

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480030122. X

C07K 9/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 10 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 100554279C

[22] 申请日 2004.9.15

[21] 申请号 200480030122. X

[30] 优先权

[32] 2003.9.17 [33] US [31] 60/503,784

[86] 国际申请 PCT/US2004/026737 2004.9.15

[87] 国际公布 WO2005/035588 英 2005.4.21

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.13

[73] 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 L·C·布拉茨扎克

J·A·小克莱伍兰德

K·A·泰勒 N·T·布莱克本

A·R·克拉夫特 C·E·科恩

[56] 参考文献

US4186194A 1980.1.29

WO99/60155 1999.11.25

WO2002/085929A1 2002.10.31

Synthetic study of peptidoglycan partial structures. Synthesis of tetrasaccharide and octasaccharide fragments. Seiichi Inamura 等. Tetrahedron Letters, Vol. 43. 2001

审查员 张 娜

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

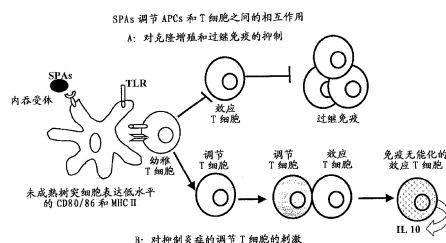
权利要求书 8 页 说明书 88 页 附图 8 页

[54] 发明名称

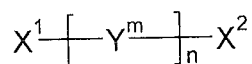
用于疾病免疫干预的合成多糖抗原

[57] 摘要

本发明提供了根据其结构而具有抗炎或炎性免疫调节特性的合成多糖抗原 (SPAs)。本发明还提供了包含这些 SPAs 的组合物, 以及使用这些 SPAs 和组合物通过利用合适的 SPAs, 预防或治疗炎性病变、或者对炎性调节剂治疗敏感的疾病或病情的方法。



1、式 I 的线性非交联免疫调节聚合化合物或其药学上可接受的盐:



式 I

其中:

下标  $n$  表示聚合物中式  $Y^m$  单体单元的数目, 是从 2 至 375 范围内的单个整数;

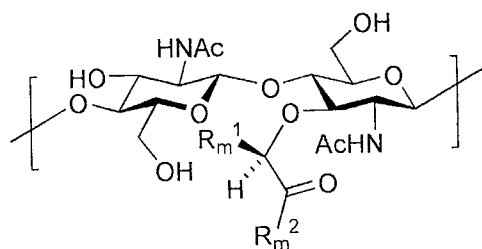
上标  $m$  表示聚合物中特定单体单元  $Y^m$  的位置, 从左至右顺次为一组从 1 至  $n$  的整数;

$X^1$  为 H 或具有游离还原型异头醇的胞壁酸残基;

$X^2$  为 OH 或具有游离还原型异头醇的胞壁酸残基;

式  $Y^m$  每一个单体单元独立地为:

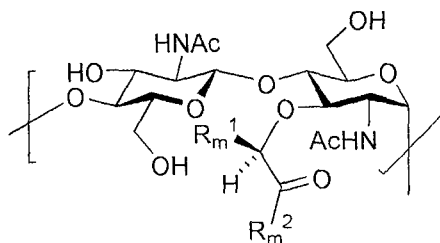
(a) 当  $Y^m$  不是  $Y^n$  时, 式 IIa 的基团;



式 IIa

或者

(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时, 式 IIb 的基团



式 IIb;

每一个  $R_1^1$ 、 $R_2^1 \dots R_{n-1}^1$  和  $R_n^1$  独立地为 H 或 1 到 4 个碳原子的烷基;

每一个  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  独立地为 -OH、-NH<sub>2</sub>、氨基酸残基、或含有 2 至 10 个氨基酸残基的肽, 其中:

(a) 每一个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;

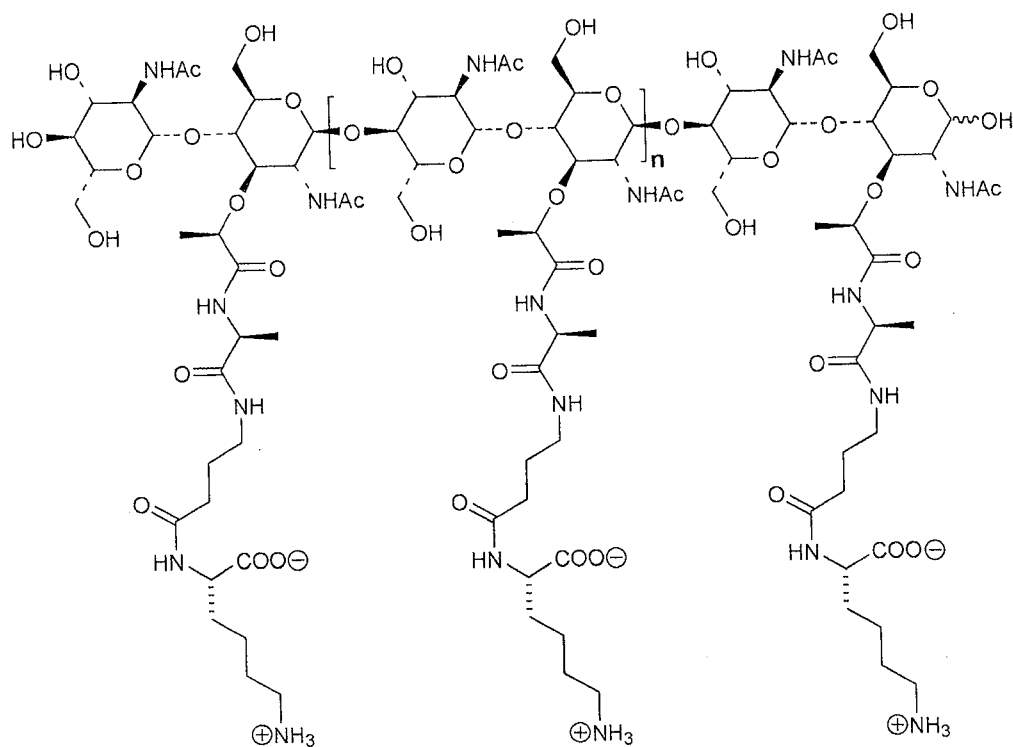
(b) 每一个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、CF<sub>3</sub>、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、-C(O)O 烷基和 -NO<sub>2</sub> 的基团取代; 和

(a) 所述氨基酸残基独立地连接在  $\gamma$  羧基的  $\alpha$  位上、 $\alpha$  或  $\epsilon$  氨基上、或者是它们的任意组合;

其中所述聚合物的分子量大于 10 kDa,

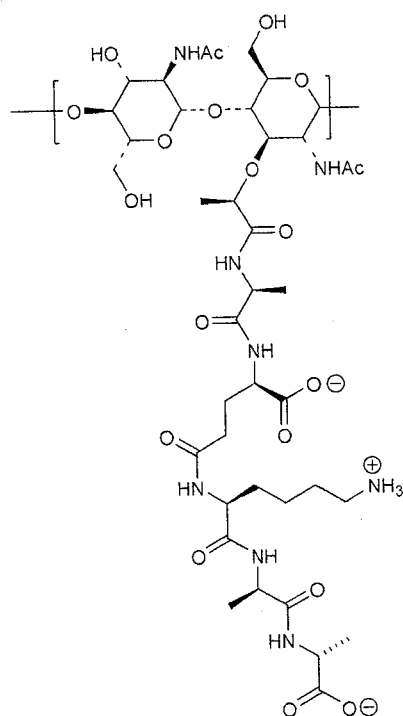
只要所述线性聚合物不是:

(a) 下式的均聚物, 其中  $n$  为 75 至 375:



或

(b)含下式的单体单元的均聚物:



2、如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_1^1$ 、 $R_2^1 \dots R_{n-1}^1$  和  $R_n^1$  中的一个或多个是甲基。

3、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐，其

中  $X^1$  是 H,  $X^2$  是 OH。

4、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中  $n$  为 75 至 375。

5、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个是二肽。

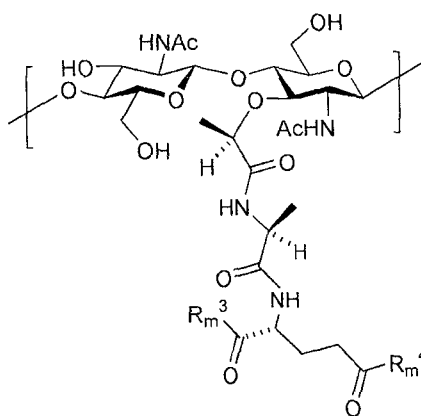
6、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个是三肽。

7、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个是四肽。

8、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个是五肽。

9、权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中式  $Y^m$  的一个或多个单体单元是:

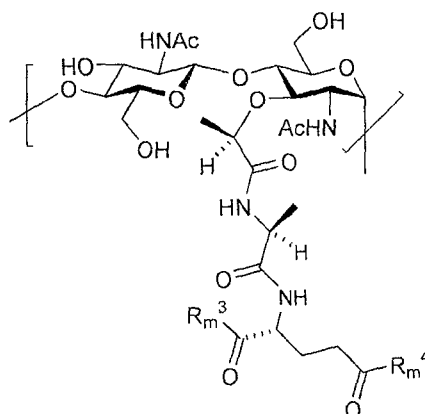
(a) 当  $Y^m$  不是  $Y^n$  时, 式 IIIa 的基团;



式 IIIa

或者

(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时, 式 IIIb 的基团



式 IIIb

其中:

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

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

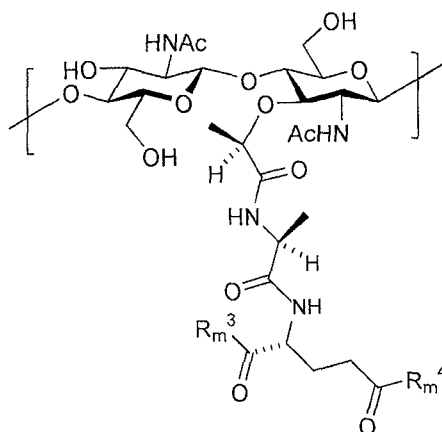
- (a) 每一个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;
- (b) 每一个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、 $\text{CF}_3$ 、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}$  烷基和  $-\text{NO}_2$  的基团取代; 和
- (c) 所述氨基酸残基独立地连接在  $\gamma$  羧基的  $\alpha$  位上、 $\alpha$  或  $\varepsilon$  氨基上、或者是它们的任意组合。

10、如权利要求 9 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中:

- (a) 式  $\text{Y}^m$  的每一个单体单元, 除了  $\text{Y}^n$  之外, 为式 IIIa 的基团; 和
- (b)  $\text{Y}^n$  为式 IIIb 的基团。

11、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中式  $\text{Y}^m$  的任何一个单体单元都不是:

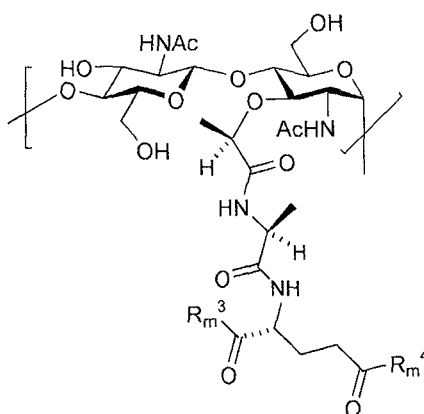
- (a) 当  $\text{Y}^m$  不是  $\text{Y}^n$  时, 式 IIIa 的基团;



式 IIIa

或者

(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时, 式 IIIb 的基团



式 IIIb

其中:

每一个  $R_1^3$ 、 $R_2^3 \dots R_{n-1}^3$  和  $R_n^3$  独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ ;

每一个  $R_1^4$ 、 $R_2^4 \dots R_{n-1}^4$  和  $R_n^4$  独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ 、氨基酸残基或者含有 2 至 8 个氨基酸残基的肽, 其中:

(c) 每一个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;

(d) 每一个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、 $CF_3$ 、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、 $-C(O)O$  烷基和  $-NO_2$  的基团取代; 和

(e) 所述氨基酸残基独立地连接在 $\gamma$ 羧基的 $\alpha$ 位上、 $\alpha$ 或 $\varepsilon$ 氨基上、或者是它们的任意组合。

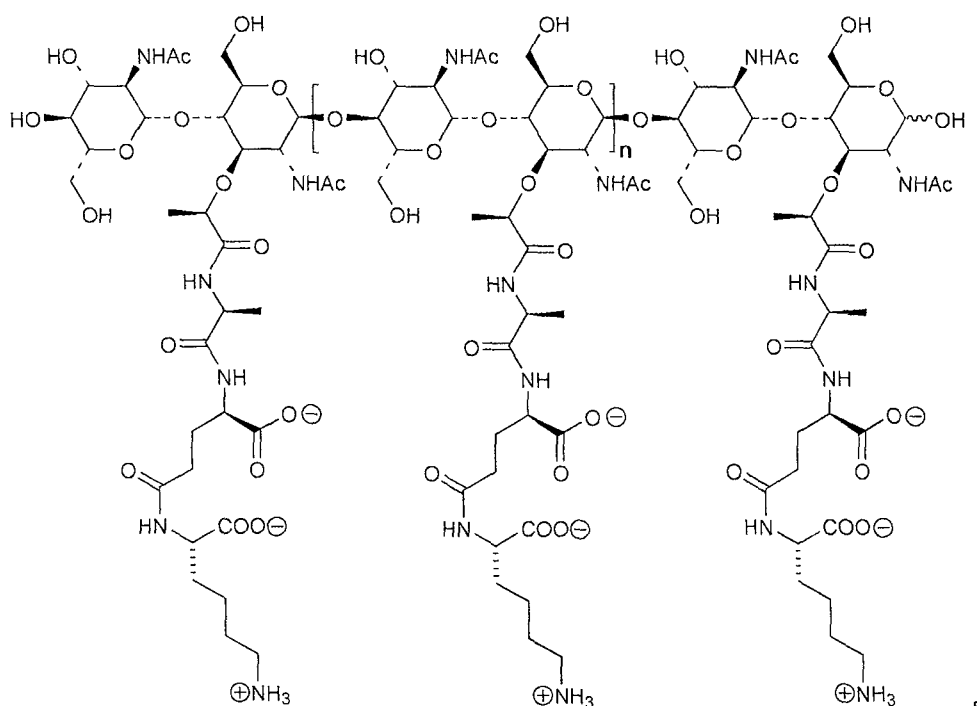
12、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个带净电荷。

13、如权利要求 12 所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述的净电荷是负的。

14、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述线性聚合物是均聚物、无规共聚物、交替共聚物或嵌段共聚物。

15、如权利要求 14 所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述线性聚合物是无规共聚物、交替共聚物或嵌段共聚物，并且包含两种或两种以上不同的单体单元。

16、如权利要求 1-2 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐，其为具有下式结构的化合物或其药学上可接受的盐：



17、一种药物组合物，包括权利要求 1-16 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐，连同药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。



18、如权利要求 1 - 16 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐用于制备疫苗佐剂的用途。

19、如权利要求 1 - 16 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途，用于制备用于预防或治疗对免疫调节剂治疗敏感的疾病或紊乱的药物。

## 用于疾病免疫干预的合成多糖抗原

### 发明背景

#### 发明领域

本发明涉及免疫学领域，更特别地涉及免疫调节。本发明通过采用具有免疫调节特性的合成多糖抗原（SPAs）为疾病的免疫干预提供新的化合物和方法。这些 SPAs 可用于人类以及其他动物，以提供炎性病变的防御保护和/或治疗，或诱导可控的炎性应答，以治疗其中免疫应答具有治疗益处的疾病状态或病情，例如抗病毒治疗、抗癌治疗或作为疫苗佐剂

#### 相关领域的说明

微生物抗原是已知的最强大的免疫调节剂。其中最常见的例子有来自革兰氏阴性菌的脂多糖（LPS）、以及来自革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的细菌细胞壁糖肽、也称为胞壁质或肽聚糖（PG）。细菌的 PG 被充分确认为有效的炎性剂（Wahl 等人（1986）《实验医学杂志》（*J. Exp. Med.*）165:884）。

许多微生物抗原，包括 PG 在内，据认为是通过活化称之为 Toll 样受体（TLRs）的哺乳动物细胞表面受体之一来发挥它们的促炎效果的。TLR 的活化触发胞内信号传导路径，导致诱导转录因子 NF- $\kappa$ B，其依次诱导编码炎性调节剂（趋化因子和某些细胞因子）的基因表达。PG 自身据认为是通过 TLR2 活化的（Takeuchi 等人（1999）《免疫》（*Immunity*）11:443）。

近来，cDNA 阵列技术为我们理解 PG 诱发的促炎调节剂提供了甚至

更高级的解决方案(Wang 等人, (2000) 《生物学化学杂志》 (*J. Biol. Chem.*) 275:20260)。被最高度活化的基因是表达趋化因子(IL-8 和 MIP-1 $\beta$ )的那些基因, 而仅居其次被最高活化的基因是表达细胞因子 (TNF- $\alpha$ 、IL1 和 IL6)的那些基因。不考虑机制细节, 细菌 PG 对宿主的下游效应是强有效的炎症应答。事实上, PG 已被长期用来诱发动物模型的关节炎 (Cromartie 等人 (1977) 《实验医学杂志》 (*J. Exp. Med.*) 146:1585)。从化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 中部分纯化的 PG 目前可以商购获得(Lee Laboratories, 亚特兰大, GA) 而用于此目的。

低分子量的 PG 片断, 通称为胞壁肽 (muropeptides), 也在动物中表现出炎症效应, 并且这些效应取决于胞壁肽结构 (Tuomanen 等人, (1993) 《临床研究杂志》 (*J. Clin Invest.*) 92:297)。即使是最小的称之为胞壁酰二肽 (MDP)以及葡萄糖胺基胞壁酰二肽(GMDP)的 PG 片断, 还有它们的衍生物, 在动物中都表现出炎症效应(Kohashi 等人, (1980) 《传染性免疫》 (*Infect. Immun*) 29:70)。尽管高分子量的 PG 通过位于细胞表面的 TLR2 诱导促炎应答, 但低分子量的 PG 片断通过称之为 Nod1 和 Nod2 的胞内受体诱导它们的促炎活性(Girardin 等人, 《生物学化学杂志》 (*J. Biol. Chem.*), 于 2003 年 7 月 18 日网上公开, 原稿为 M307198200)。

Kasper 和 Tzianabos 证实, 在炎症模型如腹内脓肿形成、腹内败血以及术后粘连模型中测试时, 纯化自细菌细胞表面的某些多糖表现出体内保护效应(美国专利 5,679,654 和 5,700,787; PCT 国际公开 WO 96/07427、WO 00/59515 和 WO 02/45708)。这些研究者证实当从整个荚膜 (capsule) 纯化时, 源于脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 以及肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的某些多肽具有独特的特征, 这使得它们有别于许多的多糖抗原。前述分子

在本质上是高分子量、螺旋状和两性离子性的 (Wang 等人, (2000) 《美国国家科学院进展》 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 97:13478-13481, 以及其中的参考文献 5-9)。大多数细菌多糖是中性或带负电荷的, 并被认为是 T 细胞依赖性抗原 (Abbas 等人, (2000) 《细胞和分子免疫生物学》 (*Cellular and Molecular Immunobiology*) W.B. Saunders, 费城)。Kasper 和 Tzianabos 提出这些多糖的两性离子性质在它们与 CD4<sup>+</sup> T 细胞的相互作用中起作用 (Tzianabos 等人, (1993) 《科学》 262: 416-419; Tzianabos 等 (2001) 《美国国家科学院进展》 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 98:9365-9370)。这个小组近来更多的工作提示这些分子中有些可以介由它们的两性离子特征而与抗原提呈细胞 (APCs) 相互作用, 并且, 这些多糖抗原对 CD4<sup>+</sup> T 细胞的刺激有赖于携带 MHC II 的 APCs (Kalka-Moll 等人, (2002) 《免疫学杂志》 (*J. Immunol.*) 169:6149-6153)。有待于准确测定的是两性离子多糖与 APCs 之间的这些相互作用可以怎样刺激 CD4<sup>+</sup>T 细胞。这些研究者证明两性离子多糖在体外活化 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 这由增殖刺激以及细胞因子 IL2、INF $\gamma$ 和 IL10 的产生得到证明, 并且这种保护在体内可通过多糖刺激过的 T 细胞而过继性地转移 (PCT 国际公开 WO 00/59515; Kalka-Moll 等人, (2000) 《免疫学杂志》 (*J. Immunol.*) 164:719-724; Tzianabos 等人, (2000) 《生物学化学杂志》 (*J. Biol. Chem.*) 275:6733-6738)。在这个小组早期的研究中, CD4<sup>+</sup>细胞的刺激并不一定依赖于 APCs 的存在, 并且这些分子对来源于大鼠和小鼠物种的 T 细胞的促有丝分裂特性是不同的: 大鼠脾细胞响应 CP1 处理而增殖, 而小鼠脾细胞并不这样 (Tzianabos 等人, (1995) 《临床研究杂志》 (*J. Clin. Invest.*) 96:2727-2731; Brubaker 等人, (1999) 《免疫学杂志》 (*J. Immunol.*) 162:2235-2242)。

然而,总的说来,他们的观察令这个小组假设多糖对 CD4+ T 细胞的活化导致产生防御炎性应答的细胞因子如 IL2 或 IL10 (PCT 国际公布 WO 00/59515; Kalka-Moll 等人, (2000) 《免疫学杂志》 (*J. Immunol.*) 164:719-724; Tzianabos 等人, (2000) 《生物学化学杂志》 (*J. Biol. Chem.*) 275:6733-6738; Tzianabos 等人, (1999) 《免疫学杂志》 (*J. Immunol.*) 163: 893-897)。然而,究竟这些分子是怎样活化 T 细胞的或它们是怎样发挥它们的保护效果的仍不清楚。使得对这些多糖的理解更为混乱的是,这个组发表的其他论文表明相同的两性多糖在曾观察到这些分子保护作用的同样的体内模型中能诱发脓肿形成 (Tzianabos 等人, (1993) 《科学》 262: 416-419; Tzianabos 等人, (1994) 《传染性免疫》 (*Infect. Immun.*) 62:3590-3593)。因此,根据这群文献难以确定这些两性多糖在体内如何作为免疫系统的抑制性调节剂发挥作用的机理。

另一个组研究人员描述了分离自橄榄压榨废水的革兰氏阳性菌, *Paenibacillus jamilae* 的外多糖(荚膜样)的免疫调节效果 (Ruiz-Bravo 等人, (2001) 《临床诊断和实验室免疫学》 (*Clin. Diag. Lab. Immunol.*) 8:706-710)。尽管作者未公开此多糖的结构特征,他们的结果与上述 Kasper 和 Tzianabos 的工作类似。该分子称为 CP-7, 刺激培养物的淋巴细胞增殖以及 IFN $\gamma$  和 GM-CSF 的显著表达。另外,这个小组报道该化合物使得小鼠对单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 感染有抵抗力。这些研究者认为机理可能是通过刺激炎性 Th1 应答。

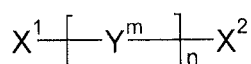
根据上文所讨论的大量研究,人们可以推断多糖抗原可能取决于目前尚未完全理解的结构特征而诱发促炎或抗炎应答。

考虑到文献中报道的有关大量免疫调节多糖的混乱的而且有时是矛盾的效果,本领域需要理解多糖促炎以及抗炎免疫调节的潜在的结构基础。

也需要另外的治疗分子，既包括促炎的也包括抗炎的，它们以安全和有效的方式调节免疫应答。这样的领悟以及另外的分子将促进开发甚至更为有效的用于疾病预防和治疗的免疫治疗策略。

### 发明概述

相应地，本发明提供式 I 的线性非交联免疫调节聚合化合物：



式 I

其中：

下标  $n$  表示聚合物中式  $Y^m$  单体单元的数目，是从 2 至 375 范围内的单个整数；

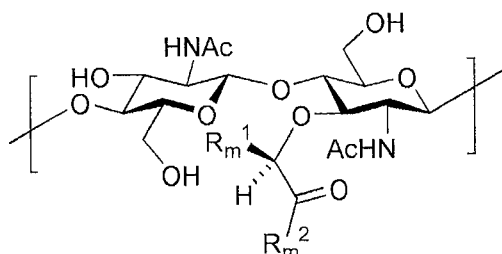
上标  $m$  表示聚合物中特定  $Y^m$  单体单元的位置，从左至右顺次为一组从 1 至  $n$  的整数；

$X^1$  为 H 或端基；

$X^2$  为 OH 或端基；

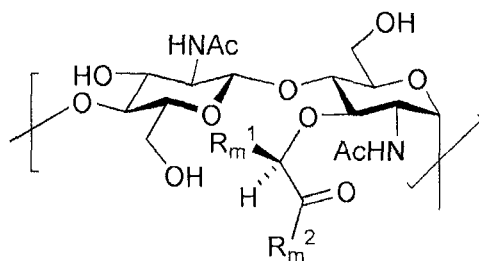
式  $Y^m$  的每一个单体单元独立地为：

(a) 当  $Y^m$  不是  $Y^n$  时，式 IIa 的基团；



式 IIa

或者(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时，式 IIb 的基团



式 IIb;

每一个  $R_1^1$ 、 $R_2^1 \dots R_{n-1}^1$  和  $R_n^1$  独立地为 H 或低级烷基;

每一个  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  独立地为 -OH、-NH<sub>2</sub>、氨基酸残基、或含有 2 至 10 个氨基酸残基的肽, 其中:

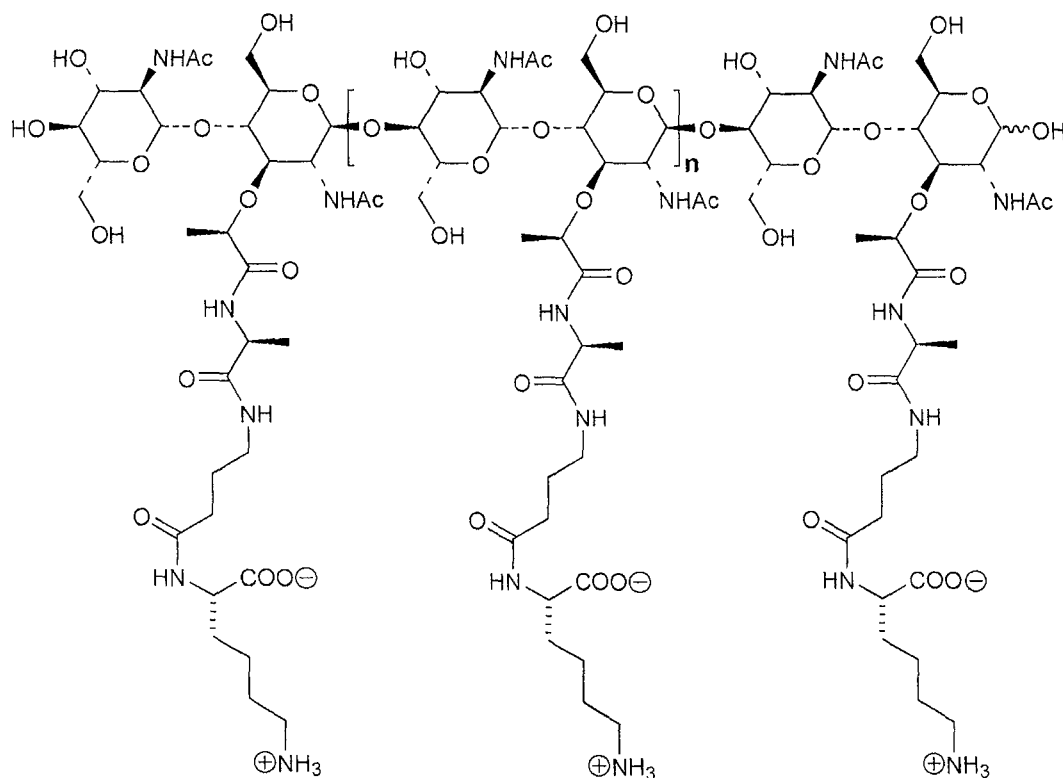
(a) 每一个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;

