

公告本

申請日期	86.12.24
案 號	86119711
類 別	A61K 31/15, C12N 5/08

A4
C4

555562

11.016 (以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新 型 名 稱	中 文	人類抗原呈現細胞之活性化法，經活性化之人類抗原呈現細胞及其用途
	英 文	METHOD FOR ACTIVATION OF HUMAN ANTIGEN-PRESENTING CELLS, ACTIVATED HUMAN ANTIGEN-PRESENTING CELLS AND USE THEREOF
	日 文	ヒト抗原提示細胞の活性化法、活性化されたヒト抗原提示細胞およびその使用
二、發明 創 作 人	姓 名	1.肥塚 靖彦 2.山口 泰範 3.元木 一宏
	國 籍	均日本
	住、居所	均日本國群馬縣高崎市宮原町3番地麒麟麥酒股份有限公司醫藥探索研究所內
三、申請人	姓 名 (名稱)	日商麒麟麥酒股份有限公司
	國 籍	日本
	住、居所 (事務所)	日本國東京都中央區新川2丁目10番1號
	代 表 人 姓 名	佐藤 安弘

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝 訂 線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，有 無主張優先權

日本國

1996年12月27日 特願平8-350429 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

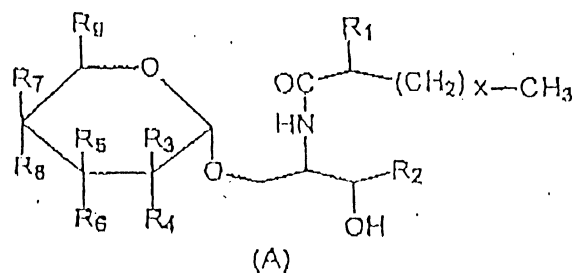
五、發明說明(4)

但是，KRN7000等之配糖體或其鹽對多含小白鼠骨髓由來的樹狀細胞或皮膚由來的蘭氏細胞之抗原呈現細胞的作用則未明。此外，亦沒有報告指出腫瘤細胞移植後再植入以KRN7000激活之多含樹狀細胞的小白鼠脾臟及骨髓由來的抗原呈現細胞有抗腫瘤效果。而對人類抗原呈現細胞而言，KRN7000等配糖體及其鹽之作用則完全不明。

本發明則針對上述事宜開發出新穎人類抗原呈現細胞活性化劑及使用該活性化劑之人類抗原呈現細胞活性化法，在不使用腫瘤抗原激活下對癌或AIDS等感染症也有充分的療效。

發明之要旨

本發明提供一種人類抗原呈現細胞活性化法，其特徵乃於試管中將人類抗原呈現細胞與式(A)所示的至少一種之配體糖化合物或其鹽一起培養



(R₁-R₉及X係如後所定義)。

本發明的一具體例為於試管中將人類抗原呈現細胞與(2S,3S,4R)-1-(α-D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十六醯

五、發明說明(5)

醯胺-3,4-十八烷二醇之配糖體化合物或其鹽一起培養之人類抗原呈現細胞活性化法。

本發明所提供之經活化之人類抗原呈現細胞乃於試管中將人類抗原呈現細胞與式(A)所示的至少一種之配糖體化合物或其鹽一起培養而得。

本發明所提供之癌或AIDS等感染症之治療法，乃為使用上述方法所活化之人類抗原呈現細胞的治療法。

本發明並提供使用上述經活化之人類抗原呈現細胞的癌或AIDS等感染症之人類抗原呈現細胞治療法用醫藥品的製造法。

圖面之簡單說明

圖1為各種處理細胞 ^3H -TdR攝取量。V-APC及KRN-APC各為使用賦形劑及KRN7000前處理之人類末梢血液由來的抗原呈現細胞。

圖2為抗原呈現細胞數及異基因(allogeneic)T細胞的 ^3H -TdR攝取量之關係。V-APC及KRN-APC各為使用賦形劑及KRN7000刺激之人類臍帶血液由來的抗原呈現細胞(CD1c⁺細胞)。

圖3為抗原呈現細胞數及自體(autologous)T細胞的 ^3H -TdR攝取量之關係。V-APC及KRN-APC同圖2。

圖4為抗原呈現細胞數及脾臟細胞的 ^3H -TdR攝取量之關係。V-APC, KRN-APC, 583-APC, 517-APC, 564-APC, 563-APC及562-APC各為使用賦形劑, KRN7000, AGL-583, AGL-517, AGL-564, AGL-563及AGL-562前處理之

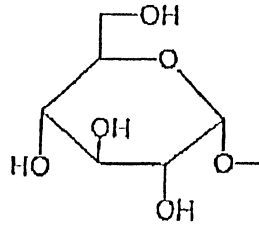
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

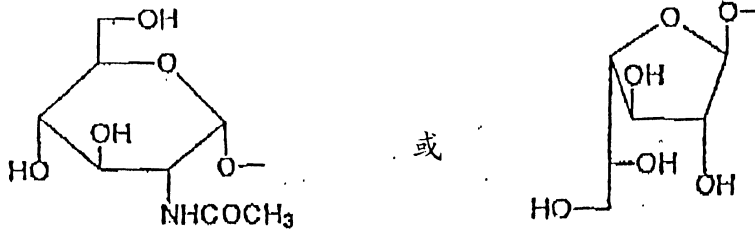
五、發明說明(9)

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

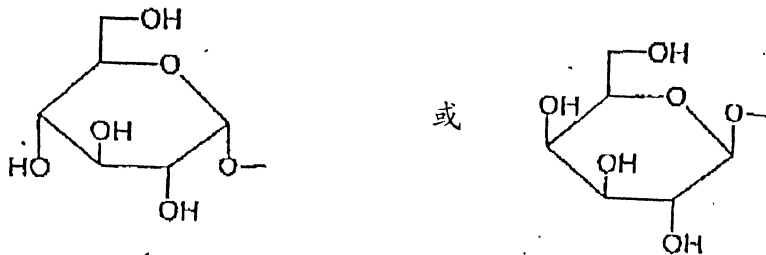
R_3 為 H、 R_4 為 OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 或



R_5 及 R_6 任一方為 H、他方為 OH、



R_7 及 R_8 任一方為 H、他方為 OH、

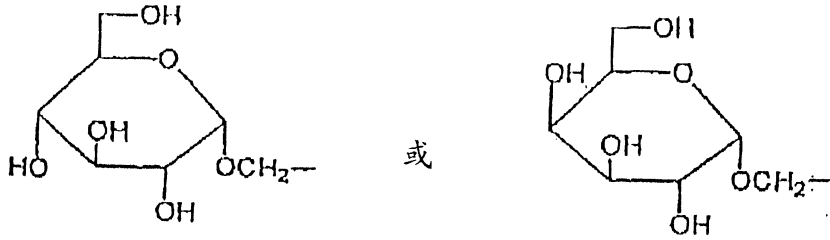


(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

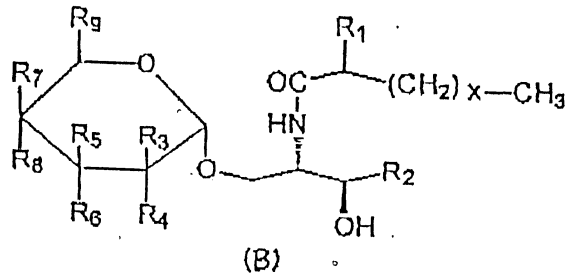
訂

五、發明說明 (10)

R_1 為 H、 CH_3 、 CH_2OH 、



本發明所提供之人類抗原呈現細胞之活性化法使用至少一種如下式(B)所示之配糖體化合物或其鹽。

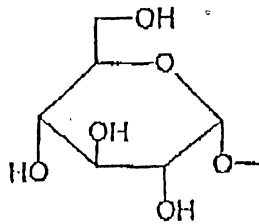


[式中、 R_1 、 X 及 R_2 同(A)所定義； R_3 - R_9 為下列i)-iii)所選任一取代基：

i) [半乳糖系]

R_3 、 R_6 及 R_8 均為H、

R_4 為OH、或



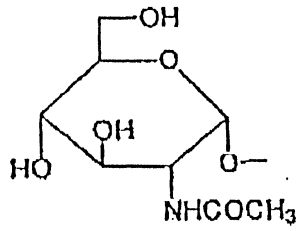
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

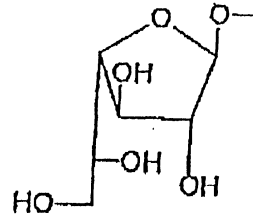
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (11)

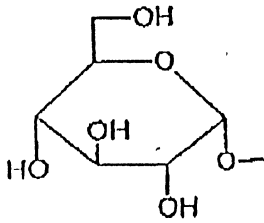
R₅ 為 OH、



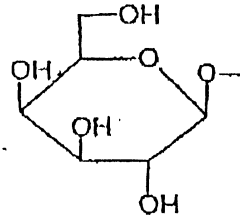
或



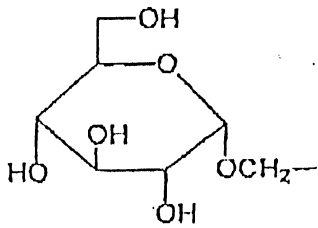
R₇ 為 OH、或



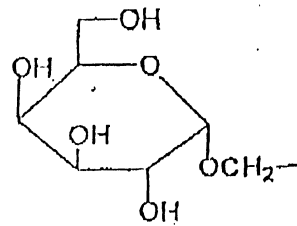
或



R₉ 為 H、CH₃、CH₂OH 或



或



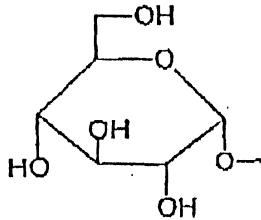
ii) [葡萄糖系]

R₃、R₆及R₇均為H、

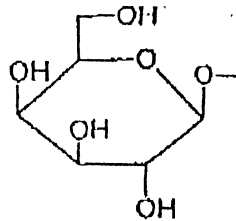
R₄、R₅及R₉各同i)所定義、

五、發明說明(12)

R_8 為 OH、



或



iii)[阿洛糖系]

R_3 、 R_5 及 R_7 各為 H， R_4 、 R_6 及 R_8 各同 OH， R_9 為 H， CH_3 或 CH_2OH 。

式 A 或 B 所定義的配糖體化合物含糖部分及配質部分，有 α -腦苷脂類， α -糖基神經醯胺， α -葡萄糖基神經醯胺， α -半乳糖基腦苷脂類或 α -半乳糖基神經醯胺。上述化合物的共同特徵為皆為 α -變旋體。

上述配糖體化合物的糖部分中，以上述 i)[半乳糖類]者為佳，而 R_3 ， R_6 及 R_8 為 H， R_4 ， R_5 及 R_7 各為 OH， R_9 為 CH_2OH ，即糖部分為 α -半乳糖吡喃糖基為佳。

上述配糖體化合物之配質部分中， R_2 以取代基 (b)，(c) 或 (e) 為佳。 R_1 為 H (即 clasin 型) 且 R_2 為取代基 (b) 者更佳。 X 為 21 (25 且 Y 為 11 (15 為佳)。

上述配糖體化合物中之較佳的例子如下。此處 1)(9) 之 R_2 取代基為 (a)，10)(24) 之 R_2 取代基為 (b)，25)(31) 之 R_2 取代基為 (c)，32) 及 33) 之 R_2 取代基為 (d)，34) 之 R_2 取代基為 (e)。各化合物後所列的字母為記載其合成法之文

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(13)

獻，A 為 WO93/05055，B 為 WO94/02168，C 為 WO94/09020，D 為 WO94/24142。上述的配糖體化合物中以化合物 14)，即 (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十六醯胺-3,4-十八烷二醇(以下稱 KRN7000) 最有效。其合成法之一具體例為如下記的製造例及流程 1 所示。

- 1) (2S,3R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-[(R)-2-羥基二十四醯胺基]-3-十八醇 A
- 2) (2S,3R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十四醯胺基-3-十八醇 A
- 3) (2S,3R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十八醇 A
- 4) (2S,3R)-1-(α -D-葡萄糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十八醇 A
- 5) (2S,3R)-1-(6'-去氧基- α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十八醇 C
- 6) (2S,3R)-1-(B-L-阿拉伯糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十八醇 C
- 7) (2S,3S)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十六醇 A
- 8) (2R,3R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十六醇 A
- 9) (2R,3S)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十六醇 A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(14)

- 10) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-
[(R)-2-羥基二十四醯胺基]-3,4-十八烷二醇 A
- 11) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-
[(R)-2-羥基二十四醯胺基]-3,4-十一烷二醇 A
- 12) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-
[(R)-2-羥基二十四醯胺基]-3,4-二十烷二醇 A
- 13) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-
[(S)-2-羥基二十四醯胺基]-3,4-十八烷二醇 A
- 14) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十
六醯胺基-3,4-十八烷二醇 A
- 15) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十
八醯胺基-3,4-十七烷二醇 A
- 16) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十
四醯胺基-3,4-十八烷二醇 A
- 17) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十
四醯胺基-3,4-十一烷二醇 A
- 18) (2S,3S,4R)-1-(α -D-葡萄糖吡喃糖氧基)-2-二十
六醯胺基-3,4-十八烷二醇 C
- 19) O-B-D-半乳呋喃糖糖基-(1(3)-O- α -D-半乳糖吡喃
糖基-(1(1)-(2S,3S,4R)-2-胺基-N-[(R)-2-羥基二十
四醯基]-1,3,4-十八烷三醇 D
- 20) O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(6)-O- α -D-葡萄糖吡喃
糖基-(1(1)-(2S,3S,4R)-2-胺基-N-二十六醯基-
1,3,4-十八烷三醇 D

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(15)

21) O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(6))-O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(1)-(2S,3S,4R))-2-胺基-N-二十六醯基-1,3,4-十八烷三醇 D

22) O- α -D-葡萄糖吡喃糖基-(1(4))-O- α -D-葡萄糖吡喃糖基-(1(1)-(2S,3S,4R))-2-胺基-N-二十六醯基-1,3,4-十八烷三醇 D

23) O-(N-乙醯-2-胺基-去氧基- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(3))-O-[α -D-葡萄糖吡喃糖基-(1(2))]-O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(1)-(2S,3S,4R))-2-胺基-N-[(R)-2-羥基二十六醯基]-1,3,4-十八烷三醇 D

24) O-(N-乙醯-2-胺基-去氧基- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(3))-O-[α -D-葡萄糖吡喃糖基-(1(2))]-O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(1)-(2S,3S,4R))-2-胺基-N-[(R)-2-羥基二十四醯基]-1,3,4-十六烷三醇 D

25) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-[(R)-2-羥基二十三醯胺基]-16-甲基-3,4-十七烷二醇 A

26) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-[(S)-2-羥基二十四醯胺基]-16-甲基-3,4-十七烷二醇 A

27) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-16-甲基-2-二十四醯胺基-3,4-十七烷二醇 A

28) O-B-D-半乳呋喃糖糖基-(1(3))-O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(1)-(2S,3S,4R))-2-胺基-N-[(R)-2-羥基二十四醯基]-17-甲基-1,3,4-十八烷三醇 D

29) O-B-D-半乳呋喃糖糖基-(1(3))-O- α -D-半乳糖吡喃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(18)

