



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103108654 A

(43) 申请公布日 2013.05.15

(21) 申请号 201180039259.1

(22) 申请日 2011.06.10

(30) 优先权数据

61/353,722 2010.06.11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013.02.07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/040074 2011.06.10

(87) PCT申请的公布数据

W02011/156774 EN 2011.12.15

(71) 申请人 索隆 - 基特林癌症研究协会

地址 美国纽约州

(72) 发明人 赛缪尔·J·达尼谢夫斯凯

戈文德·拉古帕蒂

菲利普·O·利文斯顿 朱江龙

卡尔蒂克·耶尔 杨广斌

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书8页 说明书48页 附图8页

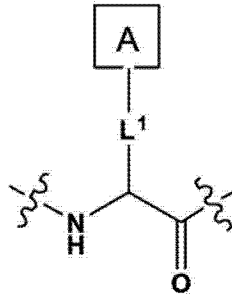
(54) 发明名称

多价糖肽构建体及其用途

(57) 摘要

本发明公开了包含 GM2 和 / 或 Gb5 糖类决定子的糖肽缀合物以及制备和使用此类缀合物的方法。证明了选择的糖肽缀合物的免疫原性。包含 GM2 抗原的疫苗组合物会使患者的临床前景恶化而不是改善,在本发明的糖肽和 / 或糖缀合物的情况中包含 GM2 的疫苗组合物在模型系统中显示出显著的生物益处。因此,本发明的糖肽缀合物提供通过施用包含 GM2 聚糖(如,在糖肽和 / 或糖缀合物的情况中)的疫苗组合物治疗患有或易患某些癌症的个体的方法。

1. 一种治疗患有癌症的受试者中的癌症的方法,包括对所述受试者施用治疗有效量的免疫原性糖缀合物,其中所述免疫原性糖缀合物包含具有由至少五个氨基酸残基组成的肽骨架的多抗原糖肽,其中五个或更多个所述氨基酸独立地具有以下结构:



其中:

$L^1$  是取代或未取代的脂族或杂脂族部分;及

A 是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 和 GM2 组成的组的糖类决定子;

其中至少一次出现的 A 是 Gb5 或 GM2。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述糖肽出现 5 至 7 次 A。

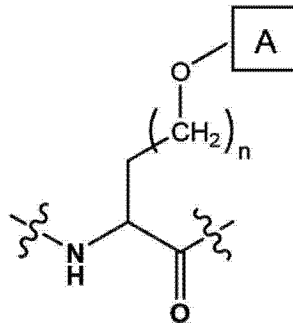
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述糖肽出现 7 次 A。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述糖肽出现 6 次 A。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述糖肽出现 5 次 A。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中每次出现的 A 都不同。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中每个  $L^1$  独立地是  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ , 以提供具有下述结构的氨基酸:



其中每个  $n$  独立地是 1-8。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中每个  $n$  独立地是 3-5。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中每个  $n$  独立地是 3 或 5。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中  $L^1$  不是  $-\text{O}-(\text{CHMe})-$  或  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 。

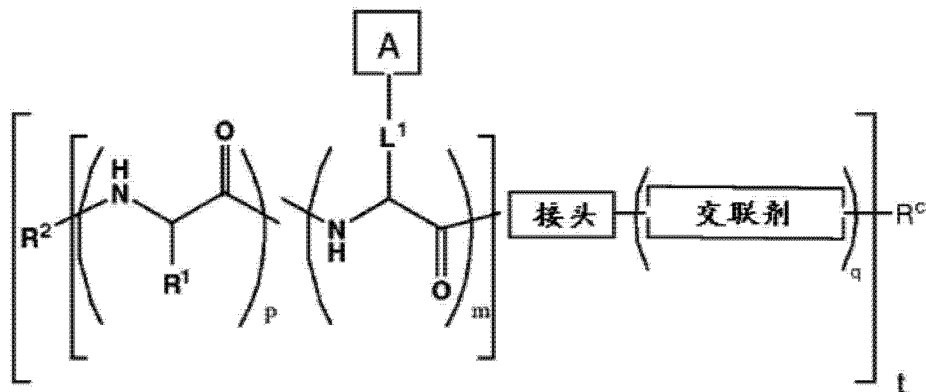
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述治疗有效量包括有效抑制肿瘤生长的量。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述治疗有效量包括有效诱发识别至少一种所述糖类决定子的抗体的量。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述治疗有效量包括有效诱发识别每种所述糖类抗原的抗体的量。

14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述治疗有效量是有效治疗一种或多种实体肿瘤的量。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌或前列腺癌。
16. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌。
17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述癌症是腹膜癌。
18. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述癌症是输卵管癌。
19. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述癌症是上皮癌。
20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者处于临床缓解期,或者其中所述受试者已通过手术进行治疗,具有有限的未切除的疾病。
21. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述糖肽直接或间接与免疫原性载体蛋白、肽或脂质连接。
22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述免疫原性载体是牛血清白蛋白、聚赖氨酸、钥孔血蓝蛋白或三棕榈酰-S-甘油基半胱氨酰丝氨酸。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括同时施用一种或多种免疫佐剂。
24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述一种或多种免疫佐剂中至少一种是皂苷佐剂。
25. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述佐剂是 QS-21。
26. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述一种或多种免疫佐剂中至少一种是细菌或脂质体。
27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述佐剂是明尼苏达沙门氏菌细胞或卡介苗。
28. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括同时施用药学上合适的载体。
29. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述糖缀合物具有下述结构:



其中:

每个  $R^1$  独立地是天然或非天然氨基酸侧链;

$R^2$  是氢或氨基保护基团;

$R^c$  是免疫原性载体;

所述交联剂是源自能够将接头上的反应性部分与免疫原性载体上的反应性部分缀合的双官能团交联剂的部分;

所述接头是共价键、包括 2 至约 20 个羟酰基残基的低聚酯片段、包括 2 至约 20 个氨酰基残基的肽片段、直链或支链烷基或芳基羧酸酯,或任选取代的二价  $C_{1-20}$  饱和或不

饱和直链或支链烃链,其中所述链的 1 至 6 个亚甲基单元独立地被  $-\text{CR}_2-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{SO}_2-$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{C}(=\text{NR})-$ 、 $-\text{N}=\text{N}-$  或  $-\text{C}(=\text{N}_2)-$  替换;

每个 R 独立地是氢或任选取代的  $\text{C}_{1-6}$  脂族基团;

m 是 5-20;

p 是 0-100;

q 是 0 或 1;及

t 是与免疫原性载体连接的糖肽基团的数量。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中 m 是 5-7。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中 m 是 5。

32. 根据权利要求 29 所述的方法,其中 p 是 0。

33. 根据权利要求 29 所述的方法,其中 t 是 50 至 1200。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中 t 是 200 至 800。

35. 根据权利要求 33 所述的方法,其中 t 至少是 300。

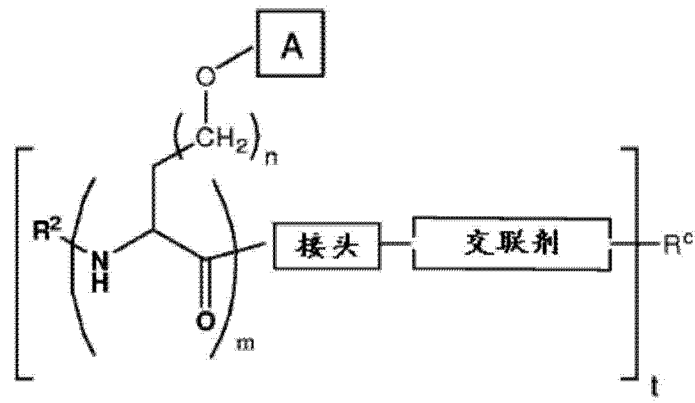
36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中 t 至少是 400。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中 t 至少是 500。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中 t 是 500 至 800。

39. 根据权利要求 29 所述的方法,其中每次出现的 A 都不同。

40. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述糖缀合物具有下述结构:



41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中 m 是 5。

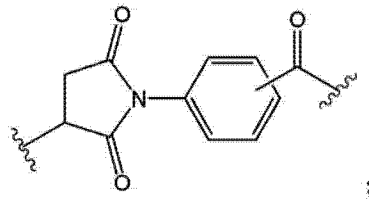
42. 根据权利要求 40 所述的方法,其中 n 是 3 至 5。

43. 根据权利要求 40 所述的方法,其中每个 A 是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF 和 GM2 所组成的组的糖类决定子,并且其中每次出现的 A 都不同。

44. 根据权利要求 40 所述的方法,其中每个 A 是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF 和 Gb5 所组成的组的糖类决定子,并且其中每次出现的 A 都不同。

45. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述交联剂是源自能够将载体的表面胺和所述接头的硫醇缀合的双官能团交联剂的部分。

46. 根据权利要求 45 所述的方法,其中所述交联剂是具有下述结构的部分:



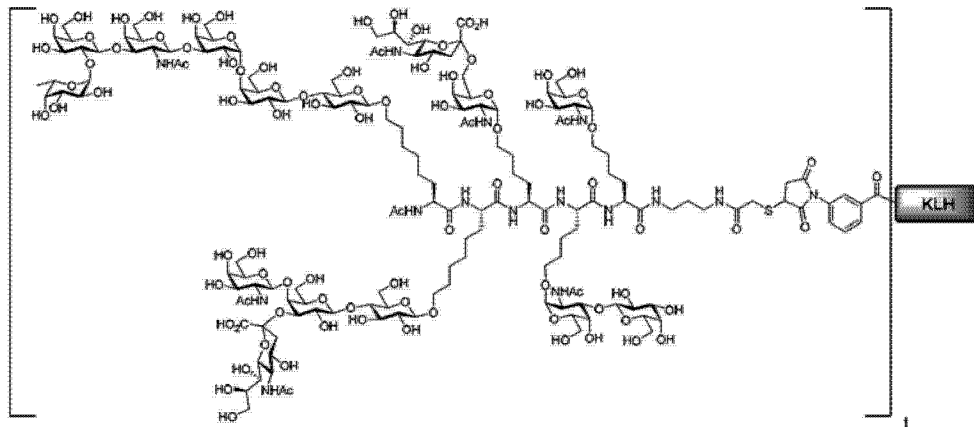
其中,所述结构是在将马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯与接头缀合后产生的。

47. 根据权利要求 45 所述的方法,其中所述接头是直链或支链烷基羧酸酯或芳基羧酸酯,或任选取代的二价  $C_{1-10}$  饱和或不饱和直链或支链烃链,其中所述链的 1 至 6 个亚甲基单元独立地被  $-S-$ 、 $-NR-$ 、 $-N(R)C(O)-$ 、 $-C(O)N(R)-$ 、 $-O-$  或  $-C(O)-$  替换。

48. 根据权利要求 47 所述的方法,其中所述接头是  $-NH(CH_2)_{2-5}NHC(O)CH_2S-$ 。

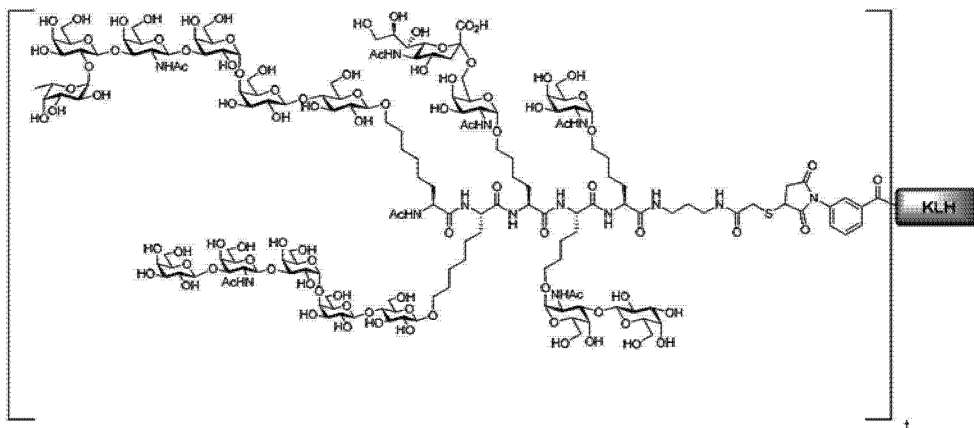
49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中所述接头是  $-NH(CH_2)_3NHC(O)CH_2S-$ 。

50. 根据权利要求 1 或 40 所述的方法,其中所述糖缀合物具有下述结构:



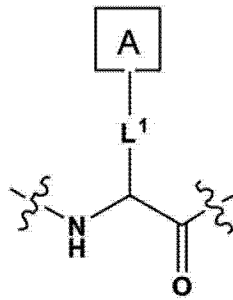
其中  $t$  是与免疫原性载体连接的糖肽基团的数量。

51. 根据权利要求 1 或 40 所述的方法,其中所述糖缀合物具有下述结构:



其中  $t$  是与免疫原性载体连接的糖肽基团的数量。

52. 一种在受试者中诱导抗体的方法,其中所述抗体能够与人肿瘤细胞特异性结合,所述方法包括对所述受试者施用免疫原性糖缀合物,其中所述免疫原性糖缀合物包含具有由至少五个氨基酸残基组成的肽骨架的多抗原糖肽,其中五个或更多个所述氨基酸独立地是:



其中：

L<sup>1</sup> 是取代或未取代的脂族或杂脂族部分；及

A 是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 和 GM2 组成的组的糖类决定子；

其中至少一次出现的 A 是 Gb5 或 GM2。

53. 根据权利要求 52 所述的方法，其中所述诱导的抗体识别选自由 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 和 GM2 组成的组的糖类决定子中的至少一种。

54. 根据权利要求 52 所述的方法，其中所述产生的抗体识别所述糖肽上存在的每种所述糖类决定子。

55. 一种方法，包括以下步骤：

(a) 使免疫原性载体蛋白与交联剂孵育以提供待交联的免疫原性载体蛋白；

(b) 用合适的二硫化物还原剂处理含硫醇生物分子；及

(c) 将待交联的免疫原性载体蛋白与含硫醇生物分子在合适的条件下结合以提供免疫原性载体蛋白 - 生物分子缀合物。

56. 根据权利要求 55 所述的方法，进一步包括在与待交联的免疫原性载体蛋白缀合之前，新鲜制备含硫醇生物分子的步骤。

57. 一种方法，包括以下步骤：

(a) 用合适的二硫化物还原剂处理含硫醇生物分子；

(b) 使含硫醇生物分子与交联剂孵育以提供待交联的生物分子；及

(c) 将待交联的生物分子与免疫原性载体蛋白在合适的条件下结合以提供免疫原性载体蛋白 - 生物分子缀合物。

58. 根据权利要求 57 所述的方法，进一步包括在用合适的二硫化物还原剂处理之前，新鲜制备含硫醇生物分子的步骤。

59. 根据权利要求 55 或 57 的方法，其中所述生物分子是糖肽。

60. 根据权利要求 55 所述的方法，进一步包括在步骤(a) 中去除未反应的交联剂的步骤。

61. 根据权利要求 55 所述的方法，进一步包括在缀合步骤(c) 后去除未反应的生物分子的步骤。

62. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述免疫原性载体蛋白是 KLH。

63. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述含硫醇生物分子是糖肽。

64. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述交联剂是间 - 马来酰亚胺苯甲酰基 -N- 羧基琥珀酰亚胺。

65. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述用合适的二硫化物还原剂处理含硫醇生物

分子的步骤包括 TCEP。

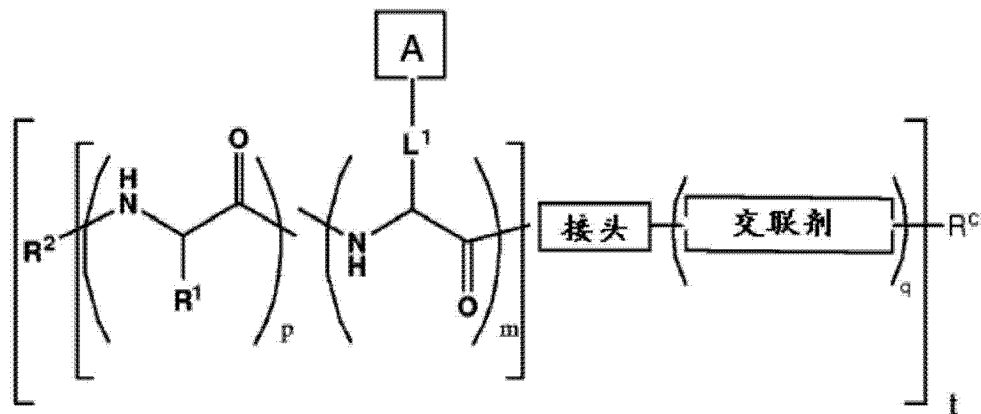
66. 根据权利要求 55 或 57 所述的方法,其中所述方法的缀合效率是每种免疫原性载体蛋白至少 200 个生物分子。

67. 根据权利要求 66 所述的方法,其中所述方法的缀合效率是每种免疫原性载体蛋白至少 400 个生物分子。

68. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述方法的缀合效率是每种免疫原性载体蛋白至少 500 个生物分子。

69. 根据权利要求 66 所述的方法,其中所述方法的缀合效率是每种免疫原性载体蛋白 200 至 800 个生物分子。

70. 一种糖缀合物,具有下述结构:



其中:

每个 A 独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子;

每个 L<sup>1</sup> 独立地是取代或未取代的脂族或杂脂族部分;

每个 R<sup>1</sup> 独立地是天然或非天然氨基酸侧链;

R<sup>2</sup> 是氢或氨基保护基团;

R<sup>c</sup> 是免疫原性载体;

所述交联剂是源自能够将接头上的反应性部分与免疫原性载体上的反应性部分缀合的双官能团交联剂的部分;

所述接头是共价键、包括 2 至约 20 个羧基残基的低聚酯片段、包括 2 至约 20 个氨基残基的肽片段、直链或支链烷基或芳基羧酸酯,或任选取代的二价 C<sub>1-20</sub> 饱和或不饱和直链或支链烃链,其中所述链的 1 至 6 个亚甲基单元独立地被 -CR<sub>2</sub>-、-NR-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、-SO<sub>2</sub>N(R)-、-O-、-C(O)-、-OC(O)-、-C(O)O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-C(=S)-、-C(=NR)-、-N=N- 或 -C(=N<sub>2</sub>)- 替换;

每个 R 独立地是氢或任选取代的基团,所述基团选自 C<sub>1-6</sub> 脂族基团、苯基、3-7 元饱和或部分不饱和碳环、具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元饱和或部分不饱和单环杂环,或具有 1-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元杂芳环;

m 是 5-20;

p 是 0-20;

q 是 0 或 1;及

t 是与免疫原性载体连接的糖肽基团的数量,并且大于 200。

71. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中至少一次出现的 A 选自 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 或 GM2。

72. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中每次出现的 A 都选自 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 或 GM2。

73. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中每次出现的 A 都不同。

74. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中至少一次出现的 A 包括二糖或更大的糖类。

75. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中每次出现的 A 都包括二糖或更大的糖类。

76. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中至少一次出现的 A 包括三糖或更大的糖类。

77. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中每次出现的 A 都包括三糖或更大的糖类。

78. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中至少一次出现的 A 包括分子量大于 350 道尔顿的糖类。

79. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中至少一次出现的 A 包括分子量大于 500 道尔顿的糖类。

80. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中至少一次出现的 A 包括分子量大于 750 道尔顿的糖类。

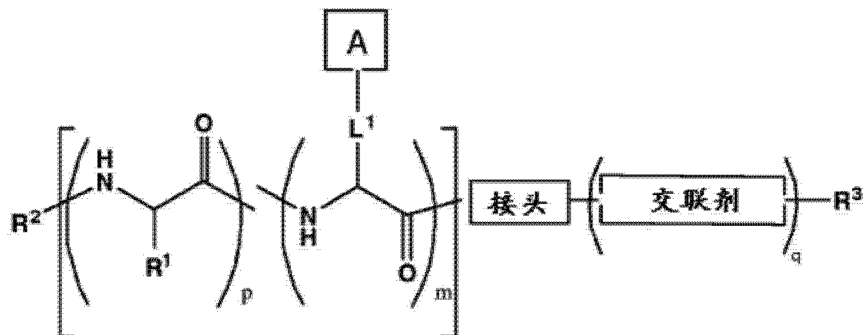
81. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中至少一次出现的 A 是 Globo-H、Gb5 或 GM2。

82. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中 t 大于 400。

83. 根据权利要求 82 所述的缀合物,其中 t 大于 500。

84. 根据权利要求 70 所述的缀合物,其中 t 是 200-1200。

85. 一种糖肽,具有下述结构:



其中:

每个 A 独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子,其中至少一次出现的 A 是 Gb5;

每个 L<sup>1</sup> 独立地是取代或未取代的脂族或杂脂族部分;

每个 R<sup>1</sup> 独立地是天然或非天然氨基酸侧链;

R<sup>2</sup> 是氢或氨基保护基团;

R<sup>3</sup> 是氢或免疫原性载体;

所述交联剂是源自能够将接头上的反应性部分与免疫原性载体上的反应性部分缀合的双官能团交联剂的部分;

所述接头是共价键、包括 2 至约 20 个羟酰基残基的低聚酯片段、包括 2 至约 20 个氨酰基残基的肽片段、直链或支链烷基或芳基羧酸酯,或任选取代的二价 C<sub>1-20</sub> 饱和或不饱和直链或支链烃链,其中所述链的 1 至 6 个亚甲基单元独立地被 -CR<sub>2</sub>-、-NR-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、-SO<sub>2</sub>N(R)-、-O-、-C(O)-、-OC(O)-、-C(O)O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>

-、-C(=S)-、-C(=NR)-、-N=N- 或 -C(=N<sub>2</sub>)- 替换；

每个 R 独立地是氢或任选取代的基团，所述基团选自 C<sub>1-6</sub> 脂族基团、苯基、3-7 元饱和或部分不饱和碳环、具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元饱和或部分不饱和单环杂环，或具有 1-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元杂芳环；

m 是 5-20；

p 是 0-20；及

q 是 0 或 1。

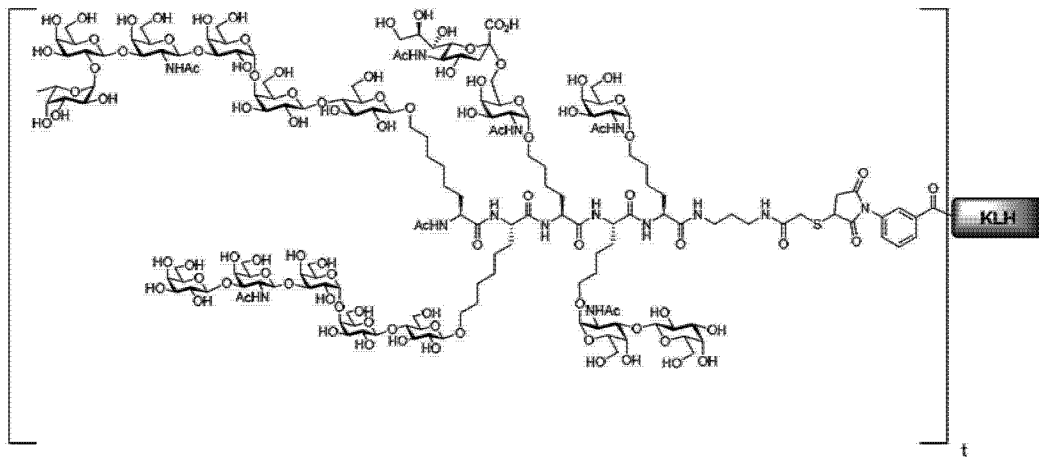
86. 根据权利要求 85 所述的糖肽或糖缀合物，其中 m 是 5-7。

87. 根据权利要求 85 所述的糖肽或糖缀合物，其中 p 是 0。

88. 根据权利要求 85 所述的糖肽或糖缀合物，其中每个 A 是选自由 Gb5、Globo-H、STN、Tn 和 TF 组成的组的糖类决定子。

89. 根据权利要求 88 所述的糖肽或糖缀合物，其中每次出现的 A 都不同。

90. 根据权利要求 88 所述的糖肽，具有下述结构：



其中 t 是与 KLH 连接的糖肽基团的数量。

91. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 70-90 中任一项所述的糖肽或糖缀合物，其中所述药物组合物包含药学上可接受的载体。

## 多价糖肽构建体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 6 月 11 日提交的美国临时专利申请序列号 61/353,722 的优先权,该专利申请的全部内容在此通过引用并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明在美国政府支持下根据美国国立卫生研究院授予的资助项目 CA28824 和 P01CA052477 进行。美国政府享有本发明的某些权利。

### 背景技术

[0005] 众所周知,恶性转化细胞通常显示异常水平和类型的表面糖基化,这是一个区分肿瘤细胞和正常、健康细胞的典型特征。肿瘤细胞表面上的这种异常糖基化模式为肿瘤免疫学家开发用于癌症治疗性治疗的基于糖类的抗癌疫苗提供了潜在机会。含肿瘤相关糖类抗原的疫苗构建体与免疫系统的适当接触将刺激形成相应的抗体。这些抗体反过来将选择性地结合和帮助消灭过度表达那些糖类表位的肿瘤细胞。

[0006] 为此,合成化学家和癌症免疫学家一直努力开发用于癌症免疫治疗的基于糖类的有效抗癌疫苗。近年来,其他人(Ingale, S. ;Wolfert, M. A. ;Gaekwad, J. ;Buskas, T. ;Boons, G. -J. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 663 ;Buskas, T. ;Ingale, S. ;Boons, G. -J. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2005, 44, 5985 ;Kunz, H. ;Dziadek, S. ;Wittrock, S. ;Becker, T. *ACS Symposium Series* 2008, 989 (Carbohydrate-Based Vaccines), 293 ;Westerlind, U. ;Hobel, A. ;Gaidzik, N. ;Schmitt, E. ;Kunz, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008, 47, 7551 ;Wittrock, S. ;Becker, T. ;Kunz, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2007, 46, 5226-5230 ;Dziadek, S. ;Brocke, C. ;Kunz, H. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 4150 ;Hermans, I. F. ;Silk, J. D. ;Gileadi, U. ;Salio, M. ;Mathew, B. ;Ritter, G. ;Schmidt, R. ;Harris, Adrian L. ;Old, L. ;Cerundolo, V. *J. Immunol.* 2003, 171, 5140 ;Schmidt, R. R. ;Castro-Palomino, J. C. ;Retz, O. *Pure Appl. Chem.* 1999, 71, 729) 以及申请人 (Danishefsky, S. J. ;Bilodeau, M. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 1380 ;Danishefsky, S. J. ;Allen, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2000, 39, 836 ;Keding, S. J. ;Danishefsky, S. J. *Carbohydrate-Based Drug Discovery* 2003, 1, 381 ;Warren, J. D. ;Geng, X. ;Danishefsky, S. J. *Top. Curr. Chem.* 2007, 267, 109) 报道了该领域重要的进展。

[0007] 虽然近些年已经开发了几种合成构建体,如上文所述及本申请中描述的参考文献所述,但是仍然需要进行进一步研究,以开发能够诱导更持久或更高效(和优选具有选择性)的免疫响应的新型构建体。显然,为了实现这个目标,开发用于诱导免疫响应的新的组合物和方法及用于治疗癌症的改进方法和 / 或新方法是有用的。

### 附图说明

[0008] 图 1 说明了来自用实施例 1 中所示五价 -KLH 构建体 2 免疫的小鼠的 ELISA 效价数据。小鼠产生了可观的与所有糖类抗原(包括 Globo-H 神经酰胺、GM2 神经酰胺、STn (OSM)、

TF(dPSM) 和 Tn(dOSM) 对应的抗体效价。

[0009] 图 2 描述了 Gb5 糖化氨基酸的合成方案。

[0010] 图 3 描述了 Gb5- 脂类化合物 4-4 的合成方案。

[0011] 图 4A-C 描述了五价 GloboH-Gb5-STn-TF-Tn 化合物的合成方案。

[0012] 图 5 是五价 GloboH-Gb5-STn-TF-Tn 化合物 G-1 的  $^1\text{H}$  NMR 谱。

## 具体实施方式

[0013] 定义

[0014] 本公开的某些化合物及特定官能团的定义将在下文中进行更详细的描述。对于本公开的目的,化学元素按照第 75 版《化学和物理手册》CAS 版本封面内页的元素周期表标识,并且特定官能团通常按照其中所述定义。此外,有机化学的一般原理,以及特定的官能部分和反应性描述在“Organic Chemistry”Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito:1999,其全部内容通过引用并入本文。

[0015] 如本文所用,除非另外指明,否则下述定义应适用。

[0016] 如本文所用的术语“脂族的”或“脂族基团”指的是完全饱和的或含一个或多个不饱和单元的直链(即,无支链的)或支链取代或未取代的烃链,或完全饱和的或含一个或多个不饱和单元但其是非芳族的(此处亦称为“碳环”,“脂环”或“环烷基”)、有一个与分子的其它部分连接的连接点的单环烃或双环烃。除非另外规定,否则脂族基团含 1-12 个脂族碳原子。在一些实施方案中,脂族基团含 1-6 个脂族碳原子。在一些实施方案中,脂族基团含 1-5 个脂族碳原子。在其它实施方案中,脂族基团含 1-4 个脂族碳原子。在另外其它实施方案中,脂族基团含 1-3 个脂族碳原子,并在其它实施方案中,脂族基团含 1-2 个碳原子。在一些实施方案中,“脂环”(或“碳环”或“环烷基”)指的是完全饱和的或含一个或多个不饱和单元(但其是非芳族的)、有一个与分子的其它部分连接的非芳香单环  $\text{C}_3\text{-C}_6$  烃。合适的脂族基团包括但不限于直链或支链的取代或未取代的烷基、烯基、炔基及它们的混合,如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。

