

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502025

(P2004-502025A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int.Cl.⁷
C08B 37/00F I
C08B 37/00Z
テーマコード (参考)
4C090

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2002-506748 (P2002-506748)	(71) 出願人	503009177
(86) (22) 出願日	平成12年7月3日 (2000.7.3)		ザ バイオメンブレイン インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日 (2002.12.26)		アメリカ合衆国 ワシントン 98122
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/018219		, シアトル, ブロードウェイ 720
(87) 国際公開番号	W02002/002127	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		弁理士 山本 秀策
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CN, JP, KR, SG	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腫瘍関連抗原としての拡張1型スフィンゴ糖脂質鎖

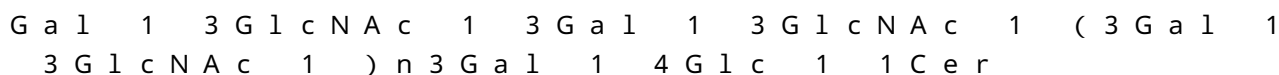
(57) 【要約】

本発明は、概して新規のヒト腫瘍関連抗原に関する。本発明は、より詳細には、拡張1型スフィンゴ糖脂質鎖およびその使用（例えば、免疫原および腫瘍マーカーとしての使用）に関する。免疫原および腫瘍マーカーとして有用な種々の化合物が提供される。本発明は、癌の検出に関連する方法を開示する。ラクト系列1型鎖の拡張形態は、種々の癌組織に存在することが示される。本発明はまた、細胞株およびそれから生成されるモノクローナル抗体を提供する。このような抗体は、診断方法または治療方法における使用を含む多数の用途を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フコシル残基および/またはシアリル残基を含むかまたは含まない、単離された化合物であって、該化合物は、以下の式：



を有し、ここで、 n は 0 または 1 以上の整数であり、そして $n = 1$ である場合、少なくとも 2 つのフコシル残基および/または 1 つ以上のシアリル残基が存在し、Gal は、ガラクトースを表し、GlcNAc は、N - アセチルグルコサミンを表し、Glc は、グルコースを表し、そして Cer は、セラミドを表し、そしてここで、該少なくとも 2 つのフコシル残基は、1 4 連結を介して該 GlcNAc 残基に連結され、かつ/または 1 2 連結を介して該末端 Gal 残基に連結され、そして該 1 以上のシアリル残基は、2 3 連結を介して末端 Gal 残基に連結され、かつ/または 2 6 連結を介して 1 つ以上の末端近傍 GlcNAc 残基に連結される、単離された化合物。

10

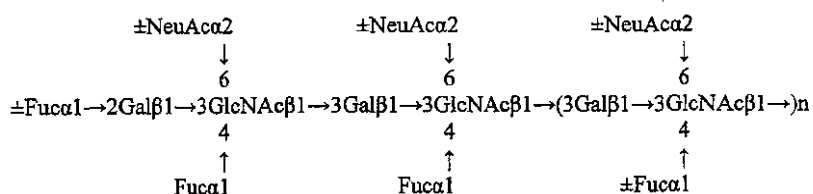
【請求項 2】

少なくとも 2 つのシアリル残基が存在する、請求項 1 に記載の単離された化合物。

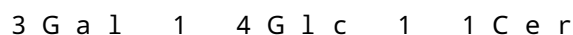
【請求項 3】

以下の式：

【化 1】



20

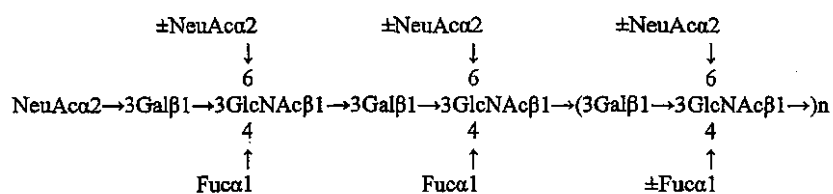


を有する、請求項 1 に記載の単離された化合物であって、ここで Fuc は、フコースを表し、そして NeuAc は、N - アセチルノイラミン酸を表す、単離された化合物。

【請求項 4】

以下の式：

【化 2】



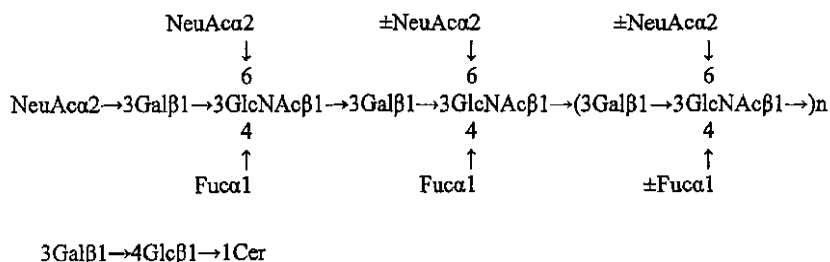
40

を有する、請求項 1 に記載の単離された化合物であって、ここで Fuc は、フコースを表し、そして NeuAc は、N - アセチルノイラミン酸を表す、単離された化合物。

【請求項 5】

以下の式：

【化 3】



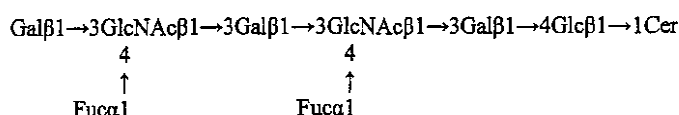
を有する、請求項 1 に記載の単離された化合物であって、
ここで F u c は、フコースを表し、そして N e u A c は、N - アセチルノイラミン酸を表す、単離された化合物。

10

【請求項 6】

以下の式：

【化 4】



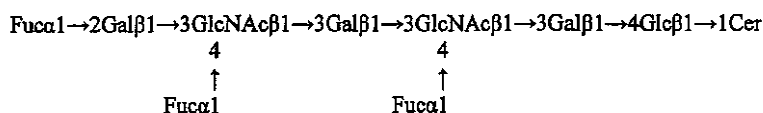
を有する請求項 1 に記載の単離された化合物であって、
ここで F u c がフコースを表す、単離された化合物。

20

【請求項 7】

以下の式：

【化 5】



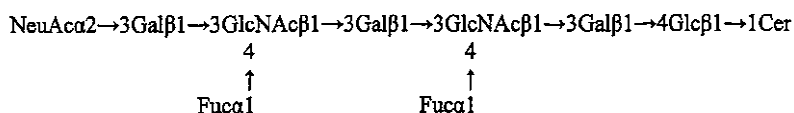
を有する、請求項 1 に記載の単離された化合物であって、
ここで F u c がフコースを表す、単離された化合物。

30

【請求項 8】

以下の式：

【化 6】



を有する、請求項 1 に記載の単離された化合物であって、
ここで N e u A c が、N - アセチルノイラミン酸を表し、そして F u c がフコースを表す、単離された化合物。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、概して新規のヒト腫瘍関連抗原に関する。本発明は、より詳細には、拡張 1 型スフィンゴ糖脂質鎖およびその使用（例えば、免疫原および腫瘍マーカーとしての使用）に関する。

【0002】

(発明の背景)

財源および人材の莫大な投資にも関わらず、癌は、依然として死亡の主要な原因の 1 つのままである。最新の癌治療は、悪性腫瘍を発症する患者の約 50 % のみを治療する。大部

50

分のヒト悪性疾患において、転移は死亡の主要な原因である。

【0003】

転移は、遠隔部位における第2の腫瘍コロニーの形成である。大部分のヒト悪性疾患において、遠隔転移は、しばしばあまりにも小さすぎて、原発腫瘍が処置される時点では検出されない。さらに、転移性コロニーの広範囲な開始は、通常、転移性疾患の臨床的症状が明らかである前に起こる。転移におけるサイズおよび年齢の変化、それらの分散した解剖学的位置、およびそれらの不均質な組成は、外科的除去を妨げ、転移性コロニーに送達され得る抗ガン剤の濃度を抑える全ての因子である。それ故に、原発部位からの腫瘍細胞の播種前の悪性疾患の検出が、現在の癌治療の効果を向上させるのに必要とされる。

【0004】

異常なグリコシル化は、大部分の癌の型について一般的な特徴であることが観察されてきた。ヒト癌の診断のために使用される糖質抗原の大部分は、ポリラクトサミン構造を有し、すなわち、それらはGal 1 3 / 4 GlcNAcを含む。ポリラクトサミンは、通常、それらのポリラクトサミン単位構造に従って、2つのカテゴリーに分類される。Gal 1 3 GlcNAc構造を有するポリラクトサミンは、1型鎖と呼ばれ、Gal 1 4 GlcNAc構造を有するポリラクトサミンは、2型鎖と呼ばれる。主なヒト癌に見出される最も一般的な腫瘍関連抗原は、ラクト系列2型鎖構造を有し、これは通常、シアリル化および/またはフコシル化されている。1型鎖抗原は、正常の細胞および組織において豊富であり、また癌と関連する。例えば、2 3シアリル化Le^a抗原(N19-9抗体によって規定されるCA19-9抗原)は、癌関連1型鎖-抗原である。しかし、これらの公知の抗原の検出に基づく癌診断方法は、高い偽陽性発生数および/または高い偽陰性発生数によって妨害されている。

【0005】

癌の診断に対する現在のアプローチにおける困難性のために、当該分野において改善された組成物および方法が必要とされる。本発明は、この要求を満たし、さらに他の関連した利点を提供する。

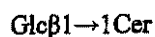
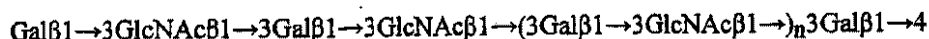
【0006】

(発明の要旨)

簡単に述べると、本発明は、単離された化合物およびこのような化合物を検出することによって癌をスクリーニングする方法を提供する。1局面において、本発明は、フコシル残基および/またはシアリル残基を有しても有さなくてもよい、以下：

【0007】

【化7】



【0008】

の式を有する単離された化合物を提供し、

ここで、nは0または1以上の整数であり、少なくとも2個のフコシル残基および/または1個以上のシアリル残基が存在し、Galはガラクトースを表し、Glcはグルコースを表し、GlcAcはN-アセチルグルコサミンを表し、Cerはセラミドを表し、ここで、上記少なくとも2個のフコシル残基は、1 4結合を介してGlcNAcに連結し、および/または1 2結合を介して末端Gal残基に連結し、そして上記1個以上のシアリル残基は、2 3結合を介して末端Gal残基に連結し、および/または2 6結合を介して末端付近の1個以上のGlcNAc残基に連結する。

【0009】

さらなる局面において、本発明は、以下：

【0010】

【化8】

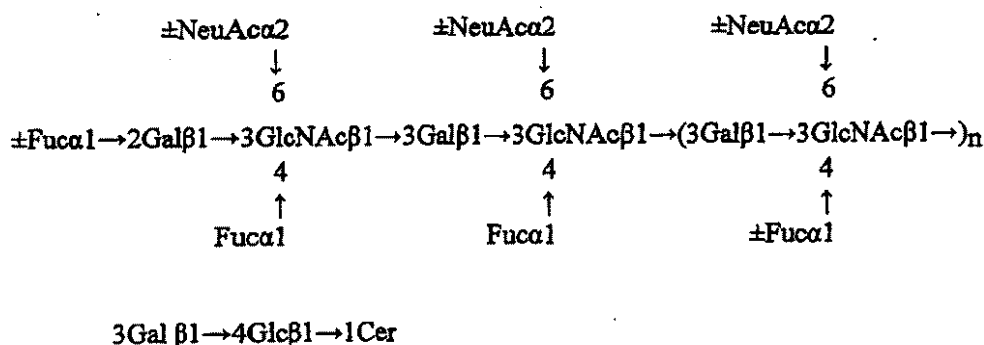
10

20

30

40

50



10

【 0 0 1 1 】

の式を有する上記の単離された化合物を提供し、

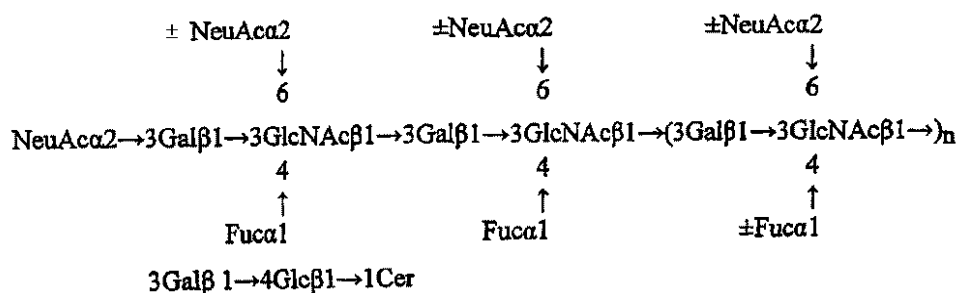
ここで、F u c はフコースを表し、N e u A c はN - アセチルノイラミン酸を表す。

