



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105008381 B

(45)授权公告日 2018.08.07

(21)申请号 201380065216.X

(22)申请日 2013.12.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105008381 A

(43)申请公布日 2015.10.28

(30)优先权数据

61/737,006 2012.12.13 US

61/790,514 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.06.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/075189 2013.12.13

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/093936 EN 2014.06.19

(73)专利权人 艾杜罗生物科技公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 T·W·小杜本斯基 D·B·肯奈
M·L·L·梁 E·E·莱门斯
L·H·格利克曼

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

代理人 孟锐

(51)Int.Cl.

C07H 21/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

审查员 姚旻

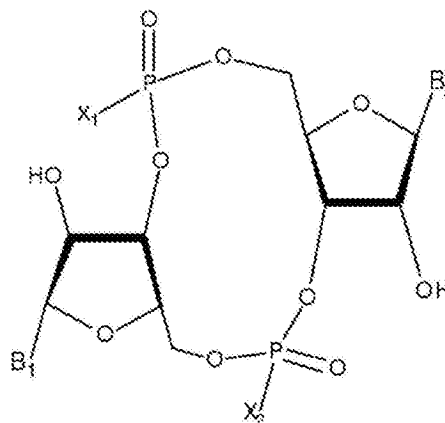
权利要求书1页 说明书51页 附图15页

(54)发明名称

包含具有确定立体化学的环嘌呤二核苷酸的组合物及其制备和使用方法

(57)摘要

本发明的目的是提供通过最新发现的称为STING(干扰素基因刺激剂)的胞质受体激活DC的新型和高活性的环二核苷酸(CDN)免疫刺激剂。具体地,本发明的CDN以包含一种或多种诱导STING依赖性TBK1激活的环嘌呤二核苷酸的组合物形式提供,其中存在于该组合物中的环嘌呤二核苷酸是基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp立体异构体,且具体是基本上纯的Rp,Rp或RpSp CDN硫代磷酸盐非对映体。



$X_1 = X_2 = O$,

$X_1 = X_2 = S$,

或 $X_1 = O, X_2 = S$

1. 下述组合物在制造用于诱导个体中针对癌症的免疫应答或诱导个体中针对病原体的免疫应答的制剂中的用途,所述组合物包含:

一种或多种环嘌呤二核苷酸或其药学上可接受的盐,其诱导STING依赖性TBK1激活,其中存在于所述组合物中的所述环嘌呤二核苷酸是至少75%纯的Rp,Rp非对映体的环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐,或其药学上可接受的盐,其中所述一种或多种环嘌呤二核苷酸的任一或两个核糖部分的2'-OH取代基被选自氟、氯、溴和碘的取代基替换。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述组合物包含灭活的肿瘤细胞或与所述个体的癌症类型相匹配的不同肿瘤细胞的混合物。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述肿瘤细胞选自结肠直肠癌细胞、呼吸消化鳞状癌细胞、肺癌细胞、脑癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞、肉瘤细胞、白血病细胞、淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、卵巢癌细胞、子宫癌细胞、乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞和肾癌细胞。

4. 一种或多种环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐在制造用于诱导个体中STING依赖性TBK1激活的制剂中的用途,所述一种或多种环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐结合至需要其的个体中的STING,其中存在于所述制剂中的所述环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐是至少75%纯的Rp,Rp非对映体,其中所述一种或多种环嘌呤二核苷酸的任一或两个核糖部分的2'-OH取代基被选自氟、氯、溴和碘的取代基替换。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐与一种或多种脂质一起配制。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述一种或多种脂质包含洋地黄皂苷。

7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述一种或多种脂质形成脂质体。

8. 根据权利要求4所述的用途,其中所述环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐与一种或多种佐剂一起配制。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述一种或多种佐剂包括CpG和/或单磷酰脂质A。

10. 根据权利要求4所述的用途,其中所述制剂还包括一种或多种疫苗,所述疫苗包括选择用于刺激针对表达一种或多种抗原的病原体的免疫应答的一种或多种抗原。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述疫苗包含灭活的或减毒的细菌或病毒,所述细菌或病毒包含所述目标抗原、纯化的抗原、重组工程化以表达和/或分泌所述抗原的活病毒或细菌递送载体、包含装载所述抗原或用包含编码所述抗原的核酸的组合物转染的细胞的抗原呈递细胞(APC)载体、包含抗原的脂质体递送载体或编码所述抗原的裸核酸载体。

12. 根据权利要求4所述的用途,其中所述一种或多种环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐被配制成纳米颗粒。

包含具有确定立体化学的环嘌呤二核苷酸的组合物及其制备和使用方法

[0001] 本申请要求于2012年12月13日提交的美国临时申请61/737,006和于2013年3月15日提交的美国临时申请61/790,514的优先权,每一篇申请的内容通过引用整体(包括表、图和权利要求)并入本文。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明背景的下列讨论仅被提供以帮助读者理解本发明,并且不容许描述或构成本发明的现有技术。

[0004] 人免疫系统通常可分为两类武器,称为“先天性免疫”和“适应性免疫”。免疫系统的先天性武器主要负责通过许多可溶性因子(包括补体系统和趋化因子/细胞因子系统);和许多专门的细胞类型(包括肥大细胞、巨噬细胞、树突细胞(DC)和自然杀伤细胞)的最初炎性应答。与此相反,适应性免疫武器涉及在对抗原的免疫记忆中发挥关键作用的延迟的和更持久的抗体应答以及CD8+和CD4+T细胞应答。免疫系统的第三类武器可以被识别为涉及 $\gamma\delta$ T细胞和具有受限的T细胞受体库(repertoire)的T细胞,诸如NKT细胞和MAIT细胞。

[0005] 对于针对抗原的有效免疫应答,抗原呈递细胞(APC)必须处理抗原并在适当的MHC情况下将抗原展示给T细胞,然后将导致细胞毒性和辅助性T细胞的T细胞刺激。抗原呈递成功后,在APC和T细胞两者上共刺激分子的相互作用必须发生或者激活将被中止。GM-CSF和IL-12在许多肿瘤模型中作为有效的促炎分子。例如,GM-CSF诱导髓前体细胞增殖并分化成树突细胞(DC),尽管其它信号在激活它们成熟成为T细胞激活所必需的有效抗原呈递细胞中是必需的。有效免疫治疗的障碍包括对可以限制适当大小和功能的细胞毒性CD8T细胞的诱导的靶抗原耐受、产生的T细胞到恶性细胞位点的较差运输以及诱导的T细胞应答的较差持久性。

[0006] 吞噬肿瘤细胞碎片的DC处理材料用于主要组织相容性复合体(MHC)呈递、上调共刺激分子的表达并且迁移至局部淋巴结以刺激肿瘤特异性淋巴细胞。这一途径导致对肿瘤相关抗原作出反应的CD4+和CD8+T细胞的增殖和激活。事实上,此类细胞可以经常在血液、淋巴组织以及患者恶性病变中检测。

[0007] 对于成为免疫逃避基础的机制的新观点,连同直接或间接地通过与免疫关卡抑制剂(immune checkpoint inhibitor)或其它治疗联合来加强治疗性免疫接种的效力的组合治疗方案,已经作为开发诱导有效抗肿瘤免疫的疫苗的基础。CDN环di-AMP(由单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)产生)及其类似物环di-GMP(由嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)产生)被宿主细胞识别为PAMP(病原体相关分子模式),其结合到被称为STING的PRR(病原体识别受体)。STING是在宿主哺乳动物细胞的胞质中的衔接蛋白,其激活TANK结合激酶(TBK1)-IRF3信号传导轴,结果诱导强烈激活先天性免疫的IFN- β 和其它IRF-3依赖性基因产物。已认识到,STING是宿主胞质监测途径的组成部分,其感测与细胞内病原体的感染,并且与之相应诱导产生IFN- β ,导致形成由抗原特异性CD4和CD8T细胞以及病原体特异性抗体组成的自适应保护病原体特异性免疫应答。环嘌呤二核苷酸的实例在例如美国专利号7,709,458和7,592,326;WO2007/054279;和Yan等,Bioorg.Med.Chem

Lett.18:5631 (2008) 中详细描述,其每一个在此通过引用并入本文。

[0008] 仍然需要用于免疫策略的改进的组合物和方法以治疗可能难以用传统治疗方法治疗的疾病(诸如癌症)。

发明概要

[0009] 本发明的目的是提供通过最新发现的称为STING(干扰素基因刺激剂)的胞质受体激活DC的新型和高活性的环二核苷酸(CDN)免疫刺激剂。具体地,本发明的CDN以包含一种或多种诱导STING依赖性TBK1激活的环嘌呤二核苷酸的组合物形式提供,其中存在于该组合物中的环嘌呤二核苷酸是基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp立体异构体,且具体是基本上纯的Rp,Rp或RpSp CDN硫代磷酸盐非对映体。

[0010] 在第一方面,本发明提供包含一种或多种环嘌呤二核苷酸的组合物,其中存在于该组合物中的环嘌呤二核苷酸是基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp非对映体,或其前药或药学上可接受的盐。这些诱发STING依赖性TBK1激活的组合物可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂,并且可如本文所述用作佐剂。特别优选的是如下文所述的环嘌呤二核苷酸的硫代磷酸盐衍生物。

[0011] 在其作为佐剂的作用中,在某些实施方案中,本发明的组合物可在采用疫苗的治疗性或预防性策略中用作佐剂。因此,基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp非对映体,或其前药或药学上可接受的盐,可与所选的一种或多种疫苗一起使用,以刺激对一种或多种预定抗原的免疫应答。本发明的基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp非对映体,或其前药或药学上可接受的盐,可与此类疫苗一起提供,或除了此类疫苗之外提供。

[0012] 此类疫苗可包含灭活的或减毒的细菌或病毒,所述细菌或病毒包含目标抗原、纯化的抗原、重组工程化以表达和/或分泌抗原的活病毒或细菌递送载体、包含装载抗原或转染包含编码抗原的核酸的组合物细胞的抗原呈递细胞(APC)载体、脂质体抗原递送载体或编码抗原的裸核酸载体。这个列举并不意味着是限制性的。以举例的方式,此类疫苗还可包含表达和分泌一种或多种GM-CSF、CCL20、CCL3、IL-12p70、FLT-3配体的灭活的肿瘤细胞。

[0013] 本发明的组合物可通过多种胃肠外和非注射途径以含有药学上可接受的载体、佐剂和媒介物的制剂来施用于有此需要的个体。优选的路径是胃肠外,且包括但不限于皮下、静脉内、肌内、动脉内、皮内、鞘内和硬膜外施用的一种或多种。特别优选的是通过皮下施用来施用。优选的药物组合物被配制成水性或水包油乳液。

[0014] 本发明的组合物可包含以下或可与以下一起施用:一种或多种另外的药学活性成分

[0015] 诸如佐剂、脂质诸如洋地黄皂苷、脂质体、CTLA-4和PD-1途径拮抗剂、PD-1途径阻断剂、诱导先天性免疫的灭活的细菌(例如,灭活的或减毒的单核细胞增生李斯特菌)、通过Toll样受体(TLR)、(NOD)样受体(NLR)、基于视黄酸可诱导的基因的(RIG)-I样受体(RLR)、C型凝集素受体(CLR)、病原体相关分子模式("PAMP")来介导先天性免疫激活的组合物、化疗剂等。

[0016] 如下文所述,与一种或多种脂质一起配制的环嘌呤二核苷酸可表现出改进的特性,包括改进的树突细胞激活活性。因此,本发明还涉及包含一种或多种CDN和一种或多种脂质的组合物。在某些优选的实施方案中,一种或多种CDN与洋地黄皂苷、脂质体制剂和/或

水包油乳剂一起配制。根据权利要求1-5中任一项所述的组合物,其还包含一种或多种CTLA-4拮抗剂和TLR-4激动剂。

[0017] 在优选的实施方案中,一种或多种环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐包含选自c-di-AMP硫代磷酸盐、c-di-GMP硫代磷酸盐、c-di-IMP硫代磷酸盐、c-AMP-GMP硫代磷酸盐、c-AMP-IMP硫代磷酸盐和c-GMP-IMP硫代磷酸盐或其组合的基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp硫代磷酸盐非对映体,包括其前药和药学上可接受的盐。

[0018] 在相关的方面,本发明涉及诱导、刺激或辅助个体中的免疫应答的方法。这些方法包括向个体施用包含一种或多种环嘌呤二核苷酸的组合物,其中存在于该组合物中的环嘌呤二核苷酸硫代磷酸盐是对个体基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp非对映体,或其前药或药学上可接受的盐。优选的施用途是胃肠外。如上所述,特别优选的是此类环嘌呤二核苷酸的硫代磷酸盐衍生物。

[0019] 在某些实施方案中,所述方法是癌症治疗方法。以举例的方式,本发明的基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp非对映体,或其前药或药学上可接受的盐,可与本领域已知的一种或多种癌症疫苗组合物一起提供,或除了本领域已知的一种或多种癌症疫苗组合物之外而提供。接受此类治疗的患者可患有选自以下的癌症:结肠直肠癌细胞、呼吸消化鳞状癌(aerodigestive squamous cancer)、肺癌、脑癌、肝癌、胃癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、子宫癌、乳腺癌、黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌和肾癌。在其它实施方案中,所述方法是诱导、刺激或辅助免疫应答病原体的方法。

[0020] 在其它相关方面,本发明涉及诱导个体中STING依赖性TBK1激活的方法,所述方法包括给个体施用与STING结合的一种或多种环嘌呤二核苷酸,其中存在于该组合物中的环嘌呤二核苷酸是对个体基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp非对映体,或其前药或药学上可接受的盐。优选的施用途是胃肠外。如上所述,特别优选的是此类环嘌呤二核苷酸的硫代磷酸盐衍生物。

[0021] 本文所述的方法可包括在施用于哺乳动物的初级治疗之前或之后,给哺乳动物施用有效量的本发明的基本上纯的CDN或其前药或药学上可接受的盐,以除去或杀死表达癌症抗原的癌细胞。可提供本发明的组合物作为新的辅助治疗;然而在优选的实施方案中,本发明的组合物在初级治疗之后施用。在各种实施方案中,初级治疗包括从哺乳动物除去癌细胞的手术、杀死哺乳动物中癌细胞的放射治疗或手术和放射治疗二者结合。

[0022] 在其它实施方案中,本文所述的方法可包括给哺乳动物施用有效量的本发明的基本上纯的CDN用于病症的治疗,在病症的治疗中Th1向Th2免疫的转移赋予临床益处。细胞介导的免疫(CMI)与产生细胞因子IL-2、干扰素(IFN)- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的TH1CD4+T淋巴细胞有关。与此相反,体液免疫与产生IL-4、IL-6和IL-10的TH2CD4+T淋巴细胞有关。针对Th1应答的免疫偏离通常产生细胞毒性T细胞淋巴细胞(CTL)、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和单核细胞的激活。一般而言,Th1应答针对细胞内病原体(宿主细胞内的病毒和细菌)和肿瘤更有效,而Th2应答针对细胞外细菌、寄生虫(包括蠕虫)和毒素更有效。此外,先天性免疫的激活预期使辅助性T细胞类型1和2(Th1/Th2)免疫系统平衡标准化,并抑制引起免疫球蛋白(Ig)E-依赖性过敏和过敏性哮喘的Th2型应答的过度反应。

[0023] 附图简述

[0024] 图1描绘CDN的一般结构。

[0025] 图2描绘c-di-GMP (化合物11A) 和c-di-AMP (化合物10A) 的结构。

[0026] 图3描绘Rp,Rp-c-di-GMP-硫代磷酸盐 (化合物11B) 和Rp,Rp-c-di-AMP-硫代磷酸盐 (化合物10B) 的结构。

[0027] 图4描绘Rp,Sp-c-di-GMP-硫代磷酸盐 (化合物11C) 和Rp,Sp-c-di-AMP-硫代磷酸盐 (化合物10C) 的结构。

[0028] 图5描绘Sp,Sp-c-di-GMP-硫代磷酸盐和Sp,Sp-c-di-AMP-硫代磷酸盐的结构。

[0029] 图6描绘c-di-AMP和c-di-AMP-硫代磷酸盐的合成方案。

[0030] 图7描绘抗原呈递细胞中通过相应的二硫代衍生物分子的母体CDN和非对映体的IFN- β 诱导。

[0031] 图8描绘在用蛇毒磷酸二酯酶治疗后抗原呈递细胞中通过CDN非对映体的IFN- β 诱导。

[0032] 图9描绘在疫苗接种与CDN治疗结合后的第10天测量的PBMC中OVA特异性的CD4和CD8T细胞应答。

[0033] 图10描绘在疫苗接种与CDN治疗结合后在PBMC中测量的SIVgag特异性的CD4和CD8T细胞应答。

[0034] 图11描绘在李斯特菌-OVA挑战小鼠模型中通过CDN诱导的保护。

[0035] 图12描绘在小鼠前列腺癌模型中通过与GVAX一起配制的CDN诱导的抗肿瘤功效。

[0036] 图13描绘本发明的CDN的2'-O-取代基前药类似物。

[0037] 图14描绘本发明的CDN的O-或S-取代基前药类似物的合成。

[0038] 图15描绘在施用c-di-GMP的单-2'-O-肉豆蔻酰基c-di-GMP前药形式后在人单核细胞系中的IFN- β 诱导。

[0039] 图16描绘在用c-di-GMP的单-2'-O-肉豆蔻酰基c-di-GMP前药形式进行疫苗接种后OVA特异性的CD8T细胞应答。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明涉及通过最新发现的称为STING (干扰素基因刺激剂) 的细胞质受体激活DC的新型和高活性的环二核苷酸 (CDN) 免疫刺激剂的用途。具体地, 本发明的CDN以包含一种或多种诱导STING依赖性TBK1激活的环嘌呤二核苷酸的组合物形式提供, 其中存在于该组合物中的环嘌呤二核苷酸是基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp立体异构体, 且具体是基本上纯的Rp,Rp或RpSp CDN硫代磷酸盐非对映体。

[0042] 针对佐剂的设计和发展的最新观点依据的基本理解是称为病原体相关分子模式 (PAMP) 的保守的微生物结构是由宿主细胞模式识别受体 (PRR) 感测, 引发产生诱导细胞因子和趋化因子的下游信号级联放大, 并启动特异性的适应性免疫应答。微生物的PAMP补体如何参与先天性免疫系统形成了适应性应答, 该适应性应答适于对抗入侵的病原体引起疾病。佐剂设计的目的是选择对指定的PRR具有特异性的所定义的PAMP或合成分子以启动期望的应答。诸如单磷酸脂质A (MPL) 和CpG的佐剂是由Toll样受体 (TLR) 识别的PAMP, 该Toll样受体是通过MyD88和Trif衔接分子发出信号并介导NF- κ B依赖性促炎性细胞因子的诱导的一类跨膜PRR。MPL (TLR-4激动剂) 和CpG (TLR-9激动剂) 是临床上先进的佐剂, 并且是被FDA批准或待批准的疫苗成分。尽管存在于细胞表面上的TLR (例如, TLR-4) 和胞内体 (例如, CpG) 感测细胞外和空泡病原体, 但包括病毒和细胞内细菌的多种病原体的繁殖性生长周期

发生在细胞质中。细胞外、空泡和细胞质PRR的区室化已导致通过监测细胞质来区别致病性和非致病性微生物之间的先天性免疫系统的假设。对本领域技术人员应该是显而易见的是对PRR特异性的激动剂包含胞质监测途径,引发针对细胞内病原体的保护性免疫的发展,并且与疫苗设计相关。这些相同的靶向配体也将在形成靶向恶性肿瘤的有效疫苗中至关重要,已知需要肿瘤特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0043] 胞质监测途径(CSP)的激活在形成针对细胞内病原体的保护性免疫中是不可或缺的。CSP检测细菌、病毒和原生动物病原体,导致TANK结合激酶(TBK-1)/IRF-3信号传导轴的激活和IFN- β 和其它共同被调节的基因的诱导。病毒和细菌核酸均激活此途径,并且IFN- β 的诱导是不依赖MyD88和Trif的。尽管I型干扰素通常被认为是主要作为宿主抗病毒应答,但IFN- β 的诱导是在感染了细胞内细菌,单核细胞增生李斯特菌(Lm)的巨噬细胞中胞质生长的标记。在小鼠李斯特菌模型中的著名的二分法是,在野生型Lm引发保护小鼠免受细菌挑战的强烈的CD4和CD8T细胞免疫时,用李斯特菌溶血素O(LL0)-缺失的Lm免疫接种不引起功能性T细胞或诱导保护性免疫。这种差别是需要表达宿主细胞基因和通过Lm的胞质访问以引起功能性T细胞介导的保护性免疫的证据。在感染的宿主细胞中IFN- β 的水平受到分泌结构上不相关的小分子(包括抗生素)的Lm多药流出泵(MDR)的调节。IFN- β 在感染了限于吞噬溶酶体的Lm LL0突变体的宿主细胞中未被诱导。在所有TLR介导的信号传导有缺陷的感染的MyD88^{-/-}Trif^{-/-}巨噬细胞中诱导IFN- β 的正常水平。这些数据表明,尽管Lm参与TLR(对感染野生型Lm作出应答),但需要宿主细胞CSP以形成与诱导IFN- β 相关的保护性免疫。

[0044] 如本文所用的术语“环二核苷酸”(“CDN”)是指在两个嘌呤核苷酸之间包含2'-5'和/或3'-5'磷酸二酯键的一类分子。这包括2'-5'-2', 5', 2'-5'-3' 5'和3', 5'-3', 5'键。CDN通过使两种胞质PRR,DDX41与STING直接结合来激活胞质监测途径。作为对感染Lm和其它细胞内细菌的应答的I型干扰素来源于c-di-AMP或其相关的环二核苷酸(CDN)c-di-GMP的分泌、及其与DDX41和DEAD(天冬氨酸-谷氨酸-丙氨酸-天冬氨酸)盒解螺旋酶和STING(干扰素基因刺激剂)的直接结合,这是一种最近确定的胞质监测途径的受体。CDN是由大多数细菌表达的第二信使并调节不同过程,包括运动性和生物膜的形成。CDN以高亲和力结合至DDX41,并与STING衔接蛋白形成复合物,导致TBK1/IRF3信号传导途径的激活,并诱导强烈激活先天性免疫的IFN- β 和其它IRF-3依赖性基因产物。

[0045] 天然CDN分子对通过存在于宿主细胞中的磷酸二酯酶的降解敏感,所述宿主细胞例如摄取含有所述天然CDN分子的疫苗制剂的抗原呈递细胞。定义的佐剂的效力可通过此类降解而减少,因为所述佐剂将不能结合并激活其定义的PRR靶标。例如通过较低数量的先天性免疫的标记分子(例如,IFN- β)诱导的表达可以测量更低的佐剂效力,所述标记分子与弱的疫苗效力相关,如通过测得的抗原特异性免疫应答的数量级所定义。

[0046] 在本发明中,提供c-di-AMP和c-di-GMP的二硫代二磷酸盐衍生物。对c-di-AMP和c-di-GMP分子的所述二硫代二磷酸盐衍生物的合成过程导致非对映体的混合物,包括c-di-AMP和c-di-GMP分子的Rp,Rp,Sp,Sp和Rp,Sp二硫代二磷酸盐衍生物。先前已经表明,所述含有c-di-GMP的Rp,Rp和Rp,Sp二硫代二磷酸盐衍生物的非对映体混合物当通过鼻内途径施用于小鼠时招募并激活炎性细胞进入支气管肺泡空间。然而,没有证据表明,此类c-di-GMP的二硫代二磷酸盐衍生物提供与母体c-di-GMP分子相比关于刺激免疫应答的任何优点,并且事实上,此类c-di-GMP二硫代二磷酸盐制剂仅具有与母体c-di-GMP分子相比类

似或较弱的效力。

[0047] 定义

[0048] 如本文所用关于人类、哺乳动物、哺乳动物类受试者、动物、兽医受试者、安慰剂受试者、研究对象、实验对象、细胞、组织、器官或生物流体的“施用”，是指但不限于给受试者、细胞、组织、器官或生物流体等接触外源配体、试剂、安慰剂、小分子、药剂、治疗剂、诊断剂或组合物。“施用”可指例如治疗剂、药代动力学、诊断学、研究、安慰剂和实验方法。细胞治疗包括使试剂与细胞接触，以及使试剂与流体接触，其中所述流体与所述细胞接触。“施用”还包括细胞的体外和离体治疗，例如通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞。“一起施用”不旨在表示两种或更多种试剂作为单一组合物而施用。虽然作为单一组合物的施用涵盖在本发明中，但此类试剂可以作为可在相同或不同时间并且可以通过相同施用途径或不同施用途径的单独施用而递送至单个受试者。

[0049] “激动剂”（因为它涉及配体和受体）包括刺激受体的分子、分子组合、复合物或试剂组合。例如，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）的激动剂可包括GM-CSF、GM-CSF的突变蛋白或衍生物、GM-CSF的肽模拟物、模仿GM-CSF的生物学功能的小分子或刺激GM-CSF受体的抗体。

[0050] “拮抗剂”（因为它涉及配体和受体）包括抑制、抵消、下调受体和/或使受体脱敏的分子、分子组合或复合物。“拮抗剂”包括抑制受体的组成型活性的任何试剂。组成型活性是在不存在配体/受体相互作用下显示的活性。“拮抗剂”还包括抑制或防止受体的刺激（或调节）活性的任何试剂。以举例的方式，GM-CSF受体的拮抗剂包括（并不意味着任何限制）结合至配体（GM-CSF）并防止其与受体结合的抗体，或结合至受体并防止配体与受体结合的抗体，或者其中抗体以无活性构象锁定受体。

[0051] 如本文所用提及肽、多肽或蛋白质的“类似物”或“衍生物”是指具有与最初的肽、多肽或蛋白质相似或相同的功能，但并不必然包括与最初的肽、多肽或蛋白质类似或相同的氨基酸序列或结构的另一种肽、多肽或蛋白质。类似物优先满足以下至少一者：(a) 具有与最初氨基酸序列至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同的氨基酸序列的蛋白质性质的剂；(b) 由在严格条件下与编码最初氨基酸序列的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码的蛋白质性质的剂；和(c) 由与编码最初氨基酸序列的核苷酸序列至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同的核苷酸序列编码的蛋白质性质的剂。

[0052] “抗原呈递细胞”（APC）是用于将抗原呈递给T细胞的免疫系统细胞。APC包括树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、边缘区Kupffer细胞、小神经胶质细胞、朗格汉斯（Langerhans）细胞、T细胞和B细胞。树突细胞至少发生在两个谱系中。第一谱系包括前体DC1、骨髓DC1和成熟DC1。第二谱系包括CD34⁺CD45RA⁻早期祖多能细胞、CD34⁺CD45RA⁺细胞、CD34⁺CD45RA⁺CD4⁺IL-3Rα⁺促DC2细胞、CD4⁺CD11c⁻类浆细胞前体DC2细胞、淋巴样人类DC2类浆细胞衍生的DC2和成熟DC2。

[0053] “减毒”和“减毒的”包括被改性以降低对宿主毒性的细菌、病毒、寄生虫、传染性生物体、朊病毒、肿瘤细胞、传染性生物体中的基因等。宿主可以是人或动物宿主、或器官、组

织或细胞。为给出非限制性实例,细菌可以被减毒以减少与宿主细胞的结合,减少从一个宿主细胞到另一个宿主细胞的传播,减少细胞外生长,或减少在宿主细胞中的细胞内生长。减毒可以通过测量例如毒性的标志或指标、LD₅₀、器官清除率或竞争性指标来评估(参见,例如,Auerbuch等(2001) *Infect. Immunity* 69:5953-5957)。通常,减毒引起LD₅₀增加和/或清除率增加至少25%;更通常至少50%;最通常至少100% (2-倍);一般至少5-倍;更一般至少10-倍;最一般至少50-倍;经常至少100-倍;更经常至少500-倍;且最经常至少1000-倍;普遍至少5000-倍;更普遍至少10,000-倍;且最普遍至少50,000-倍;且最经常至少100,000-倍。

[0054] “纯化的”和“分离的”是指指定的物质在存在于组合物的物质中占至少50%,更经常占至少60%,典型占至少70%,更典型占至少75%,最典型占至少80%,通常占至少85%,更通常占至少90%,最通常占至少95%,且惯例占至少98% (重量),或更多。水、缓冲剂、盐、去垢剂、还原剂、蛋白酶抑制剂、稳定剂(包括加入的蛋白质诸如白蛋白)和赋形剂的重量一般不用于纯度测定。