[0017] 术语“低级烷基”指的是  $\text{C}_{1-4}$  直链或支链烷基。示例性的低级烷基为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和叔丁基。

[0018] 术语“低级卤代烷基”指的是被一个或多个卤素原子取代的  $\text{C}_{1-4}$  直链或支链烷基。

[0019] 术语“杂原子”指的是氧、硫、氮、磷或硅中的一种或多种(包括氮、硫、磷或硅的任何氧化形式;任何碱性氮的季铵化形式;或杂环的可取代氮,例如 N(如 3,4-二氢-2H-吡咯基中所示)、NH(如吡咯烷基中所示)或  $\text{NR}^+$ (如 N-取代吡咯烷基中所示))。

[0020] 如本文所用的术语“不饱和”指的是具有一个或多个不饱和单元的部分。

[0021] 如本文所用的术语“二价饱和或不饱和的直链或支链烃链”指的是如本文定义的直链或支链的二价亚烷基、亚烯基和亚炔基链。

[0022] 术语“亚烷基”指的是二价烷基。“亚烷基链”是聚亚甲基,即  $-(\text{CH}_2)_n-$ ,其中 n 是正整数,优选是 1 至 6、1 至 4、1 至 3、1 至 2 或 2 至 3。取代的亚烷基链是其中一个或多个亚甲基氢原子被取代基取代的聚亚甲基。合适的取代基包括下文对取代的脂族基团中所述的那些基团。

[0023] 术语“亚烯基”指的是二价烯基。取代的亚烯基链是含至少一个双键、其中一个或



环原子中使用时,术语“氮”包括取代的氮。例如,在具有 0-3 个选自氧、硫或氮的杂原子的饱和或部分不饱和环中,氮可以是 N (如 3,4-二氢-2H-吡咯基中所示)、NH (如吡咯烷基中所示) 或  $^+NR$  (如 N-取代吡咯烷基)。

[0033] 杂环可以连接到其任何杂原子或碳原子的侧基,形成稳定的结构,且任何环原子可以任选被取代。此类饱和或部分不饱和杂环基团的实例包括但不限于四氢呋喃基、四氢苯硫基、吡咯烷基、哌啶基、吡咯啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、噁唑烷基、哌嗪基、二噁烷基、二氧杂环戊基、二氮杂~~草~~基、氧氮杂~~草~~基、硫氮杂~~草~~基、吗啉基和喹啉环基。术语“杂环”、“杂环基”、“杂环基环”、“杂环基团”、“杂环部分”及“杂环基”在本文可以互换使用,并且还包含其中杂环基环稠合到一个或多个芳基、杂芳基或环脂族环上的基团,如二氢吲哚基、3H-吲哚基、苯并二氢吡喃基、菲啶基或四氢喹啉基,其中连接的基团或点位于杂环基环上。杂环基团可以是单环或双环的。术语“杂环基烷基”指的是被杂环基取代的烷基,其中所述烷基和杂环基部分独立地任选被取代。

[0034] 如本文所用的术语“部分不饱和的”指的是包括至少一个双键或叁键的环部分。术语“部分不饱和的”旨在包括具有多个不饱和位点的环,但是并不旨在包括如本文定义的芳基或杂芳基。

[0035] 另一方面,本公开提供“药学上可接受的”组合物,包括治疗有效量的本文所述的一种或多种化合物,所述化合物与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制。正如详细描述的那样,本公开的所述药物组合物可专门配制成以固体或液体形式施用,包括那些适用于下述的形式:口服施用,例如,浸液(drench)(水性或非水性溶液或悬浮液)、片剂(如旨在用于颊、舌下和全身吸收的片剂)、丸剂、粉剂、粒剂、施用于舌头上的糊剂;胃肠外施用,例如,皮下施用、肌肉注射、静脉内注射或硬膜外注射,例如,灭菌溶液或悬浮液形式,或持续释放制剂;局部施用,例如,以霜剂、软膏剂或控释贴剂或喷雾的形式施用到皮肤、肺或口腔;阴道内或直肠内施用,例如,以阴道栓剂、霜剂或泡沫的形式施用;舌下施用;眼睛施用;经皮施用;或鼻部施用、肺部施用或其它粘膜表面施用。

[0036] 如本文所用的词语“药学上可接受的”指的是那些在合理的医学判断范围之内,适用于与人类和动物组织接触、不会带来过度毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症且具有合理的益处/风险比的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0037] 如本文所用的词语“药学上可接受的载体”指的是涉及将主题化合物从一个器官或身体的一部分携带或输送到另一个器官或身体的一部分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂或溶剂封装材料。每种载体在与制剂的其它成分相容方面及不会伤害患者方面必须是“可接受的”。可作为药学上可接受的载体的一些材料实例包括:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无致热源的水;生理盐水;林格溶液;乙醇;pH 缓冲溶液;聚酯,聚碳酸酯和/或聚酞;及药物制剂中使用的其它无毒的相容物质。

[0038] 除非另外声明,本文所描述的结构还包括所述结构的所有同分异构体形式(如对映体、非对映体和几何学(或构象)形式;例如,每个立体中心的 R 构型和 S 构型、Z 和 E 双键

异构体及 Z 和 E 构象异构体。因此,本发明化合物的单一立体异构体以及对映体、非对映体和几何学(或构象)混合物均属于本公开的范围。除非另外声明,本公开的化合物的所有互变异构体形式都属于本公开的范围。

[0039] 提供的化合物可包括一个或多个糖部分。除非特别规定, D- 和 L- 构型及其混合物均属于本公开的范围。除非另外规定, 否则  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 连接的实施方案及其混合物, 均属于本公开设想的范围。

[0040] 例如, 如果需要本公开化合物的特殊对映体, 则可通过不对称合成法、手性色谱法或通过手性助剂衍生法制备, 其中, 将所得到的非对映体混合物分离, 并使辅助基团分解而提供所需的纯对映体。或者, 当分子包含碱性官能团(如氨基)或酸性官能团(如羧基)时, 采用合适的光学活性的酸或碱, 形成非对映体的盐, 然后通过本领域熟悉的分步结晶或色谱手段拆分所形成的非对映体, 随后回收纯的对映体。

[0041] 此外, 除非另外声明, 否则本文所描述的结构还意在包括仅在存在一个或多个同位素富集原子方面不同的化合物。例如, 具有本发明结构的化合物, 包括采用氘或氚取代氢, 或  $^{13}\text{C}$ - 或  $^{14}\text{C}$ - 富集碳取代碳的化合物, 均属于本公开的范围。根据本公开, 此类化合物可作为, 例如, 分析工具、作为生物检定中的探针或作为治疗剂。

[0042] 本领域技术人员将理解的是, 本文所述的合成方法利用各种保护基团。如本文所用的术语“保护基团”, 指的是特殊的官能部分, 如 O、S 或 N 被掩蔽或封闭, 如果需要的话, 使反应在多官能团化合物的另一个反应位点选择性地反应。在优选的实施方案中, 保护基团以良好的产率选择性地反应, 得到对于预期反应稳定的受保护底物; 保护基团采用不会攻击其它官能团的容易获得且优选无毒的试剂选择性地脱除; 保护基团形成可以分离的衍生物(更优选不产生新的立体中心); 并且保护基团优选具有最低的其它官能度, 以避免其它反应部位。正如本文详细描述, 可以利用氧、硫、氮和碳保护基团。作为非限制性实例, 羟基保护基团包括甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲基硫甲基(MTM)、叔-丁基硫甲基、(苯基二甲基硅烷)甲氧基甲基(SMOM)、苄氧基甲基(BOM)、对-甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(p-AOM)、愈创木酚甲基(guaiacolmethyl)(GUM)、叔-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、四氢噻喃基、1-甲氧基环己基、4-甲氧基四氢吡喃基(MTHP)、4-甲氧基四氢噻喃基、4-甲氧基四氢噻喃基-S, S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(CTMP)、1,4-二噁烷-2-基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-亚甲基苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧乙基、1-甲基-1-苄氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基-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、叔-丁基、烯丙基、对-氯苯基、对-甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苄基、对-甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、邻-硝基苄基、对-硝基苄基、对-卤代苄基、2,6-二氯苄基、对-氰基苄基、对-苯基苄基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基-N-氧代(oxido)、二苯基甲基、p, p'-二硝基二苯基甲基、5-二苯并环庚基、三苯基甲基、 $\alpha$ -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'-溴苯酰氧基苯基)二苯基甲基、4,4',4''-三(4,5-二氯邻苯二甲酰亚胺基苯基)甲基、4,4',4''-三(乙酰丙氧

基苯基) 甲基、4, 4', 4''-三(苯甲酰基氧基苯基) 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'-苧基甲基、9-苊基、9-(9-苯基) 氧杂苊基、9-(9-苯基-10-氧代) 苊基、1, 3-苯并二硫杂环戊烷-2-基、苯并异噻唑-S, S-二氧代、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)、二甲基己基硅烷基、叔-丁基二甲基硅烷基 (TBDMS)、叔-丁基二苯基硅烷基 (TBDPS)、三苄基硅烷基、三-对-二甲苯基硅烷基、三苯基硅烷基、二苯基甲基硅烷基 (DPMS)、叔-丁基甲氧基苯基硅烷基 (TBMPs)、甲酸酯、苯甲酰甲酸酯、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-氧代戊酸酯(乙酰丙酸酯)、4, 4-(亚乙基二硫代) 戊酸酯(乙酰丙酸基二硫代缩醛)、特戊酸酯、金刚酸酯(adamantoate)、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(茱酸酯)、烷基甲基碳酸酯、9-苊基甲基碳酸酯(Fmoc)、烷基乙基碳酸酯、烷基 2, 2, 2-三氯乙基碳酸酯(Troc)、2-(三甲基硅烷基) 乙基碳酸酯(TMSEC)、2-(苯磺酰) 乙基碳酸酯(Psec)、2-(三苯基磷鎓基) 乙基碳酸酯(Peoc)、烷基异丁基碳酸酯、烷基乙烯基碳酸酯、烷基烯丙基碳酸酯、烷基对-硝基苯基碳酸酯、烷基苄基碳酸酯、烷基对-甲氧基苄基碳酸酯、烷基 3, 4-二甲氧基碳酸酯、烷基邻-硝基苄基碳酸酯、烷基对-硝基苄基碳酸酯、烷基 S-苄基硫代碳酸酯、4-乙氧基-1-萘基碳酸酯、甲基二硫代碳酸酯、2-碘苯甲酸酯、4-叠氮丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、邻-(二溴甲基) 苯甲酸酯、2-甲酰苯磺酸酯、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、单琥珀酸酯(monosuccinoate)、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、邻-(甲氧基羰基) 苯甲酸酯、 $\alpha$ -萘甲酸酯、硝酸酯、烷基 N, N, N', N'-四甲基磷二酰胺、烷基 N-苯基氨基甲酸酯、硼酸酯、二甲基硫磷基、烷基 2, 4-二硝基苯基次磺酸酯、硫酸酯、甲烷磺酸酯(甲磺酸酯)、苄基磺酸酯和甲苯磺酸酯(Ts)。

[0043] 为了保护 1, 2- 或 1, 3- 二醇, 所述保护基团包括亚甲基缩醛、亚乙基缩醛、1-叔-丁基亚乙基缩酮、1-苯基亚乙基缩酮、(4-甲氧基苯基) 亚乙基缩醛、2, 2, 2-三氯亚乙基缩醛、丙酮化合物(acetonide)、环亚戊基缩酮、环亚己基缩酮、环亚庚基缩酮、苯亚甲基缩醛、对-甲氧基苯亚甲基缩醛、2, 4-二甲氧基苯亚甲基缩酮、3, 4-二甲氧基苯亚甲基缩醛、2-硝基苯亚甲基缩醛、甲氧基亚甲基缩醛、乙氧基亚甲基缩醛、二甲氧基亚甲基原酸酯、1-甲氧基亚乙基原酸酯、1-乙氧基亚乙基原酸酯、1, 2-二甲氧基亚乙基原酸酯、 $\alpha$ -甲氧基苯亚甲基原酸酯、1-(N, N-二甲基氨基) 亚乙基衍生物、 $\alpha$ -(N, N'-二甲基氨基) 苯亚甲基衍生物、2-氧杂亚环戊基原酸酯、二-叔-丁基亚硅基(DTBS)、1, 3-(1, 1, 3, 3-四异丙基二亚硅氧烷基衍生物(TIPDS)、四-叔-丁氧基二硅氧烷-1, 3-二亚基衍生物(TBDS)、环状碳酸酯、环状硼酸酯、硼酸乙酯和硼酸苯酯, 但是并不限于以上这些基团。

[0044] 氨基保护基团包括氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、9-苊基甲基氨基甲酸酯(Fmoc)、9-(2-磺基) 苊基甲基氨基甲酸酯、9-(2, 7-二溴) 苊基甲基氨基甲酸酯、2, 7-二-叔-丁基-[9-(10, 10-二氧代-10, 10, 10, 10-四氢硫杂苊基)] 甲基氨基甲酸酯(DBD-Tmoc)、4-甲氧基苯甲酰甲基氨基甲酸酯(Phenoc)、2, 2, 2-三氯乙基氨基甲酸酯(Troc)、2-三甲硅烷基

乙基氨基甲酸酯 (Teoc)、2- 苄乙基氨基甲酸酯 (hZ)、1-(1- 金刚烷基)-1- 甲基乙基氨基甲酸酯 (Adpoc)、1, 1- 二甲基-2- 卤乙基氨基甲酸酯、1, 1- 二甲基-2, 2- 二溴乙基氨基甲酸酯 (DB-t-BOC)、1, 1- 二甲基-2, 2, 2- 三氯乙基氨基甲酸酯 (TCBOC)、1- 甲基-1-(4- 联苯基) 乙基氨基甲酸酯 (Bpoc)、1-(3, 5- 二-叔-丁基苯基)-1- 甲基乙基氨基甲酸酯 (t-Bumeoc)、2-(2'-和 4'-吡啶基) 乙基氨基甲酸酯 (Pyoc)、2-(N, N- 二环己基羧酰氨基) 乙基氨基甲酸酯、叔-丁基氨基甲酸酯 (BOC)、1- 金刚烷基氨基甲酸酯 (Adoc)、乙烯基氨基甲酸酯 (Voc)、烯丙基氨基甲酸酯 (Alloc)、1- 异丙基烯丙基氨基甲酸酯 (Ipaoc)、肉桂基氨基甲酸酯 (Coc)、4- 硝基肉桂基氨基甲酸酯 (Noc)、8- 喹啉基氨基甲酸酯、N- 羟基哌啶基氨基甲酸酯、烷基二硫代氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯 (Cbz)、对- 甲氧苄基氨基甲酸酯 (Moz)、对- 硝基苄基氨基甲酸酯、对- 溴苄基氨基甲酸酯、对- 氯苄基氨基甲酸酯、2, 4- 二氯苄基氨基甲酸酯、4- 甲基亚硫酰基苄基氨基甲酸酯 (Msz)、9- 蒎基甲基氨基甲酸酯、二苯基甲基氨基甲酸酯、2- 甲基硫代乙基氨基甲酸酯、2- 甲基磺酰基乙基氨基甲酸酯、2-( 对- 甲苯磺酰基) 乙基氨基甲酸酯、[2-(1, 3- 二噻烷基)] 甲基氨基甲酸酯 (Dmoc)、4- 甲基苯硫基氨基甲酸酯 (Mtpc)、2, 4- 二甲基苯硫基氨基甲酸酯 (Bmpc)、2- 磷基乙基氨基甲酸酯 (Peoc)、2- 三苯基磷基异丙基氨基甲酸酯 (Ppoc)、1, 1- 二甲基-2- 氰乙基氨基甲酸酯、间- 氯- 对- 酰氧基苄基氨基甲酸酯、对-( 二羟基硼基) 苄基氨基甲酸酯、5- 苯并异噁唑基甲基氨基甲酸酯、2-( 三氟甲基)-6- 色酮基甲基氨基甲酸酯 (Tcroc)、间- 硝基苯基氨基甲酸酯、3, 5- 二甲氧基苄基氨基甲酸酯、邻- 硝基苄基氨基甲酸酯、3, 4- 二甲氧基-6- 硝基苄基氨基甲酸酯、苯基( 邻- 硝基苯基) 甲基氨基甲酸酯、吩噻嗪基-(10)- 羰基衍生物、N'- 对- 甲苯磺酰氨基羰基衍生物、N'- 苯基氨基硫代羰基衍生物、叔- 戊基氨基甲酸酯、S- 苄基硫代氨基甲酸酯、对- 氰基苄基氨基甲酸酯、环丁基氨基甲酸酯、环己基氨基甲酸酯、环戊基氨基甲酸酯、环丙基甲基氨基甲酸酯、对- 癸氧基苄基氨基甲酸酯、2, 2- 二甲氧基羰基乙烯基氨基甲酸酯、邻-(N, N- 二甲基羧酰氨基) 苄基氨基甲酸酯、1, 1- 二甲基-3-(N, N- 二甲基羧酰氨基) 丙基氨基甲酸酯、1, 1- 二甲基丙炔基氨基甲酸酯、二(2- 吡啶基) 甲基氨基甲酸酯、2- 咪喃基甲基氨基甲酸酯、2- 碘乙基氨基甲酸酯、异硼基氨基甲酸酯、异丁基氨基甲酸酯、异烟酰基氨基甲酸酯、p-(p'- 甲氧基苯偶氮基) 苄基氨基甲酸酯、1- 甲基环丁基氨基甲酸酯、1- 甲基环己基氨基甲酸酯、1- 甲基-1- 环丙基甲基氨基甲酸酯、1- 甲基-1-(3, 5- 二甲氧基苯基) 乙基氨基甲酸酯、1- 甲基-1-( 对- 苯偶氮基苯基) 乙基氨基甲酸酯、1- 甲基-1- 苄乙基氨基甲酸酯、1- 甲基-1-(4- 吡啶基) 乙基氨基甲酸酯、氨基甲酸苯酯、对-( 苯偶氮基) 苄基氨基甲酸酯、2, 4, 6- 三-叔-丁基苯基氨基甲酸酯、4-( 三甲基铵基) 苄基氨基甲酸酯、2, 4, 6- 三甲基苄基氨基甲酸酯、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- 吡啶甲酰胺、N- 苯甲酰基苯基丙氨酰基衍生物、苯甲酰胺、对- 苯基苯甲酰胺、邻- 硝基苯乙酰胺、邻- 硝基苯氧基乙酰胺、乙酰乙酰胺、(N'- 二硫代苄氧基羰基氨基) 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- 乙酰基蛋氨酸衍生物、邻- 硝基苯甲酰胺、邻-( 苯酰氧基甲基) 苯甲酰胺、4, 5- 二苯基-3- 噁唑啉-2- 酮、N- 邻苯二甲酰亚胺、N- 二硫杂琥珀酰亚胺 (Dts)、N-2, 3- 二苯基马来酰亚胺、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- 取代的 1, 3- 二甲基-1, 3, 5- 三氮杂环己-2- 酮、

5-取代的 1, 3-二苄基-1, 3, 5-三氮杂环己-2-酮、1-取代的 3, 5-二硝基-4-吡啶酮、N-甲胺、N-烯丙基胺、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-氧代-3-吡咯啉-3-基)胺、季铵盐、N-苄胺、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-苯基苄胺 (PhF)、N-2, 7-二氯-9-苄基亚甲胺、N-二茂铁基甲胺 (Fcm)、N-2-吡啶甲基氨基 N'-氧化物、N-1, 1-二甲基硫代亚甲胺、N-亚苄基胺 (N-benzylideneamine)、N-对-甲氧基亚苄基胺、N-二苯基亚甲胺、N-[(2-吡啶基)均三甲苯基]亚甲胺、N-(N', N'-二甲基氨基亚甲基)胺、N, N'-异亚丙基二胺、N-对-硝基亚苄基胺、N-亚水杨基胺、N-5-氯亚水杨基胺、N-(5-氯-2-羟苯基)苯基亚甲胺、N-环亚己胺、N-(5, 5-二甲基-3-氧代-1-环己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基硼酸衍生物、N-[苯基(五烷基铬-或钨)羰基]胺、N-铜螯合物、N-锌螯合物、N-硝胺、N-亚硝胺、胺 N-氧化物、二苯基膦酰胺 (Dpp)、二甲基硫代膦酰胺 (Mpt)、二苯基硫代膦酰胺 (Ppt)、二烷基氨基磷酸酯、二苄基氨基磷酸酯、二苯基氨基磷酸酯、苯基亚磺酰胺、邻-硝基苯基亚磺酰胺 (Nps)、2, 4-二硝基苯基亚磺酰胺、五氯苯基亚磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯基亚磺酰胺、三苯基甲基亚磺酰胺、3-硝基吡啶亚磺酰胺 (Npys)、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-蒽磺酰胺、4-(4', 8'-二甲氧基萘甲基)苯磺酰胺 (DNMBS)、苄磺酰胺、三氟甲基磺酰胺及苯甲酰甲基磺酰胺。本文详细说明了保护基团, 但是, 应该理解的是, 本公开并不旨在限制这些保护基团; 相反, 采用上述标准及本公开中采用的方法, 很容易辨别各种其它等同的保护基团。此外, 各种保护基团是所属领域技术人员所熟悉的, 并且包括 Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, 第 3 版, John Wiley & Sons, 1999 中详细说明的那些基团, 该文献的全部内容通过引用并入本文。

[0045] 如本文所述, 本公开的化合物可能包含“任选取代的”部分。一般来说, 术语“取代的”, 不管是在术语“任选地”后面或不在其后面, 都指的是指定部分的一个或多个氢被合适的取代基取代。除非另外说明, 否则“任选取代的”基团在基团的每个可取代位置有一个合适的取代基, 而且, 当任何给定结构中不止一个位置被一个以上选自规定基团的取代基取代时, 每个位置的所述取代基可以相同或不同。本公开设想的取代基的组合优选是那些形成稳定的或化学上可行的化合物的基团。如本文所用的术语“稳定的”指的是当经历允许其制备、检测、以及在某些实施方案中, 其回收、纯化及用于一种或多种本文公开的目的用途的条件时基本上不改变的化合物。

[0046] “任选取代的”基团的可取代的碳原子上合适的一价取代基独立地是卤素;  $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$ ;  $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$ ;  $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$ ; 可被  $R^\circ$  取代的  $-(CH_2)_{0-4}Ph$ ; 可被  $R^\circ$  取代的  $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$ ; 可被  $R^\circ$  取代的  $-CH=CHPh$ ; 可被  $R^\circ$  取代的  $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -吡啶基;  $-NO_2$ ;  $-CN$ ;  $-N_3$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ;  $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ;  $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ;  $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ;  $-N(R^\circ)$

$N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ;  $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$ ;  $-C(S)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$ ;  $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$ ;  $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR-$ ,  $SC(S)SR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$ ;  $-C(S)NR^\circ_2$ ;  $-C(S)SR^\circ$ ;  $-SC(S)SR^\circ$ ,  $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$ ;  $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$ ;  $-C(O)C(O)R^\circ$ ;  $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$ ;  $-C(NOR^\circ)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$ ;  $-S(O)_2NR^\circ_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$ ;  $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$ ;  $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$ ;  $-N(OR^\circ)R^\circ$ ;  $-C(NH)NR^\circ_2$ ;  $-P(O)_2R^\circ$ ;  $-P(O)R^\circ_2$ ;  $-OP(O)R^\circ_2$ ;  $-OP(O)(OR^\circ)_2$ ;  $SiR^\circ_3$ ;  $-(C_{1-4} \text{直链或支链亚烷基})O-N(R^\circ)_2$ ; 或  $-(C_{1-4} \text{直链或支链亚烷基})C(O)O-N(R^\circ)_2$ , 其中每个  $R^\circ$  可如下文所述被取代, 并独立地是氢;  $C_{1-6}$  脂族基团;  $-CH_2Ph$ ;  $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ ;  $-CH_2-$ (5-6-元杂芳环)、或 5-6 元饱和、部分不饱和的基团; 或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环; 或不受上述定义束缚, 两个独立出现的  $R^\circ$ , 连同它们的插入原子一起形成 3-12 元饱和、部分不饱和的基团; 或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳基单环或双环, 其如以下所定义的那样可被取代。

[0047]  $R^\circ$  (或通过两个独立出现的  $R^\circ$  连同它们的插入原子一起形成的环) 上合适的一价取代基独立地是卤素、 $-(CH_2)_{0-2}R^\bullet$ 、 $-(\text{卤代 } R^\bullet)$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^\bullet)_2$ 、 $-O(\text{卤代 } R^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NH_2$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NHR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NR^\bullet_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SiR^\bullet_3$ 、 $-OSiR^\bullet_3$ 、 $-C(O)SR^\bullet$ 、 $-(C_{1-4} \text{直链或支链亚烷基})C(O)OR^\bullet$  或  $-SSR^\bullet$ , 其中每个  $R^\bullet$  是未取代的或在前面是“卤代”时仅被一个或多个卤素取代, 并且是独立地选自  $C_{1-4}$  脂族基团、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$  或 5-6 元饱和、部分不饱和的基团, 或具有 0-4 个选自氮、氧或硫的杂原子的芳环。 $R^\circ$  的饱和碳原子上合适的二价取代基包括  $=O$  和  $=S$ 。



[0048] “任选取代的”基团的饱和碳原子上合适的二价取代基包括下述基团:  $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNR^*_2$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHC(O)OR^*$ 、 $=NNHS(O)_2R^*$ 、 $=NR^*$ 、 $=NOR^*$ 、 $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$  或  $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$ , 其中每个独立出现的  $R^*$  选自氢; 如以下所定义的那样可被取代的  $C_{1-6}$  脂族基团; 或未取代的 5-6 元饱和、部分不饱和的基团; 或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环。连接到“任选取代的”基团的邻位可取代碳原子上的合适的二价取代基包括:  $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$ , 其中每个独立出现的  $R^*$  选自氢; 如以下所定义的那样可被取代的  $C_{1-6}$  脂族基团; 或未取代的 5-6 元饱和、部分不饱和的基团; 或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环。

[0049]  $R^*$  的脂族基团上合适的取代基包括卤素、 $-R^\bullet$ 、 $-(\text{卤代 } R^\bullet)$ 、 $-OH$ 、 $-OR^\bullet$ 、 $-O(\text{卤代 } R^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^\bullet$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^\bullet$ 、 $-NR^\bullet_2$  或  $-NO_2$ , 其中每个  $R^\bullet$  是未取代的或在前面是“卤代”时仅被一个或多个卤素取代, 并且独立地是  $C_{1-4}$  脂族基团、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$  或 5-6 元饱和、部分不饱和的基团, 或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环。

[0050] “任选取代的”基团的可取代氮原子上合适的取代基包括  $-R^\dagger$ 、 $-NR^\dagger_2$ 、 $-C(O)R^\dagger$ 、 $-C(O)OR^\dagger$ 、 $-C(O)C(O)R^\dagger$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^\dagger$ 、 $-S(O)_2R^\dagger$ 、 $-S(O)_2NR^\dagger_2$ 、 $-C(S)NR^\dagger_2$ 、 $-C(NH)NR^\dagger_2$  或  $-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger$ ; 其中每个  $R^\dagger$  独立地是氢; 如以下所定义的那样可被取代的  $C_{1-6}$  脂族基团; 未取代的  $-OPh$ ; 或未

取代的 5-6 元饱和、部分不饱和的基团；或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环；或不受上述定义束缚，两个独立出现的  $R^{\dagger}$ ，连同它们的插入原子一起形成未取代的 3-12 元饱和、部分不饱和的基团；或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳基单环或双环。

[0051]  $R^{\dagger}$  的脂族基团上合适的取代基独立地是卤素、 $-R^{\bullet}$ 、 $-(\text{卤代 } R^{\bullet})$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\bullet}$ 、 $-O(\text{卤代 } R^{\bullet})$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\bullet}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}^{\bullet}$ 、 $-\text{NR}_2^{\bullet}$  或  $-\text{NO}_2$ ，其中每个  $R^{\bullet}$  是未取代的或在前面是“卤代”时仅被一个或多个卤素取代，并且是独立地是  $\text{C}_{1-4}$  脂族基团、 $-\text{CH}_2\text{Ph}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$  或 5-6 元饱和、部分不饱和的基团，或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环。

[0052] 当“”作为化学键使用时，应理解为用于描述碳中心的不明确的立体化学的碳-碳单键。因此，与具有“”键的碳原子连接的取代基指的是其中取代基伸向纸平面前方的实施方案，其中取代基伸向纸平面后方及它们的组合（即，立体化学混合物）。

[0053] 如本文所用的术语“生物分子”指的是属于通常存在于细胞和组织中的不管天然存在还是人工生成（如，通过合成或重组方法）的化合物类别的分子（如蛋白质、氨基酸、肽、多核苷酸、核苷酸、碳水化合物、糖、脂质、核蛋白、糖肽、糖蛋白、脂蛋白、类固醇等）生物分子的示例性类型包括但不限于糖肽、酶、受体、神经递质、激素、细胞因子、细胞反应调节剂（如生长因子和趋化因子）、抗体、疫苗、半抗原、毒素、干扰素、核酶、反义剂、质粒、DNA 和 RNA。

