



(21)申請案號：099118278

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 04 日

(51)Int. Cl. : A61K39/39 (2006.01)

A61K31/661 (2006.01)

(30)優先權：2009/06/05 美國

61/184,703

(71)申請人：美國疾病傳染研究機構(美國) INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE
(US)

美國

(72)發明人：理德 史蒂芬 G REED, STEVEN G. (US)；卡特 戴瑞克 CARTER, DARRICK (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

EP 0172581A2

WO 2009/035528A2

Montminy Sara W et al.; "Virulence factors of Yersinia pestis are overcome by a strong lipopolysaccharide response"; NATURE IMMUNOLOGY, 2006, vol.7, no.10, pages 1066-1073.

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：4 共 130 頁

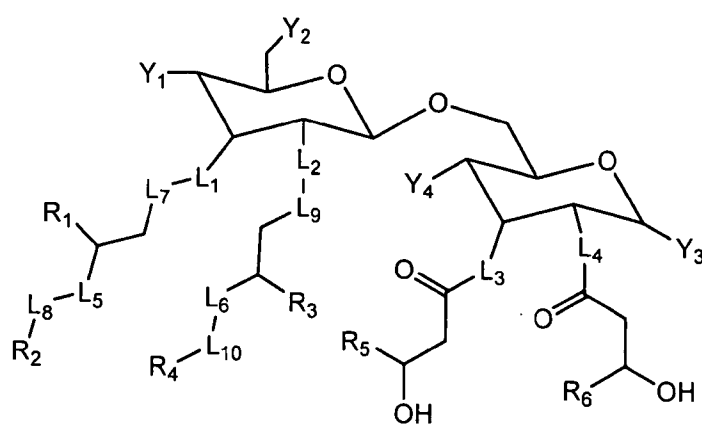
(54)名稱

合成的葡萄糖吡喃糖基脂質佐劑

SYNTHETIC GLUCOPYRANOSYL LIPID ADJUVANTS

(57)摘要

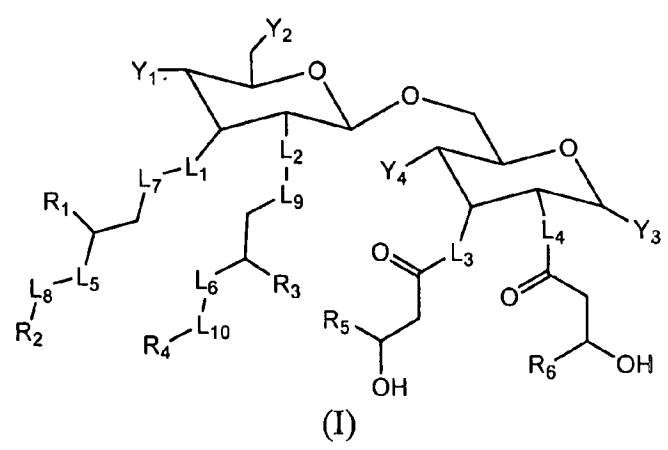
本發明提供一種化合物，特定言之具有以下結構(I)之葡萄糖吡喃糖基脂質佐劑(GLA)化合物：



(I)

或其醫藥上可接受之鹽，其中 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 L_6 、 L_7 、 L_8 、 L_9 、 L_{10} 、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 係如本文所定義。本發明亦提供醫藥組合物、疫苗組合物及誘發或增強免疫應答之相關方法。

Compounds, particularly, glucopyranosyl lipid adjuvant (GLA) compounds, having the following structure (I) are provided:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, L₆, L₇, L₈, L₉, L₁₀, Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, are as defined herein. Pharmaceutical compositions, vaccine compositions, and related methods for inducing or enhancing immune responses, are also provided.

(無元件符號說明)

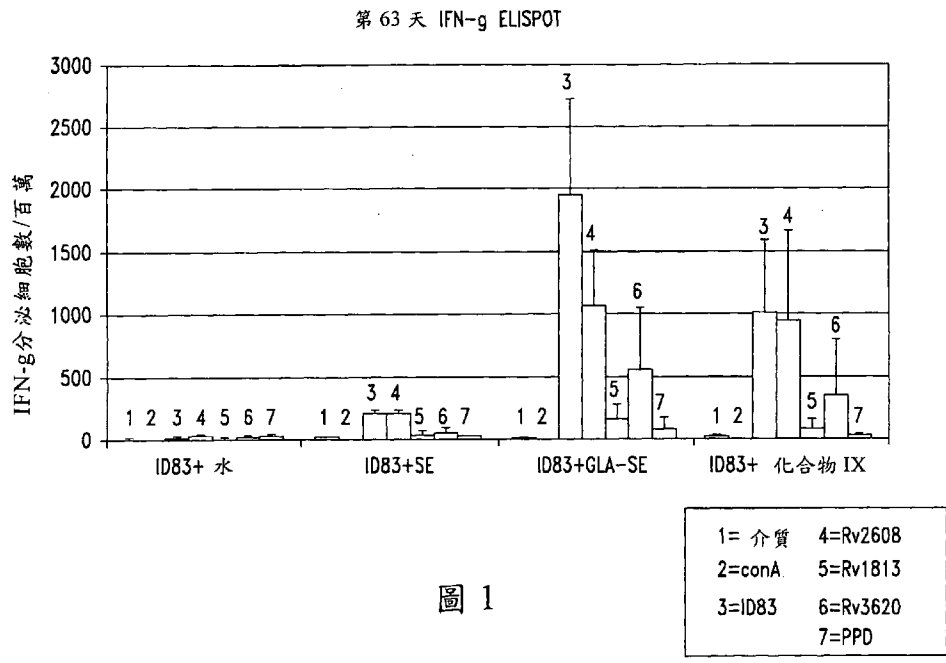
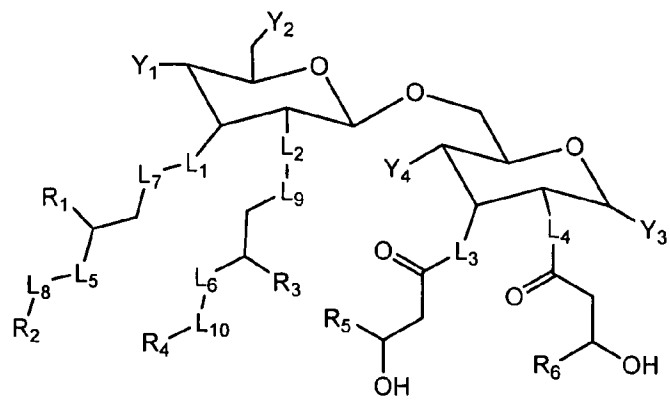


圖 1



(I)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99/118,788

※ 申請日：99 6 4

※IPC 分類：C07D; A61K; A61P

一、發明名稱：(中文/英文)

合成的葡萄糖吡喃糖基脂質佐劑

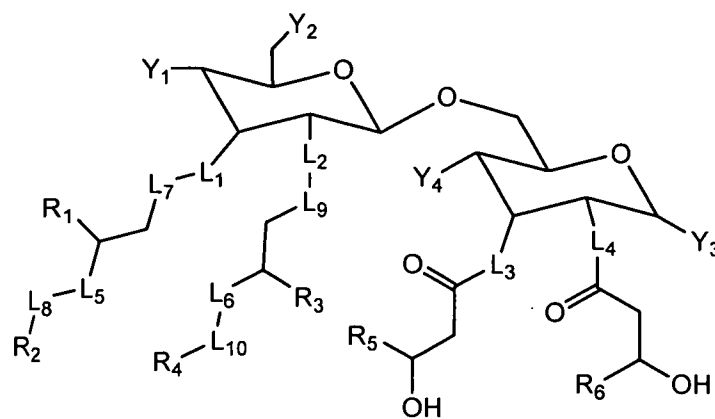
SYNTHETIC GLUCOPYRANOSYL LIPID ADJUVANTS

A61K^{39/39} (2006.01)

A61K^{31/661} (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明提供一種化合物，特定言之具有以下結構(I)之葡萄糖吡喃糖基脂質佐劑(GLA)化合物：

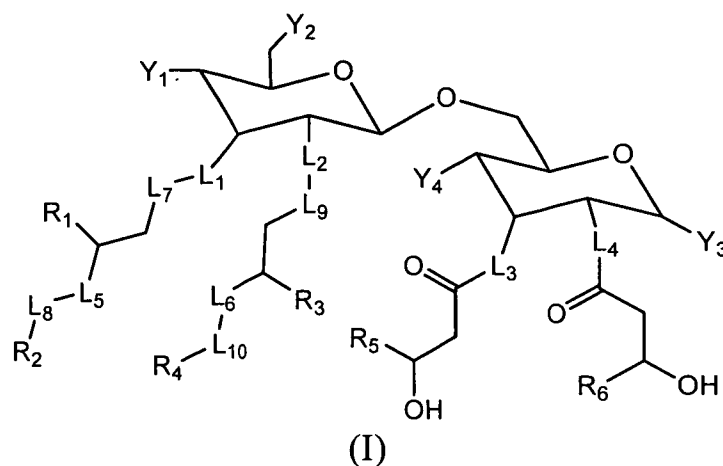


(I)

或其醫藥上可接受之鹽，其中 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 L_6 、 L_7 、 L_8 、 L_9 、 L_{10} 、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 係如本文所定義。本發明亦提供醫藥組合物、疫苗組合物及誘發或增強免疫應答之相關方法。

三、英文發明摘要：

Compounds, particularly, glucopyranosyl lipid adjuvant (GLA) compounds, having the following structure (I) are provided:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 , L_6 , L_7 , L_8 , L_9 , L_{10} , Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , are as defined herein. Pharmaceutical compositions, vaccine compositions, and related methods for inducing or enhancing immune responses, are also provided.

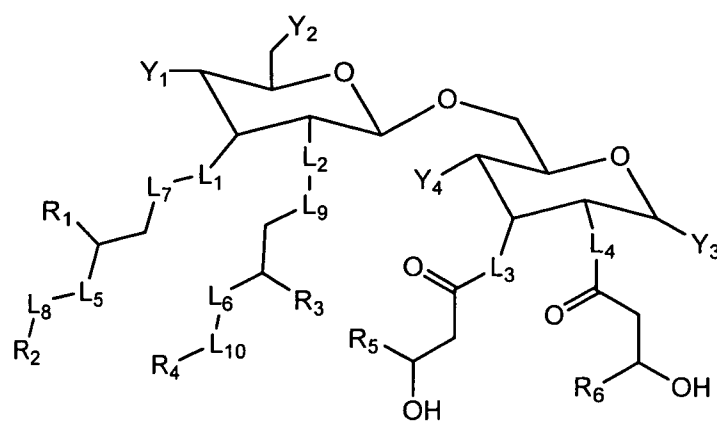
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(I)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於醫藥及疫苗組合物之領域。更具體而言，本文所述實施例係關於醫藥及疫苗組合物、以及相關預防及治療方法，其中該等組合物包含如本文所述葡萄吡喃糖基脂質佐劑(GLA)。

【先前技術】

較高等有機體之免疫系統的特徵在於辨別外來試劑(或「非自身」試劑)與熟悉或「自身」組份，以使外來試劑激發免疫應答同時忽略或耐受「自身」組份。傳統上，免疫應答之特徵在於其中由稱作血漿細胞之分化B淋巴細胞產生對抗原具有特異性之抗體的體液應答、或其中各種類型之T淋巴細胞藉由多種機制起作用以消除抗原的細胞調介之應答。舉例而言，能夠辨識特異性抗原之CD4+輔助T細胞可藉由釋放可溶性調介子(例如細胞因子)以募集免疫系統之額外細胞以在免疫應答中沉澱來應答。同時，亦能夠辨識特異性抗原之CD8+細胞毒性T細胞可藉由結合帶有抗原之細胞或顆粒並對其進行破壞或損害來應答。已知在免疫技術中通常出於誘發宿主中之期望免疫應答的目的，根據各種調配物提供某些疫苗。

經由向宿主投與疫苗來激發特異性免疫應答之若干策略包括用熱殺死或活的減毒感染病原體(例如，病毒、細菌或某些真核生物病原體)進行免疫接種；或用能夠引導編碼抗原之遺傳物質表現的非病毒感染劑進行免疫接種，期

望對該(等)抗原免疫應答；及用含有來自特定病原體之分離免疫原(例如蛋白質)的亞單位疫苗進行免疫接種以誘發抵抗病原體之免疫力。(參見，例如，Liu, 1998 *Nature Medicine* 4(增刊5): 515)。對於某些抗原而言，可存在一或多種類型之合意的免疫力，其中該等方法均不特別有效，包括有效保護宿主免疫抵抗人類免疫缺陷病毒或其他感染病原體、癌症、自身免疫疾病或其他臨床病況之疫苗的開發。

很早以前就已知腸細菌脂多糖(LPS)係免疫系統之強效刺激劑，但因其毒性效應其在佐劑中之用途受到限制。LPS之非毒性衍生物(藉由自還原端葡萄糖胺去除核心碳水化合物基團及磷酸根產生之單磷醯脂質A (MPL))已由Ribi等人(1986, *Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ.公司，NY, p407-419)進行闡述。

MPL之其他去毒形式係由自二糖骨架之3位置去除醯基鏈產生且稱為3-O-去醯基化單磷醯脂質A (3D-MPL)。可藉由GB 2122204B中教示之方法對其進行純化及製備，該參考文獻亦揭示二磷醯脂質A、及其3-O-去醯基化變體之製備。舉例而言，已製備呈具有直徑小於0.2 μm 之小粒徑的乳液形式的3D-MPL，且其製造方法揭示於WO 94/21292中。包含單磷醯脂質A及表面活性劑之水性調配物已闡述於WO 9843670A2中。

可自細菌來源純化及處理欲調配於佐劑組合中之細菌脂多糖衍生之佐劑，或者另一選擇為其可合成。舉例而言，

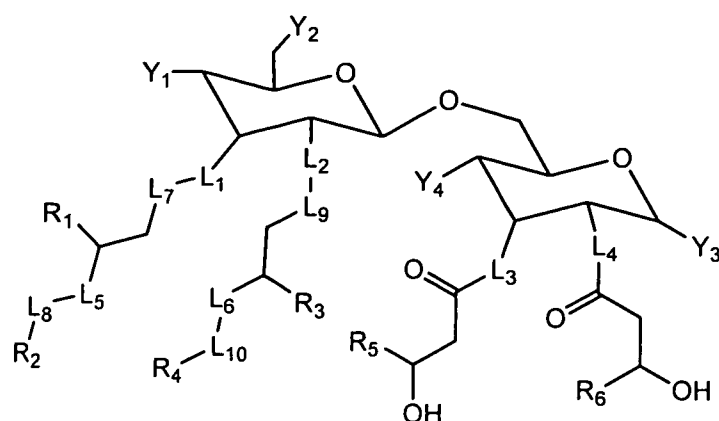
純化單磷醯脂質A闡述於Ribi等人(1986)(見上文)中，且源自沙門氏菌屬(*Salmonella sp.*)之3-O-去醯基化單磷醯或二磷醯脂質A闡述於GB 2220211及美國專利第4,912,094號中。3D-MPL及 $\beta(1-6)$ 葡萄糖胺二糖以及其他純化及合成脂多糖已進行闡述(WO 98/01139；美國專利第6,005,099號及EP 0 729 473 B1，Hilgers等人，1986 *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 79(4):392-6；Hilgers等人，1987, *Immunology*, 60(1)；141-6；及EP 0 549 074 B1)。3D-MPL及源自奎拉雅屬皂樹(*Quillaja Saponaria molina*)之樹皮之皂苷佐劑的組合已闡述於EP 0 761 231B中。WO 95/17210揭示基於角鯊烯、 α -生育酚及聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯(TWEEN™-80)之佐劑乳液系統，其與免疫刺激劑QS21一起調配且視情況包括3D-MPL。儘管存在該等組合之可及性，但使用源自天然產物之佐劑伴有高生產成本、各批次之間不一致性、與大規模生產相關之困難、及在任一給定製劑之組成構成中對於是否存在雜質之不確定性。

因此，需要改良之疫苗、且具體而言需要有利地含有高純度、化學界定佐劑組份之疫苗，該等佐劑組份呈現批次之間一致性且可以工業規模有效率地製造而不引入不期望或化學上未界定之污染物。本發明提供用於該等疫苗之組合物及方法，且提供其他相關優勢。

【發明內容】

本發明在其若干態樣中係關於有利地利用某些合成的葡萄糖吡喃糖基脂質佐劑(GLA)作為免疫調節劑或佐劑的化合

物、組合物及方法。因此，根據本文所述本發明之一個態樣，提供具有下式(I)之結構的GLA化合物：



(I)

或其醫藥上可接受之鹽，其中 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 L_6 、 L_7 、 L_8 、 L_9 、 L_{10} 、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 係如本文所定義。

本發明之GLA化合物在寬範圍之治療應用中具有效用，其中期望誘發特異性或非特異性免疫應答。舉例而言，在本發明之某些態樣中，提供包含一或多種本文所述GLA化合物與抗原之組合的疫苗組合物。該等疫苗組合物可有利地用於在有需要之個體中刺激抗原特異性免疫應答之方法中。在本發明之其他態樣中，提供包含一或多種本文所述GLA化合物之醫藥組合物，其中該等組合物實質上無抗原。該等醫藥組合物可有利地用於在有需要之個體中刺激非特異性免疫應答之方法中，例如，用於治療感染、季節性鼻炎及諸如此類。

參照下文具體說明及附圖，本發明之該等及其他態樣將

顯而易見。另外，本文所述之各種參考文獻更詳細地闡述本發明之某些態樣，且因此其全文以引用方式併入本文中。

【實施方式】

已知單磷醯脂質 A (MPL) 及其他相關佐劑可至少部分地藉由作為類鐸 (Toll-like) 受體 (TLR) 之激動劑起作用來調介其效應。基於與 TLR 受體刺激有關之 3D 結構考慮因素合理地設計本發明之葡萄吡喃糖基脂質佐劑 (GLA) 化合物。更具體而言，根據本發明，藉由選擇性界定本發明 GLA 化合物之醯基鏈長度以使其在化合物之三維結構中達成「扁平」底部，可在 TLR 受體之結合位點內達成改良之配合，藉此產生增強之 TLR 刺激及增強之免疫刺激性質。另外，本發明 GLA 化合物之溶解度 (例如，在水溶液中) 由於縮短之醯基鏈長度而有利地得以改良，藉此有利於有效率且有效之化合物調配。此外，由於醯基鏈長度適於使得分子沿分子底部為三維「平的」，故可將化合物更有效地納入囊泡中用於 (例如) 脂質體調配物。

另外，本發明化合物提供有利之效能對毒性之曲線。舉例而言，本發明化合物可在寬且相對較高劑量範圍內使用以達成期望位準之活性 (例如，佐劑活性)，同時仍然對人類細胞及人類患者實質上無毒性，如藉由 (例如) 在一系列濃度內自人類細胞產生之腫瘤壞死因子之含量所分析，其不像其他更具毒性之 TLR4 激動劑 (例如脂多糖) 那樣，而是快速升高並趨向於平穩。此基於細胞之分析應可預測人類藥理學中不利事件中涉及之較低炎症標記 (如 C-反應蛋

白)。例如，當將本發明化合物投與給對細胞因子之耐受性可能較低的兒童時，或當該等化合物用於以大群體為目標之調配物中時，本發明化合物的有利之效能對毒性之曲線可尤為重要，其中對於對TLR激動具有不同應答性之人群而言，更平穩的應答將轉化為更一致臨床結果。類似地，當活性醫藥成份之範圍不需嚴格控制於耐受位準時，由於靶向投藥將更具寬容度且製造簡單化，故註冊審批亦將簡單化。

因此，本發明在其許多實施例中提供包括如本文所述合成的GLA化合物之化合物、疫苗組合物、佐劑組合物、醫藥組合物及相關調配物及方法。GLA化合物代表合成的免疫調節劑，相對於現有技術之佐劑且尤其相對於天然產物佐劑，其可有利地以實質上均勻形式製備。此外，本發明之GLA化合物可經由大規模合成化學製造方法有效率且經濟地製備，不同於天然產物衍生之佐劑。由於自界定起始材料化學合成以獲得化學界定之產物的合成佐劑呈現定性及定量批與批之間一致性，故本發明之GLA化合物提供包括改良之產品品質控制的益處。

如本文所述，在一些實施例中，GLA化合物、組合物及其使用方法包括GLA本身與醫藥上可接受之載劑或賦形劑用於免疫佐劑活性(例如，非特異性免疫刺激活性)之用途，包括其中向個體投與GLA可完全獨立於向個體投與一或多種抗原及/或在時間上及/或空間上與其分離之「輔佐性」，期望激發或增強個體中對該等抗原之免疫應答(例

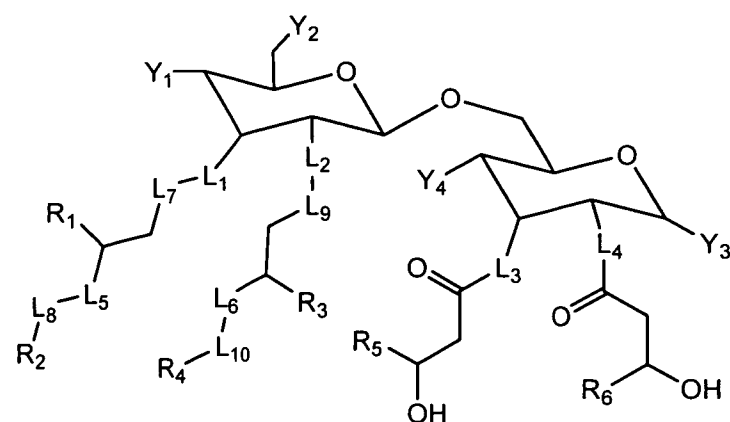
如，抗原特異性應答)。其他實施例包括 GLA 在疫苗組合物中之用途，該疫苗組合物亦包括期望藉由此疫苗激發或增強免疫應答之一或複數種抗原。

如本文所述，該等疫苗組合物可在某些相關實施例中亦包括一或多種類鐸受體 (TLR) 激動劑及 / 或一或多種共佐劑、咪唑并喹啉免疫應答調節劑、及雙莖環免疫調節劑 (dSLIM) 中之一個或複數個。在其他相關實施例中，本文提供之疫苗組合物可包含 GLA 及一或多種重組表現構築體，該等構築體各自包含可操作地連接至編碼抗原之核酸序列的啟動子，期望激發或增強個體中對該抗原之免疫應答 (例如，抗原特異性應答)。

GLA

如上所述，由於 GLA 係化學合成佐劑，故其可以實質上均勻形式製備，該實質上均勻形式 GLA 係指就 GLA 分子而言純度為至少 80%、較佳至少 85%、更佳至少 90%、更佳至少 95% 且仍更佳至少 96%、97%、98% 或 99% 的 GLA 製劑。

本發明之 GLA 化合物具有下式 (I)：



(I)

或其醫藥上可接受之鹽，其中：

L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 及 L_6 相同或不同且獨立地係-O-、-NH-或-(CH₂)-；

L_7 、 L_8 、 L_9 及 L_{10} 相同或不同且獨立地不存在或為-C(=O)-；

Y_1 係酸官能團；

Y_2 及 Y_3 相同或不同且獨立地係-OH、-SH或酸官能團；

Y_4 係-OH或-SH；

R_1 、 R_3 、 R_5 及 R_6 相同或不同且獨立地係C₈₋₁₃烷基；且

R_2 及 R_4 相同或不同且獨立地係C₆₋₁₁烷基。

本文所用上述術語具有以下含義：

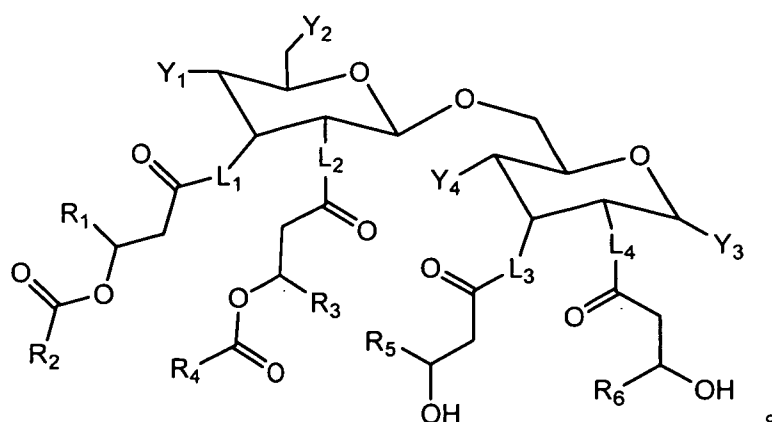
「烷基」意指含有1至20個碳原子、且在某些較佳實施例中含有11至20個碳原子之直鏈或具支鏈、非環狀或環狀、不飽和或飽和脂肪族烴。代表性飽和直鏈烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基及諸如此類，包括十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等；而飽和具支鏈烷基包括異丙基、第二丁基、異丁基、第三丁基、異戊基及諸如此類。代表性飽和環狀烷基包括環丙基、環丁基、環戊基、環己基及諸如此類；而不飽和環狀烷基包括環戊烯基及環己烯基及諸如此類。環狀烷基在本文中亦稱作「同素環」或「同素環狀環」。不飽和烷基在相鄰碳原子間含有至少一個雙鍵或三鍵(分別稱為「烯基」或「炔基」)。代表性直鏈及具支鏈烯基包括乙烯基、丙烯基、1-

丁烯基、2-丁烯基、異丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基及諸如此類；而代表性直鏈及具支鏈炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基及諸如此類。

