

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/16 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680021882.3

[43] 公开日 2009 年 6 月 3 日

[11] 公开号 CN 101448517A

[22] 申请日 2006.4.19

[21] 申请号 200680021882.3

[30] 优先权

[32] 2005.4.19 [33] US [31] 60/672,807

[86] 国际申请 PCT/US2006/014720 2006.4.19

[87] 国际公布 WO2006/113792 英 2006.10.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.18

[71] 申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 L·C·布拉茨扎克

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

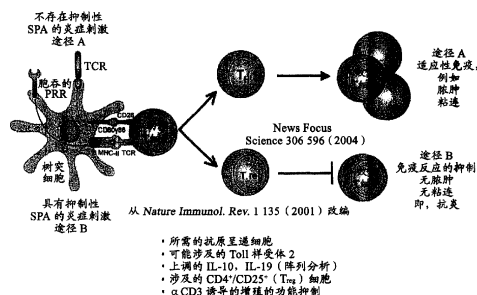
权利要求书 11 页 说明书 95 页 附图 8 页

[54] 发明名称

用于疾病免疫干预的单价和多价合成多糖抗原

[57] 摘要

本发明提供促炎症的合成多糖抗原 (SPA) 或其可药用盐, 其包含靶定 TLR2 的合成肽聚糖 (PGN) 部分, 其上各自共价附着第一表位和第二表位。第一表位包含一个或多个一般的 T 辅助表位的, 第二表位包含一个或多个目标表位。第一和第二表位每种以一个或多个拷贝存在于 SPA 内。每个目标表位是肽序列或糖类部分, 并且是 CD8 + T 细胞或 B 细胞的免疫原。本发明还提供了抑制性合成多糖抗原 (SPA) 或其可药用盐, 其包含靶定 TLR2 的合成肽聚糖 (PGN) 部分, 其上共价附着一个或多个目标表位。每个目标表位是肽序列或糖类部分, 并且在 SPA 中以一个或多个拷贝存在。



1. 促炎症合成多糖抗原(SPA) , 或其可药用盐, 其包含:

靶定 TLR2 的合成肽聚糖(PGN)部分, 其上各自共价附着第一表位和第二表位;

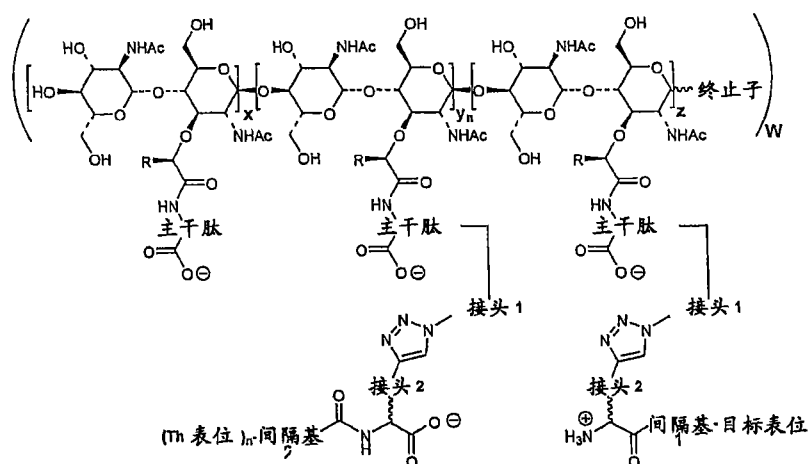
包含一个或多个一般的 T 辅助表位的第一表位, 包含一个或多个目标表位的第二表位; 第一和第二表位每种以一个或多个拷贝存在于 SPA 内,

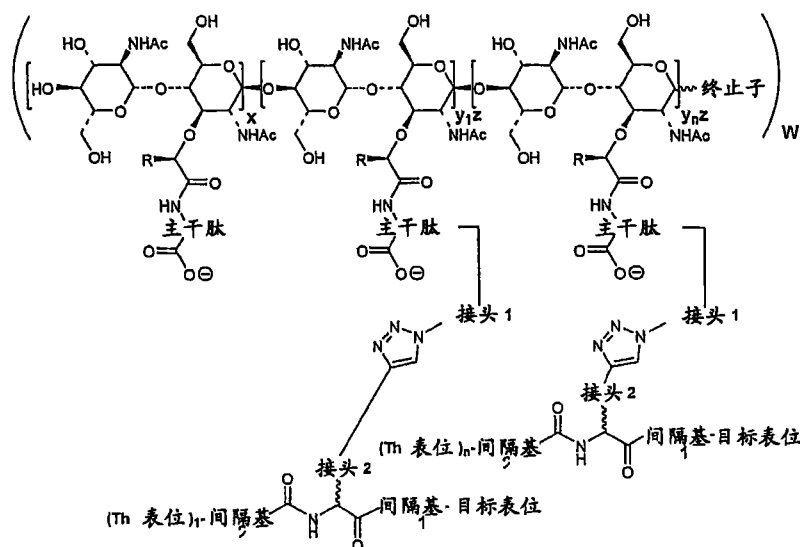
其中, 每个目标表位是肽序列或糖类部分, 并且其中每一个目标表位是 CD8+T 细胞或 B 细胞的免疫原。

2. 权利要求 1 的促炎症 SPA, 或其可药用盐, 其包含在 SPA 内一个或多个拷贝的单种目标表位。

3. 权利要求 1 的促炎症 SPA, 或其可药用盐, 其包含在 SPA 内各自一个或多个拷贝的一种以上的目标表位。

4. 权利要求 2 的促炎症 SPA, 其中该 SPA 选自





和其可药用盐，其中，

W 是 SPA 中单体单位的总数，并且是在从约 10 到约 375 之间的整数；

R 独立地选自 H 或低级烷基；

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数；

y_n 是 SPA 中第 n 种 Th 表位重复单位(ThR)的摩尔份数；

z 是 SPA 中目标表位重复单位(TR)的摩尔份数；

$y_n z$ 是 SPA 中第 n 种组合 Th 表位/目标表位重复单位(Th/TR)的摩尔份数；

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽是独立选择的，并且包含约 2 个到约 5 个氨基酸，其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ϵ 氨基，或其任一组合上；

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中，R 是低级烷基，那么接头 1 和接头 2 是独立选择的，并且包括约 1 个到约 6 个片段，每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$ ，和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ ，和 $-\text{SO}_2-$ ；

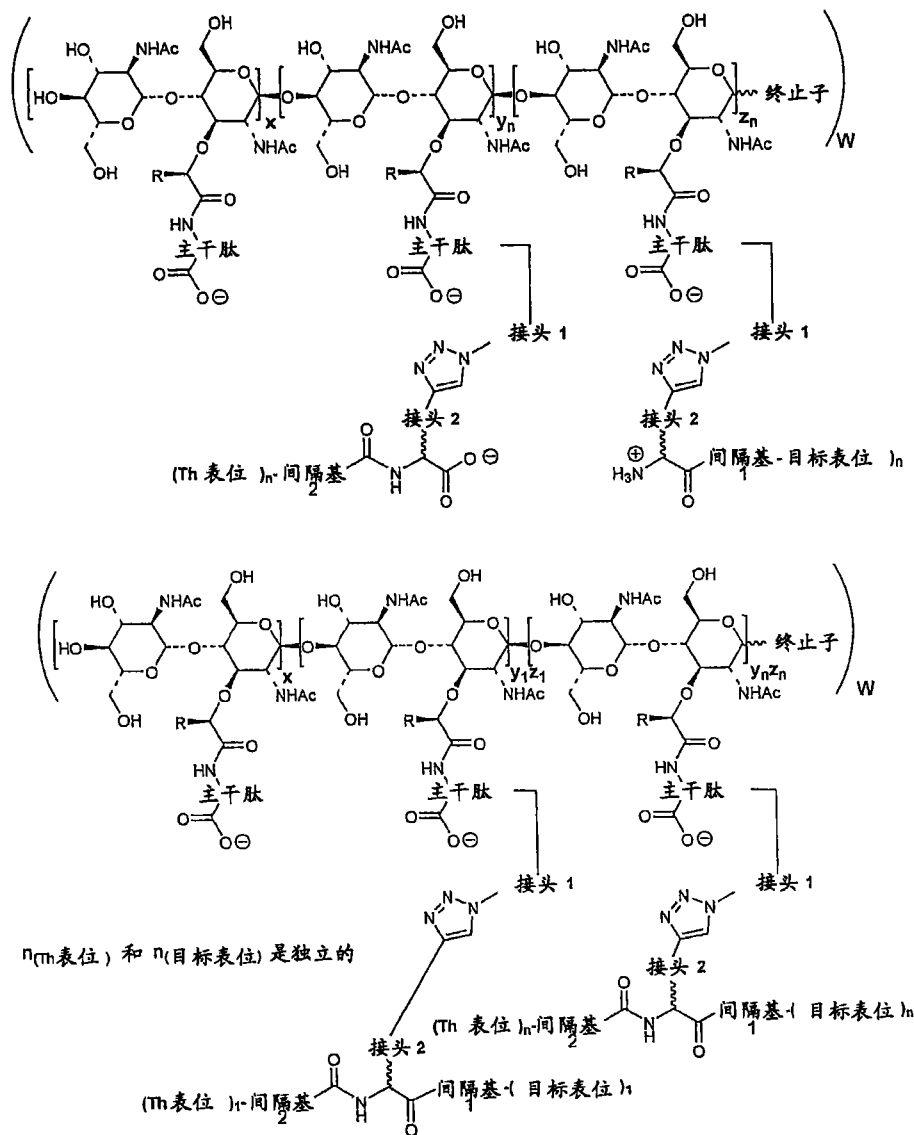
间隔基 1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽；

间隔基 2 的长度为 0 到约 10 个氨基酸；

目标表位是作为 CD8+T 细胞或 B 细胞免疫原的肽序列或糖类部分；
以及

(Th 表位)_n 是第 n 种不同的 Th 表位, 每一个 Th 表位是独立选择的并包含一般的 T 辅助表位。

5. 权利要求 3 的促炎症 SPA, 其中所述 SPA 选自



和其可药用盐, 其中,

W 是 SPA 中单体单位的总数, 并且是在从约 10 到约 375 之间的整数;

R 独立地选自 H 或低级烷基;

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数;

y_n 是 SPA 中第 n 种 Th 表位重复单位(ThR)的摩尔份数;

z_n 是 SPA 中第 n 种目标表位重复单位(TR)的摩尔份数;

$y_n z_n$ 是 SPA 中第 n/n 种组合 Th 表位/目标表位重复单位(Th/TR)的摩

尔份数;

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团,那么主干肽是独立选择的,并且包含约2个到约5个氨基酸,其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基,或其任一组合上;

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段1和2中,R是低级烷基,那么接头1和接头2是独立选择的,包括约1个到约6个片段,每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$,和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$,和 $-\text{SO}_2-$;

间隔基1是长度为约1个到约10个氨基酸的肽;

间隔基2的长度为0到约10个氨基酸;

(目标表位)_n是第n种不同的目标表位,每个目标表位独立地选择并且是作为CD8+T细胞或B细胞免疫原的肽序列或糖类部分;以及

(Th表位)_n是第n种不同的Th表位,每一个Th表位是独立选择的并包含一般的T辅助表位。

6. 权利要求3或5的促炎症SPA,其中SPA包含约2到约180种目标表位和约1到约180种Th辅助表位,每一种有一个或多个拷贝。

7. 抑制性的合成多糖抗原(SPA)或其可药用盐,其包含:

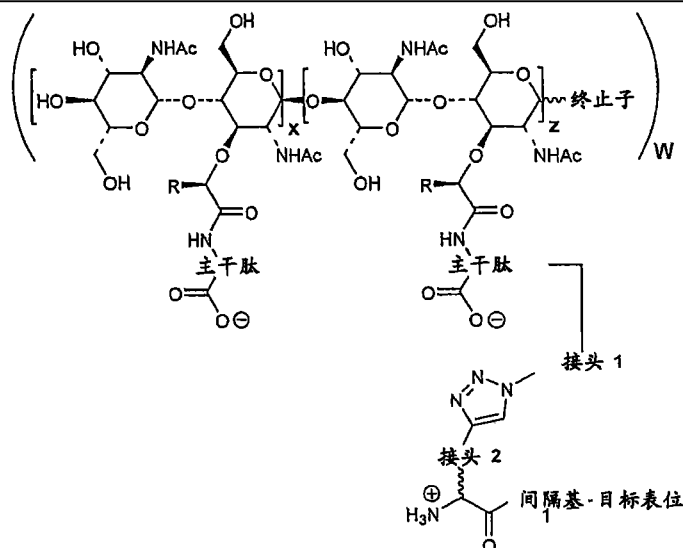
靶定TLR2的合成肽聚糖(PGN)部分,其上共价附着一种或多种目标表位,每种表位以一个或多个拷贝存在于SPA中,

其中每种目标表位是肽序列或糖类部分。

8. 权利要求7的抑制性SPA或其可药用盐,其包含SPA内一个或多个拷贝的一种目标表位。

9. 权利要求7的抑制性SPA或其可药用盐,其包含SPA内一个或多个拷贝的一种以上的目标表位。

10. 权利要求8的抑制性SPA,其中该SPA是



或其可药用盐，其中，

W 是 SPA 中单体单位的总数，并且是在从约 10 到约 375 之间的整数；

R 独立地选自 H 或低级烷基；

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数；

z 是 SPA 中目标表位重复单位(TR)的摩尔份数；

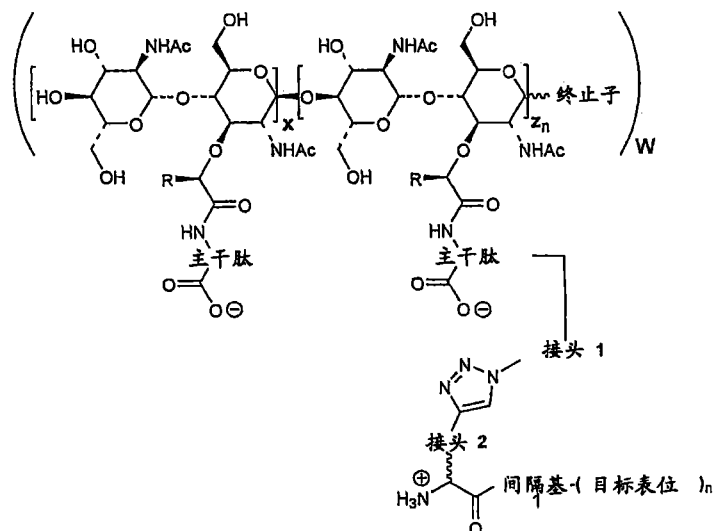
假如没有侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽是独立选择的，并且包含约 2 个到约 5 个氨基酸，其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基，或其任一组合上；

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中，R 是低级烷基，那么接头 1 和接头 2 是独立选择的，包含约 1 个到约 6 个片段，每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$ ，和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ ，和 $-\text{SO}_2-$ ；

间隔基 1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽；

目标表位是肽序列或糖类部分。

11. 权利要求 9 的抑制性 SPA，其中该 SPA 是



或其可药用盐，其中，

W 是 SPA 中单体单位的总数，并且是在从约 10 到约 375 之间的整数；

R 独立地选自 H 或低级烷基；

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数；

z_n 是 SPA 中第 n 种目标表位重复单位(TR)的摩尔份数；

假如没有侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽是独立选择的，包含约 2 个到约 5 个氨基酸，其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基，或其任一组合上；

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中，R 是低级烷基，那么接头 1 和接头 2 是独立选择的，包含约 1 个到约 6 个片段，每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$ ，和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ ，和 $-\text{SO}_2-$ ；

间隔基 1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽；

(目标表位) $_n$ 是第 n 种不同的目标表位，每个目标表位独立地选择并且是肽序列或糖类部分。

12. 权利要求 9 或 11 的抑制性 SPA，其中该 SPA 包含约 2 种到约 180 种目标表位，每种表位有一个或多个拷贝。

13. 合成的多糖抗原，其中该 SPA 是聚合物，包含序列：



其中,

X^1 和 X^2 独立地是 H 或终止子;

W 代表聚合物中单体单位(MO)的数目, 并且可以是在约 2 到约 375 之间的整数;

每一个 MO 是选自未取代的重复单位(UR)、一个或多种 Th 表位重复单位(ThR)、一个或多种目标表位重复单位(TR)、一个或多种组合的 Th/目标表位重复单位(Th/TR)和其组合的单体单位,

或其可药用盐。

14. 权利要求 13 的合成的多糖抗原, 其中该 SPA 是无规共聚物。

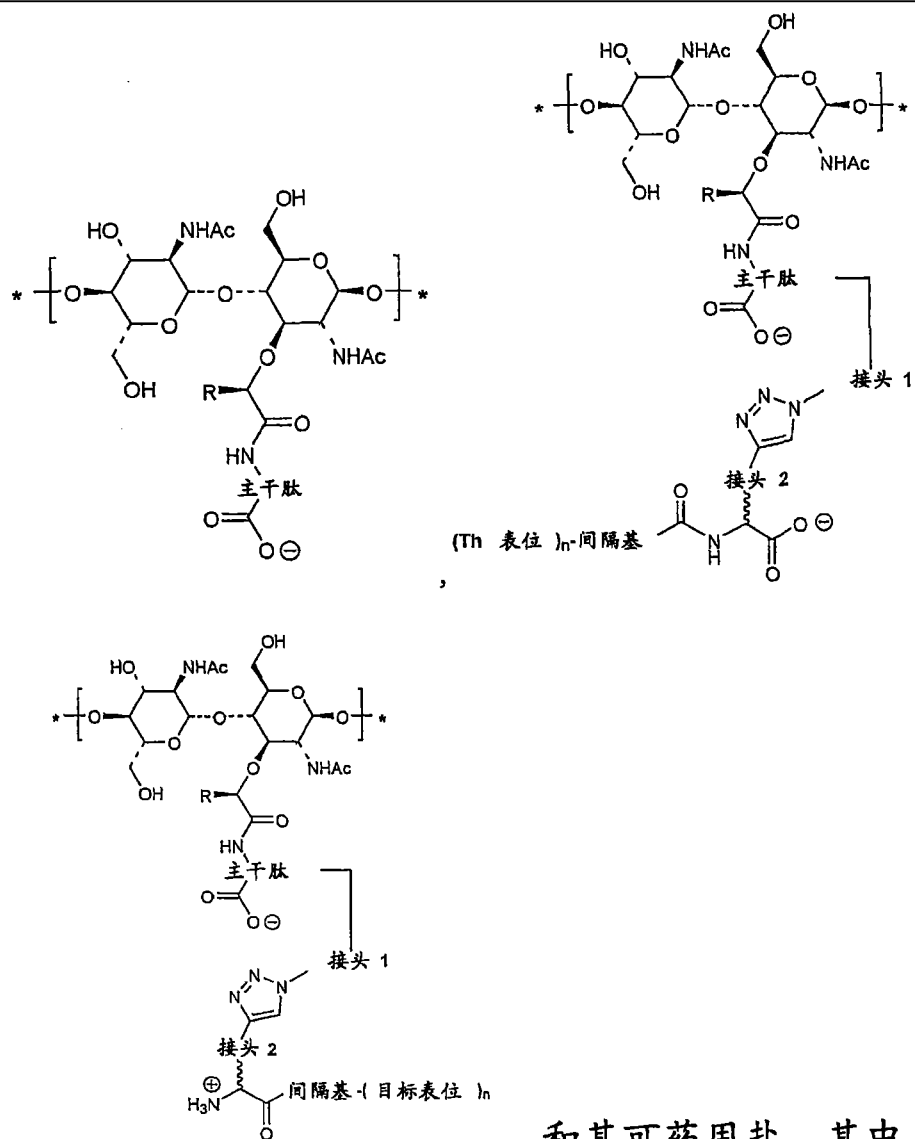
15. 权利要求 13 的合成的多糖抗原, 其中该 SPA 是嵌段共聚物。

16. 权利要求 13 的合成的多糖抗原, 其中该 SPA 是交替共聚物。

17. 权利要求 13 的合成的多糖抗原, 或其可药用盐, 其中 SPA 是促炎症合成多糖抗原, 包括第一表位和第二表位共价附着在其上的靶定 TLR2 的合成肽聚糖(PGN)部分; 包含一个或多个一般的 T 辅助表位的第一表位, 包括一个或多个目标表位的第二表位, 且第一和第二表位在 SPA 内以一个或多个拷贝存在, 其中每一个目标表位是肽序列或糖类部分, 其中每一个目标表位是 CD8⁺T 细胞或 B 细胞的免疫原。

18. 权利要求 13 的合成的多糖抗原, 或其可药用盐, 其中 SPA 是抑制性的合成多糖抗原, 包含一个或多个目标表位共价附着在其上的靶定 TLR2 的合成肽聚糖(PGN)部分, 每一种表位在 SPA 内以一个或多个拷贝存在, 其中每一个目标表位是肽序列或糖类部分。

19. 包含约 10 到约 375 个单体单位的促炎症合成多糖抗原(SPA), 所述单体单位独立地选自



，和其可药用盐，其中

R 独立地选自 **H** 或低级烷基；

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽是独立选择的，包含约 2 个到约 5 个氨基酸，其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基，或其任一组合上；

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中，**R** 是低级烷基，那么接头 1 和接头 2 是独立选择的，包括约 1 个到约 6 个片段，每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$ ，和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ ，和 $-\text{SO}_2-$ ；

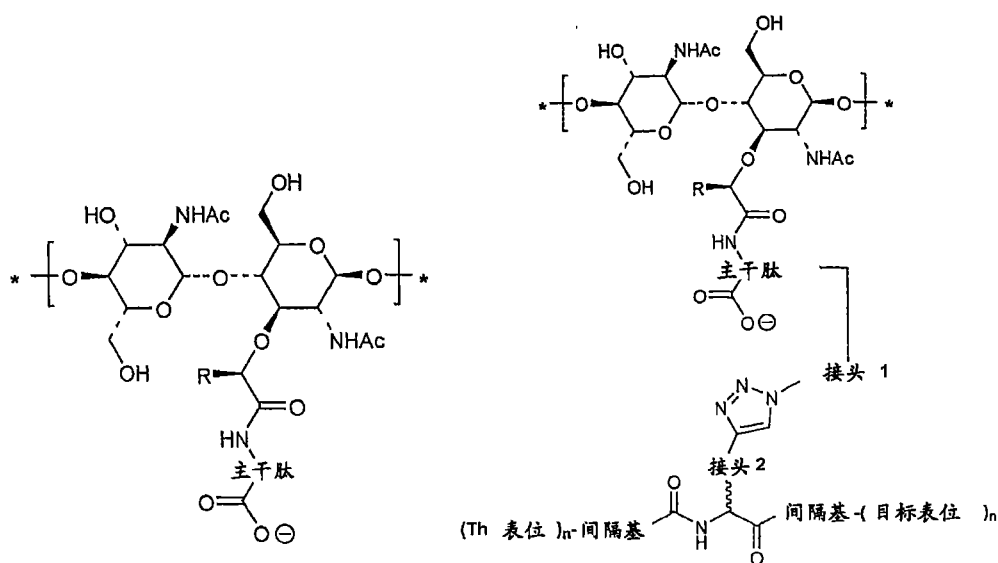
间隔基 1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽；

间隔基 2 的长度为 0 到约 10 个氨基酸；

(目标表位)_n是第 n 种不同的目标表位, 每个目标表位独立地选择并且是作为 CD8+T 细胞或 B 细胞免疫原的肽序列或糖类部分;

(Th 表位)_n是第 n 种不同的 Th 表位, 每一个 Th 表位是独立选择的并包含一般的 T 辅助表位。

20. 包含约 10 个到约 375 个单体单位的促炎症合成多糖抗原(SPA), 所述单体单位独立地选自



和其可药用盐, 其中

R 独立地选自 H 或低级烷基;

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团, 那么主干肽是独立选择的, 包括约 2 个到约 5 个氨基酸, 其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ϵ 氨基, 或其任一组合上;

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头 1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

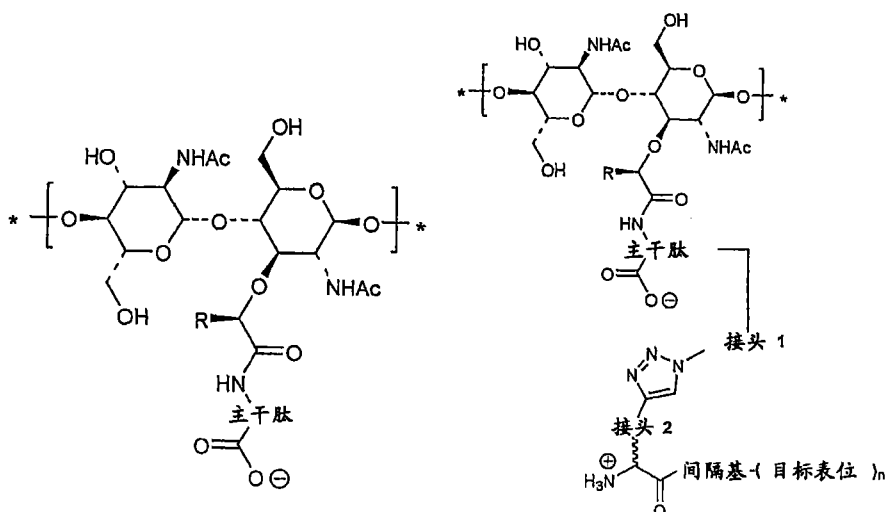
间隔基 1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

间隔基 2 的长度为 0 到约 10 个氨基酸;

(目标表位)_n是第 n 种不同的目标表位, 每个目标表位独立地选择并且是作为 CD8+T 细胞或 B 细胞免疫原的肽序列或糖类部分;

(Th 表位)_n 是第 n 种不同的 Th 表位, 每一个 Th 表位是独立选择的并包含一般的 T 辅助表位。

21. 包含约 10 到约 375 个单体单位的抑制性合成多糖抗原(SPA), 所述单体单位独立地选自



和其可药用盐, 其中

R 独立地选自 H 或低级烷基;

假如不存在侧翼羧酸或羧酰胺基团, 那么主干肽是独立选择的, 包括约 2 个到约 5 个氨基酸, 其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ϵ 氨基, 或其任一组合上;

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头 1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

间隔基 1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

(目标表位)_n 是第 n 种不同的目标表位, 每个目标表位独立地选择并且是肽序列或糖类部分。

22. 药物组合物, 其包含权利要求 1 到 21 任一项的合成多糖, 或其可药用盐, 和可药用的稀释剂、赋形剂或载体。

23. 权利要求 1 到 21 任一项的合成多糖抗原或其可药用盐作为药物的用途。

24. 权利要求 1 到 21 任一项的化合物或其可药用盐用于制备用来预防或治疗对免疫调节剂治疗敏感的疾病或病症的药物的用途。

25. 治疗或预防对免疫调节剂治疗敏感的疾病或病症的方法，其包括对需要其的患者施用有效量的权利要求 1 到 21 任一项的化合物或其可药用盐。

26. 在哺乳动物中诱导免疫反应的方法，其包括对所述哺乳动物施用有效量的权利要求 1 到 21 任一项的合成多糖抗原或其可药用盐。

用于疾病免疫干预的单价和 多价合成多糖抗原

发明领域

本发明涉及用于疾病免疫干预的单价和多价合成多糖抗原。更特别地，本发明涉及用单价和多价合成多糖抗原对免疫反应进行抗原特异性地刺激和抑制。

发明背景

树突细胞(DCs)在不成熟状态(iDC)时几乎都位于外周组织，从而使它们能够吞噬抗原，从抗原产生肽表位，并将表位装载到由主要组织相容性复合体(MHC)编码的分子的识别缝隙内。对抗原的吸收和加工能导致树突细胞的成熟，从而导致其失去摄入和加工抗原、在其表面呈递加工过的抗原的能力，其特征不在于增加表面 MHC II 类分子和共刺激分子(如 CD80 和 CD86)的表达(Chakraborty 等人 (2000) Clin. Immunol. 94:88-98)。树突细胞成熟的起始是由出现在树突细胞上的 toll 样受体(TLRs)刺激引起的。Toll 样受体识别具有高度保守的结构基序的抗原，例如病原体相关的分子模式(PAMPs; Medzhitov (2001) Nat. Rev. Immunol. 135-145)，包括脂多糖(LPS)、肽聚糖和脂肽，以及鞭毛蛋白、细菌 DNA 和病毒双链 RNA。

成熟的树突细胞是 T 细胞有效的刺激物，并且用它们的多触角(树突的形状，通过负载表位的 MHC 分子与大量的 T 细胞进行细胞与细胞间接触(Banchereau 等人(2000) Annu. Rev. Immunol.18:767-811)。然后，活化的 CD4+T 辅助(Th)细胞能将趋化因子和细胞因子信号传送到其他的树突细胞，使它们能活化幼稚的 CD8+T 细胞，并将这些细胞转化为抗原特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)。活化的 Th 细胞与 B 细胞相互作用，为这

些 B 细胞提供控制分化、克隆扩增的分子信号, 以及确定在产生获得性免疫体液应答中由 B 细胞分泌的抗体同种型。

树突细胞活化 T 细胞的能力与它们的 MHC 和共刺激标记物(如 CD80 和 CD86)的组成型表达相关(Banchereau 等人(2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811)。如果这些分子在树突细胞表面的量减少或缺失, 树突细胞就不能参与与 T 细胞的刺激性同源相互作用。不成熟的树突细胞通过诱导人 T 调节(Treg)细胞的分化而促进外周耐受性(Jonuleit 等人(2000) *J. Exp. Med.* 192:1213-1222), 所述 Treg 细胞在体内和体外展示调节功能。活化的 Treg 细胞也已经表现出能通过自分泌或在效应 T 细胞中的诱导而引起抗炎细胞因子 IL-10 的产生(Dieckmann 等人(2002) *J. Exp. Med.* 196:247-253)。

IL-10 属于 II 型细胞因子, 它具有强烈的抗炎症活性, 下调 T 效应细胞(Morel 等人 (2002) *Immunol.* 106:229-236)、树突细胞(Martin 等人 (2003) *Immunity* 18:155-167)和其他抗原递呈细胞(Williams 等人 (2002) *J. Leuko. Biol.* 72:800-809)的炎症反应。IL-10 能下调未经限制的炎症反应, 否则这样的炎症反应可能对宿主有害(Moore 等人(2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19:683-765)。

接种疫苗和免疫治疗策略是直接对这种复杂设计的一系列细胞相互作用的外部处理。

当前的疫苗技术

针对给定的 CTL 表位的强 CD8+T 细胞反应和针对给定的表位的抗体反应的产生都需要强的 Th 反应的产生。因此给予至少一种含抗原性表位的 T 辅助细胞是非常需要的(Vitello 等人 *J. Clin. Invest* (1995) 95:341; Livingston 等人(1997) *J. Immunol.* 159:1383)。为了避免在个体对特定抗原的免疫应答中出现大的遗传变异, 通常将抗原与有多种 Th 表位的大的蛋白质(如匙孔血蓝蛋白, KLH)一起给药。

另外, 含有非种系选择性或者允许性 Th 表位的肽与抗原一起给药。含有非种系选择性或者允许性 Th 表位的肽被递呈到多数 MHC II 类单元型分子上, 从而在大多数人群中诱导强的 CD4+Th 反应。非种系选择性或

者允许性 T 辅助表位包括破伤风类毒素肽、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)pfd27、乳酸脱氢酶肽和 HIV 的 gp120。

免疫治疗和接种疫苗对预防和治疗很多紊乱(如某些感染性疾病或癌症)是很吸引人的方法。但是这样治疗的成功通常受免疫治疗方案内在的几个缺点的限制。最常见的是选择出来的 CTL 表位的弱免疫原性。代表 T 细胞免疫原的合成肽在单独递送时只能引起弱的免疫反应。因而,它们作为疫苗或免疫治疗制品不是有效的。含有 CTL 表位的全长蛋白质不能有效地进入 MHC I 类分子的加工途径。另外,CTL 表位也是 HLA 限制的,因而在人群中很大程度的 MHC I 类分子的多态性意味着以 CTL 表位为基础的疫苗不能在人群中提供针对所有基因型的广泛保护。此外,由于病原体/肿瘤的异质性,需要多种抗原有效消灭目标微生物或肿瘤细胞。

增加免疫反应的标准方法是使用佐剂,如从免疫原中分离到的完全弗氏佐剂(CFA)。但是很多有效的佐剂,包括完全弗氏佐剂,在对人使用时毒性太大。一些佐剂由于非常差的可溶性,需要在给药前立即与免疫原进行配制。在被批准用于人的很少的几种佐剂中,明矾就是这种佐剂的例子。近来,某些微生物天然产品已经表现出在免疫调节中非常有用,特别是作为佐剂使用,并为开发新的疫苗技术打下良好的基础(Kensil, *Methods Mol. Med.* (2000) 42:259)。

促炎症反应

微生物抗原,如来自革兰氏阴性细菌的脂多糖(LPS)和来自革兰氏阴性细菌和阳性细菌的细菌细胞壁糖肽(也称作胞壁质或肽聚糖(PGN))都是有效的免疫调节剂。例如,来自天然来源的高分子量的细菌肽聚糖公知为有效的炎症物质,并很久就用来在实验动物中诱导关节炎(Wahl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 165:884)。

很多微生物抗原,包括肽聚糖,被认为通过活化一种或更多的哺乳动物 TLR 而发挥促炎症效应。结合和活化 TLR 能引发细胞内的信号级联反应,从而诱导转录因子 NF- κ B, NF- κ B 又刺激编码促炎症介质(如趋化因子和某些细胞因子)的基因的表达。

TLR2 的第二种天然产物配体是来自支原体的巨噬细胞活化性脂肽 2(MALP-2)的脂类组分(Mulradt 等人 (2002) J. Exp. Med. 185:1951)。Pam3Cys 是 MALP-2 的合成形式, 当它缀合合适的表位时, 已经表现出能促进针对流感病毒感染细胞的病毒特异性的 CTL 反应(Deres 等人(1989) Nature 342:561), 和刺激产生针对口蹄疫的保护性抗体(Weismuller 等人 (1989) Vaccine 7:29; 美国专利号 6,024,964)。MALP-2 的另一种合成形式 Pam2Cys 已经共价附着到多种抗原肽表位, 并且这些单价的基于表位的疫苗/治疗剂在动物模型中显示出细胞(细胞毒性 T 细胞)或体液(抗体介导的)免疫反应(Jackson 等人(2004) PNAS 101:16440; WO 2003/014956 和 WO 2003/014957)。

单价的基于表位的疫苗/治疗剂策略已经吸引这相当多的关注, 特别是在癌症化学治疗领域。例如热休克蛋白质 - 肽的缀合物(WO 2004/071457; WO 2004/091493)、糖类 - 载体蛋白质缀合物(Slovin 等人 (1999) PNAS 96:5710)和 Pam2Cys-肽缀合物(WO 2004/014956; WO 2004/14957)已经用来引发针对特异抗原的细胞或体液免疫反应。但是, 考虑到肿瘤抗原的异质性和针对任何一个给定的抗原表位的人免疫反应的异质性, 需要多价疫苗以产生一致的临床成功。例如 Pneumovax® 23 (Merck and Co.)包括来自肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的 23 种不同血清型的表位, 并能针对链球菌侵染提供广泛的、全身性的免疫性。

