



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104661683 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号	201280065531. 8	<i>C07D 487/04</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2012. 11. 09	<i>C07D 471/04</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>C07D 493/04</i> (2006. 01)
	2011904656 2011. 11. 09 AU	<i>C07D 473/18</i> (2006. 01)
		<i>A61P 37/02</i> (2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日		
	2014. 06. 30	
(86) PCT国际申请的申请数据		
	PCT/AU2012/001387 2012. 11. 09	
(87) PCT国际申请的公布数据		
	W02013/067597 EN 2013. 05. 16	
(71) 申请人	埃森德生物制药有限公司	
	地址 澳大利亚维多利亚州	
(72) 发明人	G · A · 彼得斯 C · 莱昂	
(74) 专利代理机构	北京尚诚知识产权代理有限公司	
	11322	
	代理人 龙淳	
(51) Int. Cl.		
	<i>A61K 47/48</i> (2006. 01)	
	<i>C08B 37/00</i> (2006. 01)	

权利要求书16页 说明书84页
序列表1页 附图49页

(54) 发明名称
免疫调节缀合物

(57) 摘要

本发明提供一种包含碳水化合物聚合物的免疫调节化合物,所述碳水化合物聚合物包含甘露糖,其中所述碳水化合物聚合物与至少一种免疫调节剂缀合。本发明还提供这种化合物在用于接种方法和基因治疗方法的免疫调节组合物中的用途、连同用于其制备的方法。

1. 一种包含碳水化合物聚合物的免疫调节化合物,所述碳水化合物聚合物包含甘露糖,其中所述碳水化合物聚合物与至少一种免疫调节剂缀合。

2. 如权利要求 1 所述的化合物,其中当存在多于一种免疫调节剂时,每种免疫调节剂可以是相同的或不同的。

3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的化合物,其中所述碳水化合物聚合物大于约 1000kDa。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的化合物,其中所述碳水化合物聚合物是氧化的。

5. 如权利要求 4 所述的化合物,其中所述碳水化合物聚合物进一步与至少一种抗原或编码所述抗原的核酸缀合。

6. 如权利要求 4 或权利要求 5 所述的化合物,其中所述氧化的碳水化合物聚合物在与所述免疫调节剂和 / 或抗原或编码所述抗原的核酸缀合之前具有至少 150 个醛基。

7. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的化合物,其中所述抗原是病毒的、细菌的、原生动物的、真菌的、或肿瘤抗原、自身抗原或过敏原。

8. 如权利要求 5 至 7 中任一项所述的化合物,其中所述氧化的碳水化合物聚合物与所述至少一种抗原共价缀合。

9. 如权利要求 5 至 7 中任一项所述的化合物,其中所述氧化的碳水化合物聚合物经由聚阳离子与所述至少一种核酸缀合。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的化合物,其中所述碳水化合物聚合物是甘露聚糖。

11. 如权利要求 10 所述的化合物,其中所述甘露聚糖来自酵母。

12. 如权利要求 10 或权利要求 11 所述的化合物,其中在与所述免疫调节剂和 / 或抗原或编码所述抗原的核酸缀合之前并且在用氨基萘-1, 3, 6- 三磺酸 (ANTS) 标记之后,所述甘露聚糖的大小分布基于蛋白质标准是在约 150 ~ 250kDa 之间且 / 或基于碳水化合物标准是在约 800 ~ 3000kDa 之间。

13. 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的化合物,其中所述至少一种免疫调节剂是 Toll- 样受体 (TLR) 激动剂。

14. 如权利要求 13 所述的化合物,其中所述至少一种 TLR 激动剂选自:鸟苷类似物、脱氮-腺苷类似物、咪唑并喹啉及其衍生物。

15. 如权利要求 13 或权利要求 14 所述的化合物,其中所述 TLR 激动剂选自:洛索立宾、艾沙托立宾、咪喹莫特、瑞喹莫德及其衍生物。

16. 如权利要求 1 至 15 中任一项所述的化合物,其中每种免疫调节剂经由接头与所述碳水化合物聚合物缀合,并且其中在缀合之前每个接头包含能够与所述免疫调节剂或所述碳水化合物聚合物缀合的一个或多个官能团,并且其中所述官能团可以任选地包含适合的离去基团或保护基团。

17. 如权利要求 16 所述的化合物,其中每个官能团选自:醛、酮、甲酰基、肼、酰肼、胺、酰胺、羧酸、炔、马来酰亚胺、巯基以及卤素。

18. 如权利要求 17 所述的化合物,其中所述胺的适合的保护基团是 BOC 基团。

19. 如权利要求 17 所述的化合物,其中所述甲酰基的适合的离去基团是对硝基苯氧基。

20. 如权利要求 1 至 19 中任一项所述的化合物,其中每种免疫调节剂经由接头与所述碳水化合物聚合物缀合,所述接头包含:

- i) 与所述碳水化合物聚合物缀合的官能团 ((i) 型基团);
- ii) 与所述免疫调节剂缀合的官能团 ((ii) 型基团);以及
- iii) 间隔基;

并且其中每个接头可以是彼此相同的或不同的。

21. 如权利要求 20 所述的化合物,其中所述 (i) 型基团是脞。

22. 如权利要求 20 所述的化合物,其中所述 (ii) 型基团是氨基甲酸酯基团。

23. 如权利要求 20 至 22 中任一项所述的化合物,其中所述间隔基包含一个或多个不同类型的连接单元。

24. 如权利要求 23 所述的化合物,其中每个连接单元独立地选自:乙二醇和/或丙二醇的聚合物;聚芳基;氨基酸残基或其衍生物;烷基或烯基链;含有苯基的部分;以及糖类。

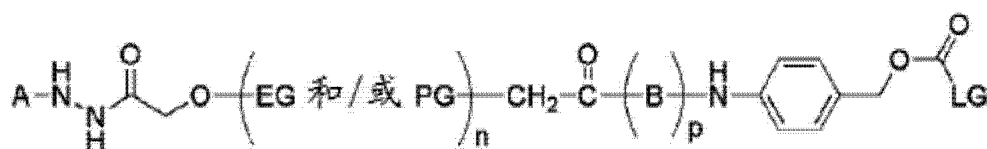
25. 如权利要求 20 至 22 中任一项所述的化合物,其中所述间隔基包含聚合物,所述聚合物包含 1 至 100 个乙二醇和/或丙二醇单元。

26. 如权利要求 24 或权利要求 25 所述的化合物,其中所述间隔基包含聚合物,所述聚合物包含 1 至 10 个乙二醇和/或丙二醇单元、1 至 5 个氨基酸残基或其衍生物以及含有苯基的部分。

27. 如权利要求 20 至 26 中任一项所述的化合物,其中所述接头在缀合之后是可裂解的。

28. 如权利要求 27 所述的化合物,其中所述可裂解的接头包含选自以下的可裂解的基团:酯、氨基甲酸酯、脞、酰胺以及缩醛。

29. 如权利要求 4 至 28 中任一项所述的化合物,其中所述氧化的碳水化合物聚合物和所述免疫调节剂通过与式 I 的接头的反应而连接:



式 I

其中,

A 是保护基团;

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

B 是氨基酸残基或其衍生物;

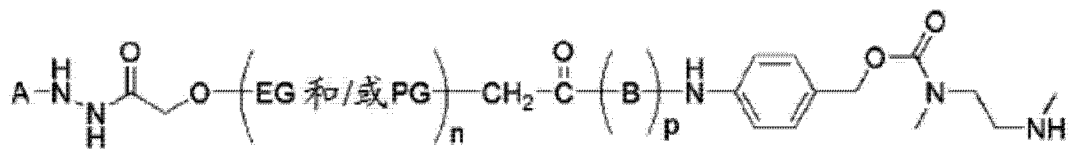
n 是 1 与 10 之间的整数;

p 是 1 与 5 之间的整数;并且

LG 是离去基团。

30. 如权利要求 29 所述的免疫调节化合物,其中所述离去基团是对硝基苯氧基。

31. 如权利要求 4 至 28 中任一项所述的化合物, 其中所述氧化的碳水化合物聚合物和所述免疫调节剂通过与式 II 的接头的反应而连接:



式 II

其中,

A 是保护基团;

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

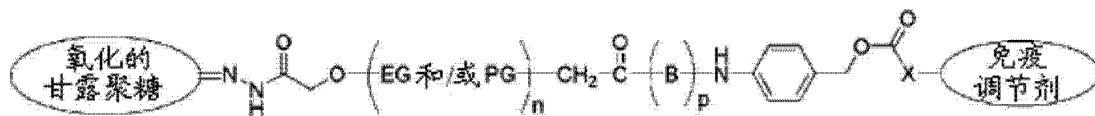
B 是氨基酸残基或其衍生物;

n 是 1 与 10 之间的整数; 并且

p 是 1 与 5 之间的整数。

32. 如权利要求 29 至 31 中任一项所述的化合物, 其中所述保护基团是 BOC。

33. 一种包含氧化的甘露聚糖的式 III 的化合物, 所述氧化的甘露聚糖经由接头与至少一种免疫调节剂缀合:



式 III

其中,

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

B 是氨基酸残基或其衍生物;

n 是 1 与 10 之间的整数;

p 是 1 与 5 之间的整数; 并且

X 是键或 $-\text{MeN}(\text{CH}_2)_2\text{NMeC}(=\text{O})-$ 。

34. 如权利要求 33 所述的化合物, 其中

i) 所述免疫调节剂是洛索立宾或其衍生物;

ii) X 是 $-\text{MeN}(\text{CH}_2)_2\text{NMeC}(=\text{O})-$; 并且

iii) 所述免疫调节剂通过其伯羟基或仲羟基与 X 缀合。

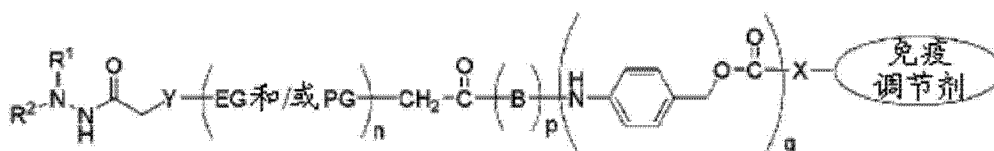
35. 如权利要求 33 所述的化合物, 其中

i) 所述免疫调节剂是瑞喹莫德或其衍生物;

ii) X 是 $-\text{MeN}(\text{CH}_2)_2\text{NMeC}(=\text{O})-$; 并且

iii) 所述免疫调节剂通过所述免疫调节剂上的游离羟基与 X 缀合。

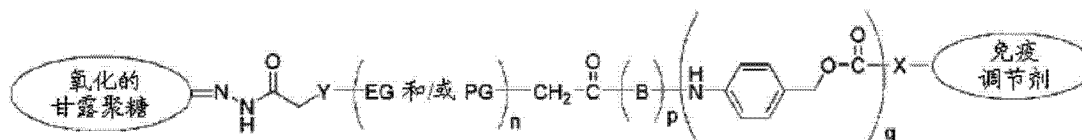
36. 如权利要求 35 所述的化合物,其中所述游离羟基是叔羟基。
37. 如权利要求 33 所述的化合物,其中
- 所述免疫调节剂是洛索立宾或瑞喹莫德或其衍生物;
 - X 是键;并且
 - 所述免疫调节剂通过所述免疫调节剂上的游离氨基与 X 缀合。
38. 如权利要求 29 至 37 中任一项所述的化合物,其中
- (EG 和 / 或 PG)_n- 是仅乙二醇 (EG) 单元;
 - (EG 和 / 或 PG)_n- 是仅丙二醇 (PG) 单元;或
 - (EG 和 / 或 PG)_n- 是乙二醇 (EG) 单元与丙二醇 (PG) 单元的混合物。
39. 如权利要求 29 至 38 中任一项所述的化合物,其中 n 是 8 且 / 或 p 是 1 至 3。
40. 如权利要求 39 所述的化合物,其中 p 是 2。
41. 如权利要求 29 至 40 中任一项所述的化合物,其中当 p 大于 1 时,每个氨基酸残基是相同的或不同的。
42. 如权利要求 29 至 41 中任一项所述的化合物,其中每个氨基酸残基独立地选自缬氨酸和赖氨酸。
43. 一种式 IV 的化合物



式 IV

- 其中,
- R¹和 R²各自独立地选自氢和 A
- 其中 A 是保护基团;
- 或 R¹和 R²一起形成双键,所述双键经由羰基碳连接至另一个部分;
- Y 选自 -CH₂- 和 -O-;
- EG 是 -CH₂-CH₂-O-;
- PG 是 -CH₂-CH₂-CH₂-O-;
- B 是氨基酸残基或其衍生物;
- n 是 0 与 10 之间的整数;
- p 是 1 与 5 之间的整数;
- q 是选自 0 和 1 的整数;
- X 是能够与所述免疫调节剂的一个或多个羟基或所述免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。
44. 如权利要求 43 所述的化合物,其中 R¹和 R²一起形成双键,所述双键经由羰基碳连接至碳水化合物聚合物。
45. 如权利要求 44 所述的化合物,其中所述碳水化合物聚合物是氧化的甘露聚糖。
46. 一种包含氧化的甘露聚糖的式 V 的化合物,所述氧化的甘露聚糖经由接头与至少

一种免疫调节剂缀合：



式 V

其中，

Y 选自 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-$ ；

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

B 是氨基酸残基或其衍生物；

n 是 0 与 10 之间的整数；

p 是 1 与 5 之间的整数；

q 是选自 0 和 1 的整数；

X 是能够与所述免疫调节剂的一个或多个羟基或所述免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。

47. 如权利要求 43 至 46 中任一项所述的化合物，其中 p 是 1 与 3 之间的整数。

48. 如权利要求 47 所述的化合物，其中 p 是 2。

49. 如权利要求 43 至 48 中任一项所述的化合物，其中当 p 大于 1 时，每个氨基酸残基是相同的或不同的。

50. 如权利要求 49 所述的化合物，其中每个氨基酸残基独立地选自缬氨酸和赖氨酸。

51. 如权利要求 43 至 50 中任一项所述的化合物，其中 n 是 0。

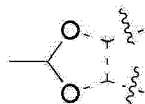
52. 如权利要求 43 至 51 中任一项所述的化合物，其中 q 是 0。

53. 如权利要求 43 至 52 中任一项所述的化合物，其中 X 是经由所述免疫调节剂的至少一个羟基或游离氨基连接至所述免疫调节剂的 $-\text{R}^3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NR}^4\text{C}(\text{O})-$ ；

其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基。

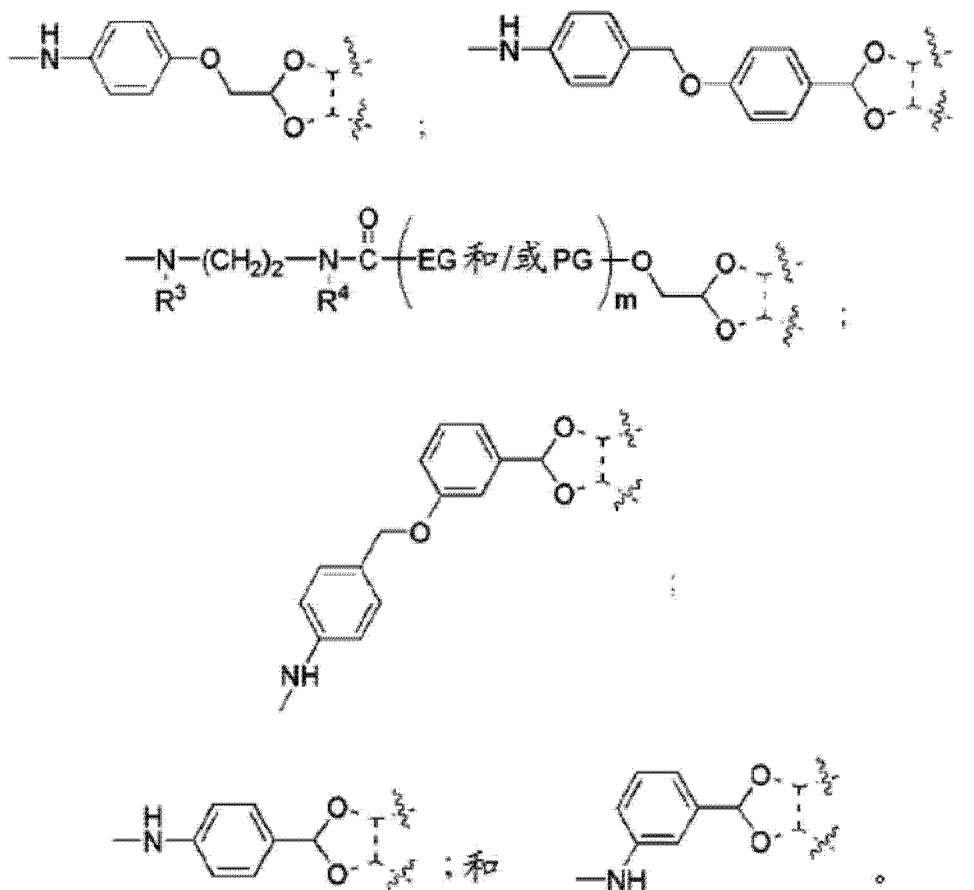
54. 如权利要求 43 至 52 中任一项所述的化合物，其中 X 通过与所述免疫调节剂的两个羟基形成缩醛而连接至所述免疫调节剂。

55. 如权利要求 54 所述的化合物，其中 X- 免疫调节剂包含以下官能性：



其中两个氧和虚线键是所述免疫调节剂分子的部分。

56. 如权利要求 54 或权利要求 55 所述的化合物，其中 X- 免疫调节剂包含选自以下的基团：



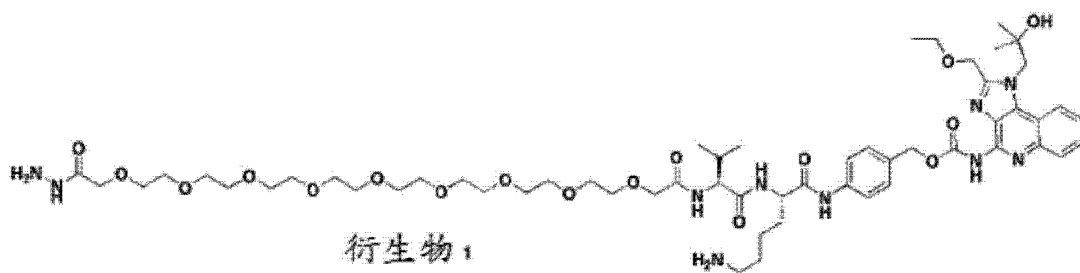
其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基；

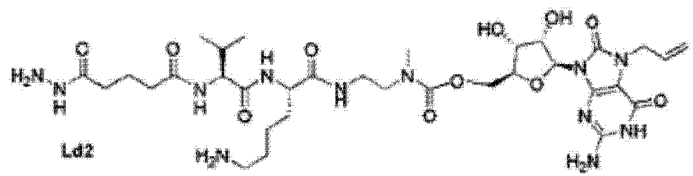
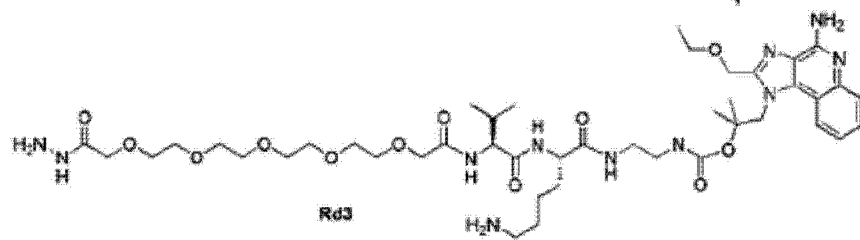
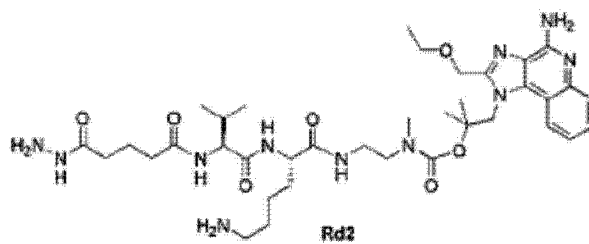
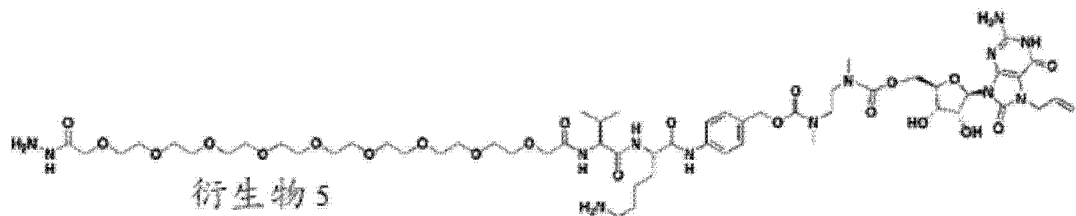
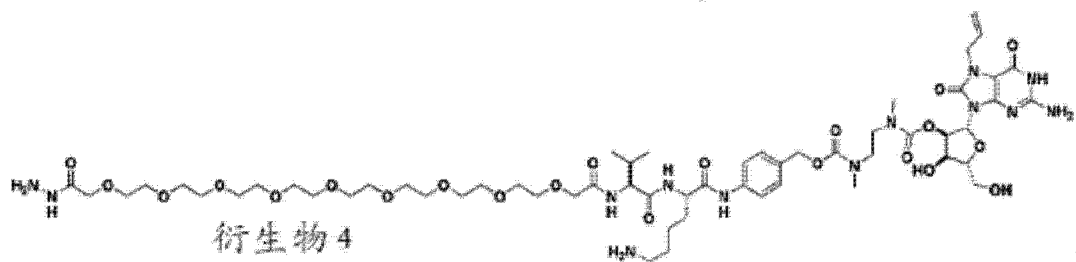
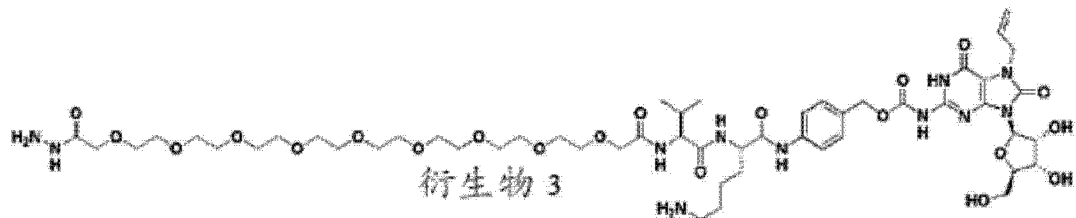
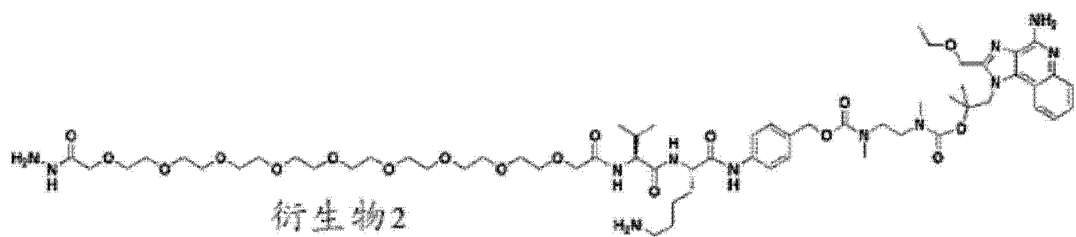
EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

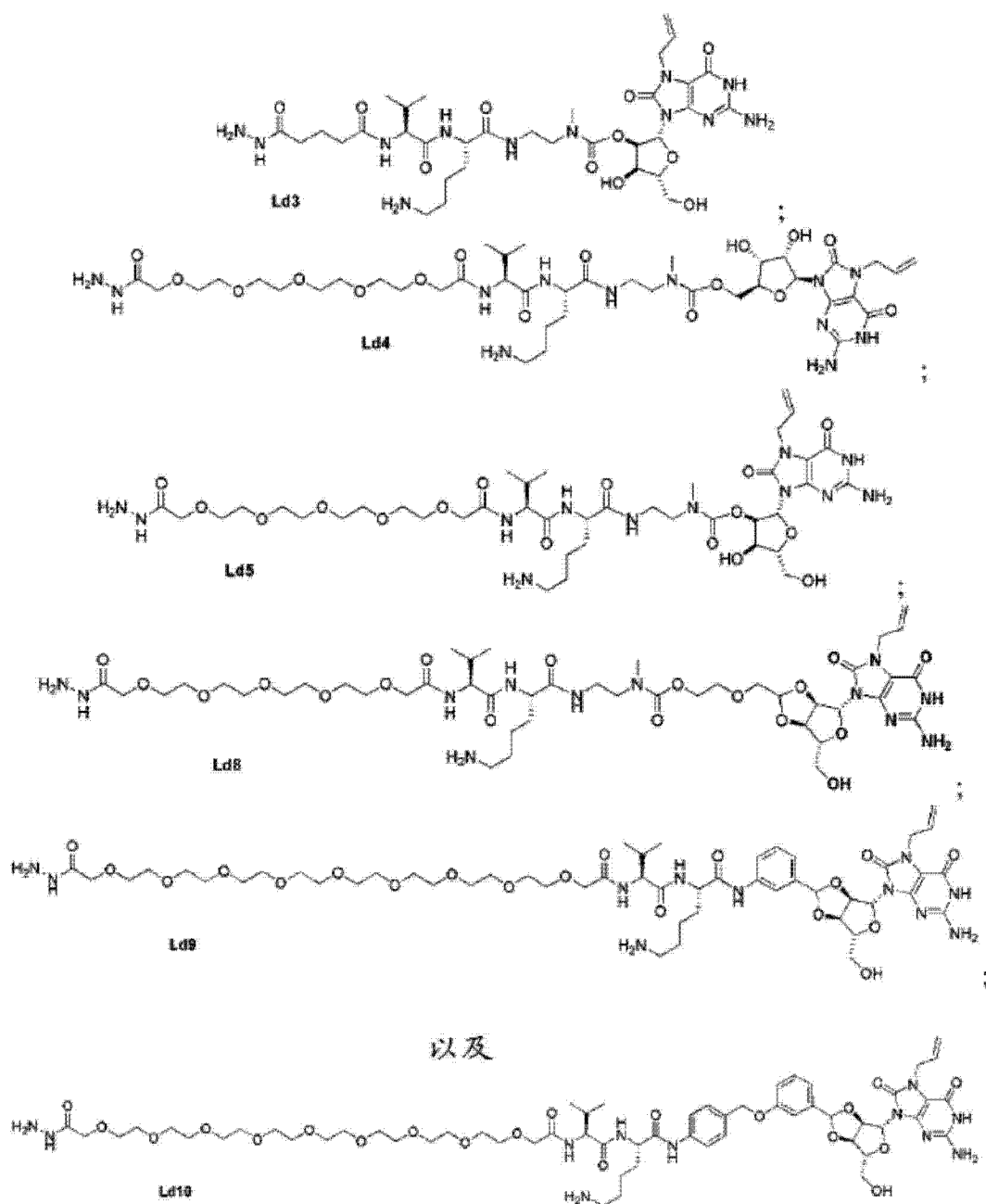
PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；并且

m 是 0 与 10 之间的整数。

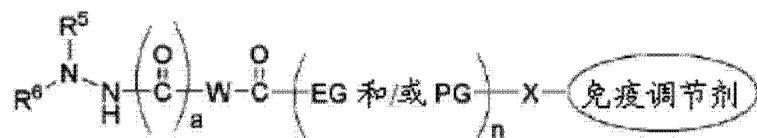
57. 一种式 IV 的化合物, 所述化合物是选自以下的化合物：







58. 一种式 VI 的化合物：



式 VI

其中 R^5 和 R^6 各自独立地选自氢和 A

其中 A 是保护基团；

或 R^5 和 R^6 一起形成双键，所述双键经由羰基碳连接至另一个部分；

W 是包含芳环或杂芳环的连接基团

其中所述杂芳环包含 1 至 3 个选自 N、O 以及 S 的杂原子；

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

n 是 0 与 10 之间的整数；

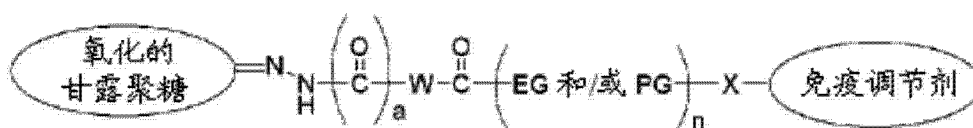
a 是选自 0 和 1 的整数；

X 是能够与所述免疫调节剂的一个或多个羟基或所述免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。

59. 如权利要求 58 所述的化合物，其中 R^1 和 R^2 一起形成双键，所述双键经由羰基碳连接至碳水化合物聚合物。

60. 如权利要求 59 所述的化合物，其中所述碳水化合物聚合物是氧化的甘露聚糖。

61. 一种包含氧化的甘露聚糖的式 VII 的化合物，所述氧化的甘露聚糖经由接头与至少一种免疫调节剂缀合：



式 VII

其中

W 是包含芳环或杂芳环的连接基团；

其中所述杂芳环包含 1 至 3 个选自 N、O 以及 S 的杂原子；

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

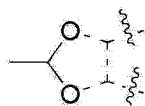
n 是 0 与 10 之间的整数；

a 是选自 0 和 1 的整数；

X 是能够与所述免疫调节剂的一个或多个羟基或所述免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。

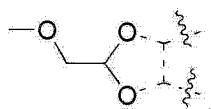
62. 如权利要求 58 至 61 中任一项所述的化合物，其中 X 通过与所述免疫调节剂的两个羟基形成缩醛而连接至所述免疫调节剂。

63. 如权利要求 62 所述的化合物，其中 X- 免疫调节剂包含以下官能性：



其中两个氧和虚线键是所述免疫调节剂分子的部分。

64. 如权利要求 62 或权利要求 63 所述的化合物，其中所述 X- 免疫调节剂官能性包含：

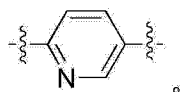


65. 如权利要求 58 至 61 中任一项所述的化合物，其中 X 选自键和 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ 。

66. 如权利要求 58 至 65 中任一项所述的化合物，其中 W 是杂芳环。

67. 如权利要求 66 所述的化合物,其中在所述杂芳环中是吡啶环。

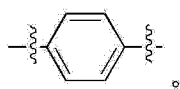
68. 如权利要求 66 或权利要求 67 所述的化合物,其中 W 是:



69. 如权利要求 58 至 65 中任一项所述的化合物,其中 W 是芳环。

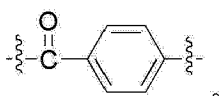
70. 如权利要求 69 所述的化合物,其中在所述芳环中是苯环。

71. 如权利要求 69 或权利要求 70 所述的化合物,其中 W 是:

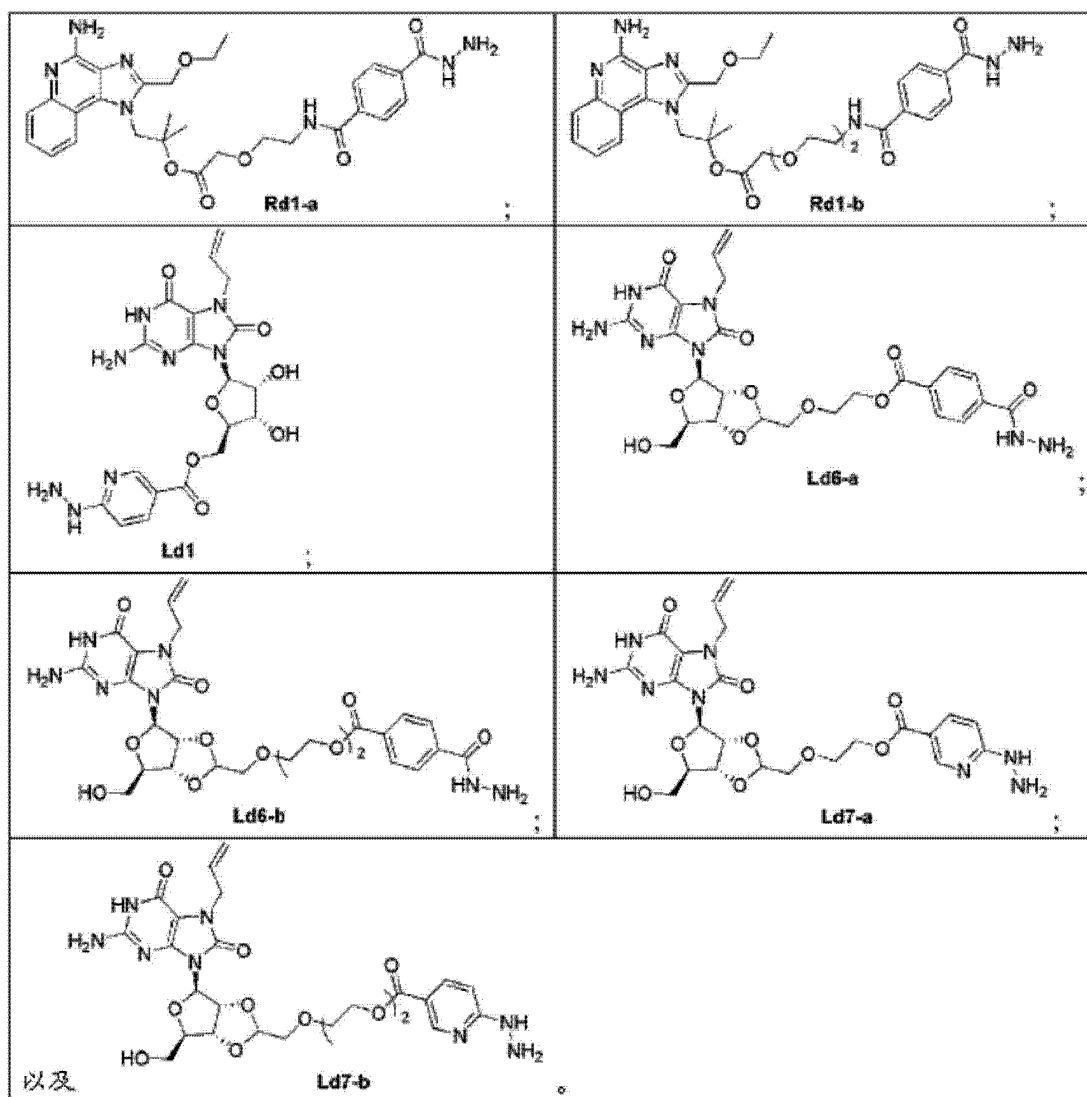


72. 如权利要求 58 至 71 中任一项所述的化合物,其中 a 是 1。

73. 如权利要求 69 至 72 中任一项所述的化合物,其中 $-(C(O))_a-W$ 是:



74. 一种式 VI 的化合物,所述化合物选自以下:



75. 如权利要求 33 至 42、46 至 56 或 61 至 73 中任一项所述的化合物,其中所述氧化的甘露聚糖与至少一种抗原或编码所述抗原的核酸缀合。

76. 一种免疫调节组合物,所述组合物包含如权利要求 1 至 42、46 至 56、61 至 73 以及 75 中任一项所述的化合物。

77. 一种疫苗组合物,所述组合物包含:

i) 如权利要求 5 至 42 中任一项所述的化合物;

ii) 如权利要求 1 至 42 中任一项所述的化合物和至少一种抗原或编码所述抗原的核酸,其中所述至少一种抗原或编码所述抗原的核酸不与所述碳水化合物聚合物缀合。

78. 如权利要求 76 或权利要求 77 所述的组合物,其中至少 75% 的所述碳水化合物聚合物大于约 1000kDa。

79. 如权利要求 76 至 78 中任一项所述的组合物,其中至少 75% 的所述碳水化合物聚合物是氧化的并且在与所述免疫调节剂和 / 或抗原或编码所述抗原的核酸缀合之前具有至少 150 个醛基。

80. 如权利要求 76 至 79 中任一项所述的组合物,所述组合物被配制用于经粘膜、局部、皮内、肌肉内、皮下或静脉内施用。

81. 如权利要求 76 至 80 中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含至少一种可接受的载体。

82. 一种用于诱导和 / 或增强或抑制或耐受受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求 76 至 81 中任一项所述的第一组合物。

83. 如权利要求 82 所述的方法,其中如果所述第一组合物不包含至少一种抗原或编码所述抗原的核酸,则所述方法进一步包括施用包含至少一种抗原或编码所述抗原的核酸的第二组合物。

84. 如权利要求 83 所述的方法,其中所述第一和第二组合物顺序地或同时地施用。

85. 如权利要求 82 至 84 中任一项所述的方法,所述方法使所述受试者针对病原体免疫。

86. 如权利要求 82 至 84 中任一项所述的方法,所述方法用于癌症治疗。

87. 如权利要求 82 至 86 中任一项所述的方法,其中所述组合物经粘膜、局部、皮内、肌肉内、皮下或静脉内施用。

88. 如权利要求 82 至 87 中任一项所述的方法,其中所述受试者是鸟或哺乳动物。

89. 如权利要求 88 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

90. 如权利要求 1 至 42、46 至 56、61 至 73 以及 75 中任一项所述的化合物,用于制造用于诱导和 / 或增强或抑制或耐受受试者中的免疫应答的药剂的用途。

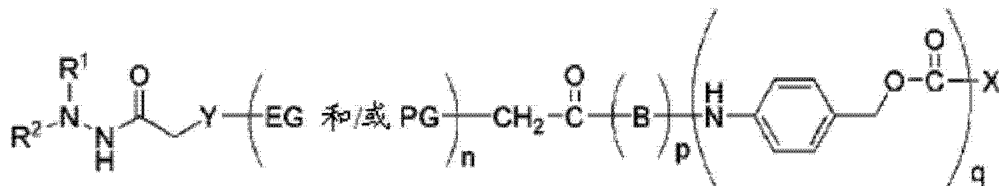
91. 如权利要求 1 至 42、46 至 56、61 至 73 以及 75 中任一项所述的化合物或如权利要求 76 至 81 中任一项所述的组合物,用于诱导和 / 或增强或抑制或耐受受试者中的免疫应答的用途。

92. 如权利要求 1 至 42、46 至 56、61 至 73 以及 75 中任一项所述的化合物或如权利要求 76 至 81 中任一项所述的组合物,用于诱导和 / 或增强或抑制或耐受受试者中的免疫应答。

93. 一种用于体外或离体活化巨噬细胞、树突细胞和 / 或 CTL 的方法,所述方法包括使

所述细胞与如权利要求 1 至 42、46 至 56、61 至 73 以及 75 中任一项所述的化合物或如权利要求 76 至 81 中任一项所述的组合物接触。

94. 一种式 VIII 的接头



式 VIII

其中，

R¹和 R²各自独立地选自氢和 A

其中 A 是保护基团；

Y 选自 -CH₂- 和 -O-；

EG 是 -CH₂-CH₂-O-；

PG 是 -CH₂-CH₂-CH₂-O-；

B 是氨基酸残基或其衍生物；

n 是 0 与 10 之间的整数；

p 是 1 与 5 之间的整数；

q 是选自 0 和 1 的整数；

X 是能够与一个或多个羟基或游离氨基结合的连接基团。

95. 如权利要求 94 所述的接头，其中 p 是 1 与 3 之间的整数。

96. 如权利要求 95 所述的接头，其中 p 是 2。

97. 如权利要求 94 至 96 中任一项所述的接头，其中当 p 大于 1 时，每个氨基酸残基是相同的或不同的。

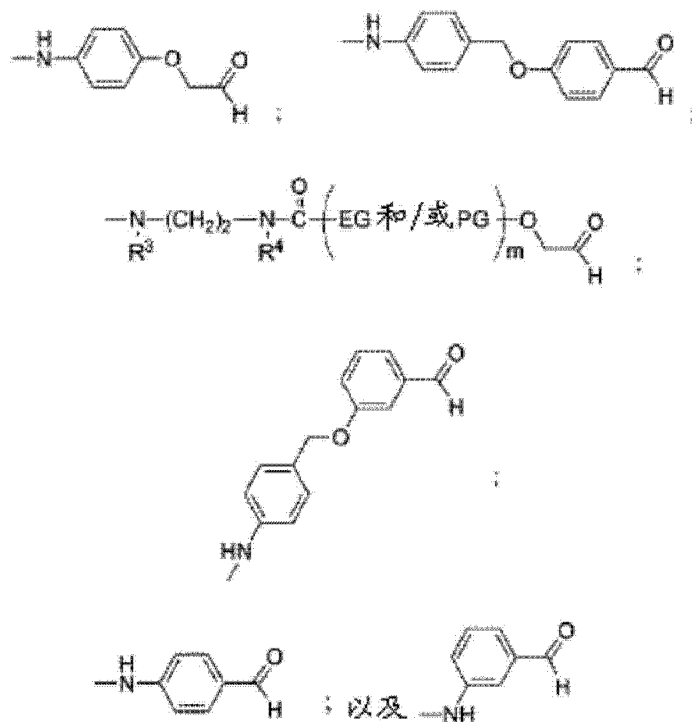
98. 如权利要求 97 所述的接头，其中每个氨基酸残基独立地选自缬氨酸和赖氨酸。

99. 如权利要求 94 至 98 中任一项所述的接头，其中 n 是 0。

100. 如权利要求 94 至 99 中任一项所述的接头，其中 q 是 0。

101. 如权利要求 94 至 100 中任一项所述的接头，其中 X 是 -R³N(CH₂)₂NR⁴C(O)H；
其中 R³和 R⁴各自独立地选自 H 和 C₁₋₄烷基。

102. 如权利要求 94 至 100 中任一项所述的接头，其中 X 包含选自以下的基团：



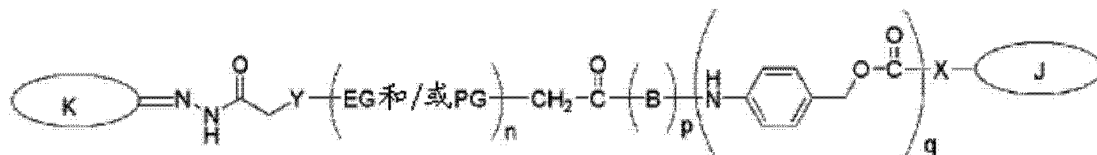
其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基；

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；并且

m 是 0 与 10 之间的整数。

103. 一种式 IX 的化合物：



式 IX

其中，

Y 选自 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-$ ；

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

B 是氨基酸残基或其衍生物；

n 是 0 与 10 之间的整数；

p 是 1 与 5 之间的整数；

q 是选自 0 和 1 的整数；

X 是能够与 J 的一个或多个羟基或 J 的游离氨基结合的连接基团；

J 是包含一个或多个羟基和 / 或游离氨基的部分；并且

K 是经由羰基碳连接的部分。

104. 如权利要求 103 所述的化合物，其中 p 是 1 与 3 之间的整数。

105. 如权利要求 104 所述的化合物，其中 p 是 2。

106. 如权利要求 103 至 105 中任一项所述的化合物, 其中当 p 大于 1 时, 每个氨基酸残基是相同的或不同的。

107. 如权利要求 106 所述的化合物, 其中每个氨基酸残基独立地选自缬氨酸和赖氨酸。

108. 如权利要求 103 至 107 中任一项所述的化合物, 其中 n 是 0。

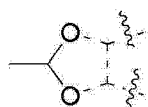
109. 如权利要求 103 至 108 中任一项所述的化合物, 其中 q 是 0。

110. 如权利要求 103 至 109 中任一项所述的化合物, 其中 X 是经由 J 的至少一个羟基或游离氨基连接至 J 的 $-R^3N(CH_2)_2NR^4C(O)-$;

其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基。

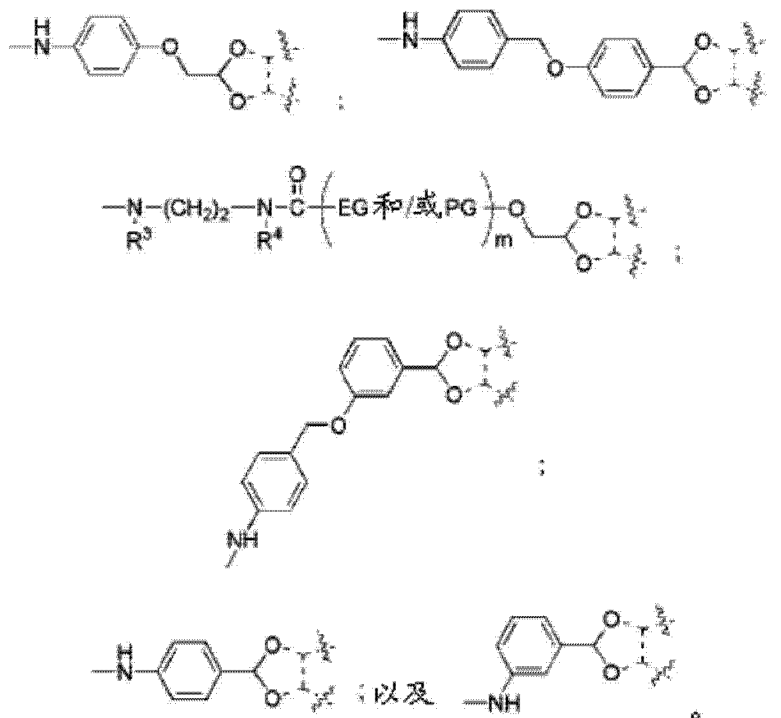
111. 如权利要求 103 至 109 中任一项所述的化合物, 其中 X 通过与 J 的两个羟基形成缩醛而连接至 J 。

112. 如权利要求 111 所述的化合物, 其中 $X-J$ 包含以下官能性:



其中两个氧和虚线键是所述免疫调节剂分子的部分。

113. 如权利要求 111 或权利要求 112 所述的化合物, 其中 $X-J$ 包含选自以下的基团:



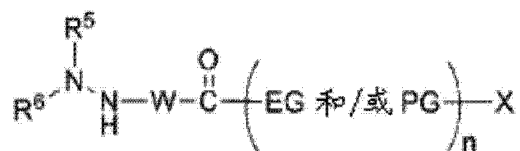
其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基;

EG 是 $-CH_2-CH_2-O-$;

PG 是 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$; 并且

m 是 0 与 10 之间的整数。

114. 一种式 X 的接头



式 X

其中 R⁵和 R⁶各自独立地选自氢和 A

其中 A 是保护基团；

W 是包含芳环或杂芳环的连接基团

其中所述杂芳环包含 1 至 3 个选自 N、O 以及 S 的杂原子；

EG 是 -CH₂-CH₂-O-；

PG 是 -CH₂-CH₂-CH₂-O-；

n 是 0 与 10 之间的整数；

a 是选自 0 和 1 的整数；

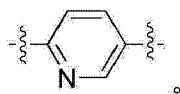
X 是能够与一个或多个羟基或游离氨基结合的连接基团。

115. 如权利要求 114 所述的接头, 其中 X 选自离去基团和 -CH₂-C(O)-H。

116. 如权利要求 114 或权利要求 115 所述的接头, 其中 W 是杂芳环。

117. 如权利要求 116 所述的接头, 其中在所述杂芳环中是吡啶环。

118. 如权利要求 116 或权利要求 117 所述的接头, 其中 W 是：



119. 如权利要求 114 或权利要求 115 所述的接头, 其中 W 是芳环。

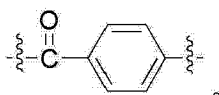
120. 如权利要求 119 所述的接头, 其中在所述芳环中是苯环。

121. 如权利要求 119 或权利要求 120 所述的接头, 其中 W 是：

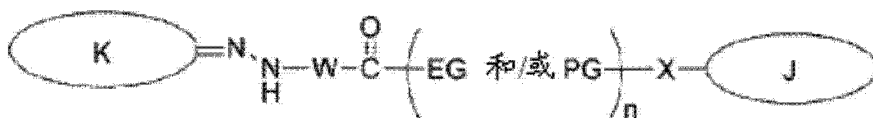


122. 如权利要求 114 至 121 中任一项所述的接头, 其中 a 是 1。

123. 如权利要求 119 至 122 中任一项所述的接头, 其中 -(C(O))_a-W 是：



124. 一种式 XI 的化合物：



式 XI

其中

W 是包含芳环或杂芳环的连接基团；

其中所述杂芳环包含 1 至 3 个选自 N、O 以及 S 的杂原子；

EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

n 是 0 与 10 之间的整数；

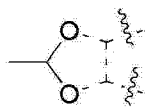
a 是选自 0 和 1 的整数；

X 是能够与 J 的一个或多个羟基或 J 的游离氨基结合的连接基团；

K 是经由羰基碳连接的部分。

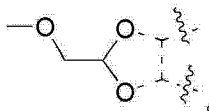
125. 如权利要求 124 所述的化合物, 其中 X 通过与 J 的两个羟基形成缩醛而连接至 J。

126. 如权利要求 125 所述的化合物, 其中 X-J 包含以下官能性：



其中两个氧和虚线键是所述免疫调节剂分子的部分。

127. 如权利要求 124 至 126 中任一项所述的化合物, 其中所述 X-J 官能性包含：

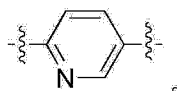


128. 如权利要求 124 至 127 中任一项所述的化合物, 其中 X 选自键和 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ 。

129. 如权利要求 124 至 128 中任一项所述的化合物, 其中 W 是杂芳环。

130. 如权利要求 129 所述的化合物, 其中在所述杂芳环中是吡啶环。

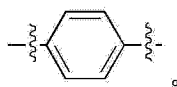
131. 如权利要求 129 或权利要求 130 所述的化合物, 其中 W 是：



132. 如权利要求 124 至 128 中任一项所述的化合物, 其中 W 是芳环。

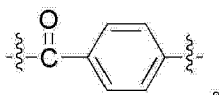
133. 如权利要求 132 所述的化合物, 其中在所述芳环中是苯环。

134. 如权利要求 132 或权利要求 133 所述的化合物, 其中 W 是：



135. 如权利要求 124 至 134 中任一项所述的化合物, 其中 a 是 1。

136. 如权利要求 132 至 135 中任一项所述的化合物, 其中 $-(\text{C}(\text{O}))_a-\text{W}$ 是：



免疫调节缀合物

发明领域

[0001] 本发明涉及包含与至少一种免疫调节剂缀合的甘露糖的碳水化合物聚合物、其制备以及在免疫调节组合物和疫苗组合物中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 近年来主要致力于发现通过刺激免疫系统的某些关键方面以及通过抑制某些其它方面起作用的新的药物化合物。本文被称为免疫调节剂的这些化合物可以适用于治疗多种多样的疾病和病状。例如,某些免疫调节剂可以适用于治疗病毒性疾病(例如,人乳头瘤病毒、肝炎、疱疹)、瘤形成(例如,基底细胞癌、鳞状细胞癌、光化性角化症、黑色素瘤)、以及 Th2- 介导的疾病(例如,哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、多发性硬化症),并且还适用作疫苗佐剂。

[0004] 甘露糖的一些多糖(碳水化合物聚合物)(例如,甘露聚糖)、 β (1, 3) 葡萄糖(例如,葡聚糖)、 β (1, 4) 乙酰化甘露糖(乙酰吗喃)、 β (1, 4) N- 乙酰基- 葡糖胺(壳聚糖)以及杂多糖如鼠李糖聚半乳糖醛酸聚糖(rhamnogalacturonan)(果胶)已经显示出刺激免疫系统。

[0005] 多糖与 C- 型凝集素受体的结合诱导免疫刺激,如通过吞噬作用、增殖应答、细胞因子的释放以及免疫系统的其它活性的增加所显示的。由于这种免疫刺激活性,这些多糖已经被建议用于疫苗组合物中。特别感兴趣的是甘露聚糖。

[0006] 甘露聚糖是由 C- 型凝集素受体如甘露糖受体(CD206)和 DC-SIGN(CD209)识别的聚甘露糖。由于它们在抗原呈递细胞上的存在,已经针对这些受体摄取含有甘露糖、岩藻糖或葡萄糖的化合物对它们进行了表征。甘露聚糖与甘露糖受体的结合例如诱导内吞作用,接着是其递送至胞内体(endosomal)途径中。关于甘露糖化抗原的早期研究指示抗原上甘露糖残基的存在大大增强了树突细胞(DC)的抗原摄取和主要组织相容性复合体(MHC) II 类限制性抗原呈递。甘露聚糖与至少一种抗原的缀合也增强它的摄取和呈递。

[0007] 需要用于疾病的治疗或预防的其它免疫调节组合物和疫苗组合物以及用于其制备的可靠方法。此外,鉴于免疫调节剂的较大治疗潜力,并且尽管已经进行的工作,仍然存在相当大的持续的需要来扩展它们的用途和治疗益处。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明人已经开发了用于刺激免疫应答的新化合物。

[0010] 第一方面,本发明提供一种包含碳水化合物聚合物的免疫调节化合物,所述碳水化合物聚合物包含甘露糖,其中所述碳水化合物聚合物与至少一种免疫调节剂缀合。

[0011] 在一个实施方案中,存在多于一种免疫调节剂,并且每种免疫调节剂是相同的或不同的。例如,碳水化合物聚合物包含可以与免疫调节剂直接缀合或经由接头缀合的多于一个官能团。可替代地或另外地,碳水化合物聚合物经由分支接头与多于一种免疫调节剂缀合。

[0012] 在一个实施方案中,碳水化合物聚合物大于约 1000kDa。

[0013] 在一个实施方案中,碳水化合物聚合物是氧化的。氧化的碳水化合物聚合物在与

免疫调节剂缀合之前可以具有至少 150 个醛基。

[0014] 在一个实施方案中,氧化的碳水化合物聚合物进一步与至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸缀合。抗原可以来自任何来源,如病毒的、细菌的、原生动物的、真菌的、肿瘤抗原、自身抗原或过敏原。抗原可以是例如整个生物体、蛋白质或抗原肽。抗原可以与氧化的甘露聚糖任选地经由接头直接地缀合;或任选地经由接头通过与免疫调节剂缀合来与氧化的甘露聚糖间接地缀合。类似地,核酸可以与氧化的甘露聚糖(经由,例如,IRM)直接地或间接地缀合。

[0015] 在一个实施方案中,氧化的碳水化合物聚合物与至少一种抗原共价地缀合。

[0016] 在一个实施方案中,氧化的碳水化合物聚合物经由聚阳离子与至少一种核酸缀合。

[0017] 在一个实施方案中,碳水化合物聚合物是甘露聚糖。甘露聚糖可以来自任何来源,如真菌,更优选地酵母。

[0018] 在一个实施方案中,在与免疫调节剂和/或抗原或编码所述抗原的核酸缀合之前并且在用氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS)标记之后,甘露聚糖的大小分布基于蛋白质标准是在约 150 至约 250kDa 之间和/或基于碳水化合物标准是在约 800 至约 3000kDa 之间。

[0019] 在一个实施方案中,免疫调节剂是 Toll-样受体(TLR)激动剂,例如像鸟苷类似物、脱氮-腺苷类似物、咪唑并喹啉或其衍生物。在优选实施方案中,TLR 激动剂是洛索立宾(Loxoribine)、艾沙托立宾(Isatoribine)、咪喹莫特(Imiquimod)、瑞喹莫德(Resiquimod)或其衍生物。

[0020] 在一个实施方案中,每种免疫调节剂经由接头与碳水化合物聚合物缀合,并且在缀合之前每个接头包含能够与所述免疫调节剂或所述碳水化合物聚合物缀合的一个或多个官能团,并且所述官能团可以任选地包含适合的离去基团或保护基团。

[0021] 在一个实施方案中,每个官能团选自自由以下组成的组:醛、酮、甲酰基、肼、酰肼、胺、酰胺、羧酸、炔、马来酰亚胺、巯基以及卤素。

[0022] 在一个实施方案中,胺的保护基团是 BOC 基团。

[0023] 在一个实施方案中,甲酰基的离去基团是对硝基苯氧基。

[0024] 在一个实施方案中,每种免疫调节剂经由接头与碳水化合物聚合物缀合,所述接头包含:

[0025] i) 与所述碳水化合物聚合物缀合的官能团((i)型基团);

[0026] ii) 与所述免疫调节剂缀合的官能团((ii)型基团);以及

[0027] iii) 间隔基;

[0028] 并且其中每个接头可以是彼此相同的或不同的。

[0029] 在一个实施方案中,(i)型基团是脞。

[0030] 在一个实施方案中,(ii)型基团是氨基甲酸酯基团。

[0031] 在一个实施方案中,间隔基包含一个或多个不同类型的连接单元。在一个实施方案中,每个连接单元可以独立地选自自由以下组成的组:乙二醇和/或丙二醇的聚合物;聚芳基;氨基酸残基或其衍生物;烷基或烯基链;含有苯基的部分;以及糖类。

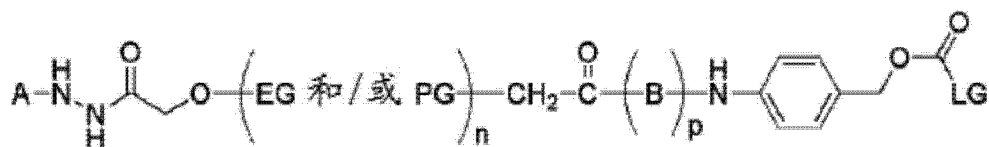
[0032] 在一个实施方案中,间隔基包含聚合物,所述聚合物包含 1 至 100 个乙二醇和/或丙二醇单元。例如,间隔基可以包含聚合物,所述聚合物包含 1 至 10 个乙二醇和/或丙二

醇单元、1 至 5 个氨基酸残基或其衍生物、以及含有苯基的部分。

[0033] 在一个实施方案中,接头在缀合之后是可裂解的。例如,接头包含选自由酯、氨基甲酸酯、脲、酰胺以及缩醛组成的组的可裂解的基团。

[0034] 在优选的实施方案中,碳水化合物聚合物和免疫调节剂通过与式 I 的接头反应连接:

[0035]



式 I

[0036] 其中,

[0037] A 是保护基团;

[0038] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0039] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0040] B 是氨基酸残基或其衍生物;

[0041] n 是 1 与 10 之间的整数;

[0042] p 是 1 与 5 之间的整数;以及

[0043] LG 是离去基团。

[0044] 在一个实施方案中,离去基团是对硝基苯氧基。

[0045] 在一个实施方案中,保护基团是 BOC。

[0046] 在一个实施方案中:

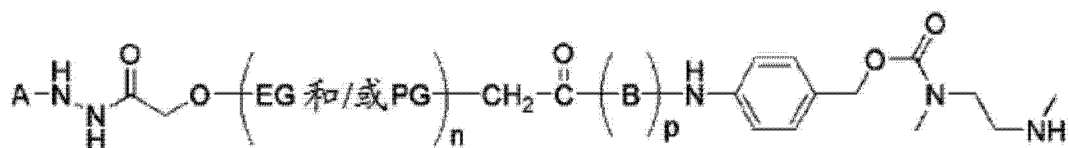
[0047] i) $-(\text{EG 和 / 或 PG})_n-$ 是仅乙二醇 (EG) 单元;

[0048] ii) $-(\text{EG 和 / 或 PG})_n-$ 是仅丙二醇 (PG) 单元;或

[0049] iii) $-(\text{EG 和 / 或 PG})_n-$ 是乙二醇 (EG) 单元与丙二醇 (PG) 单元的混合物。

[0050] 在替代优选的实施方案中,碳水化合物聚合物和免疫调节剂通过与式 II 的接头反应连接:

[0051]



式 II

[0052] 其中,

[0053] A 是保护基团;

[0054] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0055] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0056] B 是氨基酸残基或其衍生物；

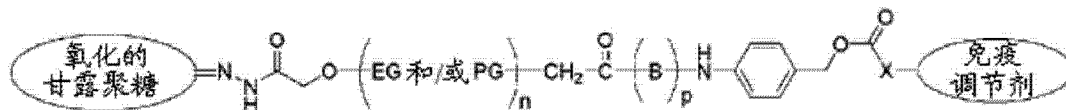
[0057] n 是 1 与 10 之间的整数；以及

[0058] p 是 1 与 5 之间的整数。

[0059] 在一个实施方案中，保护基团是 BOC。

[0060] 另一方面，本发明提供一种包含氧化的甘露聚糖的式 III 的化合物，所述氧化的甘露聚糖经由接头与至少一种免疫调节剂缀合：

[0061]



式 III

[0062] 其中，

[0063] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

[0064] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；

[0065] B 是氨基酸残基或其衍生物；

[0066] n 是 1 与 10 之间的整数；

[0067] p 是 1 与 5 之间的整数；以及

[0068] X 是键或 $-\text{MeN}(\text{CH}_2)_2\text{NMeC}(\text{O})-$ 。

[0069] 在一个实施方案中：

[0070] i) $-(\text{EG 和 / 或 PG})_n-$ 是仅乙二醇 (EG) 单元；

[0071] ii) $-(\text{EG 和 / 或 PG})_n-$ 是仅丙二醇 (PG) 单元；或

[0072] iii) $-(\text{EG 和 / 或 PG})_n-$ 是乙二醇 (EG) 单元与丙二醇 (PG) 单元的混合物。

[0073] 在一个实施方案中，n 是 8 和 / 或 p 是 1 至 3。在优选的实施方案中，p 是 2。

[0074] 在一个实施方案中，p 大于 1 并且每个氨基酸残基是相同的或不同的。每个氨基酸残基可以独立地选自由缬氨酸和赖氨酸组成的组。

[0075] 在其它实施方案中，氧化的甘露聚糖与至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸缀合。

[0076] 在其它实施方案中：

[0077] i) 免疫调节剂是洛索立宾或其衍生物；

[0078] ii) X 是 $-\text{MeN}(\text{CH}_2)_2\text{NMeC}(\text{O})-$ ；以及

[0079] iii) 免疫调节剂通过其伯羟基或仲羟基与 X 缀合。

[0080] 在替代实施方案中：

[0081] i) 免疫调节剂是瑞喹莫德或其衍生物；

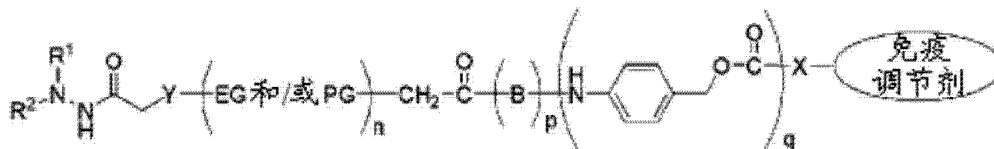
[0082] ii) X 是 $-\text{MeN}(\text{CH}_2)_2\text{NMeC}(\text{O})-$ ；以及

[0083] iii) 免疫调节剂通过所述免疫调节剂上的游离羟基与 X 缀合。

[0084] 在一个实施方案中，游离羟基是叔羟基。

[0085] 在替代实施方案中：

- [0086] i) 免疫调节剂是洛索立宾或瑞喹莫德或其衍生物；
 [0087] ii) X 是键；以及
 [0088] iii) 免疫调节剂通过所述免疫调节剂上的游离氨基与 X 缀合。
 [0089] 另一方面，提供一种式 IV 的化合物
 [0090]



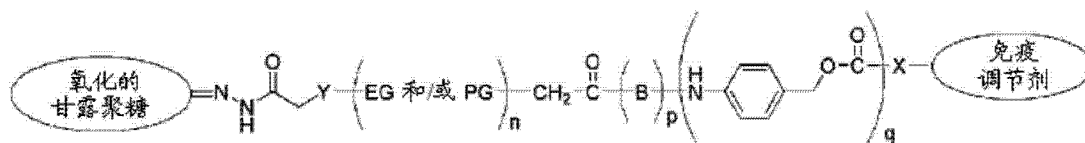
式 IV

- [0091] 其中，
 [0092] R^1 和 R^2 各自独立地选自由氢和 A 组成的组
 [0093] 其中 A 是保护基团；
 [0094] 或 R^1 和 R^2 一起形成双键，所述双键经由羰基碳连接至另一个部分；
 [0095] Y 选自 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-$ ；
 [0096] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0097] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0098] B 是氨基酸残基或其衍生物；
 [0099] n 是 0 与 10 之间的整数；
 [0100] p 是 1 与 5 之间的整数；
 [0101] q 是选自 0 和 1 的整数；
 [0102] X 是能够与免疫调节剂的一个或多个羟基或免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。

[0103] 在优选的实施方案中， R^1 和 R^2 一起形成双键，所述双键经由羰基碳连接至碳水化合物聚合物。甚至更优选地，碳水化合物聚合物是氧化的甘露聚糖。

[0104] 另一方面，本发明提供一种包含氧化的甘露聚糖的式 V 的化合物，所述氧化的甘露聚糖经由接头与至少一种免疫调节剂缀合：

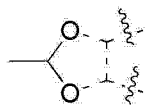
[0105]



