



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109893648 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201811491358.3

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2014.06.27

A61K 39/39(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 39/00(2006.01)

612654 2013.06.28 NZ

A61K 39/12(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 31/12(2006.01)

201480042833.2 2014.06.27

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 奥克兰联合服务有限公司

地址 新西兰奥克兰

(72)发明人 玛格丽特·安妮·布林布尔

托马斯·休·赖特

彼得·罗德里克·邓巴

杰弗里·马丁·威廉斯

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 张小勇

权利要求书11页 说明书75页

序列表11页 附图9页

(54)发明名称

氨基酸缀合物和肽缀合物及缀合方法

(57)摘要

本发明涉及氨基酸缀合物和肽缀合物、用于产生氨基酸缀合物和肽缀合物的方法、通过所述方法产生的缀合物、包含所述缀合物药物组合物、在受试者中激发免疫反应的方法和接种受试者的方法、所述缀合物用于所述方法的用途和缀合物在制造用于所述方法的药物中的用途。

1. 一种用于产生氨基酸缀合物或肽缀合物的方法,所述方法包括使含有脂质的缀合配偶体,和包含氨基酸的缀合配偶体在下述条件下反应,所述条件有效通过用硫醇使碳-碳双键发生氢硫化,将含有脂质的缀合配偶体与包含氨基酸的缀合配偶体缀合。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中包含氨基酸的缀合配偶体是含有肽的缀合配偶体。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中包含氨基酸的缀合配偶体包含表位。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括将氨基酸缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联以提供肽缀合物。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,所述方法还包括将氨基酸缀合物的氨基酸或肽缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联,从而提供包含肽表位的肽缀合物。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述方法还包括将表位与氨基酸缀合物的氨基或肽缀合物的氨基酸偶联。
7. 根据权利要求3、5和6中任一项所述的方法,其中表位是肽表位。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中表位经接头基团偶联或结合。
9. 根据权利要求4至8中任一项所述的方法,其中与含有脂质的缀合物缀合的肽缀合物氨基酸是N端氨基酸残基。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中包含氨基酸的缀合配偶体的所述或一个氨基酸包含碳-碳双键或巯基。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中包含碳-碳双键或巯基的氨基酸是N端氨基酸残基。
12. 根据权利要求10或11所述的方法,其中包含碳-碳双键或巯基的氨基酸的氨基酰化。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述方法还包括酰化与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸缀合物的氨基酸的氨基或肽缀合物的氨基酸残基的氨基。
14. 根据权利要求10至13中任一项所述的方法,其中包含氨基酸的缀合配偶体的所述或一个氨基酸包含巯基。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中巯基是半胱氨酸残基的巯基。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中半胱氨酸残基的氨基用C2-20脂肪酸酰化。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中C2-20脂肪酸是乙酰基。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中肽缀合物或包含氨基酸的缀合配偶体包含一个或多个增溶基团。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中增溶基团是在肽链中包含两个或更多个连续亲水性氨基酸残基的序列的氨基酸序列。
20. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中肽缀合物或包含氨基酸的缀合配偶体包含毗邻与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸残基的丝氨酸残基。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中肽还包含与丝氨酸残基毗邻的两个或更多个亲水性氨基酸残基的连续序列。
22. 根据权利要求1至3、5、7、8、以及10至21中任一项所述的方法,其中包含氨基酸的缀

合配偶体的一个或多个氨基酸的一个或多个反应性官能团是未保护的。

23. 根据权利要求1至3、5、7、8、以及10至22中任一项所述的方法,其中包含氨基酸的缀合配偶体由肽组成。

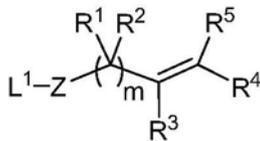
24. 根据权利要求1、4至10、以及12至21中任一项所述的方法,其中包含氨基酸的缀合配偶体由氨基酸组成。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中氨基酸的羧基用羧基保护基保护和/或氨基酸的氨基用氨基保护基保护。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中含有脂质的缀合配偶体包含一条或多条任选取代的直链或分枝脂族链或杂脂族链,所述链各自含有至少4个或至少6个连接链的原子。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中一条或多条链通过含有杂原子的官能团与包含碳-碳双键或巯基的部分共价结合。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中含有脂质的缀合配偶体是式(A1)的化合物或其可药用盐或溶剂化物:



(A1)

其中

Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-;

R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基,其中烷基或环烷基是任选取代的;

m是从0至4的整数;

R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;

R3、R4和R5各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R3是L2-C(O)-OC1-6烷基;

L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

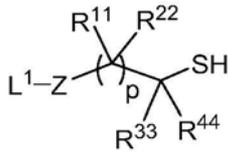
前提是:

当R3是L2-C(O)-OC1-6烷基时,R1不是L2-C(O)-OC1-6烷基;并且

当m是从2至4的整数时,不多于一个R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;并且

其中R1、R2、R3、R4、R5、L1和L2任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的。

29. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中含有脂质的缀合配偶体是式(B1)的化合物或其可药用盐或溶剂化物:

**(B1)**

其中

Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-;

R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基,其中烷基或环烷基是任选取代的;

p是从0至4的整数;

R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R11是L2-C(O)-OC1-6烷基;

R33和R44各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R33是L2-C(O)-OC1-6烷基;

L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

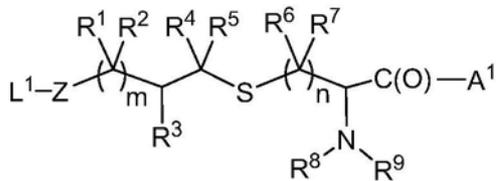
前提是:

当R33是L2-C(O)-OC1-6烷基时,R11不是L2-C(O)-OC1-6烷基;和

当p是从2至4的整数时,不多于一个R11是L2-C(O)-OC1-6烷基;并且

其中R11、R22、R33、R44、L1和L2任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代。

30. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法,其中氨基酸缀合物或肽缀合物包含式(A)的结构或其可药用盐或溶剂化物:

**(A)**

其中

Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-;

R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基,其中烷基或环烷基是任选取代的;

m是从0至4的整数。

n是1或2;

R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;

R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R3是L2-C(O)-OC1-6烷基;

或R9是氨基保护基、L3-C(O)或A2;

R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;

L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；

A1和A2各自独立地是氨基酸或肽；或A1是OH或OP1，其中P1是羧基保护基；

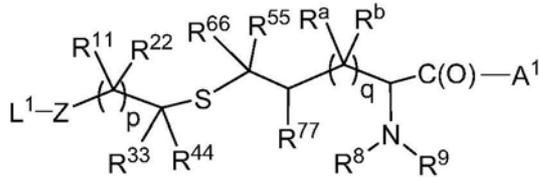
前提是：

当R3是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R1不是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

当m是从2至4的整数时，不多于一个R1是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的。

31. 根据权利要求1至27和29中任一项所述的方法，其中氨基酸缀合物或肽缀合物包含式(B)的结构或其可药用盐或溶剂化物：



(B)

其中

Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-；

R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基，其中烷基或环烷基是任选取代的；

p是从0至4的整数；

q是从0至2的整数；

R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；

R33、R44、R55、R66、R77、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R33是L2-C(O)-OC1-6烷基；

或R9是氨基保护基、L3-C(O)或A2；

Ra和Rb在q的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基；

L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；

A1和A2各自独立地是氨基酸或肽；或A1是OH或OP1，其中P1是羧基保护基；

前提是：

当R33是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R11不是L2-C(O)-OC1-6烷基；和

当p是从2至4的整数时，不多于一个R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

其中R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的。

32. 根据权利要求30或31所述的方法，其中R9独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

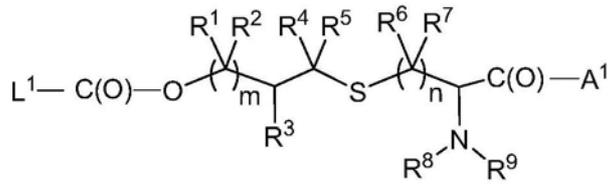
或R9是L3-C(O)或A2；并且

A1和A2各自独立地是肽；或A1是OH；

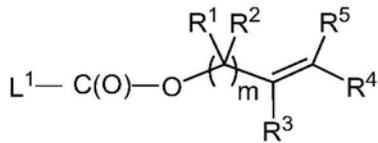
前提是：

当R9不是A2时，A1是肽。

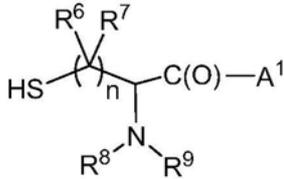
33. 根据权利要求1至28、30和32中任一项所述的方法,其中氨基酸缀合物或肽缀合物包含式(I)的结构或其可药用盐或溶剂化物

**(I)**

其中m、n、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、L¹和A¹如权利要求30中限定;并且所述方法包括使式(II)的含有脂质的缀合配偶体

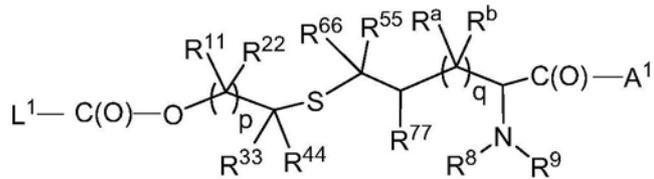
**(II)**

和包含式(III)结构的含有肽的缀合配偶体

**(III)**

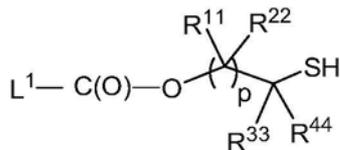
在下述条件下反应,所述条件有效通过用式(III)化合物中的巯基使式(II)化合物中的碳-碳双键发生氢硫化,将式(II)化合物与式(III)化合物缀合。

34. 根据权利要求1至27、29、31和32中任一项所述的方法,其中氨基酸缀合物或肽缀合物包含式(IA)的结构或其可药用盐或溶剂化物,

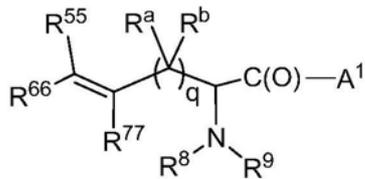
**(IA)**

其中p、q、R¹¹、R²²、R³³、R⁴⁴、R⁵⁵、R⁶⁶、R⁷⁷、R⁸、R⁹、R^a、R^b、L¹和A¹如权利要求31中限定;并且

所述方法包括使下式(IIA)的化合物

**(IIA)**

和式(IIIA)的化合物

**(IIIA)**

在下述条件下反应,所述条件有效通过用式 (IIA) 的化合物中巯基使式 (IIIA) 化合物中的碳-碳双键发生氢硫化,将式 (IIA) 化合物与式 (IIIA) 化合物缀合。

35. 根据权利要求29、31、32和34中任一项所述的方法,其中p是从0至2的整数。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中p是0或1。

37. 根据权利要求29、31、32、以及34至36中任一项所述的方法,其中R₁₁和R₂₂在p的每种情况下各自独立地是氢。

38. 根据权利要求29、31、32、以及34至37中任一项所述的方法,其中R₃₃和R₄₄各自是氢。

39. 根据权利要求31、32、以及34至38中任一项所述的方法,其中q是0或1。

40. 根据权利要求31、32、以及34至39中任一项所述的方法,其中R₅₅、R₆₆和R₇₇各自是氢。

41. 根据权利要求31、32、以及34至40中任一项所述的方法,其中R_a和R_b在q的每种情况下各自是氢。

42. 根据权利要求28、30、32和33中任一项所述的方法,其中m是从0至2的整数。

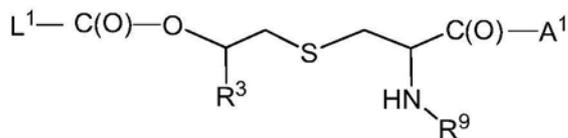
43. 根据权利要求42所述的方法,其中m是0或1。

44. 根据权利要求28、30、32、33、42和43中任一项所述的方法,其中R₁和R₂在m的每种情况下各自独立地是氢。

45. 根据权利要求28、30、32、33和42至44中任一项所述的方法,其中R₄和R₅各自是氢。

46. 根据权利要求30、32、33和42至45中任一项所述的方法,其中R₆和R₇各自是氢。

47. 根据权利要求30、32、33和42至46中任一项所述的方法,其中式 (I) 化合物是式 (IV) 的化合物或其可药用盐或溶剂化物:

**(IV)**

其中

R₃是氢或L₂-C(O)-OCH₂;

R₉是氢、氨基保护基、L₃-C(O) 或A₂; 并且

L₁和L₂各自独立地是C₅-21烷基或C₄-20杂烷基;

L₃是C₁-21烷基或C₄-20杂烷基;

A₁和A₂各自独立地是氨基酸或肽; 或A₁是OH或OP₁, 其中P₁是羧基保护基。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中R₉是氢、L₃-C(O) 或A₂; 并且

A₁和A₂各自独立地是肽; 或A₁是OH;

前提是：

当R9不是A2时，A1是肽。

49. 根据权利要求28至48中任一项所述的方法，其中L1是C5-21烷基。

50. 根据权利要求49所述的方法，其中L1是C15直链烷基。

51. 根据权利要求28至50中任一项所述的方法，其中L2是C5-21烷基。

52. 根据权利要求28、30、32、33和42至51中任一项所述的方法，其中R3是氢。

53. 根据权利要求30至52中任一项所述的方法，其中R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。

54. 根据权利要求30至53中任一项所述的方法，其中R9是氢或氨基保护基，并且所述方法还包括酰化氨基酸缀合物或肽缀合物，从而将R9处的氢或氨基保护基更换为L3-C(O)。

55. 根据权利要求30至54中任一项所述的方法，其中L3是甲基或C15直链烷基。

56. 根据权利要求55所述的方法，其中L3是甲基。

57. 根据权利要求25至56所述的方法，其中氨基保护基是Boc或Fmoc。

58. 根据权利要求30至57中任一项所述的方法，其中A1和/或A2是氨基酸或肽。

59. 根据权利要求30至57中任一项所述的方法，其中A1是OP1或OH并且R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。

60. 根据权利要求59所述的方法，其中所述方法还包括偶联氨基酸或肽，从而将A1和/或R9更换为所述氨基酸或肽。

61. 根据权利要求58或60所述的方法，其中肽包含表位。

62. 根据权利要求3和5至61中任一项所述的方法，其中肽包含选自以下的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成

a. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 1]的8个或更多个连续氨基酸残基，其中Xaa₁不存在或是S，Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸，Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸，并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸，

b. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 2]的8个或更多个连续氨基酸残基，其中Xaa₁不存在或是S，Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸，并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸，

c. 来自序列Xaa₁Xaa₂GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 3]的8个或更多个连续氨基酸残基，其中Xaa₁不存在或是S，并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸，

d. 来自序列SKKKKGARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 4]的8个或更多个连续氨基酸残基，

e. 来自序列GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 5]的8个或更多个连续氨基酸残基，

f. 来自序列LAMPFATPM [SEQ ID NO: 6]的8个或更多个连续氨基酸残基，

g. 来自序列FATPMEAE L [SEQ ID NO: 7]的8个或更多个连续氨基酸残基，

h. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAA DHR [SEQ ID NO: 8]的8个或更多个连续氨基酸残基，其中Xaa₁不存在或是S，Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸，Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸，并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸，

i. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAA DHR [SEQ ID NO: 9]的8个或更多个

连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸,

j.来自序列Xaa₁Xaa₂VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:10]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸,

k.来自序列SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:11]的8个或更多个连续氨基酸残基,

l.来自序列VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:12]的8个或更多个连续氨基酸残基,

m.来自序列EFTVSGNIL[SEQ ID NO:13]的8个或更多个连续氨基酸残基,

n.来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:14]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸,

o.来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:15]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸,

p.来自序列Xaa₁Xaa₂LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:16]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸,

q.来自序列SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:17]的8个或更多个连续氨基酸残基,

r.来自序列LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:18]的8个或更多个连续氨基酸残基,

s.来自序列SLLMWITQCFLPVF[SEQ ID NO:19]的8个或更多个连续氨基酸残基,

t.来自序列SLLMWITQC[SEQ ID NO:20]的8个或更多个连续氨基酸残基,

u. SEQ ID NO:1至20中任一个的序列,

v.或上述(a)至(u)中两者或更多者的任何组合。

63.根据权利要求1至62中任一项所述的方法,其中有效将含有脂质的缀合配偶体与包含氨基酸的缀合配偶体缀合的条件包括生成通过热降解热引发剂或光化学降解光化学引发剂引发的一个或多个自由基。

64.根据权利要求63所述的方法,其中热引发剂是AIBN。

65.根据权利要求64所述的方法,其中光引发剂是DMPA。

66.根据权利要求63或65所述的方法,其中光化学降解自由基引发剂包括用具有约365nm波长的紫外光照射。

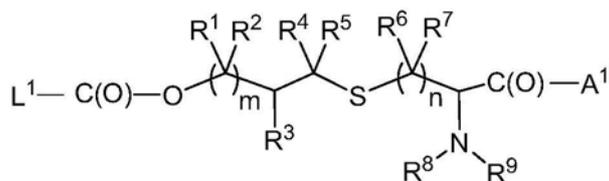
67.根据权利要求1至66中任一项所述的方法,其中反应在包含溶剂的液态介质中实施,其中溶剂包括NMP、DMSO或其混合物。

68.根据权利要求1至67中任一项所述的方法,其中反应在一种或多种抑制二聚化、调聚反应或聚合的添加物存在下实施。

69.根据权利要求68所述的方法,其中添加物是DTT或叔丁基硫醇。

70.氨基酸缀合物或肽缀合物,通过权利要求1至69中任一项所述的方法产生。

71.式(V)的化合物或其可药用盐或溶剂化物:

**(V)**

其中

m是从0至4的整数。

n是1或2；

R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R9是氨基保护基、L3-C(O)或A2；

R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基，

L1是C5-21烷基或C4-20杂烷基；

L3是C1-6烷基或C3-6环烷基；

A1和A2各自独立地是氨基酸或肽；或A1是OH或OP1，其中P1是羧基保护基；

其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代。

72. 根据权利要求72所述的化合物，其中R9独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R9是L3-C(O)或A2；和

A1和A2各自独立地是肽；或A1是OH；

前提是：

A1和A2至少之一包含表位；并且

当R9不是A2时，A1是肽。

73. 根据权利要求72或73所述的化合物，其中L1如权利要求中49或50限定。

74. 根据权利要求72至74中任一项所述的化合物，其中m如权利要求42或43中限定。

75. 根据权利要求72至75中任一项所述的化合物，其中m是0。

76. 根据权利要求72至76中任一项所述的化合物，其中R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢。

77. 根据权利要求72至77中任一项所述的化合物，其中R3是氢。

78. 根据权利要求72至78中任一项所述的化合物，其中R4和R5各自是氢。

79. 根据权利要求72至79中任一项所述的化合物，其中R6和R7各自是氢。

80. 根据权利要求72至80中任一项所述的化合物，其中R8是氢并且R9是氢、氨基保护基、L3-C(O)或A2。

81. 根据权利要求72至81中任一项所述的化合物，其中A1是OP1或OH并且R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。

82. 根据权利要求72至82中任一项所述的化合物，其中L3是Me。

83. 根据权利要求72至83中任一项所述的化合物，其中A1和/或A2是氨基酸或肽。

84. 根据权利要求72至84中任一项所述的化合物，其中肽包含表位。

85. 根据权利要求72至81和83至85中任一项所述的化合物，其中A1是丝氨酸或包含丝

氨酸作为第一N端氨基酸残基的肽。

86. 根据权利要求72至81和83至86中任一项所述的化合物,其中A1和/或A2是包含增溶基团的肽,所述增溶基团包含在肽链中包含两个或更多个亲水性氨基酸残基的氨基酸序列。

87. 根据权利要求83至86中任一项所述的化合物,其中肽包含选自以下的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成

a. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄GARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 1]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸,

b. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃GARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 2]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸,

c. 来自序列Xaa₁Xaa₂GARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 3]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸,

d. 来自序列SKKKKGARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 4]的8个或更多个连续氨基酸残基,

e. 来自序列GARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO: 5]的8个或更多个连续氨基酸残基,

f. 来自序列LAMPFATPM [SEQ ID NO: 6]的8个或更多个连续氨基酸残基,

g. 来自序列FATPMEAE L [SEQ ID NO: 7]的8个或更多个连续氨基酸残基,

h. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO: 8]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸,

i. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO: 9]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸,

j. 来自序列Xaa₁Xaa₂VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO: 10]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸,

k. 来自序列SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO: 11]的8个或更多个连续氨基酸残基,

l. 来自序列VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO: 12]的8个或更多个连续氨基酸残基,

m. 来自序列EFTVSGNIL [SEQ ID NO: 13]的8个或更多个连续氨基酸残基,

n. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR [SEQ ID NO: 14]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸,

o. 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃2LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR [SEQ ID NO: 15]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存

在或是1个至10个亲水性氨基酸，

p. 来自序列Xaa₁Xaa₂2LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:16]的8个或更多个连续氨基酸残基，其中Xaa₁不存在或是S，并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸，

q. 来自序列SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:17]的8个或更多个连续氨基酸残基，

r. 来自序列LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:18]的8个或更多个连续氨基酸残基，

s. 来自序列SLLMWITQCFLPVF[SEQ ID NO:19]的8个或更多个连续氨基酸残基，

t. 来自序列SLLMWITQC[SEQ ID NO:20]的8个或更多个连续氨基酸残基，

u. SEQ ID NO:1至20中任一个的序列，

v. 或上述(a)至(u)中两者或更多者的任何组合。

88. 分离、纯化或重组的肽，包含选自SEQ ID NO:1-5、8-12或14-18中任一个的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成。

89. 根据权利要求88所述的肽，其中肽由选自SEQ ID NO:4、5、11、12、17和18中任一个的氨基酸序列组成。

90. 药物组合物，包含有效量的根据权利要求71至87中任一项所述的肽缀合物或根据权利要求88或89所述的肽或其可药用盐或溶剂化物，或其任意组合，和可药用载体。

91. 根据权利要求90所述的药物组合物，包含有效量的两种或更多种根据权利要求71至87中任一项所述的肽缀合物，或两种或更多种根据权利要求88或89所述的肽，或一种或多种根据权利要求71至87中任一项所述的肽缀合物和一种或多种根据权利要求88或89所述的肽的任何组合。

92. 在受试者中接种或激发免疫反应的方法，包括向受试者施用有效量的根据权利要求71至87中任一项所述的肽缀合物或根据权利要求88或89所述的肽或其可药用盐或溶剂化物。

93. 在受试者中接种或激发免疫反应的方法，包括向受试者施用有效量的根据权利要求90或91所述的药物组合物。

氨基酸缀合物和肽缀合物及缀合方法

[0001] 本申请是中国发明专利申请号201480042833.2 (PCT国际申请号PCT/IB2014/062648)的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及氨基酸缀合物和肽缀合物、用于产生氨基酸缀合物和肽缀合物的方法、通过所述方法产生的缀合物、包含所述缀合物的药物组合物、在受试者中激发免疫反应的方法和接种受试者的方法、所述缀合物用于所述方法的用途和缀合物在制造用于所述方法的药物中的用途。

背景技术

[0003] 合成肽疫苗通常包含蛋白质抗原的免疫原性部分的合成性副本。这种疫苗开发方法具有多个优点,包括易于合成、避免潜在有毒的生物学副产物和表征简单。

[0004] 开发肽疫苗中的一个关键问题是缺少作为唯一疫苗组分的肽所显示的免疫原性。通常必需在疫苗中包含佐剂,所述佐剂设计成激活天然免疫系统的组成部分(例如弗氏佐剂)。

[0005] 肽疫苗设计中的一项备选策略产生自我辅佐性疫苗,其中目的肽表位与适宜的佐剂共价连接。与抗原连同外来佐剂的简单联合制剂相比,这类自我辅佐性疫苗可以具有增强的抗原摄取、呈递和树状细胞成熟。

[0006] 已经开发出几种自我辅佐性疫苗,但是这类疫苗的制备可能是复杂的。

[0007] 对新自我辅佐性疫苗和产生自我辅佐性疫苗的新方法的需求正日益增长。本发明的目的有助于满足这些需求;和/或是至少向公众提供可用选项。

[0008] 本发明的其他目的可以从仅以举例方式给出的以下说明变得显而易见。

[0009] 对本说明书中已经包括的文献、动作、材料、装置、制品等的任何讨论仅目的在于提供本发明的语境。不得因其存在于优先权日之前而视为承认任何或全部的这些事物构成现有技术基础的部分或是与本发明相关的领域内的公知常识。

[0010] 发明概述

[0011] 在一个方面,本发明提供一种用于产生氨基酸缀合物或肽缀合物的方法,所述方法包括使

[0012] 含有脂质的缀合配偶体,和

[0013] 包含氨基酸的缀合配偶体

[0014] 在下述条件下反应,所述条件有效通过用硫醇使碳-碳双键发生氢硫化,将含有脂质的缀合配偶体与包含氨基酸的缀合配偶体缀合。

[0015] 本文所述的任何实施方案涉及本文中的任何方面。

[0016] 在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体是含有肽的缀合配偶体,并且含有脂质的缀合配偶体与含有肽的缀合配偶体的肽偶联。

[0017] 在一些实施方案中,含有脂质的缀合配偶体与含有氨基酸的缀合配偶体的所述或

一个氨基酸或含有肽的缀合配偶体的肽的所述或一个氨基酸缀合。

[0018] 在某些实施方案中,含有脂质的缀合配偶体与含有氨基酸的缀合配偶体的所述或一个氨基酸缀合。

[0019] 因此,在另一个方面,本发明提供一种用于产生肽缀合物的方法,所述方法包括使

[0020] 含有脂质的缀合配偶体,和

[0021] 含有肽的缀合配偶体

[0022] 在下述条件下反应,所述条件有效通过用硫醇使碳-碳双键发生氢硫化,将含有脂质的缀合配偶体与含有肽的缀合配偶体缀合。

[0023] 在一个实施方案中,缀合物是脂肽,从而该方法用于产生脂肽。

[0024] 在一个实施方案中,含有脂质的缀合配偶体包含碳-碳双键,并且含有肽的缀合配偶体的肽包含巯基。

[0025] 在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体包含表位。在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含表位。在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体包含两个或更多个表位。在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含两个或更多个表位。在一个实施方案中,肽缀合物包含两个或更多个表位。在一个实施方案中,该表位是肽表位。在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体由肽组成。在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体由包含肽表位的肽组成。在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体由肽组成。在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体由包含肽表位的肽组成。

[0026] 在一些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体包含与缀合配偶体的所述或一个氨基酸结合的表位。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含与含有肽的缀合配偶体的肽结合的表位。在一些实施方案中,该表位经接头基团与肽结合。

[0027] 在一些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体包含经接头基团与缀合配偶体的所述或一个氨基酸结合的肽表位。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含经接头基团与肽结合的肽表位。

[0028] 在一些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体和/或含有肽的缀合配偶体包含抗原性肽。在一些实施方案中,肽缀合物包含抗原性肽。

[0029] 在一些实施方案中,该方法还包括将氨基酸缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联以提供肽缀合物。

[0030] 在一些实施方案中,偶联肽包括单独偶联一个或多个氨基酸和/或一种或多种肽。

[0031] 在一些实施方案中,该方法还包括将氨基酸缀合物的氨基酸或肽缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联,从而提供包含其接头基团或一个或多个氨基酸的肽缀合物。

[0032] 在一些实施方案中,该方法还包括将包含其接头基团或一个或多个氨基酸的肽缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联,从而提供包含与下述氨基酸结合的肽表位的肽缀合物,所述氨基酸经接头基团与含有脂质的缀合配偶体缀合。

[0033] 在一些实施方案中,与含有脂质的缀合物缀合缀合的肽缀合物氨基酸是N端氨基酸残基。

[0034] 在一些实施方案中,该方法还包括将氨基酸缀合物的氨基酸或肽缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联,从而提供包含肽表位的肽缀合物。

[0035] 在一些实施方案中,该方法还包括将表位与氨基酸缀合物的氨基酸缀合物或肽缀

合物的氨基酸偶联。在一些实施方案中,该方法还包括将肽表位与氨基酸缀合物的氨基酸或肽缀合物的氨基酸偶联。在一些实施方案中,表位经接头基团偶联或结合。

[0036] 在一些实施方案中,该方法还包括将表位与肽缀合物的肽偶联。在一些实施方案中,该方法还包括将肽表位与肽缀合物的肽偶联。在一些实施方案中,该表位经接头基团与肽结合。

[0037] 在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体由氨基酸组成。在一个实施方案中,氨基酸C末端的羧基用羧基保护基保护和/或氨基酸的Na-氨基用氨基保护基保护。

[0038] 在一些实施方案中,肽C末端的羧基用羧基保护基保护和/或肽的Na-氨基用氨基保护基保护。

[0039] 在一个实施方案中,含有脂质的缀合配偶体包含一条或多条任选取代的直链或分枝脂族链或杂脂族链,所述链各自含有至少4个连接链的原子。在一个实施方案中,含有脂质的缀合配偶体包含一条或多条任选取代的直链或分枝脂族链或杂脂族链,所述链各自含有至少6个连接链的原子。在一个具体构思的实施方案中,一条或多条链是脂族的。在一个具体构思的实施方案中,一条或多条链是饱和的。

[0040] 在一些实施方案中,一条或多条链是任选取代的。在一些实施方案中,一条或多条链任选用一个或多个芳基取代。

[0041] 在一些实施方案中,一条或多条链包含至少4、6、8、10、12或14个连接链的原子。在一些实施方案中,一条或多条链包含4-22、6-22、8-22、10-22、12-22或14-22个连接链的原子。

[0042] 在一个实施方案中,一条或多条链通过含有杂原子的官能团与包含碳-碳双键或巯基的部分(moiety)共价结合。含有杂原子的官能团的例子包括但不限于醚、胺、硫化物、亚砷、砷、酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯和脲基。

[0043] 在示例性实施方案中,一条或多条链通过酯官能团与部分共价结合。

[0044] 在一个实施方案中,含有脂质的缀合配偶体包含一种或多种饱和或不饱和的脂肪酸酯。在一些实施方案中,脂肪酸是饱和的。在一个实施方案中,一种或多种脂肪酸酯与包含碳-碳双键或巯基的部分结合。在一个实施方案中,酯是脂肪酸的羧基与该部分的醇的酯。

[0045] 在一个实施方案中,脂肪酸是C4-22脂肪酸。在一个实施方案中,脂肪酸是C6-22脂肪酸。在另一个实施方案中,脂肪酸是C10-22脂肪酸。在又一个实施方案中,脂肪酸是C12-22脂肪酸。在一个示例性实施方案中,脂肪酸是C12、C14、C16、C18或C20脂肪酸。

[0046] 在一些实施方案中,脂肪酸是月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、棕榈油酸、油酸、反油酸、亚油酸、 α -亚麻酸和花生四烯酸。在一个实施方案中,脂肪酸是月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸或硬脂酸。在具体构思的实施方案中,脂肪酸是棕榈酸。

[0047] 在一个示例性实施方案中,含有脂质的缀合配偶体包含一种或两种脂肪酸酯。在具体构思的实施方案中,含有脂质的缀合配偶体包含一种脂肪酸酯。

[0048] 在某些实施方案中,脂肪酸酯是包含碳-碳双键或巯基的醇的酯。在一个实施方案中,醇是单羟基、二羟基或三羟基C2-6脂族醇。在另一个实施方案中,醇是单羟基或二羟基C2-4脂族醇。在一个示例性实施方案中,醇是单羟基C2脂族醇或单羟基或二羟基C3脂族醇。在具体构思的实施方案中,醇是单羟基C2醇。

- [0049] 在某些实施方案中,含有脂质的缀合配偶体包含碳-碳双键。
- [0050] 在一个示例性实施方案中,醇包含碳-碳双键。在具体构思的实施方案中,醇是乙烯醇。
- [0051] 在具体构思的实施方案中,肽是合成肽。
- [0052] 在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体和/或肽缀合物包含合成肽。在一些实施方案中,合成肽是通过包括固相肽合成(SPPS)的方法制备的肽。
- [0053] 在一些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体的所述或一个氨基酸包含碳-碳双键或巯基。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸残基包含碳-碳双键或巯基。
- [0054] 在一些实施方案中,包含碳-碳双键或巯基的氨基酸残基是末端氨基酸残基。在一些实施方案中,末端氨基酸残基是N端残基。
- [0055] 在一些实施方案中,包含碳-碳双键或巯基的氨基酸的N α -氨基被酰化。
- [0056] 在某些实施方案中,该方法还包括酰化与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸缀合物的氨基酸的N α -氨基或肽缀合物的氨基酸残基的N α -氨基。在某些实施方案中,该方法还包括用C2-20脂肪酸酰化N α -氨基。
- [0057] 在某些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体的氨基酸包含巯基。在某些实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸残基包含巯基。在某些实施方案中,巯基是半胱氨酸残基的巯基。
- [0058] 在某些实施方案中,半胱氨酸残基是末端残基。在某些实施方案中,半胱氨酸残基是N端残基。
- [0059] 在一些实施方案中,半胱氨酸残基的氨基被酰化。
- [0060] 在一个实施方案中,氨基用C2-20脂肪酸酰化。
- [0061] 在一个示例性实施方案中,C2-20脂肪酸是乙酰基或棕榈酰基。在另一个示例性实施方案中,C2-20脂肪酸是乙酰基。
- [0062] 在一些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体和/或肽缀合物包含8至220个、8至200个、8至175个、8至150个、8至125个、8至100个、8至90个、8至80个、8至70个、8至60个、8至50个、8至40个、8至30个、8至25个、8至20个、或8至15个氨基酸。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含8至220个、8至200个、8至175个、8至150个、8至125个、8至100个、8至90个、8至80个、8至70个、8至60个、8至50个、8至40个、8至30个、8至25个、8至20个或8至15个氨基酸。
- [0063] 在一个示例性实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体和/或肽缀合物包含肽,所述肽包含8至60个氨基酸。在一个示例性实施方案中,该肽包含8至60个氨基酸。
- [0064] 在其他实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体和/或肽缀合物包含5至220个、8至220个、5至175个、8至175个、8至150个、10至150个、15至125个、20至100个、20至80个、20至60个、25至100个、25至80个、25至60个、30至80个、40至60个或50至60个氨基酸。在其他实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含5至220个、8至220个、5至175个、8至175个、8至150个、10至150个、15至125个、20至100个、20至80个、20至60个、25至100个、25至80个、25至60个、30至80个、40至60个或50至60个氨基酸。
- [0065] 在其他实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体和/或肽缀合物包含5至150个、5至

125个、5至100个、5至75个、5至60个、5至50个、5至40个、5至30个、5至25个、5至20个、8至150个、8至125个、8至100个、8至75个、8至60个、8至50个、8至40个、8至30个、8至25个或8至20氨基酸。在其他实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含5至150个、5至125个、5至100个、5至75个、5至60个、5至50个、5至40个、5至30个、5至25个、5至20个、8至150个、8至125个、8至100个、8至75个、8至60个、8至50个、8至40个、8至30个、8至25个或8至20个氨基酸。

[0066] 在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体和/或肽缀合物包含一个或多个增溶基团。在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含一个或多个增溶基团。

[0067] 在某些实施方案中,增溶基团是在肽链中包含两个或更多个亲水性氨基酸残基的氨基酸序列。在某些实施方案中,增溶基团是在肽链中包含两个或更多个连续亲水性氨基酸残基的序列的氨基酸序列。在一个实施方案中,亲水性氨基酸残基是阳离子氨基酸残基。在一个实施方案中,阳离子氨基酸残基是精氨酸残基或赖氨酸残基。在一个具体构思的实施方案中,阳离子氨基酸残基是赖氨酸残基。在一个实施方案中,该序列包含2至20个、2至15个、2至10个、3至7个或3至5个氨基酸。在一个实施方案中,增溶基团是三、四、五、六或七赖氨酸序列。在一个具体构思的实施方案中,增溶基团是四赖氨酸序列。

[0068] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或包含氨基酸的缀合配偶体包含毗邻与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸残基的丝氨酸残基。在具体构思的实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽包含毗邻与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸残基的丝氨酸残基。在一个示例性实施方案中,与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸残基是N末端残基。在具体构思的实施方案中,肽还包含与丝氨酸残基毗邻的两个或更多个亲水性氨基酸残基的连续序列。

[0069] 在某些实施方案中,肽缀合物和/或包含氨基酸的缀合配偶体包含与丝氨酸残基毗邻的两个或更多个亲水性氨基酸残基的连续序列。

[0070] 在某些实施方案中,肽缀合物和/或包含氨基酸的缀合配偶体仅包含天然存在的氨基酸。在某些实施方案中,含有肽的缀合配偶体仅包含天然存在的氨基酸。在其他实施方案中,肽中75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多、或99%或更多的氨基酸残基是天然存在的氨基酸。

[0071] 在其他实施方案中,肽缀合物和/或包含氨基酸的缀合配偶体中75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多、或99%或更多的氨基酸残基是天然存在的氨基酸。

[0072] 在示例性实施方案中,肽缀合物和/或包含氨基酸的缀合配偶体包含了包含肽表位的肽。在示例性实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽包含一个或多个肽表位。

[0073] 在一个实施方案中,肽包含选自以下的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成:

[0074] (a) 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄GARGPESRLLEFYLPMPFATPMEAEELARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO:1]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸,

[0075] (b) 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃GARGPESRLLEFYLPMPFATPMEAEELARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO:2]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸,

[0076] (c) 来自序列Xaa₁Xaa₂GARGPESRLLEFYLPMPFATPMEAEELARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO:3]