抑制性反应

并不是 TLR2 的所有配体都能起始促炎症的细胞内信号级联反应。例如, 已经表明对 TLR2 特异的小鼠抗人的阻断性抗体能被 TLR2 内化, 并掺入 MHC II 类分子加工途径中, 但是没有发现树突细胞成熟, 共刺激分子 CD80 和 CD86 的上调, 或 MHC II 类分子的上调或促炎症介质的诱导(Schejete 等人 (2003) J. Immunol. 171:32)。

WO 2003/070761 公开热休克蛋白质 60 的命名为 p277 的特异性片段, 其能结合 TLR2, 并导致抗炎反应。将 P277 缀合到对细胞介导的自身免疫疾病特异的抗原表位上能导致抗原特异性的抗炎双功能分子(TLR2 配体

-表位)。但是每一种双功能分子只局限于来自目的炎症或自身免疫疾病状态的一个表位。

WO 2003/075593 描述了与能诱导 NF- κ B 产生的天然的细菌肽聚糖相比,不能通过 TLR2 诱导 NF- κ B 的一种完全合成的细菌肽聚糖。合成肽聚糖的结构与天然肽聚糖的结构类似,但是象前面讨论的 P277 和阻断性抗体一样,合成肽聚糖能结合 TLR2 但不通过 TLR2 刺激。在体内合成肽聚糖都能抑制腹膜脓肿的形成、手术后粘连形成和 candidin DTH 反应。而且,这些作者通过阵列分析指出,用合成的肽聚糖处理能上调抗炎介质 IL-10 和 IL-19 而不上调刺激性细胞因子和趋化因子。依据这些结果,WO 2003/075593 中合成的肽聚糖是促炎症效应 T 细胞的一般性抑制剂。

IL-10 在很多炎症动物模型中已经表现出是有效的,如炎症肠病(IBD)、克隆病、类风湿性关节炎、自身免疫糖尿病和过敏性疾病(Madsen (2002) Gastroenterol. 123:2140-2144; Barnes (2001) Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 1:555-560; Bremeanu 等人 (2001) Int. Rev. Immunol. 20:301-331; St. Clair (2000) Curr. Dir. Autoimmun. 2:126-149)。但是用重组的 IL-10 治疗炎症肠病的临床试验遇到混合的结果。对重复性高剂量方案的需要以及一些得到的毒性阻碍了这些努力的成功。

仍然需要能在促炎症和抑制性背景中以安全、有效的方式调节免疫反应的治疗性分子。这些额外的分子能促进为疾病预防和治疗开发更有效的免疫治疗策略。

发明概述

本发明涉及用于疾病免疫干预的单价和多价合成多肽抗原(SPAs)。更特别地,本发明涉及用单价和多价合成多糖抗原对免疫反应的抗原特异性刺激和抑制。

本发明提供促炎症的合成多糖抗原(SPA),其包含:

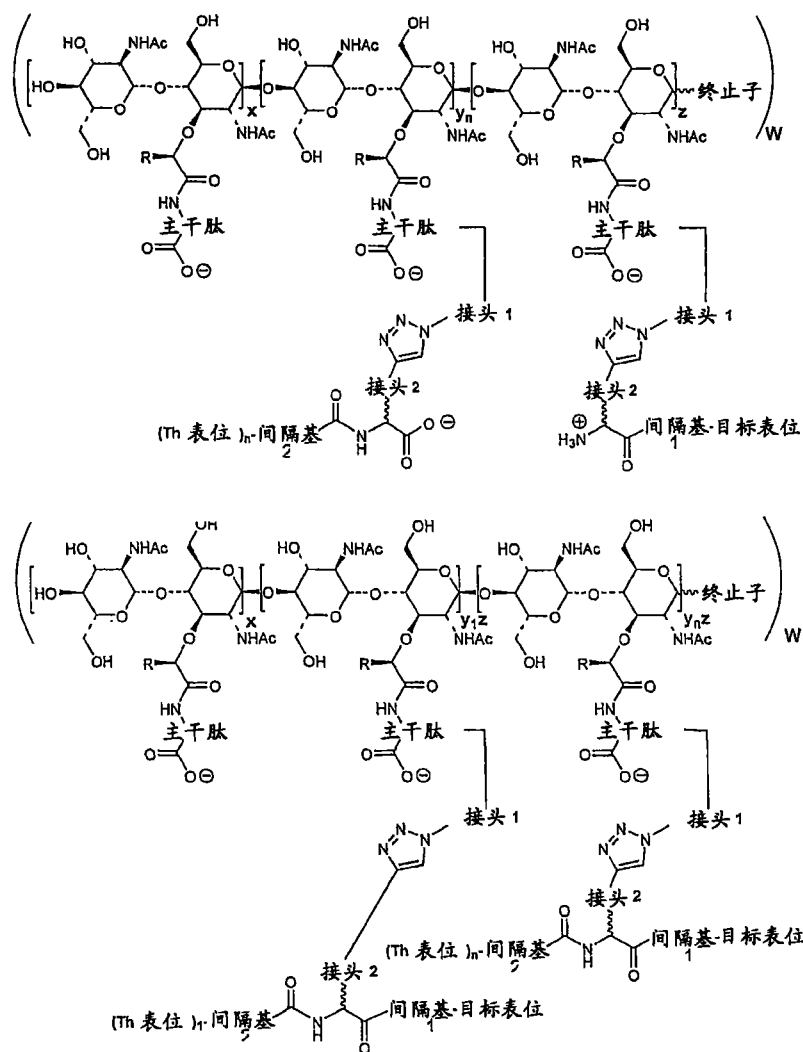
靶定 TLR2 的合成肽聚糖(PGN)部分,其上各自共价附着第一表位和第二表位;

包含一个或多个一般的 T 辅助表位的第一表位, 包含一个或多个目标表位的第二表位; 第一和第二表位每种以一个或多个拷贝存在于 SPA 内,

其中, 每个目标表位是肽序列或糖类部分, 并且其中每一个目标表位是 CD8+T 细胞或 B 细胞的免疫原, 或其可药用盐。

促炎症的 SPA 或其可药用盐可以包括在 SPA 内一个或多个拷贝的单一目标表位。

本发明也涉及提供如刚才描述的促炎症 SPA, 其选自



和其可药用盐, 其中,

W 是 SPA 中单体单位的总数, 并且是在从约 10 到约 375 之间的整数;

R 独立地选自 H 或低级烷基;

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数;

y_n 是 SPA 中第 n 种 Th 表位重复单位(ThR)的摩尔份数;

z 是 SPA 中目标表位重复单位(TR)的摩尔份数;

$y_n z$ 是 SPA 中第 n 种组合 Th 表位/目标表位重复单位(Th/TR)的摩尔份数;

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团, 那么主干肽(STEM PEPTIDE)是独立选择的, 包括约 2 个到约 5 个氨基酸, 其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ϵ 氨基, 或其任一组合上;

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头(LINKER)1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

间隔基(SPACER)1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

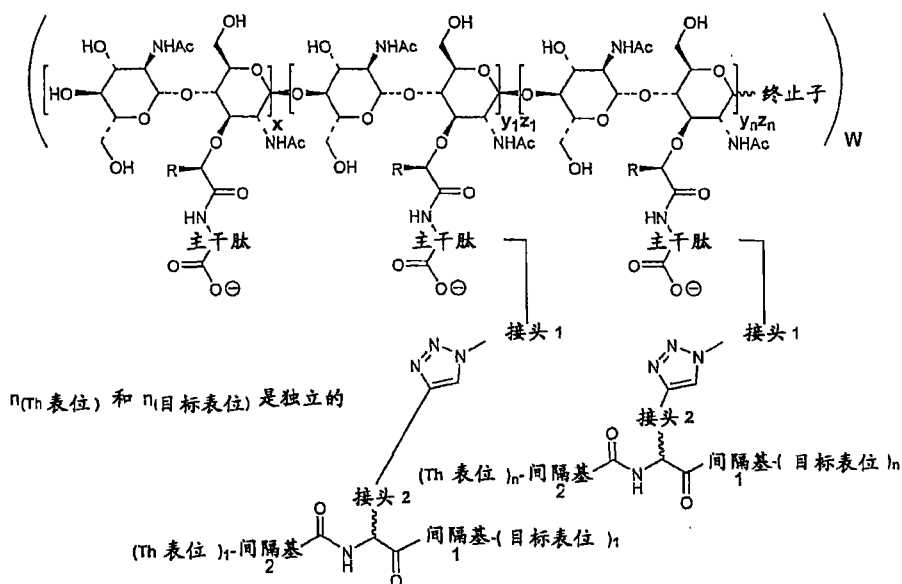
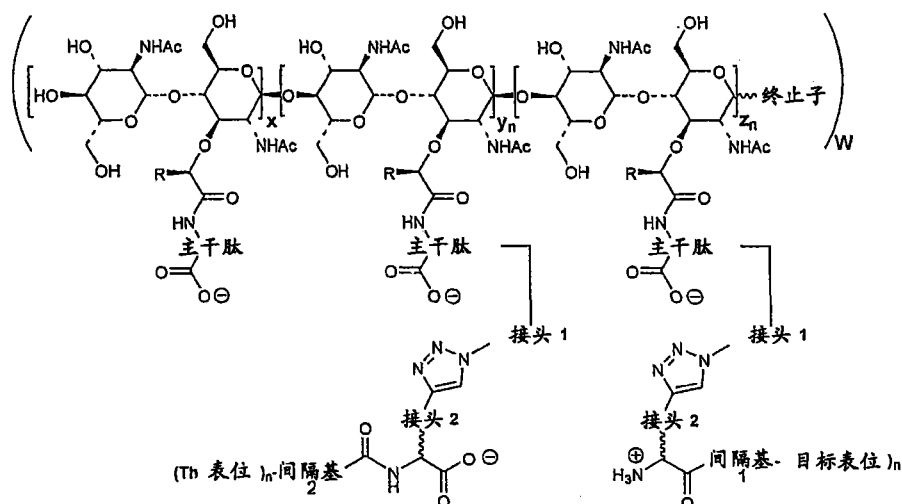
间隔基 2 的长度为 0 到约 10 个氨基酸;

目标表位是作为 CD8+T 细胞或 B 细胞免疫原的肽序列或糖类部分;
以及

$(\text{Th 表位})_n$ 是第 n 种不同的 Th 表位, 每一个 Th 表位是独立选择的并包含一般的 T 辅助表位。

本发明中的促炎症 SPA 或其可药用盐可以备选包含一种以上的目标表位, 其在 SPA 内以一个或多个拷贝存在。

本发明还提供如刚才所述的促炎症 SPA, 其选自



和其可药用盐，其中，

W 是 SPA 中单体单位的总数，并且是在从约 10 到约 375 之间的整数；

R 独立地选自 H 或低级烷基；

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数；

y_n 是 SPA 中第 n 种 Th 表位重复单位(ThR)的摩尔份数；

z_n 是 SPA 中第 n 种目标表位重复单位(TR)的摩尔份数；

$y_n z_n$ 是 SPA 中第 n/n 种组合 Th 表位/目标表位重复单位(Th/TR)的摩尔份数；

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽(STEM PEPTIDE)是独

立选择的, 包括约 2 个到约 5 个氨基酸, 其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基, 或其任一组合上;

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头(LINKER)1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

间隔基(SPACER)1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

间隔基 2 的长度为 0 到约 10 个氨基酸;

(目标表位)_n 是第 n 种不同的目标表位, 每个目标表位独立地选择并且是作为 CD8+T 细胞或 B 细胞免疫原的肽序列或糖类部分; 以及

(Th 表位)_n 是第 n 种不同的 Th 表位, 每一种 Th 表位是独立选择的并包含一般的 T 辅助表位。

前面描述的促炎症 SPA 可以包括约 2 种到约 180 种目标表位和约 1 个到约 180 种 Th 辅助表位, 每种表位以一个或多个拷贝存在。

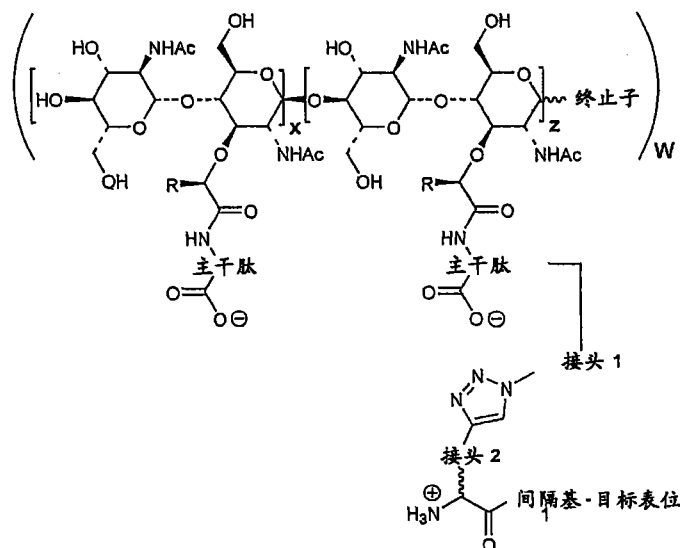
本发明提供抑制性的合成多糖抗原(SPA), 包括:

靶定 TLR2 的合成肽聚糖(PGN)部分, 其上共价附着一种或多种目标表位, 每种表位以一个或多个拷贝出现在 SPA 中, 其中每种目标表位是肽序列或糖类部分。

或其可药用盐。

抑制性 SPA 或其可药用盐可以包括一种目标表位, 每一种表位以一个或多个拷贝存在于 SPA 内。

本发明也提供刚才描述的抑制性 SPA, 它是下面的 SPA



或其可药用盐，其中，

W 是 SPA 中单体单位的总数，并且是在从约 10 到约 375 之间的整数；

R 独立地选自 H 或低级烷基；

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数；

z 是 SPA 中目标表位重复单位(TR)的摩尔份数；

假如没有侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽(STEM PEPTIDE)是独立选择的，包括约 2 个到约 5 个氨基酸，其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基，或其任一组合上；

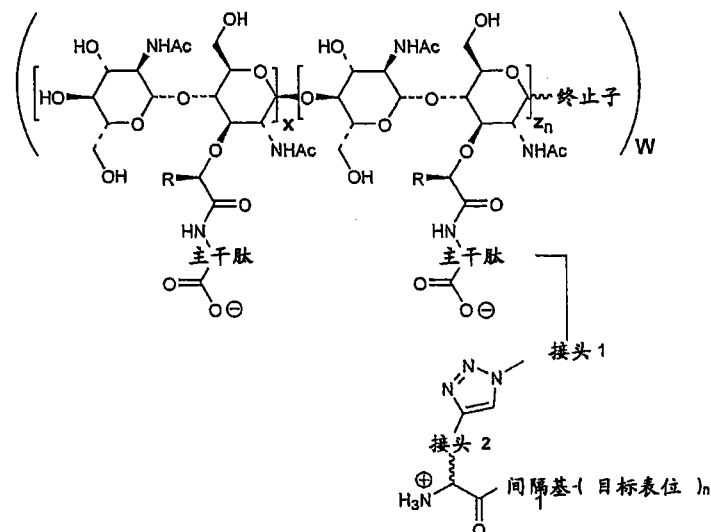
假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中，R 是低级烷基，那么接头(LINKER)1 和接头 2 是独立选择的，包括约 1 个到约 6 个片段，每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$ ，和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ ，和 $-\text{SO}_2-$ ；

间隔基(SPACER)1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽；

目标表位是肽序列或糖类部分。

本发明中的抑制性 SPA 或其可药用盐可以备选包含一种以上的目标表位，每一种表位以一个或多个拷贝存在于 SPA 内。

本发明也提供刚才描述的抑制性 SPA，它是下面的 SPA



或其可药用盐，其中，

W 是 SPA 中单体单位的总数,并且是在从约 10 到约 375 之间的整数;

R 独立地选自 H 或低级烷基:

x 是 SPA 中未取代的重复单位(UR)的摩尔份数;

z_n 是 SPA 中第 n 种目标表位重复单位 (TR) 的摩尔份数;

假如没有侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽(STEM PEPTIDE)是独立选择的，包括约 2 个到约 5 个氨基酸，其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基，或其任一组合上：

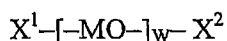
假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头(LINKER)1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

间隔基(SPACER)1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

(目标表位)_n是第 n 种不同的目标表位, 每个目标表位独立地选择并且是肽序列或糖类部分。

前面描述的抑制性 SPA 可以包括约 2 个到约 180 个目标表位, 每种表位有一个或多个拷贝。

本发明还提供合成的多糖抗原，其中该 SPA 是聚合物，包含序列：



其中,

X^1 和 X^2 独立地是 H 或终止子;

W 代表聚合物中单体单位(MO)的数目, 并且可以是在约 2 到约 375 之间的整数;

每一个 MO 是选自未取代的重复单位(UR)、一个或多种 Th 表位重复单位(ThR)、一个或多种目标表位重复单位(TR)、一个或多种组合的 Th/目标表位重复单位(Th/TR)和其组合的单体单位,

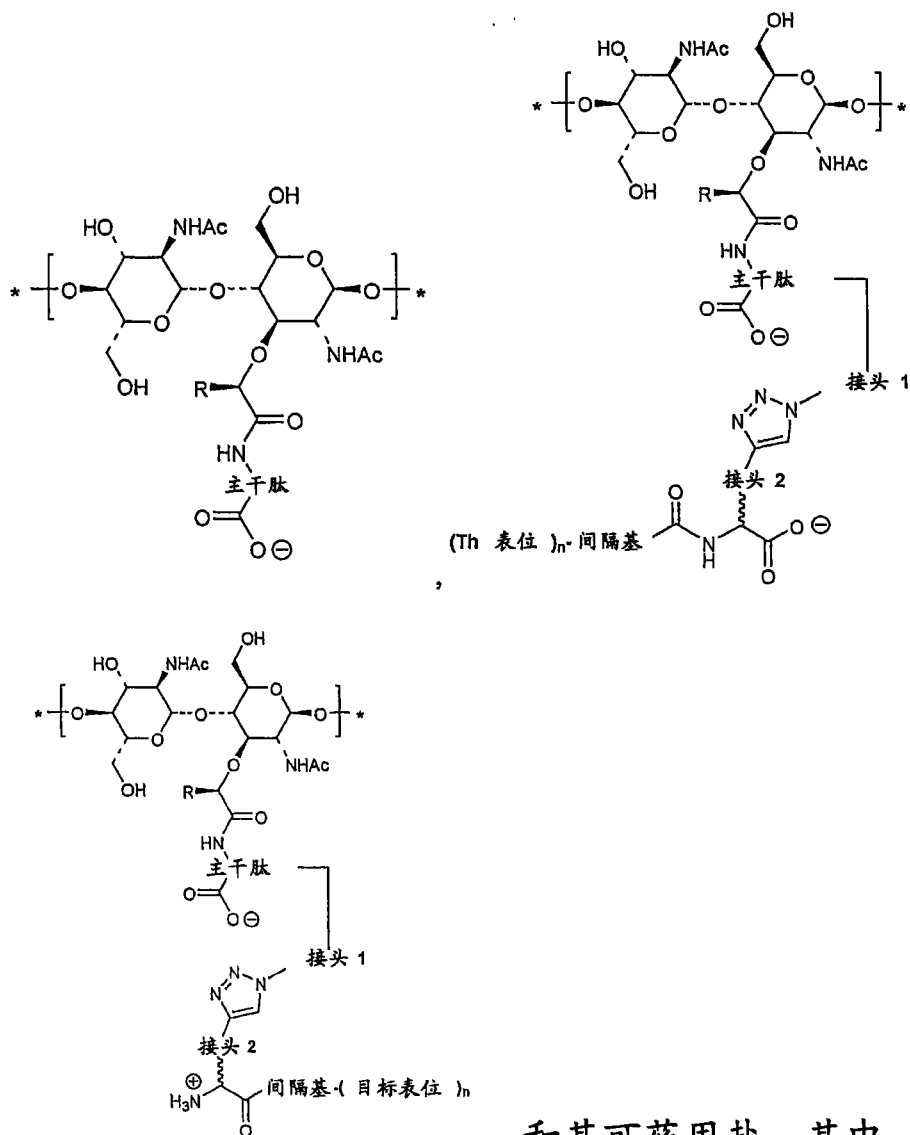
或其可药用盐。

刚才描述的 SPA 可以是无规共聚物、嵌段共聚物或交替共聚物。

本发明也提供如前述 SPA 或其可药用盐, 其中 SPA 是促炎症合成多糖抗原, 包括第一表位和第二表位共价附着在其上的靶定 TLR2 的合成肽聚糖(PGN)部分; 包括一个或多个一般的 T 辅助表位的第一表位, 包括一个或多个目标表位的第二表位, 且第一和第二表位在 SPA 内以一个或多个拷贝存在, 其中每一个目标表位是肽序列或糖类部分, 其中每一个目标表位是 CD8+T 细胞或 B 细胞的免疫原, 或其可药用盐。

本发明也提供如前述的合成多糖抗原或其可药用盐, 其中 SPA 是抑制性的合成多糖抗原, 包括一个或多个目标表位共价附着在其上的靶定 TLR2 的合成肽聚糖(PGN)部分, 每一种表位在 SPA 内以一个或多个拷贝存在, 其中每一个目标表位是肽序列或糖类部分。

本发明还提供包括约 10 到约 375 个单体单位的促炎症合成多糖抗原 (SPA), 单体单位独立地选自



，和其可药用盐，其中

R 独立地选自 H 或低级烷基:

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团，那么主干肽(STEM PEPTIDE)是独立选择的，包括约 2 个到约 5 个氨基酸，其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ε 氨基，或其任一组合上；

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头(LINKER)1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

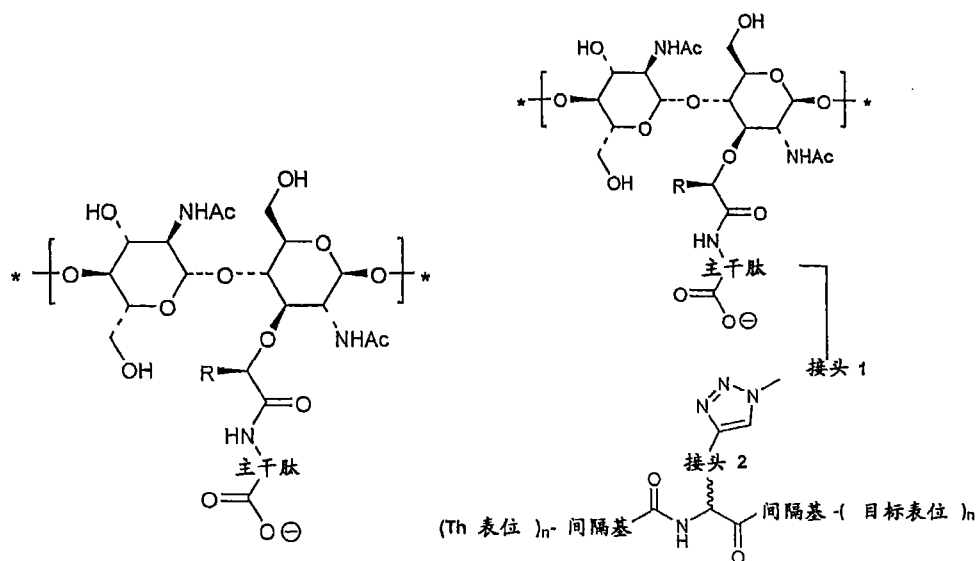
间隔基(SPACER)1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

间隔基 2 的长度为 0 到约 10 个氨基酸:

(目标表位)_n是第 n 种不同的目标表位, 每个目标表位独立地选择并且是作为 CD8+T 细胞或 B 细胞免疫原的肽序列或糖类部分;

(Th 表位)_n是第 n 种不同的 Th 表位, 每一个 Th 表位是独立选择的并包含一般的 T 辅助表位。

本发明也提供包括约 10 个到 375 个单体单位的促炎症合成多糖抗原(SPA), 单体单位独立地选自



和其可药用盐, 其中

R 独立地选自 H 或低级烷基;

假如存在侧翼羧酸或羧酰胺基团, 那么主干肽(STEM PEPTIDE)是独立选择的, 包括约 2 个到约 5 个氨基酸, 其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ϵ 氨基, 或其任一组合上;

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头(LINKER)1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

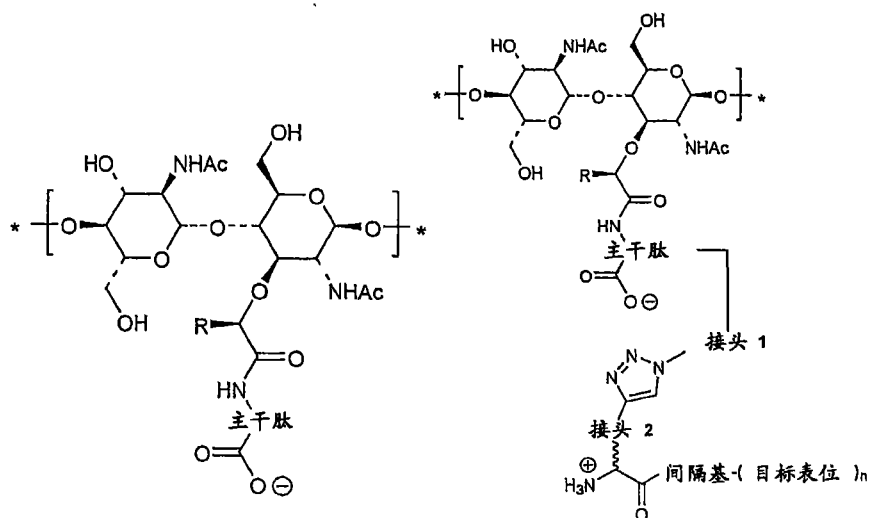
间隔基(SPACER)1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

间隔基 2 的长度为 0 到约 10 个氨基酸;

(目标表位)_n是第 n 种不同的目标表位, 每个目标表位独立地选择并且是作为 CD8+T 细胞或 B 细胞免疫原的肽序列或糖类部分;

(Th 表位)_n 是第 n 种不同的 Th 表位, 每一个 Th 表位是独立选择的并包含一般的 T 辅助表位。

本发明还提供包括约 10 到约 375 个单体单位的抑制性合成多糖抗原 (SPA), 单体单位独立地选自



和其可药用盐, 其中

R 独立地选自 H 或低级烷基;

假如不存在侧翼羧酸或酰胺基团, 那么主干肽 (STEM PEPTIDE) 是独立选择的, 包括约 2 个到约 5 个氨基酸, 其中氨基酸独立地结合在 α 或 γ 羧基、结合在 α 或 ϵ 氨基, 或其任一组合上;

假如没有连续的杂原子片段且杂原子片段不在片段 1 和 2 中, R 是低级烷基, 那么接头 (LINKER) 1 和接头 2 是独立选择的, 包括约 1 个到约 6 个片段, 每个片段选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$, 和 $\equiv\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$, 和 $-\text{SO}_2-$;

间隔基 (SPACER) 1 是长度为约 1 个到约 10 个氨基酸的肽;

(目标表位)_n 是第 n 种不同的目标表位, 每种目标表位独立地选择并且是肽序列或糖类部分。

本发明也提供药物组合物, 其包括在本发明中描述的任一种合成多糖, 或其可药用盐, 以及可药用的稀释剂、赋形剂或载体。

本发明也提供本发明中任一种合成多糖抗原或其可药用盐作为药物的用途。

本发明还提供在本发明中描述的任一种合成多糖的任一种化合物，或其可药用盐用于制备用来预防或治疗对免疫调节剂治疗敏感的疾病或病症的药物的用途。

本发明还提供治疗或预防对免疫调节剂治疗敏感的疾病或病症的方法，包括对需要其的患者施用有效量的本发明的任一种合成多糖或其可药用盐。

本发明也提供在哺乳动物中诱导免疫反应的方法，包括用本发明中描述的任一种合成多糖或其可药用盐的有效量对哺乳动物给药。

本发明中的单价和多价合成多糖抗原能在单一分子实体内递送一种表位或多种表位的多个拷贝，每一种表位有多个拷贝。设计的这些新分子能以合理的直接、抗原特异性的方式提供促炎症或抗炎症治疗。

本发明中炎性单价和多价合成多糖抗原可在人类和其他哺乳动物中使用，诱导抗原特异性的炎症反应，从而治疗炎症反应在治疗上是有益的疾病状态或条件，例如在抗微生物、抗病毒的或抗癌治疗中。本发明中抑制性的单价和多价合成多糖抗原可以在人类和其他哺乳动物中使用，从而治疗促炎症免疫反应的抑制在治疗上是有益的疾病状态，例如在治疗如胰岛素依赖性糖尿病、红斑狼疮、多发性硬化和移植排斥的自身免疫疾病中。

利用个体的免疫系统选择性地产生内源性细胞因子和趋化因子可以提供更好的免疫治疗的途径。内源性的细胞因子和趋化因子的表达可通过宿主在完全的免疫系统内调节，这种表达可以提供合适的背景达到功效而不需要重复给药或细胞因子或趋化因子毒性的问题。而且，细胞群选择性的增加可以证明是这样的有效细胞因子/趋化因子的理想的递送系统。免疫细胞所有组成成分中内在的是能够在体内运输到炎症部位。这种治疗方法避免了与用有效的细胞因子/趋化因子全身给药相关的问题，并能更好地模拟这种免疫介质的天然的局部作用。

此发明概述不必须描述本发明的所有特征。

附图简述

参考下面对附图的描述,本发明的这些以及其他特征将变得更加显而易见,其中:

图 1 是 T 调节细胞假说的示意图。

图 2 是当炎性化合物、树突细胞和 T 细胞间相互作用导致炎症或获得性免疫时出现的事件的示意图。

图 3 显示了本发明中的促炎症单价合成多糖抗原(monoSPA)。

图 4 显示了本发明中的促炎症单价合成多糖抗原。

图 5 显示了本发明中的促炎症多价合成多糖抗原(polySPA)。

图 6 显示了本发明中的促炎症多价合成多糖抗原。

图 7 显示了本发明中的抑制性单价合成多糖抗原。

图 8 显示了本发明中的抑制性多价合成多糖抗原。

在图 1 到 8 中,方框表示合成多糖抗原的 TLR2 结合结构域。并且每一类型的单体单位的摩尔份数用下标表示(x 、 y_n 、 z_n 或 $y_n z_n$)。摩尔份数 0.6 表示给定的单体单位在合成多糖抗原中以 60%的重复单位存在。未取代的重复单位(UR)的摩尔份数的名称为 x (图 7 和 8);例如如果 $x=0.4$,那么未取代的重复单位在合成多糖抗原中以 40%的单体单位存在。Th 表位重复单位(ThR)种类的摩尔份数的名称为 y_n ;例如,如果 $y_n=0.15$,那么 ThR 的第 n 个不同种类在合成多糖抗原中以 15%的单体单位存在。目标表位重复单位(TR)种类的摩尔份数名称为 z_n ;例如如果 $z_n=0.20$,那么 TR 的第 n 个不同种类在合成多糖抗原中以 20%的单体单位存在。组合的 Th/目标表位重复单位(Th/TR)种类的摩尔份数名称为 $y_n z_n$,例如如果 $y_n z_n=0.17$,那么 Th/TR 的第 n 个不同种类在合成多糖抗原中以 17%的单体单位存在。在单价合成多糖抗原的情况中,TR 的摩尔份数名称可以是 z_1 或 z (见图 3 和 7);类似地,在单价合成多糖抗原中 Th/TR 种类的摩尔份数可以是 $y_n z_1$ 或 $y_n z$ (见图 4)。

本领域的技术人员将认识到摩尔份数的总和必须等于 1.00,即 $x + y + y_1 + y_2 + \dots + y_n + z + z_1 + z_2 + \dots + z_n$, (作为可能的情况)的总和=1.00。由于各种重复单位的酶促聚合的速率对于替换变化很少(如果变化),所以,

UR、ThR、TR 和/或 Th/TR 根据它们各自在组合物中的摩尔份数沿着聚合物的糖类轴均匀地分布。注意，由于共聚合物形成的随机属性，UR、ThR、TR 和/或 Th/TR 在多糖内可以以任何顺序存在。

W 是 SPA 聚合物中单体单位的总数。数字 W 可以在 10 和 375 之间，并且更通常地描述为位于约 130 到约 180 之间的分布中心。

详细描述

定义

如在这里使用的，除非另有说明，下面的术语有下面的含义：

“Ac”指 $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ 。

“烷基”指直链或支链的脂肪族烃基，在其链上有约 1 个到约 20 个碳原子，或这之间的任何数目；例如烃基可以有约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个碳原子，或在这里定义的任何两个数量确定的范围内的任何数量的碳原子。在非限制性例子中，烷基可以在链内有约 1 个到约 12 个碳原子，或可以是低级烷基。支链的指一个或多个低级烷基(如甲基、乙基或丙基)连接到线性烷基链。”低级烷基”指在直链或支链中有约 1 个到约 5 个碳原子的烃基，或在这之间的任何数量；例如低级烷基可以有 1、2、3、4 或 5 个碳原子。

“氨基酸”指选自天然和非天然氨基酸的氨基酸。氨基酸也包括在 α -碳原子上有 L-或 D-立体化学结构的氨基酸；在特定的非限制性实例中，氨基酸是那些具有 α -氨基的氨基酸。天然的氨基酸能被分为下列四组：(1) 酸性氨基酸(带负电荷)，如天冬氨酸和谷氨酸；(2) 碱性氨基酸(带正电荷)，如精氨酸、组氨酸和赖氨酸；(3) 中性极性氨基酸，如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸/胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺；和(4) 中性非极性氨基酸，如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。“非天然氨基酸”指没有其核酸密码子的氨基酸，这些氨基酸也可是中性的或是带正电荷或负电荷的。非天然氨基酸的非限制性实例包括前面指出的天然 α 氨基酸的 D-型异构体；Aib(氨基丁酸)、 β Aib(3-氨基异丁酸)、Nva(正缬氨酸)、 β -丙氨酸、Aad(2-氨基己二酸)、

β Aad(3-氨基己二酸)、Abu(2-氨基丁酸)、Gaba(γ -氨基丁酸)、Acp(6-氨基己酸)、Dbu(2,4-二氨基丁酸)、 α -氨基庚二酸、TMSA(三甲基甲硅烷基丙氨酸)、aIle(别异亮氨酸)、Nle(正亮氨酸)、叔-Leu、Cit(瓜氨酸)、鸟氨酸、Dpm(2,2'-二氨基庚二酸)、Dpr(2,3-二氨基丙酸)、 α -或 β -Nal、Cha(环己基-丙氨酸)、羟脯氨酸、Sar(肌氨酸)等等;环状氨基酸; N^a -烷基化氨基酸如 MeGly(N^a -甲基甘氨酸)、EtGly(N^a -乙基甘氨酸)和 EtAsn(N^a -乙基天门冬酰胺);以及 α -碳原子携带两个侧链取代基的氨基酸。文中使用的天然和非天然氨基酸及其残基的命名是由 IUPAC 有机化学命名委员会和 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会根据命名大会如“ α -氨基酸的命名(推荐, 1974)”生物化学, 14(2), (1975) 中所建议的。

“氨基酸残基”是指通过酰胺键掺入到肽或分子的肽部分的单个氨基酸单元。”肽”是指含有通过酰胺键连接起来的氨基酸残基的聚合物。

“净电荷”是指离子性物质电荷的算术总和, 本领域技术人员能熟练地确定净电荷。 “两性离子”指在多糖单体单位中单分子两极或多极离子, 包括如具有净负电荷、正电荷或中性电荷的分子。

