

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-533998
(P2024-533998A)

(43)公表日 令和6年9月18日(2024.9.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	2 G 0 4 5
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	4 C 0 8 4
A 6 1 K	38/28 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 5
A 6 1 K	38/43 (2006.01)	A 6 1 K	38/28		4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全77頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-508333(P2024-508333)			(71)出願人	518056003
(86)(22)出願日	令和4年8月10日(2022.8.10)				ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ
(85)翻訳文提出日	令和6年4月8日(2024.4.8)				アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1
(86)国際出願番号	PCT/US2022/074785				2 1 8、ボルチモア、ノース・チャール
(87)国際公開番号	WO2023/019186				ズ・ストリート 3 4 0 0
(87)国際公開日	令和5年2月16日(2023.2.16)			(74)代理人	100189131
(31)優先権主張番号	63/231,694				弁理士 佐伯 拓郎
(32)優先日	令和3年8月10日(2021.8.10)			(74)代理人	100182486
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 中村 正展
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(74)代理人	100147289
					弁理士 佐伯 裕子
				(72)発明者	チャタジー, スプロト
					アメリカ合衆国 2 1 0 0 4 メリーラン
					ド州 コロンビア, セプリング ドライブ
					6 0 9 8 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌の治療のための組成物及び方法

(57)【要約】
結腸直腸癌又は異常レベルのβ-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β-1, 4-G a l T-V)に関連する疾患等の癌の予防及び治療における組成物は、少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤を含む。
【選択図】 図 1-1

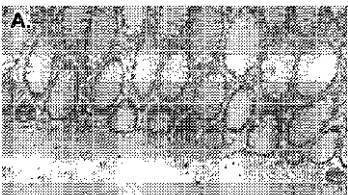


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療有効量の抗体を含む医薬組成物であって、前記抗体が、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、前記抗体が、

EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQ
RPGQG LEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSSSTA
YMQ LNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS (配列番
号 3) と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は
DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN
WLLQRPQGQSPKRLIYL VSKLGS GVPDRFTGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号 4
) と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む、医薬組成物。

10

【請求項 2】

治療有効量の抗体を含む医薬組成物であって、前記抗体が、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、前記抗体が、

EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQ
RPGQG LEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSSSTA
YMQ LNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS (配列番
号 3) と少なくとも 85% のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は
DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN
WLLQRPQGQSPKRLIYL VSKLGS GVPDRFTGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号 4
) と少なくとも 85% のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む、医薬組成物。

20

【請求項 3】

治療有効量の抗体を含む医薬組成物であって、前記抗体が、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、前記抗体が、

EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQ
RPGQG LEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSSSTA
YMQ LNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS (配列番
号 3) と少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は
DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN
WLLQRPQGQSPKRLIYL VSKLGS GVPDRFTGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号 4
) と少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む、医薬組成物。

30

【請求項 4】

前記抗体が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 5】

前記抗体が、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

1 つ以上の二次治療剤を更に含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記 1 つ以上の二次治療剤が、化学療法剤、抗炎症剤、コレステロール低下剤、インスリン、抗体、ペプチド、酵素、アジュバント又はそれらの組合せを含む、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

50

前記抗体を、検出可能な薬剤、放射線治療剤、毒素、放射性薬剤、色素、ペプチド、ポリヌクレオチド又はナノリポソームにコンジュゲートさせることを更に含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記医薬組成物が、1 つ以上の治療剤を含むナノリポソームを含む、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

I G A Q V Y E Q V L R S A Y A K R N S S V N D（配列番号 5）と少なくとも 80 % の配列同一性を有するペプチドを更に含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 11】

I G A Q V Y E Q V L R S A Y A K R N S S V N D（配列番号 5）と少なくとも 90 % の配列同一性を有するペプチドを更に含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記抗体がヒト化されている、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合することができる、ヒト化抗体が提供される。

20

【請求項 14】

請求項 13 に記載のヒト化抗体を含む、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

発現ベクターであって、g a a g t t c a g c t g g a g c a g t c t g g g g c t g a a c t g g c t a g a c c t g g g g c t t c a g t g a a g t t g t c c t g t a g g a c t t c t g g c t a c a c c t t t a c a a a c t a c t g g a t g c a g t g g a t t a a a c a g a g g c c t g g a c a g g g t c t g g a a t g g a t t g g g g c t a t g c a t c c t g g a c g t g c g t a t a t t a g g t a c a a c c a g a a g t t c c a g g g c a a g g c c a c a t t g a c t g c a g a t a a a t c c t c c a g c a c a g c t t a c a t g c a a c t c a a c a g c t t g g c a t c t g a g g a c t c t g c g g t c t a t t a c t g t g c a a g a t g g a g t g a c t a c g a c t a c t g g g g t c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c t c a（配列番号 1）と少なくとも 80 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列を含む、発現ベクター。

30

【請求項 16】

発現ベクターであって、g a a g t t c a g c t g g a g c a g t c t g g g g c t g a a c t g g c t a g a c c t g g g g c t t c a g t g a a g t t g t c c t g t a g g a c t t c t g g c t a c a c c t t t a c a a a c t a c t g g a t g c a g t g g a t t a a a c a g a g g c c t g g a c a g g g t c t g g a a t g g a t t g g g g c t a t g c a t c c t g g a c g t g c g t a t a t t a g g t a c a a c c a g a a g t t c c a g g g c a a g g c c a c a t t g a c t g c a g a t a a a t c c t c c a g c a c a g c t t a c a t g c a a c t c a a c a g c t t g g c a t c t g a g g a c t c t g c g g t c t a t t a c t g t g c a a g a t g g a g t g a c t a c g a c t a c t g g g g t c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c t c a（配列番号 1）と少なくとも 90 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列を含む、発現ベクター。

40

【請求項 17】

前記ベクターが、配列番号 1 に示される核酸配列を含む、請求項 15 又は 16 に記載の発現ベクター。

【請求項 18】

発現ベクターであって、g a t g t t g t g a t g a c c c a g a c t c c a c t c a

50

c t t t g t c g g t t a c c a t t g g a c a a c c a g c c t c c a t c t c t t g
c a a g t c a a g t c a g a g c c t c t t a g a t a g t g a t g g a a a g a c a
t a t t t g a a t t g g t t g t t a c a g a g g c c a g g c c a g t c t c c a a
a g c g c c t a a t c t a t c t g g t g t c t a a a c t g g g c t c t g g a g t
c c c t g a c a g g t t c a c t g g c a g t g g a t c a g g g a c a g a t t t c
a c a c t g a a a a t c a g c a g a g t g g a g g c t g a g g a t t t g g g a g
t t t a t t a t t g c t g g c a a g g t a c a c a t t t t c c t c g g a c g t t
c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a a t c a a a c g g (配列番号2)と少
なくとも80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む、発現ベクター。

【請求項19】

発現ベクターであって、g a t g t t g t g a t g a c c c a g a c t c c a c t c a
c t t t g t c g g t t a c c a t t g g a c a a c c a g c c t c c a t c t c t t g
c a a g t c a a g t c a g a g c c t c t t a g a t a g t g a t g g a a a g a c a
t a t t t g a a t t g g t t g t t a c a g a g g c c a g g c c a g t c t c c a a
a g c g c c t a a t c t a t c t g g t g t c t a a a c t g g g c t c t g g a g t
c c c t g a c a g g t t c a c t g g c a g t g g a t c a g g g a c a g a t t t c
a c a c t g a a a a t c a g c a g a g t g g a g g c t g a g g a t t t g g g a g
t t t a t t a t t g c t g g c a a g g t a c a c a t t t t c c t c g g a c g t t
c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a a t c a a a c g g (配列番号2)と少
なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む、発現ベクター。

【請求項20】

前記ベクターが、配列番号2に示される核酸配列を含む、請求項19に記載の発現ベクター。

【請求項21】

発現ベクターであって、(i)配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列と、(ii)配列番号2と少なくとも80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列とを含む、発現ベクター。

【請求項22】

発現ベクターであって、(i)配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列と、(ii)配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列とを含む、発現ベクター。

【請求項23】

発現ベクターであって、(i)配列番号3と少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列と、(ii)配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列とを含む、発現ベクター。

【請求項24】

(i)配列番号3を含む重鎖可変領域配列核酸配列と、(ii)配列番号2を含む軽鎖可変領域配列核酸配列とを含む、請求項23に記載の発現ベクター。

【請求項25】

合成ペプチドであって、配列番号5と少なくとも80%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む、合成ペプチド。

【請求項26】

合成ペプチドであって、配列番号5と少なくとも90%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む、合成ペプチド。

【請求項27】

前記ペプチドが、配列番号5を含む、請求項26に記載の合成ペプチド。

【請求項28】

医薬組成物であって、配列番号5と少なくとも90%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む治療有効量の合成ペプチドと、少なくとも1つのアジュバントとを含む、医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

前記合成ペプチドが、配列番号 5 を含む、請求項 28 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

医薬組成物であって、治療有効量の

(i) (a) 配列番号 3 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列、及び／又は (b) 配列番号 2 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む抗体、

(ii) 配列番号 5 と少なくとも 80 % のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む合成ペプチド、

(iii) アジュバント又は薬学的に許容され得る担体、
を含む、医薬組成物。

10

【請求項 31】

医薬組成物であって、治療有効量の

(i) (a) 配列番号 3 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列、及び／又は (b) 配列番号 2 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む抗体、

(ii) 配列番号 5 と少なくとも 90 % のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む合成ペプチド、

(iii) アジュバント又は薬学的に許容され得る担体、
を含む、医薬組成物。

20

【請求項 32】

前記抗体が、(a) 配列番号 3 を含む重鎖可変領域核酸配列、及び (b) 配列番号 2 を含む軽鎖可変領域核酸配列と、配列番号 5 を含む合成ペプチドアミノ酸配列とを含む、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

医薬組成物であって、治療有効量の

(a) 抗体であって、前記抗体が、 $\beta-1, 4$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ V ($\beta-1, 4$ -GalT-V) エピトープに特異的に結合し、前記抗体が、

(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTF TNYWMQW
IKQRP GQG LEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSS
STAYMQLNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS (配列番号 3) と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は

30

(ii) DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK
TYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVS KLGS GVPDRFTGSGSGTD
FTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号 4) と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列と、

(b) 治療有効量の少なくとも 1 つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤と
を含む、医薬組成物。

【請求項 34】

40

医薬組成物であって、治療有効量の

(a) 抗体であって、前記抗体が、 $\beta-1, 4$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ V ($\beta-1, 4$ -GalT-V) エピトープに特異的に結合し、前記抗体が、

(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTF TNYWMQW
IKQRP GQG LEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSS
STAYMQLNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS (配列番号 3) 少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は

(ii) DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK
TYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVS KLGS GVPDRFTGSGSGTD

50

F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P R T F G G G T K L E I K R (配列番号 4) と少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列と、

(b) 治療有効量の少なくとも 1 つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 35】

前記抗体が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含む、請求項 33 又は 34 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記抗体が、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含む、請求項 33 ~ 35 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

フィンゴ糖脂質合成の前記少なくとも 1 つの阻害剤が、生分解性ポリマーによってカプセル化されていないか、又はカプセル化されている、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D-PDMP)、(1R, 2R)-ノナン酸 (2-(2', 3-ジヒドロ-ベンゾ (1, 4) ジオキシ-6'-イル)-2-ヒドロキシ-1-ピロリジン-1-イルメチル-エチル)-アミド-L-酒石酸塩 (Genz-123346)、イミド糖、1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (DMP)、1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (PPMP)、脂質、セラミド、又はそれらの組合せを含む、請求項 33 ~ 36 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

前記スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤が、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D-PDMP) である、請求項 33 ~ 36 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

前記生分解性ポリマーが、ポリエチレングリコール及びセバシン酸からなる、請求項 37 又は 38 に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) に対する免疫応答を、それを必要とする対象において生じさせる方法であって、治療有効量の、配列番号 5 と少なくとも 80% のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列と、アジュバントと、を含む、方法。

【請求項 41】

β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) に対する免疫応答を、それを必要とする対象において生じさせる方法であって、配列番号 5 と少なくとも 90% のアミノ酸配列を有する治療有効量のアミノ酸配列と、アジュバントと、を含む、方法。

【請求項 42】

結腸直腸癌を治療する方法であって、結腸直腸癌に罹患しているか、又は結腸直腸癌に罹患しやすい対象に、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合する抗体を投与することを含む、結腸直腸癌を治療する方法。

【請求項 43】

結腸直腸癌を治療する方法であって、結腸直腸癌に罹患しているか、又は結腸直腸癌に罹患しやすい対象に、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合するヒト化抗体を投与することを含む、結腸直腸癌を治療する方法。

【請求項 44】

結腸直腸癌を治療する方法であって、結腸直腸癌に罹患しているか、又は結腸直腸癌に罹患しやすい対象に、請求項 1 ~ 39 のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、発現ベ

10

20

30

40

50

クター又はペプチドを投与することを含む、結腸直腸癌を治療する方法。

【請求項 4 5】

結腸直腸癌を治療する方法であって、(a) 配列番号 3 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列、及び／又は (b) 配列番号 2 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む抗体を含む医薬組成物を対象に投与することを含む、結腸直腸癌を治療する方法。

【請求項 4 6】

結腸直腸癌を治療する方法であって、(a) 配列番号 3 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列、及び／又は (b) 配列番号 2 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む抗体を含む医薬組成物を対象に投与することを含む、結腸直腸癌を治療する方法。

【請求項 4 7】

前記対象が結腸直腸癌に罹患していると同定され、前記同定された対象に前記医薬組成物、発現ベクター又はペプチドが投与される、請求項 4 1 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記抗体が、(a) 配列番号 3 を含む重鎖可変領域核酸配列、及び／又は (b) 配列番号 2 を含む軽鎖可変領域核酸配列を含む、請求項 4 1 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

配列番号 5 と少なくとも 80 % のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む治療有効量の合成ペプチドと、少なくとも 1 つのアジュバントを投与することを更に含む、請求項 4 1 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

配列番号 5 と少なくとも 90 % のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む治療有効量の合成ペプチドと、少なくとも 1 つのアジュバントを投与することを更に含む、請求項 4 1 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記合成ペプチドが、配列番号 5 を含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

化学療法剤、放射線療法、毒素又はそれらの組合せを投与することを更に含む、請求項 4 1 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

生分解性ポリマーによってカプセル化されていないか、又はカプセル化されている、D-トリオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D-PDMP)、(1R, 2R)-ノナン酸 (2-(2', 3-ジヒドロベンゾ (1, 4) ジオキシ-6'-イル)-2-ヒドロキシ-1-ピロリジン-1-イルメチル-エチル)-アミド-L-酒石酸塩 (Genz-123346)、イミド糖、1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (DMP)、1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (PPMP)、脂質、セラミド、又はそれらの組合せを含む少なくとも 1 つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤を投与することを更に含む、請求項 4 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

D-トリオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D-PDMP) であるスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤が投与される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記生分解性ポリマーが、ポリエチレングリコール及びセバシン酸からなる、請求項 5 3 又は 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

糖尿病、アテローム性動脈硬化症、肥満、自己免疫疾患、又は異常なレベルの $\beta-1$ ，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$ ，4-GaLT-V)に関連する疾患を治療する方法であって、それを必要とする対象に、請求項1～39のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、発現ペクター若しくはペプチド、又はそれらの組合せを投与することを含む、方法。

【請求項57】

結腸直腸癌を診断及び治療する方法であって、

対象の生物学的試料中の $\beta-1$ ，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$ ，4-GaLT-V)及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することであって、健常対象と比較した場合に、 $\beta-1$ ，4-GaLT-V及び／又はGSLレベルの増加が上昇しており、 $\beta-1$ ，4-GaLT-V及び／又はGSLレベルの上昇が結腸直腸癌の診断である、対象の生物学的試料中の $\beta-1$ ，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$ ，4-GaLT-V)及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することと、

結腸直腸癌と診断された前記対象に、請求項1～39のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、発現ペクター若しくはペプチド、又はそれらの組合せを投与することと、それにより、結腸直腸癌を治療することと、

を含む、結腸直腸癌を診断及び治療する方法。

【請求項58】

$\beta-1$ ，4-GaLT-V及び／又はGSLレベルと組み合わせて結腸直腸癌腫瘍マーカーのレベルを測定することを更に含む、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

結腸直腸癌腫瘍マーカーが、NMT-1、APC、p53及びそれらの組合せを含む、請求項57記載の方法。

【請求項60】

対象における結腸直腸癌の進行及び治療を監視する方法であって、

結腸直腸癌と診断された前記対象に、請求項1～39のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、発現ペクター若しくはペプチド、又はそれらの組合せを投与することと、

対象の生物学的試料中の $\beta-1$ ，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$ ，4-GaLT-V)及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することであって、ベスラインと比較した場合の $\beta-1$ ，4-GaLT-V及び／又はGSLレベルの低下が、結腸直腸癌細胞の減少及び結腸直腸癌の治療を示す、対象の生物学的試料中の $\beta-1$ ，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$ ，4-GaLT-V)及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することと、

それにより、結腸直腸癌の進行及び治療を監視することと、

を含む、対象における結腸直腸癌の進行及び治療を監視する方法。

【請求項61】

前記対象に投与される前記組成物の前記用量が、前記結腸直腸癌の進行に基づいて調節される、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

黄斑変性症に罹患しているか、又は黄斑変性症に罹患しやすい対象を治療する方法であって、有効量の請求項1～39のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、発現ペクター若しくはペプチド、又はそれらの組合せを前記対象に投与することを含む、黄斑変性症に罹患しているか、又は黄斑変性症に罹患しやすい対象を治療する方法。

【請求項63】

前記対象が黄斑変性に罹患していると同定され、前記医薬組成物、ペプチド若しくは発現ペクター又はそれらの組合せが前記同定された対象に投与される、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

アルツハイマー病に罹患しているか、又はアルツハイマー病に罹患しやすい対象を治療する方法であって、有効量の請求項1～39のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、

10

20

30

40

50

発現ベクター若しくはペプチド、又はそれらの組合せを前記対象に投与することを含む、アルツハイマー病に罹患しているか、又はアルツハイマー病に罹患しやすい対象を治療する方法。

【請求項 65】

前記対象がアルツハイマー病に罹患していると同定され、前記医薬組成物、ペプチド若しくは発現ベクター又はそれらの組合せが前記同定された対象に投与される、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

片頭痛若しくは片頭痛の疼痛に罹患しているか、又は片頭痛若しくは片頭痛の疼痛に罹患しやすい対象を治療する方法であって、有効量の請求項 1～39 のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、発現ベクター若しくはペプチド、又はそれらの組合せを前記対象に投与することを含む、片頭痛若しくは片頭痛の疼痛に罹患しているか、又は片頭痛若しくは片頭痛の疼痛に罹患しやすい対象を治療する方法。

【請求項 67】

前記対象が片頭痛又は片頭痛の疼痛に罹患していると同定され、前記医薬組成物、ペプチド若しくは発現ベクター又はそれらの組合せが前記同定された対象に投与される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

メタボリックシンドロームに罹患しているか、又はメタボリックシンドロームに罹患しやすい対象を治療する方法であって、有効量の請求項 1～39 のいずれか一項に記載の医薬組成物、抗体、発現ベクター若しくはペプチド、又はそれらの組合せを前記対象に投与することを含む、メタボリックシンドロームに罹患しているか、又はメタボリックシンドロームに罹患しやすい対象を治療する方法。

【請求項 69】

前記対象がメタボリックシンドロームに罹患していると同定され、前記医薬組成物、ペプチド若しくは発現ベクター又はそれらの組合せが前記同定された対象に投与される、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

前記対象がヒトである、請求項 40～69 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2021年8月10日に出願された米国仮出願第 63 / 231, 694 号の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

実施形態は、スフィンゴ糖脂質合成を阻害する組成物、及び結腸直腸癌等の癌の治療におけるそれらの使用に関する。

【0003】

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する記載

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号 HL 107153 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

結腸直腸癌 (CRC) は、140 万人を超えて罹患し、世界中で 69 万人を超える死亡を引き起こし (P. Favoriti, et al., Worldwide burden of colorectal cancer: a review, Updates Surg. 68 (1) (2016) 7-11. doi.org/10.1007/s13304-016-0359-y. H. Brenner, et al., Colorectal cancer, Lancet. 383 (9927) (2014) 1490-1502. doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9.

Ferlay, I. et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer*. 136 (5) (2015) E359–E386. doi.org/10.1002/ijc.29210. M. Arnold, et al., Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *Gut*. 66 (4) (2017) 683–691. doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912)、全癌型の有病率で3番目である(H. Brenner, C. Stock, M. Hoffmeister, Colorectal cancer screening: the time to act is now, *BMC Med*. 13 (2015) 262. doi.org/10.1186/s12916-015-0498-x)。現在のCRC早期検出方法は、利用可能性が限られていること、患者のコンプライアンスが低いこと、及び検査特異度が低いこと(T. Tanaka, et al., Biomarkers for colorectal cancer, *Int. J. Mol. Sci*. 11 (9) (2010) 3209–3225. doi.org/10.3390/ijms11093209. S. Hundt, U. Haug, H. Brenner, Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 16 (10) (2007) 1935–1953. doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0994. K. Simon, V. Balchen, Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin. Interv. Aging*. 11 (2016) 967–976. doi.org/10.2147/CIA.S109285. T. F. Imperiale, et al., Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening, *N. Engl. J. Med*. 370 (2014) 1287–1297. doi.org/10.1056/NEJMoa1311194)によって課題がある。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】P. Favoriti, et al., Worldwide burden of colorectal cancer: a review, *Updates Surg*. 68 (1) (2016) 7–11. doi.org/10.1007/s13304-016-0359-y.

【非特許文献2】H. Brenner, et al., Colorectal cancer, *Lancet*. 383 (9927) (2014) 1490–1502. doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9.

【非特許文献3】Ferlay, I. et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer*. 136 (5) (2015) E359–E386. doi.org/10.1002/ijc.29210.

【非特許文献4】M. Arnold, et al., Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *Gut*. 66 (4) (2017) 683–691. doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912

【非特許文献5】H. Brenner, C. Stock, M. Hoffmeister, Colorectal cancer screening: the time to

act is now, BMC Med. 13 (2015) 262. doi.org/10.1186/s12916-015-0498-x

【非特許文献6】T. Tanaka, et al., Biomarkers for colorectal cancer, Int. J. Mol. Sci. 11 (9) (2010) 3209-3225. doi.org/10.3390/ijms11093209.

【非特許文献7】S. Hundt, U. Haug, H. Brenner, Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 16 (10) (2007) 1935-1953. doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0994.

【非特許文献8】K. Simon, V. Balchen, Colorectal cancer development and advances in screening. Clin. Interv. Aging. 11 (2016) 967-976. doi.org/10.2147/CIA.S109285.

【非特許文献9】T. F. Imperiale, et al., Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening, N. Engl. J. Med. 370 (2014) 1287-1297. doi.org/10.1056/NEJMoa1311194

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の実施形態は、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤を含む組成物及び使用方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

第1の態様において、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合することができるヒト化抗体が提供される。

【0008】

本発明のヒト化抗体は、癌、特にGalT-Vを過剰発現する癌、例えば結腸直腸癌、腎癌及び神経芽細胞腫に対する治療に特に有用である。

【0009】

第2の態様において、癌を治療する方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の抗体を含む組成物を投与することを含み、抗体は、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、抗体は、(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQRP GQG LEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQGKATLTADKSSSTAYMQLNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS (配列番号3) と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は、(ii) DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRP GQSPKRLIYLVSKLGS GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号4) と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む。好ましくは、治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤も対象に投与される。

【0010】

第3の態様において、癌を治療する方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の抗体を含む組成物を投与することを含み、抗体は、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV (β -1, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、抗体は、(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQRP

PGQGLEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQGKATLTADKSSSTAY
MQLNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS（配列番号
3）と少なくとも83、84、85、86、又は87%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は、（ii）DVVMTQTPTL SVTIGQPASIS
CKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLGS
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPRT
FGGGTKLEIKR（配列番号4）と少なくとも83、84、85、86、又は87
%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む。好ましくは、治療有効量の少なく
とも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤も対象に投与される。

【0011】

第4の態様において、癌を治療する方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の（
a）抗体であって、該抗体は、 β -1，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V（ β -
1，4-GalT-V）エピトープに特異的に結合し、該抗体は、（i）EVQLEQSGAE
LARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQRPQGQGLEW
IGAMHPGRAYIRYNQKFQGKATLTADKSSSTAYMQLNSLA
SEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS（配列番号3）と少なくと
も90%若しくは95%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は（
ii）DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTY
LNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLGS GVPDRFTGSGSGTDF
TLKISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR（配列番
号4）と少なくとも90%若しくは95%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を
含む。好ましくは、治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤も対象
に投与される。

【0012】

特定の実施形態において、抗体は、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可
変領域配列を含む。特定の実施形態において、抗体は、配列番号4に示されるアミノ酸配
列を有する軽鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態において、医薬組成物は、1つ以上
の二次治療剤を更に含む。特定の実施形態において、1つ以上の二次治療剤は、化学療法
剤、抗炎症剤、コレステロール低下剤、インスリン、抗体、ペプチド、酵素、アジュバント
又はそれらの組合せを含む。特定の実施形態において、医薬組成物は、抗体を、検出可
能な薬剤、放射線治療剤、毒素、放射性薬剤、色素、ペプチド、ポリヌクレオチド又はナ
ノリポソームにコンジュゲートさせることを更に含む。特定の実施形態において、ナノリ
ポソームは、治療剤（複数可）を含む。特定の実施形態において、医薬組成物は、IGA
QVYEQVLRSA YAKRNS SVND（配列番号5）と少なくとも90%の配列同
一性を有するペプチドを更に含む。

【0013】

第5の態様において、医薬組成物は、治療有効量の：（i）（a）配列番号3と少なく
とも80%、85%、90%若しくは95%の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸
配列、及び（b）配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列
核酸配列を含む抗体、及び／又は（ii）配列番号5と少なくとも80%、85%、90
%若しくは95%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む合成ペプチドを含む。特定
の実施形態において、医薬組成物はまた、1つ以上のアジュバント及び／又は1つ以上の
薬学的に許容され得る担体を含んでもよい。特定の実施形態において、抗体は、（a）配
列番号3を含む重鎖可変領域核酸配列、及び／又は（b）配列番号2を含む軽鎖可変領域
核酸配列、及び／又は配列番号5を含む合成ペプチドアミノ酸配列を含む。

【0014】

第6の態様において、医薬組成物は、治療有効量の（a）抗体であって、該抗体は、 β -
1，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V（ β -1，4-GalT-V）エピトープ
に特異的に結合し、該抗体は、（i）EVQLEQSGAE LARPGASVKLS C
RTSGYTFTNYWMQWIKQRPQGQGLEWIGAMHPGRAYIRYNQ

10

20

30

40

50

K F Q G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L N S L A S E D S A V Y Y C A R W S D Y
D Y W G Q G T T L T V S S (配列番号3)と少なくとも80%、85%、90%若しくは
95%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は(ii) D V V M
T Q T P P T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W L L Q R
P G Q S P K R L I Y L V S K L G S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I S R V E
A E D L G V Y Y C W Q G T H F P R T F G G G T K L E I K R (配列番号4)と少なく
とも80%、85%、90%若しくは95%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列
を含む。特定の好ましい態様において、医薬組成物はまた、治療有効量の少なくとも1つ
のスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤を含み得る。特定の実施形態において、抗体は、配列番
号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態において
、抗体は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含む。特定の
実施形態において、少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤は、生分解性ポリマ
ーによってカプセル化されていないか、又はカプセル化されている、D-トレオ-1-フ
ェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(D-PDMP)、
(1R, 2R)-ノナン酸(2-(2', 3-ジヒドロベンゾ(1, 4)ジオキシ-
6'-イル)-2-ヒドロキシ-1-ピロリジン-1-イルメチル-エチル)-アミド-
L-酒石酸塩(Genz-123346)、イミド糖、1-フェニル-2-デカノイルア
ミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(DMP)、1-フェニル-2-パルミトイル
アミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(PPMP)、脂質、セラミド、又はそれら
の組合せを含む。特定の実施形態において、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤は、生分解性
ポリマー(BPD)にカプセル化されていないか、又はカプセル化されている、D-トレ
オ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(D-P
DMP)である。特定の実施形態において、生分解性ポリマーは、ポリエチレングリコー
ル及びセバシン酸からなる。特定の実施形態において、本明細書に開示される抗体、D-
PDMPペプチドにカップリングされたポリ(アミドアミン)デンドリマーベースのナノ
プラットフォームは、癌検出並びに標的療法において有用である。

10

20

30

40

50

【0015】

第7の態様において、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V(β -1, 4-
GalT-V)エпитープに特異的に結合する抗体は、ヒト化される。特定の実施形態
において、抗体は、(i) E V Q L E Q S G A E L A R P G A S V K L S C R T S G Y T
F T N Y W M Q W I K Q R P G Q G L E W I G A M H P G R A Y I R Y N Q K F Q G K A
T L T A D K S S S T A Y M Q L N S L A S E D S A V Y Y C A R W S D Y D Y W G Q G
T T L T V S S (配列番号3)と少なくとも80%、85%、90%若しくは95%のア
ミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は(ii) D V V M T Q T P P T
L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K
R L I Y L V S K L G S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V
Y Y C W Q G T H F P R T F G G G T K L E I K R (配列番号4)と少なくとも80%、
85%、90%若しくは95%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む。

【0016】

第8の態様において、医薬組成物は、治療有効量の、配列番号5と少なくとも90%の
アミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む合成ペプチド、好ましくは少なくとも1つのア
ジュバント、又は少なくとも1つの他の薬学的に許容され得る担体を含む。特定の実施形
態において、合成ペプチドは、配列番号5を含む。

【0017】

第9の態様において、発現ベクターは、g a a g t t c a g c t g g a g c a g t c t
g g g c t g a a c t g g c t a g a c c t g g g c t t c a g t g a a g t t g t
c c t g t a g g a c t t c t g g c t a c a c c t t t a c a a a c t a c t g g a t
g c a g t g g a t t a a a c a g a g g c c t g g a c a g g g t c t g g a a t g g
a t t g g g g c t a t g c a t c c t g g a c g t g c g t a t a t t a g g t a c a
a c c a g a a g t t c c a g g g c a a g g c c a c a t t g a c t g c a g a t a a

a t c c t c c a g c a c a g c t t a c a t g c a a c t c a a c a g c t t g g c a
t c t g a g g a c t c t g c g g t c t a t t a c t g t g c a a g a t g g a g t g
a c t a c g a c t a c t g g g g t c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c
c t c a (配列番号1)と少なくとも80%、85%、90%又は95%の配列同一性を
有する重鎖可変領域配列核酸配列を含む。特定の実施形態において、ペクターは、配列番
号1に示される核酸配列を含む。