【 0 0 1 2 】

別の局面において、本発明は、以下：

【 0 0 1 3 】

【 化 9 】



20

【 0 0 1 4 】

の式を有する最初に記載された化合物を提供し、

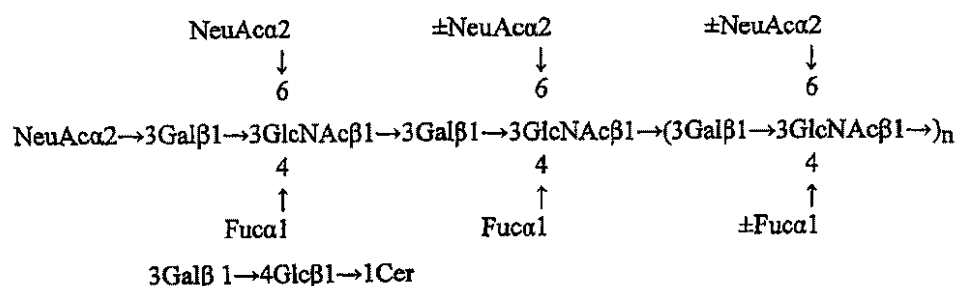
ここで、F u c はフコースを表し、N e u A c はN - アセチルノイラミン酸を表す。

【 0 0 1 5 】

別の局面において、本発明は、以下：

【 0 0 1 6 】

【 化 1 0 】



40

【 0 0 1 7 】

の式を有する最初に記載された化合物を提供し、

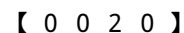
ここで、F u c はフコースを表し、N e u A c はN - アセチルノイラミン酸を表す。

【 0 0 1 8 】

なおさらなる実施形態において、本発明は、以下：

【 0 0 1 9 】

【 化 1 1 】



【 0 0 2 1 】

【 0 0 2 2 】

【化 1 2】



【 0 0 2 4 】

【 0 0 2 5 】

【 0 0 2 6 】

【 0 0 2 7 】

【 0 0 2 8 】

【 0 0 2 9 】

ゆっくりと移動するシアル酸 - Lewis^a (sLe^a) 活性スフィンゴ糖脂質 (GSL) を、結腸腺癌細胞系統 Colo 205 のモノシアリルガングリオシド画分から精製して均質にした。この化合物を、2 種の異なる溶媒系で HPLC および分取 HPTLC によって精製し、
- sLe モノクローナル抗体 (MAb) NKH - 1 を使用する TLC 免疫染色によって強く染色した。穏やかな酸加水分解 (1 % 酢酸、100 で 1 時間) により 50

【化 1 3】



○

上述した特定の糖脂質に加え、 $\text{Le}^a - \text{Le}^a$ エピトープおよび $\text{Le}^b - \text{Le}^a$ エピトープは、追加の $[\text{Gal} - \text{GalNAc}]_n$ 単位を有する拡張 1 型として提供され得る。さらに、 $\text{Le}^a - \text{Le}^a$ エピトープおよび $\text{Le}^b - \text{Le}^a$ エピトープは、糖タンパク質（例えば、高分子量ムチン様血清糖タンパク質）によって運搬され得る。

20

30

50

合されて、ハイブリッド細胞系統（「ハイブリドーマ」または「クローン」）を形成する。各ハイブリドーマは、単一の型の免疫グロブリンを分泌し、骨髓腫細胞と同様に、無限な細胞分裂のための能力を有する。ハイブリドーマを介するM A bの産生の代替は、バクテリオファージおよびバクテリアを使用するM A b発現ライブラリーの形成である（例えば、S a s t r y ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 5 7 2 8 , 1 9 8 9 ; H u s e ら , , S c i e n c e 2 4 6 : 1 2 7 5 , 1 9 8 9 ）。所望された特異性を示す抗体の選択は、当業者に周知の種々の方法で実施され得る。

【0035】

本発明の化合物の免疫原性を増加させるために、その化合物をキャリアと合わせることが所望され得る。適切なキャリアとして、不活化した細菌、カサガイヘモシアニン（k e y h o l e l i m p e t h e m o c y a n i n ）、サイログロブリン、ウシ血清アルブミンおよびそれらの誘導体が挙げられる。例えば、G S L s L e ^a - L e ^a または L e ^b - L e ^a の糖質残基の全てまたは一部は、キャリアと合わせられ得る。本発明の化合物は、種々の手段（吸着および共有結合を含む）によってキャリアと合わせられ得る。

10

【0036】

免疫原としての本発明の化合物の使用の代表例は、L e ^b / L e ^a 抗原によるマウスの免疫化である。簡単に述べれば、C o l o 2 0 5 細胞から単離した L e ^b / L e ^a を、酸処理した S a l m o n e l l a m i n n e s o t a e の懸濁液と合わせ、尾静脈を介して B A L B / c マウスに注射し、そしてこの注射を10日間の間隔で3回繰り返した。最終注射後、免疫化したマウスの脾細胞を採取し、骨髓腫細胞と融合した。免疫原と優先的な反応性を示したハイブリドーマ、I M H 2 を樹立し、A T C C (A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n , 1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d , M a n a s s a s , V i r g i n i a 2 0 1 1 0 U S A) に A T C C 番号 H B 1 1 0 2 6 として寄託した。このハイブリドーマは、I g G 3 アイソタイプを有する M A b 1 M H 2 を産生する。

20

【0037】

L e ^a - L e ^a 抗原および/または L e ^b - L e ^b 抗原のような拡張形態のI型鎖抗原を検出するための方法は、癌についてスクリーンするために使用され得る。例えば、G S L L e ^b - L e ^a および G S L L e ^a - L e ^a を、種々の腫瘍サンプルから調製した中性糖脂質画分のそれぞれ M A b 1 M H 2 および M A b N C C - S T - 4 2 1 で免疫染色する T L C (W a t a n a b e ら , J p n . J . C a n c e r R e s (G a n n) 7 6 : 4 3 - 5 2 , 1 9 8 5 に従って確立された) によって検出した。このようなサンプルとして、結腸癌、乳癌、ホジキン病、胆嚢癌および胎児性横紋筋肉腫由来の組織が挙げられる。例えば、G S L L e ^a - L e ^a は、脾臓、肝臓、腎臓、胎盤および肺由来の正常の組織から、糖脂質画分内で検出されなかった。本明細書中に提供される教示によれば、腫瘍関連拡張I型抗原を検出するための種々の手段（G S L L e ^a - L e ^a および L e ^b - L e ^a のような腫瘍関連拡張I型抗原に対して特異的な結合パートナーの使用を含む）が本発明の方法内で使用され得ることは、当業者にとって明らかである。例えば、L e ^a - L e ^a または L e ^b - L e ^a エピトープについて特異的な抗体は、上記のように産生され得、免疫複合体の存在は、免疫複合体の形成を可能にするのに十分な条件下および時間で、このような抗体の生物学的サンプルとの接触（例えば、インキュベーション）後、試験され得る。

30

40

【0038】

上記の抗原とこの抗原に対して特異的な抗体との間で形成された免疫複合体の存在の検出は、種々の公知の技術（例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A ）および酵素結合イムノソルベントアッセイ（E L I S A ））によって達成され得る。適切なイムノアッセイとして、D a v i d ら（米国特許第4,376,110号）の二重モノクローナル抗体サンドウィッチイムノアッセイ技術；モノクローナル-ポリクローナル抗体サンドウィッチアッセイ（W i d e ら、K i r k h a m a n d H u n t e r 編、R a d i o i m m u n o a s s a y M e t h o d s E . a n d S . L i v i n g s t o n e , E d i n b u

50

rough, 1970); Gordonら(米国特許第4,452,901号)の「ウエスタンブロット」法; 標識されたりガンドの免疫沈降法(Brownら, J. Biol. Chem. 255:4980-4983, 1980); 例えば、Raines and Ross(J. Biol. Chem. 257:5154-5160, 1982)によって記載されるような酵素結合イムノソルベントアッセイ; 免疫細胞学技術(蛍光色素の使用(Brooksら, Clin. Exp. Immunol. 39:477, 1980)を含む); および活性の中性化(Bowen-Popeら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2396-2400, 1984)が挙げられる。上記のイムノアッセイに加えて、多数の他のイムノアッセイ(米国特許第3,817,827号; 同第3,850,752号; 同第3,901,654号; 同第3,935,074号; 同第3,984,533号; 同第3,996,345号; 同第4,034,074号; および同第4,098,876号に記載されるイムノアッセイを含む)が利用可能である。

10

20

30

40

50

【0039】

検出の目的のために、抗体は標識されてもよいし、標識されなくてもよい。標識されていない場合、抗体は凝集アッセイにおける使用を見出す。さらに、非標識抗体は、免疫複合体と反応性である標識された分子と組み合わせて、あるいは、免疫グロブリンに対して特異的な抗体のような、この化合物に対して指向された抗体と反応性である標識された抗体(二次抗体)と組み合わせて、使用され得る。あるいは、この抗体は直接標識され得る。それらが標識される場合、レポーター基は、ラジオアイソトープ、蛍光色素、酵素、発光体(luminescer)、または色素粒子を含み得る。これらの標識および他の標識は、当該分野において周知であり、例えば、以下の米国特許第3,766,162号; 同第3,791,932号; 同第3,817,837号; 同第3,996,345号; および同第4,233,402号に記載される。

【0040】

免疫複合体を検出するための1つの好ましい実施形態において、レポーター基は、抗体に結合される。免疫複合体を検出する工程は、実質的に全ての非結合抗体を除去する工程、および次いでこのレポーター基の存在を検出する工程を包含する。非結合抗体は、この抗原に結合しなかった抗体である。

【0041】

別の好ましい実施形態において、レポーター基は、この抗原に対して特異的な抗体に結合し得る二次抗体に結合する。免疫複合体を検出する工程は、(a)実質的に全ての非結合抗体(すなわち、この抗原に結合しなかった抗体)を除去する工程、(b)二次抗体を加える工程、(c)実質的に全ての結合していない二次抗体を除去する工程、および、次いで(d)このレポーター基の存在を検出する工程を包含する。例えば、抗原に対して特異的な抗体がマウス由来である場合、二次抗体は抗マウス抗体である。

【0042】

免疫複合体を検出するための第3の好ましい実施形態において、レポーター基は、この免疫複合体に結合し得る分子に結合する。この検出する工程は、(a)この分子を添加する工程、(b)実質的に全ての非結合分子を除去する工程、および、次いで、(c)このレポーター基の存在を検出する工程を包含する。免疫複合体に結合し得る分子の例は、プロ

【0043】

免疫複合体と反応性である標識された抗体、標識された第2の抗体または標識された分子の使用の代替は、一般的には標識された抗原を使用するイムノアッセイである。このようなアッセイ(「間接的」または「競合的」)において、サンプル中に存在する抗原は、この抗体について標識された抗原と競合する。

【0044】

免疫複合体を検出するための種々の方法が本発明において使用され得ることは、当業者にとって明らかである。この方法のいずれかにおける使用に適切なレポーター基として、ラジオアイソトープ、蛍光色素、酵素、発光体、および色素粒子が挙げられる。さらに、本

発明の腫瘍関連拡張1型抗原に対して特異的な結合パートナー（抗体を除く）は、このような抗原について試験するために使用され得、このような結合パートナーと抗原との間で形成された複合体は、免疫複合体について上に記載された技術に類似の技術によって検出され得る。

【0045】

以下の実施例は、例示のために提供され、限定するためではない。

【0046】

（実施例）

（実施例1）

（腫瘍組織および正常組織から調製された中性糖脂質のMAB NCC-ST-421を用いるHPTLC免疫染色およびイムノアッセイ）

（A．モノクローナル抗体およびイムノアッセイ）

MAB ST-421を、以前に記載されたとおりに樹立した（Watanabeら, Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 76: 43-52, 1985）。MAB MNH-1（1型N-アセチルラクトサミン鎖（Gal 1 3GlcNAc 1 R）を規定する）を、本発明者らの研究室で調製した；MAB 1B2（2型N-アセチルラクトサミン鎖（Gal 1 4GlcNAc 1 R）を規定する）を、以前に記載されるとおりに樹立した（Youngら, J. Biol. Chem. 256: 10967-10972, 1981）。抗Le^a MABを、Chembiomed Ltd. (Edmonton, Alberta, Canada) から得た。抗Le^y MAB AH6を、以前に記載されるように樹立し（Abeら, J. Biol. Chem. 258: 11793-11797, 1983）、そしてこれは、Le^b との交差反応性を示さなかった。抗Le^b MABを、Chembiomed Ltd. (Edmonton, Alberta, Canada) から購入し、そしてこれは、1型H鎖との交差反応性を示した。別の抗Le^b MABを、Monocarab (Lund, Sweden) から購入し、そしてこれは、Le^b、1型H鎖、およびLe^y との反応性を示した。HPTLC免疫染色を、Whattman HPTLCプレート（HP-KF）を使用して、元々Magnaniら（Magnaniら, Anal. Biochem. 109: 399-402, 1980）により記載された方法の改変版（Kannagiら, J. Biol. Chem. 257: 4438-4442, 1982; Kannagiら, J. Biol. Chem. 257: 14865-14874, 1982）により実施した。

