

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98811400.3

[51] Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

C07H 15/04 (2006.01)

C07H 15/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100352918C

[22] 申请日 1998.9.22 [21] 申请号 98811400.3

[30] 优先权

[32] 1997. 9.22 [33] JP [31] 257188/97

[86] 国际申请 PCT/JP1998/004249 1998.9.22

[87] 国际公布 WO1999/015627 日 1999.4.1

[85] 进入国家阶段日期 2000.5.22

[73] 专利权人 麒麟麦酒株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 元木一宏

[56] 参考文献

WO9424142A 1994.10.27

WO9305055A 1993.3.18

审查员 王大鹏

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 杨丽琴

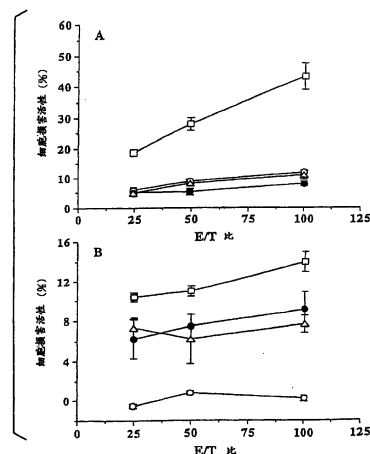
权利要求书 11 页 说明书 31 页 附图 8 页

[54] 发明名称

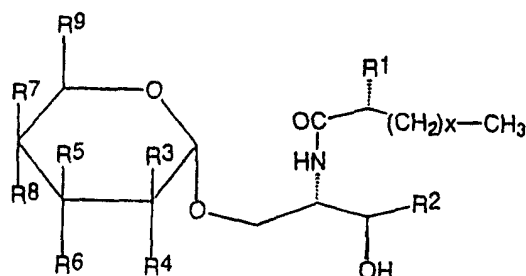
含有 α -糖基神经酰胺的用于增强细胞免疫原性的组合物

[57] 摘要

本发明提供一种用于增强肿瘤细胞或病原体感染细胞免疫原性的组合物,其中含有具有 α -糖基神经酰胺结构的化合物或其盐或溶剂合物。通过具有 α -糖基神经酰胺结构的化合物增强了免疫原性的肿瘤细胞在肿瘤治疗(肿瘤疫苗治疗)中是很有效的。



1. 增强肿瘤细胞或病原体感染细胞免疫原性的方法，包括使肿瘤细胞或病原体感染细胞与式(I)化合物或其盐或它们的溶剂合物在体外接触，



(I)

上式中，

R^1 为 H 或 OH，

X 为 7 - 27 的任何一个整数，

R^2 为选自下述 (a) - (e) 中的取代基，这里，Y 是 5 - 17 的任意整数

(a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

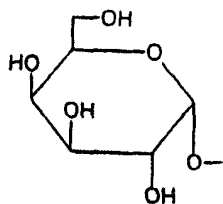
(d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ，而且

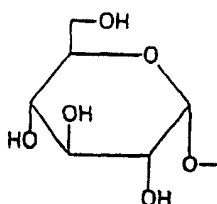
$R^3 - R^9$ 是在下述 i) 或 ii) 中的任意一种情况下定义的取代基：

i) 当 R^3 、 R^6 、及 R^8 是 H 时

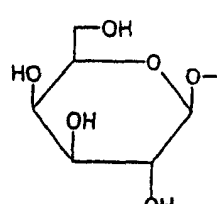
R^4 为 H、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基：



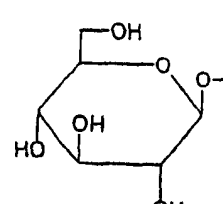
(A)



(B)

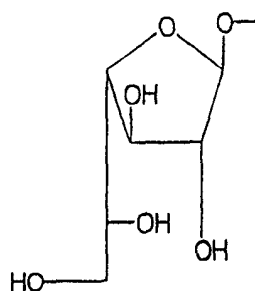


(C)

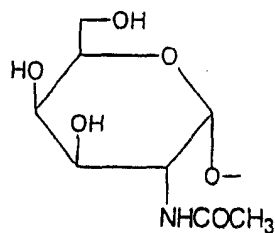


(D)

R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:

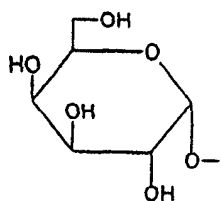


(E)

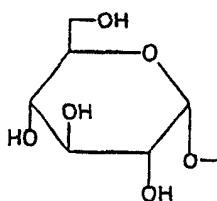


(F)

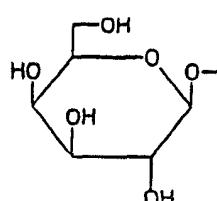
R^7 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



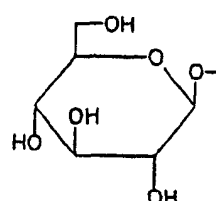
(A)



(B)

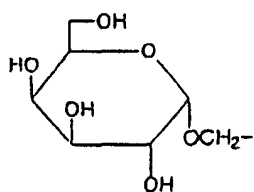


(C)

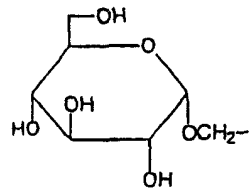


(D)

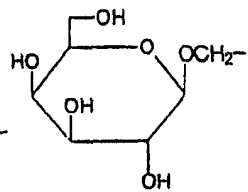
R^9 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 中的取代基:



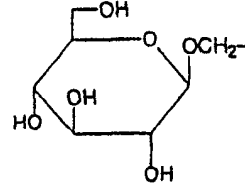
(A')



(B')



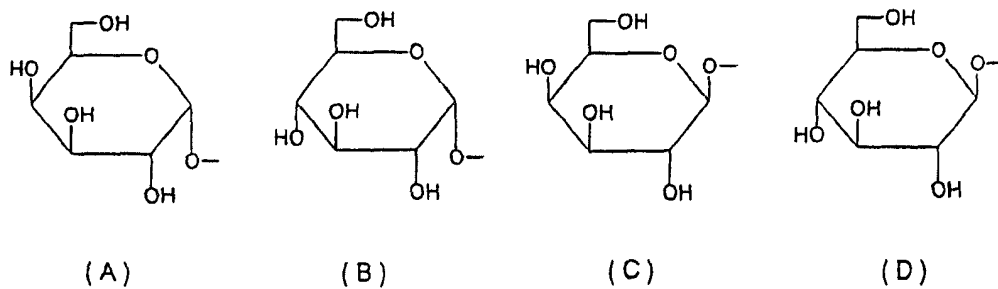
(C')



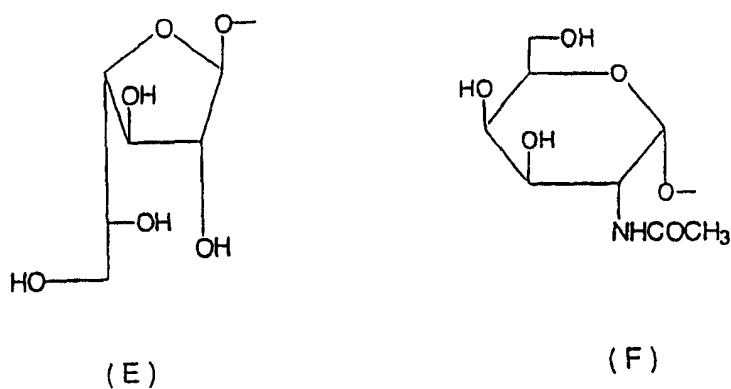
(D')

ii) 当 R^3 、 R^6 、及 R^7 是 H 时

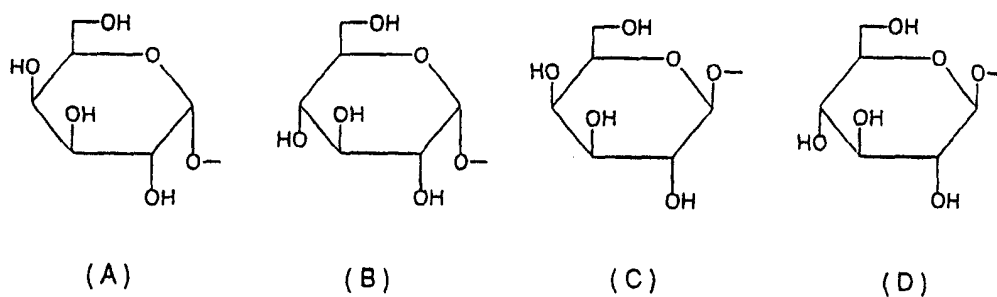
R^4 是 H、OH、 NH_2 、 $NHC(=O)CH_3$ 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



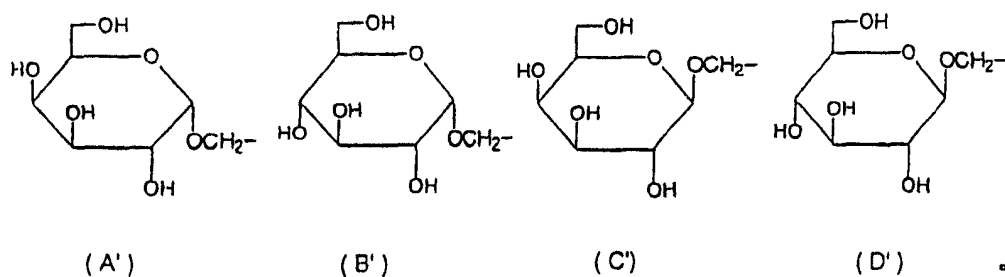
R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:



R^8 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:

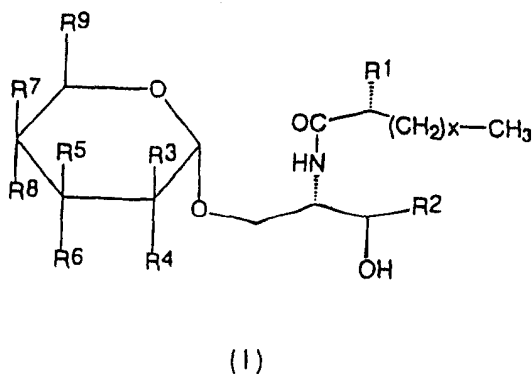


R^9 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 组成的群体中选择的取代基:



2. 如权利要求 1 所述的方法，其中细胞为肿瘤细胞。

3. 一种细胞，所述细胞为肿瘤细胞或病原体感染细胞，其通过将肿瘤细胞或病原体感染细胞与式 (I) 化合物或其盐或它们的溶剂合物进行体外接触得到，



上式中，

R^1 为 H 或 OH，

x 为 7 - 27 的任何一个整数，

R^2 为选自下述 (a) - (e) 中的取代基，这里， y 是 5 - 17 的任意整数

(a) - $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$

(b) - $\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$

(c) - $\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_y\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

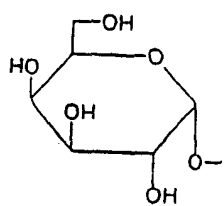
(d) - $\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$

(e) - $\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_y\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ，而且

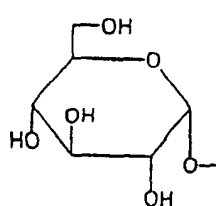
$R^3 - R^9$ 是在下述 i) 或 ii) 中的任意一种情况下定义的取代基：

i) 当 R^3 、 R^6 、及 R^8 是 H 时

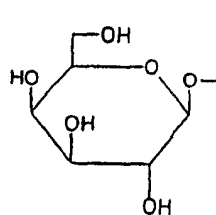
R^4 为 H、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基：



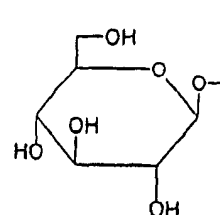
(A)



(B)

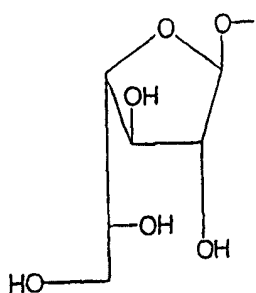


(C)

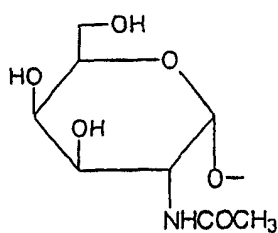


(D)

R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:

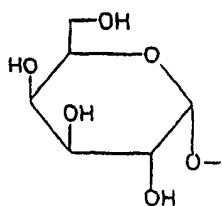


(E)

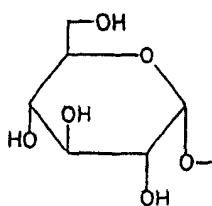


(F)

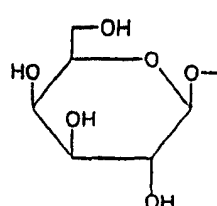
R^7 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



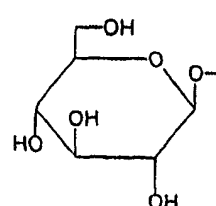
(A)



(B)

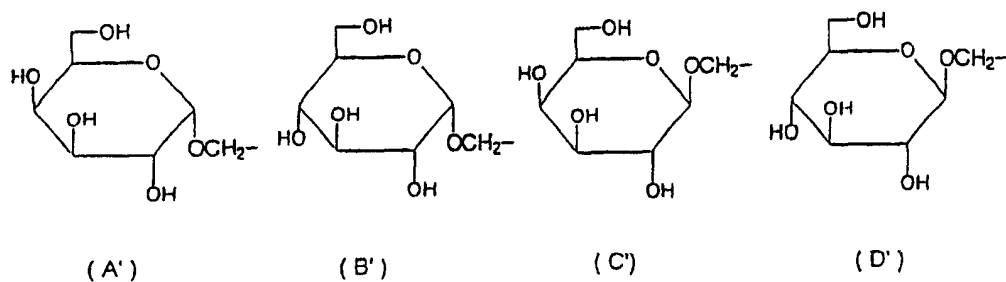


(C)



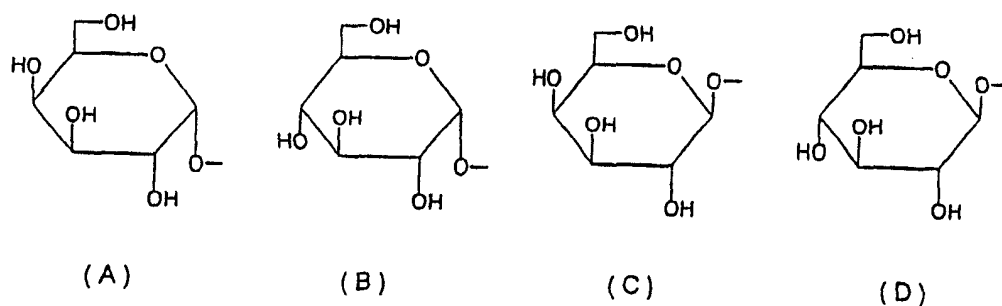
(D)

R^9 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 中的取代基:

