



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110650729 B

(45) 授权公告日 2024.08.20

(21) 申请号 201880034048.0	A61K 31/505 (2006.01)
(22) 申请日 2018.03.28	A61K 39/00 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110650729 A	A61K 39/39 (2006.01)
(43) 申请公布日 2020.01.03	A61K 45/00 (2006.01)
(30) 优先权数据 2017-066280 2017.03.29 JP	A61K 47/06 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.11.22	A61K 47/24 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2018/012637 2018.03.28	A61K 47/28 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/181420 JA 2018.10.04	A61K 47/54 (2006.01)
(73) 专利权人 住友制药株式会社 地址 日本大阪府大阪市中央区道修町二丁目6番8号	A61K 47/69 (2006.01)
(72) 发明人 福岛晃久	A61P 31/00 (2006.01)
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001 专利代理师 高旭轶 梅黎	A61P 35/00 (2006.01)
(51) Int.Cl. A61K 9/127 (2006.01)	A61P 37/04 (2006.01)
	(56) 对比文件
	Kevin J. Peine et al.Liposomal resiquimod for the treatment of Leishmania donovani infection.J Antimicrob Chemother.2014,第69卷168-175.
	Didier Desmaële et al.Squalenoylation: A generic platform for nanoparticulate drug delivery.Journal of Controlled Release.2012,第161卷609-618.
	审查员 刘南岑
	权利要求书1页 说明书32页 附图3页

(54) 发明名称

疫苗佐剂制剂

(57) 摘要

提供了可用作疫苗佐剂的脂质体。更具体而言,提供了包含含有二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱和卵磷脂酰甘油的脂质双层和缀合化合物的脂质体,其中增强TLR7的生理活性的低分子量化合物通过连接基结合至角鲨烯,所述缀合化合物被包封在脂质双层中。

1. 脂质体,其包含(1)和(2):

(1) 脂质多层,其包含脂质组分,所述脂质组分包含二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和蛋黄磷脂酰甘油(EPG)的混合物;和

(2) 缀合化合物,其是(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[4-[(2-氨基-4-[(3S)-1-羟基己烷-3-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺,所述缀合化合物包封在(1)的脂质多层中,

其中所述缀合化合物与所述脂质组分的重量比是1:8至1:30,并且其中二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)与蛋黄磷脂酰甘油(EPG)的摩尔比是1:1至2:1。

2. 根据权利要求1的脂质体,其中所述脂质多层是脂质双层。

3. 根据权利要求1或2的脂质体,其中所述缀合化合物与所述脂质组分的重量比是1:8至1:12。

4. 根据权利要求1或2的脂质体,其中所述缀合化合物与所述脂质组分的重量比是1:10。

5. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1或2所述的脂质体。

6. 一种疫苗佐剂,其包含根据权利要求1或2所述的脂质体。

7. 一种疫苗,其包含根据权利要求1或2所述的脂质体和抗原。

8. 根据权利要求7的疫苗,其中所述抗原是衍生自病原体的物质。

9. 试剂盒,其包含:

a) 如权利要求1中定义的脂质体;

b) 抗原;和

c) 组合或分开容纳a)和b)的单位剂型的容器或装置。

## 疫苗佐剂制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及可用作疫苗佐剂的脂质体,包含所述脂质体的组合物,和所述组合物作为疫苗佐剂的用途。

### 背景技术

[0002] 包含来自微生物的蛋白质或其部分肽的疫苗可以使用化学合成或基因重组技术生产并且在安全性和生产方法方面是有利的。另一方面,包含部分肽(表位)的亚单位疫苗倾向于具有与活疫苗和灭活疫苗相比更低的免疫刺激能力。因此,为了增强表位的免疫原性和改善疫苗的免疫刺激活性,已研究了组合使用佐剂和抗原的预防或治疗方法。

[0003] 佐剂是增强对抗原的体液和/或细胞免疫反应的添加剂,且佐剂例如明矾和皂苷已经用作疫苗佐剂。

[0004] 最近,已经揭示了Toll样受体(TLR)在先天免疫的激活中起重要作用,所述先天免疫是活生物抵御微生物的防御机制。在人类中鉴定的已知的十种TLR中,TLR7被其激动剂激活以激活树突状细胞(DC)等。结果,增强了T细胞共刺激分子(CD80、CD86、CD40)的表达,并且产生了包括I型干扰素(特别是IFN $\alpha$ )、TNF $\alpha$ 、IL-6或IL-12的炎性细胞因子。

[0005] 除了DC的这种激活以外,已知TLR7激动剂活化B细胞并进一步刺激NK细胞和T细胞以促进IFN $\gamma$ 产生,并且因此,其被预期具有疫苗佐剂活性。实际上,已报告了TLR7激动剂,例如瑞喹莫德(Resiquimod)和咪喹莫特(Imiquimod)的佐剂活性(非专利文献1)。

[0006] 根据上述,存在开发激活TLR7的新的疫苗佐剂的需求。

[0007] 另一方面,角鲨烯是被用作水包油和油包水乳液制剂的油组分的油状物质,并且已将含角鲨烯的佐剂,例如MF59用作流感疫苗的佐剂(非专利文献2、3和4)。

[0008] 现有技术

[0009] 专利文献

[0010] [专利文献1] W000/12487

[0011] [专利文献2] W02009/067081

[0012] [专利文献3] W02010/133885

[0013] [专利文献4] W02012/066335

[0014] [专利文献5] W02012/066336

[0015] [专利文献6] W02012/067268

[0016] [专利文献7] W02012/067269

[0017] [专利文献8] W02013/172479

[0018] [非专利文献]

[0019] [非专利文献1] Steinhagen,F. 等人,Vaccine,2010年8月14日,第29卷,第3341-3355页

[0020] [非专利文献2] M. A. Tomai等人,Exp. Rev. Vaccine,6,835

[0021] [非专利文献3] G. Ott等人. Methods in MolecularMedicine,2000,42,211-

228

[0022] [非专利文献4] D. T. O'Hagan等人. Vaccine 2012,4341-4348

[0023] [非专利文献5] C.B. Fox,molecules 2009,14,3286。

### 发明概述

[0024] 发明所要解决的问题

[0025] 本发明提供了在长期稳定性和免疫刺激活性方面是优异的可用作疫苗佐剂的组合物。

[0026] 解决该问题的手段

[0027] 作为专心致志的研究的结果,本发明人发现了一种化合物(其中一种低分子量化合物(其是增强Toll样受体7 (TLR7)的生理活性(功能)的TLR7激动剂)与角鲨烯通过间隔基化学结合)(以下称为“本发明的缀合化合物”)通过包封在包含某种脂质组分的脂质体中而显示出优异的佐剂活性。

[0028] 本发明如下所述。

[0029] [1] 脂质体,其包含(1)和(2):

[0030] (1) 脂质多层,其包含

[0031] 选自以下的两种不同脂质的混合物:氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和蛋黄磷脂酰甘油(EPG),或

[0032] 两种不同的脂质和胆固醇(Chol)的混合物;和

[0033] (2) 缀合化合物,其中增强TLR7的生理活性的低分子量化合物通过间隔基化学结合至角鲨烯或衍生自角鲨烯的脂质,所述缀合化合物包封在(1)的脂质多层中。

[0034] [2] 根据[1]的脂质体,其中所述缀合化合物与所述脂质组分的重量比是1:8 至 1:250。

[0035] [3] 包含根据[1]或[2]的缀合化合物的脂质体,其中(1)的脂质多层是包含脂质组分的脂质多层,所述脂质组分包含二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和蛋黄磷脂酰甘油(EPG)的混合物。

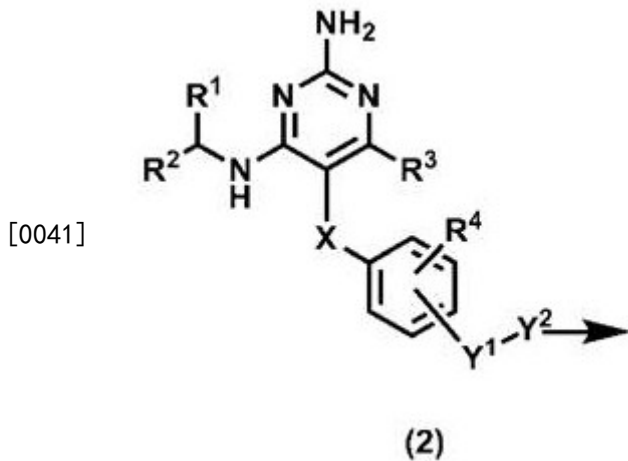
[0036] [4] 根据[1]至[3]中任一项的脂质体,其中二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)与蛋黄磷脂酰甘油(EPG)的摩尔比是1:1至2:1。

[0037] [5] 根据[1]至[4]中任一项的脂质体,其特征在于,增强TLR7的生理活性的低分子量化合物具有200至600的分子量,并具有腺嘌呤骨架、嘧啶骨架、咪唑并喹啉骨架、咪唑并吡啶骨架或喹啉骨架。

[0038] [6] 根据[5]的脂质体,其中增强TLR7的生理活性的低分子量化合物具有嘧啶骨架、腺嘌呤骨架或咪唑并喹啉骨架。

[0039] [7] 根据[6]的脂质体,其中增强TLR7的生理活性的低分子量化合物包含式(2)的结构,所述低分子量化合物结合至间隔基:

[0040] [化学式1]



[0042] 其中

[0043] X是亚甲基、氧原子、硫原子、S<sub>0</sub>、S<sub>0</sub><sub>2</sub>或NR<sup>7</sup>,其中R<sup>7</sup>是氢原子或1至3个碳原子的烷基;

[0044] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地是氢原子或1至6个碳原子的取代或未取代的烷基,条件是当所述烷基被取代时,其被选自羟基、卤素原子和1至6个碳原子的烷氧基中的1至4个相同或不同的取代基取代;

[0045] R<sup>3</sup>是1至6个碳原子的烷基、1至6个碳原子的烷氧基或1至6个碳原子的烷硫基;

[0046] R<sup>4</sup>是氢原子、卤素原子、羟基、1至6个碳原子的烷基、1至6个碳原子的烷氧基或氰基;

[0047] Y<sup>1</sup>是单键、-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-、-CH=CH-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-、

[0048] [化学式2]

[0049]  $-\text{C}=\text{C}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_q-$

[0050] 或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>9'</sup>R<sup>10'</sup>)<sub>r'</sub>- ,其中R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>9'</sup>和R<sup>10'</sup>独立地是氢原子或1至4个碳原子的烷基;

[0051] Y<sup>2</sup>是单键或-C(O)-;

[0052] 条件是当所述烷基被取代时,其被选自羟基和卤素原子的1至4个相同或不同的取代基取代;

[0053] p是1至6的整数;

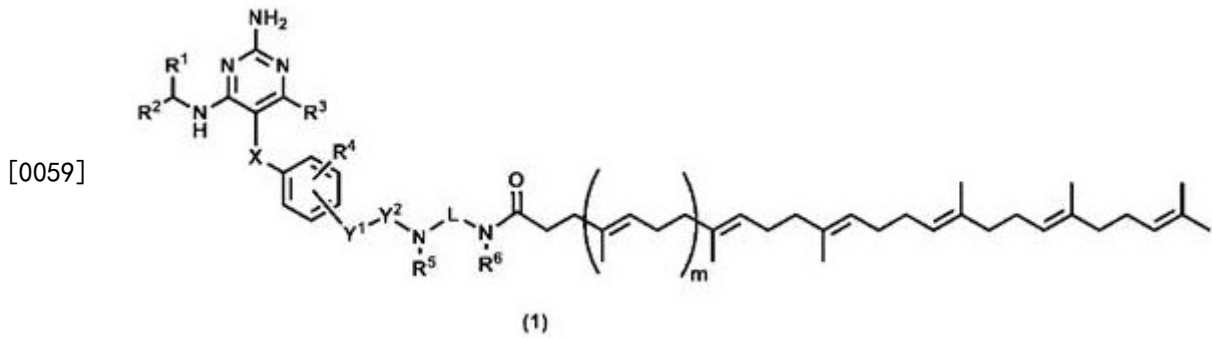
[0054] q和q'独立地是0至4的整数;

[0055] r是0至5的整数,并且r'是1至5的整数,条件是r和r'的和是5或更小并且条件是当Y<sup>2</sup>是单键时r'是2或更大的整数;和

[0056] 箭头线表示与间隔基的键。

[0057] [8] 根据[1]至[6]中任一项的脂质体,其中所述缀合化合物是式(1)的化合物或其药学上可接受的盐:

[0058] [化学式3]



[0060] 其中

[0061] X是亚甲基、氧原子、硫原子、SO、SO<sub>2</sub>或NR<sup>7</sup>,其中R<sup>7</sup>是氢原子或1至3个碳原子的烷基;

[0062] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地是氢原子或1至6个碳原子的取代或未取代的烷基,条件是当所述烷基被取代时,其被选自羟基、卤素原子和1至6个碳原子的烷氧基中的1至4个相同或不同的取代基取代;

[0063] R<sup>3</sup>是1至6个碳原子的烷基、1至6个碳原子的烷氧基或1至6个碳原子的烷硫基;

[0064] R<sup>4</sup>是氢原子、卤素原子、羟基、1至6个碳原子的烷基、1至6个碳原子的烷氧基或氰基;

[0065] Y<sup>1</sup>是单键、-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-、-CH=CH-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-、

[0066] [化学式4]

[0067]  $\text{—C}\equiv\text{C}(\text{CR}^9\text{R}^{10})_q\text{—}$

[0068] 或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-,其中R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>9'</sup>和R<sup>10'</sup>独立地是氢原子或1至4个碳原子的烷基;

[0069] Y<sup>2</sup>是单键或-C(O)-;

[0070] L是2至6个碳原子的取代或未取代的直链亚烷基或衍生自4至8元的环烷烃的二价基团,条件是当所述直链亚烷基或环烷烃被取代时,其被选自1至5个碳原子的烷基、羟基和卤素原子中的1至4个相同或不同的取代基取代,并且条件是L的直链亚烷基中的任一个亚甲基任选被羰基替代;

[0071] R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地是氢原子或1至6个碳原子的取代或未取代的烷基,或R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>与L的任何碳原子结合在一起形成4-至8-元含氮饱和杂环,或R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>结合在一起形成取代或未取代的5-至8-元含氮饱和杂环,条件是当所述烷基被取代时,其被选自羟基和卤素原子的1至4个相同或不同的取代基取代并且条件是当所述4-至8-元含氮饱和杂环或所述5-至8-元含氮饱和杂环被取代时,其被选自甲基、乙基、丙基、羟甲基、羟乙基、羰基、羟基和卤素原子的相同或不同的1至4个取代基取代;

[0072] m是0或1;

[0073] p是1至6的整数;

[0074] q和q'独立地是0至4的整数;和

[0075] r是0至5的整数,并且r'是1至5的整数,条件是r和r'的和是5或更小并且条件是当Y<sup>2</sup>是单键时r'是2或更大的整数。

[0076] [9] 根据[1]至[8]中任一项的脂质体,其中所述脂质多层是脂质双层。

- [0077] [10] 一种药物组合物,其包含根据[1]至[9]中任一项的脂质体。
- [0078] [11] 一种疫苗佐剂,其包含根据[1]至[9]中任一项的脂质体。
- [0079] [12] 一种疫苗,其包含根据[1]至[9]中任一项的脂质体和抗原。
- [0080] [13] 根据[12]的疫苗,其中所述抗原是衍生自病原体的物质。
- [0081] 发明效果
- [0082] 本发明的疫苗佐剂能够增强对抗原的特异性免疫应答,并且在长时间内稳定。

