

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-539172

(P2016-539172A)

(43) 公表日 平成28年12月15日 (2016. 12. 15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 1 5 / 2 0 3 (2006. 01)	C 0 7 H 1 5 / 2 0 3 C S P	4 C 0 5 7
A 6 1 P 3 5 / 0 0 (2006. 01)	A 6 1 P 3 5 / 0 0	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3 7 / 0 4 (2006. 01)	A 6 1 P 3 7 / 0 4	4 C 0 8 6
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 (2006. 01)	A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 E	
A 6 1 K 3 9 / 0 0 (2006. 01)	A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 T	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-536849 (P2016-536849)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月4日 (2014. 12. 4)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月5日 (2016. 8. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2014/051165
 (87) 国際公開番号 W02015/081438
 (87) 国際公開日 平成27年6月11日 (2015. 6. 11)
 (31) 優先権主張番号 61/912, 684
 (32) 優先日 平成25年12月6日 (2013. 12. 6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510042677
 ザ ロイヤル インスティテューション
 フォー ザ アドバンスメント オブ ラ
 ーニング/マギル ユニバーシティ
 カナダ国 ケベック州 モントリオール
 シャープルック ストリート ウェスト
 8 4 5
 (74) 代理人 100086771
 弁理士 西島 孝喜
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 稲田 篤

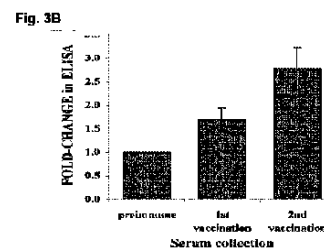
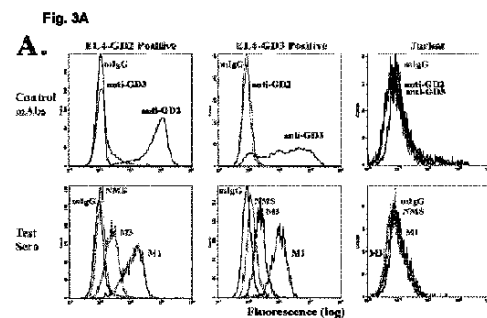
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌標的化及び抗体作製のための抗ガングリオシド化合物

(57) 【要約】

治療用癌ワクチンとしての多価ガングリオシド (g a n g l o s i d e) 糖質が提供される。開示されるコンジュゲートした G D 2 及び G D 3 糖質は、スパーサーにより連結されて、天然に存在する G D 2 または G D 3 の本来の構造的特徴を保存している多量体を形成し、その四量体は、免疫原性であり、i n v i v o で細胞傷害性抗ガングリオシド液性応答及び細胞性応答を誘発する。

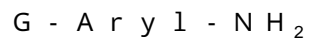
【選択図】 図 3 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式

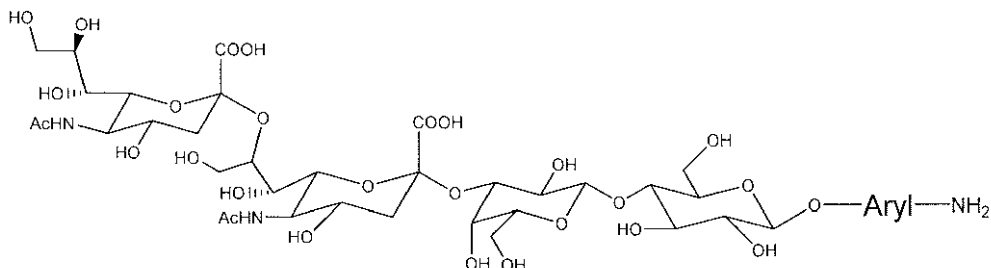


のガングリオシド炭水化物であって、式中、Gが、1つまたは複数のシアル酸（例えば、n - アセチルノイラミン酸）を含むオリゴ糖であり、前記Gが、C1アノマー酸素原子によりアリールと結合しており、Arylが、任意に置換されたC6～C10アリールである、ガングリオシド炭水化物。

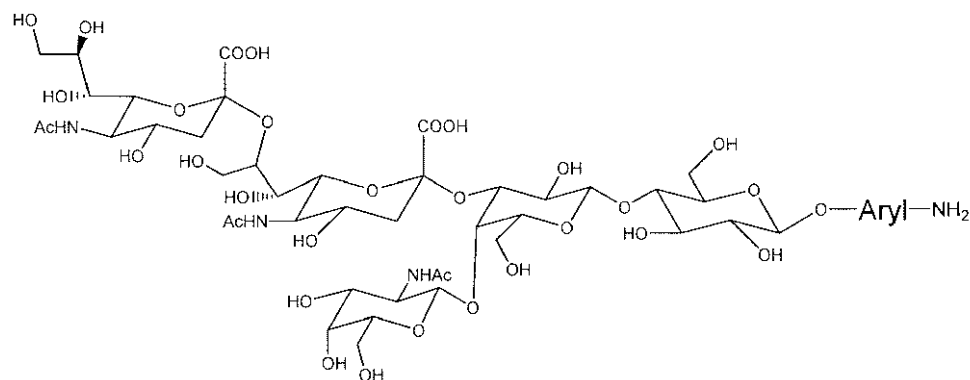
【請求項 2】

式

【化 1】



または

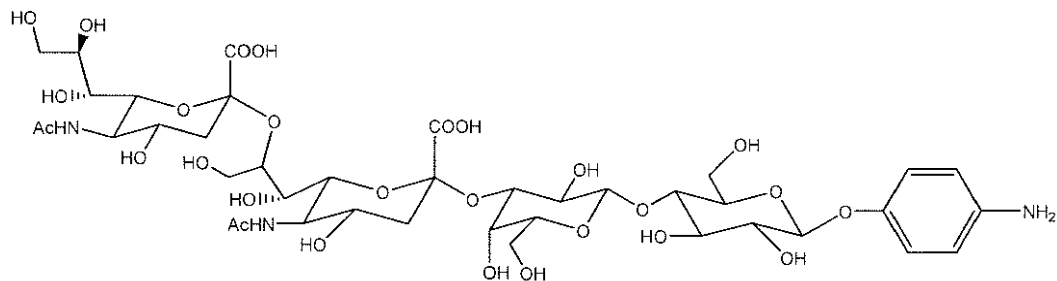


を有する、請求項 1 に記載のガングリオシド糖質。

【請求項 3】

式

【化 2】



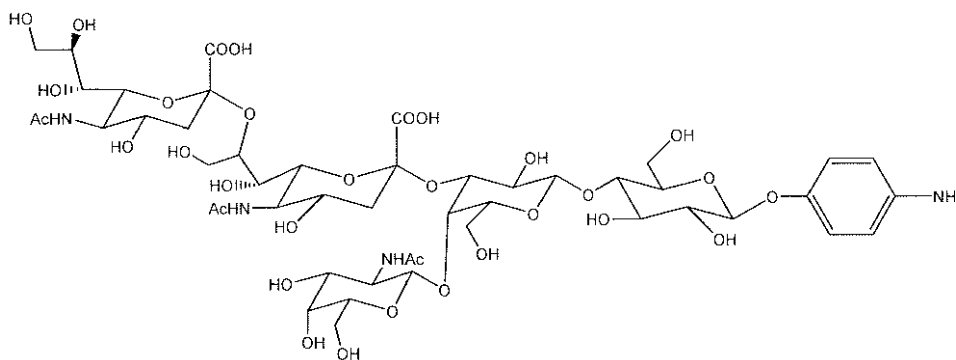
または

10

20

30

40



10

を有する、請求項 1 に記載のガングリオシド糖質。

【請求項 4】

多量体コア分子と共有結合した少なくとも 1 つまたは少なくとも 2 つの糖質ガングリオシド類似体を含む、ガングリオシド糖質多量体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のガングリオシド糖質からなる少なくとも 1 つまたは少なくとも 2 つの糖質ガングリオシド類似体を含む、請求項 4 に記載のガングリオシド糖質多量体。

【請求項 6】

前記少なくとも 2 つの糖質ガングリオシド類似体が、少なくとも 1 つの G D 2 糖質ガングリオシド類似体または少なくとも 1 つの G D 3 糖質ガングリオシド類似体を含む、請求項 4 または 5 に記載のガングリオシド糖質多量体。

20

【請求項 7】

前記ガングリオシド糖質多量体が、前記糖質ガングリオシド類似体の四量体である、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のガングリオシド糖質多量体。

【請求項 8】

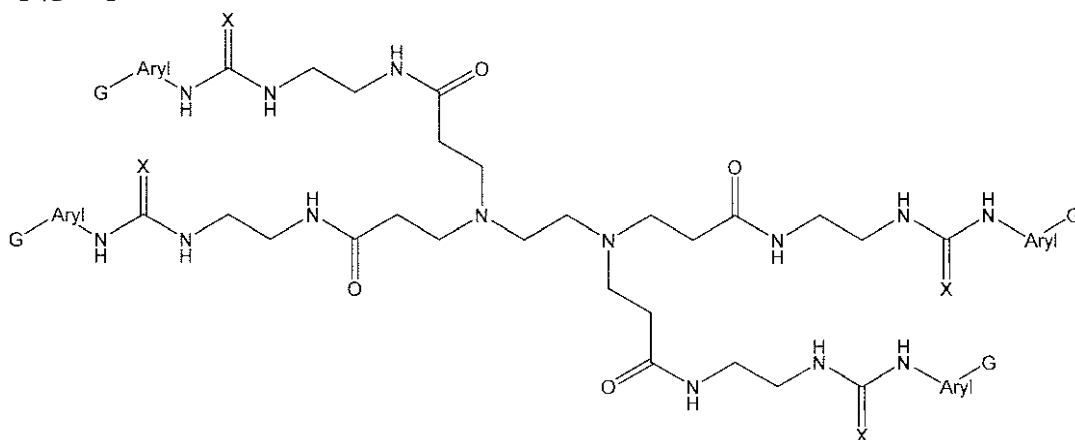
前記少なくとも 1 つまたは少なくとも 2 つの糖質ガングリオシド類似体が、G D 2、G D 3、G M 2 及び G T 1 b のうちの少なくとも 1 つの類似体である、請求項 4 に記載のガングリオシド糖質多量体。

【請求項 9】

式

30

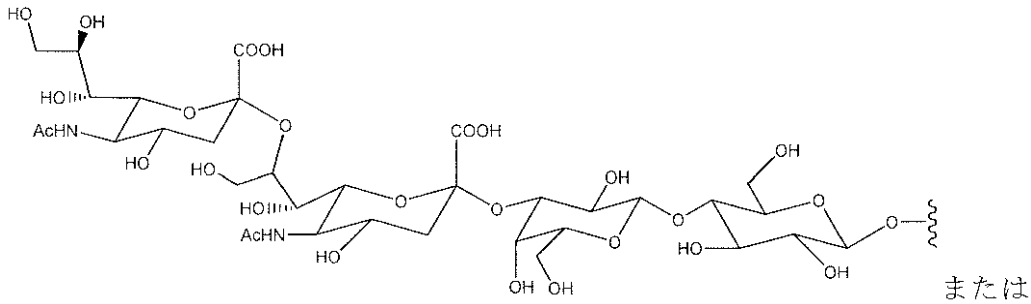
【化 3】



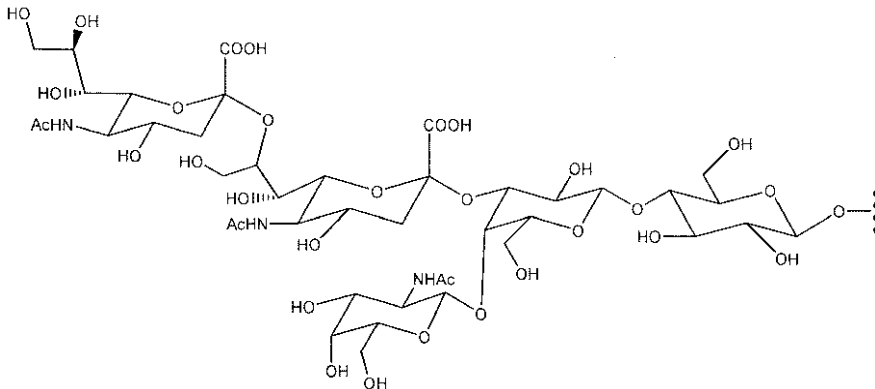
40

を有し、式中、A r y l が、任意に置換された C 6 ~ C 1 0 アリールであり；X が O または S であり、G が

【化 4】



10



20

である、請求項 4 に記載のガングリオシド糖質多量体。

【請求項 10】

腫瘍に対して免疫原性である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のガングロシド (gangloside) 糖質。