「 C_{8-13} 烷基」及「 C_{6-11} 烷基」意指分別含有8至13或6至11個碳原子之如上文所定義烷基。

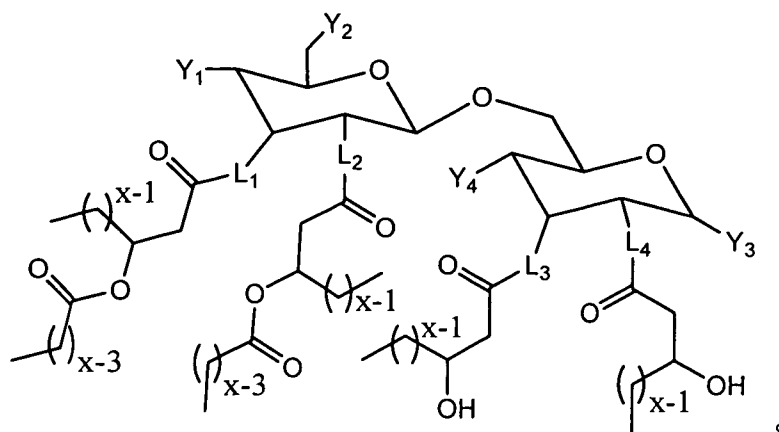
「酸官能團」意指能夠在水性介質中提供質子之官能團(即Brønsted-Lowry酸)。在供應質子之後，酸官能團變為帶負電荷之物質(即，酸官能團之共軛鹼)。酸官能團之實例包括(但不限於)： $-OP(=O)(OH)_2$ (磷酸根)、 $-OS(=O)(OH)_2$ (硫酸根)、 $-OS(OH)_2$ (亞硫酸根)、 $-C(=O)OH$ (羧酸根)、 $-OC(=O)CH(NH_2)CH_2C(=O)OH$ (天冬胺酸根)、 $-OC(=O)CH_2CH_2C(=O)OH$ (琥珀酸酯根)、及 $-OC(=O)CH_2OP(=O)(OH)_2$ (羧甲基磷酸根)。

在更具體實施例中，本發明提供式(I)之GLA化合物，其中 L_5 及 L_6 二者均係-O-且 L_7 、 L_8 、 L_9 及 L_{10} 各自係 $-C(=O)-$ ，且GLA化合物具有下式(II)：



(II)

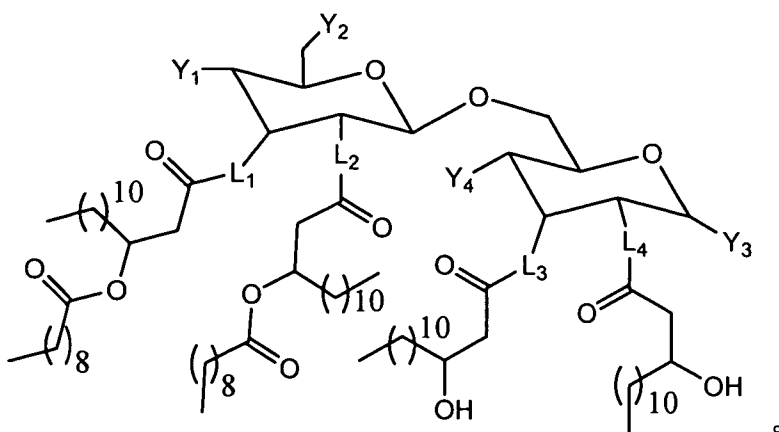
在更具體實施例中，本發明提供式(II)之GLA化合物，其中 R_1 、 R_3 、 R_5 及 R_6 各自係 C_x 烷基，其中 x 係恆定的且係選自8至13之整數，且 R_2 及 R_4 二者均係 C_{x-2} 烷基，且GLA化合物具有下式(III)：



(III)

在其他更具體實施例中，本發明提供式(III)之GLA化合物，其中 x 係選自10至12之整數。

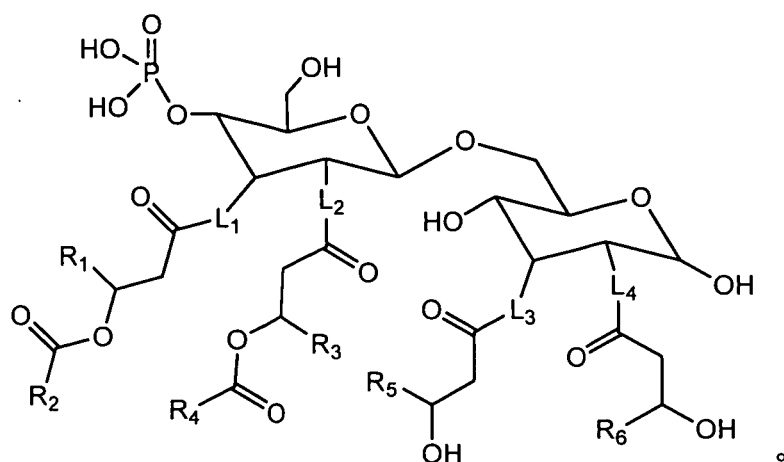
在其他更具體實施例中，本發明提供式(III)之GLA化合物，其中 x 係11，且GLA化合物具有以下結構(IV)：



(IV)

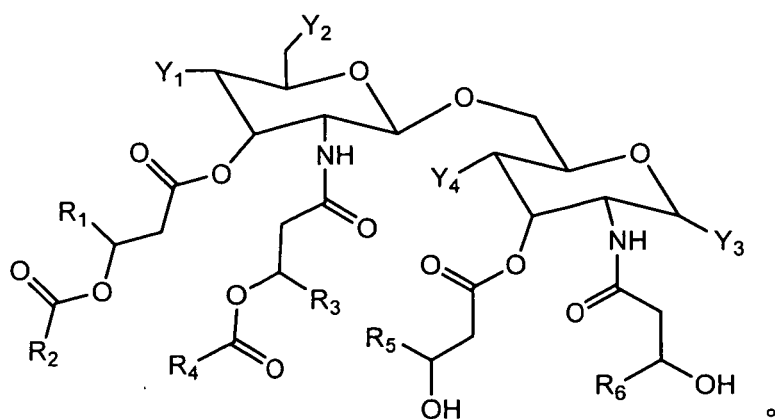
在又一些具體實施例中，本發明提供式(II)之GLA化合物

物，其中 Y_1 係 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 且 Y_2 、 Y_3 及 Y_4 各自係 $-\text{OH}$ ，且 GLA 化合物具有下式 (V)：



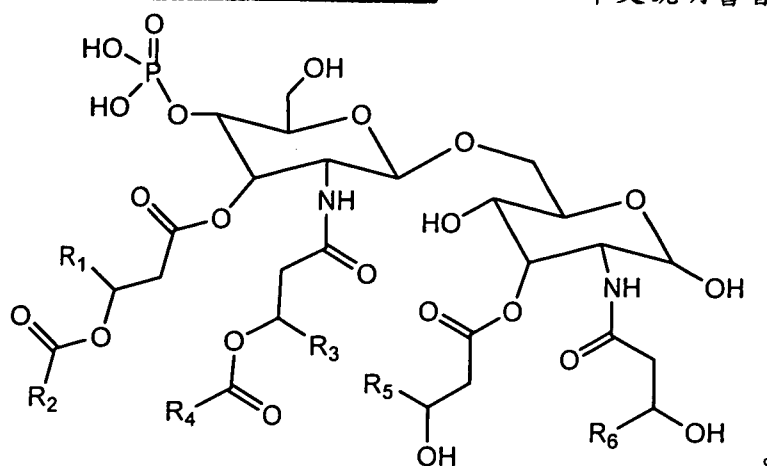
(V)

在其他具體實施例中，本發明提供式 (II) 之 GLA 化合物，其中 L_1 及 L_3 二者均係 $-\text{O}-$ 且 L_2 及 L_4 二者均係 $-\text{NH}-$ ，且 GLA 化合物具有下式 (VI)：



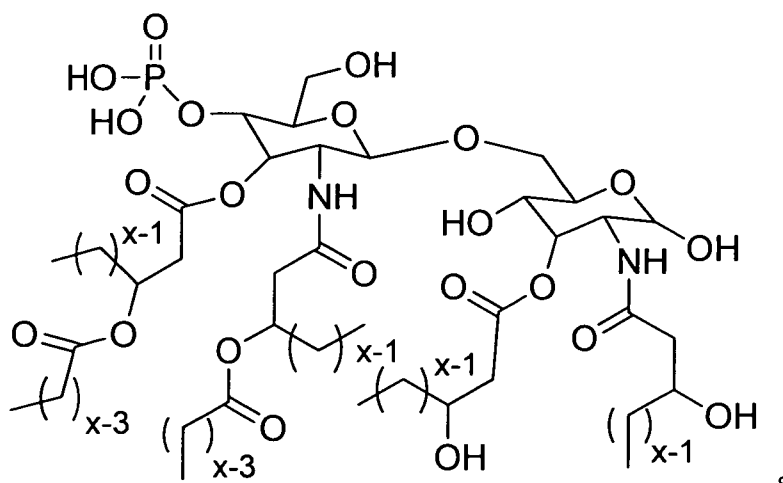
(VI)

在再更具體實施例中，本發明提供式 (II) 之 GLA 化合物，其中 Y_1 係 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$ ， Y_2 、 Y_3 及 Y_4 各自係 $-\text{OH}$ ， L_1 及 L_3 二者均係 $-\text{O}-$ ，且 L_2 及 L_4 二者均係 $-\text{NH}-$ ，且 GLA 化合物具有下式 (VII)：



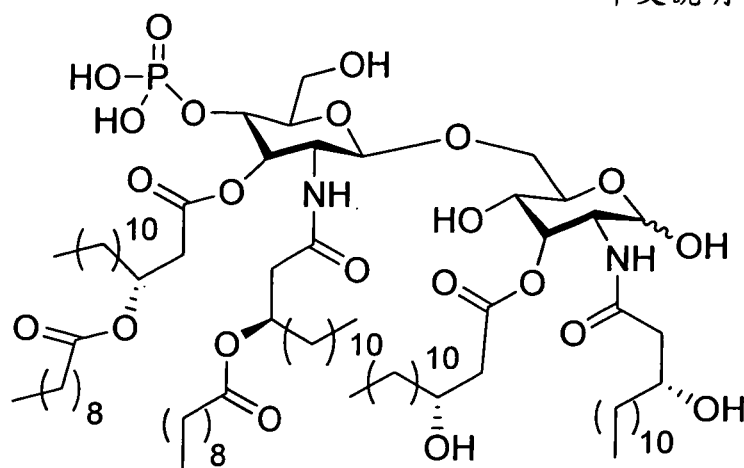
(VII)

在又一些具體實施例中，本發明提供式(II)之GLA化合物，其中 Y_1 係 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ， Y_2 、 Y_3 及 Y_4 各自係 $-\text{OH}$ ， L_1 及 L_3 二者均係 $-\text{O}-$ ， L_2 及 L_4 二者均係 $-\text{NH}-$ ， R_1 、 R_3 、 R_5 及 R_6 各自係 C_x 烷基，其中 x 係恆定的且係選自8至13之整數，且 R_2 及 R_4 二者均係 C_{x-2} 烷基，且GLA化合物具有下式(VIII)：



(VIII)

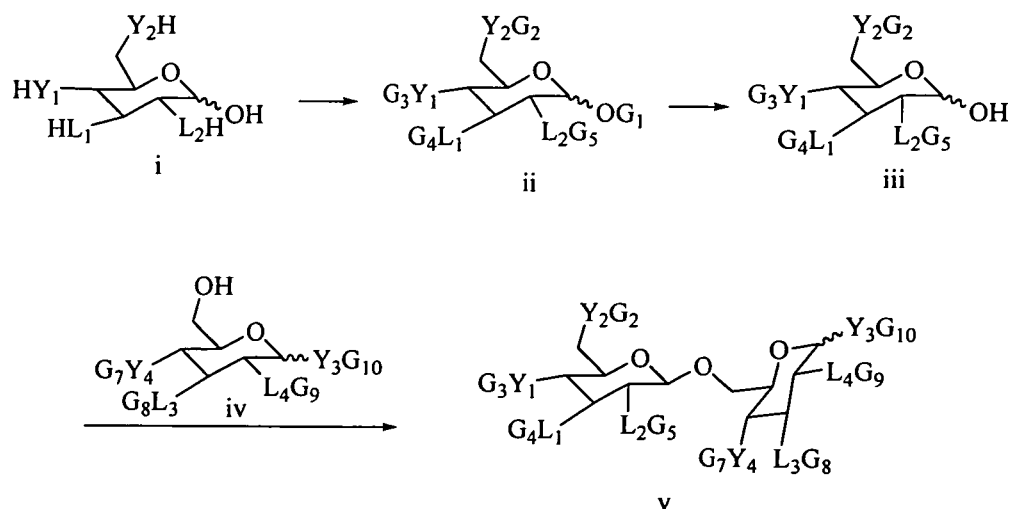
在式(VIII)之更具體實施例中， x 係11，且本發明提供具有以下結構(IX)之GLA化合物：



(IX)

GLA化合物

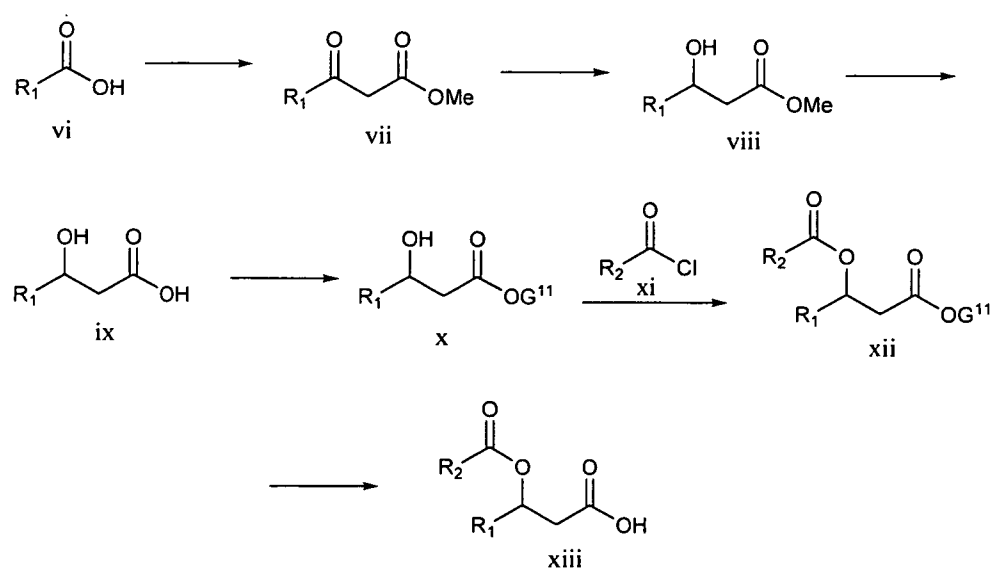
如上文所提及，本發明提供GLA化合物。本發明之GLA化合物可藉由已知有機合成技術(包括實例中更詳細闡述之方法)製備。一般而言，結構(I)之GLA化合物可藉由以下反應示意圖製備，其中除非另有說明否則所有取代基均係如上文所定義。

反應示意圖 1

代表性GLA化合物之糖骨架通常可根據反應示意圖1製備，其中 G_1 、 G_2 、 G_3 、 G_4 、 G_5 、 G_6 、 G_7 、 G_8 、 G_9 及 G_{10} 相

同或不同且獨立地係適當保護基團或氫。適當糖(例如(i))可購得或根據彼等熟習此項技術者已知之方法製備。隨後可使用彼等熟習此項技術者已知之方法完全保護糖(i)之官能團以獲得(ii)。就此而言,熟習此項技術者應認識到可採用可使得糖官能團選擇性去保護之適當正交保護基團策略。適宜保護基團包括(但不限於)甲矽烷基醚、苄基醚、烯丙氧基羰基、縮醛、Fmoc、疊氮化物及諸如此類。 G_1 之去保護產生游離醇(iii),隨後可使用適當偶合條件(例如, CCl_3CN/NaH)使其與經保護糖(iv)偶合,從而獲得期望糖骨架(v)。

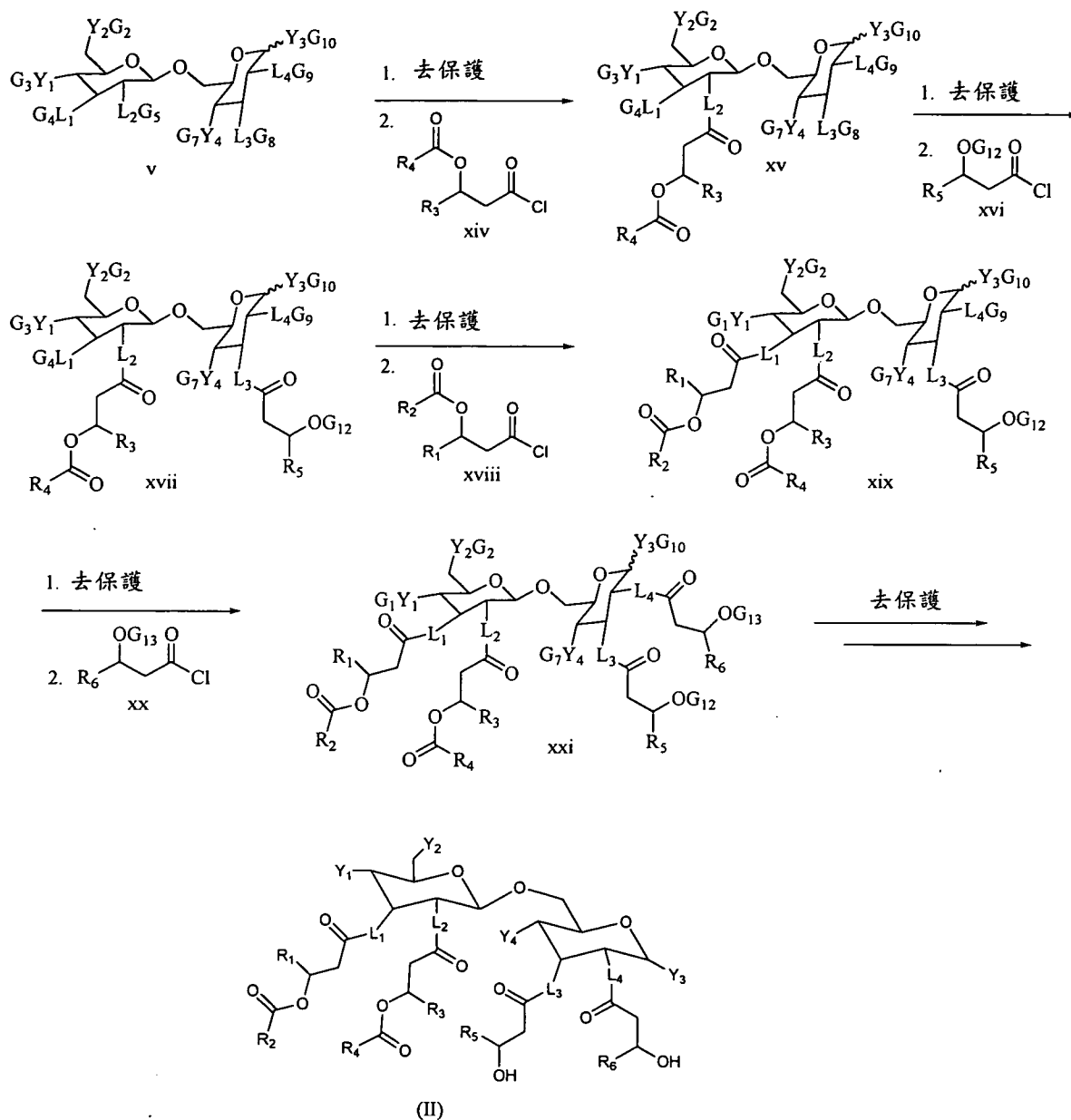
反應示意圖 2



代表性GLA化合物尾片(其中 L_5 及 L_6 二者均係-O-且 L_7 、 L_8 、 L_9 及 L^{10} 各自係-C(=O)-)通常可根據反應示意圖2製備,其中 G^{11} 代表適當保護基團。結構(vi)之酸化合物可購得或根據彼等熟習此項技術者已知之方法製備。與適當試

劑(例如甲基丙二酸氫)反應，產生酮酯(vii)。還原(vii)，產生醇(viii)。熟習此項技術者應認識到可如實例中所例示在適當條件下立體專一還原(vii)之酮基團。(viii)之皂化產生酸(ix)，可隨後對其進行保護以產生(x)。用醯氯(xi)處理(x)，產生(xii)，其在去保護後產生(xiii)。化合物(ix)及(xiii)二者均可藉由彼等熟習此項技術者已知之方法轉化為適宜保護之醯氯衍生物且附接至GLA化合物糖骨架，如下文反應示意圖3中所示。儘管反應示意圖2繪示包含 R_1 及 R_2 之GLA化合物尾片的合成，但應瞭解亦可藉由類似方法製備包含其他烷基(例如， R_3 、 R_4 、 R_5 及 R_6)之其他尾片。亦可藉由類似方法製備具有不同 L_5 、 L_6 、 L_7 、 L_8 、 L_9 及 L_{10} 基團之其他尾片。

反應示意圖3



代表性 GLA 化合物通常可根據反應示意圖 3 製備，其中 G_{12} 及 G_{13} 相同或不同且獨立地代表適當保護基團。去除 (v) 之 G_5 保護基團，之後與醯氯 (xiv) 反應，從而生成 (xv)。類似地，去除 (xv) 之 G_8 保護基團，之後與醯氯 (xvi) 反應，從而產生 (xvii)。使 (xvii) 去保護並與醯氯 (xviii) 反應，從而產生 (xix)。去除 G_9 且與 (xx) 反應，則生成受保護之 GLA 化

合物(xxi)。使(xxi)整體去保護，從而產生結構(II)之化合物。儘管反應示意圖3繪示結構(II)之化合物的合成，但熟習此項技術者應認識到可採用類似方法生成結構(I)之任一化合物。另外，熟習此項技術者亦應認識到利用適當保護基團之選擇，最終去保護產生期望化合物。

本發明化合物通常可以游離鹼或游離酸形式利用。或者，本發明化合物可以酸或鹼加成鹽形式使用。本發明之游離胺基化合物的酸加成鹽可藉由相關技藝熟知之方法製備且可自有機及無機酸形成。適宜有機酸包括馬來酸、富馬酸、苯甲酸、抗壞血酸、琥珀酸、甲烷磺酸、乙酸、草酸、丙酸、酒石酸、水楊酸、檸檬酸、葡萄糖酸、乳酸、扁桃酸、肉桂酸、天冬胺酸、硬脂酸、棕櫚酸、乙醇酸、麩胺酸及苯磺酸。適宜無機酸包括氫氯酸、氫溴酸、硫酸、磷酸及硝酸。

類似地，本發明之酸化合物的鹼加成鹽可藉由相關技藝熟知之方法製備且可自有機及無機鹼形成。適宜有機鹼包括(但不限於)三乙胺及吡啶。適宜無機鹼包括(但不限於)氫氧化鈉、氫氧化鉀、碳酸鈉、碳酸鉀及氨。因而，術語結構(I)之「醫藥上可接受之鹽」意欲涵蓋任一及所有可接受之鹽形式。

另外，本發明上下文中亦包括前藥。前藥係在將該前藥投與患者時在活體內釋放結構(I)之化合物的任何共價鍵結載劑。前藥通常係以修飾藉由常規操作或在活體內解離而產生母體化合物之方式修飾官能團來製備。前藥包括(例

如)本發明化合物，其中羥基、胺或巰基鍵結至當投與患者時解離形成羥基、胺或巰基之任一基團。因而，前藥之代表性實例包括(但不限於)結構(I)之化合物之醇及胺官能團的乙酸鹽、甲酸鹽及苯甲酸鹽衍生物。此外，在羧酸(COOH)之情形下，可採用酯，例如甲基酯、乙基酯及諸如此類。

就立體異構體而言，結構(I)之化合物可具有對掌性中心且可以外消旋異構體、外消旋混合物及個別對映異構體或非對映異構體形式存在。所有該等同分異構體形式均包括於本發明內，包括其混合物。此外，結構(I)之化合物的一些結晶形式可以多晶型形式存在，其包括於本發明中。另外，一些結構(I)之化合物亦可與水或其他有機溶劑形成溶劑合物。該等溶劑合物類似地包括於本發明範疇內。

抗原

用於本文所述疫苗組合物及採用GLA之方法的某些實施例中之抗原可為任一靶向抗原決定基、分子(包括生物分子)、分子複合物(包括含有生物分子之分子複合物)、亞細胞總成、細胞或組織，期望激發或增強個體中對該抗原之免疫反應性。通常，術語抗原應指目標多肽抗原。然而，本文所用抗原亦可指編碼目標多肽抗原之重組構築體(例如，表現構築體)。在某些較佳實施例中，抗原可為、或可源自與以下疾病相關之感染病原體及/或抗原決定基、生物分子、細胞或組織，或可與其免疫交叉反應：感染、癌症、自身免疫疾病、過敏症、哮喘或其中刺激抗原特異