### 附图简述

[0083] [图1]图1显示实施例5的脂质体的粒径分布和Zeta电位分布的结果,该脂质体在其制备后立即用纯净水稀释并使用MALVERN Zetasizer Nano通过动态光散射法进行测量。纵坐标表示散射强度,且横坐标分别表示粒径和Zeta电位。

[0084] [图2]图2显示肌内施用实施例1和实施例5的脂质体的免疫小鼠血清中OVA特异性IgG2c的ELISA定量的结果。

[0085] 纵坐标代表血清中OVA特异性IgG2c的抗体效价。横坐标表示施用的样品,如下(在括号中指示施用的脂质体或明矾的剂量)。1:实施例5的阴性对照(不含缀合化合物的脂质体,即空脂质体,其脂质重量等于施用50 $\mu$ g/小鼠的缀合化合物的脂质体); 2:实施例5的脂质体(50 $\mu$ g/小鼠); 3:实施例5的脂质体(10 $\mu$ g/小鼠); 4:实施例5的脂质体(2 $\mu$ g/小鼠); 5:实施例1的阴性对照(如上述1中的不含缀合化合物的脂质体); 6:实施例1的脂质体(10 $\mu$ g/小鼠); 7:实施例1的脂质体(2 $\mu$ g/小鼠); 8:实施例1的脂质体(0.4 $\mu$ g/小鼠); 9:明矾(氢氧化铝)(150 $\mu$ g/只)。

[0086] [图3]图3是显示肌内施用实施例1或实施例5的脂质体的小鼠的脾细胞中的1型辅助性T细胞的比例的图。横坐标的含义与图2相同。

[0087] [图4]图4是显示肌内施用实施例1或实施例5的脂质体的小鼠的脾细胞中的OVA四聚体阳性CD8 T细胞的比例的图。横坐标的含义与图2相同。

[0088] [图5]图5是显示肌内施用实施例1或实施例5的脂质体的小鼠的脾细胞中的效应记忆性CD8 T细胞的比例的图。横坐标的含义与图2相同。

[0089] 实施方案的描述

[0090] 脂质体是包含具有内相的脂质多层,例如两亲性脂质分子的双层膜(脂质双层)的微泡。构成这种脂质多层的脂质在本文中可称为脂质组分。本文使用的脂质多层优选是脂质双层。

[0091] 在构成本发明制剂的脂质体中,脂质多层(优选脂质双层)的脂质组分可包含选自以下的两种不同脂质的混合物:氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC:也称为氢化大豆磷脂)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和蛋黄磷脂酰甘油(EPG:也称为卵磷脂酰甘油)或这样的两种不同的脂质和胆固醇(Chol)的混合物。

[0092] 如果构成上述脂质体的脂质组分具有酸性基团或碱性基团,则它们可以形成药学上可接受的盐,例如碱金属盐(例如,钠盐、钾盐)。

[0093] 本发明的脂质体可以以基本上不影响其稳定性的量包含其它组分。

[0094] 在某些实施方案中,构成脂质双层的脂质组分包含DMPC和EPG的混合物。DMPC与

EPG的摩尔比(DMPC:EPG)是,例如,1:10至10:1,优选1:4至4:1,更优选1:1至2:1。

[0095] 在一个特别的实施方案中,DMPC与EPG的摩尔比(DMPC:EPG)是5:3。

[0096] 在一个特别的实施方案中,构成脂质双层的脂质组分包含HSPC、Chol和DSPG的混合物。HSPC、Chol和DSPG中的每一种的比例可以适当地设置在10%和60%之间,以使总比例为100%。例如,HSPC:Chol:DSPG的比例可以是50-60:25-30:10-25(总共为100)。在一个实施例中,HSPC:Chol:DSPG为约53.1:约 26.3:约 20.5(总共为100)。

[0097] 在一个特别的实施方案中,构成脂质双层的脂质组分包含DOPC、Chol和DOPG的混合物。DOPC、Chol和DOPG中的每一种的比例可以适当地设置在10%和60%之间,以使总比例为100%。例如,DOPC:Chol:DOPG的比例可以为50-60:25-30:10-25(总共为100)。在一个实施例中,DOPC:Chol:DOPG为约53.1:约 26.3:约 20.5(总共为100)。

[0098] 如本文所用,“被包封在脂质多层,优选地在脂质双层中的缀合化合物”或“被包封在脂质体中的缀合化合物”是指被包括在构成脂质体的脂质多层,优选脂质双层以内的本发明的缀合化合物,并且还指存在于构成脂质体的脂质多层,优选脂质双层的表面或内部的本发明的缀合化合物。

[0099] 本发明的脂质体可以使用本发明的缀合化合物和脂质组分,根据用于制造脂质体的已知方法获得。例如,将预定量的本发明的缀合化合物和脂质组分溶解在合适的有机溶剂(氯仿、甲醇、己烷等)中,并将溶液放入容器中。除去溶剂以在容器壁上形成薄膜。将膜干燥,并且然后将合适的水溶液例如缓冲溶液倒入容器中以重新水合。施加超声处理以使膜分离,然后搅拌以形成脂质体。脂质体的粒径可以通过使获得的脂质体分散体通过具有针对孔径而适当设定的过滤器的挤出机而进行调节。此外,从如此获得的脂质体分散体中,可以通过凝胶过滤、超速离心、渗析、离子交换色谱法等将未掺入脂质体中的缀合化合物和脂质组分除去。

[0100] 在本发明的一个实施方案中,掺入脂质体中的缀合化合物相对于脂质组分的总重量的重量比(缀合化合物:脂质组分)为1:3至1:30,优选1:5至1:15,更优选1:8至1:12,且仍更优选1:10。

[0101] 如本文所用,衍生自角鲨烯的脂质的实例包括(6E,10E,14E)-2,6,10,15,19-五甲基二十碳-2,6,10,14,18-五烯。可以通过本领域公知的方法通过间隔基将这种衍生自角鲨烯的化合物适当地结合,以提供本发明的缀合化合物。

[0102] 作为增强TLR7的生理活性的TLR7激动剂的本发明的低分子量化合物的实例包括具有200至600的分子量,优选250至500的分子量,更优选300至500的分子量的那些,且优选具有腺嘌呤骨架、嘧啶骨架、咪唑并喹啉骨架、咪唑并吡啶骨架或喹唑啉骨架的那些。

[0103] 具有腺嘌呤骨架的化合物的实例包括具有4-氨基-8-氧代-嘌呤(8-氧代腺嘌呤)骨架的化合物,例如在9位被可以被5-或6-元芳族碳环、5-或6-元芳族杂环或4-至7-元脂肪族含氮杂环取代的烷基(例如,具有1至6个碳原子的直链烷基)取代的具有4-氨基-8-氧代-嘌呤骨架的化合物。具体实例包括GSK-2245035(2-[1(S)-甲基丁氧基]-9-[5-(1-哌啶基)戊基]-8,9-二氢-7H-腺嘌呤-8-酮)和如W098/01448、W099/28321、W002/085905、W02008/114008、W02008/114819、W02008/114817、W02008/114006、W02010/018131、W02010/018134、W02008/101867、W02010/018133或W02009/005687中公开的化合物。

[0104] 具有嘧啶骨架的化合物的实例包括具有2,4-二氨基嘧啶骨架的化合物,例如,在

6-位被诸如烷基的取代基和在5-位被可以被5-或6-元芳族碳环、5-或6-元芳族杂环或4-至7-元脂肪族含氮杂环取代的烷基(例如,具有1至6个碳原子的直链烷基)适当取代的2,4-二氨基嘧啶。具体实例包括如W000/12487、W02010/133885、W02013/172479或W02012/136834中公开的化合物。

[0105] 具有咪唑并喹啉骨架的化合物的实例包括具有4-氨基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉骨架的化合物,包括咪喹莫特、瑞喹莫德和852A(N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]甲烷磺酰胺),诸如在1位被C1-6烷基或C1-6烷氧基取代且在2-位被C1-6烷基或C1-6烷氧基取代的4-氨基-1H[4,5-c]喹啉。具体实例包括如W02010/48520、W02008/135791、US4689338、US4698348或W02007/030777中公开的化合物。

[0106] 具有咪唑并吡啶骨架的化合物的实例包括具有4-氨基-1,3-二氢-2H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-酮骨架的化合物,诸如具有在6-或7-位被可以被卤素取代的C1-6烷基或C1-6烷氧基取代的且在1-位被可以被5-或6-元芳族碳环、5-或6-元芳族杂环或4-至7-元脂肪族含氮杂环取代的烷基(例如,具有1至4个碳原子的直链烷基)取代的4-氨基-1,3-二氢-2H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-酮骨架的化合物。具体实例包括如W02007/93901中公开的化合物和PF-4171455(4-氨基-1-苄基-6-(三氟甲基)-1,3-二氢-2H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-酮)。

[0107] 具有喹啉骨架的化合物的实例包括具有2,4-二氨基喹啉骨架的衍生物,诸如具有在4-位被可以被羟基或卤素原子适当地取代的烷基(例如,具有1至8个碳原子的直链或支链烷基)取代的2,4-二氨基喹啉骨架的化合物。具体实例包括如W02012/156498或W02014/76221中公开的化合物。

[0108] 另外,作为TLR7激动剂的低分子量化合物的实例包括besatrimod(4-氨基-2-丁氧基-8-[[3-[(吡咯烷-1-基)甲基]苯基]甲基]-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮)和如W02010/077613中公开的化合物。

[0109] 本发明的缀合化合物中的间隔基的实例包括化学稳定且众所周知的间隔基,其能够连接低分子量化合物和角鲨烯或衍生自角鲨烯的脂质。具体实例包括包含C1-4亚烷基、酰胺键、酯键、醚键、硫醚键、脲键、尿烷键和磺酰胺键中的一种或组合的连接基。

[0110] 在本发明的一个实施方案中,增强TLR7的生理活性的本发明的低分子量化合物包含由上式(2)表示的结构。

[0111] 在本发明的一个实施方案中,本发明的缀合化合物是由上式(1)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0112] 式(1)或式(2)中的每一术语的定义如下所述。

[0113] 术语“卤素原子”包括氟原子、氯原子、溴原子和碘原子,并且优选氟原子和氯原子。

[0114] 术语“直链亚烷基”包括1至6个碳原子的直链亚烷基。直链亚烷基的具体实例包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚正丙基和亚正丁基。

[0115] 术语“烷基”包括1至6个碳原子的直链或支链烷基。烷基的具体实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和叔丁基。

[0116] 术语“环烷烃”包括4-至8-元环烷烃,具体而言,环丁烷、环戊烷、环己烷、环庚烷和环辛烷,且优选环戊烷、环己烷和环庚烷。

[0117] 术语“衍生自环烷烃的二价基团”包括但不限于能够结合至环烷烃上的不同碳原

子的毗邻原子的二价基团。

[0118] 术语“烷氧基”包括1至6碳原子的直链或支链烷氧基。烷氧基的具体实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和异戊氧基。

[0119] 术语“4-至8-元含氮饱和杂环”包括含有1至3个杂原子的4-至8-元含氮饱和杂环，所述杂原子选自2或3个氮原子、0或1个氧原子和0或1个硫原子，其中环中含有至少两个氮原子。具体实施例包括氮杂环丁烷、吡咯烷、哌啶、全氢化氮杂环庚三烯(perhydroazepine)、咪唑烷、哌嗪、吗啉、硫吗啉和全氢化-1,4-二氮杂环庚三烯。

[0120] “5-至8-元含氮饱和杂环”可以是5-至8-元的上述“4-至8-元含氮饱和杂环”。

[0121] 含氮饱和杂环的取代基的实例优选包括甲基、乙基、丙基、羟甲基、羟乙基、羰基、羟基和卤素原子，并且更优选羟基和卤素原子。所述含氮饱和杂环可以被相同或不同的1至4个所述取代基取代。

[0122] 在式(1)中，X代表亚甲基、氧原子、硫原子、SO、SO<sub>2</sub>或NR<sup>7</sup>，其中R<sup>7</sup>代表氢原子或1至3个碳原子的烷基。R<sup>7</sup>优选代表氢原子或甲基。X优选代表亚甲基。

[0123] 在式(1)中，R<sup>1</sup>优选代表氢原子或1至4个碳原子的烷基。R<sup>1</sup>的具体实例包括甲基、乙基、丙基和丁基。

[0124] 在式(1)中，R<sup>2</sup>代表氢原子或1至4个碳原子的取代或未取代的烷基。当烷基被取代时，取代基的具体实例包括羟基。R<sup>2</sup>的具体实例包括氢原子、甲基、乙基、丙基、羟基甲基和羟基乙基。

[0125] 在式(1)中，R<sup>3</sup>优选代表1至4个碳原子的烷基、1至4个碳原子的烷氧基或1至4个碳原子的烷硫基，更优选1至3个碳原子的烷基或1至3个碳原子的烷氧基。R<sup>3</sup>的具体实例包括甲基、乙基、丙基和丁基，并且更优选甲基。

[0126] 在式(1)中，R<sup>4</sup>的实例优选包括氢原子、1至3个碳原子的烷基、1至3个碳原子的烷氧基、羟基和卤素原子，并且更优选氢原子和甲氧基。

[0127] 在式(1)中，Y<sup>1</sup>优选代表单键、-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>9'</sup>R<sup>10'</sup>)<sub>r'</sub>-，其中R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>9'</sup>和R<sup>10'</sup>独立地是氢原子或1至4个碳原子的烷基。R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>9'</sup>和R<sup>10'</sup>优选独立地为氢原子或甲基，更优选氢原子。更优选地，Y<sup>1</sup>是单键或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-。

[0128] 在式(1)中，当Y<sup>1</sup>是-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-时，p优选是1至4的整数，更优选1、2或3。

[0129] 在式(1)中，当Y<sup>1</sup>代表-CH=CH-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-或

[0130] [化学式5]

[0131]  $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_q-$  时，

[0132] q和q' 优选独立地为0至3的整数，更优选0或1。

[0133] 在式(1)中，当Y<sup>1</sup>代表-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>9'</sup>R<sup>10'</sup>)<sub>r'</sub>-时，r优选是0至3的整数并且r' 优选是1至4，条件是r和r' 的和是5或更小，并且更优选r是0或1并且r' 是1或2。

[0134] 在式(1)中，当Y<sup>1</sup>是单键或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-时，Y<sup>2</sup>代表单键或-C(O)- (羰基)。

[0135] 在一个优选的实施方案中，Y<sup>1</sup>代表单键并且Y<sup>2</sup>代表-C(O)-。

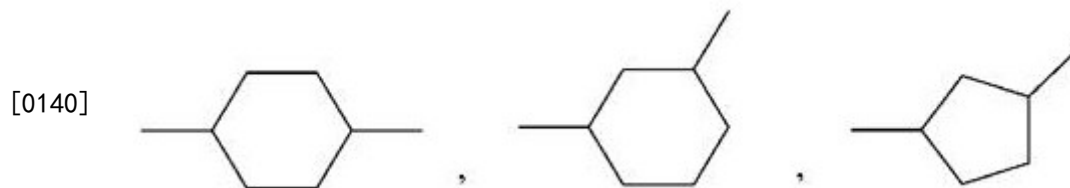
[0136] 在一个优选的实施方案中，Y<sup>1</sup>代表-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-并且Y<sup>2</sup>代表单键，其中R<sup>9</sup>和R<sup>10</sup>优选独立地为氢原子或甲基，更优选氢原子，并且p优选是1至4的整数，更优选1、2或3。