AIDS等感染症也非常有潛力。

所以，本發明也提供了一種利用上述活性化人類抗原呈現細胞治療癌或AIDS等感染症的方法。

本發明提供一種為製造癌或AIDS等感染症用抗原呈現細胞療法之醫藥品，而使用上述活性化人類抗原呈現細胞之方法。

以下為本發明的實施例，但本發明並不在此限。

實施例

製造例

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

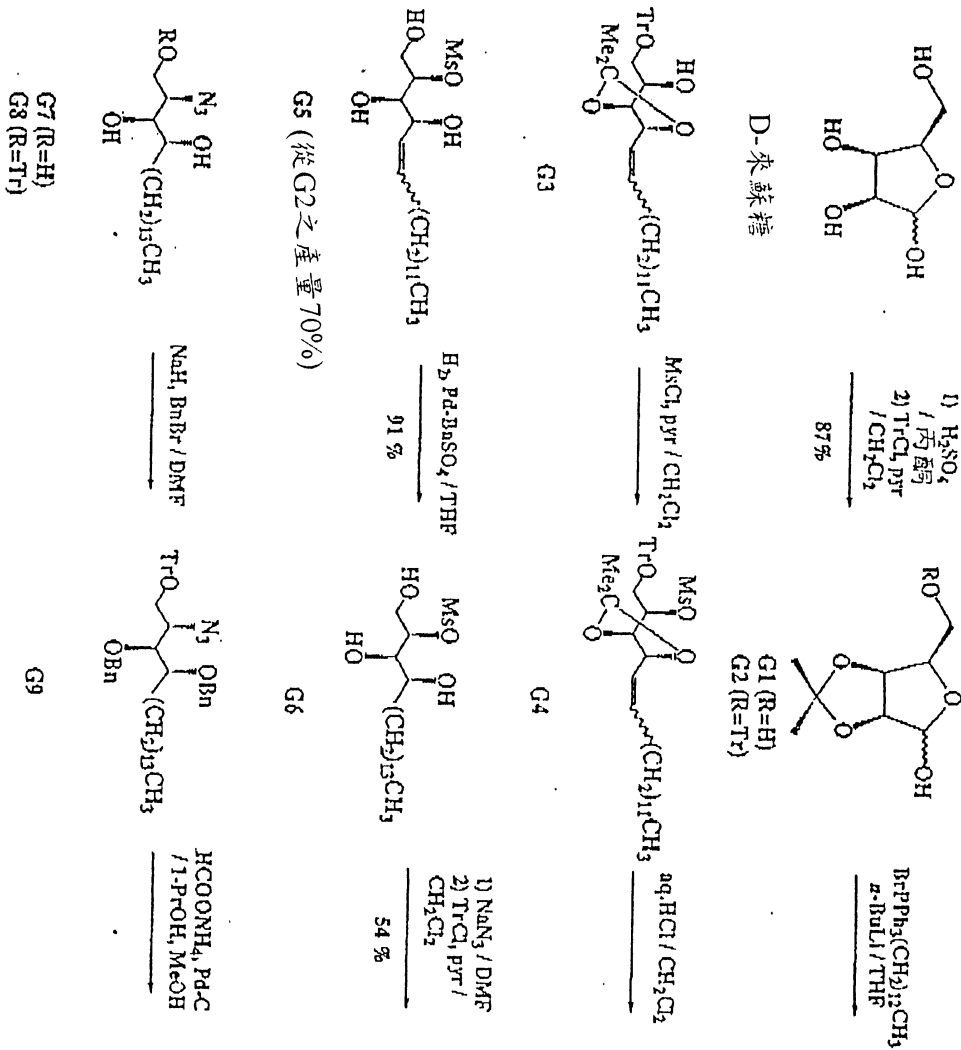
訂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

流程圖 1

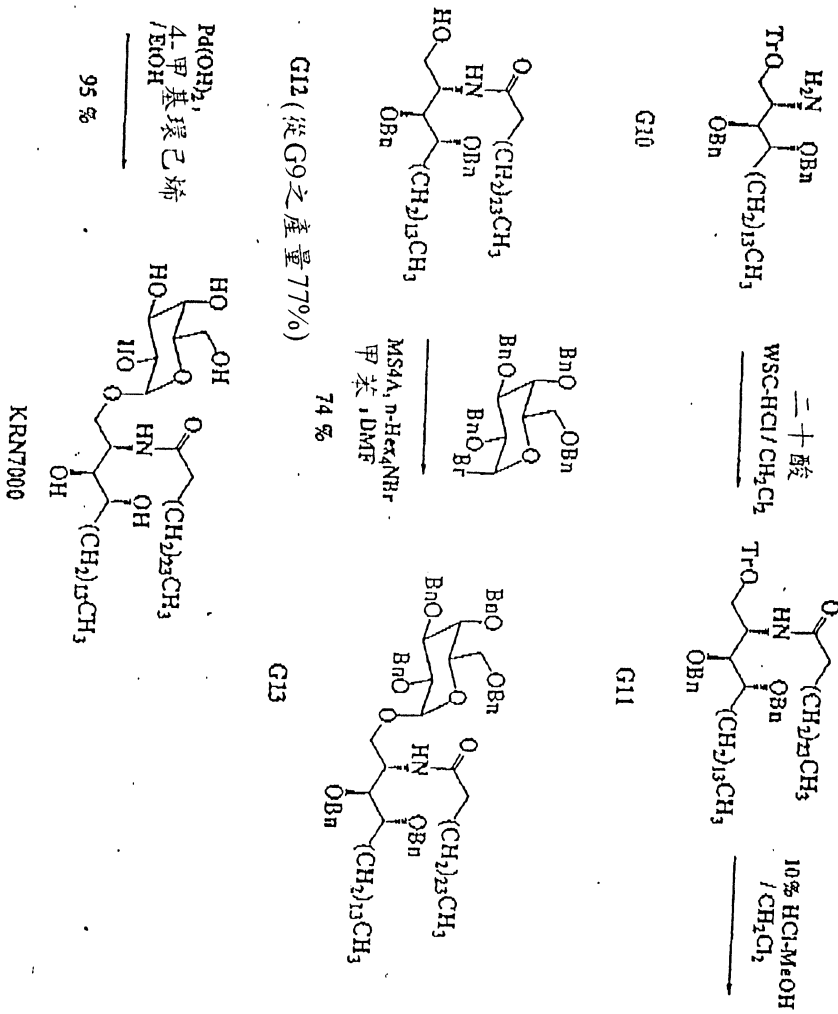


(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (20)

流程圖 1 (續)



五、發明說明 (21)

化合物G1的合成

將D-來蘇糖(200 g, 1.33 莫耳)溶於以氯化鈣乾燥過之丙酮(3.0L), 加入硫酸(0.5 ml)室溫攪拌18小時。加入分子篩4A粉末(100 g), 中和, 矽藻土過濾後, 以丙酮洗淨殘渣。減壓濃縮濾液及洗液的混合液而得G1的粗生成物。產量240 g(95%)。不作進一步精製直接供下一步工程使用。分析用試料則以矽膠管柱層析精製(己烷: 丙酮=9: 1)。
 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)。

化合物G2的合成

將G1(239 g, 約1.26 莫耳)溶於二氯甲烷(168 ml), 加入吡啶(10 ml), 三苯甲基氯(39.0 g)32°C攪拌4小時。滴下乙醇(8 ml)室溫攪拌2小時。以飽和NH₄Cl水溶液, 飽和小蘇打水, 食鹽水洗淨後, 減壓濃縮之。殘渣溶於醋酸乙酯後於0°C冷卻結晶。產量501 g(由D-來蘇糖87%)。

mp 174 - 176°C : FDMS m/z 432 M⁺ ; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.21-7.49 (15H, m), 5.38 (1H, d, J=2.4 Hz), 4.75 (1H, dd, J=3.7, 6.1 Hz), 4.59 (1H, d, J=6.1 Hz), 4.31-4.35 (1H, m), 3.43 (1H, dd, J=4.9, 9.8 Hz), 3.39 (1H, dd, J=6.7, 9.8 Hz), 1.29(3H, s), 1.28 (3H, s)。

化合物G3的合成

在0°C之Ar大氣下, 於溴化十三基三苯磷(962 g, 1.16

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (22)

莫耳：以1-溴十三烷，三苯膦於140°C加熱4.5小時而得)之THF溶液(1500 ml)中滴入正丁基鋰之2.5M己烷溶液(462 ml：1.16莫耳)。滴完後攪拌15分，再滴入G2(250 g，579莫耳)之THF溶液(450 ml)。攪拌中18內緩緩升溫至室溫。減壓濃縮所得之殘渣加入1000 ml之己烷：甲醇：水(10：7：3)之混合液，以飽和NH₄Cl水溶液洗淨。水層以500 ml之己烷萃取，所有有機層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮而得G3之粗生成物。產量339 g(98%)。不作進一步精製直接供下一步工程使用。分析用試料則以矽膠管柱層析精製(己烷：丙酮：9：1)。

FDMS m/z 598 M⁺：¹H NMR (500MHz, CDCl₃) 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及1.38 (3H, 各s), 1.21-1.34 (20H, m), 0.88 (3H, t, J=6.7 Hz)。

化合物G4的合成

在G3(338 g，約565 mmol)之二氯甲烷溶液(1500 ml)加入500 ml之吡啶，滴入甲磺醯氯(49 ml，633 mmol)後於31°C攪拌24小時。減壓濃縮所得之殘渣加入1000 ml之己烷：甲醇：水(10：7：3)之混合液，分液。水層以200 ml

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (23)

之己烷萃取3次，所有有機層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮而得G4之粗生成物。產量363 g(95%)。不作進一步精製直接供下一步工程使用。分析用試料則以矽膠管柱層析精製(己烷：丙酮：9：1)。

FDMS m/z 676 M^+ ; 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 7.21-7.45 (15H, m), 5.41 (0.7H, ddd, $J=5.5, 9.2, 11.0$ Hz), 5.32 (0.7H, bt, $J=11.0$ Hz), 5.22 (0.3H, bdd, $J=9.2, 15.0$ Hz), 5.02 (0.3H, dt, $J_t=7.3$ Hz, $J_d=15.0$ Hz), 4.8 (0.7H, ddd, $J=3.1, 5.5, 7.9$ Hz), 4.73 (0.7H, dd, $J=5.5, 9.8$ Hz), 4.64-4.67 (0.3H, m), 4.61 (0.3H, dd, $J=5.5, 9.2$ Hz), 4.48 (0.7H, dd, $J=5.5, 7.9$ Hz), 4.22 (0.3H, dd, $J=5.5, 9.2$ Hz), 3.55 (0.3H, dd, $J=2.4, 11.6$ Hz), 3.45 (0.7H, dd, $J=3.2, 11.0$ Hz), 3.06-3.12 [4H, (3.12, s), (3.11, s), (3.09, dd, $J=3.1, 11.0$ Hz)], 1.66-1.82 (2H, m), 1.47及1.46 (3H, 各s), 1.39 (3H, s), 1.13-1.35 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.8$ Hz)。

化合物G5的合成

將G4(362 g, 約536莫耳)溶於二氯甲烷(1500 ml), 加入甲醇(350 ml), 滴入濃鹽酸(200 ml)後室溫攪拌5小時。用小蘇打水中和後過濾。減壓濃縮濾液, 殘渣溶於醋酸乙酯後用食鹽水洗淨。水層用醋酸乙酯萃取, 所有有機層用無水硫酸鎂乾燥後, 減壓濃縮之。用己烷結晶。產量161 g(由G2為70%)。

mp 66-67 °C ; FDMS m/z 377 ($M-H_2O$)⁺ ; 1H NMR

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(24)

(500MHz, $\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$) δ 5.86 (0.3H, dt, $J_t=7.3$ Hz, $J_d=14.7$ Hz), 5.77 (0.7H, dt, $J_t=7.3$, $J_d=10.4$ Hz), 5.55 (0.3H, br.dd, $J=7.3$, 14.7 Hz), 5.49 (0.7H, bt, $J=9.8$ Hz), 4.91-4.97 (1H, m), 4.51 (0.7H, bt, $J=9.8$ Hz), 4.11 (0.3H, bt, $J=7.3$ Hz), 3.94-4.03 (2H, m), 3.67-3.73 [1H, (3.70, dd, $J=3.1$, 6.7 Hz), (3.69, dd, $J=3.1$, 7.3 Hz)], 3.20 及 3.19 (3H, 各 s), 2.05-2.22 (2H, m), 1.22-1.43 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.7$ Hz)。

化合物G6的合成

將G5(160 g, 約405 mmol)溶於THF(780 ml), 加入5% Pd-硫酸鋇(16g), 充滿氫氣後室溫攪拌20小時。反應液用矽藻土濾過, 以氯仿: 甲醇(1:1)的混合液洗淨。混合濾液及洗液, 減壓濃縮之。殘渣以醋酸乙酯結晶。產量146 g(91%)。

$[\alpha]_{23}^D +12^\circ$ (c1, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1:1$); mp 124-126°C; FDMS m/z 397 (M+1); $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$) δ 4.93-4.96 (1H, m, H2), 3.91 (1H, dd, $J=6.7$, 12.2 Hz), 3.85 (1H, dd, $J=4.9$, 12.2 Hz), 3.54-3.60 (1H, m), 3.50 (1H, dd, $J=1.8$, 8.5 Hz), 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, $J=6.7$ Hz)。

化合物G7的合成

在G6(145 g, 約365 mmol)之DMF溶液中(1000 ml)加入 NaN_3 (47 g, 730 mmol), 95°C攪拌4小時。濃縮, 加入

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (25)

醋酸乙酯(450 ml)後，水洗。水層以醋酸乙酯再萃取。所有有機層用食鹽水洗淨後，以無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮而得G7之粗生成物。產量122 g(97%)。不作進一步精製直接供下一步工程使用。分析用試料則以矽膠管柱層析精製(己烷：丙酮：9：1)。

$[\alpha]_{23}^D +16.5^\circ$ (c0.5, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1:1$) ; mp 92-93°C ; FDMS m/z 397 (M+1)⁺ ; ¹H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ 3.91 (1H, dd, J=3.7, 11.6 Hz), 3.75 (1H, dd, J=7.9, 11.6 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 Hz)。

化合物G8的合成

在G.7(121 g, 約352 mmol)之二氯甲烷溶液(750 ml)中加入250 ml之吡啶及三苯甲基氯(124 ml, 445 mmol), 室溫攪拌30分。以飽和小蘇打水, 飽和 NH_4Cl 水溶液, 食鹽水洗淨後, 用無水硫酸鎂乾燥後, 減壓濃縮之。以矽膠管柱層析精製(己烷：醋酸酯=10：1)。產量34.4 g(由G6為52%)。

$[\alpha]_{24}^D +11.9^\circ$ (c0.9, CHCl_3) ; FDMS m/z 585 M⁺ ; ¹H-NMR (500MHz, $\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$) 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 Hz), 1.23-1.56 (26H, m), 0.88 (3H, t, J=6.7 Hz)。

化合物G9的合成

在G8(33.5 g, 57.3 mmol)之DMF溶液(300 ml)加入60%NaN(5.5 g, 約138 mmol), 室溫攪拌40分。將反應液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (26)

冷卻至0°C後，滴入苯甲基氯(15 ml, 120 mmol)。18小時內攪拌下回溫至室溫。加入冰水(100 ml)停止反應後，用醋酸乙酯萃取。萃取液用食鹽水洗淨3次，所有有機層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮而得G9之粗生成物。不作進一步精製直接供下一步工程使用。產量42.2 g(96%)。分析用試料則以矽膠管柱層析精製(己烷：醋酸乙酯=100：1)。