【0047】

（B．糖脂質調製）

使用された全ての糖脂質サンプルを、単離するかまたは酵素的に合成した。VI³ NeuAcnLc₆、IV³ NeuAcII⁴ FucLc₄、VI² FucnLc₆、およびIV² FucLc₄を、それぞれヒト胎盤、肝臓腺癌、ヒトO型赤血球、およびブタ腸から、IHW（55:25:20）での抽出、次いでFolch分配、DEAE-Sephadexクロマトグラフィー、およびIatrobeads 6RS-8010カラムでのHPTLCの後、単離した（Magnaniら, J. Biol. Chem. 257: 14365-14369, 1982; Watanabeら, J. Biol. Chem. 254: 8223-8229, 1979; Hakomoriら, J. Immunol. 98: 31-38, 1967; Stellererら, Biochemistry 12: 656-661, 1973）。nLc₆ およびII⁴ FucLc₄を、100 で1時間1%酢酸中でサンプルを加熱することによる、それぞれVI³ NeuAcnLc₆ およびIV³ NeuAcII⁴ FucLc₄の脱シアリルにより調製した。IV³ GlcNAcnLc₄、IV₃ Gal 1 3-GlcNAcnLc₄、IV³ Gal 1 3[Fuc 1 4]GlcNAcnLc₄ およびIV³ Gal 1 3[Fuc 1 4]GlcNAcII³ FucnLc₄（Le^a-Le^x）を、酵素的合成により調製した。IV³ Gal 1 3GlcNAcII³ FucnLc₄を、IV³ Gal 1 3[Fuc 1 4]GlcNAcII³ FucnLc₄の -フコシダーゼ処理により調製した；す

なわち、100 μ g の糖脂質を、0.05 単位のウシ腎臓 - L - フコシダーゼ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) を含む 0.2 M のクエン酸緩衝液 (pH 4.5) と共に 2 時間 37 でインキュベートした。IV² III⁴ Fuc₂ Lc₄、V³ III³ Fuc₂ nLc₆、および VI² V³ Fuc₂ nLc₆ を、Colo205 由来の 1 3 / 4 フコシルトランスフェラーゼを使用して、基質として IV² Fuc Lc₄、nLc₆、および VI² Fuc nLc₆ (それぞれ) の 1 3 フコシル化により生合成的に調製した。1 3 / 4 フコシルトランスフェラーゼを、4 にて 2 容量の 50 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.0)、0.5 M スクロース、1 mM EDTA、および 1% Triton CF-54 中、Potter-Elvehjem ホモジナイザーで Colo205 細胞から可溶化した。このホモジネートを、100,000 \times g で 1 時間遠心分離し、そしてその上清を透析により細胞の元の容積まで濃縮した。この酵素調製物を -80 で必要になるまで保存した。

10

20

30

40

50

【0048】

酵素的 1 3 / 4 フコシル化を、1 ml の全容積中に 1 mg のスフィンゴ糖脂質 (GSL) 基質、1 mg のデオキシタウロコール酸塩、10 μ mol の MnCl₂、25 μ mol の Hepes 緩衝液 (pH 7.0)、5 μ mol の CDP-コリン、6 μ mol の GDP-フコース、および 500 μ l の酵素調製物を含む反応混合物中で行った。この反応混合物を、37 で 16 時間インキュベートし、次いで凍結乾燥し、イソプロパノール-ヘキサン-水 (IHW) (55:25:20) で超音波処理により抽出し、そして遠心分離した。その上清を、Iatrobeads 6RS-8010 カラムで 55:40:5 ~ 55:25:20 の IHW 勾配溶出を使用して 200 分間にわたって HPLC にかけた。2 ml ずつのフラクションを収集し、そして最終生成物を含むチューブを、クロロホルム-メタノール-水 50:40:10 中の HPTLC 移動度に従ってプールした。GSL バンドを、オルシノールスプレー試薬により可視化した。

【0049】

規定された構造を有する各 GSL を、特定の MA b (単数または複数) との反応性により特徴付けた (すなわち、抗 Le^b MA b と反応するが抗 Le^y MA b AH6 とは反応しない Le^b / Le^a 抗原; AH6 とは反応するが抗 Le^b MA b と抗 Le^x MA b ととも反応しない Le^y / Le^x; 抗 Le^a MA b および MA b ST-421 と反応する Le^a / Le^a および Le^a / Le^x)。

【0050】

(C. TLC 免疫染色)

種々の腫瘍サンプルから調製された中性糖脂質フラクションの TLC 免疫染色は、-Le^a - 活性セラミドペンタサッカリドよりも遅く移動するポジティブなバンドの存在、および抗 Le^a MA b との交差反応を示した。このバンドは、MA b NCC-ST-421 により強く染色され、そして以前に試験された腫瘍の大部分に見られた。結腸癌、乳癌、ホジキン病、胆嚢癌、および胎児性横紋筋肉腫由来の例。

【0051】

(実施例 2)

(ダイマー Le^a 抗原および Le^b - Le^a 抗原の単離)

(A. 腫瘍組織の調製)

Colo205 細胞 (ATCC) (Sample 5, Cancer Res. 38:1345-1355, 1978) を、10% ウシ胎児血清を含有する RPMI 1640 培地中で増殖した。細胞を採取し、そしておよそ 7 日間毎に継代した。採取された細胞をトリプシン処理し、遠心分離し、リン酸緩衝化生理食塩水 (pH 7.4) で 2 回洗浄し、そして血球計を使用して計数した。4 \times 10⁶ 個の細胞を、6 匹の無胸腺症 (ヌード) マウスの各々に皮下注射した。腫瘍 (それぞれ約 2 ml) を、2 週間後に切除し、そして必要になるまで -80 で凍結保存した。

【0052】

(B. Colo205 腫瘍由来の移動遅延性 Le^a 活性成分 (ダイマー Le^a) の単離)

約200gの腫瘍を、イソプロパノール - ヘキサン - 水 (I H W) (5 5 : 2 5 : 2 0) で抽出し、次いでF o l c h分配、D E A E - s e p h a d e xクロマトグラフィー、そしてI a t r o b e a d s 6 R S - 8 0 1 0カラムのH P L Cにかけた。上相中性フラクションの勾配溶出を、5 5 : 4 0 : 5 ~ 5 5 : 2 5 : 2 0のI H Wで2 0 0分間にわたって行った。2 m lずつのフラクションを収集し、そしてクロロホルム - メタノール - 水 (5 0 : 4 0 : 1 0) 中のH P T L C移動度に従ってプールした。遅延移動性L e ^a 活性フラクション (T L C免疫染色により示される) を、M e r c k H P T L Cプレート (S i l i c a G e l 6 0 , M e r c k , D a r m s t a d t , G e r m a n y) の分取T L Cによりさらに精製し、そして構造特徴付けに使用した。

【 0 0 5 3 】

10

(C . L e ^b - L e ^a 抗原の単離)

ダイマーL e ^a 抗原の直ぐ下に移動するポジティブなバンド (実施例 1 に従うM A b N C C - S T - 4 2 1 を用いた免疫染色による) を、上記のB 節に記載される方法を使用して精製する。

【 0 0 5 4 】

(実施例 3)

(ダイマーL e ^a 抗原およびL e ^b - L e ^a 抗原の特徴付け)

(A . 酵素分解)

1 m g のダイマーL e ^a の酵素分解を、0 . 5 単位の - フコシダーゼ (ウシ腎臓)、0 . 5 単位の - ガラクトシダーゼ (ナタマメ)、および0 . 5 単位の - N - アセチルグルコサミニダーゼ (ウシ精巣) (S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s , M o .) を用いて逐次的に加水分解により行った。全ての反応を0 . 2 M クエン酸ナトリウム (p H 4 . 5) 中4時間3 7 ° で振盪しながら水浴中で行った。各分解産物の精製を、分取H P T L Cにより行った。

20

【 0 0 5 5 】

(B . I M H 2 のインビトロ細胞傷害性)

(1 . 細胞株)

C o l o 2 0 5 を、最初にA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) から入手し、そして1 0 % のウシ胎児血清、m M のL - グルタミン、1 0 0 I U / m l のペニシリン、および1 0 μ g / m l のストレプトマイシンを補充したR P M I - 1 6 4 0 培地で培養した。ヒト類表皮癌A 4 3 1 細胞株 (M a c L e o d ら , J . C e l l . P h y s i o l . 1 2 7 : 1 7 5 - 1 8 2 , 1 9 8 6) は、元々C a r o l M a c L e o d 博士 (G i l d r e d C a n c e r F a c i l i t y , U C S D S c h o o l o f M e d i c i n e , S a n D i e g o , C A) から提供された。この細胞株は、E G F レセプター上でL e ^a、L e ^b、L e ^x、L e ^y およびA L e ^b を発現する (G o o i ら , B i o s c i . R e p o r t s 5 : 8 3 - 9 4 , 1 9 8 5)。A 4 3 1 細胞を、5 % ウシ胎児血清、1 m M のグルタミン、1 1 0 m g / l のピルビン酸ナトリウム、1 0 0 I U / m l のペニシリン、および1 0 μ g / m l のストレプトマイシンを補充したD u l b e c c o 改変E a g l e 培地 (I r v i n e S c i e n t i f i c , S a n t a A n a , C A) 中で培養した。細胞 (約 5 × 1 0 ⁵ / m l) を、接種し、そしてE D T A 処理次いでC a ²⁺ およびM g ²⁺ を含有するP B S での洗浄による集密度で採取した。これらをインビトロ細胞傷害性アッセイにおける標的細胞として使用するか、または5 × 1 0 ⁶ 個の細胞の皮下接種によるムーロマウスにおける腫瘍形成を試験するために使用した。ヒト赤白血病K 5 6 2 細胞 (L o z z i o ら ; B l o o d 4 5 : 3 2 1 - 3 3 4 , 1 9 7 5) を、アッセイ系で使用されるリンパ球のナチュラルキラー (N K) 活性についてのコントロールとして使用した。

30

40

【 0 0 5 6 】

(2 . 抗体依存性細胞の細胞傷害性 (A D C C) および補体依存性細胞傷害性 (C D C))

A D C C アッセイのために、ヒト末梢血リンパ球 (H P B L) (エフェクター細胞として

50

使用される)を、健康な志願ドナー由来の血液のバフィーコートフラクションから得た。簡単には、単核細胞を、Ficoll-Hypaque勾配溶液による2000rpmで20分間の遠心分離により分離した(Mishellら, Mishell, B. BおよびShiigi, S. M. (編), Selected Methods in Cellular Immunology, pp. 3-27, W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980)。マウス脾臓細胞およびマウス腹膜マクロファージ(エフェクター細胞)を、以下のようないくつかの改変をしてMishellらにより以前に記載されたように調製した。標的細胞(5×10^6 個)を、 $100 \mu\text{l}$ の ^{51}Cr と共に90分間37℃でインキュベートすることにより標識した。洗浄(3回)およびインキュベーション(37℃で1時間)の後、細胞($1 \times 10^6 / \text{ml}$)を、25mMのHEPES緩衝液および3%のウシ血清アルブミンを補充したRPMI-1640中に懸濁した。20 μl の標識した細胞、100 μl のIMH2またはST-421、および100 μl のエフェクター細胞懸濁液をマイクロタイターU底プレート(Corning, NY)中に混合した。非特異的マウスIg(Sigma, St. Louis, MO)をネガティブコントロールとして使用した。4時間のインキュベーションの後、これらのプレートを、遠心分離機に組み立てられた懸垂プレートホルダーを用いて遠心分離し(500 $\times g$ 、2分間)、そして各ウェル中の100 μl の上清における放射能を線計数器で測定した。各実験群を3回試験した。特異的溶解%を、式($[A - B] \times 100$) / C(ここで、A = 溶解した実験細胞中のcpm; B = 未溶解の標的細胞中のcpm; C = 全標的細胞中のcpm)に従って計算した。自発性放出は、放出可能な最大の標識放射能の15%を超えなかった。

【0057】

CDCに関して、 ^{51}Cr 放出アッセイを、エフェクター細胞の代わりに補体源として100 μl の希釈ヒト血清を加えたことを除いて、ADCCと同様な手順を使用して行った。この血清を56℃で30分間不活化し、そしてコントロールとして使用した。特異的溶解%を、上記のように計算した。

