



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91101721.6

[51] Int.Cl⁵
G01N 33/50

[43] 公开日 1991年10月30日

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>[22] 申请日 91.2.19</p> <p>[30] 优先权 [32] 90.2.19 [33] JP [31] 39044/90</p> <p>[71] 申请人 美克德株式会社 地址 日本东京都</p> <p>[72] 发明人 永井克孝 须田功 日野明弘 杉本守 田中诚 伊藤正善 小川智也</p> | <p>[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利 代理部 代理人 李 瑛</p> <p>G01N 33/53 G01N 33/574 A61K 31/70 A61K 45/05</p> <p>说明书页数: 12 附图页数: 4</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[54] 发明名称 含有表唾液酸复合碳水化合物的药物

[57] 摘要

一种血清诊断药物,尤其是一种用于癌症的血清诊断药物,含有一种表唾液酸复合碳水化合物,例如 epiGM₃, epiGM₄ 和 epiGM₅。一种癌症疫苗,含有所述表唾液酸复合碳水化合物。一种血清诊断方法,尤其是一种用来预防和治疗癌症的诊断方法。

< 35 >

权 利 要 求 书

1. 一种血清诊断药物, 该药物含有至少一种表唾液酸复合碳水化合物。

2. 根据权利要求1所述的血清诊断药物, 其特征在于所述表唾液酸复合碳水化合物是选自 epiGM_3 、 epiGM_4 和 epiGM_5 。

3. 一种用于癌症的血清诊断药物, 该药物含有至少一种表唾液酸复合碳水化合物。

4. 根据权利要求3所述的血清诊断药物, 其特征在于所述表唾液酸复合碳水化合物是选自 epiGM_3 、 epiGM_4 和 epiGM_5 。

5. 一种癌症疫苗, 该疫苗含有至少一种表唾液酸复合碳水化合物。

6. 根据权利要求5所述的癌症疫苗, 其特征在于所述表唾液酸复合碳水化合物是选自 epiGM_3 、 epiGM_4 和 epiGM_5 。

7. 一种血清诊断方法, 该方法包括使血清与一种表唾液酸复合碳水化合物的反应。

8. 根据权利要求7所述的血清诊断方法, 其特征在于所述表唾液酸复合碳水化合物是选自 epiGM_3 、 epiGM_4 和 epiGM_5 。

9. 一种诊断癌症的方法, 该方法包括使血清与一种表唾液酸复合碳水化合物反应。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其特征在于所述表唾液酸复合碳水化合物是选自 epiGM_3 、 epiGM_4 和 epiGM_5 。

含有表唾液酸复合碳水化合物的药物

本发明与一种使用表唾液酸复合碳水化合物 (episialo complex carbohydrate) 的血清诊断药物有关, 尤其是与一种癌症血清诊断药物有关。本发明还与一种癌症疫苗有关, 并且与一种血清诊断方法有关, 尤其是与一种预防和治疗癌症的方法有关。

碳水化合物链是细胞表面上抗原性的重要成分, 细胞表面上的碳水化合物链抗原发生异常就变为癌症抗原。近来, 使用抗癌症抗原的单克隆抗体治疗癌症和对癌症进行血清诊断的可能性受到人们的特别推崇。

进一步讲, 有可能通过检查人体中抗癌症抗原的抗体的存在来诊断癌症。提供一种可与癌症抗原反应的抗体是很必要的。

本发明的一个目的是提供一种与癌症抗原反应的抗体。

本发明的另一个目的是提供一种使用这样一种抗体的预防、治疗和诊断的药物。

本发明的发明者发现了在一种动物血清中存在一种能识别表唾液酸复合碳水化合物的抗体, 并完成了本发明。

本发明与一种含有表唾液酸复合碳水化合物的血清诊断药物有关, 尤其是与一种癌症血清诊断药物有关, 并且与一种包括使表唾液酸复合碳水化合物与血清反应的诊断方法有关, 尤其是与一种癌症的血清诊断方法有关。