$[\alpha]_{25}^{D} +9.8^{\circ}$ (c1.0, CHCl_3) ; FDMS m/z 738 (M-N_2)⁺ ; ¹H-NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.07-7.48 (25H, m), 4.57 (1H, d, J=11.6 Hz), 4.44 (1H, d, J=11.6 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 Hz), 1.20-1.64 (26H, m), 0.88 (3H, t, J=6.7 Hz)。

化合物G10及G11的合成

G9(41.2 g, 約54 mmol)之1-丙烷溶液(250 ml)中加入甲醇(30 ml)，再加入5% Pd C(4.1 g)，蟻縮 NH_4 (27.1 g, 4.3 mol)。室溫攪拌16小時後，以醋酸乙酯稀釋，矽藻土過濾。濾液減壓濃縮，醋酸乙酯溶解後，用飽和小蘇打水及食鹽水洗淨3次，所有有機層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮而得G10之粗生成物。不作進一步精製直接供下一步工程使用。產量38.9 g(98%)。

於G10之二氯甲烷溶液(300 ml)中加入二十六酸(22.4 g, 56.6 mmol)，WSC鹽酸鹽(12.6 g, 64.6 mmol)加熱回流2小時。冷卻至室溫後，減壓濃縮之。加入醋酸乙酯

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (27)

(500 ml)至殘渣中，以0.5 M鹽酸水溶液，食鹽水，飽和小蘇打水及食鹽水洗淨。所有有機層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮而得G11之粗生成物。不作進一步精製直接供下一步工程使用。產量53.2 g(88%)。分析用試料則以矽膠管柱層析精製(己烷：醋酸乙酯=100：1)。

$[\alpha]_{24}^D +5.3^\circ$ (c0.4, CHCl_3) ; FDMS m/z 1118 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.20-7.38 (25H, m), 5.57 (1H, d, $J=9.1$ Hz), 4.80 (1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.48-4.30 (3H, m), 4.24-4.32 (1H, m), 3.83 (1H, dd, $J=3.0, 6.7$ Hz), 3.43-3.51 (2H, m, H1a), 3.29 (1H, dd, $J=4.3, 9.8$ Hz), 1.92 (2H, t, $J=7.3$ Hz), 1.28-1.60 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J=6.7$ Hz)。

化合物G12之合成

G11(52.2 g, 約47 mmol)之二氯甲烷溶液(180 ml)中加入甲醇(36 ml)，再滴入10%之鹽酸甲醇溶液(3.0 ml)，室溫攪拌2小時。反應液以粉末狀重碳酸鈉(18g)中後，矽藻土過濾。殘渣以二氯甲烷洗淨。濾液與洗液以食鹽水洗淨，有機層用無水硫酸鎂乾燥後，減壓濃縮之。殘渣用熱丙酮溶解，冷卻至0°C沉澱精製之。產量38.6 g(由G9為77%)。

$[\alpha]_{24}^D -29.7^\circ$ (c0.7, CHCl_3) ; mp 75-76.5°C ; FDMS m/z 876 M^+ ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.30-7.47 (10H, m), 6.03 (1H, d, $J=7.9$ Hz), 4.72 (1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.66 (1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.61 (1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.45 (1H, d,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(28)

J=11.6 Hz), 4.12-4.17 (1H, m), 4.00 (1H, dt, $J_t=4.3$, $J_d=7.3$ Hz), 3.67-3.72 (2H, m), 3.61 (1H, ddd, $J=4.3$, 8.6, 11.6 Hz), 1.94-2.05 (2H, m), 1.15-1.69 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J=6.1$ Hz)。

化合物G13之合成

1) 2,3,4,6-四-O-苯基-D-半乳糖基吡喃糖基乙酸酯(79.8 g)以甲苯(160 ml)及異丙醚(520 ml)之混合液溶解，冷卻至 $-10-0^{\circ}\text{C}$ 。加入2.0等量之Hbr異丙醚溶液(2.8 mmol/ml, 約100 ml)。 $-10-0^{\circ}\text{C}$ 下約90分攪拌後，加入5%之小蘇打水溶液，攪拌以中和過剩的Hbr。移至分液漏斗分液後，捨卻水層，用10%食鹽水洗淨2次。減壓濃縮而得2,3,4,6-四-O-苯基- α -D-半乳糖基吡喃糖基溴(Gal-Br)之糖漿。

2) 將G12(60.0 g, 68.6 mmol)，四己基 NH_4Br (89.4 g, 2.06 mmol)，分子篩4A(60g)之甲苯溶液(420 ml)中依順序加入DMF(140 ml)，GalBr(約137 mmol)之甲苯溶液(250 ml)，室溫攪拌72小時。反應液加入12 ml之甲醇，攪拌2小時。矽藻土過濾後，以飽和小蘇打水，食鹽水洗淨，無硫酸鎂乾燥，減壓濃縮之。殘渣加入乙腈，攪拌2小時而得沉澱。減壓乾燥沉澱而得粉末。以矽膠管柱層析精製(己烷：醋酸乙酯=8：1)，產量70.9 g(74%)。

$[\alpha]_{24}^D+18.8^{\circ}$ (c0.9, CHCl_3) : mp $74-75^{\circ}\text{C}$: FDMS m/z 1399 (M+1)⁺ : $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.21-7.37 (30H, m), 6.12 (1H, d, $J=9.0$ Hz), 4.91 (1H, d, $J=11.6$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(29)

Hz), 4.84 (1H, d, J=3.7 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 Hz), 3.47-3.51 (2H, m), 3.42 (1H, dd, J=6.1, 9.1 Hz), 1.87-1.99 (2H, m), 1.18-1.70 (72H, m), 0.88 (6H, t, J=7.4 Hz)。

(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-半乳糖吡喃糖基)-N-二十六醯-2-胺-1,3,4-十八烷三醇(KRN7000)

G13(60.0 g, 42.9 mmol)以960 ml之乙醇懸浮之，再加入20%Pd(OH)₂(6.0 g)之乙醇懸浮液。再加入氫源之4-甲基環己烯(120 ml, 93.5 mmol)，加熱回流4小時後，過濾除去觸媒。殘渣用溫乙醇洗淨。濾液於室溫放置而得白色沉澱，過濾，減壓乾燥之。所得之粉末懸浮於乙醇：水(92：8, 3.5 L)，攪拌下加熱溶解後，室溫放置沉澱之。減壓乾燥濾得之塊狀物而得白色粉末。產量35.0 g(95%)。

$[\alpha]_{23}^D +43.6^\circ$ (c1.0, 吡啶)；mp 189.5-190.5 °C；陰性 FABMS m/z 857 (M-H)⁻；IR(cm⁻¹, Kbr) 3300, 2930, 2850, 1640, 1540, 1470, 1070；¹H-NMR (500MHz, 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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (33)

胞，V-APC)之³H-TdR攝取量(異基因T細胞的增殖)與V-APC的數目正相關。而KRN7000所刺激的CD1c⁺細胞(抗原呈現細胞，KRN-APC)比V-APC有更強的異基因T細胞增殖促進作用。

如圖3所示，以自體T細胞為反應細胞時，賦形劑所刺激的CD1c⁺細胞(抗原呈現細胞，V-APC)，即使加至10000細胞/穴之濃度也不會促進自體T細胞的增殖。但是，KRN7000所刺激的CD1c⁺細胞(抗原呈現細胞，KRN-APC)則與異基因T細胞的情況一致，有顯著的自體T細胞增殖促進作用。

(藥理試驗3) α 及B-半乳糖基神經醯胺與 α 及B-葡萄糖基神經醯胺對小白鼠脾臟由來的抗原呈現細胞之作用

小白鼠脾臟由來的多含樹狀細胞的抗原呈現細胞之調製基本上可由上述Clowley, M.等之方法進行。即，採取BDF1小白鼠之脾臟以100U/ml之膠原酵素處理後，以銼子細切分開細胞浮游液及組織斷片。將組織斷片浮游於400U/ml之膠原酵素液，於CO₂恆溫箱保持20分，以注射器及不銹鋼網濾得浮游細胞，並前述的細胞浮游液一齊離心沉澱。細胞浮游液再用BSA密度梯度離心取得低密度細胞劃分。將此細胞劃分撒在60 mm之吸紙上，培養2小時。浮游細胞除去操作進行3回後，於吸紙加入含10%非動化FBS之RPMI1640培養基再添加最終濃度為100 ng/ml之KRN7000(化合物No.14)，AGL583(KRN7000之B-變旋物)，AGL517(化合物No.3)，AGL564(AGL517B-變旋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(34)

物)，AGL563(化合物No.4)，AGL562(AGL563B-變旋物)，或賦形劑(最終濃度0.1% DMSO)，培養一晚後，回收浮游細胞，洗淨後即得抗原呈現細胞。

一方面的反應細胞則將BDF1小白鼠脾臟細胞的紅血球用NH₄Cl，Tris-HCl紅血球除去緩衝液除去紅血球後，浮游於含10%非動化FBS之RPMI1640培養基。將此細胞劃分撒在100 mm之吸紙上，於CO₂恆溫箱培養2小時，回收的浮游細胞即為反應細胞。

將上述的抗原呈現細胞(1×10^3 ， 3.3×10^3 ， 1×10^4 細胞/穴)及反應細胞(2.5×10^5 細胞/穴)添加於96穴平底盤上進行同基因MLR分析。培養一日後於各細胞添加³H-TdR 0.5 μCi/細胞，16小時培養後以放射量計算其³H-TdR攝取量。其結果如圖4(3穴的平均值及標準偏差)。

此處之V-APC，KRN-APC，583-APC，517-APC，564-APC，563-APC及562-APC各為以賦形劑，KRN7000，AGL-583，AGL-517，AGL-564，AGL-563及AGL-562前處理之抗原呈現細胞。

如圖4所示，以KRN-APC及517-APC等α-半乳糖基神經醯胺前處理而得之抗原呈現細胞有顯著同基因MLR增強作用；但是以583-APC及564-APC等B-半乳糖基神經醯胺處理則無此效果。以583-APC等α-葡萄糖基神經醯胺前處理而得之抗原呈現細胞有顯著同基因MLR增強作用；但是以562-APC等B-葡萄糖基神經醯胺處理則無此效果。
(藥理試驗4)使用以KRN7000前處理過之小白鼠脾臟由來

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (35)

的抗原呈現細胞之抗原呈現細胞療法

為檢討對腫瘤細胞移植後移入以KRN7000活化之小白鼠脾臟由來之抗原呈現細胞時之抗腫瘤作用，使用BDF1小白鼠(6週齡，雌性)6隻1組作試驗。將小白鼠T淋巴腫EL-4細胞(1×10^5 細胞/小白鼠)靜脈注射入各小白鼠中，此日作為日-0計算。依藥理試驗3調製賦形劑前處理抗原呈現細胞(V-APC)及KRN7000(100 ng/ml)前處理抗原呈現細胞(KRN-APC)，並以 5×10^5 細胞/小白鼠之劑量於日-1移植至靜脈內。另外，正面對照實驗則於日-1，5，9靜脈投與KRN7000 100 μ g/kg。每日觀察各小白鼠的壽命之結果如圖5。

如圖5所示，V-APC之移植並不延長壽命，但KRN-APC之移植則有生命延長現象，且有50%的小白鼠康復。而以KRN7000 100 μ g/kg分三次投與雖然有顯著的效果，但此一次投與KRN-APC的效果差。

(藥理試驗5)KRN7000對小白鼠骨髓由來的樹狀細胞之抗原呈現機能增強作用

從小白鼠的骨髓調製多含樹狀細胞之抗原呈現細胞的方法乃由Inaba, K.等之方法(Yamaguchi Y.等, Stem細胞, 1997: 15: 144 - 153)改良而來。即，調製BALB/C小白鼠骨髓細胞，以NH₄Cl溶液使紅血球溶血後，用人類 γ -球蛋白吸紙除去FcR⁺細胞。再使細胞浮游於含10% FCS之RPMI培養基，以 5×10^5 細胞/穴(1ml/穴)之濃度於24穴平底盤添加小白鼠 γ GM-CSF 10 mg/ml，人類 γ TGF-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 (36)

B 10 mg/ml 培養六天。各穴之培養液每格1天以吸管輕輕地沖洗後，吸除約75%，並添加含上記因子的培養基1ml。培養6天後，回收非附著性細胞，再用人類 γ -球蛋白吸紙除去FcR⁺細胞。此細胞再用含有小白鼠 γ GM-CSF 10 mg/ml，人類 γ TGF-B 10 mg/ml之培養基培養2天。此時添加賦形劑(最終濃度0.1% DMSO)或KRN7000(最終濃度100 ng/ml)。回收細胞，洗淨三次即為抗原呈現細胞。反應細胞則用T富細胞柱(R&D公司)由BALB/c小白鼠脾臟調製而得的T細胞。將此細胞加入96穴平底盤(3×10^5 細胞/穴)再添加不同濃度(3×10^4 ， 1×10^4 ， 3×10^3 及 1×10^3 細胞/穴)之抗原呈現細胞進行同基因MLR分析。培養2天後，添加 0.5μ Ci/ml之³H-TdR，培養6小時後測定放射量以計算細胞內³H-TdR攝取量。結果如圖6(3穴之平均值及標準偏差)。此處的V-APC及KRN-APC各代表以賦形劑及KRN7000前處理之抗原呈現細胞。如圖6所示，以KRN7000刺激的小白鼠骨髓由來抗原呈現細胞(KRN-APC)比用賦形劑刺激的抗原呈現細胞(V-APC)有顯著的同基因MRL增強作用。

(藥理試驗6) 使用以KRN7000前處理過之小白鼠骨髓由來的抗原呈現細胞之抗原呈現細胞療法

為檢討對腫瘤細胞移植後移入以KRN7000活化之小白鼠骨髓由來之抗原呈現細胞時之抗腫瘤作用，使用CDF1小白鼠(6週齡，雌性)5隻小組作試驗。將小白鼠大腸癌Colon26細胞(2×10^6 細胞/小白鼠)由脾臟移入各小白鼠

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (37)

中，此日作為日-0計算。依藥理試驗5調製賦形劑前處理抗原呈現細胞(V-APC)及KRN7000(100ng/ml)前處理抗原呈現細胞(KRN-APC)，並以 8×10^5 細胞/小白鼠之劑量於日-1移植至靜脈內。另外，正面對照實驗則於日1，5，9靜脈投與KRN7000 100 μ g/kg。最後於日-14拿出各小白鼠的肝臟，並測量各肝臟的重量，結果如圖7(5隻小白鼠的肝臟重量平均值及標準偏差)。未移植腫瘤之小白鼠肝臟重量約1g，所以，由腫瘤移植小白鼠之肝臟重量減1g約為腫瘤重。

如圖7所示，V-APC之植入多少有腫瘤增殖抑制作用。而KRN-APC之移植則有顯著的腫瘤增殖抑制現象，且5隻有3隻肉眼觀察不到肝臟的腫瘤。而以KRN7000 100 μ g/kg分三次投與的效果，與一次投與KRN-APC的腫瘤增殖抑制效果同樣顯著。

