御脱N-アセチル化により製造したOS誘導体の効果

実施例10で述べたように調製した部分的に脱N-アセチル化されたコロミン酸誘導体

(40分deNAccol)の接触の培養中のヒトT細胞白血病ジャーカット細胞株の生存能に対する効果を細胞生存能検定を用いて測定した。40分deNAccol保存水溶液を最初に56℃に1時間加熱して、溶液を滅菌した。40分deNAccolは0.22μmフィルターを通過しない高分子量の凝集体を形成し、したがって、保存水溶液はろ過により滅菌することができないので、これが必要である。ジャーカット細胞(2×10⁵個細胞/ml)を図9に示すいくつかの希釈度の誘導体とともに丸底96ウェルプレート(Falcon)、200μl/ウェルで40時間インキュベートした。次いで、プレートを1000×gで5分間遠心分離した。細胞をGuava ViaCount試薬に再懸濁し、Guava ViaCount検定法を用いてGuava EasyCyteフローサイトメーター(すべてGuava Technologiesから入手)で読み取った。

10

図9に示すように、40分deNAccol誘導体は、ジャーカット細胞の生存能を低下させる。生存能曲線は極めて高い濃度依存性を有し、高度に協力的過程、例えば、高分子量の複合体の協力的集合が示唆される。

α(2→9)グルコシド結合により連結されたC7-O-アセチルおよびC8-O-アセチル残基を有するN-アセチルノイラミン酸からなる髄膜炎菌血清グループC莢膜多糖ホモポリマーから調製したOS誘導体について同様な結果が得られた。

【0130】

(実施例12)

非酸化酸加水分解による非還元端脱N-アセチルシアル酸残基が富化されたOS誘導体の製造

20

非還元端における脱N-アセチルシアル酸が富化したより小さいOS誘導体を製造するために、40分アルカリ脱N-アセチル化(実施例10で述べた方法)の後に、溶液を真空中で交互に凍結および解凍することによって溶存ガスを排気した加水分解チューブ(Pierce)中、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.5中で18時間非酸化酸加水分解した。溶液からの溶存ガスの除去は、強酸または高濃度(10%)の酢酸の存在下で起こり得る多糖の酸化的損傷を最小限にするために必須であることがわかった。室温に冷却した後に、2M NaOHでpHを8~9に上昇させた。上述のように溶液を水中で透析し、凍結乾燥した。得られた物質は、非還元端におけるNeu残基が富化しており、酸化による損傷を実質的に受けていない。

30

【0131】

(実施例13)

ジャーカット白血病細胞に対して細胞傷害性である規定のOS誘導体の精製

OS(実施例12で述べたように40分アルカリ脱N-アセチル化の後に0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.5中での18時間の非酸化酸加水分解により調製した)を5mlのHiTrap QFF(商標)陰イオン交換カラムを装着したAkra(商標)FPLC(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.、Piscataway、NJ)上でのイオン交換クロマトグラフィー(AEC)により分離した。20mgのOSを25mlの20mMビスートリス緩衝液(Sigma-Aldrich)、pH7で希釈し、カラムに注入した。20mMビスートリス緩衝液中塩化ナトリウムの0M~0.25M勾配を用いてOSを30分間にわたってカラムから溶出させた(5ml/分)。画分(1ml)を深いウェルのマイクロタイタープレート(Thermo-Fisher)に前方、後方の列に交互に収集した。勾配および溶出プロファイルを図10に示す。NP r P S A-ドデシルアミン(実施例7で調製した)に対するSEAM3の結合を阻害する各画分の能力を阻害ELISA(実施例8で述べた)により測定した。また、各画分の一部をHPAC-PAD(実施例10で述べた)により分析した。図11にAECカラムからのいくつかの画分のHPAC-PADクロマトグラムを示す。クロマトグラム1は、未精製の40分deNAccol調製物である。特にクロマトグラム2において、いかにほぼ純粋な二量体が画分B9に存在しているが、後の画分C2における他の二量体(図11のクロマトグラム3)は、クロマトグラム2に示す画分B9の二量体より

40

50

早く P A 2 0 カラムから溶出することに注意すること。クロマトグラム 3 における二量体は、両残基において N-アセチル化されており、したがって、A E C カラムからより高い濃度の塩とともに溶出する。本実施例は、A E C クロマトグラフィーを用いて異なる量の N e u 残基を含む多糖をどのようにして分離することができるか、また多糖誘導体を H P A C-P A D によりどのようにして同定することができるかを例示するものである。

狭いサイズ範囲のオリゴマーを含む画分を図 1 0 の線で囲ったピークの上に示す文字によって示すようにプールし、水中で透析し、凍結乾燥した。次いで、個々の画分プールのいくつかを実施例 1 1 で述べたようにジャークット細胞の生存能を低下させる能力について試験し、N-アセチルおよび脱 N-アセチルシアル酸 (N e u) の量をレゾルシノール検定 (実施例 9) に測定した。データを表 1 に要約する。