【0018】

第10の態様において、発現ペクターは、g a t g t t g t g a t g a c c c a g a c
t c c a c t c a c t t t g t c g g t t a c c a t t g g a c a a c c a g c c t c c
a t c t c t t g c a a g t c a a g t c a g a g c c t c t t a g a t a g t g a t g
g a a a g a c a t a t t t g a a t t g g t t g t t a c a g a g g c c a g g c c a
g t c t c c a a a g c g c c t a a t c t a t c t g g t g t c t a a a c t g g g c
t c t g g a g t c c c t g a c a g g t t c a c t g g c a g t g g a t c a g g g a
c a g a t t t c a c a c t g a a a a t c a g c a g a g t g g a g g c t g a g g a
t t t g g g a g t t t a t t a t t g c t g g c a a g g t a c a c a t t t t c c t
c g g a c g t t c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a a t c a a a c g g (配列番号2)と少なくとも80%、85%、90%又は95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む。特定の実施形態において、ペクターは、配列番号2に示される核酸配列を含む。

10

【0019】

第11の態様において、発現ペクターは、(i)配列番号3と少なくとも80%、85%、90%若しくは95%の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列、及び／又は(ii)配列番号2と少なくとも80%、85%、90%若しくは95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む。

20

【0020】

第12の態様において、発現ペクターは、(i)配列番号3を含む重鎖可変領域配列核酸配列、及び(ii)配列番号2を含む軽鎖可変領域配列核酸配列を含む。

【0021】

第13の態様において、合成ペプチドは、配列番号5に対する少なくとも80%、85%、90%又は95%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、合成ペプチドは、配列番号5を含む。

30

【0022】

第14の態様において、 β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼV(β -1,4-GalT-V)に対する免疫応答を、それを必要とする対象において生じさせる方法は、治療有効量の、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%又は95%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む合成ペプチドと、好ましくはアジュバント又は薬学的に許容され得る担体とを投与することを含む。

【0023】

第15の態様において、結腸直腸癌を治療する方法は、(a)配列番号3と少なくとも80%、85%、90%若しくは95%の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列、及び／又は(b)配列番号2と少なくとも80%、85%、90%若しくは95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む抗体を含む医薬組成物を対象に投与することを含む。特定の実施形態において、抗体は、(a)配列番号3を含む重鎖可変領域核酸配列、及び(b)配列番号2を含む軽鎖可変領域核酸配列を含む。特定の実施形態において、方法は、治療有効量の、配列番号5と少なくとも80%、85%、90%又は95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む合成ペプチドと、好ましくは少なくとも1つのアジュバント又は薬学的に許容され得る担体とを投与することを更に含む。特定の実施形態において、合成ペプチドは、配列番号5を含む。特定の実施形態において、方法は、化学療法剤、放射線療法、毒素又はそれらの組合せ等の抗癌剤を投与することを更に含む。特定の実施形態において、抗癌剤は、化学療法剤又は成長阻害剤、標的化治

40

50

療剤、キメラ抗原受容体を発現するT細胞、抗体又はその抗原結合断片、抗体－薬物コンジュゲート、血管新生阻害剤、抗新生物剤、癌ワクチン、アジュバント、及びそれらの組合せである。特定の実施形態において、抗癌剤は、化学療法剤又は成長阻害剤である。例えば、化学療法剤又は増殖阻害剤には、アルキル化剤、アントラサイクリン、抗ホルモン剤、アロマターゼ阻害剤、抗アンドロゲン、プロテインキナーゼ阻害剤、脂質キナーゼ阻害剤、L y nキナーゼ阻害剤、S r cキナーゼ阻害剤、V E G F－R 1 R 2阻害剤、E G F－R阻害剤、G S K－アルファキナーゼ阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞毒性剤又は抗腫瘍抗生物質、プロテアソーム阻害剤、抗微小管剤、E G F Rアンタゴニスト、レチノイド、チロシンキナーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、及びそれらの組合せが含まれ得る。

10

【0024】

特定の実施形態において、抗癌剤は、アジュバントである。癌関連抗原に対する等の抗癌免疫応答を増強するか、又は免疫系の成分への癌抗原の提示を助ける任意の物質を、本開示の抗癌アジュバントと見なし得る。特定の実施形態において、方法は、生分解性ポリマーによってカプセル化されていないか、又はカプセル化されている、D－トレオ－1－フェニル－2－デカノイルアミノ－3－モルホリノ－1－プロパノール（D－P D M P）、（1 R，2 R）－ノナン酸（2－（2’，3－ジヒドロ－ベンゾ（1，4）ジオキシシ－6’－イル）－2－ヒドロキシ－1－ピロリジン－1－イルメチル－エチル）－アミド－L－酒石酸塩（G e n z－1 2 3 3 4 6）、イミド糖、1－フェニル－2－デカノイルアミノ－3－モルホリノ－1－プロパノール（D M P）、1－フェニル－2－パルミトイルアミノ－3－モルホリノ－1－プロパノール（P P M P）、脂質、セラミド、又はそれらの組合せを含む少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤を投与することを更に含む。特定の実施形態において、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤は、D－トレオ－1－フェニル－2－デカノイルアミノ－3－モルホリノ－1－プロパノール（D－P D M P）（例えば、生分解性ポリマーと混合され得る、例えば、生分解性ポリマー（B P D）にカプセル化されていないか、又はカプセル化されているD－P D M Pを含む）である。特定の実施形態において、生分解性ポリマーは、ポリエチレングリコール及びセバシン酸からなる。

20

【0025】

第16の態様において、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、肥満、自己免疫疾患、又は異常なレベルの β －1，4－ガラクトシルトランスフェラーゼ－V（ β －1，4－G a l T－V）に関連する疾患、例えば全身性エリテマトーデス（S L E）、腎癌、肺癌、黒色腫、神経芽細胞腫、神経膠芽腫、肺、癌、肝臓癌を治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書で具体化される医薬組成物；本明細書で具体化される発現ベクター；本明細書で具体化される合成ペプチド；又はそれらの組合せを投与することを含む。

30

【0026】

第17の態様において、結腸直腸癌を診断及び治療する方法は、対象の生物学的試料中の β －1，4－ガラクトシルトランスフェラーゼ－V（ β －1，4－G a l T－V）及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することであって、健常対象と比較した場合に、 β －1，4－G a l T－V及び／又はG S Lレベルの増加が上昇しており、 β －1，4－G a l T－V及び／又はG S Lレベルの上昇が結腸直腸癌の診断である、対象の生物学的試料中の β －1，4－ガラクトシルトランスフェラーゼ－V（ β －1，4－G a l T－V）及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することと、結腸直腸癌と診断された前記対象に、本明細書で具体化される医薬組成物；本明細書で具体化される発現ベクター；本明細書で具体化される合成ペプチド；又はそれらの組合せを投与することを含む。特定の実施形態において、方法は、 β －1，4－G a l T－V及び／又はG S Lレベルと組み合わせて結腸直腸癌腫瘍マーカーのレベルを測定することを更に含む。特定の実施形態において、結腸直腸癌腫瘍マーカーは、N M T－1、A P C、p 5 3、N O T C H－1、B－C A T E N I N及びそれらの組合せを含む。

40

【0027】

50

第18の態様において、蛍光タグ付きGalT-V抗体又は放射性同位体（例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{89}\text{Zr}]$ 、及び他のガンマ放出同位体を含むタグ付きGalT-V抗体、又はCF-750タグ付きGATT-V抗体を使用して、腫瘍進行（直腸又は結腸直腸の腫瘍又は癌を含む）を監視する方法。

【0028】

対象における結腸直腸癌の治療において、治療は、結腸直腸癌と診断された対象に、本明細書に開示される医薬組成物；本明細書で具体化される発現ベクター；本明細書で具体化される合成ペプチドを投与することと、対象の生物学的試料中の β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V（ β -1,4-GalT-V）及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することであって、ベースラインと比較した場合の β -1,4-GalT-V及び／又はGSLレベル（例えば、蛍光タグ付きスフィンゴ糖脂質抗体を使用する）の低下が、結腸直腸癌細胞の減少及び結腸直腸癌の治療を示す、対象の生物学的試料中の β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V（ β -1,4-GalT-V）及び／又はスフィンゴ糖脂質のレベルを測定することを含み得る。特定の実施形態において、対象に投与される組成物の用量は、結腸直腸癌の進行に基づいて調節される。

10

【0029】

特定の実施形態において、治療又は監視されている癌は、デュークスB（ステージII）又はデュークスC（ステージIII）の結腸直腸癌である。

【0030】

なお更なる態様において、黄斑変性症に罹患している又は黄斑変性症に罹患しやすい患者を治療するための方法であって、有効量の本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド及び／又は発現ベクター（それらの組合せを含む）を対象に投与することを含む方法が提供される。特定の態様において、対象は黄斑変性症に罹患していると同定され得、本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド及び／又は発現ベクターは、同定された対象に投与される。特定の好ましい実施形態において、対象はヒトである。

20

【0031】

追加の態様において、アルツハイマー病に罹患している又はアルツハイマー病に罹患しやすい患者を治療するための方法であって、有効量の本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド及び／又は発現ベクター（それらの組合せを含む）を対象に投与することを含む方法が提供される。特定の態様において、対象はアルツハイマー病に罹患していると同定され得、本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド又は発現ベクターは、同定された対象に投与される。特定の好ましい実施形態において、対象はヒトである。

30

【0032】

更なる態様において、片頭痛若しくは片頭痛の疼痛に罹患している又は片頭痛若しくは片頭痛の疼痛に罹患しやすい患者を治療するための方法であって、有効量の本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド及び／又は発現ベクター（それらの組合せを含む）を対象に投与することを含む方法が提供される。特定の態様において、対象は片頭痛又は片頭痛の疼痛に罹患していると同定され得、本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド及び／又は発現ベクターは、同定された対象に投与される。特定の好ましい実施形態において、対象はヒトである。

40

【0033】

更に追加の態様において、メタボリックシンドロームに罹患している又はメタボリックシンドロームに罹患しやすい患者を治療するための方法であって、有効量の本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド及び／又は発現ベクター（それらの組合せを含む）を対象に投与することを含む方法が提供される。特定の態様において、対象はメタボリックシンドロームに罹患していると同定され得、本明細書に開示される1つ以上の医薬組成物、ペプチド及び／又は発現ベクターは、同定された対象に投与される。特定の好ましい実施形態において、対象はヒトである。

【0034】

50

他の態様については、以下に記載する。

【0035】

定義

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、本発明を限定することを意図するものではない。本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈が明らかにそうでないことを示さない限り、複数形も含むことが意図される。さらに、「含む(including)」、「含む(includes)」、「有する(having)」、「有する(has)」、「有する(with)」という用語、又はそれらの変形が詳細な説明及び／又は特許請求の範囲のいずれかで使用される限り、そのような用語は、「含む(comprising)」という用語と同様に包括的であることを意図している。

10

【0036】

「約」又は「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値の許容可能な誤差範囲内を意味し、これは値がどのように測定又は決定されるか、すなわち測定システムの制限に部分的に依存する。例えば、「約」は、当技術分野の慣例に従って、1標準偏差以内又は1標準偏差を超えることを意味することができる。あるいは、「約」は、所与の値又は範囲の最大20%、最大10%、最大5%、又は最大1%の範囲を意味することができる。あるいは、特に生物学的システム又はプロセスに関して、この用語は、ある値の5倍以内、更には2倍以内の1桁以内を意味し得る。特定の値が本出願及び特許請求の範囲に記載されている場合、特に明記しない限り、「約」という用語は、特定の値の許容可能な誤差範囲内を意味すると仮定されるべきである。

20

【0037】

「アジュバント」という用語は、ワクチン技術の分野におけるその通常の意味、すなわち、1)それ自体ではワクチンの免疫原に対する特異的免疫応答を開始することができないが、2)それにもかかわらず免疫原に対する免疫応答を増強することができる物質又は組成物を有する。又は、言い換えれば、アジュバント単独でのワクチン接種は免疫原に対する免疫応答をもたらさず、免疫原によるワクチン接種は免疫原に対する免疫応答を生じさせても生じなくてもよいが、免疫原とアジュバントとの併用ワクチン接種は、免疫原単独によって誘導されるものよりも強い免疫原に対する免疫応答を誘導する。

【0038】

本明細書で使用される場合、「投与する」という用語は、治療剤をそのような薬剤による治療を必要とする対象に移す、送達する、導入する、又は輸送する任意の様式を指す。そのような様式には、経口、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、鼻腔内及び皮下の投与が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0039】

本明細書で使用される場合、「薬剤」という用語は、 β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV(BGA)の発現又は活性を調節することができる任意の分子、化学的実体、組成物、薬物、治療剤、化学療法剤、又は生物学的薬剤を包含することを意味する。この用語は、小分子化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA試薬、抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂断片、Fv断片、一本鎖抗体、抗体模倣物(例えば、DARPin、アフィボディ分子、アフィリン、アフィチン、アンチカリン、アビマー、フィノマー、クニツドメインペプチド及びモノボディ)、ペプチド、アプタマー等のエпитープ認識部位を有する抗体断片；酵素、ペプチド有機分子又はペプチド無機分子、天然又は合成の化合物等含む。薬剤を、臨床試験中、治験前試験中、又はFDA承認後の任意の段階で本発明の方法に従ってアッセイすることができる。

40

【0040】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、ヒト及びヒト化抗体を含む全ての種を含み、抗原性標的は任意の種に由来し得る。したがって、例えば抗原「X」に結合する抗体は、マウス抗ヒトX、ヒト抗ヒトX；ヒト化抗ヒトX、ヤギ抗ヒトX；ヤギ抗マウスX；ラット抗ヒトX；マウス抗ラットX等であり得る。別の種からの抗原標的、例えば

50

「X」に対する特定の種、又は場合によっては同じ種（例えば、自己免疫応答又は炎症応答において）に対して生成される抗体の組合せは限定されず、全ての種が本発明で具体化される。抗体という用語は最も広い意味で使用され、完全に組み立てられた抗体、モノクローナル抗体（ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び所望の生物学的活性を示す限り、前述の相補性決定領域（CDR）を含む、抗原に結合することができる抗体断片（例えば、Fab'、F'（ab）₂、Fv、一本鎖抗体、ダイアボディ）を含む。二重特異性抗体の例としては、GalT-V抗体と別の抗体、例えばラクトスルセラミド、Lynキナーゼ、Srcキナーゼ、VEGF-R1、R2、EGF-R GSK-アルファキナーゼとの組合せが挙げられる。

10

【0041】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「アンチセンス化合物」とは、別のRNA又はDNA（標的RNA、DNA）に結合するRNA又はDNA分子を意味する。例えば、それがRNAオリゴヌクレオチドである場合、RNA-RNA相互作用によって別のRNA標的に結合し、標的RNAの活性を変化させる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のポリヌクレオチドの発現及び／又は機能を上方制御又は下方制御することができる。定義は、治療、診断、又は他の観点から有用な任意の外来RNA又はDNA分子を含むことを意味する。そのような分子には、例えば、アンチセンスRNA分子又はアンチセンスDNA分子、干渉RNA（RNAi）、マイクロRNA、デコイRNA分子、siRNA、酵素RNA、ショートヘアピンRNA（shRNA）、治療用編集RNA並びにアゴニスト及びアンタゴニストRNA、アンチセンスオリゴマー化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド、交互スプライサー、プライマー、プローブ、並びに標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズする他のオリゴマー化合物が含まれる。したがって、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、部分的に一本鎖、又は環状オリゴマー化合物の形態で導入され得る。

20

【0042】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、「又は」という用語は、一般に、その内容が明らかにそうでないことを指示しない限り、「及び／又は」を含む意味で使用される。

【0043】

本明細書で使用される場合、当技術分野でのその使用と一致する「化学療法剤」という用語は、癌を治療することが知られているか、又は癌の治療に寄与することが知られているか、又は知られている特徴を有する1つ以上の薬剤を指す。特に、化学療法剤には、アポトーシス促進剤、細胞増殖抑制剤及び／又は細胞傷害剤が含まれる。いくつかの実施形態において、化学療法剤は、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤（例えば、以下の微小管標的化部分、例えばタキサン、メイタンシン及びその類縁体）、エポチロン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤HDAC）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、トポイソメラーゼI及び／又はトポイソメラーゼIIの阻害剤）、キナーゼ阻害剤、ヌクレオチド類縁体又はヌクレオチド前駆体類縁体、ペプチド抗生物質、白金系薬剤、レチノイド、ビンカルカロイド、及び／又は関連する抗増殖活性を共有する類縁体であり得るか、又はそれらを含み得る。いくつかの実施形態において、化学療法剤は、アクチノマイシン、オールトランスレチノイン酸、アウイリスタチン、アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、クルクミン、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イマチニブ、イリノテカン、メイタンシン及び／又はその類縁体（例えば、DM1）、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、メイタンシノイド、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、又はそれらの組合

30

40

50

せであり得るか、又はそれらを含み得る。いくつかの実施形態において、化学療法剤は、抗体－薬物コンジュゲートの状況で利用することができる。いくつかの実施形態において、化学療法剤は、hLL1－ドキシソルビン、hRS7－SN－38、hMN－14－SN－38、hLL2－SN－38、hA20－SN－38、hPAM4－SN－38、hLL1－SN－38、hRS7－Pro－2－P－Dox、hMN－14－Pro－2－P－Dox、hLL2－Pro－2－P－Dox、hA20－Pro－2－P－Dox、hPAM4－Pro－2－P－Dox、hLL1－Pro－2－P－Dox、P4／D10－ドキシソルビン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、グレムバツムマブベドチン、SAR3419、SAR566658、BIB015、BT062、SGN－75、SGN－CD19A、AMG－172、AMG－595、BAY－94－9343、ASG－SME、ASG－22ME、ASG－16M8F、MDX－1203、MLN－0264、anti－PSMA ADC、RG－7450、RG－7458、RG－7593、RG－7596、RG－7598、RG－7599、RG－7600、RG－7636、ABT－414、IMGN－853、IMGN－529、ボルセツズマブマホドチン、及びロルボツズマブメルタンシンからなる群から選択される抗体－薬物コンジュゲート中に見出される。

10

【0044】

本明細書で使用される場合、本明細書で使用される「併用療法」という用語は、対象が両方の薬剤に同時に曝露されるように、2つ以上の異なる医薬品が重複レジメンで投与される状況を指す。併用療法で使用される場合、2つ以上の異なる薬剤が同時に又は別々に投与され得る。この組合せでの投与は、同じ剤形での2つ以上の薬剤の同時投与、別々の剤形での同時投与、及び別々の投与を含み得る。すなわち、2つ以上の薬剤を同じ剤形と一緒に製剤化し、同時に投与することができる。あるいは、2つ以上の薬剤を同時に投与ことができ、薬剤は別々の製剤中に存在する。別の実施形態において、第1の薬剤を投与した後、1つ以上の追加の薬剤を投与することができる。別個の投与プロトコルでは、2つ以上の薬剤は、数分間隔で、又は数時間間隔で、又は数日間隔で投与され得る。

20

【0045】

本明細書で使用される場合、「含む（こと）（comprising）」、「含む（comprise）」又は「含まれる（comprised）」という用語及びその変形は、項目、組成物、装置、方法、プロセス、システム等の定義された又は記載された要素に関して、包括的又はオープンエンドであることを意味し、追加の要素を可能にし、それによって定義された又は記載された項目、組成物、装置、方法、プロセス、システム等がそれらの指定された要素、又は必要に応じてそれらの均等物を含むこと、及び他の要素が含まれてもよく、定義された項目、組成物、装置、方法、プロセス、システム等の範囲／定義内に入ることを示す。

30

【0046】

本明細書で使用される場合、「診断」という用語は、対象が疾患、障害、症状、又は状態を有するか、若しくは発症するであろうかどうかを判断すること、及び／又は定量的確率の定性的な判断を指す。例えば、癌の診断において、診断は、癌のリスク、タイプ、病期、悪性度、又は他の分類に関する判定を含むことができる。場合によっては、例えば本明細書に記載されるように、診断は、予後及び／又は1つ以上の一般的若しくは特定の治療剤若しくはレジメンに対する可能性のある応答に関する決定であり得るか、又はそれを含み得る。

40

【0047】

「疾患」は、動物が恒常性を維持することができず、疾患が改善されない場合、動物の健康が悪化し続ける動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、動物が恒常性を維持することができる健康状態であるが、動物の健康状態は、障害がない場合よりも好ましくない。未治療のままでは、障害は必ずしも動物の健康状態の更なる低下を引き起こさない。疾患又は障害は、疾患又は障害の症候の重症度、そのような症候が患者に

50

よって経験される頻度、又はその両方が低下する場合に「緩和される」。

【0048】

「投薬レジメン」（又は「治療レジメン」）は、その用語が本明細書で使用される場合、典型的には期間で区切られて対象に個別に投与される単位用量（典型的には2つ以上）のセットである。いくつかの実施形態において、所与の治療剤は、1つ以上の用量を含み得る推奨される投薬レジメンを有する。いくつかの実施形態において、投薬レジメンは、それぞれが同じ長さの期間だけ互いに隔てられている複数の用量を含み、いくつかの態様において、投薬レジメンは、複数の用量と、個々の用量を分離する少なくとも2つの異なる期間とを含む。いくつかの実施形態において、投薬レジメンは、患者の集団にわたって投与された場合、所望の治療成績であるか、又はそれと相関していた。本明細書で使用される場合、「制御放出投与製剤」は、特定の制御可能な速度で長期放出を提供する薬物の製剤を指す。

10

【0049】

「有効量」とは、未治療の患者と比較して疾患の症候を改善するのに必要な量を意味する。疾患の治療的処置のために本発明を実施するために使用される活性化合物（複数可）の有効量は、投与様式、対象の年齢、体重及び全般的な健康状態に応じて変化する。最終的には、主治医又は獣医が適切な量及び投与レジメンを決定する。このような量を「有効」量と呼ぶ。治療有効量、並びに剤形、投与経路、及び投与頻度を含む本発明の化合物の本発明の対象への有効投与に関連する他の要因の決定は、治療又は対処されている対象及び症状、特定の対象における症状の重症度、使用されている特定の化合物、使用されている特定の投与経路、投与頻度、及び使用されている特定の製剤を含む、遭遇する症状の詳細に依存し得る。本発明の対象に対する治療上有効な治療レジメンの決定は、医学分野又は獣医学分野の当業者のレベルの範囲内である。臨床使用において、有効量は、米国食品医薬品局又は同等の外国機関によって推奨される量であり得る。単一剤形を生成するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、治療される対象及び特定の投与様式に応じて変化する。

20

【0050】

抗体に対する「高親和性」とは、標的抗原に対する K_D が 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 5×10^{-8} M以下、更に好ましくは 1×10^{-8} M以下、更により好ましくは 5×10^{-9} M以下、更に好ましくは 1×10^{-9} M以下の抗体をいう。しかしながら、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプについて異なり得る。例えば、IgMアイソタイプに対する「高親和性」結合は、 10^{-6} M以下、 10^{-7} M以下、又は 10^{-8} M以下の K_D を有する抗体を指す。

30

【0051】

「増強（enhancement）」、「増強する（enhance）」、「増強する（enhances）」又は「増強する（こと）（enhancing）」という用語は、特定のパラメータの増加（例えば、少なくとも約1.1倍、1.25倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、又は更には15倍以上の増加）及び／又は少なくとも約5%、10%、25%、35%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%の特定の活性の増加を指す。

40

【0052】

本明細書で使用される場合、対象への治療の投与の状況における「組み合わせて」という用語は、治療上の利益のための2つ以上の治療の使用を指す。投与の状況における「組み合わせて」という用語はまた、少なくとも1つの追加の治療と共に使用される場合の対象への治療の予防的使用を指すことができる。「組み合わせて」という用語の使用は、治療（例えば、第1及び第2の治療）が対象に投与される順序を制限しない。治療は、癌を有していた、有している、又は癌にかかりやすい対象への第2の治療の投与の前に（例えば、1分、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間

50

、6週間、8週間、又は12週間前）、それと同時に、又はそれに続いて（例えば、1分後、5分後、15分後、30分後、45分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、8週間後、又は12週間後）投与することができる。治療は、治療法と一緒に作用することができるように、一連の時間間隔内で対象に投与される。特定の実施形態において、治療は、他の方法で投与された場合よりも高い利益を提供するように、一連の時間間隔内で対象に投与される。任意の追加の治療は、他の更なる治療と任意の順序で投与することができる。

【0053】

本明細書で使用される場合、スフィンゴ糖脂質合成又はグルコシルセラミド合成の「阻害剤」は、合成のサイクルに関連するものを含むこれらの分子の合成を阻害する。これらの分子の合成の阻害は、任意の標準的なアッセイによって測定することができる。例えば、以下の実施例の項の方法を参照されたい。

【0054】

本明細書で使用される場合、 $\beta 1$ 、4-ガラクトシルトランスフェラーゼVの「阻害」又は「減少」は、細胞内の $\beta 1$ 、4-ガラクトシルトランスフェラーゼVの量を約20%、40%、60%、80%、85%、90%、95%、又は100%超減少させる。 $\beta 1$ 、4-ガラクトシルトランスフェラーゼVの量は、限定するものではないが、デンストメーター、蛍光光度計、ラジオグラフィ、ルミノメーター、抗体ベースの方法及び活性測定を含む周知の方法によって決定することができる。

【0055】

「阻害する」、「減弱させる」、「減少させる」又は「抑制する」という用語は、特定のパラメータの減少（例えば、少なくとも約1.1倍、1.25倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、又は更には15倍以上の増加）及び／又は特定の活性の少なくとも約5%、10%、25%、35%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%の減少又は減少を指す。これらの用語は、参照又は対照に対するものであることを意図している。

【0056】

本明細書で使用される場合、「 K_{assoc} 」又は「 K_a 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指すことを意図しており、一方、本明細書で使用される場合、「 K_{dis} 」又は「 K_d 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指すことを意図している。本明細書で使用される場合、「 K_D 」という用語は、 K_d 対 K_a （すなわち、 K_d/K_a ）の比から得られ、モル濃度（M）として表される解離定数を指すことを意図している。抗体の K_D 値は、当技術分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体の K_D を決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用すること、例えば、BIAcore（商標）システム等のバイオセンサシステムを使用することによるものである。

【0057】

本明細書で使用される場合、「調節する（modulate）」、「調節する（modulates）」又は「調節（modulation）」は、特定の活性又はレベル（例えば、mRNAの量、タンパク質の量、マーカーの発現、GSLの量等）の増強（例えば、増加）又は阻害（例えば、減弱、減少又は抑制される）を指す。対照レベルと比較して、決定されるレベルは増加したレベルであり得る。本明細書で使用される場合、レベル（例えば、タンパク質又はmRNAレベル）に関して「増加した」という用語は、対照レベルを超える任意の%増加を指す。様々な実施形態において、増加したレベルは、対照レベルと比較して、少なくとも又は約5%の増加、少なくとも又は約10%の増加、少なくとも又は約15%の増加、少なくとも又は約20%の増加、少なくとも又は約25%の増加、少なくとも又は約30%の増加、少なくとも又は約35%の増加、少なくとも又は約40%の増加、少なくとも又は約45%の増加、少なくとも又は約50%の増加、少なくとも又は約55%の増加、少なくとも又は約60%の増加、少なくとも又は約65%の増加

、少なくとも又は約 70 % の増加、少なくとも又は約 75 % の増加、少なくとも又は約 80 % の増加、少なくとも又は約 85 % の増加、少なくとも又は約 90 % の増加、少なくとも又は約 95 % の増加であり得る。対照レベルと比較して、決定されるレベルは低下したレベルであり得る。本明細書で使用される場合、レベル（例えば、タンパク質又は mRNA レベル）に関して「減少した」という用語は、対照レベルを下回る任意の % 減少を指す。様々な実施形態において、減少したレベルは、対照レベルと比較して、少なくとも又は約 5 % の減少、少なくとも又は約 10 % の減少、少なくとも又は約 15 % の減少、少なくとも又は約 20 % の減少、少なくとも又は約 25 % の減少、少なくとも又は約 30 % の減少、少なくとも又は約 35 % の減少、少なくとも又は約 40 % の減少、少なくとも又は約 45 % の減少、少なくとも又は約 50 % の減少、少なくとも又は約 55 % の減少、少なくとも又は約 60 % の減少、少なくとも又は約 65 % の減少、少なくとも又は約 70 % の減少、少なくとも又は約 75 % の減少、少なくとも又は約 80 % の減少、少なくとも又は約 85 % の減少、少なくとも又は約 90 % の減少、少なくとも又は約 95 % の減少であり得る。

10

【0058】

疾患、障害又は症状の発生に関連して本明細書で使用される場合、「予防する」及び「予防」という用語は、疾患、障害若しくは症状を発症するリスクを低下させること；疾患、障害若しくは症状の発病を遅延させること；疾患、障害、若しくは状態の 1 以上の特徴若しくは症候の発病を遅延させること；並びに／又は疾患、障害、若しくは症候の 1 つ以上の特徴若しくは症状の頻度及び／若しくは重症度を低下させることを指す。予防は、特定の対象における予防又は対象の集団に対する統計的影響を指すことができる。疾患、障害、又は症状の発病が所定の期間遅延した場合、予防は完全であると考えることができる。

20

【0059】

本明細書で使用される場合、「予後」という用語は、少なくとも 1 つの可能性のある将来の転帰又は事象の定量的確率の定性的な決定を指す。本明細書で使用される場合、予後は、対象における癌等の疾患、障害、又は症状の可能性のある経過の決定、対象の平均余命に関する決定、又は治療、例えば特定の治療に対する応答に関する決定であり得る。

【0060】

本明細書で使用される場合、「予後情報」という用語は、予後を提供するのに有用な情報を指す。予後情報は、バイオマーカーの状態情報を含み得るが、これに限定されない。

30

【0061】

本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、*in vitro*での評価を目的として得られた生物学的試料を指す。実施形態において、試料は体液を含み得る。いくつかの実施形態において、体液には、対象から得られた全血、血漿、血清、リンパ液、母乳、唾液、粘液、精液、細胞抽出物、炎症液、脳脊髄液、硝子体液、涙液、硝子体液、房水、又は尿が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、試料は 2 つ以上の体液の複合パネルである。例示的な態様において、試料は血液又はその画分（例えば、血漿、血清、又は白血球除去療法によって得られた画分）を含む。

【0062】

本明細書で使用される場合、対象への治療の投与の状況における「予防する」、「予防する（こと）」及び「予防」という用語は、治療（例えば、予防剤）又は治療の組合せ（例えば、予防剤の組合せ）の投与に起因する対象における疾患若しくは障害又はその症候の再発、発病及び／又は発症の予防又は阻害を指す。

