



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I655201 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：103122466

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 06 月 30 日

(51)Int. Cl. : C07K1/107 (2006.01)

C07B45/06 (2006.01)

A61K39/39 (2006.01)

(30)優先權：2013/06/28

紐西蘭

612654

(71)申請人：紐西蘭商奧克蘭聯合服務公司(紐西蘭) AUCKLAND UNISERVICES LIMITED (NZ)

紐西蘭

(72)發明人：布萊博 瑪格蕾特 安 BRIMBLE, MARGARET ANNE (NZ)；瑞特 湯馬斯 修 WRIGHT, THOMAS HUGH (NZ)；登巴 彼得 羅德艾瑞克 DUNBAR, PETER RODERICK (NZ)；威廉斯 傑佛瑞 馬丁 WILLIAMS, GEOFFREY MARTYN (NZ)

(74)代理人：陳翠華

(56)參考文獻：

CN 1684700A

CN 101113178A

US 2009/0123488A1

WO 2013/036543A2

Deepak B. Salunke et al., " Structure-Activity Relationships in Human Toll-like Receptor 2-Specific Monoacyl Lipopeptides", J. Med. Chem., 2012, 55 (7), pp 3353-3363

Yuk Fai Lau et al., "Lipid-containing mimetics of natural triggers of innate immunity as CTL-inducing influenza vaccines", International Immunology, Volume 18, Issue 12, 2006, Pages1801-1813

審查人員：謝敏哲

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：15 共 215 頁

(54)名稱

胺基酸及胜肽接合物及結合方法

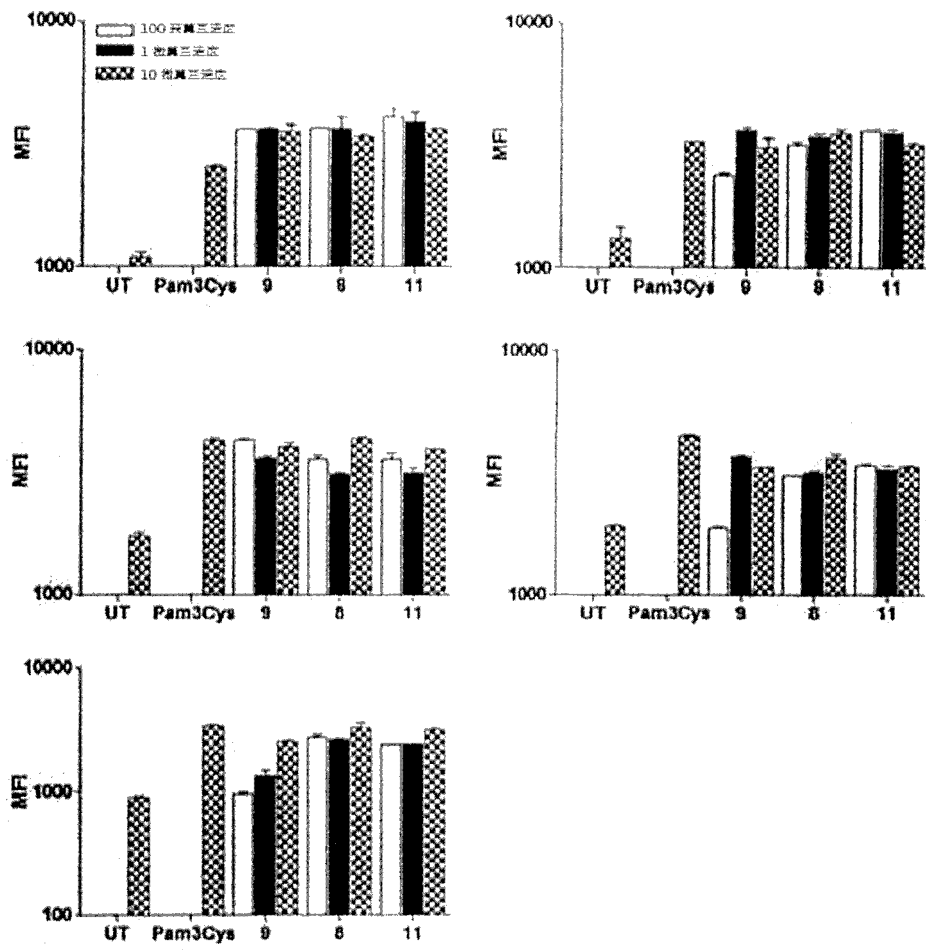
AMINO ACID AND PEPTIDE CONJUGATES AND CONJUGATION PROCESS

(57)摘要

本發明係關於胺基酸及胜肽接合物(conjugate)、製造胺基酸及胜肽接合物的方法、該方法製造的接合物、包含該接合物的醫藥組合物、在一個體中引起免疫反應的方法及接種一個體的方法、使用該接合物於該目的、及使用該接合物於製造用於該目的之藥物。

The present invention relates to amino acid and peptide conjugates, methods for making amino acid and peptide conjugates, conjugates produced by the methods, pharmaceutical compositions comprising the conjugates, methods of eliciting immune responses in a subject and methods of vaccinating a subject, uses of the conjugates for the same, and uses of the conjugates in the manufacture of medicaments for the same.

指定代表圖：



第 1 圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

胺基酸及胜肽接合物及結合方法 / AMINO ACID AND PEPTIDE CONJUGATES AND CONJUGATION PROCESS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於胺基酸及胜肽接合物 (conjugate)、製造胺基酸及胜肽接合物的方法、該方法製造的接合物、包含該接合物的醫藥組合物、在一個體中引起免疫反應的方法及接種一個體的方法、使用該接合物於該目的、及使用該接合物於製造用於該目的之藥物。

【先前技術】

【0002】 合成胜肽疫苗通常包含蛋白質抗原之引起免疫部分的合成複本。這樣的手段對疫苗開發具有許多優點，包括容易合成、避免潛在毒性生物副產物及直接的特性 (straightforward characterisation)。

【0003】 於胜肽疫苗開發中的一個關鍵問題為缺少顯示免疫原性 (immunogenicity) 的胜肽以做為唯一的疫苗組份。疫苗通常必須包括一佐劑，其係經設計以活化先天性免疫系統的組分 (例如，弗氏佐劑 (Freund's adjuvant))。

【0004】 胜肽疫苗設計的一替代性策略為建立自佐劑 (self-adjuvanting) 疫苗，其中所關注的胜肽抗原決定位係共價連接至一適當的佐劑。相較於帶有一外部佐劑之抗原的簡易共調配物 (co-formulation)，此自佐劑疫苗係可具有增進的抗原吸收、呈

現及樹突細胞成熟。

【0005】 業已開發數種自佐劑疫苗，然而該等疫苗的製備可為複雜的。

【0006】 對於新的自佐劑疫苗及製造自佐劑疫苗的新方法乃存在持續的需求。本發明之一目的在於朝向符合此等需求的方向；及／或至少提供公眾一有用的選擇。

【0007】 從以下僅供例示的描述中，本發明的其他目的將顯得更為明顯。

【0008】 在本發明說明書中所包括的任何文件、行動、材料、裝置、物品或其類似物之討論，僅係為了提供本發明內容的目的，而非作為承認此等之任何或全部係形成先前技術基礎的部分或如同其在優先權日已存在之為本發明相關領域的一般通常知識。

【發明內容】

【0009】 在一方面，本發明係提供一種製造胺基酸接合物（conjugate）或胜肽接合物的方法，該方法包含透過碳-碳雙鍵與硫醇基（thiol）的氫硫反應（hydrothiolation），使一含脂質的接合配偶體（conjugation partner）以及一包含胺基酸的接合配偶體，在有效於將該含脂質的接合配偶體接合到該包含胺基酸的接合配偶體的條件下反應。

【0010】 本文描述的任何實施態樣係關於任何本文的方面。

【0011】 在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係一含胜肽的接合配偶體，且該含脂質的接合配偶體係耦合至該含胜肽之接合配偶體的胜肽上。

【0012】 在一些實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係接合

至該包含胺基酸的接合配偶體的該或一胺基酸上，或該含胜肽的接合配偶體的胜肽上。

【0013】 在特定實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係接合至該包含胺基酸的接合配偶體的該或一胺基酸上。

【0014】 因此，在另一方面，本發明係提供一種製造一胜肽接合物的方法，該方法包含透過碳-碳雙鍵與硫醇基的氫硫反應，使一含脂質的接合配偶體以及一含胜肽的接合配偶體，在有效於將該含脂質的接合配偶體接合至該含胜肽的接合配偶體的條件下反應。

【0015】 在一實施態樣中，該接合物係一脂肽，使得該方法係用於製造一脂肽。

【0016】 在一實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係包含該碳-碳雙鍵，且該含胜肽之接合配偶體的胜肽係包含該硫醇基。

【0017】 在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係包含一抗原決定位 (epitope)。在一實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含一抗原決定位。在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係包含二或多個抗原決定位。在一實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含二或多個抗原決定位。在一實施態樣中，該胜肽接合物係包含二或多個抗原決定位。在一實施態樣中，該抗原決定位係一胜肽抗原決定位。在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係由一胜肽所組成。在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係由一包含一胜肽抗原決定位的胜肽所組成。在一實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係由一胜肽所組成。在一實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係由一包含一胜肽抗原決

定位的胜肽所組成。

【0018】 在一些實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係包含一鍵結至該接合配偶體的該或一胺基酸的抗原決定位。在一些實施態樣中，該含胜肽之接合配偶體係包含一鍵結至該含接合配偶體之胜肽的抗原決定位。在一些實施態樣中，該抗原決定位係經由連結基團（linker group）鍵結至該胜肽。

【0019】 在一些實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係包含一經由一連結基團鍵結至該接合配偶體之該或一胺基酸的胜肽抗原決定位。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含一經由一連結基團鍵結至該胜肽的胜肽抗原決定位。

【0020】 在一些實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體及／或該含胜肽的接合配偶體係包含一抗原性（antigenic）胜肽。在一些實施態樣中，該胜肽接合物係包含一抗原性胜肽。

【0021】 在一些實施態樣中，該方法更包含耦合該胺基酸接合物的胺基酸至一胺基酸或一胜肽以提供一胜肽接合物。

【0022】 在一些實施態樣中，耦合一胜肽係包含個別耦合一或多個胺基酸及／或一或多個胜肽。

【0023】 在一些實施態樣中，該方法更包含耦合該胺基酸接合物的胺基酸或該胜肽接合物的一胺基酸至一胺基酸或一胜肽，從而提供一包含一連結基團或其一或多個胺基酸的胜肽接合物。

【0024】 在一些實施態樣中，該方法更包含耦合該包含一連結基團或其一或多個胺基酸的胜肽接合物的一胺基酸至一胺基酸或一胜肽，從而提供一包含一鍵結至該胺基酸之胜肽抗原決定位的胜肽接合物，含脂質的接合配偶體係經由一連結基團而接合至

該胺基酸。

【0025】 在一些實施態樣中，該含脂質的接合物所接合之該胜肽接合物的胺基酸係一 N 端的胺基酸殘基 (N-terminal amino acid residue)。

【0026】 在一些實施態樣中，該方法更包含耦合該胺基酸接合物的胺基酸或該胜肽接合物的一胺基酸至一胺基酸或一胜肽，從而提供一包含一胜肽抗原決定位的胜肽接合物。

【0027】 在一些實施態樣中，該方法更包含耦合一抗原決定位至該胺基酸接合物的胺基酸或該胜肽接合物的一胺基酸。在一些實施態樣中，該方法更包含耦合一胜肽抗原決定位至該胺基酸接合物的胺基酸或該胜肽接合物的一胺基酸。在一些實施態樣中，該抗原決定位係經由一連結基團來耦合或鍵結。

【0028】 在一些實施態樣中，該方法更包含耦合一抗原決定位至該胜肽接合物的胜肽。在一些實施態樣中，該方法更包含耦合一胜肽抗原決定位至該胜肽接合物的胜肽。在一些實施態樣中，該抗原決定位係經由一連結基團鍵結至該胜肽。

【0029】 在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體係由一胺基酸所組成。在一實施態樣中，該胺基酸之 C-端的羰基係由一羰基保護基團所保護，及／或該胺基酸的 N α -胺基基團係由一胺基保護基團所保護。

【0030】 在一些實施態樣中，該胜肽之 C-端的羰基係由一羰基保護基團所保護及／或該胜肽的 N α -胺基基團係由一胺基保護基團所保護。

【0031】 在一實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係包含一

或多個視需要經取代之直鏈或側鏈脂肪族或雜脂肪族鏈，各含有至少 4 個鏈結原子 (chain-linked atoms)。在一實施態樣中，該含脂質的接合配偶體系包含一或多個視需要經取代之直鏈或側鏈脂肪族或雜脂肪族鏈，各含有至少 6 個鏈結原子。在一具體考量的實施態樣中，該一或多個鏈係脂肪族。在一具體考量的實施態樣中，該一或多個鏈係飽和的。

【0032】 在一些實施態樣中，該一或多個鏈係視需要經取代。在一些實施態樣中，該一或多個鏈係視需要經一或多個芳基取代。

【0033】 在一些實施態樣中，該一或多個鏈係包含至少 4、6、8、10、12 或 14 個鏈結原子。在一些實施態樣中，該一或多個鏈係包含 4-22、6-22、8-22、10-22、12-22 或 14-22 個鏈結原子。

【0034】 在一實施態樣中，該一或多個鏈係經由一含雜原子的官能基而共價鍵結至一含有碳-碳雙鍵或硫醇基的部分 (moiety)。含雜原子的官能基的例子包括，但不限於乙醚、胺、硫化物、亞砒、砒、酯、醯胺、碳酸酯、胺甲酸酯 (carbamate) 及尿素基團。

【0035】 在一例示性的實施態樣中，該一或多個鏈係經由酯官能基而共價鍵結至該部分。

【0036】 在一實施態樣中，該含脂質的接合配偶體系包含一或多個飽和或不飽和脂肪酸酯。在一些實施態樣中，該脂肪酸係飽和的。在一實施態樣中，一或多個脂肪酸酯係鍵結至該部分，包含鍵結至碳-碳雙鍵或硫醇基。在一實施態樣中，該酯係該脂肪酸之羰基與該部分之醇的酯。

【0037】 在一實施態樣中，該脂肪酸係一 C4-22 脂肪酸。在一實施態樣中，該脂肪酸係一 C6-22 脂肪酸。在另一實施態樣中，該脂肪酸係一 C10-22 脂肪酸。在又一實施態樣中，該脂肪酸係一 C12-22 脂肪酸。在一例示性的實施態樣中，該脂肪酸係一 C12、C14、C16、C18 或 C20 脂肪酸。

【0038】 在一些實施態樣中，該脂肪酸係月桂酸 (lauric acid)、肉豆蔻酸 (myristic acid)、軟脂酸 (palmitic acid)、硬脂酸 (stearic acid)、二十酸 (arachic acid)、十六烯酸 (palmitoleic acid)、十八烯酸 (oleic acid)、反十八烯酸 (elaidic acid)、十八碳二烯酸 (linoleic acid)、 α -十八碳三烯酸 (α -linolenic acid) 及二十碳四烯酸 (arachidonic acid)。在一實施態樣中，該脂肪酸係月桂酸、肉豆蔻酸、軟脂酸或硬脂酸。在一具體考量的實施態樣中，該脂肪酸係軟脂酸。

【0039】 在一例示性的實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係包含一或二個脂肪酸酯。在一具體考量的實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係包含一個脂肪酸酯。

【0040】 在特定實施態樣中，該脂肪酸之酯係一包含該碳-碳雙鍵或硫醇基之醇的酯。在一實施態樣中，該醇係一元、二元、或三元 C2-6 脂肪族醇。在另一實施態樣中，該醇係一元或二元 C2-4 脂肪族醇。在一例示性的實施態樣中，該醇係一元 C2 脂肪族醇或一元或二元 C3 脂肪族醇。在一具體考量的實施態樣中，該醇係一元 C2 醇。

【0041】 在特定實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係包含該碳-碳雙鍵。

【0042】 在一個例示性的實施態樣中，該醇係包含碳-碳雙鍵。在一具體考量的實施態樣中，該醇係乙烯醇。

【0043】 在具體考量的實施態樣中，該胜肽係一合成性胜肽。

【0044】 在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體及／或胜肽接合物係包含一合成性胜肽。在一些實施態樣中，該合成性胜肽係一經由包含固相胜肽合成（solid phase peptide synthesis，SPPS）的方法而製備的胜肽。

【0045】 在一些實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體的該或一胺基酸係包含該碳-碳雙鍵或硫醇基。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體之胜肽的一胺基酸殘基係包含該碳-碳雙鍵或硫醇基。

【0046】 在一些實施態樣中，該包含碳-碳雙鍵或硫醇基的胺基酸殘基係一末端胺基酸殘基。在一些實施態樣中，該末端胺基酸殘基係一 N 端殘基。

【0047】 在一些實施態樣中，包含該碳-碳雙鍵或硫醇基之胺基酸的 N α -胺基係經醯化（acylated）。

【0048】 在特定實施態樣中，該方法更包含醯化該胺基酸接合物之該胺基酸的 N α -胺基或該胜肽接合物的胺基酸殘基，該含脂質的接合配偶體係經由該胺基酸殘基而接合。在特定實施態樣中，該方法更包含以 C2-20 脂肪酸醯化該 N α -胺基。

【0049】 在特定實施態樣中，含該胺基酸之接合配偶體的該或一胺基酸係包含該硫醇基。在特定實施態樣中，該含胜肽之接合配偶體之胜肽的一胺基酸殘基係包含該硫醇基。在特定實施態樣中，該硫醇基係一半胱氨酸殘基的硫醇基。

【0050】 在特定實施態樣中，該半胱氨酸殘基系一末端殘基。在特定實施態樣中，該半胱氨酸殘基係一 N-端殘基。

【0051】 在一些實施態樣中，該半胱氨酸殘基的該胺基係經醯化。

【0052】 在一實施態樣中，該胺基係以 C2-20 脂肪酸醯化。

【0053】 在一例示性的實施態樣中，該 C2-20 脂肪酸係乙醯基或十六醯基。在另一例示性的實施態樣中，該 C2-20 脂肪酸係乙醯基。

【0054】 在一些實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體及／或胜肽接合物係包含 8 至 220、8 至 200、8 至 175、8 至 150、8 至 125、8 至 100、8 至 90、8 至 80、8 至 70、8 至 60、8 至 50、8 至 40、8 至 30、8 至 25、8 至 20、或 8 至 15 個胺基酸。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含 8 至 220、8 至 200、8 至 175、8 至 150、8 至 125、8 至 100、8 至 90、8 至 80、8 至 70、8 至 60、8 至 50、8 至 40、8 至 30、8 至 25、8 至 20 或 8 至 15 個胺基酸。

【0055】 在一例示性的實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體及／或胜肽接合物係包含一胜肽，其包含 8 至 60 個胺基酸。在一例示性的實施態樣中，該胜肽係包含 8 至 60 個胺基酸。

【0056】 在另一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體及／或胜肽接合物係包含 5 至 220、8 至 220、5 至 175、8 至 175、8 至 150、10 至 150、15 至 125、20 至 100、20 至 80、20 至 60、25 至 100、25 至 80、25 至 60、30 至 80、40 至 60 或 50 至 60 個胺基酸。在其他實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含 5 至

220、8 至 220、5 至 175、8 至 175、8 至 150、10 至 150、15 至 125、20 至 100、20 至 80、20 至 60、25 至 100、25 至 80、25 至 60、30 至 80、40 至 60、或 50 至 60 個胺基酸。

【0057】 在其他實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體及／或胜肽接合物係包含 5 至 150、5 至 125、5 至 100、5 至 75、5 至 60、5 至 50、5 至 40、5 至 30、5 至 25、5 至 20、8 至 150、8 至 125、8 至 100、8 至 75、8 至 60、8 至 50、8 至 40、8 至 30、8 至 25、或 8 至 20 個胺基酸。在其他實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含 5 至 150、5 至 125、5 至 100、5 至 75、5 至 60、5 至 50、5 至 40、5 至 30、5 至 25、5 至 20、8 至 150、8 至 125、8 至 100、8 至 75、8 至 60、8 至 50、8 至 40、8 至 30、8 至 25、或 8 至 20 個胺基酸。

【0058】 在一實施態樣中，該包含胺基酸的接合配偶體及／或胜肽接合物係包含一或多個增溶性基團（solubilizing group）。在一實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含一或多個增溶性基團。

【0059】 在特定實施態樣中，該增溶性基團係於該胜肽鏈中的一包含二或多個親水性胺基酸殘基的胺基酸序列。在特定實施態樣中，該增溶性基團係於該胜肽鏈中的一包含二或多個連續親水性胺基酸殘基之一序列的胺基酸序列。在一實施態樣中，該親水性胺基酸殘基係陽離子胺基酸殘基。在一實施態樣中，該陽離子胺基酸殘基係精胺酸殘基或離胺酸殘基。在一具體考量的實施態樣中，該陽離子胺基酸殘基係離胺酸殘基。在一實施態樣中，該序列係包含 2 至 20、2 至 15、2 至 10、3 至 7、或 3 至 5 個胺基

酸。在一實施態樣中，該增溶性基團係三 (tri-)、四 (tetra-)、五 (penta-)、六 (hexa-)、或七 (hepta-) 離胺酸序列。在一具體考量的實施態樣中，該增溶性基團係四離胺酸 (tetralysine) 序列。

【0060】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或包含胺基酸的接合配偶體係包含一鄰近該含脂質配偶體所接合之胺基酸殘基的絲胺酸殘基。在一具體考量的實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一鄰近該含脂質的接合配偶體所接合之胺基酸殘基的絲胺酸殘基。在一例示性的實施態樣中，該含脂質的接合配偶體所接合之該胺基酸殘基係 N 端。在一具體考量的實施態樣中，該胜肽更包含一鄰近該絲胺酸之二或多個親水性胺基酸殘基的連續性序列。

【0061】 在特定實施態樣中，該胜肽接合物及／或包含胺基酸的接合配偶體係包含鄰近該絲胺酸殘基的二或多個親水性胺基酸殘基的一連續性序列。

【0062】 在特定實施態樣中，該胜肽接合物及／或包含胺基酸的接合配偶體只包含自然存在的胺基酸。在特定實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體只包含自然存在的胺基酸。在其他實施態樣中，該胜肽中的 75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多、或 99%或更多的胺基酸殘基係自然存在的胺基酸。

【0063】 在其他實施態樣中，該胜肽的接合物中及／或包含胺基酸的接合配偶體中的 75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多或者 99%或更多的胺基酸殘基係自然存在的胺基酸。

要經取代；

m 係一 0 至 4 的整數；

n 係 1 或 2；

R1 以及 R2 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R1 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

R3、R4、R5、R8 以及 R9 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R3 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

或者 R9 係一胺基保護基團、L3-C(O)、或 A2；

R6 以及 R7 在 n 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L1 以及 L2 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L3 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

A1 以及 A2 係各自獨立為胺基酸或胜肽；或者 A1 係 OH 或 OP1，其中 P1 係一羧基保護基團；

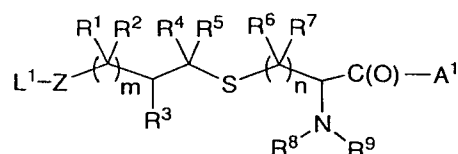
條件為：

當 R3 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基時，R1 不為 L2-C(O)-OC1-6 烷基；以及

當 m 係 2 至 4 的整數時，不超過一個 R1 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；以及

其中存在於 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2 以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0077】 在一實施態樣中，該方法包含係製造一包含一具式 (A) 結構的胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(A)

其中，

Z 係選自由以下所組成之群組： $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)NR-$ 、 $-NRC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-NRC(O)O-$ 、 $-OC(O)NR-$ 、以及 $-NRC(O)NR-$ ；

R 係氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基，其中該烷基或環烷基係視需要經取代；

m 係— 0 至 4 的整數；

n 係 1 或 2；

R1 以及 R2 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R1 係 $L2-C(O)-OC1-6$ 烷基；

R3、R4、R5、R8 以及 R9 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R3 係 $L2-C(O)-OC1-6$ 烷基；

或者 R9 係 $L3-C(O)$ 、或 A2；

R6 以及 R7 在 n 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L1 以及 L2 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L3 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

A1 以及 A2 係各自獨立為胜肽；或者 A1 係 OH；

條件為：

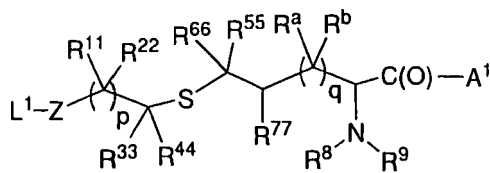
當R9不為A2時，A1係一胜肽；

當R3係L2-C(O)-OC1-6烷基時，R1不為L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

當m係2至4的整數時，不超過一個R1係L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

其中存在於 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0078】 在一實施態樣中，該方法係包含製造一包含一具式 (B) 結構的胺基酸接合物或胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(B)

其中，

Z 係選自由以下所組成之群組：-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR-以及-NRC(O)NR-；

R 係氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基，其中該烷基或環烷基係視需要經取代；

p 係一 0 至 4 的整數；

q 係一 0 至 2 的整數；

R11 以及 R22 在 p 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R11 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

R33、R44、R55、R66、R77、R8 以及 R9 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R33 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

或者 R9 係一胺基保護基團、L3-C(O)、或 A2；

Ra 以及 Rb 在 q 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L1 以及 L2 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L3 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

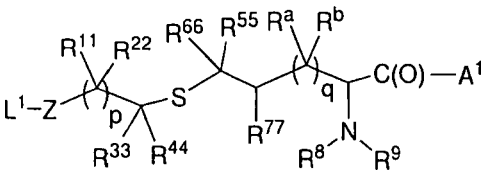
A1 以及 A2 係各自獨立為胺基酸或胜肽；或者 A1 係 OH 或 OP1，其中 P1 係一羧基保護基團；

條件為：

當 R33 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基時，R11 不為 L2-C(O)-OC1-6 烷基；以及當 p 係 2 至 4 的整數時，不超過一個 R11 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；以及

其中存在於 R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2 以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0079】 在一實施態樣中，該方法包含係製造一包含一具式 (B) 結構的胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(B)

其中，

Z 係選自由以下所組成之群組：-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR-以及-NRC(O)NR-；

R 係氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基，其中該烷基或環烷基係視需要經取代；

p 係一 0 至 4 的整數；

q 係一 0 至 2 的整數；

R¹¹ 以及 R²² 在 p 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R¹¹ 係 L²-C(O)-OC1-6 烷基；

R³³、R⁴⁴、R⁵⁵、R⁶⁶、R⁷⁷、R⁸ 以及 R⁹ 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R³³ 係 L²-C(O)-OC1-6 烷基；

或者 R⁹ 係 L³-C(O)或 A²；

R^a 以及 R^b 在 q 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L¹ 以及 L² 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L³ 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

A¹ 以及 A² 係各自獨立為胜肽；或者 A¹ 係 OH；

條件為：

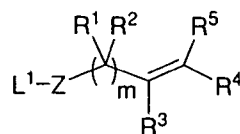
當R9不為A2時，A1係一胜肽；

當R33係L2-C(O)-OC1-6烷基時，R11不為L2-C(O)-OC1-6烷基；以及當p係2至4的整數時，不超過一個R11係

L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

其中存在於 R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2 以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0080】 在一實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係一式 (A1) 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(A1)

其中，

Z係選自由以下所組成之群

組：-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR-、以及-NRC(O)NR-；

R係氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基，其中該烷基或環烷基係視需要經取代；

m係一0至4的整數；

R1以及R2在m的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；或者R1係L2-C(O)-OC1-6烷基；

R3、R4以及R5係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；或者R3係L2-C(O)-OC1-6烷基；

L1以及L2係各自獨立為C5-21烷基或C4-20雜烷基；

條件為：

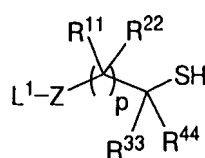
當R3係L2-C(O)-OC1-6烷基時，R1不為L2-C(O)-OC1-6烷基；

以及

當 m 係一 2 至 4 的整數時，不超過一個 R1 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；以及

其中存在於 R1、R2、R3、R4、R5、L1 以及 L2 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0081】 在另一實施態樣中，該含脂質的接合配偶體係一式 (B1) 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(B1)

其中，

Z係選自由以下所組成之群

組：-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR-以

及-NRC(O)NR-；

R係氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基，其中該烷基或環烷基係視需要經取代；

p係一0至4的整數；

R11以及R22在p的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；或者R11係L2-C(O)-OC1-6烷基；

R33以及R44係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；或者R33係L2-C(O)-OC1-6烷基；

L1以及L2係各自獨立為C5-21烷基或C4-20雜烷基；

條件為：

當R33係L2-C(O)-OC1-6烷基時，R11不為L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

當p係2至4的整數時，不超過一個R11係L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

其中存在於 R11、R22、R33、R44、L1 以及 L2 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0082】 在一實施態樣中，該含脂質之接合配偶體係一如本文描述之任一實施態樣所定義之式（II）的化合物。

【0083】 在一實施態樣中，該含脂質之接合配偶體係一如本文描述之任一實施態樣所定義之式（IIA）的化合物。

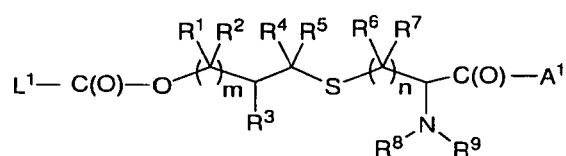
【0084】 在一實施態樣中，該包含胺基酸之接合配偶體係一如本文描述之任一實施態樣所定義之式（III）的化合物。

【0085】 在一實施態樣中，該含胜肽之接合配偶體系一如本文描述之任一實施態樣所定義之式（Ⅲ）的化合物。

【0086】 在一實施態樣中，該包含胺基酸之接合配偶體系一如本文描述之任一實施態樣所定義之式（ⅢA）的化合物。

【0087】 在一實施態樣中，該含胜肽之接合配偶體系一如本文描述之任一實施態樣所定義之式（ⅢA）的化合物。

【0088】 在一實施態樣中，該方法係包含製造一包含一具式（I）結構的胺基酸接合物或胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(I)

其中，

m 係一 0 至 4 的整數；

n 係 1 或 2；

R1 以及 R2 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R1 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

R3、R4、R5、R8 以及 R9 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R3 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

或者 R9 係一胺基保護基團、L3-C(O)、或 A2；

R6 以及 R7 在 n 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L1 以及 L2 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L3 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

A1 以及 A2 係各自獨立為胺基酸或胜肽；或者 A1 係 OH 或 OP1，其中 P1 係一羧基保護基團；

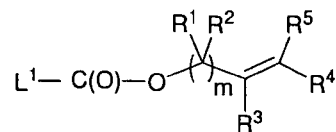
條件為：

當 R3 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基時，R1 不為 L2-C(O)-OC1-6 烷基；以及

當 m 係 2 至 4 的整數時，不超過一個 R1 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；以及

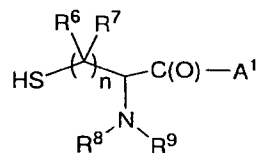
其中存在於 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2 以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代；

該方法包含使一式 (II) 之含脂質的接合配偶體



(II)

其中 m、R1、R2、R3、R4、R5、以及 L1 係如於式 (I) 化合物所定義者，與一包含一具式 (III) 結構之含胜肽的接合配偶體反應

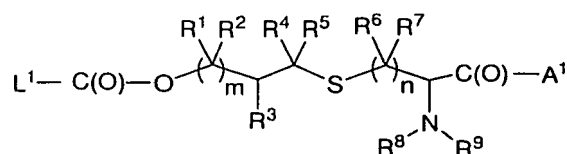


(III)

其中 n、R6、R7、R8、R9 以及 A1 係如於式 (I) 化合物所定義者，該反應係在有效於使式 (II) 化合物與式 (III) 化合物透過式

(II) 化合物中的碳-碳雙鍵與式 (III) 化合物中的硫醇基 (thiol) 進行氫硫反應的條件下接合而進行。

【0089】 在一實施態樣中，該方法係包含製造一包含一具式 (I) 結構的胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(I)

其中，

m 係一 0 至 4 的整數；

n 係 1 或 2；

R¹ 以及 R² 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R¹ 係 L²-C(O)-OC1-6 烷基；

R³、R⁴、R⁵、R⁸ 以及 R⁹ 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R³ 係 L²-C(O)-OC1-6 烷基；

或者 R⁹ 係 L³-C(O)、或 A²；

R⁶ 以及 R⁷ 在 n 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L¹ 以及 L² 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L³ 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

A¹ 以及 A² 係各自獨立為胜肽；或者 A¹ 係 OH；

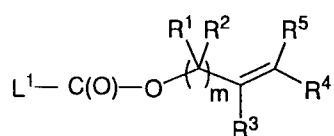
條件為：

當R9不為A2時，A1係一胜肽；

當R3係L2-C(O)-OC1-6烷基時，R1不為L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

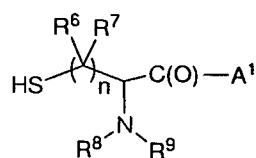
當m係2至4的整數時，不超過一個R1係L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

其中存在於 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1、L2
以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代；
該方法係包含使一式（II）之含脂質的接合配偶體



(II)

其中 m、R1、R2、R3、R4、R5、以及 L1 係如於式（I）化合物所定義者，與一包含一具式（III）結構之含胜肽的接合配偶體反應

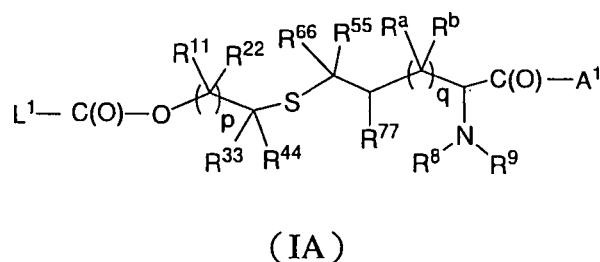


(III)

其中 n、R6、R7、R8、R9 以及 A1 係如於式（I）化合物所定義者，該反應係在有效於使式（II）化合物與式（III）化合物透過式（II）化合物中的碳-碳雙鍵與式（III）化合物中的硫醇基進行氫

硫反應的條件下接合而進行。

【0090】 在一實施態樣中，該方法係包含製造一包含一具式 (IA) 結構的胺基酸接合物或胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



其中

p 係一 0 至 4 的整數；

q 係一 0 至 2 的整數；

R11 以及 R22 在 p 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R11 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

R33、R44、R55、R66、R77、R8 以及 R9 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R33 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

或者 R9 係一胺基保護基團、L3-C(O)、或 A2；

Ra 以及 Rb 在 q 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L1 以及 L2 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L3 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

A1 以及 A2 係各自獨立為胺基酸或胜肽；或者 A1 係 OH 或 OP1，

其中 P1 係一羧基保護基團；

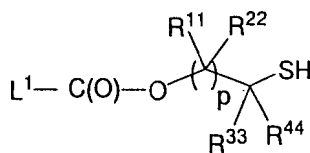
條件為：

當R33係L2-C(O)-OC1-6烷基時，R11不為L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

當p係2至4的整數時，不超過一個R11係L2-C(O)-OC1-6烷基；以及

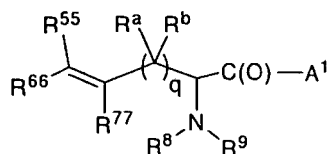
其中存在於 R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2 以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代；

該方法包含使一式（IIA）之化合物



（IIA）

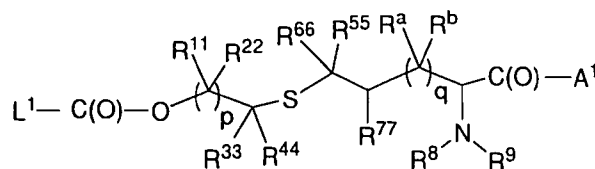
其中 p、R11、R22、R33、R44、R55、以及 L1 係如於式（IA）化合物所定義者，與一式（IIIA）之化合物反應



（IIIA）

其中 q、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、以及 A1 係如於式（IA）化合物所定義者，該反應係在有效於使式（IIA）化合物與式（IIIA）化合物透過式（IIIA）化合物中的碳-碳雙鍵與式（IIA）化合物中的硫醇基進行氫硫反應的條件下接合而進行。

【0091】 在一實施態樣中，該方法係包含製造一包含一具式 (IA) 結構的胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(IA)

其中

p 係— 0 至 4 的整數；

q 係— 0 至 2 的整數；

R11 以及 R22 在 p 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R11 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