【0132】

【表 1】

プール画分	Neuのパーセント	ジャークット細胞の生存能 低下のパーセント
A	36	25
B	17	15
C	19	9
F	14	28
G	32	8

【0133】

表 1 に示すデータから、最小の N e u 含有 O S を含む画分 (例えば、プール A d p = 2 ~ 5) は最大の O S を含む画分 (プール F) と同様に大きい細胞傷害活性を有することがわかる。すべての検定は、2.5 mg / ml (時として 250 g / ml の残基分子質量に基づいて 10 mM と表される) を用いて行った。

上の結果は、非還元端における脱 N-アセチルシアル酸が富化した P S A および O S 誘導体が、がん細胞により容易に取り込まれ、S E A M 3 に対する結合について陽性の細胞の数を増加させ、細胞に結合する抗体の量を増加させたことを実証するものである。誘導体はまた、曝露および抗原に対する抗体のインターナリゼーションにより、S E A M 3 反応性抗原を発現するがん細胞の生存能を低下させることができることが認められ、抗体の非存在下でさえも、より高い濃度でがん細胞に対して細胞傷害性であった。誘導体の高分子量複合体 / 凝集体が特に活性であることがわかった。

【0134】

さらに、がん細胞における N e u 含有シアル酸抗原の発現を増大させるのに用いることができる規定の N e u 含有 O S 誘導体を製造し、精製し、特性を評価する方法を述べた。約 2 ~ 5、特に約 2 ~ 4 の重合度、および非還元端脱 N-アセチルシアル酸残基を有する小さく、実質的に非酸化で、精製された O S 誘導体は、より長い O S 誘導体 (d p = 5 +) と同様に大きい活性を示すことが認められ、非還元端脱 N-アセチルシアル酸残基を有する最小の O S 誘導体が有効な活性に必要な最小限の特徴を含んでいることが示唆される。

上の結果および考察から、P S A および O S 誘導体は、特に細胞の脱 N-アセチルエピトープを増加させるために適用するとき、また特にがん療法に適用するとき、結合体として単独で、あるいは S E A M 3 または同様の抗原特異性を有する他の抗体による免疫療法の有効性、ならびに細胞傷害性薬物、毒素または放射性核種で修飾した抗体の取込みを増加させるために用いることができることは明らかである。

【0135】

前述の発明を明快な理解の目的のために実例および実施例により多少詳細に記述したが、一定の変更および修正は、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することな