[0055] 当指配体/受体、核酸/互补核酸、抗体/抗原或其它结合对(例如,细胞因子对细胞因子受体)(各自通常在本文中称为“靶生物分子”或“靶标”)时,“特异性地”或“选择性地”结合表示与蛋白质和其它生物制剂的异质群体中存在靶标有关的结合反应。特异性结合可意指例如,与非靶标分子的亲和力相比,所预期方法的来源于抗体的抗原结合位点的结合化合物、核酸配体、抗体或结合组合物以经常至少25%以上,更经常至少50%以上,最经常至少100% (2-倍)以上,一般至少10倍以上,更一般至少20倍以上,并且最一般至少100倍以上的亲和力结合至其靶标。

[0056] “配体”是指与靶生物分子结合的小分子、核酸、肽、多肽、糖、多糖、聚糖、糖蛋白、糖脂或其组合。尽管此类配体可以是受体的激动剂或拮抗剂,但配体还包括不是激动剂或拮抗剂的结合剂,并且不具有激动剂或拮抗剂特性。配体与其同源靶标的特异性结合经常表达为术语“亲和力”。在优选的实施方案中,本发明的配体的结合力在约 10^4M^{-1} 和约 10^8M^{-1} 之间。亲和力计算为 $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} 是解离率常数, k_{on} 是结合率常数,并且 K_d 是平衡常数)。

[0057] 可以通过在平衡时测量各种浓度(c)下所标记配体的结合的级分(r)来测定亲和力。使用Scatchard方程绘制数据: $r/c = K(n-r)$;其中 r =平衡状态下结合的配体的摩尔数/受体的摩尔数; c =平衡状态下游离配体浓度; K =平衡结合常数;且 n =每个受体分子的配体结合位点的数目。通过图形分析, r/c 绘制在Y轴而 r 在X轴,从而产生Scatchard图。通过Scatchard分析的亲和力测量是本领域公知的。参见,例如,van Erp等, *J. Immunoassay* 12: 425-43, 1991; Nelson和Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27:65-8, 1988。在替代方案中,亲和力可以通过等温滴定量热法(ITC)进行测量。在典型的ITC实验中,将配体的溶液滴定到其同源靶标的溶液中。随时间监测其相互作用释放的热量(ΔH)。随着连续量的配体滴定到ITC细胞中,吸收或释放的热量与结合量成正比。随着系统达到饱和,加热信号减少直到仅观察到稀释热量。然后从针对细胞中配体与结合伴侣的比率的每次注射的热量图获得结合曲线。用适当的结合模型来分析结合曲线以确定 K_B 、 n 和 ΔH 。式中 $K_B = 1/K_d$ 。

[0058] 如本文所用,术语“受试者”是指人类或非人类生物体。因此,本文所述的方法和组合物适用于人类和兽医疾病二者。在某些实施方案中,受试者是“患者”,即正在接受疾病或病状治疗的活人。这包括正在接受病理体征调查而不具有所定义疾病的人。优选的是已经

诊断患有正被本发明的组合物和方法靶向的特定癌症的受试者。用本文所述的组合物治疗的优选癌症包括但不限于前列腺癌、肾癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、头颈癌、肺癌和乳腺癌。

[0059] “治疗有效量”被定义为足以显示出患者益处(即导致所治疗病状的症状减少、预防或改善)的试剂或药物组合物的量。当试剂或药物组合物包含诊断剂时,“诊断有效量”被定义为足以产生信号、图像或其它诊断参数的量。药物制剂的有效量将根据诸如个体的易感程度、个体的年龄、性别和体重以及个体的特异体质应答的因素而变化。“有效量”包括但不限于可以改善、逆转、减轻、预防或诊断医学病状或病症或其致病过程的症状或迹象的量。除非明确地或通过上下文另有规定,否则“有效量”并不限于足以改善病症的最小量。

[0060] “治疗(Treatment)”或“治疗(treating)”(关于病状或疾病)是获得有益的或期望的结果(包括并优选临床结果)的方法。对于本发明的目的,关于疾病的有益的或期望的结果包括但不限于以下中的一种或多种:预防疾病、改善与疾病相关的病状、治愈疾病、减轻疾病严重程度、延缓疾病进展、缓解与疾病相关的一种或多种症状、提高患有疾病的人的生活质量和/或延长存活。另外,对于本发明的目的,关于病状的有益的或期望的结果包括但不限于以下中的一种或多种:预防病状、改善病状、治愈病状、减轻病状严重程度、延缓病状进展、缓解与病状相关的一种或多种症状、提高患有病状的人的生活质量和/或延长存活。例如,在其中本文所述的组合物用于治疗癌症的实施方案中,有益的或期望的结果包括但不限于以下中的一种或多种:减少(或破坏)肿瘤或癌细胞的增殖、减少在癌症中发现的肿瘤细胞的转移、缩小肿瘤的大小、减少癌症引起的症状、提高患有癌症的人的生活质量、减少治疗疾病所需的其它药物的剂量、延缓癌症进展,和/或延长患有癌症的患者的存活。根据上下文,受试者的“治疗”可意味着受试者是需要治疗的,例如,在其中受试者包含预期通过施用试剂来改善的病症的情况下。

[0061] “纯化的”和“分离的”(当涉及多肽时)意指该多肽存在,而自然界中与该多肽有关的其它生物大分子基本上不存在。如本文所用的术语“纯化的”意指在存在的多肽中所识别的多肽经常占至少50%,更经常占至少60%,典型占至少70%,更典型占至少75%,最典型占至少80%,通常占至少85%,更通常占至少90%,最通常占至少95%,且惯例占至少98%(重量),或更大。水、缓冲剂、盐、去垢剂、还原剂、蛋白酶抑制剂、稳定剂(包括加入的蛋白质诸如白蛋白)和赋形剂以及分子量小于1000的分子的重量一般不用于多肽纯度的测定。参见,例如,Covacci,等提交的美国专利号6,090,611中对纯度的讨论

[0062] “肽”是指氨基酸的短序列,其中所述氨基酸通过肽键彼此连接。肽可游离存在或结合至另一部分,诸如大分子、脂质、寡糖或多糖和/或多肽。当肽被并入多肽链中时,术语“肽”仍然可以用来具体指氨基酸的短序列。“肽”可以通过肽键或一些其它类型的键的方式连接到另一部分。肽的长度为至少两个氨基酸并且长度通常小于约25个氨基酸,其中最大长度是自定义或上下文的函数。术语“肽”和“寡肽”可以互换使用。

[0063] “蛋白质”通常指包含多肽链的氨基酸的顺序。蛋白质也可以指多肽的三维结构。“变性的蛋白质”是指具有一些残余的三维结构的部分变性的多肽或者,可选地基本上是随机的三维结构,即完全变性。本发明包括使用多肽变体,例如涉及糖基化、磷酸化、硫酸化、二硫键形成、脱酰胺、异构化、在信号或前导序列加工中的切割点、共价和非共价结合辅因子、氧化的变体等的试剂和方法。二硫键连接的蛋白的形成描述于(参见,例如,

Woycechowsky和Raines (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:533-539; Creighton, 等 (1995) *Trends Biotechnol.* 13:18-23)。

[0064] “重组”当涉及例如核酸、细胞、动物、病毒、质粒、载体等使用时,表示通过引入外源的、非天然核酸、天然核酸的改变,或通过全部或部分衍生于重组核酸、细胞、病毒、质粒或载体而改性。重组蛋白是指例如从重组核酸、病毒、质粒、载体等衍生的蛋白质。“重组细菌”包括其中基因组通过重组方法(例如通过突变、缺失、插入和/或重排的方式)被工程化的细菌。“重组细菌”还涵盖改性以包括重组基因组外核酸(例如质粒或第二染色体)的细菌,或其中现有基因组外核酸被改变的细菌。

[0065] “样本”是指来自人、动物、安慰剂或研究样本,例如细胞、组织、器官、流体、气体、气溶胶、浆料、胶体或凝固材料的样本。“样本”可以体内测试,例如不从人或动物除去,或者其可以体外测试。样本可以在加工后例如通过组织学方法测试。“样本”也指例如包含流体或组织样本的细胞或从流体或组织样本中分离的细胞。“样本”也可以指从人或动物新鲜获取的细胞、组织、器官或流体,或被加工或存储的细胞、组织、器官或流体。

[0066] “疫苗”包括预防性疫苗。疫苗还包括治疗性疫苗,例如施用于哺乳动物包括与由疫苗提供的抗原或表位有关的病状或病症的疫苗。

[0067] 本文所用的术语“抗体”是指衍生自、建模后、或基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因或其片段编码的,能够特异性结合抗原或表位的肽或多肽。参见,例如, *Fundamental Immunology*, 第3版, W.E. Paul, 编, Raven Press, N.Y (1993); Wilson (1994; *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97。术语抗体包括抗原结合部分,即保留结合抗原能力的“抗原结合位点”(例如片段、子序列、互补决定区(CDR)),其包括:(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包括在铰链区由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等, (1989) *Nature* 341:544-546);和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。单链抗体通过引用也包括在术语“抗体”中。

[0068] 环嘌呤二核苷酸

[0069] 如本文所述,本发明涉及诱导STING依赖性TBK1激活的立体化学纯的环嘌呤二核苷酸及其制备和使用方法。

[0070] 原核以及真核细胞使用各种小分子用于细胞信号传导和细胞内和细胞间传达。已知环状核苷酸(如cGMP、cAMP等)在原核和真核细胞中具有调节和引发活性。不同于真核细胞,原核细胞还使用环嘌呤二核苷酸作为调节分子。在原核生物中,两个GTP分子的缩合是通过二鸟苷酸环状酶(DGC)催化以得到表示细菌中重要调节子的c-diGMP。

[0071] 最新研究表明CDN(诸如环diGMP或其类似物)还可以刺激或增强患者的免疫或炎症应答,或可以在哺乳动物中作为佐剂增强对疫苗的免疫应答。病原体衍生的DNA的胞质检测需要通过TANK结合激酶1(TBK1)及其下游转录因子、IFN调节因子3(IRF3)的信号传导。称为STING (IFN基因的刺激剂;也称为MITA、ERIS、MPYS和TMEM173)的跨膜蛋白用作这些环嘌呤二核苷酸的信号传导受体,导致TBK1-IRF3信号传导轴的刺激和STING依赖性I型干扰素应答。参见,例如,图1。Burdette等, *Nature* 478:515-18, 2011表明STING直接结合至环二鸟苷酸单磷酸盐,但不结合至其它不相关的核苷酸或核酸。

[0072] 疫苗制剂的目标通常是提供抗原和携带目标抗原能够产生足够的记忆性T细胞和/或B细胞群以快速应对病原体、肿瘤细胞等的佐剂的组合。本发明涉及用于提供包含一种或多种环嘌呤二核苷酸的佐剂组合物(其中存在于所述组合物中的环嘌呤二核苷酸是基本上纯的Rp,Rp或Rp,Sp非对映体)的方法、其制造方法,及其刺激动物中免疫应答的使用方法。

[0073] 优选的环嘌呤二核苷酸包括但不限于c-di-AMP、c-di-GMP、c-di-IMP、c-AMP-GMP、c-AMP-IMP和c-GMP-IMP及其类似物,所述类似物包括但不限于在本文称为“硫代磷酸盐”的硫代磷酸酯类似物。CDN硫代磷酸盐的一般结构提供于图1。在该图中,B1和B2表示碱基部分。硫代磷酸盐是正常核苷酸的变体,其中非桥接的氧中的一个被替换为硫。核苷酸内的键的硫化显著减少内切和外切核酸酶的作用,所述酶包括5'至3'和3'至5'DNA POL 1核酸外切酶、核酸酶S1和P1、核糖核酸酶、血清核酸酶和蛇毒磷酸二酯酶。此外,穿过脂质双层的电势增加。

[0074] 硫代磷酸酯键是固有手性的。本领域技术人员将认识到,在此结构中的磷酸盐可各自以R或S形式存在。因此,Rp,Rp、Sp,Sp和Rp,Sp形式是可能的。在每种情况下,优选的是这些分子的基本上纯的Rp,Rp和Rp,Sp非对映体。此类CDN硫代磷酸盐分子的实例描绘于本文图2-6中,其显示Rp,Rp-c-di-单磷酸腺苷;Rp,Sp-c-di-单磷酸腺苷;Rp,Rp-c-di-单磷酸鸟苷和Rp,Sp-c-di-单磷酸鸟苷的硫代磷酸盐形式。在这些图中,磷酸盐中心的立体化学根据需要被表示为R或S。

[0075] 优选的环嘌呤二核苷酸还包括CDN的2'-O-取代基形式,尤其是CDN硫代磷酸盐。可以通过取代核糖部分的2'-OH来提供另外的稳定性和生物利用度。此类2'-O-取代基类似物的实例示于图11。本文适用的取代基包括但不限于卤素、羟基、烷基、烯基、炔基、酰基(-C(=O)R_{aa})、羧基(-C(=O)O-R_{aa})、脂族基、脂环基、烷氧基、取代的氧基(-O-R_{aa})、芳基、芳烷基、杂环基、杂芳基、杂芳基烷基、氨基(-N(R_{bb})(R_{cc}))、亚氨基(=NR_{bb})、酰氨基(-C(=O)N(R_{bb})(R_{cc}))或-N(R_{bb})C(=O)R_{aa})、叠氮基(-N₃)、硝基(-NO₂)、氰基(-CN)、脲基(carbamido)(-OC(=O)N(R_{bb})(R_{cc}))或-N(R_{bb})C(=O)OR_{aa})、脲基(ureido)(-N(R_{bb})C(=O)-N(R_{bb})(R_{cc}))、硫脲基(-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc}))、胍基(-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc}))、脒基(-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc}))或-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa}))、巯基(-SR_{bb})、亚磺酰基(-S(=O)R_{bb})、磺酰基(-S(=O)₂R_b)和磺酰胺基(-S(=O)₂N(R_{bb})(R_{cc}))或-N(R_{bb})S(=O)₂R_{bb})。其中每个R_{aa}、R_{bb}和R_{cc}独立地为H、任选连接的化学官能团或另外的具有优选列表的取代基,所述列表包括但不限于H、烷基、烯基、炔基、脂族、烷氧基、酰基、芳基、芳烷基、杂芳基、脂环、杂环和杂芳基烷基。本文所述的化合物内的所选取代基以递归度表示。

[0076] 其它优选的环嘌呤二核苷酸还包括CDN的S-取代基形式,以及特别地CDN硫代磷酸盐,它可以有利地提供具有改善的生物利用度的前药。如本文所用的术语“前药”是指所考虑化合物的改性,其中所述改性的化合物在体内(例如,在靶细胞或靶器官内)通过酶促或非酶促反应被转化回未改性形式。在某些实施方案中,一个核糖上的羟基包括前药离去基团。前药可以使药物的物理化学、生物制药和药代动力学特性改性。传统的前药被归类为通过经历体内转化被激活以形成活性药物的药物。前药开发的原因通常是水溶性差、化学不稳定、低口服生物利用度、缺少血脑屏障渗透和与母体药物相关的高首过代谢。合适的前药部分描述于例如“Prodrugs and Targeted Delivery,”J.Rautico编,John Wiley&Sons,

2011。

[0077] 此类前药类似物的实例示于图12。这种具有改进的亲脂性的前药形式可以通过存在于靶生物体的酯酶的作用被裂解成活性形式。本文适用的取代基包括但不限于卤素、羟基、烷基、烯基、炔基、酰基 ($-C(0)R_{aa}$)、羧基 ($-C(0)O-R_{aa}$)、脂族基、脂环基、烷氧基、取代的氧基 ($-OR_{aa}$)、芳基、芳烷基、杂环基、杂芳基、杂芳基烷基、氨基 ($-N(R_{bb})(R_{cc})$)、亚氨基 ($=NR_{bb}$)、酰氨基 ($-C(0)N(R_{bb})(R_{cc})$ 或 $-N(R_{bb})C(0)R_{aa}$)、叠氮基 ($-N_3$)、硝基 ($-NO_2$)、氰基 ($-CN$)、脲基 (carbamido) ($-OC(0)N(R_{bb})(R_{cc})$ 或 $-N(R_{bb})C(0)OR_{aa}$)、脲基 (ureido) ($-N(R_{bb})C(0)-N(R_{bb})(R_{cc})$)、硫脲基 ($-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})$)、胍基 ($-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$)、脒基 ($-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$ 或 $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})$)、巯基 ($-SR_{bb}$)、亚磺酰基 ($-S(0)R_{bb}$)、磺酰基 ($-S(0)_2R_{bb}$) 和磺酰胺基 ($-S(0)_2N(R_{bb})(R_{cc})$ 或 $-N(R_{bb})S(0)_2R_{bb}$)。其中每个 R_{aa} 、 R_{bb} 和 R_{cc} 独立地为H、任选连接的化学官能团或另外的具有优选列表的取代基,所述列表包括但不限于H、烷基、烯基、炔基、脂族、烷氧基、酰基、芳基、芳烷基、杂芳基、脂环、杂环和杂芳基烷基。本文所述的化合物内的所选取代基以递归度表示。优选的取代基包括甲基、异丙基和叔丁基。核苷酸的前药形式在本领域已知。参见,例如, Nucleotide Prodrugs for HCV Therapy, Sofia, M.J., Antiviral Chem and Chemother., 2011, 22:23-49; Nucleoside, Nucleotide, and Non-Nucleoside Inhibitors of Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA-Polymerase, Sofia, M.J., 等, J. Med. Chem., 2012, 55:2481-2531。

[0078] 如本文所用的术语“烷基”是指含有多至二十四个碳原子的饱和直链或支链烃基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、正己基、辛基、癸基、十二烷基等。烷基通常包括1至约24个碳原子,更通常地1至约12个碳原子,其中1至约6个碳原子更优选。如本文所用的术语“低级烷基”包括1至约6个碳原子。如本文所用的烷基可任选地包括一个或多个另外的取代基。

[0079] 如本文所用的术语“烯基”是指含有多至二十四个碳原子并且具有至少一个碳-碳双键的直链或支链烃基。烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基、二烯诸如1,3-丁二烯等。烯基通常包括2至约24个碳原子,更通常地2至约12个碳原子,其中2至约6个碳原子更优选。如本文所用的烯基可任选地包括一个或多个另外的取代基。

[0080] 如本文所用的术语“炔基”是指含有多至二十四个碳原子并且具有至少一个碳-碳三键的直链或支链烃基。炔基的实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、1-丁炔基等。炔基通常包括2至约24个碳原子,更通常地2至约12个碳原子,其中2至约6个碳原子更优选。如本文所用的炔基可任选地包括一个或多个另外的取代基。

[0081] 如本文所用的术语“酰基”是指通过从有机酸中去除羟基而形成的基团并且具有通式 $-C(0)-X$, 其中X通常为脂族、脂环族或芳族。实例包括脂族羰基、芳族羰基、脂族磺酰基、芳族亚磺酰基、脂族亚磺酰基、芳族磷酸酯、脂族磷酸酯等。如本文所用的酰基可任选地包括另外的取代基。

[0082] “脂环族”是指其中环为脂族的环系统。环系统可包含一个或多个环,其中至少一个环为脂族。优选的脂环族包括其中具有约5至约9个碳原子的环。如本文所用的脂环族可任选地包括另外的取代基。

[0083] 如本文所用的“脂族”是指含有多至二十四个碳原子的直链或支链烃基,其中任何

两个碳原子之间的饱和度为单键、双键或三键。脂族基团优选含有1至约24个碳原子,更通常地1至约12个碳原子,其中1至约6个碳原子更优选。脂族基团的直链或支链可被一个或多个杂原子中断,所述杂原子包括氮、氧、硫和磷。被杂原子中断的所述脂族基团包括但不限于聚烷氧基,如聚亚烷基二醇、聚胺和聚亚胺。如本文所用的脂族基团可任选地包括另外的取代基。

[0084] 如本文所用的术语“烷氧基”是指在烷基与氧原子之间形成的基团,其中氧原子用来将烷氧基连接至母体分子。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、新戊氧基、正己氧基等。如本文所用的烷氧基可任选地包括另外的取代基。

[0085] 如本文所用的术语“氨基烷基”是指被 $C\backslash-C_n$ 烷基取代的氨基。基团的烷基部分与母体分子形成共价键。氨基可位于任何位置并且氨基烷基可在烷基和/或氨基部分上被另外的取代基取代。

[0086] 如本文所用的术语“芳烷基”和“芳基烷基”是指共价连接至 $C\backslash-C_n$ 烷基的芳香族基团。所得到的芳烷基(或芳基烷基)的烷基部分与母体分子形成共价键。实例包括但不限于苯甲基、苯乙基等。如本文所用的芳烷基可任选地包括连接至烷基、芳基或形成基团的这两个基团的另外的取代基。

[0087] 如本文所用的术语“芳基”和“芳族”是指具有一个或多个芳环的单环或多环碳环系统基团。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。优选的芳环系统在一个或多个环中具有约5至约20个碳原子。如本文所用的芳基可任选地包括另外的取代基。

[0088] 如本文所用的术语“卤基”和“卤素”是指选自氟、氯、溴、碘的原子。

[0089] 如本文所用的术语“杂芳基”和“杂芳族”是指包含单环或多环芳环、环系统或稠环系统的基团,其中至少一个环为芳族的并且包括一个或多个杂原子。杂芳基还旨在包括稠环系统,所述稠环系统包括其中一个或多个稠环不含有杂原子的系统。杂芳基通常包括一个选自硫、氮或氧的环原子。杂芳基的实例包括但不限于吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、噻吩基、呋喃基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、喹喔啉基等。杂芳基可直接或通过连接部分如脂族基团或杂原子连接至母体分子。如本文所用的杂芳基可任选地包括另外的取代基。

[0090] 如本文所用的术语“杂芳基烷基”是指如前面所定义的进一步包括共价连接的 C_1-C_{12} 烷基的杂芳基。所得的杂芳基烷基的烷基部分能与母体分子形成共价键。实例包括但不限于吡啶基甲基、嘧啶基乙基、萘基丙基等。如本文所用的杂芳基烷基可任选地包括杂芳基或烷基部分中一者或两者上的另外的取代基。

[0091] 如上所示,优选的环嘌呤二核苷酸还包括CDN的前药形式,尤其是CDN硫代磷酸盐。前药可以使药物的物理化学、生物制药和药代动力学特性改性。传统的前药被归类为通过经历体内转化被激活以形成活性药物的药物。前药开发的原因通常是水溶性差、化学不稳定、低口服生物利用度、缺少血脑屏障渗透和与母体药物相关的高首过代谢。合适的前药部分描述于例如“Prodrugs and Targeted Delivery,”J.Rautico,编,John Wiley&Sons, 2011。

[0092] 如本文所用关于环嘌呤二核苷酸的术语“基本上纯的”是指相对于上图所示的手

性中心的其它可能的立体化学为至少75%纯的Rp,Rp或RP,Sp形式。通过示例的方式,“基本上纯的Rp,Rp c-di-GMP硫代磷酸盐”将是关于c-di-GMP硫代磷酸盐的RP,Sp和Sp,Sp形式为至少75%纯的。在优选的实施方案中,基本上纯的环嘌呤二核苷酸是至少85%纯的、至少90%纯的、至少95%纯的、至少97%纯的和至少99%纯的。尽管本发明的基本上纯的环嘌呤二核苷酸制剂是“立体化学纯的”,但这并不意味着表示在这些手性中心具有特定立体化学的制剂中的所有CDN在其它方面是相同的。例如,基本上纯的环嘌呤二核苷酸制剂可以含有Rp,Rp c-di-GMP硫代磷酸盐和Rp,Rp c-di-AMP硫代磷酸盐的组合,并且仍然是基本上纯的环嘌呤二核苷酸制剂。此类制剂还可以包括有利于患者治疗的如下文所述的其它组分,前提是该制剂中的所有CDN在这些手性中心具有特定立体化学。

[0093] 本文所述的CDN组合物可以足够诱导、改性或刺激适当的免疫应答的量单独或与药学上可接受的赋形剂组合施用于宿主。免疫应答可包括但不限于特异性免疫应答、非特异性免疫应答、特异性和非特异性应答、先天性应答、初次免疫应答、适应性免疫、二次免疫应答、记忆性免疫应答、免疫细胞激活、免疫细胞增殖、免疫细胞分化和细胞因子表达。在某些实施方案中,CDN组合物与一种或多种另外的组合物联合施用,所述另外的组合物包括旨在刺激针对一种或多种预定抗原的免疫应答的疫苗;佐剂;CTLA-4和PD-1途径拮抗剂、脂质、脂质体、化疗剂、免疫调节细胞系等。

[0094] CDN组合物可在另外的治疗或预防组合物之前、之后和/或与其一起施用。这些包括但不限于B7共刺激分子、白细胞介素-2、干扰素- γ 、GM-CSF、CTLA-4拮抗剂、OX-40/OX-40配体、CD40/CD40配体、沙格司亭、左旋咪唑、牛痘病毒、卡介苗(BCG)、脂质体、明矾、弗氏完全或不完全佐剂、解毒的内毒素、矿物油、表面活性物质诸如脂肪卵磷脂、普郎尼克多元醇、聚阴离子、肽和油或烃乳剂。用于诱导对比抗体应答优先刺激细胞毒性T细胞应答的T细胞免疫应答的载体是优选的,尽管刺激这两种类型应答的那些载体也可以使用。在试剂是多肽的情况下,可施用该多肽本身或编码该多肽的多核苷酸。载体可以是细胞,诸如抗原呈递细胞(APC)或树突细胞。抗原呈递细胞包括如巨噬细胞、树突细胞和B细胞这样的细胞类型。其它专业的抗原呈递细胞包括单核细胞、边缘区Kupffer细胞、小胶质细胞、朗格汉斯细胞、指状树突细胞、滤泡树突状细胞和T细胞。也可使用兼性抗原呈递细胞。兼性抗原呈递细胞的实例包括星形胶质细胞、滤泡细胞、内皮细胞和成纤维细胞。载体可以是转化以表达多肽或递送随后在接种个体的细胞中表达的多核苷酸的细菌细胞。可加入诸如氢氧化铝或磷酸铝的佐剂以增加疫苗引发、增强或延长免疫应答的能力。另外的材料,诸如细胞因子、趋化因子和细菌核酸序列,如CpG、toll样受体(TLR)9激动剂以及针对TLR 2、TLR 4、TLR 5、TLR 7、TLR 8、TLR9的单独或与所述组合物组合使用的另外的激动剂,包括脂蛋白、LPS、单磷酸脂质A、脂磷壁酸、咪喹莫特(imiquimod)、瑞喹莫德(resiquimod),也是潜在的佐剂。佐剂的其它代表性实例包括合成佐剂QS-21,其包括从皂树(*Quillaja saponaria*)的树皮和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)纯化的均质皂苷(McCune等,Cancer,1979;43:1619)。应该理解的是,该佐剂是经过优化的。换句话说,本领域技术人员可进行常规实验来确定使用的最佳佐剂。

[0095] 用于与另外的治疗剂共施用的方法是本领域公知的(Hardman,等(编)(2001) Goodman和Gilman的The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,McGraw-Hill,New York,NY;Poole和Peterson(编)(2001)Pharmacotherapeutics for Advanced

Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner 和 Longo (编) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA)。

[0096] 佐剂

[0097] 除了上述的环嘌呤二核苷酸,本发明的组合物可进一步包含一种或多种另外的物质,所述另外的物质由于其佐剂性质,可用于刺激免疫系统以对在灭活的肿瘤细胞上呈现的癌抗原作出应答。此类佐剂包括但不限于脂质、脂质体、诱导先天性免疫的灭活的细菌(例如,灭活的或减毒的单核细胞增生李斯特菌)、通过Toll样受体(TLR)、(NOD)样受体(NLR)、基于视黄酸可诱导的基因的(RIG)-I样受体(RLR)和/或C型凝集素受体(CLR)介导先天性免疫激活的组合物。PAMP的实例包括脂蛋白、脂多肽、肽聚糖、酵母聚糖、脂多糖、奈瑟氏球菌属(neisserial)孔蛋白、鞭毛蛋白、肌动结合蛋白(profilin)、神经酰胺半乳糖脂(galactoceramide)、胞壁酰二肽。肽聚糖、脂蛋白和脂磷壁酸是革兰氏阳性菌的细胞壁成分。脂多糖由大多数细菌表达,MPL就是一个例子。鞭毛蛋白是指由致病性和共生性细菌分泌的细菌鞭毛的结构成分。 α -半乳糖神经酰胺(α -GalCer)是自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂。胞壁酰二肽是所有细菌共有的生物活性肽聚糖基序。这个列举并不意味着是限制性的。优选的佐剂组合物描述如下。