R33、R44、R55、R66、R77、R8 以及 R9 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R33 係 L2-C(O)-OC1-6 烷基；

或者 R9 係 L3-C(O)、或 A2；

Ra 以及 Rb 在 q 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

L1 以及 L2 係各自獨立為 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L3 係 C1-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

A1 以及 A2 係各自獨立為胜肽；或者 A1 係 OH；

條件為：

當R9不為A2時，A1係一胜肽；

當R33係L2-C(O)-OC1-6烷基時，R11不為L2-C(O)-OC1-6烷

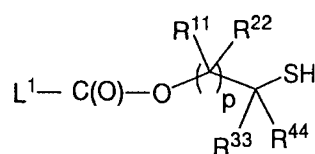
基；以及

當p係2至4的整數時，不超過一個R11係L2-C(O)-OC1-6烷

基；以及

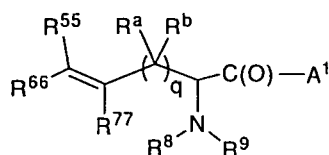
其中存在於 R11、R22、R33、R44、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、L1、L2 以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代；

該方法包含使式 (IIA) 化合物



(IIA)

其中 p、R11、R22、R33、R44、R55、以及 L1 係如於式 (IA) 化合物所定義者，與式 (IIIA) 化合物反應



(IIIA)

其中 q、R55、R66、R77、R8、R9、Ra、Rb、以及 A1 係如式 (IA) 化合物所定義者，該反應係在有效於使式 (IIA) 化合物與式 (IIIA) 化合物透過式 (IIIA) 化合物中的碳-碳雙鍵與式 (IIA) 化合物中的硫醇基進行氫硫反應的條件下接合而進行。

【0092】 在一實施態樣中，L1 及 L2 之至少一者係 C5-22 烷

基。

【0093】 在一實施態樣中， p 係— 0 至 2 的整數。在另一實施態樣中， p 係 0 或 1。

【0094】 在一些實施態樣中， R_{11} 及 R_{22} 在 p 的各個情況中係各自獨立為氫；或 R_{11} 係 $L_2-C(O)-OCH_2$ 。在一實施態樣中，在鄰近 $L_1-C(O)-O$ 之碳上的 R_{11} 係 $L_2-C(O)-OCH_2$ 。

【0095】 在一具體考量的實施態樣中， R_{11} 及 R_{22} 在 p 的各個情況中係各自獨立為氫。

【0096】 在一實施態樣中， R_{33} 係氫或 $L_2-C(O)-OCH_2$ 。

【0097】 在一實施態樣中， R_{33} 及 R_{44} 係各自為氫。

【0098】 在一具體考量的實施態樣， q 係 0 或 1。在一具體考量的實施態樣中， q 係 0。

【0099】 在一具體考量的實施態樣中， R_{55} 、 R_{66} 及 R_{77} 係各自為氫。

【0100】 在一些實施態樣中， q 的 R_a 及 R_b 在每個實例中係各自為氫。

【0101】 在一實施態樣中， L_1 係 C_{11-21} 烷基； p 係 1； R_{11} 係氫或 $L_2-C(O)-OCH_2$ ； R_{22} 係氫； R_{33} 係氫或 $L_2-C(O)-OCH_2$ ； R_{44} 係氫；以及 L_2 係 C_{11-21} 烷基。

【0102】 在一實施態樣中， R_{55} 、 R_{66} 、 R_{77} 、 R_a 、 R_b 以及 R_8 係各自為氫；以及 R_9 係氫、 $L_3-C(O)$ 、或 A_2 。在一實施態樣中， R_{55} 、 R_{66} 、 R_{77} 、 R_a 、 R_b 以及 R_8 係各自為氫；以及 R_9 係氫或 $L_3-C(O)$ 。

【0103】 在一實施態樣中， L_1 係 C_{11-21} 烷基； p 係 1； R_{11}

係氫或 L2-C(O)-OCH_2 ； R_{22} 係氫； R_{33} 係氫或 L2-C(O)-OCH_2 ； R_{44} 係氫； L_2 係 C_{11-21} 烷基； R_{55} 、 R_{66} 、 R_{77} 、 R_a 、 R_b 以及 R_8 係各自為氫；以及 R_9 係氫、 L3-C(O) 、或 A_2 。

【0104】 在一實施態樣中， L_1 係 C_{5-21} 烷基。在另一實施態樣中， L_1 係 C_{9-21} 烷基。在又一實施態樣中， L_1 係 C_{11-21} 烷基。在一例示性的實施態樣中， L_1 係 C_{11} 、 C_{13} 、 C_{15} 、 C_{17} 或 C_{19} 烷基。在一具體考量的實施態樣中， L_1 係 C_{15} 烷基。

【0105】 在一實施態樣中， L_1 係一 9-21 碳原子的直鏈。在一具體考量的實施態樣中， L_1 係直鏈 C_{15} 烷基。

【0106】 在一實施態樣中， m 係一 0 至 2 的整數。在另一實施態樣中， m 係 0 或 1。在一具體考量的實施態樣中， m 係 0。

【0107】 在一些實施態樣中， R_1 及 R_2 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫；或 R_1 係 L2-C(O)-OCH_2 。在一實施態樣中，在鄰近 L1-C(O)-O 之碳原子上的 R_1 係 L2-C(O)-OCH_2 。

【0108】 在一具體考量的實施態樣中， R_1 及 R_2 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫。

【0109】 在一實施態樣中， R_3 係氫或 L2-C(O)-OCH_2 。在一具體考量的實施態樣中， R_3 係氫。

【0110】 在一實施態樣中， L_2 係 C_{5-21} 烷基。在另一實施態樣中， L_2 係 C_{9-21} 烷基。在又一實施態樣中， L_2 係 C_{11-21} 烷基。在一例示性的實施態樣中， L_2 係 C_{11} 、 C_{13} 、 C_{15} 、 C_{17} 或 C_{19} 烷基。在另一例示性的實施態樣中， L_2 係 C_{15} 烷基。

【0111】 在一具體考量的實施態樣中， R_4 及 R_5 係各自為氫。

【0112】 在一具體考量的實施態樣中， n 係 1。

【0113】 在一具體考量的實施態樣中，R6 及 R7 係各自為氫。

【0114】 在一例示性的實施態樣中，R8 係氫。

【0115】 在一實施態樣中，R8 及 R9 係各自為氫；或 R9 係 L3-C(O)或 A2。在一例示性的實施態樣中，R8 係氫而且 R9 係 L3-C(O)。

【0116】 在一些實施態樣中，L3 係 C1-21 烷基。在一具體考量的實施態樣中，L3 係甲基或直鏈 C15 烷基。在一例示性的實施態樣中，L3 係甲基。

【0117】 熟習此項技術者將理解該式 (III) 及 (III A) 結構可包含該含胜肽的接合配偶體的一胜肽。如本文所描述，該胜肽可視需要經取代、修改或鍵結至如本文所描述的其他部分以提供該含胜肽的接合配偶體。

【0118】 在一實施態樣中，A1 係一包含一抗原決定位的胜肽。在一實施態樣中，A2 係一包含一抗原決定位的胜肽。

【0119】 在一些實施態樣中，A1 係一包含一胜肽抗原決定位的胜肽。在一些實施態樣中，A2 係一包含一胜肽抗原決定位的胜肽。在一實施態樣中，A1 係一胜肽，其中該胜肽係包含一胜肽抗原決定位。

【0120】 在另一實施態樣中，A2 係一胜肽，其中該胜肽係包含一胜肽抗原決定位。

【0121】 在一實施態樣中，A1 係一經抗原決定位取代的胜肽。在一實施態樣中，A2 係一經抗原決定位取代的胜肽。

【0122】 在一實施態樣中，該抗原決定位係經由一連結基團而鍵結至該胜肽。

【0123】 在一實施態樣中，該抗原決定位係一胜肽抗原決定位。

【0124】 在一些實施態樣中，A1 及／或 A2 係各自獨立為一包含約 8 至 220、8 至 200、8 至 175、8 至 150、8 至 125、8 至 100、8 至 90、8 至 80、8 至 70、8 至 60、8 至 50、8 至 40、8 至 30、8 至 25、8 至 20 或 8 至 15 個胺基酸的胜肽。在一例示性的實施態樣中，A1 及 A2 係各自獨立為一包含約 8 至 60 個胺基酸的胜肽。

【0125】 在另一實施態樣中，A1 及／或 A2 係各自獨立為一包含約 5 至 150、5 至 125、5 至 100、5 至 75、5 至 60、5 至 50、5 至 40、5 至 30、5 至 25、5 至 20、8 至 150、8 至 125、8 至 100、8 至 75、8 至 60、8 至 50、8 至 40、8 至 30、8 至 25、或 8 至 20 個胺基酸的胜肽。

【0126】 在一些實施態樣中，A1 及／或 A2 係各自獨立為一胜肽，其中該胜肽係包含 8 至 60 個胺基酸。

【0127】 在一些實施態樣中，A1 及／或 A2 係各自獨立為一包含或經一胜肽抗原決定位取代的胜肽，其中該胜肽抗原決定位係包含 8 至 60 個胺基酸。

【0128】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫或 L2-C(O)-OCH₂；L2 係 C11-21 烷基；而且 R4 及 R5 係各自為氫。

【0129】 在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；及 R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；及 R9 係氫或 L3-C(O)。在一實施態樣中，L3 係甲基或直鏈 C15 烷基。

【0130】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫或 L2-C(O)-OCH₂；L2 係 C11-21 烷基；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。
在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫或 L2-C(O)-OCH₂；L2 係 C11-21 烷基；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫或 L3-C(O)。

【0131】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；而且 R4 及 R5 係各自為氫。

【0132】 在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；及 R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；及 R9 係氫或 L3-C(O)。在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；及 R9 係氫或 L3-C(O)，其中 L3 係甲基。

【0133】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫或 L3-C(O)。

【0134】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫或 L3-C(O)，其中 L3 係甲基。

【0135】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；而且 R4 及 R5 係各自為氫。

【0136】 在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為

氫；及 R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；及 R9 係氫或 L3-C(O)。在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；及 R9 係氫或 L3-C(O)，其中 L3 係甲基。

【0137】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫或 L3-C(O)。

【0138】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫或 L3-C(O)，其中 L3 係甲基。

【0139】 在一些實施態樣中，A1 係一包含以絲胺酸作為第一 N 端之胺基酸殘基的胜肽。在一些實施態樣中，A1 及／或 A2 係一包含增溶性基團的胜肽。在一些實施態樣中，該增溶性基團係包含一胜肽鏈中包含二或多個親水性胺基酸殘基的胺基酸序列。在特定實施態樣中，A1 係包含一增溶性基團的胜肽，該基團係包含一在該胜肽鏈中包含二或多個親水性胺基酸殘基的胺基酸序列。

【0140】 在一些實施態樣中，A1 係一胜肽，包含以絲胺酸作為第一 N 端之胺基酸殘基以及一包含一胺基酸序列之增溶性基團，該序列於鄰近該絲胺酸之胜肽鏈中包含二或多個親水性胺基酸殘基。

【0141】 在一些實施態樣中，該增溶性基團係包含一胜肽鏈

中包含二或多個連續親水性胺基酸殘基的胺基酸序列。

【0142】 在一實施態樣中，該親水性胺基酸殘基係陽離子胺基酸殘基。在一實施態樣中，該陽離子胺基酸殘基係精胺酸或絲胺酸殘基。在一具體考量的實施態樣中，該陽離子胺基酸殘基係絲胺酸殘基。在一實施態樣中，該序列係包含 2 至 20、2 至 15、2 至 10、3 至 7、或 3 至 5 個胺基酸。在一實施態樣中，該增溶性基團係一三 (tri-)、四 (tetra-)、五 (penta-)、六 (hexa-)、或七 (hepta-) 離胺酸序列，在一具體考量的實施態樣中，該增溶性基團係四離胺酸。

【0143】 在一些實施態樣中，R9 係氫、一胺基保護基團或一 L3-C(O)。在一些實施態樣中，R9 係氫或 L3-C(O)。

【0144】 在一些實施態樣中，R9 係氫或一胺基保護基團，且該方法更包含醯化該胺基酸接合物或胜肽接合物，從而以 L3-C(O) 取代 R9 上的氫或胺基保護基團。在一些實施態樣中，醯化該胺基酸接合物或胜肽接合物，從而以 L3-C(O) 取代 R9 上的胺基保護基團，包含移除在 R9 上的胺基保護基團以在 R9 上提供一氫。

【0145】 在一些實施態樣中，A1 及／或 A2 係一胺基酸或一胜肽。在一些實施態樣中，A1 及／或 A2 係一胜肽。

【0146】 在一些實施態樣中，A1 係 OH 或 OP1 及／或 R9 係氫、一胺基保護基團或 L3-C(O)。在一些實施態樣中，A1 係 OP1 或 OH 及／或 R9 係氫、一胺基保護基團或 L3-C(O)。在一些實施態樣中，A1 係 OP1 或 OH 且 R9 係氫、一胺基保護基團或 L3-C(O)。

【0147】 在一些實施態樣中，A1 係 OP1 或 OH 及／或 R9 係氫、一胺基保護基團或 L3-C(O)，且該方法包含耦合一胺基酸或

一胜肽，從而以該胺基酸或胜肽取代 A1 及／或 R9。

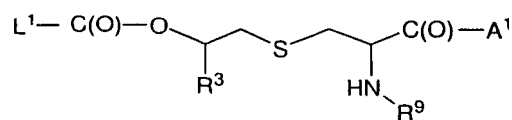
【0148】 在一些實施態樣中，A1 係 OP1 或 OH 且 R9 係氫、一胺基保護基團或 L3-C(O)，且該方法更包含耦合一胺基酸或一胜肽，從而以該胺基酸或胜肽取代 A1 及／或 R9。

【0149】 在一些實施態樣中，耦合一胜肽係包含獨立耦合一或多個胺基酸及／或一或多個胜肽。

【0150】 在一些實施態樣中，耦合胺基酸或胜肽提供一包含一胜肽抗原決定位的胜肽接合物。在一些實施態樣中，耦合該胺基酸或胜肽以提供一含有一連結基團或其一或多個胺基酸的胜肽接合物。在一些實施態樣中，耦合該胺基酸或胜肽提供一包含一胜肽抗原決定位的胜肽接合物，該胜肽抗原決定位係鍵結至其中含脂質的接合配偶體經由一連結基團而與其接合的胺基酸。

【0151】 在一些實施態樣中，該胺基保護基團係三級丁基氧羰基 (tert-butyloxycarbonyl, Boc)、氯甲酸 9H-芴-9-基甲基酯 (chloroformic acid 9H-fluoren-9-ylmethyl ester, Fmoc)、苄氧羰基 (carboxybenzyl, Cbz)、鄰-或對-硝基苯基磺醯基 (o- or p-nitrophenylsulfonyl, Nosyl)、2-(4-聯苯基)異丙氧基羰基 (2-(4-biphenyl) isopropoxycarbonyl, Bpoc) 及 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亞己基乙基)(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo hexylidene)ethyl, Dde)。在一些實施態樣中，該胺基保護基團係 Boc 或 Fmoc。

【0152】 在一些實施態樣中，該羰基保護基團係三級丁基或苄基。在一實施態樣中，該式 (I) 的化合物係一式 (IV) 化合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(IV)

其中，

R³ 係氫或 L²-C(O)-OCH₂；

R⁹ 係氫、胺基保護基團、L³-C(O)、或 A²；以及

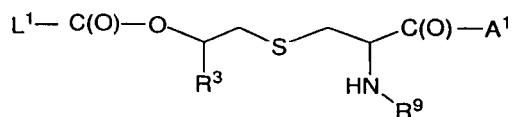
L¹ 及 L² 係各自獨立為 C₅-21 烷基或 C₄-20 雜烷基；

L³ 係 C₁-21 烷基或 C₄-20 雜烷基；

A¹ 及 A² 係各自獨立為胺基酸或胜肽；或 A¹ 係 OH 或 OP₁，

其中 P₁ 係一羧基保護基團。

【0153】 在一實施態樣中，該式 (I) 化合物係一式 (IV) 化合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(IV)

其中，

R³ 係氫或 L²-C(O)-OCH₂；

R⁹ 係氫、L³-C(O)、或 A²；及

L¹ 及 L² 係各自獨立為 C₅-21 烷基或 C₄-20 雜烷基；

L³ 係 C₁-21 烷基或 C₄-20 雜烷基；

A¹ 及 A² 係各自獨立為胜肽；或 A¹ 係 OH；

條件為：

當 R9 不為 A2 時，A1 係一胜肽。

【0154】 在一實施態樣中，式 (IV) 之化合物的 L1、A1、A2、L2 及 L3 係各自獨立如在關於式 (I) 化合物之任何實施態樣中所定義者。

【0155】 在一具體考量的實施態樣中，R3 係氫。

【0156】 在另一具體考量的實施態樣中，R9 係乙醯基。

【0157】 在另一具體考量的實施態樣中，R3 係氫且 R9 係乙醯基。

【0158】 在一些實施態樣中，該方法係用於製造式 (IV) 的一化合物，其中 L1 係 C15 直鏈烷基，R3 係氫，R9 係 Fmoc，且 A1 係 OH，且該方法包含使軟酯酸乙烯酯 (vinyl palmitate) 與 Fmoc-半胱氨酸-OH (Fmoc-Cys-OH) 反應。

【0159】 在一些實施態樣中，該胺基保護基團不是 Fmoc。在一些實施態樣中，該胺基保護基團係 Boc。

【0160】 在一些實施態樣中，該包含胺基酸之接合配偶體不是 Fmoc-Cys-OH。

【0161】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物係包含 3 或更多個、4 或更多個、或 5 或更多個連續胺基酸。在一些實施態樣中，式 (I) 化合物係包含 3 或更多個、4 或更多個、或 5 或更多個連續胺基酸。

【0162】 在一實施態樣中，該有效於使該含脂質的接合配偶體與該包含胺基酸的接合配偶體接合的條件係包含產生一或多個自由基。在一實施態樣中，該有效於使該含脂質的接合配偶體與該含胜肽的接合配偶體接合的條件係包含產生一或多個自由基。

【0163】 在一些實施態樣中，產生一或多個自由基係由熱及／或光化學來引發。在特定實施態樣中，產生一或多個自由基係由自由基引發劑的熱及／或光化學降解來引發。在例示性實施態樣中，產生一或多個自由基係由一熱引發劑的熱降解或一光化學引發劑的光化學降解來引發。

【0164】 在一些實施態樣中，自由基引發劑的熱降解係包含在一合適的溫度下加熱該反應混合物。在一些實施態樣中，該反應混合物係在約 40°C 至約 200°C、約 50°C 至約 180°C、約 60°C 至約 150°C、約 65°C 至約 120°C、約 70°C 至約 115°C、約 75°C 至約 110°C、或約 80°C 至約 100°C 的溫度加熱。在其他的實施態樣中，該反應混合物係在至少約 40°C、至少約 50°C、至少約 60°C、或者至少約 65°C 的溫度加熱。在一具體考量的實施態樣中，該反應混合物係在約 90°C 的溫度加熱。

【0165】 在一些實施態樣中，該自由基引發劑的光化學降解係包含以紫外光照射。在一具體考量的實施態樣中，該紫外光係具有約 365 奈米的波長。在例示性的實施態樣中，該自由基引發劑的光化學降解係在約環境溫度下進行。

【0166】 在一具體考量的實施態樣中，該熱引發劑係 2,2'-偶氮二異丁腈 (2,2'-azobisisobutyronitrile, AIBN)。在一具體考量的實施態樣中，該光引發劑係 2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮 (2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone, DMPA)。

【0167】 在特定實施態樣中，該反應係在一液體介質中進行。在一實施態樣中，該液體介質係包含一溶劑。在一實施態樣中，該溶劑係選自以下所組成的群組：N-甲基吡咯烷酮

(N-methylpyrrolidone, NMP)、二甲基亞砜 (DMSO)、N,N-二甲基甲醯胺 (N,N-dimethylformamide, DMF)、二氯甲烷 (DCM)、1,2-二氯乙烷及其混合物。在一具體考量的實施態樣中，該溶劑係包含 NMP、DMSO 或其混合物。

【0168】 在一具體考量的實施態樣中，該溶劑係包含 DMSO。

【0169】 在一些實施態樣中，該反應係在一或多個抑制二聚化反應 (dimerisation)、調聚反應 (telomerisation)、或聚合反應之添加物存在下進行。在一些例示性的實施態樣中，該添加物劑係選自以下所組成的群組：麩胺基硫 (glutathione, GSH)、2,2'-(亞乙基二氧基)二乙硫醇 (2,2'-(ethylenedioxy) di ethanethiol, DODT)、1,4-二硫蘇糖醇 (1,4-dithiothreitol, DTT)、及蛋白質。在一具體考量的實施態樣中，該添加物係 DTT。在一些實施態樣中，該添加物係 DTT 或三級丁基硫醇 (*tert*-butyl mercaptan)。

【0170】 在一些實施態樣中，該一或多個添加物係選自以下所組成的群組：三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA)、三級丁基硫醇、及其組合物。在特定實施態樣中，該一或多個添加物係 TFA 及三級丁基硫醇的組合物。在一些實施態樣中，該反應係進行約 5 分鐘至約 48 小時、5 分鐘至約 24 小時、約 5 分鐘至約 12 小時、5 分鐘至約 6 小時、約 5 分鐘至約 3 小時、約 5 分鐘至約 2 小時、或約 5 分鐘至約 1 小時的時間。在例示性的實施態樣中，該反應係進行約 5 分鐘至約 1 小時。在一些實施態樣中，該反應係進行直到接合配偶體之一者的至少約 70%、80%、90%、95%、97%、99% 或 100% 被消耗。

【0171】 在特定實施態樣中，該反應係在實質上不含氧的條

件下進行。

【0172】 在部分實施態樣中，該方法係包含：

反應該含脂質的接合配偶體以及一包含胺基酸的接合配偶體以提供一胺基酸接合物或胜肽接合物；

藉由固相胜肽合成（SPPS）合成一胜肽的胺基酸序列；

藉由 SPPS 耦合該胺基酸接合物的胺基酸或該胜肽接合物的一胺基酸至鍵結於固相的胜肽，以提供一包含一胜肽抗原決定位的胜肽接合物、一包含一連結基團或其一或多個胺基酸的胜肽接合物、或者一包含一胜肽抗原決定位的胜肽接合物，其中該胜肽抗原決定位係鍵結至一經由一連結基團與含脂質接合配偶體接合的胺基酸。

【0173】 在一些實施態樣中，該方法更包含醃化該胺基酸接合物之該胺基酸的 $N\alpha$ -基團，或醃化任一與胜肽接合物之含脂質接合配偶體接合的胺基酸。

【0174】 在一些實施態樣中，該方法包含自固相支持體（support）分割（cleaving）該胜肽接合物。

【0175】 在一些實施態樣中，該方法包含

藉由固相胜肽合成（SPPS）合成該含胜肽的接合配偶體之胜肽的胺基酸序列；以及

根據本文所描述之任何實施態樣，將該含脂質的接合配偶體與含胜肽的接合配偶體反應。

【0176】 在例示性的實施態樣中，該方法包含

藉由 SPPS 合成該含胜肽的接合配偶體之胜肽的胺基酸序列，自該固相支持體分割該胜肽；以及

根據本文所描述之任何實施態樣，將該含脂質的接合配偶體與含胜肽的接合配偶體反應。

【0177】 在一實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體在與該含脂質的接合配偶體反應之前未經純化。

【0178】 在一些實施態樣中，在自該固相支持體分割胜肽時移除一或多個保護基團。在特定實施態樣中，存在該胜肽的該所有保護基團皆被移除。

【0179】 在一實施態樣中，該 SPPS 係 Fmoc-SPPS。

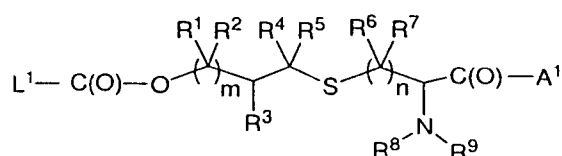
【0180】 在一些實施態樣中，該具有待反應之碳-碳雙鍵或硫醇基之含胜肽的接合配偶體之胜肽中的胺基酸殘基，係一 N-端胺基酸殘基，且該方法係包含自該固相分割該胜肽之前醃化該 N-端胺基。在例示性的實施態樣中，該胺基酸殘基係一 N-端殘基。在具體考量的實施態樣中，該 N-端殘基係一半胱胺酸殘基。

【0181】 在一實施態樣中，該方法更包含自該反應介質中分割該胜肽接合物，並視需要純化該胜肽接合物。

【0182】 在另一方面，本發明係提供一種經由本發明方法製造的胺基酸接合物或胜肽接合物。

【0183】 在另一方面，本發明係提供一種經由本發明方法製造的胜肽接合物。

【0184】 在另一方面，本發明係提供一種式 (V) 化合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(V)

其中，

m係一0至4的整數；

n係1或2；

R1及R2在m的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；

R3、R4、R5、R8及R9係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；或者R9係胺基保護基團、L3-C(O)、或A2；

R6及R7在n的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基，

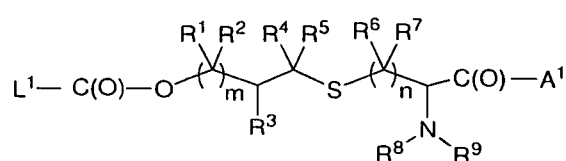
L1係C5-21烷基或C4-20雜烷基；

L3係C1-6烷基或C3-6環烷基；

A1及A2係各自獨立為胺基酸或胜肽；或者A1係OH或OP1，其中P1係一羧基保護基團；

其中存在於R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1及L3中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0185】 在另一方面，本發明係提供一種式(V)化合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(V)

其中，

m係一0至4的整數；

n係1或2；

R1及R2在m的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；

R3、R4、R5、R8及R9係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基；或者R9係胺基保護基團、L3-C(O)、或A2；

R6及R7在n的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6烷基、或C3-6環烷基，

L1係C5-21烷基或C4-20雜烷基；

L3係C1-6烷基或C3-6環烷基；

A1及A2係各自獨立為胜肽；或者A1係OH；

條件為：

A1及A2之至少一者係包含一抗原決定位；及

當R9不為A2時，A1係一胜肽；及

其中存在於 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1 及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基係視需要經取代。

【0186】 在一實施態樣中，m、n、R6、R7、A1 及 A2 係各自獨立為如關於式 (I) 化合物的任何實施態樣所定義者。

【0187】 在一實施態樣中，L1 係 C5-21 烷基。在一實施態樣

中，L1 係 C5-21 烷基。在另一實施態樣中，L1 係 C9-21 烷基。在另一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基。在一例示性的實施態樣中，L1 係 C11、C13、C15、C17、或 C19 烷基。在一具體考量的實施態樣中，L1 係 C15 烷基。

【0188】 在一實施態樣中，L1 包含 9-21 碳原子的一直鏈。在一具體考量的實施態樣中，L1 係直鏈 C15 烷基。

【0189】 在一實施態樣中，m 係 0 至 2 的一整數。在另一實施態樣中，m 係 0 或 1。在一具體考量的實施態樣中，m 係 0。

【0190】 在一具體考量的實施態樣中，R1 及 R2 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫。

【0191】 在一具體考量的實施態樣中，R3 係氫。

【0192】 在一具體考量的實施態樣中，R4 及 R5 係各自為氫。

【0193】 在一具體考量的實施態樣中，n 係 1。

【0194】 在一具體考量的實施態樣中，R6 及 R7 係各自為氫。

【0195】 在例示性的實施態樣中，R8 係氫。

【0196】 在一些實施態樣中，R8 係氫及 R9 係氫、一胺基保護基團、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，R8 及 R9 係各自為氫；或 R9 係 L3-C(O)或 A2。在一例示性的實施態樣中，R8 係氫而且 R9 係 L3-C(O)。在一具體考量的實施態樣中，L3 係甲基。

【0197】 在一些實施態樣中，A1 係 OP1 或 OH，且 R9 係氫、一胺基保護基團或 L3-C(O)。

【0198】 在一些實施態樣中，A1 及／或 A2 係一胺基酸或一胜肽。在一些實施態樣中，該胜肽係包含一抗原決定位。

【0199】 在一些實施態樣中，A1 係絲胺酸或一包含絲胺酸做

為第一 N 端之胺基酸殘基的胜肽。

【0200】 在一些實施態樣中 A1 及／或 A2 係一包含一含一胺基酸序列之增溶性基團的胜肽，該胺基酸序列係包含二或多個親水性胺基酸殘基在該胜肽鏈中。

【0201】 在一些實施態樣中，A1 係一胜肽，包含絲胺酸做為第一 N 端之胺基酸殘基，以及一增溶性基團在鄰近該絲胺酸之胜肽鏈中包含一包含二或多個親水性胺基酸殘基的胺基酸序列。

【0202】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；且 R4 及 R5 係各自為氫。

【0203】 在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；且 R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；且 R9 係氫或 L3-C(O)。在一實施態樣中，n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；且 R9 係氫或 L3-C(O)，其中 L3 係甲基。

【0204】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫、L3-C(O)、或 A2。在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫或 L3-C(O)。

【0205】 在一實施態樣中，L1 係 C11-21 烷基；m 係 0；R3 係氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係 1；R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係氫或 L3-C(O)，其中 L3 係甲基。

【0206】 在一些實施態樣中，L1 係 C15 直鏈烷基；m 係 0；n 係 1；R3、R4、R5、R6、R7、及 R8 係各自為氫；R9 係 Fmoc，

且在式 (V) 的化合物中的 A1 係 OH。

【0207】 在一些實施態樣中，R9 的該胺基保護基團不是 Fmoc。在一些實施態樣中，R9 的胺基保護基團係 Boc。

【0208】 在一些實施態樣中，式 (V) 的化合物係包含 3 或更多個、4 或更多個或 5 或更多個連續性胺基酸。

【0209】 在一些實施態樣中，該胺基保護基團及／或羰基保護基團係如關於式 (I) 化合物的任何實施態樣所定義者。

【0210】 熟習此項技術者將理解式 (V) 的化合物係一胜肽接合物，且本文描述之關於該接合方法之該胜肽接合物的特定實施態樣也適用於式 (V) 的化合物。

【0211】 在一些實施態樣中，式 (V) 的化合物係一自佐劑胜肽 (self adjuvanting peptide)。

【0212】 在一些實施態樣中，該化合物係包含一連結體 (linker) 或其一或多個胺基酸。在一些實施態樣中，該胜肽係包含一連結體或其一或多個胺基酸。在一些實施態樣中，該胜肽係包含一經由一連結體鍵結至 L1 所鍵結之胺基酸的胜肽抗原結合位。在一些實施態樣中，該胜肽係包含二或多個抗原決定位。在一些實施態樣中，該胜肽係包含一胜肽抗原。在一些實施態樣中，該連結體係一胺基酸序列，長度為約 2 至 20、2 至 18、2 至 16、2 至 14、2 至 12、2 至 10、或 2 至 8 個胺基酸。

【0213】 在另一方面，本發明係提供一經單離、純化、或重組的胜肽，包含或者由 20 個或更多個來自 SEQ ID NOs 1-5、8-12、或 14-18 之任一胺基酸序列之連續性胺基酸所組成。

【0214】 在一實施態樣中，該胜肽係包含一胺基酸序列、或

實質上由或由該胺基酸序列所組成，該胺基酸序列係選自由 SEQ ID NOs 1-5、8-12、或 14-18 所組成的群組。

【0215】 在一實施態樣中，該胜肽係包含一胺基酸序列、或實質上由或由該胺基酸序列所組成，該胺基酸序列係選自 SEQ ID NOs 4、5、11、12、17、及 18 所組成的群組。

【0216】 在另一方面，本發明係提供一種醫藥組合物，包含有效量之本發明胜肽接合物或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物，及一醫藥上可接受之載體。

【0217】 在一實施態樣中，該醫藥組合物係一免疫性的組合物。

【0218】 在一實施態樣中，該組合物並不包括一外部佐劑。

【0219】 在一些實施態樣中，該組合物係一疫苗。

【0220】 在一實施態樣中，該醫藥組合物係包含有效量之二或多個本發明胜肽接合物，例如該醫藥組合物係包含有效量之三或多個本發明胜肽接合物。

【0221】 在另一方面，本發明係提供一種醫藥組合物，包含有效量之本發明胜肽或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物，及一醫藥上可接受的載體。

【0222】 在一實施態樣中，該醫藥組合物係包含有效量之二或多個本發明胜肽，例如該醫藥組合物係包含有效量之三或多個本發明胜肽。

【0223】 在一實施態樣中，該醫藥組合物係包含有效量之一或多個本發明胜肽接合物，以及一或多個本發明胜肽，或其任意組合。舉例言之，該醫藥組合物係包含有效量之二或多個本發明

胜肽接合物及一或多個本發明胜肽，或有效量之一或多個本發明胜肽接合物及二或多個本發明胜肽。

【0224】 在另一方面，本發明係提供一種在一個體中接種或引發免疫反應的方法，包含投予該個體有效量之本發明胜肽接合物或胜肽。

【0225】 在另一方面，本發明係提供本發明胜肽接合物或胜肽在一個體中接種或引發免疫反應的用途。

【0226】 在另一方面，本發明係提供本發明胜肽接合物或胜肽於製造一用於在一個體中接種或引發免疫反應之藥劑的用途。

【0227】 在另一方面，本發明係提供一種在一個體中接種或引發一免疫反應的方法，包含投予該個體有效量之本發明醫藥組合物。

【0228】 在另一方面，本發明係提供使用本發明醫藥組合物於一個體中接種或引發免疫反應。

【0229】 在另一方面，本發明係提供使用一或多個本發明胜肽或一或多個本發明胜肽接合物於製造一用於在一個體中接種或引發免疫反應之藥劑的用途。

【0230】 在另一方面，本發明係提供一種在一個體中引發免疫反應的方法，包含投予該個體有效量之本發明胜肽接合物或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物。

【0231】 在另一方面，本發明係提供使用本發明胜肽或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物於一個體中引發免疫反應的用途。

【0232】 在另一方面，本發明係提供使用本發明胜肽接合物或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物於製造一於一個體中引發免疫

反應之藥劑的用途。

【0233】 在另一方面，本發明係提供一種接種一個體的方法，包含投予該個體有效量之本發明胜肽接合物或其藥學可接受之鹽或溶劑化物。

【0234】 在另一方面，本發明係提供使用本發明胜肽接合物、其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物於接種一個體的用途。

【0235】 在另一方面，本發明係提供使用本發明胜肽接合物或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物於製造一用於接種一個體之藥劑的用途。

【0236】 在一些實施態樣中，該方法係包含投予一或多個本發明胜肽及／或一或多個本發明胜肽接合物，例如一或多個胜肽組合一或多個胜肽接合物至該個體。

【0237】 在一些實施態樣中，一或多個本發明胜肽或一或多個本發明胜肽接合物，例如一或多個胜肽組合一或多個胜肽接合物係用於在該個體中接種或引發免疫反應，或用於製造一在該個體中接種或引發免疫反應的藥劑。

【0238】 在一些實施態樣中，係使用或投予二或多個胜肽、二或多個胜肽接合物、或一或多個胜肽及一或多個胜肽接合物。在一些實施態樣中，係同時、依序、或分開使用或投予二或多個胜肽、二或多個胜肽接合物、或一或多個胜肽及一或多個胜肽接合物。

【0239】 不對稱中心可存在於本文所描述的化合物中。該不對稱中心可稱為(R)或(S)，取決於取代基在對掌性碳原子(chiral carbon atom)中三度空間中的構形。所有該等化合物的立體化學

異構物，包括非對映異構物（diastereomeric）、鏡像異構物、及差向異構物（epimeric forms）、以及 d-異構物及 l-異構物、及前述之混合物，包括富含對映異構物（enantiomerically）及富含非對映異構物之立體化學異構物的混合物，均在本發明的範圍內。

【0240】 個別的對映異構物可從商購的映純（enantiopure）起始物料合成製備或由製備對映異構物混合物並分解該混合物成個別的對映異構物來製備。分解方法包括，轉換該對映異構物混合物成非對映異構物的混合物，並分離該非對映異構物，藉由例如，再結晶或色層分析、及任何其他該技術領域中已知的合適的方法。具經定義之立體化學的起始物料可為商購或製得且，如果需要，可由業界已知的技術來分解。

【0241】 本文所描述的化合物可以構形或幾何異構物存在，包括順式（cis）、反式（trans）、同向（syn）、異向（anti）、對面（entgegen，E）、及共同（zusammen，Z）異構物。所有此等異構物及其任何混合物皆在本發明的範圍內。