【請求項 11】

癌を予防または治療するための、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のガングロシド (gangloside) 糖質。

【請求項 12】

前記癌が、ガングリオシド陽性の癌である、請求項 11 に記載のガングロシド (gangloside) 糖質。

30

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のガングリオシド糖質と特異的に結合する、抗体。

【請求項 14】

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはヒト化抗体である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】

癌を予防または治療するための、請求項 13 または 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

前記癌が、ガングリオシド陽性の癌である、請求項 15 に記載の抗体。

40

【請求項 17】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のガングリオシド糖質と、担体とを含む、ワクチン。

【請求項 18】

癌を予防または治療するための、請求項 17 に記載のワクチン。

【請求項 19】

癌の予防または治療を必要とする患者における癌を予防または治療する方法であって、前記患者に有効量の請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のガングリオシド糖質、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体または請求項 17 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のワクチンを投与する段階を含む、方法。

50

【請求項 20】

前記癌が、ガングリオシド陽性の癌である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記癌が、神経芽腫、メラノーマまたは神経膠腫である、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記癌が、乳癌または小細胞肺癌である、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

免疫原性応答の誘発を必要とする患者における免疫原性応答を誘発する方法であって、前記患者に有効量の請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のガングリオシド糖質、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体または請求項 17 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のワクチンを投与する段階を含む、方法。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本記載は、ガングリオシド(ganglioside)複合糖質(glycoconjugate)及びその抗腫瘍ワクチンとしての使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

ガングリオシドは、細胞膜外葉に蓄積するノイラミン酸含有スフィンゴ糖脂質である。GD2 及び GD3 などのガングリオシドは広く認められている腫瘍マーカーである。これらは神経芽腫、メラノーマ、小細胞肺癌及び神経膠腫(Hakomori, 1996, Cancer, 56:5309)のほか、乳癌幹細胞(Battulaら, 2012, The Journal of clinical investigations, 122:2066)にも発現するが、正常細胞には存在しない。このため、GD2 及び GD3 は腫瘍標的として利用されており、臨床標的として有効であることが確認されている。精製抗 GD2 (Cheunら, 1987, J Clin Oncol, 5:1430)または抗 GD3 モノクローナル抗体(mAb)(Houghtonら, 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82:1242)を受動的に投与することにより局所治療を達成することができる。しかし、受動免疫は経済的コストが高く、重大な副作用がみられ、介入の頻度が限られるほか、治療効果も低い(Navidら, 2010, Current Cancer Drug Targets, 10:200)。

20

30

【0003】

これに代わるものとして、多くのグループが能動的免疫療法ガングリオシドを追究してきた(Astronomo及びBurton, 2010, Nat Rev Drug Discov, 9:308)。しかし、ガングリオシドに付随する重大な困難として、免疫原性及び溶解性が低く、製剤に不向きであり、十分に特徴付けられた均一な免疫原を調製するには方法が限られ困難であるほか、選択性が低く、構造的に関係が深い非腫瘍ガングリオシドに対する交差反応性のリスクの可能性があるといった点が挙げられる。

40

【0004】

例えば、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と化学的にコンジュゲートしたGD2 ラクトンは免疫原性であり、マウスの腫瘍成長を遅らせる抗体を誘導することができる(Chapmanら, 2000, Clinical Cancer Research, 6:4658)。このワクチンによって誘導された抗体は補体依存性細胞傷害(CDC)機序を介して作用する(Kimら, 2011, Cancer Immunology, Immunotherapy, 60:621)。しかし、KLHとガングリオシドのコンジュゲーションでは化学的に不均一な生成物が生じ(Danieshefsky及びAllen, 2000, Angew Chem Int Ed, 39:836)、このことが重大な欠点となっている。その他のガングリオシドコンジュゲートは免疫原性が低く、

50

一般に低い一過性の抗ガングリオシド抗体応答を誘発することが明らかにされている (Ragupathiら, 2000, International Journal of Cancer, 85:659)。最も免疫原性の高いガングリオシドである GM2-KLH ワクチンでさえ臨床的有用性が認められず (Kirkwoodら, 2001, Journal of Clinical Oncology, 19:2370)、中止された。実験的方法としてほかにも、GD2 に対する交差反応免疫を引き起こし得る GD2-ペプチドミモトープ (Wondimuら, 2008, Cancer Immunology, Immunotherapy, 57:1079)、GD2 模倣ペプチド (Bolestaraら, 2005, Cancer Research, 65:3410) 及び GD2 ミモトープ DNA ワクチン (Zeytinら, 2000, Cancer Gene Therapy, 7:1426) が挙げられる。しかし、腫瘍治療のパラダイムでは、免疫応答は宿主の保護にあまり効果的ではなかった (Bleekerら, 2009, European Journal of Cancer, 45:2915)。

10

【0005】

このため、ガングリオシドを標的として用いる新規な治療法を提供することが未だ必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

一態様では、式： $G-Aryl-NH_2$ のガングリオシド糖質 (carbohydrate) が提供され、式中、G は、1 つまたは複数のシアル酸 (例えば、n-アセチルノイラミン酸) を含むオリゴ糖であり、前記 G は C1 アノマー酸素原子によりアリールと共有結合しており、G は免疫原性であり、Aryl は任意に置換された C6 ~ C10 アリールである。

20

【0007】

本明細書に提供されるガングロシド (gangloside) 糖質は、腫瘍に対して免疫原性である。より具体的には、癌を予防または治療するための腫瘍に対して免疫原性のガングロシド (gangloside) 糖質が提供される。

【0008】

本記載ではほかにも、多量体 (multimeric) コア分子と共有結合した少なくとも 1 つまたは少なくとも 2 つの本明細書に記載される糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質を含むガングリオシド糖質多量体が提供される。

30

【0009】

本明細書で定義されるガングリオシド糖質またはガングリオシド糖質多量体と特異的に結合する抗体が提供される。

【0010】

このほか、本明細書で定義されるガングリオシド糖質またはガングリオシド糖質多量体を含むワクチンが提供される。

【0011】

このほか、本明細書で定義されるガングリオシド糖質またはガングリオシド糖質多量体の癌の予防または治療への使用が提供される。

【0012】

このほか、癌を予防または治療する薬剤の製造への本明細書で定義されるガングリオシド糖質またはガングリオシド糖質多量体の使用が提供される。

40

【0013】

このほか、必要とする患者の癌を予防または治療する方法であって、前記患者に有効量の本明細書で定義されるガングリオシド糖質またはガングリオシド糖質多量体を投与する工程を含む方法が提供される。

【0014】

このほか、必要とする患者に免疫原性応答を誘発する方法であって、前記患者に有効量の本明細書で定義されるガングリオシド糖質またはガングリオシド糖質多量体を投与する工程を含む方法が提供される。

50

【 0 0 1 5 】

このほか、有効量の本明細書で定義されるガングリオシド糖質多量体と、薬学的に適切な担体または補形剤とを含む、医薬組成物が提供される。

【 0 0 1 6 】

ここで添付図面に言及する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1 A】ガングリオシド G M 1、G D 3 及び G D 2 の構造を示す図である。

【図 1 B】本明細書に開示される G D 2 類似体及び G D 3 類似体を合成するスキームを示す図である。

10

【図 1 C】本明細書に開示される抗原を合成するスキームを示す図である。

【図 2 A】G D 2 (A P - G D 2) のアミノフェニルエーテル類似体の質量スペクトルを示す図である。

【図 2 B】重水素化水中の G D 2 (A P - G D 2) のアミノフェニルエーテル類似体の H - N M R スペクトルを示す図である。

【図 2 C】重水素化水中のテトラ G D 2 デンドリマーの H - N M R スペクトルを示す図である。

【図 3 A】I g G クラスの抗 G D 2 反応性抗体の存在を示す代表的な F A C S c a n データを示す図である。

【図 3 B】抗マウス I g G 二次試薬を用いて試験した被験血清または対照血清の段階希釈物を示す図である。

20

【図 3 C】各免疫化後に I g G アイソタイプ及び I g M アイソタイプが増加したことを示す血清アイソタイピングを示す図である。

【図 3 D】示された抗体とともに培養した完全培地で指数関数的に増殖する E L 4 - G D 2 ⁺ 細胞及び 2 4 時間後に M T T により定量化したその生存 / 代謝を示す図である。

【図 4 A】³ H - チミジン取込みアッセイにより評価した T 細胞増殖を示す図であり、ここでは、腫瘍細胞と、ワクチン接種マウスまたは無感作マウスから精製した T 細胞とを 1 : 1 0 の比で培養した。

【図 4 B】トリパンブルー排除法により測定した G D 2 依存性 T 細胞増殖を示す図である。

30

【図 5 A】腹腔内にワクチン接種したマウスで測定した腫瘍体積を示す図である。

【図 5 B】対照マウスで測定した腫瘍体積の平均値に対する免疫化マウスで測定した腫瘍体積の平均値を示す図である。

【図 5 C】腹腔内にテトラ G D 2 をワクチン接種したマウスで測定した腫瘍体積を示す図である。

【図 5 D】対照マウスで測定した腫瘍体積の平均値に対する免疫化マウスで測定した腫瘍体積の平均値を示す図である。

【図 5 E】養子移植治療の効果を示す図である。

【図 5 F】リンパ節への転移の定量化を示す図である。

【図 6】2 群の無感作腫瘍担持マウス (対照またはワクチン接種) から精製した T 細胞及び F A C S c a n により定量化した細胞の C D 4 / C D 8 プロファイルを示す図である。

40

【図 7】I g G サブクラスの抗 G D 3 反応性抗体を示す血清の代表的な E L I S A のデータを示す図である。

【図 8】テトラ G D 3 によるワクチン接種の結果を示す図である。

【図 9】テトラ G D 3 によるワクチン接種の結果を示す図である。

【図 1 0】G D 3 ワクチンを用いたワクチン接種後の転移性小結節のカウント数を示す図である。

【発明を実施するための形態】

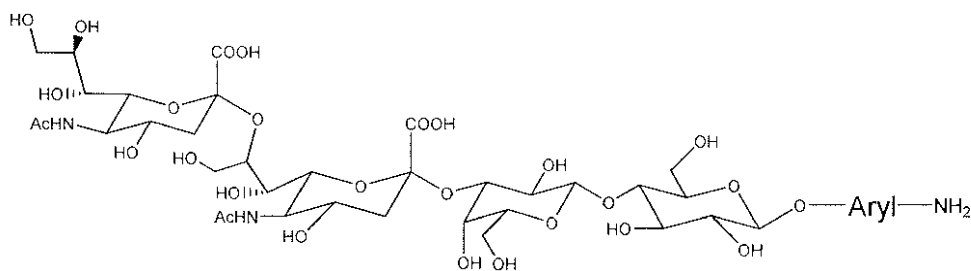
【 0 0 1 8 】

(詳細な説明)