10

20

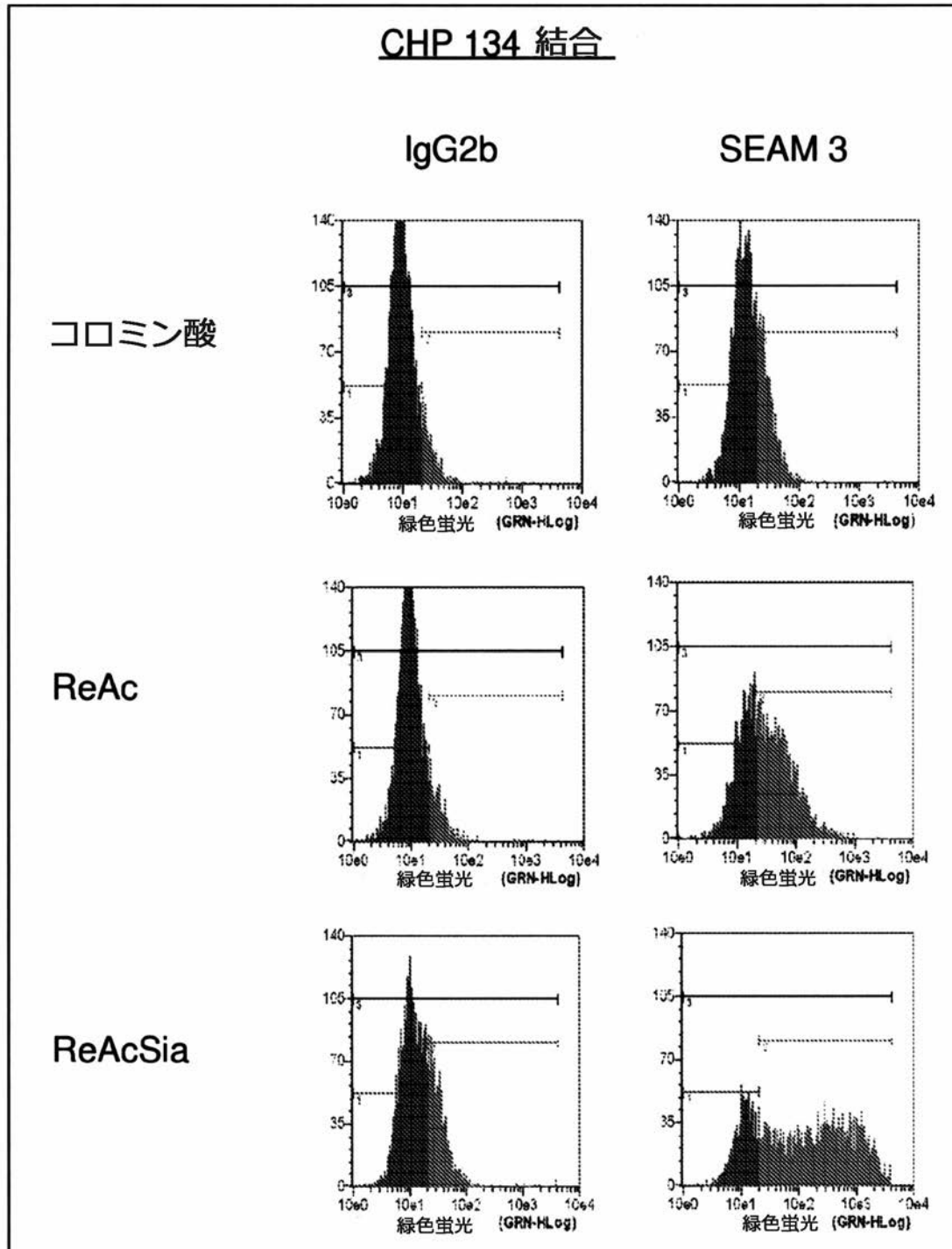
30

40

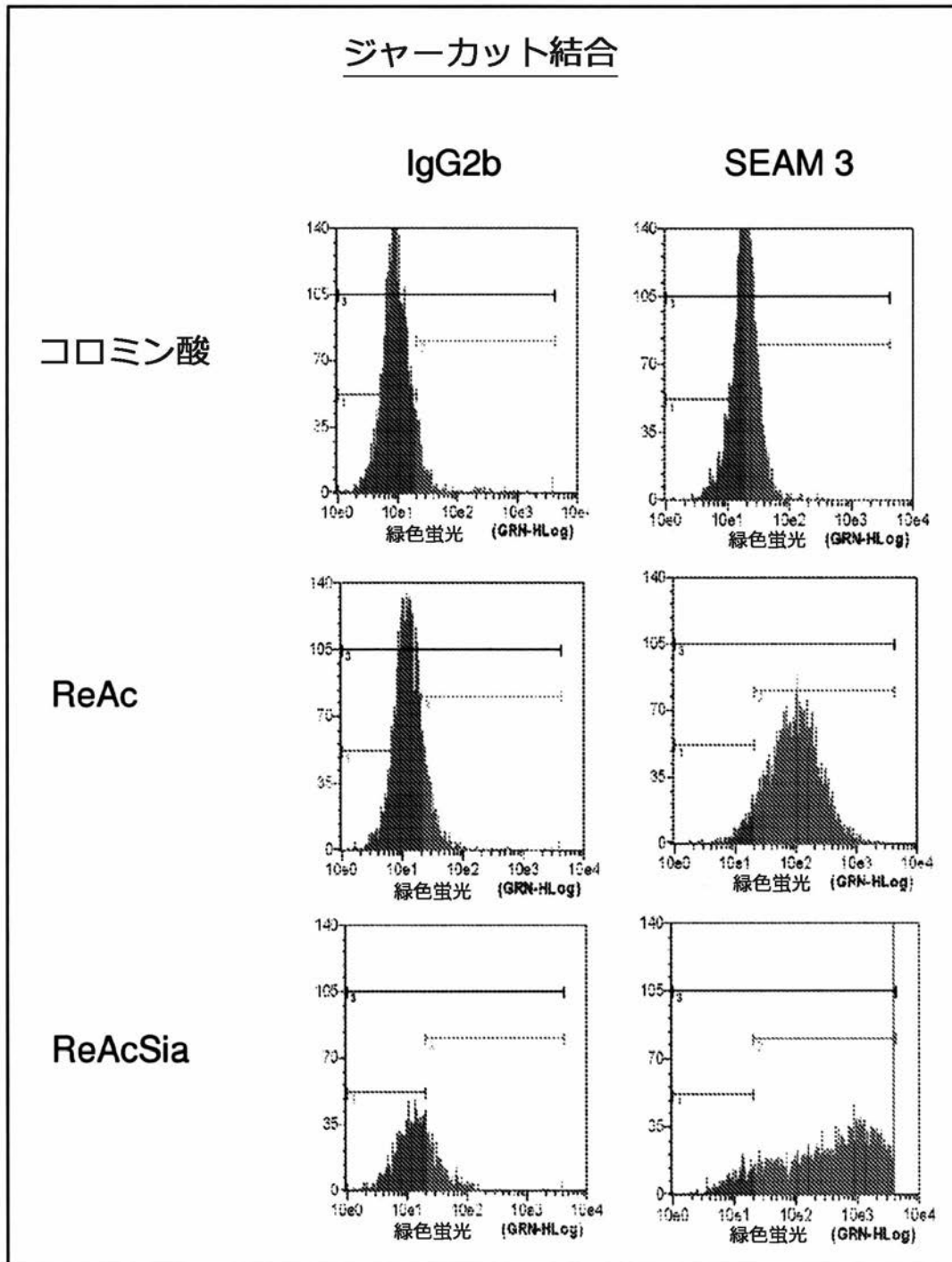
50

く行うことができることは本発明の教示に照らして当業者には容易に明らかである。

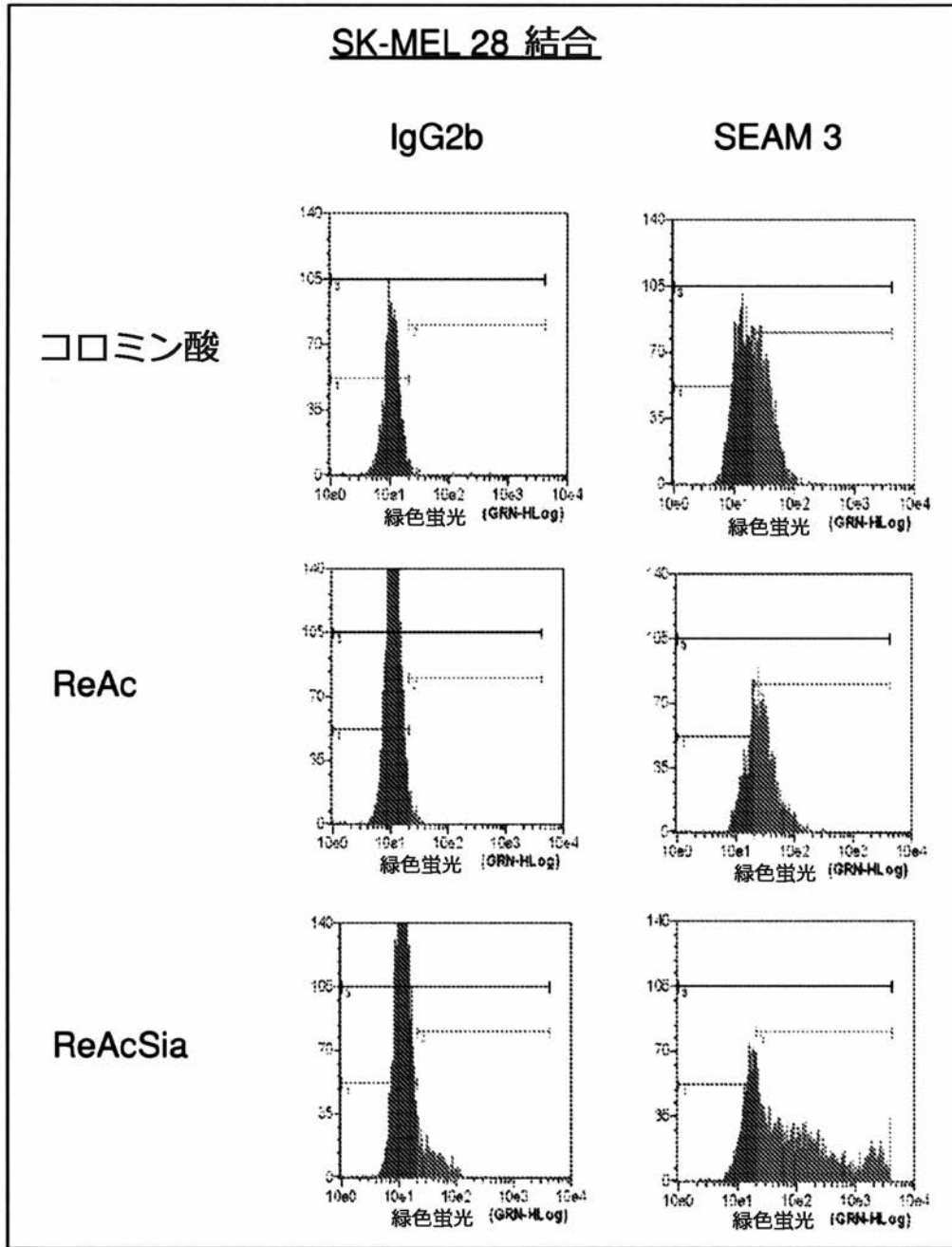
【図 1】