本发明的另一个实施例是一种含有表唾液酸复合碳水化合物的癌症疫苗。

图 1 说明一种正常小鼠的血清与 $G M_3$ 和 $epiG M_3$ 的反应度。

图 2 说明一种已植入癌症的小鼠的血清与 GM_3 和 $e\pi iGM_3$ 的反应度。

图 3 说明一种植入癌症的小鼠的血清与 GM_3 , $e\pi iGM_3$, GM_4 , $e\pi iGM_4$, GM_5 和 $e\pi iGM_5$ 的反应度。

图 4 说明 N —乙酰神经氨糖酸对植入癌症的小鼠的血清与 $e\pi iGM_3$ 反应度的抑制作用。

以下将对本发明作更详细的说明。

神经节苷脂是一种复合碳水化合物。存在于天然神经节苷脂中的乙酰神经氨糖酸的键合结构是 α 型的。然而,近年来通过一种神经节苷脂的化学合成方法已经合成了乙酰神经氨糖酸的键合结构为 β 型的所谓唾液酸复合碳水化合物。

所有通常的碳水化合物链标记都具有乙酰神经氨糖酸的 α 型键合结构,并且唾液酸复合碳水化合物可以起一种碳水化合物链癌症标记作用这一点一直未被人们所了解。

最近人们才了解的碳水化合物的不完整性是由于在癌细胞中合成的碳水化合物链中碳水化合物的组合模式的异常所造成的。此外,最近有报道说:如果发生癌,就出现 N —羟乙酰神经氨糖酸 ($NeuGc$)。人们的唾液酸除胎儿时期外都是 N —羟乙酰基型。 N —羟乙酰神经氨糖酸很容易通过将乙酰神经氨糖酸 5 位上的 N —乙酰基变为羟基来获得。这就是说,最近才为人们所了解的碳水化合物的不完整性是基于在碳水化合物链中取代基不同或碳水化合物组合模式不同。

这就是说,人们一直不知道出现了一种具有异常碳水化合物链的物质,这种异常是由于所述结构类型(例如本发明中所利用的唾液酸复合碳水化合物)所造成的。

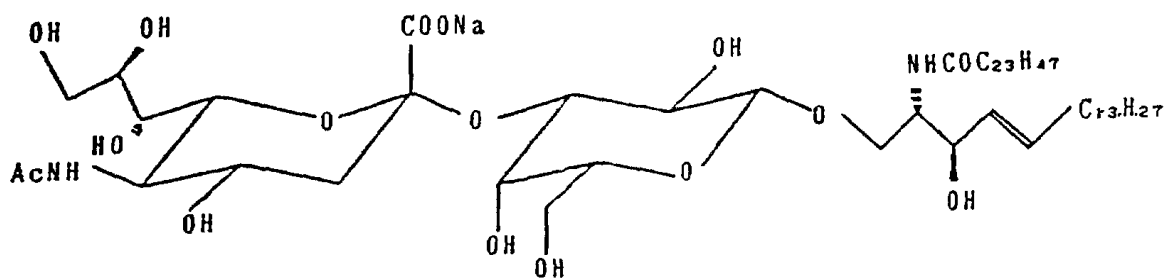
本发明是基于下述知识，即：在以患有肿瘤的动物身上所获取的血清中能识别表唾液酸复合碳水化合物的抗体的含量比未患肿瘤动物身上获取的血清中的值要高。这使人们联想到：在正常细胞中没有发现过的表唾液酸碳水化合物或许存在于患肿瘤的动物身上。

本发明的表唾液酸复合碳水化合物是这样的神经节苷脂，其乙酰神经氨酸的键合结构是 β 型的。表唾液酸复合碳水化合物的例子包括 epiGM_1 、 epiGM_2 、 epiGM_3 、 epiGM_4 和 epiGM_5 。