[0137] 在本发明的一个实施方案中，式(1)中的L是2至4个碳原子的直链亚烷基，优选2或

3个碳原子的直链亚烷基,并且更优选亚乙基。

[0138] 在本发明的一个实施方案中,式(1)中的L代表衍生自4至8元的环烷烃的二价基团,更优选衍生自5-或6-元环烷烃的二价基团。二价基团的具体实例包括以下二价基团。

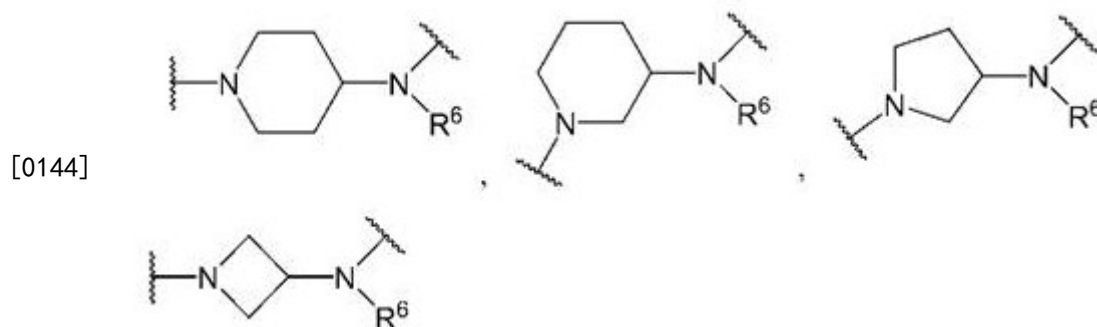
[0139] [化学式6]



[0141] 在本发明的一个实施方案中,式(1)中的 $R^5$ 和 $R^6$ 代表氢原子或1至3个碳原子的取代或未取代的烷基,优选独立地氢原子或1至3个碳原子的烷基,更优选独立地氢原子或甲基,且仍更优选氢原子。当烷基被取代时,其被1至4个选自羟基或卤素原子的相同或不同的取代基取代。

[0142] 在本发明的一个实施方案中,式(1)中的 $R^5$ 或 $R^6$ 可以与L的任何碳原子结合在一起形成4-至8-元含氮饱和杂环,优选4-至6-元含氮饱和杂环。所述通过 $R^5$ 与L的任何碳原子结合形成的4-至8-元含氮饱和杂环的具体实例包括以下。

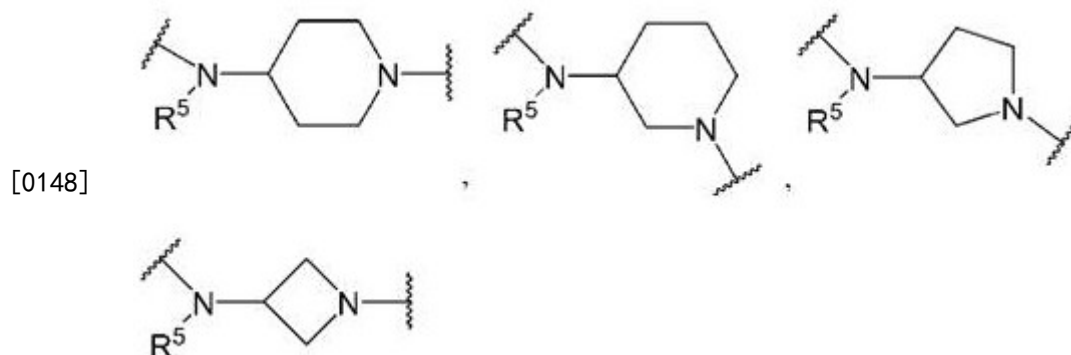
[0143] [化学式7]



[0145] 其中 $R^6$ 代表氢原子或1至6个碳原子的取代或未取代的烷基。

[0146] 所述通过 $R^6$ 与L的任何碳原子结合形成的4-至8-元含氮饱和杂环的具体实例包括以下。

[0147] [化学式8]

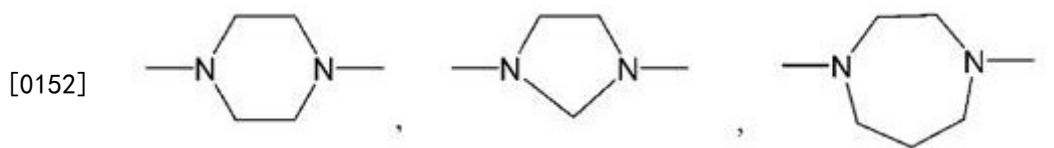


[0149] 其中 $R^5$ 代表氢原子或1至6个碳原子的取代或未取代的烷基。

[0150] 在本发明的一个实施方案中,式(1)中的 $R^5$ 和 $R^6$ 可以结合在一起形成取代或未取代的5-至8-元含氮饱和杂环,优选5-或6-元含氮饱和杂环。这样的含氮饱和杂环的具体实例

包括下式的含氮饱和杂环：

[0151] [化学式9]



[0153] 当 $R^5$ 或 $R^6$ 与L的任何碳原子结合在一起形成取代的4-至8-元含氮饱和杂环或当 $R^5$ 和 $R^6$ 结合在一起形成取代的5-至8-元含氮饱和杂环时，取代基优选是选自羟基或卤素原子的相同或不同的1至4个取代基。

[0154] 在式(1)中，m优选代表1。

[0155] 在一个优选的实施方案中，式(1)的化合物是这样的化合物，其中

[0156] X代表亚甲基，

[0157]  $R^1$ 代表1至4个碳原子的烷基，

[0158]  $R^2$ 代表氢原子、1至3个碳原子的烷基或被羟基取代的1至3个碳原子的烷基，

[0159]  $R^3$ 代表1至3个碳原子的烷基或1至3个碳原子的烷氧基，

[0160]  $R^4$ 代表氢原子、卤素原子、羟基、1至6个碳原子的烷基或1至6个碳原子的烷氧基，

[0161]  $Y^1$ 代表单键或 $-(CR^9R^{10})_p-$ ，

[0162]  $Y^2$ 代表 $-C(O)-$ ，

[0163] L代表2至6个碳原子的直链亚烷基，

[0164]  $R^5$ 和 $R^6$ 独立地代表氢原子或1至3个碳原子的烷基或 $R^5$ 或 $R^6$ 与L的任何碳原子结合在一起形成4-至8-元含氮饱和杂环或 $R^5$ 和 $R^6$ 结合在一起形成取代或未取代的4-至8-元含氮饱和杂环，

[0165] m代表0或1，优选1。

[0166] 在一个优选的实施方案中，式(1)的化合物是这样的化合物，其中

[0167] X代表亚甲基，

[0168]  $R^1$ 代表1至4个碳原子的烷基，

[0169]  $R^2$ 代表氢原子、1至3个碳原子的烷基或被羟基取代的1至3个碳原子的烷基，

[0170]  $R^3$ 代表1至3个碳原子的烷基或1至3个碳原子的烷氧基，

[0171]  $R^4$ 代表氢原子、卤素原子、羟基、1至6个碳原子的烷基或1至6个碳原子的烷氧基，

[0172]  $Y^1$ 代表 $-(CR^9R^{10})_p-$

[0173]  $Y^2$ 代表单键，

[0174] L代表2至6个碳原子的直链亚烷基，

[0175]  $R^5$ 和 $R^6$ 独立地代表氢原子或1至3个碳原子的烷基或 $R^5$ 或 $R^6$ 与L的任何碳原子结合在一起形成4-至8-元含氮饱和杂环或 $R^5$ 和 $R^6$ 结合在一起形成取代或未取代的4-至8-元含氮饱和杂环，

[0176] m代表0或1，优选1。

[0177] 在一个优选的实施方案中，式(1)的化合物是这样的化合物，其中

[0178] X代表亚甲基，

[0179]  $R^1$ 代表1至4个碳原子的烷基，

- [0180]  $R^2$ 代表氢原子、1至3个碳原子的烷基或被羟基取代的1至3个碳原子的烷基，
- [0181]  $R^3$ 代表1至3个碳原子的烷基或1至3个碳原子的烷氧基，
- [0182]  $R^4$ 代表氢原子、卤素原子、羟基、1至6个碳原子的烷基或1至6个碳原子的烷氧基，
- [0183]  $Y^1$ 代表单键并且 $Y^2$ 代表-C(O)-，或 $Y^1$ 代表-( $CR^9R^{10}$ )<sub>p</sub>-并且 $Y^2$ 代表单键，
- [0184] L代表2至6个碳原子的直链亚烷基，
- [0185]  $R^5$ 和 $R^6$ 独立地代表氢原子或1至3个碳原子的烷基，
- [0186] m代表0或1，优选1。
- [0187] 本发明的优选的缀合化合物的实例包括以下化合物或其药学上可接受的盐：
- [0188] (4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[[4-[(2-氨基-4-[[1-羟基己烷-3-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基](甲基)氨基}乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺；
- [0189] (4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-[[1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苄基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；
- [0190] (4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-[[1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苯甲酰基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；
- [0191] 4-[(2-氨基-4-[[1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-[[4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺；和
- [0192] 4-[(2-氨基-4-[[1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-[[4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺。
- [0193] 可替代地，
- [0194] (4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[[4-[(2-氨基-4-[(3S)-1-羟基己烷-3-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基](甲基)氨基}乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺；
- [0195] (4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苄基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；
- [0196] (4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苯甲酰基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；
- [0197] 4-[(2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-[[4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺；和
- [0198] 4-[(2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-[[4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺。

[0199] 本文使用的式(1)的化合物的药学上可接受的盐的实例包括式(1)的化合物的酸加成盐或碱加成盐。酸加成盐的实例包括与无机或有机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、三氟乙酸、柠檬酸和马来酸的酸加成盐。碱加成盐的实例包括碱金属盐诸如钠盐和钾盐、碱土金属盐诸如钙盐以及铵盐。

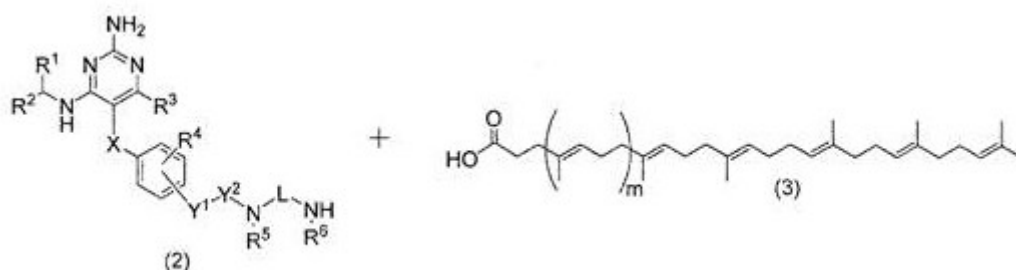
[0200] 式(1)的化合物可以通过以下方法使用已知化合物作为起始材料制备。

[0201] 起始材料可以作为盐使用。此外,以下方法仅仅是示例性的,并且所述化合物可以通过适当地基于有机合成领域技术人员的知识的另一种方法制造。

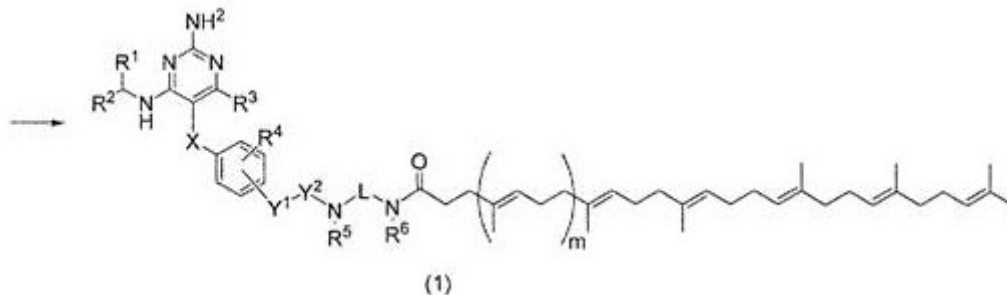
[0202] [用于制备化合物(1)的方法1]

[0203] 式(1)的化合物或其盐可以例如通过以下方法制备。

[0204] [化学式10]



[0205]



[0206] 化合物(1)可以通过在惰性溶剂中使用缩合剂(任选地在碱存在下)使化合物(3)与化合物(2)反应制备。

[0207] 碱没有限制,只要其被本领域技术人员在有机化学反应中使用即可,并且实例包括有机碱诸如N-甲基吗啉、三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1,8-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯、1,4-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯、吡啶、二甲基氨基吡啶和皮考啉;和无机碱诸如碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠和碳酸钾。相对于化合物(3),该碱可以通常以0.1至100当量,优选1至5当量的量使用。

[0208] 缩合剂可以是日本化学会,Maruzen Co., Ltd.编辑的Experimental Chemistry Course第22卷中所述的那些,且实例包括磷酸酯诸如氰基磷酸二乙酯和二苯基磷酰基叠氮化物;碳二亚胺诸如1-乙基-3-(3-二乙基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(WSC·HCl)和二环己基碳二亚胺(DCC);二硫醚(disulfide)诸如2,2'-二吡啶基二硫醚和磷诸如三苯基磷的组合;卤化磷诸如N,N'-双(2-氧代-3-噁唑烷基)次磷酰氯(BOPCl);偶氮二甲酸二酯诸如偶氮二甲酸二乙酯和磷诸如三苯基磷的组合;2-卤代-1-低级烷基吡啶鎓卤化物诸如2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物;1,1'-羰基二咪唑(CDI);二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA);二乙基磷酰基叠氮化物(DEPC);四氟硼酸盐诸如2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TBTU)和2-氯-1,3-二甲基咪唑烷鎓四氟硼酸盐(CIB);磷酸盐诸如2-(1H-苯并三唑-1-

基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)、苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)、苯并三唑-1-基氧基三(吡咯烷基)磷六氟磷酸盐(PYBOP)和2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)。

[0209] 惰性溶剂的实例包括醚溶剂,诸如氢氢呋喃、二乙醚、1,4-二氧六环、1,2-二甲氧基乙烷;烃溶剂,诸如己烷、庚烷、甲苯、苯和二甲苯;卤代烃溶剂,诸如二氯甲烷、氯仿和二氯乙烷;酮溶剂,诸如丙酮;非质子溶剂,诸如乙腈、N,N'-二甲基甲酰胺、二甲亚砜和六甲基磷酰胺;及其混合物。反应温度优选选自但不限于约-70°C至100°C,更优选0°C至40°C的范围。

[0210] 可替代地,可以使用卤化剂(例如,1-氯-N,N,2-三甲基丙基胺、三氯氧磷、三氯化磷、亚硫酸氯、五氯化磷)将化合物(3)转化为酰卤,然后在惰性溶剂中任选地在碱存在下与化合物(2)反应,以得到化合物(1)。

