

(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2017-528131

(P2017-528131A)

(43) 公表日 平成29年9月28日 (2017.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30	4 C O 4 8
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 5 0
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 5 7
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-511761 (P2017-511761)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月21日 (2015.8.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月24日 (2017.4.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/087717
 (87) 国際公開番号 W02016/026456
 (87) 国際公開日 平成28年2月25日 (2016.2.25)
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2014/085027
 (32) 優先日 平成26年8月22日 (2014.8.22)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 517062263
 ワン, ファイルー
 中華人民共和国 102209 ペイジン
 , チャンピン, ベイチージア タウン, デ
 ィンシー ロード, #309, ペイジン
 ヤンフアン, ビルディング 23
 (74) 代理人 100075409
 弁理士 植木 久一
 (74) 代理人 100129757
 弁理士 植木 久彦
 (74) 代理人 100115082
 弁理士 菅河 忠志
 (74) 代理人 100125243
 弁理士 伊藤 浩彰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖類系バイオマーカーおよび治療剤

(57) 【要約】

本発明は癌細胞または炎症性細胞に発現されているN-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を提供する。また、これらの抗体を含む組成物、およびポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、並びに生産における有用な方法を提供する。本発明は、さらに、N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合する抗体を、他の抗癌剤と任意に選択して組み合わせて個体に投与し、個体の癌を治療と予防する方法と試薬キットを提供する。また、N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合する抗体を個体に投与することにより個体の胃腸疾患を治療と予防するための方法と試薬キットを提供する。さらに、N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を個体の癌細胞の存在を測定するための方法と試薬キットを提供する。

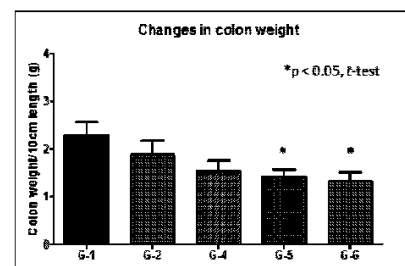


FIG. 27

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる単離モノクローナル抗体であって、前記エピトープは癌細胞または炎症性細胞によって発現されている単離モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記抗体はN－アセチルグルコサミンを含むエピトープ及びN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

抗体断片である請求項 1 または 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

F a b 断片、s c F v、ミニボディ、ダイアボディ、s c F v 多量体、または二重特異性抗体断片である請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

ヒト化抗体である請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

ヒト抗体である請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7】

キメラ抗体である請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記エピトープが癌細胞の細胞表面に発現している請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

20

【請求項 9】

前記エピトープが癌細胞内に発現している請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 10】

前記癌細胞は神経膠腫細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、乳癌細胞、卵巢癌細胞、及び子宮頸部腺癌細胞よりなる群から選ばれる請求項 8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記肺癌細胞は小細胞肺癌細胞、肺扁平上皮癌細胞、または肺腺癌細胞である請求項 10 に記載の抗体。

30

【請求項 12】

前記抗体と前記エピトープとの結合は癌細胞の成長を抑制する請求項 8 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 13】

前記炎症細胞は結腸炎、炎症性腸症、または胃腸炎の腸炎症性細胞であり、かつ前記エピトープが炎症細胞の細胞表面に発現している請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 14】

SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む重鎖可変領域、および SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

【請求項 15】

SEQ ID NO: 24 の HVR－H1 配列、SEQ ID NO: 25 の HVR－H2 配列、および SEQ ID NO: 26 の HVR－H3 配列を含む重鎖可変領域、並びに SEQ ID NO: 27 の HVR－L1 配列、SEQ ID NO: 28 の HVR－L2 配列、および SEQ ID NO: 29 の HVR－L3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 16】

SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 15 のい

50

いずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 17】

SEQ ID NO: 3 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む重鎖可変領域、および SEQ ID NO: 4 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 18】

SEQ ID NO: 7 の HVR-H1 配列、SEQ ID NO: 30 の HVR-H2 配列および SEQ ID NO: 31 の HVR-H3 配列を含む重鎖可変領域、並びに SEQ ID NO: 11 の HVR-L1 配列、SEQ ID NO: 14 の HVR-L2 配列、および SEQ ID NO: 15 の HVR-L3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

10

【請求項 19】

SEQ ID NO: 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13、17、18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 20】

SEQ ID NO: 5 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む重鎖可変領域、および SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 21】

SEQ ID NO: 32 の HVR-H1 配列、SEQ ID NO: 33 の HVR-H2 配列、および SEQ ID NO: 34 の HVR-H3 配列を含む重鎖可変領域、並びに SEQ ID NO: 35 の HVR-L1 配列、SEQ ID NO: 36 の HVR-L2 配列、および SEQ ID NO: 37 の HVR-L3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

20

【請求項 22】

SEQ ID NO: 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、7 ～ 13、20、21 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 23】

SEQ ID NO: 7 の HVR-H1 配列、SEQ ID NO: 8 の HVR-H2 配列、および SEQ ID NO: 9 の HVR-H3 配列を含む重鎖可変領域、並びに SEQ ID NO: 10 の HVR-L1 配列、SEQ ID NO: 12 の HVR-L2 配列、および SEQ ID NO: 15 の HVR-L3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、8 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

30

【請求項 24】

SEQ ID NO: 16 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、8 ～ 13、23 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 25】

SEQ ID NO: 7 の HVR-H1 配列、SEQ ID NO: 8 の HVR-H2 配列、および SEQ ID NO: 9 の HVR-H3 配列を含む重鎖可変領域、並びに SEQ ID NO: 11 の HVR-L1 配列、SEQ ID NO: 13 の HVR-L2 配列、および SEQ ID NO: 15 の HVR-L3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、8 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

【請求項 26】

SEQ ID NO: 16 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 ～ 5、8 ～ 13、25 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 27】

50

SEQ ID NO: 7 の HVR-H1 配列、SEQ ID NO: 8 の HVR-H2 配列、および SEQ ID NO: 9 の HVR-H3 配列を含む重鎖可変領域、並びに SEQ ID NO: 11 の HVR-L1 配列、SEQ ID NO: 14 の HVR-L2 配列、および SEQ ID NO: 15 の HVR-L3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1～5、8～13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 28】

SEQ ID NO: 16 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 22 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1～5、8～13、27 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 29】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の抗体と薬学的に許容可能な担体を含む組成物。

【請求項 30】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする核酸配列を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項 31】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする核酸配列を含むベクター。

【請求項 32】

請求項 31 に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の宿主細胞を培養して、核酸によってコードされた抗体を生成する工程、および細胞培養物から抗体を回収する工程を含む抗体の製造方法。

【請求項 34】

請求項 33 に記載の方法により製造される抗体。

【請求項 35】

請求項 1～28、34 のいずれか 1 項に記載の抗体の有効量を含む組成物を個体に投与する工程を含む、個体の癌の予防または治療に用いる方法。

【請求項 36】

前記癌は、脳癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、および子宮頸癌よりなる群から選ばれる請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記個体はヒトである請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記個体は非ヒト動物である請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 39】

請求項 1～28 と 34 のいずれか 1 項に記載の所定量の抗体、及び所定量の他の抗癌剤を個体に投与する工程を含み、前記抗体と前記抗癌剤とを併用することにより、個体の癌の効果的な治療と予防を提供する個体の癌の予防または治療に用いる方法。

【請求項 40】

前記治療される癌は、脳癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、結腸癌、胃癌または胃腫瘍 (stomach or gastric cancer)、食道癌、および線維肉腫よりなる群から選ばれる請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記個体はヒトである請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記個体は非ヒト動物である請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 43】

前記抗癌剤は化学療法剤である請求項 39～42 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 44】

(a) 前記個体に由来する生物サンプルを請求項 1～28、34 のいずれか 1 項に記載の抗体と接触させる工程、および

10

20

30

40

50

(b) 前記抗体と前記サンプルとの結合を測定し、前記抗体と前記サンプルとの結合が前記個体に癌細胞が存在することを示すことができる工程を含む、個体の癌細胞を測定するための方法。

【請求項 4 5】

前記工程 (b) で測定された結合した抗体の量と、対照サンプルに結合した抗体の量を比較する工程を含む請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記抗体と前記生物サンプルとの結合は、E L I S A アッセイ、フローサイトメトリーアッセイ、免疫組織化学アッセイ、免疫蛍光アッセイ、循環腫瘍細胞アッセイ、および免疫金コロイドアッセイよりなる群から選ばれるアッセイで測定する請求項 4 4 または 4 5 に記載の方法。

10

【請求項 4 7】

前記生物サンプルは、血液、血清、尿、糞便、乳、精液、唾液、胸液、腹腔液、脳脊髄液、痰、及びいかなる他の体液または分泌物よりなる群から選ばれる請求項 4 4 ～ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記個体はヒトである請求項 4 4 ～ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記個体は非ヒト動物である請求項 4 4 ～ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

20

前記抗体が S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または S E Q I D N O : 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記抗体が S E Q I D N O : 2 4 の H V R - H 1 配列、S E Q I D N O : 2 5 の H V R - H 2 配列、および S E Q I D N O : 2 6 の H V R - H 3 配列を含む重鎖可変領域、並びに S E Q I D N O : 2 7 の H V R - L 1 配列、S E Q I D N O : 2 8 の H V R - L 2 配列、および S E Q I D N O : 2 9 の H V R - L 3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

30

前記抗体が S E Q I D N O : 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または S E Q I D N O : 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記抗体が S E Q I D N O : 7 の H V R - H 1 配列、S E Q I D N O : 3 0 の H V R - H 2 配列、および S E Q I D N O : 3 1 の H V R - H 3 配列を含む重鎖可変領域、並びに S E Q I D N O : 1 1 の H V R - L 1 配列、S E Q I D N O : 1 4 の H V R - L 2 配列、および S E Q I D N O : 1 5 の H V R - L 3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

40

前記抗体が S E Q I D N O : 7 の H V R - H 1 配列、S E Q I D N O : 8 の H V R - H 2 配列、および S E Q I D N O : 9 の H V R - H 3 配列を含む重鎖可変領域、並びに S E Q I D N O : 1 0 の H V R - L 1 配列、S E Q I D N O : 1 2 の H V R - L 2 配列、および S E Q I D N O : 1 5 の H V R - L 3 配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記抗体が S E Q I D N O : 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または S E Q I D N O : 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 4 4 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

50

前記抗体がSEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、およびSEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、並びにSEQ ID NO: 11のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 13のHVR-L2配列、およびSEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項44～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

前記抗体がSEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項44～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

前記抗体がSEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、およびSEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、並びにSEQ ID NO: 11のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 14のHVR-L2配列、およびSEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項44～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】

前記抗体がSEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項44～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項60】

前記癌細胞は、肺癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞、結腸癌または大腸癌細胞、食道癌細胞、胃癌細胞、子宮内膜癌細胞、子宮頸癌細胞、甲状腺癌細胞、脳癌細胞、およびリンパ腫細胞よりなる群から選ばれる請求項44～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】

請求項1～28、34のいずれか1項に記載の抗体の有効量を個体に投与する工程を含む、個体の胃腸疾患を治療または予防するための方法。

【請求項62】

前記個体は炎症性腸疾患にかかっている請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記個体はクローン病にかかっている請求項61に記載の方法。

【請求項64】

前記個体は潰瘍性結腸炎にかかっている請求項61に記載の方法。

【請求項65】

前記個体は急性感染性胃腸炎にかかっている請求項61に記載の方法。

【請求項66】

前記個体は痔にかかっている請求項61に記載の方法。

【請求項67】

前記個体はウイルスの感染によって引き起こされる胃腸疾患にかかっている請求項61に記載の方法。

【請求項68】

前記ウイルスの感染はロタウイルス感染または豚流行性下痢ウイルス感染である請求項67に記載の方法。

【請求項69】

前記個体はヒトである請求項61～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

前記個体は非ヒト動物である請求項61～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項71】

前記抗体は静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植、吸入、鞘内、心室内、または鼻腔内に投与される請求項61～70のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 2】

請求項 1～2 8、3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む薬物組成物を含む試薬キット。

【請求項 7 3】

癌を治療または予防するために有効量の前記薬物組成物を個体に投与するための取扱説明書を含む請求項 7 2 に記載の試薬キット。

【請求項 7 4】

胃腸疾患を治療または予防するために有効量の前記薬物組成物を個体に投与するための取扱説明書を含む請求項 7 2 に記載の試薬キット。

【請求項 7 5】

個体に癌細胞の存在を測定するための取扱説明書を含む請求項 7 2 に記載の試薬キット。

【請求項 7 6】

癌にかかっている個体に由来する生物サンプルの N－アセチルグルコサミンまたは N－アセチルガラクトサミンのレベルを決定するための取扱説明書を含む請求項 7 2 に記載の試薬キット。

【請求項 7 7】

(a) N－アセチルグルコサミンまたは N－アセチルガラクトサミンを含む組成物、および

(b) 前記組成物を使用して癌または炎症にかかっている個体中の自己抗体の存在を測定するための取扱説明書または他の試薬を含む試薬キット。

【請求項 7 8】

(a) N－アセチルグルコサミンまたは N－アセチルガラクトサミンと特異的に結合する植物レクチンを含む組成物、および

(b) 前記組成物を使用して癌にかかっている個体の生物サンプル中の N－アセチルグルコサミンまたは N－アセチルガラクトサミンのレベルを決定するための取扱説明書または他の試薬を含む試薬キット。

【請求項 7 9】

前記植物レクチンはコムギ胚芽凝集素 (WGA) または大豆凝集素 (SBA) である請求項 7 8 に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌細胞または炎症性細胞が発現する N－アセチルグルコサミンまたは N－アセチルガラクトサミンと特異的に結合する抗体、およびそれに関連する組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、生成方法、使用方法、並びに試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

多種多様の原因により、癌は現代医学の治療において最も困難な疾病の一つである。癌は人自体の細胞の異常な活性に由来するものであるため、患者の体内で癌性細胞と正常な細胞とを区別することは困難である。通常、体自身の免疫システムにより癌細胞を識別して除去することは困難である。また「癌」とは個体の病気の集まり、すなわち癌のタイプとサブタイプである。多くの異なる細胞のタイプは、多くの異なる機序により癌になることができ、癌細胞のタイプの中で極めて多い表現型変体を出現させる可能性がある。この多様性は、癌の治療に大きな問題をもたらしており、その理由は、異なるタイプの癌細胞はおそらく診断の異なる識別特性、またはおそらく異なる治療の弱点または抗性特性があるからである。この問題により、単一の治療プランまたは試薬を通じて複数の種類の癌を診断、治療および／または予防方法を提供することは困難になる。腫瘍学は過去十年ほどの間に急速に発展を遂げているが、依然として癌細胞を特異的に識別する新規バイオマーカーが必要とされており、特に多種の癌を特徴付け、正常組織を特徴付けないバイオマー

10

20

30

40

50

カーが必要とされている。

【0003】

細胞表面分子は癌細胞にとって非常に重要である。これらの分子が細胞間の相互作用に関与することは重要である。これは多種の癌細胞の活動、例えば細胞浸潤、転移、免疫システムからの回避、及び治療剤に対する反応にとって重要である。癌細胞は正常細胞と相違し、多くの細胞表面タンパク質を発現することが既に知られている。しかし、多くの細胞表面タンパク質は、糖類（例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）が付加することによって修飾され、この過程はタンパク質のグリコシル化と言われている。いかにして糖類を付加することで特定の細胞表面タンパク質を修飾させるか、どの糖類はどの細胞表面タンパク質で発見することができるか、および異なるタイプまたは発癌段階でグリコシル化パターンはどのように変化するかということは、研究され始めたばかりの問題である（上記で述べたようにMoremen, K. W. 等（2012）Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13（7）：448-62）を参照）。このグリコシル化の多様性は、表面のバイオマーカーによる癌細胞認識の複雑さが増加させる。従って、依然として癌を診断、治療および予防するための新規バイオマーカーと治療剤が必要とされており、特に癌特異的なグリコシル化パターンを標的とするバイオマーカーと試薬が必要とされている。

10

【0004】

本願で引用した全ての参考文献は、特許出願書類、特許公表書類およびUniProt KB/Swiss-Prot登録番号を含み、これらを引用することにより全体が本願に組み込まれ、各参考文献を引用して組み込まれることを個別かつ具体的に明示する。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

癌を診断、治療および予防するための多種のタイプの癌の新規バイオマーカーと治療剤の需要を満足するために、本願は、癌細胞または炎症性細胞が発現するN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合するモノクローナル抗体、およびそれに関連する組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、生成方法、使用方法、並びに試薬キットを提供する。更に、癌細胞の細胞表面に発現するN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合する抗体を投与することにより、個体中の癌を治療または予防する方法、およびN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合する抗体を用いて癌を診断する方法を提供する。これらの組成物と方法によれば、一部の下記の予想できない発見に基づき、多種の異なるタイプの癌の人の癌細胞は、正常な人の組織に比べて、より高レベルのN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを発現することを示す。また本発明により予想できない結果を証明、すなわち、癌細胞の細胞表面に発現するN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合する抗体が、数種類の異なるタイプの癌の成長速度（体外と体内との二つの場合）が低下することに対して強力かつ有効である。また本発明では予想できない発見、すなわち、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合する抗体を、胃腸疾患、例えば病毒感染、炎症性腸疾患および痔への有効な予防と治療に使用することができることが記載されている。

30

40

【0006】

一方、本願では、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を提供するが、当該エピトープは癌細胞または炎症性細胞によって発現されている。また、これらの抗体を含む組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、並びに生産における有用な方法を提供する。更に、個体に抗体を投与することにより、個体の癌の予防または治療に有用な方法と試薬キットを提供し、当該抗体は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合し、他の抗癌剤を任意に選択して組み合わせることができる。更に、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合

50

する抗体を個体に投与することにより個体の胃腸疾患の治療と予防に有用な方法と試薬キットを提供する。更に、個体から生物サンプルを得て、生物サンプルをN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体と接触させて、生物サンプルに結合する抗体の量を測定することにより、個体における癌細胞の存在を測定することに用いる方法と試薬キットを提供し、当該抗体結合は個体に癌細胞が存在することを示す。

【0007】

ある側面において、本発明は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する単離モノクローナル抗体を提供し、当該エピトープは癌細胞または炎症性細胞によって発現されている。特定の実施形態では、抗体はN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する。前記実施形態のいずれかを組合せることができる実施形態では、抗体は抗体断片である。特定の実施形態において、抗体はFab断片、scFv、ミニボディ、ダイアボディ、scFv多量体、または二重特異性抗体断片である。特定の実施形態において、抗体はヒト化抗体である。特定の実施形態において、抗体はヒト抗体である。特定の実施形態において、抗体はキメラ抗体である。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、エピトープが癌細胞の細胞表面に発現している。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、エピトープは癌細胞の中で発現している。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、癌細胞として、神経膠腫細胞、肝細胞癌細胞、肺癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、及び子宮頸部腺癌細胞が挙げられる。特定の実施形態において、肺癌細胞は小細胞肺癌細胞、肺扁平上皮癌細胞、または肺腺癌細胞である。特定の実施形態において、抗体とエピトープとの結合は癌細胞の成長を抑制する。特定の実施形態において、炎症細胞は結腸炎、炎症性腸症、または胃腸炎の腸炎症性細胞であり、かつエピトープが炎症細胞の細胞表面に発現している。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 24のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 25のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 26のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 27のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 28のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 29のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列含有軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 30のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 31のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、および配列SEQ ID NO: 11のHVR-L1、SEQ ID NO: 14のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、配列SEQ ID NO: 3のアミノ酸を含む重鎖可変領域、および／または配列SEQ ID NO: 4のアミノ酸を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態においては、抗体は、SEQ ID NO: 32のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 33のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 34のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 35のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 36のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 37のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 6のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 10のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 12のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 11のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 13のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 11のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 14のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。

10

20

【0008】

他の側面において、本発明は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体と薬学的に許容可能な担体を含む組成物を提供する。他の側面において、本発明は、前記実施形態のいずれかの抗体と薬学的に許容可能な担体を含む組成物を提供する。更に他の側面において、本発明は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体をコードする核酸配列を含む単離ポリヌクレオチドを提供する。更に他の側面において、本発明は、前記実施形態のいずれかの抗体をコードする核酸配列を含む単離ポリヌクレオチドを提供する。更に別の側面において、本発明は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体をコードする核酸配列を含むベクターを提供する。更に別の側面において、本発明は、上記実施形態のいずれかの抗体をコードする核酸配列を含むベクターを提供する。更にいくつかの側面において、本発明は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体をコードする核酸配列を含むベクターを含有する単離宿主細胞を提供する。更にいくつかの側面において、本発明は、上記実施形態のいずれかの抗体をコードする核酸配列を含むベクターを含有する単離宿主細胞を提供する。更にいくつかの側面において、本発明は、ベクターを含有する宿主細胞を培養し、前記ベクターはN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体をコードする核酸配列を含み、前記宿主細胞は、当該核酸がコードされる抗体を生成し、かつ細胞培養物から抗体を回収する工程を含む抗体の製造方法を提供する。更にいくつかの側面において、本発明は、ベクターを含有する宿主細胞を培養し、前記ベクターは上記実施形態のいずれかの抗体をコードする核酸配列を含み、前記宿主細胞は、当該核酸がコードされる抗体を生成し、かつ細胞培養物から抗体を回収することによって製造する抗体を提供する。更にいくつかの側面において、本発明は、ベクターを含有する宿主細胞を培養し、前記ベクターは上記実施形態のいずれかの抗体をコードする核酸配列を含み、前記宿主細胞は、当該核酸がコードされる抗体を生成し、かつ細胞

30

40

50

胞培養物から抗体を回収することによって製造される抗体を提供する。

【0009】

他の側面において、本発明は、個体の癌の予防または治療に用いる方法を提供し、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する有効量の抗体の組成物を個体に投与する工程を含む。他の側面において、本発明は、前記実施形態のいずれかの有効量の抗体の組成物を個体に投与する工程を含む、個体の癌の予防または治療に用いる方法を提供する。特定の実施形態において、癌は、脳癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、および子宮頸癌よりなる群から選ばれる。特定の実施形態において、個体はヒトである。特定の実施形態において、個体は非ヒト動物である。

【0010】

他の側面において、本発明は、個体の癌の予防または治療に用いる方法を提供し、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する所定量の抗体、及び所定量の他の抗癌剤を個体に投与する工程を含み、前記抗体と抗癌剤とを併用することにより、個体の癌への効果的な治療または予防を提供する。他の側面において、本発明は、個体の癌の予防または治療に用いる方法を提供し、前記実施形態のいずれかの所定量の抗体、及び所定量の他の抗癌剤を個体に投与する工程を含み、前記抗体と抗癌剤とを併用することにより、個体の癌への効果的な治療と予防を提供する。特定の実施形態において、治療される癌は、脳癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、結腸癌、胃癌または胃腫瘍 (stomach or gastric cancer)、食道癌、および線維肉腫よりなる群から選ばれる。特定の実施形態において、個体はヒトである。特定の実施形態において、前記個体は非ヒト動物である。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、抗癌剤は化学療法剤である。

【0011】

他の側面において、本発明は、個体の癌細胞を測定するための方法を提供し、個体に由来する生物サンプルを、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体と接触させ、抗体と生物サンプルとの結合を測定する工程を含み、前記抗体とサンプルとの結合は、個体に癌細胞が存在することを示すことができる。他の側面において、本発明は、個体の癌細胞を測定するための方法を提供し、個体に由来する生物サンプルを、前記実施形態のいずれかの得られた抗体と接触させ、抗体と生物サンプルとの結合を測定する工程を含み、前記抗体とサンプルとの結合は、個体に癌細胞が存在することを示すことができる。特定の実施形態において、前記方法は、測定された結合した抗体の量を、対照サンプルに結合した抗体の量と比較する工程を含む。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、抗体と生物サンプルとの結合は、ELISAアッセイ、フローサイトメトリーアッセイ、免疫組織化学アッセイ、免疫蛍光アッセイ、循環腫瘍細胞アッセイ、および免疫金コロイドアッセイよりなる群から選ばれるアッセイで測定する。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、生物サンプルは、血液、血清、尿、便、乳、精液、唾液、胸液、腹腔液、脳脊髄液、痰、およびいかなる他の体液または分泌物よりなる群から選ばれる。特定の実施形態において、個体はヒトである。特定の実施形態において、個体は非ヒト動物である。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 24のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 25のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 26のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 27のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 28のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 29のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 30のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 31のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ I