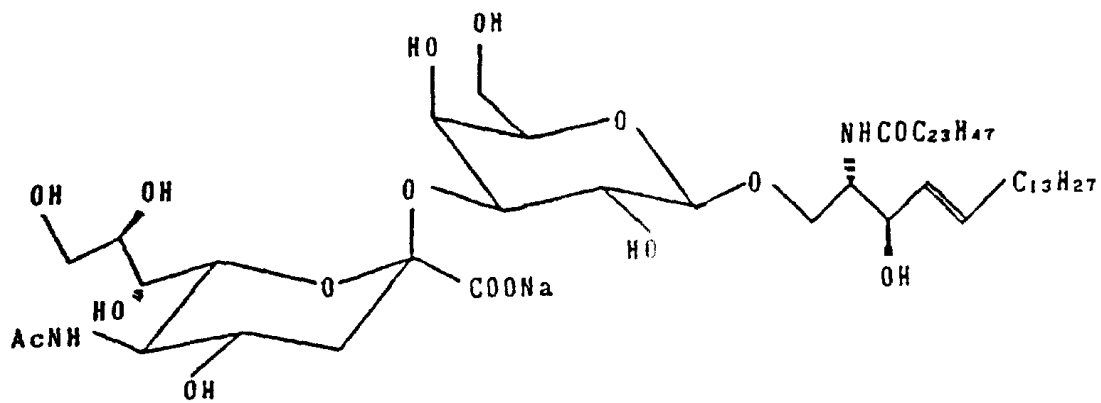
epiGM_3 是日本专利公告 (KOKOKU) 1—49354 和美国专利 4968786 中所述的化合物 (28)，并且是根据这些公开内容所述的方法制备的。 GM_3 和 epiGM_3 的化学结构如下：

epiGM_4 是在日本专利公开 (K O K A T) 6 1—2 8 2 3 9 1 和美国专利 4 7 5 1 2 9 0 中所描述的那种化合物 (2 7), 并且根据在这些公开内容中所描述的方法制备。 GM_4 和 epiGM_4 的化学结构如下 :

GM₄

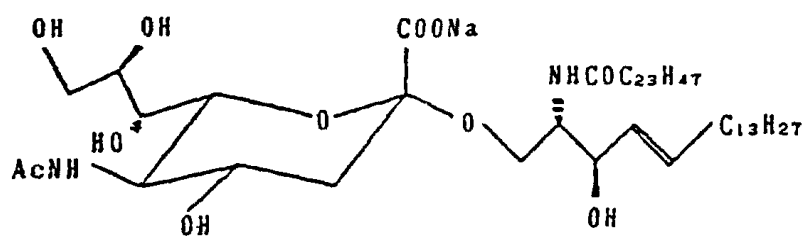


epi GM₄

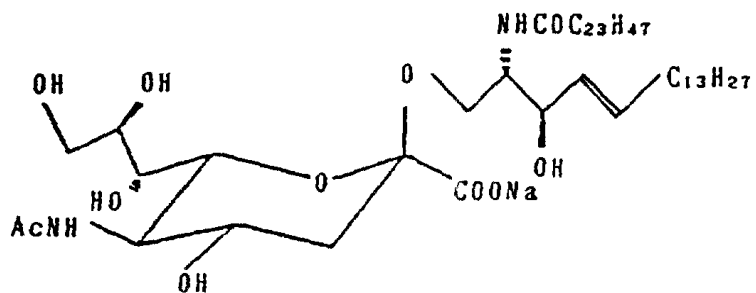


epiGM₅ 是在日本专利公开 (K O K A T) 6 3 — 4 5 2 9 3 1 和美国专利 4 7 3 0 0 5 8 中所描述的那种化合物 (III), 并且根据在这些公开内容中所描述的方法制备。GM₅ 和 epiGM₅ 的化学结构如下 :