“保守氨基酸替换”指在蛋白质或肽中氨基酸替换以产生所得的肽, 其保留肽结构和生物学功能。在这样的改变中要考虑多种因素, 包括氨基酸的亲水指数和亲水性。在考虑保守氨基酸突变中可以使用的另一因素是氨基酸侧链取代基的相对相似性, 其考虑疏水性、亲水性、电荷、大小等。在肽中导致沉默变化的保守氨基酸替换可以选自前面描述的天然存在的氨基酸所属类别的其他成员。

氨基酸的相对亲水性特性促进了所得肽和多肽的二级结构, 其又影响肽或多肽与如酶和细胞受体等分子间的相互作用。依据其疏水性和电荷特性, 已经赋予每种氨基酸的亲水指数如下: 异亮氨酸(+4.5)、缬氨酸(+4.2)、亮氨酸(+3.8)、苯丙氨酸(+2.8)、半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)、甲硫氨酸(+1.9)、丙氨酸(+1.8)、甘氨酸(-0.4)、苏氨酸(-0.7)、丝氨酸(-0.8)、色氨酸(-0.9)、酪氨酸(-1.3)、脯氨酸(-1.6)、组氨酸(-3.2)、谷氨酸/谷氨酰胺/天冬氨酸/天冬酰胺(-3.5)、赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。同样地, 根据亲水性也可以替换类

似的氨基酸。赋予氨基酸下面的亲水值：精氨酸/赖氨酸(+3.0)、天冬氨酸/谷氨酸(+3.0±1)、丝氨酸(+0.3)、天冬酰胺/谷氨酰胺(+0.2)、甘氨酸(0)、苏氨酸(-0.4)、脯氨酸(-0.5±1)、丙氨酸/组氨酸(-0.5)、半胱氨酸(-1.0)、甲硫氨酸(-1.3)、缬氨酸(-1.5)、亮氨酸/异亮氨酸(-1.8)、酪氨酸(-2.3)、苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。本领域的技术人员将认识到，在肽、多肽中的氨基酸可以被具有相似亲水指数或亲水得分的另一氨基酸替换，并仍然产生具有相似生物学活性的所得肽。在产生这样的变化中，具有一个或多个亲水指数在±2内的氨基酸通常相互替换，例如一个氨基酸可以被具有亲水指数或亲水得分在±1 或±0.5 内的另一个氨基酸替换。

“微生物”指任何自由生活的单细胞生物。非限制性实例包括原生动物、寄生虫、细菌，包括分枝杆菌、古细菌、支原体和衣原体。

“非免疫细胞”是指通常不参与免疫应答、但是具有受免疫系统产物调节的能力的细胞。

“免疫细胞”是指能够在整个宿主免疫系统内响应或起始应答的任何细胞。通常这些细胞被称作“白细胞”，但是并非必然限于此类细胞。免疫细胞的实例包括但不限于 T 和 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞、树突细胞、抗原提呈细胞和多形核白细胞。

“T 调节细胞”或“T_{regs}”是指独特谱系的免疫调节性 T 细胞，其在体内和体外有效地抑制炎症效应 T 细胞。T_{regs} 特征在于表达某些细胞表面标志，例如，包括 CD4 和 CD25 (CD4⁺/CD25⁺)。

“免疫反应”指免疫系统的促炎症反应或抗炎症反应。

术语“炎症”、“炎症反应”、“促炎反应”等是指有内源或外源组织损伤起始的复杂机体过程。这类损伤的炎症反应包括可溶性因子如细胞因子(包括但不限于：白介素(IL) 1、IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)-α)以及趋化因子(包括但不限于：IL-8、干扰素-γ 和巨噬细胞诱导蛋白(MIP)-1β)的诱导。几种免疫细胞群也参与炎症反应，包括但不限于：嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。尽管炎症是作为保护功能进化并且可能是作为保护功能而诱发的，但是可能遇到众多炎症病变的实例(包括但不限于，炎症肠病，术后

粘联的过度形成以及脓肿形成)。

术语“抗炎症”、“抗炎性反应”、“抑制性反应”等是指削弱或逆转炎症性反应的任何过程。该过程包括但不限于：可溶性调节剂如 IL-10 的诱导或细胞群如调节 T (T_{reg}) 细胞的诱导。

“IL10”是内源性调节剂，常参与炎症应答的下调。IL10 的定向内源产生可以最大化功效并最小化毒性作用。

术语“调控”或“调节”等是指选定参数的上升或下降。

“合成多糖抗原”或“SPA”是合成产生的基本上纯的线性非交联 N-乙酰葡萄糖胺基-β-[1,4]-N-乙酰胞壁酰基肽的聚合物。所述肽可含有一个或多个天然或非天然结构的 D 或 L 构型的氨基酸。如文中所公开的基本上纯的合成多糖抗原基本上没有天然存在的细菌细胞壁污染物。这种抗原不能从自然界得到。SPA 包括，但不局限于，天然的未交联的细菌肽序列，或可以通过完全合成产生。SPA 的实例包括，但不局限于化合物 1、2 和 3，或这里公开的单价合成多糖抗原(mono SPA)和多价合成多糖抗原(poly SPA)，它们是合成的肽聚糖(PGN)。

本发明中包含的 SPA 包括，但不局限于，这里公开的 SPA，并且也包含额外的取代基。但是，这样的取代基将不实质上影响 SPA 调节本文公开的免疫反应的基本的和新颖的特性，与本文公开的相应的 SPA 相比也不影响它们的定量效果。

“糖类核心”指由 N-乙酰葡萄糖胺基-β-[1,4]-N-乙酰胞壁酰基的 β-[1,4]连接的重复单位组成的 SPA 糖聚合物。

“植烷基”指 SPA 的直接合成前体的脂类组分。它是包括通常以“从头到尾”(无分枝到分枝的)方向排列的四个异戊二烯基单位(C₂₀)的完全饱和的烃，在未分枝的末端具有连接点。

“端基”或“终止子”：本发明的合成聚合物终止于具有游离还原型异头醇的胞壁酸残基。本领域技术人员将会意识到所述结构为吡喃型葡萄糖基的 N-乙酰胞壁酰基末端可由芳氨基处理形成 C-1 N-芳基衍生物，以及由芳胍基处理形成 C-1 胍。此外，用溶解性转糖基酶(如, Dijkstra 等人 (1994))

《结构生物学当代意见》(*Curr. Opin. Struct. Biol.*)4:810)限制性消化合成聚合物将产生具有胞壁酰基-[1,6]-酞键的末端,这可用于所得异头碳的化学修饰。

“主干肽”指从糖类核心的乳酰基羰基(胞壁酰)功能的 N 端向 C 端延伸的肽。主干肽是 SPA 糖类核心的胞壁酰取代基。

“表位”指能抗原的定义特异性的部分,即抗原决定族。例如,表位可以是肽或糖类。

“T 辅助(Th)表位”指抗原决定族,其在 MHC II 类分子中,诱导 CD4+T 细胞活化,然后活化的 CD4+T 细胞诱导 CD8+细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)克隆扩增和/或从 B 细胞产生抗体。

“一般的 Th 表位”指某种含有 T 辅助(Th)表位的肽,其是非种系选择性或者宽容的肽,且其可以被递呈的多数 MHC II 类单元型中,从而能在大部分远亲繁殖的人群或其他哺乳动物种群中诱导强的 CD4+Th 反应和/或 CD8+ CTL 反应和/或抗体产生。

“目标表位”指驱动特异性 CD8+CTL 克隆扩增和活化或从 B 细胞中产生抗体的抗原决定族。CTL 表位和 B 细胞表位是目标表位的具体类型。

“价”指在合成多糖抗原(SPA)中含有的目标表位的数目,不包括在 SPA 中含有的 Th 表位的数目。

“单价”指沿着 SPA 的聚合骨架显示单一抗原决定族或表位的一个或多个拷贝。

“多价”指沿着 SPA 的聚合骨架显示一种以上不同的抗原决定族或表位每一种的一个或多个拷贝。

“单价合成多糖抗原”或“monoSPA”在这里定义为展示出一个或多个二糖重复单位种类的 SPA,所述种类经修饰而含有单个种类的目标表位。抗原决定族或表位可以在单个 SPA 分子中以多个拷贝存在。

“多价合成多糖抗原”或“polySPA”在这里定义为展示出两个或多个不同的二糖重复单位种类的 SPA,所述种类经修饰每个含有一个不同的目标表位。在单个 SPA 分子中每一个目标表位可以以一个或多个拷贝存在。

polySPA 含有两个或多个不同的目标表位。

“可药用盐”是指本发明化合物相对无毒的无机和有机酸加成盐以及碱加成盐。这些盐可在化合物最终的分离和纯化期间原位制备。具体地，酸加成盐可如此制备，即将游离碱形式的纯化化合物分别与合适的有机或无机酸反应，并分离这样形成的盐。典型的酸加成盐包括但不限于氢溴酸盐、氢氯酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月硅酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘盐(naphthylate)、甲磺酸盐、葡萄糖酸盐、lactiobionate、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双- β -羟基萘甲酸盐、龙胆酸盐、羟乙基磺酸盐、对甲基二苯甲酰酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯酰磺酸盐、环己基磺酸盐和奎尼酸十二烷醇基磺酸盐(quinateslaurylsulphonate salts)等等。例如，参见 S.M. Berge 等人，“药盐” J. Pharm. Sci., **66**, 1-19 (1977)，特此并入作为参考。碱加成盐也可如此制备，即将酸形式的纯化化合物分别与合适的有机或无机碱反应，并分离这样形成的盐。碱加成盐包括但不限于药学上可接受的金属和氨基盐。合适的金属盐包括钠、钾、钙、钡、锌、镁和铝盐。在具体实例中，金属盐是钠盐和钾盐。合适的无机碱加成盐是由金属碱制备的，这包括但不限于，氯化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化锌。合适的氨基碱加成盐是由具有足够碱性以形成稳定盐的氮制备的，包括那些在药物化学领域中因其低毒性和药用可接受性而频繁使用的胺。例如，但不限于，氨、乙二氨、N-甲基-葡萄糖氨、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄甲基苄乙胺、二乙胺、哌嗪、三(羟甲基)-氨基甲烷、四甲基氢氧化胺、三乙胺、二苄胺、ephedrine, 脱氢枞胺、N-乙基哌啶、苄胺、四甲基胺、四乙胺、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、碱性氨基酸，如赖氨酸和精氨酸，以及二环己基胺等等。

“基本纯”指在约 90%到约 100%的范围内或其之间的任何百分比的

范围内的纯度；例如，“基本纯”可以是纯度约在 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和 100%，或在这里的任何两个百分比定义的范围内的任何纯度。例如，“基本纯”可以从约 95%到约 100%或从约 97%到约 100%的纯度。本发明化合物可以基本上纯的或分离的形式获得，不含大量的生物污染物(包括具有免疫调节活性的其他分子)，它们通常出现在分离自天然细菌源的肽聚糖制品中。

“佐剂”是当与免疫原组合时，能增强针对免疫原的免疫反应的物质。

术语“生物标志”表示与药物给药有关的特定活性的标志。非限制的生物标志实例包括细胞表面受体、可溶性调节剂、mRNA 信使、或受调节且可测量的体内应答。

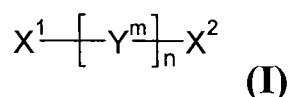
“有效量”是指本发明的化合物或组合物有效产生期望的或所示的免疫或治疗效果的数量。

术语“患者”或“受试者”是指哺乳动物和其他动物，包括人和其他灵长类动物；陪伴动物、动物园动物及农场动物，包括但不限于：猫、狗、啮齿动物、马、牛、绵羊、猪、山羊；禽类等等。

抗原非特异性的 SPA

抗原非特异性的 SPA 在 WO 2005/035588 和 WO 2003/075953(两者在此处引用作参考)中已经描述。它们是线性的、没有交联的聚合物，以及包括多种类型的均聚物和共聚物。这些聚合物可以通过化学酶总合成(如从 N-乙酰基-葡萄糖胺合成)获得。而且，依靠它们的结构，式 I 中化合物可以是炎性的或抗炎症的。

式 I 的线性的非交联的聚合物



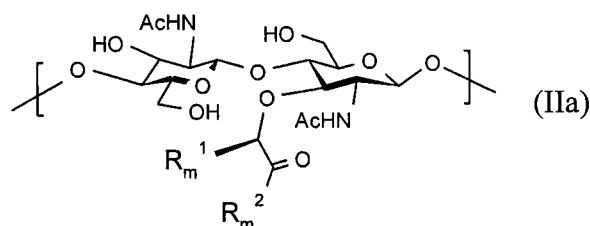
包括 n 个独立的单体单位 Y^m 。 X^1 和 X^2 独立地是 H 或终止子。下标 n 代表在聚合物中单体单位 Y^m 的数目，n 是在从约 2 到约 375 之间的范围内的整数，或其间的任何数值；例如单体 Y^m 的数目可以是约 2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、

100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370 或 375，或这些数值之间的任何数，或由在这里定义的任何两个数定义的范围内的任何数。上标 m 代表着特定单体单位 Y^m 在聚合物中顺序地从非还原端到还原端中的位置。 m 是从 1 到 n 的一系列的整数。在非限制性的实例中，当 $n=2$ 时，有两个单体单位： Y^1 和 Y^2 ，当 $n=3$ 时，有三个单体单位： Y^1 、 Y^2 和 Y^3 ，当 $n=375$ 时，有 375 个单体单位： Y^1 、 Y^2 、 Y^3 Y^{375} 。 Y^1 直接附着在 X^1 上，而 Y^n 直接附着在 X^2 上。

每一个单体单位 Y^m (即每一个 Y^1 , Y^2 ... Y^{n-1} 和 Y^n) 是独立选择的，这样它们可以是都相同的，或都不同的，或是其任一组合。因而本发明包括均聚物(即所有的单体是相同的)和共聚物(即有两个或多个不同的单体)。如在 WO 2005/035588(在此引用作为参考)中定义，共聚物可以是无规共聚物、嵌段共聚物或交替共聚物。

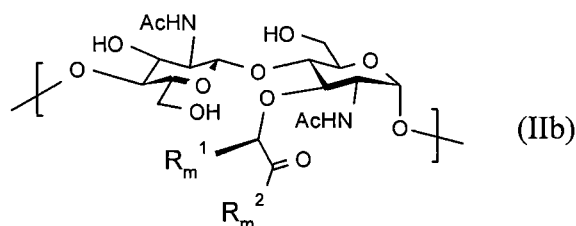
在式 I 的聚合物中，式 Y^m 的每一个单体单位独立地是：

(a) 当 Y^m 不是 Y^n 时，式 IIa 的基团



其中单体的还原端是 β 构型；或

(b) 当 Y^m 是 Y^n 时，式 IIb 的基团



其中单体的还原端可以是 α 或 β 构型 (α 构型在前面显示)。

式 Y^m 的每一个单体单位包括如下两套独立的变量：

第一套: R_1^1 、 R_2^1 、 R_3^1 ... R_{n-1}^1 和 R_n^1

第二套: R_1^2 、 R_2^2 、 R_3^2 ... R_{n-1}^2 和 R_n^2

在每一套中, 变量是独立选择的, 可以是都相同, 都不同或其任何组合。即 R_1^1 、 R_2^1 、 R_3^1 ... R_{n-1}^1 和 R_n^1 的每一个是独立选择的。同样, R_1^2 、 R_2^2 、 R_3^2 ... R_{n-1}^2 和 R_n^2 的每一个是独立选择的。

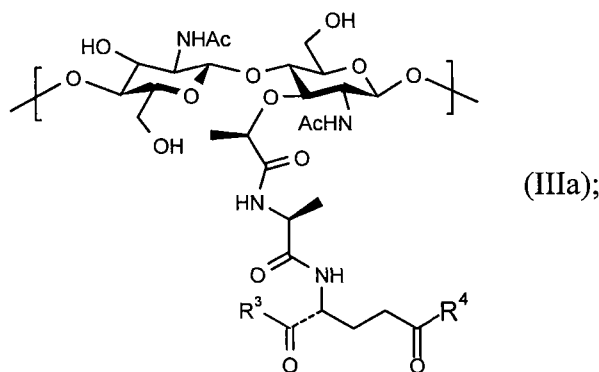
每一个变量 R_m^1 (即 R_1^1 、 R_2^1 、 R_3^1 ... R_{n-1}^1 和 R_n^1) 可以是 H 或低级烷基, 每一个变量 R_m^2 (即 R_1^2 、 R_2^2 、 R_3^2 ... R_{n-1}^2 和 R_n^2) 可以是 -OH 或 -NH₂, 氨基酸残基或包括 2 到 10 个氨基酸残基的肽, 其中:

- (i) 每一个氨基酸残基独立地是 D 型或 L 构型;
 - (ii) 每一个氨基酸残基是未取代的或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、CF₃、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、-C(O)O 烷基和 -NO₂ 的基团取代; 和
 - (iii) 氨基酸残基独立地结合到 α 或 γ 羧基上, 和在 α 或 ε 氨基上或其任一组合,
- 或其可药用盐。

炎性化合物

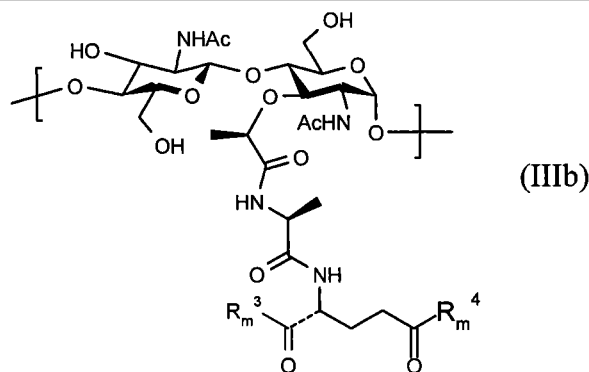
式 I 中的一些化合物能诱导炎症反应, 例如, 其中一个或多个单体单位 Y^m 是:

(a) 当 Y^m 不是 Yⁿ 时, 式 IIIa 的基团



其中, 单体的还原端是 β 构型; 或

(b) 当 Y^m 是 Yⁿ 时, 式 IIIb 中的基团



其中，单体的还原端可以是 α 或 β 构型(α 构象在前面显示)。

其中：

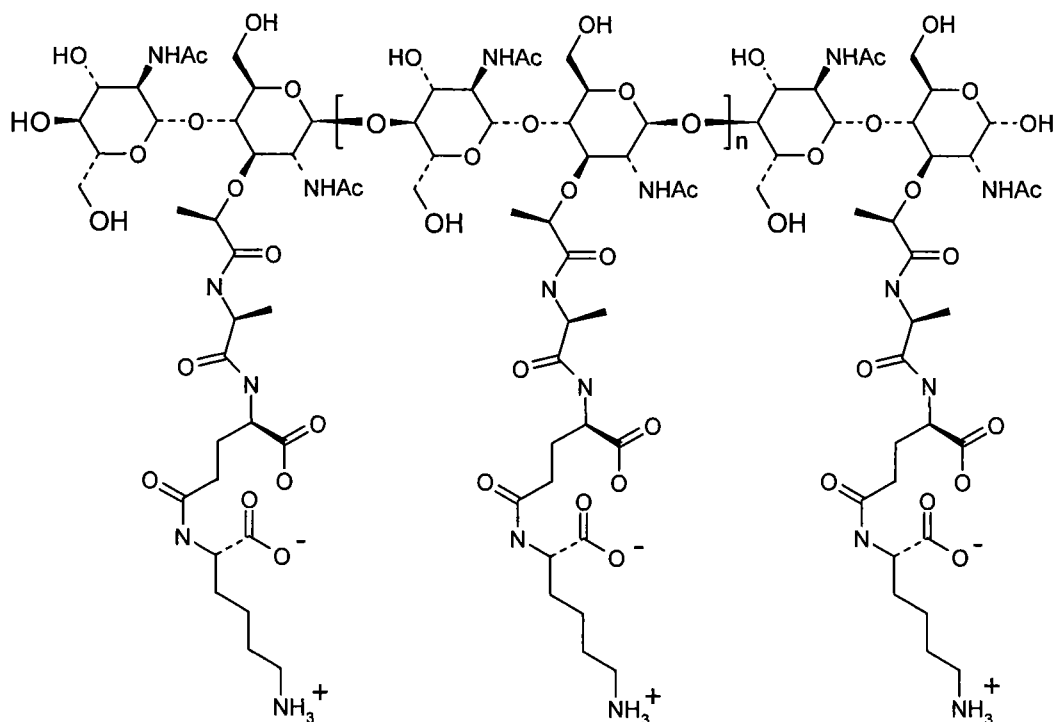
每一个 R_1^3 、 R_2^3 ... R_{n-1}^3 和 R_n^3 独立地是 $-\text{OH}$ 或 $-\text{NH}_2$ ；

每一个 R_1^4 、 R_2^4 ... R_{n-1}^4 和 R_n^4 独立地是 $-\text{OH}$ 或 $-\text{NH}_2$ ，氨基酸残基或含有 2 到 8 个氨基酸残基的肽，其中：

- (i) 每一个氨基酸残基独立地是 D 或 L 构型；
- (ii) 每一个氨基酸残基是未取代的或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、 CF_3 、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ 烷基和 $-\text{NO}_2$ 的基团取代；和
- (iii) 氨基酸残基独立地结合到 α 或 γ 羧基上，和在 α 或 ϵ 氨基上或其任一组合。

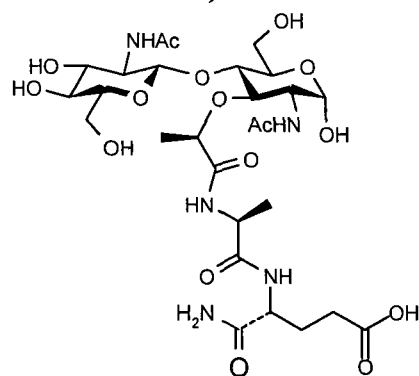
炎性化合物有侧翼羧酸盐或羧酰胺基团，并在这里称作式 V 的化合物。实例包括化合物 2 和化合物 3，以及 GMDP 和 GMDP-A 的聚合物。

化合物 2 是本发明中式 V 的代表性化合物，是促炎症免疫调节剂的实例。这个分子活化 TLR2 并通过人 PBMCs 诱导促炎症细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 的产生。化合物 2 的促炎症活性显著地小于从细菌来源分离到的天然的肽聚糖的有效炎症活性。这种差异最大可能是由于从细菌中分离的异质性材料中大量生物污染物的存在和活性造成的。

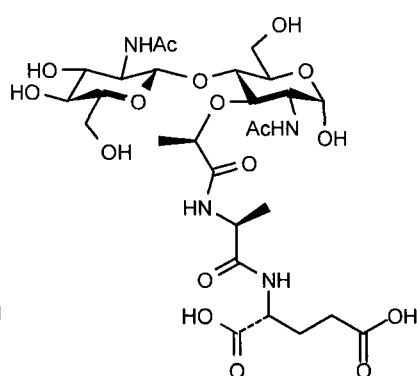


化合物 2

已经报道下面结构的二糖单体 GMDP(N-乙酰基葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺)和 GMDP-A(N-乙酰基葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸)



GMDP

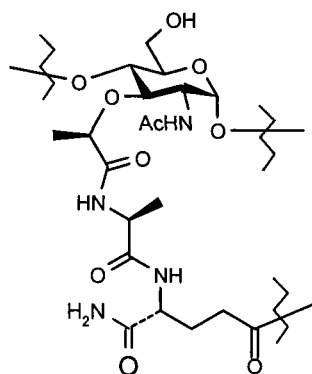


GMDP-A

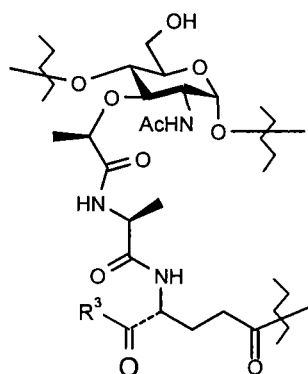
能诱导炎症反应(见如美国专利 4,395,399)。

同样地, 商业上可以获得的聚合的细菌肽聚糖样品(金黄色葡萄球 (*Staphylococcus aureus*), Sigma; 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*), Lee Laboratories)是有效炎性的(葡萄球菌 > 链球菌)。尽管这些物质在组合物中是异质的, 已经用 HPLC 纯化出较小的二糖片段并表征, 并且也是炎性的。这些物质的炎症潜能据报道依赖其结构(Tuomanen 等人(1993) J. Clin.

Invest. 92:297)。报道的有生物学活性的肽聚糖的最小片段是胞壁酰二肽或 MDP, 并且其生物学活性天然是炎性的(Chedid (1983) Microbio. Immunol. 27:723)。实际上, 在下面显示的 MDP 和 MDP-A 基序是已知的炎性化合物的共同特性:

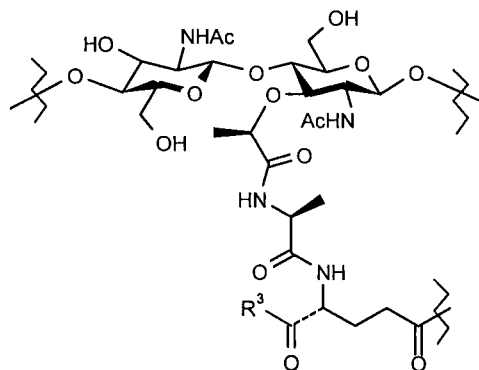


MDP 基序

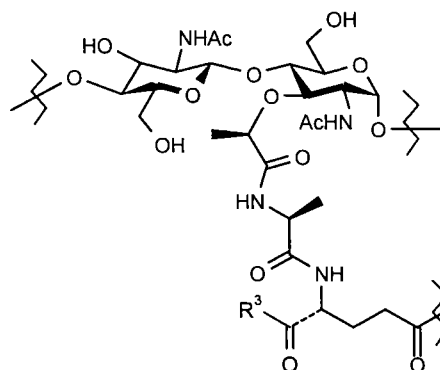


MDP-A 基序

式 I 中的化合物最少必须包括下面基序中的一种以诱导炎症反应(WO 2005/035588, 在此引用作为参考):



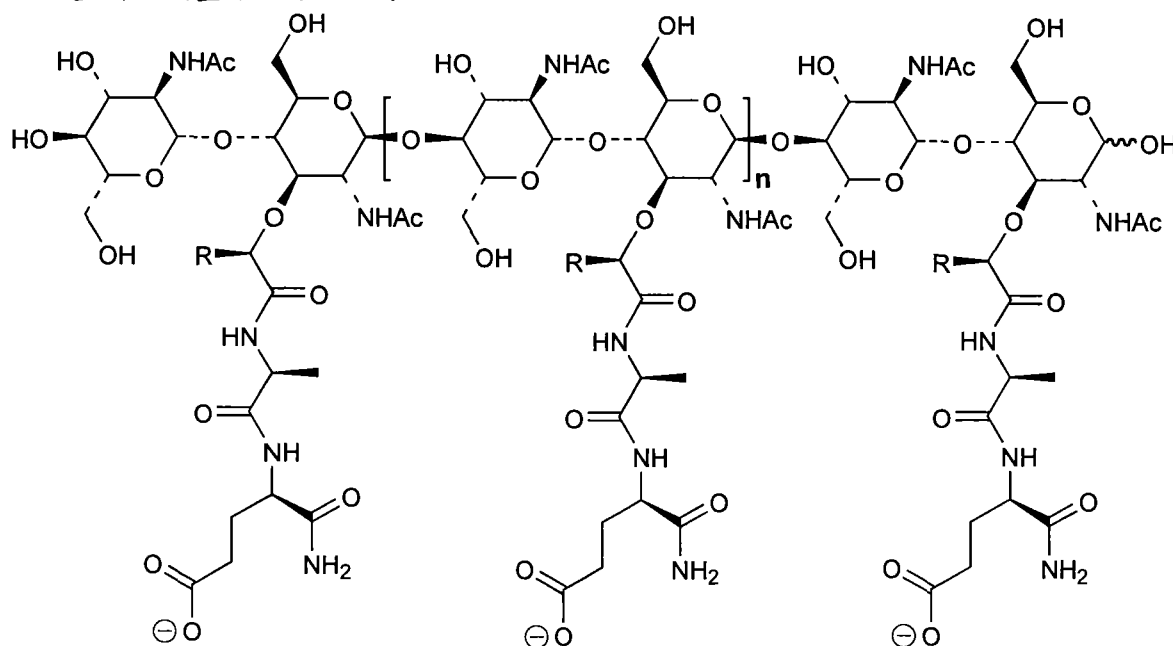
GMPD 基序



GMPD-A 基序

如果这些基序缺失或被修饰, 聚合物可以诱导抗炎症反应。如果第二个氨基酸(D-异谷氨酸或 D-异谷氨酰胺)缺失侧翼的羧基, 或如果侧翼的羧基是 L 构型, 炎症活性就消失(Girardin et al. (2003) J. Biol Chem. 278:8869)。添加一种或多种剩余的三种氨基酸(赖氨酸-D-丙氨酸-D-丙氨酸)可导致活性的保持。在 WO 2005/035588 中展示, 化合物 2 可从人外周血单核细胞中产生促炎症反应。其聚合结构是-[NAG-NAM-三肽]_n, 其中 n 是整数, 其分布是以 ca.135 周围为中心, 并且该三肽是天然的细菌序列(丙氨酸-D-异谷氨酸-赖氨酸)。

化合物 3 是用 WO 2003/075953 的方法通过化学酶总合成从 N-乙酰基葡糖胺制备的另一个促炎症(刺激的)合成细菌肽聚糖。其聚糖主链由 β -[1,4]-连接的 N-乙酰基葡糖胺基- β -[1,4]-N-乙酰基-胞壁酰重复单位组成, 其中, 乳酰基取代基 R 可以是 H 或低级烷基(C_1 - C_5), 优选甲基。甲基或低级烷基取代基优选 D 构型。



化合物 3

这种类型的分子作为以约 130-180 个重复单位($n=130-180$)为中心的分子量分布存在。该聚合物是吸湿性的白色粉末, 它可以溶解在水或盐水中。粘附在每一个二糖重复单位的主干肽可以含有从约 1 个到约 5 个氨基酸。位置 1 可以被丙氨酸、丙氨酸的低级烷基(C_1 - C_5)同系物或甘氨酸占据; 例如, 但不局限于, 丙氨酸或其同系物在 α -碳原子上是 L 构型。位置 2 可以被谷氨酸或谷氨酰胺占据; 这些氨基酸在 α -碳原子上可以是 D 构型, 并且酰胺可以是伯酰胺, 可以是在异(非蛋白质)位。预期保守氨基酸的取代是在位置 1 和 2 上(从乳酰基羰基的 N 端到 C 端)。位置 3 可以被任一天然的或非天然的 α -氨基酸占据; 在非限制性实例中, 赖氨酸或二氨基庚二酸在位置 3 上。位置 4 可以被任一天然的或非天然的 α -氨基酸占据; 在非限制性实例中, 位置 4 被 D-丙氨酸占据。位置 5 可以被任一天然的或非天然的 α -氨基酸占据; 在非限制性实例中, 位置 5 是 D-丙氨酸。化合物 3 代表

刺激性(促炎症性)的合成肽聚糖的最小肽的实例。

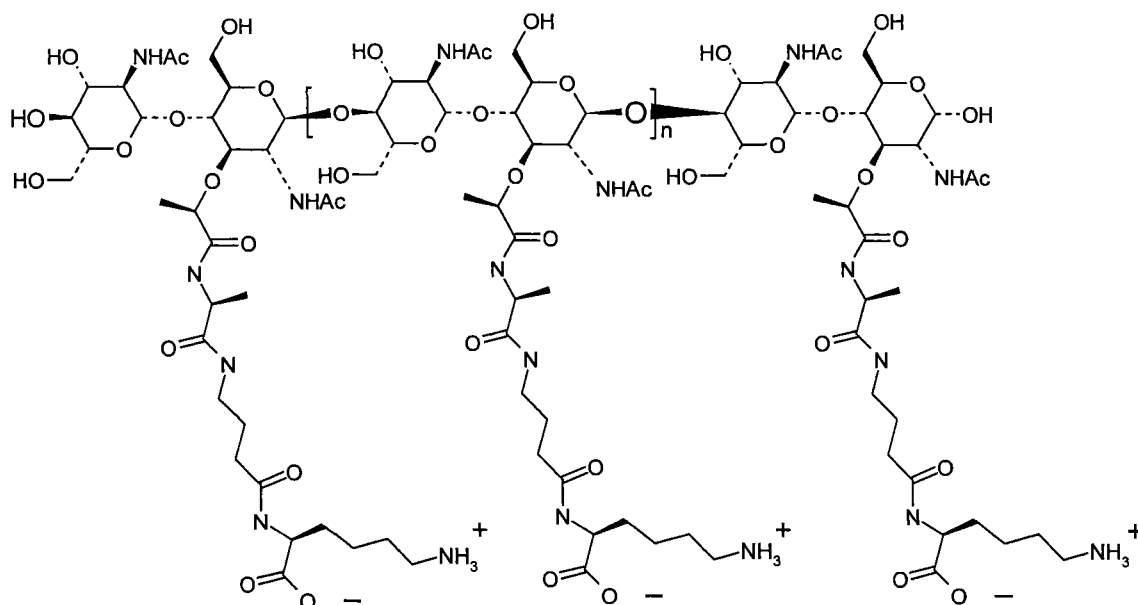
抗炎性化合物

相反,式 I 中的一些化合物诱导抗炎反应,例如,单体单位 Y^m 选自前面定义的式 IIa 和式 IIb 的基团,条件是(a)当 Y^m 不是 Y^n 时,单体单位不是前面定义的式 IIIa 的基团,或(b)当 Y^m 是 Y^n 时,单体单位不是前面定义的式 IIIb 的基团。

这些抗炎性化合物不包括侧翼羧酸或羧酰胺基团,并且这里称作式 VI 的抗炎化合物。化合物 1 是式 VI 的抗炎化合物的实例。应该注意,化合物 1 和化合物 2 有相同的结构,只是化合物 1 没有侧翼羧酸或羧酰胺基团。

化合物 1 是抗炎免疫调节剂。它是所示重复单位的均聚物,作为以 150 千道尔顿为中心的分子量分布存在。该聚合物是吸湿性的白色粉末,可溶于水或盐水中。

而且,WO 2005/035588(在此引用作为参考)已经展示,化合物 1 在多种生物系统中产生抗炎反应。除了第二个氨基酸没有其侧翼羧基外,这种分子与化合物 2 相同。



化合物 1

在细菌细胞壁中的天然的肽聚糖是单一的共价闭合的大分子,其在整个细胞周期中精确地限定细菌细胞的形状。它由平行的聚合肽聚糖聚糖链

的刚性轴组成，其中重复单位是 β -[1,4]-连接的 N-乙酰基葡萄糖胺基- β -[1,4]-N-乙酰基-胞壁酰五肽。聚糖链是螺旋状，螺旋的每个完全回转有约 4 个重复单位。更柔性的五肽轴从胞壁酸残基的乳酰基羧基的 N 向 C 延伸。该肽通常是 H_2N -丙氨酸-D-异-谷氨酸(或异谷氨酰胺)-赖氨酸(或二氨基庚二酸, DAP)-D-丙氨酸-D-丙氨酸-COOH。肽可以在从供体链的赖氨酸(或 DAP)到受体链的倒数第二个 D-丙氨酸的羧基之间交联。在活细胞中实际交联的程度随着属而变化，并且总是小于 100%。相比，在前面的化合物中，在肽中没有交联。