50

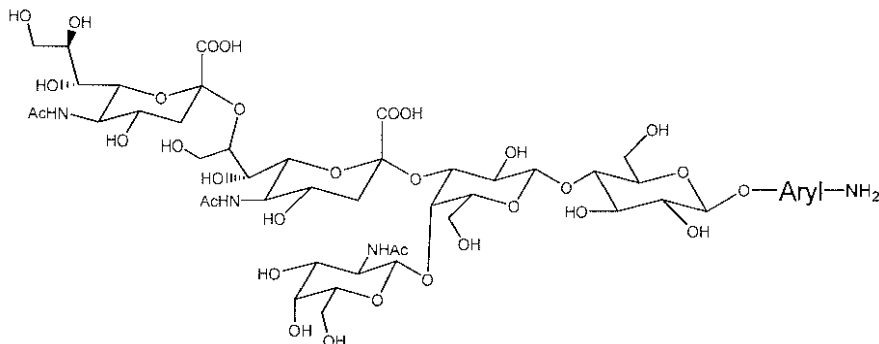
本開示は、

【化 1】



または

10



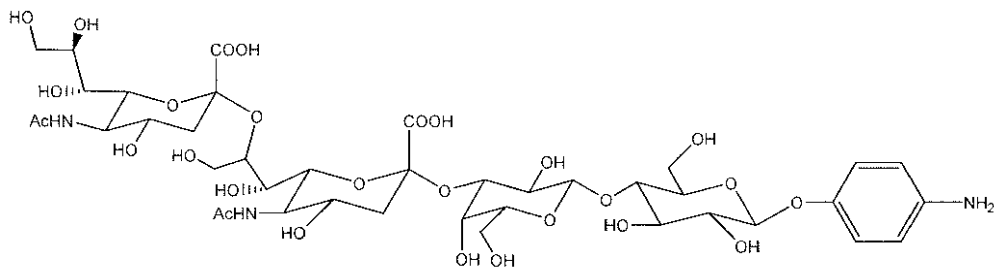
からなるガングリオシド糖質に関する。

20

【 0 0 1 9 】

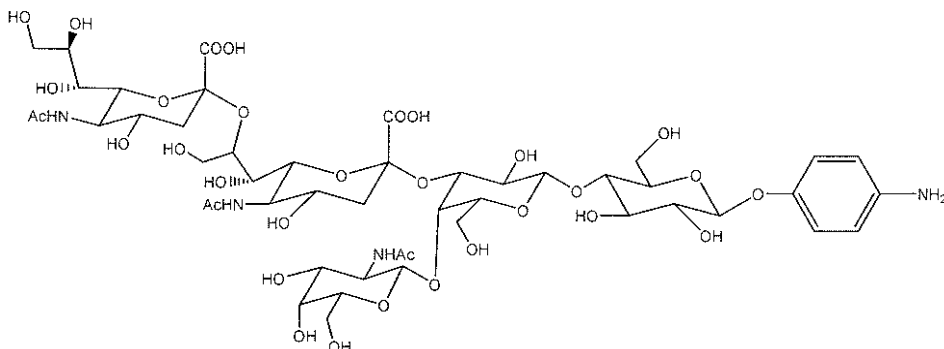
本開示は特に、

【化 2】



または

30



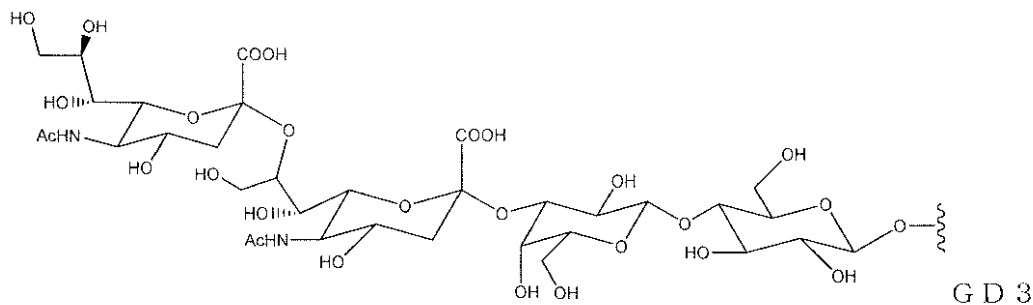
40

からなるガングリオシド糖質を提供する。

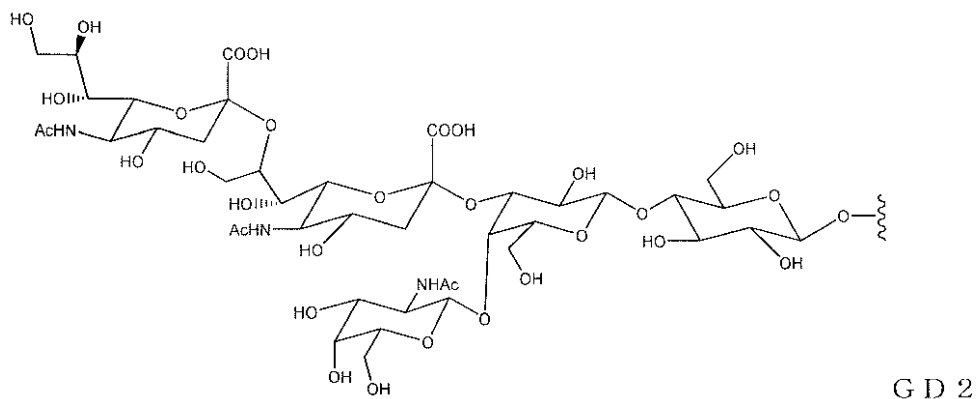
【 0 0 2 0 】

本明細書で使用される G は、各ガングリオシドに対応するオリゴ糖及びシアル酸（例えば、n - アセチルノイラミン酸、NANA）のみを含む各ガングリオシド（GD2、GD3、GM2 及び GT1b など）の一部を指す。換言すれば、G は、本明細書ではアミノ - アリール残基（アミノ - フェニルなど）に置き換わったガングリオシドのセラミド部分を除く、対応するガングリオシドのオリゴ糖及びシアル酸を指す。本明細書で使用される G の例としては、

【化 3】



10



20

などの GD 3 及び GD 2 の残基が挙げられる。

【0021】

本明細書で使用される「アリール」という用語は、6～10員芳香族基、例えばフェニルまたはナフチル、好ましくはフェニルを指すものとして理解される。芳香環は、1つまたは複数の環位置、好ましくは置換基が存在しない位置で置換されていてよく、アミノ基は糖部分に対してフェニルのパラ位にあるのが好ましい。したがって、「-アリール-NH₂」は4-アミノフェニルであるのが好ましい。

【0022】

アリールに関する「任意に置換された」という用語は、任意の利用可能な1つまたは複数の位置で、アルキル、アリールまたはハロゲンのうちの1つまたは複数によって、任意に置換されていることを意味する。置換基は存在しないのが好ましい。

30

【0023】

本開示は、多量体コア分子と共有結合した少なくとも1つまたは少なくとも2つの糖質ガングリオシド類似体を含む、ガングリオシド糖質多量体を提供する。

【0024】

一実施形態では、糖質ガングリオシド類似体は、GD 2、GD 3、GM 2 及び GT 1 b のうちの少なくとも1つの類似体である。

【0025】

一実施形態では、糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質多量体は、少なくとも1つの GD 2 糖質ガングリオシド類似体または少なくとも1つの GD 3 糖質ガングリオシド類似体を含む。

40

【0026】

一実施形態では、糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質多量体は、糖質ガングリオシド類似体の四量体である。一実施形態では、糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質多量体は、癌の予防または治療に有用である。一実施形態では、糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質多量体は、癌の治療に有用である。一実施形態では、癌は、ガングリオシド陽性の癌である。別の実施形態では、癌は、神経芽腫、メラノーマまたは神経膠腫である。一実施形態では、癌は乳癌または小細胞肺癌である。

【0027】

50

一実施形態では、本明細書で定義される糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質多量体と特異的に結合する抗体が提供される。一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはヒト化抗体である。一実施形態では、抗体は、癌を予防または治療するためのものである。一実施形態では、癌は、ガングリオシド陽性の癌である。一実施形態では、癌は、神経芽腫、メラノーマまたは神経膠腫である。一実施形態では、癌は乳癌または小細胞肺癌である。一実施形態では、癌は乳癌または小細胞肺癌である。

【0028】

一実施形態では、本明細書で定義される糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質多量体と、担体とを含む、ワクチンが提供される。一実施形態では、ワクチンは、癌を予防または治療するためのものである。一実施形態では、癌は、ガングリオシド陽性の癌である。一実施形態では、癌は、神経芽腫、メラノーマまたは神経膠腫である。一実施形態では、癌は乳癌または小細胞肺癌である。

10

【0029】

一実施形態では、本明細書で定義される方法または使用のための糖質ガングリオシド類似体またはガングリオシド糖質多量体を注射用に製剤化する。一実施形態では、ワクチンを経皮投与または経口投与用に製剤化する。一実施形態では、親投与 (parental administration) は、筋肉内投与、皮下投与または静脈内投与である。

【0030】

特定の実施形態では、抗腫瘍ワクチンとして適用される免疫原性のGD2複合糖質が開示される。

20

【0031】

コンジュゲートしてデンドリマー (例えば、四量体、以降「テトラGD2」または「テトラGD3」) を形成するGD2及びGD3糖質の水溶性類似体の設計及び特徴付けが本明細書に開示される。

【0032】

四量体ガングリオシド糖質は、例えば天然に存在するGD2またはGD3の本来の構造的特徴を保存しているが、免疫原性であり、in vivoで細胞傷害性抗ガングリオシド液性応答及び細胞性応答を誘発する。例えば、テトラGD2は、予防パラダイム及び治療パラダイムにおいてGD2-癌ワクチンとして有効である。細胞表面糖質を標的とし、治療パラダイムにおいて防御的な液性免疫応答及び細胞性免疫応答を迅速に誘発する、有効な抗腫瘍ワクチンが提供される。

30

【0033】

ガングリオシドは細胞膜外葉に蓄積し、セラミド及び脂質は埋没し、糖質頭部は露出している。このことは、複雑なガングリオシドがネオ抗原であり、腫瘍マーカーとしての特徴を示すことから、免疫系による認識を可能にするはずである。さらに、抗原性のガングリオシドでさえ免疫原性が低い。免疫系は、糖質を「自己」として認識し応答を開始しないか、交差反応性の病理的応答を生じ得る (例えば、ギラン・バレー症候群は抗GM1抗体に起因するものである)。

40

【0034】

免疫原性であり、腫瘍に対して選択的な免疫を生じさせるのに用いることができる、GD2及びGD3の合成糖質類似体を作製した。

【0035】

Gの類似体 (GD2、GD3、GM2及びGT1bのうちの少なくとも1つの類似体) は、多量体、すなわち二量体、三量体、四量体または適切な空間的配置を可能にするのに適した他の任意の形態であり得ると考えられる。