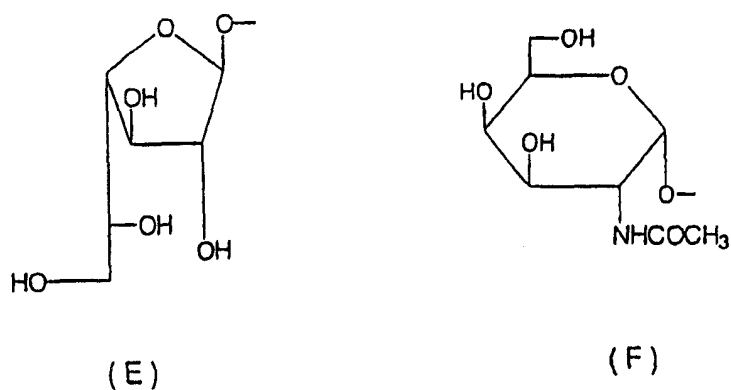


ii) 当 R^3 、 R^6 、及 R^7 是 H 时

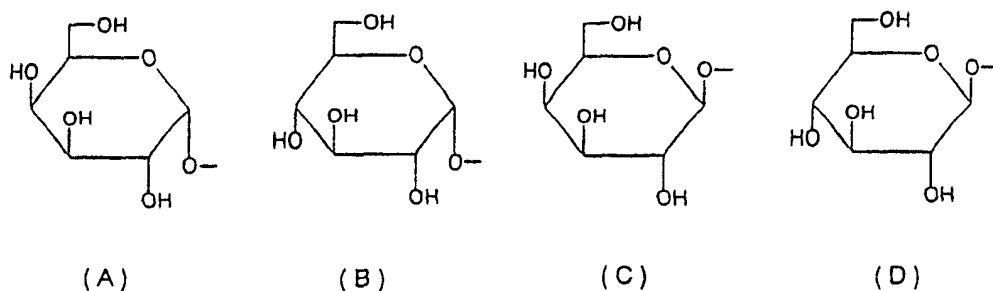
R^4 是 H、OH、 NH_2 、 $NHCOCH_3$ 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



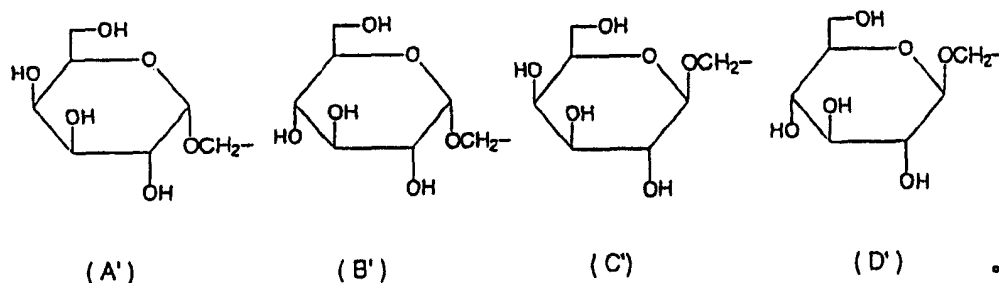
R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:



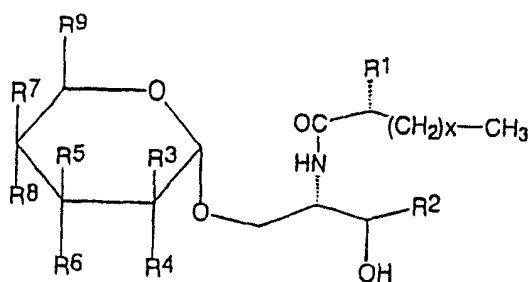
R^8 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



R' 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 组成的群体中选择的取代基:



4. 如权利要求 3 所述的细胞, 为肿瘤细胞。
5. 一种药物组合物, 其含有有效量的权利要求 3 所述细胞, 并用于治疗该细胞引起的疾病。
6. 用于治疗肿瘤的药物组合物, 含有有效量的权利要求 4 所述细胞。
7. 权利要求 3 所述细胞在制备用于治疗该细胞引起的疾病的药物中的应用。
8. 权利要求 4 所述细胞在制备用于治疗肿瘤的药物上的应用。
9. 式(I)的化合物或其盐或它们的溶剂合物在制备用于增强肿瘤细胞或病原体感染细胞的免疫原性的药剂中的应用,



(I)

上式中,

R^1 为 H 或 OH,

X 为 7-27 的任何一个整数,

R^2 为选自下述 (a) - (e) 中的取代基, 这里, Y 是 5-17 的任意整数

(a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

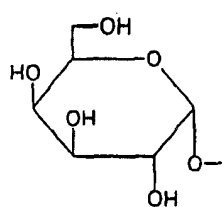
(d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, 而且

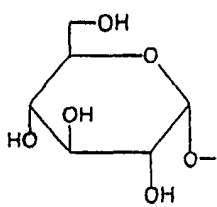
$R^3 - R^9$ 是在下述 i) 或 ii) 中的任意一种情况下定义的取代基:

i) 当 R^3 、 R^6 、及 R^8 是 H 时

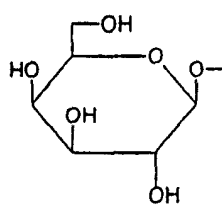
R^4 为 H、OH、 NH_2 、 NHCCH_3 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



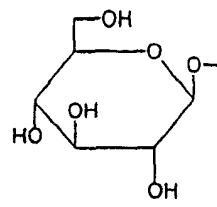
(A)



(B)

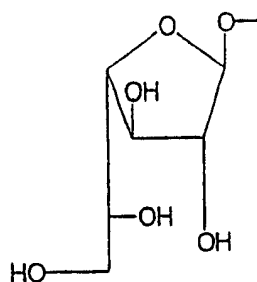


(C)

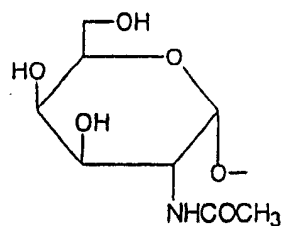


(D)

R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:

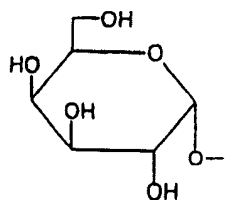


(E)

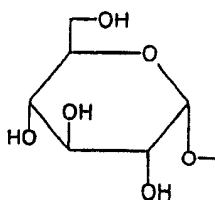


(F)

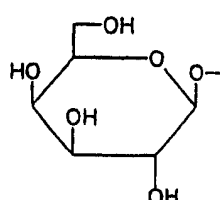
R^7 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



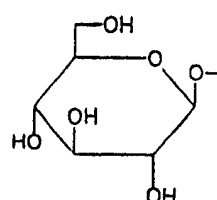
(A)



(B)

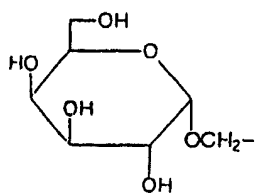


(C)

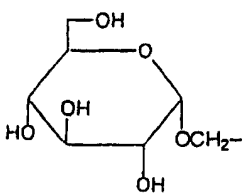


(D)

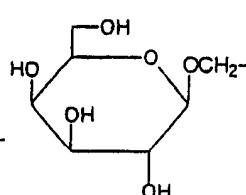
R^9 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 中的取代基:



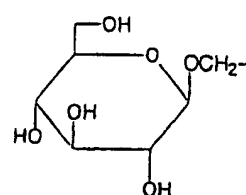
(A')



(B')



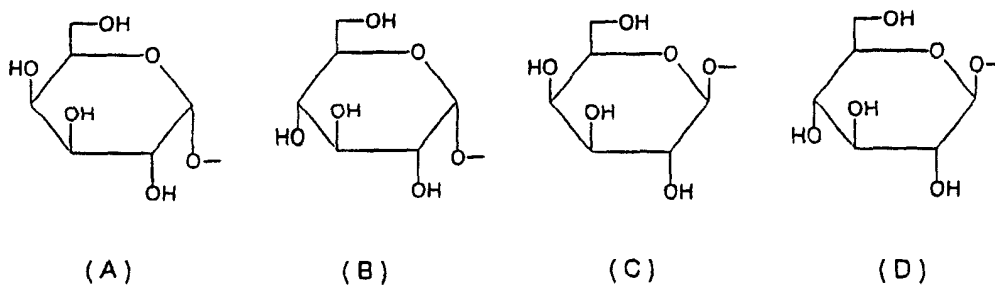
(C')



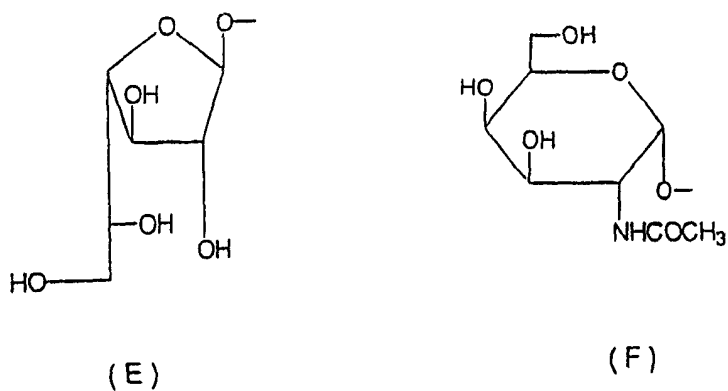
(D')

ii) 当 R^3 、 R^6 、及 R^7 是 H 时

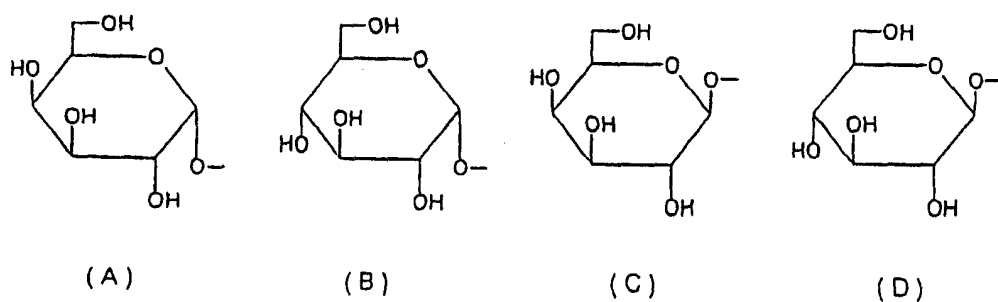
R^4 是 H、OH、 NH_2 、 $NHCOCH_3$ 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



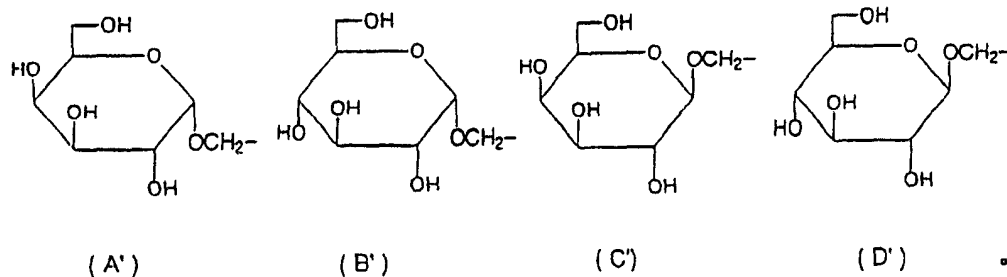
R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:



R^8 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



R^9 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 组成的群体中选择的取代基:



10. 如权利要求 9 所述的应用, 在式(I)化合物中 R^3 及 R^6 表示 H, R^4 表示 OH 或基团 (A) - (D) 中的任一取代基, R^5 表示 OH 或基团 (E) 或基团 (F) 取代基, R^7 及 R^8 分别表示 H 或 OH 中的任意一个, 但是, R^7 及 R^8 两者不能表示同一基团, R^9 表示 CH_2OH 、 CH_3 、H、或基团 (A') - (D') 中的任一取代基。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的应用, 式(I)化合物中 X 为 21 - 25 的整数, R^2 表示取代基 (b), 式中 Y 是 11 - 15。

12. 如权利要求 9 所述的应用, 式(I)化合物为 (2S, 3S, 4R) - 1 - (α -D-吡喃半乳糖氧基) - 2 - 二十六烷酰胺基 - 3, 4 - 十八烷二醇。

13. 如权利要求 9 所述的应用, 其中所述药剂用于增强肿瘤细胞的免疫原性。

14. 如权利要求 9 所述的应用, 其中所述药剂在体外使用。

15. 如权利要求 9 所述的应用, 其中所述药剂用来制备用于肿瘤疗法的肿瘤细胞。

含有 α -糖基神经酰胺的 用于增强细胞免疫原性的组合物

发明的背景

发明领域

本发明涉及通过具有 α -糖基神经酰胺结构的化合物来增强肿瘤细胞及病原体感染细胞的免疫原性的方法，更详细的说，涉及使用增强了免疫原性的肿瘤细胞的肿瘤治疗方法。

背景技术

通过给癌症患者接种采用化疗制剂及经放射线照射杀死的自己或非己的肿瘤细胞，在癌症宿主中诱导肿瘤特异免疫，从而有效治疗癌症的肿瘤治疗方法 (Tumor Therapy) 正在逐步对黑素瘤 (melanoma) (Mitchell, M. S. et al., J. Clin. Oncol., 8, 409(1990))、肾癌 (Neidart, J. A. et al., Cancer, 46, 1128(1980))、卵巢癌 (Freedman, R. S. et al., Gynecol. Oncol., 29, 337(1988))、大肠癌 (Hoover, H. C., Cancer, 55, 1236(1985)) 等癌症患者进行试验。但是，肿瘤细胞不同于生物体内的细菌类异物，是由原来宿主细胞改变了特征而产生的细胞，所以免疫原性低下。因此，不能得期望的效果，只不过可以认为对黑素瘤及肾癌等免疫原性比较高的癌种多少有一些效果 (Mullen, C. A. et al., in Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, eds. Pinedo, H. M. et al., (Elsevier Science B. V.), pp285-294(1996))。

近年来，伴随着分子生物学、基因工程学的发展，使基因的导入成为可能，已经尝试运用基因导入法使用导入与癌症相关抗原基因的肿瘤细胞的肿瘤治疗方法。也就是说，已经尝试把与肿瘤相关的抗原基因导入自身的肿瘤细胞或者如果这样比较困难时导入非己肿瘤细胞，将较原来肿瘤细胞提高了免疫原性的肿瘤细胞用于肿瘤治疗方法。但是，这种尝试由于可以鉴定为与肿瘤相关抗原的抗原极少，所以现状是只能在极有限的癌种中实施。(Conry, R. M., et al., Cancer Res., 54, 1164(1994))。进一步发现，癌症宿主的免疫力由于肿瘤细胞产生因子等而显著受损，所以只提高肿瘤细胞的抗原性，并不能得

到预期的治疗效果,莫不如重要的是修复癌症宿主的免疫力。因此,现在主要是尝试以下研究:通过接种导入了细胞因子基因及、适合主要组织的抗原基因、costimulatory molecule等的细胞,改善癌症宿主受损的免疫力,从而提高治疗效果的研究。例如,使用导入IL-2 (Connor, J. et al., J. Exp. Med., 177, 1127(1993))、IL-4 (Golumbek, P. T. et al., Science, 254, 713(1991))、IL-6 (Porgador, A. et al., Cancer Res., 52, 3679(1992))、IFN- γ (Belldegrun, A. et al., J. Natl. Cancer Inst., 85, 207(1993))、GM-CSF (Dranoff, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3539(1993))、IL-12(Tahara, H. et al., Gene Therapy, 2, 96(1995))等细胞因子基因的肿瘤细胞,或导入MHC class II及B7-1基因的肿瘤细胞 (Travis, J. et al., Science, 259, 310(1993); Basker, S. et al., J. Exp. Med, 181, 619(1995))的方法已有报道。