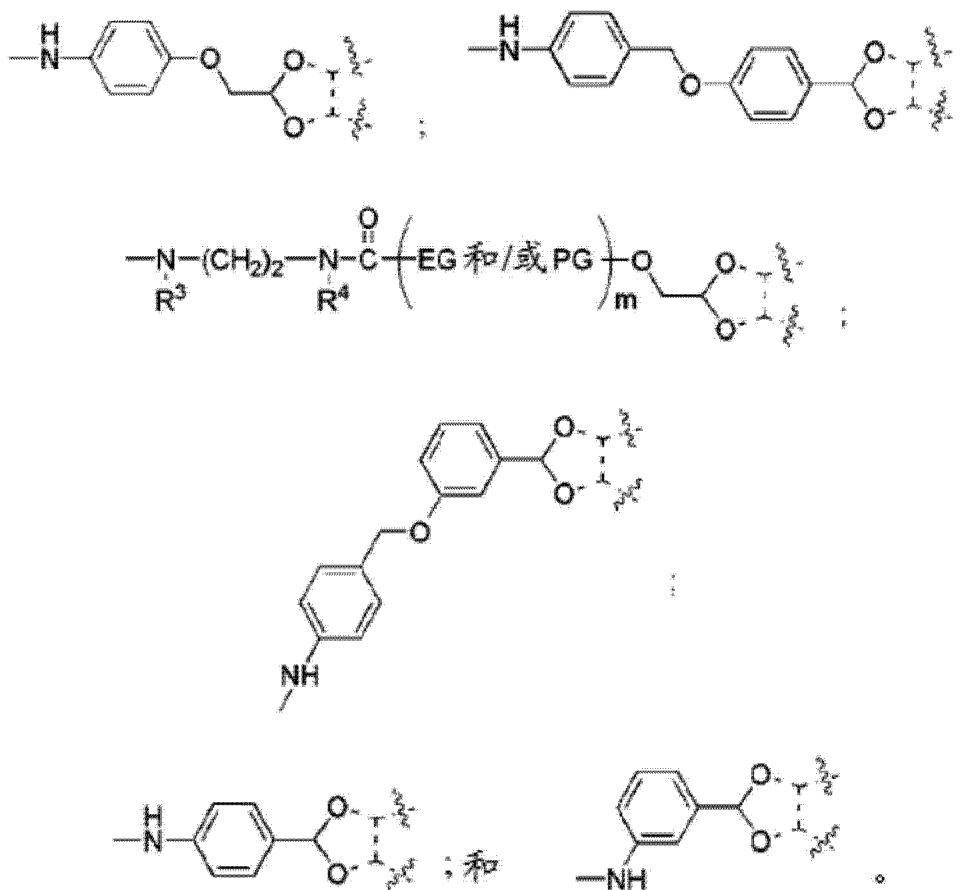
式 V

- [0106] 其中，
 [0107] Y 选自 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-$ ；
 [0108] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0109] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0110] B 是氨基酸残基或其衍生物；

- [0111] n 是 0 与 10 之间的整数；
- [0112] p 是 1 与 5 之间的整数。
- [0113] q 是选自 0 和 1 的整数；
- [0114] X 是能够与免疫调节剂的一个或多个羟基或免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。
- [0115] 在一个实施方案中，p 是 1 与 3 之间的整数。在优选的实施方案中，p 是 2。
- [0116] 在一个实施方案中，当 p 大于 1 时，每个氨基酸残基是相同的或不同的。在优选的实施方案中，每个氨基酸残基独立地选自由缬氨酸和赖氨酸组成的组。
- [0117] 在一个实施方案中，n 是 0。
- [0118] 在另一个实施方案中，q 是 0。
- [0119] 在一个实施方案中，X 是键。
- [0120] 在一个实施方案中，X 是经由免疫调节剂的至少一个羟基或游离氨基连接至所述免疫调节剂的 $-R^3N(CH_2)_2NR^4C(O)-$ ；
- [0121] 其中 R^3 和 R^4 各自独立地选自由 H 和 C_{1-4} 烷基组成的组。
- [0122] 在一个实施方案中，X 通过与免疫调节剂的两个羟基形成缩醛连接至所述免疫调节剂。
- [0123] 优选地，X- 免疫调节剂包含以下官能性：
- [0124]



- [0125] 其中两个氧和虚线键是免疫调节剂分子的部分。
- [0126] 甚至更优选地，X- 免疫调节剂包含选自由以下组成的组的基团：
- [0127]



[0128] 其中 R³和 R⁴各自独立地选自由 H 和 C₁₋₄烷基组成的组；

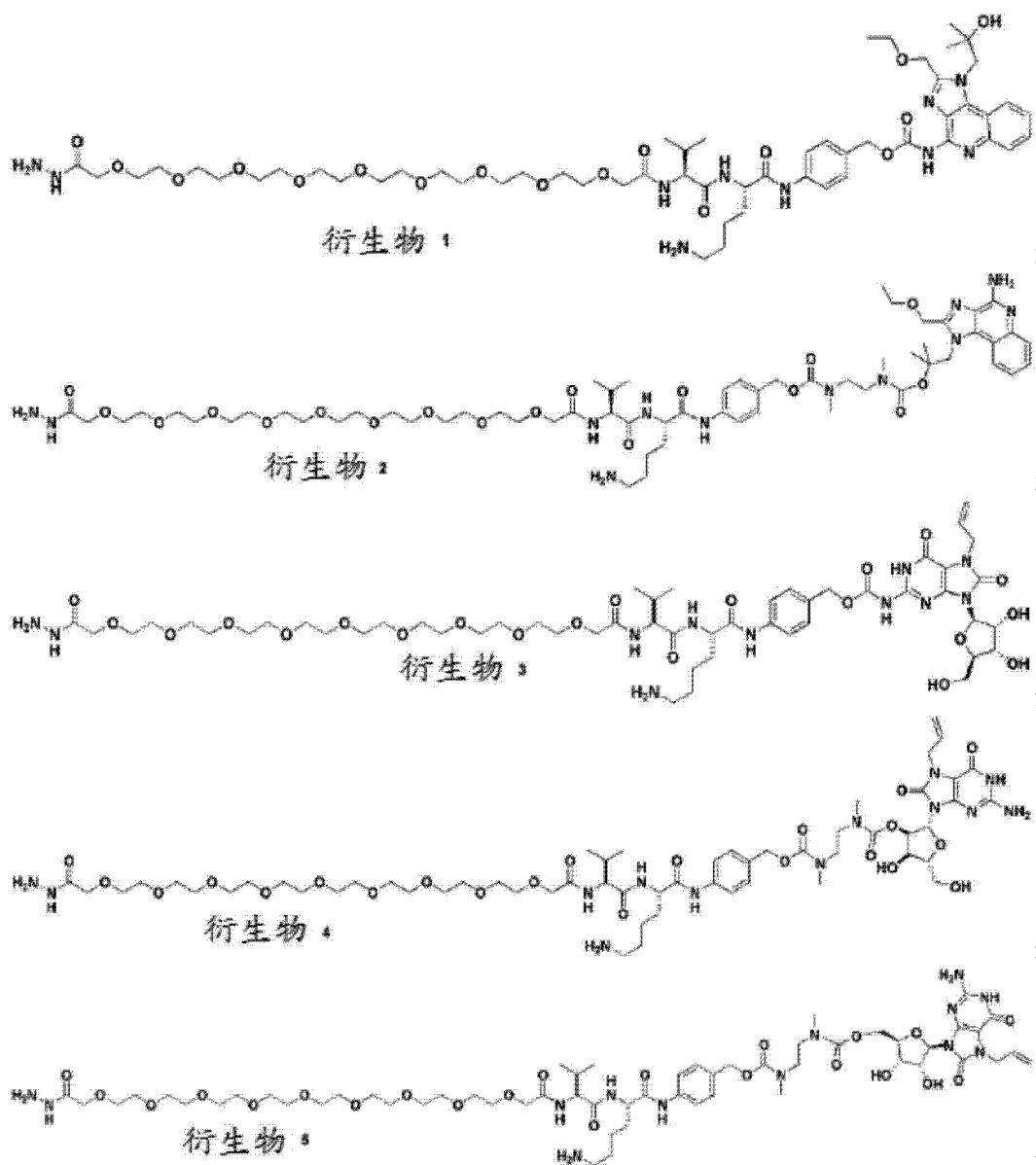
[0129] EG 是 -CH₂-CH₂-O-；

[0130] PG 是 -CH₂-CH₂-CH₂-O-；以及

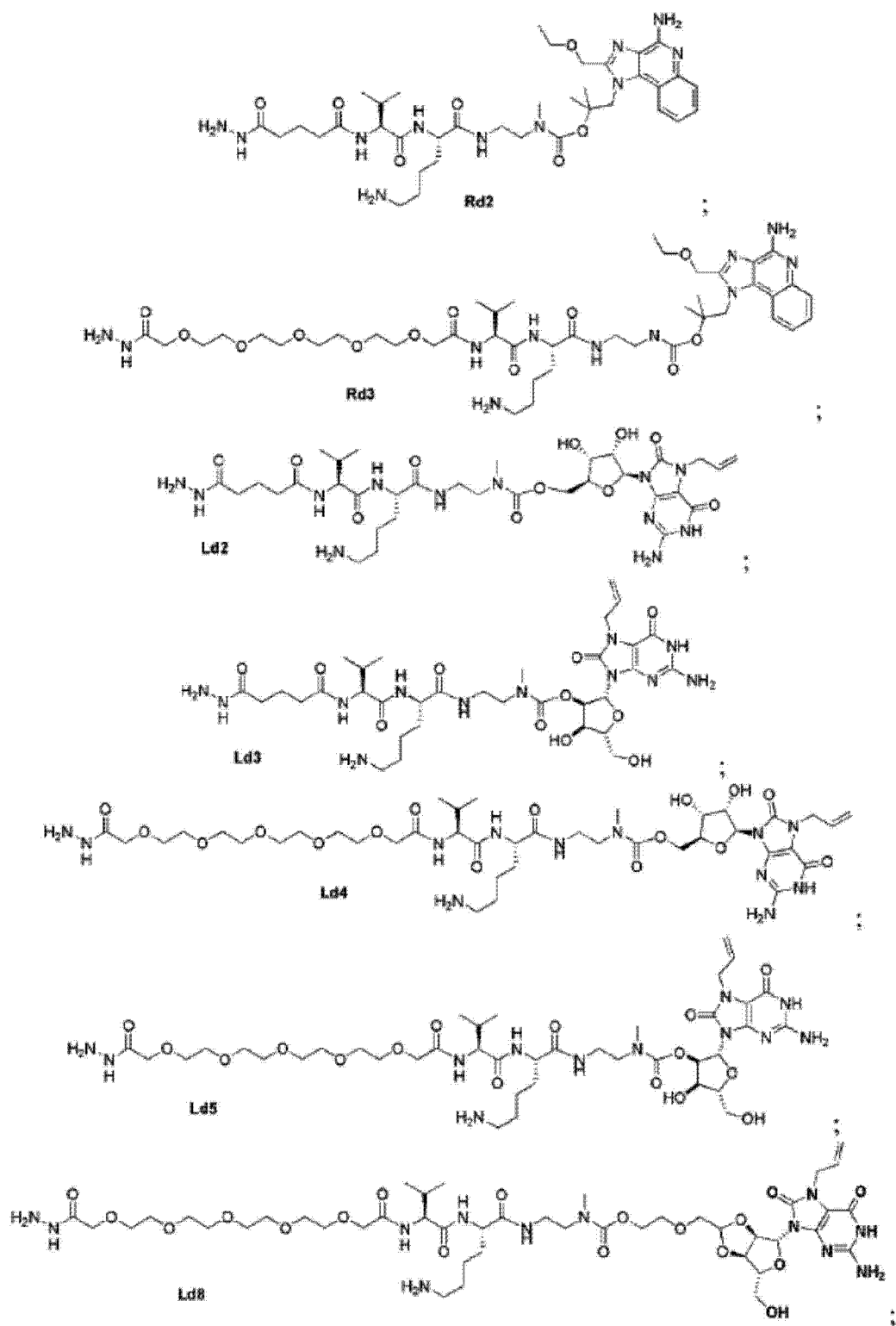
[0131] m 是 0 与 10 之间的整数。

[0132] 在某些实施方案中，式 IV 的化合物是选自由以下组成的组的化合物：

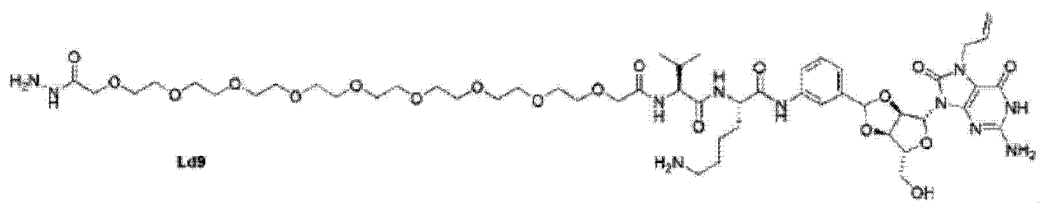
[0133]



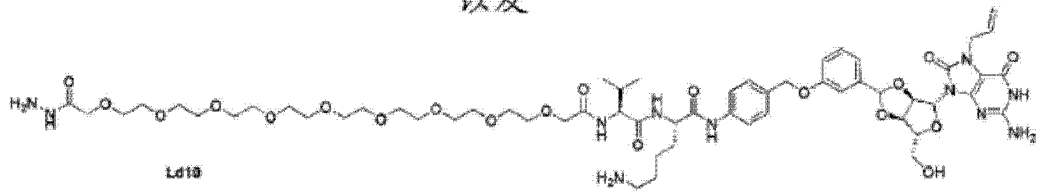
[0134]



[0135]

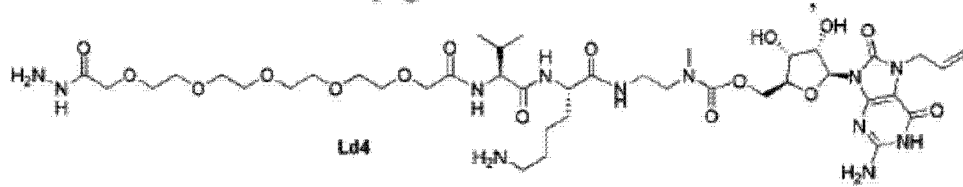
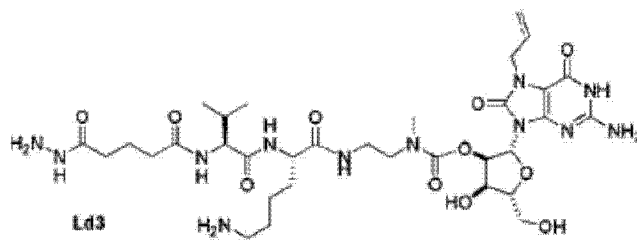
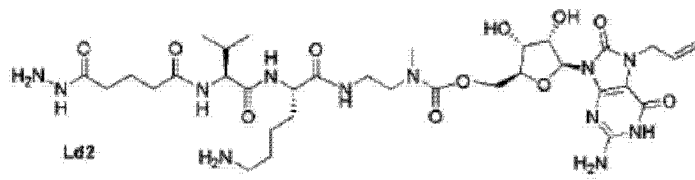
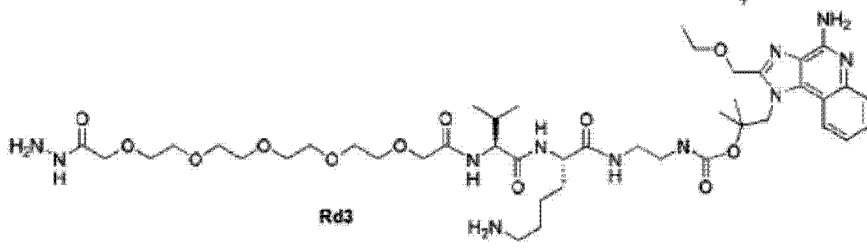
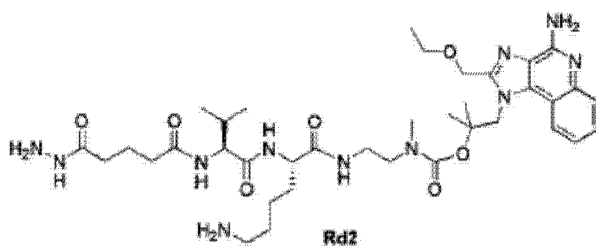


以及

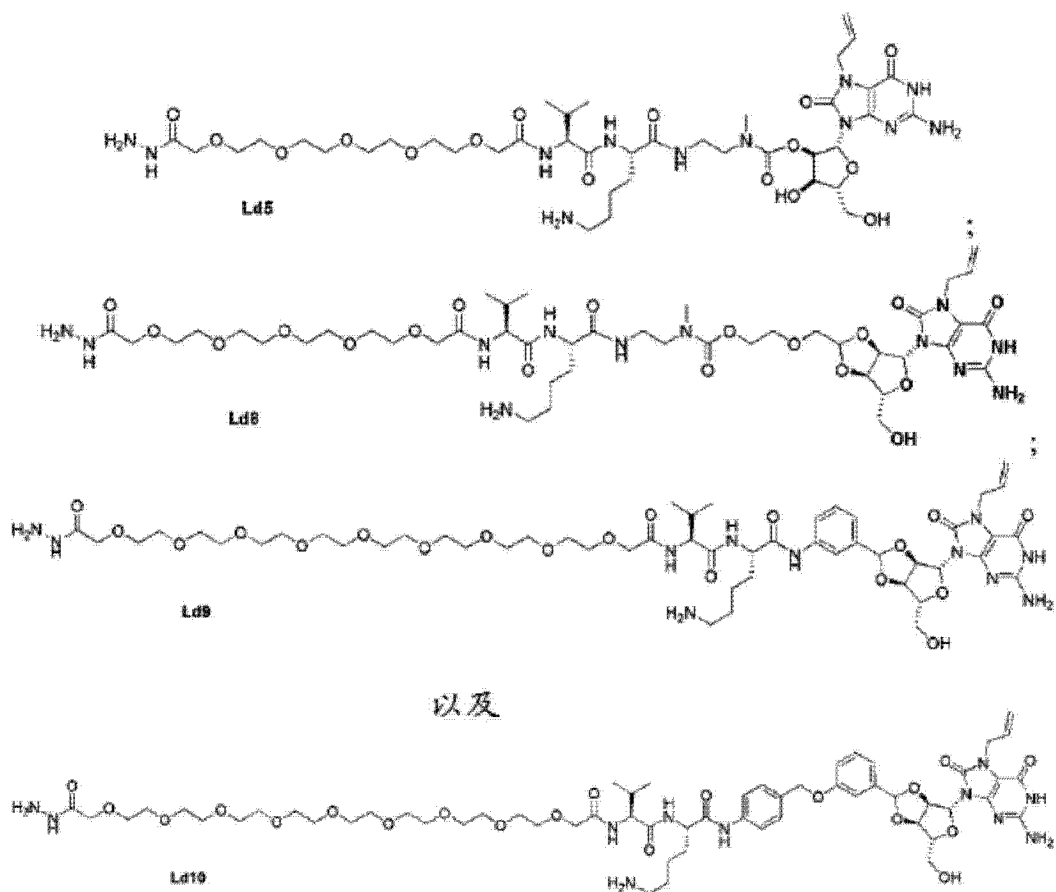


[0136] 优选地,在某些实施方案中,式 IV 的化合物是选自由以下组成的组的化合物:

[0137]

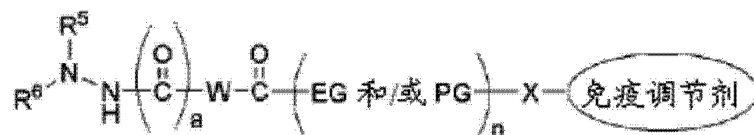


[0138]



[0139] 另一方面,本发明提供式 VI 的化合物:

[0140]



式 VI

[0141] 其中 R^5 和 R^6 各自独立地选自由氢和 A 组成的组

[0142] 其中 A 是保护基团;

[0143] 或 R^5 和 R^6 一起形成双键,所述双键经由羰基碳连接至另一个部分;

[0144] W 是包含芳环或杂芳环的连接基团

[0145] 其中杂芳环包含选自由 N、O 以及 S 组成的组的 1 至 3 个杂原子;

[0146] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0147] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0148] n 是 0 与 10 之间的整数;

[0149] a 是选自 0 和 1 的整数;

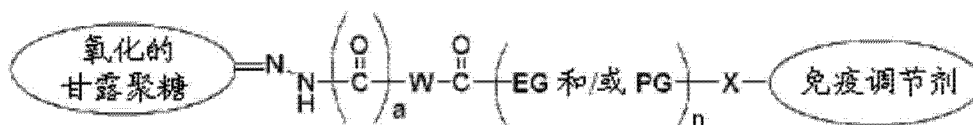
[0150] X 是能够与免疫调节剂的一个或多个羟基或免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。

[0151] 在优选的实施方案中, R^1 和 R^2 一起形成双键,所述双键经由羰基碳连接至碳水化

合物聚合物。甚至更优选地,碳水化合物聚合物是氧化的甘露聚糖。

[0152] 另一方面,本发明提供一种包含氧化的甘露聚糖的式 VII 化合物,所述氧化的甘露聚糖经由接头与至少一种免疫调节剂缀合:

[0153]



式 VII

[0154] 其中

[0155] W 是包含芳环或杂芳环的连接基团;

[0156] 其中杂芳环包含选自由 N、O 以及 S 组成的组的 1 至 3 个杂原子;

[0157] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0158] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0159] n 是 0 与 10 之间的整数;

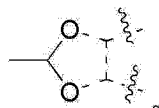
[0160] a 是选自 0 和 1 的整数;

[0161] X 是能够与免疫调节剂的一个或多个羟基或免疫调节剂的游离氨基结合的连接基团。

[0162] 在一个实施方案中, X 通过与免疫调节剂的两个羟基形成缩醛连接至所述免疫调节剂。

[0163] 在一个实施方案中, X- 免疫调节剂包含以下官能性:

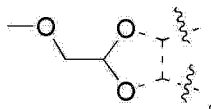
[0164]



[0165] 其中两个氧和虚线键是免疫调节剂分子的部分。

[0166] 优选地, X- 免疫调节剂官能性包含:

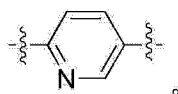
[0167]



[0168] 在另一个实施方案中, X 选自由键和 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ 组成的组。

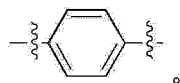
[0169] 在一个实施方案中, W 是杂芳环, 优选地是吡啶环。甚至更优选地, W 是

[0170]



[0171] 在另一个实施方案中, W 是芳环, 优选地是苯环。甚至更优选地, W 是

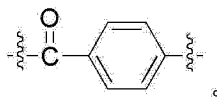
[0172]



[0173] 在一个实施方案中, a 是 1。

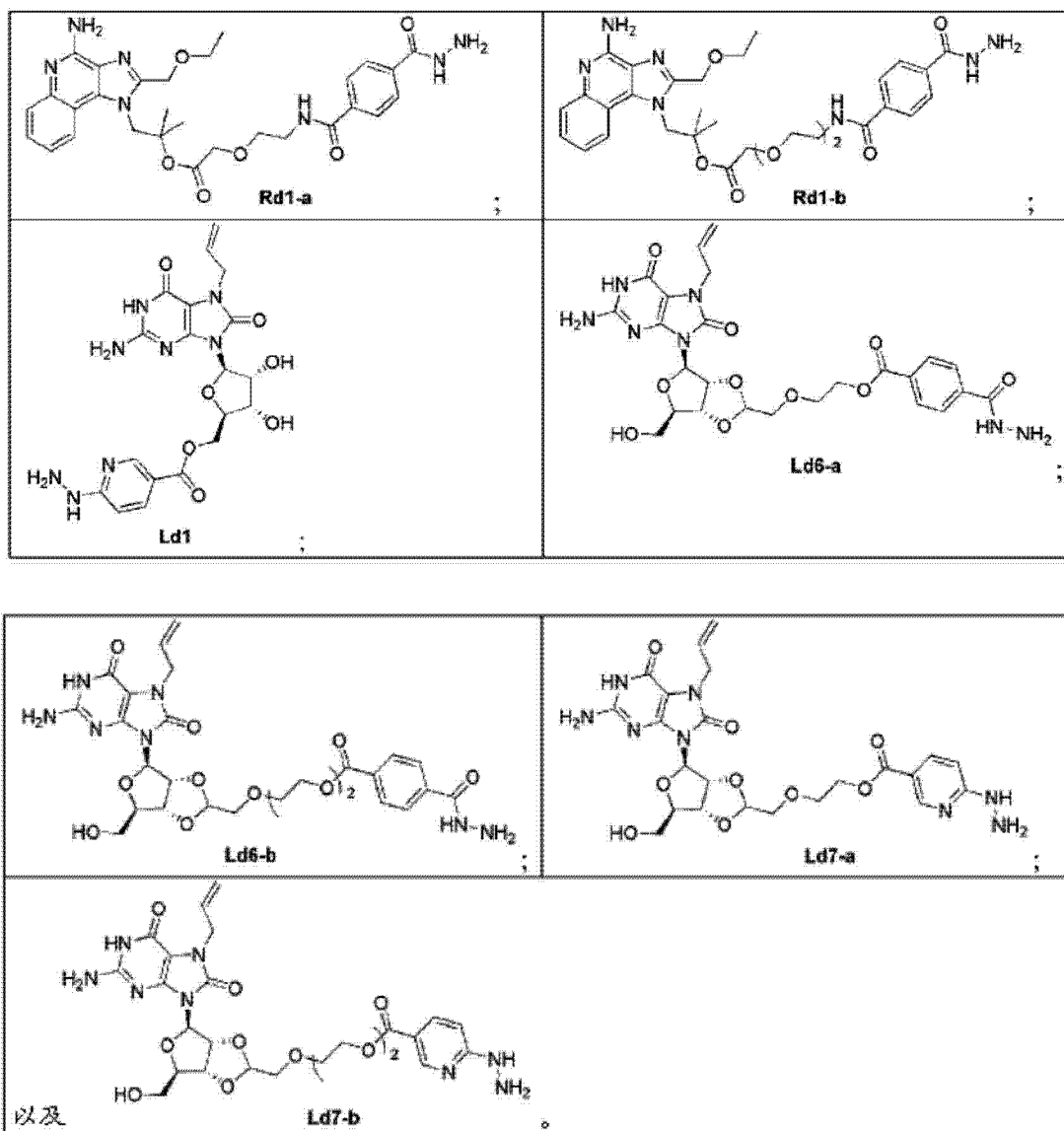
[0174] 在一个实施方案中, $-(C(O))_a-W$ 是

[0175]



[0176] 在某些实施方案中, 式 VI 的化合物选自由以下组成的组:

[0177]



[0178] 另一方面, 本发明提供一种包含本发明的化合物的免疫调节组合物。

[0179] 另一方面, 本发明提供一种疫苗组合物, 所述疫苗组合物包含:

[0180] i) 本发明的化合物和至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸, 其中所述至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸与碳水化合物聚合物缀合; 或

[0181] ii) 本发明的化合物和至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸, 其中所述

至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸不与所述碳水化合物聚合物缀合。

[0182] 在一个实施方案中,所述组合物中的至少 75 % 的碳水化合物聚合物大于约 1000kDa。

[0183] 在一个实施方案中,所述组合物中的至少 75 % 的碳水化合物聚合物是氧化的并且在与免疫调节剂和 / 或抗原或编码所述抗原的核酸缀合之前具有至少 150 个醛基。

[0184] 在一个实施方案中,所述组合物被配制用于经粘膜、局部、皮内、肌内、皮下或静脉内施用。

[0185] 在一个实施方案中,所述组合物进一步包含至少一种可接受的载体。

[0186] 在本发明的另一方面,本发明提供一种用于诱导和 / 或增强或抑制或耐受受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据本发明的第一组合物。

[0187] 在一个实施方案中,所述第一组合物不包含至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸,并且所述方法进一步包括施用包含至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸的第二组合物。

[0188] 在一个实施方案中,所述第一和第二组合物顺序地或同时地施用。

[0189] 在一个实施方案中,当抗原来自感染剂或是其突变体 / 衍生物时,所述方法使所述受试者针对病原体 (感染剂) 免疫。在另一个实施方案中,当抗原来自癌细胞或是其突变体 / 衍生物时,所述方法用于癌症治疗。

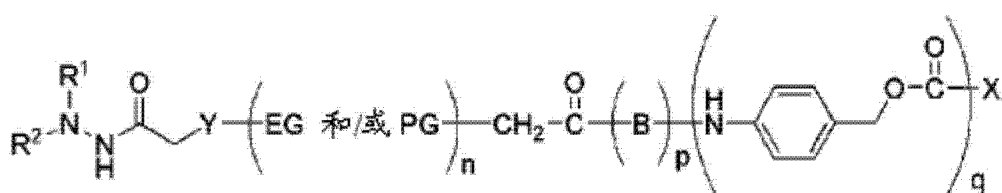
[0190] 还提供本发明的化合物用于制造用以诱导和 / 或增强或抑制或耐受受试者中的免疫应答的药剂的用途。

[0191] 另外,提供本发明的化合物用于诱导和 / 或增强或抑制或耐受受试者中的免疫应答的用途。

[0192] 另一方面,本发明提供一种用于体外或离体活化巨噬细胞、DC 和 / 或细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的方法,所述方法包括使所述细胞与本发明的化合物或组合物接触。

[0193] 另一方面,本发明提供一种式 VIII 的接头

[0194]



式 VIII

[0195] 其中,

[0196] R^1 和 R^2 各自独立地选自由氢和 A 组成的组

[0197] 其中 A 是保护基团;

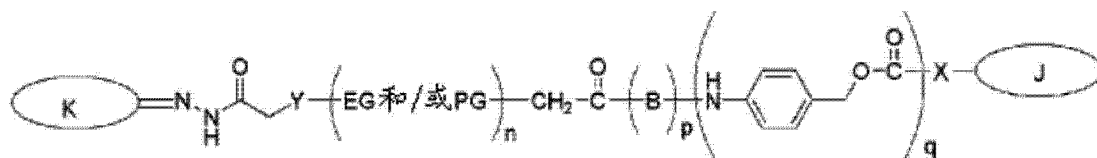
[0198] Y 选自 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-$;

[0199] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0200] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

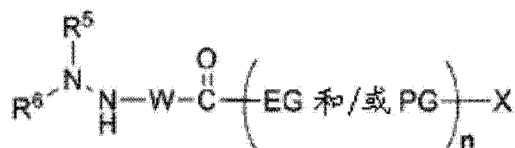
[0201] B 是氨基酸残基或其衍生物;

- [0202] n 是 0 与 10 之间的整数；
 [0203] p 是 1 与 5 之间的整数；
 [0204] q 是选自 0 和 1 的整数；
 [0205] X 是能够与一个或多个羟基或游离氨基结合的连接基团。
 [0206] 另一方面，本发明提供一种式 IX 的化合物：
 [0207]



式 IX

- [0208] 其中，
 [0209] Y 选自 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-$ ；
 [0210] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0211] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0212] B 是氨基酸残基或其衍生物；
 [0213] n 是 0 与 10 之间的整数；
 [0214] p 是 1 与 5 之间的整数。
 [0215] q 是选自 0 和 1 的整数；
 [0216] X 是能够与 J 的一个或多个羟基或 J 的游离氨基结合的连接基团。
 [0217] J 是包含一个或多个羟基和 / 或游离氨基的部分；并且
 [0218] K 是经由羰基碳连接的部分。
 [0219] 另一方面，本发明提供一种式 X 的接头：
 [0220]

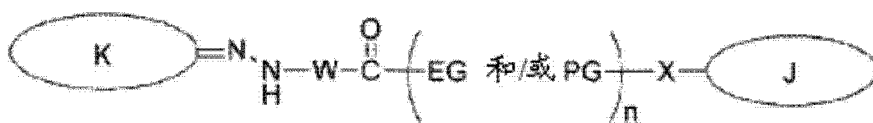


式 X

- [0221] 其中 R^5 和 R^6 各自独立地选自由氢和 A 组成的组
 [0222] 其中 A 是保护基团；
 [0223] W 是包含芳环或杂芳环的连接基团
 [0224] 其中杂芳环包含选自由 N、O 以及 S 组成的组的 1 至 3 个杂原子；
 [0225] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0226] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ；
 [0227] n 是 0 与 10 之间的整数；
 [0228] a 是选自 0 和 1 的整数；
 [0229] X 是能够与一个或多个羟基或游离氨基结合的连接基团。

[0230] 另一方面,本发明提供一种式 XI 的化合物:

[0231]



式 XI

[0232] 其中

[0233] W 是包含芳环或杂芳环的连接基团;

[0234] 其中杂芳环包含选自由 N、O 以及 S 组成的组的 1 至 3 个杂原子;

[0235] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0236] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0237] n 是 0 与 10 之间的整数;

[0238] a 是选自 0 和 1 的整数;

[0239] X 是能够与 J 的一个或多个羟基或 J 的游离氨基结合的连接基团。

[0240] K 是经由羰基碳连接的部分。

[0241] 除非另外具体地说明,否则本文的任何实施方案应视为在加以必要的变更的情况下适用于任何其它实施方案。

[0242] 本发明在范围上不受本文所描述的具体实施方案限制,所述具体实施方案意图仅用于例示的目的。功能上等同的产物、组合物以及方法明显在如本文所描述的本发明的范围内。

[0243] 如将是显而易见的,本发明的一个方面的优选特点和特征可以应用于本发明的许多其它方面。

[0244] 在本说明书中,除非另外具体地说明或上下文另外要求,否则提及单个步骤、物质的组合物、步骤的组或物质组合物的组应视为涵盖那些步骤、物质组合物、步骤的组或物质组合物的组中的一个和多个(即一个或多个)。

[0245] 通过以下非限制性实施例并且参考附图在下文中描述本发明。

[0246] 附图简述

[0247] 图 1:使用 Centriprep 浓缩器的分级分离方法。

[0248] 图 2:描绘用于定量氧化的甘露聚糖中的醛残基的方法的示意图。

[0249] 图 3:描绘用 ANTS 修饰氧化的甘露聚糖的示意图。

[0250] 图 4:描绘蛋白质与氧化的甘露聚糖的缀合的示意图。

[0251] 图 5:将甘露聚糖用异硫氰酸荧光素 (FITC) 进行标记并且通过流式细胞术来测量在不同浓度下与 huh7 人肝癌细胞的结合。

[0252] 图 6:BMDC 与全甘露聚糖和甘露聚糖部分的成熟。在第 6(图 6A)、第 24(图 6B) 以及第 48(图 6C) 小时时间点处通过流式细胞术来测量共刺激分子 CD40、CD80 以及 CD86 的上调。将样品在不同剂量下进行分析。

[0253] 图 7:BMDC 与全甘露聚糖、>1000kDa 甘露聚糖部分以及 >300kDa 甘露聚糖部分的成熟。通过流式细胞术来测量共刺激分子 CD40(图 7A) 和 CD86(图 7B) 的上调。将样品在

不同剂量下并且在第 48 小时时间点处进行分析。

[0254] 图 8 :证明甘露聚糖部分的不同甘露糖含量的间苯二酚测定的吸光度对浓度曲线。

[0255] 图 9 :天然 PAGE 凝胶上 ANTS 标记的甘露聚糖部分的分析。

[0256] 图 10 :SDS-PAGE 凝胶上 ANTS 标记的甘露聚糖部分的分析。

[0257] 图 11 :ANTS 标记的甘露聚糖部分的扫描的 SDS-PAGE 凝胶,具有注释的 Rf (图 11A) 和分子量 (图 11B)。

[0258] 图 12 :通过 Quantity one 软件产生的标准曲线。

[0259] 图 13 :基于蛋白质标准的相对分子量。

[0260] 图 14 :基于碳水化合物标准的相对分子量。

[0261] 图 15 :SDS-PAGE 凝胶上与 MUC1-FP 缀合的全甘露聚糖和甘露聚糖的部分的分析。星号表示并入与全甘露聚糖-MUC1-FP 缀合物中相同比例的 MUC1-FP:甘露聚糖的缀合物。

[0262] 图 16 :在第 0、第 10 以及第 17 天用 10 μ g 的 MUC1-FP、MFP 或 >1000MFP 免疫的小鼠的脾细胞中的 MUC1- 特异性 IFN- γ 应答。

[0263] 图 17 :在第 0、第 10 以及第 17 天用 10 μ g 的 MUC1-FP、MFP 或 >1000MFP 免疫的小鼠中的总抗-MUC1 血清 IgG、IgG1 以及 IgG2a。

[0264] 图 18 :来自供应商的甘露聚糖规格。

[0265] 图 19A :使用间苯二酚测定分析甘露聚糖的批次。

[0266] 图 19B :使用间苯二酚测定获得的甘露糖的标准曲线。

[0267] 图 20 :在高碘酸盐氧化之后通过定量醛残基来比较来自 Sigma 的不同批次的甘露聚糖。

[0268] 图 21 :与 ANTS 反应的不同批次的甘露聚糖的荧光对浓度曲线。

[0269] 图 22 :聚乙二醇接头的合成。

[0270] 图 23 :瑞喹莫德 (R-848) 的合成。

[0271] 图 24 :功能化的衍生物的合成。

[0272] 图 25 :功能化的衍生物的合成。

[0273] 图 26 :功能化的衍生物的合成。

[0274] 图 27 :功能化的衍生物的合成。

[0275] 图 28 :功能化的衍生物的合成。

[0276] 图 29 :免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物的一般合成。

[0277] 图 30 :功能化的衍生物 1 至 5。

[0278] 图 31 :瑞喹莫德 (R-848) 的替代合成。

[0279] 图 32 :PEG-A 的合成。

[0280] 图 33 :L-1 和接头 -1 的替代合成。

[0281] 图 34 :洛索立宾的合成。

[0282] 图 35 :衍生物 4-3 的合成。

[0283] 图 36 :衍生物 5-2 和 5-3 的合成。

[0284] 图 37 :功能化的瑞喹莫德衍生物 Rd1 至 Rd3。

[0285] 图 38 :功能化的洛索立宾衍生物 Ld1 至 Ld10。

[0286] 图 39 :Ld1 的合成。

[0287] 图 40 :Ld2 的合成。

[0288] 图 41 :IM2 的合成。

[0289] 图 42 :IM3 的合成。

[0290] 图 43 :Rd1 的合成。

[0291] 图 44 :Ld6/Ld10 的合成。

[0292] 图 45 :FP 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖的缀合。将分子量标准、FP 以及 >1000MFP 在 SDS-PAGE 凝胶 (4%至 20%) 上运行并且用考马斯蓝 (coomassie blue) 进行染色。

[0293] 图 46 :MUC1- 特异性 T 细胞应答的唤起。将同种异体的 DC(BC16) 用 10 和 20 μ g/ml 的 >1000MFP 或 FP 进行脉冲并且用于唤起 MUC1- 特异性 T 细胞系中的 CD8(图 46A) 和 CD4(图 46B) 细胞内 IFN γ 应答。

[0294] 图 47 :pTrc (MUC1-VNTR) 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖的缀合。将分子量标准、pTrc 以及 >1000kDa pTrc 在 SDS-PAGE 凝胶 (4%至 20%) 上运行并且用考马斯蓝进行染色。

[0295] 图 48 :MUC1- 特异性 T 细胞应答的唤起。将同种异体的 DC(BC17A) 用 20 和 40 μ g/ml 的 >1000kDa pTrc 或 pTrc 进行脉冲并且用于唤起来自供体 BC13 的 pTrc (MUC1)- 特异性 T 细胞系中的 CD8 细胞内 IFN γ 应答。

[0296] 图 49 :MUC1- 特异性 T 细胞应答的唤起。将自体的 DC 用 20 μ g/ml 的 >1000kDa 氧化的甘露聚糖 -pTrc 或 pTrc 进行脉冲并且用于唤起来自供体 BC17K 的 MFP- 特异性 T 细胞系中的 CD8 细胞内 IFN γ 应答。

[0297] 图 50 :MART-1 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖的缀合。将分子量标准、MART-1、>1000 甘露聚糖 -MART-1 在 SDS-PAGE 凝胶 (4%至 20%) 上运行并且用考马斯蓝进行染色。

[0298] 图 51 :MART-1- 特异性应答的引发 (1 刺激)。将来自供体 BC28 的 PBMC 如实施例 1 中所描述的用 MART-1 蛋白或 MART-1>1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物进行引发。示出了通过 MART-1 类似物和类似物肽脉冲的 T2 细胞唤起 MART-1- 特异性 CD8 细胞内 IFN γ 应答。

[0299] 图 52 :MART-1- 特异性应答的引发 (2 刺激)。将来自供体 BC28 和 BC29 的 PBMC 如实施例 1 中所描述的用 MART-1 蛋白或 MART-1>1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物进行引发。示出了通过 MART-1 蛋白和 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物唤起 MART-1- 特异性 CD8 细胞内 IFN γ 应答。

[0300] 图 53 :针对 H1N1 和 H1N1+>1000kDa 甘露聚糖的混合物的 H1N1- 特异性抗体应答。将小鼠在第 0 天和第 14 天用 1 μ g 的单独的或与 >1000kDa 甘露聚糖混合的 H1N1 进行鼻内免疫。在最终免疫之后 10 天,收获血清样品和肺洗液样品并且通过 ELISA 测定针对抗 -H1N1IgG1、IgG2a 以及 IgA 活性进行测试。

[0301] 序列表的略语表

[0302] SEQ ID NO:1 :对于 Melan/MART-1 具有特异性的 HLA-A2 表位肽 (天然)。

[0303] SEQ ID NO:2 :对于 Melan/MART-1 具有特异性的 HLA-A2 表位肽 (类似物)。

[0304] 发明详述

[0305] 通用技术和定义

[0306] 除非另外明确定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语应理解为具有与本领域 (例如,在细胞培养、分子遗传学、疫苗技术、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学以及生

物化学中) 的普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0307] 除非另外指明, 否则本发明中使用的重组蛋白、细胞培养以及免疫技术是本领域的技术人员熟知的标准程序。在以下来源中的文献通篇中描述和解释这类技术, 如 J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons(1984)、Maniatis 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1982)、J. Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989)、T. A. Brown(编辑), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第 1 卷 和 第 2 卷, IRL Press(1991)、D. M. Glover 和 B. D. Hames(编辑), DNA Cloning: A Practical Approach, 第 1 卷 至 第 4 卷, IRL Press(1995 和 1996)、F. M. Ausubel 等人, (编辑), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience(1988, 包括直到目前的所有更新)、E. Harlow 和 D. Lane(编辑), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory(1988)、以及 J. E. Coligan 等人(编辑), Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons(1991, 包括直到目前的所有更新)。

[0308] 如本文所用, “约”或“大约”通常应意指在给定值或范围的 20% 内、更优选 10% 内、并且甚至更优选 5% 内。

[0309] 术语“和 / 或”, 例如“X 和 / 或 Y”应理解为意指“X 和 Y”抑或“X 或 Y”, 并且应被视为对于两种含义或对于任一含义提供明确的支持。

[0310] “受试者”可以是其中当施用本发明的化合物或组合物时, 诱导和 / 或增强免疫应答的任何生物体。在优选的实施方案中, 受试者是动物, 更优选哺乳动物或鸟类。在特别优选的实施方案中, 受试者是人。其它优选的实施方案包括伴侣 / 家养动物, 如猫和狗; 家畜动物, 如马、牛、绵羊、猪以及山羊; 家禽或野生动物。

[0311] 免疫调节剂

[0312] 本发明的化合物包含与包含甘露糖的碳水化合物聚合物缀合的免疫调节剂。

[0313] 如本文所用的术语“免疫调节剂”意指调节受试者的免疫系统的物质。免疫调节剂可以如在免疫增强、免疫抑制、或免疫耐受的诱导中将免疫应答调整至所需水平。用于本发明的化合物中的免疫调节剂包括但不限于, 蛋白质、肽、抗体、抗体片段、小分子、细胞因子、激素、酶、核酸、反义寡核苷酸如 siRNA、毒素、抗血管生成剂、细胞毒性剂、促细胞凋亡剂以及其它已知的治疗剂。优选的免疫调节剂包括小分子(例如, R848、洛索立宾、Stat-3 抑制剂、TGF β 抑制剂、雷帕霉素 / FK506)、细胞因子(例如, IL-2、TGF β)、抗体片段(例如, CTLA-4 激动剂 scFv)、核酸(例如, CpG、siRNA)。

[0314] 免疫调节剂可以调节细胞因子和 / 或趋化因子生物合成。例如, 免疫调节剂可以诱导以下细胞因子的产生和 / 或分泌, 例如像, I 型干扰素 (IFN- α 、IFN- β)、II 型干扰素 (IFN- γ)、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10 和 / 或 IL-12 和 / 或趋化因子、IL-8、MIP-I、MCP-I 和 / 或 RANTES。可替代地, 免疫调节剂可以抑制以下细胞因子的产生和 / 或分泌, 例如像 TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-5 和 / 或 IL-13。

[0315] 免疫调节剂可以调节天然和 / 或获得性免疫。

[0316] 免疫调节剂可以诱导体液、细胞、Th1 或 Th2 应答或其组合。

[0317] 免疫调节剂可以用作佐剂。活化强 CTL 应答的免疫调节剂化合物作为疫苗佐剂可

能是特别期望的,尤其是用于治疗性病毒和 / 或癌症疫苗,因为这些环境中的治疗作用通常依赖于细胞免疫的活化。

[0318] 免疫调节剂可以调节粘膜和 / 或全身免疫。

[0319] 在优选的实施方案中,免疫调节剂是至少一种 toll- 样受体 (TLR) 的激动剂。

[0320] 如本文所用,“激动剂”是指与至少一种 TLR 结合并且能够增加 TLR 信号传导的试剂。在这方面,TLR 信号传导的水平可以在预先存在的信号传导水平上增强或它可以在信号传导的背景水平上诱导。TLR 信号传导可以介导免疫应答。

[0321] 如本文所用,术语“TLR 信号传导”是指与通过 TLR 的信号传导相关的细胞内信号传导的任何方面。示例性 TLR 激动剂在表 1 中示出。

[0322] 出于本发明的目的,用于确定免疫调节剂是否被认为是具体 TLR 的激动剂的一种方式它是是否相对于对照转染株在 TLR 转染的宿主细胞 (例如像 HEK293 或 Namalwa 细胞) 中通过来自靶物种的所述 TLR 活化 NF κ B/ 荧光素报道构建体多于约 1.5 倍,并且通常至少约 2 倍。关于 TLR 活化的信息,参见例如 US7,375,180、US7,485,432、US20040014779、US20040132079、US20040197865 以及 W003/043588。

[0323] 适合的 TLR 激动剂包括天然 TLR 配体和一些种类的小分子,包括鸟苷类似物 (例如,洛索立宾和艾沙托立宾)、脱氮 - 腺苷类似物 (例如,Sumitomo 化合物) 以及咪唑并噻啉 (例如,咪唑莫特、瑞唑莫德、3M-001、3M-002、3M-003)。

[0324] 为选自 TLR7、8 和 / 或 9 的 TLR 的激动剂的免疫调节化合物可能特别适用于某些应用。

[0325] TLR7- 介导的免疫应答通常以 IFN- α 和 IFN- γ 可诱导的细胞因子 (如 EP-10 和 I-TAC) 的诱导为特征。在 TLR7- 介导的免疫应答中诱导的细胞因子 IL-1 α / β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α / β 以及 MIP-3 α / β 的水平通常低于在 TLR8- 介导的免疫应答中诱导的那些。

[0326] TLR8- 介导的免疫应答通常以促炎性细胞因子如 IFN- γ 、IL-12p40/70、TNF- α 、IL-1 α / β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α / β 以及 MIP-3 α / β 的诱导为特征。

[0327] TLR9- 介导的免疫应答通常以至少 IFN- γ 和 IL-12 的产生和 / 或分泌为特征,但通常在低于经由 TLR8- 介导的免疫应答所实现的水平。

[0328]

表 1: 示例性免疫调节剂

化合物	公司	靶标	药物种类	一种或多种适应症
SMP-105	Dainippon Sumitomo Pharma	TLR2	高压灭菌的分支杆菌	癌症
OM-174	OM Pharma	TLR2, TLR4	脂质-A衍生物	癌症
林他莫德 (Rinatolimod)	Hemispherx Biopharma	TLR3	dsRNA分子	癌症; 病毒感染
IPH-3102	Innate Pharma	TLR3	dsRNA模拟物	癌症
Pollinex Quattro	Allergy Therapeutics	TLR4	MPL加上花粉	过敏症
CBLB502	Cleveland Biolabs Inc	TLR5	鞭毛蛋白(Flagellin)	癌症
VAX-102	VaxInnate Corp.	TLR5	来自鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) 的 M2e肽/鞭毛蛋白	流行性感
ANA773	Anadys Pharmaceuticals	TLR7	ssRNA分子	癌症; 丙型肝炎
852A	3M Pharmaceuticals	TLR7	小分子ssRNA	癌症
咪喹莫特	3M Pharmaceuticals	TLR7	小分子ssRNA	癌症; 角化症; 乳头瘤 病毒感染
瑞喹莫德	3M Pharmaceuticals	TLR7, TLR8	ssRNA分子	丙型肝炎, 疱疹
AZD8848 (DSP-3025)	Astra-Zeneca	TLR7	基于ssRNA的分子	过敏症, 哮喘
VTX-1463	VentiRx Pharmaceuticals Inc.	TLR8	基于ssRNA的分子	过敏症
IMO-2055	Idera Pharmaceuticals	TLR9	CpG寡核苷酸	癌症
MGN-1706	Molgen	TLR9	非编码茎-环DNA	癌症
ISS1018	Dynavax Technologies	TLR9	短DNA寡核苷酸	癌症
阿托莫德 (Agatolimod)	Pfizer	TLR9	CpG寡核苷酸	癌症
SD-101	Dynavax Technologies	TLR9	CpG寡核苷酸	丙型肝炎

[0329]

化合物	公司	靶标	药物种类	一种或多种适应症
IMO-2125	Idera Pharmaceuticals	TLR9	CpG 寡核苷酸	丙型肝炎
Biothrax 加上 CpG-7909	Coley Pharmaceuticals	TLR9	CpG 寡核苷酸	炭疽 (Anthrax)
HEPLISAV	Dynavax Technologies	TLR9	CpG DNA 加上乙型肝炎抗原	肝炎
AVE0675	Sanofi-Aventis/Coley Pharmaceuticals	TLR9	CpG 寡核苷酸	哮喘, 过敏性鼻炎
QAX-935	Idera Pharmaceuticals/Novartis	TLR9	CpG 寡核苷酸	过敏症, 哮喘
SAR-21609	Sanofi-Aventis/Coley Pharmaceuticals	TLR9	CpG 寡核苷酸	哮喘
DIMS0150	InDex Pharmaceuticals	TLR9	CpG 寡核苷酸	炎症肠病
Cadi-05	Cadila Pharmaceuticals	聚TLR	高压灭菌的分枝杆菌	癌症; 结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) 感染

[0330] 为 TLR8 激动剂的免疫调节剂化合物与治疗性癌症疫苗一起使用可能是特别期望的, 因为表达 TLR8 的抗原呈递细胞已经显示出在通过 TLR8 刺激时产生 IL-12。IL-12 据信

在 CTL 的活化中起重要作用,所述 CTL 对于介导治疗功效来说是重要的。

[0331] 为 TLR7 激动剂和 / 或 TLR9 激动剂的免疫调节剂化合物与预防性疫苗一起使用可能是特别期望的,因为通过这些 TLR 的刺激诱导的 I 型干扰素据信有助于中和 Th1- 样体液和细胞应答的形成。

[0332] 为 TLR7 激动剂和 TLR8 激动剂二者的免疫调节剂化合物与治疗性病毒疫苗和 / 或癌症疫苗一起使用可以是特别期望的,因为 TLR7 刺激据信诱导 I 型干扰素的产生和先天性细胞如巨噬细胞和自然杀伤 (NK) 细胞的活化,并且 TLR8 刺激据信活化抗原呈递细胞以便起始如以上所描述的细胞获得性免疫。这些细胞类型能够介导病毒清除和 / 或针对赘生物的治疗性生长抑制作用。

[0333] 不是 TLR7 激动剂并且不诱导显著量的 IFN α 的免疫调节剂化合物与某些疫苗 (如细菌性疫苗) 一起使用可能是期望的,因为 TLR7 诱导 I 型干扰素产生,所述 I 型干扰素下调由巨噬细胞和 DC 产生 IL-12。IL-12 有助于巨噬细胞、NK 细胞以及 CTL 的随后活化,所有这些有助于抗细菌免疫。因此,针对一些种类的细菌诱导抗细菌免疫可以在不存在 IFN α 的情况下增强。

[0334] TLR7 激动剂包括,例如,鸟苷类似物如 C8- 取代的鸟苷、主要由 G 和 U 组成的核糖核苷的混合物、鸟苷核糖核苷酸以及 RNA 或 RNA- 样分子 (W02003/086280)、以及基于腺苷的化合物 (例如,6- 氨基 -9- 苯甲基 -2- (3- 羟基 - 丙氧基) -9H- 嘌呤 -8- 醇 (CL-029, Sumitomo)、6- 氨基 -9- 苯甲基 -2- 丁氧基 -9H- 嘌呤 -8- 醇以及其它相关的化合物如描述于 US6,310,070 中的那些)。TLR7 激动剂还公开于 Gorden 等人 (2005) 中 (例如,3M-001、N-[4- (4- 氨基 -2- 乙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 基) 丁基 -] 甲磺酰胺; $C_{17}H_{23}N_5O_2S$; 分子量 361)。

[0335] TLR8 激动剂包括,例如,主要由 G 和 U 组成的核糖核酸的混合物、鸟苷核糖核苷酸以及 RNA 或 RNA- 样分子 (W02003/086280)。另外的 TLR8 激动剂还公开于 Gorden 等人 (2005) 中 (例如,3M-002、2- 丙基噻唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺; $C_{13}H_{13}N_3S$; 分子量 243)。

[0336] TLR7 和 TLR8 二者的激动剂包括,例如,咪唑并喹啉、主要由 G 和 U 组成的核糖核苷的混合物、鸟苷核糖核苷酸以及 RNA 或 RNA- 样分子 (W02003/086280)。另外的 TLR7/8 激动剂还公开于 Gorden 等人 (2005) 中 (例如,3M-003、4- 氨基 -2- (乙氧基甲基) - α , α - 二甲基 -6,7,8,9- 四氢 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 乙醇水合物; $C_{17}H_{26}N_4O_2$; 分子量 318)。

[0337] TLR9 激动剂包括,例如,免疫调节核酸,并且具体地说 CpG 免疫调节核酸。

[0338] 鸟苷类似物

[0339] 如本文所用,术语“鸟苷类似物”是指具有涉及鸟嘌呤碱基、鸟苷核苷糖或鸟嘌呤碱基和鸟苷核苷糖二者的化学修饰的鸟苷样核苷 (鸟苷除外)。在一个实例中,鸟苷类似物是 7- 脱氮 - 鸟苷。

[0340] 在另一个实例中,鸟苷类似物是 C8 取代的鸟苷。C8 取代的鸟苷的实例包括 7- 烯丙基 -7,8- 二氢 -8- 氧代 - 鸟苷 (洛索立宾)、7- 硫杂 -8- 氧代鸟苷 (Immunosine、艾沙托立宾、ANA245、7- 硫代 -8- 氧代 -7,8- 二氢鸟苷、5- 氨基 -3- (β-D- 呋喃核糖基) -3H,6H- 噻唑 [4,5-d] 嘧啶 -2,7- 二酮)、8- 巯基鸟苷、8- 溴代鸟苷、8- 甲基鸟苷、8- 氧代 -7,8- 二氢鸟苷、C8- 芳基氨基 -2'- 脱氧鸟苷、C8- 丙炔基 - 鸟苷、C8- 和 N7- 取代的鸟嘌呤核糖核苷酸、7- 甲基 -8- 氧代鸟苷、8- 氨基鸟苷、8- 羟基 -2'- 脱氧鸟苷、7- 脱氮 -8- 取代的鸟苷以

及 8- 羟基鸟苷。

[0341] 腺苷类似物

[0342] 如本文所用, 术语“腺苷类似物”是指具有涉及腺嘌呤碱基、腺苷核苷糖或腺嘌呤碱基和腺苷核苷糖二者的化学修饰的腺苷样核苷(腺苷除外)。基于腺苷的化合物包括, 例如 6- 氨基-9- 苯甲基-2-(3- 羟基- 丙氧基)-9H- 嘌呤-8- 醇和 6- 氨基-9- 苯甲基-2- 丁氧基-9H- 嘌呤-8- 醇。

[0343] 与五元含氮杂环稠合的 2- 氨基吡啶

[0344] 具有与五元含氮杂环稠合的 2- 氨基吡啶的化合物可以是咪唑并喹啉胺, 包括但不限于, 取代的咪唑并喹啉胺, 例如像酰胺取代的咪唑并喹啉胺、磺酰胺取代的咪唑并喹啉胺、脲取代的咪唑并喹啉胺、芳基醚取代的咪唑并喹啉胺、杂环醚取代的咪唑并喹啉胺、酰胺醚取代的咪唑并喹啉胺、磺酰胺基醚取代的咪唑并喹啉胺、脲取代的咪唑并喹啉醚、硫醚取代的咪唑并喹啉胺、羟基胺取代的咪唑并喹啉胺、胍取代的咪唑并喹啉胺, 6-、7-、8-、或 9- 芳基、杂芳基、芳氧基或芳基亚烷基氧基取代的咪唑并喹啉胺, 以及咪唑并喹啉二胺; 四氢咪唑并喹啉胺, 包括但不限于酰胺取代的四氢咪唑并喹啉胺、磺酰胺取代的四氢咪唑并喹啉胺、脲取代的四氢咪唑并喹啉胺、芳基醚取代的四氢咪唑并喹啉胺、杂环醚取代的四氢咪唑并喹啉胺、酰胺醚取代的四氢咪唑并喹啉胺、磺酰胺基醚取代的四氢咪唑并喹啉胺、脲取代的四氢咪唑并喹啉醚、硫醚取代的四氢咪唑并喹啉胺、羟基胺取代的四氢咪唑并喹啉胺、胍取代的四氢咪唑并喹啉胺以及四氢咪唑并喹啉二胺; 咪唑并吡啶胺, 包括但不限于, 酰胺取代的咪唑并吡啶胺、磺酰胺取代的咪唑并吡啶胺、脲取代的咪唑并吡啶胺、芳基醚取代的咪唑并吡啶胺、杂环醚取代的咪唑并吡啶胺、酰胺醚取代的咪唑并吡啶胺、磺酰胺基醚取代的咪唑并吡啶胺、脲取代的咪唑并吡啶醚以及硫醚取代的咪唑并吡啶胺; 1, 2- 桥接咪唑并喹啉胺、6, 7- 稠合环烷基咪唑并吡啶胺; 咪唑并萘啶胺; 四氢咪唑并萘啶胺; 噁唑并喹啉胺; 噁唑并喹啉胺; 噁唑并吡啶胺; 噁唑并吡啶胺; 噁唑并萘啶胺; 噁唑并萘啶胺; 吡唑并吡啶胺; 吡唑并喹啉胺; 四氢吡唑并喹啉胺; 吡唑并萘啶胺; 四氢吡唑并萘啶胺; 以及与吡啶胺、喹啉胺、四氢喹啉胺、萘啶胺或四氢萘啶胺稠合的 1H- 咪唑并二聚体, 如公开于以下中的那些: US4, 689, 338、US4, 929, 624、US4, 988, 815、US5, 037, 986、US5, 175, 296、US5, 238, 944、US5, 266, 575、US5, 268, 376、US5, 346, 905、US5, 352, 784、US5, 367, 076、US5, 389, 640、US5, 395, 937、US5, 446, 153、US5, 482, 936、US5, 693, 811、US5, 741, 908、US5, 756, 747、US5, 939, 090、US6, 039, 969、US6, 083, 505、US6, 110, 929、US6, 194, 425、US6, 245, 776、US6, 331, 539、US6, 376, 669、US6, 451, 810、US6, 525, 064、US6, 545, 016、US6, 545, 017、US6, 558, 951、US6, 573, 273、US6, 656, 938、US6, 660, 735、US6, 660, 747、US6, 664, 260、US6, 664, 264、US6, 664, 265、US6, 667, 312、US6, 670, 372、US6, 677, 347、US6, 677, 348、US6, 677, 349、US6, 683, 088、US6, 894, 060、EP0394026、US20020055517、US20020110840、US20030133913、US20030199538、US20040014779、W002/102377 以及 W003/103584。

[0345] 其它免疫调节剂

[0346] 适合的免疫调节剂化合物还包括嘌呤衍生物(如公开于 US6, 376, 501 和 US6, 028, 076 中的那些)、咪唑并喹啉酰胺衍生物如公开于 US6, 069, 149 中的那些)、苯并咪唑衍生物(如公开于 US6, 387, 938 中的那些)、腺嘌呤衍生物(如公开于 US6, 376, 501、

US6, 028, 076、US6, 329, 381 以及 W02002/08905 中的那些)、氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯(如公开于 US6, 113, 918、US6, 303, 347、US6, 525, 028 以及 US6, 649, 172 中的那些)、小分子免疫-增效剂化合物(如公开于 US2005/0136065 中的那些)、以及含有胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)的寡核苷酸序列(如公开于 US6, 194, 388、US6, 207, 646、US6, 239, 116、US6, 339, 068 以及 US6, 406, 705 中的那些)。一些含有 CpG 的寡核苷酸包括合成的免疫调节结构基序(如公开于 US6, 426, 334 和 US6, 476, 000 中的那些)。

[0347] 包含甘露糖的碳水化合物聚合物

[0348] 如本文所用,“包含甘露糖的碳水化合物聚合物”是包含甘露糖亚基(即,甘露糖单体单元)或其变体、更优选地由甘露糖亚基(即,甘露糖单体单元)或其变体组成的任何多亚基化合物。实例包括但不限于,甘露聚糖、半乳甘露聚糖(galactomannan)以及乙酰吗喃。在一个实施方案中,碳水化合物聚合物包含醛基。

[0349] 在优选的实施方案中,碳水化合物聚合物被氧化以便得到聚-醛。在其它优选的实施方案中,碳水化合物聚合物在与至少一种免疫调节剂和/或至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸缀合之前包含 150 个醛基。在包含待与所述至少一种免疫调节剂和/或至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸缀合的碳水化合物聚合物的组合物中,所述组合物中的优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 97%、更优选至少 99%、并且甚至更优选所有的碳水化合物聚合物各自具有至少 150 个醛基。

[0350] 在一个实施方案中,包含甘露糖的碳水化合物聚合物在与所述至少一种免疫调节剂和/或至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸缀合之前具有大于约 1000kDa 的分子量。在包含待与所述至少一种免疫调节剂和/或至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸缀合的碳水化合物聚合物的组合物中,所述组合物中的优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 97%、更优选至少 99%、并且甚至更优选所有的碳水化合物聚合物大于约 1000kDa。

[0351] 如本文所用,“甘露聚糖”是指仅由甘露糖形成的直链的或支链的多糖,并且不是指修饰的,例如乙酰化甘露糖(乙酰吗喃)或具有甘露糖主链但非甘露糖侧基的取代的甘露聚糖(例如,由具有半乳糖侧基的甘露糖主链组成的半乳甘露聚糖)的多糖。

[0352] 适用于本发明的化合物中的甘露聚糖在(例如)真菌、更优选地酵母中发现。在来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)(面包酵母)的支链甘露聚糖中,所述甘露聚糖由在 O-2 原子上被 α -D-吡喃甘露糖基(mannopyranosyl)、 α -D-吡喃甘露糖基- α -(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-吡喃甘露糖基以及 α -D-吡喃甘露糖基 α -(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-吡喃甘露糖基- α -(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-吡喃甘露糖基的侧链取代的 α -(1 $\rightarrow$ 6)连接的吡喃甘露糖基主链结构组成。此外,酿酒酵母甘露聚糖还可以被磷酸化(Barreto-Bergter 和 Gorin, 1983; Vinogradov 等人, 1998)。

[0353] 甘露聚糖优选地分离自真菌、更优选地酵母的细胞壁。在一个实施方案中,甘露聚糖可以分离自己已经被工程化以便优先表达高分子量甘露聚糖、优选地大于 1000kDa 的甘露聚糖的遗传修饰的酵母。

[0354] 包含醛基的甘露聚糖可以通过从(例如)酵母获得的甘露聚糖的氧化产生。用于将醛引入至碳水化合物聚合物中的最常见的方法是通过邻位二元醇的高碘酸盐介导

的(NaIO_4)氧化(参见图2的示意图)。关于其它氧化方法,通常参见 M. L. Wolfrom(编辑), *Periodate oxidation of carbohydrates*, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 第11卷,第1页至第40页(1956)。

[0355] 在优选的实施方案中,使用 NaIO_4 来氧化甘露聚糖以便产生聚醛,所述聚醛然后与至少一种免疫调节剂和/或至少一种抗原或编码所述至少一种抗原的核酸缀合。