40

【0063】

「減少する」とは、参照と比較して少なくとも 10 %、25 %、50 %、75 %、又は 100 % の負の変化を意味する。

【0064】

「参照」とは、標準又は対照条件を意味する。

【0065】

50

本明細書で使用される場合、ポリペプチド又はエピトープに「特異的に結合する」抗体は、 1×10^{-7} M以下、又は 5×10^{-8} M以下、又は 3×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、又は 5×10^{-9} M以下の K_D でポリペプチド又はエピトープに結合する抗体を指すことを意図している。したがって、「特異的結合」又は「特異的に結合する」という用語は、タンパク質と抗体又は代替タンパク質骨格又はペプトイド又はアプタマーとの相互作用に関して使用される場合、相互作用がタンパク質上の特定の構造（すなわち、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存することを意味し、換言すれば、抗体は、一般にタンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識して結合している。したがって、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに「特異的に結合する」又は「特異的である」抗体は、任意の他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する抗体である。

10

【0066】

本明細書で使用される場合、「持続放出投与製剤」は、最小の副作用で特定の期間一定の薬物濃度を維持するために、薬物を所定の速度で放出するように設計された薬物の製剤である。任意に、期間は、30分若しくはそれ以上、例えば2～4時間若しくはそれ以上、例えば3～8時間若しくはそれ以上、例えば4～24時間であり、又は例えば、1～3日若しくはそれ以上、例えば、2～7日若しくはそれ以上、例えば、4～14日若しくはそれ以上、例えば、7日若しくはそれ以上、例えば、14日間～1ヶ月若しくはそれ以上である。

20

【0067】

本明細書で使用される場合、症状、疾患若しくは障害、又は症状、疾患若しくは障害に関連する症候を「治療すること」又はその「治療」は、臨床結果を含む有益な又は所望の結果を得るためのアプローチを指す。有益な又は所望の臨床結果としては、限定されないが、部分的であるか全体的であるかを問わない、1つ以上の症候又は症状の緩和又は改善、症状、障害又は疾患の程度の減弱、症状、障害又は疾患の状態の安定化、症状、障害又は疾患の発症の予防、症状、障害又は疾患の進展の予防、症状、障害又は疾患の進行の遅延又は減速、症状、障害又は疾患の発病の遅延又は減速、症状、障害又は疾患の状態の改善又は緩和、及び寛解が挙げられ得る。「治療すること」はまた、症状、障害又は疾患の進行を阻害すること、症状、障害又は疾患の進行を一時的に減速させることを意味し得るが、場合によっては、症状、障害又は疾患の進行を永続的に停止させることを含む。

30

【0068】

本明細書で提供される範囲は、その範囲内の全ての値の省略表現であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50、並びに例えば1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、又は1.9等の前述の整数間の全ての介在する十進数値を含むと理解される。部分範囲に関して、範囲のいずれかの終点から延びる「入れ子状部分範囲（nested sub-range）」が特に企図される。例えば、1～50の例示的な範囲の入れ子状部分範囲は、一方向に1～10、1～20、1～30、及び1～40、又は他の方向に50～40、50～30、50～20、及び50～10を含み得る。

40

【0069】

本明細書で提供される任意の組成物又は方法は、本明細書で提供される他の組成物及び方法のいずれかの1つ以上と組み合わせることができる。

【0070】

特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を伴うこの特許又は特許出願公開の写しは、請求及び必要な料金の支払いに応じて特許庁によって提供される。

50

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】図1A～図1Iは、CRC組織が抗 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ 抗体に強く免疫反応し、LCS活性及びB4GALT5発現の増加を示すことを実証する一連の免疫染色及びグラフである。(図1A)正常結腸スコア2(倍率20倍)。(図1B)内皮の細胞質染色(20倍)。(図1C)結腸癌症例スコア1(20倍)。(図1D)結腸癌症例スコア2(20倍)。(図1E)結腸癌症例スコア3(20倍)。(図1F)CRC組織は、 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ を過剰発現する。視覚的に正常なCRC組織(それぞれ50mg)をRIPA緩衝液中でホモジナイズし、1000rpmで遠心分離した。上清を使用して、ELISAによって $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ 質量を測定した。次いで、このアッセイを、正常及び腫瘍試料の両方について、 $N=10$ で三連で行った。平均値 $\pm$ SEM値を示す(* $P=0.0340$)。対応のないt検定を使用して、統計学的有意性を決定した。(図1G)結腸直腸腫瘍におけるLCS活性の増加。平均 $\pm$ SEM、** $P=0.0052$ 。(図1H)APC、NMT1及びTP53遺伝子は、正常試料の発現と比較して、腫瘍における発現の増加を示した。(図1I)B4GALT5は特異的に発現増加を示したが、B4GALT6及びUGCGは比較的発現が増加しなかった。平均 $\pm$ SEM、患者の正常試料と腫瘍試料の両方について $N\geq 4$ 。通常の一元配置ANOVAを統計分析に利用した。

10

【0072】

【図2】図2A～図2Gは、LacCer質量がCRC組織において増加していることを実証する一連のグラフである。視覚的に正常なCRC組織(それぞれ50mg)を、内部スフィンゴ脂質標準の存在下でクロロホルム-メタノール(2:1)中でホモジナイズした。次いで、脂質抽出物をLC-MSに供して、(図2A)Cer、(図2B)DHCer、(図2C)GalCer及びGlcCer、(図2D)ジヒドロGalCer/ジヒドロGlcCer、(図2E)LacCer及び(図2F)DHLacCerを用いて、CRC又は正常組織におけるスフィンゴ脂質種のレベルの変化を調べた。調査したGSLの中で、LacCerレベルのみ(図2E)が結腸直腸腫瘍で統計的かつ有意に増加した(* $P=0.0112$)。Cer及びジヒドロGalCer/ジヒドロGlcCerの場合、 $N=10$ (正常)及び $N=9$ (腫瘍)；DHCerの場合、 $N=9$ (正常)及び $N=10$ (腫瘍)；並びにGalCerとGlcCer、LacCer、及びDHLacCerの場合、 $N=10$ (正常及び腫瘍の両方)。(図2G)正常組織及び腫瘍組織を、LC-MSによってスフィンゴミエリン及びDHSMLレベルについて評価した。正常対腫瘍のスフィンゴミエリン値に静的に有意な差は見られなかった。対照的に、腫瘍試料は、正常と比較して有意に上昇したDHSML値を示した(** $P=0.0059$)。スフィンゴミエリンの場合、 $N=10$ (正常)及び $N=6$ (腫瘍)、並びにDHSMLの場合、 $N=10$ (正常と腫瘍の両方)。平均 $\pm$ SEM値及び対応のないt検定を使用して、統計学的有意性を決定した。

20

30

【0073】

【図3】図3A～図3Hは、GSL合成の薬理的阻害が増殖を用量依存的に減少させ、HCT-116における $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ タンパク質発現を減少させることを実証する一連のグラフ及び蛍光染色である。D-PDMPは、対照と比較して、HCT-116細胞増殖において(図3A)24時間及び(図3B)96時間で用量及び時間依存的減少を示し、最大有効用量は $20\mu\text{M}$ であった。* $P\leq 0.05$ 、** $P\leq 0.01$ 、*** $P\leq 0.001$ 。24時間での(図3C)対照のUGCG免疫蛍光と比較して、(図3D)D-PDMP処置細胞のUGCG免疫蛍光に差は見られなかった。しかし、(図3F)24時間及び(図3H)96時間でのD-PDMP処置は、未処置対照のものと比較してGalT-V蛍光を減少させた(それぞれE及びG)。

40

【0074】

【図4】図4A～図4Hは、D-PDMP処置がHCT-116中のいくつかのスフィンゴ脂質のレベルを低下させることを実証する一連のグラフである。HCT-116細胞(

50

10⁵)を、10 mLの培地中の滅菌(100 mm²)プラスチックペトリ皿上に24時間播種した。次いで、培地を、D-PDMP(10 μM)を含む又は含まない2%血清含有培地に交換した。24時間後、培地を除去し、スフィンゴ脂質内部標準の存在下でヘキサノールイソプロパノール(体積で3:2)を用いて総脂質を抽出し、MSに供した。D-PDMP処置(x軸でD10と示す)は、対照値(x軸でCと示す)と比較して、10 μMで(図4A)Cer、(図4B)DHCer、(図4C)モノヘキサシルセラミド、(図4D)ジヒドロGlc／ガルセラミド(galceramide)、(図4E)ジヘキサシルセラミド、(図4F)DHLacCerのレベルを低下させたが、(図4G)スフィンゴミエリンのレベルも(図4H)DHSMのレベルも低下させなかった。データは平均±SEMを表し、対照及び(図4A～図4H)の10 μM D-PDMPについてN=3生物学的反復を表し、対応のないt検定を統計分析に使用した。*P≤0.05、**P≤0.01〕\

10

【0075】

【図5】図5A～図5Dは、CRC組織が抗β-1,4-GalT-V抗体に強く免疫反応することを実証する一連の免疫染色である。

【0076】

【図6】図6は、結腸癌切片のGalT-V抗体による免疫染色を示す。

【0077】

【図7】図7は、スフィンゴ脂質合成経路を示す模式図である。

【0078】

【図8】図8は、GalT-Vに対するGalT-V抗体による処置が増殖イオンHCT-116細胞を用量依存的に減少させることを実証するグラフである。HCT-116細胞を96ウェルトレイに播種し(1×10⁴細胞／ウェル)、10%ウシ胎児血清を補充した培地で成長させた。24時間後、³H-チミジン(5 μCi／mL)及び様々な希釈のGalT-Vモノクローナル抗体を含有する新鮮な培地を添加した。D-PDMP(5 μM)による処置を陽性対照とした。24時間のインキュベーション後、放射能のDNAへの取り込みをシンチレーション分光法によって測定した。GalT-V抗体は、HCT-116細胞増殖を用量依存的に減少させた(P**≤0.01、P***≤0.001及びP****≤0.0001(N=5))。

20

【0079】

【図9】図9は、GalT-Vに対するGalT-V抗体での処置がマウス結腸直腸癌細胞における増殖を用量依存的に減少させることを実証するグラフである。マウス結腸直腸癌細胞を96ウェルトレイに播種し(1×10⁴細胞／ウェル)、10%ウシ胎児血清を補充した最少必須培地中で成長させ、上記の図8に記載されるように処理した。GalT-V抗体は、MC-38細胞増殖を用量依存的に減少させたことに留意されたい(N=5)。

30

【0080】

【図10】図10A～図10Iは、VEGF誘導管形成がβ-GalT-Vに対する抗体及びラクトシルセラミド抗体によって軽減されたことを実証する一連の写真及びグラフである。ヒト臍帯静脈内皮細胞を様々な希釈のβ-GalT-V抗体又はLacCer抗体と1時間インキュベートし、続いてVEGFで6時間処置した。次いで、管形成アッセイを行った。グラフの処置軸上の文字(図10I)は、図10A～図10Hに示す処置を表す。

40

【0081】

【図11】図11A～図11Dは、β-1,4GalT-V抗体又はバイオポリマーカプセル化D-PDMPによる処置が、正常な雌マウスにおいて腫瘍成長を妨げたことを実証する一連の写真である。32週齢の正常雌マウス(C57BL/6)を剃毛した。背側領域をアルコール消毒綿で洗浄し、100 μLの結腸直腸癌細胞HCT-116(4×10⁶)懸濁液を注入した。1週間後、100 μLのβ-1,4GalT-Vに対するモノクローナル抗体(図11A、図11B)又はβ-1,4GalT-V阻害剤(5 mpkの

50

バイオポリマー-カプセル化D-PDMP（図11C、図11D）を腫瘍細胞注射部位に3週間注入した。背部に毛が伸びた場合には背部領域を再度Nairで剃毛し、マウスを撮影した。処置マウスでは腫瘍成長は観察されなかったことに留意されたい（図11A～図11D）。

【0082】

【図12】図12は、 β -ガラクトシルトランスフェラーゼ（ β -GalT-V）が結腸直腸癌にどのように寄与し得るか、及びそれを予防するための本明細書の新規アプローチに関する反応の概要を示す概略図である。

【0083】

【図13】図13は、実施例4のGalT-V抗体処置モデルの模式図である。

10

【0084】

【図14】図14は、GalT-V抗体による処置がNOD-SCIDマウスにおいて体重を変化させなかったことを示す結果を示す。

【0085】

【図15】図15（図15A～図15Bを含む）は、GalT-V抗体による処置を示し、これはHCT-116細胞を接種したNOD-SCIDマウスにおいて用量依存的に腫瘍体積を減少した。

【0086】

【図16】図16（図16A～図16Cを含む）は、HCT-116直腸同所性腫瘍を担持するマウスの光学イメージングを示す。

20

【0087】

【図17】図17は、CRCマウスにおけるB4GALT-V、CEA及びNMT-1の遺伝子発現のq-RT-PCR分析を示す。

【0088】

【図18】図18（図18A～図18Bを含む）は、GalT-V-Abによる処置が血漿中のGalT-Vの質量を減少させたことを実証する図18AのELISAアッセイ、及びGalT-V-Abによる処置がプラセボと比較して腫瘍組織中のLacCerの質量を減少させたことを実証する図18BのHPTLC及びデンストメトリー分析を示す。

【0089】

【図19】図19は、共焦点顕微鏡法（実施例5）によって決定されたGalT-V抗体の細胞表面局在を示す。

30

【0090】

【図20】図20は、共焦点顕微鏡法によって決定されるような内在化されたGalT-V抗体（37℃）を示す。

【0091】

【図21】図21は、ヒト冠動脈内皮細胞（HCAEC）及びヒト結腸直腸癌細胞における $[^{89}\text{Zr}]$ GalT-V抗体結合を示す。

【0092】

【図22】図22は、ヒト冠動脈内皮細胞（HCAEC）及びヒト結腸直腸癌細胞における $[^{89}\text{Zr}]$ GalT-V抗体結合を示す。

40

【0093】

【図23】図23は、D-PDMPが、ヒト結腸直腸癌細胞におけるジルコニウムタグ付きGalT-V抗体結合を阻害することを示す。

【0094】

【図24】図24は、ヒト結腸直腸癌細胞における $[^{89}\text{Zr}]$ GalT-V抗体の結合及び内在化の特異性を示す図である。

【0095】

【図25】図25は、ヒト結腸直腸癌細胞における $[^{89}\text{Zr}]$ GalT-V抗体の時間依存的結合及び内在化を示す。

【0096】

50

【図 26-27】図 26 及び図 27 は、特定の期間におけるヒト CRC 腫瘍担持マウスの *in vivo* 異種蛍光画像を示す。

【0097】

【図 28】図 28（図 28A～図 28C を含む）は、皮下／異種移植腫瘍担持マウス由来の個々の組織における CF-750 GalT-V 抗体蛍光の分布を示す。

【発明を実施するための形態】

【0098】

本発明は、 β -ガラクトシルトランスフェラーゼ（ β -GalT-V）がヒト CRC において役割を果たし、その阻害が腫瘍細胞増殖も軽減するという発見に部分的に基づく。結腸直腸癌対象からの試料は、 β -1, 4-GalT-V 抗体に対して免疫反応性であることが分かった。さらに、 β -1, 4-GalT-V 質量、mRNA 発現、酵素活性、及び GSL 最終生成物レベルを評価した。ヒト CRC 細胞株における GSL グリコシルトランスフェラーゼ阻害剤の効果を調べた。実施例のセクションで詳細に記載されるこれらの結果は、CRC の病理発生に対する新たな洞察を提供し、CRC の有望な検出／予後バイオマーカーを明らかにする。用途には、癌、特に結腸直腸癌及び結腸直腸癌の前駆腫瘍（例えば、進行した腺腫）のスクリーニングに有用なバイオマーカーが含まれる。結腸直腸癌等の癌の治療に使用するための組成物も記載される。

【0099】

結腸直腸癌には、結腸癌、直腸癌、及びそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。結腸直腸癌には、転移性結腸直腸癌及び非転移性結腸直腸癌が含まれる。結腸直腸癌には、結腸癌の近位部分に位置する癌及び結腸の遠位部分に位置する癌が含まれる。結腸直腸癌には、例えば、ステージ I、ステージ II、ステージ III 及びステージ IV 結腸直腸癌（例えば、ステージ 0、I、IIA、IIB、IIC、IIIA、IIIB、IIIC、IVA、IVB 及び IVC）を含む、当技術分野で公知の様々な可能性のあるステージのいずれかの結腸直腸癌が含まれる。結腸直腸癌には、腫瘍／結節／転移（TNM）の病期分類システムの全ての病期が含まれる。結腸直腸癌に関して、T は、腫瘍が結腸又は直腸の壁内に成長したかどうか、及びその場合は何層まで成長したかを指すことができ、N は、腫瘍がリンパ節に進展しているかどうか、及び進展している場合、リンパ節の数及びそれらが位置する場所を指すことができ、M は、癌が身体他の部分に進展しているかどうか、及び進展している場合はどの部分にどの程度まで進展しているかを指すことができる。T、N、及び M の特定の病期は、当技術分野で公知である。T 病期は、TX、T0、Tis、T1、T2、T3、T4a、及び T4b を含むことができ、N 病期は、NX、N0、N1a、N1b、N1c、N2a、及び N2b を含むことができ、M 病期は、M0、M1a、及び M1b を含むことができる。さらに、結腸直腸癌のグレードには、GX、G1、G2、G3 及び G4 が含まれ得る。癌、特に結腸直腸癌を病期分類する様々な手段は当技術分野で周知であり、例えば、cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/stages に要約される。

【0100】

特定の実施形態において、本開示は、初期結腸直腸癌のスクリーニングを含む。初期段階の結腸直腸癌は、例えば、それらがまだ対象のリンパ節、例えば癌に近いリンパ節に進展しておらず（ステージ N0）、遠隔部位に進展していない（ステージ M0）という点で、例えば対象内に局在する結腸直腸癌を含み得る。初期癌には、例えばステージ 0～IIC に対応する結腸直腸癌が含まれる。

【0101】

したがって、結腸直腸癌には、とりわけ、前悪性結腸直腸癌（例えば、進行した腺腫）及び悪性結腸直腸癌が含まれる。本開示の方法及び組成物は、本明細書に命名されたもの又は当技術分野で他の方法で公知のもの、並びにそれらの全てのサブセットを含むがこれらに限定されない、その形態及び病期の全てにおいて結腸直腸癌のスクリーニングに有用である。したがって、当業者は、本明細書で提供される結腸直腸癌への全ての言及が、本明細書に命名されたもの又は他の状態で当技術分野で公知のものを含むがこれらに限定さ

れない、その全ての形態及び病期の結腸直腸癌、並びにその全てのサブセットを含むがこれらに限定されないことを理解するであろう。

【0102】

したがって、特定の実施形態において、癌、例えば結腸直腸癌の予防及び治療における医薬組成物は、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤の、それを必要とする対象への投与を含む。

【0103】

特定の実施形態において、癌を治療する方法は、治療有効量の (a) 抗体であって、該抗体は、 $\beta-1$, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、該抗体は、(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQRPQGGL EWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSSSTAYMQLNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTLTVSS (配列番号3) と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び(ii) DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLGS GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号4) と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む抗体と、(b) 治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤と、を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。特定の実施形態において、抗体は、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態において、抗体は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含む。

10

20

【0104】

特定の実施形態において、医薬組成物は、治療有効量の (i) (a) 配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域配列核酸配列、及び(b) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列核酸配列を含む抗体と、(ii) 配列番号5と少なくとも90%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む合成ペプチドと、(iii) アジュバントとを含む。特定の実施形態において、抗体は、(a) 配列番号3を含む重鎖可変領域核酸配列、及び(b) 配列番号2を含む軽鎖可変領域核酸配列と、配列番号5を含む合成ペプチドアミノ酸配列とを含む。

30

【0105】

特定の実施形態において、医薬組成物は、治療有効量の (a) 抗体であって、該抗体は $\beta-1$, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、該抗体は、(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQRPQGGL EWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSSSTAYMQLNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTLTVSS (配列番号3) と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び(ii) DVVMTQTPTL SVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLGS GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号4) と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む抗体と、(b) 治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤と、を含む。特定の実施形態において、抗体は、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態において、抗体は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含む。

40

【0106】

特定の実施形態において、医薬組成物は、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D-PDMP)、(1R, 2R)-ノナン酸 (2-(2', 3-ジヒドロベンゾ (1, 4) ジオキシ-6'-イル)-2-ヒドロキシ-1-ピロリジン-1-イルメチル-エチル)-アミド-L-酒石酸塩 (Genz-

50

1 2 3 3 4 6)、イミド糖、1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(DMP)、1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(PPMP)、脂質、セラミド、又はそれらの組合せを含む少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤を更に含み、生分解性ポリマーによってカプセル化されていないか、又はカプセル化されている。特定の実施形態において、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤は、生分解性ポリマー(BPD)にカプセル化されていないか、又はカプセル化されている、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(D-PDMP)である。特定の実施形態において、生分解性ポリマーは、ポリエチレングリコール及びセバシン酸からなる。

【0107】

特定の実施形態において、医薬組成物は、1つ以上の二次治療剤を更に含む。特定の実施形態において、1つ以上の二次治療剤は、化学療法剤、抗炎症剤、コレステロール低下剤、インスリン、抗体、ペプチド、酵素、アジュバント又はそれらの組合せを含む。特定の実施形態において、医薬組成物は、抗体を、検出可能な薬剤、放射線治療剤、毒素、放射性薬剤、色素、ペプチド、ポリヌクレオチド又はナノリポソームにコンジュゲートさせることを更に含む。特定の実施形態において、ナノリポソームは、治療剤(複数可)を含む。

【0108】

特定の実施形態において、医薬組成物は、IGAQVYEQVLRSA YAKRNS SVND(配列番号5)と少なくとも90%の配列同一性を有するペプチドを更に含む。

【0109】

特定の実施形態において、組成物が、治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤及び/又は治療有効量の、 β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV(BGA)、そのアイソフォーム若しくはペプチドに特異的に結合する抗体を含む。

【0110】

特定の実施形態において、組成物が、治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤及び/又は治療有効量の β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV(BGA)、そのアイソフォーム若しくはペプチドの発現又は活性を調節する薬剤を含む。特定の実施形態において、薬剤は、 β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV(BGA)、そのアイソフォーム又はペプチドの発現又は活性を阻害する。

【0111】

脂質の例としては、限定されないが、脂肪酸、遊離脂肪酸、コレステロール、ステロールエステル、トリグリセリド、ジグリセリド、グリセリド、ワックスエステル、スクアレン、セラミド、脂質、リン脂質、糖脂質、リノール酸又はそれらの組合せが挙げられる。

【0112】

他の実施形態において、癌を治療する方法は、それを必要とする対象に、治療有効量のスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤、脂質又はそれらの組合せを投与することを含む。特定の実施形態において、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤は、生分解性ポリマー(BPD)にカプセル化されていないか、結合されていないか、又はカプセル化されている、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(D-PDMP)である。特定の実施形態において、生分解性ポリマーは、ポリエチレングリコール及びセバシン酸からなる。

【0113】

併用療法

特定の実施形態において、医薬組成物は、化学療法剤、放射線療法、毒素又はそれらの組合せ等の抗癌剤を含む。

【0114】

特定の実施形態において、特定の実施形態において、抗癌剤は、化学療法剤又は成長阻害剤、標的化治療剤、キメラ抗原受容体を発現するT細胞、抗体又はその抗原結合断片、抗体-薬物コンジュゲート、血管新生阻害剤、抗新生物剤、癌ワクチン、アジュバント、

10

20

30

40

50

及びそれらの組合せである。特定の実施形態において、抗癌剤は、化学療法剤又は成長阻害剤である。例えば、化学療法剤又は増殖阻害剤には、アルキル化剤、アントラサイクリン、抗ホルモン剤、アロマターゼ阻害剤、抗アンドロゲン、プロテインキナーゼ阻害剤、脂質キナーゼ阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞毒性剤又は抗腫瘍抗生物質、プロテアソーム阻害剤、抗微小管剤、EGFRアンタゴニスト、レチノイド、チロシンキナーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、及びそれらの組合せが含まれ得る。特定の実施形態において、抗癌剤は、アジュバントである。癌関連抗原に対する等の抗癌免疫応答を増強するか、又は免疫系の成分への癌抗原の提示を助ける任意の物質を、本開示の抗癌アジュバントと見なし得る。

10

【0115】

化学療法：一般に、癌治療には、化学療法及び放射線療法の両方に基づく治療を伴う様々な併用療法も含まれる。併用化学療法としては、例えば、シスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビン、ナベルピン、ファメシルータンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン及びメトトレキサート、テマゾロミド（DTICの水性形態）、又は前述の任意の類縁体若しくは誘導体変異体が挙げられる。化学療法と生物学的療法との組合せは、生物化学療法として知られている。化学療法はまた、メトロノミック化学療法として知られている低用量の連続投与で投与され得る。

20

【0116】

なお更なる併用化学療法には、例えば、チオテパ及びシクロホスファミド等のアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン等のアルキルスルホネート；ベンゾドパ、カルボコン、メトレドパ、ウレドパ等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、トリメチロメラミンを含むエチレンイミン及びメチルアメラミン；アセトゲニン（特にブラタシン及びブラタシノン）；カンプトテシン（合成類縁体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリストアチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成類縁体を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類縁体、KW-2189及びCB1-TM1を含む）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロフォスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン等のニトロソ尿素；エンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシングムオール及びカリケアマイシンオメガオール）等の抗生物質；ダイネマイシン（ダイネマイシンAを含む）；ビスホスホネート、例えばクロドロネート；エスペラマイシン；同様にまた、ネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連する色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラルマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-2-ノルロイシン、ドキソルビシン（モルホリノードキソルビシン、シアノモルホリノードキソルビシン、2-ピロリジン-ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラルマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポフィロ

30

40

50

マイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ドキシソルピシン；メトトレキサート、5-フルオロウラシル（5-FU）等の代謝拮抗剤；デノプテリン、プテロプテリン、トリメトトレキサート等の葉酸類縁体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン等のプリン類縁体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン等のピリミジン類縁体；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗アドレナリン、例えば、ミトタン、トリロスタン；フロリン酸等の葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルホルミチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン；トグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシン及びアンサミトシン等のメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモル；ニトレリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖複合体；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2"-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラクリンA、ロリジンA及びアンギジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；タキソイド、例えばパクリタキセル及びドセタキセルゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；シスプラチン、オキサリプラチン及びカルボプラチン等の白金配位錯体；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼロダ；イバンドロネート；イリノテカン（例えば、CPT-11）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルクロルニチン（DMFO）；レチノイン酸等のレチノイド；カペシタビン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン、ゲムシタビン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金；並びに上記のいずれかの薬学的に許容され得る塩、酸又は誘導体が含まれる。特定の実施形態において、1つ以上化学療法剤が、本明細書に提供される組成物と組み合わせて使用される場合がある。

10

20

30

40

【0117】

放射線療法：DNA損傷を引き起こし、癌治療において広く使用されている他の因子には、ガンマ線、X線、及び／又は腫瘍細胞への放射性同位元素の指向性送達として一般に知られているものが含まれる。マイクロ波及びUV照射等の他の形態のDNA損傷因子も知られている。これらの因子の全てが、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製及び修復、並びに染色体の構築及び維持に広範囲の損傷をもたらす可能性が最も高い。X線の線量範囲は、長期間（3～4週間）にわたる50～200レントゲンの1日線量から2000～6000レントゲンの単回線量までの範囲である。放射性同位元素の線量範囲は広く異なり、同位体の半減期、放出される放射線の強度及び種類、並びに新生物細胞による取り込みに依存する。

【0118】

免疫療法：免疫療法は、一般に、癌細胞を標的化して破壊するための免疫エフェクター細胞及び分子の使用に依存する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカーに特異的な抗体であり得る。抗体は単独で治療のエフェクターとして機能し得るか、又は他の細胞を動員して実際に細胞死滅をもたらし得る。抗体はまた、薬物又は毒素（化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等）に結合体化され得、単に標的化剤として機能し得る。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接的又は間接的に相互作用する表面分子を担持するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞及びNK細胞、並びにキメラ抗原受容体を発現するよう

50

に改変されたこれらの細胞型の遺伝子操作された変異体が含まれる。

【0119】

免疫療法は、1つ以上の癌抗原、特にタンパク質若しくはその免疫原性断片、前記癌抗原をコードするDNA若しくはRNA、特にタンパク質若しくはその免疫原性断片、癌細胞溶解物、及び／又は腫瘍細胞からのタンパク質調製物を含む癌ワクチンであり得る。本明細書で使用される場合、癌抗原は、癌細胞に存在する抗原性物質である。原則として、変異に起因する異常な構造を有する癌細胞において産生されるタンパク質はいずれも、癌抗原として作用し得る。原則として、癌抗原は、変異癌遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子の産物、他の変異遺伝子の産物、過剰発現又は異常発現細胞タンパク質、発癌性ウイルスによって産生される癌抗原、癌胎児抗原、変化した細胞表面糖脂質及び糖タンパク質、又は細胞型特異的分化抗原であり得る。癌抗原の例としては、ras及びp53遺伝子の異常産物が挙げられる。他の例としては、組織分化抗原、変異タンパク質抗原、発癌性ウイルス抗原、癌精巢抗原及び血管又は間質特異的抗原が挙げられる。組織分化抗原は、特定のタイプの組織に特異的な抗原である。正常細胞はこれらのタンパク質を含有すべきではないので、変異タンパク質抗原は癌細胞にはるかに特異的である可能性が高い。正常細胞はそのMHC分子上に正常タンパク質抗原を提示するが、癌細胞は変異型を提示する。いくつかのウイルスタンパク質は癌の形成に関与しており、いくつかのウイルス抗原も癌抗原である。

10

【0120】

特定の実施形態において、癌を治療する方法は、配列番号5と少なくとも90%のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含む治療有効量の合成ペプチドと、少なくとも1つのアジュバントを投与することを含む。特定の実施形態において、合成ペプチドは、配列番号5を含む。治療有効量の配列番号5の投与は、 $\beta-1$ 、4-ガラクトシルトランスフェラーゼV ($\beta-1$ 、4-GalT-V) に対する免疫応答を生成する。特定の実施形態において、アジュバントも対象に投与される。

20

【0121】

特定の実施形態において、免疫療法は、ポリクローナル抗体調製物の一部等の抗体であり得るか、又はモノクローナル抗体であり得る。抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体断片、二重特異性抗体又は一本鎖抗体であり得る。本明細書に開示される抗体は、限定されないが、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)及びVLドメイン又はVHドメインのいずれかを含む断片等の抗体断片を含む。

30

【0122】

特定の実施形態において、抗体は、(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQRPQGGL EWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSSSTAYMQLNSLASEDSAVYYCARWSDYDYWGQGTTTLTVSS (配列番号3) と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び／又は(ii) DVVMTQTPTPLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLGSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPRTFGGGT KLEIKR (配列番号4) と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む。

40

【0123】

特定の実施形態において、1つ以上の抗体は、併用療法として、それを必要とする対象に投与される。本明細書で提供される組成物と組み合わせて使用され得るモノクローナル抗体の例には、限定されないが、トラスツズマブ(抗HER2/neu抗体)；ペルツズマブ(抗HER2 mAb)；セツキシマブ(上皮増殖因子受容体EGFRに対するキメラモノクローナル抗体)；パニツムマブ(抗EGFR抗体)；ニモツズマブ(抗EGFR抗体)；ザルツムマブ(抗EGFR mAb)；ネシツムマブ(抗EGFR mAb)；MDX-210(ヒト化抗HER-2二重特異性抗体)；MDX-210(ヒト化抗HER