式 I 化合物的效应

式 I 中的化合物如 WO 2005/035588(在此以整体引入作为参考)公开的方法制备和分析。更特别地，化合物 1 作为式 VI 的化合物的实例而制备；而化合物 2 作为式 V 的化合物的实例而制备。合成化合物的结构均一性用大小排阻层析、 1H NMR 光谱、酶敏感性、质谱或其组合进行测定。

用化合物 1 在体外处理人外周血单核细胞导致炎症细胞因子白介素-2、 γ -干扰素、 α -肿瘤坏死因子、白介素-6 或白介素-12 的可忽略的表达，因而表明不能刺激 TLR2。但是，主要的反应是抗炎症细胞因子白介素-10 的表达。白介素-10 的表达在时间过程的后期观测到，在第 5 天可检测到，并在第 8 天继续升高到浓度约为 80pg/ml。这些结果表明式 VI 的化合物在 PBMC 细胞培养物中可选择性地诱导白介素-10 的表达，并且在炎症动物模型中是有效的，可治疗多种类型的炎症病理。

用体外模型系统，也可以测定式 VI 的化合物在体外是否能活化 NK- κ B(促炎症细胞因子的转录因子)。尽管不同浓度的商业上可获得的天然肽聚糖能在 HEK293 细胞中刺激 NK- κ B 萤光素酶 NK- κ B 报道子的显著诱导，在高达 500 μ g/ml 的浓度，化合物 1 显示没有活化萤光素酶 NK- κ B 报道子。这些结果表明，不像天然的肽聚糖，化合物 1 不能通过 TLR2 诱导萤光素酶 NK- κ B 报道子的活化。进一步的实验表明，化合物 1 不能用任何其他的 TLR 受体诱导萤光素酶 NK- κ B 报道子信号传递。

用特异性的簇分化标记的表达水平跟踪与化合物 1 温育的树突细胞的成熟状态。数据显示,与化合物 1 温育不能改变未成熟树突细胞的染色谱,表明这种化合物能影响树突细胞的成熟。

为了评估化合物 1 诱导的树突细胞成熟的抑制是否是由于不能内吞高分子量的免疫调节多糖抗原(如式 VI 中的化合物),用化合物 1 的荧光衍生物和共焦显微术进行摄取研究。化合物 1 的细胞内定位显示,内化的聚合物不是分散在整个细胞质,而是位于不连续的叠堆或囊泡中,与它们在内吞噬泡中存在一致。而且,显示未成熟的树突细胞能迅速内吞荧光标记的化合物 1,并且分子不能引起树突细胞成熟不是由于其对内吞摄取的抵抗。

也检测式 VI 中化合物干预未成熟树突细胞成熟的能力。结果显示,化合物 1 能干预 LPS 诱导的未成熟树突细胞的成熟。特别是,在化合物 1 存在的时共刺激标记 CD86 在表面的表达减少,而测试的其他标记基本上没有变化。另外的实验也证明,另一个共刺激标记 CD80 也减少了。因而,式 VI 中的化合物影响树突细胞表面共刺激标记表达的能力暗示这种类型的分子在诱导耐受原的树突细胞中的作用机理。于是,这些耐受原的树突细胞能直接的或通过 Treg 细胞群的活性诱导 T 细胞无反应性。

也显示,与用多克隆促分裂原(如植物凝集素(PHA))或超抗原(如金黄色葡萄球菌肠毒素 A(SEA))处理的对照培养物相比较,用化合物 1 处理的人 PBMC 培养物没有出现增殖应答(见实施例 3)。但是,用化合物 2 与人 PBMCs 温育可导致促炎症细胞因子 TNF- α 的识别和产生(见实施例 3)。而且,当用抗 CD3 的抗体刺激化合物 1 处理过的 PBMC 培养物时,培养物的增殖能力比没有处理的对照有显著的抑制。微阵列分析也揭示,用化合物 1 和抗 CD3 抗体处理 PBMC 培养物能选择性地上调在 CD3+T 细胞群中的 IL10 和 IL19(IL10 的种内同源物)信息的表达,而下调几种炎症细胞因子信息,如 IL 和 TNFb。

这些数据一起表明式 VI 中的化合物(如化合物 1)抑制树突细胞的成熟。用式 VI 中的化合物处理后 PBMC 培养物中存在的 CD4+CD25+细胞数目的增加表明,这些化合物产生未成熟抗原递呈细胞群体,其驱动培养

物中的 T 调节细胞的刺激。这个观点也被下面的观察所支持：用化合物 1 处理后，用抗 CD3 抗体刺激能抑制 PBMC 培养物中的 T 细胞的增殖。未成熟的树突细胞有独特的能力驱动 Treg 细胞的产生。然后，Treg 细胞可以通过细胞与细胞间信号以及通过刺激 IL10 在炎症部位的无反应性的 T 细胞中表达，参与炎症反应的抑制。

在体外具有抑制功能的 Treg 细胞的诱导，以及在人 PBMCs 中 IL10 的晚期产生，导致评估化合物 1 保护动物免受体内脓肿炎症形成的能力。结果表明，化合物 1 在多种剂量能产生抗脓肿形成的相当大的保护作用。被保护的动物没有表现出抗原给药的有害效应，如果有，则有发烧和昏睡病征，这些是炎症或脓毒症的通常症状。而且，用化合物 1 处理的大鼠中手术后粘连的形成显著地受限制，这表明这种多糖抗原能有效地保护大鼠免于形成严重的手术诱导的粘连，并暗示式 VI 中的化合物能在体内诱导抗炎症效应。

免疫调节剂(如式 VI 中的化合物)的安全性和有效性的临床评估需要方便的生物标志。因此，开发了迟发型超敏反应(DTH)的豚鼠模型以评估式 VI 中的化合物限制皮肤中的局部炎症反应的能力。用来引起炎症 T 细胞活性的抗原来自白假丝酵母(*Candida albicans*) (Candin)。用化合物 1 处理的动物中的潮红面积要比对照动物的小。

获得的结果表明免疫系统对细菌肽聚糖识别的文献直接相反。而且，考虑到关于天然肽聚糖的当前的大量证据，由式 VI 中的化合物引起的抗炎症反应的刺激是完全新颖的和意想不到的，说明细菌肽聚糖是有效的炎症性剂。因而，尽管天然肽聚糖具有有效的炎症性，但式 VI 中的化合物是抗炎症的。式 VI 中的化合物在体外表现出抗炎症活性的发现与以前发表的关于纯化的细菌肽聚糖的发现显著不同。

与化合物 1 不能刺激 TLR2 不同，化合物 2 和 3 能结合和刺激 TLR2，从而能诱导人 PBMCs 产生促炎症性的细胞因子 TNF- α 。因而，化合物 1 和化合物 2 和 3 的结构差异似乎代表着细菌肽聚糖中基本的结构/生物学活性关系。所以，化合物 2 和化合物 3 有在人和其他哺乳动物免疫治疗中作

为佐剂发挥功能所需要的特征，而化合物 1 的效应是抑制性的，作为佐剂使用是禁忌的。

式 VI 中的合成多糖抗原的作用机理：T 调节细胞假说

在式 VI 中的化合物的效应的研究中，出现了式 VI 中的合成多糖抗原的作用机理，并用图 1 概述。式 VI 中的合成免疫调节多糖抗原能抑制树突细胞的成熟。未成熟的树突细胞(iDCs)表达低水平的 CD80 和 CD86 共刺激分子。在这种状态，未成熟的树突细胞具有与幼稚 T 细胞结合和诱导 CD4+CD25+Treg 细胞(途径 B)产生的独特能力。面对炎症反应，Treg 细胞通过细胞-细胞依赖性的接触与 T 效应细胞相互作用并抑制这些 T 炎症效应细胞的增殖能力。而且，Treg 细胞与 T 效应细胞的接触使得效应细胞无反应性并刺激这些表达大量的 IL10。在前面的炎症 T 细胞细胞细胞中引起 IL10 表达能增强直接 Treg 细胞接触的抑制效应并扩大保护免于正在进行的炎症过程。由本发明研究人员发现的抑制树突细胞的成熟也能通过缺乏这两种细胞类型之间的同源相互作用(途径 A)抑制 T 效应细胞的克隆扩充。但是，数据更有力地支持 T 调节细胞最终是由本发明中式 VI 中的合成多糖抗原产生，并提供保护免于炎症性病理的假说。

式 V 中的合成多糖抗原的作用机理：炎症假说

以 TNF- α 的保护为证，以化合物 2 和 3 为例的式 V 中的化合物似乎能刺激炎症反应。化合物 2 和 3 可以以与完整细菌或细菌细胞壁抗原类似的方式，最可能通过活化 TLR2 与免疫细胞相互作用。在这种情况下，式 V 中的化合物与具有 TLR2 的细胞之间的相互作用能刺激炎症的特征性标记。这暗示炎症细胞将开始活动，因为随后能检测到入侵的病原体。这些概念在图 2 中概述。

抗原特异性 SPA

前面描述的抗原非特性的 SPA 能以非特异性的方式活化或抑制炎症反应。尽管这种类型的活化或抑制能影响大量的 T 细胞，但需要更多的定向方法通过导向特异性的 T 细胞群抑制或活化特异性的炎症反应。为了提供炎症的定向活化或抑制，根据前面描述的 V 和 VI 家族化合物的结构开发

了特异性的合成多糖抗原。抑制性合成多糖抗原包括依据式 VI 中的化合物的 TLR2 结合结构域和目标表位。促炎症 SPA 包含依据式 VI 中的化合物的 TLR2 结合结构域、目标表位和能增强炎症反应的 Th 辅助表位。

促炎症性的 monoSPA 和 polySPA

根据本发明的合成促炎症性的 SPA 包括:

TLR2 定向的合成 PGN 部分(图 3 到 6, 方框), 其可提供佐剂功能和第一表位和第二表位每一个共价附着在其上的糖肽骨架;

第一表位, 其包括一个或多个一般的 T 辅助表位;

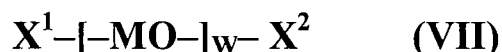
第二表位, 其包括一个或多个目标表位;

第一和第二表位在 SPA 内有一个或多个拷贝,

其中, 每个目标表位可以是肽序列或糖类部分, 以及其中每个目标表位是 CD8+T 细胞或 B 细胞的免疫原, 或其可药用盐。

促炎症 SPA 的特定实例在图 3 到 6 中图示, 但不意味着以任何方式限制。

与非特异性 SPA 类似, SPA 是式 VII 中线性的、非交联的聚合化合物:



其中,

X^1 和 X^2 独立地是 H 或终止子;

W 代表聚合物中单体单位(MO)的数目, 并且可以是在从约 10 到约 375 之间的范围内的整数或它们之间的任何数; 例如, n 可以是约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370 或 375, 或它们之间的任何数值, 或由这里定义的任意两个数值确定的范围内的任何数值。在另一个非限制性实例中, W 可以描述为位于约 130 和约 180 之间的分布中心或它们之间的任何数值;

单体单位 MO 包括:

未取代的重复单位(UR; 见例如图 3 到 6);

一个或多个种类的 Th 表位重复单位(ThR; 见例如图 3 和 5); 和

一个或多个种类的目标表位重复单位(TR; 见例如图 3 和 5)。

备选地, 一个或多个种类的 ThR 和一个或多个种类的 TR 可以被一个或

多个种类的组合 Th/目标表位重复单位(Th/TR; 见例如图 4 和 6)替代。

促炎症 SPA 可以在 ThR 或 Th/TR 种类的 SPA 分子中包括从约 1 到约 180 个不同的 Th 表位或它们之间的任何数值。每个表位命名为”(Th 表位)”_n(见图 3 到 6)。例如, 在 ThR 或 Th/TR 种类的 SPA 分子中可以有约 1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 种不同的 Th 表位, 或它们之间的任何数值, 或由本文公开的任何两个数值定义的范围内的任何数值。在本发明中预期各种类型的 Th 表位, 并且合适表位的非限制性实例在本发明后面描述。本领域的技术人员能认识到, 根据情况, Th 表位的数目将决定 ThR 或 Th/TR 种类的数目。例如, 不希望以任何方式限制, 如果使用 4 种不同的 Th 表位, 表位命名为(Th 表位)₁、(Th 表位)₂、(Th 表位)₃、(Th 表位)₄, 每种表位出现在其各自种类的 ThR 上, 即 4 种不同的 ThR 种类命名为 ThR¹ (携带(Th 表位)₁)、ThR² (携带(Th 表位)₂)、ThR³ (携带(Th 表位)₃)、ThR⁴ (携带(Th 表位)₄)。

在促炎症合成多糖抗原中的目标表位的数目是不依赖于 Th 表位的数目。因此, 在 TR 或 Th/TR 种类的合成多糖抗原分子中, 合成多糖抗原可以包括从约 1 到约 180 个不同目标表位, 或它们之间的任何数值。每个表位命名为”(目标表位)”_n(见图 3 到 6)。例如, 在在 TR 或 ThR 种类的合成多糖抗原分子中, 有 1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 种不同的目标表位, 或由本文公开的任何两个数值定义的范围内的任何数

值。本发明预期各种类型的目标表位,包括肽或糖类、CD8+T 细胞或 B 细胞或其任一组合。合适表位的非限制性实例在本发明后面描述。本领域的技术人员能认识到,根据情况,目标表位的数目决定着 TR 或 Th/TR 种类的数目。例如,以及不希望任何方式的限制,如果使用 3 种不同的目标表位,表位将命名为(目标表位)₁、(目标表位)₂、(目标表位)₃,每种表位出现在其各自种类的 TR 上,即命名为 TR¹(携带(目标表位)₁)、TR²(携带(目标表位)₂)、TR³(携带(目标表位)₃)的 3 种不同的 TR 种类。

当存在一种目标表位,如图 3 和 4 中所示的时,SPA 是单价的 SPA 或 *monoSPA*。当存在多种目标表位,如图 5 和 6 中所示的时,SPA 是多价的 SPA 或 *polySPA*。

Th 表位与目标表位的最适比例根据经验确定,无需过度的实验。

每种单体单位在 SPA 中以称作下标(x 、 y_n 、 z_n 或 $y_n z_n$)的给定摩尔份数存在。例如,摩尔份数为 0.6 表示给定的单体单位占 SPA 中的重复单位的 60%。未取代的重复单位(UR)的摩尔份数的名称为 x ;例如,如果 $x=0.4$,未取代的重复单位(UR)在 SPA 中占单体单位的 40%。Th 表位重复单位(ThR)种类的摩尔份数的名称为 y_n ;例如,如果 $y_n=0.15$,第 n 种不同种类的 ThR 占 SPA 中单体单位的 15%。目标表位重复单位(TR)种类的摩尔份数的名称为 z_n ;例如,如果 $z_n=0.20$,第 n 种不同种类的 TR 占 SPA 中单体单位的 15%。组合的 Th/目标表位重复单位(Th/TR)种类的摩尔份数的名称为 $y_n z_n$,例如,如果 $y_n z_n=0.17$,第 n 种不同种类的 Th/TR 占 SPA 单体单位的 17%。

本领域的技术人员将认识到摩尔份数的总和必须等于 1.00,即 $x + y + y_1 + y_2 + \dots + y_n + z + z_1 + z_2 + \dots + z_n$ 的总和(根据情况)=1.00。由于各种重复单位的酶聚合速率随着替换差异很少(如果有),所以 UR、ThR、TR 和/或 Th/TR 根据它们各自在组合物中的摩尔份数沿着聚合物的糖类轴均匀地分布。注意,由于共聚物形成的随机属性,UR、ThR、TR 和/或 Th/TR 可以以任何顺序出现在多糖中。

为了阐明前面描述的数值的关系,给出下面的非限制性实例:包括共

50 个单体单位(即 $W=50$)的 SPA 聚合物。SPA 聚合物有 2 个 Th 表位((Th 表位)₁ 和(Th 表位)₂)和 4 个目标表位((目标表位)₁、(目标表位)₂、(目标表位)₃ 和 (目标表位)₄)；因而，聚合物包括 1 种 UR，2 种 ThR，和 4 种 TR。如果 UR 的摩尔份数(即 x)为 0.4；携带(Th 表位)₁ 的 ThR 的摩尔份数(即 y_1)为 0.08；携带(Th 表位)₂ 的 ThR 摩尔份数(即 y_2)为 0.12；携带(目标表位)₁ 的 TR 摩尔份数(即 z_1)为 0.10；携带(目标表位)₂ 的 TR 摩尔份数(即 z_2)为 0.06；携带(目标表位)₃ 的 TR 的摩尔份数(即 z_3)为 0.06；携带(目标表位)₄ 的 TR 摩尔份数(即 z_4)为 0.18；那么聚合物将包含 40% UR、8% ThR¹、12% ThR²、10% TR¹、6% TR²、6% TR³ 和 18% TR⁴ (即 20 个 UR 单体、4 个 ThR¹ 单体、6 个 ThR² 单体、5 个 TR¹ 单体、3 个 TR² 单体、3 个 ThR³ 单体和 9 个 TR⁴ 单体)。

另一个说明性的、非限制性的实例是包括总共 100 个单体单位(即 $W=100$)的 SPA 聚合物。SPA 聚合物有 3 个 Th 表位((Th 表位)₁、(Th 表位)₂ 和(Th 表位)₃)和 2 个目标表位((目标表位)₁ 和(目标表位)₂)；聚合物包括 1 种 UR 和 6 种 Th/TR。如果 UR 的摩尔份数(即 x)为 0.35；携带(Th 表位)₁ 和(目标表位)₁ 的 Th/TR 摩尔份数(即 y_1z_1)为 0.13；携带(Th 表位)₁ 和(目标表位)₂ 的 Th/TR 摩尔份数(即 y_1z_2)为 0.04；携带(Th 表位)₂ 和(目标表位)₁ 的 Th/TR 摩尔份数(即 y_2z_1)为 0.15；携带(Th 表位)₂ 和(目标表位)₂ 的 Th/TR 摩尔份数(即 y_2z_2)为 0.20；携带(Th 表位)₃ 和(目标表位)₁ 的 Th/TR 摩尔份数(即 y_3z_1)为 0.08；和携带(Th 表位)₃ 和(目标表位)₂ 的 Th/TR 摩尔份数(即 y_3z_2)为 0.05；那么聚合物将包含 35% UR、13% Th¹/TR¹、4% Th¹/TR²、15% Th²/TR¹、20% Th²/TR²、8% Th³/TR¹ 和 5% Th³/TR² (即 35 个 UR 单体、13 个 Th¹/TR¹ 单体、4 个 Th¹/TR² 单体、15 个 Th²/TR¹ 单体、20 个 Th²/TR² 单体、8 个 Th³/TR¹ 单体和 5 个 Th³/TR² 单体)。

本发明中的抗原特异性的促炎症 SPAs 是共聚物(即有两个或多个不同的单体)。各种单体单位(UR、ThR、TR 和/或 Th/TR)的酶聚合速率差异很少，因而，单体可以依据它们各自在组合物中的摩尔份数沿着 SPA 共聚物的长度均匀地分布。本领域的技术人员很容易地认识到，尽管图 3 到 6 以

在 SPA 内特定的顺序描述单体, 由于聚合的随机属性, 单体可以以在 SPA 内以任一顺序存在。因此, 共聚物可以是无规共聚物、嵌段聚合物或交替共聚物。例如, 并且不希望限制, 对于包括 UR、一种 $TR(TR^1)$ 和一种 $ThR(ThR^1)$ 的 SPA, 聚合物的类型包括:

聚合物类型	实例
无规共聚物*	$X^1-UR-ThR^1-TR^1-ThR^1-UR-TR^1-TR^1-ThR^1-UR-TR^1-X^2$
嵌段共聚物**	$X^1-UR-UR-UR-ThR^1-ThR^1-ThR^1-TR^1-TR^1-TR^1-X^2$
交替共聚物*	$X^1-UR-ThR^1-TR^1-UR-ThR^1-TR^1-UR-ThR^1-TR^1-X^2$

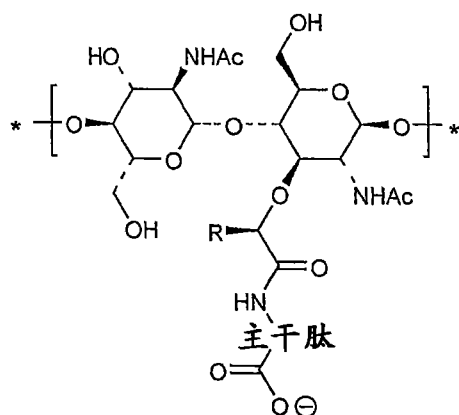
*这种共聚物的长度可以与展示的长度不同;

**其中每个“嵌段”可以是不同的长度, 并且可以在整个共聚物中重复; 这种共聚物的长度也可以与展示的长度不同。

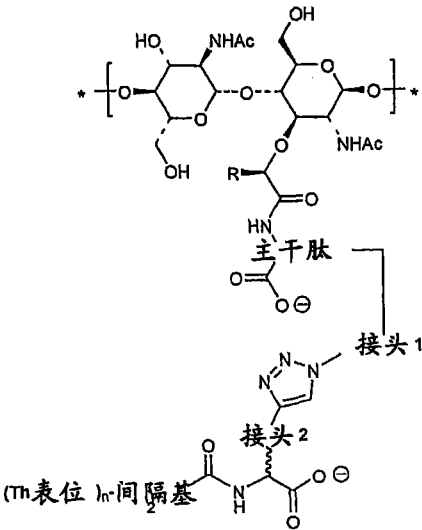
本发明中的促炎症 *monoSPA* 和 *polySPA* 是随机线性的共聚物, 包括不同类型的 β -[1,4]-连接的 N-乙酰基葡萄糖胺基- β -[1,4]-N-乙酰基胞壁酰肽重复单位。在糖类核心中预期保守取代。例如, 并且不希望限制, 乳酰基甲基也可以是低级烷基(C_1-C_5)或 H。在另一个非限制性实例中, 当存在烷基时, 带氧的碳是 D 构型。

总之, 各种单体单位(MO)可以用下面的结构描述:

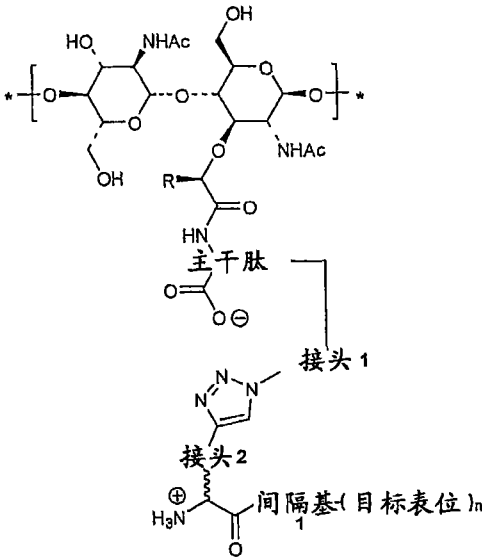
UR (式 VIII):



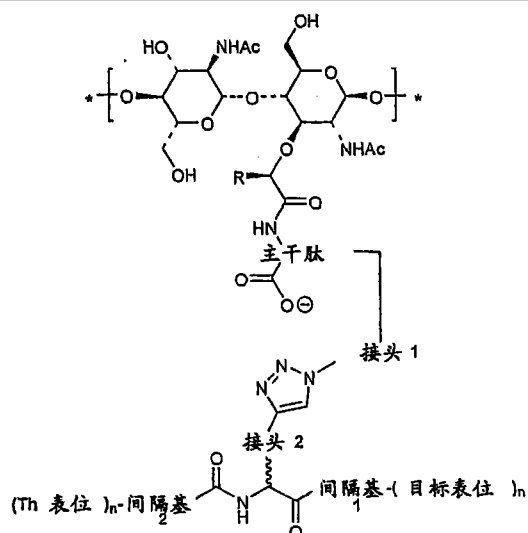
ThR(式 IX):



TR (式 X):



Th/TR (式 XI):



单体单位的 R 基团可以是独立选择的, 以及可以是 H 或低烷基 (C₁-C₅)。

未取代的重复单位的主干肽(UR; 见例如图 3 到 6)、Th 表位重复单位(ThR; 见例如图 3 和 5)、目标表位重复单位(TR; 见例如图 3 和 5)、组合 Th/目标表位重复单位(Th/TR; 见例如图 4 和 6)都是独立选择的, 并且每一个含有从约 2 个到约 5 个氨基酸。主干肽可以包括天然的或非天然的任何氨基酸。例如, 以及不希望以任何方式限制, 可以使用下面的氨基酸。位置 1 可以由丙氨酸、丙氨酸的低级烷基(C₁-C₅)的同系物或甘氨酸占据; 在另一个非限制性实例中, 在丙氨酸或其同系物的 α-碳优选 L 构型。谷氨酸、谷氨酰胺或低级烷基(C₁-C₅)谷氨酰胺伯或叔酰胺可以在位置 2; 在另一个非限制性实例中, 氨基酸优选 D 构型, 并且侧翼的酰胺可以是在异(非蛋白质)位上。位置 3 由任一天然的或非天然的 α-氨基酸占据; 在另一个非限制性实例中, 赖氨酸或二氨基庚二酸占据位置 3。位置 4 可以由任一天然的或非天然的 α-氨基酸占据; 在另一个非限制性实例中, 位置 4 的氨基酸是 D-丙氨酸。位置 5 可以由任一天然的或非天然的 α-氨基酸占据; 在另一个非限制性实例中, D-丙氨酸在位置 5 上。氨基酸残基可以是独立地结合到 α 或 γ 羧基上, 和在 α 或 ε 氨基上, 或其任一组合, 条件是存在侧翼羧酸或者羧酰胺基团。在特定的非限制性实例中, 侧翼羧酸或者羧酰胺基团在位置 2 的氨基酸的上。另外, 主干肽的每个氨基酸残基可以是未取代的或者被一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、氨基、

烷基氨基、二烷基氨基、C(O)O 烷基和-NO₂ 的基团取代。

接头 1 和接头 2 可以独立地选择，并且可以包含本领域已知的任何合适的接头。在具体实例中，每个接头可以包括从约 1 个到约 6 个片段，或它们之间任何数值的片段；例如，接头可以包括 1、2、3、4、5 或 6 个片段。不希望限制，每个片段可以选自-CH₂-、-CHR-、=CH-和 ≡CH-，在这里 R 是低级烷基。当有 3 到 6 个片段时，假设没有临近的杂原子片段，片段 1 到 4 也可以选自-O-、NH-、-NR-、-S-、-SO-和-SO₂-。在特定的非限制性实例中，接头 1 可以是主干肽的一部分上的赖氨酸的侧链。

每一个在主干肽和接头 1(见图 3 到 6)之间的连接可以在主干肽的任何一个氨基酸上独立地形成。在非限制性实例中，主干肽和接头 1 之间的连接在主干肽的位置 3 处形成。接头 1 和接头 2 之间的连接可以是 1,4-[1,2,3-三唑] (Rostovtsev 等人(2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 114:2708)或是本领域技术人员已知的任何其他连接化学，例如，但不局限于硫醇盐/马来酰亚胺 (Verez-Bencomo 等人(2004) *Science* 305:522)和胺/醛还原性的烷基化 (Slovin 等人(1999) *PNAS* 96:5710)。在特定的非限制性实例中，目标表位是糖类，接头 1 和接头 2 之间的连接子是胺/醛还原性烷基化。

目标表位的间隔基 1 可以从约 1 个到约 10 个氨基酸的长度，或它们之间的任何数值；例如，间隔基可以是约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸的长度。氨基酸可以是本领域已知的任何天然的或非天然的氨基酸。在特定的非限制性实例中，间隔基可以是 Gly-Ser-Gly-Ser(见图 1-6)，但是，如果需要，在间隔基内可以使用其他氨基酸，并且间隔基可以是刚才描述的不同长度，如从约 2 个到约 10 个氨基酸或它们之间的任何数值，如从约 4 个到约 8 个氨基酸或它们之间的任何数值。在特定的非限制性实例中，间隔基是 4 个氨基酸的长度。间隔基可以在它的 N 末端(即 α-氨基)或通过其任何一个氨基酸的侧链的 ε 氨基(如果有的话)连接到单体单位上。例如，但不希望限制，间隔基在其位置 1 上氨基酸的 α-氨基基团处连接到单体单位。间隔基通过肽键(如果表位是肽的话)或通过 O-连接的糖基化(如果表位是糖类的话)连接到目标表位上。

Th 表位的间隔基 2 可以是约 0 个到约 10 个氨基酸长度, 或它们之间的任何数值; 例如间隔基可以是约 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸长度。氨基酸可以是本领域已知的天然的或非天然的氨基酸。在特定的非限制性实例中, 间隔基包括 0 个氨基酸(见图 1-6)。但是, 如果需要, 在间隔基内可以使用其他氨基酸, 并且间隔基可以是刚才描述的不同长度, 如从约 2 个到约 10 个氨基酸或它们之间的任何数值, 如从约 4 个到约 8 个氨基酸或它们之间的任何数值。间隔基可以在它的 N 末端(即 α -氨基)或通过其任何一个氨基酸的侧链的 ϵ 氨基(如果有的话)连接到单体单位上。例如, 但不希望限制, 间隔基在其位置 1 上氨基酸的 α -氨基基团处连接到单体单位。间隔基通过肽键(如果表位是肽的话)或通过 O-连接的糖基化(如果表位是糖类的话)连接到 Th 表位上。

本发明也预期含有仅仅 Th 表位的促炎症 *monoAPS* 和 *polySPA*。这些特殊的 SPAs 可以是有效的一般佐剂。

抑制性 *monoAPS* 和 *polySPA*

本发明中的合成的抑制性 SPAs 包括:

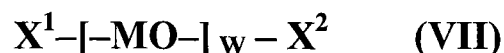
靶定 TLR2 的合成 PGN 部分(图 7 和 8, 方框), 它提供了 APC 细胞内机器的接近以加工和递呈, 并提供共价连接一个或多个目标表位的糖肽骨架; 和

一个或多个目标表位, 在 SPA 分子内每个表位有一个或多个拷贝。目标表可以是肽序列或糖类部分,

或其可药用盐。

抑制性 SPAs 的特定实例在图 7 和 8 中概略地展示, 但不意味着以任何方式限制。

与非特异 SPA 类似, SPA 是式 VII 中的线性的、非交联的聚合化合物:



其中,

X^1 和 X^2 独立地是 H 或终止子;

W 代表聚合物中单体单位(MO)的数目, 并且可以是在从约 10 到约 375

之间的范围内的整数或它们之间的任何数；例如， n 可以是约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370或375，或它们之间的任何数值，或由这里定义的任意两个数值确定的范围内的任何数值。在另一个非限制性实例中， W 可以描述为位于约130和约180之间的分布中心或它们之间的任何数值；

单体单位 MO 包括：

未取代的重复单位(UR ；见例如图7和8)；和

一个或多个种类的目标表位重复单位(TR ；见例如图7和8)，

或其可药用盐。

抑制性 $SPAs$ 在 TR 种类의 SPA 分子中可以包括从约1个到约180个不同的目标表位，或它们之间的任何数值。每个表位命名为“(目标表位) $_n$ ”(见图3到6)。例如，在 TR 种类의 SPA 分子中可以有约1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175或180个不同的目标表位，或它们之间的任何数值，或由这里描述的任何两个数值定义的范围内的任何数值。本发明预期各种类型的目标表位。合适表位的非限制性实例在本发明的后面描述。本领域内的技术人员能认识到目标表位的数目将决定 TR 种类的数目，例如，以及不希望任何方式的限制，如果使用3种不同的目标表位，表位将命名为(目标表位) $_1$ 、(目标表位) $_2$ 、(目标表位) $_3$ ，每种表位出现在其各自种类的 TR 上，即命名为 TR^1 (携带(目标表位) $_1$)、 TR^2 (携带(目标表位) $_2$)、 TR^3 (携带(目标表位) $_3$)的3种不同的 TR 种类。

当存在一种目标表位，如图7所示，则 SPA 为 *monoSPA*。当存在多种目标表位，如图8所示，则 SPA 为 *polySPA*。

每种单体单位在 SPA 中以称作下标(x 或 z_n)的给定摩尔份数存在。例如, 摩尔份数为 0.6 表示给定的单体单位占 SPA 中的重复单位的 60%。未取代的重复单位(UR)的摩尔份数的名称为 x ; 例如, 如果 $x=0.4$, 未取代的重复单位(UR)在 SPA 中占单体单位的 40%。目标表位重复单位(TR)的摩尔份数的名称为 z_n ; 例如, 如果 $z_n=0.20$, 则第 n 个不同种类的 TR 在 SPA 中占单体单位的 20%。

本领域的技术人员将认识到摩尔份数的总和必须等于 1.00, 即 $x + y + y_1 + y_2 + \dots + y_n + z + z_1 + z_2 + \dots + z_n$ 的总和(根据情况) = 1.00。由于各种重复单位的酶聚合速率随着替换差异很少(如果有), 所以 UR、ThR、TR 和/或 Th/TR 根据它们各自在组合物中的摩尔份数沿着聚合物的糖类轴均匀地分布。注意, 由于共聚物形成的随机属性, UR、ThR、TR 和/或 Th/TR 可以以任何顺序出现在多糖中。

为了阐明前面描述的数值的关系, 给出下面的非限制性实例: 包括共 50 个单体单位(即 $W=50$)的 SPA 聚合物。SPA 聚合物有 4 个目标表位((目标表位)₁、(目标表位)₂、(目标表位)₃、和(目标表位)₄), 从而聚合物包括 1 种 UR 和 4 种 TR。如果 UR 的摩尔份数(即 x)为 0.4, 携带(目标表位)₁ 的 TR 的摩尔份数(即 z_1)为 0.06; 携带(目标表位)₂ 的 TR 的摩尔份数(即 z_2)为 0.2; 携带(目标表位)₃ 的 TR 的摩尔份数(即 z_3)为 0.24; 携带(目标表位)₄ 的 TR 的摩尔份数(即 z_4)为 0.10; 那么聚合物将包括 40% UR、6% TR¹、20% TR²、24% TR³ 和 10% TR⁴ (即 20 个 UR 单体、3 个 TR¹ 单体、10 个 TR² 单体、12 个 ThR³ 单体和 5 个 TR⁴ 单体)。

本发明中的抗原特异性的抑制性 SPAs 是共聚物(即有两个或多个不同的单体)。各种单体单位(UR 和 TR)的酶聚合速率差异很少, 因而, 单体可以依据它们各自在组合物中的摩尔份数沿着 SPA 共聚物的长度均匀地分布。本领域的技术人员很容易地认识到, 尽管图 7 到 8 以在 SPA 内特定的顺序描述单体, 由于聚合的随机属性, 单体可以以在 SPA 内以任一顺序存在。因此, 共聚物可以是无规共聚物、嵌段聚合物或交替共聚物。例如, 并且不希望限制, 对于包括 UR 和一种 TR(TR¹)的 SPA, 聚合物的类型包

括:

聚合物类型	实例
无规共聚物*	$X^1-UR-TR^1-TR^1-UR-UR-TR^1-TR^1-UR-TR^1-X^2$
嵌段共聚物**	$X^1-UR-UR-TR^1-TR^1-UR-UR-TR^1-TR^1-X^2$
交替共聚物*	$X^1-UR-TR^1-UR-TR^1-UR-TR^1-UR-TR^1-X^2$