【0058】

Colo205細胞は、拡張1型Le^a/Le^a鎖抗原およびLe^b/Le^a抗原を発現すると特徴付けられていたので(これらは、それぞれMAb ST-421およびIMH2と強く反応する)、IMH2のColo205に対する細胞傷害性効果を評価し、ST-421の細胞傷害性効果と比較した。両方のMAbは、Colo205細胞の顕著なADCC殺傷を示した。この殺傷は、エフェクター細胞：標的細胞(E：T)比およびMAb濃度と相関があった。この細胞傷害性効果は、100：1～200：1のE：T比、および35～70 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のMAb濃度で最大であった。コントロールマウスIgGおよび他の非特異的MAbは、E：T比またはMAb濃度にかかわらず細胞傷害性効果を示さなかった。同じ細胞傷害性試験をマウス脾臓細胞で行った場合、対応する値は、わずか7%溶解および17%溶解(E：T比200：1、MAb濃度30 $\mu\text{g} / \text{ml}$)であった。MAbは、A431細胞に対して弱い細胞傷害性効果を示した(表)。Colo205細胞、A431細胞、およびK562細胞の最大IMH2依存性溶解の比較を表に示す。高い溶解値(例えば、それぞれIMH2およびST-421を用いたColo205細胞の65%溶解および94%溶解)は、HPBLの存在下でのみ顕著であり; ST-421で以前に観察されたように、値は、マウス脾臓細胞では非常に低かった(Watanabeら, Cancer Res. 51: 2199-2204, 1991)。IMH2およびST-421により媒介されるCDCは、同様に補体濃度およびMAb濃度と相関した。(表 MAb ST-421およびIMH2による、Colo205細胞、A431細胞、およびK562細胞に対するMAb依存性細胞傷害性効果)

【0059】

【表1】

標的細胞	抗体 / 反応性 ^b	溶解パーセント ^a		
		エフェクター細胞 +	エフェクター細胞 +	エフェクター細胞 -
		MAb+	MAb-	MAb+
Colo205	ST-421 +	94.5	2.7	0.8
	IMH2 +	65.0	2.7	0.7
A431	ST-421 ±	14.4	10.9	1.1
	IMH2 ±	7.6	9.2	0.6
K562 ^c	ST-421 -	48.2	36.2	0.5
	IMH2 -	44.8	36.2	0.3

10

【0060】

a. IMH2 (35 µg/ml) および ST-421 (×100 希釈腹水) を用いて、100:1 の E:T (エフェクター細胞:標的細胞) 比における溶解パーセント。

b. フローサイトメトリーにより決定。+、ポジティブ; ±、弱いポジティブ; -、ネガティブ。

c. K562 細胞の高い細胞傷害性効果はまた、MAb の非存在下で観察され、そしてこれは、ナチュラルキラー細胞活性を反映すると考えられる。

【0061】

(C. インビボ腫瘍抑制)

インビボ実験に使用される Colo205 細胞および A431 細胞を、インビトロで増殖し、培地で2回洗浄し、そして PBS 中で所望の細胞密度で再形成した。細胞 (5 × 10⁶ / 100 µl) を、5~7 週齢の無胸腺症 BALB/c マウスの背部に皮下注射し、そして MAb の腹腔内投与を注射の直後に開始した。IgG の対応する濃度 (1.1 ~ 1.2 ng/ml) を有する、腹水液中の精製された IMH2 (1.1 mg/ml) または ST-421 を、0.2 ml / 動物の投薬量で、2週間にわたって1回/日で腹腔内注入した。腫瘍の幅および長さを、同一の観察者により3回/週で測定した。腫瘍重量を、(幅² × 長さ) / 2 として見積もった。コントロール動物に、BALB/c マウスにおけるマウス骨髄腫細胞株 NS1 により作製された腹水タンパク質を投与した。1群あたり7匹のマウスを、各実験に使用し、そして実験を2回行った。2回の実験に基づく平均腫瘍重量値をプロットした。

30

【0062】

MAb IMH2 および ST-421 の両方は、ヌードマウスにおける Colo205 腫瘍増殖の顕著な阻害を示した。対照的に、両方の MAb は、A431 腫瘍増殖に対して最小の阻害効果を示した。従って、規定された抗原の高い発現は、インビボでの腫瘍増殖の抗体依存性阻害に対する感受性に必須であると思われる。

【0063】

(D. 種々の腫瘍組織および正常組織との IMH2 の反応性)

種々の腫瘍組織および隣接正常組織を、ホルマリンで固定しそしてパラフィンに包埋した外科標本から得た。さらに、脳、胸腺、肺、肝臓、胃、結腸、腎臓、副腎、腺、脾臓、膵臓、子宮 (子宮内膜を含む)、および皮膚由来の正常組織およびいくつかの腫瘍組織を、事故犠牲者からの新しい剖検から得た。外科標本および剖検標本の両方は、Department of Pathology, Swedish Medical Center, Seattle, WA および The Biomembrane Institute の Ms. Debbie Bennett からの無料提供であった。サンプルを薄片に切り (厚さ 3 µm)、キシレン (xylene) でパラフィンを除去し、エタノールで脱水し、一次 MAb で処理して、ビオチン化二次 MAb およびペルオキシダーゼ結合体化アビジンで続けて処理し、そして 3', 3'-ジアミノベンジジンで染色した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、切片を 0.3% H₂O₂ で20分間処理することによりブロックした。いくつかの切片をネガティブコントロールとしてマウス IgG と共にインキュベートした。ビオチン化ヤギ抗マウス IgM、アビジン、およびビオチンは、Vectastain (

50

Burlingame, CA) 由来であった。

【0064】

MAb IMH2は、結腸、直腸、肝臓、脾臓、および子宮内膜由来の腫瘍と、強くかつ高い発生率で反応した(表I)。対照的に、遠位結腸および直腸の正常粘膜(陰窩領域および杯細胞を含む)とは反応性を示さなかった。肺腺癌とは反応したが、大細胞癌または小細胞癌とは反応しなかった。5件の扁平上皮癌のうち1つは、強いポジティブの反応性を示した。MAb IMH2は、正常な脳、肺、脾臓、皮膚の組織、または顆粒球を含む種々の血球と反応しなかった。

【0065】

強い染色が観察された正常組織の場所は、以下の通りである：胸腺のハッサル体および上皮細胞(胸腺細胞はネガティブである)；胃粘膜の粘膜上皮および分泌腺(固有層、漿膜、および筋層はネガティブであった)；副腎の髄質および皮質の両方。中程度から弱いポジティブ染色を有する正常組織の場所は、以下である：腎臓の近位回および遠位回の上皮細胞(その他の部分はネガティブであった)；脾臓のランゲルハンス島の細胞(脾臓のその他の部分はネガティブであった)；盲管粘膜；尿路上皮。非常に弱い染色が肝細胞に関して観察された(肝臓のその他の部分、小葉間結合組織、中心静脈、胆管、およびクップファー細胞は、ネガティブであった)。これらの結果を表Iに要約する。

表I. MAb IMH2による正常組織および癌の免疫組織学的染色

【0066】

【表2】

組織	染色	位置/備考
正常		
脳	—	
肺	—	細気管支(broncheolar)上皮を含む
脾臓	—	
直腸	—	陰窩領域を含む
結腸	—	—11/12、±1/12
盲端	+	
皮膚	—	
顆粒球	—	
リンパ球	—	
脾臓	+	ランゲルハンス島において+ /その他—
肝臓	±	わずかに+/±肝細胞；その他—
胸腺	++	ハッサル体、上皮細胞および細胞網細胞 において++/胸腺細胞において—
胃	+++	粘膜、腺細胞(文中参照)
腎臓	+	管状上皮において弱く+ (文中参照)
副腎	+++	
子宮/子宮内膜	—/+	子宮内膜において—または弱く+； —9/15、±2/15、+4/15(全ポジ ティブケース4/15=27%)
癌		
結腸/直腸	+ / +++	+++4、++6、+4、±1、—1 (全ポジティブケース14/16=88%)
肝臓(原発性)	++	2/3
脾臓	+++	2/2
肺腺癌	++	2/4
扁平上皮癌	+	1/5
大細胞	—	0/3
小細胞	—	0/5
子宮内膜	— / +++	+++4、++11、+6/24、±/-3 (全ポジティブケース21/24=88%)

【0067】

(E. 既知のルイス状態および分泌状態を有する患者由来の結腸および膀胱の正常組織お

よび悪性組織とのIMH2の反応性)

Le^bおよびLe^y決定基の発現は、個体の分泌状態と相関し(Sakamotoら, Molec. Immun. 21:1093-1098, 1984; Oerntoftら, J. Urol. 138:171-176, 1987)、他方、いくつかの腫瘍におけるルイス抗原の発現は、宿主のルイス状態と関連しない(Oerntoftら, Lab. Invest. 58:576-583, 1988; Oerntoftら, Blood 77:1389-1396, 1991)。従って、既知のルイス状態および分泌状態を有する患者由来の結腸および膀胱の正常組織および悪性組織とのMAb IMH2の反応性を調べた。結果を表IIおよび表IIIに要約する。IMH2は、直腸腫瘍と反応性であるが、正常直腸組織とは反応性ではなく、そしてこの反応性は、分泌状態とは関係がない。逆に、IMH2は、正常盲端とは反応性であったが、調べられた単一の盲端腫瘍サンプルとはそれほど反応性ではなかった。これらの結果は、結腸正常組織および悪性組織におけるIMH2エピトープ発現の傾向は、ABH抗原の十分に確立されている発現パターンと類似していることを示唆する。真性ルイスネガティブ(Le^{a-b-})の個体(Oerntoftら, Lab. Invest. 58:576-583, 1988)は、結腸正常組織および悪性組織の両方においてIMH2エピトープを発現した(表IIおよびIII)。

【0068】

IMH2エピトープは、正常尿路上皮において発現されるが、その発現は、膀胱腫瘍の程度の変化に対して減少する。これらは、腹水の段階との相関と思われる。すなわち、IMH2エピトープ発現は、高度に侵襲性の腫瘍において最も低い。また、この傾向は、膀胱正常組織および悪性組織におけるABH抗原の発現の傾向と類似する。しかし、結腸組織と対照的に、血液型群Aの個体由来の膀胱組織におけるIMH2エピトープ発現は、分泌状態と相関する。真性ルイスネガティブ(Le^{a-b-})の個体は、膀胱正常組織および悪性組織の両方においてIMH2エピトープを発現した。

表II. 結腸正常組織および悪性組織のMAb IMH2による免疫組織学的染色：宿主ルイス状態との関係。

【0069】

【表3】

	正常		悪性	
	直腸	盲端	直腸	盲端
ALe ^{a-b+}	0/5	1/1	3/4	1/1
ALe ^{a+b-}	0/4	ND	2/2	ND
OLe ^{a-b+}	0/2	ND	2/3	ND
OLe ^{a+b-}	0/2	ND	1/1	ND
真性Le ^{a-b-}	0/1	1/1 ^a	1/1	0/1
非真性Le ^{a-b-}	0/2	ND	1/1	0/1

【0070】

数字は、試験された合計標本で割ったポジティブ標本を示す。ND = 決定されない。Le^{a-b-}個体(真性および非真性)について、表現型状態を、唾液における1-4フコシルトランスフェラーゼ活性、ならびに抗Le^aMAbおよび抗Le^bMAbとの赤血球反応性により決定した。表現型の定義は、Holmesら, Arch. Biochem. Biophys. 274:14-25, 1989、およびOerntoftら, Lab. Invest. 58:576-583, 1988に見出され得る。

^a 非分泌者

表III. 膀胱正常組織および悪性組織のMAb IMH2による免疫組織学的染色：宿主ルイス状態との関係

【0071】

【表 4】

	正常	膀胱癌	
		非浸潤性	浸潤性
A Le ^{a-b+}	4/4	1/1	1/2
A Le ^{a+b-}	0/2	1/2	1/3
O Le ^{a-b+}	1/1	1/1	1/2
O Le ^{a+b-}	2/2	1/1	0/1
真性 Le ^{a-b-}	2/2	ND	0/1
非真性 Le ^{a-b-}	ND	ND	ND

10

【0072】

主な脚注は表 I I のとおり。

【0073】

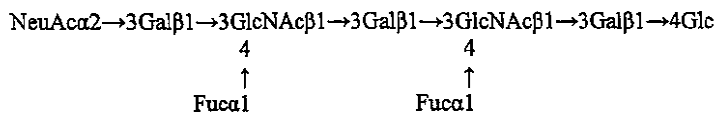
(F、拡張シアリル - Le^a (すなわち S Le^a - Le^a) の単離)

Colo205細胞のモノシアロ - ガングリオシドフラクションの試験は、高性能薄層クロマトグラフィー技術による1つの主要なガングリオシドの単離をもたらすかまたは単離を生じた。この主要なバンドを抽出して特徴付けした。構造を以下：