[0098] CTLA-4和PD-1途径拮抗剂

[0099] CTLA-4被认为是适应性免疫应答的重要的负调节剂。激活的T细胞上调CTLA-4,其使用比CD28更高的亲和力结合抗原呈递细胞上的CD80和CD86,从而抑制T细胞激活、IL-2基因表达和T细胞增殖。CTLA4阻塞的抗肿瘤作用在结肠癌、转移性前列腺癌和转移性黑色素瘤的小鼠模型中已被观察到。

[0100] 易普利单抗(ipilimumab) (YervoyTM) 和曲美木单抗(tremelimumab)是结合至人CTLA4并防止其与CD80和CD86相互作用的人源化单克隆抗体。使用易普利单抗和曲美木单抗的I期和II期研究已经证明在癌症患者中的临床活性。可通过类似策略靶向的其它负免疫调节剂包括程序性细胞死亡1、B和T淋巴细胞衰减剂、转化生长因子 β 、白介素-10和血管内皮生长因子。

[0101] PD-1是在激活的T细胞上表达的适应性免疫应答的另一种负调节剂。PD-1结合至B7-H1和B7-DC,并且PD-1的参与抑制T细胞激活。PD-1途径阻塞的抗肿瘤效果已被证实。已在文献中报道BMS-936558、MK3475、CT-011、AMP-224和MDX-1106是可用于本发明的PD-1途径阻断剂的实例。

[0102] TLR激动剂

[0103] 如本文所用的术语“Toll样受体”(或“TLR”)是指感测微生物产物和/或启动适应性免疫应答的蛋白质或其片段的Toll样受体家族的一个成员。在一个实施方案中,TLR激活树突细胞(DC)。Toll样受体(TLR)是最初被确定为识别微生物病原体的先天性免疫系统感受器的模式识别受体家族。TLR包括含有富含亮氨酸重复序列的胞外域、跨膜结构域和胞内TIR(Toll/IL-1R)结构域的保守的跨膜分子家族。TLR识别微生物中的不同结构,通常被称为“PAMP”(病原体相关的分子模式)。结合至TLR的配体引起诱导产生参与炎症和免疫的因子的细胞内信号传导通路的级联放大。

[0104] 在人体中,已经确定10种TLR。在细胞表面上表达的TLR包括TLR-1、-2、-4、-5和-6,

而TLR-3、-7/8和-9与ER区室一起表达。人树突细胞亚群可在独特的TLR表达模式的基础上被识别。以举例的方式,当受到刺激时骨髓或DC (mDC) 的“常规的”亚群表达TLR1-8,并且产生激活标记(例如CD80、CD86、MHC I类和II类、CCR7)、促炎性细胞因子和趋化因子的级联放大。这种刺激和所得的表达的结果是引发抗原特异性CD4+和CD8+T细胞。这些DC获得增强的能力以摄取抗原并以适当的形式将它们呈现给T细胞。与此相反,DC (pDC) 的类浆细胞亚群在激活时只表达TLR7和TLR9,从而激活NK细胞以及T细胞。由于濒临死亡的肿瘤细胞可能对DC功能产生不利的影响,因此已经提出,用TLR激动剂激活DC可有利于在免疫治疗方法中引发抗肿瘤免疫以治疗癌症。还已经提出,使用辐射和化疗成功治疗乳腺癌需要TLR4激活。

[0105] 本领域已知的且用于本发明的TLR激动剂包括但不限于以下:

[0106] Pam3Cys, TLR-1/2激动剂;

[0107] CFA, TLR-2激动剂;

[0108] MALP2, TLR-2激动剂;

[0109] Pam2Cys, TLR-2激动剂;

[0110] FSL-1, TLR-2激动剂;

[0111] Hib-OMPC, TLR-2激动剂;

[0112] 聚肌苷酸:聚胞苷酸 (Poly I:C), TLR-3激动剂;

[0113] 聚腺苷酸-聚尿苷酸 (polyAU), TLR-3激动剂;

[0114] 用聚-L-赖氨酸和羧甲基纤维素稳定的聚肌胞苷酸(Hiltonol®), TLR-3激动剂;

[0115] 单磷酸脂质A (MPL), TLR-4激动剂;

[0116] LPS, TLR-4激动剂;

[0117] 细菌鞭毛蛋白, TLR-5激动剂;

[0118] 唾液酸-Tn (STn), 与许多人类癌细胞上的MUC1粘蛋白和TLR-4激动剂有关的碳水化合物;

[0119] 咪喹莫特, TLR-7激动剂;

[0120] 瑞喹莫德, TLR-7/8激动剂;

[0121] 洛索立宾, TLR-7/8激动剂; 和

[0122] 未甲基化的CpG二核苷酸 (CpG-ODN), TLR-9激动剂。

[0123] 由于其佐剂特质, TLR激动剂优选地与其它疫苗、佐剂和/或免疫调节剂组合使用, 并且可以各种组合形式被组合。因此, 在某些实施方案中, 结合至STING并诱导STING依赖性TBK1激活和表达并分泌刺激树突细胞诱导、招募和/或成熟的一种或多种细胞因子的灭活的肿瘤细胞的本文所述的环嘌呤二核苷酸可与一种或多种TLR激动剂一起施用用于治疗目的。

[0124] 脂质和脂质体

[0125] 脂质体是由磷脂的一层(“单层的”)或多层(“多层的”)形成的囊泡。由于磷脂构建块的两亲性质, 脂质体通常包括呈现亲水性外表面和包封亲水性核的亲水层。脂质体在掺入亲水性/疏水性组分中的通用性、其无毒性质、生物可降解性、生物相容性、佐剂性质、诱导细胞免疫、持续释放和通过巨噬细胞迅速摄取的特性, 使得它们成为抗原递送的有吸引力的候选者。

[0126] 通过引用整体并入本文的W02010/104833描述了脂质体制剂, 其包括:

[0127] a) 水性媒介物;

[0128] b) 脂质体,其包括

[0129] (i) 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”),

[0130] (ii) 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)、二肉豆蔻酰三甲基丙胺(“DMTAP”),或DMPG和DMTAP两者,

[0131] 和

[0132] (iii) 至少一种甾醇衍生物;和

[0133] c) 共价连接到1%至100%之间的所述至少一种甾醇衍生物的一种或多种免疫原性多肽或碳水化合物。

[0134] 本文称为VesiVax® (Molecular Express, Inc.)的具有或不具有上面提到的“免疫原性多肽或碳水化合物”的此类脂质体制剂可以包含一种或多种另外的组分,诸如肽聚糖、脂肽、脂多糖、单磷酰脂质A、脂磷壁酸、瑞喹莫德、咪喹莫特、鞭毛蛋白、含有未甲基化的CpG基序的寡核苷酸、 β -半乳糖神经酰胺、胞壁酰二肽、全反式视黄酸、双链病毒RNA、热休克蛋白、双十八烷基二甲基溴化铵、阳离子表面活性剂、toll样受体激动剂、二肉豆蔻酰基三甲基铵丙烷和nod样受体激动剂。有利的是,这些脂质体制剂可用来根据本发明递送一种或多种环嘌呤二核苷酸。

[0135] 此外,尽管以上讨论的脂质体制剂采用“类固醇衍生物”作为锚定剂用于将免疫原性多肽或碳水化合物连接到脂质体上,但类固醇可简单地提供作为未缀合的类固醇,诸如胆固醇。

[0136] 用于从脂质混合物制备脂质体的合适方法是本领域公知的。参见,例如,Basu & Basu, Liposome Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 2002; Gregoriadis, Liposome Technology, 第3版, Informa HealthCare, 2006。优选的方法包括其中所述的挤出、均质化和超声方法。用于制备用于本发明的脂质体的示例性方法描述于W02010/104833,所述方法包括使脂质混合物干燥、随后在水性媒介物中水合和超声以形成脂质体。

[0137] 在某些实施方案中,提供在特定平均粒度范围内的脂质体。可以例如通过将包含脂质体的水性媒介物挤压通过具有预选孔径的膜并收集流经膜的物质来选择脂质体大小。在优选的实施方案中,选择的脂质体直径基本在50和500nm之间,更优选地直径基本在50和200nm之间,并且最优选地直径基本在50和150nm之间。在上下文中如本文所用的术语“基本上”意指至少75%,更优选80%,最优选至少90%的脂质体在指定的范围内。

[0138] 可用于本发明的其它脂质和脂质类佐剂包括水包油(o/w)乳剂(参见,例如,Muderhwa等, J. Pharmaceut. Sci. 88:1332-9, 1999)、VesiVax® TLR (Molecular Express, Inc.)、洋地黄皂苷(参见,例如,美国专利5,698,432)和吡喃葡萄糖基脂(glucopyranosyl lipid)(参见,例如,美国专利申请20100310602)。

[0139] 化疗剂

[0140] 在另外的实施方案中,所述方法还涉及向受试者施用有效量的一种或多种化疗剂作为另外的治疗。在某些实施方案中,所述一种或多种化疗剂选自醋酸阿比特龙、六甲蜜胺、脱水长春碱、奥里斯他汀(auristatin)、贝沙罗汀、比卡鲁胺、BMS 184476、2,3,4,5,6-五氟-N-(3-氟-4-甲氧基苯基)苯磺酰胺、博来霉素、N,N-二甲基-L-缬氨酰-L-缬氨酰-N-甲

基-L-缬氨酰-L-脯氨酰-1-L-脯氨酸叔丁酰胺、恶病质素、西马多丁(cemadotin)、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、3',4'-二脱氢-4'-脱氧-8'-去甲-长春花碱(calectolastine)、多西紫杉醇(docetaxol)、多西他赛(doxetaxel)、环磷酰胺、卡铂、卡莫司汀、顺铂、念珠藻环肽(cryptophycin)、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪(DTIC)、更生霉素、柔红霉素、地西他滨、多拉司他汀(dolastatin)、阿霉素(阿霉素)、依托泊苷、5-氟尿嘧啶、非那雄胺、氟他胺、羟基脲和羟基脲紫杉烷(hydroxyureataxane)、异环磷酰胺、利阿唑、氯尼达明(lonidamine)、洛莫司汀(CCNU)、MDV3100、二氯甲基二乙胺(氮芥)、美法仑、羟乙磺酸米伏布林(mivobulin isethionate)、根霉素、sertenef、链佐星、丝裂霉素、甲氨蝶呤、紫杉烷类、尼鲁米特、奥那司酮、紫杉醇、泼尼氮芥、甲基苄肼、RPR109881、磷酸雌莫司汀(stramustine phosphate)、他莫昔芬、他索纳明(tasonermin)、紫杉酚、维甲酸、长春碱、长春新碱、硫酸长春地辛和长春氟宁。

[0141] 免疫调节细胞系

[0142] “灭活的肿瘤细胞”意指已经过处理以防止细胞分裂的肿瘤细胞(对患者是“自体的”或“同种异体的”)。就本发明的目的而言,此类细胞保持它们的免疫原性和它们的代谢活性。此类肿瘤细胞被基因修饰以表达转基因,该转基因在患者内表达作为癌症治疗的一部分。因此,本发明的组合物或疫苗包含经过处理的对患者是自体或同种异体的瘤性(例如,肿瘤)细胞,并且最优选的是与困扰患者的细胞相同的一般类型肿瘤细胞。例如,患有黑色素瘤的患者将通常施用从黑色素瘤衍生的经过基因修饰的细胞。用于本发明的用于灭活肿瘤细胞的方法(诸如使用辐射)是本领域公知的。

[0143] 本发明的灭活的肿瘤细胞与一种或多种共刺激分子或药剂一起施用于患者。优选的共刺激剂包括刺激树突细胞诱导、招募和/或成熟的一种或多种细胞因子。用于评估此类共刺激剂的方法是文献中公知的。DC的诱导和成熟通常由某些膜分子诸如CD80和CD86的增加的表达,和/或刺激后促炎性细胞因子,诸如IL-12和I型干扰素的分泌来评估。

[0144] 在优选的实施方案中,灭活的肿瘤细胞本身被改性以表达和分泌刺激树突细胞诱导、招募和/或成熟的一种或多种细胞因子。以关于GM-CSF的使用的示例性术语来描述本发明。因此,通过举例的方式,肿瘤细胞可表达编码GM-CSF的转基因,如在美国专利号5,637,483、5,904,920、6,277,368和6,350,445,以及美国专利公布号20100150946中所述,其每一篇通过引用被明确地并入本文中。用于治疗胰腺癌的表达GM-CSF的基因修饰的癌细胞或“表达细胞因子的细胞疫苗”的形式描述于美国专利号6,033,674和5,985,290,这两者都通过引用明确地并入本文。

[0145] 代替GM-CSF或与GM-CSF一起的可以由此类灭活的肿瘤细胞和/或旁观者细胞表达的其它合适的细胞因子包括但不限于一个或多个CD40配体、IL-12、CCL3、CCL20和CCL21。这个列举并不意味着是限制性的。

[0146] 尽管优选的是施用于受试者的灭活的肿瘤细胞表达一种或多种目标细胞因子,但肿瘤细胞系可以伴随表达并分泌刺激树突细胞诱导、招募和/或成熟的一种或多种细胞因子的灭活的旁观者细胞系。旁观者细胞系可以提供所有刺激树突细胞诱导、招募和/或成熟的细胞因子,或者可以补充由灭活的肿瘤细胞表达并分泌的刺激树突细胞诱导、招募和/或成熟的细胞因子。以举例的方式,免疫调节细胞因子表达的旁观者细胞系公开于美国专利号6,464,973和8,012,469, Dessureault等, Ann. Surg. Oncol. 14:869-84, 2007, 以及 Eager

和Nemunaitis, Mol. Ther. 12:18-27, 2005, 其中的每一个通过引用明确并入本文。

[0147] “粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)多肽”意指具有免疫调节活性并具有与GenBank登录号AAA52122.1至少约85%氨基酸序列同一性的细胞因子或其片段。

[0148] 疫苗

[0149] 在某些实施方案中, CDN组合物与一种或多种旨在刺激针对一个或多个预定抗原的免疫应答的疫苗联合施用。可用于本发明的靶抗原的实例列于下表中。靶抗原也可以是包含在表中所列的抗原的免疫活性部分的片段或融合多肽。这个列举并不意味着是限制性的。

[0150] 表1. 抗原。

抗原	参考
肿瘤抗原	
间皮素	GenBank 登录号 NM_005823; U40434; NM_013404; BC003512 (还参见, 例如, Hassan, 等 (2004) Clin. Cancer Res. 10:3937-3942; Muminova, 等 (2004) BMC Cancer 4:19; Iacobuzio-Donahue, 等 (2003) Cancer Res. 63:8614-8622)。
[0151] 威尔姆氏(Wilms')肿瘤-1 相关蛋白(Wt-1), 包括同种型 A; 同种型 B; 同种型 C; 同种型 D。	WT-1 同种型 A (GenBank 登录号 NM_000378; NP_000369)。WT-1 同种型 B (GenBank 登录号 NM_024424; NP_077742)。WT-1 同种型 C (GenBank 登录号 NM_024425; NP_077743)。WT-1 同种型 D (GenBank 登录号 NM_024426; NP_077744)。
角质层胰凝乳蛋白酶 (SCCE)及其变体。	GenBank 登录号 NM_005046; NM_139277; AF332583。还参见, 例如, Bondurant, 等 (2005) Clin. Cancer Res. 11:3446-3454; Santin, 等 (2004) Gynecol. Oncol. 94:283-288; Shigemasa, 等 (2001) Int. J. Gynecol. Cancer 11:454-461; Sepehr, 等 (2001) Oncogene 20:7368-7374。
MHC I 类链相关蛋白 A (MICA); MHC I 类链相关蛋白 A (M	参见, 例如, Groh, 等 (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:6461-6466; GenBank 登录号 NM_000247; BC_016929; AY750850; NM_005931。

[0152]

ICB)。	
胃泌素和从胃泌素衍生的肽;胃泌素/CCK-2受体(也称为 CCK-B)。	Harris, 等 (2004) Cancer Res.64:5624-5631; Gilliam, 等 (2004) Eur.J. Surg.Oncol.30:536-543; Laheru 和 Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467。
磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (例如, 肝细胞癌和黑色素瘤的抗原)。	GenBank 登录号 NM_004484。Nakatsura, 等 (2003) Biochem.Biophys.Res.Comm.306:16-25; Capurro, 等 (2003) Gastroenterol.125:89-97; Nakatsura, 等 (2004) Clin.Cancer Res.10:6612-6621。
毛状蛋白样蛋白。	Nakatsura, 等 (2002) Eur.J. Immunol. 32:826-836; Laheru 和 Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467。
前列腺干细胞抗原(PSCA)。	GenBank 登录号 AF043498; AR026974; AR302232 (还参见, 例如, Argani, 等 (2001) Cancer Res.61:4320-4324; Christiansen, 等 (2003) Prostate 55:9-19; Fuessel, 等 (2003) 23:221-228)。
前列腺酸性磷酸酶(PAP); 前列腺特异性抗原(PSA); PSM; PSMa。	Small, 等 (2000) J. Clin.Oncol.18:3894-3903; Altwein 和 Luboldt (1999) Urol.Int. 63:62-71; Chan, 等 (1999) Prostate 41:99-109; Ito, 等 (2005) Cancer 103:242-250; Schmittgen, 等 (2003) Int. J. Cancer 107:323-329; Millon, 等 (1999) Eur.Urol.36:278-285。
前列腺六次跨膜上皮抗原(STEAP)。	参见, 例如, Machlenkin, 等 (2005) Cancer Res.65:6435-6442; GenBank 登录号 NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802。
前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)。	参见, 例如, Machlenkin, 等 (2005) Cancer Res.65:6435-6442; GenBank 登录号 L78132。
前列腺肿瘤诱导基因-1 (PTI-1)。	参见, 例如, Machlenkin, 等 (2005) Cancer Res.65:6435-6442)。
与 G 蛋白偶联受体具有同源性的前列腺特异性基因。	参见, 例如, Machlenkin, 等 (2005) Cancer Res.65:6435-6442)。
前列腺酶(Prostase) (抗原调节的丝氨酸蛋白酶)。	参见, 例如, Machlenkin, 等 (2005) Cancer Res.65:6435-6442; GenBank 登录号 BC096178; BC096176; BC096175。
蛋白酶 3。	GenBank 登录号 X55668。
肿瘤-睾丸抗原, 例如, NY-ESO-1; SCP-1; SSX-1; SSX-2; SSX-4; GAGE, CT7; CT8; CT10; MAGE-1; MAGE-2; MAGE	GenBank 登录号 NM_001327 (NY-ESO-1) (还参见, 例如, Li, 等 (2005) Clin.Cancer Res.11:1809-1814; Chen, 等 (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.101 (25):9363-9368; Kubuschok, 等 (2004) Int. J. Cancer.109:568-575; Scanlan, 等 (2004) Cancer Immun.4:1; Scanlan, 等 (2002) Cancer Res.62:4041-4047; Sea

[0153]

-3; MAGE-4; MAGE-6; LAGE-1。	Scanlan, 等 (2000) Cancer Lett.150:155-164; Dalerba, 等 (2001) Int. J. Cancer 93:85-90; Ries, 等 (2005) Int. J. Oncol.26:817-824。
MAGE-A1; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-3/6; NT-SAR-35; BAGE; CA125。	Otte, 等 (2001) Cancer Res.61:6682-6687; Lee, 等 (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2651-2656; Sarcevic, 等 (2003) Oncology 64:443-449; Lin, 等 (2004) Clin.Cancer Res.10:5708-5716。
GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE-7; GAGE-8; GAGE-65; GAGE-11; GAGE-13; GAGE-7B。	De Backer, 等 (1999) Cancer Res.59:3157-3165; Scazzella, 等 (1999) Clin.Cancer Res.5:335-341。
HIP1R; LMNA; KIAA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3。	Scanlan, 等 (2002) Cancer Res.62:4041-4047。
DAM 家族基因, 例如, DAM-1; DAM-6。	Fleishhauer, 等 (1998) Cancer Res.58:2969-2972。
RCAS1。	Enjoji, 等 (2004) Dig.Dis. Sci. 49:1654-1656。
RU2。	Van Den Eynde, 等 (1999) J. Exp. Med. 190:1793-1800。
CAMEL。	Slager, 等 (2004) J. Immunol. 172:5095-5102; Slager, 等 (2004) Cancer Gene Ther. 11:227-236。
结肠癌相关抗原, 例如, NY-CO-8; NY-CO-9; NY-CO-13; NY-CO-16; NY-CO-20; NY-CO-38; NY-CO-45; NY-CO-9/HDAC5; NY-CO-41/MBD2; NY-CO-42/TRIP4; NY-CO-95/KIAA1416; KNSL6; seb4D。	Scanlan, 等 (2002) Cancer Res.62:4041-4047。
N-乙酰葡萄糖胺转移酶 V (GnT-V)。	Dosaka-Akita, 等 (2004) Clin.Cancer Res.10:1773-1779。
延伸因子 2 突变型(ELF2M)。	Renkvist, 等 (2001) Cancer Immunol Immunother.50:3-15。
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, 等 (2004) Int. J. Cancer 112:661-668; Scanlan, 等 (2000) Cancer Lett.150:155-164。

[0154]

BRDT。	Scanlan, 等 (2000) Cancer Lett.150:155-164。
SAGE; HAGE。	Sasaki, 等 (2003) Eur.J. Surg.Oncol.29:900-903。
RAGE。	参见, 例如, Li, 等 (2004) Am. J. Pathol.164:1389-1397; Shirasawa, 等 (2004) Genes to Cells 9:165-174。
MUM-1 (黑色素瘤普遍存在的突变型); MUM-2; MUM-2 Arg-Gly 突变; MUM-3。	Gueguen, 等 (1998) J. Immunol. 160:6188-6194; Hirose, 等 (2005) Int. J. Hematol.81:48-57; Baurain, 等 (2000) J. Immunol. 164:6057-6066; Chiari, 等 (1999) Cancer Res.59:5785-5792。
黑色素瘤的 LDLR/FUT 融合蛋白抗原。	Wang, 等 (1999) J. Exp. Med. 189:1659-1667。
NY-REN 系列肾癌抗原。	Scanlan, 等 (2002) Cancer Res.62:4041-4047; Scanlan, 等 (1999) Cancer Res.83:456-464。
NY-BR 系列乳腺癌抗原, 例如, NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85。	Scanlan, 等 (2002) Cancer Res.62:4041-4047; Scanlan, 等 (2001) Cancer Immunity 1:4。
BRCA-1; BRCA-2。	Stolier, 等 (2004) Breast J. 10:475-480; Nicoletto, 等 (2001) Cancer Treat Rev.27:295-304。
DEK/CAN 融合蛋白。	Von Lindern, 等 (1992) Mol. Cell.Biol. 12:1687-1697。
Ras, 例如野生型 ras, 在密码子 12、13、59 或 61 处具有突变的 ras, 例如突变 G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H。K-RAS; H-RAS; N-RAS。	GenBank 登录号 P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654。还参见, 例如, GenBank 登录号 M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343。
BRAF (RAF 的同种型)。	Tannapfel, 等 (2005) Am. J. Clin.Pathol.123:256-2601; Tsao 和 Sober (2005) Dermatol.Clin.23:323-333。
黑色素瘤抗原, 包括 HST-2 黑色素瘤细胞抗原。	GenBank 登录号 NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_006115; NM_005367; NM_004988; AY148486; U10340; U10339; M77481。参见, 例如, Suzuki, 等 (1999) J. Immunol. 163:2783-2791。
存活素(Survivin)	GenBank 登录号 AB028869; U75285 (还参见, 例如, Tsuruma, 等 (2004) J. Translational Med. 2:19 (11 pages); Pisarev, 等 (2003) Clin.Cancer Res.9:6523-6533; Siegel, 等 (2003) Br.J. Haematol.122:911-914;

[0155]

	Andersen, 等 (2002) <i>Histol.Histopathol.</i> 17:669-675)。
MDM-2	NM_002392; NM_006878 (还参见, 例如, Mayo, 等 (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:5013-5016; Demidenko 和 Blagosklonny (2004) <i>Cancer Res.</i> 64:3653-3660)。
甲基-CpG-结合蛋白 (MeCP2; MBD2)。	Muller, 等 (2003) <i>Br.J. Cancer</i> 89:1934-1939; Fang, 等 (2004) <i>World J. Gastroenterol.</i> 10:3394-3398。
NA88-A。	Moreau-Aubry, 等 (2000) <i>J. Exp. Med.</i> 191:1617-1624。
组蛋白去乙酰化酶(HDAC), 例如, HDAC 5。	Waltregny, 等 (2004) <i>Eur.J. Histochem.</i> 48:273-290; Scanlan, 等 (2002) <i>Cancer Res.</i> 62:4041-4047。
亲环素 B (Cyp-B)。	Tamura, 等 (2001) <i>Jpn.J. Cancer Res.</i> 92:762-767。
CA 15-3; CA 27.29。	Clinton, 等 (2003) <i>Biomed.Sci. Instrum.</i> 39:408-414。
热休克蛋白 Hsp70。	Faure, 等 (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:863-870。
GAGE/PAGE 家族, 例如, PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3。	Brinkmann, 等 (1999) <i>Cancer Res.</i> 59:1445-1448。
MAGE-A、B、C 和 D 家族。MAGE-B5; MAGE-B6; MAGE-C2; MAGE-C3; MAGE-3; MAGE-6。	Lucas, 等 (2000) <i>Int. J. Cancer</i> 87:55-60; Scanlan, 等 (2001) <i>Cancer Immun.</i> 1:4。
驱动蛋白 2; TATA 元件调节因子 1; 肿瘤蛋白 D53; NY	Scanlan, 等 (2001) <i>Cancer Immun.</i> 30:1-4。
α -甲胎蛋白(AFP)	Grimm, 等 (2000) <i>Gastroenterol.</i> 119:1104-1112。
SART1; SART2; SART3; ART4。	Kumamuru, 等 (2004) <i>Int. J. Cancer</i> 108:686-695; Sasatomi, 等 (2002) <i>Cancer</i> 94:1636-1641; Matsumoto, 等 (1998) <i>Jpn.J. Cancer Res.</i> 89:1292-1295; Tanaka, 等 (2000) <i>Jpn.J. Cancer Res.</i> 91:1177-1184。
优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)。	Matsushita, 等 (2003) <i>Leuk.Lymphoma</i> 44:439-444; Oberthuer, 等 (2004) <i>Clin.Cancer Res.</i> 10:4307-4313。
癌胚抗原(CEA), CA P1-6D 增强剂激动剂肽。	GenBank 登录号 M29540; E03352; X98311; M17303 (还参见, 例如, Zaremba (1997) <i>Cancer Res.</i> 57:4570-4577; Sarobe, 等 (2004) <i>Curr.Cancer Drug Targets</i> 4:443-454; Tsang, 等 (1997) <i>Clin.Cancer Res.</i> 3:2439-2449; Fong, 等 (2001) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. US A</i> 98:8809-8814)。
HER-2/neu。	Disis, 等 (2004) <i>J. Clin.Immunol.</i> 24:571-578; Disis 和 Cheever (1997) <i>Adv.Cancer Res.</i> 71:343-371。

[0156]

Cdk4; cdk6; p16 (INK4); Rb 蛋白。	Ghazizadeh, 等 (2005) Respiration 72:68-73; Ericson, 等 (2003) Mol. Cancer Res.1:654-664。
TEL; AML1; TEL/AML1。	Stams, 等 (2005) Clin.Cancer Res.11:2974-2980。
端粒酶(TERT)。	Nair, 等 (2000) Nat. Med. 6:1011-1017。
707-AP。	Takahashi, 等 (1997) Clin.Cancer Res.3:1363-1370。
膜联蛋白, 例如膜联蛋白 II。	Zimmerman, 等 (2004) Virchows Arch.445:368-374。
BCR/ABL; BCR/ABL p210; BCR/ABL p190; CML-66; CML-28。	Cobalddda, 等 (2000) Blood 95:1007-1013; Hakansson, 等 (2004) Leukemia 18:538-547; Schwartz, 等 (2003) Semin.Hematol.40:87-96; Lim, 等 (1999) Int. J. Mol. Med. 4:665-667。
BCL2; BLC6; CD10 蛋白。	Iqbal, 等 (2004) Am. J. Pathol.165:159-166。
CDC27 (这是黑色素瘤抗原)。	Wang, 等 (1999) Science 284:1351-1354。
精子蛋白 17 (SP17); 14-3-3- ζ ; MEMD; KIAA0471; TC21。	Arora, 等 (2005) Mol. Carcinog.42:97-108。
酪氨酸酶相关蛋白 1 和 2 (TRP-1 和 TRP-2)。	GenBank 登录号 NM_001922。(还参见, 例如, Bronte, 等 (2000) Cancer Res.60:253-258)。
Gp100/pmcl-17。	GenBank 登录号 AH003567 ; U31798 ; U31799 ; U31807 ; U31799 (还参见, 例如, Bronte, 等 (2000) Cancer Res.60:253-258)。
TARP。	参见, 例如, Clifton, 等 (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:10166-10171; Virok, 等 (2005) Infection Immunity 73:1939-1946。
酪氨酸酶相关蛋白 1 和 2 (TRP-1 和 TRP-2)。	GenBank 登录号 NM_001922。(还参见, 例如, Bronte, 等 (2000) Cancer Res.60:253-258)。
黑皮素 1 受体(MC1R); MAGE-3; gp100; 酪氨酸酶; 多巴色素互变异构酶(TRP-2); MART-1。	Salazar-Onfray, 等 (1997) Cancer Res.57:4348-4355; Reynolds, 等 (1998) J. Immunol. 161:6970-6976; Chang, 等 (2002) Clin.Cancer Res.8:1021-1032。
MUC-1; MUC-2。	参见, 例如, Davies, 等 (1994) Cancer Lett.82:179-184; Gambus, 等 (1995) Int. J. Cancer 60:146-148; McCool, 等 (1999) Biochem.J. 341:593-600。
Spas-1。	美国公布的专利申请号 20020150588, Allison, 等。
CASP-8; FLICE; MACH。	Mandruzzato, 等 (1997) J. Exp. Med. 186:785-793。
CEACAM6; CAP-1。	Duxbury, 等 (2004) Biochem.Biophys.Res.Comm.317:837-843; Morse, 等 (1999) Clin.Cancer Res.5:133