(b) 每一个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、CF<sub>3</sub>、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、-C(O)O 烷基和 -NO<sub>2</sub> 的基团取代; 和

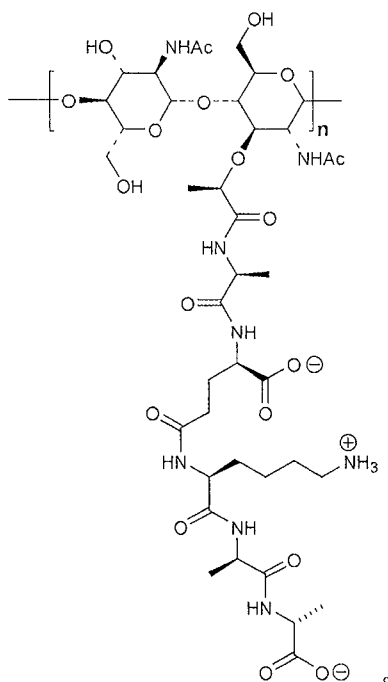
(a) 所述氨基酸残基独立地连接在  $\gamma$  羧基的  $\alpha$  位上、 $\alpha$  或  $\epsilon$  氨基上、或者是它们的任意组合;

或其药学上可接受的盐, 只要所述线性聚合物不是:

(a) 下式的均聚物, 其中  $n$  为 75 至 375:



(b) 或含下式的单体单元的均聚物:



在一个实施方案中, 其中  $R_1^1$ 、 $R_2^1 \dots R_{n-1}^1$  和  $R_n^1$  中的一个或多个是甲基。优选地,  $R_1^1$ 、 $R_2^1 \dots R_{n-1}^1$  和  $R_n^1$  每一个都是甲基。

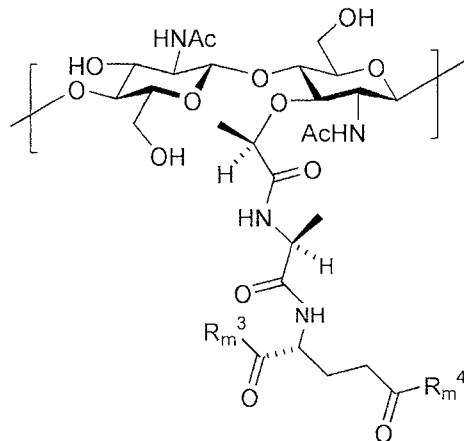
在另一个实施方案中,  $X^1$  是 H,  $X^2$  是 OH。

在另一实施方案中,  $n$  为 75 至 375、或 2 至 10、或 2 至 3。

在另一个实施方案中,  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个是二肽、三肽、四肽或五肽。优选地,  $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  每一个都是二肽、三肽、四肽或五肽。

在另一个实施方案中, 式  $Y_m$  的一个或多个单体单元是:

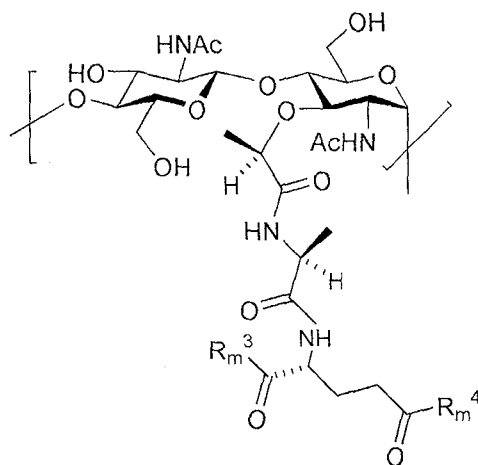
(a) 当  $Y^m$  不是  $Y^n$  时, 式 IIIa 的基团;



式 IIIa



或者(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时, 式 IIIb 的基团



式 IIIb

其中:

每一个  $R_1^3$ 、 $R_2^3 \dots R_{n-1}^3$  和  $R_n^3$  独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ ;

每一个  $R_1^4$ 、 $R_2^4 \dots R_{n-1}^4$  和  $R_n^4$  独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ 、氨基酸残基、或含有 2 至 8 个氨基酸残基的肽, 其中:

(a) 每一个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;

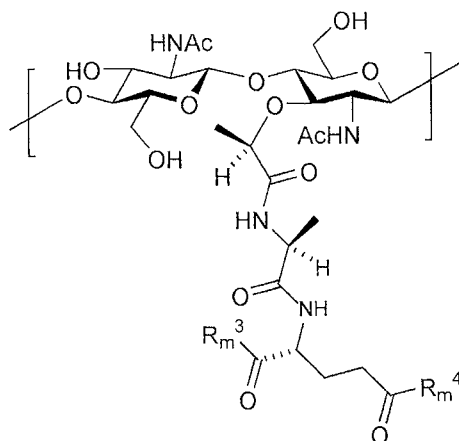
(b) 每一个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、 $CF_3$ 、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、 $-C(O)O$  烷基和  $-NO_2$  的基团取代; 和

(c) 所述氨基酸残基独立地连接在  $\gamma$  羧基的  $\alpha$  位上、 $\alpha$  或  $\epsilon$  氨基上、或者是它们的任意组合。

优选地, 式  $Y^m$  的每一个单体单元, 除了  $Y^n$  之外, 为式 IIIa 的基团; 并且  $Y^n$  为式 IIIb 的基团。这些化合物在文中称之为式 V 的化合物。优选地, 这些化合物是基本上纯的。

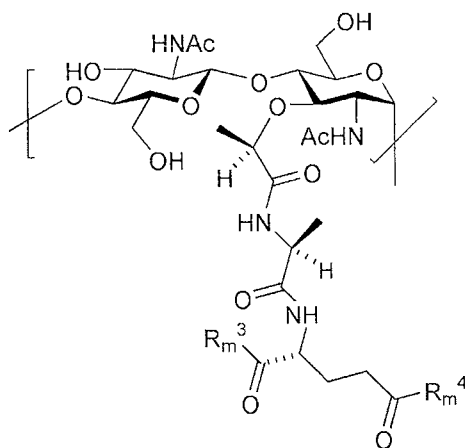
在另一个实施方案中, 式  $Y^m$  的任何一个单体单元都不是

(a) 当  $Y^m$  不是  $Y^n$  时, 式 IIIa 的基团;



式 IIIa

或者(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时, 式 IIIb 的基团



式 IIIb

其中:

每一个  $R_1^3$ 、 $R_2^3 \dots R_{n-1}^3$  和  $R_n^3$  独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ ;

每一个  $R_1^4$ 、 $R_2^4 \dots R_{n-1}^4$  和  $R_n^4$  独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ 、氨基酸残基或者含有 2 至 8 个氨基酸残基的肽, 其中:

(c) 每一个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;

(d) 每一个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、 $CF_3$ 、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、 $-C(O)O$  烷基和  $-NO_2$  的基团取代; 和

(e) 所述氨基酸残基独立地连接在  $\gamma$  羧基的  $\alpha$  位上、 $\alpha$  或  $\epsilon$  氨基上、或者是它们的任意组合;

这些化合物在文中称之为式 VI 的化合物。

在另一个实施方案中， $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个带净电荷，优选负净电荷。优选地， $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  每一个都带净电荷，优选负净电荷。

在另一个实施方案中， $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中的一个或多个带净中性电荷。优选地， $R_1^2$ 、 $R_2^2 \dots R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  每一个都带净中性电荷。

在另一个实施方案中，所述线性聚合物是均聚物。

在另一个实施方案中，所述线性聚合物是无规共聚物、交替共聚物或嵌段共聚物。优选地，所述线性聚合物是无规共聚物。所述线性聚合物可含有 2 至 375 种不同的单体单元。

在另一个实施方案中，本发明提供了组合物，其含有任一前述化合物或其盐，连同缓冲剂、稀释剂、赋形剂或载体。所述组合物还可含有分散剂，如聚乙二醇、甘油或蔗糖。

在另一个实施方案中，本发明提供了药物组合物，其含有任一前述化合物或其药学上可接受的盐，连同药学上可接受的缓冲剂、稀释剂、赋形剂或载体。所述药学组合物还可含有分散剂，如聚乙二醇、甘油或蔗糖。

在另一个实施方案中，本发明提供了式 I 的化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗对免疫调节剂治疗敏感的疾病或紊乱的药物的用途。

在另一实施方案中，本发明提供了式 V 的化合物或其药学上可接受的盐用于制备疫苗佐剂的用途。

在另一个实施方案中，本发明提供了式 I 的化合物或其药学上可接受的盐用于治疗对免疫调节剂治疗敏感的疾病或紊乱的用途。

在另一个实施方案中，本发明提供了在哺乳动物中诱导免疫应答的方法，所述方法包括向所述哺乳动物给药有效量的式 I 的化合物或其药学上可接受的盐。

在另一个实施方案中，所述免疫应答是炎性的，并且所述化合物是式 V 的化合物或其药学上可接受的盐。

在另一个实施方案中，所述免疫应答是抗炎性的，并且所述化合物是式 VI 的化合物或其药学上可接受的盐。

在另一个实施方案中，本发明提供了抑制抗原提呈细胞成熟的方法，所述方法包括将所述抗原提呈细胞和有效量的式 VI 的化合物或其药学上可接受的盐在体外和有效抑制所述抗原提呈细胞成熟的条件下接触一段时间。

在另一个实施方案中，本发明提供了抑制哺乳动物抗原提呈细胞成熟的方法，所述方法包括向哺乳动物给药有效量的式 VI 的化合物或其药学上可接受的盐而抑制所述抗原提呈细胞成熟。

在另一个实施方案中，本发明提供了在需要的哺乳动物中抑制炎性应答的方法，包括：

(a) 从所述哺乳动物中分离外周血单核细胞或其含单核细胞的级分；

(b) 将所述分离的外周血单核细胞或单核细胞和含有有效量的使单核细胞分化为未成熟树突细胞的细胞因子的组合物在体外和有效产生未成熟的单核细胞来源的树突细胞的条件下接触一段时间；

(c) 将所述未成熟的单核细胞来源的树突细胞和有效量的式 VI 的化合物或其药学上可接受的盐在体外和有效阻止未成熟的单核细胞来源的树突细胞成熟的条件下接触一段时间；和

(d) 向所述哺乳动物给药所述未成熟的单核细胞来源的树突细胞，降低所述哺乳动物的树突细胞驱动与 T 细胞同源性相互作用的能力，并抑制所述哺乳动物的炎性应答。

在文中公开的这种及其他离体方法中，经处理细胞的给药可以通过静

脉内、腹膜内或经由心间（intercardiac）路径实施。

可经由上述和下述方法治疗的炎性应答包括脓肿和术后粘连、败血症；类风湿性关节炎；重症肌无力；炎性肠病；结肠炎；系统性红斑狼疮；多发性硬化症；冠状动脉疾病；糖尿病；肝纤维化；银屑病；湿疹；急性呼吸窘迫综合症；急性炎性胰腺炎；内窥镜逆行胆管胰造影术诱导的胰腺炎；烧伤；冠状、脑及外周动脉粥样化形成；阑尾炎；胆囊炎；憩室炎；内脏纤维变性紊乱；创伤愈合；皮肤瘢痕形成紊乱；肉芽肿紊乱；哮喘；坏疽性脓皮症；急性发热性中性白细胞增多性皮肤病性脓皮病；贝切特氏病；原发硬化性胆管炎以及细胞、组织或器官移植。

又在另一个实施方案中，本发明提供了在需要的哺乳动物中抑制炎性应答的方法，包括：

向所述哺乳动物给药有效量的式 VI 的化合物或其药学可接受的盐，以阻止所述哺乳动物的树突细胞或其他抗原提呈细胞成熟，从而使得它们不能刺激 T 细胞活化，

由此抑制所述哺乳动物中所述的炎性应答。

在另一个实施方案中，本发明提供了在需要的哺乳动物中抑制炎性应答的方法，包括：

(a) 从所述哺乳动物中分离外周血单核细胞或其含单核细胞的级分；

(b) 将所述分离的外周血单核细胞或单核细胞和含有有效量的使单核细胞分化为未成熟树突细胞的细胞因子的组合物在体外和有效产生未成熟的单核细胞来源的树突细胞的条件下接触一段时间；

(c) 将所述未成熟的单核细胞来源的树突细胞和有效量的式 VI 的化合物或其药学上可接受的盐在体外和有效阻止未成熟的单核细胞来源的树突细胞成熟的条件下接触一段时间；

(d) 将所述未成熟的树突细胞和幼稚 T 细胞在体外接触以产生 T 调节细胞；和

(e) 向所述哺乳动物给药抑制 T 效应细胞的所述 T 调节细胞，  
由此抑制所述炎性应答。

在另一实施方案中，本发明提供了在需要的哺乳动物中抑制炎性应答的方法，包括：

向所述哺乳动物给药有效量的式 VI 的化合物或其药学上可接受的盐，

产生抑制 T 效应细胞并抑制所述炎性应答的 T 调节细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了测量式 VI 的化合物或其药学上可接受的盐的免疫学活性的方法，包括：

向所述哺乳动物给药所述化合物；

向所述哺乳动物给药 Candin（白色念珠菌皮试抗原）；和

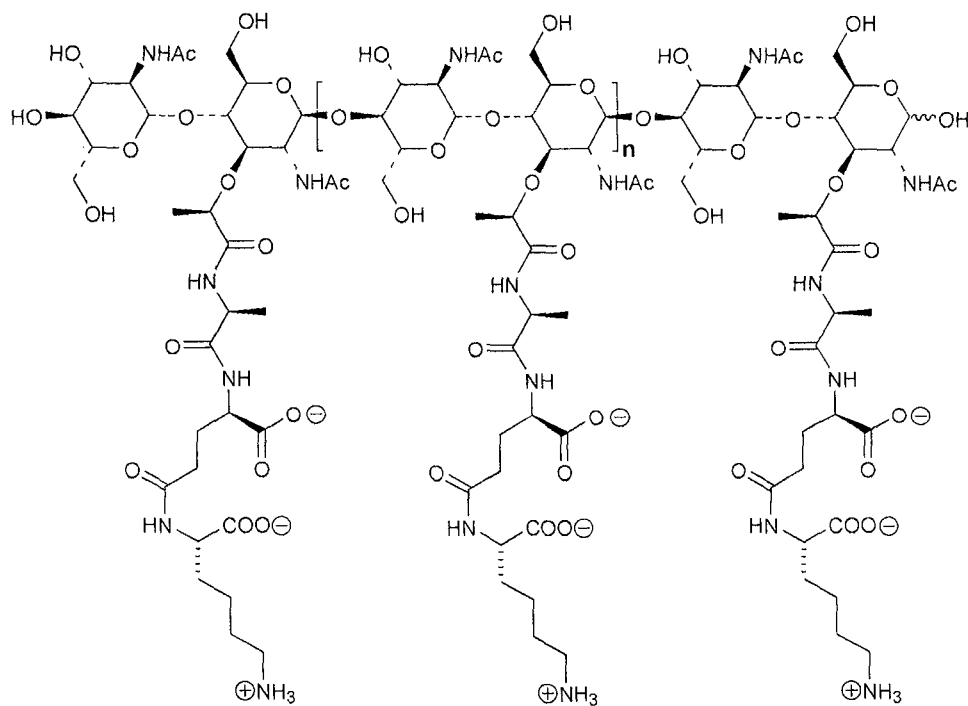
测量对由所述 Candin 引发的迟发型超敏反应皮肤病变的抑制，

其中，与未接受所述化合物的未治疗对照哺乳动物的病变大小相比，所述哺乳动物病变大小的下降表明所述化合物能有效抑制局部炎性应答。

在另一个实施方案中，本发明提供了活化抗原提呈细胞 toll 样受体的方法，所述方法包括将所述抗原提呈细胞和有效量的式 V 的化合物或其药学上可接受的盐在有效活化所述 toll 样受体的条件下接触一段时间。所述 toll 样受体可以是 toll 样受体 2。

在另一个实施方案中，本发明提供了在需要的哺乳动物中预防或治疗病毒感染或癌症的方法，所述方法包括向所述哺乳动物给药有效量的式 V 的化合物或其药学上可接受的盐。

在另一个实施方案中，本发明提供了诱导哺乳动物炎症应答的方法，包括向哺乳动物给药有效量的下式的线性均聚物，其中  $n$  为 2 至 375：



本发明涵盖文中公开的实施方案的所有组合。

本发明更多的应用范围将会由下面提供的详细说明而变得显而易见。但是，应当理解，本发明的详细说明和具体实施例，虽然表明了本发明的优选实施方案，但仅仅是作为举例说明而提供的，这是因为根据此种详细说明，在本发明的精神和范围之内进行各种变化和修改对本领域技术人员来说是显而易见的。

### 附图的简短说明

根据下面的详细说明结合附图，将会更好地理解本发明的上述和其他方面、实施方案、特征以及优点，所有这些仅作为举例说明而提供，而不是限制本发明，其中：

图 1 为示意图, 显示了当树突细胞和 T 细胞之间的相互作用导致炎症或过继性免疫时发生的正常事件。

图 2 为示意图, 显示了本发明的 T 调节细胞假说。

图 3 显示了经化合物 1 处理的来自人外周血单核细胞(PBMCs)的细胞因子的图型。培养的人 PBMCs 用 0.6 微克/毫升的化合物 1 处理, 并且在为期 8 天的时间内测量细胞因子的表达。以未处理的对照培养基校正结果。数据表达为一式三份 3 个孔的平均值 $\pm$ 所表现的细胞因子浓度的标准误差。结果显示化合物 1 处理的主要应答是 IL10 的表达。

图 4 显示经 FITC-葡聚糖(FITC-Dx、大小 40 kDa; 图表 A)或 Oregon 绿标记的化合物 1 (OG-Cpd 1、大小 150 kDa; 图表 B) 处理 2 分钟的人 iDCs 的共聚焦显微图像。与聚合物孵育后, 彻底洗涤细胞以除掉任何外部的聚合物, 以 2 分钟的间隔追踪被内在化的物质。使用任一化合物都能观察聚合物在内吞液泡中的分布, 并且在照片暗视野的细胞中荧光显现为白点物质。

图 5 分别显示了 37°C 或 0°C 下人单核细胞来源的树突细胞对 FITC-葡聚糖(图表 A)或 Oregon 绿标记的化合物 1 (图表 B) 的摄取的流式细胞分析。每一个柱形图显示了在所示的时间间隔内荧光信号相对于细胞数目的平均荧光强度。结果显示对每种分子的摄取是相似的, 并且这种摄取在 0 °C 当细胞新陈代谢失活时被抑制。

图 6 显示化合物 1 并不诱导培养物中 PBMCs 的分裂。分离的 PBMCs 与 100  $\mu$ g/ml 的化合物 1( $\nabla$ )、25  $\mu$ g/ml 的植物凝集素(PHA) ( $\blacksquare$ ) 孵育, 或者在所示的天数内留置不处理( $\bullet$ )。在每一个时间点前 18 小时向培养物中加入放射性胸苷 [ $^3$ H]-Thy, 并通过闪烁计数测量掺入细胞的放射标记的量。放射性测量为每分钟的计数。



图 7 显示化合物 1 抑制抗-CD3 抗体介导的人 PBMCs 的增殖。PBMCs 在包被多种浓度的抗-CD3 抗体的组织培养板上孵育 48 小时（图表 A）或 72 小时（图表 B）之前，先与 100  $\mu\text{g/ml}$  化合物 1 预孵育 24 小时。使用  $^3\text{H}$ -胸苷掺入测定接着通过液体闪烁计数测量细胞增殖。

图 8 为示意图，显示了当化合物 2、树突细胞和 T 细胞之间的相互作用导致炎症或过继性免疫时可能发生的事件。

### 发明详述

提供如下的发明详述以帮助技术人员实施本发明。虽然如此，如下的详述不能理解为对本发明不合理的限制，因为本领域普通技术人员能够对本文讨论的实施方案进行修饰和变动而不偏离本发明的精神和范围。

特此将文中所引用的每一篇参考文献的内容全文并入以作参考。

### 定义

如文中所用，缩写词“h”或“hr”表示小时。缩写词“min”表示分钟。

如文中所用，除非另行指出，如下术语具有如下含义：

"Ac" 是指  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ 。

"烷基"是指脂肪烃基团，其可以是直链或支链的，链中具有大约 1 到大约 20 个碳原子。优选烷基基团链中有 1 到大约 12 个碳原子，更优选是如文中所定义的低级烷基。支链表示一个或多个低级烷基基团如甲基、乙基或丙基连接在线性烃链上。"低级烷基"是指可以是直链或支链的链中的大约 1 到大约 4 个碳原子。

"氨基酸"是指选自如文中定义天然和非天然氨基酸的氨基酸。氨基酸也旨在包括在  $\alpha$ -碳上有左旋或右旋立体化学的氨基酸。优选的氨基酸是

拥有 $\alpha$ -氨基基团的那些。取决于侧链上的取代基，所述氨基酸可以是中性的、阳性的或阴性的。“中性氨基酸”是指含有不带电荷的侧链取代基的氨基酸。典型的中性氨基酸包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸。“阳性氨基酸”是指在生理 pH 下侧链取代基带正电荷的氨基酸。典型的阳性氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。“阴性氨基酸”是指在生理 pH 下侧链取代基携带净负电荷的氨基酸。典型的阴性氨基酸包括天门冬氨酸和谷氨酸。优选的氨基酸是 $\alpha$ -氨基酸。典型的天然氨基酸是异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸。“非天然氨基酸”是指没有核酸密码子的氨基酸。例如，典型的非天然氨基酸包括如上所述的天然 $\alpha$ -氨基酸的 D-异构体；Aib (氨基丁酸)、 $\beta$ Aib (3-氨基-异丁酸)、Nva (正缬氨酸)、 $\beta$ -Ala、Aad (2-氨基己二酸)、 $\beta$ Aad (3-氨基己二酸)、Abu (2-氨基丁酸)、Gaba ( $\gamma$ -氨基丁酸)、Acp (6-氨基己酸)、Dbu (2,4-二氨基丁酸)、 $\alpha$ -氨基庚二酸、TMSA (三甲基硅基丙氨酸)、aIle (别-异亮氨酸)、Nle (正亮氨酸)、叔-Leu、Cit (瓜氨酸)、鸟氨酸、Dpm (2,2'-二氨基庚二酸)、Dpr (2,3-二氨基丙酸)、 $\alpha$ -或 $\beta$ -Nal、Cha (环己基-丙氨酸)、羟基脯氨酸、Sar (肌氨酸)等等；环状氨基酸；N<sup>a</sup>-烷基化氨基酸如 MeGly (N<sup>a</sup>-甲基甘氨酸)、EtGly (N<sup>a</sup>-乙基甘氨酸) 和 EtAsn (N<sup>a</sup>-乙基天门冬酰胺)；以及 $\alpha$ -碳原子携带两个侧链取代基的氨基酸。文中使用的天然和非天然氨基酸及其残基的命名是由 IUPAC 有机化学命名委员会和 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会根据命名大会如“ $\alpha$ -氨基酸的命名 (推荐, 1974)”生物化学, 14(2), (1975) 中所示建议的。就本说明书和所附权利要求书中所采用

的氨基酸及其残基的名称和缩写与上面所指出的那些不同而言，变换不同名称和缩写将得以阐明。

“氨基酸残基”是指通过酰胺键掺入到肽或分子的肽部分的单个氨基酸单元。

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

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

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

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

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

术语“抗炎症”、“抗炎性”等是指削弱或逆转炎症应答的任何过程。该

过程包括但不限于：可溶性调节剂如 IL-10 的诱导或细胞群如调节 T ( $T_{reg}$ ) 细胞的诱导。

“免疫应答”是指免疫系统的促炎或抗炎应答。

术语“调控”或“调节”等是指选定参数的上升或下降。

“净电荷”是指离子性物质电荷的算术总数，如存在净负电荷时具有(-)电荷的肽；存在净负电荷时具有(+,-)电荷的肽；存在净正电荷时具有(+,+,-)电荷的肽；存在净负电荷时具有(-,-)的肽；存在净正电荷时具有(+)的肽等。特别要注意，在具有(+,-)电荷的肽中不存在净电荷。

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

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

“肽”是指含有通过酰胺键连接起来的氨基酸残基的聚合物。

“药学上可接受的盐”是指本发明化合物相对无毒的无机和有机酸式加成盐以及碱式加成盐。这些盐可在化合物最终的分离和纯化期间原位制备。具体地，酸式加成盐可如此制备，即将游离碱形式的纯化化合物分别与合适的有机或无机酸反应，并分离这样形成的盐。典型的酸式加成盐包括氢溴酸盐、氢氯酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月硅酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘盐 (naphthylate)、甲磺酸盐、葡萄糖酸盐、lactobionate、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双- $\beta$ -羟基萘甲酸盐、龙胆酸盐、羟乙基磺酸盐、对甲基二苯甲酰酒石酸盐、甲磺

酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯酰磺酸盐、环己基磺酸盐和奎尼酸十二烷醇基磺酸盐 (quinateslaurylsulphonate salts) 等等。例如, 参见 S.M. Berge 等人, “药盐” J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977), 特此并入作为参考。碱式加成盐也可如此制备, 即将酸形式的纯化化合物分别与合适的有机或无机碱反应, 并分离这样形成的盐。碱式加成盐包括药学上可接受的金属和氨基盐。合适的金属盐包括钠、钾、钙、钡、锌、镁和铝盐。优选钠盐和钾盐。合适的无机碱式加成盐是由金属碱制备的, 这包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化锌。合适的氨基碱式加成盐是由具有足够碱性以形成稳定盐的氨制备的, 优选包括那些在药物化学领域中因其低毒性和药用可接受性而频繁使用的氨。氨、乙二氨、N-甲基-葡萄糖氨、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄甲基苄乙胺、二乙胺、哌嗪、三(羟甲基)-氨基甲烷、四甲基氢氧化胺、三乙胺、二苄胺、ephedrine, 脱氢枞胺、N-乙基哌啶、苄胺、四甲基胺、四乙胺、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、碱性氨基酸, 如赖氨酸和精氨酸, 以及二环己基胺等等。

“基本上纯的”是指纯度在约 90%到约 100%的范围内, 更优选从约 95%到约 100%, 并且甚至更优选从约 97%到约 100%, 包括 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和 100%的个体值或其中的任何范围。本发明化合物可以基本上纯的或分离的形式获得, 不含大量的生物污染物(包括具有免疫调节活性的其他分子), 它们通常出现在分离自天然细菌源的肽聚糖制品中。

如文中定义的“合成多糖抗原”或“SPA”是合成产生的基本上纯的线性非交联 N-乙酰葡萄糖胺基- $\beta$ -[1,4]-N-乙酰胞壁酰基肽的聚合物。所述肽可

含有两个或多个天然或非天然结构的 D 或 L 构型的氨基酸。如文中所公开的纯合成多糖抗原基本上没有天然存在的细菌细胞壁污染物。这种抗原不能由任何已知的化学或酶法从自然界得到。注意这种定义包括但不限于：天然的非交联细菌肽序列。文中公开的化合物 1 和 2 是合成肽聚糖(PGs)，它们是特殊的 SPAs。SPAs 可通过全合成产生。