目前,世界上这种使用通过导入基因进行修饰的肿瘤细胞的肿瘤治疗方法正在尝试用于临床上(Roth, J. A., et al., J. Natl. Cancer Inst., 89, 21(1997))。但是,这种方法中基因的操作复杂(Pardoll, D. M., Immunol. Today, 14, 310(1993)),而且也不能得到令人满意治疗效果的充分有效导入基因的媒介物,这就要求进一步改善上述肿瘤治疗方法 (Mullen, C. A. et al., in Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, eds. Pinedo, H. M. et al. (Elsevier Science B. V.), pp285-294(1996))。

这里,生物体内存在各种糖与神经酰胺以 β 键结合的 β -糖基神经酰胺 (Svennerholm L. et al., Biochem. Biophys. Acta, 280, 626(1972); Karlsson, K. et al., Biochem. Biophys. Acta, 316, 317(1973))。另一方面,已知 α -糖基神经酰胺具有显著的免疫激活作用及抗肿瘤作用 (Morita, M. et al., J. Med. Chem., 38, 2176(1995)),以及 α -糖基神经酰胺的这些作用远远超出 β -糖基神经酰胺的作用 (Motoki, K. et al., Biol. Pharm. Bull., 18, 1487(1995))。而且,已知具有 α -糖基神经酰胺结构的化合物具有活化抗原提示细胞的作用,使用经具有 α -糖基神经酰胺结构的化合物活化的抗原提示细胞的抗原提示细胞疗法对癌症治疗是极为有效的 (Yamaguchi, Y. et al., Oncol. Res., 8, 399(1997))。另外,已知

具有 α -糖基神经酰胺结构的化合物在投到生物体内时,有防护放射线的作用 (Motoki, K. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 5, 2413 (1995)), 以及增加血小板数及白细胞数的作用 (Motoki, K. et al., Biol. Pharm. Bull., 19, 952 (1996))。

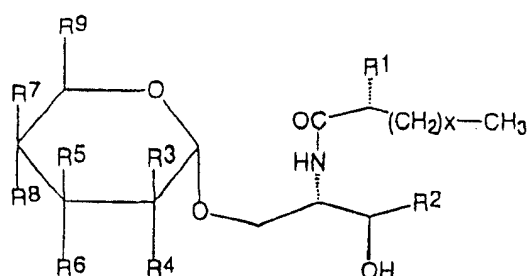
但是,关于用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞肯定对肿瘤疗法有效、以及 α -糖基神经酰胺能够增强肿瘤细胞的免疫原性,除本发明人知道以外尚未被报道。

发明概要

本发明者发现:在含有有 α -糖基神经酰胺结构的化合物的培养基中体外培养的肿瘤细胞具有高免疫原性,如果给与癌症动物该细胞或对该细胞进行放射线照射后的物质则能够得到显著的抗肿瘤效果,而且,由于该肿瘤细胞产生肿瘤的性质消失,所以在肿瘤治疗方面安全性也很优良。本发明就是基于这些发现完成的。

本发明的目的在于提供:能够简单制备对肿瘤治疗方法有效的肿瘤细胞用于增强肿瘤细胞免疫原性的组合物,能够简单制备对感染症等治疗有效的病原体感染细胞用于增强病原体感染细胞免疫原性的组合物,增强细胞免疫原性的方法,通过 α -糖基神经酰胺增强了免疫原性的细胞,含有上述细胞用于治疗这些细胞引起的疾病(特别是肿瘤)的药物组合物,上述细胞在制备上述药物组合物中的应用,以及由上述细胞引起的疾病(特别是肿瘤)的治疗方法。

而且,本发明中用于增强细胞免疫原性的组合物含有下式(I)的化合物或其盐或它们的溶剂合物:



(I)

(上式中,

R^1 为 H 或 OH,

X 为 7 - 27 的任何一个整数

R^2 为选自下述 (a) - (e) 中的取代基 (这里, Y 是 5 - 17 的任意整数)

(a) - $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(b) - $\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(c) - $\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

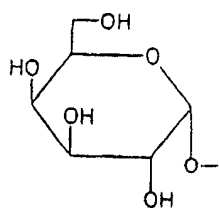
(d) - $\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$

(e) - $\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, 而且

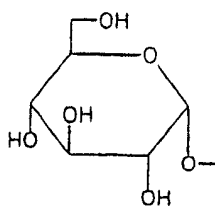
$R^3 - R^9$ 是在下述 i) 或 ii) 中的任意一种情况下定义的取代基:

i) 当 R^3 、 R^6 、及 R^8 是 H 时

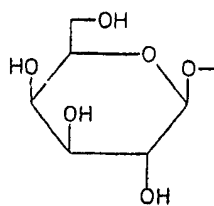
R^4 为 H、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



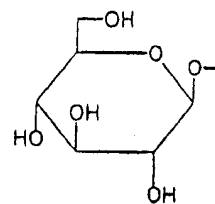
(A)



(B)

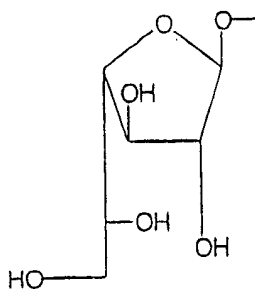


(C)

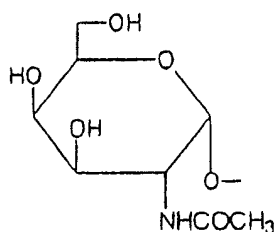


(D)

R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:

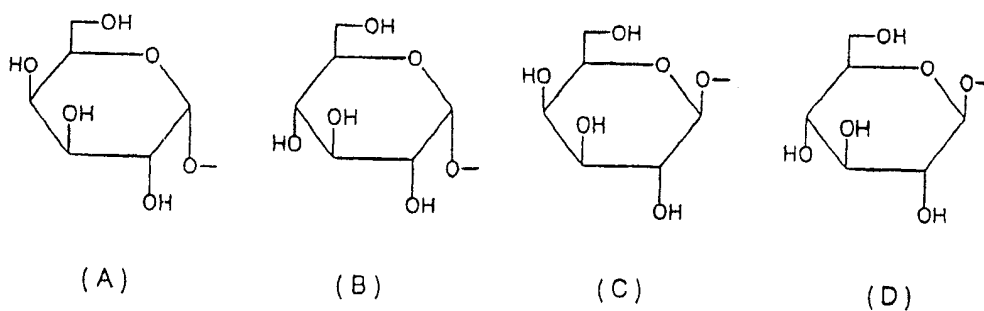


(E)

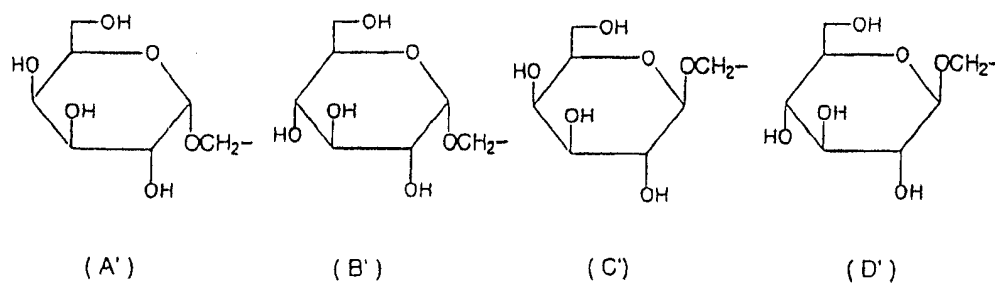


(F)

R^7 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:

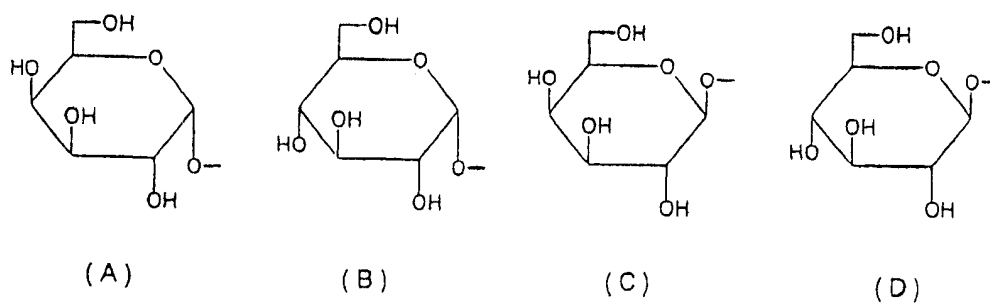


R^9 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 中的取代基:

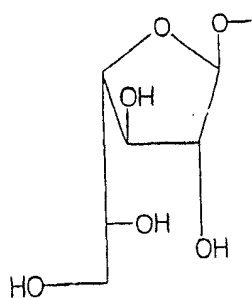


ii) 当 R^3 、 R^6 、及 R^7 是 H 时

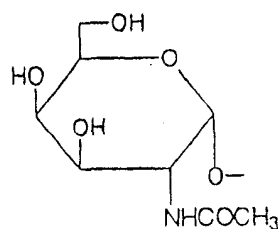
R^4 是 H、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



R^5 是 OH、或选自下述基团 (E) 及 (F) 的取代基:

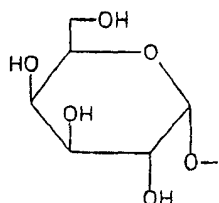


(E)

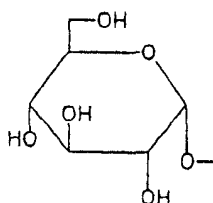


(F)

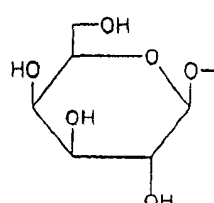
R^8 是 OH 或选自下述基团 (A) - (D) 中的取代基:



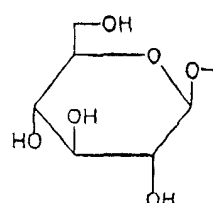
(A)



(B)

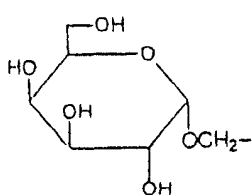


(C)

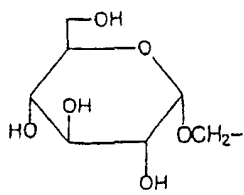


(D)

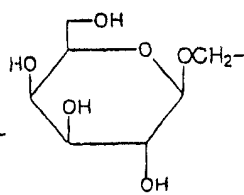
R^9 是 H、 CH_3 、 CH_2OH 、或选自下述基团 (A') - (D') 组成的群体中选择的取代基:)。



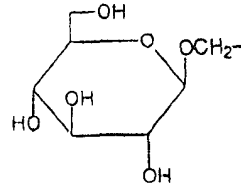
(A')



(B')



(C')



(D')

附图的简单说明

图 1 表示 α -糖基神经酰胺对肿瘤细胞免疫原性的效果。免疫原性以小鼠脾细胞的细胞损害活性为指标。○: 对照, ●: EL-4/V, □: EL-4/KRN, △: EL-4/583。

图 2 表示 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞对 EL-4 肝转移模型

小鼠的效果。○：对照，●：EL-4/V，□：EL-4/KRN，△：EL-4/583。

图3表示 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞对B16黑素瘤肺转移模型小鼠的效果。○：控制，●：B16/V，□：B16/KRN。

图4表示 α -糖基神经酰胺对肿瘤细胞产生肿瘤性的效果。○：未处理的肿瘤细胞，●：用媒介物处理的肿瘤细胞，■：用KRN7000处理的肿瘤细胞。

图5表示 α -糖基神经酰胺经放射线照射处理及未照射肿瘤细胞对B16肺转移模型的效果。○：对照，△：放射线未照射B16/V，□：放射线照射B16/V，▲：放射线未照射B16/K，■：放射线照射B16/K。

图6是表示本发明中所用 α -糖基神经酰胺化合物代表例(KRN7000)的合成反应路径的简图。

反应路线中pyr表示吡啶，BrPPh₃(CH₂)₁₂CH₃表示十三烷三苯基溴化磷，n-BuLi表示正丁基锂，MsCl表示甲磺酰氯，BnBr表示溴代苯甲基，1-PrOH表示丙醇。

图7表示接着图6的合成路线的简图。

反应路线中WSC-HCl是1-乙基-3-(3'-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺·盐酸盐，MS4A是分子筛4A，Hex4NBr是四己基溴化铵。

图8表示实施例1-3化合物的化学式。

图9表示实施例1-3化合物的化学式。是图8的继续。

发明的具体说明

式(I)的化合物

上述式(I)化合物中神经酰胺部分的X优选11-25的整数。

R²中的Y优选9-17的整数，更优选11-15。

式(I)的神经酰胺部分中的X及R²的优选组合是X为21-25的整数，R²表示取代基(b)(式中Y是11-15)的化合物。

式(I)的糖部分中R³-R⁹的优选组合是R³及R⁶表示H，R⁴表示OH或基团(A)-(D)中的任意取代基，R⁵表示OH或基团(E)或基团(F)的取代基，R⁷及R⁸分别表示H或OH中的任意一个(但是，R⁷及R⁸两者不能表示同一基团)，R⁹表示CH₂OH、CH₃、H、或基团(A')-(D')中的任意取代基的化合物。

更优选的组合例如R³及R⁶为H，R⁴及R⁵为OH，R⁷及R⁸各自为H

或 OH 中的任意一个(但是, R^7 及 R^8 两者不能表示同一基团), 而且 R^9 表示 CH_2OH 或基团 (A') - (D') 中的任意取代基的化合物, 以及 R^3 、 R^6 及 R^8 为 H, R^4 、 R^5 及 R^7 为 OH, 而且 R^9 为 CH_2OH 的化合物。

作为式 (I) 化合物优选的例子, 可以举出:

X 是 21 - 25 的整数,

R^2 是取代基 (b) (式中 Y 是 11 - 15 的整数),

R^3 和 R^6 是 H,

R^4 是 OH 或选自基团 (A) - (D) 中的基团,

R^5 是 OH 或选自基团 (E) 和 (F) 的基团,

R^7 及 R^8 分别是 H 或 OH (但是, 两者不表示同一基团),

R^9 是 CH_2OH 或选自基团 (A') - (D') 中的基团的化合物;

X 是 21 - 25 的整数,

R^2 是取代基 (b) (式中 Y 是 11 - 15 的整数),

R^3 及 R^6 是 H,

R^4 及 R^5 是 OH,

R^7 及 R^8 分别为 H 或 OH (但是, 两者不表示同一基团),

R^9 是 CH_2OH 或选自基团 (A') - (D') 中的基团的化合物; 以及

X 是 21 - 25 的整数,

R^2 是取代基 (b) (式中 Y 是 11 - 15 的整数),

R^3 、 R^6 及 R^8 是 H,

R^4 、 R^5 及 R^7 是 OH,

R^9 是 CH_2OH 的化合物。

作为增强细胞免疫原性的化合物, 优选的化合物是 (2S, 3S, 4R) - 1 - (α - D - 吡喃半乳糖氧) - 2 - 二十六烷酰胺基 - 3, 4 - 十八烷二醇 (KRN7000)。