的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸,

[0077] (d) 来自序列SKKKKGARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL[SEQ ID NO:4]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0078] (e) SEQ ID NO:1至4中任一个的序列,

[0079] (f) 来自序列GARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL[SEQ ID NO:5]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0080] (g) SEQ ID NO:5的序列

[0081] (h) 来自序列LAMPFATPM[SEQ ID NO:6]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0082] (i) SEQ ID NO:6的序列

[0083] (j) 来自序列FATPMEAE L[SEQ ID NO:7]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0084] (k) SEQ ID NO:7的序列

[0085] (l) 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:8]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸,

[0086] (m) 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:9]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸,

[0087] (n) 来自序列Xaa₁Xaa₂VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:10]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸,

[0088] (o) 来自序列SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:11]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0089] (p) SEQ ID NO:8至11中任一个的序列,

[0090] (q) 来自序列VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR[SEQ ID NO:12]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0091] (r) SEQ ID NO:12的序列

[0092] (s) 来自序列EFTVSGNIL[SEQ ID NO:13]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0093] (t) SEQ ID NO:13的序列

[0094] (u) 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:14]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,Xaa₃不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₄不存在或是一个或多个亲水性氨基酸,

[0095] (v) 来自序列Xaa₁Xaa₂Xaa₃LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:15]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,Xaa₂不存在或是亲水性氨基酸,并且Xaa₃不存在或是1个至10个亲水性氨基酸,

[0096] (w) 来自序列Xaa₁Xaa₂LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:16]的8个或更多个连续氨基酸残基,其中Xaa₁不存在或是S,并且Xaa₂不存在或是1个至4个亲水性氨基酸,

[0097] (x) 来自序列SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:17]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0098] (y) SEQ ID NO:14至17中任一个的序列,

[0099] (z) 来自序列LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR[SEQ ID NO:18]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0100] (aa) SEQ ID NO:18的序列

[0101] (bb) 来自序列SLLMWITQCFLPVF[SEQ ID NO:19]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0102] (cc) SEQ ID NO:19的序列

[0103] (dd) 来自序列SLLMWITQC[SEQ ID NO:20]的8个或更多个连续氨基酸残基,

[0104] (ee) SEQ ID NO:20的序列

[0105] (ff) 或上述(a)至(ee)中两者或更多者的任何组合。

[0106] 在一个示范性实施方案中,肽表位衍生自NY-ES0-1。在一个具体构思的实施方案中,肽包含下述氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述氨基酸序列选自具有来自SEQ ID NO:5、6、7、12、13、18、19和20任一者的8个或更多个连续氨基酸残基。

[0107] 在一个实施方案中,肽包含下述氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:5、6、7、12、13、18、19和20的任一者。

[0108] 在一个实施方案中,肽包含下述氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:5、12和18的任一者。

[0109] 在一个实施方案中,肽包含下述氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:5、12和18的任一者。

[0110] 在一个实施方案中,肽包含下述氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:4、11和17的任一者。

[0111] 在一个具体构思的实施方案中,含有肽的缀合配偶体的氨基酸的反应性官能团是未保护的。

[0112] 在某些实施方案中,肽缀合物的一个或多个氨基酸的一个或多个反应性官能团是未保护的。

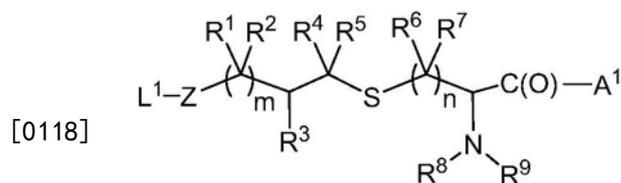
[0113] 在某些实施方案中,氨基酸缀合物的氨基酸的一个或多个反应性官能团是未保护的。

[0114] 在某些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体的一个或多个氨基酸的一个或多个反应性官能团是未保护的。

[0115] 在某些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体包含肽,其中该肽的氨基酸的侧链的反应性官能团是未保护的,例外是除待反应的巯基之外的任何巯基。

[0116] 在一个具体构思的实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸的反应性官能团是未保护的。在一个具体构思的实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸的反应性官能团是未保护的,例外是除待反应的巯基之外的任何巯基。

[0117] 在一个实施方案中,该方法包括产生包含式(A)结构的氨基酸缀合物或肽缀合物:



(A)

[0119] 其中

[0120] Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-;

[0121] R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基,其中烷基或环烷基是任选取代的;

[0122] m是从0至4的整数。

[0123] n是1或2;

[0124] R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;

[0125] R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R3是L2-C(O)-OC1-6烷基;

[0126] 或R9是氨基保护基、L3-C(O)或A2;

[0127] R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;

[0128] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

[0129] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基;

[0130] A1和A2各自独立地是氨基酸或肽;或A1是OH或OP1,其中P1是羧基保护基;

[0131] 前提是:

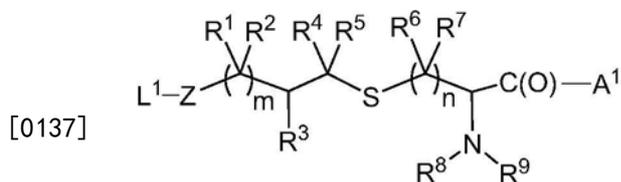
[0132] 当R3是L2-C(O)-OC1-6烷基时,R1不是L2-C(O)-OC1-6烷基;并且

[0133] 当m是从2至4的整数时,不多于一个R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;并且

[0134] 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的;

[0135] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0136] 在一个实施方案中,该方法包括产生包含式(A)结构的肽缀合物:



(A)

[0138] 其中

[0139] Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-;

[0140] R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基,其中烷基或环烷基是任选取代的;

[0141] m是从0至4的整数。

[0142] n是1或2;

[0143] R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;

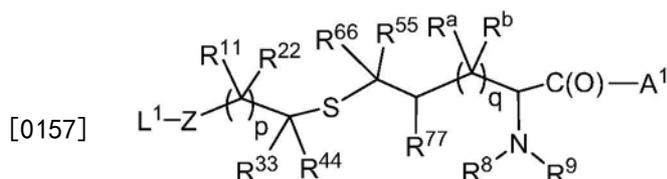
[0144] R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R3是L2-C(O)-OC1-6烷基;

[0145] 或R9是L3-C(O)或A2;

[0146] R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;

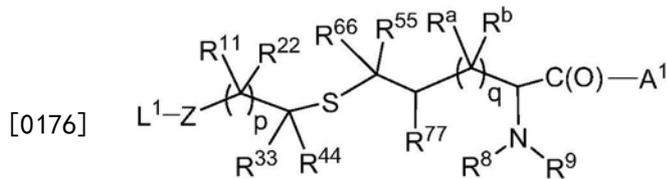
[0147] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

- [0148] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；
 [0149] A1和A2各自独立地是肽；或A1是OH；
 [0150] 前提是：
 [0151] 当R9不是A2时，A1是肽；
 [0152] 当R3是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R1不是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且
 [0153] 当m是从2至4的整数时，不多于一个R1是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且
 [0154] 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的；
 [0155] 或其可药用盐或溶剂化物。
 [0156] 在一个实施方案中，该方法包括产生包含式(B)结构的氨基酸缀合物或肽缀合物：



(B)

- [0158] 其中
 [0159] Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-；
 [0160] R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基，其中烷基或环烷基是任选取代的；
 [0161] p是从0至4的整数；
 [0162] q是从0至2的整数；
 [0163] R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；
 [0164] R33、R44、R55、R66、R77、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R33是L2-C(O)-OC1-6烷基；
 [0165] 或R9是氨基保护基、L3-C(O)或A2；
 [0166] Ra和Rb在q的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；
 [0167] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基；
 [0168] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；
 [0169] A1和A2各自独立地是氨基酸或肽；或A1是OH或OP1，其中P1是羧基保护基；
 [0170] 前提是：
 [0171] 当R33是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R11不是L2-C(O)-OC1-6烷基；和
 [0172] 当p是从2至4的整数时，不多于一个R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且
 [0173] 其中R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的；
 [0174] 或其可药用盐或溶剂化物。
 [0175] 在一个实施方案中，该方法包括产生包含式(B)结构的肽缀合物：

**(B)**

[0177] 其中

[0178] Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-；

[0179] R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基，其中烷基或环烷基是任选取代的；

[0180] p是从0至4的整数；

[0181] q是从0至2的整数；

[0182] R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0183] R33、R44、R55、R66、R77、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R33是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0184] 或R9是L3-C(O)或A2；

[0185] Ra和Rb在q的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

[0186] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基；

[0187] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；

[0188] A1和A2各自独立地是肽；或A1是OH；

[0189] 前提是：

[0190] 当R9不是A2时，A1是肽；

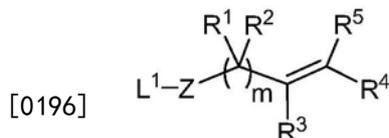
[0191] 当R33是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R11不是L2-C(O)-OC1-6烷基；和

[0192] 当p是从2至4的整数时，不多于一个R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

[0193] 其中R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的；

[0194] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0195] 在一个实施方案中，含有脂质的缀合配偶体是式(A1)的化合物：

**(A1)**

[0197] 其中

[0198] Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-；

[0199] R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基，其中烷基或环烷基是任选取代的；

[0200] m是从0至4的整数。

[0201] R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R1是L2-C

(O) -OC1-6烷基;

[0202] R3、R4和R5各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R3是L2-C(O) -OC1-6烷基;

[0203] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

[0204] 前提是:

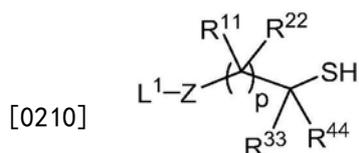
[0205] 当R3是L2-C(O) -OC1-6烷基时,R1不是L2-C(O) -OC1-6烷基;并且

[0206] 当m是从2至4的整数时,不多于一个R1是L2-C(O) -OC1-6烷基;并且

[0207] 其中R1、R2、R3、R4、R5、L1和L2任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的,

[0208] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0209] 在另一个实施方案中,含有脂质的缀合配偶体是式(B1)的化合物:



(B1)

[0211] 其中

[0212] Z选自 -O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR- 和 -NRC(O)NR-;

[0213] R是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基,其中烷基或环烷基是任选取代的;

[0214] p是从0至4的整数;

[0215] R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R11是L2-C(O) -OC1-6烷基;

[0216] R33和R44各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R33是L2-C(O) -OC1-6烷基;

[0217] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

[0218] 前提是:

[0219] 当R33是L2-C(O) -OC1-6烷基时,R11不是L2-C(O) -OC1-6烷基;和

[0220] 当p是从2至4的整数时,不多于一个R11是L2-C(O) -OC1-6烷基;并且

[0221] 其中R11、R22、R33、R44、L1和L2任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代;

[0222] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0223] 在一个实施方案中,含有脂质的缀合配偶体是如本文所述的任一实施方案中所限定的式(II)化合物。

[0224] 在一个实施方案中,含有脂质的缀合配偶体是如本文所述的任一实施方案中所限定的式(IIA)化合物。

[0225] 在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体是如本文所述的任一实施方案中所限定的式(III)化合物。

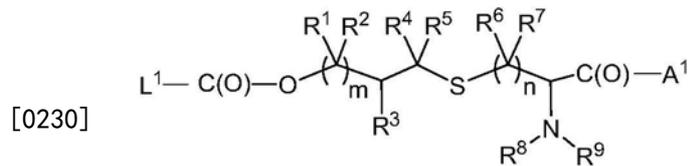
[0226] 在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体是如本文所述的任一实施方案中所限定的式(III)化合物。

[0227] 在一个实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体是如本文所述的任一实施方案中所

限定的式 (IIIA) 化合物。

[0228] 在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体是如本文所述的任一实施方案中所限定的式 (IIIA) 化合物。

[0229] 在一个实施方案中,该方法包括产生包含式 (I) 结构的氨基酸缀合物或肽缀合物



(I)

[0231] 其中

[0232] m是从0至4的整数。

[0233] n是1或2;

[0234] R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;

[0235] R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R3是L2-C(O)-OC1-6烷基;

[0236] 或R9是氨基保护基、L3-C(O)或A2;

[0237] R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;

[0238] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

[0239] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基;

[0240] A1和A2各自独立地是氨基酸或肽;或A1是OH或OP1,其中P1是羧基保护基;

[0241] 前提是:

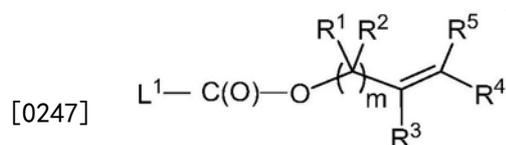
[0242] 当R3是L2-C(O)-OC1-6烷基时,R1不是L2-C(O)-OC1-6烷基;并且

[0243] 当m是从2至4的整数时,不多于一个R1是L2-C(O)-OC1-6烷基;并且

[0244] 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的;

[0245] 或其可药用盐或溶剂化物;

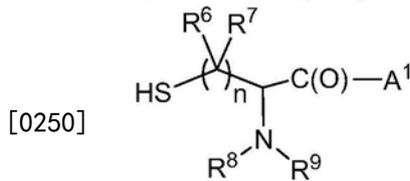
[0246] 所述方法包括使式 (II) 的含有脂质的缀合配偶体



(II)

[0248] 其中m、R1、R2、R3、R4、R5和L1如式 (I) 的化合物中所限定;

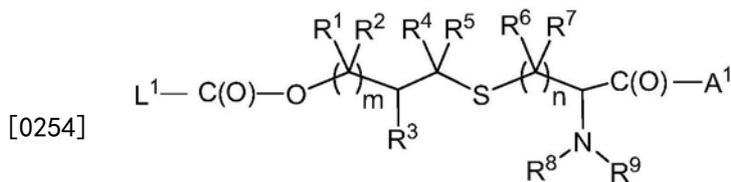
[0249] 和包含式 (III) 结构的含有肽的缀合配偶体

**(III)**

[0251] 其中n、R6、R7、R8、R9和A1如式(I)的化合物中所限定；

[0252] 在下述条件下反应，所述条件有效通过用式(III)化合物中的巯基使式(II)化合物中的碳-碳双键发生氢硫化，将式(II)化合物与式(III)化合物缀合。

[0253] 在一个实施方案中，该方法包括产生包含式(I)结构的肽缀合物

**(I)**

[0255] 其中

[0256] m是从0至4的整数。

[0257] n是1或2；

[0258] R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R1是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0259] R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R3是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0260] 或R9是L3-C(O)或A2；

[0261] R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

[0262] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基；

[0263] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；

[0264] A1和A2各自独立地是肽；或A1是OH；

[0265] 前提是：

[0266] 当R9不是A2时，A1是肽；

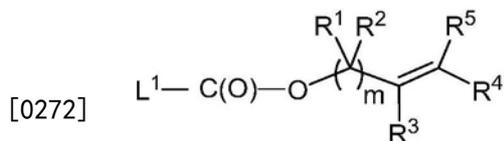
[0267] 当R3是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R1不是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

[0268] 当m是从2至4的整数时，不多于一个R1是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

[0269] 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的；

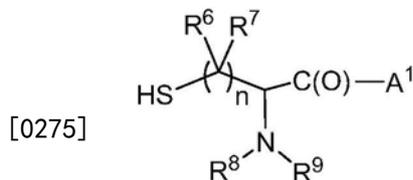
[0270] 或其可药用盐或溶剂化物；

[0271] 所述方法包括使式(II)的含有脂质的缀合配偶体

**(II)**

[0273] 其中m、R1、R2、R3、R4、R5和L1如式(I)的化合物中所限定；

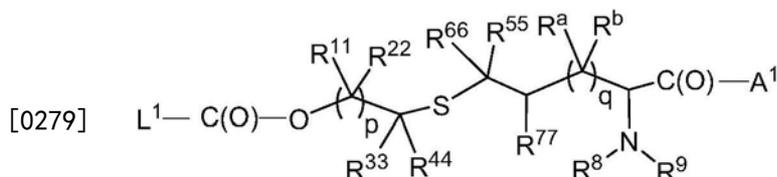
[0274] 和包含式(III)结构的含有肽的缀合配偶体

**(III)**

[0276] 其中n、R6、R7、R8、R9和A1如式(I)的化合物中所限定；

[0277] 在下述条件下反应，所述条件有效通过用式(III)化合物中的巯基使式(II)化合物中的碳-碳双键发生氢硫化，将式(II)化合物与式(III)化合物缀合。

[0278] 在一个实施方案中，该方法包括产生包含式(IA)结构的氨基酸缀合物或肽缀合物

**(IA)**

[0280] 其中

[0281] p是从0至4的整数；

[0282] q是从0至2的整数；

[0283] R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0284] R33、R44、R55、R66、R77、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R33是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0285] 或R9是氨基保护基、L3-C(O)或A2；

[0286] Ra和Rb在q的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

[0287] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基；

[0288] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；

[0289] A1和A2各自独立地是氨基酸或肽；或A1是OH或OP1，其中P1是羧基保护基；

[0290] 前提是：

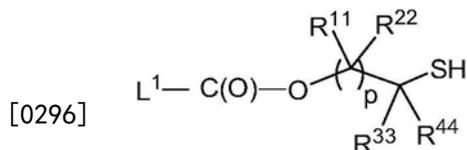
[0291] 当R33是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R11不是L2-C(O)-OC1-6烷基；和

[0292] 当p是从2至4的整数时，不多于一个R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

[0293] 其中R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的；

[0294] 或其可药用盐或溶剂化物；

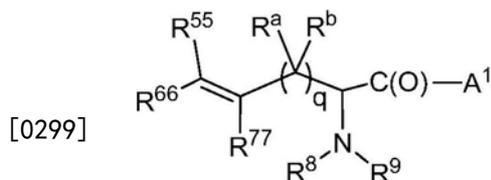
[0295] 所述方法包括使下式 (IIA) 的化合物



(IIA)

[0297] 其中p、R11、R22、R33、R44和L1如式 (IA) 的化合物中所限定；

[0298] 和式 (IIIA) 的化合物

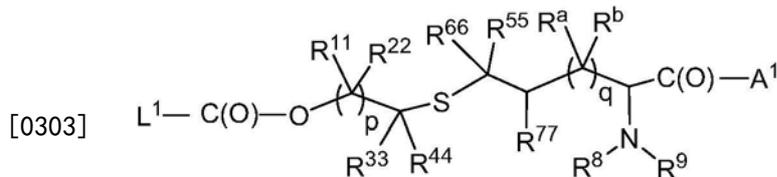


(IIIA)

[0300] 其中q、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb和A1如式 (IA) 的化合物中所限定；

[0301] 在下述条件下反应，所述条件有效通过用式 (IIA) 的化合物中巯基使式 (IIIA) 化合物中的碳-碳双键发生氢硫化，将式 (IIA) 化合物与式 (IIIA) 化合物缀合。

[0302] 在一个实施方案中，该方法包括产生包含式 (IA) 结构的肽缀合物



(IA)

[0304] 其中

[0305] p是从0至4的整数；

[0306] q是从0至2的整数；

[0307] R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0308] R33、R44、R55、R66、R77、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R33是L2-C(O)-OC1-6烷基；

[0309] 或R9是L3-C(O)或A2；

[0310] Ra和Rb在q的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

[0311] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基；

[0312] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基；

[0313] A1和A2各自独立地是肽；或A1是OH；

[0314] 前提是：

[0315] 当R9不是A2时，A1是肽；

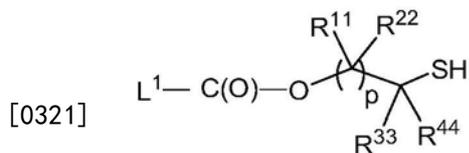
[0316] 当R33是L2-C(O)-OC1-6烷基时，R11不是L2-C(O)-OC1-6烷基；和

[0317] 当p是从2至4的整数时，不多于一个R11是L2-C(O)-OC1-6烷基；并且

[0318] 其中R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代的；

[0319] 或其可药用盐或溶剂化物；

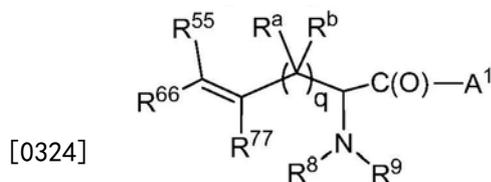
[0320] 所述方法包括使下式 (IIA) 的化合物



(IIA)

[0322] 其中p、R11、R22、R33、R44和L1如式 (IA) 的化合物中所限定；

[0323] 和式 (IIIA) 的化合物



(IIIA)

[0325] 其中q、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb和A1如式 (IA) 的化合物中所限定；

[0326] 在下述条件下反应，所述条件有效通过用式 (IIA) 的化合物中巯基使式 (IIIA) 化合物中的碳-碳双键发生氢硫化，将式 (IIA) 化合物与式 (IIIA) 化合物缀合。

[0327] 在一个实施方案中，L1和L2至少之一是C5-22烷基。

[0328] 在一个实施方案中，p是从0至2的整数。在另一个实施方案中，p是0或1。

[0329] 在一些实施方案中，R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢；或R11是L2-C(O)-OCH2。在一个实施方案中，R11在毗邻L1-C(O)-O的碳上是L2-C(O)-OCH2。

[0330] 在一个具体构思的实施方案中，R11和R22在p的每种情况下各自独立地是氢。

[0331] 在一个实施方案中，R33是氢或L2-C(O)-OCH2。

[0332] 在一个实施方案中，R33和R44各自是氢。

[0333] 在一个具体构思的实施方案中，q是0或1。在一个具体构思的实施方案中，q是0。

[0334] 在一个具体构思的实施方案中，R55、R66和R77各自是氢。

[0335] 在一些实施方案中，Ra和Rb在q的每种情况下各自是氢。

[0336] 在一个实施方案中，L1是C11-21烷基；p是1；R11是氢或L2-C(O)-OCH2；R22是氢；R33是氢或L2-C(O)-OCH2；R44是氢；并且L2是C11-21烷基。

[0337] 在一个实施方案中，R55、R66、R77、Ra、Rb和R8各自是氢；并且R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中，R55、R66、R77、Ra、Rb和R8各自是氢；并且R9是氢或L3-C(O)。

[0338] 在一个实施方案中，L1是C11-21烷基；p是1；R11是氢或L2-C(O)-OCH2；R22是氢；R33是氢或L2-C(O)-OCH2；R44是氢；L2是C11-21烷基；R55、R66、R77、Ra、Rb和R8各自是氢；并且R9是氢、L3-C(O)或A2。

[0339] 在一个实施方案中，L1是C5-21烷基。在另一个实施方案中，L1是C9-21烷基。在又一个实施方案中，L1是C11-21烷基。在一个示例性实施方案中，L1是C11、C13、C15、C17或C19

烷基。在一个具体构思的实施方案中，L1是C15烷基。

[0340] 在一个实施方案中，L1包含9-21个碳原子的直链。在一个具体构思的实施方案中，L1是C15直链烷基。

[0341] 在一个实施方案中，m是从0至2的整数。在另一个实施方案中，m是0或1。在一个具体构思的实施方案中，m是0。

[0342] 在一些实施方案中，R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢；或R1是L2-C(O)-OCH₂。在一个实施方案中，R11在毗邻L1-C(O)-O的碳原子上是L2-C(O)-OCH₂。

[0343] 在一个具体构思的实施方案中，R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢。

[0344] 在一个实施方案中，R3是氢或L2-C(O)-OCH₂。在一个具体构思的实施方案中，R3是氢。

[0345] 在一个实施方案中，L2是C5-21烷基。在另一个实施方案中，L2是C9-21烷基。在又一个实施方案中，L2是C11-21烷基。在一个示例性实施方案中，L2是C11、C13、C15、C17或C19烷基。在另一个示例性实施方案中，L2是C15烷基。

[0346] 在一个具体构思的实施方案中，R4和R5各自是氢。

[0347] 在一个具体构思的实施方案中，n是1。

[0348] 在一个具体构思的实施方案中，R6和R7各自是氢。

[0349] 在示例性实施方案中，R8是氢。

[0350] 在一个实施方案中，R8和R9各自是氢；或R9是L3-C(O)或A₂。在一个示例性实施方案中R8是氢并且R9是L3-C(O)。

[0351] 在一些实施方案中，L3是C1-21烷基。在一个具体构思的实施方案中，L3是甲基或C15直链烷基。在示例性实施方案中，L3是甲基。

[0352] 本领域技术人员将理解，式(III)和(IIIA)的结构可以包含含有肽的缀合配偶体的肽。如本文所述，肽可以是任选取代的，修饰的或与如本文所述的多种其他部分结合以提供含有肽的缀合配偶体。

[0353] 在一个实施方案中，A₁是包含表位的肽。在一个实施方案中，A₂是包含表位的肽。

[0354] 在一些实施方案中，A₁是包含肽表位的肽。在一些实施方案中，A₂是包含肽表位的肽。在一个实施方案中，A₁是肽，其中所述肽包含肽表位。

[0355] 在另一个实施方案中，A₂是肽，其中所述肽包含肽表位。

[0356] 在一个实施方案中，A₁是以表位置换的肽。在一个实施方案中，A₂是以表位置换的肽。

[0357] 在一个实施方案中，该表位经接头基团与肽结合。

[0358] 在一个实施方案中，该表位是肽表位。

[0359] 在一些实施方案中，A₁和/或A₂各自独立地是包含约8至220个、8至200个、8至175个、8至150个、8至125个、8至100个、8至90个、8至80个、8至70个、8至60个、8至50个、8至40个、8至30个、8至25个、8至20个或8至15个氨基酸的肽。在一个示例性实施方案中，A₁和A₂各自独立地是包含约8至60个氨基酸的肽。

[0360] 在其他实施方案中，A₁和/或A₂各自独立地是包含约8至220个、8至200个、8至175个、8至150个、8至125个、8至100个、8至90个、8至80个、8至70个、8至60个、8至50个、8至40个、8至30个、8至25个、8至20个或8至15个氨基酸的肽

[0361] 在其他实施方案中,A1和/或A2各自独立地是包含约5至150个、5至125个、5至100个、5至75个、5至60个、5至50个、5至40个、5至30个、5至25个、5至20个、8至150个、8至125个、8至100个、8至75个、8至60个、8至50个、8至40个、8至30个、8至25个或8至20个氨基酸的肽。

[0362] 在一些实施方案中,A1和/或A2各自独立地是肽,其中该肽包含8至60个氨基酸。

[0363] 在一些实施方案中,A1和/或A2各自独立地是包含肽表位或以肽表位置换的肽,其中所述肽表位包含8至60个氨基酸。

[0364] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢或L2-C(O)-OCH₂;L2是C11-21烷基;并且R4和R5各自是氢。

[0365] 在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢或L3-C(O)。在一个实施方案中,L3是甲基或C15直链烷基。

[0366] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢或L2-C(O)-OCH₂;L2是C11-21烷基;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢或L2-C(O)-OCH₂;L2是C11-21烷基;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢或L3-C(O)。

[0367] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;并且R4和R5各自是氢。

[0368] 在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢或L3-C(O)。在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢或L3-C(O),其中L3是甲基。

[0369] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢或L3-C(O)。

[0370] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢或L3-C(O),其中L3是甲基。

[0371] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;并且R4和R5各自是氢。

[0372] 在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢或L3-C(O)。在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢或L3-C(O),其中L3是甲基。

[0373] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢或L3-C(O)。

[0374] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢或L3-C(O),其中L3是甲基。

[0375] 在一些实施方案中,A1是包含丝氨酸作为第一N端氨基酸残基的肽。在一些实施方案中,A1和/或A2是包含增溶基团的肽。在一些实施方案中,增溶基团包含氨基酸序列,所述氨基酸序列在肽链中包含的两个或更多个亲水性氨基酸残基。在某些实施方案中,A1是包含增溶基团的肽,所述增溶基团包含氨基酸序列,所述氨基酸序列在肽链中包含的两个或更多个亲水性氨基酸残基。

[0376] 在一些实施方案中,A1是包含丝氨酸作为第一N端氨基酸残基的肽和包含氨基酸

序列的增溶基团,所述增溶基团在肽链中包含与丝氨酸毗邻的两个或更多个亲水性氨基酸残基。

[0377] 在一些实施方案中,增溶基团包含氨基酸序列,所述氨基酸序列在肽链中包含的两个或更多个连续亲水性氨基酸残基。

[0378] 在一个实施方案中,亲水性氨基酸残基是阳离子氨基酸残基。在一个实施方案中,阳离子氨基酸残基是精氨酸残基或赖氨酸残基。在一个具体构思的实施方案中,阳离子氨基酸残基是赖氨酸残基。在一个实施方案中,该序列包含2至20个、2至15个、2至10个、3至7个或3至5个氨基酸。在一个实施方案中,增溶基团是三、四、五、六或七赖氨酸序列。在一个具体构思的实施方案中,增溶基团是四赖氨酸序列。

[0379] 在一些实施方案中,R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。在一些实施方案中,R9是氢或L3-C(O)。

[0380] 在一些实施方案中,R9是氢或氨基保护基,并且所述方法还包括酰化氨基酸缀合物或肽缀合物,从而将R9处的氢或氨基保护基更换为L3-C(O)。在一些实施方案中,如此酰化氨基酸缀合物或肽缀合物,从而将R9处的氨基保护基更换为L3-C(O)包括移除R9处的氨基保护基以在R9处提供氢。

[0381] 在一些实施方案中,A1和/或A2是氨基酸或肽。在一些实施方案中,A1和/或A2是肽。

[0382] 在一些实施方案中,A1是OH或OP1和/或R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。在一些实施方案中,A1是OP1或OH和/或R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。在一些实施方案中,A1是OP1或OH和R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。

[0383] 在一些实施方案中,A1是OP1或OH和/或R9是氢、氨基保护基或L3-C(O),并且所述方法包括偶联氨基酸或肽,从而将A1和/或R9更换为所述氨基酸或肽。

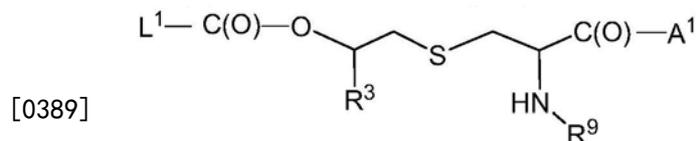
[0384] 在一些实施方案中,A1是OP1或OH并且R9是氢、氨基保护基或L3-C(O),并且所述方法还包括偶联氨基酸或肽,从而将A1和/或R9更换为所述氨基酸或肽。

[0385] 在一些实施方案中,偶联肽包括单独偶联一个或多个氨基酸和/或一种或多种肽。

[0386] 在一些实施方案中,偶联所述氨基酸或肽提供了包含肽表位的肽缀合物。在一些实施方案中,偶联所述氨基酸或肽提供了包含其接头基团或一个或多个氨基酸的肽缀合物。在一些实施方案中,偶联所述氨基酸或肽提供了与下述氨基酸结合的肽表位的肽缀合物,所述氨基酸经接头基团与含有脂质的缀合配偶体缀合。

[0387] 在一些实施方案中,氨基保护基是Boc、Fmoc、Cbz(羧苄基)、Nosyl(邻-或对-硝基苄基)、Bpoc(2-(4-联苯)异丙氧基羰基)和Dde(1-(4,4-二甲基-2,6-二氧杂亚己基)乙基)。在一些实施方案中,氨基保护基是Boc或Fmoc。

[0388] 在一些实施方案中,羧基保护基是叔丁基或苄基。在一个实施方案中,式(I)的化合物是式(IV)的化合物:



(IV)

[0390] 其中

[0391] R3是氢或L2-C(O)-OCH₂;

[0392] R9是氢、氨基保护基、L3-C(O)或A2;并且

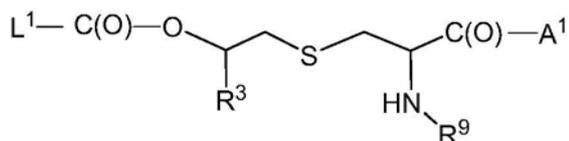
[0393] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

[0394] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基;

[0395] A1和A2各自独立地是氨基酸或肽;或A1是OH或OP1,其中P1是羧基保护基;

[0396] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0397] 在一个实施方案中,式(I)的化合物是式(IV)的化合物:



[0398]

(IV)

[0399] 其中

[0400] R3是氢或L2-C(O)-OCH₂;

[0401] R9是氢、L3-C(O)或A2;并且

[0402] L1和L2各自独立地是C5-21烷基或C4-20杂烷基;

[0403] L3是C1-21烷基或C4-20杂烷基;

[0404] A1和A2各自独立地是肽;或A1是OH;

[0405] 前提是:

[0406] 当R9不是A2时,A1是肽;

[0407] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0408] 在一个实施方案中,式(IV)化合物中的L1、A1、A2、L2和L3各自独立地如涉及式(I)化合物的任一实施方案中所限定。

[0409] 在一个具体构思的实施方案中,R3是氢。

[0410] 在另一个具体构思的实施方案中,R9是乙酰基。

[0411] 在另一个具体构思的实施方案中,R3是氢并且R9是乙酰基。

[0412] 在一些实施方案中,该方法用于产生式(IV)的化合物,其中L1是C15直链烷基,R3是氢,R9是Fmoc,并且A1是OH,并且该方法包括使棕榈酸乙烯酯和Fmoc-Cys-OH反应。

[0413] 在一些实施方案中,氨基保护基不是Fmoc。在一些实施方案中,氨基保护基是Boc。

[0414] 在一些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体不是Fmoc-Cys-OH。

[0415] 在一些实施方案中,肽缀合物包含3个或更多个、4个或更多个或5个或更多个连续氨基酸。在一些实施方案中,式(I)的化合物包含3个或更多个、4个或更多个或5个或更多个连续氨基酸。

[0416] 在一个实施方案中,有效将含有脂质的缀合配偶体与包含氨基酸的缀合配偶体缀合的条件包括生成一个或多个自由基。在一个实施方案中,有效将含有脂质的缀合配偶体与含有肽的缀合配偶体缀合的条件包括生成一个或多个自由基。

[0417] 在一些实施方案中,热方式和/或光化学方式引发一个或多个自由基的生成。在某些实施方案中,通过自由基引发剂的热降解和/或光化学降解,引发一个或多个自由基的生

成。在示例性实施方案中,通过热降解热引发剂或光化学降解光化学引发剂,引发一个或多个自由基的生成。

[0418] 在一些实施方案中,自由基引发剂的热降解包括在合适的温度加热反应混合物。在一些实施方案中,将反应混合物在约40°C至约200°C、约50°C至约180°C、约60°C至约150°C、约65°C至约120°C、约70°C至约115°C、约75°C至约110°C或约80°C至约100°C的温度加热。在其他实施方案中,将反应混合物在至少约40°C、至少约50°C、至少约60°C或至少约65°C的温度加热。在一个具体构思的实施方案中,将反应混合物在约90°C的温度加热。

[0419] 在一些实施方案中,光化学降解自由基引发剂包括用紫外光照射。在具体构思的实施方案中,紫外光具有约365nm的波长。在示例性实施方案中,光化学降解自由基引发剂在大约环境温度实施。

[0420] 在一个具体构思的实施方案中,热引发剂是2,2'-偶氮双异丁腈(AIBN)。在一个具体构思的实施方案中,光引发剂是2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮(DMPA)。

[0421] 在某些实施方案中,反应在液态介质中实施。在一个实施方案中,液态介质包含溶剂。在一个实施方案中,溶剂选自N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砷(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、1,2-二氯乙烷及其混合物。在一个具体构思的实施方案中,溶剂包含NMP、DMSO或其混合物。

[0422] 在一个具体构思的实施方案中,溶剂包含DMSO。

[0423] 在一些实施方案中,反应是在一种或多种抑制二聚化、调聚反应或聚合的添加物存在下实施。在一些示例性实施方案中,添加物选自还原型谷胱甘肽(GSH)、2,2'-(乙二氧基)二乙硫醇(DODT)、1,4-二硫苏糖醇(DTT)和蛋白质。在具体构思的实施方案中,添加物是DTT。在一些实施方案中,添加物是DTT或叔丁基硫醇。

[0424] 在一些实施方案中,一种或多种添加物选自TFA、叔丁基硫醇及其组合。在某些实施方案中,一种或多种添加物是TFA和叔丁基硫醇的组合。在一些实施方案中,将反应实施约5分钟至约48小时、5分钟至约24小时、约5分钟至约12小时、约5分钟至约6小时、约5分钟至约3小时、5分钟至2小时或约5分钟至约1小时的一段时间。在示例性实施方案中,将反应实施约5分钟至约1小时的一段时间。在一些实施方案中,实施反应直至缀合配偶体之一至少消耗约70%、80%、90%、95%、97%、99%或100%。

[0425] 在某些实施方案中,反应是在基本上无氧条件下实施。

[0426] 在一些实施方案中,该方法包括

[0427] 使含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体反应以提供氨基酸缀合物或肽缀合物;

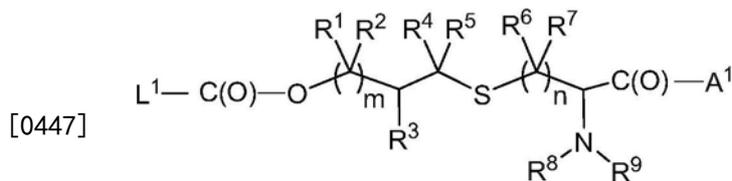
[0428] 通过固相肽合成法(SPPS)合成肽的氨基酸序列;

[0429] 通过SPPS,将氨基酸缀合物的氨基酸或肽缀合物的氨基酸与固相结合的肽偶联,从而提供包含肽表位的肽缀合物、包含其接头基团或一个或多个氨基酸的肽缀合物、或包含与下述氨基酸结合的肽表位的肽缀合物,所述氨基酸经接头基团与含有脂质的缀合配偶体缀合。