“端基”：本发明的合成聚合物终止于具有游离还原型异头醇的胞壁酰残基。本领域技术人员将会意识到所述结构为吡喃型葡萄糖基的 N-乙酰胞壁酰基末端可由芳氨基处理形成 C-1 N-芳基衍生物，以及由芳胍基处理形成 C-1 胍。此外，用溶解性转糖基酶(如，Dijkstra 等人 (1994) 《结构生物学当代意见》 (*Curr. Opin. Struct. Biol.*) 4:810)限制性消化合成聚合物将产生具有胞壁酰基-[1,6]-酏键的末端，这可用于所得异头碳的化学修饰。

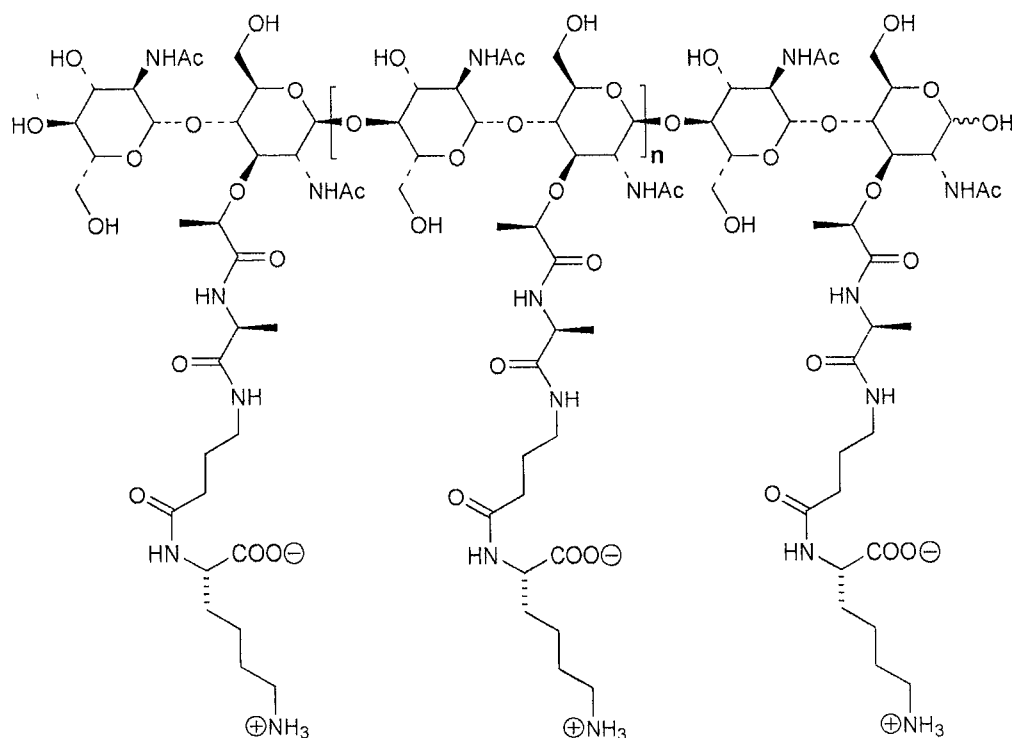
“T 调节细胞”或“T<sub>regs</sub>”是指独特谱系的免疫调节性 T 细胞，其在体内和体外有效地抑制炎症效应 T 细胞。T<sub>regs</sub> 特征在于表达某些细胞表面标志，例如，包括 CD4 和 CD25 (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>)。

“两性离子”是指每个多糖重复单元为单分子偶极离子或多极离子，例如，包括具有(+,-)、(+,-,-)等电荷的分子。

### 本发明的免疫调节剂

本发明的式 I 的化合物是线性非交联聚合物，并包括多种类型的均聚物和共聚物。这些聚合物可通过化学-酶促全合成得到，例如由 N-乙酰-葡萄糖胺获得。此外，取决于其结构，本发明的化合物可以是炎性或抗炎性的。

如下所示的化合物 1，一种式 VI 的化合物，为抗炎性免疫调节剂的实例。它是所示重复单元的均聚物，呈以 150 千道尔顿为中心的分子量分布。所述聚合物为吸湿性白色粉末，溶于水或盐。



化合物 1

细菌细胞壁中的天然的肽聚糖是单一的共价闭合高分子，其在整个细胞周期内精确限定了细菌细胞的形状。它是由聚合的肽聚糖聚糖链的平行刚性轴组成的，其中重复单元是 $\beta$ -[1,4]-交联 N-乙酰葡萄糖胺基- $\beta$ -[1,4]-N-乙酰基-胞壁酰基五肽。聚糖链呈每圈完整螺旋约 4 个重复单元的螺旋状。更为柔性的五肽轴从胞壁酸残基的乳酸羧基自 N 向 C 延伸。该肽一般是  $\text{H}_2\text{N}$ -丙氨酸-D-异-谷氨酸(或异-谷氨酰氨)-赖氨酸(或二氨基庚二酸盐 DAP)-D-丙氨酸-D-丙氨酸- $\text{COOH}$ 。该肽可在来自供体链的赖氨酸(或 DAP)与受体链倒数第二个 D-丙氨酸的羧基之间交联。活细胞中的实际交联度随种属而变，一般低于 100%。与之相比，本发明的化合物是线性的，也就是说，在肽中没有交联。

如下文所示，化合物1在腹膜内脓肿和术后粘连模型中防御炎症诱导。如下文所示实施例所证明的那样，对由此分子诱导的保护机制的研究揭示其可能抑制树突细胞 [免疫细胞所有成员中最为强大的抗原提呈细胞 (APCs)] 的成熟。未成熟APCs不能活化T细胞，这是因为其无力通过共刺

激向 T 细胞传递信号。用化合物 1 处理人 PBMCs 不能刺激 T 细胞的活化或增殖。用式 VI 的其他分子处理人 PBMCs 应当也不能刺激 T 细胞的活化或增殖。考虑到早先所讨论的有关两性离子多糖以及天然存在的肽聚糖的文献,这完全是预料之外的。业已报道两性离子多糖以及天然存在的肽聚糖都是 T 细胞活化的有丝分裂原 (PCT 国际公开 WO 00/59515; Kalka-Moll 等人(2000)《免疫学杂志》(*J. Immunol.*) 164:719-724; Tzianabos 等人(2000)《生物学化学杂志》(*J. Biol. Chem.*) 275:6733-6738; Levinson 等人(1983)《感染免疫学》(*Infect. Immun.*) 39:290-296)。此外,化合物 1 不能刺激体外受体细胞中的 Toll 样受体或者刺激 PBMC 培养物中炎性细胞因子的表达,而如果 APCs 成熟通过刺激 TLR2 或其他 TLRs 发生 (Schwander 等人(1999)《生物学化学杂志》(*J. Biol. Chem.*) 274:17406-17409; Medzhitov 等人(2001)《免疫学自然评论》(*Nat. Rev. Immunol.*) 6: 135-145),随后在抗原的存在下通过两类细胞之间预期的同源相互作用活化 T 细胞的话,这些都将是预期事件。预期式 VI 的其他化合物将不是 TLR2 或其他 TLRs 的配体。本发明人也推测在继式 VI 的分子处理之后, PBMC 培养物中存在的 CD4+CD25+细胞数目增加,表明用这类分子处理产生了未成熟 APCs 群,其驱动刺激培养物内的 T 调节细胞。这种假说进一步得到如下功能观察的支持,即继化合物 1 处理之后,用抗-CD3 抗体刺激抑制 PBMC 培养物中 T 细胞的增殖。

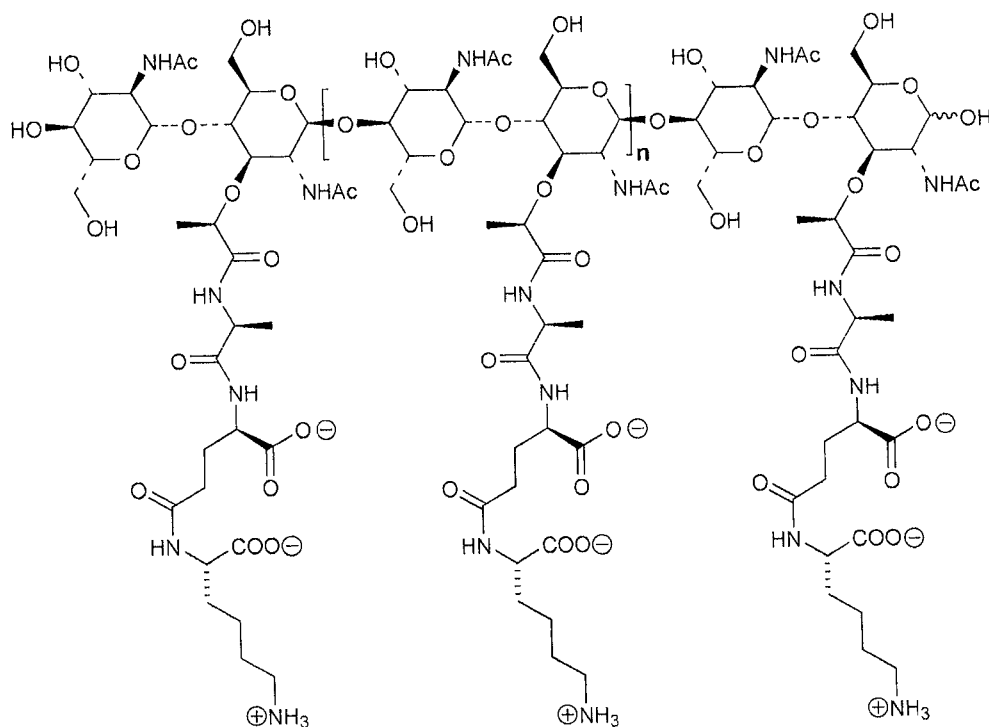
最后,发明人也令人惊讶地发现当用化合物1体外处理人PBMCs时,应答最为显著的是IL10的表达。观察到可忽略不计的IL2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL6或IL12的表达。IL10为具有多形效果的II型细胞因子(Moore等人(2001)《免疫学年鉴评论》(*Annu. Rev. Immunol.*) 19:683-765)。已经证明其具有强抗炎活性,下调效应T细胞 (Morel等人(2002)《免疫学》(*Immunol.*)



106:229-236)、树突细胞(Martin等人(2003)《免疫》(*Immunity*) 18:155-167)及其他抗原提呈细胞(Williams等人(2002)《白细胞生物学杂志》(*J. Leuko. Biol.*) 72:800-809)的炎性应答。IL10由多种细胞类型生产,包括T细胞、树突细胞、单核细胞(Moore等人(2001)《免疫学年鉴评论》(*Annu. Rev. Immunol.*) 19:683-765)以及称之为调节T (Treg)细胞的特化T细胞亚型(Suri-Payor等人(2001)《自身免疫杂志》(*J. Autoimmun.*) 16:115-123)。此细胞因子以许多方式帮助维持免疫系统内的动态平衡。IL10起压制未经校验的炎性应答的作用,否则它们对宿主将是有害的(Moore等人(2001)《免疫学年鉴评论》(*Annu. Rev. Immunol.*) 19:683-765)。

这些结果与表征免疫系统对细菌肽聚糖的识别的大量文献形成直接对照。此外,考虑到上文讨论的表明细菌肽聚糖是强致炎剂的当前大量有关天然肽聚糖的证据,本文公开的式 VI 的化合物对抗炎应答的刺激是全新的并且是预料之外的。从而,尽管天然肽聚糖是强致炎性的,但本文公开的 VI 的化合物是抗炎性的。发明人令人惊讶的 VI 的化合物应表现出体外抗炎活性的发现与先前公开的有关纯化的细菌肽聚糖的结果形成鲜明对照,从而促使在动物炎症模型中测试化合物 1 的活性。如下文所证明的那样,该合成肽聚糖在以炎症为基础的病变动物模型中表现出保护性的治疗效果。

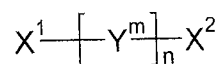
化合物2是本发明式V的代表性化合物,为炎性免疫调节剂的实例。



化合物2

该分子活化TLR2 (数据未显示), 并且如下文所示, 诱导人PBMCs适度产生促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 。化合物2适度的促炎活性与分离自细菌来源的天然肽聚糖的强致炎活性形成对照。这种差异很可能是因分离自细菌的异质物质中存在着的众多生物学污染物的存在和活性所致。

式I的线性非交联聚合物:



式 I

包含  $n$  个独立的式  $Y^m$  的单体单元。下标  $n$  表示聚合物中式  $Y^m$  单体单元的数目, 为从 2 到的 375 范围中的单个整数。例如, 当  $n=2$  时, 存在两个单体单元:  $Y^1$  和  $Y^2$ 。当  $n=3$  时, 存在三个单体单元:  $Y^1$ 、 $Y^2$  和  $Y^3$ 。当  $n=375$  时, 存在 375 个单体单元:  $Y^1$ 、 $Y^2$ 、 $Y^3 \dots Y^{374}$  和  $Y^{375}$ 。

上标  $m$  表示聚合物中顺次从左到右特定单体单元  $Y^m$  的位置, 是从 1 到  $n$  的系列整数。 $Y^1$  直接连接于  $X^1$ , 而  $Y^n$  直接连接于  $X^2$ 。序列的阐释性实例包括如下:

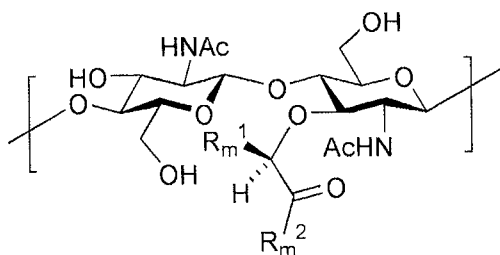
| <u><math>n</math></u> | <u><math>m</math></u> | <u>式 I 的聚合物</u>                               |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
| $n$                   | 1、2、3... $n-1$ 和 $n$  | $X^1-Y^1-Y^2-Y^3-...-Y^{n-1}-Y^n-X^2$         |
| 2                     | 1 和 2                 | $X^1-Y^1-Y^2-X^2$                             |
| 3                     | 1、2 和 3               | $X^1-Y^1-Y^2-Y^3-X^2$                         |
| 4                     | 1、2、3 和 4             | $X^1-Y^1-Y^2-Y^3-Y^4-X^2$                     |
| 375                   | 1、2、3... 374 和 375    | $X^1-Y^1-Y^2-Y^3-Y^4-...-Y^{374}-Y^{375}-X^2$ |

每个单体单元  $Y^m$  (即  $Y^1$ 、 $Y^2$ ... $Y^{n-1}$  和  $Y^n$  中的每一个)独立选择, 从而它们可以全部相同、全部不同或者是它们的任意组合。从而, 本发明包括均聚物 (即所有单体都相同) 和共聚物 (即两个或多个不同单体)。共聚物可以是无规共聚物、嵌段共聚物或交替共聚物。例如, 如果  $Y^1$  和  $Y^2$  表示两个不同的式  $Y^m$  单体单元, 则聚合物类型可阐释如下:

| <u>聚合物类型</u> | <u>阐释性实例</u>                                              |
|--------------|-----------------------------------------------------------|
| 均聚物          | $X^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^1-X^2$     |
| 无规共聚物        | $X^1-Y^1-Y^2-Y^1-Y^1-Y^2-Y^2-Y^1-Y^2-Y^1-Y^1-Y^2-Y^1-X^2$ |
| 嵌段共聚物        | $X^1-Y^1-Y^1-Y^1-Y^2-Y^2-Y^2-Y^1-Y^1-Y^1-Y^2-Y^2-Y^2-X^2$ |
| 交替共聚物        | $X^1-Y^1-Y^2-Y^1-Y^2-Y^1-Y^2-Y^1-Y^2-Y^1-Y^2-Y^1-Y^2-X^2$ |

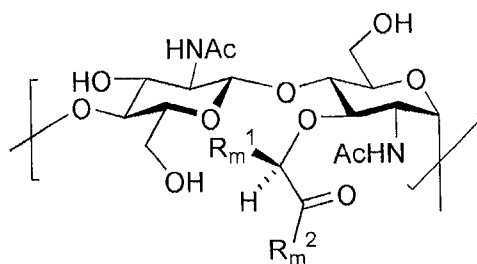
在式 I 的聚合物中, 式  $Y^m$  的每个单体单元独立地为:

(a) 当  $Y^m$  不是  $Y^n$  时, 式 IIa 的基团;



式 IIa

或者(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时, 式 IIb 的基团



式 IIb。

式  $Y^m$  的每个单体单元包含如下所述的独立的变量组:  $R_m^1$  和  $R_m^2$ :

| 单体单元: $Y^m$ | $Y^m$ 变量: $R_m^1$ 和 $R_m^2$ |
|-------------|-----------------------------|
| $Y^m$       | $R_m^1$ 和 $R_m^2$           |
| $Y^1$       | $R_1^1$ 和 $R_1^2$           |
| $Y^2$       | $R_2^1$ 和 $R_2^2$           |
| $Y^3$       | $R_3^1$ 和 $R_3^2$           |
| $Y^{375}$   | $R_{375}^1$ 和 $R_{375}^2$   |

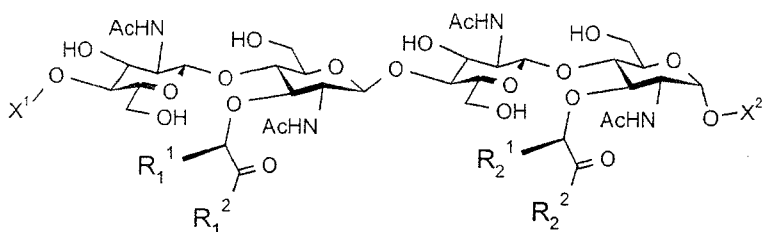
从而, 包含  $n$  个单体  $Y^m$  单元(即  $Y^1$ 、 $Y^2$ 、 $Y^3$ ... $Y^{n-1}$  和  $Y^n$ )的聚合物将具有两组变量:

组 1:  $R_1^1$ 、 $R_2^1$ 、 $R_3^1$ ... $R_{n-1}^1$  和  $R_n^1$

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

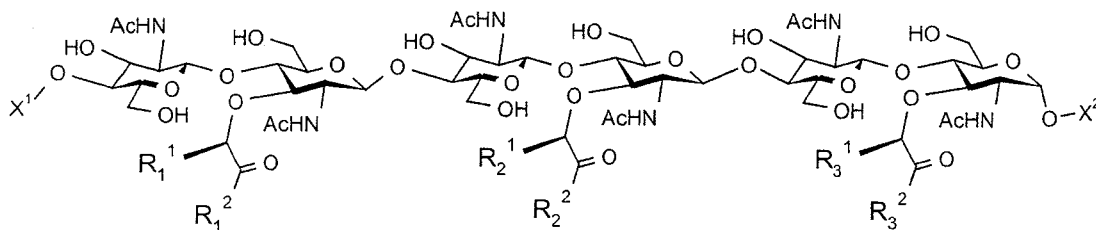
在每一组中, 变量独立选择, 全部相同、全部不同, 或者是它们的任意组合。也就是说,  $R_1^1$ 、 $R_2^1$ 、 $R_3^1$ ... $R_{n-1}^1$  和  $R_n^1$  中每一个都独立选择。同样地,  $R_1^2$ 、 $R_2^2$ 、 $R_3^2$ ... $R_{n-1}^2$  和  $R_n^2$  中每一个也都独立选择。

当  $n=2$  时, 式 I 的聚合物的实例如下所示:



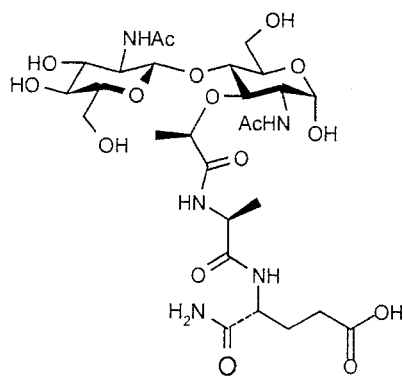
其中,  $R_1^1$  和  $R_2^1$  独立选择, 并且  $R_1^2$  和  $R_2^2$  也独立选择。

类似地, 当  $n=3$  时, 式 I 的聚合物如下所示:

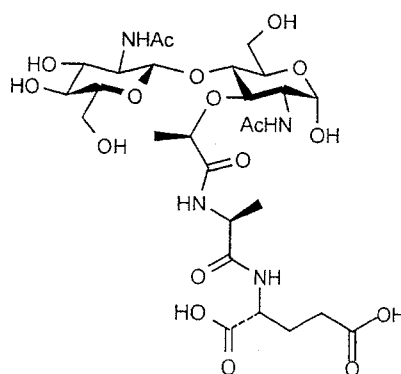


其中,  $R_1^1$ 、 $R_2^1$  和  $R_3^1$  独立选择, 并且  $R_1^2$ 、 $R_2^2$  和  $R_3^2$  也独立选择。

具有如下结构的二糖单体 GMDP (N-乙酰葡萄糖胺基-N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺) 和 GMDP-A (N-乙酰葡萄糖胺基-N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-谷氨酸):



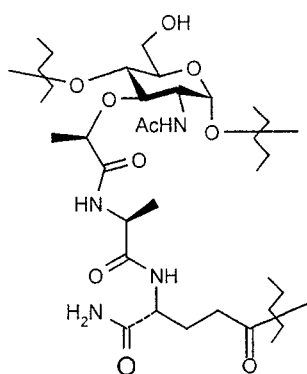
GMDP



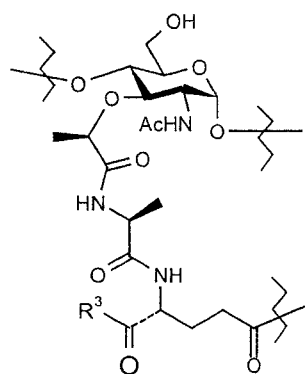
GMDP-A

据报道诱导炎性应答 (例如参见美国专利 4,395,399)。类似地, 商业

上可得的聚合细菌肽聚糖样品(金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), Sigma; 酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*), Lee Laboratories)是强致炎性的(酿脓链球菌>链球菌)。尽管这些物质在组成上是异质的,业已HPLC纯化和表征了更小的二糖片断(其中一些具有肽交联),并且也是致炎性的。这些物质的致炎能力据报道取决于结构(Tuomanen 等人(1993)《临床研究杂志》(*J. Clin. Invest.*) 92:297)。据报道具有生物学活性的最小肽聚糖片断为胞壁酰二肽或MDP,并且其生物学活性在本质上是致炎性的(Chedid (1983)《微生物学免疫学》(*Microbio. Immunol.*) 27:723)。事实上,如下所示的MDP和MDP-A基序是已知致炎化合物的共同特征:



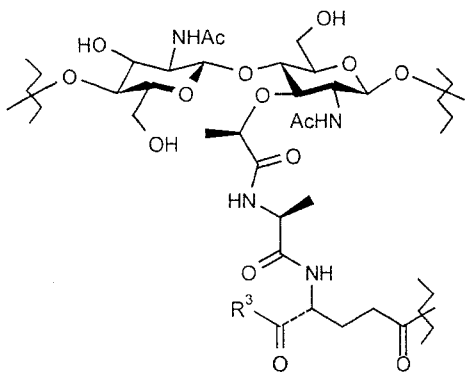
MDP 基序



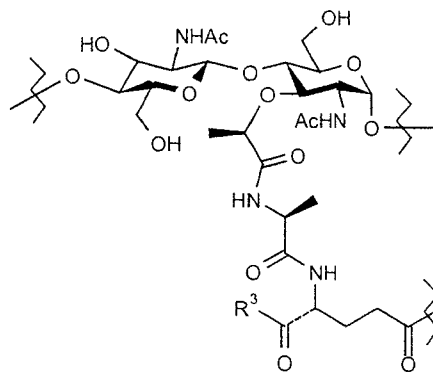
MDP-A 基序

申请人发现至少式 I 的化合物必须包括如下基序之一,以诱导炎症应

答:



GMPD 基序

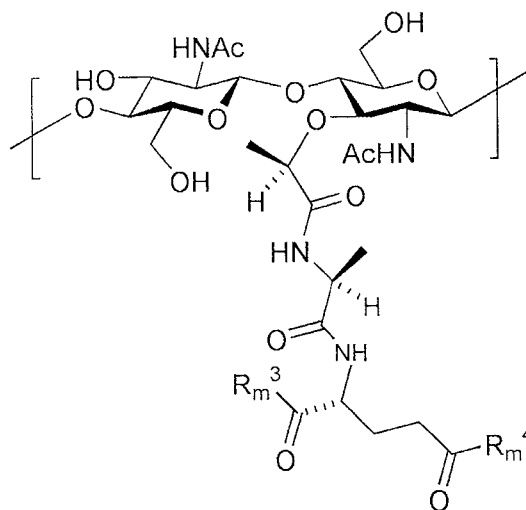


GMDP 基序

如果这些基序缺失或被修饰,则聚合物将诱导抗炎应答。如果第二氨基酸(D-异-Glu 或 D-异-Gln)缺少侧羧基,或者所述侧羧基为 L 构型,则促炎活性消除(Girardin 等人(2003)《生物学化学杂志》(*J. Biol Chem.*) 278:8869)。剩余的三个氨基酸(Lys-D-Ala-D-Ala)中增加一个或多个导致活性保留。我们在下文证明化合物 2 由人外周血单核细胞产生促炎应答。其聚合结构为 $-\text{[NAG-NAM]}_n\text{-}$ 三肽,其中  $n$  为整数,其分布值中在大约 135 左右,而三肽为天然细菌序列(Ala-D-异-Glu-Lys)。此外,我们在下文证明化合物 1 在许多生物学系统中产生抗炎应答。除了第二氨基酸缺少侧羧基之外,该分子与化合物 2 相同。

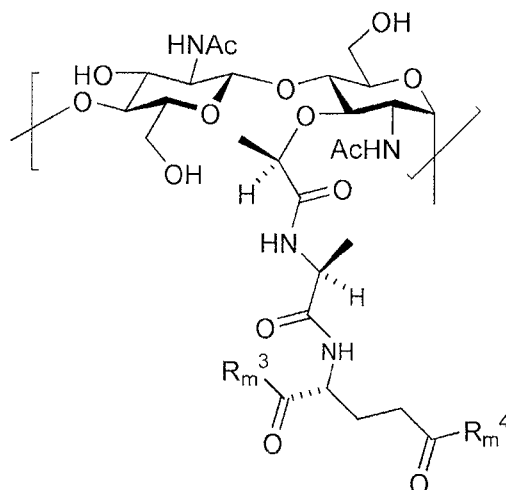
某些式 I 的化合物也诱导炎性应答,例如,当一个或多个式  $Y^m$  的单体单元为以下时:

(a) 当  $Y^m$  不是  $Y^n$  时,式 IIIa 的基团;



式 IIIa

或者(b)当  $Y^m$  是  $Y^n$  时,式 IIIb 的基团,



式 IIIb

其中:

$R_1^3$ 、 $R_2^3 \dots R_{n-1}^3$  和  $R_n^3$  中的每一个独立地为 -OH 或 -NH<sub>2</sub>;

$R_1^4$ 、 $R_2^4 \dots R_{n-1}^4$  和  $R_n^4$  中的每一个独立地为 -OH 或 -NH<sub>2</sub>、氨基酸残基或者含有 2-8 个氨基酸残基的肽, 其中:

(f) 每个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;

(g) 每个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、CF<sub>3</sub>、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、-C(O)O 烷基和 -NO<sub>2</sub> 的基团取代; 和