【0242】 所描述之化合物的任何互變異構物（tautomeric isomers）或其混合物也在本發明範圍內。如熟習此項技術者可理解，眾多官能基及其他結構係可呈現互變異構性（tautomerism）。例子包括，但不限於，酮基／醯醇互變異構性、亞胺／烯胺互變異構性、及硫酮／烯硫醇（enethiol）互變異構性。

【0243】 本文所描述的化合物亦可以同位素分子（isotopologues）及同位素的同分異構體（isotopomers）存在，其中化合物中的一或多個原子係經不同的同位素所取代。合適的同位素包括，例如 ^1H 、 ^2H （D）、 ^3H （T）、 ^{12}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{16}O 、及

^{18}O 。用於將此等同位素併至本文所描述該化合物中的程序，對於熟習此項技術者係明顯的。本文所描述化合物之同位素分子及同分異構體也在本發明的範圍內。

【0244】 亦在本發明範圍內者為本文所描述化合物之醫藥上可接受鹽及溶劑化物，包括水合物。此等鹽包括，酸加成鹽（acid addition salts）、鹼加成鹽（base addition salts）、及鹼性含氮基團的四級鹽。

【0245】 酸加成鹽可經由反應游離鹼形式的化合物與無機或有機酸來製備。無機酸的例子包括，但不限於，氯化氫、溴化氫、硝酸、硫酸及磷酸。有機酸的例子包括，但不限於，乙酸、三氟乙酸、丙酸、丁二酸、乙醇酸、乳酸、羥基丁二酸、酒石酸、檸檬酸、抗壞血酸、馬來酸、丁烯二酸、丙酮酸、天冬胺酸、麩胺酸、硬脂酸、水楊酸、甲磺酸、苯磺酸、2-羥乙磺酸、對胺苯磺酸、己二酸、丁酸、及三甲基乙酸。

【0246】 鹼加成鹽可經由反應游離酸形式的化合物與無機或有機鹼來製備。無機鹼加成鹽的例子包括，但不限於，鹼金屬鹽、鹼土金屬鹽、及其他生理可接受金屬鹽，例如，鋁、鈣、鋰、鎂、鉀、鈉、或鋅鹽。有機鹼加成鹽的例子包括，但不限於，胺鹽，例如，三甲胺、二乙胺、乙醇胺、二乙醇胺、及乙二胺的鹽。

【0247】 化合物中的鹼性含氮基團的四級鹽可經由，例如，反應該化合物與鹵化烷（例如甲基、乙基、丙基、及丁基氯化物、溴化物及碘化物；二烷基硫酸鹽，例如二甲基、二乙基、二丁基、及二戊基硫酸鹽；及其類似物）來製備。

【0248】 用於本文所述式中的一般化學術語係具有他們的通

常意義。

【0249】 術語「脂肪族 (aliphatic)」係欲包括飽和及未飽和、非芳香族、直鏈、側鏈、非環狀、及環狀烴類。熟習此項技術者可理解脂肪族基團包括，例如，烷基、烯基、炔基、環烷基、及環烯基。在一些實施態樣中，該脂肪族基團係飽和的。

【0250】 術語「雜脂肪族 (heteroaliphatic)」係欲包括脂肪族基團，其中一或多個鏈碳原子係經一雜原子所取代。在一些實施態樣中，該雜脂肪族係飽和的。

【0251】 術語「烷基」係欲包括飽和或未飽和直鏈及側鏈烴基。飽和烴基的例子包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、三級丁基、異丁基、二級丁基、及其類似物。未飽和烷基具有一或多個碳-碳雙鍵或三鍵。未飽和烷基的例子包括乙烯基、丙-2-烯基 (prop-2-enyl)、巴豆基 (crotyl)、異戊-2-烯基 (isopent-2-enyl)、2-丁二烯基 (2-butadienyl)、戊-2,4-二烯基 (penta-2,4-dienyl)、戊-1,4-二烯基 (penta-1,4-dienyl)、乙炔基、丙-3-炔基 (prop-3-ynyl)、丁-3-炔基 (but-3-ynyl)、及其類似物。在一些實施態樣中，該烷基係飽和的。

【0252】 術語「雜烷基 (heteroalkyl)」係欲包括烷基，其中一或多個碳鏈原子係經雜原子所取代。在一些實施態樣中，該雜烷基係飽和的。

【0253】 術語「環烷基」係欲包括非芳香環烷基 (non-aromatic cyclic alkyl groups)。環烷基的例子包括，但不限於環戊基、環己基、環己-1-烯基 (cyclohex-1-enyl)、環己-3-烯基、環庚基。在一些實施態樣中，該環烷基係飽和的。

【0254】 術語「雜原子 (heteroatom)」係欲包括氧、氮、硫、或磷。在一些實施態樣中，該雜原子係選自以下所組成的群組：氧、氮、及硫。

【0255】 術語「芳基 (aryl)」係欲包括芳香族自由基 (aromatic radical)。例子包括，但不限於，苯基、甲苯基 (tolyl)、萘基、二氫茚基、及其類似物。在一些實施態樣中，芳基係在芳香環系統中包含 4 至 8 個或 6 至 8 個碳原子。

【0256】 如本文所使用，術語「經取代」係欲指在所指出的基團中的一或多個氫原子係經一或多個獨立選定的合適的取代基所取代，條件為不超過取代基所附之各原子的正常價位 (valency)，以及該取代係產生一穩定化合物。

【0257】 本文描述之化合物中的脂肪族、雜脂肪族、烷基、雜烷基、及環烷基之視需要取代基的例子係包括但不限於，鹵基、CN、NO₂、OH、NH₂、NHR₁、NR₁R₂、C1-6 鹵烷基、C1-6 鹵烷氧基、C(O)NH₂、C(O)NHR₁、C(O)NR₁R₁、SO₂R₁、OR₁、SR₁、S(O)R₁、C(O)R₁、及 C1-6 脂肪族基；其中 R₁ 及 R₂ 係各自獨立為 C1-6 烷基。

【0258】 本文所使用的術語「羰基保護基團」係表示一基團，其在合成程序中能易於被去除以提供一羰基的 OH 基團並保護該羰基免於不欲的反應。此等保護基團係描述於由 T. W. Greene 等人所編纂的 *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley & Sons, 1999) 及 'Amino Acid-Protecting Groups' by Fernando Albericio (with Albert Isidro-Llobet and Mercedes Alvarez) *Chemical Reviews* 2009 (109) 2455-2504。例子包括，但不限於烷基及矽烷

基 (silyl group)，舉例言之，甲基、乙基、三級丁基、甲基氧甲基 (methoxymethyl)、2,2,2-三氯乙基 (2,2,2-trichloroethyl)、苯甲基、二苯甲基、三甲基矽烷基、及三級丁基二甲矽烷基 (*tert*-butyldimethylsilyl)、及其類似物。

【0259】 本文所使用的術語「胺基保護基團」係指一基團，其在合成程序中能夠易於被去除以提供一胺基的 NH_2 基團並保護胺基免於不欲的反應。此等保護基團係描述於由 T. W. Greene 等人所編纂的 *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley & Sons, 1999) 及 'Amino Acid-Protecting Groups' by Fernando Albericio (with Albert Isidro-Llobet and Mercedes Alvarez) *Chemical Reviews* 2009 (109) 2455-2504。例子包括，但不限於，醯基及醯氧基，例如乙醯基、氯乙醯基 (chloroacetyl)、三氯乙醯基 (trichloroacetyl)、鄰-硝基乙醯基 (o-nitrophenylacetyl)、鄰-硝基苯氧基乙醯基 (o-nitrophenoxy-acetyl)、三氟乙醯基 (trifluoroacetyl)、乙醯乙醯基、4-氯丁醯基 (4-chlorobutyryl)、異丁醯基、吡啶甲基 (picolinoyl)、胺基己醯基 (aminocaproyl)、苯甲醯基、甲氧-羰基 (methoxy-carbonyl)、9-芴基甲氧基羰基 (9-fluorenylmethoxycarbonyl)、2,2,2-三氟乙氧基羰基 (2,2,2-trifluoroethoxycarbonyl)、2-三甲基甲矽烷基-羰基 (2-trimethylsilylethoxy-carbonyl)、三級丁基氧羰基 (*tert*-butoxycarbonyl)、苯甲氧羰基 (benzyloxycarbonyl)、對-硝基苄氧基羰基 (p-nitrobenzyloxycarbonyl)、2,4-二氯苄氧基羰基 (2,4-dichloro-benzyloxycarbonyl)、及其類似物。更多的例子包括 Cbz (苄氧羰基 (carboxybenzyl))、Nosyl (鄰-或對-硝基苯基磺酰

基 (o- or p-nitrophenylsulfonyl))、Bpoc (2- (4-聯苯基) 異丙氧基羰基 (2-(4-biphenyl)isopropoxycarbonyl))、及 Dde (1-(4,4-二甲基 -2,6- 二 氧 代 亞 己 基) 乙 基 (1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxohexylidene)ethyl))。

【0260】 當使用於本文，術語「及／或」係意指「及」，或者「或」，或二者。

【0261】 名詞術語的「複數形式 (s)」係考量為單數或複數形式，或二者。

【0262】 本說明書所使用的用語「包含」係意指「至少部分由以下所組成」。當解釋本說明書中每一個包括用語「包含」的陳述時，也可存在由該用語所呈現的該或該等特徵以外的特徵。相關的用語例如「包含 (comprise)」及「包含 (comprises)」係以相同方式解釋。「含有 (containing)」亦以相同方式解釋。

【0263】 本發明也可以廣義的說係單獨或整體地在於本申請案說明書中所引述或指出的部分、元件或特徵，在於所述部分、元件或特徵之任一或二或多者的所有組合，其中本文所特別提及的整數，其係具有與本發明相關技術領域中已知的均等物 (equivalents)，此已知的均等物係被視為併入本文，如同單獨闡述。

【0264】 此處所揭露一範圍之數字 (例如，1 至 10) 的引述係意指亦併含對於在該範圍內的所有有理數 (例如，1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9、及 10) 以及在該範圍內的有理數的任何範圍 (例如，2 至 8、1.5 至 5.5、及 3.1 至 4.7) 的引述，且因此，所有本文所揭露之範圍的所有子範圍係在此被明確揭露。

這些僅是特別想要的例子，且所有介於所列舉之最低及該最高數值的可能的數值組合係被理解為於本說明書中以類似方法被明確陳述。

【0265】 儘管本發明係於上述廣泛定義，熟習此項技術者可理解本發明並不限於其中，且本發明也包括下述給出之實施例的實施態樣。

【圖式簡單說明】

【0266】 本發明將參照附圖而描述，其中：

第 1 圖係一系列顯示 Pam3CSK4、**22**、**20** 及 **26** 在五個予體（donors）間的 CD80 反應的圖。MFI：平均螢光強度；UT：未處理；Pam3CSK4 = Pam3Cys；**22** = 8；**20** = 9；**26** = 11。

第 2a 圖及第 2b 圖係純的 **25**（2a）及 **26**（2b）在 210 奈米之高效能液相層析（HPLC）的層析圖。

第 2c 圖係 **26** 之 HPLC 層析圖之主峰的 ESI-MS。

第 3 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃ 構築體（construct）及以同種異株（allogenic）之 HLA-A2+MoDC 作為 APC 的 CD8+ T 細胞克隆（clone）4D9，如本文實施例 4 中所描述。

第 4 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀ 構築體及以自體的類淋巴母細胞株（autologous LCL）的 T 細胞作為 APC 的 CD8+ T 細胞克隆 2F2，如本文實施例 5 所描述。

第 5 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀ 構築體及以同種異株之 HLA-A2+HLA-DP4+MoDC

作為 APC 的 CD8+ T 細胞克隆 2F2，如本文實施例 5 所描述。

第 6 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀ 構築體及以自體 LCL 作為 APC 的 CD4+ T 細胞克隆 1B7，如本文實施例 6 所描述。

第 7 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀ 構築體及以同種異株之 HLA-A2+HLA-DP4+MoDC 作為 APC 的 CD4+ T 細胞克隆 1B7，如本文實施例 6 所描述。

第 8 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀ 構築體及以同種異株之 HLA-A2+HLA-DP4+MoDC 作為 APC 的 CD4+ T 細胞克隆 1C11，如本文實施例 6 所描述。

第 9 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₇₉₋₁₁₆ 構築體及以自體的 LCL 作為 APC 的 CD8+ T 細胞克隆 1D7，如本文實施例 7 所描述。

第 10 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₇₉₋₁₁₆ 構築體及以自體的 LCL 作為 APC 的 CD8+ T 細胞克隆 1F10，如本文實施例 7 所描述。

第 11 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃ 構築體及以自體的 LCL 作為 APC 的 CD8+ T 細胞克隆 1C11，如本文實施例 8 所描述。

第 12 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃ 構築體及以自體的 LCL 作為 APC 的 CD4+ T 細胞克隆 1E4，如本文實施例 9 所描述。

第 13 圖係一顯示 T 細胞活化試驗的結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃ 構築體及以自體的 LCL 作為 APC 的 CD4+ T 細胞

克隆 1D6，如本文實施例 9 所描述。

第 14 圖係一顯示類鐸受體（TLR）促效作用（agonism）試驗之結果的圖，該試驗係使用 NY-ESO-1 構築體及 HekBlue™，如本文實施例 10 所描述。

第 15 圖係四張顯示類鐸受體促效作用之結果的圖，其係使用 NY-ESO-1 構築體及 IL-8 試驗，如本文實施例 10 所描述。

【實施方式】

【0267】 本發明係關於一種製造胺基酸及胜肽接合物的方法。該方法係包含使一含脂質的接合配偶體與一包含胺基酸的接合配偶體反應，該反應係在有效於使該含脂質的接合配偶體在硫醇-烯反應中接合至該包含胺基酸的接合配偶體的條件下進行。在一些實施態樣中，該方法包含使一含脂質的接合配偶體與一含胜肽的接合配偶體反應，該反應係在有效於使該含脂質的接合配偶體在硫醇-烯反應中接合至該含胜肽的接合配偶體的條件下進行。

【0268】 該硫醇-烯反應係涉及透過一非芳香族碳-碳雙鍵而添加硫醇（即，該碳-碳雙鍵的氫硫作用）。該反應係經由一自由基機制而進行。在該反應中有三個不同的階段：引發、聚合或耦合、及終止。自由基生成會引發親電子含硫自由基（其透過烯基而傳播）形成一以碳為中心的自由基。而後來自一額外硫醇基分子的鏈轉移係淬滅該碳上自由基而給出終產物。

【0269】 在本發明方法中，一接合配偶體係包含硫醇基，且其他則包含碳碳雙鍵。

【0270】 可以業界所知任何方法在本發明方法中產生一或多個自由基。該等自由基可以熱及／或光化學方式產生。可使用一

或多個自由基引發劑來引發自由基的產生。合適的自由基引發劑包括熱引發劑及光引發劑。

【0271】 藉由加熱而從熱引發劑中產生自由基。熱引發劑的降解速度及產生自由基的形成速度係取決於該引發劑以及該引發劑所加熱的溫度。較高的溫度通常造成較快的降解速度。熟習此項技術者可選擇一合適的溫度以加熱該引發劑而無需過度實驗。

【0272】 許多熱引發劑為商業上可購得的。熱引發劑的例子包括，但不限於三級戊基過氧苯甲酸酯（*tert*-amyl peroxybenzoate）、1,1'-偶氮雙（環己烷腈）（1,1'-azobis（cyclohexanecarbonitrile））、2,2'-偶氮二異丁腈（2,2'-azobisisobutyronitrile，AIBN）、過氧化苯甲醯（benzoyl peroxide）、三級丁基氫化過氧化物（*tert*-butyl hydroperoxide）、過乙酸三級丁酯（*tert*-butyl peracetate）、三級丁基過氧化物（*tert*-butyl peroxide）、三級丁基過氧化苯甲酸酯（*tert*-butyl peroxybenzoate）、三級丁基過氧化異丙基碳酸酯（*tert*-butylperoxy isopropyl carbonate）、過氧化月桂醯（lauroyl peroxide）、過氧乙酸（peracetic acid）及過硫酸鉀（potassium persulfate）。

【0273】 可藉由照光而由光引發劑中產生自由基。引起光引發劑的降解及自由基形成所必須的光頻率係取決於該引發劑。許多光引發劑可經由紫外光來引發。

【0274】 可使用特定波長或特定波長範圍的光以選擇性地照射該引發劑，其中該含脂質的接合配偶體或包含胺基酸的接合配偶體（例如一含胜肽的接合配偶體）係包含光敏感基團。在本發明方法的特定實施態樣中，係使用約 365 奈米的頻率。此頻率的

光通常可與自然產生之胺基酸的側鏈相容。

【0275】 範圍廣泛的光引發劑係可商購的。光引發劑的例子包括，但不限於苯乙酮、對二甲氧苯偶姻 (anisoin)、蒽醌 (anthraquinone)、蒽醌-2-磺酸 (anthraquinone-2-sulfonic acid)、二苯二甲酮 (benzil)、安息香、安息香乙醚、安息香異丁基醚 (benzoin isobutyl ether)、安息香甲醚 (benzoin methyl ether)、二苯甲酮、3,3',4,4'-二苯甲酮四羧酸二酐 (3,3',4,4'-benzophenonetetracarboxylic dianhydride)、4-苯甲醯基聯苯 (4-benzoylbiphenyl)、2-苄基-2-(二甲氨基)琥珀醯基嗎啉代丁醯苯 (2-benzyl-2-(dimethylamino) -4'-morpholinobutyrophenone)、4'-雙(二乙基氨基)二苯甲酮 (4'-bis (diethylamino) benzophenone)、4,4'-雙(二甲氨基)二苯甲酮 (4,4'-bis (dimethylamino) benzophenone)、樟腦醌 (camphorquinone)、2-氯噻噸-9-酮 (2-chlorothioxanthen-9-one)、二苯并環庚烯酮 (dibenzosuberone)、2,2-二乙氧基苯乙酮 (2,2-diethoxyacetophenone)、4,4'-二羥基二苯甲酮 (4,4'-dihydroxybenzophenone)、2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮 (2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone, DMPA)、4-(二甲基氨基)二苯甲酮 (4-(dimethylamino) benzophenone)、4,4'-二甲基聯苯醯 (4,4'-dimethylbenzil)、2,5-二甲基二苯甲酮 (2,5-dimethylbenzophenone)、3,4-二甲基二苯甲酮 (3,4-dimethylbenzophenone)、4'-乙氧基苯乙酮 (4'-ethoxyacetophenone)、2-乙基蒽醌 (2-ethylanthraquinone)、3'-羥基乙醯苯酮 (3'-hydroxyacetophenone)、4'-羥基乙醯苯酮

(4'-hydroxyacetophenone) 、 3- 羥基二苯甲酮
 (3-hydroxybenzophenone) 、 4 - 羥基二苯甲酮
 (4-hydroxybenzophenone) 、 1- 羥基環己基苯基酮
 (1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone) 、 2-羥基-2-甲基苯丙酮
 (2-hydroxy-2-methylpropiophenone) 、 2- 甲基二苯甲酮
 (2-methylbenzophenone) 、 3- 甲基二苯甲酮
 (3-methylbenzophenone) 、 甲基苯甲醯甲酸鹽
 (methybenzoylformate) 、 2-甲基-4'- (甲硫基) -2-嗎啉代苯丙酮
 (2-methyl-4'- (methylthio) -2-morpholinopropiophenone) 、 菲醌
 (phenanthrenequinone) 、 4'- 苯氧基苯乙酮
 (4'-phenoxyacetophenone) 、 及噻噸-9-酮 (thioxanthen-9-one) 。

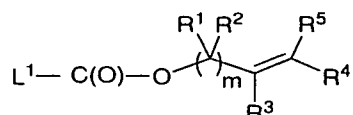
【0276】 熟習此項技術者將能選擇用於該方法中的合適的自由基引發劑，考慮例如，該含脂質的接合配偶體、包含胺基酸的接合配偶體（例如含胜肽的接合配偶體）、以及任何存在於該反應混合物中的其他成分的性質。在一些實施態樣中，引發劑係以相對於包含該硫醇基之起始物料為約 20：1 至約 0.05：1、約 10：1 至約 0.05：1、約 5：1 至約 0.05：1、約 3：1 至約 0.5：1 的化學計量比例存於該反應中。

【0277】 在該反應中的含脂質的接合配偶體及包含胺基酸的接合配偶體（例如含胜肽的接合配偶體），係如本說明書所描述的任何實施態樣所定義者。

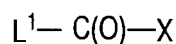
【0278】 可使用已知的合成化學技術來製備該含脂質的接合配偶體及包含胺基酸的接合配偶體（例如含胜肽的接合配偶體）（舉例言之，大致描述於 Louis F Fieser and Mary F, *Reagents for*

Organic Synthesis v. 1-19, Wiley, New York (1967-1999 ed.) 或 *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*, 4, Aufl. Ed. Springer-Verlag Berlin, 包括附件, 的方法) (亦可由 Beilsteins 線上資料庫 (Beilstein online database) 取得)), 或者, 在一些實施態樣中, 可商購取得。

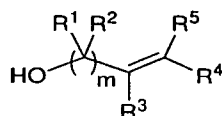
【0279】 式 (II) 之含脂質的接合配偶體化合物係可經由在有效於酯化反應的條件下, 經由反應式 (VI) 化合物與式 (VII) 化合物來製備



(II)



(VI)



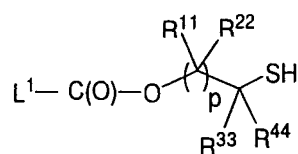
(VII)

其中, m 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、及 L^1 係各自獨立為如在針對式 (I) 化合物所描述的任何實施態樣中所定義者, 其中 X 係 OH 或一合適離去基 (leaving group)。用於酯化的方法係業界所熟知。舉例言之, 當 X 係氨基時, 該反應可在鹼 (例如吡啶或三乙胺) 存

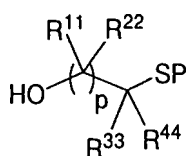
在的情況下在一合適的溶劑中進行。該酸性氯化物可被原位轉換成一更具反應性的物種（例如，使用碘化鈉轉換成對應的碘化物）。進行該反應的溫度係取決於酸物種的反應性及所使用的溶劑。

【0280】 許多式（VI）化合物為可商購的。其他的則可使用標準的合成化學技術從可商購的前驅物製備。例如，式（VI）化合物，其中 X 係氯基，可經由在合適的溶劑或溶劑混合物中以亞硫醯氯（thioyl chloride）處理相對應的羧酸而製備。

【0281】 式（IIA）之含脂質的接合配偶體化合物可在有效於酯化反應的條件下，經由反應如上述定義之式（VI）化合物及式（VIII）化合物並接著移除保護基團來製備：



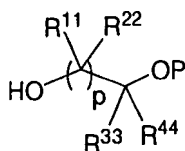
(IIA)



(VIII)

其中，p、R11、R22、R33、R44、及 L1 係如在式（IA）化合物中所定義者，P 係一合適保護基團。

【0282】 或者，式（IIA）化合物可在有效於酯化反應的條件下，經由反應如上界定之式（VI）化合物及式（IX）化合物，移除該保護基團，接著轉換相對應的醇成為硫醇來製備：



(IX)

其中，P 係一合適的保護基團。將醇轉換成硫醇之合適的法對於熟習此項技術者係為明顯的。

【0283】 該化合物的製備可涉及多種化學基團的保護及去保護。對於保護及去保護的需要、以及合適保護基團的選擇，係熟習此項技術者可輕易選定者。保護基團以及用以保護及去保護的方法係業界所習知的（可參見例如 T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., Wiley & Sons, Inc., New York (1999)）。

【0284】 同樣的，式 (VII)、(VIII)、及 (IX) 化合物也為可商購的，或可經由使用可商購的前驅物以標準的合成化學技術來製備。

【0285】 引入含脂質的接合配偶體及包含胺基酸的接合配偶體（例如含胜肽的接合配偶體），及在反應混合物中存在的任何組分至反應容器中的順序為可改變的。該反應可以一鍋化程序（one-pot procedure）來進行。

【0286】 含脂質的接合配偶體及包含胺基酸的接合配偶體

(例如一含胜肽的接合配偶體) 該反應中的化學計量比為可改變的。在一些實施態樣中, 包含胺基酸的接合配偶體與含脂質的接合配偶體的化學計量比係約 1 : 0.5 至約 1 : 20、約 1 : 1 至約 1 : 10、約 1 : 1 至約 1 : 5、約 1 : 1 至約 1 : 3。在一些實施態樣中, 含胜肽的接合配偶體與含脂質的接合配偶體的化學計量係約 1 : 0.5 至約 1 : 20、約 1 : 1 至約 1 : 10、約 1 : 1 至約 1 : 5、約 1 : 1 至約 1 : 3。

【0287】 可在任何合適的溫度下進行該反應。在一些實施態樣中, 該反應係在約 -25°C 至約 200°C、約 -10°C 至約 150°C、約 0°C 至約 125°C、約環境溫度至約 100°C 的溫度下進行。在一些實施態樣中, 該反應係在低於約 200°C、低於約 175°C、低於約 150°C、低於約 125°C、或低於約 100°C 的溫度下進行。

【0288】 在一些實施態樣中, 該反應係在高於環境溫度的溫度進行。在一實施態樣中, 該反應係在 40 至 200°C、50 至 150°C、60 至 100°C、65 至 90°C、或 70 至 80°C 的溫度下進行。在一些實施態樣中, 該反應係在大於 40°C、大於 50°C、大於 75°C、大於 100°C、或大於 150°C 的溫度下進行。

【0289】 進行反應的溫度係可取決於反應中自由基如何產生而定。可選定所使用的溫度以控制反應的速度。可在反應過程中調整溫度以控制反應的速度。藉由控制反應的速度, 可能可不欲副產物的形成 (例如, 調聚反應或者聚合反應產物) 最小化或避免。

【0290】 如果自由基係由熱產生 (例如, 使用熱引發劑), 該反應一般將在高於環境溫度的溫度下進行。該溫度將取決於產生

自由基之物種的反應性。

【0291】 如果自由基係由光化學產生，該反應有利的是在環境溫度下進行。在特定實施態樣中，冷卻反應混合物以減緩反應的速度，或者相反地，加熱反應混合物以增加反應的速度可為所欲者。

【0292】 熟習此項技術者將可選擇合適溫度以進行該方法，該方法係顧及含脂質的接合配偶體、包含胺基酸的接合配偶體（例如含胜肽的接合配偶體）、及若使用之自由基引發劑的反應性。

【0293】 進行反應的溫度可由加熱或冷卻反應混合物來控制。反應混合物的溫度可由業界已知的合適的方法來控制。可將熱施用至反應混合物上，例如，在反應容器中使用一熱交換器，在反應容器周圍使用一加熱外套（heating jacket），或者經由將反應容器浸泡在一經加熱的液體中（例如，一油浴或一沙浴）。在特定的例示性實施態樣中，該反應混合物係經由微波照射來加熱。

【0294】 可以任何合適的手段來監控反應的過程，例如，由薄層色層分析（TLC）或高效能液相層析（HPLC）。可允許反應進行至實質上完成，藉由監控至少一個起始物料的消耗量而進行。在一些實施態樣中，可與許該反應進行 1 分鐘至 7 天、5 分鐘至 72 小時、10 分鐘至 48 小時，10 分鐘至 24 小時。在其他實施態樣中，係允許該反應進行少於 72 小時、少於 48 小時、少於 24 小時、少於 12 小時、少於 6 小時、少於 4 小時、少於 2 小時、或少於 1 小時的時間。

【0295】 在一些實施態樣中，該反應係進行到含脂質的接合配偶體或包含胺基酸的接合配偶體之化學計量較低者消耗至少約

50%，至少約 60%、至少約 70%、至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 97%、至少約 99%。在一些實施態樣中，該反應係進行到含脂質的接合配偶體或含胜肽的接合配偶體之化學計量較低者消耗至少約 50%、至少約 60%、至少約 70%、至少約 75%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 97%、至少約 99%。可以任何合適的方法來監控起始物料的消耗量，例如，HPLC。

【0296】 可以該技術領域中已知的任何合適的方法來混合反應混合物，例如，使用磁力或機械攪拌器。所使用的方法可取決於反應所進行的規模。

【0297】 該反應一般係在一液體反應介質 (medium) 中進行。該液體反應介質可包含一溶劑。合適溶劑的例子包括二甲基甲醯胺、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、三氯甲烷、四氯化碳、水、甲醇、乙醇、二甲基亞颯、三氟乙酸、乙酸、乙腈、及前述之混合物。

【0298】 可基於含脂質的接合配偶體及包含胺基酸的接合配偶體（例如含胜肽的接合配偶體），在溶劑中的溶解度而選擇溶劑。自由基引發劑的溶解度也是相關的。在一些實施態樣中，含脂質的接合配偶體係疏水性的。包含胺基酸的接合配偶體（例如一含胜肽的接合配偶體）的疏水性或親水性係可依例如含胜肽的接合配偶體之胜肽的胺基酸序列而變化。在含胜肽的接合配偶體中之增溶性基團的存係可增加在極性溶劑（例如水）中的溶解度。熟習此項技術者可選擇合適的溶劑而無須過度實驗。

【0299】 該反應可在實質上不含氧的條件下進行。氧會淬滅

在反應中形成的自由基。反應混合物可以一實質上不含氧的惰性氣體（例如，氮或氬）來脫氣，以在產生自由基之前移除任何溶解氧。或者，反應混合物的個別組分可在於反應容器中結合之前，以實質上不含氧的惰性氣體脫氣。該反應可在實質上不含氧之惰性氣體的氣氛下進行。

【0300】 可在環境壓力下進行本發明方法。

【0301】 如果在硫醇-烯反應中鏈轉移速度相對於鏈傳播（propagation）低，則可能會發生非所欲的二聚化反應、調聚反應、或聚合反應。

【0302】 抑制二聚化反應、調聚反應、或聚合反應的添加物可併含在本發明方法的反應混合物中。發明人已發現在一些實施態樣中，在反應混合物中併含一可加速鏈轉移的外來硫醇做為添加物，係可降低非所欲的副產物的形成。在一些實施態樣中，該外來硫醇可增加所欲之硫醇烯反應的效率。合適之外來硫醇的例子包括，但不限於還原的巯胺基硫、DODT、DTT、蛋白質、及其類似物。發明人已發現在一些實施態樣中，併含 DTT 會導致沒有非所欲的副產物。

【0303】 在特定實施態樣中，該外來硫醇係一立體障礙硫醇（sterically hindered thiol）。合適的立體障礙外來硫醇的非限制性例子包括，三級丁基硫醇基及 1-甲基丙基硫醇基。

【0304】 在一些實施態樣中，併含酸亦可抑止二聚化反應、調聚反應、或聚合反應。酸可為一強無機酸，例如，HCl，或有機酸，例如 TFA。在特定實施態樣中，該添加物係 TFA。

【0305】 發明人已發現在一些於反應混合物中包括三級丁基

硫醇及 TFA 作為添加物的實施態樣中，可降低寡聚物的形成及增加起始物料轉換成所欲的產物。因此，在特定的例示性實施態樣中，該反應混合物係包含 TFA 及三級丁基硫醇的組合。

【0306】 添加物一般係以足以使非所欲副產物的形成最小化，且對反應或者任何該方法的後續視需要步驟沒有不利影響的用量使用。在一些實施態樣中，添加物係以相對於包含該硫醇之起始物料的化學計量比為約 20:1 至約 0.05:1、約 10:1 至約 0.5:1、約 5:1 至約 1:1、約 3:1 至約 1:1 存在於反應中。

【0307】 在一些實施態樣中，按重量計，少於約 50%、少於約 40%、少於約 30%、少於約 25%、少於約 20%、少於約 15%、少於約 10%、少於約 5%、少於約 3%、或少於約 1%之用於反應中的含脂質的接合配偶體及包含胺基酸的接合配偶體起始物料是由二聚化反應、調聚反應或聚合反應所產生的非所欲副產物。在一些實施態樣中，按重量計，少於約 50%、少於約 40%、少於約 30%、少於約 25%、少於約 20%、少於約 15%、少於約 10%、少於約 5%、少於約 3%、或者少於約 1%的用於反應中的含脂質的接合配偶體及含胜肽的接合配偶體是由二聚化反應、調聚反應或聚合反應所產生的非所欲副產物。反應之產物的純度可由，例如 HPLC 來測定。

【0308】 在反應混合物中之含脂質的接合配偶體及包含胺基酸的接合配偶體（例如含胜肽的接合配偶體）的濃度，也可能會分別影響反應。熟習此項技術者可改變反應混合物中含脂質的接合配偶體及含胜肽的接合配偶體的濃度以例如在毋需過度實驗下最適化產量及純度。

【0309】 在一些實施態樣中，包含硫醇基的起始物料係以濃度為約 0.05 毫莫耳濃度 (mM) 至約 1 莫耳濃度、約 0.5 毫莫耳濃度至約 1 莫耳濃度、約 1 毫莫耳濃度至約 1 莫耳濃度存在。在一些實施態樣中，該濃度係至少約 0.05 毫莫耳濃度、0.5 毫莫耳濃度或 1 毫莫耳濃度。

【0310】 在一些實施態樣中，包含烯類的起始物料的濃度為至少約 0.05 毫莫耳濃度、0.5 毫莫耳濃度、或 1 毫莫耳濃度。

【0311】 在一些實施態樣中，該胺基酸接合物或胜肽接合物可在反應後從反應介質中分離並視需要純化。在一些實施態樣中，胜肽接合物可在反應後從反應介質中分離並視需要純化。可使用任何業界已知的合適方法，例如，藉由沉降以自反應介質中分離接合物。

【0312】 在一些實施態樣中，該胺基酸或胜肽接合物係在自反應介質中分離後純化。在一些實施態樣中，該胜肽接合物係在自反應介質中分離後純化。在特別考量的實施態樣中，以使用一或多種合適的溶劑的 HPLC 來純化接合物。

【0313】 本發明方法所製造的胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體係可包含一合成性胜肽。可使用固相胜肽合成 (SPPS) 來製備合成性胜肽。

【0314】 固相胜肽合成 (SPPS) 的基本原則係逐步加入胺基酸至經由連結分子而錨固 (anchored) 至一固相支持體之增長中的多胜肽鏈，該固相支持體典型為樹脂顆粒，其係允許於多胜肽鏈完成後的分割 (cleavage) 及純化。簡言之，使固相樹脂支持體及起始胺基酸經由一連結分子而互相連接。此樹脂-連結體-酸基質為

可商購獲得的。

【0315】 待耦合至樹脂的胺基酸係藉由一化學保護基團而保護其 $N\alpha$ -端。

【0316】 該胺基酸亦可具有一側鏈保護基團。此保護基團可防止在待耦合之胺基酸的羰基與附著在樹脂上之胜肽鏈的未受保護 $N\alpha$ -胺基之間形成新胜肽鏈的過程中發生非所欲或有害的反應。

【0317】 該待耦合之胺基酸係與胜肽鏈之 N 端之胺基酸的未受保護 $N\alpha$ -胺基基團反應，增加該胜肽鏈的鏈長度一胺基酸。可經由一合適的化學活化劑來活化該待耦合之胺基酸的羰基，以促進與胜肽鏈之 $N\alpha$ -胺基的反應。胜肽鏈之 N 端胺基酸的 $N\alpha$ -保護基團接著被移除，以準備與下一個胺基酸殘基耦合。此技術由許多重覆的步驟所組成，使得自動化只要在有可能的情形下，無論何時皆具吸引力。熟習此項技術者可理解，胜肽可耦合至鍵結在固相上之胺基酸或胜肽的 $N\alpha$ -胺基而不是個別胺基酸的 $N\alpha$ -胺基，例如，若一收斂性（convergent）胜肽合成係為所欲者。

【0318】 當所欲的胺基酸序列完成，從該固相支持體的連結分子上分割該胜肽。

【0319】 可使用連續流動方法（continuous flow method）或批次流動方法（batch flow method）來進行 SPPS。連續流動法容許通過分光光度計的即時監控反應程序，但仍有二個明顯的缺點—與在樹脂上之胜肽接觸的試劑係經稀釋，且其規模因固相樹脂的物理尺寸限制而受到限制。批次流動係發生於一過濾反應容器中，且因反應物為可取得的並可手動加入或自動加入而為有用的。

【0320】 保護基團的種類係通常用於保護 $N\alpha$ -胺基端：「Boc」

(三級丁基氧羰基) 及「Fmoc」(9-芴基甲氧基羰基 (9-fluorenylmethyloxycarbonyl))。用於 Boc 方法的試劑係相對便宜，然而其係高腐蝕性且需要昂貴的設備，並需採取更多謹慎的預防措施。Fmoc 方法，其使用上較不具腐蝕性，儘管更為昂貴，然而一般而言是較佳的試劑。