GM₅



epi GM₅



根据本发明，利用表唾液酸复合碳水化合物进行血清诊断，尤其是进行癌症血清诊断是可能的。

使用表唾液酸复合碳水化合物的血清诊断可以借助于与传统的血清诊断相同的方式来进行。这就是说，将表唾液酸复合碳水化合物与动物血清一起进行培养，然后借助于通常已知的检验方法，例如 ELISA 法和 R I A 法，来检验同所述表唾液酸复合碳水化合物反应的抗体的存在，并且，如果必要的话，检验所述抗体的数量。

最好是使用一种诊断药物，使其在一种溶剂（例如乙醇或甲醇）中溶解表唾液酸碳水化合物。所述表唾液酸复合碳水化合物在所述溶剂中的浓度范围要适当，例如在 1 ng/ml 到 1000 ng/ml 之间。

根据本发明的血清诊断方法，诊断癌症、传染病，遗传疾病和免疫疾病是可能的。

此外，本发明还提供了一种含有一种或多种表唾液酸复合碳水化合物的癌症疫苗。

这种癌症疫苗本身就是所述的表唾液酸复合碳水化合物，或是所述表唾液酸复合碳水化合物和佐剂的混合物以及 B C G 的脂质体的混合物。

本发明的所述癌症疫苗的接种最好是在 1 至 4 星期期间进行 4 至 8 次，并且最好是每次接种 1 至 $1000 \mu\text{g}$ 所述表唾液酸复合碳水化合物。

根据使用所述表唾液酸复合碳水化合物的血清诊断方法，诊断癌症、传染病、遗传疾病和免疫疾病是可能的。

使用本发明的癌症疫苗，人们有可能提供抗癌免疫。

本发明的内容将参考下述例子加以介绍。

神经节苷脂

表唾液酸复合碳水化合物 G M₃ 和神经节苷脂 G M₃ 都是根据在日本专利公开 1—4 9 3 5 4 中所述的方法合成的。表唾液酸复合碳水化合物 G M₄ 和神经节苷脂 G M₄ 是根据日本专利公开 6 1—2 8 2 3 9 1 中所描述的方法合成的。表唾液酸复合碳水化合物 G M₅ 和神经节苷脂 G M₅ 是根据在日本专利公开 6 1—4 5 2 9 3 中所述的方法合成的。

小鼠

使用由 Charles River Japan Co. Ltd 和 Japan S L C Co. Ltd. 买来的并保存在 S P F 环境中的各种近亲繁殖系小鼠。

血清

血清的获得方法是：使利用眼底法从小鼠身上采集的血凝固，并将所采集的血进行离心分离。

ELISA 测定法

ELISA 测定法是按常规方法进行的。

将每一份 1 0 0 n g 溶于乙醇的神经节苷脂加到一个 9 6 穴微量滴定板的每一个穴中，然后使之保持在 3 7 °C 下，以便完全除去乙醇。将由含 5 % 的牛血清清蛋白 (B S A) 以及类似物质的磷酸盐缓冲溶液 (P B S) 构成的封阻溶液加入所述的那些穴中，并且将所述点滴板在 3 7 °C 下培养 2 小时。在除去封阻溶液后，将所采集的小鼠血加入每一个穴中，并将所述滴定板在 3 7 °C 下培养 1 小时。每一个穴都用含 1 % 的 B S A 的磷酸盐缓冲溶液洗涤。加有过氧化物标记的抗小

鼠 IgG、IgM 和 IgA 的抗体被加到每一个穴中，所述滴定板在 37 °C 下培养 1 小时。每一个穴都用含有 1% 的 BSA 的磷酸盐缓冲溶液洗涤。将含有 400 μg 邻苯二胺和 0.001% 的过氧化氢的底物溶液加入每一个穴中，并且使反应在室温下进行 15 分钟。加入 8 N 硫酸使反应中止，然后利用一台分光光度计测量微量培养板的每一个穴中的反应混合物在 490 nm 波长下的吸收值。