性免疫應答可為合意的或有益處之任一其他病況。

較佳地且在某些實施例中，本發明之疫苗調配物含有能夠激發抵抗人類或其他哺乳動物病原體之免疫應答的抗原或抗原性組合物，該抗原或抗原性組合物可包括源自諸如以下等病毒之組合物：HIV-1(例如，tat、nef、gp120或gp160)、人類皰疹病毒(例如，gD或其衍生物)或即刻早期蛋白(例如，來自HSV1或HSV2之ICP27)、巨細胞病毒((尤其人類))(例如gB或其衍生物)、輪狀病毒(包括活的減毒病毒)、愛潑斯坦巴爾病毒(Epstein Barr virus)(例如，gp350或其衍生物)、水痘-帶狀皰疹病毒(Varicella Zoster Virus)(例如，gpI、II及IE63)、或肝炎病毒(例如，B型肝炎病毒(例如，B型肝炎表面抗原或其衍生物)、A型肝炎病毒、C型肝炎病毒及E型肝炎病毒)、或其他病毒病原體(例如，副黏病毒(paramyxoviruses)：呼吸道合胞病毒(例如，F及G蛋白或其衍生物)、副流行性感冒病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、人類乳頭瘤病毒(例如，HPV6、11、16、18等)、黃病毒(例如，黃熱病病毒、登革熱病毒(Dengue Virus)、蜱傳腦炎病毒(Tick-borne encephalitis virus)、日本腦炎病毒(Japanese Encephalitis Virus)或流行性感冒病毒(全活或滅活病毒、裂解之流行性感冒病毒(生長於蛋或MDCK細胞中)、或全流行性感冒病毒體(如由Gluck, *Vaccine*, 1992, 10, 915-920所述)或其純化或重組蛋白(例如HA、NP、NA或M蛋白、或其組合))。

在某些其他較佳實施例中，本發明之疫苗調配物含有能

夠激發抵抗人類或其他哺乳動物病原體之免疫應答的抗原或抗原性組合物，該抗原或抗原性組合物可包括源自以下之一或多種細菌病原體的組合物：例如，奈瑟菌屬 (*Neisseria spp*)，包括淋球菌 (*N. gonorrhea*) 及腦膜炎雙球菌 (*N. meningitidis*) (例如，莢膜多糖及其偶聯物、轉鐵蛋白結合蛋白、乳鐵傳遞蛋白結合蛋白、PilC、黏附素)；膿鏈球菌 (*S. pyogenes*) (例如，M蛋白或其片段、C5A蛋白酶、脂磷壁酸)；無乳鏈球菌 (*S. agalactiae*)、變形鏈球菌 (*S. mutans*)；杜克氏嗜血桿菌 (*H. ducreyi*)；莫拉菌屬 (*Moraxella spp*)，包括卡他莫拉菌 (*M. catarrhalis*)，亦稱作卡他布蘭漢球菌 (*Branhamella catarrhalis*) (例如，高及低分子量黏附素及侵染素)；博德氏桿菌屬 (*Bordetella spp*)，包括百日咳博德氏桿菌 (*B. pertussis*) (例如，百日咳桿菌黏附素 (pertactin)、百日咳毒素或其衍生物、絲狀血凝素、腺苷酸環化酶、菌毛)、副百日咳博德氏桿菌 (*B. parapertussis*) 及枝氣管敗血鮑特氏菌 (*B. bronchiseptica*)；分枝桿菌屬 (*Mycobacterium spp.*)，包括結核分枝桿菌 (*M. tuberculosis*) (例如 ESAT6、抗原 85A、-B 或 -C)、牛型分枝桿菌 (*M. bovis*)、麻風分枝桿菌 (*M. leprae*)、鳥型分枝桿菌 (*M. avium*)、副結核分枝桿菌 (*M. paratuberculosis*)、齒垢分枝桿菌 (*M. smegmatis*)；軍團菌屬 (*Legionella spp*)，包括嗜肺軍團菌 (*L. pneumophila*)；埃希氏菌屬 (*Escherichia spp*)，包括腸毒素大腸桿菌 (*enterotoxigenic E. coli*) (例如，定居因子、不耐熱毒素或其衍生物、耐熱毒素或其衍生

物)、腸出血性大腸桿菌、腸道病原性大腸桿菌(例如,志賀毒素樣毒素(shiga toxin-like toxin)或其衍生物);弧菌屬(*Vibrio spp*),包括霍亂弧菌(*V. cholera*)(例如,霍亂毒素或其衍生物);志賀氏桿菌屬(*Shigella spp*),包括宋內氏志賀桿菌(*S. sonnei*)、停乳志賀氏桿菌(*S. dysenteriae*)、福氏志賀氏桿菌(*S. flexnerii*);耶爾森氏菌屬(*Yersinia spp*),包括小腸結腸炎耶爾森氏菌(*Y. enterocolitica*)(例如,Yop蛋白)、鼠疫耶爾森氏菌(*Y. pestis*)、假結核耶爾森氏菌(*Y. pseudotuberculosis*);彎曲桿菌屬(*Campylobacter spp*),包括空腸彎曲桿菌(*C. jejuni*)(例如,毒素、黏附素及侵染素)及大腸彎曲桿菌(*C. coli*);沙門氏菌屬,包括傷寒沙門氏菌(*S. typhi*)、副傷寒沙門氏菌(*S. paratyphi*)、豬霍亂沙門氏菌(*S. choleraesuis*)、腸炎沙門氏菌(*S. enteritidis*);利斯特氏菌屬(*Listeria spp.*),包括單核細胞增生利斯特菌(*L. monocytogenes*);螺旋桿菌屬(*Helicobacter spp*),包括幽門螺旋桿菌(*H. pylori*)(例如,脲酶、過氧化氫酶、空泡素);假單胞菌屬(*Pseudomonas spp*),包括銅綠假單胞菌(*P. aeruginosa*);葡萄球菌屬(*Staphylococcus spp.*),包括金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*);腸球菌屬(*Enterococcus spp.*),包括糞腸球菌(*E. faecalis*)、屎腸球菌(*E. faecium*);梭狀芽孢桿菌屬(*Clostridium spp.*),包括破傷風梭狀芽孢桿菌(*C. tetani*)(例如,破傷風毒素及其衍生物)、肉毒梭狀芽孢桿菌(*C. botulinum*)(例如,肉毒毒素及其衍生物)、難辨梭狀

芽孢桿菌 (*C. difficile*)(例如，梭狀芽孢桿菌毒素 A 或 B 及其衍生物)；芽孢桿菌屬 (*Bacillus spp.*)，包括炭疽芽孢桿菌 (*B. anthracis*)(例如，肉毒毒素及其衍生物)；棒桿菌屬 (*Corynebacterium spp.*)，包括白喉棒桿菌 (*C. diphtheriae*)(例如，白喉毒素及其衍生物)；疏螺旋體屬 (*Borrelia spp.*)，包括布氏疏螺旋體 (*B. burgdorferi*)(例如，OspA、OspC、DbpA、DbpB)、嘎氏疏螺旋體 (*B. garinii*)(例如，OspA、OspC、DbpA、DbpB)、阿氏疏螺旋體 (*B. afzelii*)(例如，OspA、OspC、DbpA、DbpB)、安氏疏螺旋體 (*B. andersonii*)(例如，OspA、OspC、DbpA、DbpB)、赫氏疏螺旋體 (*B. hermsii*)；埃裏希氏體屬 (*Ehrlichia spp.*)，包括馬埃裏希氏體 (*E. equi*)及人粒細胞埃裏希氏體病 (Human Granulocytic Ehrlichiosis) 之病因；立克次氏體屬 (*Rickettsia spp.*)，包括立氏立克次氏體 (*R. rickettsii*)；衣原體屬 (*Chlamydia spp.*)，包括沙眼衣原體 (*C. trachomatis*)(例如，MOMP、肝素結合蛋白)、肺炎衣原體 (*C. pneumoniae*)(例如，MOMP、肝素結合蛋白)、鸚鵡熱衣原體 (*C. psittaci*)；鉤端螺旋體屬 (*Leptospira spp.*)，包括問號鉤端螺旋體 (*L. interrogans*)；密螺旋體屬 (*Treponema spp.*)，包括蒼白密螺旋體 (*T. pallidum*)(例如，稀有外膜蛋白)、齒垢密螺旋體 (*T. denticola*)、豬痢疾密螺旋體 (*T. hyodysenteriae*)；或其他細菌病原體。

在某些其他較佳實施例中，本發明之疫苗調配物含有能夠激發抵抗人類或其他哺乳動物病原體之免疫應答的抗原

或抗原性組合物，該抗原或抗原性組合物可包括源自以下之一或多者的組合物：寄生蟲(參見，例如，John, D.T.及Petri, W.A., *Markell and Voge's Medical Parasitology*-第9版，2006, WB Saunders, Philadelphia; Bowman, D.D., *Georgis' Parasitology for Veterinarians*-第8版，2002, WB Saunders, Philadelphia)，例如瘧疾原蟲屬(*Plasmodium spp.*)，包括惡性瘧原蟲(*P. falciparum*)；弓形蟲屬(*Toxoplasma spp.*)，包括鼠弓形蟲(*T. gondii*)(例如，SAG2、SAG3、Tg34)；內阿米巴屬(*Entamoeba spp.*)，包括溶組織內阿米巴(*E. histolytica*)；巴貝蟲屬(*Babesia spp.*)，包括果氏巴貝蟲(*B. microti*)；錐蟲屬(*Trypanosoma spp.*)，包括克魯斯錐蟲(*T. cruzi*)；賈第蟲屬(*Giardia spp.*)，包括蘭伯賈第蟲(*G. lamblia*)；利什曼原蟲屬(*Leishmania spp.*)，包括碩大利什曼原蟲(*L. major*)；肺囊蟲屬(*Pneumocystis spp.*)，包括卡氏肺囊蟲(*P. carinii*)；毛滴蟲屬(*Trichomonas spp.*)，包括陰道毛滴蟲(*T. vaginalis*)；或來自能夠感染哺乳動物之蠕蟲，例如：(i) 線蟲感染(包括但不限於：蟯蟲(*Enterobius vermicularis*)、人蛔蟲(*Ascaris lumbricoides*)、人鞭蟲(*Trichuris trichuria*)、美洲鉤蟲(*Necator americanus*)、十二指腸鉤蟲(*Ancylostoma duodenalee*)、班氏吳策線蟲(*Wuchereria bancrofti*)、馬來絲蟲(*Brugia malayi*)、旋盤尾絲蟲(*Onchocerca volvulus*)、麥地那龍線蟲(*Dracanculus medinensis*)、旋毛線蟲(*Trichinella spiralis*)、及糞類圓線

蟲(*Strongyloides stercoralis*)) ; (ii) 吸蟲感染(包括但不限於：曼森血吸蟲(*Schistosoma mansoni*)、埃及血吸蟲(*Schistosoma haematobium*)、日本血吸蟲(*Schistosoma japonicum*)、湄公河裂體吸蟲(*Schistosoma mekongi*)、中華後傘吸蟲(*Opisthorchis sinensis*)、並殖吸蟲屬(*Paragonimus* sp)、肝片形吸蟲(*Fasciola hepatica*)、薑片吸蟲(*Fasciola magna*)、大片吸蟲(*Fasciola gigantica*)) ; 及 (iii) 條蟲感染(包括但不限於：牛肉條蟲(*Taenia saginata*)及豬肉條蟲(*Taenia solium*))。因此，某些實施例可涵蓋包括源自血吸蟲屬(*Schistosoma* spp.)(曼森血吸蟲、埃及血吸蟲及/或日本血吸蟲)、或源自酵母(例如，念珠菌屬(*Candida* spp.)，包括白色念珠菌(*C. albicans*)；隱球菌屬(*Cryptococcus* spp.)，包括新型隱球菌(*C. neoformans*))之抗原的疫苗組合物。

結核分枝桿菌之其他較佳特異性抗原係(例如)Th Ra12、Tb H9、Tb Ra35、Tb38-1、Erd 14、DPV、MTI、MSL、mTTC2及hTCC1 (WO 99/51748)。結核分枝桿菌之蛋白質亦包括融合蛋白質及其變體，其中至少兩種、較佳三種結核分枝桿菌多肽融合成較大蛋白質。較佳之融合體包括Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI、DPV-MTI-MSL、Erd14DPV-MTI-MSL-mTCC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、DPV-MTI-MSL-mTCC2、TbH9-DPV-MTI (WO 99/51748)。

衣原體之某些較佳抗原包括(例如)高分子量蛋白質(HWMP) (WO 99/17741)、ORF3 (EP 366 412)、CT622、

CT610、pmpD、UVEB及推定之膜蛋白(Pmp)。疫苗調配物之其他衣原體抗原可選自WO 99128475中所述之群。較佳之細菌疫苗包含源自鏈球菌屬(*Streptococcus spp*)(包括肺炎鏈球菌(*S. pneumoniae*)(例如，莢膜多糖及其偶聯物、PsaA、PspA、PdB、鏈球菌溶血素、膽鹼結合蛋白)之抗原及蛋白抗原肺炎球菌溶血素(Biochem Biophys Acta, 1989, 67,1007; Rubins等人, Microbial Pathogenesis, 25, 337-342)及其突變體脫毒衍生物(WO 90/06951; WO 99/03884)。其他較佳之細菌疫苗包含源自嗜血桿菌屬(*Haemophilus spp.*)之抗原，該等嗜血桿菌包括B型流感嗜血桿菌(*H. influenzae type B*)(例如，PRP及其偶聯物)、非定型流感嗜血桿菌(*nontypeable H. influenzae*)(例如，OMP26)、高分子量黏附素、P5、P6、蛋白D及脂蛋白D、及絲束蛋白及絲束蛋白衍生肽(美國專利第5,843,464號)或其多次拷貝變體或融合蛋白。

B型肝炎表面抗原之衍生物已為相關技藝所熟知且尤其包括歐洲專利申請案EP-A414 374、EP-A-0304 578及EP 198474中所述彼等PreS1、Pars2 S抗原。在一個較佳態樣中，尤其當在CHO細胞中表現時，本發明之疫苗調配物包含HIV-1抗原、gp120。在又一實施例中，本發明之疫苗調配物包含gD2t，如上文所定義。

在本發明之一較佳實施例中，含有所主張佐劑之疫苗包含源自被視為可造成生殖器疣之人類乳頭瘤病毒(HPV)(HPV 6或HPV 11及其他)、及可造成子宮頸癌之HPV

病毒(HPV16、HPV18及其他)的抗原。生殖器疣預防性或治療性疫苗之尤佳形式包含L1粒子或殼粒、及包含選自HPV 6及HPV 11蛋白質E6、E7、L1及L2之一或多種抗原的融合蛋白。融合蛋白之某些較佳形式包括如WO 96/26277中所揭示L2E7、及如GB 9717953.5 (PCT/EP98/05285)中所揭示蛋白D(1/3)-E7。較佳HPV子宮頸感染或癌症之預防性或治療性疫苗可包含HPV 16或18抗原。舉例而言，L1或L2抗原單體、或L1或L2抗原一起作為病毒樣粒子(VLP)存在或單獨的L1蛋白單獨存於VLP或殼粒結構中。此等抗原、病毒樣粒子及殼粒本身為已知。參見，例如，WO 94/00152、WO 94/20137、WO 94/05792及WO 93/02184。

舉例而言，額外早期蛋白可單獨包括或以融合蛋白(例如，E7、E2或較佳F5)形式包括；尤佳實施例包括包含L1E7融合蛋白之VLP (WO 96/11272)。尤佳HPV 16抗原包含與蛋白D載體融合以自HPV 16形成蛋白D-E6或E7融合體之早期蛋白E6或E7、或其組合；或E6或E7與L2之組合(WO 96/26277)。或者，HPV 16或18早期蛋白E6及E7可以單一分子(較佳為蛋白D-E6/E7融合體)形式存在。該疫苗可視情況含有來自HPV 18之E6及E7蛋白中的任一種或兩種，較佳地，呈蛋白D-E6或蛋白D-E7融合蛋白或蛋白D E6/E7融合蛋白形式。本發明之疫苗可額外包含來自其他HPV菌株、較佳來自菌株HPV 31或33之抗原。

本發明之疫苗進一步包含源自引發瘧疾之寄生蟲的抗原。舉例而言，來自惡性瘧原蟲之較佳抗原包括RTS,S及

TRAP。RTS係一種雜合蛋白，其實質上包含經由B型肝炎表面抗原preS2部分之四個胺基酸連接至B型肝炎病毒表面(S)抗原的惡性瘧原蟲環孢子(CS)蛋白之所有C-末端部分。其全結構揭示於國際專利申請案第PCT/EP92/02591中，公開為主張英國專利申請案第9124390.7號之優先權的WO 93/10152。當在酵母中表現時，RTS以脂蛋白粒子形式產生，且當其與來自HBV之S抗原共表現時，其產生稱為RTS,S之混合粒子。

TRAP抗原闡述於公開為WO 90/01496之國際專利申請案第PCT/GB89/00895號中。本發明之一較佳實施例係瘧疾疫苗，其中抗原性製劑包含RTS,S與TRAP抗原之組合。可能為多級瘧疾疫苗之組份的候選物的其他瘧原蟲抗原係惡性瘧原蟲MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、鉗合蛋白、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27125、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230及其在瘧原蟲屬中之相似物。

因此，某些本文所揭示實施例涵蓋源自至少一種感染病原體之抗原，該等病原體係例如細菌、病毒或真菌，包括放線細菌(Actinobacterium)，例如結核分枝桿菌或麻風分枝桿菌或另一分枝桿菌；細菌，例如屬沙門氏菌、奈瑟菌、疏螺旋體、衣原體或博德氏桿菌之一員；病毒，例如單純皰疹病毒、人類免疫缺陷病毒(HIV)、貓免疫缺陷病毒(FIV)、巨細胞病毒、水痘-帶狀皰疹病毒、肝炎病毒、愛潑斯坦巴爾病毒(EBV)、呼吸道合胞病毒、人類乳頭瘤

病毒(HPV)及巨細胞病毒；HIV，例如HIV-1或HIV-2；真菌，例如曲黴菌屬(*Aspergillus*)、芽生菌屬(*Blastomyces*)、球孢菌屬(*Coccidioides*)及肺囊蟲屬或酵母，包括念珠菌物種，例如白色念珠菌、光滑球念珠菌(*C. glabrata*)、克柔念珠菌(*C. krusei*)、魯希特念珠菌(*C. lusitaniae*)、熱帶念珠菌(*C. tropicalis*)及近平滑假絲酵母(*C. parapsilosis*)；寄生蟲，例如原蟲，例如，瘧原蟲物種，包括惡性瘧原蟲、間日瘧原蟲(*P. vivax*)、三日瘧原蟲(*P. malariae*)及卵形瘧原蟲(*P. ovale*)；或另一寄生蟲，例如棘阿米巴屬(*Acanthamoeba*)、溶組織內阿米巴、管圓線蟲屬(*Angiostrongylus*)、曼森血吸蟲、埃及血吸蟲、日本血吸蟲、隱孢子蟲屬(*Cryptosporidium*)、鉤口線蟲屬(*Ancylostoma*)、溶組織內阿米巴、結腸內阿米巴(*Entamoeba coli*)、迪斯帕內阿米巴(*Entamoeba dispar*)、哈氏內阿米巴(*Entamoeba hartmanni*)、波氏內阿米巴(*Entamoeba polecki*)、班氏吳策線蟲、賈第蟲及利什曼原蟲中之一或更多者。

舉例而言，在含有源自疏螺旋體屬之抗原的含GLA之疫苗實施例中，抗原可包括核酸、病原體衍生之抗原或抗原性製劑、重組製造之蛋白或肽、及嵌合融合蛋白。一種此抗原係OspA。OspA由於其在宿主細胞(Lipo-OspA)中生物合成可為呈脂質化形式之完全成熟蛋白或另一選擇可為非脂質化衍生物。該等非脂質化衍生物包括非脂質化NS1-OspA融合蛋白，其具有流行性感冒病毒之非結構蛋白

(NS1)的前81個N-端胺基酸、及完全OspA蛋白，且另一MDP-OspA係攜帶3個額外N-端胺基酸之OspA的非脂質化形式。

鑒定患有或懷疑處於感染如本文所述感染病原體之風險的個體之組合物及方法已為相關技藝所知。

舉例而言，細菌結核分枝桿菌引起結核病(TB)。細菌通常襲擊肺但亦可襲擊腎、脊柱及腦。若不經適當治療，則TB疾病可為致命的。當感染者打噴嚏或咳嗽時，該疾病通過空氣在人之間傳播。2003年，美國報告了14,000例以上TB病例。

儘管通常可使用長期抗生素療法控制結核病，但該治療不足以防止疾病傳播且存在關於抗生素抗性菌株之有效選擇的問題。感染個體可無症狀，但有時有傳染性。另外，儘管與治療方案之順應性至關重要，但難以監測患者行為。一些患者未完成治療過程，此可導致無效治療並形成藥物抗性。(例如，美國專利第7,087,713號)

目前，利用活細菌疫苗接種係誘發抵抗結核病之保護性免疫力的最有效方法。出於此目的採用之最常見分枝桿菌係卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*) (BCG)，一種牛分枝桿菌(*Mycobacterium bovis*)之無毒性菌株。然而，BCG之安全及功效係爭論之來源且一些國家(例如美國)不對普通大眾進行接種。通常使用皮膚測試達成診斷，該測試涉及皮內暴露於結核菌素PPD(蛋白純化衍生物)。抗原特異性T細胞應答在注射後48至72小時於注射位點處產生可量測之

硬結，此指示暴露於分枝桿菌抗原中。然而，敏感性及特异性已經成為此測試之問題，且不能將接種BCG之個體與感染個體區分開。(例如，美國專利第7,087,713號)

儘管已顯示巨噬細胞可起結核分枝桿菌免疫之主要效應劑的作用，但T細胞係該免疫之重要誘發劑。T細胞在抵抗結核分枝桿菌感染中之基本作用係藉由AIDS患者中結核分枝桿菌之頻繁出現闡釋，此頻繁出現係由於與人類免疫缺陷病毒(HIV)感染相關之CD4 T細胞耗盡。已顯示分枝桿菌反應性CD4 T細胞為干擾素- γ (IFN- γ)之強效產生者，已顯示其進而觸發小鼠中巨噬細胞之抗分枝桿菌效應。儘管干擾素- γ 在人類中之作用尚較不清楚，但研究已顯示1,25-二羥基-維他命D3單獨或與IFN- γ 或腫瘤壞死因子- α 組合可活化人類巨噬細胞以抑制結核分枝桿菌感染。此外，已知IFN- γ 刺激人類巨噬細胞以產生1,25-二羥基-維他命D3。類似地，已顯示IL-12在刺激對結核分枝桿菌感染之抗性中起作用。關於結核分枝桿菌感染之免疫學的綜述，參見Chan及Kaufmann，*Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Bloom(編輯)，ASM Press. Washington, D.C. (1994)。

用於診斷結核病或誘發抵抗結核病之保護免疫力的現有化合物及方法包括使用含有一或多種分枝桿菌蛋白之至少一免疫原性部分及編碼該等多肽之DNA分子的多肽。含有該等多肽或DNA序列及適宜檢測試劑之診斷套組可用於檢測患者及生物試樣中之分枝桿菌感染。亦提供針對該等多

肽之抗體。另外，可將該等化合物調配成用於抵抗分枝桿菌感染之免疫的疫苗及/或醫藥組合物。(美國專利第6,949,246號及第6,555,653號)。

20世紀60年代，瘧疾曾在世界的許多地方銷聲匿跡，但現在此疾病仍然存在且出現了此疾病抗現有藥物之新菌株。在90個以上國家中，瘧疾係主要公共健康問題。瘧疾之十分之九的病例發生於撒哈拉以南非洲。三分之一以上之世界人口處於風險中，且每年3.5億與5億之間之人受瘧疾感染。今年有4500萬妊娠女性處於感染瘧疾之風險中。在彼等已感染之個體中，每年有100萬以上彼等感染者死於此可預防性疾病。大多數彼等死亡者係非洲之兒童。

當人被已感染之雌性按蚊(*Anopheles mosquito*)叮咬時，通常會傳播瘧疾。為了傳染，蚊必須自己感染瘧疾之人體吸取血液而被感染。瘧疾係由寄生蟲引發且該疾病之臨床症狀包括發熱及流感樣疾病，例如寒戰、頭痛、肌肉酸痛及疲勞。該等症狀可能伴有噁心、嘔吐及腹瀉。瘧疾由於紅血細胞之損失亦可引發貧血及黃疸。感染一種類型瘧疾(惡性瘧原蟲)若不及時治療可引發腎衰竭、癲癇發作、精神錯亂、昏迷及死亡。

已知一種活體外診斷個體瘧疾之方法，其包括由取自個體之組織或生物體液與分子或多肽組合物在可使該組合物與可能存在於組織或生物體液中之抗體之間發生活體外免疫反應的條件下接觸，其中該分子或多肽組合物包含帶有由惡性瘧原蟲之感染活性所產生蛋白質之一或多個T抗原

決定基之所有或一部分的一或多種肽序列，並於活體外檢測所形成抗原-抗體複合物(參見，例如，美國專利第7,087,231號)。

已闡述重組惡性瘧原蟲(3D7) AMA-1胞外結構域之表現及純化。先前方法已產生高度純化蛋白質，其保留天然分子之摺疊及二硫鍵橋。重組AMA-1適用為診斷試劑且適用於生產抗體，並可單獨作為蛋白質或作為疫苗之一部分用於預防瘧疾。(美國專利第7,029,685號)

相關技藝曾闡述編碼物種特異性間日瘧原蟲瘧疾肽抗原之聚核苷酸，其係易感性哺乳動物宿主在感染後分泌至血漿中之蛋白質或蛋白質片段，因為其具有針對該等抗原之單株或多株抗體。在用於診斷瘧疾、以及確定間日瘧原蟲是否為造成感染之物種之分析法中利用肽抗原、單株抗體、及/或多株抗體。(美國專利第6,706,872號)。亦已報告物種特異性間日瘧原蟲瘧疾肽抗原，其係易感性哺乳動物宿主在感染後分泌至血漿中之蛋白質或蛋白質片段，因為其具有針對該等抗原之單株或多株抗體。在用於診斷瘧疾、以及確定間日瘧原蟲是否是造成感染之物種之分析中利用肽抗原、單株抗體、及/或多株抗體(參見，例如，美國專利第6,231,861號)。

