



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105682666 B

(45) 授权公告日 2021.06.01

(21) 申请号 201480049320.4

(22) 申请日 2014.09.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105682666 A

(43) 申请公布日 2016.06.15

(30) 优先权数据  
61/874,946 2013.09.06 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.03.07(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/054617 2014.09.08(87) PCT国际申请的公布数据  
W02015/035337 EN 2015.03.12(73) 专利权人 中央研究院  
地址 中国台湾台北市南港区研究院路2段  
128号(72) 发明人 翁启惠 爱丽斯·L·于 林昆贤  
吴岱娜(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司  
11287  
代理人 林斯凯(51) Int.Cl.  
C07H 15/18 (2006.01)  
A61K 35/17 (2015.01)  
A61K 31/7012 (2006.01)  
A61K 31/739 (2006.01)(56) 对比文件  
US 5849716 A, 1998.12.15

审查员 金英

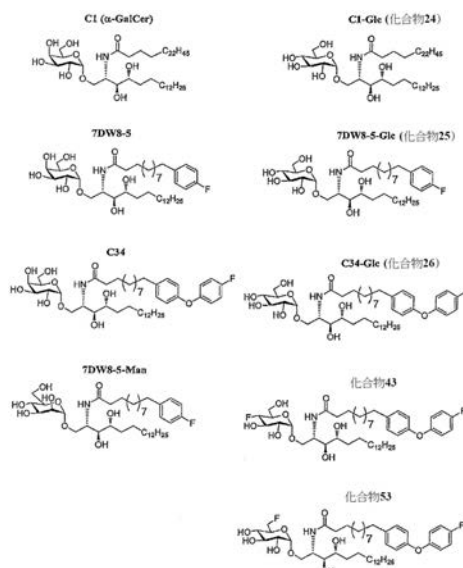
权利要求书9页 说明书64页 附图12页

## (54) 发明名称

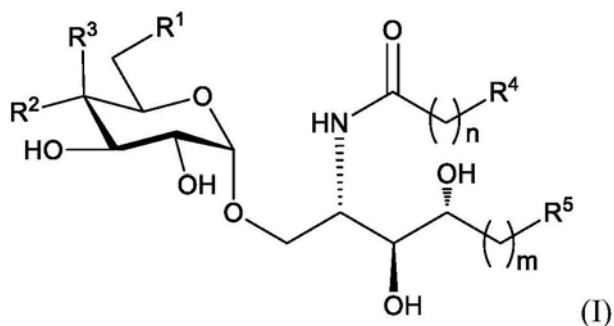
使用糖脂激活人类iNKT细胞

## (57) 摘要

本发明提供具有 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -glucose)之鞘糖脂(glycosphingolipid;GSL),其较优选地激活人类恒定型自然杀手T(iNKT)细胞。具有 $\alpha$ -葡萄糖之鞘糖脂与具有 $\alpha$ -半乳糖( $\alpha$ -galactose)之鞘糖脂相较,其可较强地诱导人类(但在小鼠中较弱)细胞激素及/或趋化激素及扩大及/或活化免疫细胞。本发明亦提供具有 $\alpha$ -葡萄糖之鞘糖脂及衍生物,其于4及/或6位为氟。本发明揭示此等具有 $\alpha$ -葡萄糖之鞘糖脂及其衍生物用于iNKT非依赖性诱导趋化激素之方法。本发明亦提供使用具有 $\alpha$ -葡萄糖之鞘糖脂及其衍生物于刺激人类免疫的方法。



1. 一种具有式 (I) 的人类免疫佐剂化合物:



或其医药学上可接受的盐;

其中:

$R^1$  为 -OH 或 F;

$R^2$  为 -OH 或 F;

$R^3$  为氢;

$R^4$  是经选自 F 及  $-OR^{aa}$  的取代基所组成的群组取代的芳基, 其中  $R^{aa}$  为经 F 取代的  $C_{6-14}$  芳基;

$R^5$  是氢; 或经卤素、-CN、 $-NO_2$  或  $-N_3$  取代的烷基、烯基或炔基;

$n$  为 1 至 15 的整数, 包括本数; 及

$m$  为 1 至 20 的整数, 包括本数。

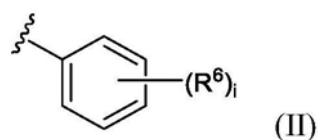
2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中  $R^2$  为 -OH。

3. 根据权利要求 1 的化合物, 其中  $R^2$  为 F。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的化合物, 其中  $R^1$  为 -OH。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的化合物, 其中  $R^1$  为 F。

6. 根据权利要求 1 的化合物, 其中  $R^4$  具有式 (II):

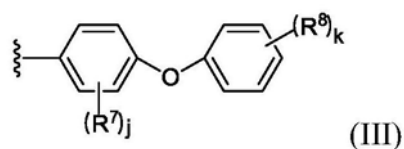


其中:

$i$  为 1、2、3、4 或 5;

$R^6$  是 F。

7. 根据权利要求 1 的化合物, 其中  $R^4$  为式 (III):



其中:

$j$  为 0、1、2、3 或 4;

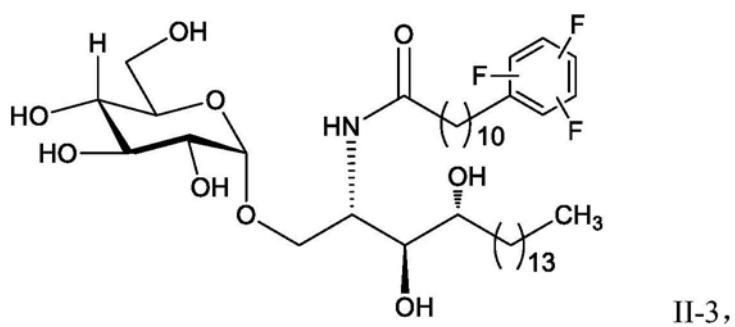
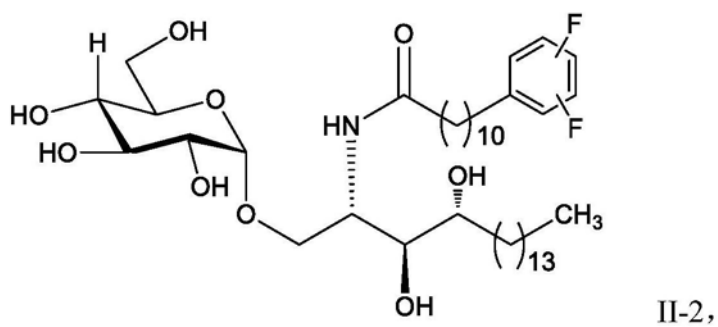
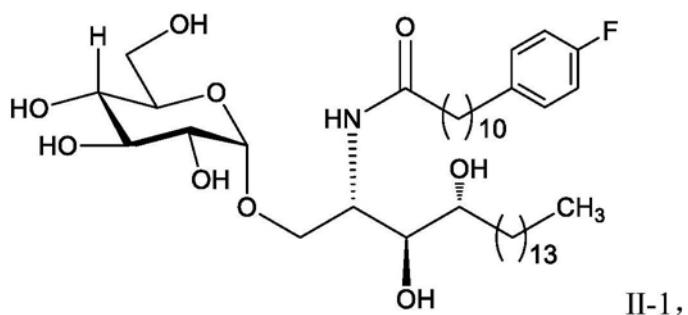
$k$  为 1、2、3、4 或 5; 及

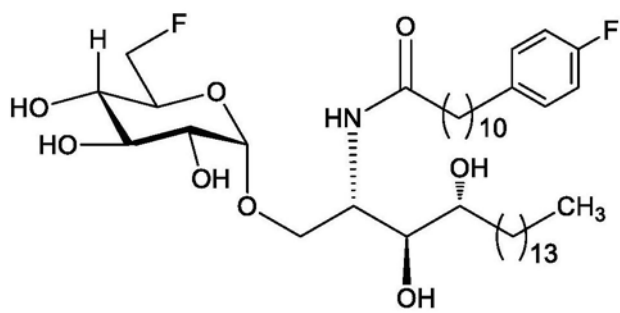
$R_7$  及  $R_8$  是 F。

8. 根据权利要求 7 的化合物, 其中  $j$  为 0; 以及  $k$  为 1、2 或 3。

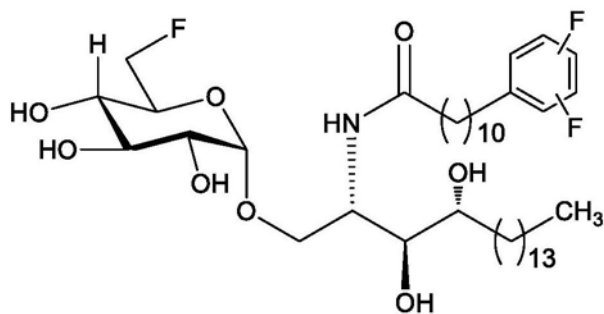
9. 根据权利要求7的化合物, 其中k为1、2或3; 以及j为1、2或3。

10. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物选自以下之一者:

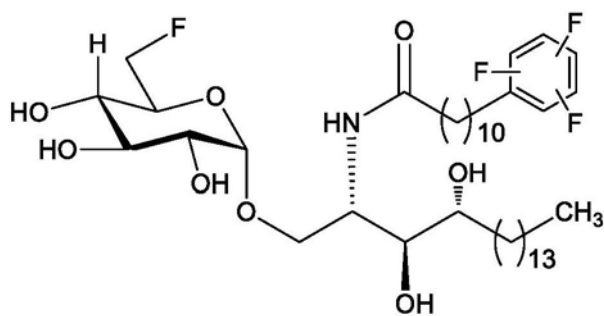




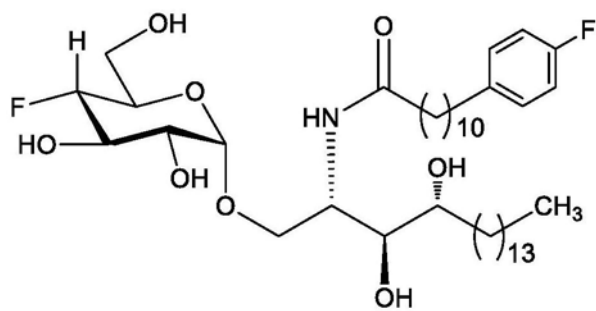
II-4,



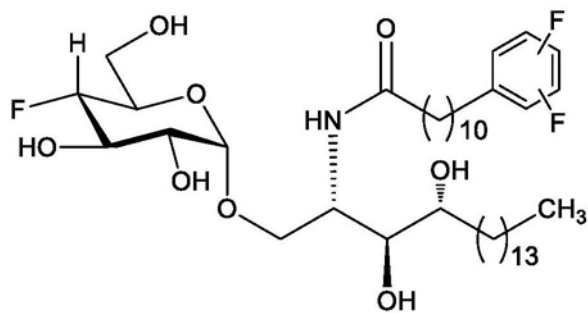
II-5,



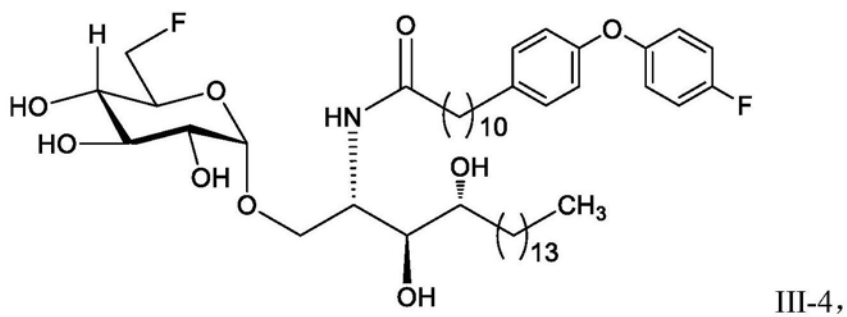
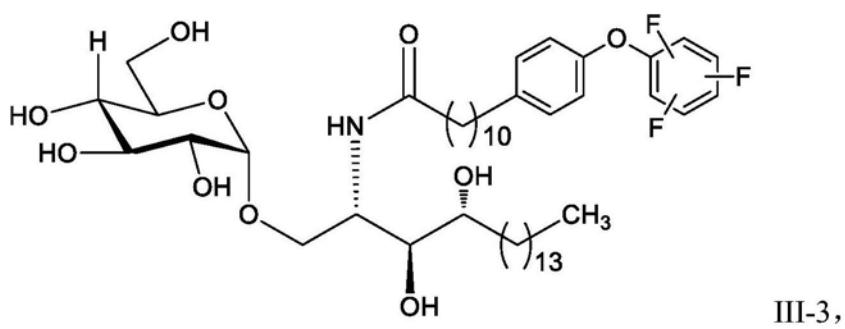
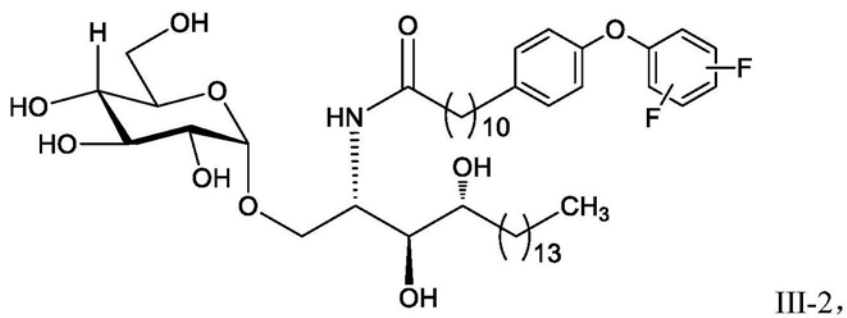
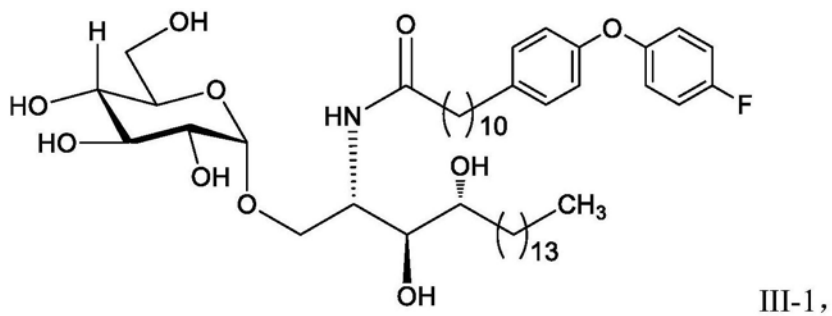
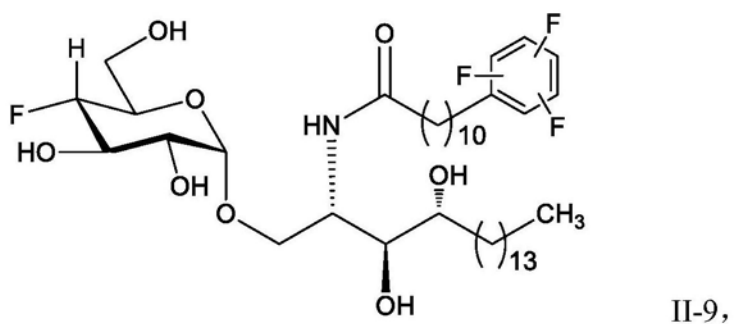
II-6,

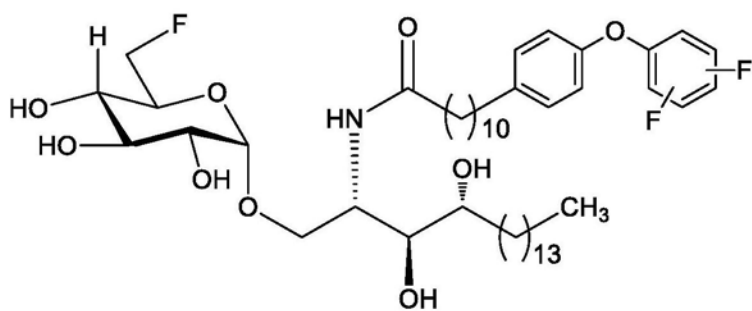


II-7,

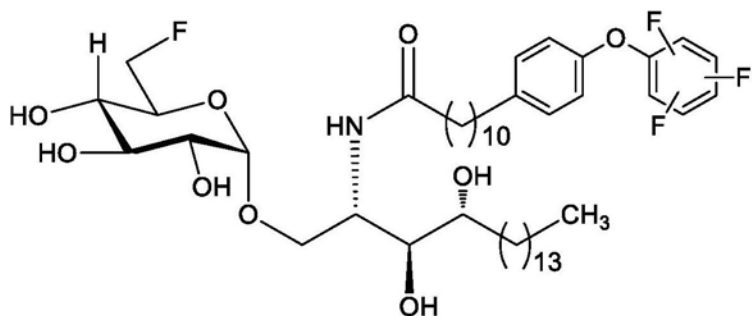


II-8,

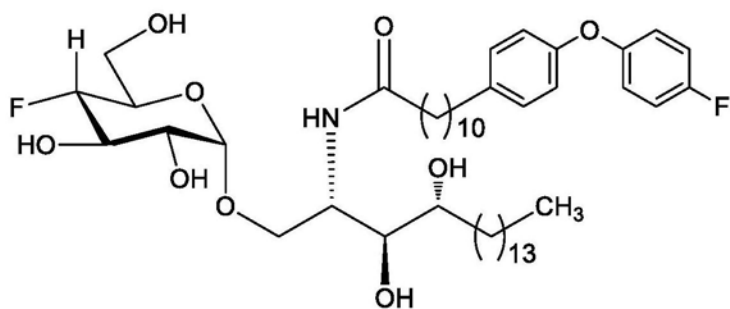




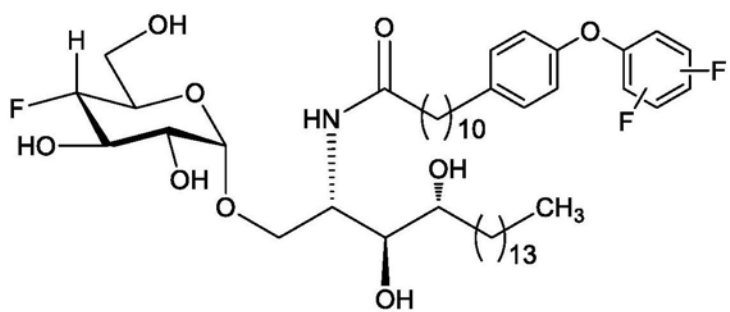
III-5,



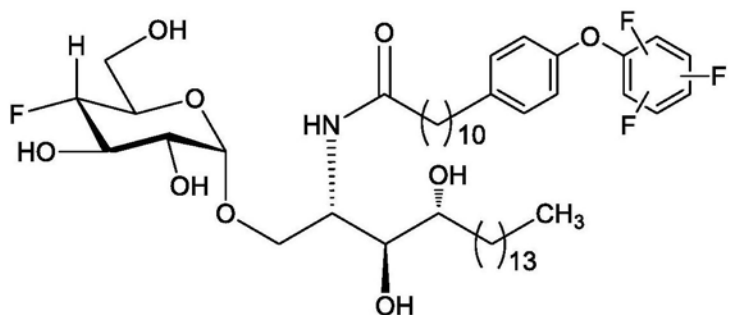
III-6,



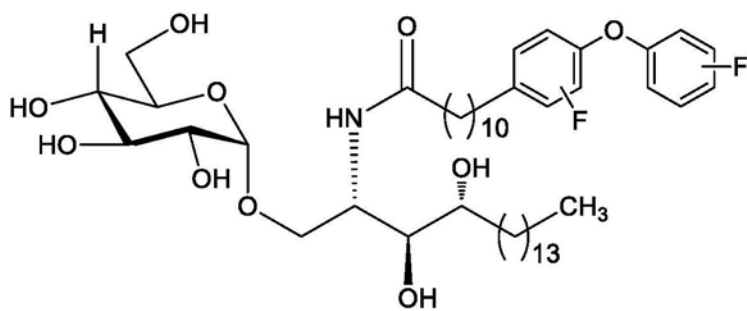
III-7,



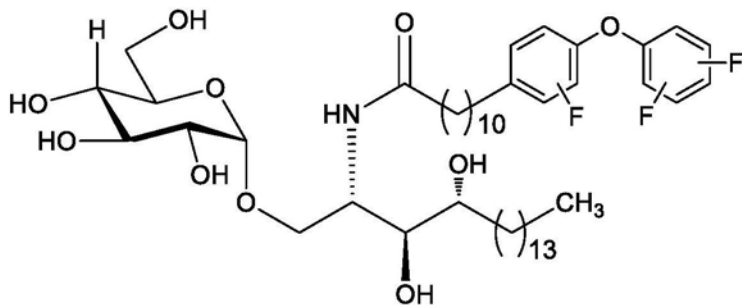
III-8,



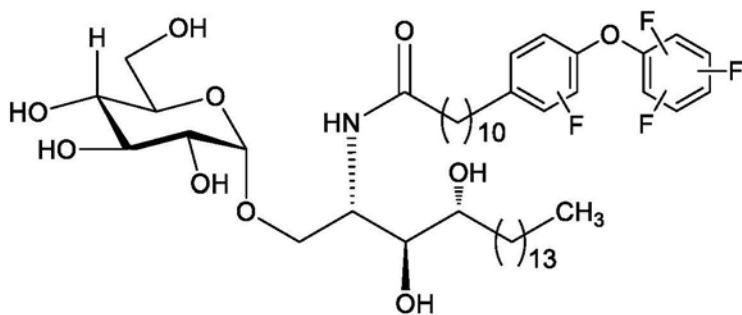
III-9,



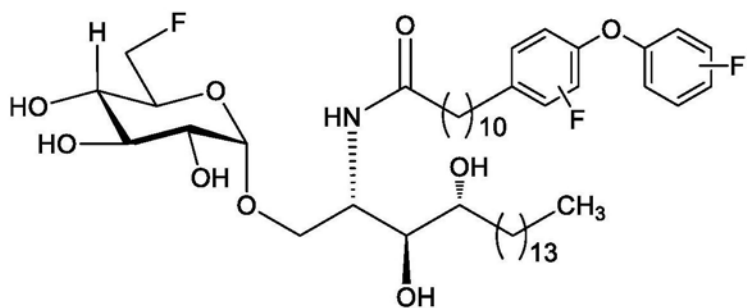
III-13,



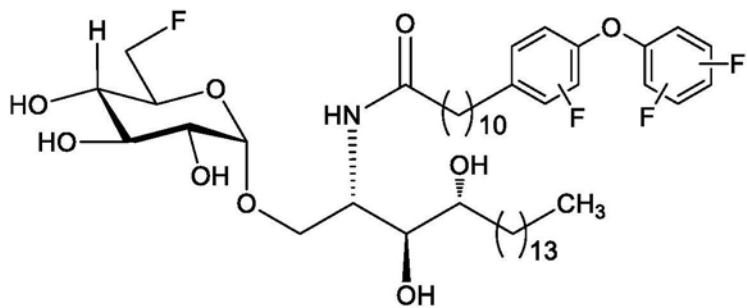
III-14,



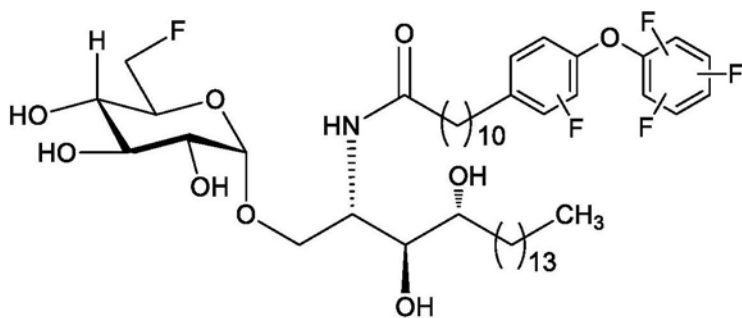
III-15,



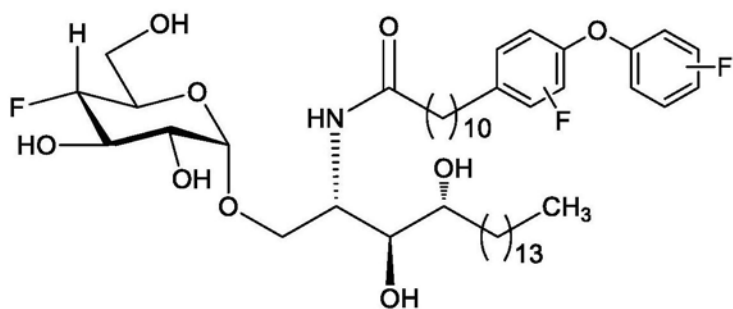
III-16,



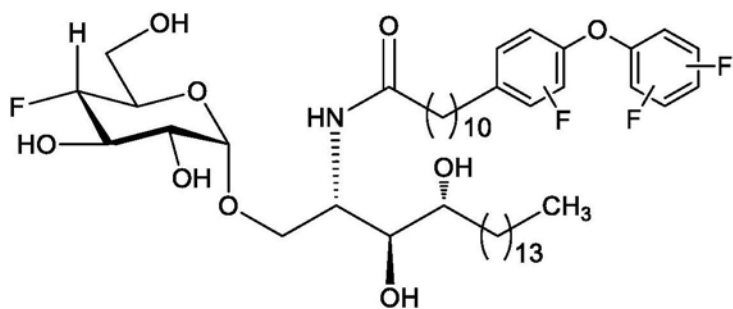
III-17,



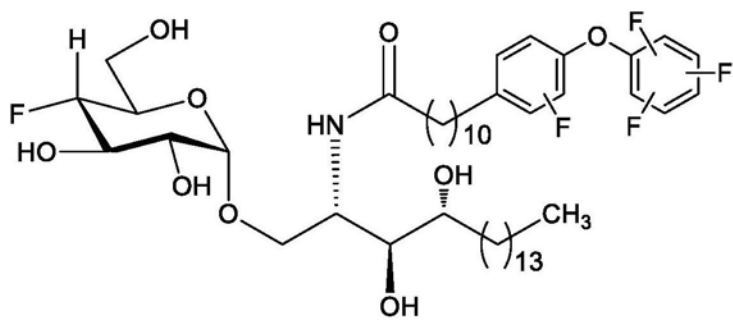
III-18,



III-19,



III-20, 或



III-21。

11. 一种医药组合物, 其包含: (i) 当与抗原一起共投与人类个体时足以刺激免疫反应的量的根据权利要求1至10中任一项的化合物及(ii) 医药学上可接受的赋形剂。

12. 一种佐剂组合物用于制备强化有需要的个体的抗原免疫原性的药剂的用途, 所述佐剂组合物包含根据权利要求1至10中任一项所述的化合物。

13. 一种佐剂组合物用于制备刺激有需要的人类个体的免疫反应的药剂的用途, 所述佐剂组合物包含根据权利要求1至10中任一项所述的化合物。

14. 根据权利要求12的用途, 其中该佐剂组合物为疫苗佐剂。

15. 根据权利要求12的用途, 其中该佐剂组合物是经投与能够升高人类中恒定型自然杀手T (iNKT) 细胞的量。

16. 根据权利要求15的用途, 其中投与该佐剂组合物增加人类的细胞激素及/或趋化激



素产生。

17. 根据权利要求16的用途,其中该细胞激素产生足以逆激活下游免疫细胞。

18. 根据权利要求17的用途,其中该下游免疫细胞包含树突状细胞(DC)、自然杀手细胞(NK)、B细胞、CD4+T及CD8+T细胞中的一或多者。

19. 根据权利要求16的用途,其中该细胞激素包含Th1细胞激素。

20. 根据权利要求19的用途,其中该Th1细胞激素是选自包含以下之群中的至少一者:干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、GM-CSF、TNF $\alpha$ 、介白素2、介白素12及介白素10。

21. 根据权利要求16的用途,其中该趋化激素是选自包含以下之群中之至少一者: RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、KC、MCP-1、IP-10及MIG。

22. 根据权利要求12的用途,其中投与该组合物具有抗癌效应。

23. 根据权利要求22的用途,其中该癌症是选自由以下组成之群之癌症:肺癌、乳癌、肝癌、白血病、实体肿瘤及癌瘤。

24. 根据权利要求12的用途,其中人类中Th1细胞激素的增加超过任何Th2细胞激素的增加。

25. 一种组合物用于制备升高有需要的人类个体的恒定型自然杀手T(iNKT)细胞产生的药剂的用途,所述组合物包含根据权利要求1至10中任一项所述的化合物。

26. 根据权利要求25的用途,其中该iNKT量的升高大于投药相等量的包含 $\alpha$ 半乳糖( $\alpha$  Gal)作为糖基头部的糖脂类似物导致的升高。

27. 一种组合物用于制备刺激有需要的人类个体的细胞激素及/或趋化激素产生的药剂的用途,所述组合物包含根据权利要求1至10中任一项所述的化合物。

28. 根据权利要求27的用途,其中该细胞激素产生足以逆激活下游免疫细胞。

29. 根据权利要求28的用途,其中该下游免疫细胞包含树突状细胞(DC)、自然杀手细胞(NK)、B细胞、CD4+T及CD8+T细胞中的一或多者。

30. 根据权利要求27的用途,其中该细胞激素包含Th1细胞激素。

31. 根据权利要求30的用途,其中该细胞激素是选自:干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、GM-CSF、TNF $\alpha$ 、介白素2、介白素12及介白素10。

32. 根据权利要求27的用途,其中该趋化激素是选自:RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、KC、MCP-1、IP-10及MIG。

33. 根据权利要求11的医药组合物,其中该组合物为疫苗佐剂。

34. 根据权利要求11的医药组合物,其中该组合物为抗癌治疗剂。

35. 根据权利要求12的医药组合物,其中人类中Th1细胞激素的增加超过任何Th2细胞激素的增加。

36. 一种疫苗用于制备强化个体的抗原免疫反应的药剂的用途,所述疫苗包含根据权利要求11的医药组合物,且所述疫苗进一步包含一或多种抗原或与一或多种抗原共投与。

37. 根据权利要求36的用途,其中该一或多种抗原是选自由以下组成之群:细菌抗原、病毒抗原、真菌抗原、原虫抗原、普利昂抗原、新抗原、肿瘤抗原及自身抗原。

38. 根据权利要求36的用途,其中该疫苗是选自由以下组成的群组:核酸、蛋白质、肽、糖蛋白、碳水化合物、融合蛋白、脂质、糖脂、碳水化合物-蛋白质结合物;细胞或其提取物;死细胞或减毒细胞、或其提取物;肿瘤细胞或其提取物;病毒粒子;过敏原或其混合物。

39. 根据权利要求36的用途,其中该投药的抗原为肿瘤抗原。
40. 根据权利要求36的用途,其中该抗原量是经投与在每公斤体重0.1 $\mu$ g至100mg范围内。
41. 根据权利要求36的用途,其中该佐剂量是在每公斤体重10至100 $\mu$ g范围内。
42. 根据权利要求36的用途,其中该共投药的组合物为包含该式I的GSL及医药学上可接受的载剂的共调配的医药学上可接受的组合物。
43. 一种制品,其包含根据权利要求1的式I化合物。
44. 一种套组,其包含根据权利要求1至9中任一项的化合物及使用说明书。

## 使用醣脂激活人类iNKT细胞

### 技术领域

[0001] 本发明大体上涉及免疫疗法领域。详言之,本发明系涉及醣脂及其变体,这些可调节人类恒定型自然杀手T (iNKT) 细胞及刺激细胞激素及/或趋化激素产生且因此逆激活下游免疫细胞,由此衔接先天性及适应性免疫。

### 背景技术

[0002] 似自然杀手T (NKT) 细胞为在诸如癌症及自体免疫病症的疾病的治疗中具有巨大治疗潜能独特T淋巴球群体。恒定型自然杀手T (iNKT) 细胞形成具有先天性及适应性免疫特征的调节性T细胞子集。相较于习知T细胞系经MHC I类或II类分子呈现的肽激活,iNKT细胞系识别在抗原呈现细胞 (APC) 上表达的非经典MHC I分子CD1d的情形中存在的脂质衍生物。

[0003]  $\alpha$ -GalCer ( $\alpha$ -半乳糖基神经酰胺),一种由 $\alpha$ -连接的半乳糖、神经鞘胺醇及酰基尾组成的醣脂,系得自agelasphin的结构最适化,其系分离自天然海棉 (Agelas mauritianus)。已发现其呈现活体外及活体内抗肿瘤活性,并且显示其为已知小鼠及人类恒定型自然杀手T细胞 (iNKT细胞) 的最强力配位体。

[0004] 恒定型NKT细胞 (iNKT细胞) 携有恒定TCR- $\alpha$ 链 (小鼠中的V $\alpha$ 14/J $\alpha$ 18及人类中的V $\alpha$ 24/J $\alpha$ 18) 且共表达CD161抗原 (小鼠中的NK细胞标记NK1.1及人类中的NKR-P1A)。(1) Lantz, O.; Bendelac, A. J. Exp. Med. 1994, 180, 1097; (2) Dellabona, P.; Padovan, E.; Casorati, G.; Brockhaus, M.; Lanzavecchia, A. J. Exp. Med. 1994, 180, 1171; (3) Makino, Y.; Kanno, R.; Ito, T.; Higashino, K.; Taniguchi, M. Int. Immunol. 1995, 7, 1157; 及 (4) Davodeau, F.; Peyrat, M. A.; Necker, A.; Dominici, R.; Blanchard, F.; Leget, C.; Gaschet, J.; Costa, P.; Jacques, Y.; Godard, A.; Vie, H.; Poggi, A.; Romagne, F.; Bonneville, M. J. Immunol. 1997, 158, 5603。这些会回应通过抗原呈现细胞上的CD1d分子呈现的 $\alpha$ GalCer而分泌大量Th1 (例如IFN- $\gamma$ 、IL-2) 及Th2 (例如IL-4、IL-6) 细胞激素。<sup>5-9</sup> (5) Kawano, T.; Cui, J.; Koezuka, Y.; Toura, I.; Kaneko, Y.; Motoki, K.; Ueno, H.; Nakagawa, R.; Sato, H.; Kondo, E.; Koseki, H.; Taniguchi, M. Science 1997, 278, 1626; (6) Yoshimoto, T.; Paul, W. E. J. Exp. Med. 1994, 179, 1285; (7) Arase, H.; Arase, N.; Nakagawa, K.; Good, R. A.; Onoe, K. Eur. J. Immunol. 1993, 23, 307; (8) Kawakami, K.; Yamamoto, N.; Kinjo, Y.; Miyagi, K.; Nakasone, C.; Uezu, K.; Kinjo, T.; Nakayama, T.; Taniguchi, M.; Saito, A. Eur. J. Immunol. 2003, 33, 3322; 及 (9) Nieuwenhuis, E. E.; Matsumoto, T.; Exley, M.; Schleipman, R. A.; Glickman, J.; Bailey, D. T.; Corazza, N.; Colgan, S. P.; Onderdonk, A. B.; Blumberg, R. S. Nat. Med. 2002, 8, 588。这些经分泌的细胞激素可接着逆激活下游免疫细胞,包括树突状细胞 (DC)、自然杀手细胞 (NK)、B细胞、CD4<sup>+</sup>T及CD8<sup>+</sup>T细胞,且由此衔接先天性及适应性免疫。<sup>10-12</sup> (10) Eberl, G.; MacDonald, H. R. Eur. J. Immunol. 2000, 30, 985; (11) Eberl, G.; Brawand, P.; MacDonald, H. R. J. Immunol. 2000, 165, 4305; 及 (12) Kitamura, H.; Ohta, A.; Sekimoto, M.; Sato, M.; Iwakabe, K.; Nakui, M.; Yahata, T.; Meng, H.; Koda, T.;

Nishimura, S.; Kawano, T.; Taniguchi, M.; Nishimura, T. *Cell. Immunol.* 2000, 199, 37。

[0005] 然而, Th1及Th2细胞激素的抗衡会限制 $\alpha$ GalCer用于治疗多种病症的临床应用。<sup>13-16</sup>

(13) Tahir, S.M.; Cheng, O.; Shaulov, A.; Koezuka, Y.; Bubley, G.J.; Wilson, S.B.; Balk, S.P.; Exley, M.A. *J. Immunol.* 2001, 167, 4046; (14) Dhodapkar, M.V.; Geller, M.D.; Chang, D.H.; Shimizu, K.; Fujii, S.; Dhodapkar, K.M.; Krasovsky, J.J. *Exp. Med.* 2003, 197, 1667; (15) Giaccone, G.; Punt, C.J.; Ando, Y.; Ruijter, R.; Nishi, N.; Peters, M.; von Blomberg, B.M.; Scheper, R.J.; van der Vliet, H.J.; van den Eertwegh, A.J.; Roelvink, M.; Beijnen, J.; Zwierzina, H.; Pinedo, H.M. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8, 3702; 及 (16) Bricard, G.; Cesson, V.; Devevre, E.; Bouzourene, H.; Barbey, C.; Rufer, N.; Im, J.S.; Alves, P.M.; Martinet, O.; Halkic, N.; Cerottini, J.C.; Romero, P.; Porcelli, S.A.; Macdonald, H.R.; Speiser, D.E. *J. Immunol.* 2009, 182, 5140。

## 发明内容

[0006] 因此, 许多类似物系经设计从而刺激iNKT细胞的选择性Th1或Th2细胞激素反应。醚脂在小鼠及人类中均具有显著Th1偏向, 从而产生优异的活体内肿瘤保护。举例而言, 具有截短的神经鞘胺醇尾的鞘醚脂(GSL)可驱使免疫反应朝着Th2方向且预防自体免疫脑脊髓炎。<sup>17</sup> Miyamoto, K.; Miyake, S.; Yamamura, T. *Nature* 2001, 413, 531。另一方面, 在酰基链上具有苯环的GSL会诱导小鼠及人类的偏向Th1的细胞激素且显示出对小鼠乳房肿瘤、肺肿瘤及黑色素瘤的更有效的抗癌活性<sup>18,19</sup>。((18) Chang, Y.J.; Huang, J.R.; Tsai, Y.C.; Hung, J.T.; Wu, D.; Fujio, M.; Wong, C.H.; Yu, A.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104, 10299 及 (19) Wu, T.N.; Lin, K.H.; Chang, Y.J.; Huang, J.R.; Cheng, J.Y.; Yu, A.L.; Wong, C.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 17275。

[0007] CD1d与醚脂之间的二元相互作用以及iNKT TCR与CD1d-醚脂复合物之间的三元相互作用的检查阐明其结构-活性关系(SAR)的潜在机制。与 $\alpha$ GalCer相比, 具有相同醚基的苯基GSL展现更强二元及三元相互作用, 从而产生更加偏向Th1的反应, 且生物反应与小鼠及人类的三元复合物的结合亲和力具有显著相关性。<sup>19-21</sup> (19) Wu, T.N.; Lin, K.H.; Chang, Y.J.; Huang, J.R.; Cheng, J.Y.; Yu, A.L.; Wong, C.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 17275; (20) Liang, P.H.; Imamura, M.; Li, X.; Wu, D.; Fujio, M.; Guy, R.T.; Wu, B.C.; Tsuji, M.; Wong, C.H. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 12348; 及 (21) Li, X.; Fujio, M.; Imamura, M.; Wu, D.; Vasan, S.; Wong, C.H.; Ho, D.D.; Tsuji, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107, 13010。

[0008] 已发现相较 $\alpha$ -半乳糖基神经酰胺( $\alpha$ GalCer), 在酰基链上带有 $\alpha$ -半乳糖基( $\alpha$ -Gal)与苯基环的鞘醚脂(GSL)对于刺激恒定型自然杀手T(iNKT)细胞更为有效。他们在小鼠与人类的活性与iNKT TCR与CD1d-GSL复合物间的三元交互作用具很好的相关性。

[0009] 已知恒定型自然杀手T(iNKT)细胞因其产生大量效应细胞激素的能力而具有显著的免疫调节能力。需要可刺激人类恒定型NKT(iNKT)细胞及调节人类的细胞激素及趋化激素产生的经改良鞘醚脂。

[0010] 因此, 本发明系基于以下意外发现: 相较于具 $\alpha$ -半乳糖( $\alpha$ -Gal)的鞘醚脂(GSL), 具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的GSL在人类(但在小鼠较弱)的细胞因子和趋化因子的诱导和免疫细胞

的扩增和/或活化呈现较强的诱导。在糖基的4'-OH方向的变化导致在小鼠和人类不同的生物活性。在糖基的位置6的改变也表现出对生物反应的差异性影响。本文揭示具 $\alpha$ -葡萄糖的GSL和在4-和/或6位具有F的 $\alpha$ -葡萄糖的GSL衍生物。本发明揭示通过这些例示性的具 $\alpha$ -葡萄糖的GSL和在4-和/或6位具有F的 $\alpha$ -葡萄糖的GSL衍生物用于iNKT非依赖性诱导趋化激素的方法,亦提供使用具 $\alpha$ -葡萄糖的GSL和在4-和/或6位具有F的 $\alpha$ -葡萄糖的GSL衍生物的人类免疫刺激方法。

[0011] 本发明提供一种强化有需要的个体的抗原免疫原性的方法,其包含以共投与或共调配形式组合投与所述抗原与包含通式1的GSL的佐剂组合物。

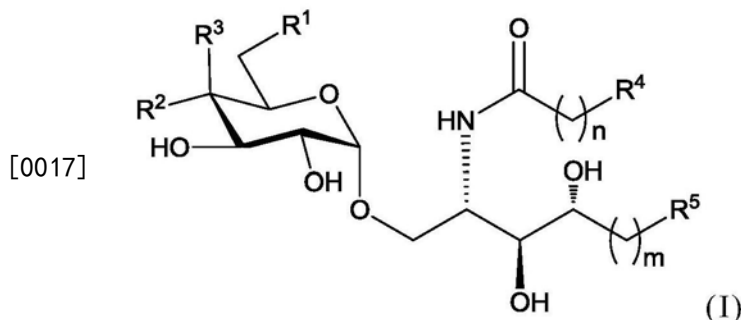
[0012] 根据本发明,使用GSL作为免疫佐剂可引起由抗原诱导的保护性免疫的增强及/或持续时间延长,且至少部分归因于抗原特异性Th1型反应的增强及/或延长。

[0013] 本发明的含GSLs- $\alpha$ -Glc的佐剂可与任何抗原(详言之,与来源于感染物或肿瘤的抗原)联合投与。优选地,佐剂及抗原同时投与,最佳以单一剂型投与。

[0014] 在另一个实施例中,本发明提供一种用于治疗个体的疾病的预防及/或治疗方法,其包含向所述个体投与免疫保护性抗原以及包括GSL的佐剂组合物。如本文所规定,此方法可用于预防及/或治疗各种感染性或赘生性疾病。

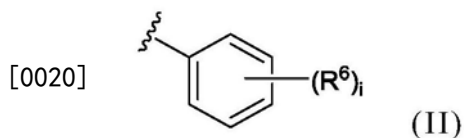
[0015] 结合本发明的方法,亦提供医药组合物及疫苗组合物,其包含免疫原性有效量的抗原及免疫原性有效量的选自式1内的GSL的佐剂,以及视情况存在的医药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0016] 因此,在一个态样中,本发明涉及式(I)的免疫佐剂化合物的结构及功能范例:



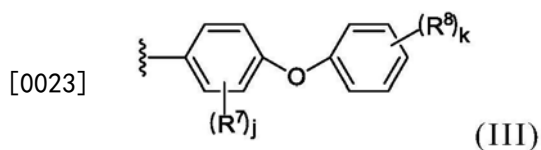
[0018] 或其医药学上可接受的盐;其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $n$ 及 $m$ 如本文所述。

[0019] 在一些实施例中, $R^4$ 具有式(II):



[0021] 其中 $i$ 及 $R^6$ 如本文所述。

[0022] 在一些实施例中, $R^4$ 具有式(III):