结果

(1) 小鼠血清与 epiGM₃ 的反应度

如图 1 所示，使取自 C57BL/6 雌性小鼠（9 周龄）的正常血清与 epiGM₃ 反应（用实线表示）。然而取自 C57BL/6 雌性小鼠的正常血清不与 GM₃ 反应（用虚线表示）。

如图 2 所示，还使 9 周龄的 C57BL/6 雌性小鼠（该小鼠已于两周前植入 B16 黑色素瘤细胞）的若干份血清与 epiGM₃ 反应（用实线表示）。该反应的强度显著地增加了。然而，这些血清不与 GM₃ 反应（用虚线表示）。在图 2 中，●、△、▲ 和 □ 分别表示相应于取自直径为 5 mm 或小于 5 mm、6 mm、8 mm 和 16 mm 的肿瘤的那些血清的数据。

将图 1 的结果同图 2 加以比较，可以清楚地看出：取自植入肿瘤细胞的小鼠的血清与 epiGM₃ 的反应度要比取自正常小鼠的血清与 epiGM₃ 的反应度要强。

图 1 和图 2 中所示数据是通过扣除本底值并取三个穴的平均值得到的。

(2) 小鼠血清同神经节苷脂的反应度（而不是同 epiGM₃ 的反应度）

将下述血清稀释200倍，并试验与GM₃、e piGM₃、GM₄、e piGM₄、GM₅和e piGM₅的反应度，所述血清是取自带有6mm肿瘤的小鼠。并且该血清在取自在上述过程(1)中已植入B16黑色素瘤的C57BL/6雌性小鼠(9周龄)的血清之中显示出最强反应度。如图3所示，与e piGM₃的反应度为最强，与e piGM₄的反应度为其次。

图3所示数据是通过扣除本底值并且取三个穴的平均值得到的。

(3)用乙酰神经氨酸抑制小鼠血清与e piGM₃的反应度。

将具有各种浓度的N—乙酰神经氨酸钠溶液加入与上述过程(2)中所使用的血清相同的小鼠血清中。试验血清同e piGM₃和同GM₃的反应度，并且把它们表示在图4中(实线表示血清与e piGM₃的反应度，虚线表示同GM₃的反应度)。图4所示数据是通过扣除本底值并且取三个穴的平均值获得的。为了避免在反应溶液中pH值降低的影响，使用了乙酰神经氨酸的钠盐。

如以图4中的结果中所看到的那样，小鼠血清与e piGM₃的反应度受到了β型羟基结构的N—乙酰神经氨酸的抑制。这样我们显然可以假定小鼠血清同e piGM₃的强反应度是由e piGM₃中乙酰神经氨酸基团的β型结构所造成的。