D NO: 11のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 14のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 10のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 12のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 11のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 13のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 7のHVR-H1配列、SEQ ID NO: 8のHVR-H2配列、SEQ ID NO: 9のHVR-H3配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 11のHVR-L1配列、SEQ ID NO: 14のHVR-L2配列、SEQ ID NO: 15のHVR-L3配列を含む軽鎖可変領域を有する。特定の実施形態において、抗体は、SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／またはSEQ ID NO: 22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、癌細胞は、肺癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞、結腸癌または大腸癌細胞、食道癌細胞、胃癌細胞、子宮内膜癌細胞、子宮頸癌細胞、甲状腺癌細胞、脳癌細胞、およびリンパ腫細胞よりなる群から選ばれる。

【0012】

他の側面において、本発明は、個体の胃腸疾患を治療または予防するための方法を提供し、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する有効量の抗体を個体に投与する工程を含む。他の側面において、本発明は、個体の胃腸疾患を治療または予防するための方法を提供し、前記実施形態のいずれかの有効量の抗体を個体に投与する工程を含む。特定の実施形態において、個体は炎症性腸疾患にかかっている。特定の実施形態において、個体はクローン病にかかっている。特定の実施形態において、個体は潰瘍性結腸炎にかかっている。特定の実施形態において、個体は急性感染性胃腸炎にかかっている。特定の実施形態において、個体は痔にかかっている。特定の実施形態において、個体はウイルスの感染によって引き起こされる胃腸疾患にかかっている。特定の実施形態において、ウイルスの感染はロタウイルス感染または豚流行性下痢ウイルス感染である。特定の実施形態において、個体はヒトである。特定の実施形態において、個体は非ヒト動物である。前記実施形態のいずれかと組合せてもよい特定の実施形態において、抗体は静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植、吸入、鞘内、心室内、または鼻腔内に投与される。

【0013】

他の側面において、本発明は、薬物組成物を含む試薬キットを提供し、当該薬物組成物はN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を含む。他の側面において、本発明は、薬物組成物を含む試薬キットを提供し、当該薬物組成物は前記実施形態のいずれかの抗体を含む。特定の側面において、当該試薬キットは、癌を治療または予防するために有効量の薬物組成物を個体に投与するための取扱説明書を含む。特定の側面において、当該試薬キットは、胃腸疾患を治療または予防するために有効量の薬物組成物を個体に投与するための取扱説明書を含む。特定の側面において、当該試薬キットは、また個体に癌細胞の存在を測定するための取扱説明書を含む。特定の側面において、当該試薬キットは、更に、癌にかかっている個体に由来す

る生物サンプルのN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンのレベルを決定するための取扱説明書を含む。

【0014】

他の側面において、本発明は、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミン含有組成物およびそれを使用して癌または炎症にかかっている個体中の自己抗体の存在を測定するための取扱説明書または他の試薬を含む試薬キットを提供する。

【0015】

他の側面において、本発明は、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンと特異的に結合する植物レクチン、およびそれを使用して癌にかかっている個体の生物サンプル中のN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンのレベルを決定するための取扱説明書または他の試薬を含む試薬キットを提供する。特定の実施形態において、前記植物レクチンはコムギ胚芽凝集素（WGA）または大豆凝集素（SBA）である。

【0016】

本発明のその他の実施形態を形成するために、本発明で述べた各種の実施形態のいずれか一つ、いくつか、または全ての性質を組み合わせてもよいことを理解しなければならない。本発明のこれら及び他の実施形態は、下記の詳しい記載により、更に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1はN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンに特異的に識別するコムギ胚芽凝集素を用いる健康なヒトの組織（A）、ヒト腫瘍に隣接する組織（B）およびヒト腫瘍組織（C）の免疫組織の化学染色を示す。各々のセットに用いるサンプルの組織を表記する。ヒトの皮膚悪性黒色腫は癌組織（「皮膚－B」）の陽性対照である。組織のパネルは米国FDAにより推奨されたものである。

【図2】図2はコムギ胚芽凝集素（WGA；A）または大豆凝集素（SBA；B）を用いるHep-G2とHEK-293株の蛍光染色を示す。

【図3】図3は、ELISA法により、N－アセチルグルコサミン、N－アセチルガラクトサミン、および種々の癌細胞株からの溶解物に結合するモノクローナル抗体をスクリーニングした結果を示す。

【図4】図4はA細胞成長のMTTアッセイを使用してモノクローナル抗体2F7H4により処理することで、種々のヒト癌細胞株の成長速度を抑制する結果を示す。アッセイ毎に使用する抗体と細胞株の用量を表記する。数値は、抗体で処理して観察した成長抑制の割合を示す。

【図5】図5は細胞成長のMTTアッセイを使用してモノクローナル抗体1C5C9により処理することで種々のヒト癌細胞株の成長速度を抑制する結果を示す。アッセイ毎に使用する抗体と細胞株の用量を表記する。数値は、抗体で処理して観察した成長抑制の割合を示す。

【図6】図6は細胞成長のMTTアッセイを使用してモノクローナル抗体3C4F12により処理することで種々のヒト癌細胞株の成長速度を抑制する結果を示す。アッセイ毎に使用する抗体と細胞株の用量を表記に示す。数値は、抗体で処理して観察した成長抑制を示す割合を示す。

【図7】図7は種々のモノクローナル抗体（濃度1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）によるMCF-7、SKOV-3とHelaヒト癌細胞株の成長速度の抑制の効果を示す（図はAに示し、表はBに示す）。数値は、抗体で処理して観察された成長抑制率を示し、且つ、マイナスの値は抗体処理に反応して成長速度率が高くなったことを示す。

【図8】図8は種々のモノクローナル抗体（濃度2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）によるSW11/b、ECAP-1090、HUTU-80、HT-1080、およびACC-2ヒト癌細胞株の成長速度の抑制の効果を示す（図はAに示し、表はBに示す）。数値は、抗体で処理して観察した成長抑制率を示す。

【図9】図9は体内腫瘍異種移植モデルを用いた抗体3C4F12の腫瘍の大きさに及ぼ

10

20

30

40

50

す影響を示す。(A)生理食塩水、コムギ胚芽凝集素(WGA)、または3C4F12を用いて処理される動物において、時間に伴った腫瘍異種移植物の大きさを示す。(B)生理食塩水、コムギ胚芽凝集素(WGA)または3C4F12を用いて処理される腫瘍異種移植物を示す。

【図10】図10はモノクローナル抗体1C5C9による各種類型の癌にかかっている患者由来の血清サンプル中の癌に関連する抗原のELISAアッセイによる測定結果を示す。表3においては、サンプルの分級システムを示す。

【図11】図11はモノクローナル抗体2F7H4による各種類型の癌にかかっている患者由来の血液サンプル中の循環癌細胞のフローサイトメトリーアッセイによる測定結果を示す。

【図12】図12はモノクローナル抗体1C5C9による各種類型の癌にかかっている患者由来の血液サンプル中の循環癌細胞のフローサイトメトリーアッセイによる測定結果を示す。

【図13】図13はモノクローナル抗体1B3E12による各種類型の癌にかかっている患者由来の血液サンプル中の循環癌細胞のフローサイトメトリーアッセイによる測定結果を示す。

【図14】図14は健康なマウスの腸(A)と比較して、モノクローナル抗体1C5C9を使用してロタウイルス感染を誘導した炎症マウスの腸組織切片(B)に対する染色の免疫蛍光染色による測定結果を示す。

【図15】図15はMAb-1C5C9またはエンロフロキサシンを用いて治療する時にブタ流行性下痢ウイルス(PEDV)に暴露した仔豚の死亡率(百分率で表す)を、未治療の対照群と比較した結果を示す。MAb-1C5C9での治療に比べて死亡率の統計的有意性が観察された。

【図16】図16はELISAで測定したヒト化抗体1C5C9とN-アセチルグルコサミン(NAG)との結合の結果を示す。測定された抗体は、キメラ1C5C9(「XHC+XLC」)、ヒト化1C5-VK1(「VH5+VK1」)、ヒト化1C5-VK2(「VH5+VK2」)、ヒト化1C5-VK3、ヒト化1C5-VK4(「VH5+VK4」)、及びヒト化1C5-VK5(「VH5+VK5」)を含む。

【図17】図17はヒト化抗体1C5-VK2がTNBSによって誘発されたIBDモデルマウスの腸形態に対する作用を示し、7日目に行った巨視的評価判断の結果を示す。治療群は、G1:未治療(n=4);G2:5µg 1C5-VK2/動物、腹腔内(IP)(n=6);G3:5µg 1C5-VK2/動物、経口(PO)(n=6);及びG4:2µg 1C5-VK2/動物、腹腔内(IP)(n=6)を含む。*はt検定でのP<0.05と示される(治療群G2と未治療群G1、及び治療群G2と治療群G4の間で比較する)。

【図18A】図18Aは、TNBS誘発のIBDモデルの7日目で得られた代表的な全体図を示す。IBDモデルの誘発から48時間後にヒト化抗体1C5-VK2を投与した。治療群は上述の図17で説明している通りである。図示しているように、治療前の結腸の状態は、誘発から48時間後にIBDモデルより分離したサンプルを撮った画像に示されている。

【図18B】図18BはIBDモデルの7日目で得られた代表的な全体図を示す。誘発から48時間後にIBDモデルにヒト化抗体1C5-VK1を投与して治療した。治療群はG1:未治療;及びG5:5µg 1C5-VK1/動物、腹腔内(IP)を含む。図示しているように、治療前の結腸の状態は、IBDモデルの誘発から48時間後に分離したサンプルを撮った画像に示されている。

【図19A】図19AはIBDモデルの7日目で得られた組織学的図を示す。IBDモデルの誘発から48時間後にヒト化抗体1C5-VK2を投与して治療した。治療群は上述の図17について記載している通りである。矢印は腸上皮再生を示す。図示するように、治療前の結腸の状態としては、IBDモデルの誘発から48時間後に分離したサンプルを撮った画像に示されている。

10

20

30

40

50

【図 19 B】図 19 B は I B D モデルの 7 日目 で得られた組織学的な図を示す。I B D モデルの誘発から 48 時間後にヒト化抗体 1 C 5 - V K 1 を投与して治療した。全てのサンプルは、治療群 G 5 : 5 μ g 1 C 5 - V K 1 / 動物、腹腔内 (I P) 由来のものである。矢印は腸上皮再生を示す。

【図 20】図 20 は対照群マウスと比較して、ヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 で治療したマウスの結腸切片の免疫組織化学的 (I H C) 染色結果を示す。一週齢の I B D モデルのマウスから組織を得て、抗ヒト I g G - H R P で染色した。矢印は結腸炎症部位で抗体 1 C 5 - V K 2 の測定を示す。

【図 21】図 21 はマウスにおけるヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 の急性毒性試験の結果 (体重 / 時間) を示す。治療群は G 1 : 1 . 0 m g / k g , 静脈内 (I V) ; G 2 : 1 . 0 m g / k g , 経口 (P O) ; G 3 : 5 . 0 m g / k g , 静脈内 (I V) ; 及び G 4 : 5 . 0 m g / k g , 腹腔内 (I P) を含む。全ての群において、6 匹の動物のサンプルサイズを用いた。

【図 22】図 22 は E L I S A で測定した静脈内治療したマウスにおけるヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 の血清レベルを示す。y 軸は測定した抗体のレベル (O D _{450nm}) を示す。x 軸は治療後のサンプルを収集する時間を示す (時間単位であり、「2 W」のみ 2 週間を示す) 。治療群とサンプルサイズは上述の図 21 で説明している通りである。

【図 23】図 23 は E L I S A で測定した経口治療したマウスにおけるヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 の血清レベルを示す。x 軸は治療後のサンプルを収集する時間を示す (時間単位) 。治療群とサンプルサイズは上述の図 21 で説明している通りである。

【図 24】図 24 は、T N B S 誘発による炎症性腸疾患 (I B D) モデルにおけるヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 の経時的なラットの体重に対する影響を示す。治療群は G 1 : 未治療 (n = 5) ; G 2 : 1 2 5 μ g / k g のヒト I g G , 腹腔内 (I P) (n = 5) ; G 4 : 1 2 5 μ g / k g の 1 C 5 - V K 2 , 腹腔内 (I P) (n = 5) ; G 5 : 1 2 2 μ g / k g の 1 C 5 - V K 2 , 皮下 (S C) (n = 6) ; 及び G 6 : 2 5 0 μ g / k g の 1 C 5 - V K 2 , 強制経口投与 (P O) (n = 6) を含む。

【図 25】図 25 は、I B D モデルの 8 日目 で得られた代表的な全体図を示す。I B D モデルの誘発から 48 時間後にヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 を投与して治療した。治療群は上述の図 24 で説明している通りである。

【図 26】図 26 は、ラット I B D モデルの 8 日目における結腸の巨視的評価のスコアを示す。I B D モデルの誘発から 48 時間後にヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 を投与して治療した。治療群は上述の図 24 で説明している通りである。* は治療群と未治療の対照群 (G 1) との t 検定での比較において P < 0 . 0 5 を示している。

【図 27】図 27 は、I B D モデルの 8 日目でのラット結腸重量を示している。I B D モデルの誘発から 48 時間後にヒト化抗体 1 C 5 - V K 2 を投与して治療した。治療群は上述の図 24 で説明している通りである。* は治療群と、未治療の対照群 (G 1) との t 検定での比較において P < 0 . 0 5 を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明者は、多くのヒト癌および癌細胞株において N - アセチルグルコサミンまたは N - アセチルガラクトサミンが優先的に発現するが、ヒト正常組織において、ほとんど又は全く発現しないことを明らかにした。更に、本発明者は N - アセチルグルコサミンまたは N - アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体を製造した。本明細書に記載の結果より、これらの抗体が各種ヒト癌細胞に結合し、当該癌細胞の成長を阻害することを証明した。本明細書に記載の結果により、更に、これらの抗体を種々の胃腸疾患の予防又は治療に使用することができることを証明した。また、本明細書に記載の結果より、更に、これらの抗体を、様々な癌に特異的に発現し且つ血液と他の体液や分泌液に放出される糖類に関連するバイオマーカーの測定に用いることができることを示している。

【0019】

I . 一般的な技術

当業者は、例えば、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel等eds., (2003)); Harlow and Lane eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney ed. (1987)); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean eds., Oxford University Press, 2000); および Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita等eds., J. B. Lippincott Company, 1993) 等に記載されている広く用いられている方法等の従来技術を用いることにより、本明細書に記載または参照される技術を良く理解し、採用できる。

10

【0020】

II. 定義

本発明をより詳細に説明する前に、本発明は特定の組成物または生物学的システムに限らず、それらはもちろん変更できることを理解するべきである。また、本明細書で用いられる用語は、具体的な実施形態について説明することを目的とするだけのものであり、限定の意図がないことを理解するべきである。

20

【0021】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形の「一 (a)」、「一つ (an)」および「当該 (the)」は複数の対象を含み、文の前後に別に明示されている場合はこの限りではない。よって、例えば前述した「分子」は自由に選択して2つ以上のそのような分子の組み合わせ等を含む。

【0022】

本明細書で使用される用語「約」とは、当業者が容易に知られているそれぞれの値について通常の誤差の範囲を示す。本明細書で「約」値、またはパラメータ値が示すことは、この値またはパラメータ自体に対する実施方式を含む（および説明する）。

30

【0023】

本明細書に記載の側面と実施方式は、側面と実施方式「を含む」、「からなる」および「基本的に、からなる」を含むことを理解するべきである。

【0024】

用語「炎症」とは、生体組織が有害な刺激、例えば病原体、損傷した細胞または刺激物に対する複雑な生物反応である。急性炎症の古典的な徴候は、痛み、熱、赤み、腫れ、および機能の喪失を含むがこれに限定されない。炎症は一般的な反応であるので、それは自然免疫のメカニズムであると考えられる。炎症は急性炎症と慢性炎症に分けることができる。急性炎症とは、有害刺激に対する生体の初期反応であることを示し、しかもプラズマと白血球（特に顆粒球）が、血液から損傷した組織へ加速運動することによって引き起こされる。一連の生化学的なプロセスを経て、炎症反応を伝播させて成熟するが、傷ついた組織には局所血管系、免疫システム、および種々の細胞が含まれる。長期の炎症は慢性炎症と呼ばれ、炎症部位に存在する細胞種が進行性の変化を引き起こし、且つ炎症プロセスに由来する組織が同時に破壊と治癒がなされることを特徴とする。

40

【0025】

用語「炎症細胞」とは、通常、血液中に存在し、かつ溢出を通じて炎症組織へ進んで炎症を起こす組織に役立つ白血球（例えば、好中球、マクロファージ、単球、好酸球および好塩基球）を示す。いくつかは食細胞として作用し、細菌、ウイルスと細胞破砕片を貪食する。その他は病原性侵入物を損傷し酵素粒子を放出する。白血球は炎症反応を進展およ

50

び維持する炎症性メディエーターを放出する。一般的には、急性炎症の顆粒球を介するのに対して、慢性炎症は単球とリンパ球等の単核細胞を介する。

【0026】

用語「炎症性腸疾患（IBD）」とは、消化管の全てまたは一部の慢性炎症を特徴とする病理的状态を示す。IBDは、主に潰瘍性大腸炎、クローン病を含む。両方とも通常、重度の下痢、痛み、疲労、体重減少等の症状があらわれる。潰瘍性大腸炎は大腸（結腸）と直腸に長期的な炎症や瘡（潰瘍）を引き起こすIBDの形態である。クローン病は消化管の炎症を引き起こすIBDの形態である。クローン病では、炎症がしばしば影響を受けている組織に深く広がっている。炎症は、例えば大腸、小腸または両方等の消化管の異なる領域が含まれる。膠原性大腸炎とリンパ球性大腸炎も、炎症性腸疾患と考えられるが、通常、古典的な炎症性腸疾患とは異なると考えられている。

10

【0027】

用語「癌」と「癌細胞」とは、無秩序状態の細胞成長を特徴とする動物の生理的状态を示すか又は説明する。癌の例としては、肺癌（小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌細胞を含む）、肝細胞癌、脳癌（悪性乏突起膠腫、膠芽細胞腫や神経膠腫を含む）、胃腸癌（食道癌、胃腫瘍（stomach or gastric cancer）、腸癌、結腸癌、及び大腸癌を含む）、腎明細胞癌、皮膚基底細胞癌、皮膚鱗状細胞癌、喉癌、ホジキンリンパ腫、甲状腺髄様癌、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、尿路癌、乳癌、子宮内膜や子宮癌、唾液腺癌、前立腺癌、メラノーマ、多発性骨髄腫やB細胞リンパ腫、白血病、およびそれらに関連する転移腫瘍が挙げられるが、これらに限定されるものではない。幾つかの実施形態において、癌の種類は脳癌、肝癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、及び子宮頸癌から選択される。幾つかの実施形態において、癌細胞は神経膠腫細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、および子宮頸部腺癌細胞から選択される。

20

【0028】

用語「免疫グロブリン」（Ig）は本明細書中の「抗体」とほとんど同じ意味で使われる。本明細書中の用語「抗体」はもっとも広い意味で使用され、所望の生物活性を示す限り、更に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2種の無傷の抗体から形成される多特異的抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片（例えばfabフラグメント、scfv、ミニボディ、ダイアボディ、scfv多量体、または二重特異性抗体断片）を具体的に含有する。

30

【0029】

本明細書で使用される用語「と特異的に結合する」または「に対して特異的な」とは、測定可能かつ再現できる相互作用を示し、例えば、標的と抗体間の結合、それは生体分子を含む分子の異種集団の存在下で標的の存在を決定するものである。例えば、標的（エピトープであってもよい）と特異的に結合する抗体は、他の標的との結合に比べて、より大きい親和性、アビディティ、より容易におよび／またはより長い持続時間で当該標的に結合する抗体である。特定の実施形態において、標的と特異的に結合する抗体の解離定数（kd）は $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ または $\leq 0.1 \text{ nM}$ である。もう一つの実施形態において、特異的結合は、排他的な結合を含んでもよいが含むことは必須ではない。

40

【0030】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを示す。重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「V_H」と「V_L」と呼ぶことができる。これらのドメインは一般的には、抗体の最も可変な部分（同じクラスの他の抗体に対する）であり、そして抗原結合部位を含んでいる。

【0031】

用語「可変」は、抗体間で、可変ドメインの特定のセグメントが、配列において広い範囲で異なるという事実を示す。Vドメインは、抗原結合を仲介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を決定する。しかし、可変性は可変ドメインの全体で均一に分布していない。逆にそれは軽鎖と重鎖の可変ドメイン（抗体またはその抗原結合断片に計6つ

50

のHVRがある)における「超可変領域(HVR)」と呼ばれる3つのセグメントに集中している。本明細書で使用されているように「超可変領域(HVR)」は特異抗原結合を抗体に与える高度に可変な配列を含んでいる。可変領域のより高度な保守部分はフレームワーク領域と呼ばれる(FR)。各鎖におけるHVRはFR領域に近接して一緒に保持され、他の鎖に由来するHVRで、抗体の抗原結合部位の形成に役立つ(Kabat等, Sequences of Immunological Interest, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991) 参照)。定常ドメインは抗原と抗体との結合に直接関与しないが、様々なエフェクター機能を発揮し、例えば、抗体依存性の細胞毒性に関与する。

【0032】

多くのHVRについての記載は、本発明に用いられ、且つ含まれる。Kabatの相補性決定領域(CDR)は、配列多様性に基づき、最も一般的に使用されているものである(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。そしてChchothiaは構造環の位置を示す(ChothiaとLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVRは、KabatのHVRとChothiaの構造環の間での折衷(compromise)を示し、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアにより用いられる。「接触」HVRは獲得可能な複合体の結晶構造解析に基づいている。これらの各HVRの残基を以下に示す。

環	カバット	AbM	コチア	接触
L 1	L 24-L 34	L 24-L 34	L 26-L 32	L 30-L 36
L 2	L 50-L 56	L 50-L 56	L 50-L 52	L 46-L 55
L 3	L 89-L 97	L 89-L 97	L 91-L 96	L 89-L 96
H 1	H 31-H 35 B	H 26-H 35 B	H 26-H 32	H 30-H 35 B (カバット番号)
H 1	H 31-H 35	H 26-H 35	H 26-H 32	H 30-H 35 (コチア番号)
H 2	H 50-H 65	H 50-H 58	H 53-H 55	H 47-H 58
H 3	H 95-H 102	H 95-H 102	H 96-H 101	H 93-H 101

【0033】

HVRは次のような「拡張HVR」：VL中の24-36または24-34(L1)、46-56または50-56(L2)、および89-97または89-96(L3)、並びにVH中の26-35(H1)、50-65または49-65(H2)、および93-102、94-102または95-102(H3)を含むことができる。これらの定義における各HVRについて、Kabat等により上記の可変領域の残基に対して番号付けする。

【0034】

本明細書に記載の用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一の抗体集団の中から獲得する抗体を示し、即ち前記抗体は、少量存在することが可能な自然に発生する突然変異及び／又は翻訳後修飾(例えば異性化、アミド化)を除いて同一の集団を含む単独の抗体である。モノクローナル抗体は単一の抗原部位に高く特異的な反応をする。典型的には異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体とは逆に、各モノクローナル抗体は単一の抗原決定基に反応する。