[0430] 在一些实施方案中,该方法还包括酰化氨基酸缀合物的氨基酸的N α -氨基或任一种肽缀合物的与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸的N α -氨基。

[0431] 在一些实施方案中,该方法包括从固相支持物切下肽缀合物。

- [0432] 在一些实施方案中,该方法包括
- [0433] 通过固相肽合成法 (SPPS) 合成含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸序列;并且
- [0434] 使含有脂质的缀合配偶体和含有肽的缀合配偶体根据本文所述的任何实施方案反应。
- [0435] 在示例性实施方案中,该方法包括
- [0436] 通过SPPS合成含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸序列;
- [0437] 从固相支持物切下肽;并且
- [0438] 使含有脂质的缀合配偶体和含有肽的缀合配偶体根据本文所述的任何实施方案反应。
- [0439] 在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体在与含有脂质的缀合配偶体反应前不纯化。
- [0440] 在一些实施方案中,从固相支持物切下肽时移除一个或多个保护基。在某些实施方案中,移除肽中存在的全部保护基。
- [0441] 在一个实施方案中,SPPS是Fmoc-SPPS。
- [0442] 在一些实施方案中,在含有肽的缀合配偶体的肽中携带碳-碳双键或巯基待反应的氨基酸残基是N端氨基酸残基并且该方法包括从固相切下肽之前酰化N末端氨基。在示例性实施方案中,氨基酸残基是N端残基。在具体构思的实施方案中,N端残基是半胱氨酸残基。
- [0443] 在一个实施方案中,该方法还包括从反应介质分离肽缀合物并且任选地纯化肽缀合物。
- [0444] 在另一个方面,本发明提供通过本发明方法产生的氨基酸缀合物或肽缀合物。
- [0445] 在另一个方面,本发明提供通过本发明方法产生的肽缀合物。
- [0446] 在另一个方面,本发明提供式 (V) 的化合物:



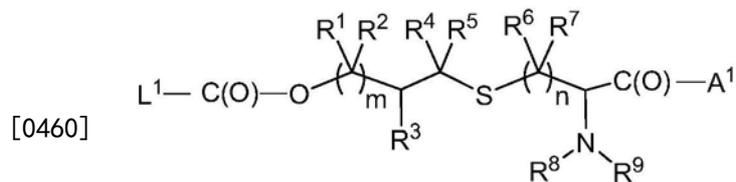
(V)

- [0448] 其中
- [0449] m是从0至4的整数。
- [0450] n是1或2;
- [0451] R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;
- [0452] R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基;或R9是氨基保护基、L3-C(0)或A2;
- [0453] R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基,
- [0454] L1是C5-21烷基或C4-20杂烷基;
- [0455] L3是C1-6烷基或C3-6环烷基;
- [0456] A1和A2各自独立地是氨基酸或肽;或A1是OH或OP1,其中P1是羧基保护基;并且
- [0457] 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或

杂烷基是任选取代；

[0458] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0459] 在另一个方面，本发明提供式 (V) 的化合物：



(V)

[0461] 其中

[0462] m是从0至4的整数。

[0463] n是1或2；

[0464] R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

[0465] R3、R4、R5、R8和R9各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；或R9是L3-C(O)或A2；

[0466] R6和R7在n的每种情况下各自独立地是氢、C1-6烷基或C3-6环烷基；

[0467] L1是C5-21烷基或C4-20杂烷基；

[0468] L3是C1-6烷基或C3-6环烷基；

[0469] A1和A2各自独立地是肽；或A1是OH；

[0470] 前提是：

[0471] A1和A2至少之一包含表位；并且

[0472] 当R9不是A2时，A1是肽；并且

[0473] 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1和L3任一者中存在的任何烷基、环烷基或杂烷基是任选取代；

[0474] 或其可药用盐或溶剂化物。

[0475] 在一个实施方案中，m、n、R6、R7、A1和A2各自独立地如涉及式 (I) 化合物的任一实施方案中所限定。

[0476] 在一个实施方案中，L1是C5-21烷基。在一个实施方案中，L1是C5-21烷基。在另一个实施方案中，L1是C9-21烷基。在又一个实施方案中，L1是C11-21烷基。在一个示例性实施方案中，L1是C11、C13、C15、C17或C19烷基。在一个具体构思的实施方案中，L1是C15烷基。

[0477] 在一个实施方案中，L1包含9-21个碳原子的直链。在一个具体构思的实施方案中，L1是C15直链烷基。

[0478] 在一个实施方案中，m是从0至2的整数。在另一个实施方案中，m是0或1。在一个具体构思的实施方案中，m是0。

[0479] 在一个具体构思的实施方案中，R1和R2在m的每种情况下各自独立地是氢。

[0480] 在一个具体构思的实施方案中，R3是氢。

[0481] 在一个具体构思的实施方案中，R4和R5各自是氢。

[0482] 在一个具体构思的实施方案中，n是1。

[0483] 在一个具体构思的实施方案中，R6和R7各自是氢。

[0484] 在示例性实施方案中，R8是氢。

[0485] 在一些实施方案中，R8是氢并且R9是氢、氨基保护基、L3-C(O)或A2。在一个实施方

案中,R8和R9各自是氢;或R9是L3-C(O)或A2。在一个示例性实施方案中R8是氢并且R9是L3-C(O)。在一个具体构思的实施方案中,L3是甲基。

[0486] 在一些实施方案中,A1是OP1或OH并且R9是氢、氨基保护基或L3-C(O)。

[0487] 在一些实施方案中,A1和/或A2是氨基酸或肽。在一些实施方案中,肽包含表位。

[0488] 在一些实施方案中,A1是丝氨酸或包含丝氨酸作为第一N端氨基酸残基的肽。

[0489] 在一些实施方案中,A1和/或A2是包含增溶基团的肽,所述增溶基团包含氨基酸序列,所述氨基酸序列在肽链中包含两个或更多个亲水性氨基酸残基。

[0490] 在一些实施方案中,A1是包含丝氨酸作为第一N端氨基酸残基的肽和包含氨基酸序列的增溶基团,所述增溶基团在肽链中包含与丝氨酸毗邻的两个或更多个亲水性氨基酸残基。

[0491] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;并且R4和R5各自是氢。

[0492] 在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢或L3-C(O)。在一个实施方案中,n是1;R6、R7和R8各自是氢;并且R9是氢或L3-C(O),其中L3是甲基。

[0493] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢、L3-C(O)或A2。在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢或L3-C(O)。

[0494] 在一个实施方案中,L1是C11-21烷基;m是0;R3是氢;R4和R5各自是氢;n是1;R6、R7和R8各自是氢;R9是氢或L3-C(O),其中L3是甲基。

[0495] 在一些实施方案中,L1是C15直链烷基;m是0;n是1;R3、R4、R5、R6、R7和R8各自是氢;R9是Fmoc,并且A1在式(V)化合物中是OH。

[0496] 在一些实施方案中,R9的氨基保护基不是Fmoc。在一些实施方案中,R9的氨基保护基是Boc。

[0497] 在一些实施方案中,式(V)的化合物包含3个或更多个、4个或更多个或5个或更多个连续氨基酸。

[0498] 在一些实施方案中,氨基和/或羧基保护基如涉及式(I)化合物的任一实施方案中所限定。

[0499] 本领域技术人员将理解,式(V)的化合物是肽缀合物,并且涉及本文所述的缀合方法的肽缀合物的某些实施方案也适用于式(V)的化合物。

[0500] 在一些实施方案中,式(V)的化合物是自我辅佐性肽。

[0501] 在一些实施方案中,该化合物包含接头或其一个或多个氨基酸。在一些实施方案中,肽包含接头或其一个或多个氨基酸。在一些实施方案中,肽包含经接头与下述氨基酸结合的肽表位,其中所述氨基酸与L1结合。在一些实施方案中,肽包含两个或更多个表位。在一些实施方案中,肽包含肽抗原。在一些实施方案中,接头是长度约2至20个、2至18个、2至16个、2至14个、2至12个、2至10个或2至8个氨基酸的氨基酸序列。

[0502] 在另一个方面,本发明提供分离、纯化或重组的肽,所述肽包含来自SEQ ID NO:1-5、8-12或14-18中任一个的20个或更多个连续氨基酸或由其组成。

[0503] 在一个实施方案中,肽包含下述氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:1-5、8-12或14-18的任一者。

[0504] 在一个实施方案中,肽包含下述氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:4、5、11、12、17和18的任一者。

[0505] 在另一个方面,本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的本发明肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物和可药用载体。

[0506] 在一个实施方案中,药物组合物是免疫原性组合物。

[0507] 在一个实施方案中,该组合物不包含外来佐剂。

[0508] 在一些实施方案中,该组合物是疫苗。

[0509] 在一个实施方案中,药物组合物包含有效量的两种或更多种本发明肽缀合物,例如,药物组合物包含有效量的三种或更多种本发明肽缀合物。

[0510] 在另一个方面,本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的本发明肽或其可药用盐或溶剂化物和可药用载体。

[0511] 在一个实施方案中,药物组合物包含有效量的两种或更多种本发明肽,例如,药物组合物包含有效量的三种或更多种本发明肽。

[0512] 在一个实施方案中,药物组合物包含有效量的与一个或多个本发明肽在一起的一种或更多种本发明肽缀合物或其任意组合。例如,药物组合物包含有效量的两种或更多种本发明肽缀合物和一种或多种本发明肽,或有效量的一种或多种本发明肽缀合物和两种或更多种本发明肽。

[0513] 在另一个方面,本发明提供一种在受试者中接种或激发免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明肽缀合物或肽。

[0514] 在另一个方面,本发明提供本发明肽缀合物或肽在受试者中接种或激发免疫反应的用途。

[0515] 在另一个方面,本发明提供本发明肽缀合物或肽在制造用于受试者中接种或激发免疫反应的药物中的用途。

[0516] 在另一个方面,本发明提供一种在受试者中接种或激发免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明药物组合物。

[0517] 在另一个方面,本发明提供本发明的药物组合物在受试者中接种或激发免疫反应的用途。

[0518] 在另一个方面,本发明提供一种或多种本发明肽或一种或多种本发明肽缀合物在制造用于受试者中接种或激发免疫反应的药物中的用途。

[0519] 在另一个方面,本发明提供一种在受试者中激发免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明的肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物。

[0520] 在另一个方面,本发明提供本发明的肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物在受试者中激发免疫反应的用途。

[0521] 在另一个方面,本发明提供本发明的肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物在制造用于受试者中激发免疫反应的药物中的用途。

[0522] 在另一个方面,本发明提供一种接种受试者的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明的肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物。

[0523] 在另一个方面,本发明提供本发明的肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物用于接种受试者的用途。

[0524] 在另一个方面,本发明提供本发明的肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物在制造用于接种受试者的药物中的用途。

[0525] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用一种或多种本发明肽和/或一种或多种本发明肽缀合物,例如与一种或多种肽缀合物组合的一种或多种肽。

[0526] 在一些实施方案中,一种或多种本发明肽和/或一种或多种本发明肽缀合物,例如与一种或多种肽缀合物组合的一种或多种肽,用于受试者中接种或激发免疫反应或用于制造在受试者中接种或激发免疫反应的药物。

[0527] 在一些实施方案中,使用或施用两种或更多种肽、两种或更多种肽缀合物或者一种或多种肽和一种或多种肽缀合物。在一些实施方案中,同时、依次或分别施用两种或更多种肽、两种或更多种肽缀合物,或者一种或多种肽和一种或多种肽缀合物。

[0528] 非对称中心存在于本文描述的化合物中。取决于取代基在手性碳原子处三维空间中的构型,非对称中心可以命名为(R)或(S)。化合物的全部立体化学异构形式,包括非对映异构形式、对映异构形式和差向异构形式,以及d-异构体和l-异构体,及其混合物,包括对映异构富集的和非对映异构体富集的立体化学异构体混合物,均处于本发明的范围内。

[0529] 各种对映异构体可以从市售光学纯起始物料合成地制备或通过制备对映异构混合物并将混合物拆分成各种对映异构体来制备。拆分方法包括对映异构混合物转化成非对映异构体的混合物并且通过例如重结晶法或色谱法和本领域已知的任何其他适宜方法分离非对映异构体。具有确定立体化学的起始物料可以是市售或被制造,并且,如果需要,通过本领域熟知的技术拆分。

[0530] 本文所述的化合物还可以作为构象异构体或几何异构体存在,包括顺、反、顺(syn)、反、entgegen(E)和zusammen(Z)异构体。全部这类异构体和任何其混合物均处于本发明的范围内。

[0531] 所述化合物的任何互变异构体或其混合物也处于本发明的范围内。如本领域技术人员将领会,多种类型的官能团和其他结构物可能显示互变异构。例子包括但不限于、酮/烯醇、亚胺/烯胺和硫酮/烯硫醇互变异构。

[0532] 本文所述的化合物还可以作为同位素体和同位素异位体(isotopomer)存在,其中化合物中的一个或多个原子更换为不同的同位素。合适的同位素例如包括¹H、²H(D)、³H(T)、¹²C、¹³C、¹⁴C、¹⁶O和¹⁸O。用于掺入这类同位素至本文所述化合物的程序将是本领域技术人员显而易见的。本文所述化合物的同位素体和同位素异位体也处于本发明的范围内。

[0533] 本文所述化合物的可药用盐和溶剂化物,包括水合物,也处于本发明的范围内是。这类种盐包括酸加成盐、碱加成盐和碱性含氮基团的季盐。

[0534] 可以通过游离碱形式的化合物与无机酸或有机酸反应,制备酸加成盐。无机酸的例子包括但不限于氢氯酸、氢溴酸、硝酸、硫酸和磷酸。有机酸的例子包括但不限于,乙酸、三氟乙酸、丙酸、琥珀酸、羟乙酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、马来酸、延胡索酸、丙酮酸、天冬氨酸,谷氨酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、羟乙基磺酸、对氨基苯磺酸、己二酸、丁酸和特戊酸。

[0535] 可以通过游离酸形式的化合物与无机碱或有机碱反应,制备碱加成盐。无机碱加成盐的例子包括碱金属盐、碱土金属盐和其他生理可接受的金属盐,例如,铝盐、钙盐、锂盐、镁盐、钾盐、钠盐或锌盐。有机碱加成盐的例子包括胺盐,例如,三甲胺、二乙胺、乙醇

胺、二乙醇胺和乙二胺的盐。

[0536] 可以通过例如化合物与烷基卤如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物、二烷基硫酸盐如二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐等反应，制备化合物中碱性含氮基团的季盐。

[0537] 本文式中所用的通用化学术语具有它们的寻常含义。

[0538] 术语“脂族”意在包括饱和和不饱和烃、非芳族烃、直链烃、支链烃、无环烃和环状烃。本领域技术人员将理解，脂族基团例如包括烷基、链烯基、炔基、环烷基和环烯基。在一些实施方案中，脂族基团是饱和的。

[0539] 术语“杂脂族的”意在包括脂族基团，其中一个或多个链碳原子更换为杂原子。在一些实施方案中，杂脂族是饱和的。

[0540] 术语“烷基”意在包括饱和或不饱和的直链和支链烃基。饱和烃基的例子包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基等。不饱和烷基具有一个或多个碳-碳双键或叁键。不饱和烷基的例子包括乙烯基、丙-2-烯基、巴豆基、异戊-2-烯基、2-丁二烯基、戊-2,4-二烯基、戊-1,4-二烯基、乙炔基、丙-3-炔基、丁-3-炔基等。在一些实施方案中，烷基是饱和的。

[0541] 术语“杂烷基”意在包括烷基，其中一个或多个链碳原子更换为杂原子。在一些实施方案中，杂烷基是饱和的。

[0542] 术语“环烷基”意在包括非芳族环状烷基。环烷基的例子包括但不限于环戊基、环己基、环己-1-烯基、环己-3-烯基、环庚基。在一些实施方案中，环烷基是饱和的。

[0543] 术语“杂原子”意在包括氧、氮、硫或磷。在一些实施方案中，杂原子选自氧、氮和硫。

[0544] 术语“芳基”意在包括芳族原子团。例子包括但不限于苯基、甲苯基、萘基、茚满基等。在一些实施方案中，芳基在芳环系统中包含4至8个或6至8个碳原子。

[0545] 如本文所用，术语“取代的”意指所示基团中的一个或多个氢原子更换为一个或多个独立选择合适的取代基，前提不超过与该取代基连接的每个原子的正常价态并且取代作用导致稳定的化合物。

[0546] 用于本文所述化合物中的脂族基、杂脂族基、烷基、杂烷基和环烷基的任选取代基的例子包括但不限于卤素、CN、NO₂、OH、NH₂、NHR₁、NR₁R₂、C₁-6卤代烷基、C₁-6卤代烷氧基、C(O)NH₂、C(O)NHR₁、C(O)NR₁R₁、SO₂R₁、OR₁、SR₁、S(O)R₁、C(O)R₁和C₁-6脂族基；其中R₁和R₂各自独立地是C₁-6烷基。

[0547] 如本文所用的术语“羧基保护基”意指能够被轻易移除以在合成过程期间向羧基提供OH基并且保护羧基免于不利反应的基团。这类保护基在T.W.Greene等人编著的Protective Groups in Organic Synthesis (John Wiley&Sons, 1999) 和Fernando Albericio (联合Albert Isidro-Llobet和Mercedes Alvarez) 的“Amino Acid-Protecting Groups' Chemical Reviews 2009 (109) 2455-2504中描述。例子包括但不限于烷基和甲硅烷基，例如甲基、乙基、叔丁基、甲氧甲基、2,2,2-三氯乙基、苄基、二苯甲基、三甲基甲硅烷基和叔丁基二甲基甲硅烷基等。

[0548] 如本文所用的术语“胺保护基”意指能够被轻易移除以在合成过程期间向胺提供NH₂基团并且保护胺基免于不利反应的基团。这类保护基在T.W.Greene等人编著的

Protective Groups in Organic Synthesis (John Wiley&Sons,1999) 和Fernando Albericio (联合Albert Isidro-Llobet和Mercedes Alvarez) 的”Amino Acid-Protecting Groups’ Chemical Reviews 2009 (109) 2455-2504中描述。例子包括但不限于酰基和酰氧基, 例如乙酰基、氯乙酰基、三氯乙酰基、邻-硝基苯基乙酰基、邻-硝基苯氧基乙酰基、三氟乙酰基、乙酰乙酰、4-氯丁酰基、异丁酰基、吡啶甲酰基 (picolinoyl)、氨基己酰基、苯甲酰基、甲氧基-羰基、9-芴基甲氧羰基、2,2,2-三氟乙氧羰基、2-三甲基甲硅烷基乙氧羰基、叔丁氧羰基、苯甲氧基羰基、对-硝基苄氧羰基、2,4-二氯苯甲氧基羰基等。其他例子包括Cbz (羧苄基)、Nosyl (邻-或对-硝基苄基)、Bpoc (2-(4-联苯) 异丙氧基羰基) 和Dde (1-(4,4-二甲基-2,6-二氧杂亚己基) 乙基)。

[0549] 如本文所用,术语“和/或”意指“和”或“或”或这两者。

[0550] 名词后的术语“(s)”构思单数形式和复数形式,或这两种形式。

[0551] 如本说明书所用的术语“包括”意指“至少部分地由……组成”。在解释本说明书中的包含术语“包括”的每项描述时,也可以存在除前接本术语的这个和那些特征之外的特征。以相同的方式解释相关的术语如“包括了”和“包括”。还以相同方式解读“含有”。

[0552] 本发明也可以广义地称为由单独或整体地在本申请的说明书中所提到或所指示的部分、要素和特征组成、由所述部分、要素和特征中两种或更多种的任意或全部组合组成,并且在本文提到在本发明涉及的领域中具有已知等同物的特定整数时,将此类已知的等同物视为如同单独描述那样并入本文。

[0553] 谈及本文公开的数字范围(例如,1至10)还意在包括谈及该范围内的全部有理数(例如,1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9和10)并且还意在谈及该范围内的任何有理数范围(例如,2至8,1.5至5.5,和3.1至4.7),并且因此,本文中明确所公开的全部范围的全部子范围因而明确地公开。这些仅是具体意指的例子并且在所列举的最低值和最高值之间的全部可能数值组合均视为在本申请中以相似方式明确陈述。

[0554] 尽管本发明如上文那样广义地限定,但是那些本领域技术人员将理解,本发明不是限于此并且本发明还包括以下描述给出的实施例的实施方案。

[0555] 附图简述

[0556] 本发明现在将参考附图进行描述,其中:

[0557] 图1是显示5位供体之间Pam3CSK4、22、20和26的CD80反应的系列曲线。MFI:平均荧光强度;UT:未处理;Pam3CSK4=Pam3Cys;22=8;20=9;26=11。

[0558] 图2a和2b是纯25(2a)和纯26(2b)在210nm处的HPLC色谱图。

[0559] 图2c是26的HPLC色谱图的主峰的ESI-MS。

[0560] 图3是显示使用CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃构建体和具有如APC那样的同种异型HLA-A2+ MoDC的CD8+ T细胞克隆4D9时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例4中所述。

[0561] 图4是显示使用NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀构建体和具有如APC那样的自体LCL的CD8+ T细胞克隆2F2时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例5中所述。

[0562] 图5是显示使用NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀构建体和具有如APC那样的同种异型HLA-A2+ HLA-DP4+ MoDC的CD8+ T细胞克隆2F2时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例5中所述。

[0563] 图6是显示使用NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀构建体和具有如APC那样的自体LCL的CD4+ T细胞克隆1B7时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例6中所述。

[0564] 图7是显示使用NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀构建体和具有如APC那样的同种异型HLA-A2+ HLA-DP4+ MoDC的CD4+ T细胞克隆1B7时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例6中所述。

[0565] 图8是显示使用NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀构建体和具有如APC那样的同种异型HLA-A2+ HLA-DP4+ MoDC的CD4+ T细胞克隆1C11时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例6中所述。

[0566] 图9是显示使用NY-ESO-1₇₉₋₁₁₆构建体和具有如APC那样的自体LCL的CD8+ T细胞克隆1D7时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例7中所述。

[0567] 图10是显示使用NY-ESO-1₇₉₋₁₁₆构建体和具有如APC那样的自体LCL的CD8+ T细胞克隆1F10时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例7中所述。

[0568] 图11是显示使用NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃构建体和具有如APC那样的自体LCL的CD8+ T细胞克隆1C11时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例8中所述。

[0569] 图12是显示使用NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃构建体和具有如APC那样的自体LCL的CD4+ T细胞克隆1E4时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例9中所述。

[0570] 图13是显示使用NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃构建体和具有如APC那样的自体LCL的CD4+ T细胞克隆1D6时,T细胞活化分析结果的曲线,如本文实施例9中所述。

[0571] 图14是显示使用NY-ESO-1构建体和HekBlue™时TLR激动分析结果的曲线,如本文实施例10中所述。

[0572] 图15是显示使用NY-ESO-1构建体和IL-8测定法时TLR激动分析结果的四条曲线,如本文实施例10中所述。

[0573] 发明详述

[0574] 本发明涉及一种产生氨基酸缀合物和肽缀合物的方法。该方法包括使含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体在下述条件下反应,所述条件有效将含有脂质的缀合配偶体与包含氨基酸的缀合配偶体在巯基-烯(thiol-ene)反应中缀合。在一些实施方案中,该方法包括使含有脂质的缀合配偶体和含有肽的缀合配偶体在下述条件下反应,所述条件有效将含有脂质的缀合配偶体与含有肽的缀合配偶体的肽在巯基-烯反应中缀合。

[0575] 巯基-烯反应包括跨非芳族碳-碳双键加成硫醇(即碳-碳双键的氢硫羟化)。反应借助自由基机理推进。反应中存在三个不同的阶段:引发、聚合或偶联、和终止。自由基生成作用产生亲电性硫醚自由基,后者跨烯基增殖,形成以碳为中心的自由基。链从额外的硫醇分子转移,随后在碳上猝灭该自由基以产生终产物。

[0576] 在本发明方法中,一种缀合配偶体包含巯基并且另一种包含碳碳双键。

[0577] 可以在本发明的方法中通过本领域已知的任何方法生成一个或多个自由基。自由基可以按热方式和/或光学方式生成。一种或多种自由基引发剂可以用来引发自由基生成。合适的自由基引发剂包括热引发剂和光引发剂。

[0578] 通过加热从热引发剂生成自由基。热引发剂降解和所致自由基形成的速率取决于引发剂和加热引发剂的温度。较高的温度通常导致分解更快。本领域技术人员将能够在无需过多实验的情况下选择加热引发剂的适宜温度。

[0579] 众多热引发剂是可商业获得的。引发剂的例子包括但不限于过氧化苯甲酸叔戊酯、1,1'-偶氮双(环己烷甲腈)、2,2'-偶氮双异丁腈(AIBN)、过氧化苯甲酰、叔丁基过氧化氢、过氧乙酸叔丁酯、叔丁基过氧化物、过氧化苯甲酸叔丁酯、碳酸叔丁基过氧化异丙酯、过氧化月桂酰、过乙酸和过硫酸钾。

[0580] 可以通过用光照射从光引发剂生成自由基。引起光引发剂降解和自由基形成必需的光频率取决于引发剂。许多光引发剂可以用紫外光引发。

[0581] 特定波长或波长范围的光可以用来选择性地照射引发剂,其中含有脂质的缀合配偶体或包含氨基酸的缀合配偶体,例如含有肽的缀合配偶体,包含光敏基团。在本发明方法的某些实施方案中,使用约365nm的频率。这个频率的光通常与天然存在氨基酸的侧链相容。

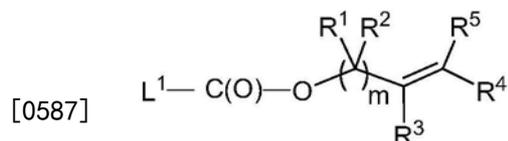
[0582] 广泛类型的光引发剂是可商业获得的。光引发剂的例子包括但不限于苯乙酮、anisoin、蒽醌、蒽醌-2-磺酸、苯偶酰、苯偶姻、苯偶姻乙醚、苯偶姻异丁基醚、苯偶姻甲基醚、二苯酮、3,3',4,4'-二苯酮四羧酸二酐、4-苯基二苯酮、2-苄基-2-(二甲基氨基)-4'-吗啉苯基丁酮、4'-双(二乙基氨基)二苯酮、4,4'-双(二甲基氨基)二苯酮、樟脑醌、2-氯硫代咕吨-9-酮、二苯并环庚烯酮、2,2-二乙氧基苯乙酮、4,4'-二羟基二苯酮、2,2-二甲氧基-2-苄基苯乙酮(DMPA)、4-(二甲基氨基)二苯酮、4,4'-二甲基苯偶酰、2,5-二甲基二苯酮、3,4-二甲基二苯酮、4'-乙氧基苯乙酮、2-乙基蒽醌、3'-羟基苯乙酮、4'-羟基苯乙酮、3-羟基二苯酮、4-羟基二苯酮、1-羟环己基苯酮、2-羟-2-甲基苯丙酮、2-甲基二苯酮、3-甲基二苯酮、苯甲酰甲酸甲酯、2-甲基-4'-(甲基硫基)-2-吗啉苯丙酮、菲醌、4'-苯氧基苯乙酮和硫代咕吨-9-酮。

[0583] 本领域技术人员将能够考虑例如含有脂质的缀合配偶体、包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)和反应混合物中存在的任何其他组分的性质,选择用于本发明方法的适宜自由基引发剂。在一些实施方案中,引发剂在反应中包含巯基的起始物料按照约20:1至约0.05:1、约10:1至约0.05:1、约5:1至约0.05:1、约3:1至约0.5:1的化学计量比率存在。

[0584] 反应中含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体,例如含有肽的缀合配偶体,是如本文所述的任一实施方案中所限定的。

[0585] 含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)可以使用已知的合成化学技术(例如,通常在以下文献中描述的方法:Louis F Fieser和Mary F, Reagents for Organic Synthesis第1-19卷,Wiley, New York (1967-1999编著)或Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. 编著. Springer-Verlag Berlin, 包含补充材料(还通过Beilstein在线数据库可获得))进行制备,或在一些实施方案中,可以商业获得。

[0586] 式(II)的含有脂质的缀合配偶体化合物



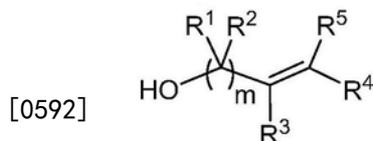
(II)

[0588] 其中m、R1、R2、R3、R4、R5和L1各自独立地如所述的任一实施方案中所限定,可以通过以下方式制备式(I)的化合物:使式(VI)化合物

[0589] $L^1C(O)-X$

[0590] (VI)

[0591] 其中X是OH或合适的离去基团,与式(VII)化合物:

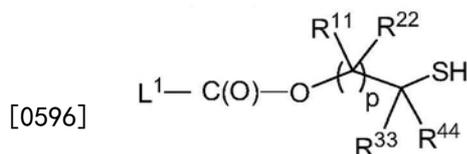


(VII)

[0593] 在有效酯化条件下反应。用于酯化的方法是本领域熟知的。例如,当X是氯时,反应可以在碱(如吡啶或三乙胺)存在下在合适的溶剂中实施。酰基氯可以原位转换成反应性更强的种类(例如,使用碘化钠,转换成相应碘化物)。实施反应的温度取决于所用酸种类和溶剂的反应性。

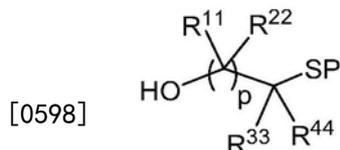
[0594] 众多的式(VI)化合物是可商业获得的。可以使用标准合成化学技术,从市售前体制备其他化合物。例如,可以在合适溶剂或溶剂混合物中用亚硫酰氯处理相应羧酸,制备其中X是氯的式(VI)化合物。

[0595] 式(IIA)的含有脂质的缀合配偶体化合物



(IIA)

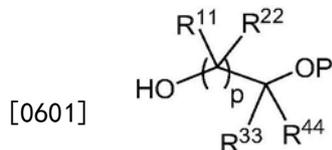
[0597] 其中p、R11、R22、R33、R44和L1如式(IA)化合物中所限定,可以通过以下方式制备:将如上文定义的式(VI)化合物与式(VIII)化合物反应:



(VIII)

[0599] 其中P是在有效酯化条件下的合适保护基,并且随后移除该保护基。

[0600] 备选地,式(IIA)的化合物可以通过以下方式制备:将如上文定义的式(VI)化合物与式(IX)化合物反应:



(IX)

[0602] 其中P是在有效酯化条件下的合适保护基,移除该保护基,并且随后将相应醇转化成硫醇。用于将醇转化成硫醇的合适方法将是本领域技术人员显而易见的。

[0603] 化合物的制备可以涉及多种化学基团的保护和脱保护。保护和脱保护的需求和适宜保护基的选择可以由本领域技术人员容易地确定。保护基和用于保护和脱保护的方法是本领域熟知的(参见例如T.W.Greene and P.G.M.Wuts, Protective Groups in Organic

Synthesis, 第3版, Wiley&Sons, Inc., New York (1999))。

[0604] 类似地,式(VII)、(VIII)和(IX)的化合物也是市售或可以使用标准的合成化学技术从市售前体制备。

[0605] 可以变动其中向反应容器中引入含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)和反应混合物中存在的任何其他组分的顺序。反应可以如一锅法(one-pot)那样实施。

[0606] 反应中含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)的化学计量可以变动。在一些实施方案中,包含氨基酸的缀合配偶体对含有脂质的缀合配偶体的化学计量比率是约1:0.5至约1:20、约1:1至约1:10、约1:1至约1:5、约1:1至约1:3。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体对含有脂质的缀合配偶体的化学计量比率是约1:0.5至约1:20、约1:1至约1:10、约1:1至约1:5、约1:1至约1:3。

[0607] 反应可以在任何合适的温度实施。在一些实施方案中,反应在约-25℃至约200℃、约-10℃至约150℃、约0℃至约125℃、约环境温度至约100℃的温度实施。在一些实施方案中,反应在低于约200℃,低于约175℃,低于约150℃,低于约125℃或低于约100℃的温度实施。

[0608] 在一些实施方案中,反应在高于环境温度的温度实施。在一个实施方案中,反应在40℃至200℃、50℃至150℃、60℃至100℃、65℃至90℃或70℃至80℃的温度实。在一些实施方案中,反应在高于40℃、高于50℃、高于75℃、高于100℃或高于150℃的温度实施。

[0609] 实施反应的温度可以取决于怎样在反应中生成自由基。可以选择所用的温度以控制反应的速率。可以在反应过程期间调整温度以控制反应的速率。控制反应的速率可以最大限度减少或避免不利副产物(例如调聚反应产物或聚合产物)的形成。

[0610] 如果自由基以热方式生成(例如使用热引发剂),则反应将通常在高于环境温度的温度实施。该温度将取决于从中生成自由基的类型的反应性。

[0611] 如果光化学地生成自由基,则反应可以有有利地在环境温度实施。在某些实施方案中,可能想要冷却反应混合物以减缓反应速率或相反,加热反应混合物以增加反应速率。

[0612] 本领域技术人员将能够考虑含有脂质的缀合配偶体、包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)和自由基引发剂(如果使用)的性质,选择用于实施本发明方法的适宜温度。

[0613] 可以通过加热或冷却反应混合物控制实施反应的温度。可以通过本领域已知合适方法控制反应混合物的温度。可以向反应混合物施加热,例如,使用反应容器内部的换热器、包围反应容器的加热套,或通过将反应容器浸没在加热的液体(例如油浴或砂浴)中。在某些示例性实施方案中,通过微波照射加热反应混合物。

[0614] 可以通过任何合适手段,例如,通过薄层色谱(TLC)或高效液体色谱(HPLC),监测反应的进程。可以允许反应推进至基本上完成,如通过至少一种起始物料消耗量所监测。在一些实施方案中,允许反应推进1分钟至7天、5分钟至72小时、10分钟至48小时、10分钟至24小时的时间。在其他实施方案中,允许反应推进小于72小时、小于48小时、小于24小时、小于12小时、小于6小时、小于4小时、小于2小时或小于1小时的时间。

[0615] 在一些实施方案中,实施反应直至已经消耗至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约

99%的含有脂质的缀合配偶体或包含氨基酸的缀合配偶体(以化学计量更少者为准)。在一些实施方案中,实施反应直至已经消耗至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约99%的含有脂质的缀合配偶体或含有肽的缀合配偶体(以化学计量更少者为准)。可以通过任何合适方法例如HPLC,监测起始物料的消费。

[0616] 可以通过本领域已知的任何合适方法,例如,使用磁力搅拌器或机械搅拌器,混合反应混合物。所用的方法可以取决于实施哪种反应。

[0617] 该反应通常在液态介质中实施。液态反应介质可以包含溶剂。合适溶剂的例子包括二甲基甲酰胺、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、氯仿、四氯化碳、水、甲醇、乙醇、二甲基亚砷、三氟乙酸、乙酸、乙腈及其混合物。

[0618] 可以基于含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)在溶剂中的溶解度,选择溶剂。自由基引发剂的溶解度也可能有关。在一些实施方案中,含有脂质的缀合配偶体是疏水的。包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)的疏水性或亲水性可以例如根据含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸序列变动。含有肽的缀合配偶体中增溶基团的存在可以增加在极性溶剂(如水)中的溶解度。本领域技术人员将能够在无需过多实验的情况下选择适宜的溶剂。

[0619] 反应可以在基本上无氧条件下实施。氧可以猝灭反应中形成的自由基。反应混合物可以用基本上无氧的惰性气体(例如氮气或氩气)脱气,以在生成自由基之前除去任何溶解氧。备选地,反应混合物的各种组分可以在反应容器中混合之前基本上无氧的惰性气体脱气。反应可以在基本上无氧的惰性气体的气氛下实施。

[0620] 本发明的方法可以在环境压力实施。

[0621] 如果相对巯基-烯反应中增殖而言链转移的速率慢,则不利的二聚化、调聚反应或聚合可能发生。

[0622] 在本发明的方法中,可以在反应混合物中纳入抑制二聚化、调聚反应或聚合的添加物。发明人已经发现,在一些实施方案中外部硫醇的纳入促进链转移,因为反应混合物中的添加物减少不利副产物的形成。在一些实施方案中,外部硫醇可以增加所需的巯基-烯反应的效率。合适的外部硫醇的例子包括但不限于还原型谷胱甘肽、DODT、DTT、蛋白质等。发明人已经发现,在一些实施方案中纳入DTT不产生不利的副产物。

[0623] 在某些实施方案中,外部硫醇是空间位阻型硫醇。合适的空间位阻型外部硫醇的非限制性例子包括叔丁基硫醇和1-甲基丙基硫醇。

[0624] 在一些实施方案中,纳入酸也可以抑制二聚化、调聚反应或聚合。酸可以是强无机酸,例如HCl或有机酸,例如TFA。在某些实施方案中,添加物是TFA。

[0625] 发明人已经发现在一些实施方案中,在反应混合物中纳入叔丁基硫醇和TFA作为添加物可以减少低聚物的形成,并且增加起始物料向所需产物的转化。因此,在某些示例性实施方案中,反应混合物包含TFA和叔丁基硫醇的组合。

[0626] 添加物通常按照在并未在该方法中不利影响反应或任何任选后续步骤的情况下,足以最大限度减少该方法中不利副产物形成的量使用。在一些实施方案中,添加物在反应中包含巯基的起始物料按照约20:1至约0.05:1、约10:1至约0.5:1、约5:1至约1:1、约3:1至约1:1的化学计量比率存在。