[0054] 术语“碳水化合物”指的是糖或糖的聚合物。术语“糖类”、“多糖”、“碳水化合物”及“寡糖”可互换使用。大多数碳水化合物是具有许多羟基的醛或酮，通常分子的每个碳原子上都有一个羟基。碳水化合物的分子式通常是  $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$ 。碳水化合物可以是单糖、二糖、三糖、寡糖或多糖。大多数基础碳水化合物是单糖，如葡萄糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、核糖、阿拉伯糖、木糖和果糖。二糖是两个连接的单糖。二糖的实例包括蔗糖、麦芽糖、纤维二糖和乳糖。一般来说，寡糖包括三个至六个单糖单元（如蜜三糖、水苏糖），并且多糖包括六个或六个以上的单糖单元。多糖的实例包括淀粉、糖原和纤维素。碳水化合物可包含改性糖单元，如其中羟基被脱除的 2' - 脱氧核糖，其中羟基被氟取代的 2' - 氟代核糖或 N-乙酰基氨基葡萄糖，葡萄糖的一种含氮形式（如 2' - 氟代核糖、脱氧核糖和己糖）。碳水化合物可以以许多不同的形式存在，例如，构象异构体、环状形式、非环状形式、立体异构体、互变异构体、反构体和同分异构体。

[0055] 本文所用的术语“天然氨基酸侧链”指的是天然存在的蛋白质中发现的任何一个普通、天然存在的 L-氨基酸上的侧链基团：甘氨酸 (Gly)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、赖氨酸 (Lys)、精氨酸 (Arg)、组氨酸 (His)、脯氨酸 (Pro)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp)、天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、天门冬酰胺 (Asn)、谷氨酰胺 (Gln)、半胱氨酸 (Cys) 和蛋氨酸 (Met)。

[0056] 本文所用的术语“非天然氨基酸侧链”指的是所有非天然氨基酸的侧链。此类氨基酸包括 20 种天然存在的氨基酸中任一种的 D-异构体。非天然氨基酸还包括高丝氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸和甲状腺素。其它非天然氨基酸是本领域技术人员所熟知的，并且包括非天然脂族侧链。在某些实施方案中，非天然氨基酸是 N-烷基化的、环化的、磷酸化的、乙酰

化的、酰胺化的、叠氮化的、标记的等氨基酸。在一些实施方案中,非天然氨基酸是 D- 异构体。在一些实施方案中,非天然氨基酸是 L- 异构体。在一些实施方案中,非天然氨基酸是  $\alpha$  氨基酸。在其它实施方案中,非天然氨基酸是  $\beta$  氨基酸。

[0057] 更广泛地说,如本文所用的术语“氨基酸”包括天然氨基酸和非天然氨基酸。

[0058] 本文及权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”、“该”包括复数指示物,除非上下文另有清楚地规定。因此,例如,提到“一种化合物”时包括多个此类化合物。

[0059] 术语“化合物”、“缀合物”和“构建体”在本公开中可互换使用。因此,如本文所描述的构建体或缀合物视为化合物,反之亦然。

[0060] 如本文所用的词语“胃肠外施用”和“在胃肠外施用”指的是不同于肠内施用和局部施用的施用模式,通常是通过注射,并且包括但不限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输液。

[0061] 如本文所用的词语“全身施用”、“全身地施用”、“外周施用”和“外周地施用”指的是化合物、药物或其它材料并非直接施用到中枢神经系统,这样使其进入患者系统内并且从而经历新陈代谢和其它类似过程,例如皮下施用。

[0062] 术语“减轻”指的是专注于减轻疾病症状和 / 或治疗方案的副作用但无法治愈的治疗。

[0063] 如本文所用的术语“治疗有效量”指的是当作为治疗方案一部分施用时引起期望的生物响应的物质(如,治疗剂、组合物和 / 或制剂)的量。在一些实施方案中,物质的治疗有效量是当施用于患有疾病、病症和 / 或病况的患者或易患疾病、病症和 / 或病况的受试者时足够治疗所述疾病、病症和 / 或病况的量。正如本领域技术人员了解的那样,物质的有效剂量可依各种因素而变化,如期望的生物端点、待递送的物质、靶细胞或组织等。例如,治疗疾病、病症和 / 或病况的制剂中化合物的有效量是减轻、改善、缓解、抑制、预防疾病、病症和 / 或病况的一种或多种症状或特征、延迟其发作、降低其严重程度和 / 或降低其发生率的量。在一些实施方案中,治疗有效量以单次剂量施用;在一些实施方案中,需要多个单位剂量以递送治疗有效量。

[0064] 如本文所用的术语“治疗”指的是用于部分或完全减轻、改善、缓解、抑制、预防疾病、病症和 / 或病况的一种或多种症状或特征、延迟其发作、降低其严重程度和 / 或降低其发生率的任何方法。治疗可施用于未表现出疾病、病症和 / 或病况的迹象的受试者。在一些实施方案中,为了降低发展成与疾病、病症和 / 或病况有关的病理学的风险,治疗可施用于仅显示疾病、病症和 / 或病况的早期迹象的受试者。

[0065] 如本文所用的表述“单位剂量”指的是适合于待治疗受试者的制剂的物理上分立的单位。但是,应该理解的是,本发明制剂的每日总用量将由主治医生在合理的医学判断范围内决定。任何特定受试者或生物体的具体有效剂量水平可能取决于多种因素,包括被治疗病症和该病症的严重度;采用的特定活性化合物的活性;采用的特定组合物;受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;采用的特定活性化合物的施用时间和排泄速率;治疗持续时间;与采用的特定化合物结合使用或协同使用的药物和 / 或其它治疗,及医学领域熟知的类似因素。具体的单位剂量可包含或不包含治疗有效量的治疗剂。

[0066] “患有”疾病、病症和 / 或病况的个体经诊断具有和 / 或显示出疾病、病症和 / 或病

况的一种或多种症状。

[0067] “易患”疾病、病症和 / 或病况的个体并未诊断患有疾病、病症和 / 或病况。在一些实施方案中,易患疾病、病症和 / 或病况的个体可能表现出疾病、病症和 / 或病况的症状。在一些实施方案中,易患疾病、病症和 / 或病况的个体可能并未表现出疾病、病症和 / 或病况的症状。在一些实施方案中,易患疾病、病症和 / 或病况的个体可能将发展疾病、病症和 / 或病况。在一些实施方案中,易患疾病、病症和 / 或病况的个体将不会发展疾病、病症和 / 或病况。

[0068] 某些实施方案的详述

[0069] 本发明包括这一认识,即仍然需要对治疗癌症方面有用和 / 或在诱导抵抗糖缀合物上存在的所有单个糖类抗原的抗体方面有效的糖缀合物疫苗。

[0070] 本发明尤其提供用于将糖肽与载体连接以产生糖缀合物的新技术和 / 或改进技术。所提供的技术允许出乎意料的大量糖肽与单个载体缀合。在本发明的一些实施方案中,超过 300、350、400、350、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000 个糖肽可与根据本发明的特定载体缀合。

[0071] 本发明还尤其提供用于提供和 / 或偶联用于本文所述的糖肽和 / 或糖缀合物的聚糖的新型技术。例如,本发明提供用于制备和 / 或偶联 GM2 和 / 或 Gb5 聚糖的技术。

[0072] 虽然以前的证据证明,包含 GM2 抗原的疫苗组合物会使患者的临床前景恶化而不是改善,但是,本发明进一步提供了令人吃惊的证据,在本发明的糖肽和 / 或糖缀合物的情况中包含 GM2 的疫苗组合物在模型系统中显示出显著的生物益处。因此,本发明提供通过施用包含 GM2 聚糖(如,在糖肽和 / 或糖缀合物的情况中)的疫苗组合物治疗患有或易患某些癌症的个体的方法。

[0073] 本发明提供了多种抗原、糖肽、糖缀合物及疫苗组合物,以及与其制备、鉴定、表征和 / 或用途有关的各种方法及试剂。

[0074] 本领域的技术人员将理解的是,本发明人具有与糖类抗原、糖肽和 / 或糖缀合物制品及其生产和用途有关的丰富的经验。本申请尤其描述了与某些含糖类 - 抗原的组合物(如糖肽、糖缀合物;等)的制备、鉴定、表征和 / 或用途有关的方法和试剂。在一些实施方案中,提供的材料和 / 或方法在医学方面有用。在一些实施方案中,提供的材料和 / 或方法用于治疗癌症。在一些实施方案中,提供的材料和 / 或方法用于治疗实体肿瘤。在一些实施方案中,提供的材料和 / 或方法用于治疗上皮源性肿瘤。在一些实施方案中,提供的材料和 / 或方法用于治疗乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤与前列腺癌。

[0075] 在与 KLH 载体蛋白缀合的第一代构建体中,五种不同的与前列腺癌和乳腺癌有关的糖抗原——Globo-H、Le<sup>y</sup>、STn、TF 和 Tn——被掺入到单个肽骨架上(Keding, S. J. ;Danishefsky, S. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101, 11937 ;Ragupathi, G. ; Koide, F. ;Livingston, P. O. ;Cho, Y. S. ;Atsushi, E. ;Wan, Q. ;Spassova, M. K. ; Keding, S. J. ;Allen, J. ;Ouerfelli, O. ;Wilson, R. M. ;Danishefsky, S. J. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2715)。然后,在小鼠中评估这种 KLH 缀合物连同合适的佐剂(QS-21),并将其免疫原性与对应的混合一价疫苗进行比较。实验结果表明,这种 KLH 缀合物对于诱导对抗除 Le<sup>y</sup> 以外的所有糖类抗原的抗体是最佳的。之所以观察到令人失望的 Le<sup>y</sup> 抗原免疫原性,很可能是因为其以相对较高的水平进行内源性表达。

[0076] 荧光激活细胞分选(FACS)分析表明,由这种第一代单分子五价疫苗诱导的抗体与评估的三个细胞系反应明显,每个细胞系都表达高水平的两种或多种对应抗原。因此,这些累积数据表明,在这些精心制备的疫苗中,单个抗原的免疫特性得到了保存。

[0077] 先前已经描述了通过显示 Globo-H、GM2、STn、TF 和 Tn 糖类抗原(参见下文方案 1 中的 4-8)的一批糖基氨基酸的组合而合成五价糖肽构建体(Ragupathi, G. ; Koide, F. ; Livingston, P. O. ; Cho, Y. S. ; Atsushi, E. ; Wan, Q. ; Spassova, M. K. ; Keding, S. J. ; Allen, J. ; Ouerfelli, O. ; Wilson, R. M. ; Danishefsky, S. J. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2715)。在这种特定的构建体中,先前使用的戊多糖 Le<sup>y</sup> 抗原被与前列腺癌和乳腺癌有关的四糖抗原 GM2 代替。基于表明 GM2- 诱导的抗体在对抗人类 GM2- 阳性细胞方面具有活性的报道,选择纳入 GM2。此外,单独用 GM2 进行的人临床试验已表明增强的 GM2 抗体水平和存活之间的相关性(Livingston, P. O. ; Natoli, E. J. ; Calves, M. J. ; Stockert, E. ; Oettgen, H. F. ; Old, L. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 2911 ; Livingston P. O. ; Wong, G. Y. ; Adluri, S. ; Tao, Y. ; Padavan, M. ; Parente, R. ; Hanlon, C. ; Calves, M. J. ; Helling, F. ; Ritter, G. J. Clin. Oncol. 1994, 12, 1036)。然而,在本公开之前,这种五价构建体的免疫原性是未知的。

[0078] 本申请尤其具体描述了出色的第二代单分子五价构建体的合成和用途,其用于医学,例如,用于治疗实体瘤,如卵巢癌、前列腺癌和 / 或乳腺癌。

[0079] 包含 GM2 的癌症疫苗的临床研究已经取得了有限的成功,并且目前是肿瘤学领域有争议的主题。早在中期分析就治疗安全性和 / 或有效性提出严重质疑后,黑素瘤疫苗的大型 III 临床试验, EORTC18961 即被中止 (Eggermont, A. M. M. 等, *Annals of Oncology* 20 (增刊 6) :vi30-vi34, 2009 ; Saul, H. , *European Journal of Cancer*, Issue 16, 2008)。特别是,分析显示,与观察组相比,接受治疗的患者的存活可能性降低。对于主要终点指标,无复发生存期来说,试验被认为并非绝对没有作用(即,观察组中事件的数量与疫苗组完全相同)。

[0080] 另一项黑素瘤试验 ECOG1694 将高剂量干扰素(HDI)与基于 GM2 的疫苗进行了对比。中期分析表明, HDI 治疗效果更好,并且疫苗被认为没有任何作用。随后的分析表明,这一结论甚至比理应的更差,并且疫苗治疗的效果实际上比观察组更差(Saul, 同上)。

[0081] 虽然并不希望受任何具体理论的束缚,但是,本申请人提出这些这种可能性:前面这些包含 GM2 的癌症疫苗之所以没有成功是因为它们亚溶解水平的细胞表面补体的活化。因此,本发明在一些实施方案中提供了对以前未知的问题根源的确认。免疫学熟知的是,补体级联的活化超过某一阈值会导致靶细胞的渗透性溶解。但是,补体的不完全或亚溶解的活化可能是细胞保护性的(即,促进血管形成、增殖等)。由于 GM2 在黑素瘤细胞上未高度表达,以上所述黑素瘤研究中使用的 GM2 疫苗可能激活了细胞表面补体的此种亚溶解水平。此外还提出了其它理论(Saul, 同上)。

[0082] 不管怎样,在本文描述的教导之前,本领域技术人员理解,含 GM2 抗原的疫苗可能存在独特的安全性和 / 或有效性方面的挑战或其它缺点。在此背景下,本公开提供了令人吃惊的证据,证明了本文所述的含 GM-2 的组合物在治疗癌症(如,乳腺癌与其它癌症,如黑素瘤、前列腺癌和卵巢癌)方面的有用性和有效性。

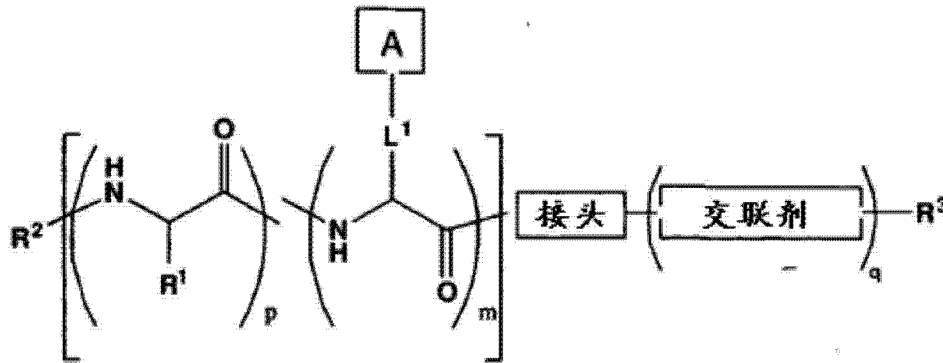
[0083] 本申请人已经发现,包含 Globo-H、GM2、STn、TF 和 Tn 抗原的五价缀合物诱导对抗这五种糖类抗原中每一种抗原的 IgG 和 IgM 抗体。此外,产生的抗体能够与表达这些糖类

抗原的癌细胞系反应。

[0084] 本发明包括这一认识,即另一种糖类抗原, Gb5, 可用于制备多抗原免疫原性糖缀合物(Park, T. K. 等, Tet. Lett. Vol. 36, No. 50, 9089-9092, 1995; 国际专利申请公布 W02010/005598; 美国专利申请公布 2009/0317411)。在一些实施方案中, 本发明提供包含作为糖类决定子的 Gb5 的糖肽和 / 或糖缀合物。

[0085] 在一些实施方案中, 本发明提供具有下述结构的糖肽:

[0086]



[0087] 其中:

[0088] 每个 A 独立地是肿瘤细胞上发现的糖类决定子, 其中至少一次出现的 A 是 Gb5;

[0089] 每个 L<sup>1</sup> 独立地是取代或未取代的脂族或杂脂族部分;

[0090] 每个 R<sup>1</sup> 独立地是天然或非天然氨基酸侧链;

[0091] R<sup>2</sup> 是氢或氨基保护基团;

[0092] R<sup>3</sup> 是氢或免疫原性载体;

[0093] 交联剂是源自能够将接头上的反应性基团与免疫原性载体上的反应性基团结合的双官能团交联剂的部分;

[0094] 所述接头是共价键、包括 2 至约 20 个羧基残基的低聚酯片段、包括 2 至约 20 个氨基残基的肽片段、直链或支链烷基或芳基羧酸酯, 或任选取代的二价 C<sub>1-20</sub> 饱和或不饱和直链或支链烃链, 其中所述烃链的 1 至 6 个亚甲基单元独立地被 -Cy-, -CR<sub>2</sub>-, -NR-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -N(R)SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>N(R)-, -O-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -C(=S)-, -C(=NR)-, -N=N- 或 -C(=N<sub>2</sub>)- 替换。

[0095] Cy- 是任选取代的 5-8 元二价饱和、部分不饱和的基团, 或具有 0-4 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳环, 或任选取代的 8-10 元二价饱和、部分不饱和的基团, 或具有 0-5 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的芳基双环;

[0096] 每个 R 独立地是氢或任选取代的基团, 所述基团选自 C<sub>1-6</sub> 脂族基团、苯基、3-7 元饱和或部分不饱和碳环、具有 1-2 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 3-7 元饱和或部分不饱和单环杂环, 或具有 1-3 个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的 5-6 元杂芳环;

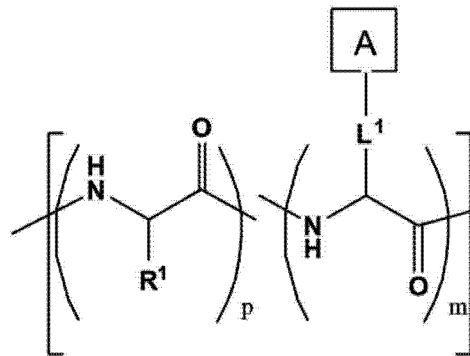
[0097] m 是 3-20;

[0098] p 是 0-100; 及

[0099] q 是 0 或 1。

[0100] 本领域技术人员应该理解的是, 所述部分:

[0101]



[0102] 在本文式中描述，p- 括号内的单元和 m- 括号内的单元可能在方括号内以任何组合或顺序出现。例如，单元可以这样排列： $\cdots p-m-p-m-p-m\cdots$ 、 $\cdots p-p-m-p-m-m-p\cdots$ 、 $\cdots m-m-m-p-p-p\cdots$ 等。

[0103] 在一些实施方案中，m 是 5-20。在一些实施方案中，m 是 4-10。在一些实施方案中，m 是 5-7。在一些实施方案中，m 是 3。在一些实施方案中，m 是 4。在一些实施方案中，m 是 5。在一些实施方案中，m 是 6。在一些实施方案中，m 是 7。在一些实施方案中，m 是 8。在一些实施方案中，m 是 9。在一些实施方案中，m 是 10。在一些实施方案中，m 是 11。在一些实施方案中，m 是 12。在一些实施方案中，m 是 13。在一些实施方案中，m 是 14。在一些实施方案中，m 是 15。在一些实施方案中，m 是 16。在一些实施方案中，m 是 17。在一些实施方案中，m 是 18。在一些实施方案中，m 是 19。在一些实施方案中，m 是 20。

[0104] 在一些实施方案中，p 是 0。在一些实施方案中，p 是 1-100。在一些实施方案中，p 是 1-80。在一些实施方案中，p 是 1-50。在一些实施方案中，p 是 1-40。在一些实施方案中，p 是 1-30。在一些实施方案中，p 是 1-25。在一些实施方案中，p 是 0-20。在一些实施方案中，p 是 0-50。在一些实施方案中，p 是 1-20。在一些实施方案中，在 m 出现的次数之间出现一次或多次 p。

[0105] 在某些实施方案中，q 是 0。在某些实施方案中，q 是 0， $R^3$  是氢，所述接头是共价键。在其它实施方案中，q 是 1。

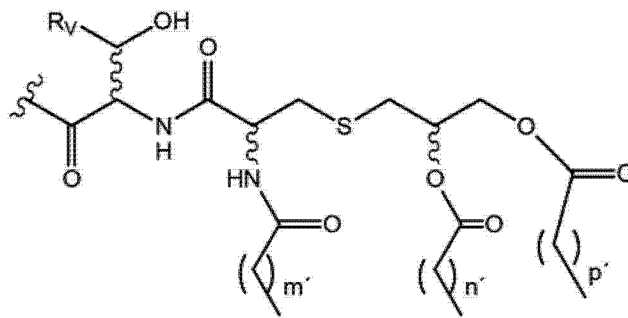
[0106] 在某些实施方案中，一次出现的 A 是 Gb5，其它出现的 A 独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子。在一些实施方案中，A 每次出现都是 Gb5。在一些实施方案中，每个 A 独立地是选自由岩藻糖基 GM1、 $Le^x$ 、Gb3、KH-1、N3、globo-H、血型糖蛋白、Tn、TF、STN、(2, 3)ST、2, 6-STn、 $Le^y$ 、GM2 和 Gb5 组成的组的糖类决定子。在一些实施方案中，每个 A 独立地是选自由 Gb5、Globo-H、TN、Tn 和 TF 组成的组的糖类决定子。在一些实施方案中，A 每次出现都不同。

[0107] 在一些实施方案中，每个  $R^1$  独立地是天然氨基酸侧链。在一些实施方案中，每个  $R^1$  独立地是非天然氨基酸侧链。

[0108] 在一些实施方案中， $R^2$  是 -Ac。在一些实施方案中， $R^2$  是氢。

[0109] 在一些实施方案中， $R^3$  是氢。在一些实施方案中， $R^3$  是免疫原性载体。在一些实施方案中， $R^3$  是选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、阳离子化的牛血清白蛋白、聚赖氨酸、OMPC 或 KLH 的免疫原性载体蛋白。在一些实施方案中，免疫原性载体蛋白是 KLH。在某些实施方案中，免疫原性载体是具有下述结构的脂质：

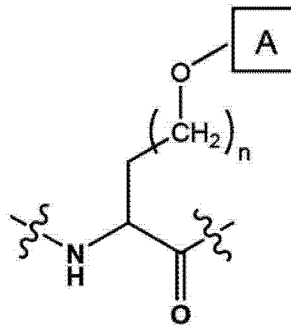
[0110]



[0111] 其中  $m'$ 、 $n'$  和  $p'$  均独立地是约 8 至 20 的整数；并且  $R_v$  是氢、取代或未取代的直链或支链低级烷基或取代或未取代的苯基。在某些示例性的实施方案中， $m'$ 、 $n'$  和  $p'$  均是 14，所述脂质是三棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸（即 PamCys）。

[0112] 在一些实施方案中，每个  $L^1$  独立地是支链脂族或杂脂族部分。在一些实施方案中，每个  $L^1$  包括天然或非天然氨基酸侧链。在一些实施方案中，每次出现的  $L^1$  独立地是  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ ，以提供具有下述结构的氨基酸：

[0113]

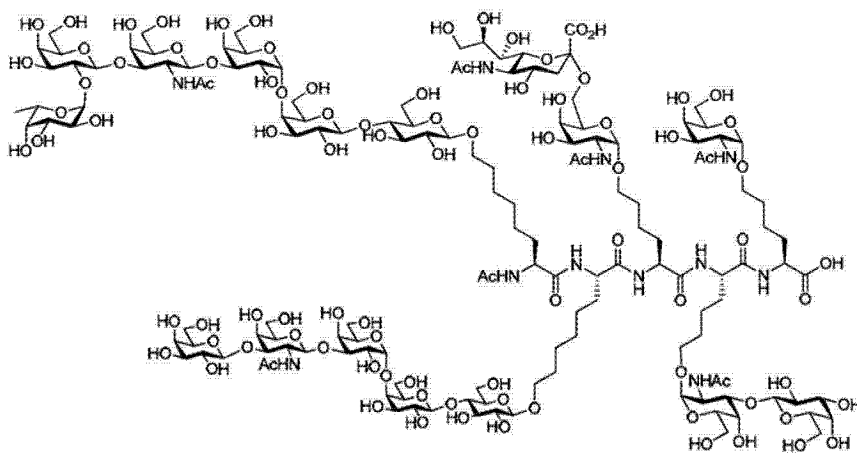


[0114] 式中  $n$  是 1-8。在一些实施方案中， $n$  是 1。在一些实施方案中， $n$  是 2。在一些实施方案中， $n$  是 3。在一些实施方案中， $n$  是 4。在一些实施方案中， $n$  是 5。在一些实施方案中， $n$  是 6。在一些实施方案中， $n$  是 7。在一些实施方案中， $n$  是 8。

[0115] 在一些实施方案中， $L^1$  是  $-\text{O}-(\text{CHMe})-$  或  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 。

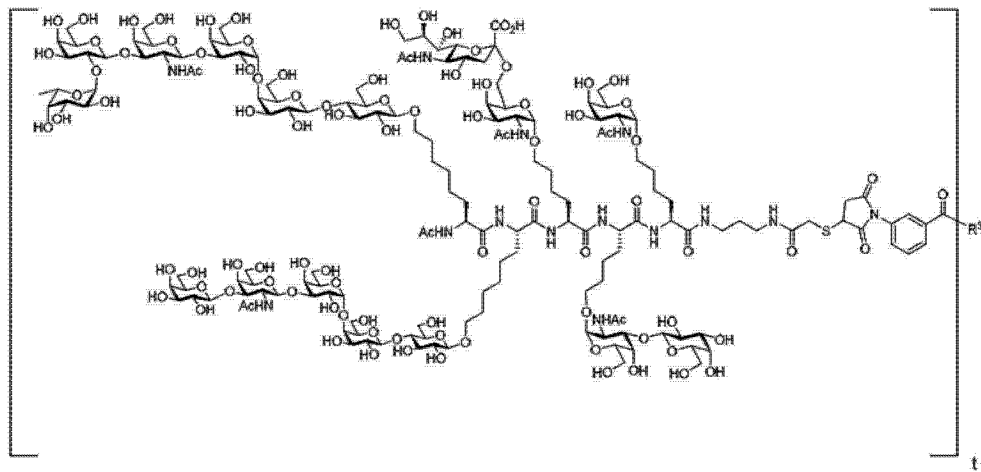
[0116] 在某些实施方案中，所提供的糖肽具有下述结构：

[0117]



[0118] 在一些实施方案中，所提供的糖缀合物具有下述结构：

[0119]

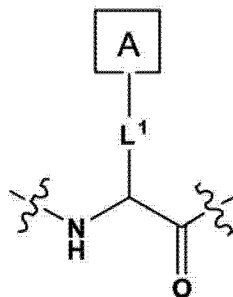


[0120] 其中  $R^3$  是免疫原性载体， $t$  是与免疫原性载体连接的糖肽基团的数量。在某些实施方案中， $t$  是 1。在一些实施方案中， $t$  是 200-1200。在一些实施方案中， $t$  是至少 200、至少 300、至少 400、至少 500、至少 600、至少 700、至少 800、至少 900、至少 1000 或至少 1100。在一些实施方案中，免疫原性载体是 KLH。

[0121] 使用缀合物的方法

[0122] 在某些实施方案中，本发明提供在患有癌症的受试者中治疗癌症的方法，包括对受试者施用治疗有效量的免疫原性糖缀合物，其中免疫原性糖缀合物包含具有由至少三个氨基酸残基组成的肽骨架的多抗原糖肽，其中三个或更多个所述氨基酸独立地是：

[0123]



[0124] 其中：

[0125] 每个  $L^1$  独立地如上文所定义，并且在本文以类和子类描述；及

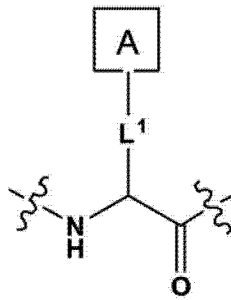
[0126] 每个 A 独立地是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 和 GM2 组成的组的糖类决定子；

[0127] 其中至少一次出现的 A 是 Gb5 或 GM2。

[0128] 在某些实施方案中，糖肽出现 3 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 4 次 A。

[0129] 在一些实施方案中，本发明提供在患有癌症的受试者中治疗癌症的方法，包括对受试者施用治疗有效量的免疫原性糖缀合物，其中所述免疫原性糖缀合物包含具有由至少五个氨基酸残基组成的肽骨架的多抗原糖肽，其中五个或更多个所述氨基酸独立地是：

[0130]



[0131] 其中：

[0132] 每个 L<sup>1</sup> 独立地如上文所定义，并且在本文以类和子类描述；及

[0133] 每个 A 独立地是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 和 GM2 组成的组的糖类决定子；

[0134] 其中至少一次出现的 A 是 Gb5 或 GM2。

[0135] 在一些实施方案中，所述糖肽出现 5 至 7 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 5 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 6 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 7 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 8 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 9 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 10 次 A。在一些实施方案中，所述糖肽出现 10 次以上 A。

[0136] 在一些实施方案中，A 每次出现都不同。在其它实施方案中，A 每次出现都相同。

[0137] 在一些实施方案中，至少一次出现的 A 是 GM2。在一些实施方案中，至少一次出现的 A 是 Gb5。在某些实施方案中，一次出现的 A 是 Gb5，其它出现的 A 独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子。在某些实施方案中，一次出现的 A 是 GM2，其它出现的 A 独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子。在一些实施方案中，至少一次出现的 A 是 GM2，剩下的每个 A 独立地是选自由岩藻糖基 GM1、GM2、Le<sup>x</sup>、Gb3、KH-1、N3、globo-H、血型糖蛋白、Tn、TF、STN、(2, 3) ST、2, 6-STn、Le<sup>y</sup> 和 Gb5 组成的组的糖类决定子。在一些实施方案中，至少一次出现的 A 是 Gb5，剩下的每个 A 独立地是选自由岩藻糖基 GM1、GM2、Le<sup>x</sup>、Gb3、KH-1、N3、globo-H、血型糖蛋白、Tn、TF、STN、(2, 3) ST、2, 6-STn、Le<sup>y</sup> 和 Gb5 组成的组的糖类决定子。