【0035】

修飾語の「モノクローナル」は、ほぼ同種の抗体集団から獲得する抗体の特徴を示し、いかなる特定の方法によって、抗体を製造する必要があると解釈すべきではない。例えば、本発明に用いるモノクローナル抗体は、多種の技術によって生成することができ、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、KohlerとMilstein, Nature, 25

10

20

30

40

50

6:495-97 (1975))、組換えDNA法 (例えば米国特許第4,816,567号参照)、ファージディスプレイ技術 (例えばClackson等, Nature, 352:624-628 (1991)参照)、および動物中でヒトまたはヒト化の抗体を産生することに用いる技術であって前記ヒトまたはヒト化の抗体はヒト免疫グロブリン遺伝子座またはヒト免疫グロブリンをコードする配列の一部または全部を有するものが挙げられる (例えばJakobovits等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Lonberg等, Nature 368:856-859 (1994)参照)。

【0036】

「抗体断片」は完全な抗体の一部を含んでいるものであり、好ましくは完全な抗体の抗原結合および／または可変領域である。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂とFv断片；ミニボディ；ダイアボディ；scFv；scFv多量体；線形抗体 (linear antibody)；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された二重特異性または多特異的抗体を含む。

【0037】

「一本鎖Fv」(「sFv」または「scFv」とも略される)は、単一ポリペプチド鎖に連結されるVHおよびVL抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、更にscFvポリペプチドはVHとVLとのドメインの間にあるポリペプチドのリンカーを含み、当該リンカーは抗原結合のための所望の構造を形成することができる。scFvの概要に関して、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113巻, RosenbergとMoore eds, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁 (1994)を参照すればよい。

【0038】

用語「ダイアボディ」は、Vドメインの鎖内のペアリングではなく、V_HとV_Lドメインの鎖間でのペアリングによる短いリンカー (約5~10残基)を有するscFv断片 (前記段落を参照)を構成することにより製造される小さい抗体断片を意味する。それにより2つの断片、即ち、2つの抗原結合サイトを有する断片が生じる。ダイアボディについては更に詳しく説明する。例えばEP404,097; WO93/11161; Hollinger等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993))を参照すればよい。

【0039】

具体的には、本明細書におけるモノクローナル抗体は、所望の生物活性を示す限り、「キメラ」抗体 (免疫グロブリン) 及びこれらの抗体の断片を含み、重鎖および／または軽鎖の一部は、特定の種に由来し、または特定の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体に対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残り部分は、もう一つの種に由来し、または別の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体に対応する配列と同一または相同である (米国特許第4,816,567号、Morrisson等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984))。

【0040】

ヒト以外 (例えばネズミ科の動物) の抗体の「ヒト化」の形態は、ヒト以外の免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。1つの実施形態において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) であり、レシピエントからのHVRの残基は、所望の特異性、親和性および／または能力を持つ、ヒト以外 (ドナー抗体) の種 (例えばマウス、大きいネズミ、ウサギまたはヒト以外の霊長類動物) のHVRの残基に置き換えられたものである。詳しい内容については、Jones等, Nature 321:522-525 (1986)を参照すればよい。

【0041】

「ヒト抗体」は、ヒト由来の抗体および／または本書に開示のヒト抗体作製のいかなる技術によっても製造される抗体に対応するアミノ酸配列を有する。ヒト抗体は、本分野に

10

20

30

40

50

において既に良く知られた多種の技術を使用することにより産生することができる。例えば、Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77頁(1985); Boerner等, J. Immunol., 147(1): 86-95(1991)に記載の方法が挙げられる。

【0042】

「単離」抗体は、その生産環境のコンポーネント（例えば、自然または組換え）から識別、分離および／または回収される抗体である。好ましくは、単離されたポリペプチドは一般的には、抗体の使用を干渉する混入成分（例えば酵素、ホルモン、および他の蛋白質性または非蛋白質性の溶質）が含まれていない。

10

【0043】

本明細書における用語「治療」とは、臨床病理学過程に治療する個体または細胞の自然過程を変更するために設計された臨床介入を示す。治療の所望の効果は、病気の進行速度を遅らせ、病気の状態を改善または緩解し、予後の緩解や改良をすることを含む。例えば、癌に伴う一つ以上の症状を軽減または除去をするならば、個体への治療は成功である。

【0044】

本明細書における用語「予防」は、個体の中での疾患の発生や再発の予防を含む。個体は特定の種類の癌にかかりやすいか、特定の種類の癌の影響を受けやすいか、または特定の種類の癌の発症リスクが存在しているが、まだ当該疾患にかかったと診断されていないものである。

20

【0045】

「有効量」とは、必要な薬剤投与量と期間内での所望の治療または予防の結果を効果的に達成するための最小量を示す。有効量は、一回または数回に分けて投与することができる。

【0046】

「治療有効量」は、少なくとも測定できる特定の疾患（例えば、癌）の改善効果に必要なとされる最小濃度である。本文における治療有効量は、例えば患者の病態、年齢、性別、体重、およびモノクローナル抗体が個体において所望の反応を誘発する能力等の要因に応じて変化する。治療有効量は、モノクローナル抗体の治療上の有益な効果が、いかなる毒性や有害作用をも上回ったときの量である。「予防有効量」とは、必要な薬剤投与量と期間内で所望の予防的な結果を効果的に達成するための量を示す。しかし、疾患の初期段階の前と疾患の初期段階では被験者に対して、通常必要ではない予防的投与量を使用しているので、予防有効量は治療有効量より少なくてもよい。

30

【0047】

本明細書における、もう一つの化合物または組成物との「併用」投与は、同時投薬及び／または異なる時間での投薬を含む。併用投与は、合剤投薬または単独組成物投薬を含み、異なる投与頻度や間隔で投薬することを含み、かつ同じ投与経路または異なる投与経路を用いる。

【0048】

治療または予防を目的とする「個体」は、哺乳類として分類されたいかなる動物をも含み、例えばヒト、家畜や農場の動物、および動物園動物、スポーツ動物またはペット動物（例えば犬、馬、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、スナネズミ、マウス、フェレット、ラット、猫等を含む。幾つかの実施形態では、前記個体はヒトである。幾つかの実施形態では、前記個体は非ヒト動物である。

40

【0049】

本明細書における「担体」は、採用した投薬量及び使用濃度にさらされている細胞または哺乳類には無毒である。薬学的に許容可能な担体、賦形剤または安定剤を含む。通常、生理学的に許容可能なベクターはpH緩衝水溶液である。生理学的に許容可能な担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸等のバッファ；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；グリ

50

シン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む炭水化物；および／またはT W E E NTM、ポリエチレングリコール（P E G）とP L U R O N I C STM等の非イオン界面活性剤を含む。

【0050】

「薬学的に許容可能な」バッファと塩は、上記の酸と塩基両者からの酸と塩基付加塩由来のものを含む。特定のバッファおよび／または塩はヒスチジン、コハク酸塩と酢酸塩を含む。

【0051】

本明細書で、ほとんど同じ意味で使われる「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、任意の長さのヌクレオチドの重合体を示し、且つ、DNAとRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、または塩基、および／またはそれらの類似物、または、DNAやRNAポリメラーゼまたは合成反応によってポリマーに取り込まれる任意の基質であってもよい。

【0052】

本発明の抗体をコードする「単離」ポリヌクレオチドは、少なくとも一つの混入核酸分子から識別や分離をした核酸分子であり、この核酸分子は通常、その発生する環境において混入核酸分子と結合する。本発明のポリペプチドと抗体をコードする単離核酸分子はその自然に発見された形態またはセッティング以外の形態で存在している。好ましくは、単離核酸はその生産環境に関する全ての成分に結合しないものである。

【0053】

本発明に使用される「ベクター」は、それがリンクされている他の核酸の核酸分子を輸送できることを意味している。ベクターの種類はプラスミド（即ち、別のDNAセグメントを連結できる環状二本鎖DNA）とウイルスベクターを含む。特定のベクターは、導入された宿主細胞において自律して複製できる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターとエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクターは、宿主細胞のゲノムに統合されて、宿主ゲノムに伴って複製することができる。また特定のベクターは、作動可能にリンクされている遺伝子の発現を導くことができる。本発明では、このようなベクトルを「組換え発現ベクター」と呼ぶか、または「発現ベクター」と省略する。プラスミドは最も常用されているベクター形態であるため、本明細書では「プラスチド」と「ベクター」は、ほぼ同じ意味で使用される。

【0054】

I I I . 糖類

本発明の特定の側面では、糖類を含有するエピトープに関連している。本明細書における「糖類」は、単糖、オリゴ糖や多糖類を示してもよい。単糖類は、フルクトース、グルコース、マンノース、フコース、キシロース、ガラクトース、ラクトース、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、及びシアル酸を含むがそれに限定されない。オリゴ糖は、成分糖のグリコシド結合で連結された複数の糖モノマーを含む糖類の重合体である。

【0055】

糖タンパク質やプロテオ糖（p r o t e o s a c c h a r i d e）とは、糖類に結合する蛋白質を示すが、通常、例えばタンパク質中のアミノ酸側鎖や脂質部分への互換性の単糖類のO-またはN-グリコシド結合を含んでもよい。本明細書における用語「グリカン」と「グリコシル部分」はほぼ同じ意味で使用され、単独の糖類または糖タンパク質の糖類成分としての糖を示す。アスパラギン側鎖のアミド窒素のN-グリコシル化と、セリンおよびトレオニン側鎖のヒドロキシ酸素のO-グリコシル化というグリコシル化の2つのタイプは本分野において既に知られる。他の糖類は、O-G l c N A c、G A G 鎖、グリコサミノサッカライド、およびスフィンゴ糖脂質を含むがそれに限定されない。真核生物においてO-とN-結合型糖類は非常によく存在し、原核生物において見つけることができるが、あまり好ましくない。

【0056】

本発明の特定の側面では、N－アセチルグルコサミン及びN－アセチルガラクトサミンに関する。N－アセチルグルコサミンとは、N－グルコサミン残基を含むいかなるアミノ糖化合物を示してもよい。本明細書におけるN－アセチルグルコサミンとは、単糖類自体、または比較的大きい多糖の構成要素とする単糖類を示してもよい。本明細書におけるN－アセチルグルコサミンは、糖類物自体、または糖タンパク質や一つ以上のN－アセチルグルコサミン成分にグリコシル化のタンパク質（例えば、N－アセチルグルコサミンを含む単糖または多糖）をグリカンの成分とする糖類を示してもよい。

【0057】

N－アセチルガラクトサミンとは、酢酸部分とN－結合されるグルコサミンを含む任意の化合物を示してもよい。N－アセチルガラクトサミンとは、N－結合されるガラクトサミン部分を含む任意のアミノ糖化合物を示してもよい。本明細書におけるN－アセチルガラクトサミンとは、単糖類自体、または比較的大きい多糖の構成要素とする単糖類を示してもよい。本明細書におけるN－アセチルガラクトサミンとは、糖類物自体、または糖タンパク質や一つ以上のN－アセチルガラクトサミン部分を有するグリコシル化のタンパク質（例えば、N－アセチルガラクトサミンを含む単糖または多糖）をグリカンの成分とする糖類を示してもよい。

【0058】

多くのタンパク質がグリコシル化されていることは知られているが、糖タンパク質は、しばしば細胞外表面（即ち、細胞外）で発見され、または分泌されている。そのため、糖タンパク質は外部の試薬（例えば、患者へ投与の外因性化合物）に非常に接近しやすい。例えば、特定の糖タンパク質成分を特異的に認識する成分（例えば、抗体やレクチン）は、無傷の生物において、細胞表面上のこれらの糖タンパク質を発現する細胞に結合することができる。特定の糖タンパク質成分を特異的に認識する成分は、分泌される糖類や糖タンパク質、例えば特定の組織サンプル（血液または血清を含むが、それに限定されない）中に見出され、遊離の糖または糖タンパク質に結合することができる。

【0059】

本分野において、レクチンは高い特異性で同族の糖部分を認識できる糖結合タンパク質として知られている。これらの非常に特異的な結合相互作用は、例えば、組織に特定の糖の測定（例えば、特定の糖部分でグリコシル化による修飾の細胞表面タンパク質の測定に用いる）に用いてもよい。レクチンは、例えば動物レクチン、植物レクチン、および病原体のレクチンを含んでもよい。哺乳類等の動物では、例えば、排他的に病原体上に見出され、または宿主細胞上の見えにくい炭水化物を認識することにより、レクチンが免疫システムにおいて重要な役割を果たすことは知られている。

【0060】

本発明の特定の側面において、植物レクチンを用いて特定の糖鎖の存在または発現を検出する。例えば、植物レクチンはフルクトース、マンノース、グルコース、フコース、ガラクトース、N－アセチルガラクトサミン、及びN－アセチルグルコサミンに対する特異的なレクチンを含むがそれに限定されない。

【0061】

IV. 抗体

エピトープとの結合

本発明の特定の側面では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体に関する。上述したように、このような抗体は測定可能かつ再現できる相互作用を示し、例えば、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープに結合される。例えば、他の標的に比べてエピトープと特異的に結合する抗体は、より大きな親和性、アビディティ、より容易におよび／またはより長い持続時間でこのエピトープに結合する抗体である。N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープの例は、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミン含有糖タンパク質を含み、例えば、癌細胞の表面に発現しているN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミン部分を

有する細胞表面の糖タンパク質に制限されない。

【0062】

特異的結合は、排他的な結合を含んでもよいが、必須ではない。N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体であるが、それらの抗体はこれらの部分を含んでいない他のエピトープに結合することが発見され、例えば、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと比較してより小さい結合親和性を有していても良い。

【0063】

幾つかの実施形態では、抗体はN－アセチルグルコサミンとN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する。例えば抗体は、N－アセチルグルコサミンを含むエピトープ、及びN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合してもよい。幾つかの実施形態では、抗体は、同時にN－アセチルグルコサミンとN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合してもよい。

【0064】

幾つかの実施形態では、抗体は癌細胞の細胞表面に発現しているN－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープとの結合によって、癌細胞の成長を阻害する。本明細書における細胞成長の阻害とは、その増殖率の抑制を示してもよい。理論に束縛されることを希望せずに、抗体は、細胞表面に結合して様々なメカニズムによって細胞の成長を阻害することができる。例えば、細胞表面に結合する抗体は、細胞に対して毒性があり、または他の方法によって細胞死を引き起こす可能性があるが、例えばアポトーシスや壊死に限定されない。細胞表面に結合する抗体は、細胞増殖を遅くするか、または阻止することができる。細胞表面上の細胞表面糖タンパク質と結合する抗体は、例えば細胞シグナル伝達の機能等の糖タンパクの機能を抑制するか、または強化することができるが、抗体の結合により細胞成長を阻害することができる。細胞表面と結合する抗体は外因性配位子と競合することができ、前記外因性配位子、例えば成長因子は、細胞表面への結合によって細胞成長を促進する。このような競合は間接的なものであり、すなわち抗体は外因性配位子と同様の糖タンパク質上のエピトープに競合的に結合する必要がない。細胞表面に結合する抗体は、免疫システムの一つ以上の成分を引きつけることができ、例えば、ナチュラルキラーやNK細胞は、抗体が結合した細胞成長を阻害する。異なる抗体が細胞表面上のエピトープに結合することによって細胞成長を阻害するメカニズムは、細胞コンテキストまたは特異的な抗体またはエピトープによって異なる。

【0065】

抗体の特徴

本発明において、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する特定の抗体が記載され、特徴的である。幾つかの実施形態では、抗体は2F7H4である。幾つかの実施形態では、抗体は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む軽鎖可変領域を有する。幾つかの実施形態では、重鎖可変領域は、FTFSDFYME配列（SEQ ID NO: 24）を含むHVR1、ASRNKANDYTTEYSASVKG配列（SEQ ID NO: 25）を含むHVR2、DAWFA配列（SEQ ID NO: 26）を含むHVR3を含有する。幾つかの実施形態では、軽鎖可変領域は、KSSQSLLYSSNQKNYLA配列（SEQ ID NO: 27）を含むHVR1、WASTRES配列（SEQ ID NO: 28）を含むHVR2、QQYYSYPR配列（SEQ ID NO: 29）を含むHVR3を含有する。

【0066】

幾つかの実施形態では、抗体は1C5C9である。幾つかの実施形態では、抗体は、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む軽鎖可変領域を有する。幾つかの実施形態では、重鎖可変領域は、YTFPDYNIH配列（SEQ ID NO

： 7）を含むHVR1、CIYPYNGNTAYNQKFKT配列（SEQ ID NO：30）を含むHVR2、SDLYYFGSRGFV配列（SEQ ID NO：31）を含むHVR3を含有する。幾つかの実施形態では、軽鎖可変領域は、RASQDISTYLN配列（SEQ ID NO：11）を含むHVR1、FTSRLHS配列（SEQ ID NO：14）を含むHVR2、QQGNTLPW配列（SEQ ID NO：15）を含むHVR3を含有する。

【0067】

幾つかの実施形態では、抗体は1C5C9抗体のヒト化形式である。幾つかの実施形態では、抗体はヒト化の1C5-VK1である。幾つかの実施形態では、抗体は、YTFPDYNIH（SEQ ID NO：7）のHVR-H1配列、CIYPYNGNTA（SEQ ID NO：8）のHVR-H2配列、及びSDLYYFGSRGFD（SEQ ID NO：9）のHVR-H3配列を有する重鎖可変領域を含む。幾つかの実施形態では、抗体は、QASQDISTYLN（SEQ ID NO：10）のHVR-L1配列、FTSNLET（SEQ ID NO：12）のHVR-L2配列、及びQQGNTLPW（SEQ ID NO：15）のHVR-L3配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0068】

幾つかの実施形態では、抗体は、下記のアミノ酸配列含有重鎖可変領域、
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPDYNIHWVRQA
PGQGLEWMGC IYPYNGNTAYA QKFQGRVTMTTRDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCARSDLYYFGSRGFDYWGQGTLVTV
SSA（SEQ ID NO：16）、および／または下記のアミノ酸配列含有軽鎖可変領域を含む。

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSNLETGVPSTRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGTKLE（SEQ ID NO：18）。

【0069】

幾つかの実施形態では、抗体は、下記のアミノ酸配列含有重鎖、
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPDYNIHWVRQA
PGQGLEWMGC IYPYNGNTAYA QKFQGRVTMTTRDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCARSDLYYFGSRGFDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDS DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：17）、および／または下記のアミノ酸配列含有軽鎖を含む。

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSNLETGVPSTRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGTKLER TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO：19）。

【0070】

幾つかの実施形態では、抗体はヒト化の1C5-VK2である。幾つかの実施形態では、抗体は、YTFPDYNIH（SEQ ID NO：7）のHVR-H1配列、CIYPYNGNTA（SEQ ID NO：8）のHVR-H2配列、及びSDLYYFGS

R G F D (S E Q I D N O : 9) の H V R - H 3 配列を有する重鎖可変領域を含む。
幾つかの実施形態では、抗体は、R A S Q D I S T Y L N (S E Q I D N O : 1 1)
の H V R - L 1 配列、F T S S L Q S (S E Q I D N O : 1 3) の H V R - L 2 配列
、及び Q Q G N T L P W (S E Q I D N O : 1 5) の H V R - L 3 配列を有する軽鎖
可変領域を含む。

【 0 0 7 1 】

幾つかの実施形態では、抗体は、下記のアミノ酸配列含有重鎖可変領域、

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F P D Y N I H W V R Q A
P G Q G L E W M G C I Y P Y N G N T A Y A Q K F Q G R V T M T R D T S I S T A Y
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S D L Y Y F G S R G F D Y W G Q G T L V T V
S S A (S E Q I D N O : 1 6) 、および／または下記のアミノ酸配列含有軽鎖

10

可変領域を含む。
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S T Y L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y F T S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D I A T Y Y C Q Q G N T L P W T F G G G T K L E (S E Q I D N O : 2 0
) 。

【 0 0 7 2 】

幾つかの実施形態では、抗体は、下記のアミノ酸配列含有重鎖、

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F P D Y N I H W V R Q A
P G Q G L E W M G C I Y P Y N G N T A Y A Q K F Q G R V T M T R D T S I S T A Y
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S D L Y Y F G S R G F D Y W G Q G T L V T V
S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T
V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T
Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L
G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N
G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H
Y T Q K S L S L S P G K (S E Q I D N O : 1 7) 、および／または下記のア

20

30

ミノ酸配列含有軽鎖を含む。
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S T Y L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y F T S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D I A T Y Y C Q Q G N T L P W T F G G G T K L E R T V A A P S V F I F P P S D
E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S
S P V T K S F N R G E C (S E Q I D N O : 2 1) 。

【 0 0 7 3 】

幾つかの実施形態では、抗体は、下記のアミノ酸配列含有重鎖可変領域、

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F P D Y N I H W V R Q A
P G Q G L E W M G C I Y P Y N G N T A Y A Q K F Q G R V T M T R D T S I S T A Y
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S D L Y Y F G S R G F D Y W G Q G T L V T V
S S A (S E Q I D N O : 1 6) 、および／または下記のアミノ酸配列含有軽鎖可
変領域を含む。

40

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S T Y L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y F T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D I A T Y Y C Q Q G N T L P W T F G G G T K L E (S E Q I D N O : 2 2
) 。

【 0 0 7 4 】

幾つかの実施形態では、抗体は、下記のアミノ酸配列含有重鎖、

50

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPDYNIHWVRQA
PGQGLEWMGCIYPYNGNTAYAAQKFQGRVTMTTRDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCARSDLYYFGSRGFQDYWGQGTLLVTV
SSASTKGPSPVFPPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVVTVPPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCTPCPAPPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)、および／または下記のア
ミノ酸配列含有軽鎖を含む。

10

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISTYLNWYQQKP
GKAPKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQP
EDIATYYCQQGNTLPWTFGGGTKLER TVAAPS VFI FPPSD
EQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)。

20

【0075】

幾つかの実施形態では、抗体はヒト化の1C5-VKWである。幾つかの実施形態では、抗体は、YTFPDYNIH (SEQ ID NO: 7) のHVR-H1配列、CIYPYNGNTA (SEQ ID NO: 8) のHVR-H2配列、及びSDLYYFGSRGFQDYWGQGTLLVTV (SEQ ID NO: 9) のHVR-H3配列を有する重鎖可変領域を含む。幾つかの実施形態では、抗体は、RASQDISTYLN (SEQ ID NO: 11) のHVR-L1配列、FTSRLHS (SEQ ID NO: 14) のHVR-L2配列、及びQQGNTLPW (SEQ ID NO: 15) のHVR-L3配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0076】

幾つかの実施形態では、前記抗体は3C4F12である。幾つかの実施形態では、抗体は、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列由来の3つのHVRを含む軽鎖可変領域を有する。幾つかの実施形態では、重鎖可変領域は、FAFSSYDMS配列 (SEQ ID NO: 32) を含むHVR1、YISSGGGSTYYPDTVKG配列 (SEQ ID NO: 33) を含むHVR2、およびRYYYGSSWAMD配列 (SEQ ID NO: 34) を含むHVR3を含有する。幾つかの実施形態では、軽鎖可変領域は、KASQSVSNDVA配列 (SEQ ID NO: 35) を含むHVR1、YASNRYT配列 (SEQ ID NO: 36) を含むHVR2、およびQQDYSSPY配列 (SEQ ID NO: 37) を含むHVR3を含有する。幾つかの実施形態では、抗体は1B3E12である。