[0627] 在一些实施方案中,因二聚化、调聚反应或聚合产生的不利副产物以重量计小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约3%、或小于约1%在反应中所用的含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体起始物料。在一些实施方案中,因二聚化、调聚反应或聚合产生的不利副产物以重量计小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约3%、或小于约1%在反应中所用的含有脂质的缀合配偶体和含有肽的缀合配偶体起始物料。反应产物的纯度可以通过例如HPLC测定。

[0628] 反应混合物中含有脂质的缀合配偶体和包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)的浓度也可以各自影响反应。本领域技术人员将能够在无需过多实验的情况下变动含有脂质的缀合配偶体和含有肽的缀合配偶体在反应混合物中的浓度,以例如优化产率和纯度。

[0629] 在一些实施方案中,包含巯基的起始物料以约0.05mM至约1M、约0.5mM至约1M、约1mM至约1M的浓度存在。在一些实施方案中,该浓度是至少约0.05mM、0.5mM或1mM。

[0630] 在一些实施方案中,包含烯的起始物料的浓度是至少约0.05mM、0.5mM或1mM。

[0631] 在一些实施方案中,氨基酸缀合物或肽缀合物可以在反应后从反应介质分离并任选地纯化。在一些实施方案中,肽缀合物可以在反应后从反应介质分离并任选地纯化。可以使用本领域已知的任何合适方法,例如,通过沉淀,从反应介质分离缀合物。

[0632] 在一些实施方案中,将氨基酸缀合物或肽缀合物在它和反应介质分离后纯化。在一些实施方案中,将肽缀合物在它和反应介质分离后纯化。在具体构思的实施方案中,通过使用一种或多种合适溶剂的HPLC纯化缀合物。

[0633] 通过本发明方法产生的肽缀合物和/或在本发明方法中的含有肽的缀合配偶体可以包含合成肽。可以使用固相肽合成法(SPPS)制备合成肽。

[0634] 固相肽合成法(SPPS)的基本原理是逐步添加氨基酸至正在生长的多肽链,所述多肽链经接头分子锚定至一旦多肽链完整则允许切下并纯化的固相支持物,一般是树脂粒子。简而言之,固相树脂支持物和起始氨基酸彼此经接头分子连接。这类树脂-接头-酸基质是可商业获得的。

[0635] 待偶联至树脂的氨基酸在其 $N\alpha$ -末端受化学保护基团保护。

[0636] 氨基酸还可以具有侧链保护基。这类保护基防止不利或有害的反应在待偶联氨基酸的羧基和与树脂连接的肽链的未保护 $N\alpha$ -氨基之间形成新肽键期间发生。

[0637] 待偶联的氨基酸与肽链N端氨基酸的未保护 $N\alpha$ -氨基反应,增加肽链的链长度一个氨基酸。待偶联的氨基酸的羧基可以用合适的化学活化剂活化以促进与肽链的 $N\alpha$ -氨基反应。肽链的N端氨基酸的 $N\alpha$ -保护基随后在制备中移除以便与下一个氨基酸残基偶联。这项技术由多个重复步骤组成,无论何时有可能的话,这有望自动化。本领域技术人员将理解,肽可以偶联于固相结合氨基酸或肽的 $N\alpha$ -氨基,而非独立的氨基酸,例如在需要收敛性肽合成的情况下。

[0638] 当实现所需的氨基酸序列时,将肽在接头分子处从固相支持物切下。

[0639] SPPS可以使用连续流方法或间歇流方法实施。连续流允许借助分光光度计实时监测反应进程,但是具有两个明显缺点-与树脂上的肽接触的试剂稀释,并且规模更受限,原因在于固相树脂的物理尺寸约束。间歇流在滤器反应容器中进行并且是有用,原因在于反

应物是可及的并且可以手工或自动添加。

[0640] 多个类型的保护基常用于保护N- α -氨基末端：“Boc”（叔丁氧羰基）和“Fmoc”（9-芴甲氧羰基）。Boc法的试剂相对价廉，但是它们具有高度腐蚀性并且需要昂贵设备及待采取的注意事项更严格。一般优选Fmoc法，其使用尽管更昂贵但腐蚀性较小的试剂。

[0641] 对于SPPS，多种类型的固相支持物相是可获得的。用于合成的固相支持物可以是适于合成目的合成树脂、合成聚合物薄膜或者硅或硅酸盐表面（例如，可控孔度玻璃）。通常，使用树脂，常见地使用聚苯乙烯悬液或聚苯乙烯-聚乙二醇或聚合物支持物例如聚酰胺。用适于Boc化学的接头官能化树脂的例子包括PAM树脂、脲树脂SS、苯酚树脂、溴化Wang树脂和溴化PPOA树脂。适于Fmoc化学的树脂的例子包括AMPB-BHA树脂、Sieber酰胺树脂、Rink酸树脂、TentaGel S AC树脂、2-氯三苯甲基氯化物树脂、2-氯三苯甲基醇树脂、TentaGel S Trt-OH树脂、Knorr-2-氯三苯甲基树脂、胍-2-氯三苯甲基树脂、ANP树脂、Fmoc光不稳定性树脂、HMBA-MBHA树脂、TentaGel S HMB树脂、芳族安全Catch树脂、BA1树脂和Fmoc-羟胺2氯三苯甲基树脂。其他树脂包括PL Cl-Trt树脂、PL-脲树脂和PL-HMBA树脂。

[0642] 对于每种树脂，文献中已知用于连接起始单体或子单元的适宜偶联条件。

[0643] 固相支持物的准备包括支持物在适宜溶剂（例如二甲基甲酰胺）中溶剂化。固相一般在溶剂化期间体积增加，这转而增加可用于实施肽合成的表面积。

[0644] 接头分子随后与支持物连接以将肽链连接至固相支持物。接头分子通常如此设计，从而最终的切割过程在C末端提供游离酸或酰胺。接头通常不是树脂特有的。接头的例子包括肽酸例如4-羟甲基苯氧基乙酰-4'-甲基苄胺（HMP）或肽酰胺例如二苯甲胺衍生物。

[0645] 肽序列的首个氨基酸可以在接头与固相支持物连接后连接至接头或使用包含肽序列的首个氨基酸的接头连接至固相支持物。包括氨基酸的接头是可商业获得的。

[0646] 下一个步骤是首个氨基酸的N- α -氨基脱保护。对于Fmoc SPPS，可以用温和碱处理（哌嗪或哌啶，例如）实施N- α -氨基的脱保护。可以通过中等酸解（三氟乙酸（TFA），例如）移除侧链保护基。对于Boc SPPS，可以使用例如TFA实施N- α -氨基的脱保护。

[0647] 在脱保护之后，通过肽键的形成推进氨基酸链延长或偶联。这个过程需要活化待偶联氨基酸的C- α -羧基。这可以例如使用原位试剂、预制对称酐、活泼酯、酰卤或氨基甲酸乙酯保护的N-羧基环内酸酐完成。原位法允许同时活化和偶联。偶联试剂包括碳二亚胺衍生物，例如N,N'-二环己基碳二亚胺或N,N'-二异丙基碳二亚胺。偶联试剂还包括苯并三唑的脒盐或磷脒盐衍生物。这类脒盐和磷脒盐的例子包括HBTU（O-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐）、BOP（苯并三唑-1-基-氧-三（二甲基氨基）-磷脒六氟磷酸盐）、PyBOP（苯并三唑-1-基-氧-三吡咯烷基磷脒六氟磷酸盐）、PyAOP、HCTU（O-(1H-6-氯-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸盐）、TCTU（O-(1H-6-氯-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒四氟硼酸盐）、HATU（O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸盐）、TATU（O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟硼酸盐）、TOTU（O-[氰基（乙氧羰基）亚甲基氨基]-N,N,N',N''-四甲基脒六氟硼酸盐）和HAPU（O-(苯并三唑-1-基)氧双-(吡咯烷基)-脒六氟磷酸盐）。在一些实施方案中，偶联试剂是HBTU、HATU、BOP或PyBOP。

[0648] 在所需的氨基酸序列已经合成后,将肽从树脂切下。这个过程中所用的条件取决于肽的氨基酸组成及侧链保护基的敏感性。通常,切割在含有使源自保护基和接头的反应性正碳离子猝灭的多种清除剂的环境中实施。常用的切割剂例如包括TFA和氟化氢(HF)。在一些实施方案中,在肽经接头与固相支持物结合的情况下,通过从接头切下肽,将肽链从固相支持物切下。

[0649] 用于从树脂切下肽的条件可以同时移除一个或多个侧链保护基。

[0650] 保护基在SPPS中的用途是充分建立的。常见保护基的例子包括但不限于乙酰氨基甲基(Acm)、乙酰基(Ac)、金刚烷基氧(AdaO)、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bz1)、2-溴苄基,苄基(Bz10)、苯甲氧基羰基(Z)、苄氧甲基(Bom)、2-溴苄氧羰基(2-Br-Z)、叔丁氧基(tBuO)、叔丁氧基(Boc)、叔丁氧甲基(Bom)、叔丁基(tBu)、叔丁基硫代(tButhio)、2-氯苄基(2-Cl-Z)、环己基氧(cHxO)、2,6-二氯苄基(2,6-DiCl-Bz1)、4,4'-二甲氧基二苯甲基(Mbh)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代-3-甲基-丁基(ivDde)、4-[N-[1-(4,4-二甲基-2,6-二氧杂环己亚基)3-甲基丁基]-氨基]苄基(ODmab)、2,4-二硝基苯基(Dnp)、苄基甲氧羰基(Fmoc)、甲酰基(For)、均三甲苯-2-磺酰(Mts)、4-甲氧苄基(MeOBz1)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基(Mtr)、4-甲氧三苯甲基(Mmt)、4-甲基苄基(MeBz1)、4-甲基三苯甲基(Mtt)、3-硝基-2-吡啶氧硫基(Npys)、2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并咪唑-5-磺酰(Pbf)、2,2,5,7,8-五甲基-色烷-6-磺酰(Pmc)、甲苯磺酰基(Tos)、三氟乙酰基(Tfa)、三甲基乙酰胺基甲基(Tacm)、三苯甲基(Trt)和咕吨基(Xan)。

[0651] 在肽的氨基酸的一个或多个侧链含有官能团如例如额外的羧基、氨基、羟基或巯基情况下,额外的保护基可能是必要的。例如,如果使用Fmoc策略,则Mtr、Pmc、Pbf可以用于保护Arg;Trt、Tmob可以用于保护Asn和Gln;Boc可以用于保护Trp和Lys;tBu可以用于保护Asp、Glu、Ser、Thr和Tyr;并且Acm、tBu、tButhio、Trt和Mmt可以用于保护Cys。本领域技术人员将理解存在众多其他合适的组合。

[0652] 上文所概述的SPPS方法是本领域熟知的。参见,例如,Atherton和Sheppard,“Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach,”New York:IRL Press,1989;Stewart和Young:“Solid-Phase Peptide Synthesis第2版,”Rockford,Illinois:Pierce Chemical Co.,1984;Jones,“The Chemical Synthesis of Peptides,”Oxford:Clarendon Press,1994;Merrifield,J. Am. Soc. 85:2146-2149(1963);Marglin,A.和Merrifield,R. B. Annu. Rev. Biochem. 39:841-66(1970);和Merrifield R. B. JAMA. 210(7):1247-54(1969);和“Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach”(W.C.Chan和P.D.White编著Oxford University Press,2000)。自动化合成肽或多肽的设备轻易地从供应商如Perkin Elmer/Applied Biosystems(Foster City,CA)可商业获得并且可以根据制造商的说明书运行。

[0653] 在从树脂切下之后,可以将肽从反应介质分离,例如通过离心或过滤分离。随后可以后续纯化肽,例如通过使用一种或多种合适溶剂的HPLC。

[0654] 有利地,发明人已经发现在一些实施方案中,从树脂切下肽后,含有肽的缀合配偶体可以在不纯化的情况下用于本发明的方法中。

[0655] 发明人还已经有利地发现,可以使用含有肽的缀合配偶体实施本发明的方法,其中肽不含有N α -氨基保护基或任何侧链保护基。该反应通常对硫醇和非芳族碳-碳双键的反

应具有选择性。

[0656] 可能需要用保护基保护在含有肽的缀合配偶体存在(例如在肽的半胱氨酸残基中)的巯基以阻止本发明方法中的不利竞争性反应。巯基可以用保护基进行保护,所述保护基在用来移除肽中存在的一个或多个其他保护基或用来从树脂切下肽的条件下不可移除。一般,将使用携带适宜保护基的氨基酸合成肽。本领域技术人员将能够在无需过多实验的情况下选择适宜的保护基。

[0657] 在某些实施方案中,除待反应的碳-碳双键之外,包含氨基酸的缀合配偶体和含有脂质的缀合配偶体还包含一个或多个不饱和碳-碳键。在某些实施方案中,除待反应的碳-碳双键之外,含有肽的缀合配偶体和含有脂质的缀合配偶体还包含一个或多个不饱和碳-碳键。本领域技术人员将理解在这类实施方案中,巯基对待反应的碳-碳双键的选择性可以例如取决于碳-碳双键相对一个或多个不饱和碳-碳键的空间环境和/或电子环境。在某些实施方案中,待反应的碳-碳双键相对包含氨基酸的缀合配偶体和含有脂质的缀合配偶体中的任何其他不饱和碳-碳键而活化。在某些实施方案中,待反应的碳-碳双键相对含有肽的缀合配偶体和含有脂质的缀合配偶体中的任何其他不饱和碳-碳键而活化。

[0658] 在一些实施方案中,包含碳-碳双键或巯基的包含氨基酸的缀合配偶体的氨基酸的Na-氨基酰化,例如乙酰化。在一些实施方案中,本发明的方法可以包括酰化例如乙酰化包含待反应碳-碳双键或巯基的包含氨基酸的缀合配偶体的氨基酸的Na-氨基。

[0659] 在含有肽的缀合配偶体已经通过SPPS合成的情况下,酰化可以从树脂切下之前或之后实施。在一些实施方案中,在含有肽的缀合配偶体中携带碳-碳双键或巯基待反应的氨基酸残基是N端氨基酸残基并且该方法包括在切下肽之前酰化N末端氨基。

[0660] 在一些实施方案中,该方法还包括酰化与含有脂质的缀合配偶体缀合的氨基酸缀合物的氨基酸的Na-氨基或肽缀合物的氨基酸残基的Na-氨基。

[0661] 氨基酸的Na-氨基酰化可以实施通过使氨基酸或肽与酰化剂在碱存在下在合适的溶剂例如DMF中反应。酰化剂的非限制性例子包括酰卤,例如酰基氯如乙酰氯,和酸酐,例如乙酸酐。这类试剂可以是市售的或可以通过本领域熟知的方法制备。合适碱的非限制性例子包括三乙胺、二异丙基乙胺、4-甲基吗啉等。

[0662] 在其他实施方案中,合成含有肽的缀合配偶体的肽包括将下述氨基酸或包含下述氨基酸的肽与一个或多个氨基酸和/或一种或多种肽偶联,所述氨基酸在Na-氨基处酰化并且包含待反应的碳-碳双键或巯基。

[0663] 在一些实施方案中,该方法包括将氨基酸缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联以提供肽缀合物。在一些实施方案中,该方法包括将氨基酸缀合物的氨基酸通过SPPS与结合于固相树脂支持物的氨基酸或肽偶联。在一些实施方案中,该方法包括将氨基酸缀合物的氨基酸通过SPPS与结合于固相树脂支持物的肽偶联。该方法可以包括通过SPPS合成与固相树脂支持物结合的肽。

[0664] 在一些实施方案中,该方法还包括将氨基酸缀合物的氨基酸或肽缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联,从而提供包含肽表位的肽缀合物。在一些实施方案中,待偶联的肽包含肽表位。在其他实施方案中,肽表位在偶联时形成。这种偶联可以通过如本文所述的SPPS实施。

[0665] 在一些实施方案中,该方法包括将氨基酸缀合物的氨基酸通过SPPS与结合于固相

树脂支持物的肽偶联,从而提供包含肽表位的肽缀合物。

[0666] 在一个实施方案中,待偶联的肽缀合物的肽与固相树脂支持物结合,并且该方法包括将待偶联的肽缀合物的氨基酸与氨基酸或肽偶联,从而提供包含肽表位的肽缀合物。

[0667] 在备选实施方案中,该方法包括将肽缀合物的氨基酸通过SPPS与结合于固相树脂支持物的氨基酸或肽偶联,从而提供包含肽表位的肽缀合物。

[0668] 在一些实施方案中,该方法还包括将表位(例如肽表位)与氨基酸缀合物或肽缀合物偶联。在该方法包括偶联肽表位的情况下,这种偶联可以通过如本文所述的SPPS实施。

[0669] 在某些实施方案中,表位(例如肽表位)经接头基团偶联或结合。在某些实施方案中,接头基团是氨基序列,例如具有2个或更多个、3个或更多个或4个或更多个连续氨基酸的序列。在某些实施方案中,接头包含约2至20个、2至18个、2至16个、2至14个、2至12个、2至10个、4至20个、4至18个、4至16个、4至14个、4至12个或4至10个氨基酸。

[0670] 本领域技术人员将领会,如本文所述将一个氨基酸或一个肽与另一个氨基酸或肽偶联可以包括在该氨基酸或一个偶联配偶体的该肽的氨基酸的Na-末端和该氨基酸或另一个偶联配偶体的该肽的氨基酸C末端之间形成肽键。

[0671] 在一些实施方案中,本发明的方法包括通过SPPS合成含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸序列;并且使含有脂质的缀合配偶体与含有肽的缀合配偶体反应。

[0672] 在一些实施方案中,通过SPPS合成含有肽的缀合配偶体的肽的氨基酸序列包括将氨基酸或肽与结合于固相树脂支持物的氨基酸或肽偶联以提供肽或其部分的氨基酸序列。在某些实施方案中,通过SPPS合成含有肽的缀合配偶体的完整肽的氨基酸序列。

[0673] 含有肽的缀合配偶体可以与含有脂质的缀合配偶体反应,同时与固相树脂支持物结合。备选地,肽可以从固相树脂支持物切下,并且任选地与含有脂质的缀合配偶体反应之前纯化。

[0674] 肽缀合物和/或包含氨基酸的缀合配偶体(例如含有肽的缀合配偶体)可以包含一个或多个增溶基团。一个或多个增溶基团例如增加含有肽的缀合配偶体在极性溶剂(如水)中的溶解度。在示例性实施方案中,增溶基团并没有不利地影响肽缀合物的生物活性。

[0675] 增溶基团的存在可以有利于配制和/或施用作为药物组合物的肽缀合物。

[0676] 在一些实施方案中,增溶基团与肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽结合。在一些实施方案中,增溶基团与含有肽的缀合配偶体的肽结合。在一些实施方案中,肽缀合物的肽和/或含有肽的配偶体的肽包含增溶基团。在一些实施方案中,含有肽的配偶体的肽包含增溶基团。

[0677] 在一些实施方案中,增溶基团与肽链中氨基酸的侧链结合。在一些实施方案中,增溶基团与肽链的C末端或N末端结合。在一些实施方案中,增溶基团在肽链中两个氨基酸残基之间结合。在一些实施方案中,增溶基团与肽链中一个氨基酸残基的Na-氨基和肽链中另一个氨基酸残基的羧基结合。

[0678] 合适增溶基团的例子包括但不限于亲水性氨基酸序列或聚乙二醇(PEG)。

[0679] 在一个实施方案中,增溶基团是在肽链中包含两个或更多个亲水性氨基酸残基的亲水性氨基酸序列。在一些实施方案中,增溶基团是氨基酸序列在肽链中包含两个或更多个连续亲水性氨基酸残基的序列。可以通过以下方式形成这类增溶基团:通过SPPS向肽链的每个氨基酸添加增溶基团。

[0680] 在另一个实施方案中,增溶基团是聚乙二醇。在一些实施方案中,聚乙二醇与肽链中一个氨基酸残基的Na-氨基和肽链中另一个氨基酸残基的羧基结合。

[0681] 在一些实施方案中,聚乙二醇包含约1至约100个、约1至约50个、约1至约25个、约1至约20个、约1至约15个、约1至约15个、约1至约10个、约2至约10个或约2至约4个乙二醇单体单元。用于将聚乙二醇与肽偶联的方法是已知的。

[0682] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体包含一种抗原,例如,抗原性肽。在一个实施方案中,肽缀合物或含有肽的缀合配偶体的肽是或包含抗原;或与肽结合、任选地经接头结合的抗原。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含抗原,例如,抗原性肽。在一个实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽是或包含抗原;或与肽结合、任选地经接头结合的抗原。

[0683] 在一个实施方案中,抗原包含肽,所述肽包含表位。在一个实施方案中,包含表位的肽是包含表位的糖肽。在一个实施方案中,抗原包含糖肽,所述糖肽包含表位。

[0684] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体包含表位。在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽包含表位。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含表位。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽包含表位。

[0685] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体包含两个或更多个表位,例如,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽包含两个或更多个表位。

[0686] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体是或包含糖肽,所述糖肽包含表位。在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽是糖肽。在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体包含糖肽,所述糖肽包含与肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽结合的表位。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体是或包含糖肽,所述糖肽包含表位。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽是糖肽。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含糖肽,所述糖肽包含与含有肽的缀合配偶体的肽结合的表位。

[0687] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体包含蛋白酶剪切位点。在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽包含蛋白酶剪切位点。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含蛋白酶剪切位点。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽包含蛋白酶剪切位点。

[0688] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽包含一个或多个接头基团。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体的肽包含一个或多个接头基团。

[0689] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体包含接头基团。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含接头基团。

[0690] 在一些实施方案中,肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体包含表位,所述表位经接头基团与肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽结合。在一些实施方案中,含有肽的缀合配偶体包含经接头基团与含有肽的缀合配偶体的肽结合的表位。

[0691] 接头基团的例子包括但不限于氨基酸序列(例如,肽)、聚乙二醇,烷基氨基酸等。在一些实施方案中,接头是或包含蛋白酶剪切位点。在一些实施方案中,接头是或包含增溶基团。

[0692] 在一些实施方案中,接头在肽链中两个氨基酸残基之间结合。

[0693] 在一些实施方案中,增溶基团与肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体中一个氨基酸残基的Na-氨基和含有肽的缀合配偶体中另一个氨基酸残基的羧基结合。在一些实施方案中,增溶基团与含有肽的缀合配偶体中一个氨基酸残基的Na-氨基和含有肽的缀合配偶体中另一个氨基酸残基的羧基结合。

[0694] 在某些实施方案中,接头基团是在体内从与它结合的氨基酸可切下的。在某些实施方案中,接头基团是在体内通过水解可切下的。在某些实施方案中,接头基团是在体内通过酶促水解可切下的。可以通过本领域已知的任何合适方法引入接头基团。

[0695] 该方法还可以包括将表位与氨基酸缀合物的氨基酸或肽缀合物的肽偶联。如上文所述,表位可以经接头基团结合。在一些实施方案中,表位是肽表位。在一些实施方案中,该方法包括偶联包含表位的糖肽。

[0696] 将可以理解在某些合乎需要的实施方案中,本发明的肽缀合物维持由抗原呈递细胞适宜地摄取、加工和呈递。合乎需要地,含有脂质的缀合物不干扰抗原呈递细胞呈递缀合物中存在的任何抗原性肽。本文中呈献的例子确立,与非缀合的相关肽相比,本发明的缀合物由抗原呈递细胞呈递。

[0697] 可以便利地通过例如氨基酸分析、质谱法、Edman降解等,证实所合成的肽的身份。

[0698] 本发明的方法还可以包括从液态反应介质分离氨基酸缀合物。备选地,本发明的方法还可以包括从液态反应介质分离肽缀合物。可以例如使用本领域已知的任何合适分离方法,沉淀法和过滤法。可以后续纯化缀合物,例如通过使用一种或多种合适溶剂的HPLC。

[0699] 本发明还涉及通过本发明方法产生的氨基酸缀合物和肽缀合物。缀合物是如本文所述的任一实施方案中限定的。

[0700] 本发明还涉及式(V)的化合物,其是氨基酸缀合物。

[0701] 本发明还涉及式(V)的化合物,其是肽缀合物。

[0702] 肽缀合物可以是纯的或纯化的,或基本上纯的。

[0703] 如本文所用“纯化”不需要绝对纯粹;反而,它意图作为其中所讨论的材料比它先前所处于环境下更纯的相对术语。在实践中,该材料一般已经例如经历分级以移除各种其他组分,并且所得到的材料具有基本上保留的其所需生物活性或活性。术语“基本上纯化的”指这些材料,所述材料至少约60%不含、优选地至少约75%不含并且最优选地至少约90%不含、至少约95%不含、至少约98%或更多地不含在制造期间可能与其结合的其他组分。

[0704] 术语“ α -氨基酸”或“氨基酸”指含有与称作 α -碳的碳结合的氨基和羧基的分子。合适的氨基酸包括而限于天然存在氨基酸的D-和L-异构体,以及通过有机合成或其他代谢途径制备的非天然存在氨基酸。除非上下文特别提示,否则如本文所用,术语氨基酸意在包括氨基酸类似物。

[0705] 在某些实施方案中,含有肽的缀合配偶体仅包含天然氨基酸。术语“天然存在的氨基酸”指在自然界合成的肽中常见的20种氨基酸的任一种并且按单字母缩写已知A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y和V。

[0706] 术语“氨基酸类似物”或“非天然存在的氨基酸”指结构上与氨基酸相似并且可以替换氨基酸的分子。氨基酸类似物包括而限于这样的化合物,它们结构上与如本文定义的氨基酸相同,例外是在氨基和羧基之间包含一个或多个额外亚甲基(例如, α -氨基 β -羧基

酸),或氨基或羧基由具有类似反应性的基团取代(例如,伯胺由仲胺或叔胺取代或羧基由酯取代)。

[0707] 除非另外说明,否则处于本领域技术人员能力范围内的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学常规技术可以用于实施本文所述的方法。这类技术在以下文献中充分解释,如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版(Sambrook等人,1989);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编著,1984);Animal Cell Culture(R.I.Freshney编著,1987);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir&C.C.Blackwell编著);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller&M.P.Calos编著,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编著,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编著,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编著,1991);The Immunoassay Handbook(David Wild编著,Stockton Press NY,1994);Antibodies:A Laboratory Manual(Harlow等人编著,1987);和Methods of Immunological Analysis(R.Masseyeff,W.H.Albert和N.A.Staines编著,Weinheim:VCH Verlags gesellschaft mbH,1993)。

[0708] 术语“肽”等在本文中用来指任何长度的任何氨基酸残基聚合物。聚合物可以是线型或非线型(例如,分枝的),它可以包含修饰的氨基酸或氨基酸类似物。本术语也涵盖已经按天然方式或通过干预(例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他修饰或操作,如以标记组分或生物活性组分缀合)而修饰的氨基酸聚合物。

[0709] 发明人已经发现,本发明的某些肽缀合物具有免疫活性。

[0710] 细胞介导免疫主要由T-淋巴细胞介导。致病性抗原表达在抗原呈递细胞(如巨噬细胞,B-淋巴细胞,和树状细胞)的表面上,与主要组织相容性MHC I类分子或MHC II类分子结合。与MHC II类偶联的致病性抗原的呈递激活辅助(CD4+)T-细胞反应。一旦T细胞与抗原-MHC II复合物结合,CD4+T细胞释放细胞因子并增殖。

[0711] 与MHC I类结合的致病性抗原的呈递激活细胞毒(CD8+)T-细胞反应。一旦T细胞与抗原-MHC I复合物结合,CD8+细胞分泌穿孔素和其他介质,导致靶细胞死亡。不希望受任何理论约束,申请人认为在某些实施方案中,CD8+细胞增强的反应CD4+细胞识别的一个或多个表位存在下实现。

[0712] 评估和监测受试者中细胞介导反应的启动或进展的方法是本领域熟知的。便利示例性方法包括其中评估与细胞介导反应相关的一种或多种细胞因子(如本文中确定的那些)的存在或其水平的那些方法。类似地,评估或监测细胞介导反应的启动或进展的基于细胞的方法能够用于本发明中,并且可以包括细胞增殖或活化测定法,包括目标在于确定一个或多个免疫细胞(如T-淋巴细胞)群体活化或扩充的测定法。

[0713] 在某些实施方案中,本发明的方法激发细胞介导的免疫反应和体液反应。

[0714] 体液免疫反应由B细胞产生的分泌型抗体介导。分泌型抗体与正在入侵的病原体的表面上呈递的抗原结合,标记它们以便摧毁。

[0715] 再次,评估和监测受试者中体液反应反应的启动或进展的方法是本领域熟知的。这些方法包括抗体结合测定法、ELISA和皮肤点刺试验等。

[0716] 不希望受理论约束,发明人认为肽缀合物在一些实施方案中刺激Toll样受体(TLR)。

[0717] Toll样受体 (TLR) 是高度保守的样式识别受体 (PRR), 这些受体识别病原体相关分子模式并且向细胞传递危险信号 (Kawai, T., Akira, S., *Immunity* 2011, 34, 637-650)。TLR2 是在一系列不同细胞类型上表达的细胞表面受体, 所述细胞类型包括树状细胞、巨噬细胞和淋巴细胞 (Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., *Immunity* 2010, 33, 492-503)。

[0718] TLR2识别广泛类型的微生物组分, 包括脂多糖、肽聚糖和脂磷壁酸。它在TLR当中独特, 在于它与TLR1或TLR6形成异二聚体; 与其他PRR形成复合物的能力可以解释广泛类型的TLR2激动剂 (Feldmann, M., Steinman, L., *Nature* 2005, 435, 612-619)。一旦配体结合并且异二聚化, 信号传导借助MyD88途径发生, 导致NF κ B激活和后续产生炎性细胞因子和效应细胞因子。

[0719] 衍生自细菌细胞-壁组分的二酰化和三酰化脂肽已经作为TLR2激动剂广泛地研究 (Eriksson, E.M.Y., Jackson, D.C., *Curr. Prot. and Pept. Sci.* 2007, 8, 412-417)。已经报道脂肽促进树状细胞成熟, 造成细胞表面上的共刺激分子上调和增强的抗原呈递。也已经报道脂肽刺激巨噬细胞释放细胞因子并促进淋巴细胞 (包括B细胞和CD8+T细胞) 活化。

[0720] 在一些实施方案中, 肽缀合物具有TLR2激动剂活性。在一些实施方案中, 肽缀合物具有与Pam3CSK4可比较的TLR2激动剂活性。在一些实施方案中, 肽缀合物的TLR2激动剂活性是Pam3CSK4的TLR2激动剂活性的至少约50%、约60%、约70%、约80%、约90%。在一些实施方案中, 例如, 在其中需要受调节的免疫反应的实施方案中, 肽缀合物具有比Pam3CSK4更低的TLR2激动剂活性。例如, 肽缀合物具有比Pam3CSK4小约50%、小约40%、小约30%、小约20%或小约10%的TLR2激动剂活性。

[0721] 在一些实施方案中, 肽缀合物和/或含有肽的缀合配偶体的肽包含这样的丝氨酸氨基酸残基, 所述残基毗邻于含有脂质的缀合配偶体经其与肽缀合的氨基酸。在一些实施方案中, 肽含有缀合配偶体的肽包含这样的丝氨酸氨基酸残基, 所述残基毗邻于含有脂质的缀合配偶体经其与肽缀合的氨基酸。丝氨酸氨基酸残基在这个位置的存在可以增强TLR2结合作用。在一些实施方案中, 丝氨酸氨基酸残基与含有脂质的缀合配偶体经其与肽缀合的氨基酸的C末端结合。

[0722] 如本领域技术人员在阅读本公开内容将领会, 肽缀合物可以包含表位, 例如包含两个或更多个表位。在一些实施方案中, 表位是肽表位。本领域技术人员将理解, 可以在本发明中使用广泛类型的肽表位。

[0723] 抗原

[0724] 将可以理解多种抗原, 例如肿瘤抗原或来自各种致病生物的抗原, 已经表征并且适用于本发明中。构思了能够激发免疫反应的全部抗原, 无论目前是否表征。

[0725] 因此, 取决于抗原选项, 本发明的缀合物应用于广泛类型的免疫疗法中, 所述免疫疗法包括但不限于治疗和预防感染性疾病、治疗和预防癌症和治疗免疫抑制期间或之后病毒再活化, 例如在已经接受骨髓移植或造血干细胞移植的患者中。

[0726] 还构思了包含一个或多个氨基酸置换如一个或多个保守性氨基酸置换的抗原。

[0727] “保守性氨基酸置换”是这样的氨基酸置换, 其中一个氨基酸残基更换为具有化学相似或衍生化侧链的另一个氨基酸残基。例如, 已经在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族例如包括具有碱性侧链的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电的极性侧链的氨基酸 (例

如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支的侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸),以及具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。本发明中还构思了氨基酸类似物(例如,磷酸化或糖基化氨基酸),还构思了以非天然存在氨基酸置换的肽,所述的非天然存在氨基酸包括但不限于N-烷基氨基酸(例如N-甲基氨基酸)、D-氨基酸、 β -氨基酸和 γ -氨基酸。

[0728] 还具体构思了抗原的片段和变体。

[0729] 肽的“片段”是肽的子序列,所述子序列履行酶活性或结合活性要求的功能和/或提供肽的三维结构,如多肽的三维结构。

[0730] 如本文所用,术语“变体”指其中缺失、置换或添加一个或多个氨基酸残基的肽序列,例如包括与具体鉴定的序列不同的肽序列。变体是天然存在的变体或非天然存在的变体。变体来自相同物种或来自其他物种并且可以涵盖同源物、旁系同源物和直向同源物。在某些实施方案中,肽的变体包括拥有与野生型肽活性相同或与相似的生物活性的肽。术语“变体”结合肽涵盖如本文定义的肽全部形式。

[0731] 本领域技术人员将理解,本发明的缀合物在某些实施方案中特别地适用于刺激T-细胞反应,例如适用于治疗肿瘤性疾病,包括癌症。具体构思了包含一种或多种肿瘤抗原的本发明缀合物。将可以理解,构思用于制备本发明肽缀合物的肿瘤抗原通常将包含一种或多种肽。在本发明的某些实施方案中,例如包括本发明的药物组合物,可以存在一种或多种额外的肿瘤抗原,其中一种或多种肿瘤抗原不包含肽。肿瘤抗原一般划分为独特抗原或共有抗原,其中后者类别包括分化抗原、癌特异性抗原和过量表达的抗原。每个类别的例子均能够用于本发明中。下文讨论用于治疗例如免疫治疗或肿瘤性疾病(包括癌症)疫苗接种的代表性肿瘤抗原。具体构思了包含使用那些免疫方法制备的一种或多种抗原的化合物、疫苗和组合物。

[0732] 在某些实施方案中,肿瘤抗原是含有肽的肿瘤抗原,如多肽肿瘤抗原或糖蛋白肿瘤抗原。在某些实施方案中,肿瘤抗原是含有糖的肿瘤抗原,如糖脂肿瘤抗原或神经节苷脂肿瘤抗原。在某些实施方案中,肿瘤抗原是含有多核苷酸的肿瘤抗原,所述多核苷酸的肿瘤抗原表达含有多肽的肿瘤抗原,例如, RNA载体构建体或DNA载体构建体如质粒DNA。

[0733] 适用于本发明中的肿瘤抗原涵盖多种类型的分子,如(a)含有肽的肿瘤抗原,包括肽表位(其范围可以例如从8-20个氨基酸长度,不过这个范围之外的长度也常见)、脂多肽和糖蛋白,(b)含有糖的肿瘤抗原,包括多糖、黏蛋白、神经节苷脂、糖脂和糖蛋白,和(c)表达抗原性多肽的多核苷酸。再次,本领域技术人员将认识到,在本发明缀合物或组合物存在的肿瘤抗原一般将包含肽。但是,构思了这样的本发明实施方案,其中一种或多种缀合物包含本身不包含肽而是例如与包含氨基酸或含有肽的缀合配偶体结合的肿瘤抗原。类似地,构思了本发明的组合物,其中存在一种或多种本身不包含肽的肿瘤抗原。

[0734] 在某些实施方案中,肿瘤抗原例如是(a)与癌细胞相关的全长分子,(b)其同源物和修饰形式,包括具有缺失、添加和/或置换部分的分子,和(c)其片段,前提是所述片段保持抗原性或免疫原性。在某些实施方案中,肿瘤抗原以重组形式提供。在某些实施方案中,肿瘤抗原例如包括,CD8+淋巴细胞识别的I类限制性抗原或CD4+淋巴细胞识别的II类限制性抗原。

[0735] 共有肿瘤抗原通常视为肿瘤表达的天然、未突变序列，原因在于允许发育阻遏型基因的去阻遏的表观遗传变化。因此，相对于过量表达的或分化相关的抗原，共有抗原一般视为优选，原因是正常组织中不存在其表达。另外，可以在多种癌症患者中靶向相同的抗原。例如，在患有多种肿瘤的大部分患者中和在患有其他肿瘤的可观少数患者存在癌症-睾丸抗原NY-ESO-1。在另一个例子中，乳房分化肿瘤抗原NYBR-1和NYBR-1.1在某个比例的乳腺癌患者中存在。共有肿瘤抗原因此代表一种有开发吸引力的靶。

[0736] 本文中具体构思了共有肿瘤抗原、包括NY-ESO-1、CTSP-1、CTSP-2、CTSP-3、CTSP-4、SSX2和SCP1在内的这类癌症-睾丸抗原和乳腺癌抗原NYBR-1和NYBR-1.1在本发明缀合物中的用途。

[0737] 在一个示例性实施方案中，含有肽的缀合配偶体或肽缀合物的肽包含从NY-ESO-1衍生的一个或多个表位。在一个实施方案中，该肽包含从NY-ESO-1残基79-116衍生的一个或多个表位。在一个实施方案中，该肽包含从NY-ESO-1残基118-143衍生的一个或多个表位。在一个实施方案中，该肽包含从NY-ESO-1残基153-180衍生的一个或多个表位。