【0036】

特に、GD2及びGD3の類似体は多量体、すなわち二量体、三量体、四量体またはGD2またはGD3の適切な空間的配置を可能にするのに適した他の任意の形態であり得る

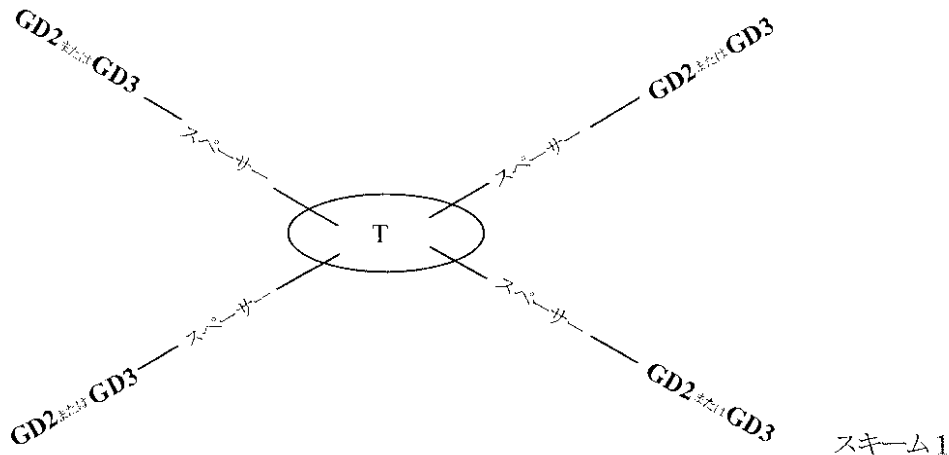
50

と考えられる。本明細書に包含されるものには、本明細書に記載される糖質ガングリオシド類似体の 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 の多量体がある。

【0037】

下のスキーム 1 は、四量体形態の GD2 及び GD3 の免疫原性合成糖質類似体を示している。

【化 4】



10

20

【0038】

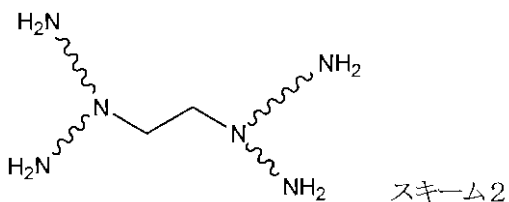
類似体は本質的に、所望の GD2 または GD3 とさらに共有結合しているスパーサーとの共有結合を可能にする中心多量体（または上に示す四量体）コアを含む。このようなスパーサーの典型的な例が $-(C=X)-$ であり、式中、X は、N または O である（ $-(C=S)-$ または $-(C=O)-$ など）。スパーサーは、イソシアナートまたはイソチオシアナートの化学反応を用いることによって導入することができる。図 1 c に具体例を示すが、この化学反応は上に開示した GD2 / GD3 - アミノアリアル化合物にも適用可能である。

【0039】

好ましくは、中心コアは、スキーム 2 に概略的に記載されるように、多数の末端（すなわち、第一級）アミノ基が結合したエチレンジアミン残基を含む。

30

【化 5】

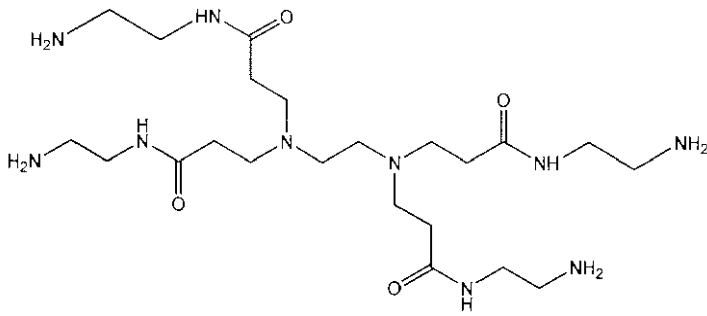


【0040】

このようなコアの例としては PAMAM 化合物が考えられ、その多くが市販されている（www.sigmaaldrich.com の Aldrich Catalog を参照されたい）。好ましくは、中心多量体コアは多数の末端（すなわち、第一級）アミノ基を有する。PAMAM 化合物の例としては、ジェネレーション 0.0 PAMAM が挙げられる。

40

【化 6】

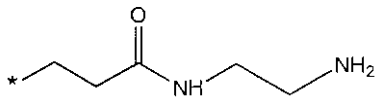


【 0 0 4 1】

10

さらにジェネレーションの高い P A M A M 化合物としては、末端 - N H ₂ がさらに（一部または全体が）残基：

【化 7】



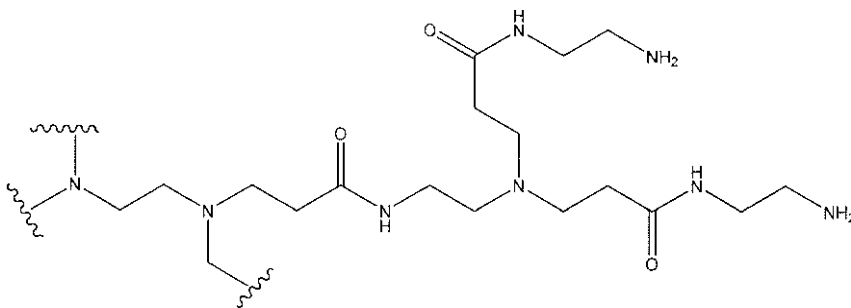
で官能化された P A M A M が挙げられる。

【 0 0 4 2】

このような高いジェネレーションの P A M A M の一部分は以下のようなもの：

【化 8】

20



であり、式中、残りの「腕」（波線で示される）は任意にほかにも、さらに拡張することが可能な最大 8 の多量体になるようにアミドアミン残基を有し得る。

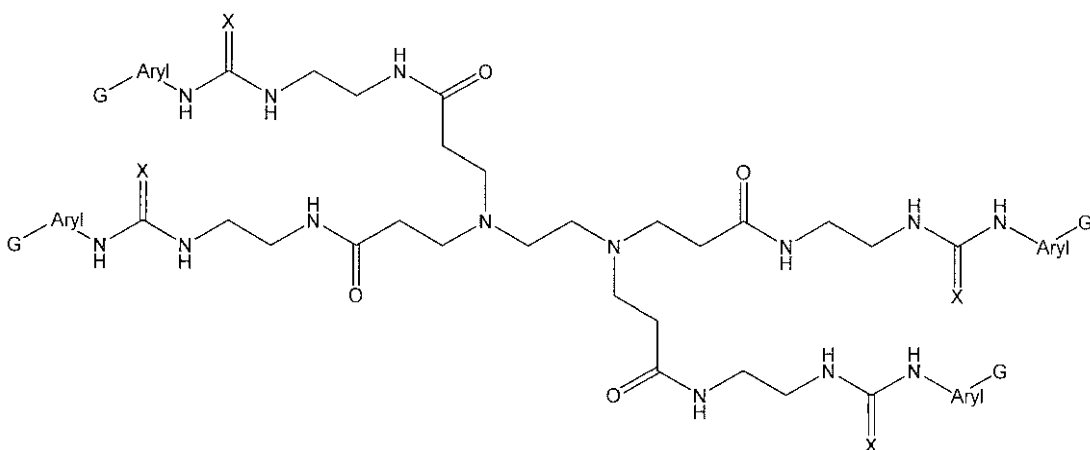
30

【 0 0 4 3】

上に示したように中心コアがジェネレーション 0 . 0 である場合の四量体の G（G D 2 及び G D 3 など）の免疫原性合成糖質類似体は、以下のように示すことができ：

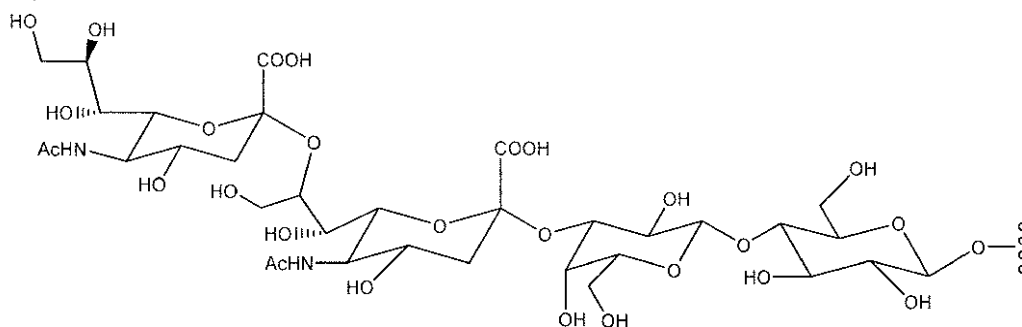
【化 9】

40

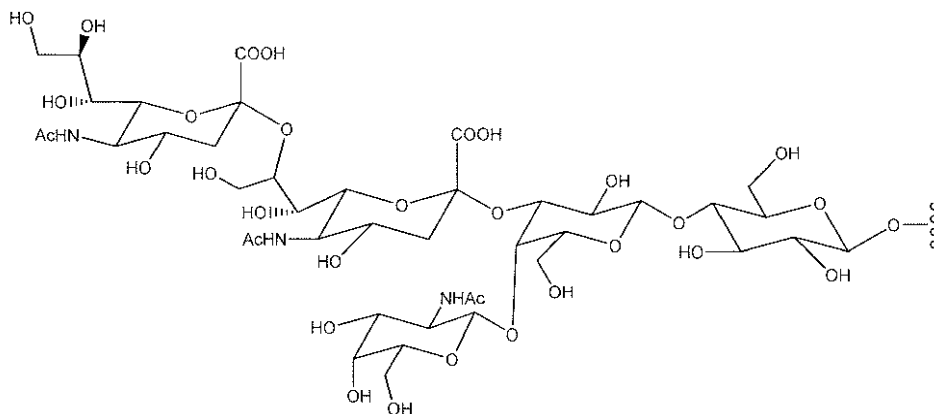


式中、G は上で定義される通りであるか、好ましくは

【化 10】



10



20

であり、XがOまたはSであり、好ましくは、XがSである。

【0044】

GD2またはGD3誘導体は、Tongら、2010、Chem Biol、17:183の工程を修正して、GD2またはGD3と中心多量体コアとの共有結合に用いることができるアミノ基を有する適切に官能化された-D-ラクトピラノシドを用いると同時に、Gilbertら、2002、J Biol Chem、277:327)に記載されている通りに合成することができる。例えば、官能化-D-ラクトピラノシドは、C1-

30

【0045】

官能化-D-ラクトピラノシドは、中心多量体(または上に示される四量体)コアが共有結合できるようさらに誘導体化することができる。官能化-D-ラクトピラノシドを適切な試薬と反応させて、活性化カルボニル残基を得ることができる。例えば、C1-アミノアリアル誘導体または好ましくはアミノフェニル-D-ラクトピラノシドまたはより好ましくはp-アミノフェニル-D-ラクトピラノシドをホスゲン、ジホスゲン、トリホスゲン、チオホスゲン、カルボニルジイミダゾール、ジスクシンイミジルカルボナートをはじめとする適切な試薬と反応させて、対応するイソシアナート、イソチオシアナート、カルボニルイミダゾリルまたはスクシンイミジルカルボニル誘導体を得ることが

40

【0046】

次いで、中心多量体コアと、上記の活性化カルボニル残基を有する官能化-D-ラクトピラノシドとを反応させて、所望の免疫原性分子を得ることができる。

【0047】

別の合成方法として、最初に中心多量体コア(PAMAMなど)を適切な試薬と反応させて、上記の活性化カルボニル残基を得ることができる。次いで、アミノ基を含む官能化-D-ラクトピラノシドを付加して、所望の免疫原性分子を得ることができる。

【0048】

当業者には、追加の治療剤がさらに必要であるか、望まれる場合、比を容易に調節する

50

ことが可能であることが明らかであろう。本明細書に記載される組合せの範囲には、特に限定されるわけではないが、原則的に癌の予防または治療に有用な任意の治療剤が含まれることが理解されよう。

【0049】

治療に使用するのに必要な本発明の化合物の量は、選択する具体的な化合物のみならず、投与経路、治療が必要な病態の性状のほか、患者の年齢及び状態によっても異なり、最終的には担当医師の判断に委ねられることが理解されよう。