[0356] 在一个实施方案中,高分子量甘露聚糖(即,大于约 1000kDa)是通过来自例如酵母(如酿酒酵母)的全甘露聚糖提取物的大小分级分离来获得。在这个实例中,全甘露聚糖可以通过本领域已知的方法源自酿酒酵母,所述方法包括培养细胞或喷雾干燥的细胞的热萃取和溶剂萃取方法。源自酿酒酵母的甘露聚糖可以从供应商(例如)Sigma(St. Louis, MO)获得,并且在一个实施方案中,随后进行分级分离以便得到高分子量甘露聚糖组合物。在一个实施方案中,高分子量甘露聚糖组合物基本上不含核糖、核酸、核糖核酸、蛋白质和/或其它碳水化合物。

[0357] 包含甘露糖的碳水化合物聚合物的制备

[0358] 用于分离碳水化合物与糖的方法是本领域熟知的(通常参见, Z. El Rassi(编辑), *Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis*, *Journal of Chromatography*, 第66卷, Elsevier Science(2002))。

[0359] 大小分级分离

[0360] 在一个实施方案中,包含含有甘露糖的碳水化合物聚合物的组合物、更优选地包含甘露聚糖的组合物的大小分级分离通过切向流过滤(TFF),还被称为交叉流过滤(CFF)来进行。TFF是其中产物流(进料)沿膜的表面被切向地引导,其中大多数溶液循环回至进料槽的一种方法。进料溶液跨过膜的迅速流动用于“吹扫”表面,从而降低浓差极化(在所述膜表面处的产物浓度)。它还防止结垢物(foulant)的堆积,所述结垢物可能堵塞在膜表面处的孔。快速交叉流产生压力降,所述压力降迫使一些进料溶液和小于膜中的孔的溶解的分子通过膜过滤器。穿过膜的溶液被称为滤液或渗透物。大于所述膜孔的分子或颗粒被保留在进料溶液中并且有效地浓缩。

[0361] 膜过滤可以被分类为“微滤”抑或“超滤”方法。具有通常在 0.1 微米与 1 微米之间的孔径大小的微滤膜通常用于澄清、灭菌以及微粒子的去除或用于细胞收获。具有在 0.001 与 0.1 微米之间的更小的孔径大小的超滤膜用于浓缩并且脱盐溶解的分子(蛋白质、肽、核酸、碳水化合物以及其它生物分子)、交换缓冲剂、分级分离以及水净化。超滤膜通常通过截留分子量(MWCO)而不是孔径大小来进行分类。

[0362] 在另一个实施方案中,包含含有甘露糖的碳水化合物聚合物的组合物的大小分级分离通过尺寸排阻色谱法来进行。

[0363] 尺寸排阻色谱法的基本原理是本领域的技术人员熟知的,并且在“Gel filtration: Principles and Methods, GE Healthcare”中进行解释。用于分级分离具体范围的适当柱可以容易地选择并且有效地用于解析以上部分,例如,聚丙烯酰胺葡聚糖(Sephacryl)S-100HR、聚丙烯酰胺葡聚糖 S-200HR、聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300HR、聚丙烯酰胺葡聚糖 S-400HR 以及聚丙烯酰胺葡聚糖 S-500HR 或其等效物。在类似方式中,可以使用琼脂糖介质或其等效物,例如,琼脂糖 6B、4B、2B。在一个实施方案中,聚丙烯酰胺葡聚糖 S-400HR 用于分级分离包含含有甘露糖的碳水化合物聚合物的组合物。

[0364] 在又一个实施方案中,包含含有甘露糖的碳水化合物聚合物的组合物的的大小分级分离通过超滤来进行。

[0365] 样品的超滤可以使用具有适当的分子量截留的分子膜来进行。用于实现分级分离的具体膜和程序对于本领域的技术人员来说是广泛可获得的。

[0366] 本领域的技术人员还将认识到包含含有甘露糖的碳水化合物聚合物的组合物的的大小分级分离还可以通过密度梯度离心来进行。

[0367] 在优选的实施方案中,样品在分级分离之前是至少部分纯化的,以便去除污染物,例如像核糖、包括 DNA 和 RNA 的核酸、蛋白质和 / 或不包含甘露糖的碳水化合物。纯化可以与其它色谱技术(包括亲和、离子交换以及疏水相互作用色谱法)组合实现。组合物的纯度可以如以下所描述通过测量其甘露糖含量来确定。

[0368] 去除非碳水化合物组分的一种方法是使用消化酶以便裂解所述非碳水化合物组分,接着大小分级分离以便去除所裂解的产物。包括链霉蛋白酶(pronase)、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶(DNase)以及蛋白酶的消化酶是本领域熟知的并且描述于不同教科书中,所述教科书的一个实例是 Maniatis 等人(1982),同上。适用于消化蛋白质的蛋白酶包括内肽酶和外肽酶、链霉蛋白酶、丝氨酸蛋白酶(如胰蛋白酶(trypsin)、糜蛋白酶(chymotrypsin)以及枯草杆菌蛋白酶(subtilisin))、硫醇蛋白酶如木瓜蛋白酶(papain)、以及钙-需求蛋白酶如嗜热菌蛋白酶(thermolysin)。

[0369] 可替代地,非碳水化合物组分可以通过亲和色谱法,例如通过使用 DNA- 或 RNA- 结合基质来去除(Maniatis 等人,1982,同上)。另一种选项是通过使用多糖结合基质如凝集素来纯化碳水化合物聚合物与污染组分分开。

[0370] 根据本发明的方法,可以确定选定部分中包含甘露糖的碳水化合物聚合物的的大小分布、醛和 / 或甘露糖含量。这种验证在获得在人中使用的法规性批准中可能是重要的。

[0371] 大小分布

[0372] 可以确定样品在分级分离之前和 / 或之后的大小分布。当在分级分离之前进行时,这一分析帮助选择用于分级分离的碳水化合物聚合物的起始组合物。例如,如果起始组合物中的聚合物的大多数分子量物质低于 1000kDa,那么所述组合物可以被丢弃,并且具有碳水化合物聚合物的更高分布的高分子量物质的另一批次被选择用于分级分离。相比之下,所回收的部分的大小分布的分析用于确认或验证分级分离方法。在获得用于在人中使用这些碳水化合物聚合物的法规性批准时,这将是重要的。

[0373] 组合物的碳水化合物聚合物的的大小分布可以通过使氧化的样品与 ANTS 反应(参见图 3 的示意图)、并且通过 SDS-PAGE 解析 ANTS 标记的样品来确定。针对蛋白质标准和 / 或碳水化合物标准比较所解析的 ANTS 标记的样品将允许确定所述样品的大小分布。

[0374] 如本文所用,“蛋白质标准和 / 或碳水化合物标准”是指具有不同分子量的已知蛋白质或碳水化合物的组合物用作 SDS-PAGE 中的分子量标准。所述组合物被设计成给出尖锐、良好分离的条带,所述条带用于估计在同一凝胶的相邻泳道中电泳的样品的分子量的分子量标准。所述标准可以是预先染色的(以便允许在电泳过程中分子量范围的容易可视化)或未染色的。多种标准可供用于电泳应用并且可以购自,例如,Invitrogen 或 Bio-rad。通常,所述标准是以即时可用的形式来供应,从而消除了减少、预混合或添加负载染料的需要。这些标准在批与批之间一致并且在适当的凝胶上是严格质量控制的以确保一

致的条带迁移和强度。

[0375] 醛含量

[0376] 还可以在分级分离之前和 / 或之后确定样品的醛含量以便帮助批次选择和 / 或部分验证。

[0377] 在一个实施方案中,通过定量在用 NaIO_4 氧化之后所述样品中醛残基的数目来确定样品的醛含量。例如,如果甘露聚糖各自包含大约 90 至 200 个醛残基,那么可以选择包含所述甘露聚糖的组合物用于分级分离。

[0378] 所述方法涉及首先通过 (例如) 使于 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH6.0) 中的 100 μl 中的 1.4mg 样品与 0.01M NaIO_4 在黑暗中在冰上反应 1 小时来氧化所述样品。然后将所述反应应用 10 μl 乙二醇淬灭并且允许在上样在用 0.1M 乙酸盐缓冲液 (pH4.8) 预先平衡的 PD10 柱上之前再反应 1/2 小时,以便去除过量 NaIO_4 。

[0379] 随后可以通过分光光度法通过测量当用 PDPH 处理时吡啶-2-硫酮的释放来测量醛基的数目。

[0380] 如本领域的技术人员所理解,一些其它方法可以用于醛的定量。例如,肟、酰肼、氨基脒 (semicarbazide) 以及碳酰肼 (carbohydrazide) 容易地与醛反应,并且可以被附接至报道分子 (例如,荧光化合物) 用于碳水化合物聚合物中的醛基的定量。可以使用的荧光化合物的选择详述于 www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Reagents-for-Modifying-Groups-Other-Than-Thiols-or-Amines/Hydrazines-Hydroxylamines-and-Aromatic-Amines-for-Modifying-Aldehydes-and-Ketones.html 中。实例包括荧光素-5-氨基硫脒、Alexa Fluor488、Alexa Fluor555、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor633、Alexa Fluor647 以及德克萨斯红。

[0381] 此外,2,4-二硝基苯肼与醛反应以便形成红色腙,所述红色腙可以用于通过吸光度分光光度法来定量碳水化合物聚合物中的醛基的数目 (Apostolopoulos 等人,2000)。

[0382] 甘露糖含量

[0383] 在一个实施方案中,通过比色测定针对中性糖来确定组合物的甘露糖含量,其中中性糖与间苯二酚在水合硫酸溶液的存在下反应。

[0384] 例如,将 200 μl 的 6mg/ml 间苯二酚和 1ml75% 硫酸添加至含有样品 (溶解于 0.01M 乙酸中) 的测定管,所述样品在 200 μl 的体积中具有 5 至 100nmol 的中性糖。然后将所述溶液进行涡旋并且在 90°C 下在温度调节的水浴中加热 30 分钟并且随后在黑暗中放置在冷水浴中持续 30 分钟。然后在 430 或 480nm 下测定所述混合物的光密度。可以通过使用以上所指示的一半体积来进行同一测定,具有类似的结果。

[0385] 可替代地,所述测定可以以微板形式进行。在这个实施方案中,将 20 μl 的 6mg/ml 间苯二酚和 100 μl 75% 硫酸以及 50 μl 姥蛟烷 (pristine) 添加至含有样品 (溶解于 0.01M 乙酸中) 的 96 孔微量滴定板的 U 形孔中,所述样品在 20 μl 的体积中具有 1 至 100nmol 的中性糖。然后将所述溶液通过用涡旋装置振荡所述板来进行混合并且在 90°C 下在孵育箱中加热 30 分钟,并且随后在黑暗中保持在室温下持续 30 分钟。然后使用微量滴定板读数仪在 430 或 480nm 下测定所述混合物的光密度。出于定量目的,空白、中性糖标准以及样品一式两份、更优选地一式三份、更优选地一式四份进行测定。

[0386] 甘露糖含量还可以通过碳水化合物聚合物的酶或酸水解、接着通过 HPLC、质谱法、毛细管电泳或薄层色谱术分析来测定 (Wang 等人, 2007; Anumula, 1994; R. Townsend, Chromatography in Biotechnology, C. Horvath 和 L. S. Ettre (编辑), American Chemical Society, Washington, D. C. (1993) 第 86 页至 101 页)。

[0387] 免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物及其制备

[0388] 本发明涉及免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物和用于制备所述免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物的方法。

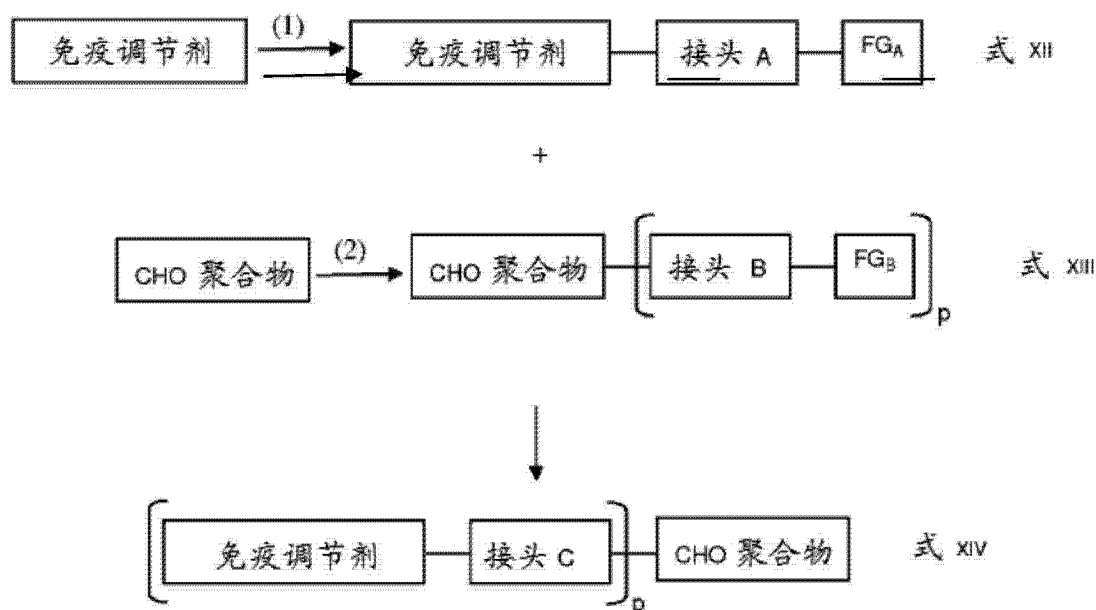
[0389] 在一个实施方案中, 免疫调节剂经由接头与碳水化合物聚合物缀合。碳水化合物聚合物可以具有官能团, 所述官能团可以与接头形成共价键, 同时保存所述碳水化合物聚合物的至少一部分生物活性。可替代地, 在一些情况下, 可以通过以下方式容易地产生或添加这种官能团: 化学反应, 例如像碳水化合物聚合物的氧化以便得到聚醛; 或碳水化合物聚合物与具有官能团 (例如, 丙二酰基或磺酰基) 的部分的键联。

[0390] 在一个实施方案中, 具有第一官能团的接头与具有免疫调节活性的免疫调节剂在所述免疫调节剂上被选择来保存所述免疫调节剂的至少一部分免疫调节活性的位点处共价连接, 从而形成免疫调节剂-接头。然后使所述免疫调节剂-接头与碳水化合物聚合物反应, 从而允许所述接头的第二官能团在所述碳水化合物聚合物上的位点处共价键合, 由此形成免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物, 所述缀合物具有免疫调节活性和所述碳水化合物聚合物的生物活性。可替代地, 所述接头可以首先与所述碳水化合物聚合物缀合, 并且随后使所得到的缀合物与所述免疫调节剂反应。再者, 免疫调节剂和碳水化合物聚合物二者可以各自首先与接头缀合, 并且随后使所得到的缀合物反应。

[0391] 用于制备本发明的缀合物的适合的方法描述于 US2009/0035323 中。US2009/0035323 教导了免疫调节剂与第二活性部分的缀合。然而, US2009/0035323 未教导所述免疫调节剂与包含甘露糖的碳水化合物聚合物 (例如, 甘露聚糖) 的缀合。此外, US2009/0035323 未教导或建议所述免疫调节剂与高分子量碳水化合物聚合物的缀合。

[0392] 可以使用以下反应方案中所示的一般方法来制备本发明的缀合物:

[0393]



[0394] 在以上反应流程中,碳水化合物 (CHO) 聚合物和免疫调节剂是如以上所描述,而 FG_A 、 FG_B 、接头 A、接头 B 以及接头 C 是如 US2009/0035323 中所定义。本领域的技术人员将认识到 p 取决于所述碳水化合物聚合物的长度而变化。在一个实施方案中, p 是 1 至 100 的整数。

[0395] 在以上反应流程的步骤 (1) 中,对免疫调节剂进行修饰以便提供式 XII 的功能化的免疫调节剂。可以使用异双功能接头来制备式 XII 的功能化的免疫调节剂化合物。如本文所用,“异双功能接头”包括在任一端处的两个不同的反应性官能团和不同长度的间隔基以及组合物。免疫调节剂上可以被异双功能接头修饰的有用的官能团包括但不限于,胺、硫醇 ($-SH$)、酮、酰肼 ($-C(O)NHNH_2$)、肼 ($-NHNH_2$)、羟基胺 ($-NHOH$)、以及 O -烷基羟基胺 ($-O-NH_2$)。可以通过不同于采用异双功能接头的方式来合成式 XII 的功能化的免疫调节剂化合物。

[0396] 在一些实施方案中,可以在不并入接头 A 的情况下使用免疫调节剂。例如,包含官能团 FG_A 的免疫调节剂可以与式 XIII 的功能化的部分反应以便形成式 XIV 的免疫调节剂-碳水化合物缀合物。免疫调节剂中优选的官能团 FG_A 包括但不限于,胺、硫醇 ($-SH$)、酮、酰肼 ($-C(O)NHNH_2$)、肼 ($-NHNH_2$)、羟基胺 ($-NHOH$) 以及 O -烷基羟基胺 ($-O-NH_2$)。

[0397] 在以上反应流程的步骤 (2) 中,对碳水化合物聚合物进行修饰以便提供式 XIII 的功能化的部分。可以使用异双功能接头通过采用与以上步骤 (1) 中所描述的策略类似的策略来制备式 XIII 的功能化的部分。碳水化合物聚合物上的有用的官能团 FG_B 包括但不限于,胺 ($-NH_2$)、硫醇 ($-SH$) 以及醛 ($-CHO$)。在一些情况下,可以在碳水化合物聚合物上容易地产生有用的官能团 FG_B 。例如,可以使用高碘酸钠来氧化所述聚合物上的碳水化合物残基以便形成反应性醛。可以通过不同于采用异双功能接头的方式来合成式 XIII 的功能化的部分。

[0398] 在优选的实施方案中,可以在不并入连接物 B 的情况下使用碳水化合物聚合物。例如,包含官能团 FG_B 的碳水化合物聚合物可以与式 XII 的功能化的免疫调节剂反应以便形成式 XIV 的免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物。碳水化合物聚合物上的有用的官能团 FG_B 包括但不限于,胺 ($-NH_2$)、硫醇 ($-SH$) 以及醛 ($-CHO$)。在一些情况下,可以在碳水化合物聚合物上容易地产生有用的官能团 FG_B 。例如,可以使用高碘酸钠来氧化所述聚合物上的碳水化合物残基以便形成反应性醛。

[0399] 反应可以通过将式 XII 的功能化的免疫调节剂于适合的溶剂如二甲亚砜 (DMSO) 或 N,N -二甲基甲酰胺中的溶液添加至式 XIII 的功能化的部分于适合的缓冲剂如磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的溶液来进行。反应可以在环境温度下进行。所得到的缀合物可以使用常规方法例如像尺寸排阻色谱法来进行纯化。

[0400] 选择式 XII 的功能化的免疫调节剂和式 XIII 的功能化的部分,这样使得官能团 FG_A 和官能团 FG_B 彼此反应以便在式 XIV 的免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物中形成新的共价键。

[0401] 在一些实施方案中,意图与碳水化合物聚合物上的适当的官能团 FG_B 反应的免疫调节剂上的官能团 FG_A 可能与所述免疫调节剂中的某些官能团 (例如,氨基或羟基) 不相容。

[0402] 在这些情况下,可能需要使用保护基团或前药基团以便暂时地掩盖 (例如) 氨基

或羟基的反应性。保护基团然后可以在合成途径中的适当步骤处去除。

[0403] 适合的氨基保护基团描述于 US2009/0035323 中, 并且包括乙酰基、三氟乙酰基、叔-丁氧基羰基 (BOC)、苄氧基羰基以及 9-苄基甲氧基羰基 (FMOC)。适合的羟基保护基团描述于 US2009/0035323 中, 并且包括乙酰基和甲硅烷基如叔丁基二甲基甲硅烷基。

[0404] 在本发明的一些实施方案中, 可以使用免疫调节剂的前药。术语“前药”意指可以在体内转化以便产生修饰免疫应答的化合物。前药本身可以是修饰免疫应答的化合物。转化可以通过不同机制发生, 如通过化学 (例如, 溶剂分解或水解, 例如在血液中) 或酶生物转化。适合的前药描述于 US2009/0035323 中。

[0405] 接头

[0406] 在一个实施方案中, 接头包含:

[0407] i) 可以与碳水化合物聚合物缀合的第一官能团 ((i) 型基团);

[0408] ii) 可以与免疫调节剂缀合的第二官能团 ((ii) 型基团); 以及

[0409] iii) 间隔基。

[0410] 所述第一基团和第二基团可以任选地包含适合的离去基团或保护基团。

[0411] 所述第一基团可以是, 例如, 醛、酮、甲酰基、肼、酰肼、胺、酰胺、羧酸、炔或卤素。

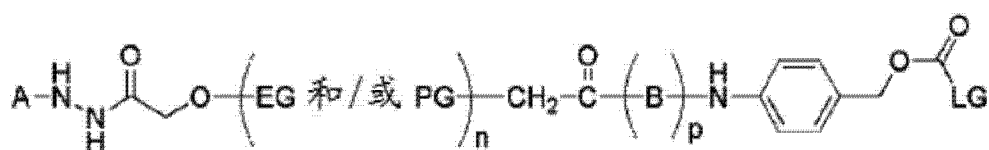
[0412] 所述第二基团可以是, 例如, 醛、酮、甲酰基、肼、酰肼、胺、酰胺、羧酸、炔或卤素。

[0413] 接头可以是支链的, 这样使得多种免疫调节剂化合物可以共价地附接至所述接头。当多种免疫调节剂化合物被附接至所述接头时, 所述免疫调节剂化合物可以是相同的化合物或不同的化合物。

[0414] 多于一个接头可以被共价附接至碳水化合物聚合物, 这样使得多种免疫调节剂化合物可以与所述碳水化合物聚合物缀合。当多个接头被附接至碳水化合物聚合物时, 所述接头可以是相同的或不同的。此外, 附接至每个接头的免疫调节剂化合物可以是相同的化合物或不同的化合物。

[0415] 在一个实施方案中, 接头是异双功能的并且具有式 I 的式:

[0416]



式 I

[0417] 其中,

[0418] A 是保护基团;

[0419] EG 是 $-CH_2-CH_2-O-$;

[0420] PG 是 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$;

[0421] B 是氨基酸残基或其衍生物;

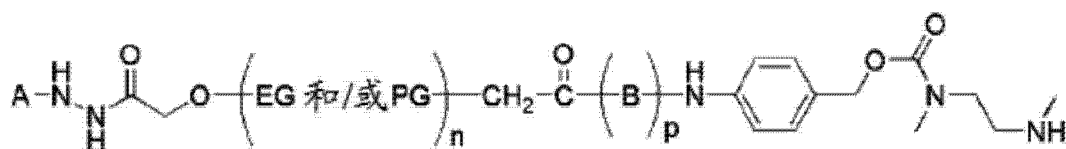
[0422] n 是 1 与 10 之间的整数;

[0423] p 是 1 与 5 之间的整数; 以及

[0424] LG 是离去基团。

[0425] 在另一个实施方案中,接头是异双功能的并且具有式 II 的式:

[0426]



式 II

[0427] 其中,

[0428] A 是保护基团;

[0429] EG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0430] PG 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$;

[0431] B 是氨基酸残基或其衍生物;

[0432] n 是 1 与 10 之间的整数;以及

[0433] p 是 1 与 5 之间的整数。

[0434] 接头的长度、刚性或柔性以及疏水性或亲水性可以针对每种免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物进行优化。此外,接头可以被设计并且合成为包括分支点,这样使得多种免疫调节剂化合物可以被附接至单个接头。

[0435] 最后,接头可以被设计和合成为使得免疫调节剂在体内从免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物释放。例如,接头可以包含不稳定的键联,所述不稳定的键联包括但不限于,在有或没有自我牺牲型 (self-immolative) 间隔基的情况下使用的肽单元的二硫键、脘部分或酰胺键,如描述于文献 (Toki 等人, 2002 ;Jeffrey 等人, 2005 ;Sun 等人, 2005 ; WO2005/082023) 中的那些。

[0436] 不稳定的键容易地在体内裂解。裂解可以通过各种机制发生,如通过化学(例如,在某些肿瘤内发现的在生理 pH 下的水解或在更低 pH 环境下的水解)或酶(例如,与酯酶反应)生物转化。

[0437] 这类缀合物可以适用于允许所施用的缀合物在诱导和/或增强或抑制或耐受免疫应答之前到达靶组织。这样可以通过提供更高局部的免疫应答来提供治疗益处。免疫调节剂部分可以保持无活性,直到缀合物到达需要免疫治疗的靶组织,从而减少、甚至防止全身免疫应答。

[0438] 免疫调节化合物和组合物

[0439] 如本文所用,术语“免疫调节化合物”是指所述化合物诱导和/或增强或抑制或耐受免疫应答的能力。

[0440] 类似地,如本文所用,术语“免疫调节组合物”是指所述组合物诱导和/或增强或抑制或耐受免疫应答的能力。

[0441] 术语“免疫应答”具有其在本领域中的普通意义,并且包括体液免疫和细胞免疫二者。免疫应答可以表现为以下中的一种或多种:抗-抗原抗体的发育、抗原特异性 T 细胞的扩增、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的增加;抗肿瘤或抗肿瘤抗原迟发型超敏反应 (DTH) 应答的发展、病原体的清除率、病原体 and / 或肿瘤生长和 / 或扩散的抑制、肿瘤减少、转移的减少

或消除、复发的时间增加、病原体或无肿瘤存活的时间增加以及存活时间增加。免疫应答可以由以下中的一种或多种介导：B 细胞活化、T 细胞活化、自然杀伤细胞活化、抗原呈递细胞（例如，B 细胞、DC、单核细胞和 / 或巨噬细胞）的活化、细胞因子产生、趋化因子产生、特异性细胞表面标志物表达、具体地说共刺激分子的表达。免疫应答可以以体液、细胞、Th1 或 Th2 应答或其组合为特征。

[0442] 体液应答

[0443] 在一个实施方案中，本发明的化合物、组合物或疫苗的施用产生体液应答，其中 IgA、IgG、IgM 以及任选地 IgE 抗体产生中的一种或多种被刺激。

[0444] 免疫球蛋白可以包括在每类抗体内的一个或多个亚类，例如 IgG2a 和 IgG1。

[0445] 在一个实施方案中，IgG1 和 / 或 IgA 产生被刺激。

[0446] 在一些情况下，IgE 产生的刺激可能是有益的，例如，以便针对蠕虫感染进行免疫。

[0447] 在其它情况下，总 IgE 产生的减少或 IgE 水平相对于其它抗体类别的减少可能是有益的，例如，以便防止或减少 I 型超敏反应或特应性，例如枯草热 (hayfever)、哮喘发作或食物和其它过敏。IgE 与其受体结合并且随后与过敏原交联负责在潜在病状如哮喘（包括特应性哮喘）、过敏性鼻炎以及特应性皮炎下触发免疫应答，所述病状是流行病比例的健康问题。因此，在一个实施方案中，免疫应答使得 IgE 产生被减少。

[0448] 在另一个实施方案中，IgE 滴度相对于 IgA、IgG、IgM 或这些的亚类中的一种或多种被降低。IgE 产生可能不变，然而一种或多种其它抗体的产生在用组合物免疫时增加。

[0449] 在一个实施方案中，免疫选择性地刺激 IgA、IgG 以及 IgM 中的一种或多种的产生超过 IgE。

[0450] 在一个实施方案中，IgA 产生被刺激，并且一个或多个粘膜区处和 / 或血清中的 IgA 的滴度增加。

[0451] 在一个实施方案中，在免疫时，当与 IgG、IgM 以及 IgE 的产生相比时，IgA 产生更多。

[0452] 在另一个实施方案中，免疫导致相对于 IgG1 和 / 或 IgG2a 产生的增加，更多的 IgA 产生。

[0453] 在又一个实施方案中，IgG 产生被刺激，并且一个或多个全身区处的和 / 或血清中的 IgG 的滴度增加。

[0454] 在一个实施方案中，在免疫时，当与 IgA、IgM 以及 IgE 的产生相比时，IgG 产生更多。

[0455] 在另一个实施方案中，免疫导致相对于 IgA 的增加，更多的 IgG 产生。

[0456] 在一个实施方案中，免疫导致相对于 IgG1 的增加，更多的 IgG2a 产生。

[0457] 细胞免疫应答

[0458] 在一个实施方案中，本发明的化合物、组合物或疫苗的施用产生细胞应答，其中一种或多种抗原呈递细胞被活化。

[0459] 在一个实施方案中，巨噬细胞和 / 或 DC 被活化。

[0460] DC 的活化可能导致共刺激分子（包括，例如 CD40、CD80 以及 86）的表面表达升高和 / 或促炎性细胞因子（例如，IL-12 和 / 或 IL-4）的增加和 / 或 MHC I 和 / 或 II 类分子的增加。

[0461] 在其它实施方案中,免疫产生 CD8 和 / 或 CD4T 细胞应答。

[0462] 在其它实施方案中,免疫导致细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答的产生。

[0463] 在一个实施方案中,DC 活化初始 T 细胞。树突细胞被认为在引发免疫系统对疫苗抗原的应答中起至少三种独特作用:

[0464] 1) 疫苗抗原的 MHC II 类 - 限制性呈递在其内吞作用之后在外源途径中进行,

[0465] 2) 疫苗抗原的 MHC I 类和 / 或 II 类 - 限制性呈递在用 (例如) 编码所述抗原的质粒 DNA 直接转染 DC 之后,

[0466] 3) 疫苗抗原的 MHC I 类限制性“交叉”呈递。

[0467] Th1/Th2

[0468] 在一个实施方案中,本发明的化合物、组合物或疫苗的施用刺激体液免疫和 / 或细胞免疫的介体。

[0469] 在一个实施方案中,本发明的化合物、组合物或疫苗的施用产生细胞介导的 Th1- 型应答。

[0470] 在另一个实施方案中,本发明的化合物、组合物或疫苗的施用产生抗体介导的 Th2- 型应答。

[0471] 在一个实施方案中,本发明的化合物、组合物或疫苗的施用导致 Th1- 诱导细胞因子如 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 以及 IFN- γ 的产生。这些细胞因子通常促进细胞介导的免疫。

[0472] 在另一个实施方案中,本发明的化合物、组合物或疫苗的施用导致 Th2- 诱导细胞因子如 IL-4、IL-5 以及 IL-10 的产生。这些细胞因子通常促进体液免疫。

[0473] 在一个实施方案中,巨噬细胞的活化导致 IL-12 和 / 或 IL-18 的产生。这进而可以活化由 NK 细胞产生的 IFN- γ δ , 从而诱导分化成 Th1 介导的免疫应答,所述 Th1 介导的免疫应答支持细胞介导的免疫和 / 或补体固定抗体的产生。

[0474] 疫苗

[0475] 术语“疫苗组合物”是指可以用于引发受体受试者中的保护性免疫的组合物。应该指出为了有效,本发明的疫苗可引发群体中一部分的免疫,因为一些个体可能无法发动强烈的或保护性免疫应答、或在一些情况下针对所述疫苗的任何免疫应答。这种无能力可能起源于所述个体的遗传背景或由于免疫缺陷病状 (获得性抑或先天性的) 或免疫抑制 (例如,用免疫抑制药物治疗以便预防器官排斥或抑制自身免疫性病状)。可以在动物模型中确立功效。

[0476] 疫苗可以是“单价的 (monovalent)” (还被称为单价的 (univalent)) 或“多价的 (multivalent)” (还被称为多价的 (polyvalent))。单价疫苗包含单一抗原。多价 (multivalent) 或多价 (polyvalent) 疫苗包含两种或更多种抗原,所述两种或更多种抗原可以 (例如) 针对同一病原体的两个或更多个菌株或针对两种或更多种病原体进行免疫。

[0477] 所述组合物或疫苗可以用于针对 (例如) 病原体或肿瘤免疫、耐受、治疗或保护受试者。

[0478] 术语“免疫”在本文用于意指在受试者中产生保护性免疫应答,以便对受试者提供针对具体病原体或疾病的抗性。

[0479] 术语“耐受”在本文用于意指诱导受试者中的免疫耐受。为了耐受,受试者将诱导

所述受试者中的特异性免疫应答的逃避或抑制。免疫耐受可以用于预防或改善例如移植排斥、自身免疫或过敏性反应。

[0480] 术语“治疗”在本文用于意指受试者内的病原体感染的细胞或肿瘤细胞的部分或全部破坏,优选地对非感染的细胞具有极微的破坏作用。本发明的组合物的治疗性施用可以治疗被病原体感染或患有癌症的受体受试者。在一个替代实施方案中,使抗原呈递细胞(例如巨噬细胞和DC)与本发明的组合物体外或离体接触,并且然后施用至受试者。如本领域的普通技术人员所意识到的,体外进行的程序不是在活生物体中进行,而是在受控制的环境中进行。这类体外程序可以在来自生物体的一种或多种组织或细胞之中或之上进行,并且通常被称为离体程序。

[0481] 术语“保护”在本文用于意指预防被病原体感染或肿瘤生长的开始(即,预防癌症的发作)或延迟肿瘤生长的发作。本发明的组合物的预防性施用可以保护受体受试者免于所述感染或肿瘤生长。

[0482] 抗原

[0483] 本发明提供免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物与至少一种抗原组合在疫苗组合物中的用途。免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物可以与所述至少一种抗原混合或缀合以便在接种之后产生保护性免疫应答。

[0484] 所谓“至少一种抗原”意指一种或多种抗原类型或抗原决定簇。此外,本领域的普通技术人员将会理解多于一种抗原分子可以与免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物缀合(即,所得到的缀合物可以包含与所述碳水化合物聚合物缀合的多于一种单一抗原分子,并且可以包含一种或多种抗原类型或抗原决定簇)。

[0485] 一些策略可以用于使用氧化的甘露聚糖来递送免疫调节剂和抗原。免疫调节剂和抗原可以与氧化的甘露聚糖同时地或顺序地(以任何顺序)缀合,或可替代地,免疫调节剂-抗原复合体可以首先产生并且然后与氧化的甘露聚糖顺序地缀合。在一个实例中,氧化的甘露聚糖的醛基可以与抗原的氨基直接反应以便形成席夫碱(Schiff base)键联。在另一个实例中,免疫调节剂是TLR激动剂,所述TLR激动剂已经用含有可以与抗原上的巯基(半胱氨酸)或氨基(赖氨酸)反应的马来酰亚胺、卤代乙酰基或活化的酯(例如,N-羟基琥珀酰亚胺)接头基团进行修饰。TLR激动剂还可以用含有可以与分别用醛基或乙炔基功能化的抗原反应的酰肼基或叠氮基的接头进行修饰。TLR-抗原缀合物然后可以与氧化的甘露聚糖反应。

[0486] 疫苗可以被施用至患有或易患疾病或处于疾病的风险的受试者。疾病可以与病原体感染相关。在这个实施方案中,疫苗施用可以预防或改善病原体的感染作用。

[0487] 如本文所用,“抗原”意指具有诱导特异性免疫应答能力的物质。抗原可以是处于其任何生命周期阶段的完整生物体、灭活的完整生物体、从所述完整生物体分离的片段或组分、所述生物体的溶解产物或肿瘤溶解产物、通过本领域已知的方法遗传或合成工程化的特异性抗原。此外,所选择的抗原可以来源于成熟的完整生物体抑或孢子孢子(sporozoite)(卵囊(oocyst))或二者。

[0488] 用于本发明的化合物、组合物以及方法的抗原还可以由完整细胞或其亚细胞部分组分。这类细胞或其亚细胞部分可以来源于(例如)肿瘤或受感染的组织。

[0489] 优选的抗原包括(例如)来自以下的抗原:

[0490] 花粉；

[0491] 过敏原，尤其是诱导哮喘的那些；

[0492] 病毒，如流感、猫白血病毒、猫免疫缺陷病毒、HIV-1、HIV-2、狂犬病、麻疹、乙型肝炎、口蹄疫、乳头状瘤病毒、巨细胞病毒、单纯性疱疹、甲型肝炎、丙型肝炎、HTLV-1 以及 HTLV-2；

[0493] 细菌，如炭疽、麻风病、结核病、白喉、莱姆病 (Lyme disease)、梅毒、伤寒以及淋病的病原 (ethiological agent)；

[0494] 原生动物，如牛巴贝虫 (Babesiosis bovis)、疟原虫 (Plasmodium)、利什曼原虫 (Leishmania spp.)、鼠弓形体 (Toxoplasma gondii) 以及克氏锥虫 (Trypanosoma cruzi)；

[0495] 真菌，如曲霉 (Aspergillus sp.)、白色念珠菌 (Candida albicans)、新型隐球菌 (Cryptococcus neoformans) 以及荚膜组织胞浆菌 (Histoplasma capsulatum)；

[0496] 寄生虫如蠕虫；以及

[0497] 肿瘤抗原，如粘蛋白 -1 (MUC-1)、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen)、前列腺 - 特异性膜抗原、前列腺特异性抗原、蛋白 MZ2-E、多形上皮粘蛋白 (PEM)、叶酸结合蛋白 LK26、平截形表皮生长因子受体 (EGFR)、汤姆森 - 佛里奇 (Thomsen-Friedenreich) (T) 抗原、端粒酶 (telomerase)、存活蛋白 (survivin)、Melan-A/MART-1、WT1、LMP2、人乳头瘤病毒 (HPV) E6E7、人上皮生长因子受体 (HER-2/neu)、个体遗传型 (Idiotypic)、黑色素瘤相关的抗原 3 (MAGE-3)、p53、NY-ESO-1、前列腺酸性磷酸酶 (PAP)、癌睾丸抗原、5T4 以及 GM-2 和 GD-2 神经节苷脂。

[0498] 抗原可以是蛋白质、肽、多糖或寡糖（游离或与蛋白质载体缀合）、或其混合物。所述蛋白质和肽可以是天然来源纯化的、通过固相合成合成的提取物或溶解产物的一部分，或可以通过重组遗传学获得。所述多糖和寡糖可以从天然来源分离，或可以使用酶程序和 / 或有机合成方法来合成。

[0499] 抗原可以形成融合蛋白的一部分，以便有助于在重组宿主细胞中的融合蛋白的产生时表达和纯化。融合蛋白的非抗原部分将通常表示包含抗原序列的具有羧基末端序列的融合多肽的 N- 末端区域。融合蛋白可以选自谷胱甘肽 -S- 转移酶、 β - 半乳糖苷酶 (galactosidase) 或任何其它蛋白质或其部分，具体地说，能够利用蛋白质的结合或其它亲和力和力特征进行亲和纯化以便纯化所得到的融合蛋白的那些。蛋白质还可以与载体蛋白的 C- 末端或 N- 末端融合。融合蛋白的性质将取决于产生融合蛋白的载体系统。细菌表达载体的一个实例是 pGEX，其在将目标基因亚克隆至这种载体时产生由具有目标蛋白质的谷胱甘肽 -S- 转移酶组成的融合蛋白。产生具有目标蛋白质的融合蛋白的其它载体系统的实例描述于 Sambrook 等人 (1989)，同上。

[0500] 可替代地，可以在本发明中使用任选地与蛋白质载体偶联的合成肽或多肽。可以根据标准方法产生合成肽或多肽。

[0501] 有用的肽或多肽可以包含以下多肽的携带表位部分，所述多肽已知在将完整多肽施用至动物时引发抗体和 / 或抗原特异性 CTL 应答。这种多肽部分的表位是所述多肽的免疫原性或抗原表位。

[0502] “免疫原性表位”被定义为以下蛋白质的一部分，所述蛋白质在完整蛋白质是免疫

原时引发抗体和 / 或抗原特异性 CTL 应答。另一方面, 抗体或 MHC 分子可以结合的蛋白质分子的区域被定义为“抗原表位”。蛋白质的免疫原性表位的数目通常少于抗原表位的数目。

[0503] 关于携带抗原表位的肽或多肽选择, 本领域熟知的是模拟蛋白质序列的一部分的相对短的合成肽常规地引发与部分模拟的蛋白质反应的抗血清 (参见, 例如, Sutcliffe 等人, 1983)。能够引发蛋白质反应性血清的肽由蛋白质的一级序列表示, 可以通过一套简单的化学规则来进行表征, 并且既不限于完整蛋白质的免疫显性区域 (即, 免疫原性表位) 也不限于氨基或羧基末端。

[0504] 本发明的携带抗原表位的肽和多肽优选地包含至少七个、更优选至少九个并且最优选约 15 至 30 个之间的包含在具体多肽的氨基酸序列内的氨基酸的序列。

[0505] 由 CTL 上的 T 细胞受体识别的表位可以与通过抗体所见的那些不同。通常, CTL 识别与 MHC I 类分子结合并且暴露在细胞表面上的肽 (来源于在细胞溶质区室中酶降解的蛋白质)。这些 CTL 识别的肽根据 MHC 等位基因 - 特异性序列基序与 MHC I 类分子选择性地结合。这些肽可以通过表达克隆进行鉴别 (参见 van der Bruggen 等人, 1991) 并且使用不同的 I 类和 II 类结合肽算法进行预测 (Pietersz 等人, 2006)。

[0506] 可替代地, CTL 识别的肽可以通过经由用来源于用于免疫的蛋白质抗原的肽体外或离体刺激来诱导 CTL 进行鉴别。本发明的具体 CTL 识别的表位携带肽和多肽优选地是至少六个氨基酸、并且更优选约 7 至 20 个之间的氨基酸的序列。

[0507] 可以通过任何常规手段来产生表位携带肽和多肽。

[0508] 细菌抗原

[0509] 抗原可以来源于细菌, 包括但不限于, 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* spp.)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、链球菌属 (*Streptococcus* spp.)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、绿色链球菌 (*Streptococcus viridans*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、沙门氏菌属 (*Salmonella* spp.)、伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、鼠疫巴斯德菌 (*Pasteurella pestis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter* spp.)、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)、梭菌属 (*Clostridium* spp.)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium* spp.)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、密螺旋体属 (*Treponema* spp.)、疏螺旋体属 (*Borrelia* spp.)、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira* spp.)、杜克雷嗜血杆菌 (*Hemophilus ducreyi*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*)、百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*)、副百日咳博德特菌 (*Bordetella parapertussis*)、支气管炎博德特菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、流感嗜血杆菌 (*hemophilus influenza*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、志贺氏杆菌属 (*Shigella* spp.)、埃里希氏体属 (*Ehrlichia* spp.) 以及立克次氏体属 (*Rickettsia* spp.)。

[0510] 细菌抗原可以是天然的、重组的或合成的。这类细菌抗原包括但不限于, 来自与细

胞表面上存在的碳水化合物决定簇结合的细菌的选择蛋白或凝集素,以及蛋白质的细菌受体,如纤连蛋白、层粘连蛋白以及胶原。

[0511] 病毒抗原

[0512] 抗原可以来源于病毒,包括但不限于,流感病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus)、埃-巴二氏病毒 (Epstein-Barr virus)、鼻病毒 (Rhinoviruses)、脊髓灰质炎病毒 (Polioviruses)、柯萨奇病毒 (Coxsackieviruses)、埃可病毒 (Echoviruses)、麻疹病毒 (Rubeola virus)、风疹病毒 (Rubella virus)、水痘-带状疱疹病毒 (Varicell-zoster virus)、疱疹病毒 (Herpes viruses) (人和动物)、单纯性疱疹病毒 (Herpes simplex virus)、细小病毒 (Parvoviruses) (人和动物)、巨细胞病毒 (Cytomegalovirus)、肝炎病毒、人乳头瘤病毒、甲病毒 (Alphaviruses)、黄病毒 (Flaviviruses)、布尼亚病毒 (Bunyaviruses)、狂犬病病毒、沙粒病毒 (Arenaviruses)、线状病毒 (Filoviruses)、HIV1、HIV2、HTLV-1、HTLV-II、FeLV、牛 LV、FeIV、犬瘟热病毒 (Canine distemper virus)、犬传染性肝炎病毒 (Canine contagious hepatitis virus)、猫杯状病毒 (Feline calicivirus)、猫鼻气管炎病毒 (Feline rhinotracheitis virus)、TGE 病毒 (猪) 以及口蹄疫 (Foot and mouth disease)。

[0513] 病毒抗原可以是天然的、重组的或合成的。这类病毒抗原包括但不限于负责附接至细胞表面受体以便起始感染过程的病毒蛋白质,如 (i) 逆转录病毒 (HIV、HTLV、FeLV 以及其它) 和疱疹病毒的包膜糖蛋白,以及 (ii) 流感病毒的神经氨酸酶 (neuramidase)。

[0514] 肿瘤抗原

[0515] 在本发明的一个实施方案中,受试者患有癌症或处于发展癌症的增加了的风险中。

[0516] 所谓“癌症”意指以具有侵入周围组织和/或转移至新的定殖位点能力的细胞的增殖为特征的任何不同的恶性肿瘤。癌症可以是,例如乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌或肺癌。在优选的实施方案中,所述癌症是乳腺癌。

[0517] 癌症的许多“风险因素”是完善确立的,如癌症的家族史、癌症的个人史、增殖性疾病如非典型增生的之前活组织检查检测。具体的遗传风险因素也是已知的,乳腺癌的实例包括 BRCA1、BRCA2、ATM、CHEK-2 以及 p53 突变。还可以考虑生活方式相关的风险因素。女性中乳腺癌的生活方式相关的风险因素包括延迟的分娩直到 30 岁之后和长期使用激素替代疗法。熟练的执业医师可以评估这些以及其它风险因素来确定受试者是否将受益于本发明的疫苗组合物的预防性使用。

[0518] 本发明的癌症疫苗可以包含一种或多种肿瘤相关抗原。肿瘤相关抗原可以是天然的、重组的或合成的。这类肿瘤相关抗原包括但不限于, MUC-1 及其肽片段、蛋白质 MZ2-E、多形上皮粘蛋白、叶酸结合蛋白 LK26、MAGE-1 或 MAGE-3 及其肽片段、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其肽片段、癌胚抗原 (CEA) 及其肽片段、 α 胎蛋白 (fetoprotein) (AFP) 及其肽片段、胰腺癌胚抗原及其肽片段, CA125、15-3、19-9、549、195 及其肽片段、前列腺特异性抗原 (PSA) 及其肽片段、前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 及其肽片段、鳞状细胞癌抗原 (SCCA) 及其肽片段、卵巢癌抗原 (OCA) 及其肽片段、胰腺癌相关抗原 (PaA) 及其肽片段、Her1/neu 及其肽片段、gp-100 及其肽片段、突变 K-ras 蛋白及其肽片段、突变 p53 及其肽片段、非突变 p53 及其肽片段、平截形表皮生长因子受体 (EGFR)、嵌合蛋白 p210BCR-ABL、端粒酶及其肽

片段、存活蛋白及其肽片段、Melan-A/MART-1 蛋白及其肽片段、WT1 蛋白及其肽片段、LMP2 蛋白及其肽片段、HPV E6E7 蛋白及其肽片段、HER-2/neu 蛋白及其肽片段、个体遗传型蛋白 (Idiotypic protein) 及其肽片段、NY-ESO-1 蛋白及其肽片段、PAP 蛋白及其肽片段、癌睾丸蛋白及其肽片段以及 5T4 蛋白及其肽片段。其它示例性肿瘤抗原描述于 Cheever 等人, 2009 中。

[0519] 粘蛋白

[0520] 在优选的实施方案中, 抗原是粘蛋白或其抗原片段或免疫原性突变体 / 衍生物。许多癌症伴随着人粘蛋白的过量产生。粘蛋白是由许多上皮细胞和肿瘤产生的高度糖基化的蛋白质 (大于约 100kDa)。在癌细胞上发现的粘蛋白在一些方面与正常上皮细胞上的那些不同, 不同之处在于一些粘蛋白在其碳水化合物包被 (coat) 中具有使蛋白质核心暴露的缺陷。存在 21 种形式的已知人粘蛋白, 所述粘蛋白被指定为 MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5、MUC-6 以及 MUC-7 等。MUC-1 是最普遍存在的。不同的粘蛋白都具有非常类似的特性, 即它们是跨膜糖蛋白, 都具有可变数目的重复氨基酸序列, 所述氨基酸序列具有高含量的丝氨酸、苏氨酸以及脯氨酸。异常糖基化的粘蛋白的过量产生 (非糖基化的抑或糖基化中的缺陷) 是乳腺、卵巢、胰腺、结肠、肺、前列腺的肿瘤以及其它分泌组织肿瘤的特征。对人粘蛋白 MUC-1 至 MUC-21 的对应蛋白质核心的 cDNA 序列已经进行了克隆和表征, 并且已经被发现包含不同数目的具体氨基酸基序的重复的高度重复的中心部分 (被称为 VNTR's)。作为举例, MUC-1 由通过含有四十至八十个串联安排的拷贝或二十个氨基酸基序的重复的高度重复的中心部分分开的独特氨基和羧基末端序列组成。

[0521] 在一个实施方案中, 肿瘤相关抗原是人粘蛋白 MUC-1 至 MUC-21 中的任何一个或多个, 如以上所提及, 所述人粘蛋白都包含重复的氨基酸序列的高度重复的中心部分, 所述氨基酸序列富含丝氨酸、苏氨酸以及脯氨酸。具体地说, 本发明的疫苗可以包含人粘蛋白多肽 (含有可变数目的与正常等位基因变异相关的重复), 或可以包含一个或多个人的粘蛋白的重复的序列, 优选二至八十、更优选二至二十并且甚至更优选二至十个人粘蛋白的重复的亚基。人粘蛋白及其亚基优选地是非糖基化的或异常糖基化的, 以便引起对癌细胞上发现的粘蛋白的免疫应答, 所述粘蛋白在其碳水化合物包被中具有使蛋白质核心暴露的缺陷。人粘蛋白 MUC-1 的使用是特别优选的, 但应清楚地理解, 本发明扩展至任何抗原的使用, 并且尤其扩展至人粘蛋白 MUC-1 至 MUC-21 的使用。

[0522] MUC-1 抗原可以是如 (例如) W095/108145、US6, 054, 438、US6, 222, 020、W098/50527、W001/18035、W000/63363、W095/03825、W000/06723 以及 W004/016643 中所描述的。还考虑了 W02008/011672 中所公开的源自 MUC-1T 细胞表位的肽或肽类似物的使用。

[0523] 免疫调节剂 - 碳水化合物聚合物缀合物 + 一种或多种抗原

[0524] 当所述至少一种抗原与所述免疫调节剂 - 碳水化合物聚合物缀合时, 所述至少一种抗原至 (例如) 巨噬细胞和 DC 的递送可以被增加。虽然不希望受理论限制, 但是这是最有可能的, 因为巨噬细胞和 DC 具有识别碳水化合物部分 (通常来自微生物) 并且介导吞噬作用以及胞饮作用 (在抗原呈递中涉及的两个过程) 的细胞表面受体。如此, 本发明的免疫调节剂 - 碳水化合物聚合物 - 抗原缀合物提供用于 APC 靶向的有效机制。

[0525] 在优选的实施方案中, 将所述碳水化合物聚合物在与所述至少一种抗原缀合之前用 (例如) NaIO_4 进行氧化。在一个实施方案中, 所述碳水化合物聚合物是甘露聚糖并且所述甘露聚糖的多糖链在与至少一种抗原缀合之前被氧化。所述至少一种抗原可以以与

W095/18145 中所描述的方式类似的方式与氧化的甘露聚糖缀合。还可以使用还原的甘露聚糖,并且含有这种还原的甘露聚糖的组合物可以通过将硼氢化钠或氰基硼氢化钠添加至氧化的甘露聚糖-抗原缀合物来制备。

[0526] 在一个替代的实施方案中,碳水化合物聚合物可以首先用溴化氰进行活化,并且然后使所述活化的碳水化合物聚合物与二胺反应,接着与所述至少一种抗原缀合以形成缀合物,所述缀合物然后可以任选地被氧化。

[0527] 所述碳水化合物聚合物和所述至少一种抗原可以用双功能试剂进行衍生化以使所述碳水化合物聚合物和所述至少一种抗原交联。通常使用的交联剂包括例如 1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙烷;戊二醛;N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如与 4-叠氮基水杨酸的酯;同质双官能亚氨酸酯(homobifunctional imidoester),包括二琥珀酰亚胺基酯,如 3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯);以及双官能马来酰亚胺,如双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷。如甲基-3-[(对-叠氮基-苯基)二硫代]丙亚氨酸酯的衍生化试剂产生能够在光存在下形成交联的光可活化中间体。氧化的碳水化合物聚合物可以与抗原的胍衍生物反应以便得到缀合物。可替代地,碳水化合物聚合物可以首先与试剂如羰基二咪唑反应,然后与抗原反应,并且氧化以得到缀合物。

[0528] 所述至少一种抗原与所述碳水化合物聚合物的偶联涉及使所述碳水化合物上的官能团与所述抗原上的官能团反应。碳水化合物聚合物具有很多羟基。这些基团可以根据标准化学程序进行活化。例如,羟基可以与卤化氢(如碘化氢、溴化氢以及氯化氢)反应以得到功能化的卤化多糖。羟基可以用三卤化磷、活性金属(如乙醇钠、异丙醇铝以及叔丁醇钾)进行活化,或(用基团如对甲苯磺酰氯或乙酸)酯化以形成官能团,所述官能团然后可以与多肽上的官能团反应以形成一个或多个键。

[0529] 编码抗原的核酸

[0530] 在一个实施方案中,疫苗组合物包含编码抗原的核酸。可以将多种核酸并入疫苗中以便产生多价抗原疫苗。在一个实施方案中,疫苗是 DNA 疫苗。

[0531] 至少一种核酸可以(例如)经由聚阳离子如聚-L-赖氨酸、聚乙亚胺或 PAMAM 树枝状聚合物(dendrimer)连接至碳水化合物聚合物。在一个实施方案中,氧化的甘露聚糖-聚阳离子的正电荷与带负电荷的 DNA 相互作用并且形成可以用于转染的复合物(polyplex)(Tang 等人,2008;Tang 等人,2007;Tang 等人,2009)。

[0532] DNA 接种通常涉及将编码抗原的 DNA 直接体内引入至(例如)受试者的肌肉或皮肤中用于通过所述受试者的细胞表达所述抗原。一旦 DNA 编码的抗原被转染的细胞加工和呈递,就可以引起细胞和/或体液免疫应答。DNA 疫苗描述于 US5,939,400、US6,110,898、W095/20660 以及 W093/19183 中。

[0533] 迄今为止,哺乳动物系统中的大多数 DNA 疫苗依赖于源自巨细胞病毒(CMV)的病毒启动子。这些在多种哺乳动物物种中的肌肉和皮肤接种二者中具有良好效率。已知影响由 DNA 免疫引发的免疫应答的一种因素是 DNA 递送的方法,例如,胃肠外途径可以产生低速率的基因转移并且产生相当大的基因表达变异性。使用基因枪的高速质粒接种增强了小鼠的免疫应答,大概是由于更大的 DNA 转染效率和 DC 的更有效的抗原呈递。含有本发明的基于核酸的疫苗的载体还可以通过本领域已知的其它方法引入至所需宿主,所述其他方法例如转染、电穿孔、显微注射、转导、细胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂转染(溶酶体融

合)或DNA载体转运蛋白。DNA疫苗的施用机制在以下进行更详细地描述。

[0534] 其它组分

[0535] 本发明的组合物可以包含至少一种药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”是指当施用至受试者,具体地说哺乳动物,并且更具体地说人时不会产生过敏性、毒性或另外不良反应的分子实体和组合物。药学上可接受的载体可以是固体或液体。有用的药学上可接受的载体的例子包括但不限于,不会影响本发明的活性剂的活性的稀释剂、赋形剂、溶剂、表面活性剂、悬浮剂、缓冲剂、润滑剂、媒介物、乳化剂、吸收剂、分散介质、包衣、稳定剂、保护胶体、粘合剂、增稠剂、触变剂(thixotropic agent)、渗透剂、螯合剂、等渗和吸收延迟剂。

[0536] 载体可以是任何常规使用的那些,并且仅受化学-物理考虑(如溶解度和与活性剂的反应性的缺乏)和施用途径限制。本发明的适合的载体包括常规使用的那些,例如,水、盐水、水性右旋糖、乳糖、林格氏溶液、缓冲溶液、透明质酸、二醇类、淀粉、纤维素、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、硬脂酸单甘油酯、氯化钠、甘油、丙二醇、水、乙醇等。脂质体也可以用作载体。

[0537] 还可以施用可以进一步增强本发明的化合物和组合物的免疫原性或有效性的化合物。这些化合物可以包含于本发明的组合物中或与本发明的化合物或组合物共同施用。例如,所述组合物可以包含一种或多种油(例如,完全和不完全弗氏佐剂(Freund's Complete and Incomplete))、皂苷、修饰的皂苷、脂质体、矿物质盐(例如, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$ 、二氧化硅、明矾、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、高岭土以及碳)、多核苷酸(例如,聚IC和聚AU酸)、以及某些天然物质(例如,脂质A、来自结核分枝杆菌的蜡D、以及在小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)、百日咳博德特菌以及布鲁氏杆菌属(genus *Brucella*)的成员中发现的物质)、牛血清白蛋白、白喉类毒素、破伤风类毒素、麻仁球蛋白(edestin)、匙孔-威血蓝蛋白(keyhole-limpet hemocyanin)、假单胞菌毒素A、霍乱类毒素(cholera toxin)、霍乱毒素、百日咳毒素、病毒蛋白质以及真核生物蛋白质如干扰素、白细胞介素或肿瘤坏死因子。这类蛋白质可以根据本领域的技术人员已知的方法从天然或重组来源获得。其它已知的免疫原性大分子包括多糖、tRNA,不可代谢的合成聚合物如聚乙烯胺、聚甲基丙烯酸、聚乙烯吡咯烷酮、4',4'-二氨基二苯基-甲烷-3,3'-二羧酸与4-硝基-2-氨基苯甲酸或糖脂、脂质或碳水化合物的混合的缩聚物(具有相对高的分子量)。

[0538] 施用

[0539] 本发明的化合物、组合物或疫苗可以单独地抑或与第二化合物组合通过适当的途径施用至受试者。

[0540] 在一个实施方案中,第二化合物是抗原或编码所述抗原的核酸。在一个实施方案中,免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物和抗原或编码所述抗原的核酸在不同组合物中顺序地或同时施用。在优选的实施方案中,它们在同一组合物中施用。

[0541] 免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物可以以与抗原或编码所述抗原的混合物施用,或可替代地所述免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物可以与所述抗原或与编码所述抗原的核酸缀合。

[0542] 多种施用途径是可能的,包括但不限于口服、膳食、局部、胃肠外(例如,静脉内、动脉内、肌肉内、皮内、血管内或皮下注射)以及吸入(例如,支气管内、鼻内或口服吸入、鼻

内滴剂)施用途径。

[0543] 在一个实施方案中,本发明的化合物、组合物或疫苗被施用至粘膜部位。粘膜部位的实例包括但不限于,呼吸道,如鼻区域(例如,鼻)、气管、支气管以及肺;颊或口腔组织,包括口腔(例如,口和齿龈)和口咽空腔;喉,包括扁桃体;眼睛的结膜;胃肠道(例如,食管、胃、十二指肠、小肠和大肠、结肠以及直肠)、生殖道/组织(包括但不限于,膀胱、输尿管、尿道和相关组织、阴茎、外阴/阴道和宫颈-阴道组织、以及子宫和输卵管)。

[0544] 待施用的组合物或疫苗的制剂将根据所选择的施用途径而变化(例如,溶液、乳液、胶囊)。

[0545] 例如,免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物可以以约 0.0001%至约 20%(除非另外指明,本文所提供的所有百分比是相对于总制剂的重量/重量)的制剂施用至受试者。在一个实施方案中,免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物以包含约 0.01%至约 1%的所述缀合物的制剂,例如包含约 0.1%至约 0.5%的所述缀合物的制剂施用至受试者。

[0546] 本发明的化合物可以在生理学上可接受的载体中制备。对于溶液或乳液来说,适合的载体包括水或醇的溶液/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏(lactated Ringer's)或非挥发油。静脉内载体包括各种添加剂、防腐剂或流体、营养素或电解质补充剂等(通常参见,Remington's Pharmaceutical Sciences,1985)。对于吸入来说,可溶性组合物或疫苗可以被负载至用于施用的适合的分配器(例如,喷雾器、雾化器或加压的气溶胶分配器)中。

[0547] 核酸可以通过并入至逆转录病毒、腺病毒或其它适合的载体或各种其它基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物中、以及通过使用有助于递送“裸”多核苷酸的技术(如电穿孔或“基因枪”递送)来直接地递送至细胞。可替代地,核酸可以引入至能够表达用于递送的蛋白质的宿主细胞中。这些转染的或转化的细胞然后可以以有效于表达治疗有效量的抗原的量植入(单独地或在屏障装置中)、注射或以另外的方式引入。

[0548] 在一个替代实施方案中,抗原呈递细胞(例如巨噬细胞和/或 DC)可以与本发明的化合物或组合物体外或离体接触以便实现负载抗原,并且然后施用至受试者。在一个实施方案中,抗原呈递细胞来源于受试者或自体供体并且离体负载有抗原。例如,血液可以取自受试者或自体供体并且通过密度梯度离心针对外周血液单核细胞(PBMC)进行富集,接着粘附至塑料表面以便富集单核细胞。粘附细胞然后可以与细胞因子混合物一起培养以便诱导分化成(例如)未成熟的 DC,并且所得到的未成熟的 DC 可以与疫苗抗原和免疫调节剂-碳水化合物聚合物相接触,或可替代地用编码所述抗原的核酸进行转染。所得到的成熟/活化的 DC 制备物(即,具有上调的共刺激分子 CD40、CD80 以及 CD86)的等分部分(例如,深低温保藏的等分部分)然后可以按照方案定义的时间表通过(例如)一次或多次皮内注射施用至受试者。

[0549] 本发明的化合物、组合物或疫苗的施用可以是单一或多事件,或可以是引发-加强方案的一部分,这些、或这些中的每一个与其它常规施用/接种方法的组合。引发-加强方案可以(例如)包括通过(例如)肌肉内、皮内、血管内、皮下或静脉内施用来引发,和通过(例如)鼻内、肌肉内、皮内、血管内、皮下或静脉内施用来加强。引发和加强组合物中的一者或二者可以包含抗原或编码所述抗原的核酸和免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物。引发组合物和加强组合物中的一者可以省略免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物。

[0550] 对于具体应用有效的免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物的量和施用频率将根据本领域已知的因素而变化,所述因素包括但不限于,所述免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物(例如,免疫调节剂部分和/或碳水化合物聚合物)的物理和化学性质、载体的性质、预期的剂量方案、受试者的免疫系统的状态(例如,抑制的、受损的、刺激的)、施用所述免疫调节剂缀合物的方法以及正在向其施用所述制剂的物种。因此,总体上列出对于所有可能的应用有效的免疫调节剂缀合物的量是不切实际的。量和频率可以由主治医师或兽医决定。

[0551] 施用有效量的组合物。“有效量”是在施用条件下足以实现所需的免疫调节作用的量。

[0552] 作为举例,约 100ng/kg 至约 50mg/kg 免疫调节剂可以被施用至受试者,优选约 10 μg/kg 至约 5mg/kg、更优选约 100 μg/kg 至约 1mg/kg。

[0553] 作为举例,约 100ng/kg 至约 50mg/kg 碳水化合物聚合物可以被施用至受试者,优选约 10 μg/kg 至约 10mg/kg。甚至更优选地,考虑约 1mg/kg 至约 10mg/kg 碳水化合物的剂量,尤其是用于人。

[0554] 作为举例,约 1 μg/kg 至约 10,000 μg/kg 抗原可以被施用至受试者,优选约 5 μg/kg 至约 5000 μg/kg、更优选约 8 μg/kg 至约 1000 μg/kg、并且最优选约 400 μg/kg 至约 600 μg/kg。甚至更优选地,考虑约 100 μg/kg 至约 200 μg/kg 抗原的剂量,尤其是用于人。

[0555] 可替代地,可以使用就在开始治疗过程之前所获得的实际体重来计算剂量。对于以这种方式计算的剂量来说,在开始治疗过程之前使用杜博瓦方法(Dubois method): $m^2 = (\text{重量 kg}^{0.425} \times \text{高度 cm}^{0.725}) \times 0.007184$ 来计算身体表面积(m^2)。在一个实施方案中,免疫调节剂是以(例如)约 0.01mg/ m^2 至约 10mg/ m^2 的剂量施用至受试者。

[0556] 本发明的化合物、组合物以及疫苗还可以与其它免疫应答修饰剂结合施用至受试者,所述免疫应答修饰剂例如细胞因子、HLA II 类蛋白质结合辅助分子、CD40 激动剂、检查点受体的拮抗剂(例如,CTLA-4、PD-1、Stat3)、B7 共刺激分子、Flt3 激动剂以及 CD40L 激动剂。

[0557] HLA II 类蛋白质结合辅助分子的存在有效于刺激辅助($CD4^+$)T 细胞。HLA II 类蛋白质结合辅助分子可以是任何本领域的技术人员熟知的那些,包括例如,匙孔血蓝蛋白(KLH)、破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素或更小 T 细胞辅助表位(如 PADRE 肽)及其组合。

[0558] 还可以施用可以进一步增强本发明的化合物或组合物的免疫原性或有效性的化合物。

[0559] 本发明的化合物和组合物还可以与其它免疫治疗策略(例如,化学疗法)组合使用,其中受试者患有癌症并且疫苗是癌症疫苗。

[0560] 可以通过施用免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物治疗的病状包括,但不限于:

[0561] (a) 病毒性疾病,例如像由以下病毒感染引起的疾病:腺病毒、疱疹病毒(例如,HSV-I、HSV-II、CMV 或 VZV)、痘病毒(例如,正痘病毒如天花或牛痘,或传染性软疣)、细小核糖核酸病毒(例如,鼻病毒或肠道病毒)、正粘病毒(例如,流感病毒)、副粘病毒(例如,副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒以及呼吸道合胞病毒(RSV))、冠状病毒(例如, SARS)、乳多空病毒(例如,乳头瘤病毒,如引起生殖疣、普通疣或足底疣的那些)、嗜肝 DNA 病毒(例

如,乙型肝炎病毒)、黄病毒(例如,丙型肝炎病毒或登革热病毒)或逆转录病毒(例如,慢病毒如 HIV);

[0562] (b) 细菌性疾病,例如像由以下的细菌感染引起的疾病:例如,埃希氏菌属(genus *Escherichia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、志贺氏杆菌属(*Shigella*)、利斯特氏菌属(*Listeria*)、气杆菌属(*Aerobacter*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、克雷白氏杆菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链球菌属(*Streptococcus*)、衣原体、支原体、肺炎球菌、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、梭菌属(*Clostridium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、弧菌属(*Vibrio*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、普罗威登斯菌属(*Providencia*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)、布鲁氏杆菌属(*Brucella*)、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)或博德特氏菌属(*Bordetella*);

[0563] (c) 其它感染性疾病,如衣原体、真菌性疾病,包括但不限于念珠菌病(*candidiasis*)、曲霉菌病(*aspergillosis*)、组织胞浆菌病(*histoplasmosis*)、隐球菌性脑膜炎(*cryptococcal meningitis*);或寄生性疾病,包括但不限于疟疾,卡氏肺孢子虫肺炎(*pneumocystis carinii pneumonia*)、利什曼病(*leishmaniasis*)、隐孢子虫病(*cryptosporidiosis*)、弓形虫病(*toxoplasmosis*)以及锥虫感染;

[0564] (d) 肿瘤性疾病,如上皮内瘤变、宫颈发育异常、光化性角化症、基底细胞癌、鳞状细胞癌、肾细胞癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、黑素瘤;白血病,包括但不限于:粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、皮肤 T-细胞淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤以及毛细胞性白血病;乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌以及其它癌症;

[0565] (e) Th2-介导的特应性疾病,如特应性皮炎或湿疹、嗜酸粒细胞增多、哮喘、过敏症、过敏性鼻炎以及 Ommen's 综合征;

[0566] (f) 某些自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、特发性血小板增多症、多发性硬化症、盘状狼疮、斑秃;以及

[0567] (g) 与伤口修复相关的疾病,例如像瘢痕疙瘩形成和其它类型的瘢痕的抑制(例如,增强伤口愈合,包括慢性伤口)。

[0568] 免疫调节剂-碳水化合物聚合物缀合物还可以适用于具有受损的免疫功能的个体。例如,某些缀合物可以用于治疗(例如)移植患者、癌症患者以及 HIV 患者中在细胞介导的免疫抑制之后发生的机会性感染和肿瘤。

[0569] 核酸至细胞的递送

[0570] 在一个实施方案中,本发明涉及一种用于将核酸递送至细胞的化合物或组合物。至少一种核酸可以经由聚阳离子与碳水化合物聚合物缀合。

[0571] 在一个实施方案中,核酸编码抗原。

[0572] 术语“核酸”与呈所有其形式的 DNA、RNA 以及多核苷酸同义,即单链和双链 DNA、cDNA、mRNA、siRNA 等。

[0573] 核酸递送至受试者的手段包括所述核酸的直接递送和用所述核酸转染或转化的细胞的递送。细胞或核酸可以(例如)通过注射、导管插入术或内窥镜检查术直接地递送至所需的器官或肿瘤。它们还可以静脉内、支气管内、肿瘤内、鞘内、肌肉内、眼内、局部、皮

下、经皮或经口递送。

[0574] 核酸递送媒介物的实例是脂质体、生物相容性聚合物（包括天然聚合物和合成聚合物）、脂蛋白、多肽、多糖、脂多糖、人工病毒包膜、金属颗粒、以及细菌、病毒（如杆状病毒、腺病毒以及逆转录病毒）、噬菌体、粘粒、质粒、真菌载体以及通常用于本领域中的其它重组媒介物，所述重组媒介物已经被描述用于在多种真核宿主和原核宿主中表达，并且可以用于基因疗法、遗传接种（例如，DNA 接种）、以及用于单纯蛋白质表达。

[0575] 如本文所用，“载体”是指用于将异源核酸引入至用于其表达抑或复制的细胞中的离散元件。例如，载体可以是人工染色体、质粒、粘粒、噬菌体或病毒，并且可能能够稳定稳定整合至宿主细胞基因组中，或它可能作为独立的遗传元件（例如，附加体、质粒）存在。载体可以作为单个多核苷酸或作为两个或更多个单独的多核苷酸存在。当存在于宿主细胞中时，载体可以是单拷贝载体或多拷贝载体。用于本发明中的优选的载体是表达载体，其中一个或多个功能性基因可以以适当的定向并且邻近表达控制元件插入至所述载体中，以便在宿主细胞中直接表达一种或多种蛋白质。

[0576] 术语“控制元件”是指在具体宿主细胞中表达可操作地连接的核苷酸编码序列所需的核酸序列。适合用于在原核生物中表达的控制序列（例如）包括复制起点、启动子、核糖体结合位点以及转录终止位点。适合用于在真核生物中表达的控制序列（例如）包括复制起点、启动子、核糖体结合位点、多腺苷酸化信号以及增强子。

[0577] “启动子”指导核酸的转录。如本文中所用，“启动子”包括转录起始位点附近的必需核酸序列，在 II 型聚合酶启动子的情况下如 TATA 元件。

[0578] 启动子还任选地包括远端的“增强子或抑制子元件”，其可以位于离转录起始位点远至数千碱基对的位置。启动子可以是同源的抑或异源的。“组成型”启动子是在大多数环境和发育条件下在所选择的生物体中具活性的启动子。“诱导型”启动子是在所选择的生物体中在环境或发育调控下的启动子。

[0579] 载体可以是病毒或非病毒载体，包括腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体以及质粒载体。病毒的示例性类型包括 HSV（单纯性疱疹病毒）、腺病毒、AAV（腺相关病毒）、HIV（人免疫缺陷病毒）、BIV（牛免疫缺陷病毒）以及 MLV（鼠白血病病毒）。核酸可以以提供充分有效的递送水平的任何所需的形式施用，包括以病毒颗粒、脂质体、纳米颗粒的形式以及复合到聚合物。如本文所用，基因递送、基因转移等是提及核酸（有时被称为“转基因”）引入至宿主细胞中的术语，而不管用于引入的方法。这类方法包括多种已知技术，如载体-介导的基因转移（通过，例如，病毒感染/转染，或各种其它基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物）以及有助于“裸”多聚核苷酸的递送的技术（如电穿孔、“基因枪”递送以及用于引入核酸的各种其它技术）。所引入的多核苷酸可以稳定地或短暂地维持在宿主细胞中。稳定维持通常要求所引入的多核苷酸包含与宿主细胞相容的复制起点抑或整合至宿主细胞的复制子如染色体外复制子（例如质粒）或核或线粒体染色体中。多种载体已知能够介导基因转移至哺乳动物细胞，如本领域已知和本文所描述的。

实施例

[0580] 实施例 1：材料和方法

[0581] 培养基与化学品

[0582] 完全 RPMI-1640 培养基通过补充 2% HEPES、0.1mM 2-巯基乙醇、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM 谷氨酰胺以及 10% (v/v) 胎牛血清来制备。用于培养 DC 的重组 GM-CSF 购自 BD-Pharmingen (San Diego, USA) 并且在 PBS 中进行复水。脂多糖 (LPS) (L3137, Sigma, Castle Hill Australia) 在无菌蒸馏水中进行复水。抗-CD11c-APC 购自 BD Pharmingen (San Diego, CA)。抗-CD40、CD80 以及 CD86 抗体是内部制备的。甘露聚糖、 NaIO_4 、ANTS、乙烷-1, 2-二醇购自 Sigma。

[0583] 在这些研究中使用的甘露聚糖来自面包酵母 (酿酒酵母)。甘露聚糖具有 50 至 >1,000kDa 范围的不同分子量的富含非常不均匀并入的甘露糖的多糖。

[0584] 分级分离方法

[0585] 将于双重蒸馏水 (DDW) 中的 20mg/ml 甘露聚糖 (Sigma) 添加至 20ml 300kDa MWC0 Vivaspin 浓缩器 (Sartorius), 在 2500rpm 下离心 15 至 20 分钟并且浓缩至 1 至 2ml (图 1)。将浓缩器重新填充直到整个样品被添加。需要几次旋转。收集滤液并且进行 2 次 DDW 洗涤但丢弃。浓缩的部分 (滞留物) 是 >300kDa 部分。然后将滤液施加至 15ml 100kDa MWC0 Amicon 旋转浓缩器 (Millipore) 并且如之前详述的进行。然后将甘露聚糖使用 2x15ml 50kDa MWC0 Amicon 旋转浓缩器 (Millipore)、接着 2x15ml 30kDa MWC0 Amicon 旋转浓缩器 (Millipore) 顺序地分级分离。这样产生 >300、100 至 300、50 至 100、30 至 50 以及 <30kDa 的部分。将滞留物部分和最终滤液冷冻干燥成白色松散粉末, 除了为胶状并且不使用的 <30kDa 部分之外。将样品进行称重并且记录回收率。

[0586] 在之后分级分离运行中, 来自 Sartorius 的 2x20ml 1000kDa MWC0 Vivaspin 的浓缩器用作第一分级分离步骤、接着如以上所提及的其它浓缩器的顺序。这样产生 >1000、300 至 1000、100 至 300、50 至 100、30 至 50 以及 <30kDa 的部分。

[0587] 如之前, 将滞留物部分和最终滤液冷冻干燥成白色松散粉末, 并且不使用 <30kDa 部分。将样品进行称重并且记录回收率。在一些运行中, 不存在 300 至 1000kDa 部分中的粉末并且因此在那些运行中特定部分不用于分析。

[0588] 使用 PDPH 定量方法定量甘露聚糖中的醛残基

[0589] 用于定量氧化的甘露聚糖中醛基的数目的方法在图 2 中示意性地示出。使用相同摩尔浓度的 NaIO_4 , 这样使得氧化的程度将取决于甘露聚糖的分子量。将于 0.1M 磷酸盐 (pH 6.0) 缓冲液中的甘露聚糖和甘露聚糖部分 1.4mg/0.1ml 用 0.01M NaIO_4 进行氧化并且允许在黑暗中的冰上反应 1 小时。将反应用 10 μ l 乙烷-1, 2-二醇淬灭并且允许反应另外 1/2 小时, 之后通过具有 0.1M 乙酸盐缓冲液 (pH 4.8) 的 PD10 柱。

[0590] 将 0.7mg/ml 的 2ml 氧化的甘露聚糖中的 1ml 与 0.1mg PDPH 反应, 在室温下旋转过夜, 之后通过具有 DDW 的 PD10。醛基的数目可以通过与 0.01MDTT 反应 15 分钟并且读取在 OD_{343nm} 下的吸光度来确定。这样释放 2-吡啶, 所述 2-吡啶指示醛基 (图 2)。

[0591] 醛残基的数目

[0592] = 2-吡啶硫酮的浓度 (M) / 甘露聚糖的浓度 (M)

[0593] = $[\text{OD}_{343}/8080] / [\text{甘露聚糖的浓度 (mg/ml)} / \text{甘露聚糖的分子量}]$ 。

[0594] 用于不同部分的平均分子量是: 全甘露聚糖 = 500kDa、>1,000 = 1000kDa、>300 = 650kDa、100 至 300 = 200kDa、50 至 100 = 75kDa、30 至 50 = 40kDa。

[0595] 用 ANTS 化学修饰甘露聚糖和定量

[0596] 用 ANTS 化学修饰氧化的甘露聚糖在图 3 中示意性地示出。将于 0.1M 磷酸盐 (pH6.0) 缓冲液中的甘露聚糖和甘露聚糖部分 1.4mg/0.1ml 用 0.01M NaIO_4 进行氧化并且允许在黑暗中的冰上反应 1 小时。将反应用乙烷-1,2-二醇淬灭并且允许反应另外 1/2 小时,之后通过具有 0.1M 乙酸盐缓冲液 (pH4.8) 的 PD10 柱。

[0597] 将 0.7mg/ml 的氧化的甘露聚糖中的 1ml、>300kDa、100 至 300kDa、50 至 100kDa 以及 30-50kDa 部分分别在 3/17 乙酸/DDW 中与 0.288、0.184、0.598、1.59 以及 2.99mg ANTS(x400 过量)反应。添加氰基硼氢化钠 (50 μl , 1M;Sigma) 并且使反应在室温下旋转过夜,之后通过具有 DDW 的 PD10。在激发 405nm 发射 520nm 下针对 ANTS 标准读取 ANTS 缀合物的荧光。

[0598] 用于定量甘露糖残基的间苯二酚测定

[0599] 使用间苯二酚测定对甘露聚糖和甘露聚糖部分进行定量 (Monsigny 等人,1988)。甘露糖用作标准。在 OD450nm(因为不存在 430 或 480nm) 下的吸光度下读取板。

[0600] 抗原与甘露聚糖的缀合

[0601] 蛋白质与氧化的甘露聚糖的缀合在图 4 中示意性地示出。将于 0.1M 磷酸盐 (pH6.0) 中的 14mg/ml 下的甘露聚糖和 >1000kDa、300 至 1000kDa(或在早期运行中 >300)、100 至 300kDa、50 至 100kDa、30 至 50kDa 的部分(除在 14mg/0.5ml 下的 30 至 50 部分)用分别添加 0.1M NaIO_4 100、77、250、600 μl 以及 1.25ml 进行氧化并且补足至 1.6ml 的最终体积。

[0602] 将混合物在黑暗中的冰上放置 1 小时,用乙烷-1,2-二醇淬灭并且进一步如之前反应 1/2 小时。将缀合物在用 0.05M 碳酸氢盐 (pH9.0) 预先平衡的 PD10 柱 (GE Biosciences) 上进行分离以便去除未反应的材料和副产物。这涉及使 1.6ml 样品、接着 0.9ml 缓冲液通过所述柱并且丢弃。收集接下来 2ml 并且将 1ml 的氧化的甘露聚糖或部分分别与计算量的 0.35、0.3、0.495、0.735 以及 0.59mg 的 FP 和 OVA 反应。将缀合物在室温下孵育过夜并且在 4%至 12%或 4%至 20% SDS-PAGE 凝胶上进行分离以便核实成功的缀合。良好缀合通过模糊的并且缺乏清楚的蛋白质条带指示。

[0603] 对于体内研究中所使用的最终 >1000MFP 缀合物来说,将 0.7mgFP (5.45mg/ml, 128 μl) 与 2ml 氧化的甘露聚糖反应。类似地,对于 >1000ManRSVg 缀合物来说,将 0.25mg RSVg (0.37mg/ml, 367 μl) 与 2ml 氧化的甘露聚糖反应。

[0604] >1000MFP 中的甘露聚糖的摩尔浓度是 MFP 中的甘露聚糖的摩尔病毒的二分之一,因此 10 μg FP 用于体内免疫原性研究中。

[0605] 非变性和变性凝胶电泳

[0606] 将甘露聚糖和部分在 SDS-PAGE 或非变性凝胶上可视化。将预制 (PAGE 凝胶) SDS4%至 12%或 4%至 20%梯度凝胶 (PAGE 凝胶) 在 1xMOPS SDS 运行缓冲液中运行。可替代地,使用由在 0.063M Tris-HCl (pH6.8) 中制成的 5%浓缩胶和在 TBE 中制成的分离胶组成的 12%非变性凝胶(碱性条件)。电泳在 TBE 加 0.19M 甘氨酸中进行 (Sharma 等人, 2003)。

[0607] 考马斯染色和 PAS 染色分别用于染色蛋白质和糖的凝胶。

[0608] 通过光密度测定法的甘露聚糖部分的分子量确定

[0609] 将甘露聚糖部分如以上用 NaIO_4 进行氧化并且用 ANTS 进行标记。将 ANTS 标记的

甘露聚糖的样品在 PAS 染色之后通过 SDS-PAGE 进行分析。使用 Quantity One (Bio-Rad) 软件通过光密度测定法对干燥的凝胶进行扫描和分析。

[0610] 来源于骨髓的树突细胞的产生

[0611] 如之前所描述的产生鼠 DC (Apostolopoulos 等人, 2006)。简言之, 从股骨和胫骨的腔提取骨髓细胞。然后将骨髓细胞在 37°C 下用无菌 0.73% (w/v) NH_4Cl 处理 10 分钟以便溶解红细胞。将细胞洗涤并且再悬浮于补充有 10 ng/ml 的 GM-CSF 的完全培养基中 (2×10^6 个细胞 / 3 ml)。将这些细胞在 24 孔板中 (1 ml / 孔) 培养 4 天。通过轻轻地吸移培养基来收获细胞。GM-CSF 培养的骨髓细胞产生为有效的混合淋巴细胞反应 (MLR) 刺激细胞的大量 MHC II 类表达 DC。

[0612] 体外树突细胞成熟研究

[0613] 来自 C57BL/6 小鼠的 DC 用于成熟研究中。从培养板去除树突细胞并且将 1×10^5 个 DC 再悬浮于补充有 10 ng/ml GM-CSF 的 150 μl 完全 RPMI 中并且接种至 48 孔板中。添加甘露聚糖和不同甘露聚糖部分, 这样使得 800、400 以及 200 $\mu\text{g/ml}$ 的最终浓度添加至孔。LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 用作阳性对照并且也添加至对应孔中并且在 37°C 下孵育 18 小时。收获细胞并且将细胞用与异硫氰酸荧光素 (FITC) 缀合的抗 -CD11c-APC 连同抗 -CD86、抗 -CD40 或抗 -CD80 进行染色。将 CD11c⁺ 细胞进行门控 (gate) 并且通过直方图分析来确定 FITC 的强度以便确定 DC 成熟状态。

[0614] 体内小鼠免疫原性研究

[0615] 小鼠和免疫

[0616] HLA-A2/K^b 小鼠购自 Animal Resources Centre, Perth, Australia。为了确定由 MFP、>1000MFP 以及未缀合的 FP 诱导的效应子免疫应答, 将 HLA-A2/K^b 小鼠在第 0 天、第 10 天以及第 17 天以 100 μl 的体积在尾根部中进行皮内免疫, 并且使用 ELISpot 测定在 10 至 14 天之后评估免疫应答。对小鼠在第 2 和第 3 次注射之后进行抽血并且通过 ELISA 测定检测 MUC1- 特异性总 Ig、IgG2a 以及 IgG1。

[0617] 体内抗原特异性 T 细胞应答

[0618] 分离来自免疫的 HLA-A2/K^b 小鼠的脾细胞并且通过 ELISpot 针对抗原特异性 IFN- γ 分泌进行评估。将混合的乙酸酯板 (MAIP Millipore) 用抗小鼠 IFN- γ (AN18, 5 $\mu\text{g/ml}$, Mabtech, Germany) 进行包被过夜。添加 5×10^5 个脾细胞 / 孔并且在 MUC-FP (20 $\mu\text{g/ml}$) 存在下在 10% FCS RPMI 1640 培养基中孵育 18 小时。将 ConA (1 $\mu\text{g/ml}$) 或单独细胞分别用作阳性对照和阴性对照将细胞丢弃并且在洗涤 (0.05% Tween20/PBS) 之后, 持续 2 小时添加抗小鼠 IFN- γ 抗体 - 生物素 (R4-6A2, Mabtech, CA, USA), 接着在室温下持续 2 小时添加 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 的 extravidin- 碱性磷酸酶 (Sigma, UK)。使用比色 AP 试剂盒 (Biorad, Hercules, CA, USA) 检测活性斑点。将细胞因子斑点用 AID ELISpot 读数器系统 (Autoimmun Diagnostika GmbH, Germany) 进行计数。数据表示为平均斑点形成单位 (SFU) 每 0.5×10^6 个细胞 $\pm$ 平均值 (SD) 的标准偏差。

[0619] 连接至 >1000kDa 氧化的甘露聚糖的蛋白质抗原的人体外免疫原性研究

[0620] 蛋白质 / 肽抗原

[0621] MART-1 蛋白质购自 Biovision, USA。如 Apostolopoulos 等人 (1993) 中所描述的来制备 GST-MUC1-VNTR (FP)。在 pTrcB 载体 (Invitrogen) (Loveland 等人,

2006) 中内部制备 His 标记的 MUC1-VNTR(pTrec)。由 Genscript, USA 合成对 Melan-A/MART-1 [EAAGIGILTV (天然) (SEQ ID NO:1), ELAGIGILTV (类似物) (SEQ ID NO:2)] 特异的 HLA-A2 表位肽。

[0622] GST-MUC1-VNTR(FP)、MUC1-VNTR(pTrec) 以及 MART-1 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖的缀合

[0623] 如以上所描述来进行抗原与高碘酸盐 >1000kDa 氧化的甘露聚糖的缀合。>1000kDa 氧化的甘露聚糖与抗原的比例是 40:1。

[0624] 肽特异性 CD8T 细胞的产生

[0625] 使用 Ficol1-Paque PLUS (GE Healthcare) 经由密度梯度离心从血沉棕黄层分离 PBMC。通过流式细胞术评估 HLA-A2 状态。将 PBMC 以 5×10^6 /ml 下再悬浮于完全 AB 培养基 (RPMI1640、10% AB 血清、Pen/Strep、HEPES、L-GLUT、NEAA、丙酮酸钠 (Invitrogen)、2- 巯基乙醇) 中并且在 24 孔板中用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 MART-1 类似物肽 (ELAGIGILTV) (SEQ ID NO:2) 和 $3 \mu\text{g/ml}$ R848 (InvivoGen) 进行刺激。三天之后, 添加补充有 50U/ml IL-2 (R&D 系统)、20ng/ml IL-15 以及 20ng/ml IL-7 (PeproTech) 的另外 1ml 完全 AB 培养基。在初始引发之后七至十天, 将细胞用以 $2 \mu\text{g/ml}$ FMP 或 $10 \mu\text{g/ml}$ MART1 类似物肽 (ELA) 进行脉冲的辐射处理的自体 PBMC (1:100) 进行再刺激。在第二天, 将 1ml 上清液换成含有 25U/ml IL-2 的完全 AB 培养基。每 3 至 4 天如此重复。

[0626] 通过 FACS 分选来产生 MART-1- 特异性 T 细胞克隆。在与用肽脉冲的辐射处理的 (6000cGy) T2 细胞孵育 4 小时之后, 使用 FACS Aria 来分选对 ELAGIGILTV 肽 (SEQ ID NO:2) 特异的分泌 IFN γ 的细胞。使用根据制造商的方案进行的 IFN γ 分泌和检测测定 (Miltenyi Biotech) 来鉴定分泌 IFN γ 的细胞。

[0627] 引发蛋白质抗原特异性 T 细胞应答

[0628] 使用 CD14 微珠粒 (Miltenyi Biotech) 通过 AutoMACS 分离从 PBMC 纯化单核细胞。通过在 T75 烧瓶中在含有 50ng/ml GM-CSF 和 20ng/ml IL-4 (R&D 系统) 的完全 FCS 培养基 (RPMI1640+10% FCS+L-GLUT、Pen/Strep、HEPES、非必需氨基酸、丙酮酸钠、2- 巯基乙醇) 中培养单核细胞 (5×10^5 /ml) 5 至 6 天来产生来源于单核细胞的树突细胞 (MoDC)。

[0629] 将于完全 AB 培养基中的 2×10^5 /ml (1:20 MoDC:T 细胞) 的 MoDC 添加至 24 孔板 (每测试条件 1ml), 接着添加蛋白质或 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物 (10 至 $20 \mu\text{g/ml}$)。四小时之后, 将在 1ml 完全 AB 培养基中的 4×10^6 个 CD14 耗尽的 PBMC 添加至所述孔。在 3 天之后, 添加 25U/ml IL-2、10ng/ml IL-7 以及 10ng/ml IL-15。将 T 细胞在 7 至 10 天之后用负载有抗原的 1×10^5 个 MoDC 进行再刺激。在再刺激之后二十四小时, 将培养物用 25U/ml IL-2 进行补充并且在 3 至 4 天之后再次补充。通常在 1 或 2 次再刺激之后对 T 细胞培养物进行分析。

[0630] 抗原特异性 T 细胞应答的分析

[0631] 对于 T 细胞表位肽来说, 通过在具有 $1.25 \mu\text{g/ml}$ β 2- 微球蛋白的无血清培养基中用不相关的肽 (例如, CAP-110 $\mu\text{g/ml}$ 或无肽) 和具有目标肽 ($5 \mu\text{g/ml}$) 的一种肽脉冲 1 小时来制备肽负载的 T2 细胞 (2×10^5 个/孔)。将 T2 细胞以 $100 \mu\text{l}$ 中的约 1:5 比例 (4×10^4 个/孔) 添加至重复的 T 细胞孔并且在 37°C 5% CO_2 下孵育 1 小时。添加含有 Golgi-Stop (每 $200 \mu\text{l}$ T 细胞/MoDC 共培养物 $0.1 \mu\text{l}$) 的 $50 \mu\text{l}$ 培养基并且将细胞在 37°C 5% CO_2 下孵育

另外 3 至 4 小时。

[0632] 对于蛋白质抗原和缀合物来说,将抗原或 >1000kDa 甘露聚糖缀合物 (20 μ g/ml) 添加至于 75 至 100 μ l 完全培养基中的含有 2×10^4 个 MoDC/ 孔 (自体的或 A2 匹配的) 的 v 形底部 96 孔聚簇板并且孵育 2 小时。将于 75 至 100 μ l 完全培养基中的 2×10^5 个刺激的 T 细胞添加至各孔并且将细胞在 37°C 5% CO₂ 下孵育 15 至 16 小时。添加含有 Golgi-Stop (每 200 μ l T 细胞 /MoDC 共培养物 0.1 μ l) 的 50 μ l 培养基并且将细胞在 37°C 5% CO₂ 下孵育另外 4 至 5 小时。

[0633] 细胞内干扰素- γ (IFN γ) 应答的分析

[0634] 将细胞针对表面标志物 CD8 和 CD4 进行染色、固定并且透化,然后用 Cytofix/CytoPerm 试剂盒 (BD) 使用 CD4APC-Cy7、CD8FITC 以及 IFN γ PE-Cy7 (BD) 针对细胞内 IFN γ 的积聚进行染色。通过流式细胞术来鉴定抗原特异性 T 细胞,从而在目标肽 / 蛋白质存在下将 IFN γ +CD4 和 CD8T 细胞与不相关的肽 / 蛋白质对照进行比较。

[0635] 来自新鲜血液的外周血单核细胞 (PBMC) 的分离

[0636] 从健康志愿者收集新鲜血液并且储存在肝素钠管中。随后将 15mL 血液转移至 50ml 离心管并且与相等体积的 DPBS 轻轻混合。将 10ml Ficol1 使用移液管缓慢地放在底部。将管在 800g 下在室温下在无中断情况下离心 30 分钟。将血沉棕黄层 (含有 PBMC) 在血清与 Ficol1 之间的界面处吸出。将 PBMC 用足够的 DPBS 进行洗涤并且在 900g 下离心以去除 Ficol1。将 RPMI-1640 培养基添加至所收集的 PBMC 并且通过计数来确定 PBMC 的数目。1ml 血液通常产生至少 1 百万个 PBMC。

[0637] 用于测量 IL-6 的细胞因子释放测定

[0638] 将 PBMC 进行计数并且调整细胞密度。将 100 μ l 细胞添加至所要求数目的孔中,这样使得 IL-6 测定的细胞密度是 5,000 个 / 孔。将用于筛选的 LD1- 氧化的甘露聚糖缀合物在 DMSO 中进行连续稀释。将 LD1 溶液添加至各孔 (测定中 DMSO 的最终浓度不超过 0.03%)。将板在 CO₂ 孵育箱中在 37°C 下进行孵育并且在第 6 小时和第 24 小时收集上清液。在每个收集时间点,将板在 900rpm 下离心 4 分钟并且将上清液转移至另一个 96 孔板。将这些进行标记并且储存在 -80°C 下。用于 IL-6 的 ELISA 试剂盒 (Invitrogen) 用于定量所释放的细胞因子。如制造商的说明书中所描述的来进行 ELISA。通过 FlexStation3 来测量吸光度。在每个时间绘制每个细胞因子的标准曲线用于分析数据。

[0639] 实施例 2 :甘露聚糖的分级分离

[0640] 起初,将甘露聚糖顺序地通过如在材料和方法中所描述的膜以便分离 >300kDa、100 至 300kDa、50 至 100kDa、30 至 50kDa、4 至 30kDa 甘露聚糖部分。随后,分离甘露聚糖部分 >1000kDa、100 至 300kDa、50 至 100kDa 以及 30 至 50kDa。4 至 30kDa 部分像胶样残基,因此不包括在随后研究中。

[0641] 通过使已知体积的已知浓度下的甘露聚糖通过 300kDa、100kDa、50kDa、30kDa 膜顺序地分级分离来进行分离 (图 1)。来自每个膜的流过流和洗涤液通过下一个膜。所有分离在水中进行,并且最后将所有样品冻干并且记录白色粉末的重量 (表 2)。

[0642] 表 2 :显示回收各种部分的分级分离运行和氧化的甘露聚糖上的醛残基的代表性样品

[0643]

运行5	240mg	甘露聚糖	>300	100-300	50-100	30-50	<30		
	回收%		11.2	7.2	17.2	16.08	7.2		58.88
	醛残基	113	135	113	30.7	15.9			
		112	135	63	31	16			
运行6	480 mg								
	回收%		8.75	8.89	5.3	7.8ND			30.74
	醛残基	74	84	38	21	11			
运行7	960 mg								
	回收%		6	8.5	10.3	7.2ND			32
	醛残基	73	82	35	19	9			

[0644] 如在方法中所描述,在与 0.01M NaIO_4 反应之后针对所产生的醛残基对不同部分进行分析。如表 2 中所示,全甘露聚糖、>300kDa、100 至 300kDa、50 至 100kDa 以及 30 至 50kDa 部分分别产生 73、82、35、19 以及 9 个醛残基(例如,运行 7)。

[0645] 实施例 3:不同甘露聚糖部分与甘露糖受体的结合

[0646] Huh-7 细胞是表达甘露糖受体的人肝细胞癌细胞。甘露糖-BSA 已知结合甘露糖受体并且被包括作为这些研究中的阳性对照。将全甘露聚糖和不同部分用 FITC 进行标记并且通过流式细胞术观察与 huh-7 细胞的结合(图 5)。

[0647] 全甘露聚糖和所有部分以剂量依赖性方式结合 huh-7 细胞。因此,不管大小,所有甘露聚糖部分结合甘露糖受体或其它甘露糖结合凝集素。

[0648] 实施例 4:通过甘露聚糖和甘露聚糖的不同部分活化 BMDC

[0649] 为了确定甘露聚糖的不同部分是否活化 BMDC 并且任何部分是否优于全甘露聚糖,将部分与 DC 在不同剂量下孵育并且孵育不同的时间,并且通过流式细胞术来监测成熟标志物 CD40、CD80 以及 CD86(图 6)。如图 6 中所示,所有部分以剂量和时间依赖性方式活化 DC。>300kDa 部分优于全甘露聚糖。

[0650] 实施例 5:>1000kDa 甘露聚糖部分的分离

[0651] 因为甘露聚糖的 >300kDa 部分比全甘露聚糖更有效地活化 BMDC,所以分离更高分子量部分用于分析。为了分离甚至更高分子量部分,将全甘露聚糖通过具有 1,000kDa 截留值膜的 Centriprep 浓缩器。不同部分的产率在表 3 中示出。有趣的是,300 至 1,000kDa 部分大大减少,从而指示 >1,000kDa 甘露聚糖在之前分离的 >300kDa 甘露聚糖部分中占主要地位。

[0652] 实施例 6:>1000kDa 甘露聚糖部分与全甘露聚糖和 >300kDa 甘露聚糖部分的活性的比较

[0653] 通过在 48 小时时段之后通过流式细胞术观察 CD40 和 CD86 的上调来测量不同剂量的 >1000kDa 部分刺激 BMDC 的能力(分别图 7A 和 7B)。将 >1000kDa 部分与 >300kDa 部分和全甘露聚糖进行比较,很明显 >1000kDa 部分优于全甘露聚糖并且与 >300kDa 部分类似。

[0654]

表 3: 分离>1000 kDa 甘露聚糖部分的分级分离运行的代表性实例

分级 分离	瓶/批次			甘露聚 糖	>1000		300 至 1000	100 至 300	50 至 100	30 至 50	<30		回收
8	批次 2	985.5mg											
	102K37781	回收%			3.6		0	4.9	10.4	7.3			26.1
		醛残基		106	205			44	16	8.8			
9	批次 2	1019mg											
	102K37781	回收%			6.7		0	20	14.7	7.5			48.9
		醛残基		108	228.9		N/A	42	19.7	10.6			
10	批次 7	1007mg											
	048K3810	回收%			31		0.26	20	0.49	2.3			53.7
		醛残基		115	219		111	39.8	21	8.1			
11	批次 7	1063mg	(结束-)										
	048K3810	回收%			37		0	12	0.87	0.36			53
		醛残基		95	218		N/A	39.8	15	7.2			

[0655] 实施例 7:甘露聚糖部分的分子量的分析

[0656] 如以上所看出,甘露聚糖的不同部分能够活化 BMDC、与甘露聚糖受体结合并且

>1000kDa 甘露聚糖部分是最具生物活性的部分。然而,重要的是能够分析所述部分的生物化学特性以及获得所述部分的相对分子量,这样使得能够设定一组规范。本发明人已经显示,当用 NaIO_4 氧化时,不同甘露聚糖产生不同数目的醛基(表 2 和表 3)。

[0657] 测量甘露聚糖的甘露糖含量的间苯二酚测定还可以用作鉴别甘露聚糖的不同部分的手段(图 8)。

[0658] 甘露聚糖是不带电荷的碳水化合物并且高度亲水性的,并且因此不会在用于蛋白质分析的 SDS-PAGE 凝胶上迁移。经常,对碳水化合物进行化学修饰以便并入电荷和疏水特性用于分析。为了并入这些特性,使氧化的甘露聚糖与 ANTS 反应。天然 PAGE 凝胶上用 ANTS 标记的甘露聚糖部分的分析(图 9)未基于其相对分子量解析甘露聚糖。

[0659] 然而,当通过 SDS-PAGE 来分析 ANTS 标记的部分时,它们以与分级分离的分子量(膜截留值)类似的模式迁移(图 10)。将 SDS-PAGE 凝胶进行扫描并且用于光密度测定分析(图 11)。还使用常规蛋白质标准。这使得能将分子量范围分配至不同定义的蛋白质被扩散的条带(宽条带)。对来自一些分级分离运行的甘露聚糖进行分析以便验证所述分析。从已知分子量(蛋白质或甘露聚糖部分)和相对前沿(Rf)产生标准曲线。Rf 被定义为所迁移的总距离除以由特异性条带迁移的距离(图 12)。基于标准曲线,对不同甘露聚糖部分的相对分子量进行计算(图 13 和 14)。

[0660] 实施例 8:MUC1-FP 与甘露聚糖的缀合

[0661] 将甘露聚糖的不同部分与 MUC1-FP 如方法中所描述的进行缀合。因为与所述部分相比,所产生的醛基的分子量和数目在全甘露聚糖中不同,所以所使用的 FP 的量被标准化为 MUC1-FP 与所述醛的摩尔比。此外,将一系列量的 MUC1-FP 进行缀合并且通过 SDS-PAGE 进行分析(图 15)。

[0662] 实施例 9:小鼠中 >1000MFP 和 MFP 的体内活性

[0663] 如以上所描述制备全甘露聚糖和 >1000kDa 甘露聚糖并且用于体内免疫原性研究。

[0664] 为了确定与全甘露聚糖、>1000kDa 甘露聚糖连接的 MUC1 的免疫原性,将缀合物或 MUC1-FP 在第 0 天、第 10 天、第 17 天以及第 14 天以 $10\ \mu\text{g}$ 的剂量皮内注射至小鼠中。将小鼠安乐死以便通过 ELISpot 分析来分析细胞应答(图 16)。在来自免疫的小鼠的脾细胞培养物中测量对不同剂量的 MUC1-FP 的抗原特异性 IFN- γ 应答。如图 16 中所示,细胞应答在 MUC1-FP、MFP 以及 >1000MFP 免疫的小鼠之间没有显著不同。将来自免疫的小鼠的血清针对抗 -MUC1- 特异性总 IgG、IgG1 以及 IgG2a 抗体进行测试(图 17)。有趣的是,与其它组相比,用 >1000MFP 免疫的小鼠具有大约 10 倍更高的抗 -MUC1- 特异性 IgG2a 滴度。类似的 IgG2a 偏向在 2 次免疫之后来自小鼠的血清中得以证明(数据未示出)。

[0665] 实施例 10:甘露聚糖和可能的质量控制测定的表征

[0666] 甘露聚糖当前来源于 Sigma。它不具有优质生产规范(GMP)标准并且所给出的仅有信息在图 18 中示出。如果从制造商购买它,那么它对于酵母甘露聚糖来说将是重要的,以便确保它符合具体标准。PDPH 测定可以用于测量醛,间苯二酚测定可以用于测量甘露糖含量并且 ANTS 测定可以用于表征甘露聚糖的不同批次。

[0667] 使用间苯二酚测定对来自 Sigma 的五批甘露聚糖进行分析。如在图 19A 中所示,所有批次展示出相同吸光度对浓度曲线,从而指示甘露聚糖中相同的甘露糖含量。图 19B

示出在间苯二酚测定中使用甘露糖的标准曲线。类似地,将所有 5 个批次在用 NaIO_4 氧化之后针对醛残基进行分析(图 20)。

[0668] 从三个独立的测量,可以看出醛残基的数目在 90 至 155 个残基之间变化。因此,如果所产生的醛残基是 $125\% \pm 20\%$,那么对于甘露聚糖的规范可以被设定为通过。以类似的方式,氧化的甘露聚糖可以与 ANTS 而不是 PDPH 反应用于测量荧光(图 21)。有趣的是,在这一测定中所有批次中的变化也是大约 $\pm 20\%$ 。

[0669] 实施例 11:碳水化合物聚合物-免疫调节剂缀合物的合成

[0670] 可以使用图 22 至 44 中所示的一般方法来制备本发明的缀合物。

[0671] 在一个实施方案中,免疫调节剂是瑞喹莫德。在一个替代实施方案中,免疫调节剂是洛索立宾。

[0672] 免疫调节剂可以经由接头与氧化的甘露聚糖缀合,所述接头具有能够与氧化的甘露聚糖上的官能团反应的第一官能团和能够与免疫调节剂上的官能团反应的第二官能团。

[0673] 免疫调节剂可以使用接头 1 或接头 2 与氧化的甘露聚糖缀合。接头 1 和接头 2 可以使用图 22 或图 33 中所示的方法进行制备。

[0674] 瑞喹莫德可以通过其游离氨基或游离羟基与接头缀合。接头 1 和接头 2 可以分别用于与瑞喹莫德的游离氨基和瑞喹莫德的羟基活化的衍生物反应(参见图 24 和 25)。这种衍生物可以在瑞喹莫德上并入受保护的酰肼基,所述酰肼基可以被脱保护并且与氧化的甘露聚糖的醛基反应。

[0675] 例如,瑞喹莫德-氧化的甘露聚糖缀合物可以通过以下来制备:

[0676] i) 如之前所详述,用于 0.1M 磷酸盐 (pH6.0) 缓冲液中的 0.01M NaIO_4 氧化甘露聚糖;

[0677] ii) 通过用乙酸盐缓冲液 (pH4.5 至 6.5) 平衡的凝胶过滤柱(例如,PD10 柱)以便去除不想要的副产物;

[0678] iii) 将于适合的溶剂中的酰肼功能化的瑞喹莫德逐滴添加至氧化的甘露聚糖;

[0679] iv) (在步骤 iii 之后 2 至 16 小时) 通过用磷酸盐缓冲盐水平衡的凝胶过滤柱以便去除未反应的瑞喹莫德。

[0680] 与氧化的甘露聚糖反应的瑞喹莫德分子的数目可以通过分光光度计法进行定量。瑞喹莫德-氧化的甘露聚糖缀合物然后可以用于生物测定或治疗方法中。

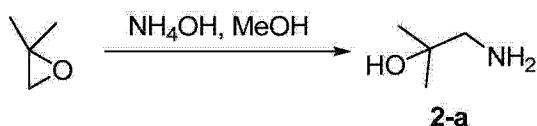
[0681] 洛索立宾可以通过其氨基或其伯或仲羟基与接头缀合。羟基可以被适合地活化。然而,不需要适合地保护其它羟基免于反应。接头 1 和接头 2 可以分别用于与洛索立宾的游离氨基和洛索立宾的羟基活化的衍生物反应(参见图 26 至图 28)。一旦获得酰肼衍生物,它们就可以用于如以上针对瑞喹莫德所描述的与氧化的甘露聚糖缀合。

[0682] R-848 的合成

[0683] 可以使用图 31 中所示的方法并且如以下所描述来制备 R-848。

[0684] 1. 化合物 2-a 的制备

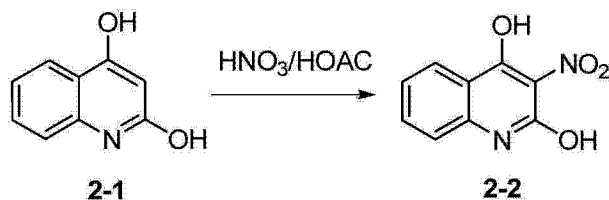
[0685]



[0686] 向装有磁棒 NH_4OH (60mL) 的圆底烧瓶添加氧化异丁烯 (10.0g, 138.6mmol) 和 MeOH (125g)。将混合物在室温下搅拌 12 小时, 并且然后缓慢加热至 60°C 并且搅拌 2 至 3 小时。在减压下去除溶剂, 并且将残余物在大气压下进行蒸馏以得到所需产物 (3.0g, 33%)。

[0687] 2. 化合物 2-2 的制备

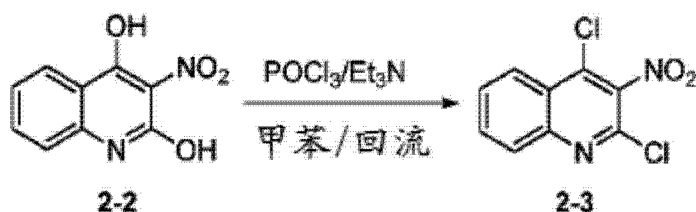
[0688]



[0689] 将化合物 2-1 (80g, 0.5mol) 于 HNO_3 (130mL) 和 HOAc (500mL) 中的混合物在 105°C 下搅拌 1 小时。然后将它冷却至室温, 并且通过添加水来淬灭反应。将固体沉淀并且过滤以得到黄色产物 2-2 (60g, 58%)。

[0690] 3. 化合物 2-3 的制备

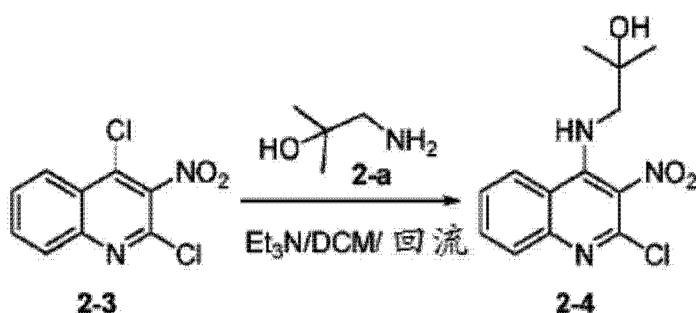
[0691]



[0692] 向 2-2 (10g, 48.5mmol) 于 POCl_3 (80mL) 中的溶液添加 Et_3N (4.85g, 48.5mmol)。将溶液加热至 120°C 并且搅拌 3 小时, 并且然后在真空中去除溶剂。将残余物倒入冰水中, 并且用 DCM 萃取。将有机相用 NaHCO_3 和盐水洗涤, 并且用无水 Na_2SO_4 干燥并且过滤。浓缩过滤物并且获得所需产物 (30g, 68%)。

[0693] 4. 化合物 2-4 的制备

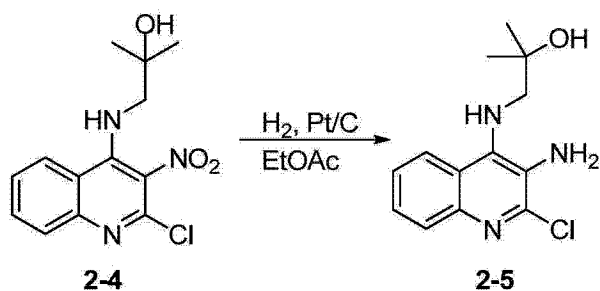
[0694]



[0695] 向 2-3 (10g, 41mmol) 和 TEA (5g, 49mmol) 于 DCM 中的溶液逐滴添加 2-a (3g, 34mmol)。将混合物在 40°C 下搅拌 12 小时。将溶液冷却至室温, 并且用盐水洗涤、用无水 Na_2SO_4 干燥并且过滤。浓缩过滤物并且获得粗产物。通过二氧化硅胶柱色谱法 ($\text{PE}:\text{EA} = 1:1$) 进一步纯化得到 6.0g 所需产物, 产率 50%。

[0696] 5. 化合物 2-5 的制备

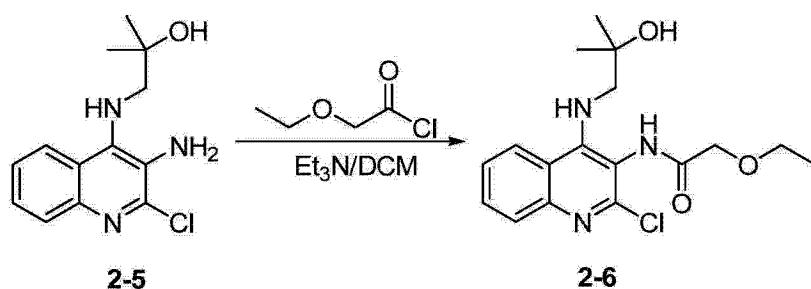
[0697]



[0698] 将化合物 2-4 (6g, 20mmol)、Pt/C(800mg) 于 EA 中的混合物在室温下氢化 4 小时。然后过滤混合物并且浓缩过滤物以得到所需产物 2-5 (5.7g)。

[0699] 6. 化合物 2-6 的制备

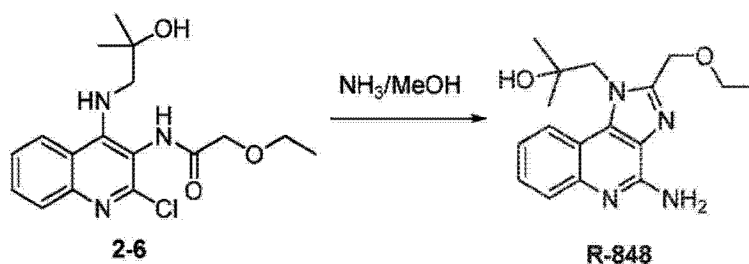
[0700]



[0701] 向 2-5 (5.7g, 21.5mmol) 和 TEA (4g, 40mmol) 于 DCM (100mL) 中的溶液添加化合物 2-乙氧基乙酰氯 (3g)。将混合物搅拌 3 小时, 并且然后将它用饱和盐水进行洗涤。浓缩有机层并且将残余物通过硅胶柱色谱法 (EA:PE = 1:2) 进行纯化。获得所需产物 (3.7g, 50%)。

[0702] 7. R-848 的制备

[0703]



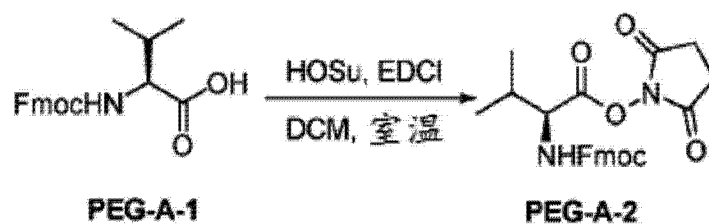
[0704] 将化合物 2-6 (1.87g, 5.3mmol) 于 NH₃/MeOH 中的混合物密封在高压灭菌器中并且在 160℃ 下搅拌 8 小时。然后去除溶剂并且将残余物通过硅胶柱色谱法 (EA/TEA95:5) 进行纯化。获得所需产物 R-848 (1.5g)。

[0705] PEG-A 的合成

[0706] 可以使用图 32 中所示的方法并且如以下所描述来制备 PEG-A。

[0707] 1. PEG-A-2 的制备

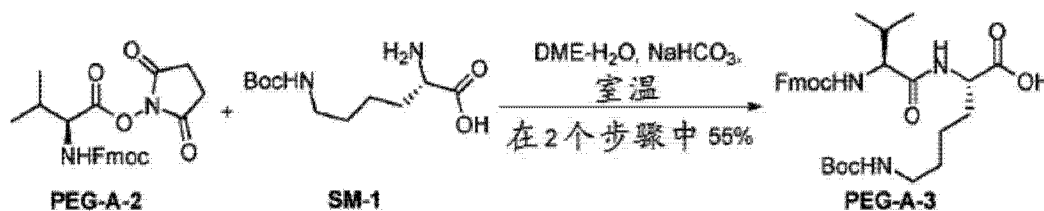
[0708]



[0709] 向 PEG-A-1 (30g, 93mmol) 和 EDCI (36.52g, 138mmol) 在 0℃ 下于 DCM 中的搅拌溶液添加 HOSu (12.72g, 111.7mmol)。将混合物在冰浴中搅拌 30 分钟。然后使溶液加热至室温并且搅拌 15 小时。将混合物用 H₂O、1N HCl 水溶液以及饱和 NaHCO₃ 进行洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 将溶剂蒸发以得到 36.5g 粗 PEG-A-2。

[0710] 2. PEG-A-3 的制备

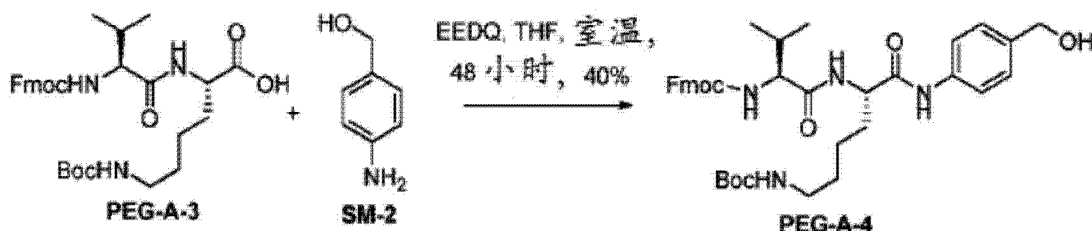
[0711]



[0712] 向 SM-1 (24.71g, 100.32mmol) 和 NaHCO₃ (8.43g, 100.32mmol) 于 50mL H₂O 中的溶液添加溶解于 50mL DME 中的 PEG-A-2 (83.6g, 36.5mmol)。将混合物在室温下搅拌 15 小时, 在真空中蒸发。将残余物溶解于 100mL EA 中, 并且通过添加 1N HCl 水溶液将 pH 调整至 2 至 3, 并且将反应混合物用 H₂O 洗涤、然后用 Na₂SO₄ 干燥、在减压下蒸发并且通过用 PE/EA = 1:1 洗脱的柱色谱法纯化以得到浅黄色固体 PEG-A-3 (15.2g, 70%)。

[0713] 3. PEG-A-4 的制备

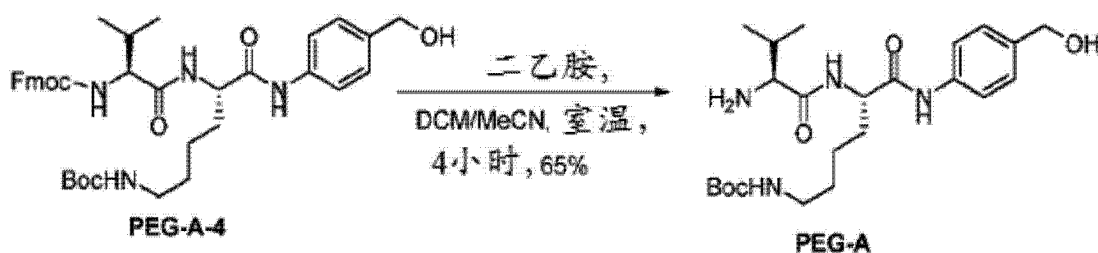
[0714]



[0715] 向 1L 圆底烧瓶加入 PEG-A-3 (9.5g, 16.7mmol)、SM-2 (4.04g, 33.4mmol)、EEDQ (8.26g, 33.4mmol)、DCM (300mL) 以及 MeOH (100mL)。将混合物在室温下搅拌过夜, 用 1N HCl 水溶液洗涤并且用 Na₂SO₄ 干燥。将溶剂蒸发并且通过柱色谱法纯化以得到浅黄色固体 PEG-A-4 (4g, 40%)。

[0716] 4. PEG-A 的制备

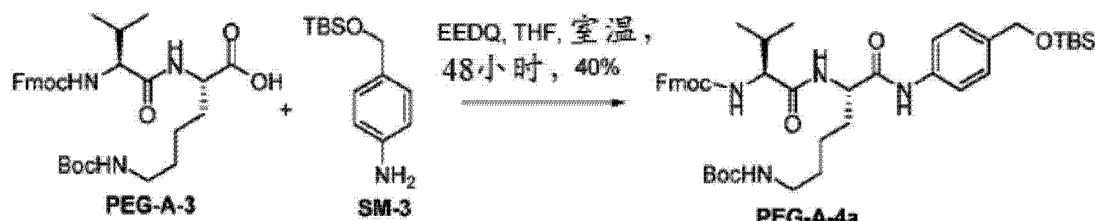
[0717]



[0718] 向 1L 圆底烧瓶加入 PEG-A-4 (4.5g, 6.68mmol)、二乙胺 (7.33g, 100.2mmol)、DCM (200mL)、MeCN (200mL)。将混合物在 0℃ 下搅拌 2 小时, 然后在室温下搅拌 15 小时。TLC 显示起始材料为痕量, 并且将混合物用 1N HCl 水溶液、H₂O 洗涤并且用 Na₂SO₄ 干燥。将溶剂蒸发并且将残余物通过柱色谱法纯化以得到 PEG-A (1.5g, 65%)。

[0719] 5. PEG-A-4a 的制备

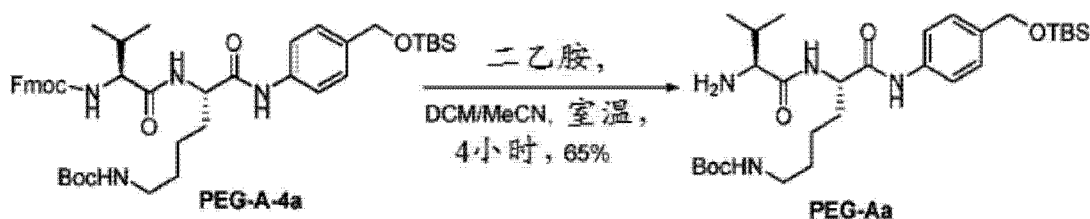
[0720]



[0721] 程序与 PEG-A-4 相同。

[0722] 6. PEG-Aa 的制备

[0723]



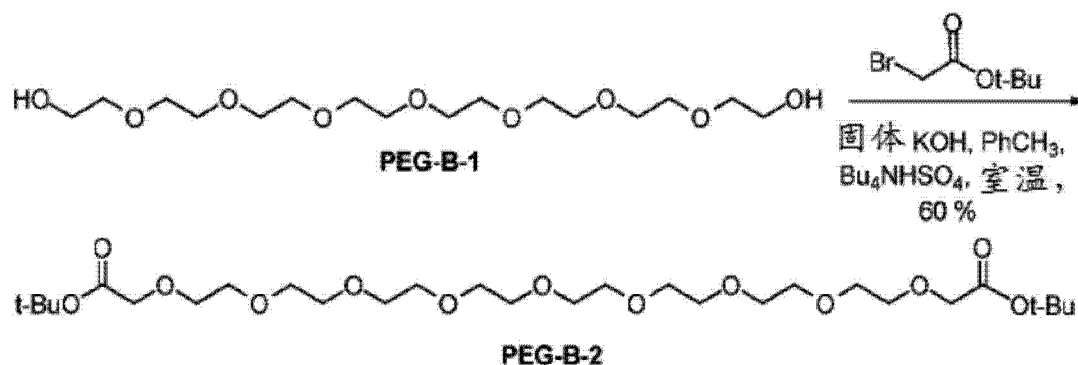
[0724] 程序与 PEG-A 相同。

[0725] L-1 和接头 -1 的合成

[0726] 可以使用图 33 中所示的方法并且如以下所描述来制备 L-1 和接头 -1。

[0727] 1. PEG-B-2 的制备

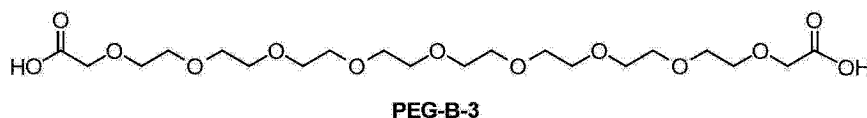
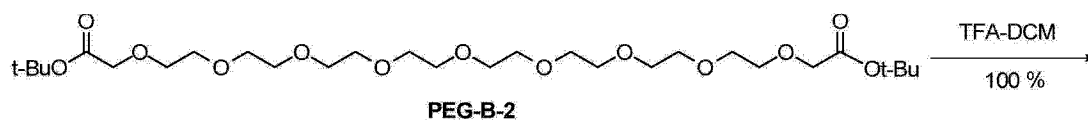
[0728]



[0729] 在 0℃ 下向 PEG-B-1 (11g, 30mmol)、固体 KOH (6.72g, 120mmol) 以及 n-Bu₄NHSO₄ (1.3g, 3.6mmol) 于甲苯 (160mL) 中的溶液逐滴添加溴乙酸叔丁酯 (18mL, 120mmol)。将反应混合物在 0℃ 下搅拌 1 小时, 然后在室温下搅拌 4 小时, 过滤, 用水、饱和 NH₄Cl、饱和 NaHCO₃、饱和盐水洗涤并且用 Na₂SO₄ 干燥, 蒸发以提供 PEG-B-2 (12g, 产率 70%)。

[0730] 2. PEG-B-3 的制备

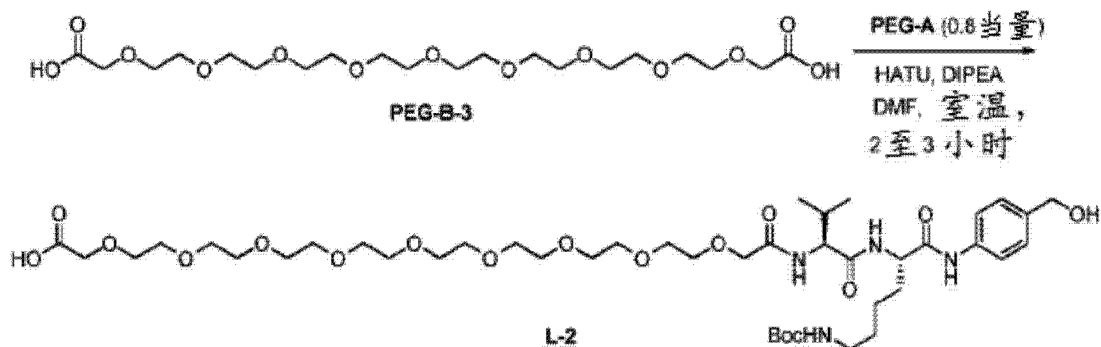
[0731]



[0732] 将 PEG-B-2 (6g, 10mmol) 于 TFA/DCM (5mL/5mL) 中的混合物在室温下搅拌 2 小时。TLC 显示反应结束。蒸发以定量地得到 PEG-B-3, 并且直接用于下一步骤中。

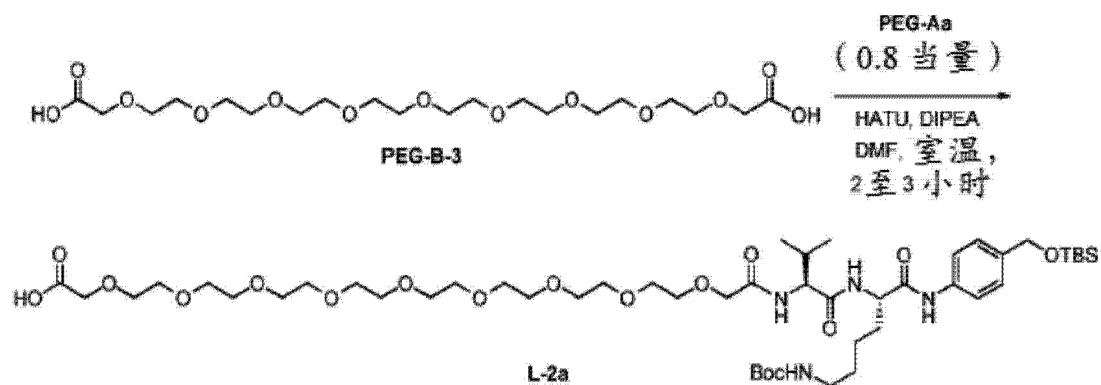
[0733] 3. L-2 与 L-2a 的制备

[0734]



[0735] 向 PEG-B-3 (1.2g, 2.4mmol) 和 HATU (0.8g, 2.1mmol) 于 10mL THF 中的溶液添加 PEG-A (0.9g, 2mmol) 和 DIPEA (0.47g, 3.6mmol)。将混合物在室温下搅拌 2 小时, 在真空中蒸发并且将残余物溶解于 100mL EA 中。将溶液用饱和 NH_4Cl 、饱和 NaHCO_3 、饱和 NaCl 洗涤, 然后用 Na_2SO_4 干燥, 在减压下蒸发以提供粗 L-2, 所述 L-2 直接用于下一步骤。

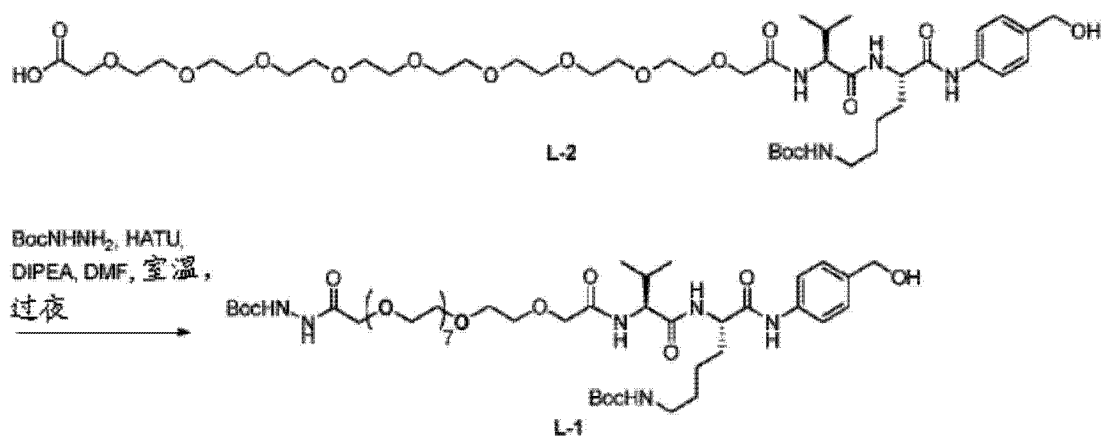
[0736]