式 (I) 的化合物可以是无毒性的可药用盐。式 (I) 化合物的盐如酸加成盐, 例如, 与无机酸 (例如盐酸、硫酸、硝酸、磷酸) 形成的盐, 或与有机酸 (醋酸、丙酸、马来酸、油酸、棕榈酸、柠檬酸、琥珀酸、酒石酸、富马酸、谷氨酸、泛酸、十二烷基磺酸、甲磺酸及邻苯二甲酸) 形成的盐。

式 (I) 化合物可以是溶剂合物 (例如水合物)。

式 (I) 化合物可以采用能达到合成 α - 糖基神经酰胺的目的的任

意方法制备。

首先，以 D- 来苏糖为原料合成神经酰胺部分，接着，通过在该神经酰胺中导入糖能够制得式 (I) 的化合物。关于这样合成 α - 糖基神经酰胺的一般方法，可以参照例如 W093/5055 号、W094/2168 号、W094/9020 号、及 W094/24142 号。

另外，式 (I) 的化合物也可以由自然界(生物等)通过柱色谱分析法分离·精制得到。

用于增强细胞免疫原性的组合物

式 (I) 的化合物对增强细胞免疫原性有效(药理实验例 1-5)。这里所谓“免疫原性”是指细胞在生物体内引起免疫应答的活性及通过其结果诱导产生的免疫系统来识别的活性。

本发明中用于增强免疫原性的组合物通过在体外与欲增强免疫原性的细胞的接触来使用。例如，向细胞培养基中加入本发明用于增强免疫原性的组合物，使式 (I) 化合物的最终浓度达到 0.1-10000ng/ml(优选 1-1000ng/ml)，培养该细胞 30 分钟-4 天(优选 3 小时-2 天)，能够增强细胞的免疫原性。细胞的培养条件及使用的培养基可以采用常规技术进行选择。

本发明用于增强细胞免疫原性的组合物能够以溶液、悬浊液、乳液形式添加到欲增强免疫原性的细胞培养液中。

这些各种溶液可以含有可药用载体或稀释剂等添加剂，具体的说是溶剂(例如水、生理盐水)、助溶剂(例如乙醇、聚山梨醇酯)、等渗剂、防腐剂、抗氧化剂、赋形剂(例如乳糖、淀粉、结晶纤维素、甘露醇、麦芽糖、磷酸氢钙、软质硅酸酐、碳酸钙)、粘合剂(例如淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素、阿拉伯胶)、稳定剂(例如乳糖、甘露醇、麦芽糖、聚山梨醇酯类、聚乙二醇类、聚氧乙烯硬化蓖麻油)、崩解剂(例如淀粉、羧甲基纤维素钙)、润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石粉、硬化油)等。

另外，必要时也可以添加甘油、二甲基乙酰胺、70% 乳酸钠、表面活性剂、碱性物质(例如乙二胺、乙醇胺、碳酸钠、精氨酸、葡甲胺、三氨基甲烷)。

如果把与式 (I) 化合物接触的肿瘤细胞投给小鼠，对该肿瘤细胞可以诱导免疫(细胞毒性活性)。另外，意外地发现对该肿瘤细胞以外

的肿瘤细胞也可以诱导免疫(细胞毒性活性)(参照药理实验例1)。

作为欲增强免疫原性的细胞可以举出肿瘤细胞与病原体感染细胞。它们可以是从小患有肿瘤的患者或被病原体感染的患者分离得到的物质,也可以是在体外人为制造的物质。

作为欲增强免疫原性的肿瘤细胞基本可以举出包括黑素瘤、肾癌、子宫癌、胰腺癌、脑肿瘤、成神经胶质细胞瘤、大肠癌、肺癌、肝癌、淋巴癌、白血病、纤维肉瘤等所有肿瘤,特别优选黑素瘤及肾癌。

另外,作为病原体感染细胞,可以举出病毒感染细胞。这里所谓的“病原体”包括衣原体、立克次氏体、单核细胞增多性李司特氏菌、利什曼原虫、锥虫、及朊病毒蛋白类病原因子。

按照本发明可以提供一种包括使细胞与式(I)化合物或其盐或其溶剂合物接触的增强细胞免疫原性的方法。细胞与式(I)化合物的接触可以按照与上述相同的方法进行。

免疫原性增强细胞

本发明的免疫原性增强细胞可以通过式(I)化合物或其盐或其溶剂合物与体外欲增强免疫原性的细胞接触而得到。免疫原性增强细胞的制备可以按照上述条件进行。

如果将增强了免疫原性的细胞作为抗原投给哺乳类动物,对该细胞的免疫得到强力诱导,从而能够治疗该细胞引起的疾病。

因此,按照本发明可以提供一种含有通过在体外与式(I)化合物或其盐或溶剂合物接触而得到的细胞的,用于治疗该细胞引起疾病的治疗药。在本说明书中,“治疗”也包括“预防”的意思。

另外,按照本发明可以提供一种包括投给通过在体外与式(I)化合物或其盐或溶剂合物接触而得到的细胞,以治疗该细胞引起疾病的治疗方法。

使用增强了免疫原性的某种肿瘤细胞作为有效成分时,能够治疗该肿瘤;使用增强了免疫原性的病原体细胞作为有效成分时,能够治疗其感染症。

如果将通过式(I)化合物增强免疫原性的肿瘤细胞投给生物体,对肿瘤细胞能够诱发产生强免疫力,其结果是通过生物体的免疫系统使肿瘤受到攻击,从而能够缩小或消灭肿瘤。本发明的肿瘤细胞不只

是黑素瘤类高免疫原性的肿瘤，对 T 淋巴肿瘤也能诱发产生强免疫力（参照药理实验例 2 及 3）。

因此，按照本发明可以提供一种含有通过在体外与式(I)化合物或其盐或溶剂合物接触而得到的肿瘤细胞（增强免疫原性的肿瘤细胞）的用于治疗肿瘤的药物组合物。

另外，按照本发明还可以提供一种包括投给增强了免疫原性的肿瘤细胞的肿瘤治疗方法。

本说明书中所谓的“肿瘤”包括黑素瘤、肾癌、子宫癌、胰腺癌、脑肿瘤、成神经胶质细胞瘤、大肠癌、肺癌、肝癌、淋巴瘤、白血病、纤维肉瘤等癌症。

另外，本说明书中所谓“用于治疗肿瘤的药物组合物”包括肿瘤疫苗及肿瘤细胞疫苗类肿瘤治疗药。

本发明中免疫原性增强细胞可以采用能达到目的的任何给药途径给药，具体的说可以通过腹腔内给药、皮下给药、静脉或动脉血管给药、通过注射的局部给药等方法给与。另外，人的场合，可以通过静脉给药、动脉给药、采用注射的局部给药、腹腔或胸腔给药、皮下给药、肌肉给药等方法给与。最优选静脉给药。

本发明中免疫原性增强细胞可以基于常规方法，以注射剂、悬浊剂、乳剂等形式给药，必要时，为了进一步增强细胞的免疫原性，可以悬浊到弗罗因德氏完全佐剂中，或者可以同时投给 BCG 类具有佐剂活性的物质。本发明中用于肿瘤治疗的药物组合物能够含有上述可药用载体或添加剂。

本发明药物组合物的各种有效成分可以根据个体的状况连续或间歇给药。具体的给药量随给药方法、患者的各种条件、例如年龄、体重、性别、敏感性、给药时间、联合用药等而变化。例如增强免疫原性的肿瘤细胞表现出其活性的必要给药量，如果是静脉给药，对成人是每日 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^9$ 个细胞/体重(kg)，优选 $1 \times 10^6 - 5 \times 10^8$ 个细胞/体重(kg)。免疫原性增强细胞，优选注射剂，可以直接投给预先调节到规定浓度的物质，或给药前用注射用生理盐水等稀释到规定浓度后给药。

本发明的免疫原性增强细胞在投给患者前，也可以先用通过放射线或有细胞毒性的药剂处理，从而使之灭亡（丧失增殖能力）。

实施例

结合以下的实施例详细说明本发明，但是本发明并不只限于此。

化合物的合成及分离·精制

实施例 1 (2S, 3S, 4R) - 1 - (α -D-吡喃半乳糖氧基) - 2 - 二十六烷酰胺基 - 3, 4 - 十八烷二醇 (KRN7000) 的合成

标题化合物的合成步骤如图 6 及 7 所示。

(1) 化合物 G1 的合成

向 D-来苏糖(200g、1.33ml)的用氯化钙干燥的丙酮溶液(3.0L)中加入硫酸(0.5mL)，室温下搅拌 18 小时。加入分子筛 4A 的粉末(100g)，中和反应液后，用硅藻土过滤，用丙酮洗涤残渣。合并滤液与洗涤液，减压浓缩，得到 G1 的粗产物。收量为 240g(95%)。不进行精制直接用于下一步。分析用样品以己烷：丙酮(9：1)为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法进行精制。

mp 76-78°C; FDMS m/z 191 ($M+1$)⁺; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ 5.45 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 4.83 (1H, dd, $J=3.7, 5.5$ Hz), 4.64 (1H, d, $J=6.1$ Hz), 4.27-4.30 (1H, m), 3.90-3.99 (2H, m), 1.48 (3H, s), 1.32 (3H, s)。

(2) 化合物 G2 的合成

向化合物 G1(239g、约 1.26mmol)的二氯甲烷溶液(168ml)中加入吡啶(10ml)、三苯甲基氯(39.0g)，32°C下搅拌 4 小时。滴加乙醇(8ml)，室温下搅拌 2 小时。用饱和氯化铵水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、食盐水洗涤后，减压浓缩。将残渣溶解于乙酸乙酯中，冷却到 0°C 使之结晶。收量为 501g(按 D-来苏糖计算为 87%)。

mp 174–176°C; FDMS m/z 432 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.21–7.49 (15H, m), 5.38 (1H, d, $J=2.4\text{ Hz}$), 4.75 (1H, dd, $J=3.7, 6.1\text{ Hz}$), 4.59 (1H, d, $J=6.1\text{ Hz}$), 4.31–4.35 (1H, m), 3.43 (1H, dd, $J=4.9, 9.8\text{ Hz}$), 3.39 (1H, dd, $J=6.7, 9.8\text{ Hz}$), 1.29 (3H, s), 1.28 (3H, s)。

(3) 化合物 G3 的合成

在 0°C、氩气环境中，向十三烷三苯基溴化磷(962g、1.16mol; 通过将 1-溴代十三烷、三苯基磷在 140°C 加热 4.5 小时制得)的 THF 溶液(1500ml)中滴加正丁基锂的 2.5M 己烷溶液(462mL; 366mmol)。滴加结束后，搅拌 15 分钟，滴加化合物 G2(250g、579mmol)的 THF 溶液(450ml)。一边慢慢将温度上升到室温，一边搅拌 18 个小时。减压浓缩反应液，向残渣中加入己烷：甲醇：水(10：7：3、1000ml)的混合液，用饱和氯化铵水溶液洗涤。用己烷(500ml)萃取水层，合并所有的有机层，用无水硫酸镁干燥后，减压浓缩，得到 G3 的粗产物。不进行精制直接用于下一步。收量为 339g(98%)。分析用样品以己烷：乙酸乙酯(9：1)为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法精制。

FDMS m/z 598 M^+ ; 1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$)
 δ 7.21–7.45 (15H, m), 5.48–5.59 (2H, m), 4.91 (0.7H, t, $J=7.3$ Hz), 4.44 (0.3H, t, $J=7.3$ Hz), 4.26 (0.3H, dd, $J=4.3, 7.3$ Hz), 4.21 (0.7H, dd, $J=4.3, 6.7$ Hz), 3.75 (0.7H, m), 3.69 (0.3H, m), 3.24 (0.3H, dd, $J=4.9, 9.8$ Hz), 3.17 (0.7H, dd, $J=4.9, 9.8$ Hz), 3.09–3.14 [1H, (3.11, dd, $J=4.9, 9.2$ Hz), H1bE overlapped], 1.75–2.03 (2H, m), 1.49 (3H, s), 1.39 and 1.38 (3H, each s), 1.21–1.34 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.7$ Hz)。

(4) 化合物 G4 的合成

向化合物 G3 (338g、约 565mmol) 的二氯甲烷溶液 (1500ml) 中加入吡啶 (500ml)，再滴加甲磺酰氯 (49ml、633mmol)，31℃ 下搅拌 24 小时。滴加乙醇 (40ml)，室温下搅拌 1 小时。减压浓缩后，向残渣中加入己烷：甲醇：水 (10: 7: 3, 1000ml) 的混合液，分液。用己烷 (200ml) 萃取水层 3 次，合并所有的有机层，用无水硫酸镁干燥后，减压浓缩，得到 G4 的粗生成物。不进行精制直接用于下一步。收量为 363g (95%)。分析用样品以己烷：乙酸乙酯 (9: 1) 为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法精制。

FDMS m/z 676 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3)
 δ 7.21–7.47 (15H, m), 5.41 (0.7H, ddd, $J=5$,
 5.9.2, 11.0Hz), 5.32 (0.7H, bt, $J=11.0\text{Hz}$),
 5.22 (0.3H, bdd, $J=9.2$, 15.0Hz), 5.02 (0.3
 H, dt, $J_t=7.3\text{Hz}$, $J_d=15.0\text{Hz}$), 4.8 (0.7H, ddd,
 $J=3.1$, 5.5, 7.9Hz), 4.73 (0.7H, dd, $J=5$,
 5.9.8Hz), 4.64–4.67 (0.3H, m), 4.61 (0.3H,
 dd, $J=5.5$, 9.2Hz), 4.48 (0.7H, dd, $J=5.5$, 7.
 9Hz), 4.22 (0.3H, dd, $J=5.5$, 9.2Hz), 3.55
 (0.3H, dd, $J=2.4$, 11.6Hz), 3.45 (0.7H, dd,
 $J=3.2$, 11.0Hz), 3.06–3.12 [4H, (3.12, s),
 (3.11, s), (3.09, dd, $J=3.1$, 11.0Hz)], 1.6
 6–1.82 (2H, m), 1.47 and 1.46 (3H, each s),
 1.39 (3H, s), 1.13–1.35 (20H, m), 0.88 (3H,
 t, $J=6.8\text{Hz}$)。

(5) 化合物 G5 的合成

向化合物 G4(362g、约 536mmol)的二氯甲烷溶液(1500ml)中加入甲醇(350ml), 再向其中滴加浓盐酸(200ml), 室温下搅拌 5 小时。向反应液中加入碳酸氢钠中和后, 过滤。减压浓缩滤液, 向残渣中加入乙酸乙酯, 用食盐水洗涤。用乙酸乙酯萃取水层, 合并所有的有机层, 用无水硫酸镁干燥后, 减压浓缩。通过己烷使之结晶。收量为 161g(由 G2 为 70%)。

mp 66–67°C; FDMS m/z 377 ($M-H_2O$)⁺; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃+D₂O) δ 5.86 (0.3H, dt, J_t = 7.3Hz, J_d = 14.7Hz), 5.77 (0.7H, dt, J_t = 7.3, J_d = 10.4Hz), 5.55 (0.3H, br. dd, J = 7.3, 14.7Hz), 5.49 (0.7H, bt, J = 9.8Hz), 4.91–4.97 (1H, m), 4.51 (0.7H, bt, J = 9.8Hz), 4.11 (0.3H, bt, J = 7.3Hz), 3.94–4.03 (2H, m), 3.67–3.73 [1H, (3.70, dd, J = 3.1, 6.7Hz), (3.69, dd, J = 3.1, 7.3Hz)], 3.20 and 3.19 (3H, each s), 2.05–2.22 (2H, m), 1.22–1.43 (20H, m), 0.88 (3H, t, J = 6.7Hz)。