[0024] 其中 $j$ 、 $k$ 、 $R^7$ 及 $R^8$ 如本文所述。

[0025] 本发明的态样亦涉及医药组合物,其包含(i)当向个体(包括人类)投与时足以刺

激免疫反应的量的本文所揭示化合物及(ii)医药学上可接受的赋形剂。

[0026] 在一些实施例中,医药组合物包含抗原及疫苗佐剂。在某些实施例中,抗原为肿瘤抗原。

[0027] 在一些实施例中,医药组合物包含抗癌治疗剂。

[0028] 在医药组合物的一些实施例中,化合物中的R<sup>4</sup>系选自经取代或未经取代的芳基及经取代或未经取代的杂芳基,且其中所述化合物能够增加人类的Th1细胞激素,同时伴随最少Th2细胞激素增加。

[0029] 本发明的态样系涉及用于刺激有需要的人类个体的免疫反应的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的本文所揭示的组合物。

[0030] 在一些态样中,化合物以能够升高人类的恒定型自然杀手T(iNKT)细胞的量投与。

[0031] 在一些态样中,化合物的投与增加人类的细胞激素及/或趋化激素产生。在一些实施例中,细胞激素产生足以反式激活下游免疫细胞。在一些实施例中,下游免疫细胞包含树突状细胞(DC)、自然杀手细胞(NK)、B细胞、CD4<sup>+</sup>T及CD8<sup>+</sup>T细胞中的一或多者。

[0032] 在一些态样中,细胞激素包含Th1细胞激素。在一些实施例中,Th1细胞激素系选自:干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、GM-CSF、TNF $\alpha$ 、介白素2、介白素12和介白素10。

[0033] 在一些态样中,趋化激素系选自:RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、KC、MCP-1、IP-10及MIG。

[0034] 在一些态样中,组合物的投与具有抗癌效应。在一些实施例中,癌症系选自由以下组成的群组:肺癌、乳癌、肝癌、白血病、实体肿瘤及癌瘤。

[0035] 在一些实施例中,化合物中的R<sup>4</sup>系选自经取代或未经取代的芳基及经取代或未经取代的杂芳基,且其中人类Th1细胞激素的增加超过任何Th2细胞激素的增加。

[0036] 本发明的态样涉及用于升高有需要的人类个体的恒定型自然杀手T(iNKT)细胞产生的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的组合物,其中所述组合物包含本文所揭示的化合物。在一些实施例中,iNKT含量的升高,当与由投与等量包含 $\alpha$ -半乳糖( $\alpha$ Gal)作为糖基头基的糖脂类似物引起的iNKT含量升高相比时较大。

[0037] 本发明的态样涉及用于刺激有需要的人类个体的细胞激素及/或趋化激素产生的方法,所述方法包含:向所述个体投与治疗有效量的组合物,其中所述组合物包含足以增加细胞激素/趋化激素产生的量的本文所揭示的化合物。

[0038] 在一些实施例中,细胞激素产生足以反式激活下游免疫细胞。在一些实施例中,下游免疫细胞包含树突状细胞(DC)、自然杀手细胞(NK)、B细胞、CD4<sup>+</sup>T及CD8<sup>+</sup>T细胞中的一或多者。

[0039] 在一些态样中,细胞激素包含Th1细胞激素。在一些实施例中,细胞激素系选自:干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、GM-CSF、TNF $\alpha$ 、介白素2及介白素12和介白素10。

[0040] 在一些态样中,趋化激素系选自:RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、KC、MCP-1、IP-10及MIG。

[0041] 这些及其他态样将由以下优选实施例的描述结合以下图式而变得显而易见,但可在不脱离本发明的新颖概念的精神及范畴的情况下,于其中进行变化及修改。

## 附图说明

[0042] 以下图式形成本发明的一部分且经包括以进一步证明本发明的某些态样,其发明内容可通过参照这些图式中之一或多者结合本文中存在的特定实施例的详细描述而被理

解的更好。

[0043] 图1展示:具有 $\alpha$ Gal或 $\alpha$ Glc的酯脂的结构。7DW8-5-Man为唯一具有 $\alpha$ Man的化合物。

[0044] 图2展示:相较于具 $\alpha$ Glc的酯脂质类似物,具 $\alpha$ Gal的酯脂质类似物在小鼠为较强(但在人类较弱)的免疫调节物。B6野生型及J $\alpha$ 18基因剔除小鼠( $n=4$ )经静脉注射指定的酯脂( $1\mu\text{g}/\text{鼠}$ )或载剂。在注射后2小时即18小时收集的血清用于分析如IFN- $\gamma$ (2A)与IL-4(2B)的细胞激素的分泌。IFN- $\gamma$ 与IL-4分别在注射后18小时与2小时达到尖峰。(2C)以指定的酯脂( $1\mu\text{g}/\text{鼠}$ )或载剂(1%DMSO于PBS)处理的B6WT小鼠在注射后72小时被牺牲,且它们的脾细胞经FACS分析从而测定总CD3+细胞。(2D)人类天然V $\alpha$ 24+iNKT细胞以自体未成熟的CD14+DCs培养,在第2天加入100ng/ml的指定酯脂或DMSO。在第3天移除抗原后,人类iNKT细胞在IL-2存在下培养。在第9天,使用Guava ViaCount试剂计数扩增的iNKT细胞数目。选用Student t检验分析7DW8-5与7DW8-5-Glc间的差异( $p<0.001$ ,\*\*\*)。测定是在具有类似趋势的两种不同的供体进行。

[0045] 图3展示:CD1d-酯脂复合物与iNKT细胞的三元相互作用。(3A) DN3A4-1.2V $\alpha$ 14+iNKT融合瘤细胞及(3B) 7DW8-5-扩增V $\alpha$ 24+iNKT细胞分别用各种浓度的指定二聚mCD1d-酯脂及hCD1d-酯脂复合物在4°C下培育30分钟。在指定浓度下结合复合物的含量通过抗mIgG1二级抗体侦测且通过流动式细胞测量术分析。CD1ddi-酯脂复合物的结合百分比与浓度之间的关系标绘在小鼠(3A)及人类(3B)中。小鼠(3C)及人类(3D)中的KD值分别由标绘图(3A)及(3B)的史卡查变换(Scatchard transformation)计算得到。所进行的分析为二重复。

[0046] 图4展示:mCD1d相较于hCD1d调换分析。(4A)鼠类DN3A4-1.2V $\alpha$ 14+iNKT融合瘤细胞或(4B) C1-扩增V $\alpha$ 24+iNKT细胞用由mCD1d(A20-CD1d细胞)或hCD1d(HeLa-CD1d细胞)呈现的指定酯脂在1、0.1及0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下脉冲。在18小时后,收集清液层通过ELISA分析(4A)或使用Beadlyte®人类细胞激素套组及Luminex® 200™阅读系统(4B)量测IL-2分泌。所进行的分析为三重复。8-5为7DW8-5的缩写。

[0047] 图5展示:CD1d-GSL-iNKT TCR三元复合物的计算机模型化。展示小鼠(5A)及人类(5B)的CD1d-C1-iNKT TCR复合物内的(5A)/(5B)氢键。注意氢键的形成在保守残基中,包括CD1d的人类Asp80(小鼠Asp80)、人类Thr154(小鼠Thr156)、人类Asp151(小鼠Asp 153)及iNKT TCR的人类Gly96(小鼠Gly96)。此外,iNKT TCR的小鼠Asn30以及人类Phe29及Ser30为与C1的3'-及/或4'-OH形成H键相互作用的关键残基。(5C)葡萄糖的水平位4'-OH可通过与结晶水的较强相互作用补偿Phe29相互作用的缺失,结晶水由人类iNKTTCR-Phe51及hCD1d-Trp153捕获。(5D)来自芳族相互作用的较高能量可驱使C34或C34-Glc的酰基链至CD1d内A'信道的较低位置(接近Cys12),产生对头基取向的细微扰动。(5E)使用Autodock4.2计算得到的三元复合物的自由能

[0048] 图6展示:由7DW8-5-Glc触发的剂量依赖性趋化激素分泌。B6野生型小鼠以每只小鼠0.1或1 $\mu\text{g}$ 静脉内注射7DW8-5-Glc。针对趋化激素分泌物,诸如IP-10(6A)、KC(6B)、MCP-1(6C)及MIP-1 $\alpha$ (6D),对注射后2小时及18小时收集的血清加以分析。这些趋化激素在注射后2小时达至峰值。

[0049] 图7展示:细胞激素及趋化激素的iNKT依赖性产生。B6野生型及J $\alpha$ 18基因剔除小鼠静脉内注射指定酯脂(1微克/小鼠)或媒剂。针对细胞激素,如IL-2(7A)、IL-6(7B)、GM-CSF(7C)及TNF $\alpha$ (7D),以及趋化激素,诸如IP-10(7E)、MIG(7F)、KC(7G)及MCP-1(7H),对注射后2

小时及18小时收集的血清加以分析。仅MIG在注射后18小时达至峰值,而其余在注射后2小时达至峰值。

[0050] 图8展示:在指定醣脂刺激后野生型小鼠免疫细胞的荧光流式细胞分选仪分析。用指定醣脂(1微克/小鼠)或媒剂(含1%DMSO的PBS)处理的B6野生型小鼠在注射后72小时处死且对其脾细胞进行荧光流式细胞分选仪分析。(8A)总脾细胞,(8B)总CD11Chi细胞,(8C)CD11Chi/CD80+细胞,(8D)CD11Chi/CD86+细胞,(8E)CD4+T细胞及(8F)CD8+T细胞。

[0051] 图9展示:在指定醣脂刺激后J $\alpha$ 18 KO小鼠免疫细胞的荧光流式细胞分选仪分析。用指定醣脂(1微克/小鼠)或媒剂(含1%DMSO的PBS)处理的B6J $\alpha$ 18 KO小鼠在注射后72小时处死且对其脾细胞进行荧光流式细胞分选仪分析。(9A)总脾细胞,(9B)总CD11Chi细胞,(9C)CD11Chi/CD80+细胞,(9D)CD11Chi/CD86+细胞,(9E)CD4+T细胞及(9F)CD8+T细胞(学生t检验:\*,与D相比 $p<0.05$ )

[0052] 图10展示:mCD1d与醣脂之间二元复合物的结合强度。(10A,10B)涂布于ELISA盘上的不同浓度的mCD1d-醣脂复合物用饱和量的与生物素结合的L363抗体培育,后为抗生蛋白链菌素-HRP侦测及ELISA量测。(10A)标绘反映L363抗体结合的OD值与CD1ddi-醣脂复合物的浓度之间的关系。(10B)如材料及方法中所述计算L363抗体与指定mCD1d-醣脂复合物之间的解离常数(KD)。(10C)标绘反映L363抗体结合的OD值与醣脂浓度之间的关系。(10D)由L363抗体结合曲线(10C)的史卡查变换的线性回归计算得到二元复合物的KD值。

[0053] 图11展示:活体内C1脉冲脾细胞的CD1d二聚体染色。在注射C1(1微克/小鼠)后3天收集B6野生型脾细胞( $n=3$ )且在4℃下用CD3、CD45R及与RPE结合的指定二聚体复合物染色1小时。(11A)CD3+/CD45R-细胞经闸控从而分析二聚体染色。(11B)未负载的二聚体用作对照。(11C)负载有7DW8-5-Glc的mCD1d二聚体使 $17.1\pm0.8\%$ 的C1脉冲脾细胞染色。(11D)负载有7DW8-5的mCD1d二聚体使 $36.2\pm5.0\%$ 的C1脉冲脾细胞染色。

[0054] 图12展示:mCD1d相较于hCD1d调换分析。C1-扩增V $\alpha$ 24+iNKT细胞用由mCD1d(A20-CD1d细胞)或hCD1d(HeLa-CD1d细胞)呈现的指定醣脂抗原在1、0.1及0.01 $\mu$ g/ml下脉冲。在18小时后,收集清液层用于量测IFN- $\gamma$ (12A)及IL-4(12B)分泌。(12C)在不同浓度的醣脂下计算得到IFN- $\gamma$ 比IL-4的比率。通过学生t检验使不同醣脂的IFN- $\gamma$ 比IL-4的比率与指定浓度的C1相比(\*, $p<0.05$ ;\*\*, $p<0.01$ ;\*\*\*, $p<0.001$ )。所进行的分析为三重复。

## 具体实施方式

[0055] 自然杀手T细胞(NKT)表示具有独特特性的T淋巴球子集,这些特性包括对由CD1d呈现的天然或合成醣脂的反应性及恒定型T细胞抗原受体(TCR) $\alpha$ 链的表达。NKT不同于功能上分化的习知 $\alpha\beta$ T细胞,因为其共享自然杀手细胞及T细胞的特性,在用其配位体刺激后可快速产生TH1型及TH2型反应(先天性免疫)。NKT的激活自相矛盾地可引起免疫反应的抑制或刺激。举例而言,TH1细胞激素的产生被认为促进具有抗肿瘤、抗病毒/抗细菌及佐剂活性的细胞免疫,而TH2细胞激素产生被认为减轻自体免疫疾病且促进抗体产生。因为NKT在免疫系统中发挥调节作用,所以其为引人注目的免疫疗法的目标。

[0056] 如上所述,本发明基于以下的未预期发现:相较于具 $\alpha$ -半乳糖( $\alpha$ -Gal)的鞘醣脂(GSL),具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的GSL在人类(但在小鼠较弱)的细胞因子和趋化因子的诱导和免疫细胞的扩增和/或活化呈现较强的诱导。因此,本文提供包含例示性GSL的方法及组合



物。

[0057] 除非另外指明,否则本发明的实践将采用属于此项技术的技能范围内的习知分子生物学、微生物学、重组DNA及免疫学技术。此类技术充分解释于文献中。参见例如Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Sambrook,Fritsch及Maniatis编(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989);DNA Cloning,卷I及II(D.N.Glover编,1985);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning (1984);the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller及M.P.Calos编,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Methods In Enzymology,卷154及155(Wu等人编),Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer及Walker编,Academic Press,London,1987);Antibodies:A Laboratory Manual,by Harlow及Lanes(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988);及Handbook Of Experimental Immunology,卷I-IV(D.M.Weir及C.C.Blackwell编,1986)。另外,制造及使用免疫佐剂的方法描述于美国专利第7,488,491号及第7,928,077号中,其相关揭示内容以引用的方式并入本文中。

[0058] 如本文所用,术语「脂质」系指参与细胞信号传导路径的任何脂溶性(亲脂性)分子。如本文所用,术语「醣脂」系指充当细胞识别标记的附接碳水化合物的脂质。

[0059] 如本文所用,术语「聚醣」系指多醣或寡醣。聚醣在本文中亦用于指以下醣结合物的碳水化合物部分,诸如醣蛋白、醣脂、醣肽、醣蛋白质组、肽聚醣、脂多醣或蛋白聚醣。聚醣通常仅由单醣之间的O-醣苷键联组成。举例而言,纤维素为由 $\beta$ -1,4-连接型D-葡萄糖组成的聚醣(或更特定言之,葡聚糖),且甲壳素为由 $\beta$ -1,4-连接型N-乙酰基-D-葡萄糖胺组成的聚醣。聚醣可为单醣残基的均聚物或杂聚物,且可为线性或分枝的。如在醣蛋白及蛋白聚醣中,可发现聚醣附接于蛋白质。其一般发现于细胞外表面上。O-连接型及N-连接型聚醣在真核生物中很常见,且亦可发现于原核生物中(但不常见)。发现N-连接型聚醣附接于序列子中天冬酰胺的R-基团氮(N)。序列子为Asn-X-Ser或Asn-X-Thr序列,其中X为除脯胺酸之外的任何氨基酸。

[0060] 如本文所用,术语「醣蛋白」系指经聚醣共价修饰的蛋白质。存在四种类型的醣蛋白:1)N-连接型醣蛋白、2)O-连接型醣蛋白(黏蛋白)、3)葡萄糖胺聚糖(GAG,其亦称为蛋白聚醣)、4)GPI锚定型。大多数醣蛋白具有结构微异质性(多种不同聚醣结构附接在同一醣基化位点内)及结构巨异质性(多个位点及类型的聚醣附接)。

[0061] 如本文所用,术语「类似物」系指结构与另一种化合物有关、但其化学及生物特性可非常不同的化合物,例如药物。

[0062] 如本文所用,术语「抗原」定义为能够引发免疫反应的任何物质。

[0063] 如本文所用,术语「病原体」为造成其宿主患病或生病的生物因子。身体含有许多以人类免疫系统形式抵抗一些常见病原体(诸如肺囊虫属(Pneumocystis))的天然防御。

[0064] 如本文所用,术语「免疫原」系指抗原或能够诱导抗原产生的物质,诸如DNA疫苗。

[0065] 如本文所用,术语「免疫原性」系指免疫原、抗原或疫苗刺激免疫反应的能力。

[0066] 如本文所用,术语「免疫疗法」系指基于调节免疫系统从而达到预防及/或治疗目标的概念的一系列治疗策略。

[0067] 其他定义

[0068] 如本文所用,术语「治疗(treating及treatment)」系指向罹患不良病状、病症或疾病的有临床症状的个体投与药剂或调配物,从而实现症状严重程度及/或频率降低、消除症状及/或其潜在病因及/或有助于损伤好转或修复。术语「预防(preventing及prevention)」系指向易罹患具体不良病状、病症或疾病的无临床征状的个体投与药剂或组合物,且因此涉及预防症状出现及/或其潜在病因。除非本文中另外明确或通过暗示指明,否则若在未提及可能的预防的情况下使用术语「治疗」,则意欲亦涵盖预防。

[0069] 「视情况选用」或「视情况存在」(如在「视情况选用的取代基」或「视情况存在的添加剂」中)意味着随后描述的组分(例如取代基或添加剂)可能存在或可能不存在,从而使得描述包括组分存在的情形及其不存在的情形。

[0070] 「医药学上可接受」意味着材料并非生物学或其他方面不合需要的,例如所述材料可并入本发明的调配物中而不会导致任何不合需要的生物效应或以有害方式与剂型调配物的其他组分中的任一者相互作用。然而,当术语「医药学上可接受」用以指医药赋形剂时,其暗示所述赋形剂已满足毒理学及制造测试所要求的标准及/或其包括在由美国食品药品监督管理局(the U.S. Food and Drug Administration)准备的非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)上。如下文进一步详细解释,如「药理学活性」衍生物或类似物中的「药理学活性」(或简单地「活性」)系指具有与亲本药剂相同类型的药理学活性的衍生物或类似物。

[0071] 如本文所用,术语「免疫原」系指抗原或能够诱导抗原产生的物质,诸如DNA疫苗。

[0072] 如本文所用,术语「免疫原性」系指免疫原、抗原或疫苗刺激免疫反应的能力。

[0073] 如本文所用,术语「免疫疗法」系指基于调节免疫系统从而达到预防及/或治疗目标的概念的一系列治疗策略。

[0074] 如本文所用,术语「细胞激素」系指通过影响免疫细胞分化过程调节免疫反应的强度及持续时间的许多小型分泌蛋白中的任一者,所述免疫细胞分化过程通常涉及使前体细胞变成独特的特化细胞类型的基因表达变化。细胞激素已基于其推测的功能、分泌细胞或作用目标而不同地命名为淋巴激素、介白素及趋化激素。举例而言,一些常见介白素包括(但不限于)IL-12、IL-18、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF、IL-4、IL-10、IL-13、IL-21及TGF- $\beta$ 。「细胞激素」为由一种细胞群体释放而作用于另一种细胞群体的一组蛋白质(如细胞间介质)的通用术语。此类细胞激素的实例为淋巴激素、单核球激素及传统多肽激素。细胞激素包括干扰素(IFN,尤其IFN- $\gamma$ )、介白素(IL,尤其IL-1、IL-2、IL-4、IL-10、IL-12)、群落刺激因子(CSF)、血小板生成素(TPO)、红血球生成素(EPO)、白血病抑制因子(LIF)、kit配位体、生长激素(GH)、胰岛素样生长因子(IGF)、副甲状腺激素、甲状腺素、胰岛素、松弛素、促卵泡素(FSH)、促甲状腺素(TSH)、黄体生成激素(LH)、造血生长因子、肝生长因子、纤维母细胞生长因子(FGF)、促乳素、胎盘生乳素、肿瘤坏死因子(TNF)、苗勒氏管抑制物(mullerian-inhibiting substance)、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、活化素、血管内皮生长因子(VEGF)、整合素、神经生长因子(NGF)、血小板生长因子、转型生长因子(TGF)、骨诱导因子等。

[0075] 如本文所用,术语「趋化激素」系指在感染部位释放的各种小型趋化性细胞激素中的任一者,其提供用于淋巴球移动及激活的方式。趋化激素将白血球吸引至感染部位。趋化激素具有允许将其分配成四组的保守半胱氨酸残基。具有代表性趋化激素的各组为C-C趋

化激素 (RANTES、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 及MIP-1 $\beta$ )、C-X-C趋化激素 (IL-8)、C趋化激素 (淋巴细胞趋化激素) 及CXXXC趋化激素 (弗拉塔凯 (Fractalkine))。

[0076] 如本文所用,术语「抗原决定基」定义为抗原分子的一部分,其接触抗体或T细胞受体的抗原结合位点。

[0077] 为进一步解释小鼠及人类三元复合物的差异性结合亲合力,分别基于鼠类及人类CD1d- $\alpha$ GalCer-iNKT TCR复合物的x射线结构进行计算机模型化(PDB访问代码3HUJ、3QUX、3QUY、3QUZ及3HE6)。<sup>27-29</sup> (27) Borg, N.A.; Wun, K.S.; Kjer-Nielsen, L.; Wilce, M.C.; Pellicci, D.G.; Koh, R.; Besra, G.S.; Bharadwaj, M.; Godfrey, D.I.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. *Nature* 2007, 448, 44; (28) Pellicci, D.G.; Patel, O.; Kjer-Nielsen, L.; Pang, S.S.; Sullivan, L.C.; Kyparissoudis, K.; Brooks, A.G.; Reid, H.H.; Gras, S.; Lucet, I.S.; Koh, R.; Smyth, M.J.; Mallewaey, T.; Matsuda, J.L.; Gapin, L.; McCluskey, J.; Godfrey, D.I.; Rossjohn, J. *Immunity* 2009, 31, 47; 及 (29) Aspeslagh, S.; Li, Y.; Yu, E.D.; Pauwels, N.; Trappeniers, M.; Girardi, E.; Decruy, T.; Van Beneden, K.; Venken, K.; Drennan, M.; Leybaert, L.; Wang, J.; Franck, R.W.; Van Calenbergh, S.; Zajonc, D.M.; Elewaut, D. *EMBO J.* 2011, 30, 2294。

[0078] 如本文所用,术语「疫苗」系指含有抗原的制剂,其由完整致病生物体(杀死或减毒)或这些生物体的组分(诸如蛋白质、肽或多糖)组成,用于赋予针对这些生物体所致的疾病的免疫力。疫苗制剂可为天然的、合成的或通过重组DNA技术获得。

[0079] 如本文所用,术语「免疫佐剂」系指结合免疫原使用的增强或调节针对免疫原的免疫反应的物质。特定言之,术语「佐剂」及「免疫佐剂」可在本发明中互换使用且系指当单独投与宿主时可为非免疫原性,但当与另一种抗原联合投与时强化宿主对所述抗原的免疫反应的化合物或混合物。佐剂介导的免疫反应增强及/或持续时间延长可通过此项技术中已知的任何方法评定,包括(但不限于)以下中的一或多者:(i) 响应于使用佐剂/抗原组合免疫产生的抗体的数目相较于响应于单独使用抗原免疫产生的抗体的数目增加;(ii) 识别抗原或佐剂的T细胞的数目增加;以及(iii) 一或多种I型细胞激素的含量增加。

[0080] 本发明的例示性佐剂包含可由通式1表示的化合物。

[0081] 优选地,本发明的例示性佐剂用于人类为医药学上可接受的。

[0082] 本发明的佐剂可作为包含抗原的医药疫苗组合物的一部分投与,或作为单独调配物与含有抗原的第二组合物联合投与。在这些组合物中的任一者中,具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)可与其他佐剂及/或赋形剂/载剂组合。这些其他佐剂包括(但不限于)基于油乳剂及乳化剂的佐剂,诸如弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant)、弗氏不完全佐剂、MF59或SAF;矿物凝胶,诸如氢氧化铝(矾)、磷酸铝或磷酸钙;源于微生物的佐剂,诸如霍乱毒素(CT)、百日咳毒素、大肠杆菌不耐热毒素(LT)、突变体毒素(例如LTK63或LTR72)、卡介苗(BCG)、短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)、DNA CpG基元、胞壁酰二肽或单磷酸基脂质A;微粒佐剂,诸如免疫刺激复合物(ISCOM)、脂质体、可生物降解微球或皂苷(例如QS-21);细胞激素,诸如IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12或GM-CSF;合成佐剂,诸如非离子嵌段共聚物、胞壁酰肽类似物(例如N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏胺酰基-D-异亮氨酸[thr-MDP]、N-乙酰基-去甲基-胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异亮氨酸、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异亮氨酸酰基-L-丙氨酸-2-[1'-2'-二软脂酰基-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基]-乙胺)、聚磷氮烯

或合成聚核苷酸;及表面活性物质,诸如溶血卵磷脂、普洛尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、羟乳液或匙孔螺血氰蛋白(KLH)。优选地,这些额外佐剂用于人类亦为医药学上可接受的。

[0083] 在本发明的含义内,术语「联合投与或共投与」用以指免疫佐剂及抗原同时在一个组合物中或同时在不同组合物中或依次投与。然而,对于被视为「联合」的依序投与,抗原及佐剂必须相隔一定时间间隔投与,所述时间间隔仍允许佐剂强化对抗原的免疫反应。举例而言,当抗原为多肽时,抗原及佐剂在同一天、优选地彼此在一小时内且最佳同时投与。然而,当向个体递送核酸且在个体细胞中表达多肽抗原时,佐剂在核酸投与24小时内、优选在6小时内投与。

[0084] 如本文所用,术语「免疫原性」意味着药剂能够引发体液或细胞免疫反应且优选两者。免疫原性实体亦为抗原性。免疫原性组合物为当向具有免疫系统的动物投与时引发体液或细胞免疫反应或两者的组合物。

[0085] 术语「抗原」系指当引入具有免疫系统的宿主、动物或人类中(如在例如DNA疫苗中直接或在表达后)时,由所述宿主的免疫系统识别且能够引发免疫反应的任何药剂(例如蛋白质、肽、多糖、糖蛋白、糖脂、核酸或其组合)。如本文所定义,抗原诱导的免疫反应可为体液或细胞介导型或两者。当药剂能够与免疫系统的抗原识别分子(诸如免疫球蛋白(抗体)或T细胞抗原受体(TCR))特异性相互作用时,其被称为「抗原性」。在本发明的含义内,抗原优选为「表面抗原」,亦即天然表达在病原体表面或感染细胞表面或肿瘤细胞表面上。抗原性分子无需自身具有免疫原性,亦即能够在无佐剂或载剂的情况下引发免疫反应。如本文所用,术语「抗原特异性」系指细胞群体的特性,其使得特定抗原或抗原片段的供应引起特异性细胞特征。

[0086] 术语「抗原决定基」或「抗原决定子」系指由B细胞或T细胞或两者识别的抗原的任何部分。优选地,此类抗原决定基与免疫球蛋白(抗体)或T细胞抗原受体(TCR)的抗原识别位点的相互作用诱导抗原特异性免疫反应。T细胞仅在以下情况识别蛋白质:当其已裂解成较小肽且呈现在位于另一细胞表面上的称为「主要组织相容性复合体(MHC)」的复合物中时。存在两种类别的MHC复合物(I类及II类)且每一类别由许多不同对偶基因组成。I类MHC复合物发现于几乎每一细胞上且呈现来自细胞内部产生的蛋白质的肽。因此,I类MHC复合物适用于杀死由病毒感染的细胞或由于致癌基因表达已变成癌性的细胞。在表面上具有称为CD8的蛋白质的T细胞经由T细胞受体(TCR)特异性结合至I类MHC/肽复合物。此引起溶胞效应活性。II类MHC复合物仅发现于抗原呈现细胞(APC)上且用于呈现来自由APC吞噬的循环病原体的肽。具有称为CD4的蛋白质的T细胞经由TCR结合至II类MHC/肽复合物。此引起刺激免疫反应的特异性细胞激素的合成。为经由I类MHC呈现而由免疫系统有效识别,抗原性多肽必须含有至少约8至10个氨基酸的抗原决定基,而为经由II类MHC呈现而由免疫系统有效识别,抗原性多肽必须含有至少约13至25个氨基酸的抗原决定基。参见例如Fundamental Immunology,第3版,W.E.Paul编,1999,Lippincott-Raven Publ。

[0087] 术语「物种特异性」抗原系指仅存在于或来源于特定物种的抗原。因此,术语「源于疟疾」或「疟疾特异性」抗原系指包含来源于构成疟原虫(所述疟原虫为(但不限于)恶性疟原虫(*P.falciparum*)、间日疟原虫(*P.vivax*)、三日疟原虫(*P.malariae*)、卵形疟原虫(*P.ovale*)、里氏疟原虫(*P.reichenowi*)、诺氏疟原虫(*P.knowlesi*)、食蟹猴疟原虫

(*P.cynomolgi*)、巴西疟原虫(*P.brasilianum*)、约氏疟原虫(*P.yoelii*)、伯氏疟原虫(*P.berghei*)或夏氏疟原虫(*P.chabaudi*))的蛋白质中的任一者的至少一个抗原决定基(B细胞及/或T细胞)且包含至少5-10个氨基酸残基的天然(例如经辐照孢子)或合成(例如以化学方式产生的多抗原肽[MAP]或以重组方式合成的多肽)抗原。用于抗原生成的优选疟原虫蛋白质为环孢子蛋白(CS)蛋白,然而,亦可使用其他蛋白质,例如血小板反应蛋白相关黏附(匿名)蛋白(TRAP),亦称为孢子表面蛋白2(SSP2)、LSA I、hsp70、SALSA、STARP、Hep17、MSA、RAP-1、RAP-2等。

[0088] 术语「疫苗」系指可用于引起接受者的保护性免疫的组合物(例如蛋白质或载体,诸如腺病毒载体、辛德比病毒载体(Sindbis virus vector)或痘病毒载体)。应注意有效的是,本发明的疫苗可在一部分经免疫群体中引起免疫,因为一些个体可能未能建立稳固或保护性免疫反应或在一些情况下,任何免疫反应。此无效性可源于个体的遗传背景或由于免疫缺陷病状(后天性或先天性)或免疫抑制(例如归因于用化学疗法治疗或使用免疫抑制药物,例如以防止器官排斥反应或抑制自体免疫病状)。可在动物模型中确定疫苗功效。

[0089] 术语「DNA疫苗」为此项技术的非正式术语且在本文中用以指借助于重组载体递送的疫苗。本文中所用的替代性且更具描述性术语为「载体疫苗」(因为一些可能的载体(诸如反转录病毒及慢病毒)为RNA病毒,且因为在一些情况下,经由载体向细胞递送非病毒RNA而非DNA)。一般而言,活体内投与载体,但亦涵盖适当抗原呈现细胞(诸如树突状细胞(DC))的离体转导及活体内投与转导细胞。

[0090] 术语「治疗」在本文中用以意指减轻或缓解个体疾病的至少一种症状。在本发明的含义内,术语「治疗」亦可意指延长显露前期,亦即疾病的感染与临床表现之间的时段。优选地,疾病为感染性疾病(例如病毒、细菌、寄生虫或真菌)或恶性病(例如实体或血液肿瘤,诸如肉瘤、癌瘤、神经胶质瘤、母细胞瘤、胰脏癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、淋巴瘤、白血病、黑色素瘤等)。

[0091] 术语「保护」在本文中用以意指按需要预防或治疗或预防及治疗个体疾病的出现或持续。在本发明的含义内,疾病可选自由以下组成之群:感染(例如病毒、细菌、寄生虫或真菌)及/或恶性病(例如实体或血液肿瘤,诸如肉瘤、癌瘤、神经胶质瘤、母细胞瘤、胰脏癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、淋巴瘤、白血病、黑色素瘤等)。举例而言,根据本发明,肿瘤特异性抗原与包含式1的例示性药剂的佐剂联合的治疗性投与可增强抗肿瘤免疫反应,使得肿瘤生长及癌转移减缓或甚至肿瘤消退。

[0092] 术语「保护性免疫」系指宿主动物中的免疫反应(主动/后天性或被动/先天性或两者皆有),其引起所述抗原的不活化及/或负荷减小及生成持久的免疫(亦即后天性,例如经由抗体产生),其在反复暴露于相同或相关抗原时预防或推迟疾病出现。「保护性免疫反应」包含有效例如消除或减小病原体或感染细胞的负荷(或产生任何其他可量测的感染缓解)或减小经免疫(接种)个体的肿瘤负荷的体液(抗体)免疫或细胞免疫或两者皆有。在本发明的含义内,保护性免疫可为部分。

[0093] 免疫系统分类成两个一般系统,亦即「先天性」或「天然」免疫系统及「后天性」或「适应性」免疫系统。据认为先天性免疫系统最初保持感染在控制下,允许适应性免疫系统有一定时间产生适当反应。近期研究已提出先天性免疫系统的各种组分触发且强化适应性免疫系统的组分,包括抗原特异性B及T淋巴球(Fearon及Locksley,见上文;Kos,1998,

Immunol. Res., 17:303; Romagnani, 1992, Immunol. Today, 13:379; Banchereau及Steinman, 1988, Nature, 392:245)。

[0094] 术语「先天性免疫」或「天然免疫」系指不受与抗原预先接触影响的先天性免疫反应。先天性免疫系统的细胞,包括巨噬细胞及树突状细胞(DC),经由模式识别受体摄取外来抗原,组合这些抗原的肽片段与MHC I类及II类分子且分别刺激初始CD8<sup>+</sup>及CD4<sup>+</sup>T细胞。(Banchereau及Steinman,见上文;Holmskov等人,1994,Immunol. Today, 15:67;Ulevitch及Tobias,1995,Annu. Rev. Immunol., 13:437)。专职性抗原呈现细胞(APC)与这些T细胞通信,使得初始CD4<sup>+</sup>T细胞分别分化成介导细胞及体液免疫的辅助性T-1(Th1)或辅助性T-2(Th2)淋巴球(Trinchieri,1995,Annu. Rev. Immunol., 13:251;Howard及O'Garra,1992,Immunol. Today, 13:198;Abbas等人,1996,Nature, 383:787;Okamura等人,1998,Adv. Immunol., 70:281;Mosmann及Sad,1996,Immunol. Today, 17:138;O'Garra,1998,Immunity, 8:275)。

[0095] 术语「后天性免疫」或「适应性免疫」在本文中用以意指在动物生命期间建立的特异性针对诱导性抗原且以在反复遇到所述抗原时反应增强为标志的主动或被动体液或细胞免疫。适应性免疫系统的T淋巴球的关键特征为其侦测由细胞表面上的MHC分子呈现的源于病原体的肽的微小浓度的能力。

[0096] 如本文所用,术语「强化免疫反应」意指增强免疫反应或延长其持续时间或两者皆有。当提及药剂(例如佐剂)的特性时,术语「[能够]强化免疫原性」系指增强抗原免疫原性的能力或延长针对抗原的免疫反应的持续时间的能力或两者皆有。

[0097] 在本发明的含义内,词组「增强免疫反应」系指增加针对给定抗原的免疫反应性的规模及/或功效的特性或过程,所述免疫反应性为体液或细胞免疫或两者皆有。若抗原特异性免疫反应性的任何可量测参数(例如抗体力价、T细胞产生)增加至少两倍、优选十倍、最优选三十倍,则咸信免疫反应增强。

[0098] 应用于剂量或量的术语「治疗有效」系指化合物或医药组合物或疫苗的数量在向有需要的哺乳动物投与后足以产生所需活性。如本文涉及含佐剂及抗原的组合物或疫苗所用,术语「治疗有效量/剂量」可与术语「免疫原性有效量/剂量」互换使用且系指在向哺乳动物投与后足以产生有效免疫反应的化合物(例如抗原及/或包含具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂或医药组合物或疫苗的量/剂量。

[0099] 如与本发明的组合物结合使用的词组「医药学上可接受」系指此类组合物的分子实体及其他成分为生理学上可耐受的且当向人类投与时通常不产生不良反应。优选地,如本文所用,术语「医药学上可接受」意指经联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他公认的适用于哺乳动物(且更特定言之,适用于人类)的药典中列出。

[0100] 应用于本发明的医药或疫苗组合物的术语「载剂」系指与化合物(例如抗原及/或包含具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂一起投与的稀释剂、赋形剂或媒剂。此类医药载剂可为无菌液体,诸如水及油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油及其类似物。水或水溶液、生理盐水溶液以及右旋糖及丙三醇水溶液优选用作载剂,尤其用于可注射溶液。适合的医药载剂描述于「Remington's Pharmaceutical Sciences」E.W.Martin,第18版中。

[0101] 术语「天然抗体」或「免疫球蛋白」系指通常由两个相同轻(L)链及两个相同重(H)

链组成的约150,000道尔顿的杂四聚体糖蛋白。各轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而不同免疫球蛋白同型的重链间,二硫键的数目不同。各重链及轻链亦具有有规律间隔的链内二硫桥键。各重链在一端具有可变结构域(VH),其后为多个恒定结构域。各轻链在一端具有可变结构域(VL)且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准,且轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。咸信特定氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成接口(Clothia等人,J Mol.Biol.,186:651-663,1985;Novotny及Haber,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:4592-4596,1985)。

[0102] 术语「抗体」或「Ab」以最广泛的意义使用且特定言之,涵盖不仅天然抗体,而且单一单株抗体(包括促效剂及拮抗剂抗体)、具有多抗原决定基特异性的抗体组合物以及抗体片段(例如Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv及Fv),只要其展现所需生物活性即可。

[0103] 如本文所用,术语「CD1d」系指各种人类抗原呈现细胞表面上所表达的糖蛋白的CD1(分化丛集1)家族的一员。CD1d呈现的脂质抗原激活自然杀手T细胞。CD1d具有供糖脂抗原结合于其中的较深抗原结合凹槽。表达于树突状细胞上的CD1d分子可结合且呈现糖脂。

[0104] 如本文所用,术语「适应性免疫系统」系指消除致病性攻击的高度特化全身性细胞及过程。适应性免疫系统的细胞为一类白血球,称为淋巴球。B细胞及T细胞为淋巴球的主要类型。

[0105] 如本文所用,术语「T细胞」及「T」系指一群称为淋巴球的白血球,其在细胞介导的免疫中发挥中心作用。T细胞可通过其细胞表面上称为T细胞受体(TCR)的特殊受体的存在而区别于其他淋巴球类型,诸如B细胞及NK。已描述数个不同子集的T细胞,其各自具有独特功能。辅助性T(T<sub>H</sub>)细胞为适应性免疫系统的「中间人」。在激活后,其快速分裂且分泌调节或「辅助」免疫反应的称为细胞激素的小型蛋白质。视所接受的细胞激素信号而定,这些细胞分化成T<sub>H</sub>1、T<sub>H</sub>2、T<sub>H</sub>17或其他子集中之一者,其分泌不同细胞激素。

[0106] 如本文所用,术语「抗原呈现细胞」(APC)系指在表面上呈现与主要组织兼容性复合体(MHC)复合的外来抗原的细胞。T细胞可使用其TCR识别此复合物。APC分成两种类别:专职性或非专职性。树突状细胞(DC)属于专职性类别且在CD1的情形下能够向T细胞呈现抗原。在一个例示性实施方案中,本发明方法中所采用的DC可为数个DC子集中的任一者,其在一个实施方案中,自淋巴分化或在另一个实施方案中,自骨髓祖细胞分化。

[0107] 如本文所用,术语「初始细胞」系指未分化的免疫系统细胞,例如尚未经特化以识别特异性病原体的CD4T细胞。

[0108] 如本文所用,术语「自然杀手细胞」及「NK」系指通过干扰素激活从而促成抵抗病毒及其他细胞内病原体的先天性宿主防御的一类淋巴细胞。

[0109] 如本文所用,术语「自然杀手T细胞」(NKT)系指与习知T及NK共享特征/受体的T细胞子集。许多这些细胞识别非多形性CD1d分子,亦即结合自身及外来脂质及糖脂的抗原呈现分子。NKT的TCR能够识别由CD1d分子呈现(伴随)的糖脂抗原。在刺激后,NKT的主要反应为快速分泌细胞激素,包括IL-4、IFN- $\gamma$ 及IL-10,且因此影响不同免疫反应及致病过程。NKT可为均质群体或非均质群体。在一个例示性实施方案中,群体可为「非恒定型NKT」,其可包含人类及小鼠骨髓及人类肝脏T细胞群体,其为例如CD1d反应性非恒定型T细胞,表达不同TCR且亦可产生大量IL-4及IFN- $\gamma$ 。CD1d依赖性NKT的最佳已知子集表达恒定TCR- $\alpha$ 链。其称为I型或恒定型NKT(iNKT)。这些细胞在人类(V $\alpha$ 24i NKT)与小鼠(V $\alpha$ 14i NKT)之间保守且

牵涉在许多免疫过程中。

[0110] 如本文所用,术语「细胞激素」系指通过影响免疫细胞分化过程调节免疫反应的强度及持续时间的许多小型分泌蛋白中的任一者,所述免疫细胞分化过程通常涉及使前体细胞变成独特的特化细胞类型的基因表达变化。细胞激素已基于其推测的功能、分泌细胞或作用目标而不同地命名为淋巴激素、介白素及趋化激素。举例而言,一些常见介白素包括(但不限于)IL-12、IL-18、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF、IL-4、IL-10、IL-13、IL-21及TGF- $\beta$ 。

[0111] 如本文所用,术语「趋化激素」系指在感染部位释放的各种小型趋化性细胞激素中的任一者,其提供用于淋巴球移动及激活的方式。趋化激素将白血球吸引到感染部位。趋化激素具有允许将其分配成四组的保守半胱氨酸残基。具有代表性趋化激素的各组为C-C趋化激素(RANTES、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 及MIP-1 $\beta$ )、C-X-C趋化激素(IL-8)、C趋化激素(淋巴细胞趋化激素)及CXXXC趋化激素(弗拉塔凯)。

[0112] 如本文所用,术语「T<sub>H</sub>2型反应」系指使得某些类型的细胞激素、干扰素、趋化激素产生的细胞激素表达模式。典型T<sub>H</sub>2细胞激素包括(但不限于)IL-4、IL-5、IL-6及IL-10。

[0113] 如本文所用,术语「T<sub>H</sub>1型反应」系指使得某些类型的细胞激素、干扰素、趋化激素产生的细胞激素表达模式。典型T<sub>H</sub>1细胞激素包括(但不限于)IL-2、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF及TNF- $\beta$ 。

[0114] 如本文所用,术语「偏向T<sub>H</sub>1」系指T<sub>H</sub>1细胞激素及/或趋化激素的产生与T<sub>H</sub>2细胞激素及/或趋化激素的产生相比增加至更大程度的免疫原性反应。

[0115] 如本文所用,术语「抗微生物剂」系指杀死或抑制微生物(诸如细菌、真菌或病毒)生长的物质。

[0116] 如本文所用,术语「类毒素」系指毒性已通过化学(福尔马林(formalin))或热处理而减弱或抑制,同时维持其他特性(通常免疫原性)的细菌毒素。类毒素用于疫苗中,因为其诱导针对原始毒素的免疫反应或增加针对另一种抗原的反应。举例而言,破伤风类毒素来源于由破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)产生的破伤风痉挛毒素且导致破伤风。破伤风类毒素由美国许多血浆中心用于研发富含血浆的疫苗。

[0117] 如本文所用,术语「DNA疫苗」系指引入细胞中且随后转译成特异性抗原蛋白的DNA构筑体。

[0118] 如本文所用,术语「质粒」系指能够复制的染色体外环状DNA,其可用作选殖载体。

[0119] 如本文所用,术语「微生物(microorganism及microbe)」系指微观(太小而无法由人类肉眼看见)的生物体。微生物极为多样且包括(但不限于)细菌及真菌。