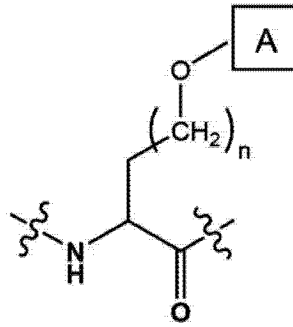
[0138] 在某些实施方案中，出现五次 A，其中一次出现的 A 是 Gb5，其它出现的 A 独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子。在某些实施方案中，出现五次 A，其中一次出现的 A 是 GM2，其它出现的 A 独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子。

[0139] 在一些实施方案中，每个 A 独立地是选自由岩藻糖基 GM1、GM2、Le<sup>x</sup>、Gb3、KH-1、N3、globo-H、血型糖蛋白、Tn、TF、STN、(2, 3) ST、2, 6-STn、Le<sup>y</sup> 和 Gb5 组成的组的糖类决定子。

[0140] 在一些实施方案中，每个 A 独立地是选自由 GM2、Gb5、Globo-H、STN、Tn 和 TF 组成的组的糖类决定子。在一些实施方案中，出现五次 A，每个 A 独立地是选自由 Gb5、Globo-H、STN、Tn 和 TF 组成的组的糖类决定子。在一些实施方案中，出现五次 A，每个 A 独立地是选自由 GM2、Globo-H、STN、Tn 和 TF 组成的组的糖类决定子。

[0141] 在一些实施方案中，每个 L<sup>1</sup> 独立地是支链脂族或杂脂族部分。在一些实施方案中，每个 L<sup>1</sup> 包括天然或非天然氨基酸侧链。在一些实施方案中，每次出现的 L<sup>1</sup> 独立地是 -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-，以提供具有下述结构的氨基酸：

[0142]



[0143] 式中  $n$  是 1-8。在一些实施方案中,  $n$  是 1。在一些实施方案中,  $n$  是 2。在一些实施方案中,  $n$  是 3。在一些实施方案中,  $n$  是 4。在一些实施方案中,  $n$  是 5。在一些实施方案中,  $n$  是 6。在一些实施方案中,  $n$  是 7。在一些实施方案中,  $n$  是 8。

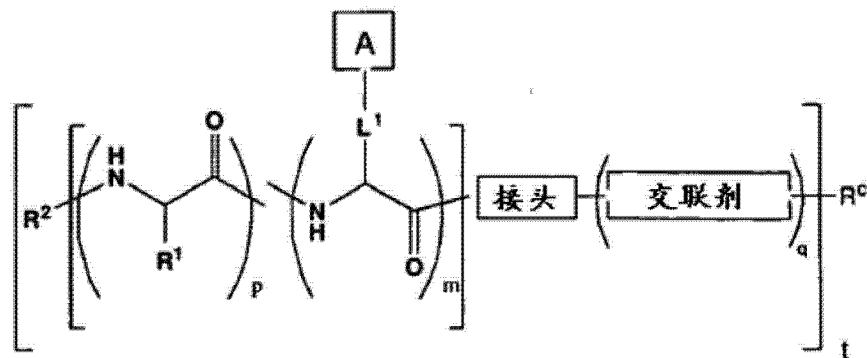
[0144] 在一些实施方案中,  $L^1$  不是  $-O-(CHMe)-$  或  $-O-CH_2-$ 。

[0145] 在某些实施方案中, 本文所述的免疫原性糖缀合物的治疗有效量包括有效抑制肿瘤生长的量。在某些实施方案中, 所述治疗有效量包括有效诱发免疫应答的量, 所述免疫应答诱导与 IgM 同工型抗体相比相对更大量的 IgG 同工型抗体。在一些实施方案中, 所述治疗有效量包括有效诱发识别至少一种糖类决定子的抗体的量。在某些实施方案中, 所述治疗有效量包括有效诱发每种糖类抗原的抗体的量。在一些实施方案中, 治疗有效量是有效治疗一种或多种实体瘤的量。

[0146] 在某些实施方案中, 所述免疫原性糖缀合物包括共价键合到免疫原性载体上的多抗原糖肽。

[0147] 在一些实施方案中, 糖缀合物具有下述结构:

[0148]



[0149] 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $L^1$ 、 $A$ 、 $p$ 、 $m$ 、 $q$ 、 $t$ 、接头和交联剂中的每一个如上所定义, 并且在本文以类和子类描述, 并且其中  $R^c$  是免疫原性载体。

[0150] 在一些实施方案中,  $m$  是 5-20。在一些实施方案中,  $m$  是 4-10。在一些实施方案中,  $m$  是 5-7。在一些实施方案中,  $m$  是 3。在一些实施方案中,  $m$  是 4。在一些实施方案中,  $m$  是 5。在一些实施方案中,  $m$  是 6。在一些实施方案中,  $m$  是 7。在一些实施方案中,  $m$  是 8。在一些实施方案中,  $m$  是 9。在一些实施方案中,  $m$  是 10。在一些实施方案中,  $m$  是 11。在一些实施方案中,  $m$  是 12。在一些实施方案中,  $m$  是 13。在一些实施方案中,  $m$  是 14。在一些实施方案中,  $m$  是 15。在一些实施方案中,  $m$  是 16。在一些实施方案中,  $m$  是 17。在一些实施方案中,  $m$  是 18。在一些实施方案中,  $m$  是 19。在一些实施方案中,  $m$  是 20。

[0151] 在一些实施方案中,  $p$  是 0。在一些实施方案中,  $p$  是 1-20。在一些实施方案中, 一

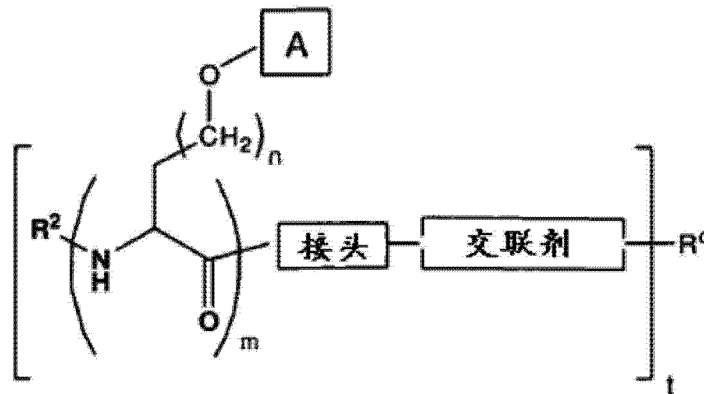
次或多次出现的 p 位于 m 的次数之间。

[0152] 在某些实施方案中, q 是 0。在其它实施方案中, q 是 1。

[0153] 在某些实施方案中, t 是 1。在一些实施方案中, t 是 200-1200。在一些实施方案中, t 是至少 200、至少 300、至少 400、至少 500、至少 600、至少 700、至少 800、至少 900、至少 1000 或至少 1100。在一些实施方案中, t 是 50-1200。在一些实施方案中, t 是 200-800。在一些实施方案中, t 是 500-800。

[0154] 在某些实施方案中, 糖缀合物具有下述结构:

[0155]

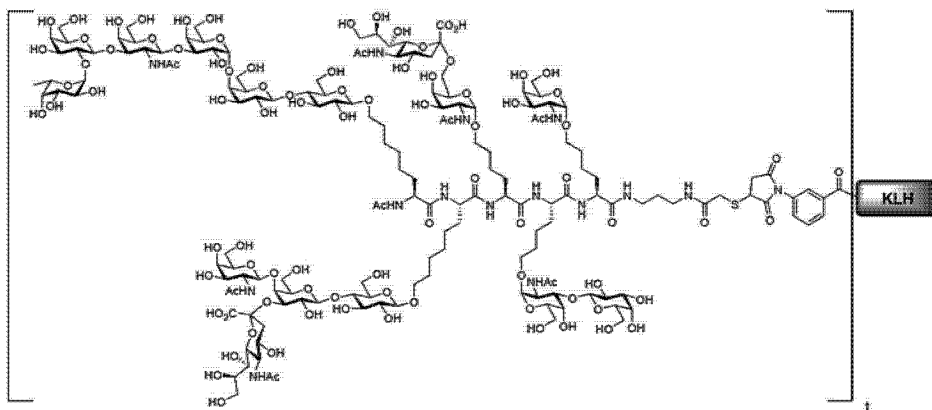


[0156] 其中  $R^2$ 、m、n、t 和  $R^c$  中的每一个如上文所定义并且在本文以类和子类描述。

[0157] 在一些实施方案中, m 是 5 并且每次出现的 n 是 3 或 5。在一些实施方案中, m 是 5, 每次出现的 n 是 3 或 5, 并且每个 A 是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF 和 GM2 所组成的组的糖类决定子, 并且其中每次出现的 A 都不同。在一些实施方案中, m 是 5, 每次出现的 n 是 3 或 5, 并且每个 A 是选自由 Globo-H、STN、Tn、TF 和 Gb5 所组成的组的糖类决定子, 并且其中每次出现的 A 都不同。

[0158] 在某些实施方案中, 所述糖缀合物具有下述结构:

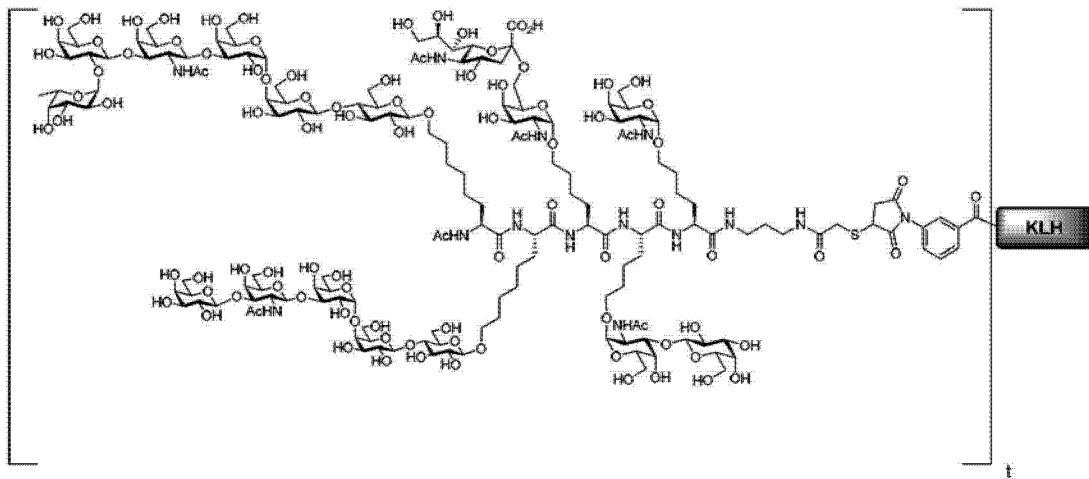
[0159]



[0160] 其中 t 如上文所述并且在本文以类和子类描述。

[0161] 在某些实施方案中, 所述糖缀合物具有下述结构:

[0162]



[0163] 其中 t 如上文所述及并且在本文以类和子类描述。

[0164] 在某些实施方案中,本发明提供在受试者中诱导抗体的方法,其中所述抗体能够特异性结合人肿瘤细胞,所述方法包括对受试者施用本文所述的任何免疫原性糖缀合物,其中所述免疫原性糖缀合物包括本文所述的任何多抗原糖肽。

[0165] 在一些实施方案中,诱导的抗体识别至少一种选自由 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 和 GM2 组成的组的糖类决定子。在一些实施方案中,诱导抗体的方法包括诱导与 IgM 同工型抗体相比相对更高量的 IgG 同工型抗体。在某些实施方案中,产生的抗体识别糖肽上存在的每种糖类决定子。

[0166] 缀合物

[0167] 在一些实施方案中,本发明提供包括下述步骤的方法:

[0168] (a) 使免疫原性载体蛋白与交联剂孵育以提供待交联的免疫原性载体蛋白;

[0169] (b) 用合适的二硫化物还原剂处理含硫醇生物分子;及

[0170] (c) 将使待交联的免疫原性载体蛋白与含硫醇生物分子在合适的条件下结合以提供免疫原性载体蛋白-生物分子缀合物。

[0171] 可选地和/或除步骤(b)外,在某些实施方案中,提供包括下述步骤的方法:在与待交联的免疫原性载体蛋白缀合之前,新鲜制备含硫醇生物分子。在某些实施方案中,方法进一步包括在步骤(a)中去除未反应的交联剂的步骤。在一些实施方案中,方法进一步包括在缀合步骤(c)后去除未反应的生物分子的步骤。

[0172] 在一些实施方案中,本发明提供包括下述步骤的方法:

[0173] (a) 用合适的二硫化物还原剂处理含硫醇生物分子;

[0174] (b) 使含硫醇生物分子与交联剂孵育以提供待交联的生物分子;及

[0175] (c) 将待交联的生物分子与免疫原性载体蛋白在合适的条件下结合以提供免疫原性载体蛋白-生物分子缀合物。

[0176] 可选地和/或除步骤(b)外,在某些实施方案中,提供包括下述步骤的方法:在孵育含硫醇生物分子与交联剂之前,新鲜制备含硫醇生物分子。在某些实施方案中,所述方法进一步包括在步骤(b)中去除未反应的交联剂的步骤。

[0177] 在本文所述的缀合方法的某些实施方案中,所述免疫原性载体蛋白选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、阳离子化的牛血清白蛋白、聚赖氨酸、OMPC 或 KLH。在一些实施方案中,免疫原性载体蛋白是 KLH。

[0178] 在某些实施方案中,含硫醇生物分子是糖肽。在一些实施方案中,含硫醇生物分子是本文所述的任何糖肽。

[0179] 本领域的技术人员熟悉许多根据所提供的方法使用的合适的交联剂。此类合适的交联剂描述在 Hermanson, G. T. (2008) *Bioconjugate Techniques*. 第 2 版, Academic Press, New York。在某些实施方案中,交联剂是异型双官能试剂。在某些实施方案中,交联剂是同型双官能试剂。在一些实施方案中,双官能交联剂选自:

[0180] i) 马来酰亚胺(双-马来酰亚胺乙烷、1,4-双马来酰亚胺丁烷、双马来酰亚胺己烷、三[2-马来酰亚胺乙基]胺、1,8-双-马来酰亚胺二乙二醇、1,11-双-马来酰亚胺二乙二醇、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷、二硫代-双马来酰亚胺乙烷);

[0181] ii) 吡啶基二硫醇(1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫代)-丙酰胺基]丁烷);

[0182] iii) 芳基叠氮化物(双-[b-(4-叠氮基水杨基酰胺基)乙基]二硫化物);

[0183] iv) NHS 酯/马来酰亚胺(N-(a-马来酰亚胺乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯、N-[β-马来酰亚胺丙氧基]琥珀酰亚胺酯、N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯、N-[γ-马来酰亚胺丁酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯、间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯、间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯、4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺基酯、[N-e-马来酰亚胺己酰氧基]琥珀酰亚胺酯、[N-e-马来酰亚胺己酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯、4-[对-马来酰亚胺苯基]丁酸琥珀酰亚胺酯、4-[对-马来酰亚胺苯基]丁酸磺基琥珀酰亚胺酯、6-[β-马来酰亚胺丙酰胺基]己酸琥珀酰亚胺基酯、琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧基-[6-酰胺基己酸酯]、N-[k-马来酰亚胺十一酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯、琥珀酰亚胺基-(N-马来酰亚胺丙酰胺基)-# 乙二醇)酯);

[0184] v) NHS 酯/吡啶基二硫醇(4-琥珀酰亚胺氧羰基-甲基-a-[2-吡啶基二硫代]甲苯、4-磺基琥珀酰亚胺基-6-甲基-a-(2-吡啶基二硫代)甲苯酰胺基己酸酯);

[0185] vi) NHS 酯/卤素代乙酰基(N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯、3-[溴乙酰胺基]丙酸琥珀酰亚胺酯、[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸 N-琥珀酰亚胺酯、[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸 N-磺基琥珀酰亚胺酯);

[0186] vii) 吡啶基二硫醇/芳基叠氮化物(N-[4-(对-叠氮基水杨基酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺);

[0187] viii) 马来酰亚胺/酰肼(N-[β-马来酰亚胺丙酸]酰肼三氟乙酸盐、[N-e-马来酰亚胺己酸]酰肼三氟乙酸盐、4-(4-N-马来酰亚胺苯基)丁酸酰肼盐酸盐、N-[k-马来酰亚胺十一烷酸]酰肼);

[0188] ix) 吡啶基二硫醇/酰肼(3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼);

[0189] x) 异氰酸酯/马来酰亚胺(N-[对-马来酰亚胺苯基]异氰酸酯),及 1,6-己烷-双-乙烯砜,仅举几个例子。

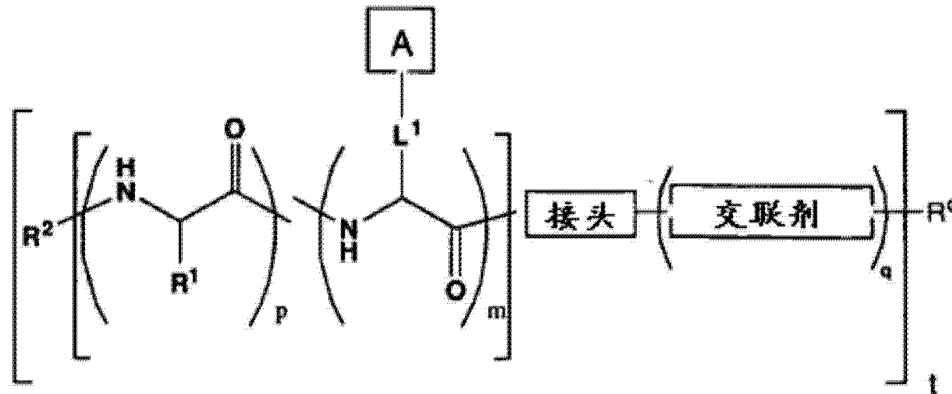
[0190] 根据所述缀合方法可以使用任何合适的还原剂。在一些实施方案中,用合适的二硫化物还原剂处理含硫醇生物分子的步骤包括选自三(2-羧乙基)膦(TCEP)、2-巯基乙醇、半胱氨酸、2-巯基乙醇(BME)或二硫苏糖醇(DTT)的二硫化物还原剂。在一些实施方案中,还原剂是固定化试剂。在一些实施方案中,还原剂是 TCEP 凝胶。

[0191] 在某些实施方案中,所提供的缀合方法的效率是每种免疫原性载体蛋白至少 200

个生物分子。在某些实施方案中,所提供的缀合方法的效率是每种免疫原性载体蛋白至少 300、至少 400、至少 500、至少 600、至少 700、至少 800、至少 900、至少 1000、至少 1100 个生物分子。在某些实施方案中,所述提供的缀合方法的效率是每种免疫原性载体蛋白约 200 至约 800 个生物分子。

[0192] 在某些实施方案中,本发明提供了一种能够显著增加生物缀合物的表位比的改进的生物缀合试验。在某些实施方案中,本发明提供具有下述结构的免疫原缀合物:

[0193]



[0194] 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^c$ 、 $L^1$ 、 $A$ 、 $p$ 、 $m$ 、 $q$ 、接头和交联剂中的每一个如上文定义并且在本文以类和子类描述;

[0195] 每个  $A$  独立地是肿瘤细胞中发现的糖类决定子;

[0196]  $t$  是与免疫原性载体连接的糖肽基团的数量,并且大于 200。在某些实施方案中, $t$  大于 300、400、500、600、700、800、900 或 1000。

[0197] 虽然不希望受任何具体理论的束缚,但是,此类缀合物较高的表位比(即  $t$  值较高)可能与施用的缀合物的免疫原性提高有关。此外,血清中抗体的高效产生可能有助于消除表达相应糖类抗原的肿瘤细胞。

[0198] 在某些实施方案中,至少一次出现的  $A$  选自 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 或 GM2。在某些实施方案中,每次出现的  $A$  均选自 Globo-H、STN、Tn、TF、Gb5 或 GM2。在一些实施方案中,每次出现的  $A$  都不同。

[0199] 在一些实施方案中,至少一次出现的  $A$  包括二糖或更大的糖类。在一些实施方案中,每次出现的  $A$  包括二糖或更大的糖类。在一些实施方案中,至少一次出现的  $A$  包括三糖或更大的糖类。在一些实施方案中,每次出现的  $A$  包括三糖或更大的糖类。在某些实施方案中,至少一次出现的  $A$  包括分子量大于 350 道尔顿的糖类。在某些实施方案中,至少一次出现的  $A$  包括分子量大于 500 道尔顿的糖类。在某些实施方案中,至少一次出现的  $A$  包括分子量大于 750 道尔顿的糖类。在一些实施方案中,至少一次出现的  $A$  是 Globo-H、Gb5 或 GM2。

[0200] 在某些实施方案中,交联剂源自上述的任何双官能团交联剂。

[0201] 接头

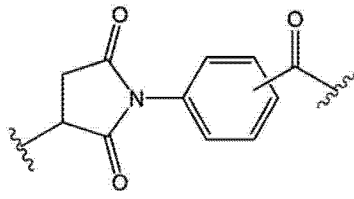
[0202] 在所述方法、糖肽和糖缀合物的某些实施方案中,接头是共价键。在一些实施方案中,接头是直链或支链烷基或芳基羧酸酯,或任选取代的二价  $C_{1-10}$  饱和或不饱和直链或支链烃链,其中所述链的 1 至 6 个亚甲基单元独立地被  $-S-$ 、 $-NR-$ 、 $-N(R)C(O)-$ 、 $-C(O)$

N(R)-、-O- 或 -C(O)- 替换。在某些实施方案中,接头是  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$ 。在一些实施方案中,接头是  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$ 。

[0203] 交联剂

[0204] 在上述方法、糖肽和糖缀合物的某些实施方案中,交联剂是源自上述双官能团交联剂的部分。在一些实施方案中,交联剂是源自能够将载体的表面胺和接头的硫醇缀合的双官能团交联剂的部分。在某些实施方案中,交联剂是源自能够将载体的表面羟基和接头的硫醇缀合的双官能团交联剂的部分。在一些实施方案中,交联剂是源自能够将载体的表面硫醇和接头的硫醇缀合的双官能团交联剂的部分。在一些实施方案中,交联剂是源自能够将载体的表面羧基和接头的硫醇缀合的双官能团交联剂的部分。在一些实施方案中,交联剂是具有下述结构的部分:

[0205]



[0206] 其中,所述结构是在将马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯与接头缀合时产生的。

[0207] 制剂

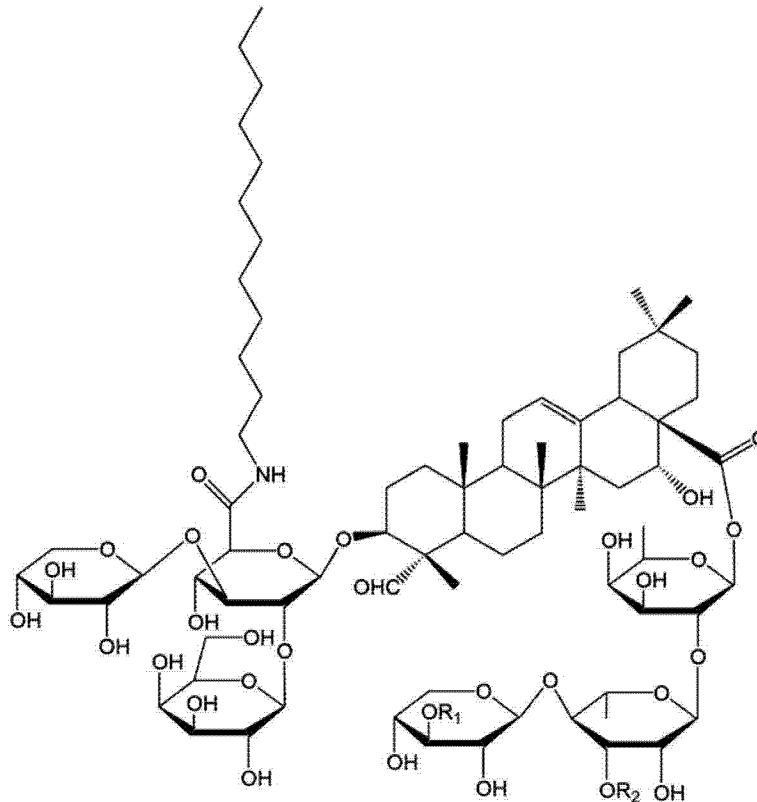
[0208] 如上所述,本发明提供用于开发新型治疗剂,尤其是全合成癌症疫苗和/或疗法的化合物和合成方法。一般来说,本文公开的所述化合物和糖肽可以与蛋白载体或脂质结合,以产生用于治疗 and / 或预防(优选预防复发)癌症的糖缀合物。此外,采用本文公开的方法制备的糖缀合物可作为能够诱导产生与各种肿瘤细胞免疫应答的抗体的疫苗用于辅助治疗。此类辅助治疗可以降低某些癌症的复发率,提高术后生存率。临床试验表明,患者接受癌症手术治疗后,采用由免疫之前缺乏抗体的患者体内发现的细胞表面分化抗原制备的疫苗治疗,可以观察到患者的无病间隔显著延长(P. O. Livingston, 等, J. Clin. Oncol., 1994, 12, 1036)。

[0209] 因此,本发明提供用于治疗癌症和/或预防癌症复发的药物组合物,包括本文公开的本发明的任何化合物作为活性成分,任选与药学上可接受的载体组合。本发明的药物组合物可以进一步包括其它治疗活性成分(如,化疗剂和/或缓和剂)。例如,缓和剂治疗包括止痛药、止吐药物和抗恶心药物。此外,化疗、放射疗法和手术都可以缓和地使用(也就是说,减轻症状,但并没有治愈;例如,使肿瘤萎缩和降低压力、减少出血、疼痛和癌症的其它症状)。

[0210] 在某些实施方案中,本发明的药物组合物或方法包括免疫佐剂,或免疫佐剂的组合。

[0211] 在某些实施方案中,所述佐剂是皂苷佐剂(参见,例如 Marciani 等, Vaccine, 2000, 18, 3141、美国专利第 6,080,725 号和第 5,977,081 号,其全部内容在此通过引用并入)。皂苷佐剂的一个实例包括但不限于 GPI-0100, (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Frederick, MD), 这是一种通过对选择的天然皂苷进行修饰而得到的半合成佐剂。

[0212]



[0213] GPI-0100

[0214] 从石碱木(*Quillaja saponaria* Molina)中分离出来的皂苷包含两个酰基部分、一个去甲基单萜羧酸和一个去甲基单萜羧酸糖苷,与连接在C-28位的岩藻糖残基线性连接。已经假设这些亲脂性酰基可能导致这些皂苷的毒性和它们刺激细胞毒性T细胞来抵抗外源性抗原的能力。岩藻糖残基和酰基之间的连接不稳定,并且在温和的条件下( $\text{pH} \geq 6$ )水解,同时失去皂苷刺激细胞介导免疫应答的能力。与它们的皂苷前体不同的是,GPI-0100佐剂在皂苷葡萄糖醛残基中包含稳定无毒的亲脂性部分。制备这些半合成佐剂的方法是本领域熟知的。例如,GPI-0100佐剂可通过在碱性条件下水解皂树皂苷(可商购)以得到相应的脱酰基产品而制备。然后,采用标准羧酸部分活化方法,可使所述脱酰基中间体与合适的胺试剂反应以得到期望的化合物。许多方法有效用于提取皂苷化合物。这些方法概括如下:(i)用疏水性有机溶剂,如石油醚使有机物质脱脂;(ii)用合适的醇(如,甲醇或乙醇)或醇-水混合物提取;(iii)将原醇(carinol)溶剂蒸发;和(iv)在水和用水饱和的正丁醇之间分配干燥的甲醇提取物,然后用合适的有机溶剂(如,二乙醚)将粗皂苷从正丁醇/水中沉淀出来。皂苷提取物的纯化可能需要几个分离步骤。例如,可使用传统开放式柱色谱法或硅胶快速色谱法,结合更先进的色谱技术,如高压液相色谱法(HPLC)、液滴逆流液相色谱法(DCCC)或离心液相色谱法(RLCC),进行初级分离。这些技术与制备型TLC的整合一般可提供分离且纯化的皂苷。

[0215] 在某些实施方案中,佐剂是细菌或脂质体或包含细菌或脂质体。在某些示例性的实施方案中,所述佐剂包括但不限于明尼苏达沙门氏菌(*Salmonella minnesota*)细胞、卡介苗(bacille Calmette-Guerin)、GPI-0100或QS-21。

[0216] 本发明化合物可与药学上可接受的载体组合以形成药物组合物。Remington's Pharmaceutical Sciences, 地16版, E.W.Martin(Mack Publishing

Co., Easton, Pa., 1980) 公开了用于配制药组合物和各种载体及用于制备药物组合物的各种熟知的技术。在某些实施方案中,所述药物组合物包括药学上可接受的量的本发明化合物。可与载体材料组合而产生单一剂型的活性成分的数量将根据待治疗的宿主和施用的具体模式而变化。可与载体材料组合而产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的量。一般来说,此量将是约 1% 至约 99% 的活性成分,约 5% 至约 70% 的活性成分,或约 10% 至约 30% 的活性成分。

[0217] 所述组合物中还可以存在润湿剂、乳化剂、润滑剂(如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁)及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0218] 药学上可接受的抗氧化剂实例包括:水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;和金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0219] 本发明的制剂包括那些适合口服、鼻、局部(包括颊和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外施用的制剂。制剂可方便地以单位剂型形式存在,并可采用药学领域熟知的任何方法制备。在某些实施方案中,本发明的制剂包含选自由环糊精、脂质体、胶束成型剂(如胆汁酸)和聚合物载体(如聚酯和聚酐)组成的组的赋形剂;及本发明化合物。在某些实施方案中,前述制剂赋予本发明化合物口服生物利用性。