【0050】

所望の用量は、都合に合わせて、単回投与でも、あるいはしかるべき間隔で、例えば、1日2回、3回、4回またはそれ以上投与する分割投与でも提供され得る。

10

【0051】

医薬組成物としては、特に限定されないが、経皮投与または非経口（筋肉内、皮下及び静脈内を含む）投与に適した医薬組成物が挙げられる。

【0052】

医薬組成物を調製する方法は、本明細書で定義される化合物と、薬学的に許容される補形剤とを一緒にする工程を含み得る。

【0053】

本明細書で定義される化合物及び組合せはこのほか、（例えば、注入、例えばボーラス注入または持続注入による）非経口投与用に製剤化してもよく、またアンプル、予め充填したシリンジ、小容量輸液または保存剤を添加した多回投与容器に入れた単位投与形態で提供してもよい。組成物は、懸濁剤、液剤または油性もしくは水性媒体を用いた乳剤の形態をとってもよく、また懸濁化剤、安定剤及び/または分散剤などの製剤用剤を含有してもよい。あるいは、有効成分は、使用前に適切な溶媒、例えば滅菌水または生理食塩水で構築できるように、滅菌固体の無菌単離または溶液からの凍結乾燥によって得られる粉末形態であってもよい。

20

【0054】

具体的な実施形態を以下及びそれに続く実施例に記載する。

【0055】

セラミド及び脂質に代わってアミノフェニル基を有する以外は正確なGD2糖質構造を有するアミノフェニルエーテル-GD2類似体（本明細書ではAP-GD2）を開示する（図1Bを参照されたい）。この類似体は水溶性である。AP-GD2では、フェニル基と1番目の糖との間の結合は、配置であるのが好ましく、これは、天然のガングリオシドでセラミドと1番目の糖との間にみられる立体配置である。この結合は、糖質全体を通じて適切で均一な構造を示すのに極めて重要である。予測される質量及び立体配置をそれぞれ質量分析（図2A）及びNMR分光測定（図2B）により確認した。

30

【0056】

AP-GD2をその対応するイソチオシアナトフェニル類似体に変換し、この中間体を四価PAMAM G0リンカー樹状コアの末端遊離アミンと結合させた（図1C）。HMB Cのスペクトルに見られる178 ppmにおける炭素化学シフト（NHC(S)NHPh）により、AP-GD2とPAMAM G0リンカーとの間にチオウレア架橋が形成されたことを確認した。1D-¹H-NMRにより四量体生成物の形成を確認した。1D-¹H-NMRスペクトルから、いずれの糖単位についても単一シグナルパターンが見て取れたほか、アミドNH、NHC(S)NHPh、H-オルト、H-メタ、NHAc/CH₃/H_{ax}またはH_{eq}の比が40:36:8であることがわかり、GD2デンドリマーが確かに四価であることが示された（図2C）。

40

【0057】

腫瘍治療の研究に免疫原として使用するテトラGD抗原を設計した。有望な免疫原としてテトラGD2を設計する理論的根拠は、以下の概念に基づくものであった。第一に、テトラGD2を提示する方が、膜ラフトに通常集積するGD2のオリゴマー提示をより厳密に模倣し得る。第二に、糖AP-GD2類似体は、穏やかな条件下でPAMAMリンカー

50

と室温で容易にコンジュゲートさせることができる。第三に、化学酵素合成によりグリコシド結合のしかるべき立体配置が確実に得られ、ひいては糖質全体の立体配置が維持される。第四に、抗原が化学的に均一で十分に特徴付けられたものとなる。第五に、得られる生成物が水溶性で安定なものとなる。これらの特徴はいずれもワクチンに望ましいものであり、本明細書に開示される A P - G D 3 になり得る。

【 0 0 5 8 】

マウスをテトラ G D 2 で最大 4 回免疫化した。各免疫化から 4 日後、血清を採取し、試料の抗ガングリオシド抗体の有無を検査した。テトラ G D 2 で免疫化することにより、マウス 25 匹のうち 22 匹 (88 %) に腫瘍マーカーである G D 2 ガングリオシド及び G D 3 ガングリオシドに対して高力価で選択的な抗血清が生成された。

10

【 0 0 5 9 】

F A C S c a n アッセイのデータから、免疫化マウスの血清に腫瘍細胞の細胞表面 G D 2 及び G D 3 と選択的に反応する抗体が認められることがわかった (図 3 A 及び表 1 を参照されたい) 。免疫化マウスの血清には、I g G アイソタイプ及び I g M アイソタイプ (使用したアイソタイプ特異的二次試薬に基づく) の抗体が含まれていた。血清は E L 4 - G D 2 + 細胞及び / または E L 4 - G D 3 + 細胞と結合した。陰性対照である免疫前正常マウスの血清 (N M S) に反応性は認められなかった。陽性対照の m A b は、E L 4 - G D 2 + 細胞が G D 2 を発現するが G D 3 は発現せず、E L 4 - G D 3 + 細胞が G D 3 は発現するが G D 2 は発現しないことを示している。細胞対照では、血清は、G D 2 も G D 3 も発現しないが、その他の多くのガングリオシド、例えば G M 1 などを発現する J u r k a t

20

【 0 0 6 0 】

【表 1】

G D 2 四量体で免疫化したマウスの血清の抗ガングリオシド反応性

マウス	細胞での FACSscan		ELISA	
	EL4 GD2	EL4 GD3	播いた GD2	播いた GD3
M1	+++++	+++++	+	++
M2	++	++	-	-
M3	++	++	-	-
M4	-	++	-	-
M5	+	++	+	-
M6	+++	++	+	-
M7	+++	+++	++	+++

30

【 0 0 6 1 】

ほかに、血清が固定化したガングリオシドと直接結合するかどうかを E L I S A により検討した。ガングリオシド G D 2 、 G D 3 または対照をプレートに固定化し、示した被験血清及び対照免疫前血清の希釈物をアッセイした。ワクチン接種により生成した抗体は G D 2 と選択的に結合した (図 3 B を参照されたい) 。循環血中抗 G D 2 I g G をバックグラウンドの約 2 倍に増加させるのに 1 回の免疫化で十分であり、追加免疫後にはバックグラウンドの約 3 倍に増加した (図 3 C) 。抗体は G D 3 とも結合したが、G M 1 とは結合しなかった。抗 G D 2 I g G アイソタイプ及び抗 G D 2 I g M アイソタイプの両方が検出された。I g G アイソタイプは各追加免疫の後に増加し、B 細胞成熟及びクラススイッチングが示唆された (図 3 C) 。これらの E L I S A のデータは、F A C S c a n によって得られた結果と一致する。

40

【 0 0 6 2 】

テトラ G D 2 をワクチン接種したマウスの抗体は、培養 E L 4 - G D 2 + 細胞を死滅させた (図 3 D) 。E L 4 - G D 2 + 細胞は補体の非存在下で免疫血清によって死滅したが、この効果はいくつかの抗 G D 2 m A b で報告されている (Y o s h i d a ら , 2 0 0 1 , C a n c e r R e s e a r c h , 6 1 : 4 2 4 4) (例えば、m A b 3 F 8 は細胞

50

を死滅させるが、mAb ME361は死滅させない)。さらに、生体染色色素のトリパンブルーで染色された細胞をカウントし、その形態を評価することにより、EL4-GD2⁺細胞に対する殺作用が確認された。

【0063】

以上のデータを考え合わせると、テトラGD2が細胞傷害性液性免疫を生じさせ成熟させる免疫原であることが裏付けられる。

【0064】

糖ペプチドワクチンは、組織適合性クラスII (MHC II) と結合することによって適応免疫系を活性化し得ることが示されている (Avciら, 2011, Nature Medicine, 17: 1602)。このことから、T細胞性免疫がテトラGD2によっても活性化され得ることが示唆された。したがって、³H-チミジン取込みを測定する混合リンパ球反応 (MLR) で一次T細胞を試験した。T細胞活性化の標的細胞刺激細胞として、マイトマイシン処理EL4-GD2⁺細胞を用い、陰性対照としてJurkat細胞 (GD2⁻) を用いた (図4A)。マイトマイシンで処理したEL4-GD2⁺細胞にもJurkat細胞にも、³H-チミジンの取込みはみられず (それぞれ 188 ± 4 cpm及び 107 ± 5 cpm)、したがって、両細胞は刺激細胞としてのみ作用する。

【0065】

テトラGD2で2回ワクチン接種したマウスのT細胞は、EL4-GD2⁺細胞で攻撃を誘発した場合、盛んに増殖したが、Jurkat細胞で攻撃を誘発した場合、増殖しなかった。対照細胞では、ワクチン接種していないマウスのT細胞は、EL4-GD2⁺細胞またはJurkat細胞のいずれを用いて攻撃を誘発しても増殖しなかった。陽性対照では、ConAで処理すると、対照マウスまたはワクチン接種マウスのT細胞増殖が同程度刺激された (それぞれ $21,457 \pm 504$ cpm及び $19,834 \pm 309$ cpm)。各グループの増殖T細胞数をトリパンブルー排除法によりカウントした関連するアッセイでも、ほぼ同じデータが得られた (図4B)。これらのアッセイでは、テトラGD2をワクチン接種したマウスから得られた応答T細胞40,000個を、刺激細胞であるJurkatまたはEL4の生細胞とともに播種した。in vitroで7日後、EL4標的細胞がすべて死滅したのに対し、Jurkat細胞は生存し、増殖していた。

【0066】

以上のデータを考え合わせると、テトラGD2が細胞性免疫を生じさせる免疫原であることが裏付けられる。

【0067】

腫瘍予防パラダイムでは、侵襲性及び転移性が極めて高い同系EL4-GD2⁺細胞を免疫適格C57/B16マウスの腹腔内に1週間置きに2回注射し、次いで皮下に移植して免疫化した。EL4細胞は同系細胞であり、上記のマウスで極めて短期間のうちに増殖し転移する。いずれの測定日 (腫瘍移植後第11日、第14日、第16日) にも、免疫化マウス (5 n 9) に対照マウスよりも大きさが有意に小さい原発性腫瘍が認められた (図5A)。この腫瘍予防ワクチンの実験を独立させて3回再現した (総個体数は免疫化マウスが n = 22、対照マウスが n = 22であった)。全3回の独立した実験を比較するため、各実験の第16日の対照マウスの平均腫瘍体積を100%に正規化した。この基準を用いたところ、免疫化マウスの腫瘍体積は全体で約57%減少していた (図5B)。

【0068】

腫瘍治療パラダイムでは、最初にEL4-GD2⁺細胞をマウスに移植し、腫瘍が肉眼/触知で確認できたとき、マウスをテトラGD2または対照溶媒で2回免疫化した。この臨床的にさらに重要なパラダイムでは、いずれの測定日にも、対照マウスに比して免疫化マウス (4 n 6) に原発性腫瘍成長の有意な遅延が認められた (図5C)。18日後、全対照マウスに平均約 $6,000 \text{ mm}^3$ の原発性腫瘍及び広範囲に及ぶリンパ節転移が認められた。これに対し、免疫化マウスには約 $2,300 \text{ mm}^3$ の原発性腫瘍が認められた。

【0069】

10

20

30

40

50

腫瘍治療ワクチンのデータを2つの独立した実験で再現した（免疫化マウスは $N = 13$ 、対照マウスは $n = 18$ であった）。全実験を比較するため、各実験の第18日の対照マウスの平均腫瘍体積を100%に正規化した。この基準を用いたところ、免疫化マウスの腫瘍体積は全体で約51%減少していた（図5D）。