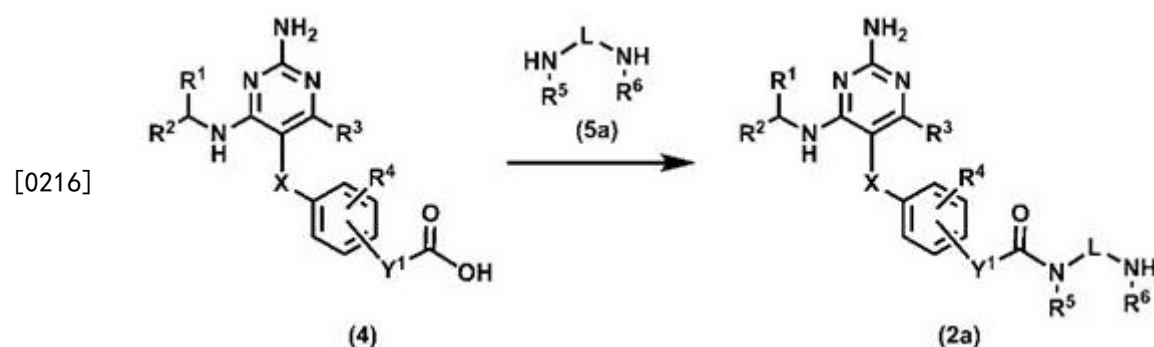
[0211] 惰性溶剂的实例包括醚溶剂,诸如氢氢呋喃、二乙醚、1,4-二氧六环、1,2-二甲氧基乙烷;烃溶剂,诸如己烷、庚烷、甲苯、苯和二甲苯;卤代烃溶剂,诸如二氯甲烷、氯仿和二氯乙烷;酯溶剂,诸如乙酸乙酯和乙酸异丙酯;酮溶剂,诸如甲基乙基酮和丙酮;和非质子溶剂,诸如乙腈、N,N'-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜和六甲基磷酰胺。碱的实例包括有机碱,诸如N-甲基吗啉、三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1,8-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯、1,4-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯、吡啶、二甲基氨基吡啶、皮考啉。相对于化合物(3),卤化剂可以以0.1至100当量,优选0.8至3当量的量使用。反应温度优选选自但不限于约-30°C至60°C的范围。

[0212] 化合物(3)可以根据本领域众所周知的方法(参见Org. Biomol. Chem. 2011, 9, 4367)制备。

[0213] [用于制备化合物(2)的方法1]

[0214] 化合物(2a)(其中式(2)中的Y<sup>2</sup>是-C(O)-)或其盐可以通过以下方法制备。

[0215] [化学式11]



[0217] 其中 X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、Y<sup>1</sup>和L如上面所定义。

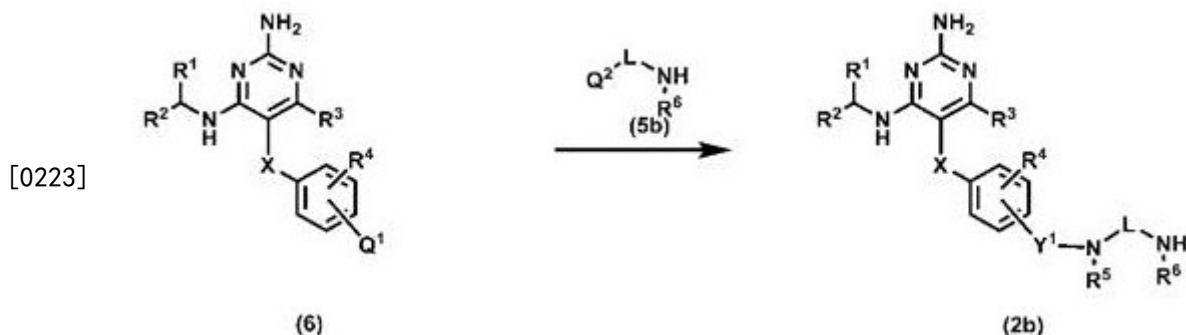
[0218] 化合物(2a)可以根据如制备化合物(1)所述的方法从化合物(4)和化合物(5a)合成。

[0219] 化合物(4)可以根据本领域众所周知的方法,诸如W0 2009/067081和W0 2010/103885中描述的那些制备。

[0220] [用于制备化合物(2)的方法2]

[0221] 化合物(2b)(其中式(2)中的Y<sup>2</sup>是单键)或其盐可以例如通过以下方法制备。

[0222] [化学式12]



[0224] 其中 X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和L如上面所定义，Y<sup>1</sup>是-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-、-CH=CH-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-或

[0225] [化学式13]

[0226]  $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_{q'}-$ 

[0227] 其中 p、q和q'如上面所定义，并且

[0228] (1) Q<sup>1</sup>代表-Y<sup>1</sup>NHR<sup>5</sup>并且Q<sup>2</sup>代表CHO；或

[0229] (2) Q<sup>1</sup>代表-Y<sup>1'</sup>-CHO，其中 Y<sup>1'</sup>为不存在或代表亚烷基并且-Y<sup>1'</sup>-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)-相应于-Y<sup>1</sup>-，并且Q<sup>2</sup>代表-CH<sub>2</sub>NHR<sup>5</sup>。

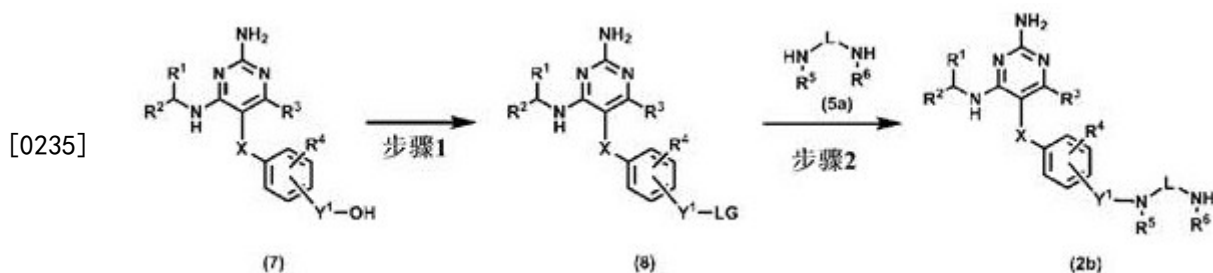
[0230] 化合物(2b)可以通过在本领域众所周知的用于还原胺化的条件下偶联化合物(6)和化合物(5b)制备。具体而言，醛化合物和胺化合物可以在存在或不存在酸，诸如乙酸的情况下在溶剂中与还原剂，诸如三乙酰氧基硼氢化钠和氰基硼氢化钠反应以制备化合物(2b)。

[0231] 化合物(6)可以根据本领域众所周知的方法，诸如W02010/133885、W02012/066335和W02012/066336中描述的那些制备。

[0232] [用于制备化合物(2)的方法3]

[0233] 此外，化合物(2b)或其盐可以根据以下方法制备。

[0234] [化学式14]



[0236] 其中 X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和L如上面所定义，并且Y<sup>1</sup>是-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-、-CH=CH-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-、

[0237] [化学式15]

[0238]  $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_{q'}-$ 

[0239] 或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>9'</sup>R<sup>10'</sup>)<sub>r'</sub>-，其中 R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>9'</sup>、R<sup>10'</sup>、p、q、q'、r和r'如上面所定义，并且LG是离去基。

## [0240] 步骤1

[0241] 化合物(7)可以根据本领域众所周知的方法(参见WO 2010/133885、WO 2012/066336等)制备。化合物(8)中的离去基LG没有限制,只要它在本领域中作为离去基是众所周知的即可,并且可以适当地使用卤素原子、烷基磺酰氧基、芳基磺酰氧基等。化合物(8)可以通过在碱诸如三乙基胺、二异丙基乙基胺、吡啶、二甲基氨基吡啶、碳酸钠、碳酸钾等存在下使化合物(7)与甲烷磺酰氯、对甲苯磺酰氯等反应制备。反应温度优选选自但不限于约0°C至120°C的范围。

## [0242] 步骤2

[0243] 化合物(2b)可以通过在惰性溶剂中在碱存在下使化合物(8)与化合物(5a)反应制备。

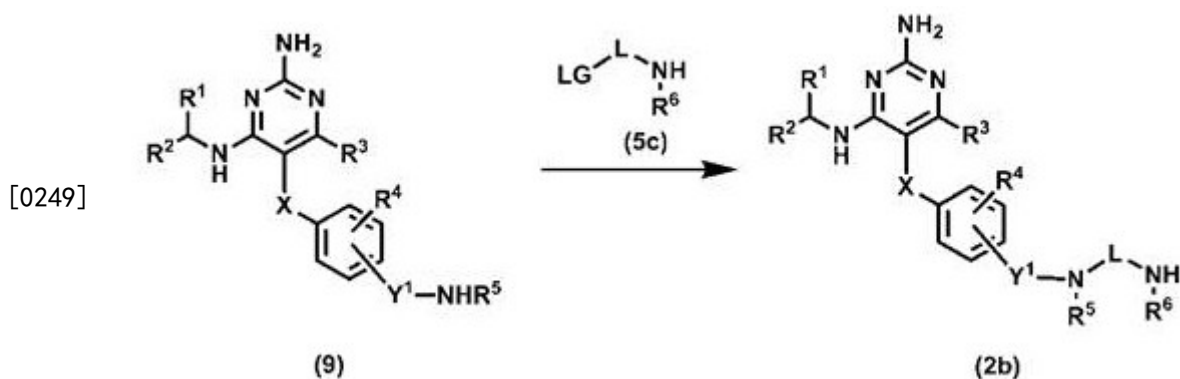
[0244] 碱没有限制,只要其在通常反应中被用作碱即可,并且实例包括有机碱诸如N-甲基吗啉、三乙基胺、二异丙基乙基胺、三丁基胺、1,8-二氮杂双环[4.3.0]壬-5-烯、1,4-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯、吡啶、二甲基氨基吡啶;无机碱诸如碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、氢氧化钠和氢化钠。相对于化合物(8),该碱可以通常以0.1至100当量,优选1至3当量的量使用。

[0245] 惰性溶剂的实例包括醚溶剂,诸如氢氢呋喃、二乙醚、1,4-二氧六环、1,2-二甲氧基乙烷;烃溶剂,诸如己烷、庚烷、甲苯、苯和二甲苯;非质子溶剂,诸如乙腈、N,N'-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砷;及其混合物。反应温度优选选自但不限于约0°C至120°C的范围。

[0246] [用于制备化合物(2)的方法4]

[0247] 此外,化合物(2b)或其盐可以根据以下方法制备。

[0248] [化学式16]



[0250] 其中 X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>如上面所定义,L是2至6个碳原子的取代或未取代的亚烷基,Y<sup>1</sup>是单键、-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-、-CH=CH-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-、

[0251] [化学式17]

[0252]  $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_q-$

[0253] 或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>9'</sup>R<sup>10'</sup>)<sub>r'</sub>- ,其中 R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>9'</sup>、R<sup>10'</sup>、q、q'、r和r' 如上面所定义,并且LG是离去基。

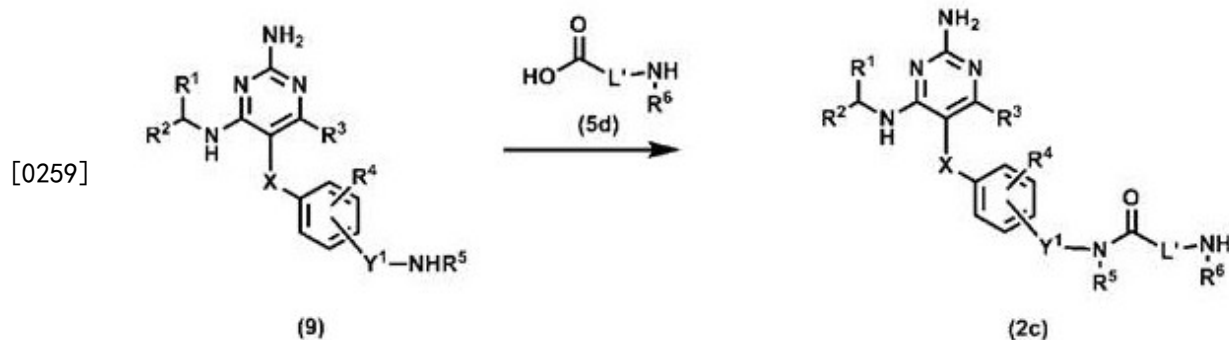
[0254] 化合物(2b)可以以与用于制备化合物(2)的方法3的步骤2中所述的类似的方式使用化合物(9)和化合物(5c)制备。

[0255] 化合物(9)可以根据本领域众所周知的方法,诸如W02010/133885和W02012/066336中所述的那些制备。

[0256] [用于制备化合物(2)的方法5]

[0257] 化合物(2c)或其盐可以根据以下方法制备。

[0258] [化学式18]



[0260] 其中 X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>如上面所定义,L'是1至5个碳原子的取代或未取代的亚烷基,Y<sup>1</sup>是单键、-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>p</sub>-、-CH=CH-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>q</sub>-、

[0261] [化学式19]

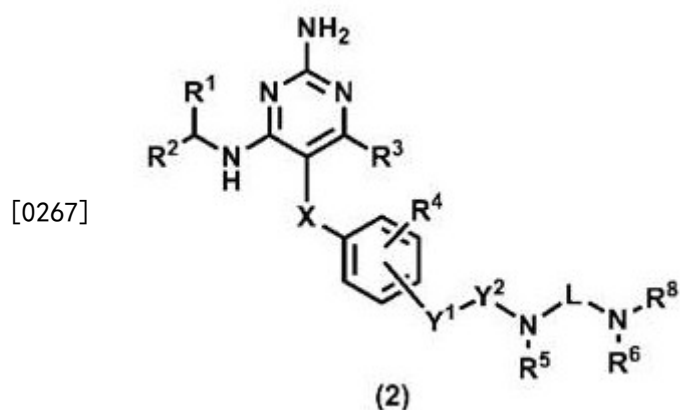
[0262]  $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_q-$

[0263] 或-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>)<sub>r</sub>- ,其中R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>9'</sup>、R<sup>10'</sup>、p、q、r和r'如上面所定义。

[0264] 化合物(2c)可以如用于制备化合物(1)的方法中所述使用化合物(9)和化合物(5d)制备。

[0265] 本发明提供了上述方法中的中间体。具体而言,这样的中间体可以是式(2)的化合物:

[0266] [化学式20]



[0268] 其中

[0269] X是亚甲基、氧原子、硫原子、SO、SO<sub>2</sub>或NR<sup>7</sup>,其中R<sup>7</sup>是氢原子或1至3个碳原子的烷基;

[0270] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地是氢原子或1至6个碳原子的取代或未取代的烷基,条件是当所述烷基被取代时,其被选自羟基、卤素原子和1至6个碳原子的烷氧基中的1至4个相同或不同的取代基取代;