[0220] 制备这些制剂的方法包括将本发明化合物与载体及任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。一般来说,制剂通过将本发明化合物与液体载体或极细固体载体或这两种载体均匀且密切地结合,然后,如果必要的话,使产品成形而制备。

[0221] 适合口服施用的本发明制剂可以是胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(采用经调味的基料,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、粒剂形式,或作为水溶液或非水溶液中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或浆剂,或作为锭剂(采用惰性的基料,如明胶或甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或含漱剂等,每种形式包含预定量的作为活性成分的本发明化合物。本发明化合物还可以作为大丸剂、药糖剂或糊剂施用。

[0222] 在本发明用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉剂、粒剂等)中,所述活性成分与一种或多种药学上可接受的载体混合,如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或下述任何一种载体:填料或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;粘合剂,如,例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;湿润剂,如甘油;崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐及碳酸钠;溶液延缓剂(solution retarding agent),如石蜡;吸收促进剂,如季铵化合物;润湿剂,如十六醇、单硬脂酸甘油酯和非离子表面活性剂;吸附剂,如高岭土和膨润土;润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,所述药物组合物还可以包括缓冲剂。采用例如乳糖或奶糖等载体,以及高分子量聚乙二醇等,类似类型的固体组合物也可作为软壳和硬壳明胶胶囊中的填料使用。

[0223] 片剂任选与一种或多种辅助成分可通过压制或模制来制备。可以采用粘合剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羧基乙酸淀粉钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂制备压缩片。模制片可在合适的机器中制作,其中采用惰性液体稀释剂润湿粉末化合物的混合物。

[0224] 本发明药物组合物的片剂,及其它固体剂型,如糖衣丸、胶囊、丸剂和粒剂,可任选被刻痕或用包衣和壳体来制备,如肠溶包衣和药学配制领域熟知的其它包衣。它们还可以配制成提供对活性成分的缓释或控释,例如,采用不同比例的羧丙基甲基纤维素以提供所需的释放行为、其它聚合物基质、脂质体和 / 或微球。它们可配制用于快速释放,如冻干。它们可以在临用前通过例如细菌截留过滤器过滤,或通过掺入可以溶于无菌水或某些其它无菌可注射介质中的无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌。这些组合物还可任选包括遮光剂,并且组合物可以是仅在,或者优选在胃肠道某部分释放,任选以延迟的方式释放活性成分的组合物。可以使用的嵌入组合物的实例包括聚合物物质和蜡。活性成分,如果合适的话,与一种或多种上述赋形剂一起还可呈微胶囊的形式。

[0225] 用于本发明化合物口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除活性成分外,所述液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂(如水或其它溶剂)、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糖醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及它们的混合物。

[0226] 除惰性稀释剂外,口服组合物还可以包括诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂等佐剂。

[0227] 除活性化合物之外,悬浮液还可以包含悬浮剂(如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯)、微晶纤维素、氢氧化铝氧化物(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和黄蓍胶,以及它们的混合物。

[0228] 用于直肠施用和阴道施用的本发明的药物组合物制剂可以栓剂形式呈现,其可以通过将本发明的一种或多种化合物与一种或多种合适的非刺激性赋形剂或载体混合来配制,所述赋形剂或载体包括,例如,可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯(盐),它们在室温时呈固体,但是在体温时呈液体,因此,将在直肠或阴道内融化而释放出活性化合物。

[0229] 适合阴道施用的本发明制剂还包括含有本领域已知的适宜的载体的阴道栓剂、棉塞、霜剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0230] 本发明化合物的局部或经皮施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。所述活性化合物可在灭菌条件下与药学上可接受的载体、任何防腐剂、缓冲剂或可能需要的推进剂一起混合。

[0231] 除本发明的活性成分之外,软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶可以包含赋形剂,如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌,或它们的混合物。

[0232] 除本发明的活性成分之外,粉剂和喷雾剂可以包含赋形剂,如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。此外,喷雾剂还可以包含常规推进剂,如氯氟烃和挥发性未取代烃,如丁烷和丙烷。

[0233] 透皮贴剂具有将本发明化合物控制递送到体内的额外优点。将所述化合物溶解或分散在合适的介质中可以制备此种剂型。为了增加化合物在皮肤上的流动,也可以使用吸收促进剂。提供速率控制膜或者将化合物分散在聚合物基质或凝胶中,可以控制此类通量的速率。

[0234] 还设想眼科制剂、眼膏、粉剂、溶液等在本发明的范围之内。

[0235] 适合胃肠外施用的本发明的药物组合物包括本发明的一种或多种化合物,以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散液、混悬液或乳液,或在临用前可以复原成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末,它们可以包含糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期受体血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[0236] 可在本发明药物组合物中采用的合适的水载体和非水载体的实例,包括水、醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),以及它们合适的混合物,植物油如橄榄油,和可注射的有机酯如油酸乙酯。可以例如使用包衣材料(如卵磷脂)、通过在分散液的情况下保持所需粒径,以及使用表面活性剂来保持合适的流动性。

[0237] 这些组合物还可以包括防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂等佐剂。通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂,如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等,可以确保预防微生物对主题化合物的作用。将等渗剂例如糖、氯化钠等掺入组合物中可能也是可取的。此外,通过包括延迟吸收的试剂,如单硬脂酸铝和明胶,可以延长可注射药物形式的吸收。

[0238] 在某些情况下,为了延长药效,减慢药物从皮下或肌肉注射的吸收是可取的。这可以使用水溶解度较差的结晶或无定形材料的液体混悬液来实现。然后,药物的吸收速率取决于它的溶解速率,溶解速率反过来可能取决于晶体大小和结晶形态。或者,胃肠外施用的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解或悬浮于油性媒介物中实现。

[0239] 通过在生物可降解聚合物如乳酸-羟基乙酸共聚物中形成主题化合物的微胶囊基质,制备可注射的长效剂型。根据药物和聚合物的比例,及所采用的具体聚合物的性质,可以控制药物的释放速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酐)。贮库可注射制剂还可以通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中制备。

[0240] 药物洗脱形式包括涂层支架或药物支架和植入装置。药物洗脱支架和其它装置可涂敷有化合物或药物制剂,并且可以进一步包括设计用于延时释放的聚合物。

[0241] 在某些实施方案中,化合物或药物制剂是口服施用的。在其它实施方案中,化合物或药物制剂是静脉内施用的。在某些实施方案中,化合物通过可切割的接头与采用导管施用的固体支撑物连接。施用的替代路径包括舌下施用、肌肉施用和经皮施用。

[0242] 当本发明化合物作为药物施用于人和动物时,它们可以本身的形式施用,或以包含例如0.1%至99.5%、或0.5%至90%的活性成分与药学上可接受的载体组合的药物组合物的形式施用。

[0243] 本发明的制剂可以口服、胃肠外、局部或直肠施用。当然,它们是以适合每种施用途径的形式给予。例如,它们是以片剂或胶囊形式、通过注射、吸入、洗眼剂、软膏剂、栓剂等施用,通过注射、输液或吸入施用;通过洗液或软膏剂局部施用;通过栓剂直肠施用。

[0244] 这些化合物可通过任何合适的施用途径施用于人或动物中,包括口服、鼻施用,例如通过气溶胶、喷雾剂;直肠、阴道内、胃肠外、池内和局部施用,例如通过粉末;软膏剂或滴剂施用,包括颊和舌下。

[0245] 不管所选择的施用途径如何,通过本领域技术人员熟悉的传统方法,将可以合适的水合形式使用的本发明化合物、和/或本发明的药物组合物配制成药学上可接受的剂型。

[0246] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可能变化,从而得到有效实现针对具体患者、组合物和施用模式的治疗反应并且对患者无毒性的活性成分的量。

[0247] 选择的剂量水平将取决于多种因素,包括采用的本发明的具体化合物、或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、采用的具体化合物的排泄速率或代谢速率、治疗持续时间、与采用的具体化合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或材料、患者的年龄、性别、体重、病况、一般健康状况和以前的医疗史,以及医学领域熟知的各种因素。

[0248] 具有本领域普通技能的医生或兽医可容易地确定所需的药物组合物的有效量并开所述有效量的处方。例如,医生或兽医一开始使用的药物组合物中采用的本发明化合物的剂量的水平可以低于实现期望疗效所需的水平,然后逐渐递增剂量,直到实现期望的效果。

[0249] 在一些实施方案中,向受试者长期提供本发明化合物或药物组合物。长期治疗包括重复施用持续延长的时段的任何形式,如重复施用一个月或多个月,重复施用一个月至一年,重复施用一年或多年,或更长时间。在许多实施方案中,长期治疗包括在受试者的生命中重复施用本发明化合物或药物组合物。优选的长期治疗包括定期施用,例如,一天一次或多次,一周一次或多次,或者一月一次或多次。一般来说,本发明化合物的合适剂量如日剂量,应是有效产生疗效的最低剂量的化合物的量。这种有效剂量通常取决于上面所述的各种因素。当用于指定的效果时,对于患者来说,本发明化合物的常用剂量是每天约 0.0001 至 100mg/kg 体重。日剂量优选是 0.001 至 50mg/kg 体重,甚至更优选是 0.01 至 10mg/kg 体重。然而,也可以使用更低或更高的剂量。在一些实施方案中,向受试者施用的剂量可以根据受试者因年龄、疾病进展、体重或其它因素引起的生理学变化而变化。

[0250] 如果需要,所述活性化合物的有效日剂量可以任选以单位剂量形式在一天内按照合适的间隔以二次、三次、四次、五次、六次或更多次亚剂量分开施用。

[0251] 虽然本发明化合物可能单独施用,但是,优选所述化合物作为上文所述的药物制剂(组合物)施用。

[0252] 与其它药物类似,根据本发明的化合物可以配制成以任何方便的方式作为人用药或兽药施用。

[0253] 本发明提供包括本发明化合物的药物组合物的试剂盒。在某些实施方案中,此种试剂盒包括本发明化合物和另一种化疗剂的组合。所述试剂可以单独包装或包装在一起。所述试剂盒可以任选包括药物处方说明。在某些实施方案中,所述试剂盒包括每种试剂的多次剂量。所述试剂盒可包括足够量的每种组分以治疗受试者一周、两周、三周、四周或多月。所述试剂盒可能包括整个化疗周期。在某些实施方案中,所述试剂盒包括多个化疗周期。

[0254] 用途

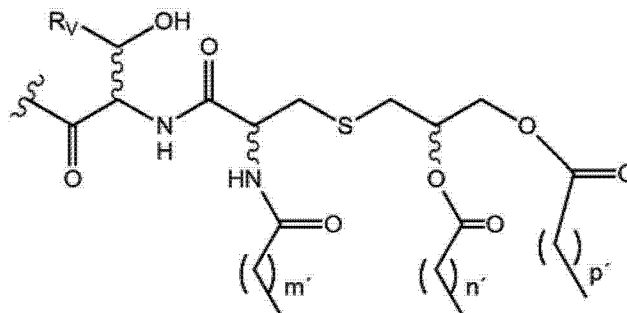
[0255] 目前,患有晚期卵巢癌患者的标准治疗由侵略性的肿瘤细胞减灭术及之后基于紫杉烷和铂的化疗组成。患有卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌的患者有 80% 的机会对基于紫杉烷和铂的化疗有临床反应,并且很大一部分在治疗结束时将进入临床完全缓解期。虽然最佳的减积 (debulked) 患者的总存活率中值增加到 65.6 个月,但少于 30% 的患者保持无病,并且 10% 患有欠佳减积疾病的患者将保持无病,两者的无恶化间隔分别是 24 个月和 18 个月 (Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, 等 *N Engl J Med* 354:34-43, 2006)。复发的患者通常具有持续时间有限的后续响应,并且最终发展成抵抗疾病 (Markman M, Markman J, Webster K, 等 *J Clin Oncol* 22:3120-5, 2004)。需要延长缓解期和 / 或防止复发的选项,

并且可由本发明提供这些选项。

[0256] 对于处于疾病负担最低的临床缓解期的患者来说,免疫定向治疗是一种颇有吸引力的研究治疗策略(Sabbatini P, Spriggs DR. *J Clin Oncol*24:537-9, 2006)。临床前模型已经证明通过被动施用的抗体和疫苗诱导的抗体可以清除循环肿瘤细胞和消除系统性微转移(Zhang H, Zhang, S, Cheung NK, 等 *Vaccine*23:3114-22, 2005 ;Ragupathi G, Gathuru J, Livingston P. *Cancer Treat Res*123:157-80, 2005)。

[0257] 在某些实施方案中,提供了一种治疗方法,包括对受试者施用治疗有效量的本文公开的任何糖缀合物,任选与药学上可接受的载体组合。在一些实施方案中,所述方法进一步包括共施用免疫佐剂(下文进一步定义)或免疫佐剂的组合。在某些实施方案中,所述癌症是实体瘤或上皮细胞瘤。如上所述,提供了用于治疗癌症和/或预防癌症复发的方法,包括对受试者施用有效诱导抗体的量的上文公开的任何糖缀合物。此外,还提供用于在人受试者中诱导抗体的方法,其中所述抗体能够与人体肿瘤细胞特异性结合。在某些实施方案中,糖类抗原直接与免疫原性载体连接或通过交联剂与免疫原性载体连接,其中所述载体是蛋白质、肽或脂质。在某些实施方案中,载体是选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、阳离子化的牛血清白蛋白、聚赖氨酸、OMPC 或 KLH。在某些实施方案中,所述载体是具有下述结构的脂质:

[0258]



[0259] 其中 m'、n' 和 p' 各自独立地是约 8 至 20 的整数;并且 R<sub>v</sub> 是氢、取代或未取代的直链或支链低级烷基或取代或未取代的苯基。在某些示例性的实施方案中, m'、n' 和 p' 各是 14, 并且所述脂质是三棕榈酰-S-甘油基半胱氨酰丝氨酸(例如, PamCys)。

[0260] 在某些实施方案中,提供的方法包括对受试者施用治疗有效量的本文公开的任何化合物和/或糖肽,与免疫原性载体组合,任选与药学上可接受的载体组合。特别是,在某些实施方案中,提供的方法包括施用与免疫原性载体缀合的糖类抗原。在某些实施方案中,提供的方法包括施用糖类抗原和未缀合的免疫原性载体。更确切地说,它们可以同时施用,或作为单独的实体相继施用。

[0261] 对于本发明的目的,当化合物/糖肽和载体按照下述方法施用时,则称其为同时施用:(i) 作为含有所述化合物/糖肽和载体的单一组合物;(ii) 作为两个单独的组合物或(iii) 在足够短的时间段内通过单独的途径递送,其有效结果与化合物/糖肽和载体作为单一组合物施用时获得的结果相当。

[0262] 在某些实施方案中,本公开提供在受试者中诱发抗体的方法,包括对受试者施用本公开的构建体。在一些实施方案中,本发明提供诱导抗体的方法,进一步包括同时施用免疫佐剂,或免疫佐剂的组合。在某些实施方案中,佐剂是皂苷佐剂。在某些实施方案中,佐

剂是细菌或脂质体。在某些实施方案中,所述佐剂包括但不限于明尼苏达沙门氏菌细胞、卡介苗、GPI-0100 或 QS-21。特别是,当使用包括至少两种不同抗原结构域的多抗原糖肽时,可能诱导至少两种不同类型的抗体。在某些实施方案中,糖肽上存在的每种抗原都诱发一种对此抗原特异的抗体类型。在某些实施方案中,产生的抗体是那些识别存在于糖肽上的至少一种抗原的抗体。在某些实施方案中,当施用至受试者时,本发明的多抗原糖肽产生针对存在于糖肽骨架上的抗原子集的抗体。在某些实施方案中,产生的某些抗体识别糖肽的两个或更多个抗原。在某些实施方案中,本发明的糖肽包括肿瘤细胞中发现的糖类结构域,或其缩短或加长的形式。

[0263] 本发明化合物可体外使用或体内使用。所述发明化合物在治疗肿瘤或体内其它增殖性疾病方面尤其有用。然而,以上所述的本发明化合物还在体内使用以用于研究或临床目的(如确定患者疾病对本发明化合物的敏感性,研究作用机理,阐明细胞通路或过程)。

[0264] 在一些实施方案中,提供本发明化合物用于药物。在一些实施方案中,本发明提供在患有增殖性疾病的受试者中治疗增殖性疾病的方法,所述方法包括对受试者施用治疗有效量的本发明化合物。在某些实施方案中,所述增殖性疾病是良性肿瘤。在某些实施方案中,所述增殖性疾病是癌症。

[0265] 本发明化合物可用于治疗或预防肿瘤。在某些实施方案中,所述肿瘤是良性肿瘤。在某些实施方案中,所述肿瘤是恶性肿瘤。

[0266] 在某些实施方案中,所述癌症是血液恶性肿瘤。在某些实施方案中,所述癌症是实体瘤。可使用本发明化合物治疗的癌症实例仅举几个例子,包括结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、皮肤癌、脑癌、肝癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、神经内分泌癌、乳腺癌、胃癌、眼癌、胆囊癌、喉癌、口腔癌、阴茎癌、腺瘤、直肠癌、小肠癌、肉瘤、癌、黑素瘤、尿道癌、阴道癌。在一些实施方案中,所述癌症是小细胞肺癌。在一些实施方案中,所述癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,所述癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,所述癌症是肺癌。在一些实施方案中,所述癌症是子宫内膜癌。在一些实施方案中,所述癌症是上皮癌。在一些实施方案中,所述癌症是结肠癌。在一些实施方案中,所述癌症是前列腺癌。在一些实施方案中,所述癌症是胃癌。在一些实施方案中,所述癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,所述癌症是腹膜癌。在一些实施方案中,所述癌症是输卵管癌。在一些实施方案中,所述癌症是上述任何器官或组织的癌症。

[0267] 在某些实施方案中,本发明化合物和药物组合物可用于联合疗法中,也就是说,所述化合物和药物组合物可以与一种或多种其它期望的治疗或医疗程序同时施用,或在它们之前施用或在它们之后施用。在组合方案中采用的治疗(治疗或程序)的具体组合将考虑所期望治疗和 / 或程序的相容性及期望实现的治疗效果。还应该理解的是,采用的治疗对于相同的病症可以达到期望的效果(例如,本发明化合物可以与另一种抗癌剂同时使用),或者可以实现不同的效果(例如,控制任何不良作用)。

[0268] 例如,可以与本发明化合物组合使用的其它治疗或抗癌剂仅举几个例子,包括手术、放射疗法( $\gamma$ -放射、中子束放射治疗、电子束放射治疗、质子疗法、近距放射疗法和全身放射性同位素疗法,仅举几个例子)、内分泌疗法、生物反应调节剂(干扰素、白细胞介素类和肿瘤坏死因子(TNF),仅举几个例子)、高温疗法和冷冻疗法、减少任何不良作用的药剂(如止呕剂),和其它批准的化疗药物,包括但不限于烷基化药物(氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰

胺、美法仑、异环磷酰胺)、抗代谢物(甲氨蝶呤)、嘌呤拮抗剂和嘧啶拮抗剂(6-巯基嘌呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨)、纺丝体毒剂(长春碱、长春新碱、长春瑞滨、紫杉酚)、鬼臼毒素(依托泊苷、伊立替康、托泊替康)、抗生素(阿霉素、争光霉素、丝裂霉素)、亚硝基脲(卡莫司汀、洛莫司汀)、无机离子(顺铂、卡铂)、酶(天门冬酰胺酶)和激素(他莫西芬、亮丙瑞林、氟他米特和甲地孕酮)。此外,本发明还包括使用目前正在临床进行试验并且可能最终得到 FDA 批准的某种细胞毒素剂或抗癌药物(包括但不限于埃博霉素及其类似物和格尔德霉素及其类似物)。要更全面地讨论最新的癌症治疗,参见 [www.nci.nih.gov](http://www.nci.nih.gov) 和 The Merck Manual, 第 17 版, 1999, 这些文献的全部内容在此通过引用并入。

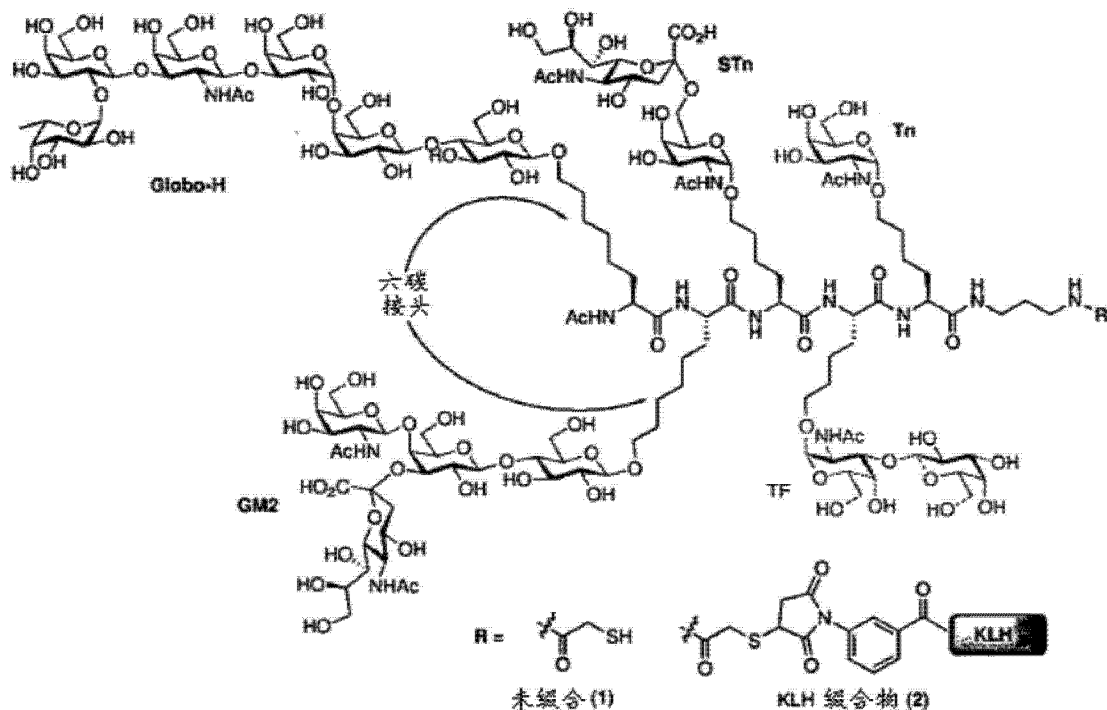
[0269] 在某些实施方案中,本发明化合物用于治疗临床缓解期的受试者。在一些实施方案中,所述受试者已经进行了手术治疗,并且可能具有有限未切除的疾病。

[0270] 实施例

[0271] 实施例 1

[0272] 包含 Globo-H、GM2、STn、TF 和 Tn 的单分子五价疫苗构建体的合成:

[0273]



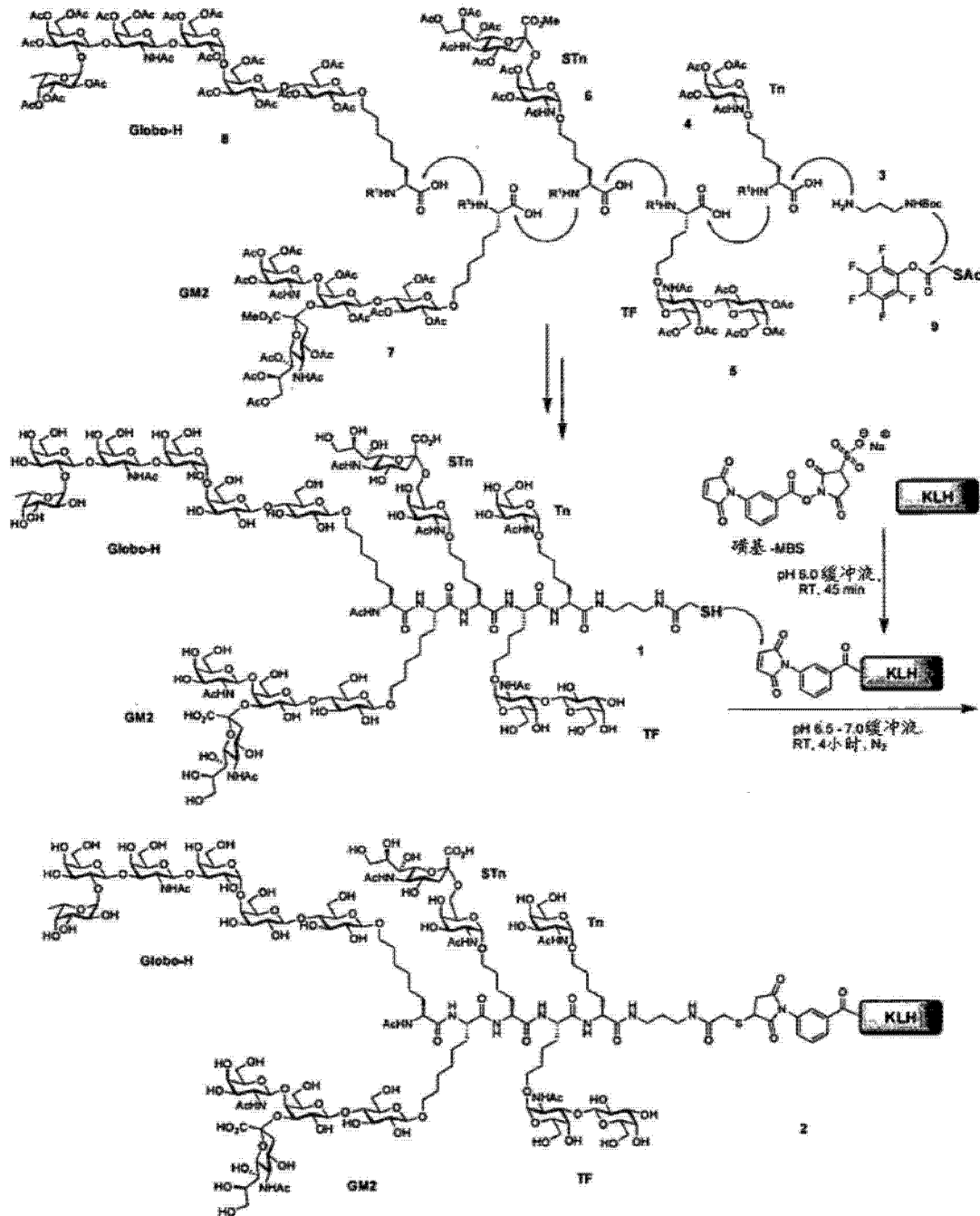
[0274] 单分子五价构建体 KLH 缀合物 (2)

[0275] 该实例描述了缀合物 (2) 的制备。在早期研究中,已经将结构上相关的第一代单分子五价构建体缀合到 KLH 载体蛋白上,其中缀合效率是每个 KLH228 个糖肽(Keding, S. J. ;Danishefsky, S. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101, 11937 ;Ragupathi2006, 同上 ;Biswas K, Coltart DM, Danishefsky SJ. Tetrahedron Lett3:6107-10, 2002 ; Cho YS, Wan Q, Danishefsky SJ. Bioorg Med Chem13:5259-66, 2005 ;Wan Q, 等 Olefin Cross-Metathesis: A powerful tool for constructing vaccines composed of multimeric antigens. J Carbohydrate Chem24:425-40, 2005 ; Keding SJ, 等 Tetrahedron Lett44:3413-16, 2003 ;Keding SJ, Edno A, Danishefsky SJ. Tetrahedron59:7023-31, 2003 ;Cho SC 等 Bioorg. Med. Chem. 13, 5259-5266, 2005)。认

识到通过获得缀合物(2)的更高表位 /KLH 比率,可以产生更稳健的免疫应答,因此,申请人开发了一种如下文所述的用于缀合的新程序。

[0276] 方案 1. 包含 Globo-H、GM2、STn、TF 和 Tn 的缀合物 2 的合成

[0277]



[0278] 载体蛋白 KLH 首先在 pH6.0 的磷酸盐缓冲液中与磺基 -MBS(间 - 马来酰亚胺苯甲酰基 -N- 羟基琥珀酰亚胺)孵育 1 小时。接下来,通过穿过 G25Sephadex (交联葡聚糖凝胶)柱,去除未缀合的磺基 -MBS,并且然后得到马来酰亚胺活化的 KLH。将糖肽构建体 1(刚制备的,在临用前立即穿过 TCEP 凝胶)与刚制备的马来酰亚胺活化的 KLH 在 pH6.5-7.0 的磷酸盐缓冲液中混合,并在室温搅拌 4 小时。在孵育之后,采用截留分子量 30,000 的 Pellicon XL 过滤器(Millipore)脱除未反应的糖肽。最后,得到对应的 KLH 缀合物 2,为磷酸盐缓冲液形式。

[0279] 通过水解糖分析测定,在 KLH 缀合物中包含的糖肽构建体的拷贝数是 505/KLH (Lloyd, K. O. ;Savage, A. Glycoconjugate J. 1991, 8, 439 ;Hardy, M. R. ;Townsend, R. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA1988, 85, 3289) 和标准蛋白分析 (Bio-Rad 染料结合法)。所述缀合产率相对于单分子五价糖肽构建体是 50%,KLH 的回收产率是约 98%。因此,这种修改的程序提供了比以前的程序效率高得多的缀合负荷 (228/1)。虽然不希望受任何具体理论的束缚,但是,使用刚配制的包含高度可氧化的巯基的糖肽构建体 1,用于实现这么高的表位比是可能的。敏感性巯基的已知可能的氧化之一通过二硫化物的形成而导致其假定二聚体形式。因此,在临用前将这种构建体通过 TCEP 凝胶,以减少二聚体,并且回收糖肽构建体 1 是有用的。对于大概通过马来酰亚胺的迈克尔加成进行后续生物缀合反应来说,保存巯基完整是非常重要的。现在有了五价缀合物 2,可以按照实施例 2 中所述开展临床前小鼠环境下的免疫学研究。