[0738] 在一个具体构思的实施方案中，含有肽的缀合配偶体或肽缀合物的肽包含选自以下氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成，所述氨基酸序列从来自SEQ ID NO:1至20中任一者的8个或更多个连续氨基酸、10个或更多个连续氨基酸、12个或更多个连续氨基酸、15个或更多个连续氨基酸、20个或更多个连续氨基酸或25个或更多个连续氨基酸选出。

[0739] 在多种实施方案中，肽包含多于一个选自SEQ ID NO:1至20中任一者的一个氨基酸序列。在一个实施方案中，肽包含选自SEQ ID NO:4-7、12、13和18-20的一个或多个氨基酸序列。

[0740] 类似地，前列腺疫苗Sipuleucel-T (APC8015, Provenge™) 包含在95%前列腺癌细胞中存在的抗原前列腺酸性磷酸酶 (PAP)。至少部分地归因于这种在显著比例的前列腺癌患者中的潜在有效性，Sipuleucel-T由FDA在2010年批准用于治疗无症状、激素难治性前列腺癌。本发明中具体构思了PAP抗原在本发明缀合物中的用途。

[0741] 视为独特抗原是个体独有或由低比例癌症患者共有的那些抗原，并且一般因导致独特蛋白质序列的突变所致。独特肿瘤抗原的代表性例子包括突变型Ras抗原和突变型p53抗原。如已经阅读本说明书的本领域技术人员将领会，本发明的方法能够例如在制备患者专用治疗药时便利制备包含一种或多种独特肿瘤抗原的缀合物，例如以激发针对一种或多种独特肿瘤抗原的特异性T-细胞反应。

[0742] 因此，代表性肿瘤抗原包括但不限于 (a) 抗原如RAGE、BAGE、GAGE和MAGE家族多肽，例如，GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6和MAGE-12 (其可以例如用于对付黑素瘤、肺肿瘤、头颈肿瘤、NSCLC、乳腺肿瘤、胃肠道肿瘤和膀胱肿瘤)，(b) 突变型抗原，例如，p53 (与各种实体瘤例如结直肠癌、肺癌、头颈癌相关)、p21/Ras (例如与黑素瘤、胰腺癌和结直肠癌相关)、CDK4 (例如与黑素瘤相关)、MUM1 (例如与黑素瘤相关)、胱天蛋白酶-8 (例如与头颈癌相关)、CIA 0205 (例如与膀胱癌相关)、HLA-A2-R1701、β联蛋白 (例如与黑素瘤相关)、TCR (例如与T细胞非霍奇金淋巴瘤相关)、BCR-ab1 (例如与慢性髓性白血病相关)、磷酸丙糖异构酶、MA0205、CDC-27和LDLR-FUT，(c) 过量表达的抗原，例如，半乳糖凝集素4 (例如与结直肠癌相关)、半乳糖凝集素9 (例如与霍奇金病相关)、蛋白酶3 (例如与慢性髓性白血病相关)、Wilms肿瘤抗原-1 (WT1，例如与各种白血病相关)、碳酸酐酶 (例如与

肾癌相关)、醛缩酶A(例如与肺癌相关)、PRAME(例如与黑素瘤相关)、HER-2/neu(例如与乳腺、结肠、肺和卵巢癌相关)、 α -胎蛋白(例如与肝癌相关)、KSA(例如与结直肠癌相关)、胃泌素(例如与胰腺和胃癌相关)、端粒酶催化蛋白、MUC-1(例如与乳腺癌和卵巢癌相关)、G-250(例如与肾细胞癌相关)、p53(例如与乳腺癌、结肠癌相关)和癌胚抗原(例如与乳腺癌、肺癌和胃肠道癌症如结直肠癌相关), (d) 共有抗原, 例如, 黑素瘤-黑素细胞分化抗原如MART-1/MelanA、gp100、MC1R、黑素细胞刺激激素受体、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1/TRP1和酪氨酸酶相关蛋白-2/TRP2(例如与黑素瘤相关), (e) 前列腺相关抗原, 如与例如前列腺癌相关的PAP、前列腺血清抗原(前列腺特异性抗原)、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2, (f) 免疫球蛋白独特型(例如与骨髓瘤和B细胞淋巴瘤相关)和(g) 其他肿瘤抗原, 如含有多肽的和含有糖的抗原, 包括(i) 糖蛋白, 如唾液酰Tn和唾液酰Le. sup. x(例如与乳腺和结直肠癌相关)以及多种黏蛋白; 糖蛋白与载体蛋白偶联(例如, MUC-1与KLH偶联); (ii) 脂多肽(例如, 与脂质部分连接的MUC-1); (iii) 与载体蛋白(例如, 与KLH)偶联的多糖(例如, Globo H合成性六糖), (iv) 也与载体蛋白(例如, KLH)偶联的神经节苷脂如GM2、GM12、GD2、GD3(例如与脑癌、肺癌、黑素瘤相关)。

[0743] 能够在本发明中使用的其他代表性肿瘤包括TAG-72(参见, 例如, 美国专利号5, 892, 020; 人癌抗原(参见, 例如, 美国专利号5, 808, 005); 来自骨癌细胞的TP1和TP3抗原(参见, 例如, 美国专利号5, 855, 866); 来自腺癌细胞的Thomsen-Friedenreich(TF)抗原(参见, 例如, 美国专利号5, 110, 911); 来自人前列腺癌细胞的KC-4抗原(参见, 例如, 美国专利号4, 743, 543); 人结直肠癌抗原(参见, 例如, 美国专利号4, 921, 789); 来自胰腺癌的CA125抗原(参见, 例如, 美国专利号4, 921, 790); 来自人乳腺癌的DF3抗原(参见, 例如, 美国专利号4, 963, 484和5, 053, 489); 人乳腺肿瘤抗原(参见, 例如, 美国专利号4, 939, 240); 人黑素瘤p97抗原(参见, 例如, 美国专利号4, 918, 164); 癌或血清类黏蛋白相关抗原(CORA)(参见, 例如, 美国专利号4, 914, 021); 在人乳腺癌糖蛋白、MSA乳腺癌糖蛋白中的T半抗原和Tn半抗原; MFGM乳腺癌抗原; DU-PAN-2胰腺癌抗原; CA125卵巢癌抗原; YH206肺癌抗原, α 胎蛋白(AFP)肝细胞癌抗原; 癌胚抗原(CEA)肠癌抗原; 上皮肿瘤抗原(ETA)、乳腺癌抗原; 酪氨酸酶; raf癌基因产物; gp75; gp100; EBV-LMP1和2; EBV-EBNA1、2和3C; HPV-E4、6、7; C017-1A; GA733; gp72; p53; 蛋白酶3; 端粒酶; 和黑素瘤神经节苷脂。这些肿瘤抗原和其他肿瘤抗原构思用于本发明中, 无论现在是否表征。

[0744] 在某些实施方案中, 肿瘤抗原衍生自突变型或变异型细胞组分。变异型细胞组分的代表性例子包括但不限于ras、p53、Rb、由Wilms瘤基因编码的变异型蛋白、遍在蛋白、黏蛋白、由DCC基因、APC基因和MCC基因编码的蛋白质以及受体或受体样结构如neu、甲状腺激素受体、血小板衍生生长因子(PDGF)受体、胰岛素受体、表皮生长因子(EGF)受体和集落刺激因子(CSF)受体。

[0745] 本发明中使用的含有多核苷酸的抗原包括编码多肽肿瘤抗原(如上文列出的那些)的多核苷酸。在某些实施方案中, 含有多核苷酸的抗原包括但不限于能够在体内表达多肽肿瘤抗原的DNA或RNA载体构建体, 如质粒载体(例如, pCMV)。

[0746] 本发明还构思了制备包含病毒抗原的缀合物, 所述病毒抗原能够在正在免疫抑制或已经免疫抑制的患者(例如已经接受骨髓移植、造血干细胞移植或正在进行免疫抑制的患者)中刺激T细胞以激发有效抗病毒免疫。

[0747] 类似地,从与癌症发生率增加相关的或据报道造成癌症的病毒如人乳头状瘤、甲型肝炎病毒和乙型肝炎病毒衍生的抗原构思用于本发明中。

[0748] 例如,在某些实施方案中,肿瘤抗原包括但不限于p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、Epstein Barr病毒抗原、人乳头状瘤(HPV)抗原(包括E6和E7)、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒抗原、嗜人类T淋巴细胞病毒抗原、TSP-180、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、mn-23H1、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、p16、TAGE、PSCA、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、Ga733(EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90(Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白)、TAAL6、TAG72、TLP、TPS等。

[0749] 下文讨论用于致病生物疫苗接种的代表性抗原。具体构思了包含使用那些免疫方法制备的一种或多种抗原的化合物、疫苗和组合物。

[0750] 结核病抗原

[0751] 将可以理解,多种结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)抗原已经表征并且适用于本发明中。构思了能够激发免疫反应的全部结核分枝杆菌抗原,无论目前是否表征。

[0752] 适用的示例性结核分枝杆菌抗原包括早期分泌性抗原靶(ESAT)-6、Ag85A、Ag85B(MPT59)、Ag85B、Ag85C、MPT32、MPT51、MPT59、MPT63、MPT64、MPT83、MPB5、MPB59、MPB64、MTC28、Mtb2、Mtb8.4、Mtb9.9、Mtb32A、Mtb39、Mtb41、TB10.4、TB10C、TB11B、TB12.5、TB13A、TB14、TB15、TB15A、TB16、TB16A、TB17、TB18、TB21、TB20.6、TB24、TB27B、TB32、TB32A、TB33、TB38、TB40.8、TB51、TB54、TB64、CFP6、CFP7、CFP7A、CFP7B、CFP8A、CFP8B、CFP9、CFP10、CFP11、CFP16、CFP17、CFP19、CFP19A、CFP19B、CFP20、CFP21、CFP22、CFP22A、CFP23、CFP23A、CFP23B、CFP25、CFP25A、CFP27、CFP28、CFP28B、CFP29、CFP30A、CFP30B、CFP50、CWP32、hspX(α -晶体)、APA、结核菌素纯化蛋白衍生物(PPD)、ST-CF、PPE68、LppX、PstS-1、PstS-2、PstS-3、HBHA、GroEL、GroEL2、GrpES、LHP、19kDa脂蛋白、71kDa、RD1-ORF2、RD1-ORF3、RD1-ORF4、RD1-ORF5、RD1-ORF8、RD1-ORF9A、RD1-ORF9B、Rv1984c、Rv0577、Rv1827、BfrB、Tpx、Rv1352、Rv1810、PpiA、Cut2、FbpB、FbpA、FbpC、DnaK、FecB、Ssb、RplL、FixA、FixB、AhpC2、Rv2626c、Rv1211、Mdh、Rv1626、Adk、ClpP、SucD(Belisle等人,2005;US 7,037,510;US 2004/0057963;US 2008/0199493;US 2008/0267990)或上文提到的任一抗原的至少一个抗原性部分或T细胞表位。

[0753] 肝炎抗原

[0754] 多种肝炎抗原已经表征并且适用于本发明中。示例性丙型肝炎抗原包括C-p22、E1-gp35、E2-gp70、NS1-p7、NS2-p23、NS3-p70、NS4A-p8、NS4B-p27、NS5A-p56/58和NS5B-p68,并且连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位各自(无论是单独或是组合)适于用于本发明中。构思了能够激发免疫反应的全部肝炎抗原,无论目前是否表征。

[0755] 流感抗原

[0756] 多种流感抗原已经表征并且适用于本发明中。适用于本发明中的示例性流感抗原包括PB、PB2、PA、血凝素(HA)蛋白或神经氨酸酶(NA)、NP、M和NS中任一者,并且连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位各自(无论是单独或是组合)适于用于本发明中。构思了能够激发免疫反应的全部流感抗原,无论目前是否表征。

[0757] 炭疽抗原

[0758] 已经鉴定多种炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*) 抗原作为疫苗开发的候选者并且它们可用于本发明中。例如, PA83是这样一种用于疫苗开发的抗原。目前, FDA许可的仅一种炭疽疫苗可用, 称作“吸附型炭疽疫苗”(AVA) 或 **BioThrax®**。这种疫苗衍生自吸附于铝佐剂的炭疽芽孢杆菌无荚膜菌株无细胞上清液。PA是AVA中的主要免疫原。适用于本发明中的其他示例性炭疽抗原包括保护性抗原 (PA或PA63)、LF和EF (蛋白质)、聚- γ -(D-谷氨酸) 荚膜盒、孢子抗原 (内生孢子特定组分)、Bc1A (外生孢子特异性蛋白)、BxpB (孢子相关蛋白) 和分泌型蛋白。构思了能够激发免疫反应的全部炭疽抗原, 连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位, 无论现在是否表征。

[0759] 土拉热抗原

[0760] 已经鉴定多种土拉热弗朗西氏菌 (*F. tularensis*) 抗原作为疫苗开发的候选者并且它们可用于本发明中。例如, AcpA和IglC是适于疫苗开发的抗原。适用于本发明中的其他示例性土拉热抗原包括O-抗原、CPS、外膜蛋白 (例如FopA)、脂蛋白 (例如Tu14)、分泌型蛋白和脂多糖。构思了能够激发免疫反应的全部土拉热抗原, 连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位, 无论现在是否表征。

[0761] 布氏杆菌病抗原

[0762] 已经鉴定多种流产布鲁氏杆菌 (*B. abortus*) 抗原作为疫苗开发的候选者并且它们可用于本发明中。例如, Omp16是这样一种用于疫苗开发的抗原。适用于本发明中的其他示例性布氏杆菌病抗原包括O-抗原、脂多糖、外膜蛋白 (例如Omp16)、分泌型蛋白、核糖体蛋白 (例如L7和L12)、细菌铁蛋白、p39 (推定性周质结合蛋白)、groEL (热休克蛋白)、二氧四氢蝶呤合酶、BCSP31表面蛋白、PAL16.50M脂蛋白、过氧化氢酶、26kDa周质蛋白、31kDa Omp31、28kDa Omp、25kDa Omp、和10kDa Om脂蛋白。构思了能够激发免疫反应的全部布氏杆菌病抗原, 连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位, 无论现在是否表征。

[0763] 脑膜炎抗原

[0764] 已经鉴定多种脑膜炎奈瑟菌 (*N. meningitidis*) 抗原作为疫苗开发的候选者并且它们可用于本发明中。例如, Cys6、PorA、PorB、FetA和ZnuD是适于疫苗开发的抗原。适用于本发明中的其他示例性脑膜炎抗原包括O-抗原、因子H结合蛋白 (fHbp)、TbpB、NspA、NadA、外膜蛋白、B组CPS、分泌型蛋白和脂多糖。构思了能够激发免疫反应的全部脑膜炎抗原, 连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位, 无论现在是否表征。

[0765] 登革热抗原

[0766] 已经鉴定多种黄病毒抗原作为疫苗开发的候选者以治疗登革热并且它们可用于本发明中。例如, 登革病毒包膜蛋白E1-E4和膜蛋白M1-M4是适于疫苗开发的抗原。适用于本发明中的其他示例性登革热抗原包括C, preM、1、2A、2B、3、4A、4B和5。构思了能够激发免疫反应的全部登革热抗原, 连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位, 无论现在是否表征。

[0767] 埃博拉抗原

[0768] 已经鉴定多种埃博拉病毒抗原作为疫苗开发的候选者以治疗埃博拉感染并且它们可用于本发明中。例如, 丝状病毒科 (*Filoviridae*) 扎伊尔埃博拉病毒和苏丹埃博拉病毒粒纤突糖蛋白前体抗原ZEBOV-GP和SEBOV-GP分别适于疫苗开发。适用于本发明中的其他示

例性埃博拉抗原包括NP、vp35、vp40、GP、vp30、vp24和L。构思了能够激发免疫反应的全部埃博拉抗原,连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位,无论现在是否表征。

[0769] 西尼罗河抗原

[0770] 已经鉴定多种西尼罗河病毒抗原作为疫苗开发的候选者以治疗感染并且它们可用于本发明中。例如,来自西尼罗河病毒(WNV)的黄病毒包膜抗原(E)是在WNV病毒粒(WNVE)表面上表达的无毒蛋白并且适于疫苗开发。适用于本发明中的其他示例性WNV抗原包括Cp、Prm、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5。

[0771] 构思了能够激发免疫反应的全部西尼罗河抗原,连同衍生自其中的一个或多个抗原性部分或表位,无论现在是否表征。

[0772] 上文所列或提到的抗原是本发明的示例性,而不限制本发明。

[0773] 本发明还涉及药物组合物,所述药物组合物包含有效量的本发明肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物和可药用载体。

[0774] 本发明涉及一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的本发明肽或其可药用盐或溶剂化物和可药用载体。

[0775] 该药物组合物可以包含有效量的两种或更多种本发明肽、两种或更多种本发明肽缀合物或多于一种本发明多肽和一种或多种组合的本发明肽缀合物。

[0776] 术语“可药用载体”指可以与本发明的肽或肽缀合物或其可药用盐或溶剂化物和可药用载体一起施用至受试者的载体(佐剂或载体)。

[0777] 可以在组合物中使用的可药用载体的包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、自乳化药物递送系统(SEDSS)如d- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯、药物剂型中所用的表面活性剂如Tweens或其他相似的聚合物递送基质、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、钠羧甲基纤维素、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。环糊精如 α -、 β -和 γ -环糊精或化学改性衍生物如羟烷基环糊精(包括2-和3-羟丙基- β -环糊精)或其他增溶衍生物也可以有利地用来增强递送。油溶液剂或混悬剂还可以含有在配制可药用剂型如乳剂和或混悬剂中常使用的长链醇稀释剂或分散剂或羧甲基纤维素或类似的分散剂。

[0778] 配制组合物以允许通过选择的任何途径施用至受试者,所述途径包括但不限于口服施用或肠胃外(包括局部、皮下、肌内和静脉内)施用。

[0779] 例如,组合物可以用根据预期施用途径和标准药物实践选择的适宜可药用载体(包括赋形剂、稀释剂、辅剂及其组合)配制。例如,组合物可以作为散剂、液体剂、片剂或胶囊剂口服施用或作为膏剂、乳膏剂或洗剂局部施用。如需要,合适的制剂可以含有额外的物质,所述物质包括乳化剂、抗氧化剂、矫味剂或着色剂,并且可以适用于速释、延迟释放、改良释放、缓释、脉释放或控释。

[0780] 可以配制组合物以优化生物利用率、免疫原性或以维持免疫原性范围或治疗范围内的血浆浓度、血液浓度或组织浓度,包含延长的时间。例如,受控的递送制品也可以用来优化作用部位处的抗原浓度。

[0781] 可以配制组合物用于定期施用,例如以提供持续的暴露。激发有益免疫反应的策

略,例如使用一次或多次“强化”接种的那些策略,是本领域熟知的并且可以采取这类策略。

[0782] 组合物可以通过肠胃外途径施用。胃肠外剂型的例子包含活性物质的水溶液、等渗盐水或5%葡萄糖或其他熟知可药用赋形剂。例如,可以利用本领域技术人员熟知的环糊精或其他增溶剂作药物赋形剂用于递送治疗剂。

[0783] 适于口服施用的剂型的例子包括但不限于能够提供治疗有效量的组合物的片剂、胶囊、锭剂等形式或任何液体形式如糖浆剂、水溶液剂、乳剂等。胶囊剂可以含有任何标准可药用物质如明胶或纤维素。可以根据常规方法,通过压制有效成分与固态载体和润滑剂的混合物,配制片剂。固态载体的例子包含淀粉和糖膨润土。有效成分也可以按照含有粘合剂(例如,乳糖或甘露醇)、常规填料和造片剂的硬壳片剂和胶囊剂形式施用。

[0784] 适于透皮施用的剂型的例子包括但不限于透皮贴剂、透皮绷带等。

[0785] 适于局部施用所述组合物的剂型的例子包括任何洗剂、棒剂、喷雾剂、油膏剂、糊膏、乳膏剂、凝胶等,无论是否直接施加至皮肤或通过中介物如垫、贴片等施加至皮肤。

[0786] 适于栓剂施用所述组合物的剂型的例子包括插入体孔的任何固体剂型,尤其直肠、阴道和尿道插入的那些。

[0787] 适于注射所述组合物的剂型的例子包括借助推注(如通过静脉内注射单次或多次施用)、皮下、真皮下和肌内施用或口服施用递送。

[0788] 适于储库施用所述组合物的剂型的例子包括肽或肽缀合物的丸粒剂或这样的固体形式,其中肽或肽缀合物截留于生物可降解聚合物基质、微乳剂、脂质体中或微囊化。

[0789] 用于组合物的输注装置的例子包括提供所需剂量数或稳态施用的输注泵,并且包括植入式药物泵。

[0790] 用于组合物的植入式输注装置的例子包括任何固态形式,其中肽或肽缀合物包封于生物可降解聚合物或合成聚合物如硅氧烷、硅橡胶、硅橡胶或相似聚合物内部或分散遍及其各处。

[0791] 适于粘膜递送所述组合物的剂型的例子包括灌肠用贮藏式溶液剂(depositories solution)、阴道栓剂、塞,乳膏剂剂、凝胶剂、糊膏剂、泡沫剂、雾化溶液剂、散剂和除有效成分之外含有如本领域已知适宜的这类载体的相似制剂。这类剂型包括适于吸入或吹入组合物的形式,包括在可药用、水质或有机溶剂或其混合物中包含溶液和/或悬液和/或粉末的组合物。透黏膜施用组合物可以利用任何粘膜,但是常利用鼻、颊、阴道和直肠组织。适于经鼻施用所述组合物的制剂可以按液态形式(例如,鼻喷雾剂、滴鼻剂)施用或用雾化器通过气溶胶施用,所述气溶胶包含聚合物颗粒的水溶液或油溶液。可以使用苯醇或其他合适防腐剂、提高生物利用率的吸收促进剂、氟烃和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂,将制剂制备为水溶液,例如在盐水溶液中。

[0792] 适于颊部或舌下施用所述组合物的剂型的例子包括糖锭剂、片剂等。适于适于眼科施用所述组合物的剂型的例子包括插入物和/或在可药用的水质或有机溶剂或其混合物中包含溶液和/或悬液和/或粉末的组合物。

[0793] 组合物制剂(包括疫苗)的例子可以在例如以下文献中找到Sweetman, S.C. (编著) Martindale. The Complete Drug Reference, 第33版, Pharmaceutical Press, Chicago, 2002, 第2483页; Aulton, M.E. (Ed.) Pharmaceuticals. The Science of Dosage Form Design. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000, 第734页以及Ansel, H.C., Allen, L.V.

和Popovich,N.G.Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippincott 1999,第676页。本领域技术人员已知的多种出版物中描述了制造物递送系统时使用的赋形剂,所述出版物例如包括Kibbe,E.H.Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,American Pharmaceutical Association,Washington,2000,第665页。USP还提供的例子改良释放口服剂型,包括作为片剂或胶囊剂配制的那些。参见,例如,美国药典23/国家处方集18,美国药典委员会Inc.,Rockville MD,1995(下文“USP”),该文献还描述了确定延长释放型和延迟释放型片剂和胶囊的药物释放能力的具体试验。用于延长释放型制品和延迟释放型制品的药物释放的USP试验以来自剂量单位的药物溶出度对流逝试验时间为基础。可以在USP中找到对各种试验装置和程序的描述。关于分析延长释放剂型的其他指南已由F.D.A提供。(参见Guidance for Industry.Extended release oral dosage forms:development,evaluation,and application of in vitro/in vivo correlations.Rockville,MD:药物评价与研究中心,美国食品药品监督管理局,1997年)。

[0794] 尽管组合物可以包含一种或多种外来佐剂,但是在一些实施方案中,这有利地并非必需。在一些实施方案中,肽缀合物包含表位并具有自我辅佐性。

[0795] 本发明提供一种在受试者中接种或激发免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明肽缀合物或肽。本发明还涉及本发明肽缀合物或肽在受试者中接种或激发免疫反应中的用途,并涉及本发明肽缀合物或肽在制造用于受试者中接种或激发免疫反应的药物中的用途。

[0796] 本发明还提供一种在受试者中接种或激发免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明药物组合物。本发明还涉及本发明的药物组合物在受试者中接种或激发免疫反应中的用途,并涉及一个或多个本发明肽或一种或多种本发明肽缀合物在制造用于受试者中接种或激发免疫反应的药物中的用途。

[0797] 本发明提供一种在受试者中激发免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明肽。本发明还涉及本发明缀合物激发免疫反应的用途,并涉及本发明肽缀合物在制造用于受试者中激发免疫反应的药物中的用途。

[0798] 本发明提供一种接种受试者的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明肽。本发明还涉及本发明缀合物激发免疫反应的用途,并涉及本发明肽缀合物在制造用于受试者中激发免疫反应的药物中的用途。

[0799] 本文中构思了施用或使用一种或多种本发明肽和/或一种或多种本发明肽缀合物,例如与一种或多种肽缀合物结合的一种或多种肽,用于受试者中接种或激发免疫反应。

[0800] 在施用或使用两种或更多种肽、两种或更多种肽缀合物或一种或多种肽和一种或多种肽缀合物情况下,两种或更多种肽、两种或更多种肽缀合物或一种或多种肽和一种或多种肽缀合物可以同时、依次或分别施用或使用。

[0801] “受试者”指作为哺乳动物例如人类的脊椎动物。哺乳动物包括但不限于人类、家畜、竞赛动物、宠物、灵长类、小鼠和大鼠。

[0802] “有效量”是足以实现有益或所需结果(包括临床结果)的量。有效量可以通过各种施用途径在一次或多次施用中施用。

[0803] 连同其他因素,有效量将根据适用的疾病、疾病严重程度、受试者年龄和相对健康、施用的化合物的效力、施用模式和想要的治疗变动。考虑这类其他有关因素的任一者,

本领域技术人员将能够确定适宜的剂量。

[0804] 可以在体外和在体内评价组合物的效力。例如,可以在体外和在体内测试组合物诱导细胞介导的免疫反应的能力。对于体内研究,组合物可以饲喂至或注入动物(例如,小鼠)并随后评估其对激发免疫反应的影响。基于这些结果,可以确定适宜的剂量范围和施用途径。

[0805] 组合物可以根据单剂量或多剂量方案施用。多剂量可以用于初次免疫接种方案和/或用于强化免疫接种方案。

[0806] 在某些实施方案中,激发免疫反应包括升高或增强免疫反应。在示例性实施方案中,激发免疫反应包括激发体液反应和细胞介导的反应。

[0807] 在某些实施方案中,激发免疫反应提供免疫力。

[0808] 激发免疫反应以治疗疾病或病状。本领域技术人员将理解,本文所述的肽和肽缀合物可用于治疗多种疾病和病状,这例如取决于表位的性质。

[0809] 在一些实施方案中,疾病或病状选自与本文所述的各种抗原相关的那些。

[0810] 在一些实施方案中,感染性疾病、癌症或病骨髓移植后或出于任何其他原因诱导重度免疫抑制之后病毒再激活。

[0811] 如本文所用,术语“治疗”和相关术语如“正在治疗”和“治疗”一般地指治疗其中实现某种所需治疗效果的人或非人类受试者。治疗效果可以例如抑制、减少、改善、停顿或预防疾病或病状。

[0812] 组合物可以用来激发全身性和/或粘膜免疫力。增强的全身性和/或粘膜免疫力可以反映为增强的Th1和/或Th2免疫反应。增强的免疫反应可以包括IgG1和/或IgG2a和/或IgA的产生增加。

实施例

[0813] 实施例1. 缀合物200、20、22和26的制备

[0814] 1.1一般详述

[0815] 市售起始物料购自Acros Organics、Ajax Finechem、Alfa Aesar、CEM、GL-Biochem、Merck、NOVA Biochem、Sigma Aldrich和TCI并且如供应那样使用。通过在N₂或氩气氛下蒸馏,制备无水溶剂。在钠/二苯甲酮上新鲜蒸馏四氢呋喃(THF)。在氯化钙上新鲜蒸馏甲醇(MeOH)和甲苯。除非另外声明,否则产率指色谱上和光谱上(¹H NMR)均一的材料。

[0816] 在Merck Kieselgel F₂₅₄ 200 μ m二氧化硅板上进行薄层色谱(TLC)。使用紫外光作为可视化剂并且使用碱性水溶液中的高锰酸钾和乙醇溶液中的香草醛作为通用显影剂。所用的特定显影剂是用于鉴定伯胺的含酸的茚三酮乙醇溶液。当使用任何显影剂时,进行加热。硅胶(0.063-0.100mm)用于快速柱色谱。

[0817] 在室温在Bruker DRX400谱仪上在CDCl₃或D₂O中获得核磁共振(NMR)谱,所述谱仪在用于¹H核的400MHz和在用于¹³C核的100MHz运行。在D₂O中对于CDCl₃,¹H谱和¹³C谱的参比峰分别设定至 δ 0.00和 δ 77.0,并且对于¹H谱,设定至 δ 4.79。NMR数据按化学位移值报告为 δ 标尺上的每百万份(ppm),并且耦合常数以赫兹(Hz)报告。多重性报告为s=单峰,d=二重峰,t=三重峰,q=四重峰,dd=二重峰的二重峰,dt=三重峰的二重峰,tt=三重峰的三重峰,dq=四重峰的二重峰,dqn=五重峰的二重峰,sx=六重峰,br s=宽阔单峰,并且m=多重

峰。 C_q 的归属用来指季碳。

[0818] 在Bruker microOTOF-Q II质谱仪上以标称分辨率5000获得高分辨质谱。在Dionex UltiMate 3000HPLC系统加Finnigan Surveyor MSQ Plus质谱仪或Agilent 1120Compact LC系统加Hewlett Packard Series1100MSD质谱仪上获得分析性高效液相色谱(HPLC)色谱图和液相色谱-质谱(LC-MS)色谱图。使用MeCN/H₂O+0.1%TFA溶剂体系,进行分析性反相(RP)HPLC。使用MeCN/H₂O+0.1%TFA溶剂体系,在Dionex UltiMate 3000HPLC系统上进行半制备性RP HPLC。使用CEM Liberty自动化微波系统进行微波反应。

[0819] 1.2用于延伸肽链的一般方法

[0820] 手工合成方法

[0821] 将溶胀的肽-树脂在室温用20%v/v哌啶在DMF(5.0mL)中处理并振摇20分钟。排干溶液并将树脂用DMF(x 2)和DCM(x 2)洗涤。添加Fmoc-AA-OH(2.0当量)、HBTU(2.0当量)和iPr₂NEt(4.0当量)在DMF(1mL)中的偶联混合物并且将树脂振摇1小时。将树脂排干并再次洗涤。对于序列中的其余残基,重复该程序。

[0822] 自动化合成方法(标准,0.2mmol规模)

[0823] 将肽-树脂转移至Tribute自动化肽合成仪的反应容器。以Fmoc脱保护和Fmoc-AA-OH偶联步骤的循环进行自动化合成。通过添加DMF(6.0mL)中的20%v/v哌啶并搅拌(2x 7分钟),进行脱保护。在树脂排干和DMF洗涤(4mL x 3)之后,偶联步骤用5当量溶解于HBTU(DMF中0.24mM,4mL)中的Fmoc-AA-OH进行。加碱步骤中使用DMF(4mL)中的2M N-甲基吗啉(NMM)。偶联推进1小时。在DMF洗涤步骤后,下一个脱保护和偶联循环开始,重复直至偶联全部氨基酸。

[0824] 偶联半胱氨酸衍生物的程序(0.1mmol规模)

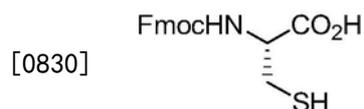
[0825] 将肽-树脂在1:1CH₂Cl₂:DMF中溶胀30分钟,随后排干。将Cys氨基酸(0.2mmol,2当量)、BOP(0.4mmol,4当量)和HOBt·H₂O(0.4mmol,4当量)的偶联混合物溶解于1:1CH₂Cl₂:DMF(2mL)中。随后添加2,4,6-三甲基吡啶(0.4mmol,4当量)并将所得到的溶液添加至肽-树脂。将树脂搅拌1小时,或直至茚三酮试验指示无游离胺。随后将树脂排干,用DMF(2x)和CH₂Cl₂(2x)洗涤,并干燥。

[0826] 茚三酮检验程序

[0827] 取出少部分树脂,用CH₂Cl₂洗涤并允许干燥。将EtOH中5%v/v茚三酮溶液、EtOH中80%w/v苯酚溶液和吡啶中2%v/v KCN溶液各1滴添加至树脂并将混合物在90℃加热2分钟。蓝色着染的珠和溶液表示存在游离伯胺,而黄颜色表示不存在游离氨基。

[0828] 1.3氨基酸缀合物200的制备

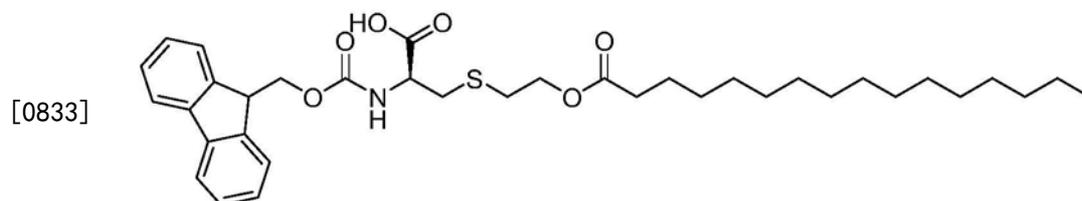
[0829] N-苄基甲氧羰基-[R]-半胱氨酸



[0831] 将Fmoc-Cys(Trt)-OH(1.0g,1.7mmol)溶解于CH₂Cl₂(50mL)中。添加TFA(1.5mL,19.6mmol)和iPr₃SiH(0.75mL),造成溶液变黄。将溶液在室温搅拌2小时,此时溶液已经变成无色。通过添加Na₂CO₃·H₂O,将混合物碱化至pH9并用EtOAc洗涤。将溶液用10M HCl酸化,用EtOAc提取并在真空下浓缩以产生白色粉末和粉红色残留物。将粉末和残留物溶解于4:

1MeCN:H₂O中并冻干,产生粗制粉红色-白色粉末(424mg,粗产率73.1%)。使这种粗产物经历下文描述巯基-烯反应。

[0832] (R)-2-(((9H-芴-9-yl)甲氧基)羰基)氨基)-3-((2-(棕榈酰氧)乙基)硫代)丙酸(200)



[0834] 热引发(Li, J. Dong, S. 等人, Chemistry as an Expanding Resource in Protein Science: Fully Synthetic and Fully Active Human Parathyroid Hormone-Related Protein(1-141). Angewandte Chemie International Edition 2012, 51(49), 12263-12267)。

[0835] 将Fmoc-Cys-OH(100mg, 0.29mmol)、棕榈酸乙烯酯(476μL, 1.5mmol)和AIBN(9.6mg, 59μmol)溶解于脱气的1,2-二氯乙烷(3mL)中。随后将反应混合物在回流下(90°C)加热24小时,此后TLC显示Fmoc-Cys-OH耗尽。随后使溶液冷却至室温。在降低的压力下除去溶剂。过质谱法证实粗制反应混合物中存在所需的产物200。

[0836] MS(ESI⁻):对于C₃₆H₅₁N₆O₆S⁻[M-H]⁻-m/z计算值:625.96,测定值626.0

[0837] 光引发

[0838] 将Fmoc-Cys-OH(100mg, 0.29mmol)溶解于脱气的无水DMF(500μL)中。将棕榈酸乙烯酯(90μL, 0.3mmol)和DMPA(5.0mg, 20μmol)溶解于脱气的CH₂Cl₂(200μL)中。将两个溶液混合并将所得到的混合物在标准光化学装置中照射6小时(365nm UV)。当通过TLC未观察到反应混合物中的进一步变化时,在降低的压力下移除溶剂。将粗产物通过硅胶快速色谱纯化(3:1EtOAc:正己烷+2%AcOH),随后从1:1H₂O:MeCN+0.1%TFA冻干,以提供标题化合物作为粉状白色固体(24mg, 13%)。通过质谱法证实所需产物200的结构。

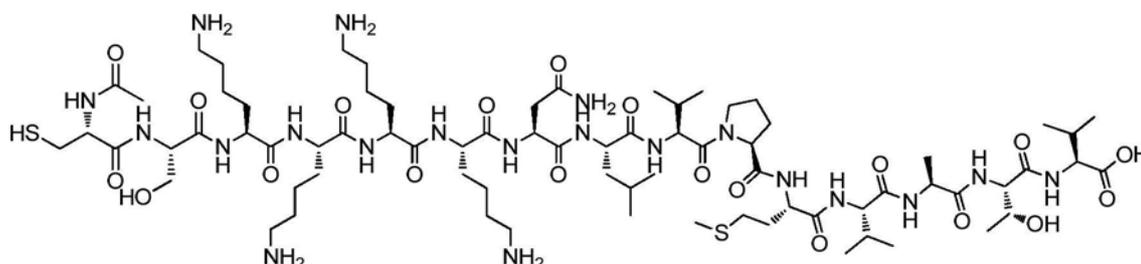
[0839] MS(ESI⁻):对于C₃₆H₅₁N₆O₆S⁻[M-H]⁻-m/z计算值:625.96,测定值626.0

[0840] 1.4肽缀合物20、22和26的制备

[0841] 肽

[0842] AcN-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Asn-Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val-OH 25

[0843]