- [0271]  $R^3$ 是1至6个碳原子的烷基、1至6个碳原子的烷氧基或1至6个碳原子的烷硫基；
- [0272]  $R^4$ 是氢原子、卤素原子、羟基、1至6个碳原子的烷基、1至6个碳原子的烷氧基或氰基；
- [0273]  $Y^1$ 是单键、 $-(CR^9R^{10})_p-$ 、 $-CH=CH-(CR^9R^{10})_q-$ 、
- [0274] [化学式21]
- [0275]  $-C\equiv C-(CR^9R^{10})_q-$
- [0276] 或 $-(CR^9R^{10})_r-O-(CR^9R^{10'})_r-$ ，其中 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^9'$ 和 $R^{10}'$ 独立地是氢原子或1至4个碳原子的烷基；
- [0277]  $Y^2$ 是单键或 $-C(O)-$ ；
- [0278] L是2至6个碳原子的取代或未取代的直链亚烷基或衍生自4至8元的环烷烃的二价基团，条件是当所述直链亚烷基或环烷烃被取代时，其被选自1至5个碳原子的烷基、羟基和卤素原子中的1至4个相同或不同的取代基取代，并且L的直链亚烷基中的任一个亚甲基任选被羰基替代；
- [0279]  $R^5$ 和 $R^6$ 独立地是氢原子或1至6个碳原子的取代或未取代的烷基，或 $R^5$ 或 $R^6$ 与L的任何碳原子结合在一起形成4-至8-元含氮饱和杂环，或 $R^5$ 和 $R^6$ 结合在一起形成取代或未取代的5-至8-元含氮饱和杂环；条件是当所述烷基被取代时，其被选自羟基和卤素原子的相同或不同的1至4个基团取代；当所述4-至8-元含氮饱和杂环或所述5-至8-元含氮饱和杂环被取代时，其被选自甲基、乙基、丙基、羟甲基、羟乙基、羰基、羟基和卤素原子的相同或不同的1至4个基团取代；
- [0280] p是1至6的整数；
- [0281] q和q'独立地是0至4的整数；
- [0282] r是0至5的整数，并且r'是1至5的整数，条件是r和r'的和是5或更小并且条件是当 $Y^2$ 是单键时，r'是2或更大的整数；和
- [0283]  $R^8$ 是氢原子或氨基保护基，
- [0284] 及其盐。
- [0285] 式(2)中的 $R^8$ 的保护基可以是，但不限于通常用作氨基保护基的基团。具体实例包括氨基甲酸酯诸如叔丁氧基羰基、苄基氧基羰基和9-苄基甲基氧基羰基；苄基；砜，诸如硝基苯磺酰基(nosyl group)；酰亚胺诸如酞酰亚胺。
- [0286] 在本发明的方法中，如果某一试剂中的特定官能团，诸如羟基或氨基需要被保护，则可以根据本领域中众所周知的程序在方法中的适当步骤进行一个或多个保护基的保护/脱保护。
- [0287] 官能团的保护/脱保护描述于J. W. F. McOmie, Ed., "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press (1973)和T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 第3版, Wiley-Interscience (1999)。
- [0288] 本领域技术人员可以根据适当地与本领域中众所周知的有机合成技术组合的类似于上面描述的方法制备本发明的缀合化合物。
- [0289] 在其中本发明的缀合化合物凭借一个或多个不对称碳原子而以光学活性或外消旋形式存在时，本公开在其范围内包括具有如下所述的生理活性的这样的光学活性或外消

旋形式。这样的光学活性形式的合成可以通过本领域中众所周知的有机化学的标准技术，例如从光学活性起始材料合成或拆分外消旋混合物进行。生理活性可以使用如下所述的标准实验室技术评估。

[0290] 本发明的缀合化合物可以以未溶剂化的或溶剂化的形式诸如水合物存在。

[0291] 此外，本发明的缀合化合物可以为其中一个或多个<sup>1</sup>H被<sup>2</sup>H(D)代替的氘化的形式。

[0292] 本发明的缀合化合物的形式可以是但不限于无定形的或作为晶体存在。晶体多态现象可以呈现为结晶的式(1)的化合物或其药学上可接受的盐，并且因此，本发明的化合物包括呈任何晶体形式的那些。

[0293] 在本发明的一个实施方案中，提供了组合物，特别是药物组合物，其包含本发明的脂质体。

[0294] 该组合物可以用作用于维持或增强具有免疫刺激活性的活性成分的免疫刺激活性的佐剂。

[0295] 即，该包含本发明的脂质体的组合物具有诱导或增强抗原特异性抗体，具体而言抗原特异性IgG，更具体而言Th1型抗原特异性IgG（例如，IgG2c）的活性。

[0296] 此外，该包含本发明的脂质体的组合物具有诱导或增强CD4-阳性（即，MHC类别2-受限的）和/或CD8-阳性（即，MHC类别1-受限的）T淋巴细胞的活性。

[0297] 而且，该包含本发明的脂质体的组合物具有诱导或增强MHC-受限的抗原特异性T淋巴细胞的活性。

[0298] 再者，该包含本发明的脂质体的组合物具有诱导或增强记忆性T淋巴细胞，具体而言CD8-阳性效应记忆性T淋巴细胞的活性。

[0299] 该包含本发明的脂质体的组合物可以含有抗原。抗原的实例包括肿瘤抗原蛋白；衍生自所述肿瘤抗原蛋白的肿瘤抗原肽，诸如NY-ESO-1、MAGE-3、WT1和Her2/neu；抗体的高变区；和病原体衍生的抗原，诸如衍生自病毒或细菌的蛋白或其部分肽。另外，这样的抗原和载体的复合物也包括在如本文中使用的抗原的范围内。这样的复合物的实例包括其中抗原（包括但不限于蛋白质和肽）通过本领域众所周知的连接基化学结合至充当载体的蛋白的那些；以及其中在病毒样颗粒（VLP）中包含抗原的那些。因此，通过与上述抗原组合使用，包含本发明的脂质体的组合物可用作治疗或预防癌症、病毒或细菌感染的药物。

[0300] 另外，包含本发明的脂质体的组合物可以用作佐剂，以辅助用于诱导其它免疫学或免疫反应的治疗中的免疫刺激。治疗的具体实例包括用于增强患者的肿瘤细胞的免疫原性的离体（*ex vivo*）和体内（*in vivo*）途径（例如用细胞因子如白介素2、白介素4或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子转染）、用于减少T细胞无反应性的途径、使用转染的免疫细胞（例如细胞因子转染的树突细胞）的途径、使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的途径、用于降低免疫抑制细胞（例如调节性T细胞、骨髓源性的被抑制的细胞和表达IDO（吡啶胺2,3-双加氧酶）的树突细胞）的功能的途径、和用于诱导免疫反应的放射疗法。

[0301] 所述组合物的施用路径的实例包括肠胃外施用，具体而言血管内（例如静脉内）、皮下、皮内、肌肉内、鼻内和经皮施用。

[0302] 一个实施方案中，包含本发明的脂质体的组合物可以含有本发明的脂质体和其量基本上不影响脂质体的稳定性和缀合化合物的功效的药学上可接受的稀释剂、抗氧化剂、稳定剂、糖、缓冲剂或载体。

[0303] 本发明的组合物的剂型可以是用于注射剂或滴鼻剂的液体制剂或通过将液体制剂冻干而制备的冻干制剂。

[0304] 用于注射的液体制剂的实例包括水性悬浮液制剂,其中本发明的脂质体分散在水中。

[0305] 用于滴鼻剂的液体制剂的实例包括水性悬浮液制剂,其中本发明的脂质体分散在水中。

[0306] 水溶液或水性悬浮液制剂可以是含有注射用蒸馏水以及适当地含有缓冲剂、pH调节剂、稳定剂、等渗剂或乳化剂的水溶液或水性悬浮液。

[0307] 缓冲剂的实例包括磷酸盐和有机酸盐。

[0308] 在制备冻干制剂时,可以视情况添加赋形剂。赋形剂及其量没有限制,只要它们优选形成良好的冻干饼或冻干粉即可,且实例包括糖、糖醇、氨基酸和氯化钠,例如0.1至20%的甘露醇。

[0309] 本发明的组合物可进一步含有其它添加剂,并且这样的添加剂的实例包括抗氧化剂、防腐剂 and 安抚剂。

[0310] 本发明的脂质体可以与抗原物质(免疫原)同时或在抗原物质(免疫原)之前或之后以任何间隔施用,其单位剂量范围通常为5至5000mg/m<sup>2</sup>体表面积,即约0.1ng/kg至100mg/kg,这提供预防或治疗有效剂量。注射剂、片剂或胶囊剂的单位剂型通常例如含有脂质体,所述脂质体含有1ng至250mg的本发明的缀合化合物,并且优选以1ng至50mg/kg的缀合化合物/天范围的剂量使用。但是,每日剂量可能根据要治疗的宿主、施用途径和所治疗疾病的严重程度而变化。因此,最佳剂量可以由治疗个体患者或温血动物的医师来确定。

[0311] 如本文所用,术语“治疗”是指全部或部分减轻疾病的一些或全部症状,或预防或延迟疾病的进展。

[0312] 如本文所用,术语“预防”是指疾病的一级预防(预防疾病发作)或疾病的二级预防(预防其在疾病发作后症状已减轻或疾病已治愈的患者再恶化,预防复发)。

[0313] 由于本发明的脂质体在体外或体内具有免疫佐剂活性,因此其可用于维持或增强抗原的免疫原性的疫苗佐剂。

[0314] 本发明的脂质体可以用于维持或增强作为用于治疗或预防疾病的试剂的免疫刺激物质(免疫刺激性物质)的作用,即,诱导抗原特异性免疫反应的物质的作用。

[0315] 包含本发明的脂质体和增强抗原特异性免疫反应的物质(也称为抗原)的组合物也是本发明的一个实施方案。所述抗原可以是但不限于抗原蛋白、衍生自所述抗原蛋白的抗原肽(部分肽)或其与载体的复合物。

[0316] 在本发明的某些实施方案中,可以将本发明的脂质体与用于癌症免疫疗法的肿瘤抗原蛋白或肿瘤抗原肽组合施用以治疗或预防癌症。癌症的实例包括常见的癌症,例如膀胱癌、头颈癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、肠和结肠癌、胃癌、皮肤癌和脑癌;影响骨髓(包括白血病)和淋巴组织增生系统的恶性疾病(霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤等)。如本文所用,癌症的治疗或预防可以是转移性疾病和肿瘤复发的预防,以及副肿瘤综合症的预防和治疗。

[0317] 抗原的实例包括但不限于MAGE (Science, 254: p 1643 (1991))、gp 100 (J. Exp. Med., 179: p 1005 (1994))、MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: p3515

(1994))、酪氨酸酶(J. Exp. Med., 178: p489 (1993))、MAGE相关蛋白(J. Exp. Med., 179: p921 (1994))、 $\beta$ -连环蛋白(J. Exp. Med., 183: p1185 (1996))、CDK4 (Science, 269: p1281 (1995))、HER2/neu (J. Exp. Med., 181: p2109 (1995))、突变型p53 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: p14704(1996))、CEA(J. Natl. Cancer. Inst., 87: p982 (1995))、PSA (J. Natl. Cancer. Inst., 89: p293 (1997))、WT1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: p13885 (2004))、HPV-衍生的抗原(J. Immunol., 154: p5934 (1995))和EBV-衍生的抗原(Int. Immunol., 7: p653 (1995))。

[0318] 衍生自癌症抗原的肿瘤抗原肽的实例包括但不限于MAGEA3肽168-176 (Coulie PG等人, Immunol. Rev. 188: 33 (2002))、gp100肽209-217(Rosenberg SA等人, Nat. Med. 4: 321 (1998))、gp100肽280-288 (Phan GQ等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8372 (2003))、Melan-A肽27-35 (Cormier JN等人, Cancer J. Sci. Am. 3: 37 (1997))、Melan-A肽26-35、酪氨酸酶肽1-9、酪氨酸酶肽368-376、gp100肽280-288、gp100肽457-466 (Jager E等人, Int. J. Cancer 67: 54 (1996))、HER-2肽369-384、HER-2肽688-703、HER-2肽971-984 (KnutsonKL等人, J. Clin. Invest. 107: 477 (2001))和MAGE-A12肽170-178 (Bettinotti MP等人, Int. J. Cancer 105: 210 (2003))。

[0319] 另外,通过与用于预防感染性疾病的疫苗的活性成分组合施用,本发明的脂质体可以预防各种感染性疾病,诸如生殖器疣、普通疣、足底疣、乙型肝炎、丙型肝炎、单纯疱疹病毒、传染性软疣、天花、人免疫缺陷病毒(HIV)、人乳头瘤病毒(HPV)、RS病毒、诺罗病毒、巨细胞病毒(CMV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、鼻病毒、腺病毒、冠状病毒、流感和副流感;细菌性疾病,诸如结核病、鸟分枝杆菌和汉森氏病;感染,诸如真菌病、衣原体、念珠菌、曲霉、隐球菌脑膜炎、卡氏肺孢子虫、隐孢子虫病、组织胞浆菌病、弓形虫病、疟疾、锥虫属感染和利什曼病。用于预防感染的疫苗的活性成分的实例包括但不限于衍生自引起感染性疾病的微生物/病原体,包括细菌、真菌、原生动物和病毒的物质,诸如抗原蛋白、来自所述抗原蛋白的抗原肽(部分肽)、多糖、脂质及其组合或衍生自所述微生物/病原体的物质与载体的组合。

[0320] 衍生自病毒抗原的病毒抗原肽的实例包括但不限于流感基质蛋白肽58-66 (Jager E等人, Int. J. Cancer 67: 54 (1996))、HPV16 E7肽86-93 (van Driel WJ等人, Eur. J. Cancer 35:946 (1999))、HPV E7肽12-20(Scheibenbogen C等人, J. Immunother 23: 275 (2000))、HPV16 E7肽11-20(Smith JWI等人, J. Clin. Oncol. 21: 1562 (2003))、HSV2 gD (Berman PW等人, Science 227: 1490 (1985))、CMV gB (Frey SE等人, Infect Dis. 180: 1700 (1999))、Gonzol E.等人,Exp. Opin. Biol. Ther. 1: 401 (2001))和CMV pp65 (Rosa CL等人, Blood 100: 3681 (2002), Gonzol E.等人, Exp. Opin. Biol. Ther. 1: 401 (2001))。

[0321] 本文使用的载体是抗原蛋白或抗原肽化学和/或物理结合于其上的物质,诸如蛋白质和脂质,并且实例包括但不限于CRM 197 (Vaccine. 2013年10月1日;31(42):4827-33)、KLH (Cancer Immunol Immunother. 2003年10月;52(10):608-16)、病毒样颗粒(PLoS ONE 5(3): e9809)和脂质体(JLiposome Res. 2004;14(3-4):175-89)。

[0322] 根据教科书,例如《分子克隆第二版(Molecular Cloning 2nd ed.)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)(1989),可以通过克隆编码抗原蛋白

的cDNA并在宿主细胞中表达来制备抗原蛋白。

[0323] 抗原肽的合成可以按照肽化学中通常使用的,例如,如文献(Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;The Proteins, Vol. 2, Academic PressInc., New York, 1976)中所述的方法进行。

[0324] 本发明进一步提供了试剂盒,其包含:

[0325] a) 本发明的脂质体;

[0326] b) 抗原;和

[0327] c) 组合或分开容纳a)和b)的单位剂型的容器或装置。

[0328] 所述抗原没有限制,只要它是可用作疫苗的活性成分的抗原即可,并且实例包括如上所述的抗原蛋白、衍生自这样的抗原蛋白的抗原肽(部分肽)及其与载体的复合物。

[0329] 在本发明的一个实施方案中,提供了本发明的脂质体在制备疫苗佐剂中的用途。

[0330] 在本发明的一个实施方案中,提供了本发明的脂质体作为疫苗佐剂在制备用于治疗疾病或病症的疫苗中的用途。

[0331] 而且,在本发明的一个实施方案中,提供了一种用于治疗疾病、预防疾病或预防疾病进展的方法,其包括将本发明的脂质体与抗原一起施用于患者的步骤。

[0332] 本发明将参照下述实施例进一步描述,所述实施例不应当在任何方面被当作是限制性的。

[0333] [实施例]

[0334] THF: 四氢呋喃

[0335] EtOAc: 乙酸乙酯

[0336] NMP: N-甲基吡咯烷酮

[0337] TEA: 三乙基胺

[0338] 高效液相色谱质谱(LCMS)的测量条件如下所述。观察到的MS(m/z)值以M+H示出。

[0339] MS检测器: LCMS-IT-TOF

[0340] HPLC: 岛津Nexera X2 LC 30AD

[0341] 柱: Kinetex 1.7 $\mu$  C18 100A 新柱50  $\times$  2.1 mm

[0342] 流速: 1.2 ml/min

[0343] 测量波长: 254 nm

[0344] 流动相:溶液A: 0.1%甲酸水溶液

[0345] 溶液B: 乙腈

[0346] 时间程序:

[0347] 步骤时间(min)

[0348] 1 0.01-1.40 溶液A: 溶液B =90: 10至5: 95

[0349] 2 1.40-1.60 溶液A: 溶液B = 5: 95

[0350] 3 1.61-2.00 溶液A: 溶液B = 99: 1。

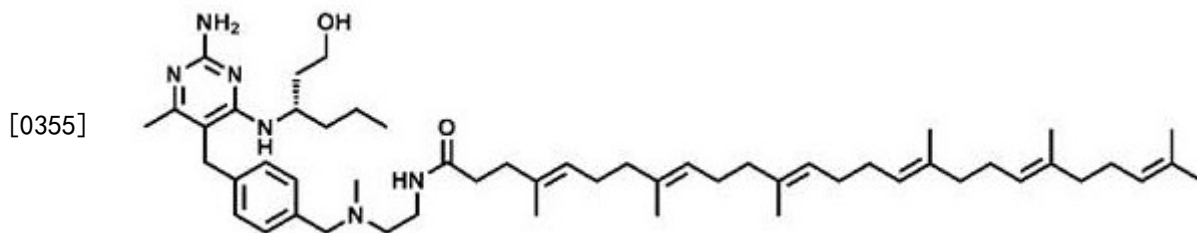
[0351] 缀合化合物的制备

[0352] (制备实施例1)

[0353] (4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[4-[2-氨基-4-[(3S)-1-羟基己烷-3-基]氨基]-6-甲基嘧啶-5-基]甲基]苄基}(甲基氨基)乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,

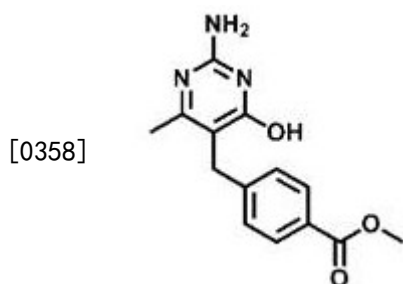
8,12,16,20,24-六烯酰胺

[0354] [化学式22]



[0356] 步骤1

[0357] [化学式23]

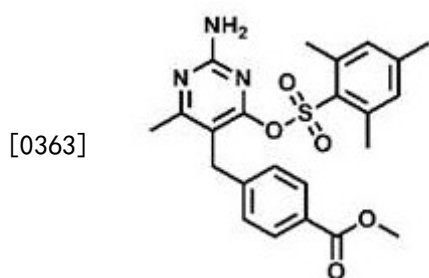


[0359] 将4-(2-(乙氧基羰基)-3-氧代丁基)苯甲酸甲酯(3.56 g, 12.8 mmol)和碳酸胍(4.61 g, 25.6 mmol)溶解于甲醇(23 ml),并将混合物在搅拌下加热至回流保持7小时。冷却反应混合物后,加入水(30 ml)和乙酸(0.660ml, 11.5 mmol)。通过过滤收集沉淀的固体。将固体悬浮于THF并在搅拌下加热至回流保持1小时。冷却后,通过过滤收集固体,用THF洗涤并干燥以得到期望的产物(1.62 g, 46%)。

[0360]  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2.00 (3H, s), 3.71 (2H, s), 3.82 (3H, s), 6.35(1H, br), 7.31 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.84 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz).

[0361] 步骤2

[0362] [化学式24]

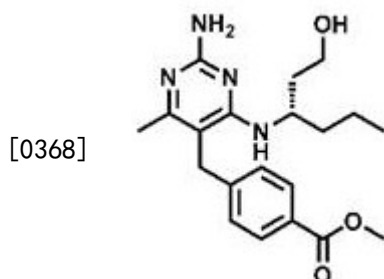


[0364] 将步骤1中得到的化合物(1.62 g, 5.93 mmol)和N,N,N',N'-四甲基-1,3-丙烷二胺(1.41 ml, 8.89 mmol)悬浮于THF(24 ml),并加入2-均三甲苯磺酰氯(1.94 g, 8.89 mmol)。将混合物在室温搅拌20小时。将水加入至混合物。将混合物用乙酸乙酯萃取。将有机层用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤,并在减压下浓缩。将得到的固体用乙醚洗涤,并用己烷洗涤,并干燥以得到期望的产物(2.69g, 99.6%)。

[0365]  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2.20 (3H, s), 2.29 (3H, s), 2.48 (6H, s), 3.84 (3H, s), 3.88 (2H, s), 6.35 (1H, br), 7.08 (2H, s), 7.19 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.85 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz).

[0366] 步骤3

[0367] [化学式25]

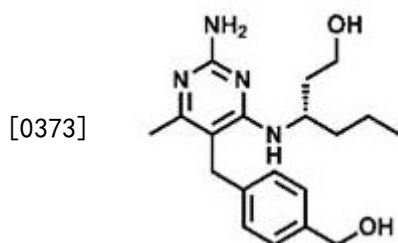


[0369] 将4-((2-氨基-4-((均三甲苯基磺酰基)氧基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)苯甲酸甲酯(3.6 g, 8.0 mmol)溶解于丙腈(80 ml)中。加入(S)-(+)-3-氨基-1-己醇(5.6 g, 48 mmol)和三氟乙酸(1.2 ml, 16 mmol),并将混合物加热至110℃。在搅拌36小时后,将混合物冷却至室温并在减压下浓缩。将残余物在硅胶柱(乙酸乙酯:甲醇=20:1至5:1)上纯化以得到期望的产物(2.1 g, 71%)。

[0370]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.73 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 0.90-1.76 (m, 6H), 2.41 (s, 3H), 3.49-3.61 (m, 2H), 3.69-3.87 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 4.24 (m, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.98 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H).

[0371] 步骤4

[0372] [化学式26]

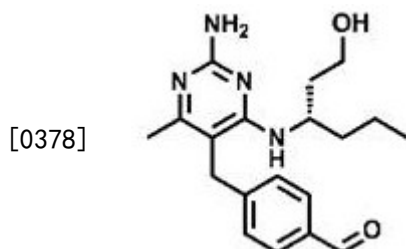


[0374] 将(S)-4-((2-氨基-4-((1-羟基己烷-3-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)苯甲酸甲酯(2.1 g, 5.6 mmol)溶解于四氢呋喃(56 mL)/甲醇(5.6 mL)中。加入硼氢化锂(3M于四氢呋喃中, 5.6 mL, 17 mmol),并将混合物加热至60℃。在搅拌2小时后,加入硼氢化锂(3M于四氢呋喃中, 5.6 mL, 17 mmol),并将混合物在60℃进一步搅拌2小时。冷却至0℃后,加入4N盐酸(30 mL)。将混合物在室温搅拌1小时,用碳酸氢钠水溶液中和,并且然后用乙酸乙酯萃取。将有机层用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,并在减压下浓缩以得到粗产物(1.2 g)。

[0375]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0.78 (t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 3H), 1.03-1.76 (m, 6H), 2.18 (s, 3H), 3.41-3.48 (m, 2H), 3.76-3.88 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 4.55 (s, 2H), 7.11 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 2H), 7.26 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 2H).

[0376] 步骤5

[0377] [化学式27]

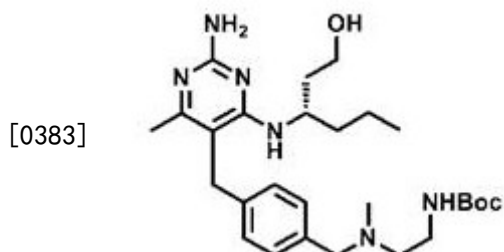


[0379] 将(S)-3-((2-氨基-5-(4-(羟基甲基)苄基)-6-甲基嘧啶-4-基)氨基)己烷-1-醇(1.2 g, 3.5 mmol)溶解于氯仿(35 mL)/甲醇(3.5 mL)中,并加入二氧化锰(3.1g, 35 mmol)。将混合物搅拌过夜并通过西莱特过滤。将滤液在减压下浓缩。将残余物在硅胶柱(氯仿:甲醇=99:1至4:1)上纯化以得到期望的产物(0.72 g, 37%(2步))。

[0380]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0.70 (t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 3H), 1.05-1.77 (m, 6H), 2.20 (s, 3H), 3.42-3.50 (m, 2H), 3.90-4.03 (m, 2H), 4.32 (m, 1H), 7.35 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 2H), 7.84 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 2H), 9.93 (s, 1H).

[0381] 步骤6

[0382] [化学式28]

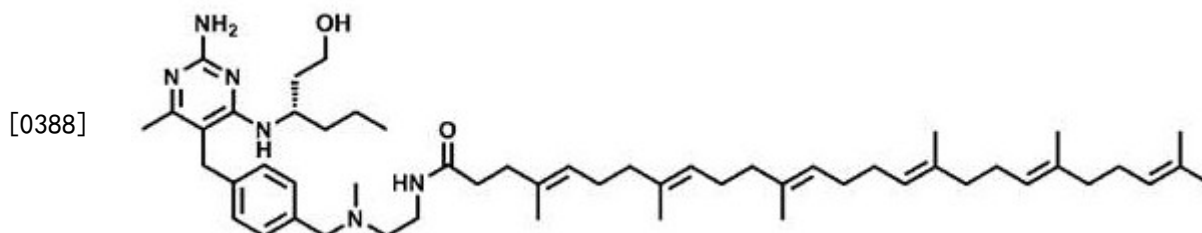


[0384] 将(S)-4-((2-氨基-4-((1-羟基己烷-3-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)苯甲醛(0.28 g, 0.82 mmol)溶解于氯仿(8 mL)中。加入(2-(甲基氨基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(0.29 g, 1.6mmol)、乙酸(0.23 mL, 4.1 mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(0.52 g, 2.5 mmol)。将混合物在室温搅拌过夜。加入水,并将混合物用乙酸乙酯萃取。将有机层用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,在减压下浓缩。将残余物在氨基硅胶柱(乙酸乙酯: 甲醇= 99:1至95:5)上纯化以得到粗产物(0.23 g, 56%)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.66 (t, J = 7.2Hz, 3H), 0.91-1.77 (m, 6H), 1.40 (s, 9H), 2.12 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.39-2.44 (m, 2H), 3.15-3.46 (m, 4H) [0385] ), 3.43 (s, 2H), 3.61-3.86 (m, 2H), 4.05(m, 1H), 4.67-4.77 (br, 2H), 4.91-5.01 (br, 1H), 7.05 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 8.0 Hz, 2H) ).

[0386] 步骤7

[0387] [化学式29]



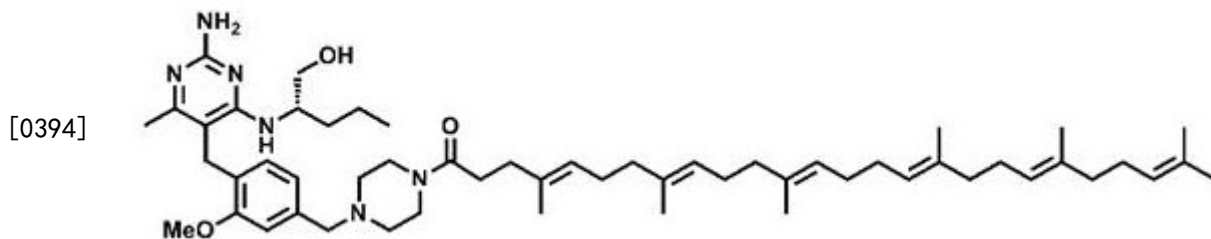
[0389] 将(S) - (2-((4-((2-氨基-4-((1-羟基己烷-3-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)苄基)(甲基)氨基)乙基)氨基甲酸丁酯(0.150 g, 0.29 mmol)溶解于氯仿(4 mL)中。加入氯化氢(4M于环戊基甲基醚中, 2.2 mL, 8.80 mmol)。将混合物在室温搅拌1小时并且然后在减压下浓缩。将(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酸(123mg, 0.262 mmol)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-1-鎓3-氧化物六氟磷酸盐(150 mg, 0.393 mmol)和N,N-二异丙基乙基胺(0.137 mL, 0.787 mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(3 mL)中,并将混合物搅拌5 min。将粗产物溶解于N,N-二甲基甲酰胺(3 mL)中并加入至混合物中。将混合物在室温搅拌过夜。加入水,并将混合物用乙酸乙酯萃取。将有机层用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,并在减压下浓缩。将残余物在氨基硅胶柱(氯仿: 甲醇= 99: 1至90:10)上纯化以得到期望的产物(80 mg, 32%)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.71 (t, J = 7.2Hz, 3H), 0.92-1.83 (m, 27H), 1.95-2.08 (m, 20H), 2.18-2.32 (m, 10H), 2.46 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.28-3.43 (m, 4H), 3.46 (s, 2H), 3.64-3.81 (m, 2H), 4.10 (m, 1H), 4.48-4.58 (br, 2H), 5.06-5.17 (m, 6H), 5.94-6.04 (br, 1H), 7.06 (d, J = 8.0 Hz, 2H) [0390] ), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 2H). ESI: [M+H]<sup>+</sup> 852.6

[0391] (制备实施例2)

[0392] (4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[ (2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苄基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮

[0393] [化学式30]



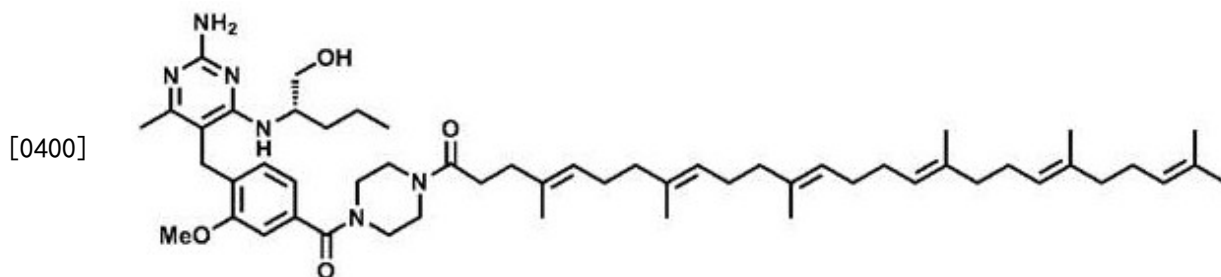
[0395] 使用已知化合物(S)-4-((2-氨基-4-((1-羟基戊烷-2-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)-3-甲氧基苯甲醛(0.10 g, 0.28 mmol)、哌嗪-1-甲酸叔丁酯(0.13 g, 0.71 mmol)和(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酸(72 mg, 0.15 mmol),以与制备实施例1的步骤6和步骤7类似的方式获得期望的产物(96 mg, 23%(2步))。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.77 (t, J = 7.2Hz, 3H), 1.00-1.44 (m, 4H), 1.57-1.65 (m, 21H), 1.88-2.04 (m, 20H), 2.23-2.38 (m, 11H), 3.38-3.74 (m, 6H), 3.44 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 4.00 (m, 1H), 4.77-4.87 (br, 2H), 5.03-5.11 (m, 6H), 6.79 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.89 (d, J = 8.0 Hz, 1H). ESI: [M+H]<sup>+</sup> 879.6

[0397] (制备实施例3)