[0737] L-2a 的制备与 L-2 相同。

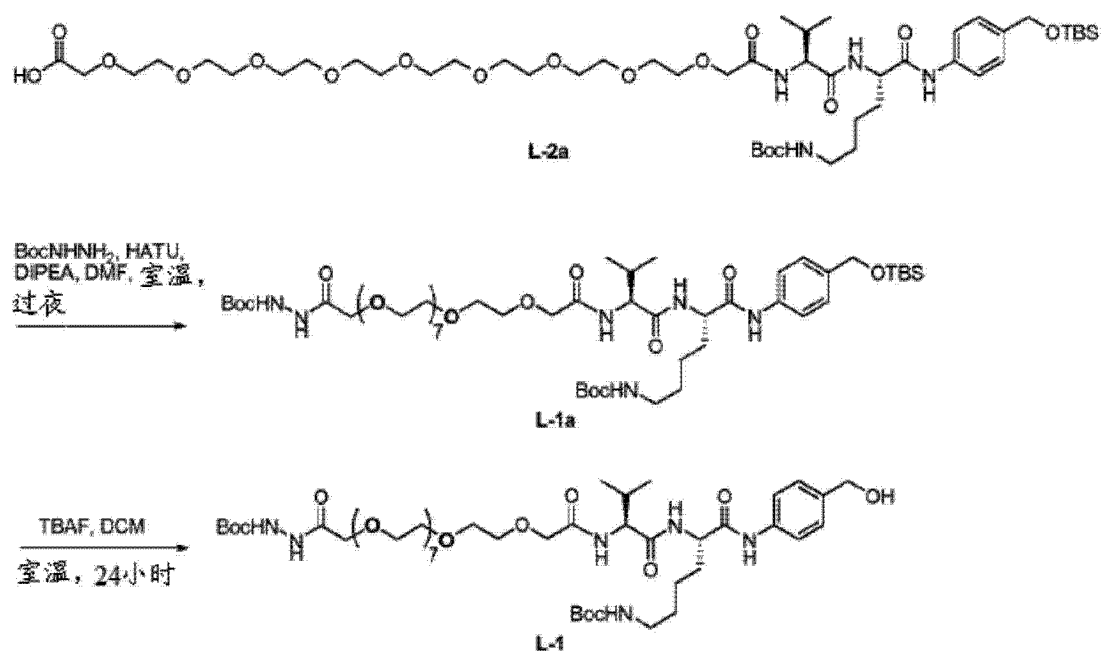
[0738] 4. L-1 与 L-1a 的制备

[0739]



[0740] 向 L-2 (4.6g, 5mmol) 和 HATU (2.3g, 6mmol) 于 20mL DMF 中的溶液添加 BocNHNH₂ (1.32g, 10mmol) 和 DIPEA (0.77g, 6mmol)。将混合物在室温下搅拌 2 小时。将混合物在真空中蒸发并且将残余物溶解于 100mL EA 中。将混合物用饱和 NH₄Cl、饱和 NaHCO₃、饱和 NaCl 洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 在减压下蒸发以提供粗 L-1, 所述 L-1 直接用于下一步骤。

[0741]



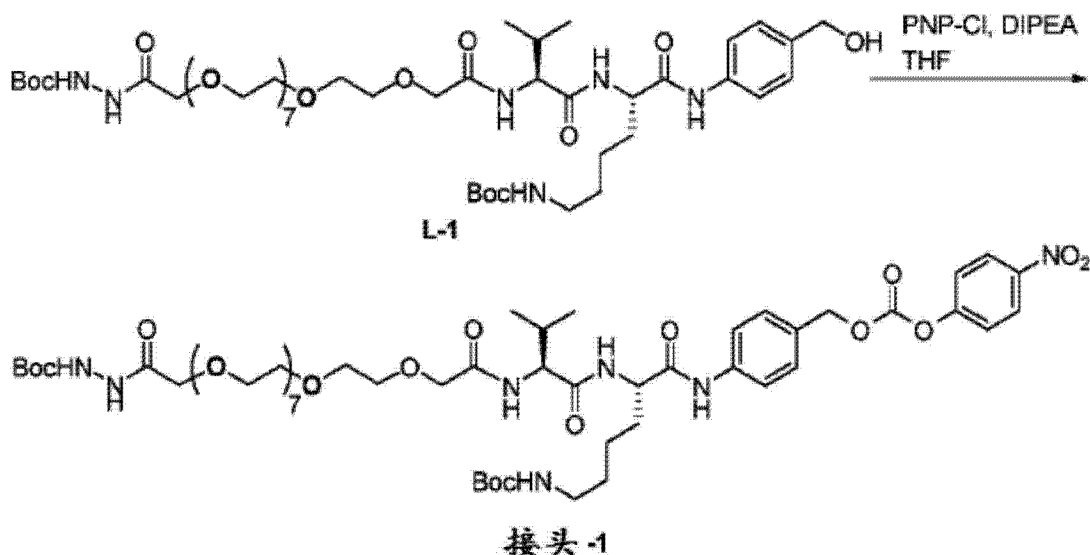
[0742] L-1a 的制备与 L-1 相同。

[0743] 程序从 L-1a 至 L-1:

[0744] 向 L-1a (4g 粗, 1mmol) 于 20mL DCM 中的溶液添加 TBAF (2.2g, 8mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 24 小时, 然后用饱和 NaCl 洗涤, 用 Na₂SO₄ 干燥, 蒸发并且通过柱色谱法纯化以得到 L-1 (1.1g)。

[0745] 5. 接头 -1 的制备

[0746]



[0747] 在 0℃ 下向 L-1 (310mg, 0.3mmol)、吡啶 (237mg, 3mmol) 于 2mL DCM 中的溶液逐滴添加 PNP-Cl (485mg, 2.4mmol) 于 2mL DCM 中的溶液。将混合物在室温下搅拌 20 小时。将溶液用盐水洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 蒸发并且通过柱色谱法 (DCM:MeOH = 25:1) 纯化以提供接头-1 (100mg)。

[0748] 洛索立宾的合成

[0749] 可以使用图 34 中所示的方法并且如以下所描述来制备洛索立宾 A。

[0750] 1. 洛索立宾的制备

[0751] 向 NaH (4.2g, 176mmol) 于 DMSO (300mL) 中的溶液一次性添加丙-2-烯-1-醇 (30mL) 和 8-溴鸟嘌呤 (15g, 41.4mmol)。将混合物在 65℃ 下搅拌 3 小时, 冷却, 然后添加 EA (1000mL), 过滤。收集固体, 用 EA 洗涤, 然后在冰浴下溶解于 H₂O 和 AcOH (5:1, 90mL) 中。将混合物搅拌 30 分钟, 过滤并且固体 (3-0) 不经纯化用于下一步骤。

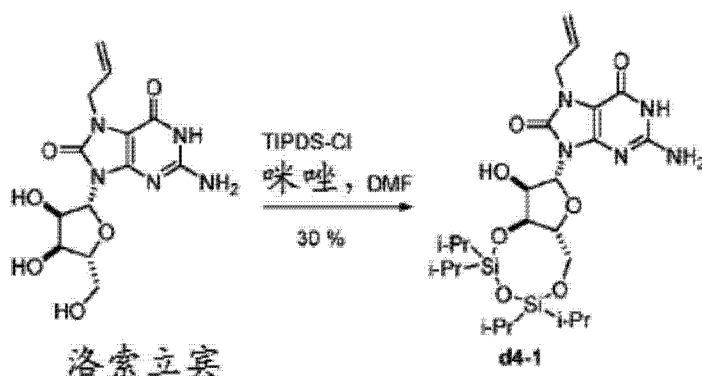
[0752] 将以上固体 (3-0) 溶解于 H₂O 和 MeOH (1:1, 300mL) 中。将混合物回流 5 小时, 然后蒸发以提供粗洛索立宾 (10.7g, 对于两个步骤产率 76%)。

[0753] d4-3 的合成

[0754] 可以使用图 35 中所示的方法并且如以下所描述来制备衍生物 4-3。

[0755] 1. d4-1 的制备

[0756]

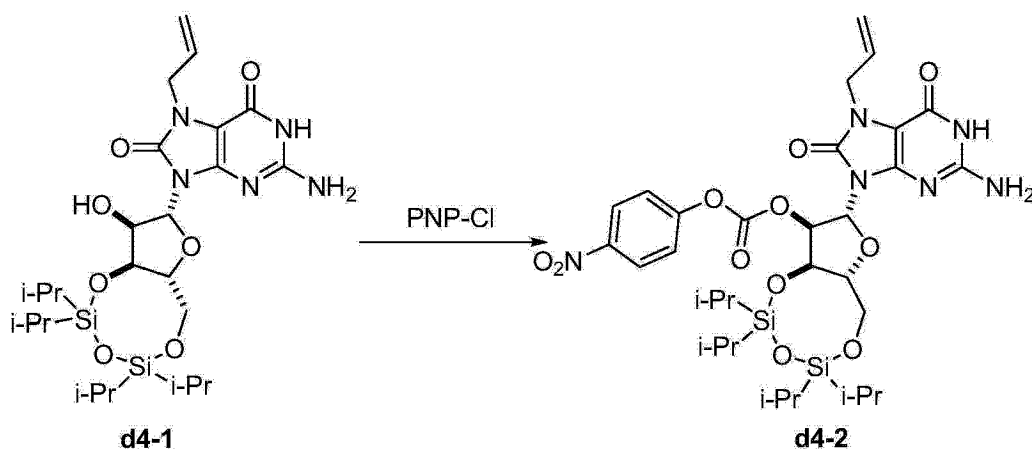


[0757] 向洛索立宾 (2g, 6mmol) 和咪唑 (820mg, 12mmol) 于 DMF (10mL, 干燥的) 中的溶液逐滴添加 TIPDS-Cl (2mL)。然后将混合物在室温下搅拌 4 小时。添加 EA, 将有机相用饱和

NaHCO₃、饱和盐水洗涤,然后用 Na₂SO₄干燥,蒸发并且通过柱色谱法 (PE:EA = 1:1) 纯化以提供 d4-1 (900mg)。

[0758] 2. d4-2 的制备

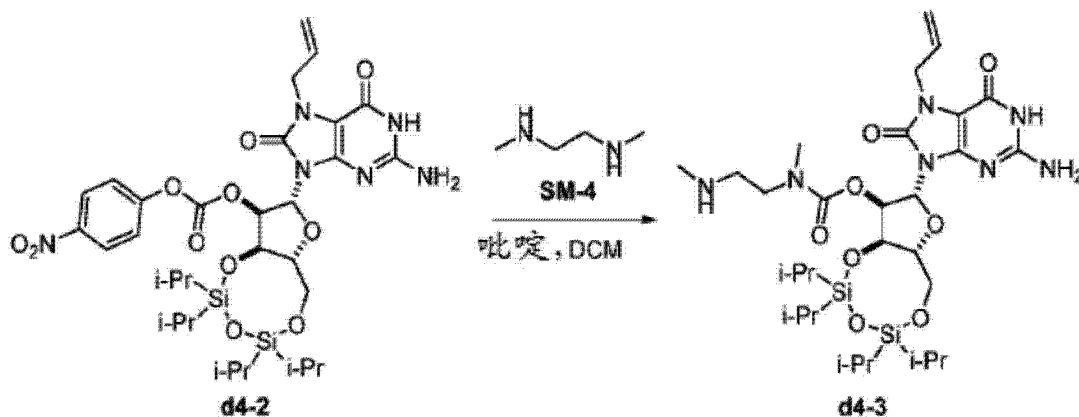
[0759]



[0760] 在 0℃ 下向 d4-1 (870mg, 1.5mmol) 和吡啶 (1.2g, 15mmol) 于 15mL DCM 中的溶液逐滴添加 PNP-Cl (3g, 15mmol) 于 5mL DCM 中的溶液。将混合物在室温下搅拌 10 小时, 用饱和 NaCl 洗涤, 然后用 Na_2SO_4 干燥, 蒸发以提供所需的粗产物, 所述粗产物直接用于下一步骤。

[0761] 3. d4-3 的制备

[0762]



[0763] 向 d4-2(380mg, 0.5mmol) 和吡啶 (400mg, 5mmol) 于 5mL DCM 中的溶液添加 SM-4 (530mg, 6mmol)。将混合物在室温下搅拌 4 小时, 用 H₂O、饱和盐水洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 蒸发并且通过柱色谱法 (DCM:MeOH = 5:1) 纯化以提供 d4-3 (100mg)。

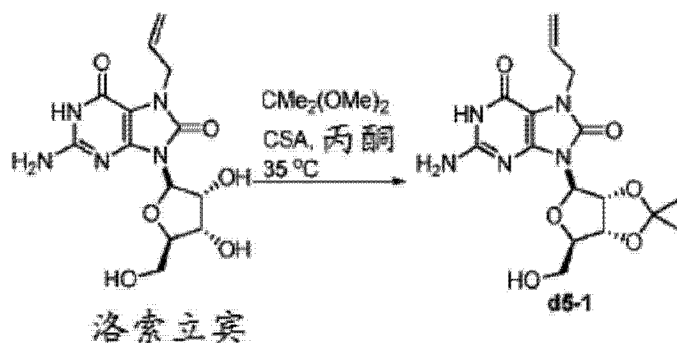
[0764] d4-3 与接头 1 的反应和脱保护将得到衍生物 4。

[0765] d5-2 和 d5-3 的合成

[0766] 可以使用图 36 中所示的方法并且如以下所描述来制备衍生物 5-2 和 5-3。

[0767] 1. d5-1 的制备

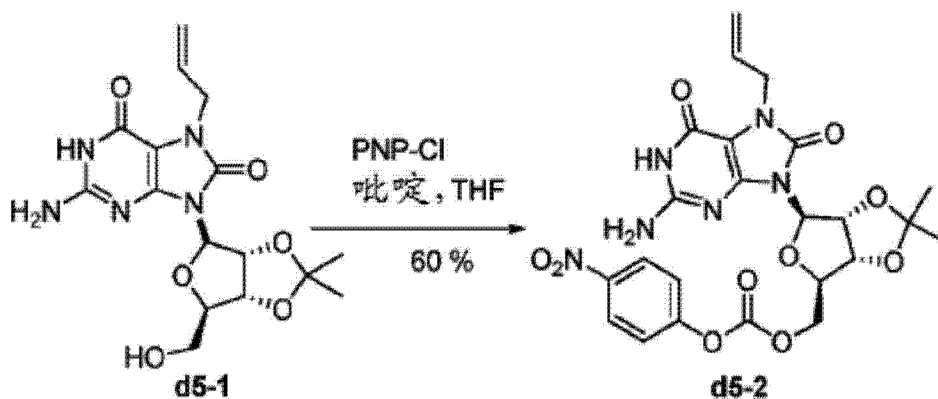
[0768]



[0769] 将洛索立宾 (2.5g, 7.4mmol)、2,2-二甲氧基丙烷 (14.1g, 134.7mmol) 以及 CSA (1.89g, 8.2mmol) 于 50mL 丙酮中的混合物在 35℃ 下搅拌 5 小时, 蒸发并且通过柱色谱法 (DCM:MeOH = 10:1) 纯化以提供 d5-1 (1.5g, 产率 55%)。

[0770] 2. d5-2 的制备

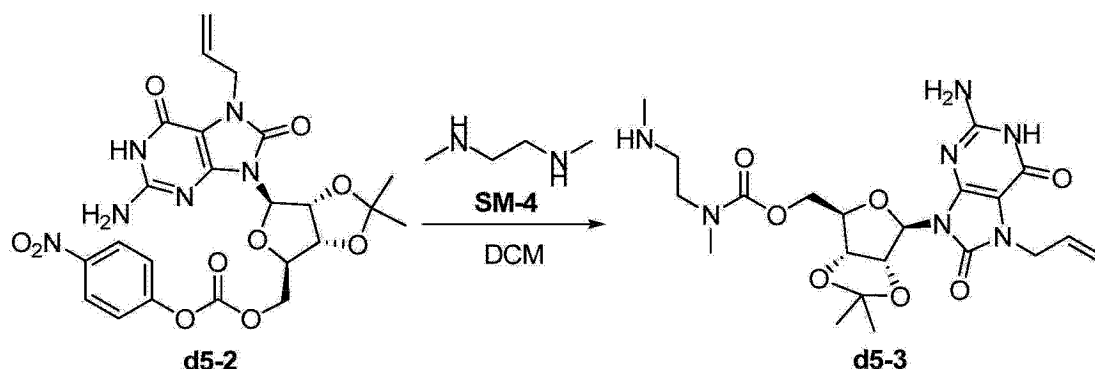
[0771]



[0772] 在 0℃ 下向 d5-1 (860mg, 2.27mmol) 和吡啶 (1.8g, 22.7mmol) 于 25mL DCM 中的溶液逐滴添加 PNP-Cl (2.83g, 14mmol) 于 15mL DCM 中的溶液。将混合物在室温下搅拌 10 小时。将溶液用盐水洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 蒸发并且通过柱色谱法 (DCM:MeOH = 300:1 至 100:1) 纯化以提供 d5-2 (620mg, 产率 50%)。

[0773] 3. d5-3 的制备

[0774]



[0775] 向 d5-2 (640mg, 1.18mmol) 于 15mL DCM 中的溶液添加 SM-4 (210mg, 2.36mmol)。将混合物在室温下搅拌 1 小时。将溶液用 H₂O、盐水洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 蒸发并且通过柱色谱法 (DCM:MeOH = 5:1) 纯化以提供 d5-3 (300mg)。

[0776] d5-3 与接头 1 的反应和脱保护将得到衍生物 5。

[0777] 实施例 12:碳水化合物聚合物-免疫调节剂缀合物的合成

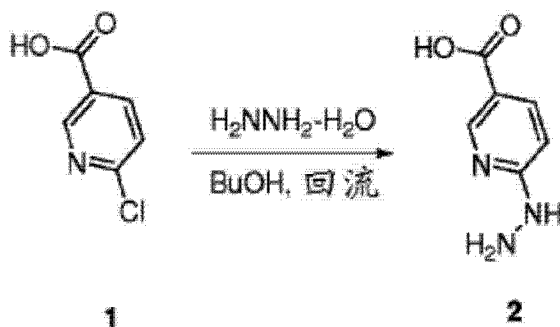
[0778] 其它瑞喹莫德衍生物(被称为 Rd1 至 Rd3)和洛索立宾衍生物(被称为 Ld1 至 Ld10)分别在图 37 和图 38 中示出。

[0779] Ld1 的合成

[0780] 可以使用图 39 中所示的方法并且如以下所描述来制备 Ld1。

[0781] 1. 6-肼基烟酸的合成

[0782]

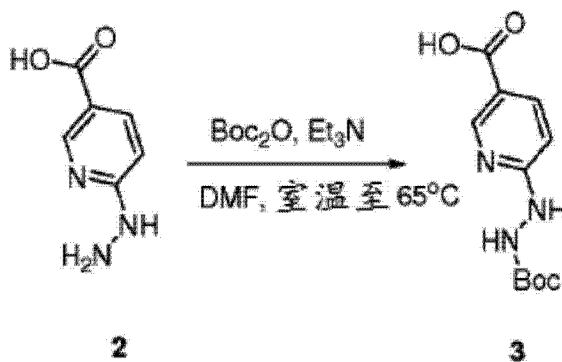


[0783] 向 6-氯烟酸(5g, 32mmol)于 EtOH(50mL)中的溶液添加水合肼(3.7mL, 80mmol)。将混合物在搅拌下加热至回流持续 48 小时。使混合物冷却至室温以得到灰色沉淀物,通过过滤收集所述灰色沉淀物并且然后用 EtOH 和石油醚/EtOAc(2:1)洗涤以得到 2g 固体(40%)。

[0784] LC-MS:CP-0007023-001:(ES, m/z):154[M+H]⁺

[0785] 2. 6-(2-(叔-丁氧基羰基)肼基)烟酸的合成

[0786]

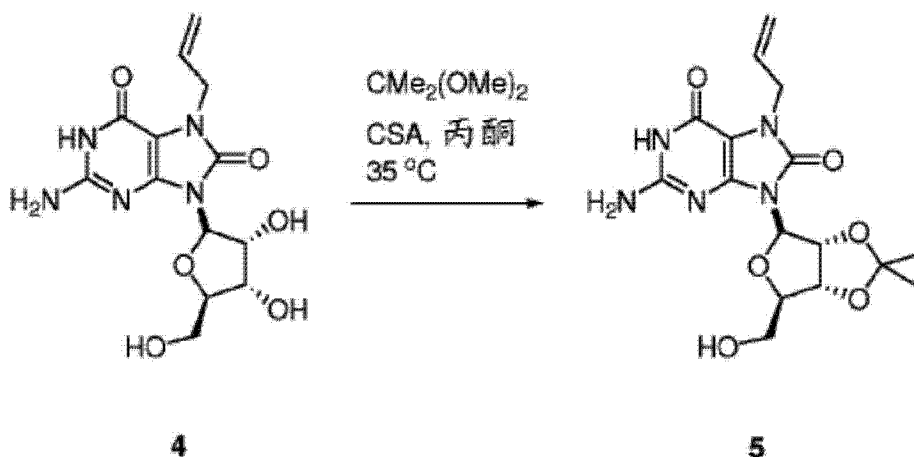


[0787] 向 6-肼基烟酸(3g, 19.6mmol)于 DMF(20mL)中的悬浮液添加 TEA(2.97g, 29.4mmol)和 Boc₂O(4.7g, 21.6mmol)。将悬浮液在搅拌下加热至 65°C 持续 15 小时。将悬浮液倒入水(20mL)中并且用 HCl(1M)将 pH 调整至 6, 并且然后通过反相 biotage 纯化以得到 1.2g 固体(24%)。

[0788] LC-MS:CP-0007023-008:(ES, m/z):254[M+H]⁺

[0789] 3. 7-烯丙基-2-氨基-9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(羟甲基)-2,2-二甲基-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-1H-嘌呤-6,8(7H,9H)-二酮的合成

[0790]

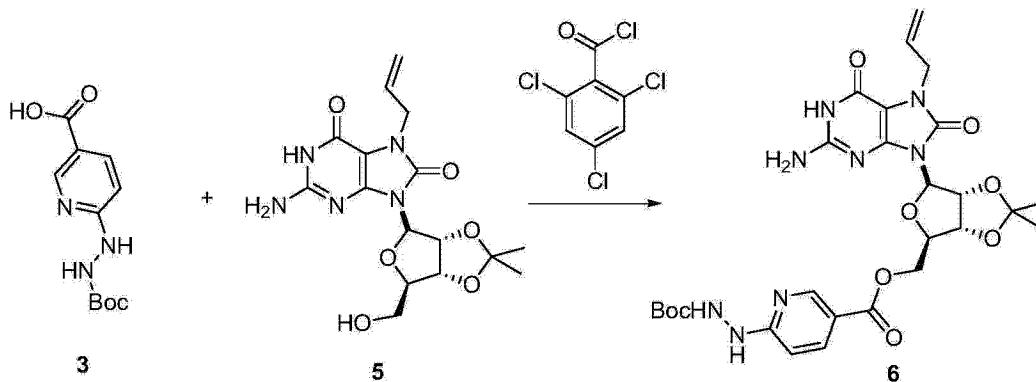


[0791] 向 7-烯丙基-2-氨基-9-((2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟甲基)-四氢呋喃-2-基)-1H-嘌呤-6,8(7H,9H)-二酮 (1.1g, 3.24mmol) 和 2,2-二甲氧基丙烷 (6.75g, 64.9mmol) 于丙酮 (40mL) 中的悬浮液添加 (+/-)-樟脑-10-磺酸 (301mg, 1.3mmol)。将悬浮液在搅拌下加热至 35℃ 持续 2 小时。将混合物浓缩、通过柱色谱法 (MeOH/CH₂Cl₂ = 20:1) 纯化以得到白色固体产物 (710mg, 58%)。

[0792] LC-MS: CP-0007023-045: (ES, m/z): 380 [M+H]⁺

[0793] 4. 6-(2-(叔-丁氧基羰基)胍基)烟酸 ((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-2,2-二甲基-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲酯的合成

[0794]



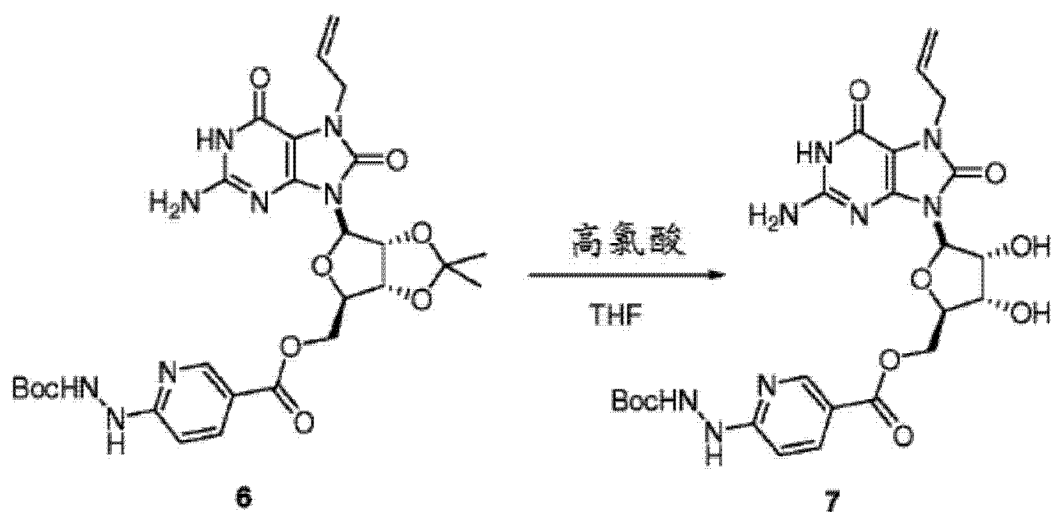
[0795] 向 6-(2-(叔-丁氧基羰基)胍基)烟酸 (668mg, 2.63mmol) 于甲苯 (10mL, 无水) 中的悬浮液添加 2,4,6-三氯苯甲酰氯 (959mg, 3.95mmol) 和 DIPEA (679mg, 5.62mmol)。将悬浮液搅拌 10 分钟, 并且然后添加 7-烯丙基-2-氨基-9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(羟甲基)-2,2-二甲基-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-1H-嘌呤-6,8(7H,9H)-二酮 (500mg, 1.32mmol) 和 DMAP (321mg, 2.63mmol) 于甲苯 (10mL, 无水) 中的悬浮液。将悬浮液搅拌 15 小时, 然后用盐水淬灭。将水相用 EtOAc (20mL*3) 萃取。将有机相合并, 用 Na₂SO₄ 干燥、过滤并且浓缩。将残余物通过反相 biotage 进行纯化以得到白色固体产物 (390mg, 48%)。

[0796] LC-MS: CP-0007023-070: (ES, m/z): 615 [M+H]⁺

[0797] 5. 6-(2-(叔-丁氧基羰基)胍基)烟酸 ((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-3,4-二羟基-四氢呋喃-2-基)甲酯的合

成

[0798]

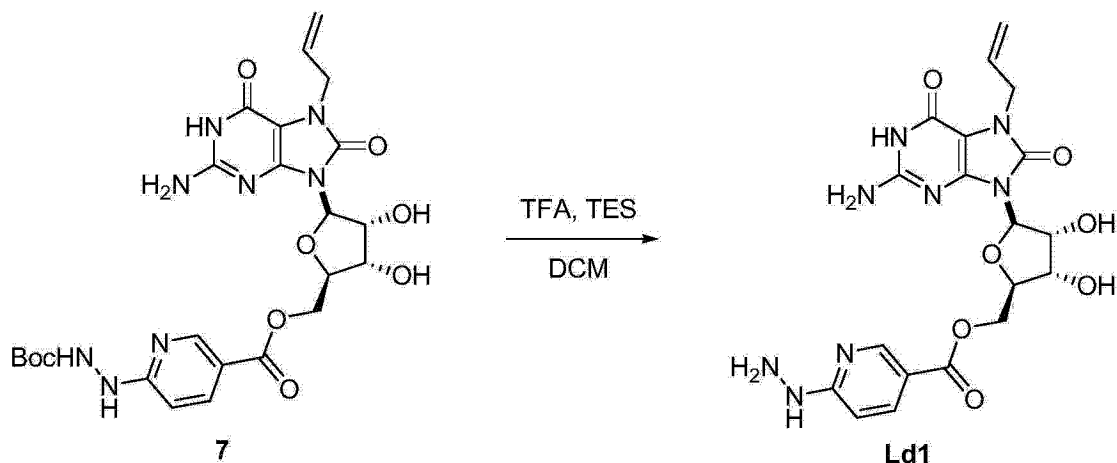


[0799] 将 6-(2-(叔-丁氧基羰基)肼基)烟酸((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-2,2-二甲基-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲酯(220mg, 0.36mmol)添加至高氯酸(6.6mL, 10%)与 THF(13.2mL)的混合物中。将混合物通过微波在 40℃下反应 1 小时。将混合物倒入水(10mL)中并且用 NaHCO₃(水溶液)将 pH 调整至 8, 用 EtOAc(15mL*3)萃取。将有机相合并, 并且用 Na₂SO₄干燥、过滤并且浓缩。将残余物通过反相 biotage 进行纯化以得到白色固体产物(56mg, 27%)。

[0800] LC-MS: CP-0007023-109: (ES, m/z): 575 [M+H]⁺

[0801] 6.6-肼基烟酸((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-3,4-二羟基-四氢呋喃-2-基)甲酯的合成

[0802]



[0803] 在 0℃下向 6-(2-(叔-丁氧基羰基)肼基)烟酸((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-3,4-二羟基-四氢呋喃-2-基)甲酯(250mg, 0.44mmol)和 TES(12.5mL)于 CH₂Cl₂(25mL)中的溶液逐滴添加 TFA(10mL)。将混合物在 0℃下搅拌 2.5 小时并且然后在减压下浓缩。将残余物通过反相 biotage 进行纯化以得到白色固体产物(40mg, 17%)。

[0804] LC-MS: CP-0007023-117: (ES, m/z): 475 [M+H]⁺

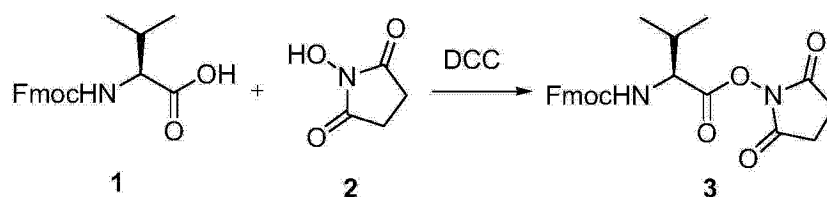
[0805] ^1H NMR: CP-0007023-117: ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500MHz): δ (ppm) 10.953 (s, 1H), 8.585-8.581 (d, J = 2Hz, 1H), 8.408 (s, 1H), 7.895-7.874 (dd, J = 2, 9Hz, 1H), 6.721-6.707 (d, J = 7Hz, 1H), 6.587 (s, 2H), 5.923-5.857 (m, 1H), 5.627-5.619 (d, J = 4Hz, 1H), 5.379-5.368 (d, J = 5.5Hz, 1H), 5.135-5.016 (m, 3H), 4.811-4.872 (m, 1H), 4.429-4.355 (m, 6H), 4.295-4.259 (m, 1H), 4.020-3.988 (m, 1H)。

[0806] Ld2 的合成

[0807] 可以使用图 40 中所示的方法并且如以下所描述来制备 Ld2。

[0808] 1. 2-(((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基) 羰基氨基)-3- 甲基丁酸 (S)-2, 5- 二氧代吡咯烷-1- 基酯的合成

[0809]

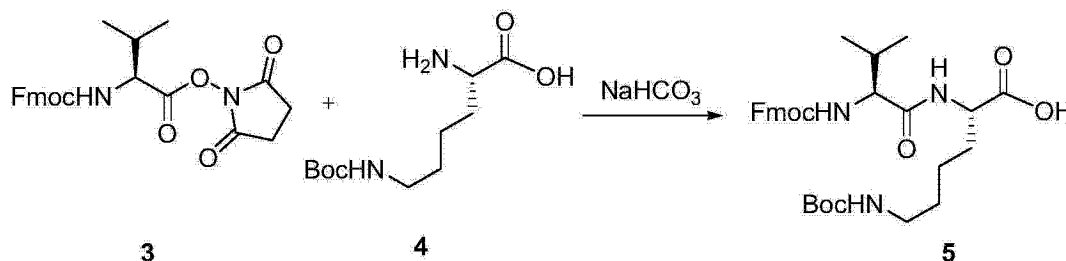


[0810] 将 (S)-2-(((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基) 羰基氨基)-3- 甲基丁酸 (5g, 15mmol) 和 1- 羟基吡咯烷-2, 5- 二酮 (1.8g, 17mmol) 溶解于干燥 THF (40mL) 中。在 0℃ 下添加于干燥 THF (20mL) 中的 DCC (3.4g, 17mmol) 并且将悬浮液在 0℃ 下搅拌 4 小时。滤出固体并且将滤液通过柱色谱法 (PE:EtOAc = 3:1) 进行纯化以得到 2.56g 固体 (40%)。

[0811] LC-MS: CP-0007349-011: (ES, m/z): 459 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

[0812] 2. (S)-2-(((S)-2-(((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基) 羰基氨基)-3- 甲基丁酰胺基)-6-(叔-丁氧基羰基氨基)己酸的合成

[0813]

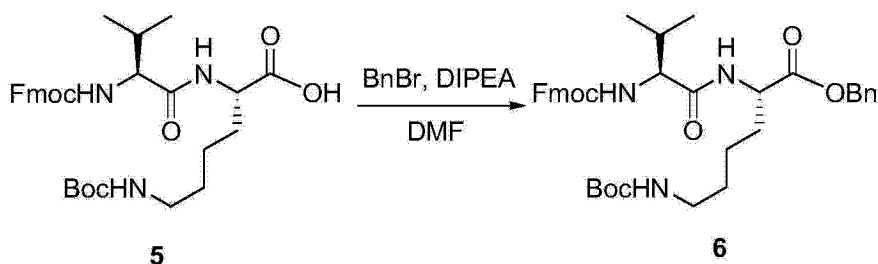


[0814] 向 (S)-2-氨基-6-(叔丁氧基羰基氨基)己酸 (524mg, 2.2mmol) 于丙酮 (10mL) 和 NaHCO_3 (616mg, 于 H_2O (10mL) 中 7.34mmol) 中的悬浮液添加 2-(((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基) 羰基氨基)-3- 甲基丁酸 (S)-2, 5- 二氧代吡咯烷-1- 基酯 (800mg, 1.83mmol)。将悬浮液搅拌 18 小时并且然后用 Et_2O (10mL) 洗涤。将 EtOAc (20mL) 添加至混合物并且用 HCl (1M) 将 pH 调整至 5。收集有机相并且用水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥、过滤并且浓缩以得到 820mg 固体 (78%)。

[0815] LC-MS: CP-0007023-104: (ES, m/z): 568 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0816] 3. (S)-2-(((S)-2-(((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基) 羰基氨基)-3- 甲基丁酰胺基)-6-(叔-丁氧基羰基氨基)己酸苯甲酯的合成

[0817]

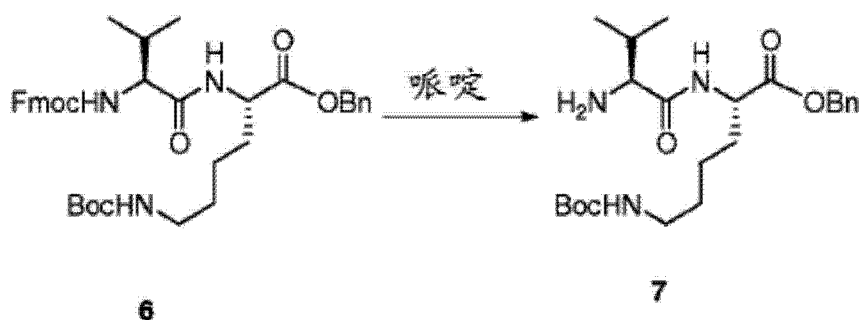


[0818] 在 0℃ 下向 (S)-2-((S)-2-((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基) 羰基氨基)-3- 甲基丁酰胺基)-6-(叔-丁氧基羰基氨基)己酸 (1g, 1.76mmol) 和 DIPEA (1.14g, 8.82mmol) 于 DMF (20mL) 中的溶液逐滴添加 BnBr (899mg, 5.29mmol)。将混合物在室温下搅拌 3 小时。将混合物倒入水 (150mL) 中并且用 EtOAc (100mL*3) 萃取。将有机相合并, 并且用水 (50mL) 洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥、过滤并且浓缩。将残余物通过柱色谱法 (MeOH/CH₂Cl₂ = 1:99) 纯化以得到白色固体产物 (980mg, 84%)。

[0819] LC-MS: CP-0007349-062: (ES, m/z): 658 [M+H]⁺

[0820] 4. (S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)-6-(叔-丁氧基羰基氨基)己酸苯甲酯的合成

[0821]

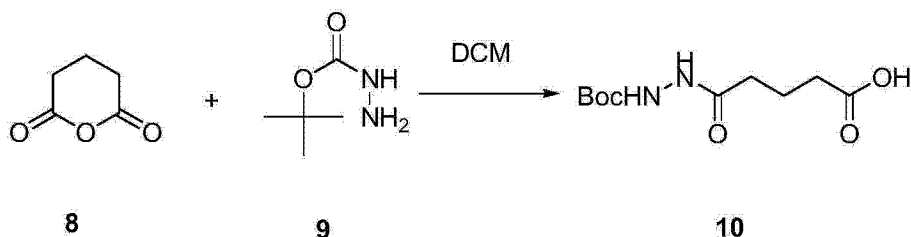


[0822] 向 (S)-2-((S)-2-((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基) 羰基氨基)-3- 甲基丁酰胺基)-6-(叔-丁氧基羰基氨基)己酸苯甲酯 (950mg, 1.45mmol) 于 CH₂Cl₂ (30mL) 中溶液添加哌啶 (1.23g, 14.5mmol)。将混合物搅拌 3 小时, 并且然后在减压下浓缩, 并且通过柱色谱法纯化残余物以得到白色固体产物 (330mg, 52%)。

[0823] LC-MS: CP-0007349-067: (ES, m/z): 436 [M+H]⁺

[0824] 5. 5-(2-(叔-丁氧基羰基)肼基)-5-氧代戊酸的合成

[0825]



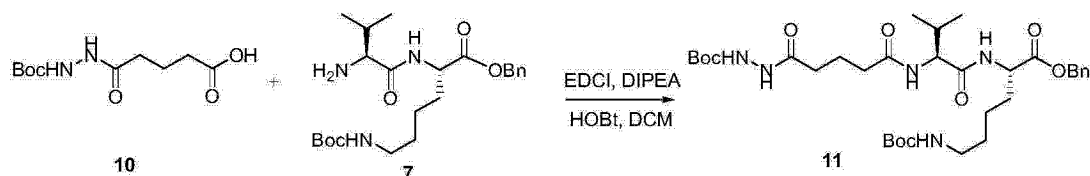
[0826] 向二氢-3H-吡喃-2,6-二酮 (250mg, 2.19mmol) 于 CH₂Cl₂ (4mL) 中的溶液逐滴添加肼甲酸叔丁酯 (290mg, 2.19mmol) 于 CH₂Cl₂ (1mL) 中的溶液。将混合物搅拌 2 小时, 并且然后在减压下浓缩, 并且通过柱色谱法纯化残余物以得到油状产物 (190mg, 35%)。

[0827] ¹H-NMR-CP-0007023-169: ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500MHz): δ (ppm) 12.052 (s, 1H), 9.480

(s, 1H), 8.654(s, 1H), 2.249-2.218(t, J = 7.5, 15.5Hz, 2H), 2.105-2.007(t, J = 7, 14Hz, 2H), 1.741-1.682(m, 2H), 1.391(s, 9H)。

[0828] 6. 化合物 11 的合成

[0829]

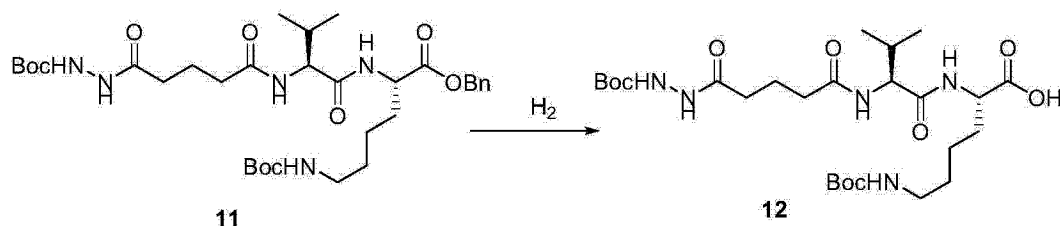


[0830] 向 5-(2-(叔丁氧基羰基)胍基)-5-氧代戊酸 (339mg, 1.38mmol) 于 DMF (8mL) 中的溶液添加 DIPEA (1.33g, 10.3mmol)、EDCI (397mg, 2.07mmol) 以及 HOBt (186mg, 1.38mmol)。将混合物搅拌 1.5 小时, 并且然后添加 (S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)-6-(叔丁氧基羰基氨基)己酸苯甲酯 (300mg, 0.69mmol) 和 DMAP (168mg, 1.38mmol)。将混合物在室温下搅拌 16 小时。将混合物倒入水 (100mL) 中并且用 EtOAc (30mL*3) 萃取。将有机相合并并且用水 (15mL) 洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥、浓缩并且通过柱色谱法 (MeOH/CH₂Cl₂ = 3:97) 纯化以得到白色固体产物 (150mg, 33%)。

[0831] LC-MS:CP-0007349-069: (ES, m/z): 664 [M+H]⁺

[0832] 7. (13S, 16S)-13-异丙基-2, 2, 24, 24-四甲基-4, 7, 11, 14, 22-五氧代-3, 23-二氧杂-5, 6, 12, 15, 21-五氮杂二十五烷-16-羧酸的合成

[0833]

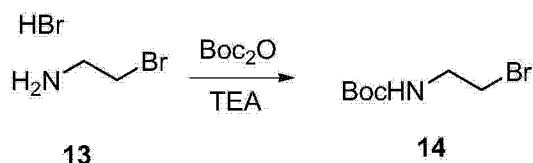


[0834] 向 11 (140mg, 0.21mmol) 于 THF (10mL) 中的溶液添加 Pd/C (40mg, 10%)。将悬浮液在 H₂ 气氛下在搅拌下振荡 3 小时。通过过滤去除催化剂并且在减压下浓缩滤液以得到白色固体产物 (96mg, 80%)。

[0835] LC-MS:CP-0007349-069: (ES, m/z): 574 [M+H]⁺

[0836] 8. 2-溴乙基氨基甲酸叔丁酯的合成

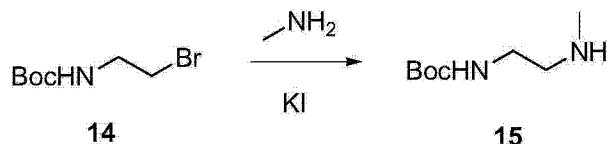
[0837]



[0838] 向 2-溴乙烷氢溴酸盐 (10g, 48.8mmol) 于 CH₂Cl₂ (190mL) 中的悬浮液添加 TEA (12.34g, 121.95mmol) 和 Boc₂O (11.72g, 53.7mmol)。将混合物搅拌 16 小时, 并且用水和盐水洗涤, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并且在减压下浓缩以得到 8.7g 油状物 (不经纯化用于下一步骤)。

[0839] 9. 2-(甲基氨基)乙基氨基甲酸叔丁酯的合成

[0840]



[0841] 向 2-溴乙基氨基甲酸叔丁酯 (9g, 40.3mmol) 和甲胺 (41.7g, 403mmol, 于 EtOH 中 30%) 于 EtOH (80mL) 中的溶液添加 KI (140mg, 0.8mmol)。将混合物在搅拌下加热至 50℃ 持续 5 小时, 并且然后在减压下浓缩, 将残余物倒入水中并且用 EtOAc (3*80mL) 萃取。将有机相用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并且去除溶剂以得到 4.3g 油状物 (不经纯化用于下一步骤)。

[0842] LC-MS: CP-0007023-128: (ES, m/z): 175 [M+H]⁺

[0843] 10. 化合物 16 的合成

[0844]

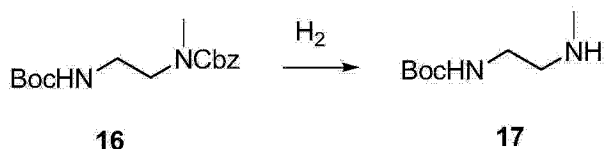


[0845] 在 0℃ 下向 2-(甲基氨基)乙基氨基甲酸叔丁酯 (4.3g, 0.44mmol) 于 THF (60mL) 中的溶液添加 TEA (5.49g, 54.3mmol) 和 CbzCl (4.62g, 27.1mmol)。将混合物在 0℃ 下搅拌 4 小时, 并且然后倒入水 (100mL) 中, 并且用 EtOAc (3*80mL) 萃取。将有机相用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并且将残余物通过反相 biotage 纯化以得到油状产物 (2.5g, 33%)。

[0846] LC-MS: CP-0007023-130: (ES, m/z): 331 [M+Na]⁺

[0847] 11. 2-(甲基氨基)乙基氨基甲酸叔丁酯的合成

[0848]

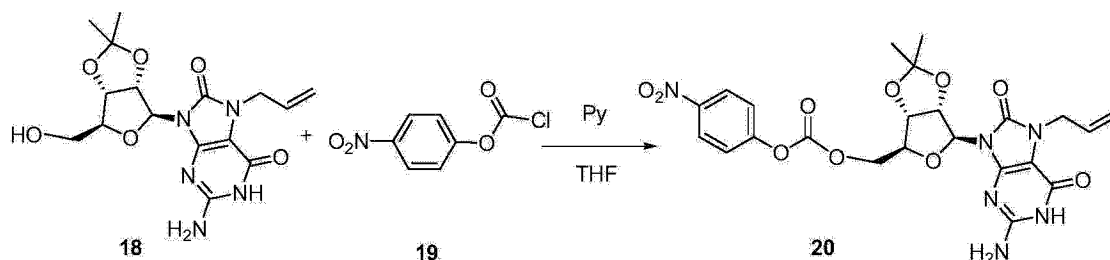


[0849] 向化合物 16 (1.3g, 4.22mmol) 于 MeOH (30mL) 中的溶液添加 Pd/C (150mg, 10%)。将悬浮液在 H₂ 气氛下在搅拌下振荡 2 小时。通过过滤去除催化剂并且在减压下浓缩滤液以得到油状产物 (720mg, 98%)。

[0850] ¹H NMR: CP-0007023-117: ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500MHz): δ (ppm) 6.707 (s, 1H), 2.999-2.962 (q, J = 6.5, 12.5Hz, 2H), 2.488-2.461 (t, J = 7, 13.5Hz, 2H), 2.247 (s, 3H), 1.369 (s, 9H)。

[0851] 12. 4-硝基苯基碳酸 ((3aS, 4S, 6S, 6aS)-6-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-2,2-二甲基-四氢呋喃并 [3,4-d] [1,3] 间二氧杂环戊烯-4-基) 甲酯的合成

[0852]

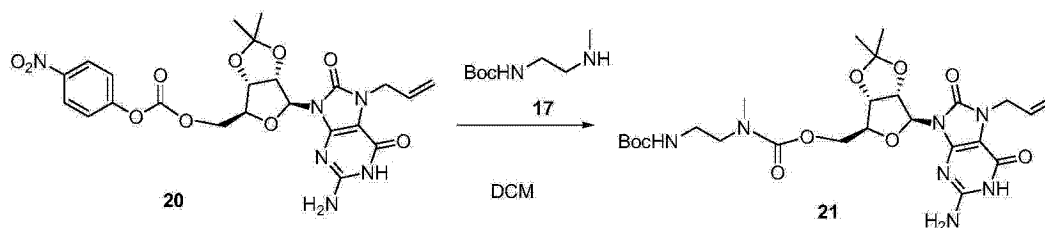


[0853] 向 7-烯丙基-2-氨基-9-((3aS, 4S, 6S, 6aS)-6-(羟甲基)-2, 2-二甲基-四氢呋喃并[3, 4-d][1, 3]间二氧杂环戊烯-4-yl)-1H-嘌呤-6, 8(7H, 9H)-二酮 (1.4g, 3.7mmol) 于干燥 THF (36mL) 中的悬浮液添加吡啶 (2.92g, 37mmol), 将悬浮液搅拌 0.5 小时, 并且然后在 0℃ 下逐滴添加氯甲酸 4-硝基苯基酯 (4.48g, 22.2mmol) 于干燥 THF (24mL) 中的溶液。将混合物在室温下搅拌 5 小时并且然后在减压下浓缩。将残余物溶解于 CH₂Cl₂ (70mL) 中, 并且用盐水 (饱和) 洗涤, 将有机相用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并且浓缩。将残余物通过反相 biotage 进行纯化以得到黄色固体产物 (1.2g, 55%)。

[0854] LC-MS: CP-0007023-172: (ES, m/z): 545 [M+H]⁺

[0855] 13. 化合物 21 的合成

[0856]

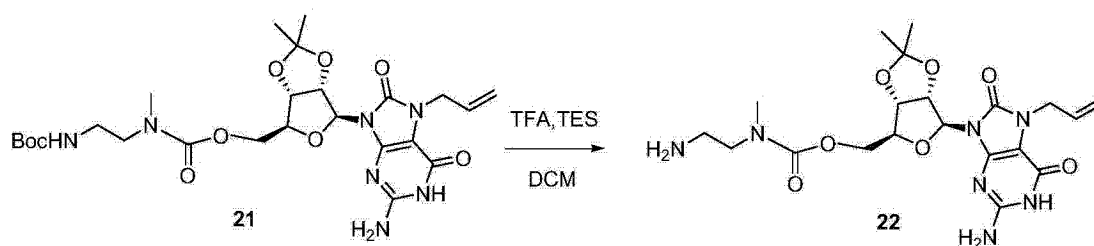


[0857] 向 4-硝基苯基碳酸 ((3aS, 4S, 6S, 6aS)-6-(7-烯丙基-2-氨基-6, 8-二氧代-1, 6, 7, 8-四氢嘌呤-9-基)-2, 2-二甲基-四氢呋喃并[3, 4-d][1, 3]间二氧杂环戊烯-4-基) 甲酯 (1.1g, 2mmol) 于 CH₂Cl₂ (10mL) 中的溶液添加 2-(甲基氨基) 乙基氨基甲酸叔丁酯 (704mg, 4mmol)。将混合物在室温下搅拌 2 小时, 并且然后用盐水 (饱和) 洗涤。将有机相用 Na₂SO₄ 干燥并且通过反相 biotage 纯化以得到黄色固体产物 (910mg, 78%)。

[0858] LC-MS: CP-0007023-175: ES, m/z): 580 [M+H]⁺

[0859] 14. 2-氨基乙基(甲基)氨基甲酸 ((3aS, 4S, 6S, 6aS)-6-(7-烯丙基-2-氨基-6, 8-二氧代-1, 6, 7, 8-四氢嘌呤-9-基)-2, 2-二甲基-四氢呋喃并[3, 4-d][1, 3]间二氧杂环戊烯-4-基) 甲酯的合成

[0860]

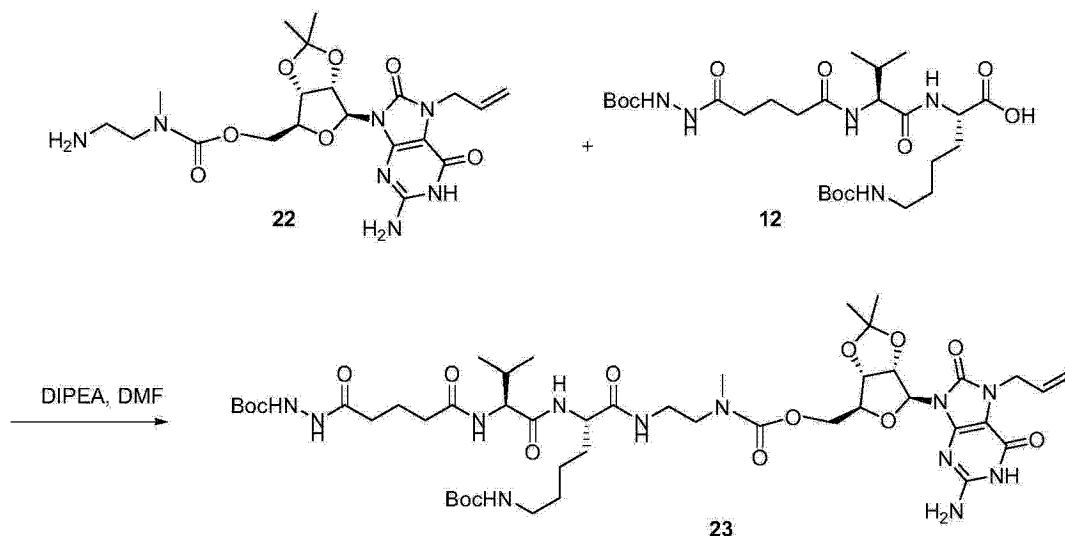


[0861] 在 0℃ 下向 21 (1g, 1.73mmol) 和 TES (3.4mL) 于 CH₂Cl₂ (16.5mL) 中的溶液逐滴添加 TFA (3.4mL)。将混合物在 0℃ 下搅拌 2 小时并且然后在减压下浓缩。将残余物用 Et₂O 洗涤以得到白色固体产物 (920mg, 90%)。

[0862] LC-MS:CP-0007023-179: (ES, m/z): 480 [M+H]⁺

[0863] 15. 化合物 23 的合成

[0864]

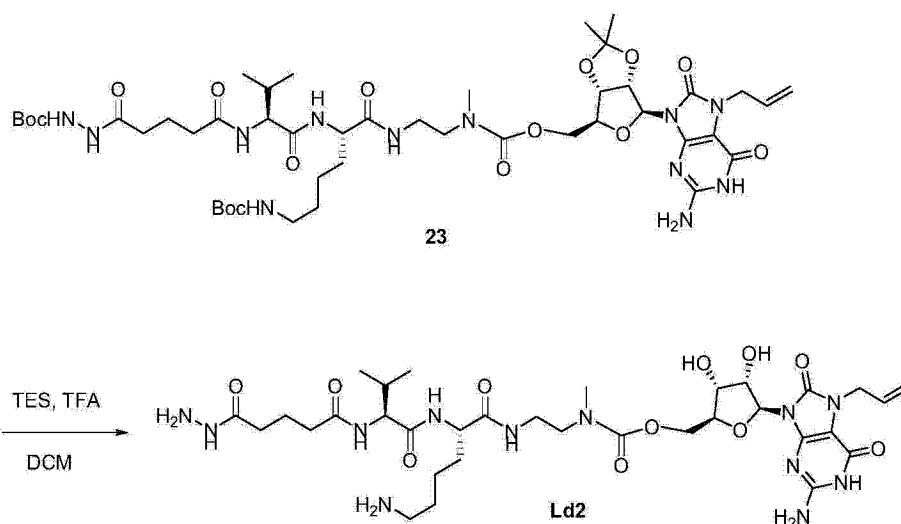


[0865] 向 (13S, 16S)-13-异丙基-2,2,24,24-四甲基-4,7,11,14,22-五氧代-3,23-二氧杂-5,6,12,15,21-五氮杂二十五烷-16-苯甲酸 (197mg, 0.34mmol) 于 DMF (5mL) 中的溶液添加 DIPEA (296mg, 2.3mmol)、EDCI (132mg, 0.69mmol) 以及 HOBt (62mg, 0.46mmol)。将混合物搅拌 1.5 小时, 并且然后添加 2-氨基乙基(甲基)氨基甲酸 ((3aS, 4S, 6S, 6aS)-6-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-2,2-二甲基-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲酯 (110mg, 0.23mmol) 和 DMAP (56mg, 0.46mmol), 将混合物在室温下搅拌 16 小时。将混合物倒入水 (50mL) 中并且用 EtOAc (30mL*3) 萃取。将有机相合并, 并且用水 (15mL) 洗涤, 然后用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并且浓缩。将残余物通过 Pre-HPLC 进行纯化以得到白色固体产物 (43mg, 23%)。

[0866] LC-MS:CP-0007349-069: (ES, m/z): 1035 [M+H]⁺

[0867] 16. 2-((S)-6-氨基-2-((S)-2-(5-胍基-5-氧代戊酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)己酰胺基)乙基(甲基)氨基甲酸 ((2S, 3R, 4S, 5S)-5-(7-烯丙基-2-氨基-6,8-二氧代-1,6,7,8-四氢嘌呤-9-基)-3,4-二羟基-四氢呋喃-2-基)甲酯的合成

[0868]



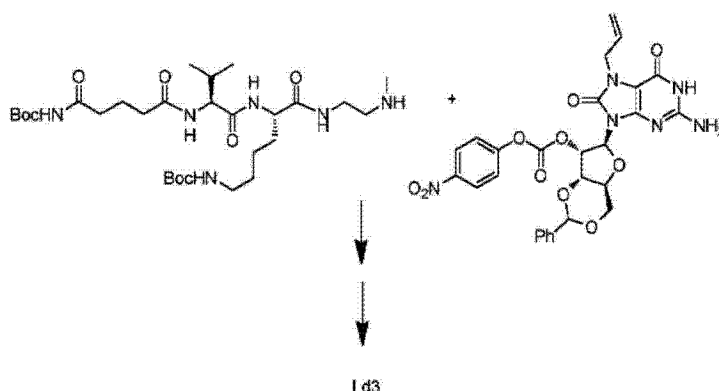
[0869] 在 0℃ 下向化合物 23 (30mg, 0.03mmol) 和 TES (0.5mL) 于 CH₂Cl₂ (1mL) 中的溶液逐滴添加 TFA (0.5mL)。将混合物在搅拌下加热至室温持续 4 小时并且然后在减压下浓缩。将残余物通过 Pre-HPLC 进行纯化以得到白色固体产物 (4mg, 17%)。

[0870] LC-MS: CP-0007023-117: (ES, m/z): 795 [M+H]⁺

[0871] Ld3 的合成

[0872] 可以通过使用与本说明书中所描述的那些类似的方法使洛索立宾的衍生物与接头如下所示反应来制备 Ld3。

[0873]



[0874] Ld4 的合成

[0875] 可以使用较短 PEG 链、使用与图 28 中所示的方法类似的方法来制备 Ld4。

[0876] Ld5 的合成

[0877] 可以使用较短 PEG 链、使用与图 27 中所示的方法类似的方法来制备 Ld5。

[0878] Ld6 的合成

[0879] Ld6 可以使用图 44 中所示的方法进行制备。

[0880] Ld7 的合成

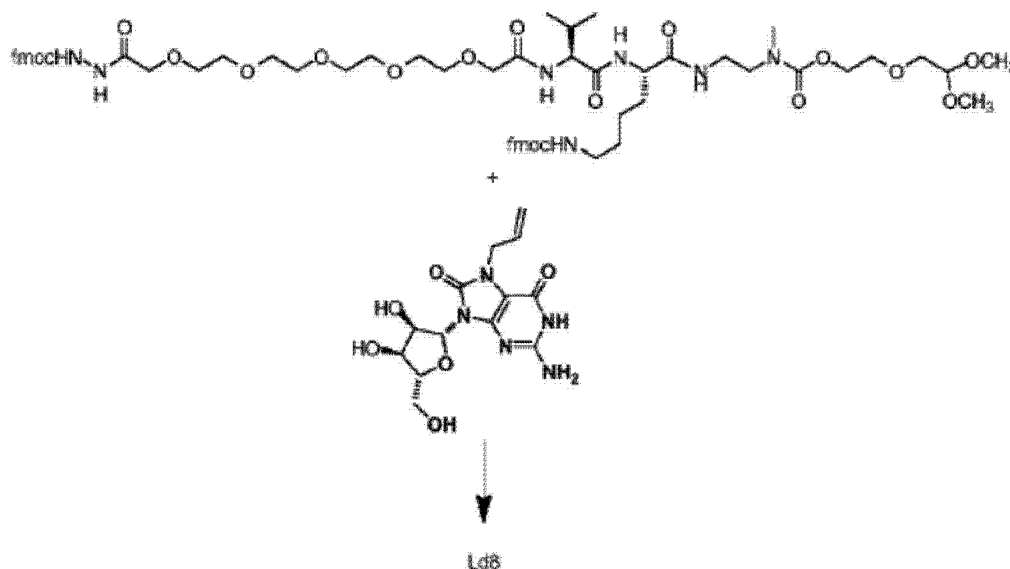
[0881] Ld7 并入胍烟酸而不是碳酸胍苯甲酸并且可以使用用于制备 Ld6 的相同方法进行制备。

[0882] Ld8 的合成

[0883] 用于合成基于 PEG 的接头的类似策略可以用于合成 Ld8 所要求的具有缩醛基的

PEG 接头。这种接头可以如以下所示与洛索立宾缩合以形成并入环状缩醛的 Ld8。

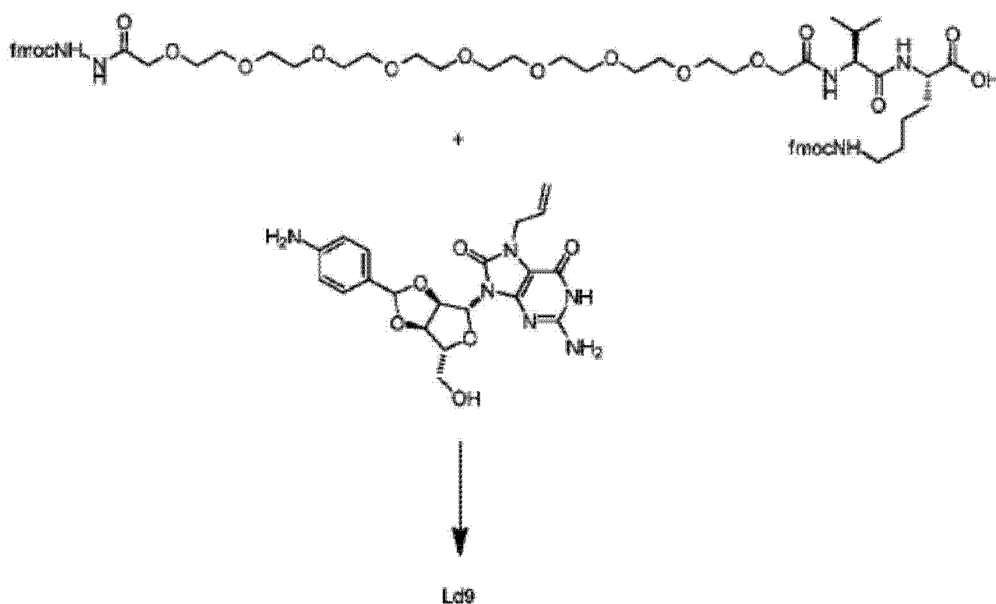
[0884]



[0885] Ld9 的合成

[0886] 用于合成基于 PEG 的接头的类似策略可以用于合成 Ld9 所要求的 PEG 接头。这种接头可以如以下所示与洛索立宾的缩醛缩合以形成 Ld9。

[0887]



[0888] Ld10 的合成

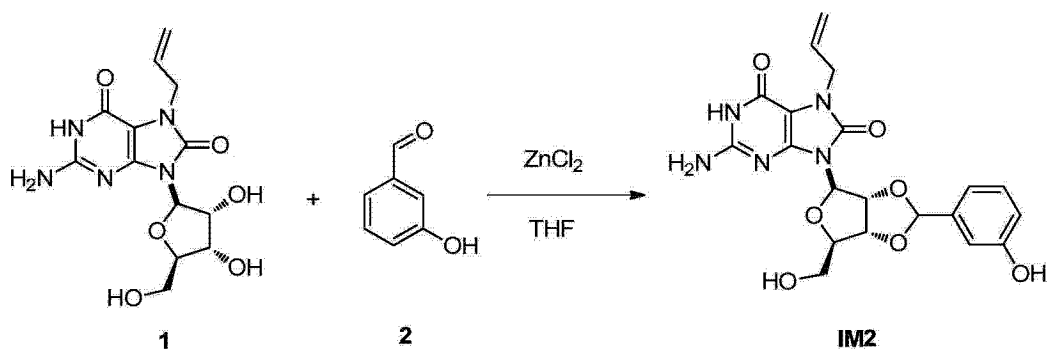
[0889] Ld10 可以使用图 44 中所示的方法进行制备。

[0890] IM2 的合成

[0891] 可以使用图 41 中所示的方法并且如以下所描述来制备 IM2 (Ld10 的合成中的中间体化合物)。

[0892] 1. 7-烯丙基-2-氨基-9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(羟甲基)-2-(3-羟苯基)-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-1H-嘌呤-6,8(7H,9H)-二酮的合成

[0893]



[0894] 向 7-烯丙基-2-氨基-9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟甲基)-四氢呋喃-2-基)-1H-嘌呤-6, 8(7H, 9H)-二酮 (500mg, 1.47mmol) 和 3-羟基苯甲醛 (1.8g, 14.7mmol) 于 THF (40mL, 无水) 中的悬浮液添加 ZnCl_2 (7.37mL, 7.37mmol, 于 Et_2O 中)。将悬浮液在搅拌下加热至回流持续 48 小时。将悬浮液冷却至室温并且倒入 Et_2O (300mL) 中以得到灰色沉淀物, 并且然后通过 Pre-TLC 纯化以得到灰色固体产物 (45mg, 7%)。