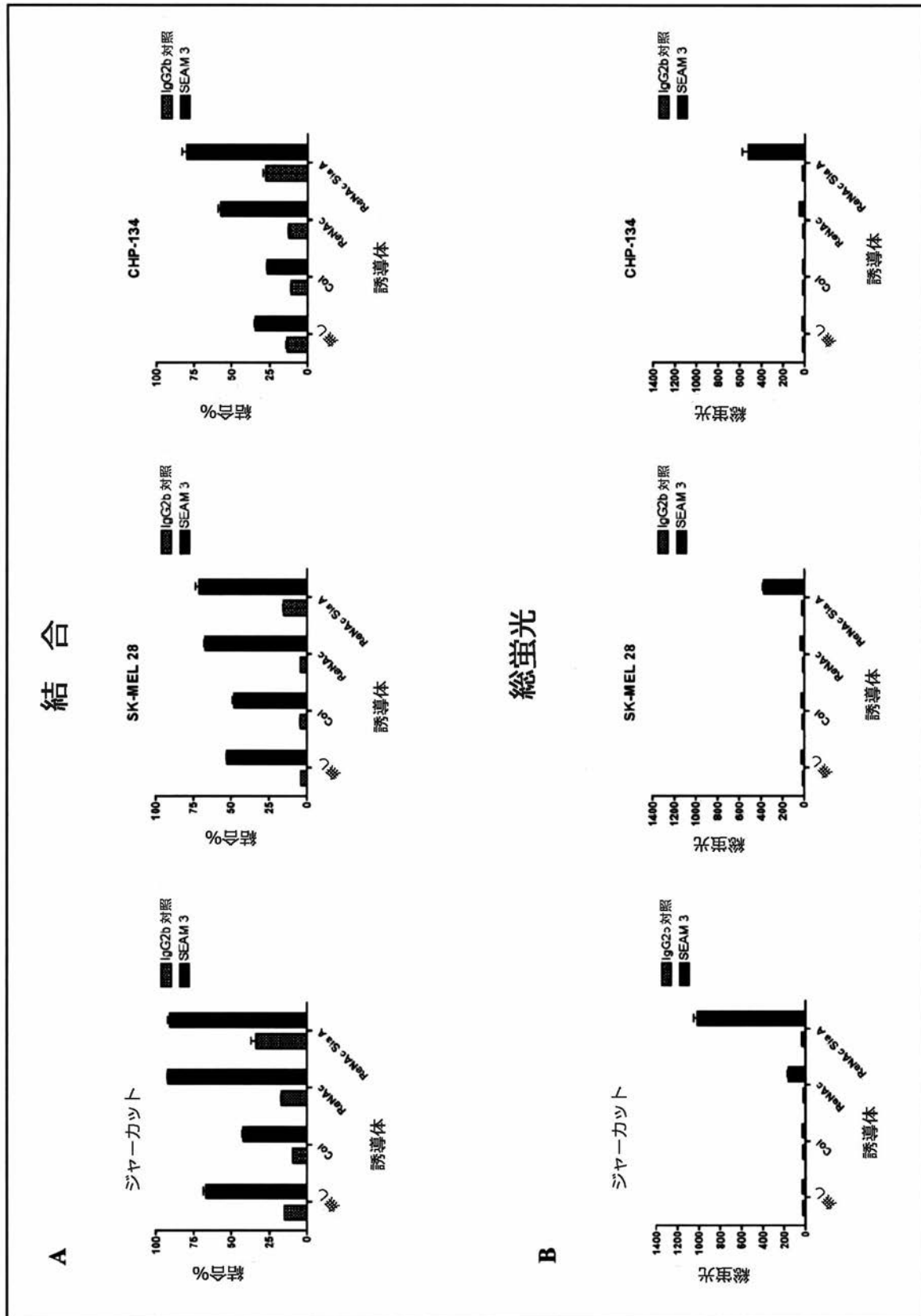
【図 2】



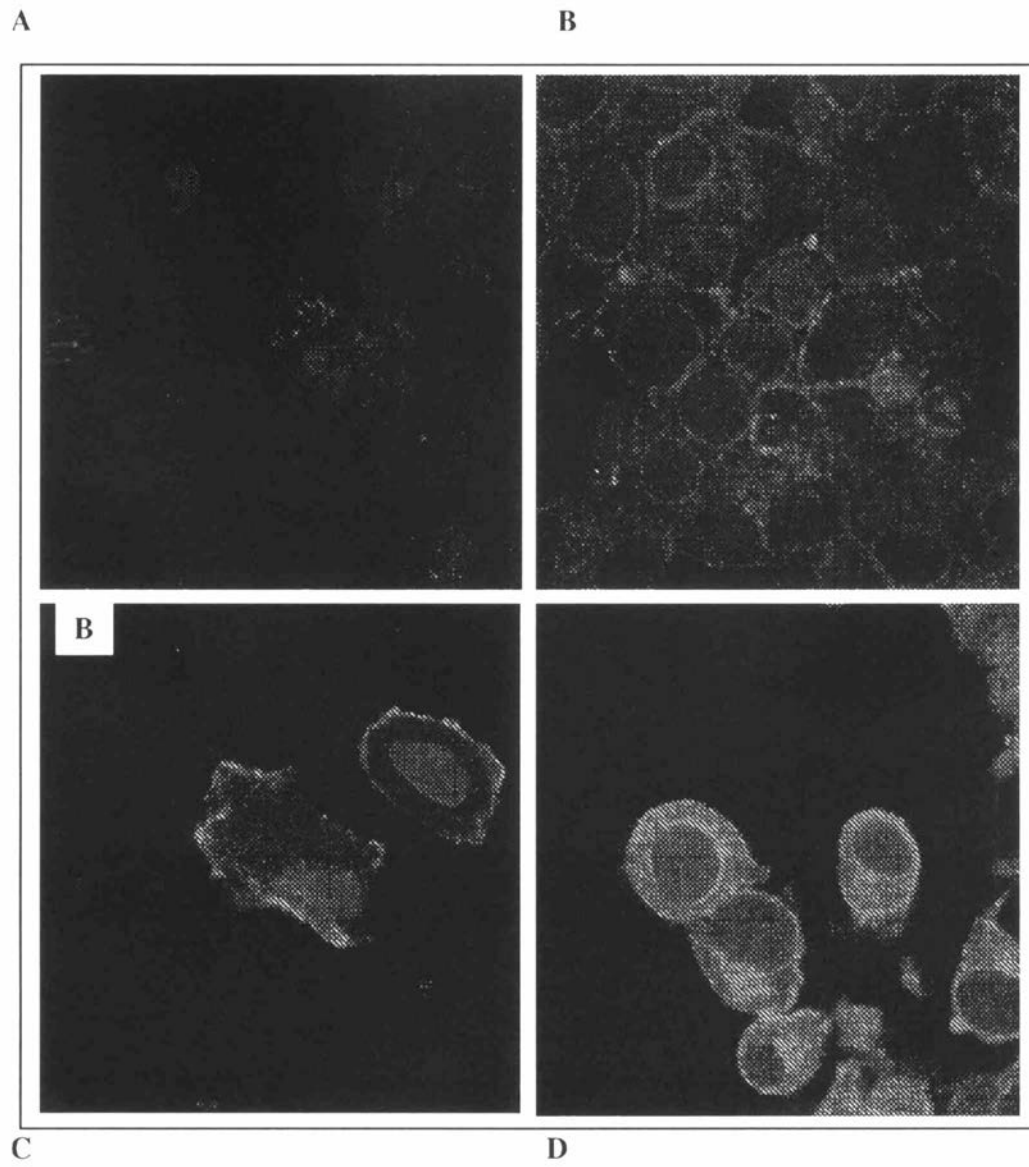
【図 3】



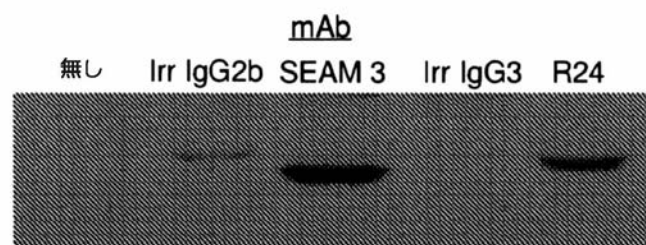
【図 4】



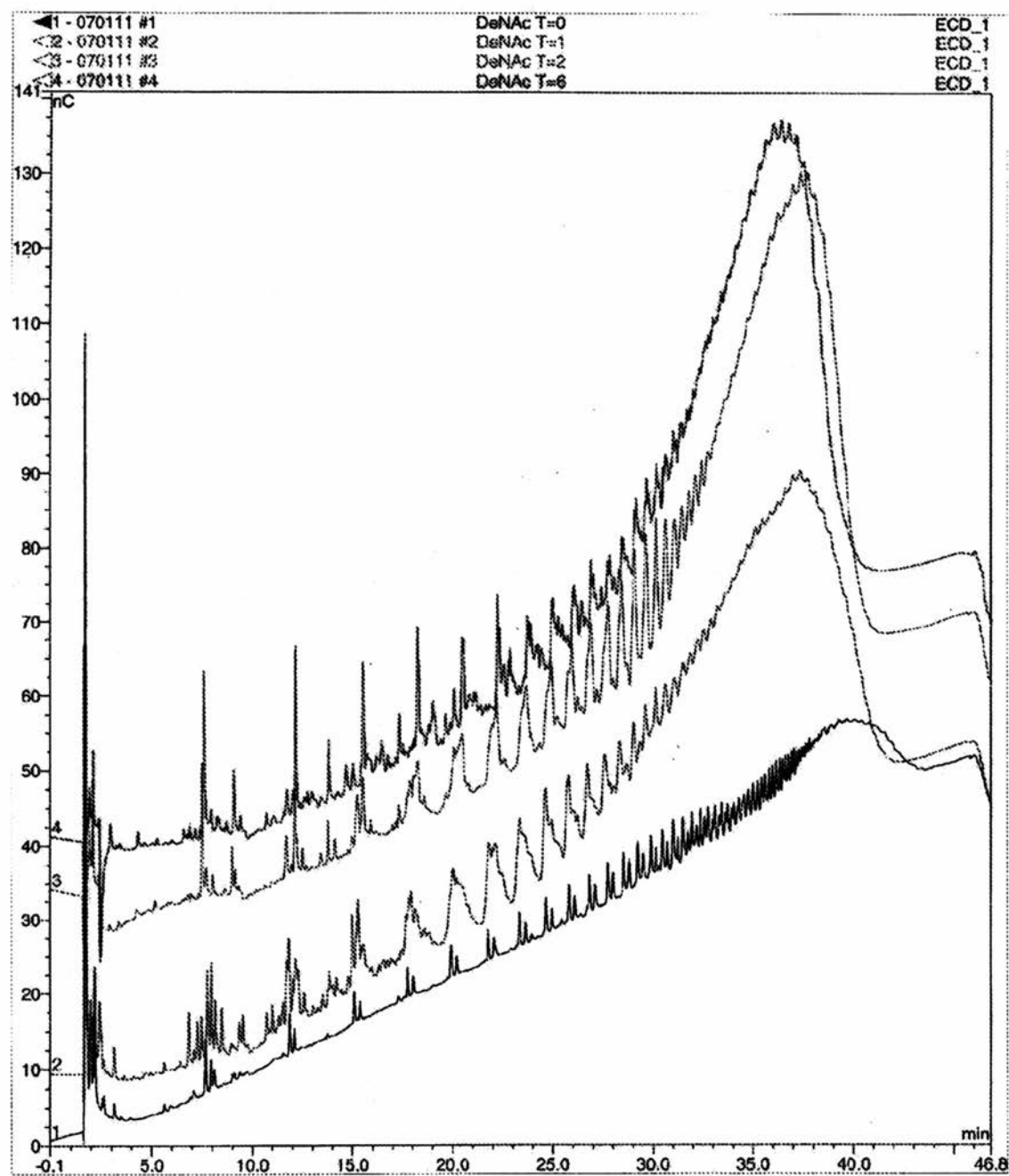
【図 5】