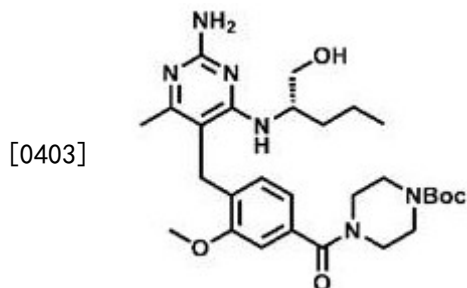
[0398] (4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基)-6-甲基嘧啶-5-基]甲基}-3-甲氧基苯酰基)哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮

[0399] [化学式31]



[0401] 步骤1

[0402] [化学式32]



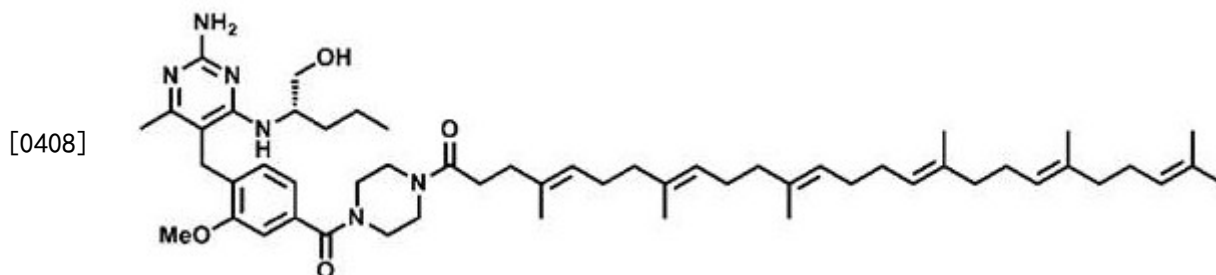
[0404] 将(S)-4-((2-氨基-4-((1-羟基戊烷-2-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)-3-甲

氧基苯甲酸 (190 mg, 0.507 mmol) (其如W02012/066336中所述制备) 和1-BOC-哌嗪 (142 mg, 0.761 mmol) 溶解于N,N-二乙基甲酰胺 (5 ml) 中。加入1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓 3-氧化物六氟磷酸盐 (289 mg, 0.761 mmol) 和N,N-二异丙基乙基胺 (197mg, 1.52 mmol), 并将混合物在室温搅拌10小时。将水加入至混合物中, 并将混合物用氯仿萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥, 过滤, 并在减压下浓缩。将所得残余物在硅胶柱色谱法 (乙酸乙酯/甲醇= 20/1至5/1) 上纯化以得到期望的产物 (202 mg, 73%), 为无色无定形物。

[0405] MS (ESI+): [M+H]<sup>+</sup> 543.4

[0406] 步骤2

[0407] [化学式33]



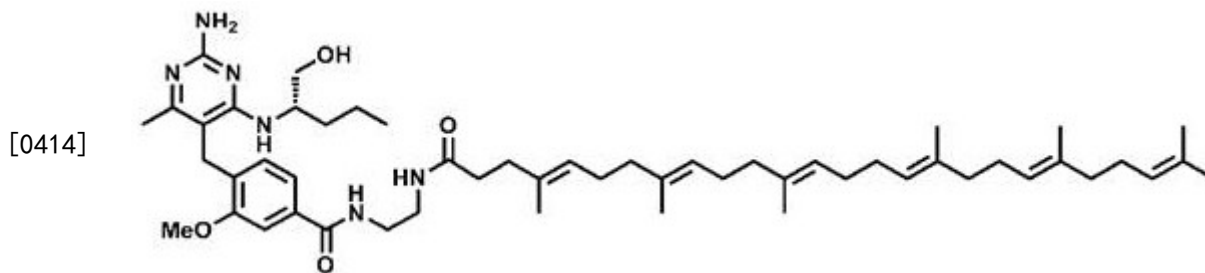
[0409] 将(S)-4-(4-((2-氨基-4-((1-羟基戊烷-2-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酰基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (200 mg, 0.369 mmol) 溶解于氯仿 (3.0 ml) 中。加入4M盐酸-环戊基甲基醚溶液 (3 ml, 12.0mmol), 并将混合物在室温搅拌1小时。将甲苯加入至反应中, 并将混合物在减压下浓缩。将残余物加入至 (4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酸 (166 mg, 0.355 mmol)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐 (202 mg, 0.532mmol) 和N,N-二异丙基乙基胺 (0.185 ml, 1.065 mmol) 于N,N-二甲基甲酰胺 (5 ml) 中的溶液中, 并将混合物在室温搅拌6小时。将水加入至混合物中, 并将混合物用氯仿萃取。将有机层用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 并在减压下浓缩。将残余物在硅胶柱色谱法 (氯仿/甲醇20/1) 上纯化以得到标题化合物 (159 mg, 50%)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.83 (t, J = 7.3Hz, 3H), 1.15-1.48 (m, 4H), 1.58-1.68 (m, 21H), 1.94-2.15 (m, 20H), 2.25-2.32 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.40-2.48 (m, 2H), 3.37-3.80 (m, 12H), 3.93 (s, 3H), 3.99-4.05 (m, 1H), 4.65 (brs, 2H), 4.80 (br, 1H), 5.07-5.18 (m, 6H), 6.86 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 6.97-7.00 (m, 2H). MS (ESI+): [M+H]<sup>+</sup> 893.6

[0411] (制备实施例4)

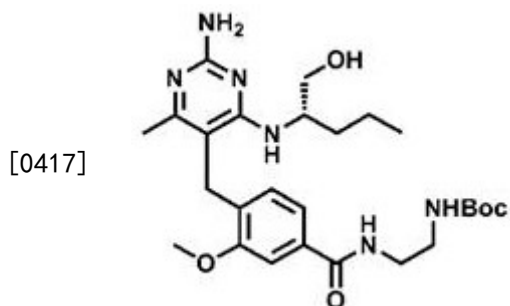
[0412] 4-[(2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基)乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺

[0413] [化学式34]



[0415] 步骤1

[0416] [化学式35]

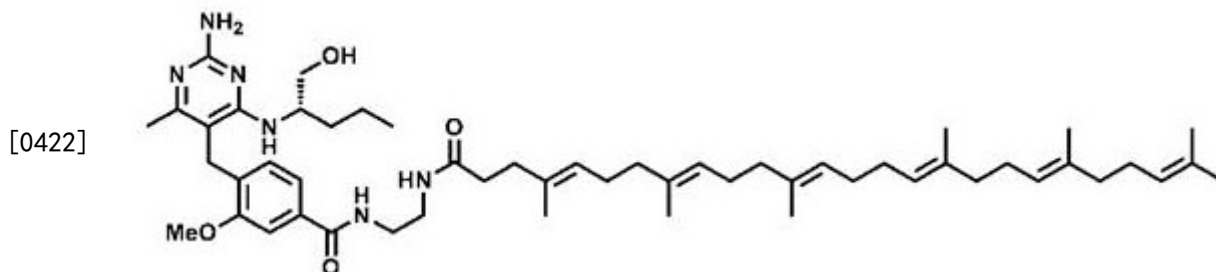


[0418] 使用(S)-4-((2-氨基-4-((1-羟基戊烷-2-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酸(0.14 g, 0.41 mmol)(其如W02012/066336中所述制备)和(2-氨基乙基)氨基甲酸叔丁酯(137 mg, 0.855 mmol),以与制备实施例3的步骤1类似的方式获得标题化合物(216 mg, 78%)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.81 (t, J = 7.3Hz, 3H), 1.07-1.40 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 2.32 (s, 3H), 3.37-3.45 (m, 3H), 3.52-3.57 (m, 2H), 3.63-3.67 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.97-4.03 (m, 1H), 4.58 (br, 2H), 4.75-4.77 (br, 1H), 4.97-4.99 (br, 1H), 6.95-6.98 (m, 1H), 7.22-7.23 (m, 1H), 7.27-7.31 (br, 1H), 7.47-7.49 (m, 1H).

[0420] 步骤2

[0421] [化学式36]



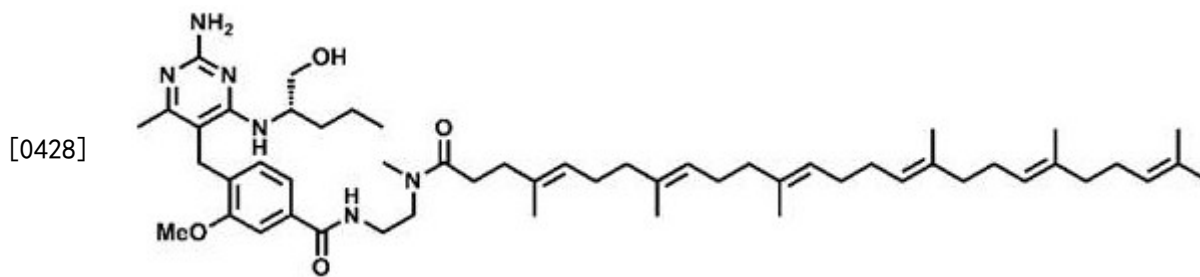
[0423] 使用步骤1中得到的化合物(205 mg, 0.397 mmol),以与制备实施例3的步骤2类似的方式获得标题化合物(84.0 mg, 24%)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.81 (t, J = 7.3Hz, 3H), 1.07-1.46 (m, 4H), 1.55-1.70 (m, 21H), 1.90-2.10 (m, 20H), 2.26-2.30 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 3.38-3.44 (m, 1H), 3.46-3.58 (m, 4H), 3.62-3.67 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.97-4.03 (m, 1H), 4.54-4.57 (br, 2H), 4.76-4.79 (br, 1H), 5.06-5.15 (m, 6H), 6.10-6.14 (br, 1H), 7.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.38-7.41 (br, 1H), 7.45 (d, J = 1.6 Hz, 1H). MS (ESI+): [M+H]<sup>+</sup> 867.6.

[0425] (制备实施例5)

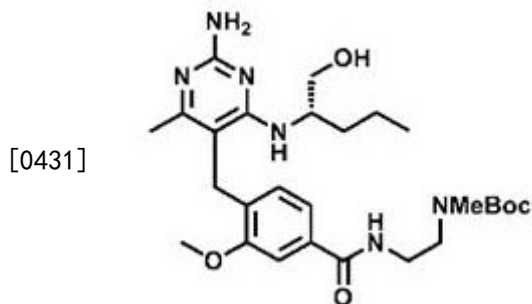
[0426] 4-[(2-氨基-4-[(2S)-1-羟基戊烷-2-基]氨基)-6-甲基嘧啶-5-基]甲基-N-(2-[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基](甲基)氨基)乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺

[0427] [化学式37]



[0429] 步骤1

[0430] [化学式38]

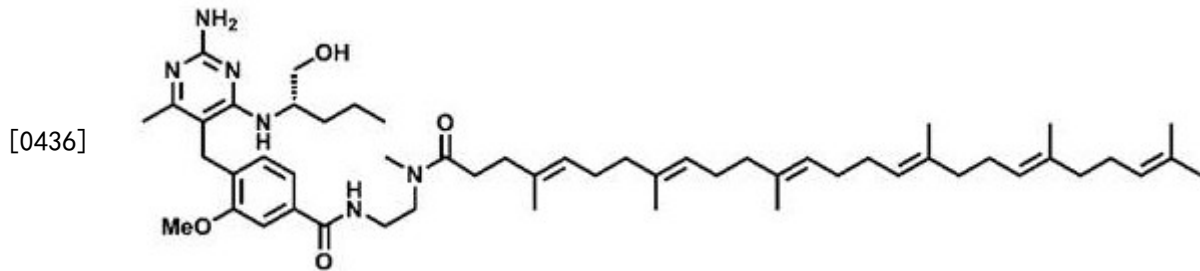


[0432] 使用(S)-4-((2-氨基-4-((1-羟基戊烷-2-基)氨基)-6-甲基嘧啶-5-基)甲基)-3-甲氧基苯甲酸(0.14 g, 0.41 mmol)(其如W02012/066336中所述制备)和N-(2-氨基乙基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(98 mg, 0.561 mmol),以与制备实施例3的步骤1类似的方式获得标题化合物(242 mg, 81%)。

[0433]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.84 (t,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 3H), 1.07-1.41 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 2.31 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 3.39-3.44 (m, 1H), 3.45-3.55 (m, 2H), 3.56-3.61 (m, 2H), 3.62-3.67 (m, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.97-4.02 (m, 1H), 4.55-4.59 (br, 2H), 4.74-4.78 (br, 1H), 6.94-6.97 (m, 1H), 7.21-7.24 (m, 1H), 7.47-7.50 (m, 2H).

[0434] 步骤2

[0435] [化学式39]



[0437] 使用步骤1中得到的化合物 (236 mg, 0.445 mmol), 以与制备实施例3的步骤2类似的方式获得标题化合物 (149 mg, 38%)。

[0438]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.80 (t,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 3H), 1.06-1.45 (m, 4H), 1.56-1.68 (m, 21H), 1.90-2.09 (m, 20H), 2.21-2.31 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.37-2.43 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.37-3.45 (m, 1H), 3.55-3.69 (m, 5H), 3.73 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.97-4.03 (m, 1H), 4.55-4.58 (br, 2H), 4.77-4.80 (br, 1H), 5.06-5.14 (m, 6H), 7.00 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , 1H), 7.24 (dd,  $J = 8.0, 1.2\text{ Hz}$ , 1H), 7.44 (d,  $J = 1.6\text{ Hz}$ , 1H), 7.53-7.55 (br, 1H).