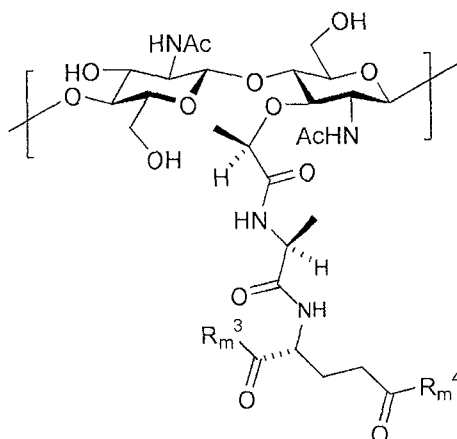
(b) 氨基酸残基独立地连接在  $\gamma$  羧基的  $\alpha$  位上、 $\alpha$  或  $\varepsilon$  氨基上、或者是它们的任意组合。

这些炎性化合物在文中称之为式 V 的化合物。实例包括如文中所述的化合物 2 以及 GMDP 和 GMDP-A 的聚合物。

相反, 有些式 I 的化合物诱导抗炎应答, 例如, 当任何式 Y<sup>m</sup> 的单体单元都不是如下时:

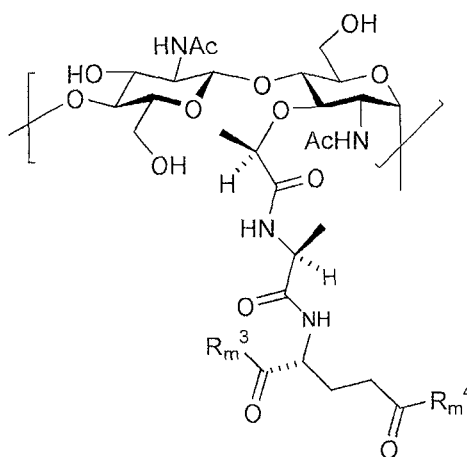
(a) 当 Y<sup>m</sup> 不是 Y<sup>n</sup> 时, 式 IIIa 的基团;





式 IIIa

或者(b) 当  $Y^m$  是  $Y^n$  时, 式 IIIb 的基团



式 IIIb

其中:

$R_1^3$ 、 $R_2^3 \dots R_{n-1}^3$  和  $R_n^3$  中的每一个独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ ;

$R_1^4$ 、 $R_2^4 \dots R_{n-1}^4$  和  $R_n^4$  中的每一个独立地为  $-OH$  或  $-NH_2$ 、氨基酸残基或者含有 2-8 个氨基酸残基的肽, 其中:

(h) 每个氨基酸残基独立地为 D 或 L 构型;

(i) 每个氨基酸残基未被取代, 或用一个或多个选自卤素、烷基、羟基、烷氧基、苯氧基、 $CF_3$ 、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、 $-C(O)O$  烷基和  $-NO_2$  的基团取代; 和

(c) 氨基酸残基独立地连接在  $\gamma$  羧基的  $\alpha$  位上、 $\alpha$  或  $\varepsilon$  氨基上、或者是它们的任意组合。

这些抗炎化合物在文中称之为式 VI 的化合物。虽然并非本发明的化

合物, 化合物 1 是包含式 IIIa 和 IIIb 的基团的抗炎化合物的实例。

应当理解, 上述实例仅用于阐释目的, 而并不旨在缩小本发明的范围。

### 细菌肽聚糖和合成多糖抗原与树突细胞的相互作用

多数微生物抗原通过称之为抗原相关的微生物模式(PAMPs)的高度保守的结构基序向免疫系统传递信号(Medzhitov (2001) 《免疫学自然评论》(*Nat. Rev. Immunol.*) 135-145)。PAMPs 与存在于多种抗原提呈细胞上的 Toll 样受体(TLRs)相互作用, 以起始信号传导级联, 导致促炎细胞因子如 IL12 和 IL6 以及多种趋化因子的表达(Janeway 等人(2002) 《免疫学年鉴评论》(*Annu. Rev. Immunol.*) 20:197-216)。抗原提呈细胞通过 TLRs 特别是树突细胞的活化引起了以表面 MHC II 类分子和共刺激分子如 CD80 和 CD86 表达增加为特征的成熟过程(Chakraborty 等人(2000) 《临床免疫学》(*Clin. Immunol.*) 94:88-98)。这种级联是设计用于集合先天免疫系统的早期防御者, 以立即对入侵作出应答, 并构成了通过抗原提呈细胞将长期存在的过继性免疫与 T 细胞联系起来的基础(Keller (2001) 《免疫学通讯》(*Immunol. Lett.*) 78:113-122) (见图 1)。由于化合物 1 模仿天然细菌细胞壁来源的肽聚糖, 可是为单链, 人们可能预期该聚合物将拥有能够通过 TLRs 传递信号的 PAMPs。的确, 业已证明天然肽聚糖为 TLR2 配体(Schwandner 等人(1999) 《生物学化学杂志》(*J. Biol. Chem.*) 274:17406-17409)。令人惊讶的是, 如本文所示, 化合物 1 为式 VI 的代表性化合物, 似乎并不活化在人或啮齿动物细胞中测试的 TLR2 或任何其他 TLR。这进一步通过用此化合物刺激的 PBMC 培养物中缺乏 IL12、IL6 或其他促炎细胞因子的表达而得到证明。另外, 人类单核细胞来源的树突细胞并不因此化合物刺激而驱动成熟。在用化合物 1 处理后, 未成熟树突

细胞并不表现出其表面特有的 MHC II、CD80 或 CD86 的上调, 尽管事实上认为这些细胞是最有效的抗原提呈细胞, 而且热衷于内在化这些分子并将它们集中在内吞液泡中。

细菌脂多糖(LPS)是强大的 TLR4 激动剂(Beulter (2002) 《当代高端微生物学免疫学》 (*Curr. Top Microbiol. Immunol.*) 270:109-120), 并常用作未成熟树突细胞的成熟信号(Ardavin 等人 (2001) 《免疫学趋势》 (*Trends Immunol.*) 22:691-700)。LPS 特异性上调树突细胞上的共刺激分子如 CD80 和 CD86 (Michelsen 等人 (2001) 《生物学化学杂志》 (*J. Biol. Chem.*) 276:25680-25686)。这些表面分子对于信号传递 T 细胞细调其效应细胞功能如炎症应答是至关重要的。当未成熟树突细胞与化合物 1 和 LPS 共培养时, CD80 和 CD86 并不上调, 表明式 VI 的化合物应当抑制树突细胞的成熟。

### 树突细胞

树突细胞(DCs)是见于几乎每一器官中的专职抗原提呈细胞。树突细胞亚型已被很好地确定, 并且已经证明这些细胞类型在其整个生命周期中通过几种水平的分化和成熟进化(Jonuleit 等人(2001) 《免疫学趋势》 (*Trends in Immunol.*) 22:394-400)。未成熟树突细胞以低水平表达的 MHC II 类分子以及有限表达的共刺激分子 CD80 和 CD86 为特征。这些表面分子的表达响应炎症刺激物如 IFN $\gamma$  或通过与细菌抗原相互作用的 TLR 活化而显著上调。在功能上, 外周的未成熟 DCs 特别擅长于捕获和加工抗原。成熟 DCs 下调这些活性, 并通过介由 MHCII 呈递抗原以及通过 CD80/86 的共刺激而显著上调其刺激幼稚 T 细胞的能力。(Banchereau 等人(2000) 《免

疫学年鉴评论》(*Annu. Rev. Immunol.*) 18:767-811)。这些总结于图 1 之中。

在无炎症情况下,多数外周 DCs 处于未成熟状态,并认为这些细胞在维持外周 T 细胞耐受(识别自身)、诱导 T 细胞无能以及防御自身免疫性方面起着主要作用(Jonuleit 等人(2001)《免疫学趋势》(*Trends in Immunol.*) 22:394-400)。

如本文所示,尽管存在强效的炎性刺激物(LPS),用化合物 1 处理未成熟树突细胞抑制其成熟的能力。通过未成熟或半成熟(低水平 CD80 和 CD86 表达)树突细胞进行免疫调节的重要性才刚刚被充分认可(Lutz 等人(2002)《免疫学趋势》(*Trends in Immunol.*) 23:445-449)。业已表明对抗耐受或炎症抑制的过继免疫的诱导可由外周末成熟或半成熟 DCs 与完全成熟 DCs 的比率决定(Jonuleit 等人(2001)《免疫学趋势》(*Trends in Immunol.*) 22:394-400; Garza 等人(2000)《实验医学杂志》(*J. Exp. Med.*) 191:2021-2028)。通过用式 VI 的化合物处理化疗维持未成熟 DC 群应当能够抑制 T 细胞和 DCs 之间的同源性相互作用,从而防止抗原特异性效应 T 细胞响应炎性刺激物克隆扩增。然而,考虑到本文提出的所有证据,很可能通过式 VI 的化合物处理产生的未成熟 DCs 将诱导 T 调节细胞群,它们直接抑制炎性效应 T 细胞的活性,从而提供抗炎性病变保护。文献中越来越多的证据表明未成熟 DCs 在体内诱导 T 调节细胞,此外,业已由特异性保护动物免受流感病毒感染并在移植模型中防止排斥的未成熟 DCs 诱导了 T 调节细胞(Jonuleit 等人(2001)《免疫学趋势》(*Trends in Immunol.*) 22:394-400; Dhodapkar 等人(2001)《实验医学杂志》(*J. Exp. Med.*) 193:233-238; Thomson 等人(1999)《移植进展》(*Transplant. Proc.*) 31:2738-2739)。在这些研究中,离体扩增未成熟 DCs,然后给予动物。式

VI 的化合物能够提供独特的治疗,其中通过离体处理使得自体或免疫学相容的 DCs 长期地不成熟,然后重新引入患者体内,以刺激 T 调节细胞活性。

### T 调节细胞

最近来自若干实验室的研究证明未成熟树突细胞在 T 调节细胞(Tregs)的产生中是至关重要的组分(Jonuleit 等人(2001) 《免疫学趋势》 (*Trend Immunol.*) 22:394-400)。T 调节细胞发挥作用,以维持外周耐受,防御自身免疫性,并参与炎症调节,以允许对微生物入侵进行适当的应答,同时还保护宿主免受有害的副作用(Maloy 等人(2001) 《天然免疫学》 (*Nat. Immunol.*) 2:816-822)。

最近深入研究的 Treg 表型以表面标志 CD4 和 CD25 的组成型表达为特征(Shevach (2002) 《免疫学自然评论》(*Nat. Rev. Immunol.*) 2:389-400)。在啮齿动物(Taylor 等人(2001) 《实验医学杂志》 (*J. Exp. Med.*) 193:1311-1317)和人(Jonuleit 等人(2001) 《实验医学杂志》 (*J. Exp. Med.*) 193:1285-1294)中均已鉴定到具有此表型的 T 调节细胞。CD4+CD25+ T 细胞以大约 2-10%的频率天然地存在于外周循环中(Shevach (2002) 《免疫学自然评论》 (*Nat. Rev. Immunol.*) 2:389-400)。在 CD4+CD25-靶细胞和 CD4+CD25+T 调节细胞的共培养中,尽管存在着强效增殖信号如抗-CD3 抗体或异源 APCs, T 调节细胞抑制 CD4+CD25-靶细胞的增殖(Pasare 等人(2003) 《科学》 (*Science*) 299:1033-1036)。迄今为止,尚没有报道说明在体内产生 T 调节细胞的明确的化学手段。文献中报道的早期研究显示 CD4+ CD25+ Treg 细胞在体外表达少许 IL10 (2002) 《免疫学自然评论》 (*Nat. Rev. Immunol.*) 2:389-400)。此外,在炎性模型中,CD4+ CD25+ 细胞不能抑制 IL10 敲除动物的炎症(Shevach (2002) 《免疫学自然评论》

(*Nat. Rev. Immunol.*) 2:389-400)。这些研究导致了普遍相信 T 调节细胞抗炎活性的机制是介由 IL10 的表达。在几个实验室中进行的精细研究 (Jonuleit 等人(2001) 《实验医学杂志》 (*J. Exp. Med.*) 193:1285-1294; Levings 等人(2001) *J. Exp. Med.* 193:1295-1302; Dieckman 等人(2001) 《实验医学杂志》 (*J. Exp. Med.*) 193:1303-1310) 已证明虽然 CD4+CD25+ T 细胞的确表达 IL10 和/或其他细胞因子, 但它们抑制炎性 T 细胞的机制取决于细胞-细胞接触。在 CD4+CD25+ T 细胞与其靶标之间最初的相互作用中, 细胞因子表达并不起作用。最近, 这组看似荒谬的观察结果因 Dieckman 等人的工作而澄清((2002) 《实验医学杂志》 (*J. Exp. Med.*) 196:247-253)。该研究组还证明 CD4+CD25+ T 细胞与炎性 T 细胞通过细胞-细胞接触相互作用。尽管由这种接触传导的信号的确切性质尚不知晓, 这些工作者证明接触的一个重要意义在于靶细胞即 CD4+CD25- T 细胞变得无能, 并开始表达高水平的 IL10。既然 T 调节细胞就整个免疫系统而言相对稀少, 这提供了扩大抗炎效果的机制, 并解释了显示 IL10 在由 CD4+CD25+ T 细胞介导的系统性抗炎反应中的作用的广大数据。

如下文所示, 当与用多克隆有丝分裂原如植物凝集素(PHA)或超抗原如金色葡萄球菌肠毒素 A (SEA)处理的对照培养物相比时, 用化合物 1 处理的人 PBMC 培养物并不通过增殖应答。此外, 当化合物 1 处理的 PBMC 培养物用抗-CD3 抗体刺激时, 与未处理对照相比, 存在着显著的培养物增殖能力的抑制。微阵列分析进一步揭示用化合物 1 和抗-CD3 抗体处理的 PBMC 培养物选择性上调 CD3+ T 细胞群中 IL10 和 IL19 (IL10 旁系同源物) 信息的表达, 而下调多种炎性细胞因子信息如 IL17 和 TNF $\beta$ 。

综上所述, 这些数据表明式 VI 的化合物, 以化合物 1 为例, 抑制树突细胞的成熟。未成熟树突细胞具有驱使产生 T 调节细胞的独特能力。Treg

细胞可随之通过细胞-细胞信号传导以及通过在炎症部位刺激无能化 T 细胞表达 IL10 而参与炎性应答的抑制。

### IL10 的治疗应用

使用重组 IL10 作为免疫治疗剂的概念广为接受(Madsen (2002) 《肠胃病学》 (*Gastroenterol.*) 123:2140-2144; Barnes (2001) 《过敏症临床免疫学当代意见》 (*Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*) 1:555-560; Bremeanu 等人(2001) 《国际免疫学评论》 (*Int. Rev. Immunol.*) 20:301-331; St. Clair (2000) *Curr. Dir. Autoimmun.* 2:126-149)。存在着众多已证明 IL10 有效的动物炎症模型, 如炎症肠病(IBD)、Crohn's 病、类风湿性关节炎、自体免疫性糖尿病以及变应性病(Madsen (2002) 《肠胃病学》 (*Gastroenterol.*) 123:2140-2144; Barnes (2001) 《过敏症临床免疫学当代意见》 (*Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*) 1:555-560; Bremeanu 等人(2001) 《国际免疫学评论》 (*Int. Rev. Immunol.*) 20:301-331; St. Clair (2000) *Curr. Dir. Autoimmun.* 2:126-149)。可是, 使用重组 IL10 治疗炎症肠病的临床试验取得了各种各样混杂的结果。重复高剂量方案的需求以及某些产生的毒性妨碍了这些努力的成功。控制个体免疫系统, 以介由 T 调节细胞活性选择性产生内源性 IL10 可能提供更好的免疫治疗路径。受宿主整个免疫系统调节的内源性 IL-10 的表达可能提供了获得功效的合适环境, 而没有重复剂量给药的需求或细胞因子毒性的问题。此外, 细胞群的选择性增强可能证明是这种强效细胞因子理想的递送系统。全体免疫细胞所固有的性质是在体内输送到炎症部位的能力。已介由式 VI 化合物耐受的树突细胞给予特定输送信号的免疫细胞群可能迁往特定部位并局部诱导 IL10 表达。这种治疗

途径将避免与系统性给药强效细胞因子相关的问题，并更好地模拟此免疫调节剂天然的局部性的作用。

### 腹内脓肿

腹内脓肿的形成是结肠细菌污染腹腔的结果。这通常发生在外伤或外科手术干预期间。细菌刺激强烈的炎性应答，导致巨噬细胞、多形核白细胞(PMNs)和淋巴细胞的募集，以及多种炎性调节剂如 IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ 、IL17 还有许多趋化因子的释放(Whal.等人(1986)《实验医学杂志》(*J. Exp. Med.*)163:884-891; Tzianabos 等人(2002)《微生物当代意见》(*Curr. Opin. Micro.*) 5:92-95)。这种应答一个可能的结果是与沉积的血纤维蛋白交织的多种免疫细胞对入侵细菌的封装。一旦形成，脓肿相对地抗抗生素治疗，因此患者通常需要外科手术干预以排出脓肿。尽管向风险患者给予预防性抗生素，但这些干预并非完全成功。经由 T 调节细胞活性和 IL10 表达来调节宿主应答而预防脓肿的最初形成的方法代表了更好形式的治疗，其能够成为风险外科手术操作的护理标准。

### 术后粘连

术后粘连是腹部、妇产科、整形外科及心胸外科手术重大的并发症。腹部和盆腔粘连与相当高的发病率有关，并且可以是致命的。在预临床模型中，外源给药 IL10 已证明限制粘连的形成 (Laan.等人(1999)《免疫学杂志》(*J. Immunol.*) 162:2347-2352; Chung 等人(2002)《实验医学杂志》(*J. Exp. Med.*) 195:1471-1476)。然而，人类医学现有疗法旨在中断外科手术损害后粘连的形成。这些产品涉及向外科手术部位引入凝胶或阻隔产



品。这些装置仅取得了有限的成功，这是因感染率增大、缺乏效力所致，因而在医学界中使用率相对低。急需防止粘连形成的更好的方法。

同通脓肿形成一样，现有证据表明粘连的形成也涉及炎性过程的活化，最突出的是一致的炎性调节剂 IL17 的表达以及血纤维蛋白和其他基质蛋白的沉积。总而言之，这些过程定义了免疫系统与纤维蛋白原生成及创伤修复之间独特的交叉点。

### 用作临床研究生物标志的延迟型超敏分析试验

考虑到化合物 1 可能通过 T 调节细胞群对炎性刺激物的应答而引发其保护效应的假说，需要建立特异性分析试验以测量用于临床研究的这种活性。早期临床试验典型地采用健康志愿者进行安全性和剂量应答评估，一种并非必要地包括特定炎症病变的诱导或测量。因此有必要开发替代性的这些化合物活性的生物标志。数十年来已利用皮肤中的延迟型超敏(DTH)反应评估人对结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) (TB)的接触，并且最近用于确定免疫受损情况下 T 细胞应答性的状态(Anderson 等人(1968)《免疫学》(*Immunology*) 15:405-409; Gray 等人(1994)《免疫学当代意见》(*Curr. Opin. Immunol.*) 6:425-437; Kuby 等人(2000)《免疫学》(*Immunology*), W. H. Freeman and Co)。文献研究业已证明 DTH 应答主要地是由 T 细胞介导的，并且所述炎症活性可单独通过 DTH T 细胞过继性地转移给幼稚动物(Elices 等人(1993)《临床实验风湿病学》(*Clin. Exp. Rheumatol.*) 11:s77-s80)。如本文所公开的那样，已开发了豚鼠 DTH 模型以评估式 VI 的化合物限制皮肤局部化炎性反应的能力。DTH 应答的直观测量可容易地在人和豚鼠中观察和测量。在皮肤表面可观察到并容易地定量测量红肿、疹块和/或硬结。在此分析试验中用于引发炎性 T 细胞活

性的抗原来源于白色念珠菌 (*Candida albicans*) (Candin), 普遍地在临床上用于测量经历移植治疗或患有 AIDS 的个体的免疫全能性。也认为对于一般人群而言, 此抗原比 TB 抗原更安全。因为文献中已报道 CD4+CD25+T 调节细胞是针对白色念珠菌的记忆和保护性免疫性的重要组分(Montagnoli 等人(2002)《免疫学杂志》(*J. Immunol.*)169:6298-6308), 这些结果将为式 VI 化合物的保护性效果来源于 T 调节细胞活性提供进一步的证据。

#### 式 VI 的合成多糖抗原的作用机制:

##### T 调节细胞假说:

下文公开的是关于免疫调节分子如合成多糖抗原化合物 1 在哺乳动物中指导和引发抗炎效果, 包括诱导 T 调节细胞群的机制的详细研究。根据这些结果, 得到了如下总结于图 2 中的附图。

如图 2 所示, 以化合物 1 为例的式 VI 的合成免疫调节多糖抗原抑制树突细胞成熟。未成熟(iDCs)表达低水平的 CD80 和 CD86 共刺激分子。在这种状态下, iDCs 具有与幼稚 T 细胞相互作用以及诱导产生 CD4+CD25+T 调节细胞(路径 B)的独特能力。在面对炎性炎性应答时, T 调节细胞通过细胞-细胞接触与效应 T 细胞相互作用, 并抑制这些 T 炎性效应细胞的增殖能力。此外, T 调节细胞和效应 T 细胞之间的接触使得效应细胞无能, 并刺激这些细胞表达大量 IL10。在所述炎性 T 效应细胞中引发 IL10 表达起到放大直接的 T 调节细胞接触的抑制效果的作用, 并扩大了对进行中的炎性过程的防御。由本发明研究人员观察到的树突细胞成熟的抑制也能够因两类细胞之间同源性相互作用的缺乏而抑制效应 T 细胞的克隆扩增(路径 A)。然而, 本文提供的数据更引人注目地支持了这样的

假说, 即 T 调节细胞最终是由本发明式 VI 的合成多糖抗原产生的, 并提供了抗炎性病变的保护。

#### 式 V 的合成多糖抗原的作用机制:

##### 炎症假说:

以化合物 2 为例的式 V 的化合物似乎刺激炎性应答, 如通过  $\text{TNF-}\alpha$  的产生所证明的那样。化合物 2 可能以类似于完整细菌或细菌细胞壁抗原的方式与免疫细胞相互作用, 最有可能是通过 TLR2 的活化。在这种情况下, 式 V 的化合物与 TLR2 携带细胞之间的相互作用刺激特征性炎症标志。这将表明炎性细胞将开始活动, 正如检测到入侵病原体之后的情况那样。这些概念总结于图 8 之中。

#### 药物组合物及其配制

取决于它们的结构, 本文公开的式 I 的化合物可用于预防或治疗炎性病变, 或用于诱导与不同疾病状态或状况有关的炎症, 其中这种炎症为人或其他动物提供了有益的治疗或预防效果。从而, 在一个方面, 本发明提供了人用及兽医用的药物组合物, 其包含式 I 的化合物或其药学上可接受的盐, 连同药学上或生理学上可接受的缓冲剂、载体、赋形剂或稀释剂, 以及任选地, 其他治疗剂。应当指出, 本发明的化合物可单独或者以包含两个或多个化合物的混合物形式给药。本发明也涵盖式 I 化合物或其药学上可接受的盐制备用于预防或治疗炎性病变、或者其中炎性免疫应答有益的疾病状态或状况的用途。用于这些用途的具有式 V 或 VI 的化合物的选择取决于治疗目的期望哪类免疫应答。

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

### 净电荷和聚集

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

最好是，本发明的线形高分子因其肽部分保持电荷-电荷排斥，在生理 pH 下每个重复单元具有净的正电荷或负电荷。这类分子因此表现出理想的溶液行为，即具有最低分子内或分子间聚集的长期溶液状态，这些事件可随着时间减小免疫学活性，特别是在低离子强度尤为如此。因此，每个重复单元具有净的正电荷或负电荷的本发明的分子将表现得同聚合电解质一样，并具有表现出增强的溶解从而是贮存行为的优势。已经直接通过原子力显微镜(AFM)观察到了聚(2-乙烯基吡啶)的聚合电解质电荷-电荷排斥现象(Minko 等人(2002) 《美国化学协会杂志》 (*J. Am. Chem. Soc.*) 124:3218)。此外，每个重复单元表现出净的正电荷或负电荷的式 V 和 VI

的合成多糖抗原的免疫调节活性通过分子内和分子间电荷-电荷排斥力得以显著增大，这些排斥力防止这些分子聚集，促进其结构特征正确展示在细胞受体上。

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

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

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

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

例如，含药物的前述聚合物的微胶囊描述在美国专利 5,075,109 中。递送系统液包括非聚合物系统如：脂质，包括固醇类如胆固醇、胆固醇酯、以及脂肪酸或中性脂肪如单甘油酯、双甘油酯和三甘油酯；水凝胶释放系统；硅橡胶系统；基于肽的系统；蜡质包衣；使用常规胶粘剂和赋形剂压制的片剂；部分融合的植入体；等等。具体实例包括但不限于(a) 侵蚀系统，其中本发明的试剂以处于如美国专利 4,452,775、4,675,189 和 5,736,152，所述的基质内的形式包含在内，和(b) 扩散系统，其中活性成分以可调速率自如美国专利 3,854,480、5,133,974 和 5,407,686 所述的聚合物中渗透。另外，也可以使用基于泵的硬件递送系统，其中一些适合于植入。

本发明涵盖包含与抗菌剂或其他治疗剂、以及药学上可接受的缓冲剂、载体、赋形剂或稀释剂联合的本发明所述免疫调节聚合物的药物组合物。本发明的免疫调节聚合物可与其他抗菌抗生素药物分开递送，或者以抗菌抗生素混合物的形式递送。抗菌抗生素混合物是本发明分子与抗菌抗生素药物和/或辅助增效剂的混合物。抗生素在细菌感染治疗中的使用是本领域常规的。在这个实施方案中，常见给药载体(如片剂、植入物、注射液等)可含有天然或合成多糖抗原和抗菌抗生素药物和/或辅助增效剂。备选地，抗菌抗生素药物可分开剂量给药。

可用于本发明的抗细菌抗生素药物的非限制性实例包括：青霉素 G、青霉素 V、氨苄青霉素、arnoxicillin、巴氨西林、环西林、依匹西林、海他西林、匹氨西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、氟氯西林、羧苄西林、羧噻吩青霉素、avlocillin、美洛西林、哌拉西林、氮卓西林、头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢克洛、头孢唑啉、头孢呋肟酯、头孢羟唑、头孢羟苄磺唑、头孢西丁、头孢噻肟、头孢唑肟、cefmenoxine、头孢曲松、moxalactarn、头孢替坦、头孢哌酮、ceftazidme、亚胺培南、克拉维酸、特美汀、舒巴坦、新霉素、奥利万星、红霉素、甲硝唑、氯霉素、克林霉素、林可霉素、万古霉素、甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异噁唑、氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类和利福平。这方面请见 *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 9 版, Hardman 等人编, McGraw-Hill, New York, (1996)。与本发明免疫调节聚合物联合使用的治疗剂的精确含量将取决于多种因素, 包括聚合物本身、剂量和所选的剂量给药时间、给药方式、可予以考虑的任何外科手术的性、以及受试者的某些特征。当进行局部给药时, 应当理解可能需要极小的量(纳克或者可能是皮克)。所选的精确含量可无需过度试验确定, 特别地是因为阈值量将是有利地促进期望的免疫应答的任何含量。范围在大约 1 皮克到大约 1 毫克的剂量可能是有效的, 取决于递送方式; 范围在大约 1 纳克到大约 1 微克可能也是有用的。

### 剂量给药、治疗方案以及给药

适当选择的本发明的化合物可以这样的有效量给药, 即诱导防御多种多样的不同以炎症为基础的病变的有效量, 所述病变包括术后粘连和与细菌感染相关的腹内脓肿, 或者诱导与各种疾病状态或紊乱相关的炎症的有