#### [0280] 实施例 2

[0281] 该实施例描述了实施例中所述缀合物的生物学研究 (Zhu, J. 等, J. Am. Chem. Soc. 131, 9298-9303, 2009)。

#### [0282] 动物免疫

[0283] 在 0 周、1 周、2 周和 5 周时在一个部位用 200  $\mu$  L PBS 中含 10  $\mu$  g 单分子五价构建体 (UPC) 和 20  $\mu$  g QS-21 佐剂的疫苗 (2) 皮下免疫五只小鼠的组 (雌性 ;C57BL/6J)。在首次疫苗接种前一周采集“治疗前”血清。在第三次疫苗接种后一周采集“接种后”血清。在第四次疫苗接种后一周采取“加强血清”。

#### [0284] 血清 ELISA 分析

[0285] 如前文所述 (Ragupathi, G. ;Cappello, S. ;Yi, S. S. ;Canter, D. ;Spasova, M. ;Bornmann, W. G. ;Danishefsky, S. J. ;Livingston, P. O. Vaccine2002, 20, 1030. (b) Ragupathi, G. ;Koide, F. ;Sathyan, N. ;Kagan, E. ;Spasova, M. ;Bornmann, W. ;Gregor, P. ;Reis, C. A. ;Clausen, H. ;Danishefsky, S. J. ;Livingston, P. O. Cancer Immunol. Immunother. 2003, 52, 608),进行酶联免疫吸附测定 (ELISA) 以测定与每个单独的糖类抗原 (Globo-H、GM2、sTn、TF 和 Tn) 有关的达到的 IgM 和 IgG 血清抗体效价。特别是,将 Globo-H 神经酰胺、GM2 神经酰胺、Gb5 神经酰胺、Gb5- 脂质 (参见实施例 4 和实施例 5)、羊科动物颌下粘蛋白 (OSM, 表达 sTn)、去唾液酸猪科动物颌下粘蛋白 (dPSM 表达 TF) 及去唾液酸羊科动物颌下粘蛋白 (dOSM, 表达 Tn) 以抗原剂量为 0.1  $\mu$  g/ 孔涂覆在 ELISA 板上,并在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 3% 人血清白蛋白 (HAS) 阻断非特异性位点 2 小时,并且向每个孔中顺序加入稀释的抗血清。在孵育 1 小时后,洗涤板,以 1:200 稀释度加入碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgM 或 IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL)。抗体效价定义为吸光度超过正常对照小鼠血清的吸光度 0.1 或更多时的最高稀释度。

[0286] 如表 1 和图 1 所示,五只小鼠中任一鼠的接种疫苗前的血清均未显示出对疫苗中的五种抗原反应性。采用化合物 2 疫苗 +QS-21 佐剂免疫的小鼠的免疫后血清产生了与五种糖类抗原 (Globo-H 神经酰胺、GM2 神经酰胺、STn (OSM)、TF (dPSM) 和 Tn (dOSM)) 中的每种抗原对应的可观的效价。与并未成功地诱导对抗其中一种抗原 (Lewis<sup>x</sup>) 的抗体的以前的第一代单分子五价构建体 KLH 缀合物不同的是,这种第二代构建体—缀合物 2 确实产生了对抗全部五种抗原 (包括在此构建体中代替 Lewis<sup>x</sup> 的 GM2 抗原) 优

良的 IgG 和 IgM 抗体效价。由于 GM2 是前列腺癌和乳腺癌细胞系上过表达的重要表位 (Livingston, P. O. ;Natoli, E. J. ;Calves, M. J. ;Stockert, E. ;Oettgen, H. F. ;Old, L. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA1987, 84, 2911 ;Livingston P. O. ;Wong, G. Y. ;Adluri, S. ;Tao, Y. ;Padavan, M. ;Parente, R. ;Hanlon, C. ;Calves, M. J. ;Helling, F. ;Ritter, G. J. Clin. Oncol. 1994, 12, 1036), 本申请人试图将 GM2 并入构建体中, 以极大地增强缀合物 2 的免疫原性。所有数据表明, 单独糖类抗原的免疫特性均保存在这些高度复杂的疫苗构建体中。

[0287] 表 1 :酶联免疫吸附测定(ELISA)<sup>a</sup> 得到的抗体效价

小鼠#	Globo-H 神经酰胺		GM2 神经酰胺		sTn 的 OSM		TF 的 dPSM		Tn 的 dOSM	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
疫苗接种前的血清	0	0	0	0	0	0	0	160	0	0
1	160	160	160	0	400	320	400	400	800	0
2	640	160	640	0	1600	40	400	400	1600	0
3	640	160	640	0	800	320	200	100	6400	200
4	640	640	2560	0	1600	2560	1600	800	3200	400
5	640	160	640	0	1600	20	1600	800	1600	400
中值	640	160	640	0	1600	320	800	400	1600	200

[0289] a 对于五价疫苗中五种抗原测试的疫苗接种前血清和疫苗接种后血清的 IgM 或 IgG 抗体效价倒数。按照以前文献所述 (Ragupathi2002&2003, 同上), 进行 ELISA 测定以测定 IgM 和 IgG 血清抗体效价。简单地说, Globo-H 神经酰胺、GM2 神经酰胺、绵羊科动物颌下粘蛋白 (OSM, 表达 sTn)、去唾液酸羊科动物颌下粘蛋白 (表达 Tn 的 dOSM) 或去唾液酸猪科动物颌下粘蛋白 (表达 TF 的 dPSM) 以抗原剂量为 0.1 μg / 孔涂覆在 ELISA 板上, 并在 4°C 孵育过夜。用 1% 人血清白蛋白 (HAS) 阻断非特异性位点 2 小时, 并向每个孔中加入系列稀释的抗血清。在孵育 1 小时后, 洗涤板, 并且以 1:400 稀释度加入碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgM 或 IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL)。抗体效价定义为吸光度超过正常对照小鼠血清的吸光度 0.1 或更多时的最高稀释度。

[0290] 流式细胞术

[0291] 如之前所述, 用 MCF-7 乳腺癌细胞, 通过 FACS 测定分析测定由缀合物 2 疫苗诱导的抗体的细胞表面反应性 (Sabbatini, P. J. ;Kudryashov, V. ;Ragupathi, G. ;Danishefsky, S. J. ;Livingston, P. O. ;Bornmann, W. ;Spassova, M. ;Zatorski, A. ;Spriggs, D. ;Aghajanian, C. ;Soignet, S. ;Peyton, M. ;O'Flaherty, C. ;Curtin, J. ;Lloyd, K. O. Int. J. Cancer. 2000, 87, 79)。将 5×10<sup>5</sup> 个细胞 / 管的单细胞悬浮液在含 3% 胎牛血清的磷酸缓冲盐水中洗涤, 并且然后与 20 μL / 200 稀释的抗血清在冰上孵育 30 分钟。

加入总共 20  $\mu$  L 用 FITC 标记的 1/15 山羊抗小鼠 IgG 或 IgM, 并且使用 FACSscan (Becton Dickinson, San Jose, CA) 分析染色细胞的阳性细胞百分比和平均荧光强度 (MFI)。

[0292] 接受疫苗 2 的五只小鼠的疫苗接种后及加强-疫苗接种后的血清流式细胞术结果如表 2 中所述。对这些疫苗接种的血清学反应几乎全部是 IgM。如图所示, 疫苗接种后血清中阳性细胞的百分比中值从 10% 增加到 36%, 并且平均荧光强度 (MFI) 从 85 增加到 302。加强疫苗接种后的血清表明, 阳性细胞百分比进一步增加到 70%, 其中 MFI 增加到 486。这些实验结果表明, 缀合物 2 可能确实是十分有效且临床上有用的疫苗候选物, 特别是与加强注射结合时。

[0293] 表 2: 通过荧光活化细胞分选 (FACS)<sup>a</sup> 进行的抗体结合研究

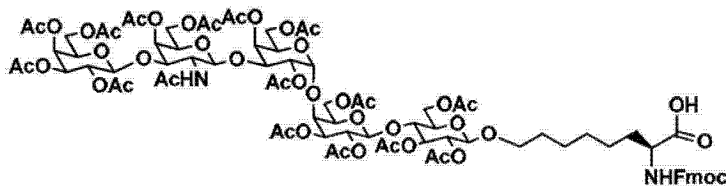
小鼠#	疫苗接种后血清 MCF-7 细胞(乳腺癌)				加强疫苗接种后血清 MCF-7 细胞 (乳腺癌)			
	IgM		IgG		IgM		IgG	
	阳性细胞%	MFI	阳性细胞%	MFI	阳性细胞%	MFI	阳性细胞%	MFI
疫苗接种前的血清	10%	85	10%	64	10%	85	10%	64
1	53%	302	14%	87	70%	561	8%	55
2	33%	203	8%	78	72%	486	1%	33
3	36%	313	16%	245	72%	897	3%	41
4	49%	321	8%	52	51%	424	3%	20
5	34%	195	10%	55	56%	450	10%	68
中值	36%	302	10%	78	70%	486	3%	41

[0295] <sup>a</sup> 所测试的用 5  $\mu$  g 单分子五价 -KLH 疫苗 +QS-21 免疫的五只小鼠针对 MCF-7 乳腺癌细胞系的 IgM 和 IgG FACS 特征。示出了疫苗接种前、疫苗接种后及加强疫苗接种的结果, 阳性细胞 % (MFI)。FACS 分析 (v(a)): 表达所有五种抗原 (但是, 特别是表达 globo H) 的 MCF-7 人乳腺癌细胞。将  $5 \times 10^7$  个细胞 / 管的单细胞悬浮液在含 3% 胎牛血清的磷酸缓冲盐水中洗涤, 然后与 20  $\mu$  L 的 1/200 稀释的抗血清在冰上孵育 30 分钟。加入总共 20  $\mu$  L 用 FITC 标记的 1/15 山羊抗小鼠 IgG 或 IgM, 并且使用 FACSscan (Becton Dickinson, San Jose, CA) 分析染色细胞的阳性细胞百分比和平均荧光强度 (MFI)。一起分析接种疫苗前、接种疫苗后和加强疫苗接种的血清, 并且治疗前阳性细胞百分比达到 10%。当阳性细胞百分比是阴性对照的 3 倍 (>30% 阳性细胞), 并且 MFI 是阴性对照 MFI 的 150% 或更高时, 则结果视为阳性。

[0296] 实施例 3

[0297] Gb5 糖化氨基酸 10 的合成

[0298]



[0299] 乙基硫代磺酰胺 12 的合成

[0300] 在  $-8^{\circ}\text{C}$  下向干燥乙醚(80mL)中的烯糖 11 (2.0g, 2.63mmol)、苯磺酰胺 (2.48g, 15.8mmol)及刚活化的粉末  $4 \text{ \AA}$  MS (2g) 的搅拌混合物中加入  $\text{I}(\text{sym-co11})_2\text{ClO}_4$  (4.92g, 10.5mmol)。将所得混合物在暗处于  $-8^{\circ}\text{C}$  搅拌过夜,并用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液 (100mL) 淬灭。过滤并用乙醚萃取 ( $3 \times 60\text{mL}$ ) 后,用饱和  $\text{CuSO}_4$  溶液 (100mL) 和盐水 (50mL) 洗涤合并的有机层,经  $\text{MgSO}_4$  干燥,并真空浓缩。粗产物不需进一步纯化即可进行下一步反应。在  $-40^{\circ}\text{C}$  下向乙硫醇 (1.94mL, 26.2mmol) 的无水 DMF 溶液 (10mL) 中加入 LHMDS (13.3mL, 1.0M 的 THF 溶液)。搅拌 5 分钟后,  $-40^{\circ}\text{C}$  下通过套管将反应混合物转移到盛放溶于 DMF (40mL) 中的碘代磺酰胺(粗)的烧瓶中。将反应混合物缓慢加热到  $0^{\circ}\text{C}$ , 并搅拌共 3 小时。用乙醚 (300mL) 稀释后,用  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液 (50mL) 和盐水洗涤有机层,然后经  $\text{MgSO}_4$  干燥,并在减压条件下浓缩。使用 10:1-7:1 己烷 /EtOAc 的快速柱色谱法,得到呈白色泡沫的 12 (900mg, 35%) 和回收初始材料 (420mg)。 $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.92 (dd, 2H,  $J=7.2\text{Hz}$ ,  $J=1.3\text{Hz}$ ), 7.58-7.55 (m, 1H), 7.51-7.47 (m, 2H), 5.39 (bs, 1H), 5.09 (d, 1H,  $J=9.0\text{Hz}$ ), 4.67 (bd, 1H,  $J=8.9\text{Hz}$ ), 4.49 (d, 1H,  $J=3.0\text{Hz}$ ), 4.48 (d, 1H,  $J=1.5\text{Hz}$ ), 4.31 (d, 1H,  $J=10.1\text{Hz}$ ), 4.25 (dd, 1H,  $J=9.0\text{Hz}$ ,  $J=5.4\text{Hz}$ ), 4.09 (s, 1H), 3.92 (dd, 1H,  $J=9.1\text{Hz}$ ,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 4.09 (t, 1H,  $J=2.6\text{Hz}$ ), 3.92 (dd, 1H,  $J=9.6\text{Hz}$ ,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 3.85 (dd, 1H,  $J=9.1\text{Hz}$ ,  $J=5.3\text{Hz}$ ), 3.81-3.74 (m, 3H), 3.53 (dt, 1H,  $J=10.0\text{Hz}$ ,  $J=6.6\text{Hz}$ ), 3.47 (t, 1H,  $J=6.3\text{Hz}$ ), 2.90 (bd, 1H,  $J=2.1\text{Hz}$ ), 2.40 (dq, 1H,  $J=12.4\text{Hz}$ ,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 2.20 (dq, 1H,  $J=12.4\text{Hz}$ ,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 1.12-1.05 (m, 42H), 0.90 (s, 9H), 0.24 (s, 3H), 0.19 (s, 3H);  $\text{C}_{45}\text{H}_{83}\text{NO}_{12}\text{S}_2\text{Si}_3$  的 LRMS  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  实测值:1000.7;计算值:1000.5;  $[\text{M}-\text{H}]^+$  实测值:976.7;计算值:976.5。

[0301] Gb5 戊多糖 15 的合成

[0302] 将硫糖苷 12 (373mg, 0.38mmol) 和受体 13 (502mg, 0.363mmol) 的混合物与无水苯共沸三次,并在高真空条件下放置 1 小时。向混合物中加入刚活化的  $4 \text{ \AA}$  MS (1.0g), 并且在干燥  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.3mL) 和干燥乙醚 (6.6mL) 中进行,在室温搅拌 5 分钟,并冷却到  $0^{\circ}\text{C}$ 。将混合物在  $0^{\circ}\text{C}$  搅拌 5 分钟,并逐滴加入 MeOTf (100  $\mu\text{L}$ )。在  $0^{\circ}\text{C}$  搅拌反应 2 小时后,在  $0^{\circ}\text{C}$  下逐滴加入另一部分 MeOTf (116  $\mu\text{L}$ )。将反应混合物缓慢加热到室温,保持两天。加入固体  $\text{NaHCO}_3$  (0.5g), 并通过硅藻土衬垫过滤反应混合物,并浓缩。使用 9:1-6:1-4:1 己烷 /EtOAc 通过快速柱色谱法纯化,得到呈白色泡沫的混合物 13 和 14。将混合物 13 和 14 溶解于 MeOH (5mL) 中,并且加入 NaOMe (0.1mL, 25% 的 MeOH 溶液), 以达到  $\text{pH}=10$ , 并在室温搅拌混合物过夜。浓缩并通过使用 6:1-4:1-2:1 己烷 /EtOAc 的快速柱色谱法纯化,得到 15 (486mg, 55%)。 $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.79 (d, 2H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 7.34-7.03 (m, 46H), 6.98 (d, 2H,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 5.83-5.75 (m, 1H), 5.09 (d, 1H,  $J=3.2\text{Hz}$ ), 5.05-4.93 (m, 3H), 4.88-4.84 (m, 2H), 4.79-4.73 (m, 3H), 4.62-4.55 (m, 2H), 4.53-4.42 (m, 5H), 4.38-4.36 (m, 1H), 4.32-4.28 (m, 3H), 4.18-4.04 (m, 9H), 3.95 (d, 1H,  $J=2.1\text{Hz}$ ), 3.92-3.77 (m, 8H), 3.71-3.66 (m, 4H), 3.62

-3.49 (m, 7H), 3.46-3.41 (m, 2H), 3.31-3.21 (m, 5H), 2.72 (t, 1H, J=5.7Hz), 2.67 (dd, 1H, J=10.4Hz, J=3.2Hz), 2.59 (bs, 1H), 2.42 (d, 1H, J=3.1Hz), 2.14-2.07 (m, 2H), 1.73-1.64 (m, 2H), 1.08-1.04 (m, 36H), 0.90 (s, 3H), 0.15 (s, 3H), 0.11 (s, 3H)。C<sub>128</sub>H<sub>173</sub>NO<sub>27</sub>SSi<sub>3</sub> 的 LRMS[M+Na]<sup>+</sup> 实测值:2295.0;计算值:2295.1。

#### [0303] Gb5 戊多糖 16 的合成

[0304] 在室温下向 15(500mg, 0.22mmol) 在干燥 THF(20mL) 中的溶液加入 TBAF(2.2mL, 1.0M 的 THF 溶液)。在室温搅拌混合物过夜。浓缩并通过使用 1%-2%-4%MeOH/DCM 的快速柱色谱法纯化, 得到 6(352mg, 86.7%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82(d, 2H, J=7.6Hz), 7.33-7.05(m, 46H), 6.92(d, 2H, J=7.2Hz), 5.82-5.77(m, 1H), 5.07(d, 1H, J=3.0Hz), 5.02-4.73(m, 8H), 4.64-4.61(d, 1H, J=10.8Hz), 4.57-4.53(m, 2H), 4.51-4.48(m, 2H), 4.46-4.44(m, 2H), 4.40-4.37(m, 1H), 4.34-4.31(m, 2H), 4.23(d, 1H, J=8.4Hz), 4.20-4.13(m, 4H), 4.08-4.04(m, 4H), 3.95-3.73(m, 11H), 3.69-3.64(m, 6H), 3.62-3.48(m, 9H), 3.43-3.40(m, 2H), 3.34-3.30(m, 2H), 3.25-3.18(m, 4H), 3.02(bs, 1H), 2.86(bs, 2H), 2.74(dd, 1H, J=10.2Hz, J=2.7Hz), 2.66(bs, 1H), 2.62(t, 1H, J=5.6Hz), 2.14-2.12(m, 2H), 1.76-1.61(m, 18H), 1.40-1.35(m, 2H)。C<sub>104</sub>H<sub>119</sub>NO<sub>27</sub>SSi<sub>3</sub> 的 LRMS[M+Na]<sup>+</sup> 实测值:1869.1;计算值:1868.1。

#### [0305] Gb5 戊多糖 17 的合成

[0306] 在 -78 °C 向液态 NH<sub>3</sub>(30mL) 中加入 Na(350mg, 15.2mmol), 在氩气条件下搅拌混合物 2 分钟以形成蓝色溶液, 并且向此蓝色溶液中加入 THF(2mL) 中的化合物 16(400mg, 0.217mmol)。将此混合物在 -78 °C 搅拌 1 小时, 并且用固体 NH<sub>4</sub>Cl(1.0g) 淬灭。通过 Ar 流除去氨。向此固体中加入吡啶(15mL)、醋酸酐(10mL) 和结晶 DMAP。在室温搅拌此混合物两天。浓缩并通过使用 1%-4%-10%MeOH/DCM 的快速柱色谱法纯化, 得到 17(300mg, 88%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.82-5.76(m, 1H), 5.68(d, 1H, J=5.7Hz), 5.59(d, 1H, J=2.8Hz), 5.42(d, 1H, J=3.0Hz), 5.34(d, 1H, J=3.1Hz), 5.21-5.09(m, 1H), 5.03(d, 1H, J=1.0Hz), 4.99-4.95(m, 2H), 4.92(d, 1H, J=3.6Hz), 4.89(t, 1H, J=8.1Hz), 4.75(dd, 1H, J=10.9Hz, J=2.5Hz), 4.67(dd, 1H, J=10.9Hz, J=3.4Hz), 4.61(d, 1H, J=7.8Hz), 4.53(d, 1H, J=7.7Hz), 4.46(d, 1H, J=8.0Hz), 4.44(dd, 1H, J=10.8Hz, J=1.5Hz), 4.41(dd, 1H, J=10.9Hz, J=6.2Hz), 4.36(t, 1H, J=6.3Hz), 4.22-4.18(m, 2H), 4.17-4.03(m, 7H), 4.00(d, 1H, J=1.0Hz), 3.93(t, 1H, J=6.1Hz), 3.89-3.82(m, 2H), 3.80-3.75(m, 2H), 3.62-3.59(m, 2H), 3.51-3.44(m, 1H), 3.27(m, 3.23(m, 1H), 2.14, 2.12, 2.11, 2.10, 2.10, 2.087, 2.086, 2.08, 2.07, 2.06, 2.056, 2.056, 2.056, -2.04, 1.97, 1.93(16s, 48H), 1.70-1.62(m, 2H)。<sup>13</sup>C NMR(125MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.89, 170.45, 170.45, 170.34, 170.30, 170.24, 170.21, 170.11, 170.01, 169.79, 169.66, 169.31, 169.31, 169.28, 168.94, 168.69, 137.59, 114.91, 100.67, 100.42, 100.35, 99.27, 98.93, 76.55, 76.31, 74.24, 72.60, 72.53, 72.36, 72.26, 71.80, 71.47, 71.09, 70.72, 70.47, 70.35, 69.88, 69.51, 69.12, 69.01, 68.90, 68.43, 67.50, 66.77, 62.11, 61.48, 61.24, 61.00, 60.13, 54.96, 53.56, 29.60, 28.36, 23.30, 20.78, 20.71, 20.68, 20.59, 20.57, 20.55, 20.51, 20.51, 20.51, 20.47, 20.44, 20.44, 20.38, 20.30, 20.25, 13.98, 13.87。C<sub>67</sub>H<sub>93</sub>NO<sub>41</sub> 的 LRMS[M+Na]<sup>+</sup> 实测值:1590.6;计算值:1590.5。

#### [0307] Gb5 糖化氨基酸 10 的合成

[0308] 向 17(200mg, 0.128mmol) 和烯丙基甘氨酸(450mg, 1.05mmol) 在 DCM(4mL) 中的

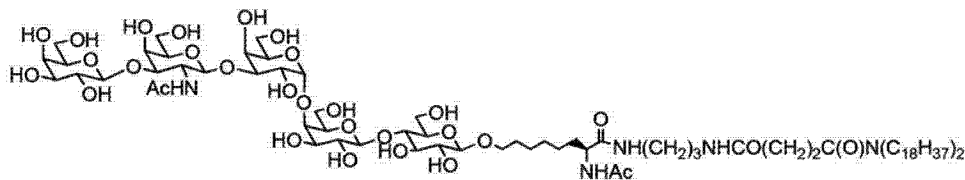
溶液加入 Hoveyda Grubbs I 催化剂 (36mg, 0.06mmol)。在 35°C 搅拌此混合物两天。浓缩并通过使用 10:1-3:1-1:3 己烷 /EtOAc、然后使用 10%MeOH/DCM 的快速柱色谱法纯化,得到产物和初始材料 7 的混合物(190mg)。将粗产物溶于 MeOH/水 (10:1, 10mL) 中,并加入 Pt (C) 56mg, 与压力 1atm 的 H<sub>2</sub> 气缸连接,并将所得混合物在室温搅拌过夜。将反应混合物通过硅藻土过滤,将滤液蒸发,并将残留物加载到快速色谱柱上,用含 0.3%HOAc 的 7%MeOH/DCM 洗脱。收集产品 10。将产品重新加载到 PTLC 上,并用 AcOH-MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.3:7:100) 洗脱。收集 Gb5 糖化氨基酸 10 (120mg, 产率 51%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, MeOD) δ 7.81 (d, 2H, J=7.6Hz), 7.68 (t, 2H, J=7.1Hz), 7.40 (t, 2H, J=7.4Hz), 7.31 (t, 2H, J=7.4Hz), 5.65 (d, 1H, J=2.8Hz), 5.34 (d, 1H, J=3.2Hz), 5.32 (d, 1H, J=2.8Hz) 5.19-5.15 (m, 2H), 5.10-4.93 (m, 5H), 4.81 (t, 1H, J=8.3Hz), 4.70-4.67 (m, 2H), 4.57 (d, 1H, J=8.0Hz), 4.48-4.36 (m, 5H), 4.25-3.94 (m, 17H), 3.83-3.75 (m, 3H), 3.70-3.67 (m, 1H), 3.52-3.47 (m, 1H), 2.15, 2.12, 2.11, 2.107, 2.10, 2.09, 2.08, 2.07, 2.034, 2.024, 2.033, 2.033, 2.02, 1.99, 1.94, 1.92, 1.84-1.80 (m, 1H), 1.68-1.66 (m, 1H), 1.57-1.54 (m, 2H), <sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.98, 170.66, 170.60, 170.57, 170.46, 170.42, 170.36, 170.24, 170.14, 170.06, 170.00, 169.63, 169.56, 169.41, 169.30, 168.90, 256.67, 101.06, 100.49, 100.17, 99.35, 98.74, 79.41, 76.06, 74.39, 72.89, 72.65, 72.43, 70.05, 71.89, 71.78, 71.20, 70.96, 70.75, 70.14, 70.03, 69.97, 69.20, 68.94, 67.97, 67.68, 66.74, 62.20, 62.12, 61.15, 61.10, 60.89, 36.94, 35.80, 32.57, 30.00, 29.22, 28.89, 28.38, 25.57, 25.33, 23.59, 23.22, 20.96, 20.93, 20.93, 20.88, 20.80, 20.80, 20.80, 20.77, 20.77, 20.77, 20.77, 20.69, 20.68, 20.65, 20.54, 20.50。C<sub>85</sub>H<sub>110</sub>N<sub>2</sub>O<sub>45</sub> 的 LRMS [M+Na]<sup>+</sup> 实测值:1901.7;计算值:1901.6。

#### [0309] 实施例 4

[0310] 用于 ELISA 测定的 Gb5 缀合物的合成

[0311] Gb5-脂质 4-4 的合成

[0312]



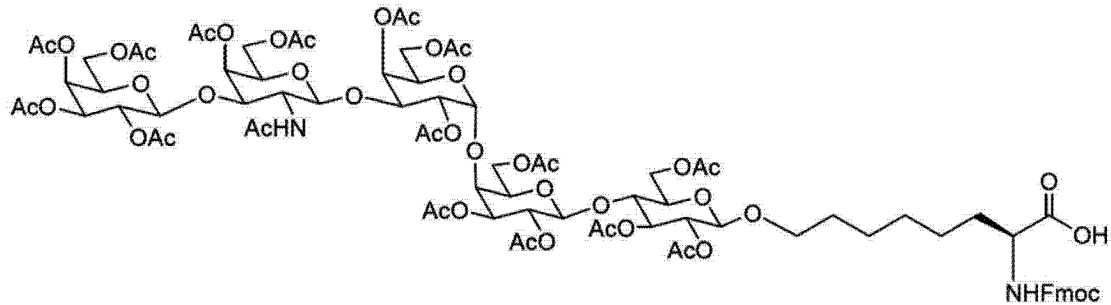
[0313] 4-4

[0314] 如图 3 所示,将 4-1 (13mg, 7.0 μmol) 的 DCM/TFA (1/3, 0.6mL) 溶液在室温下搅拌 30 分钟。去除溶剂,并且残留物不经纯化即可直接用于下一步骤。将残留物溶于 DCM (1.0mL) 中,并向此混合物中加入化合物 4-2 (30mg, 41.7 μmol) (Schmitt, L.; Dietrich, C.; Tampe, R. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 8485-8491) 和 DIPEA (50 μL)。在室温搅拌反应过夜。浓缩并通过使用 1%-5%MeOH/DCM 的快速柱色谱法纯化,得到 4-3 (14mg, 85%)。

[0315] 向 4-3 (12mg, 5.1 μmol) 在 MeOH (1.0mL) 中的溶液加入 NaOMe (25%NaOMe/MeOH, 12 μL), 并将混合物在室温搅拌 2 小时。采用 1N HCl 淬灭反应至最终 pH 为 6.5-7.0。去除溶剂,并将残留物溶于 H<sub>2</sub>O (1.0mL) 中。在冻干后,得到产物 4-4 (8mg, 91%)。MS (m/z): 865.2 [M+2H]<sup>+</sup>, 1730.2 [M+H]<sup>+</sup>

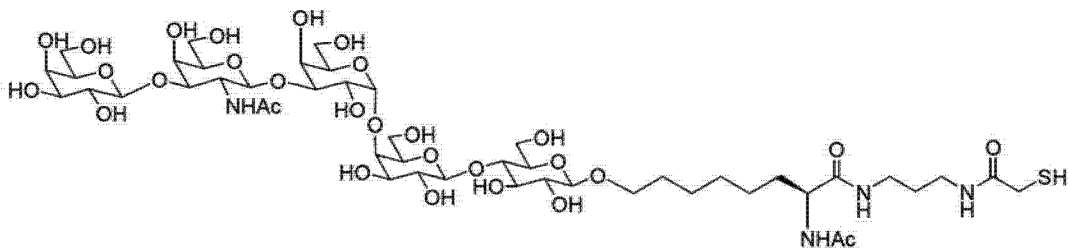
[0316] Gb5-KLH 的合成

[0317]