50

R-2 二重特異性抗体) ; MDX-447 (ヒト化抗 EGF 受容体二重特異性抗体) ; リツキシマブ (キメラマウス/ヒト抗 CD20 mAb) ; オビヌツズマブ (抗 CD20 mAb) ; オファツムマブ (抗 CD20 mAb) ; トシツムマブ-I131 (抗 CD20 mAb) ; イブリツモマブチウキセタン (抗 CD20 mAb) ; ベバシズマブ (抗 VEGF mAb) ; ラムシルマブ (抗 VEGFR2 mAb) ; ラニビズマブ (抗 VEGF mAb) ; アフリベルセプト (IgG1Fc に融合した VEGFR1 及び VEGFR2 の細胞外ドメイン) ; AMG386 (IgG1Fc に融合したアンジオポエチン-1 及び-2 結合ペプチド) ; ダロツズマブ (抗 IGF-1R mAb) ; ゲムツズマブオゾガマイシン (抗 CD33 mAb) ; アレムツズマブ (抗 Campath-1/CD52 mAb) ; ブレンツキシマブベドチン (抗 CD30 mAb) ; カツマキソマブ (上皮細胞接着分子及び CD3 を標的とする二重特異性 mAb) ; ナプトモマブ (抗 5T4 mAb) ; ジレンツキシマブ (抗炭酸脱水酵素 ix) ; 又はファルレツズマブ (抗葉酸受容体) が含まれる。他の例には、抗体、例えば、Panorex (商標) (17-1A) (マウスモノクローナル抗体) ; Panorex (17-1A) (キメラマウスモノクローナル抗体) ; BEC2 (アミイディオタイプ mAb は GD エピトープを模倣する) (BCG 使用) ; 腫瘍 (Lym-1 モノクローナル抗体) ; SMART M195 Ab、ヒト化 13' 1 LYM-1 (Oncolym)、Ovarex (B43.13、抗イディオタイプマウス mAb) ; 腺癌上の EGP40 (17-1A) 汎癌抗原に結合する 3622W94 mAb ; Zenapax (SMART 抗 Tac (IL-2 受容体) ; SMART M195 Ab、ヒト化 Ab、ヒト化) ; NovoMAb-G2 (汎癌特異的 Ab) ; TNT (ヒストン抗原に対するキメラ mAb) ; TNT (ヒストン抗原に対するキメラ mAb) ; グリオーマブ-H (モノクローナル抗体-ヒト化 Ab) ; GNI-250 Mab ; EMD-72000 (キメラ EGF アンタゴニスト) ; リンホシド (ヒト化 IL-2 抗体) ; 及び MDX-260 二重特異性、標的である GD-2、ANA Ab、SMART IDIO Ab、SMART ABL 364 Ab 又は ImmurAIT-CEA が含まれる。抗体の例としては、米国特許第 5,736,167 号、米国特許第 7,060,808 号及び米国特許第 5,821,337 号に開示されているものが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0124】

受動免疫療法：癌の受動免疫療法のためのいくつかの異なるアプローチが存在する。それらは、以下に広く分類され得る：抗体単独の注射；毒素又は化学療法剤に結合した抗体の注射；放射性同位体に結合した抗体の注入；抗イディオタイプ抗体の注射；最後に、骨髄中の腫瘍細胞のパーズを行う。

【0125】

したがって、特定の実施形態において、癌を治療する方法は、治療有効量の (a) 抗体であって、該抗体は、 $\beta-1$, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V ($\beta-1$, 4-GalT-V) エピトープに特異的に結合し、該抗体は、(i) EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTFTNYWMQWIKQRP GGQGLEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADKSSSTAYMQ LNSLASEDS AVYYCARWSDYDYWGQG GTTLTVSS (配列番号 3) と少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び (ii) DVVMTQTPTPLSVTIGQPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNWLLQRP GGQSPKRLIYLVSKLGS GVPDRFTGS GSGTDFTLKISRVEAEDLG VY YCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR (配列番号 4) と少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む抗体と、1つ以上の二次治療剤と、を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。特定の実施形態において、1つ以上の二次治療剤は、化学療法剤、抗炎症剤、コレステロール低下剤、インスリン、抗体、ペプチド、酵素、アジュバント又はそれらの組合せを含む。特定の実施形態において、医薬組成物は、抗体を、検出可能な薬剤、放射線治療剤、毒素、放射性薬剤、色素、ペプチド、ポリヌクレオチド又はナノリポソームにコンジュゲートさせることを更に含む。特

定の実施形態において、ナノリボソームは、治療剤（複数可）を含む。

【0126】

他の薬剤：治療の治療有効性を改善するために、他の薬剤を本明細書で提供される組成物と組み合わせて使用され得ると考えられる。これらの追加の薬剤には、免疫調節剤、細胞表面受容体及びGAP接合部の上方制御に影響を及ぼす薬剤、細胞増殖抑制剤及び分化剤、細胞接着の阻害剤、又はアポトーシス誘導因子に対する過剰増殖性細胞の感受性を増加させる薬剤を含む。免疫調節剤には、腫瘍壊死因子；インターフェロナルファ、ベータ及びガンマ；IL-2及び他のサイトカイン；F42K及び他のサイトカイン類縁体；又はMIP-1、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES及び他のケモカインが含まれる。細胞表面受容体又はそれらのリガンド（例えば、Fas/Fasリガンド、DR4又はDR5/TRAIL等）のアプレギュレーションは、過剰増殖性細胞に対するオートクリン又はパラクリン効果の確立によって、本明細書中に提供される組成物のアポトーシス誘導能を増強するであろうことが更に想定される。GAP接合部の数を増加させることによる細胞間シグナル伝達の増加は、隣接する過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増加させるであろう。他の実施形態において、細胞増殖抑制剤又は分化剤を本明細書で提供される組成物と組み合わせて使用して、治療の抗増殖効力を改善することができる。細胞接着の阻害剤は、本発明の有効性を改善するために企図される。細胞接着阻害剤の例は、焦点接着キナーゼ（FAK）阻害剤及びロバスタチンである。アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感受性を増加させる他の薬剤、例えば抗体c225を、本明細書に提供される組成物と組み合わせて使用して、治療効力を改善することができることが更に企

10

20

【0127】

更なる実施形態において、他の薬剤は、1つ以上の腫瘍溶解性ウイルス、例えばp53及び／又はIL24以外の遺伝子、例えばサイトカインを発現するように操作された腫瘍溶解性ウイルスであり得る。腫瘍溶解性ウイルスの例としては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ポリオウイルス、ニューカッスル病ウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス、インフルエンザウイルス及びレオウイルスが挙げられる。

【0128】

特定の実施形態において、ホルモン療法はまた、本実施形態と組み合わせて、又は前述の任意の他の癌治療と組み合わせて使用されてもよい。ホルモンの使用は、特定のホルモンのレベルを低下させるか又はその効果を遮断するために使用され得る。この治療は、治療選択肢として、又は転移のリスクを低減するために、少なくとも1つの他の癌治療と組み合わせて使用されることが多い。

30

【0129】

いくつかの態様において、追加の抗癌剤は、EGFR、VEGFR、AKT、Erb1、Erb2、ErbB、Syk、Bcr-Abl、JAK、Src、GSK-3、PI3K、Ras、Raf、MAPK、MAPKK、mTOR、c-Kit、ephr受容体又はBRAF阻害剤等のプロテインキナーゼ又は成長因子シグナル伝達経路に關与する受容体を阻害するプロテインキナーゼ阻害剤又はモノクローナル抗体である。プロテインキナーゼ又は成長因子シグナル伝達経路阻害剤の非限定的な例には、アフマチニブ、アキシチニブ、ペバシズマブ、ボスチニブ、セツキシマブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンバチニブ、ムブリチニブ、ニロチニブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ペガブタニブ、ラニビズマブ、ルキシリチニブ、サラカチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トラスツズマブ、バンデタニブ、AP23451、ベムラフェニブ、MK-2206、GSK690693、A-443654、VQD-002、ミルテホシン、ペリホシン、CAL101、PX-866、LY294002、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、リダフォロリムス、アルボシジブ、ゲニステイン、セルメチニブ、AZD-6244、バタラニブ、P1446A

40

50

ー 05、AG-024322、ZD1839、P276-00、GW572016又はそれらの混合物が含まれる。

【0130】

追加の癌治療は、例えば、上皮増殖因子受容体 (EGFR、EGFR1、ErbB-1、HER1)、ErbB-2 (HER2/neu)、ErbB-3/HER3、ErbB-4/HER4、EGFRリガンドファミリー；インスリン様成長因子受容体 (IGFR) ファミリー、IGF結合タンパク質 (IGFBP)、IGFRリガンドファミリー (IGF-1R)；血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) ファミリー、PDGFRリガンドファミリー；線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) ファミリー、FGFRリガンドファミリー、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) ファミリー、VEGFファミリー；HGF受容体ファミリー；TRK受容体ファミリー；エフリン (EPH) 受容体ファミリー；AXL受容体ファミリー；白血球チロシンキナーゼ (LTK) 受容体ファミリー；TIE受容体ファミリー、アンジオポエチン1、2；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 (ROR) 受容体ファミリー；ジスコイジンドメイン受容体 (DDR) ファミリー；RET受容体ファミリー；KLG受容体ファミリー；RYKレセプターファミリー；MUSK受容体ファミリー；トランスフォーミング成長因子アルファ (TGF- α)、TGF- α 受容体；形質転換成長因子 β (TGF- β)、TGF- β 受容体；インターロイキン13受容体アルファ2鎖 (IL13Rアルファ2)、インターロイキン-6 (IL-6)、IL-6受容体、インターロイキン-4、IL-4受容体、サイトカイン受容体、クラスI (ヘマトポエチンファミリー) 及びクラスII (インターフェロン/IL-10ファミリー) 受容体、腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリー、TNF- α 、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体スーパーファミリー (TNTRSF)、細胞死受容体ファミリー、TRAIL受容体；癌精巢 (CT) 抗原、系統特異的抗原、分化抗原、アルファ-アクチニン-4、ARTC1、切断点クラスター領域-アベルソン (Bcr-abl) 融合産物、BRAF、カスパーゼ-5 (CASP-5)、カスパーゼ-8 (CASP-8)、ベータ-カテニン (CTNNB1)、細胞分裂周期27 (CDC27)、サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、CDKN2A、COA-1、dek-can融合タンパク質、EFTUD-2、伸長因子2 (ELF2)、Ets変異体遺伝子6/急性骨髄性白血病1遺伝子ETS (ETC6-AML1) 融合タンパク質、フィブロネクチン (FN)、GPNMB、低密度脂質受容体/GDP-Lフコース： β -ガラクトース2-アルファ-Lフコシルトランスフェラーゼ；(LDLR/FUT) 融合タンパク質、HLA-A2、HLA-A2遺伝子のアルファ2ドメインのアルファヘリックスの残基170におけるアルギニンからイソロイシンへの交換 (HLA-A*201-R170I)、MLA-A11、熱ショックタンパク質70-2変異 (HSP70-2M)、KIAA0205、MART2、偏在性黒色腫変異1、2、3 (MUM-1、2、3)、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)、neo-PAP、ミオシンクラス1、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARアルファ融合タンパク質、PRDXS、PTPRK、K-ras (KRAS2)、N-ras (NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1又は-SSX2融合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE、BAGE-1、BAGE-2、3、4、5、GAGE-1、2、3、4、5、6、7、8、GnT-V (異常なN-アセチルジウコサミニルトランスフェラーゼV、MGATS)、HERV-K-MEL、KK-LC、KM-HN-1、LAGE、LAGE-1、黒色腫上のCTL認識抗原 (CAMEL)、MAGE-A1 (MAGE-1)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-AS、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、ムチン1 (MUC1)、MART-1/Melan-A (MLANA)、gp100、gp100/Pme117 (S1LV)、チロシンナーゼ (TYR)、TRP-1、HAGE、NA-88、NY-ESO-1、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1、2、3、4、TRP2-1NT2、癌胎児性抗原 (C

10

20

30

40

50

E A)、カリクレフィン4 (K a l l i k f e i n 4)、m a m m a g l o b i n-A、O A 1、前立腺特異的抗原 (P S A)、前立腺特異的膜抗原、T R P-1 / g p 7 5、T R P-2、アディポフィリン、ニエラノルナ2に存在しないインターフェロン誘導性タンパク質 (A I M-2)、B I N G-4、C P S F、サイクリンD 1、上皮細胞接着分子 (E p-C A M)、E p b A 3、線維芽細胞増殖因子-5 (F G F-5)、糖タンパク質250 (g p 250 腸管カルボキシルエステラーゼ (i C E)、アルファーフェトタンパク質 (A F P)、M-C S F、m d m-2、M U C I、p 5 3 (T P 5 3)、P B F、F R A M E、P S M A、R A G E-1、R N F 4 3、R U 2 A S、S O X 1 0、S T E A P 1 1、サバイビン (B I R C S)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、テロメラーゼ、ウィルス腫瘍遺伝子 (W T 1)、S Y C P 1、B R D T、S P A N X、X A G E、A D A M 2、P A G E-5、L I P 1、C T A G E-1、C S A G E、M M A 1、C A G E、B O R I S、H O M-T E S-8 5、A F 1 5 q 1 4、H C A 6 6 I、L D H C、M O R C、S G Y-1、S P O 1 1、T P X 1、N Y-S A R-3 5、F T H L I 7、N X F 2 T D R D 1、T E X 1 5、F A T E、T P T E、免疫グロブリンイデオタイプ、ベンス・ジョーンズタンパク質、エストロゲン受容体 (E R)、アンドロゲン受容体 (A R)、C D 4 0、C D 3 0、C D 2 0、C D 1 9、C D 3 3、C D 4、C D 2 5、C D 3、癌抗原72-4 (C A 72-4)、癌抗原15-3 (C A 15-3)、癌抗原27-29 (C A 27-29)、癌抗原125 (C A 125)、癌抗原19-9 (C A 19-9)、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、1-2ミクログロブリン、扁平上皮癌抗原、ニューロン特異的 e n o J a s e、熱ショックタンパク質 g p 9 6、G M 2、サルグラモスチム、C T L A-4、707アラニンプロリン (707-AP)、T細胞によって認識される腺癌抗原4 (A R T-4)、癌発生抗原ペプチド-1 (C A P-1)、カルシウム活性化クロライドチャネル-2 (C L C A 2)、シクロフィリンB (C y p-B)、ヒトシネ環腫瘍-2 (H S T-2)、ヒトパピローマウイルス (H P V) タンパク質 (H P V-E 6、H P V-E 7、主要カプシド抗原又は微量カプシド抗原、その他)、エプスタイン・バー・ビム (E B V) タンパク質 (E B V 潜在膜タンパク質-L M P 1、L M P 2; その他)、B型又はC型肝炎ウイルスタンパク質、及びH I Vタンパク質を標的とする抗体、ペプチド、ポリペプチド、小分子阻害剤、s i R N A、m i R N A、又は遺伝子治療を含み得る。

10

20

30

40

50

【0131】

スフィンゴ糖脂質合成阻害剤：特定の実施形態において、方法は、生分解性ポリマーによってカプセル化されていないか、又はカプセル化されている、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D-P D M P)、(1R, 2R)-ノナン酸 (2-(2', 3-ジヒドロベンゾ (1, 4) ジオキシシ-6'-イル)-2-ヒドロキシ-1-ピロリジン-1-イルメチル-エチル)-アミド-ル-酒石酸塩 (G e n z-123346)、イミド糖、1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D M P)、1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (P P M P)、脂質、セラミド、又はそれらの組合せを含む少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤を投与することを更に含む。特定の実施形態において、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤は、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール (D-P D M P) (例えば、生分解性ポリマーと混合され得る、例えば、生分解性ポリマー (B P D) にカプセル化されていないか、又はカプセル化されているD-P D M Pを含む) である。特定の実施形態において、生分解性ポリマーは、ポリエチレングリコール及びセバシン酸からなる。

【0132】

ある特定の実施形態において、組成物は、スフィンゴ糖脂質合成の阻害剤、グルコシルセラミドシンターゼの阻害剤又はそれらの組合せを含む。特定の実施形態において、グルコシルセラミド合成を阻害する化合物は、イミノ糖である。別の実施形態において、イミド糖は、N-ブチルデオキシノジリマイシン、N-ブチルデオキシガラクトノジリマイシン (N B-D G J) 又はN-ノニルデオキシノジリマイシンである。別の実施形態におい

て、グルコシルセラミド合成の阻害剤は、1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール（DMP）、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール及びその構造的に関連する類縁体である。別の実施形態において、グルコシルセラミド合成の阻害剤は、1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール（PPMP）及びその構造的に関連する類縁体である。特定の実施形態において、組成物は、生分解性ポリマーによってカプセル化されている、D-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール（D-PDMP）、（1R, 2R）-ノナン酸（2-（2', 3-ジヒドロ-ベンゾ（1, 4）ジオキシン-6'-イル）-2-ヒドロキシ-1-ピロリジン-1-イルメチル-エチル）-アミド-L-酒石酸塩（Genz-123346）、イミド糖、1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール（DMP）、1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール（PPMP）、脂質、セラミド、又はそれらの組合せを含む。

10

【0133】

医薬製剤

特定の実施形態において、本明細書で具体化される医薬組成物は、全身投与、例えば経口、i.v.、i.m.等のために製剤化され、治療有効量のスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤、例えば、治療有効量の（a）抗体であって、該抗体は β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V（ β -1, 4-GalT-V）エピトープに特異的に結合し、該抗体は、（i）EVQLEQSGAELARPGASVKLS CRTSGYTF TNYWM QWIKQRP GQGLEWIGAMHPGRAYIRYNQKFQ GKATLTADK SSSTAYMQLNS LASEDS AVYYCARWSDYDYWGQGTTLT VSS（配列番号3）と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域配列、及び（ii）DVVMTQTPTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDS DG KTYLNLWL LQRP GQSPKRLIYLVS KLGSGVPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIKR（配列番号4）と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変配列を含む抗体、及び／又は配列番号5を含むペプチド、及び／又は例えば、生分解性ポリマーと混合され得る、例えば、生分解性ポリマー（BPD）にカプセル化されていない若しくはカプセル化されたD-PDMPを含むD-トレオ-1-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール（D-PDMP）、又はそれらの組合せを含む。

20

30

【0134】

医薬組成物は、薬学的に許容され得る担体を含み得る。「薬学的に許容され得る」という用語は、連邦政府若しくは州政府の規制機関によって承認されていること、又は動物、より具体的にはヒトでの使用について、米国薬局方若しくは他の一般に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。そのような医薬担体は、滅菌液体、例えば水及び油、例えば石油、動物、植物又は合成起源のもの、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油、オリーブ油、ゲル（例えば、ヒドロゲル）等であり得る。医薬組成物を静脈内投与する場合、生理食塩水が好ましい担体である。生理食塩水並びにデキストロス及びグリセロール水溶液も、特に注射液用の液体担体として使用することができる。

40

【0135】

適切な医薬賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が含まれる。組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤も含有することができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続放出製剤等の形態をとることができる。経口製剤は、医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体

50

を含むことができる。適切な医薬担体の例は、E. W. Martinによる“Remington's Pharmaceutical Sciences”に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。そのような組成物は、一般に、患者への適切な投与のための形態を提供するように、適切な量の担体と共に、精製形態の治療有効量の医薬品及び／又は治療化合物（例えば、バイオポリマーカプセル化D-PDMP）を含有する。製剤は投与様式に適するべきである。

【0136】

実施形態において、医薬品及び／又は治療化合物は、例えば活性物質の制御された溶解及び／又は拡散によって、即時放出又は制御放出組成物として局所投与される。溶解又は拡散制御放出は、活性物質を適切なマトリックスに組み込むことによって達成することができる。制御放出マトリックスは、バイオポリマー、シェラック、ミツロウ、グリコワックス（glycowax）、キャスターワックス、カルナバロウ、ステアリルアルコール、モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、パルミトステアリン酸グリセロールエステル、エチルセルロース、アクリル樹脂、d-ポリ乳酸、酢酸酪酸セルロース、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ビニルピロリドン、ポリエチレン、ポリメタクリレート、メチルメタクリレート、2-ヒドロキシメタクリレート、メタクリレートヒドロゲル、1,3-ブチレングリコール、エチレングリコールメタクリレート、及び／又はポリエチレングリコール及び／又はセバシン酸のうちの1つ以上を含み得る。制御放出マトリックス配合物では、マトリックス材料はまた、例えば、水和メチルセルロース、カルナバワックス及びステアリルアルコール、カルボポール934、シリコーン、グリセリルトリスチアレート、メチルアクリレート-メチルメタクリレート、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、及び／又はハロゲン化フルオロカーボンを含み得る。特定の実施形態において、制御放出組成物は、経皮パッチを介して達成される。

【0137】

制御放出マトリックスはまた、ヒドロゲル：大量の水を取り込むことができる三次元、親水性又は両親媒性ポリマーネットワークであってもよい。ネットワークは、共有結合性の化学的又は物理的（例えば、イオン性、疎水性相互作用、絡み合い）架橋の存在に起因して不溶性であるホモポリマー又はコポリマーから構成され得る。架橋は、ネットワーク構造及び物理的完全性を提供する。ヒドロゲルは、水性媒体中で膨潤することを可能にする水との熱力学的適合性を示す。ネットワークの鎖は、細孔が存在し、これらの細孔のかなりの部分が1nm~1000nmの寸法であるように接続されている。

【0138】

ヒドロゲルは、親水性バイオポリマー又は合成ポリマーを架橋することによって調製することができる。親水性バイオポリマーの物理的又は化学的架橋から形成されるヒドロゲルの例には、ヒアルロナン、キトサン、アルギネート、コラーゲン、デキストラン、ペクチン、カラギーナン、ポリリジン、ゼラチン、アガロース、（メタ）アクリレート-オリゴラクチド-PEO-オリゴラクチド（メタ）アクリレート、ポリ（エチレングリコール）（PEO）、ポリ（プロピレングリコール）（PPO）、PEO-PPO-PEOコポリマー（Pluronic）、ポリ（ホスファゼン）、ポリ（メタクリレート）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、PL(G)A-PEO-PL(G)Aコポリマー、ポリ（エチレンイミン）等が含まれるが、これらに限定されない。Hennink and van Nostrum, Adv. Drug Del. Rev. 54:13-36 (2002); Hoffman, Adv. Drug Del. Rev. 43:3-12 (2002); Cadee et al., J. Control. Release 78:1-13 (2002); Surini et al., J. Control. Release 90:291-301 (2003); 及び米国特許第7,968,085号（これらの各々は、参照によりその全体が組み込まれる）を参照されたい。これらの材料は、直鎖又は分枝鎖の多糖又はポリペプチドからなる高分子量骨格鎖からなる。

【0139】

アテローム性心疾患の治療又は予防に有効となる本発明の医薬組成物の量は、標準的な

臨床技術によって決定することができる。さらに、*in vitro*アッセイは、任意に、最適な投与量範囲を特定するのに助けるために使用され得る。製剤に使用される正確な用量はまた、投与経路及び疾患の重篤度に依存し得、施術者の判断及び各患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、本明細書に記載されるか又は当業者に公知の *in vitro* 又は動物モデル試験系から誘導される用量応答曲線から外挿され得る。

【0140】

投与及び投与レジメン

医薬品及び／又は治療用化合物又はこれらの剤／化合物を含有する組成物は、投与製剤と適合する様式で、治療的に効果的、保護的及び免疫原性であり得る量で投与され得る。

【0141】

薬剤及び／又は組成物は、経口、経口胃管栄養、非経口、頬側及び舌下、直腸、エアロゾル、鼻、筋肉内、皮下、皮内、骨内、皮膚、及び局所を含むがこれらに限定されない異なる経路を介して投与され得る。本明細書で使用される場合、非経口という用語は、例えば、眼内、皮下、腹腔内、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、病巣内、及び頭蓋内注射、又は他の注入技術を含む。

【0142】

実施形態において、本発明に従って製剤化された医薬品及び／又は治療化合物は、全身応答を誘発するように製剤化され送達される。したがって、実施形態において、製剤は、有効成分を液体担体と均一かつ密接に会合させることによって調製される。投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤及び製剤を意図するレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性滅菌溶液、並びに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量又は複数用量容器、例えば密封されたアンプル及びバイアルで提供されてもよく、使用直前に滅菌液体担体、例えば水の添加のみを必要とする凍結乾燥（凍結乾燥）条件で保存されてもよい。即時の溶液及び懸濁液は、当業者によって一般的に使用される滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。

【0143】

薬剤及び／又は組成物は、限定されないが、溶液、エマルジョン及び懸濁液、ミクロスフェア、粒子、マイクロ粒子、ナノ粒子、リポソーム等を含む異なる形態で投与され得る。

【0144】

医薬品及び／又は治療化合物は、投与製剤と適合する様式で、治療的に有効、免疫原性及び保護的であり得る量で投与され得る。投与される量は、例えば、疾患の病期を含む、治療される対象に依存する。投与する必要がある有効成分の正確な量は、施術者の判断に依存する。しかしながら、適切な投与量範囲は、当業者によって容易に決定可能であり、1用量当たり1マイクログラム～1ミリグラム程度の有効成分（複数可）であり得る。投与量はまた、投与経路に依存し得、宿主のサイズに応じて変動し得る。

【0145】

医薬品及び／又は治療化合物は、疾患を改善、治療及び／又は予防するのに有効な量で対象に投与されるべきである。任意の特定の対象に対する具体的な投与量及び治療レジメンは、使用される具体的な化合物の活性、年齢、体重、全身の健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組合せ、疾患の重症度及び経過（腫瘍サイズを含む）、症状又は症候、疾患に対する対象の性質、症状又は症候、投与方法、及び治療する医師の判断を含む様々な因子に依存し得る。実際の投与量は、当業者によって容易に決定され得る。

【0146】

例示的な単位投与製剤は、投与される成分の用量若しくは単位又はその適切な画分を含有するものである。本明細書で言及される成分に加えて、本発明の製剤は、当業者によって一般的に使用される他の薬剤を含み得ることを理解されたい。

【0147】

特定の実施形態において、 $\beta 1$ ，4-ガラクトシルトランスフェラーゼ V（BGA）に特異的に結合する抗体、そのアイソフォーム又はペプチドは、全身投与されるか、内視鏡

10

20

30

40

50

検査を介して投与されるか、又は肛門内投与される。

【0148】

特定の実施形態において、治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤及び／又は β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV (BGA)、そのアイソフォーム若しくはペプチドの発現又は活性を調節する治療有効量の薬剤を含む組成物を、全身又は局所に投与する。

【0149】

特定の実施形態において、治療有効量の少なくとも1つのスフィンゴ糖脂質合成の阻害剤及び／又は β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼV (BGA)、そのアイソフォーム若しくはペプチドの発現又は活性を調節する治療有効量の薬剤を含む組成物を、対象に同時投与する。「同時投与」という用語は、個体の血液中の2つの活性剤の同時存在を指す。同時投与される活性剤は、同時に又は順次送達され得る。

【0150】

典型的には、従来の全身投与治療では、治療有効投与量は、約0.1 ng/ml～約50～100 μ g/mlの化合物の血清濃度をもたらすはずである。医薬組成物は、典型的には、1日当たり体重1キログラム当たり約0.001 mg～約2000 mgの投与量の化合物を提供する。例えば、ヒト患者への全身投与のための投与量は、1～10 μ g/kg、20～80 μ g/kg、5～50 μ g/kg、75～150 μ g/kg、100～500 μ g/kg、250～750 μ g/kg、500～1000 μ g/kg、1～10 mg/kg、5～50 mg/kg、25～75 mg/kg、50～100 mg/kg、100～250 mg/kg、50～100 mg/kg、250～500 mg/kg、500～750 mg/kg、750～1000 mg/kg、1000～1500 mg/kg、1500～2000 mg/kg、5 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg、500 mg/kg、1000 mg/kg、1500 mg/kg又は2000 mg/kgの範囲であり得る。例示的な実施形態において、体重200 kgのヒトに対する経口投与量は、約200 mg/日である。医薬投薬単位形態は、投薬単位形態あたり約1 mg～約5000 mg、例えば約100～約2500 mgの化合物又は必須成分の組合せを提供するように調製される。

【0151】

一般に、剤形中の本化合物の治療有効量は、通常、使用される化合物、治療される症状又は感染症及び投与経路に応じて、患者の約0.025 mg/kg/日よりわずかに少ない～約2.5 g/kg/日、好ましくは約0.1 mg/kg/日～約100 mg/kg/日又はかなり多い範囲であるが、この投与量範囲に対する例外が本発明によって企図され得る。本発明は、ヒト及び獣医学の両方の用途を有することを理解されたい。

【0152】

薬剤及び／又は組成物は、所望の効果を達成するために必要に応じて1つ以上の用量で投与される。したがって、薬剤及び／又は組成物は、1、2、3、4、5、又はそれ以上の用量で投与され得る。さらに、用量は、任意の期間、例えば、数時間、数日、数週間、数ヶ月、及び数年を空けてもよい。

【0153】

薬剤及び／又は組成物は、液体若しくは乾燥粉末として、又はミクロスフェアの形態で製剤化することができる。

【0154】

薬剤及び／又は組成物は、貯蔵期間に応じて、約-100℃～約25℃の温度で貯蔵されてもよい。薬剤及び／又は組成物はまた、室温を含む異なる温度で凍結乾燥状態で保存されてもよい。薬剤及び／又は組成物は、当業者に公知の従来の手段によって滅菌され得る。そのような手段には、濾過が含まれるが、これに限定されない。組成物はまた、他の抗アテローム硬化性治療剤と組み合わせてもよい。

【0155】

単一剤形を生成するために担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、治療される

宿主及び特定の投与様式に応じて変化し得る。実施形態において、調製物は、約 0.1 % ~ 約 95 % の活性化化合物 (w/w)、約 20 % ~ 約 80 % の活性化化合物、又はそれらの間の任意の割合の活性化化合物を含有し得る。

【0156】

実施形態において、製剤の pH は、製剤化された化合物又はその送達形態の安定性を高めるために、薬学的に許容され得る酸、塩基又は緩衝剤で調整され得る。

【0157】

実施形態において、薬学的担体は、例えば滅菌水性又は油性懸濁液としての滅菌液体製剤の形態であり得る。使用され得る許容され得るビヒクル及び溶媒の中には、マンニトール、水、リンゲル液及び等張塩化ナトリウム溶液がある。