(藥理試驗7) KRN7000對小白鼠表皮由來的抗原呈現細胞之抗原呈現機能增強作用

從小白鼠的耳朵調製含蘭氏細胞之抗原呈現細胞的方法基本上採用上述的Witmer-Pack, M.等之方法。即，將BALB/C小白鼠耳朵剝成背腹兩片，各浸於含1%胰蛋白酶之韓氏液，37°C處理30分-1小時而得表皮。將表皮置於篩網上，於含10% FCS之韓氏液中上下振動，回收脫離細胞。再使細胞浮游於含10% FCS之RPMI培養基(10^6 細胞/ml)，添加賦形劑(最終濃度0.1% DMSO)或KRN7000(最終濃度100 ng/ml)，於37°C，5%CO₂下培養3天。培

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(38)

養後，以吸紙回收非附著性細胞，再以淋巴-M(1400 rpm × 10分)離心而得低比重細胞。以RPMI洗淨2次後即為抗原呈現細胞。

反應細胞則由小白鼠脾臟依藥理試驗3之方法調製。將此細胞加入96穴平底盤(2.5×10^5 細胞/穴)再添加不同濃度(4×10^4 ， $4/3 \times 10^4$ 及 $4/9 \times 10^4$ 細胞/穴)之抗原呈現細胞進行同基因MLR分析。培養2天後，添加 $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ 之 $^3\text{H-TdR}$ ，培養6小時後測定放射量以計算細胞內 $^3\text{H-TdR}$ 攝取量。結果如圖8(3穴之平均值及標準偏差)。此處的V-APC及KRN-APC各代表以賦形劑及KRN7000前處理之抗原呈現細胞。如圖8所示，以KRN7000刺激的小白鼠皮膚由來抗原呈現細胞(KRN-APC)比用賦形劑刺激的抗原呈現細胞(V-APC)有更顯著的同基因MRL增強作用。

(藥理試驗8) 使用以KRN7000前處理過之小白鼠脾臟由來的抗原呈現細胞之抗原呈現細胞療法

使用BDF1小白鼠(6週齡，雌性)6隻1組作試驗。將小白鼠黑色素細胞瘤B16(1.5×10^6 細胞/小白鼠)由皮下移入各小白鼠中，此日作為日-0計算。依藥理試驗3調製賦形劑(最後終濃度0.1% DMSO)前處理抗原呈現細胞(V-APC)以賦形劑(最終濃度0.1% DMSO)及B-16腫瘤細胞分解物前處理之抗原呈現細胞(V-T-APC)，以KRN7000(100 ng/ml)及B16-腫瘤細胞分解物前處理之抗原呈現細胞(KRN-APC)，並以 5×10^5 細胞/小白鼠之劑量於日-1移植至靜脈內。另外，正面對照實驗則於日-1，5，9靜脈投

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明(42)

應細胞增殖抑制作用之原因可能為反應細胞的過度生長。

由上述的結果得知，KRN7000可活化由人類臍帶血以不同方法誘導而得之抗原呈現細胞。

(藥理試驗13) α -半乳糖基神經醯胺衍生物對小白鼠脾臟由來的抗原呈現細胞之作用

愛此進行除KRN7000以外之本發明 α -半乳糖基神經醯胺衍生物的藥理試驗以證實其有抗原呈現細胞活性化作用。

小白鼠脾臟由來的多含樹狀細胞的抗原呈現細胞之調製乃依藥理試驗3之方法進行。即，於培養基添加最終濃度100 ng/ml之KRN7000(化合物No.14)，AGL512(本發明的化合物No.10)，AGL525(本發明的化合物No.16)，AGL506(本發明的化合物No.1)，AGL514(本發明的化合物No.2)，AGL571(本發明的化合物No.5)，或賦形劑(最終濃度0.1% DMSO)調製而得。將上述的抗原呈現細胞(1×10^4 細胞/穴)及反應細胞(2.5×10^5 細胞/穴)添加於96穴平底盤上進行同基因MLR分析。培養2日後於各穴添加 $^3\text{H-TdR}$ 0.5 Ci/穴，8小時後以放射量計算其 $^3\text{H-TdR}$ 攝取量。其結果如圖14。

此處之V-APC，KRN-APC，512-APC，525-APC，506-APC，514-APC及571-APC各為以賦形劑，KRN7000，AGL-512，AGL-525，AGL-506，AGL-514及AGL-571前處理之抗原呈現細胞。

如圖14所示，以 α -半乳糖基神經醯胺衍生物前處理而得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

製

五、發明說明(43)

之抗原呈現細胞有顯著同基因MLR增強作用。

結果顯示，KRN7000以外的本發明化合物(α -半乳糖基神經醯胺及 α -葡萄糖基神經醯胺)對小白鼠脾臟由來的含樹狀細胞的抗原呈現細胞也有活性作用(抗原呈現機能增強作用)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