[0157]

	1-1338。
HMGB1 (DNA 结合蛋白和细胞因子)。	Brezniceanu, 等 (2003) FASEB J. 17:1295-1297。
ETV6/AML1。	Codrington, 等 (2000) Br.J. Haematol.111:1071-1079。
腺瘤性结肠息肉(APC)的突变和野生型形式; β -连环蛋白; c-met; p53; E-钙粘蛋白; 环氧酶-2 (COX-2)。	Clements, 等 (2003) Clin.Colorectal Cancer 3:113-120; Gulmann, 等 (2003) Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.11:230-237; Jungck, 等 (2004) Int. J. Colorectal.Dis. 19:438-445; Wang, 等 (2004) J. Surg.Res.120:242-248; Abutaily, 等 (2003) J. Pathol.201:355-362; Liang, 等 (2004) Br.J. Surg.91:355-361; Shirakawa, 等 (2004) Clin.Cancer Res.10:4342-4348。
通过 mAB G250 结合的肾细胞癌抗原。	Mulders, 等 (2003) Urol.Clin.North Am. 30:455-465; Steffens, 等 (1999) Anticancer Res.19:1197-1200。
EphA2	参见, 例如, 美国专利公布号 2005/0281783 A1; Genbank 登录号 NM_004431 (人); Genbank 登录号 NM_010139 (小鼠); Genbank 登录号 AB038986 (鸡, 部分序列); GenBank 登录号 NP_004422, AAH37166 和 AA53375 (人); GenBank 登录号 NP_034269 (小鼠), AAH06954 (小鼠), XP_345597 (大鼠)和 BAB63910 (鸡)。
EGFRvIII	参见, 例如, WO/2012/068360
土拉弗朗西斯菌抗原	
土拉弗朗西斯菌 A 和 B。	亚种 Schu S4 (GenBank 登录号 AJ749949); 亚种 Schu 4 (GenBank 登录号 NC_006570)的完整基因组。外膜蛋白(43 kDa) Bevanger, 等 (1988) J. Clin.Microbiol.27:922-926; Porsch-Ozcurumez, 等 (2004) Clin.Diagnostic.Lab.Immunol. 11:1008-1015)。土拉弗朗西斯菌的抗原成分包括, 例如, 80 抗原, 包括 10 kDa 和 60 kDa 伴侣蛋白(Havlasova, 等 (2002) Proteomics 2:857-86)、二磷酸核苷激酶、异柠檬酸脱氢酶、RNA 结合蛋白 Hfq、分子伴侣 ClpB (Havlasova, 等 (2005) Proteomics 5:2090-2103)。还参见, 例如, Oyston 和 Quarry (2005) Antonie Van Leeuwenhoek 87:277-281; Isherwood, 等 (2005) Adv.Drug Deliv.Rev.57:1403-1414; Biagini, 等 (2005) Anal.Bioanal.Chem.382:1027-1034。
疟疾抗原	
环孢子蛋白(CSP); SSP2; HEP17; 在恶性疟原虫(P. falciparum)中发现的 Exp-1 直系同源物; 和 LSA	参见, 例如, Haddad, 等 (2004) Infection Immunity 72:1594-1602; Hoffman, 等 (1997) Vaccine 15:842-845; Oliveira-Ferreira 和 Daniel-Ribeiro (2001) Mem.Inst.Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 96:221-227。CSP (参见, 例如, GenBank 登录号 AB121024)。SSP2 (参

[0158]

-1。	见, 例如, GenBank 登录号 AF249739)。LSA-1 (参见, 例如, GenBank 登录号 Z30319)。
环状体感染的红细胞表面蛋白(RESA); 裂殖子表面蛋白 2 (MSP2); Spf66; 裂殖子表面蛋白 1 (MSP1); 195A; BVp42。	参见, 例如, Stirnadel, 等 (2000) Int. J. Epidemiol.29:579-586; Krzych, 等 (1995) J. Immunol. 155:4072-4077。还参见, Good, 等 (2004) Immunol. Rev.201:254-267; Good, 等 (2004) Ann.Rev. Immunol. 23:69-99。MSP2 (参见, 例如, GenBank 登录号 X96399; X96397)。MSP1 (参见, 例如, GenBank 登录号 X03371)。RESA (参见, 例如, GenBank 登录号 X05181; X05182)。
顶膜抗原 1 (AMA1)。	参见, 例如, Gupta, 等 (2005) Protein Expr.Purif.41: 186-198。AMA1 (参见, 例如, GenBank 登录号 A13; AJ494905; AJ490565)。
病毒和病毒抗原	
甲型肝炎	GenBank 登录号, 例如, NC_001489; AY644670; X83302; K02990; M14707。
乙型肝炎	完整的基因组(参见, 例如, GenBank 登录号 AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756)。
丙型肝炎	完整的基因组(参见, 例如, GenBank 登录号 NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; AJ000009; D84263)。
丁型肝炎	GenBank 登录号, 例如, NC_001653; AB118847; AY261457。
人乳头瘤病毒, 包括所有 200 多个亚型(分类成 16 组), 诸如高风险亚型 16、18、30、31、33、45。	参见, 例如, Trimble, 等 (2003) Vaccine 21:4036-4042; Kim, 等 (2004) Gene Ther. 11:1011-1018; Simon, 等 (2003) Eur.J. Obstet.Gynecol.Reprod.Biol. 109: 219-223; Jung, 等 (2004) J. Microbiol.42:255-266; Damasus-Awatai 和 Freeman-Wang (2003) Curr.Opin. Obstet.Gynecol.15:473-477; Jansen 和 Shaw (2004) Annu.Rev. Med. 55:319-331; Roden 和 Wu (2003) Expert Rev. Vaccines 2:495-516; de Villiers, 等 (2004) Virology 324:17-24; Hussain 和 Paterson (2005) Cancer Immunol. Immunother.54:577-586; Molijn, 等 (2005) J. Clin.Virol.32 (增刊 1) S43-S51。GenBank 登录号 AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596)。
人类嗜 T 淋巴细胞病毒(HTLV) I 型和 II 型, 包括 HTLV I 型亚型 Cosmopolitan、Central African 和 Aust	参见, 例如, Capdepon, 等 (2005) AIDS Res.Hum. Retrovirus 21:28-42; Bhigjee, 等 (1999) AIDS Res. Hum.Retrovirus 15:1229-1233; Vandamme, 等 (1998) J. Virol.72:4327-4340; Vallejo, 等 (1996) J. Acquir.Immune Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.13:384-391。H

[0159]

ro-Melanesian, 以及 HTLV II 型亚型 Iia、Iib、Iic 和 Iid。	TLV I 型(参见, 例如, GenBank 登录号 AY563954; AY563953。HTLV II 型(参见, 例如, GenBank 登录号 L03561; Y13051; AF139382)。
冠状病毒科, 包括冠状病毒, 诸如 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)和朊病毒(torovirus e)。	参见, 例如, Brian 和 Baric (2005) Curr.Top.Microbiol.Immunol. 287:1-30; Gonzalez, 等 (2003) Arch.Virol.148:2207-2235; Smits, 等 (2003) J. Virol.77:9567-9577; Jamieson, 等 (1998) J. Infect.Dis. 178:1263-1269 (GenBank 登录号 AY348314; NC_004718; AY394850)。
风疹病毒。	GenBank 登录号 NC_001545; AF435866。
腮腺炎病毒, 包括基因型 A、C、D、G、H 和 I。	参见, 例如, Orvell, 等(2002) J. Gen. Virol.83:2489-2496。参见, 例如, GenBank 登录号 AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473。
柯萨奇病毒 A 包括血清型 1、11、13、15、17、18、19、20、21、22 和 24 (也被称为人类肠道病毒 C; HEV-C)。	参见, 例如, Brown, 等 (2003) J. Virol.77:8973-8984。GenBank 登录号 AY421768; AY790926; X67706。
柯萨奇病毒 B, 包括亚型 1-6。	参见, 例如, Ahn, 等 (2005) J. Med. Virol.75:290-294; Patel, 等 (2004) J. Virol.Methods 120:167-172; Rezig, 等 (2004) J. Med. Virol.72:268-274。GenBank 登录号 X05690。
人类肠道病毒包括, 例如人类肠道病毒 A (HEV-A、CAV2 至 CAV8、CAV10、CAV12、CAV14、CAV16 和 EV71), 也包括 HEV-B (CAV9、CBV1 至 CBV6、E1 至 E7、E9、E11 至 E21、E24 至 E27、E29 至 E33 和 EV69 和 E73)以及 HEV。	参见, 例如, Oberste, 等 (2004) J. Virol.78:855-867。人类肠道病毒 A (GenBank 登录号 NC_001612); 人类肠道病毒 B (NC_001472); 人类肠道病毒 C (NC_001428); 人类肠道病毒 D (NC_001430)。猿肠道病毒 A (GenBank 登录号 NC_003988)。
脊髓灰质炎病毒包括 PV1、PV2 和 PV3。	参见, 例如, He, 等 (2003) J. Virol.77:4827-4835; Hahsido, 等 (1999) Microbiol.Immunol. 43:73-77。GenBank 登录号 AJ132961 (类型 1); AY278550 (类型 2); X04468 (类型 3)。
病毒性脑炎病毒, 包括马脑炎、委内瑞拉马脑炎(VEE) (包括亚型 IA、IB、IC、ID、IIIC、IIID)、东方	参见, 例如, Hoke (2005) Mil.Med. 170:92-105; Estrada-Franco, 等 (2004) Emerg.Infect.Dis. 10:2113-2121; Das, 等 (2004) Antiviral Res.64:85-92; Aguilar, 等 (2004) Emerg.Infect.Dis. 10:880-888; Weaver, 等 (2004) Arch.Virol.Suppl.18:43-64; Weaver, 等 (200

[0160]

马脑炎(EEE)、西方马脑炎(WEE)、圣路易斯(St. Louis)脑炎、穆雷谷(Murray Valley)(澳大利亚)脑炎、日本脑炎和蜱出生脑炎。	4) Annu.Rev. Entomol.49:141-174。东方马脑炎病毒(GenBank 登录号 NC_003899; AY722102); 西方马脑炎病毒(NC_003908)。
人类疱疹病毒, 包括巨细胞病毒(CMV)、艾巴氏(Epstein-Barr)病毒(EBV)、人类疱疹病毒 1 型(HHV-1)、HHV-2、HHV-3、HHV-4、HHV-5、HHV-6、HHV-7、HHV-8、乙型疱疹病毒、单纯疱疹病毒 1 型和 2 型(HSV-1、HSV-2)和水痘带状疱疹病毒(VZV)。	参见, 例如, Studahl, 等 (2000) Scand.J. Infect.Dis. 32:237-248; Padilla, 等 (2003) J. Med. Virol.70 (增刊 1) S103-S110; Jainkittivong 和 Langlais (1998) Oral Surg.Oral Med. 85:399-403。GenBank 号 NC_001806 (疱疹病毒 1); NC_001798 (疱疹病毒 2); X04370 和 NC_001348 (疱疹病毒 3); NC_001345 (疱疹病毒 4); NC_001347 (疱疹病毒 5); X83413 和 NC_000898 (疱疹病毒 6); NC_001716 (疱疹病毒 7)。人类疱疹病毒类型 6 和 7 (HHV-6; HHV-7)公开于例如 Padilla, 等 (2003) J. Med. Virol.70 (增刊 1)S103-S110。人类疱疹病毒 8 (HHV-8), 包括亚型 A-E, 公开于例如, Treurnicht, 等 (2002) J. Med. Virol.66:235-240。
HIV-1 包括 M 组(包括亚型 A 至 J)和 O 组(包括任何可区别的亚型) (HIV-2, 包括亚型 A-E)。	参见, 例如, Smith, 等 (1998) J. Med. Virol.56:264-268。还参见, 例如, GenBank 登录号 DQ054367; NC_001802; AY968312; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597;和 AJ508596。
艾巴氏病毒(EBV), 包括亚型 A 和 B。	参见, 例如, Peh, 等 (2002) Pathology 34:446-450。艾巴氏病毒株 B95-8 (GenBank 登录号 V01555)。
呼肠弧病毒, 包括血清型和毒株 1、2 和 3, 1 型 Lang, 2 型 Jones 和 3 型 Dearing。	参见, 例如, Barthold, 等 (1993) Lab.Anim.Sci. 43: 425-430; Roner, 等 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 92:12362-12366; Kedl, 等 (1995) J. Virol.69:552-559。GenBank 登录号 K02739 (σ -3 基因表面蛋白)。
巨细胞病毒(CMV)亚型包括 CMV 亚型 I-VII。	参见, 例如, Chern, 等 (1998) J. Infect.Dis. 178:1149-1153; Vilas Boas, 等 (2003) J. Med. Virol.71:404-407; Trincado, 等 (2000) J. Med. Virol.61:481-487。GenBank 登录号 X17403。
鼻病毒, 包括所有血清型。	人类鼻病毒 2 (GenBank 登录号 X02316); 人类鼻病毒 B (GenBank 登录号 NC_001490); 人类鼻病毒 89 (GenBank 登录号 NC_001617); 人类鼻病毒 39 (GenBank 登录号 AY751783)。
腺病毒, 包括所有血清型。	AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_000015; AC_000008; AC_000007; AC_000006; AC_000005; AY737798; AY737797; NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253;

	NC_001460; NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578。
丝状病毒, 包括马尔堡(Marburg)病毒和埃博拉(Ebola)病毒, 以及菌株诸如埃博拉苏丹(Ebola-Sudan) (EBO-S), 埃博拉-扎伊尔(Ebola-Zaire) (EBO-Z)和埃博拉-斯顿(Ebola-Reston) (EBO-R)。	参见, 例如, Geisbert 和 Jahrling (1995) Virus Res.3 9:129-150; Hutchinson, 等 (2001) J. Med. Virol.65:5 61-566。马尔堡病毒(参见, 例如, GenBank 登录号 NC_001608)。埃博拉病毒(参见, 例如, GenBank 登录号 NC_006432; AY769362; NC_00254 9; AF272001; AF086833)。
沙粒病毒, 包括淋巴细胞性脉络丛脑膜炎 (LCM)病毒、拉沙(Lassa)病毒、胡宁(Junin)病毒和马秋博(Machupo)病毒。	胡宁病毒, 片段 S (GenBank 登录号 NC_005081); 胡宁病毒, 片段 L (GenBank 登录号 NC_005080)。
狂犬病毒。	参见, 例如, GenBank 登录号 NC_001542; AY95631 9; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663。
[0161] 虫媒病毒, 包括西尼罗河病毒、登革热(Dengue)病毒 1 至 4、科罗拉多蜱热病毒(Colorado tick fever virus)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、披膜病毒科(Togaviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、呼肠弧病毒科(Reoviridae)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)等。	登革热病毒 1 型(参见, 例如, GenBank 登录号 AB19 5673; AY762084)。登革热病毒 2 型(参见, 例如, GenBank 登录号 NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037)。登革热病毒 3 型(参见, 例如, GenBank 登录号 AY923865; AT858043)。登革热病毒 4 型(参见, 例如, GenBank 登录号 AY947539; AY947539; AF326573)。辛德毕斯病毒(参见, 例如, GenBank 登录号 NC_001547; AF429428; J02363; AF103728)。西尼罗河病毒(参见, 例如, GenBank 登录号 NC_00156 3; AY603654)。
痘病毒包括正痘病毒(天花病毒、猴痘病毒、牛痘病毒、牛痘病毒)、亚塔痘病毒属(yatapoxvirus) (特纳河痘病毒(tanapox virus)、雅巴猴肿瘤病毒属)、副痘病毒属和软	天花(Variola)病毒(参见, 例如, GenBank 登录号 NC_001611; Y16780; X72086; X69198)。

[0162]

疣痘病毒属(mollusci poxvirus)。	
黄热病。	参见, 例如, GenBank 登录号 NC_002031; AY640589; X03700。
汉坦病毒, 包括血清型汉滩(Hantaan) (HTN)、汉城(Seoul) (SEO)、多布拉瓦(Dobrava) (DOB)、辛诺柏(Sin Nombre) (SN)、普马拉(Puumala) (PUU)和多布拉瓦(Dobrava)样 Saaremaa (SAAV)。	参见, 例如, Elgh, 等 (1997) J. Clin.Microbiol.35:1122-1130; Sjolander, 等 (2002) Epidemiol.Infect.128:99-103; Zeier, 等 (2005) Virus Genes 30:157-180。GenBank 登录号 NC_005222 和 NC_005219 (汉坦病毒)。还参见, 例如, GenBank 登录号 NC_005218; NC_005222; NC_005219。
黄病毒, 包括登革病毒、日本脑炎病毒、西尼罗河病毒、黄热病毒。	参见, 例如, Mukhopadhyay, 等 (2005) Nature Rev. Microbiol.3:13-22。GenBank 登录号 NC_001474 和 AY702040 (登革热)。GenBank 登录号 NC_001563 和 AY603654。
麻疹病毒。	参见, 例如, GenBank 登录号 AB040874 和 AY486084。
人类副流感病毒(HPV), 包括 HPV 类型 1-56。	人类副流感病毒 2 (参见, 例如, GenBank 登录号 AB176531; NC003443)。人类副流感病毒 3 (参见, 例如, GenBank 登录号 NC_001796)。
流感病毒, 包括流感病毒类型 A、B 和 C。	流感核衣壳(参见, 例如, GenBank 登录号 AY626145)。流感血细胞凝集素(参见, 例如, GenBank 登录号 AY627885; AY555153)。流感神经氨酸苷酶(参见, 例如, GenBank 登录号 AY555151; AY577316)。流感基质蛋白 2 (参见, 例如, GenBank 登录号 AY626144)。流感碱性蛋白 1 (参见, 例如, GenBank 登录号 AY627897)。流感聚合酶酸性蛋白(参见, 例如, GenBank 登录号 AY627896)。流感核蛋白(参见, 例如, GenBank 登录号 AY627895)。
流感病毒 A 亚型, 例如猪病毒(SIV): H1N1 流感 A 和猪流感病毒。	H1N1 的血凝素(GenBank 登录号 S67220)。流感病毒 A 基质蛋白(GenBank 登录号 AY700216)。流感病毒 A H5H1 核蛋白(GenBank 登录号 AY646426)。H1N1 血凝素(GenBank 登录号 D00837)。还参见, GenBank 登录号 BD006058; BD006055; BD006052。还参见, 例如, Wentworth, 等 (1994) J. Virol.68:2051-2058;

[0163]

	Wells, 等 (1991) J.A.M.A. 265:478-481。
呼吸道合胞病毒(RSV), 包括亚组 A 和亚组 B。	呼吸道合胞病毒(RSV) (参见, 例如, GenBank 登录号 AY353550; NC_001803; NC001781)。
轮状病毒, 包括人类轮状病毒 A 至 E、牛轮状病毒、猕猴轮状病毒和人类 RVV 重配。	人类轮状病毒 C 片段 8 (GenBank 登录号 AJ549087); 人类轮状病毒 G9 毒株外衣壳蛋白(参见, 例如, GenBank 登录号 DQ056300); 人类轮状病毒 B 毒株非结构蛋白 4 (参见, 例如, GenBank 登录号 AY548957); 人类轮状病毒 A 毒株主要内衣壳蛋白(参见, 例如, GenBank 登录号 AY601554)。
多瘤病毒, 包括猿病毒 40 (SV40)、JC 病毒(JCV)和 BK 病毒(BKV)。	参见, 例如, Engels, 等 (2004) J. Infect.Dis. 190:2065-2069; Vilchez 和 Butel (2004) Clin.Microbiol.Rev. 17:495-508; Shivapurkar, 等 (2004) Cancer Res.64:3757-3760; Carbone, 等 (2003) Oncogene 2:5173-5180; Barbanti-Brodano, 等 (2004) Virology 318:1-9) (SV40 完整基因组在例如, GenBank 登录号 NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562)。
Colti 病毒(Coltiviruses), 包括科罗拉多蜱传热病毒(Colorado tick fever virus)、埃亚契病毒(Eyach viruses)。	Attoui, 等 (1998) J. Gen. Virol.79:2481-2489。Eyach 病毒的片段(参见, 例如, GenBank 登录号 <u>AF282475</u> ; <u>AF282472</u> ; <u>AF282473</u> ; <u>AF282478</u> ; <u>AF282476</u> ; <u>NC_003707</u> ; <u>NC_003702</u> ; <u>NC_003703</u> ; <u>NC_003704</u> ; <u>NC_003705</u> ; <u>NC_003696</u> ; <u>NC_003697</u> ; <u>NC_003698</u> ; <u>NC_003699</u> ; <u>NC_003701</u> ; <u>NC_003706</u> ; <u>NC_003700</u> ; <u>AF282471</u> ; <u>AF282477</u>)。
杯状病毒(Calcivirus), 包括基因组诺瓦克(Norwalk)、雪山组(Snow Mountain group) (SMA)和 Saaporio。	雪山病毒(参见, 例如, GenBank 登录号 AY134748)。
细小病毒科(Parvoviridae), 包括依赖病毒属(dependovirus)、细小病毒属(包括细小病毒 B19)和红病毒属(erythrovirus)。	参见, 例如, Brown (2004) Dev. Biol. (Basel) 118:71-77; Alvarez-Lafuente, 等 (2005) Ann.Rheum.Dis. 64:780-782; Ziyacyan, 等 (2005) Jpn.J. Infect.Dis. 58:95-97; Kaufman, 等 (2005) Virology 332:189-198。

[0164] 对于合适的抗原在本领域已知的其它生物体包括但不限于沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A组链球菌)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactia*) (B组链球菌)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumonia*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟氏

菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 种 (包括伤寒杆菌 (*typhi*)、鼠伤寒杆菌 (*typhimurium*))、肠道菌 (*enterica*) (包括幽门螺杆菌志贺氏菌 (*Helicobacter pylori* *Shigella flexneri*) 和其他D组志贺氏菌 (*shigella*) 种)、鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia mallei*)、鼻疽杆菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumonia*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*) 种 (包括艰难梭菌 (*C.difficile*))、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 和创伤弧菌 (*V.vulnificus*)。这个列举并不意味着是限制性的。

[0165] 药物组合物

[0166] 如本文所用的术语“药物”是指旨在用于治愈、治疗或预防疾病并且经过美国食品和药物管理局 (或其非美国的等同机构) 的批准过程作为处方或者非处方药产品的化学物质。用于此类组合物的配制和施用的技术细节描述于 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第21版 (Mack Publishing Co., Easton, PA) 以及 Nielloud 和 Marti-Mestres, Pharmaceutical Emulsions and Suspensions: 第2版 (Marcel Dekker, Inc, New York)。

[0167] 为了本公开的目的, 可以含有药学上可接受的载体、佐剂和媒介物的制剂通过多种方式包括口服、胃肠外、通过吸入喷雾、局部或直肠来施用药物组合物。如本文所用的术语胃肠外包括但不限于使用各种输注技术的皮下、静脉内、肌内、动脉内、皮内、鞘内和硬膜外注射。如本文所用的动脉内和静脉内注射包括通过导管施用。经过冠状动脉内支架及冠状动脉内储库 (reservoir) 的施用也可以考虑。如本文所用的术语口服包括但不限于口服摄取、或通过舌下或口腔途径递送。口服施用包括流体饮用、能量棒以及丸制剂。

[0168] 药物组合物可以呈适于施用的预期方法的任何形式。当用于口服使用时, 例如可以制备片剂、含片、锭剂、水混悬剂或油混悬剂、可分散粉剂或颗粒剂、乳剂、硬胶囊或软胶囊、糖浆剂或酏剂。旨在用于口服使用的组合物可根据本领域中已知用于制造药物组合物的任何方法来制备, 并且此类组合物可含有一种或多种包括甜味剂、调味剂、着色剂以及防腐剂的药剂, 以便提供可口的制剂。含有药物化合物与适用于片剂制造的非毒性药学上可接受的赋形剂的混合物的片剂是可接受的。这些赋形剂可以是例如惰性稀释剂, 诸如碳酸钙或碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠; 成粒剂和崩解剂, 诸如玉米淀粉或海藻酸; 粘合剂, 诸如淀粉、明胶或阿拉伯胶; 以及润滑剂, 诸如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可不加以包衣或可通过包括肠溶衣、结肠溶衣或微囊化在内的已知技术加以包衣, 以延迟在胃肠道中的崩解和吸收和/或提供历经较长时间的持续作用。举例来说, 可采用延时材料诸如单独或与蜡一起的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0169] 用于口服使用的制剂还可呈现为硬明胶胶囊剂, 其中药物化合物与惰性固体稀释剂 (例如磷酸钙或高岭土) 混合; 或呈现为软明胶胶囊剂, 其中活性成分与水或油介质 (诸如花生油、液体石蜡或橄榄油) 混合。

[0170] 药物组合物可以配制成水性混悬剂与适于制造水性混悬剂的赋形剂的混合物。此类赋形剂包括助悬剂, 诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙氧基吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶, 以及分散剂或湿润剂诸如天然存在的磷脂 (例如卵磷脂)、氧化烯与脂肪酸的缩合产物 (例如聚氧乙烯硬脂酸酯)、氧化乙烯与长链脂族醇的缩合产物 (例如十七亚乙基氧基鲸蜡醇)、氧化乙烯与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产

物(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯)。水性混悬液还可含有一种或多种防腐剂诸如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂以及一或多种甜味剂诸如蔗糖或糖精。

[0171] 油性混悬剂可通过使活性成分混悬于植物油(诸如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(诸如液体石蜡)中来配制。口服混悬剂可含有增稠剂,诸如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可添加甜味剂(诸如上述的那些甜味剂)和调味剂以提供可口的口服制剂。这些组合物可通过添加诸如抗坏血酸的抗氧化剂来保存。

[0172] 适于通过添加水制备水性混悬剂的可分散的粉剂和颗粒剂,提供与分散剂或湿润剂、助悬剂及一种或多种防腐剂混合的活性成分。适合的分散剂或湿润剂及助悬剂已通过上面公开的那些物质来举例说明。还可存在额外的赋形剂,例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0173] 本发明的药物组合物还可以为水包油乳剂的形式。油相可以为植物油(诸如橄榄油或花生油)、矿物油(诸如液体石蜡)或其混合物。合适的乳化剂包括天然存在的树胶,诸如阿拉伯胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,诸如大豆卵磷脂、衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯(诸如失水山梨糖醇单油酸酯);和这些偏酯与氧化乙烯的缩合产物,诸如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。乳剂还可含有甜味剂或调味剂。

[0174] 糖浆和酏剂可与诸如甘油、山梨糖醇或蔗糖的甜味剂一起配制。此类制剂还可含有缓和剂、防腐剂、调味剂或着色剂。

[0175] 本公开的药物组合物可以是无菌可注射制剂形式,诸如无菌可注射水性或油性混悬剂。可根据已知技术,使用已在以上提及的那些适合的分散剂或润湿剂以及混悬剂来配制这种混悬液。无菌可注射制剂也可为在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬剂,诸如在1,3-丁二醇中的溶液或制备成冻干粉剂。可采用的可接受媒介物和溶剂为水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发油可常规地用作溶剂或混悬介质。对于这个目的,可采用任何温和和不挥发性油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,脂肪酸(诸如油酸)也可用于可注射液的制备。