[0120] 如本文所用,术语「佐剂或免疫佐剂」系指结合免疫原使用的增强或调节针对免疫原的免疫反应的物质。在一个范例中,本发明的化合物/类似物用作调节或强化疫苗效应的免疫佐剂,其通过刺激疫苗所投与的患者的免疫系统从而对疫苗产生更强烈的反应。

[0121] 如本文所用,术语「矾佐剂」系指具有免疫佐剂活性的铝盐。此药剂吸附溶液中的蛋白质抗原且使其沉淀;所得沉淀物通过促进接种位点处所形成的疫苗储槽中的抗原缓慢释放来改良疫苗免疫原性。

[0122] 如本文所用,术语「抗肿瘤免疫疗法活性剂」系指抑制、减小及/或消除肿瘤的本发明的例示性化合物/类似物。

[0123] 如本文所用,术语「颗粒球-巨噬细胞群落刺激因子」(GM-CSF)系指充当刺激白血



球(详言之,颗粒球(嗜中性白血球、嗜碱性血球及嗜伊红血球)、巨噬细胞及骨髓中作为血小板前体的细胞)产生的群落刺激因子的细胞激素。

[0124] 如本文所用,术语「抗原特异性」系指细胞群体的特性,其使得特定抗原或抗原片段的供应引起特异性细胞增生。

[0125] 如本文所用,术语「流动式细胞测量术」或「FACS」意指经由光学及电子侦测装置检查悬浮于流体流中的粒子或细胞的物理及化学特性的技术。

[0126] 肽中的氨基酸残基在下文中将简化如下:苯丙胺酸为Phe或F;白胺酸为Leu或L;异白胺酸为Ile或I;甲硫胺酸为Met或M;缬胺酸为Val或V;丝胺酸为Ser或S;脯胺酸为Pro或P;苏胺酸为Thr或T;丙胺酸为Ala或A;酪胺酸为Tyr或Y;组胺酸为His或H;麸酰胺酸为Gln或Q;天冬酰胺为Asn或N;离胺酸为Lys或K;天冬胺酸为Asp或D;麸胺酸为Glu或E;半胱胺酸为Cys或C;色胺酸为Trp或W;精胺酸为Arg或R;以及甘胺酸为Gly或G。涉及氨基酸的进一步描述,请参考Proteins:Structure and Molecular Properties by Creighton,T.E., W.H.Freeman&Co.,New York 1983。

[0127] 已知哺乳动物及分支杆菌脂质由人类CD1a、CD1b、CD1c及CD1d呈现。海绵(*Agelas mauritianus*)中发现的脂质 $\alpha$ -半乳糖苷基神经酰胺已成为最广泛研究的CD1d的配位体。已展示通过 $\alpha$ -GalCer活体外刺激小鼠脾脏细胞分别引起NKT增生及IFN- $\gamma$ 及IL-4产生,亦即 $T_H1$ 型及 $T_H2$ 型反应。鼠类研究已展示细胞可通过携带 $\alpha$ -GalCer的不成熟树突状细胞(iDC)快速激活且激活的iNKT可继而诱导DC完全成熟。

[0128] 包含具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂的佐剂的使用

[0129] 在一个态样中,本发明提供一种用于强化抗原在哺乳动物中的免疫原性的方法,其包含使所述抗原与包含式1的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂组合物联合投与。根据本发明,使用具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)作为佐剂使得通过抗原诱导的保护性免疫增强及/或持续时间延长。举例而言,如本文所揭示,联合投与具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)与相当于肿瘤或病毒抗原的T细胞或B细胞抗原决定基的肽或表达这些抗原的DNA构筑体增强抗原特异性免疫反应。

[0130] 本发明的含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂可与任何抗原(详言之,与来源于感染物或肿瘤的抗原)联合投与。

[0131] 小鼠及人类的免疫刺激效应可视CD1d分子的表达而定且通过NKT细胞介导。实际上,本发明证实佐剂活性至少部分归因于其增强及/或延长NKT介导的抗原特异性Th1型T细胞反应及CD8+T细胞(或Tc)反应的能力。

[0132] 根据免疫疗法观点,NKT细胞系统的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)激活似乎出于以下原因而具有优于其他机制的独特优势:(a)激活的NKT细胞的细胞毒性水平极高且有效抵抗广泛多种肿瘤细胞或感染细胞;(b)通过具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)激活NKT细胞完全取决于CD1d分子,其在个体当中呈单形性(Porcelli,Adv.Immunol.,59:1-98,1995),表明含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂可被全部患者利用,与MHC单倍型无关;(c)人类患者的DC及NKT激活的抗原呈现功能可在免疫疗法前通过在小鼠中使用V $\alpha$ 14NKT细胞状态作为指标进行评估。

[0133] 根据本发明,包含式1的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂及抗原可作为两种单独的调配物或作为同一组合物的一部分投与。若分别投与,则佐剂及抗原可依次或

同时投与。如本文所揭示,同时投与具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂与抗原为优选的且一般允许达成最高效的免疫刺激。

[0134] 由于本发明的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂与多数种不同抗原组合而发挥其免疫刺激活性,因此其适用于预防性及治疗性应用。因此,在另一个态样中,本发明提供一种用于治疗哺乳动物疾病的预防及/或治疗方法,其包含向所述哺乳动物联合投与抗原及包含式1的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂。此方法可适用于例如防御及/或治疗各种感染以及治疗各种赘生性疾病。

[0135] 本发明的免疫原性增强方法可用于对抗感染,其包括(但不限于)寄生虫感染(诸如由疟原虫属等所导致的感染)、病毒感染(诸如由流感病毒、白血病病毒、免疫缺陷病毒(诸如HIV)、乳头状瘤病毒、疱疹病毒、肝炎病毒、麻疹病毒、痘病毒、流行性腮腺炎病毒、巨细胞病毒[CMV]、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)等所导致的感染)、细菌感染(诸如由葡萄球菌属(staphylococcus)、链球菌属(streptococcus)、肺炎球菌属(pneumococcus)、淋病双球菌(Neisseria gonorrhea)、疏螺旋体属(Borrelia)、假单胞菌属(pseudomonas)等所导致的感染)及真菌感染(诸如由假丝酵母属(candida)、发癣菌属(trichophyton)、皮屑芽孢菌属(pityrosporum)等所导致的感染)。

[0136] 本发明的方法亦适用于治疗各种癌症,其包括(但不限于)纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰脏癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、淋巴瘤、白血病、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓性癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒膜癌、精原细胞瘤、胚胎瘤、维尔姆斯瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、神经管胚细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤及视网膜母细胞瘤。

[0137] 如本文中所进一步揭示,当同时投与抗原及具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂时,达到本发明的免疫原性增强方法的最大效率。

[0138] 本发明的方法可与其他治疗结合使用。举例而言,本发明的使用肿瘤特异性抗原及含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂的抗癌治疗可与化学疗法及/或放射疗法及/或IL-12治疗组合使用。包含含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂的抗病毒疫苗可与IFN- $\alpha$ 治疗组合使用。

[0139] 含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的医药及疫苗组合物

[0140] 结合本发明的方法,亦提供医药及疫苗组合物,其包含免疫原性有效量的抗原及免疫原性有效量的包含具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂以及视情况存在的额外免疫刺激剂、载剂或赋形剂(优选全部为医药学上可接受的)。所述抗原及佐剂可调配为单一组合物或两种单独的组合物,其可同时或依次投与。

[0141] 本发明的佐剂包含属于神经鞘糖脂类别的化合物,特定言之,可由通式1表示的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL):

[0142] 本发明的免疫原性(例如疫苗)组合物中所用的抗原可来源于真核细胞(例如肿瘤、寄生虫、真菌)、细菌细胞、病毒粒子或其任何部分(例如减毒病毒粒子或病毒组分)。在

免疫原性反应所针对的材料的抗原性不良的情况下,所述材料可另外使用标准共价结合技术(例如通过数个市售试剂套组中的一者)结合至诸如白蛋白或半抗原的载剂分子。

[0143] 本发明的优选肿瘤抗原的实例包括肿瘤特异性蛋白,诸如ErbB受体、Melan A [MART1]、gp100、酪氨酸酶、TRP-1/gp75及TRP-2(在黑色素瘤中);MAGE-1及MAGE-3(在膀胱癌、头颈癌及非小细胞癌中);HPV EG及E7蛋白(在宫颈癌中);黏蛋白[MUC-1](在乳癌、胰脏癌、结肠癌及前列腺癌中);前列腺特异性抗原[PSA](在前列腺癌中);癌胚抗原[CEA](在结肠癌、乳癌及胃肠道癌中)及共有的肿瘤特异性抗原,诸如MAGE-2、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-10、MAGE-12、BAGE-1、CAGE-1,2,8、CAGE-3至7、LAGE-1、NY-ESO-1/LAGE-2、NA-88、GnTV及TRP2-INT2。上述抗原清单意欲为例示性的,因为所关注的抗原可来源于任何动物或人类病原体或肿瘤。

[0144] 在一个特定实施例中,本发明的抗原可通过表达所述抗原的重组病毒呈现。优选地,病毒系选自由重组腺病毒、重组痘病毒及重组辛德比病毒组成的群。

[0145] 在本发明组合物中,抗原及具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂皆以免疫原性有效量存在。对于各特异性抗原,最佳免疫原性有效量应以实验方式确定(考虑指定患者的具体特征及/或治疗类型)。一般而言,此量在每公斤体重0.1 $\mu$ g-100mg抗原的范围内。对于本发明具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂,最佳免疫原性有效量优选在每公斤体重10-100 $\mu$ g佐剂的范围内。

[0146] 本发明亦提供一种用于制备疫苗组合物的方法,所述疫苗组合物包含至少一种抗原及包含式1的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂,所述方法包含混合所述佐剂及所述抗原以及视情况存在的一或多种生理学上可接受的载剂及/或赋形剂及/或辅助物质。

[0147] 调配物及投药

[0148] 本发明提供含有本发明的治疗剂(呈单一组合物或两种单独的组合物形式的抗原及具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂,其可同时或依次投与)的医药及疫苗调配物,这些调配物适用于投与从而引起抗原特异性保护性免疫反应用于治疗及预防上文所述的感染性或赘生性疾病。本发明的组合物可使用一或多种生理学上可接受的载剂或赋形剂以任何习知方式调配。因此,抗原及/或包含式1的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂可经调配从而通过经皮递送或通过经黏膜投与,包括(但不限于)经口、经颊、鼻内、经眼、经阴道、经直肠、脑内、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下途径、经由划痕(例如使用分叉针头划痕穿过皮肤表层);通过吸入(经肺)或吹入(经由嘴或鼻);或通过离体投与抗原呈现细胞,随后将这些细胞投与个体;或通过任何其他标准免疫途径而投与。

[0149] 优选地,本发明的免疫原性调配物可非经肠递送,亦即通过静脉内(i.v.)、皮下(s.c.)、腹膜内(i.p.)、肌肉内(i.m.)、皮下(s.d.)或皮内(i.d.)投与、通过经由例如快速注射、连续输注或基因枪(例如向个体投与载体疫苗,诸如裸DNA或RNA)直接注射。注射用调配物可呈单位剂型(例如安瓶)或添加有防腐剂的多剂量容器。组合物可采用诸如于油性或水性媒剂中的赋形剂、悬浮液、溶液或乳液的形式且可含有诸如悬浮剂、稳定剂及/或分散剂的调配剂。或者,活性成分可呈粉末形式从而在使用前用适合的媒剂(例如无菌无热原质水)复原。

[0150] 本发明亦涵盖多种黏膜疫苗接种策略。虽然黏膜可为局部递送疫苗的靶点,但可使用多种策略向黏膜递送免疫原性组合物。举例而言,在一个特定实施例中,免疫原性多肽

或载体疫苗可以与霍乱毒素(诸如霍乱毒素B或霍乱毒素A/B嵌合体)的混合物形式或以与其的结合物或嵌合融合蛋白形式投与(参见例如Hajishengallis, *J Immunol.*, 154:4322-32, 1995; Jobling及Holmes, *Infect Immun.*, 60:4915-24, 1992; Lebens及Holmgren, *Dev Biol Stand* 82:215-27, 1994)。在另一个实施例中,可制备与热不稳定肠毒素(LT)的混合物用于黏膜疫苗接种。其他黏膜免疫策略包括将免疫原囊封于微胶囊中(参见例如美国专利第5,075,109号;第5,820,883号及第5,853,763号)及使用免疫增强膜性载剂(参见例如PCT申请案第W0 98/0558号)。经口投与免疫原的免疫原性可通过使用红血球(rbc)或rbc翳(参见例如美国专利第5,643,577号)或通过使用蓝舌抗原(参见例如美国专利第5,690,938号)增强。目标免疫原的全身性投与亦可产生黏膜免疫(参见美国专利第5,518,725号)。多种策略亦可用于递送基因从而在黏膜组织中表达,诸如使用嵌合鼻病毒(参见例如美国专利第5,714,374号)、腺病毒、牛痘病毒或特异性靶向核酸(参见例如申请案第W0 97/05267号)。

[0151] 对于经口投与,本发明的调配物可呈例如锭剂或胶囊形式,其系通过习知方式用医药学上可接受的赋形剂制备,这些赋形剂诸如黏合剂(例如预胶凝化玉米淀粉、聚乙烯吡咯酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石或氧化硅);崩解剂(例如马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或湿润剂(例如十二烷基硫酸钠)。锭剂可通过此项技术中熟知的方法包覆。本发明的组合物亦可引入例如由聚-乙醇酸/乳酸(PGLA)制造的微球或微胶囊中(参见美国专利第5,814,344号、第5,100,669号及第4,849,222号;PCT公开案第W0 95/11010号及第W0 93/07861号)。用于经口投与的液体制剂可呈例如溶液、糖浆、乳液或悬浮液形式,或其可以干燥产物形式呈现从而在使用前用水或其他适合的媒剂复原。此类液体制剂可通过习知方式用医药学上可接受的添加剂制备,这些添加剂诸如悬浮剂(例如山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化可食用脂肪);乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶);非水性媒剂(例如杏仁油、油酯、乙醇或分馏植物油);及防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。这些制剂亦可按需要含有缓冲盐、调味剂、着色剂及甜味剂。可适当调配用于经口投与的制剂从而得到活性化合物的控制释放。

[0152] 对于通过吸入投与,本发明的治疗剂适宜以来自加压包装或喷雾器的气溶胶喷雾表现形式递送,其中使用适合的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合气体。在加压气溶胶情况下,剂量单位可通过提供阀以递送所计量的量来测定。用于吸入器或吹入器中的例如明胶的胶囊及药筒可经调配以含有所述化合物与诸如乳糖或淀粉的适合粉末基质的粉末混合物。

[0153] 本发明的组合物亦可调配于例如含有习知栓剂基质(诸如可可脂或其他甘油酯)的经直肠组合物(诸如栓剂或保留灌肠剂)中。

[0154] 除上述调配物外,组合物亦可调配为储槽式制剂。此类长效调配物可通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射投与。因此,例如,这些化合物可用适合的聚合或疏水性材料(例如调配为于可接受的油剂中的乳液)或离子交换树脂调配,或调配为微溶性衍生物(例如调配为微溶性盐)。

[0155] 如本文所揭示,抗原及/或具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂可与医药学上可接受且与活性成分兼容的赋形剂混合。适合的赋形剂例如水、生理盐水、缓冲生理盐

水、右旋糖、丙三醇、乙醇、无菌等张水性缓冲剂或其类似物及其组合。另外,若需要,制剂亦可包括少量辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂及/或免疫刺激剂(例如除具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)以外增强医药组合物或疫苗的有效性的佐剂。可增强本发明组合物的有效性的额外免疫刺激剂的非限制性实例包括免疫刺激性、免疫增强性或促炎性细胞激素、淋巴激素或趋化激素或编码其的核酸(特定实例包括介白素(IL)-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13、颗粒球-巨噬细胞(GM)-群落刺激因子(CSF)及其他群落刺激因子、巨噬细胞炎性因子、Flt3配位体,参见题为「定义」的部分中免疫刺激细胞激素的额外实例)。这些额外免疫刺激分子可以蛋白质形式或通过表达编码用于分子表达的载体而全身性或局部递送。上文所述用于递送抗原及具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂的技术亦可用于递送额外免疫刺激分子。

[0156] 本发明亦提供一种医药封装或套组,其包含一或多个用本发明的免疫原性调配物的一或多种成分填充的容器。在相关实施例中,本发明提供一种用于制备包含至少一种抗原及含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂的医药或疫苗组合物的套组,所述套组包含在第一容器中的所述抗原及在第二容器中的所述佐剂及视情况存在的混合所述抗原及所述佐剂及/或投与所述组合物的说明书。套组的各容器亦可视情况包括一或多种生理学上可接受的载剂及/或赋形剂及/或辅助物质。与所述(这些)容器相关联的可为由管理医药或生物产物的制造、使用或销售的政府机构所规定形式的注意事项,所述注意事项反映由人类投药的制造、使用或销售机构的批准。

[0157] 若需要,组合物可以封装或施配器装置呈现,其可含有一或多个含有活性成分(亦即抗原及/或含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂)的单位剂型。封装可例如包含金属或塑料箔,诸如泡壳封装。封装或施配器装置可附有投药用法说明书。亦可制备调配于相容医药载剂中的本发明组合物,置于适当容器中且标注用于治疗指定病状。

[0158] 有效剂量及安全性评估

[0159] 根据本发明的方法,本文所述的医药及疫苗组合物以免疫原性有效剂量、优选在最小毒性下投与患者。如题为「定义」的部分中所叙述,所揭示调配物的「免疫原性有效剂量」或「治疗有效剂量」系指足以在经治疗个体中产生有效免疫反应且因此足以产生对所述个体的健康益处的抗原及/或具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂的量。

[0160] 按照此项技术中公认的方法(参见例如reports on evaluation of several vaccine formulations containing novel adjuvants in a collaborative effort between the Center for Biological Evaluation and Food and Drug Administration and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases[Goldenthal等人, National Cooperative Vaccine Development Working Group. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1993, 9: 545-9]),本发明的化合物及组合物的有效剂量及毒性首先在临床前研究中使用小型动物模型(例如小鼠)测定,其中已发现抗原及含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的佐剂具有免疫原性且可通过提议用于人类临床试验的相同途径可再现地经免疫。特定言之,对于本发明方法中所用的任何医药组合物或疫苗,治疗有效剂量可起初由动物模型估计从而实现包括 $IC_{50}$ (亦即实现半最大症状抑制的测试化合物浓度)的循环血浆浓度范围。来源于动物系统的剂量反应曲线接着用于确定用于人类初始临床研究的测试剂量。在各组合物的安全性测定中,免疫的剂量及频率应符合或超过预期适用于

临床试验的剂量及频率。

[0161] 如本文所揭示,确定本发明组合中具有 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)、抗原及其他组分的剂量,从而确保连续或间歇投与的剂量不会超过基于测试动物中的结果及患者个体状况考虑的一定量。特定剂量视给药程序、患者或个体动物的状况(诸如年龄、体重、性别、敏感性、摄食)、给药时段、组合使用的药物、疾病严重性而自然变化。在某些条件下的适当剂量及给药时间可通过基于上述指数的测试来确定且应根据医师判断及各患者的情况根据标准临床技术来决定。与此相关,抗原的剂量一般系每公斤体重0.1 $\mu$ g-100mg的范围内,而强化针对所述抗原的免疫反应所需的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂的剂量一般在每公斤体重10-100 $\mu$ g的范围内。

[0162] 本发明的含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的免疫原性组合物的毒性及治疗功效可通过标准医药程序在实验动物中测定,例如通过测定LD<sub>50</sub>(50%群体致死的剂量)及ED<sub>50</sub>(有效治疗50%群体的剂量)。毒性效应与治疗效应之间的剂量比为治疗指数且其可表示为比率LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>。展现大治疗指数的组合物较佳。虽然可使用展现毒性副作用的治疗剂(例如当治疗重型癌症或危及生命的感染时),但应小心设计递送系统,使此类免疫原性组合物靶向特定部位(例如调节免疫反应的淋巴组织、肿瘤或支撑感染物复制的器官),从而使对其他组织及器官的潜在损伤减至最小且由此减小副作用。如本文所揭示(亦参见先前技术部分及实例),本发明的具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)佐剂不仅在相对低的剂量(例如每公斤体重10-100 $\mu$ g佐剂)下具有高度免疫刺激性,而且具有低毒性且不产生显著副作用。

[0163] 如上文所指明,由动物研究获得的资料可用于调配一系列适用于人类的剂量。本发明的含有具 $\alpha$ -葡萄糖( $\alpha$ -Glc)的鞘糖脂(GSL)的组合物在人类中的治疗有效剂量优选处于包括ED<sub>50</sub>且具有极小或无毒性的循环浓度的范围内。剂量可视所用剂型及所用投药途径而在此范围内变化。理想地,应使用单一剂量。

[0164] 涉及化学结构的定义特定官能基及化学术语的结构定义更详细地描述于下文。化学元素系根据Handbook of Chemistry and Physics,第75版,内封面的元素周期表(CAS版)来鉴别,且特定官能基一般如其中所述来定义。另外,有机化学的一般原理以及特定官能部分及反应性描述于Thomas Sorrell,Organic Chemistry,University Science Books,Sausalito,1999;Smith 及March,March's Advanced Organic Chemistry,第5版,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2001;Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers,Inc.,New York,1989;及Carruthers,Some Modern Methods of Organic Synthesis,第3版,Cambridge University Press,Cambridge,1987中。

[0165] 本文所述的化合物可包含一或多个不对称中心,且因此可以各种异构体形式(例如对映异构体及/或非对映异构体)存在。举例而言,本文所述的化合物可呈个别对映异构体、非对映异构体或几何异构体形式,或可呈立体异构体的混合物形式,包括外消旋混合物及一或多种立体异构体增浓的混合物。异构体可利用熟习此项技术者已知的方法(包括例如对掌性高压液相层析(HPLC)及对掌性盐的形成及结晶)而自混合物中分离;或可通过不对称合成来制备优选异构体。参见例如Jacques等人,Enantiomers,Racemates and Resolutions(Wiley Interscience,New York,1981);Wilén等人,Tetrahedron 33:2725

(1977); Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); 及 Wilen, Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions 第268页 (E.L. Eliel 编, Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972)。本发明另外涵盖呈实质上不含其他异构体的个别异构体形式及替代地呈各种异构体的混合物形式的本文所述化合物。

[0166] 当列举值范围时, 意欲涵盖所述范围内的每个值及子范围。举例而言, 「C<sub>1-6</sub>」意欲涵盖 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>1-6</sub>、C<sub>1-5</sub>、C<sub>1-4</sub>、C<sub>1-3</sub>、C<sub>1-2</sub>、C<sub>2-6</sub>、C<sub>2-5</sub>、C<sub>2-4</sub>、C<sub>2-3</sub>、C<sub>3-6</sub>、C<sub>3-5</sub>、C<sub>3-4</sub>、C<sub>4-6</sub>、C<sub>4-5</sub> 及 C<sub>5-6</sub>。

[0167] 「烷基」系指具有1至20个碳原子的直链或分支链饱和烃基(「C<sub>1-20</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至10个碳原子(「C<sub>1-10</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至9个碳原子(「C<sub>1-9</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至8个碳原子(「C<sub>1-8</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至7个碳原子(「C<sub>1-7</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至6个碳原子(「C<sub>1-6</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至5个碳原子(「C<sub>1-5</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至4个碳原子(「C<sub>1-4</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至3个碳原子(「C<sub>1-3</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1至2个碳原子(「C<sub>1-2</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有1个碳原子(「C<sub>1</sub>烷基」)。在一些实施例中, 烷基具有2至6个碳原子(「C<sub>2-6</sub>烷基」)。C<sub>1-6</sub>烷基的实例包括甲基(C<sub>1</sub>)、乙基(C<sub>2</sub>)、正丙基(C<sub>3</sub>)、异丙基(C<sub>3</sub>)、正丁基(C<sub>4</sub>)、第三丁基(C<sub>4</sub>)、第二丁基(C<sub>4</sub>)、异丁基(C<sub>4</sub>)、正戊基(C<sub>5</sub>)、3-戊基(C<sub>5</sub>)、戊基(C<sub>5</sub>)、新戊基(C<sub>5</sub>)、3-甲基-2-丁基(C<sub>5</sub>)、第三戊基(C<sub>5</sub>)及正己基(C<sub>6</sub>)。烷基的额外实例包括正庚基(C<sub>7</sub>)、正辛基(C<sub>8</sub>)及其类似基团。除非另外规定, 否则烷基的各实例独立地视情况经取代, 亦即未经取代(「未经取代的烷基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的烷基」)。在某些实施例中, 烷基为未经取代的C<sub>1-10</sub>烷基(例如-CH<sub>3</sub>)。在某些实施例中, 烷基为经取代的C<sub>1-10</sub>烷基。

[0168] 「烯基」系指具有2至20个碳原子、一或多个碳-碳双键且无参键的直链或分支链烃基(「C<sub>2-20</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至10个碳原子(「C<sub>2-10</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至9个碳原子(「C<sub>2-9</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至8个碳原子(「C<sub>2-8</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至7个碳原子(「C<sub>2-7</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至6个碳原子(「C<sub>2-6</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至5个碳原子(「C<sub>2-5</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至4个碳原子(「C<sub>2-4</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2至3个碳原子(「C<sub>2-3</sub>烯基」)。在一些实施例中, 烯基具有2个碳原子(「C<sub>2</sub>烯基」)。一或多个碳-碳双键可在内部(诸如2-丁烯基中)或末端(诸如1-丁烯基中)。C<sub>2-4</sub>烯基的实例包括乙烯基(C<sub>2</sub>)、1-丙烯基(C<sub>3</sub>)、2-丙烯基(C<sub>3</sub>)、1-丁烯基(C<sub>4</sub>)、2-丁烯基(C<sub>4</sub>)、丁二烯基(C<sub>4</sub>)及其类似基团。C<sub>2-6</sub>烯基的实例包括前述C<sub>2-4</sub>烯基以及戊烯基(C<sub>5</sub>)、戊二烯基(C<sub>5</sub>)、己烯基(C<sub>6</sub>)及其类似基团。烯基的其他实例包括庚烯基(C<sub>7</sub>)、辛烯基(C<sub>8</sub>)、辛三烯基(C<sub>8</sub>)及其类似基团。除非另外规定, 否则烯基的各实例独立地视情况经取代, 亦即未经取代(「未经取代的烯基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的烯基」)。在某些实施例中, 烯基为未经取代的C<sub>2-10</sub>烯基。在某些实施例中, 烯基为经取代的C<sub>2-10</sub>烯基。

[0169] 「炔基」系指具有2至20个碳原子、一或多个碳-碳参键及视情况存在的一或多个双键的直链或分支链烃基(「C<sub>2-20</sub>炔基」)。在一些实施例中, 炔基具有2至10个碳原子(「C<sub>2-10</sub>炔基」)。在一些实施例中, 炔基具有2至9个碳原子(「C<sub>2-9</sub>炔基」)。在一些实施例中, 炔基具有2至8个碳原子(「C<sub>2-8</sub>炔基」)。在一些实施例中, 炔基具有2至7个碳原子(「C<sub>2-7</sub>炔基」)。在一些

实施例中,炔基具有2至6个碳原子(「 $C_{2-6}$ 炔基」)。在一些实施例中,炔基具有2至5个碳原子(「 $C_{2-5}$ 炔基」)。在一些实施例中,炔基具有2至4个碳原子(「 $C_{2-4}$ 炔基」)。在一些实施例中,炔基具有2至3个碳原子(「 $C_{2-3}$ 炔基」)。在一些实施例中,炔基具有2个碳原子(「 $C_2$ 炔基」)。一或多个碳-碳参键可在内部(诸如2-丁炔基中)或末端(诸如1-丁炔基中)。 $C_{2-4}$ 炔基的实例包括(但不限于)乙炔基( $C_2$ )、1-丙炔基( $C_3$ )、2-丙炔基( $C_3$ )、1-丁炔基( $C_4$ )、2-丁炔基( $C_4$ )及其类似基团。 $C_{2-6}$ 烯基的实例包括前述 $C_{2-4}$ 炔基以及戊炔基( $C_5$ )、己炔基( $C_6$ )及其类似基团。炔基的其他实例包括庚炔基( $C_7$ )、辛炔基( $C_8$ )及其类似基团。除非另外规定,否则炔基的各实例独立地视情况经取代,亦即未经取代(「未经取代的炔基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的炔基」)。在某些实施例中,炔基为未经取代的 $C_{2-10}$ 炔基。在某些实施例中,炔基为经取代的 $C_{2-10}$ 炔基。

[0170] 「碳环基」或「碳环」系指在非芳环系统中具有3至10个环碳原子(「 $C_{3-10}$ 碳环基」)及0个杂原子的非芳族环烷基。在一些实施例中,碳环基具有3至8个环碳原子(「 $C_{3-8}$ 碳环基」)。在一些实施例中,碳环基具有3至6个环碳原子(「 $C_{3-6}$ 」碳环基)。在一些实施例中,碳环基具有3至6个环碳原子(「 $C_{3-6}$ 」碳环基)。在一些实施例中,碳环基具有5至10个环碳原子(「 $C_{5-10}$ 」碳环基)。例示性 $C_{3-6}$ 碳环基包括(但不限于)环丙基( $C_3$ )、环丙烯基( $C_3$ )、环丁基( $C_4$ )、环丁烯基( $C_4$ )、环戊基( $C_5$ )、环戊烯基( $C_5$ )、环己基( $C_6$ )、环己烯基( $C_6$ )、环己二烯基( $C_6$ )及其类似基团。例示性 $C_{3-8}$ 碳环基包括(但不限于)前述 $C_{3-6}$ 碳环基以及环庚基( $C_7$ )、环庚烯基( $C_7$ )、环庚二烯基( $C_7$ )、环庚三烯基( $C_7$ )、环辛基( $C_8$ )、环辛烯基( $C_8$ )、双环[2.2.1]庚基( $C_7$ )、双环[2.2.2]辛基( $C_8$ )及其类似基团。例示性 $C_{3-10}$ 碳环基包括(但不限于)前述 $C_{3-8}$ 碳环基以及环壬基( $C_9$ )、环壬烯基( $C_9$ )、环癸基( $C_{10}$ )、环癸烯基( $C_{10}$ )、八氢-1H-茛基( $C_9$ )、十氢萘基( $C_{10}$ )、螺[4.5]癸基( $C_{10}$ )及其类似基团。如前述实例所说明,在某些实施例中,碳环基为单环(「单环碳环基」)或含有稠合、桥连或螺环系统,诸如双环系统(「双环碳环基」),且可为饱和的或可为部分不饱和的。「碳环基」亦包括以下环系统,其中如上文所定义的碳环基环与一或多个芳基或杂芳基稠合,其中连接点在碳环基环上,且在這些情況下,碳的编号继续指示碳环基环系统中碳的编号。除非另外规定,否则碳环基的各实例独立地视情况经取代,亦即未经取代(「未经取代的碳环基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的碳环基」)。在某些实施例中,碳环基为未经取代的 $C_{3-10}$ 碳环基。在某些实施例中,碳环基为经取代的 $C_{3-10}$ 碳环基。

[0171] 在一些实施例中,「碳环基」为具有3至10个环碳原子的单环饱和碳环基(「 $C_{3-10}$ 环烷基」)。在一些实施例中,环烷基具有3至8个环碳原子(「 $C_{3-8}$ 环烷基」)。在一些实施例中,环烷基具有3至6个环碳原子(「 $C_{3-6}$ 环烷基」)。在一些实施例中,环烷基具有5至6个环碳原子(「 $C_{5-6}$ 环烷基」)。在一些实施例中,环烷基具有5至10个环碳原子(「 $C_{5-10}$ 环烷基」)。 $C_{5-6}$ 环烷基的实例包括环戊基( $C_5$ )及环己基( $C_6$ )。 $C_{3-6}$ 环烷基的实例包括前述 $C_{5-6}$ 环烷基以及环丙基( $C_3$ )及环丁基( $C_4$ )。 $C_{3-8}$ 环烷基的实例包括前述 $C_{3-6}$ 环烷基以及环庚基( $C_7$ )及环辛基( $C_8$ )。除非另外规定,否则环烷基的各实例独立地未经取代(「未经取代的环烷基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的环烷基」)。在某些实施例中,环烷基为未经取代的 $C_{3-10}$ 环烷基。在某些实施例中,环烷基为经取代的 $C_{3-10}$ 环烷基。

[0172] 「杂环基」或「杂环」系指具有环碳原子及1至4个环杂原子的3员至10员非芳环系统的基团,其中各杂原子独立地选自氮、氧、硫、硼、磷及硅(「3-10员杂环基」)。在某些实施例中,杂原子独立地选自氮、硫及氧。在含有一或多个氮原子的杂环基中,价数允许时,连接点



可为碳或氮原子。杂环基可为单环(「单环杂环基」)或稠合、桥连或螺环系统,诸如双环系统(「双环杂环基」),且可为饱和或部分不饱和的。杂环基双环系统可在一个或两个环中包括一或多个杂原子。「杂环基」亦包括如上文所定义的杂环与一或多个碳环基稠合的环系统,其中连接点在碳环基或杂环上;或如上文所定义的杂环与一或多个芳基或杂芳基稠合的环系统,其中连接点在杂环上,且在這些情況下,环成员的编号继续表示杂环系统中环成员的编号。除非另外规定,否则杂环基的各实例独立地视情况经取代,亦即未经取代(「未经取代的杂环基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的杂环基」)。在某些实施例中,杂环基为未经取代的3-10员杂环基。在某些实施例中,杂环基为经取代的3-10员杂环基。

[0173] 在一些实施例中,杂环基为具有环碳原子及1-4个环杂原子的5-10员非芳环系统,其中各杂原子独立地选自氮、氧、硫、硼、磷及硅(「5-10员杂环基」)。在一些实施例中,杂环基为具有环碳原子及1-4个环杂原子的5-8员非芳环系统,其中各杂原子独立地选自氮、氧及硫(「5-8员杂环基」)。在一些实施例中,杂环基为具有环碳原子及1-4个环杂原子的5-6员非芳环系统,其中各杂原子独立地选自氮、氧及硫(「5-6员杂环基」)。在一些实施例中,5-6员杂环基具有1-3个选自氮、氧及硫的环杂原子。在一些实施例中,5-6员杂环基具有1-2个选自氮、氧及硫的环杂原子。在一些实施例中,5-6员杂环基具有一个选自氮、氧及硫的环杂原子。

[0174] 含有一个杂原子的例示性3员杂环基包括(但不限于)环氮乙基、环氧乙基及环硫乙基。含有一个杂原子的例示性4员杂环基包括(但不限于)氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基及硫杂环丁烷基。含有一个杂原子的例示性5员杂环基包括(但不限于)四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、二氢噻吩基、吡咯啉基、二氢吡咯基及吡咯基-2,5-二酮。含有两个杂原子的例示性5员杂环基包括(但不限于)二氧杂戊环基、氧硫杂呋喃基、二硫杂呋喃基及恶唑啉-2-酮。含有三个杂原子的例示性5员杂环基包括(但不限于)三唑啉基、氧杂二唑啉基及硫杂二唑啉基。含有一个杂原子的例示性6员杂环基包括(但不限于)哌啶基、四氢哌喃基、二氢吡啶基及噻烷基。含有两个杂原子的例示性6员杂环基包括(但不限于)哌嗪基、吗啉基、二噻烷基及二恶烷基。含有两个杂原子的例示性6员杂环基包括(但不限于)三氮杂环己烷基。含有一个杂原子的例示性7员杂环基包括(但不限于)氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基及硫杂环庚烷基。含有一个杂原子的例示性8员杂环基包括(但不限于)氮杂环辛基、氧杂环辛基及硫杂环辛基。与 $C_6$ 芳基环稠合的例示性5员杂环基(在本文中亦称为5,6-双环杂环)包括(但不限于)二氢吡啶基、异吡啶基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并噻吩基、苯并恶唑啉酮及其类似基团。与芳基环稠合的例示性6员杂环基(在本文中亦称为6,6-双环杂环)包括(但不限于)四氢喹啉基、四氢异喹啉基及其类似基团。

[0175] 「芳基」系指单环或多环(例如双环或三环)  $4n+2$  芳环系统(例如环状数组中共享6、10或14个 $\pi$ 电子)的基团,所述芳环系统中具有6至14个环碳原子及零个杂原子(「 $C_{6-14}$ 芳基」)。在一些实施例中,芳基具有六个环碳原子(「 $C_6$ 芳基」;例如苯基)。在一些实施例中,芳基具有十个环碳原子(「 $C_{10}$ 芳基」;例如萘基,诸如1-萘基及2-萘基)。在一些实施例中,芳基具有十四个环碳原子(「 $C_{14}$ 芳基」;例如蒽基)。「芳基」亦包括如上文所定义的芳基环与一或多个碳环基或杂环基稠合的环系统,其中连接基团或连接点在芳基环上,且在這些情況下,碳原子的编号继续指示芳基环系统中碳原子的编号。除非另外规定,否则芳基的各实例独立地视情况经取代,亦即未经取代(「未经取代的芳基」)或经一或多个取代基取代(「经取代

的芳基)。在某些实施例中,芳基为未经取代的 $C_{6-14}$ 芳基。在某些实施例中,芳基为经取代的 $C_{6-14}$ 芳基。

[0176] 「芳基烷基」为如本文所定义的烷基及芳基的子集且系指经视情况经取代的芳基取代的视情况经取代的烷基。在某些实施例中,芳烷基为视情况经取代的苯甲基。在某些实施例中,芳烷基为苯甲基。在某些实施例中,芳烷基为视情况经取代的苯乙基。在某些实施例中,芳烷基为苯乙基。

[0177] 「杂芳基」系指具有芳环系统所提供的环碳原子及1-4个环杂原子的5-10员单环或双环 $4n+2$ 芳环系统(例如环状数组中共享6或10个 $\pi$ 电子)的基团,其中各杂原子独立地选自氮、氧及硫(「5-10员杂芳基」)。在含有一或多个氮原子的杂芳基中,价数允许时,连接点可为碳或氮原子。杂芳基双环系统可在一个或两个环中包括一或多个杂原子。「杂芳基」包括如上文所定义的杂芳基环与一或多个碳环基或杂环基稠合的环系统,其中连接点在杂芳基环上,且在這些情況下,环成员的编号继续指示杂芳基环系统中环成员的编号。「杂芳基」亦包括如上文所定义的杂芳基环与一或多个芳基稠合的环系统,其中连接点在芳基或杂芳基环上,且在這些情況下,环成员的编号指示稠合(芳基/杂芳基)环系统中环成员的编号。其中一个环不含杂原子的双环杂芳基(例如吡啶基、喹啉基、呋喃基及其类似基团),连接点可在任一环上,亦即携带杂原子的环(例如2-吡啶基)或不含杂原子的环(例如5-吡啶基)。

[0178] 在一些实施例中,杂芳基为具有芳环系统所提供的环碳原子及1-4个环杂原子的5-10员芳环系统,其中各杂原子独立地选自氮、氧及硫(「5-10员杂芳基」)。在一些实施例中,杂芳基为具有芳环系统所提供的环碳原子及1-4个环杂原子的5-8员芳环系统,其中各杂原子独立地选自氮、氧及硫(「5-8员杂芳基」)。在一些实施例中,杂芳基为具有芳环系统所提供的环碳原子及1-4个环杂原子的5-6员芳环系统,其中各杂原子独立地选自氮、氧及硫(「5-6员杂芳基」)。在一些实施例中,5-6员杂芳基具有1-3个选自氮、氧及硫的环杂原子。在一些实施例中,5-6员杂芳基具有1-2个选自氮、氧及硫的环杂原子。在一些实施例中,5-6员杂芳基具有1个选自氮、氧及硫的环杂原子。除非另外规定,否则杂芳基的各实例独立地视情况经取代,亦即未经取代(「未经取代的杂芳基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的杂芳基」)。在某些实施例中,杂芳基为未经取代的5-14员杂芳基。在某些实施例中,杂芳基为经取代的5-14员杂芳基。

[0179] 含有一个杂原子的例示性5员杂芳基包括(但不限于)吡咯基、呋喃基及噻吩基。含有两个杂原子的例示性5员杂芳基包括(但不限于)咪唑基、吡唑基、恶唑基、异恶唑基、噻唑基及异噻唑基。含有三个杂原子的例示性5员杂芳基包括(但不限于)三唑基、恶二唑基及噻二唑基。含有四个杂原子的例示性5员杂芳基包括(但不限于)四唑基。含有一个杂原子的例示性6员杂芳基包括(但不限于)吡啶基。含有两个杂原子的例示性6员杂芳基包括(但不限于)哒嗪基、嘧啶基及吡嗪基。含有三个或四个杂原子的例示性6员杂芳基分别包括(但不限于)三嗪基及四嗪基。含有一个杂原子的例示性7员杂芳基包括(但不限于)氮呋基、氧呋基及噻呋基。例示性5,6-双环杂芳基包括(但不限于)吡啶基、异吡啶基、吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、异苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并异呋喃基、苯并咪唑基、苯并恶唑基、苯并异恶唑基、苯并恶二唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并噻二唑基、吡啶嗪基及嘌呤基。例示性6,6-双环杂芳基包括(但不限于)啉基、喹啉基、喹啉基、异喹啉基、喹啉基、喹啉基、酞嗪基及喹啉基。

[0180] 「杂芳烷基」为如本文所定义的烷基及杂芳基的子集且系指经视情况经取代的杂芳基取代的视情况经取代的烷基。

[0181] 如本文所定义的作为二价桥连基团的烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基另外使用后缀-伸基指代例如伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸碳环基、伸杂环基、伸芳基及伸杂芳基。

[0182] 如本文所用,术语「视情况经取代」系指经取代或未经取代的部分。

[0183] 如本文所定义的烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基视情况经取代(例如「经取代」或「未经取代」的烷基、「经取代」或「未经取代」的烯基、「经取代」或「未经取代」的炔基、「经取代」或「未经取代」的碳环基、「经取代」或「未经取代」的杂环基、「经取代」或「未经取代」的芳基或「经取代」或「未经取代」的杂芳基)。一般而言,术语「经取代」,不论之前是否有术语「视情况」,均意指存在于基团(例如碳或氮原子)上的至少一个氢经容许取代基(例如在取代后产生稳定化合物(例如不会自发经历诸如重排、环化、消除或其他反应的转化的化合物)的取代基)置换。除非另外指明,否则「经取代」的基团在基团的一或多个可取代位置处具有取代基,且当任何既定结构中的一个以上位置经取代时,取代基在各位置处相同或不同。术语「经取代」预期包括经有机化合物的所有容许取代基、导致稳定化合物形成的本文所述的任何取代基取代。本发明涵盖任何及所有此类组合从而获得稳定化合物。出于本发明的目的,杂原子(诸如氮)可具有氢取代基及/或满足杂原子价数且导致稳定部分形成的如本文所述的任何适合取代基。

[0184] 例示性碳原子取代基包括(但不限于)卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{ON}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_3^+\text{X}^-$ 、 $-\text{N}(\text{OR}^{\text{cc}})\text{R}^{\text{bb}}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SSR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{C}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OS}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{Osi}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{B}(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{B}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{BR}^{\text{aa}}(\text{OR}^{\text{cc}})$ 、 $\text{C}_{1-10}$ 烷基、 $\text{C}_{1-10}$ 全卤烷基、 $\text{C}_{2-10}$ 烯基、 $\text{C}_{2-10}$ 炔基、 $\text{C}_{3-10}$ 碳环基、3-14员杂环基、 $\text{C}_{6-14}$ 芳基及5-14员杂芳基,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $\text{R}^{\text{dd}}$ 基团取代;或碳原子上的两个氢经基团 $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 、 $=\text{NN}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $=\text{NNR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $=\text{NNR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $=\text{NNR}^{\text{bb}}\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $=\text{NR}^{\text{bb}}$ 或 $=\text{NOR}^{\text{cc}}$ 置换; $\text{R}^{\text{aa}}$ 的各实例独立地选自 $\text{C}_{1-10}$ 烷基、 $\text{C}_{1-10}$ 全卤烷基、 $\text{C}_{2-10}$ 烯基、 $\text{C}_{2-10}$ 炔基、 $\text{C}_{3-10}$ 碳环基、3-14员杂环基、 $\text{C}_{6-14}$ 芳基及5-14员杂芳基,或两个 $\text{R}^{\text{aa}}$ 基团接合从而形成3-14员杂环基或5-14员杂芳基环,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $\text{R}^{\text{dd}}$ 基团取代; $\text{R}^{\text{bb}}$ 的各实例独立地选自氢、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SOR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{cc}})_2$ 、 $\text{C}_{1-10}$ 烷基、 $\text{C}_{1-10}$ 全卤烷基、 $\text{C}_{2-10}$ 烯基、 $\text{C}_{2-10}$ 炔基、 $\text{C}_{3-10}$ 碳环基、3-14员杂