(6) 化合物 G6 的合成

向化合物 G5 (160g、405mmol) 的 THF 溶液 (780ml) 中加入 5% 钨-硫酸钡 (16g), 在反应容器通入氢气后, 室温下搅拌 20 小时。用硅藻土过滤反应液后, 用氯仿: 甲醇的混合液 (1: 1) 洗涤。合并滤液与洗涤液, 减压浓缩。用乙酸乙酯使残渣结晶。收量为 146g (91%)。

$[\alpha]^{23}_D + 12^\circ$ (c 1, CHCl₃/MeOH = 1:1); mp 124–126°C; FDMS m/z 397 ($M+1$)⁺; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 4.93–4.96 (1H, m, H2), 3.91 (1H, dd, J = 6.7, 12.2Hz), 3.85 (1H, dd, J = 4.9, 12.2Hz), 3.54–3.60 (1H, m), 3.50 (1H, dd, J = 1.8, 8.5Hz), 3.19 (3H, s), 1.75–1.83 (1H, m), 1.53–1.62 (1H, m), 1.21–1.45 (24H, m), 0.89 (3H, t, J = 6.7Hz)。

(7) 化合物 G7 的合成

向化合物 G6 (145g、365mmol) 的 DMF 溶液 (1000ml) 中加入叠氮化钠 (47g、730mmol), 95℃ 下搅拌 4 小时。浓缩反应液, 向残渣中加入乙酸乙酯 (450ml), 用水洗涤。用乙酸乙酯再次萃取水层。合并所有的有机层, 用食盐水洗涤后, 用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 得到 G7 的粗产物。收量为 122g (97%)。不进行精制直接用于下一步。收量为 126g (95%)。分析用样品以己烷: 乙酸乙酯 (9: 1) 为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法精制。

$[\alpha]_D^{23} + 16.5^\circ$ (c 0.5, CHCl_3 -MeOH, 1:1); mp 92-93℃; FDMS m/z 344 ($M+1$)⁺; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 3.91 (1H, dd, $J=3.7, 11.6\text{Hz}$), 3.75 (1H, dd, $J=7.9, 11.6\text{Hz}$), 3.49-3.61 (3H, m), 1.50-1.71 (2H, m), 1.22-1.46 (24H, m), 0.90 (3H, t, $J=6.7\text{Hz}$)。

(8) 化合物 G8 的合成

向化合物 G7 (121g、约 352mmol) 的二氯甲烷溶液 (750ml) 中加入吡啶 (250ml)、三苯甲基氯 (124g、445mmol), 室温下搅拌 16 小时。滴加乙醇 (30ml), 室温下搅拌 30 分钟后, 用饱和碳酸氢钠水溶液、饱和氯化铵水溶液、食盐水洗涤后, 用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩。将残渣以己烷: 乙酸乙酯 (10: 1) 为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法精制。收量为 34.4g (由 G6 为 52%)。

$[\alpha]_D^{24} + 11.9^\circ$ (c 0.9, CHCl_3), FDMS m/z 585 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$) δ 7.24-7.61 (15H, m), 3.62-3.66 (2H, m), 3.51-3.57 (2H, m), 3.42 (1H, dd, $J=6.0, 10.4\text{Hz}$), 1.23-1.56 (26H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.7\text{Hz}$)。

(9) 化合物 G9 的合成

向化合物 G8 (33.5g, 57.3mmol) 的 DMF 溶液 (300ml) 中加入 60% 氢化钠 (5.5g, 作为 NaH 约 138mmol), 室温下搅拌 40 分钟。将反应液冷却至 0℃, 滴加溴化苯甲基 (15ml, 120mmol)。一边慢慢升温至室温, 一边搅拌 18 小时。向反应液中加入冰水 (100ml), 停止反应后, 用乙酸乙酯萃取。用食盐水洗涤萃取液 3 次, 合并所有的有机层, 用无水硫酸镁干燥后, 减压浓缩, 得到 G9 的粗产物。不进行精制直接用于下一步。收量为 42.2g (96%)。分析用样品以己烷: 乙酸乙酯 (100: 1) 为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法精制。

$[\alpha]_D^{24} + 9.8^\circ$ (c 1.0, CHCl_3), FDMS m/z 738 $(M-N_2)^+$; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.07-7.48 (2.5H, m), 4.57 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.44 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.41 (2H, s), 3.73-3.79 (1H, m), 3.46-3.56 (2H, m), 3.37 (1H, dd, $J=8.6, 10.4\text{Hz}$), 1.20-1.64 (2.6H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.7\text{Hz}$)。

(10) 化合物 G10 及 G11 的合成

向化合物 G9 (41.2g, 约 54mmol) 的 1-丙醇溶液 (250ml) 中加入甲醇 (30ml), 再加入 5% 钨碳 (4.1g)、甲酸铵 (27.1g, 4.3mol)。室温下搅拌 16 小时后, 用乙酸乙酯稀释, 用硅藻土过滤。减压浓缩滤液, 用乙酸乙酯溶解后, 用饱和碳酸氢钠水溶液、食盐水洗涤 3 次, 合并所有的有机层, 用无水硫酸镁干燥后, 减压浓缩, 得到 G10 的粗产物。收量为 38.9g (98%)。得到的 G10 不进行精制直接用于下一步。

向化合物 G10 的二氯甲烷溶液 (300ml) 中加入二十六烷酸 (22.4g, 56.5mmol)、WSC 盐酸盐 (12.6g, 64.6mmol), 加热回流 2 小时。冷却至室温后, 减压浓缩。向残渣中加入乙酸乙酯 (500ml), 用 0.5M 盐酸水溶液、食盐水、饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 再用食盐水洗涤。合并所有的有机层, 用无水硫酸镁干燥后, 减压浓缩, 得到 G11 的粗产物。收量为 53.2g (88%)。得到的 G11 不进行精制直接用于下

一步。分析用样品以己烷：乙酸乙酯(100: 1)为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法精制。

$[\alpha]_D^{24} + 5.3^\circ$ (c 0.4, CHCl_3) ; FDMS m/z 111
 8M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.20–7.38 (2
 5H, m), 5.57 (1H, d, $J=9.1\text{Hz}$), 4.80 (1H, d, J
 $=11.6\text{Hz}$), 4.48–4.50 (3H, m), 4.24–4.32 (1
 H, m), 3.83 (1H, dd, $J=3.0, 6.7\text{Hz}$), 3.43–3.
 51 (2H, m, H1a), 3.29 (1H, dd, $J=4.3, 9.8\text{Hz}$),
 1.92 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.28–1.60 (72H, m),
 0.88 (6H, t, $J=6.7\text{Hz}$)。

(11) 化合物 G12 的合成

向化合物 G11(52.2g、约 47mmol)的二氯甲烷溶液(180ml)中加入甲醇(36ml), 接着滴加 10% 盐酸甲醇溶液(3.0ml), 室温下搅拌 2 小时。用粉末状的碳酸氢钠(18g)中和反应液, 用硅藻土过滤。用二氯甲烷洗涤残渣。合并滤液与洗涤液, 用食盐水洗涤, 用无水硫酸镁干燥有机层后, 减压浓缩。将残渣加热溶解于丙酮中, 冷却至 0°C 使之沉淀进行精制。收量为 38.6g(由 G9 为 77%)。

$[\alpha]_D^{24} -29.7^\circ$ (c 0.7, CHCl_3) ; mp $75-76.5^\circ\text{C}$;
 FDMS m/z 876 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ
 7.30-7.47 (10H, m), 6.03 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$),
 4.72 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.66 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$),
 4.61 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.45 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$),
 4.12-4.17 (1H, m), 4.00 (1H, dt, $J_t=4.3$, $J_d=7.3\text{Hz}$), 3.67-3.72 (2H, m), 3.61
 (1H, ddd, $J=4.3, 8.6, 11.6\text{Hz}$), 1.94-2.05
 (2H, m), 1.15-1.69 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J=6.1\text{Hz}$)。

(12) 化合物 G13 的合成

1) 将 2, 3, 4, 6-四-0-苄基-D-吡喃半乳糖乙酸酯(79.8g)溶解在甲苯(160ml)及异丙醚(520ml)的混合液中, 冷却至 $-10-0^\circ\text{C}$ 。再向其中加入含有 2.0 当量 HBr 的异丙醚溶液(2.8mmol/ml、约 100ml)。在 $-10-0^\circ\text{C}$ 下搅拌约 90 分钟后, 向反应液中注入 5% 的碳酸氢钠水溶液, 搅拌, 中和过剩的 HBr。全部移至分液漏斗中, 分液后, 弃掉水层, 用 10% 氯化钠水溶液洗涤 2 次。减压浓缩, 得到 2, 3, 4, 6-四-0-苄甲基- α -D-吡喃半乳糖溴化物(GalBr)的糖浆。

2) 向化合物 G12(60.0g、68.6mmol)、四己基溴化铵(89.4g、206mmol)、分子筛 4A(60g)的甲苯溶液(420ml)中加入 DMF(140ml), 接着加入 GalBr(约 137mmol)的甲苯溶液(250ml), 室温下搅拌 72 小时。向反应液中加入甲醇(12ml), 搅拌 2 小时。用硅藻土过滤后, 用饱和碳酸氢钠水溶液、食盐水洗涤后, 用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩。向残渣中加入乙腈, 搅拌 2 小时, 得到沉淀。减压干燥得到的沉淀, 得到干燥粉末。以己烷: 乙酸乙酯(8: 1)为洗脱溶剂采用硅胶柱色谱法对其进行精制。收量为 70.9g(74%)。

$[\alpha]^{24}_{\text{D}} + 18.8^\circ$ (c 0.9, CHCl_3); mp $74-75^\circ\text{C}$; FD
MS m/z 1399 ($\text{M}+1$)⁺; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.21-7.37 (30H, m), 6.12 (1H, d, $J=9.0\text{Hz}$), 4.91 (1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.84 (1H, d, $J=3.7\text{Hz}$), 4.72-4.80 (4H, m), 4.35-4.65 (7H, m), 4.12-4.18 (1H, m), 3.99-4.05 (2H, m), 3.84-3.93 (4H, m), 3.73 (1H, dd, $J=3.7, 11.0\text{Hz}$), 3.47-3.51 (2H, m), 3.42 (1H, dd, $J=6.1, 9.1\text{Hz}$), 1.87-1.99 (2H, m), 1.18-1.70 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J=7.4\text{Hz}$).

(13) 化合物 KRN7000 的合成

向化合物 13 (60.0g, 42.9mmol) 中加入乙醇 (960ml), 使之悬浊, 再向其中加入 20% 氢氧化钡 (6.0g) 的乙醇悬浊液。再加入成为氢源的 4-甲基环己烯 (120ml, 93.5mmol), 加热回流 4 小时后, 过滤, 除去催化剂。将残渣用加热的乙醇洗涤。通过室温放置滤液而得到白色沉淀, 过滤沉淀, 减压干燥。将得到的粉末悬浊在乙醇: 水 (92: 8, 3.5L) 中, 边搅拌边加热溶解后, 通过室温放置再次沉淀。过滤沉淀, 减压干燥过滤得到的滤饼, 得到白色粉末。收量为 35.0g (95%)。

$[\alpha]^{23}_{\text{D}} + 43.6^\circ$ (c 1.0, pyridine); mp 189.5–190.5°C; negative FABMS m/z 857 (M-H)⁻; IR (cm⁻¹, KBr) 3300, 2930, 2850, 1640, 1540, 1470, 1070; ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ 8.47 (1H, d, J=8.5 Hz), 5.58 (1H, d, J=3.7 Hz), 5.27 (1H, m), 4.63–4.70 (2H, m), 4.56 (1H, m), 4.52 (1H, t, J=6.1 Hz), 4.37–4.47 (4H, m), 4.33 (2H, m), 2.45 (2H, t, J=7.3 Hz), 2.25–2.34 (1H, m), 1.87–1.97 (2H, m), 1.78–1.85 (2H, m), 1.62–1.72 (1H, m), 1.26–1.45 (66H, m), 0.88 (6H, t, J=6.7 Hz), ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ 173.2 (s), 101.5 (d), 76.7 (d), 73.0 (d), 72.5 (d), 71.6 (d), 71.0 (d), 70.3 (d), 68.7 (t), 62.7 (t), 51.4 (d), 36.8 (t), 34.4 (t), 32.1 (t), 30.4 (t), 30.2 (t), 30.03 (t), 30.00 (t), 29.93 (t), 29.87 (t), 29.81 (t), 29.76 (t), 29.6 (t), 26.5 (t), 26.4 (t), 22.9 (t), 14.3 (q)。

实施例 2 0-α-D-吡喃半乳糖基-(1→2)-0-α-D-吡喃半乳糖基-(1→1)-(2S, 3S, 4R)-2-氨基-N-[(R)-2-羟基二十四烷基]-1, 3, 4-十八烷三醇(S1140B-9)的分离及精制

将在冲绳县久米岛的水深 15–25m 的海底采集的海绵冷冻干燥, 用氯仿和甲醇的混合液萃取冷冻干燥的粉末 447.1g, 减压浓缩萃取液, 得到 51.28g 浸膏。将其用乙酸乙酯与水分液后, 用无水硫酸镁干燥上层与中层后, 减压浓缩, 分别得到 18.37g 与 9.44g 的馏分。由上层得到的馏分用 10% 水性甲醇与正己烷分液得到的醇层以及由中层得到的馏分合并, 浓缩后, 反复进行硅胶柱色谱分析, 从而在正

相 TLC 上得到单一的活性成分 169.9mg。再用 ODS-AM 柱 (YMC 制、250mmx 20mm 径, 甲醇, 9.0ml/min) 的反相 HPLC 精制 (保留时间: 30.3 分), 得到纯的标题化合物 (S1140B-9) 10.2mg。

另外, 标题化合物也可以参照 F. Cafieri et al., Liebigs Ann. Chem. 1995, 1477-1481 进行分离·精制。

negative FABMS m/z 1007 $[(M-H)^-]$; IR;
 ^1H NMR (500MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 24°C) δ (ppm) 8.55 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$, NH), 5.60 (1H, d, $J=3.7\text{Hz}$, H1''), 5.57 (1H, d, $J=3.7\text{Hz}$, H1'''), 5.13 (1H, m, H2), 4.75 (1H, dd, $J=3.7, 10.4\text{Hz}$, H2''), 4.62 (2H, m), 4.54 (4H, m), 4.25-4.47 (10H, m), 2.17 (2H, m), 1.99 (1H, m), 1.87 (2H, m), 1.75 (1H, m), 1.65 (2H, m), 1.12-1.49 (60H, m), 0.85 (6H, m, terminal methyl); ^{13}C NMR (125MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 45°C) δ (ppm) 175.5 (s, C1'), 99.5 (d, C1'''), 98.6 (d, C1''), 76.7 (d, C2''), 76.0 (d, C3), 72.8 (d, C4), 72.6 (d, C5''), 72.6 (d, C4''), 72.5 (d, C2), 71.3 (d, C3'''), 71.0 (d), 70.8 (d), 70.5 (d, C2'''), 69.7 (d, C3''), 68.6 (t, C1), 62.7 (t), 62.5 (t), 51.2 (t, C2), 39.4 (t), 35.6 (t), 33.7 (t), 32.2 (t), 30.5 (t), 30.3 (t), 30.1 (t), 30.0 (t), 29.7 (t), 29.6 (t), 26.7 (t), 26.0 (t), 23.0 (t), 22.9 (t), 14.3 (q, terminal methyl)。