[0895] LC-MS: CP-0007023-040: (ES, m/z): 444 [M+H]⁺

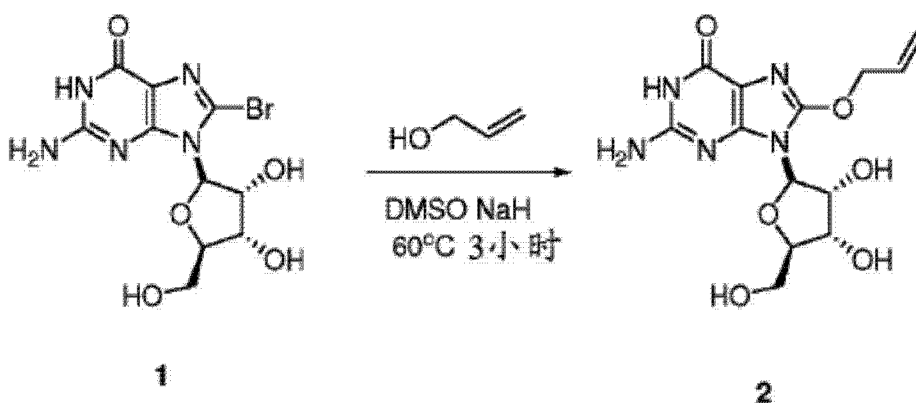
[0896] ¹H-NMR-CP-0006708-040: ¹H-NMR (DMSO- d_6 , 500MHz): δ (ppm) 11.06 (s, 1H), 9.597 (s, 1H), 7.239-7.207 (t, J = 8, 16Hz, 1H), 6.943-6.907 (m, 2H), 6.831-6.811 (dd, J = 2, 8Hz, 1H), 6.677 (s, 2H), 5.946-5.870 (m, 3H), 5.436-5.420 (dd, J = 1, 7Hz, 1H), 5.124-5.100 (dd, J = 1.5, 10.5Hz, 1H), 5.058-5.020 (m, 2H), 4.890-4.866 (t, J = 6, 24Hz, 1H), 4.411-4.400 (d, J = 5.5Hz, 2H), 4.157-4.125 (m, 1H), 3.619-3.571 (m, 1H), 3.504-3.457 (m, 1H)。

[0897] IM3 的合成

[0898] 可以使用图 42 中所示的方法并且如以下所描述来制备 IM3 (Ld10 的类似物的合成中的中间体化合物)。

[0899] 1. 8-(烯丙氧基)-2-氨基-9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟甲基)-四氢呋喃-2-基)-1H-嘌呤-6(9H)-酮的合成

[0900]



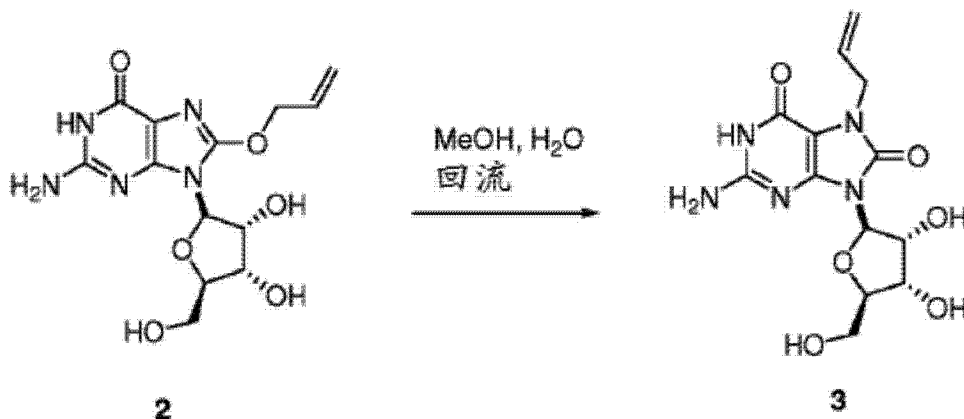
[0901] 在 0°C 下向丙-2-烯-1-醇 (120mL) 于 DMSO (160mL, 无水) 中的溶液分批添加氢化钠 (11g, 276mmol)。使混合物在搅拌下升温至 25°C 持续 1 小时, 并且然后添加 2-氨基-8-溴代-9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟甲基)-四氢呋喃-2-基)-1H-嘌呤-6(9H)-酮。将混合物搅拌 0.5 小时并且然后在搅拌下加热至 60°C 持续 4 小时。将混合物冷却至室温, 并且然后添加至二乙醚 (2.5L) 以得到灰色沉淀物, 并且通过反相 biotage 纯化以得到白色

固体产物 (4.8g, 51%)。

[0902] LC-MS:CP-0007023-020: (ES, m/z): 340 $[M+H]^+$

[0903] 2-烯丙基-2-氨基-9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟甲基)-四氢呋喃-2-基)-1H-嘌呤-6, 8(7H, 9H)-二酮的合成

[0904]

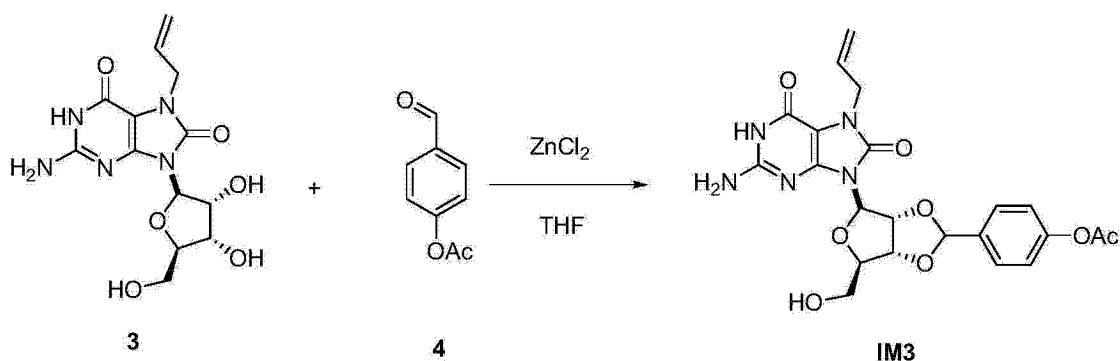


[0905] 将 8-(烯丙氧基)-2-氨基-9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟甲基)-四氢呋喃-2-基)-1H-嘌呤-6(9H)-酮 (2.6g, 7.7mmol) 悬浮于 MeOH(25mL) 和水 (25mL) 中。将悬浮液在搅拌下加热至回流持续 20 小时 (混合物变得透明)。去除有机溶剂并且将水溶液冷冻干燥以得到白色固体产物 (2.6g, 100%)。

[0906] LC-MS:CP-0007023-031: (ES, m/z): 340 $[M+H]^+$

[0907] 3. 乙酸 4-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-4-(7-烯丙基-2-氨基-6, 8-二氧代-1, 6, 7, 8-四氢嘌呤-9-基)-6-(羟甲基)-四氢呋喃并 [3, 4-d][1, 3] 间二氧杂环戊烯-2-基) 苯酯的合成

[0908]



[0909] 向 7-烯丙基-2-氨基-9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-二羟基-5-(羟甲基)-四氢呋喃-2-基)-1H-嘌呤-6, 8(7H, 9H)-二酮 (400mg, 1.18mmol) 和乙酸 4-甲酰基苯酯 (1.93g, 11.8mmol) 于 THF(30mL, 无水) 中的悬浮液添加 $ZnCl_2$ (5.9mL, 5.9mmol, 于 Et_2O 中)。将悬浮液在搅拌下加热至回流持续 48 小时。将悬浮液冷却至室温并且倒入 Et_2O (300mL) 中以得到灰色沉淀物, 并且然后通过 Pre-TLC 纯化以得到灰色固体产物 (45mg, 8%)。

[0910] LC-MS:CP-0007023-034: (ES, m/z): 486 $[M+H]^+$

[0911] 1H -NMR-CP-0006708-034: 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500MHz): δ (ppm) 11.00 (s, 1H), 7.575-7.558 (d, J = 8.5Hz, 2H), 7.221-7.204 (d, J = 8.5Hz, 2H), 6.684 (s, 2H), 5.988 (s, 1H), 5.9

45-5.879 (m, 2H), 5.466-5.450 (dd, $J = 1$, 7Hz, 1H), 5.119-5.018 (m, 3H), 4.890-4.867 (t, $J = 6$, 11.5Hz, 1H), 4.408-4.397 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 4.179-4.147 (m, 1H), 3.616-3.568 (m, 1H), 3.502-3.455 (m, 1H), 2.287 (s, 3H)。

[0912] Rd1 的合成

[0913] Rd1 可以使用图 43 中所示的方法进行制备。

[0914] Rd2 的合成

[0915] Rd2 可以使用与图 25 中所示的方法类似的方法,使用与用于 Ld2 和 Ld3 的接头类似的非 PEG 接头进行制备。

[0916] Rd3 的合成。

[0917] Rd3 并入存在于 Ld4 和 Ld5 中的 PEG 接头,并且可以使用类似策略进行制备。

[0918] LD1 与氧化的甘露聚糖的缀合

[0919] 甘露聚糖的氧化

[0920] 1. 将 28mg 甘露聚糖溶解于 2ml 0.1M PB (pH6.0) 中。

[0921] 2. 将 0.213g 高碘酸钠溶解于 10ml ddH₂O (0.1M) 中。

[0922] 3. 反应:最后添加高碘酸盐。建立两个反应。

[0923] >1000kDa 甘露聚糖, 1.0ml (14mg)

[0924] 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH6.0), 550 μ l

[0925] 0.1M 高碘酸钠, 50 μ l

[0926] 总共 1.6ml

[0927] 4. 将混合物在黑暗中的冰上孵育 1 小时。

[0928] 5. 将反应用 10 μ l 乙二醇淬灭。

[0929] 6. 将混合物在黑暗中的冰上孵育另外 0.5 小时。

[0930] 7. 将 PD-10 柱用 50ml 0.2M NaOH、接着用 50ml DDW 洗涤。

[0931] 8. 将样品通过用 0.2M 乙酸盐缓冲液 (pH5.0) 预先平衡的 PD10 (G25, GE Healthcare, 8.3ml) 柱。上样 1.6ml 样品并且运行。添加另外 0.9ml 乙酸盐缓冲液并且使其流过而不收集。

[0932] 9. 添加 2ml 乙酸盐缓冲液并且收集部分。氧化的甘露聚糖在乙酸盐缓冲液中是约 7mg/ml, 从而假定回收是 100%。

[0933] 10. 重复步骤 7 至步骤 9 以得到脱盐的剩余样品。

[0934] 与 LD1 缀合

[0935] 1. 将 5.3mg LD1 (分子量 474, 90% 纯) 溶解于 0.83ml DMSO (10mM) 中。

[0936] 2. 根据表 4 开始缀合。

[0937] 表 4: LD1 与氧化的甘露聚糖的缀合

[0938]

	氧化的甘露聚糖	LD1 (10 mM)	DMSO	注释
缀合物 x100	1.0 ml (7 mg/ml)	70 μ l	130 μ l	100倍过量的LD1
缀合物 x50	1.0 ml (浓度至14 mg/ml)	70 μ l	130 μ l	50倍过量的LD1

- [0939] 3. 将 PD-10 柱用 50ml 0.2M NaOH、接着用 50ml DDW 洗涤。
- [0940] 4. 在室温下孵育 4 小时之后, 将样品通过 PD10 柱。上样 1.2ml 样品并且运行。添加 1.3ml DDW 并且允许流过而不收集。
- [0941] 5. 添加 2ml DDW 并且收集样品。
- [0942] 6. 将样品储存在 4℃ 下。通过 OD300 测定浓度。
- [0943] 内毒素的去除
- [0944] 1. 将样品与 1% 曲通 x-114 在 4℃ 下孵育 1 小时。
- [0945] 2. 填充 1ml Q Sepharose FF 柱。
- [0946] 3. 将 Q Sepharose 柱用 10ml 1.0M NaOH、接着用 10ml H₂O 洗涤。
- [0947] 4. 将样品上样至所述柱上并且用 10ml 1% 曲通 x-114 洗涤。
- [0948] 5. 将柱用 10ml 水洗涤。
- [0949] 6. 将样品用 2ml 的 0.5M NaCl 洗脱。
- [0950] 7. 收集 100 μl 部分并且测定 OD300。
- [0951] 8. 收集含有缀合物的部分。
- [0952] 内毒素确定
- [0953] 样品的内毒素水平通过 LAL 测定进行确定。
- [0954] 浓缩
- [0955] 1. 将样品通过 Millipore Amicon Ultra (0.5ml, 截留值 30kDa) 进行浓缩。将 Amicon ultra 管在使用之前用 0.1M NaOH 进行处理。
- [0956] 2. 为了改变缓冲液, 在浓缩过程中将样品用水稀释 10 次。
- [0957] 3. 将样品储存在 -80℃ 下。
- [0958] 定量
- [0959] 因为甘露聚糖和其氧化形式在可见光下都不具有吸收作用, 所以缀合物的定量可以容易地通过检查 LD1 的浓度来进行简化。LD1 在 300nm 左右具有最大吸收并且 OD300 被证明与 LD1 浓度是线性相关的。
- [0960] 为了确定缀合物的浓度, 通过连续稀释获得 LD1 的标准曲线。测量缀合物的 OD300 并且然后根据标准曲线计算其浓度。
- [0961] 表 5: 最终产物的浓度
- [0962]

	LD1对OM 比率	浓度	量 (μl)	内毒素
OM-LD1, 缀合物x50	63	5.9 mM	30 μl	<1 ng/ml
OM-LD1, 缀合物x100	120	7.9 mM	25 μl	<1 ng/ml

- [0963] LD2 与氧化的甘露聚糖的缀合
- [0964] 甘露聚糖的氧化
- [0965] 1. 将 0.213g 高碘酸钠溶解于 10ml ddH₂O (0.1M) 中。
- [0966] 2. 将 28mg 甘露聚糖溶解于 2ml 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH6.0) 中。

- [0967] 3. 反应 :最后添加高碘酸盐。
- [0968] >1000kDa 甘露聚糖, 2.0ml (28mg)
- [0969] 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH6.0), 1.1ml
- [0970] 0.1M 高碘酸钠, 100 μ l
- [0971] 总共 3.2ml
- [0972] 4. 将混合物在黑暗中的冰上孵育 1 小时。
- [0973] 5. 将反应用 10 μ l 乙二醇淬灭。
- [0974] 6. 将混合物在黑暗中的冰上孵育另外 0.5 小时。
- [0975] 7. 将 PD-10 柱用 50ml 0.2M NaOH、接着用 50ml DDW 洗涤。
- [0976] 8. 将样品通过用 0.2M 乙酸盐缓冲液 (pH5.0) 预先平衡的 PD10(G25, GE Healthcare, 8.3ml) 柱。上样 1.6ml 样品并且运行。添加 0.9ml 乙酸盐缓冲液并且使其流过而不收集。
- [0977] 9. 添加 2ml 乙酸盐缓冲液并且收集部分。
- [0978] 10. 重复步骤 8 至步骤 9 以得到脱盐的剩余样品。
- [0979] 11. 氧化的甘露聚糖在乙酸盐缓冲液中是约 7mg/ml。回收假定为 100%。通过 LAL 方法来确定内毒素水平。
- [0980] 与 LD2 缀合
- [0981] 1. 将 4mg LD2-#195 或 #197 (分子量 794) 溶解于 0.5ml DMSO (10mM) 中。
- [0982] 2. 根据表 6 建立缀合。
- [0983] 表 6 :LD2 与氧化的甘露聚糖的缀合
- [0984]

	氧化的甘露聚糖	LD2 (10 mM)	注释
OM-LD2-#195	2.0 ml	225 μ l	150倍过量的LD2
OM-LD2-#197	2.0 ml	450 μ l	300倍过量的LD2

- [0985] 3. 将 PD-10 柱用 50ml 0.2M NaOH、接着用 50ml DDW 洗涤。
- [0986] 4. 在室温下孵育 4 小时之后, 将样品通过 PD10 柱。上样样品并且运行。添加 2.5ml DDW 并且允许流过而不收集。
- [0987] 5. 将柱用 3.5ml DDW 洗涤并且收集样品。通过 LAL 方法来确定内毒素水平。
- [0988] 6. 将样品储存在 4℃ 下。通过 OD300 确定浓度。
- [0989] 内毒素去除
- [0990] 1. 填充 1ml Q Sepharose FF 柱。
- [0991] 2. 将 Q Sepharose 柱用 10ml 1.0M NaOH、接着用 10ml H₂O 洗涤。
- [0992] 3. 将样品上样至所述柱上并且用 2.5ml 水 (收集流过流)、接着用 10ml 1% 曲通 x-114 洗涤。
- [0993] 4. 将柱用 10ml 水洗涤。
- [0994] 5. 将样品用 5ml 的 0.5M NaCl 洗脱并且收集 100 μ l 部分。
- [0995] 6. 测定每个部分的 OD300 并且收集含有缀合物的部分。
- [0996] 注意, 对于 OM-LD2-#195 来说, 约 1/3 缀合物在流过流中并且使用具有新鲜树脂的

第二 Q Sepharose 柱。

[0997] 内毒素确定

[0998] 样品的内毒素水平通过 LAL 测定进行确定。

[0999] 浓缩

[1000] 1. 将样品通过 Millipore Amicon Ultra(0.5ml, 截留值 3kDa) 进行浓缩。将 Amicon ultra 管在使用之前用 0.1M NaOH 进行处理。

[1001] 2. 为了改变缓冲液, 在浓缩过程中将样品用水稀释 10 倍。

[1002] 3. 将样品储存在 -80℃ 下。

[1003] 定量

[1004] 使用 LD2 的标准曲线和 300nm 下的光密度如针对 LD1 所描述的来确定 LD2 的浓度和残基的数目。

[1005] 表 7 :最终产物的浓度

[1006]

	LD2对OM 比率	浓度	量(μl)	内毒素
OM-LD2-#195	100	13.3 mM	45 μl	<1 ng/ml
OM-LD2-#197	60	21.3 mM	45 μl	<1 ng/ml

[1007] 实施例 13 :通过洛索立宾 (LOX) 氧化的甘露聚糖缀合物刺激由 PBMC 的细胞因子释放 (IL-6)

[1008] 合成洛索立宾 (LOX) 衍生物 LD1 并且如以上所描述将其与氧化的甘露聚糖缀合 (LD1-OM)。LOX 衍生物 LD1 并入酰肼键联用于与氧化的甘露聚糖的醛残基和接头与 LOX 之间的酯键联缀合。LD1 氧化的甘露聚糖缀合物用于刺激从人供体分离的 PBMC 并且通过 ELISA 来测量 IL-6 细胞因子释放。

[1009] IL-6 测定通过测试游离 LOX 的细胞因子刺激作用进行验证。如表 8 中所示, LOX 能够在 500 μM 的剂量下刺激 IL-6 释放。

[1010] 表 8 :通过 LOX 的 PBMC 中的细胞因子刺激

[1011]

	IL-6 (pg/ml)
对照未刺激的	4. 37
LOX (500 μ M)	103. 58
LOX (500 μ M)	218. 48

[1012] 对具有 2 种不同药物负载 (LD1-OM60 和 LD1-OM120) 的 LD1 氧化的甘露聚糖缀合物在第 6 小时和第 24 小时针对 PBMC 的 IL-6 释放进行测试。LD1 氧化的甘露聚糖缀合物在第 6 小时和第 24 小时成功地刺激由 PBMC 的 IL-6 释放 (表 9)。

[1013] 表 9 :通过 LOX 氧化的甘露聚糖缀合物的 PBMC 中的细胞因子刺激

[1014]

化合物	IL-6的EC ₅₀		量IL-6 (pg/ml)	
	第6小时	第24小时	第6小时	第24小时
LOX	/	/	/	10
LD1	/	/	/	/
LD1-OM60	54.8 μ M	107.3 μ M	86	91
LD1-OM120	74.8 μ M	146.7 μ M	105	111

[1015] “/”定义为最大细胞因子释放的 50% 的 EC₅₀ 未达到。

[1016] 因为游离 LOX 未实现 EC₅₀ 值,所以使用从 IL-6 标准曲线计算的诱导的 IL-6 (pg/ml) 的量将通过游离 LOX 刺激 IL-6 与所述缀合物进行比较。未缀合的 LD1 不刺激 IL-6。在第 24 小时时间点,500 μ M LOX 的剂量从 PBMC 刺激 10pg/ml 的 IL-6,而具有 60 和 120 个残基的 LD1 氧化的甘露聚糖缀合物分别刺激 91 和 111pg/ml IL-6。类似地,在第 6 小时时间点,LD1 缀合物诱导 86(60 个残基) 和 105pg/ml(120 个残基) IL-6,而游离 LOX 未能从人 PBMC 诱导 IL-6。

[1017] 体外数据清楚地指示 LD1 氧化的甘露聚糖缀合物在诱导由 PBMC 的 IL-6 分泌方面比游离 LOX 更有效。清楚地,LOX 衍生物 LD1 经由酯键联与氧化的甘露聚糖的键联可以导致从 PBMC 更有效的刺激 IL-6。

[1018] 实施例 14 :GST-MUC1-VNTR(FP)

[1019] 缀合

[1020] 如之前所描述将 FP 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合 (>1000MFP) (图 45)。

[1021] 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖连接的 FP 的免疫原性

[1022] 通过用氧化的甘露聚糖 -pTrc 反复刺激、接着分选 MUC1- 特异性 T 细胞和扩增来产生 MUC1- 特异性 T 细胞系。对用甘露聚糖缀合物脉冲的同种异体 DC(BC16) 将 MUC1 呈递至 MUC1- 特异性 T 细胞系的能力进行研究。>1000MFP 能够刺激 MUC1- 特异性 T 细胞系,如图 46 中所示。在 10 和 20 μ g/ml 剂量下,>1000MFP 在刺激 T 细胞方面比未缀合的 FP 更有效。

[1023] 实施例 15 :MUC1-VNTR(pTrc)

[1024] 缀合

[1025] 将 MUC1-VNTR(pTrc) 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合 (图 47)。使不同量的 pTrc 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖反应以确定最佳比率。具有抗原:甘露聚糖比率 1:40(1/2x, 泳道 5) 的缀合物用于免疫原性研究。

[1026] 与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合的 MUC1-VNTR 的免疫原性

[1027] 经由用冷冻的 MoDC(冷冻的,BC17K) 唤起的 pTrc(MUC1) T 细胞系(来自供体 BC13) 来确定与 >1000kDa 氧化的甘露聚糖连接的 pTrc 的体外免疫原性(图 48)。如所示,pTrc 未被有效地加工并且呈递至 MUC1- 特异性 T 细胞。然而,>1000kDa 缀合物比未缀合的 pTrc 更有效地刺激 MUC1 特异性 T 细胞。用 20 μ g/ml pTrc、>1000kDa pTrc 缀合物脉冲的自体 MoDC 用于从来源于健康供体 BC17K 的 MUC1- 特异性 T 细胞系唤起 MUC1 特异性 CD8 应答(图 49)。与未缀合的抗原相比,>1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物有效地刺激 CD8T 细胞中的细胞内 IFN γ 分泌。

[1028] 实施例 16 :MART-1

[1029] 缀合

[1030] 如以上所描述将重组 MART-1 蛋白也连接至 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物 (图 50)。用 MART-1 蛋白制成两种类型的缀合物, 正常的和还原的。MART-1 蛋白具有几种细胞因子并且因此易于空气氧化和聚集。为了有助于缀合, 将 MART-1 首先用 DTT 进行还原并且然后在缀合中使用。

[1031] MART-1>1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物的免疫原性

[1032] T 细胞引发和用肽唤起

[1033] 如实施例 1 中所描述, 将来自 2 个供体 (BC28 和 BC29) 的 PBMC 和 MoDC 用于用 MART-1 和 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物 (20 μ g/ml) 引发。在 1 次刺激之后, 使用脉冲的 T2 细胞来测量类似物和天然 MART-1 肽特异性 T 细胞应答 (图 51)。用 >1000kDa 氧化的甘露聚糖-MART-1 引发的 BC28 供体 T 细胞有效地响应于由 T2 细胞呈递的类似物或天然 MART-1 肽 (图 51)。将 BC28 和 BC29 培养物用对应蛋白质和缀合物进行再刺激, 并且使用自体脉冲的 MoDC 作为抗原呈递细胞来针对 MART-1 蛋白特异性 T 细胞应答进行测试 (图 52)。脉冲的 MoDC 能够在用 >1000kDa 氧化的甘露聚糖缀合物引发的 BC28 和 BC29 供体 T 细胞中唤起 MART-1 特异性 CD8T 细胞应答。用 MART-1>1000kDa 氧化的甘露聚糖引发在引发方面比未缀合的蛋白质更有效。

[1034] 实施例 17: 使用灭活的流感病毒 (H1N1) 与 >1000kDa 甘露聚糖的混合物的体内免疫原性研究

[1035] 流感病毒和小鼠

[1036] 将卵生长的 H1N1 (A/New Caledonia/20/1999) 病毒通过蔗糖梯度进行纯化、浓缩并且用 β -丙内酯进行灭活, 以产生由世界卫生组织流感咨询与研究合作中心 (North Melbourne, Australia) 的副院长 Dr Ian Barr 真诚提供的流感区带池 (influenza zonal pool, IZP) 制备物。所有小鼠是由 WEHI (Melbourne, Australia) 供应的雌性 BALB/c 并且在第一次免疫时是 8 至 10 周龄。

[1037] H1N1/>1000kDa 甘露聚糖混合物的产生

[1038] 通过将 H1N1 储备液 (从 2.7mg/ml) 和 >1000kDa 甘露聚糖储备液 (从 14mg/ml) 在无菌 PBS 中稀释来产生 H1N1/>1000kDa 甘露聚糖混合物, 这样使得各自的所需剂量包含于 50 μ l 中。将 >1000kDa 甘露聚糖如之前所描述进行分离。

[1039] 免疫

[1040] 所有免疫是经由鼻内途径施用。当完全麻醉 (经由甲氧氟烷吸入) 并且竖直放置时, 将大约 5 μ l 滴剂交替地轻轻吸移至每个鼻孔中。

[1041] 血清和 BAL (支气管-肺泡-灌洗液 / 肺-洗液) 收集

[1042] 如所描述通过眶后取血收集血清。在收集 BAL 之前, 将小鼠用氯胺酮与甲苯噻嗪 (xylazil) 的混合物安乐死。去除组织以便暴露上部气管, 并且在其中形成小的切口。借助于附接至 1ml 注射器的钝针, 将 1ml 的 PBS 轻轻地冲洗至肺中, 并且抽出。

[1043] 抗体滴度的 ELISA 测定

[1044] 使用 HRP/TMB 系统进行 ELISA。将板用在 1 μ g/ml 浓度下的完整灭活的 H1N1 (A/New Caledonia/20/1999) 进行包被。使用直接缀合的大鼠抗小鼠 IgG-HRP (GE healthcare, 产品号 RPN1231V) 检测总抗 H1N1IgG 并且使用来自 Pharmingen (产品编号 553441、553388

以及 556978) 的生物素标记的一抗和来自 GE healthcare(产品号 346480) 的第二链霉亲和素- HRP 检测 IgG1、IgG2a 以及 IgA。终点滴度被测量为滴定中的最后值以保持在相应对照值之上,其中对照被计算为在每个滴定点处初次接受免疫的小鼠血清(3 至 5 只小鼠)的平均 OD 值 +2SD。

[1045] 在第 0 天、第 14 天将 4 只 BALB/c 小鼠的组用 H1N1 ($1\ \mu\text{g}$) 或与 $>1000\text{kDa}$ 甘露聚糖 ($100\ \mu\text{g}$) 混合的 H1N1 进行鼻内免疫。在最后一次免疫之后十至十四天,将小鼠血清和肺分泌物针对 H1N1 特异性 IgG1、IgG2a 以及 IgA 抗体进行分析。如图 53 中看出, $>1000\text{kDa}$ 甘露聚糖增强了血清 IgG1 应答。更重要地, $>1000\text{kDa}$ 甘露聚糖有效增强血清和肺 H1N1-特异性 IgA。

[1046] 本领域的技术人员将了解,在不脱离广义上描述的本发明的精神或范围的情况下,可对所述具体实施方案中所示的本发明作出众多的变化和/或修改。因此,本实施方案在所有方面都被视为是说明性的而不是限制性的。

[1047] 本文所讨论的和/或引用的所有出版物整体并入本文。

[1048] 对已经包括在本说明书中的文献、行为、材料、装置、物品等等的任何讨论仅是出于提供本发明的上下文的目的。它不应被视为承认任何或所有这些内容形成了现有技术基础的一部分或是与本发明有关的领域中的常见一般知识,因为它在本申请的各项权利要求的优先权日期之前就存在。

[1049] 本申请要求于 2011 年 11 月 9 日提交的 AU2011904656 的优先权,所述申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[1050] 参考文献

[1051] Anumula, Analytical Biochemistry (1994) 220 (2):275

[1052] Apostolopoulos et al., Br. J. Cancer (1993) 67:713

[1053] Apostolopoulos et al., Vaccine (2000) 18:3174

[1054] Apostolopoulos et al., Vaccine (2006) 24:3191

[1055] Barreto-Bergter and Gorin, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. (1983) 41:67

[1056] Cheever et al., Clin. Cancer Res (2009) 15:5323

[1057] Gorden et al., J. Immunol. (2005) 174:1259

[1058] Jeffrey et al., J. Med. Chem. (2005) 48:1344 Loveland 等人 Clin. Cancer Res (2006) 123:869

[1059] Monsigny et al., Analytical Biochemistry (1988) 175:525

[1060] Pietersz et al., Current Medicinal Chemistry (2006) 13 (14):1591

[1061] Sharma et al., Electrophoresis (2003) 24:2733-2739

[1062] Sun et al., Bioconjugate Chem. (2005) 16:1282

[1063] Sutcliffe et al., Science (1983) 219:660

[1064] Tang et al., Immunology (2007) 120 (3):325

[1065] Tang et al., Vaccine (2008) 26 (31):3827

[1066] Tang et al., Biomaterials (2009) 30 (7):1389

[1067] Toki et al., J. Org. Chem. (2002) 67:1866

[1068] van der Bruggen et al., Science (1991) 245:1643

-
- [1069] Vinogradov et al., Carbohydr. Res. (1998) 307:177
- [1070] Wang et al., Journal of Chromatographic Science (2007) 45 (4) :200

[0001]

序列表

<110> Ascend Biopharmaceuticals Pty Ltd

<120> 免疫调节缀合物

<130> 512490

<150> AU2010904060

<151> 2011-11-09

<160> 2

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 1

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 2

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

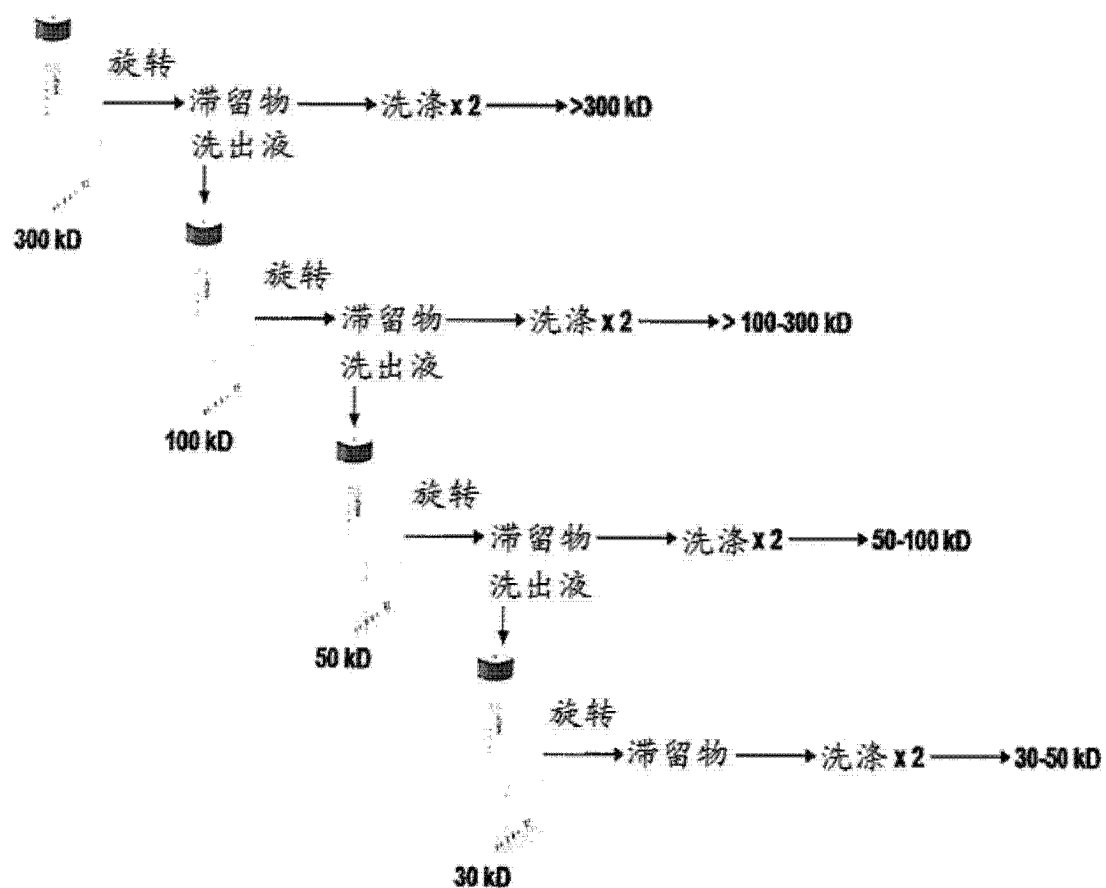


图 1

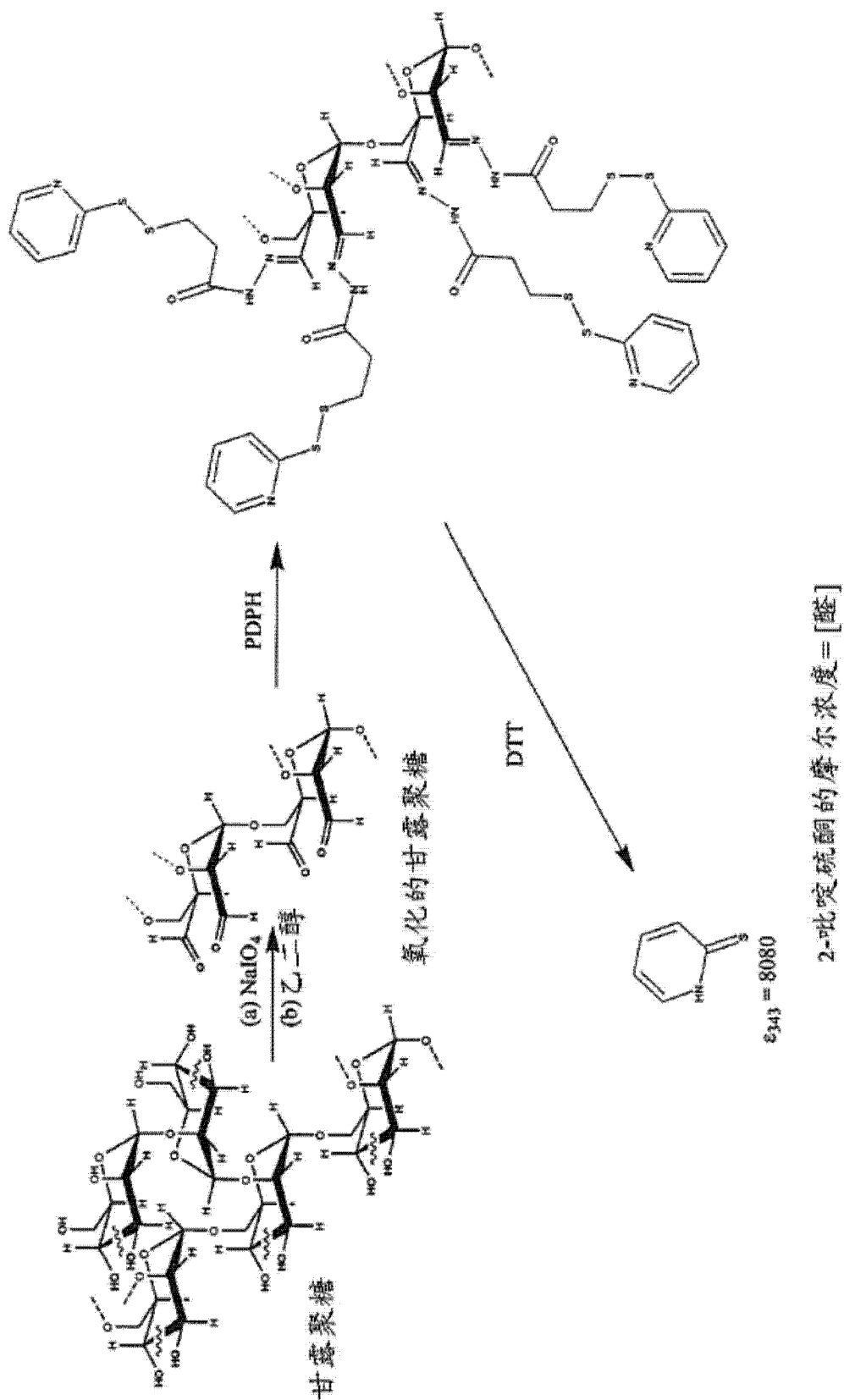


图 2

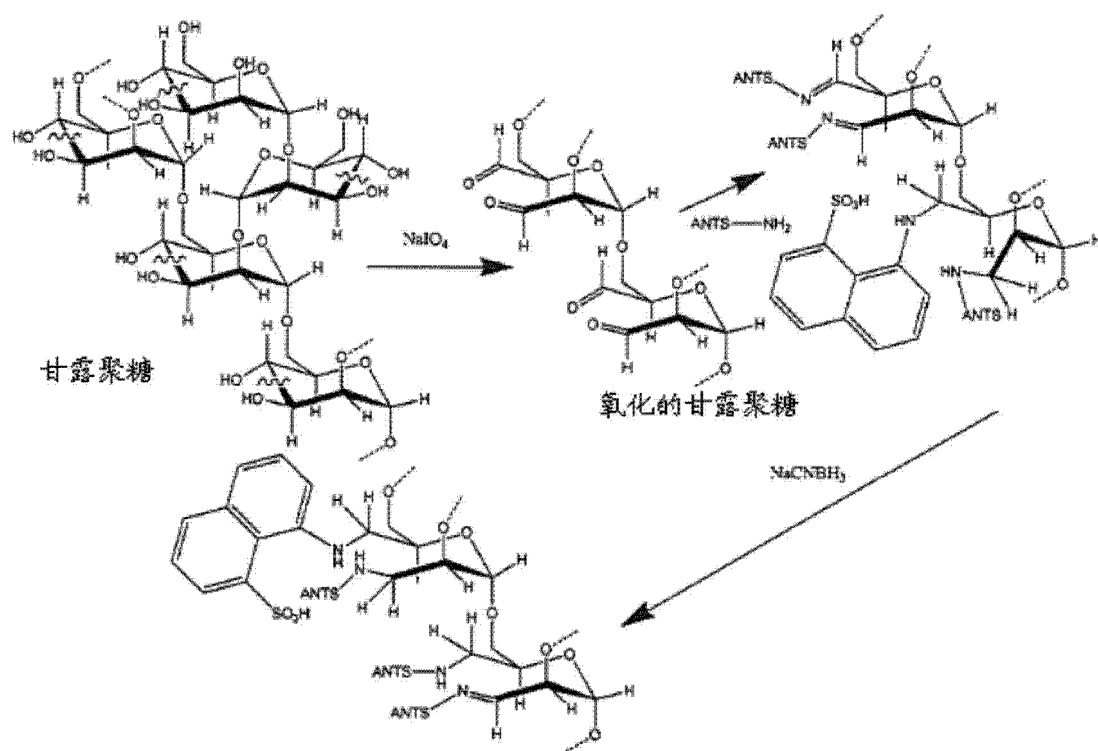


图 3

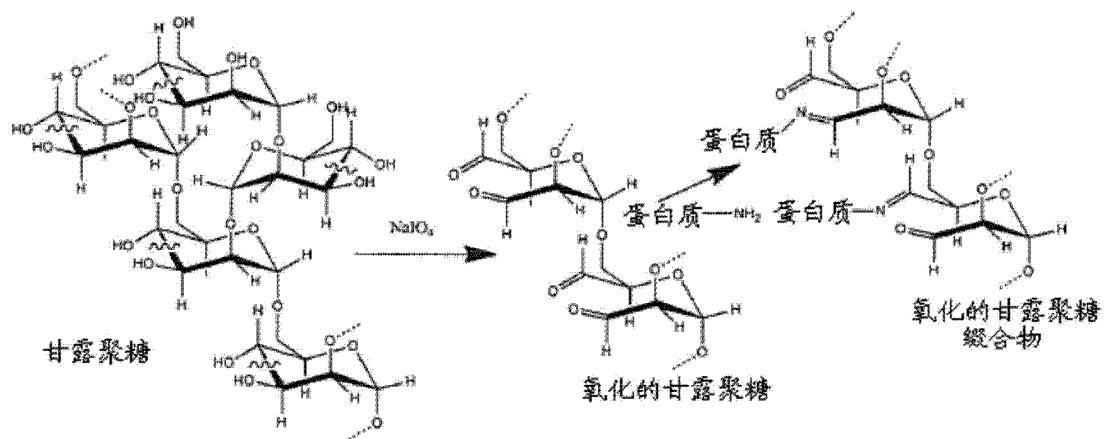


图 4

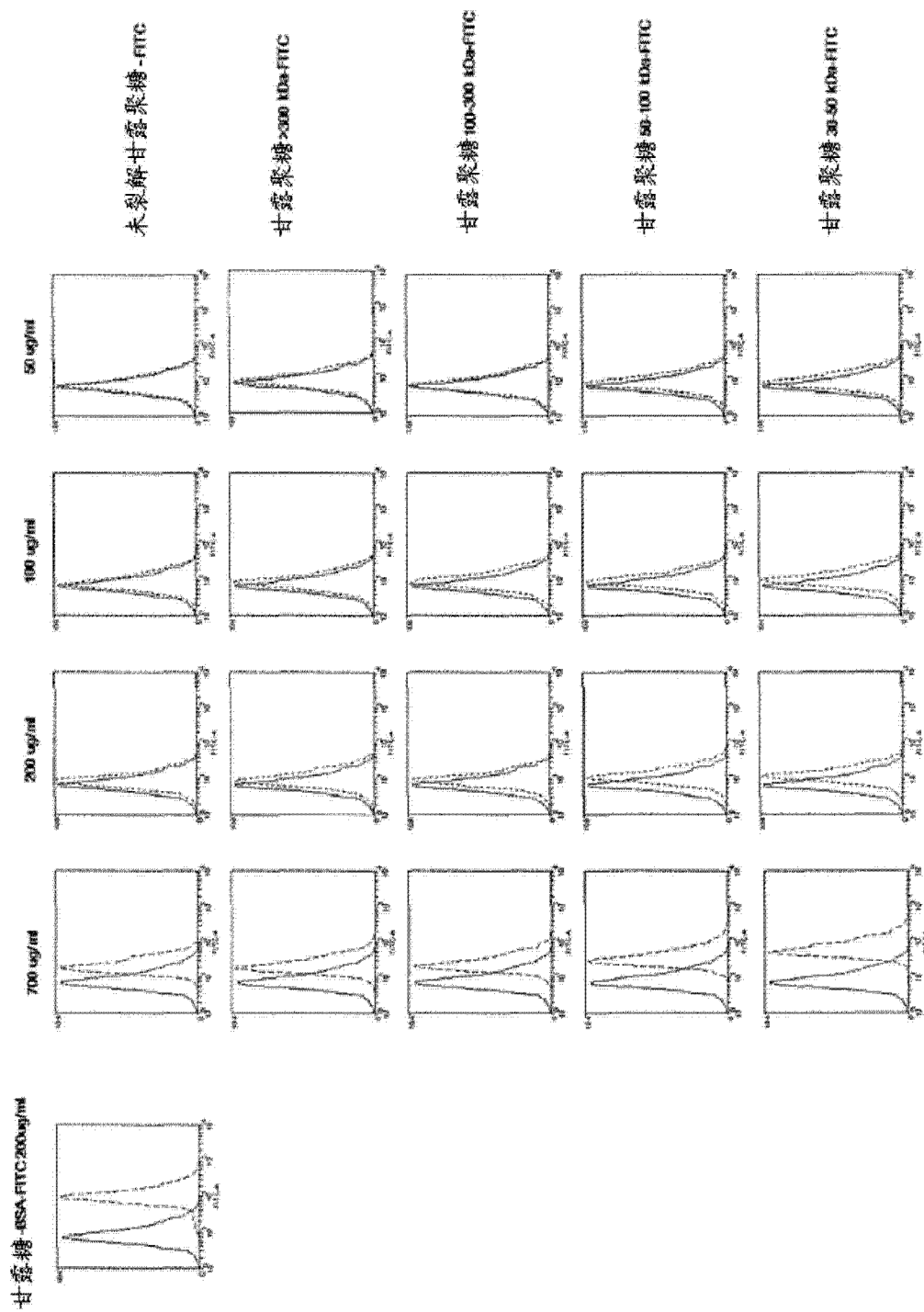


图 5

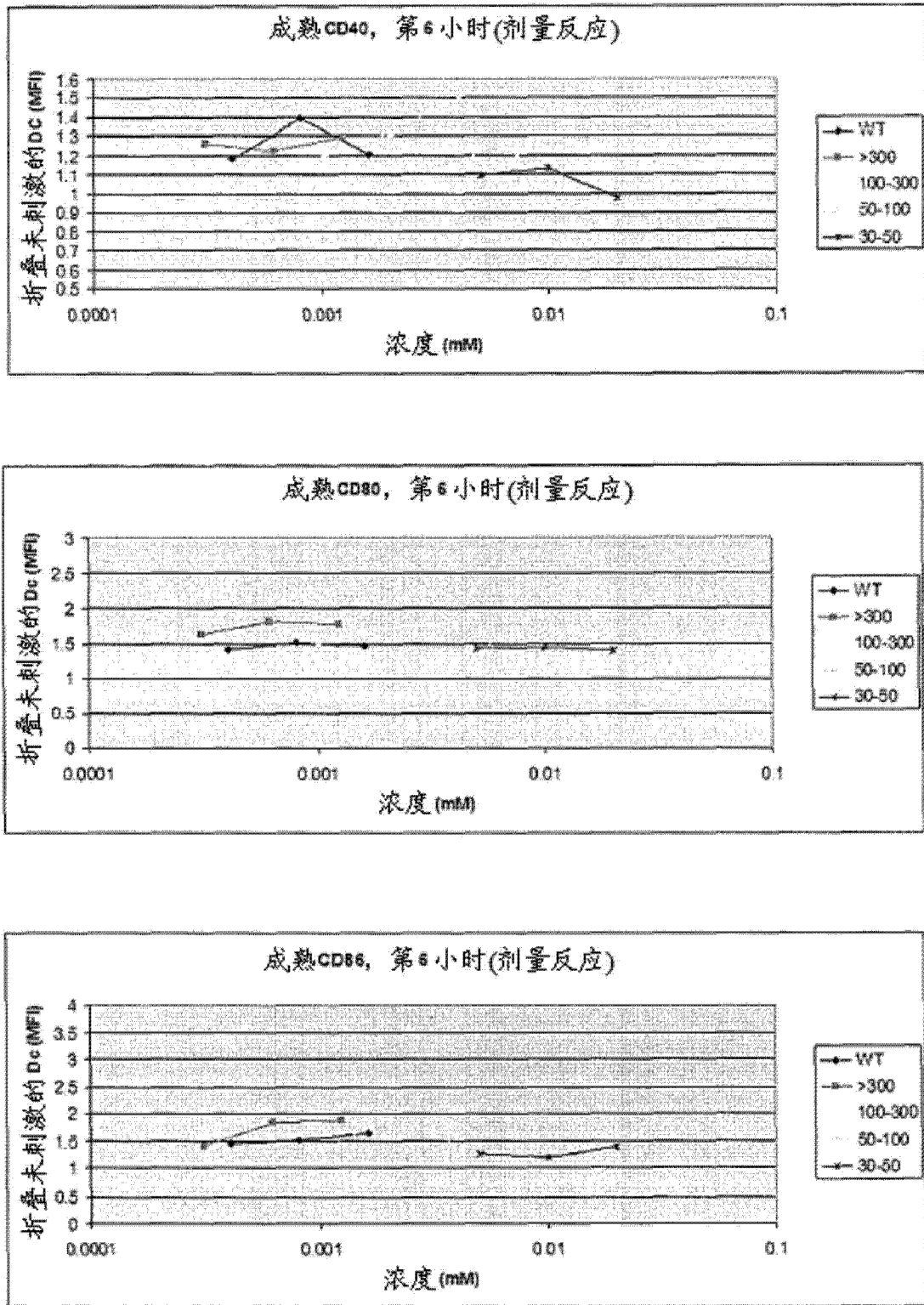


图 6A

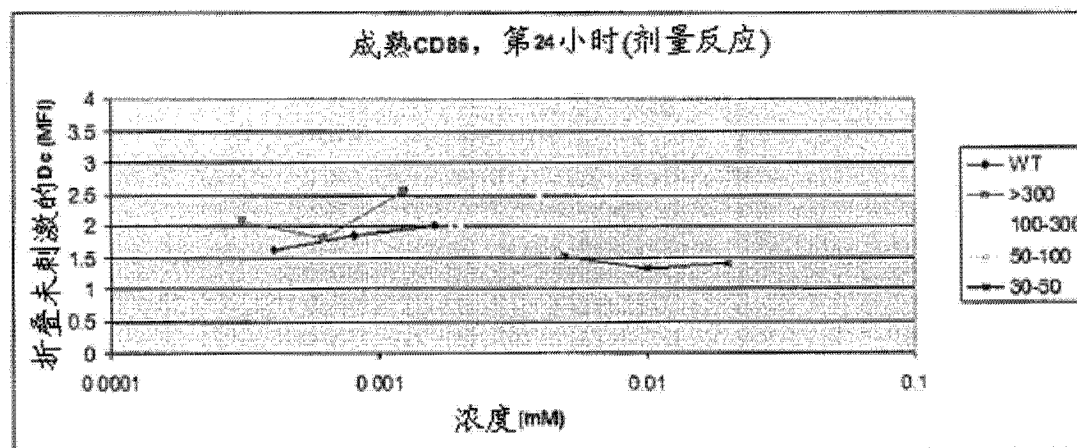
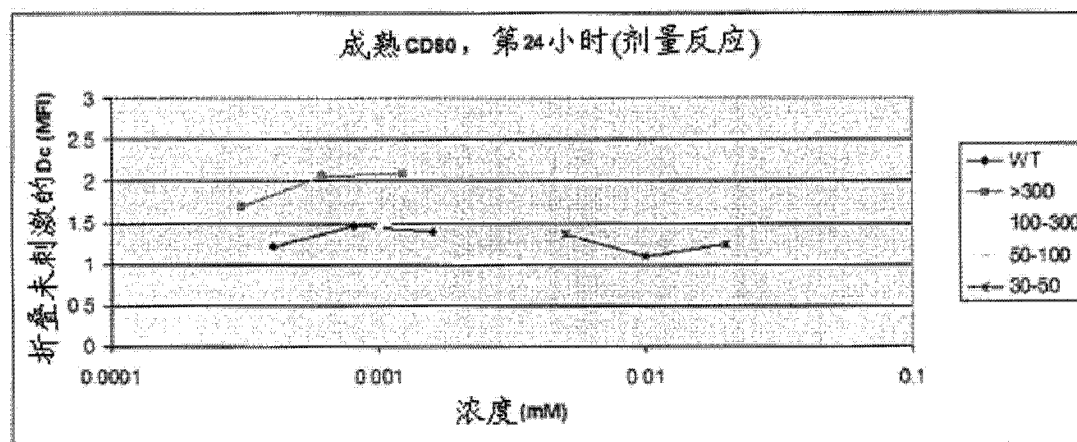
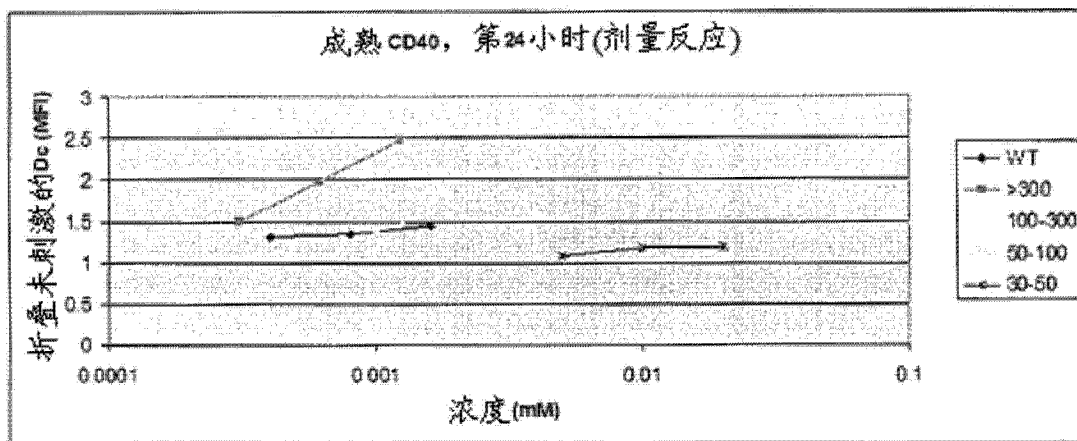


图 6B

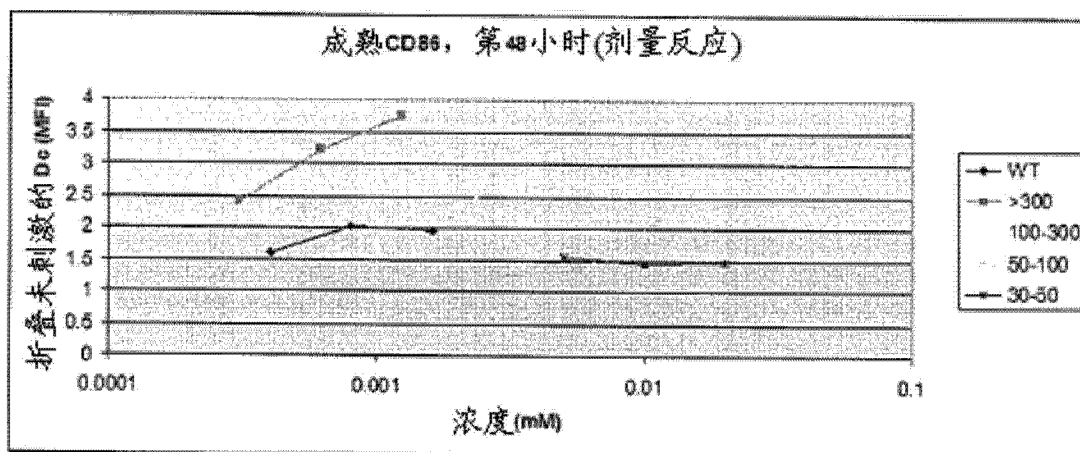
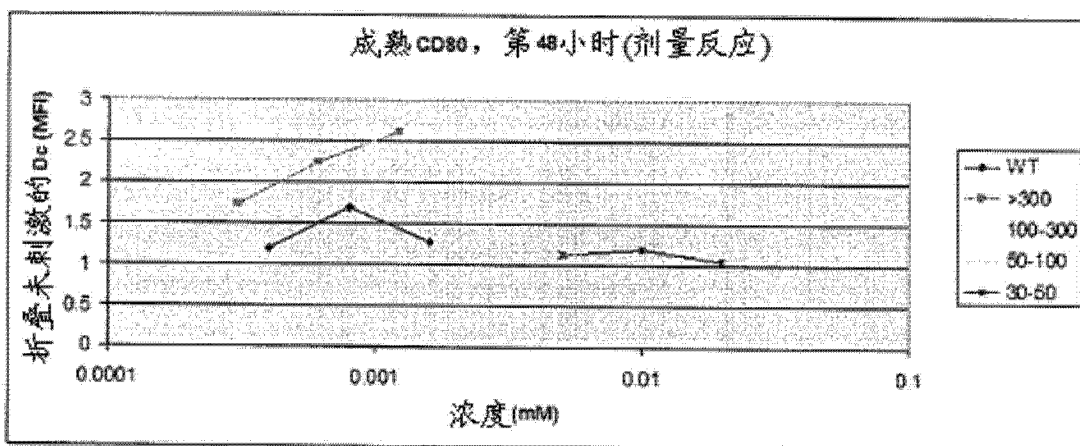
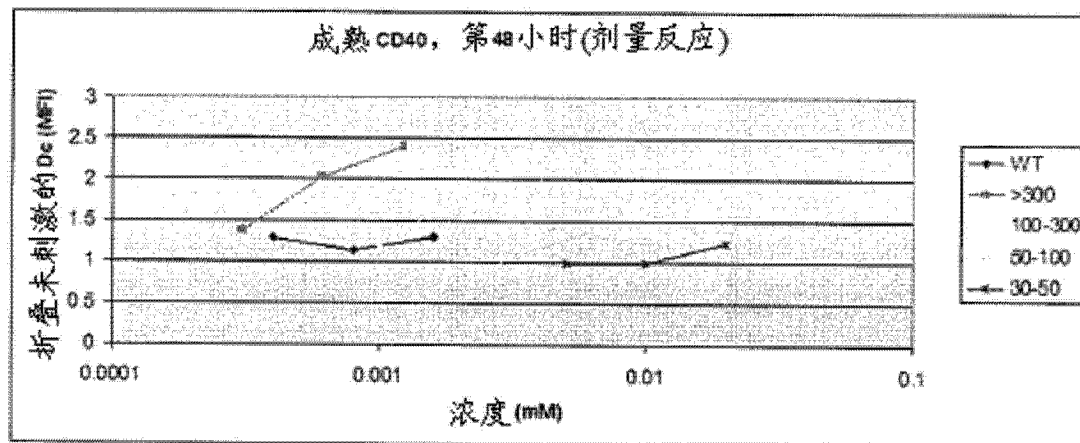