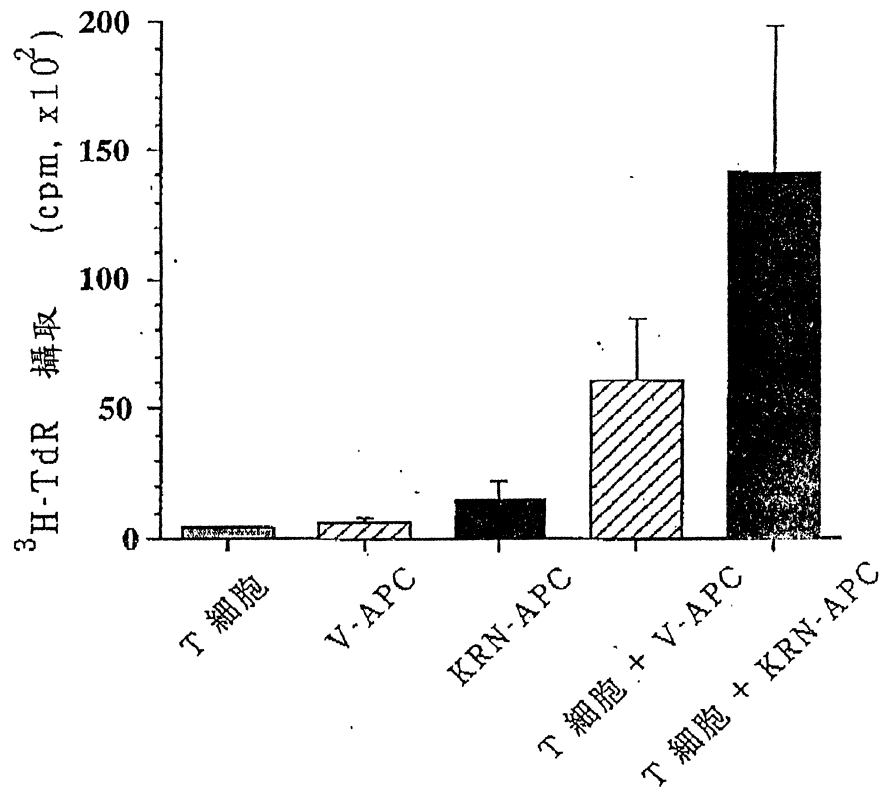


圖 1

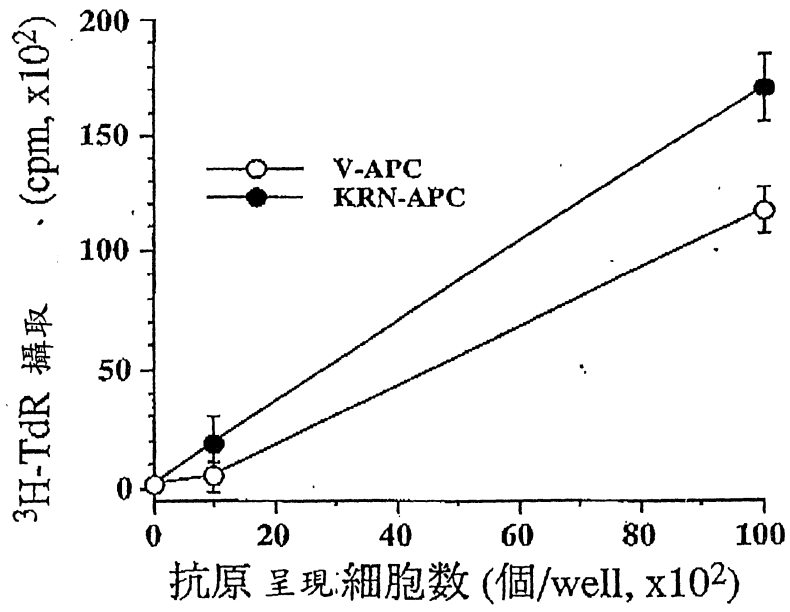


圖 2

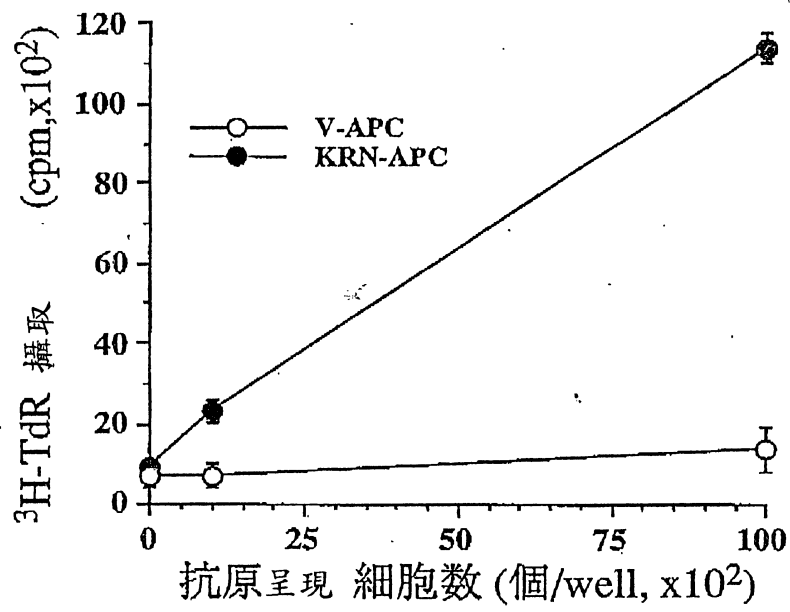


圖 3

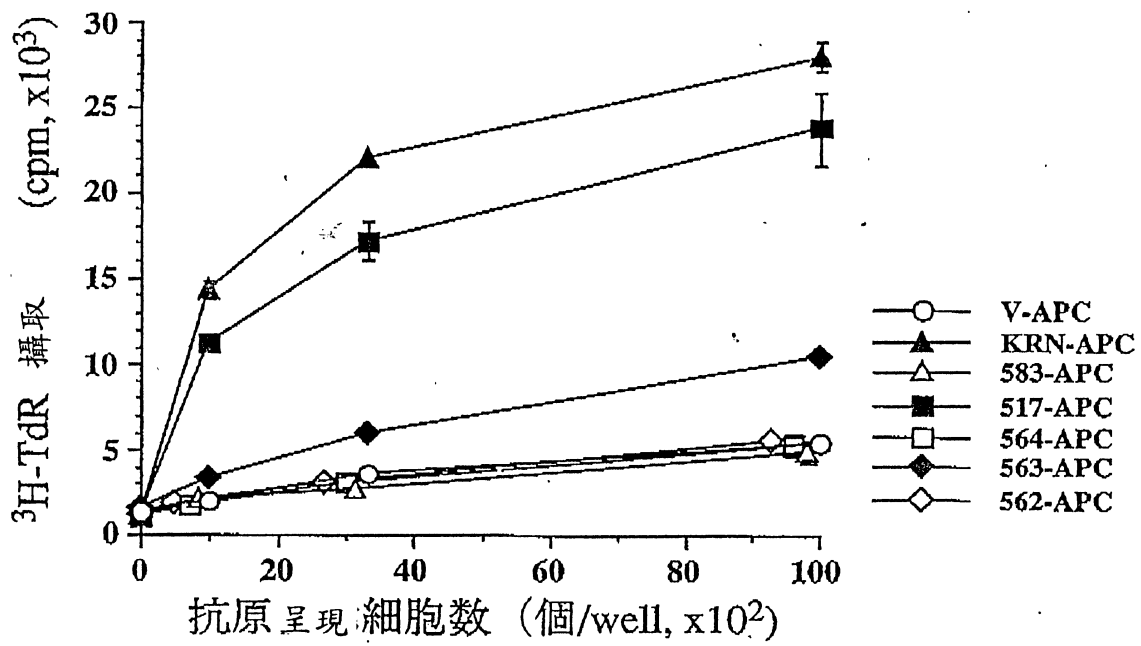


圖 4

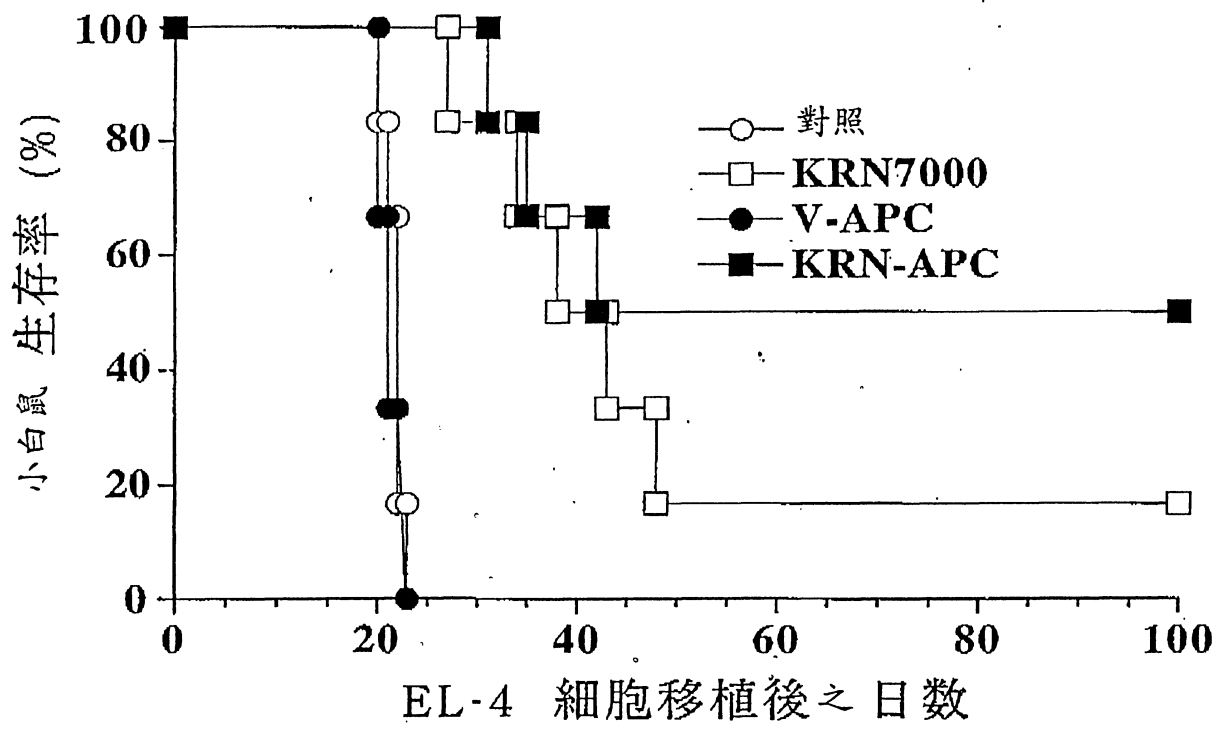


圖 5

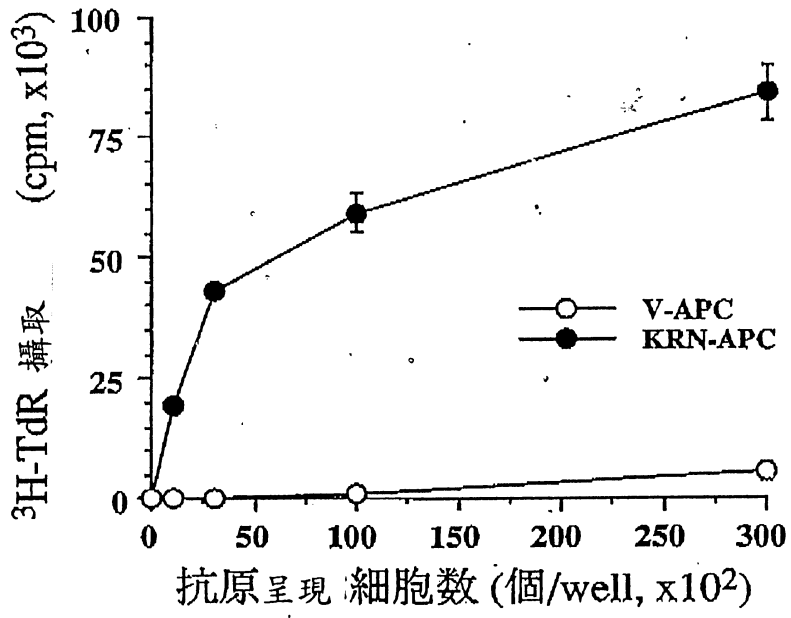


圖 6

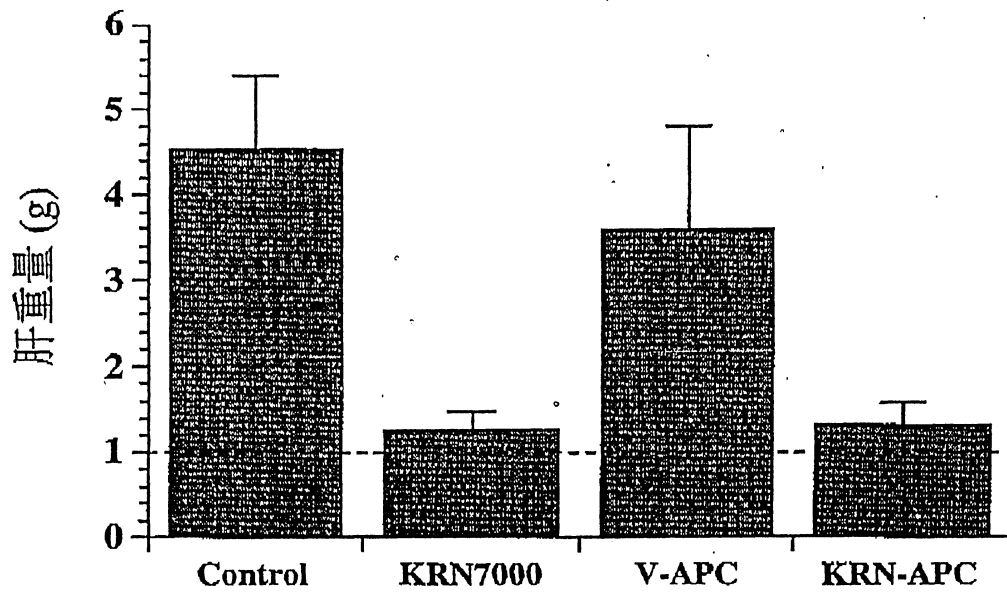


圖 7

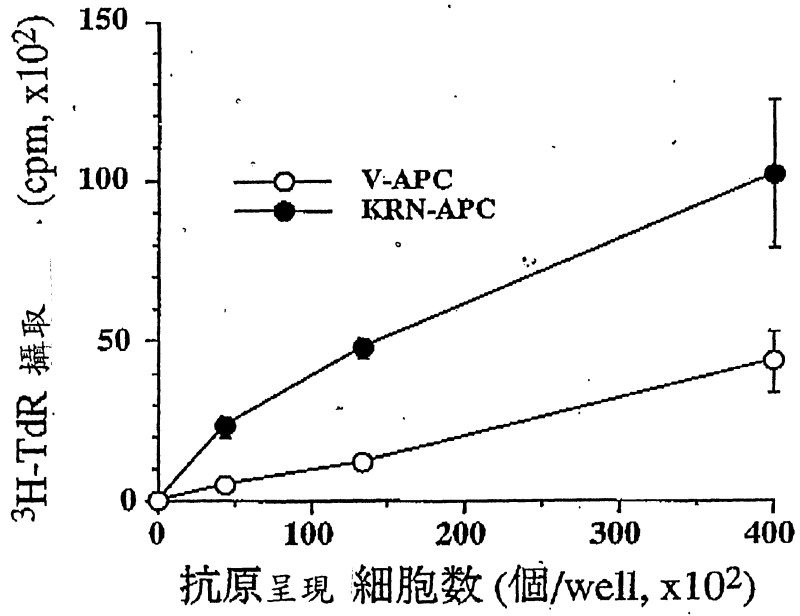


圖 8

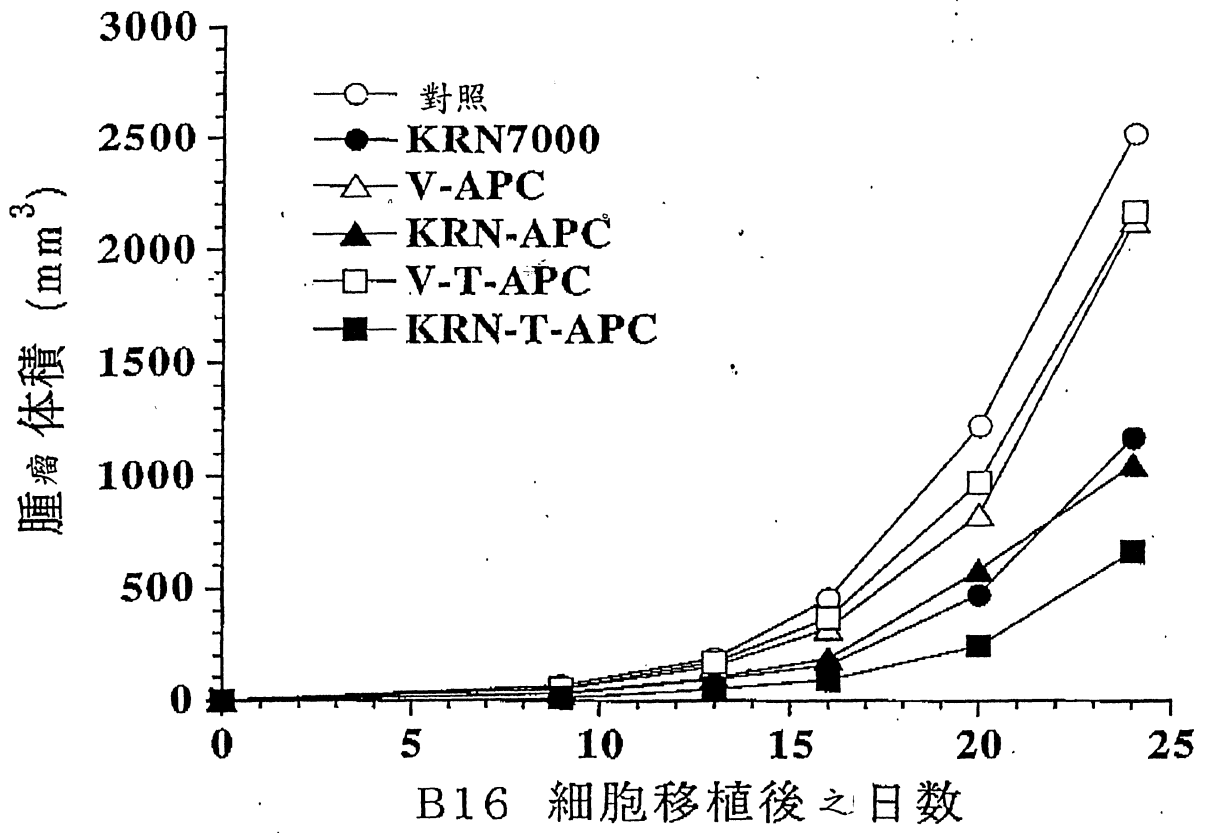


圖 9

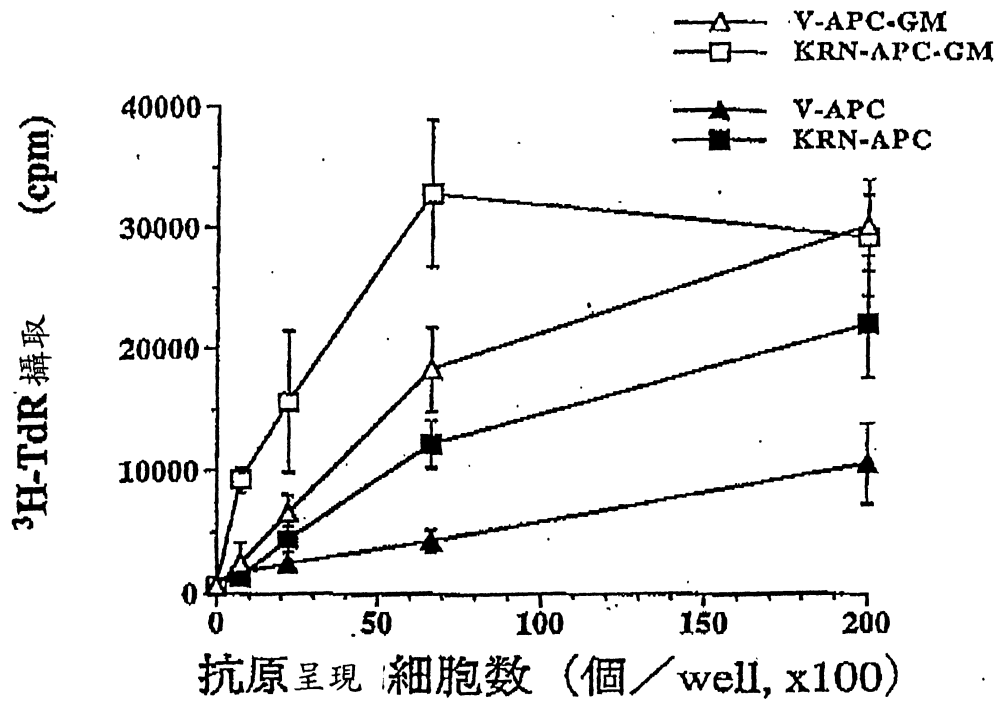


圖 10

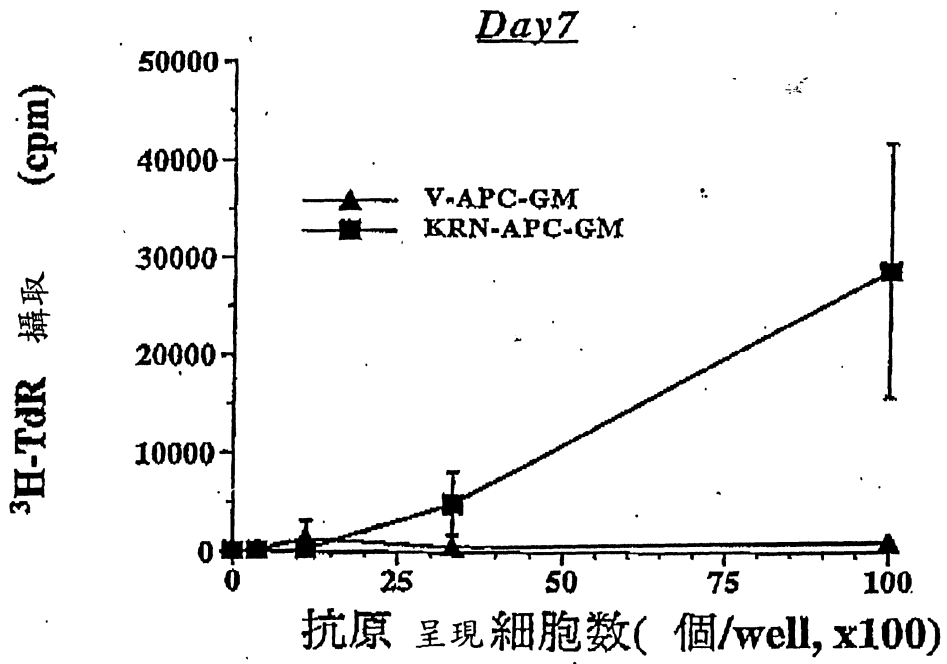


圖 11

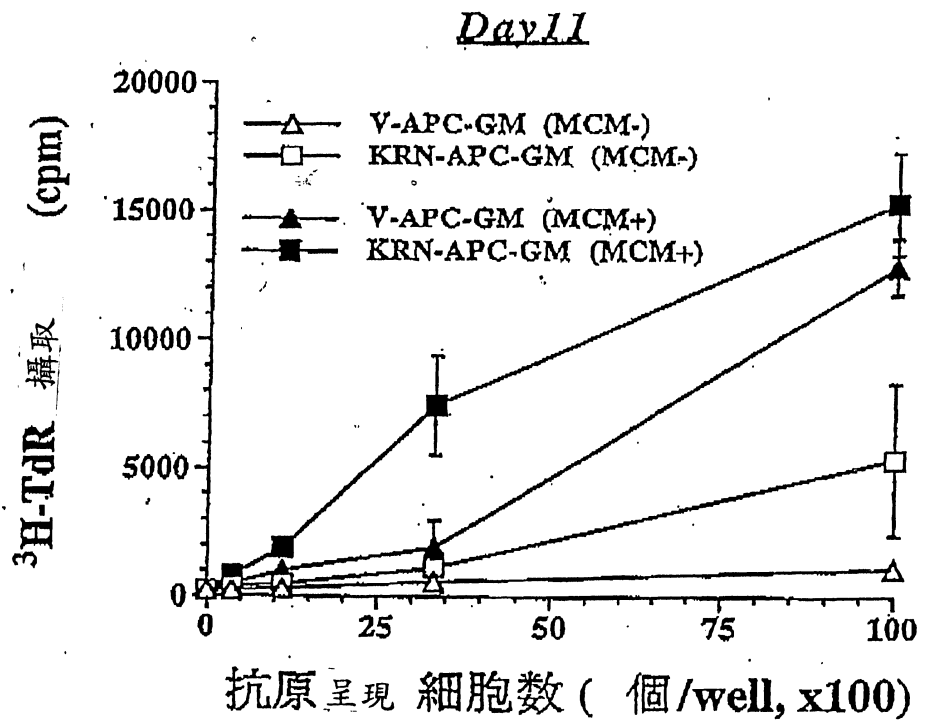


圖 12

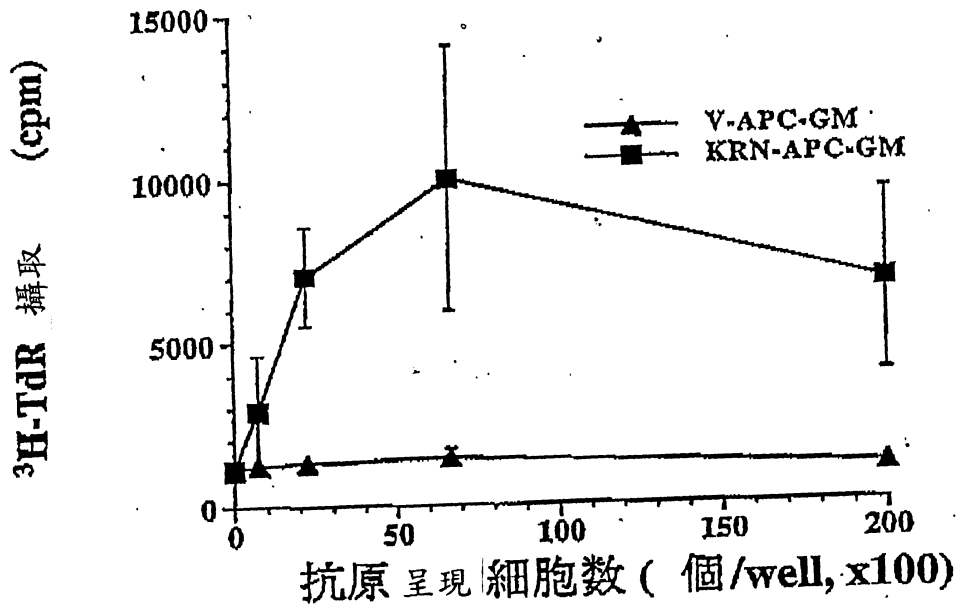


圖 13

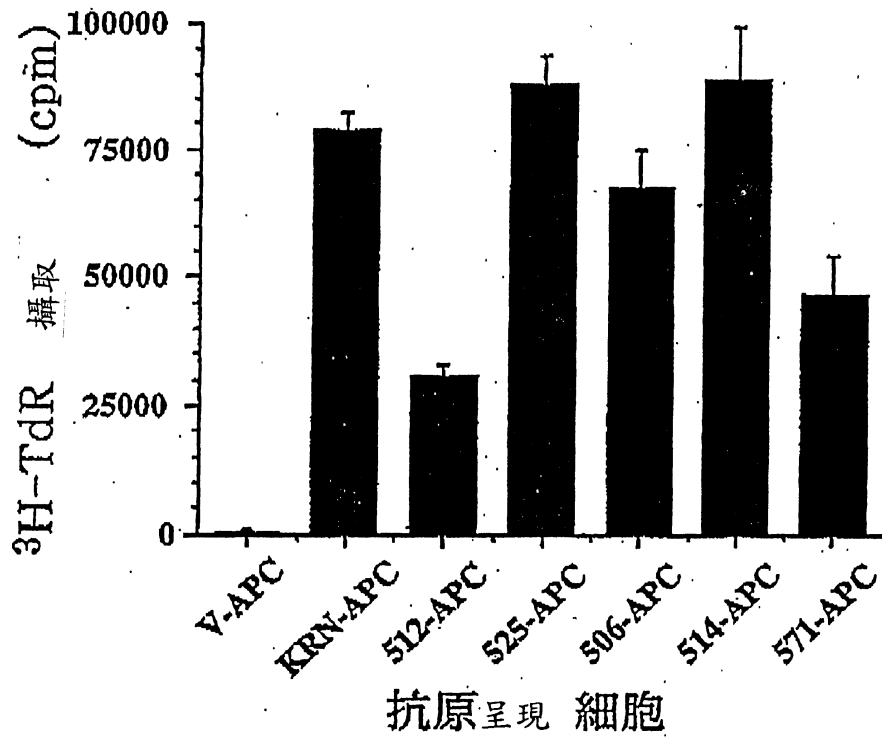
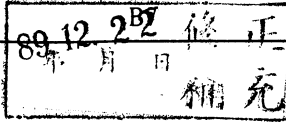


圖 14



五、發明說明(1)

發明之背景

發明的技術領域

本發明提供使用新穎之人類抗原呈現細胞，人類抗原呈現細胞的試管內活性化法，用經活性化之人類抗原呈現細胞的癌或AIDS治療法；並使用經活性化之人類抗原呈現細胞製造其治療用醫藥品。

關連技術之揭示

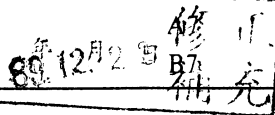
癌症的治療法有手術切除，化學療法，放射線療法，免疫療法等治療法但治癒率不高。所以，治癒率高之新穎治療劑及治療法的開發極其重要。巨噬細胞，B細胞及樹狀細胞等抗原呈現細胞(antigen-presenting cells, APC)為熟知的參與免疫反應之重要細胞；最近已有報告指出將抗原呈現細胞，特別是樹狀細胞誘導來抗癌之方法(Grabbe, S. 等(1995)Immunol. Today, 16, 117)。

小白鼠之樹狀細胞可由脾臟(Clowlwy, M. 等(1989) Cell Immunol., 118, 108)，骨髓(Inaba, K. 等(1992)J. Exp. Med., 176, 1693)及皮膚(皮膚由來的樹狀細胞即所謂蘭氏細胞)(Witmer-Pack, M. 等(1987)J. Exp. Med., 166, 1487)取得。將小白鼠骨髓所得之樹狀細胞以腫瘤抗原刺激，再於腫瘤細胞移植之前及之後植入來證明其可誘導腫瘤之免疫反應(Celluzzi, C.M. 等(1996)J. Exp. Med., 183, 283；Paglia, P. 等(1996)J. Exp. Med., 183, 317)。

人類抗原呈現細胞，特別是樹狀細胞已知可由周圍血液或臍帶血而得。如用周圍血液單核球由來的抗FcR⁺細胞，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



五、發明說明(2)

T細胞，B細胞及NK細胞抗體除去該細胞來精製人類周圍血液抗原呈現細胞之方法(Hsu等(1996)Nature Med., 2, 52)，以及將去除CD19⁺B細胞，CD2⁺T細胞之人類周圍血液單核球附著細胞用GM-CSF粒狀細胞-巨噬細胞群落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulation factor)與IL-4(間白素interleukin 4)培養7天而得之方法(Sallusto, F.等(1994)J. Exp. Med., 179, 1109)。報告指出如此而得之人類周圍血液由來的抗原呈現細胞有異基因(Allogeneic)MLR(混合白血球反應)(mixed leukocyte reaction)及自體(autologous)MLR增強效果。另而人類臍帶血液或骨髓細胞的抗原呈現細胞可由臍帶血液或骨髓CD34⁺細胞用GM-CSF及腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor)- α (TNF- α)調製而得(Santiago-Schwartz, F.等(1992)J. Leukocyte Biol., 52, 274 ; Caux, C.等(1992)Nature, 360, 258)。依前述之方法所得之人類臍帶血液或骨髓細胞由來的抗原呈現細胞雖有異基因(allogenic)MLR增強作用但無自體(autologous)MLR增強效果(Santiago-Schwartz, F.等)或效果極微(Caux, C.等)。

近年，以腫瘤抗原激活之抗原呈現細胞治療B淋巴腫瘤已被證實有效(Hsu, F. J.等(1996)Nature Med., 2, 52)。即，將由B淋巴腫瘤患者的周圍血液所調製的抗原呈現細胞與腫瘤抗原於試管中共同培養後，再植入B淋巴腫瘤患者而治療之。

如上述以腫瘤抗原激活抗原呈現細胞的方法，對B淋巴

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

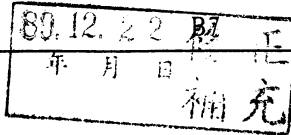
五、發明說明(3)

腫瘤這種有明確抗原之癌細胞非常有效。但是，腫瘤抗原為個體專一性抗原，要針對患者個體大量調製之成本太高。且大部分之癌患者並無特定的腫瘤抗原，所以，以腫瘤抗原激活抗原呈現細胞之治療法的適用範圍非常有限。如上述，為使這種非常有效的抗原呈現細胞療法適用於更多的癌患者，對不使用腫瘤抗原而可調製出對癌細胞有效的人類抗原呈現細胞之方法有迫切需要。