【0158】

さらに、滅菌固定油は、溶媒又は懸濁媒体として従来から使用されている。この目的のために、合成モノグリセリド又はジグリセリドを含む任意の無刺激性固定油を使用してもよい。オレイン酸及びそのグリセリド誘導体等の脂肪酸は、オリーブ油又はヒマシ油等の天然の薬学的に許容され得る油、特にそれらのポリオキシエチル化バージョンと同様に、注射剤の調製に有用である。これらの油溶液又は懸濁液はまた、エマルジョン及び／又は懸濁液等の薬学的に許容され得る剤形の製剤に一般的に使用される長鎖アルコール希釈剤若しくは分散剤、又はカルボキシメチルセルロース若しくは同様の分散剤を含有し得る。

【0159】

TWEEEN (商標) 又は SPAN (商標) 等の他の一般的に使用される界面活性剤及び／又は薬学的に許容され得る固体、液体、若しくは他の剤形の製造に一般的に使用される他の同様の乳化剤又はバイオアベイラビリティ増強剤もまた、製剤化の目的のために使用され得る。

【0160】

実施形態において、薬剤及び／又は組成物は、エキソソーム送達系で送達することができる。エキソソームは、多小胞体と原形質膜との融合中に細胞外環境に放出される小さな膜小胞である。エキソソームは、造血細胞、正常な上皮細胞、更にはいくつかの腫瘍細胞を含む様々な細胞型によって分泌される。

【0161】

特定の実施形態において、D-PDMP をカプセル化するバイオポリマーは、ポリエチレングリコール (PEG) 及びセバシン酸 (SA) を含む。PEG 及び SA の両方が FDA に承認されている。ポリエチレングリコール-セバシン酸 (PEG-SA) コポリマーは、以前に記載 (Fu J, et al. Biomaterials. 2002; 23: 4425-4433) されるように調製することができ、PEG-SA コポリマーによってカプセル化された D-PDMP の微粒子は、単一エマルジョン溶媒蒸発法を変更することによって調製される。バイオポリマーのシンチグラフィ追跡のために、PEG ポリマーを 45 mCi (810 kBq) の (^{125}I) NaI で放射性ヨウ素化する。次いで、放射性標識 PEG を PEG-SA バイオポリマーに組み込んだ。PEG-SA コポリマーは、Fu 及び共同研究者 (Id.) によって公開された文献手順に従って調製することができる。簡潔には、セバシン酸プレポリマーは、無水酢酸中でセバシン酸 (SA) を還流し、続いて高真空下で乾燥させ (蒸発)、乾燥トルエンから結晶化させ、1:1 無水エチルエーテル-石油エーテルで洗浄し、最後に風乾させることによって作製される。PEG プレポリマーは、無水酢酸中でポリオキシエチレンジカルボン酸を還流することによって作製され、揮発性溶媒は真空下で除去される。固体塊を無水エーテルで抽出し、風乾させる。次いで、ポリ (PEG-SA) コブロックポリマーを溶融重縮合法によって合成し、プロトン NMR によって特性評価する。このコポリマーは、組成及び構造的同一性について広く特徴付けられていることに留意されたい (Aich U, et al. Glycoconjugate journal. 2010; 27: 445-459)。

【0162】

ポリ (PEG-SA) への D-PDMP のカプセル化 (後に BPD と呼ばれるポリマー

10

20

30

40

50

カプセル化薬物を調製するため）と、それに続くSA及びPEGプレポリマーについて上述した溶融重縮合法であるが、ポリ（PEG-SA）対D-PDMPの出発比が70：30のD-PDMPを含む方法。続いて、単一エマルジョン溶媒蒸発法を用いて微粒子を調製する。簡潔には、D-PDMP及びPEG-SAをクロロホルム（50mg/mL）に溶解し、温度を25℃未満に保つ超音波処理条件下で1.0%w/wのポリ（ビニルアルコール）水溶液に乳化する。粒子を、12時間攪拌しながらクロロホルムを室温で蒸発させることによって硬化させる。粒子を収集し、2,600×g（30分）での遠心分離を介して再蒸留水で3回洗浄し、使用準備が整うまで48時間凍結乾燥する。

【0163】

特定の実施形態において、D-PDMPは、脂質二重層間の共有結合架橋を含む多層脂質ベシクルにカプセル化され、多層脂質ベシクル中の少なくとも2つの脂質二重層は、チオール化バイオポリマーによって互いに共有結合的に架橋されている。特定の実施形態において、脂質二重層は、官能化脂質を介して架橋されている。特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、DOTAP、DOPE、DOBAQ、DOPC又はそれらの組合せを含む。特定の実施形態において、脂質は、マレイミド官能化されているか、又はジベンゾシクロオクチン（DBCO）で修飾されている。特定の実施形態において、チオール化バイオポリマーは、キトサン、ポリグルタミン酸、ポリホスファゼン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアクリル酸（例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリ（エチルアクリル酸）、ポリ（プロピルアクリル酸）、又はポリ（ブチルアクリル酸）、HA、ペグ化アジド修飾ポリエチレンイミン、分岐ポリエチレンイミン、及びジアジドからなる群から選択される。特定の実施形態において、チオール化バイオポリマーは、複数のスルフヒドリル部分を含む。

【0164】

ナノ粒子を使用した医薬品及び／又は治療化合物の送達も本発明によって企図される。例えば、本明細書で提供される薬剤及び／又は組成物は、それに連結された、例えばナノ粒子の表面に連結された少なくとも1つ以上の薬剤を有するナノ粒子を含有することができる。組成物は、典型的には、各ナノ粒子が少なくとも1つ以上の薬剤が連結された多くのナノ粒子を含む。ナノ粒子はコロイド金属であり得る。コロイド状金属は、液体水中に分散された任意の水不溶性金属粒子又は金属化合物を含む。典型的には、コロイド金属は、水溶液中の金属粒子の懸濁液である。金、銀、銅、ニッケル、アルミニウム、亜鉛、カルシウム、白金、パラジウム、及び鉄を含む、コロイド形態で作製することができる任意の金属を使用することができる。場合によっては、金ナノ粒子が使用され、例えばHAuCl₄から調製される。ナノ粒子は、任意の形状であり得、サイズが約1nm～約10nm、例えば、サイズが約2nm～約8nm、約4～約6nm、又は約5nmの範囲であり得る。HAuCl₄からの金コロイドナノ粒子を含むコロイド金属ナノ粒子を製造する方法は、当業者に公知である。例えば、本明細書中に記載される方法並びに他の箇所に記載される方法（例えば、米国特許出願公開第2001/005581号；同第2003/0118657号；及び同第2003/0053983号（これらは参照により本明細書に組み込まれる））は、ナノ粒子を作製するための有用な指針である。

【0165】

特定の場合には、ナノ粒子は、その表面に連結された2、3、4、5、6又はそれ以上の活性剤を有することができる。典型的には、活性剤の多くの分子が、多くの位置でナノ粒子の表面に結合している。したがって、ナノ粒子が、例えば、それに連結された2つの活性剤を有すると記載される場合、ナノ粒子は、その表面に連結された、それぞれが独自の分子構造を有する2つの活性剤を有する。場合によっては、活性剤の1分子を、単一の結合部位を介して、又は複数の結合部位を介してナノ粒子に連結することができる。

【0166】

活性剤は、ナノ粒子表面に直接又は間接的に連結することができる。例えば、活性剤は、ナノ粒子の表面に直接的に、又は介在リンカーを介して間接的に連結することができる。

10

20

30

40

50

【0167】

任意の種類の分子をリンカーとして使用することができる。例えば、リンカーは、少なくとも2個の炭素原子（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の炭素原子）を含む脂肪族鎖であり得、ケトン、エーテル、エステル、アミド、アルコール、アミン、尿素、チオ尿素、スルホキシド、スルホン、スルホンアミド及びジスルフィドを含む1つ以上の官能基で官能基に置換され得る。ナノ粒子が金を含む場合、リンカーは任意のチオール含有分子であり得る。チオール基と金との反応は、共有結合スルフィド（-S-）結合をもたらす。リンカーの設計及び合成は、当技術分野で周知である。

【0168】

実施形態において、ナノ粒子は、標的化剤／部分に連結されている。標的化機能により、ナノ粒子は、他の組織よりも高い濃度で標的に蓄積することができる。一般に、標的化分子は、結合対の第2のメンバーに対して親和性及び特異性を示す結合対の1つのメンバーであり得る。例えば、抗体又は抗体断片治療剤は、治療機能も果たしながら、ナノ粒子を身体の特定の領域又は分子（例えば、抗体が特異的である領域又は分子）に標的化することができる。いくつかの場合、受容体又は受容体断片は、ナノ粒子を身体の特定の領域、例えばその結合対メンバーの位置に標的化することができる。小分子等の他の治療剤も同様に、ナノ粒子を受容体、タンパク質、又は治療剤に対する親和性を有する他の結合部位に標的化することができる。

10

【0169】

本発明の組成物が1つ以上の追加の治療剤又は予防薬を含む場合、治療剤及び追加の薬剤は、単剤療法レジメンで通常投与される投与量の約0.1～100%又は約5～95%の投与量レベルで存在すべきである。追加の薬剤は、複数回用量計画の一部として、本発明の薬剤とは別個に投与され得る。あるいは、これらの追加の薬剤は、単一組成物中で本発明の薬剤と一緒に混合された単一剤形の一部であり得る。

20

【0170】

本発明の医薬品及び／又は治療化合物の投与は、例えば、抗癌応答を誘発する。典型的には、用量は、例えば、対象の年齢、対象の健康及び身体状態、対象の免疫系が免疫応答をもたらす能力、対象の体重、対象の性別、食事、投与時間、所望の保護の程度、及び他の臨床的因子に基づいてこの範囲内で調整することができる。当業者はまた、本発明の薬剤及び／又は組成物を製剤化する場合、生物学的半減期、バイオアベイラビリティ、投与経路及び毒性等のパラメータに容易に対処することができる。

30

【実施例】

【0171】

実施例1：ラクトシルセラミドシンターゼ β -1, 4-GalT-V：ヒト結腸直腸癌の診断及び治療のための新規標的

β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ-V (β -1, 4-GalT-V) がヒトCRCにおいて十分に役割を果たし得ること、及びその阻害が腫瘍細胞増殖も軽減し得ることが仮定された。この仮説を試験するために、本発明者らは、非同定癌患者から結腸直腸組織試料を取得し、 β -1, 4-GalT-V抗体に対する免疫反応性を評価した。さらに、 β -1, 4-GalT-V質量、mRNA発現、酵素活性、及びGSL最終生成物レベルを評価した。最後に、ヒトCRC細胞株におけるGSLグリコシルトランスフェラーゼ阻害剤の効果も調べた。これらの結果は、CRCの病理発生に対する新しい洞察を提供し、CRCの有望な検出／予後バイオマーカーを明らかにする。さらに、これらの所見は、将来のCRC治療のための実行可能な標的を実証する。

40

【0172】

材料及び方法

ヒトCRC組織における β -1, 4-GalT-Vの免疫組織化学的（IHC）局在化。

IHCを、ヒト対象の研究に関する施設内審査委員会からの承認後に、ジョンズ・ホプキンス病理学部門からの保管組織に対して行った。2～3歳の材料から選択された結腸

50

癌症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから回収組織を切片化した。厚さ4ミクロンの切片を切断し、IHC分析のために染色した。 β -1, 4-GalT-V染色を、標準的なIHC法を使用して自動化された装置で行った。簡潔には、切片を脱パラフィンし、水和し、染色のために調製した。

【0173】

切片を、GalT-V合成ペプチド、IGAQVYEQVLRSA YAKRNSSVND、配列番号5(1:600希釈)に対して産生された β -1, 4-GalT-Vマウスモノクローナル抗体と共に30分間インキュベートした。二次抗体抗ウサギHRPを適用し、DAB色素原検出(カタログ番号DS 9800、Leica Biosystems)を使用して褐色のシグナルを発色させた。次いで、スライドをヘマトキシリンで対比染色し、洗浄し、脱水し、カバーガラスで覆った。IHC染色の評価を盲検病理学者が行った。染色の強度及び染色された腫瘍の面積に基づいて、染色をスコア化した。

10

【0174】

ヒトCRC組織のHスコア決定。

腫瘍組織は、チームの2人の病理学者(RM及びMA)によって独立して検査された。結腸腺癌の21例をジョンズ・ホプキンス病院の保管データから選択した。原発性の結腸癌症例のみをこの試験に含めた。症例選択のために、保管症例を解剖病理学者からの報告に基づいて再検討し、選択した。非染色切片をパラフィンブロックから得て、GalT-V抗体を用いたIHCを方法のセクションに記載されるように行った。0~3のスコアリングシステムを作成した後、結果を評価した(0=染色なし、1=非常に弱い染色、2=中程度の染色、及び3=強い染色)。腫瘍上の陽性染色面積も評価し、これをHスコアの計算に使用した。

20

【0175】

遺伝子発現分析。

患者の正常組織及びCRC組織は、Bert Vogelstein博士(JHU)との協力によって提供された。全RNAを、RNAqueous-4PCRキット(Life Technologies)を製造業者の説明書に従って使用して組織試料から単離した。TaqMan遺伝子発現アッセイ(Applied Biosystems)を使用して、大腸腺腫様ポリポーシス(APC、Hs01568269)、N-ミリストイルトランスフェラーゼ1(NMT1、Hs00221506)、腫瘍タンパク質p53(TP53、Hs01034249)、UDP-Gal: β GlcnAc β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、ポリペプチド5(β -1, 4-GalT-V、Hs00191142)、UDP-Gal: β GlcnAc、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、ポリペプチド6(β -1, 4GalT-VI、Hs00191135)及びUDP-グルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ(UGCG、Hs00234293)の発現レベルを決定した。High Capacity cDNA逆転写キット(Life Technologies 4374966)を製造業者のプロトコルに従って使用して、単離されたRNAからcDNAを合成した。TaqMan遺伝子発現アッセイを、The Genetic Resources Core Facility(Johns Hopkins Medical Institutions)において7900HT Fast Real-Time PCRによって行った。

30

40

【0176】

ラクトシルセラミドシンターゼ(LCS)活性の測定。

目に見える正常組織及び癌組織におけるLCS活性を、本発明者の以前に公開された方法(20、21)に従って測定した。10個の正常腫瘍試料及び10個の腫瘍試料の両方について、全てのアッセイを三連で実行し、平均値±測定値の標準誤差(SEM)を示し、対応のないt検定を行って統計学的有意性を決定した。

【0177】

CRC組織における β -1, 4-GalT-V質量の測定。

約10mgの組織を放射免疫沈降アッセイ(RIPA)緩衝液中でホモジナイズし、1

50

0,000rpmで遠心分離した。以前に公開されたように(22)、ELISAを使用して上清中のGalT-V質量を測定した。

【0178】

液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)。

ヒトCRC組織及びヒト培養CRC細胞(HCT-116)におけるスフィンゴ脂質レベルを、以前に記載されたように(23)、LC-MSによって測定した。視覚的に正常なCRC組織(50mg)を、スフィンゴ脂質内部標準の存在下、クロロホルム-メタノール(2:1)中でホモジナイズした。10⁵個のHCT-116細胞を100mm²の滅菌プラスチックペトリ皿で成長させた。脂質抽出物を、記載されるように(24、25)LC-MSに供した。

10

【0179】

ヒトCRC細胞におけるグリコシルトランスフェラーゼのIHC局在化に対するD-PDMPの効果の決定。

HCT-116細胞を滅菌ガラスカバーガラス上に播種し(10⁴)、次いで、これを6ウェル滅菌プラスチックトレイに入れ、完全培地中で24時間成長させた。次に、培地を2mLの2%血清含有培地+10μM D-PDMPと交換した。24時間及び96時間インキュベートした後、培地を除去し、細胞をエタノールで固定し、洗浄し、β-1,4-GalT-V又はUGCGに対する抗体とインキュベートし、写真撮影した。

【0180】

細胞増殖に対するD-PDMPの効果の決定。

20

HCT-116細胞を96ウェル滅菌プラスチックプレートに播種し(10⁴/ウェル)、10%ウシ胎児血清を含む完全培地で24時間成長させた。次いで、培地を、D-PDMPあり及びなしで、2%血清含有培地(100μL)+³H-チミジン(5μCi/mL)と交換した。更に24時間インキュベートした後、³H-チミジンのDNAへの取り込みをシンチレーション分光法によって測定した。

【0181】

結果

ヒトCRC組織は、β-1,4-GalT-V抗体に対して強い陽性免疫反応性を示す。

30

まず、モノクローナル抗体を用いて、24例のヒトCRC検体におけるβ-1,4-GalT-V免疫反応性を調べた。正常な結腸組織は、β-1,4-GalT-Vの細胞質局在を示し、大血管及び小血管において強く陽性の免疫染色された内皮細胞を示した(図1B)。結腸腺癌(図1C)では、病変細胞の約50%が軽度の細胞質β-1,4-GalT-V免疫反応性を発現することが分かった。Hスコア分析は、場合によっては100の合計スコアをもたらしたが、場合によっては200の合計スコア(図1D)に達し、他の場合では300の合計スコア(図1E)に達した(表1)。追加の研究は、ゴルジ体、細胞質、及び程度は低い細胞表面の内面への抗原局在化に関連して、核周囲領域において強い免疫反応性を示した。

【0182】

表1: 腫瘍組織のβ-1,4-GalT-V免疫組織化学染色。

40

【表 1】

症例番号	%腫瘍スコア			正常組織	Hスコア	染色パターン
	1	2	3			核／細胞質
1		50		0	120	細胞質
2	50			0	50	細胞質
3		50		1	100	細胞質
4			100	2	300	細胞質
5		20		1	40	細胞質
6		80		2	160	核／細胞質
7		80		2	160	細胞質
8		90		2	180	細胞質
9			100	1	300	細胞質
10		60		2	120	核／細胞質
11		80		2	160	細胞質
12	20			1	20	細胞質
13			90	0	270	細胞質
14		90		2	180	細胞質
15	30		na		30	核／細胞質
16		30		1	60	細胞質
17		60		2	240	細胞質
18			90	0	270	細胞質
19		90		1	180	核／細胞質
20		85		0	170	細胞質
Hスコアは、%腫瘍強度スコア×腫瘍の総面積として計算した						

【0183】

表 1 は、正常及び CRC 組織切片の β -1, 4-GalT-V 免疫組織化学染色の評価を示す。GalT-V に対する免疫染色の検討により、腫瘍細胞における様々な程度の陽性が明らかになった：1+（15%；3／20）、2+（65%；13／20）及び 3+（20%；4／20）。染色は、ほとんどが腫瘍の細胞質で観察され、ごく稀に腫瘍細胞の核で観察された。入手可能な場合、弱い（1+）から中程度の（2+）細胞質染色もまた、隣接する正常結腸粘膜において 79% の症例（15／19）で観察された。ほとんどの場合、正常な結腸粘膜も軽度から中程度のレベルで染色された。Hスコアは、腫瘍強度スコア%×腫瘍の総面積として決定した。

【0184】

CRC 組織は、タンパク質質量、活性（ラクトシルセラミドの合成）、及び β -1, 4-GalT-V の遺伝子発現が増加している。

ELISA は、同じ組織標本からの視覚的に正常な領域（すなわち、「隣接正常」）と比較して、CRC 組織における β -1, 4-GalT-V の顕著な増加（およそ 6.5 倍）を明らかにした（図 1 F）。CRC 試料では、正常な結腸上皮のものと比較して、ラクトシルセラミドシンターゼ活性において 2.25 倍の増加が観察された（**P=0.0052、図 1 G）。定量的 RT-PCR により、正常試料と比較して、CRC に以前に関連していたいくつかの遺伝子、例えば、大腸腺腫症（APC）（26）、N-ミリスチルトランスフェラーゼ 1（NMT1）及び腫瘍タンパク質 p53（TP53）の発現上昇が更に明らかにされた（図 1 H）。さらに、 β -1, 4-GalT-V（B4GALT5）は特異的に発現増加を示したが、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、ポリペプチド 6（B4GALT6）及び UDP-グルコース-セラミド β -1, 4-グルコシルトランスフェラーゼ（UGCG）は発現増加を示さなかった（図 1 I）。LC-MS は、正常な結腸標本と比較して、腫瘍中のセラミド（Cer）（図 2 A）、ジヒドロセラミド（DHCer）（図 2 B）、モノグリコシルセラミド（すなわち、ガラクトシルセラミド（GalCer））及びグルコシルセラミド（GlcCer）、図 2 C）、ジヒドロ GalCer／ジヒドロ GlcCer（図 2 D）、並びにジヒドロラクトシルセラミド（D

H L a c C e r) (図 2 F) のレベルがわずかであるが中程度に上昇していることを明らかにした。しかしながら、調査した G S L のうち、ラクトシルセラミド (L a c C e r) レベルのみが C R C 組織において統計的及び有意に増加した (図 2 E、* P = 0 . 0 1 1 2) 。 C R C 試料はまた、正常組織と比較して高いジヒドロスフィンゴミエリン (D H S M) (図 2 G、** P = 0 . 0 0 5 9) 及び同様のレベルのスフィンゴミエリン (図 2 G) を示した。

【 0 1 8 5 】

G S L 合成の阻害は、ヒト C R C 細胞の増殖を用量依存的に減少させる。

H C T - 1 1 6 細胞を、UDP-グルコース-c e r : グルコシルトランスフェラーゼ及び L C S / 3 - 1 , 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼ (G a l T - V) 活性 (2 7、2 8、2 9) の強力な阻害剤である D - トレオ - 1 - フェニル - 2 - デカノイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール (D - P D M P、図 3 A) で処置した。C R C 細胞では、D - P D M P は、対照細胞と比較して、用量及び時間依存的 (図 3 A、図 3 B) 増殖の減少を示し、最大有効用量は 2 0 μ M であることが見出された。

【 0 1 8 6 】

D - P D M P 処置は、ヒト C R C 細胞における β - 1 , 4 - G a l T - V タンパク質の発現及び活性 (すなわち、スフィンゴ脂質合成) を低下させる。

2 4 時間で対照 (図 3 C) と比較して、D - P D M P 処置細胞 (図 3 D) の U G C G 免疫蛍光に差は見られなかった。しかし、2 4 時間 (図 3 F) 及び 9 6 時間 (図 3 H) の D - P D M P 処置は、対照と比較して G a l T - V 蛍光を減少させた (図 3 E 及び図 3 G) 。 D - P D M P (1 0 μ M) あり又はなしで処置した H C T - 1 1 6 細胞に由来する G S L の L C - M S 分析により、対照値と比較して、C e r (図 4 A)、D H C e r (図 4 B)、モノヘキソシルセラミド (図 4 C)、ジヒドロ G a l C e r / ジヒドロ G l c C e r (図 4 D)、ジヘキソシルセラミド (図 4 E)、D H L a c C e r (図 4 F) のレベルが低下したが、スフィンゴミエリン (図 4 G) 及び D H S M (図 4 H) のレベルは低下しなかったことが明らかになった。

【 0 1 8 7 】

考察

この研究からいくつかの主要な知見が明らかになる。第 1 に、β - 1 , 4 - G a l T - V 発現、タンパク質量、及び I H C 染色は全て、視覚的に正常な組織と比較して、ヒト C R C 組織において著しく増加したことが観察された。第 2 に、ヒト C R C 腫瘍における β - 1 , 4 - G a l T - V (すなわち、ラクトシルセラミドの合成) の活性は、対照組織と比較して統計的に有意に高かった。第 3 に、スフィンゴ糖脂質合成の阻害は、β - 1 , 4 - G a l T - V の免疫染色を減少させ、その結果、培養されたヒト C R C (H C T - 1 1 6) 細胞における細胞増殖を減少させた。第 4 に、ジヒドロスフィンゴ脂質代謝 (図 2 G) の増強が腫瘍組織で認められ、明らかに正常な組織と比較して、ジヒドロスフィンゴミエリンのレベルが有意に増加した。

【 0 1 8 8 】

また、β - 1 , 4 - G a l T - V 抗体を用いた免疫染色により、病理医は、正常な上皮細胞 (図 1 A) と癌性上皮細胞 (図 1 C ~ 図 1 E) とを明確に区別することができた。染色後、組織を腫瘍の適切さについて評価し、適切な腫瘍組織が評価に利用可能であった 2 0 例を選択した。G a l T - V に対する免疫染色の検討により、腫瘍細胞における様々な程度の陽性が明らかになった (表 1) : 1 + (1 5 % ; 3 / 2 0)、2 + (6 5 % ; 1 3 / 2 0) 及び 3 + (2 0 % ; 4 / 2 0) 。染色は、ほとんどが腫瘍の細胞質で観察され、ごく稀に腫瘍細胞の核で観察された。入手可能な場合、弱い (1 +) から中程度の (2 +) 細胞質染色もまた、隣接する正常結腸粘膜において 7 9 % の症例 (1 5 / 1 9) で観察された。さらに、2 0 例そのような組織のコンピュータによる (A s p e r i o n プログラム) 分析は、免疫染色指数の定量的推定値を提供し、1 0 0 ~ 3 0 0 (0 ~ 3 0 0 のスケール) の実質的な H スコアをもたらした (2 1) 。これらの所見は、β - 1 , 4 - G a l T - V 免疫染色が実際に C R C 進行の新規バイオマーカーとして役立ち得るという証拠

を提供する。毛細血管内皮細胞の強い $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ 免疫染色も、本発明者の以前の研究と一致して観察された(30、31)。扁平上皮細胞内では、核周囲領域に強い免疫染色が観察され、抗原がゴルジ体内で濃縮されることが示唆された(データは示さず)。

【0189】

対照及びCRC腫瘍組織の両方における細胞質の $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ 免疫染色は、 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ が膜結合型並びに可溶性形態で存在しなければならないという証拠を提供する。溶解度は、非侵襲性又は低侵襲性の手順を介して、様々な体液中のこの抗原の測定を可能にする。結腸上皮細胞の刷子縁膜も抗体に陽性に反応したことから、これは、結腸直腸組織では、 GalT-V がエキソソーム中に放出され得るという証拠を提供する。

10

【0190】

以前の研究は、 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ が共通のステム領域を共有することを示している。 $\beta-1, 4\text{-GalT-1}$ (ラクトサミンシンターゼ)ではステム領域が短いため、酵素の大部分はゴルジの細胞質に局在し、原形質膜では比較的少ない(32)。さらに、ステム領域を構成するヒドロキシル化アミノ酸の数が $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ の局在化を決定することが提案されているが、他の因子がこのタンパク質の局在化を決定する可能性がある。ステム領域の変化が $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ の原形質膜局在化を可能にするかどうかを調べるために、更なる研究が必要である。

20

【0191】

さらに、IHCによって観察された $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ の濃縮は、 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ タンパク質質量の定量的測定によって更に実証された。CRC組織では、対照組織と比較して、 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ 質量が統計的に有意に増加した(図1F)。ラクトシルセラミドシンターゼの活性(したがって、ラクトシルセラミド質量)も、対照と比較してCRC組織で有意に高かった(図1G)。対照的に、腫瘍組織対対照組織における他のスフィンゴ脂質のレベルの差は統計学的に有意ではなかった(図2A~図2G)。

【0192】

この研究の別の興味深い知見は、ジヒドロスフィンゴ脂質経路(図7)が腫瘍組織において有意に活性であったことであった(図2G)。例えば、腫瘍組織では、ジヒドロセラミド、ジヒドロ GlcCer /ジヒドロ GalCer 、及びジヒドロ LacCer の質量がいずれもやや上昇している(但し、有意ではない)ことが観察された。しかしながら、腫瘍組織と目に見える正常組織との間の最も有意な差は、ジヒドロスフィンゴミエリンのレベルが腫瘍組織において著しく増加したことであった(図2G)。最近の研究は、ジヒドロスフィンゴ脂質、例えばジヒドロセラミドがオートファジーにおいて重要な役割を果たすことを示唆している(33、34)。しかしながら、ヒトCRCにおけるジヒドロスフィンゴミエリンの役割を調べる必要がある。

30

【0193】

本明細書における定量的RT-PCR研究は、腫瘍組織における B4GALT5 遺伝子発現の増加を明らかにしたが、そのアイソフォーム B4GALT6 又はホモログ UGCG の発現については、相対的には、明らかにしなかった(図1I)。これらの観察結果は、遺伝子発現技術の連続分析を使用して、CRC腫瘍における $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ の特異的増加を確認したが、 $\beta-1, 4\text{-GalT-VI}$ の特異的増加は確認されなかった(30)。したがって、 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ 遺伝子及びタンパク質発現の増加はCRC組織に特異的であり、この疾患を診断し、薬物応答を測定するためのバイオマーカーとして十分に役立ち得る。以前に、 NMT1 、 APC 及び TP53 を含むいくつかの他の遺伝子がCRCバイオマーカーとして役立つことが示唆されている(35、36、37)。したがって、これらの遺伝子の発現を分析し、CRC腫瘍対正常組織において、3つ全てにおいて上方制御が観察された(図1H)。したがって、 $\beta-1, 4\text{-GalT-V}$ の

40

50

上方制御を3バイオマーカーパネルに実行可能に加えることができ、したがってCRC診断の予測値を高めることができた。

【0194】

HCT-116細胞では、原形質膜及びサイトゾルの内層内にも β -1, 4-GalT-V免疫染色が観察された。さらに、免疫反応性は、細胞が24時間から96時間まで成長するにつれて増加し(図3A~図3H)、 β -1, 4-GalT-Vの発現増加と相関した。対照的に、D-PDMPによるスフィンゴ糖脂質合成の阻害は、HCT-116細胞におけるGalT-V免疫反応性を有意に減弱させ(図3A~図3H)、したがって、処置がこれらの細胞における β -1, 4-GalT-Vタンパク質質量及びジヒドログリコシルセラミド/LacCerレベルを減少させ得、その結果、細胞増殖を減少させ得るという証拠を提供する(図3A~図3H)。

10

【0195】

HCT-116細胞におけるUGCGの免疫染色を行った。同様に、この抗原/酵素は核周囲領域及び細胞質に局在することが見出された。しかしながら、D-PDMPによる処置は、抗UGCG抗体に対する免疫反応性を低下させなかった。したがって、処置は、酵素活性を阻害することによってHCT-116細胞中のグルコシルセラミドレベルを低下させる可能性がある。

【0196】

ヒトCRC腫瘍に加えて、HCT-116細胞もまた、活性なジヒドロスフィンゴ脂質経路を有することが見出された。D-PDMPによる処置は、ジヒドロスフィンゴミエリンのレベルを除いて、本発明者らの研究における全てのジヒドロスフィンゴ脂質種のレベルを低下させた。この観察に更に対処するために、更なる機構的研究が必要である。D-PDMP処置の正味の結果は、HCT-116細胞増殖の用量依存的減少であることも見出された。

20

【0197】

要約すると、この研究は、ヒトCRCにおいて、ラクトシルセラミド量の増加と同時に、 β -1, 4-GalT-Vの遺伝子発現、タンパク質レベル、及び酵素活性の特異的増加を示した。これらの分子及び生化学データは、IHC及び病理研究によって更に実証された。これらの所見は、ヒト液体生検標本中の β -1, 4-GalT-V及びラクトシルセラミドのレベルが他の現在使用されているバイオマーカー(例えば、NMT1、APC及びTP53)を補完し、したがってCRCの陽性予測値を増加させ得ることを実証している。最後に、スフィンゴ糖脂質合成の阻害は、ヒト結腸直腸癌、及びおそらくは他のタイプの癌を治療するための新規アプローチであり得る。

30

【0198】

参考文献

- (1) P. Favoriti, G. Carbone, M. Grego, et al., Worldwide burden of colorectal cancer: a review, *Updates Surg.* 68(1) (2016) 7-11. <https://doi.org/10.1007/s13304-016-0359-y>.
- (2) H. Brenner, M. Kloor, C.P. Pox, Colorectal cancer, *Lancet.* 383(9927) (2014) 1490-1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9).
- (3) J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer.* 136(5) (2015) E359-E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- (4) M. Arnold, M.S. Sierra, M. Laversanne, et al., Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *Gut.* 66(4) (2017) 683-691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- (5) H. Brenner, C. Stock, M. Hoffmeister, Colorectal cancer screening: the time to act is now, *BMC Med.* 13 (2015) 262. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0498-x>.