【0321】 對 SPPS 而言，可取得廣泛的固相支持體。用於合成的固相支持體可為一適用於合成目的合成樹脂、一合成聚合物膜、或一矽或矽酸鹽表面(例如，受控制的多孔玻璃(pore glass))。一般而言，係使用樹脂，通常為聚苯乙烯懸浮液、或聚苯乙烯-聚乙二醇 (polystyrene-polyethyleneglycol)、或聚合物支持體，例如聚醯胺。經連結體官能化之適用於 Boc-化學之樹脂的例子包括 PAM 樹脂、肟樹脂 SS、酚醛樹脂、溴化王氏樹脂(brominated Wang resin) 及溴化 PPOA 樹脂。適用於 Fmoc 化學之樹脂的例子包括 AMPB-BHA 樹脂、錫伯醯胺樹脂 (Sieber amide resin)、瑞克酸樹脂 (Rink acid resin)、天泰膠 (tentagel) S AC 樹脂 (Tentagel S AC resin)、2-氯三苯甲基氯樹脂 (2-chlorotrityl chloride resin)、2-氯三苯甲基醇樹脂 (2-chlorotrityl alcohol resin)、天泰膠 S Trt-OH 樹脂 (TentaGel S Trt-OH resin)、克諾爾-2-氯三苯甲基樹脂 (Knorr-2-chlorotrityl resin)、肼-2-氯三苯甲基樹脂 (hydrazine-2-chlorotrityl resin)、ANP 樹脂、Fmoc 耐光樹脂(Fmoc photolabile resin)、HMBA-MBHA 樹脂、天泰膠 S HMB 樹脂、芳香族安全鎖扣 resinBAI 樹脂 (Aromatic Safety Catch resinBAI resin)、及 Fmoc-羥胺 2 氯三苯甲基樹脂 (Fmoc-hydroxylamine 2 chlorotrityl resin)。其他樹脂包括 PL Cl-Trt 樹脂、PL-肟樹脂及

PL-HMBA 樹脂。

【0322】 對於每個樹脂，合適的耦合條件係可由文獻得知，以將起始單體或子單元附上。

【0323】 固相支持體的製備係包括在合適的溶劑（例如，二甲基甲醯胺）中溶劑化該支持體。該固相的體積通常會在溶劑化作用中增加，進而增加可用以進行胜肽合成的表面積。

【0324】 接著將一連結分子附著至支持體，以將胜肽鏈連接至該固相支持體。連結分子一般係設計成使得最後的分割（eventual cleavage）在該 C 端提供一游離酸或醯胺。連結體通常不具樹脂專一性。連結體的例子包括 4-羥甲基苯氧乙酰基-4'-甲基二苯甲胺（4-hydroxymethylphenoxyacetyl-4'-methylbenzyhydramine，HMP），或胜肽醯胺，例如二苯甲胺衍生物。

【0325】 該胜肽序列的第一胺基酸可在連結體附著至該固相支持體後附至該連結體，或使用一包括該胜肽序列中之第一胺基酸之連結體而附至固相支持體。包括胺基酸的連結體係可商購的。

【0326】 下個步驟係使第一胺基酸的 $N\alpha$ -胺基去保護。對於 Fmoc SPPS 而言，可以弱鹼（例如，哌嗪（piperazine）或哌啶（piperidine））處理來進行 $N\alpha$ -胺基的去保護。可以中度的酸解（例如，三氟乙酸（TFA））來移除側鏈保護基團。對於 Boc SPPS 而言，可使用例如 TFA 來進行 $N\alpha$ -胺基的去保護。

【0327】 在去保護之後，胺基酸鏈延長、或耦合，係經由胜肽鍵的形成來進行。這個過程需要活化待耦合胺基酸的 C- α -羰

基。此可經由使用，例如原位劑 (in situ reagents)、預先形成的對稱酸酐、活化酯、酸鹵化物、或經胺甲酸乙酯保護的 N-羧酸酐來完成。該原位方法係允許同時活化及耦合。耦合試劑包括碳二醯亞胺衍生物，例如 N,N'-二環己碳二醯亞胺 (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide) 或 N,N-二異丙基碳二醯亞胺 (N,N-diisopropylcarbodiimide)。耦合劑也包括苯并三唑 (benzotriazol) 的脲鎗 (uronium) 或鎗 (phosphonium) 鹽衍生物。這類脲鎗及鎗鹽衍生物的例子包括 HBTU((O-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗六氟磷酸 ((O-1H-benzotriazole-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate))、BOP(苯并三唑-1-基-氧基-三-(二甲基氨基)-鎗六氟磷酸鹽) (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate)、PyBOP(苯并三唑-1-基-氧基-三吡咯烷基六氟磷酸鹽) (Benzotriazole-1-yl-oxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)、PyAOP、HCTU((O-(1H-6-氯苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎗六氟磷酸酯)) ((O-(1H-6-chloro-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate))、TCTU((O-1H-6-氯苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎗四氟硼酸鹽) ((O-1H-6-chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate))、HATU(O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎗六氟磷酸酯) ((O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate))、TATU(O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎗四氟硼酸鹽) (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)

-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate)、TOTU(O-[氰基(乙氧基羰基)亞甲基氨基]-N,N,N',N''-四甲基脲鎗四氟硼酸鹽)(O-[cyano(ethoxycarbonyl)methyleneamino]-N,N,N',N''-tetramethyluronium tetrafluoroborate)、及 HAPyU(O-(苯并三唑-1-基)氧基雙-(吡咯烷基)-脲鎗六氟磷酸鹽)(O-(benzotriazol-1-yl)oxybis-(pyrrolidino)-uronium hexafluorophosphate)。在一些實施態樣中，該耦合試劑係 HBTU、HATU、BOP、或 PyBOP。

【0328】 在合成所欲的胺基酸序列後，將胜肽係自樹脂上分割。在這個過程中所使用的條件係取決於該胜肽及該側鏈保護基團之胺基酸組合物的敏感性。一般而言，分割係在含有複數個清除劑(scavenging agents)以淬滅源自保護基團及連結體之反應性碳離子的環境下進行。分割劑通常包括，例如，TFA 及氟化氫(HF)。在一些實施態樣中，當胜肽係經由一連結體而鍵結至固相支持體上，該胜肽鏈係經由自連結體上分割該胜肽而自固相支持體上分割。

【0329】 用於自樹脂上分割胜肽的條件係可伴隨移除一或多個保護基團的側鏈。

【0330】 保護基團在 SPPS 中的用途業經確立。常見的保護基團的例子包括，但不限於乙醯胺基(acetamidomethyl, AcM)、乙醯基(acetyl, Ac)、金剛烷氧基(adamantyloxy, AdaO)、苄醯基(benzoyl, Bz)、苄基(benzyl, Bzl)、2-溴苄基(2-bromobenzyl)、苄氧基(benzyloxy, BzlO)、苄氧羰基(benzyloxycarbonyl, Z)、苄氧基甲基(benzyloxymethyl, Bom)、2-溴苄氧基羰基

(2-bromobenzyloxycarbonyl, 2-Br-Z)、三級丁氧基 (tBuO)、三級丁氧基羰基 (tert-butoxycarbonyl, Boc)、三級丁氧基甲基 (tert-butoxymethyl, Bum)、三級丁基 (tert-butyl, tBu)、三級丁基硫醇 (tert-butylthio, tButhio)、2-氯苄氧基羰基 (2-chlorobenzyloxycarbonyl, 2-Cl-Z)、環己氧基 (cyclohexyloxy, cHxO)、2,6-二氯代苄基 (2,6-DiCl-Bzl)、4,4-二甲氧基二苯甲基 (4,4'-dimethoxybenzhydryl, Mbh)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代環己基) 3-甲基-丁基 (1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene) 3-methyl-butyl, ivDde)、4-{N-[1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代環己基) 3-甲基-丁基]-氨基-甲基} 苄氧基 (4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene) 3-methylbutyl]-amino} benzyloxy, ODmab)、2,4-二硝基苯基 (2,4-dinitrophenyl, Dnp)、芴甲氧羰基 (fluorenylmethoxycarbonyl, Fmoc)、甲醯基 (formyl, For)、均三甲苯-2-磺醯基 (mesitylene-2-sulfonyl, Mts)、4-甲氧基苄基 (4-methoxybenzyl, MeOBzl)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺醯基 (4-methoxy-2,3,6-trimethyl-benzenesulfonyl, Mtr)、4-對甲氧基 (4-methoxytrityl, Mmt)、4-甲苄基 (4-methylbenzyl, MeBzl)、4-甲基三苯甲基 (4-methyltrityl, Mtt)、3-硝基-2-吡啶氧硫基 (3-nitro-2-pyridinesulfonyl, Npys)、2,2,4,6,7-五甲基二氫苯并呋喃 -5- 磺 醯 基 (2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofurane-5-sulfonyl, pbf)、2,2,5,7,8- 五 甲 基 苯 并 二 氫 吡 喃 -6- 磺 醯 基 (2,2,5,7,8-pentamethyl-chromane-6-sulfonyl, Pmc)、甲苯磺醯基 (tosyl, Tos)、三氟乙醯基 (trifluoroacetyl, Tfa)、三甲基乙醯氨

基 (trimethylacetamidomethyl, Tacm)、三苯甲基 (trityl, Trt) 及黃嘌呤酸基 (xanthyl, Xan)。

【0331】 當胜肽之胺基酸的一或多個側鏈係含有官能基 (例如額外的羰基、胺基、羥基或硫醇基) 時, 則額外的保護基團可為必要。舉例言之, 如果使用 Fmoc 策略, Mtt、Pmc、Pbf 可用以保護 Arg; Trt、Tmob 可用以保護 Asn 及 Gln; Boc 可用以保護 Trp 及 Lys; tBu 可用以保護 Asp、Glu、Ser、Thr 及 Tyr; 及 Acn、tBu、tButhio、Trt 及 Mmt 可用以保護 Cys。熟習此項技術者可理解還有許多其他合適的組合。

【0332】 上述用於 SPPS 的方法係業界所周知的。可參見, 例如, Atherton and Sheppard, “Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach,” New York: IRL Press, 1989; Stewart and Young: “Solid-Phase Peptide Synthesis 2nd Ed.,” Rockford, Illinois: Pierce Chemical Co., 1984; Jones, “The Chemical Synthesis of Peptides,” Oxford: Clarendon Press, 1994; Merrifield, *J. Am. Soc.* 85:2146-2149 (1963); Marglin, A. and Merrifield, R.B. *Annu. Rev. Biochem.* 39:841-66 (1970); 及 Merrifield R.B. *JAMA.* 210 (7):1247-54 (1969); 及 “Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach” (W.C. Chan and P.D. White, eds. Oxford University Press, 2000)。用於胜肽或多胜肽自動合成的設備係易於自供應商, 例如 Perkin Elmer 公司 / 應用生物系統 (福斯特城, 加利福尼亞州) 商購獲得, 且可以根據製造商的使用說明來操作。

【0333】 在自樹脂上分割後, 胜肽可自反應介質分離, 例如藉由離心或過濾。隨後可例如經由使用一或多個合適溶劑的 HPLC

而純化胜肽。

【0334】 有利的是，發明人已發現在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係可用於本發明方法，而無須在自該樹脂分割之後進行純化。

【0335】 發明人也有利地發現本發明方法可使用含胜肽的接合配偶體來進行，其中該胜肽係不含 $N\alpha$ -基團保護基團或任何側鏈保護基團。該反應一般係對硫醇基與非芳香族碳-碳雙鍵的反應具選擇性。

【0336】 以保護基團保護存在該含胜肽的接合配偶體中（例如，在該胜肽中的半胱氨酸殘基中）的硫醇基團可為必須的，以避免在本發明方法中之非所欲的競爭反應。該硫醇基可受到一保護基團的保護，該保護基團在用於移除一或多個其他存在於胜肽中的其他保護基團或自樹脂分割胜肽的條件下係不會被移除。通常，該胜肽係使用帶有合適保護基團的胺基酸來合成。熟習此項技術者將可選擇合適的保護基團而無需過度實驗。

【0337】 在特定實施態樣中，除了待反應的碳-碳雙鍵之外，該包含胺基酸的接合配偶體及含脂質的接合配偶體係包含一或多個未飽和碳-碳鍵。在特定實施態樣中，除了待反應的碳-碳雙鍵之外，該含胜肽的接合配偶體及含脂質的接合配偶體係包含一或多個未飽和碳-碳鍵。熟習此項技術者將理解，此等在特定實施態樣中，硫醇基對待反應之碳-碳雙鍵的選擇性係可取決於，例如，該碳-碳雙鍵相對於一或多個未飽和碳-碳鍵的空間及／或電子環境。在特定實施態樣中，該待反應的碳-碳雙鍵係，相對於在包含胺基酸的接合配偶體及含脂質的接合配偶體中之任何其他未飽和

的碳-碳鍵，而被活化。在特定實施態樣中，該待反應的碳-碳雙鍵係，相對於在含胜肽的接合配偶體及含脂質的接合配偶體中的任何其他未飽和的碳-碳鍵，而被活化。

【0338】 在一些實施態樣中，該包含碳-碳雙鍵或硫醇基的包含胺基酸之接合配偶體之胺基酸的 $N\alpha$ -胺基係經醯化，例如經乙醯化。在一些實施態樣中，本發明方法可包含醯化（例如乙醯化）該包含待反應的碳-碳雙鍵或硫醇基的包含胺基酸之接合配偶體之胺基酸的 $N\alpha$ -胺基。

【0339】 當一含胜肽的接合配偶體已由 SPPS 合成，可在自該樹脂分割之前或之後進行醯化反應。在一些實施態樣中，具有待反應碳-碳雙鍵或硫醇基之含胜肽的接合配偶體的胺基酸殘基係一 N-端的胺基酸殘基，且該方法係包含在分割該胜肽之前，醯化該 N-端的胺基酸。

【0340】 在一些實施態樣中，該方法更包含醯化該胺基酸接合物之胺基酸的 $N\alpha$ -胺基或含脂質的接合配偶體所接合的胜肽接合物的胺基酸殘基。

【0341】 可在一合適的溶劑（例如 DMF）中、於鹼存在下，藉由反應一胺基酸或胜肽與一醯化劑來進行胺基酸之 $N\alpha$ -胺基的醯化。醯化劑的非限制性例子包括酸鹵化物，舉例言之，酸氯化物，例如氯化乙醯，及酸酐，例如乙酐。此等試劑可商購或可由業界已知的方法來製備。合適的鹼的非限制性例子包括三乙胺、二異丙基乙胺（diisopropylethylamine）、4-甲基嗎啉（4-methylmorpholine）、及其類似物。

【0342】 在其他實施態樣中，含胜肽的接合配偶體的胜肽的

合成係包含耦合一胺基酸或一含一胺基酸的胜肽，其係於 N α -胺基進行醯化且包含該待反應至一或多個胺基酸及／或一或多個胜肽的碳-碳雙鍵或硫醇基。

【0343】 在一些實施態樣中，該方法係包含將該胺基酸接合物的胺基酸耦合至一胺基酸或一胜肽以提供一胜肽接合物。在一些實施態樣中，該方法係包含藉由 SPSS 而將該胺基酸接合物的胺基酸耦合至一鍵結在一固相樹脂支持體上的胺基酸或胜肽。在一些實施態樣中，該方法係包含藉由 SPSS 而將該胺基酸接合物的胺基酸耦合至一鍵結在一固相樹脂支持體上的胜肽。該方法可包含藉由 SPSS 合成鍵結在該固相樹脂支持體上的胜肽。

【0344】 在一些實施態樣中，該方法更包含將該胺基酸接合物的胺基酸或該胜肽接合物的一胺基酸耦合至一胺基酸或一胜肽以提供一包含一胜肽抗原結合位的胜肽接合物。在一些實施態樣中，該待耦合的胜肽係包含一胜肽抗原決定位。在其他實施態樣中，一胜肽抗原決定位係經耦合形成。該耦合可藉由如本說明書所述的 SPSS 來進行。

【0345】 在一些實施態樣中，該方法係包含藉由 SPSS 而將該胺基酸接合物的胺基酸耦合至一鍵結在一固相樹脂支持體上的胜肽，以提供一包含一胜肽抗原決定位的胜肽接合物。

【0346】 在一實施態樣中，該待耦合之胜肽接合物的胜肽係鍵結至一固相樹脂支持體，且該方法係包含將待耦合之胜肽接合物的一胺基酸耦合至一胺基酸或一胜肽，以提供一包含一胜肽抗原決定位的胜肽接合物。

【0347】 在一替代的實施態樣中，該方法係包含藉由 SPSS 將

該胜肽接合物的一胺基酸耦合至一鍵結至固相樹脂支持體上的一胺基酸或一胜肽，以提供一包含一胜肽抗原決定位的胜肽。

【0348】 在一些實施態樣中，該方法更包含將一抗原決定位，例如一胜肽抗原決定位，耦合至一胺基酸接合物或胜肽接合物。當該方法包含耦合一胜肽抗原決定位時，該耦合可藉由如此處所描述的 SPPS 來進行。

【0349】 在特定實施態樣中，該抗原決定位，例如一胜肽抗原決定位，係經由一連結基團來耦合或鍵結。在特定實施態樣中，該連結基團係一胺基酸序列，例如二或多個、三或多個、或四或多個連續胺基酸的序列。在特定實施態樣中，該連結體係包含約 2 至 20、2 至 18、2 至 16、2 至 14、2 至 12、2 至 10、4 至 20、4 至 18、4 至 16、4 至 14、4 至 12、或 4 至 10 個胺基酸。

【0350】 熟習此項技術者可理解此處所描述之將一胺基酸或一胜肽耦合至其他胺基酸或胜肽，係可包含在該胺基酸的 N α -端或一耦合配偶體之胜肽的一胺基酸，以及該胺基酸之 C-端或其他耦合配偶體之胜肽的一胺基酸之間形成一胜肽鍵。

【0351】 在一些實施態樣中，本發明方法係包含藉由 SPSS 合成該含胜肽的接合配偶體之胜肽的胺基酸序列；以及反應該含脂質的接合配偶體與該含胜肽的接合配偶體。

【0352】 在一些實施態樣中，藉由 SPPS 合成該含胜肽的接合配偶體之胜肽的胺基酸序列係包含將一胺基酸或一胜肽耦合至一鍵結在一固相樹脂支持體上的胺基酸或胜肽，以提供該胜肽之胺基酸序列或其一部分。在特定實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體之全部胜肽的胺基酸序列係經由 SPPS 來合成。

【0353】 該含胜肽的接合配偶體可與含脂質的接合配偶體反應，但鍵結至一固相樹脂支持體。或者，該胜肽可自該固相樹脂支持體上分割，並視需要在與該含脂質的接合配偶體反應前純化。

【0354】 該胜肽接合物及／或包含胺基酸的接合配偶體（例如一含胜肽的接合配偶體），係可包含一或多個增溶性基團。該一或多個增溶性基團，係可增加例如該含胜肽的接合配偶體在諸如水之極性溶劑中的溶解度。在例示性的實施態樣中，該增溶性基團對於該胜肽接合物的生物活性並沒有不利的影響。

【0355】 增溶性基團的存在係可有利於胜肽接合物作為一醫藥組合物的製劑及／或投予。

【0356】 在一些實施態樣中，增溶性基團係鍵結至胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的胜肽上。在一些實施態樣中，增溶性基團係鍵結至該含胜肽的接合配偶體的胜肽。在一些實施態樣中，胜肽接合物的胜肽及／或含胜肽配偶體的胜肽係包含一增溶性基團。在一些實施態樣中，含胜肽配偶體的胜肽係包含一增溶性基團。

【0357】 在一些實施態樣中，增溶性基團係鍵結至在該胜肽鏈中一胺基酸的側鏈上。在一些實施態樣中，增溶性基團係鍵結至該胜肽鏈的 C-或 N-端。在一些實施態樣中，該增溶性基團係鍵結在該胜肽鏈中的二個胺基酸殘基之間。在一些實施態樣中，該增溶性基團係鍵結至在該胜肽鏈中之一胺基酸殘基的 $N\alpha$ -基團上及在該胜肽鏈中之其他胺基酸殘基的羰基上。

【0358】 增溶性基團的例子包括，但不限於親水性胺基酸序列或聚乙二醇（PEGs）。

【0359】 在一實施態樣中，增溶性基團係一親水性胺基酸序列，其在胜肽鏈中包含二或多個親水性胺基酸殘基。在一些實施態樣中，增溶性基團係一胺基酸序列，其在胜肽鏈中包含二或多個連續性親水性胺基酸殘基的序列。此增溶性基團可藉由 SPPS 透過將增溶性基團的各個胺基酸加至該胜肽鏈中來形成。

【0360】 在另一實施態樣中，該增溶性基團係聚乙二醇。在一些實施態樣中，該聚乙二醇係鍵結至在該胜肽鏈中之一胺基酸殘基的 $N\alpha$ -基團上及在該胜肽鏈中之其他胺基酸殘基的羰基上。

【0361】 在一些實施態樣中，該聚乙二醇係包括約 1 至約 100、約 1 至約 50、約 1 至約 25、約 1 至約 20、約 1 至約 15、約 1 至約 10、約 2 至約 10、或約 2 至約 4 個乙二醇單體。耦合聚乙二醇至胜肽的方法係為已知。

【0362】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體係包含一抗原，例如，一抗原性胜肽。在一實施態樣中，該胜肽接合物或含胜肽的接合配偶體的胜肽係或係包含一抗原；或一抗原係視需要經由一連結體而鍵結至胜肽。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含一抗原，例如，一抗原性胜肽。在一實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係或係包含一抗原；或一抗原係視需要經由一連結體而鍵結至胜肽。

【0363】 在一實施態樣中，該抗原係包含一含一抗原決定位的胜肽。在一實施態樣中，該包含一抗原決定位的胜肽係一包含一抗原決定位的醣肽。在一實施態樣中，該抗原係包含一包含一抗原決定位的醣肽。

【0364】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的

接合配偶體系包含一抗原決定位。在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一抗原決定位。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體系包含一抗原決定位。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一抗原決定位。

【0365】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體系包含二或多個抗原決定位，例如，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含二或多個抗原決定位。

【0366】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體系或係包含一包含一抗原決定位的醣肽。在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的胜肽係一醣肽。在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體系包含一包含一鍵結至該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體之胜肽之抗原決定位的醣肽。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體系或係包含一包含一抗原決定位的醣肽。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係一醣肽。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體系包含一醣肽，其包含一鍵結至該含胜肽的接合配偶體之該胜肽的抗原決定位。

【0367】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體系包含一蛋白質分解分割位（proteolytic cleavage site）。在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一蛋白質分解分割位。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體系包含一蛋白質分解分割位。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一蛋白質分解分割位。

【0368】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一或多個連結基團。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一或多個連結基團。

【0369】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體係包含一個連結基團。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含一個連結基團。

【0370】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體係包含一經由一連結基團鍵結至該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的抗原決定位。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體係包含一經由一連結基團鍵結至該含胜肽的接合配偶體的胜肽的抗原決定位。

【0371】 連結基團的例子包括，但不限於胺基酸序列（例如，一胜肽）、聚乙二醇、烷基胺基酸、及其類似物。在一些實施態樣中，該連結體係或係包含一蛋白質分解分割位。在一些實施態樣中，該連結體係或係包含一增溶性基團。

【0372】 在一些實施態樣中，該連結體係鍵結在該胜肽鏈中的二個胺基酸殘基之間。

【0373】 在一些實施態樣中，該連結基團係鍵結至在該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體中之一胺基酸殘基的 $N\alpha$ -胺基上、及在該含胜肽的接合配偶體中之另一胺基酸殘基的羰基上。在一些實施態樣中，該連結基團係鍵結至在該含胜肽的接合配偶體中之一胺基酸殘基的 $N\alpha$ -胺基上及在該含胜肽的接合配偶體中之另一胺基酸殘基的羰基上。

【0374】 在特定實施態樣中，該連結基團係可在體內(*in vivo*)

自其所鍵結的胺基酸分割。在特定實施態樣中，該連結基團係可在體內藉由水解來分割。在特定實施態樣中，該連結基團係可在體內藉由酵素水解來分割。連結基團可由業界已知的任何合適的方法來引入。

【0375】 該方法可更包含將一抗原決定位耦合至該胺基酸接合物的胺基酸或該胜肽接合物的胜肽。該抗原決定位可經由一連結基團而鍵結，如上述所描述。在一些實施態樣中，該抗原決定位係一胜肽抗原決定位。在一些實施態樣中，該方法係包含耦合一包含一抗原決定位的醣肽。

【0376】 可理解在特定的理想的實施態樣中，本發明胜肽接合物係藉由抗原呈現細胞而維持合適的吸收、加工、及呈現。所欲的是，該含脂質的接合物不會干擾在該接合物中藉由抗原呈現細胞所呈現的任何抗原性胜肽的呈現。本文呈現的例子是，本發明接合物係藉由抗原呈現細胞來呈現，與非經接合、相關的胜肽同等。

【0377】 所合成之胜肽的識別確認可便捷地藉由，例如，胺基酸分析、質譜分析、埃德曼降解法（Edman degradation）等來完成。

【0378】 本發明方法可更包含自該液體反應介質分離該胺基酸接合物。或者，本發明方法更可包含自該液體反應介質中分離該胜肽接合物。可使用業界已知的任何合適的分離方法，例如，沉澱及過濾。可隨後純化該接合物，例如，藉由使用一或多個合適溶劑的 HPLC。

【0379】 本發明也關於藉由本發明方法所製造的胺基酸接合

物及胜肽接合物。該接合物係如本文的任何實施態樣所定義。

【0380】 本發明也關於式 (V) 化合物，其係一胺基酸接合物。

【0381】 本發明也關於式 (V) 化合物，其係一胜肽接合物。

【0382】 該胜肽接合物可為純的或經純化的、或者實質上純的。

【0383】 用於本文的「經純化的」並不要求絕對的純度；其係一相對的術語，意指所述材料相較於在之前的環境中更純。該材料在實際上通常，例如，經過分餾以移除各式其他組分，且所得的材料係實質上保留其所欲之生物活性或活性。術語「實質上經純化的」指的是材料係至少約 60% 不含在製造過程中與其伴隨的其他組分、較佳係至少約 75% 不含、及最佳係至少約 90% 不含、至少約 95% 不含、至少約 98% 不含、或更高。

【0384】 術語「 α -胺基酸」或「胺基酸」指的是一含有鍵結至指定為 α -碳之碳上之胺基以及一羰基的分子。合適的胺基酸包括，但不限於，自然存在的 D-及 L-異構物胺基酸，以及藉由有機合成或其他代謝路徑製備的非自然存在的胺基酸。除非本文有特別指明，否則本文所使用的術語胺基酸，係意指包括胺基酸類似物。

【0385】 在特定實施態樣中，該含胜肽接合物配偶體係只包含自然胺基酸。術語「自然存在的胺基酸」指的是在自然界合成之胜肽中一般發現的二十個胺基酸中的任何一個，且已知可由一個字母縮寫表示：A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 及 V。

【0386】 術語「胺基酸類似物」或「非自然存在的胺基酸」係指的是一結構類似胺基酸，且可取代胺基酸的分子。胺基酸類似物包括，但不限於，與一胺基酸結構相同的化合物，如本文所定義，除了在胺基及羰基之間包含一或多個額外伸甲基（例如， α -胺基 β -羧基酸（a-amino β -carboxy acids）），或者藉由一類似反應基團取代該胺基或羰基（例如，以二級或三級胺取代該一級胺，或以一酯取代該羰基）。

【0387】 除非額外指明，該領域技術可採用的分子生物學、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學的常規技術，可用以實施本文所描述的方法。此等技術係完整解釋在文獻中，例如，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook 等人，1989)；Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984)；Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987)；Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.)；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987)；Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel 等人，eds., 1987)；PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等人，eds., 1994)；Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan 等人，eds., 1991)；The Immunoassay Handbook (David Wild, ed., Stockton Press NY, 1994)；Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow 等人，eds., 1987)；以及 Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W.H. Albert, and N.A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993)。

【0388】 術語「胜肽」及本文所使用的類似術語指的是任何

長度之胺基酸殘基的任何聚合物。該聚合物可為直鏈或非直鏈（例如，支鏈），其可包含經修改的胺基酸或胺基酸類似物。該術語也包括經自然修改或藉由干涉（intervention），例如藉由雙硫鍵的形成、醣化、酯化（lipidation）、乙醯化、磷酸化、或任何其他的修改或處理，例如以標記或生物活性組分接合的胺基酸聚合物。

【0389】 發明人已發現本發明該特定胜肽接合物係具有免疫活性。

【0390】 細胞媒介免疫（cell-mediated immunity）主要係由 T 淋巴球所調節。病原性抗原係由抗原呈現細胞（例如巨噬細胞、B-淋巴球、及樹狀細胞）的表面來表現，鍵結至主要組織相容性 MHC 類型 I 分子或 MHC 類型 II 分子。耦合至 MHC 類型 II 之病原性抗原的呈現係活化輔助性（CD4+）T 細胞的反應。經由 T 細胞與抗原-MHC II 複合物結合，CD4+ T 細胞會釋放細胞介素並增殖。

【0391】 鍵結至 MHC 類型 I 分子之病原性抗原的呈現會活化胞毒殺性（CD8+）T 細胞反應。經由 T 細胞與抗原-MHC I 複合物結合，CD8+ T 細胞將分泌穿孔素及其他調節物（mediator），造成目標細胞死亡。在不受任何理論限制的情形下，申請人相信在特定實施態樣中，在由 CD4+細胞辨識的一或多個抗原決定位存在下，CD8+細胞的反應將會增強。

【0392】 評估及監控在一個體中之細胞媒介反應的發生或進行的方法係為業界所周知。簡便的例示性方法包括評估那些在一或多個與細胞媒介反應相關之細胞介素的存在或濃度，例如那些本文所確定者。同樣的，評估或監控一細胞媒介反應的發生或進行之基於細胞的方法可使用在本發明中，且可包括細胞增生或活

化試驗，包括目標為確定的一或多個免疫細胞族群（例如，T 淋巴球）的活化或擴大之評估。

【0393】 在特定實施態樣中，本發明方法引發細胞媒介的免疫反應及體液性反應（humoral response）。

【0394】 體液性免疫反應係經由 B 細胞所製造分泌的抗體來調節。分泌的抗體與出現在入侵病原體表面的抗原結合，標記他們以摧毀。

【0395】 評估及監控體液性反應的發生或進行的方法係業界已知。此等包括抗體結合試驗、酵素免疫測定法（ELISA）、皮膚點刺測試（skin-prick test）等。

【0396】 不欲受任何理論的約束，發明人相信在一些實施態樣中，該胜肽接合物會刺激 Toll 類似受體（Toll like receptors，TLRs）。

【0397】 Toll 類似受體係高度保守的模式辨識受體（pattern recognition receptors，PRRs），其辨識病原相關分子模式並傳送危險訊號至細胞（Kawai, T., Akira, S., *Immunity* **2011**, 34, 637-650）。TLR2 係表現在一範圍之不同種細胞表面的受體，包括樹狀細胞、巨噬細胞及淋巴細胞（Coffman, R. L., Sher, A., Seder, R. A., *Immunity* **2010**, 33, 492-503）。

【0398】 TLR2 辨識廣範圍的微生物組分，包括酯多醣、肽聚醣及酯壁酸。在 TLRs 中特別的是其與任一 TLR1 或 TLR6 形成異二聚體；與其他 PRRs 形成錯合物的能力可解釋 TLR2 的廣泛促效劑（Feldmann, M., Steinman, L., *Nature* **2005**, 435, 612-619）。當配位子結合及雜二聚化（heterodimerisation）時，訊號會經由 MyD88

傳遞路徑發生，造成 NF κ B 活化以及發炎及效應物細胞介素（effector cytokines）的隨後產生。

【0399】 衍生自細菌細胞壁組分的二-及三醯基化脂肽已如同 TLR2 促效劑般地被深入的研究（Eriksson, E. M. Y., Jackson, D. C., *Curr. Prot. and Pept. Sci.* **2007**, 8, 412-417）。脂肽已被報導為可促進樹狀細胞成熟，造成在細胞表面上共刺激分子的正向調控並增強抗原呈現。脂肽也被報導為可刺激巨噬細胞以釋出細胞介素並促進包括 B 細胞以及 CD8+ T 細胞之淋巴細胞的活性。

【0400】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物係具有 TLR2 促效劑的活性。在一些實施態樣中，該胜肽接合物具有相當於 Pam3CSK4 之 TLR2 促效劑的活性。在一些實施態樣中，該胜肽接合物係具有 Pam3CSK4 之活性的至少約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90% 的 TLR2 促效劑活性。在一些實施態樣中，例如在欲調節免疫反應的實施態樣中，該胜肽接合物係具有低於 Pam3CSK4 的 TLR2 促效劑活性。在一些實施態樣中，胜肽接合物係具有 Pam3CSK4 之活性的低於約 50%、低於約 40%、低於約 30%、低於約 20%、低於約 10% 的 TLR2 促效劑活性。

【0401】 在一些實施態樣中，該胜肽接合物及／或含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一鄰近該胺基酸的絲胺酸殘基，含脂質的接合配偶體由之而接合至該胜肽。在一些實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一鄰近該胺基酸的絲胺酸殘基，含脂質的接合配偶體由之而接合至該胜肽。該絲胺酸殘基的存在可增強 TLR2 的結合。在一些實施態樣中，該絲胺酸殘基係與該胺基酸的 C-端結合，該含脂質接合配偶體由之而與該胜肽接合。

【0402】 熟習此項技術者在閱讀本揭露後將可理解，該胜肽接合物可包含一抗原決定位，包括，例如二或多個抗原決定位。在一些實施態樣中，該抗原決定位係一胜肽抗原決定位。熟習此項技術者可了解本發明可以採用廣範圍的胜肽抗原決定位。

【0403】 抗原

【0404】 可理解的事，大量的抗原，例如，腫瘤抗原或來自多種病原性有機體的抗原，係已被描述其特徵且適於用在本發明中。所有能夠引發一免疫反應的抗原，無論現在是否描述其特徵，均為本文所考量者。

【0405】 因此，根據抗原的選擇，本發明接合物可應用在廣泛的免疫治療中，包括但不限於傳染病的預防及治療、癌症的預防及治療、及在免疫抑制其間或之後的病毒再活化的治療，例如在有骨髓移植或造血幹細胞移植的病患中。

【0406】 本文也考量包含一或多個胺基酸取代基的抗原，例如一或多個保守性胺基酸取代基。

【0407】 一「保守性胺基酸取代基」係一個經其他具有化學相似或衍生側鏈之殘基取代的胺基酸殘基。具有例如相似側鏈之胺基酸殘基的家族，已於業界被定義。此等家族包括，例如，胺基酸之帶有鹼性側鏈者（例如，離胺酸、精胺酸、組胺酸）、帶有酸性側鏈者（例如，天冬胺酸、麩胺酸）、不帶電荷之極性側鏈者（例如，甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸）、非極性側鏈者（例如，丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸）、 β -分支側鏈者（例如，蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸）及芳香族側鏈者（例如，酪

胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。本發明也考量胺基酸類似物(例如,經磷酸化或醣基化的胺基酸),為經非自然存在胺基酸取代的胜肽,包括但不限於 N-烷基化胺基酸(例如, N-甲基化胺基酸)、D-胺基酸、 β -胺基酸、及 γ -胺基酸。

【0408】 也特別考量抗原的片段及變體 (variant)。

【0409】 一胜肽的「片段」,係該胜肽的一子序列,其係進行一為酵素活性或結合活性所必須的功能及/或提供該胜肽的三維結構,例如一多胜肽的三維結構。

【0410】 本文所使用的用語「變體」指的是胜肽序列,包括例如不同於特別辨識之序列的胜肽序列,其中一或多個胺基酸殘基係經刪除、取代、或增加。變體係自然存在的變體,或係非自然存在的變體。變體係來自相同或其他物種且可包含同系物 (homologues)、旁系物 (paralogues) 及直系物 (orthologues)。在特定實施態樣中,胜肽的變體包括胜肽所具備之生物活性係與野生種胜肽相同或類似。用語「變體」使用於胜肽係包含本文所定義之所有形式的胜肽。