环基、 $C_{6-14}$ 芳基及5-14员杂芳基,或两个 $R^{bb}$ 基团接合从而形成3-14员杂环基或5-14员杂芳基环,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $R^{dd}$ 基团取代; $R^{cc}$ 的各实例独立地选自氢、 $C_{1-10}$ 烷基、 $C_{1-10}$ 全卤烷基、 $C_{2-10}$ 烯基、 $C_{2-10}$ 炔基、 $C_{3-10}$ 碳环基、3-14员杂环基、 $C_{6-14}$ 芳基及5-14员杂芳基,或两个 $R^{cc}$ 基团接合从而形成3-14员杂环基或5-14员杂芳基环,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $R^{dd}$ 基团取代; $R^{dd}$ 的各实例独立地选自卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SO_2H$ 、 $-SO_3H$ 、 $-OH$ 、 $-OR^{ee}$ 、 $-ON(R^{ff})_2$ 、 $-N(R^{ff})_2$ 、 $-N(R^{ff})_3^+X^-$ 、 $-N(OR^{ee})R^{ff}$ 、 $-SH$ 、 $-SR^{ee}$ 、 $-SSR^{ee}$ 、 $-C(=O)R^{ee}$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R^{ee}$ 、 $-OC(=O)R^{ee}$ 、 $-OC(=O)N(R^{ff})_2$ 、 $-OC(=O)N(R^{ff})_2$ 、 $-NR^{ff}C(=O)R^{ee}$ 、 $-NR^{ff}CO_2R^{ee}$ 、 $-NR^{ff}C(=O)N(R^{ff})_2$ 、 $-C(=NR^{ff})OR^{ee}$ 、 $-OC(=NR^{ff})R^{ee}$ 、 $-OC(=NR^{ff})OR^{ee}$ 、 $-C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$ 、 $-OC(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$ 、 $-NR^{ff}C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$ 、 $-NR^{ff}SO_2R^{ee}$ 、 $-SO_2N(R^{ff})_2$ 、 $-SO_2R^{ee}$ 、 $-SO_2OR^{ee}$ 、 $-OSO_2R^{ee}$ 、 $-S(=O)R^{ee}$ 、 $-Si(R^{ee})_3$ 、 $-Osi(R^{ee})_3$ 、 $-C(=S)N(R^{ff})_2$ 、 $-C(=O)SR^{ee}$ 、 $-C(=S)SR^{ee}$ 、 $-SC(=S)SR^{ee}$ 、 $-P(=O)_2R^{ee}$ 、 $-P(=O)(R^{ee})_2$ 、 $-OP(=O)(R^{ee})_2$ 、 $-OP(=O)(OR^{ee})_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 全卤烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{2-6}$ 炔基、 $C_{3-10}$ 碳环基、3-10员杂环基、 $C_{6-10}$ 芳基、5-10员杂芳基,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $R^{gg}$ 基团取代,或两个 $R^{dd}$ 取代基可接合从而形成 $=O$ 或 $=S$ ;  $R^{ee}$ 的各实例独立地选自 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 全卤烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{2-6}$ 炔基、 $C_{3-10}$ 碳环基、 $C_{6-10}$ 芳基、3-10员杂环基及3-10员杂芳基,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $R^{gg}$ 基团取代; $R^{ff}$ 的各实例独立地选自氢、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 全卤烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{2-6}$ 炔基、 $C_{3-10}$ 碳环基、3-10员杂环基、 $C_{6-10}$ 芳基及5-10员杂芳基,或两个 $R^{ff}$ 基团接合从而形成3-14员杂环基或5-14员杂芳基环,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $R^{gg}$ 基团取代;以及 $R^{gg}$ 的各实例独立地为卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SO_2H$ 、 $-SO_3H$ 、 $-OH$ 、 $-OC_{1-6}alkyl$ 、 $-ON(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)_3^+X^-$ 、 $-NH(C_{1-6}烷基)_2^+X^-$ 、 $-NH_2(C_{1-6}烷基)^+X^-$ 、 $-NH_3^+X^-$ 、 $-N(OC_{1-6}烷基)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-N(OH)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-NH(OH)$ 、 $-SH$ 、 $-SC_{1-6}烷基$ 、 $-SS(C_{1-6}烷基)$ 、 $-C(=O)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2(C_{1-6}烷基)$ 、 $-OC(=O)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-OCO_2(C_{1-6}烷基)$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-OC(=O)NH(C_{1-6}烷基)$ 、 $-NHC(=O)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)C(=O)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-NHC(=O)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-NHC(=O)N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-NHC(=O)NH(C_{1-6}烷基)$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-C(=NH)O(C_{1-6}烷基)$ 、 $-OC(=NH)(C_{1-6}烷基)$ 、 $-OC(=NH)OC_{1-6}烷基$ 、 $-C(=NH)N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-C(=NH)NH(C_{1-6}烷基)$ 、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-OC(=NH)N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-OC(NH)NH(C_{1-6}烷基)$ 、 $-OC(NH)NH_2$ 、 $-NHC(NH)N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-NHSO_2(C_{1-6}烷基)$ 、 $-SO_2N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-SO_2NH(C_{1-6}烷基)$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2C_{1-6}烷基$ 、 $-SO_2OC_{1-6}烷基$ 、 $-OSO_2C_{1-6}烷基$ 、 $-SOC_{1-6}烷基$ 、 $-Si(C_{1-6}烷基)_3$ 、 $-Osi(C_{1-6}烷基)_3$ 、 $-C(=S)N(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-C(=S)NH(C_{1-6}烷基)$ 、 $-C(=S)NH_2$ 、 $-C(=O)S(C_{1-6}烷基)$ 、 $-C(=S)SC_{1-6}烷基$ 、 $-SC(=S)SC_{1-6}烷基$ 、 $-P(=O)_2(C_{1-6}烷基)$ 、 $-P(=O)(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-OP(=O)(C_{1-6}烷基)_2$ 、 $-OP(=O)(OC_{1-6}烷基)_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 全卤烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{2-6}$ 炔基、 $C_{3-10}$ 碳环基、 $C_{6-10}$ 芳基、3-10员杂环基、5-10员杂芳基;或两个 $R^{gg}$ 取代基可接合从而形成 $=O$ 或 $=S$ ;其中 $X^-$ 为相对离子。

[0185] 「卤基」或「卤素」系指氟(氟基、 $-F$ )、氯(氯基、 $-Cl$ )、溴(溴基、 $-Br$ )或碘(碘基、 $-I$ )。

[0186] 如本文所用,「酰基」系指选自由以下组成的群的部分: $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-CHO$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$ 、 $-C(=S)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR^{aa}$ 及 $-C(=S)SR^{aa}$ ,其中 $R^{aa}$ 及 $R^{bb}$ 如本文所定义。

[0187] 价数允许时,氮原子可经取代或未经取代,且包括一级、二级、三级及四级氮原子。例示性氮原子取代基包括(但不限于)氢、-OH、-OR<sup>aa</sup>、-N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-CN、-C(=O)R<sup>aa</sup>、-C(=O)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>、-C(=NR<sup>bb</sup>)R<sup>aa</sup>、-C(=NR<sup>cc</sup>)OR<sup>aa</sup>、-C(=NR<sup>cc</sup>)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>R<sup>cc</sup>、-SO<sub>2</sub>OR<sup>cc</sup>、-SOR<sup>aa</sup>、-C(=S)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-C(=O)SR<sup>cc</sup>、-C(=S)SR<sup>cc</sup>、-P(=O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>、-P(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>、-P(=O)<sub>2</sub>N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-P(=O)(NR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、C<sub>1-10</sub>烷基、C<sub>1-10</sub>全卤烷基、C<sub>2-10</sub>烯基、C<sub>2-10</sub>炔基、C<sub>3-10</sub>碳环基、3-14员杂环基、C<sub>6-14</sub>芳基及5-14员杂芳基,或连接至氮原子的两个R<sup>cc</sup>基团接合从而形成3-14员杂环基或5-14员杂芳基环,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个R<sup>dd</sup>基团取代,且其中R<sup>aa</sup>、R<sup>bb</sup>、R<sup>cc</sup>及R<sup>dd</sup>如上文所定义。

[0188] 在某些实施例中,存在于氮原子上的取代基为氮保护基(亦称为胺基保护基)。氮保护基包括(但不限于)-OH、-OR<sup>aa</sup>、-N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-C(=O)R<sup>aa</sup>、-C(=O)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>、-C(=NR<sup>cc</sup>)R<sup>aa</sup>、-C(=NR<sup>cc</sup>)OR<sup>aa</sup>、-C(=NR<sup>cc</sup>)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>R<sup>cc</sup>、-SO<sub>2</sub>OR<sup>cc</sup>、-SOR<sup>aa</sup>、-C(=S)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>、-C(=O)SR<sup>cc</sup>、-C(=S)SR<sup>cc</sup>、C<sub>1-10</sub>烷基(例如芳烷基、杂芳烷基)、C<sub>2-10</sub>烯基、C<sub>2-10</sub>炔基、C<sub>3-10</sub>碳环基、3-14员杂环基、C<sub>6-14</sub>芳基及5-14员杂芳基,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳烷基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个R<sup>dd</sup>基团取代,且其中R<sup>aa</sup>、R<sup>bb</sup>、R<sup>cc</sup>及R<sup>dd</sup>如本文所定义。氮保护基为此项技术中熟知的且包括Protecting Groups in Organic Synthesis, T.W. Greene及P.G.M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999中所描述的氮保护基,所述文献以引用的方式并入本文中。

[0189] 举例而言,氮保护基,诸如酰胺基(例如,-C(=O)R<sup>aa</sup>),包括(但不限于)甲酰胺、乙酰胺、氯乙酰胺、三氯乙酰胺、三氟乙酰胺、苯基乙酰胺、3-苯基丙酰胺、吡啶酰胺、3-吡啶基甲酰胺、N-苯甲酰基苯丙胺酰基衍生物、苯甲酰胺、对苯基苯甲酰胺、邻硝基苯基乙酰胺、邻硝基苯氧基乙酰胺、乙酰乙酰胺、(N'-二硫苯甲氧基酰胺基)乙酰胺、3-(对羟苯基)丙酰胺、3-(邻硝基苯基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻硝基苯氧基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻苯基偶氮基苯氧基)丙酰胺、4-氯丁酰胺、3-甲基-3-硝基丁酰胺、邻硝基肉桂酰胺、N-乙酰基甲硫胺酸衍生物、邻硝基苯甲酰胺及邻(苯甲酰氧基甲基)苯甲酰胺。

[0190] 氮保护基,诸如胺基甲酸酯基(例如-C(=O)OR<sup>aa</sup>),包括(但不限于)胺基甲酸甲酯、胺基甲酸乙酯、胺基甲酸9-苄基甲酯(Fmoc)、胺基甲酸9-(2-磺酸基)苄基甲酯、胺基甲酸9-(2,7-二溴)苄基甲酯、胺基甲酸2,7-二第三丁基-[9-(10,10-二侧氧基-10,10,10,10-四氢噻吨基)]甲酯(DBD-Tmoc)、胺基甲酸4-甲氧基苯甲酰甲酯(Phenoc)、胺基甲酸2,2,2-三氯乙酯(Troc)、胺基甲酸2-三甲基硅烷基乙酯(Teoc)、胺基甲酸2-苯基乙酯(hZ)、1-(1-金刚烷基)-1-甲基乙基(Adpoc)、胺基甲酸1,1-二甲基-2-卤基乙酯、胺基甲酸1,1-二甲基-2,2-二溴乙酯(DB-t-BOC)、胺基甲酸1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙酯(TCBOC)、胺基甲酸1-甲基-1-(4-联苯基)乙酯(Bpoc)、胺基甲酸1-(3,5-二第三丁基苯基)-1-甲基乙酯(t-Bumeoc)、胺基甲酸2-(2'-及4'-吡啶基)乙酯(Pyoc)、胺基甲酸2-(N,N-二环己基甲酰胺基)乙酯、胺基甲酸第三丁酯(BOC)、胺基甲酸1-金刚烷基酯(Adoc)、胺基甲酸乙烯酯(Voc)、胺基甲酸烯丙酯(Alloc)、胺基甲酸1-异丙基烯丙酯(Ipaoc)、胺基甲酸桂皮酯(Coc)、胺基甲酸4-硝基桂皮酯(Noc)、胺基甲酸8-喹啉基酯、胺基甲酸N-羟基哌啶基酯、胺基甲酸烷基二硫基酯、胺基甲酸苄基酯(Cbz)、胺基甲酸对甲氧基苯甲酯(Moz)、胺基甲酸对硝基苯甲酯、胺基甲酸对溴苯甲酯、胺基甲酸对氯苯甲酯、胺基甲酸2,4-二氯苯甲酯、胺基甲酸4-甲基亚磺酰基苯甲酯(Msz)、胺基甲酸9-蒎基甲酯、胺基甲酸二苯甲酯、胺基甲酸2-甲基硫乙酯、胺基甲酸2-甲基

磺酰基乙酯、胺基甲酸2-(对甲苯磺酰基)乙酯、胺基甲酸[2-(1,3-二噻烷基)]甲酯(Dmoc)、胺基甲酸4-甲基噻吩基酯(Mtpc)、胺基甲酸2,4-二甲基噻吩基酯(Bmpc)、胺基甲酸2-磷鎓基乙酯(Peoc)、胺基甲酸2-三苯基磷鎓基异丙酯(Ppoc)、胺基甲酸1,1-二甲基-2-氰基乙酯、胺基甲酸间氯对酰氧基苯甲酯、胺基甲酸对(二羟基氧硼基)苯甲酯、胺基甲酸5-苯并异恶唑基甲酯、胺基甲酸2-(三氟甲基)-6-色酮基甲酯(Tcroc)、胺基甲酸间硝基苯基酯、胺基甲酸3,5-二甲氧基苯甲酯、胺基甲酸邻硝基苯甲酯、胺基甲酸3,4-二甲氧基-6-硝基苯甲酯、胺基甲酸苯基(邻硝基苯基)甲酯、胺基甲酸第三戊酯、硫胺基甲酸S-苯甲酯、胺基甲酸对氰基苯甲酯、胺基甲酸环丁酯、胺基甲酸环己酯、胺基甲酸环戊酯、胺基甲酸环丙基甲酯、胺基甲酸对癸氧基苯甲酯、胺基甲酸2,2-二甲氧基酰基乙烯酯、胺基甲酸邻(N,N-二甲基甲酰胺基)苯甲酯、胺基甲酸1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲酰胺基)丙酯、胺基甲酸1,1-二甲基丙炔酯、胺基甲酸二(2-吡啶基)甲酯、胺基甲酸2-呋喃基甲酯、胺基甲酸2-碘乙酯、胺基甲酸异冰片基酯、胺基甲酸异丁酯、胺基甲酸异烟碱基酯、胺基甲酸对-(对'-甲氧基苯基偶氮基)苯甲酯、胺基甲酸1-甲基环丁酯、胺基甲酸1-甲基环己酯、胺基甲酸1-甲基-1-环丙基甲酯、胺基甲酸1-甲基-1-(3,5-二甲氧基苯基)乙酯、胺基甲酸1-甲基-1-(对苯基偶氮基苯基)乙酯、胺基甲酸1-甲基-1-苯基乙酯、胺基甲酸1-甲基-1-(4-吡啶基)乙酯、胺基甲酸苯酯、胺基甲酸对(苯基偶氮基)苯甲酯、胺基甲酸2,4,6-三第三丁基苯酯、胺基甲酸4-(三甲基铵)苯甲酯及胺基甲酸2,4,6-三甲基苯甲酯。

[0191] 氮保护基,诸如磺酰胺基(例如, $-S(=O)_2R^{aa}$ ),包括(但不限于)对甲苯磺酰胺(Ts)、苯磺酰胺、2,3,6,-三甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mtr)、2,4,6-三甲氧基苯磺酰胺(Mtb)、2,6-二甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mte)、4-甲氧基苯磺酰胺(Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺酰胺(Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺酰胺(iMds)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰胺(Pmc)、甲烷磺酰胺(Ms)、 $\beta$ -三甲基硅烷基乙烷磺酰胺(SES)、9-蒎磺酰胺、4-(4',8'-二甲氧基萘基甲基)苯磺酰胺(DNMBS)、苯甲基磺酰胺、三氟甲基磺酰胺及苯甲酰甲基磺酰胺。

[0192] 其他氮保护基包括(但不限于)啡噻嗪基-(10)-酰基衍生物、N'-对甲苯磺酰基胺酰基衍生物、N'-苯基胺基硫代酰基衍生物、N-苯甲酰基苯基丙胺酰基衍生物、N-乙酰基甲硫胺酸衍生物、4,5-二苯基-3-恶唑啉-2-酮、N-邻苯二甲酰亚胺、N-二硫杂丁二酰亚胺(Dts)、N-2,3-二苯基顺丁烯二酰亚胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-1,1,4,4-四甲基二硅烷基氮杂环戊烷加合物(STABASE)、5-取代1,3-二甲基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、5-取代1,3-二苯甲基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、1-取代3,5-二硝基-4-羟基、N-甲胺、N-烯丙胺、N-[2-(三甲基硅烷基)乙氧基]甲胺(SEM)、N-3-乙酰氧基丙胺、N-(1-异丙基-4-硝基-2-侧氧基-3-吡咯啉-3-基)胺、四级铵盐、N-苯甲胺、N-二(4-甲氧基苯基)甲胺、N-5-二苯并环庚胺、N-三苯基甲胺(Tr)、N-[(4-甲氧基苯基)二苯甲基]胺(MMTr)、N-9-苯基苄基胺(PhF)、N-2,7-二氯-9-苄基亚甲基胺、N-二茂铁基甲基胺基(Fcm)、N-2-吡啶甲基胺基N'-氧化物、N-1,1-二甲基硫基亚甲基胺、N-苯亚甲基胺、N-对甲氧基苯亚甲基胺、N-二苯基亚甲基胺、N-[(2-吡啶基)2,4,6-三甲苯基]亚甲基胺、N-(N',N'-二甲基胺基亚甲基)胺、N,N'-亚异丙基二胺、N-对硝基苯亚甲基胺、N-亚柳基胺、N-5-氯亚柳基胺、N-(5-氯-2-羟苯基)苯基亚甲基胺、N-亚环己基胺、N-(5,5-二甲基-3-侧氧基-1-环己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基硼酸衍生物、N-[苯基(五酰基铬-或钨)酰基]胺、N-铜螯合剂、N-锌螯合剂、N-硝基胺、N-亚硝基胺、N-氧化胺、

二苯基膦酰胺 (Dpp)、二甲基硫基膦酰胺 (Mpt)、二苯基硫基膦酰胺 (Ppt)、胺基磷酸二烷酯、胺基磷酸二苯甲酯、胺基磷酸二苯酯、苯亚磺酰胺、邻硝基苯亚磺酰胺 (Nps)、2,4-二硝基苯亚磺酰胺、五氯苯亚磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯亚磺酰胺、三苯基甲基亚磺酰胺及3-硝基吡啶亚磺酰胺 (Npys)。

[0193] 在某些实施例中,存在于氧原子上的取代基为氧保护基(亦称为羟基保护基)。氧保护基包括(但不限于)  $-R^{aa}$ 、 $-N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR^{aa}$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-S(=O)R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-Si(R^{aa})_3$ 、 $-P(R^{cc})_2$ 、 $-P(R^{cc})_3$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{cc})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$ 及 $-P(=O)(NR^{bb})_2$ ,其中 $R^{aa}$ 、 $R^{bb}$ 及 $R^{cc}$ 如本文所定义。氧保护基为此项技术中熟知的且包括Protecting Groups in Organic Synthesis, T.W. Greene及P.G.M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999中所描述的氧保护基, 所述文献以引用的方式并入本文中。

[0194] 例示性氧保护基包括(但不限于)甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲硫基甲基(MTM)、第三丁基硫甲基、(苯基二甲基硅烷基)甲氧基甲基(SMOM)、苯甲氧基甲基(BOM)、对甲氧基苯甲氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(p-AOM)、愈创木酚甲基(GUM)、第三丁氧基甲基、4-戊烯氧基甲基(POM)、硅烷氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、双(2-氯乙氧基)甲基、2-(三甲基硅烷基)乙氧基甲基(SEMOR)、四氢吡喃基(THP)、3-溴四氢吡喃基、四氢硫代吡喃基、1-甲氧基环己基、4-甲氧基四氢吡喃基(MTHP)、4-甲氧基四氢硫代吡喃基、4-甲氧基四氢硫代吡喃基S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基吡啶-4-基(CTMP)、1,4-二恶烷-2-基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-甲醇苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苯甲氧基乙基、1-甲基-1-苯甲氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基硅烷基乙基、2-(苯基氢硒基)乙基、第三丁基、烯丙基、对氯苯基、对甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苯甲基(Bn)、对甲氧基苯甲基、3,4-二甲氧基苯甲基、邻硝基苯甲基、对硝基苯甲基、对卤基苯甲基、2,6-二氯苯甲基、对氰基苯甲基、对苯基苯甲基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基N-氧离子基、二苯甲基、对,对'-二硝基二苯甲基、5-二苯并环庚基、三苯甲基、 $\alpha$ -萘基二苯基甲基、对甲氧基苯基二苯基甲基、二(对甲氧基苯基)苯基甲基、三(对甲氧基苯基)甲基、4-(4'-溴苯甲酰甲基氧基苯基)二苯甲基、4,4',4"-参(4,5-二氯邻苯二甲酰亚胺基苯基)甲基、4,4',4"-参(乙酰丙酰基氧基苯基)甲基、4,4',4"-参(苯甲酰氧基苯基)甲基、3-(咪唑-1-基)双(4',4"-二甲氧基苯基)甲基、1,1-双(4-甲氧基苯基)-1'-苄基甲基、9-蒎基、9-(9-苯基)基、9-(9-苯基-10-侧氧基)蒎基、1,3-苯并二硫杂环戊烷-2-基、苯并异噻唑基S,S-二氧离子基、三甲基硅烷基(TMS)、三乙基硅烷基(TES)、三异丙基硅烷基(TIPS)、二甲基异丙基硅烷基(IPDMS)、二乙基异丙基硅烷基(DEIPS)、二甲基第三己基硅烷基、第三丁基二甲基硅烷基(TBDMS)、第三丁基二苯基硅烷基(TBDPS)、三苯甲基硅烷基、三对二甲苯基硅烷基、三苯基硅烷基、二苯基甲基硅烷基(DPMS)、第三丁基甲氧基苯基硅烷基(TBMPS)、甲酸酯、苯甲酰基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯氧基乙酸酯、对氯苯氧基乙酸酯、3-苯基丙酸酯、4-侧氧基戊酸酯(乙酰丙酸酯)、4,4-(仲乙基二硫基)戊酸酯(乙酰丙酰基二硫缩醛)、新戊酸酯、金刚酸酯、巴豆酸酯、4-甲氧基巴豆酸酯、苯甲酸酯、对苯基苯甲酸酯、2,4,6-三甲基苯甲酸酯(均三甲苯酸酯)、碳酸甲酯、碳酸9-苄基甲酯(Fmoc)、碳酸乙酯、碳

酸2,2,2-三氯乙酯(Troc)、碳酸2-(三甲基硅烷基)乙酯(TMSEC)、碳酸2-(苯磺酰基)乙酯(Psec)、碳酸2-(三苯基磷鎓基)乙酯(Peoc)、碳酸异丁酯、碳酸乙烯基酯、碳酸烯丙基酯、碳酸第三丁酯(BOC)、碳酸对硝基苯酯、碳酸苯甲酯、碳酸对甲氧基苯甲酯、碳酸3,4-二甲氧基苯甲酯、碳酸邻硝基苯甲酯、碳酸对硝基苯甲酯、硫代碳酸S-苯甲酯、碳酸4-乙氧基-1-萘基酯、二硫代碳酸甲酯、2-碘苯甲酸酯、4-迭氮基丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、邻(二溴甲基)苯甲酸酯、2-甲酰基苯磺酸酯、2-(甲基硫代甲氧基)乙基、4-(甲基硫代甲氧基)丁酸酯、2-(甲基硫代甲氧基甲基)苯甲酸酯、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸酯、2,6-二氯-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯氧基乙酸酯、2,4-双(1,1-二甲基丙基)苯氧基乙酸酯、氯二苯基乙酸酯、异丁酸酯、单丁二酸酯、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、邻(甲氧基酰基)苯甲酸酯、 $\alpha$ -萘甲酸酯、硝酸酯、N,N,N',N'-四甲基二胺基磷酸酯、N-苯基胺基甲酸烷基酯、硼酸酯、二甲基膦基亚硫酰基、2,4-二硝基苯基亚磺酸烷基酯、硫酸酯、甲磺酸酯(甲磺酸酯)、苯甲基磺酸酯及甲苯磺酸酯(Ts)。

[0195] 在某些实施例中,存在于硫原子上的取代基为硫保护基(亦称为硫醇保护基)。硫保护基包括(但不限于)  $-R^{aa}$ 、 $-N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR^{aa}$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-S(=O)R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-Si(R^{aa})_3$ 、 $-P(R^{cc})_2$ 、 $-P(R^{cc})_3$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{cc})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$ 及 $-P(=O)(NR^{bb})_2$ ,其中 $R^{aa}$ 、 $R^{bb}$ 及 $R^{cc}$ 如本文所定义。硫保护基为此项技术中熟知的且包括Protecting Groups in Organic Synthesis,T.W.Greene及P.G.M.Wuts,第3版,John Wiley&Sons,1999中所描述的硫保护基,所述文献以引用的方式并入本文中。

[0196] 如本文所用,术语「离去基」具有合成有机化学技术中的一般含义且系指能够经亲核试剂置换的原子或基团。适合离去基的实例包括(但不限于)卤素(诸如F、Cl、Br或I(碘))、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、烷磺酰基氧基、芳基磺酰基氧基、烷基-羰氧基(例如乙酰氧基)、芳基羰氧基、芳氧基、甲氧基、N,0-二甲基羟胺基、9-苯基咕吨(9-phenylxanthyl, pixyl)及卤基甲酸酯。在一些情况下,离去基为磺酸酯,诸如甲苯磺酸酯(-OTf)、甲磺酸酯(-OM)、对溴苯磺酸酯(-OB)或三氟甲磺酸酯(-OTf)。在一些情况下,离去基为溴苯磺酸酯,诸如对溴苯磺酰基氧基。在一些情况下,离去基为硝基苯磺酸酯,诸如2-硝基苯磺酰基氧基。在一些实施例中,离去基为含磺酸酯的基团。在一些实施例中,离去基为甲苯磺酸酯基。离去基亦可为氧化膦(例如在光延反应(Mitsunobu reaction)期间形成)或内部脱离基,诸如环氧化物或环状硫酸酯。离去基的其他非限制性实例为水、氨、醇、醚部分、硫醚部分、卤化锌、镁部分、重氮盐及铜部分。

[0197] 例示性 $\alpha$ -GalCer类似物(具有 $\alpha$ -Glc的GSL)用作免疫佐剂从而通过刺激已经疫苗接种的患者的免疫系统而加速、增强、延长及/或调节或强化疫苗的效应。在一个例示性实施方案中,类似物C34用作佐剂。如本文所用,术语「免疫佐剂」系指具有免疫佐剂活性的铝盐,诸如磷酸铝及氢氧化铝。这些例示性药剂可吸附溶液中的蛋白质抗原且使其沉淀;所得沉淀物通过促进接种位点处所形成的疫苗储槽中的抗原缓慢释放来改良疫苗免疫原性。另外,本文中涵盖的佐剂亦可包括适合的有机佐剂及适合的病毒颗粒。在某些实施例中,例示性有机佐剂可包括基于油的佐剂,诸如角鲨烯、MF59、QS-21及AS03。

[0198] 如本文所用,术语「抗肿瘤免疫疗法活性剂」系指单独及/或与其他协同剂组合的通过本发明的疫苗产生的抑制、减小及/或消除肿瘤的抗体。



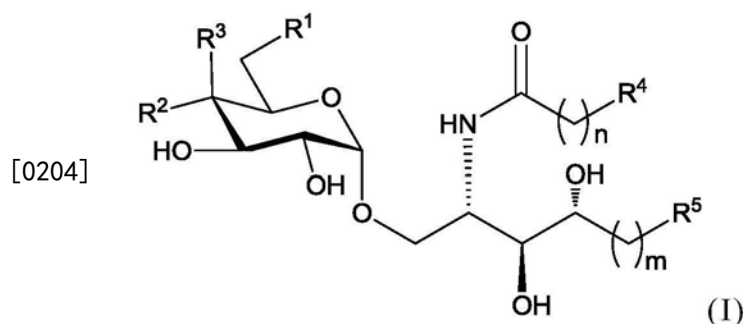
[0199] 已知携带 $\alpha$ -半乳糖苷基( $\alpha$ Gal)及在酰基链上的苯环的鞘糖脂(GSL)与 $\alpha$ -半乳糖苷基神经酰胺( $\alpha$ GalCer)相比更有效地刺激鼠类及人类恒定型NKT(iNKT)细胞。其在小鼠及人类中的活性与iNKT TCR与CD1d-GSL复合物之间的三元相互作用的结合亲和力相关。

[0200] 本发明涉及以下出人意料的发现,具有葡萄糖( $\alpha$ Glc)的GSL与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比在诱导细胞激素/趋化激素及免疫细胞扩增/激活的方面对于人类较强,但对于小鼠较弱。本文揭示具有葡萄糖( $\alpha$ Glc)及 $\alpha$ Glc的F衍生物的GSL及其对于在人类中的免疫刺激性活性的影响。本文描述各物种的与三元相互作用强度相关联的免疫刺激效能。如由本文中所揭示的mCD1d相较于hCD1d调换分析所证明,指出物种特异性反应的为iNKT TCR而非CD1d。具有 $\alpha$ Glc的鞘糖脂(GSL)与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比携有较强三元相互作用且在人类中触发更加偏向Th1的免疫。具有 $\alpha$ Glc的GSL与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比在小鼠中的刺激较小。如由如本文所述的mCD1d相较于hCD1d调换分析所证实,物种特异性反应归因于物种之间三元复合物的差异性结合亲和力,反映鼠类及人类iNKT TCR之间的差异。

[0201] 这些新颖的发现指示物种中的差异且提供在糖基上具有修饰而更有效地用于人类疗法的GSL的新颖设计。

[0202] 化合物

[0203] 本发明涉及式(I)的例示性免疫佐剂化合物:



[0205] 或其医药学上可接受的盐;其中 $R^1$ 为-OH或卤素; $R^2$ 为-OH、氢或卤素; $R^3$ 为氢或卤素; $R^4$ 及 $R^5$ 各自独立地选自由以下组成的群:氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的碳环基、视情况经取代的芳基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的杂芳基、视情况经取代的烷氧基、视情况经取代的胺基或视情况经取代的酰基; $n$ 为1至15的整数,包括本数;以及 $m$ 为1至20的整数,包括本数。

[0206] 在化合物(I)的一些实施例中, $R^2$ 为-OH。在化合物(I)的一些实施例中, $R^2$ 为氢。在化合物(I)的一些实施例中, $R^2$ 为卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^2$ 为F。在化合物(I)的一些实施例中, $R^2$ 为Cl。在化合物(I)的一些实施例中, $R^2$ 为Br。在化合物(I)的一些实施例中, $R^2$ 为I。

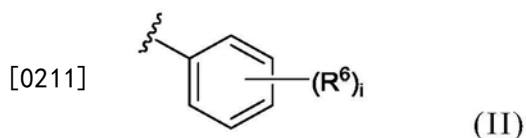
[0207] 在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为-OH。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为F。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为Cl。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为Br。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为I。

[0208] 在化合物(I)的一些实施例中, $R^3$ 为氢。在化合物(I)的一些实施例中, $R^3$ 为卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^3$ 为F。在化合物(I)的一些实施例中, $R^3$ 为Cl。在化合物(I)的一些实施例中, $R^3$ 为Br。在化合物(I)的一些实施例中, $R^3$ 为I。

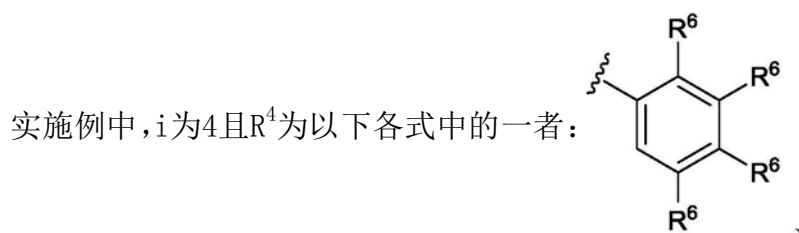
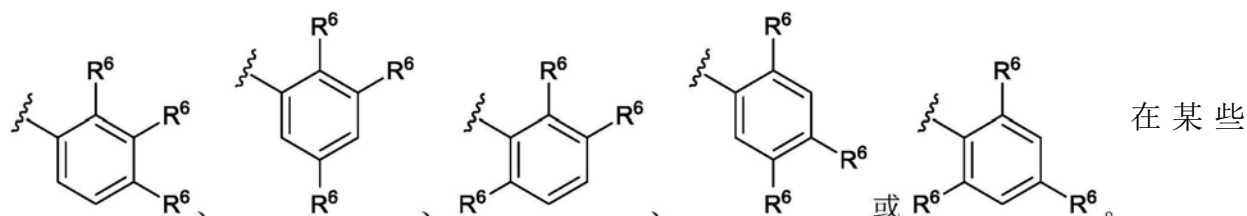
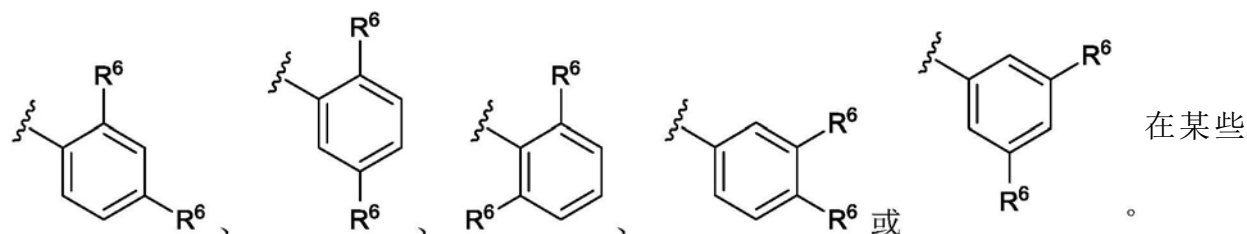
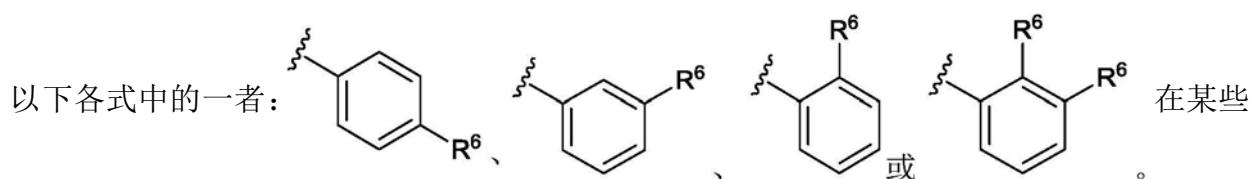
[0209] 在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为-OH; $R^2$ 为-OH、氢或卤素;以及 $R^3$ 为OH、氢或卤

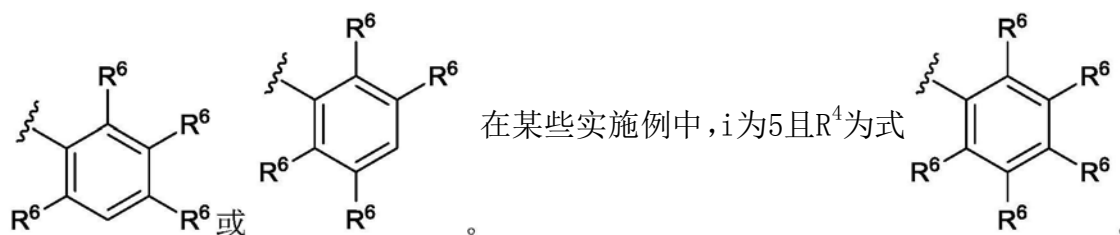
素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为-OH; $R^2$ 为-OH;以及 $R^3$ 为氢或卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为-OH; $R^2$ 为氢;以及 $R^3$ 为氢或卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为-OH; $R^2$ 为卤素;以及 $R^3$ 为氢或卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为卤素; $R^2$ 为-OH、氢或卤素;以及 $R^3$ 为氢或卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为卤素; $R^2$ 为氢;以及 $R^3$ 为OH、氢或卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为卤素; $R^2$ 为氢;以及 $R^3$ 为氢或卤素。在化合物(I)的一些实施例中, $R^1$ 为卤素; $R^2$ 为卤素;以及 $R^3$ 为氢或卤素。

[0210] 在化合物(I)的一些实施例中, $R^4$ 为苯基。在一些实施例中, $R^4$ 为式(II)的视情况经取代的苯基:



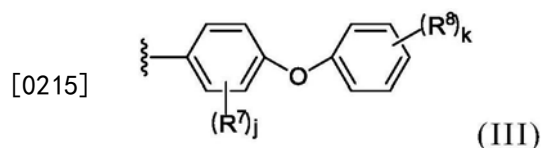
[0212] 其中 $i=0,1,2,3,4$ 或 $5$ ;  $R^6$ 的各实例独立地选自由以下组成的群:氢、卤素、-CN、-NO<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的碳环基、视情况经取代的苯基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的杂芳基、视情况经取代的烷氧基、视情况经取代的胺基或视情况经取代的酰基。在某些实施例中, $i$ 为0。在某些实施例中, $i$ 为1。在某些实施例中, $i$ 为2。在某些实施例中, $i$ 为3。在某些实施例中, $i$ 为4。在某些实施例中, $i$ 为5。在某些实施例中, $i$ 为1且 $R^6$ 为卤素。在某些实施例中, $i$ 为1且 $R^4$ 为



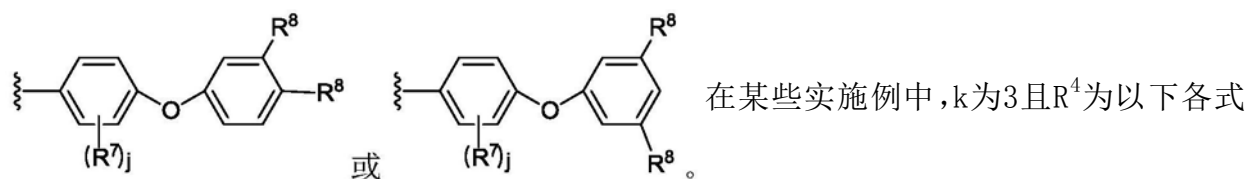
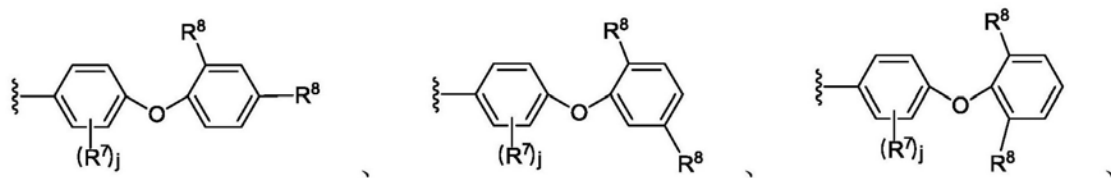
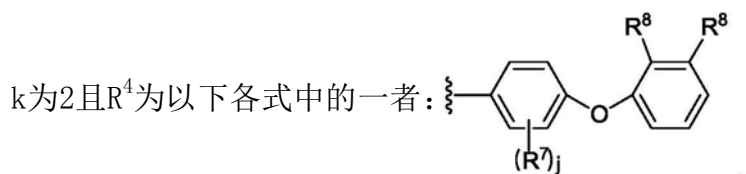
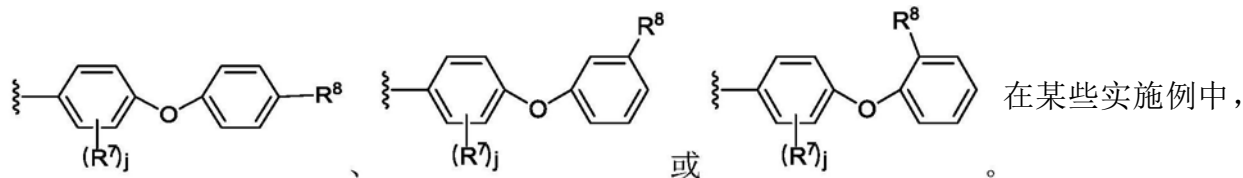


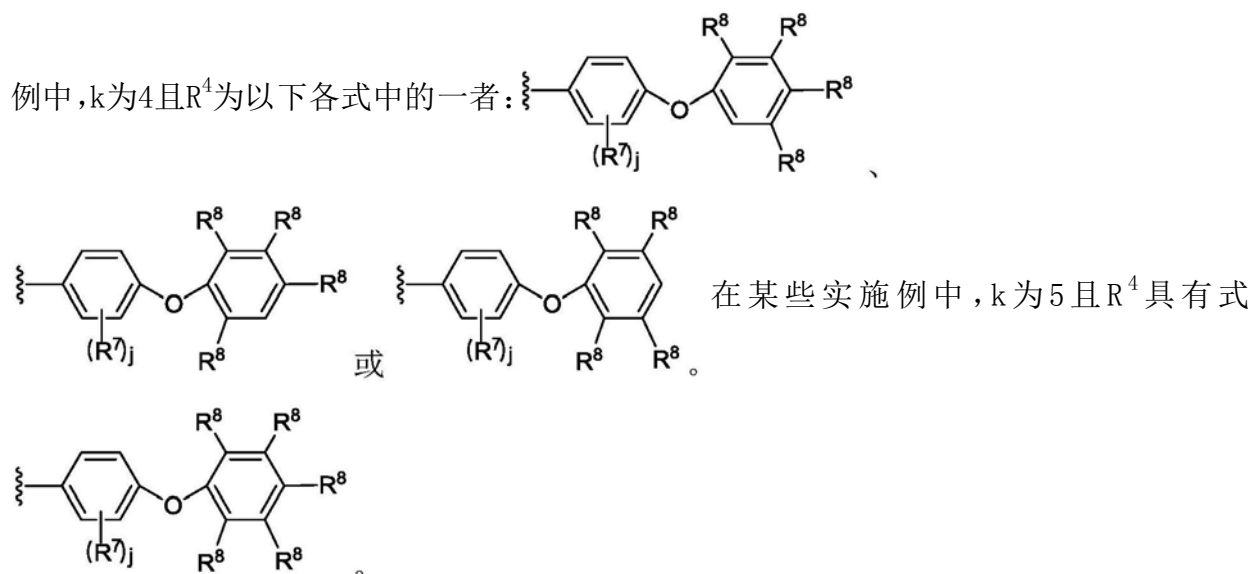
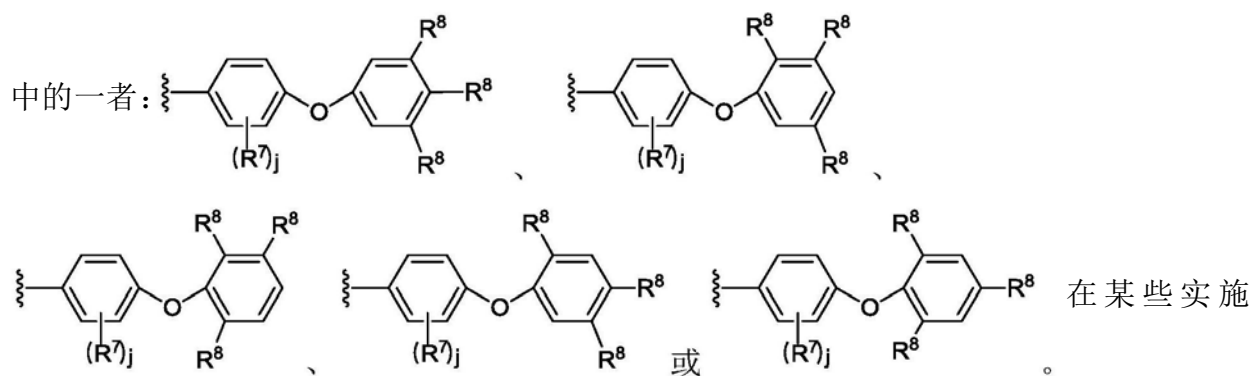
[0213] 在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^6$  为卤素。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^6$  为 F。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^6$  为 Cl。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^6$  为 Br。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^6$  为 I。