图 6C

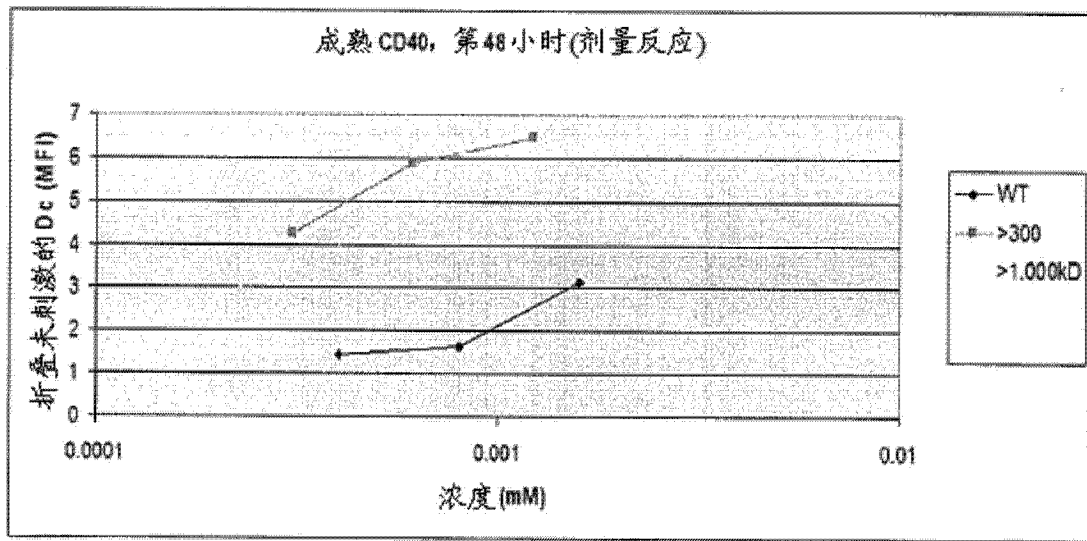


图 7A

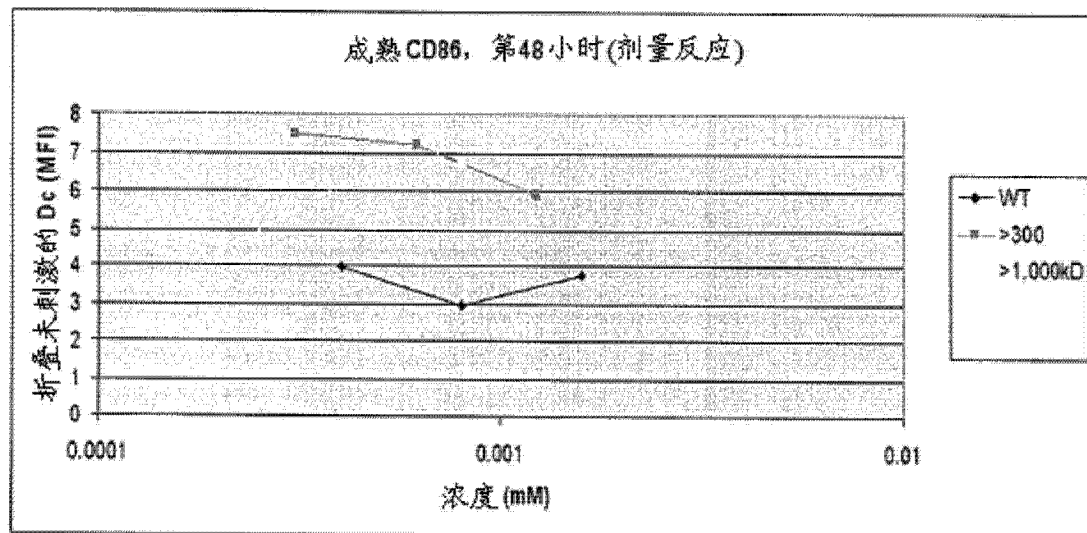


图 7B

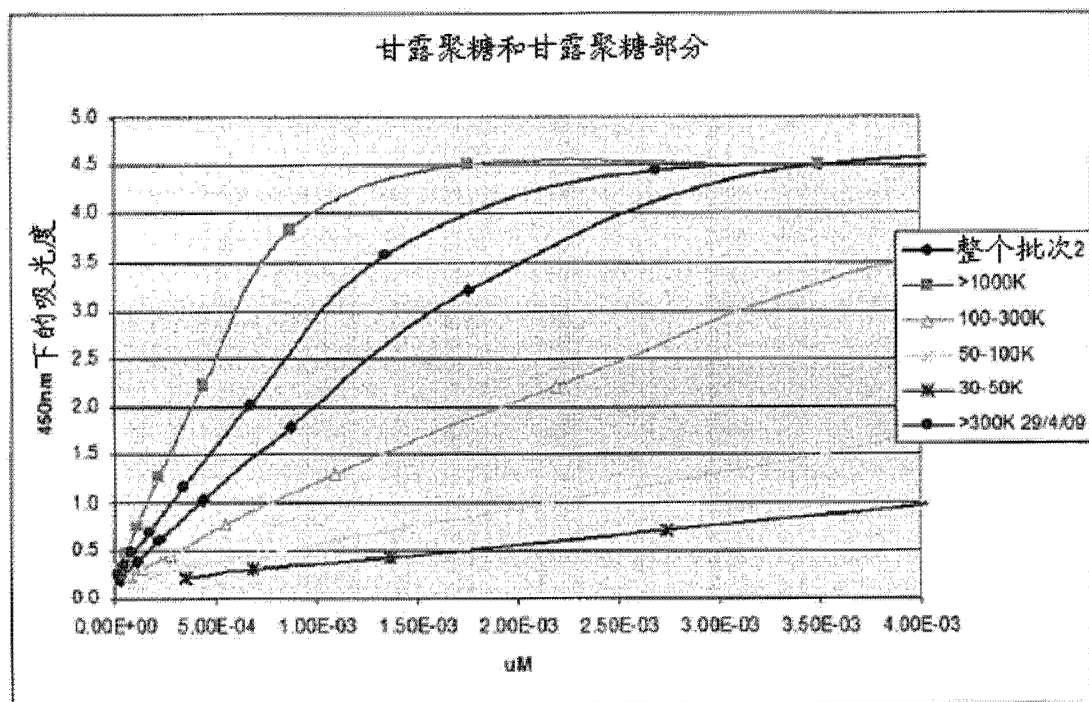


图 8

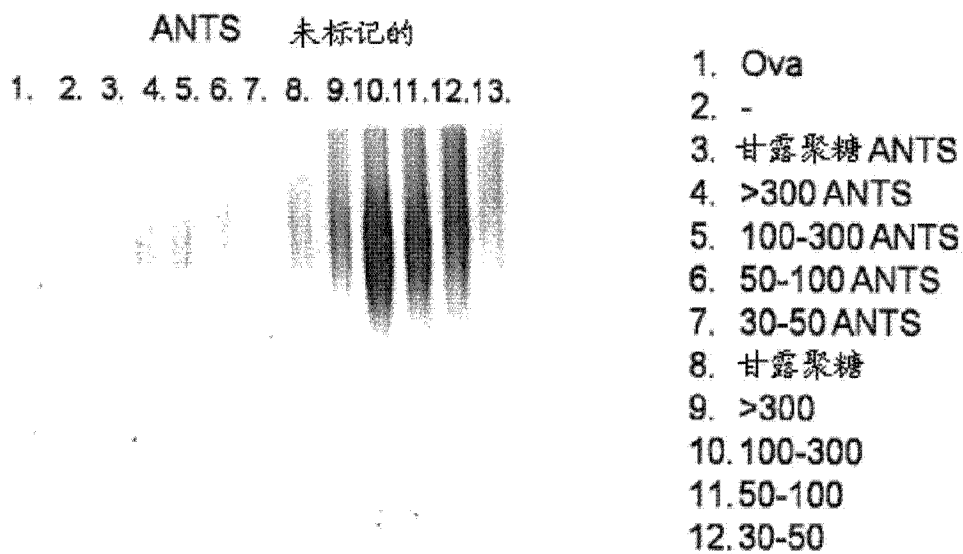


图 9

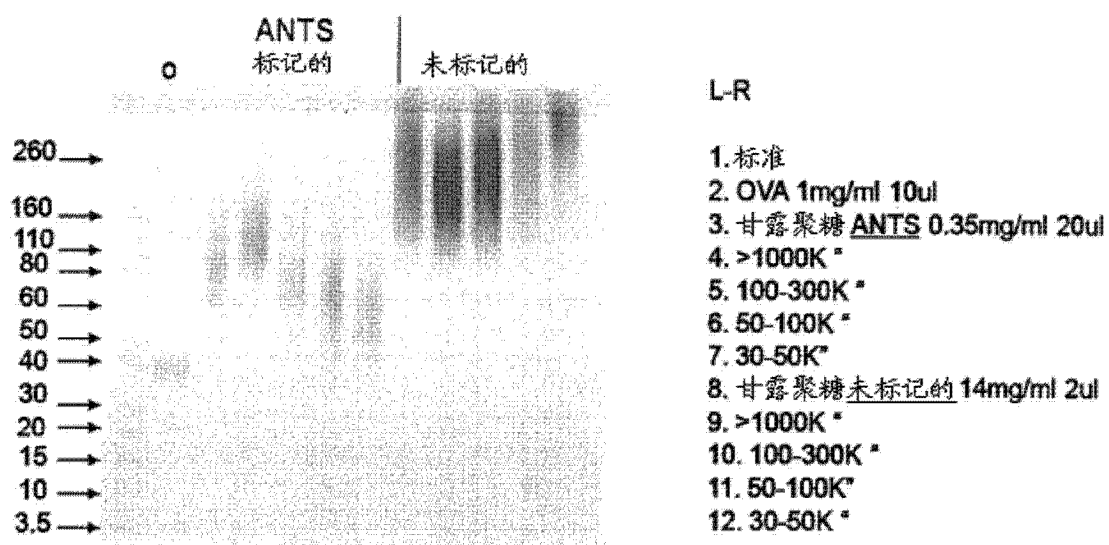


图 10

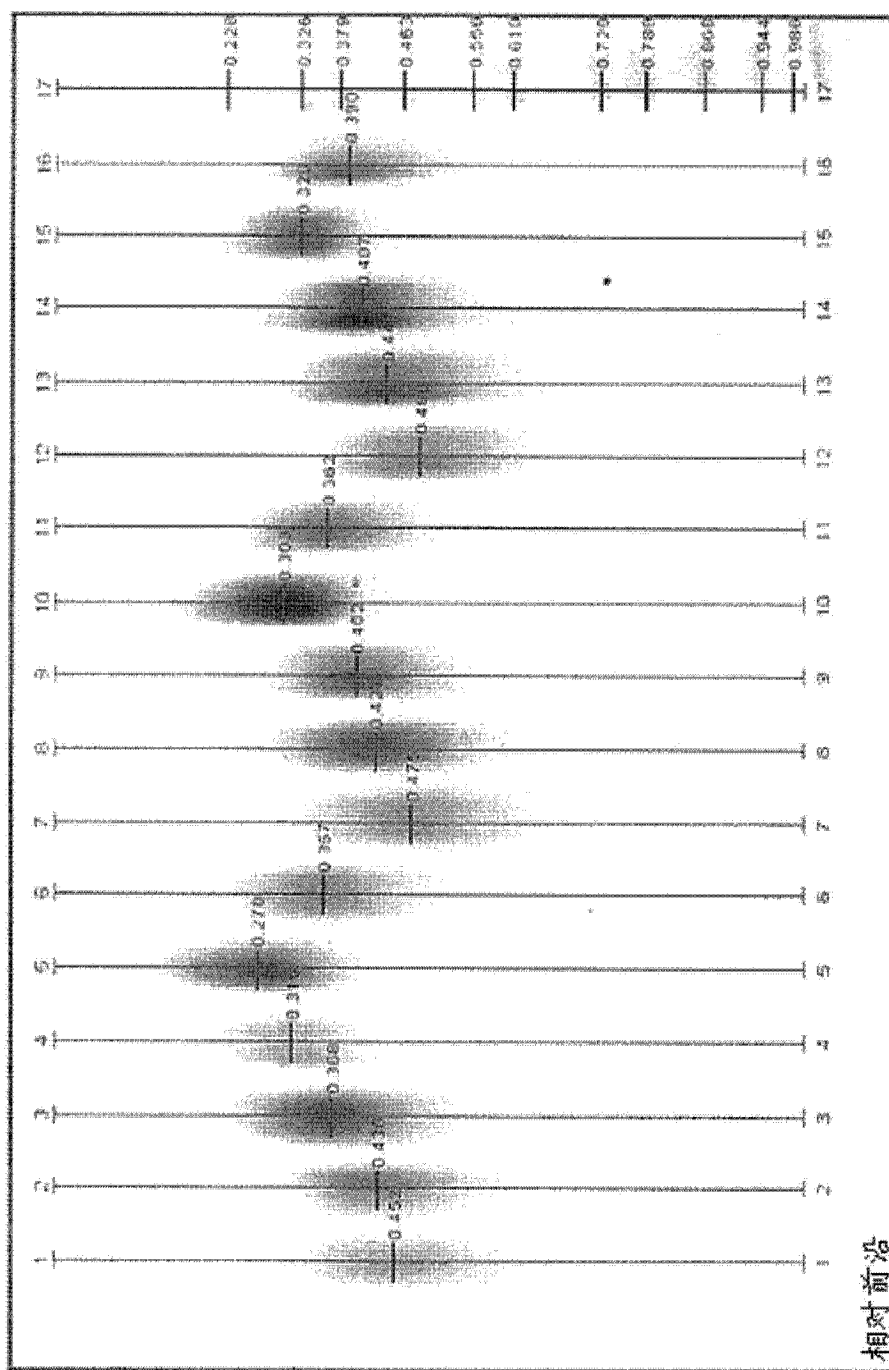


图 11A

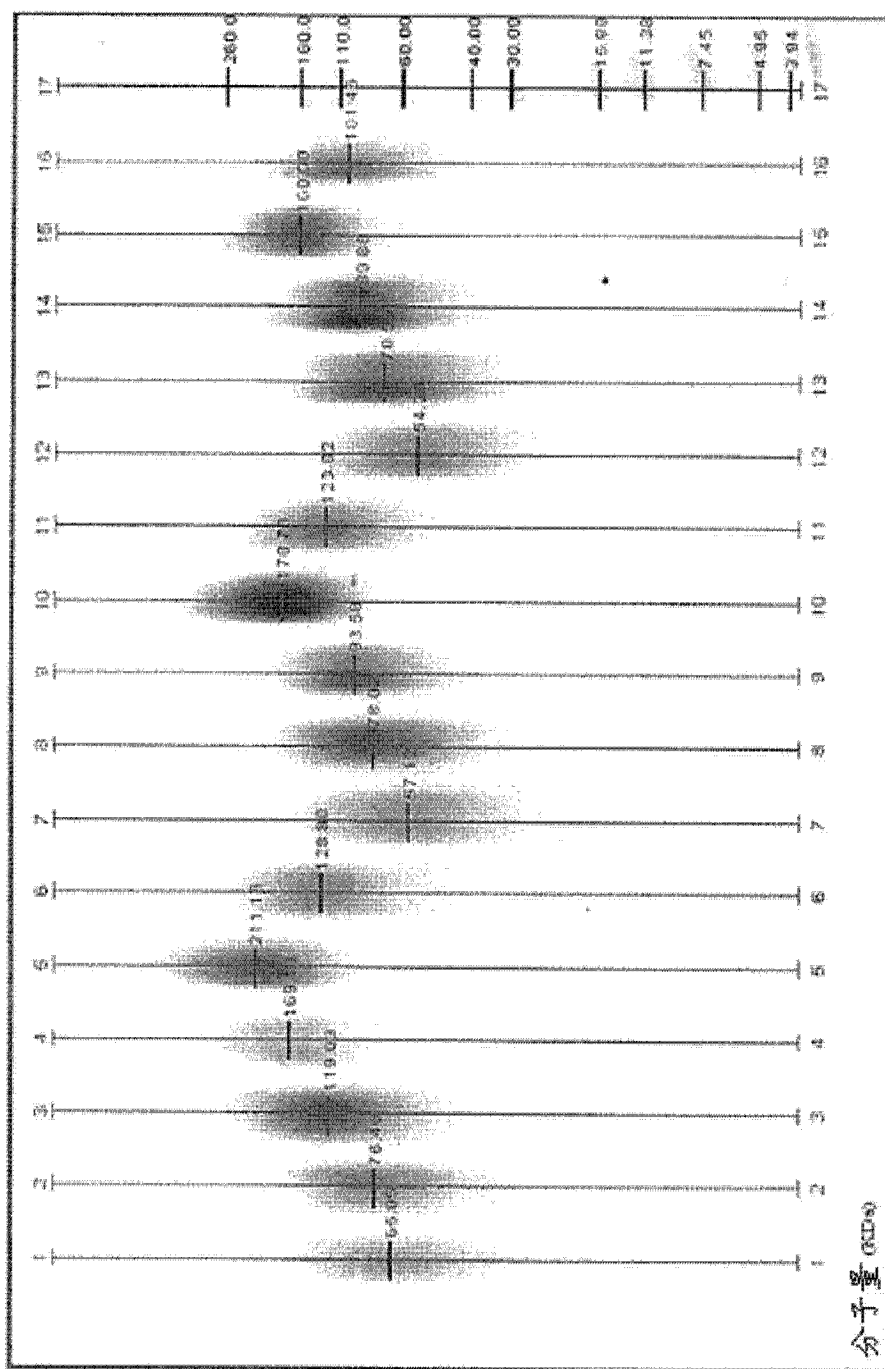


图 11B

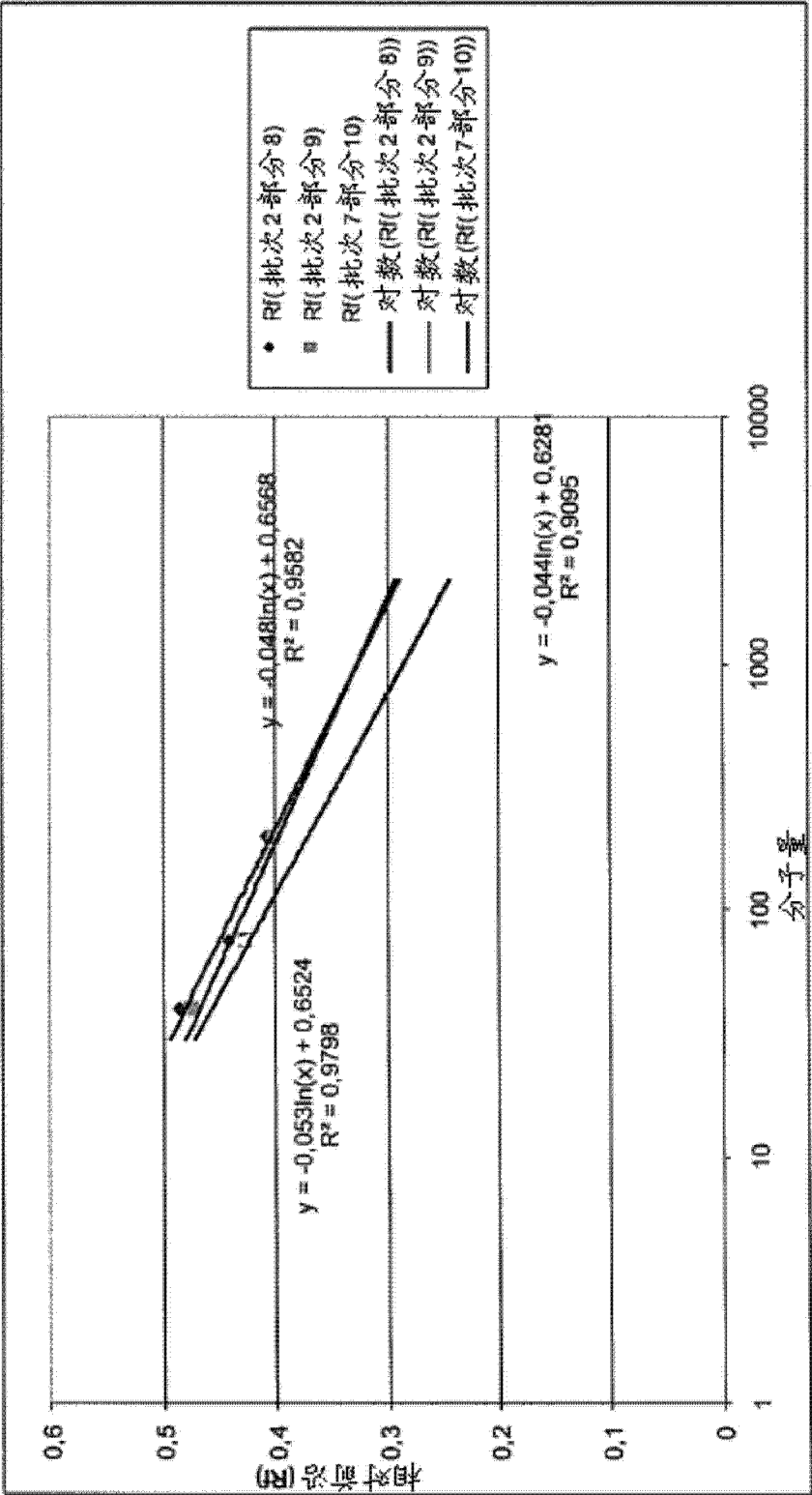


图 12

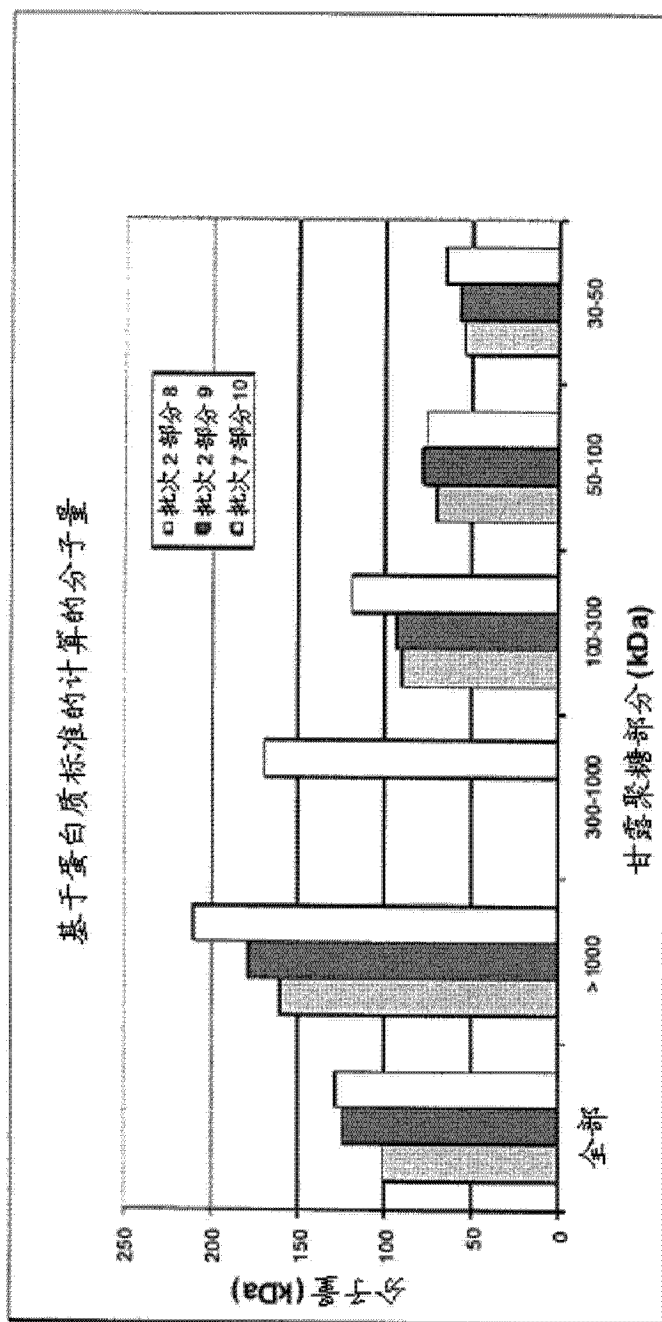


图 13

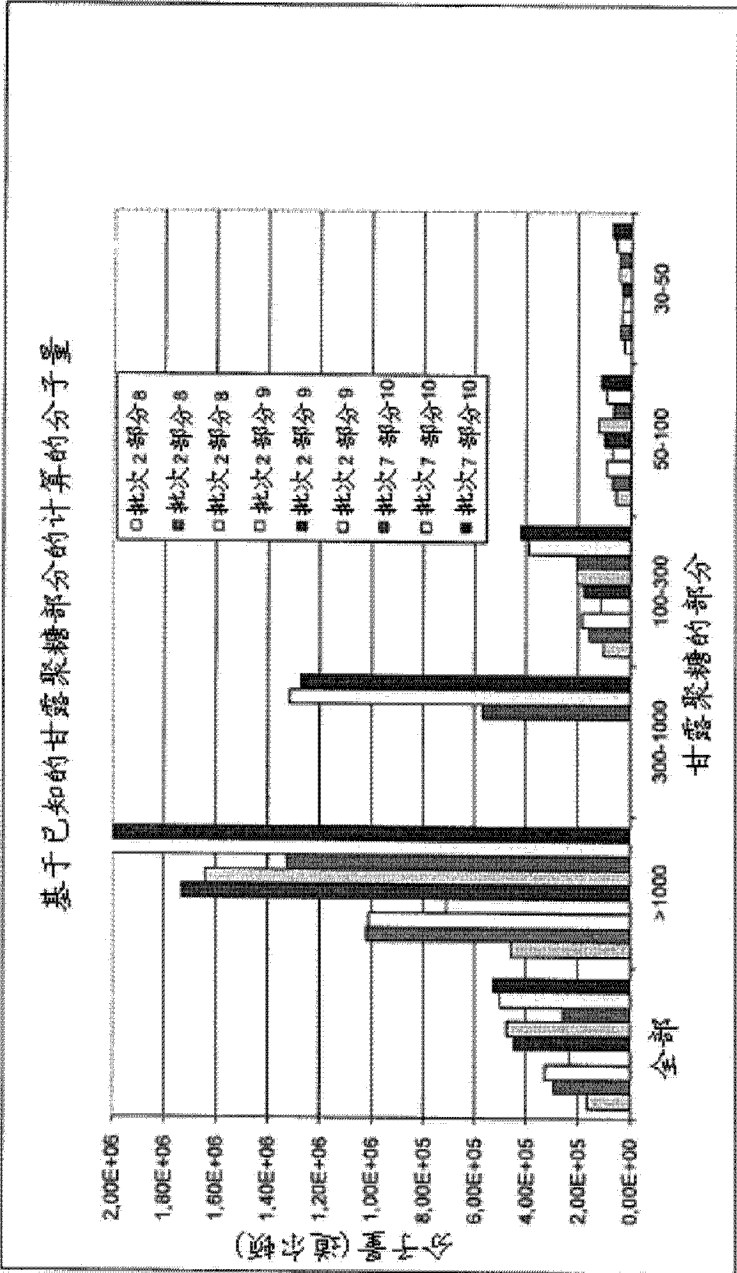


图 14

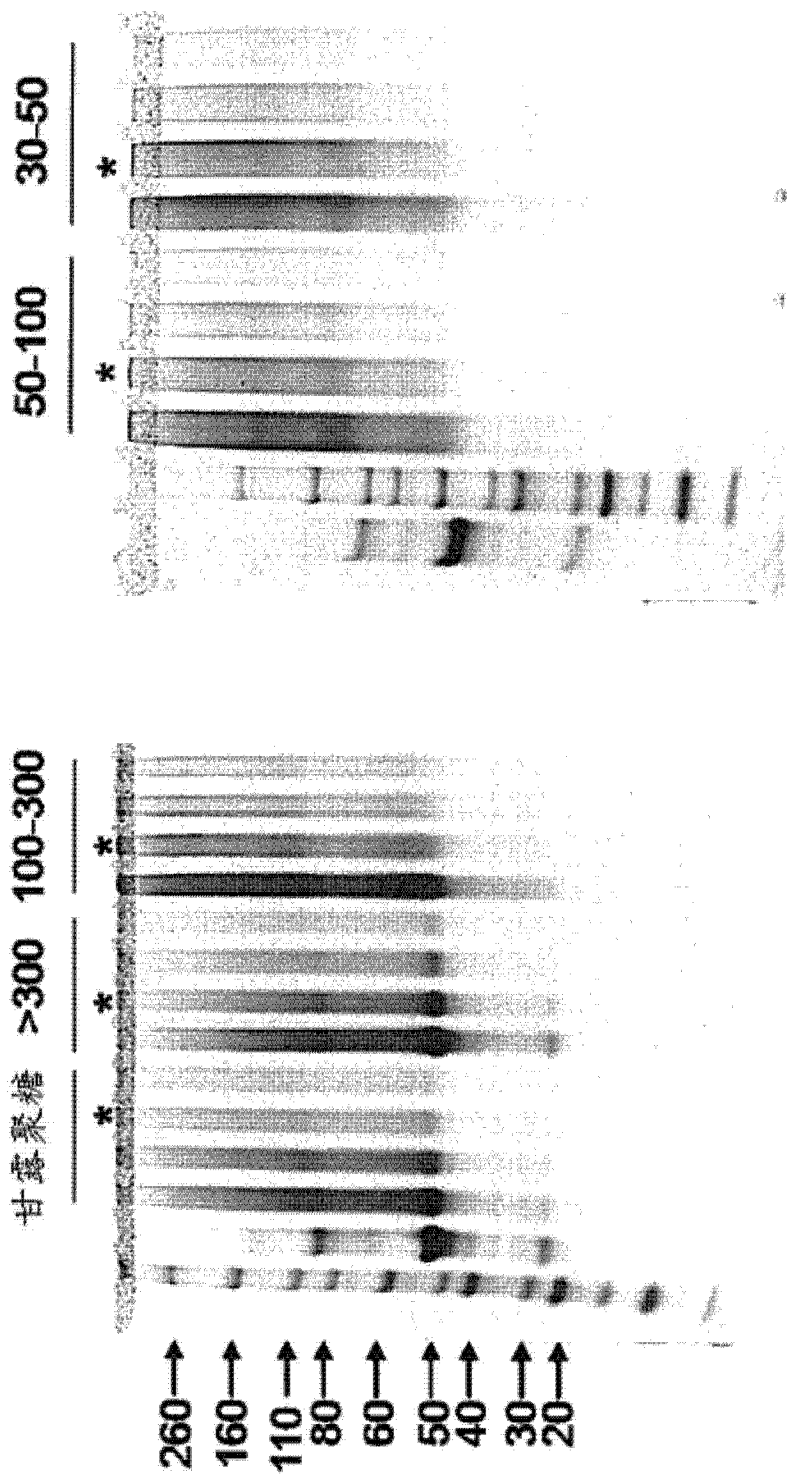


图 15

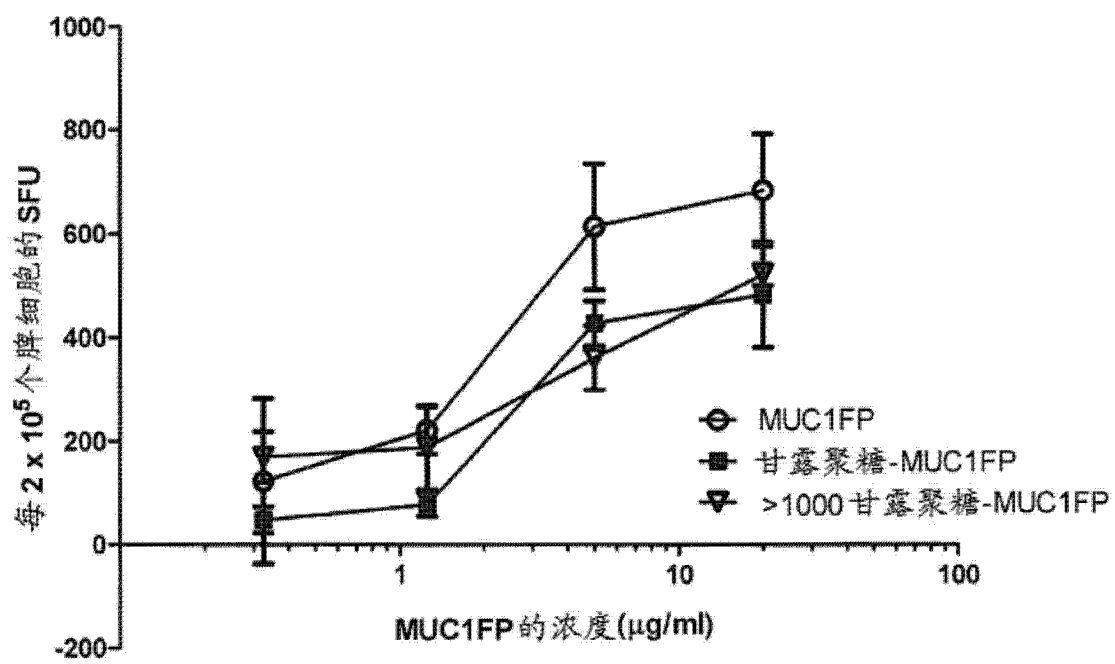


图 16

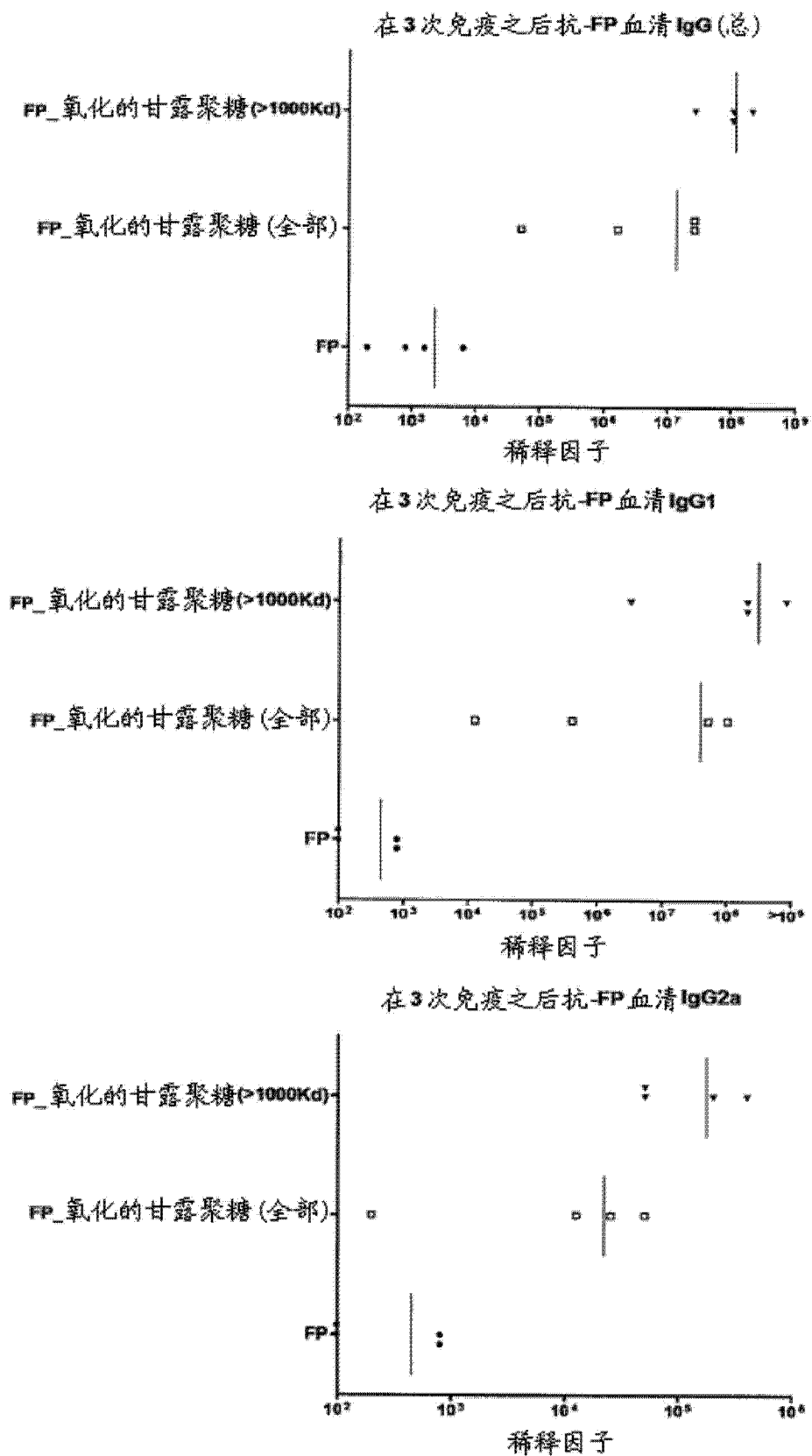


图 17

产品名称	来自酿酒酵母的甘露聚糖,	
粉末		
产品编号	M7504	
产品品牌	SIGMA	
CAS 编号	9036-88-8	
测试	规格	批048K3810产生
外观	白色至浅黄色具有褐色浇注粉末	浅黄色粉末
溶解度	在于水中50MG/ML下透明至稍微浑浊的黄色至棕褐色溶液	稍微浑浊的浅黄色
碳	报告结果	40.3% (30.7%)
磷	报告结果	0.6% (0.5%, 0.2%)
钠	报告结果	0.9% (0.7%, 0.67%, 2.3%)
旋光率	+73 至 +82 DEG (C=1 于水中)	+76 度 (+80, 75.7, 78.5, 74)
薄层色谱法未检测到低分子量糖类		一致
推荐的再测试	2 年	2010年5月
QC 出厂日期		2008年5月

图 18

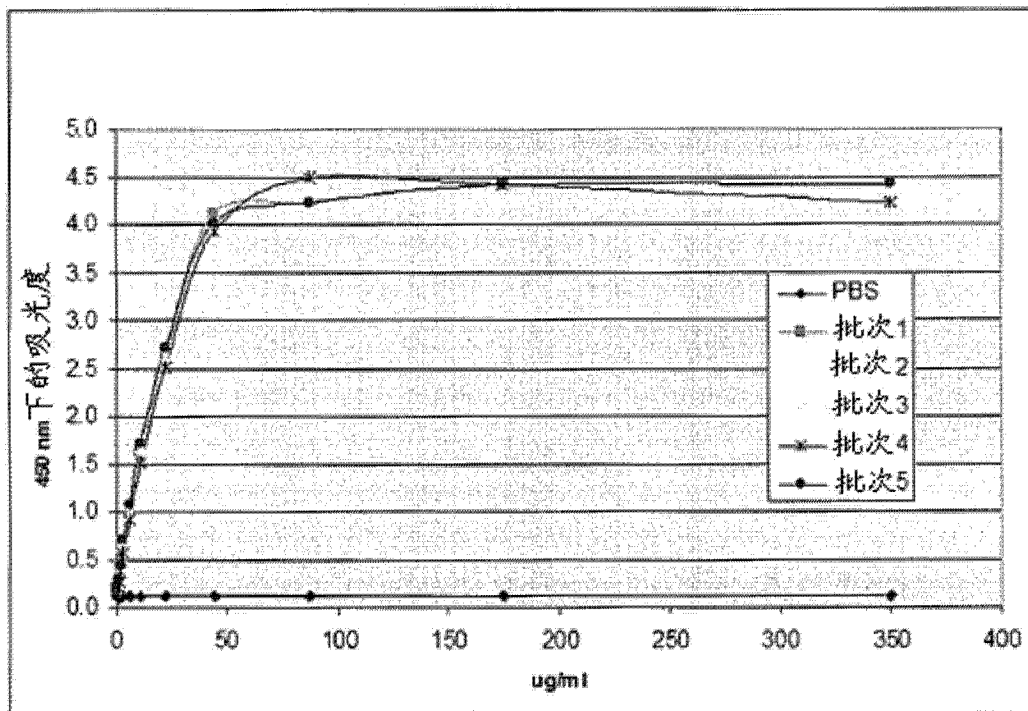


图 19A

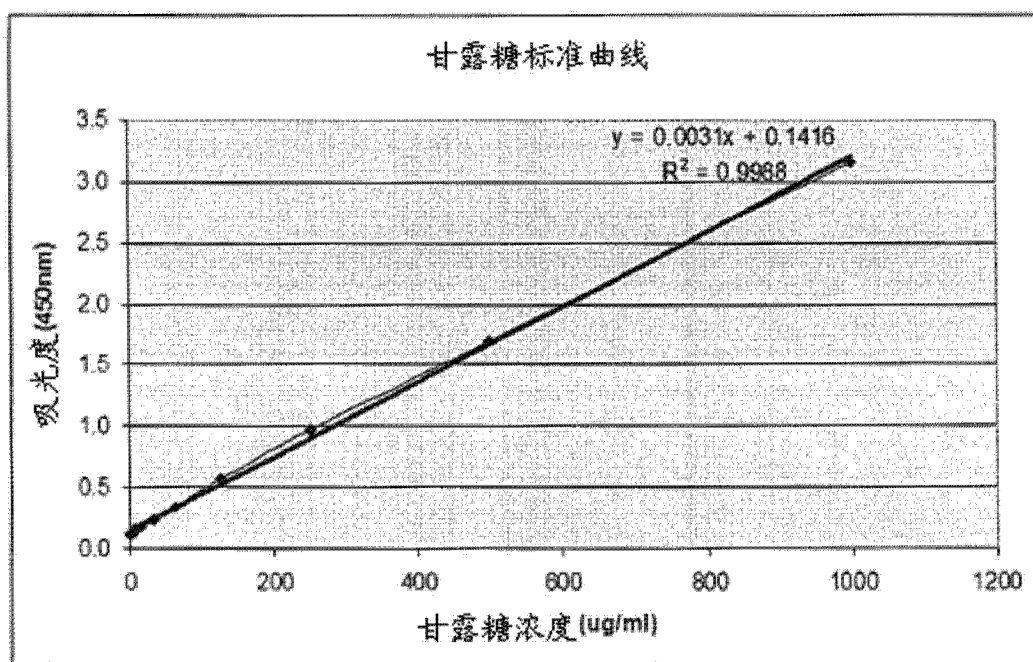


图 19B

• 批次编号与大小

残基的编号

	<u>1.</u>	<u>2.</u>	<u>3.</u>
• 102K3778 大	153	129	125
• 102K37781 大	148	128	131
• 92H3876 小	101	100	106
• 92H3876 中等	-	97	98
• 16H3843 中等	-	92	100

图 20

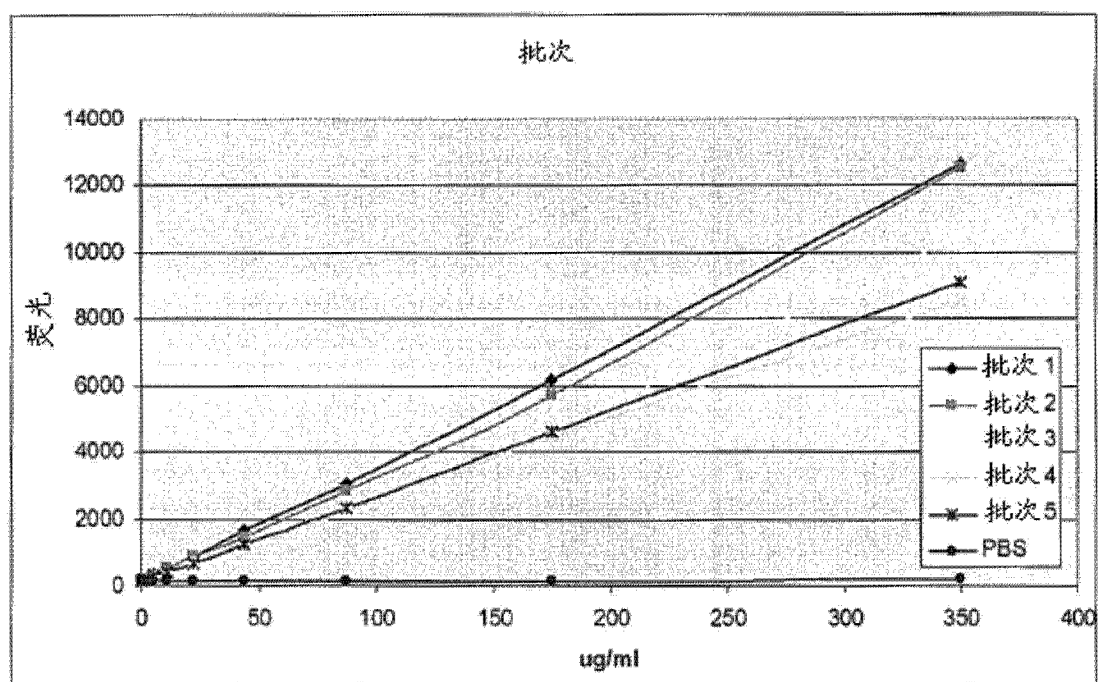


图 21

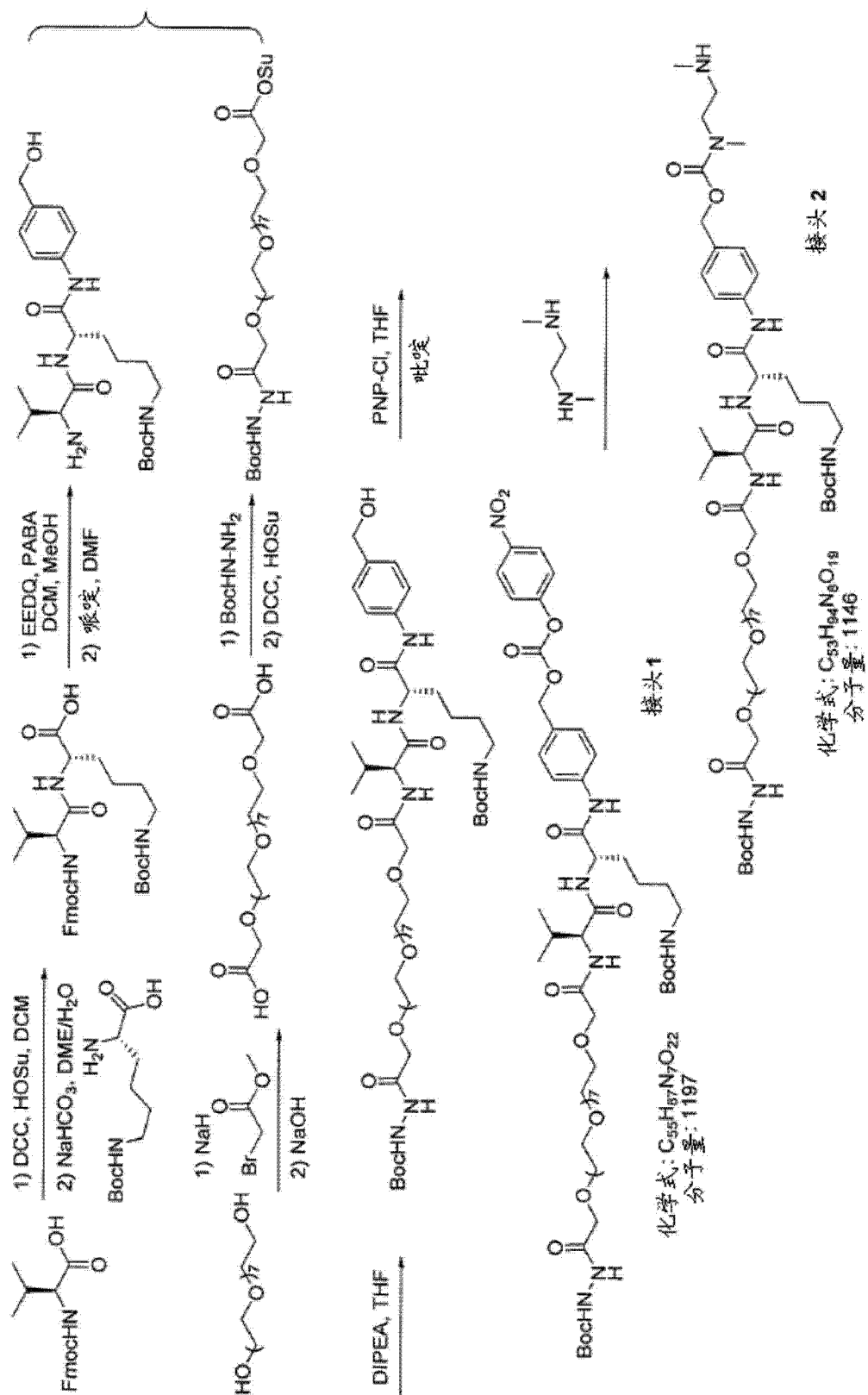


图 22

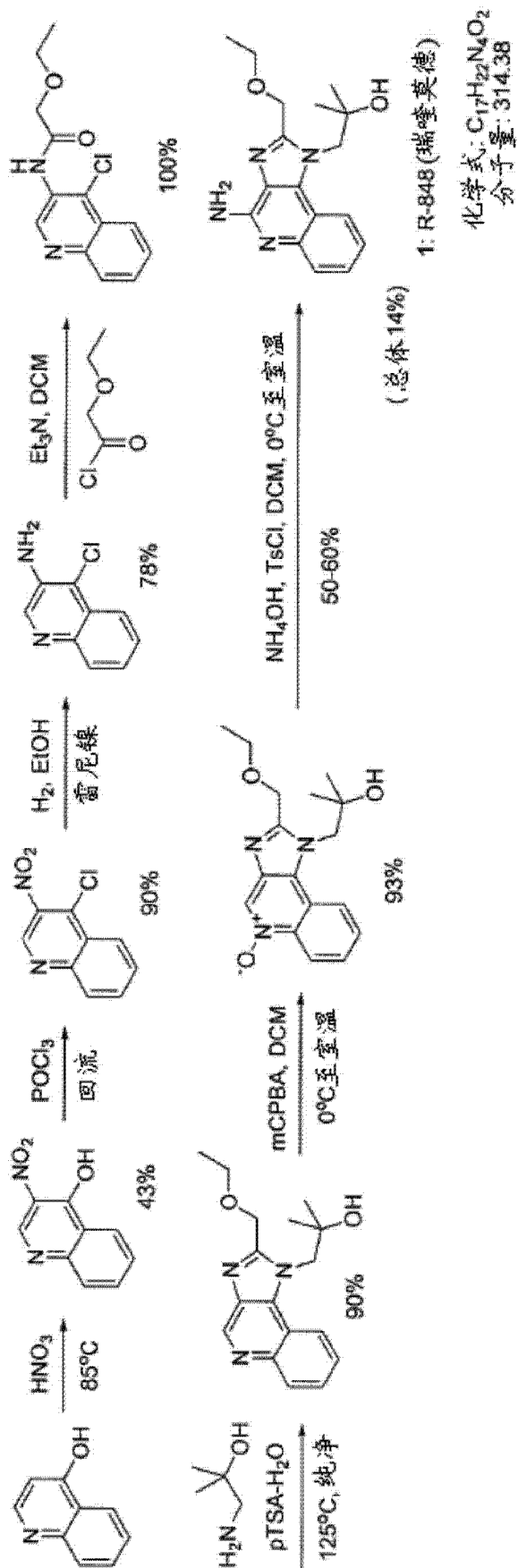


图 23

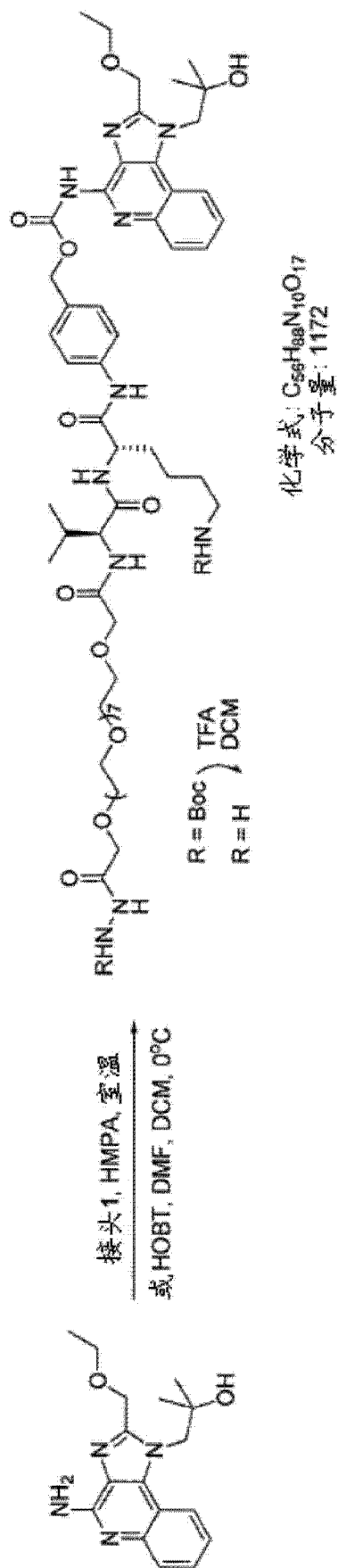


图 24

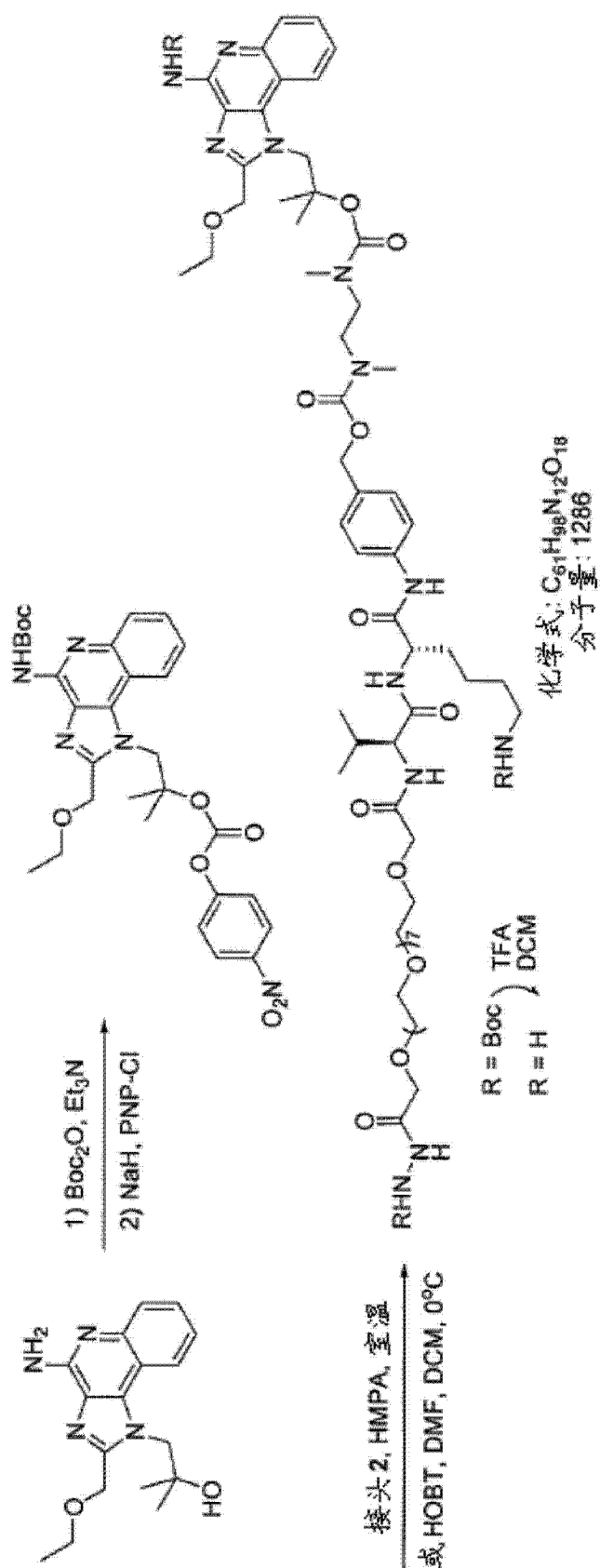


图 25

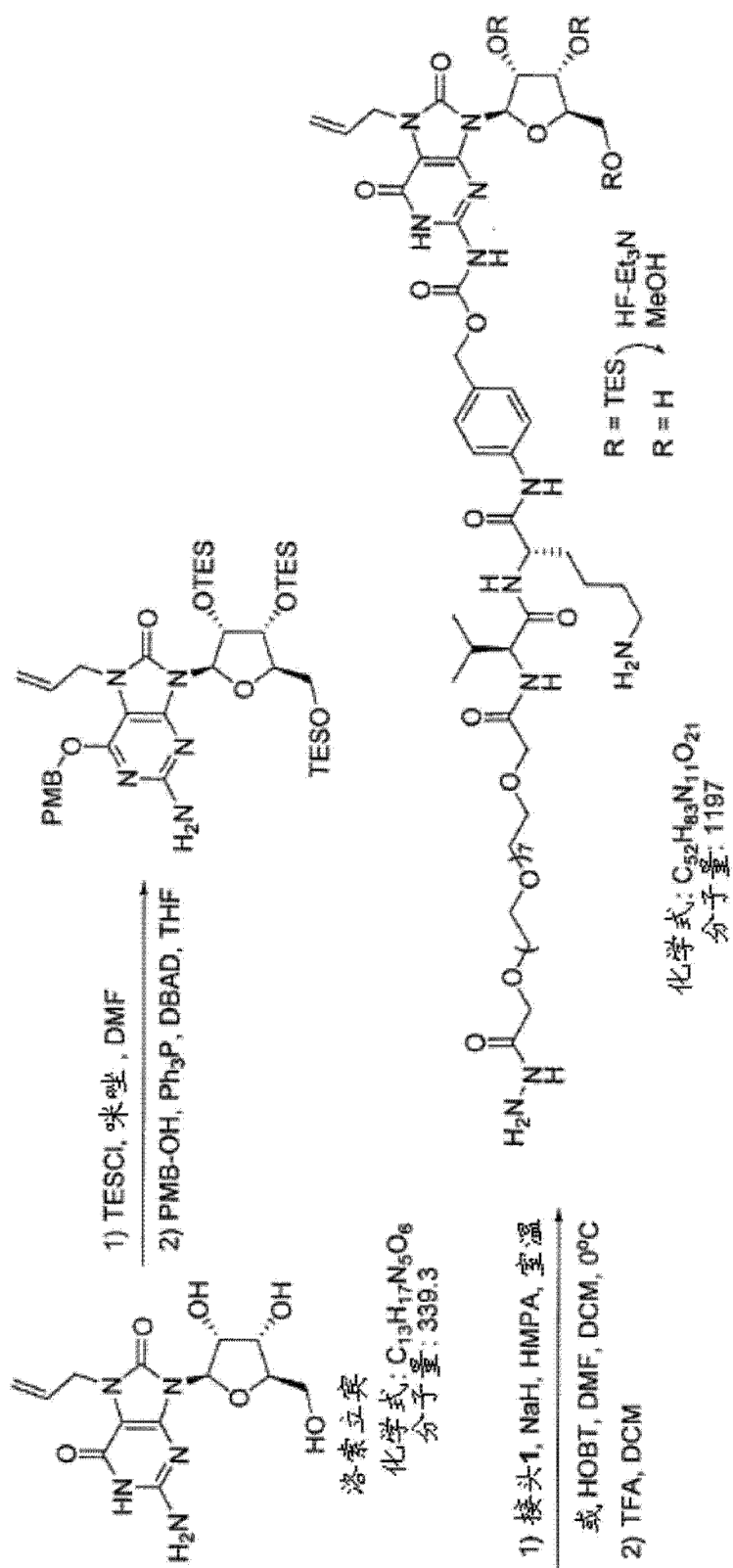


图 26

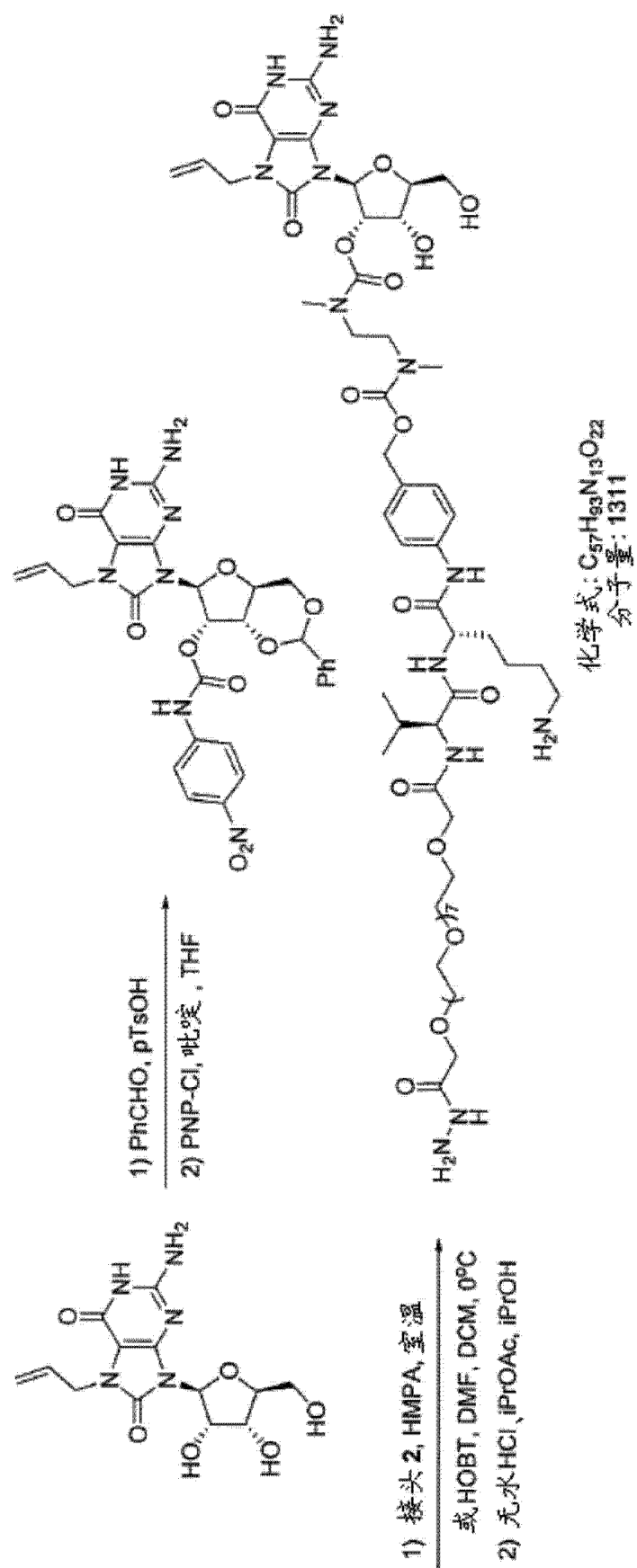


图 27

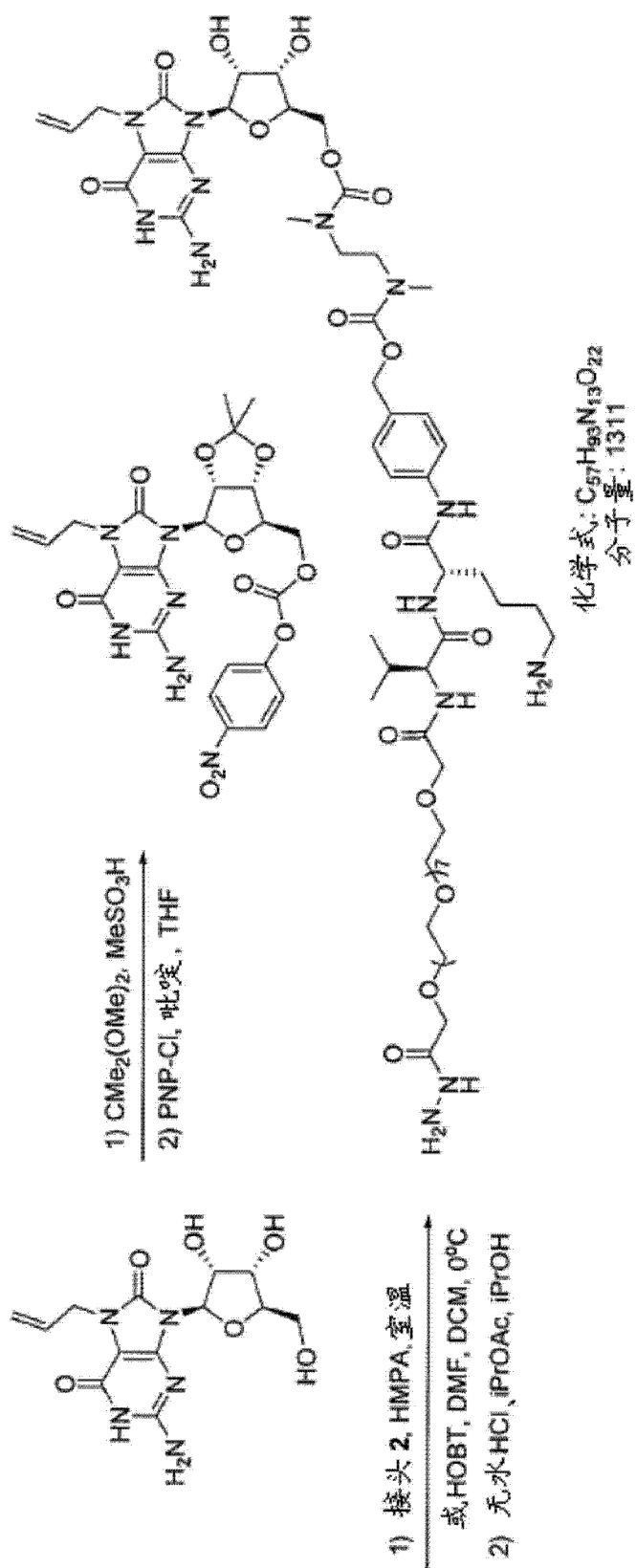


图 28

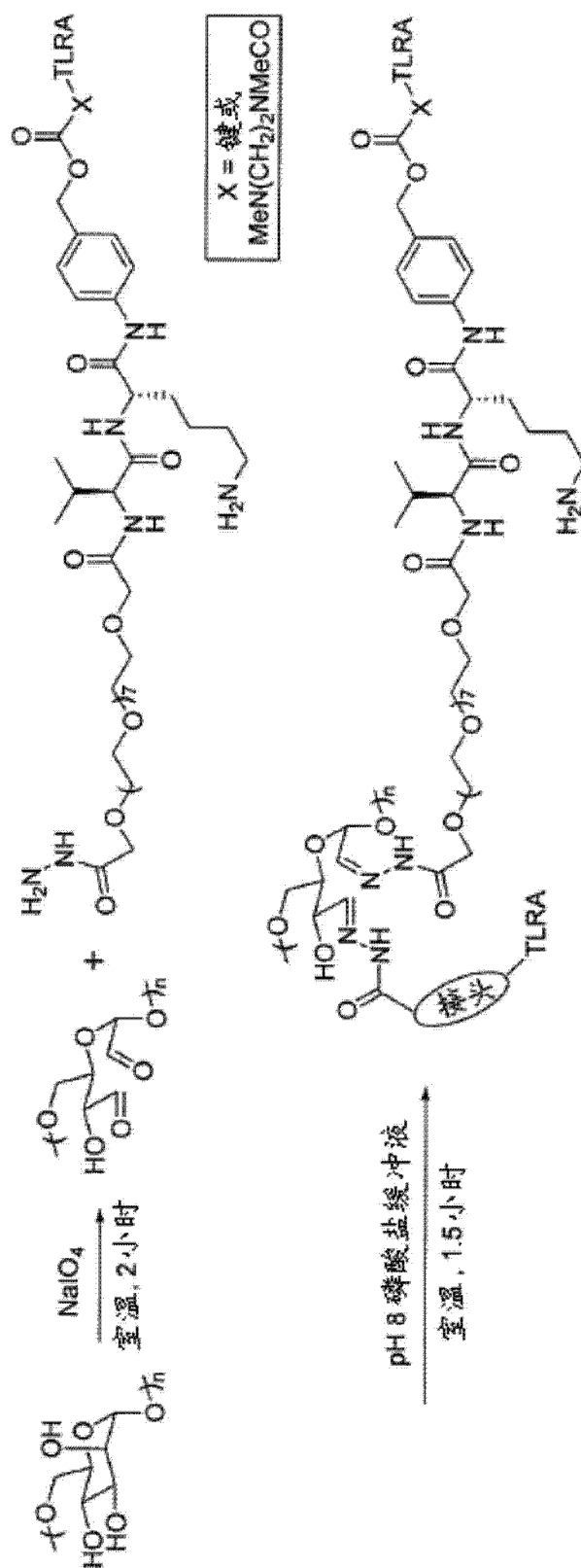


图 29

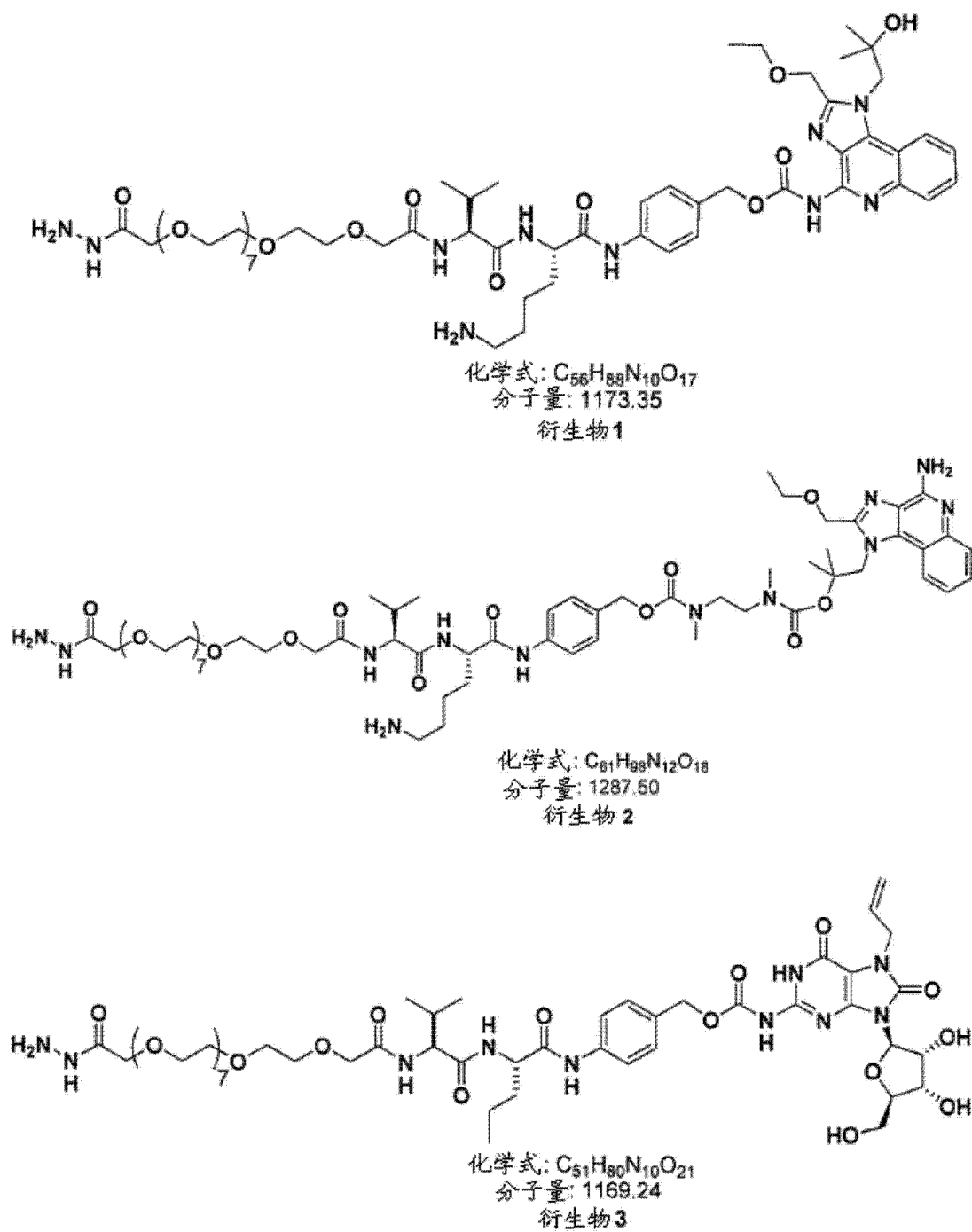
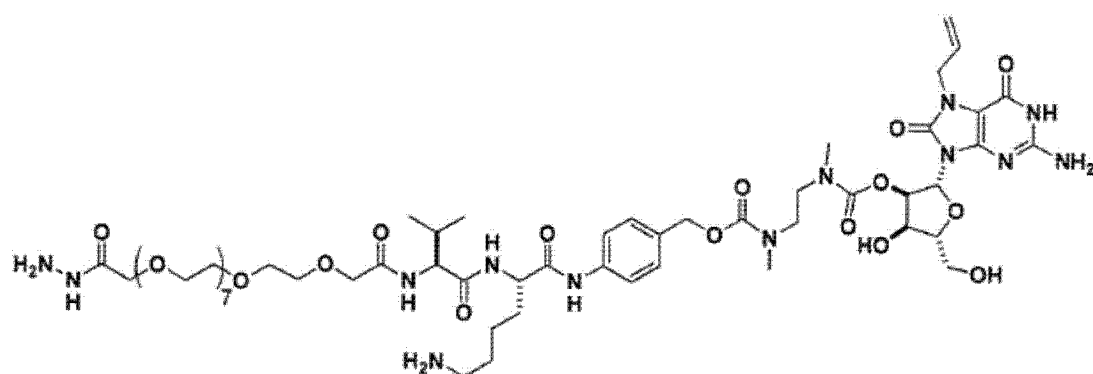