【0411】 熟習此項技術者將理解本發明接合物在特定的實施態樣中係特別適於刺激 T 細胞反應,例如在治療腫瘤疾病、包括癌症。特別考量者係包含一或多個腫瘤抗原之本發明接合物。將理解被考量以用於製備本發明胜肽接合物之腫瘤抗原一般係包含一或多個胜肽。在本發明特定實施態樣中,包括例如本發明醫藥組合物,可存在一或多個額外的腫瘤抗原,其中該一或多個腫瘤抗原係不包含胜肽。腫瘤抗原一般而言係分類為獨特抗原 (unique antigens) 或共享抗原 (shared antigens),後者群組係包括分化抗原、

癌症專一性抗原、及過度表現抗原。每一類別的例子皆適合使用於本發明。用於治療的代表性腫瘤抗原，例如免疫治療、或對抗包括癌症之腫瘤疾病的接種，係於下述討論。使用該等免疫方法所製備之化合物、疫苗及包含一或多種抗原的組合物係特別被考量者。

【0412】 在特定實施態樣中，該腫瘤抗原係一含胜肽的腫瘤抗原，例如一多胜肽腫瘤抗原或醣蛋白腫瘤抗原。在特定實施態樣中，該腫瘤抗原係一含多醣的腫瘤抗原，例如糖酯腫瘤抗原或神經節苷酯腫瘤抗原。在特定實施態樣中，該腫瘤抗原係一表現一含多胜肽之腫瘤抗原的含聚核苷酸的腫瘤抗原，例如，一 RNA 載體構築體或一 DNA 載體構築體，例如質體 DNA。

【0413】 適合用於本發明的腫瘤抗原係包含多種不同的分子，例如（a）含抗原的腫瘤抗原，包括胜肽抗原決定位（其長度可為 8 至 20 個胺基酸，儘管在這個範圍外的長度亦為常見）、酯多胜肽及醣蛋白、（b）含多醣的腫瘤抗原，包括聚多醣、液素、神經節苷酯、醣酯及醣蛋白、包括及（c）聚核苷酸，其表現抗原性多胜肽。再一次，熟習此項技術者將意識到存在於本發明接合物或組合物的腫瘤抗原通常將包含胜肽。然而，所考量者為本發明實施態樣中，其中一或多個接合物係包含一腫瘤抗原，其本身不包含胜肽、但是例如結合至包含胺基酸或含胜肽的接合配偶體。同樣的，所考量者為本發明組合物中，存在一或多個其本身不含胜肽的腫瘤抗原。

【0414】 在特定實施態樣中，該腫瘤抗原係，例如，（a）與癌症細胞有關的完整長度分子，（b）其同系物及修改形式，包括具有經刪除、加入及／或取代部分的分子，及（c）其片段，其條件

為該片段係維持其抗原性或免疫性。在特定實施態樣中，該腫瘤抗原係以重組的形式提供。在特定實施態樣中，該腫瘤抗原係包括，例如，由 CD8+淋巴細胞所辨識的類形 I -限制抗原或者由 CD4+淋巴細胞所辨識的類型 II -限制抗原。

【0415】 一般認為共享腫瘤抗原 (shared tumour antigens) 係天然、未突變的序列，其係因表觀遺傳改變 (epigenetic change) 而由腫瘤表現，該改變允許發育性抑制基因 (developmentally-repressed genes) 的去抑制 (de-repression)。因此，共享抗原通常係被認為較佳係過度表現或分化相關的抗原，因為其在正常組織中不會表現。同時，相同抗原可在一些癌症患者中被標記。舉例言之，睪丸癌抗原 NY-ESO-1 係出現在主要帶有許多腫瘤的患者，以及為數眾多之次要帶有其他腫瘤的患者中。在另一例子中，乳房分化腫瘤抗原 NYBR-1 及 NYBR-1.1 係發現於一比例的乳癌病患中。共享腫瘤抗原從而代表一吸引人的開發標的。

【0416】 在本發明接合物中使用共享腫瘤抗原，例如睪丸癌抗原包括 NY-ESO-1、CTSP-1、CTSP-2、CTSP-3、CTSP-4、SSX2、及 SCP1，及乳癌抗原 NYBR-1 及 NYBR-1.1，係於本文中被特別考量。

【0417】 在一例示性的實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體或該胜肽接合物的胜肽係包含一或多個衍生自 NY-ESO-1 的抗原決定位。在一實施態樣中，該胜肽係包含一或多個衍生自 NY-ESO-1 殘基 79-116 的抗原決定位。在一實施態樣中，該胜肽係包含一或多個衍生自 NY-ESO-1 殘基 118-143 的抗原決定位。在一實施態樣中，該胜肽係包含一或多個衍生自 NY-ESO-1 殘基 153-180 的抗原

決定位。

【0418】 在一特別考量的實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體或胜肽接合物的胜肽係一包含、實質上由、或係由 SEQ ID NOs：1 至 20 中的 8 或更多個、10 或更多個鄰接的、12 或更多個鄰接的、15 或更多個鄰接的、20 或更多個鄰接的、或 25 或更多個鄰接的胺基酸所組成的胺基酸序列。

【0419】 在各式實施態樣中，該胜肽係包含多於一個選自由 SEQ ID NOs：1 至 20 所組成之群組的胺基酸序列。在一實施態樣中，該胜肽係包含選自由 SEQ ID NOs：4-7、12、13、及 18-20 所組成的一或多個胺基酸序列。

【0420】 同樣的，前列腺疫苗 Sipuleucel-T（APC8015，Provenge™），其包含該抗原前列腺酸性磷酸酶（antigen prostatic acid phosphatase，PAP），係存在於 95% 的前列腺癌症細胞中。至少部分由於在顯著比例之前列腺癌症患者中的潛在效果，FDA 在 2010 核准在治療無症狀、抗激素型前列腺（hormone-refractory prostate cancer）的癌症中使用 Sipuleucel-T。在本發明中特別考量的是在本發明接合物中使用 PAP 抗原。

【0421】 獨特抗原（unique antigens）被認為是彼等對於一個體是獨特的或被少部分癌症患者中所共享的抗原，且通常係由突變所造成而導致獨特的蛋白質序列。獨特腫瘤抗原的代表性例子包括突變的 Ras 抗原、及突變的 p53 抗原。熟習此項技術者在閱讀本說明書後將可理解，本發明方法使得得以迅速製備包含一或多個獨特腫瘤抗原的接合物，以例如引發特定 T 細胞對一或多個特定腫瘤抗原的反應，例如在患者特定（patient-specific）治療的製備中。

【0422】 因此，代表性腫瘤抗原包括，但不限於，(a) 抗原，例如 RAGE、BAGE、GAGE 及 MAGE 家族多胜肽，例如，GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、及 MAGE-12（其可用於，例如，處理黑色素瘤、肺、頭及頸、非小細胞肺癌（NSCLC）、乳房、胃腸道、及膀胱腫瘤），(b) 突變抗原，例如，p53（與多種固體腫瘤有關，例如，結腸直腸、肺、頭及頸癌症）、p21/Ras（例如，與黑色素瘤、胰臟癌症及結腸直腸癌症有關）、CDK4（例如，與黑色素瘤有關）、MUM1（例如，與黑色素瘤有關）、凋亡蛋白酶-8（caspase-8）（例如，與頭及頸癌症有關）、CIA 0205（例如，與膀胱癌症有關）、HLA-A2-R1701、 β -鏈蛋白（beta catenin）（例如，與黑色素瘤有關）、TCR（例如，與 T 細胞非霍奇金淋巴瘤（T-cell non-Hodgkins lymphoma）有關）、BCR-abl（例如，與慢性骨髓性白血病（chronic myelogenous leukemia）有關）、磷酸丙糖異構酶（triosephosphate isomerase）、MA 0205、CDC-27、及 LDLR-FUT，(C) 過度表現抗原，例如，半乳糖凝集素 4（Galectin 4）（例如，與結腸直腸癌有關）、半乳糖凝集素 9（例如，與霍奇金病（Hodgkin's disease）有關）、蛋白質酶 3（proteinase 3）（例如，與慢性骨髓白血病有關）、威耳姆氏腫瘤抗原-1（Wilm's tumour antigen-1，WT 1）（例如，與多種白血病有關）、碳酸酐酶（例如，與腎癌有關）、醛醇酶 A（aldolase A）（例如，與肺癌有關）、PRAME（例如，與黑色素瘤有關）、HER-2/neu（例如，與乳房、結腸、肺及卵巢癌症有關）、 α -胎兒蛋白（alpha-fetoprotein）（例如，與肝細胞癌有關）、KSA（例如，與結腸直腸癌有關）、胃泌素（例如，與胰臟及胃癌有關）

關)、端粒酶催化蛋白(MUC-1)(例如,與乳房及卵巢癌有關)、G-250(例如,與腎細胞惡性腫瘤有關)、p53(例如,與乳房、結腸癌有關)、及胚性癌抗原(carcinoembryonic antigen)(例如,與乳癌、肺癌、及該腸胃道癌症例如結腸直腸癌有關),(d)共享抗原,例如,黑色素瘤-黑色素細胞分化抗原,例如 MART-1/Melan A、gp100、MC1R、黑色素細胞-刺激激素受體、酪胺酸酶、酪胺酸酶相關蛋白質-1/TRP1(tyrosinase related protein-1/TRP1)及酪胺酸酶相關蛋白質-2/TRP2(tyrosinase related protein-2/TRP2)(例如,與黑色素瘤相關),(e)前列腺相關抗原,例如 PAP、前列腺血清抗原(PSA)、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2,例如,與前列腺癌相關,(f)免疫球蛋白獨特型(immunoglobulin idiotypes)(例如,與骨髓瘤及 B 細胞淋巴瘤有關),及(g)額外腫瘤抗原,例如含多勝肽-及多醣的抗原,包括(i)醣蛋白,例如唾液化 Tn(sialyl Tn)及唾液化 Le.sup.x(sialyl Le.sup.x)(例如,與乳癌及結腸直腸癌有關)及各種黏液素;醣蛋白係耦合至一載體蛋白(例如,MUC-1 係耦合至 KLH);(ii)酯多勝肽(例如,MUC-1 連接至一脂質部分);(iii)多醣(例如,Globo H 合成性六醣),其係耦合至一載體蛋白(例如,至 KLH);(iv)神經節苷酯,例如 GM2、GM12、GD2、GD3(例如,與腦癌、肺癌、黑色素瘤有關),其亦耦合至載體蛋白(例如,KLH)。

【0423】 其他適合用於本發明的代表性腫瘤抗原包括 TAG-72(參見,例如,美國專利第 5,892,020 號);人類惡性腫瘤抗原(參見,例如,美國專利第 5,808,005 號);來自骨惡性腫瘤的 TP1 及 TP3 抗原(參見,例如,美國專利第 5,855,866 號);來

自腺惡性腫瘤的湯姆森-弗三氏 (Thomsen-Friedenreich, TF) 抗原 (參見, 例如, 美國專利第 5,110,911 號); 來自人類前列腺腺惡性腫瘤的 KC-4 抗原 (參見, 例如, 美國專利第 4,743,543 號); 人類結腸直腸癌抗原 (參見, 例如, 美國專利第 4,921,789 號); 來自囊腺惡性腫瘤的 CA125 抗原 (參見, 例如, 美國專利第 4,921,790 號); 來自人類乳房惡性腫瘤的 DF3 抗原 (參見, 例如, 美國專利第 4,963,484 號及 5,053,489 號); 人類乳房腫瘤抗原 (參見, 例如, 參見例如美國專利第 4,939,240 號); 人類黑色素瘤的 p97 抗原 (參見, 例如, 美國專利第 4,918,164 號); 惡性腫瘤或血清類黏蛋白相關抗原 (carcinoma or orosomucoid-related antigen, CORA) (參見, 例如, 美國專利第 4,914,021 號); 人類乳房惡性腫瘤之醣蛋白中的 T 及 Tn 半抗原、MSA 乳房惡性腫瘤醣蛋白; MFGM 乳房惡性腫瘤抗原; DU-PAN-2 胰臟惡性腫瘤抗原; CA125 卵巢惡性腫瘤抗原; YH206 肺惡性腫瘤抗原、 α 胎兒蛋白 (Alphafetoprotein, AFP)、肝細胞惡性腫瘤抗原; 胚性癌抗原 (CEA); 腸道癌抗原; 皮膜腫瘤抗原 (ETA); 乳癌抗原; 酪胺酸酶; 該 raf 至癌基因產物; gp75; gp100; EBV-LMP 1 & 2; EBV-EBNA 1、2 & 3C; HPV-E4、6、7; CO17-1A; GA733; gp72; p53; 蛋白質酶 3; 端粒酶; 及黑色素瘤神經節苷酯。這些及其他腫瘤抗原, 無論目前是否已被描述其特徵, 均被考量以用於本發明中。

【0424】 在特定實施態樣中, 腫瘤抗原係衍生自經突變或改變的細胞組分。經改變的細胞組分的代表性例子包括, 但不限於 ras、p53、Rb、由威耳姆氏腫瘤基因編碼的經改變蛋白質、泛素、黏液素、由 DCC、APC、及 MCC 基因編碼的蛋白質, 及受體或類

似受體的結構，例如 neu、甲狀腺激素受體（thyroid hormone receptor）、血小板衍生生長因子（platelet derived growth factor，PDGF）受體、胰島素受體、表皮生長因子（epidermal growth factor，EGF）受體、及群落刺激因子（colony stimulating factor，CSF）受體。

【0425】 使用於本發明的含聚核苷酸抗原係包括編碼如上所列之多胜肽腫瘤抗原的聚核苷酸。在特定實施態樣中，該含聚核苷酸抗原係包括，但不限於，DNA 或 RNA 載體構築體，例如質體載體（例如，pCMV），其可在體內表現多胜肽腫瘤抗原。

【0426】 本發明也考量包含病毒抗原之接合物的製備，該抗原可在經免疫抑制的患者中刺激 T 細胞引發有效的對抗病毒的免疫力，例如骨髓移植、造血幹細胞移植、或其他進行免疫抑制的患者。

【0427】 同樣地，衍生自與癌症發病率增加有關之病毒，或被報導為造成癌症的抗原，例如人類乳突狀病毒、A 型肝炎病毒、及 B 型肝炎病毒，係被考量以使用於本發明中。

【0428】 例如，在特定實施態樣中，該腫瘤抗原係包括但不限於，p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、艾司坦-巴爾病毒抗原（Epstein Barr virus antigens）、人類乳突狀病毒（HPV）抗原，包括 E6 及 E7、肝炎 B 及 C 型病毒抗原、人類 T 細胞淋巴細胞抗原、TSP-180、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、mn-23H1、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、p16、TAGE、PSCA、CT7、43-9F、5T4、791 Tgp72、beta-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3（CA 27.29

\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90 (Mac-2 結合蛋白\親環素 C-相關蛋白 (Mac-2 binding protein\cyclophilin C-associated protein))、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、及其類似物。

【0429】 用於對抗病原性微生物之疫苗免疫作用的代表性抗原係於下述討論。使用該等免疫方法所製備之化合物、疫苗及包含一或多個抗原的組合物係特別被考量者。

【0430】 結核病抗原

【0431】 將理解的是，大量的 *M. tuberculosis* 抗原已被描述其特徵且係適用於本發明。所有 *M. tuberculosis* 抗原，無論目前是否已被描述其特徵，只要可以引發免疫反應皆為所考量者。

【0432】 適用的例示性 *M. tuberculosis* 抗原係包括早期分泌抗原標的(early secretory antigen target)(ESAT)-6、Ag85A、Ag85B (MPT59)、Ag85B、Ag85C、MPT32、MPT51、MPT59、MPT63、MPT64、MPT83、MPB5、MPB59、MPB64、MTC28、Mtb2、Mtb8.4、Mtb9.9、Mtb32A、Mtb39、Mtb41、TB10.4、TB10C、TB11B、TB12.5、TB13A、TB14、TB15、TB15A、TB16、TB16A、TB17、TB18、TB21、TB20.6、TB24、TB27B、TB32、TB32A、TB33、TB38、TB40.8、TB51、TB54、TB64、CFP6、CFP7、CFP7A、CFP7B、CFP8A、CFP8B、CFP9、CFP10、CFP11、CFP16、CFP17、CFP19、CFP19A、CFP19B、CFP20、CFP21、CFP22、CFP22A、CFP23、CFP23A、CFP23B、CFP25、CFP25A、CFP27、CFP28、CFP28B、

CFP29、CFP30A、CFP30B、CFP50、CWP32、hspX (α -結晶)、APA、結核菌純化蛋白衍生物 (Tuberculin purified protein derivative, PPD)、ST-CF、PPE68、LppX、PstS-1、PstS-2、PstS-3、HBHA、GroEL、GroEL2、GrpES、LHP、19 千道爾頓酯蛋白 (19kDa lipoprotein)、71 千道爾頓蛋白質 (71kDa)、RD1-ORF2、RD1-ORF3、RD1-ORF4、RD1-ORF5、RD1-ORF8、RD1-ORF9A、RD1-ORF9B、Rv1984c、Rv0577、Rv1827、BfrB、Tpx、Rv1352、Rv1810、PpiA、Cut2、FbpB、FbpA、FbpC、DnaK、FecB、Ssb、RplL、FixA、FixB、AhpC2、Rv2626c、Rv1211、Mdh、Rv1626、Adk、ClpP、SucD (Belisle et al, 2005; US 7,037,510 ; US 2004/0057963 ; US 2008/0199493 ; US 2008/0267990)，或者上述所提抗原的至少一個抗原性部分或任何 T 細胞抗原決定位。

【0433】 肝炎抗原

【0434】 許多肝炎抗原已被描述其特徵，且係適於用於本發明。例示性的 C 型肝炎抗原包括 C – p22、E1 – gp35、E2 – gp70、NS1 – p7、NS2 – p23、NS3 – p70、NS4A – p8、NS4B – p27、NS5A – p56/58、及 NS5B – p68，以及一或多個自其所衍生的抗原性部分或抗原決定位，皆各（無論是單獨或是組合）適用於本發明的應用中。所有的肝炎抗原，無論目前是否已被描述其特徵，只要可引發免應反應就為所考量者。

【0435】 流行性感冒抗原

【0436】 許多流行性感冒抗原已被描述其特徵，且係適用於本發明。適用於本發明之例示性的流行性感冒抗原包括 PB、PB2、PA、任何的血球凝集素 (HA) 或神經胺酸酶 (NA) 蛋白質、NP、

M、及 NS、以及一或多個自其所衍生的抗原性部分或抗原決定位，皆各（無論是單獨或是組合）適用於本發明的應用中。所有的流行性感冒抗原，無論目前是否已被描述其特徵，只要可以引發免疫反應就為所考量者。

【0437】 炭疽病抗原

【0438】 許多 *B. anthracis* 抗原已被定義為用於接種研究的潛力候選者，且有用於本發明。例如，PA83 係一用於疫苗開發的此種抗原。目前，只有一個經 FDA 認證的可用於炭疽病的疫苗，稱為「炭疽病吸附疫苗（Anthrax Vaccine Adsorbed, AVA）」或者 BioThrax®。此疫苗係衍生自該吸附至鋁佐劑之 *B. anthracis* 之無莢膜株的無細胞上清液中。PA 係 AVA 中的初級免疫原。其他適合用於本發明之例示性的炭疽病抗原包括保護性抗原（PA 或 PA63）、LF 及 EF（蛋白質）、聚- γ -（D-麩胺酸）膠囊（poly-gamma-（D-glutamate）capsule）、孢子抗原（內生孢子特異性組分）、BclA（外芽孢膜特異性蛋白質）、BxpB（孢子相關蛋白質）、及分泌蛋白質。所有的炭疽病抗原以及一或多個自其衍生的抗原性部分或抗原決定位，無論目前是否已被描述其特徵，只要可引發免疫反應就為所考量者。

【0439】 土勒病抗原（*Tularemia antigens*）

【0440】 許多 *F. tularensis* 抗原已被定義為用於疫苗開發之具潛力的候選者，且有用於本發明。舉例言之，AcpA 及 IglC 係一適用於疫苗開發的此種抗原。其他適用於本發明之例示性的土勒病抗原包括 O-抗原（O-antigen）、CPS、外膜蛋白質（例如，FopA）、酯蛋白（例如，Tul4）、分泌性蛋白質及酯多醣。所有的土勒病抗

原以及一或多個自其衍生的抗原性部分或抗原決定位，無論目前是否已被描述其特徵，只要可引發免疫反應就為所考量者。

【0441】 布氏桿菌病抗原 (**Brucellosis antigens**)

【0442】 許多 *B. abortus* 抗原已被定義為用於疫苗開發之具潛力的候選者，且有用於本發明。舉例言之，Omp16 係一適用於疫苗開發的此種抗原。其他適用於本發明之例示性的布氏桿菌病抗原包括 O-抗原、酯多醣、外膜蛋白質（例如，Omp16）、分泌性蛋白質、核糖體蛋白質（例如，L7 及 L12）、細菌鐵蛋白（bacterioferritin）、p39（一推定細胞週質結合蛋白質（putative periplasmic binding protein））、groEL（熱休克蛋白質）、2,4 二氧四氫蝶啶合成酶（lumazine synthase）、BCSP31 表面蛋白質、PAL16.5 外膜酯蛋白（OM lipoprotein）、過氧化氫酶、26 千道爾頓細胞週質蛋白質、31 千道爾頓 Omp31、28 千道爾頓外膜蛋白質、25 千道爾頓外膜蛋白質及 10 千道爾頓外膜酯蛋白。所有的布氏桿菌病抗原以及一或多個自其衍生的抗原性部分或抗原決定位，無論目前是否已被描述其特徵，只要可引發免疫反應皆為所考量者。

【0443】 腦膜炎抗原

【0444】 許多 *N. meningitidis* 抗原已被定義為用於疫苗開發之具潛力的候選者，且有用於本發明。舉例言之，Cys6、PorA、PorB、FetA、及 ZnuD 係適用於疫苗開發的抗原。其他適用於本發明之例示性的腦膜炎抗原包括 O-抗原、因子 H 結合蛋白（factor H binding protein, fHbp）、TbpB、NspA、NadA、外膜蛋白質、B 群 CPS、分泌蛋白質及酯多醣。所有的腦膜炎抗原以及一或多個自其衍生的抗原性部分或抗原決定位，無論目前是否已被描述其特

徵，只要可引發免疫反應就為所考量者。

【0445】 登革熱抗原

【0446】 許多黃病毒抗原已被定義為用於疫苗開發之具潛力的候選者，且有用於本發明。舉例言之，黃病毒套膜蛋白質 E1-E4 及膜蛋白 M1-M4 係適用於疫苗開發的抗原。其他適用於本發明之例示性的登革熱抗原包括 C、preM、1、2A、2B、3、4A、4B 及 5。所有的登革熱抗原以及一或多個自其衍生的抗原性部分或抗原決定位，無論目前是否已被描述其特徵，只要可引發免疫反應就為所考量者。

【0447】 伊波拉抗原 (Ebola antigens)

【0448】 許多伊波拉抗原已被定義為用於疫苗開發之具潛力的候選者，且有用於本發明。舉例言之，絲狀病毒屬 (*Filoviridae*) 之薩伊伊波拉病毒病毒粒子尖刺醣蛋白前驅抗原 (Zaire ebolavirus virion spike glycoprotein precursor antigens, ZEBOV-GP) 及蘇丹伊波拉病毒病毒粒子尖刺醣蛋白前驅抗原 (Sudan ebolavirus virion spike glycoprotein precursor antigens, SEBOV-GP) 係分別適用於疫苗開發。其他適用於本發明之例示性的伊波拉抗原包括 NP、vp35、vp40、GP、vp30、vp24 及 L。所有的伊波拉抗原以及一或多個自其衍生的抗原性部分或抗原決定位，無論目前是否已被描述其特徵，只要可引發免疫反應就為所考量者。

【0449】 西尼羅河抗原 (West Nile antigens)

【0450】 許多西尼羅河病毒 (West Nile virus, WNV) 抗原已被定義為用於疫苗開發之具潛力的候選者，且有用於本發明。舉例言之，源自西尼羅河病毒的黃病毒套膜抗原 (*Flavivirus envelope*

antigen，E）係表現於 WNV 病毒粒子（WNVE）表面上的非毒性蛋白質，且係適用於疫苗開發。其他適合用於本發明之例示性的 WNV 抗原包括 Cp、Prm、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5。

【0451】 所有的西尼羅河抗原以及一或多個自其衍生的抗原性部分或抗原決定位，無論目前是否已被描述其特徵，只要可引發免疫反應就為所考量者。

【0452】 上述所列或參照的抗原係用以例示，而非限制本發明。

【0453】 本發明亦關於一種醫藥組合物，包含有效量之本發明胜肽接合物或其醫藥上可接受之鹽或其溶劑，及一醫藥上可接受之載劑。

【0454】 本發明係關於一種醫藥組合物，包含有效量之本發明胜肽或其醫藥上可接受之鹽或其溶劑的，及一醫藥上可接受之載劑。

【0455】 該醫藥組合物可包含有效量的二或多個本發明胜肽、二或多個本發明胜肽接合物、或組合一或多個本發明胜肽及一或多個本發明胜肽接合物。

【0456】 用語「醫藥上可接受之載劑」係指一載劑（佐劑或載具（vehicle））其可與本發明胜肽或胜肽接合物，或其醫藥上可接受之鹽或其溶劑，及一醫藥上可接受之載劑一起投予至一個體中。

【0457】 可用於組合物之醫藥上可接受的載劑包括，但不限於，離子交換劑、氧化鋁、硬酯酸鋁、卵磷脂、自乳化藥物傳輸

系統 (self-emulsifying drug delivery systems, SEDDS) (例如 d- α -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯, d- α -tocopherol polyethyleneglycol 1000 succinate)、用於醫藥劑型的界面活性劑 (例如 Tweens 或其他類似的聚合傳送基質)、血清蛋白質 (例如人類血清蛋白素, human serum albumin)、緩衝物質 (例如磷酸鹽)、甘胺酸、山梨酸、己二烯酸鉀、飽和植物性脂肪酸的偏甘油酯混合物、水, 鹽或電解質, 例如硫酸魚精蛋白、磷酸氫二鈉、磷酸氫二鉀、氯化鈉、鋅鹽、膠態矽、三矽酸鎂、聚乙烯氫吡咯酮 (polyvinyl pyrrolidone)、纖維素基物質 (cellulose-based substances)、聚乙二醇、羧甲基纖維素鈉、蠟、聚丙烯酸酯 (polyacrylates)、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物 (polyethylene-polyoxypropylene-block polymers)、聚乙二醇及羊毛酯。亦可有利地使用環糊精, 例如 α -、 β -、及 γ -環糊精、或者化學修改衍生物, 例如羥烷基環糊精, 包括 2-及 3-羥丙基- β -環糊精 (3-hydroxypropyl- β -cyclodextrins), 或其他可溶性衍生物, 以增進傳送。油溶液或懸浮液可亦含一長鏈醇稀釋劑或分散劑, 或羧甲基纖維素鈉或類似的分散劑, 其係通常使用於醫藥上可接受劑型, 例如乳化液及或懸浮液的製劑中。

【0458】 組合物係配製為允許以任何選定的途徑投予至一個體中, 包括但不限於經口服或腸胃外 (包括局部、皮下、肌肉內及靜脈內) 投予。

【0459】 舉例言之, 該組合物可根據投藥路徑及標準醫藥實務而選擇一合適的醫藥上可接受的載劑 (包括賦形劑、稀釋劑、助劑、及其組合) 來配製。例如, 該組合可為口服投予之粉末、液體、錠劑或膠囊, 或局部給藥 (topically) 之軟膏劑、膏劑 (cream)

或洗劑。合適的配方可視需要含有額外的試劑，包括乳化劑、抗氧化劑、增香劑（flavouring agents）或著色劑（colouring agents），且可適於立即釋放、延遲釋放、修正釋放（modified-release）、持續釋放、脈衝型釋放或控制釋放。

【0460】 該組合物可經配製以最適化生物活性、免疫原性（immunogenicity）、或維持血漿、血液、或組織濃度在免疫性或者治療性範圍中，包括延長的期間。例如，經控制的傳送製劑亦可用以最適化在作用部位的抗原濃度。

【0461】 該組合物可經配製以週期性投予，例如提供連續性的暴露。引發一有利於免疫反應的策略，例如那些採用一或多個「追加（booster）」疫苗免疫作用係業界已知的，且此策略可被採納。

【0462】 該組合物可經由腸胃外途徑投予。腸胃外劑型的例子包括水性溶液、等張鹽水或 5%葡萄糖的活性劑、或其他已知的醫藥上可接受的賦形劑。例如，環糊精，或其他熟習此項技藝之人士所熟知的增溶性試劑，可用作一醫藥賦形劑以傳送該治療試劑。

【0463】 適於口服的劑型的例子包括，但不限於，片劑、膠囊、錠劑、或類似形式、或者任何液體形式例如糖漿、水性溶液、乳劑及其類似物，可以提供一治療有效量的組合物。膠囊可含任何標準的醫藥上可接受物質，例如明膠或纖維素。片劑可根據傳統程序，由壓縮該活性成分的混合物與一固體載劑及一潤滑劑來配製。固體載劑的例子包括澱粉及糖基膨潤土（sugar bentonite）。活性成分可以硬殼片劑或者含一結合劑的膠囊來投予，其中該結

合劑例如乳糖或甘露醇、一普通的填充劑、及一成片劑 (tableting agent)。

【0464】 適合經皮投予 (transdermal administration) 之劑型的例子包括，但不限於，經皮貼劑 (transdermal patches)、經皮繃帶 (transdermal bandages)、及其類似物。

【0465】 適用於局部投予該組合物之劑型的例子包括任何洗劑、黏劑 (stick)、噴劑、軟膏劑、糊劑 (paste)、乳劑、凝膠等，無論是否直接或者經由媒介物例如一襯墊 (pad)、貼劑或其類似物施用在皮膚上。

【0466】 適用於栓劑投予 (suppository administration) 該組合物之劑型的例子包括插入身體孔洞，特別是插入直腸、陰道、及尿道的任何固體劑型。

【0467】 適用於注射該組合物之劑型的例子包括經由丸劑 (bolus) 傳送，例如單次或多次藉由靜脈注射、皮下、真皮下、及肌肉內投予或口服投予。

【0468】 適用於長效投予 (depot administration) 該組合物之劑型的例子包括該胜肽或胜肽接合物的沉澱物或固體形式，其中該胜肽或胜肽接合物係包埋在一可生物降解聚合物的基質、微乳劑、脂質體中或經微囊包埋者 (microencapsulated)。

【0469】 用於該組合物之輸注裝置的例子包括提供所欲劑量或穩定投予的輸注泵，且包括植入式藥物泵。

【0470】 用於該組合物之可植入輸注裝置的例子包括任何固體形式，其中該胜肽或胜肽接合物係包覆在該固體形式中或係透過一生物可降解聚合物或合成性聚合物，例如矽氧烷、矽氧橡膠、

矽橡膠或類似的聚合物而分散在該固體形式中。

【0471】 適用於經黏膜（transmucosal）傳送該組合物之劑型的例子包括存用於灌腸用直腸注射器（enemas）、子宮帽（pessaries）、衛生棉（tampons）、膏劑、凝膠、糊劑、泡沫體（foams）、霧化溶液（nebulised solutions）、粉末及含有其他業界已知之合適之活性成分的類似形式的溶液。此劑型包括適於該組合物的吸入（inhalation）或灌氣（insufflation），包括包含醫藥上可接受之水性、或有機溶劑，或其混合物及／或粉末的溶液及／或懸浮液的組合物。該組合物的黏膜投予可用於任何黏膜，但一般係用於鼻黏膜、口腔黏膜、陰道黏膜、直腸組織。該組合物適於投予鼻黏膜的形式可以液體形式投予，例如，鼻噴灑劑、鼻滴劑、或藉由噴霧器的氣霧投予劑（aerosol administration），包括該聚合物顆粒的水性或油性溶液。製劑可製為水性溶液的形式，例如在鹽水中，溶液採用苯甲醇或額外合適防腐劑、增強生物利用性的吸收促進劑、碳化氟、及／或其他業界已知的增溶劑或分散劑。

【0472】 適於口腔含化投予劑（buccal administration）或舌下投予之組合物之劑型的例子包括錠劑、片劑及其類似物。適於眼用投予（ophthalmic administration）之組合物之劑型的例子包括插劑（inserts）及／或包含在醫藥上可接受之水性、或有機溶劑中之溶液及／或懸浮液的組合物。

【0473】 組合物之劑型的例子，包括疫苗，可發現於，例如：Sweetman, S. C. (Ed.). Martindale. The Complete Drug Reference, 33rd Edition, Pharmaceutical Press, Chicago, 2002, 2483

pp.; Aulton, M. E. (Ed.) *Pharmaceutics. The Science of Dosage Form Design*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000, 734 pp.; and, Ansel, H. C., Allen, L. V. and Popovich, N. G. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th Ed., Lippincott 1999, 676 pp.。在藥物傳送系統的製造中所採用的賦形劑係描述於熟習此項技藝之人士所知之公開物，包括例如 Kibbe, E. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd Ed., American Pharmaceutical Association, Washington, 2000, 665 pp.。美國藥典委員會 (The United States Pharmacopeial Convention, USP) 也提供修改釋放之口服劑型的例子，包括該些配製成片劑或膠囊者。參見，例如，*The United States Pharmacopeia 23/National Formulary 18*, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville MD, 1995 (以下稱為「USP」)，其亦描述用以測定藥品於延長釋放 (extended-release) 及緩慢釋放 (delayed-release) 片劑及膠囊之釋放能力的特定試驗。該用於延長釋放及緩慢釋放物品之藥物釋放的 USP 試驗，係基於經過試驗時間自該劑型單位所溶解出的藥劑。各種試驗設備及程序的描述可於 USP 中發現。F.D.A.已提供有關延長釋放劑型之分析的進一步指引 (參見 *Guidance for Industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations*. Rockville, MD: Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, 1997)。

【0474】 雖然組合物可包含一或多個外部佐劑，然而有利的是在一些實施態樣中，這是沒有必要的。在一些實施態樣中，胜

肽接合物係包含一抗原決定位且係自體佐劑化(self adjuvanting)。

【0475】 本發明係提供一種在一個體中接種疫苗或引起一免疫反應的方法，包含投予該個體有效量之本發明胜肽接合物或胜肽。本發明亦關於使用本發明胜肽接合物或胜肽於一個體中接種疫苗或引起一免疫反應之用途，以及使用本發明胜肽接合物或胜肽來製造一用於一個體中接種疫苗或引起一免疫反應之藥物的用途。

【0476】 本發明亦提供一種在一個體中接種疫苗或引起一免疫反應的方法，包含投予該個體有效量之本發明醫藥組合物。本發明也關於使用本發明醫藥組合物在一個體中接種疫苗或或引發一免疫反應的用途，以及使用一或多個本發明胜肽或一或多個本發明胜肽接合物來製造一在一個體接種疫苗或引起免疫反應之藥物的用途。

【0477】 本發明係提供一種在一個體中引起一免疫反應的方法，包含投予該個體有效量之本發明胜肽。本發明也關於使用本發明接合物來引發一免疫反應的用途，及使用本發明胜肽接合物來製造一在一個體中引起免疫反應之藥物的用途。

【0478】 本發明係提供一種對一個體接種疫苗的方法，包含投予該個體有效量之本發明胜肽。本發明亦關於使用本發明接合物來引起免疫反應的用途，及使用本發明胜肽接合物來製造一在一個體中引起免疫反應之藥物的用途。

【0479】 投予或使用一或多個本發明胜肽及／或一或多個本發明胜肽接合物，例如，一或多個胜肽以及一或多個胜肽接合物，於一個體中接種疫苗或引起一免疫反應係本文所考量者。

【0480】 當投予或使用二或多個胜肽、二或多個胜肽接合物、或一或多個胜肽及一或多個胜肽接合物，該二或多個胜肽、二或多個胜肽接合物、或一或多個胜肽及一或多個胜肽接合物係可被同時、依序或分開投予或使用。

【0481】 一「個體」係意指一脊椎動物，其係哺乳動物，例如，一人類。哺乳動物包括，但不限於，人類、農場動物、放養動物（sport animals）、寵物、靈長類動物、小鼠及大鼠。

【0482】 「有效量」係足以產生有益或所欲結果（包括臨床結果）的劑量。有效量係可藉由不同的投予路徑一或多次投予。

【0483】 有效量可基於，除了其他因子外，所指疾病、疾病的嚴重程度、個體的年齡及相關的健康狀況、投予化合物的藥效、投予模式及所欲的治療而有所不同。熟習此項技術者可考量這些任何其他相關因子來決定合適的劑量。