[0176] 可与载体物质组合以产生单剂型的活性成分的量将根据治疗宿主和特殊施用模式而变化。举例来说,旨在对人口服施用的定时释放制剂可含有与适当且方便的量的载体物质混配的大约20至500mg活性物质,所述载体物质的量可在总组合物的约5%至约95%之间变化。优选的是可制备药物组合物以便容易提供可测量的施用量。通常,全身施用的有效量为约0.1mg/kg至约100mg/kg,并取决于许多因素包括例如受试者(例如,哺乳动物诸如人)的年龄和体重、需要治疗的精确条件及其严重程度、施用途径,并且将最终由护理医生或兽医判断。然而应理解,任何特殊患者的特定剂量水平将取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性;待治疗个体的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间和途径;排泄率;之前已施用的其它药物;和进行治疗的特殊病状的严重程度,如本领域技术人员所很好理解。

[0177] 如上所示,适合口服施用的本发明的制剂可作为各自含有预定量的活性成分的分散单元,诸如胶囊、扁囊剂或片剂;作为粉剂或颗粒剂;作为在水性或非水性液体中的溶液或混悬剂;或作为水包油液体乳剂或油包水液体乳剂呈现。所述药物组合物还可以大丸剂、药糖剂或糊剂施用。

[0178] 可以任选地与一种或多种辅助成分通过压制或模制来制备片剂。压制片剂可通过

在合适的机器中压制任选地与粘合剂(例如,聚维酮、明胶、羟丙基乙基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羟乙基淀粉钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂混合的呈自由流动形式的活性成分诸如粉剂或颗粒剂来制备。可通过在合适的机器中使用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物制成模制片剂。所述片剂可任选地进行包衣或刻痕,并且可以使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素配制以便提供在其中缓慢或控制释放的活性成分,以提供所需的释放曲线。可以任选地提供具有肠溶或结肠溶包衣的片剂,以提供在胃肠以外的部分释放。当此类化合物易于酸水解时,式1的化合物是特别有利的。

[0179] 适用于在口中局部施用的制剂包括:包含在调味基质(通常蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中的活性成分的锭剂;包含在惰性基质(诸如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶)中的活性成分的软锭剂(pastille);以及包含在合适的液体载体中的活性成分的漱口水。

[0180] 用于直肠施用的制剂可以呈现为具有合适的基质(包括例如可可脂或水杨酸酯)的栓剂。

[0181] 适用于阴道施用的制剂可以子宫托、棉塞、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂形式呈现,所述制剂含有除了活性成分之外的如本领域已知的合适的载体。

[0182] 适用于胃肠外施用的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和赋予制剂与预期受者血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌混悬剂,其可包括助悬剂和增稠剂。制剂可以在单位剂量或多剂量密封容器例如安瓿和小瓶中提供,并且可以贮存于冻干(冷冻干燥的)条件下,仅需要在使用前即刻添加用于注射的无菌液体载体,例如水。注射溶液剂和混悬剂可通过之前所述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0183] 如本文所用,药学上可接受的盐包括但不限于:乙酸盐、吡啶、铵盐、哌嗪、二乙胺、烟酰胺、甲酸盐、脲、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、锌盐、锂盐、肉桂酸盐、甲氨基盐、甲磺酸盐、苦味酸盐、酒石酸盐、三乙氨基盐、二甲氨基盐和三羟甲基氨基甲烷。另外的药学上可接受的盐是本领域技术人员公知的。

[0184] 特定患者的有效量可以根据诸如所治疗的病状、患者的整体健康状况、施用途径和剂量以及副作用的严重程度的因素而变化。治疗和诊断方法指南是可获得的(参见,例如,Maynard,等(1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK)。

[0185] 有效量可以以一个剂量给予,但不限于一个剂量。因此,施用可以是药物组合物的两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十或更多次施用。当在本发明方法中存在药物组合物的一次以上的施用,施用可以通过一分钟、两分钟、三、四、五、六、七、八、九、十或更多分钟的时间间隔,通过约一小时、两小时、三、四、五、六、七、八、九、十、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时并依此类推的间隔而隔开。在小时的上下文中,术语“约”意指加或减30分钟内的任何时间间隔。所述施用还可以通过一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天及其组合的时间间隔而隔开。本发明并不限于在时间上相等间隔的给药间隔,而是包括以不相等间隔的给药。

[0186] 例如一次/周、两次/周、三次/周、四次/周、五次/周、六次/周、七次/周、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次等的给药方案可用于本发明。给药方案包括总时间为例如一周、两周、三周、四周、五周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月和十二个月的给药。

[0187] 本发明提供以上给药方案的周期。该周期可以重复约例如每七天；每14天；每21天；每28天；每35天；每42天；每49天；每56天；每63天；每70天；等。非给药的间隔可以发生在周期之间，其中所述间隔可以是约例如七天；14天；21天；28天；35天；42天；49天；56天；63天；70天；等。在此背景下，术语“约”意指加或减一天、加或减两天、加或减三天、加或减四天、加或减五天、加或减六天、或加或减七天。

[0188] 用于与另外的治疗剂共施用的方法是本领域公知的 (Hardman, 等 (编) (2001) Goodman和Gilman的The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,McGraw-Hill,New York,NY;Poole和Peterson (编) (2001)Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA;Chabner和Longo (编) (2001)Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA)。

[0189] 正如所指出的,本发明的组合物优选地被配制用于胃肠外或经肠递送的药物组合物。用于施用给动物的典型药物组合物包含药学上可接受的媒介物,诸如水溶液、无毒赋形剂,包括盐、防腐剂、缓冲剂等。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版,Easton编,Mack Publishing Co.,第1405-1412页和第1461-1487页 (1975);The National Formulary XIV,第14版,American Pharmaceutical Association,Washington,DC (1975)。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射有机酯诸如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、盐水溶液、胃肠外媒介物诸如氯化钠、林格氏右旋糖,等。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。根据本领域的常规技术来调整药物组合物各种成分的pH和精确浓度。

[0190] 重复施用特定疫苗(同源加强(homologous boosting))已被证明能有效提高体液应答。由于先前对载体的免疫力趋于削弱强烈的抗原呈递和适当的炎症信号的产生,因此此类方法可能不能有效加强细胞免疫。一直以来解决这个问题的一個方法是使用不同的抗原递送系统(异源加强(heterologous boosting))来依次施用疫苗。在异源加强方案中,至少一个引发或加强递送包括递送本文所述的灭活的肿瘤细胞/环嘌呤二核苷酸组合物。该方案的异源武器可以包括使用一种或多种以下策略递送抗原:

[0191] 包含目标抗原的灭活的或减毒的细菌或病毒,这是已经用一些变性条件处理以使它们在发动(mounting)病原入侵中无效或低效的颗粒;

[0192] 纯化的抗原,这是从病原体的细胞培养物或含有病原体或其重组形式的组织样本中纯化的通常天然产生的抗原;

[0193] 在受试者的宿主细胞中重组工程化以表达和/或分泌抗原的活病毒或细菌递送载体。这些策略依赖于使病毒或细菌载体减毒(例如,通过基因工程)成非致病性的和非毒性的;

[0194] 抗原呈递细胞(APC)载体,诸如树突细胞(DC)载体,其包括装载抗原或转染包含编码抗原的核酸的组合物细胞(例如,Provence® (Dendreon Corporation)用于治疗去势

难治性 (castration-resistant) 转移性前列腺癌) ;

[0195] 脂质体抗原递送媒介物;和

[0196] 可通过基因枪、电穿孔、细菌菌影、微球、微粒、脂质体、聚阳离子纳米颗粒等施用的裸DNA载体和裸RNA载体。

[0197] 初免疫和加强疫苗可以通过下列途径中的任何一个或组合施用。在一个方面,初免疫和加强疫苗通过相同途径施用。在另一个方面,初免疫和加强疫苗通过不同途径施用。术语“不同途径”包括但不限于身体的不同位点,例如口服、非口服、肠内、胃肠外、直肠、节点内(淋巴结)、静脉内、动脉内、皮下、肌肉内、瘤内、瘤周、瘤内、输注、粘膜、鼻、在脑脊液空间或脑脊髓液等的位点,以及通过不同模式,例如口服、静脉内和肌肉内。

[0198] 初免或加强疫苗的有效量可以以一个剂量给予,但不限于一个剂量。因此,施用可以是疫苗的两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十或更多次施用。当存在疫苗的一次以上的施用,施用可以通过一分钟、两分钟、三、四、五、六、七、八、九、十或更多分钟的时间间隔,通过约一小时、两小时、三、四、五、六、七、八、九、十、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时并依此类推的间隔而隔开。在小时的上下文中,术语“约”意指加或减30分钟内的任何时间间隔。所述施用还可以通过一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天及其组合的时间间隔而隔开。本发明并不限于在时间上相等间隔的给药间隔,而是包括以不相等间隔的给药,诸如由在第1天、4天、7天和25天施用组成的引发时间表,仅提供非限制性实例。

[0199] 参考文献

[0200] 1 Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N. & Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends in immunology 30, 23-32, doi:10.1016/j.it.2008.09.006 (2009) .

[0201] 2 Dubensky, T.W., Jr. & Reed, S.G. Adjuvants for cancer vaccines. Seminars in immunology 22, 155-161, doi:10.1016/j.smim.2010.04.007 (2010) .

[0202] 3 Kastentmuller, K. et al. Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets. The Journal of clinical investigation 121, 1782-1796, doi:10.1172/JCI45416 (2011) .

[0203] 4 Coffman, R.L., Sher, A. & Seder, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. Immunity 33, 492-503, doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002 (2010) .

[0204] 5 Burdette, D.L. et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature 478, 515-518, doi:10.1038/nature10429 (2011) .

[0205] 6 Woodward, J.J., Iavarone, A.T. & Portnoy, D.A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. Science 328, 1703-1705, doi:10.1126/science.1189801 (2010) .

[0206] 7 Ishikawa, H. & Barber, G.N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. Nature 455, 674-678, doi:10.1038/nature07317 (2008) .

- [0207] 8 McWhirter, S.M. et al. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *The Journal of experimental medicine* 206, 1899–1911, doi:10.1084/jem.20082874 (2009).
- [0208] 9 Bahjat, K.S. et al. (20005).
- [0209] 10 Bahjat, K.S. et al. Cytosolic Entry Controls CD8+ T-Cell Potency during Bacterial Infection. *Infection and immunity* 74, 6387–6397 (2006).
- [0210] 11 Crimmins, G.T. et al. *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2008).
- [0211] 12 O’Riordan, M., Yi, C.H., Gonzales, R., Lee, K.D. & Portnoy, D.A. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13861–13866 (2002).
- [0212] 13 Schwartz, K.T. et al. Hyperinduction of host beta interferon by a *Listeria monocytogenes* strain naturally overexpressing the multidrug efflux pump MdrT. *Infection and immunity* 80, 1537–1545, doi:10.1128/IAI.06286-11 (2012).
- [0213] 14 Davies, B.W., Bogard, R.W., Young, T.S. & Mekalanos, J.J. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell* 149, 358–370, doi:10.1016/j.cell.2012.01.053 (2012).
- [0214] 15 Witte, C.E. et al. Innate immune pathways triggered by *Listeria monocytogenes* and their role in the induction of cell-mediated immunity. *Advances in immunology* 113, 135–156, doi:10.1016/B989-0-12-394590-7.00002-6 (2012).
- [0215] 16 Desmet, C.J. & Ishii, K.J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nature reviews. Immunology* 12, 479–491, doi:10.1038/nri3247 (2012).
- [0216] 17 Rappuoli, R., Mandl, C.W., Black, S. & De Gregorio, E. Vaccines for the twenty-first century society. *Nature reviews. Immunology* 11, 865–872, doi:10.1038/nri3085 (2011).
- [0217] 18 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291–295, doi:10.1126/science.1183021 (2010).
- [0218] 19 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11, 373–384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- [0219] 20 Einstein, M.H. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. *Human vaccines* 5, 705–719 (2009).
- [0220] 21 Ahmed, S.S., Plotkin, S.A., Black, S. & Coffman, R.L. Assessing the safety

of adjuvanted vaccines. *Science translational medicine* 3,93rv92,doi:10.1126/scitranslmed.3002302 (2011) .

[0221] 22 Vance,R.E.,Isberg,R.R.&Portnoy,D.A.Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell hostµbe* 6,10-21,doi:10.1016/j.chom.2009.06.007 (2009) .

[0222] 23 Barber,G.N.STING-dependent signaling. *Nature immunology* 12,929-930, doi:10.1038/ni.2118 (2011) .

[0223] 24 Leber,J.H.et al.Distinct TLR-and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS pathogens* 4,e6 (2008) .

[0224] 25 Jin,L.et al.MPYS is required for IFN response factor 3 activation and type I IFN production in the response of cultured phagocytes to bacterial second messengers cyclic-di-AMP and cyclic-di-GMP. *J Immunol* 187,2595-2601, doi:10.4049/jimmunol.1100088 (2011) .

[0225] 26 Lauvau,G.et al.Priming of memory but not effector CD8T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* 294,1735-1739 (2001) .

[0226] 27 Bahjat, K.S.et al.Suppression of cell-mediated immunity following recognition of phagosome-confined bacteria. *PLoS pathogens* 5,e1000568,doi: 10.1371/journal.ppat.1000568 (2009) .

[0227] 28 Tamayo,R.,Pratt,J.T.&Camilli,A.Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual review of microbiology* 61,131-148,doi:10.1146,annurev.micro.61.080706.093426 (2007) .

[0228] 29 Sauer,J.D.et al.The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infection and immunity* 79,688-694,doi:10.1128/IAI.00999-10 (2011) .

[0229] 30 Barber,G.N.Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunological reviews* 243,99-108,doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x (2011) .

[0230] 31 Tanaka,Y.&Chen,Z.J.STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Science signaling* 5,ra20,doi:10.1126/scisignal.2002521 (2012) .

[0231] 32 Ebensen,T.et al.Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate:strong Th1/Th2/Th17promoting mucosal adjuvant. *Vaccine* 29,5210-5220,doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.026 (2011) .

[0232] 33 Ebensen,T.et al.The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. *Vaccine* 25,1464-1469,doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.033 (2007) .

[0233] 34 Ebensen,T.,Schulze,K.,Riese,P.,Morr,M.&Guzman,C.A.The bacterial second messenger cdiGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. *Clinical and vaccine immunology:CVI* 14,952-958,doi:10.1128/

CVI.00119-07 (2007) .

[0234] 35 Libanova,R.et al.The member of the cyclic di-nucleotide family bis-(3',5')-cyclic dimeric inosine monophosphate exerts potent activity as mucosal adjuvant.Vaccine 28,2249-2258,doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.045 (2010) .

[0235] 36 Madhun,A.S.et al.Intranasal c-di-GMP-adjuvanted plant-derived H5influenza vaccine induces multifunctional Th1CD4+cells and strong mucosal and systemic antibody responses in mice.Vaccine29,4973-4982,doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.094 (2011) .

[0236] 37 Hu,D.L.et al.c-di-GMP as a vaccine adjuvant enhances protection against systemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection.Vaccine 27,4867-4873,doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.053 (2009) .

[0237] 38 Karaolis,D.K.et al.Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia.Infection and immunity 75,4942-4950,doi: 10.1128/IAI.01 762-06 (2007) .

[0238] 39 Ogunniyi,A.D.et al.c-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection.Vaccine 26,4676-4685,doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.099 (2008) .

[0239] 40 Karaolis,D.K.et al.Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule.J Immunol 178,2171-2181 (2007) .

[0240] 41 Wille-Reece,U.et al.Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates.The Journal of experimental medicine 203, 1249-1258 (2006) .

[0241] 42 Adler-Moore,J.et al.Characterization of the murine Th2 response to immunization with liposomal M2e influenza vaccine.Vaccine 29,4460-4468,doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.040 (2011) .

[0242] 43 Fujii,G.,Ernst,W.&Adler-Moore,J.The Vesi Vax system:a method for rapid vaccine development.Frontiers in bioscience:a journal and virtual library 13,1968-1980 (2008) .

[0243] 44 Gaffney,B.L.,Veliath,E.,Zhao,J.&Jones,R.A.One-flask syntheses of c-di-GMP and the [Rp,Rp]and[Rp,Sp]thiophosphate analogues.Organic letters 12, 3269-3271,doi:10.1021/o1101236b (2010) .

[0244] 45 Zhang,Z.,Gaffney,B.L.&Jones,R.A.c-di-GMP displays a monovalent metal ion-dependent polymorphism.Journal of the American Chemical Society 126,16700-16701,doi:10.1021/ja0449832 (2004) .

[0245] 46 Suzuki,N.,Oyama,K.-i.&Tsukamoto,M.Practical Synthesis of Cyclic Bis (3'-5') diadenylic Acid (c-di-AMP) .Chemistry Letters 40,1113-1114,doi: 10.1246/cl.2011.1113 (2011) .

- [0246] 47 Hyodo, M., Sato, Y. & Hayakawa, Y. Synthesis of cyclic bis(3'-5') diguanylic acid (c-di-GMP) analogs. *Tetrahedron* 62, 3089-3094, doi:10.1016/j.tet.2006.01.025 (2006).
- [0247] 48 Yan, H., Wang, X., Kuo Lee, R. & Chen, W. Synthesis and immunostimulatory properties of the phosphorothioate analogues of c-di-GMP. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18, 5631-5634, doi:10.1016/j.bmcl.2008.08.088 (2008).
- [0248] 49 Ross, P. et al. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives*. *The Journal of biological chemistry* 265, 18933-18943 (1990).
- [0249] 50 Grajkowski, A., Cieslak, J., Gapeev, A., Schindler, C. & Beaucage, S. L. Convenient synthesis of a propargylated cyclic (3'-5') diguanylic acid and its "click" conjugation to a biotinylated azide. *Bioconjugate chemistry* 21, 2147-2152, doi:10.1021/bc1003857 (2010).
- [0250] 51 Zhao, J., Veliath, E., Kim, S., Gaffney, B. L. & Jones, R. A. Thiophosphate analogs of c-di-GMP: impact on polymorphism. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 28, 352-378, doi:10.1080/15257770903044523 (2009).
- [0251] 52 Battistini, C., Fustinoni, S., Brasca, M. & Borghi, D. Stereoselective synthesis of cyclic dinucleotide phosphorothioates. *Tetrahedron*, 1115-1132 (1993).
- [0252] 53 Hayakawa, Y. A facile synthesis of cyclic bis(3'→5') diguanylic acid. *Tetrahedron* 59, 6465-6471, doi:10.1016/s0040-4020(03)01045-7 (2003).
- [0253] 54 Coughlin, J. E. et al. Orally bioavailable anti-HBV dinucleotide acyloxyalkyl prodrugs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20, 1783-1786, doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.010 (2010).
- [0254] 55 Ouyang, S. et al. Structural Analysis of the STING Adaptor Protein Reveals a Hydrophobic Dimer Interface and Mode of Cyclid di-GMP Binding. *Immunity*, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.019 (2012).
- [0255] 56 Baldwin, S. L. et al. The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine. *J Immunol* 188, 2189-2197, doi:10.4049/jimmunol.1102696 (2012).
- [0256] 57 Lee, A. W. et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4, A8-A22 (2002).
- [0257] 58 Lubong Sabado, R. et al. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4T cells in acute HIV-1 infection. *PloS one* 4, e4256, doi:10.1371/journal.pone.0004256 (2009).
- [0258] 59 Skoberne, M. et al. KBMA *Listeria monocytogenes* is an effective

vector for DC-mediated induction of antitumor immunity. The Journal of clinical investigation (2008).

[0259] 60 Jin, L. et al. Identification and characterization of a loss-of-function human MPYS variant. Genes and immunity 12, 263–269, doi:10.1038/gene.2010.75 (2011).

[0260] 61 Schmidt, N. W. et al. Memory CD8 T cell responses exceeding a large but definable threshold provide long-term immunity to malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 14017–14022 (2008).

[0261] 62 Pham, N. L. et al. Exploiting cross-priming to generate protective CD8T-cell immunity rapidly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 12198–12203, doi:10.1073/pnas.1004661107 (2010).

[0262] 63 Badovinac, V. P., Messingham, K. A., Jabbari, A., Haring, J. S. & Harty, J. T. Accelerated CD8+T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. Nature medicine 11, 748–756 (2005).

[0263] 64 Harty, J. T. & Badovinac, V. P. Shaping and reshaping CD8+T-cell memory. Nature reviews. Immunology 8, 107–119 (2008).

[0264] 65 Coler, R. N. et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. PloS one 6, e16333, doi:10.1371/journal.pone.0016333 (2011).

[0265] 66 Singh, S., Briles, W. E., Lupiani, B. & Collisson, E. W. Avian influenza viral nucleocapsid and hemagglutinin proteins induce chicken CD8+memory T lymphocytes. Virology 399, 231–238, doi:10.1016/j.virol.2009.12.029 (2010).

[0266] 67 Singh, S. et al. Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8(+) T lymphocytes. Virology 405, 62–69, doi:10.1016/j.virol.2010.05.002 (2010).

[0267] 68 Tewari, K. et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. Vaccine 28, 7256–7266, doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.098 (2010).

[0268] 69 Wille-Reece, U. et al. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+T cell responses in nonhuman primates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 15190–15194, doi:10.1073/pnas.0507484102 (2005).

[0269] 70 Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. Nature reviews. Immunology 8, 247–

258 (2008) .

[0270] 71 Wille-Reece,U.,Wu,C.Y.,Flynn.B.J.,Kedl,R.M.&Seder,R.A.Immunization with HIV-1Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+T cell responses.J Immunol 174, 7676-7683 (2005) .

[0271] 72 Jones et al.,US20120178710.

实施例

[0272] 本发明由以下实施例说明。这些实施例不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0273] 实施例1.一般方法

[0274] 购买适合于溶液相寡核苷酸合成的无水溶剂和试剂并使用无水技术在干燥的氩气或氮气下处理。亚酰胺偶联反应和环状均在干燥的氩气或氮气下在无水乙腈或吡啶中进行。对于在无水吡啶中所有反应的起始原料都通过从吡啶浓缩(3次)而干燥。使用Fluka 60Å高纯度级或Merck级9385二氧化硅使用二氯甲烷中的甲醇梯度进行制备型硅胶快速色谱。在具有ProStar 330光电二极管阵列检测器的Varian ProStar 210HPLC系统上,在1.0ml/mtn流速下,使用10mM TEAA和乙腈的梯度,在Varian Microsorb 100-10C₁₈250x4.6mm柱上,在254nm监测下,进行分析型HPLC。在装配有SPD-20A UV/Vis检测器的Shimadzu制备型LC20-AP HPLC系统上,在50ml/min流速下,使用10mM TEAA和乙腈的梯度,在Varian Microsorb 60-8C-1841.6x 250mm柱上,在254nm监测下,进行制备型HPLC。在~3% (重量/重量)的负载下,使用C-18Sep-Pak (Waters)进行固相萃取。使用Shimadzu LC20D分析型HPLC,在具有PDA、MS和ELSD检测的单四极管Shimadzu 2010EV仪器上,获得LC/MS (ESI/APCI)。从位于New Haven,CT的耶鲁大学的WM Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory获得高分辨率FT-ICR质谱。在Bruker 400MHz或Varian Inova 500MHz光谱仪上获得¹H和³¹P NMR光谱。³¹P NMR间接引用D₂O中的二噁烷。

[0275] HPLC纯化的环二核苷酸及衍生物的分配总结在表1中,并在实施例中详细说明。

[0276] 表1:

[0277] 在25°C三乙胺盐 (10a、10b、10c、11a、11b、11c、12、13在反相HPLC上的保留时间(分钟)和³¹P化学位移(ppm)

	化合物	保留	
		时间	³¹ P δ
[0278]	c-di-AMP <u>10a</u>	8.2*	-174
	二硫代[Rp,Sp] c-di-AMP <u>10c</u>	12.1*	54.54, 54.84, 55.92 (积分比1.0:0.9:0.1)
	二硫代[Rp,Rp] c-di-AMP <u>10b</u>	14.4*	54.41
	c-di-GMP <u>11a</u>	8.9*	-124
	二硫代[Rp,Sp] c-di-GMP <u>11c</u>	11.0*	54.77, 56.03 (积分比1:1)
	二硫代[Rp,Rp] c-di-GMP <u>11b</u>	13.2*	54.87
	C ₁₂ 酰基-c-di-GMP <u>12</u>	13.7 [†]	-137, -2.05 (积分比1:3)
	C ₁₂ 酰基-二硫代[Rp,Rp] c-di-GMP <u>13</u>	15.3 [†]	56.46, 56.86 (积分比1:1)

[0279] HPLC梯度:在20分钟内2至20%在10mMTEAA中的CH₃CN,以1m/min流速。

[0280] ¹HPLC梯度:在20分钟内2至80%在10mMTEAA中的CH₃CN,以1m/min流速。

[0281] 实施例2.10a的合成。

[0282] 环-di-AMP的以下合成示意性地描述于图6中,并且是由Gaffney等报道的合成环-di-GMP的修改(One-flask synthesis of c-di-GMP and the [Rp,Rp] and [Rp,Sp] thiophosphate analogues. *Organic Letters* 12,3269-3271 (2010))。

[0283] a) 将1用2-氯-5,6-苯并-1,3,2-二氧磷杂环己烷-4-酮(2)进行亚磷酰化并且用CH₂Cl₂/己烷(1:1)固液萃取以生成5'-DMT-3'-H-磷酸盐4。

[0284] 在搅拌下向1(3.94g, 5mmol)在15ml无水二噁烷和5ml无水吡啶中的溶液中加入5.6ml(7.0mmol) 1.25M在2-氯-5,6-苯并-1,3,2-二氧磷杂环己烷-4-酮(2)的二噁烷溶液中的储备溶液。15分钟后,将反应用1ml水淬灭,并将混合物倾倒入10ml 0.25M NaHCO₃,然后用乙酸乙酯萃取(3x 15ml)。将有机相干燥(Na₂SO₄)并浓缩以生成3.8g。将该固体用100ml CH₂Cl₂/己烷(1:1)研磨,过滤,并将残余固体干燥,得到细的白色粉末(3.5g),该粉末在用5%在CH₂Cl₂中的CH₃OH和0.5%三乙胺洗脱的TLC(R_f=0.1)上跑为一点。

[0285] b) 通过吸附在硅胶上的硫酸氢钠(NaHSO₄-SiO₂)脱三苯甲基化和5'-OH-3'-H-磷酸盐(5)的沉淀。

[0286] 向4(1.74g, 2mmol)在85ml二氯甲烷和0.072ml水(4毫摩尔)中的溶液中加入0.55g NaHSO₄-SiO₂(2.4mmol H⁺/gr NaHSO₄-SiO₂)。该反应是在室温下搅拌35分钟后完成(在10%在CH₂Cl₂中的MeOH和0.5%TEA中的TLC)。通过过滤除去NaHSO₄-SiO₂并用CH₂Cl₂洗涤(3x 5ml)。加入100ml己烷:甲苯(1:1),涡旋5分钟并将溶剂倾析(重复两次)。蒸发得到0.92g 5为固体。分析型HPLC显示纯度为96.4%。负模式中的LC/MS证实m/z (M-1) 548.2(计算值C₂₃H₃₁N₅O₇PSi⁻:548.2)。

[0287] c) 偶联、氧化和三苯甲基化。

[0288] DMT-rA(bz)-βCE-TBDMS-亚磷酸胺(3)(3.5g, 3.6毫摩尔)与20ml无水乙腈共蒸发三次,最后一次留下约10ml体积,向其中加入十个3Å分子筛。将溶液置于干燥的氩气中。

[0289] 将1.6g H-磷酸盐(5)从无水CH₃CN中蒸发三次,最后一次留下100ml。将此溶液通过注射器加至无水亚磷酸胺溶液中,随后加入1.4g三氟乙酸吡啶鎓(其已经通过从无水吡啶中蒸发3x 20ml而干燥)。20分钟后,加入3ml 5.5M叔丁基过氧化氢并搅拌30分钟。在冰浴冷却后,加入0.3g在1ml水中的NaHSO₃,并将混合物搅拌5分钟。然后将溶剂蒸发,并将残余物溶于20ml(CH₂Cl₂/MeOH, 98:2)中。过滤掉分子筛,并将溶剂转移至81ml CH₂Cl₂中。加入NaHSO₄-SiO₂(513mg)和水(65微升),并将反应搅拌40分钟。将混合物通过硅藻土过滤,用CH₂Cl₂洗涤垫,并将滤液蒸发得到粗7a。负模式中的LC/MS证实m/z (M-1) 1148.5(计算值C₄₉H₆₄N₁₁O₁₄P₂Si⁻:1148.37)。