40

50

- (6) T. Tanaka, M. Tanaka, T. Tanaka, et al., Biomarkers for colorectal cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 11(9) (2010) 3209-3225. <https://doi.org/10.3390/ijms11093209>.
- (7) S. Hundt, U. Haug, H. Brenner, Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(10) (2007) 1935-1953. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0994>.
- (8) K. Simon, V. Balchen, Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin. Interv. Aging.* 11 (2016) 967-976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>.
- (9) T.F. Imperiale, D.F. Ransohoff, S.H. Itzkowitz, et al., Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 1287-1297. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311194>.
- (10) S.I. Hakomori, W.T. Murakami, Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59(1) (1968) 254-61.
- (11) J.W. Dennis, S. Laferte, Oncodevelopmental expression of -GlcNAc beta 1-6Man alpha 1-6Man beta 1-branched asparagine-linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas, *Cancer Res.* 49(4) (1989) 945-950.
- (12) S. Hakomori, Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glycol)lipid metabolism, *Cancer Res.* 56(23) (1996) 5309-18.
- (13) M. Garcia-Barros, N. Coant, J.P. Truman, et al., Sphingolipids in colon cancer, *Biochim. Biophys. Acta.* 1841(5) (2014) 773-782. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.09.007>.
- (14) Y.Y. Liu, R.A. Hill, Y.T. Li, Ceramide glycosylation catalyzed by glucosylceramide synthase and cancer drug resistance, *Adv. Cancer Res.* 117 (2013) 59-89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394274-6.00003-0>.
- (15) B. Segui, N. Andrieu-Abadie, J.P. Jaffrezou, et al., Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets, *Biochim. Biophys. Acta.* 1758(12) (2006) 2104-2120. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.024>.
- (16) J. Arango, M. Pierce, Comparison of N-acetylglucosaminyltransferase V activities in Rous sarcoma-transformed baby hamster kidney (RS-BHK) and BHK cells, *J. Cell Biochem.* 37(2) (1988) 225-31. <https://doi.org/10.1002/jcb.240370209>.
- (17) K. Shirane, T. Sato, K. Segawa, et al., Involvement of beta-1,4-galactosyltransferase V in malignant transformation-associated changes in glycosylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265(2) (1999) 434-8. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1684>.
- (18) S. Xu, S. Zhang, C. Chen, et al., Over-expression of beta-1,4-galactosyltransferase V increases the growth of astrocytoma cell line, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 21(3) (2002) 409-414.
- (19) Y. Wei, F. Zhou, Y. Ge, et al., β 1,4-Galactosyltransferase V regulates self-renewal of glioma-initiating cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396(3) (2010) 602-607. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.110>.
- (20) S. Chatterjee, Assay of lactosylceramide synthase and comments on its potential role in signal transduction, *Methods Enzymol.* 311 (2000)

10

20

30

40

50

73-81. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)11068-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)11068-7).

(21) Varghese, F., Bukhari, A.B., Melhotra, R., et al., 2014. IHC profiler : an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One* 9(5), e96801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>.

(22) D. Bedja, W. Yan, V. Lad, et al., Inhibition of glycosphingolipid synthesis reverses skin inflammation and hair loss in ApoE ^{-/-} mice fed western diet, *Sci. Rep.* 8 (2018) 11463. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28663-9>.

(23) Chatterjee, S., Alsaeedi, N., Hou, J., et al., 2013. Use of a glycolipid inhibitor to ameliorate renal cancer in a mouse model. *PLoS One.* 8(5), e63726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063726>.

(24) N.J. Haughey, R.G. Cutler, A. Tamara, et al., Perturbation of sphingolipid metabolism and ceramide production in HIV-dementia, *Ann. Neurol.* 55(2) (2004) 257-267. <https://doi.org/10.1002/ana.10828>.

(25) V.V.R. Bandaru, J. Troncoso, D. Wheeler, et al., ApoE4 disrupts sterol and sphingolipid metabolism in Alzheimer's but not normal brain, *Neurobiol. Aging.* 30(4) (2009) 591-599.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.024>.

(26) M. El Zoghbi, L.C. Cummings, New era of colorectal cancer screening, *World J. Gastrointest. Endosc.* 8(5) (2016) 252-258. <https://doi.org/10.4253/wjge.v8.i5.252>.

(27) S. Chatterjee, Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10) (1998) 1523-1533.

(28) S. Chatterjee, T. Cleveland, W.Y. Shi, et al., Studies of the action of ceramide-like substances (D- and L-PDMP) on sphingolipid glycosyltransferases and purified lactosylceramide synthase, *Glycoconj. J.* 13(3) (1996) 481-486. <https://doi.org/10.1007/BF00731481>.

(29) S. Chatterjee, A.K. Bhunia, A. Snowden, et al., Oxidized low density lipoproteins stimulate galactosyltransferase activity, ras activation, p44 mitogen activated protein kinase and c-fos expression in aortic smooth muscle cells, *Glycobiology.* 7(5) (1997) 703-710.

(30) A. Kolmakova, M. Rajesh, D. Zang, et al., VEGF recruits lactosylceramide to induce endothelial cell adhesion molecule expression and angiogenesis in vitro and in vivo, *Glycoconj. J.* 26(5) (2009) 547-558. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9206-9>.

(31) M. Rajesh, A. Kolmakova, S. Chatterjee, Novel role of lactosylceramide in vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in human endothelial cells, *Circ. Res.* 97(8) (2005) 796-804. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000185327.45463.A8>.

(32) P.K. Qasba, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, Structure and function of beta -1,4- galactosyltransferase, *Curr. Drug Targets.* 9(4) (2008) 292-309. <https://doi.org/10.2174/138945008783954943>.

(33) W. Zheng, J. Kollmeyer, H. Symolon, et al., Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758(12) (2006) 1864-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.009>.

(34) M.M. Siddique, Y. Li, B. Chaurasia, et al., Dihydroceramides: from bit players to lead actors, *J. Biol. Chem.* 290(25) (2015) 15371-9. <http://www.jbc.org/content/290/25/15371.full>.

s://doi.org/10.1074/jbc.R115.653204.

(35) C.E. Ducker, J.J. Upson, K.J. French, et al., Two N-myristoyltransferase isozymes play unique roles in protein myristylation, proliferation, and apoptosis, *Mol. Cancer Res.* 3(8) (2005) 463-476. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0037>.

(36) T. Armaghany, J.D. Wilson, Q. Chu, et al., Genetic alterations in colorectal cancer, *Gastrointest. Cancer Res.* 5(1) (2012) 19-27.

(37) X.L. Li, J. Zhou, Z.R. Chen, et al., p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation, *World J. Gastroenterol.* 21(1) (2015) 84-93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>.

(38) N.S. Radin, J.A. Shayman, J. Inokuchi, Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances, *Adv. Lipid. Res.* 26 (1993) 183-213.

(39) J. Inokuchi, I. Mason, N.S. Radin, Antitumor activity via inhibition of glycosphingolipid biosynthesis. *Cancer Lett.* 38(1-2) (1987) 23-30. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90196-0](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90196-0).

(40) J. Inokuchi, M. Jimbo, K. Momosaki, et al., Inhibition of experimental metastasis of murine Lewis lung carcinoma by an inhibitor of glucosylceramide synthase and its possible mechanism of action, *Cancer Res.* 50(20) (1990) 6731-6737.

【0199】

実施例2: *in vivo*で結腸直腸癌(CRC)を予防するためのラクトシルセラミドシンターゼ(β -1, 4 GalT-V)抗体を使用する免疫療法。

β -1, 4 GalT-VがヒトCRCにおいて重要な役割を果たすと仮定され、この酵素を操作することは、血管新生を阻害することによって腫瘍細胞増殖及び転移を十分に軽減し得る。この仮説を試験するために、 β -1, 4 GalT-Vに対するマウスモノクローナル抗体を調製し、ヒト及びマウスCRC細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞並びにヒトCRCのマウス異種移植モデルにおける増殖及び血管新生に対するその効果を判断した。

【0200】

材料及び方法

アミノ酸配列(IGAQVYEQVLRSAYAKRNSSVND、配列番号5)を有する β -1, 4 GalT-Vペプチドに対するモノクローナル抗体を調製し、その力価に関して特性評価し、ELISA、ウエスタン免疫ブロット法アッセイ並びにマウス及びヒト組織の免疫捕捉における使用を行った。ヒト結腸直腸癌細胞株(HCT-116)は、この施設から遅れてDavid Huso博士(比較医学部門)からの贈り物であった。マウス結腸直腸癌株MC-38及びマウス結腸直腸癌由来の薄い組織切片は、施設の腫瘍学部門のCindy Sears博士からの贈り物であった。ヒト臍静脈内皮細胞をCloneticsから購入し、適切な成長培地で培養した。ヒト微小血管内皮細胞は、同部門のStephanie Brindal氏からの贈り物であった。血管内皮増殖因子は、Rand Inc. Matrigelから購入し、他の全ての試薬はSigma-Aldrichから購入した。バイオポリマーカプセル化-PDMPを記載のように調製した(6)。

【0201】

細胞増殖アッセイ

1×10^4 個のHCT-116細胞及びMC-38細胞を96ウェル滅菌プラスチックトレイに播種し、10%ウシ胎児血清を含有する100 μ Lのダルベッコの最小必須培地中、5%CO₂空気加湿インキュベーター内で37にて24時間成長させた。培地を、2%血清及び5 μ Ci/mLの(³H)チミジンを補充した新鮮な培地と交換した。 β -1, 4 GalT-V抗体の漸増希釈液をウェルに添加した。これらの実験では、ヒトIg

G又はマウスIgGを陰性対照として用い、D-PDMP (10 μ M)又は1 μ M BPDを陽性対照として用いた。24時間のインキュベーション後、実験を終了し、(³H)チミジンのDNAへの取り込みをシンチレーション分光法によって測定した。

【0202】

血管新生アッセイ

血管新生アッセイを、Chemicon Inc. から市販されているキットを使用し行った(7)。

【0203】

β -1, 4 GalT-V活性の測定

β -1, 4 GalT-Vの活性を、先に記載されたように(14)、 β -1, 4 GalT-V抗体で処置した細胞及び処理しなかった細胞において測定した。 10

【0204】

スフィンゴ糖脂質の測定

GSLの質量は、記載のように定量的HPTLCによって測定した(9)。

【0205】

腫瘍細胞成長の阻止

正常な雄及び雌のマウス(C57 BL-6)をThe Jackson Laboratoryから購入し、通常のマウス飼料を与えた。HCT-116細胞の半コンフルエント培養物を回収し、細胞ペレットを70:30(体積基準)の比でマトリゲルを補充した培地に再懸濁した。除毛剤であるNair (Church及びDwight Co.)を用いてマウスの背部毛を除毛し、アルコール消毒綿で毛のない皮膚領域を清潔にした。次に、 4×10^6 個のHCT細胞懸濁液を皮下注射した。1週間後、100 μ LのGalT-V抗体又は100 μ LのBPD (1 mg/kg体重)を腫瘍細胞の注射部位で3週間毎日皮下注射した。剃毛した領域に毛が伸びたため、Nairを使用して毛を除去して皮膚領域を露出させ、マウスを写真撮影して記録した。 20

【0206】

免疫組織化学

マウス結腸直腸癌腫瘍組織から薄い組織切片を切り出し、先に記載されたように(8)、 β -1, 4 GalT-V抗体による免疫組織化学染色に供した。簡潔には、切片を脱パラフィン化し、水和させ、 β -1, 4 GalT-V抗体(1:600希釈)と30分間インキュベートした。第2の抗体である抗ウサギHRPを適用し、DAB色素原検出(Leica Biosystems)を用いて褐色シグナルを発色させた。次に、スライドをヘマトキシリンで対比染色し、洗浄し、脱水し、カバースリップし、写真撮影した(8)。 30

【0207】

結果

GalT-V抗体は、時間依存的に内皮細胞及びHCT-116細胞に取り込まれる。ヒト微小血管内皮細胞では、蛍光タグ付きGalT-Vを4℃で取り込んだ。温度を37℃にシフトさせると、細胞質へのGalT-V抗体の取り込み及びゴルジ装置を表す核周囲領域において時間依存的増加が観察された。過剰量のGalT-Vペプチドとの細胞のプレインキュベーション。同様に、HCT-116細胞も、同様の温度及び時間依存的様式で蛍光タグ付き β -1, 4 GalT-V抗体を取り込んだ。これらの研究は、 β -1, 4 GalT-V抗体がヒト内皮細胞及びHCT-116細胞によって時間及び温度依存的に取り込まれ、内在化されることを示した。 40

【0208】

GalT-V抗体は、ヒト及びマウスの結腸直腸癌細胞における増殖を阻害する。

³Hチミジン取り込み研究により、ヒト結腸直腸癌細胞において、GalT-V抗体は細胞増殖を用量依的に減少させ、この阻害は β -1, 4 GalT-Vの薬理的阻害剤であるD-PDMPを使用して観察された阻害の範囲内であることが明らかになった。

【0209】

同様に、 $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体もマウス結腸直腸細胞の増殖を用量依存的に阻害した（図 8）；MC-38（図 9）。細胞をマウス IgG とインキュベートした場合、細胞増殖の阻害は観察されなかった。

【0210】

GalT-V 抗体は、ヒト臍帯静脈内皮細胞における VEGF 誘導血管新生を阻害する。

図 10A～図 10H は、HUVEC における管形成／血管新生の写真を示す。図 10I は、血管新生の対応する定量化を示す。HUVEC と VEGF／FGF とのインキュベーションは、対照（図 10A）と比較してチューブ形成／血管新生を著しく増加させた（図 10B）。 $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体での処置は、HUVEC における VEGF 誘導血管新生において用量依存的減少を示した（図 10C～10F）が、ウサギ IgG では示さなかった（図 10G）。

10

【0211】

GalT-V 抗体は、マウスにおける腫瘍成長を防止する。

マウスに HCT-16 細胞を注射した 7 日後、マウスを 3 週間にわたって毎日、 $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体で、及び $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体なしで処置した。並行して、別の群のマウスを腫瘍細胞注射部位で 3 週間毎日 BPD（5 mpk）で処置した。 $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体（図 11A、図 11B）又は BPD（図 11C、図 11D）による処置は、腫瘍の成長及び進行を完全に防止することが観察された。

【0212】

20

考察

この研究は、以下の結論を導く。（i） $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体によるその処置は、培養されたヒト結腸直腸癌細胞及びマウス結腸直腸癌細胞における増殖を用量依的に減少させた。（ii） $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体によるヒト臍静脈内皮細胞処置は、VEGF 誘導血管新生を用量依的に減少させた。（iii）結腸直腸癌のマウス異種移植モデルにおいて、 $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体及び BPD による処置は腫瘍成長を妨げた。

【0213】

$\beta-1, 4$ GalT-V は、ガラクトシルトランスフェラーゼの大きなファミリーのメンバーであり、その機能は、ガラクトースを UDP-ガラクトースからグルコシルセラミドに転移させてラクトシルセラミド（1）を形成することである。また、ガラクトースを、腫瘍細胞に特徴的な高度に分岐した N グリカンの GlcNAc $\beta-1, 6$ マンノース基に転移する（2、3）。これらの産物のうち、LC は、独立した分裂促進剤、血管新生剤として役立つことが示されており、同様に細胞遊走、アポトーシス及び細胞接着に参与する（4）。最も重要なことには、LC は、増殖因子、例えば VEGF、FGF、PDGF、EGF 及び炎症促進性サイトカイン TNF の作用を媒介する代理物として働き、細胞型に応じて上記の表現型をもたらす（4）。重要なことに、これらの成長因子及び TNF α 誘導性表現型は、*in vitro*（7）及び *in vivo*（15）での薬理学的薬剤 BPD 及び D-PDMP（6、9）並びに GalT-V 遺伝子操作の使用によって軽減することができる（図 12）。これは、 $\beta-1, 4$ GalT-V 免疫療法が結腸直腸癌の成長及び増殖を減少させるのに有効であることが示された最初の報告である。本明細書の研究は、ヒト結腸直腸癌組織内皮において、細胞の $\beta-1, 4$ GalT-V mRNA レベルが特異的に増加し、その結果、 $\beta-1, 4$ GalT-V タンパク質の質量も癌病期依的に増加することを示す。正常結腸細胞では $\beta-1, 4$ GalT-V は大部分が細胞質／ゴルジに見られるが、結腸直腸癌では、上皮細胞の刷子縁膜に加えて、ヒト結腸直腸癌細胞の細胞膜にある程度存在する（8）。これにより、 $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体が GalT-V タンパク質に結合する。37℃で、蛍光タグ付き $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体は、正常ヒト内皮細胞及び HCT-116 細胞の細胞質の大部分で抗原に結合することが観察された（8）。大量の非標識抗体は、タグ付き抗体の取り込みを競合的に阻害したことから、 $\beta-1, 4$ GalT-V 抗体の結合及び取り込みが培養された

30

40

50

結腸直腸細胞において特異的であることを示唆する（データは示さず）。

【0214】

本発明者の以前の研究は、活性化NAD(P)Hオキシダーゼである β -1, 4 GalT-Vの増殖因子誘導性活性化に起因してLCが生成し、細胞増殖をもたらすマイトジェン活性化プロテインキナーゼ/c-fos経路におけるシグナル伝達中間体として働く活性酸素種を生成することを示した(4)。この研究では、 β -1, 4 GalT-V抗体による処置が、 β -1, 4 GalT-V酵素活性及びLC質量を低下させ、したがってHCT-116細胞における細胞増殖を軽減することが観察された。

【0215】

モノクローナル抗体は、治療的使用のために作製された特定の種類の抗体/タンパク質である。そのような抗体は、癌細胞中の異常タンパク質を遮断するための標的療法に使用することができる。モノクローナル抗体の一部は、そのタンパク質を発現する癌細胞に特異的に結合するので、モノクローナル抗体を免疫療法に使用することができる。したがって、癌細胞を同定することにより、免疫系が癌細胞を攻撃及び破壊することが可能になる。別の種類の抗体は、免疫系のブレーキを解除することによって癌の成長に影響を及ぼし、癌細胞を破壊することができる。研究は、プログラム細胞死(PD1)/プログラム細胞死リガンド(PDL-1)、CTLA-4経路が、癌成長を制御する免疫系の能力にとって重要であることを示している。そのような経路は「免疫チェックポイント」と呼ばれる。いくつかのタイプの癌は、免疫系から逃れるためにこれらの経路を公正に使用する。対照的に、免疫チェックポイント阻害剤、例えばペンブロリズマブ(キイトルーダ)等は、癌細胞において保護シールドのように作用するPD-L1タンパク質による遮断を同定するのに有用である。最近、ペンブロリズマブは、化学療法によって治療することができない腫瘍-転移性癌並びにメルケルポリオーマウイルス感染によるメルケル皮膚癌を治療するためにFDAによって承認された。したがって、このチェックポイント阻害剤は体内の任意の腫瘍を標的とすることができ、したがって腫瘍非依存性治療と呼ばれる。ニボルマブは、化学療法が失敗した後の患者においてM91-H又はdMMRを伴うCRCを治療するために承認された薬物である。インターフェロン及びインターロイキンもまた、癌と戦うために、及び癌を破壊する細胞を生成するための免疫系を発達させるために使用されている。免疫療法の2年成功率は、ステージIVリンパ腫で最も高く(82%)、ステージIV CRCの患者ではわずか38%であった。 β -1, 4 GalT-Vモノクローナル抗体はIgG型であり、ヒトCRC組織に見られる過剰量の β -1, 4 GalT-Vタンパク質を遮断し、培養されたヒトCRC細胞の内皮細胞及び細胞質の細胞膜の内面を装飾する標的療法によく役立つ可能性がある(8)。ヒト化 β -1, 4 GalT-Vモノクローナル抗体を単独で、又はBPD及び/又は他のCRC薬物、例えばニボルマブと組み合わせて使用することは、CRCを軽減するための本発明者らの治療努力を加速するための研究の将来の方向となり得る。 β -1, 4 GalT-Vタンパク質も腎癌において過剰発現されるため(9)、この免疫療法アプローチの複数の用途が見出され得る。

【0216】

参考文献

1. Kolmakova A, Chatterjee S. Platelet derived growth factor recruits lactosylceramide to induce cell proliferation in UDPGal:GlcCer: β 1 4Galactosyltransferase (GalT-V) mutant Chinese hamster ovary cells. Glycoconj J 2005; 22: 401-7.
2. J. Arango, M. Pierce, Comparison of N-acetylglucosaminyltransferase V activities in Rous sarcoma-transformed baby hamster kidney (RS-BHK) and BHK cells, J. Cell. Biochem., 37 (2) (1988), pp. 225-231.
3. K. Shirane, T. Sato, K. Segawa, et al. Involvement of beta-1,4-galactosyltransferase V in malignant transformation-associated changes in glycosylation, Biochem. Biophys. Res. Commun., 265 (2) (1999), pp. 434-438.

4. Chatterjee, S. and Pandey, A. The Yin and Yang of lactosylceramide metabolism: implications in cell function. *Biochem. Biophys. Acta.* 1780: 370-382, 2007.
5. Chatterjee, S. Kolmakova, A and Mohanraj, R. Regulation of lactosylceramide synthase; implications as a drug target. *Curr. Drug Targets* 9: 272-281, 2008.
6. D. Bedja, W. Yan, V. Lad, et al. Inhibition of glycosphingolipid synthesis reverses skin inflammation and hair loss in ApoE^{-/-} mice fed western diet, *Sci. Rep.*, 8 (2018), p. 11463.
7. M. Rajesh, A. Kolmakova, S. Chatterjee. Novel role of lactosylceramide in vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in human endothelial cells, *Circ. Res.*, 97 (8) (2005), pp. 796-804.
8. S. Chatterjee, et al. Lactosylceramide synthase B-1,4GalT-V : A novel target for the diagnosis and therapy of human colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2019; 508, 380-400.
9. S. Chatterjee, N. Alsaeedi, J. Hou, et al., Use of a glycolipid inhibitor to ameliorate renal cancer in a mouse model, *PloS One*, 8 (5) (2013), Article e63726.
10. P. Favoriti, G. Carbone, M. Grego, et al. Worldwide burden of colorectal cancer: a review, *Updates Surg*, 68 (1) (2016), pp. 7-11.
11. S.I. Hakomori, W.T. Murakami, Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 59 (1) (1968), pp. 254-261.
12. J.W. Dennis, S. Laferte, Oncodevelopmental expression of -GlcNAc beta 1-6Man alpha 1-6Man beta 1-branched asparagine-linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas, *Cancer Res.*, 49 (4) (1989), pp. 945-950.
13. S. Hakomori, Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism, *Cancer Res.*, 56 (23) (1996), pp. 5309-5318.
14. Y.Y. Liu, R.A. Hill, Y.T. Li, Ceramide glycosylation catalyzed by glucosylceramide synthase and cancer drug resistance, *Adv. Cancer Res.*, 117 (2013), pp. 59-89.
15. Y. Wei, F. Zhou, Y. Ge, et al., β 1,4-Galactosyltransferase V regulates self-renewal of glioma-initiating cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396 (3) (2010), pp. 602-607.

【0217】

実施例3：II型糖尿病マウス（db/db）におけるアテローム性動脈硬化症及び体重減少を軽減するための β -1,4GalT-Vモノクローナル抗体。

11週齢の雄のII型糖尿病マウス（db/db）をJackson Laboratoryから購入した。本発明者らは、マウスを、正常マウス飼料及び水で飼育した。30週齢で、マウスを2つの群に分けた。第1群のマウス（プラセボ）には、6週間にわたって腹腔内注射によって毎日生理食塩水（100 μ L）を与えた。第2群のマウスを、GalT-V抗体（1mg/kg体重）で同じ期間処置した。36週齢の最後に、マウスの体重を測定し、様々な組織を収集し、更なる分析まで凍結した。次に、総脂質を抽出するために、約10mgの肝臓組織を切除し（回収を確認するためにC12セラミド及びC12スフィンゴミレインの内部標準を添加した）、アセトニトリル中でホモジナイズし、1000rpmで数分間遠心分離した。透明な上清を保存し、ペレットを繰り返し抽出した。プールした上清をN2中で乾燥させ、クロロホルム-メタノール（2:1 v/v）中で再構成した。脂質抽出物の適切なアリコートを高速度薄層クロマトグラフィープレートに

ロードした。また、コレステロールエステル、トリグリセリド及びコレステロールからなる標準的な中性脂質の誤った解釈も、プレートを校正するために負荷した。ヘプタン：エチルエーテル及び酢酸（65：16：1 v/v）を溶媒として使用してプレートを現像した。ヨウ素蒸気でプレートを曝露することによって脂質を同定し、写真撮影した。脂質の質量の定量は、個々の脂質の標準曲線を使用し、両側パラメトリック t 検定を使用して、濃度測定分析によって行った。

【0218】

結果は、GalT-VモノクローナルABで処置した糖尿病マウスが、プラセボ群のマウスと比較して有意に低下したコレステロールレベルを有することを実証した。処置はまた、マウスのプラセボ群と比較してトリグリセリド（中性脂肪）のレベルを著しく低下させた。加えて、処置はマウスの体重を約20%減少させた。

10

【0219】

実施例4：本発明者らは、培養ヒトCRC細胞（HCT-116）において、GalT-V ABによる処置が細胞増殖及び血管新生を用量依存的に軽減することを示した[1]。さらに、本発明者らは、CRCのNOD-SCIDマウスモデルにおける異種移植腫瘍におけるCF-750タグ付きGalT-V-Abの濃縮を示した。

【0220】

本発明者らは更に、GalT-V-Abによる処置がマウス直腸のマウス同所性腫瘍における腫瘍成長及び転移に影響を及ぼすかどうかを決定することを望む。

【0221】

20

方法：

直腸癌を、生きたヒト結腸直腸癌細胞（HCT-116）（McCoy培地中50uL中の 1×10^6 細胞）を注射することによってNOD-SCID/免疫無防備状態のマウスにおいて誘導した。マウスの処置群は、尾静脈へのIV注射によって50uLのPBS（プラセボ）、20ug/kgのGalT-V-Ab及び200ug/kgのGalT-V-Abを受けた。

【0222】

図13は、直腸癌のマウスモデルにおけるGalT-V抗体による処置の効果を研究するために従ったスキームを要約する。簡潔には、HCT-116細胞を組織培養において約75%コンフルエンスまで成長させた。トリプシンを用いて細胞を回収し、遠心分離し、細胞数を計測した。血清非含有McCoy培地に懸濁した 1×10^6 個の細胞を、雄NOD-SCIDマウス（約10週齢）の直腸に注射した。2週間後、直腸腫瘍が見え、定量化されたとき、処置を開始した。マウスを3つの群：A. プラセボ、B. 20ug/kgのGalT-V-Ab/kg体重、及びC. 200ug/kgのGalT-V-Ab/kg体重に分けた。1日おきに尾静脈にIVによって処置を行い、体重及び腫瘍サイズを記録した。処置の4週間後、マウスを2つの群：1. 数匹のマウスを腫瘍の撮像に使用した、及び2. 残りのマウスを安楽死させ、血液を採取して血漿及び様々な組織を採取した。腫瘍組織の半分をホルマリン溶液に保存し、脂質分析並びに免疫組織化学研究に使用した。腫瘍組織の残りの半分を急速凍結し、分子研究に使用した。

30

【0223】

40

結果：

GalT-AB抗体による処置は、NOD-SCIDマウスにおけるCRCの同所性モデルにおいて直腸腫瘍体積を用量依存的に減少させる。

【0224】

マウスの体重は、4週間にわたる処置に関係なく変化しなかった（図14）。GalT-V-Abによる処置は、腫瘍体積の用量及び時間依存性減少を有した。例えば、処置の2週間後、本発明者らは、20ug/kg及び200ug/kgの抗体を受けたマウスにおいて腫瘍体積が約38~41%減少したことに注目した（図15A）。4週間の処置後、20及び200ug/kgの抗体で処置したマウスにおける腫瘍体積は、直腸腫瘍を担持するプラセボマウスと比較して、それぞれ32%及び41%低かった（図15B）。

50

【0225】

腫瘍体積の減少の分子イメージング：

処置の4週間後、マウスに、確立された腫瘍バイオマーカーである50 uLのCF-750タグ付き癌胎児性抗原（CEA）を注射した。2時間後、図16Aに示すように、マウス全体を撮像した。

【0226】

図16では、HCT-116直腸同所性腫瘍を担持するマウスの光学画像が示される：肝臓（1）、大腸（2）、血液（3）、脳（4）、黒矢印で示されている腫瘍（5）、小腸（6）、脾臓（7）、心臓（8）、肺（9）、盲腸（10）、胃（11）、腎臓（12）が時計回りの順序で示されている。

10

【0227】

HCT-116ヒトCRC腫瘍細胞（ 1×10^6 個）をNOD-SCID雄マウス（10週齢）の直腸に移植した。2週間後、4週間にわたる1日おきのIV注射によって処置を開始した。癌胎児性抗原（CEA）に対するCF-750抗体の送達の2時間後に、Foragerイメージングマシンを用いてマウスを撮像した（図16A）：対照、CEA-Abなしのマウス、M1、200 ugのGalT-V Ab/kg体重で処置したマウス、M2、プラセボを与えたマウス及びM3、20 ugのGalT-V Ab/kg体重で処置したマウス。24時間後、マウス組織を採取し、ペトリ皿に置き、写真撮影し（図16B）、最後に画像化した（図16C）。

【0228】

イメージング研究は、ヒトCEAに対するCF-750タグ付き抗体を調製すること、及び尾静脈へのIV注射によってそれを送達することを含んだ。図16Aに示すように、プラセボ（図16AのM2）を投与したマウス全身撮像では、直腸（緑色）、肝臓（青色）及び頭部（青色）へのタグの広範な局在化／濃度が明らかになった。20 ugのGalT-V Abを投与したマウスでは、これらの組織に関連するタグは比較的少なかった（図16AのM3）。しかしながら、200 ugのGalT-V-Abで処置すると、タグのほとんどが直腸腫瘍に濃縮された（青色）（図16AのM1）。