【0484】 可在體外及體內評估組合物的效力。舉例言之，可在體外或體內測定組合物引起細胞媒介免疫的能力。對於體內研究而言，組合物可被餵食或注射至一動物中（例如，一小鼠），並評估其引發免疫反應的功效。基於這些結果，可決定合適的劑量範圍及投予途徑。

【0485】 可以單一劑量或多次劑量排程投予該組合物。多次劑量可用於一初級免疫排程（primary immunisation schedule）及／或在一個追加免疫排程（booster immunisation schedule）中。

【0486】 在特定實施態樣中，引起免疫反應係包含提高或增強免疫反應。在一例示性的實施態樣中，引起免疫反應係包含引起液體性反應及細胞媒介反應。

【0487】 在特定實施態樣中，引起一免疫反應可提供免疫力。

【0488】 該免疫反應係被引起以治療一疾病或病情。熟習此項技術者可理解本文所描述的胜肽及胜肽接合物於治療不同的疾病及病情是有用的，取決於，例如，抗原決定位的性質。

【0489】 在一些實施態樣中，該疾病或病情係選自該等與本文所描述之各種抗原相關者。

【0490】 在一些實施態樣中，一傳染疾病、癌症、或骨髓移植後的病毒重新活化，或者後續因任何原因誘發的長久的免疫抑制。

【0491】 本文所使用的術語「治療 (treatment)」，及相關術語例如「治療 (treating and treat)」一般係關於人類或非人類個體的治療，以完成一些所欲的治療效果。該治療效果可為例如抑制、降低、改善、停止、或預防一疾病或病情。

【0492】 該組合物可用於引起全身性及或黏膜性的免疫。增強的全身性及或黏膜性免疫可以增強的 TH1 及／或 TH2 免疫反應來反映。該增強的免疫反應可包括 IgG1 及／或 IgG2a 及或 IgA 製造的增加。

【0493】 實施例

【0494】 實施例 1 接合物 200、20、22、及 26 的製備

【0495】 1.1 一般細節

【0496】 從 Acros Organics、Ajax Finechem、Alfa Aesar、CEM、GL-Biochem、Merck、NOVA Biochem、Sigma Aldrich 及 TCI 購買可商購起始物料，並用以供給。在 N₂ 或氬氣氣氛下透過蒸餾製備乾燥溶劑。自鈉／二苯甲酮羰自由基

(sodium/benzophenone ketyl) 中 新 鮮 蒸 餾 出 四 氫 呋 喃 (tetrahydrofuran, THF)。自 氫 化 鈣 中 新 鮮 蒸 餾 出 甲 醇 及 甲 苯。除 非 另 有 指 出，產 量 係 參 照 均 質 材 料 的 層 析 分 析 (chromatographically) 及 光 譜 分 析 (^1H NMR)。

【0497】 在 Merck Kieselgel F₂₅₄ 200 微米的二氧化矽板上進行薄層色層分析 (TLC)。使用紫外光做為顯像劑及作為在鹼性水溶液之過錳酸鉀以及在乙醇溶液之香草晶的一般顯影劑。所使用的特定顯影劑係用作辨識一級胺之帶酸茛三酮的乙醇溶液。在使用任何顯影劑時加熱。在快速管柱色層分析 (flash column chromatography) 中使用二氧化矽凝膠 (0.063-0.100 毫米)。

【0498】 在室溫下，於 CDCl_3 或 D_2O 中，在 Bruker DRX400 光譜儀上對 ^1H 核以 400 兆赫茲操作且對 ^{13}C 核以 100 兆赫茲操作，以取得核磁共振 (NMR) 光譜。 ^1H 及 ^{13}C 光譜的參考峰值，係分別設定為針對 CDCl_3 為 $\delta 0.00$ 與 $\delta 77.0$ 且針對在 D_2O 中的 ^1H 光譜為 $\delta 4.79$ 。NMR 數據係以 δ 尺規上之以百萬分之一 (ppm) 為單位的化學位移值及以赫茲 (hertz, Hz) 為單位之耦合常數來報導。多重性 (Multiplicities) 係以如下方式報導：s = 單峰、d = 雙重峰、t = 三重峰、q = 四重峰、dd = 雙雙重峰、dt = 雙三重峰、tt = 三三重峰、dq = 雙四重峰、dq_n = 雙五重峰、sx = 六重峰、br s = 寬單峰、及 m = 多峰。 C_q 的指定係用來表示四級碳。

【0499】 於 Bruker DRX400 microOTOF-Q II 質譜儀上以 5000 的標稱解析度 (nominal resolution) 獲得高解析度質譜。在配有 Finnigan Surveyor MSQ Plus 質譜儀的 Dionex UltiMate 3000 HPLC 系統上或在配有 Hewlett Packard Series 1100 MSD 質譜儀的

Agilent 1120 Compact LC 系統上獲得分析級高效能液相層析法 (HPLC) 及液相層析質譜法 (LC-MS) 色譜。使用 MeCN/H₂O + 0.1% TFA 溶劑系統來進行分析級逆相 HPLC (Analytical reverse phase (RP) HPLC)。在一 Dionex UltiMate 3000 HPLC 系統上使用 MeCN/H₂O + 0.1% TFA 溶劑系統來進行半製備級 RP HPLC。使用 CEM Liberty Automated Microwave 系統來進行微波反應。

【0500】 1.2 用於胜肽鏈延長的一般方法

【0501】 人工合成方法

【0502】 在 DMF (5.0 毫升) 中以 20% v/v 哌啶處理經溶脹 (swelled) 的胜肽-樹脂並在室溫下搖動 20 分鐘。瀝乾該溶液並以 DMF (x2) 及 DCM (x2) 清洗該樹脂。在 DMF (1 毫升) 中加入 Fmoc-AA-OH (2.0 當量)、HBTU (2.0 當量) 及 *i*Pr₂NEt (4.0 當量) 的一耦合混合物並搖動該樹脂 1 小時。瀝乾該樹脂並再次清洗。針對序列中的其餘殘基重覆該程序。

【0503】 自動合成方法 (標準, 0.2 毫莫耳規模)

【0504】 將胜肽-樹脂轉移至一 Tribute 自動化胜肽合成器的反應容器中。以 Fmoc 去保護及 Fmoc-AA-OH 耦合步驟的循環來進行自動化合成。以在 DMF (6.0 毫升) 中加入 20% v/v 哌啶並攪拌 (2 x 7 分鐘) 來進行去保護。在樹脂引流 (resin drainage) 及 DMF 清洗 (4 毫升 x 3) 之後, 以溶解在 HBTU (0.24 毫莫耳濃度, 在 DMF 中, 4 毫升) 的 5 當量 Fmoc-AA-OH 來進行耦合步驟。在鹼加成 (base-addition) 步驟中使用在 DMF (4 毫升) 中的 2 莫耳濃度 (2M) N-甲基嗎啉 (N-methylmorpholine, NMM)。進行耦合 1 小時。在 DMF 清洗步驟後, 開始下一個去保護及耦合的循環,

重覆至所有胺基酸皆被耦合。

【0505】 耦合半胱胺酸衍生物的程序 (0.1 毫莫耳規模)

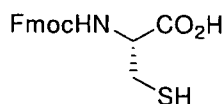
【0506】 在 1 : 1 CH_2Cl_2 : DMF 中溶脹胜肽-樹脂 30 分鐘，接著瀝乾。將 Cys 胺基酸 (0.2 毫莫耳，2 當量)、BOP (0.4 毫莫耳，4 當量) 及 HOBt. H_2O (0.4 毫莫耳，4 當量) 的混和物溶解在 1 : 1 之 CH_2Cl_2 : DMF (2 毫升) 中。接著加入 2,4,6-可力丁 (2,4,6-collidine) (0.4 毫莫耳，4 當量)，並將所得溶液加入至胜肽-樹脂中。攪拌樹脂 1 小時，或直到茚三酮試驗顯示沒有游離的胺。接著瀝乾樹脂，以 DMF (2x) 及 CH_2Cl_2 (2x) 清洗，接著乾燥。

【0507】 茚三酮測試程序

【0508】 取一小部分樹脂，以 CH_2Cl_2 清洗並使其乾燥。加入各一滴之 5% v/v 茚三酮在乙醇中的溶液、80% w/v 石碳酸在乙醇中的溶液及 2% v/v KCN 在吡啶中的溶液至該樹脂中，並加熱該混合物至 90°C 二分鐘。藍色的珠子及溶液表示存在游離一級胺，而黃色則表示不存在游離胺基。

【0509】 1.3 胺基酸接合物 200 的製備

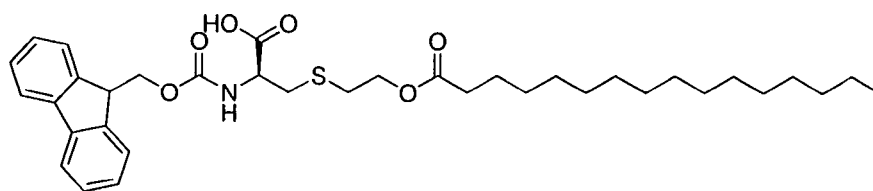
【0510】 N-苄甲氧羰基-[R]-半胱胺酸



【0511】 將 Fmoc-Cys (Trt) -OH (1.0 公克，1.7 毫莫耳) 溶解在 CH_2Cl_2 (50 毫升) 中。加入 TFA (1.5 毫升，19.6 毫莫耳) 及 $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0.75 毫升)，使該溶液轉為黃色。在室溫下攪拌該溶

液 2 小時，此時溶液轉為無色。藉由加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 使該混合物鹼化至 pH 為 9，接著以 EtOAc 清洗。以 10 莫耳濃度 (10M) HCl 酸化該溶液，以 EtOAc 來萃取並真空濃縮以取得一白色粉末及一粉紅色殘餘物。將該粉末及殘餘物溶解在 4 : 1 MeCN : H_2O 中並冷凍乾燥 (lyophilised)，得到一粗製的粉紅-白色粉末 (424 毫克，粗產量 73.1%)。此粗製產物係透過下述之硫醇-烯反應來進行。

【0512】 (R) -2- ((((9H-芴-9-基) 甲氧基) 羰基) 氨基) -3- ((2- (棕櫚醯氧基) 乙基) 硫基) 丙酸 (200) ((R) -2- ((((9H-fluoren-9-yl) methoxy) carbonyl) amino) -3- ((2- (palmitoyloxy) ethyl) thio) propanoic acid (200))



【0513】 熱引發 (Thermal Initiation) (Li, J. Dong, S.等人 Chemistry as an Expanding Resource in Protein Science: Fully Synthetic and Fully Active Human Parathyroid Hormone-Related Protein (1-141) . *Angewandte Chemie International Edition* 2012, 51 (49) , 12263-12267) .

【0514】 將 Fmoc-Cys-OH (100 毫克，0.29 毫莫耳)、軟酯酸乙烯酯 (476 微升，1.5 毫莫耳) 及 AIBN (9.6 毫克，59 微莫耳) 溶解在脫氣的 1,2-二氯乙烷 (3 毫升) 中。在回流下 (90°C) 加熱

【0536】在回流（90 度）下進行該反應 24 小時。微波加熱（1000 瓦，1 小時）產生相同的結果。以 TLC 檢測該所欲產物。也形成了許多副產物。

【0537】以 1 當量的軟酯酸乙烯酯及 0.2 當量的 DMPA 做為光引發劑來進行該反應的光引發作用。反應係在脫氣之 DMF：DMC 溶劑混合物中進行，在標準光-化學設備中以 365 奈 UV 光照射 1 小時。以 TLC 觀察到 Fmoc-Cys-OH 幾乎完全轉換。形成最小量的副產物。提供純化後約 15%產量的該產物 **200**。使用 2 當量軟酯酸乙烯酯提供純化後 44%產量的產物 **200**。

【0538】使用 NAc-CSK₄ 來進行硫醇-烯反應。如上述合成所需的胜肽基序（peptide motif）。在 Rink-Amide 連結體附上氨甲基樹脂之後，使用自動化 Fmoc-SPPS（標準耦合條件）來建立該 SK₄ 序列。接著使用減少差向異構化（epimerisation）的條件以人工方式耦合 Fmoc-Cys（Trt）-OH。接著進行 N-乙酰化。

【0539】質譜分析指出，因為半胱氨酸的三級丁基化（+56），該副產物的形成在該胜肽自該樹脂分割的時候發生。使用 Fmoc-Ser（Trt）-OH，而不是 Fmoc-Ser（t-Bu）-OH 來重覆 NAc-CSK₄ 的合成，造成一不含半胱氨酸-烷基化產物的產物。分割該胜肽並接著冷凍乾燥。

【0540】接著進行軟酯酸乙烯酯與粗製產物 **24** 的硫醇-烯反應。N-甲基吡咯烷酮（NMP）有效的溶劑化該親水性 CSK₄ 胜肽及該親油性軟酯酸乙烯酯分子。

【0541】使用過量的軟酯酸乙烯酯（至多 20 當量），以 AIBN 及微波加熱對粗製及經純化胜肽進行熱引發作用。該反應的光引

發作用提供較佳的結果。使用粗製胜肽以 DMPA 作為光引發劑在照射 1 小時後完成該反應（在 2 毫升 NMP 中，5 當量的軟酯酸乙烯酯，0.4 當量 DMPA）。藉由 MS 確認所欲產物（>90%轉換率，HPLC 純度為 60%）。

【0542】有利地，在分割後，在該硫醇-烯耦合前不需純化。藉由 RP-HPLC 的純化通常不夠有效率，常見>50%的材料損失。一般而言，盡可能減少 HPLC 所需的純化步驟是有利的。

【0543】使用半製備級 RP HPLC 上的一 Phenomenex Gemini C18 管柱運行 5-95% MeCN : H₂O + 0.1% TFA（每分鐘 3% MeCN）的梯度來完成該 N-乙醯化單醯基脂肽 22 的純化。接著冷凍乾燥該純化胜肽以得到白色粉末的所欲產物（5.1 毫克，自粗製胜肽 14.9%）。可能因為在該硫醇-烯反應中副產物的形成而導致相對低的產量。

【0544】增加該胜肽濃度至 25 毫莫耳濃度導致副產物形成的少量降低（>90%轉換率，HPLC 純度為 80%）。將濃度降低至 5 毫莫耳濃度會有反效果。

【0545】在麩胱甘胺酸（GSH）（3 當量）存在下，以 5 毫莫耳濃度胜肽在 NMP : H₂O : DMSO（4 : 2 : 1）的混合物中進行反應，導致經混合雙硫鍵的形成（50%轉換率，HPLC 純度為 75%）。使用在 NMP 中之 2,2' -（亞乙二氧基）二乙硫醇（2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol）（DODT）（3 當量）與 5 毫莫耳濃度胜肽，產生產物的一複合混合物（HPLC 轉換率為 80%）。

【0546】有利地，在該反應混合物中（NMP 中 10 毫莫耳濃度胜肽）加入 3 當量的 DTT，自軟酯酸乙烯酯之調聚反應中未觀察

到有副產物或混合二硫化物的產生，而且該反應以高轉換率進行（>90%轉換率，HPLC 純度為 85%）。可在 DMSO 中使用 DTT 來進行該反應（25 毫莫耳濃度胜肽），DMSO 為一良性且更通用的溶劑。

【0547】亦使用非乙醯化類似物 CSK₄ 來進行該硫醇-烯反應。使用上述程序來進行 CSK₄ 基序之合成。自該樹脂分割胜肽並且冷凍乾燥。在 NMP 中使用 5 當量軟酯酸乙烯酯、0.4 當量 DMPA，以 365 奈米照射 1 小時以順利進行該粗製產物的硫醇-烯反應，並給出所欲產物 20（Pam-CSK₄），以 MS 來分析。

【0548】也進行軟酯酸乙烯酯與衍生自該巨細胞病毒（CMV）ppUL83 蛋白質（「NLV 胜肽」）之免疫優勢 A*0201 限制抗原決定位的硫醇-烯反應（Kopcyński, J.等人，Sequence flexibility of the immunodominant HLA A* 0201 restricted ppUL83 CD8 T-cell of human cytomegalovirus. *Journal of medical virology* **2009**, 82 (1) 94-103)。

【0549】藉由使用標準條件的自動化 Fmoc-SPPS 來建立該 NLV 序列。接著耦合一 K₄ 標籤及一絲胺酸殘基至該序列的 N-端上。接著使用標準條件，自該合成體（synthesiser）及經人工方式耦合之半胱胺酸殘基上移除該肽基樹脂。接著進行 N-醯化。接著自該樹脂分割該胜肽並且冷凍乾燥以提供良好產量的一白色粉末。

【0550】如對於胜肽 20 及 22 的描述，使用光引發作用來進行未經保護之胜肽 25 及軟酯酸乙烯酯的硫醇-烯反應。質譜分析指出轉換為棕櫚醯化（palmitoylated）產物 26。使用經由半製備

級 RP-HPLC 上的一的 Phenomenex Gemini C18 管柱運行 5-95% MeCN : H₂O 與 0.1% TFA 的梯度來完成純化。冷凍乾燥該純化胜肽以得到白色粉末的所欲產物 (7.5%)，以及該相對應的 Met(O) 產物 (~30%)。

【0551】 遵循上述程序來進行該軟酯酸乙烯酯及粗製物 25 的硫醇-烯反應。ESI-MS 及 HPLC 分析指出轉換為棕櫚醯化產物 26 的高轉換率 (第 2a 圖及第 2b 圖)。藉由半製備級 RP-HPLC 完成純化，給出>95%純度的所欲產物 (第 2b 圖及第 2c 圖)。

【0552】 實施例 2 胜肽接合物 20、22、及 26 的生物活性

【0553】 2.1 程序

【0554】 活化全血中的人類單核球

【0555】 將 100 微升之肝素化全血 (whole blood, WB) 與 100 奈莫耳濃度、1 微莫耳濃度及 10 微莫耳濃度的個別化合物一起培養過夜 (37°C, 5% CO₂, 潮濕培養箱)，進行二重複。使用 Pam₃CSK₄ (10 微莫耳濃度；EMC Microcollections) 做為陽性控制組。為了檢測單核球的活化，在室溫下以抗 -CD14-FITC、抗 -HLA-DR-Alexa700、抗 -80-CD80-PE-Cy7、抗 -CD40-PE、抗 -CD86-APC、抗 -CD16-APC-Cy7 (皆來自 Biolegend) 避光染色 WB 樣品 20 分鐘。在培養之後，接著加入 2 毫升 BD FACS 分割液 (BD Biosciences)，在室溫下培養 15 分鐘，接著以冰冷清洗緩衝液 (PBS, 1%人類血清) 清洗 2 次。以 BD FACS Aria II (Becton Dickinson) 進行數據讀取，並使用 FlowJo software version 7.6.5 (TreeStar) 來進行分析。藉由閘控 (gating) CD14+ HLA-DR+的細胞來檢測在單核球上之 CD80 受體表現。

【0556】 2.2 討論

【0557】 藉由流式細胞儀來評定脂肽 20、22、及 26 的生物活性，以評估在新鮮血液樣品中人類單核球上之共刺激分子 CD80 的增量調節 (up-regulation) (第 1 圖)。

【0558】 在五個予體樣品中，經由特徵性細胞表面標記物 (characteristic cell surface markers) 來辨識單核球，並且在暴露於三種劑量之各種化合物的前後測定 CD80 的表現量，以商購的 Pam3CSK4 (10 微莫耳濃度) 做為陽性控制組。

【0559】 在所有經測試的劑量中，22 及 26 皆強烈增量調節 CD80 的表現量，證實大多數的予體在 10 微莫耳濃度與 Pam3CSK4 的效力相同。

【0560】 在三個予體中，相較於 22 及 26，20 顯示較低的效力，與半胱胺酸胺基的乙醯化會增強人類細胞中 TLR2 促效作用的效力一致。26 的效力證實其抗原性胜肽的接合物不會影響 TLR2 促效作用。

【0561】 實施例 3 接合物 200、120、121、110-112、112A、及 113-116 的製備

【0562】 3.1 一般細節

【0563】 經保護胺基酸及耦合試劑係自 GL-Biochem (Shanghai) 購入。用於固體-支持合成的樹脂係來自 Rapp Polymere GmbH (Tuebingen) 的預裝填天泰膠樹脂，而其他溶劑及試劑係自 Sigma (St Louis, Mo) 及 Novabiochem 所獲得。

【0564】 在一 Tribute 胜肽合成器 (Protein Technologies International, Tucson, AZ) 中使用標準的反覆的 Fmoc-固體-相胜

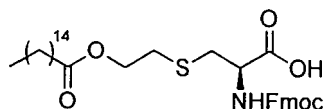
肽合成技術來進行以下描述的胜肽合成。通常以 0.1 毫莫耳規模來進行去保護及耦合循環，使用二次 20%之 DMF 中的哌啶處理（4 毫升 x 5 分鐘），接著以 DMF 清洗該樹脂，從該樹脂鍵結胺基酸移除 Fmoc 保護基團。在單獨的容器中，在 DMF（1.5 毫升）中溶解 Fmoc 胺基酸（0.5 毫莫耳）及耦合試劑（1-[雙（二甲氨基）亞甲基]-1H-1,2,3-三唑並[4,5-B]吡啶 3-氧化物六氟磷酸鹽（1-[bis（dimethylamino）methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate，HATU），0.45 毫莫耳）並加入鹼（4-甲基嗎啉，1 毫莫耳）。混合 1 分鐘後，轉移此溶液至該樹脂在室溫下攪拌 1 小時，瀝乾並清洗。

【0565】藉由在 5 毫升含 5% v/v 乙二硫醇（ethanedithiol，EDT）的三氟乙酸（TFA）中懸浮該樹脂並在室溫下攪拌 3 小時來分割該胜肽（0.1 毫莫耳規模）。在將該 TFA 倒入冷乙醚（40 毫升）之前，加入 1% v/v 三異丙基矽烷（Triisopropylsilane，TIPS）並持續攪拌 5 分鐘。以離心沉澱出該沉澱材料，丟棄醚，以醚（25 毫升）清洗一次並風乾或冷凍乾燥該沉澱物。

【0566】使用 Dionex UltiMate 3000 HPLC 系統來進行反相（RP）-HPLC。對於半製備級純化，將一胜肽樣品注入至一反相 Phenomenex Gemini C18 管柱（5 微米，110 埃；10 x 250 毫米）中，該管柱係在一合適洗提液 A（水／0.1%TFA）及洗提液 B（MeCN/0.1%TFA）的混和物中平衡，接著產生洗提液 B 之濃度梯度的提高，以洗提出該成分組分。使用一 Phenomenex Gemini C18 管柱（3 微米，110 埃；4.6 x 150 毫米）以類似方式進行分析級 HPLC。

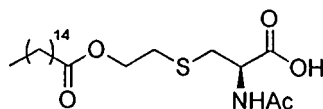
(Pam-1) -OH (121) 的性質。

【0598】 *N*-Fmoc-Cys (Pam-1) -OH (200)



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

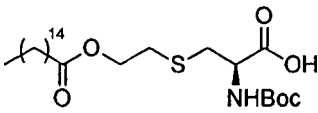
【0599】 *N*-Ac-Cys (Pam-1) -OH (120)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.21-7.70 (br s, 1H, COOH), 6.29 (d, J 7.51 Hz, 1H, NHAc), 4.79 (ddd, J_1 5.06 J_2 5.49 J_3 6.94 Hz, 1H), 4.22 (t, J 6.72 Hz, 1H), 4.21 (t, J 6.53 Hz, 1H), 3.12 (dd, J_1 4.72 J_2 14.08 Hz, 1H), 3.05 (dd, J_1 5.80 J_2 13.93 Hz, 1H), 2.78 (t, J 6.60 Hz, 1H), 2.77 (t, J 6.76 Hz,

1H), 2.33 (t, *J* 7.50 Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.27-1.22 (s, 24H), 0.87 (t, *J* 6.92 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.0, 172.7, 171.4, 62.9, 52.1, 34.2, 33.8, 31.8, 31.2, 29.6, 29.63, 29.60, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.8, 22.8, 22.6, 14.0; **HRMS** 發現值 (ESI): [M+Na]⁺ 468.2750, C₂₃H₄₃NO₅SNa 理論值: 468.2754。

【0600】 *N*-Boc-Cys (Pam-1) -OH (121)



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.71-8.84 (br s, 1H, COOH), 5.43-5.36 (m, 1H, BocNH), 4.60-4.49 (m, 1H), 4.21 (t, *J* 6.80 Hz, 2H), 3.14-2.93 (m, 2H), 2.78 (t, *J* 6.73 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* 7.46 Hz, 2H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.24 (s, 24H), 0.56 (t, *J* 6.82 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.7, 173.8, 155.4, 63.1, 53.2, 34.4, 34.2, 31.9, 31.2, 29.69, 29.66, 29.62, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.2, 28.1, 24.9, 22.6, 14.1; **HRMS** 發現值 (ESI): [M+Na]⁺ 526.3176, C₂₆H₄₉NO₆SNa 理論值: 526.3173。

【0601】 接合反應係在不同的條件下進行，其系統整於表 3。

【0602】 表 3

項目	N-α-保護基團	引發劑 (莫耳當量)	溶劑	條件 ^a	時間 (分鐘)	產物 (% 產量) ^b
1	Fmoc	DMPA (0.2)	DCM	hν (365 奈米)	60	200 (67)
2	Fmoc	DMPA (1)	DCM	hν (365 奈米)	60	200 (82)

3	Fmoc	AIBN (1)	DCM	微波 (70°C)	80	200 (41) ^c
4	Ac	DMPA (0.2)	DCM	hν (365 奈米)	60	120 (87)
5	Ac	DMPA (0.2)	DCM	hν (365 奈米), DTT	60	120 (74)
6	Ac	DMPA (1)	DCM	hν (365 奈米)	60	120 (88)
7	Ac	AIBN (1)	DCM	微波 (70°C)	80	120 (100)
8	Boc	DMPA (0.2)	DCM	hν (365 奈米)	60	121 (78)
9	Boc	DMPA (1)	DCM	hν (365 奈米)	60	121 (82)
10	Boc	AIBN (1)	DCM	微波 (70°C)	80	121 (77)

^a 使用手持 6 瓦 UV 燈 (Spectronics) 在 365 奈米操作照射；在 100 瓦及 70°C 下使用一 CEM 發現微波反應器 (CEM Discover microwave reactor) 來進行微波反應。

^b 產量係基於色層分析後的經分離材料。

^c 基於殘留的 Fmoc-半胱胺酸受質，反應在此時間之後並未完成。

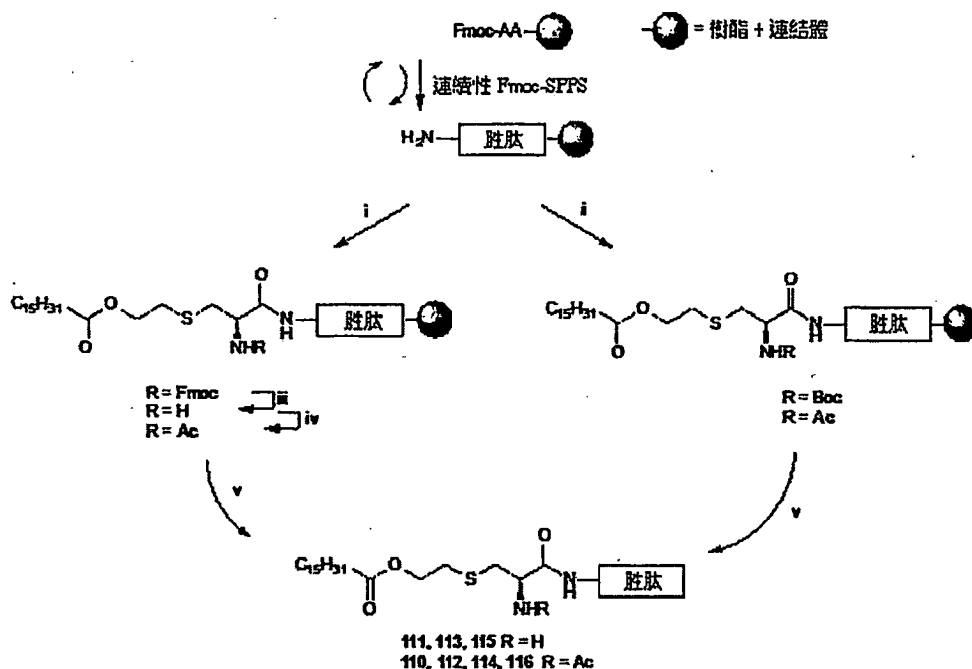
【0603】 從表 3 中可以看到，無論該半胱胺酸受質的 N-保護基團以及該光引發劑的相對濃度為何，使用光分解條件可產生相對一致產量的所欲產物。

【0604】 在熱條件下使用 AIBN 做為引發劑的產量差別很大。該 N-乙醯化之受質提供優異產量的所欲產物 120 (項目 9)。使用微波加熱係特別有效的，給出一定產量的乙醯化產物 120 (項目 7) 及高產量的 Boc 產物 121 (項目 10)。

【0605】 3.4 經由耦合胺基酸接合物來製備胜肽接合物

【0606】 如下述 (示意圖 3) 製備及描繪胜肽接合物 110-116 (表 4)。

【0607】 示意圖 3



(i) 反覆的 Fmoc-SPPS ; (ii) Fmoc-Cys (Pam-1) -OH (200) 、PyBOP、可力丁、DMF ; (iii) Ac-Cys (Pam-1) -OH (120) 或 Boc-Cys (Pam-1) -OH (121) 、PyBOP、可力丁、dmp ; (iv) 20% 哌啶 / DMF ; (v) Ac₂O / NMM , DMF ; (vi) TFA / EDT。

【0608】 如前面所描述，使用標準的反覆的 Fmoc SPPS 技術在 Tribute 胜肽合成器中合成所欲的胜肽序列。在耦合倒數第二個胺基酸殘基之後，使用在 DMF 中的 PyBOP 及可力丁，使該樹脂-鍵結胜肽鏈衍生為胺基酸接合物 N-Fmoc-Cys (Pam-1) -OH 200。接著使用 20% 之 DMF 的哌啶，以移除該 Fmoc 基團。

【0609】 接著使用 TFA / EDT 自該樹脂上分割所產生的胜肽，同時移除保護基團，以提供胜肽接合物 111、113 及 115。

【0610】 或者藉由 20% 之 DMF 的乙酸酐及 4-甲基嗎啉 (1

係添加 IL-7 及 IL-21，而用於 CD8+ T 細胞克隆的 RS5 係添加 IL-7+IL-15（所有細胞激素皆來自 PeproTech，所使用的最終濃度為 5 奈公克／毫升）。

【0624】類淋巴母細胞株（「LCL」）的產生及維持

【0625】使艾司坦-巴爾病毒（Epstein-Barr Virus，EBV）-製造的 B95-8 MMK 細胞生長於含 RPMI 1640（添加 Glutamix，Penicillin/Streptomycin，10% v/v 胎牛血清）（「RF10」，所有試劑皆來自 Invitrogen）的 T75 三角錐瓶（BD Biosciences）中。收集並離心含 EBV 培養液以沉澱非貼附細胞，接著過濾滅菌（0.22 微米）該含 EBV 的上清液。在 T25 三角錐瓶（BD Biosciences）中以 1.5 毫升的 RF10 懸浮 10×10^6 予體周邊血液單核球細胞（donor Peripheral Blood Mononuclear Cells，PBMC）。加入 2.5 毫升 B95-8 細胞培養上清液並培養細胞 2 小時。接著加入 1 毫升含 5% v/v 植物血球凝集素（Phytohemagglutinin，PHA）（Gibco）的 RF10（最終濃度為 1% v/v）。使用三角錐瓶監控 B 細胞 LCL 生長，需要時，通常在 4-6 星期後轉移至 T75 三角錐瓶（BD Biosciences）中。冷凍保存 LCL 株，以 $0.5-1.5 \times 10^6$ 個／毫升在 RF10 中維持工作庫存（working stocks）。

【0626】培養單核球-衍生的樹狀細胞（Monocyte-Derived Dendritic Cells，MoDC）

【0627】自健康予體經其同意下取得血液。藉由使用 Lymphoprep（Axis Shield）的密度離心來純化 PBMC。使用單核球單離套件 II（Monocyte Isolation Kit II）（Miltenyi Biotec）自 PBMC 中單離單核球，並在 RF10（添加 100 奈公克／毫升 GM-CSF，50

奈公克／毫升 IL-4(皆來自 Peprotech))中培養 6 天以產生 MoDC。每二天更換 50% v/v 培養液。

【0628】 CD8+ T 細胞克隆活化試驗

【0629】 以所欲濃度將予體 LCL 或 MoDC (本文也被稱為抗原呈現細胞, APC) 培養於 RF10+胜肽／構築體中 16 小時。在 Pam3Cys(「P3C」)及胜肽部分皆存在但沒有接合的樣品中, 以 P3C 預處理 LCL 30 分鐘, 接著更換為含 P3C 及胜肽的 RF10。在 RF10 中培養未處理的 APC。依照該試驗的性質及每個處理所需的 APC 個數, 在 96 孔培養盤或 48wp (平底, BD Biosciences) 中 (U 型底部, BD Biosciences) 培養 APC／構築體。在培養後, 以 RPMI 1640 清洗 APC 4 次, 以移除未鍵結的構築體／P3C。

【0630】 為了可用流式細胞儀檢測, 遵照製造商的使用說明, 如以下描述在種植 (seeding) 到 APC 孔前, 以 0.5 微莫耳濃度的 CellTrace™ Violet(「CTV」)(Life Technologies)預染色 CD8+ T 細胞, 或以抗 CD8 抗體染色, 然後共培養。

【0631】 在 96 孔培養盤 (U 型底部) 中以 4:1 的比例 (APC: T 細胞) 二重複種植經沖擊 (plused)／清洗的 APC 及經 CTV 染色的 T 細胞克隆 (所使用細胞的通常數目係 1.25×10^4 個細胞/毫升 T 細胞及 5×10^4 個細胞/毫升 APC)。在種植之後, 溫和離心 ($\leq 300 \times g$, 3 分鐘) APC／T 細胞培養盤以允許立即交互作用, 並且在一標準細胞培養箱中共培養 26 小時。

【0632】 為了檢測 T 細胞的活化, 以顯示於下表 6 的抗體以總體積 50 微升的清洗緩衝液 (PBS／FCS (1% v/v)) 中染色樣品 (若不以 CTV 預染細胞, 則僅使用抗-CD8)。

【0633】 表 6 用於 CD8+試驗的抗體

抗-CD	螢光團	克隆	劑量（微 升，每 50 微升）	供應商	編目#
8	FITC	RPA-T8	0.5	BIOLEGEND	301006
137	APC	4B4.1	1.25	BIOLEGEND	309810

【0634】 在冰上避光培養樣品 30 分鐘，接著以清洗緩衝液清洗二次，以移除未鍵結的抗體。在擷取數據之前立即加入 DAPI（最終濃度為 1 微克/毫升）至各個樣品中，以允許存活／死亡的排除。

【0635】 使用具 FACSDiva 軟體的 BD FACSAria II 來進行數據擷取，並且使用 FlowJo 軟體（Treestar）來進行數據分析。以相對於 CD137 之正向（positive）表現之活克隆細胞的平均%+SD 來呈現數據。

【0636】 CD4+T 細胞克隆活化試驗

【0637】 以如上述「用於 CD8+試驗的抗體」的描述來進行所有 APC 沖擊／清洗／種植；T 細胞克隆 CTV 染色；及 APC／T 細胞共培養步驟。

【0638】 爲了檢測 T 細胞活化，以顯示於下表 7 的抗體，在總體積 50 微升的清洗緩衝液（PBS／FCS（1% v/v））中染色樣品（若不以 CTV 預染細胞，則僅使用抗-CD4）。

【0639】 表 7 用於 CD4+試驗的抗體

CD	螢光團	克隆	劑量（微升，每 50 微升）	供應商	編目#
4	FITC	RPA-T4	0.5	BIOLEGEND	300506
25	APC-CY7 或 APC	BC96	2.5	BIOLEGEND	302614 或 302610
134	PE	ACT35	1.25	BIOLEGEND	350004

【0640】 在冰上避光培養樣品 30 分鐘，接著以清洗緩衝液清洗二次，以移除未鍵結的抗體。在擷取數據之前，立即加入 DAPI（最終濃度為 1 微克／毫升）至各個樣品中，以允許存活／死亡的排除。

【0641】 使用具 FACSDiva 軟體的 BD FACSAria II 來進行數據擷取，並使用 FlowJo 軟體（Treestar）來進行數據分析。以在活克隆細胞上之 CD25 及 CD134 表現量的螢光強度中位數（median fluorescence intensity，MFI）+ SD 來呈現數據。