[0290] d) 线性二聚体(7a)的环化和氧化以得到8a。

[0291] 向粗7a(通过从无水吡啶中蒸发干燥,最终蒸发后留下100ml)中加入DMOCP(1.9g, 10.15mmol)。12分钟后,将反应用水(2.3g)淬灭,随后立即加入碘(0.96g, 3.78mmol)。将反应混合物倒入含有0.6g NaHSO₃的400ml水中。搅拌5分钟后,分批加入11.2g NaHCO₃,并将溶液搅拌5分钟。用500ml乙酸乙酯/醚(3:2)将混合物分配两次。合并有机层,干燥(Na₂SO₄)并蒸发。加入甲苯(3x10ml)并蒸发以除去残留的吡啶,得到2.37g 8a为黄棕色固体。负模式中的LC/MS证实m/z (M-1) 1146.6(计算值C₄₉H₆₂N₁₁O₁₄P₂Si⁻:1146.4)。

[0292] e) 用浓缩的氢氧化铵使粗8a脱保护以得到粗9a和制备型HPLC以得到纯的形式的9a。

[0293] 向200ml厚壁玻璃压力管中的600mg 8a中加入40ml甲醇和40ml浓氨水,并将所得混合物在50℃搅拌16小时。将反应混合物在真空下浓缩,并将残余物用乙酸乙酯(3x 10ml)洗涤以得到510mg粗9a。

[0294] 将在4ml 20%CH₃CN的10mM三乙基乙酸铵溶液中的粗9a的102mg部分施加到制备型HPLC柱上,并用乙腈和10mM在水中的三乙基乙酸铵的梯度(在20分钟内20->50%CH₃CN以50ml/min流速)洗脱。将含有纯9a的HPLC级分合并,蒸发以除去CH₃CN,并冷冻干燥以除去剩余的水和挥发性缓冲液,得到32mg纯9a为双三乙铵盐。负模式中的LC/MS证实m/z (M-1) 885.5 (计算值C₃₂H₅₁N₁₀O₁₂P₂Si₂⁻;885.3。(也可以将制备型HPLC纯化推迟直到最后一步之后,如下面c-di-GMP和二硫代-c-di-GMP系列所述)。

[0295] f) 用三乙胺三氟化氢使9a的TBS基团脱保护,用TEAB中和,并用C-18Sep-Pak进行固相萃取,以得到纯10a为双三乙铵盐。

[0296] 向20mg 9a中加入0.25ml三乙胺三氟化氢。将该混合物放在振荡器上48小时,此时用100微升1M三乙基碳酸氢铵中和的10微升样本的分析型HPLC指示起始原料的消耗和单个新产品的出现。然后在搅拌下将该反应混合物逐滴加至10×体积的冷却的1M三乙基碳酸氢铵。然后将中和的溶液加样至Waters C-18Sep-Pak,并且在用6体积的10mM三乙基乙酸铵洗涤柱后,将产物用CH₃CN:三乙基乙酸铵(1:1)洗脱。CH₃CN经旋转蒸发除去,并且将水性样本冷冻干燥至干,得到14mg 10a为双三乙铵盐。负模式中10a的HRMS证实m/z (M-H) 657.0985 (计算值C₂₀H₂₃N₁₀O₁₂P₂⁻;657.0978)。¹H NMR (D₂O) 45℃ δ (ppm) 8.34 (s, 2H), 8.11 (s, 2H), 6.15 (s, 2H), 4.34 (m, 4H), 4.15 (m, 2H), 3.77 (m, 2H), 3.19 (q, J=7Hz), 1.27 (t, J=7Hz)。³¹P NMR (D₂O) 25℃ δ (ppm) -1.74。

[0297] 实施例3. 10b和10c的合成。

[0298] 以下合成示意性地描述于图6。

[0299] a) 市售可获得的DMT-rA (bz)-BCE-TBDMS-亚磷酰胺 (3) 的水解、B-消除和所得5'-DMT-3'-H-膦酸盐 (4) 的二氧化硅色谱:

[0300] 向DMT-rA (bz)-BCE-TBDMS-亚磷酰胺 (3) (11g, 11.1毫摩尔) 在50ml乙腈中的溶液中加入水 (0.36ml, 20毫摩尔, 1.8当量) 和三氟乙酸吡啶鎓 (2.3g, 11.9毫摩尔, 1.07当量)。在室温下搅拌该混合物5分钟后,加入叔丁胺 (50ml) 并继续再搅拌10分钟。然后将混合物浓缩成溶于二氯甲烷的泡沫状物,并施加到硅胶柱上,用5%至10%在二氯甲烷中的MeOH梯度洗脱。将含有所需产物的柱级分合并并浓缩,得到5'-DMT-3'-H-膦酸盐 (4) 为泡沫状物 (6.68g, 7.8毫摩尔, 70%产率)。

[0301] b) 5'-OH-3'-H-膦酸盐 (5) 的脱三苯甲基化和沉淀:

[0302] 向4 (6.68g, 7.8mmol) 在60ml二氯甲烷和1.4ml水 (78毫摩尔, 10当量) 中的溶液中加入6%在二氯甲烷中的二氯乙酸 (73毫摩尔, 9.35当量) 的100ml部分。在室温下搅拌10分钟后,加入吡啶 (11.2ml, 139毫摩尔, 基于DCA为1.9当量) 以淬灭酸,并将混合物浓缩,得到5为黄色/橙色玻璃状物。将玻璃状物溶于约20ml二氯甲烷中,并在搅拌下逐滴加至500ml的7:3己烷:乙醚中以沉淀出所需的5'-OH-3'-H-膦酸盐 (5)。将上清液从沉淀物 (其中大多数形成附着在烧瓶壁的胶状物) 中倾析掉,并在减压下干燥以形成粒状泥浆。将该浆料用40ml无水乙腈蒸发3次,最后一次留下约12ml。

[0303] c) 亚磷酰胺 (3) 在乙腈中的无水溶液的制备,与5'-OH-3'-H-膦酸盐 (5) 偶联,并疏

化成线性二聚体硫代磷酸盐(6b),以及脱三苯甲基化成7b。

[0304] DMT-rA(bz)-βCE-TBDMS-亚磷酰胺(3)(9.08g,9.36毫摩尔,基于H-磷酸盐(5)为1.2当量)与40ml无水乙腈共蒸发三次,最后一次留下约20ml体积,向其中加入十个3Å分子筛。将溶液置于干燥的氩气中。

[0305] 在干燥的氩气下在搅拌下向亚磷酰胺(3)的溶液中加入5(来自b)。在室温下搅拌10分钟后,在氩气下将一半的反应混合物(用于转化成二硫代类似物)转移到第二反应容器中,并加入3-((N,N-二甲基氨基亚甲基)氨基-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(0.88g,4.29mmol,1.1当量)。在室温下搅拌30分钟后,通过放置在-20℃冰箱中使反应停止。当储存于冰箱中>48小时时,黄色沉淀从溶液中分离出来。将混合物过滤并将滤液浓缩成泡沫状物(3.9g),溶解于50ml CH₂Cl₂中并用100ul水处理,随后立即用800mg NaHSO₄-二氧化硅处理。将混合物在室温下搅拌30分钟,并过滤以除去二氧化硅。然后将60ml己烷加至滤液中,下层相如油状物从溶液中分离。分离油状物并蒸发以得到3.1g粗7b。

[0306] d) 线性二聚体(7b)的环化,硫化和二氧化硅色谱,得到8b和8c的混合物。

[0307] 通过蒸发使7b(3.05g,2.6mmol)从无水吡啶(加入200ml吡啶并且旋转蒸发剩下120ml)中干燥,随后加入DMOCP(1.68g,9.1mmol,3.5当量)。12分钟后,用水(1.63g,91mmol)使反应猝灭,随后立即加入0.675g(3.0mmol,1.2当量)3-H-1,2-苯并二硫醇-3-酮。将反应混合物倒入500ml 0.25M碳酸氢钠中,然后用乙酸乙酯/乙醚(3:2)萃取2x 500ml。在真空下将有机层合并,干燥(Na₂SO₄)并蒸发。加入甲苯(3x10ml),并蒸发以除去残余吡啶。将残余物施加到二氧化硅柱上,并用0至10%在CH₂Cl₂中的CH₃OH梯度洗脱,得到总共1.47g,其中含有主要非对映体8b和8c。

[0308] e) 用浓缩的氢氧化铵使8b和8c的混合物脱保护,得到9b和9c,并通过制备型HPLC分离,得到纯的形式的9b和9c。

[0309] 向玻璃压力管中的230mg 8b和8c的混合物中加入16ml甲醇,然后加入16ml浓氨水,并将所得混合物在50℃搅拌16小时。将反应混合物在真空下浓缩,并将残余物用乙酸乙酯(3x 10ml)洗涤以得到210mg 9b和9c的粗混合物。对于9b/9c混合物的负模式中的LC/MS证实m/z (M-1) 917 (计算值C₃₂H₅₁N₁₀O₁₀P₂S₂Si₂⁻:917.2)。

[0310] 通过制备型HPLC的9b/9c混合物的分离。将在4ml 30%CH₃CN的10mM三乙基乙酸铵溶液中的9b和9c的粗混合物的105mg部分施加到制备型HPLC柱上,并用乙腈和10mM三乙基乙酸铵的梯度(在20分钟内30->50%CH₃CN以50ml/min流速)洗脱。使含有纯9b的HPLC级分从含有纯9c的那些级分中分离。将合并的级分蒸发以除去CH₃CN,并冷冻干燥以除去剩余的水和挥发性缓冲液,得到18mg 9b和14mg9c为双三乙铵盐。

[0311] f) 用三乙胺三氟化氢使9b的TBS基团脱保护,用TEAB中和,并用C-18Sep-Pak进行固相萃取(SPE),以得到纯10b为双三乙铵盐。

[0312] 向8mg 9b中加入0.4ml三乙胺三氟化氢。将该混合物放在振荡器上16小时,此时用100微升1M三乙基碳酸氢铵(TEAB)中和的5微升样本的分析型HPLC指示起始原料的消耗和单个新产品的出现。然后在搅拌下将该反应混合物逐滴加至~10×体积的冷却的1M三乙基碳酸氢铵。然后将中和的溶液加样至Waters C-18Sep Pak,并且在用6体积的10mM三乙基乙酸铵洗涤柱后,将产物用CH₃CN:10mM三乙基乙酸铵(1:5)洗脱。CH₃CN经旋转蒸发除去,并且将水性样本冷冻干燥至干,得到6mg 10b为双三乙铵盐。负模式中10b的HRMS证实m/z (M-H)

689.0526 (计算值 $C_{20}H_{23}N_{10}O_{10}P_2S_2^-$:689.0521)。 1H NMR (D_2O) 35℃ δ 8.39 (s, 2H), δ 8.16 (s, 2H), δ 6.16 (s, 2H), δ 4.97-5.03 (m, 2H), δ 4.78 (m, 2H), δ 4.50-4.55 (m, 4H), δ 4.04-4.08 (m, 2H), δ 3.20 (q, $j=7Hz$), δ 1.27 (t, $J=7Hz$)。 ^{31}P NMR (D_2O) 25℃ δ (ppm) 54.41。

[0313] g) 用三乙胺三氟化氢使9c的TBS基团脱保护,用TEAB中和,并用C-18Sep-Pak进行固相萃取,以得到纯10c为双三乙铵盐。

[0314] 向6mg 9c中加入0.3ml三乙胺三氟化氢。将该混合物放在振荡器上16小时,并且如在(f)中的小等分试样的后处理指示起始原料的消耗和单个新产品的出现。然后在搅拌下将该反应混合物逐滴加至 $\sim 10\times$ 体积的冷却的1M三乙基碳酸氢铵。然后将中和的溶液加样至Waters C-18Sep Pak,并且在用6体积的10mM三乙基乙酸铵洗涤柱后,将产物用CH₃CN:10mM三乙基乙酸铵(1:5)洗脱。CH₃CN经旋转蒸发除去,并且将水性样本冷冻干燥至干,得到4mg10c为双三乙铵盐。负模式中10c的HRMS证实 m/z (M-H) 689.0524 (计算值 $C_{20}H_{23}N_{10}O_{10}P_2S_2^-$:689.0521)。 1H NMR (D_2O) 35℃ δ (ppm) 8.50 (s, 2H), δ 8.37 (s, 2H), δ 8.20 (s, 2H), δ 8.10 (s, 2H), δ 6.17 (s, 2H), δ 6.14 (s, 2H), δ 5.06-5.07 (m, 2H), δ 4.96-5.02 (m, 2H), δ 4.87-4.93 (m, 2H), δ 4.75 (m, 2H), δ 4.34-4.56 (m, 10H), δ 3.98-4.13 (m, 2H), δ 3.20 (q, $J=7Hz$), δ 1.27 (t, $J=7Hz$)。 ^{31}P NMR (D_2O) 25℃ δ (ppm) 54.54, 54.84, 55.92 (次产物)。

[0315] 实施例4. (11a)、(11b)和(11c)的合成。

[0316] 11a、11b和11c如Gaffney等所述合成,其中加入终产物(如下所示例)的制备型HPLC纯化代替重结晶,为了获得 $\geq 97\%$ 的纯度用于生物测试。可选地,如对于图6、实施例2和3中的腺苷系列所述,制备型HPLC纯化可以在环化和脱保护步骤之后进行。

[0317] 11a

[0318] 将在3ml 10mM三乙基乙酸铵中的11a的100mg部分施加到制备型HPLC柱上,并用乙腈和10mM在水中的三乙基乙酸铵的梯度(在22分钟内0%至10%CH₃CN梯度以50ml/min流速)洗脱。将含有纯11a的HPLC级分合并,经旋转蒸发除去CH₃CN,并将剩余的水性样本冷冻干燥至干,得到40mg纯11a为双三乙铵盐。负模式中11a的HRMS为 m/z (M-H) 689.0893 (计算值 $C_{20}H_{23}N_{10}O_{14}P_2^-$:689.0876)。 1H NMR (D_2O) 45℃ δ (ppm) 8.05 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.90 (m, 2H), 4.76 (m, 2H), 4.41 (m, 2H), 4.33 (m, 2H), 4.09 (m, 2H), 3.19 (q, $J=7Hz$, 6H), 1.28 (t, $J=7Hz$, 9H)。 ^{31}P NMR (D_2O) 25℃ δ (ppm) -1.24。

[0319] 11b

[0320] 将在3ml 6%CH₃CN的10mM三乙基乙酸铵溶液中富集的11b的100mg部分施加到制备型HPLC柱上,并用乙腈和10mM在水中的三乙基乙酸铵的梯度(在22分钟内6%至18%CH₃CN梯度以50ml/min流速)洗脱。将含有纯11b的HPLC级分合并,经旋转蒸发除去CH₃CN,并将剩余的水性样本冷冻干燥至干,得到40mg (40%产率) 纯11b为双三乙铵盐。负模式中11b的HRMS证实 m/z (M-H) 721.0446 (计算值 $C_{20}H_{23}N_{10}O_{12}P_2S_2^-$:721.0419)。 1H NMR (D_2O) 45℃ δ 8.05 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 5.03 (m, 2H), 4.77 (m, 4H), 4.10 (m, 2H), 4.08 (m, 2H), 3.19 (q, $j=7Hz$, 6H), 1.28 (t, $J=7Hz$, 9H)。 ^{31}P NMR (D_2O) 25℃ δ 54.87。

[0321] 11c

[0322] 将60mg在3ml 6%CH₃CN的10mM三乙基乙酸铵溶液中富集的11c施加到制备型HPLC柱上,并用乙腈和10mM在水中的三乙基乙酸铵的梯度(在22分钟内6%至18%CH₃CN梯度以50ml/min流速)洗脱。将含有纯11c的HPLC级分合并,经旋转蒸发除去CH₃CN,并将剩余的水

性样本冷冻干燥至干,得到30mg (50%产率) 纯11c为双三乙铵盐。负模式中11c的HRMS证实 m/z (M-2H) 360.0171 (计算值 $C_{20}H_{22}N_{10}O_{12}P_2S_2^{-2}$: 360.0173)。 1H NMR (D_2O) 55°C δ (ppm) 8.13 (s, 2H), 8.03 (s, 2H), 5.97 (m, 2H), 5.06-5.12 (br, 4H), 4.98-5.00 (m, 2H), 4.81-4.83 (m, 2H), 4.04-4.08 (m, 4H), 3.20 (q, $j=7Hz$), 1.27 (t, $J=7Hz$)。 ^{31}P NMR (D_2O) 25°C δ (ppm) 54.77, 56.00。

[0323] 实施例5. 通过CDN的干扰素诱导

[0324] 为了测定相对于未改性的c-di-GMP分子在通过每个Rp,Rp二硫代c-di-GMP衍生物分子诱导的抗原呈递细胞中作为佐剂效力的标记的IFN- β 的相对水平,在37°C在5%CO₂下使衍生自小鼠的H-2b-限制性小鼠树突细胞系的 1×10^5 个DC2.4细胞与5、20和100 μM 的c-di-GMP、Rp,Rp和Rp或Sp二硫代-二磷酸盐c-di-GMP,以及c-di-AMP、Rp,Rp或Rp,Sp二硫代-二磷酸盐c-di-AMP分子或HBSS一起孵育30分钟。30分钟后,洗涤细胞并用含有10%FBS的RPMI培养基代替。为了测量诱导的IFN- β 的水平,4小时后收集来自每个样本的细胞培养液,并且向培养在RPMI培养基+10%FBS中的 5×10^4 个L929-ISRE萤光素酶报告细胞中加入10 μL 。IFN- β 产量的相对水平通过孵育4小时后测量相对光单位 (RLU) 来确定。

[0325] 如图7所示,Rp,Rp二硫代c-di-GMP和Rp,Rp二硫代c-di-AMP非对映体比c-di-GMP或c-di-AMP未改性的环二核苷酸分子诱导显著更高水平的IFN- β 。此外,通过Rp,Sp二硫代c-di-GMP和Rp,Sp二硫代c-di-AMP非对映体诱导的IFN- β 的水平低于通过Rp,Rp二硫代c-di-GMP和Rp,Rp二硫代c-di-AMP非对映体以及天然c-di-GMP和c-di-AMP分子诱导的水平。这些结果表明Rp,Rp二硫代c-di-GMP和Rp,Rp二硫代c-di-AMP非对映体的纯化的制剂比未改性的c-di-GMP和c-di-AMP分子以及Rp,Sp二硫代衍生物更深程度地激活先天性免疫应答。c-di-GMP和c-di-AMP的Rp,Sp二硫代衍生物较差地激活先天性免疫应答。对本领域技术人员显而易见的是,如相对于Rp,Sp二硫代二磷酸盐c-di-GMP或Rp,Sp二硫代二磷酸盐c-di-AMP或c-di-GMP或c-di-AMP分子,对于佐剂优选的实施方案是Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP或Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-AMP环二核苷酸,由于其增加先天性免疫应答激活的特性,如通过诱导的IFN- β 表达的量级所示。

[0326] 实施例6. 通过磷酸二酯酶的CDN的降解

[0327] 用于增加Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP和c-di-AMP衍生物相对于未改性的天然c-di-GMP和c-di-AMP的效力的一个机制可能是二硫代未修饰的衍生物通过宿主细胞磷酸二酯酶对降解的抗性。作为对这种机制的测试,在使用和不使用1mg蛇毒液磷酸二酯酶 (SVPD) 的情况下,在37°C使Rp,Rp二硫代c-di-GMP、未改性的c-di-GMP亦或是Rp,Rp二硫代c-di-AMP和c-di-AMP分子孵育过夜。在此孵育期后,反应中的SVPD酶灭活,并通过在100°C下孵育10分钟除去,然后使样本以14,000rpm离心5分钟。为了测试样本激活通过IFN- β 的表达水平测量的先天性免疫的相对能力,在37°C在5%CO₂下使 1×10^5 个DC2.4细胞与100 μM 的Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP和c-di-AMP衍生物一起孵育,并且从样本处理的未改性的天然c-di-GMP和c-di-AMP与这些环二核苷酸制剂一起孵育30分钟。30分钟后,洗涤细胞并用含有10%FBS的RPMI培养基代替,并再孵育4小时。然后收获培养液,并将10 μL 这些流体加至生长在含有10%FBS的RPMI培养基中的 5×10^4 个L929-ISRE萤光素酶报告细胞中。IFN- β 表达的相对水平是通过测量在报告细胞系中孵育4小时后的相对光单位 (RLU) 来确定。

[0328] 如图8所示,在含有Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP (“RR-CDG”) 或Rp,Rp二硫代二

磷酸盐c-di-AMP (“RR-CDA”)的细胞中IFN-β的表达水平是相当的,不论环二核苷酸是否与SVPD一起孵育。与此相反,相比于含有尚未用此酶孵育的c-di-GMP或c-di-AMP的培养物,IFN-β的表达水平在含有已被预先用SVPD孵育的c-di-GMP (“CDG”)或c-di-AMP (“CDA”)的培养物中显著较低。此外,在含有未用SVPD孵育的环二核苷酸的培养物中,相比于c-di-GMP或c-di-AMP,IFN-β的表达水平在含有Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP或Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-AMP的培养物中较高。这些数据进一步支持,相比于c-di-GMP或c-di-AMP,Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP或Rp,Rp二硫代二磷酸盐c-di-AMP的效力增加。

[0329] 实施例7.通过CDN的免疫应答诱导

[0330] 为了测试Rp,Rp二硫代c-di-GMP相对于未改性的c-di-GMP分子增强的体内免疫原性,测量在接种与CDN治疗结合使用后第10天在PBMC中的OVA特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞应答。通过使10μg OVA蛋白(EndoFit OVA,In Vivogen)和Addavax(最终2%鲨烯)与25μg或5μg环二核苷酸中任一者合并成100μL总体积来制备疫苗。使五只雌性C57BL/6小鼠(H-2b)的组用所述疫苗制剂在尾根部进行一次皮下(s.c)免疫,并且10天后通过酶联免疫斑点分析来确定外周血单核细胞(PBMC)区室中的OVA特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞应答。从年龄匹配的幼年C57BL/6小鼠中分离的 1×10^5 个PBMC和 1×10^5 个脾饲养细胞未受刺激或用1μM的MHC II型肽(OVA265-280TEWTSSNVMEERKIKV)或MHC I型(OVA257-264SIINFEKL)肽刺激过夜,并且测定形成细胞的IFN-γ斑点,如先前所描述。

[0331] 如图9所示,相比于在含有相同数量环二核苷酸佐剂的制剂中的未改性的c-di-GMP,在用含有Rp,Rp二硫代c-di-GMP的疫苗免疫的小鼠中,CD4⁺和CD8⁺OVA特异性T细胞应答的数量级更大。此外,相比于用含有5μg或25μg未改性的c-di-GMP的疫苗制剂免疫的小鼠,在用含有5μg Rp,Rp二硫代c-di-GMP的疫苗制剂免疫的小鼠中,抗原特异性CD8⁺T细胞应答的数量级更大。

[0332] 实施例8.通过CDN的T细胞应答诱导

[0333] 为了进一步评估Rp,Rp二硫代c-di-GMP相对于未改性的c-di-GMP分子的免疫原性,对SIV gag特异性CD8⁺和CD4⁺T细胞应答进行测定。将每组五只C57BL/6小鼠用1μg Rp,Rp二硫代c-di-GMP或配制在含有10μg SIV gag蛋白的2%鲨烯水溶液中的盐水对照皮下免疫两次。截止到20天单独接种,并且在第二次接种后六天收获脾脏。通过IFN γ ELISpot测定来确定对SIV gag-特异性CD8 (AL11,SIV gag₃₁₂₋₃₂₂,A)和CD4 (DD13,SIV gag₃₀₀₋₃₁₂,B) T细胞表位的免疫应答。扫描平板并使用免疫斑点(ImmunoSpot)分析仪(CTL)来计算每孔的斑点形成细胞(SFC)。

[0334] 如图10所示,相比于接受盐水对照的动物,用RR c-di-GMP免疫的动物诱导显著更高的SIV gag-特异性CD8和CD4⁺T细胞应答。这些结果表明,具有RR c-di-GMP衍生物的疫苗制剂可诱导体内SIV gag-特异性CD4和CD8⁺T细胞应答。本领域技术人员将认识到,含有Rp,Rp二硫代磷酸盐c-di-GMP或Rp,Rp二硫代磷酸盐c-di-AMP的疫苗制剂是优选的,因为此类环二核苷酸具有通过疫苗诱导的更高数量级的免疫应答,以及用相对较低剂量水平的佐剂的更高数量级的免疫应答所示的增加的效力。

[0335] 实施例9.通过CDN的保护性免疫的诱导

[0336] 为了建立相对于未改性的c-di-GMP的由Rp,Rp二硫代c-di-GMP诱导的增强的免疫原性和伴随的保护性免疫,在PBMC中测定OVA特异性CD8⁺T细胞应答并评估对抗致死性细菌

挑战的保护性免疫。通过使10 μ g OVA蛋白 (EndoFit OVA, InVivogen) 和Addavax (最终2%鲨烯) 与25 μ g环二核苷酸合并成100 μ L总体积来制备疫苗。使五只雌性C57BL/6小鼠 (H-2^b) 的组用所述疫苗制剂在尾根部进行两次皮下 (s.c) 免疫。初免和加强免疫接种的时间间隔为36天。在PBMC中OVA₂₅₇-特异性CD8T细胞应答的记忆和扩增两个阶段的数量级通过细胞内细胞因子染色 (ICS) 分析来定量, 该分析在加强免疫后27天和用OVA-表达的野生型单核细胞增生李斯特菌 (WT Lm-OVA) 的2X致死剂量 (LD)₅₀剂量 (1x 10⁵个菌落形成单位: CFU) 挑战后第3天进行。对于ICS分析, 来自测试小鼠的1x 10⁵个PBMC与从年龄匹配的幼年C57BL/6小鼠分离的1x 10⁵个脾饲养细胞的组合未受刺激或在布雷菲德菌素 (Brefeldin) A存在下用1 μ M的MHC I型肽 (OVA₂₅₇₋₂₆₄SIINFEKL) 刺激5小时, 并且通过在BD FACSVerse上的流式细胞术来测定IFN- γ 的产生。

[0337] 如图11A所示, 相比于用以未改性的c-di-GMP为佐剂的疫苗免疫的小鼠, 用以Rp, Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP为佐剂的疫苗免疫的小鼠产生更高数量级的OVA-特异性CD8T细胞记忆。在用表达同源OVA抗原的病原体挑战后, 相比于在用用以未改性的c-di-GMP为佐剂的疫苗免疫的小鼠中OVA-特异性记忆CD8T细胞的扩增水平, 通过用以Rp, Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP为佐剂的疫苗免疫诱导的OVA-特异性记忆CD8T细胞扩增至更高的数量级。在图11B中所示的FACS斑点表明OVA-特异性CD8T细胞记忆的数量级达到在来自用以Rp, Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP为佐剂的疫苗免疫的小鼠的PBMC中总CD8T细胞群的30%。有效免疫的金标准是测试疫苗候选是否能赋予针对随后用恶性病原体挑战的保护。为测试以Rp, Rp二硫代c-di-GMP和未改性的c-di-GMP为佐剂的疫苗的相对效力, 在加强免疫后27天用静脉内注射OVA-表达的野生型单核细胞增生李斯特菌 (WT Lm-OVA) 的2X LD₅₀剂量 (1x 10⁵个CFU) 来挑战小鼠。三天后, 通过接种从对脑心脏浸液琼脂培养基进行WT Lm-OVA挑战后第3天的测试小鼠中收获的脾匀浆稀释液, 并在37 $^{\circ}$ C孵育过夜后定量菌落数来测定保护性免疫。图11C示出用以Rp, Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP为佐剂的疫苗对小鼠免疫提供针对恶性病原体挑战的完全保护 (低于检测极限, LOD)。对本领域技术人员显而易见的是, 如通过高数量级CD8T细胞记忆混合物的诱导所示, 由于其赋予强烈的疫苗效力的特性, 佐剂的优选实施方案是Rp, Rp二硫代二磷酸盐c-di-GMP或Rp, Rp二硫代二磷酸盐c-di-AMP环二核苷酸, 其增强了用同源抗原的挑战并提供针对恶性病原体挑战的完全保护。

[0338] 实施例10. 通过CDN的有效的抗肿瘤免疫的诱导

[0339] 在前列腺癌的皮下小鼠模型中对Rp, Rp二硫代c-di-AMP和未改性的c-di-AMP衍生物的相对体内抗肿瘤功效进行评价。用1 $\times$ 10⁶个经照射的表达GM-CSF (GVAX) 的全TRAMP-C2小鼠前列腺肿瘤细胞来配制衍生物分子。5只雄性C57BL/6小鼠的组在脚垫被皮下植入1x 10⁵个TRAMP-C2肿瘤细胞。在肿瘤植入后的第4和11天, 小鼠在侧翼皮下施用单独GVAX、或与RR-CDA或CDA一起配制的GVAX的疫苗, 并且与HBSS对照相比。通过卡尺监测肿瘤生长, 并计算肿瘤体积。