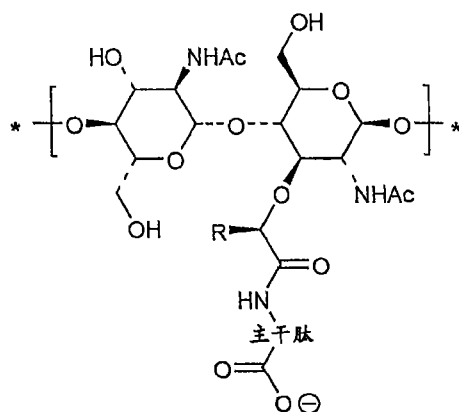
*这种共聚物的长度可以与展示的长度不同;

**其中每个“嵌段”可以是不同的长度,并且可以在整个共聚物中重复;这种共聚物的长度也可以与展示的长度不同。

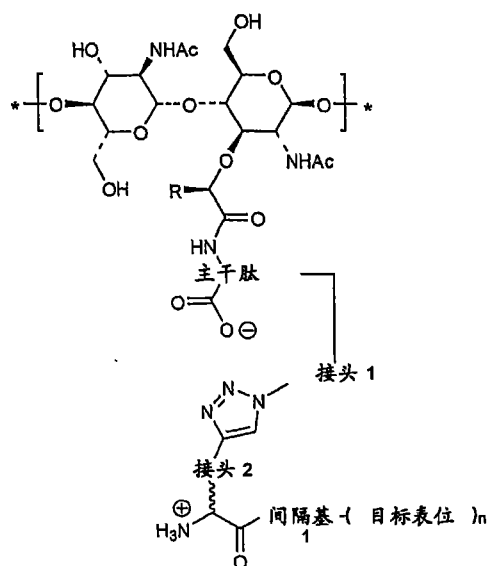
本发明中的抑制性 *monoSPA* 是随机线性的共聚物,包括不同类型的 β -[1,4]-连接的 N-乙酰基葡萄糖胺基- β -[1,4]-N-乙酰基胞壁酰肽重复单位。在糖类核心中预期保守取代。因而,乳酰基甲基可以是低级烷基(C_1-C_5)或 H,当存在任何烷基时,含氧的碳优选 D 构型。

通常,单体单位(MO)可以用下面的结构描述:

UR (式 VII):



TR (式 X):



单体单位的 R 基团可以是独立选择的, 以及可以是 H 或低烷基 (C₁-C₅)。

未取代的主干肽重复单位(UR, 见如图 7 和 8)的主干肽和目标表位重复单位(TR; 见如图 7 和 8)的主干肽都是独立选择的, 并且可以包括从约 1 个到约 5 个氨基酸。主干肽可以包括天然的或非天然的任何氨基酸。例如, 以及不希望以任何方式限制, 可以使用下面的氨基酸。位置 1 可以由丙氨酸、丙氨酸的低级烷基(C₁-C₅)的同系物或甘氨酸占据; 在另一个非限制性实例中, 在丙氨酸或其同系物的 α-碳优选 L 构型。位置 2 可以由 γ 氨基丁酸(Gaba)、甘氨酸、β-氨基丙酸、δ-氨基戊酸和 ε-氨基己酸占据; 在另一个非限制性实例中, Gaba 在位置 2 上。位置 3 可以由任何天然的或非天然的 α-氨基酸占据; 在另一个非限制性实例中, 赖氨酸或二氨基庚二酸在位置 3 上。位置 4 可以由任何天然的或非天然的 α-氨基酸占据; 在另一个非限制性实例中, 位置 4 由 D-丙氨酸占据。位置 5 可以由任何天然的或非天然的 α-氨基酸占据; 在另一个非限制性实例中, D-丙氨酸在位置 4 上。假设在主干肽上没有侧翼羧酸或羧酰胺基团, 那么氨基酸残基可以独立地结合到 α 或 γ 羧基上, 和结合到 α 或 ε 氨基上, 或其任一组合。另外, 主干肽的每个氨基酸残基可以是未取代的或者被一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、C(O)O 烷基和-NO₂ 的基团取代。

接头 1 和接头 2 可以独立地选择, 并且可以包含本领域已知的任何合适的接头。在具体实例中, 每个接头可以包括从约 1 个到约 6 个片段, 或它们之间任何数值的片段; 例如, 接头可以包括 1、2、3、4、5 或 6 个片段。不希望限制, 每个片段可以选自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $=\text{CH}-$ 和 $\equiv\text{CH}-$, 在这里 R 是低级烷基。当有 3 到 6 个片段时, 假设没有临近的杂原子片段, 片段 1 到 4 也可以选自 $-\text{O}-$ 、 $\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ 和 $-\text{SO}_2-$ 。

每一个在主干肽和接头 1(见图 3 到 6)之间的连接可以在主干肽的任何一个氨基酸上独立地形成。在非限制性实例中, 主干肽和接头 1 之间的连接在主干肽的位置 3 处形成。接头 1 和接头 2 之间的连接可以是 1,4-[1,2,3-三唑] (Rostovtsev 等人(2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 114:2708)或是本领域技术人员已知的任何其他连接化学, 例如, 但不局限于硫醇盐/马来酰亚胺 (Verez-Bencomo 等人(2004) *Science* 305:522)和胺/醛还原性的烷基化 (Slovin 等人(1999) *PNAS* 96:5710)。在特定的非限制性实例中, 目标表位是糖类, 接头 1 和接头 2 之间的连接子是胺/醛还原性烷基化。

目标表位的间隔基可以是约 1 个到约 10 个氨基酸的长度, 或它们之间的任何数值; 例如, 间隔基可以是约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸的长度。氨基酸可以是本领域已知的任何天然的或非天然的氨基酸。在特定的非限制性实例中, 间隔基可以是 Gly-Ser-Gly-Ser(见图 7 和 8), 但是, 如果需要, 在间隔基内可以使用其他氨基酸, 并且间隔基可以是刚才描述的不同长度, 如从约 2 个到约 10 个氨基酸或它们之间的任何数值, 如从约 4 个到约 8 个氨基酸或它们之间的任何数值。在特定的非限制性实例中, 间隔基是 4 个氨基酸的长度。间隔基可以在它的 N 末端(即 α -氨基)或通过其任何一个氨基酸的侧链的 ϵ 氨基(如果有的话)连接到单体单位上。例如, 但不希望限制, 间隔基在其位置 1 上氨基酸的 α -氨基基团处连接到单体单位。间隔基通过肽键(如果表位是肽的话)或通过 O-连接的糖基化(如果表位是糖类的话)连接到目标表位上。

一般的 Th 表位

T 辅助(Th)表位可以是技术人员已知的能在特定的目标受试者(如人或特定的非人类的动物, 如大鼠、小鼠、豚鼠、狗、马、猪或山羊)中提高免疫反应的任何合适的 T 辅助表位。Th 表位存在于本发明的促炎症 *mono-*和 *poly*SPAs 中。优选的 T 辅助表位包括至少约 10-24 个氨基酸长度, 或它们之间的任何数值; 例如, Th 表位可以包括约 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个氨基酸。在非限制性实例中, Th 表位可以是约 15 到约 20 个氨基酸长度。可以使用一般性(泛主的或者宽容的)T 辅助表位, 因为这些容易化学合成并避免需要使用包括多个 T 辅助表位的蛋白质或更长的多肽。

适合在本发明的 SPAs 中使用的泛主的或者宽容的 T 辅助表位的非限制性实例可以选自:

i. 破伤风毒素肽(TTP)的啮齿动物或人类的 T 辅助表位, 如 TTP 的 830-843 位的氨基酸 (Panina-Bordignon 等人(1989) Eur. J. Immun. 19:2237);

ii. 恶性疟原虫 pfg27 的啮齿动物或人类的 T 辅助表位;

iii. 乳酸脱氢酶的啮齿动物或人类的 T 辅助表位;

iv. HIV 的包膜蛋白或 HIVgp120 的啮齿动物或人类的 T 辅助表位 (Berzofsky 等人(1991) J. Clin. Invest. 88:876);

v. 根据已知的锚定蛋白的氨基酸序列预测的合成人类 T 辅助表位 (PADRE)(Alexander 等人(1994) Immunity 1:751);

vi. 麻疹病毒融合蛋白 MV5F 的啮齿动物或人类 T 辅助表位(Muller 等人(1995) Mol. Immunol. 32:37; Partidos 等人(1990) J. Gen. Virol. 71:2099);

vii. 包括犬瘟热病毒融合蛋白(CDV-F)的至少约 10 个氨基酸残基的 T 辅助表位, 如来自 CDV-F 的 148-283 位的氨基酸(Ghosh 等人(2001) Immunol.104:58 和 WO 2000/46390);

viii. 来自 MUC1 黏蛋白胞外串联重复区的肽序列的人类 T 辅助表位 (WO20018806);

ix. 流感病毒血细胞凝集素 Is(IV-H)的啮齿动物或人类的 T 辅助表位 (Jackson 等人(1994) Virol. 198:613); 和

x. 口蹄疫病毒(FMDV-O Kaufbeuren 株)的 VP3 蛋白质的牛或骆驼 T 辅助表位, 包括 VP3 的 173 到 176 位的残基或 FMDV 另一种毒株的相应的氨基酸。

本领域的技术人员公知, T 辅助表位可以被一种或多种不同种类的哺乳动物识别。因而, 这里的任何 T 辅助表位的名称并不限制能识别表位的物种的免疫系统。例如, 啮齿动物的 T 辅助表位可以被小鼠、大鼠、兔、豚鼠或其他啮齿动物或人或狗的免疫系统识别。

例如但不希望限制, T 辅助表位可以包含选自下面的氨基酸序列(WO 2004/014956, WO 2004/014957):

- i. 来自 IV-H 的 GALNNRFQIKGVELKS;
- ii. 来自 IV-H 的 ALNNRFQIKGVELKS;
- iii. 来自 MV-F 的 LSEIKGVIVHRLEGV;
- iv. 来自 CDV-F 的 TMQITAGIALHQSNLN;
- v. 来自 CDV-F 的 IGTDNVHYKIMTRPSHQ;
- vi. 来自 CDV-F 的 YKIMTRPSHQYLVIKLI;
- vii. 来自 CDV-F 的 SHQYLVIKLIPNASLIE;
- viii. 来自 CDV-F 的 KLIPNASLIENCTKAEL;
- ix. 来自 CDV-F 的 LIENCTKAELGEYEKLL;
- x. 来自 CDV-F 的 AELGEYEKLLNSVLEPI;
- xi. 来自 CDV-F 的 KLLNSVLEPINQALTLM;
- xii. 来自 CDV-F 的 EPINQALTLMTKNVKPL;
- xiii. 来自 CDV-F 的 TLMTKNVKPLQSLGSGR;
- xiv. 来自 CDV-F 的 KPLQSLGSGRRQRREFAG;
- xv. 来自 CDV-F 的 SGRRQRREFAGWLAGVA;
- xvi. 来自 CDV-F 的 FAGWLAGVALGVATAA;
- xvii. 来自 CDV-F 的 GVALGVATMQITAGIA;

- xviii. 来自 CDV-F 的 GIALHQSNLNAQAIQSL;
- xix. 来自 CDV-F 的 NLNAQAIQSLRTSLEQS;
- xx. 来自 CDV-F 的 QSLRTSLEQSNKAIEEI;
- xxi. 来自 CDV-F 的 EQSNKAIEEIREATQET;
- xxii. 来自 CDV-F 的 SSKTQTHTQQDRPPQPS;
- xxiii. 来自 CDV-F 的 QPSTELEETRTRSRARHS;
- xxiv. 来自 CDV-F 的 RHSTTSAQRSTHYDPRT;
- xxv. 来自 CDV-F 的 PRTSDRPVSYTMNRTRS;
- xxvi. 来自 CDV-F 的 TRSRKQTSHRLKNIPVH;
- xxvii. 来自 CDV-F 的 TELLIFGPSLRDPISA;
- xxviii. 来自 CDV-F 的 PRYIATNGYLISNFDES;
- xxix. 来自 CDV-F 的 CIRGDTSSCARTLVSGT;
- xxx. 来自 CDV-F 的 DESSCVFVSESAICSQN;
- xxxi. 来自 CDV-F 的 TSTIINQSPDKLLTFIA;
- xxxii. 来自 CDV-F 的 SPDKLLTFIASDTCPLV;
- xxxiii. 来自 MUC-1 的 STAPPAHGVTSAPDTRAPGSTAPP;
- xxxiv. 来自 MUC-1 的 GVTSA PDTRPAPGSTASSL;
- xxxv. 来自 MUC-1 的 GVTSA PDTRPAPGSTASL;
- xxxvi. 来自 MUC-1 的 TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPKKG;
- xxxvii. 来自 MUC-1 的 STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK;
- xxxviii. 来自 FMDV-VP3 蛋白质的 GVAE;
- xxxix. 来自 FMDV-VP3 蛋白质的 TASGVAEIN (170 到 179 位残基); 和
- xl. 来自 FMDV 的 TAKSKKFPSYTATYQF.

包括这里公开的 T 辅助表位仅用于作为范例。使用技术技术人员已知的标准肽合成技术, 这里引用的 T 辅助表位可以容易地用不同的 T 辅助表位替换, 以适应本发明中的 SPA 在不同物种的应用。因而, 技术人员已知的可用来在任何目的物种中诱导或增强免疫反应的额外的 T 辅助表位不排

除在外。

使用组分蛋白质、蛋白质片段和肽的体外 T 细胞刺激技术以鉴定合适的序列,通过详细的分析可以鉴定额外的 T 辅助表位(Goodman 和 Sercarz (1983) *Ann. Rev. Immunol.* 1:465); (Berzofsky (1986): "The Year in Immunology, Vol. 2, page 151, Karger, Basel)和(Livingstone 和 Fathman (1987) *Ann. Rev. Immunol.*5:477)。

细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)目标表位

CTL 表位可以方便地来自病毒、原核和真核生物的免疫原性蛋白质、脂蛋白或糖蛋白的氨基酸序列,包括但不限于来于自哺乳动物受试者或侵染所述的受试者的细菌、真菌、原生动物或寄生虫。CTL 表位的模拟表位特别包括在本发明的范围之内。

当对哺乳动物动物给药时,CTL 表位能优选通过活化对表位或衍生表位的抗原特异性的 CD8+T 细胞,更优选通过诱导细胞介导的抗病原体或衍生表位的肿瘤细胞的免疫性,引起 T 细胞反应。优选较短的 CTL 表位以方便肽合成。CTL 表位的长度不应超过约 30 个氨基酸的长度;例如,CTL 表位可以是 30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6 或 5 个氨基酸的长度。在非限制性的实例中,CTL 表位可以是小于约 25,或小于约 20 个氨基酸残基。在另一个实例中,CTL 表位是 8-12 个氨基酸残基的长度。

CTL 表位可以从寄生虫中获得,例如但不限于与利什曼原虫病、疟疾、锥虫病、巴贝西虫病或血吸虫病相关的寄生虫。例如,CTL 表位可以是来自选自恶性疟原虫疟疾、环形孢子虫(*Circumsporozoa*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、鼠弓形体(*Toxoplasma gondii*)、孟氏裂体吸虫(*Schistosoma mansoni*)、日本裂体吸虫(*Schistosoma japonicum*);埃及裂体吸虫(*Schistosoma hematobium*)和布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)的寄生虫抗原。

恶性疟原虫的 CTL 表位的具体实例可以是来自选自环孢子蛋白(CSP)、孢子表面蛋白 2 (PfSSP2)、肝阶段抗原 1(LSA1)、裂殖子表面蛋

白质 1(MSP1)、丝氨酸重复抗原(SERA)和 AMA-1 抗原的抗原的 CTL 表位 (Amante 等人(1997) *J. Immunol.* 159:5535; Chaba 等人(1998) *J. Immunopharm.* 20:259; Shi 等人(1999) *PNAS* 96:1615; Wang 等人(1998) *Science* 282:476 和 Zevering 等人(1998) *Immunol.* 94:445)。杜氏利什曼原虫的 CTL 表位的具体实例可以是来自重复肽的 CTL 表位(Liew 等人(1990) *J. Exp. Med.* 172:1359)。鼠弓形体的 CTL 表位的具体实例可以是来自 P30 表面蛋白 (Darcy 等人(1992) *J. Immunol.* 149:3636)的 CTL 表位。孟氏裂体吸虫的 CTL 表位的具体实例可以是来自 Sm-28GST 抗原的 CTL 表位 (Wolowxuk 等人(1991) *J. Immunol.* 146:1987)。

例如, CTL 表位可以是但不局限于病毒特异性的, 来自轮状病毒、疱疹病毒、冠状病毒、小核糖核酸病毒(如 Aphovirus)、呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒、腺病毒、痘病毒、I 型牛疱疹病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛轮状病毒、犬瘟热病毒(CDV)、口蹄疫病毒(FMDV)、麻疹病毒(MV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、EB 病毒(EBV)、人巨细胞病毒(HCMV)、肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹-1 病毒、单纯疱疹-2 病毒、乙型肝炎病毒、人疱疹病毒 6、传染性粘液囊病病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒 16 型、人乳头瘤病毒 18 型、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、猪生殖和呼吸综合症病毒、狂犬病毒、鼻病毒、牛痘(天花)病毒、痘苗病毒、带状疱疹病毒(水痘)等等。

HIV-1 的 CTL 表位的具体实例可以是来自 env 蛋白质、gag 蛋白质或 pol 蛋白质的那些。

流感病毒的 CTL 表位的具体实例可以是来自核蛋白质(Taylor 等人(1989) *Immunogenetics* 26:267 (1989); Townsend 等人(1983) *Nature* 348:674)、基质蛋白(Bednarek 等人(1991) *J. Immunol.* 147:4047)或聚合酶蛋白(Jameson 等人 (1998) *J. Virol.* 72:8682 和 Gianfrani 等人(2000) *Human Immunol.* 61:438)的那些。

淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的 CTL 表位的具体实例可以来自糖蛋白质-1 抗原(Zinkernagel 等人(1974) *Nature* 248:701)。

巨细胞病毒的 CTL 表位的具体实例可以是来自选自 pp28、pp50、pp65、pp71、pp150、gB、gH、IE-1、IE 2、US2、US3、US6、US11 和 UL18 的抗原的表位 (Longmate 等人(2000) *Immunogenet.* 52:165; Wills 等人(1996) *J. Virol.* 70:7569; Solache 等人(1999) *J. Immunol.* 163, 5512; Diamond 等人(1997) *Blood* 90:1751; Kern 等人(1998) *Nature Med.* 4:975; Weekes 等人(1999) *J. Virol.* 73, 2099; Retiere 等人(2000) *J. Virol.* 74:3948 和 Salquin 等人(2000) *Eur. J. Immunol.* 30:2531)。

麻疹病毒的 CTL 表位的具体实例可以来自融合糖蛋白(MV-F)，特别是来自其 438-446 残基(Herberts 等人(2001) *J. Gen Virol.* 82:2131)。

EB 病毒(EBV)的 CTL 表位的具体实例可以来自 EBV 的潜在的核抗原(EBNA)或潜在的膜蛋白(LMP)，如来自 EBV A 型的 EBNA 2A、EBNA 3A、EBNA 4A 或 EBNA 14a；来自 EBV B 型的 EBNA 2B、EBNA 3B、EBNA 4B 或 EBNA 14b；LMP1 或 LMP2 (PCT/AU95/00140；PCT/AU97/00328 和 PCT/AU98/00531)。

例如，CTL 表位可以是，但不局限于细菌特异性的 CTL 表位，其来自巴斯德氏菌属(*Pasteurella*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、志贺氏菌属(*Shigella*)等等。合适的细菌 CTL 表位包括但不局限于来自结核分支杆菌 65Kd 蛋白 (Lamb 等人(1987) *EMBO J.* 6:1245)、结核分支杆菌 ESAT-6 蛋白(Morten 等人(1998) *Infect. Immun.* 66:717)、金黄色葡萄球菌核酸酶蛋白 (Finnegan 等人(1986) *J. Exp. Med.* 164:897)、大肠杆菌热稳定肠毒素(Cardenas 等人(1993) *Infect. Immunity* 61:4629)和大肠杆菌不耐热肠毒素 (Clements 等人(1986) *Infect. Immunity* 53:685)的 CTL 表位。

例如，CTL 表位可以是但不局限于来自和/或能产生抗肿瘤 CTL 抗原

的 T 细胞反应的哺乳动物受试者的 CTL 表位。肿瘤特异性的 CTL 表位通常是天然的或外源性的 CTL 表位,其表达与肿瘤的发生、生长、存在或再发生相关。由于这样的 CTL 表位可用于区分异常的与正常组织,它们可用作治疗介入的靶标。这样的 CTL 表位在本领域中是众所周知的。肿瘤 CTL 表位的非限制性实例可以是来自癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、黑素瘤抗原(PAGE、SAGE、GAGE)和黏蛋白(如 MUC-1)。用于对癌症患者给药的 CTL 表位的具体实例可以是来自诱导癌症的蛋白质,如癌蛋白(如 P53、ras 等)的那些。

在非限制性的实例中,CTL 表位可以包含选自如下的氨基酸:

- i. 来自 PRO 病毒的 NP 的 TYQRTRALV;
- ii. 来自恶性疟原虫 CSP 的
KPKDELDYENDIEKKICKMEKCS;
- iii. 来自恶性疟原虫 COP 的 DIEKKICKMEKCSSVFNWNS;
- iv. 来自恶性疟原虫 LSAT 的 KPIVQYDNF ;
- v. 来自恶性疟原虫 MSP1 的 GISWEKVLAKYKDDLE;
- vi. 来自恶性疟原虫 AMA-1 的
EFTYMINFGRGQNYWEHPYQKS;
- vii. 来自恶性疟原虫 AMA-1 的 DQPKQYEQHLTDYEKIKEG;
- viii. 来自 HIV-1 env 蛋白质的 NMWQEVGKAM;
- ix. 来自 HIV-1 env 蛋白质的 APTKAKRRW;
- x. 来自 HIV-1 env 蛋白质的 CTRPNNNTRK;
- xi. 来自 HIV-1 env 蛋白质的 TVYYGVPVWK;
- xii. 来自 HIV-1 env 蛋白质的 RPWSTQLL;
- xiii. 来自 HIV-1 gag 蛋白质的 SLYNTVATLY;
- xiv. 来自 HIV-1 gag 蛋白质的 ELRSLYNTVA;
- xv. 来自 HIV-1 gag 蛋白质的 KIRLRPGGKK;
- xvi. 来自 HIV-1 gag 蛋白质的 IRLRPGGKKK;
- xvii. 来自 HIV-1 gag 蛋白质的 RLRPGGKKK;

- xxviii. 来自 HIV-1 gag 蛋白质的 GPGHKARVLA;
- xix. 来自 HIV-1 pol 蛋白质的 SPIETVPVKL;
- xx. 来自 HIV-1 pol 蛋白质的 ILKEPVHGVY;
- xxi. 来自 HIV-1 pol 蛋白质的 AIFQSSMTK;
- xxii. 来自 HIV-1 pol 蛋白质的 SPAIFQSSMT;
- xxiii. 来自 HIV-1 pol 蛋白质的 QVRDQAEHLK;
- xxiv. 来自 HIV-1 pol 蛋白质的 GPKVKQWPLT;
- xxv. 来自流感病毒的核蛋白的 TYQRTRALV;
- xxxvi. 来自流感病毒的核蛋白的 TYQRTRALVRTGMDP;
- xxvii. 来自流感病毒的核蛋白的 IASNENMDAMESSTL;
- xxviii. 来自 LCMV gp1 的 KAWNFATM;
- xxix. 来自 EBV 的 QVKWRMTTL;
- xxx. 来自 EBV 的 VFSDGRVAC;
- xxxi. 来自 EBV 的 VPAPAGPIV;
- xxxii. 来自 EBV 的 TYSAGIVQI;
- xxxiii. 来自 EBV 的 LLDFVRFMGV ;
- xxxiv. 来自 EBV 的 QNGALAINTEF;
- xxxv. 来自 EBV 的 VSSDGRVAC;
- xxxvi. 来自 EBV 的 VSSEGRVAC;
- xxxvii. 来自 EBV 的 VSSDGRVPC;
- xxxviii. 来自 EBV 的 VSSDGLVAC;
- xxxix. 来自 EBV 的 VSSDGQVAC;
- xl. 来自 EBV 的 VSSDGRWC;
- xli. 来自 EBV 的 VPAPPVGPIV;
- xl. 来自 EBV 的 VEITPYEPTG;
- xl. 来自 EBV 的 VEITPYEPTW;
- xl. 来自 EBV 的 VELTPYKPTW;
- xl. 来自 EBV 的 RRIYDLIKL;

-
- xlvi. 来自 EBV 的 RKIYDLIEL;
xlvii. 来自 EBV 的 PYLFWLAGI;
xlviii. 来自 EBV 的 TSLYNLRRGTALA;
xlix. 来自 EBV 的 DTPLIPLTIF;
l. 来自 EBV 的 TVFYNIPPMPL;
li. 来自 EBV 的 VEITPYKPTW;
lii. 来自 EBV 的 VSFIEFVGW;
liii. 来自 EBV 的 FRKAQIQGL;
liv. 来自 EBV 的 FLRGRAYGL;
lv. 来自 EBV 的 QAKWRLQTL;
lvi. 来自 EBV 的 SVRDRLARL;
lvii. 来自 EBV 的 YPLHEQHGM;
lviii. 来自 EBV 的 HLMQGMAY;
lix. 来自 EBV 的 RPPIFIRRL;
lx. 来自 EBV 的 RLRAEAGVK;
lxi. 来自 EBV 的 IVTDFSVIK;
lxii. 来自 EBV 的 AVFDRKSDAK;
lxiii. 来自 EBV 的 NPTQAPVIQLVHAVY;
lxiv. 来自 EBV 的 LPGPQVTAVLLHEES;
lxv. 来自 EBV 的 DEPASTEPVHDQLL;
lxvi. 来自 EBV 的 RYSIFFDY;
lxvii. 来自 EBV 的 AVLLHEESM;
lxviii. 来自 EBV 的 RRARSLSAERY;
lix. 来自 EBV 的 EENLLDFVRF;
lxx. 来自 EBV 的 KEHVIQNAF;
lxxi. 来自 EBV 的 RRIYDLIEL;
lxxii. 来自 EBV 的 QPRAPIRPI;
lxxiii. 来自 EBV 的 EGGVGWRHW;

- lxxiv.** 来自 EBV 的 CLGGLTMTV;
- lxxv.** 来自 EBV 的 RRRWRRLTV;
- lxxvi.** 来自 EBV 的 RAKFKQLL;
- lxxvii.** 来自 EBV 的 RKCCRAKFKQLLQHYR;
- lxxviii.** 来自 EBV 的 YLLEMLWRL;
- lxxix.** 来自 EBV 的 YFLEILWGL;
- lxxx.** 来自 EBV 的 YLLEILWRL;
- lxxxi.** 来自 EBV 的 YLQQNWWTL;
- lxxxii.** 来自 EBV 的 LLLALLFWL;
- lxxxiii.** 来自 EBV 的 LLVDLLWLL;
- lxxxiv.** 来自 EBV 的 LLLIALWNL;
- lxxxv.** 来自 EBV 的 WLLLFLAIL;
- lxxxvi.** T 来自 EBV 的 LLVDLLWL;
- lxxxvii.** 来自 EBV 的 LLWLLLFLA;
- lxxxviii.** 来自 EBV 的 ILLIIALYL;
- lxxxix.** 来自 EBV 的 VLFIFGCLL;
- xc.** 来自 EBV 的 RLGATIWQL;
- xc.** 来自 EBV 的 ILYFIAFAL;
- xcii.** 来自 EBV 的 SLVIVIIIFV;
- xciii.** 来自 EBV 的 LMIIPLINV;
- xciv.** 来自 EBV 的 ILFIGSHW;
- xcv.** 来自 EBV 的 LIPETVPYI;
- xcvi.** 来自 EBV 的 VLQWASLAV;
- xcvii.** 来自 EBV 的 QLTPHTKAV;
- xcviii.** 来自 HCMV pp65 的 SVLGPISGHVULK;
- xcix.** 来自 HCMV pp65 的 FTSQYRIQGKL;
- c.** 来自 HCMV pp65 的 FVFPTKDVALR;
- ci.** 来自 HCMV pp65 的 FPTKDVAL;

- cii.** 来自 HCMV pp65 的 NLVPMVAIV;
- ciii.** 来自 HCMV pp65 的 MLNIPSINV;
- civ.** 来自 HCMV pp65 的 RIFAELEGV;
- cv.** 来自 HCMV pp65 的 TPRVTGGGGAM;
- cvi.** 来自 HCMV pp65 的 RIPHERNGFTVL;
- cvii.** 来自 HCMV pp65 的 RLLQTGIHV;
- cviii.** 来自 HCMV pp65 的 VIGDQYVKV;
- cix.** 来自 HCMV pp65 的 ALFFFDIDL;
- cx.** 来自 HCMV pp65 的 YSEHPTFTSQY;
- cxi.** 来自 HCMV pp65 的 VLCPKNMII;
- cxii.** 来自 HCMV pp65 的 DIYRIFAEL;
- cxiii.** 来自 HCMV pp65 的 ILARNLVPMV;
- cxiv.** 来自 HCMV pp65 的 EFFWDANDIY;
- cxv.** 来自 HCMV pp65 的 IPSINVHHY;
- cxvi.** 来自 HCMV IE-1 的 YILEETSVM;
- cxvii.** 来自 HCMV IE-1 的 CVETMCNEY;
- cxviii.** 来自 HCMV IE-1 的 RRIEEEICMK;
- cxix.** 来自 HCMVpp150 的 TTWPPSSTAK;
- cxx.** 来自麻疹病毒融合糖蛋白的 RRYPDRAWL;
- cxxi.** 来自单核细胞增生利斯特氏菌的 GYKDGNEYI;
- cxxii.** 来自卵清蛋白的 SIINFEBL; 和
- cxxiii.** 来自丙型肝炎病毒核心蛋白的 DLMGYIPLV.
- cxxiv.** (MAGE-A1) [96-104] 黑素瘤;
- cxxv.** (MAGE-A10) [254-262] 黑素瘤;
- cxxvi.** gp100 [614-622] 黑素瘤; 和
- cxxvii.** 来自(Kawashima 等人(1998) Hum. Immunol. 59:1)的 6 个 HLA 交叉
反应肿瘤相关 CTL 表位。

应当理解, 本发明中的组合物和方法应服从使用这些和其他的已知的肽和糖类, 所述肽和糖类涉及作为参与目的疾病状态的 CTL 表位。很清楚, 本发明意在包含将来公开的任何其他的此类肽或糖类, 根据本发明的原理, 其可以作为 CTL 目标表位使用。

B 细胞目标表位

B 细胞表位可以方便地来自病毒、原核或真核生物的免疫原性蛋白质、脂蛋白或糖蛋白的氨基酸序列, 包括但不限于来自哺乳动物受试者或感染所述受试者的细菌、真菌、原生动物或寄生虫的抗原。特别包括需要针对其的免疫反应的独特型和抗独特型的 B 细胞表位, 如磷脂修饰的 B 细胞表位。或者, B 细胞表位可以是糖类抗原, 如 ABH 血型抗原、移植抗原(如 Gal- α -[1,3]-Gal- β -[1,4]-GlcNAc (Sandrin 等人(1993) PNAS 90:11391; (Galili 等人(1987) PNAS 84:1369; Schofield 等人(2002) Nature 418:785)或其缀合物。

当对哺乳动物给药时, B 细胞表位应能引起抗体的产生; 例如可产生中和抗体; 在另一个实例中, 可产生高效价的中和抗体。

可以使用较短的 B 细胞表位, 以方便肽合成。例如, B 细胞表位的长度不应超过约 30 个氨基酸的长度; 例如, B 细胞表位可以是 30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6 或 5 个氨基酸的长度。在非限制性的实例中, B 细胞表位可以小于约 25, 或更小于约 20 个氨基酸残基。在另一实例中, B 细胞表位是 5-20 个氨基酸残基的长度。

肽可以采取模拟 B 细胞表位所来自的天然多肽的构象。

例如, B 细胞表位可以是, 但不限于来自寄生虫, 并且可以是与利什曼原虫、疟疾、锥虫病、巴贝西虫病或血吸虫病相关的表位。不希望以任何方式限制, B 细胞表位可以选自:

i 恶性疟原虫 (NANP) 3 的 B 细胞表位(Good 等人(1986) *J. Exp. Med.* 164:655);

ii 环形孢子虫的 B 细胞表位 (Good 等人(1987) *Protein Sci.* 235:1059);

iii 包括杜氏利什曼原虫重复肽的氨基酸残基 326-343 的 B 细胞表位 (Liew 等人(1990) *J. Exp. Med.* 172:1359); 和

iv 鼠弓形体 P30 表面蛋白的 B 细胞表位(Darcy 等人(1992) *J. Immunol.* 149:3636); 和

v 孟氏裂体吸虫 Sm-28GST 抗原的 B 细胞表位 (Wolowxuk 等人(1991) *J. Immunol.* 146:1987)。

例如, B 细胞表位可以是, 但不局限于来自和/或能产生抗轮状病毒、疱疹病毒、冠状病毒、小核糖核酸病毒(如 Aphovirus)、呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒、腺病毒、痘病毒、I 型牛疱疹病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛轮状病毒、犬瘟热病毒(CDV)、口蹄疫病毒(FMDV)、麻疹病毒(MV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、EB 病毒(EBV)、人巨细胞病毒(HCMV)、肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹-1 病毒、单纯疱疹-2 病毒、乙型肝炎病毒、人疱疹病毒 6、传染性粘液囊病病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒 16 型、人乳头瘤病毒 18 型、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、猪生殖和呼吸综合症病毒、狂犬病毒、鼻病毒、牛痘(天花)病毒、痘苗病毒、带状疱疹病毒(水痘)等等的抗体。

合适的病毒 B 细胞表位包括但不限于选自下面的表位:

i HIV gp120 V3 环, 氨基酸残基 308-331(Jatsushita 等人(1988) *J. Virol.* 62:2107);

ii HIV gp120 氨基酸残基 428-443 (Ratner 等人(1985) *Nature* 313:277);

iii HIV gp120 氨基酸残基 112-124 (Berzofsky 等人(1988) *Nature* 334:706);

iv HIV 反转录酶的 B 细胞表位 (Hosmalin 等人(1990) *PNAS* 87:2344);

v 流感病毒核蛋白氨基酸残基 335-349 (Townsend 等人 *Cell* 44, 959 (1986));

- vi 流感病毒核蛋白氨基酸残基 366-379 (Townsend 等人(1986) Cell 44:959);
- vii 流感病毒血细胞凝集素氨基酸残基 48-66 (Mills 等人(1986) J. Exp. Med. 163:1477);
- viii 流感病毒血细胞凝集素氨基酸残基 111-120 (Hackett 等人(1983) J. Exp. Med. 158:294);
- ix 流感病毒血细胞凝集素氨基酸残基 114- 131 (Lamb 和 Green (1983) Immunology 50:659);
- x EB 病毒 LOP 氨基酸残基 43-53 (Thorley-Lawson 等人(1987) PNAS 84:5384);
- xi 乙型肝炎病毒表面抗原氨基酸残基 95-109 (Milich 等人(1985) J. Immunol. 134:4203);
- xii 乙型肝炎病毒表面抗原氨基酸残基 140-154;
- xiii 乙型肝炎病毒 Pre-S 抗原氨基酸残基 120-132 (Milich 等人(1986) J. Exp. Med. 164:532);
- xiv 单纯疱疹病毒 gD 蛋白质氨基酸残基 5-23 (Jayaraman 等人(1993) J. Immunol. 151:5777);
- xv 单纯疱疹病毒 gD 蛋白质氨基酸残基 241-260(Wyckoff 等人 (1988) Immunobiol. 177:134);
- xvi 狂犬病糖蛋白氨基酸残基 32-44 (MacFarlan 等人 (1984) J. Immunol. 133:2748);
- xvii 主要 FMDV 表位, 其包括 FMDV 血清型 O 的 VP1 衣壳蛋白的至少氨基酸残基 134-168 或 137-160 或残基 142-160 或残基 137-162 或残基 145- 150 或另一种血清型的相应的氨基酸残基, 例如血清型 A、C、SAT1、SAT2、SAT3 或 ASIA1 (US 5,864,008 和 US 6,107, 021);
- xviii 丙型肝炎病毒(HCV)变异株 AD78 的 E2 蛋白质的高变区 -1(HVR1)(Zibert 等人(1997) Virol. 71:4123- 4127);
- xix 乙型肝炎病毒的序列, 其选自:

表面抗原 (Kobayashi 和 Kolke (1984) Gene 30:227), 例如 LVLLDYQGMLPVCPL 和 TKPSDGNCTCIIPS; 和前体表面抗原 MQWNSTTFHQALL;

xx 来自流感病毒的序列, 其选自:

核蛋白 (Gregory 等人 (2001) J. Gen. Virol. 82:1397), 例如 MFEDLRVSSFIRGT 和 SNENMETMDSSTLE; 血细胞凝集素, 例如 HPLILDTCTIEGLIYGNPS ; YQRIQIFPDT ; 和 IQIFPDTIWNVSYSYSGTSK; 和

xxi 来自丙型肝炎病毒的序列, 例如 GGPTRTIGGSQAQTASGLVSMFSVGPSQK.