[0214] 在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^4$  为视情况经取代的芳基。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^4$  具有式 (III) :



[0216] 其中  $j$  为 0、1、2、3 或 4;  $k$  为 0、1、2、3、4 或 5;  $R^7$  及  $R^8$  的各实例系独立地选自由以下组成的群: 氢、卤素、-CN、-NO<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的碳环基、视情况经取代的苯基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的杂芳基、视情况经取代的烷氧基、视情况经取代的胺基或视情况经取代的酰基。在某些实施例中,  $k$  为 0。在某些实施例中,  $k$  为 1。在某些实施例中,  $k$  为 2。在某些实施例中,  $k$  为 3。在某些实施例中,  $k$  为 4。在某些实施例中,  $k$  为 5。在某些实施例中,  $k$  为 1 且  $R^8$  为卤素。在某些实施例中,  $k$  为 1 且  $R^4$  为以下各式中的一者:



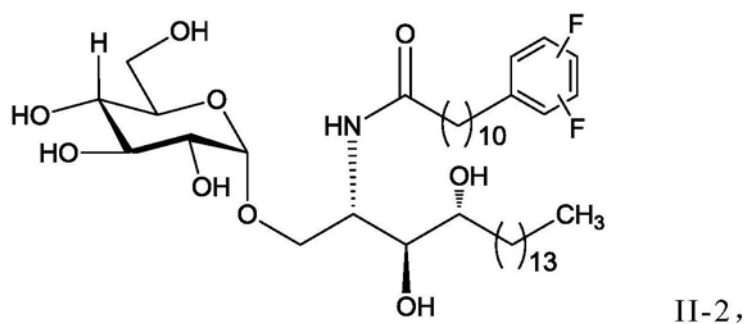
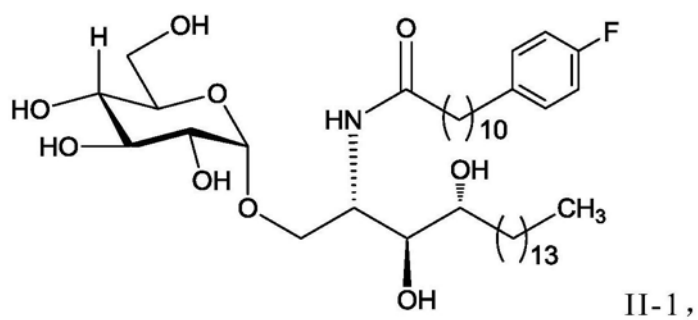


[0217] 在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 1 至 15 的整数, 包括本数。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 5 至 15 的整数, 包括本数。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 10 至 15 的整数, 包括本数。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 10。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 11。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 12。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 13。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 14。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $n$  为 15。

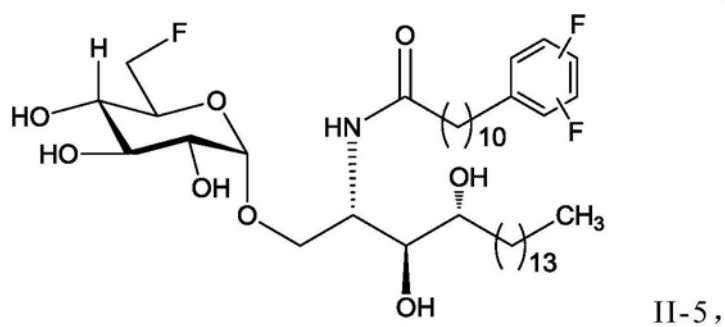
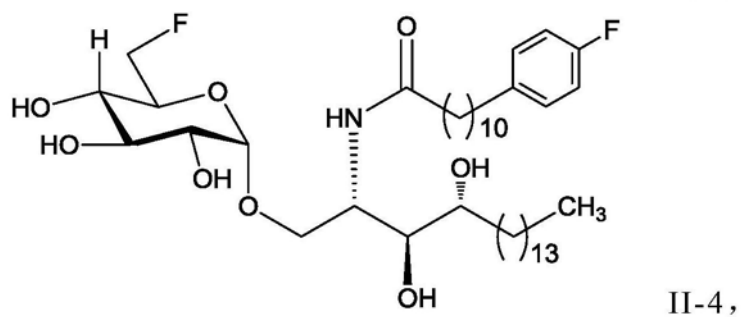
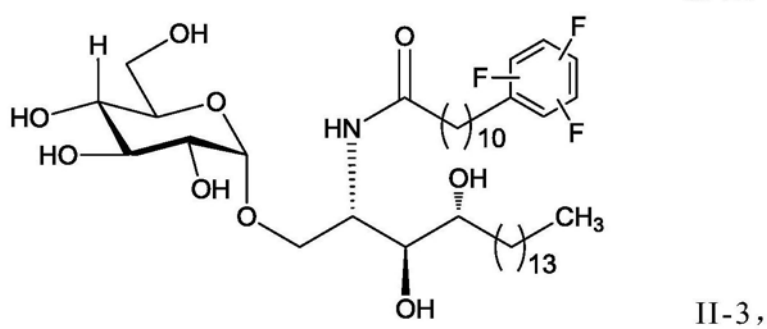
[0218] 在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 1 至 20 的整数, 包括本数。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 5 至 20 的整数, 包括本数。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 5 至 15 的整数, 包括本数。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 10 至 15 的整数, 包括本数。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 10。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 11。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 12。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 13。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 14。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $m$  为 15。

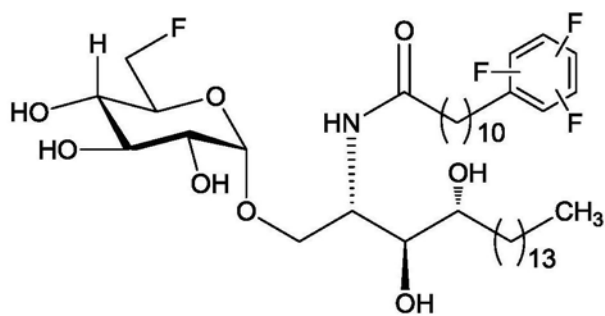
[0219] 在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^7$  为氢;  $R^8$  为 F; 以及  $k$  为 1、2 或 3。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^7$  为 F;  $R^8$  为氢; 以及  $j$  为 1、2 或 3。在化合物 (I) 的一些实施例中,  $R^7$  及  $R^8$  皆为 F;  $k$  为 1、2 或 3; 以及  $j$  为 1、2 或 3。

[0220] 在式 (I) 的一些实施例中, 所提供的化合物为以下化合物中的一者:

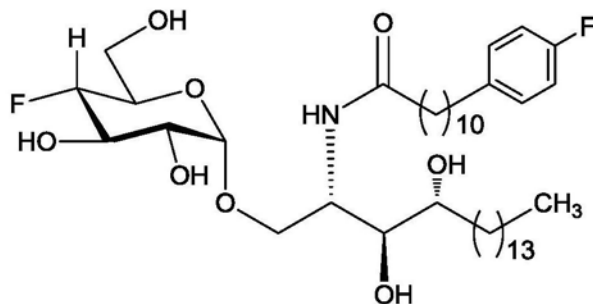


[0221]



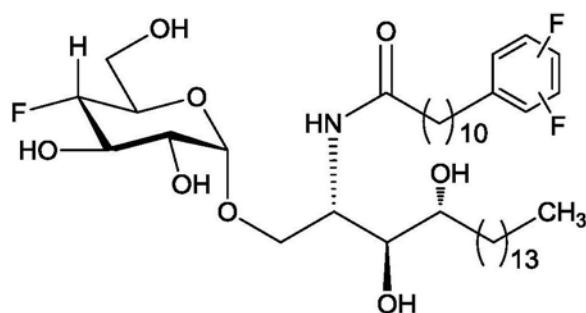


II-6,

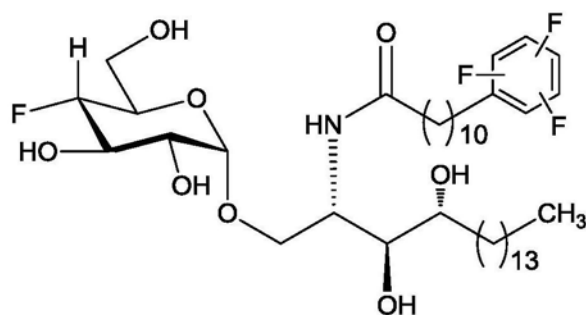


II-7,

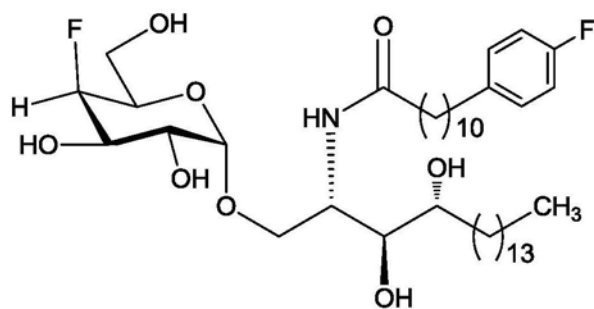
[0222]



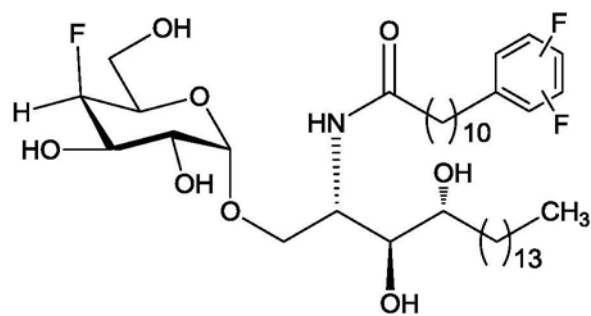
II-8,



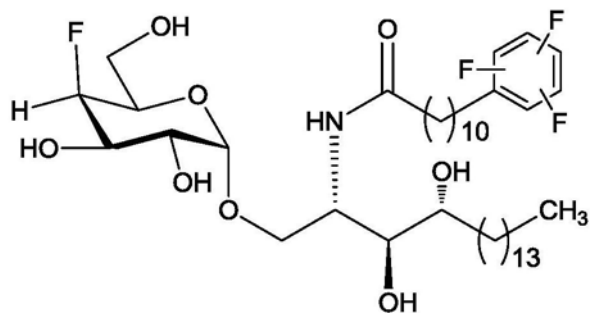
II-9,



II-10,

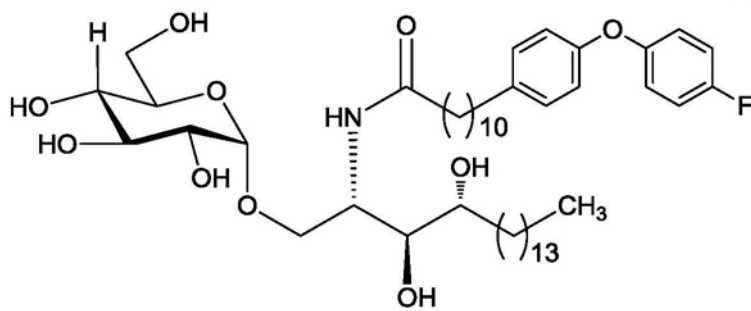


II-11,

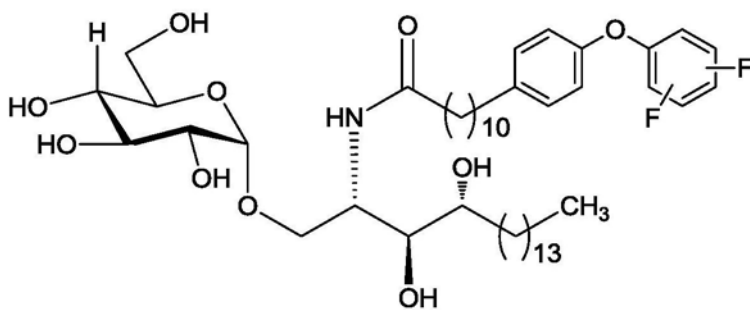


II-12,

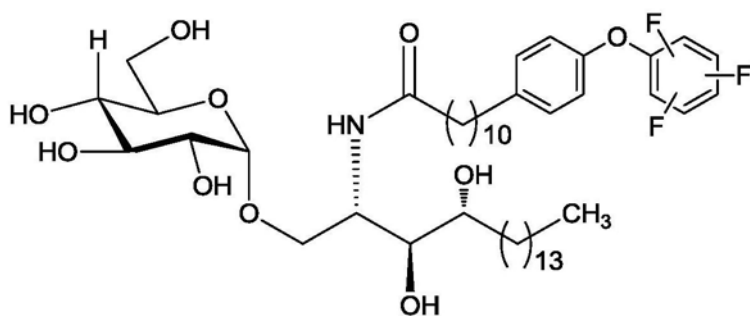
[0223]



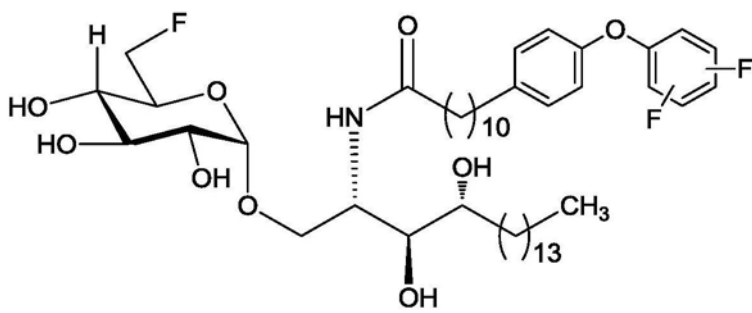
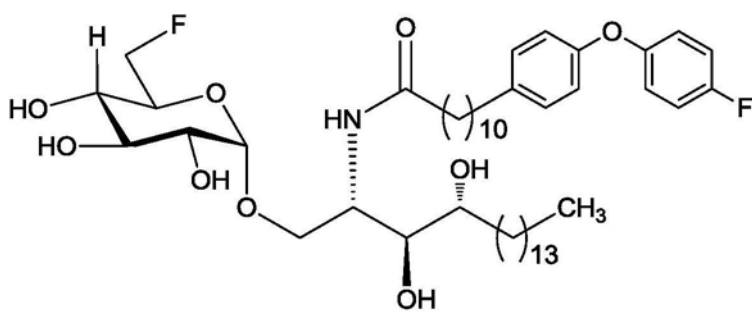
III-1,



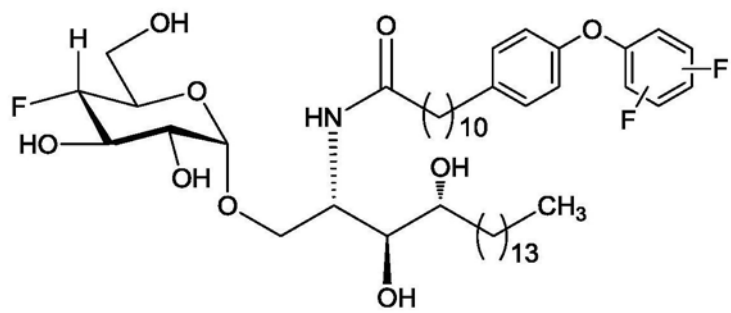
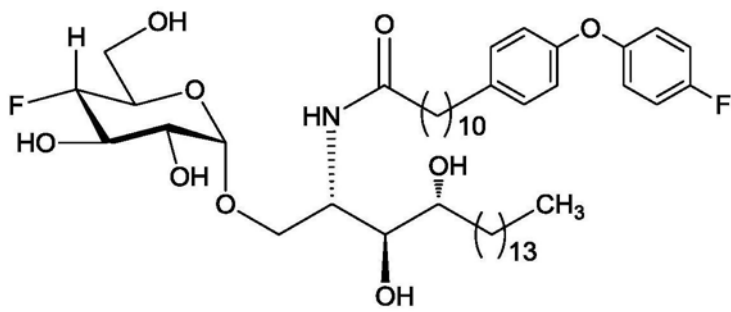
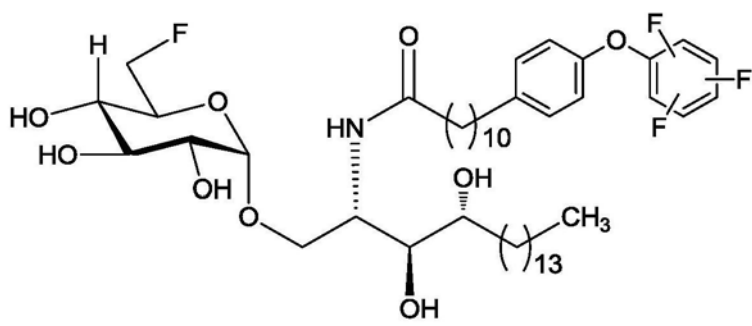
III-2,



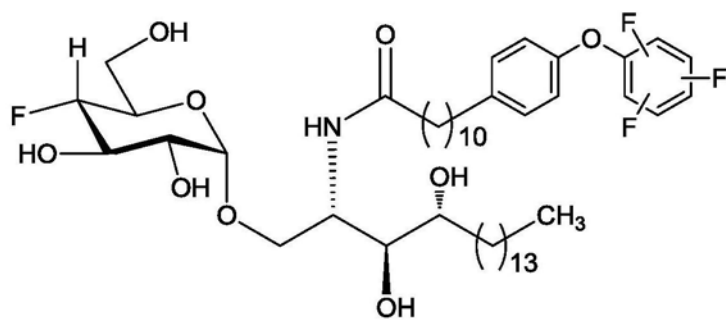
III-3,



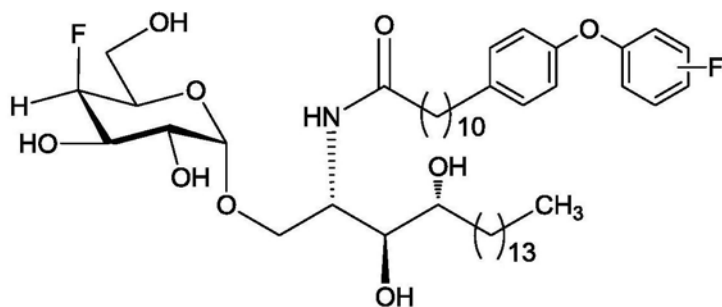
[0224]



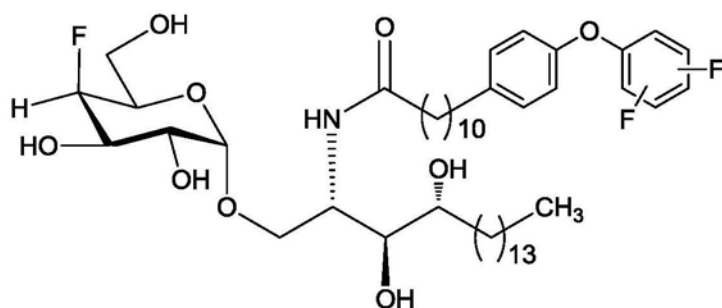




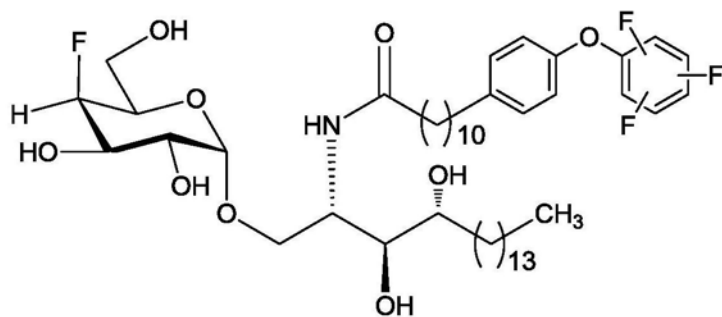
III-9,



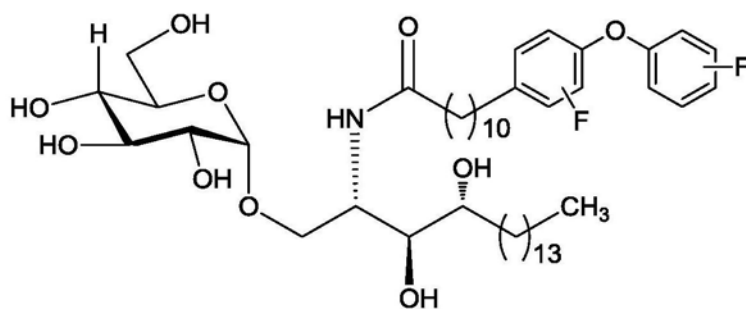
III-10,



III-11,

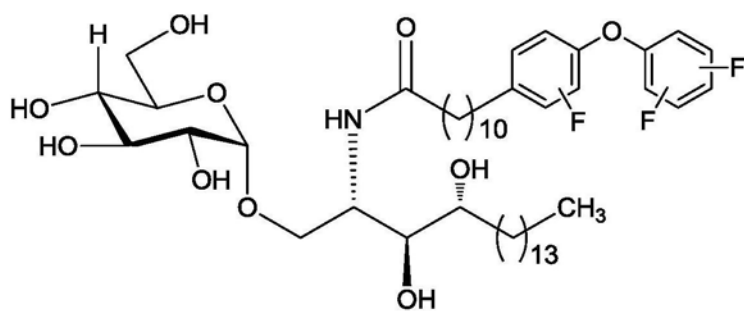


III-12,

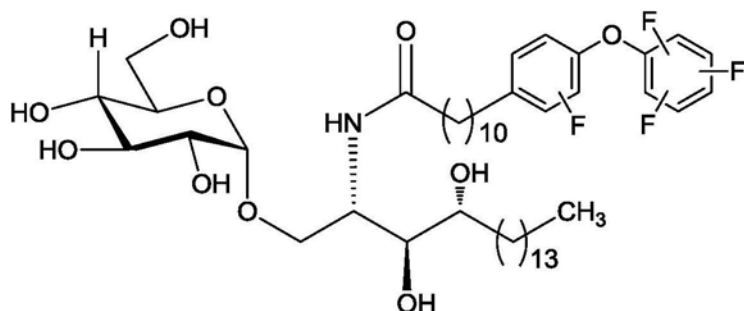


III-13,

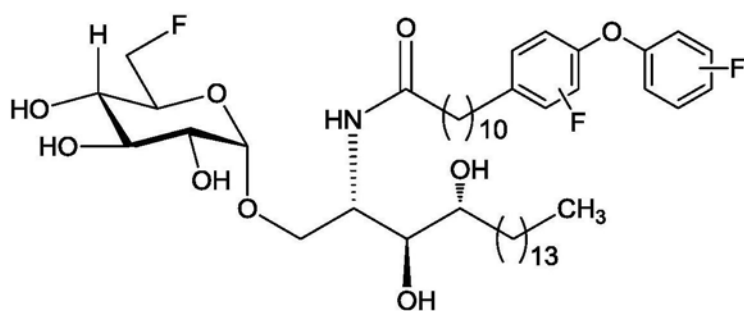
[0225]



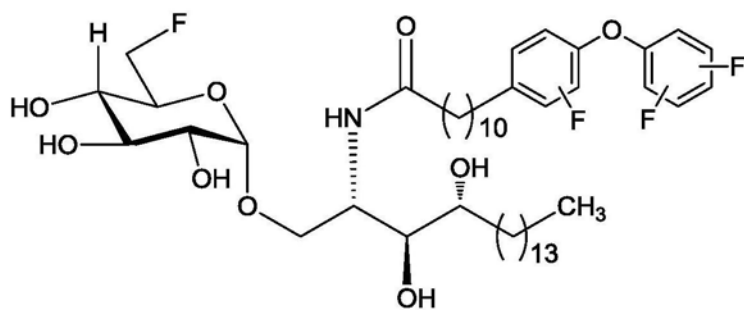
III-14,



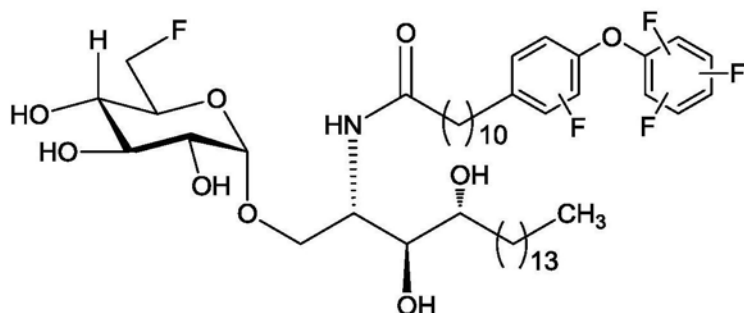
III-15,



III-16,

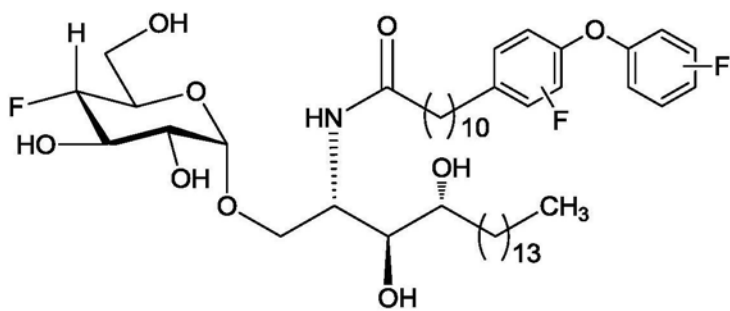


III-17,

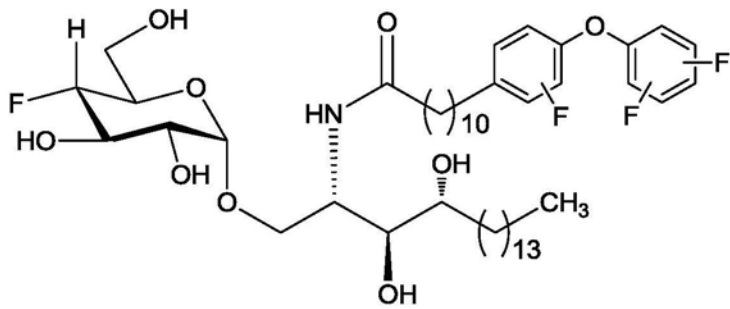


III-18,

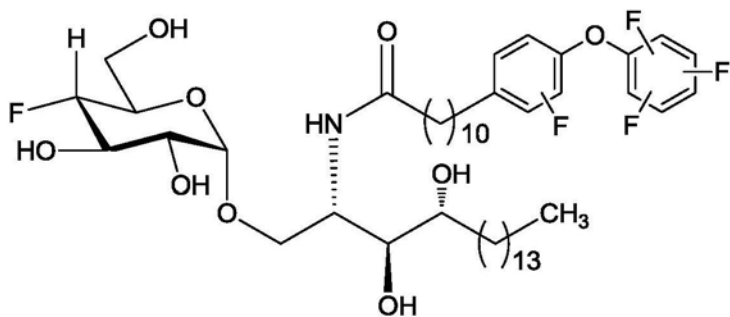
[0226]



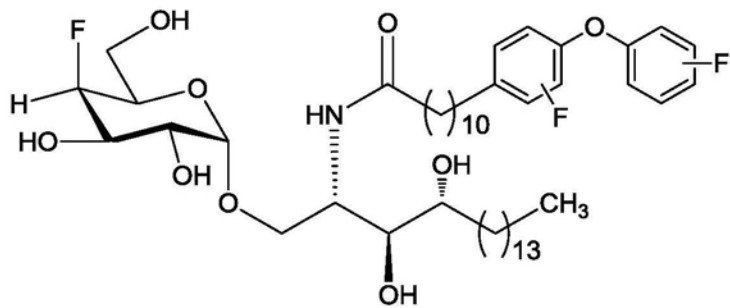
III-19,



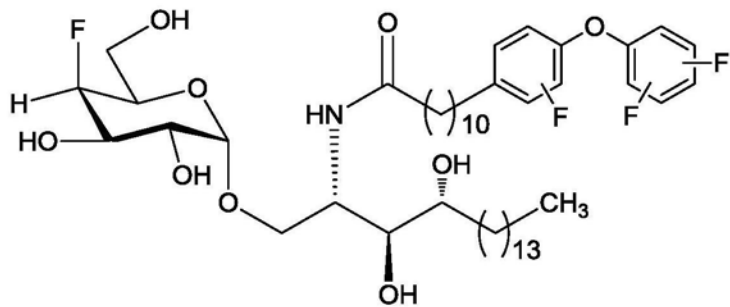
III-20,



III-21,

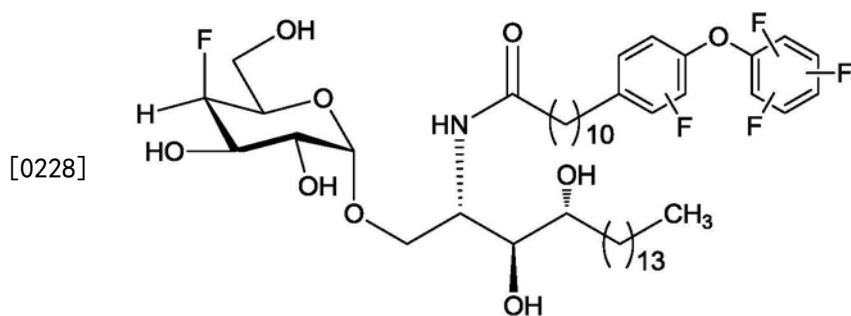


III-22,



III-23,

[0227]



### [0229] 医药组合物

[0230] 本发明提供医药组合物,其包含本文所述的例示性化合物及医药学上可接受的赋形剂。本文中所揭示的组合物可连同额外活性剂、载剂、媒剂、赋形剂或熟习此项技术者在阅读本发明后可鉴别的辅助剂一起包括于医药或营养组合物中。

[0231] 医药组合物优选包含至少一种医药学上可接受的载剂。在此类医药组合物中,本文所揭示的组合物形成「活性化合物」,亦称为「活性剂」。如本文所用,措辞「医药学上可接受的载剂」包括与医药投与相容的溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂及其类似物。亦可将补充活性化合物并入组合物中。医药组合物经调配可与其预期的投药途径兼容。投药途径的实例包括非经肠,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(局部)、经黏膜及经直肠投药。用于非经肠、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、生理盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;及张力调节剂,诸如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。非经肠制剂可封装于由玻璃或塑料制成的安瓿、抛弃式注射器或多剂量小瓶中。

[0232] 如本文所用的个体指人类及非人类灵长类动物(例如大猩猩、猕猴、狨猴)、家畜动物(例如羊、牛、马、驴及猪)、伴侣动物(例如狗、猫)、实验室测试动物(例如小鼠、兔、大鼠、天竺鼠、仓鼠)、豢养野生动物(例如狐狸、鹿)及任何其他可受益于本发明药剂的生物体。对可受益于目前描述的药剂的动物类型不存在限制。个体,不论其是否为人类或非人类生物体,可称为患者、个体、动物、宿主或接受者。

[0233] 适于可注射使用的医药组合物包括无菌水溶液(其中可溶于水)或分散液及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内投药,适合载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany N.J.)或磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)。在所有情况下,所述组合物应为无菌的且流动性应达到存在易于注射性的程度。其应在制造及储存条件下稳定且保存从而防诸如细菌及真菌的微生物的污染作用。载剂可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇及液体聚乙二醇及其类似物)及其适合混合物的溶剂或分散介质。适当流动性可例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过维持所需粒度及通过使用界面活性剂来维持。微生物活动的防止可通过各种抗细菌及抗真菌剂达成,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞及其类似物。在许多情况下,组合物中将优选包括等张剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可通过将延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝及明胶)包括在组合物中而实现可注射组合物的延长吸收。

[0234] 本文所述的组合物的用途

[0235] 本发明提供适用于刺激有需要的人类个体的免疫反应的组合物,方法包含:向所述个体投与治疗有效量的本文中所揭示的组合物。

[0236] 本文所述的组合物亦可用于提高有需要的人类个体的恒定型自然杀手T (iNKT) 细胞产生,方法包含:向所述有需要的个体投与治疗有效量的医药学上可接受的组合物,其中所述组合物包含本文所揭示的例示性化合物。

[0237] 本文所述的例示性组合物亦可用于刺激有需要的人类个体的细胞激素及/或趋化激素产生,方法包含:向所述个体投与治疗有效量的医药学上可接受的组合物,其中所述组合物包含足以增加细胞激素/趋化激素产生的量的本文所揭示的化合物。

[0238] 「有效」量或「治疗有效」量的活性剂意指无毒性但足以提供有益效应的量的所述药剂。活性剂的「有效」量将在个体之间变化,视个体的年龄及一般状况、特定活性剂及其类似物而定。除非另外指明,否则如本文所用的术语「治疗有效」量意欲涵盖有效预防不良病状及/或改善不良病状的量,亦即除有效治疗不良病状的量以外。

[0239] 如本文所定义,活性化合物的治疗有效量(亦即有效剂量)可介于每公斤体重约0.001至100g的范围内,或在无不当实验的情况下应由此项技术者清楚及了解的其他范围。熟习此项技术者应了解某些因素可影响有效治疗个体所需的剂量及时序,其包括(但不限于)疾病或病症的严重程度、先前治疗、个体的一般健康状况或年龄及存在的其他疾病。

[0240] 作为本文中所用的术语的不良病状可为常常在个体中所见的「正常」病状或可能或可能不与提出的疾病相关联的病理性病状。

[0241] 如本文所用,术语「脂质」系指参与细胞信号传导路径的任何脂溶性(亲脂性)分子。

[0242] 如本文所用,术语「醣脂」系指充当细胞识别标记的附接碳水化合物的脂质。

[0243] 根据另一个态样,可由熟习此项技术者设想一或多个分装部分的套组,亦即进行本文所揭示方法中的至少一者的分装部分的套组、包含两种或两种以上组合物的分装部分的套组,根据以上所提及的方法中的至少一者这些组合物包含单独或组合的有效量的本文所揭示的组合物。

[0244] 套组可能亦包括包含活性剂的组合物、生物事件的标识符或有技术的个人在阅读本发明后可鉴别的其他化合物。套组亦可包含至少一种包含有效量的本文所揭示的组合物或细胞株的组合物。分装部分的套组的组合物及细胞株将用于根据熟习此项技术者可鉴别的程序进行至少一种本文所揭示的方法。

[0245] 如本文所用,术语「特异性结合」系指结合对(例如抗体及抗原)之间的相互作用。在各种情形下,特异性结合可以约 $10^{-6}$ 莫耳/公升、约 $10^{-7}$ 莫耳/公升或约 $10^{-8}$ 莫耳/公升或小于 $10^{-8}$ 莫耳/公升的亲和力常数体现。

[0246] 如熟习此项技术者在阅读本发明后将显而易见,本文中所描述及说明的个别实施例中的每一者具有离散组分及特征,其可易于与其他若干实施例中的任一者的特征分离或组合而不悖离本发明的范畴或精神。任何所述方法均可以所述事件顺序或以逻辑上可能的任何其他顺序进行。

[0247] 在一个态样中,本文所述的免疫组合物可非经肠投与(例如静脉内注射、皮下注射或肌肉内注射)。或者,包括栓剂及经口调配物的其他投药模式可为所需的。对于栓剂,黏合剂及载剂可包括例如聚烷二醇或甘油三酯。经口调配物可包括通常采用的辅料,诸如医药

等级的糖精、纤维素、碳酸镁及其类似物。这些组合物呈溶液、悬浮液、锭剂、丸剂、胶囊、持续释放调配物或粉末形式且含有10-95%本文所述的免疫组合物。

[0248] 免疫组合物以与剂型兼容的方式且以治疗上具有有效性、保护性及免疫原性的量投与。投药量视所治疗的个体而定,包括例如个体免疫系统合成抗体及必要时产生细胞介导免疫反应的能力。需要投与的活性成分的精确量视从业者的判断而定。然而,熟习此项技术者容易确定适合的剂量范围。初始投药及加强剂量的适合方案亦为可变的,但可包括初始投药,后为后续投药。疫苗剂量亦可视投药途径而定且根据宿主体型而变。

[0249] 本发明的免疫组合物亦可用于在用于产生抗体的动物中产生可用于癌症治疗与诊断的抗体。用动物(例如小鼠、兔、山羊、绵羊或马)产生单株及多株抗体及其片段的方法在此项技术中已熟知。参见例如Harlow及Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。术语「抗体」包括完整免疫球蛋白分子以及其片段,诸如Fab、F(ab)<sub>2</sub>、Fv、scFv(单链抗体)及dAb(域抗体;Ward等人, (1989) *Nature*, 341, 544)。

[0250] 除非另外规定,否则本文中所用的所有技术及科学术语具有与一般熟习本发明所属技术者通常所理解相同的含义。在发生冲突的情况下,以本文献(包括定义)为准。虽然类似或等效于本文所述的彼等方法及材料的任何方法及材料可用于本发明的实践或测试中,但现在描述优选方法及材料。本文特别提及的所有公开案及专利以引用的方式并入本文中用于所有目的,包括描述及揭示公开案中所报导、可联合本发明使用的化学品、细胞株、载体、动物、仪器、统计学分析及方法。本说明书中所引用的所有参考文献视为此项技术中的技能水平的指示。本文不应解释为承认本发明无权先于凭借先前发明的此类揭示内容。

[0251] 在描述本发明材料及方法之前,应理解本发明不限于所述特定方法论、方案、材料及试剂,因为其可变化。亦应理解,本文中所用的术语仅出于描述特定实施例的目的而并不意欲限制本发明的范畴,本发明的范畴将仅由所附申请专利范围限制。

[0252] 当提供值范围时,应理解除非上下文另外明确指出,否则在彼范围的上限与下限之间的各个中间值(至下限的单位的十分之一)及在彼规定范围内的任何其他指定值或中间值均涵盖于本发明内。这些较小范围的上限及下限可独立地包括于较小范围内,且亦涵盖于本发明中,在所陈述范围内受到任何特定排他性限制。在所陈述范围包括一个或两个限制的情况下,范围排除包括彼等限制之一者或两者。

[0253] 实例

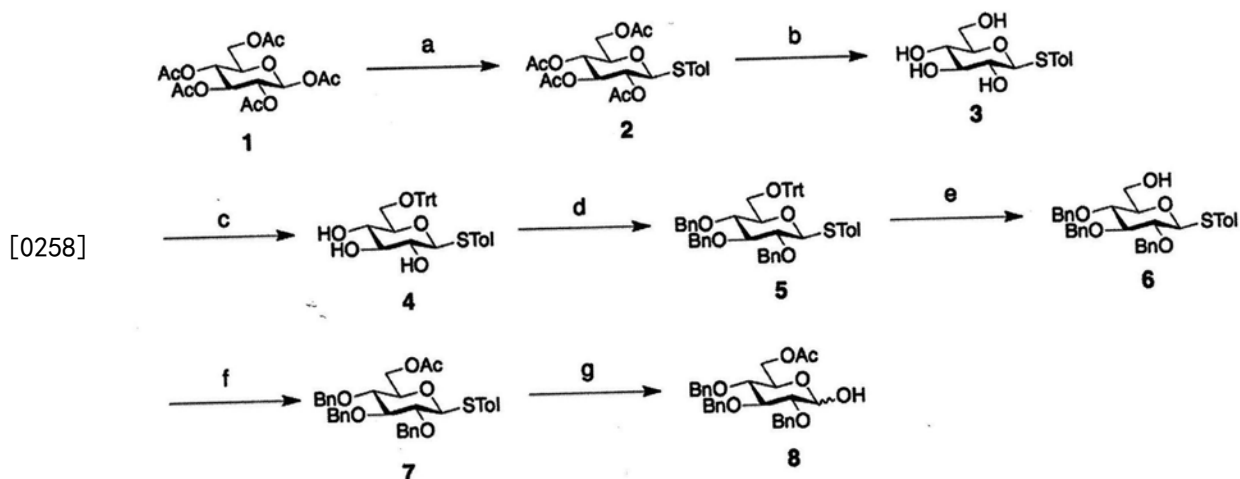
[0254] 提出以下实例从而给熟习此项技术者完整发明及如何制造及使用本发明实施例的描述,且不意欲限制本发明者视为其发现的范畴。已努力确保关于所使用的数字(例如量、温度等)的精度,但应考虑一些实验误差及偏差。除非另外指示,否则份数为重量份,分子量为重量平均分子量,温度以摄氏度计,且压力为大气压或近大气压。

[0255] 概要:所有试剂化学品均以试剂级购买且不经进一步纯化即使用。诸如二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)、四氢呋喃(THF)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇(MeOH)、吡啶的无水溶剂均购自Acros。HPLC级溶剂氯仿(CHCl<sub>3</sub>)及甲醇均购自Merck。用于糖基化的分子筛4 Å (MS4 Å)购自Acros且通过火焰激活。反应用分析型薄层层析(TLC)在EM硅胶60F254盘中监测且在UV (254nm)下观测及/或用酸性钼酸铈铵或茚三酮染色。急骤管柱层析在硅胶60Geduran (40-63μm, Merck)上进行。用于最终产物纯化的Biogel LH20购自Aldrich。在20℃下在Bruker

Topspin-600 (600MHz) 光谱仪上记录<sup>1</sup>H NMR谱。化学位移( $\delta$ ppm)根据CDCl<sub>3</sub>( $\delta$ =7.24ppm)、MeOD( $\delta$ =3.31ppm)及吡啶-d<sub>5</sub>( $\delta$ =7.58ppm)的内标物信号赋值。<sup>13</sup>C NMR谱在Bruker Topspin-600 (150MHz) 光谱仪上获得且使用CDCl<sub>3</sub>( $\delta$ =77.23ppm)、MeOD( $\delta$ =49.15ppm)的信号校准而以 $\delta$ ppm标度报告。以Hz报告耦合常数(J)。分裂模式通过使用以下缩写描述:s,单峰;d,二重峰;t,三重峰;dd,双二重峰;m,多重峰。<sup>1</sup>H NMR谱以此顺序报告:化学位移;多重性;质子数;耦合常数(s)。

[0256] 化学合成

[0257] 葡糖基供体8的合成



[0259] 化合物2: 在0℃下,向1,2,3,4,6-五-O-乙酰基-β-D-葡萄糖吡喃糖1(40g, 102.5mmol)于200mL无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的溶液中添加对甲苯硫醇(15.4g, 123mmol)及BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>(15.4mL, 123mmol),反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。所得溶液直接用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液及盐水萃取,经硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>)干燥且蒸发。接着在乙酸乙酯(AcOEt)-己烷溶液中再结晶,得到呈白色固体状的2(32.6g, 70%)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 600MHz)  $\delta$ 7.36(2H, d, J=7.2Hz), 7.10(2H, d, J=7.8Hz), 5.18(1H, t, J=9.0Hz), 5.00(1H, t, J=9.6Hz), 4.91(1H, t, J=9.0Hz), 4.61(1H, d, J=10.2Hz), 4.14-4.20(2H, m), 3.67(1H, s), 2.33(3H, s), 2.07(3H, s), 2.06(3H, s), 1.99(3H, s), 1.96(3H, s)。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>, 150MHz)  $\delta$ 170.78, 170.40, 169.59, 169.45, 139.00, 134.04, 129.88, 127.73, 86.03, 75.94, 74.21, 70.10, 68.38, 62.32, 21.39, 20.97, 20.94, 20.79, 20.78。C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>的高分辨率质谱(HRMS)(ESI-TOF)计算值477.1190,实验值477.1201。