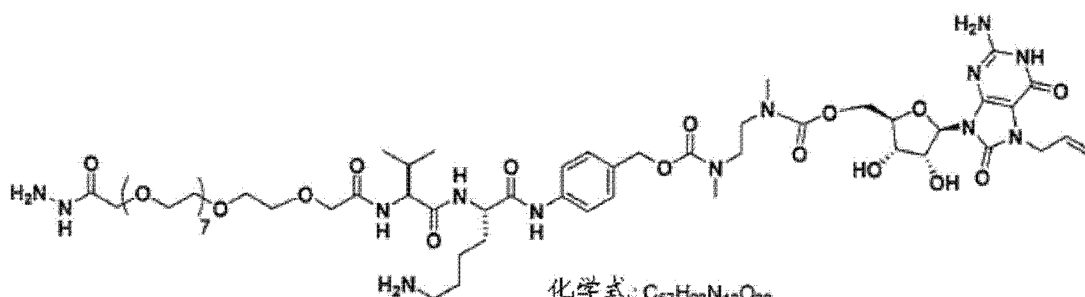
图 30A



化学式: $C_{57}H_{93}N_{13}O_{22}$

分子量: 1312.42

衍生物 4



化学式: $C_{57}H_{93}N_{13}O_{22}$

分子量: 1312.42

衍生物 5

图 30B

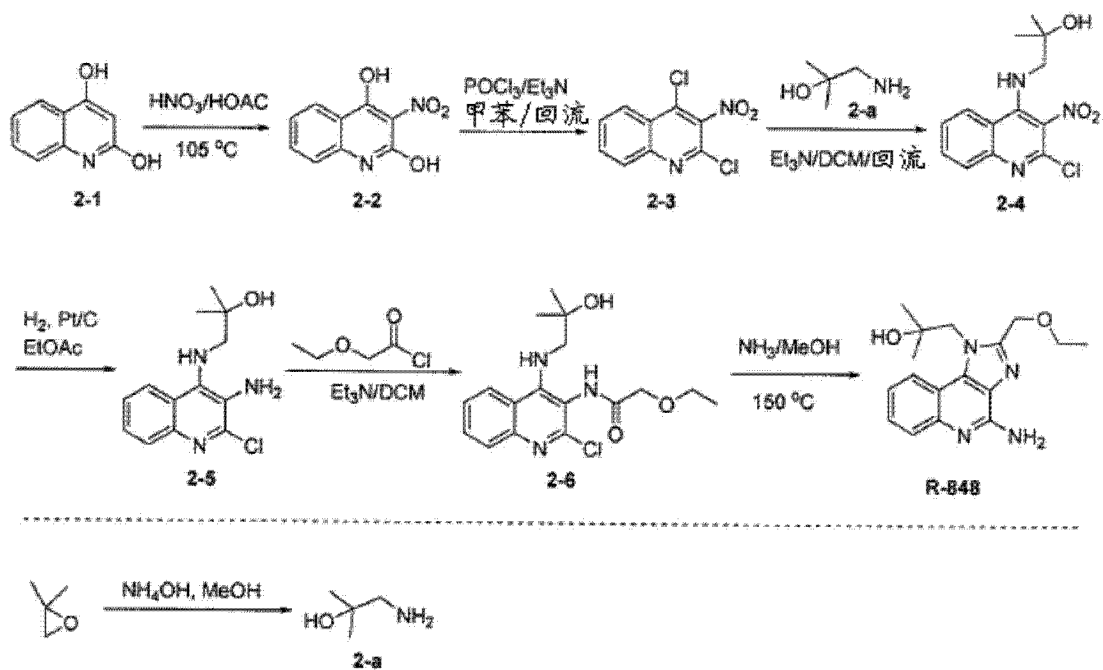


图 31

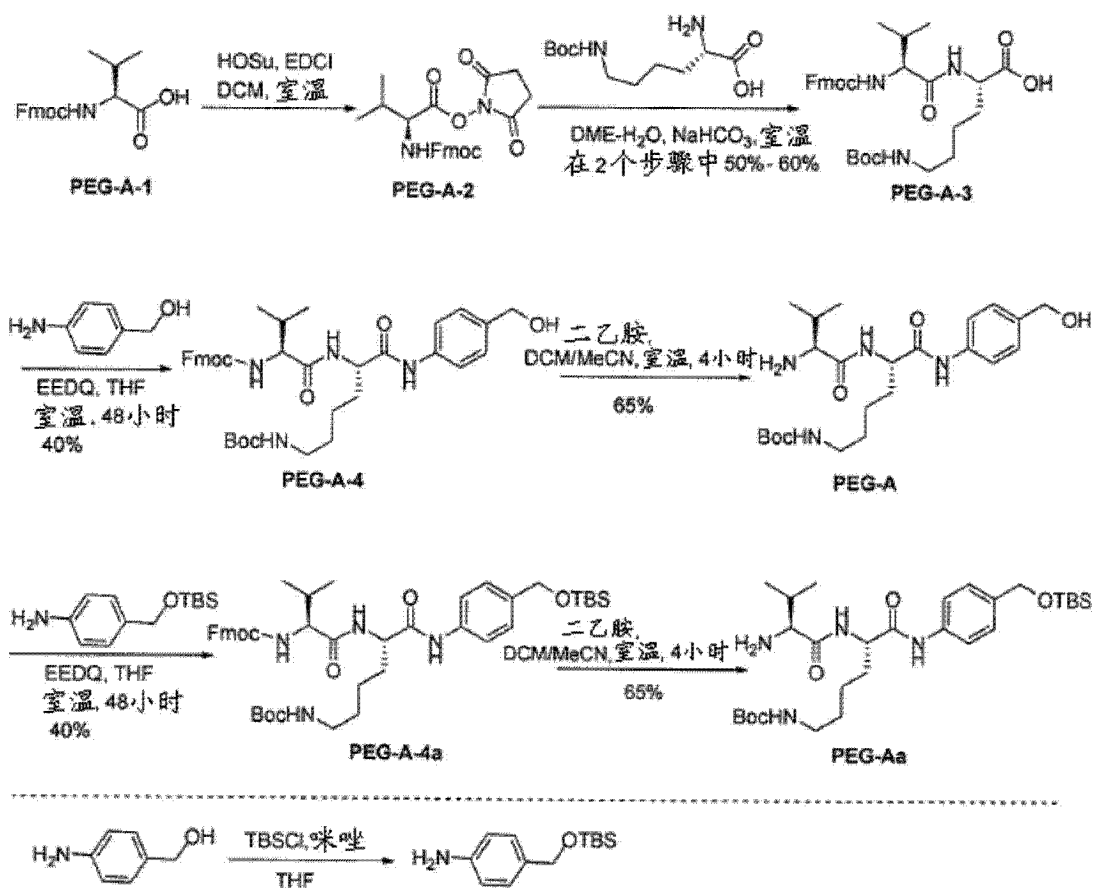


图 32

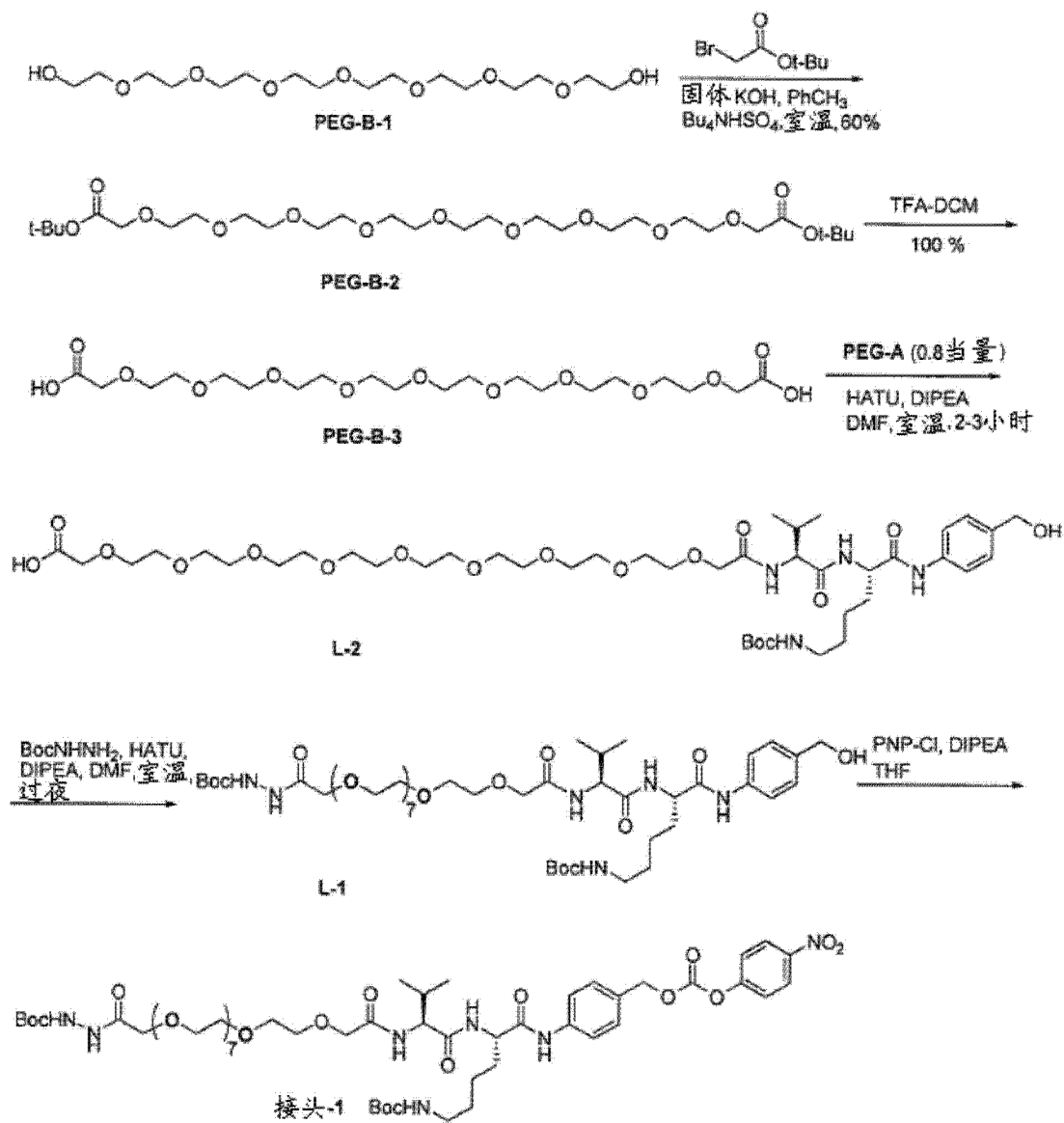


图 33

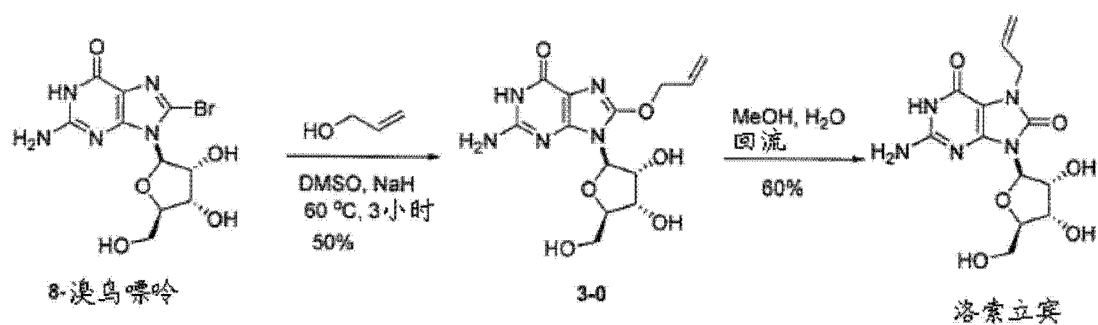


图 34

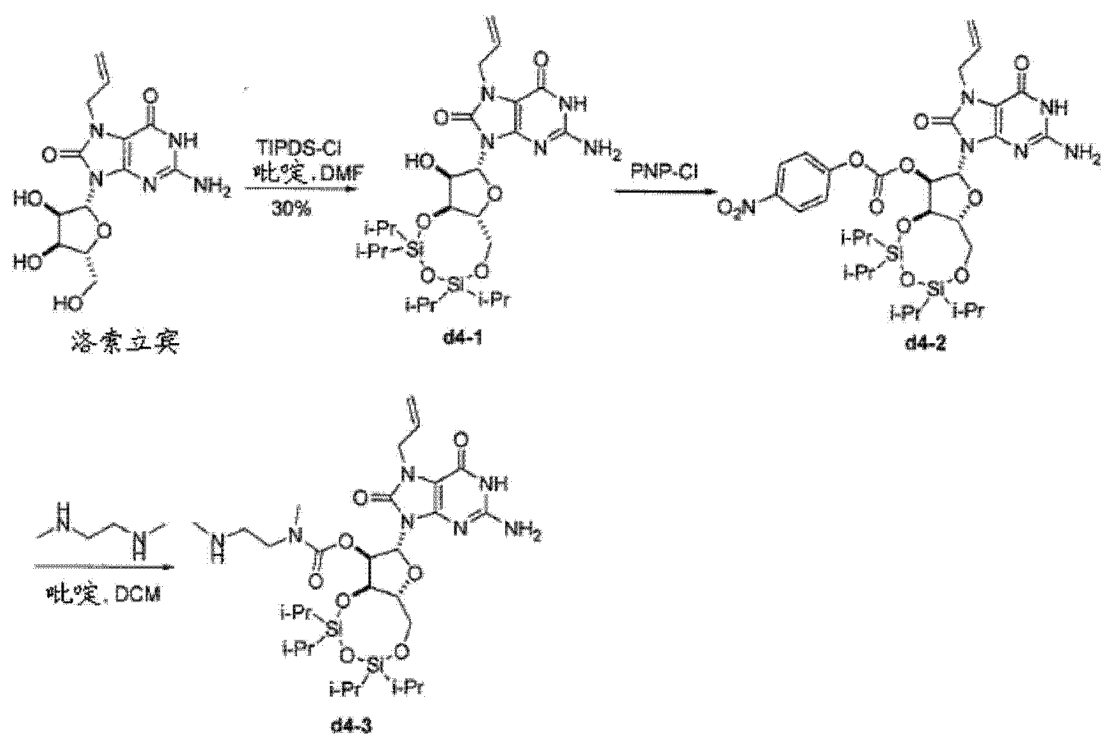


图 35

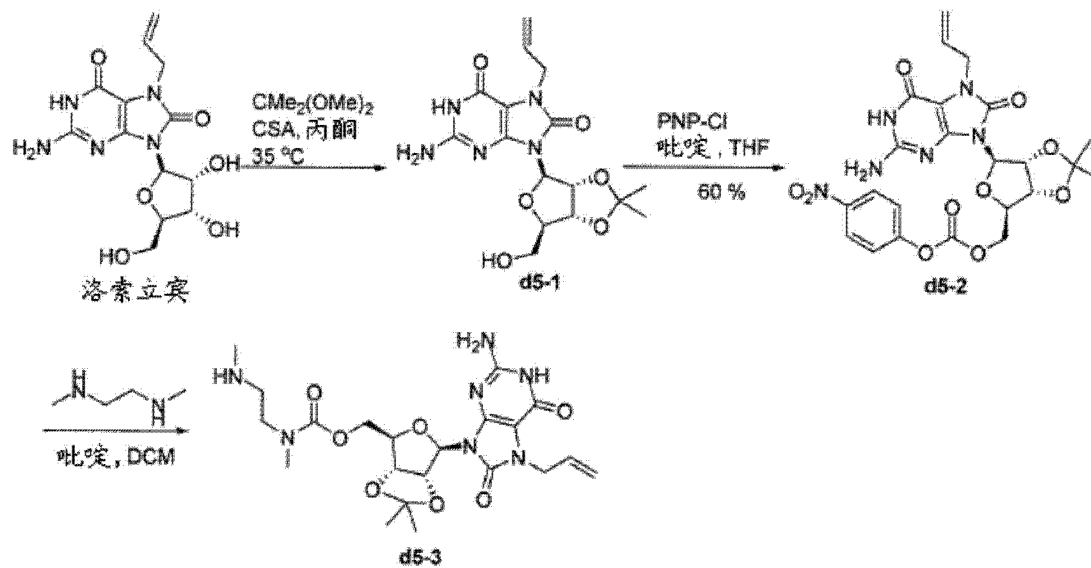


图 36

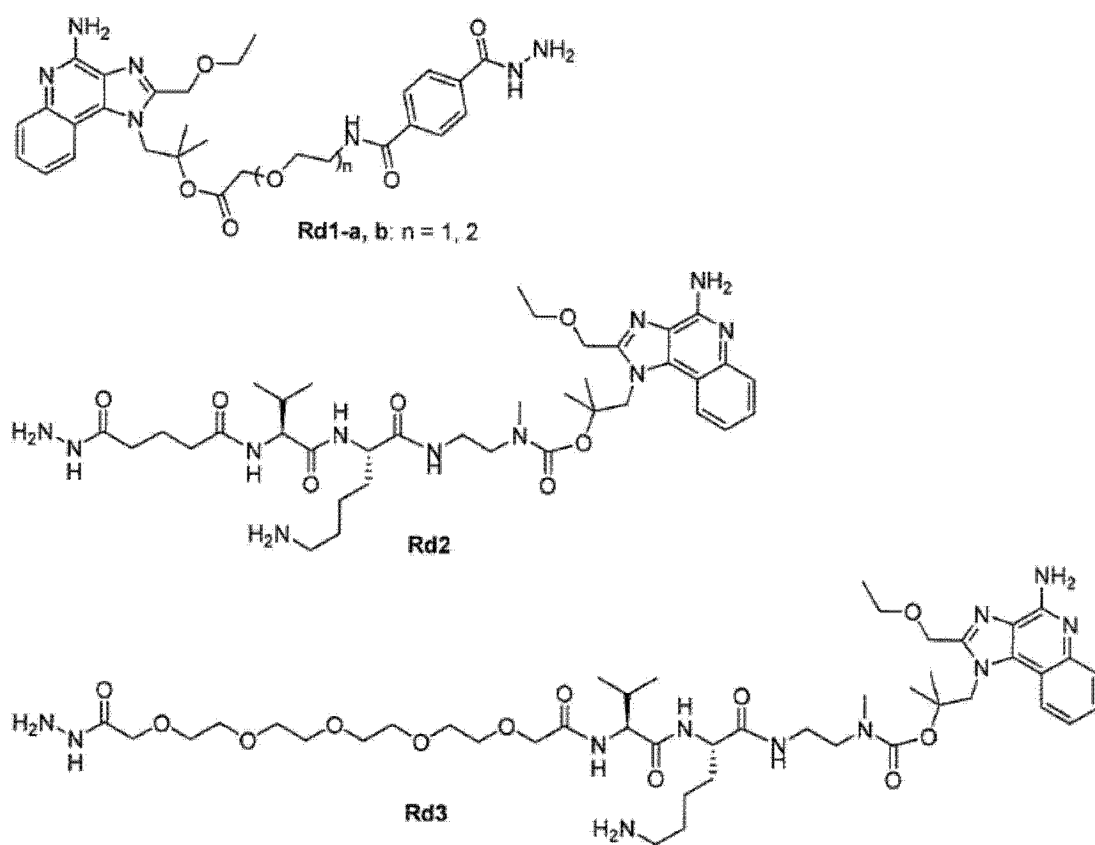


图 37

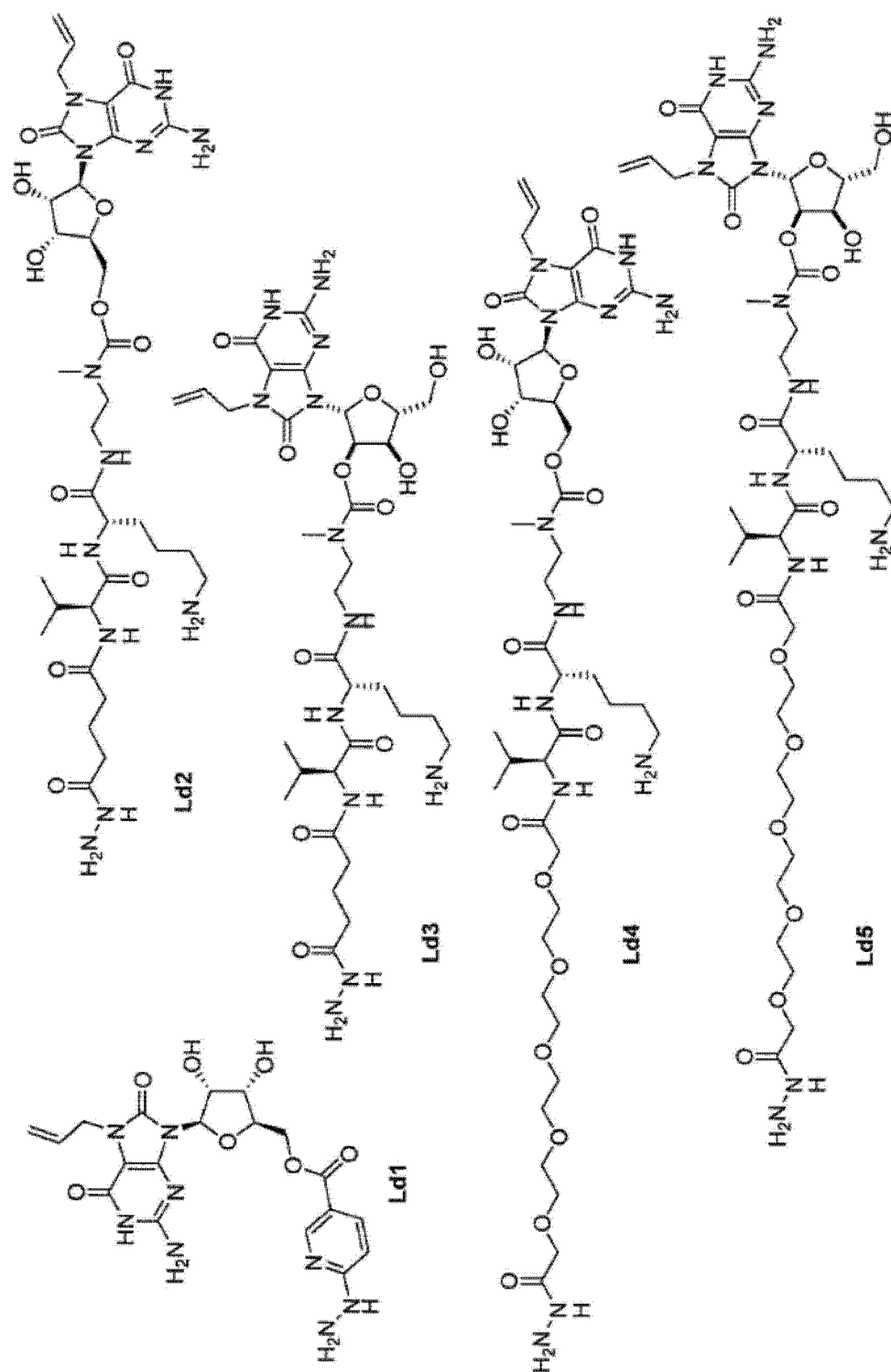


图 38A

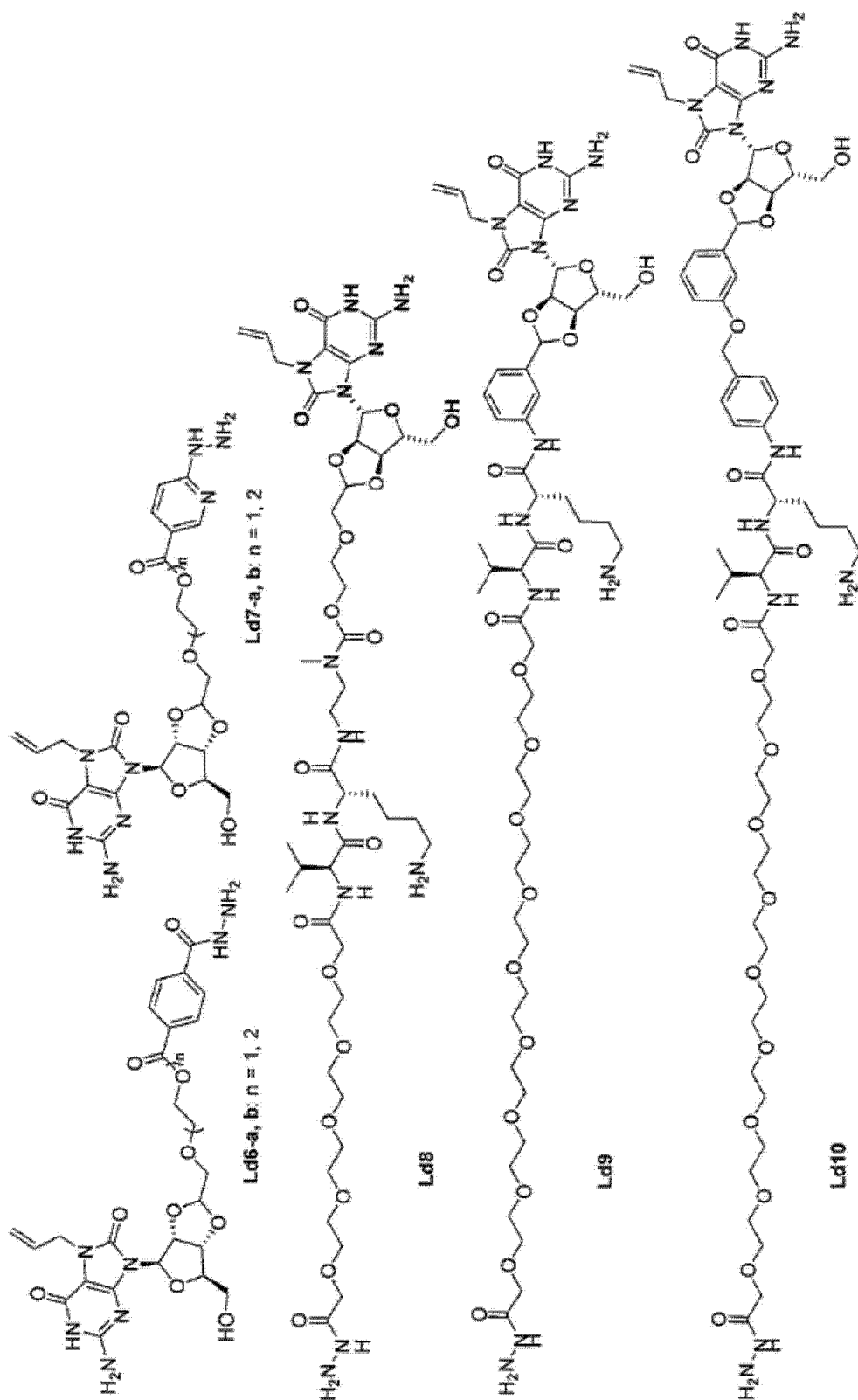


图 38B

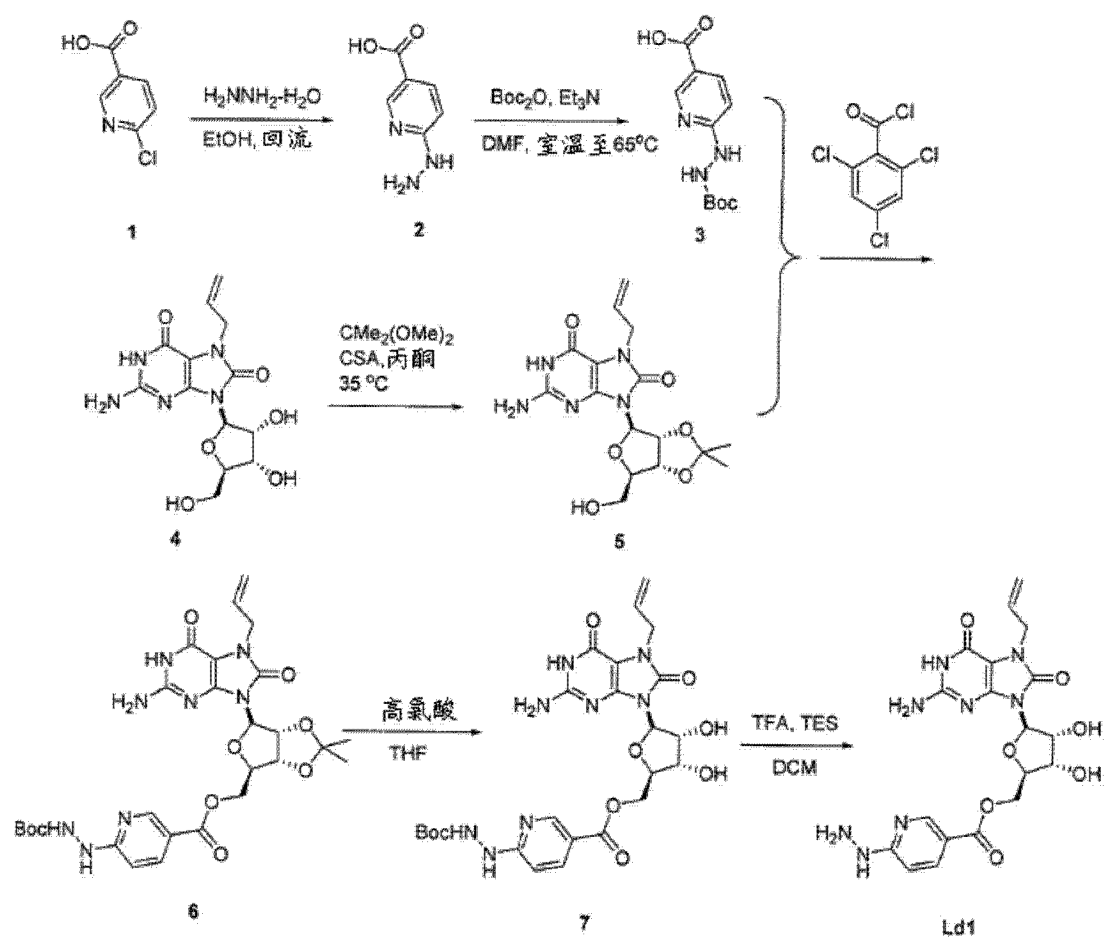


图 39

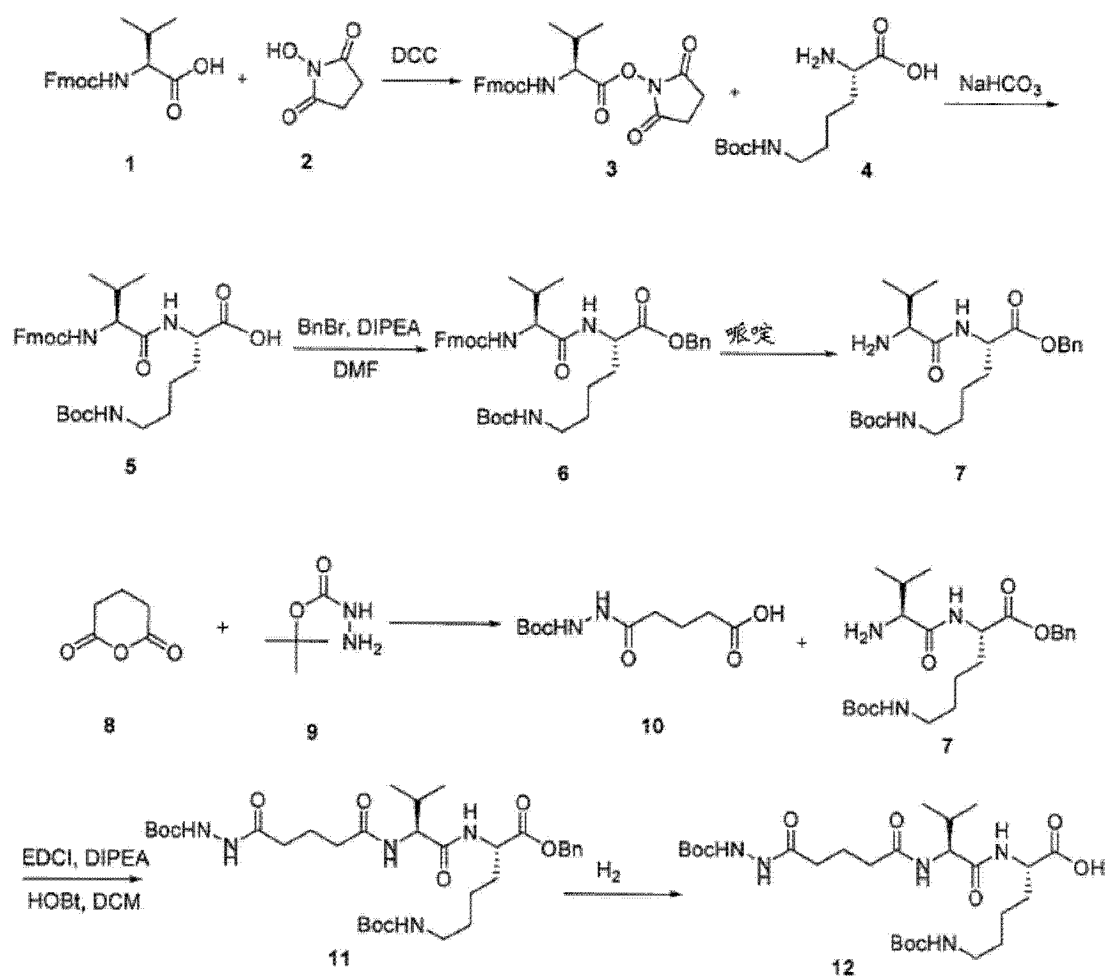


图 40A

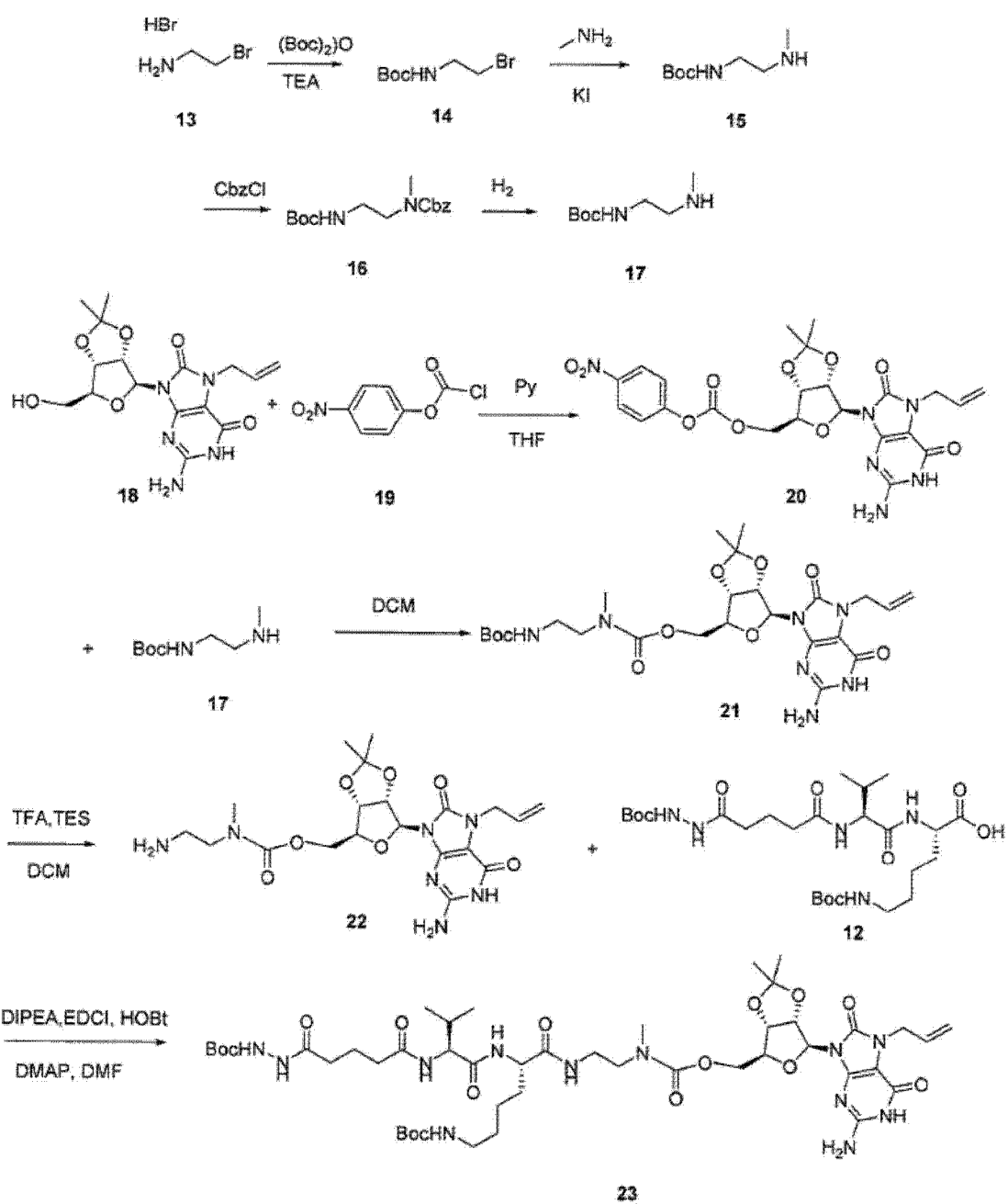


图 40B

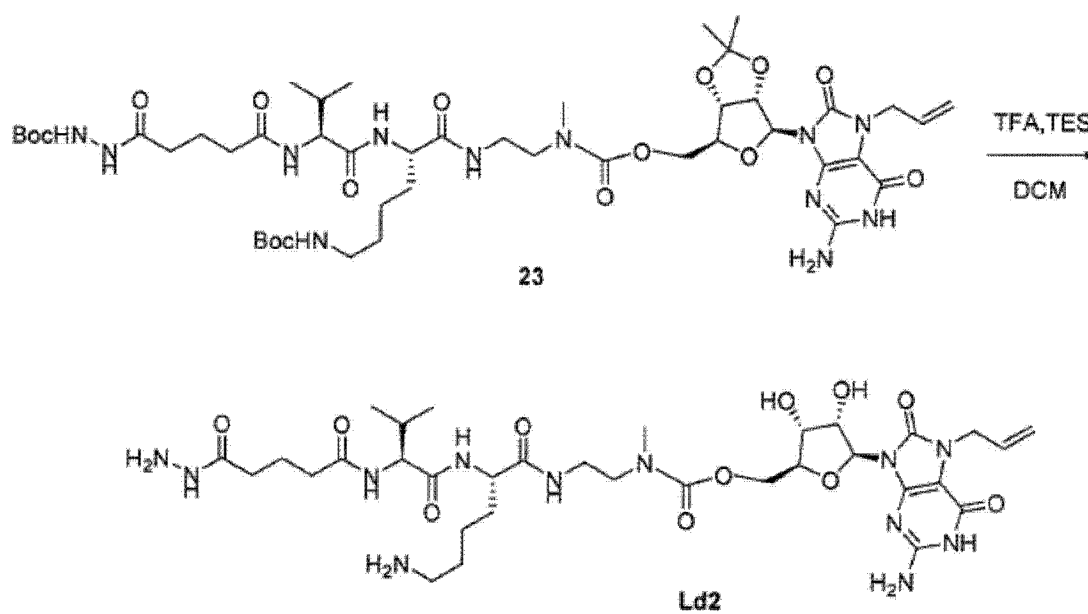


图 40C

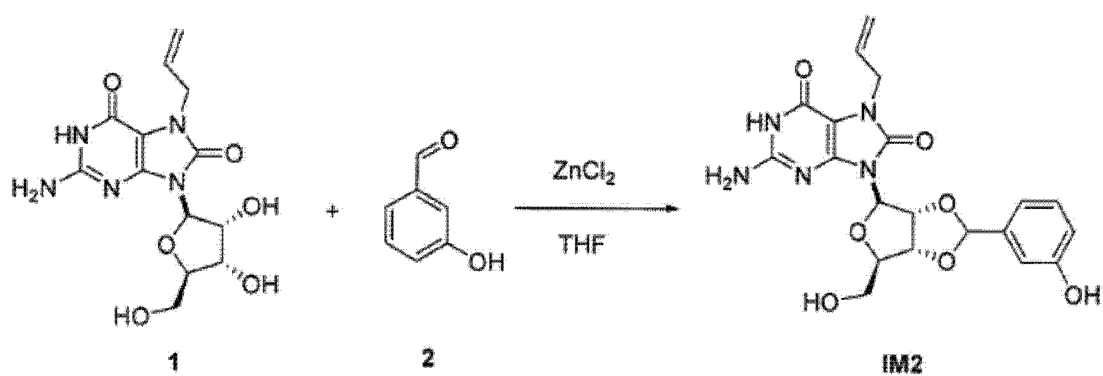


图 41

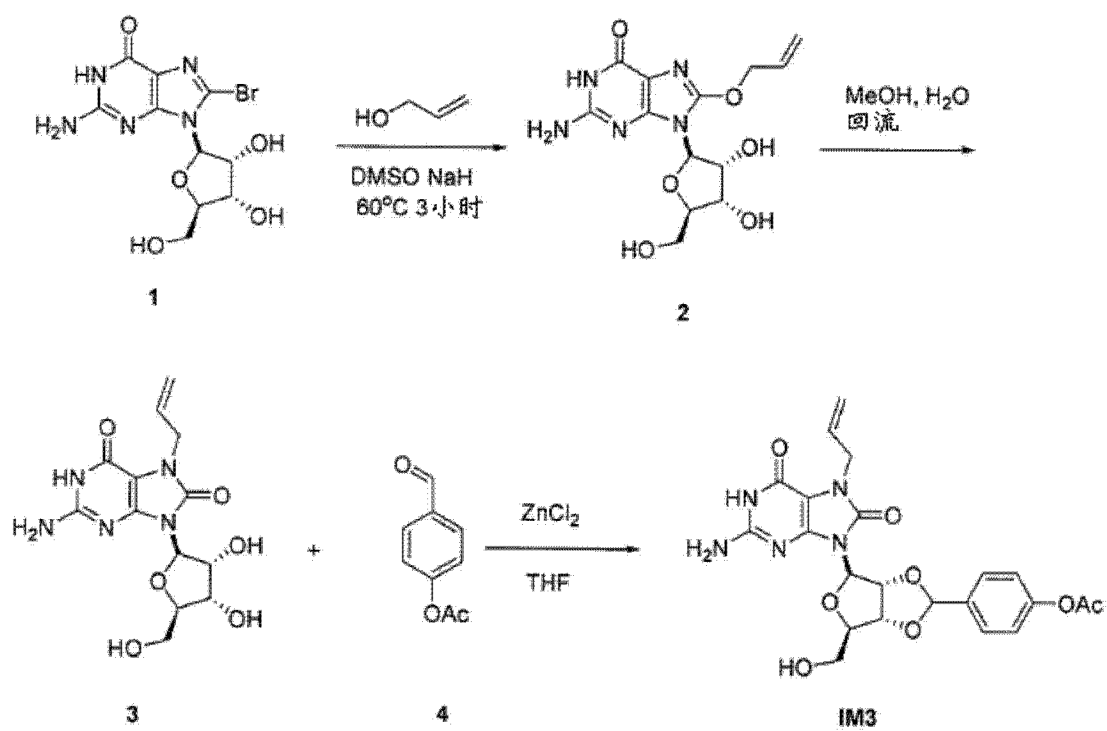


图 42

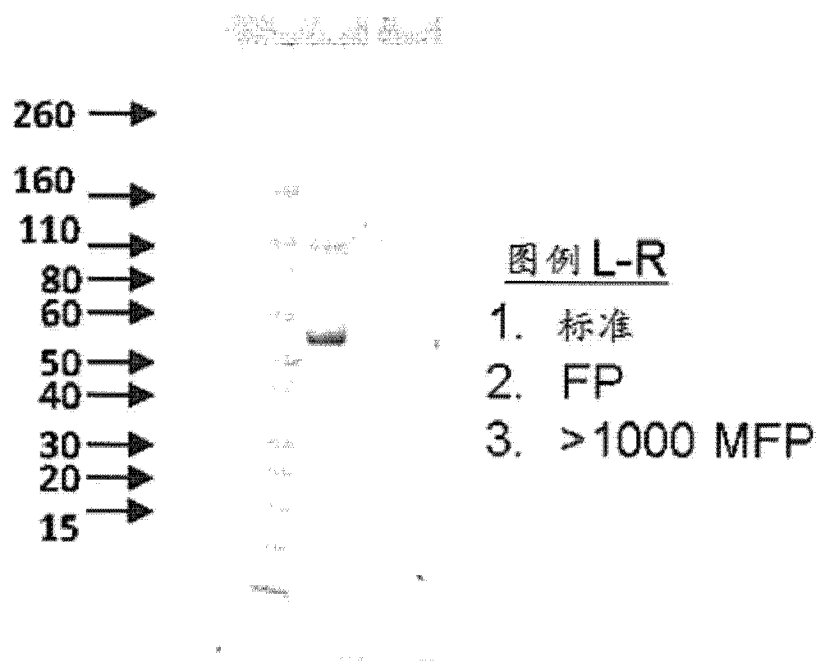


图 45

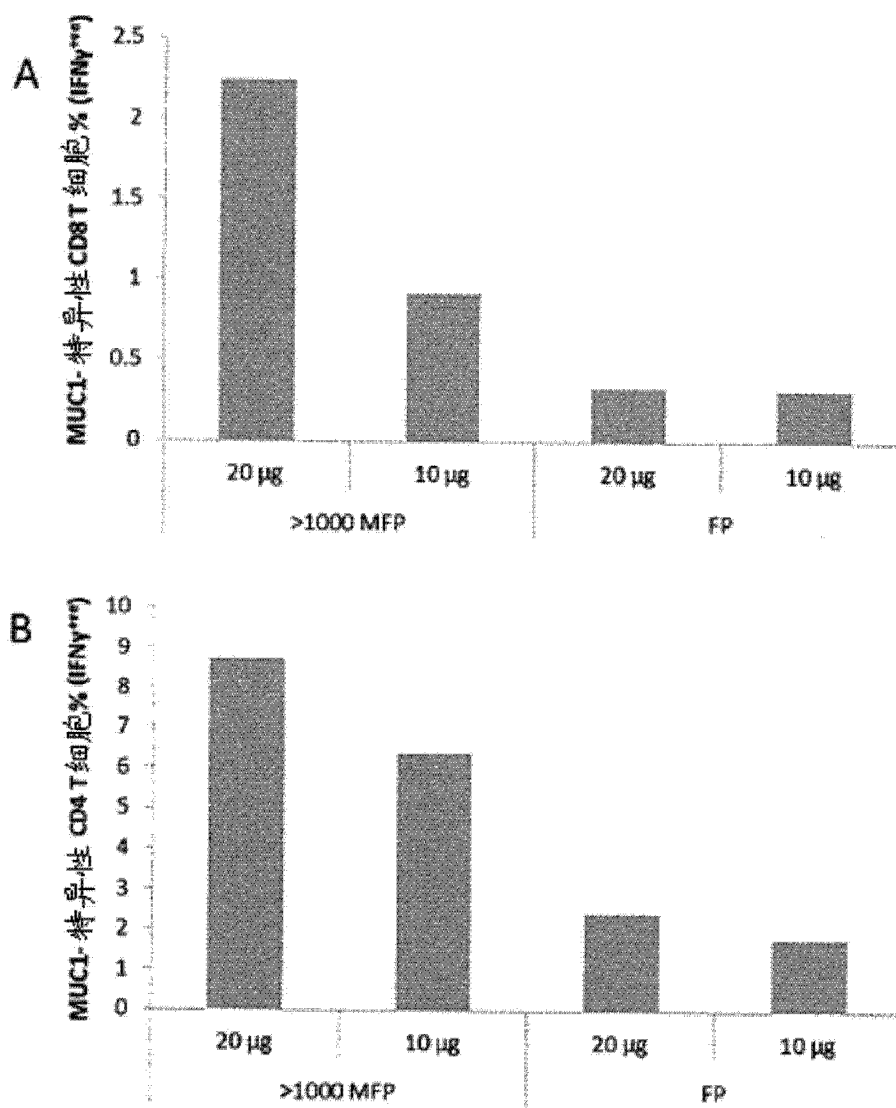


图 46

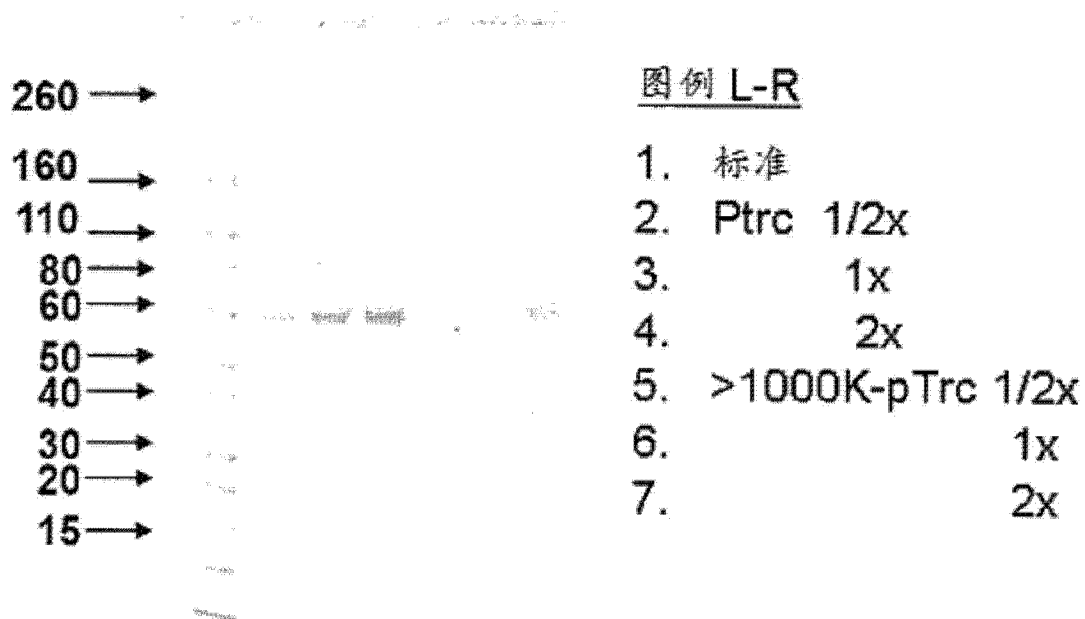


图 47

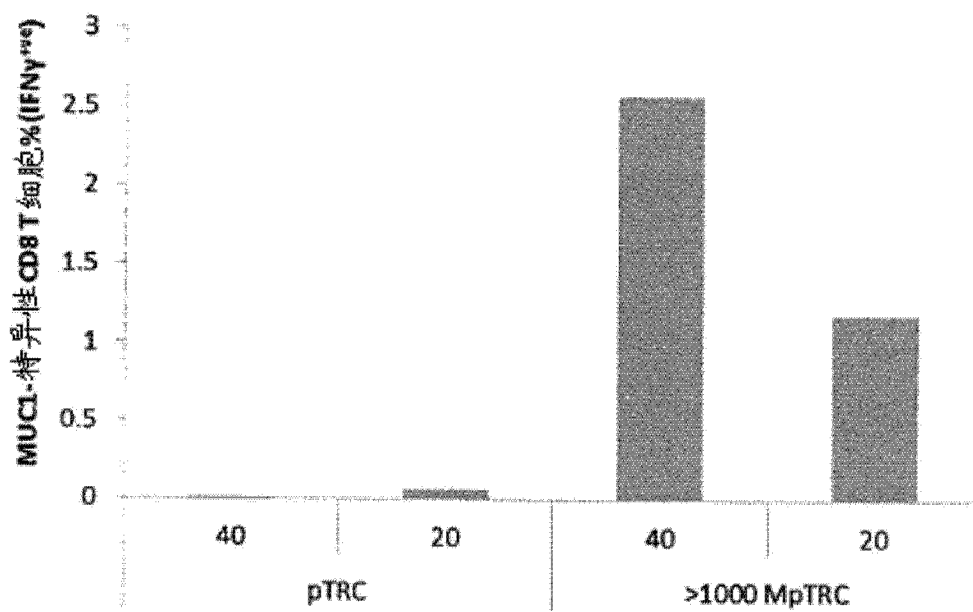


图 48

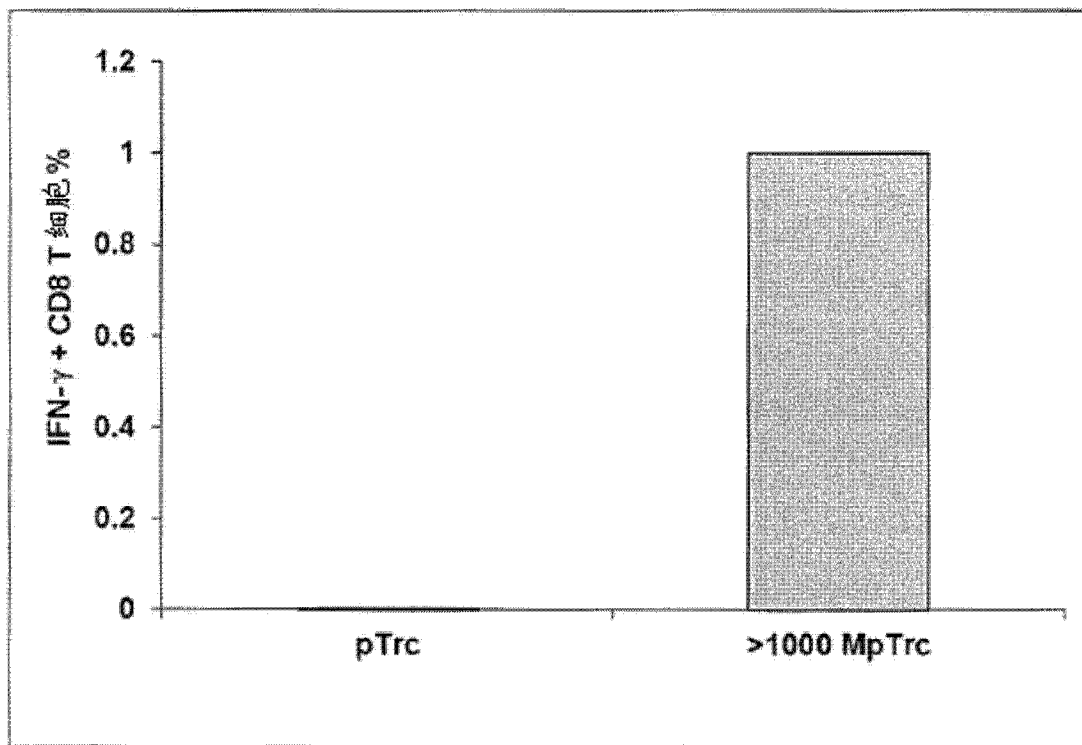


图 49

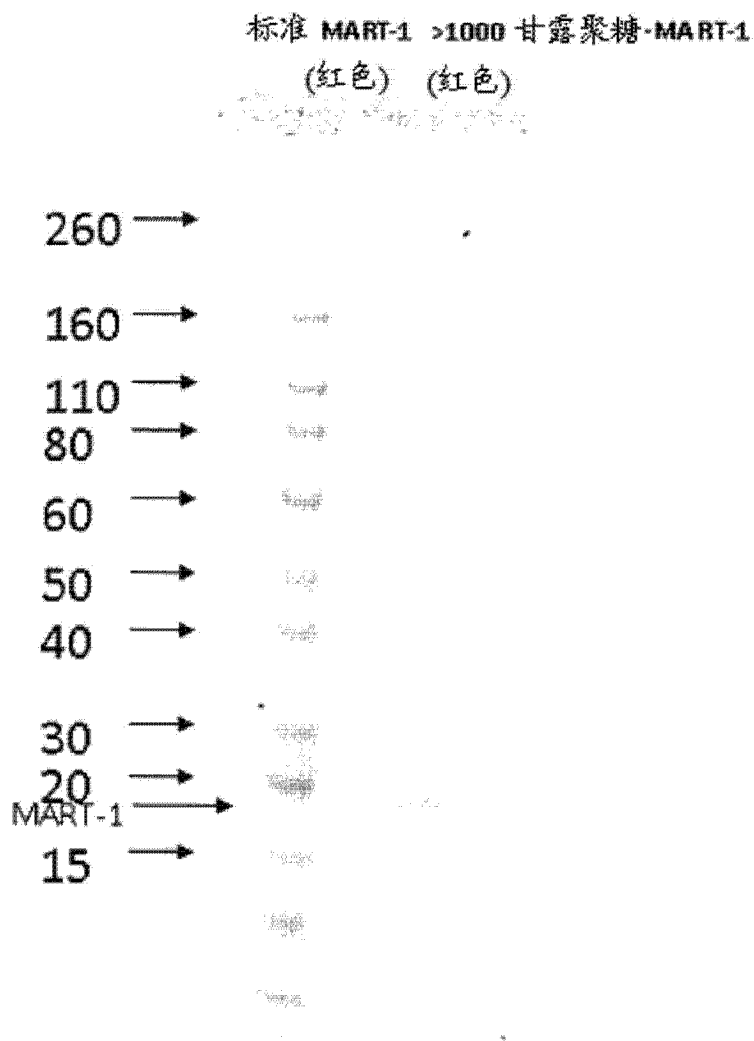


图 50

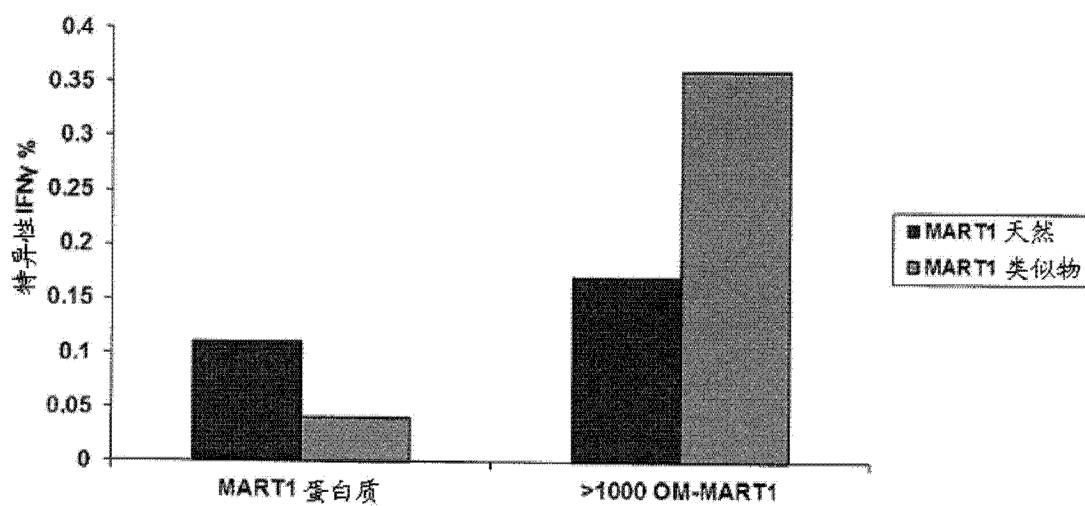


图 51

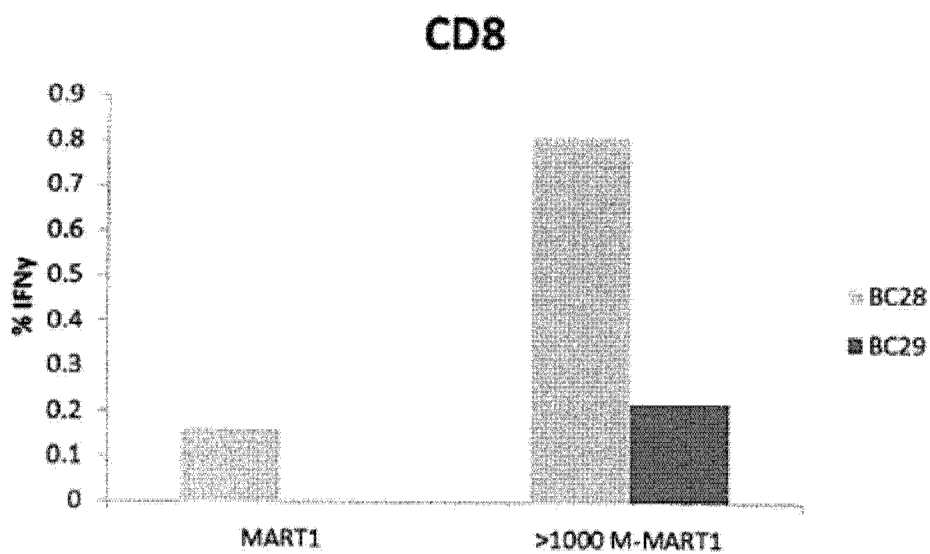


图 52

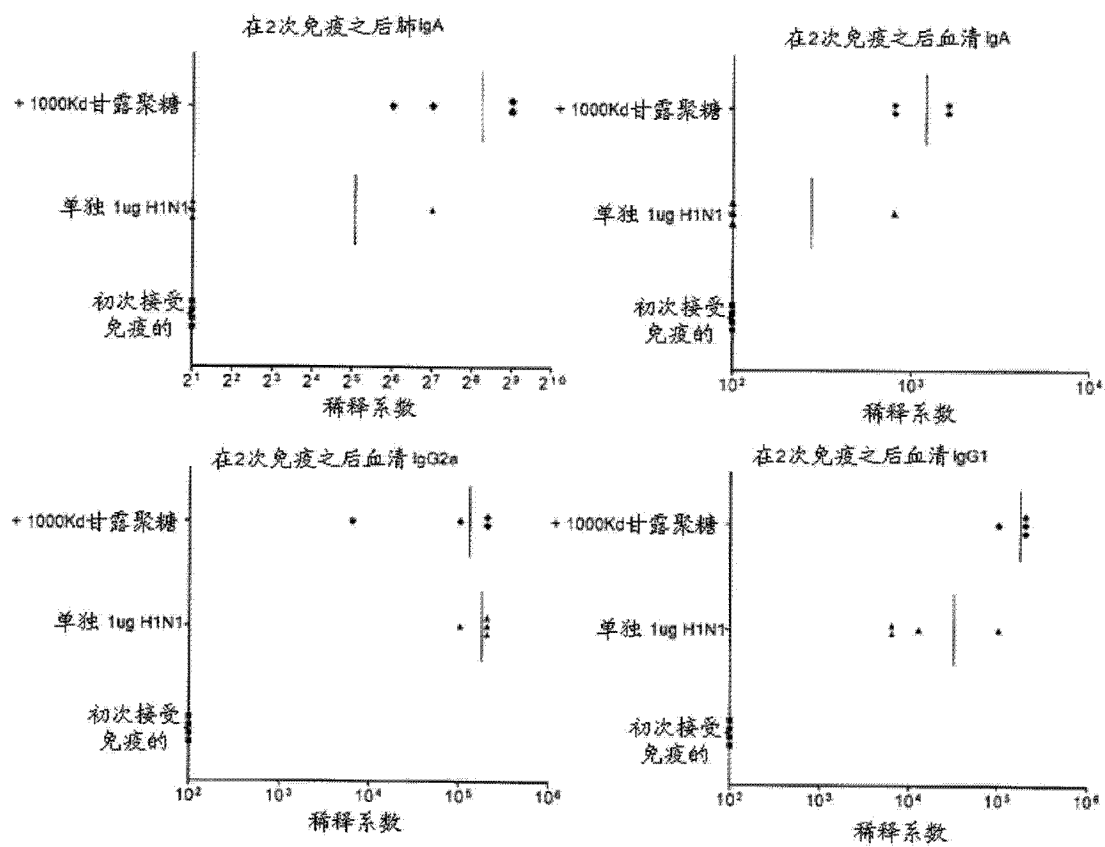


图 53