MS (ESI<sup>+</sup>):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  881.6

[0439] 制备脂质体

[0440] 制备在氯仿中的如表1中所示的含有脂质组分和制备实施例1的化合物的溶液。将每种溶液放入茄形烧瓶中并在37°C搅拌30分钟。在氮气氛下,在37°C除去溶剂并在真空中干燥。向残余物中加入PBS并再水化。使用间歇式超声处理 (batch-type ultrasonication) 使薄膜分离,并且然后在37°C搅拌1小时。在挤出 (室温, 400 nm) 并通过0.22  $\mu\text{m}$ 过滤器灭菌后得到脂质体。

[0441] [表1]

实施例	脂质体的脂质组分(摩尔比)	化合物/脂质(重量比)
1	HSPC/Chol/DSPG (53.1/26.3/20.5)	1/10
2	HSPC/Chol/DSPG (53.1/26.3/20.5)	1/2
[0442] 3	DOPC/Chol/DOPG (53.1/26.3/20.5)	1/10
4	DOPC/Chol/DOPG (53.1/26.3/20.5)	1/2
5	DMPC/EPG (62.5/37.5)	1/10
6	DMPC/EPG (62.5/37.5)	1/2

[0443] HSPC: 氢化大豆磷脂酰胆碱

[0444] (Nippon Yushi;COATSOME NC-21E)

[0445] DOPC: 二油酰磷脂酰胆碱

[0446] (Nippon Yushi;COATSOME MC-8181)

[0447] DSPG: 二硬脂酰磷脂酰甘油, 钠盐

[0448] (Nippon Yushi;COATSOME MG-8080LS)

[0449] DOPG: 二油酰磷脂酰甘油, 钠盐

[0450] (Nippon Yushi;COATSOME MG-8181LS)

[0451] DMPC: 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱

[0452] (Nippon Yushi;COATSOME MC-4040)

[0453] EPG: 蛋黄磷脂酰甘油

[0454] (Nippon Yushi;COATSOME NG-50LS)

[0455] Chol: 胆固醇(Nippon Yushi;胆固醇(HP))。

[0456] (测试实施例1)

[0457] 在视觉上观察实施例的脂质体的外观。在实施例3的脂质体中观察到乳状液分层, 并且在实施例4和实施例6的脂质体中观察到沉淀。制备后立即将实施例的脂质体用纯净水5倍稀释, 并且使用MALVERN Zetasizer Nano通过动态光散射测量粒度分布和表面电荷(参见表2)。实施例5的脂质体的粒度分布和Zeta电位分布示于图1中。将多分散性指数相对较小的实施例1和实施例5的脂质体在冰箱(4℃)中放置6周, 并用纯净水5倍稀释, 然后使用MALVERN Zetasizer Nano通过动态光散射测量粒度分布和表面电荷。确认粒度分布和表面电荷几乎与刚制备的脂质体的那些相同。对于每个实施例, 通过外标法确定脂质体中缀合化合物的含量。即, 使用基于标准样品在288nm的最大吸收波长处的吸光度制备的校准曲线来确定含量。

[0458] [表2]

实施例	平均粒度 (nm)	多分散性指数 (PDI)	表面电荷(Z-电位, mV)	共轭化合物浓度 (mg/mL)
1	148.4	0.194	-67.8	0.235
2	178.7	0.327	-65.5	0.324
[0459] 3	241.7	0.243	-36.1	1.000
4	340.2	0.463	9.24	1.850
5	166.3	0.206	-66.9	0.365
6	172.0	0.245	-27.9	2.307

[0460] 从以上结果表明,实施例1和实施例5的脂质体具有高单分散性和高稳定性。

[0461] 在以下的测试实施例中,在其制备后的六周内使用实施例1和实施例5的脂质体。

[0462] (测试实施例2)

[0463] 对于第一免疫,将等体积的卵清蛋白(OVA)(2 mg/mL)和制备实施例1的化合物(0.008至1 mg/mL)的混合溶液(100 $\mu$ L/小鼠)肌肉施用至C57BL/6雄性小鼠(7或8周龄)的腓肠肌。两周后,向腓肠肌肌肉施用等量的相同混合物以加强免疫。加强免疫后一周,在异氟烷吸入麻醉下收集心脏血液,并通过离心收集血清。通过ELISA方法确定血清中的OVA-特异性IgG2c值。具体而言,将OVA溶液(SIGMA)添加到96孔板中,然后用1%脱脂乳(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)封闭,并添加用磷酸盐缓冲液稀释的血清样品,然后添加第二抗体(山羊抗小鼠IgG1(Jackson)或IgG2c(Southern Bio))。添加SureBlue™TMB微孔过氧化物酶底物(KPL),并通过酶标仪测量酶反应的产物(参见图2)。

[0464] 实施例1和实施例5的脂质体诱导了OVA特异性IgG2c,其与阴性对照组相比显著增强。特别地,与阴性对照组相比,实施例5的脂质体诱导显著增强的OVA特异性IgG2c产生。

[0465] (测试实施例3)

[0466] 从测试实施例2的小鼠制备脾细胞。向细胞中添加OVA和布雷菲德菌素A(eBioscience),并培养过夜。收获培养的细胞,用APC标记的抗小鼠CD3e抗体、FITC标记的抗小鼠CD4抗体和Fixable Viability Dye Fluor®450(eBioscience)染色,并固定在固定/透化(Fixation/Permeabilization)缓冲液(eBioscience)中。在透化缓冲液(Permeabilization buffer,eBioscience)中处理后,将细胞用抗体混合物PerCP-Cy5.5标记的抗IFN- $\gamma$ 抗体、PE-Cy7标记的抗IL-2抗体和PE标记的TNF- $\alpha$ (eBioscience)染色。使用FACSCant II(BD Biosciences)和FLOWJO软件(TreeStar),实施数据获取和分析。结果显示于图3中。

[0467] 还将脾细胞用eFluor 450标记的抗小鼠CD3e抗体、Alexa Fluor®647标记的抗小鼠CD8抗体、PE标记的H-2K<sup>b</sup>OVA四聚体-SINFEKL(MBL)和Fixable Viability Dye eFluor 520(eBioscience)染色。使用FACS Cant II(BD Biosciences)和FLOWJO软件(TreeStar),实施数据获取和分析。结果显示于图4中。

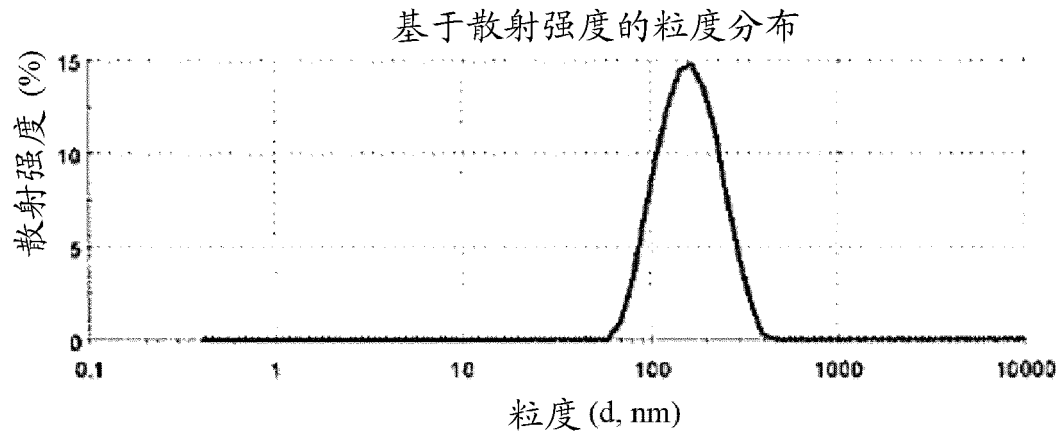
[0468] 将脾细胞进一步用抗体混合物eFluor450标记的抗小鼠CD3e抗体、Alexa Fluor647标记的抗小鼠CD8抗体、PE-Cy7标记的抗小鼠CD44抗体、PerCP-Cy5.5标记的抗小鼠CD62L抗体和Fixable Viability Dye520(eBioscience)温育。使用FACS Cant II(BD Biosciences)和FLOWJO软件(TreeStar),实施数据获取和分析。结果显示于图5中。

[0469] 与阴性对照组相比,实施例1和实施例5的脂质体显著增加了OVA特异性1型辅助T细胞,特别是OVA特异性多功能CD4阳性T淋巴细胞的比例、MHC受限的OVA特异性CD8阳性T淋巴细胞(图3中的OVA四聚体CD8阳性T淋巴细胞)的比例以及CD8阳性效应记忆性T淋巴细胞的比例。特别地,与阴性对照组相比,实施例5的脂质体显著增加了OVA特异性多功能CD4阳性T淋巴细胞的比例和MHC受限的OVA特异性CD8阳性T淋巴细胞的比例。

[0470] 工业实用性

[0471] 本发明的脂质体可用作被添加至疫苗制剂以用于增强免疫刺激作用的佐剂。

粒度分布



Zeta 电位分布

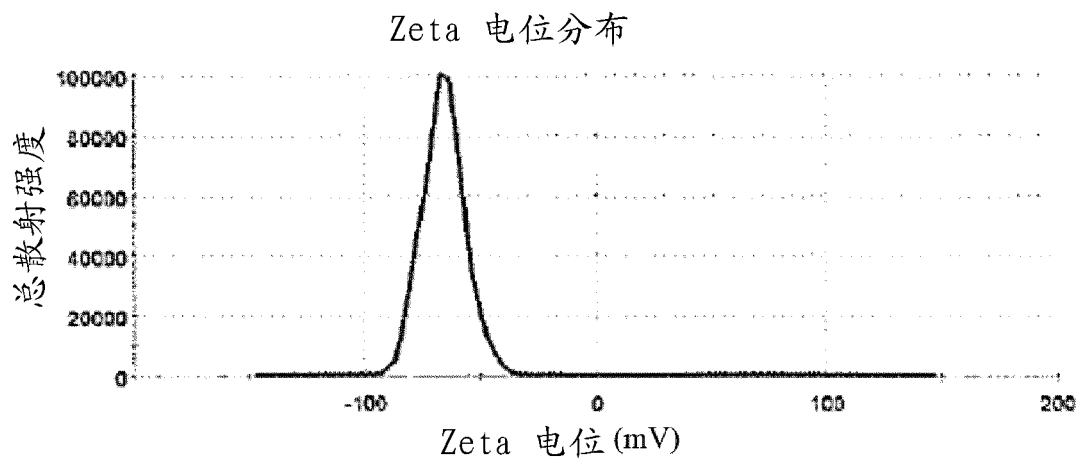


图 1

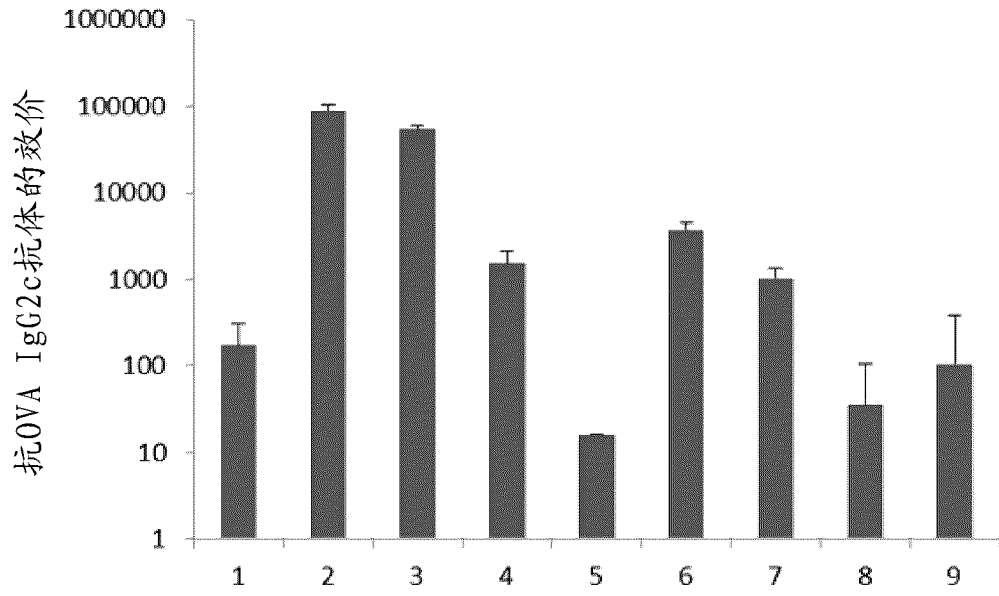


图 2

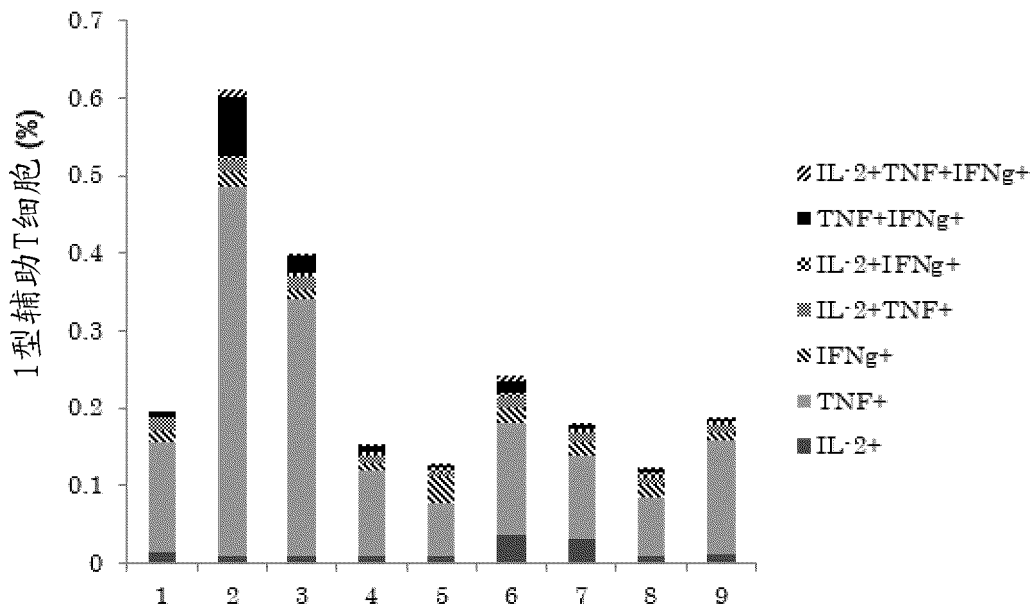


图 3

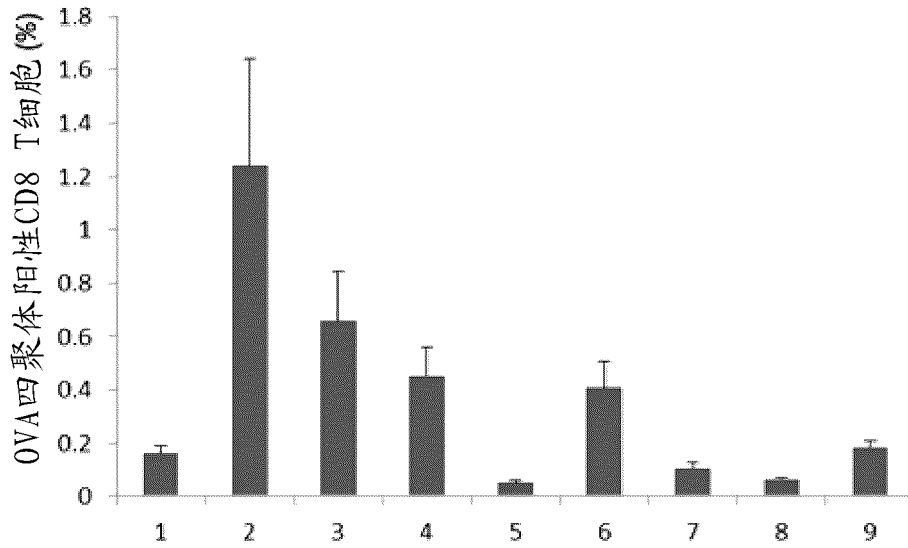


图 4

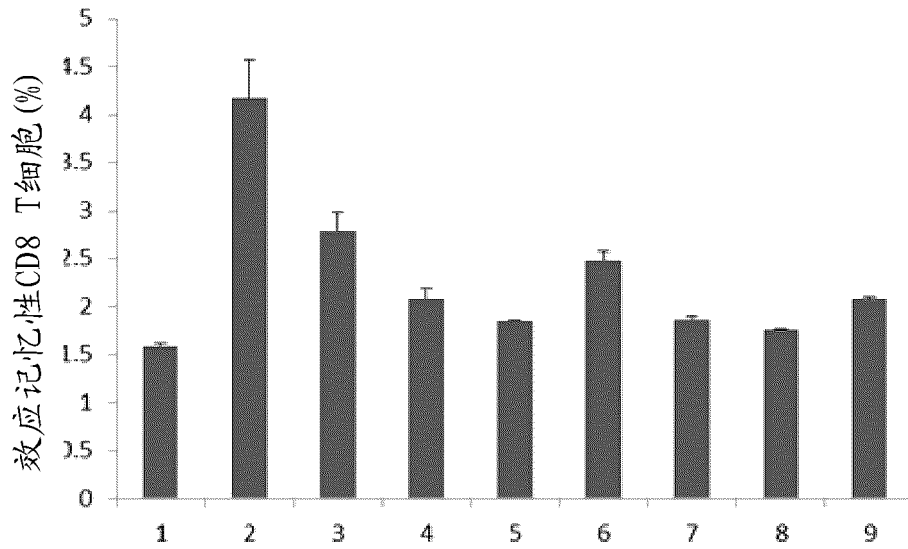


图 5