活體內有各種的糖與神經醯胺以 β -結合的方式形成種種的 β -半乳糖基神經醯胺與 β -葡萄糖基神經醯胺(Svennerholm, L.等(1972)Biochem. Biophys. Acta, 280, 626; Karksson, L.-A.等(1973)Biochim. Biophys. Acta, 316, 317)。而我們發現 α -半乳糖神經醯胺有顯著的免疫激活作用及抗腫瘤作用(Morita, M.等(1995)J. Med. Chem., 38, 2176);且 α -半乳糖基神經醯胺或 α -葡萄糖基神經醯胺之作用比其 β -變旋物更強(Motoki, K.等(1995) Biol. Pharm. Bull., 18, 1487)。且投與 α -葡萄糖基神經醯胺有放射線防護作用(Motoki, K.等(1995)Bioorg. Med. Chem. Lett., 5, 2413)及血小板或白血球增加作用(Motoki, K.等(1996)Biol. Pharm. Bull., 19, 952)。 α -半乳糖基神經醯胺之KRN7000有增強小白鼠脾臟由來之多含樹狀細胞的抗原呈現細胞機能的作用，在腫瘤移植前植入則有抗腫瘤作用(Koezuka, Y.等(1995)The 9th International Congress of Immunology, Abstract, 55, Yamaguchi, Y.等(1996)Oncol. Res. 8, 399)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



五、發明說明(6)

小白鼠脾臟由來的抗原呈現細胞。

圖5為於靜脈內投與以賦形劑或KRN7000前處理過之小白鼠脾臟由來抗原呈現細胞的EL-4擔癌小白鼠之生存期間。

圖6為抗原呈現細胞及T細胞的 ^3H -TdR攝取量之關係。V-APC及KRN-APC各為使用賦形劑及KRN7000刺激之小白鼠骨髓由來的抗原呈現細胞。

圖7為依圖6所調製而得之V-APC及KRN-APC靜脈內投與至腫瘤移植小白鼠時之各肝臟的重量。

圖8為抗原呈現細胞數及脾臟細胞的 ^3H -TdR攝取量之關係。V-APC及KRN-APC各為使用賦形劑及KRN7000刺激之小白鼠皮膚由來的抗原呈現細胞。

圖9為以賦形劑，賦形劑+B16-腫瘤細胞分解液，KRN7000或KRN7000+B16-腫瘤細胞分解液前處理而得之抗原呈現細胞(各為V-APC，V-T-APC，KRN-APC，KRN-T-APC)靜脈投與至腫瘤移植小白鼠時之各小白鼠的皮下腫瘤體積。

圖10為培養3日後之抗原呈現細胞數及人類周圍血液由來FcR⁻細胞的 ^3H -TdR攝取量之關係。V-APC，KRN-APC，V-APC-GM及KRN-APC-GM各為使用賦形劑，KRN7000，賦形劑+CM-CSF+IL4及KRN7000+GM-CSF+IL4前處理之人類周圍血液由來的抗原呈現細胞。

圖11為培養7日後之抗原呈現細胞數及人類周圍血液由來FcR⁻細胞的 ^3H -TdR攝取量之關係。V-APC-GM及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

KRN-APC-GM與圖10同。

圖12為培養11日後之抗原呈現細胞數及人類周圍血液由來FcR⁻細胞的³H-TdR攝取量之關係。V-APC-GM及KRN-APC-GM與圖10同，但MCM⁺為添加單核球馴化培養基(monocyte conditioned medium; MCM)，MCM⁻為未添加單核球馴化培養基之結果。

圖13為培養3日後之抗原呈現細胞數及人類臍帶血液由來FcR⁻細胞的³H-TdR攝取量之關係。V-APC-GM及KRN-APC-GM各為使用賦形劑+CM-CSF+IL4及KRN7000+GM-CSF+IL4前處理之人類臍帶血液由來的抗原呈現細胞。

圖14為以KRN7000以外之本發明化合物No.1, 2, 5, 10及16(各為AGL506, AGL514, AGL571, AGL512, AGL525)刺激時之小白鼠脾臟由來抗原呈現細胞的活性化作用。

發明的詳細說明

本發明者等針對上述問題點致力研究發見，KRN7000所代表的本發明的配糖體化合物對人類周圍血液及人類臍帶血液來來的抗原呈現細胞的機能有顯著的增強效果此效果並不局限於小白鼠脾臟由來之多含樹狀細胞之抗原呈現細胞，對小白鼠骨髓由來之多含樹狀細胞之抗原呈現細胞或小白鼠耳朵由來之含蘭氏細胞之抗原呈現細胞亦有顯著效果。本發明者等並發見對腫瘤移植小白鼠而言，植入添加KRN7000所代表的本發明的配糖體化合物以培養之小白

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

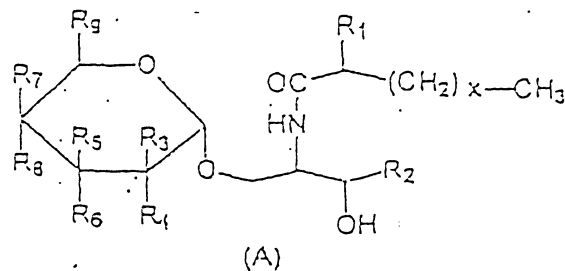
訂

五、發明說明 (8) 修正補充
89.12.27

鼠脾臟或骨髓由來之多含樹狀細胞之抗原呈現細胞有顯著抗腫瘤效果。

要言之，本發明乃有關在調製對癌或AIDS等感染症具療效之經活化之人類抗原呈現細胞時，所使用之含配糖體化合物體外活化性劑(抗原呈現機能增強劑)。詳言之，為有關人類周圍血液，人類臍帶血液，人類骨髓血液或人類皮膚製造之抗原呈現細胞(活性化對象之抗原呈現細胞)的活化性劑，尤其人類單核血球(monocyte)，人類樹狀細胞或人類CD1s細胞之活化性劑。

本發明提供一種人類抗原呈現細胞之活性化法，其特徵為於試管內一起培養人類由來之抗原呈現細胞及至少一種如下式(A)配糖體化合物或其鹽



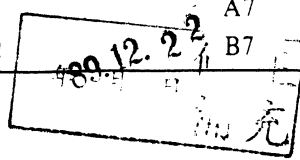
[式中、 R_1 為H或OH；

X為7-25之整數；

R_2 為下列(a)-(e)任一定義之取代基；

Y為5-17之整數；

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



五、發明說明 (16)

糖基-(1(1)-(2S,3S,4R)-2-胺基-N-[(R)-2-羥基二十四醯基]-15-甲基-1,3,4-十六烷三醇 D

30) O-(N-乙醯-2-胺基-去氧基- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(3))-O-[α -D-葡萄糖吡喃糖基-(1(2))]-O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(1)-(2S,3S,4R)-2-胺基-N-[(R)-2-羥基二十六醯基]-16-甲基-1,3,4-十八烷三醇 D

31) O-(N-乙醯-2-胺基-去氧基- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(3))-O-[α -D-葡萄糖吡喃糖基-(1(2))]-O- α -D-半乳糖吡喃糖基-(1(1)-(2S,3S,4R)-2-胺基-N-[(R)-2-羥基二十四醯基]-16-甲基-1,3,4-十七烷三醇 D

32) (2S,3S,4E)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十八醯胺基-4-十八碳烯-3-醇 A

33) (2S,3S,4E)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-4-十八碳烯-3-醇 A

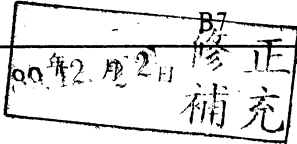
34) (2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-[(R)-2-羥二十五醯胺基]-16-甲基-3,4-十八烷二醇 A