30

40

【0077】

本発明に用いる抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片（例えば、Fab、Fab'-SH、Fv、scFvとF(ab')₂）、キメラ抗体、二重特異性抗体、多価抗体、ヘテロ共役抗体、抗体部分含有融合タンパク質、ヒト化抗体およびその必要な特異性含有抗原認識部位（例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエпитープに用いる）の免疫グロブリン分子のいかなる他の修飾構成、抗体のグリコシル化変異体、抗体のアミノ酸配列変異体、及び共有結合修飾抗体を含む。抗体は、ネズミ科の動物、ラット、ヒトまたは他の任意の起源（キメラまたはヒト化抗体を含む）であってもよい。

【0078】

50

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体はモノクローナル抗体である。例えば、モノクローナル抗体は、K o h l l e r 等, N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) で最初に記述するハイブリドーマ法を用い、または組換えDNA法によって作られてもよい（米国特許第4, 8 1 6 , 5 6 7号）。

【0079】

ハイブリドーマ細胞を培養する培地で抗原に対するモノクローナル抗体（例えばN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープ）の生成を分析する。好ましくは、免疫沈降法または体外結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ等（R I A）または酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）により、ハイブリドーマ細胞が生成したモノクローナル抗体の結合特異性を決定する。

10

【0080】

前記のように、モノクローナル抗体は組換えDNA法によって作製される。モノクローナル抗体をコードするDNAを容易に分離や配列決定して、発現ベクターに置き、大腸菌の細胞またはCHO細胞等の宿主細胞にトランスフェクトし、組換えモノクローナル抗体を生成するために従来の手順を使用する。

【0081】

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含み、前記ヒト免疫グロブリンにおけるレシピエント由来の相補性決定領域（CDR）内の残基が、所望の特異性、親和性と能力を有するヒト以外の種（ドナー抗体）、例えばマウス、ラットやウサギのCDRの残基に置換される。J o n e s 等, N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 (1 9 8 6) ; R i e c h m a n n 等, N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 9 (1 9 8 8) と P r e s t a , C u r r . O p i n . S t r u c t . B i o l . 2 : 5 9 3 - 5 9 6 (1 9 9 2) を参照すればよい。

20

【0082】

ヒト化の非ヒト抗体に用いる方法は本分野においてよく知られている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入したその中の一つ以上のアミノ酸残基を有する。基本的にヒト化は、J o n e s 等, N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 (1 9 8 6) の方法に基づいて行うことができる。または非ヒトのCDR配列でヒト抗体の相同配列を代替する。ヒト化抗体は抗原に対して高い親和性を保持することを確保するために、ヒト化抗体は、3次元モデルを用いて、親配列と種々の概念上のヒト化製品を分析する工程によりヒト化抗体を製造してもよい。三次元免疫グロブリンモデルは、通常得られるものであり、かつ、当業者によく知られているものである。一般に、CDR残基は抗原結合に直接かつ最も実質的に関与して影響を与える。

30

【0083】

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体を産生するための従来公知の方法は、ファージディスプレイ技術と抗原に反応したヒト抗体を生産するトランスジェニック動物の使用を含むがそれに限定されない。

40

【0084】

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体とは、相補性決定領域（CDR）、または1種由来の可変領域の残基と、他の種由来の定常領域に対応する配列と結合されている抗体を示してもよい。キメラ抗体を生成するための方法は本分野において知られている（例えば、米国特許第4, 8 1 6 , 5 6 7号参照）。

【0085】

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる抗体は、抗体断片である。幾つかの実施形態では

50

、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる抗体はF a b断片、s c F v、ミニボディ、ダイアボディ、s c F v多量体または二重特異性抗体断片である。F a b、F vとs c F v抗体断片は、いずれも大腸桿菌に発現され、それにより分泌されることができるので、これらの断片を直接大量生産させることができ、またはファージライブラリーから単離される。このような線形抗体断片は単一特異性または二重特異性のものであってもよい。

【0086】

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる抗体は、二重特異性抗体である。二重特異性抗体（B s A b）は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を持つ抗体であり、同じまたは別のタンパク質上のエピトープを含む。二重特異性抗体を製造するための方法は、本分野において知られている。全長二重特異性抗体の従来の生産は2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖の共発現に基づくが、そのうち2つの鎖は異なる特異性を持っている。

10

【0087】

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる抗体は、多価抗体である。多価抗体とは、2つ以上の抗原結合部位を持つ任意の抗体を示してもよい。幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる抗体は、ヘテロ共役抗体（h e t e r o c o n j u g a t e a n t i b o d y）である。ヘテロ共役抗体とは、異なる特異性を持つ2つの抗体を連結することによって（例えば共有結合によって）作製される任意の抗体を示してもよい。

20

【0088】

異なる側面によれば、所望の結合特異性を持つ抗体可変ドメイン（抗体－抗原結合部位）は、免疫グロブリン定常領域の配列と融合される。免疫グロブリン重鎖の融合体と必要な免疫グロブリン軽鎖とをコードするDNAを、異なる発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物にトランスフェクトする。

【0089】

幾つかの実施形態では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を含有する組成物は、薬学的に許容可能な担体、賦形剤、安定剤を含んでもよく、前記担体、賦形剤、または安定剤は、医薬組成物の一部としての投薬量及び使用濃度が、その中で暴露している細胞または哺乳類に対して無毒である。一般的に、生理的に許容可能な担体は水性pH緩衝溶液である。生理的に許容可能な担体の例は、リン酸、クエン酸および他の有機酸のようなバッファ；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリン等の単糖類、二糖類と他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトールやソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成性対イオン；および／またはT W E E N T M、ポリエチレングリコール（P E G）、P L U R O N I C S T M等の非イオン界面活性剤を含む。

30

40

【0090】

ポリヌクレオチド、抗体をコードするベクター、および宿主細胞

本発明の特定の側面では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体の産生に関する。具体的に、特定の側面において、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドに関する。上述したように、ポリヌクレオチドとは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、および／またはその類似体である。これらのポリヌクレオチドは、宿主細胞において体内で生成し、または体外で転写して生成してもよい。抗体をコード

50

するポリヌクレオチドとは、抗体をコードする配列を有するポリヌクレオチドを示してもよく、それは抗体を生成する細胞（例えば、B細胞またはハイブリドーマ）に識別され、または配列には同義の突然変異のポリヌクレオチドを含み、それをその自然に存在する対応物と区別するが、遺伝子コードの固有の縮重により、それらは類似した蛋白質をコードしている。本分野において従来公知の手段によってポリヌクレオチドを分離してもよく、PCRを含み、その後PCR反応に基づく沈殿の精製、またはPCR産物含有アガロースゲルのスライス、または宿主細胞由来のポリヌクレオチドを含むベクターを精製する（例えば、大腸菌由来のプラスミド製剤等）。

【0091】

本発明の特定の側面では、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体をコードする核酸配列を含むベクターに関する。抗体またはその断片を組換えて生成するため、所望の抗体または抗体断片をコードする核酸を分離し、更にクローニング（DNAの増幅）または発現ために複製可能なベクターに挿入されている。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体をコードするDNAは容易に分離される（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いた）ものであり、従来の手順を使用して、配列は決定される。多くのクローニングおよび／または発現ベクターは市販されている。

【0092】

一般的にベクターは、以下の一つ以上のシグナル配列、複製開始点、一つ以上のマーカー遺伝子、多数の制限エンドヌクレアーゼに対する認識配列を含有する多重クローニング部位、エンハンサー、プロモーターと転写終結配列を含むが、これに限定されない。発現ベクターとクローニングベクター共に、ベクターを一つ以上の選択された宿主細胞内で複製することが可能な核酸配列を含んでいる。このような配列は、様々な細菌、酵母、およびウイルスについて周知である。発現ベクターとクローニングベクターは、更に、選択可能なマーカーとする選択遺伝子を含み、前記選択遺伝子の発現は抗生物質や他の毒素に対する抵抗性を与え、栄養要求性の不足を補い、または複合培地から供給できない重要な栄養分を提供する。

【0093】

通常、発現とクローニングベクターは、宿主生物によって認識され、抗体（例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合する抗体）をコードする核酸またはその断片と、操作可能に結合するプロモーターを含む。原核生物宿主と共に使用に適したプロモーターは、phoAプロモーター、ラクタマーゼとラクトースプロモーター系、アルカリ性ホスファターゼのプロモーター、トリプトファンプロモーター系、およびtacプロモーター等のハイブリッドプロモーター、また他の既知の細菌のプロモーターにも適している。細菌のシステムに用いられるプロモーターは、抗体と抗体断片をコードするDNAと操作可能に結合するシャインダルガーノ（Shine-Dalgarno, S. D.）配列を含む。プロモーター配列は真核生物について知られているものであり、3-ホスホグリセレートキナーゼまたは他の解糖系酵素の酵母プロモーター、及びウイルスのゲノムから得られた哺乳類動物プロモーターを含む。前記ウイルスとしては、ポリオーマウイルス、サイトメガロウイルス等が挙げられ、且つ、最も好ましくはシミアンウイルス40（simian Virus 40、SV40）である。種々の異種哺乳類動物のプロモーターは、例えば、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターも知られている。真核宿主細胞に用いられる発現ベクターは、また転写の終了とmRNAの安定化に必要な配列を含む。

【0094】

本発明の特定の側面において、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合する抗体をコードする核酸配列を含有するベクターを含む単離宿主細胞に関する。抗体（例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合できる抗体）またはその断片をコードするDNAをクローニングまたは発現することに用いる適切な宿主細胞は、本書ではグラ

ム陰性またはグラム陽性生物、例えば腸内細菌科の大腸菌 (*E. coli*) 等原核生物を含む。原核生物以外に、糸状菌や酵母等の真核微生物も宿主のクローニングや発現に適し、例えば出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。酵母及び糸状菌を治療的なタンパク質の生産に用いるレビューについては、例えば、Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-44 (2004) を参照すればよい。グリコシル化抗体または抗体断片の発現に用いる適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物、およびスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*, キャタピラー)、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*, 蚊)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, ショウジョウバエ) またはカイコ (*Bombyx mori*, 蛾) 細胞等の昆虫細胞を含む。利用可能な哺乳類動物宿主細胞株の例としては、SV40で形質転換した猿腎臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651)、ヒト胚性腎臓細胞株 (293または懸濁培地における増殖した293または293細胞のサブクローニング、Graham等, J. Gen Virol. 36:59 (1977))、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL 10)、チャイニーズハムスター卵巣細胞/—DHFR (CHO, Urlaub等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)、ヒト子宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2)、及びヒト肝癌細胞株 (Hep G2) が挙げられる。抗体生産に適した特定の哺乳類動物宿主細胞株のレビューについては、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268. を参照すればよい。これらの実施例は制限されず、むしろ例示される。

【0095】

抗体の生産と精製

本発明の特定の側面において、抗体をコードする核酸配列を含有するベクターを有する宿主細胞を培養し、かつ細胞培養物から抗体を回収することにより抗体を生成する方法に関する。抗体または抗体断片を生産するために、前記発現またはクローニングベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、プロモーターの誘発、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適宜に改良した通常の栄養培地で培養する。

【0096】

本明細書に記載の抗体 (例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合できる抗体) と抗体断片の生成に用いられる宿主細胞については、いろいろな培地で培養することができる。Ham's F10 (シグマ)、最小必須培地 (MEM)、(シグマ)、RPMI-1640 (シグマ) 及びダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), シグマ) 等の市販の培地は宿主細胞の培養に適している。これらの培地は必要に応じてホルモンや他の成長因子 (例えば、インシュリン、トランスフェリン、または表皮成長因子)、塩 (例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩)、バッファ、ヌクレオチド、抗生物質、微量元素、及びグルコースまたは同等のエネルギー源を補充することができる。また、当業者に知られている適切な濃度の任意のその他の必要な補充物を含むことができる。培養条件としては、温度、pH等が挙げられ、従来が発現に用いられる宿主細胞の条件をそのまま使用することができ、そして、これは当業者に自明なものである。

【0097】

遺伝子組換え技術を用いた場合、抗体 (例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合できる抗体) または抗体断片は、細胞内、ペリプラズム空間において生成し、または直接培地に分泌されることができる。このような細胞から調製した抗体は、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電

気泳動、透析、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、基質（例えば、アガロース）に結合するタンパク質Aまたはタンパク質Gを用いる）を用いて精製することができる。

【0098】

一般的に、研究、試験と臨床応用に用いられる抗体を精製する各種の方法は、本分野において公知であるが、前記各種の方法は上述の方法学と一致及び／または関心のある特定の抗体に適すると考えられる。

【0099】

V. 癌

本発明の特定の側面において、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を含有する有効量の組成物を与えることにより、個体の癌の予防と治療に用いる方法に関し、前記エピトープは癌細胞によって発現している。幾つかの実施形態では、エピトープは、癌細胞の細胞表面に発現している。幾つかの実施形態では、抗体は癌細胞の細胞表面に発現するエピトープと結合して癌細胞の成長を抑制する。

【0100】

本書では、以下の予想外の結果を記載しているが、正常ヒト細胞の細胞表面にほとんど発現しないか又は全く発現しないことに比べて、種々のヒト癌細胞の細胞表面に特定の糖タンパク質が多く発現しており、特にN-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミンが発現している。そのため、これらの糖部分は癌の存在を示すバイオマーカーに用いられ、前記バイオマーカーは優先的に、癌細胞を標的として治療薬（例えば、抗体）に使用されてもよい。また本明細書には、どのように便利に、N-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミンと特異的な抗体を細胞表面に結合し、これらの糖部分を発現する癌細胞の成長を阻害できることが記載されている。

【0101】

本書に記載の結果は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体が、多種の異なる癌細胞の成長抑制に広く有効であることを示す。この特性はヒト癌細胞株の体外での使用より明らかにされた。重要であるのは、腫瘍異種移植モデル実験を行って、更にN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体は、体内におけるヒト癌細胞の成長を抑制する効果が確立された。このような腫瘍異種移植モデルは本分野において従来公知のヒトの腫瘍の薬物反応を測定や予測するための強力なツールである（例えば、Richmond, A. と Su, Y. (2008) Dis. Model Mech. 1 (2-3) : 78-82 参照）。

【0102】

本文に記載の結果により、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体は、多種の形態のヒト癌に広く有効であることを示す。幾つかの実施形態において、その成長が前期抗体によって抑制される癌細胞としては、神経膠腫細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、乳癌細胞、卵巢癌細胞、子宮頸部腺癌細胞、結腸癌細胞、胃癌または胃腫瘍（stomach or gastric cancer）、食道癌細胞、および線維肉腫細胞等の群から選択される。

【0103】

幾つかの実施形態では、癌細胞は神経膠腫細胞である。神経膠腫細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した神経膠腫細胞を含み、グリア細胞、例えば、脳や脊椎のグリア細胞に由来するいかなる悪性細胞を示してもよい。神経膠腫細胞とは、神経膠腫細胞の均一な集団または異なる種類のグリア細胞から発生する混合細胞集団を示してもよい。幾つかの実施形態では、神経膠腫細胞は星状細胞腫細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、神経膠腫細胞は、乏突起膠腫細胞、脳幹膠腫細胞、上衣腫細胞、または視神経膠腫細胞であってもよい。

【0104】

幾つかの実施形態では、癌細胞は肝臓癌細胞である。肝臓癌細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した肝臓癌細胞を含み、肝臓由来の任意の癌細胞を示してもよい。

【0105】

幾つかの実施形態では、癌細胞は肺癌細胞である。肺癌細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した肺癌細胞を含み、肺に由来の任意の癌細胞を示してもよい。幾つかの実施形態では、前記肺癌細胞は非小細胞肺癌細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、肺癌細胞は肺腺癌細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、肺癌細胞は肺扁平上皮癌細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、肺癌細胞は小細胞肺癌細胞であってもよい。

【0106】

幾つかの実施形態では、癌細胞は乳癌細胞である。乳癌細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した乳癌細胞を含み、乳腺に由来する任意の癌細胞を示してもよい。幾つかの実施形態では、乳癌細胞は非浸潤性乳管癌細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、乳癌細胞は浸潤性乳管癌細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、乳癌細胞は浸潤性小葉癌細胞であってもよい。

【0107】

幾つかの実施形態では、癌細胞は卵巣癌細胞である。卵巣癌細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した卵巣癌細胞を含み、卵巣に由来の任意の癌細胞を示してもよい。幾つかの実施形態では、卵巣癌細胞は表層上皮・間質性腫瘍細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、卵巣癌細胞は性索間質性腫瘍細胞であってもよい。幾つかの実施形態では、卵巣癌細胞は、胚細胞腫瘍細胞であってもよい。卵巣癌細胞とは、卵巣癌細胞の均一な集団またはこれらの異なる種類の卵巣癌から発生する混合細胞集団を示してもよい。

【0108】

幾つかの実施形態では、癌細胞が子宮頸部腺癌細胞である。子宮頸部腺癌細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した子宮頸部腺癌細胞を含み、子宮頸に由来する任意の腺癌細胞を示してもよい。幾つかの実施形態では、子宮頸部腺癌細胞は腺扁平上皮癌細胞である。

【0109】

幾つかの実施形態では、癌細胞は結腸癌細胞である。結腸癌細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した結腸癌細胞を含み、結腸または直腸に由来する任意の癌細胞を示してもよい。幾つかの実施形態では、結腸癌細胞は腺癌細胞である。幾つかの実施形態では、結腸癌細胞は腺扁平上皮癌細胞である。

【0110】

幾つかの実施形態では、癌細胞は、胃癌 (stomach cancer) または胃腫瘍 (gastric cancer) 細胞である。胃癌または胃腫瘍細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した胃癌細胞を含み、胃に由来する任意の癌細胞を示してもよい。幾つかの実施形態では、胃癌または胃腫瘍細胞は腺癌細胞である。幾つかの実施形態では、胃癌または胃腫瘍細胞は散在型腺癌細胞 (粘液、コロイド、形成性 (limiting plastic)、革袋状胃) 細胞である。幾つかの実施形態では、胃癌または胃腫瘍細胞はリンパ腫細胞である。

【0111】

幾つかの実施形態では、癌細胞は食道癌細胞である。食道癌細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した食道癌細胞を含み、食道に由来する任意の癌細胞を示してもよい。幾つかの実施形態では、食道癌細胞は腺癌細胞である。幾つかの実施形態では、食道癌細胞は扁平上皮癌細胞である。

【0112】

幾つかの実施形態では、癌細胞は線維肉腫細胞である。線維肉腫細胞とは、原発腫瘍または他の部位に転移した食道癌細胞を含み、線維性結合組織に由来する任意の癌細胞を示してもよい。

【0113】

V I . 胃腸疾患

10

20

30

40

50

本発明の特定の側面において、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を含有する有効量の組成物を個体に投与することによって、胃腸疾患を治療または予防するための方法に関し、前記エピトープは炎症性細胞によって発現されている。

【0114】

幾つかの実施形態では、前記エピトープは炎症性細胞の細胞表面によって発現されている。幾つかの実施形態では、炎症性細胞は結腸炎、炎症性腸疾患または胃腸炎の炎症性細胞であり、前記エピトープは炎症性細胞の細胞表面によって発現されている。本書で説明したように、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープを特異的に認識する抗体は、結腸の炎症部位（例えば、結腸の炎症（結腸炎、IBD、または胃腸炎等）を特徴とする疾患で見られる炎症部位）で結腸中の炎症性細胞（例えば好中球、マクロファージ、単球、好酸球および／または好塩基球等の白血球）に結合することができる。

【0115】

VII. 治療の方法

癌

本発明の特定の側面において、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を含有する有効量の組成物を個体に投与することによって、個体の癌を治療または予防するための方法に関する。本発明における予想できない発見とは、癌細胞の細胞表面または癌細胞内に発現することができ、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体は、多種の癌細胞の成長を抑制することに用いることができることである。幾つかの実施形態では、抗体と癌細胞の細胞表面に発現されているエピトープとの結合は、癌細胞の成長を抑制する。

【0116】

幾つかの実施形態では、癌は、脳癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、結腸癌、胃癌、食道癌、および線維肉腫を含んでもよい。本発明では、多種の癌組織はN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを高レベルで発現していることを実証したので、本書に記載されている方法により、多種の癌を広くかつ有効的に治療することができる。幾つかの実施形態では、治療または予防する癌とは、脳癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、結腸癌、胃癌、食道癌、または線維肉腫の原発腫瘍を代表とする原発腫瘍を示す。幾つかの実施形態では、治療または予防をする癌とは、本来、脳癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、結腸癌、胃癌、食道癌、または線維肉腫を代表とする転移性腫瘍を示す。

【0117】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は脳癌である。脳癌とは、上述した細胞から発生した癌を含むが、これに限定されず、脳に由来する任意の癌を示してもよい。脳癌の例としては、神経膠腫、髄膜腫、神経鞘腫、下垂体腺腫を含むがこれに限定されない。脳癌とは、中枢神経系に由来し、例えば脊椎等の癌を示してもよい。

【0118】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は肝臓癌である。肝臓癌とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、肝臓に由来する任意の癌を示してもよい。肝臓癌の例としては、肝臓癌、胆管癌、肝芽腫を挙げることができる。

【0119】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は肺癌である。肺癌とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、肺に由来する任意の癌を示してもよい。肺癌としては、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌等を含む肺非小細胞癌、および肺小細胞癌を含むがこれに限定されない。

【0120】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は乳癌である。乳癌とは、上述した細胞

から発生した癌を含むがこれに限定されず、乳腺に由来する任意の癌を示してもよい。乳癌の例としては、非浸潤性乳管癌、浸潤性乳管癌、トリプルネガティブ乳癌（例えば、プロゲステロン、エストロゲンおよびHER2/neu受容体陰性の細胞から発生した癌）、および炎症性乳癌を含むがこれに限定されない。

【0121】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は卵巣癌である。卵巣癌とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、卵巣に由来する任意の癌を示してもよい。卵巣癌の例としては、表層上皮・間質性腫瘍（例えば、子宮内膜腫瘍、粘液性嚢胞腺癌、漿液性腫瘍を含む）、胚細胞腫瘍、性索間質性腫瘍、混合型卵巣腫瘍を含むがこれに限定されない。

10

【0122】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は子宮頸癌である。子宮頸癌とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、子宮頸に由来する任意の癌を示してもよい。子宮頸癌の例としては、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌と腺扁平上皮癌、神経内分泌腫瘍、絨毛腺腺癌（*villoglandular adenocarcinomas*）、および、すりガラス細胞癌を含むがこれに限定されない。

【0123】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は結腸癌である。結腸癌とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、結腸または直腸に由来する任意の癌を示してもよい。結腸癌の例としては、腺癌および腺扁平上皮癌を含むがこれに限定されない。

20

【0124】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は胃癌または胃腫瘍である。胃癌または胃腫瘍とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、胃に由来する任意の癌を示してもよい。胃癌または胃腫瘍の例としては、腺癌、びまん型腺癌（粘液、コロイド、形成性、革袋状胃）、リンパ腫を含むがこれに限定されない。

【0125】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は食道癌である。食道癌とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、食道癌に由来する任意の癌を示してもよい。食道癌の例としては、腺癌と扁平上皮癌を含むがこれに限定されない。

30

【0126】

幾つかの実施形態では、治療または予防する癌は線維肉腫である。線維肉腫とは、上述した細胞から発生した癌を含むがこれに限定されず、線維性結合組織に由来する任意の癌を示してもよい。

【0127】

投与と併用療法

本分野において周知である任意の方法は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を含む有効量の組成物を個体に投与することに用いることができ、例えば、ボーラスとしてまたは一定期間にわたって連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、または吸入路等によって投与する。幾つかの実施形態では、抗体を経口投与する。幾つかの実施形態では、組成物は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる抗体と別のタンパク質、例えば、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合しないタンパク質を含んでいる。本分野において周知である任意の方法により、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる抗体を含む組成物の有効量を確定し、上述のような多くの個体特性に依存してもよい。

40

【0128】

本発明の特定の側面においては、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体と所定量の他の抗癌剤を含有する有効