【0642】 實施例 4

【0643】 本實施例描述本發明胜肽及胜肽接合物於支持藉由抗原呈現細胞（APC）將各種抗原性胜肽構築體處理及呈現至各種 T 細胞克隆之功效的評估。

【0644】 材料

Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe
1 5 10 15

Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg
20 25 30

Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu
35 40

<210> 2
<211> 41
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成性胜肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (1)..(1)

<223> X1 係不存在或者係 S

<220>

<221> 其他特徵

<222> (2)..(2)

<223> X2 係不存在或者係一親水性殘基

<220>

<221> 其他特徵

<222> (3)..(3)

<223> X3 係不存在或者係一至十個親水性殘基

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr

1 5 10 15

Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg

20 25 30

Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu

35 40

Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala
20 25 30

Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu
35 40

<210> 5
<211> 38
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> 合成性胜肽

<400> 5

Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met
1 5 10 15

Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala

20 25 30

Gln Asp Ala Pro Pro Leu
35

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成性胜肽

<400> 6

Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 7

Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu

1 5

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)..(1)

<223> X1 係不存在或係 S

<220>
<221> 其他特徵
<222> (2)..(2)
<223> X2 係不存在或係一親水性殘基

<220>
<221> 其他特徵
<222> (3)..(3)
<223> X3 係不存在或係一親水性殘基

<220>
<221> 其他特徵
<222> (4)..(4)
<223> X4 係不存在或係一或多個親水性殘基

<400> 8

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser
1 5 10 15

Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
20 25 30

<210> 9
<211> 29
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成性胜肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (1)..(1)
<223> X1 係不存在或係 S

<220>
<221> 其他特徵
<222> (2)..(2)
<223> X2 係不存在或係一親水性殘基

<220>
<221> 其他特徵
<222> (3)..(3)

<223> X3 係不存在或係一至十個親水性殘基

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly

1 5 10 15

Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg

20 25

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)..(1)

<223> X1 係不存在或係 S

<220>

<221> 其他特徵

<222> (2)..(2)

<223> X2 係不存在或係一至四個親水性胜肽

<400> 10

Xaa Xaa Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn
1 5 10 15

Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
20 25

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 11

Ser Lys Lys Lys Lys Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val
1 5 10 15

Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
20 25 30

<210> 12

<211> 26

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 12

Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg
20 25

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成性胜肽

<400> 13

Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn Ile Leu
1 5

<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)..(1)

<223> X1 係不存在或係 S

<220>

<221> 其他特徵

<222> (2)..(2)

<223> X2 係不存在或係一親水性殘基

<220>

<221> 其他特徵

<222> (3)..(3)

<223> X3 係不存在或係一親水性殘基

<220>

<221> 其他特徵

<222> (4)..(4)

<223> X4 係不存在或係一或多個親水性殘基

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln
1 5 10 15

Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
20 25 30

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)..(1)

<223> X1 係不存在或係 S

<220>
<221> 其他特徵
<222> (2)..(2)
<223> X2 係不存在或係一親水性殘基

<220>
<221> 其他特徵
<222> (3)..(3)
<223> X3 係不存在或係一至十個親水性殘基

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5 10 15

Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
20 25 30

<210> 16
<211> 30
<212> PRT
<213> 人造序列

公告本

發明摘要

※ 申請案號： 103122466

※ 申請日： 103/06/30

※IPC 分類： **C07K 1/107** (2006.01)
C07B 45/06 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

【發明名稱】

胺基酸及胜肽接合物及結合方法／AMINO ACID AND PEPTIDE
CONJUGATES AND CONJUGATION PROCESS

【中文】

本發明係關於胺基酸及胜肽接合物 (conjugate)、製造胺基酸及胜肽接合物的方法、該方法製造的接合物、包含該接合物的醫藥組合物、在一個體中引起免疫反應的方法及接種一個體的方法、使用該接合物於該目的、及使用該接合物於製造用於該目的之藥物。

【英文】

The present invention relates to amino acid and peptide conjugates, methods for making amino acid and peptide conjugates, conjugates produced by the methods, pharmaceutical compositions comprising the conjugates, methods of eliciting immune responses in a subject and methods of vaccinating a subject, uses of the conjugates for the same, and uses of the conjugates in the manufacture of medicaments for the same.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第 1 圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

【0064】 在例示性的實施態樣中，該胜肽接合物及／或包含胺基酸的接合配偶體係包含一包含胜肽抗原決定位的胜肽。在例示性的實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體的胜肽係包含一或多個胜肽抗原決定位。

【0065】 在一實施態樣中，該胜肽係包含，或實質上由或由選自以下群組的胺基酸序列所組成：

(a) 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEA
ELARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO:1] 中的 8 或更多個
連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂
係不存在或者係親水性胺基酸，Xaa₃ 係不存在或者係
親水性胺基酸，且 Xaa₄ 係不存在或者係一或多個親水
性胺基酸，

(b) 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAELA
RRSLAQDAPPL [SEQ ID NO:2] 中的 8 或更多個連續
胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不
存在或者係親水性胺基酸，且 Xaa₃ 係不存在或者係一
至十個親水性胺基酸，

(c) 序列

Xaa₁Xaa₂GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAELARRS
LAQDAPPL [SEQ ID NO:3] 中的 8 或更多個連續胺

基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，且 Xaa₂ 係不存在或者係一至四個親水性胺基酸，

(d) 序列

SKKKKGARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSL
AQDAPPL [SEQ ID NO:4] 中的 8 或更多個連續胺基
酸殘基，

(e) SEQ ID NOs: 1 至 4 中的任一序列，

(f) 序列

GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAP
PL [SEQ ID NO:5] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

(g) SEQ ID NO:5 的序列，

(h) 序列 LAMPFATPM [SEQ ID NO:6] 中的 8 或更多個連
續胺基酸殘基，

(i) SEQ ID NO:6 的序列，

(j) 序列 FATPMEAE L [SEQ ID NO:7] 中的 8 或更多個連
續胺基酸殘基，

(k) SEQ ID NO:7 的序列，

(l) 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄ VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADH
R [SEQ ID NO:8] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，
其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親
水性胺基酸，Xaa₃ 係不存在或者係親水性胺基酸，且
Xaa₄ 係不存在或者係一或多個親水性胺基酸，

(m) 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR

[SEQ ID NO:9] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基酸，且 Xaa₃ 係不存在或者係一至十個親水性胺基酸，

(n) 序列 Xaa₁Xaa₂VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR

[SEQ ID NO:10] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，且 Xaa₂ 係不存在或者係一至四個親水性胺基酸，

(o) 序列 SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR

[SEQ ID NO:11] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

(p) SEQ ID NOs:8 至 11 中的任一序列，

(q) 序列 VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR [SEQ ID NO:12] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

(r) SEQ ID NO:12 的序列，

(s) 序列 EFTVSGNIL [SEQ ID NO:13] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

(t) SEQ ID NO:13 的序列，

(u) 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPS

GQRR [SEQ ID NO:14] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基酸，Xaa₃ 係不存在或者係親水性胺基酸，且 Xaa₄ 係不存在或者係一或多個親水性胺基酸，

(v) 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR
R [SEQ ID NO:15] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，
其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親
水性胺基酸，且 Xaa₃ 係不存在或者係一至十個親水性
胺基酸，

(w) 序列

Xaa₁Xaa₂LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR
[SEQ ID NO:16] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，
其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，且 Xaa₂ 係不存在或者係
一至四個親水性胺基酸，

(x) 序列 SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR

[SEQ ID NO:17] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

(y) SEQ ID NO:14 至 17 中的任一序列，

(z) 序列 LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR [SEQ

ID NO:18] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

(aa) SEQ ID NO:18 的序列，

(bb) 序列 SLLMWITQCFLPVF [SEQ ID NO:19] 中的 8

或更多個連續胺基酸殘基，

(cc) SEQ ID NO:19 的序列，

(dd) 序列 SLLMWITQC [SEQ ID NO:20] 中的 8 或更

多個連續胺基酸殘基，

(ee) SEQ ID NO:20 的序列，

(ff) 或上述 (a) 至 (ee) 中的二或多者的任意組合。

【0066】 在一例示性的實施態樣中，該胜肽抗原決定位係源自 NY-ESO-1。在一具體考量的實施態樣中，該胜肽係包含，或實質上由或由選自以下群組的 8 或更多個連續胺基酸殘基所組成：SEQ ID NO:5、6、7、12、13、18、19 及 20。

【0067】 在一實施態樣中，該胜肽係包含，或實質上由或由選自以下群組的胺基酸序列所組成：SEQ ID NO:5、6、7、12、13、18、19 及 20。

【0068】 在一實施態樣中，該胜肽係包含，或實質上由或由選自以下群組的胺基酸序列所組成：SEQ ID NO:5、12 及 18。

【0069】 在一實施態樣中，該胜肽係包含，或實質上由或由選自以下群組的胺基酸序列所組成：SEQ ID NO:4、11 及 17。

【0070】 在一具體考量的實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體之該胺基酸的反應官能基團係未受保護。

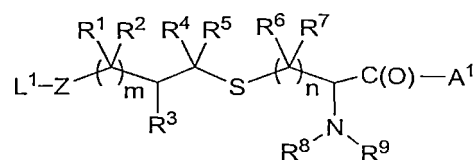
【0071】 在特定實施態樣中，該胜肽接合物之一或多個胺基酸的一或多個反應官能基團係未受保護。

【0072】 在特定實施態樣中，該胺基酸接合物之該胺基酸的一或多個反應官能基團係未受保護。
在特定實施態樣中，該包含胺基酸之接合配偶體之一或多個胺基酸的一或多個反應官能基團係未受保護。

【0073】 在特定實施態樣中，該含該胺基酸的接合配偶體係包含一胜肽，其中該胜肽之胺基酸之側鏈的反應官能基團係未受保護，除了待反應的硫醇基之外的任何硫醇基係受到保護。

【0074】 在一具體考量的實施態樣中，該含胜肽的接合配偶體之胜肽之胺基酸的反應官能基係未受保護。在一具體考量的實施態樣中，該含胜肽的配偶體之胜肽之胺基酸的反應官能基係未受保護，除了待反應的硫醇基之外的任何硫醇基係受到保護。

【0075】 在一實施態樣中，該方法包含製造一包含一具式(A)結構的胺基酸接合物或胜肽接合物、或其醫藥上可接受之鹽或溶劑化物：



(A)

其中，

Z 係選自由以下所組成之群組：-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-SO₂-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)NR-、-NRC(O)-、-OC(O)O-、-NRC(O)O-、-OC(O)NR-以及-NRC(O)NR-；

R 係氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基，其中該烷基或環烷基係視需

該反應混合物 24 小時，在此之後 TLC 顯示 Fmoc-Cys-OH 的消耗已完成。接著將該溶液冷卻至室溫。在減壓下移除該溶劑。藉由質譜儀確認該粗製反應混合物中之所欲產物 **200** 的存在。

MS (ESI⁻): 用於 C₃₆H₅₁NO₆S⁻ [M-H]⁻ m/z 計算值: 625.96, 發現值: 626.0

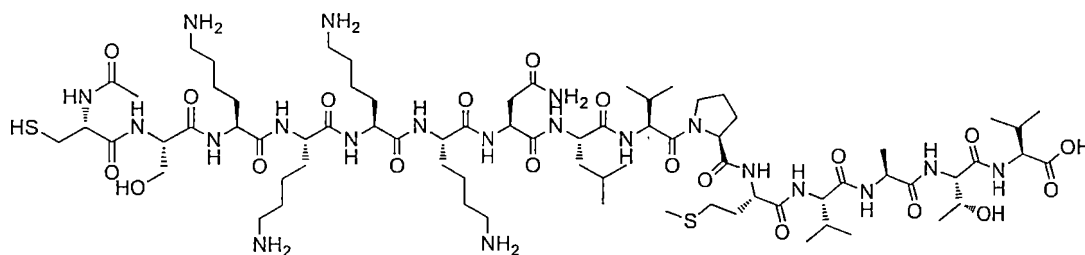
【0515】 光引/發 (*Photo-initiation*)

【0516】 將 Fmoc-Cys-OH (100 毫克, 0.29 毫莫耳) 溶解於脫氣、無水的 DMF (500 微升) 中。將軟酯酸乙烯酯 (90 微升, 0.3 毫莫耳) 及 DMPA (5.0 毫克, 20 微莫耳) 溶解於脫氣的 CH₂Cl₂ (200 微升) 中。合併該二溶液, 在一標準光化學設備中照射所得之混合物 6 小時 (365 奈紫外光)。當該反應混合物以 TLC 觀察沒有進一步的變化時, 在減壓下移除溶劑。以二氧化矽凝膠快速色層分析 (3:1 EtOAc: n-己烷+ 2% AcOH) 來純化該粗製產物, 接著自 1:1 H₂O: MeCN + 0.1% TFA 冷凍乾燥以獲得如標題之化合物的白色粉狀固體 (24 毫克, 13%)。以質譜儀確認該所欲產物 **200** 的結構。

MS (ESI⁻): 用於 C₃₆H₅₁NO₆S⁻ [M-H]⁻ m/z 計算值: 625.96, 發現值: 626.0

【0517】 1.4 胜肽接合物 **20**、**22**、及 **26** 胜肽的製備

【0518】 *AcN-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Asn-Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val- OH 25 [SEQ ID NO: 21]*



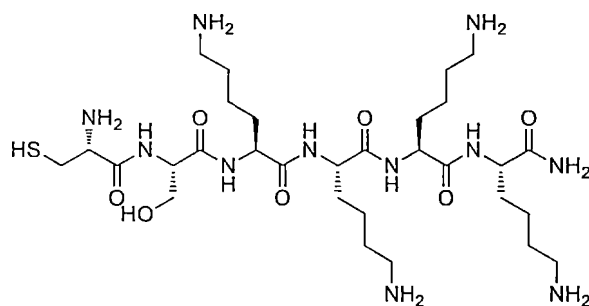
【0519】將 在 DMF (3 毫 升) 中 之 Fmoc-L-Val-O-CH₂-phi-OCH₂-CH₂-COOH (155.2 毫克、0.3 毫莫耳)、HBTU (113.8 毫克、0.3 毫莫耳) 及 *i*Pr₂Net (104 微升、0.6 毫莫耳) 的耦合混合物加入在 1 : 1 CH₂Cl₂ : DMF 中之預溶脹的氨甲基聚苯乙烯 (aminomethyl polystyrene, PS) 樹脂 (0.2 公克，裝載 1.0 毫莫耳/公克，0.2 毫莫耳規模)。在室溫搖晃該樹脂 2 小時，在此之後茚三酮試驗指出耦合完成。接著在室溫下藉由以 20% v/v 之在 DMF (5 毫升) 中的哌啶處理該樹脂 20 分鐘以去保護該 Fmoc-Val 胺基。該樹脂被轉移至一 Tribute 自動化胜肽合成器中。使用一般自動化耦合法以延長鏈至並包括 Ser 殘基。經由加入在 1 : 1 CH₂Cl₂ : DMF (2 毫升) 中的 Fmoc-Cys (Trt) -OH (235 毫克，0.4 毫莫耳)、BOP (360 毫克，0.8 毫莫耳)、HOBt.H₂O (120 毫克，0.8 毫莫耳) 及 2,4,6-可力丁 (120 微升，0.8 毫莫耳) 的混合物，以人工進行該 Fmoc-Cys (Trt) -OH 殘基的耦合。在室溫搖晃該樹脂 1 小時，在此之後茚三酮試驗指出耦合完成。在室溫下藉由以 20% v/v 之在 DMF (5 毫升) 中的哌啶處理該樹脂 20 分鐘，以完成最終的 Fmoc 去保護。

【0520】在 Fmoc 去保護之後，藉由在該樹脂中加入在 DMF

(3 毫升) 中的乙酸酐 (50 微升) 及 $i\text{Pr}_2\text{Net}$ (50 微升) 來進行 N-乙醯化。在茚三酮試驗指出沒有殘餘游離胺後，接著在室溫下搖晃該樹脂 30 分鐘。瀝乾樹脂，以 DMF 及 CH_2Cl_2 清洗並風乾。在乾樹脂中加入 $\text{TFA}:\text{H}_2\text{O}:\text{DODT}:\text{iPr}_2\text{Net}$ (94:2.5:2.5:1% v/v, 10.0 毫升) 的一裂解混合液 (cleavage cocktail) 並在室溫下搖晃該混合物 4 小時。接著以冷的二乙醚處理該裂解混合液以沉澱出粗製胜肽，其以 4000 rpm 離心 5 分鐘。在重覆該離心步驟 (spinning step) 之前，丟棄上清液並以二乙醚清洗沉澱物。丟棄該醚相且以 N_2 流乾燥該胜肽。自 $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%\text{TFA}$ 冷凍乾燥出該粗製的胜肽。使該粗製產物進行於下概述的硫醇-烯反應。

MS (ESI+): 用於 $\text{C}_{74}\text{H}_{134}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 計算值: 1688.11, 發現值: 1688.8

【0521】 *Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂* [SEQ ID NO: 22]

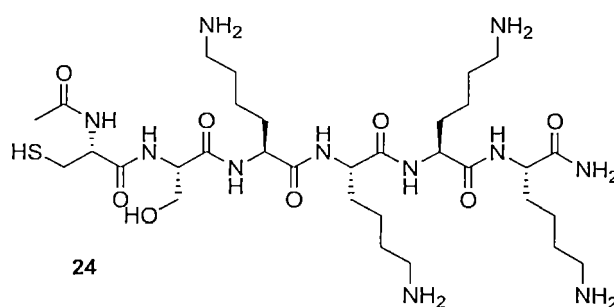


【0522】 將在 DMF (2 毫升) 中之 Fmoc-Rink-Amide-OH (216 毫克、0.4 毫莫耳)、HBTU (151.8 毫克、0.4 毫莫耳) 及 $i\text{Pr}_2\text{Net}$ (140 微升、0.8 毫莫耳) 的耦合混合物加入在 1:1 CH_2Cl_2 :DMF 中預溶脹之氨甲基聚苯乙烯樹脂 (0.2 公克, 裝載 1.0 毫莫耳/公克, 0.2 毫莫耳規模)。在室溫搖晃該樹脂 1 小時，在此之後茚三酮試驗指出耦合完成。接著在室溫下藉由 20% v/v 之在 DMF (5 毫升)

中的哌啶處理該樹脂 20 分鐘以去保護該連結胺基。轉移該樹脂至一 Tribute 自動化胜肽合成器中。使用一般自動化耦合方法以延長鏈至並包括該 Ser 殘基。在 1 : 1 CH₂Cl₂ : DMF (2 毫升) 中加入 Fmoc-Cys (Trt) -OH (235 毫克, 0.4 毫莫耳)、BOP (360 毫克, 0.8 毫莫耳)、HOBt.H₂O (120 毫克, 0.8 毫莫耳) 及 2,4,6-可力丁 (120 微升, 0.8 毫莫耳) 的混合物, 以人工進行該 Cys 殘基的耦合。在室溫搖晃該樹脂 1 小時, 在此之後茚三酮試驗指出耦合完成。在室溫下藉由 20% v/v 之在 DMF (5 毫升) 中的哌啶處理該樹脂 20 分鐘, 以完成最終的 Fmoc 去保護。瀝乾該樹脂, 並以 DMF 及 CH₂Cl₂ 清洗及風乾。在乾樹脂中加入 TFA : H₂O : DODT : *i*Pr₂Net (94 : 2.5 : 2.5 : 1% v/v, 10.0 毫升) 的一裂解混合液並在室溫下搖晃該混合物 2 小時。接著以冷的二乙醚處理該裂解混合液以沉澱出粗製胜肽, 其以 4000 rpm 離心 5 分鐘。在重覆該離心步驟之前, 丟棄上清液並以二乙醚清洗沉澱物。丟棄該醚相且以 N₂ 流乾燥該胜肽。自 H₂O + 0.1%TFA 冷凍乾燥出該粗製的胜肽。使該粗製產物進行於下概述的硫醇-烯反應。

MS (ESI+): 用於 C₃₀H₆₁N₁₁O₇S⁺ [M+H]⁺ *m/z* 計算值 : 719.94, 發現值 : 720.0

【0523】 *Ac-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂ 24 [SEQ ID NO: 22]*



【0524】將在 DMF (3 毫升) 中之 Fmoc-Rink-Amide-OH (216 毫克、0.4 毫莫耳)、HBTU (151.8 毫克、0.4 毫莫耳) 及 $i\text{Pr}_2\text{Net}$ (140 微升、0.8 毫莫耳) 的耦合混合物加入在 1 : 1 CH_2Cl_2 : DMF 中預溶脹之氨甲基聚苯乙烯樹脂 (0.20 公克, 裝載 1.0 毫莫耳 / 公克, 0.2 毫莫耳規模)。在室溫搖晃該樹脂 1 小時, 在此之後茚三酮試驗指出耦合完成。接著在室溫下藉由 20% v/v 之在 DMF (5 毫升) 中的哌啶處理樹脂 20 分鐘, 以去保護該連結胺基。轉移該樹脂至一 Tribute 自動化勝肽合成器中。使用一般自動化耦合方法以延長鏈至並包括該 Ser 殘基。經由加入在 1 : 1 CH_2Cl_2 : DMF (2 毫升) 中之 Fmoc-Cys (Trt) -OH (235 毫克, 0.4 毫莫耳)、BOP (360 毫克, 0.8 毫莫耳)、HOBt. H_2O (120 毫克, 0.8 毫莫耳) 及 2,4,6-可力丁 (120 微升, 0.8 毫莫耳) 的混合物, 以人工進行該 Cys 殘基的耦合。在室溫搖晃該樹脂 1 小時, 在此之後茚三酮試驗指出耦合完成。在 Fmoc 去保護之後, 藉由在該樹脂中加入在 DMF (3 毫升) 中之乙酸酐 (50 微升) 及 $i\text{Pr}_2\text{Net}$ (50 微升) 來進行 N-乙醯化。接著在室溫下搖晃該樹脂 30 分鐘, 在此之後茚三酮試驗指出沒有殘餘游離胺。瀝乾該樹脂, 以 DMF 及 CH_2Cl_2 清洗及風乾。在乾樹脂中加入 TFA : H_2O : DODT : $i\text{Pr}_2\text{Net}$ (94 : 2.5 : 2.5 : 1% v/v, 10.0 毫升) 的一裂解混合液並在室溫下搖晃該混合物 2 小時。接著以冷的二乙醚處理該裂解混合液以沉澱出粗製勝肽, 其以 4000 rpm 離心 5 分鐘。在重覆該離心步驟之前, 丟棄上清液並以二乙醚清洗沉澱物。丟棄該醚相並以 N_2 流乾燥該勝肽。自 H_2O + 0.1%TFA 冷凍乾燥出該粗製的勝肽。使該粗製產物進行於

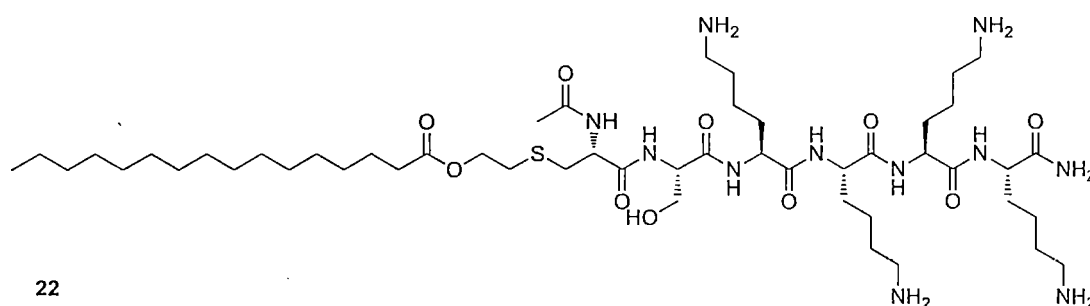
下概述的硫醇-烯反應。

MS (ESI⁺): 用於 $C_{32}H_{63}N_{11}O_8S^+$ $[M+H]^+$ m/z 計算值: 761.98, 發現值: 762.0

【0525】 胜肽接合物

【0526】 *Ac-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂* **24** [SEQ ID NO: 22]

及軟酯酸乙烯酯的硫醇-烯反應產物 **22**

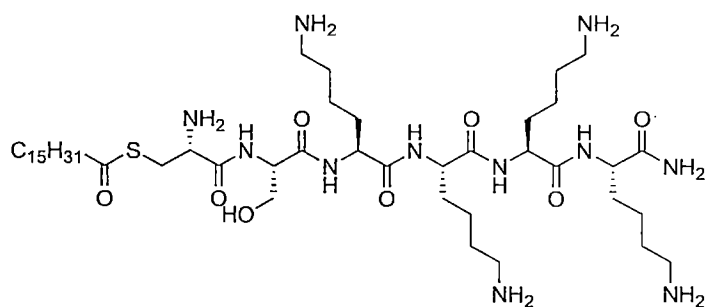


【0527】 將軟酯酸乙烯酯 (52.9 微升, 0.16 毫莫耳) 加入在 NMP 溶液 (4 毫升) 中之粗製胜肽 **24** (25 毫克, 32.6 微莫耳) 及 DMPA (3.3 毫克, 13.1 微莫耳) 中。在一標準 UV 光化學設備中以 365 奈米照射 1 小時並攪拌該所得混合物。藉由質譜分析來檢測該所欲產物 **22**。在一 Phenomenex Gemini C18 管柱運行 5-65% MeCN : H₂O + 0.1% TFA (每分鐘 3% MeCN, 50 °C) 的梯度, 並經由半製備級 RP HPLC 來純化該粗製產物 **22**。質譜儀確認該所欲產物 **22** (5.1 毫克, 「自粗製產物」 14.94%) 的結構。

R_t = 11.50 分鐘, 在一 Phenomenex Gemini C18 3 微米 110 埃 2.0 x 50 的毫米管柱使用每分鐘梯度 5-95% MeCN : H₂O + 0.1% TFA、3% MeCN ;

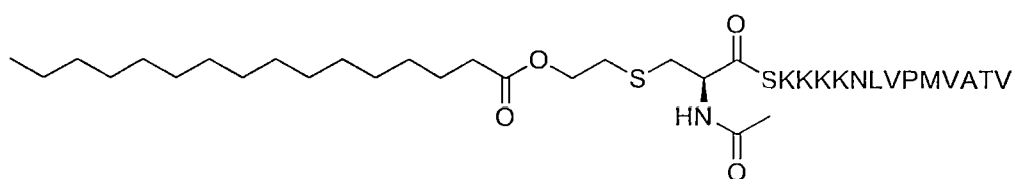
MS (ESI⁺): 用於 $C_{50}H_{97}N_{11}O_{10}S^+$ $[M+H]^+$ m/z 計算值: 1044.4, 發現值: 1044.9

【0528】 *Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂* [SEQ ID NO: 22] 及軟酯酸乙烯酯的硫醇-烯反應產物 20



【0529】 在 NMP 中粗製之 *Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂* 與 5 當量的軟酯酸乙烯酯、0.4 當量的 DMPA 之間的該硫醇-烯反應，在 365 奈米照射 1 小時後經 MS 分析給出所欲產物 20 (Pam-CSK₄)。

【0530】 *Ac-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Asn-Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val-OH* 25 [SEQ ID NO: 21] 及軟酯酸乙烯酯的硫醇烯反應產物 26



【0531】 將軟酯酸乙烯酯 (19.2 微升, 59.3 毫莫耳) 加入在粗製之胜肽 25 (20 毫克, 11.9 微莫耳) 及 DMPA (1.2 毫克, 4.74 微莫耳) 的 NMP 溶液 (3 毫升) 中。在一標準 UV 光化學設備中以 365 奈米照射 1 小時並攪拌該所得之混合物。藉由質譜分析來

檢測該所欲產物 26。經由半製備級 RP HPLC 上的一 Phenomenex Gemini C18 管柱運行 5-65% MeCN : H₂O + 0.1% TFA (每分鐘 3% MeCN, 50 °C) 的梯度來純化該粗製產物 26。以質譜儀確認該所欲產物 26 及該經氧化的 Met(O)副產物 (1.67 毫克, 7.15%「自粗製產物」-包括 Met(O)產物) 的結構。

R_t = 11.90 分鐘, 在一 Phenomenex Gemini C18 3 微米 110 埃 2.0 x 50 毫米的管柱使用每分鐘梯度 5-95% MeCN : H₂O + 0.1% TFA、3% MeCN ;

MS (ESI+): 用於 C₅₀H₉₇N₁₁O₁₀S⁺ [M+H]⁺ m/z 計算值 : 985.1, 發現值 : 993.6 (Met(O))

【0532】 1.5 在胜肽之硫醇-烯反應的一般方法

【0533】 將軟酯酸乙烯酯 (50 毫莫耳濃度) 加入在 DMSO 溶液中之粗製或經純化的胜肽 (10 毫莫耳濃度)、DTT (30 毫莫耳濃度) 及 DMPA (4 毫莫耳濃度) 中。在一標準 UV 光化學設備中以 365 奈米照射 15 分鐘並攪拌所得之混合物。藉由 ESI 質譜分析來檢測該所欲產物。為了完成該完整轉換, 有時需要再加入 DMPA 光引發劑。經由半製備級 RP HPLC 上的一 Phenomenex Gemini C18 管柱運行 1-65% MeCN : H₂O + 0.1% TFA (每分鐘 3% MeCN) 的梯度來純化該粗製產物。冷凍乾燥所匯集的部分以得到白色粉末的純產物。

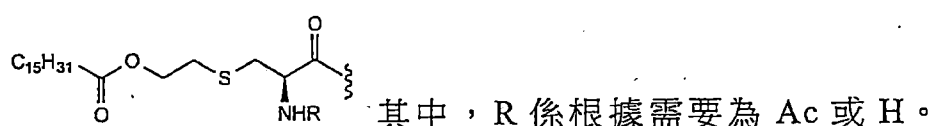
【0534】 1.6 討論

【0535】 使用 5 當量的烯類及 0.2 當量的 AIBN 做為自由基引發劑, 在 1,2-二氯乙烷中進行軟酯酸乙烯酯與 Fmoc-Cys-OH 的熱反應。

【0567】 使用 Agilent Technologies 6120 Quadrupole 質譜儀獲得低解析度質譜圖譜。

【0568】 使用 Bruker BRX400 光譜儀，對 ^1H NMR 使用 400 兆赫茲，對 ^{13}C NMR 使用 100 兆赫茲以獲得 NMR 圖譜。

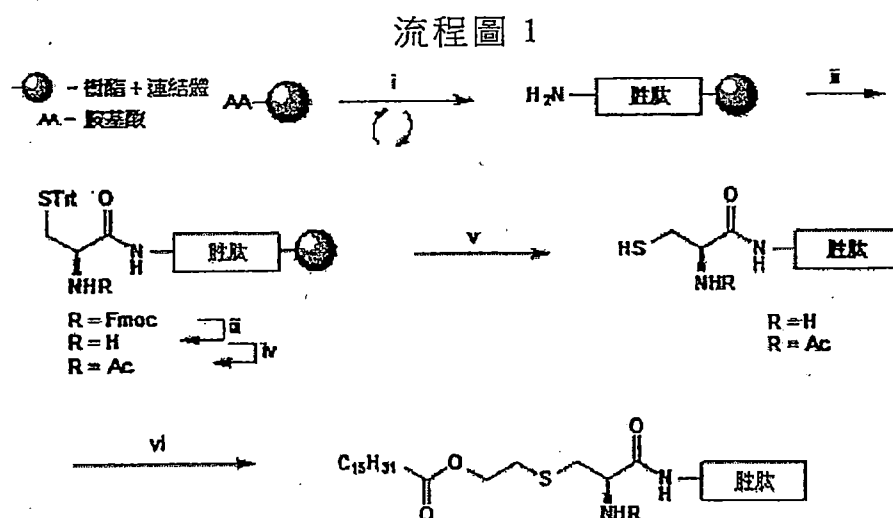
【0569】 在下述之胺基酸接合物及胜肽接合物中，縮寫 AcN-C (Pam-1) -以及 $\text{H}_2\text{N-C}$ (Pam-1) -意指



【0570】 3.2 藉由直接接合製備胜肽接合物

【0571】 胜肽

【0572】 如下述合成及描繪胜肽 100、102、103、104、105 及 106 (表 1) (流程圖 1)。



(i) 反覆的 Fmoc-SPPS ; (ii) Fmoc-Cys (Trt) -OH、HATU、NMM、DMF ; (iii) 20% 哌啶 / DMF ; (iv) Ac_2O / NMM, DMF ; (v) TFA / EDT ; (vi) 軟酯酸乙烯酯、DTT、DMPA、NMP, 365 奈米。

【0573】 在使用反覆的 Fmoc-SPPS 來合成該胜肽序列至倒數第二個胺基酸之後，藉由與在 DMF 中的 Fmoc-Cys (Trt) -OH、HATU、及 4-甲基嗎啉反應，引入 Fmoc-半胱胺酸做為該樹脂胜肽上的 N-端殘基。使用 20%之 DMF 中的哌啶來移除該 Fmoc 基團。如果需要，藉由 20%之 DMF (2 毫升) 中的酸酐以及 4-甲基嗎啉 (1 毫莫耳) 的混合物處理，使該生成的胺基轉換為乙醯胺。

【0574】 以 TFA/EDT 自樹酯分割胜肽及在醚中其沉澱後，將該固體溶解在 1：1 的水/MeCN 中並冷凍乾燥。如果該胜肽含有一甲硫胺酸殘基，在冷凍-乾燥前加熱該溶液至 60°C 1 小時，以扭轉在分割中可能發生的任何 S-烷基化。接著經由 RP-HPLC 來純化該胜肽，以給出>95%的材料。

【0575】 因為胜肽 102 在非端點半胱胺酸殘基上合成了三級丁基硫醚，可以避免在此位置上發生不希望的側鏈反應。

【0576】 表 1

	序列	胜肽	<i>m/z</i>
		SEQ ID NO	[M+3H ⁺]
100	AcHN-CSKKKKVKNLVPMVATVK (Ac) -C(O)NH2	23	619.7
102	AcHN-CSKKKKLQQLSLLMWITQC (tBu) FLPVFLAQPPSGQRR-OH	24	1357.8
103	H2N-CSKKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSL AQDAPPL-OH	25	1625.5
104	AcHN-CSKKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRS LAQDAPPL-OH	25	1639.9
105	H2N-CSKKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26	1174.8
106	AcHN-CSKKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26	1188.8

【0577】 胜肽接合物

【0578】 接著對胜肽 100 及 102-106 進行硫醇-烯反應，以產生相對應的胜肽接合物 110、112A、及 113-116（表 2）。

【0579】 將 DMPA（2.6 毫克）、二硫蘇醣醇（9.2 毫克）、及軟酯酸乙烯酯（40 毫克，毫莫耳）溶解在脫氣 NMP（2 毫升）中。在一小的聚丙烯容器中加入 100 微升的該溶液，接著秤入 1 微莫耳該胜肽，以給出一含 10 毫莫耳濃度胜肽、5 毫莫耳濃度 DMPA、30 毫莫耳濃度 DTT 及 50 毫莫耳濃度軟酯酸乙烯酯的溶液。NMP 係相容於該反應條件且可有效溶劑化該反應混合物中的所有組分。

【0580】 以氮氣沖洗（flushed）該反應容器並且劇烈攪拌該混合物，以手持 6 瓦 UV 燈（Spectronics，NY）在 365 奈米操作照射。在 30 分鐘後，由 HPLC 分析該反應並且顯示該所欲產物的轉換率。接著以 RP-HPLC 分離出該產物並且回收未反應的起始物料。

【0581】 在純化 112A 之後，藉由以三氟甲磺酸（triflic acid）及三氟乙酸（1：16 v/v）的混合物處理 3 分鐘，以移除半胱胺酸的三級丁基保護基團，乾淨地給出完全去保護的脂肽 112（表 2A）。

【0582】 儘管在還原劑 DTT 的存在下，具有未乙醯化 N-端半胱胺酸的胜肽仍會形成顯著量的二硫化二聚物（disulfide dimer）。相對應之 N-乙醯化胜肽並沒有觀察到此現象。

【0583】 藉由下述供替代之程序由胜肽 100 及 103-106 製備胜肽接合物 110 及 113-116（表 2B）。

【0584】 在此程序中，使用三級丁基硫醇（tBuSH）硫醇基來

取代 DTT。此造成該受質胜肽至該所欲胜肽接合物的轉換增加且更乾淨。

【0585】在反應混合物中引入三氟乙酸 (TFA)。此可進一步增進反應輪廓 (reaction profile)。藉由加入 TFA，可大量抑制寡聚體、由該產物胜肽接合物與軟酯酸乙烯酯之第二分子反應而給出一雙棕櫚醯化物質 (bis-palmitoylated species) 所形成之次要副產物的形成。