细菌特异性的 B 细胞表位的具体实例可以是来自和/或能产生抗巴斯德氏菌属 (*Pasteurella*)、放线杆菌属 (*Actinobacillus*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、分支杆菌属 (*Mycobacteria*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、志贺氏菌属 (*Shigella*) 等等的抗体。合适的细菌 B 细胞表位包括但不限于选自下面的表位:

- i. 结核分支杆菌 65Kd 蛋白质氨基酸残基 112-126 (Lamb 等人 (1987) EMBOJ. 6:1245);
- ii. 结核分支杆菌 65Kd 蛋白质氨基酸残基 163-184 (Lamb 等人 (1987) EMBOJ. 6:1245);
- iii. 结核分支杆菌 65Kd 蛋白质氨基酸残基 227-243 (Lamb 等人 (1987) EMBOJ. 6:1245);
- iv. 结核分支杆菌 65Kd 蛋白质氨基酸残基 242-266 (Lamb 等人 (1987) EMBOJ. 6:1245);
- v. 结核分支杆菌 65Kd 蛋白质氨基酸残基 437-459 (Lamb 等人 (1987) EMBOJ. 6:1245);
- vi. 结核分支杆菌 ESAT-6 蛋白质残基 3-15 (Morten 等人 Infect Immun. 66, 717-723, 1998);

- vii. 结核分支杆菌 ESAT-6 蛋白质残基 40-62 (Morten 等人(1998) *Infect. Immun.* 66:717);
- viii. 淋巴结分枝杆菌(*Mycobacterium scrofulaceum*) α -抗原残基 279-290 (Mikiko 等人(1997) *Microb. Path.* 23:95);
- ix. 金黄色葡萄球菌核酸酶蛋白质氨基酸残基 61-80 (Finnegan 等人(1986) *J. Exp. Med.* 164:897);
- x. 大肠杆菌热稳定肠毒素的 B 细胞表位 (Cardenas 等人 (1993) *Infect. Immunity* 61:4629);
- xi. 大肠杆菌不耐热肠毒素的 B 细胞表位(Clements 等人(1986) *Infect. Immunity* 53:685);
- xii. 宋内志贺菌(*Shigella sonnei*) I 型抗原的 B 细胞表位(Formal 等人(1981) *Infect Immunity* 34:746);
- xiii. B 细胞表位, 其来自 A 组链球菌, 优选来自 M 蛋白质, 更优选来自 M 蛋白质 C 端的半部分和更优选来自 M 蛋白质保守的 C 端半部分的最小的、螺旋的、没有宿主交叉反应的肽, 并包含非 M 蛋白质肽, 其设计成保持螺旋折叠和在所说的最小的、螺旋的、没有宿主交叉反应的肽内展示的抗原性。例如, 非 M 蛋白质肽 (如肽 J14) 可以用化学连接一种或多种血清型 M 蛋白质肽, 使免疫原展示来自(链烷)骨架侧翼的所有的单独的肽, 从而赋予极好的免疫原性和保护 (US 6,174,528) 和(Brandt 等人(2000) *Nat. Med.* 6: 455);
- xiv. 霍乱毒素 B 亚基 CTB)的 B 细胞表位, 例如在(Kazemi 和 Finkelstein (1991) *Mol. Immunol.* 28:865)中描述的;
- xv. 炭疽杆菌蛋白质的 B 细胞表位, 例如来自炭疽杆菌的外生孢子的蛋白质, 如 250 kDa 糖蛋白的 B 细胞表位(Sylvestre 等人 (2001) In: *Proc. 4th Int. Conf. Anthrax*, St. John's College, Annapolis, MD, June 10-13, Abstract 31 B);和
- xvi. 来自破伤风蛋白质, 例如破伤风类毒素蛋白质的 B 细胞表位。
- 哺乳动物受试者的 B 细胞表位的具体的非限制性实例可以来自和/或

能产生抗肿瘤抗原的抗体。肿瘤抗原通常是天然的或外来的抗原，其表达与肿瘤的发生、生长、存在和在发生有关。由于肿瘤抗原可用于区分异常和正常的组织，它们可用来作为治疗介入的靶标。肿瘤抗原在本领域内是众所周知的。肿瘤抗原的非限制性实例包括但不限于癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、CA-125、CA-19-9、CA-15-3、CA-549、CA-72-4、CA-50、Friedenreich 抗原(T)、Le^b 抗原、福斯曼抗原、黑素瘤抗原(MAGE、BAGE、GAGE)、和黏蛋白(如 MUC-1)。肿瘤抗原也可以是糖类，如 globo-H、Tn 和唾液酰 Le^a。

在具体的非限制性实例中，包括 B 细胞目标表位的肽可以包括选自前列腺特异性抗原(PSA, U.S. 6,326,471)的氨基酸序列，其选自：

LYTKWHYRKWIKDTIVANP;
AVKVMDLPQEPALGTTCTYA;
IVGGWECEKHSQPWQVLVAS;
CAQVHPQKVTKFML;
YLMLLRLSEPAELTDDAVKVM;
LLKNRFLRPGDDSSHDLMLLY;和
ILLGRHSLFHPEDTGQVFQVY,
或癌胚抗原(CEA)的序列 PPAQYSWLIDGN。

应当理解，本发明中的组合物和方法应服从使用这些和其他的已知的肽和糖类，所述肽和糖类涉及作为参与目的疾病状态的 B 细胞表位。很清楚，本发明意在包含将来公开的任何其他的此类肽或糖类，根据本发明的原理，其可以作为 B 细胞目标表位使用。

抑制性目标表位

本发明中使用的抑制性目标表位可以是来自肽序列或糖类的表位，这些肽序列或糖类涉及任何一种或多种自身免疫疾病或紊乱，其包括但不限于：糖尿病、关节炎(包括类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎)、多发性硬化、重症肌无力、系统性红斑狼疮

(SLE)、自身免疫性甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、牛皮癣、舍格伦综合征, 包括舍格伦综合征继发的干性角膜结膜炎、斑秃、由于节肢动物咬伤反应引起的过敏反应、克隆病、口疮性溃疡、虹膜炎、结膜炎、角膜结膜炎、溃疡性结肠炎、气喘、变应性哮喘、皮肤狼疮红斑、硬皮病、阴道炎、直肠炎、药疹、麻风病反向反应、麻风结节性红斑、自身免疫葡萄膜炎、过敏性脑脊髓炎、急性坏死性出血脑病、自发性两侧进行性感神经性耳聋 (*idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss*)、再生障碍性贫血、纯红细胞贫血、自发性血小板减少、多发性软骨炎、韦格纳肉芽肿病、慢性活动性肝炎、斯-约综合征、自发口炎性腹泻、扁平苔癣、Graves 眼病、结节病、原发性胆汁性肝硬变、后葡萄膜炎和肺间质纤维化。

参与自身免疫疾病的已知抗原的实例包括但不限于髓磷脂碱性蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白和髓鞘蛋白脂蛋白(参与多发性硬化)、乙酰胆碱受体组分(参与重症肌无力)、胶原蛋白和分枝杆菌 hsp 肽 180-188(参与关节炎)、层粘连蛋白和 p53 肽(参与系统性红斑狼疮)。

在具体的非限制性实例中, 抑制性目标表位可以是用于治疗多发性硬化症的髓磷脂碱性蛋白片段。在另一个实例中, 有在 U.S. 6,489,299 公开序列的髓磷脂碱性蛋白肽在这里表示为 Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr (MBP 87-99)。

例如以及不希望限制, 抑制性目标表位也可以是用于治疗重症肌无力的乙酰胆碱受体抗原或它的一种肽。在特定的非限制性实例中, 使用的乙酰胆碱受体肽可以是 p259 肽(Zisman 等人(1995) *Hum. Immunol.* 44:121) 和(Brocke 等人(1990) *Immunology* 69:495)。在另一个实例中, 使用的乙酰胆碱受体肽可以是包括 hAChR 氨基酸残基 61-76 的片段或包括 hAChR 氨基酸残基 184-210 的片段。

在非限制性实例中, 抑制性目标表位也可以是用于治疗关节炎的胶原蛋白片段。在另一个实例中, 胶原蛋白片段可以是如具有在 U.S. 6,423,315 中公开的序列的 CII 型胶原蛋白 245-270 肽, 并在这里表示为:

SPTGPLGPKGQTGELGIAGFKGEQGPK.

在具体的非限制性实例中，抑制性目标表位可以是用于治疗系统性红斑狼疮的层粘连蛋白片段。可以使用来自小鼠层粘连蛋白链的 C 端或 N 端的肽。在特定的非限制性实例中，抑制性目标表位可以是例如在美国专利号 6,228,363 中公开的层粘连蛋白片段的氨基酸序列，包括：

RPVRHAQCRVCDGNSTNPRERH;

KNLEISRSTEDLLRNSYGVRK;

TSLRKALLHAPTGSYSYGQ;

KATPMLKMRTSFHGCIK;

DGKWHTVKTEYIKRKAF;

KEGYKVRLDLNITLEFRTTSK; 和

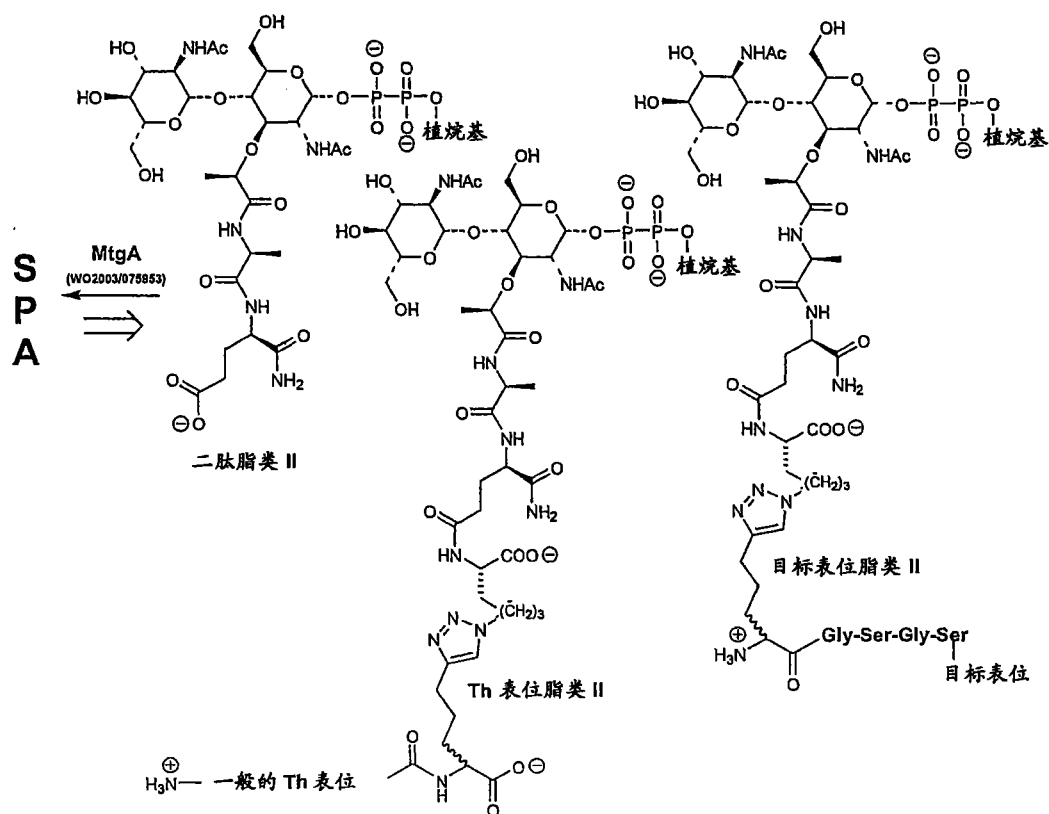
KQNCLSSRASFRGCVRNLRLSR.

应当理解，本发明中的组合物和方法应服从这些和其他已知的暗示作为表位参与自身免疫的肽和糖类。很清楚，根据本发明的原则，本发明意在包含将来公开的根据本发明的原则可以用作抑制性目标表位的任何其他的此类肽。

合成方法

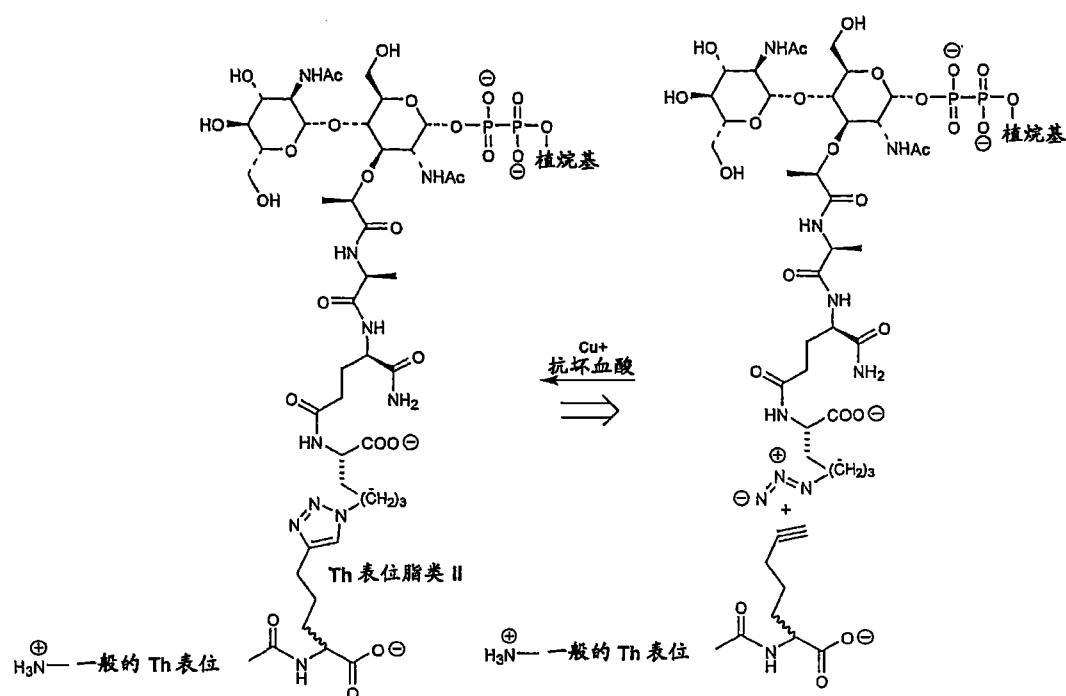
应用于广义的抗原特异性的 SPA 的逆合成分析(Corey 和 Cheng (1995) *The Logic of Chemical Synthesis*, John Wiley and Sons, New York: Chapter 1)揭示了两种构建本发明中 SPAs 的常规方法。

在非限制性的实例中，仅仅为了说明，使用广义的刺激性 *monoSPA*(例如，见图 3)阐明第一种方法。本领域的技术人员能认识到这种方法可以用来合成这里描述的所有种类的 SPA。

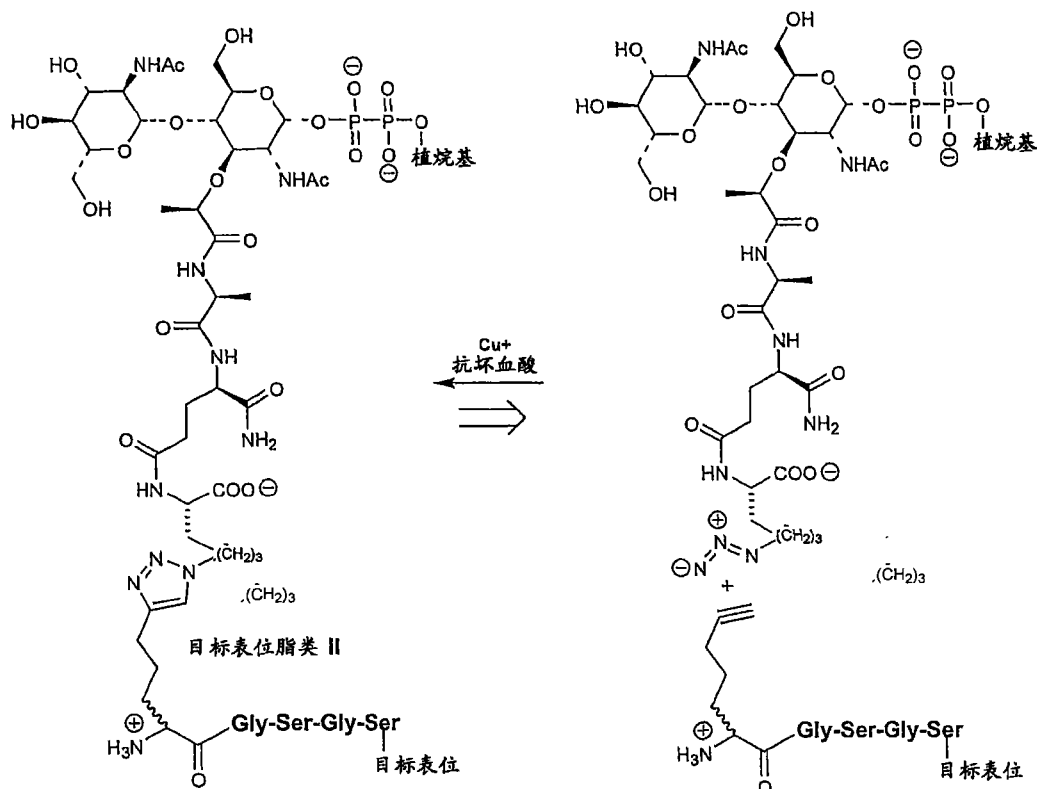


第一个逆合成断开(空箭头, 上面的从左到右方向)提供 3 种不同的脂类 II, SPA 的立即前体。在合成方向上(线性箭头, 上面的从右到左), 在水溶液中室温下(如在 WO 2003/075953 中描述的, 在此以其整体引入作为参考), MtgA 和辅因子的作用可以产生具有重复单位的无规共聚物 SPA, 所述重复单位的摩尔份数与脂类 II 起始材料的摩尔份数相同。

二肽脂类 II 可以利用在 WO 2003/075953 中描述的方法合成。

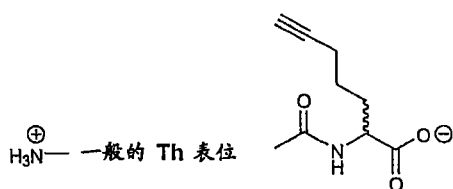
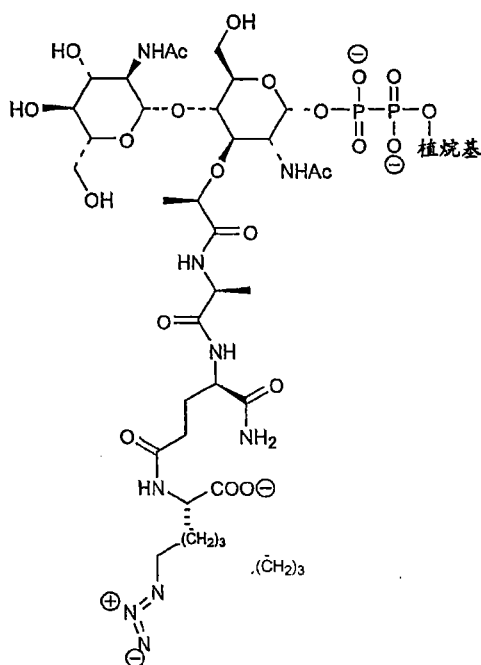


应用于 Th 表位脂类 II 的第二个逆合成断开(空箭头, 上面的从左到右方向)提供三肽脂类 II(Ala-D-异-Gln-联降叠氮基赖氨酸)和 C 端用非天然氨基酸外消旋-4-戊炔基甘氨酸修饰的一般的 Th 表位。两种组分可以通过在水溶液中的亚铜离子和抗坏血酸的作用按合成方向(线性箭头, 上面的从右到左方向)组装(Rostovtsev 等人(2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 114:2708)。

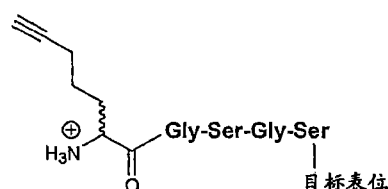


以类似的方式,应用于目标表位脂类 II 的第三种逆合成断开(空箭头,上面的从左到右方向)提供同样的三肽脂类 II(Ala-D-异-Gln-联降叠氮基赖氨酸)和 C 端用非天然氨基酸外消旋-4-戊炔基甘氨酸修饰的一个或多个目标表位。组分可以通过在水溶液中的亚铜离子和抗坏血酸的作用按合成方向(线性箭头,上面的从右到左方向)组装(Rostovtsev 等人(2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 114:2708)。

可以用在 WO 2003/075953 中描述的方法合成叠氮脂类 II。联降叠氮基赖氨酸组分可以通过标准方法通过在偶极质子惰性溶液中将叠氮化物离子置换对甲苯磺酸高丝氨酸酯制备。



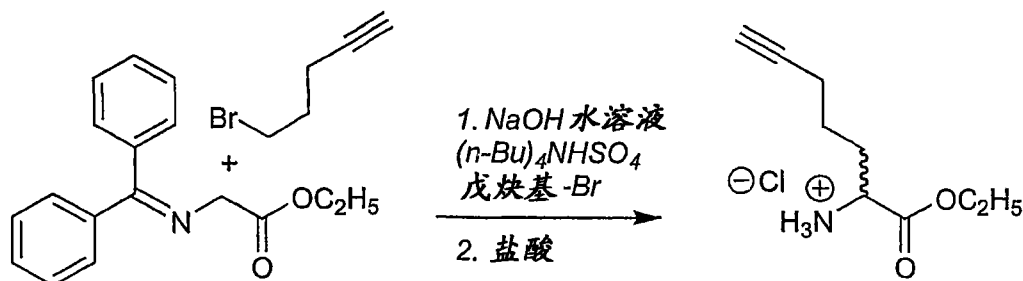
化合物 7



化合物 8

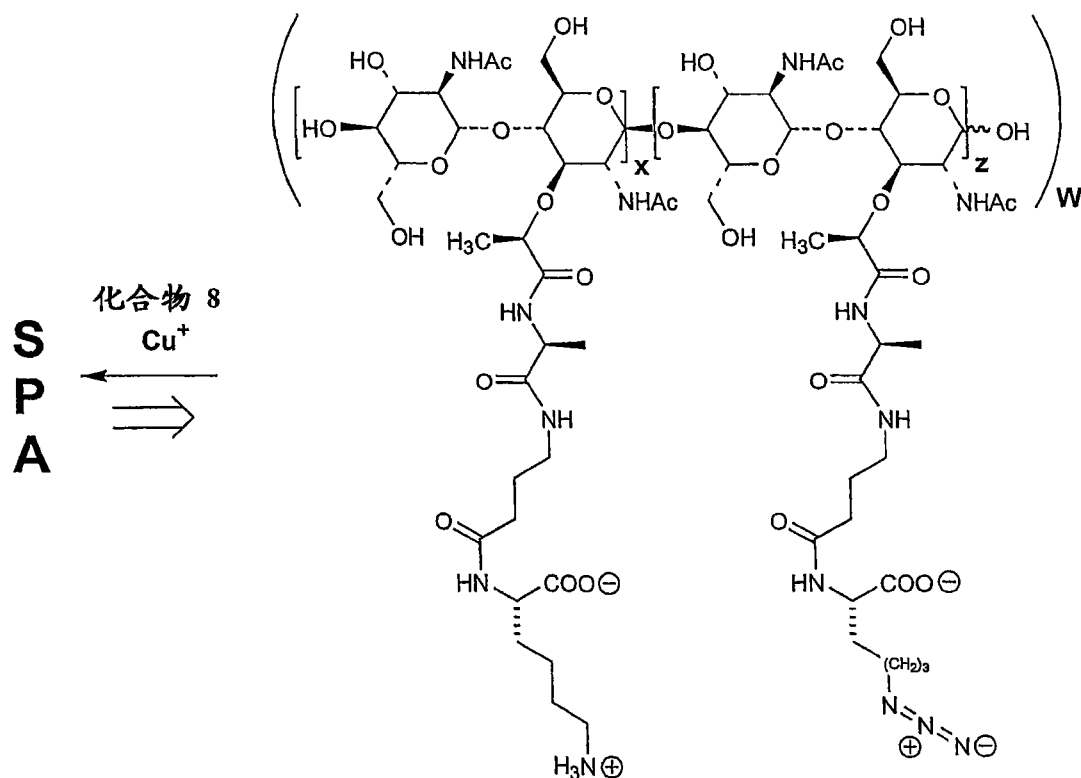
C 端修饰的 Th 表位和 N 端修饰的肽目标表位可以用标准的固相肽合成技术合成(Atherton 和 Shepard (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Pr Publishing)。糖类目标表位作为它们的链烯基

(如烯丙基、4-戊烯基)糖苷可以被臭氧化成相应的醛和与被适当保护的赖氨酸的 ϵ -氨基还原性缩合(Slovin et al. (1999) PNAS 96:5710)。因而得到的糖类衍生的赖氨酸可以掺入到标准肽合成方法中。



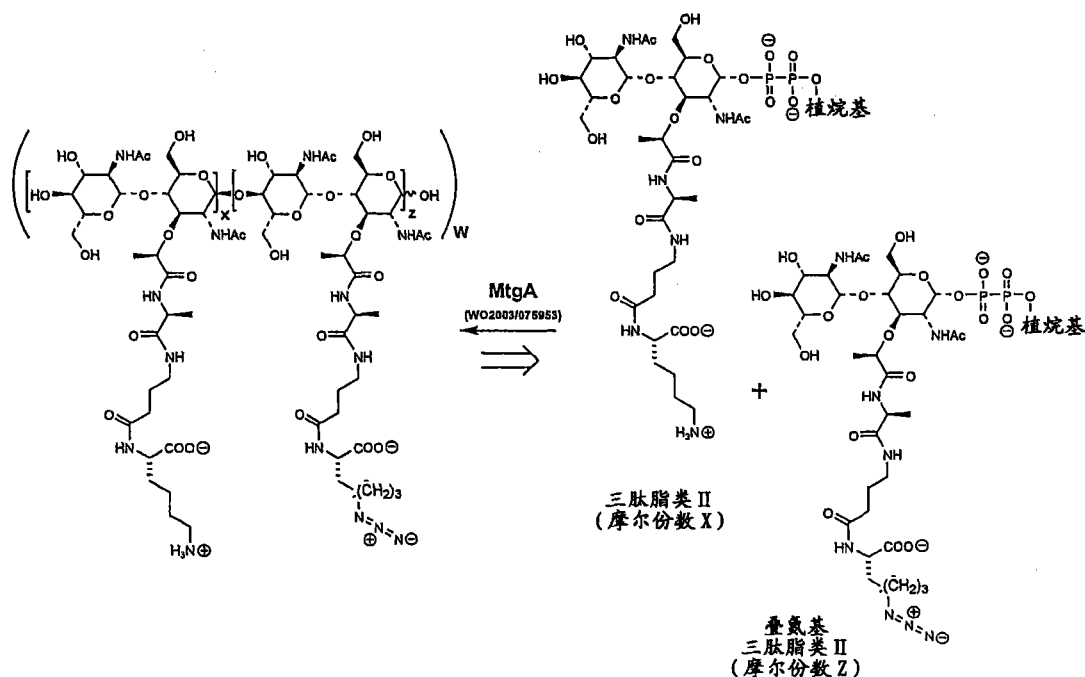
非天然的炔氨基酸可以将从商业上获得材料用甘氨酸-亚胺的方法(O'Donnell 等人 J. Am. Chem. Soc. (1989) 111:2353)经外消旋修饰制备。

广义的抑制性 *monoSPA*(如图 7 所示)可用来作为非限制性实例和仅仅为了阐明的目的来说明备选的合成途径。本领域技术人员能认识到这种方法可以应用于合成这里描述的所有种类的 SPA。第一种备选的逆合成断开显示前 SPA 糖类聚合物, 其被适当取代以接受带有需要的 N 末端序列([束缚的炔基 Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-目标表位], 即化合物 8)的任何表位。



含有叠氮化物的聚合前体可以用通常的方法(WO 2003/075953 在此以

其整体引入作为参考)从化合物脂类 II 制备。



最后，化合物脂类 II 用在 WO 2003/075953 中公开的已经建立的方法合成。技术人员还要认识到，根据待合成的确定的 SPA，优选第一种备选合成途径和第二种备选合成途径。

应当明白，前面描述的实例是仅仅为了阐明目的，并且不意味着限制本发明的范围。

药物组合物及其配制

取决于它们的结构，本文公开的 *mono*-和 *poly*SPAs 可用于预防或治疗炎性病变，或用于诱导与不同疾病状态或状况有关的炎症，其中这种炎症为人或其他动物提供了有益的治疗或预防效果。从而，在一个方面，本发明提供了人用及兽医用的药物组合物，其包含 *mono*-和 *poly*SPAs 或其可药用盐，连同药学上或生理学上可接受的缓冲剂、载体、赋形剂或稀释剂，以及任选地，其他治疗剂。应当指出，本发明的化合物可单独或者以包含两个或多个化合物的混合物形式给药。本发明也涵盖 *mono*-和 *poly*SPAs 或其可药用盐制备用于预防或治疗炎性病变、或者其中炎症免疫应答有益的疾病状态或状况的用途。用于这些用途的促炎 SPA 或者抑制性 SPA 的选

择取决于治疗目的期望哪类免疫应答。

本发明的化合物可以药学上或生理学上可接受的溶液的形式给药，其可以含有药学上或生理学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容载体、赋形剂、分散剂等，以及任选地，其他治疗成分。例如，化合物 1 和化合物 2 在中性 pH 下在水中可溶性达约 20 mg/mL。此外，该化合物的水溶液可提供低(约 0.5 到约 5)重量百分比的甘油、蔗糖及其他药学上可接受的赋形剂物质。因而本发明的 SPA 可配制为多种标准药学上可接受的肠胃外制剂。

净电荷和聚集

本发明的平衡电荷两性离子分子每个重复单元具有等数目的正负电荷，随着时间可以彼此聚集和/或由于电荷-电荷引力而发生分子内压缩。例如，本文公开的化合物 1 是代表性的平衡电荷两性离子分子表现出期望的抗炎活性。药物组合物中这类分子和抑制性 mono-和 polySPA 抗炎免疫调节活性随着时间的保持可通过最小化聚集的配制技术优化，例如纳入表面活性剂或分散剂，如聚乙二醇、甘油、蔗糖等。

最好是，本发明的线形聚合物因其肽部分保持电荷-电荷排斥，在生理 pH 下每个重复单元具有净的正电荷或负电荷。这类分子因此表现出理想的溶液行为，即具有最低分子内或分子间聚集的长期溶液状态，这些事件可随着时间减小免疫学活性，特别是在低离子强度尤为如此。因此，每个重复单元具有净的正电荷或负电荷的本发明的分子将表现得同聚合电解质一样，并具有表现出增强的溶解从而是贮存行为的优势。已经直接通过原子力显微镜(AFM)观察到了聚(2-乙烯基吡啶)的聚合电解质电荷-电荷排斥现象(Minko 等人(2002)《美国化学协会杂志》(*J. Am. Chem. Soc.*)124:3218)。此外，每个重复单元表现出净的正电荷或负电荷的 mono- 和 polySPA 的合成多糖抗原的免疫调节活性通过分子内和分子间电荷-电荷排斥力得以显著增大，这些排斥力防止这些分子聚集，促进其结构特征正确展示在细胞受体上。

本发明的药物组合物可以含有有效量的本发明公开的化合物，任选地包含在药学上或生理学上可接受的缓冲剂、载体、赋形剂或稀释剂之中。术语“药学上或生理学上可接受的缓冲剂、载体、赋形剂或稀释剂”是指一个或多个相容的固体或液体填料、稀释物质或示于给予人或其他动物的封装物质。术语“载体”表示自然或合成的有机或无机成分，活性成分与之一起混合以易化应用。药物组合物的成分能够与本发明的聚合物、以及与药物组合物成分相互混合，从而不存在将会在实质上削弱活性化合物期望的药效的相互作用。

适于肠胃外给药的组合物便利地包含无菌水制品，它们可以与受体血液等渗。在可接受的赋形剂和溶剂中，有水、林格氏溶液以及等渗氯化钠溶液。另外，可便利地采用无菌不挥发油作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可采用任何品牌的不挥发油，包括合成的单甘油酯或双甘油酯。另外，脂肪酸如油酸可用于制备注射剂、适合于皮下、肌肉、腹膜内、经脉内等给药的载体制剂可见于 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第19版, A.R. Gennaro 编, Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1995)。

组合物可便利地以单位剂量或剂量单位的形式提供，并且可以通过本领域众所周知的任何方法制备。所有方法包括使化合物与构成一种或多种配合剂的载体结合的步骤。一般而言，组合物通过使化合物与液体载体、精细分离的固体载体或两者均一密实地结合的步骤，然后，如果必要，使产品成形。本发明的化合物可以冻干贮存。

其他递送系统可包括定时释放、延迟释放或持续释放递送系统。此类系统可避免重复给药抗炎或致炎剂，增加受试者和医师的方便。许多类型的释放递送系统可利用，并且是本领域普通技术人员公知的，包括基于聚合物的系统如聚(丙交酯-乙交酯)(poly(lactide-glycolide))、共聚草酸盐(copolyoxalates)、聚己酸内酯、聚酰胺酯、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酸酐。