效量，其中这种炎症提供了有益的治疗或预防效果。为此目的，有效量是本发明的抗炎或炎性化合物单独或与其他剂量或附加的治疗化合物一起时，将分别抑制、缓解或预防以炎症为基础的病变，或者刺激治疗有益的炎性应答的量。剂量范围可以从大约 1 皮克/千克体重到大约 1 毫克/千克体重，或者从大约 1 纳克/千克体重到大约 1 微克/千克体重。绝对量将取决于多种因素，包括待治疗疾病或紊乱的性质、给药是否与所选的外科手术或急诊相结合、协同治疗、剂量给药次数、个体患者参数包括年龄、身体条件、身高和体重、以及待治疗疾病或紊乱的严重度，并且可由开业医生仅以常规实验确定。通常优选使用最大剂量，即根据可靠医学判断的最高安全剂量。多剂量的本发明的药物组合物也考虑在内。

待给予需要预防或治疗以炎症为基础的病变、或者得益于免疫系统刺激的疾病或紊乱的人或动物患者的化合物的最佳量的确定，以及给药包含此类化合物的治疗剂或药物组合物的方法落在药学、医学和兽医学领域技术人员的能力范围之内。人或动物患者的剂量给药取决于以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱的性质、患者的病情、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药时间、周期和路径、吸收率、化合物的分布、代谢和排泄、于其他药物的联合、以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱的严重度、以及所治疗病变或疾病状态的响应，并且可容易地进行优化以获得期望水平的效率。治疗过程可持续数天到数周或数月，或者直到实现治愈，或者实现了疾病可接受的减轻或预防。最佳给药方案可由患者体内药物累积的测量值结合治疗效率来计算。普通技术人员能够容易地确定最佳剂量、给药方法学以及重复率。最佳剂量可根据免疫调节聚合化合物的效率而变，并且通常可以基于在体外和体内动物模型中有效的  $ED_{50}$  值估计。用于治疗或预防以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱



的本发明化合物的有效量、含这些化合物、激动剂的递送载体、以及治疗方案可通过常规手段确定。例如，医学或兽医学从业者能够以低剂量的化合物开始对需要其的个体或患者进行治疗，然后增大剂量，或者系统性地改变剂量方案、监测其对患者或个体的效果，并调整剂量或治疗方案，以最大化期望的疗效。剂量和治疗方案有关的更多讨论可参见 Benet 等人，*Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 9 版，Hardman 等人编，McGraw-Hill, New York, (1996), 第 1 章，第 3-27 页，以及 L.A. Bauer, *Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach*, 第 4 版，DiPiro 等人编，Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, (1999), 第 3 章，第 21-43 页，以及其中所引述的参考文献，读者可以此作为参考。

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

在本发明的上下文中，术语“治疗”、“治疗用途”或“治疗方案”在文中旨在涵盖本发明免疫调节聚合物的预防、缓解性以及治疗性的给药方式，并且包括本发明所主张化合物的任何和所有的用途，包括治疗由以炎症为基础的病变或待治疗的其他疾病或紊乱所致的疾病状态、病情、症状、迹象或紊乱，或者预防、阻碍、延迟或逆转与之相关的症状、迹象、病情或紊乱的进程。从而，本发明涵盖不良的与以炎症为基础的病变、或者得益于机体免疫应答刺激的疾病或紊乱相关的疾病状态、症状、病情、迹象或紊乱的任何预防、缓解、减轻、逆转或完全消除。

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

使用最佳给药方案递送治疗有效量的本发明的化合物。为了本发明的目的，就本文公开的化合物而言的术语“有效量”或“治疗有效量”是指化合物有效地实现预期目的的量，优选没有不良的副作用如毒性、刺激或过敏反应。尽管个体患者的需要可能有变，但有效量药物组合物的最佳范围的确定落在本领域技术范围之内。人类剂量可由动物研究反推(A.S. Katocs, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第 19 版, A.R. Gennaro 编, Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1995), 第 30 章)。通常，为提供治疗有效量的药物组合物所需的剂量，可由本领域技术人员调整，将取决于年龄、健康、身体情况、体重、受体疾病或紊乱的类型和程度、治疗频率、协同治疗的性质(如果有的话)、以及期望效果的性质和范围(Nies 等人, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 9 版, Hardman 等人编, McGraw-Hill, New York, N.Y., 1996, 第 3 章)。

高危个体预防疗法也涵盖在本发明之内。如本文所用，术语“高危个体”是指已经介由例如个体或家族病史或遗传试验、生活或工作环境或病情等确定存在比正常概率显著更高的容易受到以炎症为基础的病变、或相关疾病或紊乱的发作或复发、或将得益于机体免疫应答刺激的疾病/紊乱的影响。例如，患者可能具有包括特定疾病或紊乱频繁复发的个人和/或家族

病史。作为另一个实例，患者这样的易感性可能是通过按照本领域公知技术的遗传筛查确定的(参见如美国国会技术评定局 *Genetic Monitoring and Screening in the Workplace*, OTA-BA-455, 第 5 章, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1990, 第 75-99 页)。在病毒病的情况下，环境可能是诱病因素。作为高危给体治疗方案的一部分，可预防性地治疗个体以预防以炎症为基础的病变，或疾病、紊乱、迹象、症状或病情的发作或复发，或将得益于增强的免疫应答的疾病或紊乱。术语“预防有效量”是指观察到本发明药物组合物产生效果的量，其中效果为预防感染或炎症，或炎性疾病、症状、迹象、病情或紊乱的发作或复发，或者得益于机体免疫应答刺激的疾病/紊乱。预防有效量的药物组合物典型地是通过与当下过那类似情况的个体给药缺乏活性剂的第二药物组合物时所观察到的效果相比时其所具有的效果确定的。

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

在外科手术或外伤相关的脓肿和粘连的情况下，本发明的方法可通过在外科手术之前为期三周的时间内、在外科手术之前为期两周的时间内、在外科手术之前为期一周的时间内给药多剂量实现，其中首剂量仅在外科手术之前 24 小时给药，并且甚至是在接触细菌之后给予。还可以在外科手术之后给予另外的剂量。可使用任何导致增强针对细菌感染/污染以及后续脓肿/粘连形成的免疫应答的方案，尽管最佳剂量和给药方案是不仅抑制脓肿和/或粘连形成、而且导致完全防御由特定菌体或多种菌体所致的脓肿或

粘连形成的那些方案。递送多剂量特定聚合物的期望的时间间隔可由本领域普通技术人员仅仅采用常规实验确定。

从而，只要期望预防人或动物个体细菌性脓肿或粘连的形成，本发明是可用的。这包括预防性治疗以在规划的外科手术操作中以及急诊情况下预防这类病情。所选的外科手术包括如下腹内外科手术：右半结肠切除术、左半结肠切除术、乙状结肠切除术、结肠次全切除术、全结肠切除术、腹腔镜检或开腹胆囊切除术、胃切除术、剖腹产术等。急诊手术包括矫正如下病情的手术：穿孔性溃疡（十二指肠或胃）、穿孔性憩室炎、梗阻性憩室炎、急性阑尾炎、穿孔性阑尾炎、腹部钝器伤、腹部锐器伤、排出脓肿的二次手术等。本发明的方法涵盖马科动物的结肠外科手术，伴侣动物任何类型的外科手术，例如常规消毒、肠胃侵入式操作等。本发明的方法也可用于非腹内外科手术，如心脏外科手术和矫正创伤感染的外科手术。本方法也可用于与易使个体形成脓肿如盆腔炎症性疾病、炎性肠病、泌尿道感染和结肠癌有关的疾病。本方法因此可用于几乎任何组织或器官的脓肿，具体包括但不限于：真皮脓肿如痤疮。本发明所属领域的普通技术人员将会容易地认识到本发明适用的病情和操作的范围。

在另一方面，本发明包括诱导防御与许多常见类型的外科手术相关的术后外科手术粘连形成的方法。该方法包括向需要这种保护的个体给药含有效量降低术后外科手术粘连形成的本发明的免疫调节聚合物的药物制剂的步骤。完全可以预期在不同于手术部位的部位上给药一种或多种这样的聚合物将有效地诱导抗术后外科手术粘连形成的保护。如上文所讨论的那样，考虑到以前的观察结果，这特别令人惊讶。

PCT 国际公开 WO 00/59515 教导向外科手术部位局部给药某些聚合物可有效降低术后外科手术粘连的发生率。根据本发明，当在远离粘连有可能发生的外科手术部位的地方皮下给予免疫调节聚合物时是有效的。

可以给药诱导防御术后外科手术粘连形成有效量的本发明公开的化合物。此处所用的诱导防御术后外科手术粘连形成的有效量是本发明的免疫调节聚合物单独或与其他剂量或附加治疗化合物一起时将抑制或预防形成术后外科手术粘连的量。相信剂量范围从大约 1 皮克/千克体重到大约 1 毫克/千克体重、或者从大约 1 纳克/千克体重到大约微克/千克体重将是有效的，这取决于给药方式。绝对量将取决于多种因素（包括给药是否结合所选的外科手术或急诊外科手术、协同治疗、剂量给药次数、以及个体患者参数，包括年龄、身体状况、身高和体重），并且可以经由常规实验确定。通常优选使用最大剂量，即依据可靠医学判断的最高安全剂量。

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

从而，无论何时期望预防人或动物个体术后外科粘连的形成，本发明是可用的。这包括预防性治疗以在规划的外科手术操作之后以及急诊手术之后预防粘连形成。所选的外科手术包括如下腹内外科手术：右半结肠切除术、左半结肠切除术、乙状结肠切除术、结肠次全切除术、全结肠切除术、腹腔镜检或开腹胆囊切除术、胃切除术、胰脏切除术、脾切除术、肝

脏、胰脏、小肠或肾移植、粘连松解术等。急诊腹内外科手术包括矫正如下病情的手术：穿孔性溃疡（十二指肠或胃）、穿孔性憩室炎、梗阻性憩室炎、肠梗阻、急性阑尾炎、穿孔性阑尾炎、腹部钝器伤、腹部锐器伤、排出脓肿的二次手术、腹主动脉动脉瘤破裂等。本发明的方法涵盖马科动物的结肠外科手术，伴侣动物任何类型的外科手术，例如常规消毒、肠胃侵入式操作等。本发明的方法也可用于非腹内外科手术的情况下，如心脏外科手术、开腹和内窥镜矫形外科手术、神经外科手术、妇产科手术、盆腔手术和矫正创伤感染的外科手术。本方法也可用于与易使个体自发形成粘连如盆腔炎症性疾病、炎性肠病、泌尿道感染和结肠癌有关的疾病。本方法因此可用于几乎任何组织或器官的炎性过程。

当给药异预防术后外科粘连形成时，本发明的化合物可以在远离手术部位的地方包括系统性地给药，或者局部给药到期望降低术后外科粘连形成的可能性的手术部位。本发明的化合物可作为水溶液、作为交联凝胶、或作为水溶液和交联凝胶形式的任何瞬间或物理上的联合给药。

本发明的制剂可与感染“结合”给药，表示在时间上与导致宿主脓肿或粘连形成的外科手术、外伤或疾病足够接近，从而获得抗脓肿或粘连的保护性效果。在选取外科手术的情况下，制剂可在外科手术之前很长时间给药（即数周或者甚至数月），优选在接近于外科手术的时间（以及，甚至是手术之后）加强给药。特别地在急诊情况下，制剂可在外伤或外科手术前即刻（数分到数小时）和/或之后给药。唯一重要的是制剂给药在时间上与外科手术足够接近，从而增强个体抗细菌感染/污染的免疫应答，由此提高成功宿主应答的几率并降低脓肿或粘连形成的可能性。

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

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

器官特异性自身免疫病如：

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

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

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

神经肌肉系统：重症肌无力、伊顿-兰姆博特二氏重症肌无力综合征、强直人综合征、急性播散性脑脊髓炎、多发性硬化症、格林-巴利综合征、慢性脱髓鞘性神经炎、多发性神经根性神经病、伴随传导阻滞的多灶性运动神经病以及伴随单克隆丙种球蛋白病的慢性神经病。

副肿瘤性神经紊乱：眼阵挛-肌阵挛综合征、小脑变性、脑脊髓炎、视网膜病变。

肝胆管系统：自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆管纤维硬化以及硬化性胆管炎。

胃肠道：谷蛋白敏感性肠病、恶性贫血以及炎性肠病。

器官非特异性自身免疫病如：

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

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

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

式 V 的炎性化合物、其组合物以及采用这些化合物和组合物的方法可适用的疾病和病变包括抗病毒治疗，例如治疗或预防乙肝病毒和丙肝病毒



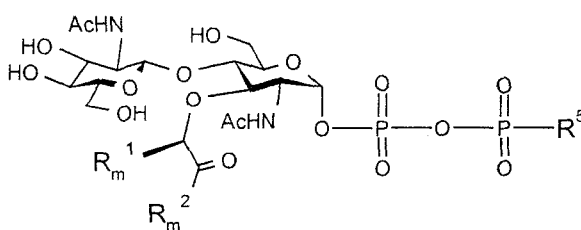
感染；抗癌治疗；以及作为疫苗佐剂使用。

前述说明提供了本发明许多方面的综述。如下实施例阐释了其各个方面，但它们并不旨在也不应该解释为以任何方式限制本发明。

### 实施例 1

#### 式 I 化合物的常规制备

例如，可通过聚合式 IV 的脂质 II 底物制备式 I 的化合物：



式 IV

其中  $R^5$  是脂质载体，其他变量如本文所述。例如，合适的脂质载体包括具有一个以上碳的饱和的和不饱和的烃链。链可以是直链的或支链的。烃也可以是取代的（例如，全氟化的）或者非取代的。优选地，烃链含有 5 到 55 个碳以及 1 到 11 个异戊二烯单元，更优选含 25 到 55 个碳以及 5 到 11 个异戊二烯单元，最优选含 40 到 55 个碳以及 8 到 11 个异戊二烯单元。例如，可根据 WO 01/79242 A3、WO 02/085929 A1 和 US 6,461,829 中所描述的方法制备式 IV 的脂质 II 底物。例如，可根据文中所述的方法，采用单功能的转糖基酶 MgtA 或者采用美国专利 6,461,829 中所描述的单或双功能的转糖基酶聚合脂质 II 底物来生产式 I 的化合物。

#### 式 I 均聚物的制备：常规方法

制备如文中所述式 IV 的脂质 II 底物分子的 20 nM 贮液。将 PEG 8000（作为溶于水的 50% 贮液）用水稀释到大约 20%（w/w）。向 PEG 溶液

中添加 pH 7.0 的 0.5M HEPES、1 M 水性氯化镁和脂质 II 底物，终浓度分别达到 20 mM、25 mM 和 2 mM。通过彻底混合使得到的溶液均质化。通过添加约 120  $\mu$ M 的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) MtgA 酶贮液引发反应，从而终摩尔酶浓度是 10  $\mu$ M (约 200:1 = 底物:酶)。将反应液充分混合并使其静置 24 小时。

在水性 HCl 中使反应混合物调至约 0.5 M。添加酸后，系统变得均质化。将水性酸液在 37℃ 孵育 4 小时，其后用 5M 水性 NaOH 将溶液中和到 pH 为 7-8。在接近 pH 7 的点，均质的溶液变得混浊。将混浊的溶液离心 (1700xg, 20 分钟)。沉淀用水冲洗并汇集上清液。添加 5M 水性 NaOH 使终浓度为 0.5 M。在室温下使该溶液静置 2 小时，然后用 5M 水性 HCl 中和到 pH 为 7，在该点上溶液变得混浊。将混浊的溶液离心 (1700xg, 20 分钟)。沉淀用水冲洗并汇集上清液，用水 2x 稀释并用氯仿抽提直到无 PEG (Nag 等. (1996) 《生物化学分析》 (*Anal Biochem.*) 237:224)。将轻微乳化的水层离心 (1700xg, 20 分钟) 并取出澄清的水层。将最终的水溶液置于 Amicon 搅动的细胞浓缩器中 (10K NMWCO 再生纤维素)，进行浓缩/稀释循环直到流出物电导接近零。然后将溶液尽可能浓缩，通过 Millipore Steriflip 过滤器 (0.2  $\mu$ ) 过滤，通过大小排阻层析 (206 nm 处的 UV 吸收) 估计式 I 化合物的浓度。

#### 式 I 共聚物的制备：常规方法

式 IV 的各种脂质 II 底物分子聚合的速率没有显著变化。所以，可聚合式 IV 的不同脂质 II 底物分子的混合物，由此得到共聚物。本领域技术人员将会意识到，使用已知的方法，有可能制备在不同单体单元的数量和这些单元发生的频率上都改变的共聚物。为了制备共聚物，贮液优选地应

当是总脂质 II 底物分子浓度为约 20  $\mu\text{M}$ 。

例如，可通过酶如 MtgA 对式 IV 的两种不同脂质 II 底物分子的混合物的作用，来制备式 I 化合物。共聚物内这两种不同单体单元相对发生率将主要地取决于它们在溶液中的相对浓度，其次取决于它们的相对聚合速率。类似地，可通过酶如 MtgA 对式 IV 的多达 375 种不同脂质 II 底物分子的混合物的作用，来制备式 I 化合物。同样地，共聚物内 375 种不同单体单元中的任何一种的相对发生率主要地取决于其相对于溶液中其他不同成分的浓度，其次取决于其相对于溶液中其他不同成分的聚合速率。

可制备式 I 的嵌段共聚物，例如，通过在限定的时间内使酶如 MtgA 将式 IV 的单个脂质 II 底物分子聚合；终止或停止该反应，或者从反应混合物中取出所形成的聚合物；将该聚合物在限定的时间内置于含有式 IV 的不同单个脂质 II 底物分子的第二酶液中等，这对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。

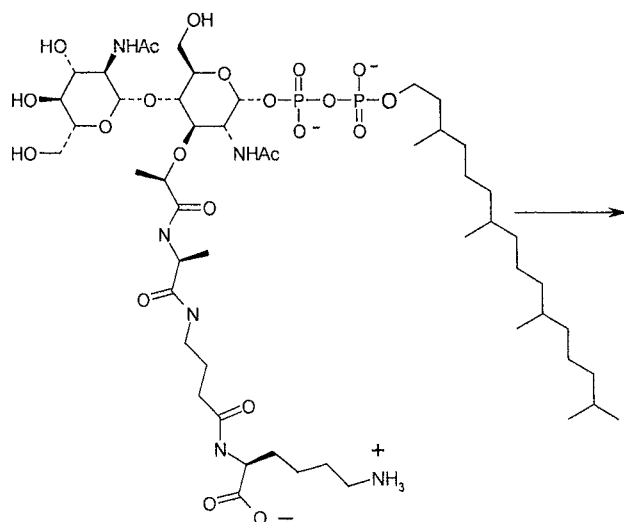
可通过酶如 MtgA 对式 IV 的单个脂质 II 底物分子溶液的作用，来制备式 I 的嵌段共聚物。共聚物内两者不同单体单元的相对发生率将主要地取决于溶液中它们的相对浓度，其次取决于它们的相对聚合速率。类似地，可通过酶如 MtgA 对式 IV 的多达 375 种不同脂质 II 底物分子混合物的作用，来制备式 I 化合物。同样地，共聚物内 375 种不同单体单元中任何一种的相对发生率将主要地取决于其相对于溶液中其他不同成分的相对浓度，其次取决于其相对于溶液中其他不同成分的聚合速率。

#### 式 I 化合物结构的验证：常规方法

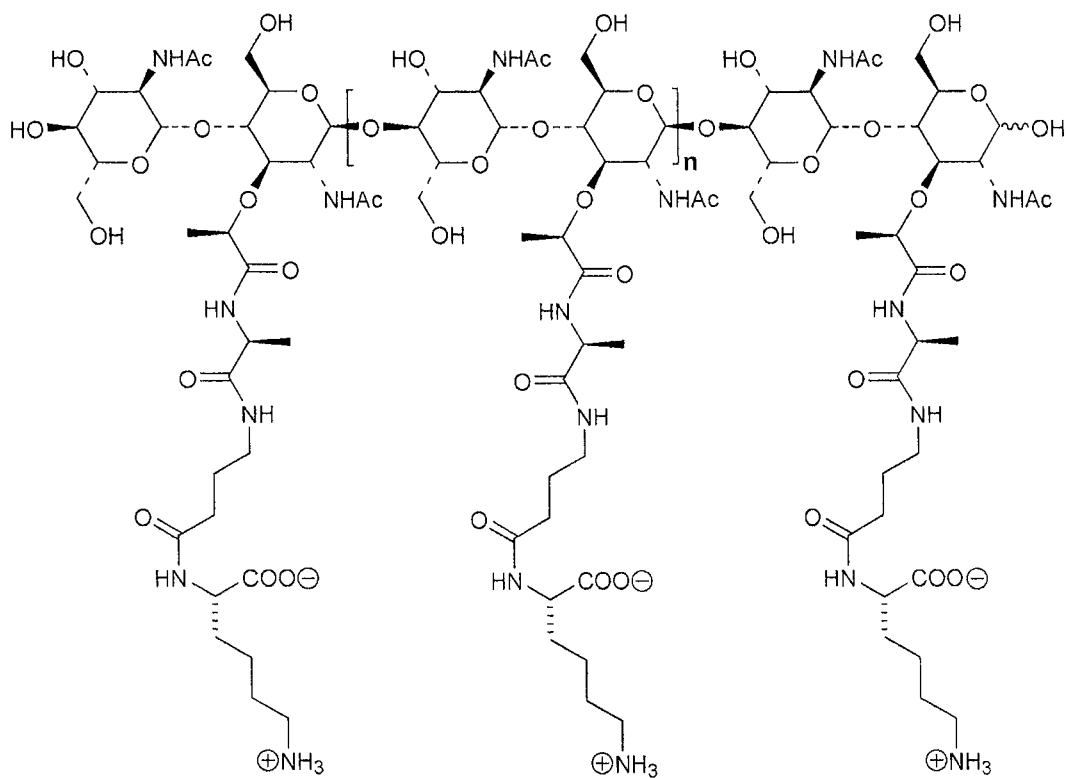
通过基于葡聚糖作为标准的大小排阻层析并通过  $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$  中  $^1\text{H}$  nmr 光谱测定法确定式 I 化合物的结构身份。所述物质可由溶菌酶降解，

并且所述二糖-肽溶菌酶降解产物可通过 ES/MS 来分析。

### 化合物 1 的制备



化合物 3



化合物 1

通过将白色粉末 (370 mg)溶解于水(14.5 mL)中, 制备化合物 3 的 20

nM 贮液。向水(79.7 mL)中添加 PEG 8000 (28.8 mL 作为溶于水的 50%贮液)。向该溶液中添加 pH 7.0 的 0.5 M 磷酸钠缓冲液(5.8 mL)和 1M 水性氯化镁(3.6 mL)。将所得的溶液等分到 3 个锥形管中,并向各管中添加化合物 3 贮液 (4.8 mL),彻底混合。通过添加金黄色葡萄球菌 MtgA 酶的贮液(美国专利 5,922,540) (123  $\mu$ M; 3.9 mL)引发聚合反应。将反应液充分混合并使其静置 24 小时。

随着聚合物的形成,其聚集并沉淀到管的底部。取出上清液并离心(3500 rpm, 20 分钟)以回收随上清液偶然除去的任何聚合物。将沉淀溶于 0.2M 水性 HCl (5 mL)中并以这种形式带到下一步。

向每个倾出上清后仍剩余的粗糙聚合物悬液中添加 5M 水性 HCl (2 x 100  $\mu$ L, 每次添加后混匀)。添加酸后系统变得均质化。向这样获得的淡黄色溶液中添加来自最初上清液加工后的酸化沉淀溶液(参见上面的描述)。将这些水性酸液在 37°C 过夜孵育,其后将管的内容物汇集至终体积约 30 ml。使用约 1.2 ml 5M 水性 NaOH 将溶液中和到 pH 7-8,在该点上均质的溶液变得混浊。将混浊的溶液离心两次(3500 rpm, 20 分钟),沉淀每次都用水洗涤然后弃去(保留的上清液的终体积 = 36 ml)。

添加水性 5M NaOH (3.6 mL)使终浓度为 0.5M。在室温下使该溶液静置 2 小时,然后用 5M 水性 HCl 中和到 pH 6。将溶液分成 8 等份 (8 x 5 mL, 1 x 3 mL),每份置于 50 ml 锥形管中。向每管添加 9 倍体积的乙醇,将溶液在 -20°C 冰箱中过夜贮藏。将管离心 (3500 rpm, 20 分钟),小心地除去上清液。真空短暂干燥后,将沉淀溶于最小量的水性 NaCl (100 mM)溶液中并汇集至终体积 16 ml。再次添加 9 倍体积乙醇,重复沉淀过程。最后,进行第三轮沉淀。

将最后的沉淀溶于水 (40 ml),置于 Amicon 型 8050 搅动的细胞浓缩

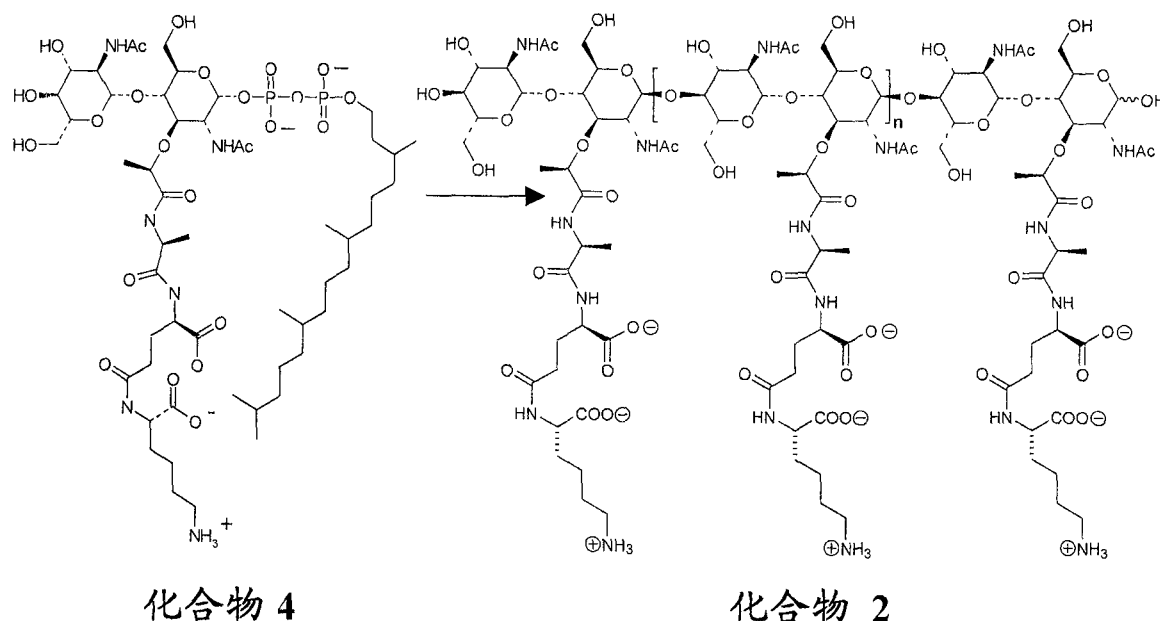
器中，进行浓缩/稀释循环，直到流出物电导接近于零。然后将溶液尽可能浓缩，通过预洗涤的 Millipore Steriflip 过滤器过滤并冻干。如此将化合物 1 分离成白色固体(144 mg, 66%)。

### 化合物 1 结构的验证

通过大小排阻层析、 $^1\text{H}$  NMR 光谱学、酶敏感性和质谱分析法确定化合物 1 的结构身份。大小排阻层析 (3.2mm x 30mm Pharmacia Superose 6 柱, pH = 7 的 20 mM 磷酸钠缓冲液) 显示基于葡聚糖作为标准, 大小分布的中点是约 150 千道尔顿(范围为从约 75 kD 到约 375 kD)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.45 (br s, 1H), 4.32 (br s, 1H), 3.50 (br m, 13H), 2.90 (m, 2H), 2.26 (M, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.75 (m, 3H), 1.62 (m, 3H), 1.31 (m, 6H)。