【0586】在此條件下，由於該甲硫胺酸明顯傾向氧化成相對應的亞砷，將那些具甲硫胺酸基團之胜肽的粗製產物混合物冷凍乾燥，溶解在 TFA 中並且以四丁基銨處理，以減少甲硫胺酸氧化物變回甲硫胺酸。

【0587】一通常的程序係如下述。將 DMPA (6.5 毫克) 溶解在脫氣 NMP (0.5 毫升) 中在一獨立容器裡，並加入三級丁基硫醇 (17 微升)，並將軟酯酸乙烯酯 (11.3 毫克) 溶解在脫氣 NMP (0.5 毫升) 中。將該胜肽 (1 微莫耳) 秤重至一設有小攪拌器的小聚丙烯容器中，並加入 10 微升的 DMPA/tBuSH 溶液，接著加入 100 微升的軟酯酸乙烯酯，以給出約 10 毫莫耳濃度胜肽、5 毫莫耳濃度 DMPA、30 毫莫耳濃度 DTT 及 80 毫莫耳濃度軟酯酸乙烯酯的溶液。接著加入 TFA (5.5 微升)，以給出 5% 溶液。以氮氣沖洗該反應容器，並劇烈攪拌混合物，以手持 6 瓦 UV 燈 (Spectronics, NY) 在 365 奈米操作照射。在 20 分鐘後再加入 DMPA (10 微升) 及軟酯酸乙烯酯 (50 微升) 並持續照射 20 分鐘。

【0588】對於那些含甲硫胺酸的胜肽，加入水 (0.5 毫升) 及 MeCN (0.5 毫升)，並冷凍乾燥該混合物。將所得固體溶解在純的

TFA (150 微升) 中，冷卻至 0°C 並加入在 25 毫升 TFA 中的四級-n-丁基碘化胺 (3.7 毫克，10 微莫耳)。加入冷乙醚 (0.5 毫升) 1 分鐘後，以離心及冷凍乾燥沉澱出該還原脂肽。

【0589】藉由 HPLC 來分析該反應以顯示所欲產物的轉換率 (表 2B)，藉由 RP-HPLC 分離所欲產物。

第 103122466 號專利申請案
說明書修正頁替換版本 (106 年 6 月)

【0590】表 2

序 列	胜肽 SEQ ID NO	轉換率	m/z [M+4H+]
110 AcHN-C (Pam-1) SKKKVKNLVPMVATVK (Ac) -C(O)NH ₂	23	54%	535.6
112A AcHN-C (Pam-1) SKKKKLQQLSLLMWITQC (tBu) FLPVFLAQPPSGQRR-OH ^a	24	44%	1089.1
113 H ₂ N-C (Pam-1) SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	25	26%	1289.9
114 AcHN-C (Pam-1) SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	25	42%	1300.4
115 H ₂ N-C (Pam-1) SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26	20%	952.0
116 AcHN-C (Pam-1) SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26	47%	962.5

^a 後續的 Cys (tBu) 殘基的去保護會得到完全去保護的脂肽 112

【0591】表 2A

序 列	胜肽 SEQ ID NO	m/z [M+4H+]
112 AcHN-C (Pam-1) SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	24	1075.0

第 103122466 號專利申請案
說明書修正頁替換版本 (106 年 6 月)

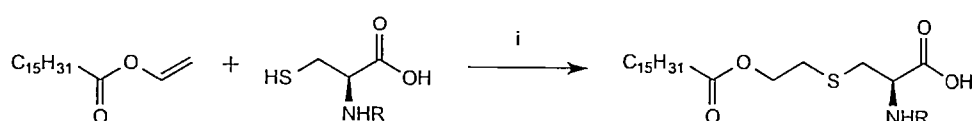
【0592】 表 2B

序列	胜肽 SEQ ID NO	轉換率	m/z [M+4H ⁺]
110 AcHN-C (Pam-1) SKKKVKNLVPMVATVK (Ac) -C(O)NH ₂	23	75%	535.6
113 H ₂ N-C (Pam-1) SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	25	35%	1289.9
114 AcHN-C (Pam-1) SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	25	41%	1300.4
116 AcHN-C (Pam-1) SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH	26	74%	962.5

【0593】 3.3 胺基酸接合物的製備

【0594】 分別經由 N- α -Fmoc-、N- α -乙醯基-及 N- α -Boc-經保護半胱胺酸來製備胺基酸接合物 200、120、及 121，如下描述及說明（示意圖 2）。

【0595】 示意圖 2



R = Fmoc, R = Ac, R = Boc 200 R = Fmoc; 120 R = Ac; 121 R = Boc

(i) 自由基引發劑，hv (365 奈米) 或加熱

【0596】 將固體 N- α -保護半胱胺酸溶解或懸浮於所指溶劑（表 3）中至 100 毫克／毫升的濃度。接著加入軟脂酸乙烯酯（1.5 莫耳當量），隨後加入所指量的引發劑。對於在光分解條件下進行的反應，在一聚丙烯容器中製備溶液，加入所指莫耳比例的 DMPA（表 3），攪拌該混合物接著以 365 奈米照射。對於在熱條件下進行的反應，在一玻璃管中製備溶液，加入所指量的 AIBN（偶氮二異丁腈），並在油浴或微波爐中加熱及攪拌該混合物。

【0597】 使用薄層色層分析來監控反應過程並允許基於該半胱胺酸起始物料的消耗量進行至完成。接著移除該溶劑並在二氧化矽凝膠上藉由快速管柱色層分析純化該殘基，以乙烷／乙酸乙酯的混合物來洗滌。由 ^1H 及 ^{13}C NMR 及質譜儀來確認 Fmoc-Cys (Pam-1) -OH (200)、Ac-Cys (Pam-1) -OH (120) 及 Boc-Cys

毫莫耳)處理,使該所產生的胜肽轉換為相對應的乙醯胺,接著自該樹脂上分割以提供胜肽接合物 110、112、114 及 116。

【0611】 或者,該樹脂-鍵結胜肽係衍生為該胺基酸接合物 *N*-Boc-Cys (Pam-1) -OH 121 或 *N*-Ac-Cys (Pam-1) -OH 120。不用因為該 Fmoc 基團而有額外必要的操作,自該樹脂上分割而直接提供該胜肽接合物 110-116。

【0612】 用於耦合該胺基酸接合物的條件係降低該胺基酸之 α -碳在激活時的外消旋化(racemise)。結合該胺基酸接合物(0.075 毫莫耳)及 PyBOP (苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基六氟磷酸鹽 (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)) (0.1 毫莫耳)並溶解在 DMF (0.3 毫升)中。加入純 2,4,6-三甲基吡啶(0.1 毫莫耳)並於混合 30 秒後將該溶液移轉至 0.025 毫莫耳的樹脂中,接著攪拌 90 分鐘,瀝乾並且清洗(DMF)。

【0613】 接著在室溫下以 1 毫升含 5% v/v 乙二硫醇的三氟乙酸中攪拌 0.015 毫莫耳的該樹脂 3 小時來分割該胜肽。接著使上清液瀝乾通過一燒結物(sinter)至 10 毫升冷凍的乙醚中,並以額外之 1 毫升的 TFA 清洗樹脂,也加入至該醚中。

【0614】 藉由離心沉澱該析出的材料,並在將該沉澱物在溶解於 1:1 MeCN/水(+0.1% TFA)之前,以醚(5 毫升)清洗該沉澱物一次,並冷凍乾燥。如果胜肽含有甲硫胺酸殘基,在冷凍乾燥前加熱該溶液至 60°C 1 個小時。接著以 RP-HPLC 純化該胜肽(>95%)並藉由分析級 RP-HPLC 及質譜儀來確認他們的性質。

第 103122466 號專利申請案
說明書修正頁替換版本 (106 年 6 月)

【0615】表 4

序列	胜肽 SEQ ID NO	m/z [M+4H+]	產量 (%)
110 AcHN-C (Pam-1) SKKKKNLVPMVATVK (Ac) - (CO) NH2	27	535.6	27
111 H2N-C (Pam-1) SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	24	1064.6	15
112 AcHN-C (Pam-1) SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	24	1075.0	20
113 H2N-C (Pam-1) SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	25	1289.9	21
114 AcHN-C (Pam-1) SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAEARRSLAQDAPPL-OH	25	1300.4	23
115 H2N-C (Pam-1) SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26	952.0	16
116 AcHN-C (Pam-1) SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26	962.5	18

【0616】 實施例 4-10 胜肽及胜肽接合物的生物活性

【0617】 這些實施例描述本發明胜肽及胜肽接合物於支持藉由抗原呈現細胞（APC）將各種抗原性胜肽構築體處理及呈現至各種 T 細胞克隆之功效的評估

【0618】 材料

【0619】 下述實施例所使用的胜肽及胜肽接合物構築體係概述於下表 5 中。

【0620】 表 5 胜肽及胜肽接合物構築體

胜肽抗原決定位 CMV pp65 殘基 495-503		胜肽 SEQ ID NO
胜肽構築體	序列	
110	Pam1Cys (Ac) -SKKKKNLVPMVATVK (Ac) -NH2	27
131	Pam2Cys-SKKKKNLVPMVATVK (Ac) -NH2	27
142	Ac-Cys-SKKKKNLVPMVATVK (Ac) -NH2	27
胜肽抗原決定位 NY-ESO-1 殘基 153-180		
胜肽構築體	序列	
143	LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	18
144	SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	17
132	Pam2Cys-SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	24
111	Pam1Cys (NH2) -SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	24
112	Pam1Cys (Ac) -SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH	24

胜肽抗原決定位 NY-ESO-1 殘基 79-116		
胜肽構 築體	序列	
145	GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL-OH	5
133	Pam2Cys-SKKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQ DAPPL-OH	25
113	Pam1Cys (NH2) -SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL- OH	25
114	Pam1Cys (Ac) -SKKKKGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL- OH	25
胜肽抗原決定位 NY-ESO-1 殘基 118-143		
胜肽代 號	序列	
147	VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	12
134	Pam2Cys-SKKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26
115	Pam1Cys (NH2) -SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26
116	Pam1Cys (Ac) -SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH	26

- 【0621】 一般方法
- 【0622】 T 細胞克隆之維持

【0623】 以 1-3x10⁶ 個／毫升的濃度將人類 CD4+及 CD8+ T 細胞維持在 RPMI 1640 (添加 Glutamix , Penicillin／Streptomycin 以及 5% v/v 人類血清)(「RS5」,所有試劑皆來自 Life Technologie) 中。每周更換 50% v/v 培養液二次。用於 CD4+T 細胞克隆的 RS5

【0645】用於本實施例中之受 CD8+ T 細胞克隆（克隆 4D9）辨識的胜肽抗原決定位，p495-503，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

142：Ac-Cys-SKKKK-**NLVPMVATVK**(Ac)-NH₂ [SEQ ID NO: 27]

131：Pam2Cys-SKKKK-**NLVPMVATVK**(Ac)-NH₂ [SEQ ID NO: 27]

110：Pam1Cys(Ac)-SKKKK-**NLVPMVATVK**(Ac)-NH₂ [SEQ ID NO: 27]

【0646】以如下描述的方法來進行 MoDC 之製備及 CD8+ T 細胞克隆活化試驗。

【0647】結果

【0648】如第 3 圖所示，對於所有胜肽構築體而言，10 微莫耳濃度即可檢測到所有 T 細胞活化，然而對於胜肽構築體 131 及 110 而言，只需要 100 奈莫耳濃度就可檢測到 T 細胞活化。

【0649】在二種濃度中，相較於構築體 142，構築體 131 及 110 可引起較好的 T 細胞活化。這些結果可支持當使用本發明方法接合至 TLR-促效劑時，本發明胜肽構築體於維持及可能地增強此抗原決定位之呈現的效力。

【0650】實施例 5

【0651】本實施例描述本發明胜肽及胜肽接合物於支持藉由自體 LCL 及同種異體 HLA-A2+HLA-DP4+MoDC 將 NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀ 構築體處理及呈現至 CD8+ T 細胞克隆之功效的評估的處理以及呈現。

【0652】 材料

【0653】 用於本實施例中之受該 CD8+ T 細胞克隆(克隆 2F2)辨識的胜肽抗原決定位，p157-165，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

143: LQQL**SLLMWITQC**FLPVFLAQPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 18]

144: SKKKK-LQQL**SLLMWITQC**FLPVFLAQPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 17]

112: Pam1Cys (Ac)
-SKKKK-LQQL**SLLMWITQC**FLPVFLAQPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 24]

111: Pam1Cys (NH₂)
-SKKKK-LQQL**SLLMWITQC**FLPVFLAQPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 24]

132:
Pam2Cys-SKKKK-LQQL**SLLMWITQC**FLPVFLAQPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 24]

【0654】 使用如實施例 4 中所描述的方法進行 LCL/MoDC 的製備及 CD8+ T 細胞克隆活化試驗。

【0655】 結果

【0656】 使用 LCL 在 10 微莫耳濃度的所有構築體中 (+/- P3C) 皆可 100%引起 T 細胞活化(見第 4 圖)。使用 100 奈莫耳濃度的構築體 143 及 144 (+/-外生性 P3C) 可以觀察到 50-100%的 T 細胞活化。在 100 奈莫耳濃度時，只有胜肽構築體 143 會引起 100%

的 T 細胞活化（第四圖，第一長柱），表示該 N-端 SKKKK 基序可能具有抗原決定位 p157-165 的減弱處理（impaired processing）。100 奈莫耳濃度的胜肽構築體 112、111 及 132 會引起<20%的 T 細胞活化，表示僅管該 TLR 促效劑接合作用，仍然允許 p157-165 抗原呈現至 CD8+ T 細胞，其無法增強該抗原決定位的處理及呈現。

【0657】如第 5 圖所示，當 10 微莫耳濃度的 MoDC 被用作 APC 時，可檢測到達到 55-95%之 T 細胞活化。

【0658】實施例 6

【0659】本實施例描述本發明胜肽及胜肽接合物於支持藉由自體 LCL 及同種異體 HLA-A2+HLA-DP4+MoDC 將 NY-ESO-1₁₅₃₋₁₈₀ 構築體處理及呈現至 CD4+T 細胞克隆之功效的評估。

【0660】材料

【0661】用於本實施例中之受 CD4+T 細胞克隆 1B7 及 1C11 辨識的胜肽抗原決定位，p157-170，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

143: LQQL**SLLMWITQCFLPVFLA**QPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 18]

144: SKKKK-LQQL**SLLMWITQCFLPVFLA**QPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 17]

112: Pam1Cys (Ac)
-SKKKK-LQQL**SLLMWITQCFLPVFLA**QPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 24]

111: Pam1Cys (NH2)

-SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 24]

132:

Pam2Cys-SKKKK-LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR-OH [SEQ ID NO: 24]

【0662】使用如實施例 4 中所描述的方法進行 LCL/MoDC 的製備及 CD8+ T 細胞克隆活化試驗。

【0663】結果

【0664】如同在第 6 至第 8 圖可以看到，當使用 LCL（僅克隆 1B7，第 6 圖）或 MoDC（克隆 1B7，第 7 圖及克隆 1C22，第 8 圖）的時候，所有構築體在 10 微莫耳濃度及 100 奈莫耳濃度時可檢測到 T 細胞的活化。如第 6 圖與第 7 圖及第 6 圖與第 8 圖的比較所顯示，相較於同種異體 MoDC，自體 LCL 似乎可引起更高的 CD25 增量調節。

【0665】相較於用於此抗原決定位（p157-170）的游離胜肽，TLR 促效劑接合作用可給出對等的抗原決定位在 MHC II 上的處理及呈現。此結果確認使用本發明方法與 TLR 促效劑的接合作用可維持抗原處理及呈現至 CD4+T 細胞。

【0666】結合第 4-8 圖的結果顯示，使用本發明方法，與一 TLR 促效劑的接合可保持該胜肽抗原 NY-ESO-1153-180 至 CD4+ 及 CD8+人類 T 細胞之抗原決定位的處理及呈現。

【0667】實施例 7

【0668】本實施例描述本發明胜肽及胜肽接合物於支持藉由自體 LCL 將 NY-ESO-179-116 構築體處理及呈現至 CD8+ T 細胞克隆

之功效的評估。

【0669】 材料

【0670】 使用於本實施例中之受 CD8+ T 細胞克隆 1D7 辨識的胜肽抗原決定位，p92-100，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

145:

GARGPESRLLEFY**LAMPFATPME**AELARRSLAQDAPPL-OH

[SEQ ID NO: 5]

114: Pam1Cys (Ac)

-SKKKK-GARGPESRLLEFY**LAMPFATPME**AELARRSLAQDAPPL-OH [SEQ ID NO: 25]

113: Pam1Cys (NH₂)

-SKKKK-GARGPESRLLEFY**LAMPFATPME**AELARRSLAQDAPPL-OH [SEQ ID NO: 25]

【0671】 使用在本實施例中之受 CD8+ T 細胞克隆 1F10 辨識的胜肽抗原決定位，p96-104，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

145:

GARGPESRLLEFY**LAMPFATPME**AELARRSLAQDAPPL-OH

[SEQ ID NO: 5]

114: Pam1Cys (Ac)

-SKKKK-GARGPESRLLEFY**LAMPFATPME**AELARRSLAQDAPPL-OH [SEQ ID NO: 25]

113: Pam1Cys (NH₂)

-SKKKK-GARGPESRLLEFY**LAMPFATPME**AELARRSLAQDAPPL-OH [SEQ ID NO: 25]

【0672】使用如上述實施例 4 中所描述的方法進行 LCL 的製備及 CD8+ T 細胞克隆活化試驗。以經 100 奈莫耳濃度的最小胜肽抗原決定位進行沖擊的 LCL 作為陽性控制組（數據未顯示）。

【0673】結果

【0674】克隆 1D7（p92-100）在所有經測試的濃度下回應所有的構築體（參見第 9 圖）。在相應的濃度中，特別在 1 微莫耳濃度／100 奈莫耳濃度，對於胜肽構築體 114 及 113 的回應該係稍差於胜肽構築體 145 +/- P3C。

【0675】克隆 1F10（p96-104）在所有經測試的濃度下回應所有的構築體（第 10 圖）。特別在 10 微莫耳濃度下，回應該胜肽構築體 114 及 113 係相當於，或稍微優於對於胜肽構築體 114 +/- P3C 者（最好由 CD137 MFI 的增加來展示；數據未顯示）。

【0676】本結果確立，在使用本發明方法與一 TLR 促效劑接合之後，胜肽 NY-ESO-1₇₉₋₁₁₆ 可保持其處理及呈現至可辨識二不同抗原決定位（p92-100 及 p96-104）的二不同的 CD8+ T 細胞株的能力。

【0677】實施例 8

【0678】本實施例描述本發明胜肽及胜肽接合物於支持藉由自體 LCL 將 NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃ 構築體處理及呈現至 CD8+ T 細胞克隆 1C11 之功效的評估。

【0679】材料

【0680】使用於本實施例中之受 CD8+ T 細胞克隆 1C11 辨識的胜肽抗原決定位，p125-133，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

147: VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO:
12]

116: Pam1Cys (Ac)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO:
26]

115: Pam1Cys (NH2)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO:
26]

【0681】 使用如上述實施例 4 中所描述的方法進行 LCL 的製備及 CD8+ T 細胞克隆活化試驗。以經 1 微莫耳濃度的 NY-ESO-1₁₂₁₋₁₃₈ 進行沖擊的 LCL 作為陽性控制組（數據未顯示）。

【0682】 結果

【0683】 如第 11 圖所示，所有構築體（+/- P3C）在 10 微莫耳濃度時可引起大於 95% 的 T 細胞活化。在 1 微莫耳濃度時，由胜肽構築體 147（+/-外源性 P3C）的 T 細胞活化分別降至 75%/60%，但對於胜肽構築體 116 及 115 而言仍然維持 ≥ 90。對於 100 奈濃度的胜肽構築體 147 時，沒有觀察到 T 細胞的活化或可忽略，然而胜肽構築體 116 及 115 可分別引起 >30% 及 20% 的 T 細胞活化。

【0684】 胜肽構築體 116 及 115 在引起 T 細胞活化的優勢代表接合至 TLR-促效劑可增進此抗原決定位（p125-133）的處理及呈現。

【0685】 實施例 9

【0686】 本實施例描述本發明胜肽及胜肽接合物於支持藉由

自體 LCL 將 NY-ESO-1₁₁₈₋₁₄₃ 構築體處理及呈現至 CD4+T 細胞克隆 1E4 及 1D6 之功效的評估。

【0687】 材料

【0688】 本實施例中所使用的胜肽構築體係顯示如下：

147: VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO: 12]

116: Pam1Cys (Ac)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO: 26]

115: Pam1Cys (NH2)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO: 26]

【0689】 使用於本實施例之受 CD4+克隆 1E4 所辨識的該推定胜肽抗原決定位，p127-138，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

147: VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO: 12]

116: Pam1Cys (Ac)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO: 26]

115: Pam1Cys(NH2)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR-OH [SEQ ID NO: 26]

【0690】 使用於本實施例之受 CD4+克隆 1D6 所辨識的推定胜肽抗原決定位，p121-132，係以粗體顯示於下述構築體序列中：

147: VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH [SEQ ID NO:
12]

116: Pam1Cys (Ac)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH [SEQ ID NO:
26]

115: Pam1Cys (NH2)
-SKKKK-VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR-OH [SEQ ID NO:
26]

【0691】 使用如上述實施例 4 中所描述的方法進行 LCL 的製
備及 CD4+T 細胞克隆活化試驗。以經 1 微莫耳濃度的
NY-ESO-1₁₂₁₋₁₃₈ 進行沖擊的 LCL 作為陽性控制組（數據未顯示）。

【0692】 結果

【0693】 如可在第 12 圖中清楚的看見，克隆 1E4 在所有經測
試的濃度下回應所有的構築體（+/-外源性 P3C）。這些結果顯示對
於來自 118-143 的克隆，該接合物抗原決定位的處理是有效的，且
不取決於或不受 TLR 促效劑連結的影響。

【0694】 如第 13 圖中所示，克隆 1D6 對於以 p121-138 沖擊
的 LCL 回應良好（數據未顯示），但不回應胜肽構築體 147
（p118-143） +/- P3C，顯示其同原抗原決定位的減弱處理。這可
能是由於在不存在 TLR 促效劑接合的情況下，該 N-端 VPG 或 C-
端 TAADHR 的存在所導致。本處理的缺點不被同時的 TLR 反式接
合所逆轉。

【0695】 然而，在一滴定的方式中，克隆 1D6 並不回應胜肽

構築體 116 及 115 (116 較 115 引起較佳的反應) (見第 13 圖)。
此顯示經由接合至一 TLR 促效劑，胜肽部分有效標記至一晚期胞內體 (endosomal) / 溶體 (lysosomal) 傳遞路徑，以緩解所觀察到之非接合性胜肽構築體 147 的處理阻隔。不希望受到任何理論的拘束，申請人提出此係至少部分由於暴露於晚期胞內體或專一性-溶體蛋白質分解酶 (lysosome-specific protease) 或處理路徑。

【0696】 實施例 10

【0697】 本實施例藉由本發明的構築體探討 TLR 促效作用。

【0698】 方法

【0699】 使用前述實施例中所載的構築體，進行下述 TLR 試驗。

【0700】 使用 HekBlue 細胞的類鐸受體 (Toll-like Receptor 2 (TLR2)) 促效作用

【0701】 自 Invivogen 購買 HEK-Blue™-hTLR2 及 HEK-Blue™-mTLR2。藉由共轉染報導基因 SEAP (分泌胚胎鹼性磷酸酶 (embryonic alkaline phosphatase)) 及人類或鼠類的任一者的 TLR2 來製造此 HekBlue 細胞。在 IFN- β 最小啟動子 (minimal promoter) 的控制下，將該 SEAP 報導基因融合至五 AP-1 及五 NF κ B 結合位。根據製造商的使用說明來培養細胞。於試驗當天，在 96-孔培養盤中，於 20 微升無內毒素的水中加入所指濃度的構築體。在 HEK-Blue™ 檢測培養液中重新懸浮 HEK-Blue™-hTLR2 或 HEK-Blue™-mTLR2 細胞至 2.83×10^4 個細胞 / 毫升，並立即加

入 180 毫升的細胞懸浮液（每孔 $\sim 5 \times 10^4$ 個細胞）。在 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 下培養該細胞隔夜。使用一 EnSpire 培養盤讀取機（EnSpire plate reader）（PerkinElmer）在 635 奈米定量 SEAP 的表現量。

【0702】 自 TLR2-暫時轉染的 HEK293 細胞檢測 IL-8 分泌的方法

【0703】 在含 10%FBS 之 DMEM 的 96 孔培養盤中接種每 50 微升 3×10^4 個 Hek-293 細胞（該培養液不添加抗體）。以 pflag-TLR2 質體及 pcDNA3.1 的組合（a kind gift from Shimizu, as reported in Shimizu, T., Y. Kida and K. Kuwano (2005). "A dipalmitoylated lipoprotein from *Mycoplasma pneumoniae* activates NF-kappa B through TLR1, TLR2, and TLR6." *J Immunol* 175 (7): 4641-4646），或者只有控制組質體（pcDNA3.1）來轉染細胞。每 50 微升樣品中，以 Opti-MEM、0.3 微升螢光金奈團簇（Lipofectamine）、100 奈公克 DNA 來組成螢光金奈團簇／DNA 複合物的主要混合物。接著培養 20 分鐘，加入該質體混合物至該細胞中。在加入構築體之前，誘導蛋白質表現 24 小時。

【0704】 加入所指濃度的構築體，使每孔中的最終體積為 200 微升。在 18 小時的刺激後，收集每個樣品，並在需要前儲存在 -20°C 下。遵照製造商的使用說明，以 Cytometric Bead Array（BD Biosciences）來確定 IL-8 分泌量，只有一處經修改：使用 25 微升而不是 50 微升的條件性培養液。為了精準確認分泌之 IL-8 的濃度，進行 11 點標準曲線（1-5000 奈公克／毫升）。使用一 BD-FACS

Aria II (BD Biosciences) 來分析樣品，並且使用 FCAP ARRAY 軟體 (版本 1.0.1) 來分析數據。

【0705】 結果

【0706】 如第 14 圖及第 15 圖所示，在 HekBlue™ (第 14 圖) 及 IL-8 (第 15 圖) 報導系統中，所有經測試的構築體皆展示 TLR 促效作用。TLR 促效作用係可滴定的，而且在上述經測試濃度下的背景中可被偵測。

【0707】 在二種試驗系統中，Pam1C (Ac) 構築體相較於相對應的 Pam1C (NH₂) 引起較強的反應。

【0708】 並不意圖限制本發明的範疇至僅為上述所提及的實施例。如熟習此項技術者可理解，在不背離本發明範疇下可有多種變化。

【符號說明】 無。

序列表

- <110> 布萊博, 瑪格蕾特
登巴, 羅德艾瑞克
瑞特, 湯瑪斯
威廉斯, 傑佛瑞
- <120> 胺基酸及胜肽接合物及結合方法
- <130> 689160
- <150> NZ612654
- <151> 2013-06-28
- <160> 27
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 42
- <212> PRT
- <213> 人造序列
- <220>

<223> 合成性胜肽

<220>

<221> 其他特徵 (MISC_feature)

<222> (1)..(1)

<223> X1 係不存在或者係 S

<220>

<221> 其他特徵

<222> (2)..(2)

<223> X2 係不存在或者係一親水性殘基

<220>

<221> 其他特徵

<222> (3)..(3)

<223> X3 係不存在或者係一親水性殘基

<220>

<221> 其他特徵

<222> (4)..(4)

<223> X4 係不存在或者係一或多個親水性殘基

<400> 1

第 103122466 號專利申請案
序列表修正頁替換版本 (106 年 6 月)

<210> 3
<211> 40
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成性胜肽

<220>
<221> 其他特徵
<222> (1)..(1)
<223> X1 係不存在或者係 S

<220>
<221> 其他特徵
<222> (2)..(2)
<223> X2 係不存在或者係一至四個親水性殘基

<400> 3

Xaa Xaa Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu

15

105

5

1

Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser

3025

20

Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu

4035

- <210> 4
- <211> 43
- <212> PRT
- <213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 4

Ser Lys Lys Lys Lys Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu

15105

1

<220>

<223> 合成性胜肽

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)..(1)

<223> X1 係不存在或係 S

<220>

<221> 其他特徵

<222> (2)..(2)

<223> X2 係不存在或係一至四個親水性殘基

<400> 16

Xaa Xaa Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe

1 5 10 15

Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg

20 25 30

<211> 28
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成性胜肽

<400> 18

Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro
1 5 10 15

Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln Arg Arg
20 25

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成性胜肽

第 103122466 號專利申請案
序列表修正頁替換版本 (106 年 6 月)

<400> 19

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe
1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 20

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

第 103122466 號專利申請案
序列表修正頁替換版本 (106 年 6 月)

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 21

Cys Ser Lys Lys Lys Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5 10 15

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 22

Cys Ser Lys Lys Lys Lys
1 5

第 103122466 號專利申請案
序列表修正頁替換版本 (106 年 6 月)

<220>

<223> 合成性胜肽

<400> 24

Cys Ser Lys Lys Lys Lys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile

1 5 10 15

Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser Gly Gln

20 25 30

Arg Arg

<210> 25

<211> 44

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成性胜肽

Cys Ser Lys Lys Lys Lys Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr

1 5 10 15

Val Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg

20 25 30

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> 人造序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成性胜肽

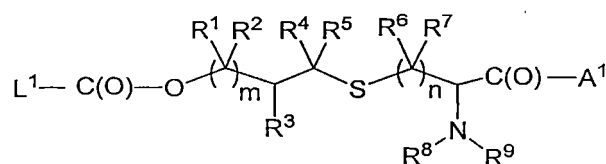
<400> 27

Cys Ser Lys Lys Lys Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Lys

1 5 10 15

申請專利範圍

1. 一種式 (V) 化合物、或其醫藥上可接受之鹽：



(V)

其中，

m 係 0 至 4 的整數；

n 係 1 或 2；

R1 及 R2 在 m 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；

R3、R4、R5、R8 以及 R9 係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R9 係胺基保護基團、L3-C(O)、或 A2；

R6 以及 R7 在 n 的各個情況中係各自獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基，

L1 係 C5-21 烷基或 C4-20 雜烷基；

L3 係 C1-6 烷基或 C3-6 環烷基；

A1 以及 A2 係各自獨立為胺基酸或胜肽；或者 A1 係 OH 或 OP1，其中 P1 係一羧基保護基團；

其中存在於 R1、R2、R4、R5、R6、R7、R8、R9、L1 以及 L3 中的任何烷基、環烷基或雜烷基，以及 R3 中的任何環烷

第 103122466 號專利申請案
申請專利範圍替換本 (107 年 12 月)

基係視需要經一或多個獨立選自以下群組的取代基取代：鹵基、CN、NO₂、OH、NH₂、NH(C1-6 烷基)、N(C1-6 烷基) (C1-6 烷基)、C1-6 鹵烷基、C1-6 鹵烷氧基、C(O)NH₂、C(O)NH(C1-6 烷基)、C(O)N(C1-6 烷基) (C1-6 烷基)、SO₂(C1-6 烷基)、O(C1-6 烷基)、S(C1-6 烷基)、S(O) (C1-6 烷基)、C(O) (C1-6 烷基)、及 C1-6 脂肪族基；以及

其中 A1 係包含一抗原決定位的胜肽，或者是 R9 為 A2 且係包含一抗原決定位的胜肽。

2. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 R9 係獨立為氫、C1-6 烷基、或 C3-6 環烷基；或者 R9 係 L3-C(O)，或 A2；而且

A1 以及 A2 係各自獨立為胜肽；或 A1 係 OH；

條件為：A1 以及 A2 之至少一者係包含抗原決定位；以及當 R9 不為 A2 時，A1 係一胜肽。

3. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 L1 係 C5-21 烷基。
4. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 m 係 0 至 2 的整數。
5. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 R1 以及 R2 在 m 的各個情況中係各別獨立為氫。
6. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 R3 係氫。
7. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 R4 以及 R5 係各自為氫。

8. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 R6 以及 R7 係各自為氫。
9. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 R8 係氫而且 R9 係氫、胺基保護基團、L3-C(O)、或 A2。
10. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 L3 係 Me。
11. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中該胜肽係包含胜肽抗原決定位。
12. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 A1 係絲胺酸或包含絲胺酸做為第一 N 端之胺基酸殘基的胜肽。
13. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 A1 及／或 A2 係包括含有胺基酸序列之增溶性基團的胜肽，該胺基酸序列係在其胜肽鏈中包含二或多個親水性胺基酸殘基。
14. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中該胜肽係包含、或實質上由選自或由選自以下群組的胺基酸序列所組成：

a. 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄GARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPL [SEQ ID NO:1] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基酸，Xaa₃ 係不存在或者係親水性胺基酸，以及 Xaa₄ 係不存在或者係一或多個親水性胺基酸，

b. 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRS
LAQDAPPL [SEQ ID NO:2] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基酸，以及 Xaa₃ 係不存在或者係一至十個親水性胺基酸，

c. 序列

Xaa₁Xaa₂GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQ
DAPPL [SEQ ID NO:3] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，以及 Xaa₂ 係不存在或者係一至四個親水性胺基酸，

d. 序列 SKKKKGARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSL
AQDAPPL [SEQ ID NO:4] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

e. 序列 GARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARRSLAQDAP
PL [SEQ ID NO:5] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

f. 序列 LAMPFATPM [SEQ ID NO:6] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

g. 序列 FATPMEAE L [SEQ ID NO:7] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

h. 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR
[SEQ ID NO:8] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基

酸，Xaa₃ 係不存在或者係親水性胺基酸，以及 Xaa₄ 係不存在或者係一或多個親水性胺基酸，

i. 序列 Xaa₁Xaa₂Xaa₃VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR

[SEQ ID NO:9] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基酸，以及 Xaa₃ 係不存在或者係一至十個親水性胺基酸，

j. 序列 Xaa₁Xaa₂VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO:10] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，以及 Xaa₂ 係不存在或者係一至四個親水性胺基酸，

k. 序列 SKKKKVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO:11] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

l. 序列 VPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR [SEQ ID NO:12] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

m. 序列 EFTVSGNIL [SEQ ID NO:13] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

n. 序列

Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQR
R [SEQ ID NO:14] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基酸，Xaa₃ 係不存在或者係親水性胺基酸，以及 Xaa₄ 係不存在或者係一或多個親水性胺基酸，

o. 序列

第 103122466 號專利申請案
申請專利範圍替換本 (107 年 12 月)

Xaa₁Xaa₂Xaa₃LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR

[SEQ ID NO:15] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，Xaa₂ 係不存在或者係親水性胺基酸，以及 Xaa₃ 係不存在或者係一至十個親水性胺基酸，

p. 序列 Xaa₁Xaa₂LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR

[SEQ ID NO:16] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，其中 Xaa₁ 係不存在或者係 S，以及 Xaa₂ 係不存在或者係一至四個親水性胺基酸，

q. 序列 SKKKKLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR

[SEQ ID NO:17] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

r. 序列 LQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR [SEQ ID NO:18] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

s. 序列 SLLMWITQCFLPVF [SEQ ID NO:19] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

t. 序列 SLLMWITQC [SEQ ID NO:20] 中的 8 或更多個連續胺基酸殘基，

u. SEQ ID NO:1 至 20 中的任一序列，

v. 或上述 (a) 至 (u) 之二或多者的任意組合。

15. 一種醫藥組合物，其係包含有效量之如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，以及醫藥上可接受的載體。

16. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中 L1 係為 C11-C21 烷基；m 係為 0；R3 係為氫；R4 及 R5 係各自為氫；n 係為 1，R6、R7 及 R8 係各自為氫；R9 係為氫或 L3-C(O)，其中

L3 係為甲基。

17. 如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽，其中該化合物係用於在一個體中接種或引發免疫反應。
18. 一種如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽於製備藥物的用途，其中該藥物係用於在一個體中接種或引發免疫反應。
19. 一種製造如請求項 1 的化合物、或其醫藥上可接受之鹽的方法，該方法包含使含脂質的接合配偶體 (conjugation partner) 與包含胺基酸的接合配偶體反應，該反應係在該含脂質的接合配偶體與該包含胺基酸的接合配偶體有效的透過碳-碳雙鍵與硫醇基 (thiol) 的氫硫反應 (hydrothiolation) 而接合的條件下進行。