图 1

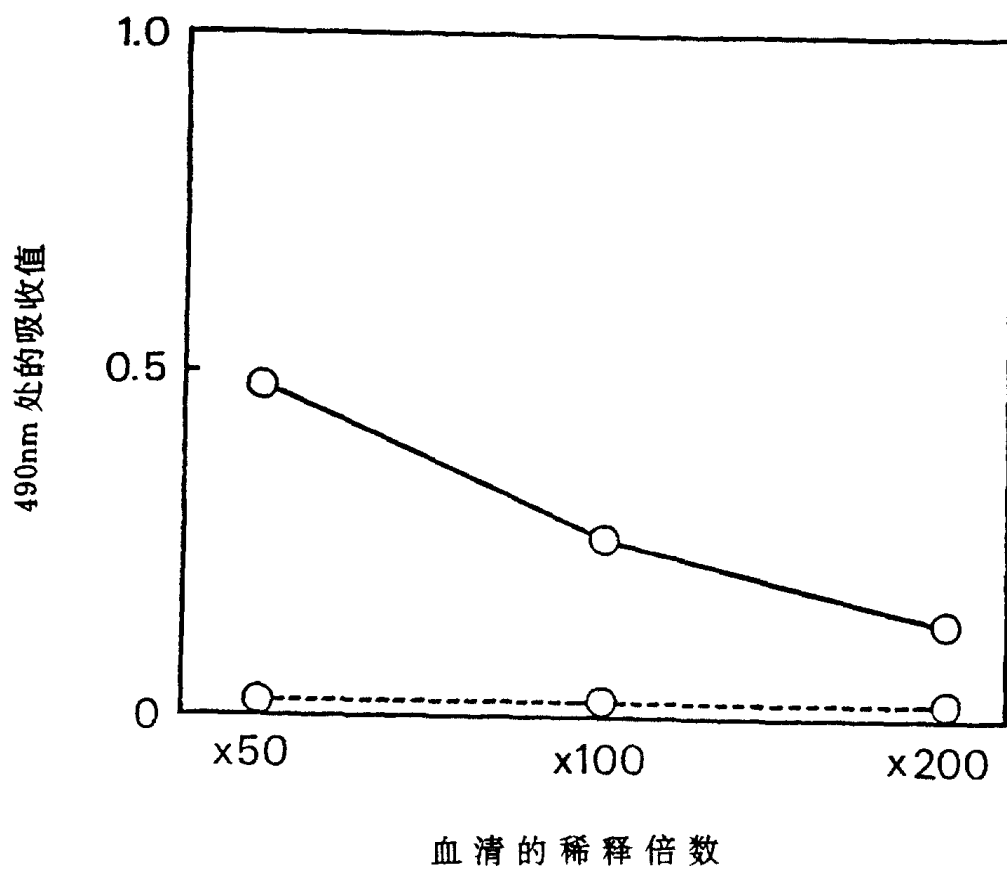


图 2

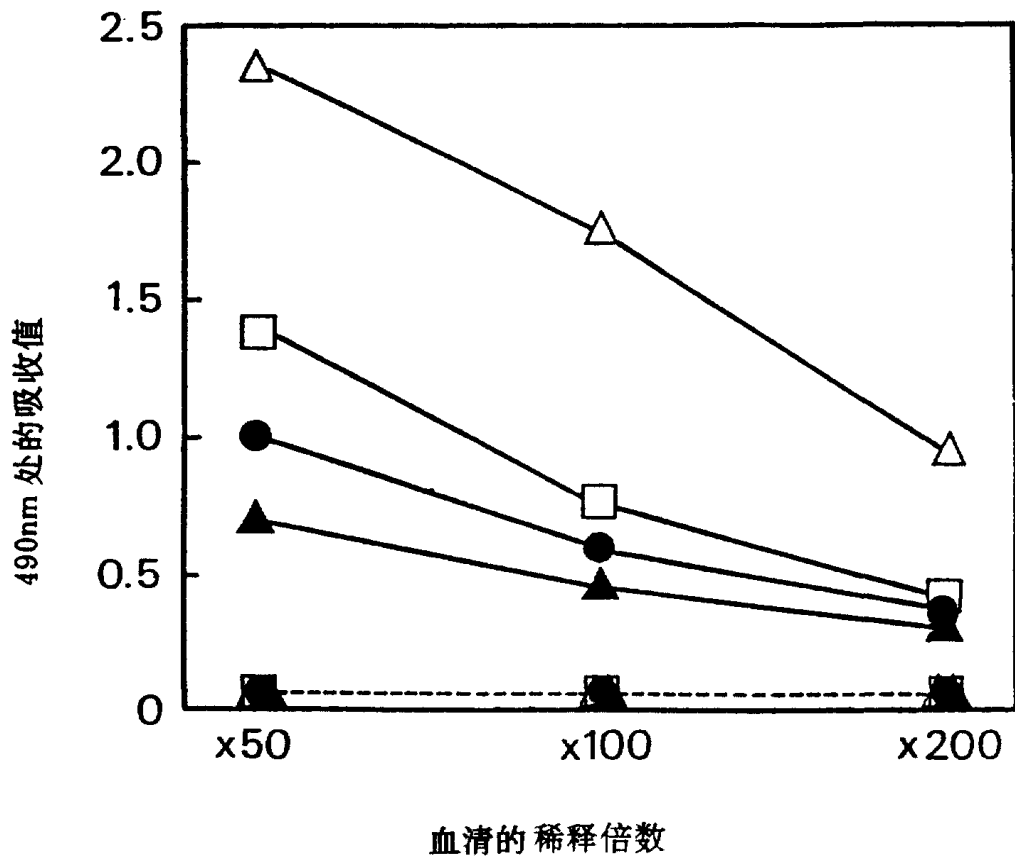