【0074】

20

【化14】



【0075】

と同定した。

【0076】

この構造は、¹H - NMR分光法により確認した。

【0077】

30

S Le^a - Le^a 構造上の拡張シアリル - Le^a を、シアリダーゼを用いる酵素分解により確認して、薄層クロマトグラフィーおよびモノクローナル抗体 ST - 421での免疫染色により確認された場合の Le^a - Le^a と同じ化合物を得た。元々のシアリル Le^a - Le^a または拡張 Le^a は、MAb ST - 421との反応性を示さない。しかし、この化合物は、N - 19 - 9、NKH - 1およびNKH - 2のようなシアリル - Le^a に特異的なMAbとの反応性を示した。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、糖 I (Glc)、II (Gal)、III (GlcNAc)、IV (Gal)、V (GlcNAc) および VI (Gal および F_{III}) として同定される III - GlcNAc に結合したフコース、および F_{IV} によって示されるような V - GlcNAc に結合したフコース) をカバーする 4.20 ppm ~ 5.60 ppm における化学シフトからの、拡張シアリル Le^a の ¹H - NMR スペクトルである。このスペクトルにおいて、F_V および F_{III} の全てのアノマープロトンスペクトルは、F_V - 1 および F_{III} - 1 として示される。さらに、フコースのスペクトル C5 プロトンは、F_{III} - 5 および F_V - 5 によって示されるように、多重カップリングによって示される。Cis として示されるスペクトルは、スフィンゴシンの Cis 二重結合であり、R - 5 および R - 4 は、スフィンゴシンのスペクトルを示す。

40

【 図 1 】

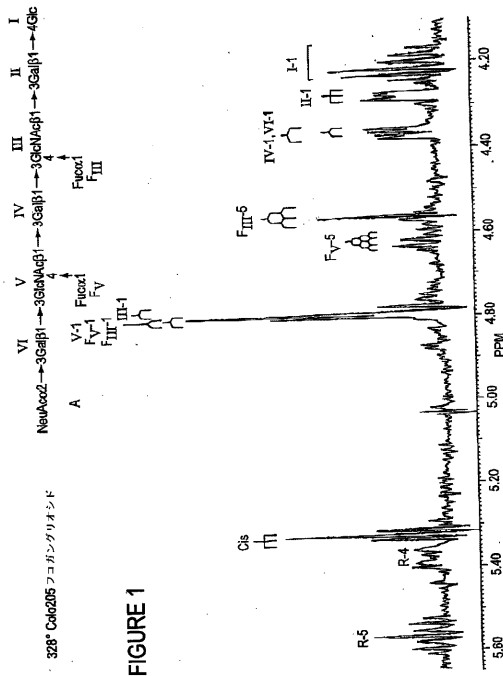


FIGURE 1

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02127 A1

- (51) International Patent Classification: **A61K 31/715**, C08B 37/00 (74) Agent: NAKAMURA, Dean; Roylance, Abrams, Berdo & Goodman, L.L.P., 1300 19th Street, N.W., Suite 600, Washington, DC 20036 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/18219 (81) Designated States (national): AU, CN, JP, KR, SG.
- (22) International Filing Date: 3 July 2000 (03.07.2000) (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (71) Applicant: BIOMEMBRANE INSTITUTE [US/US]; 720 Broadway, Seattle, WA 98122 (US). Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (72) Inventors: LEVERY, Steven; Biomembrane Institute, 720 Broadway, Seattle, WA 98122 (US). HAKOMORI, Sen-Itiroh; Biomembrane Institute, 720 Broadway, Seattle, WA 98122 (US). STROUD, Mark; Biomembrane Institute, 720 Broadway, Seattle, WA 98122 (US). For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/02127 A1

(54) Title: EXTENDED TYPE 1 CHAIN GLYCOSPHINGOLIPIDS AS TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS

(57) Abstract: A variety of compounds are provided which are useful as immunogens and as tumor markers. The present invention discloses methods relating to the detection of cancer. Extended forms of the lacto-series type 1 chain are shown to be present in various cancer tissues. The present invention also provides a cell line and the monoclonal antibody produced therefrom. Such an antibody has a number of uses, including in diagnostic or therapeutic methods.

WO 02/02127

PCT/US00/18219

Description**EXTENDED TYPE 1 CHAIN GLYCOSPHINGOLIPIDS AS
TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS**

5

Technical Field

The present invention relates generally to new human tumor-associated antigens. This invention is more particularly related to extended type 1 chain glycosphingolipids and their uses, e.g., as immunogens and as tumor markers.

10

Background of the Invention

Despite enormous investments of financial and human resources, cancer remains one of the major causes of death. Current cancer therapies cure only about 50% of the patients who develop a malignant tumor. In most human malignancies, metastasis is the major cause of death.

15

Metastasis is the formation of a secondary tumor colony at a distant site. In most human malignancies, distant metastases are often too small to be detected at the time the primary tumor is treated. Furthermore, widespread initiation of metastatic colonies usually occurs before clinical symptoms of metastatic disease are evident. The size and age variation in metastases, their dispersed anatomical location, and their heterogeneous composition are all factors that hinder surgical removal and limit the concentration of anticancer drugs that can be delivered to the metastatic colonies. Therefore, detection of malignancies prior to dissemination of the tumor cells from the primary site is needed to enhance the effectiveness of current cancer therapies.

20

25

Aberrant glycosylation has been observed to be a common feature for most cancer types. Most of the carbohydrate antigens used for the diagnosis of human cancers carry polylactosamine structures, i.e., they contain Gal β 1 \rightarrow 3/4GlcNAc. Polylactosamines are usually classified into two categories according to their polylactosamine unit structure. The polylactosamine having the Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc structure is called the type 1 chain, and that having the Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc structure is referred to as the type 2 chain. The most common tumor-associated antigens found in major human cancers have the lacto-series type 2 chain

30

WO 02/02127

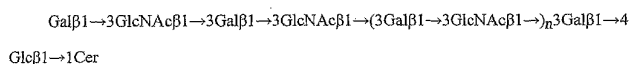
PCT/US00/18219

structure, which usually has been sialylated and/or fucosylated. Type 1 chain antigens are abundant in normal cells and tissues, and also are cancer-associated. For example, 2→3 sialylated Le^a antigen (the CA 19-9 antigen defined by the N19-9 antibody) is a cancer-associated type 1 chain-antigen. However, cancer diagnostic methods based on the detection of these known antigens have been hampered by high false positive and/or high false negative incidences.

Due to the difficulties in the current approaches to the diagnosis of cancer, there is a need in the art for improved compositions and methods. The present invention fills this need, and further provides other related advantages.

Summary of the Invention

Briefly stated, the present invention provides isolated compounds and methods of screening for cancers by detecting such compounds. In one aspect, the present invention provides an isolated compound, with or without fucosyl and/or sialyl residues, having the formula:

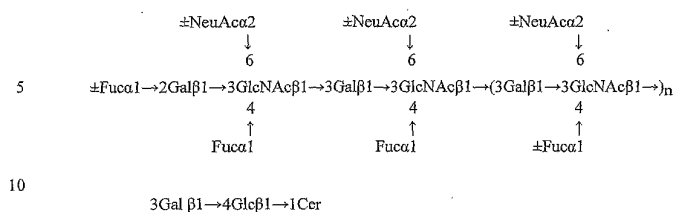


wherein n is 0 or an integer of 1 or more, there are at least two fucosyl and/or one or more sialyl residues, Gal represents galactose, Glc represents glucose, GlcAc represents N-acetylglucosamine, Cer represents a ceramide, and wherein said at least two fucosyl residues are linked to the GlcNAc residues via an $\alpha 1 \rightarrow 4$ linkage and/or to the terminal Gal residue via an $\alpha 1 \rightarrow 2$ linkage and said one or more sialyl residues are linked to the terminal Gal residue via an $\alpha 2 \rightarrow 3$ linkage and/or to one or more of the subterminal GlcNAc residues via an $\alpha 2 \rightarrow 6$ linkage.

In a further aspect, the present invention provides the above-described isolated compound having the formula:

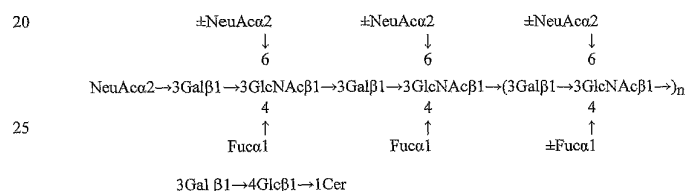
WO 02/02127

PCT/US00/18219



15 wherein Fuc represents fucose and NeuAc represents N-acetylneuraminic acid.

In another aspect the invention provides the first-described compound having the formula:



30 wherein Fuc represents fucose and NeuAc represents N-acetylneuraminic acid.

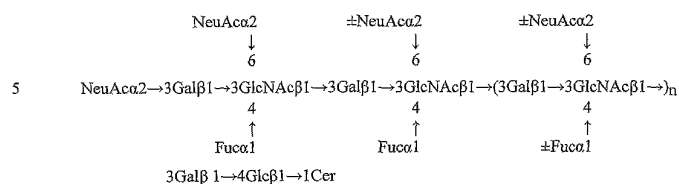
In another aspect the invention provides the first described compound having the formula:

35

40

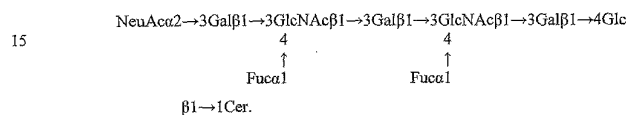
WO 02/02127

PCT/US00/18219

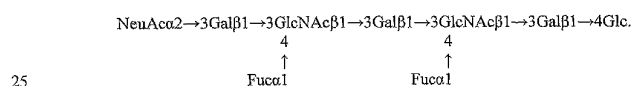


10 wherein Fuc represents fucose and NeuAc represents N-acetylneuraminic acid.

In an even further embodiment, the present invention provides an isolated compound having the formula:



20 Within an even further aspect, the present invention provides an isolated compound comprising an epitope having the formula:



In yet other aspects, any of the compounds of the present invention may be used as an immunogen for the production of polyclonal or monoclonal antibodies.

30 In another aspect of the present invention methods for screening for cancer are provided. The methods comprise (a) isolating a biological sample from a warm-blooded animal; and (b) testing the sample for the presence or amount of a compound.

Brief Description of the Drawing

Figure 1 is the ^1H -NMR spectrum of extended sialyl Le^a from chemical shift at 4.20
35 ppm to 5.60 ppm covering sugar I(Glc), II(Gal), III(GlcNAc), IV(Gal), V(GlcNAc) and

WO 02/02127

PCT/US00/18219

VI(Gal as well as fucose linked to III GlcNAc identified as F_{III} and fucose linked to V GlcNAc as indicated by F_{IV}). In this spectrum, all anomeric proton spectrums of F_V and F_{III} are indicated as F_V-1 and F_{III}-1. In addition, spectrum C5 proton of fucoses are indicated by multiple coupling as indicated by F_{III}-5 and F_V-5. Spectrum marked as Cis is a Cis double bond of sphingosine and R-5 and R-4 indicate spectrum of sphingosine.

Detailed Description of the Invention

The present invention is generally directed towards compounds and methods relating to the detection of cancers. More specifically, the disclosure of the present invention shows that lacto-series type 1 chain occurs in extended forms in cancer tissues.

As noted above, type 1 chain lactosamine (Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc) is known to be abundant in normal cells and tissues. Although poly lactosamine antigens having an extended type 2 chain (i.e., Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc core structure is repeated) have been detected, those with an extended type 1 chain have not been detected. Thus, lacto-series type 1 chain has traditionally been considered not to occur in extended form.

As disclosed within the present invention, extended forms of lacto-series type 1 chain (i.e., Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow [3Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β]_n3Gal β 1 \rightarrow R, with or without sialyl and/or fucosyl residues) are present in cancer tissues. Two representative extended forms of lacto-series type 1 chain were isolated by subjecting a glycolipid fraction (extracted from tumor cells) to preparative column and thin layer chromatography.