[0340] 如图12所示, 截止到肿瘤移植后第52天, 接种GVAX+RR-CDA的小鼠相比于HBSS对照显示出显著的肿瘤生长抑制, 相比于单独GVAX或与未修饰的c-di-AMP衍生物一起配制的GVAX具有增加的抗肿瘤效力。这些数据证明在小鼠前列腺癌模型中相比于未修饰的c-di-AMP分子, Rp, Rp二硫代c-di-AMP衍生物分子的抗肿瘤效力增加。

[0341] 实施例11. CDN的前药形式。

[0342] 前药策略提供用于促进分隔进入细胞双层或递送脂质体的有吸引力的方法。*c*-di-GMP、*c*-di-AMP和具有C-12至C-18羧酸的二硫代类似物的核糖2'-OH的酰化可以作为有价值的前药。两个实例示于图13,并在实施例中描述。

[0343] (a) 从11a合成单-2'-O-肉豆蔻酰基*c*-di-GMP 12。

[0344] 向11a (8mg, 9.0微摩尔) 的双三乙胺盐中加入0.3ml DMF、30微升吡啶和15mg肉豆蔻酸酐 (34微摩尔)。将反应混合物在室温下搅拌48小时,然后在60℃加热0.5小时。负模式中通过LC/MS证实主要产物12的质量,其中 m/z (M-1) 889 (计算值 $C_{34}H_{49}N_{10}O_{15}P_2^-$: 899.3)。蒸发后,残余物溶于30%在10mM TEAA中的CH₃CN中,过滤并在20mm制备型C-18HPLC柱上纯化,梯度洗脱 (在20分钟内30至60%在10mM TEAA中的CH₃CN,以20ml/min流速)。将含有所需产物的级分合并,旋转蒸发并冷冻干燥,得到3mg单-2'-O-肉豆蔻酰基*c*-di-GMP (12)。负模式中12的HRMS证实 m/z (M-2) 449.1389 (计算值 $C_{34}H_{48}N_{10}O_{15}P_2^{-2}$: 449.1393)。¹H NMR (DMSO+1% D₂O) 25℃ δ (ppm) 7.98 (s, 2H), 5.98 (s, 1H), 5.73 (d, 1H), 5.66 (s, 1H), 4.74 (d, 2H), 4.54 (s, 1H), 4.23 (s, 1H), 3.81-3.99 (br, 4H), 2.55 (s, 2H), 1.44 (s, 2H), 0.85 (t, 3H)。(加入1% D₂O后在纯DMSO中在10.61、7.33和6.55的NMR峰改变)。肉豆蔻酰基的亚甲基被DMSO和高场三乙基乙酸铵峰遮掩。NMR与2'-OH的单酰化一致。³¹P NMR (D₂O) 25℃ δ (ppm) -1.37, -2.06。

[0345] (b) 从11b合成单-2'-O-肉豆蔻酰基[Rp,Rp]二硫代磷酸盐*c*-di-GMP (13)。

[0346] 向11b (12mg, 13.0微摩尔) 的双三乙胺盐中加入0.3ml DMF、30微升吡啶和15mg肉豆蔻酸酐 (34微摩尔) 和催化剂DMAP。将反应混合物在室温下搅拌24小时,然后在60℃加热2小时。通过旋转蒸发除去溶剂,将残余物溶于50%在10mM TEAA中的MeOH中,过滤,并在20mm制备型C-18HPLC柱上纯化 (50%在10mM TEAA中的MeOH等度保持5分钟,然后梯度至100% MeOH保持10分钟,然后100% MeOH保持10分钟)。在此甲醇系统所需产物较晚洗脱。将含有所需产物的级分合并,旋转蒸发,然后冷冻干燥,得到4mg单-2'-O-肉豆蔻酰基[Rp,Rp]二硫代磷酸盐*c*-di-GMP (13)。负模式中13的HRMS证实 m/z (M-2) 465.1148 (计算值 $C_{34}H_{48}N_{10}O_{13}P_2S_2^{-2}$: 465.1165)。¹H NMR (DMSO+1% D₂O) 25℃ δ (ppm) 8.01 (s, 2H), 5.97 (d, 1H), 5.73 (d, 2H), 5.71 (m, 2H), 5.00 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.56 (m, 1H), 4.10-4.18 (m, 4H), 3.97 (m, 2H), 3.84-3.87 (m, 1H), 3.16 (s, 1H), 3.05 (d, 2H), 1.47 (br, 2H), 0.85 (t, 3H)。(加入1% D₂O后在纯DMSO中在10.60、7.53、6.90和6.63的NMR峰改变)。肉豆蔻酰基的亚甲基被DMSO和高场三乙基乙酸铵峰遮掩。NMR与2'-OH的单酰化一致。³¹P NMR (CD₃OD) 25℃ δ (ppm) 56.66, 55.46。

[0347] 也可以使用分别在CDN硫代磷酸盐和磷酸盐上的硫或氧的酰氧基烷基衍生的类似的前药方法。图14中的酰氧基烷基结构类似于用于治疗HIV和HBV感染的有效的核苷类似物前药阿德福韦 (Adefovir)。一旦在细胞内,细胞内酯酶将裂解存在于2'-OH或磷酸盐 (硫代磷酸盐) 上的酰基或酰氧基烷基并使未衍生的环二核苷酸再生。

[0348] 实施例12. CDN前药的药理活性。

[0349] 为了确定*c*-di-GMP的前药形式激活先天性免疫应答的相对效力,对人单核细胞系中诱导的IFN-β的相对水平进行评估。对于这些实验,用IRF诱导的分泌性胚胎碱性磷酸酶报告基因 (Invivogen) 转染4×10⁵个THP1-Blue人单核细胞,并在37℃在5% CO₂下与100μM的*c*-di-GMP、单-2'-O-肉豆蔻酰基*c*-di-GMP或HBSS一起孵育30分钟。30分钟后,洗涤细胞并接种于96孔培养皿中的含有10% FBS的RPMI培养基中,并在37℃在5% CO₂下孵育。在4小时后收集来自每个样本的细胞培养物上清液。将10μL细胞培养物上清液加至QUANTI-Blue试

剂(Invivogen)中并孵育15-30分钟。使用Model 680分光光度计(BioRad)测量655nm处的吸光度。

[0350] 如图15所示,单-2'-0-肉豆蔻酰基c-di-GMP(“单-2'-0-肉豆蔻酰基CDG”)衍生物比c-di-GMP未改性的环二核苷酸分子诱导显著更高水平的IFN- β ,并且超过在人单核细胞系中的背景(HBSS)水平。此外,这些数据表明在人单核细胞系中,对Rp,Rp二硫代c-di-GMP衍生物分子的优先诱导超过Rp,Sp二硫代c-di-GMP和c-di-GMP未改性的分子。这些结果表明单-2'-0-肉豆蔻酰基c-di-GMP衍生物的纯化制剂可以激活人类细胞系中的先天性免疫应答。

[0351] 实施例13.通过CDN前药的免疫应答的诱导

[0352] 为了评估单-2'-0-肉豆蔻酰基c-di-GMP(“单-2'-0-肉豆蔻酰基CDG”)衍生物诱导体内免疫应答的能力,测量在第二次接种与CDN治疗结合使用后第7天在脾细胞中的OVA特异性CD8T细胞应答。为了测试单-2'-0-肉豆蔻酰基c-di-GMP相对于刺激OVA特异性免疫应答的能力,通过使10 μ g OVA蛋白(EndoFit OVA,Invivogen)和Addavax(最终2%鲨烯)与0(对照)或5 μ g单-2'-0-肉豆蔻酰基c-di-GMP衍生物(“单-2'-0-肉豆蔻酰基CDG”)中任一者合并成100 μ L总体积来制备疫苗。使五只雌性C57BL/6小鼠(H-2b)的组用所述疫苗制剂在尾根部进行两次皮下(s.c)免疫,并且7天后通过细胞内细胞因子染色来确定脾中的OVA特异性CD8+T细胞应答。1 $\times$ 10⁶个脾细胞未被刺激或用1 μ M的MHC I型(OVA257-264SIINFEKL二SL8)肽刺激过夜,并且通过BD FACSVerser上的流式细胞仪测量IFN- γ 的生产。

[0353] 如图16所述,含有单-2'-0-肉豆蔻酰基c-di-GMP衍生物的疫苗相比于对照疫苗诱导更高的免疫应答。这些结果表明,在动物模型中含有单-2'-0-肉豆蔻酰基c-di-GMP衍生物的疫苗能够刺激高度有效的适应性免疫应答。

[0354] 本领域技术人员易于理解的是,本发明非常适合于实现所述目的并获得上述目标和优点,以及其中固有的那些。本文提供的实施例表示优选的实施方案,是示例性的,并且不旨在作为对本发明范围的限制。

[0355] 应当理解,本发明的应用并不限于以下描述中阐述的或在附图中示出的组件的构造与布置的细节。本发明能够具有除了所述的那些之外的实施方案并且能够以各种方式实现或执行。此外,要理解的是本文采用的用语和术语以及摘要是为了描述的目的并且不应被视为限制性的。

[0356] 因此,本领域的技术人员将理解,本公开所基于的概念可容易地被用于设计用于实施本发明的若干目的的其他结构、方法和系统的基础。因此重要的是,权利要求被视为包括此类等同构造,只要它们不脱离本发明的精神和范围。

[0357] 尽管对于本领域技术人员而言本发明已经被足够详细地描述并举例以能够制造和使用它,但是各种替换、修改和改进应该显然不偏离本发明的精神和范围。本文提供的实施例表示优选的实施方案,是示例性的,并且不旨在作为对本发明范围的限制。其中的修改和其它用途将被本领域技术人员所想到。这些修改都涵盖在本发明的精神内并且由权利要求的范围限定。

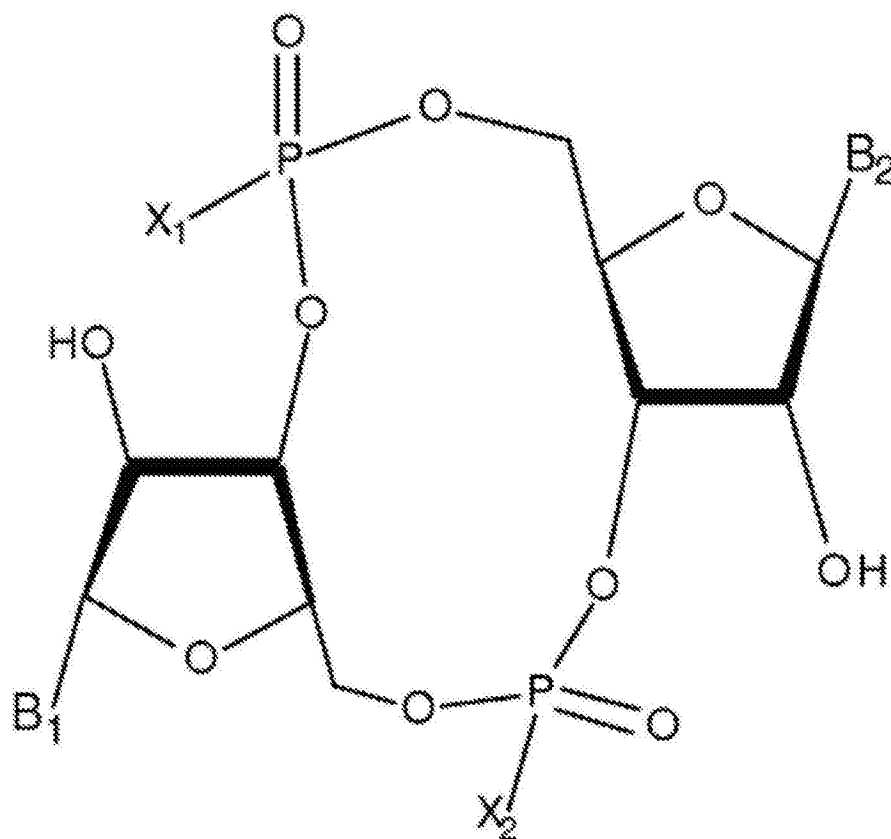
[0358] 对本领域技术人员将易于显而易见的是,可以对本文所公开的发明作出不同的替换和修改,而不脱离本发明的范围和精神。

[0359] 本说明书中所提到的所有专利和出版物指示本发明所属领域的普通技术水平。本

文所有专利和出版物以引用的方式并入,其程度如同每个单独的出版物具体地和单独地被指示为以引用的方式并入。

[0360] 本文适当地说明性描述的本发明可以在缺少本文未具体公开的任何一种或多种元素、一种或多种限制的情况下实施。因此,例如,在本文每一种情况下,术语“包括”、“基本上由.....组成”和“由...组成”中的任一者可以被替换为其它两个术语中的任一者。已采用的术语和表达用作描述而非限制的术语,并且不旨在使用此类排除任何所示和描述的特征的等同物或其部分的术语和表达,但是可认识到,各种修改可能在本发明要求保护的范围内。因此应当理解,尽管本发明已经通过优选的实施方案和任选的特征具体公开,但此公开的修改和概念的变化可以由本领域技术人员所采用,并且此类修改和变化被认为属于本发明由所附权利要求所定义的范围内。