重組惡性瘧原蟲(3D7) AMA-1胞外結構域亦藉由產生高度純化蛋白質之方法表現，該蛋白質保留天然分子之摺疊及二硫鍵橋。重組AMA-1用作診斷試劑用於抗體生產且用作疫苗。(美國專利第7,060,276號)。類似已知重組惡性瘧

原蟲(3D7) MSP-1₄₂之表現及純化，其保留天然分子之摺疊及二硫鍵橋。重組MSP-1₄₂用作診斷試劑用於抗體生產且用作疫苗。(美國專利第6,855,322號)

因而，根據該等及相關揭示內容，已知檢測人類瘧疾感染以鑒定患有或懷疑處於感染瘧疾感染病原體之風險的個體之診斷方法。具體而言，例如，組合血樣與含有3-乙酰基吡啶腺嘌呤二核苷酸(APAD)、基質(例如，乳酸鹽或乳酸)及緩衝液之試劑。試劑經設計以檢測由瘧疾寄生蟲產生之獨特糖酵解酶的存在性。此酶稱為寄生蟲乳酸脫氫酶(PLDH)。使用上述試劑可容易區別PLDH與宿主LDH。試劑與寄生蟲化血樣組合可還原APAD。然而，APAD不被宿主LDH還原。隨後可藉由各種技術(包括光譜、螢光、電泳、或比色分析)檢測經還原APAD。以上述方式檢測經還原APAD會提供瘧疾感染之陽性指示(例如，美國專利第5,124,141號)。在診斷瘧疾之另一方法中，在測試試樣中藉由抗多肽或與多肽反應之特異性抗體辨識包含源自惡性瘧原蟲抗原GLURP之特徵胺基酸序列的多肽。(美國專利第5,231,168號)

利什曼病係在印度半島、非洲及拉丁美洲廣泛傳播之寄生蟲疾病與頻發流行病且具有疫苗開發之世界衛生組織(World Health Organization)優先權。併發不同疾病時，利什曼原蟲寄生蟲會引發內臟器官之致命感染以及嚴重皮膚疾病。利什曼病之一種最具破壞性形式係鼻及口之毀損面容感染。利什曼病之病例數正逐步增加，且現在在許多地

區失去控制。利什曼病由於HIV感染亦在一些發達國家(尤其南歐洲)上升。可用之藥物具有毒性、昂貴且需要長期每日注射。

利什曼原蟲係棲息於免疫系統之巨噬細胞或白血細胞之原蟲寄生蟲。該等寄生蟲藉由小吸血昆蟲(白蛉)之叮咬傳播，該等昆蟲由於棲息於行星之廣大區域而難以控制。

內臟利什曼病係三種疾病表現之最危險者。估計每年出現約500,000內臟形式新病例(黑熱病(kala-azar)或「殺人疾病」)。目前2億以上人處於感染內臟利什曼病之風險。90%以上內臟利什曼病病例出現於印度、孟加拉國、蘇丹、巴西及尼泊爾。大多數死亡出現於兒童中。彼等具有皮膚形式者經常永久性毀損面部。

利什曼原蟲感染難以診斷且通常涉及活組織檢查樣本之組織病理分析。然而，已開發若干血清學及免疫診斷分析。(美國專利第7,008,774號；Senaldi等人，(1996) *J. Immunol. Methods* 193:9 5；Zijlstra等人，(1997) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:671 673；Badaro等人，(1996) *J. Inf. Dis.* 173:758 761；Choudhary, S.等人，(1992) *J. Comm. Dis.* 24:32 36；Badaro, R.等人，(1986) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:72 78；Choudhary, A.等人，(1990) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84:363 366；及Reed, S. G.等人，(1990) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:632 639)。前鞭毛體釋放代謝產物至培養基中以產生條件培養基。該等代謝產物對宿主具有免疫原性。參見Schnur, L. F.等人，(1972) *Isrl. J. Med. Sci.* 8:932 942；

Sergeiev, V. P.等人，(1969) Med. Parasitol. 38:208 212；
El-On, J.等人，(1979) Exper. Parasitol. 47:254 269；及
Bray, R. S.等人，(1966) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.
60:605 609；美國專利第 6,846,648 號；美國專利第
5,912,166 號；美國專利第 5,719,263 號；美國專利第
5,411,865)。

全世界約有 4000 萬人感染 HIV，其係一種引發 AIDS 之病毒。每年約 300 萬人死於此疾病，其中 95% 在發展中國家。每年，接近 500 萬人感染 HIV。目前，撒哈拉以南非洲負擔最高疾病負荷，但其快速傳播至其他國家，例如印度、中國及俄羅斯。流行病在少數人群中快速生長。在美國，自 1981 年以來已報告 950,000 例以上 AIDS。AIDS 在人最具生產年期間擊中其。女性出於生物及社會原因具有 HIV/AIDS 之增大風險。

AIDS 係由人類免疫缺陷病毒(HIV)引發，其殺死並損害身體免疫系統之細胞並漸進性破壞身體對抗感染及某些癌症之能力。HIV 最常見係藉由與感染伴侶無預防措施之性交傳播。此問題之最有力解決方案係防止病毒傳播。製備安全、有效且負擔得起之 HIV 疫苗係達成此目的之一種方式。在全世界，處於 HIV 感染之高風險的五分之一以下人獲得有效預防。

診斷 HIV 感染之方法已知，包括藉由病毒培養、自患者樣品 PCR 限定核酸序列、及抗體測試患者血清中抗-HIV 抗體之存在性(參見，例如，美國專利第 6,979,535 號、第

6,544,728 號、第 6,316,183 號、第 6,261,762 號、第 4,743,540 號)。

根據本文所揭示某些其他實施例，疫苗組合物及相關調配物及使用方法可包括源自癌症細胞之抗原，如同可用於癌症之免疫療法治療一樣。舉例而言，發現佐劑調配物可與腫瘤排斥抗原(例如，彼等對於前列腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、胰腺癌、腎癌或黑素瘤癌之抗原)一起使用。例示性癌症或癌症細胞衍生之抗原包括 MAGE 1、3 及 MAGE 4 或其他 MAGE 抗原(例如彼等揭示於 WO99/40188 中者)、PRAME、BAGE、Lage(亦稱作 NY Eos 1)SAGE 及 HAGE (WO 99/53061)或 GAGE(Robbins 及 Kawakami, 1996 *Current Opinions in Immunology* 8, 第 628-636 頁；Van den Eynde 等人, *International Journal of Clinical & Laboratory Research*(1997 及 1998)；Correale 等人(1997), *Journal of the National Cancer Institute* 89, 第 293 頁)。癌症抗原之該等非限制性實例在多種腫瘤類型(例如，黑素瘤、肺癌、肉瘤及膀胱癌)中表現。參見，例如，美國專利第 6,544,518 號。

適於與某些本發明所揭示實施例之 GLA 一起使用之其他腫瘤特異性抗原包括(但不限於)腫瘤特異性或腫瘤相關性神經節苷脂，例如 GM₂、及 GM₃ 或其與載體蛋白之偶聯物；或用於 GLA 疫苗組合物以激發或增強抗癌免疫應答之抗原可為自體肽激素，例如全長促性腺激素釋放激素(GnRH, WO 95/20600)，其為 10 個胺基酸長之短肽，且可

用於多種癌症治療。在另一實施例中，使用前列腺抗原，例如前列腺特異性抗原(PSA)、PAP、PSCA(例如，*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95(4) 1735-1740 1998)、PSMA，或在一較佳實施例中為稱作前列腺酶之抗原。(例如，Nelson等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96: 3114-3119；Ferguson等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999. 96, 3114-3119；WO 98/12302；美國專利第 5,955,306 號；WO 98/20117；美國專利第 5,840,871 號及第 5,786,148 號；WO 00/04149。其他前列腺特異性抗原自 WO 98/137418 及 WO/004149 已知。另一者係 STEAP (*PNAS* 96 14523 14528 7-12 1999)。

可用於本發明上下文中之其他腫瘤相關抗原包括：Plu-1 (*J Biol. Chem* 274 (22) 15633 -15645, 1999)、HASH-1、HasH-2、Cripto(Salomon等人，*Bioessays* 199, 21:61-70，美國專利第 5,654,140 號)及 Criptin(美國專利第 5,981,215 號)。另外，與癌症療法中之疫苗尤其相關之抗原亦包含酪胺酸酶及存活素。

關於含有 GLA 且包含癌症抗原之疫苗組合物的本文所揭示實施例可用於抵抗任一癌症，其特徵在於腫瘤相關抗原表現，例如 HER-2/neu 表現或其他癌症特異性或癌症相關性抗原。

患有癌症或懷疑處於患有癌症之風險之個體的診斷可藉由多種相關技藝接受之方法的任一者來完成，該等方法可端視包括臨床表現、癌症進程程度、癌症類型及其他因素

之多種因素有所變化。癌症診斷之實例包括患者試樣(例如，血液、皮膚活檢、其他組織活檢、手術樣品等)之組織病理學、組織細胞化學、免疫組織細胞化學及免疫組織病理學檢驗、界定基因(例如，核酸)標記之PCR測試、循環癌症相關性抗原或帶有該等抗原之細胞、或界定特異性之抗體的血清學測試、或彼等熟習此項技術者熟悉之其他方法。參見，例如，美國專利第6,734,172號；第6,770,445號；第6,893,820號；第6,979,730號；第7,060,802號；第7,030,232號；第6,933,123號；第6,682,901號；第6,587,792號；第6,512,102號；第7,078,180號；第7,070,931號；JP5-328975；Waslylyk等人，1993 *Eur. J Bioch.* 211(7):18。

本發明某些實施例之疫苗組合物及方法亦可用於自身免疫疾病之預防或治療，該等疾病包括其中宿主或個體之免疫系統有害地調介免疫應答之疾病、病況或病症，該免疫應答係針對「自身」組織、細胞、生物分子(例如，肽、多肽、蛋白質、糖蛋白、脂蛋白、蛋白脂、脂質、糖脂、核酸(例如RNA及DNA)、寡糖、多糖、蛋白多糖、葡糖胺聚糖、或諸如此類、及個體細胞及組織之其他分子組份)或抗原決定基(例如，特異性免疫界定辨識結構，例如彼等藉由抗體可變區互補決定區(CDR)或T細胞受體CDR辨識者)。

因而，自身免疫疾病之特徵在於涉及細胞或抗體之異常免疫應答，其在任一情形下係針對正常自身組織。哺乳動

物中之自身免疫疾病通常可以兩種不同類別中之一者來分類：細胞調介之疾病(即，T細胞)或抗體調介之病症。細胞調介之自身免疫疾病的非限制性實例包括多發性硬化、類風濕性關節炎、橋本甲狀腺炎(Hashimoto thyroiditis)、I型糖尿病(青少年型糖尿病)及自身免疫性葡萄膜視網膜炎。抗體調介之自身免疫病症包括(但不限於)重症肌無力、全身性紅斑狼瘡(或SLE)、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、自身免疫性溶血性貧血、自身免疫性血小板減少症、自身免疫性哮喘、冷球蛋白血症、血小板減少性紫斑症、原發性膽道硬化及惡性貧血。與以下相關之該(等)抗原：全身性紅斑狼瘡係小核糖核酸蛋白(snRNP)；格雷夫斯氏病係促甲狀腺受體、甲狀腺球蛋白及甲狀腺上皮細胞之其他組份(Akamizu等人，1996；Kellerman等人，1995；Raju等人，1997；及Texier等人，1992)；天皰瘡係鈣依黏連蛋白樣天皰瘡抗原，例如橋粒核心糖蛋白3及其他黏著分子(Memar等人，1996；Stanley，1995；Plott等人，1994；及Hashimoto，1993)；且血小板減少性紫斑症係血小板之抗原。(參見，例如，美國專利第6,929,796號；Gorski等人(編輯)，*Autoimmunity*，2001，Kluwer Academic Publishers，Norwell，MA；Radbruch及Lipsky，P.E.(編輯) *Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation (Curr. Top. Microbiol. and Immunol.)* 2001，Springer，NY)。

自身免疫在80種以上不同疾病(包括1型糖尿病、多發性

硬化、狼瘡、類風濕性關節炎、硬皮病及甲狀腺疾病)中起作用。缺乏對大多數自身免疫疾病之發病率的強烈定量估計。20世紀90年代後期實施之最近研究揭示，在美國，自身免疫疾病係第三大最常見主要疾病；且最常見自身免疫疾病影響850萬以上美國人。當前估計該疾病之患病率在5%至8%美國人群範圍內。大多數自身免疫疾病對女性之影響特別嚴重。女性獲得自身免疫疾病之可能比男性大2.7倍。女性更易受自身免疫疾病之影響；男性似乎比女性具有較高位準之天然殺傷細胞活性。(Jacobsen等人，*Clinical Immunology and Immunopathology*, 84:223-243, 1997)。

當免疫系統將自身組織誤以為非自身組織且發動不適當攻擊時，發生自身免疫疾病。身體可以不同方式受自身免疫疾病之影響，包括(例如)腸(克羅恩氏病(Crohn's disease))及腦(多發性硬化)。已知自身抗體攻擊自身細胞或自身組織而損傷其功能且結果引發自身免疫疾病，且可在自身免疫疾病實際發生(例如，出現臨床跡象及症狀)之前在患者血清中檢測到自身抗體。因而，自身抗體之檢測使得可早期發現或辨識自身免疫疾病之存在或其發育之風險。基於該等發現，已發現各種抵抗自身抗原之自身抗體且已在臨床測試中量測抵抗自身抗原之自身抗體(例如，美國專利第6,919,210號、第6,596,501號、第7,012,134號、第6,919,078號)，同時其他自身免疫診斷可涉及相關代謝產物(例如，美國專利第4,659,659號)或免疫反應性(例

如，美國專利第4,614,722號及第5,147,785號、第4,420,558號、第5,298,396號、第5,162,990號、第4,420,461號、第4,595,654號、第5,846,758號、第6,660,487)之檢測。

在某些實施例中，本發明組合物尤其適用於老年人及/或免疫抑制(包括進行腎透析之個體、進行化學療法及/或放射療法之個體、移植接受者及諸如此類)的治療。該等個體通常對疫苗呈現減少之免疫應答，且因此使用本發明組合物可增強該等個體中達成之免疫應答。

在其他實施例中，本發明組合物中所用該(等)抗原包括與呼吸性疾病(例如彼等由細菌感染(例如，肺炎球菌)引發或加劇之疾病)相關之抗原，其用於諸如慢性阻塞性肺病(COPD)等病況的預防及治療。COPD係藉由患有慢性支氣管炎及/或肺氣腫之患者中存在不可逆或部分可逆氣道阻塞而在生理上加以定義(Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov;152(5 Pt 2):S77-121)。COPD之惡化經常係由細菌(例如，肺炎球菌)感染引發(Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):336-63)。在一特定實施例中，本發明組合物包含如本文所述GLA佐劑、與肺炎球菌疫苗Pneumovax®(Wyeth)之組合。

在又一些實施例中，包含本文所述GLA之本發明組合物用於過敏病況之治療。舉例而言，在一特定實施例中，組合物用於過敏症脫敏療法。該療法涉及利用逐漸增大劑量之使人過敏之物質刺激免疫系統，其中該等物質調配於包含GLA之組合物中。在具體實施例中，組合物用於治療對

食品、花粉、蠕蟲、貓或有刺的昆蟲(例如，蜜蜂、大黃蜂、黃色胡蜂、黃蜂、蟻蜂、火蟻)之過敏症。

TLR

如本文所述，本發明之某些實施例涵蓋包括醫藥組合物在內之疫苗組合物及免疫佐劑組合物，該等組合物除本發明之該(等)GLA化合物外，亦包括一或多種類鐸受體激動劑(TLR激動劑)。類鐸受體(TLR)包括先天免疫系統之細胞表面跨膜受體，其賦予宿主細胞早期辨識各種保守微生物分子結構(例如可存在於大量感染病原體中或其上)之能力。(例如，Armant等人，2002 *Genome Biol.* 3(8):reviews3011.1-3011.6；Fearon等人，1996 *Science* 272:50；Medzhitov等人，1997 *Curr. Opin. Immunol.* 9:4；Luster 2002 *Curr. Opin. Immunol.* 14:129；Lien等人 2003 *Nat. Immunol.* 4:1162；Medzhitov, 2001 *Nat. Rev. Immunol.* 1:135；Takeda等人，2003 *Ann Rev Immunol.* 21:335；Takeda等人 2005 *Int. Immunol.* 17:1；Kaisho等人，2004 *Microbes Infect.* 6:1388；Datta等人 2003 *J. Immunol.* 170:4102)。

誘發TLR調介之信號轉導以經由先天免疫系統強化免疫應答的起始可由TLR激動劑實施，該等TLR激動劑接合細胞表面TLR。舉例而言，脂多糖(LPS)可為經由TLR2或TLR4之TLR激動劑(Tsan等人，2004 *J. Leuk. Biol.* 76:514；Tsan等人，2004 *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286:C739；Lin等人，2005 *Shock* 24:206)；聚(肌苷-胞苷)(聚I:C)可為經由TLR3之TLR激動劑(Salem等人，2006

Vaccine 24:5119)；CpG序列(含有未甲基化胞嘧啶-鳥嘌呤或「CpG」二核苷酸基元(例如CpG 7909)之寡聚去氧核苷酸，Cooper等人，2005 *AIDS* 19:1473；CpG 10101 Bayes等人，*Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27:193；Vollmer等人*Expert Opinion on Biological Therapy* 5:673；Vollmer等人，2004 *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2314；Deng等人，2004 *J. Immunol.* 173:5148)可為經由TLR9之TLR激動劑(Andaloussi等人，2006 *Glia* 54:526；Chen等人，2006 *J. Immunol.* 177:2373)；肽多糖可為TLR2及/或TLR6激動劑(Soboll等人，2006 *Biol. Reprod.* 75:131；Nakao等人，2005 *J. Immunol.* 174:1566)；3M003(4-胺基-2-(乙氧基甲基)- α,α -二甲基-6,7,8,9-四氫-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇水合物，Mol. Wt. 318 Da，來自3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN，其亦係相關化合物3M001及3M002之來源；Gorden等人，2005 *J. Immunol.* 174:1259)可為TLR7激動劑(Johansen 2005 *Clin. Exp. Allerg.* 35:1591)及/或TLR8激動劑(Johansen 2005)；鞭毛蛋白可為TLR5激動劑(Feuillet等人，2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:12487)；且C型肝炎抗原可經由TLR7及/或TLR9起TLR激動劑之作用(Lee等人，2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:1828；Horsmans等人，2005 *Hepatol.* 42:724)。已知其他TLR激動劑(例如，Schirmbeck等人，2003 *J. Immunol.* 171:5198)且可根據某些本發明所述實施例使用。

舉例而言，且藉助背景(參見，例如，美國專利第6,544,518

號)，含有未甲基化CpG二核苷酸(「CpG」)之免疫刺激性寡核苷酸在藉由全身及黏膜途徑投與時稱作佐劑(WO 96/02555, EP 468520, Davis等人, *J. Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie及Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6)。CpG係存於DNA中之胞嘧啶-鳥嘌呤二核苷酸基元之縮寫。CG基元在免疫刺激中之主要作用由Krieg(*Nature* 374, 第546頁, 1995)闡明。詳細分析已顯示CG基元必須處於某一序列文本中且該等序列在細菌DNA中常見但在脊椎動物DNA中罕見。免疫刺激序列通常為：嘌呤、嘌呤、C、G、嘧啶、嘧啶；其中二核苷酸CG基元未經甲基化，但已知其他未甲基化CpG序列具有免疫刺激性且可用於本發明之某些實施例中。當將CpG調配於疫苗中時，其可於游離溶液中與游離抗原一起投與(WO 96/02555; McCluskie及Davis, 如上文所述)，或共價結合至抗原(PCT公開案第WO 98/16247號)或與諸如氫氧化鋁等載劑一起調配(例如，Davis等人，如上文所述，Brazolot-Millan等人, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, 95(26), 15553-8)。

用於本發明佐劑或疫苗中之較佳寡核苷酸較佳含有由至少三個、更佳至少6個或更多個核苷酸分離之兩個或更多個二核苷酸CpG基元。本發明寡核苷酸通常為去氧核苷酸。在一較佳實施例中，寡核苷酸中之間核苷酸係二硫代磷酸酯、或更佳硫代磷酸酯鍵，但磷酸二酯及其他核苷酸間鍵(包括具有混合核苷酸間鍵合之寡核苷酸鍵)屬於本發

明範疇，。製造硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯之方法闡述於美國專利第5,666,153號、第5,278,302號及WO 95/26204中。

較佳寡核苷酸之實例具有揭示於以下公開案中之序列；對於某些本文所揭示實施例而言，序列較佳含有經硫代磷酸酯修飾之核苷酸間鍵合：

CPG 7909：Cooper等人，「CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults」。 *AIDS*，2005年9月23日；19(14):1473-9。

CpG 10101：Bayes等人，「Gateways to clinical trials.」 *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2005年4月；27(3):193-219。

Vollmer J., 「Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9.」 *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2005年5月；5(5):673-682。

替代CpG寡核苷酸可包含上文所列舉公開案中所述較佳序列的變體，不同之處在於其中具有不連貫核苷酸序列取代、插入、缺失及/或添加。用於本發明之某些實施例的CpG寡核苷酸可藉由相關技藝已知之任一方法來合成(例如EP 468520)。為方便起見，該等寡核苷酸可利用自動合成器來合成。寡核苷酸通常為去氧核苷酸。在一較佳實施例中，寡核苷酸中之核苷酸間鍵係二硫代磷酸酯、更佳硫代磷酸酯鍵，但磷酸二酯亦屬於本發明涵蓋之實施例的範疇。本發明亦涵蓋包含不同核苷酸間鍵合(例如混合硫代

磷酸酯磷酸二酯鍵)之寡核苷酸。亦可使用穩定寡核苷酸之其他核苷酸間鍵。

共佐劑

本文所提供某些實施例包括含有醫藥組合物在內之疫苗組合物及免疫佐劑組合物，該等醫藥組合物除該(等)GLA化合物外，亦含有至少一種共佐劑，該佐劑係指具有除GLA外之佐劑活性的該等組合物之組份。具有該佐劑活性之共佐劑包括當投與具有辨識免疫系統的個體(例如，人類(例如，人類患者)、非人靈長類、哺乳動物或另一較高等真核有機體)時能夠改變(即，以統計學顯著方式增加或降低，且在某些較佳實施例中，增強或增加)免疫應答之效能及/或壽命的組合物。(參見，例如，Powell及Newman，「Vaccine design-The Subunit and Adjuvant Approach」，1995, Plenum Press, New York)。在本文所揭示某些實施例中，GLA及期望抗原及視情況一或多種共佐劑可如此改變(例如，激發或增強)免疫應答，其針對可與GLA同時投與或可在投與時有時間及/或空間間隔(例如，在不同解剖位點處)的期望抗原，但某些本發明實施例並不意欲限於此且因而亦涵蓋組合物中之GLA的投與，該組合物並不包括指定抗原但亦可包括一或多種TLR激動劑、共佐劑、咪唑并喹啉免疫應答調節劑、及雙莖環免疫調節劑(dSLIM)。

因此且如上文所述，共佐劑包括不為GLA且具有佐劑效應之組合物，例如皂苷及皂苷模擬物，包括QS21及QS21模擬物(參見，例如，美國專利第5,057,540號；EP 0 362

279 B1；WO 95/17210)、明礬、植物生物鹼(例如，蕃茄素)、洗滌劑(例如但不限於，皂苷、聚山梨醇酯80、Span 85及硬脂基酪胺酸)、一或多種細胞因子(例如，GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、TNF- α 、IFN- γ)、咪唑并喹啉免疫應答調節劑、及雙莖環免疫調節劑(dSLIM，例如，Weeratna等人，2005 *Vaccine* 23:5263)。

包括皂苷之洗滌劑教示於(例如)美國專利第6,544,518號；Lacaille-Dubois, M及Wagner H. (1996 *Phytomedicine* 2:363-386)，美國專利第5,057,540號，Kensil, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55、及EP 0 362 279 B1中。包含Quil A(皂苷)流份之顆粒結構(稱為免疫刺激複合物(ISCOMS))具有溶血性且已用於疫苗之生產(Morein, B., EP 0 109 942 B1)。已報告該等結構具有佐劑活性(EP 0 109 942 B1；WO 96/11711)。溶血性皂苷QS21及QS17(經HPLC純化之Quil A流份)已被闡述為強效全身性佐劑，且其生產方法揭示於美國專利第5,057,540號及EP 0 362 279 B1中。在該等參考文獻中亦闡述了用作全身疫苗強效佐劑之QS7 (Quil-A之非溶血性流份)的用途。QS21之用途進一步闡述於Kensil等人(1991. *J. Immunology* 146:431-437)中。QS21與聚山梨醇酯或環糊精之組合亦已知(WO 99/10008)。包含QuilA流份(例如QS21及QS7)之顆粒佐劑系統闡述於WO 96/33739及WO 96/11711中。用於全身性疫苗接種研究之其他皂苷包括彼等源自其他植物物種(例如絲石竹屬(*Gypsophila*)及肥皂草屬(*Saponaria*))者