化合物 1 被溶菌酶迅速降解。细菌细胞壁聚糖聚合物 (肽聚糖的亚结构) 是溶菌酶的天然底物。因此, 溶菌酶的敏感性代表化合物 1 的聚糖结构的确凿证据。最后, 通过 ES/MS  $m/z$  781.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 779.5  $[\tilde{\text{M}}-\text{H}]^-$  证实了化合物 1 的溶菌酶水解产物, 即 *N*-乙酰葡糖胺基- $\beta$ -[1,4]-*N*-乙酰胞壁酰-[Ala-GABA-Lys]-肽。

### 化合物2的制备



制备化合物 4 的 20 nm 贮液。用水将 PEG 8000（作为溶于水的 50 % 贮液）稀释到约 20 %（w/w）。向 PEG 溶液中添加 pH 7.0 的 0.5 M HEPES 缓冲液、1 M 水性氯化镁和化合物 4，终浓度分别达到 20 mM、25 mM 和 2 mM。通过彻底混合使所得溶液均质化。通过添加约 120  $\mu$ M 金黄色葡萄球菌 MtgA 酶贮液引发反应，从而终摩尔酶浓度为 10  $\mu$ M（约 200:1 = 底物:酶）。将反应液充分混合并使其静置 24 小时。

将反应混合物加到约 0.5 M 水性 HCl 中。添加酸后系统变得均质化。将水性酸液在 37℃ 孵育 4 小时，其后将溶液用 5M 水性 NaOH 中和到 pH 7-8。在接近 pH 8 的点，均质的溶液变得混浊。将混浊的溶液离心 (1700xg, 20 分钟)。将沉淀用水洗涤并汇集上清液。将混浊液离心 (1700xg, 20 分钟)。将沉淀用水洗涤并汇集上清液，用水 2x 稀释并用 8x 氯仿提取。通过比色法分析没有 PEG。将轻微乳化的水层离心 (1700xg, 20 分钟)，并取出澄清的水层。将最终的水溶液置于 Amicon 搅动的细胞浓缩器 (10K NMWCO 再生纤维素) 中，并进行浓缩/稀释循环，直到流出物电导接近于零。然后将溶液尽可能浓缩，通过 Millipore Steriflip 过滤器 (0.2 μ) 过滤。

估计化合物 2 的浓度是 2.6 mg/mL (大小排阻层析、在 206 nm 处的 UV 吸收)。

### 化合物 2 结构的验证

在 Superose 6 分析层析柱 (3.2 mm x 30 cm)上通过大小排阻层析 (SEC) 分析化合物 2: 注入 25  $\mu$ L; 20 mM 磷酸钠流动相, pH 7, 流速为 50  $\mu$ L /分, 60 分钟 (匀速)。并在 206 nm UV 检测。使用从 25 - 270 kD 的葡聚糖标准用于校准。

获得的层析谱显示集中在大约 30 分钟的正态对称的钟形曲线(80-150 kD), 并在约 20 分钟(>270 kD)和约 40 分钟(< 23.8 kD)的界限以内。

化合物 4 质谱分析:

ES/MS  $m/z$  = 1264.1 (M-H), 642.8 [(M-2+Na)/2], 631.5 [(M-2)/2]

1265.7 (M+H), 807.4 (糖基阳离子), 644.4 [(M+H+Na)/2], 655.4 [(M+2Na)/2], 633.5 [(M+2)/2]

### 实施例 2

#### 式 IV 的化合物对人外周血单核细胞中 IL 10 表达的刺激

由于已经证明天然肽聚糖和细菌夹膜抗原在体外和体内刺激炎性细胞因子, 因此我们试图测定由接触了式 VI 的化合物, 以化合物 1 为例, 的人外周血单核细胞 (PBMCs)引起的细胞因子图谱。

通过 Eli Lilly 和公司捐赠计划, 从匿名供者中获得了人 PBMCs。通过 Ficoll-hypaque (Stem Cell Technologies, 温哥华, 加拿大)沉淀除去红细胞和多形核白细胞来分离单核细胞。将由 T、B 和单核细胞构成的单核细胞层在具有 10% 胎牛血清 (Gibco, BRL, Carlsbad CA)的 RPMI 1640 中培养。将 PBMCs ( $2 \times 10^6$  细胞/孔)与几种浓度的化合物 1 一起培养以测定最



佳反应。尽管对化合物 1 的反应典型地随着人供体不同而变,但是 0.6  $\mu\text{g/ml}$  浓度的化合物 1 产生可重复的和一致的结果,因此在这些实验中使用(图 3)。分离后,将人 PBMCs 用化合物 1 (0.6  $\mu\text{g/ml}$ ) 处理并在培养物中维持 8 天。每天采集上清液样本并使用多重酶联免疫吸附测定(Luminex, Linco Research, St. Charles, MO; 目录号 HCYTO-60K)分析细胞因子的表达。在这些试验中使用人多重细胞因子试剂盒测量 IL1、IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、TNF $\alpha$ 和 INF $\gamma$ 。在另外的试验中,添加定制的 IL12 特异性抗体珠复合物以进一步确定细胞因子反应(Luminex, Linco Research, St. Charles, MO)。在所有试验中,将结果相对于未处理的培养基对照进行标准化。数据表达为一式三份 3 个孔的均值 $\pm$ 所表现的细胞因子浓度的标准误差。数据代表至少 3 个试验的典型结果。

如在图 3 中所示,几个试验的结果揭示用化合物 1 处理人 PBMCs 仅导致试剂盒中所代表的多数炎性细胞因子的最低量表达。令人惊奇地是,占主导地位的反应是抗炎性细胞因子 IL10 的表达。IL10 的表达发生在晚期,在第 5 天可检测,并持续升高,在第 8 天达到大约 80  $\text{pg/ml}$  的浓度。IL2 和 INF $\gamma$  仅在早期勉强可检测到,而 IL4、IL6、IL12 或 TNF 的表达在任何时间点都不能检测到。

这些结果提示式 VI 的化合物,以化合物 1 为例,将在 PBMC 细胞培养物中选择性地诱导 IL10 的表达,而且它们在动物炎症模型中和各种类型的炎性病变的治疗中将是有有效的。

### 实施例 3

#### 式 VI 的化合物与 Toll 样受体 2 (TLR2) 的相互作用

Toll 样受体 (TLRs) 通过感知体内出现的微生物,在对侵入的病原体

的早期先天免疫中起着重要的作用 (Akira 等人 (2001) 《天然免疫学》 (*Nature Immunol.*) 2:675-680)。这些受体识别仅由微生物病原体所表达的高度保守的结构基序, 称之为病原体相关的微生物模式(PAMPs) (Medzhitov (2001) 《免疫学自然评论》 (*Nat. Rev. Immunol.*) 135-145)。PAMPs 包括各种细菌细胞壁成分如脂多糖(LPS)、肽聚糖和脂肽, 以及鞭毛蛋白、细菌 DNA 以及病毒双链 RNA。PAMPs 对 TLRs 的刺激引发导致转录因子 NF- $\kappa$ B 活化的信号级联, 其诱导分泌指导过继性免疫反应的促炎细胞因子和效应细胞因子(Janeway 等人 (2002) 《免疫学年鉴评论》 (*Annu. Rev. Immunol.*) 20:197-216)。由于天然肽聚糖是通过 TLR-2 活化细胞的 PAMP (Iwaki 等人 (2002) 《生物学化学杂志》 (*J. Biol. Chem.*) 277:24315-24320), 因此我们试图确定式 VI, 以化合物 1 为例, 是否也可在体外活化 NF- $\kappa$ B。

这些试验包括用两个质粒 DNAs 转染 HEK293 细胞 (美国典型培养物保藏中心, 马纳萨斯, 弗吉尼亚)。第一个质粒 pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) 含有人 TLR-2 基因。第二个质粒 pNF- $\kappa$ B-luc (Stratagene, La Jolla, CA) 编码与荧光素酶报告基因相连的 NF- $\kappa$ B 基因, 其产物可作为 NF- $\kappa$ B 活化的直接衡量而在体外跟踪。为了制备用于转染到细胞内的 DNA, 在 OPTI-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 生长培养基中 1: 6 稀释 Fugene6 (Roche, Basel Switzerland) 转染剂。接下来, 向稀释的 Fugene6 中添加 75 ng pNF- $\kappa$ B-luc 和 300 ng pcDNA3.1/Hygro DNA, 将混合物在 37°C 孵育 30 分钟。向 DNA/Fugene6 混合物中添加  $10^6$  细胞/ml 浓度的 HEK293 细胞。轻轻混合后, 将细胞/DNA 混合物以  $10^5$  细胞/孔的浓度等分到 96 孔组织培养板内并在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 环境中孵育 24 小时。孵育后, 向细胞中添加浓度变化的测试化合物, 使孵育再进行 24 小时。通过从细胞中除去生长培养并

用 100  $\mu$ l RLB 裂解液(Promega, Madison, WI)替换, 评估与化合物一起孵育所得的荧光素酶活性的量。通过在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的单个冻/融循环完成裂解。根据生产商的指示在 Victor 发光计 (Perkin Elmer Life Sciences, Shelton, CT)中, 在 25  $\mu$ l 一份的细胞裂解液中测定每个细胞培养物的荧光素酶活性。HEK293 细胞中 NF $\kappa$ B 活化的阳性对照是将 1 ng/ml 浓度的 TNF $\alpha$  (Pharmingen, Palo Alto, CA)与转染的细胞孵育。

表 1 显示, 使用可商购的分离自金黄色葡萄球菌的浓度变化的天然肽聚糖(Fluka, St. Louis, MO), 观察到 NF $\kappa$ B 活性与未刺激的培养物相比多达 54.5 倍的诱导。另一种可商购的肽聚糖和多糖混合物制品(PG/PS; Lee Labs Inc., Grayson, GA)在 HEK293 细胞中刺激诱导多达 33.7 倍的 NF- $\kappa$ B。表 1 中的数据显示在化合物 1 高达 500  $\mu$ g/ml 的浓度时缺乏 NF- $\kappa$ B 的活化。

表 1: 用于测量 HEK293 细胞中 TLR2 活性的荧光素酶试验

| 浓度<br>( $\mu$ g/ml) | 金黄色葡萄球菌<br>肽聚糖(Fluka) | PG/PS<br>(Lee Labs Inc) | 化合物 1 |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|-------|
| 500                 | 48.0                  | 33.7                    | 0     |
| 250                 | 51.8                  | 27.0                    | 0     |
| 125                 | 54.5                  | 15.2                    | 0     |
| 62.5                | 50.7                  | 8.8                     | 0     |
| 31.2                | 48.6                  | 5.3                     | 0     |
| 15                  | 37.7                  | 3.0                     | 0     |
| 7.5                 | 34.9                  | 2.6                     | 0     |
| 3.7                 | 31.8                  | 1.9                     | 0     |
| 1.8                 | 24.7                  | 1.6                     | 0     |
| 0.93                | 20.7                  | 1.5                     | 0     |
| 0.46                | 17.8                  | 1.0                     | 0     |

阳性刺激对照：用 1 ng/ml TNF $\alpha$ 孵育的培养物与未刺激的培养物相比，导致荧光素酶活性增加 22.5 倍。

这些结果证明不同于天然肽聚糖（其是 PAMP），化合物 1，其代表式 VI 的化合物，并不通过 TLR2 诱导 NF $\kappa$ B 活化。

#### 实施例 4

##### 式 VI 的化合物与其他 Toll 样受体(TLRs)的相互作用

与调查化合物 1 与 TLR2 相互作用的研究并行地，我们使用上述实施例 3（表 1）中相同的 NF- $\kappa$ B 报告试验，也测试了化合物 1 与扩大的 TLR 构建物名单的相互作用。结果显示于表 2。

表 2：使用各种化合物通过 NF $\kappa$ B 活化 TLR<sup>1</sup> 的总结

| 受体        | 大肠杆菌<br>LPS | 化合物 1 | PG/PS<br>(Lee Labs) |
|-----------|-------------|-------|---------------------|
| TLR2      | +           | -     | ++                  |
| TLR2/CD14 | ++          | -     | ++                  |
| TLR4/CD14 | +++         | -     | -                   |
| TLR5      | +           | -     | -                   |
| TLR7      | +/-         | -     | -                   |
| TLR8      | -           | -     | -                   |

<sup>1</sup> 符号“+”的数目表示 NF $\kappa$ B 的相对阳性活化，

而符号“-”表示没有活化。

如在表 2 中所示，0.001-100  $\mu$ g/ml 浓度之间的化合物 1 不与任何其他 TLR 受体引起 NF- $\kappa$ B 信号传导。在所有这些试验中，LPS 作为 TLR4 活化的阳性对照，而天然 PG 作为 TLR2 活化的阳性对照。

这些试验证实了先前的观察（实施例 3），即化合物 1 不活化 TLR2，甚至在存在必需的适体分子 CD14 时 (Janeway 等 (2002) 《免疫学年鉴评论》 (*Annu. Rev. Immunol.*) 20:197-216)也是如此，并且将这种现象延伸至 5 种其他的 TLRs。

### 实施例 5

#### 式 VI 的化合物不刺激人树突细胞 (DCs) 的成熟

DCs 通常被称之为专职的抗原提呈细胞和免疫系统的哨兵 (Banchereau 等人 (2000) 《免疫学年鉴评论》 (*Annu. Rev. Immunol.*) 18:767-811)。它们以未成熟的状态(iDC)存在于几乎所有外周组织中，这使得它们能够吞噬（或吞没）抗原，从而使之可被加工并呈递给免疫系统，尤其是幼稚 T 细胞(Shortman 等人 (2002) 《免疫学自然评论》 (*Nat. Rev. Immunol.*) 2:151-161)。载着它们经加工的抗原货物，树突细胞经血液和淋巴循环迁移到淋巴结、脾以及其他淋巴组织中。在此旅行期间，它们成熟、失去它们摄取和加工抗原的能力，并且开始在它们的表面展示抗原。当它们到达它们目的地的時候，它们已成为 T 细胞的有效刺激物，凭借它们的多触角（树突状）形状，开始与大量 T 细胞进行细胞-细胞间的接触 (Banchereau 等人 (2000) 《免疫学年鉴评论》 (*Annu. Rev. Immunol.*) 18:767-811)。

某些 CD（分化簇）标志为暴露于表面的蛋白和糖蛋白，可用于追踪树突细胞的成熟状态(Chakraborty 等人 (2000) 《临床免疫学》 (*Clin. Immunol.*) 94:88-98)。表 3 列举了用于此目的的通常所使用的 CD 标志以及它们在单核细胞、未成熟的树突细胞(iDC)和成熟树突细胞(mDC)上的相对表达水平(Chakraborty 等人 (2000) 《临床免疫学》 (*Clin. Immunol.*) 94:88-98)。

表 3: 用于区分单核细胞(MO)、未成熟树突细胞(iDC)和成熟树突细胞(mDC)的分化簇(CD)标志

|     | 细胞表面标志 <sup>1</sup> : |      |      |      |        |
|-----|-----------------------|------|------|------|--------|
|     | CD1a                  | CD14 | CD83 | CD86 | HLA-DR |
| MO  | -                     | ++   | -    | -    | -      |
| iDC | ++                    | -    | -    | -    | -      |
| mDC | ++                    | -    | +++  | +++  | +++    |

<sup>1</sup>表中符号“+”的数目表示每种细胞表面标志的相对量，而符号“-”表示缺乏细胞表面标志。

用缀合了荧光的抗-CD 抗体来标记细胞，允许通过测定细胞群表面上标志的平均荧光强度 (MFI)，来分析树突细胞的成熟状态。使用流式细胞仪分析大量细胞标本中是否存在细胞表面标志。在体外，可通过从人血液中分离 CD14(+)单核细胞并将这些细胞用两种细胞因子的混合物 (粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素 4 (IL-4))培养4天产生 iDC。由于几种细菌分子，例如 LPS (Matsunaga 等 (2002) *Scand. J. Immunol.* 56:593-601)和肽聚糖(Michelsen 等 (2001) *《生物学化学杂志》 (J. Biol. Chem.)* 276:25680-25686)可诱导 iDCs 分化成 mDC 表型 (如同在先天免疫系统的活化期间所发生的那样)，因此我们有兴趣评价式 VI 的化合物在使人单核细胞来源的树突细胞成熟中的潜能。

通过 Eli Lilly 和公司捐赠计划，从匿名供者中获得人 PBMCs。通过 Ficoll-hypaque (Stem Cell Technologies, 温哥华, 加拿大)沉淀除去红细胞和多形核白细胞来分离单核细胞。通过与缀合了 CD14 的磁珠(Miltenyi

Biotech Inc., Auburn, CA)一起孵育, 随后使用 autoMACS 装置 (Miltenyi Biotech, Inc., Auburn, CA)在磁场中通过物理分离, 从 PBMCs 中分离 CD14(+) 单核细胞级分。一经分离, 将 CD14(+)单核细胞在由 RPMI 1640 构成的完全 DC 培养基中培养, 其中含有 10% 热灭活的澳大利亚胎牛血清 (FBS)、非必需氨基酸、丙酮酸钠、2-巯基乙醇、青霉素-链霉素(作为 1X 溶液, 所有都购自 Gibco BRL, Carlsbad CA)。另外, 在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 中, 使用含有 20 ng/ml IL-4 (Sigma, St. Louis, MO) 和 40 ng/ml GM-CSF (Pharmingen, Palo Alto, CA)的完全 DC 培养基, 将一些培养物诱导 4 天使其分化成 iDCs。培养 4 天后, 将细胞与化合物 1 或 LPS 一起再孵育 24 小时, 之后染色进行流式细胞仪分析 CD 标志。流式细胞仪的标准染色方案包括在含有 2% 热灭活的 FBS (Gibco BLR, Carlsbad, CA) 和 0.05% 叠氮化钠(Sigma, St. Louis, MO)的 Dulbecco 氏磷酸缓冲盐溶液(DPBS, Gibco BRL, Carlsbad, CA) (以下称作“流式洗涤液”) 中将细胞洗涤两次。洗涤后, 在冰上将 10<sup>5</sup> 细胞/样品在 100 μl 流式洗涤液和 20μl 预稀释的缀合了藻红蛋白的抗-CD 标志的一抗 (使用的所有抗体购自 Pharmingen, Palo Alto, CA) 中重悬 15 分钟。在所有试验中纳入类似缀合的同型对照抗体。孵育后, 将细胞在流式洗涤液中洗涤 3 次。末次洗涤后, 通过在含有 1% 多聚甲醛(Becton Dickinson, Palo Alto, CA)的流式洗涤液中重悬而将细胞固定。将细胞样品避光贮藏在 -4℃, 直至使用 FC500 流式细胞仪 (Beckman Coulter, Miami, FL)分析。一旦细胞被正确地门控给出前向和侧向分散图, 评估 10,000 细胞/样品的平均荧光强度 (细胞表面标志的量)。

这些实验的结果总结在表 4 中。

表 4: 与化合物 1 或 LPS 孵育后单核细胞来源的树突细胞的流式细胞分析

| 细胞类型           | 细胞表面标志 <sup>1</sup> : |      |      |      |        |
|----------------|-----------------------|------|------|------|--------|
|                | CD1a                  | CD14 | CD83 | CD86 | HLA-DR |
| MO             | 5.1                   | 16.5 | 5.6  | 12.8 | 23.9   |
| iDC            | 116.1                 | 3.3  | 7.6  | 10.9 | 7.7    |
| iDC +<br>Cpd 1 | 109.8                 | 3.4  | 9.5  | 12.1 | 9.1    |
| iDC +<br>LPS   | 124.4                 | 4.1  | 46.7 | 75.4 | 29.2   |

<sup>1</sup> 数字代表 10,000 细胞/样品中的细胞表面标志的平均荧光强度。

如在表 4 中所示, 在该实验中所用的表面标志组进一步证实 CD14(+) 单核细胞与 GM-CSF 和 IL-4 的 4 天孵育诱导细胞分化为未成熟的树突细胞 (比较表 4 中的结果与表 3 中所总结的预期的表型)。如在表 4 中所示, 由于这些细胞与大肠杆菌 LPS (成熟的阳性对照) 孵育显著增加了它们细胞表面上的 CD-83、CD-86 和 HLA-DR 的染色, 这是成熟 DC 的预期表型, 因此这些未成熟的树突细胞在功能上能够达到成熟状态。表 4 中数据显示与化合物 1 的孵育不能改变 iDC 状态的染色谱, 表明该化合物, 式 VI 的化合物的代表, 能影响树突细胞的成熟。

### 实施例 6

#### 未成熟人树突细胞 (iDCs) 对式 VI 的化合物的摄取



由化合物 1 诱导的 DCs 成熟的抑制可能是由于这些细胞不能内在地加工这些分子。抗原的摄取和加工（降解）是 APCs 的两个基本属性 (Banchereau 等人 (2000) 《免疫学年鉴评论》 (*Annu. Rev. Immunol.*) 18:767-811)。DCs 是免疫系统的最有效的 APCs，部分地是由于它们能强有力地从其环境中胞吞或采集物质 (Shortman 等 (2002) 《免疫学自然评论》 (*Nat. Rev. Immunol.*) 2:151-161)。为了确定 iDCs 是否能胞吞高分子量免疫调节性多糖抗原如以化合物 1 为例的式 VI 的化合物，我们制备了化合物 1 的荧光衍生物，在采用共聚焦显微镜的摄入研究中使用。可使用该成像技术在细胞内定位荧光探针，例如文中公开的 Oregon 绿标记的化合物 1。在这些试验中，使用荧光标记 (FITC) 的葡聚糖聚合物作为对照分子。葡聚糖(大小为 40 kDa)是胞吞试验中常用的高分子 (Sallusto 等人 (1995) 《实验医学杂志》 (*J. Exp. Med.*) 182:389-400)。由于其是高分子量碳水化合物聚合物，因此其可用作化合物 1 的比较剂。

根据在 PCT 国际公开 WO 01/79242 中所描述的方法制备 Oregon 绿标记的化合物 1。简要地，在 MtgA 聚合反应中纳入与未标记的脂质 II 的比例为 1: 4 的 Oregon 绿(Molecular Probes, Eugene, OR)缀合的脂质 II，产生 25% Oregon 绿标记的聚合物。如前所述纯化和处理聚合物物质。对于摄取研究，在 37°C 将终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的荧光化合物 1 或者 1  $\text{mg}/\text{ml}$  的赖氨酸可固定的 FITC 缀合的葡聚糖（大小为 40 kDa, Molecular Probes, Eugene, OR）与根据在实施例 5 中所描述的方法制备的人单核细胞来源的 iDC 一起孵育 2 两分钟。孵育后，通过将细胞在冰冻的完全 DC 培养基（实施例 5）中洗涤 4 次，除去胞外探针。然后将洗涤过的细胞在 37°C 培养，两分钟间隔后通过在流式洗涤液中稀释的 1% 多聚甲醛固定液（其也含有代谢毒物叠氮化钠；实施例 5 中描绘的方案）中洗涤停止染色。在每个时

间间隔制备玻璃载玻片标本，并用透明指甲油密封。将标本避光贮藏在-20℃，直至使用 Radiance 2100 共聚焦显微镜 (BioRad Laboratories, Hercules, CA)分析。

图 4 显示用 FITC-葡聚糖（大小为 40 kDa）（图表 A）或 Oregon-绿标记的化合物 1（大小为大约 150 kDa）处理 2 分钟的人 iDCs 的黑白共聚焦图象。与共聚物孵育后，将细胞彻底洗涤以除去任何外部的聚合物，并以两分钟的间隔追踪内在化的物质。

与共聚物孵育两分钟后，FITC-葡聚糖或化合物 1 的细胞内定位显示为细胞暗视野中的明亮区（图 4，分别是图表 A 和 B）。此外，内在化的聚合物并不散布在整个胞浆中，相反却局限于离散的体或囊中，这与吞噬泡中它们的存在一致。

这些结果证明 iDCs 能胞吞式 VI 的化合物，即，化合物 1。

### 实施例7

#### 未成熟人树突细胞(iDCs)对式VI化合物的摄取动力学

由于似乎存在着 iDCs 对化合物 1 的强劲摄取（图 4），在流式细胞计数中使用该分子的荧光形式，以观察聚合物摄取的动力学。

在这些实验中，人类单核细胞来源的树突细胞如实施例 5 中所述制备。将树突细胞按  $5 \times 10^5$  细胞/样品重悬，并置于冰上 37℃ 孵育。在各时段的起点，将细胞与 50 µg/ml 终浓度的荧光化合物 1 或者 1 mg/ml 的 Lysine-可固定的 FITC-缀合葡聚糖(40 kDa 大小, Molecular Probes, Eugene, OR)一起孵育。在孵育开始后 0、2、10、20、30、40 和 50 分钟时，通过洗涤终止摄取，即用冰冻流动的洗涤缓冲液洗涤细胞四次(实施例 5)。也如实施例 5 所述将洗涤的细胞固定在多聚甲醛中。将染色的固定细胞 4℃ 贮存，

避光保护，直到利用 FC500 流式细胞仪(Beckman Coulter, Miami, FL) 分析。一旦细胞被正确门控给出前向和侧向散射图，就对 10,000 细胞/样品进行群体平均荧光强度评价。

图 5 (图表 B)显示了随着时间，Oregon 绿标记的化合物 1 在 iDC 胞浆中积累。对照分子 FITC-葡聚糖也是如此(图 5, 图表 A)。为控制分子对细胞表面的非特异性粘附（这在此试验中可被错误地当作阳性），也将细胞与荧光聚合物于 0 °C 一起孵育。在此温度下，iDCs 是存活的，但不能那托物质，即它们在代谢上是无活性的(Sallusto 等人(1995) *J. Exp. Med.* 182:389-400)。在此温度下，来自对照分子(FITC-葡聚糖)或化合物 1 的信号都不随时间增大(图 5, 分别为图表 A 和 B)。这表明所见的摄取是细胞内吞作用的结果。

这些结果证明 iDCs 能够迅速内吞以化合物 1 为例的荧光标记的式 VI 的化合物，并且此分子无力使 DCs 成熟并非是因抵制其内吞摄取而致。

## 实施例 8

### 式VI的化合物对LPS所诱导的iDCs成熟的干扰

如上文表 4 中所示(实施例 5)，50 µg/ml 的 LPS 能够将 iDCs 转化为以共刺激标志(CD83 和 CD86)以及 II 类主要组织相容性(MHC) 标志(HLA-DR)的增加为特征的 mDC 表型(Chakraborty 等人(2000) *Clin. Immunol.* 94:88-98)。我们下一步研究了式 VI 的化合物，以化合物 1 为例，是否能够干扰 iDCs 向的 mDCs 转化。结果示于 5。

表 5: 在式 VI 化合物的存在下用大肠杆菌 LPS 成熟的单核细胞来源的树突细胞的流式细胞计数分析

| 细胞类型                    | 细胞表面标志 <sup>1</sup> : |      |      |      |        |
|-------------------------|-----------------------|------|------|------|--------|
|                         | CD1a                  | CD14 | CD83 | CD86 | HLA-DR |
| iDC +<br>LPS            | 126.4                 | 4.1  | 46.7 | 75.4 | 29.2   |
| iDC +<br>LPS +<br>Cpd 1 | 120.2                 | 4.1  | 52.6 | 59.2 | 31.9   |