实施例 3

下面左栏记载的化合物，按照其右栏文献中记载的方法合成。

化合物名称	文献名
(2S, 3R) - 1 - (α -D-吡喃半乳糖氧基) - 2 - 十四烷酰胺基 - 3 - 十八烷醇 (AGL - 517)	W093/5055
(2S, 3R) - 1 - (α -D-吡喃葡萄糖氧基) - 2 - 十四烷酰胺基 - 3 - 十八烷醇 (AGL - 563)	W094/9020
(2S, 3R) - 1 - (6' - 脱氧 - α -D-吡喃半乳糖氧基) - 2 - 十四烷酰胺基 - 3 - 十八烷醇 (AGL - 571)	W094/9020
(2S, 3R) - 1 - (β -L-吡喃阿拉伯糖氧基) - 2 - 十四烷酰胺基 - 3 - 十八烷醇 (AGL - 577)	W094/9020
0 - α -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 6) - 0 - α -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 1) - (2S, 3S, 4R) - 2 - 氨基 - N - 二十六烷酰基 - 1, 3, 4 - 十八烷三醇 (AGL - 586)	W094/24142
0 - α -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 6) - 0 - α -D-吡喃葡萄糖基 - (1 $\rightarrow$ 1) - (2S, 3S, 4R) - 2 - 氨基 - N - 二十六烷酰基 - 1, 3, 4 - 十八烷三醇 (AGL - 584)	W094/24142
0 - α -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 3) - 0 - α -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 1) - (2S, 3S, 4R) - 2 - 氨基 - N - [(R) - 2 - 羟基二十四烷酰基] - 1, 3, 4 - 十八烷三醇 (719 - 7)	W094/24142
0 - (N - 乙酰基 - 2 - 氨基 - 2 - 脱氧 - α -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 3) - 0 - [α -D-吡喃葡萄糖基 - (1 $\rightarrow$ 2)] - 0 - α -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 1) - (2S, 3S, 4R) - 2 - 氨基 - N - [(R) - 2 - 羟基二十四烷酰基] - 1, 3, 4 - 十八烷三醇 (STL - 8)	W094/24142
(2S, 3S, 4R) - 1 - (β -D-吡喃半乳糖氧基) - 2 - 二十六烷酰胺基 - 3, 4 - 十八烷二醇 (AGL583)	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 5. No. 7, pp699 - 704 (1995)

式(I)的化合物与上述实施例记载的化合物(除 AGL583 之外)之间的对应如下述表 1 所示。

表 1

化合物名	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
KRN7000	23	H	(b)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₂ OH
AGL517	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₂ OH
AGL563	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	H	OH	CH ₂ OH
AGL571	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₃
AGL577	11	H	(a)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	H
AGL586	23	H	(b)Y=13	H	OH	OH	H	OH	H	基团(A')
AGL584	23	H	(b)Y=13	H	OH	OH	H	H	OH	基团(A')
S1140B-9	21	OH	(b)Y=13	H	基团(A)	OH	H	OH	H	CH ₂ OH
719-7	21	OH	(b)Y=13	H	OH	基团(E)	H	OH	H	CH ₂ OH
STL-8	23	OH	(b)Y=13	H	基团(B)基团(F)	H	OH	H	H	CH ₂ OH

生物学实验

药理实验 1: α -糖基神经酰胺对肿瘤细胞免疫原性的效果

使用由日本 SLC 株式会社购买的 C57BL/6 小鼠进行实验。作为具有 α -糖基神经酰胺结构化合物的代表, 在以下实验中使用实施例 1 合成的 KRN7000。另外, 作为阴性对照, 使用实施例 3 合成的具有 β -糖基神经酰胺构造的化合物 AGL-583。

首先研究媒介物、KRN7000 及 AGL-583 对肿瘤细胞的免疫原性的效果。对肿瘤细胞使用小鼠 T 淋巴肿瘤 EL-4 细胞(大日本制药株

式会社),使之浮游在含有10%FCS(牛胎儿血清)、谷氨酸及抗生素的RPMI1640培养基中,在体外进行培养。用各种药剂开始进行处理时,回收EL-4细胞,在新鲜的培养基中接种后,立即在体外添加媒介物(0.1%、DMSO)、KRN7000(100ng/ml)、或AGL-583(100ng/ml),培养1天。1天后,回收在媒介物、KRN7000或AGL-583共存的情况下培养的EL-4/V、EL-4/KRN或EL-4/583 3种肿瘤细胞,用培养基洗涤2次后,再次悬浊于新鲜培养基中,对C57BL/6小鼠(8周龄,雌性)按照 5×10^5 细胞数/小鼠的比例由尾静脉接种。3天后,制备(1)什么都未接种的健康正常小鼠(对照)的脾细胞、(2)接种EL-4/V的小鼠的脾细胞、(3)接种EL-4/KRN的小鼠的脾细胞、或(4)接种EL-4/583的小鼠的脾细胞分别作为效应细胞。另外,靶细胞使用的是用 ^{51}Cr 标记的YAC-1(大日本制药株式会社)及EL-4小鼠肿瘤细胞,将效应细胞与目标细胞接种到培养板上,使E/T(效应细胞/靶细胞)的比达到25:1、50:1以及100:1,培养4小时后,用 γ -计数器测定 ^{51}Cr 的游离量,按下式计算出各小鼠脾细胞的细胞抑制活性。

$$\text{细胞抑制活性(\%)} = \frac{(\text{实验游离量} - \text{自然游离量})}{(\text{最大游离量} - \text{自然游离量})} \times 100$$

这里,最大游离量表示添加HCl进行培养时的 ^{51}Cr 游离量,自然游离量表示不添加任何物质进行培养时的 ^{51}Cr 游离量,另外,实验游离量表示添加各种脾细胞时的 ^{51}Cr 游离量。结果如图1所示。

如图1A所示,对接种了EL-4/V及EL-4/583小鼠脾细胞YAC-1的细胞抑制活性,与什么都未接种的正常小鼠的活性相比,基本上没有变化。与此相对,接种了EL-4/KRN的小鼠脾细胞则表现出非常显著的细胞抑制活性。

另一方面,对于EL-4,如图1B所示,即使是接种了EL-4/V及EL-4/583的小鼠脾细胞,与健康正常小鼠脾细胞相比也具有较高的细胞抑制活性,而接种了EL-4/KRN的小鼠脾细胞则有更高的细胞抑制活性。

由以上结果可以判断出,通过添加 α -糖基神经酰胺培养肿瘤细胞,肿瘤细胞免疫原性增加,结果对于接种该物质的小鼠,能够诱导产生非常强的肿瘤免疫。另外,接种了EL-4/V及EL-4/583的小鼠脾细胞中,只不过诱导产生一些对EL-4的免疫力,即肿瘤特异的抗

肿瘤免疫；但是对于接种了 EL-4/KRN 的小鼠，诱导产生了对 EL-4、对 NK 感应细胞 YAC-1 也非常强的肿瘤免疫。由此可知不只诱导特异免疫，也诱导非特异免疫。

药理实验例 2: 用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞对 EL-4 肝转移模型小鼠的治疗效果

由药理实验例 1 的结果，可以看出 α -糖基神经酰胺能够增强肿瘤细胞的免疫原性，所以，接着研究通过用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞接种，对原来存在的肿瘤细胞是否具有抗肿瘤效果，即接种增强了免疫原性的肿瘤细胞实际上是否为有效的肿瘤治疗方法 (Tumor Therapy)。

即，一组 6 只 BDF1 小鼠 (6 周龄、雌性) (日本 SLC 株式会社)，由尾静脉移植小鼠 T 淋巴肿瘤 EL-4 细胞 4×10^5 细胞数/小鼠，制成患癌小鼠，以移植日为第 0 天。另一方面，同一天，按照上述药理实验例 1 所示的方法，向接种于新鲜培养基中的 EL-4 细胞中添加媒介物 (0.1%、DMSO)、KRN7000 (100ng/ml)、或 AGL-583 (100ng/ml)。培养开始 1 天后，回收在媒介物、KRN7000 或 AGL-583 共存的条件培养下培养的 EL-4/V、EL-4/KRN 或 EL-4/583，用培养基洗涤 2 次后，分别以 1×10^5 细胞数/小鼠的比例由患癌小鼠尾静脉接种，比较研究各自的抗肿瘤效果。

另外，对移植了 EL-4 的小鼠，在以肝脏为主的脏器中形成肿瘤，小鼠 30 天左右死亡。因此，通过观察癌症宿主的存活期来判断抗肿瘤效果。结果如图 2 所示。

如图 2 所示，给患癌小鼠接种用媒介物或 AGL-583 刺激的肿瘤细胞的组中，与只移植肿瘤的对照组相比，其存活期完全没有延长，确认没有明显的抗肿瘤效果。与此相对，接种用 KRN7000 刺激的肿瘤细胞的组中，其存活期显著延长，33.3% 的小鼠长期存活。

由以上结果可以看出，即使在肿瘤治疗方法中应用用媒介物或具有 β -糖基神经酰胺结构的化合物 AGL-583 处理的肿瘤细胞，也不能得到充分的效果，与此相对，通过在肿瘤治疗方法中应用添加具有 α -糖基神经酰胺结构的化合物 KRN7000 培养的肿瘤细胞，能够得到显著的抗肿瘤效果。因此，说明用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞对肿瘤治疗方法有效。

药理实验例 3: 用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞对 B16 黑素瘤肺转移模型小鼠的治疗效果

进一步, 用 α -糖基神经酰胺处理与药理试验 2 不同的肿瘤细胞 B16 黑素瘤(大日本制药株式会社), 研究这种肿瘤细胞在肿瘤治疗方法中是否有效。

即, 一组 6 只 BDF1 小鼠(6 周龄、雌性), 由尾静脉移植小鼠 B16 黑素瘤细胞 4×10^5 细胞数/小鼠, 制成患癌小鼠, 以移植日为第 0 天。按照上述药理实验例 2, 同日在体外添加媒介物(0.1%、DMSO)或 KRN7000(100ng/ml), 开始 B16 的培养。第 1 天, 回收在媒介物或 KRN7000 共存的条件下培养 1 天的 B16/V 或 B16/KRN, 用培养基洗涤 2 次后, 按照 1×10^5 细胞数/小鼠的比例由上述患癌小鼠尾静脉接种, 比较各自的抗肿瘤效果。

另外, 移植 B16 的小鼠在肺部形成肿瘤, 最终会在 30 天至 60 天死亡。因此, 通过观察其存活期来判断抗肿瘤效果。结果如图 3 所示。

如图 3 所示, 接种 B16 组中, 与只移植肿瘤的对照组相比, 完全没有抗肿瘤效果, 而存活期与对照组相比有缩短的倾向。与此相对, 接种 B16/KRN 的组中, 确认有显著的抗肿瘤效果, 半数(50%)小鼠存活至肿瘤移植后 70 天。

由以上结果说明, 在使用药理实验 2 以外的肿瘤细胞时, 通过给患癌小鼠接种用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞, 能够得到显著的抗肿瘤效果。因此, 说明用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞对肿瘤治疗方法有效。

药理试验 4: α -糖基神经酰胺对肿瘤细胞产生肿瘤性的效果

根据药理试验 2 和 3 的结果可知用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞对患癌小鼠可以发挥抗肿瘤效果。这里, 在通常的肿瘤治疗方法中, 通过放射线照射等处理使之丧失增殖能力后接种的方法是常规方法, 如果不这样的话, 接种的肿瘤疫苗自身就会形成肿瘤。实际上, 药理试验 3 的结果说明接种了用媒介物处理的肿瘤细胞的小鼠其存活期是非常短的, 有缩短的趋势。与此相对, 对于用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞, 确认不仅存活期延长, 而且还有完全治愈的病例。因此, 认为用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞即使不通过放射线照射等处理使之丧失增殖能力也可以用作肿瘤疫苗, 对于其肿瘤形成能

力(产生肿瘤性)的确认是必要的。因此,研究了关于 α -糖基神经酰胺对各种小鼠肿瘤产生肿瘤性的影响。

也就是说,按照上述药理试验,通过添加媒介物(0.1% DMSO)或 KRN7000(100ng/ml)或不添加,将来自 C57BL/6 小鼠的肿瘤——小鼠黑色素瘤 B16 细胞(大日本制药株式会社)、小鼠 T 淋巴癌 EL-4 细胞(大日本制药株式会社)和小鼠肺癌 lewis lung carcinoma 细胞(大日本制药株式会社)的 3 种肿瘤细胞和来自 BALB/c 小鼠的肿瘤——小鼠大肠癌 Colon26 细胞(财团法人 癌研究会)、小鼠白血病 L1210 细胞(财团法人 癌研究会)和小鼠纤维肉瘤 Meth A 细胞(财团法人 癌研究会)的共计 6 种小鼠肿瘤细胞培养 1 日。将各种肿瘤细胞用培养基洗涤 2 次后,再次悬浊于新鲜的培养基中,由同系小鼠的尾静脉移植。对于 B16、EL-4、LLC,分别按照 5×10^5 细胞数/小鼠、 1×10^5 细胞数/小鼠、 5×10^5 细胞数/小鼠的比例移植给 C57BL/6 (9 周龄,雌性),对于 Colon26、MethA、L1210,分别按照 2×10^6 细胞数/小鼠、 1×10^5 细胞数/小鼠、 5×10^5 细胞数/小鼠的比例移植给 BALB/c 小鼠(9 周龄,雌性)。

由尾静脉移植的各种肿瘤细胞在肝脏或以肺为主体的脏器中形成转移结节,最终死亡。因此,通过观察存活期考察对产生肿瘤性的影响。

如图 4 所示,移植了用未添加即普通培养基培养的各种肿瘤细胞的小鼠所有病例全部死亡,其产生肿瘤性为 100%。同样,移植了在媒介物存在下培养 1 日的各种肿瘤细胞的小鼠也是所有病例全部死亡,其产生肿瘤性为 100%。与此相对,接种了在 KRN7000 存在下培养 1 日的各种肿瘤细胞的组中,有 40~100% 的小鼠存活,其产生肿瘤性减少或者消失。

由以上可知通过添加以 KRN7000 为代表的 α -糖基神经酰胺进行培养,肿瘤细胞的产生肿瘤性显著降低。另外,对于 KRN7000 对肿瘤细胞是否显示增殖抑制活性进行了研究。结果是在与药理试验 4 相同的条件下添加 KRN7000 进行培养的肿瘤细胞与未添加或添加媒介物进行培养的肿瘤细胞具有同样的增殖能力。因此,认为这种效果不是由于直接作用于肿瘤细胞的细胞毒性造成的,而是由于其它作用造成的。