50

量の組成物を個体に投与することによって、個体における癌の治療または予防する方法に関し、前記抗体と抗癌剤との併用によって個体の癌に対して治療または予防する方法を提供する。本分野において周知である任意の適切な抗癌剤は、本書に記載の抗体と併用することができる。抗癌剤は抗体（抗体－薬物抱合体を含む）、小分子、免疫治療剤、分化誘導剤、標的治療剤、ホルモンを含んでもよい。

【0129】

幾つかの実施形態では、抗癌剤は化学療法剤である。多くの種類の化学療法剤が本分野において知られている。化学療法剤の例としては、代謝拮抗物質（例えば、5-フルオロウラシルまたはカペシタビン）、アントラサイクリン系薬物、抗腫瘍抗生物質（例えば、アクチノマイシンD、マイトマイシンC、ブレオマイシン）、有糸分裂阻害剤（例えば、タキソール（登録商標）またはエポチロン等の多く類）、コルチコステロイド、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、エトポシド）、アルキル化剤、及び白金薬物（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン（oxaloplatin）またはカルボプラチン）を含むがこれに限定されない。これらの薬物を例として提供し、化学療法剤の選択を制限することを目的としていない。

【0130】

胃腸疾患

本発明の特定の側面においては、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を含む有効量の組成物を個体に投与することによって個体の胃腸疾患を治療または予防する方法に関する。本発明における予想できない発見とは、炎症細胞の細胞表面によって発現され、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体を、自己免疫と感染性疾患を含む多種の胃腸疾患の治療または予防に用いることができることである。

【0131】

本明細書で述べたように、本発明の方法は個体での各種胃腸疾患に有効である。幾つかの実施形態では、個体は炎症性腸疾患にかかっている。本発明の炎症性腸疾患は、慢性または急性であってもよい。本分野において周知されるように、炎症性腸疾患等の多くの胃腸疾患は、組織中で症状を呈することができ、小腸と大腸、口、胃、食道、肛門を含むがこれらに限定されない。幾つかの実施形態では、炎症性腸疾患は結腸炎（転換、リンパ球性、膠原性または不確定性大腸炎等）またはベーチェット病（Behcet's disease）を含んでもよい。

【0132】

幾つかの実施形態では、個体はクローン病にかかっている。幾つかの実施形態では、個体は潰瘍性結腸炎にかかっている。幾つかの実施形態では、個体は急性感染性胃腸炎にかかっている。幾つかの実施形態では、個体は痔にかかっている。

【0133】

幾つかの実施形態では、個体はウイルスの感染によって引き起こされる胃腸疾患にかかっている。胃腸疾患を引き起こすウイルスは、ロタウイルス、ノロウイルス（noroviruses）、アデノウイルス、アストロウイルスを含むがこれに限定されない。幾つかの実施形態では、ウイルス感染はロタウイルス感染症である。

【0134】

幾つかの実施形態では、胃腸疾患にかかった個体はヒトである。幾つかの実施形態では、胃腸疾患にかかった個体は非ヒト動物である。

【0135】

胃腸疾患の治療又は予防に適用されている組成物の多くの投与方法は、本分野において周知である。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植、吸入、鞘内、心室内、または鼻腔内に投与されてもよい。

【0136】

VIII. 測定方法

10

20

30

40

50

本発明の特定の側面において、下記の工程により、個体に癌細胞の存在を測定するための方法に関する。

個体から生物サンプルを得て、生物サンプルを、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体に接触させ、且つ生物サンプルと抗体との結合量を測定し、抗体の結合は個体の癌細胞の存在を示す。

また本明細書では、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合する抗体は、どのようにして個体の癌の存在を測定するために用いられるかが記載されているが、これは、血清サンプルでのN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンレベルの上昇と癌の存在との間の相関性による。これらの方法は、多くの種類の癌の測定に用いられてもよく、肺癌、肝臓癌、乳癌、結腸または大腸癌、食道癌、胃癌、子宮体癌、子宮頸癌、甲状腺癌、脳癌、リンパ腫を含むが、これに限定されない。

【0137】

抗体と、N－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープとの間の特異的結合は、本分野において周知である任意の方法によって測定することができる。抗体とエピトープとの間の結合の測定に用いられる方法は、本分野において周知のものであり、ELISA（酵素免疫測定法）アッセイ、免疫組織化学（IHC）アッセイ、免疫蛍光アッセイ、フローサイトメトリー、CTC（循環腫瘍細胞）アッセイと免疫金コロイドアッセイを含んでもよい。これらの典型的なアッセイは、当業者に公知のものであり、より詳細な説明については、例えば、HarlowとLane（1988）抗体実験マニュアルを参照すればよい。ELISA法の例として、直接法、間接法、競合法、サンドイッチ法のELISAを含む。いずれの表面でも使用してもよく、プレート（例えば、96ウェルプレート）やカラムを含むがこれに限定されない。

【0138】

幾つかの実施形態では、上述で測定したN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを含むエピトープに結合する抗体の量を、対照サンプルで測定される結合した抗体の量と比較してもよい。対照サンプルに結合する抗体の量を比べて、生物サンプルに結合する抗体の量の上昇は、個体での癌細胞の存在を示している。上述で述べたように、対照サンプルは、検査待ち個体由来の生物サンプルを用いて製造してもよい。対照サンプルの例としては、癌にかかっていない個体に由来するサンプル、または既知量のN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを有するサンプルを含む。非限定的な例としては、本文に記載の方法を用い、検査待ちの個体に由来する血清を測定し、且つ、健康的（即ち、癌にかかっていない）な個体の血清と比較する。このような場合には、健康的な個体または既知量のN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを有する血清に比べて、検査待ちの個体に由来する血清中の抗体の結合の上昇は、個体の癌細胞の存在を示している。

【0139】

いずれの体液または切片も、本発明の生物サンプルとして用いてもよい。生物サンプルの例としては、血液、血清、尿、糞便、乳、精液、唾液、胸液、腹腔液、脳脊髄液、痰、いずれの他の体液や分泌物を含むがこれに限定されない。

【0140】

ここで示されるように、多くの種類の癌細胞をここで説明する方法を用いて個別に測定することができる。個別に測定できる癌細胞の例としては、肺癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞、結腸癌または大腸癌細胞、食道癌細胞、胃癌細胞、子宮内膜癌細胞、子宮頸癌細胞、甲状腺癌細胞、脳癌細胞、およびリンパ腫細胞を含むがこれに限定されない。

【0141】

また、糖類関連のバイオマーカー自体は、癌や他の疾患の患者における自己抗体の測定に用いてもよい。これらの自己抗体は糖類と結合することができ、当該糖類は癌組織やその他の病気の組織や細胞上またはその中に特異的に発現され、または血液、尿、糞便、乳、精液、唾液、体液または分泌物に放出される。体液または分泌物は、胸液、腹腔液、脳

10

20

30

40

50

脊髄液、痰および臓器のスメア (s m e a r s) を含むがこれに限定されない。幾つかの実施形態では、糖類関連バイオマーカーは、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンまたはフコース、または明らかな (d i s t i n c t) N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンまたはフコースを有する複合糖質を含むがこれに限定されない。

【0142】

IX. キット

本発明の特定の側面は、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合する抗体を含有する医薬組成物を含むキットに関する。幾つかの実施形態では、前記キットは、更に、癌を治療するための有効量の医薬組成物を個体に投与するための取扱説明書を含むことができる。これらの取扱説明書とは、通常に適応症、用法、用量、投与、禁忌、包装品と併用される他の薬剤および／またはこれらの薬剤使用上の注意事項等の情報を含む薬剤の商用パッケージに含まれる指示情報を含む取扱説明書を示す。

【0143】

本発明のキットに用いられる適切な容器は、ボトル、バイアル (例えば、二室バイアル)、注射器 (例えば、シングルまたはデュアルチャンバーの注射器)、試験管を含んでいる。製造される製品は、容器上または容器に関連するラベルまたはパッケージを更に含んでもよいが、それにより製剤の調製及び／又は使用を指示することができる。また、ラベルまたはパッケージは、前記製剤が経口投与または他の投与方法で用いられてもよく、個体での癌を治療又は予防するためであることを更に指示することができる。製造される製品は、また他のバッファ、希釈剤、フィルタ、針、注射器、取扱説明書を有するパッケージ等の商業、治療、ユーザーの立場から所望の他の材料を含んでいる。

【0144】

幾つかの実施形態では、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープと特異的に結合する抗体を含有する医薬組成物を含むキットは、個体に癌細胞の存在を測定するための取扱説明書を更に含んでもよい。これらの取扱説明書は、通常にELISA測定キット、免疫組織化学 (IHC) アッセイキット、免疫蛍光測定キット、フローサイトメトリーアッセイキット、CTC (循環腫瘍細胞) アッセイキットと免疫金コロイドアッセイキットの商用パッケージに含まれる取扱説明書を示してもよい。本発明のキットは、個体の癌細胞の存在を測定するために有用であるいずれの他の試薬、例えば、96ウェルマイクロタイタープレート、ウシ血清アルブミン等の非特異的蛋白質、本発明の抗体と結合しその抗原結合に影響しない二次抗体、または蛍光や発光のラベル等の測定するための試薬、測定可能なシグナルを生成する酵素と基質 (例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼとTMB) を含んでもよい。

【0145】

本発明の特定の側面においては、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン含有医薬組成物、医薬組成物を用いて癌や炎症にかかった個体中の自己抗体の存在を測定するための取扱説明書または他の試薬を含むキットに関する。これらの取扱説明書は、通常にELISAアッセイキット、免疫組織化学 (IHC) アッセイキット、免疫蛍光アッセイキット、フローサイトメトリーアッセイキット、CTC (循環腫瘍細胞) アッセイキットと免疫金コロイドアッセイキットを含む商用パッケージに含まれる取扱説明書を示してもよい。本発明のキットは、癌細胞の存在を個別に測定するのに有用であるいずれの他の試薬、例えば、96ウェルマイクロタイタープレート、ウシ血清アルブミン等の非特異的蛋白質、本発明の抗体と結合し、その抗原結合に影響しない二次抗体、または蛍光や発光のラベル、測定可能な信号を生成する酵素と基質 (例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼとTMB) 等の測定するための試薬を含んでもよい。

【0146】

本取扱説明書は、当業者が本発明を充分に実施することができると考えられるものである。ここで記載の内容以外に、前記の説明に基づき、本発明の種々の変更は当業者にとっ

て自明なものであり、添付の特許請求の範囲内にある。全ての目的としては、本明細書で引用される出版物、特許書類、特許出願書類の全体をそのまま本発明に引用される。

【0147】

本願は、2014年8月22日に出願された国際特許出願第PCT/CN2014/085027号に基づく優先権の利益を主張するものであり、その全ての内容が引用することにより本願に組み込まれる。

【実施例】

【0148】

以下の実施例を参照することで、本発明をより完全に理解することができる。しかし、それらが発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。ここで記載した実施例及び実施形態は説明の目的のためだけであり、当業者はそれを基に様々な補正や変更を行なうことができ、これらの補正や変更は、本願の趣旨及び範囲内に含まれ、また添付の特許請求の範囲内に含まれる。

【0149】

実施例1：癌細胞上のN-アセチルグルコサミンおよびN-アセチルガラクトサミンの発現

正常なヒトの細胞に比べて、癌細胞に優先的に発現するバイオマーカーの識別は、癌の診断、治療、及び／又は予防を補助するために、新しいアッセイおよび治療方法の設計をすることができる。この需要を満たすために、本明細書にはN-アセチルグルコサミンおよびN-アセチルガラクトサミンに結合するモノクローナル抗体を記載している。これらの結果の一部は、予想できない発見に基づき、N-アセチルグルコサミンおよびN-アセチルガラクトサミンは多くの異なる癌細胞の表面に発現されるが、ヒト正常組織においては微量発現するか又は発現しない。結果として、モノクローナル抗体は癌の診断、治療、及び／又は予防に極めて潜在的な用途を有する可能性があり、前記モノクローナル抗体はN-アセチルグルコサミンおよびN-アセチルガラクトサミンに結合し、癌細胞の成長を抑制する。

【0150】

材料と方法

組織アレイ

組織アレイチップを用い、コムギ胚芽凝集素(WGA)とヒトの健康や悪性組織との結合を測定する。当該チップには、FDA推奨の正常なヒトの臓器および癌患者の悪性組織に由来するエピトープ(Imgenex、San DiegoとUS Biomax, Rockville, MD, USA)を含有する。組織アレイについて、より詳細な説明はWO2009126652を参照すればよい。

【0151】

免疫組織化学

植物レクチンの免疫組織化学(IHC)アッセイは、癌や他の疾患に関わる糖類関連の生物学的標的またはマーカーの認識に用いられる。健康や癌性のヒト組織は、以下の植物レクチンで染色されたN-アセチルグルコサミンを特異的に認識するビオチン化コムギ胚芽凝集素(WGA)、フコースを特異的に認識するビオチン化ハリエニシダ凝集素I(Biotinylated-Ulex Europaeus agglutinin(UEA-I)、N-アセチルガラクトサミンを特異的に認識するビオチン化ダイズ凝集素(SBA)やドリコス凝集素(dolichos biflorus agglutinin、DBA)、ガラクトースを特異的に認識するビオチン化ピーナッツ凝集素(PNA)、ガラクトースとN-アセチルガラクトサミンを特異的に認識したビオチン化トウゴマ凝集素(RCA IまたはRAC120)、マンノースを特異的に認識するビオチン化コンカナバリンA(ConA)が挙げられる。全ての植物レクチンは、Vector Laboratories, Burlingame, CA, USAより供給される。ワサビペルオキシダーゼアビジンD(HRP Avidin D)とVECTASTAIN ABCキット(Vector Laboratories, Burlingame, C

A, USA) は第二試薬及びペルオキシダーゼの基質として用いられる。

【0152】

モノクローナル抗体の生成

BALB/cマウスは、肺癌(A549)、肝細胞癌(HEP-G2)、大腸癌(SW 6101)を代表とするヒト腫瘍細胞株由来の溶解物の混合物で免疫化した。骨髓腫細胞をヒト腫瘍抗原で免疫したマウスの脾臓細胞と融合することによってハイブリドーマ細胞を製造する。N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンをスクリーニング抗原として用い、ELISAによってN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンと結合するモノクローナル抗体を選択した。マウスの免疫、ハイブリドーマ細胞の発生、及びELISAに基づくスクリーニングのための方法は既に知られている。

10

【0153】

糖タンパク質および腫瘍抗原と結合する抗体のELISAアッセイ

モノクローナル抗体をN-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、およびヒト腫瘍抗原と結合する測定のためのELISA法が開発された。簡潔に言うと96ウェルのELISAプレートは100 μ L/ウェルのヒト腫瘍抗原(0.25 mg/mL)で2重に被覆する。陽性対照は、100 μ L/ウェル、2重で、N-アセチルグルコサミン(0.25 mg/mL)とN-アセチルガラクトサミン(0.25 mg/mL)が含まれる。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)は陰性対照として用いられる。ワサビペルオキシダーゼ(HRP)共役抗マウスIgGは二次試薬として用いられ、TMB(3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン)ペルオキシダーゼEIT基板キット(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)はHRP標識抗体の測定に用いられる。ELISA法では測定器によってOD₄₅₀で読み取った。

20

【0154】

腫瘍細胞成長のMTTアッセイ

本発明で開示されるモノクローナル抗体のヒト腫瘍細胞に対する体外阻害の測定のために、MTTアッセイが開発された。簡潔に言うと、約50%のヒト腫瘍細胞の96ウェル組織培養プレートを、異なる濃度のモノクローナル抗体と共に48時間インキュベートした。そして、各ウェルの培地を除去し、100 μ Lの新鮮な培地で培地交換を行った。各ウェルに12 mMのMTT(3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド)原液を10 μ L加え、そしてMTT原液10 μ Lを100 μ Lの単独の培地に加えて陰性対照とした。プレートを37°Cで4時間インキュベートした後、各ウェルに50 μ LのDMSOを加えてよく混合した。570 nmの吸光度を使ってプレートを読み取った。

30

【0155】

異種移植

簡潔に言うと、3~4週齢の雌のC. B-17 SCIDラット(Harlan, Madison, WI)をランダムに3つの群(群毎に3匹のマウス)に分けた。各マウスに皮下注射によって 5×10^6 個のA549細胞を接種した。次いで、細胞接種後10日目、14日目、17日目、21日目に静脈内(iv)に生理食塩水(媒介物対照)、小麦胚芽凝集素(WGA)、またはモノクローナル抗体3C4F12を毎日1回注入した。1回のWGA量は、5 μ gのWGAを生理食塩水100 μ Lに溶解したものであった。1回のモノクローナル抗体3C4F12は、50 μ gの抗体を生理食塩水100 μ Lに溶解したものであった。細胞移植後10日目から週2回腫瘍の成長を測定した。腫瘍の大きさは、下記の式を用いて計算した。

40

長さ $\times$ (幅/2) $\times 2\pi$ = 腫瘍の大きさ

【0156】

ELISAに基づく血液試験

簡潔に言うと、96ウェルプレートは、癌患者由来のヒト血清を用いて80 μ L/ウェル、2重に被覆した。陽性対照は、100 μ L/ウェル、2重にN-アセチルグルコサミ

50

ン (0.25 mg/mL) を被覆した。PBS はブランクコントロールとして用いた。MAb-1C5C9 (2~5 µg/mL、100 µL/ウェル) は抗体の測定に用いられた。ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 共役抗マウス IgG を二次試薬として用い、TMB (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) ペルオキシダーゼ EIT 基板キット (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) は HRP 標識抗体の測定に用いた。ELISA 法では測定器によって OD₄₅₀ で読み取った。OD₄₅₀ 値に基づいて結果を確定した。

【0157】

フローサイトメトリー分析

簡潔に言うと、健康な個体または癌患者由来の 100 µL の新鮮な血を、それぞれ 2 F 7 H 4、1 C 5 C 9 と 1 B 3 E 1 2 モノクローナル抗体と蛍光標識ヤギ抗マウス IgG で染色した。そして、赤血球溶解バッファにて赤血球を破壊した。フローサイトメータにより末梢血単核細胞 (PBMC) の蛍光陽性細胞を測定した。

10

【0158】

結果

上記の材料と方法で述べた植物レクチンをプローブとして用い、免疫組織化学によって正常なヒト組織および癌のヒト組織における種々の糖タンパク質の発現を検出した。N-アセチルグルコサミンを特異的に測定するビオチン化コムギ胚芽凝集素染色の代表図を図 1 に示す (それぞれ、図 1 A における正常組織と、図 1 B および図 1 C における癌隣接組織や癌組織とを比較する)。これらの実験により、骨髓、唾液腺、下垂体以外に、多数の正常なヒトの臓器は、N-アセチルグルコサミンの発現が微量しか存在しないか又は存在しないことが証明された。

20

【0159】

上記とは対照的に、N-アセチルグルコサミンは次の癌組織に発現していることが発見された。

皮膚悪性黒色腫、脳悪性乏突起神経膠腫、腎明細胞癌、皮膚基底細胞癌、咽喉癌、ホジキンリンパ腫、結腸中等度間質腫瘍、甲状腺髄様癌、皮膚扁平上皮癌。

これらの結果は表 1 で定量化されている。

【0160】

【表 1】

表 1. 癌組織上または癌組織中の GlcNAc* の発現

腫瘍組織	N=	陽性	陰性
肺癌	6	6	0
乳癌	3	3	0
胃癌	5	5	0
前立腺癌	8	7	1
膀胱癌	7	6	1
結腸癌	3	3	0
腎癌	5	4	1
子宮頸癌	4	4	0
脳悪性腫瘍	5	4	1
脳良性腫瘍	4	1	3
皮膚癌	3	3	0
甲状腺癌	3	3	0
膀胱癌	1	1	0
合計	57	50	7

* : GlcNAc=N-アセチルグルコサミン

【0161】

癌細胞の種々の糖タンパク質の発現を調べるために、形質転換した細胞株 Hep-G2 及び HEK-293 をビオチン化レクチンおよび蛍光共役ストレプトアビジンを用いて免疫蛍光アッセイで染色した。図 2 に示すように、N-アセチルグルコサミンを特異的に認識する小麦胚芽凝集素は、Hep-G2 及び HEK-293 細胞ともに強く染色されていた（図 2 A）。N-アセチルグルコサミンを特異的に認識するダイズ凝集素（SBA）で HEK-293 細胞を染色した（図 2 B）。これらの結果は、ヒト正常細胞の細胞表面に微量に発現するか又は全く発現しないことに比べて、特定の糖タンパク質、特に N-アセチルグルコサミンと N-アセチルガラクトサミンは、多くの種類のヒト癌細胞の細胞表面に高く発現している。N-アセチルグルコサミンと N-アセチルガラクトサミンは、癌細胞内に高く発現している（例えば、図 2 A : Hep-G2 細胞）ことを示している。従って、N-アセチルグルコサミンと N-アセチルガラクトサミンは、癌の治療のためのバイオマーカーや潜在的な治療標的に用いてもよい。同様に、癌や他の疾患に関連する（例えば、炎症）他の糖類関連の生物学的標的またはマーカーは、他の病変組織に対して特有の他の糖類に他のレクチンの特異的な結合を探すことにより、それはヒト、動物の健康な組織または上述のような種々の腫瘍細胞株と比べて、容易に認識される。

【0162】

実施例 2 : N-アセチルグルコサミンおよび N-アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体の生成

以上の結果は、N-アセチルグルコサミンおよび／または N-アセチルガラクトサミンがヒト癌組織および細胞株の範囲内で優先的に発現されるが、ヒト正常組織における微量しか存在しないか、又は全く発現しないという予想外の発見であることが示されている。従って、癌の疑いのある被験者の生体サンプル中の N-アセチルグルコサミンおよび／または N-アセチルガラクトサミンに結合できる分子を使用することにより、N-アセチルグルコサミンおよび／または N-アセチルガラクトサミンの存在を測定し、癌の診断のための方法が開発される。また、N-アセチルグルコサミンおよび／または N-アセチルガラクトサミンを発現する癌細胞の成長を結合かつ抑制する試薬、または N-アセチルグル

コサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンの発現と関連する経路を阻害する試薬は、潜在的に癌の治療やおよび／または予防に用いられてもよい。この目標を達成するために、本発明は、N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを特異的に認識するモノクローナル抗体について述べた。

【0163】

肺癌（A549）、肝癌（HEP-G2）、結腸癌（SW11／b）を代表とするヒト腫瘍細胞株からの溶解物の混合物でマウスを免疫化した。上述で述べたようにハイブリドーマを生成し抗体を選択した。

【0164】

得られたモノクローナル抗体は、1B3E12、3C4F12、7E6A10、1C5C9、2F7H4、7C10H11、4C8C12、7E6C12、4E1G10、8D9B12、7G1E12、および4H6H7を含んでいた。上述したELISAアッセイを用いて、N－アセチルグルコサミン、N－アセチルガラクトサミンヒト、およびヒト腫瘍抗原に対するそれらのモノクローナル抗体の特異性を測定した。様々なヒト腫瘍細胞株（SMMC-7721（肝細胞癌）、NCI-H446（小細胞肺癌）、SPC-A-1（肺腺癌）、MCF-7（乳癌）、SW11／b（結腸癌）、およびECAP-1090（食道腺癌）を含んでいる）に由来の溶解物に対する抗体反応性を測定した。表2で説明したOD_{450nm}値に基づいてサンプルに対する評価を行った。

【0165】

【表2】

ELISA 結果	OD ₄₅₀
陰性 (-)	<0.25
中間 (±)	0.25-0.30
陽性 (+)	0.31-0.49
陽性 (2+)	0.50-0.75
陽性 (3+)	0.76-0.99
陽性 (4+)	≥1.00