A slow-migrating sialyl-Lewis^a (sLe^a) active glycosphingolipid (GSL) was purified to homogeneity from the monosialyl ganglioside fraction of the colonic adenocarcinoma cell line Colo205. This compound was purified by HPLC and preparative HPTLC in two different solvent systems and stained strongly by TLC immunostaining using the α -sLe^a monoclonal antibody (MAb) NKH-1. Mild acid hydrolysis (1% acetic acid, 100°C for 1 hour) yielded a faster migrating component that co-migrated with a dimeric-Le^a standard

PCT/US00/18219

5 NeuAcα2→3Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→
4 4
↑ ↑
Fuca1 Fuca1
4Glcβ1→1Ceramide.

Given the teachings provided herein, it would be evident to those of ordinary skill in the art that other extended forms of lacto-series type 1 chain compounds may be isolated from biological starting materials, such as cancer tissue, or synthesized chemically (and/or enzymatically) following structural identification. Briefly, the structure of carbohydrates bound to either lipids or proteins may be determined based on degradation, mass spectrometry, including electron-impact direct-probe (EI) and fast atom bombardment (FAB), and methylation analysis (techniques described below and, for example, in Nudelman et al., J. Biol. Chem. 261:5487-5495, 1986). Degradation analysis may be accomplished chemically and/or enzymatically, e.g., by glycosidases. The carbohydrate sequence suggested by degradation analysis may be determined by methylation analysis (e.g., Hakomori, J. Biochem. 55:205-208, 1964) followed by chemical ionization mass spectrometry of permethylated sugars (e.g., Stelner et al., Arch. Biochem. Biophys. 155:464-472, 1974; Levery et al., Meth. Enzymol. 138:13-25, 1987). Alternatively, or in conjunction with these techniques, EI mass spectrometry may be performed on permethylated glycans or after the appropriate degradation of intact glycans (e.g., Kannagi et al., J. Biol. Chem. 259:8444-8451, 1984; Nudelman et al., J. Biol. Chem. 263:13942-13951, 1988). Homogeneity of the carbohydrate sequence may be demonstrated based on various chemical and physical criteria, including proton NMR spectroscopy of intact or methylated

WO 02/02127

PCT/US00/18219

glycans and FAB mass spectrometry. Once a carbohydrate structure has been determined, the carbohydrate or derivatives thereof or non-carbohydrate functional equivalents thereof may be synthesized using techniques well known to those of ordinary skill in the art.

The compounds of the present invention may be used as immunogens for the production of polyclonal and monoclonal antibodies (MAbs). Polyclonal antibodies may be produced by standard methodologies. For example, briefly, polyclonal antibodies may be produced by immunization of an animal with a compound of the present invention and subsequent collection of its sera. It is generally preferred to follow the initial immunization with one or more boosters prior to sera collection. MAbs may be generally produced by the method of Kohler and Milstein (*Nature* 256:495-497, 1975; *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976). Briefly, the lymph nodes and/or spleens of an animal immunized with a compound of the present invention are fused with myeloma cells to form hybrid cell lines ("hybridomas" or "clones"). Each hybridoma secretes a single type of immunoglobulin and, like the myeloma cells, has the potential for indefinite cell division. An alternative to the production of MAbs via hybridomas is the creation of MAb expression libraries using bacteriophage and bacteria (e.g., Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728, 1989; Huse et al., *Science* 246:1275, 1989). Selection of antibodies exhibiting a desired specificity may be performed in a variety of ways well known to those of ordinary skill in the art.

It may be desirable to combine a compound of the present invention with a carrier in order to increase their immunogenicity. Suitable carriers include inactivated bacteria, keyhole limpet hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin and derivatives thereof. For example, all or a portion of the carbohydrate residues of the GSLs Le^a-Le^a or Le^b-Le^a may be combined with a carrier. A compound of the present invention may be combined with a carrier by a variety of means, including adsorption and covalent attachment.

A representative example of the use of a compound of the present invention as an immunogen is the immunization of mice with Le^b/Le^a antigen. In brief, Le^b/Le^a isolated from Colo205 cells was combined with a suspension of acid-treated *Salmonella minnesotae*, injected via tail vein into BALB/c mice, and the injection repeated three times with 10-day intervals. Following the final injection, splenocytes of immunized mice were harvested and fused with myeloma cells. A hybridoma, IMH2, which showed preferential reactivity with the immunogen, was established and deposited with ATCC (American Type Culture

WO 02/02127

PCT/US00/18219

Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 USA) as ATCC No. HB 11026. The hybridoma produces a MAb 1MH2 with an IgG3 isotype.

Methods for the detection of extended forms of type 1 chain antigen, such as Le^a-Le^a and/or Le^b-Le^a antigens, may be used to screen for cancers. For example, the GSL Le^b-

5 Le^a and the GSL Le^a-Le^a detected by TLC immunostaining with MAb 1MH2 and MAb NCC-ST-421 (established according to Watanabe et al., Jpn. J. Cancer Res (Gann) 76:43-52, 1985), respectively, of neutral glycolipid fractions prepared from various tumor samples. Such samples include tissue from colonic cancer, breast cancer, Hodgkin's disease, gallbladder cancer and embryonal rhabdomyosarcoma. The GSL Le^a-Le^a, for example, was
 10 not detected in glycolipid fractions from normal tissue from spleen, liver, kidney, placenta and lung. Given the teachings provided herein, it would be evident to those of ordinary skill in the art that a variety of means for detecting tumor-associated extended type 1 antigens (including the use of binding partners specific for tumor-associated extended type 1 antigens; such as GSL Le^a-Le^a and Le^b-Le^a) could be employed within the methods of the
 15 present invention. For example, antibodies specific for Le^a-Le^a or Le^b-Le^a epitopes may be produced as described above, and the presence of immunocomplexes may be tested following contact (e.g., incubation) of such antibodies with a biological sample under conditions and for a time sufficient to permit the formation of immunocomplexes.

20 Detection of the presence of immunocomplexes formed between an antigen described above and an antibody specific for the antigen may be accomplished by a variety of known techniques, such as radioimmunoassays (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Suitable immunoassays include the double monoclonal antibody sandwich immunoassay technique of David et al. (U.S. Patent 4,376,110); monoclonal-polyclonal antibody sandwich assays (Wide et al., in Kirkham and Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods E. and S. Livingstone, Edinburgh, 1970); the "western blot" method of Gordon et al. (U.S. Patent 4,452,901); immunoprecipitation of labeled ligand (Brown et al., J. Biol. Chem. 255:4980-4983, 1980); enzyme-linked immunosorbent assays as described by, for example, Raines and Ross (J. Biol. Chem. 257:5154-5160, 1982); immunocytochemical techniques, including the use of fluorochromes (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol. 39:477,
 25

WO 02/02127

PCT/US00/18219

1980); and neutralization of activity (Bowen-Pope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2396-2400, 1984). In addition to the immunoassays described above, a number of other immunoassays are available, including those described in U.S. Patent Nos.: 3,817,827; 3,850,752; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; and 4,098,876.

5 For detection purposes, the antibodies may either be labeled or unlabeled. When unlabeled, the antibodies find use in agglutination assays. In addition, unlabeled antibodies can be used in combination with labeled molecules that are reactive with immunocomplexes, or in combination with labeled antibodies (second antibodies) that are reactive with the antibody directed against the compound, such as antibodies specific for immunoglobulin.

10 Alternatively, the antibodies can be directly labeled. Where they are labeled, the reporter group can include radioisotopes, fluorophores, enzymes, luminescers, or dye particles. These and other labels are well known in the art and are described, for example, in the following U.S. patents: 3,766,162; 3,791,932; 3,817,837; 3,996,345; and 4,233,402.

15 In one preferred embodiment for detecting immunocomplexes, a reporter group is bound to the antibody. The step of detecting immunocomplexes involves removing substantially any unbound antibody and then detecting the presence of the reporter group. Unbound antibody is antibody which has not bound to the antigen.

In another preferred embodiment, a reporter group is bound to a second antibody capable of binding to the antibodies specific for the antigen. The step of detecting immunocomplexes involves (a) removing substantially any unbound antibody (i.e., antibody not bound to the antigen), (b) adding the second antibody, (c) removing substantially any unbound second antibody and then (d) detecting the presence of the reporter group. For example, where the antibody specific for the antigen is derived from a mouse, the second antibody is an anti-murine antibody.

25 In a third preferred embodiment for detecting immunocomplexes, a reporter group is bound to a molecule capable of binding to the immunocomplexes. The step of detecting involves (a) adding the molecule, (b) removing substantially any unbound molecule, and then (c) detecting the presence of the reporter group. An example of a molecule capable of binding to the immunocomplexes is protein A.

30 An alternative to the use of labeled antibodies, labeled second antibodies or labeled molecules reactive with immunocomplexes generally, is an immunoassay employing a labeled antigen. In such an assay ("indirect" or "competitive"), an antigen present in a

WO 02/02127

PCT/US00/18219

sample will compete with labeled antigen for the antibodies.

It will be evident to those of ordinary skill in the art that a variety of methods for detecting immunocomplexes may be employed within the present invention. Reporter groups suitable for use in any of the methods include radioisotopes, fluorophores, enzymes, luminescers, and dye particles. Further, it will be appreciated that binding partners (other than antibodies) specific for tumor-associated extended type 1 antigens of the present invention may be used to test for such antigens and that complexes formed between such binding partners and antigens may be detected by techniques analogous to those described above for immunocomplexes.

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

HPTLC IMMUNOSTAINING AND IMMUNOASSAY WITH MAB NCC-ST-421 OF NEUTRAL GLYCOLIPIDS PREPARED FROM TUMORS AND NORMAL TISSUES

A. Monoclonal Antibodies and Immunoassays

MAB ST-421 was established as previously described (Watanabe et al., Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 76:43-52, 1985). MAB MNH-1, which defines type 1 chain N-acetyllactosamine (Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow R), was prepared in the laboratory of the inventors; MAB 1B2, which defines type 2 chain N-acetyllactosamine (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow R), was established as previously described (Young et al., J. Biol. Chem. 256:10967-10972, 1981). Anti-Le^a MAB was obtained from Chembiomed Ltd. (Edmonton, Alberta, Canada). Anti-Le^y MAB AH6 was established as previously described (Abe et al., J. Biol. Chem. 258:11793-11797, 1983), and did not show any cross-reactivity with Le^b. Anti-Le^b MAB was purchased from Chembiomed Ltd. (Edmonton, Alberta, Canada), and showed cross-reactivity with type 1 chain H. Another anti-Le^b MAB was

WO 02/02127

PCT/US00/18219

purchased from Monocarb (Lund, Sweden), and showed reactivity with Le^b, type I chain H, and Le^y. HPTLC immunostaining was performed using Whatman HPTLC plates (HP-KF) by a modified version (Kannagi et al., *J. Biol. Chem.* 257:4438-4442, 1982; Kannagi et al., *J. Biol. Chem.* 257:14865-14874, 1982) of the method originally described by Magnani et al. (Magnani et al., *Anal. Biochem.* 109:399-402, 1980).

B. Glycolipid Preparation

All glycolipid samples used were either isolated or synthesized enzymatically. VI³NeuAcnLc₆, IV³NeuAcIII⁴FucLc₄, VI²FucnLc₆, and IV²FucLc₄ were isolated from human placenta, liver adenocarcinoma, human type O erythrocytes, and porcine intestine, respectively, after extraction with IHW (55:25:20) followed by Folch partition, DEAE-Sephadex chromatography, and HPTLC on an Iatrobeds 6RS-8010 column (Magnani et al., *J. Biol. Chem.* 257:14365-14369, 1982; Watanabe et al., *J. Biol. Chem.* 254:8223-8229, 1979; Hakomori et al., *J. Immunol.* 98:31-38, 1967; Stellner et al., *Biochemistry* 12:656-661, 1973). nLc₆ and III⁴FucLc₄ were prepared by desialylation of VI³NeuAcnLc₆ and IV³NeuAcIII⁴FucLc₄, respectively, by heating the samples at 100°C for 1 hr in 1% acetic acid. IV³GlcNAcLc₄, IV₃Galβ1→3-GlcNAcLc₄, IV³Galβ1→3[Fuc1→4]GlcNAcLc₄ and IV³Galβ1→3[Fuc1→4]GlcNAcIII³FucnLc₄(Le^a-Le^x) were prepared by enzymatic synthesis. IV³Galβ1→3GlcNAcIII³FucnLc₄ was prepared by α-fucosidase treatment of IV³Galβ1→3[Fuc1→4]GlcNAcIII³FucnLc₄; i.e., 100 μg of the glycolipid was incubated with 0.2 M citrate buffer (pH 4.5) containing 0.05 units bovine kidney α-L-fucosidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) for 2 hr at 37°C. IV²III⁴Fuc₂Lc₄, V²III³Fuc₂nLc₆, and VI²V³Fuc₂nLc₆ were prepared biosynthetically by α1→3 fucosylation of IV²FucLc₄, nLc₆, and VI²FucnLc₆ (respectively) as substrates, using α1→3/4 fucosyltransferase from Colo2O5. α1→3/4 fucosyltransferase was solubilized from Colo2O5 cells by homogenization in two volumes of 50 mM Hepes buffer (pH 7.0), 0.5 M sucrose, 1 mM

WO 02/02127

PCT/US00/18219

EDTA, and 1% Triton CF-54 in a Potter-Elvehjem homogenizer at 4°C. The homogenate was centrifuged at 100,000 x g for 1 hr, and the supernatant was concentrated to the original volume of cells by dialysis. The enzyme preparation was stored at -80°C until needed.