这样,接种用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞时,即使不通过放射线照射使之丧失增殖能力,作为肿瘤疫苗也是有效的。因此,如果概括药理试验 1 至 4 的结果,可以认为接种用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞,接种的肿瘤细胞自身可以通过宿主的免疫几乎完全排除,同时通过使宿主的免疫细胞活化,即使对原来存在的肿瘤也可以诱导抗肿瘤免疫。

另外,在该研究中,对药理试验 1 至 3 使用的肿瘤细胞以外也进行了研究,证明通过用 α -糖基神经酰胺处理,所有肿瘤细胞的产生肿瘤性均减少或降低。用 α -糖基神经酰胺处理的 B16 和 EL-4 的治疗效果可以认为与其产生肿瘤性的降低密切相关,对于 B16 和 EL-4 以外的肿瘤细胞也可以治疗肿瘤。

药理试验 5: 用 α -糖基神经酰胺处理而且用放射线照射的肿瘤细胞对 B16 黑素瘤肺转移模型小鼠的治疗效果

由药理试验 2~4 的结果可知用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞即使不通过放射线照射或化疗药等处理使之死亡,作为肿瘤疫苗也是有效的。但是,在通常的肿瘤治疗方法中,常常使用经放射线照射等使之死亡的更安全的肿瘤疫苗。因此,对于用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞经放射线照射后接种到患癌小鼠时是否可以得到治疗效果进行了研究。

C57BL/6 小鼠(9 周龄,雌性)1 组 7 只,按 5×10^5 细胞/小鼠的比例经尾静脉移植小鼠 B16 黑素瘤细胞,制成患癌小鼠,这一天称为第 0 天。另外,在同一天按照药理试验 4 向接种于新鲜培养基中的 B16 细胞中体外添加媒介物(0.1% DMSO)或 KRN7000(100ng/ml),开始培养。第 1 天,回收在媒介物或 KRN7000 共存下培养 1 天的 B16/V 或 B16/KRN,用 PBS(Phosphate buffered saline)洗涤 2 次。然后,将得到的细胞分为 200Gy 放射线照射组和未照射组 2 组,按照 1×10^5 细胞/小鼠的比例由上述患癌小鼠的尾静脉接种,比较各种抗肿瘤效果。

如图 5 所示,对于接种 B16/V 的组,无论是否用放射线照射,与仅移植肿瘤的对照组相比,确认完全没有抗肿瘤效果。另一方面,对于接种 B16/KRN 的组,不管是否用放射线照射,都有显著的抗肿瘤效果,约 60~70% 的小鼠存活到肿瘤移植后 50 天。

从以上结果可知，如药理试验 2 和 3 的场合，对于用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞，与未用放射线照射的场合相同，用放射线照射的场合也可以得到显著的抗肿瘤效果。因此，判断出对于用 α -糖基神经酰胺处理的肿瘤细胞，通过进一步用放射线照射等处理，可以更安全的用于肿瘤治疗。