[0260] 化合物3: 向2(32.6g, 71.8mmol)于500mL无水甲醇(MeOH)中的溶液中添加催化量的甲醇钠(NaOMe)且在环境温度下搅拌3小时。反应物通过添加Amberlite IR-120中和且过滤,将所得溶液浓缩至干,得到呈白色固体状的3(20.3g, 99%),其未经进一步纯化即直接用于下一反应。<sup>1</sup>H NMR(MeOD, 600MHz)  $\delta$ 7.46(2H, d, J=7.8Hz), 7.12(2H, d, J=7.8Hz), 4.50(1H, d, J=9.6Hz), 3.85(1H, d, J=12.6, 1.8Hz), 3.66(1H, dd, J=12.0, 5.4Hz), 3.36(1H, t, J=9.0Hz), 3.24-3.28(2H, m), 3.17(1H, t, J=9.0Hz), 2.13(3H, s)。<sup>13</sup>C NMR(MeOD, 150MHz)  $\delta$ 138.90, 133.66, 131.33, 130.67, 89.79, 82.16, 79.81, 73.82, 71.50, 63.03, 21.24。C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>的高分辨率质谱(ESI-TOF)计算值309.0767,实验值309.0772。

[0261] 化合物4: 向3(11.1g, 38.8mmol)于48mL无水吡啶中的溶液中添加三苯甲基氯(13.5g, 46.6mmol)。反应物在60℃下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,混合物通过硅胶

加压管柱(flash column)层析(己烷:乙酸乙酯:甲醇1:1:0.1)纯化,得到呈白色粉末状的4(12.3g,60%)。<sup>1</sup>H NMR(MeOD,600MHz)  $\delta$ 7.56(2H,d,J=7.8Hz),7.47(6H,d,J=7.8Hz),7.27(6H,t,J=7.2Hz),7.22(3H,t,J=7.2Hz),7.05(2H,d,J=8.4Hz),4.58(1H,d,J=9.6Hz),3.40-3.43(2H,m),3.31(1H,m),3.23-3.27(3H,m),2.27(3H,s)。<sup>13</sup>C NMR(MeOD,150MHz)  $\delta$ 145.69,138.71,133.62,131.51,130.77,130.16,128.87,128.13,89.46,87.88,80.98,80.02,73.93,71.85,65.14,21.34。 $C_{32}H_{32}O_5Na^+[M+Na]^+$ 的高分辨率质谱(ESI-TOF)计算值551.1863,实验值551.1876。

[0262] 化合物5:在0℃下,向4(21.1g,39.9mmol)于200mL无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的溶液中添加氢化钠(60%于矿物油中)(5.8g,143.6mmol)。反应物搅拌1小时,接着添加苯甲基溴(17.2mL,143.6mmol),接着在氩气下在环境温度下搅拌16小时。反应物通过甲醇淬灭且蒸发至干。残余物用乙酸乙酯稀释,溶液用H<sub>2</sub>O及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析(己烷:乙酸乙酯9:1)纯化,得到呈白色粉末状的5(22.3g,70%)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>,600MHz)  $\delta$ 7.60(2H,d,J=7.8Hz),7.50(6H,d,J=7.8Hz),7.42(2H,d,J=7.2Hz),7.34(2H,t,J=7.2Hz),7.24-7.32(12H,m),7.18-7.23(4H,m),7.14-7.17(2H,m),7.05(2H,d,J=7.8Hz),6.82(2H,d,J=7.8Hz),4.91(1H,d,J=10.8Hz),4.84(1H,d,J=10.8Hz),4.80(1H,d,J=10.8Hz),4.74(1H,d,J=10.2Hz),4.64(2H,dd,J=9.6,5.4Hz),4.30(1H,d,J=10.2Hz),3.74(1H,t,J=9.6Hz),3.64(1H,t,J=8.4Hz),3.60(1H,d,J=9.6Hz),3.55(1H,t,J=9.6Hz),3.42(1H,m),3.25(1H,dd,J=10.2,4.2Hz),2.30(3H,s)。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>,150MHz)  $\delta$ 144.14,138.57,138.43,137.94,137.90,133.01,130.10,129.96,129.07,128.73,128.67,128.45,128.42,128.31,128.20,128.16,128.15,128.07,128.01,127.89,127.20,87.90,87.07,86.70,80.96,79.04,78.04,76.25,75.61,75.21,62.68,45.18,21.37。 $C_{53}H_{50}O_5Na^+[M+Na]^+$ 的高分辨率质谱(ESI-TOF)计算值821.3271,实验值821.3310。

[0263] 化合物6:在75℃下搅拌5(30.0g,37.5mmol)于1065mL乙酸水溶液(AcOH:H<sub>2</sub>O 4:1)中的溶液3小时。在溶剂移除后,残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析(己烷:乙酸乙酯2:1)纯化,得到呈白色固体状的6(16.7g,80%)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>,600MHz)  $\delta$ 7.37-7.41(4H,m),7.25-7.33(13H,m),7.10(2H,d,J=7.8Hz),4.91(1H,d,J=10.2Hz),4.89(1H,d,J=10.8Hz),4.84(1H,d,J=10.8Hz),4.83(1H,d,J=10.8Hz),4.74(1H,d,J=10.8Hz),4.62(1H,d,J=10.2Hz),3.83-3.86(1H,m),3.65-3.71(2H,m),3.54(1H,t,J=9.6Hz),3.44(1H,t,J=9.0Hz),3.33-3.36(1H,m),2.31(3H,s),1.87(1H,t,J=6.6Hz)。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>,150MHz)  $\delta$ 138.51,138.24,138.14,138.02,132.85,129.99,129.63,128.71,128.66,128.63,128.40,128.22,128.16,128.09,127.98,127.94,87.99,86.75,81.27,79.43,77.81,76.01,75.69,75.30,62.34,21.31。 $C_{34}H_{36}O_5Na^+[M+Na]^+$ 的高分辨率质谱(ESI-TOF)计算值579.2176,实验值579.2188。

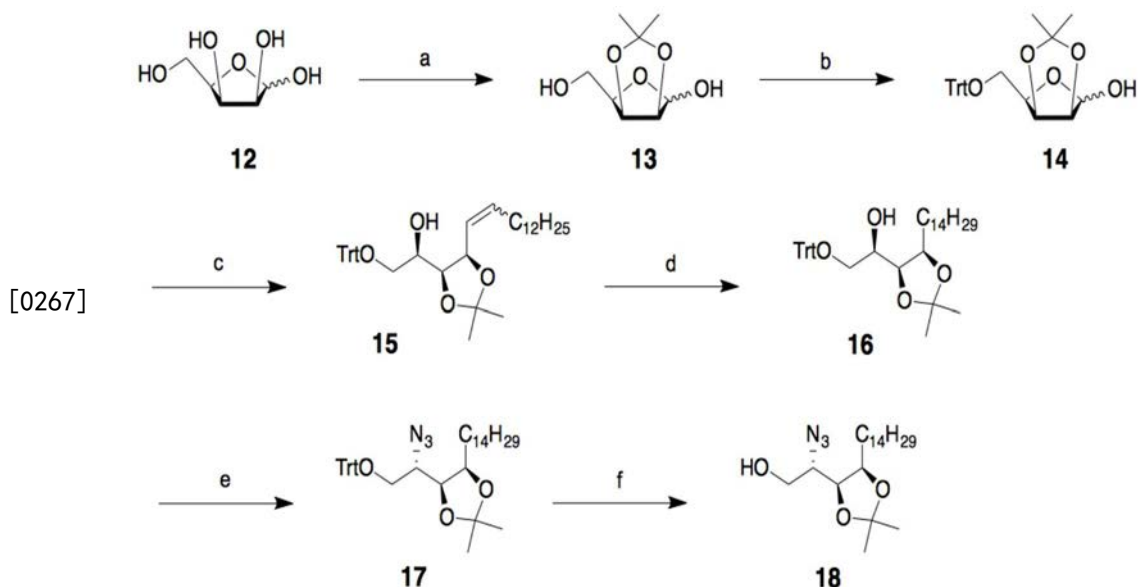
[0264] 化合物7:向6(5.0g,9.0mmol)于18mL无水吡啶中的溶液中添加乙酸酐(1.0mL)。反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,溶液用H<sub>2</sub>O及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析(己烷:乙酸乙酯5:1)纯化,得到呈白色固体状的7(5.3g,99%)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>,600MHz)  $\delta$ 7.44(2H,d,J=7.8Hz),7.38(2H,d,J=7.8Hz),7.26-7.34(11H,m),7.22-7.24(2H,m),7.08



(2H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 4.91 (1H, d,  $J=10.2\text{Hz}$ ), 4.90 (1H, d,  $J=11.4\text{Hz}$ ), 4.83 (1H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ ), 4.82 (1H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ ), 4.71 (1H, d,  $J=10.2\text{Hz}$ ), 4.57 (1H, d,  $J=9.6\text{Hz}$ ), 4.55 (1H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ ), 4.34 (1H, d,  $J=12.0\text{Hz}$ ), 4.17-4.20 (1H, m), 3.67-3.70 (1H, m), 3.49-3.50 (2H, m), 3.45 (1H, t,  $J=9.6\text{Hz}$ ), 2.32 (3H, s), 2.03 (3H, s)。 $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150MHz)  $\delta$  170.90, 138.44, 138.16, 138.13, 137.81, 132.98, 129.85, 128.76, 128.72, 128.68, 128.45, 128.30, 128.26, 128.15, 128.02, 88.00, 86.93, 81.07, 77.74, 76.08, 75.68, 75.32, 63.51, 21.35, 21.09。 $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{SNa}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值621.2281, 实验值621.2301。

[0265] 化合物8:向7 (5.5g, 9.2mmol) 于129mL丙酮水溶液 (丙酮: $\text{H}_2\text{O}$  4:1) 中的溶液中添加N-溴代丁二酰亚胺 (1.7g, 9.5mmol)。反应物在环境温度下搅拌1小时。在溶剂移除后, 残余物用乙酸乙酯稀释, 用 $\text{H}_2\text{O}$ 、硫代硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 水溶液、盐水萃取, 接着经硫酸镁干燥。混合物通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷:乙酸乙酯2:1) 纯化, 得到呈白色固体状的8 (3.1g, 69%,  $\alpha/\beta=1:1$ )。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz)  $\delta$  7.24-7.35 (30H, m), 5.18 (1H, t,  $J=3.0\text{Hz}$ ), 4.96 (1H, d,  $J=10.2\text{Hz}$ ), 4.94 (2H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ ), 4.86 (1H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ ), 4.85 (1H, d,  $J=10.2\text{Hz}$ ), 4.84 (1H, d,  $J=10.2\text{Hz}$ ), 4.80 (1H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ ), 4.76 (2H, d,  $J=11.4\text{Hz}$ ), 4.71 (1H, dd,  $J=7.2, 5.4\text{Hz}$ ), 4.68 (1H, d,  $J=12.0\text{Hz}$ ), 4.55 (2H, d,  $J=10.8\text{Hz}$ ), 4.34 (1H, dd,  $J=12.0, 1.2\text{Hz}$ ), 4.23-4.28 (2H, m), 4.17 (1H, dd,  $J=12.0, 4.8\text{Hz}$ ), 4.06-4.09 (1H, m), 3.98 (1H, t,  $J=9.6\text{Hz}$ ), 3.67 (1H, t,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 3.50-3.56 (3H, m), 3.48 (1H, t,  $J=9.0\text{Hz}$ ), 3.37-3.40 (2H, m), 3.01 (1H, d,  $J=3.0\text{Hz}$ ), 2.02 (3H, s), 2.01 (3H, s)。 $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150MHz)  $\delta$  138.64, 138.49, 138.39, 137.96, 137.89, 137.81, 128.75, 128.70, 128.68, 128.65, 128.63, 128.33, 128.29, 128.27, 128.22, 128.20, 128.14, 128.06, 127.99, 127.93, 97.62, 91.33, 84.71, 83.20, 81.82, 80.18, 77.39, 75.96, 75.92, 75.23, 75.21, 74.98, 73.47, 73.19, 69.02, 63.35, 63.27, 21.06。 $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值515.2040, 实验值515.2052。

[0266] 受体18的合成



[0268] 化合物13:在 $0^\circ\text{C}$ 下,向D-来苏糖12 (20g, 133mmol) 于200mL无水N,N-二甲基甲酰胺

(DMF) 中的溶液中添加 2-甲氧基丙烯 (15 mL, 160 mmol) 及樟脑-10-磺酸 (CSA) (3 g, 13.3 mmol)。反应物在环境温度下在氩气下搅拌 16 小时。溶液用三乙胺 ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) 淬灭, 蒸发至干且通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷: 乙酸乙酯: 甲醇 1:1:0.2) 直接纯化, 得到呈白色固体状的 13 (21 g, 83%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):  $\delta$  5.22 (s, 1H), 4.78 (dd, 1H,  $J=6.0$ , 3.6 Hz), 4.53 (d, 1H,  $J=6.0$  Hz), 4.17 (m, 1H,  $J=6.6$ , 4.8 Hz), 3.82 (dd, 1H,  $J=11.7$ , 4.8 Hz), 3.71 (dd, 1H,  $J=11.7$ , 6.6 Hz), 1.40 (s, 3H), 1.29 (s, 3H)。 $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz):  $\delta$  113.62, 102.27, 87.42, 81.73, 81.35, 61.37, 26.46, 25.02。 $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$  的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值 213.0733, 实验值 213.0751。

[0269] 化合物 14: 向 13 (21 g, 110 mmol) 于 140 mL 无水吡啶中的搅拌溶液中添加三苯甲基氯 (37.8 g, 132 mmol)。反应物在 60°C 下在氩气下搅拌 16 小时。将溶液浓缩至干, 残余物用乙酸乙酯 ( $\text{AcOEt}$ ) 溶解, 用  $\text{H}_2\text{O}$ 、盐水洗涤且经硫酸镁干燥, 接着蒸发。混合物通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷: 乙酸乙酯 1:2) 纯化, 得到呈白色粉末状的 14 (36.5 g, 77%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):  $\delta$  7.46 (m, 6H), 7.27 (m, 6H), 7.21 (m, 3H), 5.36 (d, 1H,  $J=1.8$  Hz), 4.73 (dd, 1H,  $J=6.0$ , 4.8 Hz), 4.57 (d, 1H,  $J=6.0$  Hz), 4.31 (ddd, 1H,  $J=4.8$ , 4.8, 7.8 Hz), 3.41 (dd, 1H,  $J=9.6$ , 4.8 Hz), 3.37 (dd, 1H,  $J=9.6$ , 7.8 Hz), 2.41 (m, 1H,  $J=1.8$  Hz), 1.27 (s, 3H), 1.25 (s, 3H)。 $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz):  $\delta$  143.95, 128.82, 127.75, 126.95, 112.48, 101.22, 86.85, 85.41, 80.11, 79.70, 61.85, 26.02, 25.09。 $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$  的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值 455.1829, 实验值 455.1833。

[0270] 化合物 15: 在 0°C 下, 向 14 (8.4 g, 19.4 mmol) 于 40 mL 无水四氢呋喃 (THF) 中的搅拌溶液中添加双(三甲基硅烷基)胺基锂 (LHMDS) (20 mL 于 THF 中的 1M 溶液, 20 mmol), 反应物在氩气下搅拌 1 小时。在 0°C 下, 向由 1-溴十三烷 ( $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{Br}$ ) 及三苯基膦 ( $\text{PPh}_3$ ) 于甲苯中回流 5 天制备的维蒂希试剂 (Wittig reagent)  $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{PPh}_3\text{Br}$  (20.1 g, 38.2 mmol) 于 83 mL 无水 THF 中的搅拌溶液中添加 LHMDS (40 mL 于 THF 中的 1M 溶液, 40 mmol), 反应物在氩气下搅拌 1 小时从而产生亮橙色偶极体。在 0°C 下, 将 14 的溶液逐滴添加至偶极体, 且使反应物升温至环境温度并在氩气下搅拌 9 小时。所得溶液用甲醇淬灭且蒸发至干。残余物用乙酸乙酯稀释, 用  $\text{H}_2\text{O}$  及盐水萃取, 经硫酸镁干燥, 接着浓缩。混合物通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷: 乙酸乙酯 15:1) 纯化, 得到呈无色油状的 15 (8.7 g, 75%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):  $\delta$  7.40-7.45 (m, 9H), 7.25-7.30 (m, 9H), 7.19-7.23 (m, 5H), 5.49-5.57 (m, 3H,  $J=6.6$  Hz), 4.90 (t, 1H,  $J=6.6$  Hz), 4.43 (t, 1.5H,  $J=6.6$  Hz), 4.25 (dd, 0.5H,  $J=6.6$ , 4.6 Hz), 4.20 (dd, 1H,  $J=6.6$ , 4.5 Hz), 3.74 (m, 1H), 3.68 (m, 0.5H), 3.22 (dd, 0.5H,  $J=9.6$ , 5.0 Hz), 3.15 (dd, 1H,  $J=9.3$ , 5.1 Hz), 3.10 (m, 1.5H), 2.37 (m, 1.5H), 1.90-2.00 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.47 (m, 5H), 1.37 (m, 5H), 1.19-1.33 (m, 35H), 0.86 (t, 5H,  $J=7.1$  Hz)。 $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz):  $\delta$  144.07, 137.58, 135.56, 128.90, 128.02, 127.24, 125.41, 125.15, 108.58, 108.50, 86.90, 86.84, 79.14, 77.86, 77.74, 73.21, 69.51, 69.43, 65.19, 64.84, 32.45, 32.13, 29.89, 29.86, 29.81, 29.71, 29.69, 29.57, 29.50, 29.47, 29.11, 27.80, 27.59, 27.55, 25.26, 22.91, 14.35。 $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$  的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值 621.3914, 实验值 621.3919。

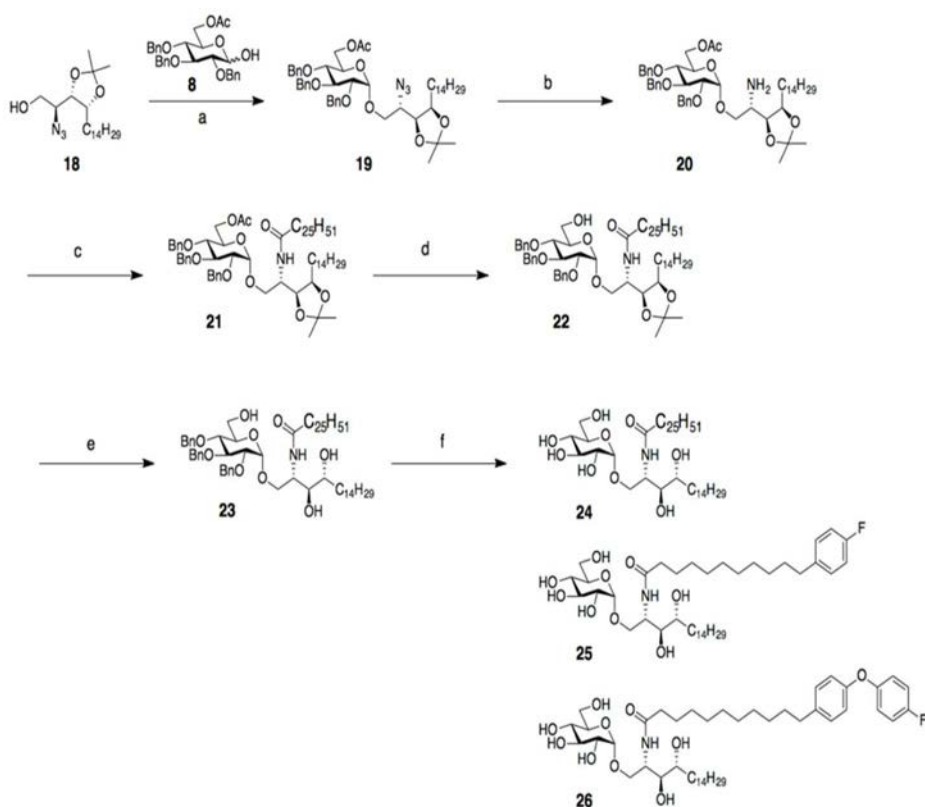
[0271] 化合物 16: 化合物 16 由 15 (1 g, 1.7 mmol) 于含有催化量氢氧化钯/碳 (20% Pd) 的 10 mL 无水甲醇中的催化氢化制备。悬浮液在  $\text{H}_2$  环境中搅拌 4 小时。溶液经由 Celite 545 过滤从而移除催化剂, 蒸发至干, 接着通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷: 乙酸乙酯

20:1) 纯化, 得到呈白色固体状的16 (903mg, 90%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz): δ7.43 (m, 6H), 7.27 (m, 6H), 7.21 (m, 3H), 4.12 (dd, 1H, J=6.4, 3.7Hz), 4.05 (ddd, 1H, J=9.9, 6.4, 3.6Hz), 3.69 (m, 1H, J=6.0, 6.0, 5.8, 3.7Hz), 3.18 (m, 2H, J=9.5, 9.5, 6.0, 5.8Hz), 2.29 (d, 1H, J=6.0Hz), 1.60-1.67 (m, 1H), 1.45-1.49 (m, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.34-1.38 (m, 1H), 1.33 (s, 3H), 1.20-1.30 (m, 23H), 0.86 (t, 3H, J=7.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150MHz): δ144.09, 128.91, 128.05, 127.26, 107.95, 87.02, 77.67, 69.15, 65.43, 32.15, 29.92, 29.88, 29.83, 29.77, 29.58, 27.60, 26.99, 25.43, 22.92, 14.36。 $C_{40}H_{56}O_4Na^+[M+Na]^+$ 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值623.4071, 实验值623.4112。

[0272] 化合物17: 在环境温度下, 向16 (5g, 8.3mmol) 及4 Å 分子筛 (1g) 于39mL无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的溶液中添加2,6-二甲基吡啶 (3.5mL, 30mmol)。当将溶液冷却至-45℃时, 逐滴添加三氟甲磺酸酐 (Tf<sub>2</sub>O) (2.67mL, 15.9mmol) 且在氩气下搅拌反应物1小时。接着添加迭氮化四甲基胍 (TMGA) (3.9g, 25mmol), 将反应物升温至环境温度且在氩气下搅拌16小时。所得溶液经由 Celite 545过滤从而移除4 Å 分子筛且残余物用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释、用H<sub>2</sub>O及盐水萃取, 经硫酸镁干燥, 接着蒸发。混合物简单地通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷: 乙酸乙酯20:1) 纯化从而移除大部分杂质且直接用于下一步骤。

[0273] 化合物18: 在4℃下, 向17于20mL无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的溶液中添加四氟乙酸/四氟乙酸酐 (含TFA/TFAA 1.8M/1.8M的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (14mL, 24.9mmol) 且在氩气下搅拌15分钟。反应物通过添加10mL Et<sub>3</sub>N淬灭, 接着倒入200mL甲醇 (MeOH) 中且再搅拌15分钟。在溶剂移除后, 残余物用乙酸乙酯稀释, 用H<sub>2</sub>O、饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液及盐水萃取, 接着经硫酸镁干燥。真空浓缩有机层且混合物通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷: 乙酸乙酯10:1) 纯化, 得到呈黄色油状的18 (2g, 两步63%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz): δ4.16 (ddd, 1H, J=9.7, 5.6, 3.6Hz), 3.97 (dd, 1H, J=11.6, 4.2Hz), 3.94 (dd, 1H, J=9.4, 5.6Hz), 3.85 (dd, 1H, J=11.6, 5.4Hz), 3.45 (ddd, 1H, J=9.4, 5.4, 4.2Hz), 1.50-1.62 (m, 2H, J=9.7, 3.6Hz), 1.41 (s, 3H), 1.31-1.37 (m, 6H), 1.22-1.30 (m, 22H), 0.86 (t, 3H, J=6.9, 6.9Hz)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150MHz): δ108.66, 77.96, 76.91, 64.18, 61.39, 32.14, 29.90, 29.87, 29.81, 29.80, 29.75, 29.60, 29.58, 28.25, 26.74, 25.77, 22.91, 14.34。 $C_{21}H_{41}N_3O_3H^+[M+H]^+$ 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值383.3148, 实验值356.3157 (-N<sub>2</sub>)。

[0274] α-葡萄糖神经酰胺类似物24-26的合成



[0275]

[0276] 化合物19:在-45℃下在氩气下,向葡萄糖基供体8 (2.9g, 5.9mmol)、二甲基硫醚 (590  $\mu$ L, 7.8mmol)、4 Å 分子筛 (500mg) 及2-氯吡啶 (1.8mL, 19.5mmol) 于无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15mL) 中的溶液中添加三氟甲磺酸酐 (1mL, 6mmol)。反应物在-45℃下搅拌20分钟,在0℃下搅拌20分钟且再在环境温度下搅拌20分钟,接着添加含受体18 (1.5g, 3.9mmol) 的5mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>。反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。溶液经由Celite 545过滤以移除分子筛。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,溶液用H<sub>2</sub>O及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱 (flash column) 层析 (己烷:乙酸乙酯10:1) 纯化,得到呈无色油状的19 (2g, 60%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz)  $\delta$  7.36 (2H, d, J=7.8Hz), 7.24-7.33 (13H, m), 4.97 (1H, d, J=10.8Hz), 4.86 (1H, d, J=10.8Hz), 4.85 (1H, d, J=3.6Hz), 4.78 (1H, d, J=10.8Hz), 4.72 (1H, d, J=12.0Hz), 4.68 (1H, d, J=12.0Hz), 4.54 (1H, d, J=10.8Hz), 4.21-4.26 (2H, m), 4.08-4.11 (1H, m), 4.02-4.07 (2H, m), 3.97 (1H, dd, J=9.6, 5.4Hz), 3.84-3.87 (1H, m), 3.60 (1H, dd, J=10.8, 7.2Hz), 3.54 (1H, dd, J=9.6, 3.6Hz), 3.44-3.48 (2H, m), 2.00 (3H, s), 1.57-1.61 (1H, m), 1.50-1.55 (1H, m), 1.37 (3H, s), 1.22-1.35 (27H, m), 0.86 (3H, t, J=7.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150MHz)  $\delta$  170.93, 138.82, 138.58, 138.05, 128.68, 128.61, 128.59, 128.34, 128.31, 128.13, 127.90, 127.86, 81.82, 80.26, 77.97, 77.30, 75.93, 75.61, 75.24, 72.92, 69.50, 69.34, 63.26, 59.99, 32.13, 29.90, 29.87, 29.82, 29.77, 29.57, 29.54, 28.42, 26.73, 25.89, 22.90, 21.03, 14.33。C<sub>50</sub>H<sub>71</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值880.5083, 实验值880.5124。

[0277] 化合物20:向19 (269mg, 0.31mmol) 于吡啶/H<sub>2</sub>O (10:1, 12mL) 中的溶液中添加三苯基膦 (165mg, 0.63mmol)。反应物在45℃下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,用H<sub>2</sub>O、盐水萃取且经硫酸镁干燥,接着蒸发至干。混合物无需预先纯化即用于

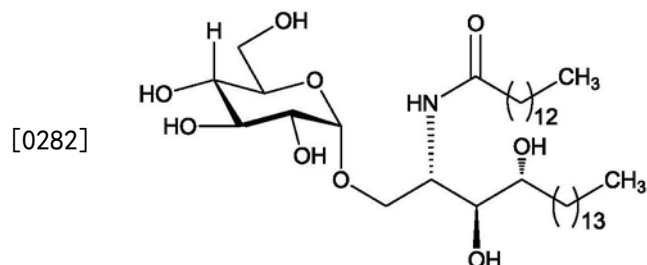
下一步骤。

[0278] 化合物21:向化合物20于36mL无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的溶液中添加二十六烷酸(159mg, 0.4mmol)、Et<sub>3</sub>N(88μL)、EDC(90mg, 0.47mmol)及HBTu(178mg, 0.47mmol)。反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,用H<sub>2</sub>O、盐水萃取且经硫酸镁干燥,接着蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析(己烷:乙酸乙酯4:1)纯化,得到呈白色固体状的21(293mg, 78%, 两步)。

[0279] 化合物22:向21(293mg, 0.24mmol)于50mL共溶剂(甲醇:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1)中的溶液中添加甲醇钠(0.024mmol)且在氩气下在环境温度下搅拌6小时。反应物通过Amberlite IR-120中和且过滤。在溶剂移除后,残余物无需预先纯化即用于下一步骤。

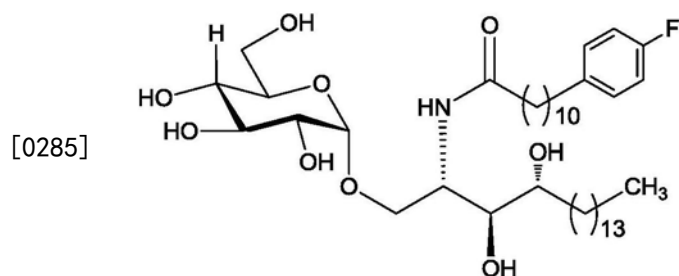
[0280] 化合物23:将水解化合物22溶解于50mL乙酸水溶液(AcOH:H<sub>2</sub>O 4:1)中且在60℃下搅拌16小时。在溶剂移除后,混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析(己烷:乙酸乙酯:甲醇1:1:0.1)纯化。

[0281] 化合物24



[0283] 将二丙酮衍生物23溶解于含有氢氧化钯/碳(20%Pd)(催化剂)的50mL共溶剂(甲醇:CHCl<sub>3</sub> 4:1)中且在H<sub>2</sub>环境中搅拌16小时。溶液经由Celite 545过滤从而移除催化剂且蒸发至干,混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析(甲醇:CHCl<sub>3</sub> 1:9)纯化且用LH20(甲醇:CHCl<sub>3</sub> 1:1)溶离,得到呈白色固体状的24(72mg, 三步35%)。<sup>1</sup>H NMR(MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 600MHz) δ: 4.83(s, 1H), 4.15(d, J=4.2Hz, 1H), 3.84(dd, J=10.8, 4.2Hz, 1H), 3.76(d, J=12.0Hz, 1H), 3.64-3.70(m, 2H), 3.60(t, J=9.6Hz, 1H), 3.51-3.57(m, 3H), 3.41(d, J=9.6Hz, 1H), 3.31(m, 1H), 2.17(t, J=7.2Hz, 2H), 1.50-1.65(m, 4H), 1.19-1.39(m, 68H), 0.85(t, J=6.6Hz, 6H)。<sup>13</sup>C NMR(MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 150MHz) δ: 175.29, 100.06, 75.05, 74.58, 73.03, 72.75, 72.62, 71.01, 67.78, 62.22, 51.11, 37.07, 32.93, 32.62, 30.49, 30.45, 30.40, 30.35, 30.25, 30.13, 30.05, 30.04, 26.61, 26.58, 23.34, 14.47。C<sub>50</sub>H<sub>99</sub>NO<sub>9</sub>Na<sup>+</sup>[M+Na]<sup>+</sup>的高分辨率质谱(MALDI-TOF)计算值880.7223, 实验值880.7212。

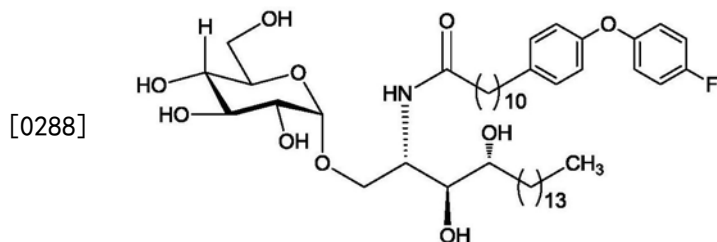
[0284] 化合物25



[0286] 化合物25使用与化合物24类似的程序合成。<sup>1</sup>H NMR(MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 600MHz) δ: 7.09(dd, J=8.4, 5.4Hz, 2H), 6.90(t, J=9.0Hz, 2H), 4.82(d, J=3.6Hz, 1H), 4.14-4.18(m,

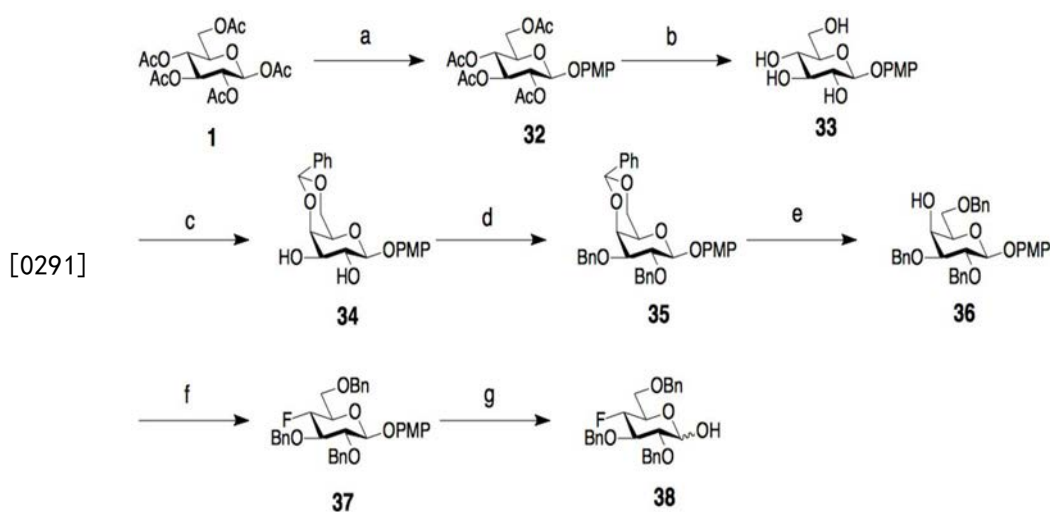
1H), 3.84 (dd, J=10.2, 4.8Hz, 1H), 3.76 (dd, J=12.0, 2.4Hz, 1H), 3.64-3.68 (m, 2H), 3.60 (t, J=9.0Hz, 1H), 3.51-3.56 (m, 3H), 3.41 (dd, J=9.6, 3.6Hz, 1H), 3.31 (m, 1H), 2.54 (t, J=7.8Hz, 2H), 2.17 (t, J=7.8Hz, 2H), 1.51-1.65 (m, 6H), 1.20-1.39 (m, 36H), 0.85 (t, J=6.6Hz, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 150MHz) δ: 175.30, 162.67, 161.07, 139.18, 139.16, 130.34, 130.29, 115.46, 115.32, 100.00, 75.03, 74.52, 72.97, 72.68, 72.55, 70.93, 67.71, 62.15, 51.11, 51.03, 37.06, 37.00, 35.72, 32.90, 32.58, 32.32, 30.45, 30.41, 30.35, 30.30, 30.22, 30.15, 30.11, 30.05, 30.00, 29.82, 26.57, 26.53, 23.29, 14.44。C<sub>41</sub>H<sub>72</sub>FNO<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值764.5083, 实验值764.5066。

[0287] 化合物26



[0289] 化合物26使用与化合物24类似的程序合成。<sup>1</sup>H NMR (MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 600MHz) δ: 7.10 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.99 (t, J=7.8Hz, 2H), 6.92 (m, 2H), 6.84 (d, J=7.8Hz, 2H), 4.83 (d, J=3.0Hz, 1H), 3.85 (dd, J=10.2, 4.2Hz, 1H), 3.77 (d, J=11.4Hz, 1H), 3.67 (m, 2H), 3.61 (t, J=9.6Hz, 1H), 3.55 (m, 3H), 3.42 (dd, J=9.0, 3.0Hz, 1H), 3.33 (m, 1H), 2.55 (t, J=7.8Hz, 2H), 2.18 (t, J=7.8Hz, 2H), 1.50-1.64 (m, 6H), 1.20-1.40 (m, 36H), 0.85 (t, J=6.6Hz, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 150MHz) δ: 175.34, 160.27, 158.67, 156.22, 154.38, 138.73, 130.34, 120.76, 120.71, 119.10, 116.87, 116.72, 100.15, 75.10, 74.66, 73.15, 72.85, 72.65, 71.09, 67.80, 62.26, 51.21, 37.09, 35.90, 32.95, 32.68, 32.44, 30.55, 30.51, 30.47, 30.40, 30.35, 30.28, 30.26, 30.17, 30.11, 30.00, 26.67, 26.63, 23.38, 14.47。C<sub>47</sub>H<sub>76</sub>FNO<sub>10</sub>Na<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值834.5526, 实验值834.5538。

[0290] 氟化供体38的合成



[0292] 化合物32: 在0℃下, 向1,2,3,4,6-五-O-乙酰基-β-D-葡萄糖呋喃糖1于无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的溶液中添加4-甲氧基苯酚及BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>, 反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。所得溶

液直接用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液及盐水萃取,经硫酸镁干燥且蒸发。产物自乙酸乙酯-己烷溶液再结晶,得到呈白色固体状的32。

[0293] 化合物33:向32于无水甲醇中的溶液中添加催化量的甲醇钠( $\text{NaOMe}$ )且在环境温度下搅拌3小时。反应物通过添加Amberlite IR-120中和且过滤,将所得溶液浓缩至干,得到呈白色固体状的33,其未经进一步纯化即直接用于下一反应。

[0294] 化合物34:向33于无水共溶剂( $\text{DMF}$ 及 $\text{CH}_3\text{CN}$ )中的溶液中添加苯甲醛二甲基缩醛及催化量的甲醇钠( $\text{NaOMe}$ )。反应物在环境温度下搅拌16小时。溶液通过添加 $\text{Et}_3\text{N}$ 中和且浓缩。将混合物溶解于乙酸乙酯中,用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发。产物自乙酸乙酯-己烷溶液再结晶,得到呈白色固体状的34。

[0295] 化合物35:在 $0^\circ\text{C}$ 下,向34于无水 $\text{N,N}$ -二甲基甲酰胺( $\text{DMF}$ )中的溶液中添加氢化钠(60%于矿物油中)。反应物搅拌1小时,接着添加苯甲基溴且反应物在氩气下在环境温度下搅拌16小时。溶液通过甲醇淬灭且蒸发至干。残余物用乙酸乙酯稀释,溶液用 $\text{H}_2\text{O}$ 及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。产物自乙酸乙酯-己烷溶液再结晶,得到呈白色固体状的35。

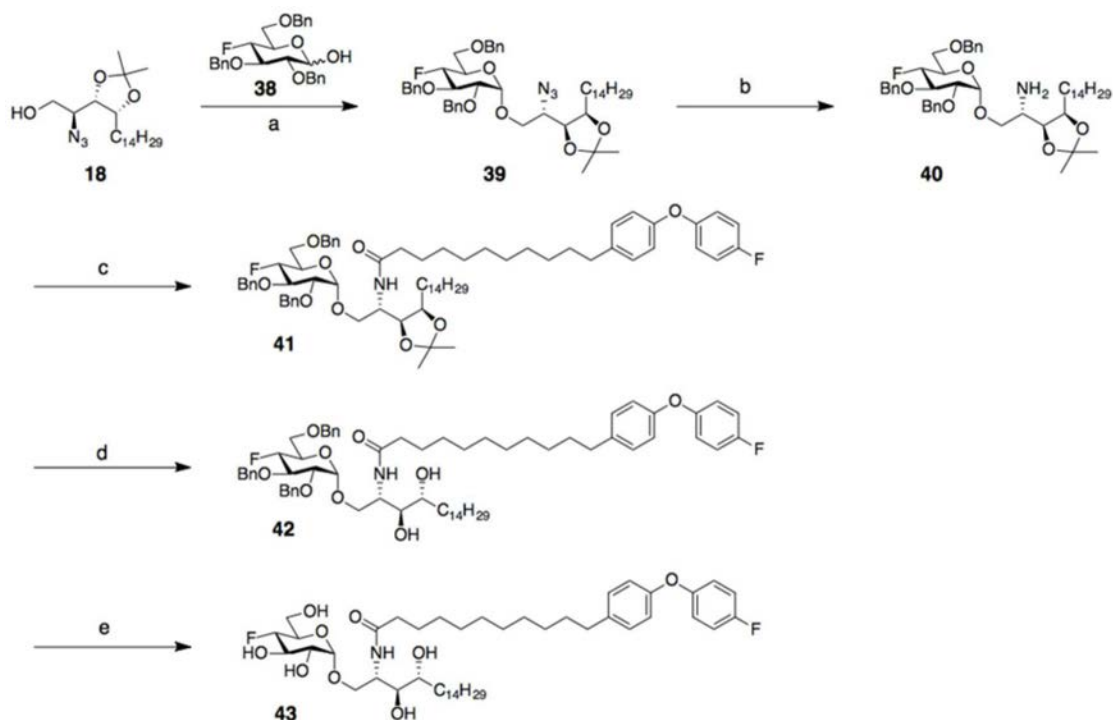
[0296] 化合物36:在 $0^\circ\text{C}$ 下,向35于 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中的溶液中添加三乙基硅烷及三氟乙酸( $\text{TFA}$ )。反应物在环境温度下搅拌3小时。溶液直接用 $\text{H}_2\text{O}$ 、饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。产物自乙酸乙酯-己烷溶液再结晶,得到呈白色固体状的36。

[0297] 化合物37:向36于 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中的溶液中添加三氟化二乙基胺基硫( $\text{DAST}$ )。反应物在 $45^\circ\text{C}$ 下搅拌16小时且溶液直接用 $\text{H}_2\text{O}$ 、饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化,得到呈无色油状的化合物37。

[0298] 化合物38:向37于无水共溶剂(甲苯、 $\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{CH}_3\text{CN}$ )中的溶液中添加硝酸铯铵( $\text{CAN}$ )。反应物在环境温度下搅拌10分钟。溶液用乙酸乙酯萃取,用 $\text{H}_2\text{O}$ 、饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液及 $\text{H}_2\text{O}$ 洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化,得到呈无色油状的化合物38。

[0299] 氟化类似物43的合成





[0300]

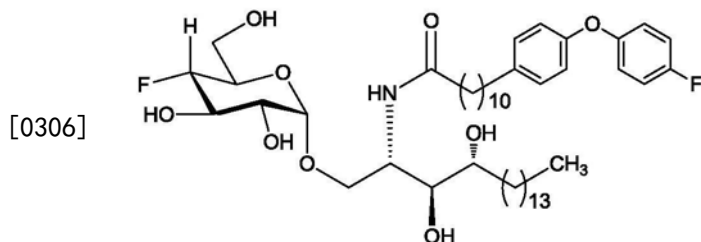
[0301] 化合物39:在-45℃下在氩气下,向供体38、二甲基硫醚、4 Å分子筛及2-氯吡啶于无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的溶液中添加三氟甲磺酸酐。反应物在-45℃下搅拌20分钟,在0℃下搅拌20分钟且再在环境温度下搅拌20分钟,接着添加含受体18的CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>。反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。溶液经由Celite 545过滤以移除分子筛。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,溶液用H<sub>2</sub>O及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到39。

[0302] 化合物40:向39于吡啶/H<sub>2</sub>O(10:1)中的溶液中添加三苯基膦。反应物在45℃下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,用H<sub>2</sub>O、盐水萃取且经硫酸镁干燥,接着蒸发至干。混合物无需预先纯化即用于下一步骤。

[0303] 化合物41:向化合物40于无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的溶液中添加4-(4-氟苯氧基)苯基十一酸、Et<sub>3</sub>N、EDC及HBTu。反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,用H<sub>2</sub>O、盐水萃取且经硫酸镁干燥,接着蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到41。

[0304] 化合物42:向化合物41于乙酸水溶液(AcOH:H<sub>2</sub>O 4:1)中的溶液且在60℃下搅拌16小时。在溶剂移除后,将混合物溶解于乙酸乙酯中,用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到42。