Enzymatic α1→3/4 fucosylation was performed in a reaction mixture containing 1 mg glycosphingolipid (GSL) substrate, 1 mg deoxytaurocholate, 10 μmol MnCl₂, 25 μmol Hepes buffer (pH 7.0), 5 μmol CDP-choline, 6 μmol GDP-fucose, and 500 μl enzyme preparation in a total volume of 1 ml. The reaction mixture was incubated at 37°C for 16 hr, then lyophilized, extracted with isopropanol-hexane-water (IHW) (55:25:20) by sonication, and centrifuged. The supernate was subjected to HPLC on an Iatrobeads 6RS-8010 column using gradient elution of IHW from 55:40:5 to 55:25:20 over 200 min. Two ml fractions were collected and tubes containing the final product were pooled according to HPTLC migration in chloroform-methanol-water 50:40:10. GSL bands were visualized by orcinol spray reagent.

Each GSL with defined structure was characterized by reactivity with specific MAb(s), i.e., Le^b/Le^a antigen reacted with anti-Le^b MAbs but not with anti-Le^y MAb AH6; Le^y/Le^x reacted with AH6 but not with anti-Le^b nor anti-Le^x MAbs; Le^a/Le^a and Le^a/Le^x reacted with anti-Le^a MAb as well as with MAb ST-421.

C. TLC Immunostaining

TLC immunostaining of neutral glycolipid fractions prepared from various tumor samples showed the presence of a positive band migrating slower than -Le^a - active ceramide pentasaccharide, and cross-reacting with anti-Le^a MAb. This band was strongly stained by MAb NCC-ST-421, and was seen in the majority of tumors so far examined. Examples from colonic cancer, breast cancer, Hodgkin's disease, gallbladder cancer, and embryonal rhabdomyosarcoma.

WO 02/02127

PCT/US00/18219

EXAMPLE 2

ISOLATION OF DIMERIC Le^a ANTIGEN AND Le^b-Le^a ANTIGEN5 A. Preparation of Tumor Tissue

Colo205 cells (ATCC) (Semple et al., *Cancer Res.* 38:1345-1355, 1978) were grown in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum. Cells were harvested and passed approximately every 7 days. Cells harvested were trypsinized, centrifuged, washed twice with phosphate-buffered saline (pH 7.4) and counted using a hemocytometer. 4×10^6 cells
10 were injected subcutaneously into each of 6 athymic (nude) mice. Tumors (approximately 2 ml each) were excised after 2 weeks and stored frozen at -80°C until needed.

B. Isolation of the Slow-Migrating, Le^a-Active Component (Dimeric Le^a) from Colo205 Tumor

15 Approximately 200 g of tumors were extracted with isopropanol-hexane-water (IHW) (55:25:20) followed by Folch partition, DEAE-sephadex chromatography and HPLC on an Iatrobeds 6RS-8010 column. Gradient elution of the upper-phase neutral fraction was performed in IHW from 55:40:5 to 55:25:20 over 200 minutes. Two-ml fractions were collected and pooled according to HPTLC migration in chloroform-methanol-water
20 (50:40:10). The slow-migrating Le^a-active fraction (revealed by TLC immunostaining) was further purified by preparative TLC on Merck HPTLC plates (Silica Gel 60, Merck, Darmstadt, Germany) and used for structural characterization.

C. Isolation of Le^b-Le^a Antigen

25 A positive band (by immunostaining with MAb NCC-ST-421 according to Example 1) which migrates just below dimeric Le^a antigen was purified using the methods described in section B above.

WO 02/02127

PCT/US00/18219

EXAMPLE 3

CHARACTERIZATION OF DIMERIC Le^a AND Le^b-Le^a ANTIGENSA. Enzymatic Degradation

5 Enzymatic degradation of 1 mg dimeric Le^a was performed by sequential hydrolysis with 0.5 units of α -fucosidase (bovine kidney), 0.5 units of β -galactosidase (jackbean), and 0.5 units of β -N-acetylglucosaminidase (bovine epididymis) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). All reactions were carried out in 0.2 M sodium citrate (pH 4.5) for 4 hr at 37°C in a water bath with shaking. Purification of each degradative product was performed by
10 preparative HPTLC.

B. In vitro Cytotoxicity of IMH21. Cell Lines

15 Colo205 was originally obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 10 μ g/ml streptomycin. Human epidermoid carcinoma A431 cell line (MacLeod et al., *J. Cell. Physiol.* 127:175-182, 1986) was originally donated by Dr. Carol MacLeod (Gildred Cancer Facility, UCSD School of Medicine, San Diego, CA). This cell line expresses Le^a, Le^b, Le^x, Le^y, and AL^b on the EGF receptor (Gooi et al., *Biosci. Reports* 5:83-94, 1985). A431 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's
20 medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) supplemented with 5% fetal calf serum, 1 mM glutamine, 110 mg/l sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, and 10 μ g/ml streptomycin. Cells (about 5×10^5 /ml) were seeded and harvested at confluency by EDTA treatment followed by washing with PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺. These were used as target cells
25 in in vitro cytotoxicity assay, or used for testing tumorigenicity in nude mice by subcutaneous inoculation of 5×10^6 cells. Human erythroleukemia K562 cells (Lozzio et al.; *Blood* 45:321-334, 1975) were used as controls for natural killer (NK) activity of lymphocytes used in the assay system.

WO 02/02127

PCT/US00/18219

2. **Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) and Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC)**

For the ADCC assay, human peripheral blood leukocytes (HPBL) (used as effector cells) were obtained from buffy coat fraction of blood from healthy volunteer donors. Briefly, mononuclear cells were separated by centrifugation through Ficoll-Hypaque gradient solution at 2000 rpm for 20 min (Mishell et al., in Mishell, B.B and Shiigi, S.M. (eds.), Selected Methods in Cellular Immunology, pp. 3-27, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980). Mouse splenocytes and mouse peritoneal macrophages (effector cells) were prepared as previously described by Mishell et al., with some modification as follows. Target cells (5×10^6) were labeled by incubation with 100 μ l of ^{51}Cr for 90 min at 37°C. After washing (3x) and incubation (1 hr at 37°C), cells (1×10^6 /ml) were suspended in RPMI-1640 supplemented with 25 mM HEPES buffer and 3% bovine serum albumin. Twenty μ l of labeled cells, 100 μ l of IMH2 or ST-421, and 100 μ l of effector cell suspension were mixed into Microtiter U-bottom plates (Corning, NY). Non-specific mouse Ig (Sigma, St. Louis, MO) was used as a negative control. After 4 hr incubation, the plates were centrifuged (500 x g, 2 min) with a hanging plate-holder assembled in a centrifuge, and radioactivity in 100 μ l supernatant in each well was measured with a gamma counter. Each experimental group was tested in triplicate. Percent specific lysis was calculated according to the formula $([A-B] \times 100)/C$, where A=cpm in lysed experimental cells; B=cpm in unlysed target cells; C=cpm in total target cells. Spontaneous release never exceeded 15% of maximally releasable labeled radioactivity.

For CDC, ^{51}Cr -release assay was performed using a procedure similar to that for ADCC, except that 100 μ l of diluted human serum was added as a complement source instead of effector cells. The serum was inactivated at 56°C for 30 min and used as a control. Percent specific lysis was calculated as described above.

Since Colo205 cells have been characterized as expressing extended type 1 chain Le^a/Le^a and Le^b/Le^a antigens, which react strongly with MAbs ST-421 and IMH2, respectively, cytotoxic effect of IMH2 against Colo205 was evaluated and compared to that of ST-421. Both MAbs showed striking ADCC killing of Colo20S cells. This killing was correlated with effector:target cell (E:T) ratio and with MAb concentration. The cytotoxic

WO 02/02127

PCT/US00/18219

effect was maximal at an E:T ratio of 100:1-200:1, and at a MAb concentration of 35-70 $\mu\text{g/ml}$. Control mouse IgG and other non-specific MAbs showed no cytotoxic effect regardless of E:T ratio or MAb concentration. When the same cytotoxicity test was performed with mouse splenocytes, the corresponding values were only 7% and 17% lysis (E:T ratio 200:1, MAb concentration 30 $\mu\text{g/ml}$). The MAbs showed a weak cytotoxic effect against A431 cells (Table). Comparison of maximum IMH2-dependent lysis of Colo 205, A431, and K562 cells is shown in the Table. High lysis values (e.g., 65% and 94% lysis of Colo205 cells with IMH2 and ST-421, respectively) were only pronounced in the presence of HPBL; values were much less with mouse splenocytes, as observed previously with ST-421 (Watanabe et al., *Cancer Res.* 51:2199-2204, 1991). CDC mediated by IMH2 and ST-421 was similarly correlated with complement concentration and with MAb concentration.

TABLE MAb-dependent cytotoxic effect on Colo205, A431, and K562 cells by MAbs ST-421 and IMH2

Target Cell	Antibody/ Reactivity ^b	Percent lysis ^a		
		eff. cell + MAb+	eff. Cell+ MAb-	eff. cell - MAb+
Colo205	ST-421 +	94.5	2.7	0.8
	IMH2 +	65.0	2.7	0.7
A431	ST-421 ±	14.4	10.9	1.1
	IMH2 ±	7.6	9.2	0.6
K562 ^c	ST-421 -	48.2	36.2	0.5
	IMH2 -	44.8	36.2	0.3

- a. Percent lysis at E:T (effector:target cell) ratio of 100:1 with IMH2 (35 $\mu\text{g/ml}$) and ST-421 (x100 diluted ascites).
- b. Determined by flow cytometry. +, positive; ±, weakly positive; -, negative.
- c. The high cytotoxic effect of K562 cells is also observed in the absence of MAb, and is considered to reflect natural killer cell activity.

WO 02/02127

PCT/US00/18219

C. In vivo Tumor Suppression

Colo205 and A431 cells used for in vivo experiments were grown in vitro, washed 2x with medium, and reconstituted at the desired cell density in PBS. Cells ($5 \times 10^6/100 \mu\text{l}$) were subcutaneously injected into the backs of 5- to 7-week-old athymic BALB/c mice, and intraperitoneal administration of MAb was started immediately after injection. Purified IMH2 (1.1 mg/ml) or ST-421 in ascites fluid with corresponding concentration of IgG (1.1-1.2 ng/ml) at a dosage of 0.2 ml/animal were intraperitoneally injected 1x/day for 2 weeks. Width and length of tumors were measured by the same observer 3x/week. Tumor weight was estimated as $(\text{width}^2 \times \text{length})/2$. Control animals received ascites protein produced by mouse myeloma cell line NS1 in BALB/c mice. Seven mice per group were used for each experiment, and experiments were run in duplicate. Mean values of tumor weight based on the duplicate experiments were plotted.

Both MAbs IMH2 and ST-421 showed striking inhibition of Colo205 tumor growth in nude mice. In contrast, both MAbs showed minimal inhibitory effect on A431 tumor growth. Thus, high expression of the defined antigen appears to be essential for susceptibility to antibody-dependent inhibition of tumor growth in vivo.

D. Reactivity of IMH2 With Various Tumors and Normal Tissues

Various tumors and adjacent normal tissues were obtained from surgical specimens fixed with formalin and paraffin-embedded. In addition, normal tissues and some tumor tissues from brain, thymus, lung, liver, stomach, colon, kidney, adrenal gland, spleen, pancreas, uterus (with endometrium), and skin were obtained by fresh necropsy from accident victims. Both surgical and necropsy specimens were provided through the courtesy of the Department of Pathology, Swedish Medical Center, Seattle, WA, and Ms. Debbie Bennett of The Biomembrane Institute. Samples were sectioned ($3 \mu\text{M}$ thickness), deparaffinized with xylene, dehydrated in ethanol, treated with primary MAb, subsequently treated with biotinylated secondary MAb and peroxidase-conjugated avidin, and stained with 3',3'-diaminobenzidine. Endogenous peroxidase activity was blocked by treatment of sections with 0.3% H_2O_2 for 20 min. Some sections were incubated with mouse IgG as a negative control. Biotinylated goat anti-mouse IgM, avidin, and biotin were from Vectastain

WO 02/02127

PCT/US00/18219

(Burlingame, CA).

MAB IMH2 reacted strongly and with high incidence with tumors from colon, rectum, liver, pancreas, and endometrium (Table I). In contrast, it showed no reactivity with normal mucosae of distal colon and rectum, including crypt regions and goblet cells. It reacted with lung adenocarcinoma, but not with large cell or small cell carcinoma. One out of 5 cases of squamous cell carcinoma showed strong positive reactivity. MAB IMH2 did not react with tissues of normal brain, lung, spleen, skin, or with various blood cells including granulocytes.

Observed locations of normal tissues with strong staining were as follows: Hassall's bodies and epithelial reticular cells of thymus (thymocytes were negative); mucous epithelium and secretory glands of gastric mucosa (lamina propria, serosa, and muscle layer were negative); both medulla and cortex of adrenal glands. Locations of normal tissues with moderate to weak positive staining were: epithelial cells of proximal and distal convolutions of kidney (other parts were negative); cells in Langerhans' islets in pancreas (other parts of pancreas were negative); cecal mucosa; urothelium. Very weak staining was observed for hepatocytes (other parts of liver, intralobular connective tissue, central vein, bile duct, and Kupffer's cells were negative). These results are summarized in Table I.