【0166】

ELISAに基づいて選別した結果は図3に示されている。これらの結果は、モノクローナル抗体1B3E12、3C4F12、7E6A10、1C5C9、2F7H4、7C10H11、4C8C12、7E6C12、8D9B12および7G1E12と、N－アセチルグルコサミンおよびN－アセチルガラクトサミンとの結合を示している。これらのモノクローナル抗体は、更に明らかなN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを有する複合糖質と結合する可能性がある。図3に示すように、いくつかのモノクローナル抗体はヒト腫瘍抗原にも結合することが可能である。理論に束縛されることを希望せず、これらの結果から、図3に示す腫瘍抗原は、N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミン、または明らかなN－アセチルグルコサミンまたはN－アセチルガラクトサミンを有する複合糖質のいずれかを含むことが分かる。これらの結果は、N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを認識する新規モノクローナル抗体の生成を説明している。

【0167】

実施例3：N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体による癌細胞の成長の体外での阻害

前記実施例は、N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体の生成を示している。続いてこれらの抗体が体外での種々

の癌細胞株の成長を阻害する能力を測定した。

【0168】

選択した抗体を測定するには、前記MTT成長アッセイを用いて各抗体による治療は、どのようにしてヒト癌細胞株U251（神経膠腫）、SMMC-7721（肝臓癌）、NCI-H466（小細胞肺癌）、SK-MES-1（肺扁平上皮癌）、SPC-A1（肺腺癌）、MCF-7（ヒト乳癌）、SKOV-3（ヒト卵巣癌）、およびHeLa（子宮頸癌）の増殖（例えば成長率）に影響を与えるかを調べた。各実験において、所定の抗体濃度の範囲（例えば用量）で抗体を測定した。

【0169】

図4はモノクローナル抗体2F7H4が種々のヒト細胞株の増殖に及ぼす影響を示している。複数の濃度では、2F7H4によって少なくとも50%のU251とSPC-A1細胞の細胞成長が抑制された。従って、モノクローナル抗体2F7H4は、複数のヒト癌を治療または診断できる可能性があり、神経膠腫等の脳腫瘍、腺癌等の肺癌を含むがこれに限定されない。

10

【0170】

図5はモノクローナル抗体1C5C9が種々のヒト細胞株の増殖に及ぼす影響を示している。複数の濃度では、1C5C9によって少なくとも50%のU251、SMMC、SK-MES-1とSPC-A1細胞の細胞成長が抑制された。従って、モノクローナル抗体1C5C9は、複数のヒト癌を治療または診断する可能性があり、神経膠腫等の脳腫瘍；肝臓癌；および肺扁平上皮癌や腺癌等の肺癌を含むがこれに限定されない。

20

【0171】

図6はモノクローナル抗体3C4F12が種々のヒト細胞株の増殖に及ぼす影響を示している。複数濃度で、3C4F12によって少なくとも50%のNCI-H446とSK-MES-1細胞の細胞成長が抑制された。従って、モノクローナル抗体3C4F12は、複数のヒト癌を治療または診断する可能性があり、小細胞肺癌や肺扁平上皮癌等の肺癌を含むがこれに限定されない。

【0172】

図7は種々のモノクローナル抗体がMCF-7（乳癌）、SKOV-3（卵巣癌）、およびHeLa（子宮頸癌）等のヒト細胞株の成長速度に及ぼす影響を示している。これらの結果は、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で投与する際に、モノクローナル抗体7E6C12、8D9B12、1C5C9、3C4F12、2F7H4、7C10H11によってMCF-7、SKOV-3およびHeLa細胞の細胞成長が50%超抑制された。従って、これらのモノクローナル抗体は、ヒト乳癌、卵巣癌、および子宮頸癌を治療または診断できる可能性がある。また、モノクローナル抗体1B3E12は3つの腫瘍細胞株の細胞成長を促進した。モノクローナル抗体1B3E12は、この3つの癌の治療に適していないかもしれないが、これらの癌の診断に用いることができる。

30

【0173】

図8は種々のモノクローナル抗体によるSW11/b（結腸癌）、ECAP-1090（食道腺癌）、HUTU-80（十二指腸腺癌）、HT-1080（線維肉腫）およびACC-2（唾液腺の腺様嚢胞癌）等のヒト癌細胞株の成長速度に及ぼす影響を示している。これらの結果は、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で投与する際に、モノクローナル抗体2F7H4、1C5C9、3C4F12、7C10H11、および8D9B12により、それぞれSW11/b、ECAP-1090、HUTU-80、HT-1080、およびACC-2細胞の細胞成長が50%超抑制された。そのため、これらのモノクローナル抗体は、ヒト食道癌、十二指腸癌、線維肉腫、および唾液腺癌を治療または診断できる可能性がある。

40

【0174】

以上の通り、これらの結果はN-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミン含有エピトープを認識する複数のモノクローナル抗体を様々なヒト癌細胞と結合して、その成長を阻害できることを示している。

【0175】

50

実施例 4：N－アセチルグルコサミンおよびN－アセチルガラクトサミンと結合するモノクローナル抗体による癌細胞の体内での成長の阻害

【0176】

次に、体内モデルにおいて、N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミン含有エピトープを認識するモノクローナル抗体の癌の成長を阻害する能力を測定した。

【0177】

上述したヒト癌細胞の異種移植モデルを用い、腫瘍細胞の成長については、本発明におけるモノクローナル抗体の抑制効果を測定した。その結果を図9に示す。WGAは生理食塩水と類似の効果があり、両者とも腫瘍異種移植物の成長を阻害することができなかった。対照的に、特に17日目後に異種移植物の成長が加速する時に（図9A）、モノクローナル抗体3C4F12は明らかに腫瘍異種移植物の成長を阻害することができた。このような成長率の阻害は、腫瘍異種移植物の全体的なサイズに反映されているが、3C4F12で治療された異種移植物はサイズが生理食塩水またはWGAで治療したものよりも、はるかに小さい（図9B）。

【0178】

重要であるのは、これらの結果がN－アセチルグルコサミンおよびN－アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体により、体内において癌細胞の成長を阻害できる可能性があることを示している。ヒト細胞株を用いた体外データと組み合わせて、これらの結果から、N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体は体内における多種のヒト癌のタイプの治療に広く用いられることが分かる。

【0179】

実施例 5：ELISAによる血液測定においてN－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体の応用

前記実施例には、N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンを認識するモノクローナル抗体は、どのようにしてヒト癌細胞と結合するのに用いられるかを記載したが、前記ヒト癌細胞は、これらの糖の高レベルの表面発現を特徴とする。これらの部分は、癌細胞上または癌細胞内に優先的に発現しているのみならず、更に、体液中（例えば、血液または他の分泌物を含む）に放出され、以下の実施例では、この性質を上記のように癌の予防および／または治療に使用でき、更に、癌患者の診断に使用できることを示している。

【0180】

上記ELISAアッセイにより、モノクローナル抗体1C5C9で患者血液サンプル中の抗原を測定した。これらのアッセイの等級指標は表3に示されている。

【0181】

【表3】

等級	OD ₄₅₀
陰性 (-)	<0.25
中間 (±)	0.25-0.30
陽性 (+)	0.31-0.49
陽性 (2+)	0.50-0.75
陽性 (3+)	0.76-0.99
陽性 (4+)	≥1.00

【0182】

図10に示すように、3%未満の健常者からの血液サンプルは、血液中に異なるレベル

のN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン（またはN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを有する分子）を有しているが、79.3%、70.6%、66.7%および50.0%の乳癌、肺癌、結腸癌、甲状腺癌にかかった患者の血液サンプルは、それぞれ、異なるレベルのN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン（またはN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを有する分子）を有している。

【0183】

これらのデータは、本発明の糖類関連バイオマーカーを認識するモノクローナル抗体を、様々な癌において特異的に発現して血液と他の体液や分泌液に放出される糖類関連のバイオマーカーの測定に使用できることを示した。従って、本書に記載の抗体は、診断アッセイ（例えばELISAによるもの）において、組織サンプル（例えば血液）中の癌細胞の存在を診断するために非常に有用なものである。本発明の抗体と併用して診断を行う本分野においてよく知られている他の方法は、免疫金コロイドアッセイを含むがそれに限定されない。

【0184】

実施例6：癌のフローサイトメトリーに基づく血液測定におけるN-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合するモノクローナル抗体の応用

【0185】

N-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミン等の部分が癌細胞に優先的に発現しているので、以下の実施例では、この性質を、上記のように癌の予防および／または治療のみに用いて、更に癌患者の診断に用いてもよいことを示している。

【0186】

上記の患者の血液サンプルにおける循環癌細胞を測定するための上記のフローサイトメトリーのアッセイを用いて、モノクローナル抗体2F7H4（図11）、1C5C9（図12）、および1B3E12（図13）を測定した。これらのアッセイの等級指標を図11～13に示す。このアッセイは、末梢血中に存在する癌細胞を測定するものである。理論に束縛されることを希望せず、癌細胞は、末梢血液循環しなければ測定されない場合があり、陰性結果は必ずしも個体内の癌の不存在を示していないかもしれない。

【0187】

図11はモノクローナル抗体2F7H4を用いてフローサイトメトリーのアッセイによる測定された結果を示している。モノクローナル抗体2F7H4により、10人の健常者由来の全てのPBMCにおいて、2.2%未満の細胞は、異なるレベルのN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン（またはN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを有する分子）を有しているが、肺癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌または大腸癌、食道癌、胃癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、甲状腺癌、脳腫瘍、リンパ腫にかかった患者の50%～100%のPBMCにおいて、2.3%以上細胞はそれぞれ異なるレベルのN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン（またはN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを有する分子）を有していることが測定して分かった。従って、モノクローナル抗体2F7H4は、上述したように複数のヒト癌の診断の可能性があり、特に肺癌、乳癌、結腸または大腸癌、胃癌および子宮内膜癌の診断の可能性がある。

【0188】

図12はモノクローナル抗体1C5C9を用いてフローサイトメトリーのアッセイによる測定された結果を示している。モノクローナル抗体1C5C9により、10人の健常者由来の全てのPBMC細胞（末梢血単核細胞）において、3.3%未満は異なるレベルのN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン（またはN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを有する分子）を有しているが、肺癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌または大腸癌、食道癌、子宮頸癌、甲状腺癌、膵臓癌にかかった患者由来の14%～100%のPBMC細胞において、それぞれ3.4%超は異なるレベルのN

ーアセチルグルコサミンまたはNーアセチルガラクトサミン（またはNーアセチルグルコサミンまたはNーアセチルガラクトサミンを有する分子）を有していることが測定して分かった。従って、モノクローナル抗体1C5C9は、上述したように複数のヒトの癌の診断の可能性があり、特に結腸または大腸癌及び肝臓癌の診断の可能性がある。

【0189】

図13はモノクローナル抗体1B3E12を用いてフローサイトメトリーのアッセイにより測定された結果を示す。モノクローナル抗体1B3E12により、10人の健常者由来の全てのPBMC細胞（末梢血単核細胞）において、3.2%未満は異なるレベルのNーアセチルグルコサミンまたはNーアセチルガラクトサミン（またはNーアセチルグルコサミンまたはNーアセチルガラクトサミンを有する分子）を有しているが、肝臓癌、乳癌、結腸または大腸癌、食道癌、卵巣癌、膵臓癌にかかった患者由来の30%～67%のPBMC細胞において、それぞれ3.3%超は異なるレベルのNーアセチルグルコサミンまたはNーアセチルガラクトサミン（またはNーアセチルグルコサミンまたはNーアセチルガラクトサミンを有する分子）を有していることが測定して分かった。従って、モノクローナル抗体1B3E12は、上述したように、複数のヒトの癌の診断の可能性があり、特に結腸または大腸癌及び乳癌の診断の可能性がある。

【0190】

これらのデータは、本発明の糖類関連バイオマーカーを認識するモノクローナル抗体を、患者の血液サンプルにおける循環癌細胞の測定に用いてもよい。循環癌細胞は糖類関連バイオマーカーを特異的に発現して血液と他の体液や分泌液に放出されることを示している。従って、本文に記載の抗体は、診断アッセイ（例えばフローサイトメトリー法によるもの）において、組織サンプル（例えば血液）中の癌細胞の存在を診断するために非常に有用なものである。いくつかの癌細胞増殖を阻害できない抗体は依然として測定方法に用いてもよいことに注意するべきである。例えば、本発明におけるモノクローナル抗体1B3E12は、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌の腫瘍細胞株の細胞成長を促進したが、しかし、フローサイトメトリーによる様々な癌の診断に用いられる。

【0191】

実施例7：胃腸疾患の予防と治療におけるNーアセチルグルコサミンおよび／またはNーアセチルガラクトサミンと特異的に結合するモノクローナル抗体の応用

Nーアセチルグルコサミンを炎症バイオマーカー（例えば、ロタウイルス感染によって引き起こされた腸炎症、PCT/US2009/039810参照）とすることが既に研究されていた。しかし、炎症におけるNーアセチルグルコサミンの役割とそれが胃腸疾患のための潜在的な治療標的として働くかどうか不明であった。従って、新生児ブタの急性感染性胃腸炎を予防と治療するために、NーアセチルグルコサミンおよびNーアセチルガラクトサミンと特異的に結合する抗体が測定された。

【0192】

まずモノクローナル抗体1C5C9（MAb-1C5C9）とロタウイルス感染により誘導された炎症性腸細胞との結合を測定した。出生後2日目でアカゲザルロタウイルス（RRV）（RRV感染組）の経口投与により、2つの群のbalb/c子マウスを処理した。このようなウイルス疾患の経過において、典型的にRRV感染後1週間以内に、子マウスは下痢、灰色便（alcoholic stool）、食欲不振、健康なマウスほど体重が増加しない等の症状を呈したが、30～40%の子マウスは極めて重篤な疾病にかかって、且つ黄疸になった。2週間に至って全てのマウスは、いずれも典型的に黄疸になり、良く食事することができなくなり、体重が増加することができなくなり、80%の子マウスは重篤な疾病にかかって死んだ。ウイルスは、通常、5日以内にクリアされ、5日目では測定できなくなる。治療後の異なる日の間に子マウスを殺し、血清サンプル、腸と肝臓組織のスナップ凍結とホルマリン固定組織を作製した。免疫蛍光アッセイにおいて、RRV感染後5日目のマウス由来の腸組織切片を抗体1C5C9（MAb-1C5C9）で染色し、かつ、蛍光共役抗マウスIgGを二次試薬として使った。RRVを感染させていない健康なマウスの腸組織切片は対照として使った。

【0193】

図14は、MAb-1C5C9をロタウイルスに感染したマウスの組織切片からの炎症性細胞に強く結合したことを示す(図14B)。対照的に、MAb-1C5C9はロタウイルス感染症のない健康なマウスの腸組織切片に結合しなかった(図14A)。これらのデータは、N-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミンを含有するエピトープを認識するモノクローナル抗体は腸内の炎症細胞と結合できることが示されている。

【0194】

伝染病の発生において、生後1～5日の新生児ブタはブタ流行性下痢ウイルス(PEDV)の感染によって急性感染性胃腸炎を起こした。100%新生児ブタが感染し、感染した80～90%の子豚が死亡した。このような感染には効果的な治療法がない。

10

【0195】

ウイルス感染症の予防におけるMAb-1C5C9の効果を測定するために、子豚の寝わら内で少数の子豚(1～2匹の子豚)が感染したことを観察した場合に、MAb-1C5C9(50μg)を寝わら内にいる全ての感染していない子豚に単回、経口投与した。約500匹の子豚に対してMAb-1C5C9で処理した。MAb-1C5C9で処理した非感染の子豚は一匹も感染しなかったか又は死亡しなかった。MAb-1C5C9で処理した(n=500)寝わら内の死亡率は約28%であり、エンロフロキサシン治療(n=500)に伴う寝わら内の死亡率は約81%であり、未処理の寝わら内の死亡率(n=500)は89%であった。抗生物質(エンロフロキサシン)処理または無処理のままの子豚と比べて、MAb-1C5C9の死亡率の低減に対する効果がp値<0.0001と統計的な有意性を示した(図15)。

20

【0196】

これらの結果は、MAb-1C5C9が有効であり、かつ、ウイルス感染(PEDV感染症と他の腸内ウイルスを含むがこれに限定されない)による胃腸炎予防のための抗生物質よりも優れていることを示している。

【0197】

ヒト群において、MAb-1C5C9の胃腸疾患の治療についての効果を測定した。55歳の女性(約58kg)は、下痢、血便、及び腹部の痛み等の腸炎症を呈し、4週間持続した。結腸内視鏡検査によって痔以外に異常はなかった。抗生物質(シプロフロキサシン)で一週間治療しても効果はなかった。

30

【0198】

MAb-1C5C9(2～3μg/kg、0.13mg/用量)を1日1回で10日間経口投与した。血便は2回投与後に減少したが、5回用量投与後に停止し、7回用量投与後に下痢が止まり、患者は10日間の治療後に回復した。治療後7ヵ月以内に腸炎症や痔の再発は認められなかった。

【0199】

これらの結果は、MAb-1C5C9に有効であって、かつ炎症性腸疾患、痔の治療のための抗生物質よりも優れていることを示している。まとめると、これらの結果は、N-アセチルグルコサミンおよびN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合する抗体を、例えば、ウイルス感染、炎症性腸疾患、痔等を含む炎症性疾患等の胃腸疾患の治療に用いられることを示している。

40

【0200】

実施例8：IBDのマウスモデルにおいてN-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合するヒト化抗体の測定

【0201】

前記実施例では、MAb-1C5C9による癌細胞の成長阻害、循環癌細胞の測定、IBD中の治療に有効であることが実証された。その後、MAb-1C5C9をヒト化した。以下の実施例では、共同の重鎖可変領域(VH)と異なる軽鎖可変領域(VH)を有するヒト化1C5C9変異体を述べている。多数のIBD体内動物モデルにおいて、ヒト化

50

1 C 5 C 9 抗体の効果、結合、及び毒性を測定した。

【0202】

材料と方法

ヒト化抗体と N-アセチルグルコサミン (NAG) の結合

100 μ L NAG を濃度 1 μ g/mL で 96 ウェルプレートのウェルに被覆し、且つ一晚を経過後に、洗浄してブロックした。5つのヒト化抗体のクローンを測定し、かつ、キメラ抗体 1 C 5 C 9 と比較した。テスト抗体をプレートに加えた後に、プレートを洗浄し、HRP 共役抗ヒト IgG を二次試薬として、結合を測定した。標準比色アッセイにより HRP を測定し、OD_{450nm} で結合を分析した。

【0203】

マウス IBD モデル

6～8週齢の雌の BALB/c マウス (体重 17～19 g) を急性大腸炎の誘発に用い、50%エタノールに溶解した 120 mg/mL のトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS: シグマアルドリッチ) を 0.15 mL 用量で経肛門投与した。マウスを5つの治療群に分けた。

G1: 未治療 (n=6)

G2: 動物一匹あたり 5 μ g の抗体 1 C 5-Vk2 で治療、腹腔内注射 (IP) (n=6)

G3: 動物一匹あたり 5 μ g の抗体 1 C 5-Vk2 で治療、経口 (PO) (n=6)

G4: 動物一匹あたり 2 μ g の抗体 1 C 5-Vk2 で治療、腹腔内注射 (IP) (n=6)

G5: 動物一匹あたり 5 μ g の抗体 1 C 5-Vk1 で治療、腹腔内注射 (IP) (n=6)

G2～G5 マウスの治療は、TNBS による IBD 誘発後、48時間から1日1回、4日間継続して投与した。

【0204】

IBD モデルのコースにおいて、各群のマウスの体重と臨床的な兆候を毎日記録した。IBD モデルの TNBS 誘発から 48 時間後、対照群 (G1) の 2 匹のマウスを屠殺し、全ての結腸組織を採取した。最終投与から 1 日 (24 時間) 後に、全ての動物に対する処理を終了した (コースの 7 日目)。図 18 に示すように、グロス病理 (結腸重量、潰瘍) と組織学的評価 (結腸組織切片の標準 HE 染色) のために、全ての結腸組織を採取し、代表図が得られた。図 20A に示す標準組織学的手法を用いて結腸組織病理学の性状を評価した。

【0205】

結腸組織切片と、HRP 共役抗ヒト IgG を測定試薬とする標準的な免疫組織化学的方法 (HE 染色) とを用い、治療されたマウスにおける抗体 1 C 5-VK2 の局在性を評価した。対照群マウスと比べた G2 群マウスの代表図を図 20 に示す。

【0206】

結果

5つのヒト化 1 C 5 C 9 クローンと NAG との結合を分析し、キメラ抗体 1 C 5 C 9 (即ち、ヒト Fc 領域に結合した親のマウス可変ドメイン) と比較した。図 16 では、全ての抗体は NAG に対して、用量依存的に結合することを示している。ヒト化抗体 1 C 5-VK1 と 1 C 5-VK2 を選択し、更に特性評価を行った。

【0207】

上述したように、マウスに急性大腸炎が誘発され、ヒト化 1 C 5-VK2 の投与による体重、下痢等の臨床徴候、および結腸の状態に及ぼす効果を測定した。図 17 に示す通り、結腸の状態の巨視的評価を行って、抗体治療の効果を分析した。治療群 G1～G4 におけるマウス結腸の結腸炎の存在を評価した結果を表 4 に示す。

【0208】

10

20

30

40

【表 4】

未治療の対照群に対する抗体で治療したマウスにおける結腸炎の発症率

群	結腸炎にかかった動物数	結腸炎にかかっていない動物数
G1	6	0
G2	2	4
G3	6	0
G4	6	0

10

【0209】

図17に示すように、未治療の対照群と比べて、1C5-VK2で治療してスコアを有意に減少させたことは、抗体治療によって潰瘍や炎症の病状が有意に緩解されたことを示している。

【0210】

これらの結腸サンプルから採取した代表的なグロス図を、図18Aに示す。対照群（G1）の全ての未治療マウスは、重篤な大腸炎、重大な潰瘍、炎症と組織の壊死を示した。G2群において、一つのサンプル（#1）は腸管壁の肥厚を示し、潰瘍や炎症がなく、三つのサンプル（#2、3、6）は潰瘍や炎症を示さなかった。残りの二つは潰瘍や炎症を示した。G3群の3つのサンプル（#1、2、4）は腸管壁の肥厚を示し、潰瘍や炎症がなかった。これらの結果は、1C5-VK2で治療することによって潰瘍や炎症を有意に緩解されたことを示している。

20

【0211】

このマウスIBDモデルにおける1C5-VK1抗体治療の効果を更に測定した。図18Bに示すように、代表的なグロス図は、未治療のG1対照と比べて、G5治療群における動物6匹のうち5匹は大腸炎の改善を示した。これらの結果は、1C5-VK1治療も潰瘍や炎症を緩解させることを示している。

【0212】

次に、上述した結腸組織切片の組織化学的調製（HE染色）によって代表的な病理図が得られた。図19Aは、G1～G4群からの1C5-VK2で治療したマウスの代表図を示す。全ての未治療の対照群（G1）のマウスは重篤な潰瘍や炎症を示し、上皮再生がなかった。G2群において、2つのサンプル（#1と2）の上皮再生、潰瘍のカバー（covering of the ulcer）を示し、かつ、1つのサンプル（#5）の上皮の一部の再生（矢印で示す）を示した。サンプル3、6は潰瘍や炎症を示さなかったが、1つだけサンプル（#4）は潰瘍や炎症を示した。G3群において、4つのサンプル（#1～4）は上皮再生と潰瘍の被覆（矢印）を示す。これらの図は、1C5-VK2で治療することでIBD病状を緩解し、そのうちIP注射治療の5/6（83%）のマウス及び経口投与（PO）治療の4/6（67%）のマウスは潰瘍や炎症の病状を顕著に緩解することを示している。