[0361] 其它实施方案在以下权利要求内示出。

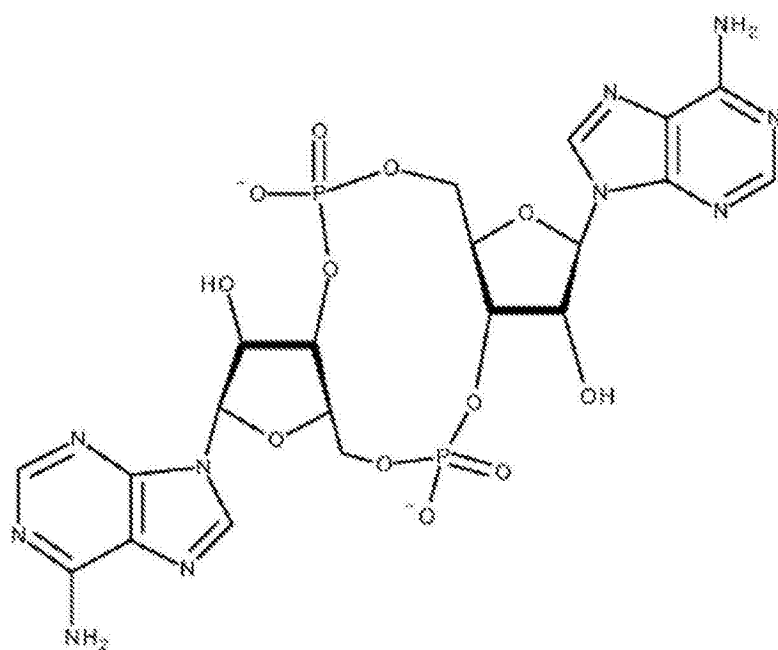


$X_1 = X_2 = O^-$,

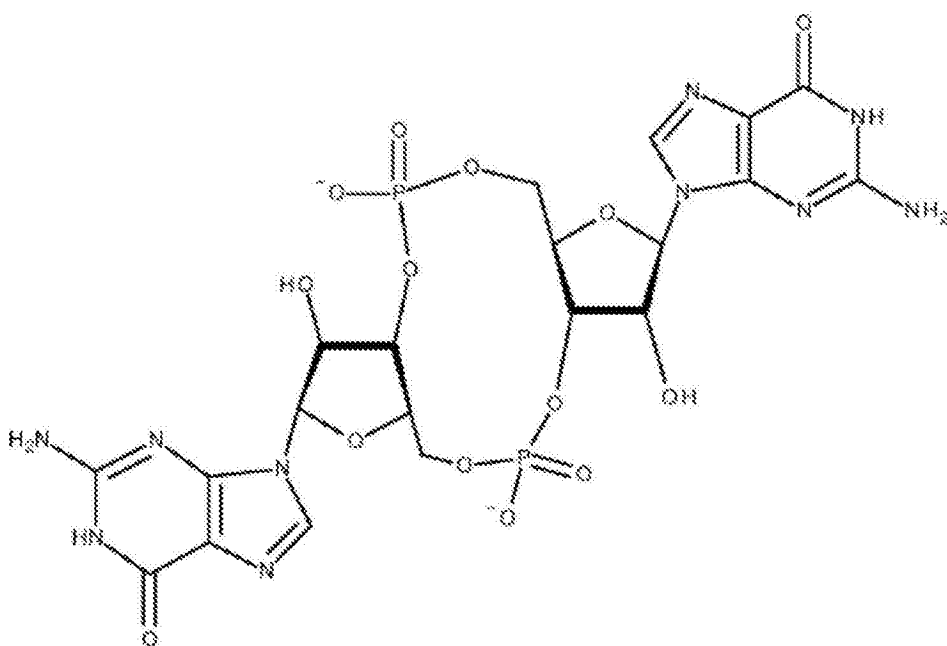
$X_1 = X_2 = S^-$,

或 $X_1 = O^-$, $X_2 = S^-$

图1

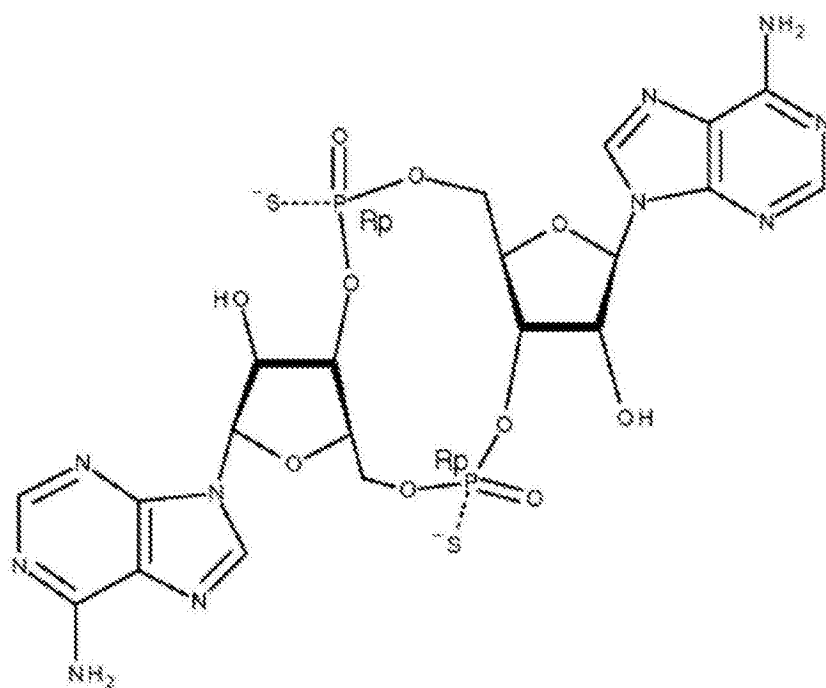


10a

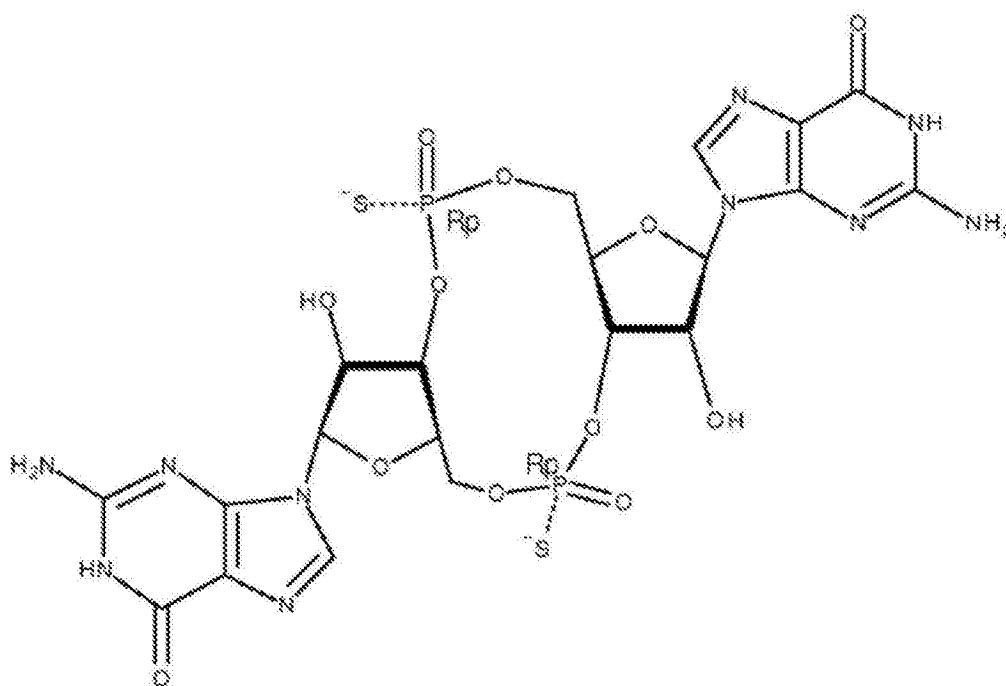


11a

图2

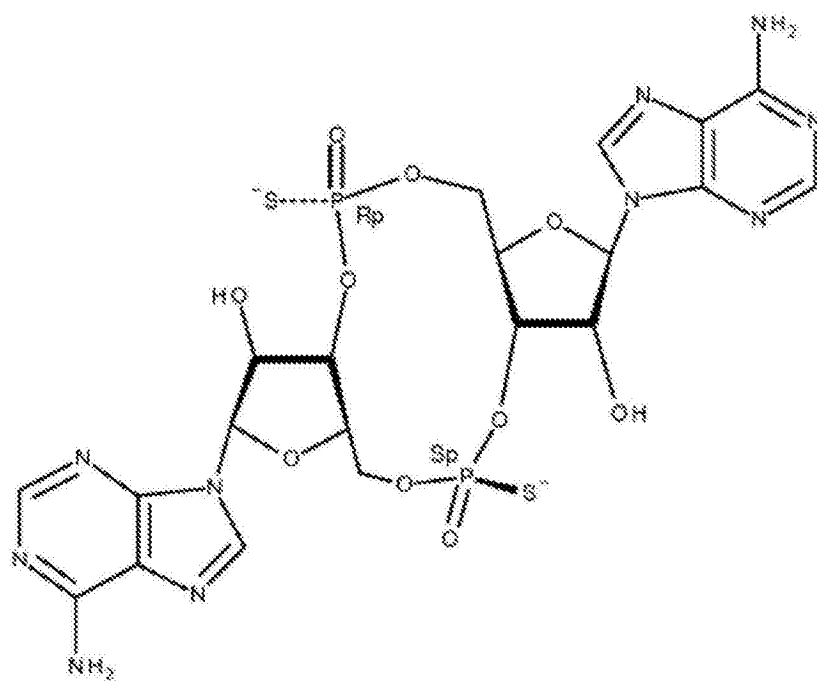


10b

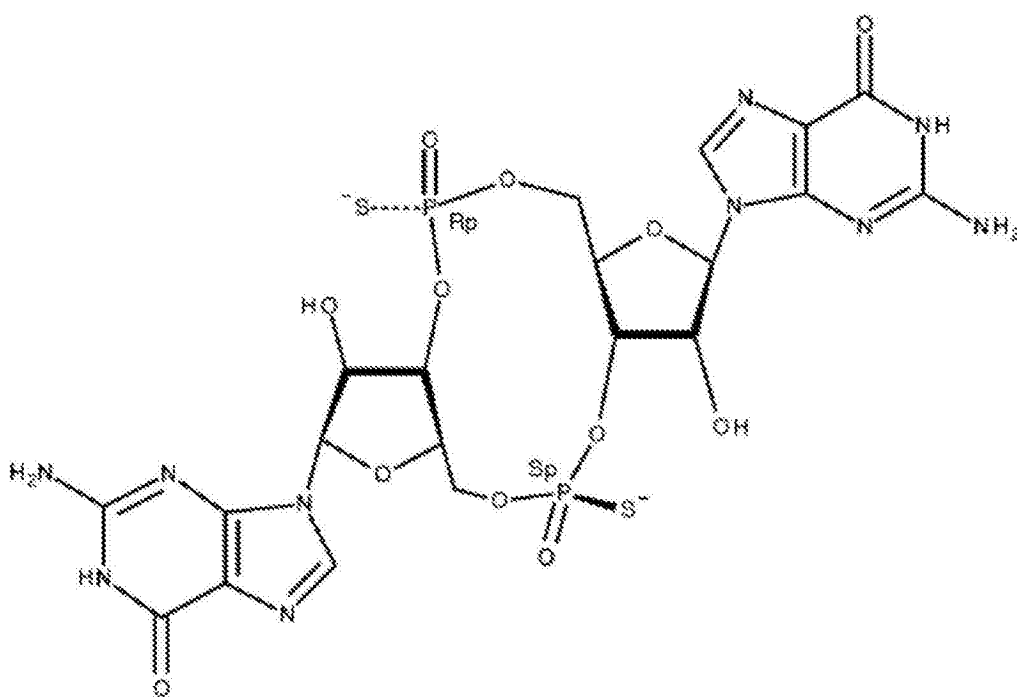


11b

图3



10c



11c

图4

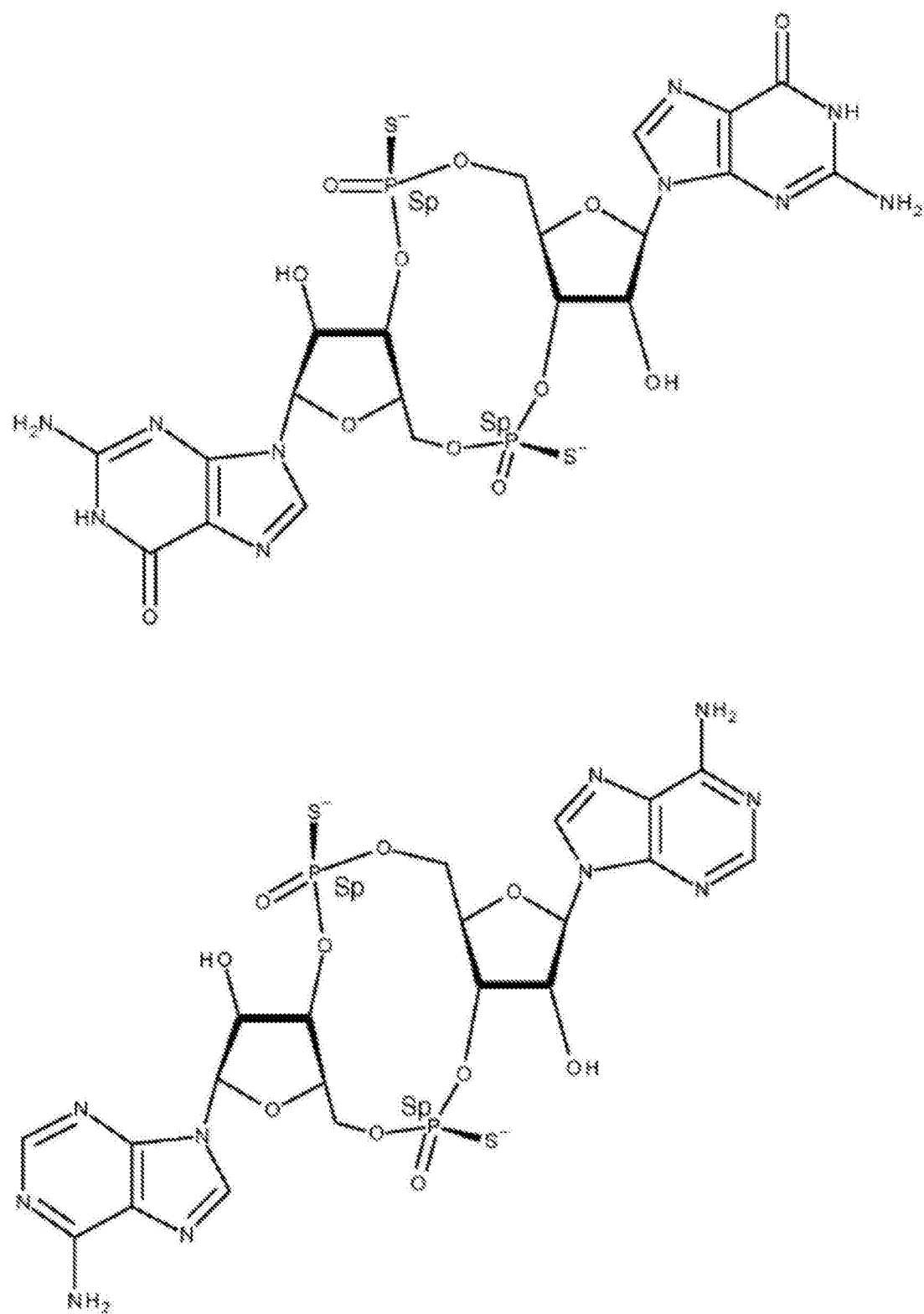


图5

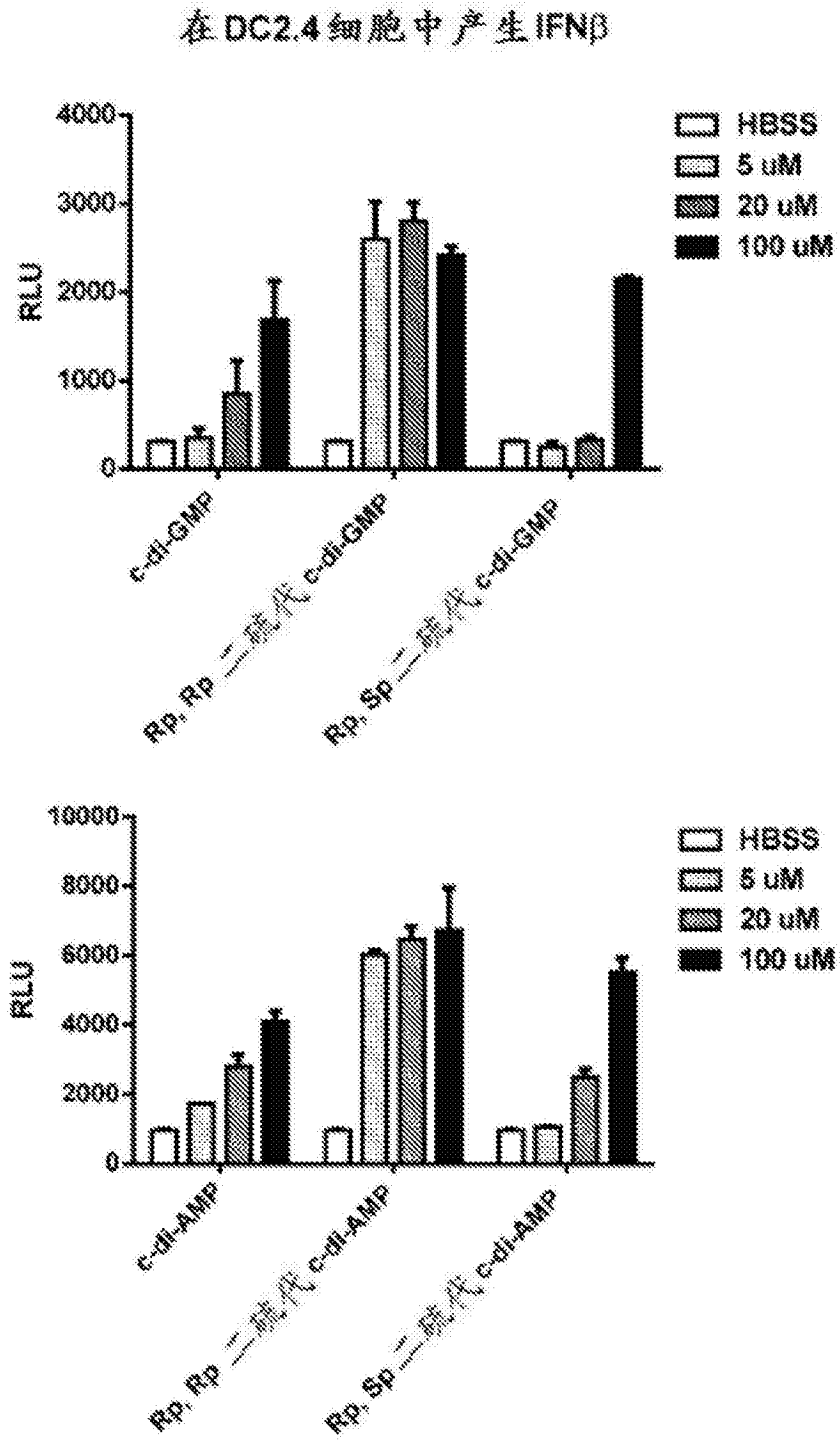


图7

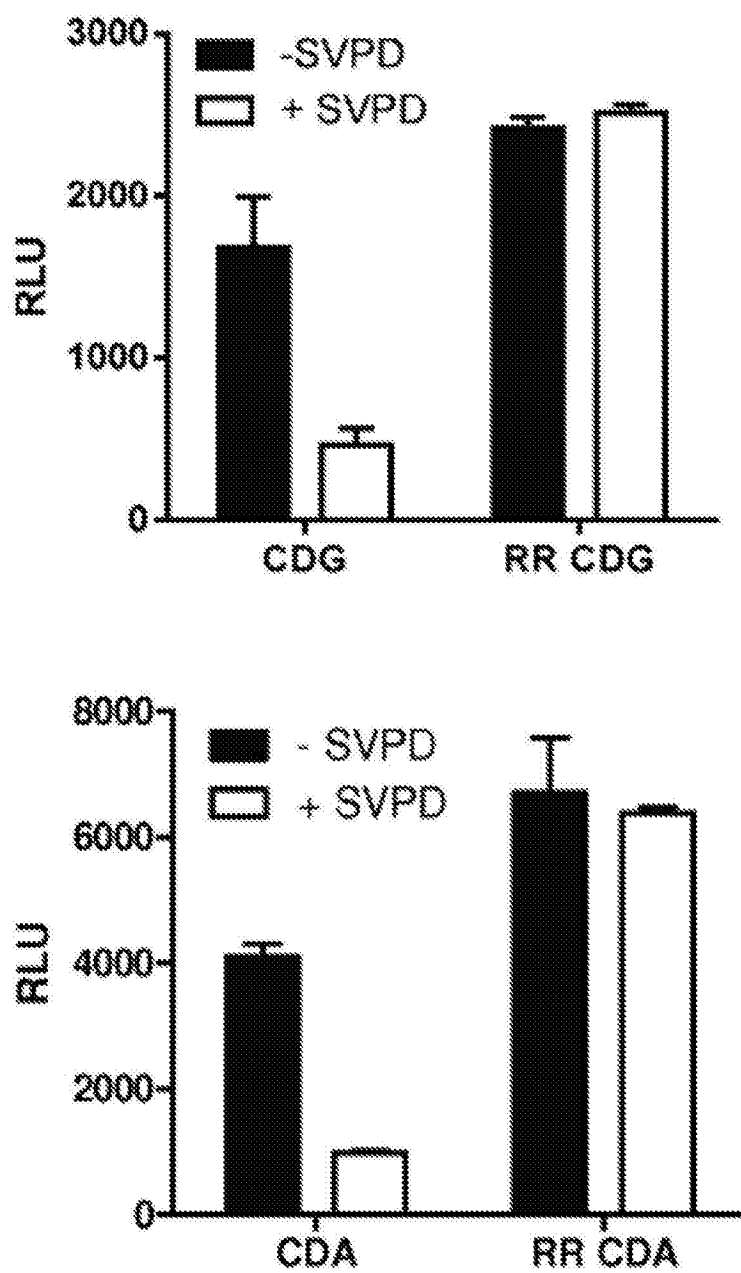
在 DC2.4 细胞中产生 IFN β 

图8

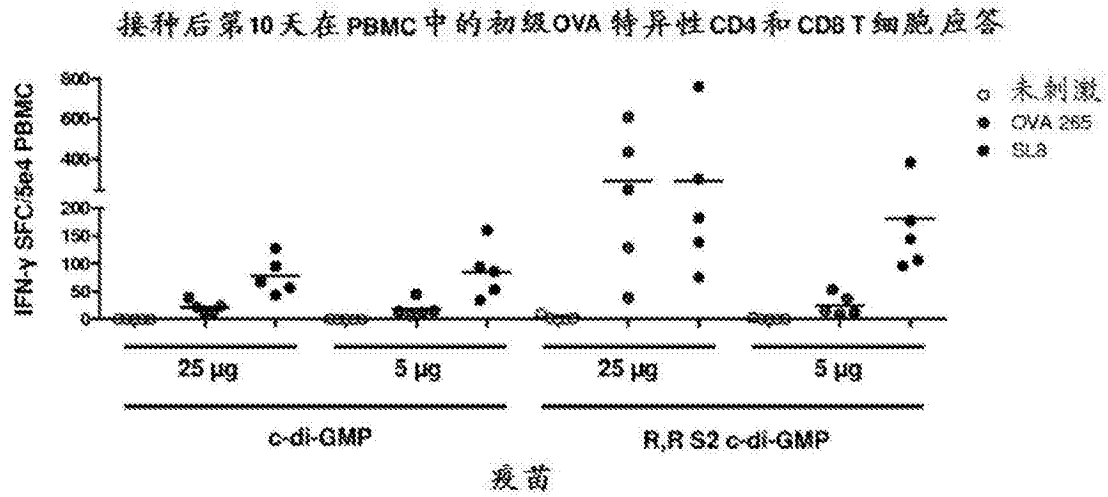
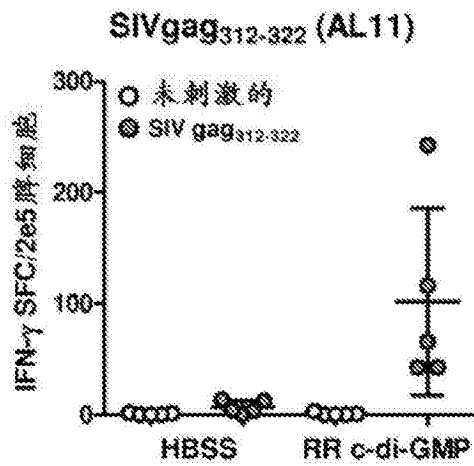


图9

10A.



10B.

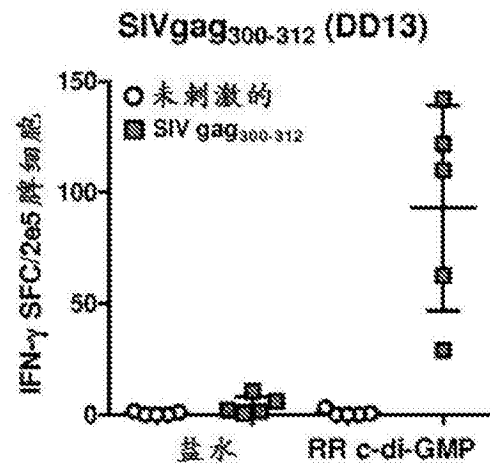
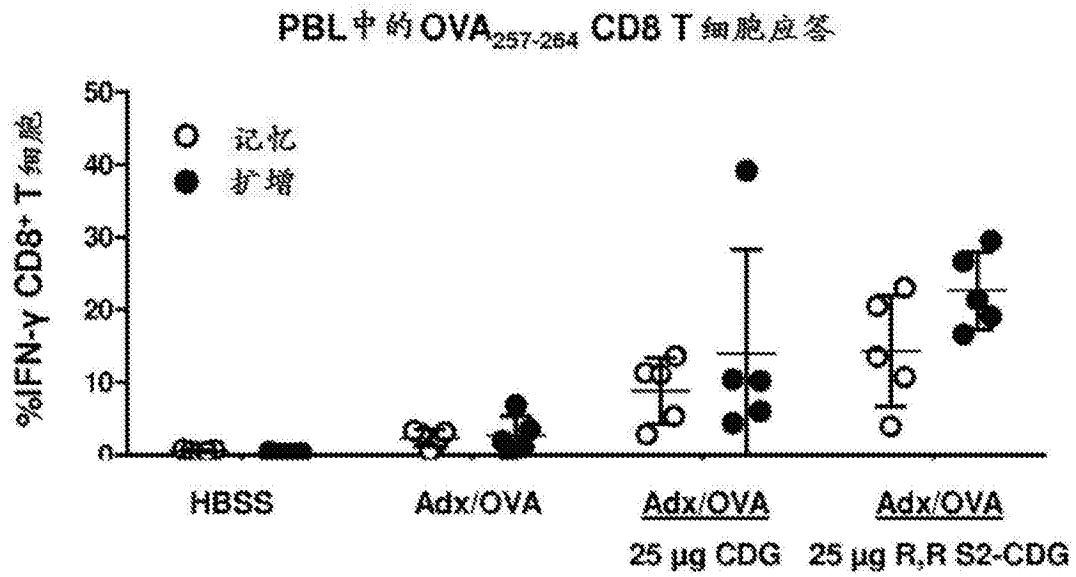
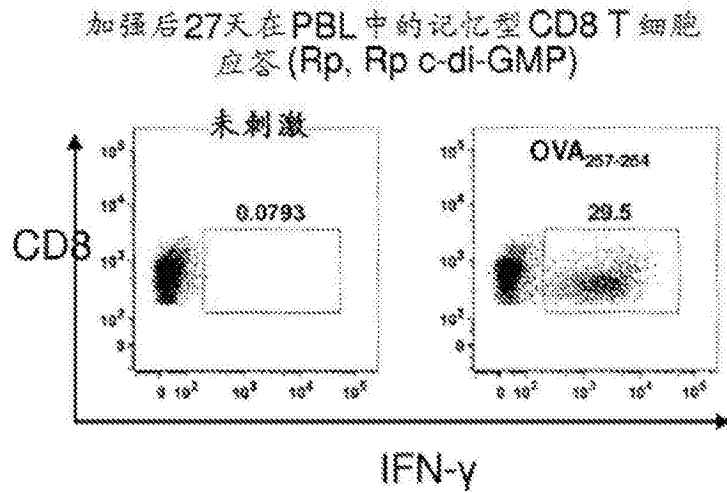


图10

11A.



11B.



IIC.

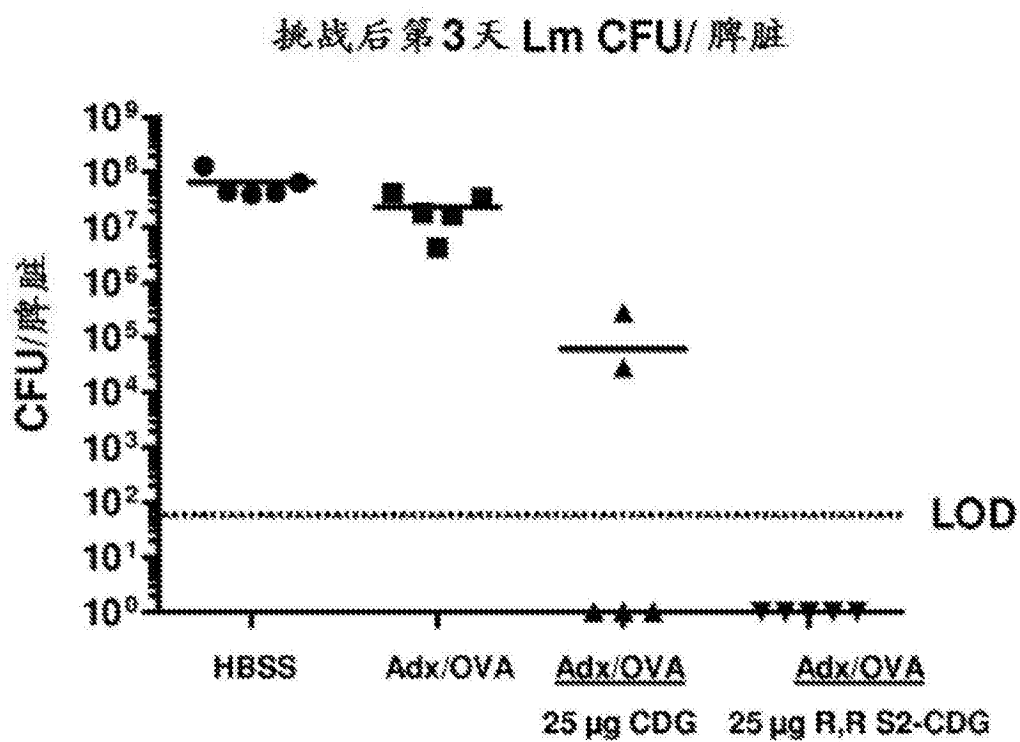


图11

在TRAMP-C2皮下模型中的抗肿瘤功效

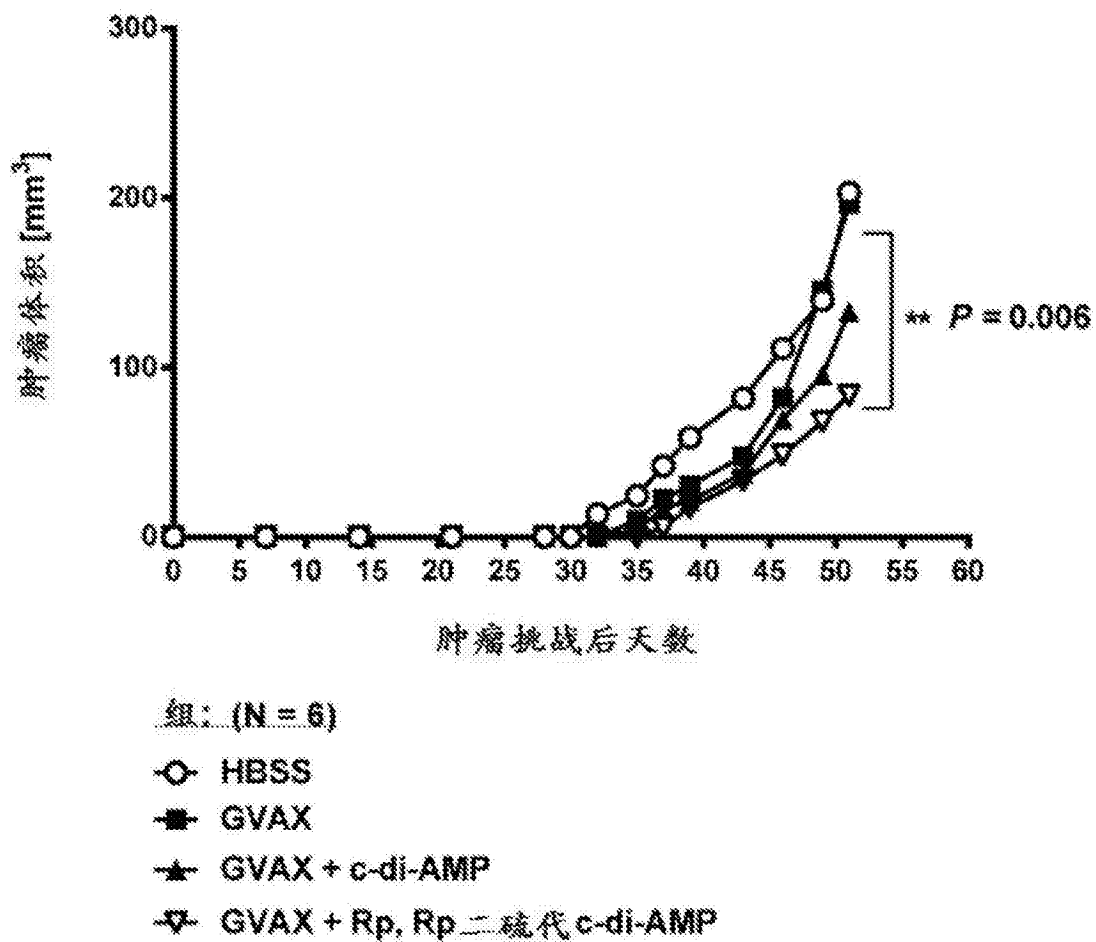


图12

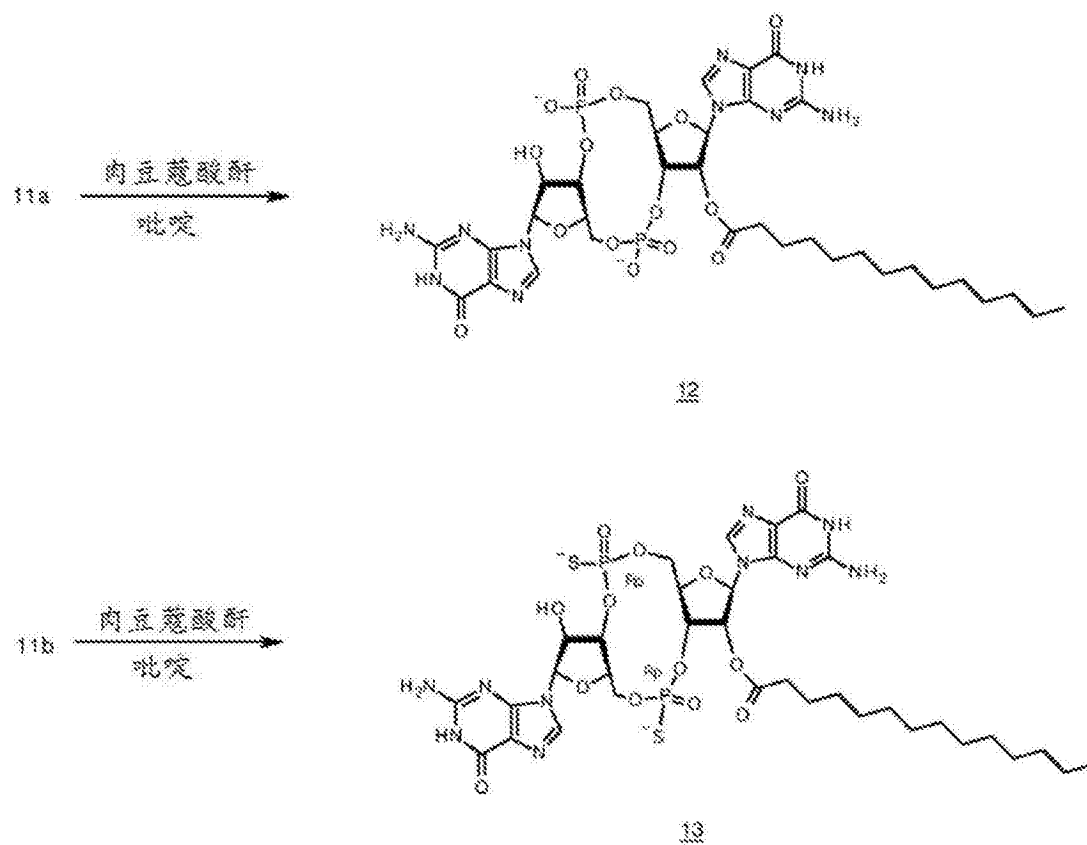


图13

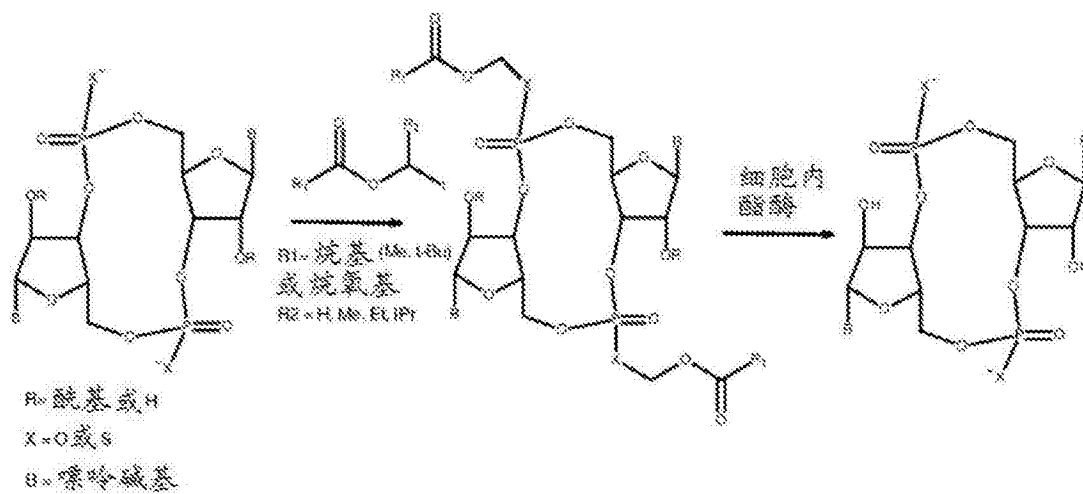


图14

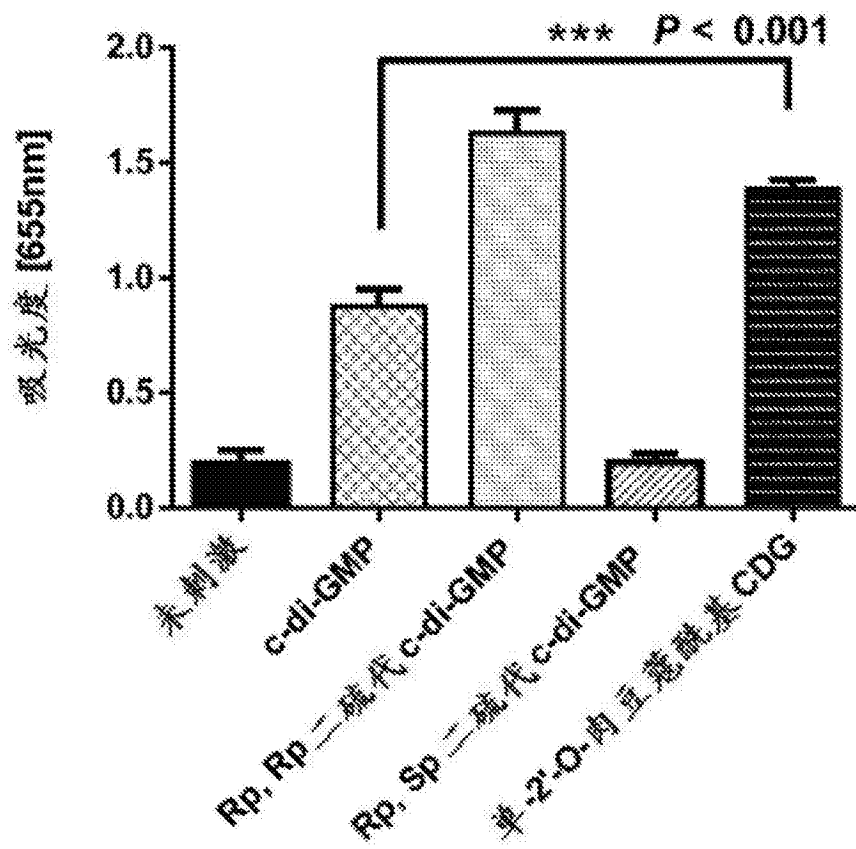
在THP1人单核细胞中的IFN β 诱导

图15

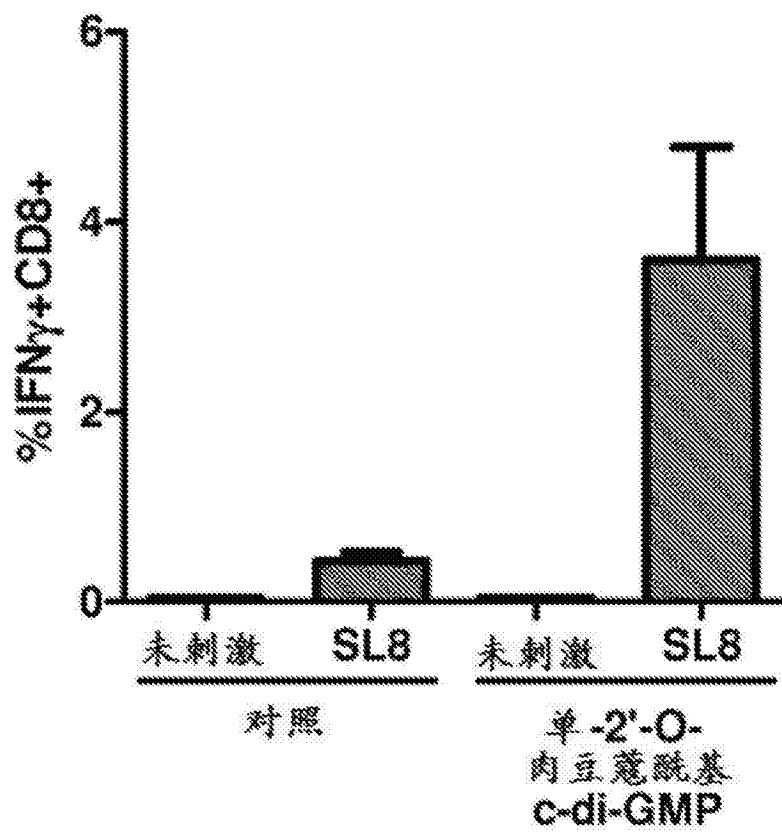


图16