图 3

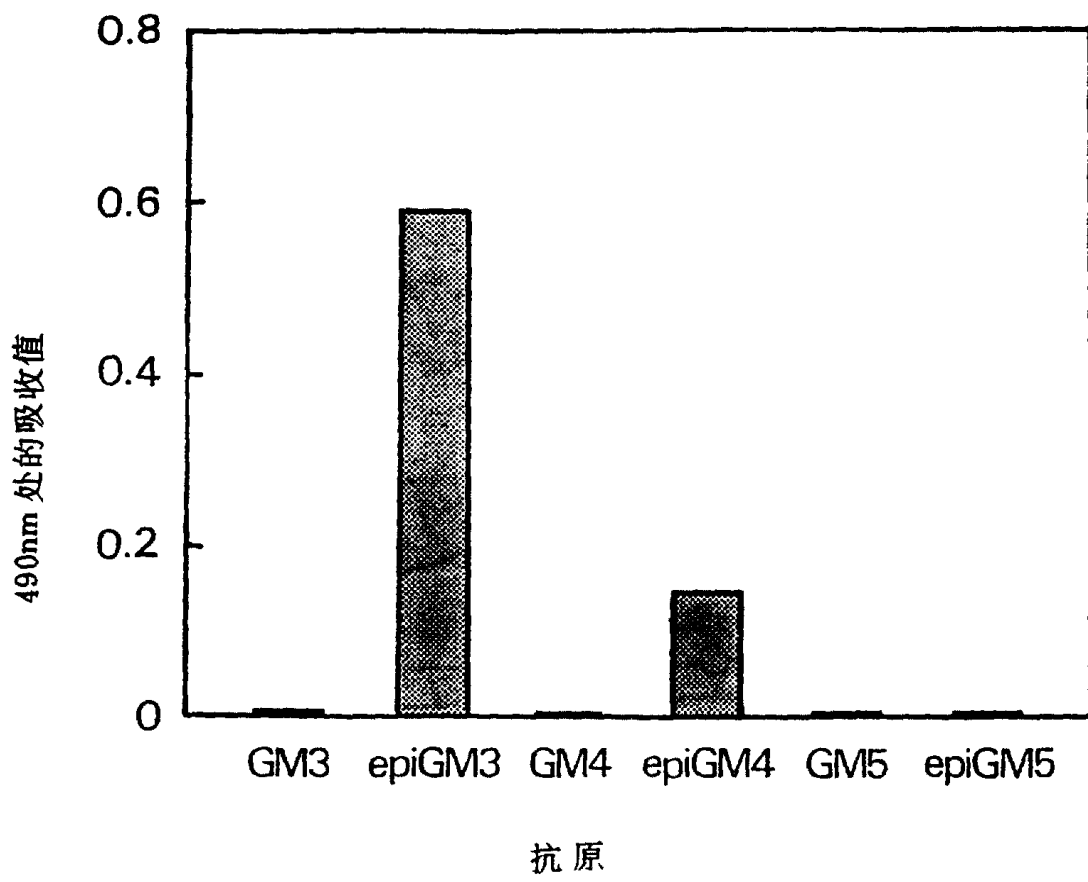


图 4