20

【0229】

図16Bは、CF-750-CEA-Ab（図16C）の注射の24時間後のイメージング前及び撮像後の個々のマウス組織の写真を示す。プラセボ腫瘍（図16C、M2）は、タグの最高レベルを占めた（赤色）。染色強度は、GalT-V-Ab処置群と比較してプラセボ肝臓（図16CのM2）で最も高かった。肺、腎臓及び血液にいくつかのタグが見られた（赤色）。本発明者らはまた、染色の強度が、20 μ g（図4CのM3）及び200 μ gのGalT-V-Ab/kg（図16CのM1）での処置時に腫瘍組織（赤色）中で用量依存的に減少したことに注目する。本発明者らはインタクトCEA-Ab（IgG1）を使用したため、それは門脈循環並びに腎臓及び肺を介して肝臓に入った。この観察結果は、以前の報告と一致する。将来、本発明者らは、CEA-AbのCF-750-Fab断片のみを使用することを計画しており、これはCEA-Abが>10:1の比で腫瘍組織対肝臓に取り込まれるためである。

30

【0230】

GalT-V抗体による処置及び腫瘍マーカー遺伝子の発現：

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）による遺伝子発現の定量分析は、CEA及びNMT-1のmRNAレベルがプラセボ群及び処置群（ns）で類似していることを示す。しかしながら、B4 GALT-Vの発現は、対照と比較して20 U/kg群で減少し、200 U/kg群では有意ではなかった。図17を参照されたい。

40

【0231】

GalT-V抗体による処置は、GalT-Vの血中レベル及びラクトシルセラミドの腫瘍レベルを低下させた。

ヒトCRC組織における本発明者らの以前の研究は、GalT-Vの質量及びLacCerのレベルの両方が、同じCRC患者由来の目に見える正常組織と比較して増加したこ

50

とを明らかにした。本発明者らはまた、G a l T - V の阻害剤である D - P D M P による処置が、H C T - 1 1 6 細胞における G a l T - V のレベル及び L a c C e r の質量を減少させ、細胞増殖を減少させたことを示した。また、ヒト内皮細胞において、D - P D M P 及び G a l T - V - A b による処置は血管新生を減少させた。最後に、D - P D M P による腎癌処置のマウスモデルでは、腫瘍体積及び G a l T - V 質量が著しく減少した [2] 。したがって、本発明者らは、血漿中の G a l T - V の質量及び腫瘍組織中の L a c C e r のレベルを測定した。図 1 8 A に示すように、G a l T - V - A b による処置は、血漿中の G a l T - V のレベルを有意に低下させた。また、G a l T - V 処置マウス群では、腫瘍組織中の L a c C e r レベルが低下する傾向があった (図 1 8 B) 。

【 0 2 3 2 】

概要：

1 . 生きた H C T - 1 1 6 細胞を接種した直腸癌の同所性マウスモデルでは、6 週間の期間にわたって腫瘍体積の著しい増加があった。

2 . 2 0 u g / k g の G a l T - V A b を与えたマウスにおいて、G a l T - V - A b 用量での処置及び時間依存的に減少した腫瘍体積は、2 週間～4 週間で 3 2 % ～3 8 % 程度であった。

3 . より高用量の G a l T - V - A b による処置は、プラセボ腫瘍体積と比較して腫瘍体積を 4 1 % 減少させた。

4 . この観察の生化学的及び分子的基礎は、処置が、少なくともマウスが 2 0 u g G a l T - V A b / k g で処置された場合に、血液中のその質量を減少させることによって抗原 G a l T - V を標的化し、同様に腫瘍組織中のその産物 L a c C e r を、G a l T - V 遺伝子発現を減少させることによって標的化したことを本発明者らが観察したことから説明された。

5 . イメージング研究は、上記の観察を再現した。さらに、イメージング研究は、プラセボマウスにおいて、接種の 6 週間後に、腫瘍転移が、血液循環における主要な組織である他の組織、例えば肝臓、腎臓及び肺に起こったことを明らかにした。これは、マウスを低用量又は高用量の G a l T - V - A b で処置した場合に有意に軽減され、高用量の G a l T - V - A b で処置したマウスでは著しく減弱された。

【 0 2 3 3 】

G a l T - V 抗体を用いた免疫療法は、直腸腫瘍の成長及び転移を予防又は阻害するための有効な治療法である。

【 0 2 3 4 】

実施例 5 : ヒト結腸直腸癌細胞における G a l T - V の局在化並びに細胞表面タンパク質及びゴルジ装置の細胞オルガネラ特異的バイオマーカーとの共局在化を判定した。

【 0 2 3 5 】

H C T - 1 1 6 細胞の *i n v i t r o* 共焦点蛍光画像を撮影した (図 1 9 参照) 。ヒト G a l T - V (赤色、ローダミン、S i g m a A l d r i c h) に対して産生された標識マウスモノクローナル抗体 (m A b) 及びマウスで産生されたモノクローナル抗カベオリン- 1 抗体 (緑色、A l e x a F l u o r 4 8 8 N H S エステル、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) の、1 時間のインキュベーション後の 4 ° C における細胞表面局在を観察した。画像をマージした場合の G a l T - V 及びカベオリンの共局在化 (黄色、注意白矢印) も同様に観察した。対応する画像をマージした場合、4 ° C でのモノクローナル抗ゴルジ 5 8 k タンパク質 (緑色、A l e x a F l u o r 4 8 8 N H S エステル、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) との共局在は観察されなかった。

【 0 2 3 6 】

ヒト G a l T - V に対するマウスモノクローナル抗体 (m A b) をローダミンでタグ付けした。カベオリン- 1 A b 及びゴルジ A b もインドシアニンググリーンでタグ付けした。次いで、これらの抗体を使用して、共焦点顕微鏡法 (D O I からのプロトコル : 1 0 . 1 0 2 1 / a c s . m o l p h a r m a c e u t . 0 c 0 0 4 5 7 に従う) を使用して G a

10

20

30

40

50

LT-Vの局在を決定した。DNAに結合するDAPI染色 (ThermoFisher Scientific) で核を染色した (青色)。図19 (上のパネル) に示すように、4℃のGalT-V (赤色染色) 及びカベオリン (緑色染色) 抗体は、ヒト結腸直腸癌細胞株HCT-116の細胞表面に強く結合した。これらの図を合成すると (上のパネルを右端に)、GalT-Vとカベオリンの免疫染色が重なり合い、色が黄色に変化することが観察された (白い矢印で示す)。細胞を内部移行の遮断薬であるメチル-シクロデキストリンとインキュベートした場合、GalT-V免疫染色の大部分は細胞表面に関連していた。対照的に、細胞をゴルジ装置に対する抗体 (図19下パネル) で処置した場合、免疫染色は全く観察されなかった。共焦点顕微鏡画像を、20倍の倍率を用いてZeiss LSM 700で撮影し、Image-Jで処理した。

10

【0237】

実施例6: GalT-V (赤色)、カベオリン (緑色) 及びゴルジ (緑色) に対する蛍光タグ付き抗体によるHCT-116細胞の*in vitro*共焦点蛍光画像。図20を参照されたい。37℃で2時間インキュベートした後のGalT-V抗体 (赤色) 及びカベオリン (緑色) 抗体の細胞内移行が観察された。画像をマージした場合、GalT-Vとカベオリン抗体の限定的な共局在が観察された (黄色、白矢印を参照)。

【0238】

次に、細胞を37℃に2時間加温した後、共焦点顕微鏡を行った。図20の上部パネルに示されるように、GalT-V Ab (赤色染色) は細胞を内在化し、細胞質と会合していた。被覆ピット内に含まれるカベオリンは内在化されて細胞表面に戻ることが知られていることから、本発明者らは細胞質及び細胞表面免疫染色 (緑色染色) を観察した。ゴルジ抗体によるかすかな免疫染色 (緑色染色) が下のパネルで観察された。

20

【0239】

実施例7: ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) 及びヒト結腸直腸癌細胞 (HCT-116) における [^{89}Zr] GalT-V 抗体の結合及び内在化

細胞培養物を漸増濃度の [^{89}Zr] GalT-V 抗体と共にインキュベートし、洗浄し、自動ガンマカウンター (1282 Compu-gamma CS, Pharmacia/LKB Nuclear, Inc.) で放射能を測定した。HCT-116細胞は、HCAEC細胞と比較して有意により多くの量のGalT-V抗体に結合することに留意されたい ($n=3$ 、 $p****$ (5ug/mL) = 0.000053、 $p****$ (10ug/mL) = 0.000805)。

30

【0240】

図21は、4℃で1時間インキュベートした後のヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) 及びヒト結腸直腸癌細胞 (HCT-116) における [^{89}Zr] GalT-V 抗体結合を示す。

【0241】

実施例8: ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) 及びヒト結腸直腸癌細胞 (HCT-116) における [^{89}Zr] GalT-V 抗体結合

細胞培養物を漸増濃度の [^{89}Zr] GalT-V 抗体と共にインキュベートし、洗浄し、放射能をガンマカウンターで測定した。HCT-116細胞は、HCAEC細胞と比較して有意により多くの量のGalT-V抗体に結合して内在化することに留意されたい ($n=3$ 、 $p****$ (10ug/mL) = 0.000124)。結果を図22に示し、これは、37℃で2時間のインキュベーション後のヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) 及びヒト結腸直腸癌細胞 (HCT-116) における [^{89}Zr] GalT-V 抗体結合を示す。

40

【0242】

実施例9: 細胞をGalT-V、D-PDMP (20uM) の阻害剤あり又はなしでプレインキュベートした後、 [^{89}Zr] GalT-V 抗体の結合及び内在化の測定を行った。D-PDMPはGalT-Vの質点を減少させることから、 [^{89}Zr] GalT-V 抗体の結合及び内在化も減少させた ($n=3$ 、 $p**$ = 0.0079)。結果を図23

50

に示し、これは、D-PDMPがヒト結腸直腸癌細胞（HCT-116）においてジルコニウムタグ付きGalT-V抗体結合を阻害することを示す。

【0243】

実施例10：細胞を、過剰の非標識（コールド、50 μ g/mL）GalT-V抗体並びに ^{89}Zr GalT-V Abの存在下でインキュベートした。非標識抗体の存在は、処置されたHCT-116細胞における ^{89}Zr の結合及び内在化を著しく減弱させたことに留意されたい（ $n=3$ 、 $p****\leq 0.0001$ ）。結果を、ヒト結腸直腸癌細胞（HCT-116）における ^{89}Zr GalT-V抗体の結合及び内在化の特異性を示す図24に示す。

【0244】

実施例11：GalT-V抗体は、強力なガンマ放出体であるため ^{89}Zr で放射性標識され、*in vitro*研究並びにマウスにおける*in vivo*研究に有用である。図21に示すように、4℃で測定したHCAEC細胞（青色）及びHCT-116細胞（赤色）への ^{89}Zr GalT-V Ab結合は濃度依存的であった。さらに、HCT-116細胞へのGalT-V Ab結合は、4℃（図21）及び37℃（図22）の両方でHCAEC細胞と比較して統計的に有意に高かった。HCT-116細胞のGalT-V活性及び質量を阻害することが知られているD-PDMPも、未処置細胞と比較して、結合したGalT-V Abが少なかった（図23）。 ^{89}Zr GalT-V Ab結合の特異性を、HCT細胞を、放射性標識されたAbと競合し得る過剰なGalT-V抗体とインキュベートすることによって評価した。図24に示すように、50 μ g/mLのコールド非標識GalT-Vと共にインキュベートしたHCT-116細胞は、熱放射性GalT-V Ab（赤色バー）と共にインキュベートした細胞と比較して、結合が著しく減弱した（青色バー）。HCT-116細胞（図25）への ^{89}Zr GalT-V Ab結合の時間経過の研究は、HCT-116細胞において30分から2時間までほぼ線形の結合を示した。

【0245】

実施例12：ヒトCRC腫瘍担持マウスの*in vivo*異種蛍光画像

ヒトCRC腫瘍担持マウスの*in vivo*異種蛍光画像を撮影した。CF-750-GalT-V抗体の注射の5時間後、図26に示されている黒矢印で示されている皮下/異種指向性CRC腫瘍を示す。

【0246】

蛍光タグ付きGalT-V抗体の注射の48時間後、図27に黒い矢印で示されている異種指向性CRC腫瘍を示す。CF-750-GalT-V抗体の強度は、異種指向性CRC腫瘍を担持するマウスにおいて注射5時間後から注射48時間後に著しく増加した（青色スポット）ことに留意されたい。

【0247】

図26に示すように、本発明者らは、CF-750-GalT-V抗体（黒矢印で示す）の注射後5時間以内にマウスの異種指向性CRC腫瘍を撮像することができた。右側のバーは、蛍光の強度を示す。深い青色及び赤色は、それぞれ非常に高い及び非常に低いGalT-V抗体蛍光強度を表す。これらのマウスの毛は自家蛍光であったため、インタクト動物では麻酔後に非侵襲的に他の内臓、例えば肝臓、脾臓等を撮像することができなかった。本発明者らは、緑色から青色への色の変化によって示されるように、異種指向性腫瘍における蛍光の時間依存性濃縮を観察した（蛍光タグ付きGalT-V抗体による注射の5時間後の図26及び48時間後の図27を比較する）。

【0248】

実施例13：異種指向性腫瘍を担持するマウスにおけるCF-750蛍光GalT-V抗体の組織分布

図28A、B及びCは、皮下/異種移植腫瘍担持マウス由来の個々の組織におけるCF-750 GalT-V抗体蛍光の分布を示す。肝臓（1）、結腸（2）、脳（3）、腫瘍（4）、S状結腸（5）、大腸（6）、脾臓（7）、心臓（8）、肺（9）、小腸（1

10

20

30

40

50

0)、盲腸(11)、胃(12)、腎臓(13)、筋肉(14)、及び血液(15)。

【0249】

CF-750-GaLT-V抗体の注射後72時間で、3匹の異種指向性腫瘍担持マウス(M1、M2、M3)を安楽死させ、個々の臓器を切除し、写真撮影した(図28A、B、C)。まず、各臓器を撮影(左パネル図28A、B、C)した後、異種指向性移植画像を撮影した。肝臓、脾臓、及び腎臓が有意な蛍光を吸収したことに留意されたい。しかし、腫瘍組織(白色矢印で示す)は最大量の蛍光を蓄積した。

【0250】

要するに、本発明者らの*in vivo*研究は、GaLT-V抗体の蛍光タグ付けがマウスのCRC腫瘍を非侵襲的に画像化するための貴重な試薬であることを明らかにする。経時的に、CF-750-GaLT-V抗体は主に腫瘍組織に濃縮される。肝臓、腎臓及び肺は抗体の代謝及びその後の排出に関与しているため、これらの組織でも有意な蛍光が観察された。この追加の情報は、CRCに加えて、腎臓癌及び肝臓癌の緩和におけるGaLT-V抗体の治療有効性を決定するのに有用であり得る。また、CF-750-GaLT-V抗体は、GaLT-V濃縮が起こり得るヒトCRC及び他の癌組織における診断ツールとして使用することができる。

10

【0251】

統計分析: GraphPad Prism 9ソフトウェアを用いた単数/複数の対応のないt検定を用いて、データの統計分析を行った。

【0252】

20

結論:

1. 免疫組織化学的研究は、ヒトHCT-116細胞では、GaLT-Vがカベオリンと細胞表面に共局在していることを示す。

2. インキュベーション温度を4℃から37℃にシフトさせると、細胞表面に結合したGaLT-Vは内部移行し、細胞質に存在する。弱い免疫染色は、存在量が低いためにゴルジ装置に関連する。

3. [⁸⁹Zr] GaLT-V抗体を使用した結合及び内在化試験は、HCT-116細胞及びHCAEC細胞への濃度依存性及び時間依存性結合を示した。

4. 結合はGaLT-V抗原に特異的であった。

5. 結合は、以下のようにGaLT-Vの細胞レベルに依存した: a. HCT-116細胞は、HCAECと比較して、より多くのGaLT-V抗体に有意に結合した。b. D-PDMP処置HCT-116細胞は、未処置細胞よりも結合が少なかった。本発明者らの以前の研究は、D-PDMPがGaLT-V質量を減少させることを示している。

30

【0253】

ヒト結腸直腸細胞では、GaLT-Vは細胞表面に局在し、対応する[⁸⁹Zr] GaLT-V抗体の結合及びその後の内在化を可能にする。

【0254】

他の実施形態

上記の説明から、本明細書に記載の発明を様々な用途及び条件に採用するために変形及び修正が行われ得ることは明らかであろう。そのような実施形態も、以下の特許請求の範囲に含まれる。

40

【0255】

本明細書における配列、特許及び刊行物に対する全ての引用は、あたかも各独立した特許及び刊行物が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】
【図 1 - 1】

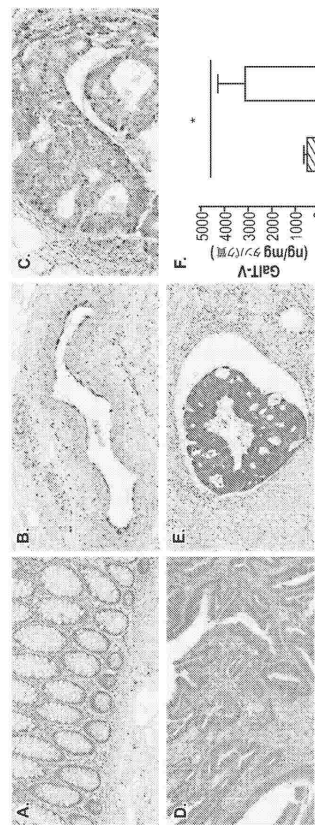


図 1A-1F

【図 1 - 2】

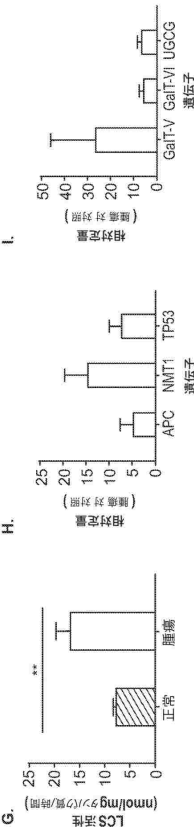


図 1G-1I

【図 2 - 1】

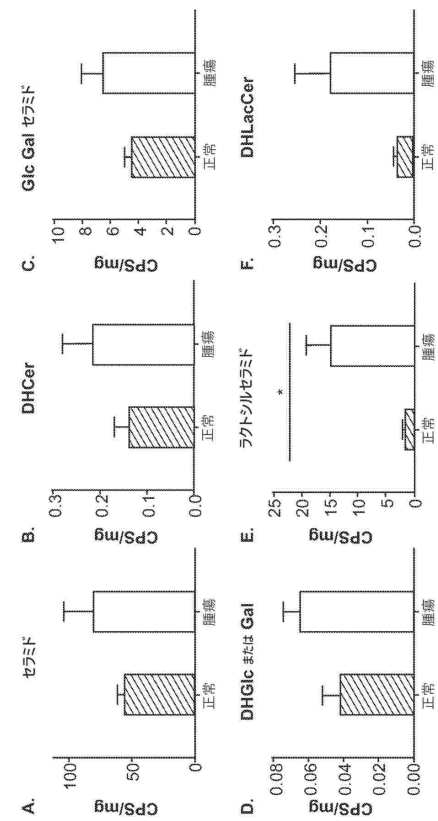


図 2A-2F

【図 2 - 2】

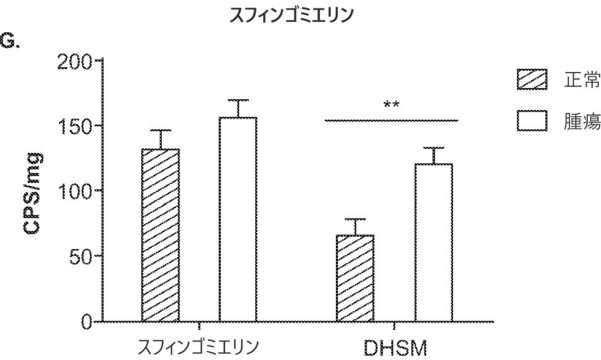


図 2G

10

20

30

40

50

【図 3 - 1】

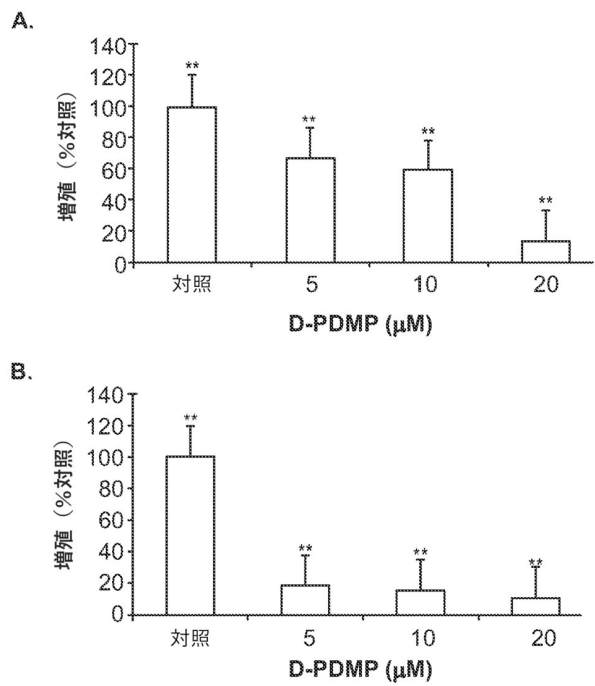


図 3A-3B

【図 3 - 2】

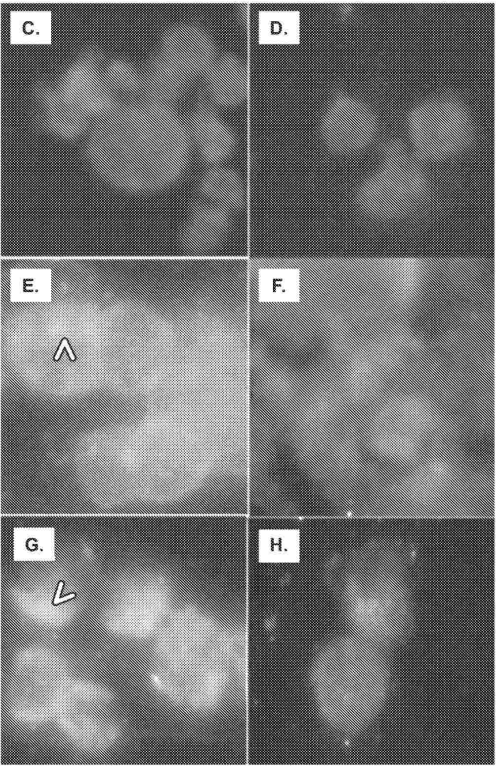
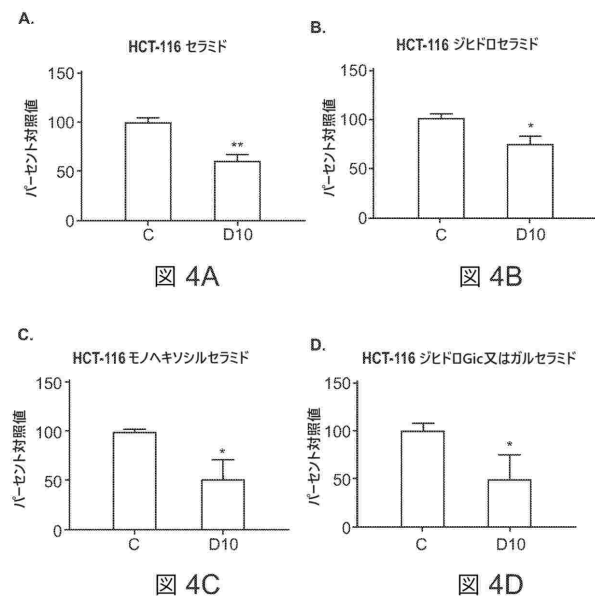
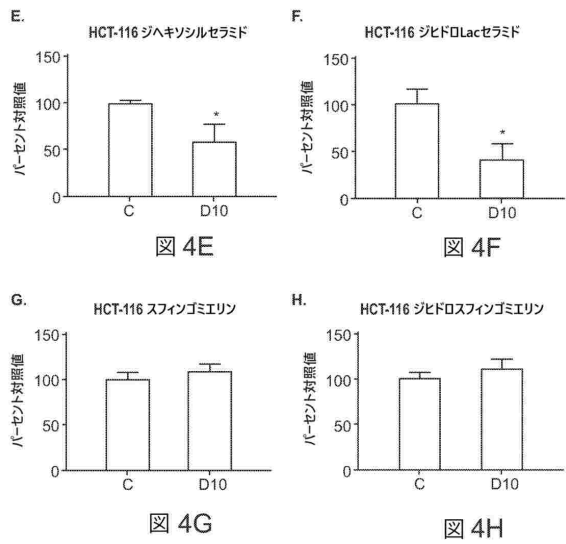


図 3C-3H

【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



10

20

30

40

50

【 図 5 】

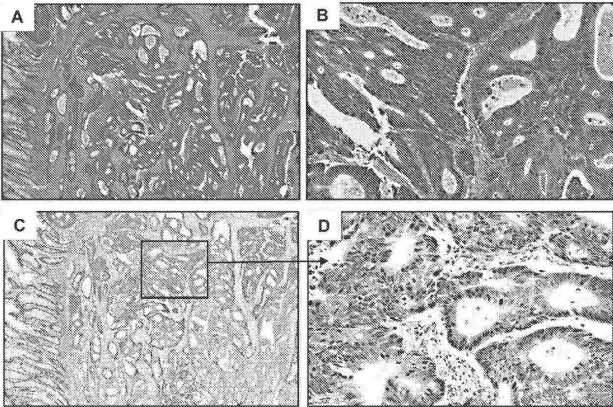


図 5A-5D

【 図 6 】

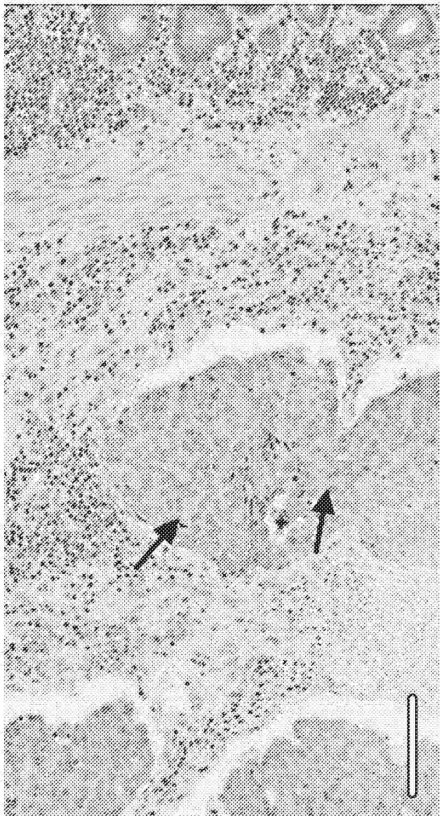


図 6

【 図 7 】

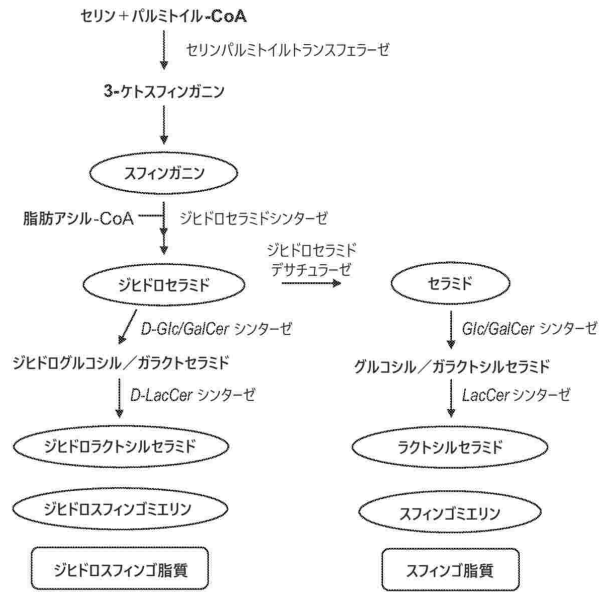
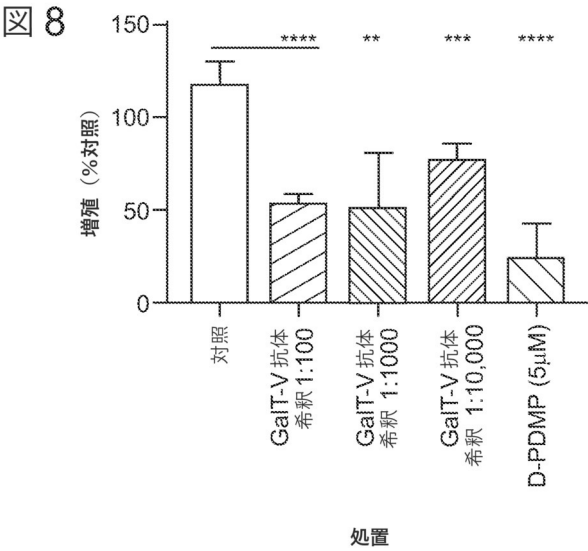