(Bomford 等人，*Vaccine*, 10(9):572-577, 1992)。

七葉素(escin)係與用於本文所揭示實施例之佐劑組合物中之皂苷相關的另一洗滌劑。七葉素作為出現於西洋栗樹(*horse chestnut tree*)、歐洲七葉樹(*Aesculus hippocastanum*)之種子中之皂苷混合物闡述於Merck index(第12版，條目3737)中。藉由層析及純化(Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213 (1953))、及離子交換樹脂(Erbring等人，美國專利第3,238,190號)對其分離進行闡述。七葉素(亦稱作七葉皂苷(aescin))之流份經純化且顯示具有生物活性(Yoshikawa M, 等人 (*Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996年8月；44(8): 1454-1464))。洋地黃皂苷(digitonin)係另一洗滌劑，亦作為皂苷闡述於Merck index(第12版，條目3204)中，其源自毛地黃(*Digitalis purpurea*)之種子且根據由Gisvold等人，*J. Am. Pharm. Assoc.*, 1934, 23, 664；及Rubenstroth-Bauer, *Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621闡述之程序進行純化。

根據某些本文所揭示實施例使用之其他共佐劑包括嵌段共聚物或生物可降解聚合物，其係指彼等相關技術中者熟悉之聚合化合物的類別。可包括於GLA疫苗組合物或GLA免疫佐劑中之嵌段共聚物或生物可降解聚合物的實例包括Pluronic® L121(BASF公司，Mount Olive, NJ；參見，例如，Yeh等人，1996 *Pharm. Res.* 13:1693；美國專利第5,565,209號)、CRL1005(例如，Triozi等人，1997 *Clin Canc. Res.* 3:2355)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(乳酸)(PLA)、聚-(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLG)、及聚I:C.(參

見，例如，Powell and Newman, 「Vaccine design-The Subunit and Adjuvant Approach」, 1995, Plenum Press, New York)。

某些實施例涵蓋包括油之GLA疫苗及GLA免疫佐劑，該油在一些該等實施例中可有利於共佐劑活性且在其他該等實施例中可額外或另一選擇為提供醫藥上可接受之載劑或賦形劑。任一數量之適宜油已知且可基於本發明經選擇以納入疫苗組合物及免疫佐劑組合物中。該等油之實例以闡釋性而非限制性方式包括角鯊烯、角鯊烷、礦物油、橄欖油、膽固醇、及二縮甘露醇單油酸酯。

免疫應答調節劑(例如咪唑并喹啉免疫應答調節劑)亦為相關技藝已知且在某些本發明揭示之實施例中亦可作為共佐劑包括於其中。某些較佳咪唑并喹啉免疫應答調節劑以非限制性實例方式包括瑞喹莫德(resiquimod) (R848)、咪喹莫德(imiquimod)及格敵喹莫德(gardiquimod)(Hemmi等人, 2002 *Nat. Immunol.* 3:196; Gibson等人, 2002 *Cell. Immunol.* 218:74; Gorden等人, 2005 *J. Immunol.* 174:1259); 該等及其他咪唑并喹啉免疫應答調節劑在適當條件下亦可具有如本文所述TLR激動劑活性。其他免疫應答調節劑係基於核酸之雙莖環免疫調節劑(dSLIM)。涵蓋用於某些本發明所揭示實施例中之dSLIM的具體實例可參見Schmidt等人, 2006 *Allergy* 61:56; Weihrauch等人 2005 *Clin Cancer Res.* 11(16):5993-6001; Modern Biopharmaceuticals, J. Knäblein(編輯)。John Wiley & Sons, 2005年12月6日。(dSLIM論述於第183至約200頁), 及來自Mologen AG (Berlin, FRG: [在

8/18/06 於 <http://www.molgen.com/English/04.20-dSLIM.shtml>
上線上檢索]。

亦如上文所述，與本文所述GLA一起使用之一種類型的共佐劑可為鋁共佐劑，其通常稱作「明礬」。明礬共佐劑係基於以下：羥基氧化鋁；羥基磷酸鋁；或各種專有鹽。使用明礬共佐劑之疫苗可包括用於破傷風菌株、HPV、A型肝炎、滅活脊髓灰質炎病毒及如本文所述其他抗原之疫苗。明礬共佐劑由於具有良好安全記錄、加強抗體應答、穩定抗原且對於大規模生產相對簡單而較為有利的。(Edelman 2002 *Mol. Biotechnol.* 21:129-148；Edelman, R. 1980 *Rev. Infect. Dis.* 2:370-383)。

可與GLA組合用於有效免疫刺激之其他共佐劑包括皂苷及皂苷模擬物，包括QS21及賦予類似效應且在本文中稱作QS21模擬物之結構上相關之化合物。QS21被視為較佳共佐劑。QS21可包含源自奎拉雅屬皂樹之樹皮的經HPLC純化之無毒性流份。QS21之生成揭示於美國專利第5,057,540號中。(亦參見美國專利第6,936,255號、第7,029,678號及第6,932,972號中)。

在某些實施例中，GLA亦可與稱作ISCOMS之「免疫刺激性複合物」(例如，美國專利第6,869,607號、第6,846,489號、第6,027,732號、第4,981,684號)(包括皂苷衍生之ISCOMATRIX®，其可自(例如)Iscotec (Stockholm, Sweden)及CSL有限公司(Parkville, Victoria, Australia)購得)組合。

重組表現構築體

根據某些本文所揭示實施例，GLA疫苗組合物可含有至少一種重組表現構築體，其包含可操作地連接至編碼抗原之核酸序列的啟動子。在某些其他實施例中，病毒載體(例如，腺病毒、腺相關病毒、皰疹病毒、慢病毒、痘病毒或逆轉錄病毒載體)中存在重組表現構築體。對於本文所提供多肽抗原之表現，製備及使用該等表現構築體及載體之組合物及方法已為相關技藝已知，根據(例如)Ausubel等人(編輯)，Current Protocols in Molecular Biology, 2006 John Wiley & Sons, NY。重組表現構築體之非限制性實例通常可參見(例如)美國專利第6,844,192號；第7,037,712號；第7,052,904號；第7,001,770號；第6,106,824號；第5,693,531號；第6,613,892號；第6,875,610號；第7,067,310號；第6,218,186號；第6,783,981號；第7,052,904號；第6,783,981號；第6,734,172號；第6,713,068號；第5,795,577號及第6,770,445號及別處，其中教示可適於如本文所提供多肽抗原之表現，其用於某些本發明所揭示實施例中。

免疫應答

本發明由此提供用於改變(即，例如，相對於熟習此項技術者熟知之適當對照，以統計學顯著方式增加或降低)能夠發動免疫應答之宿主中之免疫應答的組合物。如熟習此項技術者已知，免疫應答可為宿主之免疫狀態的任一活性改變，其可包括參與宿主免疫狀態之維持及/或調控的

一或多種組織、器官、細胞或分子之結構或功能的任一改變。通常，可藉由多種熟知參數中之任一者檢測免疫應答，該等參數包括但不限於以下之活體內或活體外測定：可溶性免疫球蛋白或抗體；可溶性調介子，例如細胞因子、淋巴因子、趨化因子、激素、生長因子及諸如此類以及其他可溶性小肽、碳水化合物、核苷酸及/或脂質調介子；細胞活化狀態變化，如由免疫系統之細胞的改變功能或結構性質所測定，例如，細胞增生、改變之運動、誘發特定活性，例如特異性基因表現或細胞溶解行為；由免疫系統之細胞的細胞分化，包括改變之表面抗原表現曲線或細胞凋亡(程序性細胞死亡)之起始；或可檢測免疫應答之存在性之任一其他標準。

免疫應答經常可被視為(例如)於分子及細胞層面下由宿主免疫系統之細胞及組織識別自身結構與非自身結構，但本發明不應限於此。舉例而言，免疫應答亦可包括免疫系統狀態變化，其係由自身分子、細胞或組織之免疫辨識產生，同時可伴隨任一數量之正常狀況(例如免疫系統組份之典型調控)，或可存在於病理狀況(例如，自身免疫及退化性疾病中觀察到之不適當自身免疫應答)中。作為另一實例，除藉由上調特定免疫系統活性(例如，抗體及/或細胞因子產生、或細胞調介之免疫力的活化)誘發外，免疫應答亦可包括可檢測免疫力之抑制、衰減或任一其他下調，其可為所選抗原、抗原投與路徑、特異性耐受力誘發或其他因素之結果。

由本發明疫苗誘發免疫應答之測定可由彼等熟習此項技術者容易熟悉之許多熟知免疫分析中之任一者來建立。該等分析包括(但無需限於)以下之活體內或活體外測定：可溶性抗體；可溶性調介子，例如細胞因子、淋巴因子、趨化因子、激素、生長因子及諸如此類以及其他可溶性小肽、碳水化合物、核苷酸及/或脂質調介子；細胞活化狀態變化，如由免疫系統之細胞的改變功能或結構性質所測定，例如，細胞增生、改變之運動、誘發特定活性，例如特異性基因表現或細胞溶解行為；由免疫系統之細胞的細胞分化，包括改變之表面抗原表現曲線或細胞凋亡(程序性細胞死亡)之起始。實施該等及類似分析之程序廣為人知且可參見(例如)Lefkovits (*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1998；亦參見 *Current Protocols in Immunology*；亦參見，例如，Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA；Mishell及 Shigii(編輯) *Selected Methods in Cellular Immunology*, 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA；Green 及 Reed, 1998 *Science* 281:1309及其中所引用之參考文獻)。

可藉由各種已知技術完成抗原反應性T細胞之增生的檢測。舉例而言，可藉由量測DNA合成速率檢測T細胞增生，且可藉由控制於其中暴露候選抗原反應性T細胞之刺激素(例如，特異性期望抗原或對照抗原脈衝之抗原呈遞細胞)來測定抗原特異性。經刺激以增生之T細胞呈現增大

之DNA合成速率。量測DNA合成速率之典型方式係(例如)藉由用經氚標記之胸苷脈衝標記T細胞之培養物，該經氚標記之胸苷係納入新合成DNA中之核苷前體。可使用液態閃爍分光光度計測定所納入經氚標記之胸苷的量。檢測T細胞增生之其他方式包括量測介白素-2 (IL-2)產生、 Ca^{2+} 通量、或染劑吸收(例如，3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-四唑鎢)之增加。或者，可量測淋巴因子(例如，干擾素- γ)之合成或可對可響應特定抗原之相對量之T細胞進行定量。

抗原特異性抗體產生之檢測可藉由以下達成：(例如)使用活體外方法(例如，放射免疫分析(RIA)、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、平衡透析法或固相免疫印記法(包括西方印記法(Western blotting))分析來自經本發明疫苗處理之宿主的試樣(例如，含有免疫球蛋白之試樣，例如血清、血漿或血液)。在較佳實施例中，ELISA分析可進一步包括目標抗原與對抗原具有特異性之固相單株抗體的抗原-捕獲固定以(例如)增強分析之敏感性。可溶性調介子(例如，細胞因子、趨化因子、淋巴因子、前列腺素等)之分泌亦可藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)使用(例如)容易自市售來源(例如，Sigma, St. Louis, MO；亦參見R & D Systems 2006 Catalog, R & D Systems, Minneapolis, MN)獲得之方法、設備及試劑容易地測定。

任何數量之其他免疫參數可使用相關技藝熟知之常規分析進行監測。該等分析可包括(例如)抗體依賴性細胞調介

之細胞毒性(ADCC)分析、活體外二級抗體應答、使用已建立良好之標記抗原系統的各種外周血液或淋巴單核細胞子群之流式免疫細胞螢光分析、免疫組織化學或其他相關分析。該等及其他分析可參見(例如)Rose等人 (編輯), *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 第5版, 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC。

因此, 預計本文所提供疫苗及佐劑組合物能夠激發或增強宿主中之至少一種免疫應答, 其係選自 T_H1 -型T淋巴細胞應答、 T_H2 -型T淋巴細胞應答、細胞毒性T淋巴細胞(CTL)應答、抗體應答、細胞因子應答、淋巴因子應答、趨化因子應答、及炎症應答。在某些實施例中, 免疫應答可包含以下之至少一種: 其中細胞因子係選自干擾素- γ (IFN- γ)、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)之一或複數個細胞因子的產生、其中介白素係選自IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-16、IL-18及IL-23之一或複數個介白素的產生、其中趨化因子係選自MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、CCL4及CCL5之一或複數個趨化因子的產生、及選自記憶T細胞應答、記憶B細胞應答、效應T細胞應答、細胞毒性T細胞應答及效應B細胞應答之淋巴細胞應答。參見, 例如, WO 94/00153; WO 95/17209, WO 96/02555, U.S. 6,692,752; U.S. 7,084,256; U.S. 6,977,073; U.S. 6,749,856; U.S. 6,733,763; U.S. 6,797,276; U.S. 6,752,995; U.S. 6,057,427; U.S. 6,472,515; U.S. 6,309,847; U.S. 6,969,704; U.S.

6,120,769 ; U.S. 5,993,800 ; U.S. 5,595,888 ; Smith 等人 , 1987 J Biol Chem. 262:6951 ; Kriegler 等人 , 1988 Cell 53:45 53 ; Beutler 等人 , 1986 Nature 320:584 ; U.S. 6,991,791 ; U.S. 6,654,462 ; U.S. 6,375,944 。

醫藥組合物

醫藥組合物通常包含至少一種本發明 GLA 化合物，且可進一步包含一或多種本文所提供組份，其選自(例如)抗原、TLR 激動劑、共佐劑(視情況包括細胞因子、咪唑并喹啉免疫應答調節劑及/或 dSLIM)、及/或重組表現構築體、與醫藥上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑之組合。

因此，在某些態樣中，本發明涉及 GLA 「單一療法」，其中將如本文所述 GLA 調配於實質上無其他抗原之組合物中，且出於治療或預防疾病或其他病況之目的(例如，用於治療被有機體感染，用於治療季節性鼻炎，或諸如此類)投與個體以刺激免疫應答(例如，非特異性免疫應答)。舉例而言，在一個實施例中，本發明之組合物及方法採用 GLA 化合物用於刺激個體中之免疫應答。在另一實施例中，GLA 係呈噴霧、視情況提供於套組中之形式。

可較佳將 GLA 調配於穩定乳液中。舉例而言，在一特定實施例中，提供包含存於實質上無其他抗原之穩定乳液中的本發明 GLA 化合物之組合物。

在某些其他實施例中，醫藥組合物係包含 GLA 及抗原二者之疫苗組合物，且可進一步包含一或多種本文所提供組份，其選自 TLR 激動劑、共佐劑(包括(例如)細胞因子、咪

唑并喹啉免疫應答調節劑及/或dSLIM)及諸如此類、及/或重組表現構築體、與醫藥上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑之組合。

闡釋性載劑在所用劑量及濃度下應對接受者無毒性。對於基於GLA-加-核酸之疫苗或對於包含GLA加上抗原之疫苗而言，通常藉由皮內、皮下、肌內或靜脈內路徑或藉由其他路徑一般投與約0.001 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 mg/kg 體重。

在一更具體實施例中，劑量係約0.001 $\mu\text{g/kg}$ 至約1 mg/kg 。在另一具體實施例中，劑量係約0.001 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 。在另一具體實施例中，劑量係約0.001 $\mu\text{g/kg}$ 至約15 $\mu\text{g/kg}$ 。

在另一具體實施例中，所投與GLA之量係約0.01 $\mu\text{g/劑量}$ 至約5 mg/劑量 。在另一具體實施例中，所投與GLA之量係約0.1 $\mu\text{g/劑量}$ 至約1 mg/劑量 。在另一具體實施例中，所投與GLA之量係約0.1 $\mu\text{g/劑量}$ 至約100 $\mu\text{g/劑量}$ 。在另一具體實施例中，所投與GLA係約0.1 $\mu\text{g/劑量}$ 至約10 $\mu\text{g/劑量}$ 。

熟習此項技術者應明瞭，投與之數量及頻率應端視宿主之反應而定。用於治療用途之「醫藥上可接受之載劑」已為醫藥技術所熟知且闡述於(例如)**Remingtons Pharmaceutical Sciences**, Mack Publishing公司(A.R. Gennaro編輯，1985)中。舉例而言，可使用生理pH下之無菌鹽水及磷酸鹽緩衝鹽水。醫藥組合物中可提供防腐劑、穩定劑、染劑及甚至矯味劑。舉例而言，可添加苯甲酸鈉、山梨酸及對羥基苯

甲酸之酯作為防腐劑。同一出處，於1449處。另外，可使用抗氧化劑及懸浮劑。同一出處。

「醫藥上可接受之鹽」係指源自該等化合物與有機酸或無機酸(酸加成鹽)或有機鹼或無機鹼(鹼加成鹽)之組合的本發明化合物之鹽。本發明組合物可以游離鹼或鹽形式使用，兩種形式均視為屬於本發明範疇。

醫藥組合物可呈可將組合物投與患者之任一形式。舉例而言，組合物可呈固體、液體或氣體(氣溶膠)形式。典型投與路徑包括(但不限於)經口、局部、非經腸(例如，經舌下或含服)、經舌下、經直腸、經陰道及經鼻內(例如，以噴霧形式)。本文所用術語非經腸包括離子導入(例如，U.S. 7,033,598；7,018,345；6,970,739)、超音波泳動(sonophoretic)(例如，U.S. 4,780,212；4,767,402；4,948,587；5,618,275；5,656,016；5,722,397；6,322,532；6,018,678)、熱(例如，U.S. 5,885,211；6,685,699)、主動經皮(例如，U.S. 3,598,122；3,598,123；4,286,592；4,314,557；4,379,454；4,568,343；5,464,387；英國專利說明書第2232892號；U.S. 6,871,477；6,974,588；6,676,961)、微型針(例如，U.S. 6,908,453；5,457,041；5,591,139；6,033,928)投與亦及皮下注射、靜脈內、肌內、胸骨內、海綿竇內、鞘內、壁內、尿道內注射或輸注技術。在一特定實施例中，藉由選自離子導入、微小細胞形成、超音波泳動或微型針之技術經皮內投與本文所述組合物(包括疫苗及醫藥組合物)。

調配醫藥組合物以便在將組合物投與患者時其中含有之

活性成份生物可用。可投與患者之組合物採取一或多個劑量單元之形式，其中(例如)錠劑可為單一劑量單元，且呈氣溶膠形式之一或多種本發明化合物的容器可容納複數個劑量單元。

經口投與時，可存在賦形劑及/或黏合劑。其實例係蔗糖、高嶺土、甘油、澱粉糊精、海藻酸鈉、羧甲基纖維素及乙基纖維素。可存在著色劑及/或矯味劑。可採用外層包衣。

組合物可呈液體(例如，醃劑、糖漿、溶液、乳液或懸浮液)形式。其中兩個實例為可經口投與液體或藉由注射遞送液體。當意欲經口投與時，較佳組合物含有甜味劑、防腐劑、染劑/著色劑及香味增強劑中之一或多者。在計畫注射投與之組合物中，可包括表面活性劑、防腐劑、潤濕劑、分散劑、懸浮劑、緩衝劑、穩定劑及等滲劑中之一或多者。

本文所用液體醫藥組合物不論呈溶液、懸浮液形式還是其他類似形式，均可包括以下一種或多種載劑或賦形劑：無菌稀釋劑(例如，注射用水)、鹽水溶液(較佳生理食鹽水、林格氏(Ringer's)溶液、等滲氯化鈉)、不揮發油(例如，角鯊烯、角鯊烷、礦物油、二縮甘露醇單油酸酯、膽固醇、及合成的甘油單酯或甘油二酯(其可用作溶劑或懸浮介質)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶劑)；抗細菌劑，例如苜醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，例如，抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，例如，乙二胺四乙酸；緩

衝劑，例如，乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽及用於調節滲透性之試劑，例如氯化鈉或右旋糖。非經腸製劑可封裝於由玻璃或塑膠製成的安瓿、可棄式注射器或多劑量小瓶中。可注射醫藥組合物為無菌較佳。

在特定實施例中，本發明之醫藥或疫苗組合物包含小於 0.2 μm 之穩定水性懸浮液且進一步包含至少一種選自由磷脂、脂肪酸、表面活性劑、洗滌劑、皂苷、氟化脂質及諸如此類組成之群中之組份。

在另一實施例中，以可氣溶膠方式調配本發明組合物。

亦可期望疫苗或醫藥組合物中包括其他組份，例如遞送媒劑，其包括但不限於鋁鹽、油包水乳液、生物可降解油媒劑、水包油乳液、生物可降解微膠囊及脂質體。用於該等媒劑中之額外免疫刺激性物質(共佐劑)之實例亦如上文所述且可包括 N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺酸-D-異麩胺醯胺(MDP)、葡聚糖、IL-12、GM-CSF、 γ 干擾素及 IL-12。

儘管本發明醫藥組合物中可採用彼等熟習此項技術者已知之任一適宜載劑，但載劑之類型可端視投與模式及是否期望持續釋放而有所變化。對於非經腸投與(例如，皮下注射)而言，載劑較佳包含水、鹽水、醇、脂肪、蠟或緩衝液。對於經口投與而言，可採用上述載劑或固體載劑中之任一者，例如，甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、滑石粉、纖維素、葡萄糖、蔗糖及碳酸鎂。亦可採用生物可降解微球體(例如，聚丙交酯-乙交酯丙交酯(poly(lactic galactide)))作為載劑用於本發明醫藥組合物。

中。適宜生物可降解微球體揭示於(例如)美國專利第4,897,268號及第5,075,109號中。就此而言,微球體較佳大於約25微米。

醫藥組合物(包括GLA疫苗及GLA免疫佐劑)亦可含有稀釋劑(例如緩衝液)、抗氧化劑(例如,抗壞血酸)、低分子量(小於約10個殘基)多肽、蛋白質、胺基酸、碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合劑(例如,EDTA、麩胱甘肽)及其他穩定劑及賦形劑。中性緩衝鹽水或混有非特异性血清白蛋白之鹽水係例示性適當稀釋劑。較佳地,可使用適當賦形劑溶液(例如,蔗糖)作為稀釋劑將產物調配為低壓凍乾物。

如上文所述,在某些實施例中,本發明包括能夠遞送編碼期望抗原之核酸分子的組合物。該等組合物包括重組病毒載體(例如,逆轉錄病毒(參見WO 90/07936、WO 91/02805、WO 93/25234、WO 93/25698及WO 94/03622)、腺病毒(參見Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Li等人, *Hum. Gene Ther.* 4:403-409, 1993; Vincent等人, *Nat. Genet.* 5:130-134, 1993; 及Kolls等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994)、痘病毒(參見美國專利第4,769,330號; 美國專利第5,017,487號; 及WO 89/01973))、與聚陽離子分子複合之重組表現構築體核酸分子(參見WO 93/03709)、及與脂質體相關之核酸(參見Wang等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851, 1987)。在某些實施例中,可將DNA連接至殺死或滅活腺病毒(參見Curiel等人, *Hum.*

Gene Ther. 3:147-154, 1992 ; Cotton 等人 , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6094, 1992) 。 其他適宜組合物包括 DNA-配體 (參見 Wu 等人 , *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989) 及 脂質 -DNA 組合 (參見 Felgner 等人 , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989) 。

除實施活體內程序外，亦可使用離體程序，其中自宿主移出細胞、對其進行修飾並放置於同一或另一宿主動物中。顯而易見，在離體環境下可利用上述組合物中之任一者用於將編碼核酸分子之抗原引入組織細胞中。用於病毒、物理及化學方法之方案已為相關技藝所熟知。

因此，本發明用於增強或激發宿主、患者或細胞培養物中之免疫應答。本文所用術語「患者」係指任一溫血動物、較佳人類。患者可患有感染病、癌症(例如乳癌)、或自身免疫疾病，或可正常(即，無可檢測到之疾病及/或感染)。「細胞培養物」係含有免疫活性細胞或免疫系統之分離細胞(包括但不限於T細胞、巨噬細胞、單核細胞、B細胞及樹突細胞)之任一製劑。可藉由彼等熟習此項技術者熟知之多種技術中之任一者(例如，Ficoll-hypaque密度離心)分離該等細胞。細胞可(但不必須)分離自患有癌症之患者，且可在治療後再引入患者中。

在某些實施例中，意欲用於非經腸或經口投與之液體組合物應含有可獲得適宜劑量之量的GLA疫苗組合物。通常，組合物中之此量係至少0.01 wt%抗原。當意欲經口投與時，此量可在組合物之0.1重量%與70重量%之間變化。

較佳口服組合物含有約4%與約50%之間之抗原。製備較佳組合物及製劑以使非經腸劑量單元含有0.01重量%至1重量%活性組合物。

醫藥組合物可意欲局部投與，在此情形下載劑可適宜地包含溶液、乳液、軟膏或凝膠基質。舉例而言，該基質可包含以下之一或多者：礦脂、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蠟、礦物油、稀釋劑(例如，水及醇)、及乳化劑及穩定劑。用於局部投與之醫藥組合物中可存在增稠劑。若意欲經皮投與，則組合物可包括經皮貼片或離子導入裝置。局部調配物可含有濃度為約0.1 w/v至約10% w/v(重量/單位體積)之抗原(例如，GLA-抗原疫苗組合物)或GLA(例如，免疫佐劑組合物；GLA係自Avanti Polar Lipids公司，Alabaster, AL購得；例如，產品號699800)。

組合物可意欲以(例如)在直腸中融化並釋放藥物之栓劑形式經直腸投與。用於經直腸投與之組合物可含有油狀基質作為適宜非刺激性賦形劑。該等基質包括(但不限於)羊毛脂、可可脂及聚乙二醇。在本發明方法中，疫苗組合物/佐劑可經由使用插入物、珠粒、定時釋放調配物、貼片或快速釋放調配物來投與。

在某些實施例中，亦涵蓋包含本文所述GLA疫苗組合物及/或GLA免疫佐劑組合物之套組，其可提供於一或多個容器中。在一個實施例中，GLA疫苗組合物及/或GLA免疫佐劑組合物之所有組份均一起存在於單一容器中，但本發明實施例並不意欲限於此且亦涵蓋兩個或更多個容器，其