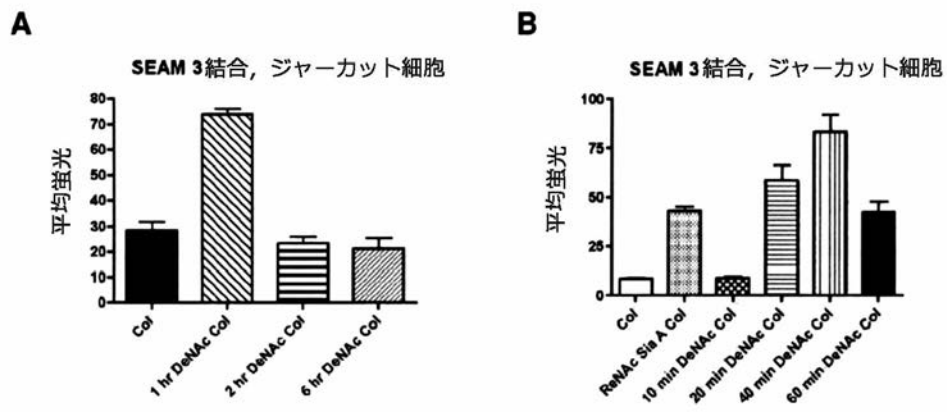
【図 6】



【図 7】

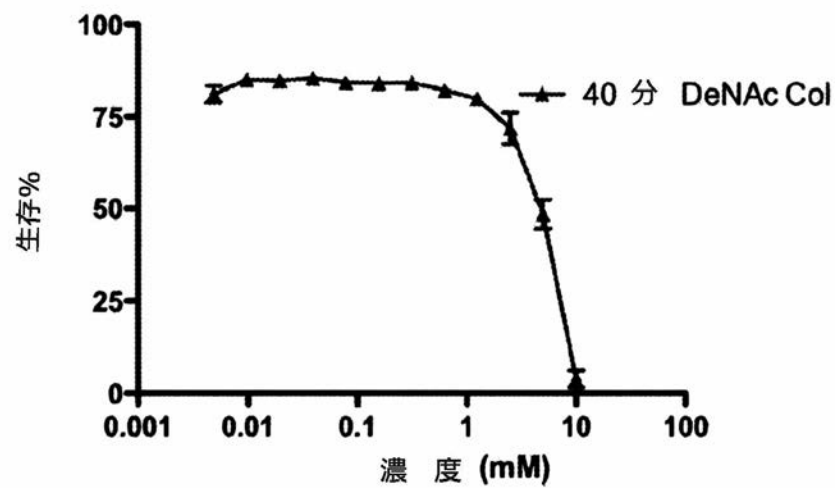


【図 8】

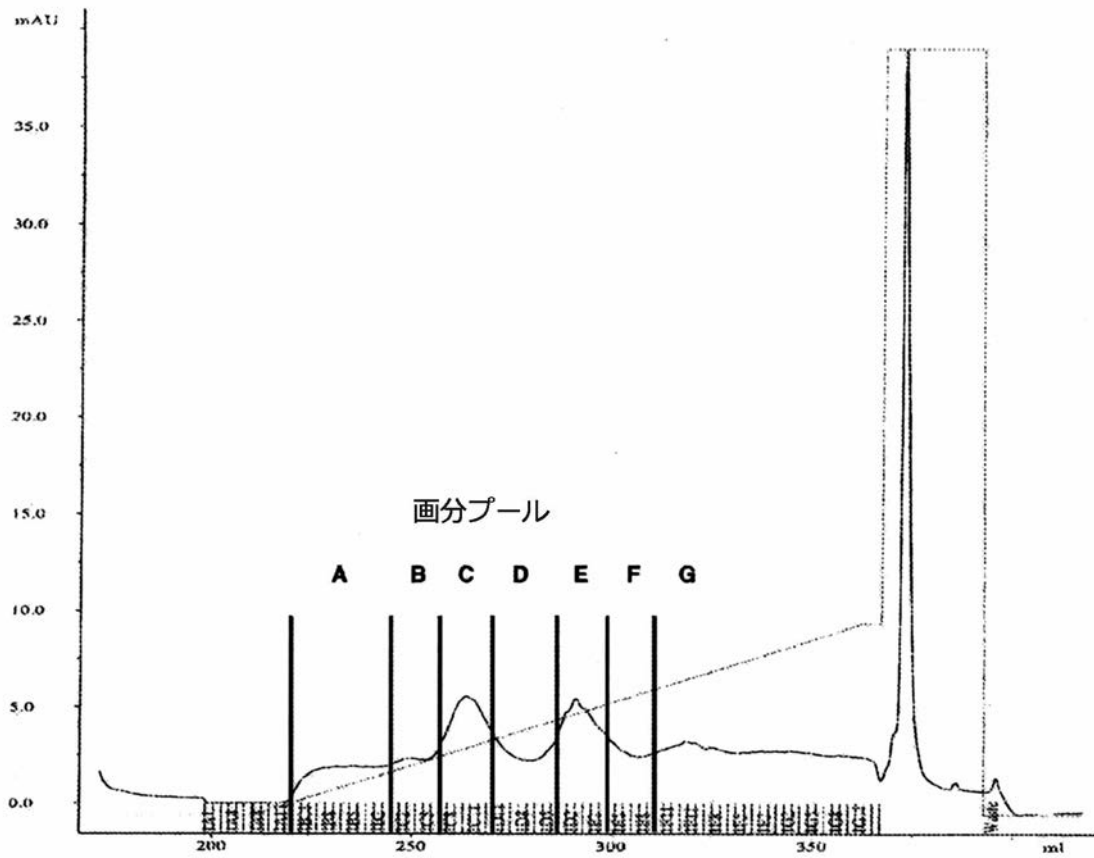


【図 9】

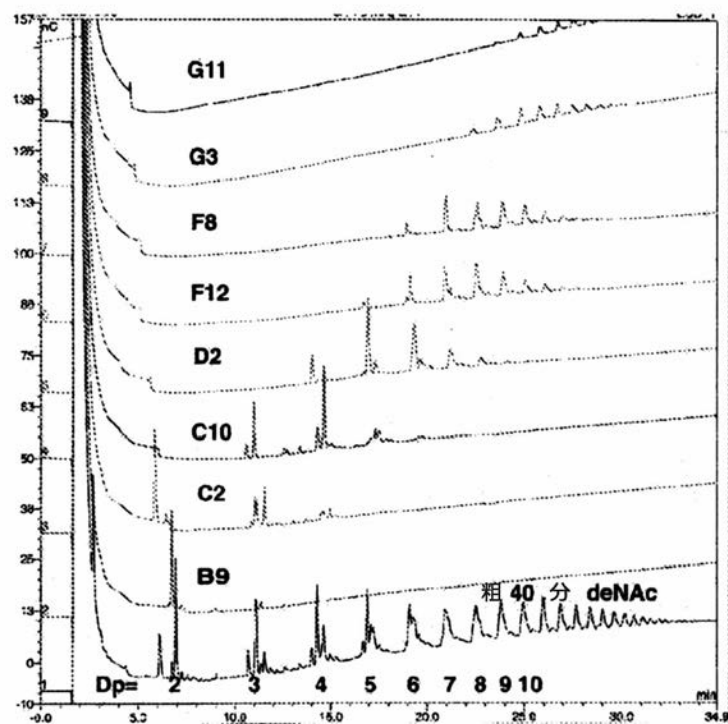
ジャーカット生存能, 40 時間インキュベーション