図 7

【 図 8 】



10

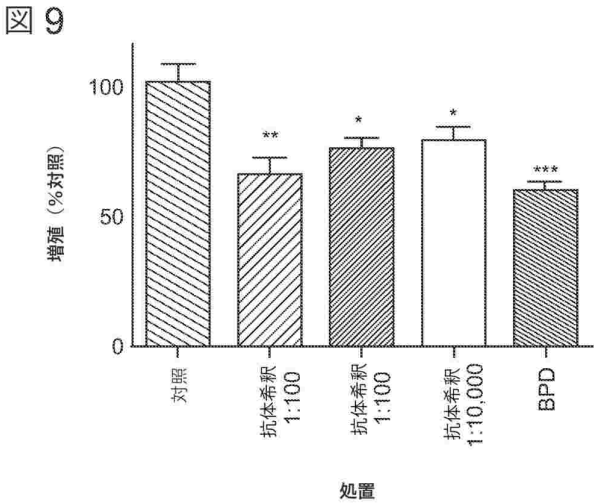
20

30

40

50

【図 9】



【図 10】

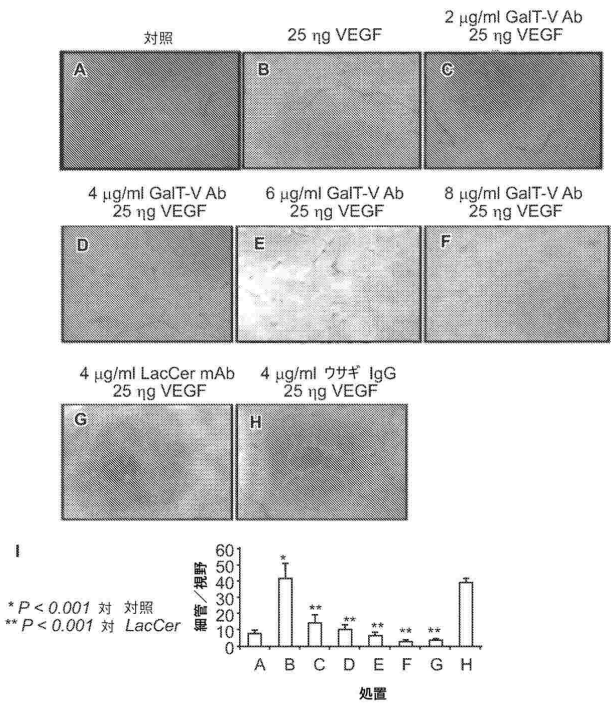
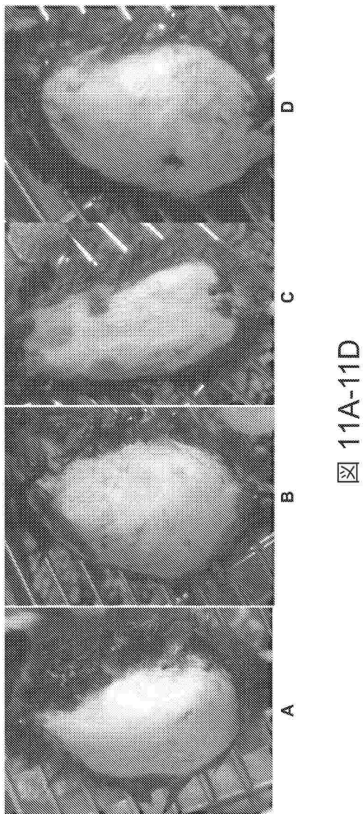


図 10A-10I

【図 11】



【図 12】

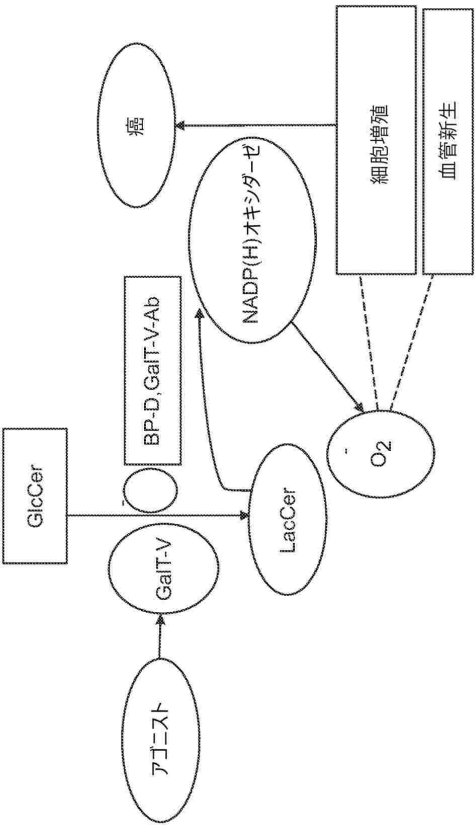
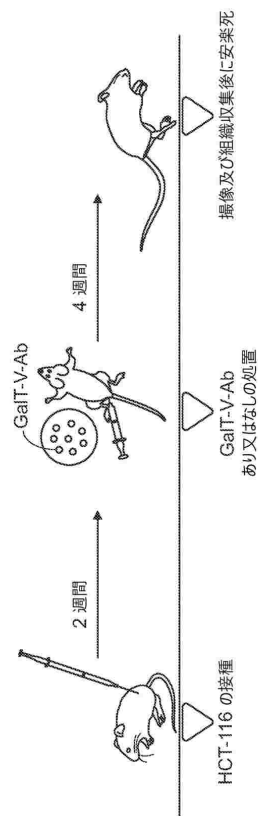
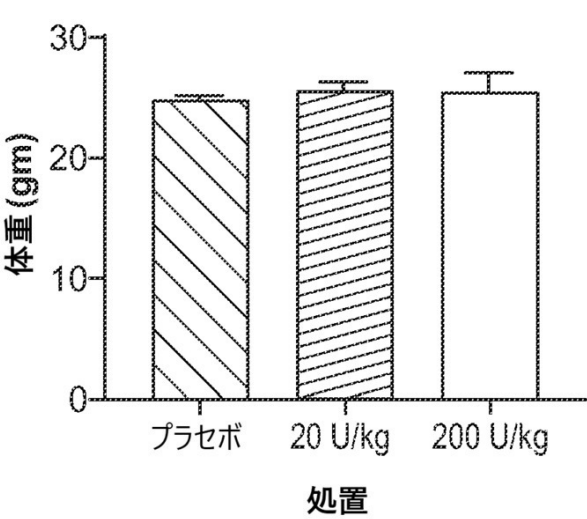


図 12

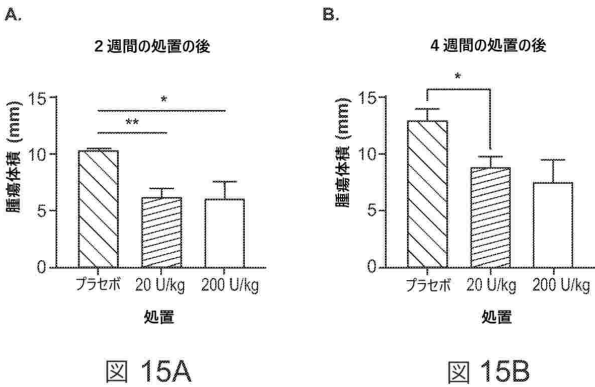
【図 1 3】



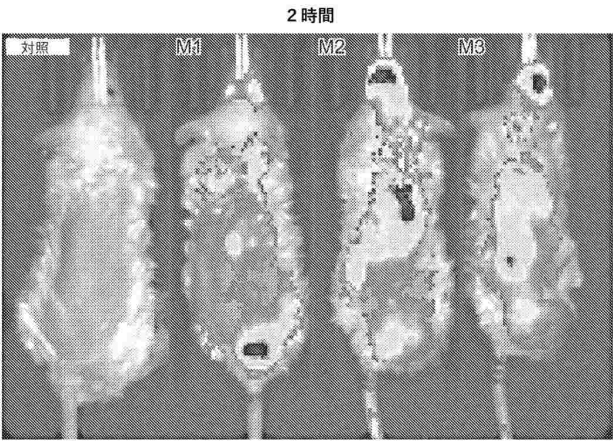
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6 - 1】



10

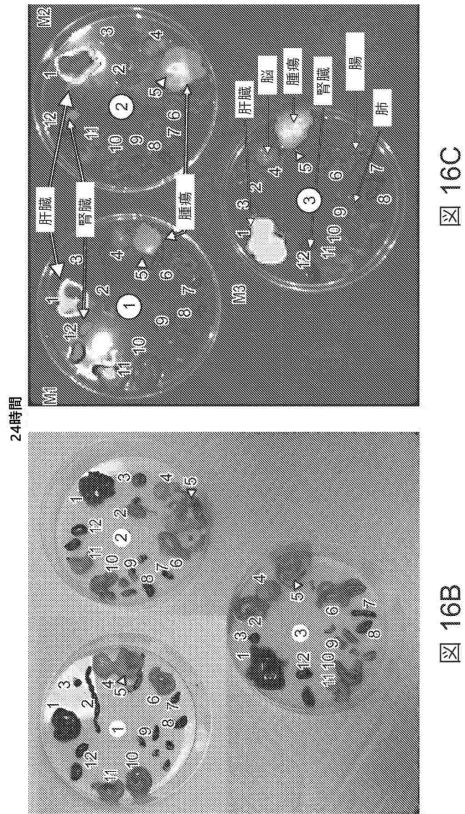
20

30

40

50

【図 16 - 2】



【図 17】

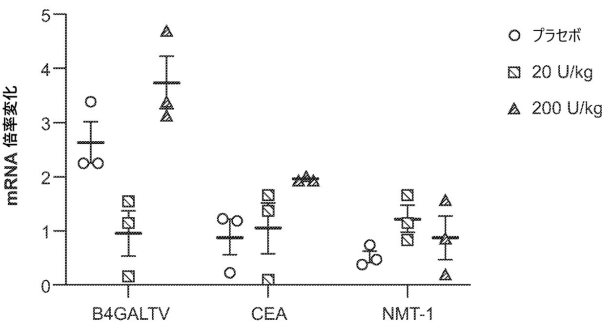


図 17

【図 18 A】

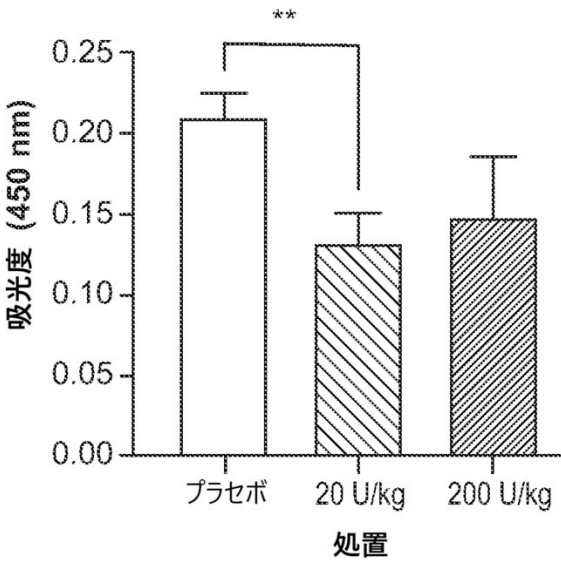


図 18A

【図 18 B】

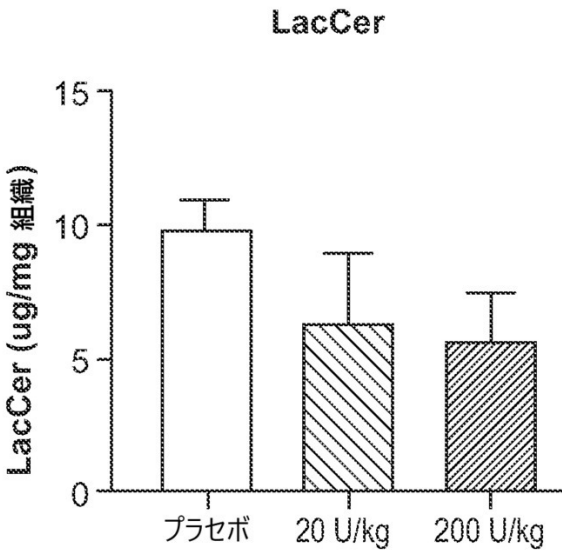


図 18B

10

20

30

40

50

【 図 1 9 】

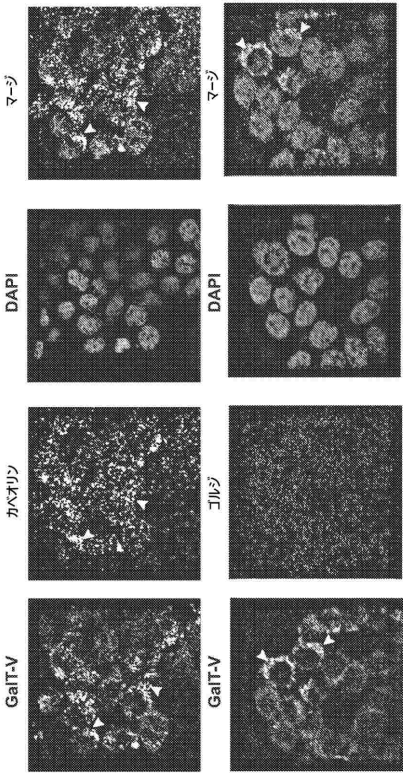


図 19

【 図 2 0 】

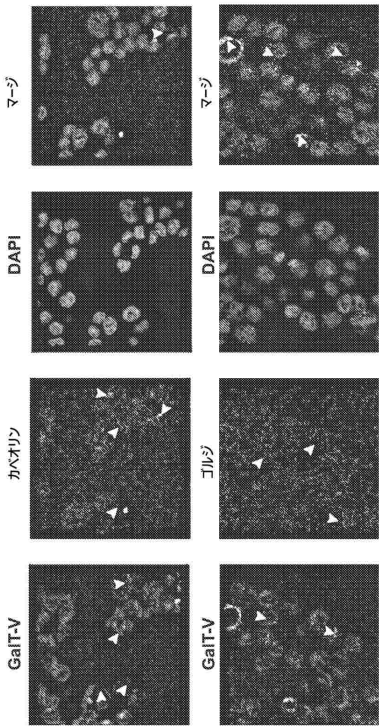


図 20

【 図 2 1 】

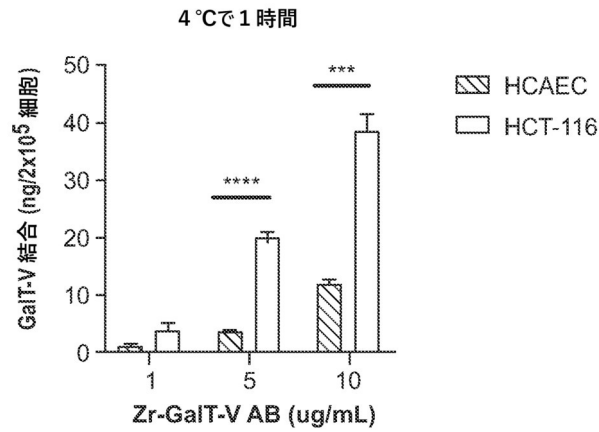


図 21

【 図 2 2 】

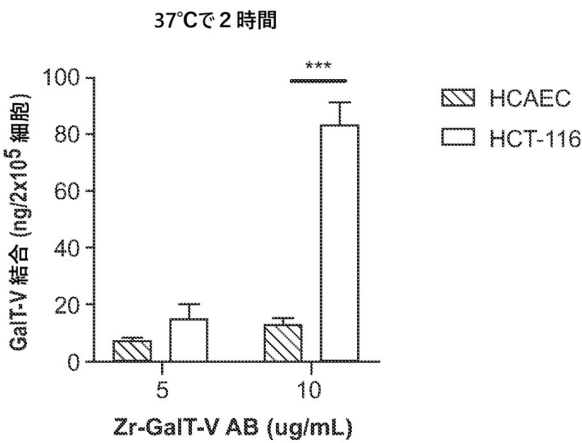


図 22

10

20

30

40

50

【図 2 3】

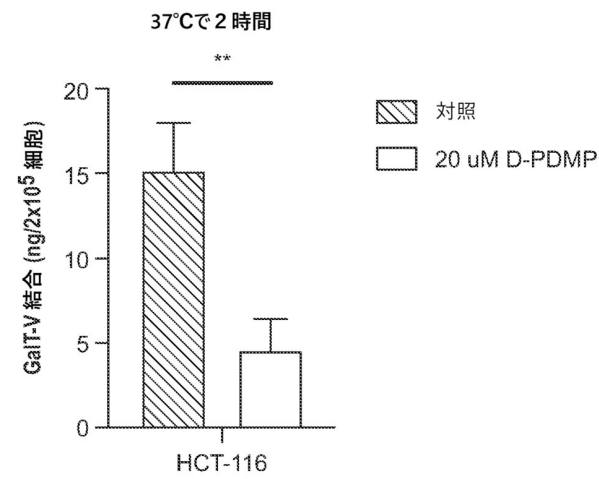


図 23

【図 2 4】

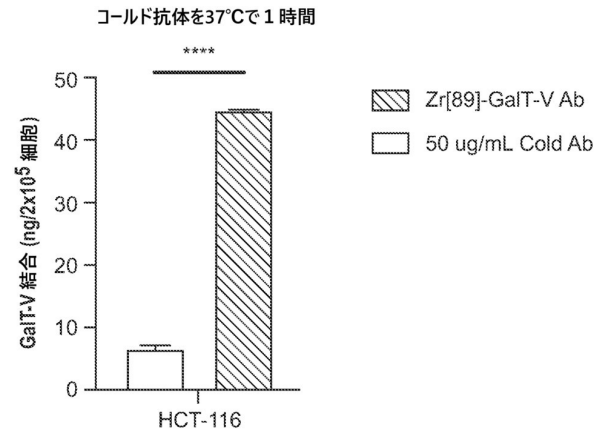


図 24

【図 2 5】

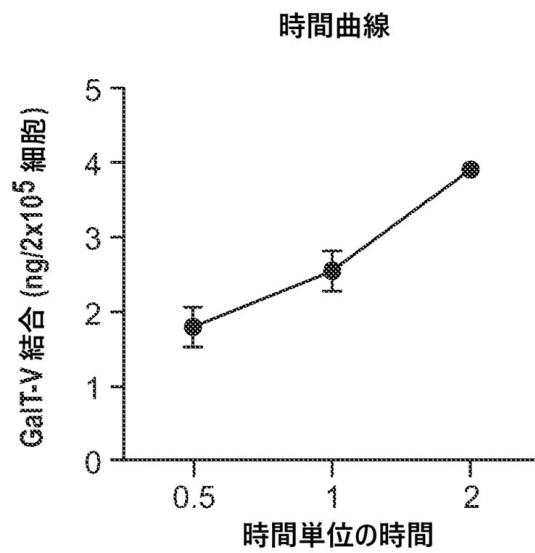


図 25

【図 2 6】

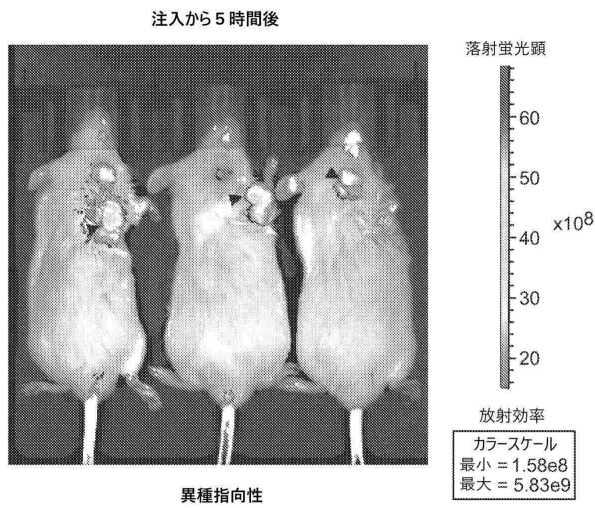


図 26

10

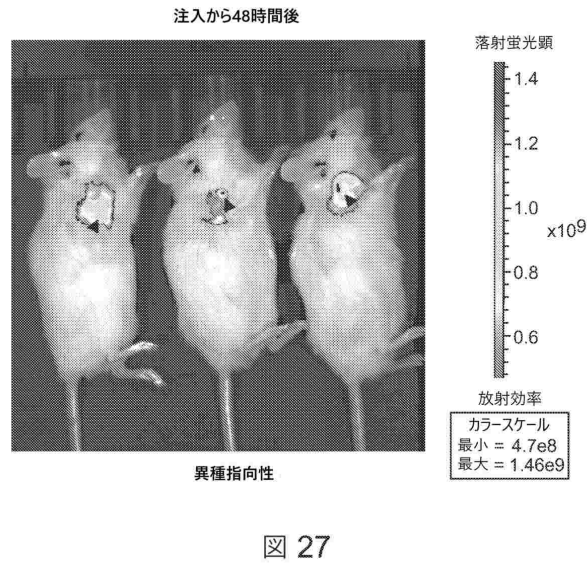
20

30

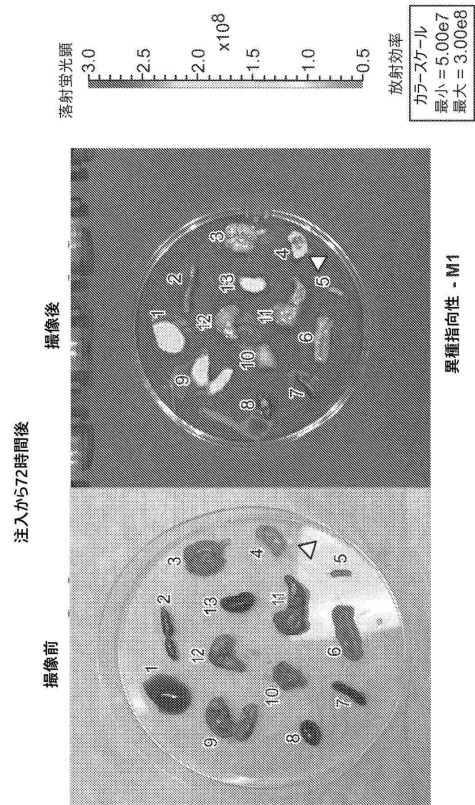
40

50

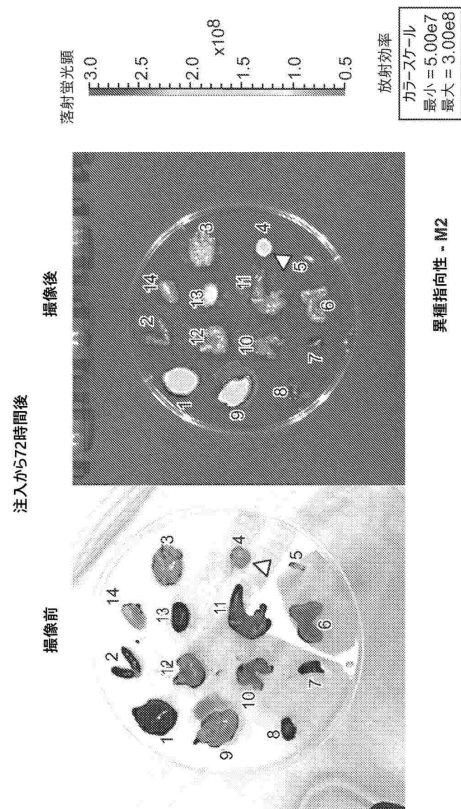
【図 2 7】



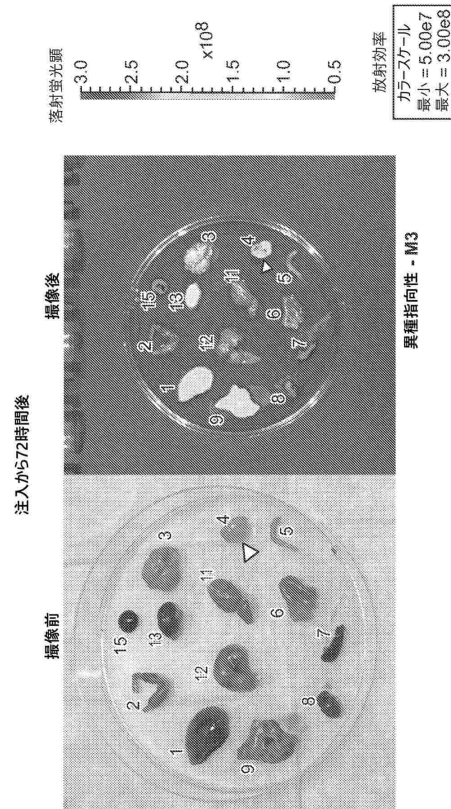
【図 2 8 A】



【図 2 8 B】



【図 2 8 C】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/074785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - INV. - A61K 39/395; C07K 16/40 (2023.01) ADD. - A61P 35/00 (2023.01) CPC - INV. - A61K 39/3955; C07K 16/40 (2023.02) ADD. - A61K 2039/505; A61P 35/00 (2023.02) 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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2020/0181264 A1 (CITY OF HOPE et al.) 11 June 2020 (11.06.2020) entire document	1-3 — 33, 34
X — Y	WO 2019/236722 A1 (CHATTERJEE) 12 December 2019 (12.12.2019) entire document	13, 42, 43 — 33, 34
A	US 2009/0202439 A1 (CHATTERJEE) 13 August 2009 (13.08.2009) entire document	1-4, 13, 33-35, 42, 43
A	US 2017/0121409 A1 (JANSSEN BIOTECH INC.) 04 May 2017 (04.05.2017) entire document	1-4, 13, 33-35, 42, 43
A	US 2019/0023776 A1 (ONCOMED PHARMACEUTICALS INC.) 24 January 2019 (24.01.2019) entire document	1-4, 13, 33-35, 42, 43
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 27 April 2023		Date of mailing of the international search report JUN 06 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/074785

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/074785

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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.: 6-12, 14, 36-39, 44, 47-70
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 13, 33-35, 42, 43

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/074785

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1-4, 13, 33-35, 42, and 43 are drawn to pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of an antibody, wherein the antibody specifically binds to a b-1,4-galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, humanized antibodies that can that specifically bind to a b-1,4- galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (a) an antibody, wherein the antibody specifically binds to a b-1,4- galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (a) an antibody, wherein the antibody specifically binds to a b-1,4- galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, and methods of treating colorectal cancer comprising the same.

Group II: claims 15-24, 30-32, 45, and 46 are drawn to expression vectors, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (i) an antibody comprising (a) a heavy chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 80% sequence identity to SEQ ID NO: 1, and/or (b) a light chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 80% sequence identity to SEQ ID NO: 2, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (i) an antibody comprising (a) a heavy chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 90% sequence identity to SEQ ID NO: 1, and/or (b) a light chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2, and methods of treating colorectal cancer comprising the same.

Group III: claims 25-29, 40, and 41 are drawn to synthetic peptides, pharmaceutical compositions comprising the same, and methods of generating an immune response to b-1,4-galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) in a subject in need thereof comprising the same.

The inventions listed in Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of an antibody, wherein the antibody specifically binds to a b-1,4-galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, humanized antibodies that can that specifically bind to a b-1,4-galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (a) an antibody, wherein the antibody specifically binds to a b-1,4-galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (a) an antibody, wherein the antibody specifically binds to a b-1,4-galactosyltransferase-V (b-1,4-GaIT-V) epitope, and methods of treating colorectal cancer comprising the same, are not present in Groups II and III; the special technical features of Group II, expression vectors, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (i) an antibody comprising (a) a heavy chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 80% sequence identity to SEQ ID NO: 1, and/or (b) a light chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 80% sequence identity to SEQ ID NO: 2, pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of: (i) an antibody comprising (a) a heavy chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 90% sequence identity to SEQ ID NO: 1, and/or (b) a light chain variable region sequence nucleic acid sequence having at least a 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2, and methods of treating colorectal cancer comprising the same, are not present in Groups I and III; and the special technical features of Group III, synthetic peptides, pharmaceutical compositions comprising the same, and methods of generating an immune response to b-1,4-galactosyltransferase-V (b-1,4- GaIT-V) in a subject in need thereof comprising the same, are not present in Groups I and II.

Additionally, even if Groups I-III were considered to share the technical features of pharmaceutical compositions comprising therapeutically effective amounts of an antibody, synthetic peptides comprising SEQ ID NO: 5, adjuvants, and methods of treating colorectal cancer comprising administering therapeutically effective amounts of an antibody, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2019/236722 A1 to Chatterjee (hereinafter, "Chatterjee '722") teaches pharmaceutical compositions comprising therapeutically effective amounts of an antibody which specifically binds to b-1,4-Galactosyltransferase V (a pharmaceutical composition... the composition comprises... a therapeutically effective amount of an agent which modulates the expression or activity of b1,4-Galactosyltransferase V (BGA), isoforms or peptides thereof. In certain embodiments, the agent inhibits the expression or activity of b-1,4-Galactosyltransferase V (BGA), isoforms or peptides thereof. In certain embodiments, the agent is an antibody, Pg. 26, Lns. 24-31; an antibody which specifically binds to b1,4-Galactosyltransferase V (BGA), Pg. 2, Lns. 20-21; a synthetic peptide comprising SEQ ID NO: 5 (A synthetic GaIT-V peptide having the sequence (IGAQVYEQVLRSAKRNSSVNDc (SEQ ID NO: 1)), Pg. 40, Lns. 6-7; SEQ ID NO: 1 of Chatterjee '722 consists of 100% sequence identity to Instant SEQ ID NO: 5); and adjuvants (The pharmaceutical compositions may include a pharmaceutically acceptable carrier.... The term "carrier" refers to a... adjuvant, Pg. 28, Lns. 15-19).

US 2018/0023776 A1 to Oncomed Pharmaceuticals Inc. teaches methods of treating colorectal cancer comprising administering a therapeutically effective amount of an antibody (The present invention provides methods for treatment of cancer, for example, colorectal, ... cancer, using antibodies, Para. [0019]; a method of inhibiting the growth of a tumor in a subject, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody, Para. [0021]).

The inventions listed in Groups I-III therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 9/127(2006.01)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)
A 6 1 K 39/39 (2006.01)
A 6 1 K 31/5375(2006.01)
A 6 1 K 31/357(2006.01)
A 6 1 K 31/164(2006.01)
A 6 1 K 9/48 (2006.01)
A 6 1 K 47/14 (2017.01)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/7088(2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)
A 6 1 P 3/04 (2006.01)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)
A 6 1 P 25/06 (2006.01)
C 0 7 K 16/40 (2006.01)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 0 7 K 14/00 (2006.01)
G 0 1 N 33/574(2006.01)
G 0 1 N 33/573(2006.01)
G 0 1 N 33/531(2006.01)
G 0 1 N 33/92 (2006.01)

A 6 1 K 38/43
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 38/16
A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 31/5375
A 6 1 K 31/357
A 6 1 K 31/164
A 6 1 K 9/48
A 6 1 K 47/14
A 6 1 P 37/04
A 6 1 K 39/00
A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/06
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 39/395
C 0 7 K 16/40
C 1 2 N 15/63
C 1 2 N 15/13
C 0 7 K 14/00
G 0 1 N 33/574
G 0 1 N 33/573
G 0 1 N 33/531
G 0 1 N 33/92

H

E

T

Z

A

A

A

Z

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,N
 E,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,
 CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
 M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,T
 H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

F ターム (参考)

2G045 AA26 DA20 DA60 FB03 FB06
 4C076 AA19 AA53 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB25 CC01
 CC06 CC07 CC10 CC11 CC27 CC41 DD47H EE41 EE59
 4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA08 BA18 BA23 DB34 DC01 MA37
 NA05 ZA08 ZA16 ZA33 ZA36 ZA66 ZA70 ZB07 ZB09 ZB26 ZC20
 ZC35 ZC41 ZC75
 4C085 AA03 AA13 AA14 AA21 AA38 CC23 DD62 EE01 EE03 EE06
 FF24 GG01 GG02 GG04 GG05 GG06
 4C086 AA01 AA02 BA15 BC73 EA16 MA03 MA05 MA37 NA05 ZA08
 ZA16 ZA33 ZA36 ZA66 ZA70 ZB07 ZB09 ZB26 ZC20 ZC35 ZC41
 ZC75
 4C206 AA01 AA02 GA03 GA25 MA03 MA05 MA57 NA05 ZA08 ZA16
 ZA33 ZA36 ZA66 ZA70 ZB07 ZB09 ZB26 ZC20 ZC35 ZC41 ZC75
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA17 CA40 DA75 DA76 EA20 FA10

F ターム (参考)

FA10 FA74