<sup>1</sup> 数字代表 10,000 细胞/样品的平均荧光强度。

在这些实验中, CD14(+)单核细胞分离自人 PBMCs, 并如实施例 5 所示分化为 iDCs。分化后, 将 iDCs 与两个已知的细胞成熟诱导剂中的任何一个一起孵育 24 小时: 大肠杆菌 LPS (Matsunaga 等人(2002) *Scand. J. Immunol.* 56:593-601)或细胞因子混合物含肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、前列腺素 E<sub>2</sub> 和 IL-6 (Dieckman 等人(2002) *J. Exp. Med.* 196:247-253)。在添加 LPS 或细胞因子的同时, 我们还向某些诱导的培养物中添加了 100  $\mu$ g/ml 的化合物 1。孵育后, 如实施例 5 所示通过流式细胞计数评价细胞 CD1a、CD14、CD83、CD86 和 HLA-DR 的表达。

在细胞因子成熟的 iDCs 的情况下, 流式细胞计数证实发生了通过细胞因子混合物诱导的成熟; 然后, 与化合物 1 孵育对成熟表型没有影响, 如通过表面标志分析所测定的那样(数据未显示)。与此相反, 表 5 显示化合物 1 能够干扰 LPS 诱导的 iDCs 成熟。具体地, 共刺激标志 CD86 的表面表达在该分子存在下降低, 而测试的其他标志基本上未变。另外的实验也证明另一共刺激标志 CD80 也降低(数据未显示)。

DCs 活化 T 细胞的强大能力与其组成型表达 MHC 和共刺激标志如

B7 家族标志(即 CD80 和 CD86)两者有关 (Banchereau 等人(2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811)。如果这些分子自 DC 细胞表面下降或缺失, 则 DCs 不能参与和 T 细胞之间的刺激性同源相互作用。Schwartz ((1990) *Science* 248:1349-1356)第一个观察到在缺乏共刺激分子时 MHC 分子上抗原的呈递诱导 T 细胞无能。从而, DCs 能够为免疫反应提供刺激(通过作为 APCs)和下调信号。

为充分理解上述发现的意义, 理解 DCs 在免疫耐受中的作用很重要。耐受是免疫系统基本的性质, 藉此自身或自体抗原不再触发免疫应答(Belz 等人(2002) *Immunol. Cell Biol.* 80:463-468)。他人已证明当 DCs 经历不完全成熟(低水平的 CD80 和或 CD86), 或者已经由封闭 B7 家族共刺激标志(即 CD80 和 CD86)的抗体处理过的时候, 这些细胞能够诱导抗原特异性的体外不应答和体内 T 细胞无能(Lu 等人(1996) *J. Immunol.* 157:3577-3586; Gao 等人(1999) *Immunology* 98:159-170)。目前已知未成熟 DCs 通过诱导人 T 调节细胞, 即一组在体外体内表现出调节功能的 T 细胞, 促成了外周耐受(Jonuleit 等人(2000) *J. Exp. Med.* 192:1213-1222)。也已经证明活化的 T 调节细胞通过自分泌表达或诱导效应 T 细胞而引发 IL-10, 一种抗原细胞因子的产生(Dieckmann 等人(2002) *J. Exp. Med.* 196:247-253)。从而, 式 VI 的代表性分子化合物 1 似乎影响 DC 表面共刺激标志的表达, 表明这类分子在诱导耐受原性 DCs 中的作用机制。这些无能 DCs 随之能够直接地或者通过 T 调节细胞群的活化而诱导 T 细胞无能。

### 实施例9

#### 式VI的分子并非多克隆有丝分裂原

#### 而且并不刺激人PBMC培养物中淋巴细胞的增殖

有丝分裂原是非特异性诱导淋巴细胞 DNA 合成和细胞分裂的物质。LPS 为 B 细胞特异性有丝分裂原(Moller 等人(1973) *J. Infect. Dis.* 128:52-56), 而植物凝集素(PHA)特异性地诱导 T 细胞分裂(Boldt 等人(1975) *J. Immunol.* 114:1532-1536)。肽聚糖是另一种 T 细胞有丝分裂原(Levinson 等人(1983) *Infect. Immun.* 39:290-296)。因此我们对确定以化合物 1 为例的的化合物是否能够刺激培养物中人外周血单核淋巴细胞(PBMCs)分裂感兴趣, 特别是因为化合物 1 是完全的合成肽聚糖。在这些实验中通过增殖细胞将放射性标记的核苷酸碱基摄入到 DNA 中来测量细胞分裂。由闪烁计数测量的培养物的每分钟放射性计数(cpm)是对细胞增殖的直接测量。

在这些实验中, 如实施例 2 所述, 从健康人类志愿者中分离 PBMCs。将分离的 PBMCs 以  $10^5$  细胞/孔的密度等分到圆底 96 孔组织培养板 (Falcon Brand, Becton Dickinson, Palo Alto, CA) 中。有些细胞还与 100  $\mu\text{g/ml}$  化合物 1 或 25  $\mu\text{g/ml}$  PHA (Sigma, St. Louis, MO)作为 T 细胞增殖的阳性对照一起孵育。将细胞于 37 °C 在 5%  $\text{CO}_2$  气氛中孵育长达 4 天。在接种后 30、54 和 78 小时, 某些培养物用 1  $\mu\text{Ci/孔}$ 的 $[\text{}^3\text{H}]$ -胸苷(比活 6.7 Ci/mmol; ICN Inc, Costa Mesa, CA)脉冲, 并返回到 37 °C 再孵育 18 小时, 之后使用 Filtermate 收集器 (Packard Instruments, Shelton, CT)收集到过滤板 (Packard Instruments, Shelton, CT) 上。收集后在添加 20  $\mu\text{l/孔}$ 的 Microscint-O 闪烁混合物(Packard Instruments, Shelton, CT)之前对过滤板进行干燥。闪烁计数用 MicroBeta TriLux 液闪计数器(Perkin Elmer, Shelton, CT)进行。

图 6 显示了人 PBMCs 对多克隆 T 细胞活化剂 PHA 的典型的增殖应答。掺入到 PHA 处理细胞中的 $[\text{}^3\text{H}]$ -胸苷在两天接触后接近于未处理细胞的 100,000 倍, 且增殖速率提高长达 4 天。与之形成对照, 用化合物 1 处

理的细胞并不通过 DNA 增殖及扩增应答(图 6)。因此, 该化合物, 式 VI 分子的代表, 在人 PBMC 培养物中似乎并不表现出象多克隆有丝分裂原那样的行为。

### 实施例10

#### 式VI 的化合物抑制抗-CD3抗体诱导的人PBMC中淋巴细胞的增殖

当抗原(Ag)在抗原提呈细胞(APC)表面 MHCII 环境下被呈递给幼稚 T 细胞时, T 细胞表面上存在 MHC-Ag 复合物与 T 细胞受体(TCR)/CD3 复合物的结合(Weiss 等人(1986) *Annu. Rev. Immunol.* 4:593-619)。这种相互作用, 与通过这两类细胞上的 CD28-B7 (CD80, CD86)相互作用产生的扩增信号一起, 引起 T 细胞活化、细胞因子刺激以及细胞分裂(Weiss 等人(1986) *Annu. Rev. Immunol.* 4:593-619。在缺乏 Ag 或 APC 时, T 淋巴细胞变的活化并在体外通过与结合在板上的抗-CD 抗体孵育而增殖(van Lier 等人(1989) *Immunol.* 68:45-50)。模拟通过抗原的活化, CD3 抗体与 T 细胞的结合导致活化酪氨酸激酶、胞内钙离子浓度上升、产生甘油二酯、并活化蛋白激酶 C。钙离子以及蛋白激酶 C 都作为胞内信使起诱导基因活化的作用(van Lier 等人(1989) *Immunol.* 68:45-50)。抗-CD3 抗体介导的 T 细胞增殖也可通过将<sup>[3H]</sup>-胸苷掺入到分裂细胞的 DNA 中来测量, 如图 6 中所举例说明的那样。

由于在用化合物 1 处理后未观察到 PBMCs 的增殖(图 6), 我们假设此类分子可刺激 T 调节细胞。进行本实验以研究化合物 1 是否诱导抑制淋巴细胞增殖。

在该实验中, 如实施例 2 所述分离和培养人 PBMCs, 并以  $10^6$  cell/ml 涂板到 T-25 组织培养瓶(Corning Inc., Corning, NY)中于 37 °C 在 5% CO<sub>2</sub>

气氛中培养 24 h。在此期间,使培养物接触 100  $\mu\text{g/ml}$  的化合物 1。在抗体包被板上孵育细胞的前一天,将抗-人 CD3 抗体 (Clone UCHT1, Pharmingen, Palo Alto, CA) 或同种型匹配的对照抗体 (Pharmingen, Palo Alto, CA) 在 Dulbecco's 磷酸缓冲盐溶液 (DPBS) (Gibco, BRL, Carlsbad, CA) 中稀释,并用 100  $\mu\text{l}$  等份的稀释抗体包被 96-孔组织培养板的孔。板于 4 °C 过夜包被,用前在 DPBS 中洗涤三次。将接触化合物 1 或不接触该化合物的人 PBMCs 以  $10^5$  细胞/孔的密度涂板到抗体包被的孔中。组织培养板于 37 °C 在 5%  $\text{CO}_2$  气氛中培养 30 或 54 小时,之后向各孔加入 1  $\mu\text{Ci}$ /孔的 [ $^3\text{H}$ ]-胸苷 (比活 6.7 Ci/mmol; ICN Inc, Costa Mesa, CA)。然后使细胞返回 37 °C 孵育另外 18 h,之后如实施例 9 所述收集细胞。液闪计数操作也如实施例 9 所述。此实验的数据计算为每分钟未加工计数 (cpm) 的放射性和刺激指数 (SI) (未显示),此为抗-CD3 抗体包被孔中细胞 cpm 与同种型 (对照) 抗体包被孔中细胞 cpm 之比。

图 7 显示了接触抗-CD3 抗体 48 或 72 小时都导致人 PBMCs 增殖,如 [ $^3\text{H}$ ]-胸苷 (图 7, 闭环) 摄取所示。此外,增殖量与孔中抗-CD3 抗体的量直接相关,最高增殖见于接触 0.4  $\mu\text{g/ml}$  抗-CD3 抗体的细胞。图 7 也显示,在与抗-CD3 抗体孵育之前,人 PBMCs 与 100  $\mu\text{g/ml}$  化合物 1 预孵育 24 h 导致后续增殖量的下降 (图 7, 开环)。

这些结果证明化合物 1, 式 VI 化合物的代表,抑制抗-CD3 抗体诱导的淋巴细胞增殖。

### 实施例 11

用式 VI 的化合物和抗-CD3 抗体处理后人 CD3+ 细胞的微阵列分析  
利用微阵列技术通过测量细胞因子调节确证和延伸了图 3 所示的证明



细胞因子表达的结果。

如实施例 2 所述分离 PBMCs, 并添加到 6-孔组织培养板中含 RPMI 和 10%胎牛血清(Gibco BRL, Carlsbad, CA)、50 M  $\beta$ -巯基乙醇和 500  $\mu\text{g/ml}$  青霉素/链霉素的培养基(完全培养基) 中。T 细胞密度为  $2.5 \times 10^6$  细胞/孔。向合适板的各孔中加入 100  $\mu\text{g/ml}$  化合物 1 和完全培养基。孵育于  $37^\circ\text{C}$  进行 24 小时。同时地, 用 5 ml/孔的 0.2  $\mu\text{g/ml}$  抗-CD3 抗体的无菌磷酸缓冲盐溶液(PBS, Gibco BRL, Carlsbad, CA)或者等体积的无菌 PBS 处理 6-孔组织培养板。未接种的板于  $4^\circ\text{C}$  过夜孵育。孵育后, 将用化合物 1 处理的细胞或未处理的对照细胞轻轻地重悬, 并添加到已经或没有包被抗-CD3 抗体的板中, 并于  $37^\circ\text{C}$  继续孵育另外 48 小时。

然后用 Pan T 细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec, cat. #130-053-001; Auburn, CA)基本上按照制造商的说明加工 PBMCs。该试剂盒为设计用于从外周血中分离未活化 T 细胞的磁标系统。使用 autoMACS (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA)从未标记的  $\text{CD3}^+$ 细胞中通过磁分离去除非 T 细胞。将分离的 T 细胞贮存在  $-80^\circ\text{C}$ 。

依据制造商说明的操作, 利用 Trizol (GibcoBRL, Carlsbad, CA)从细胞中分离总 RNA, 接着进行氯仿抽提和后续的乙醇沉淀。通过分光光度法定量 RNA, 并通过凝胶分析评估其完整性。所有的 RNA 制剂贮存在  $-80^\circ\text{C}$  备用。

总 RNA 作为模板用于合成生物素标记的 cDNA。此标记的 cDNA 随后用作为商购定向微阵列的探针。具体地, 采用了 GEArray Q 系列人常见细胞因子试剂盒 cat. # HS-003N (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD)。探针合成和微阵列加工如制造商建议的那样进行。以化学发光模式使用 Typhoon 8600 成像仪(Amersham Pharmacia Biotech,

Piscataway, NJ)以捕获和贮存图像,随会使用 ImageQuant 软件(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)分析。将数据输出到 Microsoft Excel,对图象强度进行背景校正,并使用 GEArray Analyzer 软件(SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD)在实验中进行标准化。

数据分析揭示了与如图 3 所示的使用多元酶联免疫吸附试验所见到的是一致的细胞因子调节模式。接触抗-CD3 抗体的细胞被活化,因此表现出 IL17、TNF- $\beta$  及其他已知参与炎性过程的细胞因子的上调。认为 IL17 主要是由活化 T 细胞表达的,并发挥作用以起始和维持炎性应答。抗-CD3 抗体处理的细胞也表现出 IL10 和 IL19 的下降。当将化合物 1 加至随后接触抗-CD3 抗体的细胞时,IL10 的水平显著上升。

这些微阵列实验中化合物 1 所诱导的 CD3+ T 细胞中 IL10 表达的上调验证了在实施例 2 以及在动物模型中所观察到的结果,并表明该细胞因子可用作为生物学标志,以在体外体内监测以化合物 1 为例的式 VI 的分子的生物学/免疫学活性。该数据也表明定向微阵列不仅可用于监测本发明化合物的生物学活性,而且可监测衍生化合物的生物学活性,以确定结果差异对免疫调节潜能的作用。

## 实施例12

### 式VI的化合物防御腹内脓肿的形成

由于化合物 1 诱导在体外具有抑制功能的 T 调节细胞以及人 PBMCs 中 IL10 的晚期生产(分别见实施例 10 和实施例 2),我们有兴趣评估该合成聚合物抗原在体内防止动物炎性形成的能力。使用大鼠腹内脓肿模型来解决这个问题。

这些研究中所采用的大鼠脓肿形成模型是对 Onderdonk 等人((1977) *J.*

*Infect. Dis.* 136:82-87)和 Tzianabos 等人 ((1993) *Science* 262:416-419)所述的改进。体重在 135-175 克之间的雄性 Lewis 大鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)用于所有实验。大鼠圈养在微型分离笼中,并任意给食(Ralston Purina, St. Louis, MO)和水。在刚来时,令动物适应 24 小时。腹内脓肿是通过单次腹膜内注射制备的接种物诱导的,所述接种物含有以 1:6 稀释度与含无菌大鼠盲肠内容物的佐剂溶液混合的脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) (ATCC 23745; 美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA) (每个动物  $10^8$  集落形成单位)。脆弱拟杆菌于 $-80^{\circ}\text{C}$  维持在脑心浸液中。培养物在脑心浸液中厌氧培养至对数生长期,并稀释与大鼠盲肠内容物(rSCC)一起使用。rSCC 是由溶解在脑心浸液中的大鼠盲肠沉淀制备的,高压灭菌然后过滤。在接种后六天使动物安乐死,并评估脓肿形成。具有一个或多个完全形成的脓肿的动物评定为阳性。没有脓肿的动物得出负分。评定结果的个体对于实验组的性质不明。

动物(10 只大鼠/组) 用三剂量的化合物 1 在脆弱拟杆菌/rSCC 刺激之前 1 天、当天和之后 1 天以 24 小时的间隔皮下给药(Tzianabos 等人《临床研究杂志》(*J. Clin. Invest.*) 96:2727 (1995))。接种物的刺激通过腹膜内路径进行。按 100、10 和  $1\text{ }\mu\text{g}$  (X3) /动物向动物给药对数稀释的化合物 1。结果表达为保护百分比(无脓肿动物数目/治疗组),并利用 Fishers Exact Probability 试验计算统计学意义。

如表 6 所示,与盐水对照相比,化合物 1 在  $100\text{ }\mu\text{g}$  和  $10\text{ }\mu\text{g}$  剂量时产生了可观的抗脓肿形成保护。保护评估为与具有一个或多个脓肿的对照动物相比的脓肿的完全消失。受保护动物未表现出抗原给药的有害作用,如果有的话,具有少许发烧或昏睡迹象,这是常见的炎症症状。这些动物也不表现出败血症症状。

表 6: 大鼠脓肿模型中化合物 1 的活性

| 治疗组                 | 脓肿动物/组 | 脓肿动物% | 保护%  |
|---------------------|--------|-------|------|
| Cpd 1 100 µg x 3 SC | 1/8    | 12.5  | 87.5 |
| Cpd 1 10 µg x 3 SC  | 1/8    | 12.5  | 87.5 |
| Cpd 1 1.0 µg x 3 SC | 2/8    | 25    | 75   |
| 盐水 0.1 ml x 3 SC    | 6/8    | 75    | 25   |

综合考虑实施例 2-11 所示的数据, 这些数据表明该模型中防御响应细菌刺激的脓肿形成所需的炎性过程的保护受到未成熟树突细胞的存在抑制, 其可直接抑制 T 细胞活化, 或者诱导产生 T 调节细胞群。通过 T 调节细胞接触直接抑制炎性细胞可进一步刺激表达 IL-10。总而言之, 一个或多个这些事件可能支配着体内脓肿模型中所见的炎症抑制。

### 实施例 13

#### 式 VI 的化合物降低外科术后粘连的发生率和严重度

业已证明外源 IL10 限制外科手术粘连的形成(Holschneider 等人(1997) *J. Surg. Research* 70:138-143)。此外, T 调节细胞具有强抗炎活性, 并已经证明限制体内模型的炎症(Maloy 等人(2001) *Nat. Immunol.* 2:816-822; Shevach (2002) *Nat. Rev. Immunol.* 2389-400)。T 调节细胞也已经证明引发由其靶标炎性 T 细胞产生 IL10 (Diekman 等人(2002) *J. Exp. Med.* 196:247-253)。如上文实施例 2、10、11 和 12 中不同地证明的那样, 化合物 1 刺激由 PBMCs 产生 IL10, T 调节细胞数目增加并在体外发挥作用, 并在体内提供了抗脓肿形成保护。由于导致血纤维蛋白沉积和脓肿形成的炎性应答类似于与粘连形成有关的病变, 我们假定在粘连模型中用化

合物 1 治疗将同样地刺激 T 调节细胞的活性以及最终内源 IL10 的生产，这可导致降低外科手术后粘连的形成。

为测试这种假说，雄性 Lewis 大鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)在外科手术诱导粘连之前 1 天、当天以及之后 1 天，以 24 小时的间隔，通过三次注射化合物 1 皮下给药(Tzianabos 等人(1995) *J. Clin. Invest.* 96:2727-2731)。按 0.2 ml 100  $\mu$ g、10  $\mu$ g 和 1  $\mu$ g (X3)盐水/动物向大鼠给药对数稀释的该化合物。以相同的给药方案向对照组给药 0.2 ml 体积的盐水。腹膜粘连按照 Kennedy 等人((1996) *Surgery* 120:866-871)和 Tzianabos 等人(PCT 国际公开 WO 00/59515)的方法诱导，稍加改动。简要地，大鼠用麻醉用溶于氧的 2-5%异氟烷进行外科手术平台的麻醉。对腹腔进行 1 到 2 cm 的中线切割，以暴露盲肠。从腹腔中无菌取出盲肠，并用外科手术纱布摩擦以诱导可见的微量出血。然后将盲肠重新插入腹腔之中。无菌翻转左侧和右侧腹壁，也以上述方式摩擦。在此操作后，将如实施例 12 所述制备的 0.2 – 0.3 ml 大鼠无菌盲肠内容物(rSCC)作为炎性佐剂添加到腹腔中(Onderdonk 等人(1982) *J. Clin. Invest.* 69:9-14)。用 3 – 0 丝线闭腹，接着用组织粘合剂(3M Animal Care Products, St. Paul, MN)封上皮肤。外科手术操作后一周处死动物，并评价粘连的形成。使用如 Kennedy 等人((1996) *Surgery* 120:866-871)所述的方法以 0 – 5 的等级计分：0 = 无粘连；1 = 薄膜粘连；2 = 不止一层薄粘连；3 = 具有病灶点的厚粘连；4 = 具有平面连接的厚粘连；and 5 = 极厚血管粘连或不止一层平面粘连。这种计分系统接近于人类医学上的系统，解释了粘连的存在，并显示了粘连病变的严重度；炎症和粘连形成中较高的分值指示较大的严重度。结果示于表 7。

表 7: 大鼠粘连模型中化合物 1 的活性

| 治疗组                      | 粘连得分范围/<br>个体得分    | 平均粘连得分 | 中值  |
|--------------------------|--------------------|--------|-----|
| Cpd 1 100 $\mu$ g x 3 SC | 0-4<br>(0,0,2,2,4) | 1.6    | 2   |
| Cpd 1 10 $\mu$ g x 3 SC  | 0-4<br>(0,1,3,3,4) | 2.2    | 3.0 |
| Cpd 1 1.0 $\mu$ g x 3 SC | 0-4<br>(0,1,3,3,4) | 2.2    | 3   |
| Cpd 1 0.1 $\mu$ g x 3 SC | 1-4<br>(1,3,3,4,4) | 3      | 3   |
| 盐水 0.1 ml x 3 SC         | 3-4<br>(3,3,4,4,4) | 3.6    | 4   |

表 7 所示数据证明与盐水对照相比(中值= 4.0), 用 100  $\mu$ g 化合物 1 治疗的大鼠中的粘连形成受到了显著的限制(中值= 2.0)。这些数据证明这种多糖抗原有效地保护大鼠免于形成由严重外科手术操作所诱导的粘连, 并表明式 VI 的化合物在体内诱导抗炎效果。

#### 实施例 14

##### 式 VI 的化合物对豚鼠模型中延迟型超敏反应的抑制的影响

免疫调节剂如式 VI 的化合物, 以化合物 1 为例, 的安全性和有效性的临床评价需要便利的生物标志。这之所以必要, 是因为安全性和剂量确定通常是在健康志愿者中确定的, 其中并没有测量到明确的炎性过程。此外, 这样的生物标记将可用于后期试验, 因为在免疫调节剂治疗后, 脓肿

和/或粘连不能以非侵入的方式容易地观察和进行疗效分级。所以，我们开发了延迟型超敏(DTH)动物模型(Gray 等人(1994) *Curr. Opin. Immunol.* 6:425-437)。这种试验也可在人类中用作为生物标志进行使用本发明的免疫调节剂的临床疗效研究。在临床上，DTH 皮试在总体评估人免疫能力方面具有重要价值(Gray 等人(1994) *Curr. Opin. Immunol.* 6:425-437; Kuby 等人(2000) *Immunology*, W. H. Freeman and Co)。包括如下所述给药 Candin (白色念珠菌皮试抗原)的这类测试常用于测试 AIDS 患者的免疫能力。

使用了豚鼠模型证明 DTH 应答作为生物标志的实用性。动物模型中局域化的 DTH 应答构成了与 T 细胞功能有关的重要信息源。DTH 应答的直观测量值可容易地在人类和动物中观察和测量到。在皮肤表面可观察到并容易地定量测量红肿、疹块和/或硬结。

为此目的，体重 250-299 克的雌性 Hartley 豚鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)用于所有的 DTH 实验。豚鼠圈养在微型分离笼中，并任意给食(Ralston Purina, St. Louis, MO)和水。在刚来时，令动物适应 24 小时。从动物后背剪去大约 2 x 2 英寸面积的毛。该区域用聚维酮碘(H&P Industries/Triad Medical Inc., Mukwonago, WI)擦洗，接着以酒精擦洗。下一步，通过在背面颈部皮内注射 0.2 ml 白色念珠菌 A26 (ATCC 90234)生理盐水悬液使动物对白色念珠菌抗原致敏。白色念珠菌 A26 培养物于-80°C 维持在甘油和乳糖冷冻液中，然后于 35°C 在 Sabourauds 和葡萄糖琼脂斜面(DIFCO, Detroit, MI)上有养培养 24 小时。然后将培养物悬于无菌生理盐水中，并在用前通过分光光度计调整至大约等于  $2.0 \times 10^7$  细胞/ml 的预定光密度。

致敏三天后，用以注射用无菌水(Abbott Laboratories, North Chicago, IL)配制的化合物 1 按 100、10 和 1.0 ng 每 0.2 ml 处理动物。用 0.2 ml 在背面颈部对动物进行皮下注射。第三组动物给药水载体作为阳性对照组。

致敏四天后，如上所述对动物剃毛和擦洗。在剃毛区四个同等空白的区域上皮内注射 0.1 ml Candin (Allermed Laboratories, Inc., San Diego, CA)，其用作为先前已经对白色念珠菌致敏的 T 细胞的回忆抗原。为时三天每日观察动物这四个部位上的红斑、疹块和硬结。记录每个部位红斑的两个横断（垂直和水平）直径。对其进行平均，并计算红斑面积(mm<sup>2</sup>)均值。将处理动物与未处理对照进行比较，以评估疗效。

与对照动物相比，化合物 1 处理动物的红斑面积下降，证明 DTH 皮肤试验对于临床应用和多糖免疫调节剂如式 VI 的化合物的评价来说是合适的生物标志。

### 实施例15

#### 式V和VI的化合物对人PBMCs中TNF- $\alpha$ 的分化诱导

式 V 和 VI 的化合物诱导人外周血单核细胞(PBMCs)生产促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  的能力如下测定。

来自人供体的 PBMCs 通过 Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden)密度梯度离心分离，以  $1.0 \times 10^6$  细胞/ml 的密度涂布到含 10% FBS 的 RPMI 培养基(均来自 Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)中，并分别在存在或不存在化合物 1 和化合物 2 时于 37 °C 在 5 % CO<sub>2</sub> 气氛中孵育 18 h。不同的对照细胞在如上相同的条件下与 10 ng/ml 金黄色葡萄球菌肽聚糖(Sigma)一起孵育，这是强炎性肽聚糖。孵育后，通过沉淀从不同细胞中除去组织培养基，并使用商购的利用了针对 TNF- $\alpha$  的单克隆抗体夹心 ELISA 试剂



盒(BD OptEIA™ Set Human TNF, Catalog No. 555212, Pharmingen, Inc.)测定其中存在的 TNF- $\alpha$  的量。该 ELISA 试验具有 7.8 pg/ml TNF- $\alpha$  的检测下限。

与 500  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ g/ml 和 1  $\mu$ g/ml 化合物 2 孵育 18 h 分别诱导产生 64.0 pg/ml、17.6 pg/ml 和 1.82 pg/ml TNF- $\alpha$ ，而用这些供体细胞使用相同浓度的化合物 1 未观察到可检测的 TNF- $\alpha$ 。与 10 ng/ml 金黄色葡萄球菌肽聚糖孵育在这些供体细胞中诱导 26 pg/ml TNF- $\alpha$ 。

这些结果证明人 PBMCs 识别化合物 2，它是式 V 化合物的代表，在所用浓度下生产促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 。相反，化合物 1 为式 VI 化合物的代表，并不在这些 PBMCs 中诱导 TNF- $\alpha$ 。这些观察结果与实施例 15 中所述的那些一致。

尽管这样描述了本发明，但显然可以以多种方式对其加以改变。这样的改变并不视为偏离本发明的精神和范围，并且所有对本领域技术人员显而易见的这样的改动旨在囊括在如下权利要求书的范围内。