式A或B所定義的配糖體化合物可形成醫藥上可容許之酸及酸加成鹽。形成酸加成鹽的鹽有鹽酸，硫酸，硝酸，磷酸等無機酸，或醋酸，丙酸，馬來酸，油酸，十六酸，檸檬酸，琥珀酸，酒石酸，富馬酸，麩胺酸，汎酸，十二磺酸，甲磺酸，磺酸等有機酸。

本發明的人類抗原呈現細胞活性化劑可活化從周圍血，臍帶血，骨髓細胞，皮膚等人類的各種組織而得的抗原呈現細胞。例如由人類周圍血，臍帶血或骨髓細胞(必要時使

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



五、發明說明(17)

用GM-CSF及IL-4)調製人類抗原呈現細胞時或調製後，於試管中加入本發明的活性化劑即可活化之。或於活性化人類抗原呈現細胞調製時，除GM-CSF及IL-4外，再添加SCF，IL-1，IL-3，TNF- α ，Flk2/Flt3配體等物(MCM)而調製成更有效的抗原呈現細胞。再者，於活性化人類抗原呈現細胞調製時，添加腫瘤抗原，病毒抗原或其抗元性之胜肽而調製成對癌或感染症更有療效的抗原呈現細胞。

本發明的人類抗原呈現細胞活性化劑可用適當的DMSO等溶劑溶解，再以生理食鹽水或培養基等稀釋成適當的濃度使用。活化人類抗原呈現細胞時所使用的本發明的活性化劑之最終濃度以0.1 ng/ml(10 μ g/ml，0.01 μ g/ml(1 μ g/ml為佳。本發明的人類抗原呈現細胞以使用前調配為佳。

本發明所提供之活性化人類抗原呈現細胞為在試管中將人類抗原呈現細胞加入至少一種上述式A或B所定義的配糖體化合物或其鹽培養而得。

本發明所用之人類抗原呈現細胞可為CD1s陽性細胞或富含CD1s之細胞；可由人類周圍血，人類臍帶血，人類骨髓細胞，人類皮膚等調製而得，但並不以此為限。

使用本發明的活化性劑活化人類抗原呈現細胞來治療癌患者，為非常有效之抗原呈現細胞療法。再者，利用上述的活性化抗原呈現細胞與患有周圍血共同培養所得之CTL(殺手T細胞(cytotoxic T lymphocyte))來治療癌或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (30)

充

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)。

藥理試驗

(藥理試驗1) KRN7000對人類周圍血由來的抗原呈現細胞的作用

在此對本發明的代表性配糖體化合物之KRN7000(化合物 No. 14)對人類周圍血由來之抗原呈現細胞的作用作一檢討。人類周圍血由來之抗原呈現細胞(主要為樹狀細胞)基本上依上述的Hsu等之方法調製。即，將人類周圍血以飛巴(Ficoll-Paque)(2000 rpm×35分離心)分離而得單核球劃分。此劃分之一部分浮游於含5%非動化人類AB血清中之PBS中(無Ca²⁺，Mg²⁺)，以50%巴歌(Percoll)(3000 rpm×20分)離心取得高比重劃分。此劃分以人類γ-球蛋白吸紙去除FcR⁺細胞(單核球去除劃分)。再與抗CD3，CD21，CD56單株抗體反應，洗淨後，以抗小白鼠IgG抗體吸紙除去與上述抗體有反應之T，B，NK細胞。此細胞劃分(單核球，T細胞，B細胞，NK細胞除去劃分)在賦形劑(最終濃度0.1% DMSO)及KRN7000(最終濃度100 ng/ml)之存在下，以含5%非動化AB血清之RPMI1640培養基培養40小時，洗淨後即為抗原呈現細胞。

而反應細胞則從上述所剩的單核球劃分用CD4⁺T富細胞

五、發明說明 (31)

柱精製CD4⁺T細胞，以含5%非動化AB血清之RPMI1640培養基培養至調製抗原呈現細胞時。

於96穴平底盤中加入先前所調製之抗原呈現細胞(5×10^4 細胞/穴)及反應細胞(1×10^5 細胞/穴)，進行自體MLR分析。六日間培養的最後12小時時，加入氘-胸苷($^3\text{H-TdR}$) $0.5 \mu\text{Ci}$ /穴培養，再以放射量計算細胞之 $^3\text{H-TdR}$ 攝取量。結果圖1(3穴的平均值及標準偏差)。此處的V-APC及KRN-APC各為以賦形劑及KRN7000前處理而得之抗原呈現細胞。

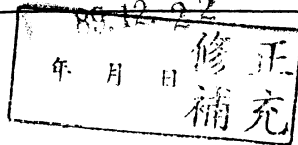
如圖1所示，CD4⁺T細胞，V-APC及KRN-APC單獨培養時並不會攝取 $^3\text{H-TdR}$ 。而將上述的T細胞與V-APC混合時則有 $^3\text{H-TdR}$ 攝取現象。若將T細胞與KRN-APC混合時，此攝取現象則更顯著。即，KRN-APC比V-APC有更強的自體MLR增強作用。KRN7000對人類周圍血由來的抗原呈現細胞有活性化作用(抗原呈現機能增強作用)。

(藥理試驗2)KRN7000對人類臍帶血由來的抗原呈現細胞的作用

人類臍帶血由來之抗原呈現細胞(CD1c陽性細胞)依以下的方法調製。即，將人類臍帶血以淋巴製劑(1500 rpm × 20分離心)分離而得單核球劃分。此劃分之一部分以含非動化FBS 2%，1 mM EDTA及PBS洗淨2次後，用人類γ-球蛋白蓋住FcR。與抗CD1c抗體反應再用FBS 2%，1 mM EDTA及PBS洗淨2次。再與抗小白鼠IgG微珠反應，用FBS 2%，1 mM EDTA及PBS洗淨2次後，浮遊於0.5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂



五、發明說明(32)

BSA, 5 mM EDTA / PBS 中。再用以 0.5 BSA, 5 mM EDTA / PBS 洗淨的 MiniMACS 磁氣管柱取得 CD1c 陽性細胞。將此 CD1c 陽性細胞溶於含 10% 非動化 AB 血清之 RPMI1640 培養基使成 1×10^6 個 / ml, 並添加於 24 穴平底盤中 (2 ml / 穴), 於各穴中增加賦形劑 (最終濃度 0.1% DMSO) 或 KRN7000 (最終濃度 100 ng / ml) 培養 3 天。上述培養基洗淨 3 回而為抗原呈現細胞。

反應細胞則從上述所剩的單核球劃分用 CD4⁺T 富細胞柱精製 CD4⁺T 細胞, 以含 10% 非動化 AB 血清之 RPMI1640 培養基培養至 1×10^6 個 / ml, 添加至 24 穴平底盤中 (2 ml / 穴) 培養 3 天以進行自體 MRL 分析。又由健康的志願者取得周圍血以人類 CD4⁺T 富細胞柱精製而得之 CD4⁺T 細胞為反應細胞進行異基因 MLR 分析。用上述的反應細胞 (1×10^5 細胞 / 50 ml / 穴) 及刺激細胞 (0, 1000, 10000 細胞 / 50 ml / 穴) 加入 96 穴平底盤中培養。在作異基因 MLR 時, 培養 4 天後於各細胞添加 ³H-TdR 0.5 μ Ci / 穴培養, 於 20 小時後再以放射量計算細胞之 ³H-TdR 攝取量。結果如圖 2 (3 穴的平均值及標準偏差)。

在作自體 MLR 時, 培養 7 天後於各細胞添加 ³H-TdR 0.5 μ Ci / 穴培養, 於 8 小時後再以放射量計算細胞之 ³H-TdR 攝取量。結果如圖 3 (3 穴的平均值及標準偏差)。此處的 V-APC 及 KRN-APC 各為以賦形劑及 KRN7000 前處理而得之抗原呈現細胞 (CD1c 陽性細胞)。

如圖 2 所示, 賦形劑所刺激的 CD1c⁺ 細胞 (抗原呈現細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

89.12.22
年 月 日 修正
補充

五、發明說明 (39)

與KRN7000 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。測量各小白鼠皮下腫瘤體積之結果如圖9(6隻小白鼠的肝臟重量平均值)。

如圖9所示，V-APC或V-T-APC之植入無腫瘤增殖抑制作用。而KRN-APC一次移植者與KRN7000 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 分三次投與者的腫瘤增殖抑制效果相當。有趣的是，以KRN-T-APC一次投與者比用KRN-APC一次移植者及KRN7000 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 分三次投與者的腫瘤增殖抑制效果更顯著。

(藥理試驗9) KRN7000對人類周圍血由來的抗原呈現細胞的作用

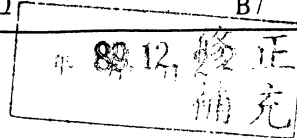
由人類周圍血單核球細胞以巴歌密度離心調製得單核球(monocyte)劃分。將此單核球劃分添加(或不添加)GM-CSF(50 ng/ml)及IL-A(100 ng/ml)培養之。同時添加賦形劑(V; 0.1% DMSO)或KRN7000(KRN; 100 ng/ml)。培養3天後回收細胞，以培養基洗淨3次而得抗原呈現細胞V-APC, KRN-APC, V-APC-GM及KRN-APC-GM(GM為添加GM-CSF及IL-4所培養的APC)。以人類周圍血由來的FcR⁺細胞為反應細胞進行異基因MLR。

如圖10所示，各種抗原呈現細胞的異基因MLR反應皆與抗原呈現細胞的數目成正相關，而相對於V-APC及V-APC-GM而言，以KRN-APC及KRN-APC-GM為抗原呈現細胞時有更明顯的反應細胞增殖促進作用。且KRN-APC-GM比KRN-APC有更強的反應細胞增殖促進作用。而添加KRN-APC-GM 20000個/穴時之反應細胞增殖抑

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(40)



制作用之原因可能為反應細胞的過度生長。

(藥理試驗10) KRN7000對人類周圍血由來的抗原呈現細胞的作用

為檢討長期培養的效果，進行了以下的實驗。由人類周圍血單核球細胞以巴歌密度離心調製得單核球(monocyte)劃分。將此單核球劃分添加GM-CSF(50 ng/ml)及IL-A(100 ng/ml)培養之。同時添加賦形劑(V; 0.1% DMSO)或KRN7000(KRN; 100 ng/ml)。培養7天後回收細胞，以培養基洗淨3次而得抗原呈現細胞V-APC-GM及KRN-APC-GM。以人類周圍血由來的FcR⁺細胞為反應細胞進行異基因MLR。

如圖11所示，V-APC-GM並不促進反應細胞增殖，但KRN-APC-GM呈現與抗原呈現細胞的數目成正相關之異基因MLR反應。

(藥理試驗11) KRN7000對人類周圍血由來的抗原呈現細胞的作用

為檢討長期培養的效果，進行了以下的實驗。由人類周圍血單核球細胞以巴歌密度離心調製得單核球(monocyte)劃分。將此單核球劃分添加GM-CSF(50 ng/ml)及IL-4(100 ng/ml)，或添加依Bender等之方法(Bender A.等(1996)J. Immunol. Method., 196, 121)所調製的單核球馴化培養基(monocyte conditioned medium MCM)培養之。同時添加賦形劑(V; 0.1% DMSO)或KRN7000(KRN; 100 ng/ml)。培養11天後回收細胞，以培養基洗淨3次而

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(41)

89.12.22 修正
年 月 日 補充

得抗原呈現細胞 V-APC-GM(MCM-)，KRN-APC-GM(MCM-)，V-APC-GM(MCM+) 及 KRN-APC-GM(MCM+)。以人類周圍血由來的 FcR⁻細胞為反應細胞進行自體 MLR。

如圖 12 所示，V-APC-GM(MCM-)並不促進反應細胞增殖，但 KRN-APC-GM(MCM-)呈現與抗原呈現細胞的數目成正相關之自體 MLR 反應。V-APC-GM(MCM+)及 KRN-APC-GM(MCM+)呈現與抗原呈現細胞的數目成正相關之自體 MLR 分析，而其效果以使用 KRN-APC-GM(MCM+)者較強。

由上述的藥理試驗 9，10，11 之結果可知，KRN7000 可活化由人類周圍血以不同方法誘導而得之抗原呈現細胞。
(藥理試驗 12) KRN7000 對人類臍帶由來的抗原呈現細胞的作用

由人類臍帶血單核球細胞以巴歌密度離心調製得單核球(monocyte)劃分。將此單核球劃分添加 GM-CSF(50 ng/ml)及 IL-4(100 ng/ml)培養之。同時添加賦形劑(V; 0.1% DMSO)或 KRN7000(KRN; 100 ng/ml)。培養 3 天後回收細胞，以培養基洗淨 3 次而得抗原呈現細胞 V-APC-GM 及 KRN-APC-GM。以人類臍帶由來的 FcR⁻細胞為反應細胞進行自體 MLR。

如圖 13 所示，V-APC-GM 並不促進反應細胞增殖，但 KRN-APC-GM 呈現與抗原呈現細胞的數目成正相關之異基因 MLR 反應。而添加 KRN-APC-GM 2000 個/穴之反

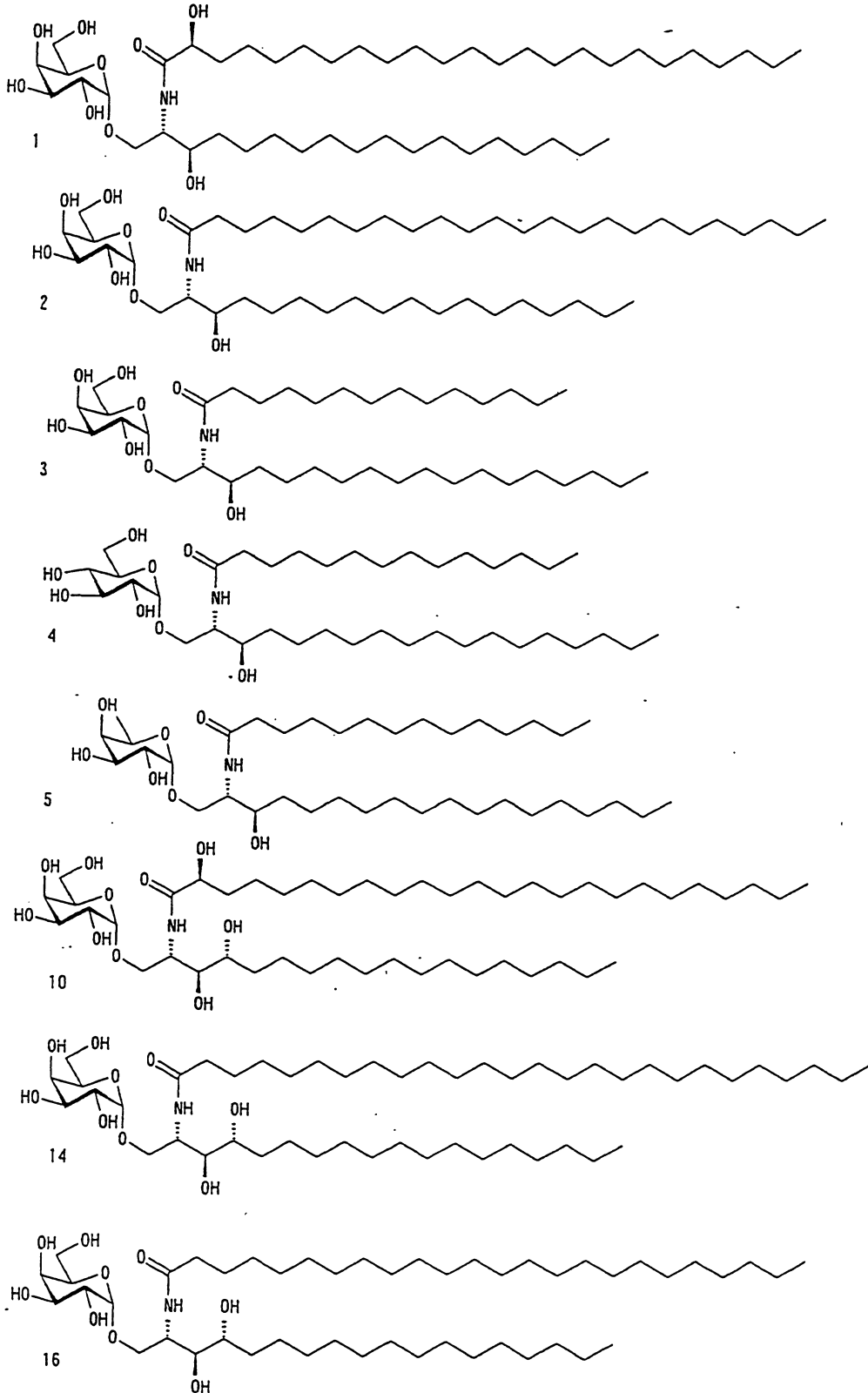
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