30

【0213】

図19Bは、G5群における1C5-VK1で治療したマウス由来の組織化学的代表図を示す。G5群において、3つのサンプルは回復（#1）または上皮再生（#3と5、矢印でハイライトされている）を示した。2つのサンプル（#2と4）も炎症の低下を示した。これらの図は、1C5-VK2で治療したマウス中の5/6（83%）のIBD病状の緩解を示している。また図19Aと19Bの組織学的データから、抗体1C5-VK1と1C5-VK2により腸上皮の再生を促進することが分かる。

40

【0214】

上述した免疫組織化学的手法を用いて、7日目に抗体1C5-VK2で治療したマウスにおける局在化を分析した。図20は、大腸炎にかかったマウスの炎症細胞（矢印は代表的な染色を示す）と再生の結腸上皮細胞において1C5-VK2が測定されたことを示し

50

ている。これは1 C 5－V K 2の投与後の炎症部位への局在化を示している。

【0 2 1 5】

実施例9：N－アセチルグルコサミンおよび／またはN－アセチルガラクトサミンと特異的に結合するヒト化抗体によるマウスの毒性と薬物動態学（P K）の測定

材料と方法

毒性試験

B A L B／c マウス、8 週齢、体重 2 2 ～ 2 4 g、ランダムに 4 つの群に分けた。群ごとに 3 匹の雄と 3 匹の雌のマウスが含まれている。各群は、以下の通り治療した。

G 1：1．0 m g／k g（2 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 静脈内（I V）投与 1 回

G 2：1．0 m g／k g（2 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 経口（P O）投与 1 回

G 3：5．0 m g／k g（1 0 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 静脈内（I V）投与 1 回

G 4：5．0 m g／k g（1 0 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 経口（P O）投与 1 回

【0 2 1 6】

治療後 1 4 日間、マウスの体重を測定した。1 4 日目では、上述のような巨視的評価と組織化学的手法により結腸サンプルを評価した。

【0 2 1 7】

薬物動態学（P K）の試験

8 週齢で体重 2 2 ～ 2 4 g の B A L B／c マウスをランダムに 4 つの群に分けた。群ごとに 3 匹の雄と 3 匹の雌のマウスが含まれている。各群は、以下の通り治療した。

G 1：1．0 m g／k g（2 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 静脈内（I V）投与 1 回

G 2：1．0 m g／k g（2 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 経口（P O）投与 1 回

G 3：5．0 m g／k g（1 0 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 静脈内（I V）投与 1 回

G 4：5．0 m g／k g（1 0 0 μ g 総用量） 1 C 5－V K 2 経口（P O）投与 1 回

【0 2 1 8】

治療後の以下の時点でマウスから血液を採取した。

5 分、0．5 時間、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、2 4 時間、及び 2 週間

血液から血清を分離し、1 0 μ L 血清＋9 0 μ L の P B S（合計 1 0 0 μ L）を 9 6 ウェルプレートで被覆し、一晚経過させた。H R P 共役抗ヒト I g G を測定試薬として用い、血清中の 1 C 5－V K 2 レベルを直接法 E L I S A にて測定した。

【0 2 1 9】

各治療群ではマウスの体重と臨床的徴候を一日おきに記録した。1 4 日目で全ての動物に対して処置を終了した。組織学的評価のために、結腸、小腸、胃、肝臓、脾臓、心臓、肺、腎臓、脾臓及び脳等の器官を集めた。

【0 2 2 0】

結果

1 C 5－V K 2 治療の毒性は、上述の通りである。図 2 1 は、未治療の対照群と比較し、2 つの異なる経路（I V と P O）を介し、2 つの異なる用量（1．0 m g／k g と 5．0 m g／k g）での治療は、マウスの体重に有意な影響はなかった。また組織学的評価は、未治療の対照群（データを示せず）と比較し、2 つの異なる経路（I V と P O）を介し、2 つの異なる用量（1．0 m g／k g と 5．0 m g／k g）での治療は、マウスにおける器官組織に重大な副作用はなかった。要するに 1 C 5－V K 2 治療時に、マウスの最小有効投与量（0．1 m g／k g）の 1 0 ～ 5 0 倍の投与量で重大な副反応は観察されなかった。ヒトに対する最小有効投与量は 0．0 0 5 m g／k g ～ 0．0 1 m g／k g である。

。

10

20

30

40

50

【0221】

また上述したように1C5-VK2投与の血清PKもELISAアッセイによって測定した。IVとPO投与の結果をそれぞれ図22と図23に示す。

【0222】

実施例10：IBDラットモデルにおけるN-アセチルグルコサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合するヒト化抗体の測定

材料と方法

50%エタノールに溶解した120mg/mLのトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS：シグマアルドリッチ）を0.25mL用量で経肛門投与し、9週齢、体重140～160gのSD雌ラットに急性大腸炎を誘発させた。下記の通り、ラットを5つの治療群に分けた。

G1：未治療

G2：125μg/kgのヒトIgGで治療し、腹腔内注射（IP）

G4：125μg/kgの1C5-Vk2で治療し、腹腔内注射（IP）

G5：122μg/kgの1C5-Vk2で治療し、皮下注射（SC）

G6：250μg/kgの1C5-Vk2で治療し、強制経口投与（PO）

G2～G6ラットの治療は、TNBSによるIBD誘発後、48時間から1日1回、4日間継続して投与した。

【0223】

用いた測定対照を下記の表5に示す。

【0224】

【表5】

ラットIBD試験の測定対照

群	動物数	測定対照	初期濃度	投与経路	投与量
G1	5	対照	N/A	N/A	N/A
G2	5	ヒトIgG	10mg/mL	IP	125μg/kg
G4	5	1C5-Vk2	1.44mg/mL	IP	125μg/kg
G5	6	1C5-Vk2	1.44mg/mL	SC	125μg/kg
G6	6	1C5-Vk2	1.44mg/mL	PO	250μg/kg

【0225】

各治療群でラットの体重および臨床徴候を毎日記録した。最後の投与から2日（48時間）後、全ての動物に対してこの処理を終了した（過程期間の8日目）。図26に示すように、グロス病理学（結腸重量、潰瘍）と組織学的評価のために結腸組織（肛門から長さ10cm）を採取し、代表図が得られた。

【0226】

結果

図24は、ラットの体重に対する抗体治療の効果を示している。未治療の対照群と比べて、全ての治療群は治療の1日目（全てのコースの4日目）から体重の増加を示した。

【0227】

図25に結腸組織サンプルの代表的な図を示す。4/5（80%）の未治療対照群（G1）のラットは、重症大腸炎及び重大な潰瘍、炎症と組織の壊死を示す。全体的に1C5-Vk2（G4、G5とG6）で治療した多数のラットは回復の兆しを、例えば、炎症の減少（より少ない炎症細胞とより少ない充血）、組織の壊死の減少、潰瘍の被覆（全体または一部）、及びより良い形態（滑らかな腸管壁）を示している。G4群において、2匹

のラット（G 4－4とG 4－5）は潰瘍や炎症を示さなかったが、1匹のラット（G 4－3）は腸管壁の肥厚、炎症の軽減と潰瘍の被覆（回復中）を示し、1匹のラット（G 4－1）は腸管壁の肥厚と炎症を示したが、潰瘍がなかった。残りのラット（G 4－2）は炎症の軽減と一部の潰瘍の被覆を示した。同様に対照ラットと比較すると、4／6（67％）のG 5ラット（G 5－1、G 5－4、G 5－5とG 5－6）は回復の兆しを示し、5／6（83％）のG 6ラット（G 6－1、G 6－2、G 6－3、G 6－4とG 6－5）は回復の兆しを示した。これらの結果は、注射（G 4組またはG 5組）または経口投与（G 6組）の1 C 5－V k 2での治療により、潰瘍性結腸炎や炎症を有意に軽減することを示唆している。

【0 2 2 8】

図 2 6 に示すように、これらの組織サンプルにおいて、結腸形態学と結腸炎病理学的症状を巨視的評価した。スコアは、抗体治療により結腸炎病変の重症度を低下させたことを示し、また未治療の対照群に比べてG 4群のスコアは統計的に有意に低い値を示した。

【0 2 2 9】

次に、秤量した各治療群の結腸の重量を長さの機能（function）とする。図 2 7 に示すように、未処置のラットの結腸重量は炎症や潰瘍により有意に増加し、1 C 5－V k 2を用いてS C（G 5）またはP O（G 6）のルートを経由して治療したラットの結腸重量を有意に増加させなかった。これらのデータは、未治療対照ラットに比べて、G 5とG 6群のラットが健常なラットの結腸により近い状態であることを示す。

【0 2 3 0】

要するに、実施例 8～10の結果は、I B D動物モデルにおけるN－アセチルグルコサミンおよびN－アセチルガラクトサミンに対するヒト化抗体による治療の有効性を示す。2つの抗体は、I B Dマウスモデルで有効性を示した。治療により潰瘍や炎症等のI B Dの病理学的徴候を緩解し、かつ、治療後に上皮の再生が観察された。

〔配列表〕

配列

説明しない限り、全てのポリペプチド配列はいずれもN末端からC末端にかける方式で提示される。

2 F 7 H 4 重鎖可変領域：

EVKLQQSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDY
TTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDWFAFWGQGTIVTVSS
(SEQ ID NO: 1)

2 F 7 H 4 軽鎖可変領域：

DIVITQTPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSPRTFGGGTKFEIK (SEQ ID
NO: 2)

1 C 5 C 9 重鎖可変領域：

EVQLEESGPPELVKPGASVKISCKASGYTFPDYNIHWVKQSHIGKSLEWIGCIYPYNGNTA
YNQKFKTKATLTVDTSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSDLYYFGSRGFVYWGQGT
ITVTVSS (SEQ ID NO: 3)

1 C 5 C 9 軽鎖可変領域：

DIVLTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISTYLNWYQQKPDGVKLLVYFSTRLLISGVPS
RFSGTGSGTDFSLTINLNDQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)

10

20

30

40

50

3 C 4 F 1 2 重鎖可変領域：

EVQLEESGGGLVKPGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGST
YYPDTVKGRTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAMYCCARRYYGSSWAMDYWGQG
TMVTVSS (SEQ ID NO: 5)

3 C 4 F 1 2 軽鎖可変領域：

DIVMTQSTKFLVLSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVP
DRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 6)

10

ヒト化 1 C 5 C 9 とパレンタル－1 C 5 C 9 H V R－H 1：
YTFPDYNIH (SEQ ID NO: 7)

ヒト化 1 C 5 C 9 H V R－H 2：
CIYPYNGNTA (SEQ ID NO: 8)

ヒト化 1 C 5 C 9 H V R－H 3：
SDLYYFGSRGFD (SEQ ID NO: 9)

ヒト化 1 C 5－V K 1 H V R－L 1：
QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 10)

20

ヒト化 1 C 5－V K 2／パレンタル－1 C 5 C 9 H V R－L 1：
RASQDISTYLN (SEQ ID NO: 11)

ヒト化 1 C 5－V K 1 H V R－L 2：
FTSNLET (SEQ ID NO: 12)

ヒト化 1 C 5－V K 2 H V R－L 2：
FTSSLQS (SEQ ID NO: 13)

30

ヒト化パレンタル－1 C 5 C 9 H V R－L 2：
FTSRLIIS (SEQ ID NO: 14)

ヒト化 1 C 5－V K 1／V K 2／パレンタル－1 C 5 C 9 H V R－L 3：
QQGNTLPW (SEQ ID NO: 15)

ヒト化 1 C 5 C 9 重鎖可変領域：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPDYNIHWVRQAPGQGLEWMGCIYPYNGN
TAYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSDLYYFGSRGFDYWGQ
GTLVTVSSA (SEQ ID NO: 16)

40

ヒト化 1 C 5 C 9 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPDYNIHWVRQAPGQGLEWMGCIYPYNGN
TAYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSDLYYFGSRGFDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

50

ヒト化 1 C 5 - V K 1 軽鎖可変領域：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGGTKLE (SEQ ID NO: 18)

ヒト化 1 C 5 - V K 1 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGGTKLERTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

10

ヒト化 1 C 5 - V K 2 軽鎖可変領域：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGGTKLE (SEQ ID NO: 20)

ヒト化 1 C 5 - V K 2 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGGTKLERTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK
ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 21)

20

ヒト化 パレンタル - 1 C 5 C 9 軽鎖可変領域：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGGTKLE (SEQ ID NO: 22)

ヒト化 パレンタル - 1 C 5 C 9 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSRLHS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGGTKLERTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSST
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)

30

2 F 7 H 4 H V R - H 1 :

FTFSDFYME (SEQ ID NO: 24)

2 F 7 H 4 H V R - H 2 :

ASRNKANDYTTEYSASVKG (SEQ ID NO: 25)

2 F 7 H 4 H V R - H 3 :

DAWFA (SEQ ID NO: 26)

2 F 7 H 4 H V R - L 1 :

KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO: 27)

40

2 F 7 H 4 H V R - L 2 :

WASTRES (SEQ ID NO: 28)

2 F 7 H 4 H V R - L 3 :

QQYYSYPR (SEQ ID NO: 29)

1 C 5 C 9 H V R - H 2 :

CIYPYNGNTAYNQKFKT (SEQ ID NO: 30)

50

1 C 5 C 9 H V R - H 3 :
SDLYYFGSRGFV (SEQ ID NO: 31)

3 C 4 F 1 2 H V R - H 1 :
FAFSSYDMS (SEQ ID NO: 32)

3 C 4 F 1 2 H V R - H 2 :
YISSGGGSTYYPD TVKG (SEQ ID NO: 33)

3 C 4 F 1 2 H V R - H 3 :
RYYYGSSWAMD (SEQ ID NO: 34)

3 C 4 F 1 2 H V R - L 1 :
KASQSVSNDVA (SEQ ID NO: 35)

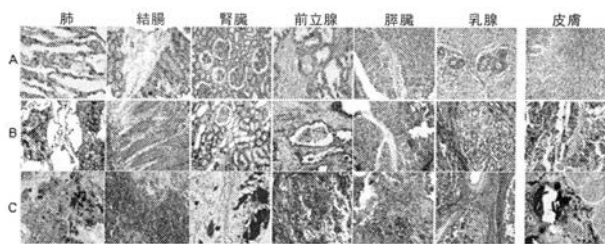
3 C 4 F 1 2 H V R - L 2 :
YASNRYT (SEQ ID NO: 36)

3 C 4 F 1 2 H V R - L 3 :
QQDYSSPY (SEQ ID NO: 37)

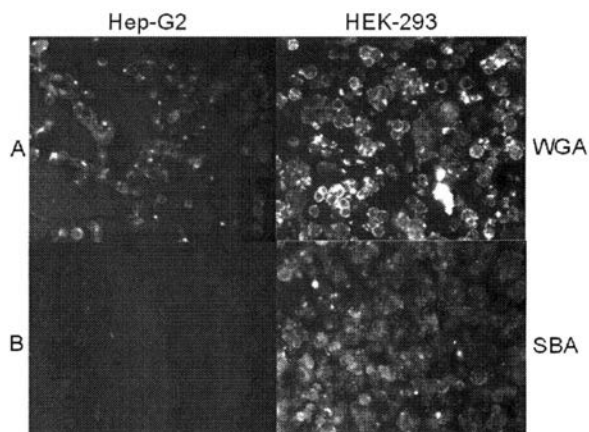
10

20

【図 1】



【図 2】



【図 3】

モノクローナル抗体とヒト腫瘍抗原との結合試験の結果											
Ad名	PBS	NAG	GalNAc	SMMC-7721	NCI-H446	SPC-A1	MCF-7	SW11/b	ECAP-1090	LCS-Ag1	LCS-Ag2
183E12	-	4+	4+	-	-	+	-	-	-	-	-
8C4F12	-	4+	4+	3+	2+	3+	±	4+	4+	4+	2+
7E6A10	-	4+	4+	-	-	+	-	-	-	2+	-
1C5C9	-	4+	4+	+	2+	2+	-	3+	2+	ND	ND
2F7H4	-	4+	3+	3+	4+	4+	4+	3+	3+	ND	ND
7C10H11	-	4+	2+	+	+	2+	±	4+	+	ND	ND
8D9812	-	2+	2+	-	+	+	+	-	-	ND	ND
4C8C12	-	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
7E6C12	-	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
7G1E12	-	4+	2+	-	-	-	-	-	-	ND	ND
4E1G10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
4H6H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND

NAG: N-アセチルグルコサミン GalNAc: N-アセチルガラクトサミン SMMC-7721: 肝臓癌
NCI-H 446: 小細胞肺癌 SPC-A1: 肺癌 MCF-7: 乳癌
SW11/b: 結腸癌 ECAP-1090: 食道癌
LCS-Ag: 肺癌にかかった患者由来の肺癌自己抗原 ND: 未実施

【図 4】

MAb-2F7H4のヒト癌細胞の抑制率(%)					
MAb (ug/ml)	U251	SMMC-7721	NCI-H446	SK-MES-1	SPC-A1
25	35	18	0	5	34
12.5	35	11	0	3	48
6.25	55	22	0	11	45
3.125	66	30	16	16	52
1.563	66	34	11	37	54
0.8	60	38	11	23	52
0.4	62	30	0	17	51
0.2	64	39	0	26	53
0.1	61	37	6	9	46
0.05	50	29	3	8	37
0.025	42	23	0	0	29
0.0125	43	17	12	0	23
0.006	37	29	11	0	17
0.003	20	4	0	0	29

U251: 神経嚢腫; SMMC: 肝臓癌; NCI-H446: 小細胞肺癌
SK-MES-1: 肺扁平上皮癌; SPC-A1: 肺癌
方法: 96ウェルプレート MTTアッセイ

【図 5】

MAb-1C5C9のヒト腫瘍細胞の抑制率 (%)					
MAb (ug/ml)	U251	SMMC-7721	NCI-H446	SK-MES-1	SPC-A1
25	18	53	0	52	38
12.5	27	42	6	67	37
6.25	50	51	17	61	35
3.125	34	36	28	76	27
1.563	30	55	28	76	23
0.8	36	78	23	77	22
0.4	41	73	19	78	48
0.2	50	72	0	68	53
0.1	61	37	4	49	56
0.05	50	29	6	38	37
0.025	52	23	0	21	29
0.0125	43	17	0	17	23
0.006	37	29	0	12	17
0.003	30	4	0	18	29

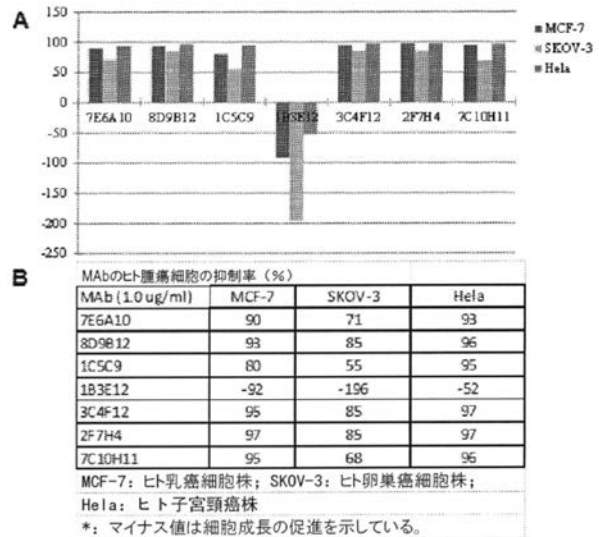
U251: 神経膠腫; SMMC: 肝臓癌; NCI-H446: 小細胞肺癌
SK-MES-1: 肺扁平上皮癌; SPC-A1: 肺腺癌
方法: 96ウェルプレート MTTアッセイ

【図 6】

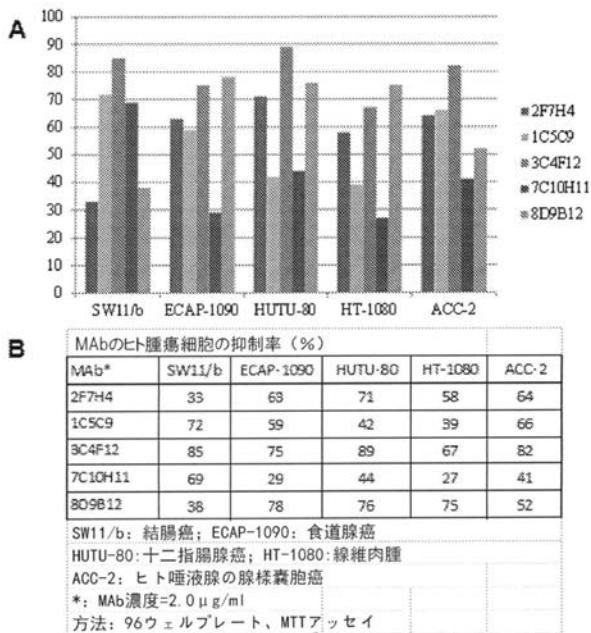
MAb-3C4F12のヒト腫瘍細胞の抑制率 (%)					
MAb (ug/ml)	U251	SMMC-7721	NCI-H446	SK-MES-1	SPC-A1
25.0	32	24	0	20	25
12.5	23	34	42	10	36
6.25	16	9	39	80	18
3.125	22	22	50	94	18
1.563	8	20	52	50	18
0.80	20	23	39	27	17
0.40	14	23	34	23	17
0.20	17	13	0	0	8

U251: 神経膠腫; SMMC: 肝臓癌; NCI-H446: 小細胞肺癌
SK-MES-1: 肺扁平上皮癌; SPC-A1: 肺腺癌
方法: 96ウェルプレート MTTアッセイ

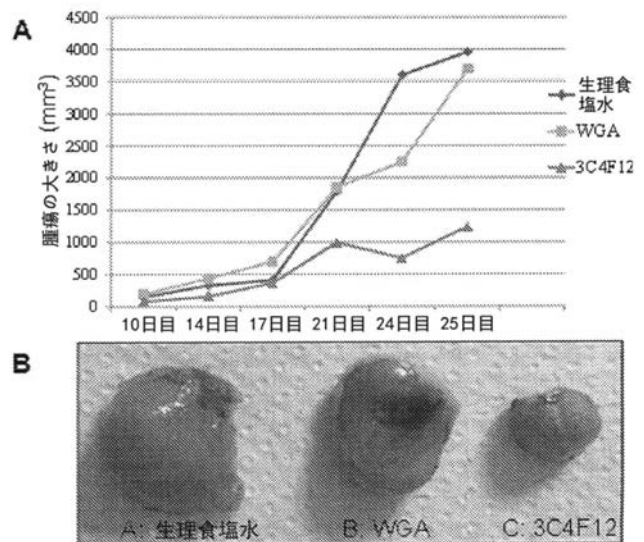
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】

血清サンプルとMAb-1C5C9のELISAアッセイの結果 (%)							
血清	N =	- / ±	+	2+	3+	4+	合計+
健康的	38	89.5	7.89	2.63	0.00	0.00	10.5
肺癌	34	2.94	23.5	47.1	17.6	8.82	97.1
乳癌	29	6.89	17.2	41.4	24.1	10.3	93.1
甲状腺癌	14	7.14	42.9	42.9	7.14	0.00	92.8
結腸癌	16	6.25	31.2	43.7	18.8	0.00	93.7