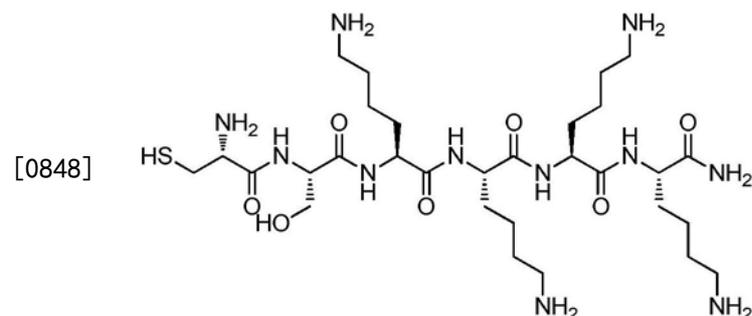
[0844] 向预溶胀于1:1CH₂Cl₂:DMF中的氨基甲基聚苯乙烯(PS)树脂(0.20g, 1.0mmol/g载量, 0.2mmol规模)添加Fmoc-L-Val-O-CH₂-phi-OCH₂-CH₂-COOH(155.2mg, 0.3mmol)、HBTU(113.8mg, 0.3mmol)和iPr₂NEt(104μL, 0.6mmol)在DMF(3mL)中的偶联混合物。将树脂在室温振摇2小时,此后茚三酮试验显示完全偶联。随后通过在室温用DMF(5mL)中的20%v/v哌

啉处理树脂20分钟,将Fmoc-Val氨基脱保护。将树脂转移至Tribute自动化肽合成仪。使用通用自动化偶联法进行链延伸直至并包含Ser残基。通过添加Fmoc-Cys(Trt)-OH(235mg, 0.4mmol)、BOP(360mg, 0.8mmol)、HOBt·H₂O(120mg, 0.8mmol)和2,4,6-三甲基吡啶(120μL, 0.8mmol)在1:1CH₂Cl₂:DMF(2mL)中的混合物,手工进行Fmoc-Cys(Trt)-OH残基的偶联。将树脂在室温振摇1小时,此后茚三酮试验显示完全偶联。随后通过在室温用DMF(5mL)中的20% v/v哌啉处理树脂20分钟,完成Fmoc最终脱保护。

[0845] 在Fmoc脱保护后,通过向树脂添加DMF(3mL)中的乙酸酐(50μL)和*i*Pr₂NEt(50μL),进行N-乙酰化。随后将树脂在室温振摇30分钟,此后茚三酮试验显示没有剩余的游离胺。将树脂排干,用DMF和CH₂Cl₂洗涤并晾干。将切割混合物TFA:H₂O:DODT:*i*Pr₃SiH(94:2.5:2.5:1% v/v, 10.0mL)添加至干树脂并且将混合物在室温振摇4小时。随后将切割混合物用冷的二乙醚处理以沉淀粗制肽,将所述粗制肽以4000转/分钟离心5分钟。抛弃上清液并将沉淀物用二乙醚洗涤,之后重复离心步骤。随后弃去醚相并将肽用N₂气流干燥。随后从H₂O+0.1% TFA冻干粗制肽。使粗产物经历下文略述的巯基-烯反应步骤。

[0846] MS(ESI⁺):对于C₇₄H₁₃₄N₂₀O₂₀S₂⁺[M+H]⁺m/z计算值:1688.11,测定值1688.8

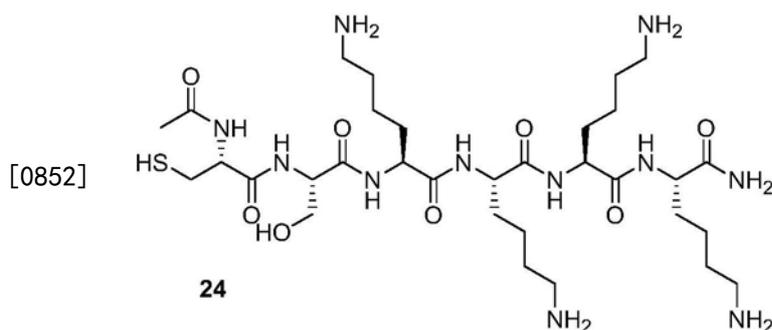
[0847] Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂



[0849] 向预溶胀于1:1CH₂Cl₂:DMF中的氨基甲基聚苯乙烯(PS)树脂(0.20g, 1.0mmol/g载量, 0.2mmol规模)添加Fmoc-Rink-酰胺-OH(216mg, 0.4mmol)、HBTU(151.8mg, 0.4mmol)和*i*Pr₂NEt(140μL, 0.8mmol)在DMF(2mL)中的偶联混合物。将树脂在室温振摇1小时,此后茚三酮试验显示完全偶联。随后通过在室温用DMF(5mL)中的20% v/v哌啉处理树脂20分钟,将接头氨基脱保护。将树脂转移至Tribute自动化肽合成仪。使用通用自动化偶联法进行链延伸直至并包含Ser残基。通过添加Fmoc-Cys(Trt)-OH(235mg, 0.4mmol)、BOP(360mg, 0.8mmol)、HOBt·H₂O(120mg, 0.8mmol)和2,4,6-三甲基吡啶(120μL, 0.8mmol)在1:1CH₂Cl₂:DMF(2mL)中的混合物,手工进行Cys残基的偶联。将树脂在室温振摇1小时,此后茚三酮试验显示完全偶联。随后通过在室温用DMF(5mL)中的20% v/v哌啉处理树脂20分钟,完成Fmoc最终脱保护。将树脂排干,用DMF和CH₂Cl₂洗涤并晾干。将切割混合物TFA:H₂O:DODT:*i*Pr₃SiH(94:2.5:2.5:1% v/v, 10.0mL)添加至干树脂并且将混合物在室温振摇2小时。随后将切割混合物用冷的二乙醚处理以沉淀粗制肽,将所述粗制肽以4000转/分钟离心5分钟。抛弃上清液并将沉淀物用二乙醚洗涤,之后重复离心步骤。随后弃去醚相并将肽用N₂气流干燥。随后从H₂O+0.1% TFA冻干粗制肽。使粗产物经历下文略述的巯基-烯反应步骤。

[0850] MS(ESI⁺):对于C₃₀H₆₁N₁₁O₇S⁺[M+H]⁺m/z计算值:719.94,测定值720.0

[0851] Ac-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ 24



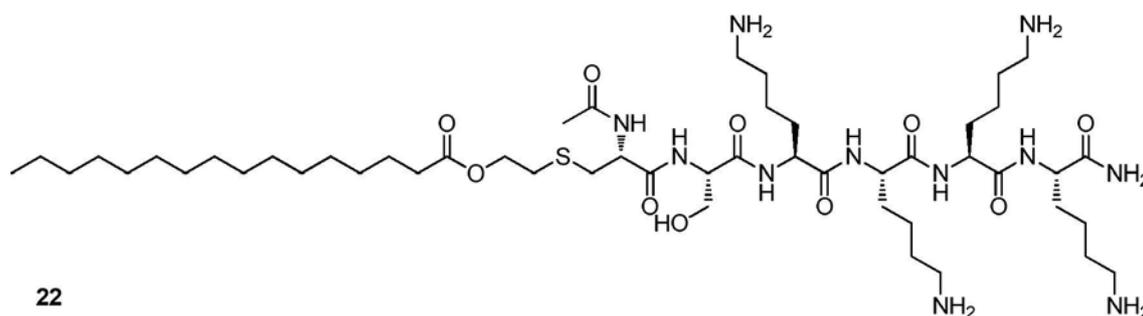
[0853] 向预溶胀于1:1CH₂Cl₂:DMF中的氨基甲基聚苯乙烯(PS)树脂(0.20g,1.0mmol/g载量,0.2mmol规模)添加Fmoc-Rink-酰胺-OH(216mg,0.4mmol)、HBTU(151.8mg,0.4mmol)和*i*Pr₂NEt(140μL,0.8mmol)在DMF(2mL)中的偶联混合物。将树脂在室温振摇1小时,此后茚三酮试验显示完全偶联。随后通过在室温用DMF(5mL)中的20%v/v哌啶处理树脂20分钟,将接头氨基脱保护。将树脂转移至Tribute自动化肽合成仪。使用通用自动化偶联法进行链延伸直至并包含Ser(Trt)残基。通过添加Fmoc-Cys(Trt)-OH(235mg,0.4mmol)、BOP(360mg,0.8mmol)、HOBt·H₂O(120mg,0.8mmol)和2,4,6-三甲基吡啶(120μL,0.8mmol)在1:1CH₂Cl₂:DMF(2mL)中的混合物,手工进行Cys残基的偶联。将树脂在室温振摇1小时,此后茚三酮试验显示完全偶联。在Fmoc脱保护后,通过向树脂添加DMF(3mL)中的乙酸酐(50μL)和*i*Pr₂NEt(50μL),进行N-乙酰化。随后将树脂在室温振摇30分钟,此后茚三酮试验显示没有剩余的游离胺。将树脂排干,用DMF和CH₂Cl₂洗涤并晾干。将切割混合物TFA:H₂O:DODT:*i*Pr₃SiH(94:2.5:2.5:1%v/v,10.0mL)添加至干树脂并且将混合物在室温振摇2小时。随后将切割混合物用冷的二乙醚处理以沉淀粗制肽,将所述粗制肽以4000转/分钟离心5分钟。抛弃上清液并将沉淀物用二乙醚洗涤,之后重复离心步骤。随后弃去醚相并将肽用N₂气流干燥。随后从H₂O+0.1%TFA冻干粗制肽。使粗产物经历下文略述的巯基-烯反应步骤。

[0854] MS(ESI⁺):对于C₃₂H₆₃N₁₁O₈S⁺[M+H]⁺_{m/z}计算值:761.98,测定值762.0

[0855] 肽缀合物

[0856] Ac-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ 24和棕榈酸乙烯酯22的巯基-烯反应产物

[0857]

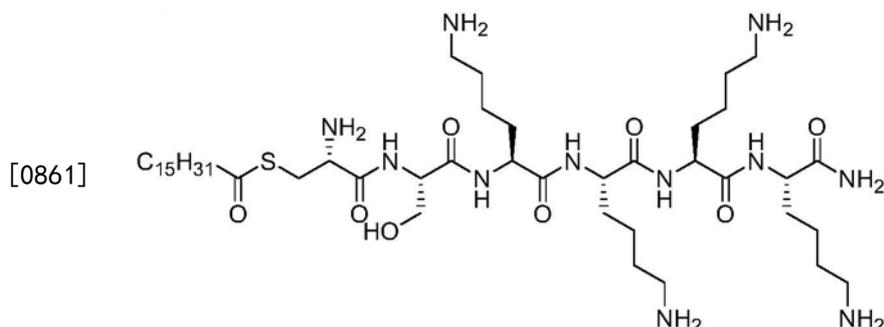


[0858] 向粗制肽24(25mg,32.6μmol)和DMPA(3.3mg,13.1μmol)在NMP(4mL)中的溶液添加棕榈酸乙烯酯(52.9μL,0.16mmol)。将所得到的混合物在搅拌下在365nm于标准UV光化学装置中照射1小时。通过质量分析检测所需的产物22。借助半制备性RP HPLC在运行以下梯度的Phenomenex Gemini C18柱上纯化粗产物22:5-65%MeCN:H₂O+0.1%TFA(每分钟3%MeCN,50℃)。质谱法证实所需产物22(5.1mg,从‘粗制起’14.94%)的结构。

[0859] R_t=11.50分钟,在使用5-95%MeCN:H₂O+0.1%TFA,每分钟3%MeCN梯度的

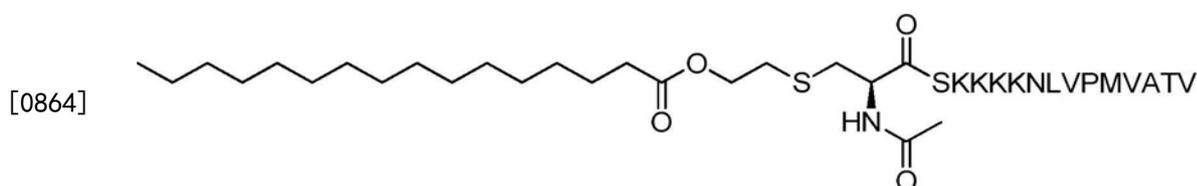
Phenomenex Gemini C18 3 μ **110Å** 2.0x 50mm柱上;MS (ESI+):对于C₅₀H₉₇N₁₁O₁₀S⁺[M+H]⁺m/z
计算值:1044.4,测定值1044.9

[0860] Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂和棕榈酸乙烯酯20的巯基-烯反应产物



[0862] Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂与5当量棕榈酸乙烯酯、NMP中的0.4当量DMPA在365nm照射1小时的巯基-烯反应粗制产生通过MS分析证实的所需产物20 (Pam-CSK₄)。

[0863] Ac-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Asn-Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val-O H 25和棕榈酸乙烯酯26的巯基-烯反应产物



[0865] 向粗制肽25 (20mg, 11.9 μ mol) 和DMPA (1.2mg, 4.74 μ mol) 在NMP (3mL) 中的溶液添加棕榈酸乙烯酯 (19.2 μ L, 59.3 μ mol)。将所得到的混合物在搅拌下在365nm于标准光化学装置中照射1小时。通过质量分析检测所需的产物26。借助半制备性RP HPLC在运行以下梯度的Phenomenex Gemini C18柱上纯化粗产物26:5-65%MeCN:H₂O+0.1%TFA (每分钟3%MeCN, 50 $^{\circ}$ C)。质谱法证实所需产物26和氧化的Met (O) 副产物 (1.67mg, 从‘粗制起’ 7.15%-包含Met (O) 产物) 的结构。

[0866] R_t = 11.90分钟, 在使用5-95% MeCN:H₂O+0.1%TFA, 每分钟3% MeCN梯度的Phenomenex Gemini C18 3 μ **110Å** 2.0x 50mm柱上;MS (ESI+):对于C₉₂H₁₆₈N₂₀O₂S₂²⁺[M+2H]²⁺
m/z计算值:985.1,测定值:993.6 (Met (O))

[0867] 1.5肽上巯基-烯反应的一般方法

[0868] 向粗制或纯化的肽 (10mM)、DTT (30mM) 和DMPA (4mM) 在DMSO中的溶液添加棕榈酸乙烯酯 (50mM)。将所得到的混合物在搅拌下在365nm于标准UV光化学装置中照射15分钟。通过ESI质量分析检测所需的产物。为了实现完全转化,有时需要进一步添加DMPA光引发剂。借助半制备性RP HPLC在运行以下梯度的Phenomenex Gemini C18柱上纯化粗产物:1-65% MeCN:H₂O+0.1%TFA (每分钟3%MeCN)。冻干汇集的级分以提供作为白色粉末的纯产物。

[0869] 1.6讨论

[0870] 使用5当量烯和0.2当量AIBN作为自由基引发剂在1,2-二氯乙烷中实施Fmoc-Cys-OH与棕榈酸乙烯酯的热反应。

[0871] 该反应在回流 (90 $^{\circ}$ C) 下进行24小时。微波加热 (100W, 1小时) 产生相同结果。通过TLC检测所需的产物。还形成多种副产物。

[0872] 用1当量棕榈酸乙烯酯和0.2当量DMPA作为光引发剂实施反应的光起始。在标准光化学仪中用365nm紫外线照射1小时在脱气的DMF:DCM溶剂混合物中实施反应。通过TLC观察Fmoc-Cys-OH几乎完全转化。形成最小的副产物。纯化过程以约15%产率提供产物200。在纯化后,使用2当量棕榈酸乙烯酯以44%产率提供200。

[0873] 使用NAc-CSK₄实施巯基-烯反应。所要求的肽基序24如上文所述合成。在Rink-酰胺接头与氨基甲基树脂接合后,使用自动化Fmoc-SPPS(标准偶联条件)建立SK₄序列。随后使用减少差向异构化的条件手工地偶联Fmoc-Cys(Trt)-OH。随后实施N-乙酰化。

[0874] 质量分析显示从树脂切下肽时,出现副产物形成,原因在于半胱氨酸的叔丁基化(+56)。使用Fmoc-Ser(Trt)-OH而非Fmoc-Ser(t-Bu)-OH重复合成NAc-CSK₄导致了不含半胱氨酸烷基化产物的产物。将肽切下并且随后冻干。

[0875] 随后实施粗制肽24与棕榈酸乙烯酯的巯基-烯反应。N-甲基吡咯烷酮(NMP)有效地使亲水性CSK₄肽和疏水性棕榈酸乙烯酯分子均溶剂化。

[0876] 使用过量的棕榈酸乙烯酯(至多20当量),利用AIBN和微波加热,对粗制肽和纯化肽实施热引发。反应的光引发提供更好的结果。使用粗制肽连同DMPA作为光引发剂,照射1小时后,反应推进至完成(5当量棕榈酸乙烯酯,2mL NMP中0.4当量DMPA)。通过MS证实所需的产物(>90%转化率,通过HPLC测定纯度为60%)。

[0877] 有利地,在巯基-烯偶联之前不要求切割后纯化。RP-HPLC纯化一般低效,>50%材料损耗率常见。通常,在可能情况下减少需要的HPLC纯化步骤数它是有利。

[0878] 使用运行以下梯度的Phenomenex C18柱,通过半制备性RP-HPLC实现N-乙酰化单酰基脂肽22的纯化:5-95%MeCN:H₂O+0.1%TFA,每分钟3%MeCN。随后冻干纯化的肽以提供作为白色粉末的所需产物(5.1mg,从粗制肽起14.9%)。相对低的产率可能归因于巯基-烯反应中副产物形成。

[0879] 增加肽浓度至25mM导致副产物形成小幅下降(>90%转化率,通过HPLC确定纯度为80%)。降低浓度至5mM具有相反的作用。

[0880] 在NMP:H₂O:DMSO(4:2:1)的混合物中在谷胱甘肽(GSH)(3当量)存在下肽浓度为5mM时实施该反应,产生混合型二硫化物形成(50%转化率,通过HPLC确定纯度为75%)。在NMP中肽浓度为5mM时使用2,2'-(乙二基双氧代)双乙硫醇(DODT)(3当量)导致复杂的产物混合物(通过HPLC确定转化率为80%)。

[0881] 有利地,当添加3当量DTT至反应混合物(NMP中的10mM肽)时,未观察到因棕榈酸乙烯酯调聚反应或混合型二硫化物产生的副产物,并且反应以高转化率推进(>90%转化率,通过HPLC确定纯度为85%)。使用DTT时,还可能在DMSO(一种良性和更通用的溶剂)中实施该反应(25mM肽)(90%转化率,通过HPLC确定纯度为>95%)。

[0882] 还使用非乙酰化的类似物CSK₄实施巯基-烯反应。使用上文描述的程序,实施CSK₄基序的合成。随后将肽从树脂切下并冻干。使用5当量棕榈酸乙烯酯、0.4当量DMPA在NMP中在365nm照射1小时,这种粗产物与棕榈酸乙烯酯的巯基-烯反应平稳推进,以产生通过MS证实的所需产物20(Pam-CSK₄)。

[0883] 还实施了棕榈酸乙烯酯与衍生自巨细胞病毒(CMV)ppUL83蛋白的免疫优势A*0200限制性表位('NLV肽')(Kopycinski, J.等人, Sequence flexibility of the immunodominant HLA A*0201restricted ppUL83CD8T-cell of human

cytomegalovirus. Journal of medical virology 2009, 82 (1) 94-103) 的巯基-烯反应。

[0884] 使用标准条件,通过自动化Fmoc-SPPS建立NLV序列。K₄标签和丝氨酸残基随后与该序列的N末端偶联。随后从合成仪取出肽酰基树脂并且使用标准条件,手工偶联半胱氨酸残基。随后实施N-乙酰化。随后将肽从树脂切下并冻干以按照良好产率产生白色粉末。

[0885] 使用光引发,如对肽20和22所述那样,实施未保护的肽25和棕榈酸乙烯酯的巯基-烯反应。质量分析指示转化成棕榈酰化产物26。使用运行以下梯度的Phenomenex C18柱,通过半制备性RP-HPLC完成纯化:含0.1% TFA的5-95% MeCN:H₂O。随后冻干纯化的肽以提供作为白色粉末的所需产物(7.5%),连同相应的Met (0) 产物(约30%)。

[0886] 遵循上文描述的一般方法,还实施粗制肽25与棕榈酸乙烯酯的巯基-烯反应。ESI-MS和HPLC分析指示良好转化成棕榈酰化产物26(图2a和图2b)。通过半制备性RP-HPLC完成纯化,以产生纯度>95%的所需产物(图2b和图2c)。

[0887] 实施例2. 肽缀合物20、22和26的生物活性

[0888] 2.1流程

[0889] 全血中人单核细胞的活化

[0890] 将100μl肝素化全血(WB)与100nM、1μM和10μM每种化合物一式两份温育,并在37°C在5%CO₂增湿培养箱中温育过夜。使用Pam₃CSK₄(10μM;EMC Microcollections)作为阳性对照。为了检测单核细胞的活化,将WB样品用抗CD14-FITC、抗HLA-DR-Alexa700、抗CD80-PE-Cy7、抗CD40-PE、抗CD86-APC、抗CD16-APC-Cy7(均来自Biolegend)在室温避光保护下染色20分钟。在温育后,添加2ml BD FACS裂解液(BD Biosciences),在室温温育15分钟,随后用冰冷的洗涤缓冲液(PBS,1%人血清)洗涤两次。在BD FACS Aria II(Becton Dickinson)上进行数据采集并使用FlowJo软件第7.6.5版(TreeStar)分析。通过对CD14+HLADR+细胞设门,检测单核细胞上的CD80受体表达。

[0891] 2.2讨论

[0892] 通过流式细胞术,评估脂肽20、22和26的生物活性以测量新鲜血液样品中人单核细胞上的共刺激分子CD80上调(图1)。

[0893] 市售Pam3CSK₄(10μM)充当阳性对照,通过特征性细胞表面标记物以及暴露于三种剂量的每种化合物之前和之后所测定的CD80表达,鉴定到5份供体样品中的单核细胞。

[0894] 22和26在测试的全部剂量均强烈上调CD80的表达,在大部分供体中在10μM剂量显示与Pam3CSK₄等同的效力。

[0895] 在三位供体中,20显示比22和26更低的效力,与改善人细胞中TLR2激动作用效力的半胱氨酸氨基乙酰化相符。26的效力表明抗原性肽的缀合不影响TLR2激动作用。

[0896] 实施例3. 缀合物200、120、121、110-112、112A和113-116的制备

[0897] 3.1一般详述

[0898] 保护的氨基酸和偶联试剂购自GL-Biochem(上海)。固相支持的合成中所用的树脂是来自Rapp Polymere GmbH(Tuebingen)的预装tentagel树脂并且其他溶剂和试剂从Sigma(St Louis, Mo)和Novabiochem获得。

[0899] 在Tribute肽合成仪(Protein Technologies International, Tucson, AZ)上,使用标准的迭代Fmoc固相肽合成技术实施下文描述的肽合成。使用两次在DMF中(4mL x 5分钟)的20%哌啶处理,随后用DMF洗涤树脂,按0.1mmol规模实施的典型脱保护和偶联循环能

够从树脂结合型氨基酸移除Fmoc保护基。在独立容器中,将Fmoc氨基酸(0.5mmol)和偶联剂(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-]三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU),0.45mmol)溶解于DMF(1.5mL)中并且添加碱(4-甲基吗啉,1mmol)。在混合1分钟后,将这种溶液转移至树脂,随后将所树脂在室温搅拌1小时,排干并洗涤。

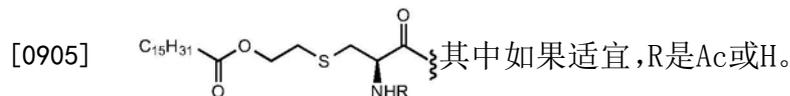
[0900] 通过在含有5% (v/v) 乙二硫醇 (EDT) 的5mL三氟乙酸 (TFA) 中悬浮树脂并且在室温搅动3小时,实现肽切割(0.1mmol规模)。随后添加三异丙基硅烷 (TIPS) 至1% (v/v), 并且继续搅拌另外5分钟,之后将TFA排入冰冷的二乙醚(40mL)。通过离心沉淀析出的物质,弃去醚,将沉淀物用醚(25mL)洗涤1次并晾干或冻干。

[0901] 使用Dionex Ultimate 3000HPLC系统实施反相 (RP) -HPLC。对于半制备性纯化,将肽样品进样至反相Phenomenex Gemini C18柱(5 μ , 110 \AA ; 10x 250mm), 所述柱在洗脱液A (水/0.1% TFA) 和洗脱剂B (MeCN/0.1% TFA) 的合适混合物中平衡,随后生成洗脱液B的增加梯度以洗脱构成组分。使用Phenomenex Gemini C18柱(3 μ , 110 \AA ; 4.6x 150mm), 类似地进行分析性HPLC。

[0902] 使用Agilent Technologies 6120Quadrupole质谱仪,获得低分辨率质谱。

[0903] 使用Bruker BRX400谱仪获得核磁共振谱,所述谱仪在用于 ^1H NMR的400MHz和在用于 ^{13}C NMR的100MHz运行。

[0904] 在下文描述的氨基酸缀合物和肽缀合物中,缩写AcN-C (Pam-1) -和 $\text{H}_2\text{N-C}$ (Pam-1) -意指

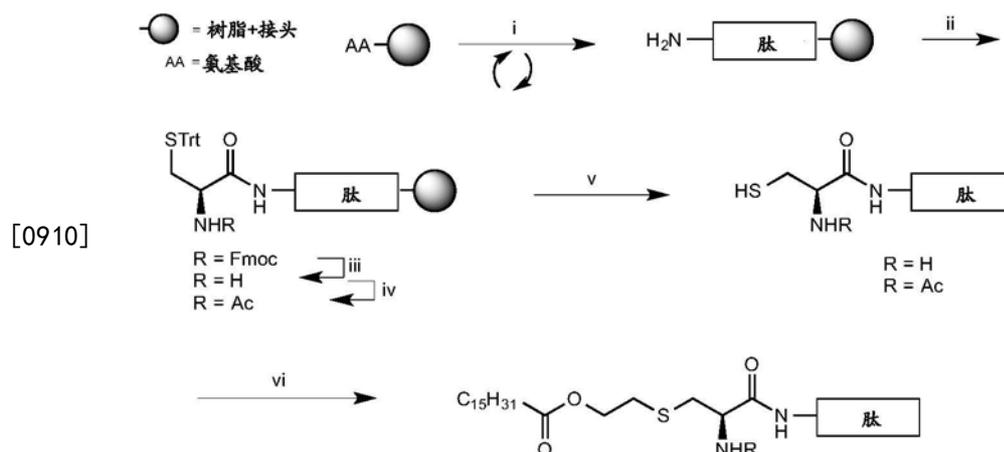


[0906] 3.2通过直接缀合制备肽缀合物

[0907] 肽

[0908] 肽100、102、103、104、105和106(表1)如下文所述和绘制那样合成(方案1)。

[0909] 方案1



[0911] (i) 迭代Fmoc-SPPS; (ii) Fmoc-Cys (Trt) -OH、HATU、NMM、DMF; (iii) 20%哌啶/DMF; (iv) Ac_2O /NMM、DMF; (v) TFA/EDT; (vi) 棕榈酸乙烯酯、DTT、DMPA、NMP, 365nm。

[0912] 在使用迭代Fmoc-SPPS法合成肽序列直至倒数第二个氨基酸之后,通过与Fmoc-Cys (Trt) -OH、HATU和4-甲基吗啉在DMF中反应,引入Fmoc-半胱氨酸作为树脂上肽的N端残

基。使用DMF中的20%吡啶移除Fmoc基团。如需要,通过用DMF (2mL) 中20%乙酸酐和4-甲基吗啉 (1mmol) 的混合物处理,将所产生的胺基转化成乙酰胺。

[0913] 用TFA/EDT从树脂切下肽并在醚中沉淀后,将固体溶解于1:1水/MeCN中并且冻干。如果该肽含有甲硫氨酸残基,则将溶液在冷冻干燥前于60℃加热1小时以逆转可能在切割期间已经发生的任何S-烷基化。随后通过RP-HPLC纯化该肽是以产生纯度>95%的材料。

[0914] 将肽102在非末端半胱氨酸残基的侧链作为叔丁基硫醚的情况下合成,从而在这个位置避免不想要的副反应。

[0915] 表1

[0916]

	序列	<i>m/z</i> [M+3H ⁺]
100	AcHN-CSKKKVKNLVPMTATVK(Ac)-C(O)NH ₂	619.7
102	AcHN-CSKKKKLQQLSLLMWITQC(tBu)FLPVFLAQPPSGQRR-OH	1357.8
103	H ₂ N-CSKKKKGARGPESRLLEFYLAAMPFATPMEAELARRSLAQ DAPPL-OH	1625.5
104	AcHN-CSKKKKGARGPESRLLEFYLAAMPFATPMEAELARRSLA QDAPPL-OH	1639.9
105	H ₂ N-CSKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	1174.8
106	AcHN-CSKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	1188.8

[0917] 肽缀合物

[0918] 随后对肽100和102-106进行巯基-烯反应以产生相应的肽缀合物110、112A和113-116 (表2)。

[0919] 将DMPA (2.6mg), 二硫苏糖醇 (9.2mg) 和棕榈酸乙烯酯 (40mg, mmol) 溶解于脱气的NMP (2mL) 中。随后将100μL这种溶液添加至1μmol称量入聚丙烯小容器的肽以产生含有10mM肽, 5mM DMPA、30mM DTT和50mM棕榈酸乙烯酯的溶液。NMP与反应条件相容并且有效地使反应混合物的全部组分溶剂化。

[0920] 将反应容器用氮气冲洗, 并用在365nm运行的手持式6瓦UV灯 (Spectronics, NY) 照射剧烈搅拌的混合物。在30分钟后, 通过HPLC分析反应并且该反应显示转化成所需的产物。随后通过RP-HPLC分离产物并且回收未反应的起始物料。

[0921] 在纯化112A之后, 通过用三氟甲磺酸和三氟乙酸 (1:16v/v) 混合物处理3分钟移除半胱氨酸的叔丁基保护基, 以洁净地产生充分脱保护的脂肽112 (表2A)。

[0922] 尽管存在还原剂DTT, 具有非乙酰化N末端半胱氨酸的肽仍形成明显量的二硫化物二聚体。采用相应的N-乙酰化肽时, 未观察到这一点。

[0923] 通过以下备选方法, 还从肽100和103-106制备肽缀合物110和113-116 (表2B)。

[0924] 在这个方法中, 使用叔丁基硫醇 (tBuSH) 替代DTT。这导致底物肽向所需肽缀合物的转化增加及更洁净。

[0925] 还将三氟乙酸 (TFA) 引入反应混合物。这进一步改进反应图谱。通过添加TFA, 大幅度抑制低聚物 (由产物肽缀合物与第二棕榈酸乙烯酯分子反应以产生双棕榈酰化种类形成的微量副产物) 的形成。

[0926] 归因于甲硫氨酸在这些条件下氧化成相应亚砷的倾向性明显, 所以将拥有甲硫氨酸基团的那些肽的粗产物混合物冻干, 溶解于TFA中并用碘化四丁基铵处理, 以将甲硫氨酸氧化物还原回甲硫氨酸。

[0927] 常见方法如下。将DMPA (6.5mg) 溶解于脱气的NMP (0.5mL) 中并且添加叔丁基硫醇 (17 μ L), 并且在独立的容器中, 将棕榈酸乙烯酯 (11.3mg) 溶解于脱气的N-甲基吡咯烷酮 (NMP) (0.5mL) 中。将肽 (1 μ mol) 称入配备小搅拌器的聚丙烯小容器中, 并且添加10 μ L DMPA/tBuSH溶液, 随后添加100 μ L棕榈酸乙烯酯溶液, 以产生具有大约10mM肽、5mM DMPA、30mM DTT和80mM棕榈酸乙烯酯的溶液。随后添加TFA (5.5 μ L) 以产生5%溶液。将反应容器用氮气冲洗, 并用在365nm运行的手持式6瓦UV灯 (Spectronics, NY) 照射剧烈搅拌的混合物。在20分钟后, 进一步添加DMPA (10 μ L) 和棕榈酸乙烯酯 (50 μ L) 并且继续照射20分钟。

[0928] 对于含有甲硫氨酸的那些肽, 添加水 (0.5mL) 和MeCN (0.5mL) 并且冻干混合物。将所得到的固体溶解于无水TFA (150 μ L) 中, 冷却至0 $^{\circ}$ C, 并且添加25 μ L TFA中的四丁基碘化铵 (3.7mg, 10 μ mol)。在1分钟后, 添加冰冷的二乙醚 (0.5mL) 以析出还原的脂肽, 将所述脂肽通过离心沉淀并冻干。

[0929] 通过HPLC分析反应以显示转化成所需的产物 (表2B), 所述的所需产物随后通过RP-HPLC分离。

[0930]

表 2

序列	转化率	m/z [M+4H ⁺]
110 AcHN-C(Pam-1)SKKKVKNLVPMVATVK(Ac)-C(O)NH ₂	54%	535.6
112A AcHN-C(Pam-1)SKKKKLQQLSLLMWITQC(tBu)FLPVFLAQPPSGQRR-OH ^a	44%	1089.1
113 H ₂ N-C(Pam-1)SKKKKGARGPESRLLLEFYLAMPFATPMEAEELARRSLAQDAPPL-OH	26%	1289.9
114 AcHN-C(Pam-1)SKKKKGARGPESRLLLEFYLAMPFATPMEAEELARRSLAQDAPPL-OH	42%	1300.4
115 H ₂ N-C(Pam-1)SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	20%	952.0
116 AcHN-C(Pam-1)SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	47%	962.5

^aCys(tBu)残基的后续脱保护提供充分脱保护的脂肽 112

[0931]

表 2A

序列	m/z [M+4H+]
112 AcHN-C(Pam-1)SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	1075.0

表 2B

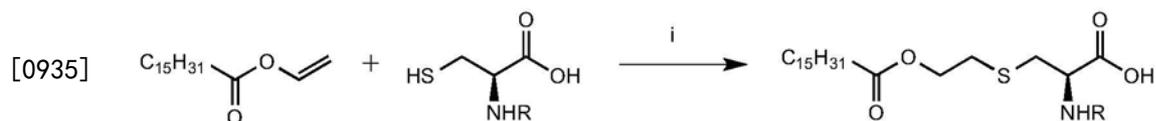
序列	转化率	m/z [M+4H+]
110 AcHN-C(Pam-1)SKKKVKNLVPMVATVK(Ac)-C(O)NH ₂	75%	535.6
113 H ₂ N-C(Pam-1)SKKKKGARGPESRLLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	35%	1289.9
114 AcHN-C(Pam-1)SKKKKGARGPESRLLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	41%	1300.4
116 AcHN-C(Pam-1)SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	74%	962.5

[0932] 3.3氨基酸缀合物的制备

[0933] 如所述那样和下文描述,分别从N- α -Fmoc-、N- α -乙酰基-和N- α -Boc-保护的半胱

氨酸制备氨基酸缀合物200、120和121(方案2)。

[0934] 方案2



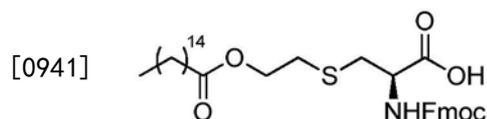
[0936] R=Fmoc, R=Ac, R=Boc 200R=Fmoc; 120R=Ac; 121R=Boc

[0937] (i) 自由基引发剂, $h\nu$ (365nm) 或热

[0938] 将固体N- α -保护的半胱氨酸在所示的溶剂中溶解或悬浮至100mg/mL浓度(表3), 并且添加棕榈酸乙烯酯(1.5摩尔当量), 随后添加所示量的引发剂。对于光解条件下实施的反应, 在聚丙烯容器中配制溶液, 按所示的摩尔比例添加DMPA(表3) 并且随后在365nm照射搅拌的混合物。对于热条件下实施反应, 在玻璃管配制溶液, 添加所示量的AIBN(偶氮双异丁腈), 并且在油浴中或在微波炉中加热搅拌的混合物。

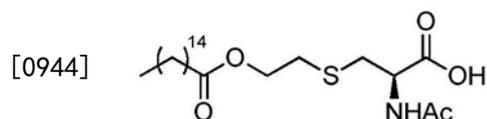
[0939] 使用薄层色谱法监测反应进程并基于半胱氨酸起始物料消耗量允许其推进完成。随后移除溶剂并且用己烷/乙酸乙酯混合物洗脱, 通过快速柱色谱在硅胶上纯化残留物。通过 ^1H 和 ^{13}C NMR证实和通过质谱法Fmoc-Cys (Pam-1)-OH (200)、Ac-Cys (Pam-1)-OH (120) 和Boc-Cys (Pam-1)-OH (121) 的身份。

[0940] N-Fmoc-Cys (Pam-1)-OH (200)



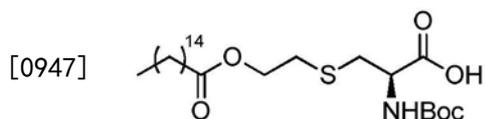
[0942] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.76 (d, J 7.61Hz, 2H), 7.60 (br s, J 6.80Hz, 2H), 7.39 (t, J 7.50Hz, 2H), 7.31 (dt, J_1 0.77 J_2 7.50Hz, 2H), 6.92-6.42 (br s, 1H, COOH), 5.72 (d, J 7.66Hz, 1H, FmocNH), 4.70-4.62 (m, 1H), 4.45-4.38 (m, 2H), 4.26-4.18 (m, 3H), 3.14 (dd, J_1 4.67 J_2 13.66Hz, 1H), 3.06 (dd, J_1 5.36, J_2 13.84Hz, 1H), 2.78 (t, J 6.40Hz, 2H), 2.29 (t, J 7.50Hz, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.28-1.21 (m, 24H), 0.88 (t, J 6.87Hz, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 174.1, 173.9, 155.9, 143.69, 143.62, 143.5, 141.3, 127.7, 127.0, 125.0, 119.9, 67.3, 63.0, 53.5, 47.0, 34.3, 34.1, 31.9, 31.2, 29.67, 29.64, 29.60, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.8, 22.6, 14.0; HRMS测定值 (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+648.3328$, $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{NO}_6\text{SNa}$ 要求648.3329。