中(例如)GLA免疫佐劑組合物與抗原組份分離且並不接觸。藉助非限制性理論，據信，在某些情形下可有利地實施僅GLA免疫佐劑組合物之投與，同時在其他情形下該投與可有利地與抗原之投與在時間上及/或空間上(例如，於不同解剖位點處)分離，同時在又一些情形下有利地向個體投與如本文所述且含有抗原及GLA二者、及視情況以及本文所述其他組份之GLA疫苗組合物。

該套組實施例之容器可為任一適宜容器、器皿、小瓶、安瓿、管、杯子、盒子、瓶、燒瓶、大口瓶、盤、單孔或多孔設備之孔、槽、罐或諸如此類、或其中可將本文所揭示組合物於其中放置、儲存及/或運輸、及存取以移除內容物之其他裝置。通常，該容器可由與期望用途一致及可容易地達成所含內容物之回收的材料製得。該等容器之較佳實例包括玻璃及/或塑膠密封或可重複密封之管及安瓿，其包括彼等具有橡膠隔片或與使用針及注射器之內容物的抽取一致之其他密封構件者。舉例而言，該等容器可由玻璃或化學上相容之塑膠或樹脂製得，其可由允許物質自容器有效回收及/或保護物質免受(例如)降解條件(例如，紫外光或溫度極端)、或免於引入不期望污染物(包括微生物污染物)的材料製得或經其塗佈。容器較佳無菌或消毒，且由可與任一載劑、賦形劑、溶劑、媒劑或諸如此類相容之材料製得，例如可用於懸浮或溶解本文所述疫苗組合物及/或免疫佐劑組合物及/或抗原及/或重組表現構築體等。

本發明調配組合物中亦可使用乳液系統。舉例而言，已闡述許多單一或多相乳液系統。已建議水包油乳液佐劑本身用作佐劑組合物(EP 0 399 843B)，同時水包油乳液及其他活性試劑之組合已闡述為用於疫苗之佐劑(WO 95/17210；WO 98/56414；WO 99/12565；WO 99/11241)。已闡述其他油乳液佐劑，例如油包水乳液(美國專利第5,422,109號；EP 0 480 982 B2)及水包油包水乳液(美國專利第5,424,067號；EP 0 480 981 B)。用於本發明中之油乳液佐劑可為天然或合成的，且可為無機或有機的。熟習此項技術者將容易地明瞭無機及有機油之實例。

在一特定實施例中，本發明組合物包含水包油乳液，其中將GLA納入油相中。在另一實施例中，本發明組合物包含水包油乳液，其中將GLA納入油相中且其中存在額外組份，例如共佐劑、TLR激動劑、或諸如此類，如本文所述。

為使任一水包油組合物適於人類投與，乳液系統之油相較佳包含可代謝油。術語可代謝油之含義已為相關技藝所熟知。可代謝可定義為「能夠藉由代謝轉化」(Dorland's illustrated Medical Dictionary, W. B. Saunders公司，第25版(1974))。該油可為任一植物油、魚油、動物油或合成油，其對接受者無毒性且能夠藉由代謝轉化。堅果(例如花生油)、種子及穀物係植物油之常見來源。合成油亦係本發明之部分且可包括市售油，例如NEOBEE®及其他。

舉例而言，角鯊烯(2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-

二十四碳六烯)係不飽和油，其在鯊魚肝油大量發現，且在橄欖油、麥胚芽油、米糠油及酵母中發現較少量，且係用於本發明中之尤佳油。由於角鯊烯係膽固醇生物合成中之中間體的事實，故其係可代謝油(Merck index，第10版，條目號8619)。尤佳油乳液係水包油乳液，且具體而言係存於水乳液中之角鯊烯。另外，本發明之最佳油乳液佐劑包含抗氧化劑，其較佳係油 α -生育酚(維他命E，EP 0 382 271 B1)。WO 95/17210及WO 99/11241揭示基於角鯊烯、 α -生育酚、及TWEEN® 80之乳液佐劑，其視情況與免疫刺激劑QS21及/或3D-MPL一起調配(上文對其進行論述)。WO 99/12565揭示利用向油相中添加類固醇對該等角鯊烯乳液之改良。另外，為穩定乳液，可向油相中添加甘油三酸酯(例如，三辛酸甘油酯($C_{27}H_{50}O_6$))(WO 98/56414)。

穩定的水包油乳液中發現之油滴的大小較佳小於1微米，其可在實質上30-600 nm範圍內、較佳實質上直徑為約30-500 nm、且最佳實質上直徑為150-500 nm、且具體而言直徑為約150 nm，如由光子相關光譜來量測。就此而言，80數量%之油滴應在較佳範圍內，更佳90數量%以上且最佳95數量%以上油滴在界定尺寸範圍內。本發明油乳液中存在之組份之量傳統上係在2%至10%油(例如角鯊烯)、及2%至10% α -生育酚(若存在)、及0.3%至3%表面活性劑(例如聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯)範圍內。較佳地，油： α -生育酚之比率等於或小於1，此時提供更穩定乳液。Span 85亦可以約1%之含量存在。在一些情形下，本發明

疫苗進一步含有穩定劑可較為有利。

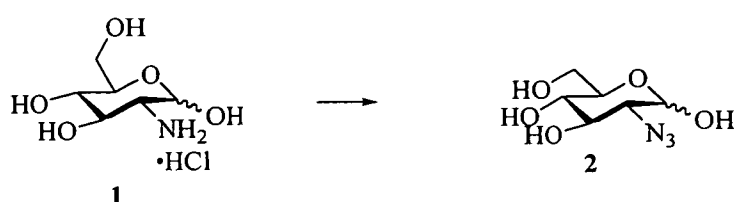
生產水包油乳液之方法已為熟習此項技術者熟知。通常，該方法包含混合油相與表面活性劑（例如 PBS/TWEEN80® 乳液），之後使用均質器進行均質化。舉例而言，包含將混合物通過注射器針頭一次、兩次或更多次之方法可適於均質化小體積之液體。相同地，微射流機 (M110S 微流體化機器，最大 50 次通過，於 6 巴最大輸入壓力 (輸出壓力為約 850 巴) 下持續 2 分鐘之時間) 中之乳化製程可適用於產生較小或較大體積之乳液。此適應可藉由常規實驗達成，其包含量測所得乳液直至獲得具有所需直徑之油滴的製劑為止。

提供下列實例以舉例說明而非加以限制。

實例

實例 1

2-疊氮基-2-去氧-D-葡萄糖吡喃糖苷 (2)



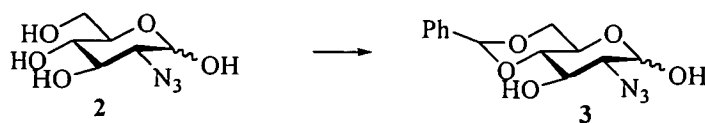
將疊氮化鈉 (2.78 g, 42.7 mmol) 溶解於水 (7 mL) 及甲苯 (7 mL) 中。在劇烈攪拌下將混合物冷卻至 0°C。逐滴添加三氟甲磺酸酐 (Triflic anhydride) (4.57 mL, 27.2 mmol)，且於 0°C 下將混合物攪拌 30 min。將溫度升高至 10°C，且將兩相混合物攪拌 2 h。逐滴添加碳酸氫鈉飽和水溶液直至停

止氣體釋放為止。分離兩相，且用甲苯(2×7 mL)萃取水層。合併之有機層用於後續重氮基轉移反應中。

將葡萄糖胺 1 (2.04 g, 9.45 mmol)、碳酸氫鈉(3.21 g, 38.22 mmol)及五水硫酸銅(II) (90.5 mg, 0.362 mmol)溶解於水(12.3 mL)中。添加上文製備之三氟甲磺酸疊氮化物儲備溶液(21 mL)，之後添加甲醇(81 mL)，從而產生均相系統。將藍色混合物於室溫下劇烈攪拌。藉由TLC(茚三酮染色法)監測胺之完全消耗且其亦由混合物自藍色至綠色之顏色變化來指示。在真空中利用旋轉蒸發器去除溶劑，將溫度嚴格保持於25℃下。藉由矽膠上層析(120 g RediSep管柱，用0%至40%甲醇/二氯甲烷之梯度洗脫，經50 min，85 mL/min)純化殘留物，從而得到無色液體狀產物 2 (1.93 g, 99%)。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD)(非對映異構體之混合物 1/1) δ 5.18 (d, *J*=3.4 Hz, 0.5H), 4.51 (d, *J*=8.0 Hz, 0.5H), 3.89-3.63 (m, 3H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.11-3.06 (m, 1H)。

實例 2

2-疊氮基-2-去氧-4,6-*O*-亞苄基-D-葡萄糖吡喃糖苷(3)

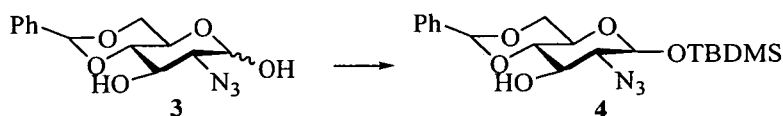


向化合物 2 (2.00 g, 9.75 mmol)存於DMF (40 mL)中之溶液中添加苯甲醛二甲縮醛(1.65 g, 10.8 mmol)及樟腦磺酸(90 mg)。將燒瓶連接至真空系統，且於50℃下在油浴中加熱混合物。3 h後，使用旋轉蒸發器濃縮混合物。將殘

留物重新溶解於二乙醚(50 mL)及Et₃N (2 mL)中，之後重新溶解於飽和碳酸氫鈉(50 mL)中。用二乙醚(3×50 mL)萃取水層。將合併之有機萃取物經硫酸鈉乾燥並過濾。在使用旋轉蒸發器去除溶劑之後，藉由矽膠上層析(120 g RediSep管柱，用0%至100%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經50 min，85 mL/min)純化殘留物，從而得到無色液體狀產物3 (2.58 g, 90%)。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.49-7.32 (m, 5H), 5.58 (s, 1H), 4.64 (d, *J*=3.8 Hz, 1H), 4.25-3.41 (m, 5H), 3.23-3.20 (m, 1H)。

實例3

第三丁基二甲基甲矽烷基-2-疊氮基-4,6-*O*-亞苄基-2-去氧-β-D-葡萄糖吡喃糖苷(4)

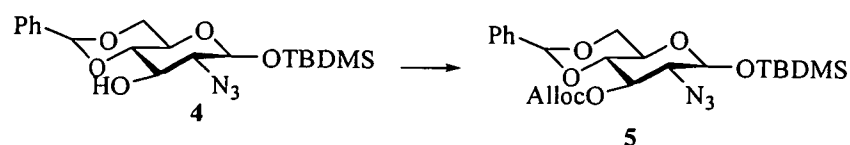


於0°C下向化合物3 (1.45 g, 4.94 mmol)及咪唑(768 mg, 11.3 mmol)存於CH₂Cl₂ (40 mL)中之混合物中添加第三丁基二甲基甲矽烷基氯(820 mg, 5.44 mmol)。在將溶液攪拌過夜之後，添加飽和碳酸氫鈉(20 mL)，且用二乙醚(3×30 mL)萃取混合物。將合併之有機層經Na₂SO₄乾燥、過濾並在真空中濃縮。藉由急驟管柱層析(80 g RediSep管柱，用0%至70%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經40 min，60 mL/min)純化殘留物，從而得到無色固體狀產物4 (1.5 g, 74%)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.46-7.43 (m, 2H),

7.35-7.32 (m, 3H), 5.48 (s, 1H), 4.59 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.23 (dd, $J=10.2, 5.0$ Hz, 1H), 3.73 (t, $J=10.2$ Hz, 1H), 3.56-3.51 (m, 2H), 3.31-3.28 (m, 2H), 2.72 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 0.91 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), 0.13 (s, 3H)。

實例 4

第三丁基二甲基甲矽烷基-3-*O*-烯丙氧基羰基-2-疊氮基-4,6-*O*-亞苄基-2-去氧-D-葡萄糖吡喃糖苷(5)



於 0°C 下向化合物 4 (1.50 g, 3.68 mmol) 及四甲基乙二胺 (TMEDA) (0.78 mL, 5.2 mmol) 存於二氯甲烷 (DCM) (50 mL) 中之溶液中逐滴添加氯甲酸烯丙酯 (0.78 mL, 7.3 mmol)。將混合物升溫至室溫，且將混合物於室溫下攪拌 10 h。將混合物用 DCM (50 mL) 稀釋並用飽和 NaHCO_3 水溶液 (2×100 mL) 及鹽水 (2×50 mL) 洗滌。將合併之有機層經 Na_2SO_4 乾燥、過濾並在真空中濃縮。藉由急驟管柱層析 (80 g RediSep 管柱，用 0% 至 50% 乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經 40 min, 60 mL/min) 純化殘留物，從而得到無色固體狀產物 5 (1.57 g, 87%)。 $R_f = 0.40$ (己烷/乙酸乙酯，3/1, v/v)。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.44-7.41 (m, 2H), 7.35-7.32 (m, 3H), 5.98-5.85 (m, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.38-5.22 (m, 2H), 4.88 (t, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.72-4.64 (m, 3H), 4.32-4.27 (m, 1H), 3.81-3.65 (m, 2H), 3.50-3.42 (m, 2H),

0.94 (s, 9H) , 0.18 (s, 3H) , 0.17 (s, 3H) 。

實例 5

第三丁基二甲基甲矽烷基-3-*O*-烯丙氧基羰基-2-疊氮基-6-*O*-苄基-2-去氧-D-葡萄糖吡喃糖苷(6)

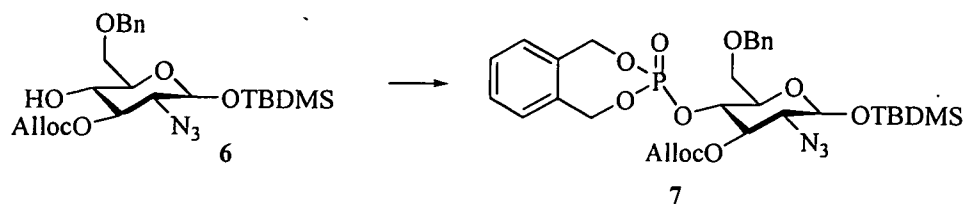


將化合物 5 (320 mg, 0.651 mmol)及分子篩(4 Å, 200 mg)存於 THF (5 mL)中之懸浮液於室溫下攪拌 1 h，且隨後添加 NaCNBH₃ (246 mg, 3.91 mmol)。向此混合物中逐滴添加氯化氫溶液(2 M，存於二乙醚中)直至混合物變為酸性(~5 mL, pH=5)。在再攪拌 0.5 h 後，將反應混合物用固體 NaHCO₃ 淬滅，用二乙醚(100 mL)稀釋，並用飽和 NaHCO₃ 水溶液(2×100 mL)及鹽水(2×50 mL)洗滌。將有機層經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾，在真空中濃縮，且藉由急驟管柱層析(40 g RediSep 管柱，用 0% 至 100% 乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經 40 min，40 mL/min)純化殘留物，從而得到無色固體狀產物 6 (273 mg, 85%)。R_f = 0.42(己烷/乙酸乙酯，4/1, v/v)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.34 (m, 5H), 5.99-5.89 (m, 1H), 5.40-5.26 (m, 2H), 4.67-4.56 (m, 5H), 3.72-3.70 (m, 3H), 3.48-3.46 (m, 2H), 3.37 (dd, *J*=9.6, 8.4 Hz, 1H), 3.01 (寬 s, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.17 (s, 6H)。

實例 6

第三丁基二甲基甲矽烷基-3-*O*-烯丙氧基羰基-2-疊氮基-6-*O*-

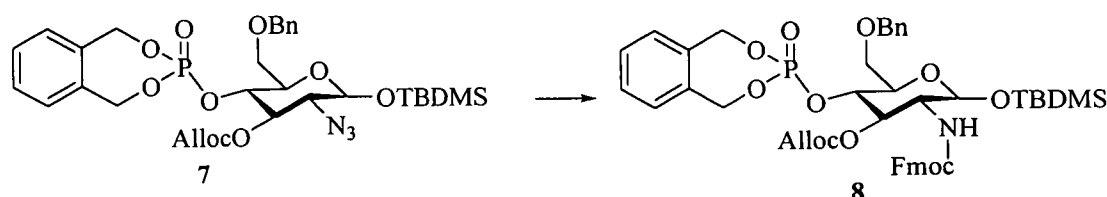
苄基-2-去氧-4-*O*-(1,5-二氫-3-側氧基-3λ⁵-3*H*-2,4,3-苯并二噁
 磷環庚烷-3-基)-*D*-葡萄糖吡喃糖苷 (7)



向化合物 6 (5.47 g, 11.1 mmol) 及 1*H*-四唑 (3 wt %, 存於乙腈中, 35.5 mmol, 104 mL) 之溶液中添加 *N,N*-二乙基-1,5-二氫-3*H*-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-胺 (5.3 g, 22 mmol)。在將反應混合物於室溫下攪拌 15 min 後, 將其冷卻至 -20°C, 於該溫度下再攪拌 10 min, 且隨後添加 *m*CPBA (8.40 g, 50-55 wt %, 24.4 mmol)。將反應混合物於 -20°C 下攪拌 20 min, 並在真空中濃縮。將殘留物重新溶解於 DCM (30 mL) 中並用飽和 NaHCO₃ 水溶液 (40 mL) 洗滌。用 DCM (3×50 mL) 萃取水層。將合併之有機層經 Na₂SO₄ 乾燥、過濾並在真空中濃縮。藉由急驟管柱層析 (120 g RediSep 管柱, 用 0% 至 100% 乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫, 經 60 min, 85 mL/min) 純化殘留物, 從而得到淺黃色油狀產物 7 (4.85 g, 65%)。 *R*_f=0.40 (己烷/乙酸乙酯, 1/1, v/v)。 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.18 (m, 9H), 5.98-5.85 (m, 1H), 5.41-5.05 (m, 6H), 4.64 (t, *J*=10.1 Hz, 1H), 4.58-4.52 (m, 6H), 3.83 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 3.72-3.61 (m, 2H), 3.41 (dd, *J*=10.5, 7.4 Hz, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.16 (s, 3H), 0.15 (s, 3H)。

實例 7

第三丁基二甲基甲矽烷基-3-*O*-烯丙氧基羰基-6-*O*-苄基-2-去
氧-4-*O*-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3*H*-2,4,3-苯并二噁磷環庚
烷-3-基)-2-(9-芴基甲氧基羰基胺基)-*D*-葡萄糖吡喃糖苷(8)



向 7 (700 mg, 1.04 mmol)及鋅粉(676 mg, 10.4 mmol)存
於DCM (15 mL)中之攪拌懸浮液中逐滴添加乙酸(0.30 mL,
5.2 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌4 h，此後用乙酸
乙酯(50 mL)對其進行稀釋。藉由過濾移出固體並用乙酸
乙酯(2×10 mL)洗滌。將合併之濾液用飽和NaHCO₃水溶液
(2×40 mL)及鹽水(2×40 mL)洗滌。乾燥(MgSO₄)並過濾有
機相，且在真空中濃縮濾液，從而獲得淺黃色油狀粗製中
間體胺。R_f = 0.21(己烷/乙酸乙酯，1/1，v/v)。於0°C下向
粗製胺及二異丙基乙基胺(DIPEA) (0.22 mL, 1.3 mmol)存
於DCM (15 mL)中之攪拌溶液中添加9-芴基甲氧基羰基
氯(Fmoc-Cl) (323 mg, 1.25 mmol)。使反應混合物升溫並
於室溫下攪拌5 h，此後將其用DCM (40 mL)稀釋並用鹽水
(2×50 mL)洗滌。乾燥(MgSO₄)有機相並加以過濾。於真空
中濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析(40 g RediSep管柱，用0%
至100%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經30 min，40 mL/min)
純化殘留物，從而得到白色固體狀產物8(337 mg，73%，

經兩個步驟)。 $R_f = 0.54$ (己烷/乙酸乙酯, 1/1, v/v)。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.78-7.20 (m, 17H), 5.92-5.82 (m, 1H), 5.49-5.16 (m, 8H), 4.69-4.06 (m, 5H), 4.49-4.28 (m, 2H), 3.88-3.61 (m, 3H), 3.60-3.51 (m, 2H), 3.32 (寬 s, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), 0.10 (s, 3H)。

實例 8

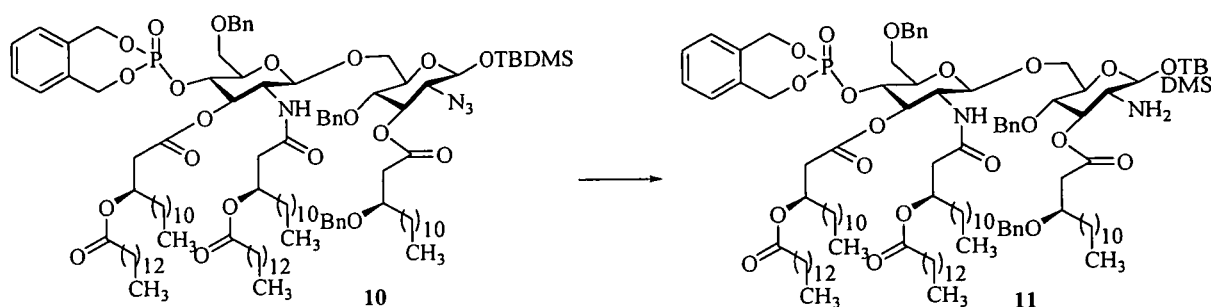
3-*O*-烯丙氧基羰基-6-*O*-苄基-2-去氧-4-*O*-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3*H*-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-(9-苄基甲氧基羰基胺基)-*D*-葡萄糖吡喃糖苷 (9)



向 8 (6.00 g, 6.88 mmol) 存於 THF (50 mL) 中之攪拌溶液中逐滴添加氯化氫/吡啶 (6 mL, 0.2 mol)。將反應混合物於室溫下攪拌 12 h，此後將其用二乙醚 (100 mL) 稀釋，且隨後用飽和 NaHCO_3 水溶液 (2×40 mL) 及鹽水 (2×40 mL) 洗滌。乾燥 (MgSO_4) 有機相並加以過濾。於真空中濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析 (120 g RediSep 管柱，用 0% 至 80% 乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經 60 min, 85 mL/min) 純化殘留物，從而得到淺黃色油狀產物 9 (4.34 g, 83%)。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.75-7.20 (m, 17H), 5.92-5.82 (m, 1H), 5.27-5.06 (m, 9H), 4.59-4.55 (m, 5H), 4.41-4.39 (m, 1H), 4.25-4.01 (m, 5H), 3.85-3.65 (m, 2H)。

實例 9

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{3-O-烯丙氧基羰基-6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-十二烷鹽基氧基-十四烷鹽基胺基]- β -D-葡萄吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十二烷鹽基]-2-去氧- β -D-葡萄吡喃糖苷 (11)

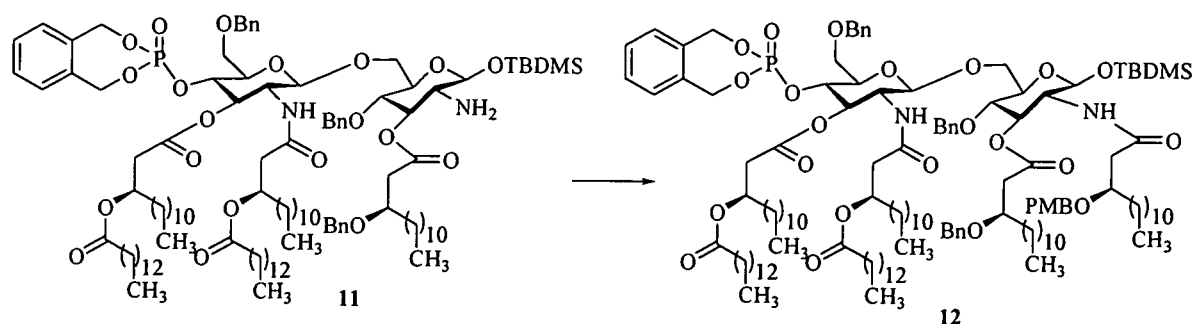


將10(參見下文製備)(350 mg, 0.172 mmol)、鋅(1.3 g, 21 mmol)及乙酸(0.70 mL, 12 mmol)存於DCM (20 mL)中之懸浮液於室溫下攪拌12 h。用二乙醚稀釋混合物。藉由過濾去除固體，且用二乙醚(2×10 mL)洗滌殘留物。用飽和NaHCO₃水溶液(2×15 mL)及鹽水(2×15 mL)洗滌合併之濾液。乾燥(MgSO₄)有機相並加以過濾。在真空中濃縮濾液，且藉由矽膠管柱層析(12 g RediSep管柱，用0%至60%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經35 min，30 mL/min)純化殘留物，從而獲得淺黃色糖漿狀產物11 (220 mg, 64%)。R_f=0.29(己烷/乙酸乙酯，5/2，v/v)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.24 (m, 20H), 6.20 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 5.59 (t, *J*=9.6 Hz, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.12-4.97 (m, 6H), 4.62-

4.44 (m, 7H), 4.05-3.24 (m, 9H), 2.68-2.12 (m, 9H), 1.64-1.59 (m, 13H), 1.27 (寬 m, 95H), 0.94 (m, 25H), 0.13 (s, 6H)。HRMS (m/z)(正) 計算值 $C_{117}H_{193}N_2O_{20}PSi$, 2005.37; 實驗值 2006.3729 $[M+H]^+$ 。

實例 10

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-*O*-{3-*O*-烯丙氧基羰基-6-*O*-苄基-2-去氧-4-*O*-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3*H*-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(*R*)-3-十二烷鹽基氧基-十四烷鹽基胺基]- β -D-葡萄吡喃糖基}-4-*O*-苄基-3-*O*-[(*R*)-3-苄基氧基-十二烷鹽基]-2-[(*R*)-3-4-甲氧基苄基氧基-十四烷鹽基]-2-去氧- β -D-葡萄吡喃糖苷 (12)