[0305] 化合物43



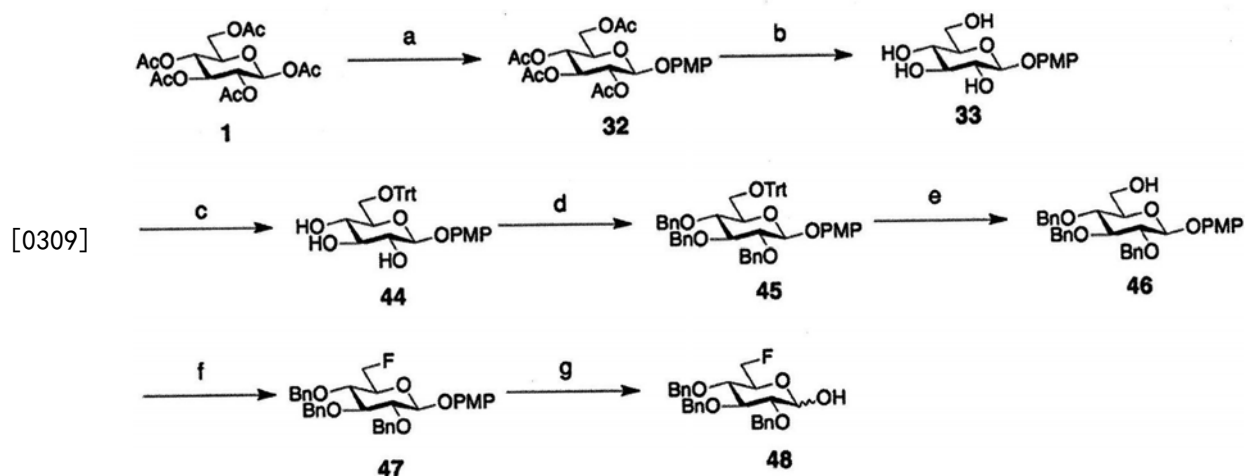
[0306]

[0307] 将二丙酮衍生物42溶解于含有氢氧化钯/碳(20%Pd)(催化剂)的共溶剂(甲醇:



CHCl<sub>3</sub> 4:1) 中且在H<sub>2</sub>环境中搅拌16小时。溶液经由Celite 545过滤从而移除催化剂且蒸发至干,混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化且用LH20溶离从而得到43。<sup>1</sup>H NMR (MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 600MHz) δ: 7.09 (1H, d, J=8.4Hz), 6.96-6.99 (2H, m), 6.91-6.92 (2H, m), 6.82-6.84 (2H, m), 4.84 (1H, t, J=3.6Hz), 4.25 (0.5H, t, J=9.0Hz), 4.15-4.18 (2H, m), 3.82-3.85 (2H, m), 3.75-3.77 (1H, m), 3.69-3.72 (1H, m), 3.64-3.68 (2H, m), 3.50-3.54 (2H, m), 3.44 (1H, dd, J=9.6, 3.6Hz), 2.54 (2H, t, J=7.2Hz), 2.17 (2H, t, J=7.8Hz), 1.50-1.64 (7H, m), 1.22-1.27 (41H, m), 0.84 (3H, t, J=7.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR (MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 150MHz) δ: 175.28, 160.20, 158.61, 156.16, 154.30, 138.67, 130.28, 120.70, 120.64, 119.04, 116.81, 116.66, 99.94, 90.61, 89.41, 75.04, 72.72, 72.59, 72.56, 72.42, 72.37, 70.82, 70.66, 67.82, 61.21, 51.10, 37.05, 35.83, 32.91, 32.61, 32.36, 30.46, 30.43, 30.39, 30.33, 30.27, 30.19, 30.18, 30.09, 30.03, 29.92, 26.63, 26.55, 23.32, 14.41。C<sub>47</sub>H<sub>75</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>9</sub>H<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 的高分辨率质谱 (ESI-TOF) 计算值836.5498, 实验值836.5483。

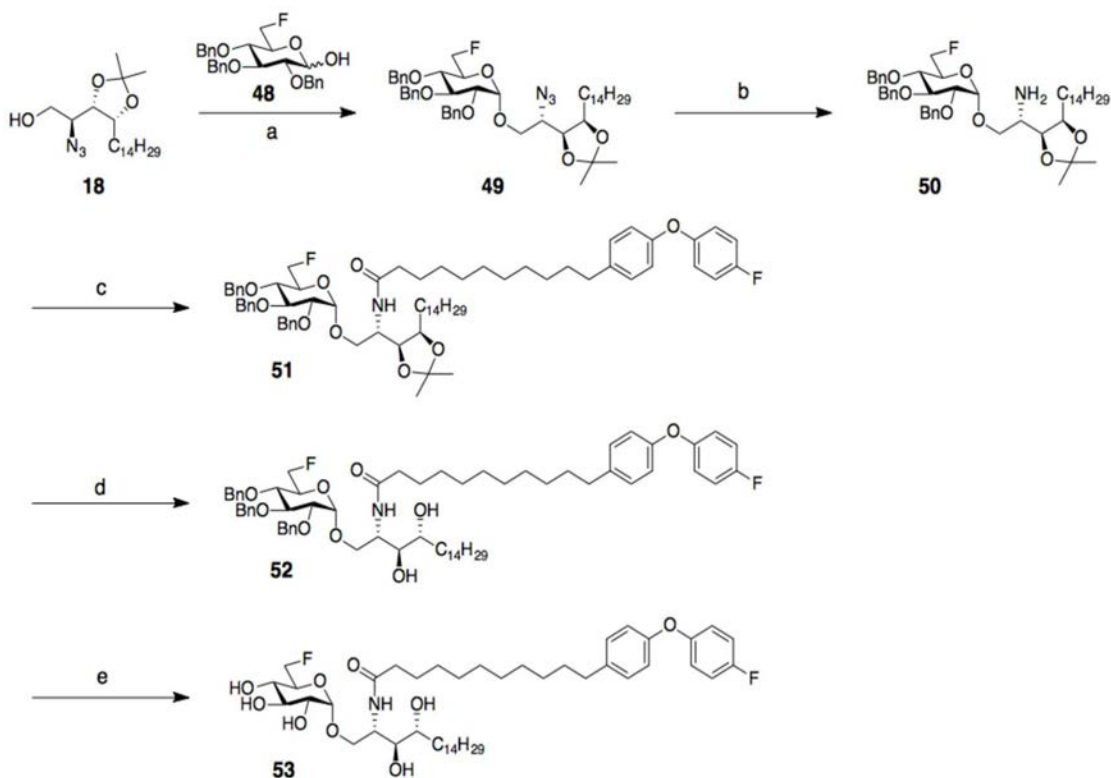
[0308] 氟化供体48的合成



[0310] 化合物44: 向32于无水吡啶中的溶液中添加三苯甲基氯。反应物在60℃下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到44。

[0311] 化合物45: 在0℃下,向44于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的溶液中添加氢化钠(60%于矿物油中)。反应物搅拌1小时,接着添加苯甲基溴且在氩气下在环境温度下搅拌16小时。反应物通过甲醇淬灭且蒸发至干。残余物用乙酸乙酯稀释,溶液用H<sub>2</sub>O及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到45。

[0312] 化合物46: 在75℃下搅拌45于乙酸水溶液(AcOH:H<sub>2</sub>O 4:1)中的溶液3小时。在溶剂移除后,混合物用乙酸乙酯稀释,溶液用H<sub>2</sub>O及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到46。



[0313]

[0314] 化合物47:向46于 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中的溶液中添加三氟化二乙基胺基硫(DAST)。反应物在45℃下搅拌16小时且溶液直接用 $\text{H}_2\text{O}$ 、饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到化合物47。

[0315] 化合物48:向47于无水共溶剂(甲苯、 $\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{CH}_3\text{CN}$ )中的溶液中添加硝酸铯铵(CAN)。反应物在环境温度下搅拌10分钟。溶液用乙酸乙酯萃取,用 $\text{H}_2\text{O}$ 、饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液及 $\text{H}_2\text{O}$ 洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化,得到呈无色油状的化合物48。

[0316] 氟化类似物53的合成

[0317] 化合物49:在-45℃下在氩气下,向供体48、二甲基硫醚、4 Å分子筛及2-氯吡啶于无水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中的溶液中添加三氟甲磺酸酐。反应物在-45℃下搅拌20分钟,在0℃下搅拌20分钟且再在环境温度下搅拌20分钟,接着添加含受体18的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 。反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。溶液经由Celite 545过滤从而移除分子筛。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,溶液用 $\text{H}_2\text{O}$ 及盐水洗涤,经硫酸镁干燥且蒸发至干。混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析(己烷:乙酸乙酯10:1)纯化从而得到49。

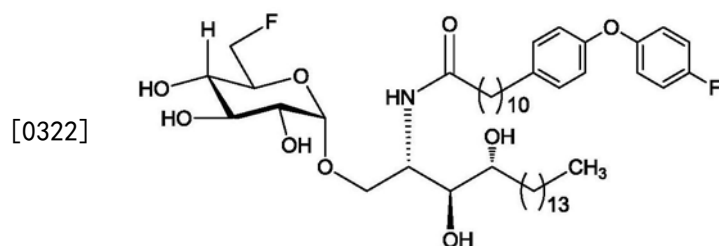
[0318] 化合物50:向49于吡啶/ $\text{H}_2\text{O}$ (10:1)中的溶液中添加三苯基膦。反应物在45℃下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,残余物用乙酸乙酯稀释,用 $\text{H}_2\text{O}$ 、盐水萃取且经硫酸镁干燥,接着蒸发至干。混合物无需预先纯化即用于下一步骤。

[0319] 化合物51:向化合物50于无水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中的溶液中添加4-(4-氟苯氧基)苯基十一酸、 $\text{Et}_3\text{N}$ 、EDC及HBTu。反应物在环境温度下在氩气下搅拌16小时。在溶剂移除后,混合物用乙酸乙酯稀释,用 $\text{H}_2\text{O}$ 、盐水萃取且经硫酸镁干燥,接着蒸发至干。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化从而得到51。

[0320] 化合物52:将化合物51溶解于乙酸水溶液( $\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$  4:1)中且在60℃下搅拌16小

时。在溶剂移除后,混合物用乙酸乙酯稀释,用H<sub>2</sub>O、盐水萃取且经硫酸镁干燥,接着蒸发至干。残余物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化。

#### [0321] 化合物53



[0323] 将二丙酮衍生物52溶解于含有氢氧化钯/碳(20%Pd)(催化剂)的共溶剂(甲醇:CHCl<sub>3</sub> 4:1)中且在H<sub>2</sub>环境中搅拌16小时。溶液经由Celite 545过滤从而移除催化剂且蒸发至干,混合物通过硅胶加压管柱(flash column)层析纯化且用LH20溶离从而得到53。<sup>1</sup>H NMR (MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 600MHz) δ: 7.51 (0.6H, d, J=8.4Hz), 7.09-7.11 (2H, m), 6.97-7.00 (2H, m), 6.91-6.94 (2H, m), 6.83-6.85 (2H, m), 4.85 (1H, d, J=3.6Hz), 4.49-4.59 (2H, m), 4.15-4.18 (1H, m), 3.85 (1H, dd, J=10.8, 4.8Hz), 3.61-3.71 (3H, m), 3.52-3.58 (2H, m), 3.43 (1H, d, J=9.6, 3.6Hz), 3.36 (1H, t, J=9.0Hz), 2.55 (2H, t, J=7.8Hz), 2.18 (2H, t, J=7.8Hz), 1.51-1.64 (6H, m), 1.23-1.39 (39H, m), 0.85 (3H, t, J=7.2Hz)。<sup>13</sup>C NMR (MeOD-CDCl<sub>3</sub> 1:1, 150MHz) δ: 175.06, 174.98, 159.99, 158.40, 155.94, 154.09, 154.08, 138.48, 130.09, 120.52, 120.46, 118.85, 116.63, 116.47, 100.02, 83.18, 82.04, 74.72, 74.31, 72.44, 72.38, 71.78, 71.67, 69.58, 69.54, 50.88, 50.79, 36.88, 36.83, 35.64, 32.64, 32.42, 32.17, 30.29, 30.24, 30.20, 30.14, 30.08, 30.01, 29.99, 29.91, 29.85, 29.74, 26.42, 26.38, 23.13, 14.26。C<sub>47</sub>H<sub>75</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>9</sub>H<sup>+</sup>[M+H]<sup>+</sup>的高分辨率质谱(ESI-TOF)计算值836.5483,实验值836.5498。

#### [0324] 生物学研究

##### [0325] 醣脂类似物注射于小鼠中

[0326] 将全部醣脂以1-2mg/ml的浓度溶解于100%DMSO中。对于活体内实验,在100μl稀释的醣脂或100μl 1%DMSO临注射于小鼠中的前,将全部化合物稀释于生理盐水中达到10μg/ml。自国家实验室动物中心(National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan)获得6-12周龄的无病原体C57BL/6雌性小鼠。Jα18基因剔除(KO)B6小鼠为Dr. Masaru Taniguchi(RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama, Japan)的馈赠。全部小鼠维持在中央研究院细胞与个体生物研究所(Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan)的无病原体饲养室中。

##### [0327] 鼠类细胞激素/趋化激素分泌的测定

[0328] B6野生型或Jα18 KO小鼠以每只小鼠0.1或1μg静脉内注射媒剂或醣脂。在注射后2及18小时收集血清用于通过Beadlyte® Mouse Cytokine套组(Millipore, NY)量测细胞激素/趋化激素且通过Luminex® 200™系统(Luminex, Austin, TX)读取。

##### [0329] 在特定醣脂刺激后小鼠免疫细胞的荧光流式细胞分选仪分析

[0330] 用特定醣脂(每只小鼠1μg)或媒剂(含1%DMSO的PBS)处理的B6野生型或Jα18 KO小鼠在注射后72小时处死且收集其脾。在按压脾穿过70μm滤网且红血球溶解之后,将有核

细胞再悬浮于含有迭氮化物(0.05%)的PBS缓冲液中且在4℃下用识别指定细胞表面抗原的抗体染色30分钟。在洗涤后,对脾细胞进行荧光流式细胞分选仪分析。抗CD3、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD11c、CD80及CD86的抗体自BD Bioscience-PharMingen获得。

[0331] mCD1d与醣脂之间二元复合物的结合强度

[0332] 涂布于ELISA盘上的不同浓度的mCD1d<sup>di</sup>-醣脂复合物用饱和量的与生物素结合的L363抗体(BioLegend)培育,后为抗生蛋白链菌素-HRP侦测及ELISA量测。L363抗体与指定mCD1d<sup>di</sup>-醣脂复合物之间的KD由使用GraphPad Prism软件的L363抗体结合曲线的史卡查变换的线性回归计算得到。发现L363以类似结合强度识别mCD1d<sup>di</sup>-7DW8-5-G1c复合物及mCD1d<sup>di</sup>-7DW8-5复合物。接着,二元复合物的KD测定如下。不同浓度的醣脂与固定量的mCD1d二聚体一起在37℃下培育隔夜,且接着在4℃下将mCD1d<sup>di</sup>-醣脂复合物涂布在96孔ELISA盘上隔夜。在室温(RT)下用BSA洗涤及阻断1小时后,在室温下添加与生物素结合的L363抗体30分钟,接着与抗生蛋白链菌素-HRP一起在室温下培育30分钟且用ELISA读取器侦测。由L363抗体结合曲线的史卡查变换的线性回归计算得到二元复合物的KD值。

[0333] 人类iNKT细胞的扩增

[0334] 人类初始V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞在第2天与在100ng/ml指定醣脂或DMSO下脉冲的自体不成熟CD14<sup>+</sup>DC一起培养18小时。在第3天,将悬浮细胞转移至新培养皿,在50U/ml IL-2(R&D Systems)存在下培养且每3天补充新鲜培养基。在第9天通过流动式细胞测量术测定V $\alpha$ 24<sup>+</sup>/V $\beta$ 11<sup>+</sup>细胞的百分比。在扩增后的总细胞数为在Guava ViaCount试剂(Millipore,USA)下计算得到且通过具有含有ViaCount模块的CytoSoft™软件的Guava系统(Millipore,USA)侦测。

[0335] 各种负载CD1d的醣脂与V $\alpha$ 14+iNKT细胞的结合亲合力

[0336] 简言之,鼠类CD1d:Ig二聚体(BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA)在37℃下以1:10的莫耳比负载有醣脂或媒剂隔夜。鼠类1.2V $\alpha$ 14<sup>+</sup>iNKT细胞与各种剂量的二聚体-醣脂复合物一起在含有迭氮化物(0.05%)的缓冲液中在4℃下培育30分钟。这些细胞接着在4℃下用抗小鼠IgG1-PE mAb(A85-1)再染色30分钟,接着洗涤,用4%多聚甲醛(PFA)固定且通过流动式细胞测量术侦测所结合的mCD1d二聚体复合物。史卡查变换的结合曲线及线性拟合通过Graphpad Prism软件标绘。

[0337] 负载CD1d的醣脂与V $\alpha$ 24+iNKT细胞的结合亲合力

[0338] 如先前所述测定人类CD1d-醣脂复合物与通过7DW8-5在100ng/ml下扩增的V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞的结合亲合力。<sup>19</sup>

[0339] 人类V $\alpha$ 24+iNKT细胞株及源于不成熟单核细胞的树突状细胞的分离及生成

[0340] 如先前所述自末梢血液细胞分离V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞及CD14<sup>+</sup>细胞。<sup>19</sup>不成熟DC由CD14<sup>+</sup>细胞在300U/ml GM-CSF(R&D Systems)及100U/ml IL-4(R&D Systems)存在下培育2天后产生。

[0341] 在7DW8-5或C1下扩增的V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞株产生如下。在用2,000rad照射后,不成熟DC与同系V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞一起在100ng/ml 7DW8-5或C1存在下共培养1天。在脂质移除后,细胞在50U/ml IL-2存在下扩增10-14天。重复相同程序一次从而进一步刺激及扩增iNKT细胞。显示7DW8-5或C1扩增的iNKT细胞株表达V $\alpha$ 24T细胞抗原受体(>95%纯度)。

[0342] mCD1d相较于hCD1d调换分析

[0343] 鼠类DN3A4-1.2V $\alpha$ 14<sup>+</sup>iNKT融合瘤细胞或C1-扩增的V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞用由mCD1d (A20-CD1d细胞) 或hCD1d (HeLa-CD1d细胞) 呈现的指定酯脂抗原在1、0.1及0.01 $\mu$ g/ml下脉冲。在18小时后,收集清液层用于量测细胞激素分泌。通过ELISA分析测定由V $\alpha$ 14<sup>+</sup>iNKT细胞释放的IL-2。使用Beadlyte® Human Cytokine套组 (Millipore, NY, USA) 及Luminex® 200™ 阅读系统侦测由V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞分泌的IFN- $\gamma$ 、IL-4及IL-2。

[0344] 计算机模型化及仿真

[0345] 呈现 $\alpha$ -GalCer至其相应iNKT TCR的人类及小鼠CD1d (hCD1d及mCD1d) 的晶体结构撷取自RCSB蛋白质数据库 (www.rcsb.org; 编码3HUJ、3QUX、3QUY、3QUZ及3HE6的PDB)。这些晶体结构通过参考3QUX的主链原子而迭置。自3HE6及3HUJ获得的两种 $\alpha$ -GalCer三元结构用于形成由不同GSL组成的其他三元复合物。含有C34的三元结构通过修饰Meastro (Schrödinger LLC, USA) 上的酰基链而衍生自含有C1的三元结构。携带C1-Glc及C34-Glc的三元结构通过分别倒转C1及C34的O4对掌性而形成。剩余新三元复合物的模型化分别使用这些GSL及小鼠及人类的3QUX及3HUJ的CD1d-iNKT TCR结构构建。所有结构使用Protein Preparation wizard (Schrödinger LLC, USA) 处理且脂质尾部使用MacroModel的构形搜寻及使用预设方法及在溶剂水中的OPLS2005力场的能量最小化进一步优化从而使空间碰撞减至最少。GSL与iNKT TCR的结合模式通过Autodock4.2使用半经验自由能力场重新计算从而评估在模拟期间的构形。在溶剂中所估计的结合自由能通过Autodock4.2中构建的等式计算:

$$[0346] \quad \Delta G = \Delta V^L (\text{结合-未结合}) + \Delta V^P (\text{结合-未结合}) + \Delta V^{PL} (\text{结合-未结合} + \Delta S_{\text{conf}})$$

[0347] 其中L系指「配位体」;P系指「蛋白质」;V系指成对能量项目,包括对分散/排斥、氢键结及静电的评估; $\Delta S_{\text{conf}}$ 为在结合后损失的构形熵的估计值。运行Autodock4所需的所有输入文件在MGLTools上准备。生成60 $\times$ 60 $\times$ 60 Å<sup>3</sup>的网格及各种原子型能量图。在各分子对接运行中,所有羟基设定成自由旋光性且两个脂质尾部经指派至其先前优化的位姿。采用拉马克遗传算法 (Lamarckian genetic algorithm) (最大数目5.0 $\times$ 10<sup>7</sup>次能量评估及27,000代以及突变率0.02,交叉率0.8) 进行搜寻。在MGLTools中观测结果且通过在函数中构建获得氢键结对个体残基的贡献。图示在Maestro上完成。

[0348] 结果

[0349] 相较于 $\alpha$ Gal的鞘酯脂 (GSL), 具 $\alpha$ Glc的鞘酯脂在人类为较强 (但在小鼠为较弱) 的免疫调节剂

[0350] 先前,每只小鼠0.1 $\mu$ g 7DW8-5足够用于免疫刺激,<sup>19</sup>但葡萄糖类似物7DW8-5-Glc诱导免疫反应需要较高剂量 (每只小鼠1 $\mu$ g) (图6)。因此,在每只小鼠静脉内注射1 $\mu$ g酯脂后2及18小时,在B6小鼠中测试新合成酯脂的生物活性。如图2及图7中所示,甘露糖类似物7DW8-5-Man未能诱导任何细胞激素/趋化激素。与具有 $\alpha$ Glc的GSL相比,具有 $\alpha$ Gal的GSL诱导较高含量的细胞激素及趋化激素,包括IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6、GM-CSF、TNF $\alpha$ 及IP-10。注意到具有不同酯基的 $\alpha$ GalCer及C34类似物的类似趋势 (图2A、2B及图7)。

[0351] 虽然C1-Glc及C34-Glc触发细胞激素及趋化激素,但7DW8-5-Glc诱导极低含量的Th1及Th2细胞激素,但相对高含量的KC、MCP-1、IP-10及MIG趋化激素。为探测除iNKT细胞外的其他免疫细胞可通过7DW8-5-Glc促成趋化激素诱导的可能性,不具有iNKT细胞的J $\alpha$ 18

KO小鼠以每只小鼠1 $\mu$ g注射7DW8-5-G1c或7DW8-5。<sup>25</sup>在注射后2及18小时收集的小鼠血清未展示由7DW8-5或7DW8-5-G1c诱导细胞激素(图2A、2B及图7)。出人意料的是,7DW8-5-G1c而非7DW8-5触发J $\alpha$ 18 KO小鼠的数个趋化激素的分泌,包括KC、MCP-1、IP-10及MIG。这些发现表明J $\alpha$ 18 KO小鼠中除iNKT细胞以外的免疫细胞一定对用7DW8-5-G1c处理的野生型小鼠及J $\alpha$ 18 KO小鼠的趋化激素产生具有贡献。

[0352] 接着,吾等分析在醣脂刺激后3天野生型小鼠的免疫细胞的扩增/激活。经具有 $\alpha$ Gal头部的GSL处理的小鼠中总T细胞、CD4<sup>+</sup>T及CD8<sup>+</sup>T细胞的数目高于经具有 $\alpha$ G1c的GSL处理的小鼠(图2C、8E及8F)。此符合具有 $\alpha$ Gal的GSL与具有 $\alpha$ G1c的GSL相比在小鼠中诱导更多细胞激素/趋化激素的观察结果(图2A、2B及7)。在具有 $\alpha$ G1c的GSL当中免疫刺激活性的进一步比较揭示C1-G1c及C34-G1c与7DW8-5-G1c相比更好地诱导细胞激素/趋化激素(图2A、2B及7)及扩增/激活DC(图8B-8D)。C34-G1c与7DW8-5-G1c相比激活约2倍多的CD80<sup>+</sup>或CD86<sup>+</sup>DC(图8C及8D),但其诱导类似数目的总脾细胞及DC(图8A及8B)。与7DW8-5-G1c相比,C1-G1c不仅扩增约1.3倍多的脾细胞及DC(图8A及8B),而且激活约3.5倍多的CD80<sup>+</sup>DC以及约3倍多的CD86<sup>+</sup>DC(图8C及8D)。增加的DC扩增/激活可有助于活体内由C1-G1c及C34-G1c触发与7DW8-5-G1c相比的较强免疫原性。相比之下,7DW8-5-Man未扩增任何类型的免疫细胞(图2C及8),与缺乏细胞激素/趋化激素的诱导相符(图2A、2B及7)。

[0353] 出乎意料地,吾等亦观测到7DW8-5-G1c在J $\alpha$ 18 KO小鼠中诱导趋化激素(图7)。在静脉内注射7DW8-5-G1c或7DW8-5后3天J $\alpha$ 18 KO小鼠脾细胞的荧光流式细胞分选仪分析揭示源于CD11c<sup>hi</sup>单核细胞的DC显著扩增且由7DW8-5-G1c而非7DW8-5激活(图9B-9D)。在用7DW8-5或7DW8-5-G1c刺激后,注意到总脾细胞、CD4<sup>+</sup>T及CD8<sup>+</sup>T细胞无显著差异(图9A、9E及9F)。这些发现指示单核细胞可负责在用7DW8-5-G1c处理的J $\alpha$ 18 KO小鼠中诱导趋化激素,诸如KC、MCP-1、IP-10及MIG。

[0354] 如上所述,与具有 $\alpha$ G1c的醣脂类似物相比,具有 $\alpha$ Gal的醣脂类似物为小鼠中较强的免疫调节剂,尤其用于7DW8-5与7DW8-5-G1c之间的比较。为研究类似趋势是否亦适用于人类iNKT细胞,使自末梢血液分离的V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞在第2天与用100ng/ml指示醣脂脉冲的不成熟DC一起培育。在第3天移除抗原后,在IL-2存在下培养人类iNKT细胞。在第9天使用Guava ViaCount试剂计数扩增iNKT细胞的数目。出人意料的是,7DW8-5-G1c与7DW8-5相比显著( $p=0.0009$ )更好地活体外扩增人类iNKT细胞(图2D)。综合而言,这些发现表明具有 $\alpha$ Gal的GSL的生物活性与具有 $\alpha$ G1c的GSL相比在小鼠中更有效,但在人类中不太有效。

[0355] mCD1d与醣脂的间的二元相互作用

[0356] 为理解7DW8-5及7DW8-5-G1c的免疫调节活性的差异基础,吾等使用可结合至与醣脂复合的mCD1d的L363mAb量测mCD1d与特定醣脂之间的二元相互作用的结合强度。<sup>26</sup>各种浓度的在固定比率下的mCD1d<sup>di</sup>-醣脂复合物与饱和量的L363-生物素抗体一起培育,接着进行抗生蛋白链菌素-HRP侦测及ELISA量测(图10A)。使用GraphPad Prism软件由标绘图(图10A)的史卡查变换的线性回归计算得到L363与指定mCD1d<sup>di</sup>-醣脂复合物之间的解离常数(KD)。发现L363以与mCD1d<sup>di</sup>-7DW8-5复合物类似的结合强度识别mCD1d<sup>di</sup>-7DW8-5-G1c复合物(图10B)。接着,我们通过培育不同浓度的醣脂与固定量的mCD1d二聚体及L363-生物素抗体,接着进行抗生蛋白链菌素-HRP侦测及ELISA量测来测定二元复合物的KD(图10C)。由L363侦测读数绘制的结合曲线的史卡查变换计算得到KD(图10D)。不出意料的是,具有与

7DW8-5相同脂质尾部的7DW8-5-Glc以类似强度结合至mCD1d二聚体,但其结合亲和力比 $\alpha$ GalCer大约20倍。此指示二元相互作用的强度可能不造成7DW8-5与7DW8-5-Glc之间的差异性免疫激活能力。

[0357] CD1d-GSL复合物与iNKT细胞之间的三元相互作用

[0358] 接着,吾等量测小鼠及人类中CD1d-糖脂复合物与iNKT TCR之间的三元相互作用。不同浓度的mCD1d<sup>di</sup>-糖脂及hCD1d<sup>di</sup>-糖脂复合物分别与固定量的DN3A4-1.2鼠类iNKT融合瘤细胞及人类V $\alpha$ 24<sup>+</sup>/V $\beta$ 11<sup>+</sup>iNKT细胞一起培育。在指定浓度下结合复合物的含量通过抗mIgG1二级抗体侦测且通过流动式细胞测量术分析(图3A及3B)。使用GraphPad Prism软件由图3A及3B中标绘图的史卡查变换计算得到三元复合物的KD。如图3C中所示,mCD1d-7DW8-5复合物与mCD1d-7DW8-5-Glc复合物相比呈现约10倍强的与iNKT TCR的相互作用。此与较高百分比的C1脉冲的脾细胞由mCD1d-7DW8-5复合物(36.2 $\pm$ 5.0%)而非mCD1d-7DW8-5-Glc复合物(17.1 $\pm$ 0.8%)染色的观察结果相符(图11)。当与mCD1d复合时,C1(KD:1.240 $\pm$ 0.003nM)及C34(KD:0.735 $\pm$ 0.010nM)皆展现分别与C1-Glc(KD:5.137 $\pm$ 0.110nM)及C34-Glc(KD:7.960 $\pm$ 1.269nM)相比对于iNKT TCR较强的三元相互作用(图3C)。

[0359] 在人类中,具有 $\alpha$ Glc的GSL(C1-Glc的KD:8.550 $\pm$ 0.617;C34-Glc:0.378 $\pm$ 0.019;7DW8-5-Glc:0.481 $\pm$ 0.008nM)与具有 $\alpha$ Gal的GSL(C1的KD:16.410 $\pm$ 4.200;C34:0.498 $\pm$ 0.005;7DW8-5:0.777 $\pm$ 0.022nM)相比在与hCD1d复合时展现对于V $\alpha$ 24<sup>+</sup>/V $\beta$ 11<sup>+</sup>iNKT TCR较强的三元相互作用(图3D)。因此,与脂质尾部的类型无关,具有 $\alpha$ Gal的GSL与具有 $\alpha$ Glc的GSL相比展现与小鼠iNKT TCR的较强三元相互作用,但与人类iNKT TCR的较弱三元相互作用(图3C及3D)。此可解释具有 $\alpha$ Gal的GSL在小鼠中触发较高含量的细胞激素/趋化激素及免疫细胞的较大扩增(图2A~2C、7及8),而在人类中的iNKT细胞扩增较小(图2D)的观察结果。综合而言,在iNKT TCR、CD1d及GSL当中的三元相互作用相比CD1d与GSL之间的二元相互作用似乎与糖脂的生物活性更加相关。

[0360] 调换人类相较于小鼠CD1d分子抵抗iNKT细胞的效应

[0361] 为解释物种特异性反应,吾等检查调换人类相较于小鼠CD1d分子抵抗人类相较于鼠类iNKT细胞对于具有不同糖基的GSL的刺激活性的效应。鼠类iNKT融合瘤细胞(图4A)或C1扩增的人类V $\alpha$ 24<sup>+</sup>iNKT细胞(图4B)用由mCD1d(A20-CD1d)或hCD1d(HeLa-CD1d)呈现的指定糖脂脉冲。24小时后收集清液层从而量测细胞激素分泌。不论由mCD1d或hCD1d呈现,具有 $\alpha$ Gal的GSL与具有 $\alpha$ Glc的GSL相比诱导更多IL-2自鼠类iNKT细胞分泌(图4A)。此与具有 $\alpha$ Gal的GSL与具有 $\alpha$ Glc的GSL相比更有效地诱导血清细胞激素分泌的活体内发现相符(图2及7)。相比之下,当由mCD1d或hCD1d呈现时,具有 $\alpha$ Glc的GSL与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比触发更多IL-2自人类iNKT细胞分泌(图4B)。在人类iNKT细胞的IFN- $\gamma$ 及IL-4分泌上亦观测到类似趋势(图12A及图12B)。具有不同糖基的GSL的物种特异性刺激活性通过鼠类相较于人类iNKT TCR(而非CD1d)指示。相比而言,7DW8-5-Man可能不刺激小鼠及人类iNKT细胞分泌任何细胞激素,与其由mCD1d或hCD1d呈现无关。值得注意的是,所有具有 $\alpha$ Glc的GSL与C1相比基于IFN- $\gamma$ 比IL-4的比率触发显著更加Th1偏斜的反应(图12C)。此外,与脂质尾部无关,具有 $\alpha$ Glc的GSL与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比在人类中似乎更加偏向Th1(图12C)。这些发现指示在糖基4'-OH处的修饰可选择性诱导人类iNKT细胞朝向Th1方向的反应。

[0362] CD1d-GSL-iNKT TCR的三元复合物的结构模型化



[0363] 为进一步解释小鼠及人类三元复合物的差异性结合亲和力,分别基于鼠类及人类 CD1d- $\alpha$ GalCer-iNKT TCR复合物的x射线结构进行计算机模型化(PDB访问代码3HUJ、3QUX、3QUY、3QUZ及3HE6)。<sup>27-29</sup>

[0364] (1) 糖头基的相互作用

[0365] 如图3A及3B中所示,当与CD1d复合时,具有Man的GSL可能不结合至小鼠及人类 iNKT细胞。甘露糖中的立式2'OH形成抵抗iNKT TCR的位阻(人类中的Ser30及小鼠中的 Asn30)且损失最初通过半乳糖的2'OH对iNKT TCR形成的两个氢键(人类中的Gly96及 Asp151以及小鼠中的Gly96及Asp153)。对于具有Gal的GSL,C1与小鼠及人类的CD1d及iNKT TCR的结合分别展示于图5A及5B中。在大多数保守残基中观测到氢键(H键)相互作用的形成,包括CD1d的人类Asp80(小鼠Asp80)、人类Thr154(小鼠Thr156)、人类Asp151(小鼠Asp 153)及iNKT TCR的人类Gly96(小鼠Gly96)。另一方面,C1的3'OH/4'OH与人类及小鼠iNKT TCR的H键相互作用非常不同。小鼠iNKTTCR的残基Asn30对于结合至C1的3'-及4'-OH而言为关键的。使用MGLTools估计Asn30的自由能贡献为-2.27~-3.38Kcal/mol。相比而言,人类 iNKTTCR的Ser30距离C1的4'-OH较远,产生仅与3'-OH的较弱H键,而H键可在C1的4'-OH与 Phe29的主链C=O基团之间形成(图5B)。C1的Ser30与3'-OH及Phe29与4'-OH的自由能贡献经计算为约-1.23~-1.63Kcal/mol。因此,4'OH的轴向(Gal)至水平向(Glc)方向的变化将损失与iNKT TCR的小鼠Asn30及人类Phe29的H键相互作用。分别与C1及C34相比,C1-Glc及 C34-Glc缺乏与鼠类Asn30的H键相互作用,使得自由能降低(通过MGLTools计算得到-0.7~-0.9Kcal/mol)。此符合当半乳糖变成葡萄糖头部时在KD量测中鼠类三元相互作用的下 降(图3C)。相反,具有葡萄糖的GSL的人类三元相互作用较大(图3D)。基于计算机模型化,吾 等发现葡萄糖的水平向4'-OH可通过与结晶水的较强相互作用( $\sim$ -1.84Kcal/mol)而补偿 Phe29相互作用的损失(-0.4Kcal/mol),结晶水由人类iNKT TCR-Phe51及hCD1d-Trp153捕 获(图5C)。在小鼠中无疏水性空间形成及捕获的水分子的情况下,具有Glc的GSL的三元相 互作用与具有Gal的GSL相比应较弱。

[0366] (2) 脂质尾部的相互作用

[0367] C34的酰基尾部的两个芳环可与CD1d的Phe70及Trp63形成芳族相互作用。因此,C1 至C34的酰基尾部的变化可增加与CD1d的相互作用(通过模型化-1.8~-2.4Kcal/mol)。另 外,来自芳族相互作用的较高能量可驱使C34或C34-Glc的酰基链至CD1d内A'信道的较低位 置(接近Cys12),产生对头基取向的细微扰动(图5D)。因此,在小鼠iNKT TCR与葡萄糖头部 的水平向4'-OH之间无亲和力(congenial force) (<http://tw.dictionary.yahoo.com/dictionary?p=congenial>) 的情况下,mCD1d-C34-Glc与iNKT TCR的结合与mCD1d-C1-Glc 相比较弱(图3C)。此可解释为何在小鼠中C34-Glc不如C1-Glc有效,而C34优于C1。(3) 使用 AUTODOCK4计算的自由能

[0368] 计算三重复中结合至人类及小鼠CD1d-iNKT TCR的各GSL的自由能。在每一轮中, GSL对接至人类及小鼠CD1d-C1-iNKT TCR且选择排列最高的自由能。如图5E中所示,计算的 自由能一般与对小鼠(图3C)及人类(图3D)量测的KD值的趋势相关。

[0369] 多种方式可用于调配本发明的组合物。调配及投与的技术可见于[Remington:The Science and Practice of Pharmacy,]Twentieth Edition,Lippincott Williams& Wilkins,Philadelphia,PA(1995)。关于人类或动物投与,制剂应满足无菌性、发热性及一



般安全性及与由FDA所要求相当的纯度标准。如本文所述,医药调配物的投与可以多种方式进行。

[0370] 在GSL、CD1d及iNKT TCR当中的细胞激素诱导及三元相互作用

[0371] 与 $\alpha$ GalCer相比,已报导 $\alpha$ GlcCer对鼠类iNKT细胞增生的刺激较小,但更有效地刺激人类iNKT细胞增生<sup>5,22</sup>。在吾等研究中,在GSL、CD1d及iNKTTCR当中的细胞激素诱导及三元相互作用方面亦观测到小鼠及人类中 $\alpha$ GalCer与 $\alpha$ GlcCer之间的差异性活性。此外,携带 $\alpha$ Gal或 $\alpha$ Glc头部的苯基GSL展示出类似物种特异性活性。因此,与脂质尾部无关,具有 $\alpha$ Gal的GSL与具有 $\alpha$ Glc的GSL相比在小鼠中较好,但在人类中较糟。此指示醣脂在小鼠中的生物活性无法解读成在人类中的生物活性,尽管小鼠与人类之间CD1d及iNKT TCR的序列高度同源。<sup>30</sup>

[0372] 一如通过mCD1d相较于hCD1d调换分析所证明,物种特异性反应最可能归因于小鼠与人类之间的iNKT TCR差异。通过mCD1d或hCD1d呈现,具有 $\alpha$ Gal的GSL与具有 $\alpha$ Glc的GSL相比更能有效地刺激鼠类iNKT细胞,但对人类iNKT细胞的刺激较小。根据CD1d- $\alpha$ GalCer-iNKT TCR的晶体结构,iNKT TCR的CDR1 $\alpha$ 区中与半乳糖头部的4'-OH接触的残基在小鼠(Asn30)与人类(Phe29)之间并不保守<sup>27,28</sup>。吾等计算机模型化揭示4'-OH自轴向至水平方向的变化在小鼠中会导致4'-OH与iNKT TCR-Asn30之间的氢键损失。相反,葡萄糖的水平向4'-OH可通过与结晶水的较强相互作用补偿Phe29相互作用的缺失,结晶水由人类iNKT TCR-Phe51及hCD1d-Trp153捕获。因此,由具有 $\alpha$ Glc的GSL组成的三元相互作用与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比在人类中较强,但在小鼠中较弱。综合而言,鼠类及人类CD1d-GSL-iNKT TCR复合物的结构模型化提供物种特异性生物活性及计算的自由能变化与三元复合物量测的结合亲合力的趋势非常相关的良好解释。

[0373] 相比于具有相同尾部但不同醣基的吾等配对类似物,亦在具有相同醣基但不同脂质尾部的其他情况中看出物种特异性免疫反应<sup>31,32</sup>。类似地,塑造两种C-醣苷类似物在小鼠与人类之间的优选活性的为iNKT TCR,而非CD1d,其与三元复合物的结合强度非常相关。<sup>31</sup>对于吾等醣脂,三元相互作用与二元相互作用相比在预测小鼠及人类的生物反应时亦更加重要。与C1相比,7DW8-5及7DW8-5-Glc与mCD1d的结合强得多,可能归因于苯环及氟化原子与CD1d A'袋的接触增加。<sup>33</sup>尽管具有相同脂质尾部的两种醣脂展现对CD1d的类似结合强度,但其展示不同免疫刺激效能。7DW8-5-Glc与7DW8-5相比在人类中较好,但在小鼠中较糟,其与三元复合物的结合亲合力具有良好关系。除7DW8-5及7DW8-5-Glc以外,其他两种配对类似物(C1相较于C1-Glc及C34相较于C34-Glc)在小鼠及人类中的生物活性亦与三元相互作用的强度非常相关。亦即,具有 $\alpha$ Gal的GSL与具有 $\alpha$ Glc的GSL相比在小鼠中展示较强三元相互作用及免疫刺激活性,但在人类中的趋势相反。因此,活体外量测三元相互作用可用于预测吾等新醣脂的活体内免疫刺激效能。

[0374] 在具有 $\alpha$ Glc的GSL当中的进一步比较揭示C1-Glc及C34-Glc与7DW8-5-Glc相比皆在小鼠中较好地诱导细胞激素。然而,C34-Glc及7DW8-5-Glc的鼠类三元复合物的结合亲合力为可比的。这些发现表明除KD以外的因素亦可调节活体内免疫反应。实际上,与7DW8-5-Glc相比,C1-Glc及C34-Glc激活更多CD80<sup>+</sup>或CD86<sup>+</sup>DC,其可有助于小鼠中C1-Glc及C34-Glc的较强生物活性。综合而言,包括三元相互作用的强度及免疫细胞的扩增/激活的数个因素可调节活体内免疫刺激。

[0375] 相比于具有 $\alpha$ Gal或 $\alpha$ Glc的GSL, $\alpha$ ManCer及7DW8-5-Man未能在小鼠及人类中诱导iNKT细胞增生<sup>5,22</sup>、细胞激素/趋化激素及/或免疫细胞的扩增/激活。此可归因于鼠类或人类iNKT TCR可识别 $\alpha$ Man头部的事实,如通过iNKT细胞中不存在用CD1d-7DW8-5-Man二聚体的染色所证明。与7DW8-5-Man相比,7DW8-5-Glc即使在极低含量下仍能够在小鼠中诱导Th1及Th2细胞激素。相比而言,在野生型及J $\alpha$ 18 KO小鼠中由7DW8-5-Glc触发大量KC、MCP-1、IP-10及MIG趋化激素,表明除iNKT细胞以外的某些类型的免疫细胞可有助于这些趋化激素分泌。实际上,单核细胞在J $\alpha$ 18 KO小鼠中由7DW8-5-Glc显著扩增/激活。已报告单核细胞可回应于刺激产生这些趋化激素<sup>34-37</sup>,表明单核细胞可造成经7DW8-5-Glc处理的小鼠的趋化激素分泌。尽管如此,吾等仍不能排除J $\alpha$ 18 KO小鼠中存在的其他可能来源亦可发挥作用。V $\alpha$ 10 NKT细胞可活体外回应于 $\alpha$ GalCer及 $\alpha$ GlcCer产生IFN- $\gamma$ 及IL-4,<sup>38</sup>但IFN- $\gamma$ 未分泌于用 $\alpha$ GalCer处理的J $\alpha$ 18 KO小鼠的血清中。<sup>39</sup>吾等未能侦测用7DW8-5或7DW8-5-Glc处理的J $\alpha$ 18 KO小鼠产生任何细胞激素。这些发现暗示V $\alpha$ 10 NKT细胞几乎不促成在小鼠中由7DW8-5-Glc触发趋化激素。