[0318] 4-5

[0319]



[0320] 4-6

[0321] 程序：用巯基乙酸 (50uL+950uL 二氯甲烷) 处理 20mg 氯代三苯甲基树脂 (0.02mmol) 1 小时，然后用 DMF 洗涤 3 次。然后，用 PyBOP (21mg, 0.04mmol) 和 DIEA (16mg, 21uL, 0.12mmol) 在 DMF 中活化树脂 10 分钟，然后加入 1,3-二氨基丙烷 (15mg, 0.2mmol)。20 分钟后，用 DMF 洗涤树脂 3 次。将 10mg 4-5 (0.0054mmol) 溶于 200uL DMF 中，并加入到树脂中。加入 150uL DMF 中的 PyBOP (8mg, 0.015mmol) 和 DIEA (7.42mg, 10uL, 0.057mmol)，并混合 2 小时。用 DMF 洗涤树脂 3 次。用 DMF 中的 30% 哌啶洗涤 2 次，洗涤 10 分钟，然后用 DMF 洗涤 (3 次)。用 20uL 500uL DMF 中的醋酸酐处理树脂 30 分钟，然后用 DMF 洗涤 (3 次)。用二氯甲烷洗涤几次。然后，通过用 DCM 中的 50% TFA 处理 10 分钟将受保护的糖类从树脂裂解，并蒸发。将油状物再悬浮在 50% 的乙腈水溶液中，冷冻和冻干过夜，得到白色粉末。用 0.3N NaOH 溶液处理该粉末 2 小时，用 HCl 中和，并通过反相 HPLC (C18) 进行纯化。得到呈白色粉末的化合物 4-6。4-6 的 MS (m/z) = 1199.1 (M+H<sup>+</sup>)。

[0322] 为了制备实施例 5 中所述的 Gb5-KLH 缀合物，使用实施例 1 中所述的程序将化合物 4-6 缀合至 KLH。(参见段落 [0192])

### [0323] 实施例 5

[0324] 本实施例描述了用实施例 4 中制备的 Gb5-KLH 缀合物免疫的小鼠进行的免疫原性研究。除非下文另外指出，否则遵循实施例 2 中描述的方案。

[0325] 虽然并不希望受任何具体理论的束缚，但是，似乎加强疫苗接种血清的 IgG 值比表 3 所示的要高。在初期数据收集期间，本实验中 IgG 的浓度比预期的高得多，并且进一步的系列稀释可能导致确定的比表 3 中所示结果更高的 IgG 效价。

[0326] 表 3：通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) a 得到的抗体效价

[0327] Gb5-KLH (5ug) + OPT-821 佐剂 (QS-21 类似物) (20ug)

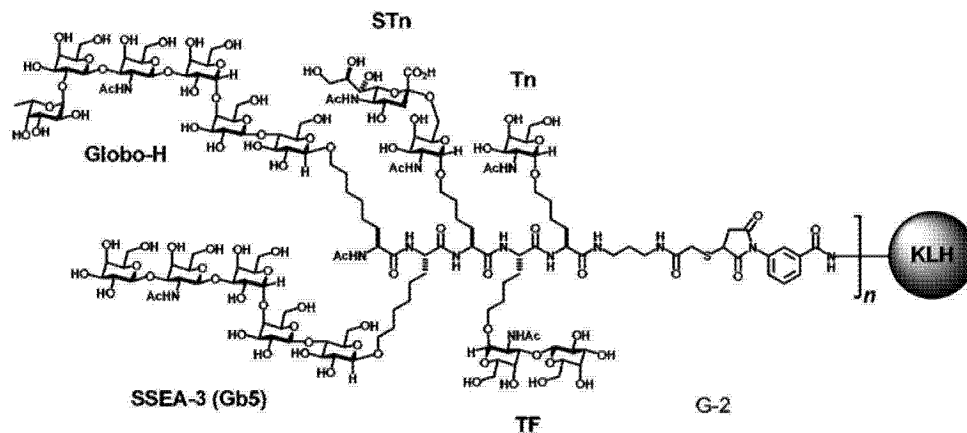
小鼠#	Gb5-脂质			
	接种疫苗后		加强疫苗接种	
	IgM	IgG	IgM	IgG
接种疫苗前血清	0	0	0	0
[0328] 1	0	640	0	2560
2	0	1280	20	>2560
3	0	320	20	>2560
4	0	640	0	>2560
5	0	640	80	>2560
中值	0	640	20	>2560

[0329] a 对于单价 Gb5-KLH 疫苗中抗原测试的接种疫苗前血清和接种疫苗后血清的 IgM 或 IgG 抗体效价倒数。如先前所述进行 ELISA 测定以测定 IgM 或 IgG 血清抗体效价 (Ragupathi 2002&2003, 同上)。简单地说, 将 Gb5-脂质以  $0.1 \mu\text{g}/\text{孔}$  的抗原剂量涂覆在 ELISA 板上, 并在  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。用 1% 人血清白蛋白 (HAS) 阻断非特异性部位 2 小时, 并向每个孔中加入系列稀释的抗血清。在孵育 1 小时后, 洗涤板, 并以 1:400 稀释度加入碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgM 或 IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL)。抗体效价定义为吸光度超过正常对照小鼠血清的吸光度 0.1 或更高时的最高稀释度。

#### [0330] 实施例 6

[0331] 包含 Globo-H、Gb5、STn、TF 和 Tn 的单分子五价疫苗构建体的合成:(参见图 4)。

[0332]



[0333] 本实施例描述缀合物 G-2 的制备。用于合成和缀合此构建体的程序与实施例 1 中所述缀合物的合成程序基本相同 (Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 11937-11942; Ragupathi, G.; Koide, F.; Livingston, P. O.; Cho, Y. S.; Endo, A.; Wan, Q.; Spassova, M. K.; Keding, S. J.; Allen, J.; Ouerfelli, O.; Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2715-2725), 只是在 AcHN-GloboH-Gb5-STn-TF-Tn-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Ac (G-0) 的合成中将 Gb5 糖基氨基酸取代为 GM2 糖化基氨基酸。包含 Globo-H、Gb5、STn、TF 和 Tn 的完全去保护的单分子五价构建体的方案参见图 4。

[0334] AcHN-GloboH-Gb5-STn-TF-Tn-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SH (G-1) 的合成

[0335] 向盛放全乙酰化的 AcHN-GloboH-Gb5-STn-TF-Tn-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Ac (G-0) (11.8mg, 2.02  $\mu\text{mol}$ ) 的圆底烧瓶中加入 1.2mL 脱气的 2:1MeOH/0.3M NaOH 水溶液。在

Ar 气氛下,在室温将所得到的清澈、无色的溶液搅拌 24 小时,然后再加入 1.2mL 脱气的 0.3M NaOH 水溶液。再搅拌 40 分钟后,通过逐滴加入乙酸(27  $\mu$  L, 0.472mmol)中和反应混合物,并且然后通过旋转蒸发浓缩。在室温用 TCEP(50  $\mu$  L, 0.025mmol)处理所得溶液 2 小时,然后用水作为洗脱剂在 Bio-Gel P-4 柱(1.5x17cm)上进行纯化。将含有所需产物的级分合并并冻干,得到呈白色粉末的 G-1,产率为 92%(7.1mg, 1.87  $\mu$  mol)。MS(ESI+)m/z1290.93[M+3Na]<sup>3+</sup>。

[0336] 包含 Globo-H、Gb5、STn、TF 和 Tn(G-2)的单分子五价疫苗构建体的缀合

[0337] 将载体蛋白 KLH 首先与磺基 -MBS (间 - 马来酰亚胺苯甲酰基 -N- 羟基琥珀酰亚胺)在含 0.9M 氯化钠的 pH7.4 磷酸盐缓冲液中孵育 1 小时 45 分钟。接下来,通过穿过 G25Sephadex (PD MiniTrap G-25 ;GE Healthcare)柱,消除未缀合的磺基 -MBS,并且然后得到马来酰亚胺活化的 KLH。糖肽构建体 G-1 (新鲜制备的,在临用前通过 TCEP 凝胶)与刚制备的马来酰亚胺活化的 KLH 在含 0.9M 氯化钠和 100mM EDTA 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液中混合,并在室温搅拌 4 小时。在孵育后,使用 Amicon Ultra-4 离心过滤装置(50,000 截留分子量 ;Millipore)去除未反应的糖肽。最后,得到对应的 KLH 缀合物 G-2,为磷酸盐缓冲溶液形式。

[0338] 通过水解糖分析和标准蛋白质分析(Bio-Rad 染料结合法),测定掺入 KLH 缀合物中的糖肽构建体的拷贝数是 593/KLH。

[0339] 实施例 7

[0340] 除其他方面外,本实施例描述了用实施例 1 和实施例 2 中描述的五价构建体免疫后测量毒性的研究,及满足免疫原性和安全性标准的预先选择的疫苗剂量水平中最低免疫原性剂量的测定。应该理解的是,本实施例中描述的方法和材料可以延伸到实施例 5 中描述的五价构建体。

[0341] 卵巢癌表达大量的细胞 - 表面抗原,包括糖类表位 GM2、Globo-H、Lewis、唾液酸 Tn(sTn)、Tn、Thompson Friedreich 抗原 (TF) 和粘蛋白 1(Muc1) (Federici MF, Kudryashov V, Saigo PE, 等 Int J Cancer81:193-8, 1999 ;Zhang S, Cordon-Cardo C, Zhang HS, 等 Int J Cancer73:42-9, 1997 ;Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, 等 Clin Cancer Res4:2669-76, 1998 ;Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, 等 Int J Cancer73:50-6, 1997)。已经使用了各种方法来产生对抗此类确定抗原的免疫应答。在使用单价抗原的先前工作中,研究人员通过将抗原与钥孔血蓝蛋白(KLH) (一种免疫原性载体蛋白)缀合,同时使用免疫佐剂皂苷 QS-21 实现了一致的免疫原性(Livingston PO, Zhang S, Lloyd KO. Cancer Immunol Immunother45:1-9, 1997)。单价疫苗接种已经造成了免疫应答 (Livingston PO, Natoli EJ, CalvesMJ, 等 Proc Natl Acad Sci U S A84:2911-5, 1987;Slovin SF, Ragupathi G, Fernandez C, 等 Vaccine23:3114-22, 2005 ; Slovin SF, Ragupathi G, Adluri S, 等 Proc Natl Acad Sci USA96:5710-5715, 1999 ; Sabbatini PJ, Kudryashov V, Ragupathi F, 等 Int J Cancer87:79-85, 2000)。但是,肿瘤细胞表面抗原显示出显著的异质性,并且采用多价方法来产生更广泛的免疫应答是颇有吸引力的。

[0342] 申请人最近表征了单独构建的多价抗原 -KLH+QS21 疫苗构建体在上皮卵巢癌、输卵管癌或腹膜癌在第 2 临床缓解期 + 临床完全缓解期中的患者的安全性和免疫原性

(Sabbatini PJ, Ragupathi G, Hood C, 等 Clin Ca Res13(14):4170-7, 2007)。在此预试验中的 11 位患者接收通过皮下施用的多价疫苗,所述多价疫苗含单独与 KLH 缀合的 GM2(10 μg)、Globo-H(10 μg)、LeY(10 μg)、Tn(c)(3 μg)、STn(c)(3 μg)、TF(c)(3 μg)、Tn-MUC1(3 μg),并且混合有佐剂 QS21(100 μg)。疫苗在第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 7 周和第 15 周施用。定期采取血液和尿液样品,以监测安全性(CBC、全项检查(comprehensive panel)、淀粉酶、TSH、尿分析)及抗体产生(ELISA、FACS、CDC)。将全部 11 名患者纳入安全分析;第 4 次疫苗接种后至少 2 周,11 名患者仍有 9 名保持研究,并纳入免疫学分析中(2 名患者因病情恶化退出)。疫苗的耐受性非常好。最常见的是自限性轻度疲劳(2 名患者出现的最大级别是 II 级)、发烧、肌痛及局部注射部位反应。未发现临床上相关的血液学异常。也未看到自身免疫的临床或实验室证据。通过 ELISA 得到的血清学反应大部分是针对每种抗原的 IgM,但其中诱导了 IgM 和 IgG 两种反应的 Tn-MUC1 除外。在免疫之前,抗体反应在免疫之前通常是不可检测的。在免疫之后,中值 IgM 效价如下:Tn-MUC11:640(IgG1:80)、Tn1:160、TF1:640、Globo-H1:40 和 STn1:80。只观察到 1 个对抗 Lewis-Y 的反应;只观察到 2 个对抗 GM2 的反应。9 名患者中的 8 名患者出现了对抗至少 3 种抗原的反应。所有患者在第 4-8 周出现抗体效价峰值。FACS 和 CDC 分析表明,9 名患者中有 7 名患者对抗 MCF7 细胞的反应性大幅增加,所有患者都观察到一些增加。申请人得出以下结论:多价 -KLH 缀合物 +QS21 的疫苗安全地诱导了对抗 7 种抗原中 5 种抗原的抗体反应,以及下一步是进行适当有效的效力试验以确定疫苗接种是否存在临床益处。

[0343] 根据可以获得的免疫原性和安全性数据,将进行 III 期随机双盲试验(n=164 名患者),以评估包含各自与 KLH 缀合的抗原 GM2、Globo-H、Tn-Muc1 和 TF 及免疫佐剂的独立构建的多价疫苗与单独采用佐剂。申请人正在生产疫苗,并且将作为本研究的主要中心。管理机构要求验证疫苗混合物的每种单独的组分(在连续 I 期试验期间完成),需要增加量的载体蛋白(每种单独组分的固定量),及每种单价 -KLH 构建体的合成包括产率较低的最后结合步骤。本实施例中提出的单分子构建体极大地简化了生产,并且容易放大。

[0344] 最近合成了含与 KLH 缀合的抗原 Globo-H、sTn、Tn、Lewis<sup>x</sup> 和 TF 及 QS-21 作为佐剂的单分子五价疫苗,并对其在临床前环境中进行研究(参见实施例 2)(Ragupathi G, Koide F, Livingston PO, 等 J Am Chem Soc128:2715-25, 2006)。对小鼠免疫并且除 Lewis 抗原外均观察到免疫反应。(用 Lewis 抗原表明免疫原性的困难以前在单价 I 期研究中也观察到)。实施例 2 中所示的 ELISA 和 FACS 数据表明,抗原的免疫特性得以保存,并支持考虑单分子多抗原合成疫苗的概念。本实施例描述了 I 期试验环境中的人评估。

[0345] 对于 I 期研究,如实施例 1 所述制备了含有与 KLH 缀合并且与 QS-21 混合的抗原 Globo-H、GM2、sTn、TF 和 Tn 的单分子多价疫苗。

[0346] 缀合

[0347] 抗原 -KLH 比率预期是 80:1-1200:1,假设 KLH 分子量是  $8.6 \times 10^6$ 。用每批抗原 -KLH 进行 SDS-Page Gels 和蛋白质印迹分析,以与未来各批进行比较。用小瓶装产品进行无菌性和安全性检测。以比临床试验中使用量大 50 倍的剂量/平方米进行毒性试验。不允许小鼠在孵育中生长和不良反应(包括体重减轻 10% 或以上)。三只或更多只小鼠以 1-2 周间隔接受免疫 3-4 次,进行免疫后血清测试。要求针对至少四种抗原的抗体效价为 1:40 或更大并且 FACS 染色大于抗原阳性细胞的 25%,以证实合适的免疫原性。

[0348] 佐剂

[0349] QS-21 是来自 Antigenics Incorporation 的免疫佐剂。在疫苗装入小瓶中时,将该佐剂与多价抗原缀合物混合。QS-21 的剂量是 100mcg。将最终的五价抗原-KLH+QS-21 佐剂混合、无菌过滤,并装入小瓶。然后,测试产品的无菌性、内毒素、免疫原性和安全性。将疫苗小瓶在 -70 至 -80 摄氏度贮存。

[0350] 此项研究调查采用单分子五价 Globo-H-GM2-sTn-TF-Tn-KLH 缀合物 + 免疫佐剂 QS-21 免疫后的安全性和免疫应答。这是评估毒性和免疫原性的 I 期研究。对约 24 名患有上皮卵巢癌、输卵管癌和腹膜癌的患者进行疫苗接种。

[0351] 在第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 7 周和第 19 周经皮下注射施用所述疫苗,在研究期间共注射 5 次。共计划三种剂量水平:25mcg、50mcg 和 10 或 100mcg;每种剂量水平接种 6 名患者,除非其中有 2 名患者观察到出现剂量限制毒性,并在成功纳入试验的最低免疫原剂量水平下纳入 6 名患者的扩展队列。

[0352] 受试者资格标准

[0353] 受试者纳入标准:

[0354] 1. 历史上记录的 III 期或 IV 期上皮癌(在卵巢中出现)、输卵管癌或腹膜癌以下述高风险属性之一进行诊断:a) 透明细胞或粘液性特征或组织学;b) 欠佳的减积术;或 c) 初次化疗第三周期时 CA-125 未正常化。

[0355] 2. 做过细胞减灭术和采用至少一种铂类化疗方案作为主要治疗一部分的化疗。

[0356] 3. 患者必须是处于第一临床完全缓解期。临床完全缓解定义为血清 CA-125 位于通常正常限值范围之内,体检阴性,腹部和骨盆计算机断层扫描(CT)表明不存在确切的疾病证据。骨盆中通常存在淋巴结和/或软组织异常性 $\leq 1.0\text{cm}$ ,并且将不视为确切的疾病证据。纳入资格仅由解剖成像是确定的(即 MRI 或 CT)。如果其它标准满足,并且解剖成像是阴性的话,则阳性 PET 图像(如果执行的话)并不排除患者。

[0357] 4. 合适的器官机能由下述标准定义:

[0358] a. 骨髓功能:嗜中性粒细胞绝对计数(ANC)大于或等于  $1,000/\text{mm}^3$ ,相当于通用毒性标准(CTCAE v3.0)1 级。血小板大于或等于  $100,000/\text{mm}^3$ 。

[0359] b. 肾功能:血清肌酐小于或等于  $1.5\times$  通用上限正常值(ULN),CTCAEv3.01 级。

[0360] c. 肝功能:胆红素、SGOT 和碱性磷酸酶小于或等于  $2.5\times$ ULN。

[0361] 5. 大便愈创木检查呈阴性。

[0362] 6. KPS $>80\%$ 。

[0363] 7. 年龄 $>18$ 岁。

[0364] 8. 患者必须已经从之前化疗的临床上明显的副作用中复原。

[0365] 受试者排除标准:

[0366] 1. 孕妇或哺乳妇女

[0367] 2. 曾经(或现在)过去 5 年患有其它侵入性恶性肿瘤证据的患者,或以前的癌症治疗与此次方案治疗矛盾的人员均排除在外。非黑素瘤皮肤癌是例外,并且不会排除任何患者。

[0368] 3. 有海鲜过敏史的患者。

[0369] 4. 以前接受过含有本试验中的任何抗原的疫苗的患者。

[0370] 5. 有免疫缺陷史或自身免疫性疾病史(不包括治疗甲状腺功能减退)的患者。

[0371] 6. 患有活性 CNS 肿瘤的患者。

[0372] 治疗前评估

[0373] 两周内 :对可能怀孕的女性进行妊娠试验。

[0374] 三周内 :完成病史检查和体检 ;全血细胞计数及分类、全项检查 (AST、ALT、钠、钾、氯、CO<sub>2</sub>、钙、葡萄糖、总蛋白、白蛋白、碱性磷酸酶、肌氨酸酐、BUN、胆红素);CA-125 ;促甲状腺激素 (TSH) 水平 ;尿分析 ;大便潜血。

[0375] 四周内 :腹部和骨盆 CT 扫描(可以进行或不进行胸部 CT 扫描)或 MRI ;CXR (如果进行了胸部 CT 扫描,则不需要);标准病理回顾。

[0376] 治疗 / 介入计划

[0377] 在第 1 周、2 周、3 周、7 周和 19 周接种所述单分子五价疫苗。疫苗在门诊部经由皮下注射接种。在上臂或大腿随机位置接种。共采用三种剂量水平 :25mcg、50mcg, 及根据首次两种剂量水平的免疫原性和安全性,采用 10mcg 或 100mcg。每种剂量水平给 6 名患者注射,除非观察到剂量限制毒性。并在成功纳入试验的最低免疫原剂量水平下纳入 6 名患者的扩展队列。该试验累计约有 24 名患者参与。

[0378] 组 治疗剂量

[0379] I (# 患者 =1-6) 25mcg

[0380] II (# 患者 =1-6) 50mcg

[0381] III (# 患者 =1-6) 10mcg 或 100mcg

[0382] 在成功纳入试验的最低免疫剂量水平将扩展到 12 名患者。

[0383] 当在给定组的 6 名患者中,不超过 1 名患者接受了 5 次计划疫苗接种中的 4 次接种,并且未出现任何 DLT 的证据,则扩展到下一队列或扩展队列。

[0384] 若出现剂量限制毒性 (DLT),则应中断研究治疗。如果因毒性问题而中断研究治疗,应对患者进行随访。DLT 由以下标准定义 :

[0385] a. III 级过敏反应。(II 级过敏反应定义为皮疹、发红、荨麻疹、呼吸困难或药物热 >38 摄氏度 ;III 级过敏反应定义为有症状的支气管痉挛、需要胃肠道药物,出现或不出现荨麻疹、过敏相关浮肿或血管性水肿 ;IV 级定义为过敏性反应。)

[0386] b. III 级自身免疫应答(II 级定义为涉及要求除免疫抑制药物之外的治疗的非必需的器官或功能(如甲状腺功能减退)的自身免疫应答的证据。III 级是涉及主要器官的可逆自身免疫应答(如结肠炎)。

[0387] c.  $\geq$  III 级血液学或非血液学毒性,包括发烧。(III 级发烧 >40°C,持续 <24 小时)。

[0388] d. III 级注射部位反应。(III 级定义为严重的或长期的,或要求手术的溃疡或坏死)。

[0389] 治疗 / 介入期间的评估

周	介入前	1	2	3	7	11	15	19	23	Q3 mos.
	注射	1	2	3	4			5		
[0390]	病史和体检	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	CMP	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	CBC及分类	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	CA-125	X			X		X		X	X
	TSH	X							X	
	尿分析	X							X	
	病理回顾	X								
	妊娠试验	X								
[0391]	大便潜血检测 试纸	X								
	CT扫描	X				X			X	X
	血清学 (3 Red Tops)		X	X		X	X	X	X	X
	血清学 (6Red Tops)	X			X					

[0392] 免疫应答

[0393] 通过 ELISA 测试患者血清的对抗此种疫苗中每个单独抗原的抗体。还用所选择的血清针对表达(或不表达)这些特定抗原的多种细胞系评估了 FACS 分析和补体依赖性细胞毒性。在第 1 周和第 7 周抽取外周血液(60mL)。在第 2 周、第 3 周、第 11 周、第 15 周、第 19 周和第 23 周抽取外周血液(30mL)。然后,只要患者仍然跟随研究并且处于缓解之中,每隔三个月获取血液。

[0394] 毒性 / 副作用

[0395] 所提议疫苗的预期安全性是基于利用相同的抗原(即使未使用单分子构建体)的多价单体疫苗在患有多种恶性肿瘤(包括卵巢癌)患者中积累的临床经验。如先前所述用单独的组分进行疫苗接种已具备良好的耐受性(Gilewski T, Ragupathi G, Bhuta S, 等 Proc Natl Acad Sci U S A 98:3270-5, 2001; Helling F, Zhang S, Shang A, 等 Cancer Res 55:2783-8, 1995; Slovin SF, Ragupathi G, Musselli C, 等 Cancer Immunol Immunother 54:694-702, 2005; Slovin SF, Ragupathi G, Musselli C, 等 J Clin Oncol 21:4292-8, 2003)。根据美国国家癌症研究所(NCI)开发的通用毒性标准版本 3.0 对毒性进行分级。

[0396] 治疗反应 / 结果评估的标准

[0397] 本研究的主要终点是描述免疫原性、评估毒性及确定多个剂量水平中的最低免疫原性剂量。虽然并不是主要终点,但是,根据病史和体检、CA-125 测定和成像来评估疾病的严重程度。

[0398] 通过 ELISA 研究对抗各种抗原的抗体,并且合适的话,通过 FACS 研究对抗人肿瘤细胞系的抗体。

[0399] 如果可行的话,在完成疫苗试验后,每隔三个月对患者进行随访,直到由 CT 成像表明病情恶化的迹象出现。

[0400] 应尽力向进入研究的所有患者解释说明评估情况或结果。所有患者均视为可以评估安全性和免疫应答。

[0401] 在研究开始时患者处于缓解期,并且由于病情恶化的射线照相证据或利用下面的 CA-125 标准将患者排除。

[0402] 在第 4 次疫苗接种前病情恶化的患者,及仅因病情恶化而从研究中排除的患者(即,不存在如 DLT 另外定义的毒性)被更换,以提供合适的队列来评估毒性。

[0403] 从研究中排除的标准

[0404] 任何时候因严重的无法接受的副作用、规定的剂量限制毒性、患者不符合规定的治疗计划,或者患者怀孕,要求撤回同意书,或者,如果研究的医生觉得这样做合适的话,可以中止治疗。

[0405] 患者因病情恶化退出研究,这种病情恶化可以通过以下标准定义:1) 体检或病情复发的射线照相证据,或 2) CA-125 升高到正常上限值的两倍(即 $\geq 70\text{U/ml}$ ),采用第二个样本确认也 $\geq 70\text{U/ml}$ 。生化复发治疗失败的时间记录为第一个样本 $\geq 70\text{U/ml}$  时的日期。

[0406] 生物统计学

[0407] 这是设计用于评估在单一多肽骨架上含缀合到 KLH 上的 Globo-H、GM2、sTn、TF 和 Tn 并混合有免疫佐剂 QS-21 的单分子五价糖类疫苗的安全性和免疫性的 I 期研究。它诱导了对抗这些单个抗原和表达这些抗原的肿瘤细胞的 IgG 和 IgM 抗体反应。6 名患者接受五价疫苗三种剂量中的一种剂量(25mcg、50mcg 和 10 或 100mcg),在满足安全性的最低免疫原剂量水平下纳入 6 名患者的扩展队列。每种剂量水平累计 6 名患者接受试验,以进一步分别评估每种剂量水平的安全性和免疫应答。该试验累计约有 24 名患者。根据前两种剂量水平的血清学反应,选择和准备第三种剂量水平(10 或 100mcg)。

[0408] 根据给定队列中观察到不超过 1 个的 DLT,推进到下一队列。如果观察到 $\leq 1$  个 DLT,则升高到下一剂量。如果 2 名患者出现 DLT,则前一剂量水平被视为安全,进一步考虑免疫应答。例如,在 25mcg 水平时观察到 2 人或多人出现 DLT,则试验降低到 10mcg。

[0409] 本试验的主要终点指标是评估对几种抗原疫苗的免疫应答(IR)。如果在不超过 23 周的任何随访时间点时患者显示对疫苗五种抗原中的至少三种抗原具有血清学反应,则患者被视为应答者。每种成分的血清学反应定义为 1) 对于具有不可检测的基线效价的患者而言,通过 ELISA 测定的抗体效价 $\geq 1:80$ ,及 2) 对于具有可检测的基线效价的患者而言,通过 ELISA 测定的抗体效价比基线 $\geq 8$  倍。估计每种剂量水平的应答者的比例。

[0410] 最高应答数量是 30 次(6 名患者乘以 5 种抗原)。如果 25 和 50mcg 两种剂量水平均被视为安全,而且如果在两种连续剂量水平的 30 种可能结果中观察到不超过 5 个应答的差异且 6 名患者中至少 5 名在 25mcg 时有应答,则降级到 10mcg 剂量水平。否则,如果相邻剂量水平的差异大于 5/30,或只有 4 名或更少的患者应答,则下一队列以 100mcg 剂量水平纳入。如果在两种连续剂量水平时,IR 差异小于或等于 5/30 且 6 名患者中至少 5 名在两种剂量水平均有应答,则最低剂量定义为最低免疫原剂量水平。

[0411] 在最低免疫原剂量水平时累计共有 12 名患者参与试验,并且如果根据免疫应答标准,12 名患者中至少有 7 人是三种或更多种抗原的应答者,则研究视为阳性。这种计算假

设在零假设条件下(即无活性),免疫应答的概率是 0.35,而可供选择的假设(即目标应答概率)的概率是 0.75。使用单级二项式比例试验, I 类误差设定为 8%,并且 II 类误差设定为 5%。如果少于 7 名患者具有 IR,则研究的结论是该群体的 IR 率比 35% 差。(Yao TJ, Begg CB, Livingston P, Optimal sample size for a series of pilot trials of new agents. *Biometrics*, 52(3):992-1001, 1996.)