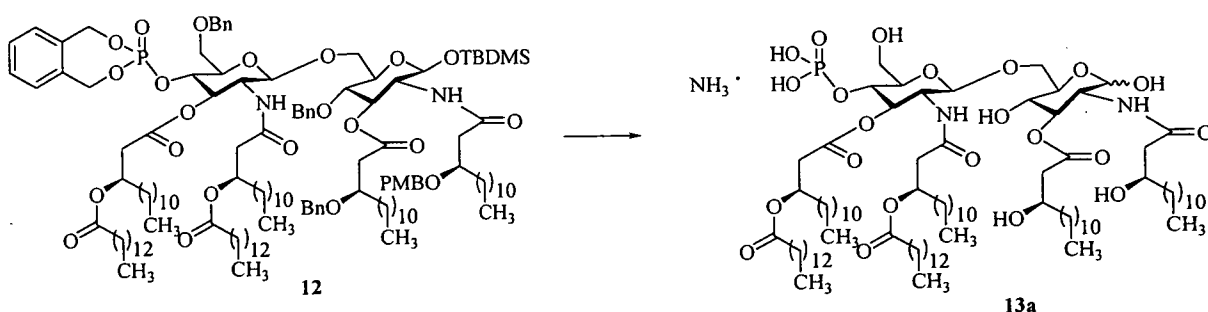


於室溫下向胺 11 (93 mg, 0.046 mmol) 存於 DCM (10 mL) 中之溶液中添加吡啶 (21 mg, 0.27 mmol)、(*R*)-3-(4-甲氧基苄基氧基)十四烷鹽基氯 (參見下文製備，化合物 35) (40 mg, 0.12 mmol) 及 4-二甲基胺基吡啶 (DMAP) (1 mg)，且將混合物攪拌過夜。將混合物轉移至分液漏斗中並用二乙醚 (20 mL) 及飽和碳酸氫鈉 (20 mL) 稀釋。用二乙醚 (3×20 mL) 萃取水層。將合併之有機萃取物經硫酸鈉乾燥，過濾並在降低之壓力下濃縮。藉由矽膠上層析 (12 g RediSep 管柱，

用 0% 至 80% 乙酸乙酯 / 己烷之梯度洗脫，經 35 min，30 mL/min) 純化殘留物，從而得到無色液體狀產物 12 (81 mg, 74%)。 $R_f = 0.34$ (己烷 / 乙酸乙酯，3/2, v/v)。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.34-7.20 (m, 20H), 6.89-6.86 (m, 4H), 6.15 (t, $J=9.0$ Hz, 1H), 5.57-5.55 (m, 1H), 5.31-4.99 (m, 8H), 4.57-4.44 (m, 11H), 4.06-3.33 (m, 15H), 2.63-2.57 (m, 5H), 2.33-2.27 (m, 9H), 1.57 (m, 8H), 1.27 (寬 m, 112H), 0.88-0.82 (m, 27H), 0.08 (s, 3H), 0.04 (s, 3H)。 HRMS (m/z) (正) 計算值 $\text{C}_{139}\text{H}_{227}\text{N}_2\text{O}_{23}\text{PSi}$, 2351.62；實驗值 2352.6343 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

實例 11

脂質 A (13a)

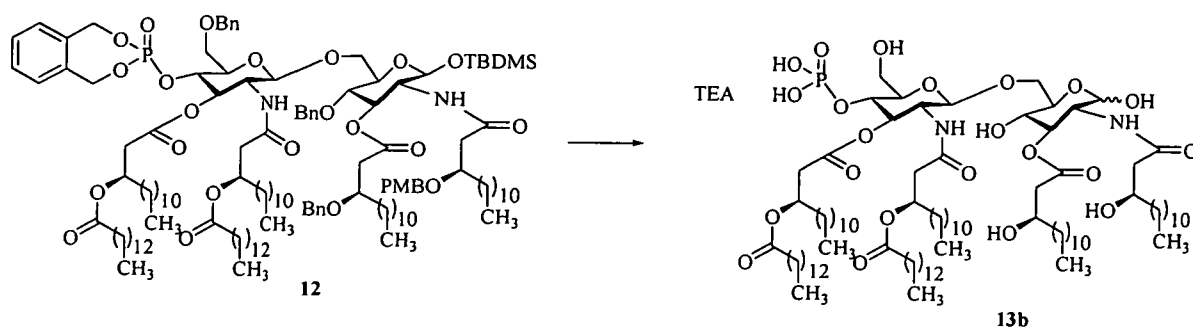


於室溫下將 12 (10 mg, 0.0042 mmol) 及 Pd-黑 (15.0 mg) 存於無水 THF (5 mL) 中之懸浮液在 H_2 (50 psi) 氛圍下振盪 30 h。藉由過濾移出觸媒。用 THF (2×1 mL) 洗滌殘留物。將溶液冷卻至 -40°C 並用存於甲醇中之氨 (0.1 mL, 7 M) 中和且濃縮而並不在真空中加熱。藉由層析 (12 g RediSep 管柱，用氯仿 / 甲醇 / 水 8/2/0.1 洗脫 30 min，30 mL/min) 純化殘留物，

從而獲得無色膜狀物 13a (4 mg, 54%)。將產物重新溶解於水及甲醇(v/v, 1/1, 2 mL)中並凍乾，從而獲得白色粉末狀產物 13a。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.00-5.00 (m, 1H), 4.50-3.50 (m, 2H), 3.00-2.00 (m, 3H), 2.00-1.00 (m, 50H), 0.81 (m, 18H)。MS(多模式，負)計算值 C₉₆H₁₈₁N₂O₂₂P, 1745.28；實驗值 1745.0 [M-H]⁻。

實例 12

脂質 A (13b)

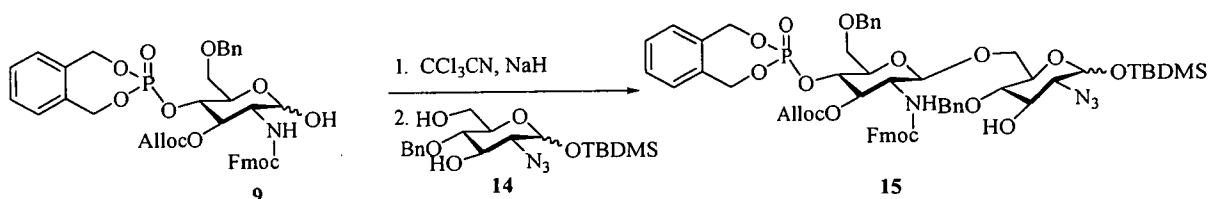


於室溫下將 12 (27 mg, 0.011 mmol)及 Pd-黑(41.0 mg)存於無水 THF (12 mL)中之懸浮液在 H₂ (50 psi)氛圍下振盪 30 h。藉由過濾移出觸媒。用 THF (2×3 mL)洗滌殘留物。用三乙胺(TEA) (0.1 mL)中和溶液並濃縮而不在真空中加熱。將合併之濾液在真空中濃縮並藉由氧化矽上層析(12 g RediSep 管柱，用氯仿/甲醇/水 8/2/0.1 洗脫 30 min，30 mL/min)純化，從而獲得無色膜狀物 13b (5 mg, 25%)。將產物重新溶解於水及甲醇(v/v, 1/1, 2 mL)中並凍乾，從而獲得白色粉末狀產物 13b。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.17 (寬, 2H), 4.23-3.62 (m, 5H), 3.11-3.07 (q, J=2.8 Hz,

2H), 2.51-2.12 (m, 6H), 1.56-1.00 (m, 69H), 0.92-0.84 (m, 18H)。MS(多模式, 負)計算值 $C_{96}H_{181}N_2O_{22}P$, 1745.28; 實驗值 1744.1 $[M-H]^-$ 。

實例 13

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-[3-O-烯丙氧基羰基-6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-(9-苄基甲氧基羰基胺基)- β -D-葡萄糖吡喃糖基]-2-疊氮基-4-O-苄基-2-去氧- β -D-葡萄糖吡喃糖苷(15)



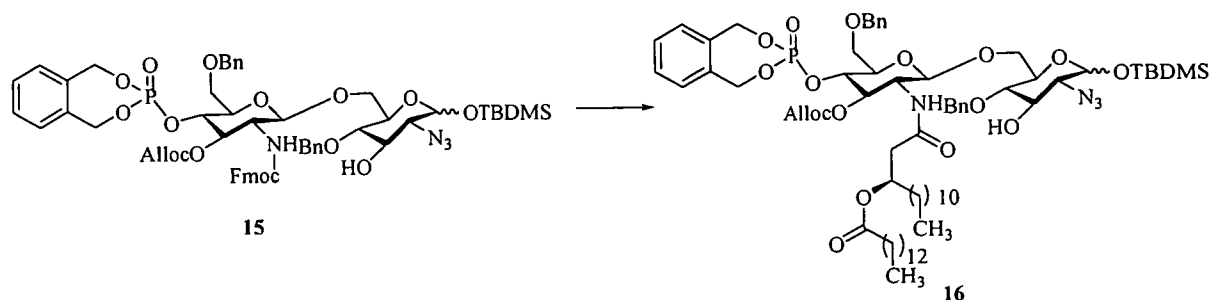
將化合物 9 (89 mg, 0.12 mmol) 溶解於無水 DMF (3 mL) 中。先後添加三氯乙腈 (1.0 mL) 及氫化鈉 (1.0 mg, 60%, 存於礦物油中)。15 min 後, TLC 指示存在 9, 因此添加額外量之氫化鈉 (1 mg, 60%, 存於礦物油中)。15 min 後, TLC 指示反應完成。將混合物在真空下濃縮並裝載於用 Et_3N 預處理且用 50% 乙酸乙酯/己烷洗脫之 SiO_2 管柱上, 從而提供三氯乙醯亞胺酯中間體 (76.9 mg, 71%), 其未經進一步純化即使用。將三氯乙醯亞胺酯 (76.9 mg, 0.0852 mmol)、受體 14 (參見下文製備) (52.34 mg, 0.1277 mmol) 及分子篩 (4 Å, 500 mg) 存於 DCM (5.0 mL) 中之懸浮液攪拌 1 h。冷卻混合 ($-60^\circ C$) 並添加 TMSOTf (1.54 μL , 0.0851 mmol)。在將反應混合物攪拌 30 min 後, 將其用固體 $NaHCO_3$ 淬

減。藉由過濾去除固體，並在真空中濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析(己烷/乙酸乙酯，2:1 (v/v))純化殘留物，從而得到無色固體狀物 15 (55 mg, 40%)。¹H NMR (500 MHz, CD₃COCD₃) δ 7.86-7.22 (m, 22H), 6.98 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 5.85 (m, 1H), 5.41 (t, *J*=9.0 Hz, 1H), 5.38-5.21 (m, 3H), 5.10-5.02 (m, 3H), 4.91 (d, *J*=11.0 Hz, 2H), 4.72-4.46 (m, 7H), 4.23-4.15 (m, 4H), 3.93-3.80 (m, 4H), 3.69-3.66 (m, 1H), 3.54 (br s, 3H), 3.20 (dd, *J*₁=8.0 Hz, *J*₂=8.0 Hz, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.17 (s, 6H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃COCD₃) δ 207.00, 156.61, 155.51, 145.22, 144.82, 142.06, 142.01, 139.98, 139.57, 136.68, 136.62, 133.02, 132.94, 129.85, 129.83, 129.15, 129.05, 128.95, 128.91, 128.82, 128.61, 128.49, 128.41, 128.21, 128.17, 128.0, 127.92, 126.19, 126.09, 125.98, 120.79, 118.60, 118.52, 101.41, 97.57, 78.78, 78.10, 76.84, 75.98, 75.88, 75.43, 75.30, 75.17, 74.70, 74.07, 70.63, 69.76, 69.64, 69.27, 69.15, 69.10, 69.02, 68.97, 67.73, 67.17, 57.29, 54.94, 26.11, 18.51; ; HR MS (*m/z*)計算值 C₅₉H₆₉N₄O₁₆PSi [M+H]⁺, 1149.4293; 實驗值 1149.4238。

實例 14

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-*O*-{3-*O*-烯丙氧基羰基-6-*O*-苄基-2-去氧-4-*O*-(1,5-二氫-3-側氧基-3λ⁵-3*H*-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(*R*)-3-十二烷鹽基氧基-十四烷鹽基胺基]-β-D-葡萄糖吡喃糖基}-2-疊氮基-4-*O*-苄基-2-去氧-β-D-葡萄糖吡喃

糖苷(16)



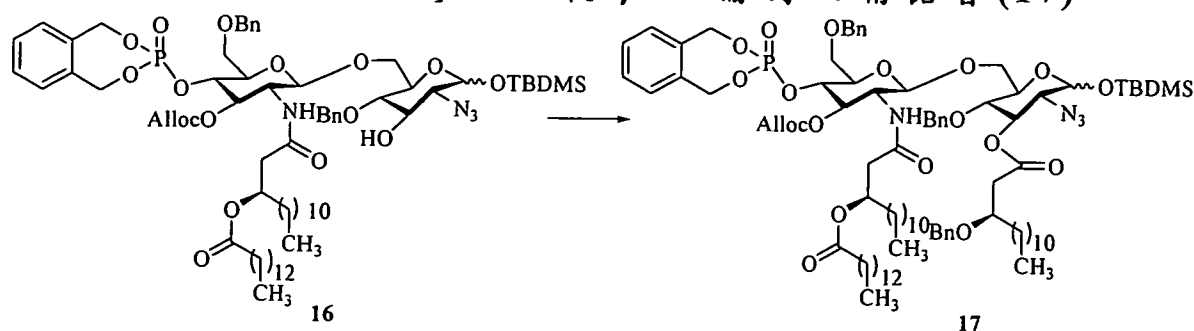
向 15 (800 mg, 0.696 mmol) 存於 DCM (10 mL) 中之溶液中逐滴添加 1,8-二氮雜二環[5.4.0]十一-7-烯 (220 μ L, 1.47 mmol)。將該反應混合物在室溫下攪拌 1 h，此後將其真空中濃縮。藉由矽膠管柱層析 (DCM/甲醇, 100:1 至 100:3 (v/v)) 純化殘留物，從而獲得無色糖漿狀游離胺 (648 mg, 99%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.17 (m, 14H), 5.96-5.88 (m, 1H), 5.40-5.06 (m, 7H), 4.84-4.50 (m, 9H), 4.21 (d, J =13.5 Hz, 1H), 4.15-4.11 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.79-3.42 (m, 5H), 3.34-3.19 (m, 2H), 2.96-2.90 (m, 1H), 2.34 (d, J =4.5 Hz, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.13 (s, 6H)。HRMS (m/z) 計算值 C₄₄H₅₉N₄O₁₄PSi [M+H]⁺, 927.3613；實驗值 927.3569。

向 (*R*)-3-十二烷鹽基-十四烷酸 (參見下文製備，化合物 40) (381 mg, 0.81 mmol) 存於 DCM (10 mL) 中之攪拌溶液中添加 *N,N*-二環己基碳化二亞胺 (DCC) (230 mg, 1.11 mmol)。在將反應混合物攪拌 10 min 後，添加存於 DCM (10 mL) 中之游離胺 (648 mg, 0.699 mmol)，且再繼續攪拌

12 h。藉由過濾去除不可溶物質，且用 DCM (2×2 mL) 洗滌殘留物。在真空中濃縮合併之濾液，且藉由矽膠管柱層析 (己烷/乙酸乙酯，2:1 (v/v)) 純化殘留物，從而得到白色固體狀物 16 (450 mg, 47%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.17 (m, 14H), 5.94-5.86 (m, 2H), 5.47 (t, *J*=9.0, 10.5 Hz, 1H), 5.37 (d, *J*=2.5 Hz, 1H), 5.34 (d, *J*=2.5 Hz, 1H), 5.24 (d, *J*=13.5 Hz, 1H), 5.13-4.97 (m, 6H), 4.75 (d, *J*=11.0 Hz, 1H), 4.66-4.49 (m, 7H), 4.00 (d, *J*=17.0 Hz, 2H), 3.83 (d, *J*=10.5 Hz, 1H), 3.75-3.56 (m, 4H), 3.49-3.36 (m, 5H), 3.20 (m, 1H), 2.42-2.17 (m, 4H), 1.93 (d, *J*=11.5 Hz, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.23 (br s, 36H), 0.92 (s, 9H), 0.89-0.86 (m, 6H), 0.14 (s, 6H); HRMS (*m/z*) 計算值 C₇₂H₁₁₁N₄O₁₇PSi [M+H]⁺, 1363.7529; 實驗值 1363.7487。

實例 15

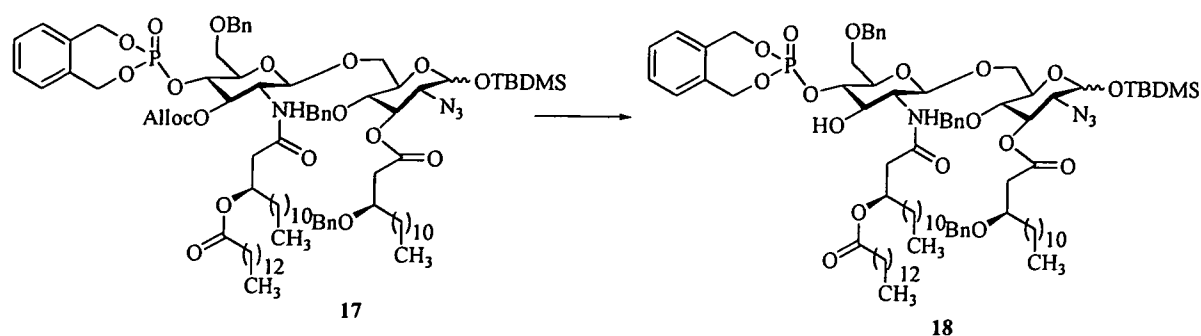
第三丁基二甲基甲矽烷基-6-*O*-{3-*O*-烯丙氧基羰基-6-*O*-苄基-2-去氧-4-*O*-(1,5-二氫-3-側氧基-3λ⁵-3*H*-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(*R*)-3-十二烷鹽基氧基-十四烷鹽基胺基]-β-*D*-葡萄糖吡喃糖基}-2-疊氮基-4-*O*-苄基-3-*O*-[(*R*)-3-苄基氧基-十四烷鹽基]-2-去氧-β-*D*-葡萄糖吡喃糖苷 (17)



將(R)-3-苄基氧基十四烷酸(參見下文製備，化合物33)(120 mg, 0.540 mmol)及DCC (171 mg, 0.830 mmol)存於DCM (5 mL)中之混合物於室溫下攪拌10 min，且隨後添加存於DCM (5 mL)中之二糖16 (451 mg, 0.331 mmol)及DMAP (25 mg, 0.21 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌14 h，此後藉由過濾去除固體。用DCM (2×4 mL)洗滌殘留物。在真空中濃縮合併之濾液，且藉由矽膠管柱層析(己烷/乙酸乙酯，4:1 (v/v))純化殘留物，從而得到白色固體狀物17 (540 mg, 97%)。 R_f = 0.41(己烷/乙酸乙酯，2:1(v/v))。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.33-7.15 (m, 19H), 5.94-5.85 (m, 2H), 5.47(t, J =9.5 Hz, 1H), 5.37 (d, J =17.5 Hz, 1H), 5.22 (d, J =10.0 Hz, 1H), 5.10-4.95 (m, 7H), 4.62-4.43 (m, 10H), 4.0-3.96 (m, 3H), 3.90-3.81 (m, 2H), 3.74-3.67 (m, 3H), 3.56-3.42 (m, 6H), 3.33-3.27 (m, 1H), 2.60-2.21 (m, 6H), 1.24 (br s, 54H), 0.91 (s, 9H), 0.87-0.84 (m, 9H), 0.14 (s, 6H)。 HRMS (m/z) 計算值 $\text{C}_{93}\text{H}_{143}\text{N}_4\text{O}_{19}\text{PSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1679.9931；實驗值1679.9934。

實例16

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-十二烷鹽基氧基-十四烷鹽基胺基]- β -D-葡萄吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十四烷鹽基]-2-去氧- β -D-葡萄吡喃糖苷(18)

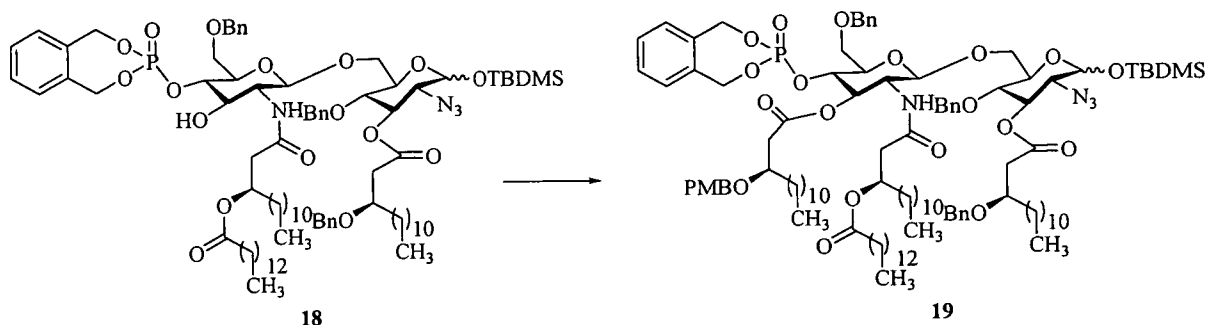


向 17 (1.66 g, 0.980 mmol)、*n*-BuNH₂ (0.19 mL, 1.97 mmol)及 HCOOH (74.5 μL, 1.98 mmol)存於 THF (20 mL)中之溶液中添加肆(三苯基膦)鈀(228 mg, 0.198 mmol)。在將反應混合物於室溫下攪拌 20 min後，將其用 DCM (40 mL)稀釋，且連續用水(40 mL)、飽和 NaHCO₃水溶液(2×40 mL)及鹽水(40 mL)洗滌。乾燥(MgSO₄)有機相並加以過濾。於真空中濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析(己烷/乙酸乙酯，4:3 (v/v))純化殘留物，從而得到化合物 18 (1.43 g, 91%)。 *R*_f = 0.5(己烷/乙酸乙酯，1:1(v/v))。 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.11 (m, 19H), 6.2 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 5.46 (t, *J*=9.0 Hz, 1H), 5.04-4.90 (m, 9H), 4.55-4.38 (m, 8H), 3.92 (d, *J*=10.0 Hz, 1H), 3.84-3.76 (m, 1H), 3.75-3.7 (m, 4H), 3.53-3.44 (m, 2H), 3.43-3.32 (m, 2H), 3.25-3.20 (m, 1H), 2.61-2.10 (m, 12H), 1.23 (br s, 54H), 0.90 (s, 9H), 0.88-0.84 (m, 9H), 0.12 (s, 6H)。 HRMS (*m/z*) 計算值 C₈₉H₁₃₉N₄O₁₇PSi [M+H]⁺, 1595.972；實驗值 1595.9713。

實例 17

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3λ⁵-3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-

[(R)-3-十二烷酯基氧基-十四烷酯基胺基]-3-O-[(R)-3-(對甲氧基)苄基氧基十四烷酯基]-β-D-葡萄糖吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十四烷酯基]-2-去氧-β-D-葡萄糖吡喃糖苷 (19)

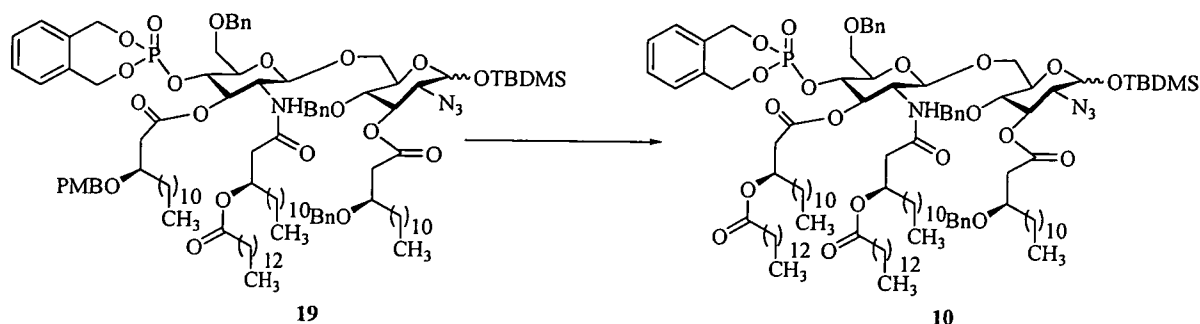


將(R)-3-(對甲氧基)苄基氧基-十四烷酸(參見下文製備，化合物 34，424 mg，1.16 mmol)及 DCC (369 mg，1.79 mmol)存於 DCM (15 mL)中之溶液於室溫下攪拌 10 min，且添加存於 DCM (10 mL)中之醇 18 (1.43 g，0.896 mmol)及 DMAP (54.72 mg，0.4479 mmol)。將反應混合物再攪拌 14 h，此後藉由過濾移出固體並用 DCM (2×5 mL)洗滌。於真空中濃縮合併之濾液。藉由矽膠管柱層析(己烷/乙酸乙酯，4:1 (v/v))純化殘留物，從而獲得白色固體狀物 19 (1.15 g，66%)。 $R_f = 0.46$ (己烷/乙酸乙酯，2:1(v/v))。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.38-6.79 (m, 23H), 5.73 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.55 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 5.20-4.88 (m, 8H), 4.66-4.47 (m, 12H), 4.33 (d, $J=12.5$ Hz, 1H), 4.0-3.66 (m, 12H), 3.61-3.40 (m, 5H), 3.36-3.27 (m, 3H), 2.67 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.60-2.22 (m, 6H), 1.27 (br s, 72H), 0.93 (s, 9H), 0.92-0.87 (m, 12H), 0.16 (s, 6H)。 HRMS (m/z)計算值