TABLE I. Immunohistological staining by MAB IMH2 of normal tissues and carcinomas.

Tissue	Staining	Localization/comments
<u>Normal</u>		
brain	-	
lung	-	including broncheolar epithelia
spleen	-	
rectum	-	including crypt area
colon	-	-11/12, \pm 1/12
cecum	+	
skin	-	
granulocytes	-	
lymphocytes	-	

	WO 02/02127		PCT/US00/18219
	pancreas	+	+ in islets of Langerhans; others-
	liver	±	faintly + /± hepatocytes; others --
	thymus	++	++ in Hassal's bodies, epithelial and reticular cells; - in thymocytes
5	stomach	+++	mucosa, glandular cells (see text)
	kidney	+	weakly + in tubular epithelia (see text)
	adrenal glands	+++	
	uterus/endometrium	-/+	- or weakly + in endometrium; - 9/15, ± 2/15, + 4/15 (total positive cases 4/15 = 27%)
10	<u>Carcinomas</u>		
	colon/rectum	+ / + + +	+ + + + 4, + + 6, + 4, ± 1, - 1 (total positive cases 14/16 = 88%)
	liver (primary)	++	2/3
15	pancreas	+++	2/2
	lung adenocarcinoma	++	2/4
	squamous	+	1/5
	large cell	-	0/3
	small cell	-	0/5
20	endometrium	- / + + +	+ + + 4, + + 11, + 6/24, ±/-3 (total positive cases 21/24 = 88%)

25 E. Reactivity of IMH2 With Normal and Malignant Colonic and Bladder
Tissues From Patients With Known Lewis and Secretor Status

30 Expression of Le^b and Le^y determinants is correlated with secretor status of the individual (Sakamoto et al., Molec. Immun. 21:1093-1098, 1984; Ørntoft et al., J. Urol. 138:171-176, 1987), whereas expression of Lewis antigens in some tumors is unrelated to host Lewis status (Ørntoft et al., Lab. Invest. 58:576-583, 1988; Ørntoft et al., Blood 77:1389-1396, 1991). Therefore, reactivity of MAb IMH2 with normal and malignant

WO 02/02127

PCT/US00/18219

colonic and bladder tissues from patients with known Lewis and secretor status was studied. Results are summarized in Tables II and III. IMH2 was reactive with rectal tumors but not with normal rectal tissue, and this reactivity was unrelated to secretor status. Conversely, IMH2 was reactive with normal cecum but less so with the single cecal tumor sample studied. These results suggest that the trend of IMH2 epitope expression in normal and malignant colonic tissues is similar to the well-established expression pattern of ABH antigens. Genuine Lewis-negative (Le^{a-b-}) individuals (Ørntoft et al., *Lab Invest.* 58:576-583, 1988), expressed IMH2 epitope in both normal and malignant colonic tissues (Tables II and III).

IMH2 epitope is expressed in normal urothelium, but its expression is diminished to varying degrees in bladder tumors. There seems to be a correlation with grade of atypia, i.e., IMH2 epitope expression is lowest in highly invasive tumors. Again, this trend is similar to that of ABH antigen expression in normal and malignant bladder tissues. However, in contrast to colonic tissues, IMH2 epitope expression in bladder tissues from blood group A individuals is correlated with secretor status. Genuine Lewis-negative (Le^{a-b-}) individuals expressed IMH2 epitope in both normal and malignant bladder tissues.

TABLE II. Immunohistological staining by MAb IMH2 of normal and malignant colonic tissues: Relationship with host Lewis status.

		Normal		Malignant	
		rectum	cecum	rectum	cecum
	A Le^{a-b+}	0/5	1/1	3/4	1/1
	A Le^{a+b-}	0/4	ND	2/2	ND
	O Le^{a-b+}	0/2	ND	2/3	ND
	O Le^{a+b-}	0/2	ND	1/1	ND
	genuine Le^{a-b-}	0/1	1/1 ^a	1/1	0/1
	non-genuine Le^{a-b-}	0/2	ND	1/1	0/1

WO 02/02127

PCT/US00/18219

Figures indicate positive specimens divided by total specimens examined. ND = not determined. For Le^{a-b-} individuals (genuine and non-genuine), phenotypic status was determined by $\alpha 1 \rightarrow 4$ fucosyltransferase activity in saliva, and erythrocyte reactivity with anti-Le^a and -Le^b MAbs. Definitions of phenotypes may be found in Holmes et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 274:14-25, 1989, and Ørntoft et al., *Lab. Invest.* 58:576-583, 1988.

^a Non-secretor.

10 **TABLE III.** Immunohistological staining by MAb IMH2 of normal and malignant bladder tissues: Relationship with host Lewis status.

		Bladder carcinoma		
		normal	noninvasive	invasive
15	A Lc ^{a-b+}	4/4	1/1	1/2
	A Lc ^{a+b-}	0/2	1/2	1/3
	O Lc ^{a-b+}	1/1	1/1	1/2
	O Lc ^{a+b-}	2/2	1/1	0/1
20	genuine Lc ^{a-b-}	2/2	ND	0/1
	non-genuine Lc ^{a-b-}	ND	ND	ND

25 Main footnote as for Table II.

F. Isolation of Extended sialyl-Le^a (or S Le^a - Le^a)

30 Examination of monosialo-ganglioside fraction of Colo 205 cells led to isolation or resulted in isolation of one major ganglioside by a high performance thin layer chromatography technique. The major band was extracted and characterized. The structure was identified as:

PCT/US00/18219



This structure was verified by ^1H -NMR spectroscopy.

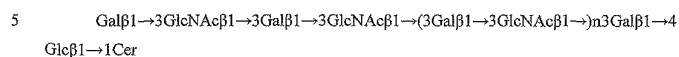
10

WO 02/02127

PCT/US00/18219

Claims

1. An isolated compound, with or without fucosyl and/or sialyl residues, having the formula:



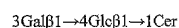
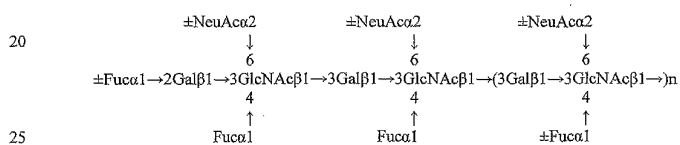
wherein n is 0 or an integer of 1 or more, and when n=1, there are at least two fucosyl and/or one or more sialyl residues, Gal represents galactose, GlcNAc represents N-

acetylglucosamine, Glc represents glucose, and Cer represents ceramide, and wherein said at

least two fucosyl residues are linked to the GlcNAc residues via an $\alpha 1 \rightarrow 4$ linkage and/or to the terminal Gal residue via an $\alpha 1 \rightarrow 2$ linkage and said one or more sialyl residues are linked to the terminal Gal residue via an $\alpha 2 \rightarrow 3$ linkage and/or to one or more of the subterminal GlcNAc residues via an $\alpha 2 \rightarrow 6$ linkage.

2. The isolated compound of claim 1, wherein there are at least two sialyl residues.

3. The isolated compound of claim 1, having the formula:

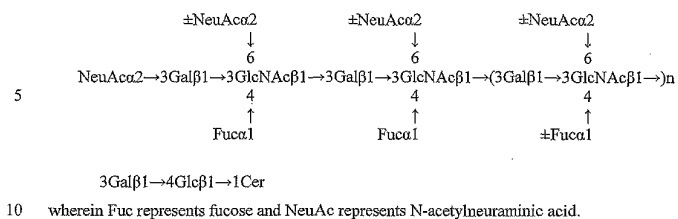


wherein Fuc represents fucose and NeuAc represents N-acetylneuraminic acid.

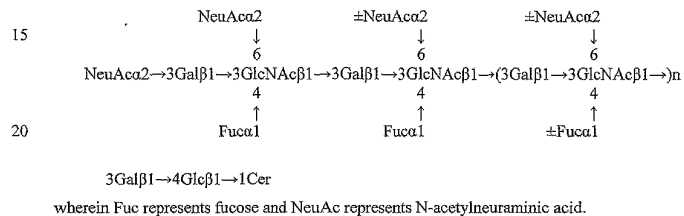
4. The isolated compound of claim 1 having the formula:

WO 02/02127

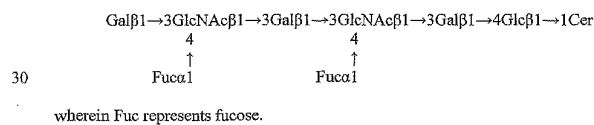
PCT/US00/18219



5. The isolated compound of claim 1 having the formula:



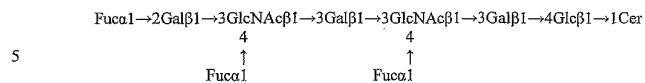
25 6. The isolated compound of claim 1 having the formula:



WO 02/02127

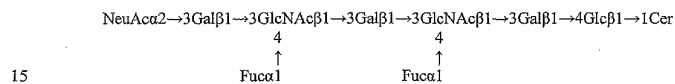
PCT/US00/18219

7. The isolated compound of claim 1 having the formula:



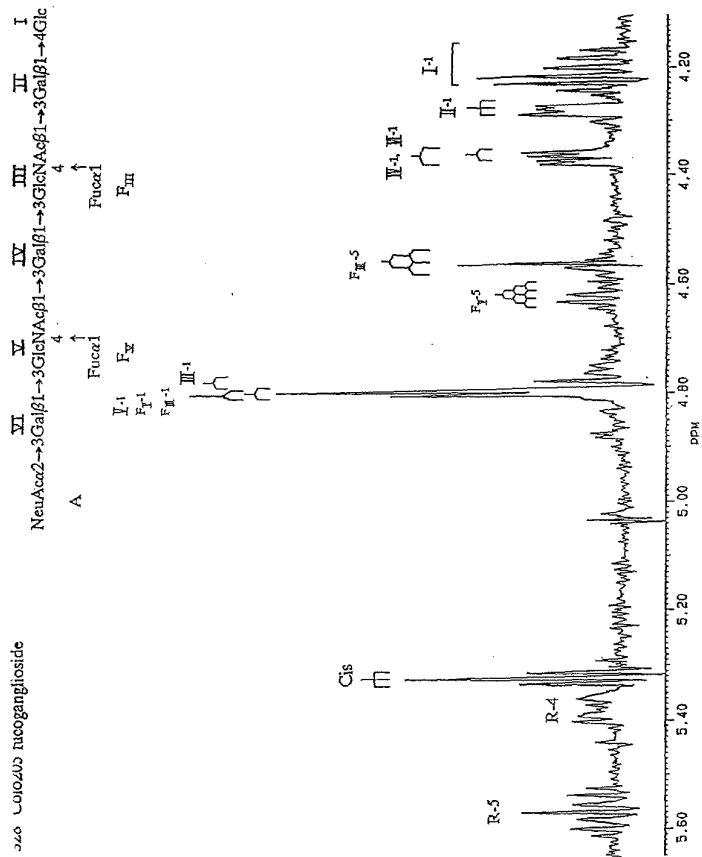
wherein Fuc represents fucose.

- 10 8. The isolated compound of claim 1 having the formula:



wherein NeuAc represents N-acetylneuraminic acid, and Fuc represents fucose.

PCT/US00/18219



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/18219												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 31/715; C08B 37/00 US CL : 514/23, 53, 54; 536/53, 55.1, 55.2, 55.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/23, 53, 54; 536/53, 55.1, 55.2, 55.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) databases: EAST, HCAPLUS, Registry search terms: inventor names, structures, glycosphingolipid, sphingoglycolipid, polyactosamine, ganglioside														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X, E	US 6,083,929 A (LEVERY et al.) 04 July 2000, see claims 1-9.	1-8												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier document published on or after the international filing date</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*A* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*B* earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.													
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
B earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family													
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 15 SEPTEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 05 NOV 2001												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer KATHLEEN KAHLER FONDA Telephone No. (703) 308-1235												

フロントページの続き

- (72)発明者 レベリー, スティーブン
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 2, シアトル, ブロードウェイ 7 2 0, バイオメ
ンブレイン インスティテュート
- (72)発明者 ハコモリ, セン-イチロー
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 2, シアトル, ブロードウェイ 7 2 0, バイオメ
ンブレイン インスティテュート
- (72)発明者 ストラウド, マーク
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 2, シアトル, ブロードウェイ 7 2 0, バイオメ
ンブレイン インスティテュート

F ターム(参考) 4C090 AA01 BA77 BB03 BB07 BB11 BB12 BB13 BB18 BB25 BB32
BB33 BB35 BB36 BB53 BB62 BB73 BB92 BC27 DA09 DA22
DA25