【0070】

皮下腫瘍担持マウスにテトラGD2免疫化ドナーマウスから精製したT細胞 4×10^6 個を腹腔内注射により投与した。いずれの測定日にも、対照未処置マウス（ $n = 6$ ）に比して養子移植マウス（ $n = 6$ ）に原発性腫瘍成長の有意な遅延が認められた（図5E）。腫瘍成長の14日後、対照群に平均約 1200 mm^3 の原発性腫瘍が認められた。これに対し、養子移植群には約 500 mm^3 の原発性腫瘍が認められた。

10

【0071】

リンパ節及び胸腺はEL4腫瘍で観察される主要な転移部位であるが、養子移植群にはいずれの器官にも転移の証拠が全くみられなかったのは注目すべきことである。EL4腫瘍転移により、組織の腫大及び定量化が可能な対応する体重増加が起こる。腫瘍担持マウス（ $n = 6$ ）には、腫瘍を担持しない未処置マウスよりも大きいリンパ節が認められ、その大きさは無感作マウスの約10倍増大している。T細胞の養子移植を実施した腫瘍担持マウス（ $n = 6$ ）にはこれより小さく、正常なリンパ節と同程度の大きさのリンパ節が認められた（図5F）。

【0072】

ワクチン接種後に活性化されたT細胞についてさらに、CD4及びCD8表現型の特徴を明らかにした。ワクチン接種した腫瘍担持マウスまたは対照マウスからT細胞を単離し、プラスチックにGD2を固定化したディッシュでその細胞を培養した。ワクチン接種マウスのT細胞はGD2でコートしたディッシュで盛んに増殖した。これに対し、対照マウスのT細胞はGD2でコートしたディッシュで増殖しなかった。いずれのマウスも腫瘍を担持し、GD2に曝露するが、この抗原に应答することができるのはワクチン接種したマウスのみである。培養物の特徴を明らかにするFACSscanアッセイでは、増殖細胞の表現型が主としてCD8⁺であることがわかった。増殖細胞ではCD8サブセットの拡大によりCD4/CD8比が変化したのに対し、対照マウスのT細胞では正常なCD4/CD8比が維持された（図6）。

20

【0073】

以上のデータは、ワクチン接種後に活性化されたT細胞が、抗原提示細胞の非存在下で、固定化された（多価）抗原に应答し得ることを示している。

30

【0074】

原発性腫瘍から作製した免疫染色凍結切片により腫瘍浸潤リンパ球の存在が確認された。EL4腫瘍は「ダブルネガティブ」T細胞であり、抗CD4抗体でも抗CD8抗体でも染色されない。免疫化マウスのT細胞を養子移植したマウスでは、原発性腫瘍に浸潤したCD8⁺細胞の数が、養子移植を実施しなかった腫瘍担持マウスに比して有意に多かった。両群とも、抗CD4抗体により浸潤CD4⁺細胞が検出された。

【0075】

以上のデータを考え合わせると、腫瘍が定着した後にワクチンを投与する現実的な治療パラダイムにおいて、原発性腫瘍成長及び腫瘍転移を管理するにはワクチン接種で十分であることがわかる。

40

【0076】

有効な糖質免疫原及び治療用癌ワクチンとして新規な四価GD2糖質デンドリマーが開発された。合成免疫原の生物物理学的特徴付けから、それが所望の結合を維持する均一な四量体であることがわかった。免疫系にオリゴマー糖質構造を提示すると、腫瘍膜のラフトGD2を模倣することによって、より本物に近い細胞傷害性抗腫瘍応答が刺激され得る。in vivo及びin vitroの生物学的研究から、ワクチンが抗GD2細胞傷害性抗体及び細胞傷害性細胞性免疫を誘導することがわかった。ワクチンにより誘発された免疫は、定着した腫瘍の成長及び転移を遅らせることができる。本明細書に開示され

50

る *in vivo* の研究は、ガングリオシドワクチンが腫瘍の成長を阻害し得るだけでなく、定着した腫瘍の成長も抑制し得ることを裏付けるものである。

【0077】

本明細書に記載される四価GD2糖質デンドリマーに関して得られたデータから、これ以外にも、糖質を標的とし、GD3などの他の腫瘍関連ガングリオシドに適合した癌ワクチンが本明細書に包含される。AP-GD2と同じく、アミノフェニルエーテル-GD3類似体から調製される四量体GD3糖質が本明細書に開示され(図1B)、この糖質は、天然に存在するGD3の本来の構造的特徴を保存しており、免疫原性を示し、*in vivo* で細胞傷害性抗ガングリオシド液性応答及び細胞性応答を誘発することが予測される。

10

【0078】

AP-GD2について記載したものと同一合成戦略を用いて、GD3デンドリマー(テトラGD3)類似体を作製し、免疫化を2回実施したところ、高力価の抗GD3抗体が検出された。図7に示されるように、テトラGD3を用いたワクチン接種により誘発された液性免疫が検出された。

【0079】

この新規なGD3ワクチンを抗癌剤として*in vivo* で評価したところ、いずれの測定日にも、免疫化マウスに大きさが対照マウスよりも有意に小さい原発性腫瘍が認められるほか(図8)、リンパ節(図9)にも肺(図10)にも実質的に転移が認められないことが明らかになった。GD3ワクチンによりメラノーマ肺転移が減少する(図10)。

20

したがって、新規な四価GD3糖質デンドリマーが有効な糖質免疫原及び治療用癌ワクチンとして開発された。

【0080】

本開示は、その範囲を限定するのではなく、実施形態を例示するために記載する以下の実施例を参照することにより、さらに容易に理解されよう。

【実施例】

【0081】

実施例 I

合成 AP-GD2 及びテトラGD2 デンドリマー

のちのデンドリマーとのコンジュゲーションのために、本来報告されているチオ-フェニル類似体を p-アミノフェニル-D-ラクトピラノシド(AP-Lac)(Toronto Research Chemicals 社製)に置き換えて、フェニルチオ-GD2の工程(Tongら, 2010, Cehm Biol, 17:183)を修正することにより、記載されている(Gilbertら, 2002, J Biol Chem, 277:327)通りに糖質を合成した(以下を参照されたい)。AP-GD2は水溶性(20mg/ml超)であり、サイズ排除(Superdex 30 16mm x 85cmカラム、GE Health Care 社)により99%超の純度まで精製された。AP-GD2の分子量の測定値は1218g/molであり、予測値と一致していた。1D及び2D NMR分光測定ならびに質量分析(EI-MS)により構造を確認した(図2A及び2B)。AP-GD2の化学酵素合成では、純物質の最終収率は約90%超であった。

30

40

【0082】

80%エタノール(300µl)にAP-GD2(2mg)を溶かした溶液を攪拌しながら、これにチオホスゲン(2µl)を加え、混合物を室温で3時間静置し、この時点で、薄層クロマトグラフィー(酢酸エチル-メタノール、4:1)により、出発物質がすべて反応し、単一の生成物が形成されたことが示された。ほぼ乾燥するまで濃縮して固体とし、水を加えた。生成物をろ過して水で洗浄し、イソチオシアナトフェニルGD2溶液が得られたら、これを凍結乾燥させて白色粉末にした(1.8mg、収率90%)。PAMAM G0(Dendritech 社)のメタノール溶液の揮発性物質を減圧下で蒸発させ、得られた残渣をジメチルホルムアミド(DMF)に溶かした。N,N-ジイソプロピ

50

ルエチルアミン (0.5 μ l) と PAMAM G0 (0.854 μ g/ μ l を 2 μ l) の DMF 溶液 (100 μ l) を攪拌しながら、これに イソチオシアナトフェニル GD2 (1.8 mg) の DMF (110 μ l) 溶液を滴加した。TLC により出発物質が全く検出されなくなるまで、反応物を室温で 20 時間攪拌した。反応混合物を水 3 ml で希釈し、水に対して透析した (MW カットオフ 2 kDa、Spectrum Laboratories 社)。得られた溶液を凍結乾燥させて、白色粉末の四価 PAMAM 系 GD2 を収率 80% (1.34 mg) で得た。1D 及び 2D NMR 分光測定により四価 PAMAM 系 GD2 を確認した。ATCC からマウスリンパ腫 EL4 - GD2⁺細胞 (野生型 EL4 細胞) 及び Jurkat 白血病細胞を入手した。抗 GD2 mAb による EL4 - GD2⁺のネガティブ選択、次いで限界希釈サブクロニングにより EL4 - GD3⁺細胞を作製した。EL4 - GD3⁺細胞は安定であり、in vitro の増殖特性及び動態が EL4 - GD2⁺細胞と同じである。全細胞を 37、5% CO₂ の加湿雰囲気中、5% ウシ胎仔血清、2 mM グルタミン、10 mM HEPES 及びペニシリン/ストレプトマイシンを添加した RPMI 1640 培地 (Wisent 社) で増殖させた。フローサイトメトリーにより、いずれの細胞系も細胞表面 GM1 を同レベルで発現することがわかった。フローサイトメトリー及びガングリオシド抽出物の薄層クロマトグラフィーにより、EL4 - GD2⁺細胞は GD2 を発現するが GD3 は発現せず、EL4 - GD3⁺細胞は GD3 を発現するが GD2 は発現せず、Jurkat 細胞は GD2 も GD3 も発現しないことが確認された。

10

20

【0083】

実施例 I I

テトラ GD2 の in vivo の特徴付け

FACS 及び ELISA による血清の特徴付けのための免疫化

テトラ GD2 (50 μ g) の PBS 溶液を C57/B16 マウスの腹腔内に投与した。10 日後、PBS 溶液をマウスの腹腔内 (25 μ g) 及び皮下 (25 μ g) に投与して再び免疫化した。4 日後、分析用に血液試料を採取した。

【0084】

FACS can: 2×10^5 個の EL4 - GD2⁺細胞、EL4 - GD3⁺細胞及び Jurkat 細胞を FACS 緩衝液 (PBS、0.5% BSA、0.05% NaN₃) で洗浄し、マウス抗血清 (1:50 希釈) 2 μ l または陽性対照の抗 GD2 mAb (13 nM) もしくは抗 GD3 mAb (13 nM) と氷上で 20 分間インキュベートした。細胞を氷冷 FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、FITC コンジュゲート抗マウス IgG または FITC コンジュゲート抗マウス IgM (Sigma 社) と氷上で 20 分間インキュベートした。細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、フローサイトメーター (Becton-Dickinson 社) で新たに調べ、Cell Quest ソフトウェアを用いてデータを解析した。陰性対照抗体としてマウス IgG または IgM 及び正常マウス血清を用いた。陰性対照細胞として Jurkat 細胞を用いた。

30

【0085】

直接結合 ELISA: ガングリオシド (Advanced ImmunoChemical 社) をポリスチレン製 Corning Strip Well 96 ウェルプレート (10 ng/ウェル) (Fisher Scientific 社) に固定化した。次いで、0.5% ウシ血清アルブミン (PBS - 0.5% BSA) を含有するリン酸緩衝生理食塩水でウェルを 1 時間「ブロック」した。被験血清、対照の前採血マウス血清、マウス IgG (Sigma 社) または特異的抗ガングリオシドモノクローナル抗体を含む一次抗体をウェルに加え、2 時間インキュベートした。プレートを PBS - 0.5% BSA で 3 回洗浄し、次いでマウス IgG アイソタイプまたはマウス IgM アイソタイプに特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート抗マウス抗体 (Sigma 社) で洗浄した。PBS - 0.5% BSA で 3 回、PBS で 2 回洗浄した後、発色基質 TMB One Solution (Promega 社) を加え、0.5 N H₂SO₄ で反応を停止させた。450 nm でプレートを読み取った (Benchmark Plus、Bio -