例如，含药物的前述聚合物的微胶囊描述在美国专利 5,075,109(将其引入本文作为参考)中。递送系统液包括非聚合物系统如：脂质，包括固醇类

如胆固醇、胆甾醇酯、以及脂肪酸或中性脂肪如单甘油酯、双甘油酯和三甘油酯；水凝胶释放系统；硅橡胶系统；基于肽的系统；蜡质包衣；使用常规胶粘剂和赋形剂压制的片剂；部分融合的植入体；等等。具体实例包括但不限于(a) 侵蚀系统，其中本发明的试剂以处于如美国专利 4,452,775、4,675,189 和 5, 736,152(将其引入本文作为参考),所述的基质内的形式包含在内，和(b) 扩散系统，其中活性成分以可调速率自如美国专利 3,854,480、5,133,974 和 5, 407,686(将其引入本文作为参考)所述的聚合物中渗透。另外，也可以使用基于泵的硬件递送系统，其中一些适合于植入。

剂量给药、治疗方案以及给药

适当选择的本发明的化合物可以这样的有效量给药，即诱导防御多种多样的不同以炎症为基础的病变的有效量，所述病变包括术后粘连和与细菌感染相关的腹内脓肿，或者诱导与各种疾病状态或紊乱相关的炎症的有效量，其中这种炎症提供了有益的治疗或预防效果。为此目的，有效量是本发明的抗炎或炎性化合物单独或与其他剂量或附加的治疗化合物一起时，将分别抑制、缓解或预防以炎症为基础的病变，或者刺激治疗有益的炎性反应的量。剂量范围可以从约 1 皮克/千克体重到约 1 毫克/千克体重，或者从约 1 纳克/千克体重到约 1 微克/千克体重。绝对量将取决于多种因素，包括待治疗疾病或紊乱的性质、给药是否与所选的外科手术或急诊相结合、协同治疗、剂量给药次数、个体患者参数包括年龄、身体条件、身高和体重、以及待治疗疾病或紊乱的严重度，并且可由开业医生仅以常规实验确定。通常优选使用最大剂量，即根据可靠医学判断的最高安全剂量。多剂量的本发明的药物组合物也考虑在内。

待给予需要预防或治疗以炎症为基础的病变、或者得益于免疫系统刺激的疾病或紊乱的人或动物患者的化合物的最佳量的确定，以及给药包含此类化合物的治疗剂或药物组合物的方法落在药学、医学和兽医学领域技术人员的能力范围之内。人或动物患者的剂量给药取决于以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱的性质、患者的病情、体重、总体健康状

况、性别、饮食、给药时间、周期和路径、吸收率、化合物的分布、代谢和排泄、于其他药物的联合、以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱的严重度、以及所治疗病变或疾病状态的响应，并且可容易地进行优化以获得期望水平的效率。治疗过程可持续数天到数周或数月，或者直到实现治愈，或者实现了疾病可接受的减轻或预防。最佳给药方案可由患者体内药物累积的测量值结合治疗效率来计算。普通技术人员能够容易地确定最佳剂量、给药方法学以及重复率。最佳剂量可根据免疫调节聚合化合物的效率而变，并且通常可以基于在体外和体内动物模型中有效的 ED_{50} 值估计。用于治疗或预防以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱的本发明化合物的有效量、含这些化合物、激动剂的递送载体、以及治疗方案可通过常规手段确定。例如，医学或兽医学从业者能够以低剂量的化合物开始对需要其的个体或患者进行治疗，然后增大剂量，或者系统性地改变剂量方案、监测其对患者或个体的效果，并调整剂量或治疗方案，以最大化期望的疗效。剂量和治疗方案有关的更多讨论可参见 Benet 等人，*Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 9 版，Hardman 等人编，McGraw-Hill, New York, (1996), 第 1 章，第 3-27 页，以及 L.A. Bauer, *Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach*, 第 4 版，DiPiro 等人编，Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, (1999), 第 3 章，第 21-43 页，以及其中所引述的参考文献，读者可以此作为参考。

多种给药路径可利用。所选的特定方式将取决于选取哪一种化合物，待治疗的特定病情，以及疗效所需的剂量。一般而言，本发明的方法可利用医学上可接受的任何给药方式实施，也就是产生有效水平的免疫应答而不会导致临床上无法接受的不利作用。优选的给药方式为肠胃外路径，尽管也可以采用口服给药。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌肉或腹膜内注射或者输注技术。

在本发明的上下文中，术语“治疗”、“治疗用途”或“治疗方案”在文中旨在涵盖本发明免疫调节聚合物的预防、缓解性以及治疗性的给药方式，并且包括本发明所主张化合物的任何和所有的用途，包括治疗由以

炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱所致的疾病状态、病情、症状、迹象或紊乱，或者预防、阻碍、延迟或逆转与之相关的症状、迹象、病情或紊乱的进程。从而，本发明涵盖不良的与以炎症为基础的病变、或者得益于机体免疫应答刺激的疾病或紊乱相关的疾病状态、症状、病情、迹象或紊乱的任何预防、缓解、减轻、逆转或完全消除。

为了本发明的目的，用于癌症治疗的术语“治疗”等等的含义是广义的，包括本领域中通常接受的广泛的各种不同的概念。因而，如这里使用的，这个术语包括但不局限于延长到达进行性疾病的时间、肿瘤的减少、疾病的减轻、痛苦的减轻、提高生命质量、延长生命、改善或控制症状，如疼痛、呼吸困难、食欲减少、体重减轻、疲劳、虚弱、消沉和焦虑、困惑等，提高病人的舒适度等。每个目的可以甚至是完全地治愈疾病。

术语“癌”有很多定义。根据美国癌症协会，癌症是一组其特征在于异常细胞不受控制地生长(和有时扩散)的疾病。尽管通常指单一的疾病，但是实际上它由超过 200 种不同的疾病组成。当这样的细胞阻止重要器官正常的功能，或扩散到全身，损伤基本的系统时，癌性生长可以致死。

本发明提供治疗哺乳动物中敏感赘生物的方法，包括对需要所述治疗的哺乳动物施用溶瘤细胞有效量的本发明化合物。

本发明中的化合物可以作为治疗剂有效治疗不同类型的癌症的非限制性的实例包括但不局限于：癌，如中枢神经系统的赘生物，包括多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞肿瘤、室管膜和脉络丛肿瘤、松果体瘤、神经元肿瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤和脑膜肉瘤；眼赘生物，包括基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑素瘤、横纹肌肉瘤和成视网膜细胞瘤；内分泌腺的赘生物，包括垂体赘生物、甲状腺赘生物、肾上腺皮质赘生物、神经内分泌系统赘生物、胃肠胰内分泌系统赘生物和性腺赘生物；头颈赘生物，包括头颈癌、口腔、咽和喉赘生物和牙源性肿瘤；胸部赘生物，包括大细胞肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、恶性间皮细胞瘤、胸腺瘤和胸的原发胚细胞肿瘤；消化道赘生物，包括食道、胃、肝脏、胆囊、胰腺外分泌部分、小肠、阑尾和腹膜的赘生物、结肠和直肠腺癌和肛

门赘生物；生殖泌尿道的赘生物，包括肾细胞癌、肾盂、输尿管、膀胱、尿道、前列腺、阴茎、睾丸赘生物；和女性生殖器官，包括外阴和阴道、子宫颈赘生物，子宫体腺癌、卵巢癌；妇科肉瘤和乳房赘生物；皮肤赘生物，包括基底细胞癌、鳞状细胞癌、皮肤纤维肉瘤、梅克尔细胞瘤和恶性黑素瘤；骨骼和软组织赘生物，包括骨肉瘤、恶性纤维组织瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、原始神经外胚层瘤和血管肉瘤；造血系统赘生物，包括骨髓异常增生综合征、急性粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、HTLV-1 和 5 T 细胞白血病/淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞性白血病、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤和肥大细胞白血病；和儿童赘生物，包括急性成淋巴细胞性白血病、急性髓细胞白血病、成神经细胞瘤、骨肿瘤、横纹肌肉瘤、淋巴瘤和肾肿瘤。

特定的治疗方案可持续一定时期，这可能取决于特定的以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱的性质、其严重度以及患者的总体情况，并且可能包括每日一次或数次给药含化合物的组合物数天、数周、数月或更长时间。在治疗之后，监测患者病情的变化、以及紊乱或疾病状态症状、迹象或情况的减轻。组合物的剂量可在患者对当前剂量水平不显著应答的情况下增大，或者如果观察到紊乱或疾病症状的减轻，或者紊乱或疾病已经消除，则可降低剂量。

使用最佳给药方案递送治疗有效量的本发明的化合物。为了本发明的目的，就本文公开的化合物而言的术语“有效量”或“治疗有效量”是指化合物有效地实现预期目的的量，优选没有不良的副作用如毒性、刺激或过敏反应。尽管个体患者的需要可能有变，但有效量药物组合物的最佳范围的确定落在本领域技术范围之内。人类剂量可由动物研究反推(A.S. Katocs, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第 19 版, A.R. Gennaro 编, Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1995), 第 30 章)。通常，为提供治疗有效量的药物组合物所需的剂量，可由本领域技术人员调整，将取决于年龄、健康、身体情况、体重、受体疾病或紊乱的类型和程度、治疗频率、协同治疗的性质(如果有的话)、以及期望效果的性质和范围(Nies

等人, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第9版, Hardman 等人编, McGraw-Hill, New York, N.Y., 1996, 第3章)。

高危个体预防疗法也涵盖在本发明之内。如本文所用, 术语“高危个体”是指已经介由例如个体或家族病史或遗传试验、生活或工作环境或病情等确定存在比正常概率显著更高的容易受到以炎症为基础的病变、或相关疾病或紊乱的发作或复发、或将得益于机体免疫应答刺激的疾病/紊乱的影响。例如, 患者可能具有包括特定疾病或紊乱频繁复发的个人和/或家族病史。作为另一个实例, 患者这样的易感性可能是通过按照本领域公知技术的遗传筛查确定的(参见如美国国会技术评定局 *Genetic Monitoring and Screening in the Workplace*, OTA-BA-455, 第5章, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1990, 第75-99页)。在病毒病的情况下, 环境可能是诱病因素。在癌症的情况下, 遗传和环境都可能是诱病因素。作为高危个体治疗方案的一部分, 可预防性地治疗个体以预防以炎症为基础的病变, 或疾病、紊乱、迹象、症状或病情的发作或复发, 或将得益于增强的免疫应答的疾病或紊乱。术语“预防有效量”是指观察到本发明药物组合物产生效果的量, 其中效果为预防感染或炎症, 或炎性疾病、症状、迹象、病情或紊乱的发作或复发, 或者得益于机体免疫应答刺激的疾病/紊乱。预防有效量的药物组合物典型地是通过与当下过那类似情况的个体给药缺乏活性剂的第二药物组合物时所观察到的效果相比时其所具有的效果确定的。

对于治疗用途, 可以有效降低疾病症候学、症状、迹象、病情或紊乱的量向怀疑患有以感染性疾病或癌症为基础的病变或者患有将得益于增强的免疫应答的疾病或紊乱的患者给药本文公开的免疫抑制化合物。本领域技术人员能够通过常规方法确定用于这类治疗的最佳剂量和治疗方案。

每当希望预防在人或动物受试者中的细菌性脓肿或粘连的形成, 就可以使用本发明。这包括预防性治疗以预防在计划的手术过程中以及在紧急情况下出现这样的情况。可使用任何导致增强针对细菌感染/污染以及后续脓肿/粘连形成的免疫应答的方案, 尽管最佳剂量和给药方案是不仅抑制脓

肿和/或粘连形成、而且导致完全防御由特定菌体或多种菌体所致的脓肿或粘连形成的那些方案。递送多剂量特定聚合物的期望的时间间隔可由本领域普通技术人员仅仅采用常规实验确定。

本方法也可用于与易使个体形成脓肿如盆腔炎症性疾病、炎性肠病、泌尿道感染和结肠癌有关的疾病。本方法因此可用于几乎任何组织或器官的脓肿，具体包括但不限于：真皮脓肿如痤疮。本发明所属领域的普通技术人员将会容易地认识到本发明适用的病情和操作的范围。

剂量范围从约1皮克/千克体重到约1毫克/千克体重、或者从约1纳克/千克体重到约微克/千克体重将是有效的，这取决于给药方式。绝对量将取决于多种因素(包括给药是否结合所选的外科手术或急诊外科手术、协同治疗、剂量给药次数、以及个体患者参数，包括年龄、身体状况、身高和体重)，并且可以经由常规实验确定。通常优选使用最大剂量，即依据可靠医学判断的最高安全剂量。

考虑多剂量的本发明的药物组合物用于诱导防御粘连的形成。这样的多剂量可以自外科手术前一天开始为期三周的时间内给药。还可以在外科手术之后给予另外的剂量。可使用任何导致降低术后外科粘连形成的方案，尽管最佳剂量和给药方案是不仅抑制术后外科粘连形成的发展、而且导致完全防御术后外科粘连形成的那些方案。递送多剂量的本发明的免疫调节聚合物之一的期望的时间间隔可由本领域普通技术仅仅采用常规实验确定。

本发明的化合物可以系统性地给药，或者局部给药到期望降低粘连形成的可能性的手术部位。本发明的化合物可作为水溶液、作为交联凝胶、或作为水溶液和交联凝胶形式的任何瞬间或物理上的联合给药。当在粘连可能形成的部位或远离该部位皮下局部给药时，免疫调节聚合物也是有效的。

本发明的制剂可与感染”结合”给药，表示在时间上与导致宿主脓肿或粘连形成的外科手术、外伤或疾病足够接近，从而获得抗脓肿或粘连的保护性效果。在选取外科手术的情况下，制剂可在外科手术之前很长时间

给药(即数周或者甚至数月), 优选在接近于外科手术的时间(以及, 甚至是手术之后)加强给药。特别地在急诊情况下, 制剂可在外伤或外科手术前即刻(数分到数小时)和/或之后给药。唯一重要的是制剂给药在时间上与外科手术足够接近, 从而增强个体抗细菌感染/污染的免疫应答, 由此提高成功宿主应答的几率并降低脓肿或粘连形成的可能性。

本发明所属领域的普通技术人员将会认识到本发明可应用于广大范围的疾病、症状、病情、迹象、紊乱和操作。除了脓肿和粘连, 本发明的抗炎 *mono-* 和 *polySPA*、组合物和方法能够适用的其他炎性过程和病变包括:

变应性疾病如 (全身性)过敏反应、血清病、全身性药物反应、食物变态反应、昆虫毒液变态反应和肥大细胞增生病; 气道变态反应如过敏性鼻炎、哮喘和超敏性肺炎; 皮肤变应性如荨麻疹、血管性水肿、湿疹、特应性皮炎、过敏性接触性皮炎、传染性皮炎、多形性红斑及斯-约二氏综合征(Stevens-Johnson syndrome); 以及眼变态反应性如变应性结膜炎、特应性角膜结膜炎、性病角膜结膜炎、巨乳头性结膜炎以及接触性变态反应。

器官特异性自身免疫病, 包括, 但不限于:

内分泌系统, 包括: (甲状腺) Hashimoto 氏甲状腺炎、格雷夫斯病、伴随甲状腺功能亢进的甲状腺炎; I 型自身免疫性多腺体综合征、II 型自身免疫性多腺体综合征、胰岛素依赖型糖尿病、免疫介导的不育症以及自身免疫性青铜色皮病。

皮肤, 包括: 寻常性天疱疮、落叶性天疱疮、副肿瘤性天疱疮、大疱性类天疱疮(bullus pemphigoid)、疱疹样皮炎、线形 IgA 大疱病获得性大疱性表皮松解症、自身免疫性秃发症、结节性红斑、妊娠性类天疱疮、疤痕性类天疱疮以及慢性儿童大疱病。

血液系统, 包括: 自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜(特发性以及药物相关的)和自身免疫性中性粒细胞减少症。

神经肌肉系统, 包括: 重症肌无力、伊顿-兰姆博特二氏重症肌无力综合征、强直人综合征、急性播散性脑脊髓炎、多发性硬化症、格林-巴利综

合征、慢性脱髓鞘性神经炎、多发性神经根性神经病、伴随传导阻滞的多灶性运动神经病以及伴随单克隆丙种球蛋白病的慢性神经病。

副肿瘤性神经紊乱，包括：眼阵挛-肌阵挛综合征、小脑变性、脑脊髓炎、视网膜病变。

肝胆管系统，包括：自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆管纤维硬化以及硬化性胆管炎。

胃肠道，包括：谷蛋白敏感性肠病、恶性贫血以及炎性肠病。

器官非特异性自身免疫病，包括，但不限于：

结缔组织疾病，包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、全身性硬化症(硬皮病)、强直性脊柱炎、反应性关节炎、多发性肌炎/皮炎、干燥综合征(Sjögren's syndrome)、混合性结缔组织病、贝切特氏综合症以及银屑病。

血管炎综合征，包括：系统性坏死性血管炎，包括经典的结节性多动脉炎、过敏性脉管炎和肉芽肿病(Churg-Strauss 氏病)以及多脉管炎重叠综合征；高敏感性脉管炎，Wegener 氏肉芽肿病，颞动脉炎，Takayasu 动脉炎，Kawasaki 病，孤立性中枢神经系统血管炎，血栓闭塞性脉管炎以及各种血管炎；肉状瘤病，移植物抗宿主病和寒冷病。

本发明的抗炎化合物可用的其他疾病和病情包括：败血病；大肠炎；冠状动脉疾病；肝纤维化；急性呼吸窘迫综合征；急性炎性胰腺炎；内窥镜逆行胆管胰造影术诱导的胰腺炎；胰腺炎；烧伤；冠状、脑及外周动脉粥样化形成；阑尾炎；胆囊炎憩室炎；内脏纤维变性紊乱(肝、肺、肠)；创伤愈合；皮肤瘢痕形成紊乱(瘢痕瘤、化脓性汗腺炎)；肉芽肿紊乱(肉状瘤病、原发性胆汁性肝硬变)；坏疽性脓皮症；急性发热性中性白细胞增多性皮肤病性脓皮病；细胞、组织或器官移植；阿尔茨海默氏病；帕金森氏病；动脉粥样硬化；肥胖症和癌症。

炎性 *mono-* 和 *poly*SPA 的炎性化合物、其组合物以及采用这些化合物和组合物的方法可适用的疾病和病变包括抗病毒治疗，例如治疗或预防乙肝病毒和丙肝病毒感染；抗癌治疗；以及作为疫苗佐剂使用。

预期本发明中药物组合物的多次剂量可诱导抗手术后粘连形成的保护。这样的多次剂量可以在手术前当天开始的三天期间给药。进一步的剂量也可以在手术后给药。任何能导致减少手术后粘连形成的方案都可以使用, 尽管最佳剂量和给药方案不但能抑制手术后粘连形成的发生, 而且可以导致抗手术后粘连形成的完全保护。本领域的普通技术人员采用只是常规的实验就可以测定递送本发明免疫调节聚合物之一的多次剂量的理想的时间间隔。

可以应用炎性 *monoSPA* 和 *polySPA*、其组合物和采用这些化合物和组合物的方法的疾病和病理包括抗病毒性治疗(例如治疗或预防乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的感染)、抗细菌治疗、抗真菌治疗、抗寄生虫治疗、抗癌治疗和作为佐剂使用。

前面的描述提供关于本发明的很多方面的全面的看法。下面的实施例阐明其各个方面, 并不是意在, 也不应将它们解释为在任何方面限制。本发明的范围不应由这里描述的具体实施例限制。正如这里描述的, 功能等同的产品、组合物和方法显然包含在本发明的范围内。

除非另有说明, 通过使用分子生物学、微生物学、病毒学、重组 DNA 技术、在溶液中的肽合成、固相肽合成和免疫学常规技术, 不用过度实验, 实施本发明。例如, 这样的程序在引入作为参考的下面的教科书中描述:

1. Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 第二版 (1989), I、II 和 III 卷的全部;

2. *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II (D. N. Glover, 编辑 1985), IRL Press, Oxford, 全文;

3. *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait 编辑 1984) IRL Press, Oxford, 全文, 特别 Gait 在这里的论文 pp. 1-22; Atkinson 等人 pp. 35-81; Sproat 等人 pp. 83-115; 和 Wu 等人 pp. 135-151;

4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames 和 S. J. Higgins 编辑 1985) IRL Press, Oxford, 全文;

5. **Animal Cell Culture: Practical Approach, 第三版**(John R.W. Masters 编辑 2000), ISBN 0199637970, 全文;
6. **Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach** (1986) IRL Press, Oxford, 全文;
7. Perbal, B., **A Practical Guide to Molecular Cloning** (1984);
8. **Methods In Enzymology** (S. Colowick 和 N. Kaplan 编辑 Academic Press, Inc.), 整个系列;
9. J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactive, Germany);
10. Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. L 和 Fenichel, R.L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73:336);
11. Merrifield, R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149;
12. Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in *The Peptides* (Gross, E. 和 Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp.1-284, Academic Press, New York;
13. Wunsch, E.编辑(1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls 25 Methoden der Organischen Chemie* (Muler, E.编辑), vol. 15, 4th edn., 第 1 和 2 部分, Thieme, Stuttgart;
14. Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg;
15. Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg;
16. Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25:449; 和
17. *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV, D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编辑 1986, Blackwell Scientific Publications.

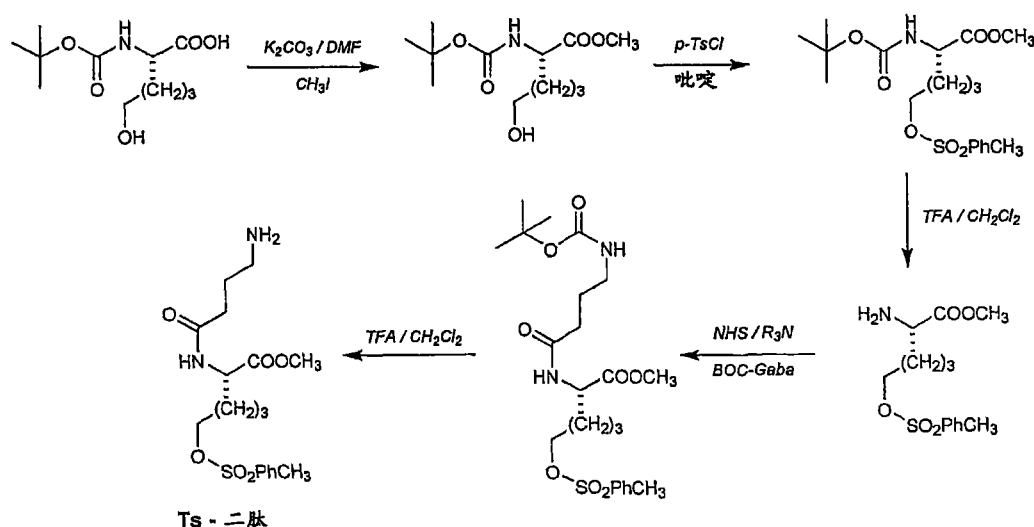
本发明降用下面的实施例进一步阐明:

实施例 1: *monoSPA* 和 *polySPA* 化合物的制备

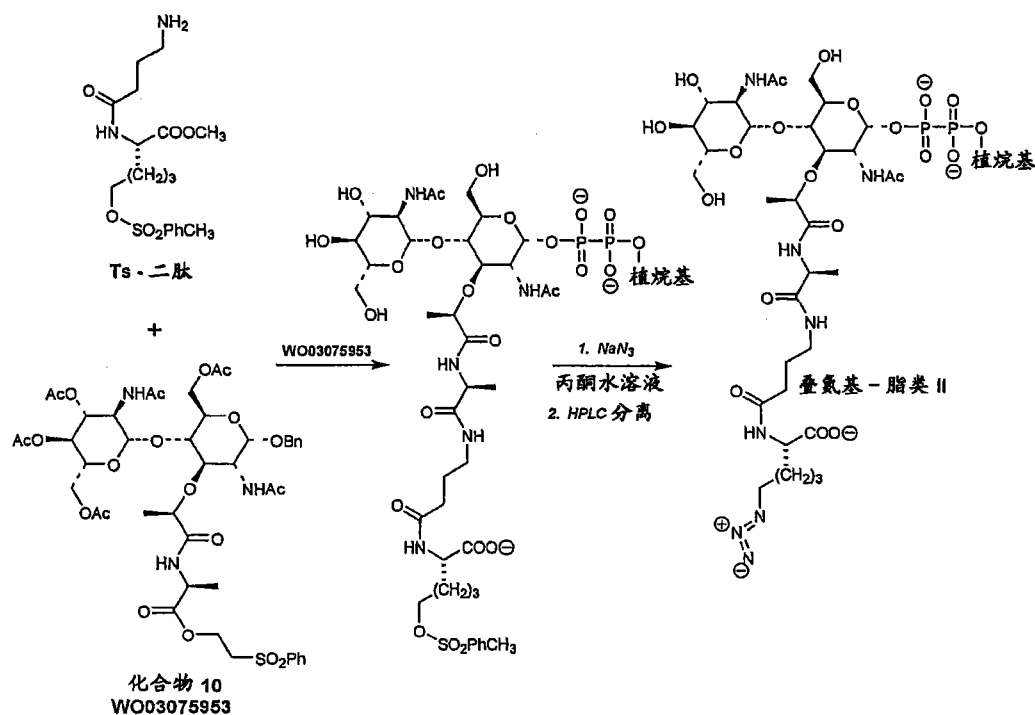
来自脂类 II 前体的二糖单位的聚合可以在表位共价连接之前或之后完

成。表位片段的理化特性通常是在途径选择中决定选择的因素。如果肽或肽/糖类片段是可溶性的，完全加工的脂类 II 的构建可以在聚合之前完成。如果表位的可溶性是个问题，*polySPA* 可以用合适的表位连接点(即烷基叠氮化物)预安装产生。通常两种选择都阐明。说明性的实例描述了抑制性 *mono/polySPA* 为例；刺激性的 *mono/polySPA* 以完全相同的方式制备。

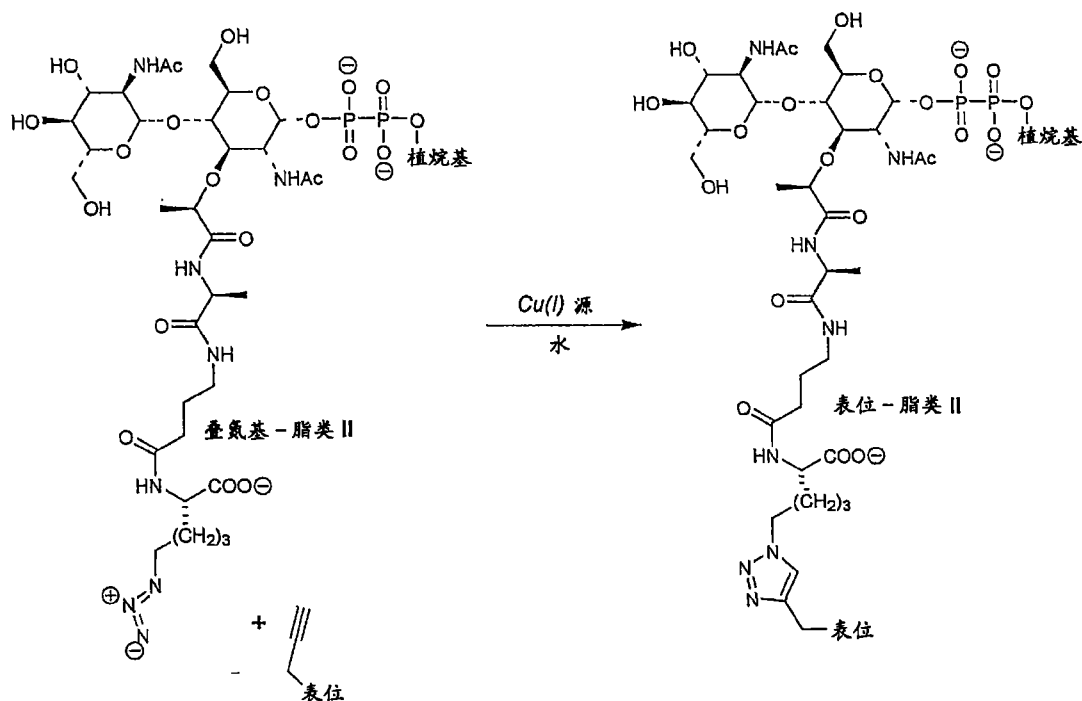
实施例 1A：表位片段是可溶性的：在聚合之前的完全加工的脂类 II 联降-叠氮基赖氨酸脂类 II 的肽前体合成。有机合成领域的技术人员很清楚细节。



联降-叠氮基赖氨酸脂类 II 的合成。有机合成领域的技术人员很清楚具体细节。需要指出的是，这里使用在 WO03075953 中所教导的完全相同的过程，其中用 Ts-二肽替换化合物 5。

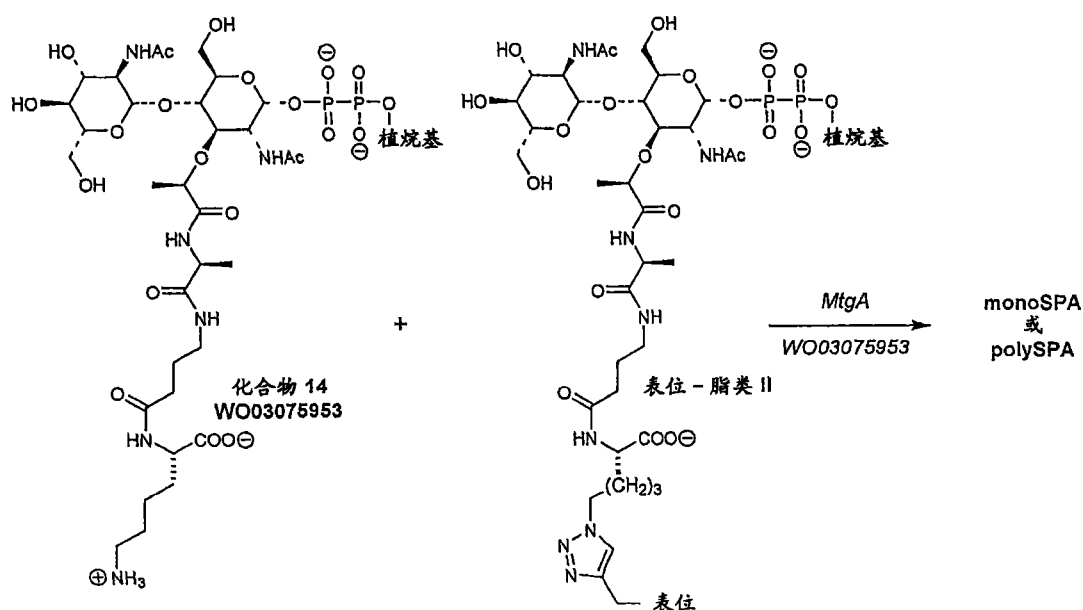


完全按照在文献中描述的方法(Rostovtsev 等人(2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 114:2708, 在这里引入作为参考)将单价或多价表位连接到叠氮基-脂类 II 上。



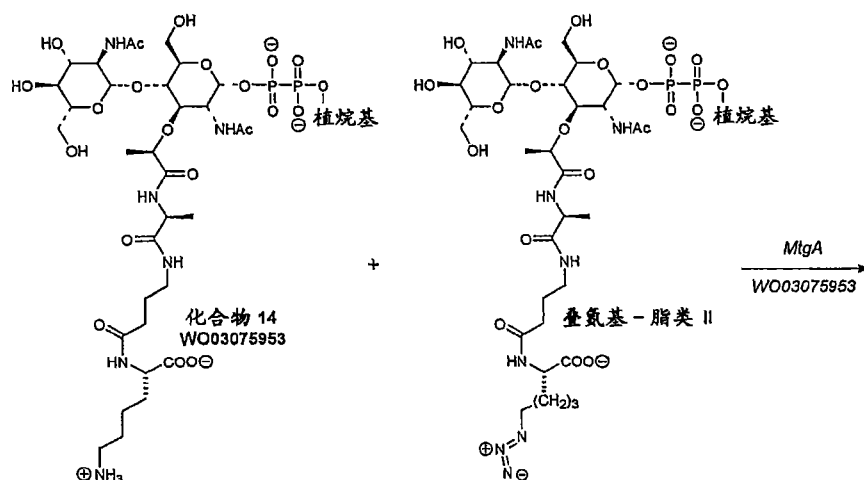
使用催化性 MtgA 在 WO 03/075953 中教导的条件下, 未取代的脂类如 WO 03/075953 的化合物 14 与表位脂类 II 的共聚得到 monoSPA 或 polySPA, 如通过选择表位脂类 II 确定。当表位分子量是 1KD 或更小(数

据没有显示)时, 未取代的和表位取代的脂类 II 聚合的相对速率几乎相等。因而, 表位沿着多糖主链几乎均匀地分布。



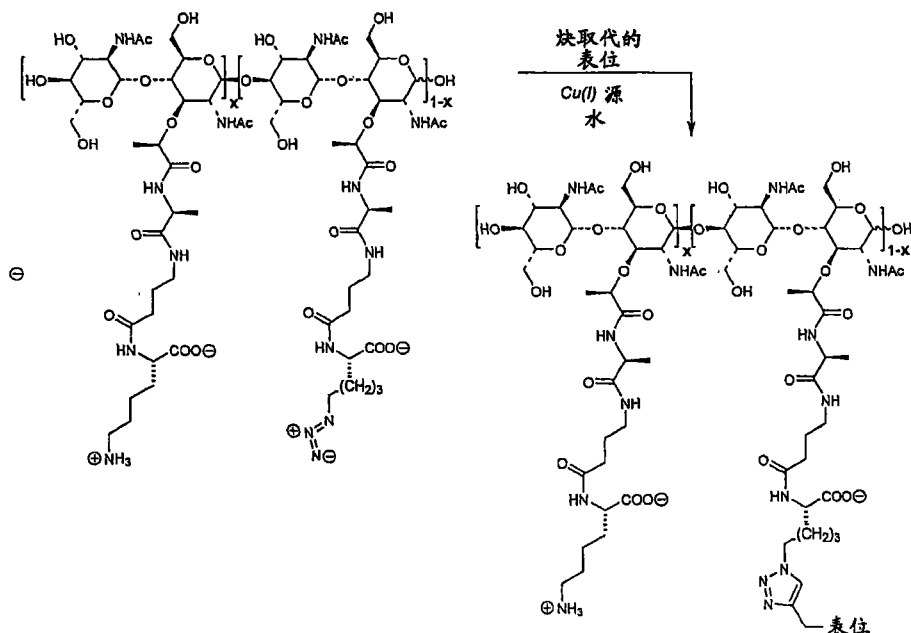
实施例 1B: monoSPA 和 polySPA 化合物的备选制备

使用催化性 MtgA 在 WO 03/075953 中教导的条件下, 未取代的脂类 II 如 WO 03/075953 的化合物与叠氮基脂类 II 的共聚得到具有烷基叠氮的 SPA, 烷基叠氮是表位的附着点, 以线性密度沿着多糖主链分布, 通过混合物中叠氮基脂类 II 的摩尔份数确定所述线性密度(未取代的脂类 II 的摩尔份数+叠氮基 - 脂类 II 的摩尔份数=1.00)。未取代的和叠氮化物取代的脂类 II 的聚合相对速率几乎是相等的。



叠氮化物在聚合后被表位取代。很清楚, 根据所选的表位数目, 将得

到 monoSPA 或 polySPA。根据 Rostovtsev 等人(2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 114:2708 应用表位, 并且 SPA 按照 WO03075953 中化合物 15 的描述纯化。