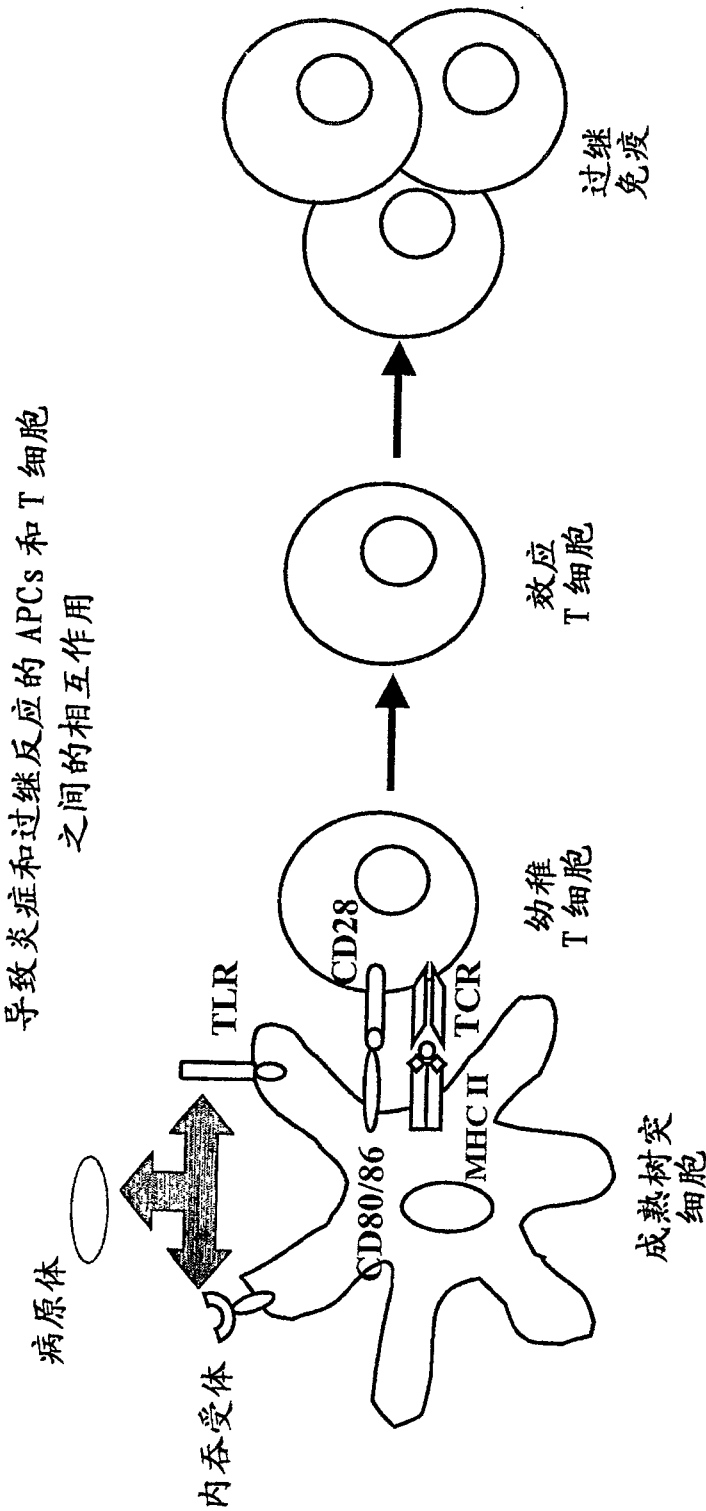


图 1

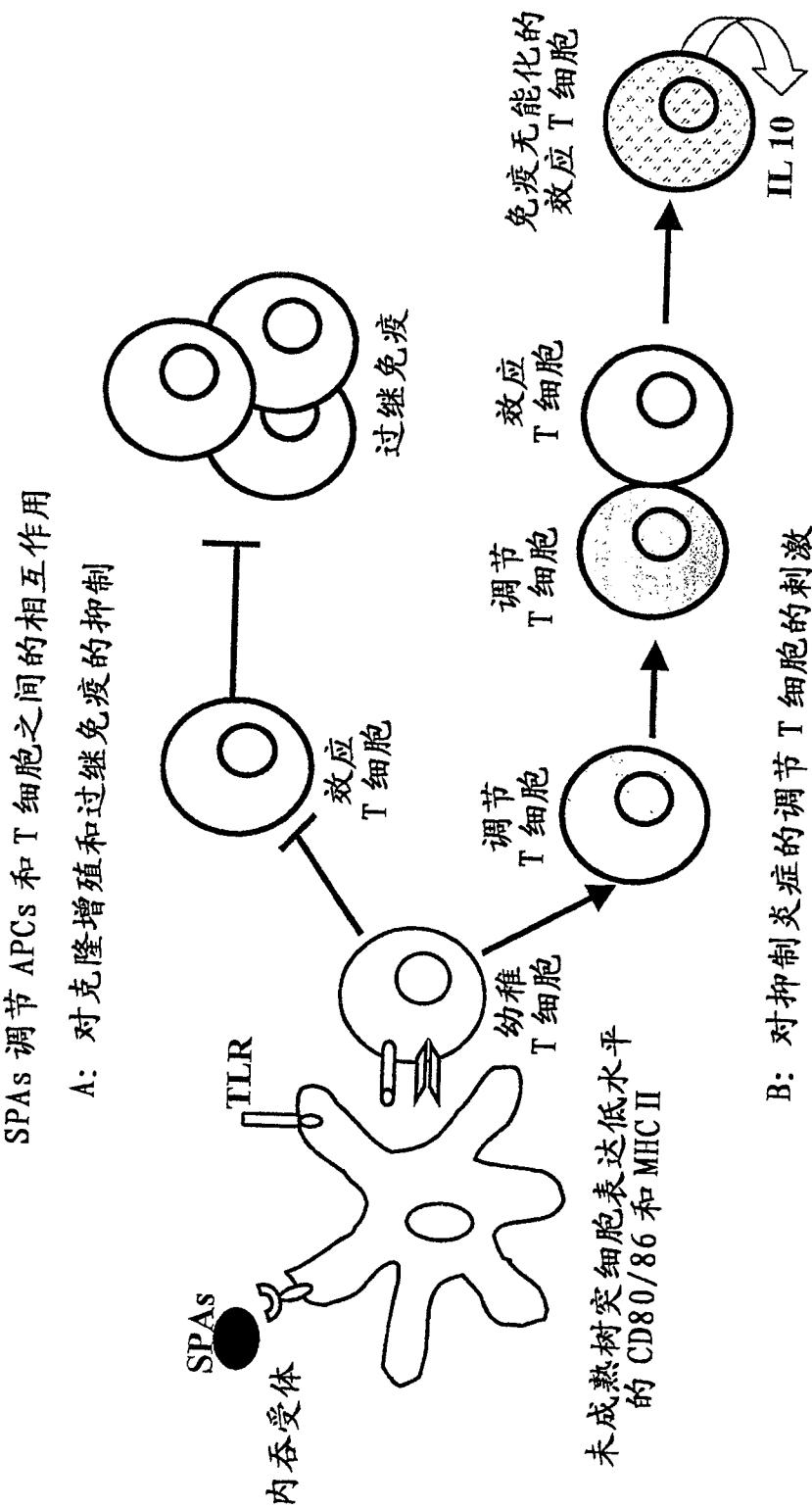


图 2

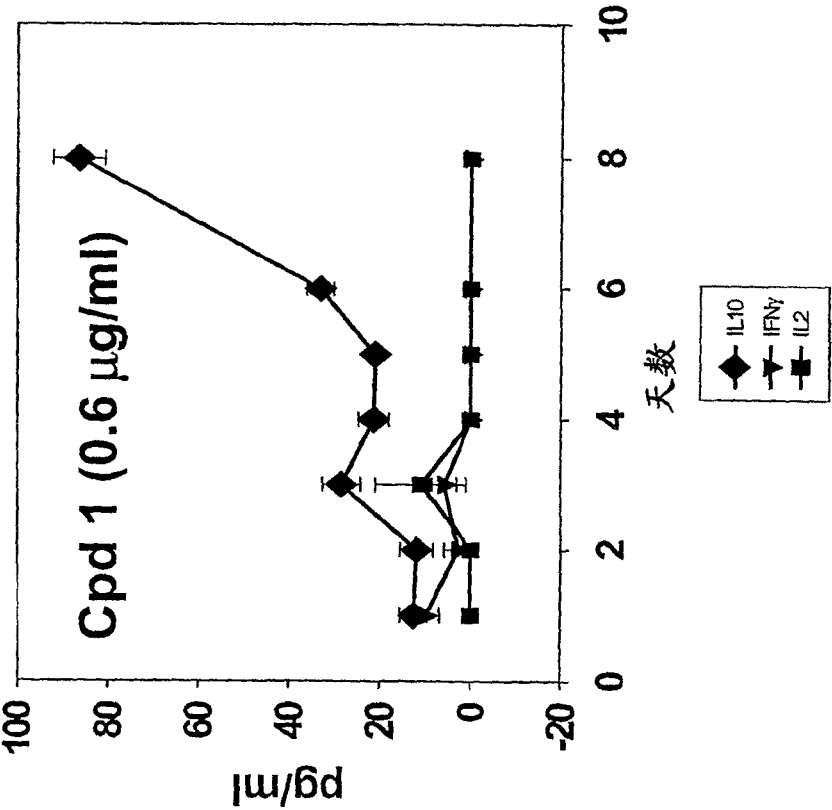


图 3

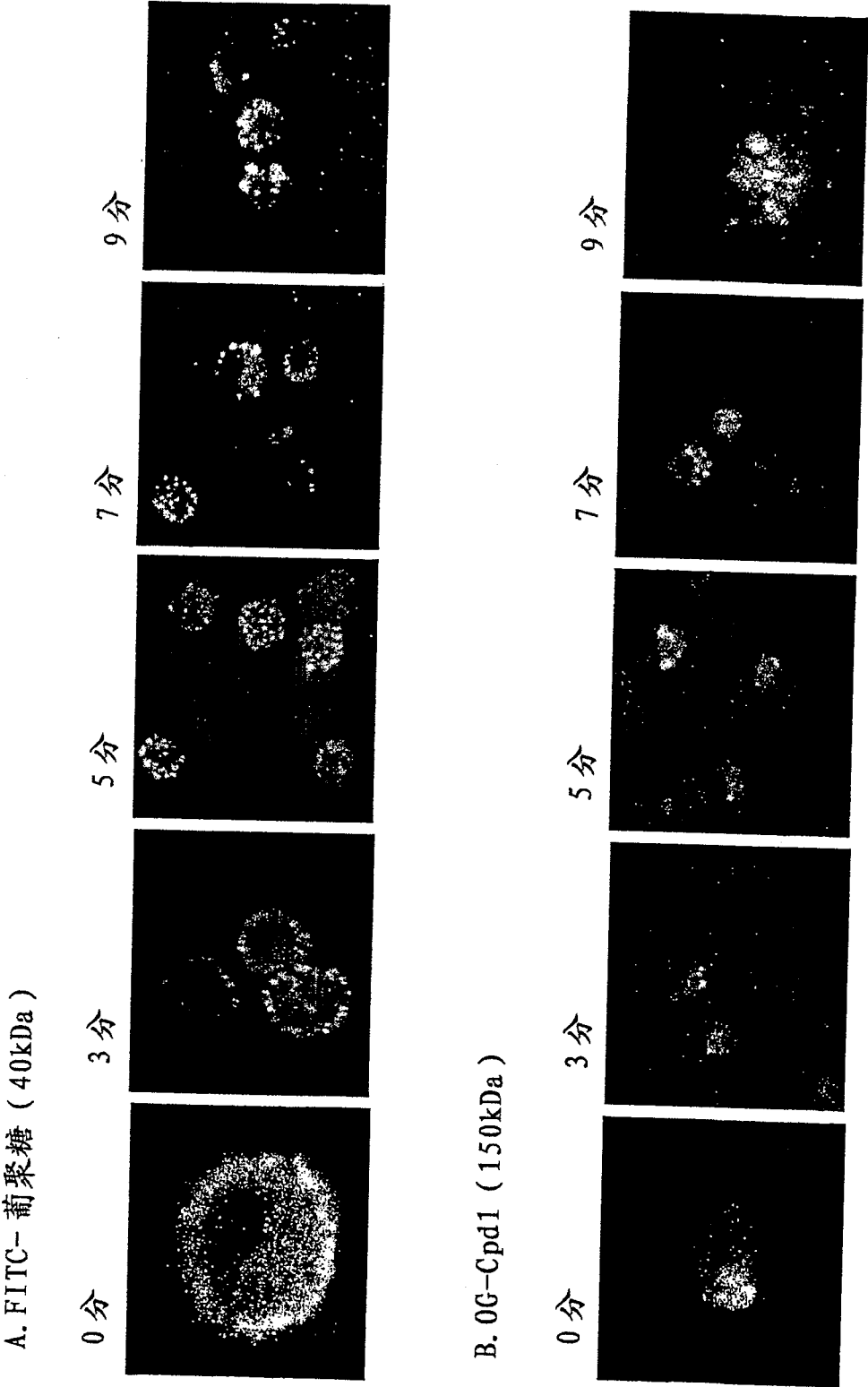


图 4

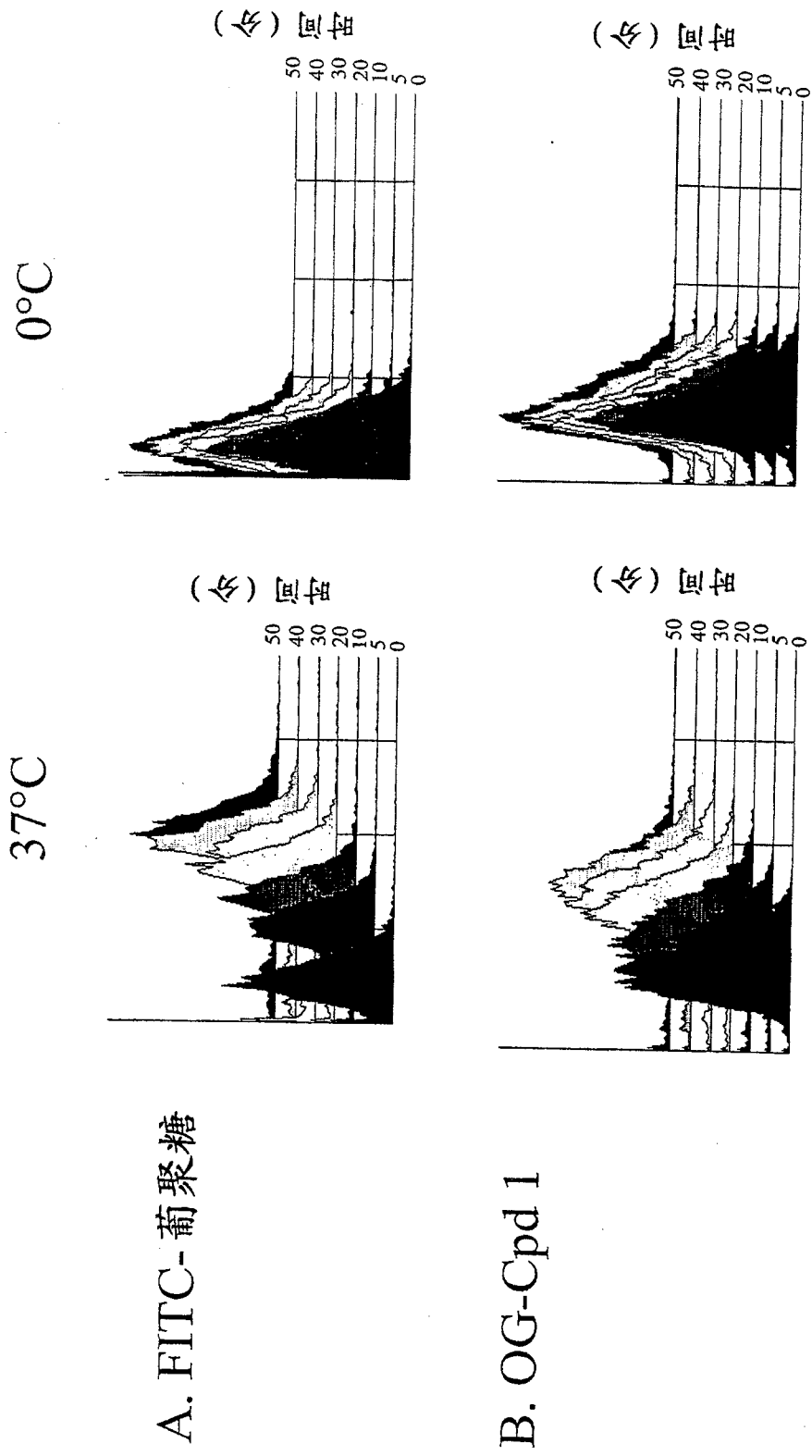


图 5

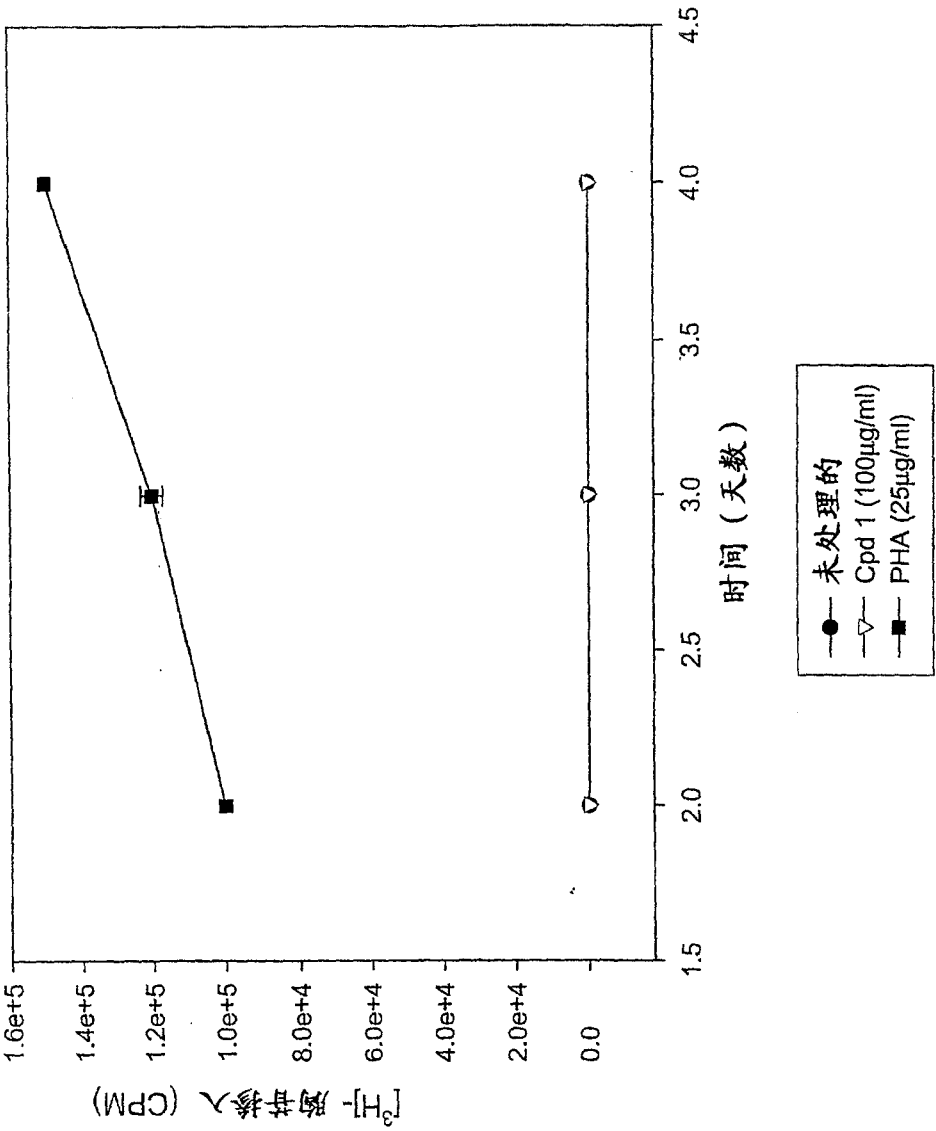


图 6

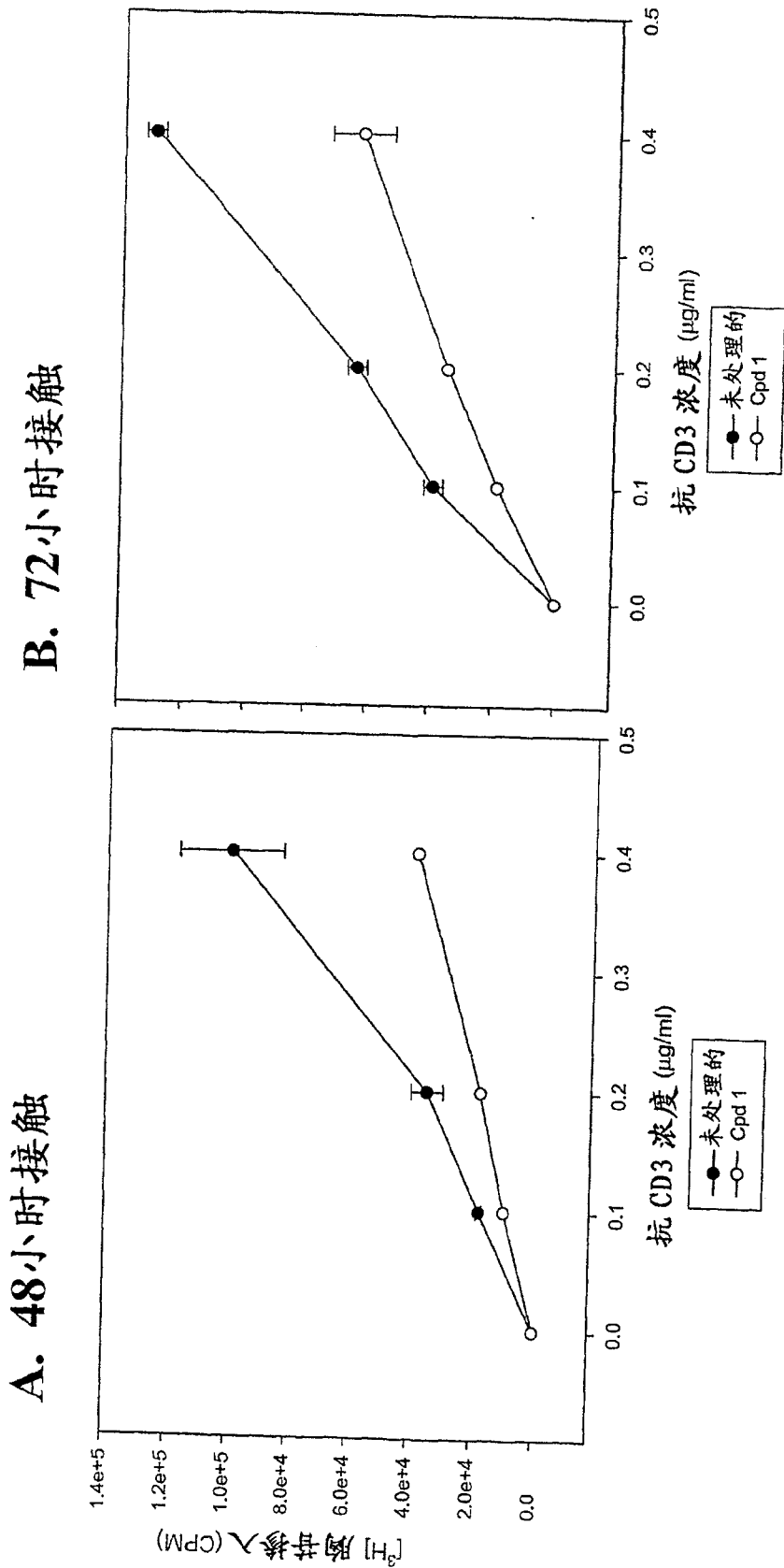


图 7



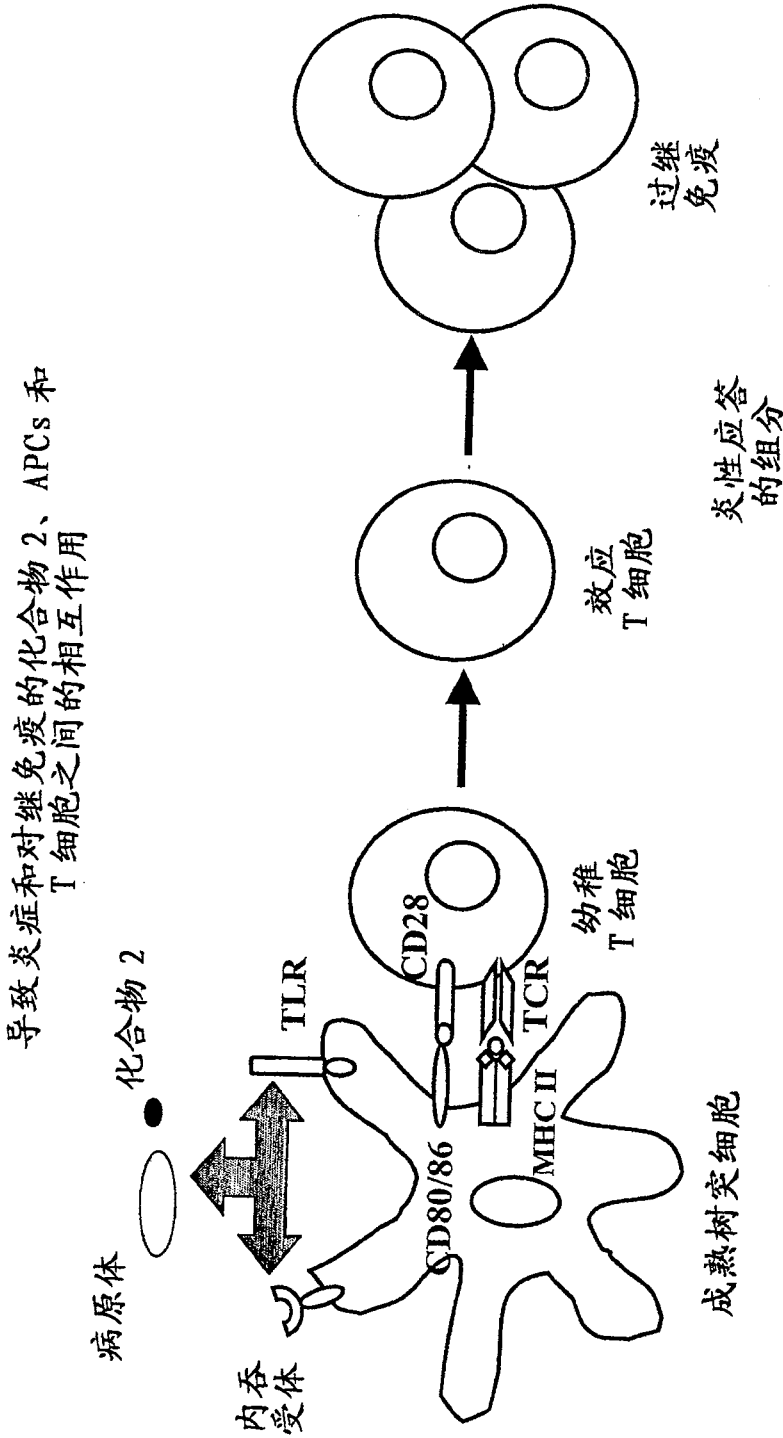


图 8