[0412] 无恶化生存率由第一次疫苗接种至病情恶化或死亡界定。Kaplan-Meier 方法将用于评估 PFS。测定 DLT 直到第 7 周(即第 4 次疫苗接种),并且如果 6 名纳入试验的患者中有 1 名患者在第 7 周时观察到  $DLT < 1$ ,则下一队列可纳入试验。

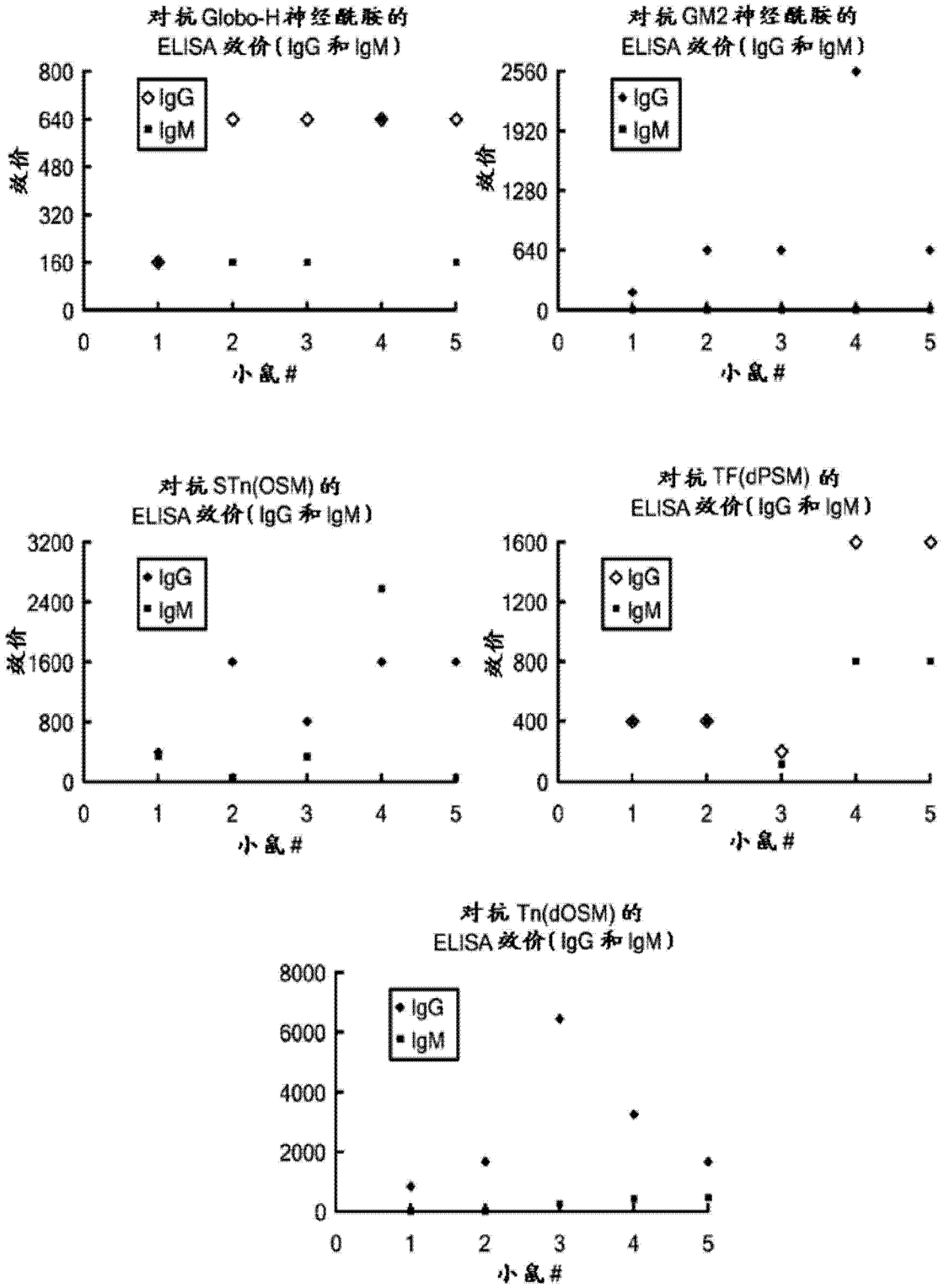


图 1

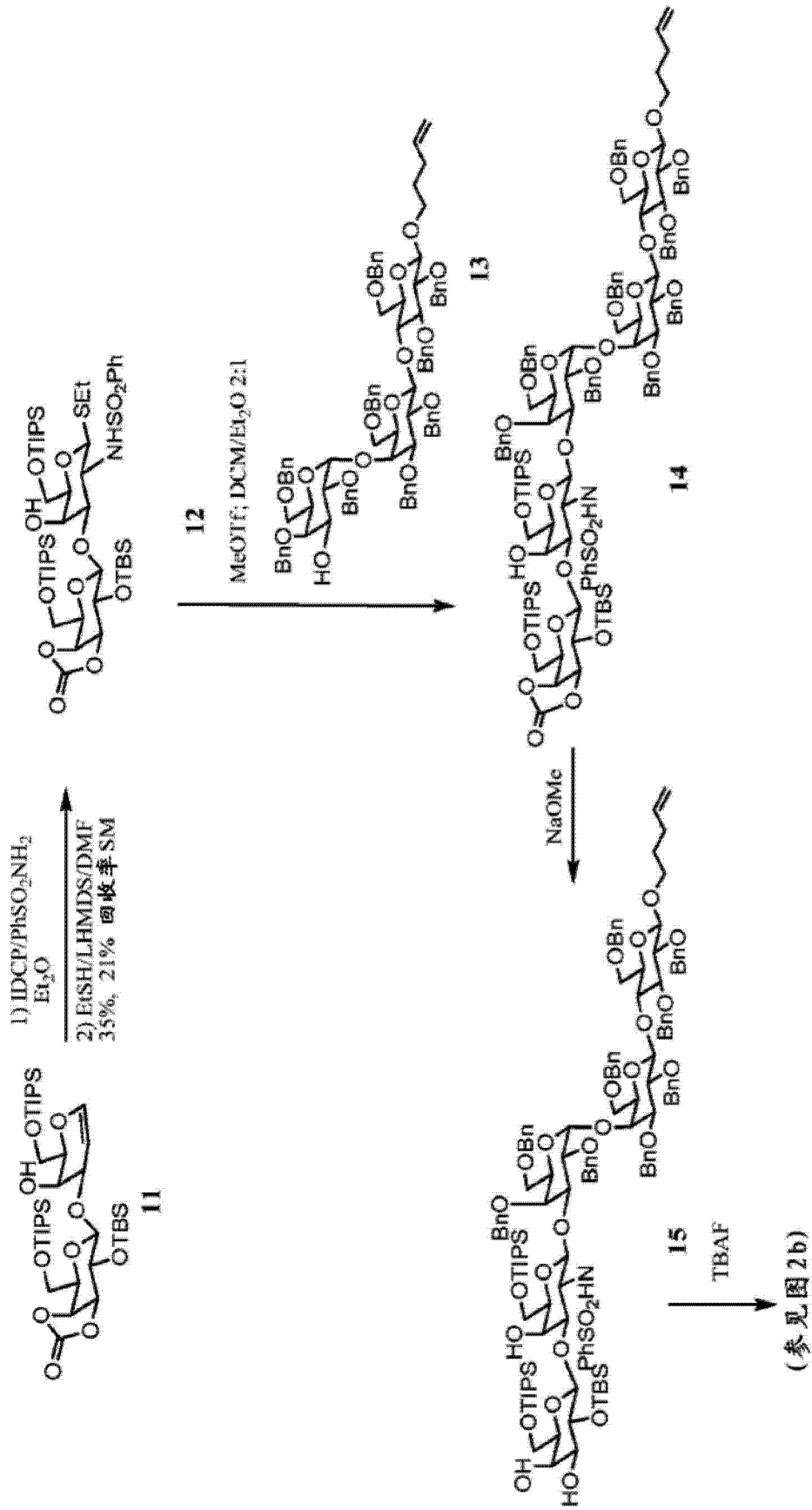


图 2a

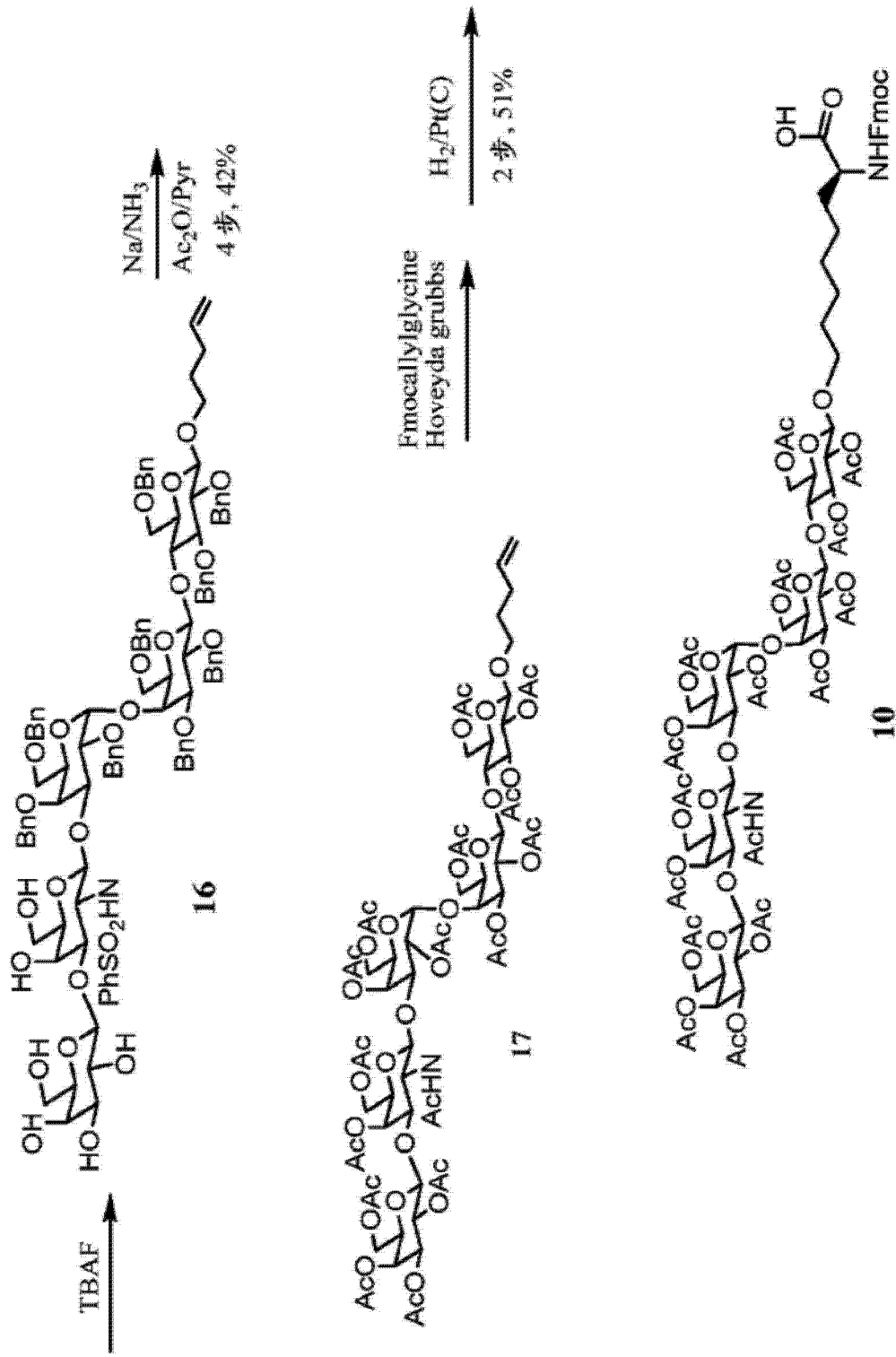


图 2b

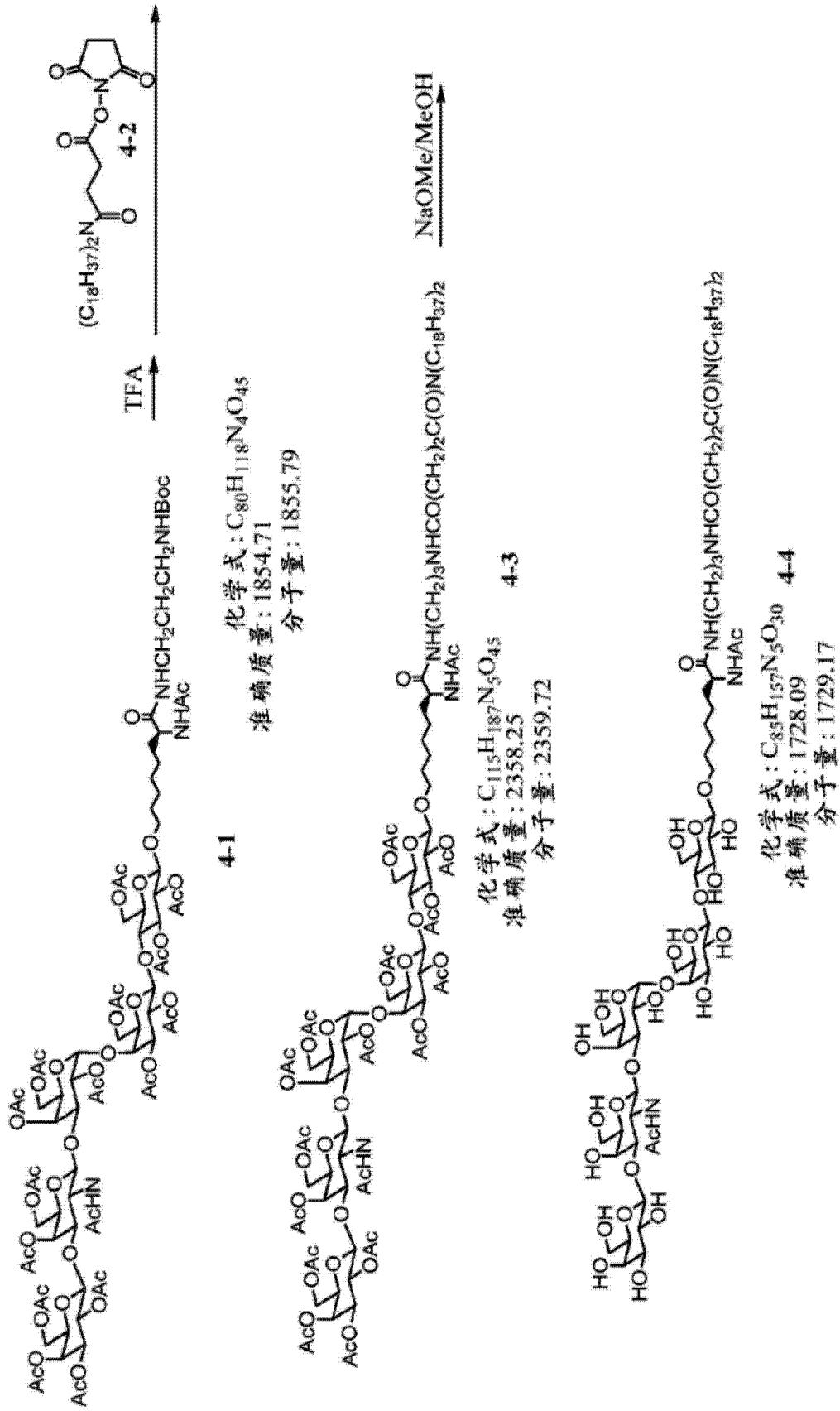


图 3

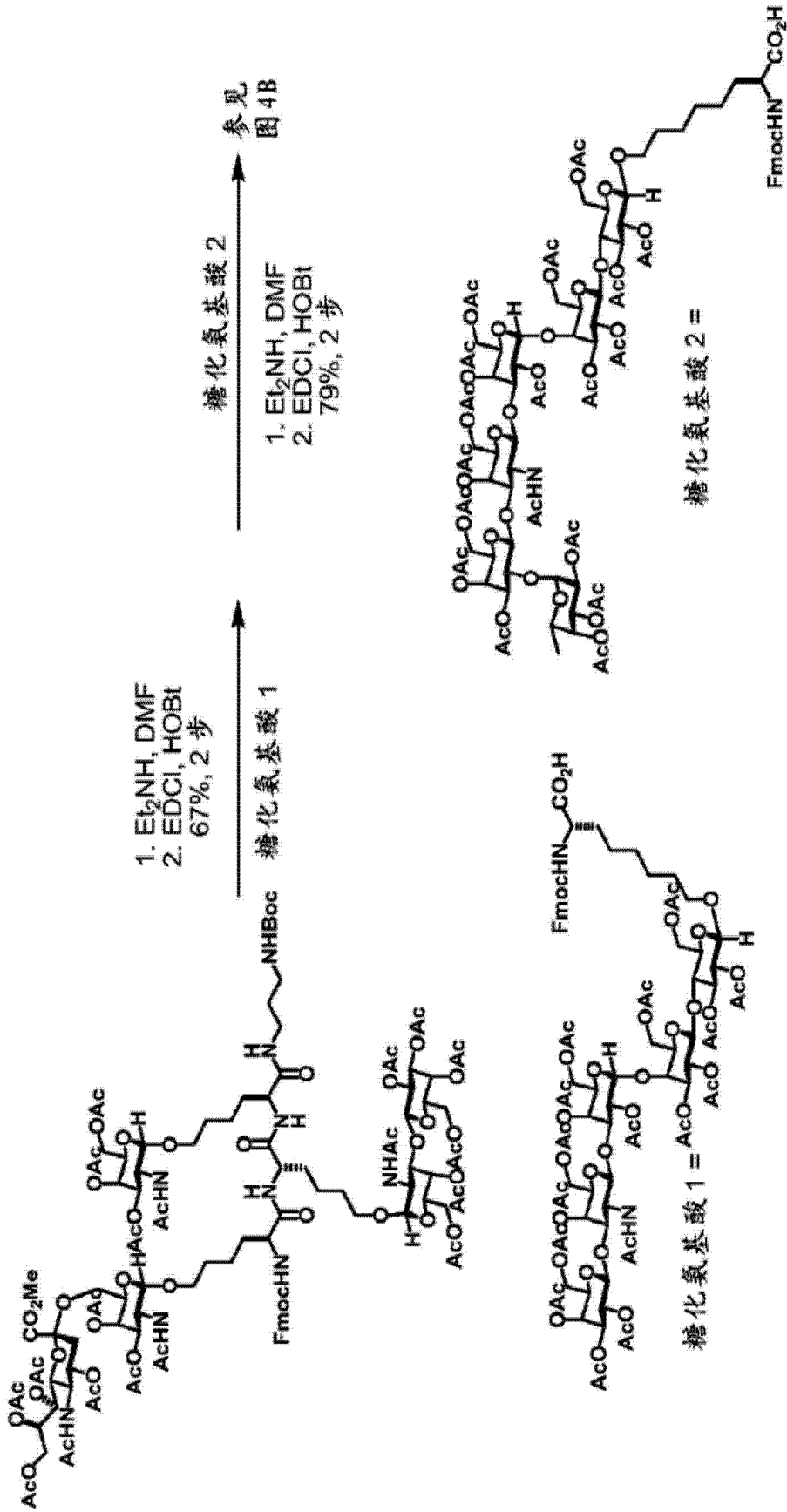
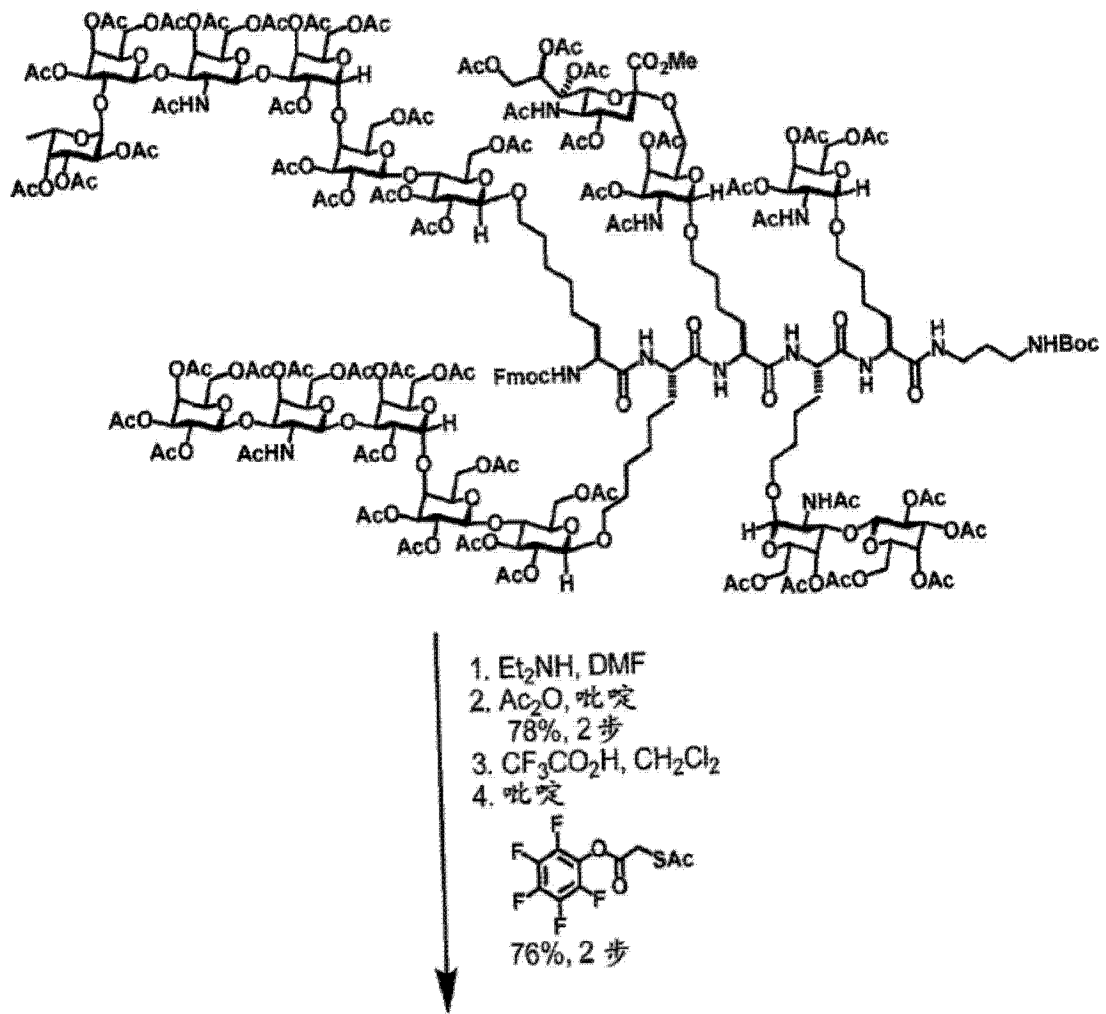


图 4A



参见图 4C

图 4B

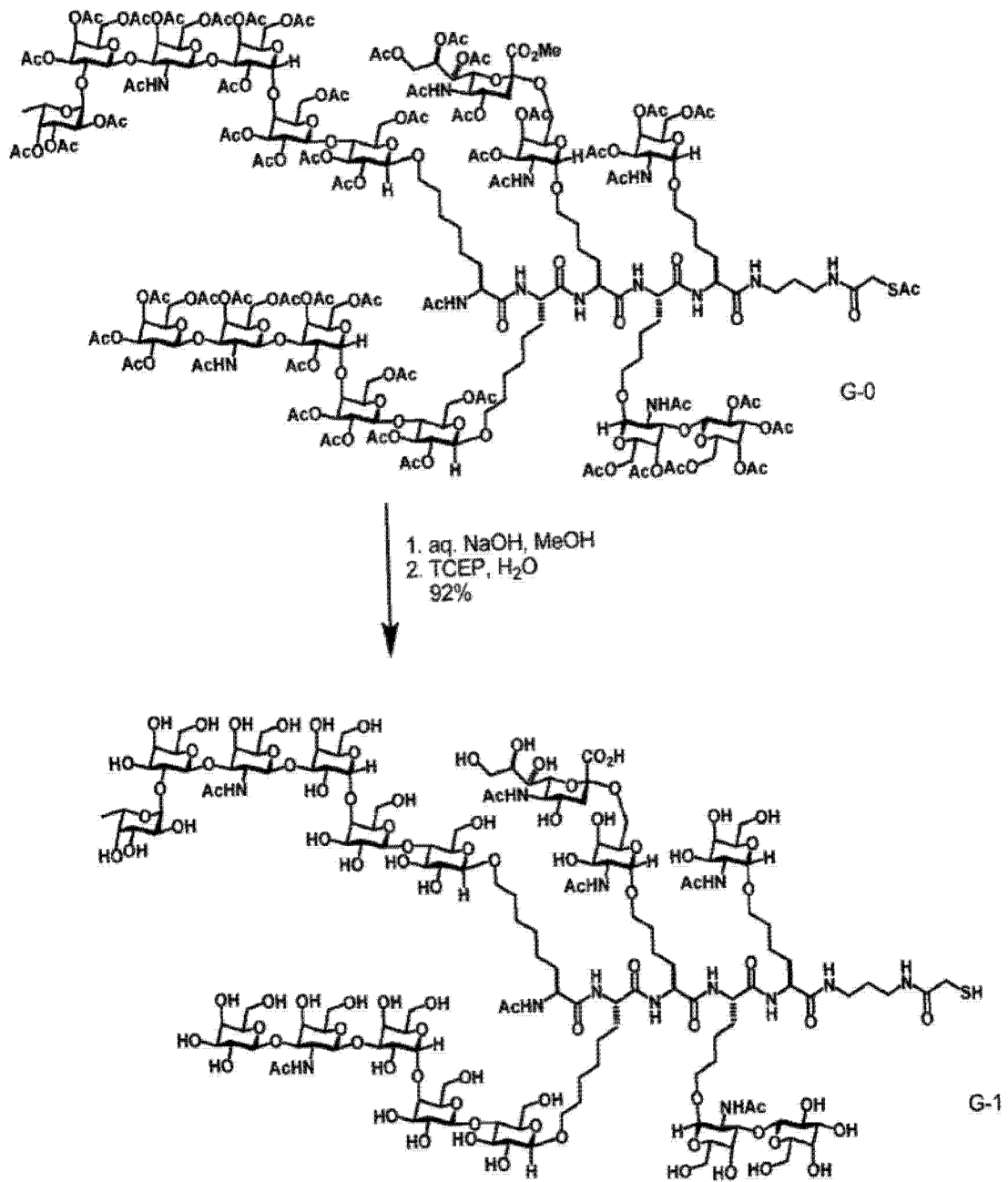


图 4C

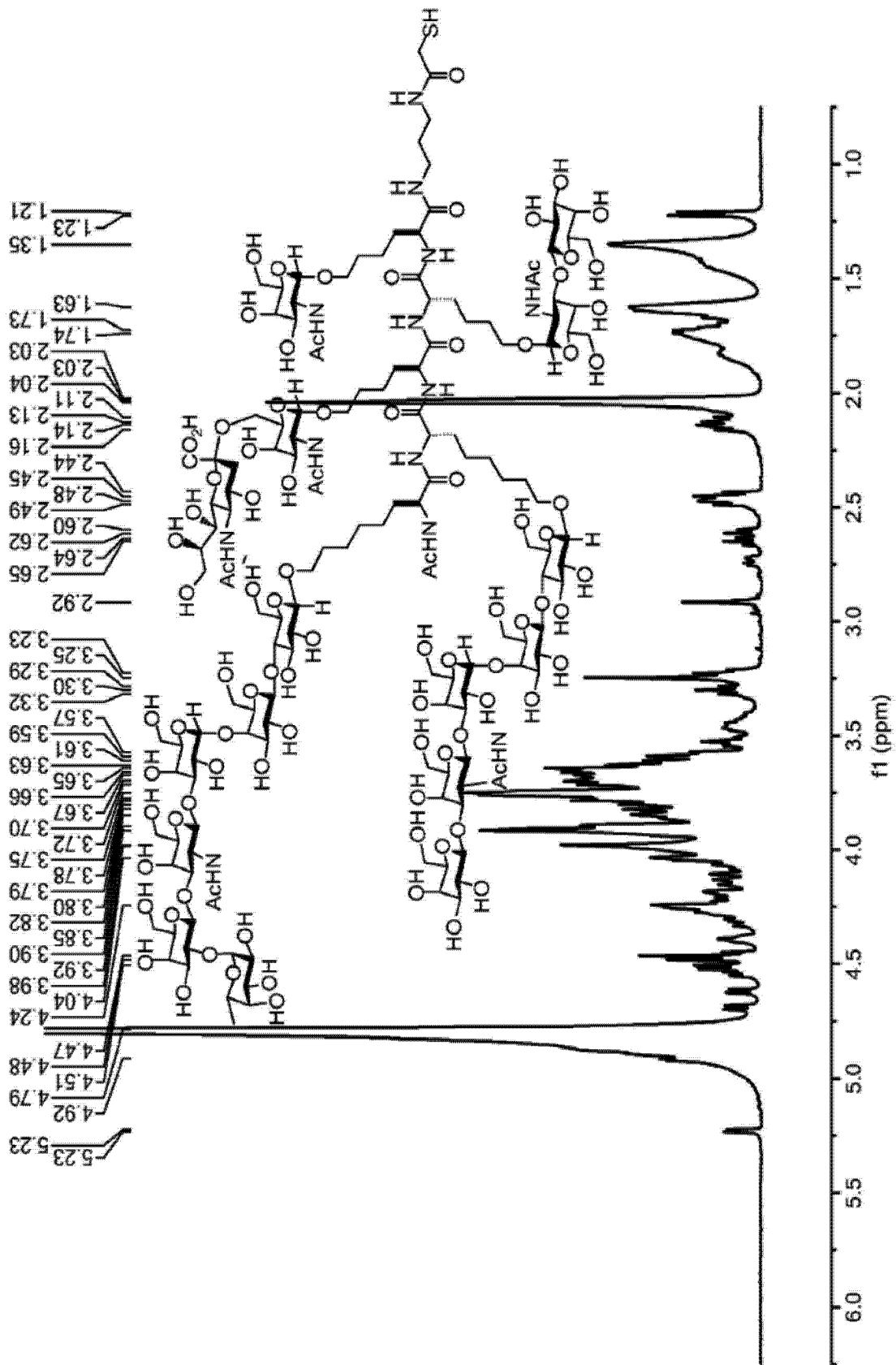


图 5