实施例 2: monoSPA 和 polySPA 化合物的表征

所有的 SPA(包括 monoSPA 和 polySPA)的多糖部分对溶菌酶消化是同样敏感的。可以利用这种现象的优势来开发对 SPA 的分析方案。皮摩尔浓度的溶菌酶在室温下反应能将大分子多糖主链降解为较小的多糖片段。毫摩尔的溶菌酶(鸡卵清或噬菌体 T4)在 37°C 能彻底地、特异性地将 SPA 降解为二糖肽组分。然后用 HPLC 峰积分定量这些二糖肽的相对丰度。然后用 HPLC 与电雾化电离质谱和傅立叶变换质谱鉴定并精确地表征 SPA 的二糖肽片段。

与其他的大分子生物分子(如抗体、DNA、蛋白质等)一样, SPA 不能简单地冻干并称重以测定在水溶液中的浓度。SPA 含有很大的但不确定量的结构水, 它不能测定或用冻干除去。使用间接的方法精确地测定 SPA 的浓度。用端基取代独立地合成 SPA 的二糖肽组分的真实样品, 所述端基取代允许这些独立合成的片段用层析的方法与相应的溶菌酶消化片段中区分出来。当为定端基标记的片段确定质量作为 HPLC 峰面积函数的标准曲线时, 溶液中的任何给定的 SPA 的绝对浓度就可以确定。这种技术对于精

确测定在动物模型和 SPA 的临床研究中的剂量是有用的。

实施例 3: 由式 V、VI 的化合物和 monoSPA 和 polySPA 对人 PBMCs 中 TNF- α 的差别诱导

式 V 和 VI 中的化合物和 monoSPA 和 polySPA 在人外周血单核细胞 (PBMCs) 中诱导产生促炎症细胞因子 TNF- α 的能力可如下述测定。这种测试可用来确定本文公开的任何结构的 SPA 是否能刺激 TLR2, 因而有能力递送抗原特异性的抑制性或促炎症效应。

这种方案也可以用来测定可耐受并仍允许结合 TLR2 的表位密度, 因为人 PMBC 对 TNF- α 的产生依赖于通过 TLR2 的连接和信号传递。监视作为 SPA 上表位密度的函数的 TNF- α 的产生并测定拐点(如果存在)。认为在基于炎症的测试中允许信号的最大表位密度与在适当衍生的 SPAs 中允许抑制的表位密度相同。

来自人类供体的 PBMCs 在 Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 上用密度梯度离心分离, 以 1.0×10^6 个细胞/ml 的密度接种在含有 10%FBS 的 RPMI 培养基(两者都来自 Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)上, 并在 37°C 在含 5%CO₂ 大气下分别在存在或不存在化合物 2、化合物 1 或抑制性或促炎症 monoSPA 和 polySPA 的情况下温育 18 小时。单独的对照细胞在与前面条件相同的情况下与 10ng/ml 金黄色葡萄球菌肽聚糖(sigma)温育。温育后, 通过移液将组织培养基从各种细胞中除去, 并用商业上可获得的利用 TNF- α 单克隆抗体(BD OptEIA™ Set Human TNF, Pharmingen, Inc.)的夹层 ELISA 试剂盒测定其中存在的 TNF- α 的量。这种 ELISA 测定对于 TNF- α 的检测极限为 7.8pg/ml。

与 500 mg/ml、100 mg/ml 和 1 mg/ml 的化合物 2 温育 18 小时能分别诱导产生 64.0 pg/ml、17.6 pg/ml 和 1.82 pg/ml 的 TNF- α , 但是对于这些供体细胞用相同浓度的化合物 1 不能观测到可检测的 TNF- α 。与 10 ng/ml 黄色葡萄球菌肽聚糖温育在这些供体细胞中诱导 26 pg/ml TNF- α 。

实施例 4: 减轻 SJL/J 小鼠中蛋白脂质蛋白 139-151 诱导的实验性自身免疫性脑炎(EAE)

多发性硬化(MS)是影响年轻人的中枢神经系统的慢性自身免疫炎性疾病。实验性自身免疫性脑炎(EAE)是多发性硬化的动物模型,可以在小鼠中通过用来源于髓磷脂蛋白质的肽(即蛋白脂质蛋白质(PLP)139-151、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)35-55 或髓磷脂碱性蛋白(MBP)85-99)给药诱导产生。不希望受理论的束缚,在这种模型中,自身反应性 CD4+T 细胞产生能介导该疾病的促炎细胞因子 IFN- γ 。抑制性细胞因子(如 IL4 和 IL10)已经表现出能减少其严重性(Stern 等人(2004) PNAS 101:11743)。

本发明中的各种化合物在用 PLP139-151 在 SJL/J 小鼠诱导的 MS 动物模型(EAE)中的功效可用三种方案阐明: (i)自身抗原和化合物同时给药(预防); (ii)用化合物预处理(接种疫苗); 和(iii)在疾病发作后用化合物给药(治疗)。正如技术人员将理解的,小鼠模型可以用小鼠肽序列进行;人药需要人肽序列。本发明的范围不受使用物种特异性肽的限制。

用 PLP139-151 和化合物共免疫小鼠保护免于 EAE

用 50 μ g 的 PLP139-151 和化合物在一定剂量范围内皮下免疫 SJL/J 小鼠。在 PLP 免疫组中, EAE 的首次临床病征在约 8 天内出现,在 16 天死亡率为 100%。用本发明有效的抗炎性的 monoSPA 或 polySPA 共免疫的小鼠(剂量组,约 10ng 到约 100 μ g)在延迟的时间点发生 EAE,随后以不同剂量依赖性速率恢复(最小阳性结果)或在 45 天实验期后基本没有形成疾病(最大阳性结果)。

预免疫小鼠保护免于 PLP139-151 诱导的 EAE

在用 50 μ g 的完全弗氏佐剂(CFA)中的 PLP139-151 给药前的 2 天,用化合物(剂量组,约 10ng 到约 100 μ g)对 SJL/J 小鼠皮下免疫。所有对照小鼠(PLP139-151/CFA)都患上 EAE 并发生 100%的死亡率。在 2 天前用本发明的有效的抗炎性 monoSPA 或 polySPA 预注射导致症状的改善,没有死亡。用这种方法阐明化合物的功效评定。

用化合物对已经建立的 PLP139-151 诱导的 EAE 的治疗减少疾病负担

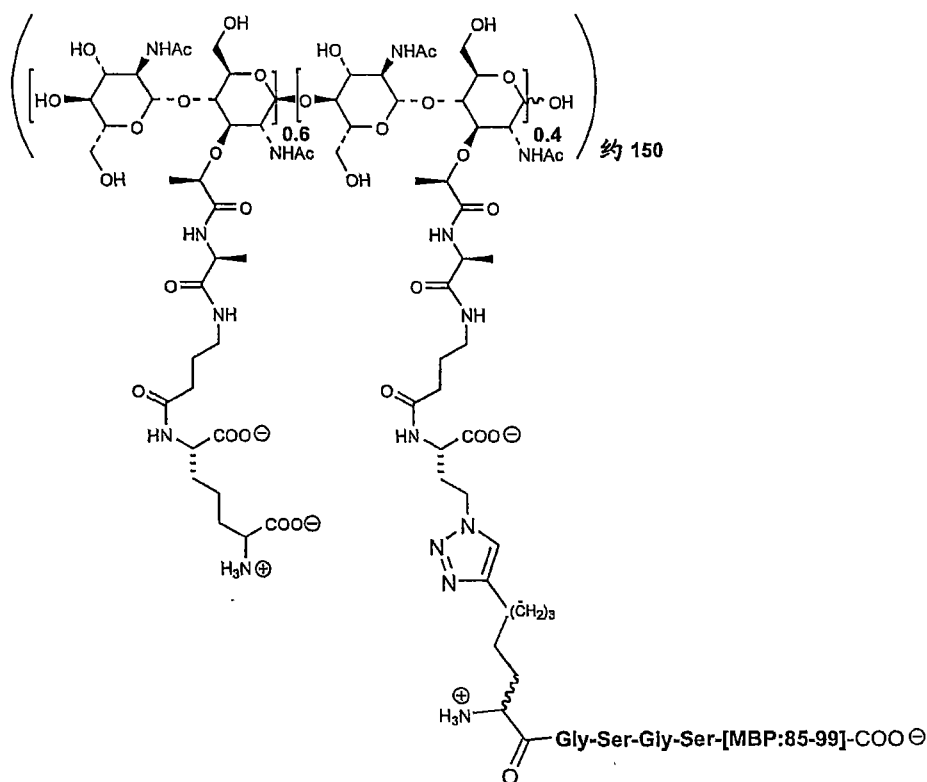
用(在完全弗氏佐剂中 50 μ g)PLP139-151 皮下免疫 SJL/J 小鼠。在或约第 10 天, 当所有的小鼠形成轻微的 EAE 临床症状(跛行尾)时, 用本发明中 *monoSPA* 或 *polySPA*(剂量组, 约 10ng 到约 100 μ g)连续 5 天皮下给药。所有对照小鼠(PLP139-151/CFA)都发生严重的 EAE 临床症状并发生 100% 的死亡率。评估在治疗组中临床症状的抑制。

EAE/MS 受试化合物和临床假说

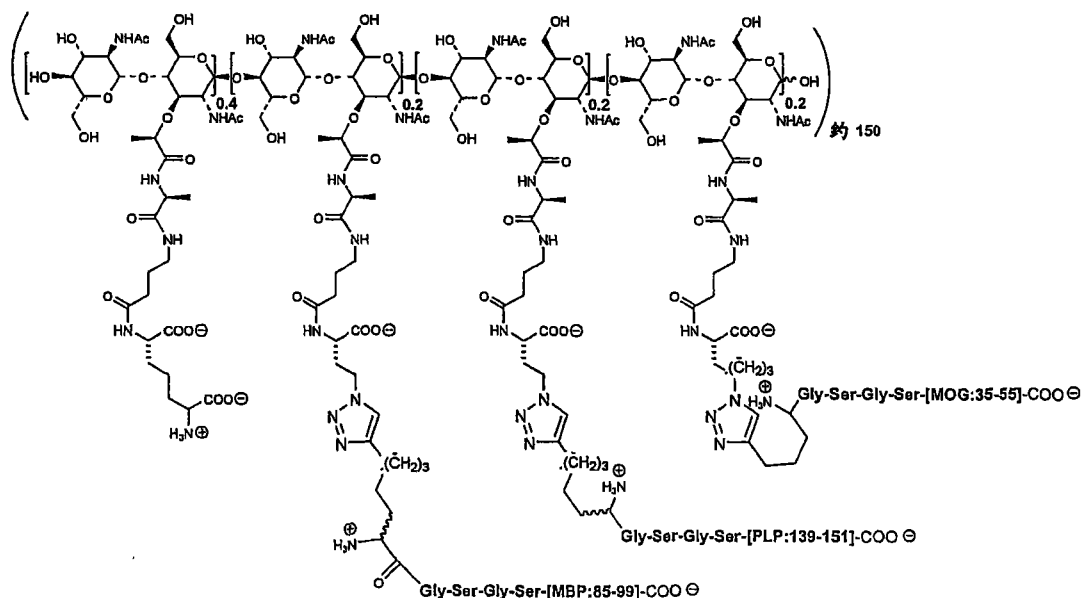
在测试方案中第一种化合物是格拉太咪尔(Cop1, 乙酸格拉太咪尔), 无规肽共聚物(Y、E、A、K)_n。它作为阳性对照并且是当前在人类医学中 MS 复发治疗的标准。

在测试方案中的第二种化合物基于化合物 1。正如前面所概括的, 化合物 1 对炎性病理展现出广泛的抑制性效应, 并期望在模型中有一定水平的功效。

在测试方案中第三种化合物是基于髓磷脂碱性蛋白表位的抑制性 *monoSPA*(见下文)。这种化合物测试可能来源于单个表位的抑制活性中功效的相对水平。



在测试方案中的第三种化合物是基于三种 MS(EAE)相关表位的抑制性 *poly*SPA。这种化合物测试在可能来源于多种 MS(EAE)相关表位的抑制性活性中功效的相对水平。



实施例 5: 诱导针对人肿瘤抗原的免疫反应

评估包括多个 T 辅助表位和目标表位的促炎症 polySPA 诱导针对人黑色素瘤免疫原的免疫反应的能力(Chianese-Bullock 等人(2005) J. Immunol. 174:3080, Slingluff 等人(2001) Clin. Cancer Res. 7:3012)。原型刺激性 polySPA 构建体包含三种 T 辅助表位：两种来自犬瘟热病毒 F(TLMTKNVKPLQSLGSGR, KLIPNASLEINCTLAEL)，一种来自破伤风类毒素(AQTIKANSKFIGITEL)以提高三种 HLA-A2 限制性 CTL 目标表位(酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ (YMDGTMSQV)、Gp100₂₀₉₋₂₁₇ (IMDQVPFSV)和 MAGE-A10₂₅₄₋₂₆₃ (GLYDGMEHL))的活性。

polySPA 是由两个脂类 II 的共聚制备的, 所述脂类 II 的主干肽包括摩尔份数分别是 0.7 和 0.3 的 Ala-D-异-Gln 和 Ala-D-异-Gln-联降-叠氮基-Lys。因而, 在产生的 polySPA 中 30% 的主干肽将含有 C 端叠氮化物残基。用标准的固相技术由商业卖主合成各种表位, 从而最后的序列在相关的 T 辅助肽 C 端含有间隔基残基 Ser-Gly-Ser-Gly-炔丙基 Gly(如 AOTIKANSKFIGITELSGSG(炔丙基 G)), 并且目标表位的最后序列在相

关的 CTL 肽 N 端含有间隔基残基(炔丙基 Gly)-Gly-Ser-Gly-Ser, 如(炔丙基 Gly) GSGSYMDGTMSQV。由供应商用 HPLC 分析测定所有的肽都是同质的。水溶液按这样的方式制备以至于存在的最后的肽序列(三个 T 辅助和三个 CTL)比 polySPA 中含叠氮化物的单位轻微的化学计量过剩。加入抗坏血酸和铜金属粉末并在室温下搅拌浆液 14 小时 (Rostovtsev 等人 (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 114:2708)。在用离心将铜除去后, 上清液放在搅拌的细胞浓缩器中并用注射水进行浓缩稀释循环直到流出液的电导几乎为零。取等分试样冻干以测定大概的 polySPA 浓度。这种 polySPA 是图 5 中概图的特定实例。第二等分试样用鸡卵清溶菌酶彻底处理以特异性地除去 SPA 的多糖主链并显现出组成性二糖-肽组分。用 HPLC/电雾化质谱法和 HPLC/傅立叶变换质谱法测定这六种相关的二糖肽组分的精确组成和相对风度。polySPA 溶液的剩余部分用来在体内评估。

HLA-A2 转基因小鼠(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)用 polySPA 以三个剂量组($1\ \mu\text{g}$ 、 $10\ \mu\text{g}$ 和 $100\ \mu\text{g}$)进行免疫。每个剂量组在第 0、21 和 35 天在颈背进行皮下接种疫苗。在第 38 天, 用标准技术分析外周血以测定对任何或所有的目标表位特异的抗体效价。在第 39 天处死动物并收获引流淋巴结。来自淋巴结的 CD8⁺T 细胞(CTL)的活性用在肿瘤免疫实践中有经验的人员所熟悉的标准四聚体、 ^{51}Cr 释放和 Elispot 测定法进行测定。阳性结果是在任何或所有的测定中观测到比本底高的抗原特异性的 CTL 活性。

如在本实施例中阐明的那些癌睾丸抗原(CTA)在多种癌, 包括黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、乳癌和前列腺癌中表达(Scanlan 等人(2004) *Cancer Immun.* 4:1)。因而, 本实施例提供在肿瘤学临床设置中广泛应用的基础。刺激性 sPGN(包括本发明中 *monoSPA* 和 *polySPA*)自身在癌化疗中尤其可用作抗原递呈的自身佐剂平台, 因为刺激性 sPGN 能够通过 TLR2 传递信号并不依赖连接的表位, 能诱导从外周血单核细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 。公知 $\text{TNF-}\alpha$ 抑制未调节的黑素细胞增殖而不影响正常的细胞。 $\text{TNF-}\alpha$ 也作为血管发生的肿瘤特异性抑制剂: 它限制通过周围的上皮细胞的血液和氧供给而抑

制肿瘤的生长(Goldsby, Kindt, Osborne 和 Kuby; Immunology, 5th Edition; W. H. Freeman and Company, New York: 2003, pp. 216-217)。

所有文献在此引用作为参考。

本发明已经关于一个或多个实施方案进行了描述。但是，本领域技术人员显而易见的是，可以对本发明进行多种变型和修改而不背离在权利要求中定义的本发明的范围。

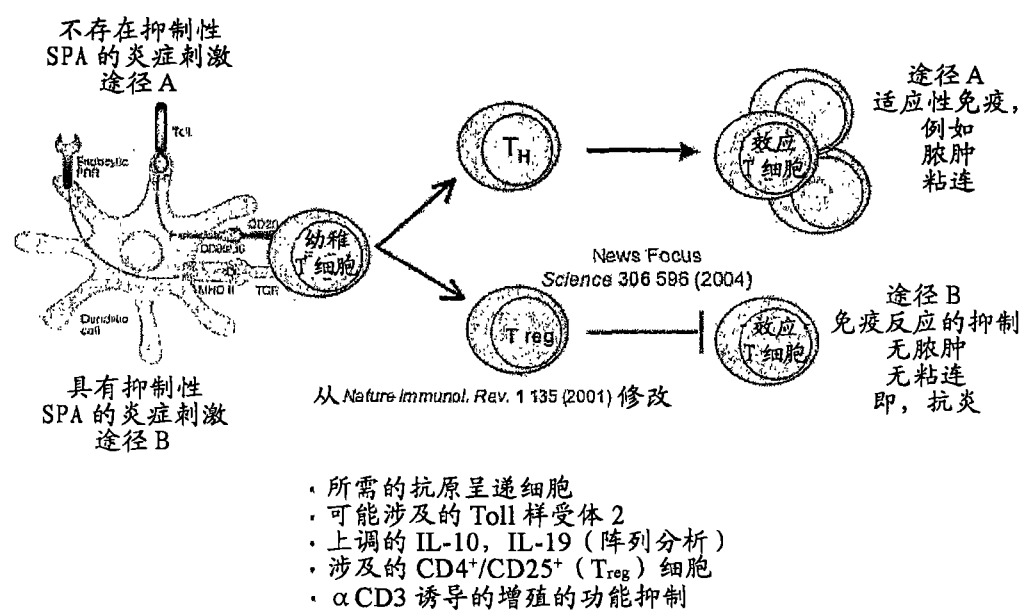


图 1

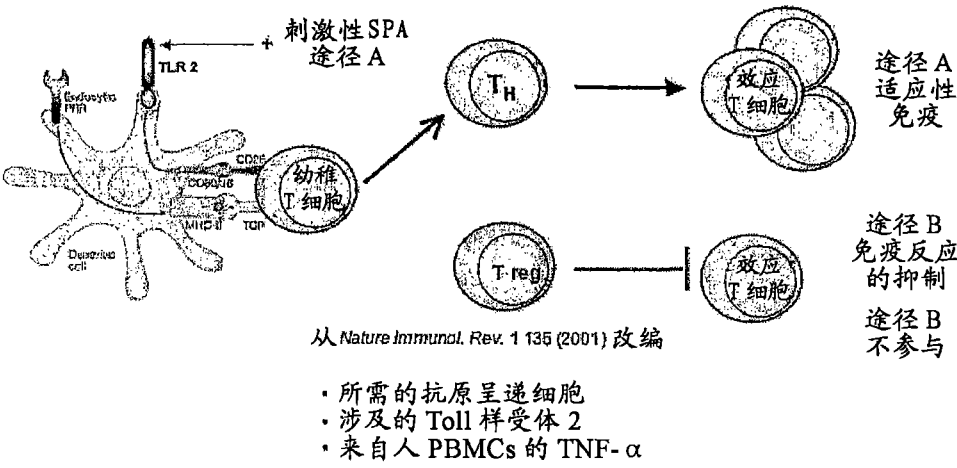


图 2

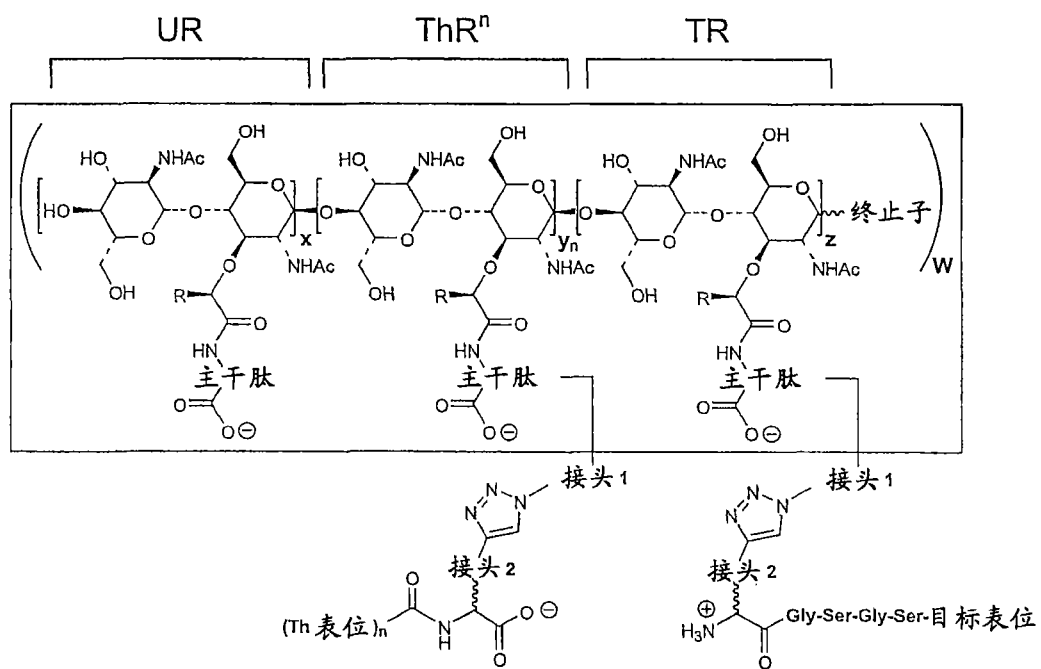


图 3

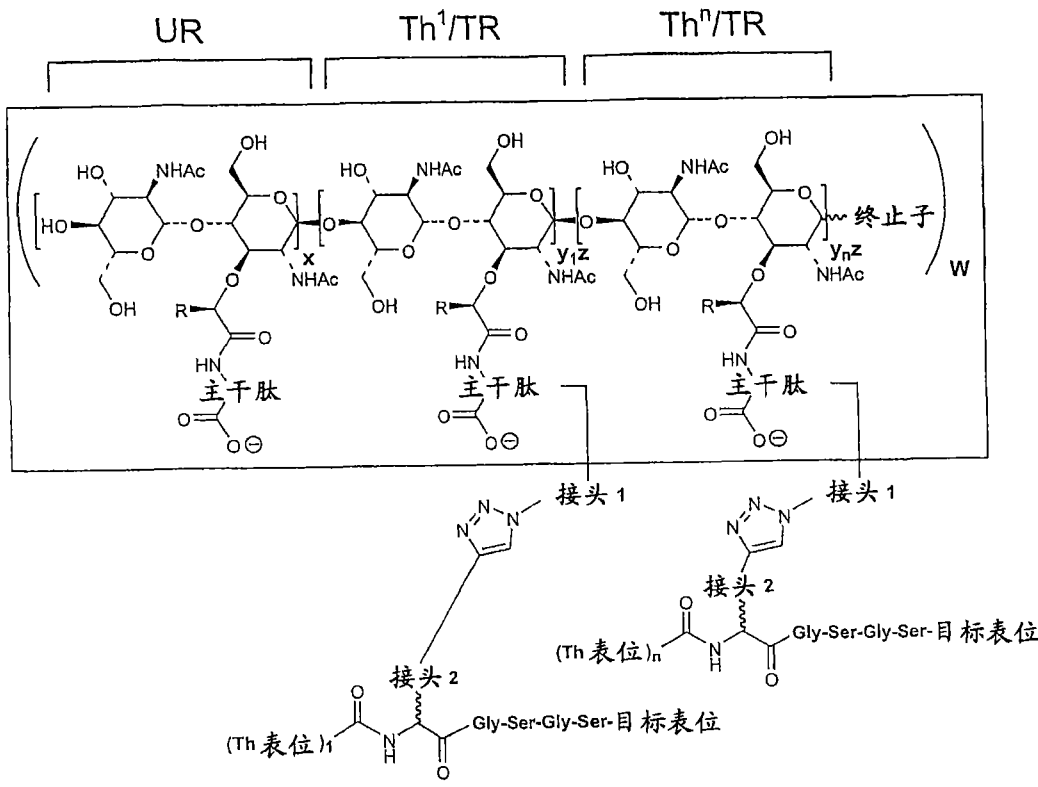


图 4

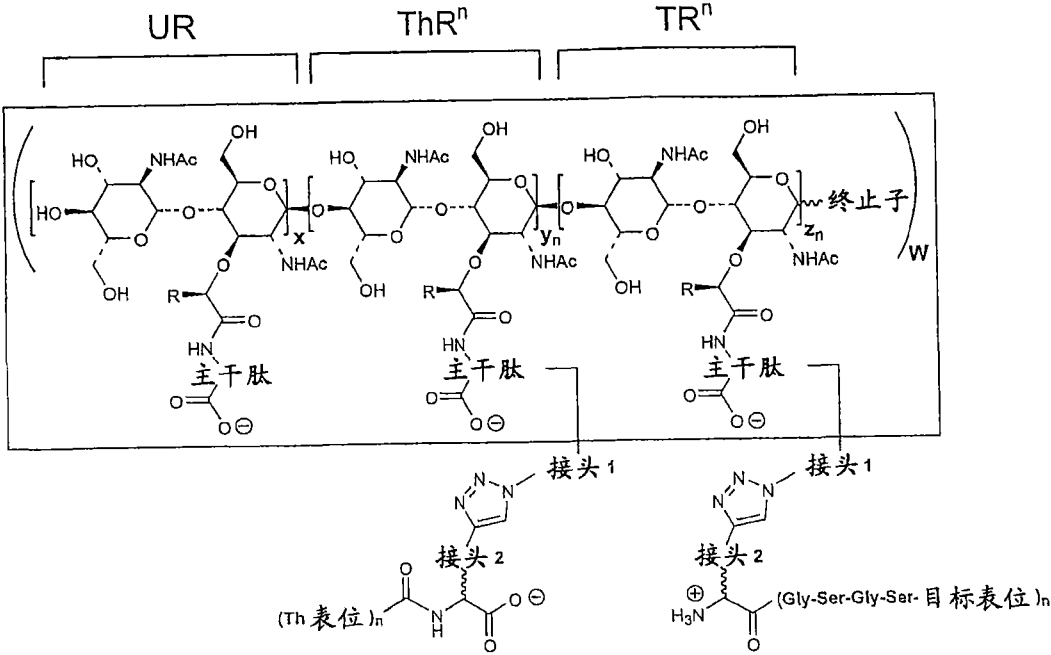


图 5

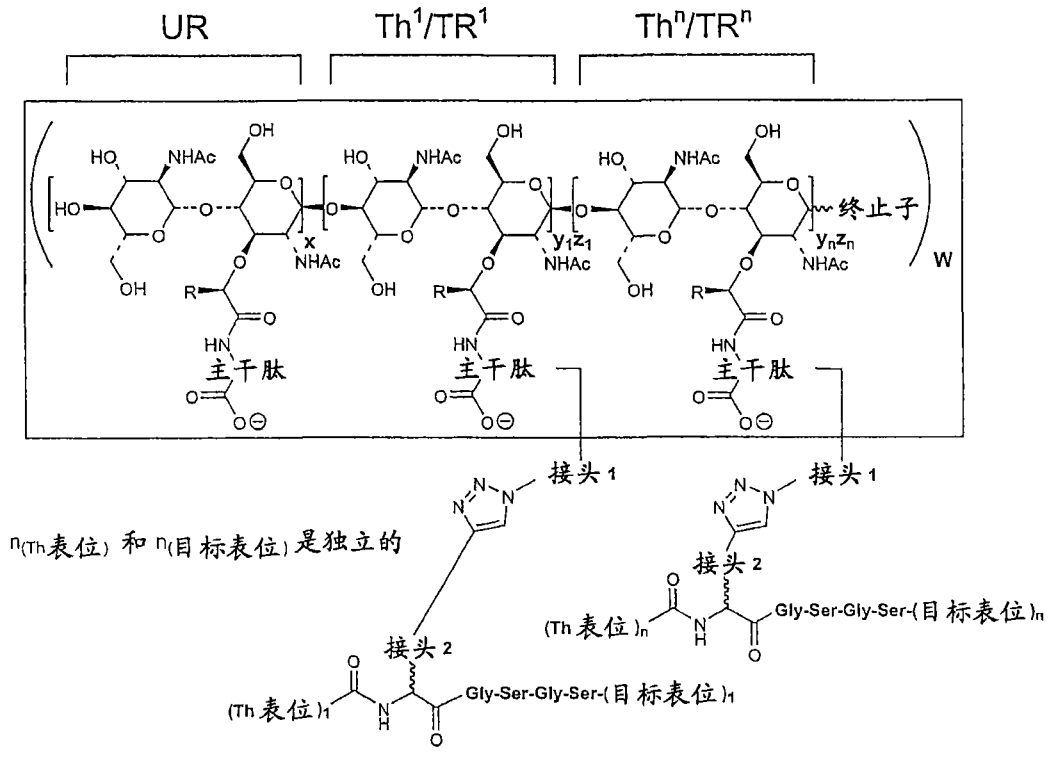


图 6

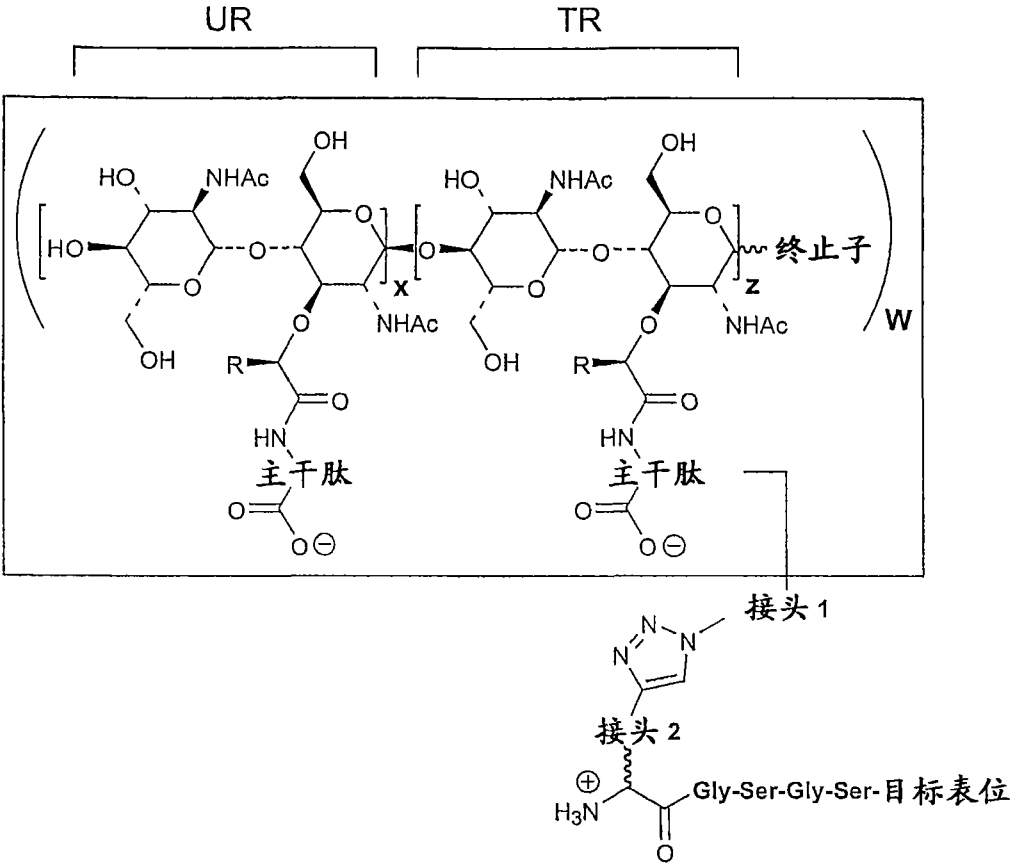


图 7

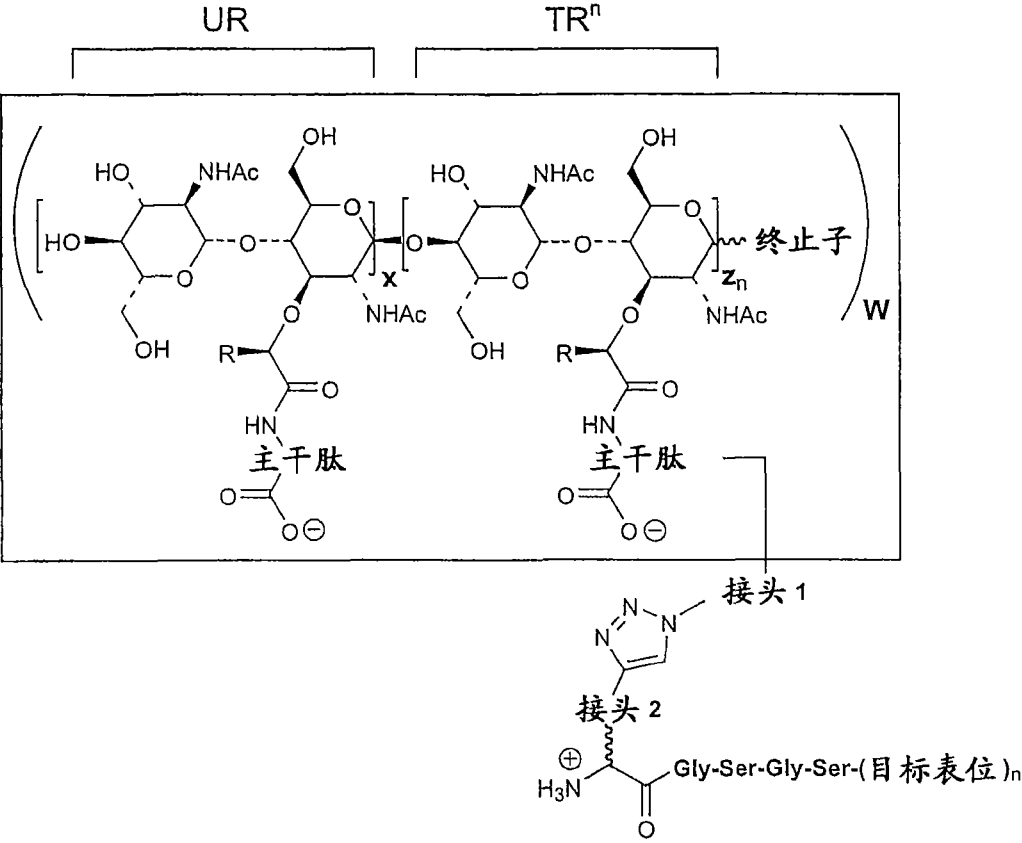


图 8