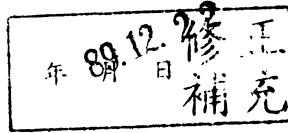
訂

五、發明說明 (43a)

91年七月一日
修正
補充

實施例中所用之各化合物之結構式如下：





四、中文發明摘要(發明之名稱：人類抗原呈現細胞之活性化法，經活性化之人類抗原呈現細胞及其用途)

本發明提供一種人類抗原性細胞活性化法，其特徵乃於試管中將人類抗原呈現細胞與式(A)所示之至少一種配糖體化合物或其鹽[適當例：(2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十六醯胺-3,4-十八烷二醇]一起培養。

本發明並提供依上述方法所活化之抗原呈現細胞，使用上述活化細胞的癌或AIDS等感染症之治療法以及該治療法所用的醫藥品的製造法。採用本發明的方法，在不使用抗腫瘤抗原激活下對癌或AIDS等感染症也有充分的療效。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱：METHOD FOR ACTIVATION OF HUMAN ANTIGEN-PRESENTING CELLS, ACTIVATED HUMAN ANTIGEN-PRESENTING CELLS AND USE THEREOF)
ヒト抗原提示細胞の活性化法、活性化されたヒト抗原提示細胞およびその使用

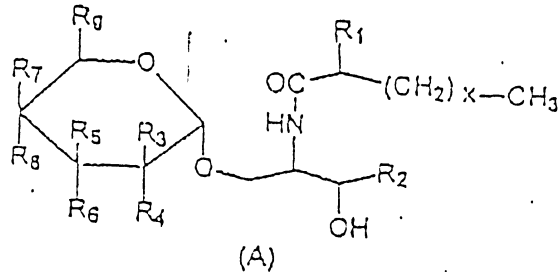
The invention relates to a method for activating human-derived antigen-presenting cells by in vitro cultivation with at least one of the glycoside compounds represented by formula (A) or salts thereof [preferred example: (2S,3S,4R)-1-(α -D-galactopyranosyloxy)-2-hexacosanoylamino-3,4-octadecanediol], and to human antigen-presenting cells activated by the method. The invention also relates to a method for treatment of cancer and infectious diseases including AIDS with the activated human

訂

線

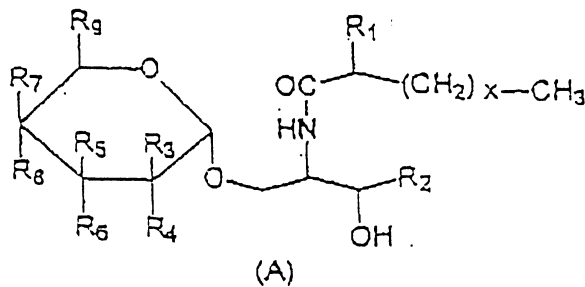
89.12.21
年 月 日
修正
補充

四、中文發明摘要 (發明之名稱:)



英文發明摘要 (發明之名稱:)

antigen-presenting cells, and to a use of the activated human antigen-presenting cells in the preparation of medicines for treating such diseases. The invention can provide a satisfactory therapeutic effect on cancer and infectious diseases including AIDS without the need to pulse the human antigen-presenting cells with tumor antigens.



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

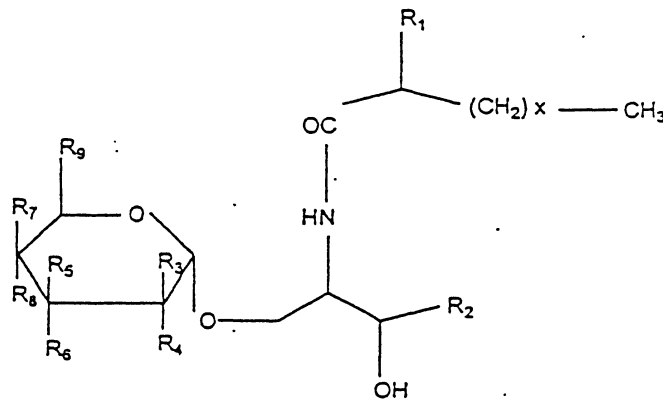
裝

訂

象

六、申請專利範圍 **公告本**

1. 一種人類抗原呈現細胞之活性化法，其特徵為於活體外共同培養人類樹狀細胞、至少一種如下式(A)配糖體化合物或其鹽，及腫瘤抗原：

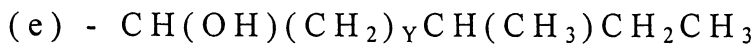
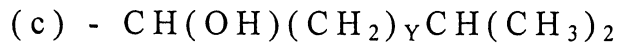
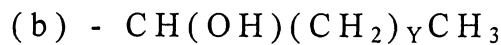
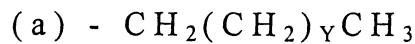


(A)

[式中、 R_1 為 H 或 OH；

X 為 7-25 之整數；

R_2 為下列(a)-(e)任一定義之取代基；



Y 為 5-17 之整數；

R_3 為 H、 R_4 為 OH；

R_5 為 OH；

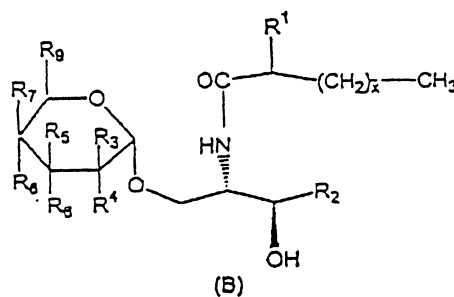
R_6 為 H；

六、申請專利範圍

R_7 及 R_8 任一方為H，他方為OH；

R_9 為H、 CH_3 或 CH_2OH 。

2. 根據申請專利範圍第1項之人類抗原呈現細胞之活性化法，其中人類樹狀細胞係藉由在GM-CSF及IL-4存在下，活體外培養人類單核白血球而製得。
3. 根據申請專利範圍第2項之活性化法，其中該人類單核白血球乃由人類周圍血液調製而得。
4. 根據申請專利範圍第2項之活性化法，其中該人類單核白血球乃由人類臍帶血液調製而得。
5. 根據申請專利範圍第2項之活性化法，其中該人類單核白血球乃由人類骨髓細胞調製而得。
6. 根據申請專利範圍第2項之活性化法，其中該人類單核白血球乃由人類皮膚調製而得。
7. 根據申請專利範圍第1~6項中任一項之人類抗原呈現細胞之活性化法，其中配糖體化合物呈如下式(B)

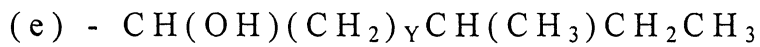
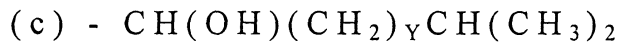
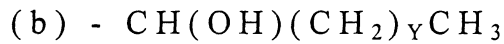
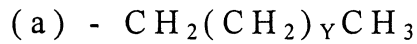


[式中、 R_1 為H或OH；

X為7-25之整數；

六、申請專利範圍

R_2 為下列 (a)-(e) 任一定義之取代基；



Y 為 5-17 之整數；

R_3 - R_9 為下列 i)-ii) 所選任一取代基；

i)

R_3 、 R_6 及 R_8 均為 H、

R_4 為 OH；

R_5 為 OH；

R_7 為 OH；

R_9 為 H、 CH_3 或 CH_2OH ；

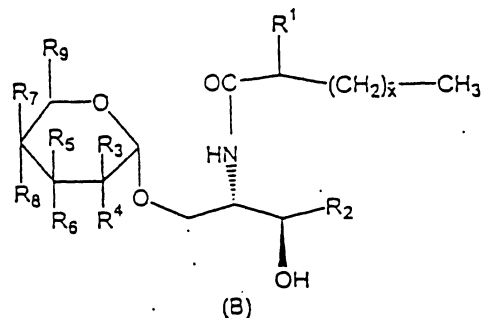
ii)

R_3 、 R_6 及 R_7 均為 H、

R_4 、 R_5 及 R_9 各同 i) 所定義、

R_8 為 OH。

8. 根據申請專利範圍第 1~6 項中任一項之人類抗原呈現細胞之活性化法，其中配糖體化合物呈如下式 (B)

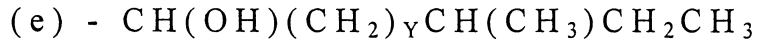
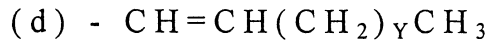
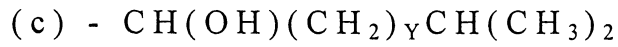
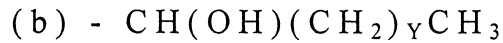
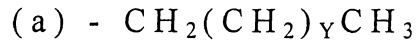


六、申請專利範圍

[式中、 R_1 為H或OH；

X為7-25之整數；

R_2 為下列(a)-(e)任一定義之取代基；



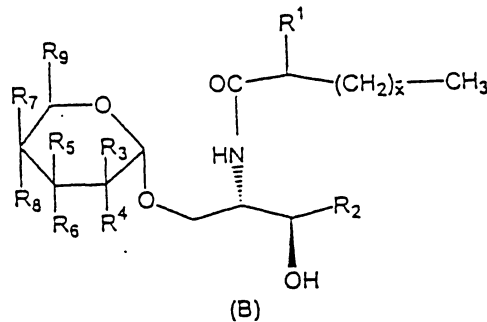
Y為5-17之整數；

R_3 、 R_6 及 R_8 均為H、

R_4 、 R_5 及 R_7 為OH；

R_9 為 CH_2OH 。

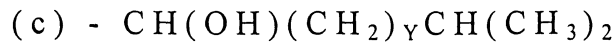
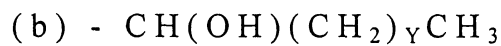
9. 根據申請專利範圍第1~6項中任一項之人類抗原呈現細胞之活性化法，其中配糖體化合物呈如下式(B)



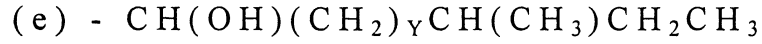
[式中、 R_1 為H或OH；

X為7-25之整數；

R_2 為下列任一定義之取代基；



六、申請專利範圍



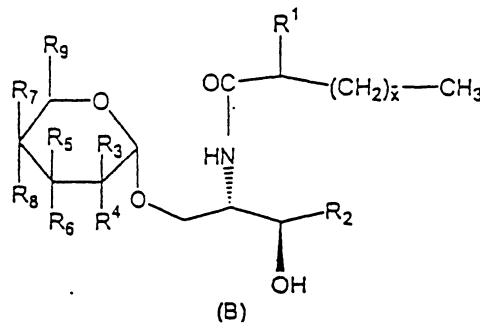
Y 為 5-17 之整數；

R_3 、 R_6 及 R_8 均為 H、

R_4 、 R_5 及 R_7 為 OH；

R_9 為 CH_2OH 。

10. 根據申請專利範圍第 1~6 項中任一項之人類抗原呈現細胞之活性化法，其中配糖體化合物呈如下式 (B)



[式 中、 R_1 為 H；

X 為 7-25 之整數；

R_2 為 $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$ ，Y 為 5-17 之整數；

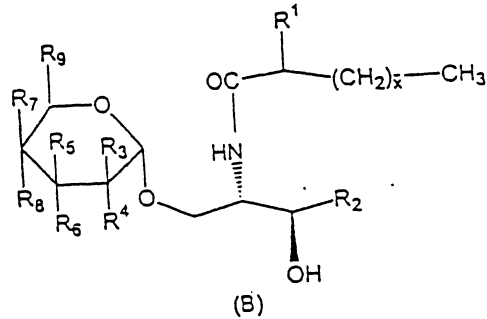
R_3 、 R_6 及 R_8 均為 H、

R_4 、 R_5 及 R_7 為 OH；

R_9 為 CH_2OH 。

11. 根據申請專利範圍第 1~6 項中任一項之人類抗原呈現細胞之活性化法，其中配糖體化合物呈如下式 (B)

六、申請專利範圍



[式中、 R_1 為H或OH；

X 為7-25之整數；

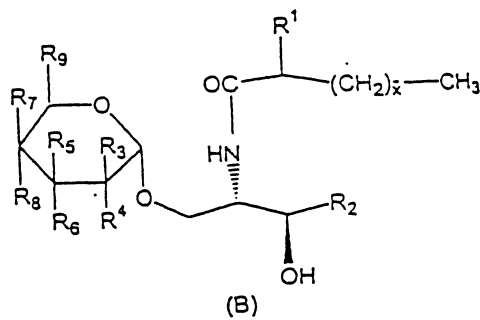
R_2 為 $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$ ， Y 為5-17之整數，該OH之立體組態為R；

R_3 、 R_6 及 R_8 均為H、

R_4 、 R_5 及 R_7 為OH；

R_9 為 CH_2OH 。

12. 根據申請專利範圍第1~6項中任一項之人類抗原呈現細胞之活性化法，其中配糖體化合物呈如下式(B)



[式中、 R_1 為H；

X 為21-25之整數；

R_2 為 $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$ ， Y 為11-15之整數，該OH

六、申請專利範圍

[式中、 R_1 為H；

X為21-25之整數；

R_2 為 $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$ ，Y為11-15之整數，該OH之立體組態為R；

R_3 、 R_6 及 R_8 均為H、

R_4 、 R_5 及 R_7 為OH；

R_9 為 CH_2OH 。

13. 根據申請專利範圍第1或2項之活性化法，其中配糖體化合物係選自下列化合物所組成之群組：

(2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十六醯胺基-3,4-十八烷二醇、

(2S,3R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-[(R)-2-羥基二十四醯胺基]-3-十八醇、

(2S,3R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十四醯胺基-3-十八醇、

(2S,3R)-1-(6'-去氧- α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-十四醯胺基-3-十八醇、

(2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-[(R)-2-羥基二十四醯胺基]-3,4-十八烷二醇，或

(2S,3S,4R)-1-(α -D-半乳糖吡喃糖氧基)-2-二十四醯胺基-3,4-十八烷二醇。

14. 一種用於治療癌症之醫藥組合物，其係包含由申請專利範圍第1~13項中任一項之活性化法所製得之經活化之人類抗原呈現細胞作為有效成分。