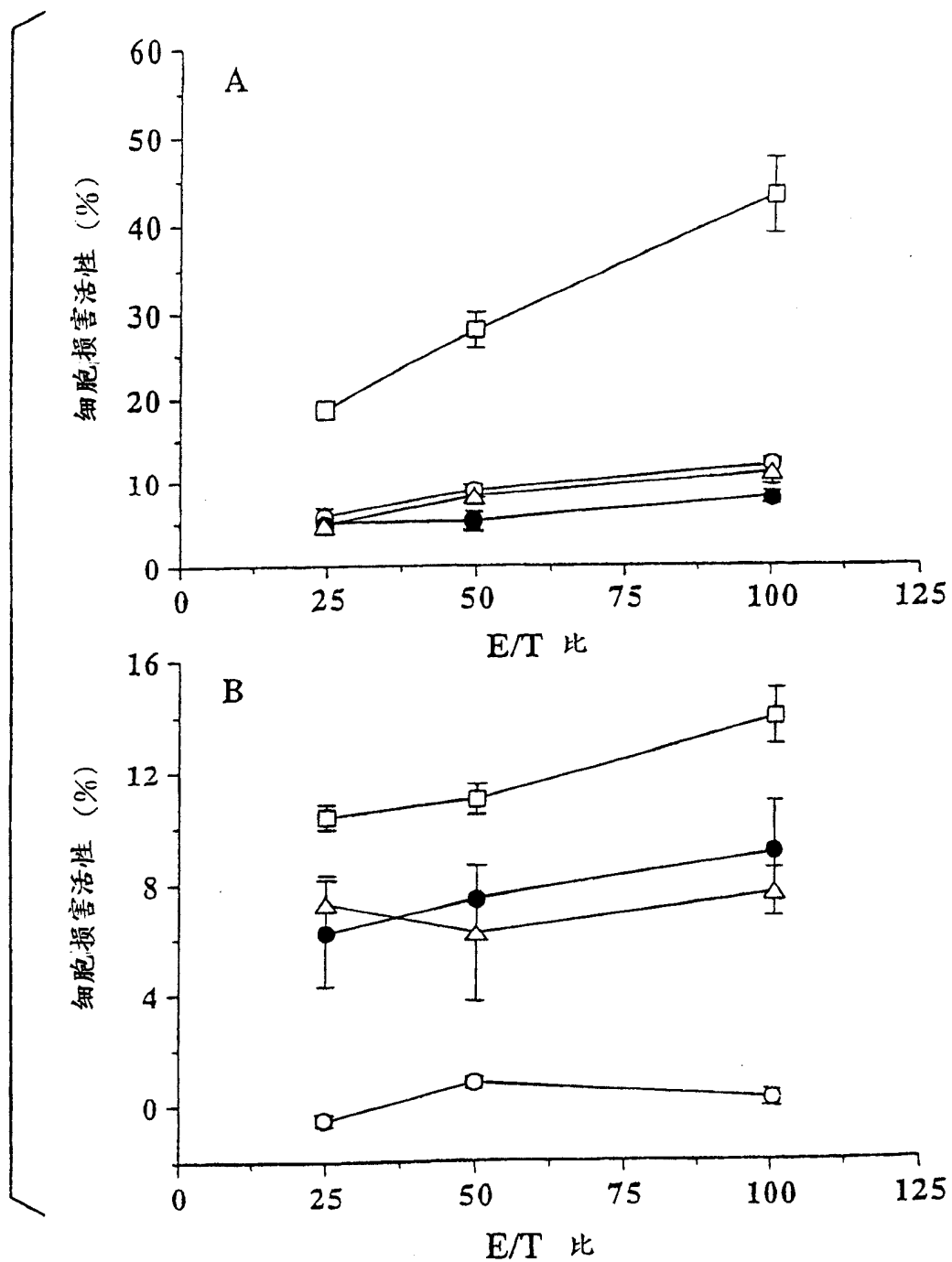


图 1

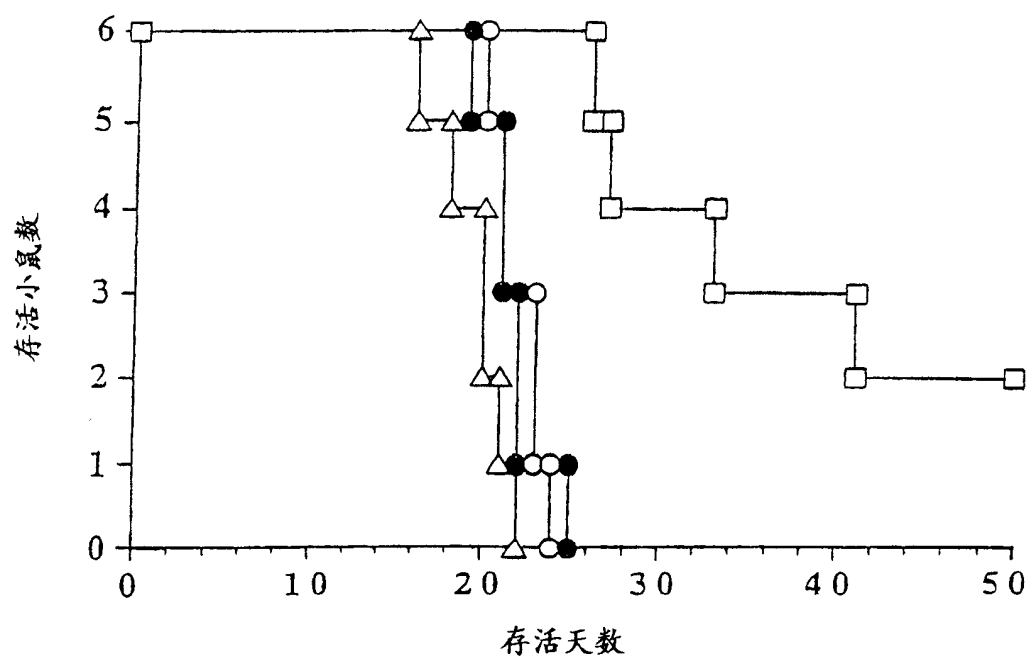


图 2

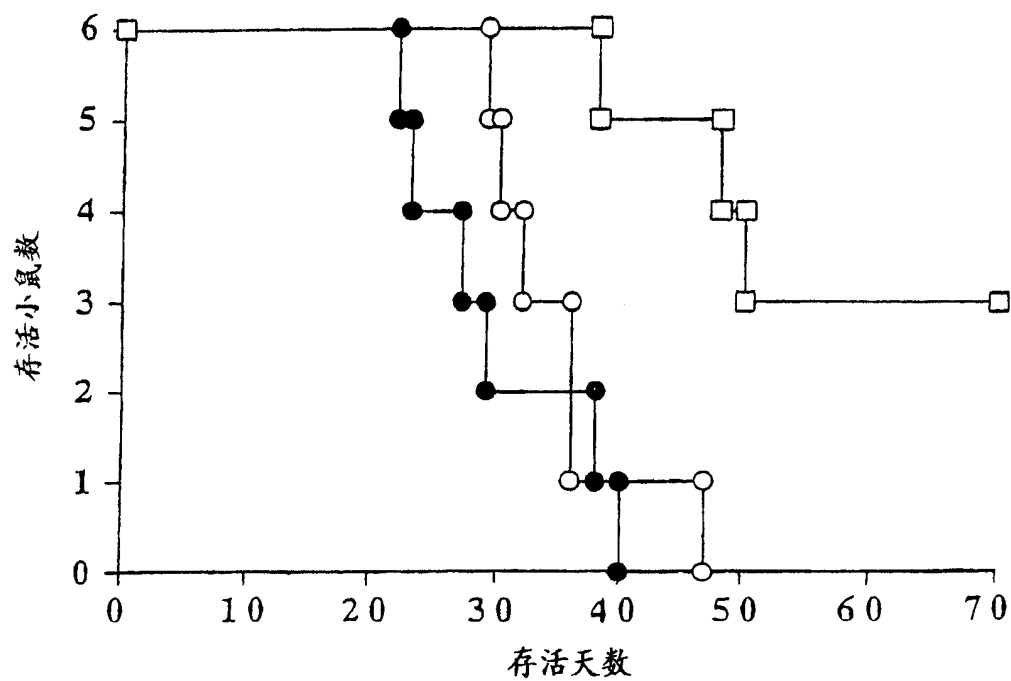


图 3

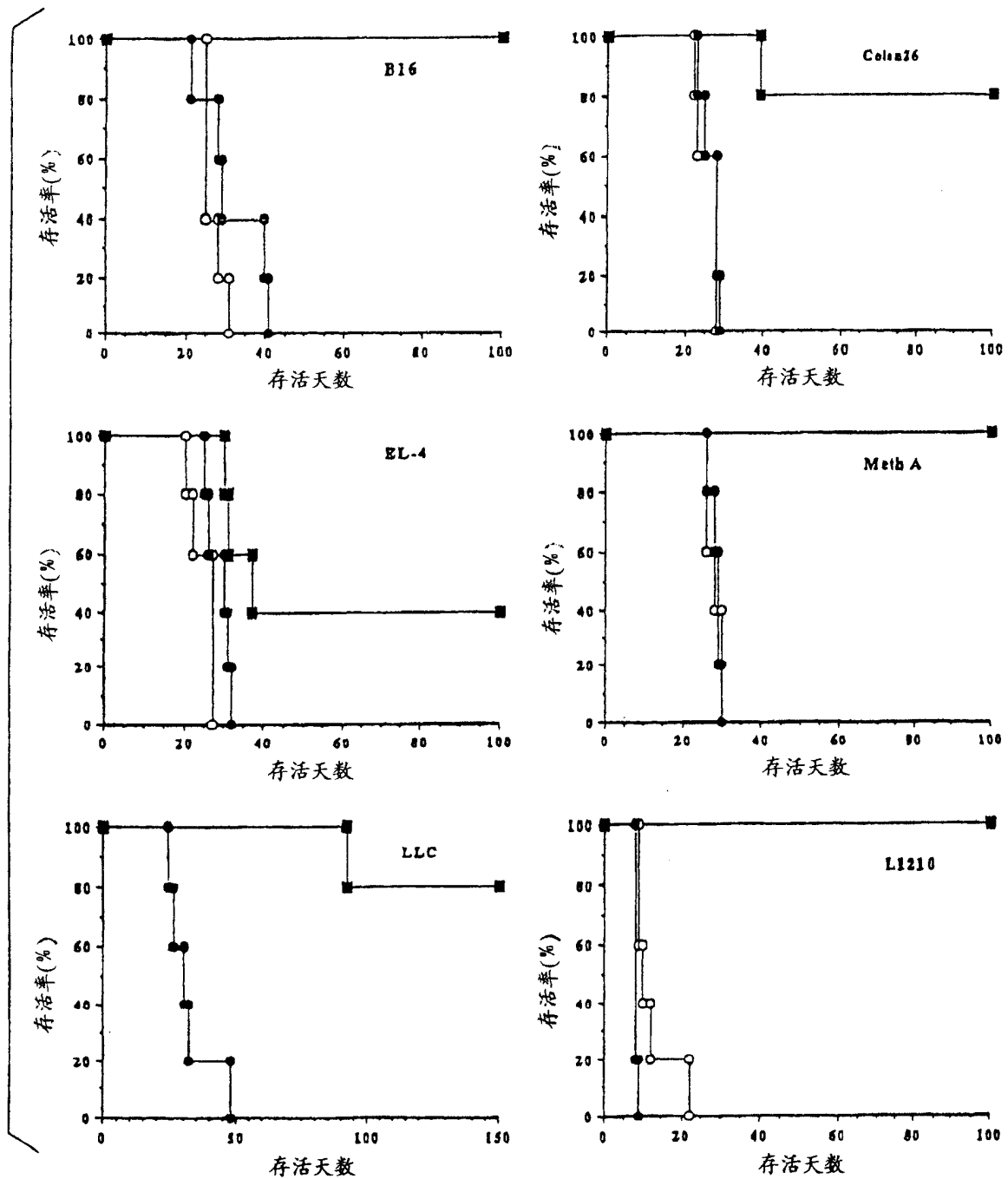


图 4

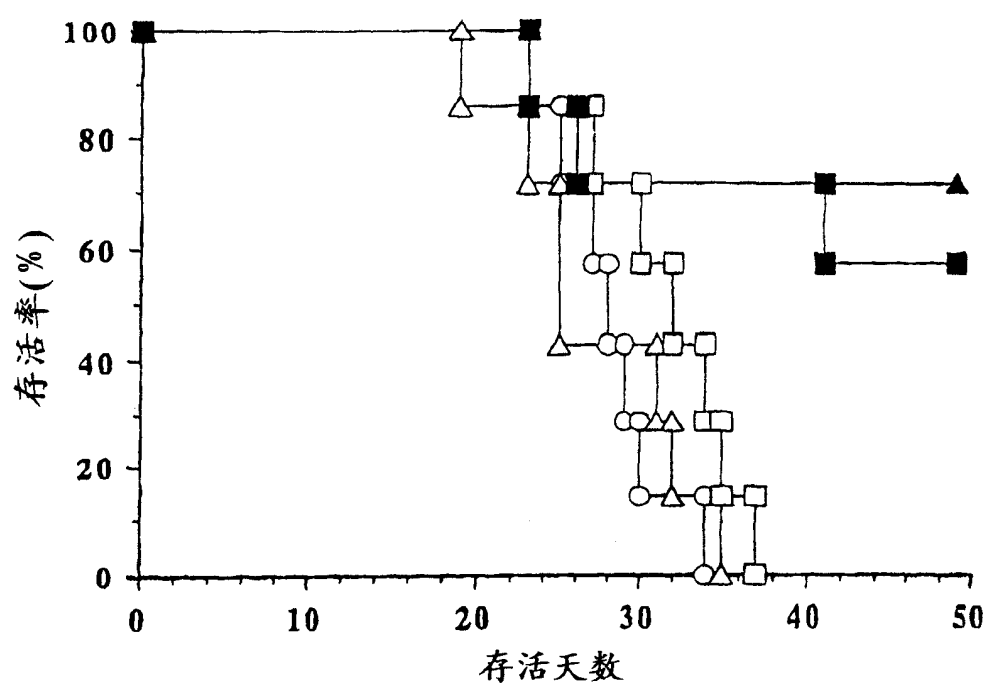
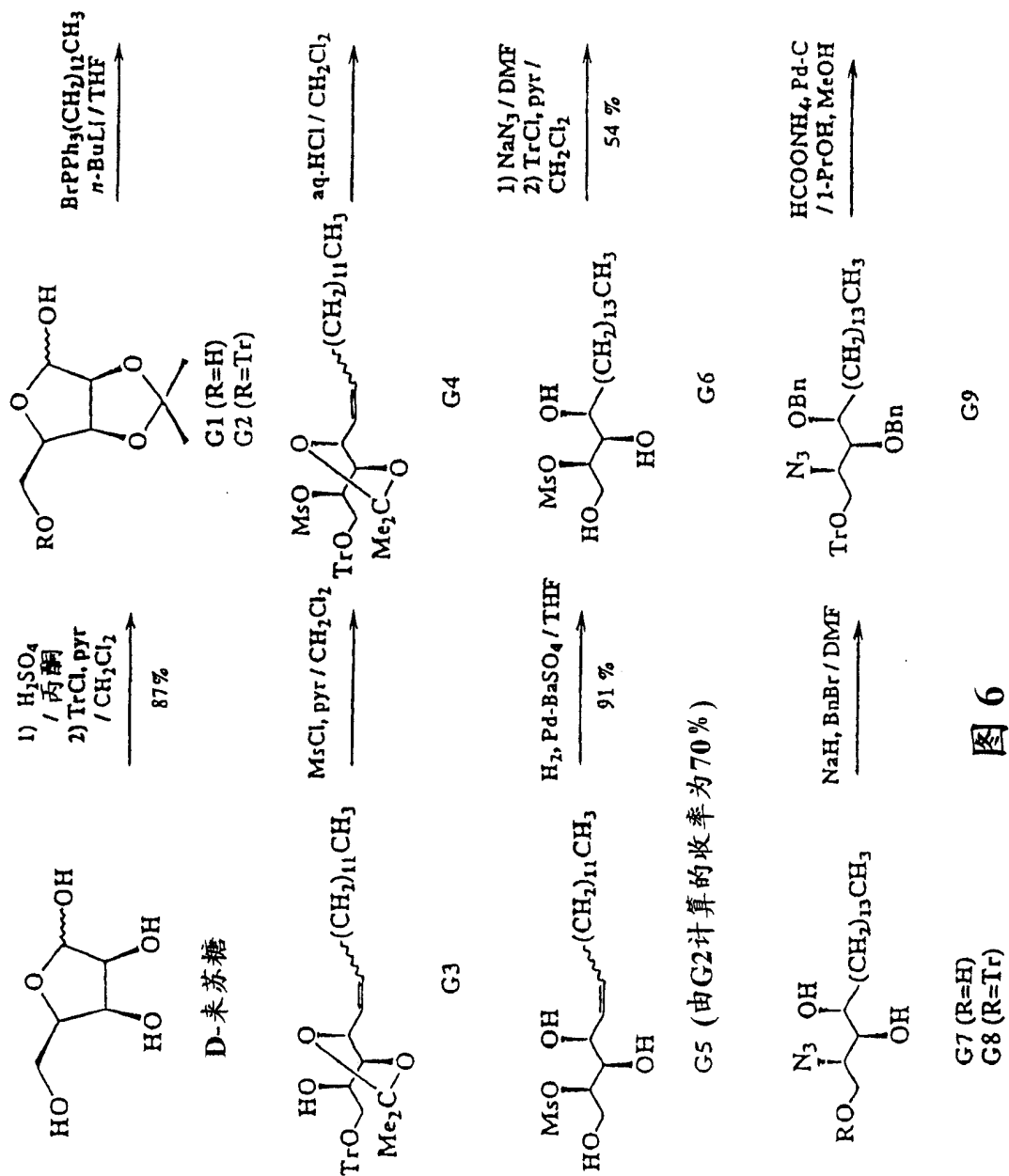


图 5



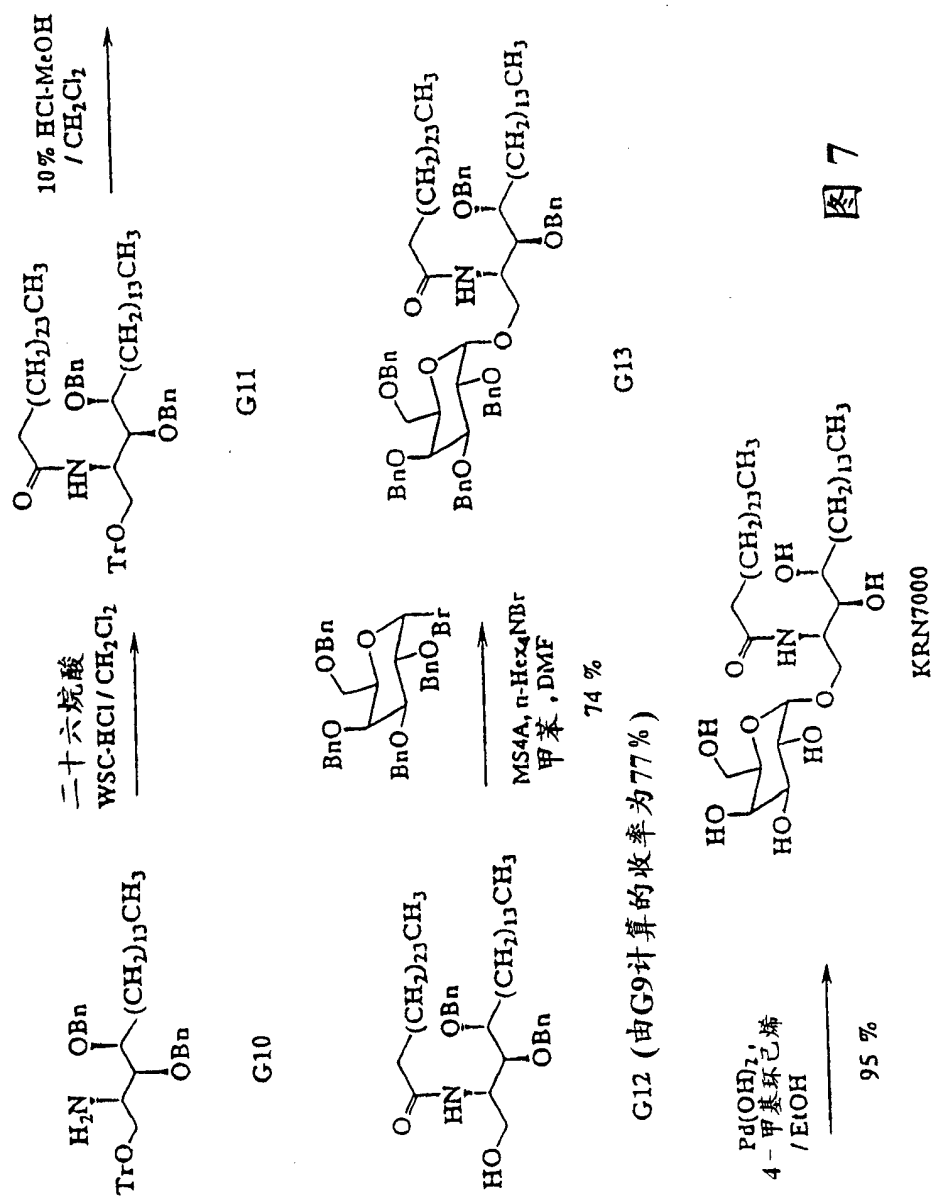


图 7

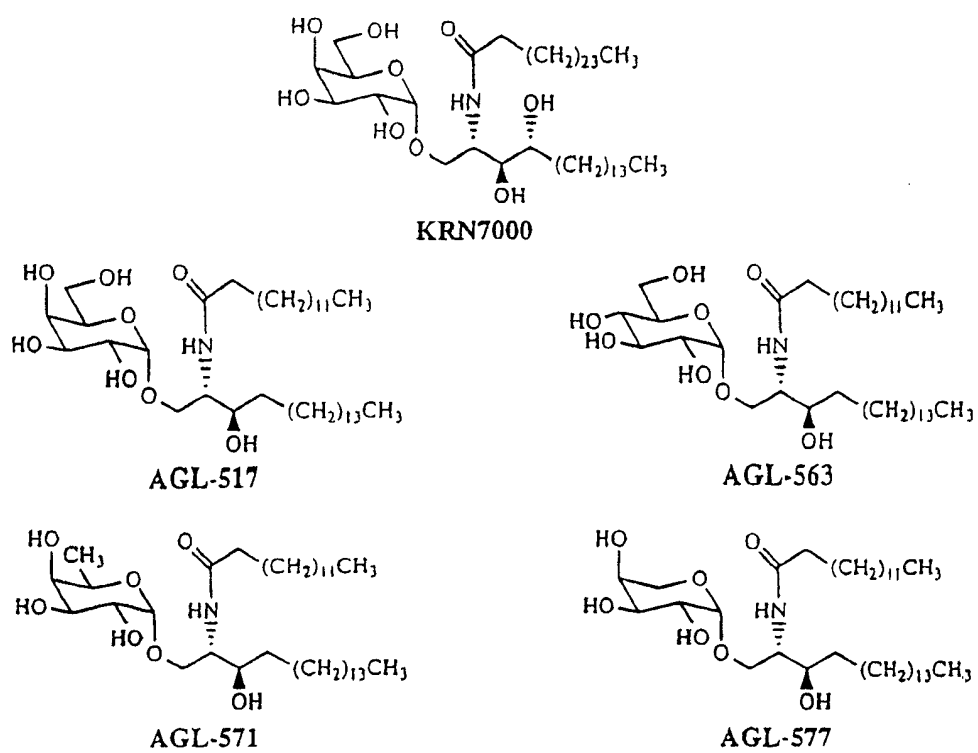


图 8

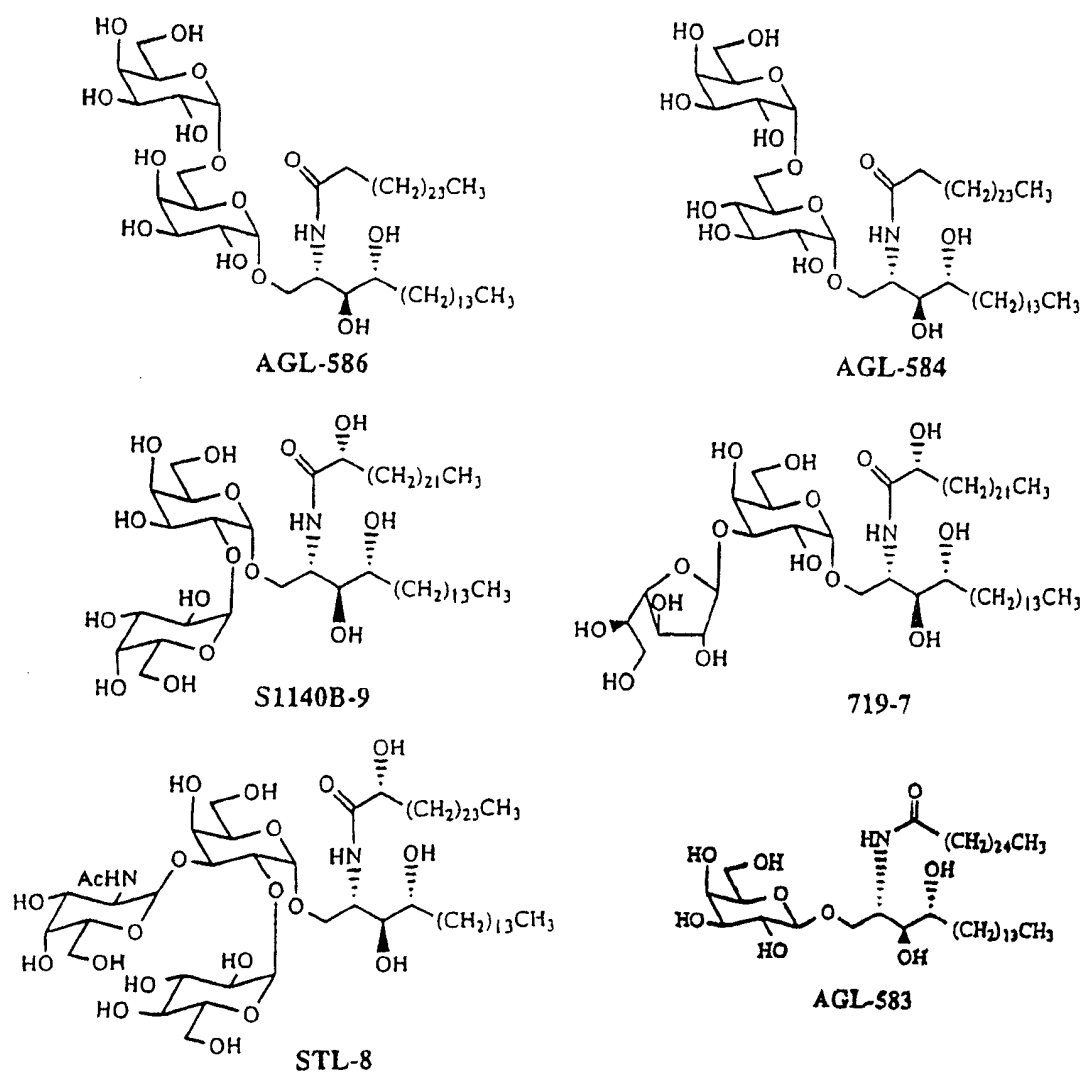


图 9