[0376] 然而,大多数细胞激素及趋化激素不在用7DW8-5或7DW8-5-Glc刺激的J $\alpha$ 18 KO小鼠中产生,包括IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-6、GM-CSF及TNF $\alpha$ 。如CD4<sup>+</sup>T及CD8<sup>+</sup>T细胞的免疫细胞不在J $\alpha$ 18 KO小鼠中扩增。因此,iNKT细胞仍在上文提及的通过7DW8-5或7DW8-5-Glc的细胞激素/趋化激素诱导及免疫细胞扩增发挥关键作用。

[0377] 总之,具有 $\alpha$ Glc的GSL与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比在人类中具有较强三元相互作用且触发更加偏向Th1的免疫。然而,具有 $\alpha$ Glc的GSL与具有 $\alpha$ Gal的GSL相比在小鼠中的刺激较小。如由mCD1d相较于hCD1d调换分析所证实,物种特异性反应归因于物种之间三元复合物的差异性结合亲和力,反映鼠类及人类iNKT TCR之间的差异。此符合在小鼠及人类中基于CD1d- $\alpha$ GalCer-iNKT TCR复合物的结晶结构的通过计算机模型化的预测。<sup>27-29</sup>除CD1d-糖脂复合物与TCR之间的三元相互作用以外,扩增/激活的单核细胞亦可调节活体内免疫反应,尤其对于具有 $\alpha$ Glc的GSL。

[0378] 根据吾等研究,糖基上的4'OH方向的变化在小鼠及人类中引起不同生物活性。此与引入至 $\alpha$ GalCer头部的4'OH的芳族基可影响小鼠的iNKT细胞细胞激素产生的报导相符,但其在人类中的效应未研究。<sup>40</sup>在糖基6位处的改变亦展示对于生物反应的不同效应。<sup>29,41</sup>这些发现连同吾等研究提供未来设计及合成新GSL的新方向。

[0379] 在本申请案通篇,引用各种公开案、专利及公开专利申请案。本申请案中提及的这些公开案、专利及公开专利申请案的发明内容以全文引用的方式并入本发明中。公开案、专利或公开专利申请案在本文中的引用并非承认所述公开案、专利或公开专利申请案为先前技术。

[0380] 本说明书中所引用的所有公开案及专利申请案以引用的方式并入本文中,就如同各个别公开案或专利申请案特定地且个别地指示以引用的方式并入一般。

[0381] 尽管已出于清楚理解的目的通过说明及实例相当详细地描述前述发明,但根据本发明的教导,可在不背离随附申请专利范围的精神及范畴下对其进行某些变化及变更将对于一般熟习此项技术者易于变得显而易见。

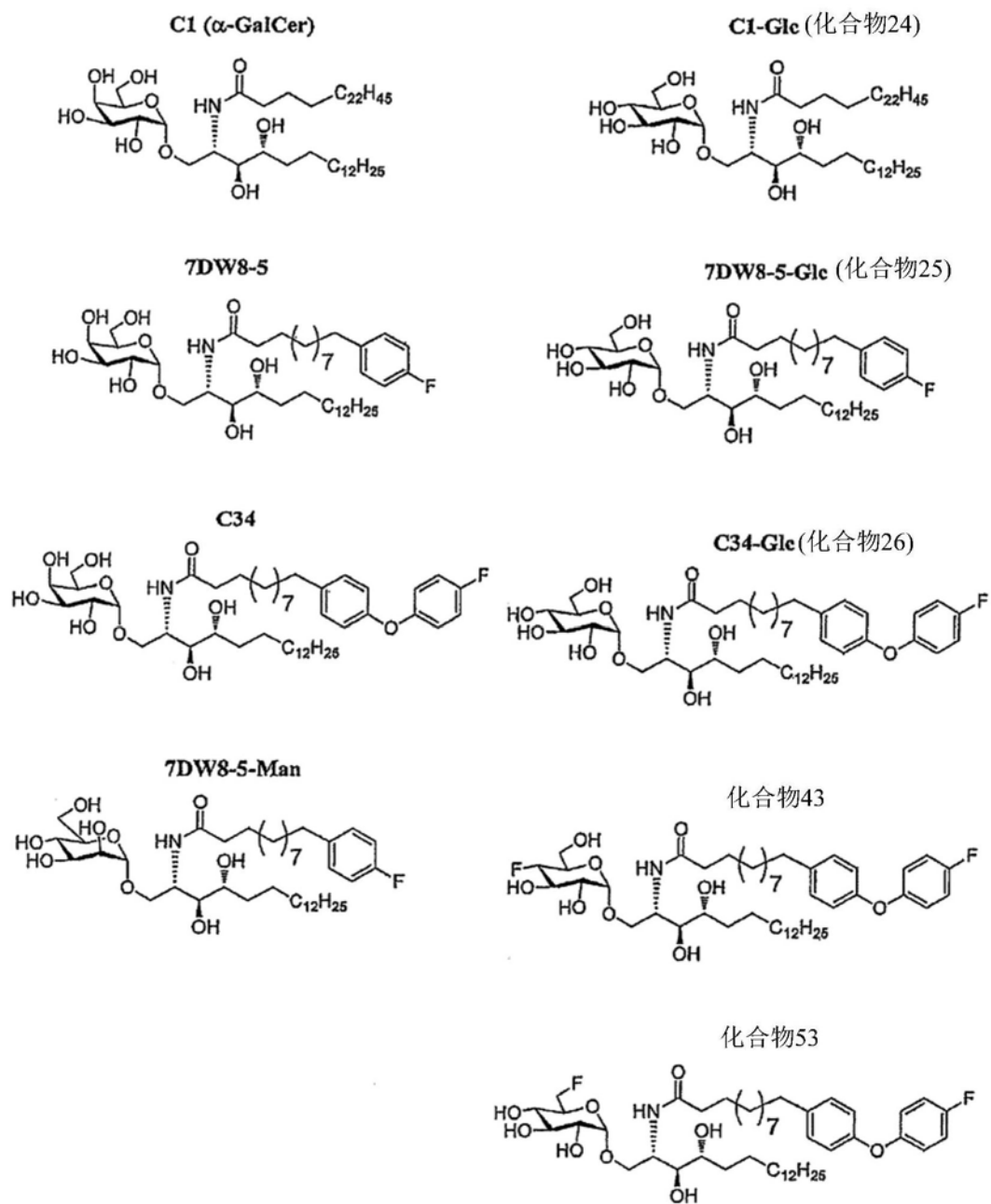


图1A

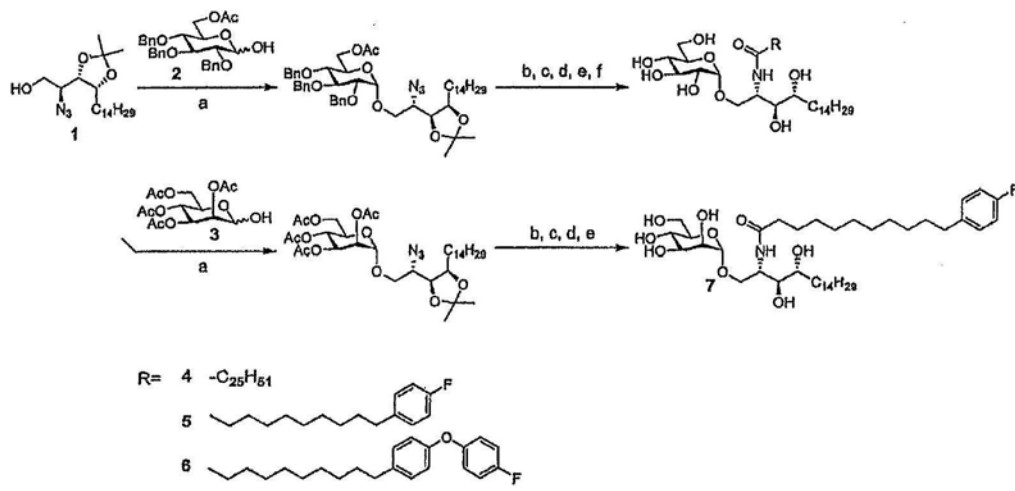


图1B

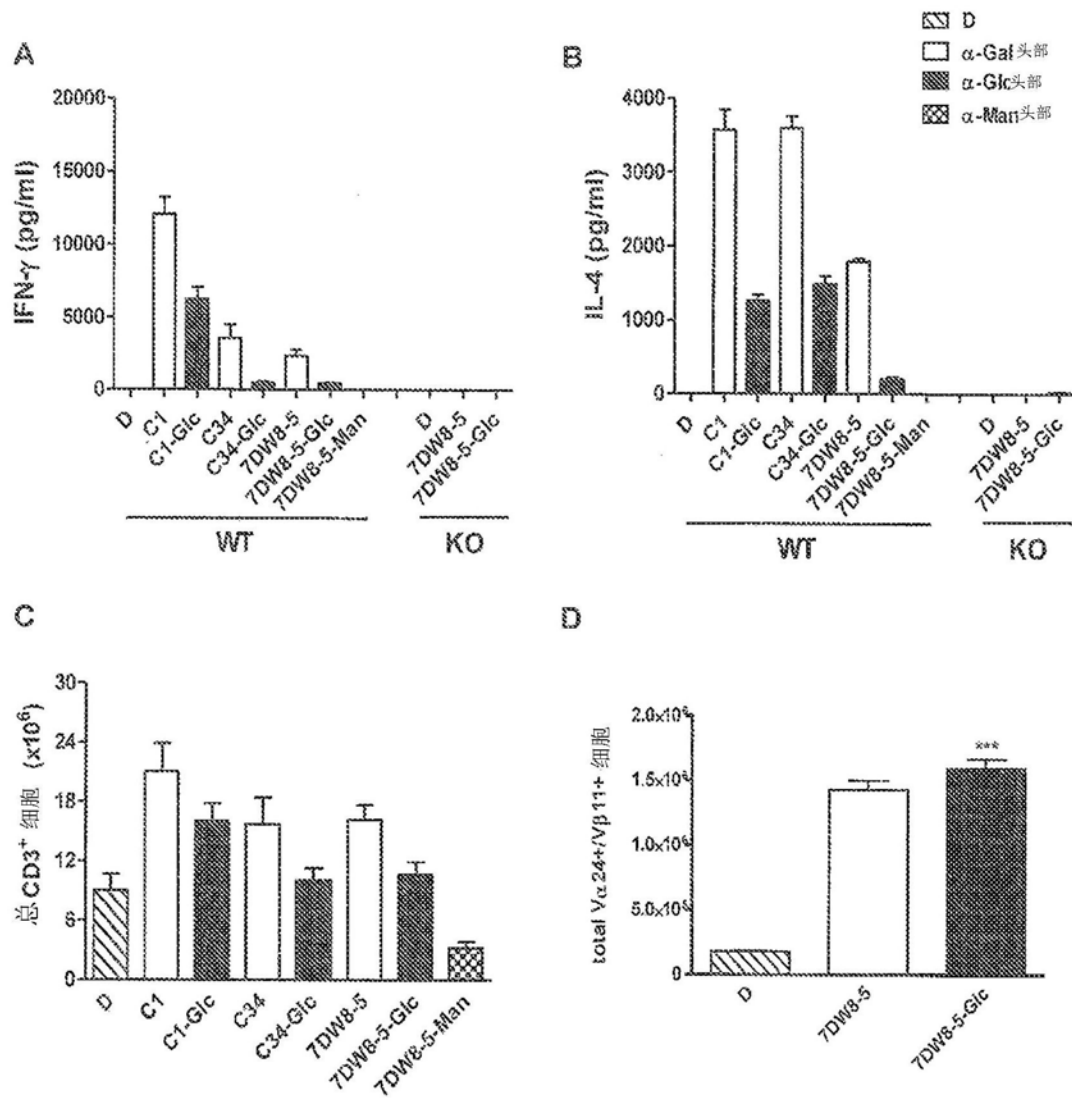


图2

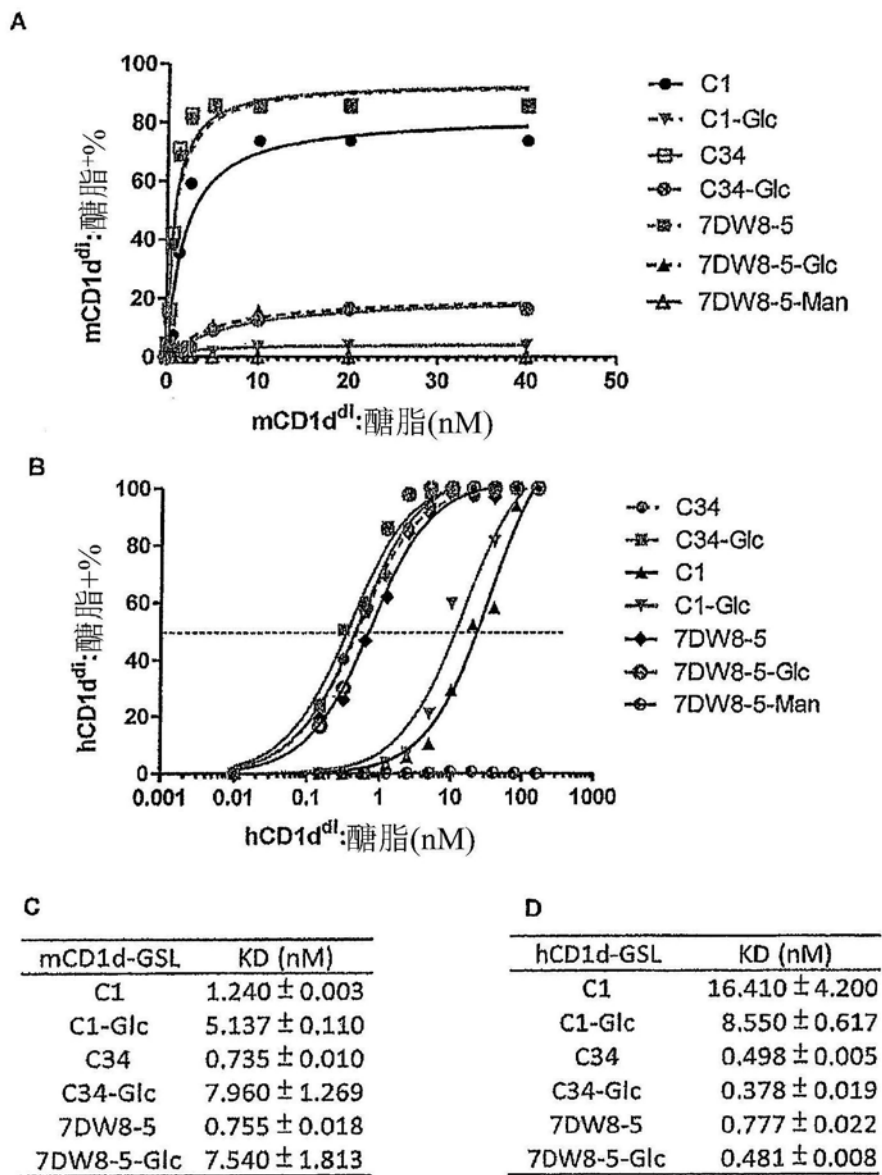


图3

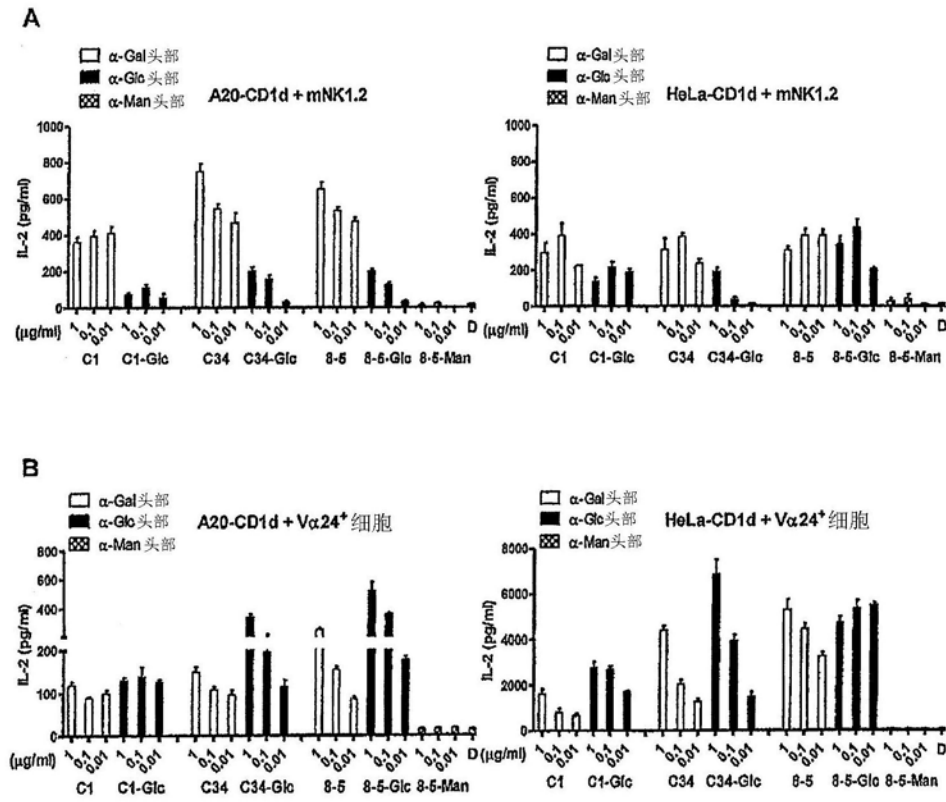


图4

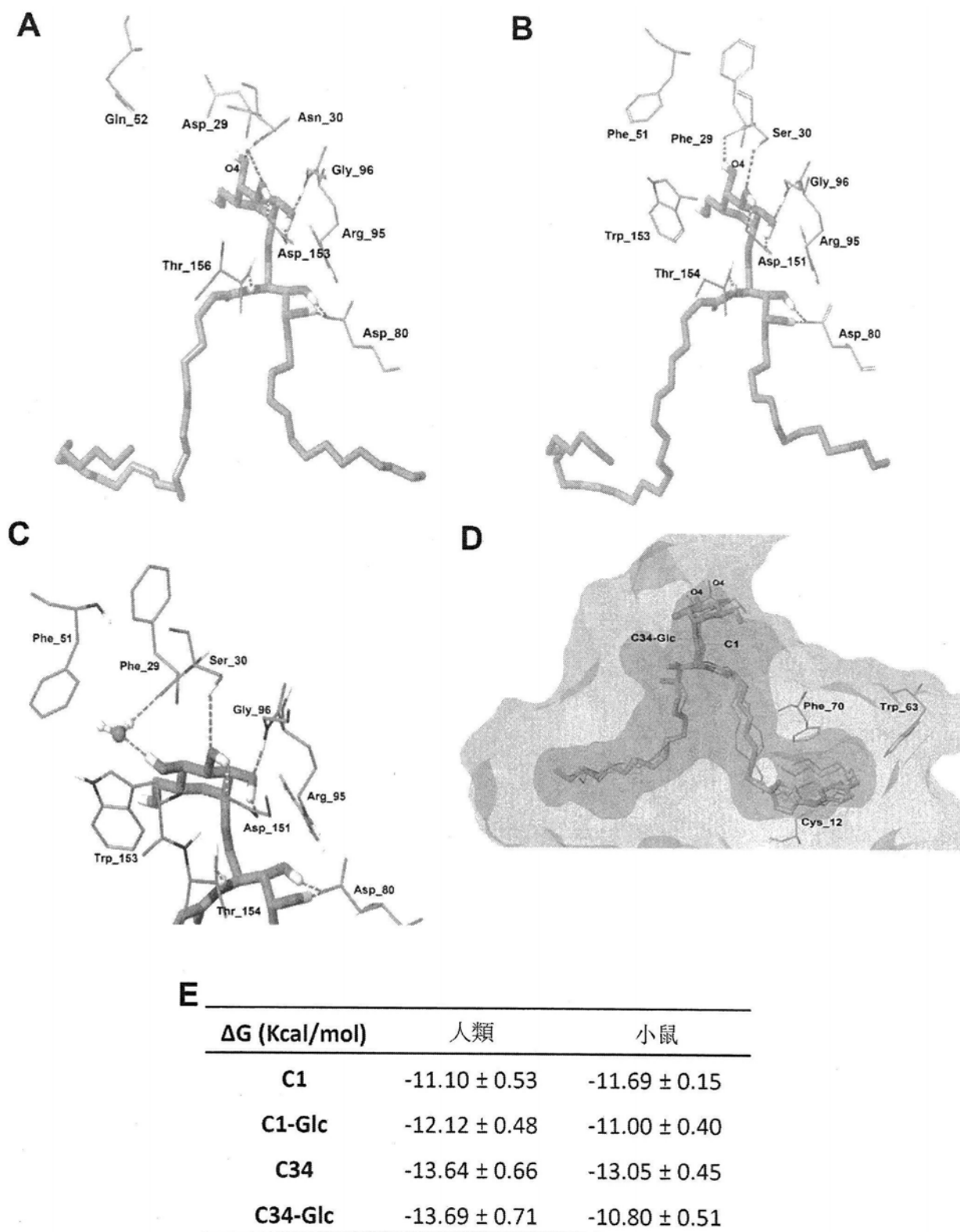


图5

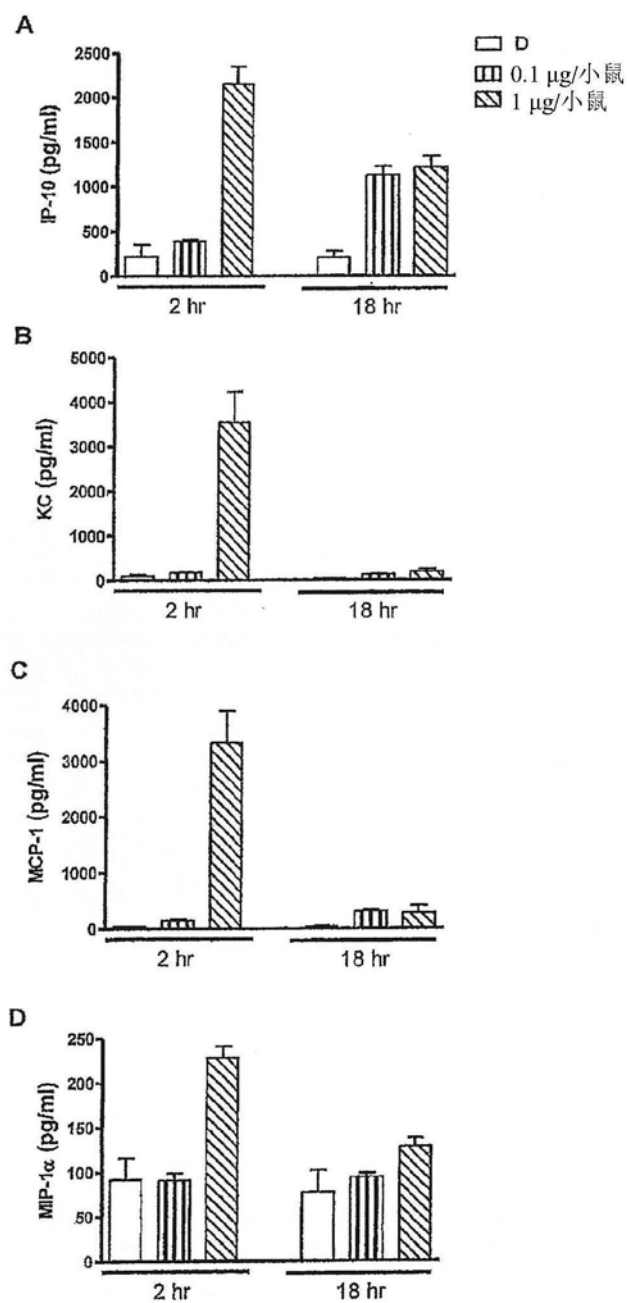


图6



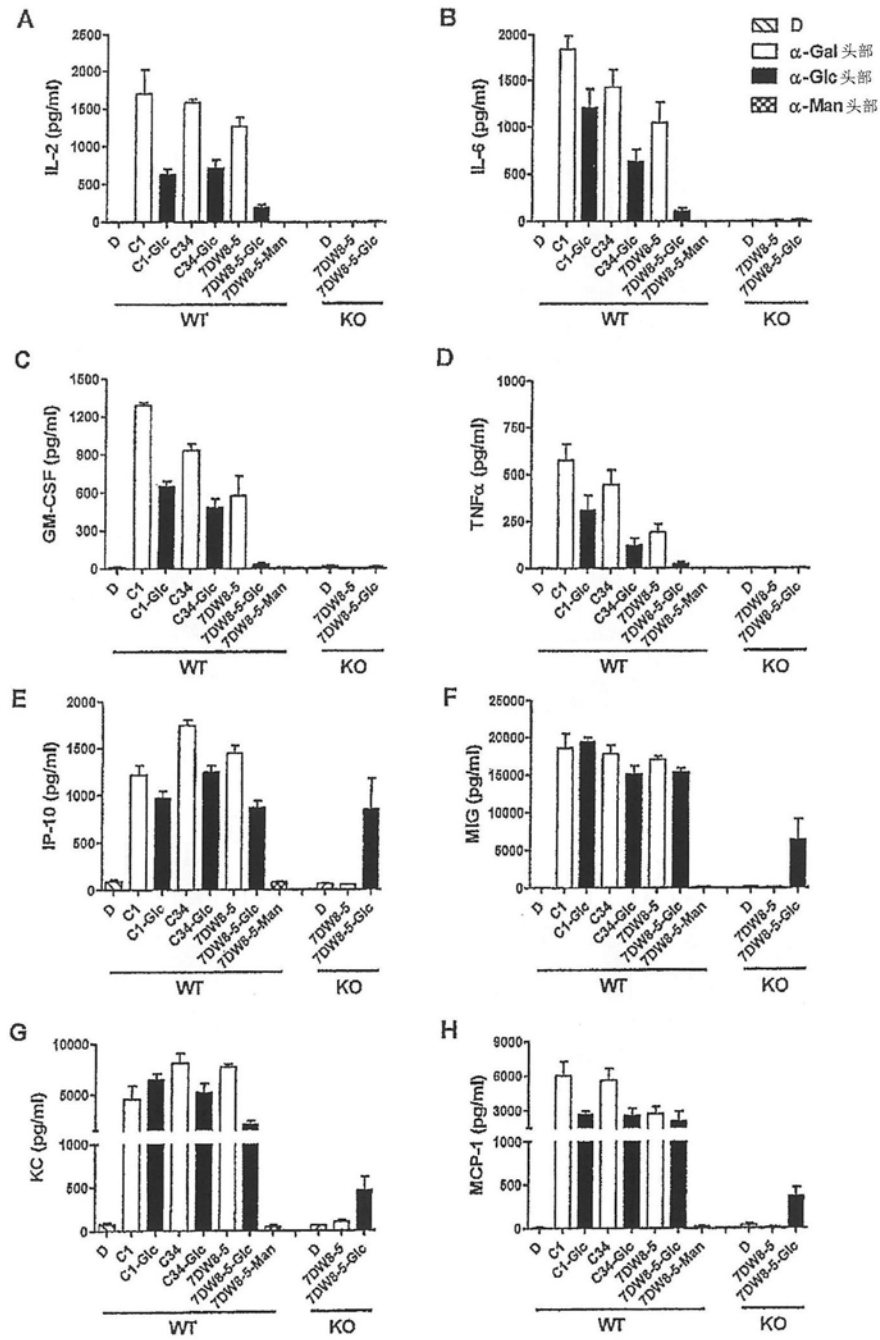


图7

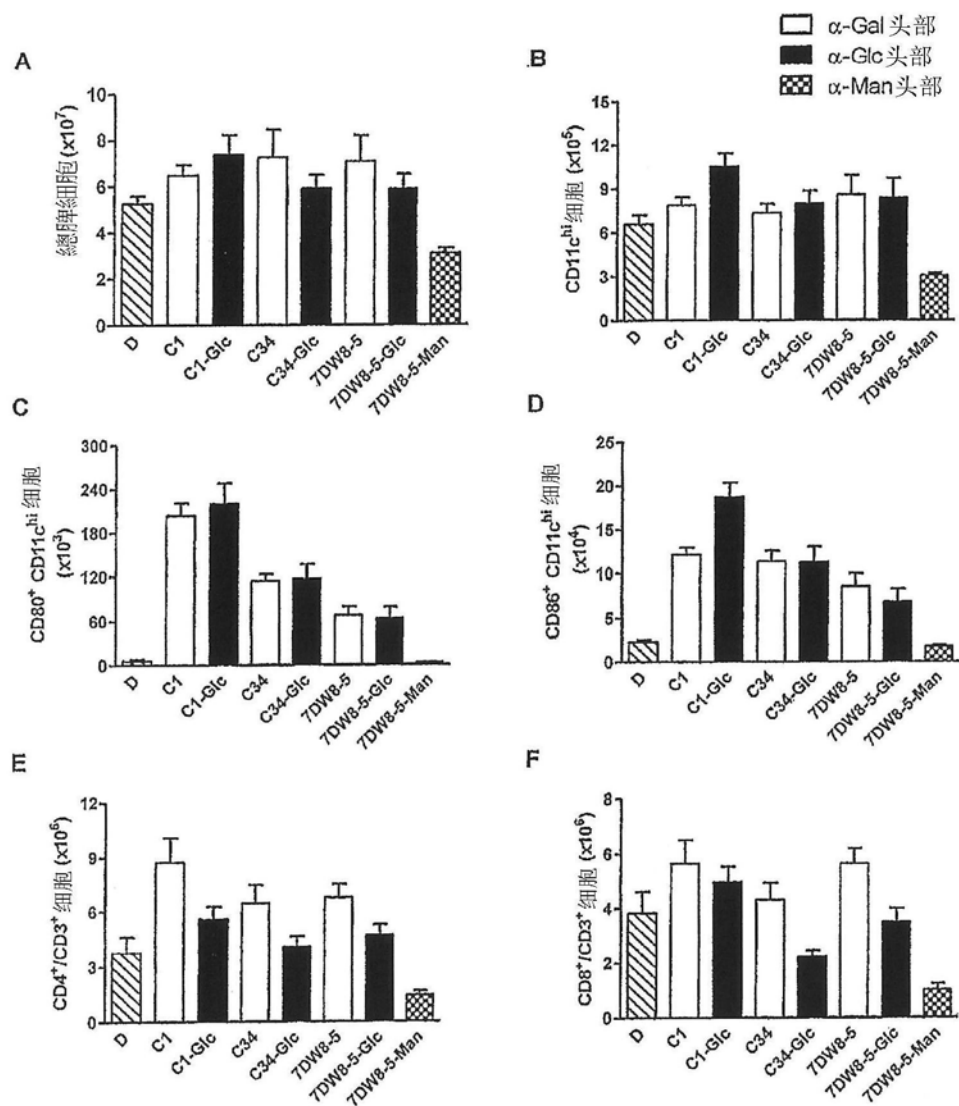


图8

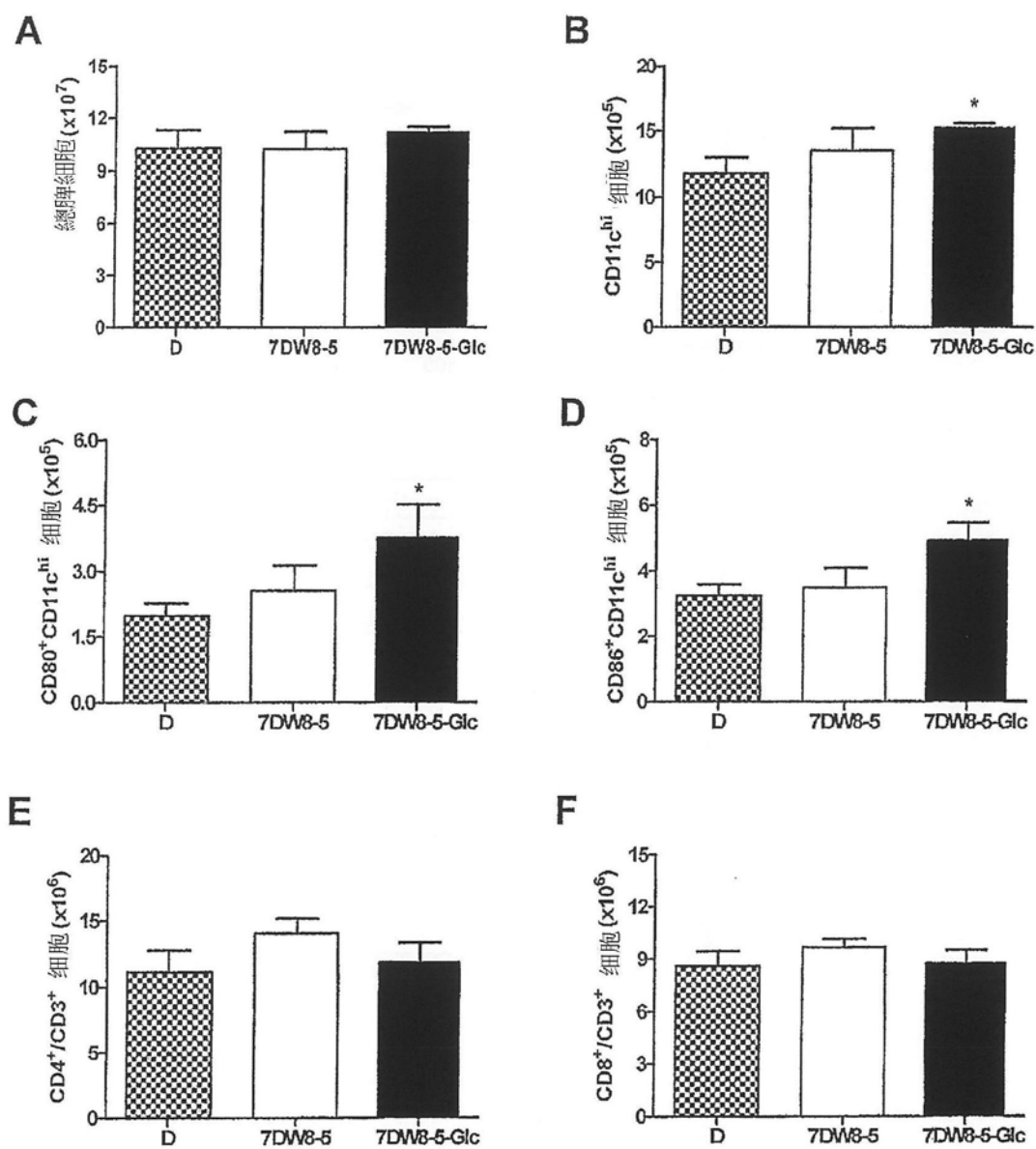


图9

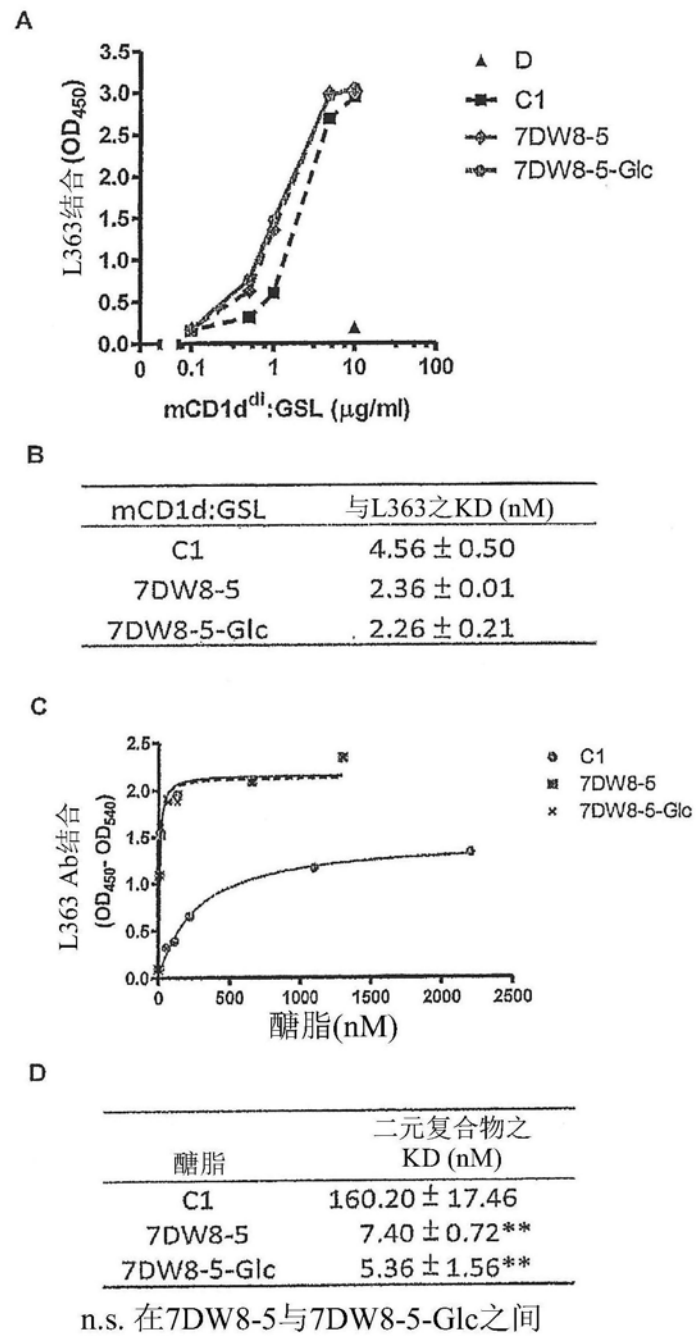


图10

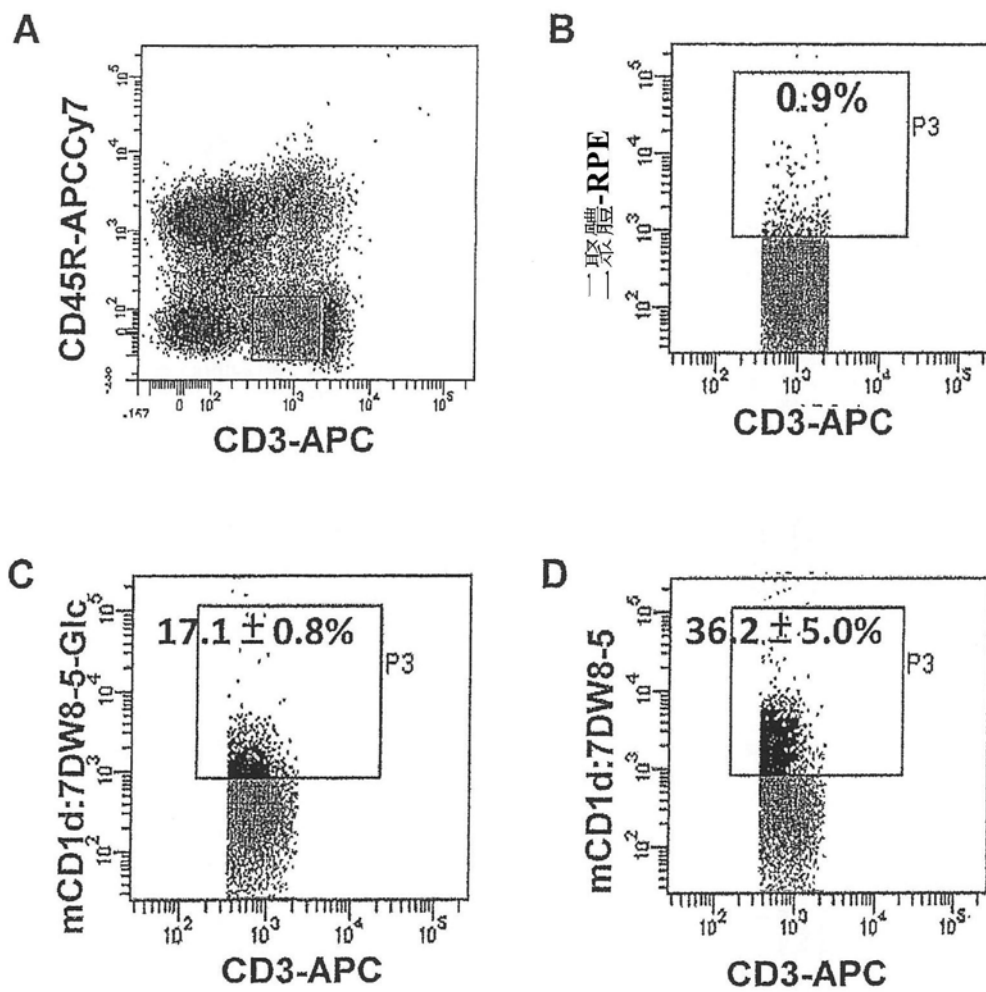


图11

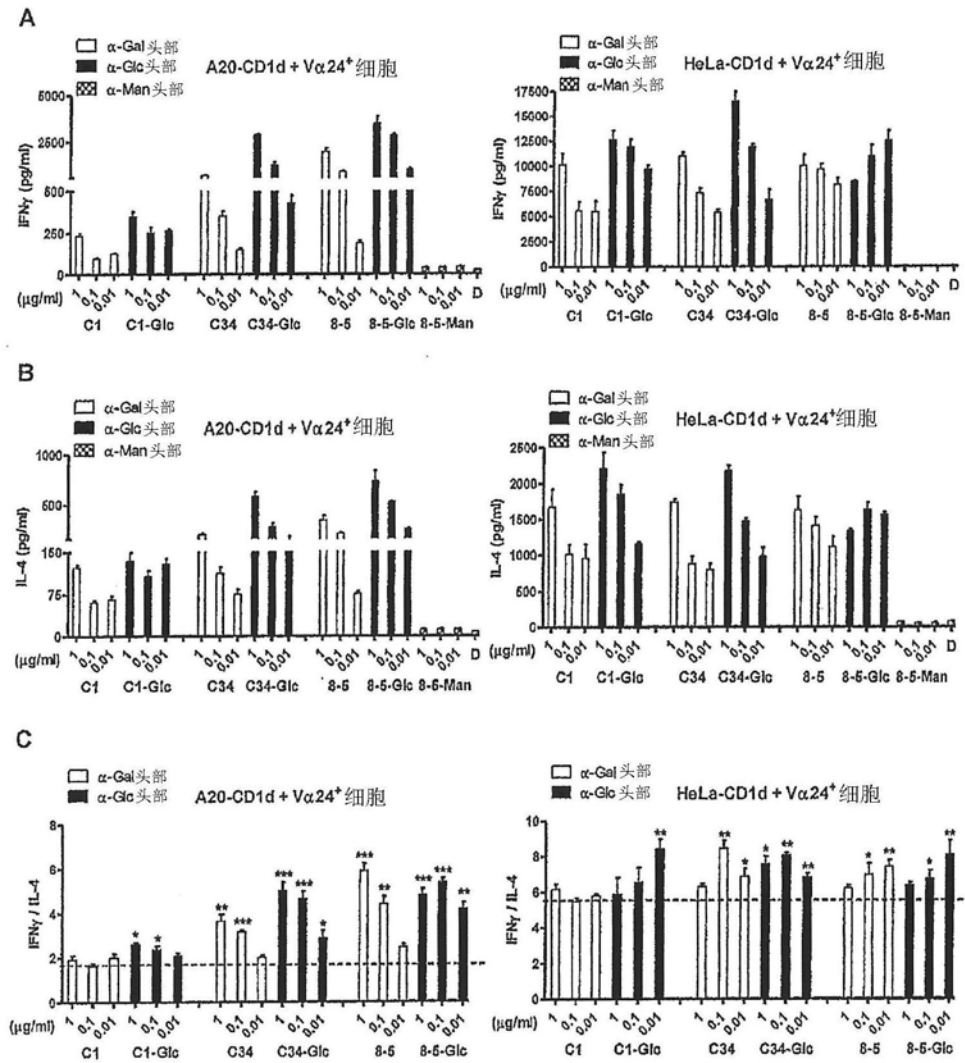


图12