[0943] N-Ac-Cys (Pam-1)-OH (120)



[0945] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.21-7.70 (br s, 1H, COOH), 6.29 (d, J 7.51Hz, 1H, NHAc), 4.79 (ddd, J_1 5.06 J_2 5.49 J_3 6.94Hz, 1H), 4.22 (t, J 6.72Hz, 1H), 4.21 (t, J 6.53Hz, 1H), 3.12 (dd, J_1 4.72 J_2 14.08Hz, 1H), 3.05 (dd, J_1 5.80 J_2 13.93Hz, 1H), 2.78 (t, J 6.60Hz, 1H), 2.77 (t, J 6.76Hz, 1H), 2.33 (t, J 7.50Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.27-1.22 (s, 24H), 0.87 (t, J 6.92Hz, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 174.0, 172.7, 171.4, 62.9, 52.1, 34.2, 33.8, 31.8, 31.2, 29.6, 29.63, 29.60, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.8, 22.8, 22.6, 14.0; HRMS测量值 (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+468.2750$, $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{SNa}$ 要求468.2754。

[0946] N-Boc-Cys (Pam-1) -OH (121)



[0948] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 9.71-8.84 (br s, 1H, COOH), 5.43-5.36 (m, 1H, BocNH), 4.60-4.49 (m, 1H), 4.21 (t, J 6.80Hz, 2H), 3.14-2.93 (m, 2H), 2.78 (t, J 6.73Hz, 2H), 2.30 (t, J 7.46Hz, 2H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.24 (s, 24H), 0.56 (t, J 6.82Hz, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) : δ 174.7, 173.8, 155.4, 63.1, 53.2, 34.4, 34.2, 31.9, 31.2, 29.69, 29.66, 29.62, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.2, 28.1, 24.9, 22.6, 14.1; HRMS测量值 (ESI) : $[\text{M}+\text{Na}]^+526.3176$, $\text{C}_{26}\text{H}_{49}\text{NO}_6\text{SNa}$ 要求526.3173。

[0949] 聚合反应在表3中总结的多种条件下实施。

[0950] 表3

项	N- α -保护基	引发剂(mol当量)	溶剂	条件 ^a	时间(分)	产物(产率%) ^b
1	Fmoc	DMPA (0.2)	DCM	hv (365 nm)	60	200 (67)
2	Fmoc	DMPA (1)	DCM	hv (365 nm)	60	200 (82)
3	Fmoc	AIBN (1)	DCM	微波(70°C)	80	200 (41) ^c
4	Ac	DMPA (0.2)	DCM	hv (365 nm)	60	120 (87)
5	Ac	DMPA (0.2)	DCM	hv (365 nm), DTT	60	120 (74)
6	Ac	DMPA (1)	DCM	hv (365 nm)	60	120 (88)
7	Ac	AIBN (1)	DCM	微波(70°C)	80	120 (100)
8	Boc	DMPA (0.2)	DCM	hv (365 nm)	60	121 (78)
9	Boc	DMPA (1)	DCM	hv (365 nm)	60	121 (82)
10	Boc	AIBN (1)	DCM	微波(70°C)	80	121 (77)

[0952] ^a使用在365nm运行的手持式Spectronics 6瓦灯进行UV照射;使用在100瓦和70°C运行的CEM Discover微波反应器实施微波反应。

[0953] ^b产率基于色谱后的分离材料。

[0954] ^c基于残余Fmoc-半胱氨酸底物,反应在这段时间后不完全。

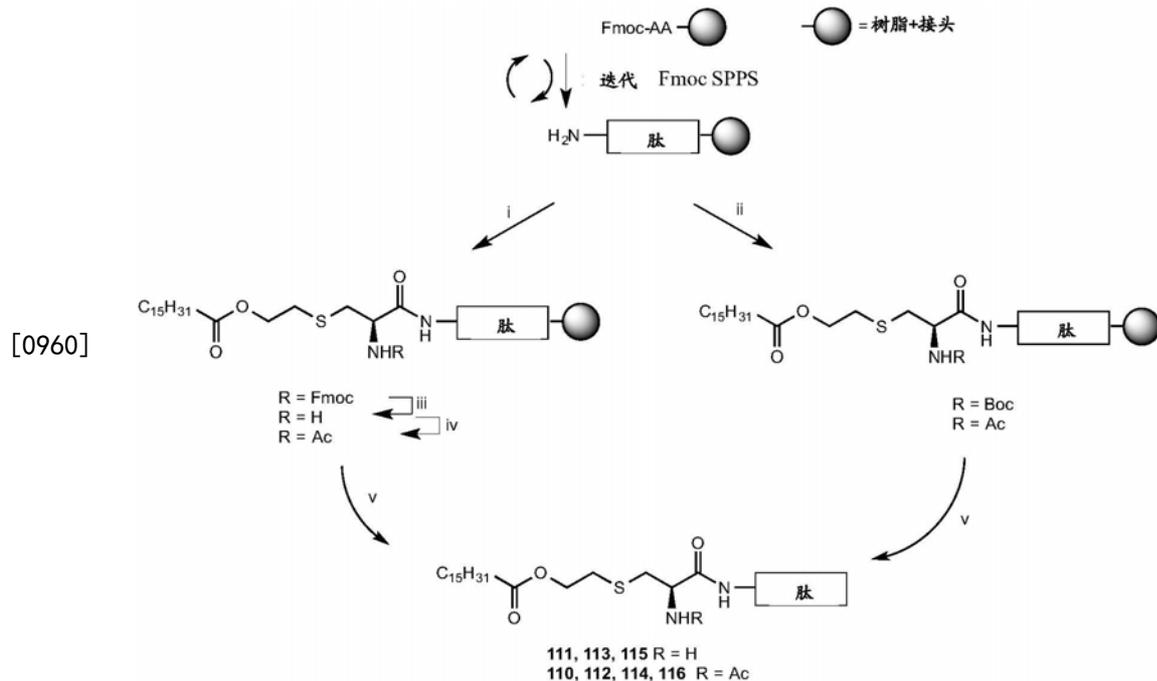
[0955] 如可以从表3见到,光解条件的使用以相对一致的产率生成所需的产物,无论半胱氨酸底物的N保护基和光引发剂相对浓度是什么。

[0956] 在使用AIBN作为引发剂的热条件下,产率明显地变动。N-乙酰化底物提供所需产物120的优异产率(项9)。使用微波加热特别有效,产生乙酰化产物120(项7)的定量产率和Boc产物121的高产率(项10)。

[0957] 3.4通过偶联氨基酸缀合物制备肽缀合物

[0958] 肽缀合物110-116(表4)如下文所述和绘制那样制备(方案3)。

[0959] 方案3



[0961] (i) 迭代Fmoc-SPPS; (ii) Fmoc-Cys (Pam-1)-OH (200)、PyBOP、三甲基吡啶、DMF; (iii) Ac-Cys (Pam-1)-OH (120) 或Boc-Cys (Pam-1)-OH (121)、PyBOP、三甲基吡啶、DMF; (iv) 20%哌啶/DMF; (v) Ac₂O/NMM、DMF; (vi) TFA/EDT。

[0962] 使用如先前所描述的Tribute肽合成仪,使用标准迭代Fmoc SPPS技术合成所需的肽序列。在偶联倒数第二个氨基酸残基后,使用DMF中的PyBOP和三甲基吡啶,将树脂结合的肽链随后用氨基酸缀合物N-Fmoc-Cys (Pam-1)-OH 200衍生化。随后使用DMF中20%哌啶移除Fmoc基团。

[0963] 随后使用TFA/EDT从树脂切下所得到的肽,同时移除保护基,以提供肽缀合物111、113和115。

[0964] 备选地,通过用DMF (2mL) 中20%乙酸酐和4-甲基吗啉 (1mmol) 的混合物处理,将所产生的肽转化成相应的乙酰胺并且随后从树脂切下以提供肽缀合物110、112、114和116。

[0965] 备选地,将树脂结合的肽用氨基酸缀合物N-Boc-Cys (Pam-1)-OH 121或N-Ac-Cys (Pam-1)-OH 120衍生化。从树脂切下时,这种直接提供肽缀合物110-116,无需因Fmoc基团所致的额外操作。

[0966] 用于偶联氨基酸缀合物的条件降低氨基酸的 α -碳在活化时外消旋化的倾向性。将氨基酸缀合物 (0.075mmol) 和PyBOP (苯并三唑-1-基-氧三吡咯烷磷鎓六氟磷酸盐) (0.1mmol) 混合并溶解于DMF (0.3mL) 中。添加无水2,4,6-三甲基吡啶 (0.1mmol) 并且在混合30秒后,将溶液转移至0.025mmol树脂,随后将所述树脂搅拌90分钟,排干并洗涤 (DMF)。

[0967] 随后通过在室温搅动在含有5% (v/v) 乙二硫醇的1mL三氟乙酸中的0.015mmol树脂3小时,切下肽。随后使上清液经烧结滤芯(sinter)排干进入冰冷的二乙醚(10mL)中,并且将树脂用另外1mL TFA洗涤,所述TFA也添加至该醚中。

[0968] 通过离心沉淀析出的物质,并且将沉淀物用醚(5mL)洗涤1次,之后溶解于1:1MeCN/水(+0.1%三氟乙酸)中并冻干。如果该肽含有甲硫氨酸残基,则将溶液在冷冻干燥前于60℃加热1小时。肽随后通过RP-HPLC纯化(>95%)并且通过分析性RP-HPLC和质谱法证实它们的身份。

[0969]

表 4

序列	m/z [M+4H+]	产率 (%)
110 AcHN-C(Pam-1)SKKKKNLVMVATVK(Ac)-(CO)NH ₂	535.6	27
111 H ₂ N-C(Pam-1)SKKKKLLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	1064.6	15
112 AcHN-C(Pam-1)SKKKKLLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	1075.0	20
113 H ₂ N-C(Pam-1)SKKKKGARGESRLLEFYLAMPEATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	1289.9	21
114 AcHN-C(Pam-1)SKKKKGARGESRLLEFYLAMPEATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	1300.4	23
115 H ₂ N-C(Pam-1)SKKKKVPGVLLKEFTVSGNLTIRLTAADHR-OH	952.0	16
116 AcHN-C(Pam-1)SKKKKVPGVLLKEFTVSGNLTIRLTAADHR-OH	962.5	18

[0970] 实施例4.10.肽和肽缀合物的生物活性

[0971] 这些实施例描述了对本发明肽和肽缀合物在支持多种抗原性肽构建体由抗原呈递细胞(APC)加工并呈递给多种T细胞克隆方面效力的评定。

[0972] 材料

[0973] 下表5中略述了以下实施例中使用的肽和肽缀合物构建体。

[0974] 表5.肽和肽缀合物构建体

[0975]

肽表位 CMV pp65 残基 495-503	
肽构建体	序列
110	Pam1Cys(Ac)-SKKKKKNLVPMTATVK(Ac)-NH₂
131	Pam2Cys-SKKKKKNLVPMTATVK(Ac)-NH₂
142	Ac-Cys-SKKKKKNLVPMTATVK(Ac)-NH₂
肽表位 NY-ESO-1 残基 153-180	
肽构建体	序列
143	LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH
144	SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH
132	Pam2Cys-SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH
111	Pam1Cys(NH₂)-SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH
112	Pam1Cys(Ac)-SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH
肽表位 NY-ESO-1 残基 79-116	
肽构建体	序列
145	GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAPPL-OH

[0976]

133	Pam2Cys-SK K K K G A R G P E S R L L E F Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A Q D A P P L - O H
113	Pam1Cys(NH₂)-S K K K K G A R G P E S R L L E F Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A Q D A P P L - O H
114	Pam1Cys(Ac)-S K K K K G A R G P E S R L L E F Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A Q D A P P L - O H
肽表位 NY-ESO-1 残基 118-143	
专利名称	序列
147	V P G V L L K E F T V S G N I L T I R L T A A D H R - O H
134	Pam2Cys-S K K K K V P G V L L K E F T V S G N I L T I R L T A A D H R - O H
115	Pam1Cys(NH₂)-S K K K K V P G V L L K E F T V S G N I L T I R L T A A D H R - O H
116	Pam1Cys(Ac)-S K K K K V P G V L L K E F T V S G N I L T I R L T A A D H R - O H

[0977] 一般方法

[0978] T细胞克隆维持

[0979] 将人CD4⁺和CD8⁺ T细胞克隆以1-3x10⁶/ml的浓度在补充有Glutamax、青霉素/链霉素和5%v/v人血清的RPMI 1640 (“RS5”,全部试剂均来自Life Technologie)中维持。培养基每周二次更新50%v/v。用于CD4⁺ T细胞克隆的RS5补充有IL-7和IL-2,并且用于CD8⁺ T细胞克隆的RS5补充有IL-7+IL-15(全部细胞因子均来自PeproTech,以终浓度5ng/ml使用)。

[0980] 淋巴母细胞样细胞系(“LCL”)生成和维持

[0981] 将产生Epstein-Barr病毒(“EBV”)的B95-8MM细胞在T75瓶(BD Biosciences)中补充有Glutamax、青霉素/链霉素和10%v/v胎牛血清的RPMI 1640 (“RF10”,全部试剂均来自Invitrogen)内培育。收集含有EBV的培养基并离心以沉淀物未贴壁的细胞,并且随后将含有EBV的上清液过滤除菌(0.22μm)。将10x 10⁶个供体外周血单核细胞(“PBMC”)悬浮在T25瓶(BD Biosciences)中的1.5ml RF10中。添加2.5ml B95-8细胞培养上清液并将细胞温育2小时。随后添加含有5%v/v植物血凝素(“PHA”,Gibco)(1%v/v终浓度)的1ml新鲜RF10。对培养瓶监测B细胞LCL的生长晕,一般持续4-6周,在需要时转移至T75瓶(BD Biosciences)。将LCL系冷冻并且工作种子以0.5-1.5x 10⁶/ml维持在RF10中。

[0982] 单核细胞衍生树状细胞(“MoDC”)的培养

[0983] 血液取自知情同意的健康供体。通过使用Lymphoprep (Axis Shield)的密度离心,纯化PBMC。使用单核细胞分离试剂盒II (Miltenyi Biotec)从PBMC分离单核细胞,并且通过在补充有100ng/ml GM-CSF和50ng/ml IL-4(二者均来自Peprotech)的RF10中培养6天,生成MoDC。培养基每两天更新50%v/v。

[0984] CD8+T细胞克隆活化测定法

[0985] 将供体LCL或MoDC(本文也称作抗原呈递细胞或“APC”)在RF10+处于所需浓度的肽/构建体中温育16小时。在Pam3Cys(“P3C”)和肽部分均存但未缀合的样品中,将LCL用P3C预处理30分钟,并且随后将培养基用同时含有P3C和肽的RF10更新。在仅RF10中温育未处理的APC。APC/构建体温育在96孔板(U型底, BD Biosciences)或48孔板中(平底, BD Biosciences)进行,这取决于测定法的性质和每次处理所要求的APC数目。在温育后,将APC用RPMI 1640洗涤4次,以移除未结合的构建体/P3C。

[0986] 为了能够进行流式细胞计数检测,将CD8+ T细胞克隆在接种入APC孔之前用0.5 μ M CellTrace™Violet(“CTV”) (Life Technologies)遵循制造商的方案预染,或在如下文描述的共温育之后用抗CD8+抗体染色。

[0987] 将脉冲标记/洗涤的APC和CTV染色的T细胞克隆按比例4:1(APC:T细胞)一式两份接种在96孔板各孔(U型底)中(所用的常见细胞数目是1.25x 10⁴个细胞/ml T细胞和5x 10⁴个细胞/ml APC)。在接种之后,温和地离心APC/T细胞板(<300x g, 3分钟)以允许立即相互作用,并且在标准细胞培养箱中共温育26小时。

[0988] 为了检测T细胞活化,将样品用下表6中显示的抗体在洗涤缓冲液(PBS/FCS(1%v/v)的50 μ l总体积中染色(仅使用抗CD8,如果细胞无法用CTV预染)。

[0989] 表6用于CD8+测定法的抗体

[0990]

抗 CD	荧光团	克隆	剂 量 (μ L/50 μ L)	供应商	目录号
8	FITC	RPA-T8	0.5	BIOLEGEND	301006
137	APC	4B4.1	1.25	BIOLEGEND	309810

[0991] 将样品在冰上在暗处温育30分钟,并且随后用洗涤缓冲液洗涤两次以除去未结合的抗体。将DAPI(1 μ g/ml终浓度)紧邻采集之前才添加至每份样品以允许活细胞/死细胞排除。

[0992] 使用具有FACSDiva软件的BD FACSAria II上进行数据采集,并使用FlowJo软件(TreeStar)进行数据分析。将数据展示为CD137表达阳性的活克隆细胞的均值%+SD。

[0993] CD4+T细胞克隆活化测定法

[0994] 如上文对“CD8+T细胞克隆活化测定法”所述那样进行全部APC脉冲标记/洗涤/接种;T细胞克隆CTV染色;和APC/T细胞共温育设置步骤。

[0995] 为了检测T细胞活化,将样品用下表7中显示的抗体在洗涤缓冲液(PBS/FCS(1%v/v)

v) 的50 μ l总体积中染色(仅使用抗CD4,如果细胞无法用CTV预染)。

[0996] 表7用于CD4+测定的抗体

[0997]

CD	荧光团	克隆	剂 量 (μ L/50 μ L)	供应商	目录号
4	FITC	RPA-T4	0.5	BIOLEGEND	300506
25	APC-CY7 或 APC	BC96	2.5	BIOLEGEND	302614 或 302610
134	PE	ACT35	1.25	BIOLEGEND	350004

[0998] 将样品在冰上在暗处温育30分钟,并且随后用洗涤缓冲液洗涤两次以除去未结合的抗体。将DAPI (1 μ g/ml 终浓度) 紧邻采集之前才添加至每份样品以允许活细胞/死细胞排除。

[0999] 使用具有FACSDiva软件的BD FACSAria II上进行数据采集,并使用FlowJo软件(TreeStar)进行数据分析。将数据展示为活克隆细胞上CD25和CD134表达的中位荧光强度(MFI)+SD。

[1000] 实施例4

[1001] 这些实施例描述了对本发明肽和肽缀合物在支持多种抗原性肽构建体由抗原呈递细胞(APC)加工并呈递给多种T细胞克隆方面效力的评定。

[1002] 材料

[1003] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD8+ T细胞克隆(克隆4D9)识别的肽表位p495-503:

[1004] 142:Ac-Cys-SK**KKK**-NLVPMVATVK(Ac)-NH₂

[1005] 131:Pam2Cys-SK**KKK**-NLVPMVATVK(Ac)-NH₂

[1006] 110:Pam1Cys(Ac)-SK**KKK**-NLVPMVATVK(Ac)-NH₂

[1007] MoDC制备和CD8+ T细胞克隆活化测定法如下文所述的方法实施。

[1008] 结果

[1009] 如图3中所示,对于全部肽构建体均在10 μ M检测到T细胞活化,但是对于肽构建体131和110,仅在100nM检测到T细胞活化。

[1010] 在两种浓度,构建体131和110激发比构建体142更大的T细胞活化。这些结果支持本发明肽缀合物在利用本发明的方法缀合于TLR-激动剂时维持这种表位并可能改善其呈递的效力。

[1011] 实施例5

[1012] 这个实施例描述了对本发明肽和肽缀合物在支持NY-ES0-1₁₅₃₋₁₈₀构建体由自体LCL以及由同种异型HLA-A2+ HLA-DP4+ MoDC加工并呈递给CD8+ T细胞克隆方面效力的评定。

[1013] 材料

[1014] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD8⁺ T细胞克隆(克隆2F2)识别的肽表位p157-165:

[1015] 143:LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1016] 144:SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1017] 112:Pam1Cys (Ac) -SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1018] 111:Pam1Cys (NH₂) -SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1019] 132:Pam2Cys-SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1020] 使用如实施例4中所述的方法,实施LCL/MoDC制备和CD8⁺ T细胞克隆活化测定法。

[1021] 结果

[1022] 使用LCL时,用全部构建体(+/-P3C)在10 μ M均激发100%T细胞活化(参见图4)。使用构建体143和144(+/-外源P3C)时,在100nM观察到50-100%T细胞活化。仅肽构建体143在100nM激发100%T细胞活化(图4,第一列),显示N末端SKKKK基序的存在可以已经损害表位p157-165的加工。肽构建体112、111和132在100nM激发<20%T细胞活化,表明尽管TLR激动剂缀合仍然允许呈递p157-165表位至CD8⁺ T细胞,但它没有改善该表位的加工和呈递。

[1023] 如图5中所示,当使用MoDC作为APC时,也可检测到T细胞活化,在10 μ M达到55-95%水平。

[1024] 实施例6

[1025] 这个实施例描述了对本发明肽和肽缀合物在支持NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀抗原性肽构建体由自体LCL以及由同种异型HLA-A2⁺ HLA-DP4⁺ MoDC加工并呈递给CD4⁺ T细胞克隆方面效力的评定。

[1026] 材料

[1027] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD4⁺ T细胞克隆1B7和1C11识别的肽表位p157-170:

[1028] 143:LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1029] 144:SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1030] 112:Pam1Cys (Ac) -SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1031] 111:Pam1Cys (NH₂) -SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1032] 132:Pam2Cys-SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQQPPSGQRR-OH

[1033] 如实施例4的方法中所述,实施LCL/MoDC制备和CD4⁺ T细胞克隆活化测定。

[1034] 结果

[1035] 如可以在图6-8中见到,当使用LCL(仅克隆1B7,图6)或MoDC(克隆1B7,图7和克隆1C11,图8)时,对于全部构建体在10 μ M和100nM均可检出T细胞活化(如通过CD25表达增加超过未处理背景所测定)。自体LCL似乎比同种异型MoDC激发更高的CD25上调水平,如通过图6分别与图7和图8比较所示。

[1036] 与这个表位(p157-170)的游离肽相比时,TLR激动剂缀合产生等同的表位加工和呈递于MHC II类上。这些结果证实,利用本发明的方法与TLR激动剂缀合维持抗原加工作用和向CD4⁺ T细胞呈递。

[1037] 图4-8的合计结果显示,利用本发明的方法与TLR激动剂缀合保留了对肽抗原NY-ESO-1153-180内部表位的加工作用及向人CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的呈递。

[1038] 实施例7

[1039] 这个实施例描述了对本发明肽和肽缀合物在支持NY-NY-ESO-1₇₉₋₁₁₆构建体由自体LCL加工并呈递给CD8⁺ T细胞克隆方面效力的评定。

[1040] 材料

[1041] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD8⁺ T细胞克隆1D7识别的肽表位p92-100:

[1042] 145:GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL-OH

[1043] 114:Pam1Cys (Ac) -SKKKK-GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL-OH

[1044] 113:Pam1Cys (NH2) -SKKKK-GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL-OH

[1045] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD8⁺ T细胞克隆1F10识别的肽表位p96-104:

[1046] 145:GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL-OH

[1047] 114:Pam1Cys (Ac) -SKKKK-GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL-OH

[1048] 113:Pam1Cys (NH2) -SKKKK-GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL-OH

[1049] 如实施例4的方法中所述,实施LCL制备和CD8⁺ T细胞活化测定法。将LCL用充当阳性对照的100nM最小肽表位脉冲标记(数据未显示)。

[1050] 结果

[1051] 在测试的全部浓度,克隆1D7 (p92-100) 均对全部构建体作出反应(图9)。在匹配的浓度,尤其在1μM/100nM,对肽构建体114和113的反应略逊于对肽构建体145+/-P3C的那些反应。

[1052] 在测试的全部浓度,克隆1F10 (p96-104) 均对全部构建体作出反应(图10)。对肽构建体114和113的反应等同于或略好于对肽构建体145+/-P3C的那些反应,尤其在10μM时是这样(由CD137MFI增加最佳展示;数据未显示)。

[1053] 这些结果确立,在利用本发明方法与TLR激动剂缀合后,肽NY-ESO-1₇₉₋₁₁₆保留其受到加工并呈递至识别两个不同表位 (p92-100和p96-104) 的两个不同CD8⁺ T细胞系的能力。

[1054] 实施例8

[1055] 这个实施例描述了对本发明肽和肽缀合物在支持NY-NY-NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃₆构建体由自体LCL加工并呈递给CD8⁺ T细胞克隆1C11方面效力的评定。

[1056] 材料

[1057] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD8⁺ T细胞克隆1C11识别的肽表位p125-133:

[1058] 147:VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1059] 116:Pam1Cys (Ac) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1060] 115:Pam1Cys (NH2) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1061] 如上文实施例4的方法中所述,实施LCL制备和CD8⁺ T细胞活化测定法。将LCL用充当阳性对照的1μM NY-ESO-1₁₂₁₋₁₃₈脉冲标记(数据未显示)。

[1062] 结果

[1063] 如图11中所示,用全部构建体 (+/-P3C) 在10μM均激发大于95%的T细胞活化(参见图4)。在1μM,肽构建体147 (+/-外源P3C) 所致的T细胞活化分别降低至75%/60%,但是对于

肽构建体116和115而言仍保持在 $\geq 90\%$ 。在100nM,对肽构建体147未观察到T细胞活化或可忽略,而肽构建体116和115分别激发 $>30\%$ 和 $>20\%$ 的T细胞活化。

[1064] 肽构建体116和115在诱导T细胞活化方面的优效性表明,与TLR-激动剂缀合改善这个表位(p125-133)的加工和呈递。

[1065] 实施例9

[1066] 这个实施例描述了对本发明肽和肽缀合物在支持NY-NY-NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃构建体由自体LCL加工并呈递给CD4⁺ T细胞克隆1E4和1D6方面效力的评定。

[1067] 材料

[1068] 下文显示该实施例中使用的肽构建体:

[1069] 147: VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1070] 116: Pam1Cys (Ac) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1071] 115: Pam1Cys (NH₂) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1072] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD4⁺克隆1E4识别的推定性肽表位p127-138:

[1073] 147: VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1074] 116: Pam1Cys (Ac) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1075] 115: Pam1Cys (NH₂) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1076] 下文以粗体显示构建体序列内部由该实施例中使用的CD4⁺克隆1D6识别的推定性肽表位p121-132:

[1077] 147: VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1078] 116: Pam1Cys (Ac) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1079] 115: Pam1Cys (NH₂) -SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH

[1080] 如上文实施例4的方法中所述,实施LCL制备和CD4⁺ T细胞活化测定法。将LCL用充当阳性对照的1 μ M NY-ESO-1₁₂₁₋₁₃₈脉冲标记(数据未显示)。

[1081] 结果

[1082] 在测试的全部浓度,克隆1E4对全部构建体(+/-外源P3C)均作出反应,作为可以在图12中清楚见到。这些结果表明,对这个克隆而言,加工来自p118-143的同族表位是高效的,并且这种加工不依赖于TLR激动剂连接或受其影响。

[1083] 如图13中所示,克隆1D6对p121-138脉冲标记的LCL反应良好(数据未显示),但对肽构建体147(p118-143)+/-P3C没有反应,提示其同族表位加工受损。在TLR激动剂缀合不存在的情况下,认为这可能归因于N末端VPG或C末端TAADHR的存在。这种加工缺陷无法通过反式同时TLR连接来拯救。

[1084] 然而,克隆1D6的确以可滴定方式对肽构建体116和115(其中116激发比115更大的反应)作出反应(参见图13)。这表明,通过与TLR激动剂缀合将肽部分高效导引至晚期内体/溶酶体途径缓解了随未缀合的肽构建体147所观察到的加工阻塞现象。不希望受任何理论约束,申请人认为,这可以至少部分地因暴露于晚期内体或溶酶体特异性蛋白酶或加工途径所致。

[1085] 实施例10

[1086] 实施例研究本发明肽构建体所致的TLR激动作用。

[1087] 方法

[1088] 使用先前实施例中所所述的构建体,如下文描述那样实施TLR测定法。

[1089] 使用HekBlue细胞时的Toll样受体2 (TLR2) 激动作用

[1090] HEK-Blue™-hTLR2和HEK-Blue™-mTLR2购自Invivogen。分别通过共转染报道基因SEAP(分泌型胚胎碱性磷酸酶)和人TLR2或鼠TLR2生成这些HEK-Blue细胞。SEAP报道基因处于融合于5个AP-1和5个NFκB结合位点的IFN-β最小启动子控制下。根据制造商的说明书培养细胞。在分析当日,在96孔板中在20μl体积无内毒素的水中以所示的浓度添加构建体。将HEK-Blue™-hTLR2或HEK-Blue™-mTLR2细胞以约 2.83×10^4 个细胞/ml重悬于HEK-Blue™检测培养基中并且立即添加180ml细胞悬液(约 5×10^4 个细胞/孔)。将细胞在37°C在5%CO₂下温育过夜。使用EnSpire平板读数仪(PerkinElmer)在635nm对SEAP表达定量。

[1091] 用于检测来自TLR2瞬时转染的Hek293细胞的IL-8分泌的方法

[1092] 将Hek-293细胞以 3×10^4 细胞每孔50μl铺种在具有DMEM的96孔板中,所述DMEM含有10%FBS(该培养基不补充抗生素)。将细胞用pFLAG-TLR2质粒和pcDNA3.1的组合(来自Shimizu的友好馈赠,如Shimizu, T., Y. Kida和K. Kuwano (2005). "A dipalmitoylated lipoprotein from Mycoplasma pneumoniae activates NF-κappa B through TLR1, TLR2, and TLR6." J Immunol 175 (7):4641-4646中所报道)或仅对照质粒(pcDNA3.1)转染。在Opti-MEM中以0.3μl脂质转染胺中的100ng DNA按照50μl体积/样品构成脂质转染胺/DNA复合物的主混合物。在温育20分钟后,将质粒混合物添加至细胞。在添加构建体之前,诱导蛋白质表达24小时。

[1093] 将构建体以所示浓度添加至各孔以形成每孔200μl的终体积。在刺激18小时后,从每份样品收获上清液并贮存在-20°C直至需要。根据制造商的方案通过Cytometric Bead Array (BD Biosciences)测定IL-8分泌,仅作出的一处修改:使用25μl条件培养基而不是50μl。为了精确测定分泌型IL-8的浓度,绘制11点标准曲线(1-5000ng/ml)。使用BD-FACS Aria II (BD Biosciences)分析样品并且使用FCAP ARRAY软件(第版1.0.1)分析数据。

[1094] 结果

[1095] 如图14和图15中所示,测试的全部构建体在HekBlue™(图14)和IL-8(图15)报道分子系统中均展示TLR激动作用。TLR激动作用是可滴定的,并且在两种测试的浓度均可检出高于背景。

[1096] 在两种测定体系中,Pam1C (Ac) 构建体比匹配的Pam1C (NH₂) 构建体激发更强烈的反应。

[1097] 不意在将本发明的范围仅限于上述实施例。如本领域技术人员将领会,不脱离本发明范围的多种变例是可能的。

<211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X1不存在或是S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> X2不存在或是亲水性残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3) .. (3)
 <223> X3不存在或是1-10个亲水性残基
 <400> 2
 Xaa Xaa Xaa Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr
 1 5 10 15
 Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg
 20 25 30
 Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu
 35 40
 <210> 3
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X1不存在或是S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> X2不存在或是1-4个亲水性残基
 <400> 3

Xaa Xaa Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser
 20 25 30
 Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu
 35 40

<210> 4

<211> 43

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 4

Ser Lys Lys Lys Lys Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala
 20 25 30
 Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu
 35 40

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 5

Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met
 1 5 10 15
 Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala
 20 25 30
 Gln Asp Ala Pro Pro Leu
 35

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> X1不存在或是S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> X2不存在或是亲水性残基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> X3不存在或是1-10个亲水性残基

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly

1 5 10 15

Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg

20 25

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> X1不存在或是S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> X2不存在或是1-4个亲水性残基

<400> 10

Xaa Xaa Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn

1 5 10 15

Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
 20 25

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

Ser Lys Lys Lys Lys Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val
 1 5 10 15

Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
 20 25 30

<210> 12

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 12

Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile Leu
 1 5 10 15

Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
 20 25

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 13

Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile Leu
 1 5

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X1不存在或是S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> X2不存在或是亲水性残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3) .. (3)
 <223> X3不存在或是亲水性残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4) .. (4)
 <223> X4不存在或是一个或多个亲水性残基
 <400> 14
 Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln
 1 5 10 15
 Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
 20 25 30
 <210> 15
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X1不存在或是S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> X2不存在或是亲水性残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3) .. (3)
 <223> X3不存在或是1-10个亲水性残基

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5 10 15
 Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
 20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> X1不存在或是S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> X2不存在或是1-4个亲水性残基

<400> 16

Xaa Xaa Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe
 1 5 10 15
 Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
 20 25 30

<210> 17

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 17

Ser Lys Lys Lys Lys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr
 1 5 10 15
 Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg
 20 25 30

Arg

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 18

Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro

1 5 10 15

Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg

 20 25

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 19

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe

1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 20

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys

1 5

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 21

Cys Ser Lys Lys Lys Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5 10 15

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 22

Cys Ser Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 23

Cys Ser Lys Lys Lys Val Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5 10 15

Lys

<210> 24

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 24

Cys Ser Lys Lys Lys Lys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile

1 5 10 15

Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln

20 25 30

Arg Arg

<210> 25

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 25

Cys Ser Lys Lys Lys Lys Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu

1 5 10 15

Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu

20 25 30

Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu

	35	40	
<210>	26		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成肽		
<400>	26		
Cys Ser Lys Lys Lys Lys Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr			
1	5	10	15
Val Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg			
	20	25	30
<210>	27		
<211>	16		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成肽		
<400>	27		
Cys Ser Lys Lys Lys Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Lys			
1	5	10	15