方法: 96ウェルELISAプレート、2重、MAb濃度: 2ug/ml。

【図 1 1】

モノクローナル抗体2F7H4を用いた患者と健康者由来のPBMCのフローサイトメトリックによる測定結果

級別	級別	N	- / ± (%)	+	2+	3+	4+	合計+	合計+2+
PBMC			2.2%-3.2%	3.2%-6.4%	6.5%-10.9%	11.0%-14.3%	14.3%-18.7%	%	%
健康者	10	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
肺癌	21	38.1	47.6	9.52	0.00	4.76	61.9	14.3	14.3
肝臓癌	19	47.4	42.1	10.5	0.00	0.00	52.6	10.5	10.5
乳癌	7	14.3	85.7	0.00	0.00	0.00	85.7	0.00	0.00
結腸癌/大腸癌	6	0.00	83.3	16.7	0.00	0.00	100	16.7	16.7
食道癌	5	40.0	60.0	0.00	0.00	0.00	60.0	0.00	0.00
胃癌	4	25.0	25.0	0.00	0.00	50.0	75.0	50.0	50.0
子宮内臓癌	4	25.0	50.0	25.0	0.00	0.00	75.0	25.0	25.0
子宮頸癌	3	33.3	33.3	33.3	0.00	0.00	66.7	33.3	33.3
甲状腺癌	3	33.3	66.7	0.00	0.00	0.00	66.7	0.00	0.00
脳癌	3	33.3	66.7	0.00	0.00	0.00	66.7	0.00	0.00
リンパ腫	3	33.3	66.7	0.00	0.00	0.00	66.7	0.00	0.00
骨癌	2	2 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
卵巣癌	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
皮膚癌	1	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
腎臓癌	1	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
前立腺癌	1	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND

PBMC: 末梢血単核細胞 ND: 未分析

【図 1 2】

モノクローナル抗体1C5C9を用いた患者と健康者由来のPBMCのフローサイトメトリックによる測定結果

級別	級別	N	- / ± (%)	+	2+	3+	4+	合計+	合計+2+
PBMC			2.4%-3.3%	3.4%-6.4%	6.5%-8.4%	8.5%-10.9%	11.0%-14.3%	%	%
健康者	10	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
肺癌	15	66.7	6.67	13.3	0.00	13.3	33.3	13.3	13.3
乳癌	18	46.2	17.8	7.69	0.00	7.69	58.8	15.4	15.4
肝臓癌	11	36.4	45.5	18.1	0.00	0.00	63.6	18.1	18.1
甲状腺癌	10	70.0	0.00	20.0	10.0	0.00	30.0	30.0	30.0
卵巣癌	7	85.7	0.00	0.00	0.00	14.3	14.3	14.3	14.3
食道癌	4	75.0	0.00	0.00	0.00	25.0	25.0	25.0	25.0
結腸癌/大腸癌	3	0.00	33.3	0.00	0.00	66.7	100	66.7	66.7
子宮頸癌	3	66.7	33.3	0.00	0.00	0.00	33.3	33.3	33.3
脳癌	3	66.7	0.00	0.00	33.3	0.00	33.3	33.3	33.3
骨癌	2	1 (ND)	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
胃癌	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
子宮内臓癌	1	0.00	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	ND	ND	ND
脳癌	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
リンパ腫	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
皮膚癌	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
腎臓癌	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
前立腺癌	1	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND

PBMC: 末梢血単核細胞 ND: 未分析

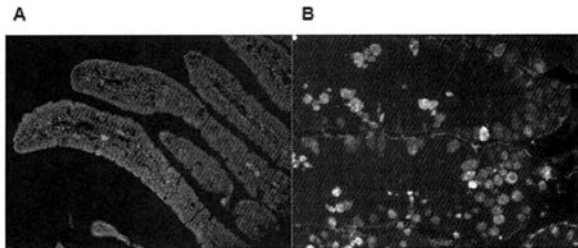
【図 1 3】

モノクローナル抗体1B3E12を用いた患者と健康者由来のPBMCのフローサイトメトリックによる測定結果

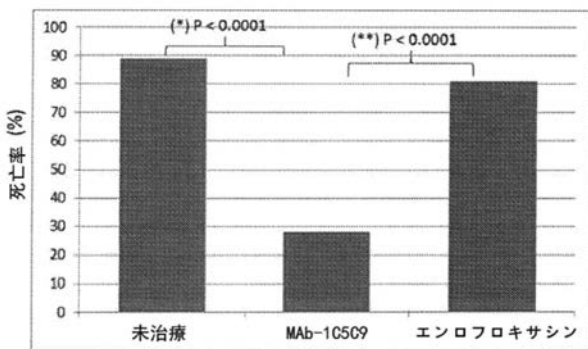
級別	級別	N	- / ± (%)	+	2+	3+	4+	合計+	合計+2+
PBMC			2.2%-3.2%	3.2%-6.4%	6.5%-10.9%	11.0%-14.3%	14.3%-18.7%	%	%
健康者	10	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
乳癌	12	50.0	33.3	16.7	0.00	0.00	50.0	16.7	16.7
肝臓癌	10	70.0	10.0	0.00	0.00	20.0	80.0	20.0	20.0
卵巣癌	7	71.4	14.3	0.00	0.00	14.3	28.6	14.3	14.3
結腸癌/大腸癌	3	33.3	0.00	33.3	0.00	33.3	66.7	33.3	33.3
食道癌	3	66.7	0.00	33.3	0.00	0.00	33.3	33.3	33.3
胃癌	2	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	1 (ND)	ND	ND	ND
肺癌	2	1 (ND)	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
子宮内臓癌	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
脳癌	1	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
リンパ腫	1	0.00	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	ND	ND	ND
皮膚癌	1	0.00	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
腎臓癌	1	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND
前立腺癌	1	1 (ND)	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND

PBMC: 末梢血単核細胞 ND: 未分析

【図 1 4】

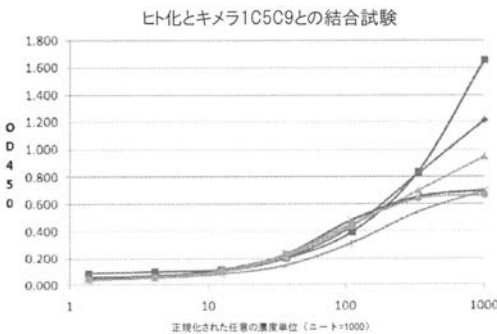


【図 1 5】

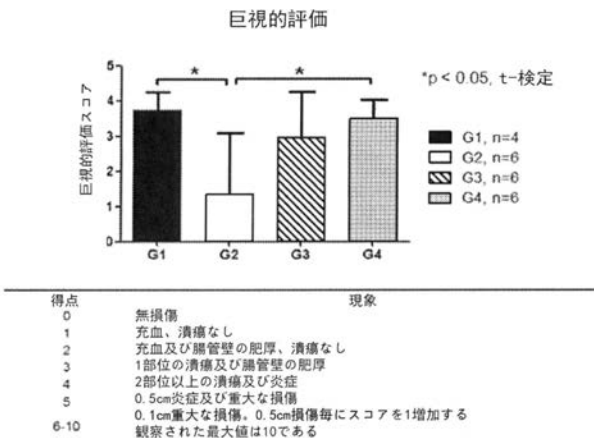


(*) 抗生物質 (エンロフロキサシン) に比べて、
MAb-1C5C9はp値<.0001の統計的有意性を示した。
(**) 未治療の子豚に比べて、MAb-1C5C9はp値<.0001
の統計的有意性を示した。

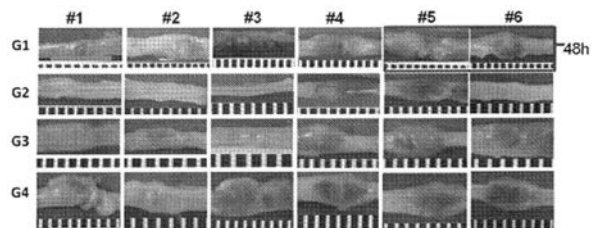
【図 1 6】



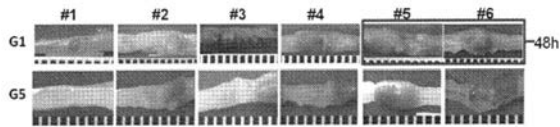
【図 1 7】



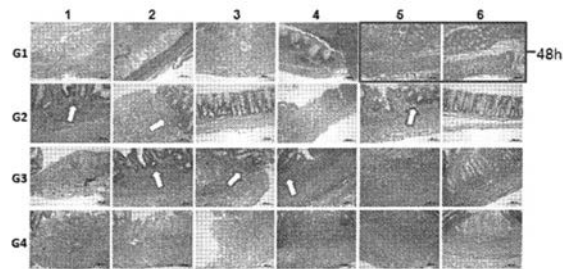
【図 1 8 A】



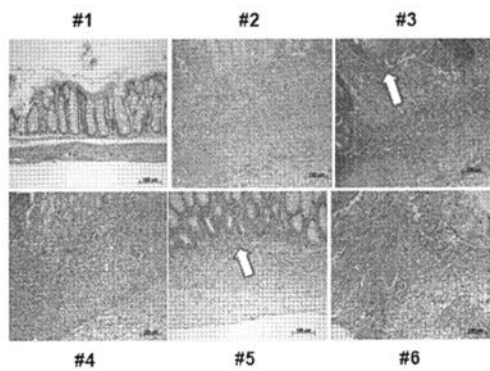
【図 18 B】



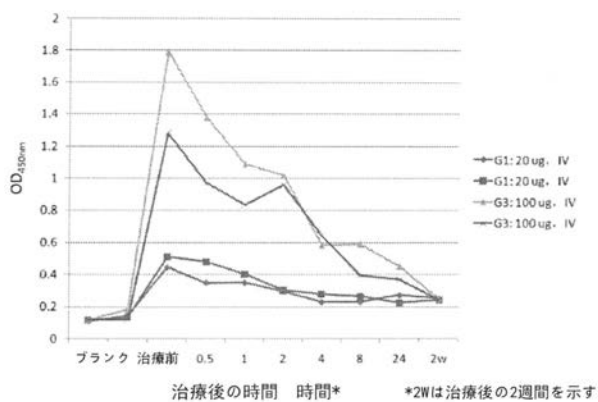
【図 19 A】



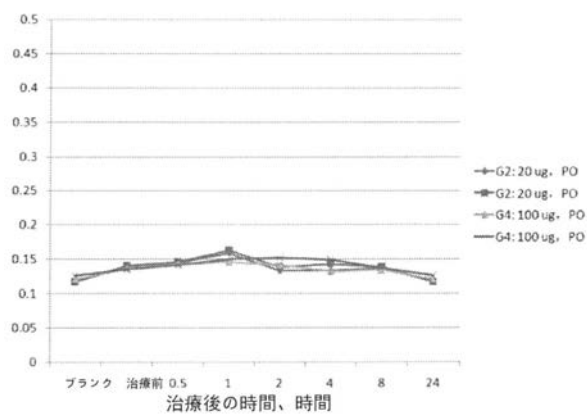
【図 19 B】



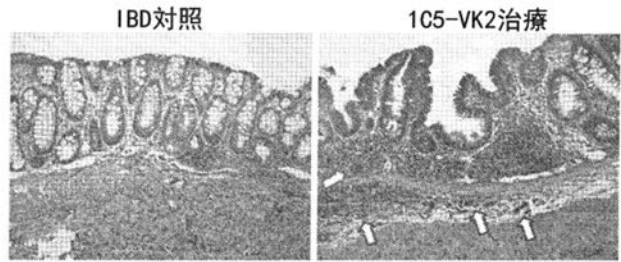
【図 22】



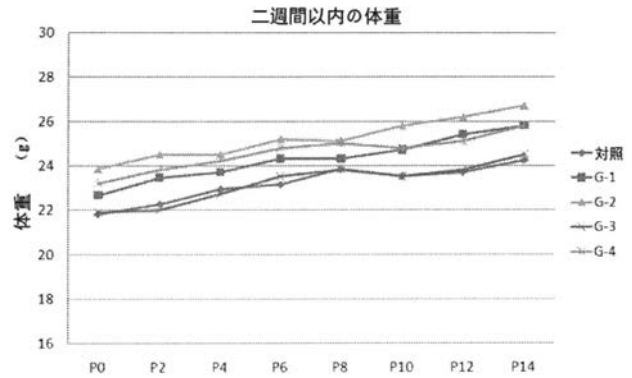
【図 23】



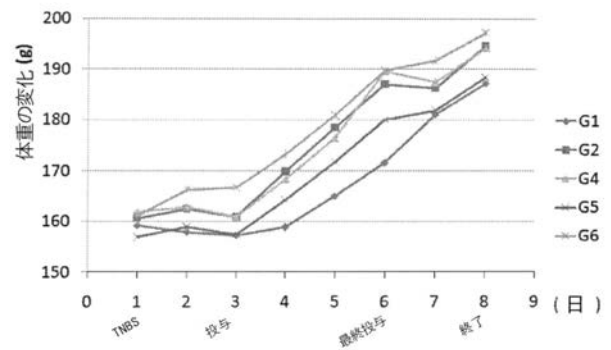
【図 20】



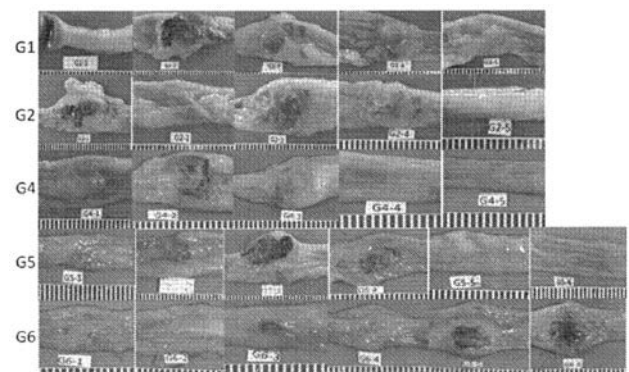
【図 21】



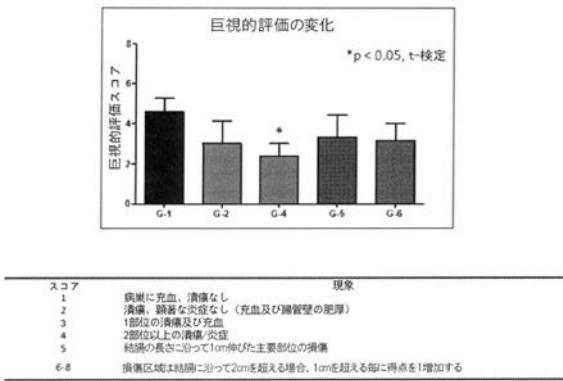
【図 24】



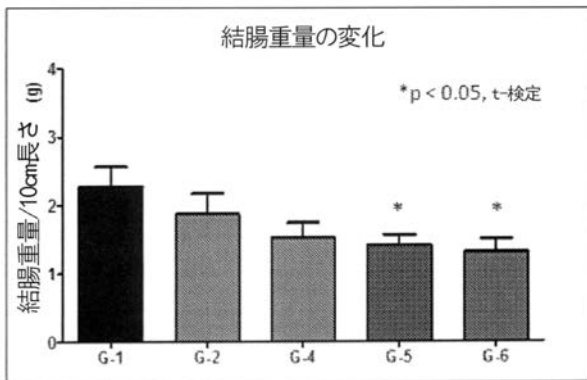
【図 25】



【図 2 6】



【図 2 7】



【配列表】

2017528131000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成29年4月24日(2017.4.24)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる単離モノクローナル抗体であって、前記エピトープは癌細胞または炎症性細胞によって発現されている単離モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記抗体はN-アセチルグルコサミンを含むエピトープ及びN-アセチルガラクトサミンを含むエピトープと特異的に結合できる請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

抗体断片である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

ヒト化抗体、ヒト抗体、またはキメラ抗体である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

前記エピトープが癌細胞の細胞表面または癌細胞内に発現している請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記癌細胞は神経膠腫細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、乳癌細胞、卵巢癌細胞、及び子宮頸部腺癌細胞よりなる群から選ばれる請求項5に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体と前記エピトープとの結合は癌細胞の成長を抑制する請求項5に記載の抗体。

【請求項 8】

前記炎症細胞は結腸炎、炎症性腸症、または胃腸炎の腸炎症性細胞であり、かつ前記エピトープが炎症細胞の細胞表面に発現している請求項1に記載の抗体。

【請求項 9】

(a) SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む重鎖可変領域、および SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む軽鎖可変領域、

(b) SEQ ID NO: 3 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む重鎖可変領域、および SEQ ID NO: 4 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む軽鎖可変領域、または

(c) SEQ ID NO: 5 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む重鎖可変領域、および SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列由来の 3 つの HVR を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

(a) SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(b) SEQ ID NO: 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(c) SEQ ID NO: 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および／または SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

請求項1に記載の抗体と薬学的に許容可能な担体を含む組成物。

【請求項 12】

請求項1に記載の抗体をコードする核酸配列を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項1に記載の抗体をコードする核酸配列を含むベクター。

【請求項 14】

請求項13に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

【請求項 15】

請求項14に記載の宿主細胞を培養して、核酸によってコードされた抗体を生成する工程、および細胞培養物から抗体を回収する工程を含む抗体の製造方法。

【請求項 16】

請求項15に記載の方法により製造される抗体。

【請求項 17】

請求項1に記載の抗体の有効量を含む組成物を個体に投与する工程を含む、個体の癌の予防または治療に用いる方法。

【請求項 18】

請求項1に記載の所定量の抗体、及び所定量の他の抗癌剤を個体に投与する工程を含み、前記抗体と前記抗癌剤とを併用することにより、個体の癌の効果的な治療と予防を提供する個体の癌の予防または治療に用いる方法。

【請求項 19】

(a) 前記個体に由来する生物サンプルを請求項1に記載の抗体と接触させる工程、および

(b) 前記抗体と前記サンプルとの結合を測定し、前記抗体と前記サンプルとの結合が

前記個体に癌細胞が存在することを示すことができる工程を含む、個体の癌細胞を測定するための方法。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の抗体の有効量を個体に投与する工程を含む、個体の胃腸疾患を治療または予防するための方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/087717

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/30(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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)

C07K 16/-; A61K 39/-; C12N 5/-; G01N 33/-; A61P 35/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, PubMed, ISI Web of Knowledge, Google, NCBI GenBank, EBI-EMBL, N-acetylglucosamine, GlcNAc, N-acetyl-galactosamine, GalNAc, cancer, inflammatory cell, inflammatory, antibody, 2F7H4, 1C5C9, 3C4F12, SEQ ID NO:1-37, treat+, prevent+, detect+, kit+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102372773 A (CHINESE ACAD. SCI. BIOPHYSICS. INST.) 14 March 2012 (2012-03-14) claims 3, 4, 5, 7, 8, description, paragraphs [0004], [0040]-[0042]	1, 3-13, 29-49, 60-79
X	BROOKS, SA et al. "Expression of alpha-GalNAc glycoproteins by breast cancers." <i>British Journal of Cancer</i> , Vol. vol.71, 31 December 1995 (1995-12-31), pages 1033-1038	1, 3-13, 29-49, 60-79
X	SEOW, Cynthia H. et al. "Novel Anti-Glycan Antibodies Related to Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Phenotype." <i>The American Journal of GASTROENTEROLOGY</i> , Vol. vol.104, 21 April 2009 (2009-04-21), pages 1426-1434	1, 3-13, 29-49, 60-79
X	US 20100254971 A1 (GLYCOMINDS LTD.) 07 October 2010 (2010-10-07) claims 30, 50	1, 3-13, 29-49, 60-79

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 November 2015

Date of mailing of the international search report

17 November 2015

Name and mailing address of the ISA/CN

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE
P.R.CHINA
6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing
100088, China

Authorized officer

LIAO, Wenying

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No. (86-10)62413867

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/087717

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JANSSON, Bo et al. "The human repertoire of antibody specificities against Thomsen-Friedenreich and Tn-carcinoma-associated antigens as defined by human monoclonal antibodies." <i>Cancer Immunol. Immunother.</i> , Vol. vol. 34, 31 December 1992 (1992-12-31), pages 294-298	1, 3-13, 29-49, 60-79
X	US 20090324617 A1 (GLYKOS FINLAND LTD.) 31 December 2009 (2009-12-31) the abstract, description, paragraph [0056]	1, 3-13, 29-49, 60-79
PX	CN 104267185 A (FAN FEIZHOU) 07 January 2015 (2015-01-07) claims 1-7, description, paragraphs [0005]-[0011]	1, 3-13, 29-49, 60-79
PX	CN 104198707 A (FAN FEIZHOU ET AL.) 10 December 2014 (2014-12-10) claims 1-9, description, paragraphs [0005]-[0016]	1, 3-13, 29-49, 60-79
PX	FAN, Zhenfu et al. "A new tumor marker: Mu-GlcNAc." <i>Labeled Immunoassays & Clin. Med.</i> , Vol. vol. 21, No. no. 5, 31 October 2014 (2014-10-31), pages 514-515	1, 3-13, 29-49, 60-79
A	Zhang, Xiaobing et al. "Protein O-GlcNAcylation and cancer." <i>TUMOR.</i> , Vol. vol. 33, No. no. 11, 30 November 2013 (2013-11-30), pages 1027-1032	1-79

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/087717

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: **35-71**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 35-43 relate to methods of treating or preating cancer in an individual, claims 44-60 relate to methods of detecing cancer cells in an individual, claims 61-71 relate to methods of treating or preaventing gastrointestinal disease in an individual, therefore claims 35-71 do not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out and based on the manufacturing of a medicament or a detecing reagent.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/087717

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102372773	A	14 March 2012	US	2013164216	A1	27 June 2013
				US	9073995	B2	07 July 2015
				WO	2012019437	A1	16 February 2012
				CN	102372773	B	05 June 2013
US	20100254971	A1	07 October 2010	WO	2005054853	A3	20 October 2005
				AU	2004294526	A1	16 June 2005
				EP	1692519	A2	23 August 2006
				CA	2546837	A1	16 June 2005
				EP	1692519	B1	02 June 2010
				US	7608414	B2	27 October 2009
				US	2006205014	A1	14 September 2006
				WO	2005054853	A2	16 June 2005
US	20090324617	A1	31 December 2009	None			
CN	104267185	A	07 January 2015	None			
CN	104198707	A	10 December 2014	None			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 7 1
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C 0 9 1
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/513	
A 6 1 K 31/407 (2006.01)	A 6 1 K 31/407	
A 6 1 K 38/06 (2006.01)	A 6 1 K 38/06	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/427 (2006.01)	A 6 1 K 31/427	
A 6 1 K 31/58 (2006.01)	A 6 1 K 31/58	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 D	
C 0 7 H 19/067 (2006.01)	C 0 7 H 19/067	
C 0 7 D 239/553 (2006.01)	C 0 7 D 239/553 A	
C 0 7 D 487/14 (2006.01)	C 0 7 D 487/14	
C 0 7 D 305/14 (2006.01)	C 0 7 D 305/14	
C 0 7 D 493/04 (2006.01)	C 0 7 D 493/04	
C 0 7 J 71/00 (2006.01)	C 0 7 J 71/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100125173

弁理士 竹岡 明美

(72)発明者 ワン, フゥイルー

中華人民共和国 1 0 2 2 0 9 ベイジン, チャンピン, ベイチージア タウン, ディンシー ロード, # 3 0 9, ベイジンイーヤンフアン, ビルディング 2 3

F ターム(参考) 4B064 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA01Y AA99Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C048 TT08 UU01 XX01

4C050 AA01 AA07 BB01 CC04 DD01 EE02 FF02 GG03 GG04 HH01

4C057 BB02 CC03 DD01 LL17 LL18

4C071 AA01 BB01 CC12 DD35 EE02 FF18 GG01 GG05 HH05 HH08

HH09 JJ04 LL01

4C084 AA02 DA28 MA02 NA05 ZA68 ZB26 ZC75

4C085 AA14 DD62 EE01 EE03

4C086 AA01 AA02 BA02 BA17 BC43 CB03 DA12 EA17 MA02 MA04

MA07 NA05 ZA68 ZB26 ZC75

4C091 AA01 BB03 BB05 CC01 DD01 EE07 FF01 GG01 HH01 JJ03

	KK12	LL01	MM03	NN12	PA03	PA05	PA09	PB02	QQ07	QQ15
4C206	AA01	AA02	JB16	MA02	MA04	MA11	NA05	ZA68	ZB26	ZC75
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	DA76	EA28	EA51	FA74		