40

50

R a d 社) (3 1) 。

【 0 0 8 6 】

血清アイソタイピング：毎回免疫化を実施した後に、毛細管血液採取システム (M i c r o v e t t e 、 S a r d s t e d t 社) を用いて血液を採取し、室温で5分間、 $10000\times g$ で遠心分離して血清を分離した。次いで、マウスサブアイソタイピングキット (C a l b i o c h e m 社、カタログ番号386445) を製造業者の仕様書の通りに用いて、血清中に存在する I g のアイソタイピングを実施した。実験は各血清について3連で4回実施した。

【 0 0 8 7 】

M T T アッセイによる細胞傷害性の評価

10

示される試薬を添加した通常培地で E L 4 - G D 2 ⁺細胞 (C o r n i n g 社の96ウェルプレートに5,000個/ウェル)を培養した。24時間後、テトラゾリウム塩試薬 (M T T 、 S i g m a 社) 及びUV吸収を用いて細胞の生存/代謝プロファイルを定量化した。アッセイは4連で5回実施した。被験試薬には陽性対照抗 G D 2 m A b (最終濃度7 n M)、陰性対照正常マウス I g G (最終濃度7 n M) が含まれる。無感作マウス (陰性対照)または腹腔内2回ワクチン接種した被験マウスから血清を採取した。上記の実験では、第3日及び第10日にワクチン接種を実施し、第13日に血清を採取した。血清採取の時間は腫瘍治療パラダイムの時間表に準じるものとした (以下を参照されたい)。血清を半精製し、約50 μ g /ウェルの血清抗体を用いた。血清抗体のごく一部が抗ガングリオシド抗体であるのに対し、m A b 対照は抗ガングリオシド I g G を100%が含有する。

20

【 0 0 8 8 】

³H - チミジン組込みアッセイによる混合リンパ球反応 (M L R) の評価

E L 4 - G D 2 ⁺細胞及び対照 J u r k a t 細胞を25 μ g / m l マイトマイシン (S i g m a 社) で1時間処理して、その増殖を停止させた。細胞を培地で3回洗浄してマイトマイシンを除去した後、96ウェルプレートに 2×10^5 細胞/ウェルで播いた。2回免疫化した (上記の通り) マウス及び溶媒を注射した対照マウスから脾細胞の単細胞懸濁液を得た。E A S Y S E P T M マグネット (S t e m C e l l T e c h 社) のプロトコルに従って細胞を分離した。各マウスの脾臓からほぼ同量のT細胞を得た (純度95%超、データ不掲載)。このT細胞をマイトマイシンで処理したE L 4 細胞またはJ u r k a t 細胞と10:1の比で播いた。対照として、T細胞単独 (刺激腫瘍細胞を含まない) またはコンカナバリン A (C o n c a n a v i l i n A) で処理したT細胞を用いた。培養から5日後、³H - チミジン (S i g m a - A l d r i c h 社) を0.1 μ C i /ウェルで加えた。DNAに取り込まれた³H - チミジンを液体シンチレーションによりカウントし、データを平均 c p m ± s d で報告する。

30

【 0 0 8 9 】

実施例 I I I

腫瘍予防試験

腫瘍予防試験のための免疫化

1週間置きに4回 (毎回50 μ g)、C 5 7 B L / 6 マウスの腹腔内にワクチン接種した。対照マウスには溶媒のみを注射した。4回目のワクチン接種から1週間後、 5×10^5 個の E L 4 - G D 2 ⁺を皮下に注射した。腫瘍による攻撃誘発から10日後、示される腫瘍移植後の時間に腫瘍を測定した。

40

【 0 0 9 0 】

腫瘍治療試験のための免疫化

E L 4 - G D 2 ⁺細胞 5×10^5 個をC 5 7 B L / 6 マウスの左側腹部の皮下に注射した。3日後、腫瘍が肉眼/触知で確認できたとき、マウスを無作為に割り付け、右側腹腔内に溶媒対照またはテトラ G D 2 デンジマー (d e n d i m e r) (P B S 中50 μ g) を2回ワクチン接種した。

【 0 0 9 1 】

50

養子 T 細胞移植治療試験

C57BL/6マウスの腹腔内にテトラGD2 50 µgを2回(1週間置きに)ワクチン接種した。2回目の免疫化から7日後、Easy Sep Negative Selection Mouse T Cell Enrichment Kit (Stem cell Technologies社)を用いて脾臓及びリンパ節からT細胞を単離した。養子移植の3日前に皮下にEL4-GD2⁺細胞を 2.5×10^5 個注射したC57BL/6マウスの腹腔内にT細胞約 4×10^6 個を注射した。示される時間に腫瘍を測定し、腫瘍移植から14日後、同側の鼠径リンパ節及び腋窩リンパ節を解剖し転移を評価するため、マウスを安楽死させた。

【0092】

10

腫瘍成長の評価

原発性腫瘍をデジタルノギスで測定し、以下の方程式： $V(\text{mm}^3) = 0.5 \times \text{幅} \times (\text{長さ})^2$ によりデータを解析した。マウスを安楽死させた後、解剖し、リンパ節及び胸腺(EL4細胞がホーミングすることが知られている器官)への転移の証拠があるかどうかを顕微鏡により検討した。

【0093】

スチューデントの両側t検定により、 $p < 0.05$ (*) 及び $p < 0.01$ (**) を有意として2つのグループの腫瘍成長の差を解析した。ほかに、チューキー・クラマー多重比較試験を用いた一元配置ANOVAで5つの異なるグループを比較した。各結果の間にみられる差が $p < 0.05$ (*) 及び $p < 0.01$ (**) であれば有意とした。

20

【0094】

実施例 I V

テトラGD3のin vivoの特徴付け

安全性。ワクチン接種マウスに既知の副作用から予測され得る有害作用の徴候は全く認められなかった。測定した評価項目はいずれも、GD2またはGD3抗原の形態を用いた臨床試験で問題となることが報告されているもの(痛覚過敏、挙動、運動及び学習/記憶の変化)を含め、陰性であった。過免疫化マウスに正常なガングリオシドに対する交差反応免疫は認められず、血液プロファイル、肝酵素プロファイル、腎酵素プロファイルのいずれにも全く変化が見られなかった。

【0095】

30

実施例 I に記載したものと同一合成戦略を用いて、GD3 dendrimer (テトラGD3) 類似体を作製した。免疫化を2回実施した後、高力価の抗GD3抗体が検出されたが、抗GM1 Abは検出されなかった。上記の通り、安全性評価で問題はみられなかった。

【0096】

図7は、テトラGD3のワクチン接種により誘発された液性免疫を示している。IgGサブクラスの抗GD3反応性抗体を示す血清の代表的なELISAのデータ。陰性対照は正常マウスのワクチン接種前の血清及びマウスIg(Sigma社)である。結合がGD3に選択的であるのに対して、GM1 ELISAプレートは陰性である(不掲載)。示されるデータは $n = 8$ の各試料の平均 \pm semである。

【0097】

40

新規なGD3ワクチンを抗癌剤としてin vivoで評価した。GD3を高レベルで発現するEL4-GD3⁺を用いた。予防パラダイムでは、マウスを2回免疫化した後、侵襲性の極めて高い同系EL4-GD3⁺を移植した。臨床的に重要な腫瘍治療モデルでは、定着した皮下腫瘍を担持するマウスにワクチン接種ドナーマウスのT細胞を養子移植した。両パラダイムとも、いずれの測定日にも免疫化マウスに対照マウスよりも大きさが有意に小さい原発性腫瘍が認められ(図8)、リンパ節(図9)及び肺(図10)への転移は実質的に認められなかった。

【0098】

図8は、テトラGD3のワクチン接種によりGD3⁺腫瘍による攻撃誘発から保護されるという結果を示している。マウスの腹腔内にテトラGD3(2回、1週間置き、毎回1

50

0 μ g / マウス、アジュバントを含まない) をワクチン接種した後、E L 4 - G D 3⁺細胞による皮下腫瘍移植を実施した。原発性腫瘍の平均体積 \pm s d。

【0099】

図9は、テトラG D 3のワクチン接種によりG D 3⁺腫瘍による攻撃誘発から保護されるという結果を示している。マウスの腹腔内にテトラG D 3 (2回、1週間置き、毎回10 μ g / マウス、アジュバントを含まない) をワクチン接種した後、E L 4 - G D 3⁺細胞による皮下腫瘍移植を実施した。リンパ節の平均体積 \pm s d (リンパ節内のE L 4細胞を検出することによって測定される転移の指標)、各グループともn = 8。例としてリンパ節が示されている。

【0100】

図10は、G D 3ワクチンがメラノーマ肺転移を減少させるという観察結果を示している。C 5 7 B L / 6マウスの尾静脈内にB 1 6 - G D 3メラノーマ細胞5 \times 10⁵個を注射した。3日後、マウスを無作為に割り付け、腹腔内に2回ワクチン接種した。14日後、マウスを屠殺した。転移性小結節の黒点を有する肺を定量化した(腫瘍にはメラニンが含まれており、容易に確認することができる)。

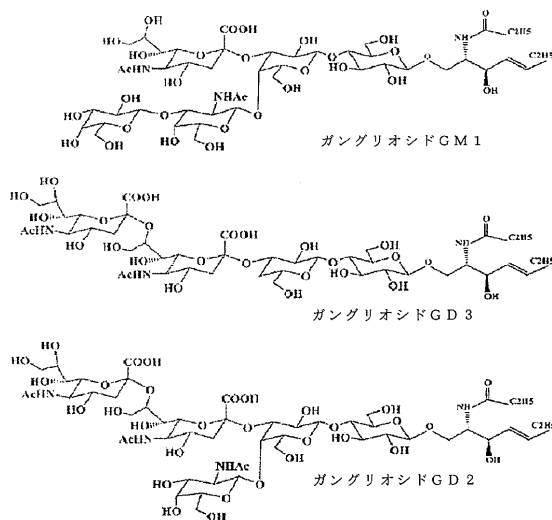
【0101】

ここまで、本発明をその特定の実施形態に関連させて説明してきたが、これにさらなる修飾を施すことが可能であるほか、本願が本発明の任意の変更、使用または適応を包含することを意図するものであるとともに、本発明が属する分野の既知のまたは慣例的な実施の範囲内にあり、上に記載した本質的な特徴に適用され得るものであり、また添付の「特許請求の範囲」の範囲内に従うものであることが理解されよう。

10

20

【図1A】



【図1B】

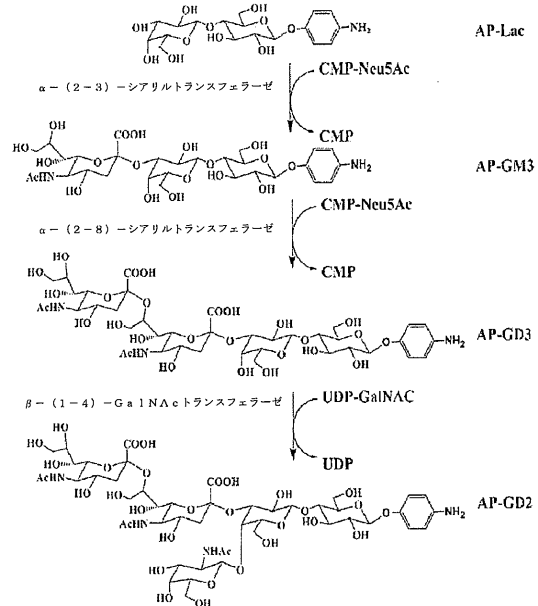
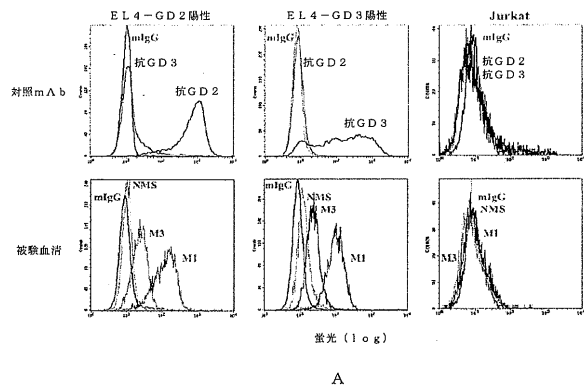
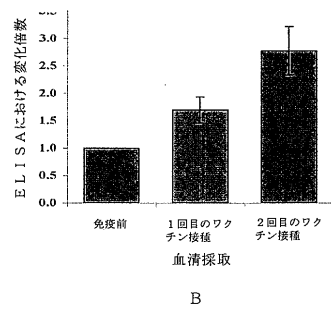