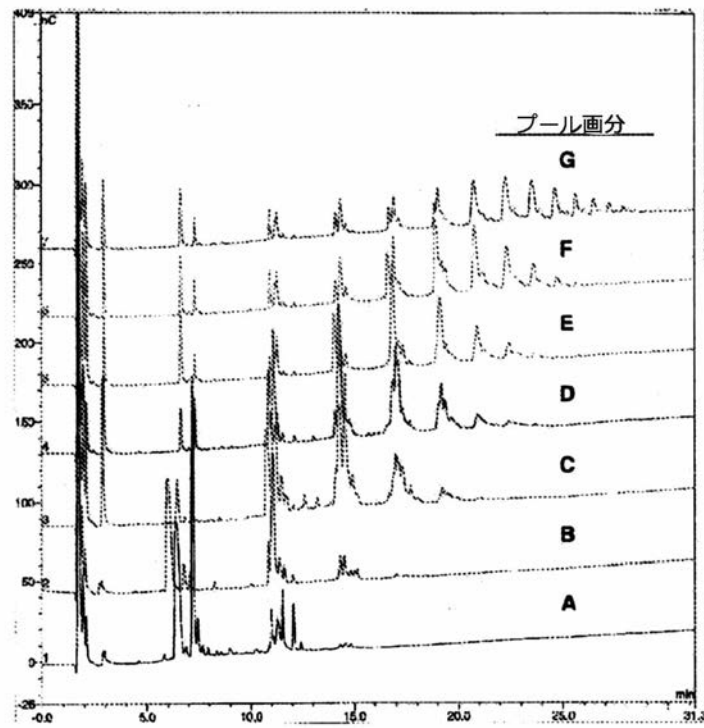
【図10】



【図11】



【図 12】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 8 B 37/00 (2006.01) A 6 1 K 39/395 T
C 0 8 B 37/00 P

(72)発明者 ハーゲン, プレント, ティー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 6 1 0, オークランド, ヴァーノン テラス 1 7 5

審査官 原田 隆興

(56)参考文献 国際公開第2006/002402 (WO, A1)
特表2001-500372 (JP, A)
特開昭62-235569 (JP, A)
特表2009-525947 (JP, A)
Iuliana Popa et al, Glycobiology, 2007年 1月22日, 17(4), p.367-373

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 1 / 7 2 6
A 6 1 K 3 9 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 2
C 0 8 B 3 7 / 0 0