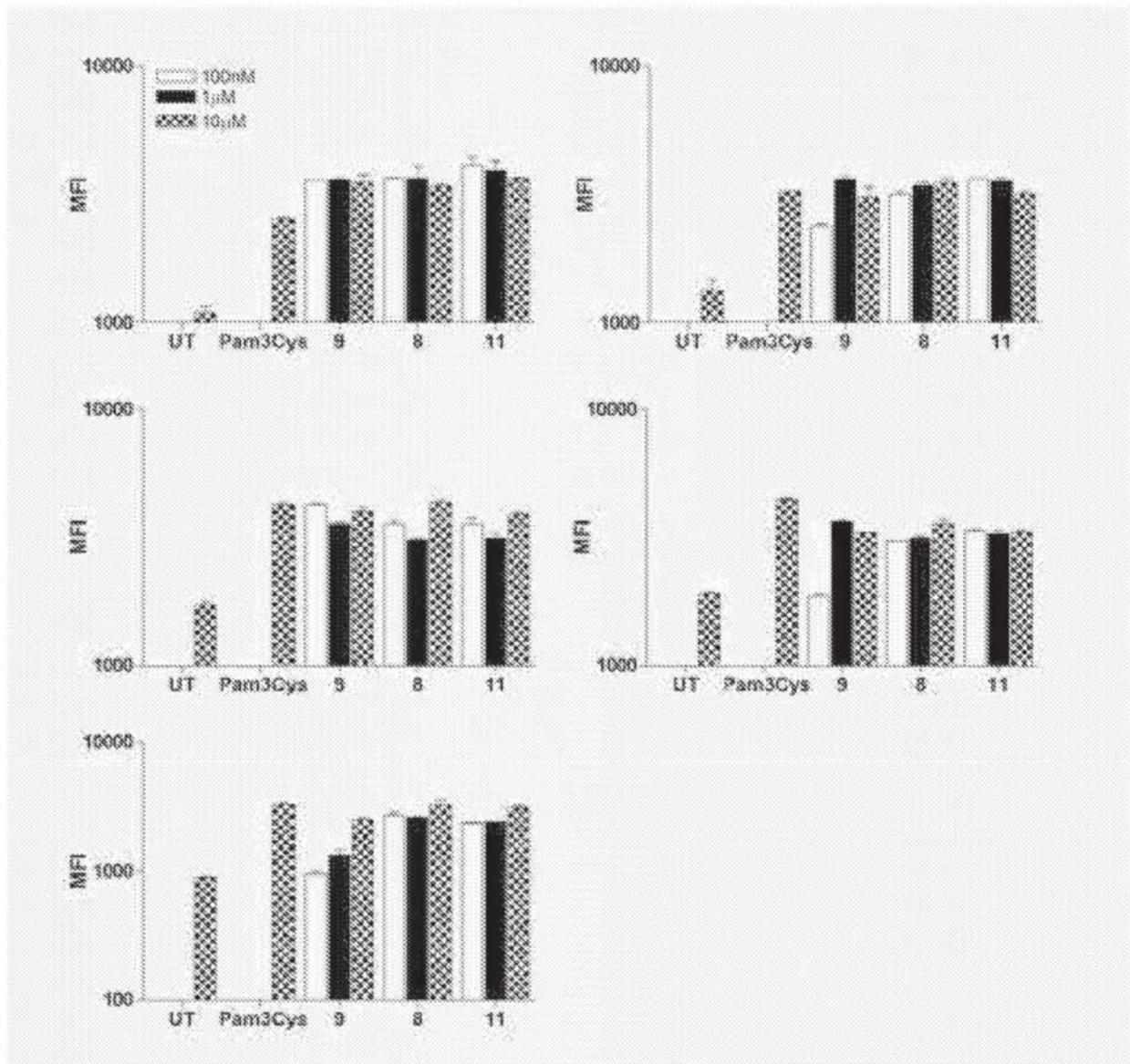


图1

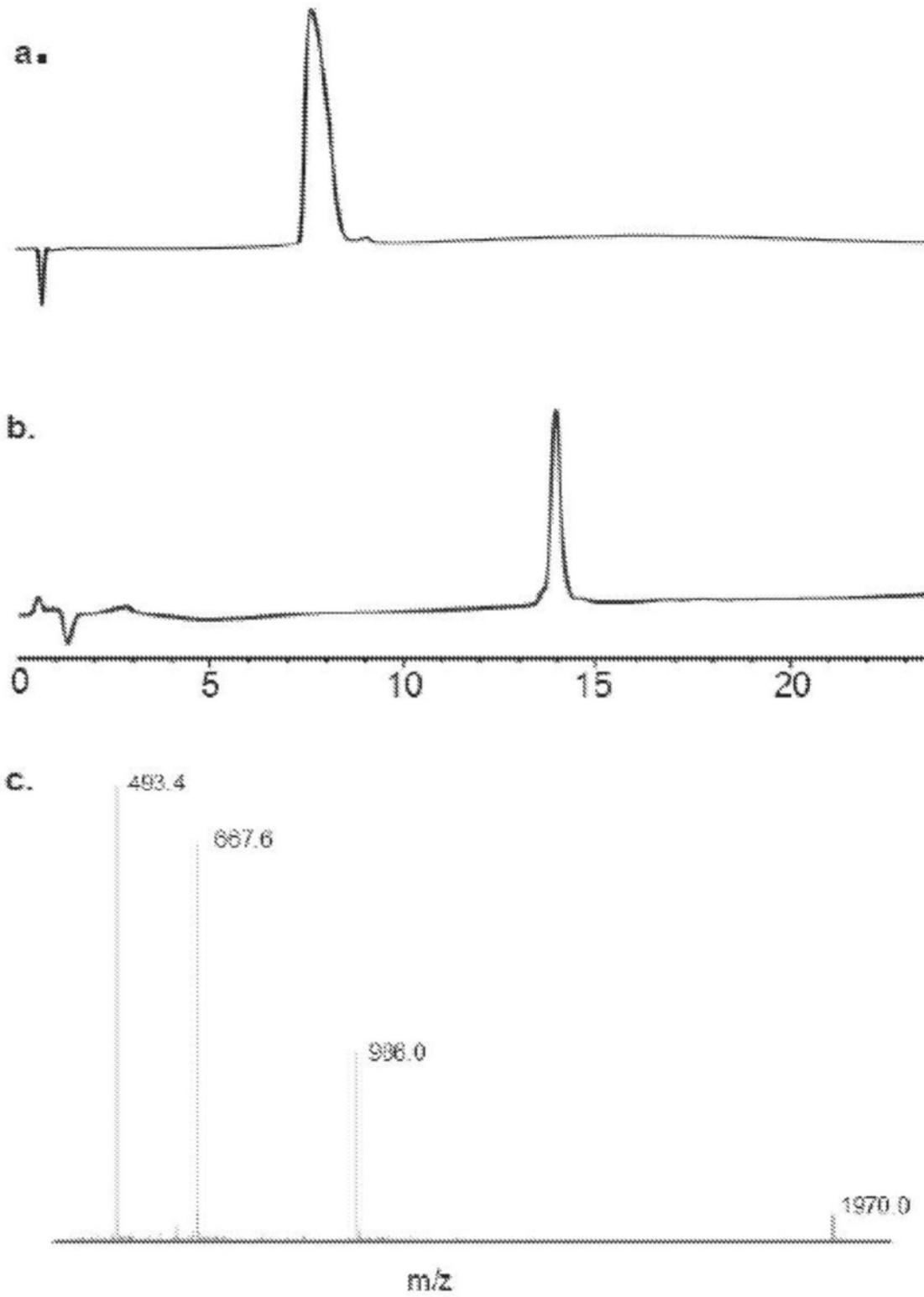


图2

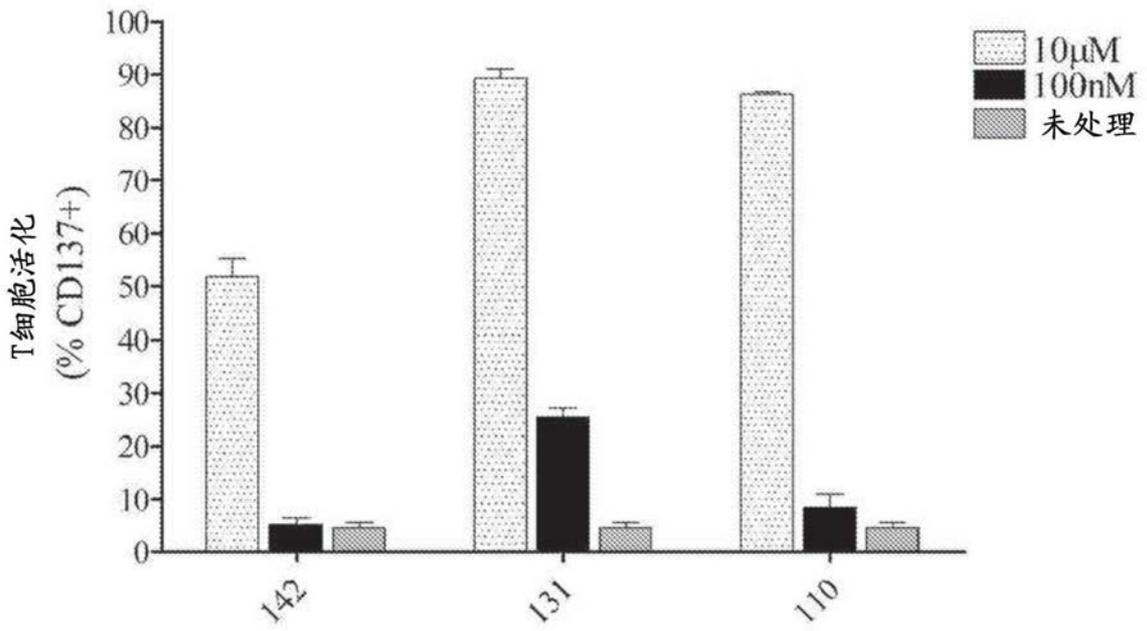


图3

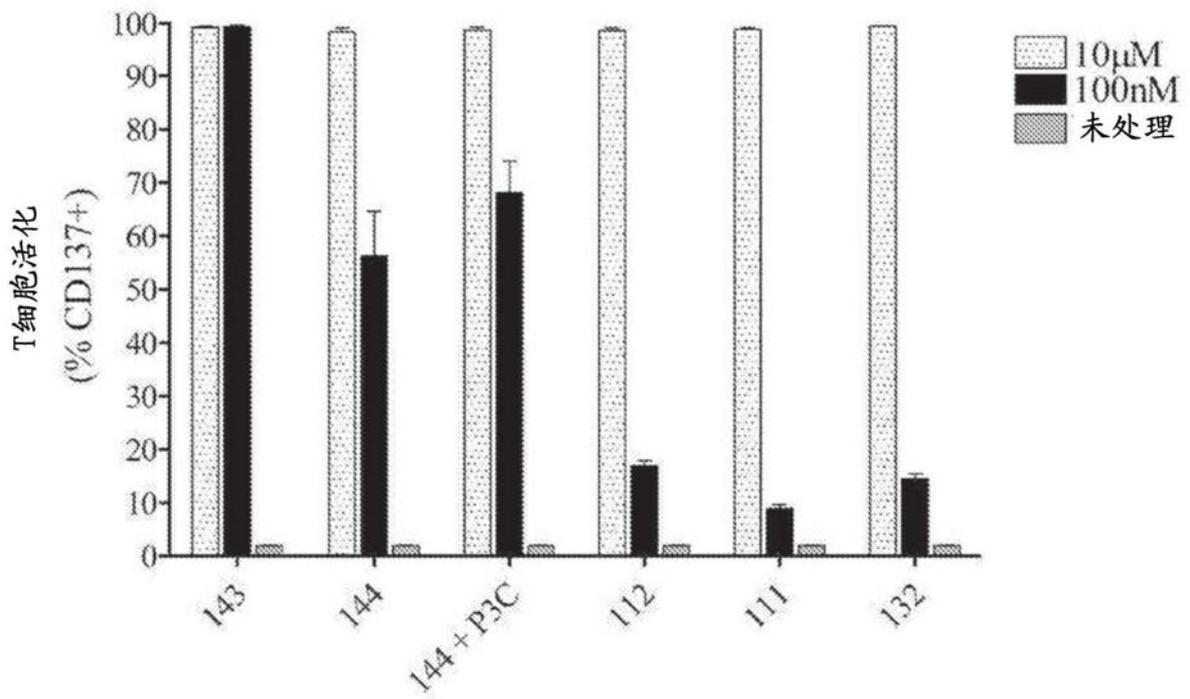


图4

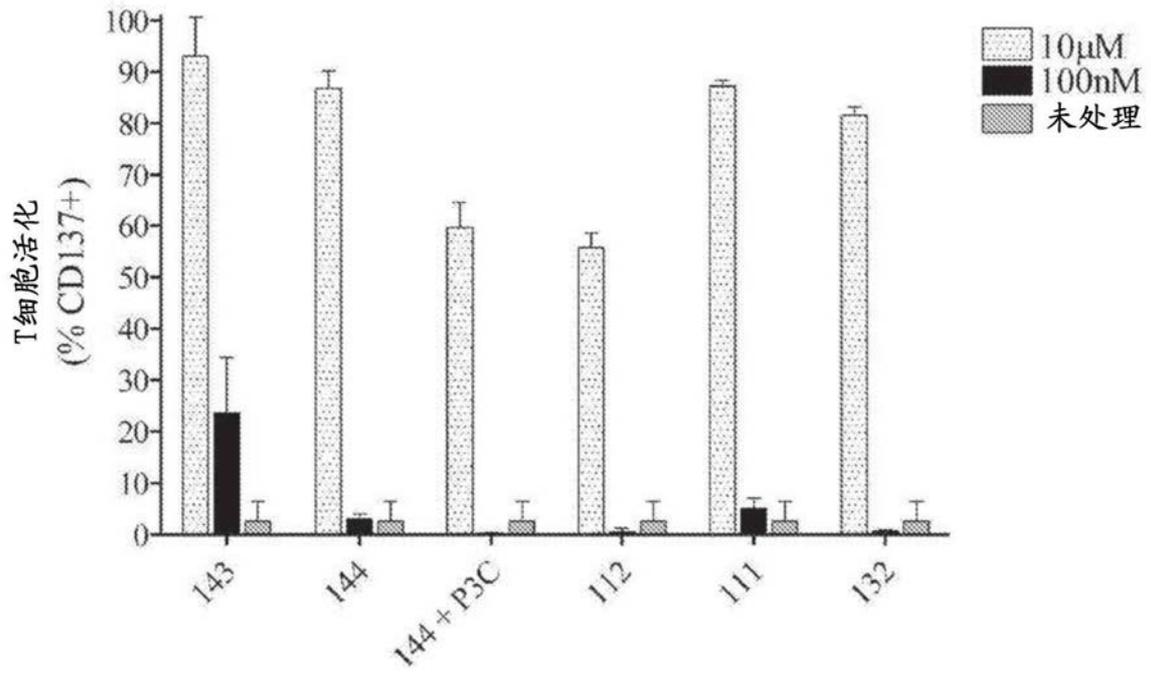


图5

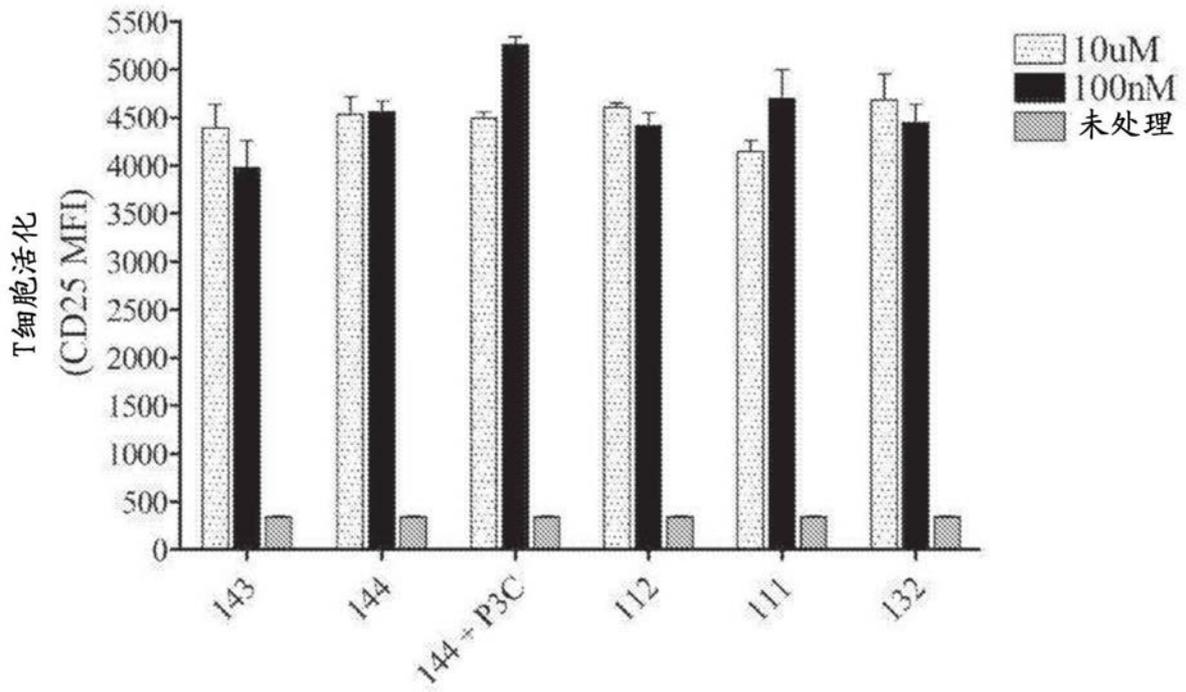


图6

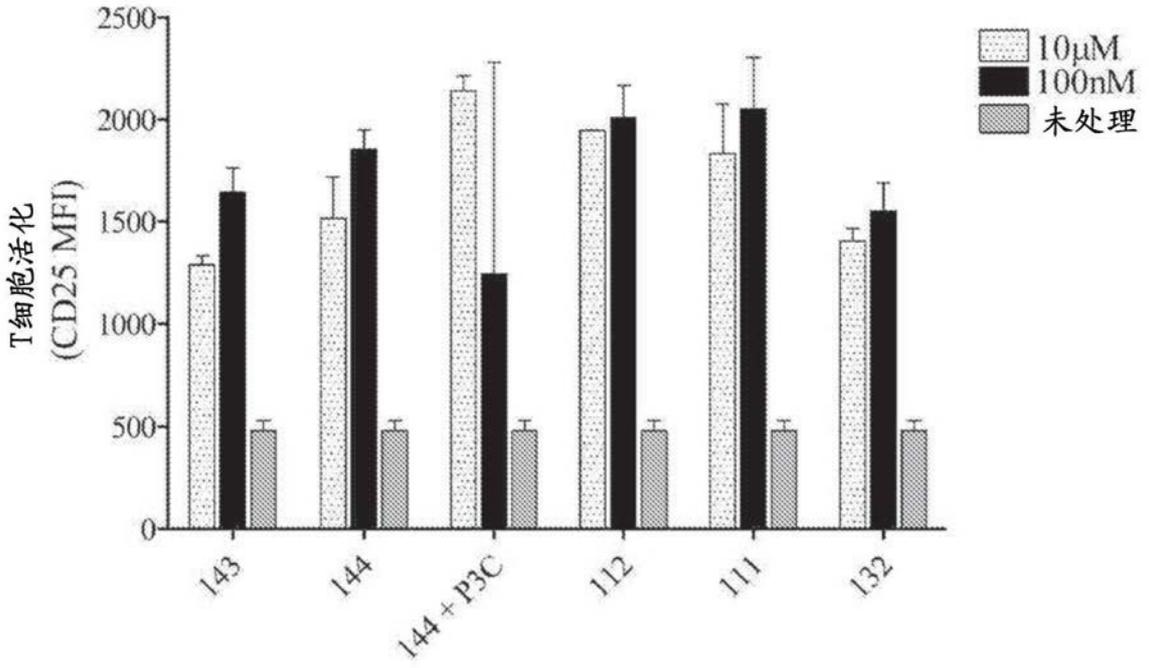


图7

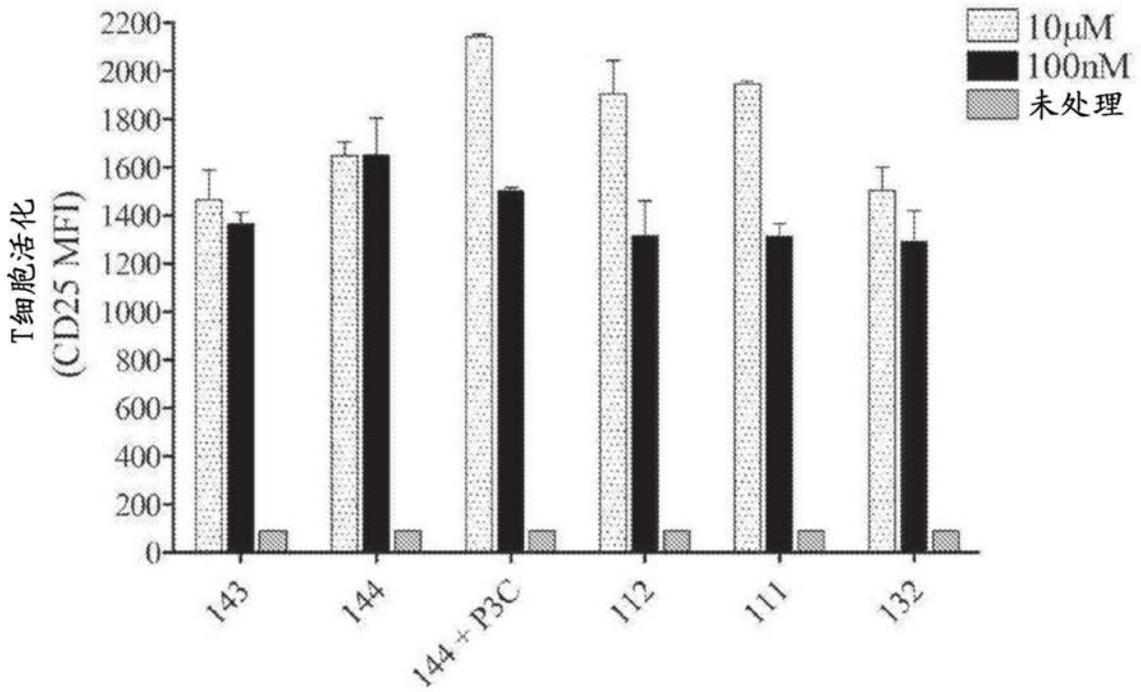


图8

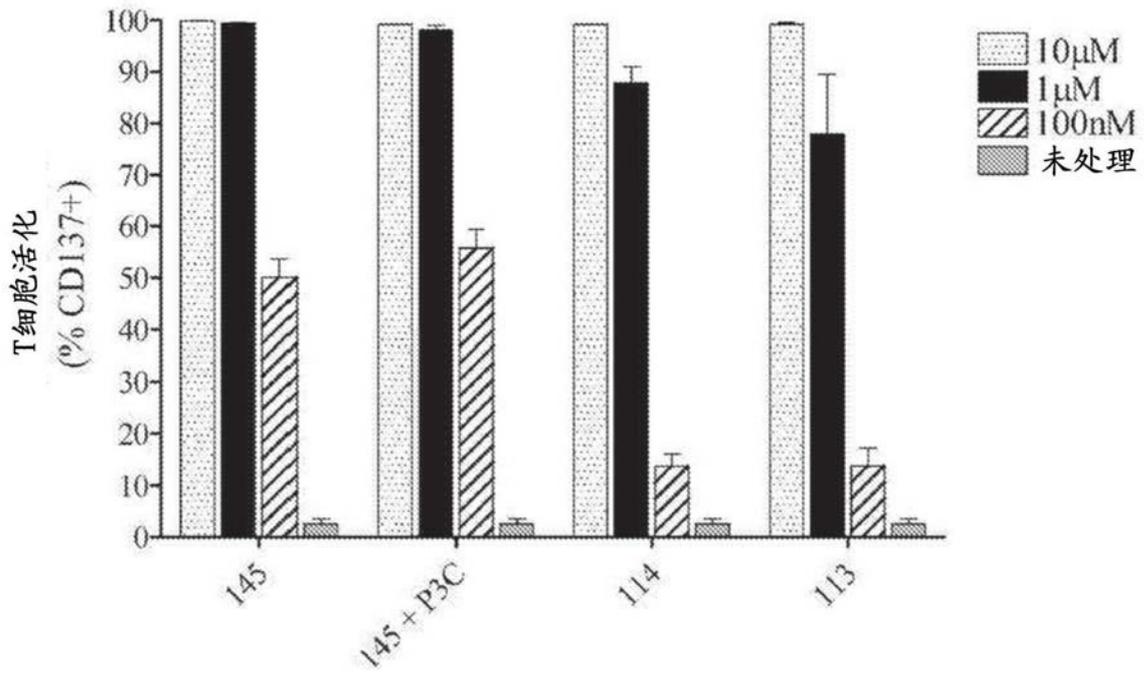


图9

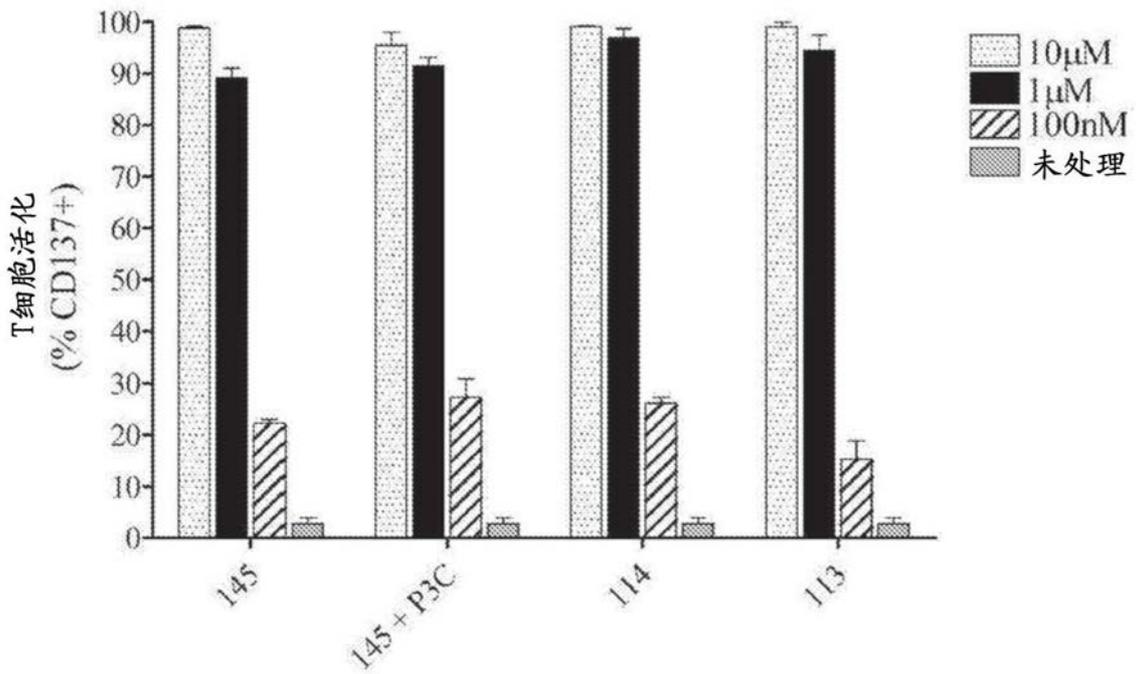


图10

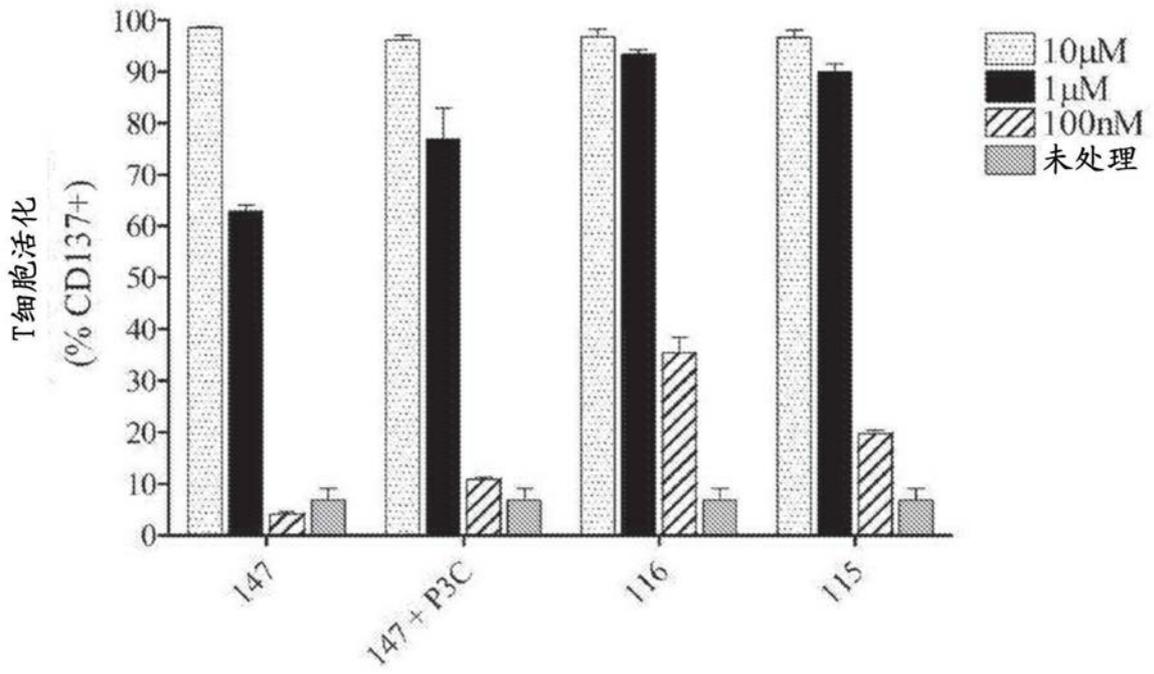


图11

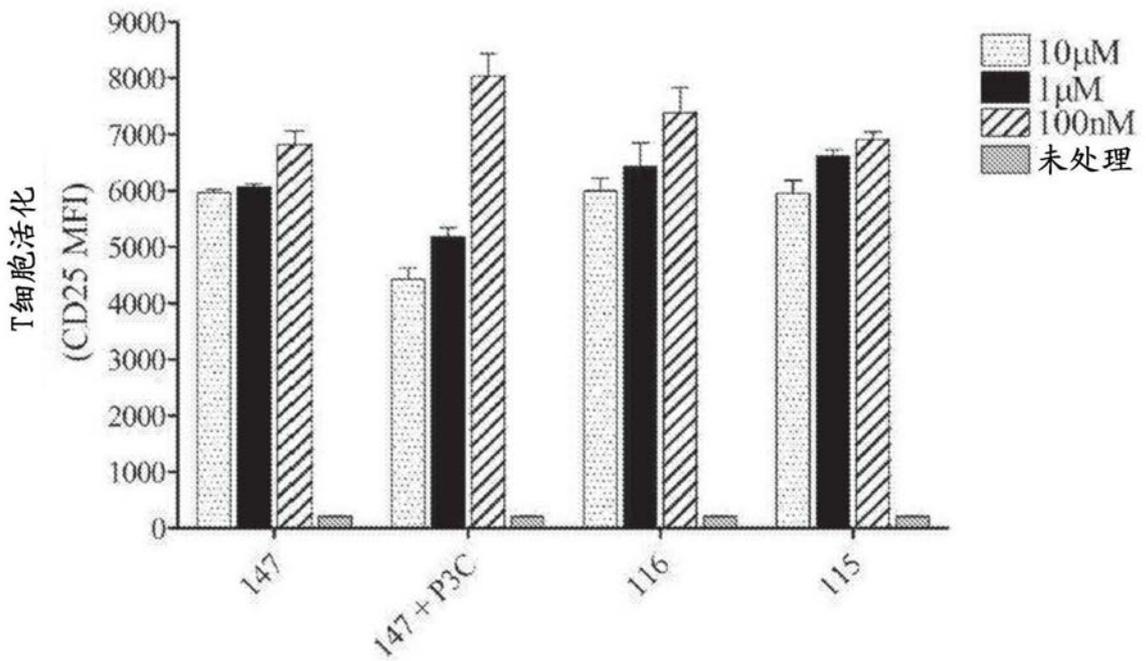


图12

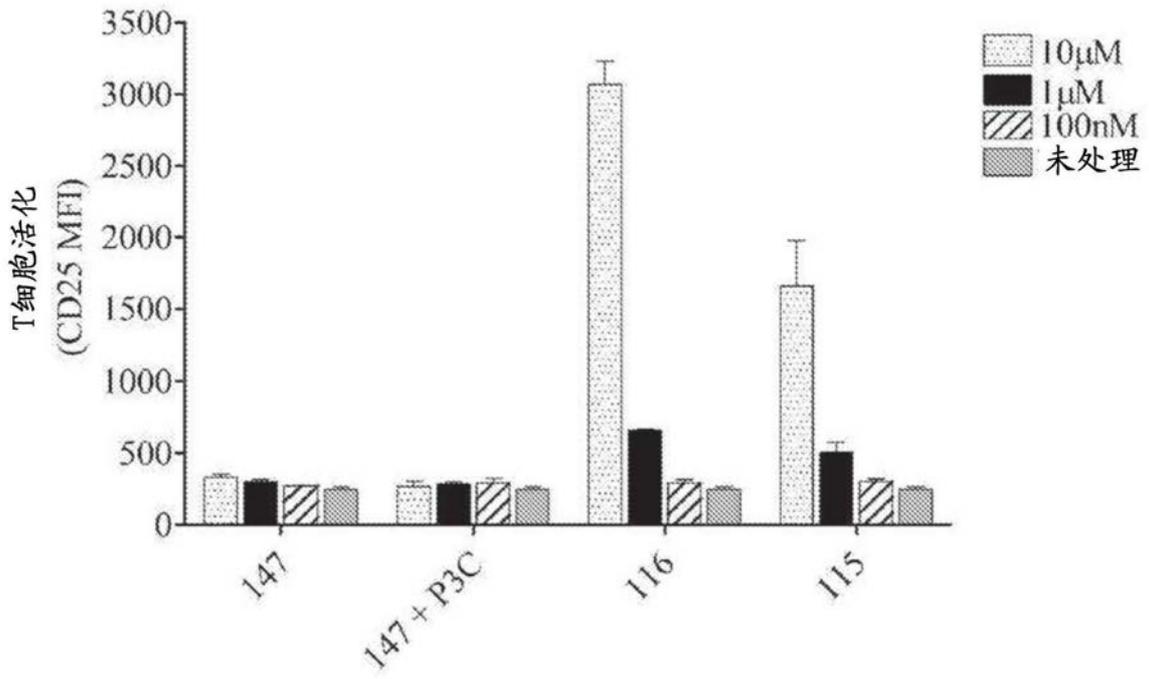


图13

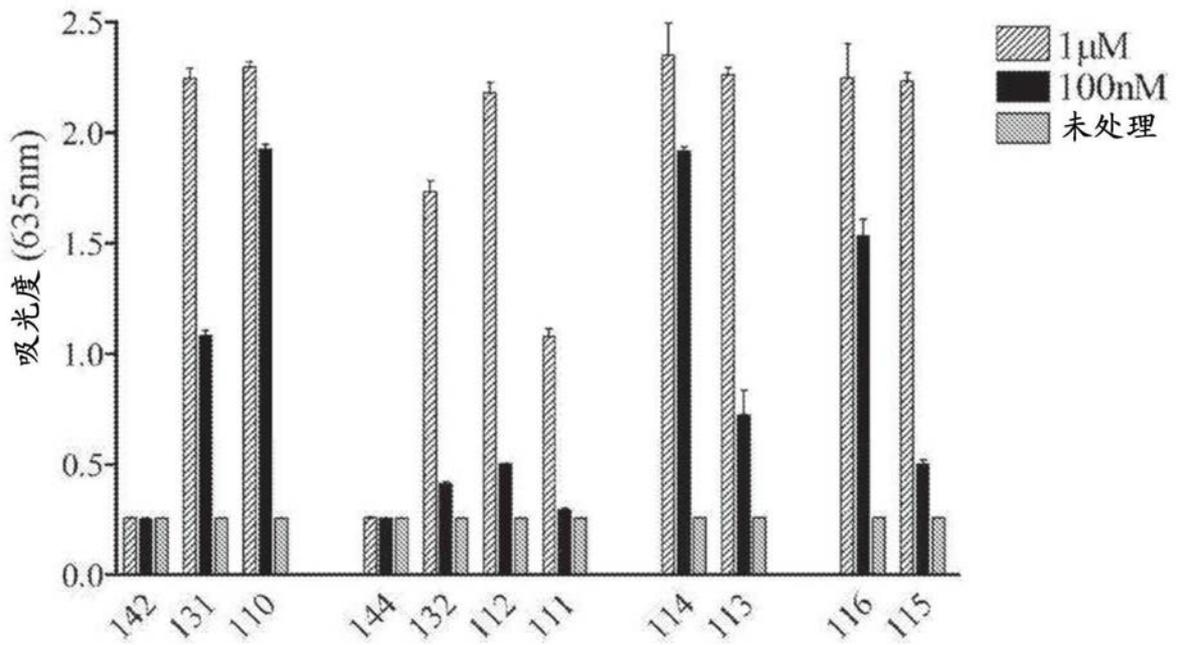


图14

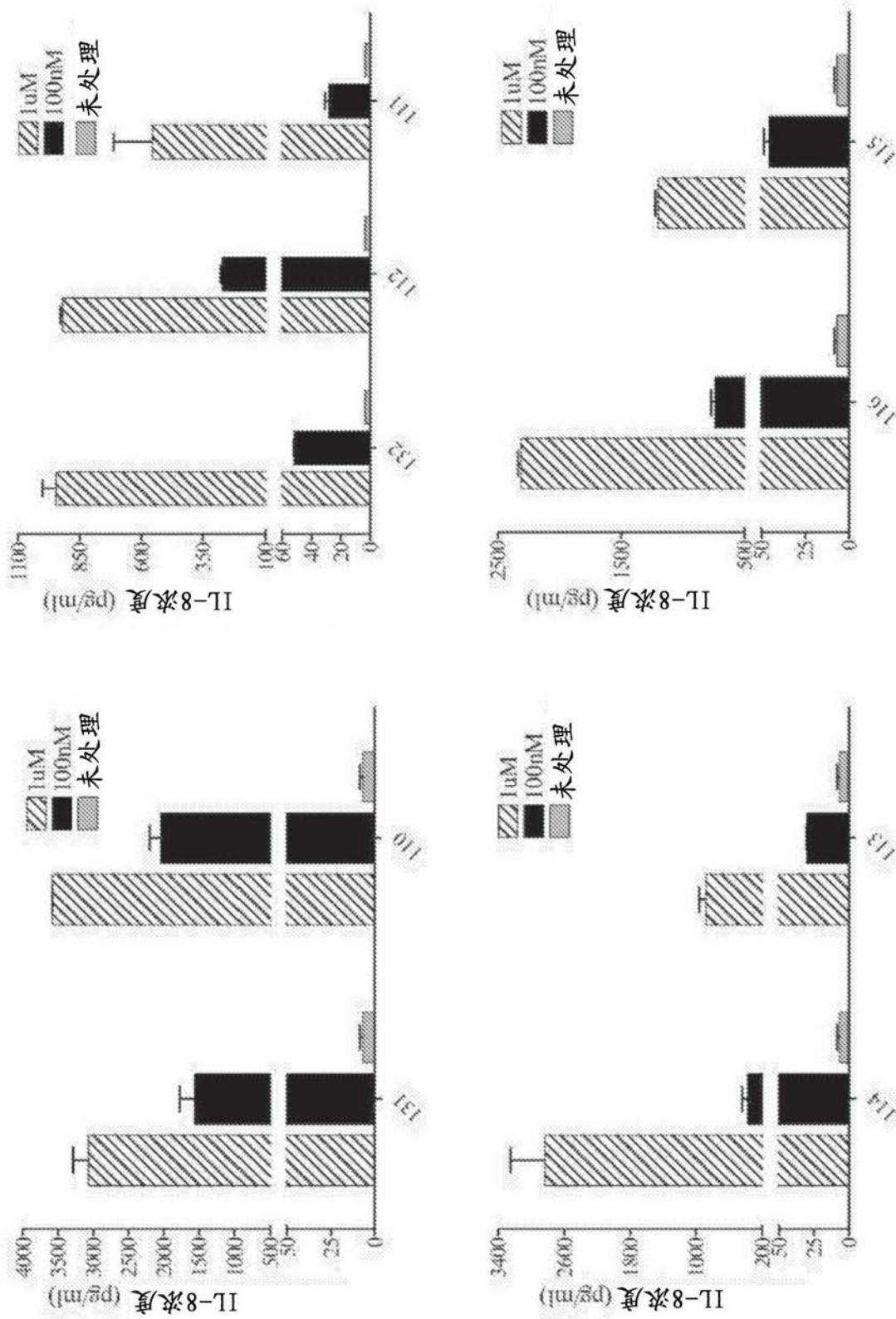


图15