図1

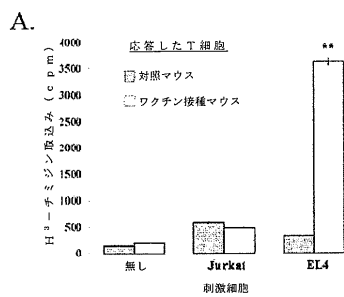
【図 3 A】



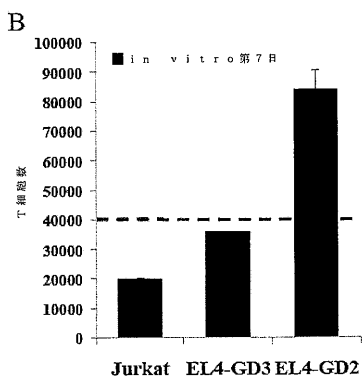
【図 3 B】



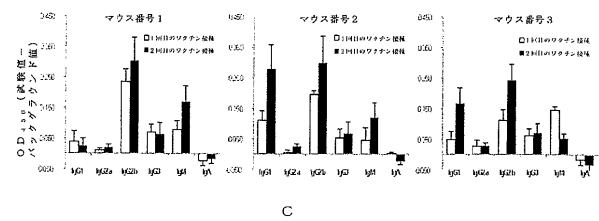
【図 4 A】



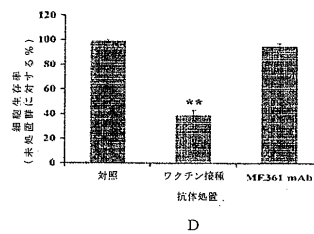
【図 4 B】



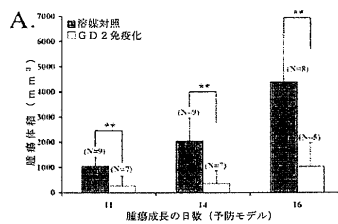
【図 3 C】



【図 3 D】

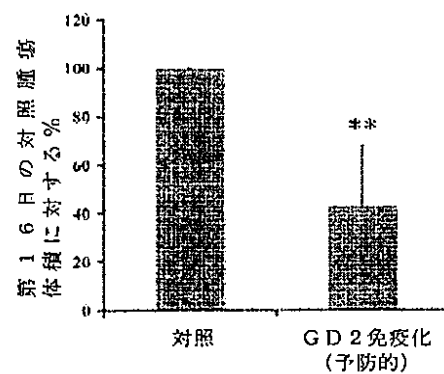


【図 5 A】

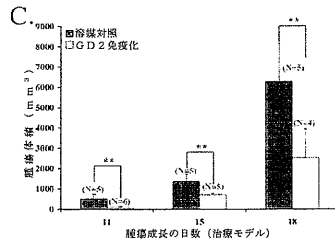


【図 5 B】

B.

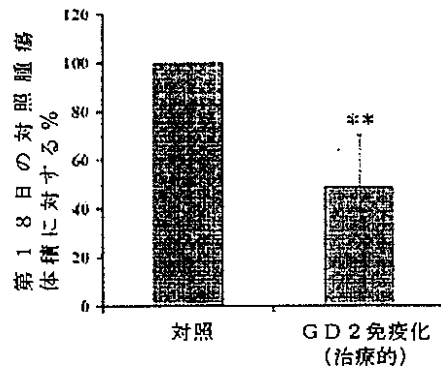


【図 5 C】

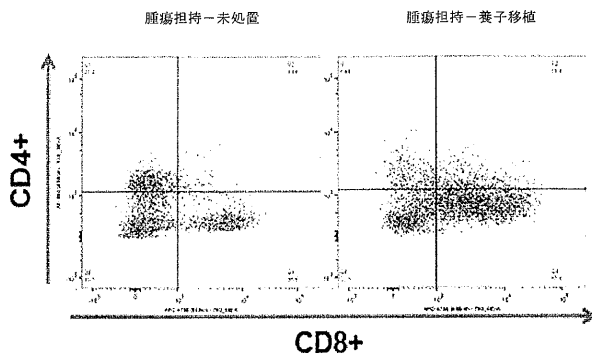


【図 5 D】

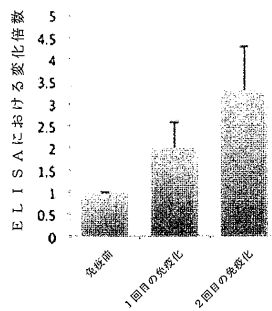
D.



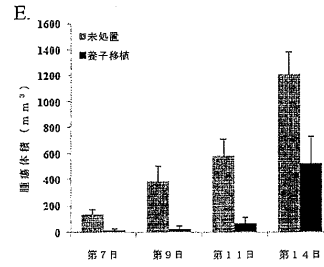
【図 6】



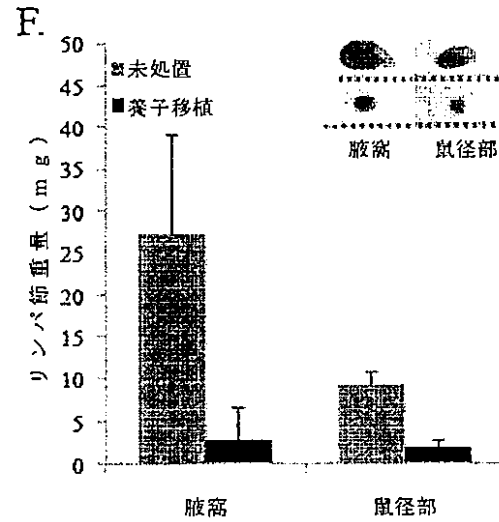
【図 7】



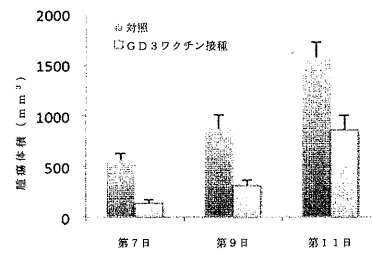
【図 5 E】



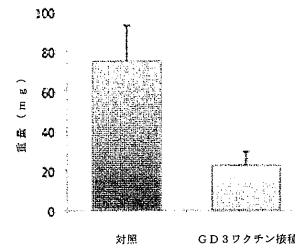
【図 5 F】



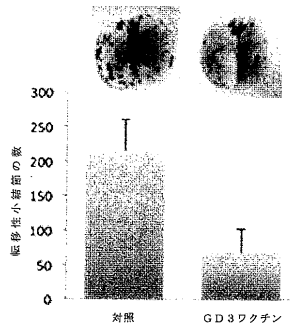
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2014/051165	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07H 15/203</i> (2006.01), <i>A61K 39/385</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01), <i>C07H 15/10</i> (2006.01), <i>C07K 16/44</i> (2006.01), <i>C12P 19/44</i> (2006.01)			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>C07H 15/203</i> (2006.01), <i>A61K 39/385</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01), <i>C07H 15/10</i> (2006.01), <i>C07K 16/44</i> (2006.01), <i>C12P 19/44</i> (2006.01)			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Questel-Orbit, Canadian Patent Database, Scopus, C/Aplus ganglioside, GD+, GM+, conjugate, dendrimer, multimer, multivalent, antigen, antibody, vaccine, immunogen, cancer			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	MUROZUKA et al, "Lyso-GM3, its dimer, and multimer: their synthesis, and their effect on epidermal growth factor-induced receptor tyrosine kinase", <i>Glycoconj J.</i> , Dec 2007, 24(9), 551-63. Epub 19 Jul 2007. Fig. 1, p.552; Fig. 3, compounds 17-19, p.554.	4-8, 11, 12, 19-21	
X	WO03003985A2, (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 16 January 2003 (16-01-2003). claims 2, 4, 13, 16, 26, 30, 47-49; p.13, 127 to p.14, 16.	4, 5, 7, 8, 10-23	
X	WO2004041310A1 (DANMARKS FOEDEVARE OG VETERINA) 21 May 2004 (21-05-2004) p.18, 1.30-35; p. 20, 1.4-7; p.24, 1.10-15.	4, 5, 7, 8	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 February 2015 (16-02-2015)		Date of mailing of the international search report 03 March 2015 (03-03-2015)	
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Yong-Huang Chen (819) 956-4113	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2014/051165**Box No. II****Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. ☒ Claim Nos.: 19-23
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 19-23 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, which the International Searching Authority is not required to search under Rule 39.1(iv) of the PCT. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effect or purpose/use of the product defined in claims 19-23.
2. ☐ Claim 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. ☐ Claim Nos.:
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:

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 claim 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 claim Nos.:

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/CA2014/051165

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	QIU et al, "Combining synthetic carbohydrate vaccines with cancer cell glycoengineering for effective cancer immunotherapy", <i>Cancer Immunol. Immunother.</i> , November 2012, 61(11), 1-17. Whole document	1-3, 10-23
A	ASTRONOMO et al, "Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations?", <i>Nat Rev Drug Discov.</i> , April 2010, 9(4), 1-32. p 11-12	1-3, 10-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2014/051165

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2004041310A1	21 May 2004 (21-05-2004)	WO2004041310A1 AU2003275954A1	21 May 2004 (21-05-2004) 07 June 2004 (07-06-2004)
WO03003985A2	16 January 2003 (16-01-2003)	WO03003985A2 WO03003985A8 WO03003985A3 AU2002354804A1 EP1458242A2 EP1458242A4 EP2263465A1 JP2004534088A US2004151733A1 US7479266B2 US2009060938A1 US8092780B2 US2012263749A1 US8540964B2 US2014037673A1	16 January 2003 (16-01-2003) 24 December 2003 (24-12-2003) 27 May 2004 (27-05-2004) 21 January 2003 (21-01-2003) 22 September 2004 (22-09-2004) 07 June 2006 (07-06-2006) 22 December 2010 (22-12-2010) 11 November 2004 (11-11-2004) 05 August 2004 (05-08-2004) 20 January 2009 (20-01-2009) 05 March 2009 (05-03-2009) 10 January 2012 (10-01-2012) 18 October 2012 (18-10-2012) 24 September 2013 (24-09-2013) 06 February 2014 (06-02-2014)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7034 (2006.01) A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K 31/7034

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

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100196405
弁理士 小松 邦光

(72)発明者 サラゴヴィ エイチ ウリ
カナダ ケベック エイチ4エイ 3エル8 モントリオール マルロウ アヴェニュー 342
1

(72)発明者 トン ウェンヨン
アメリカ合衆国 92122 カリフォルニア州 サン ディエゴ リージェンツ ロード 80
18 アpartment 101

Fターム(参考) 4C057 BB04 DD01 JJ23
4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB24 BB31 CC22 CC23 CC33 EE01
GG01 GG02 GG03 GG04
4C086 AA01 AA02 AA03 EA08 MA01 MA04 NA14 ZB09 ZB26