$C_{111}H_{173}N_4O_{20}PSi$ $[M+H]^+$, 1942.2228 ; 實驗值 1942.2289 。

實例 18

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3λ⁵-3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3基)-2-[(R)-3-十二烷醯基氧基-十四烷醯基胺基]-3-O-[(R)-3-十四烷醯基氧基-十四烷醯基]-β-D-葡萄吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十四烷醯基]-2-去氧-β-D-葡萄吡喃糖苷 (10)

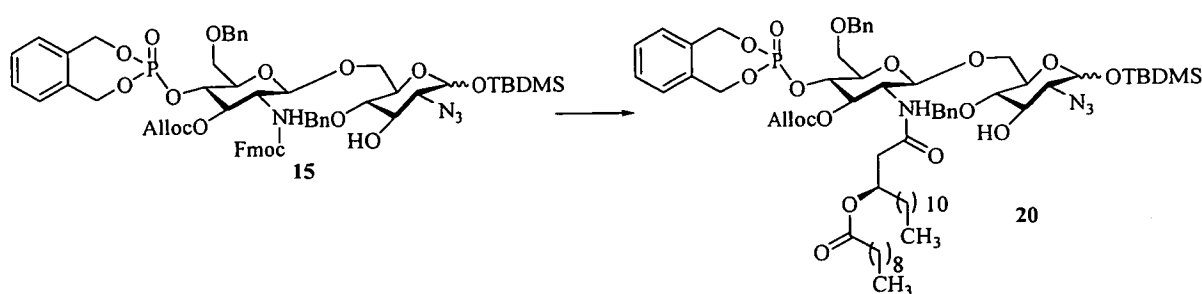


向 19 (1.15 g, 0.592 mmol) 存於 DCM 與 H₂O 混合物 (11 mL, 10:1 (v/v)) 中之攪拌溶液中添加 2,3-二氯-5,6-二氫基-1,4-苯醌 (DDQ) (202 mg, 0.890 mmol)。將該反應混合物在室溫下攪拌 1 h，此後將其用 DCM 稀釋。將混合物用鹽水 (20 mL) 洗滌，乾燥 (MgSO₄) 並在真空中濃縮。藉由矽膠管柱層析 (己烷/乙酸乙酯，3:1 (v/v)) 純化殘留物，從而得到無色糖漿狀醇 (1.01 g, 94%)。R_f = 0.50 (己烷/乙酸乙酯，5:3 (v/v))。向醇 (1.01 g, 0.554 mmol) 及吡啶 (0.35 mL, 4.33 mmol) 存於 DCM (20 mL) 中之溶液中添加肉豆蔻醯氯 (0.74 mL, 2.7 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌 12 h 後，將

其用 DCM 稀釋並用飽和 NaHCO_3 水溶液 (2×40 mL) 及鹽水 (40 mL) 洗滌。乾燥 (MgSO_4) 有機相並加以過濾。於真空中濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析 (己烷/乙酸乙酯, 4:1 (v/v)) 純化殘留物, 從而獲得白色固體狀物 10 (680 mg, 57%)。 $R_f = 0.46$ (己烷/乙酸乙酯, 5:2 (v/v))。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.24 (m, 19H), 6.23 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.58 (t, $J_1=J_2=9.5$ Hz, 1H), 5.32-5.27 (m, 1H), 5.16-4.99 (m, 6H), 4.78-4.44 (m, 7H), 4.03 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 3.99-3.20 (m, 10H), 2.65-2.21 (m, 10H), 1.61-1.51 (m, 10H), 1.27 (br s, 94H), 1.21 (br s, 25H), 0.12 (s, 6H)。

實例 19

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{3-O-烯丙氧基羰基-6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-癸酰基氧基-十四烷酰基胺基]- β -D-葡萄糖吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-2-去氧- β -D-葡萄糖吡喃糖苷 (20)

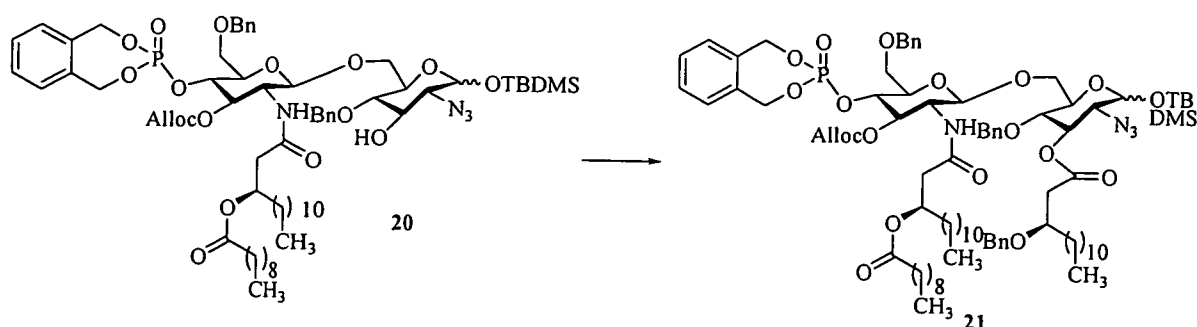


化合物 15 (1.23 g, 1.07 mmol) 以類似於化合物 16 (實例 14) 之合成方式使用 (DCC, 430 mg, 2.08 mmol)、所需脂質 (化合物 40, 實例 36, 630 mg, 1.59 mmol) 及三乙胺 (161 mg, 1.59 mmol) 酰基化, 從而提供無色油狀物 20 (1.05 g, 81%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.17 (m, 14H),

5.91-5.86 (m, 2H), 5.47 (t, $J=9.0, 10.5$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J=17$ Hz, 1H), 5.24 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 5.10-4.98 (m, 8H), 4.75 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 4.66-4.49 (m, 8H), 4.00 (d, $J=11.0$ Hz, 2H), 3.83 (d, $J=11.0$ Hz, 1H), 3.75-3.69 (m, 2H), 3.49-3.36 (m, 4H), 3.20 (m, 1H), 2.40-2.26 (m, 4H), 1.24 (br s, 32H), 0.92 (s, 9H), 0.89-0.86 (m, 6H), 0.14 (s, 6H); MS (多模式, 正) $m/z=1307$ $[M+H]^+$ 。

實例 20

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{3-O-烯丙氧基羰基-6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-癸酰基氧基-十四烷酰基胺基]- β -D-葡萄吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十四烷酰基]-2-去氧- β -D-葡萄吡喃糖苷(21)

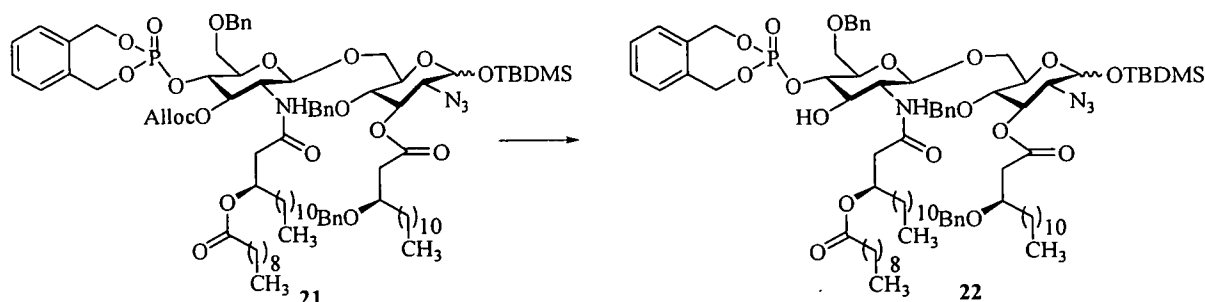


化合物 20 (1.43 g, 1.18 mmol) 以類似於化合物 17(實例 15)之合成方式使用(DCC, 453 mg, 2.20 mmol)、所需脂質(477 mg, 1.43 mmol)及 *N,N*-二甲基-4-胺基吡啶(67 mg, 0.548 mmol) 酰基化，從而提供無色油狀物 21 (1.60 g, 83%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.33-7.15 (m, 19H),

5.94-5.85 (m, 2H), 5.48 (t, $J=9.0$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J=17.5$ Hz, 1H), 5.22 (d, $J=10.0$ Hz, 1H), 5.12-4.96 (m, 7H), 4.63-4.46 (m, 11H), 3.97 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 3.89-3.85 (m, 2H), 3.74-3.68 (m, 3H), 3.55-3.52 (m, 2H), 3.47-3.41 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 2.61-2.22 (m, 8H), 1.59-1.52 (m, 6H), 1.98 (m, 2H), 1.23 (br s, 44H), 0.90 (s, 9H), 0.88-0.84 (m, 9H), 0.12 (s, 6H); MS (多模式, 正) $m/z = 1625 [M+H]^+$ 。

實例 21

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-十二烷鹽基氧基-十四烷鹽基胺基]- β -D-葡萄糖吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十四烷鹽基]-2-去氧- β -D-葡萄糖吡喃糖苷 (22)

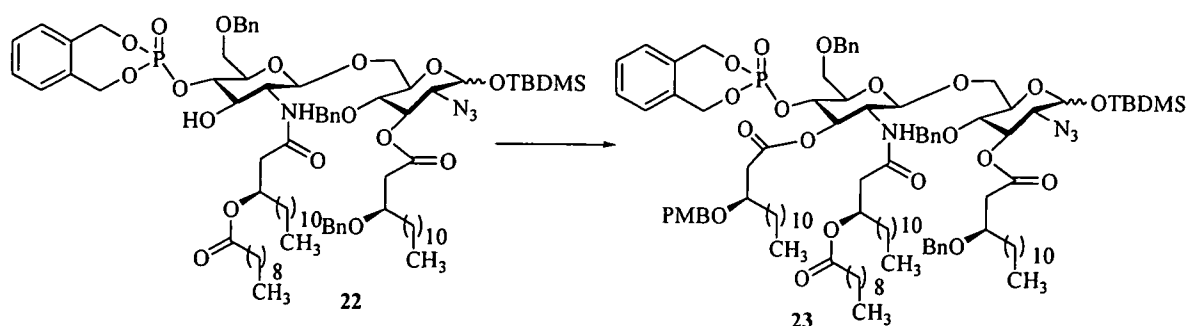


以類似於化合物 18 (實例 16) 之合成方式使化合物 21 (1.60 g, 0.985 mmol) 反應。因此，使用肆(三苯基磷)鈰 (227 mg, 0.196 mmol)、甲酸 (74 μ L, 1.97 mmol) 及正丁基胺 (144 mg, 1.97 mmol)，得到黃色固體 22 (1.25 g, 82%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.33-7.15 (m, 19H), 6.20 (d, $J=7.5$ Hz,

1H), 5.38-4.95 (m, 6H), 4.86 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.60-4.46 (m, 10H), 3.97-3.71 (m, 8H), 3.68-3.48 (m, 5H), 3.31-3.27 (m, 3H), 2.62-2.55 (m, 2H), 2.50-2.42 (m, 3H), 2.40-2.22 (m, 5H), 1.23 (br s, 44H), 0.90 (s, 9H), 0.88-0.84 (m, 9H), 0.12 (s, 6H); MS (多模式, 正) $m/z=1539$ $[M+H]^+$ 。

實例 22

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氮-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-癸酰基氧基-十四烷酰基胺基]-3-O-[(R)-3-(對甲氧基)苄基氧基十四烷酰基]- β -D-葡萄糖吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十四烷酰基]-2-去氧- β -D-葡萄糖吡喃糖苷(23)

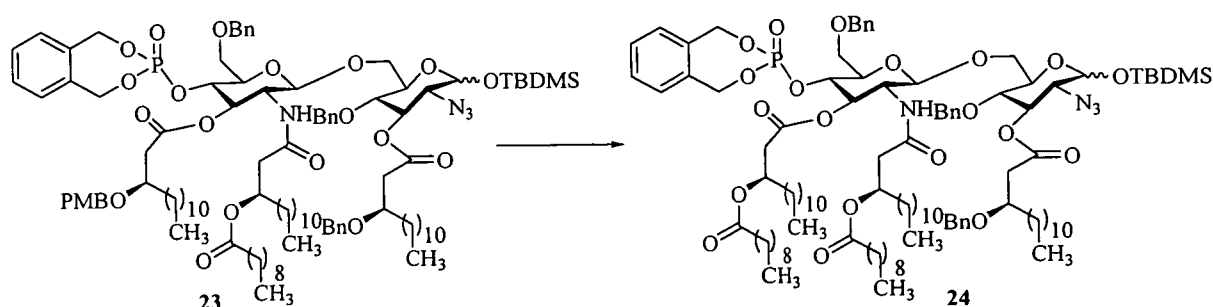


化合物 22 (1.25 g, 0.811 mmol) 以類似於化合物 19 (實例 17) 之合成方式使用 (DCC, 335 mg, 1.62 mmol)、所需脂質 (化合物 34, 實例 32, 386 mg, 1.06 mmol) 及 *N,N*-二甲基-4-氨基吡啶 (50 mg, 0.41 mmol) 酰基化, 從而提供無色油狀物 23 (440 mg, 29%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.38-6.79 (m, 23H), 5.71 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.55 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 5.06-4.85 (m, 9H), 4.66-4.45 (m, 12H), 3.97 (d, $J=11.0$ Hz,

1H), 3.90-3.69 (m, 9H), 3.60-3.55 (m, 3H), 3.37-3.29 (m, 2H), 2.65 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.61-2.55 (m, 1H), 2.48-2.42 (m, 1H), 2.35-2.21 (m, 3H), 2.11-2.05 (m, 1H), 1.62-1.59 (m, 8H), 1.27 (br s, 62H), 0.93 (s, 9H), 0.92-0.87 (m, 12H), 0.16 (s, 6H); MS (多模式, 正) $m/z=1886[M+H]^+$ 。

實例 23

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-癸醯基氧基-十四烷醯基胺基]-3-O-[(R)-3-癸醯基氧基-十四烷醯基]- β -D-葡萄吡喃糖基}-2-疊氮基-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基-十四烷醯基]-2-去氧- β -D-葡萄吡喃糖苷 (24)

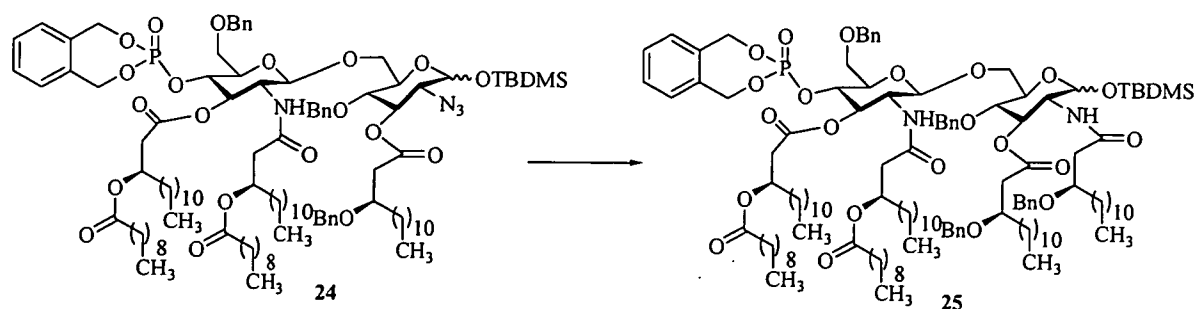


首先遵循中間體 10 針對目標 A 之程序使用 DDQ (80 mg, 0.35 mmol) 使化合物 23 (446 mg, 0.236 mmol) 去保護。隨後此中間體 (343 mg, 0.194 mmol) 以類似於化合物 10 針對目標 A 之合成方式使用癸醯氯 (185 mg, 0.970 mmol) 及吡啶 (123 mg, 1.55 mmol) 醯基化，從而提供無色油狀物 24 (343 mg, 76%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.22 (m, 14H), 6.15 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.54 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 5.28-

5.24 (m, 1H), 5.14-4.96 (m, 8H), 4.60-4.45 (m, 10H), 3.99 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 3.90-3.85 (m, 1H), 3.80-3.65 (m, 4H), 3.55 (m, 3H), 3.46-3.39 (m, 1H), 3.32-3.27 (m, 1H), 2.66-2.53 (m, 3H), 2.46-2.41 (m, 1H), 2.35-2.18 (m, 7H), 1.61-1.51 (m, 10H), 1.26 (br s, 78H), 0.95 (s, 9H), 0.92-0.90 (m, 15H), 0.19 (s, 3H), 0.18 (s, 3H)。

實例 24

第三丁基二甲基甲矽烷基-6-O-{6-O-苄基-2-去氧-4-O-(1,5-二氫-3-側氧基-3 λ^5 -3H-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(R)-3-癸醯基氧基-十四烷醯基胺基]-3-O-[(R)-3-癸醯基氧基-十四烷醯基]- β -D-葡萄吡喃糖基}-4-O-苄基-3-O-[(R)-3-苄基氧基十四烷醯基]-2-[(R)-3-苄基氧基-十四烷醯基胺基]-2-去氧- β -D-葡萄吡喃糖苷 (25)



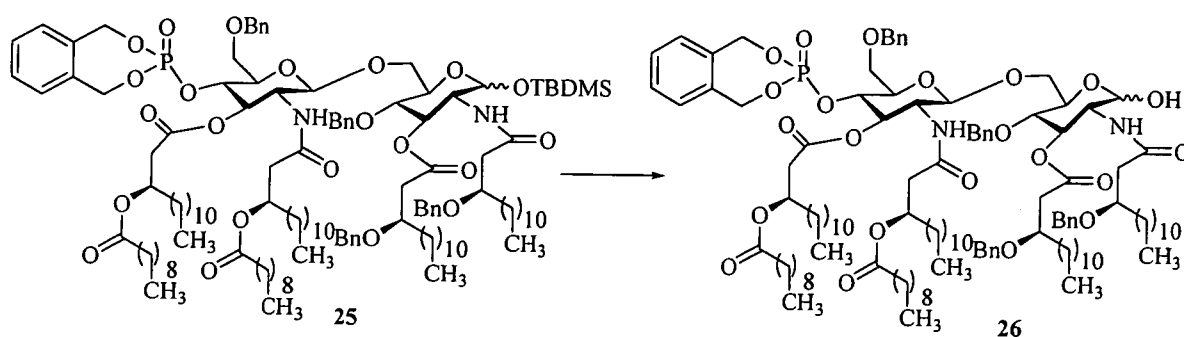
將 24 (296 mg, 0.154 mmol)、鋅(100 mg, 1.52 mmol)及乙酸(53 μ L, 0.93 mmol)存於DCM (10 mL)中之懸浮液於室溫下攪拌 12 h，此後將其用乙酸乙酯(25 mL)稀釋。藉由過濾移出固體並用乙酸乙酯(2 $\times$ 25 mL)洗滌，且用飽和NaHCO₃水溶液(2 $\times$ 100 mL)及鹽水(200 mL)洗滌合併之濾

液。乾燥(Na_2SO_4)有機相並加以過濾。於真空中濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析(己烷/乙酸乙酯, 2.5:1 (v/v))純化殘留物, 從而獲得淺黃色糖漿狀胺(245 mg, 84%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.22 (m, 14H), 6.15 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.54 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 5.29-5.23 (m, 1H), 5.13-4.93 (m, 8H), 4.62-4.30 (m, 9H), 4.00 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 3.88-3.65 (m, 6H), 3.56-3.53 (m, 2H), 3.46-3.41 (m, 1H), 2.66-2.58 (m, 4H), 2.54-2.45 (m, 2H), 2.35-2.17 (m, 7H), 1.64-1.42 (m, 12H), 1.26 (br s, 78H), 0.87 (s, 24H), 0.13 (s, 6H)。

向(*R*)-3-苄基氧基十四烷鹽基氯(228 mg, 0.646 mmol)、DMAP (15.79 mg, 0.1292 mmol)及吡啶(83 μL , 1.0 mmol)存於DCM (5.0 mL)中之攪拌溶液中添加胺。將反應混合物攪拌14 h。將混合物用 CH_2Cl_2 稀釋並用飽和 NaHCO_3 /鹽水洗滌, 在 Na_2SO_4 下乾燥並在真空中濃縮。藉由矽膠TLC層析(己烷/乙酸乙酯, 3.5:1 (v/v))純化殘留物, 從而得到白色固體狀物25 (450 mg, >100%)。 $R_f=0.54$ (己烷/乙酸乙酯, 2:1(v/v))。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.22 (m, 19H), 6.14-6.10 (m, 2H), 5.57 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 5.29-5.24 (m, 1H), 5.13-4.93 (m, 7H), 4.61-4.41 (m, 10H), 4.00 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), 3.89-3.79 (m, 8H), 3.72-3.66 (m, 4H), 3.57-3.35 (m, 3H), 2.73-2.57 (m, 10H), 2.39-2.15 (m, 10H), 1.71-1.64 (m, 7H), 1.26 (br s, 93H), 0.88 (s, 24H), 0.83 (s, 9H)。

實例 25

6-*O*-{6-*O*-苄基-2-去氧-4-*O*-(1,5-二氫-3-側氧基-3λ⁵-3*H*-2,4,3-苯并二噁磷環庚烷-3-基)-2-[(*R*)-3-癸醯基氧基-十四烷醯基胺基]-3-*O*-[(*R*)-3-癸醯基氧基-十四烷醯基]-β-*D*-葡萄糖吡喃糖基}-4-*O*-苄基-3-*O*-[(*R*)-3-苄基氧基-十四烷醯基]-2-[(*R*)-3-苄基氧基-十四烷醯基胺基]-2-去氧-α-*D*-吡喃葡萄糖 (26)

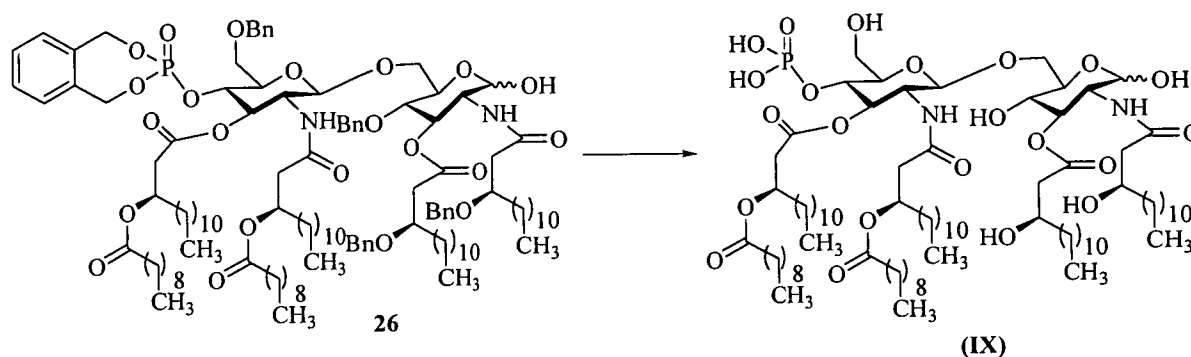


向 25 (450 mg, 0.204 mmol) 存於 THF (5 mL) 中之攪拌溶液中逐滴添加氟化氫/吡啶 (1.12 mL, 43.1 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌 14 h。將混合物用乙酸乙酯 (100 mL) 稀釋，並用飽和 NaHCO₃ 水溶液 (2×80 mL) 及鹽水洗滌。乾燥 (Na₂SO₄) 有機相並加以過濾。於真空中濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析 (己烷/乙酸乙酯，3:1 至 4:3 (v/v)) 純化殘留物，從而得到白色固體狀物 26 (180 mg, 42%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.19 (m, 19H), 6.31 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.57-5.48 (m, 2H), 5.40 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.28-5.21 (m, 1H), 5.14-4.96 (m, 8H), 4.68-4.41 (m, 12H), 4.23-4.19 (m, 1H), 4.13-4.06 (m, 1H), 3.94-3.66 (m, 9H), 3.38-3.28 (m, 2H), 2.67-2.58 (m, 3H), 2.44-

2.20 (m, 11H), 1.58 (br s, 12H), 1.26 (br s, 93H), 0.91-0.81 (m, 18H)。

實例 26

3-(癸醯基氧基)十四烷酸(3R)-((2R,3S,4R,5S)-3-((R)-3-(癸醯基氧基)十四醯胺基)-2-(((3S,4R,5S)-3,6-二羥基-5-((R)-3-羥基十四醯胺基)-4-((R)-3-羥基十四烷醯基氧基)四氫-2H-吡喃-2-基)甲氧基)-6-(羥基甲基)-5-(膦醯氧基)四氫-2H-吡喃-4-基)酯 (IX)

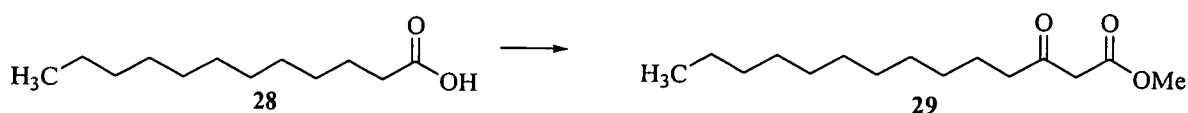


將化合物 26 (180 mg, 0.0858 mmol) 溶解於無水 THF (15 mL) 中。向混合物中添加鈹黑 (0.225 g) 且在 50 psi 氬氛圍下氬化過夜。經由矽藻土床過濾混合物。將濾液冷卻至 -40°C 並添加存於甲醇 (1.8 mL, 4 M) 中之氬溶液。在真空下濃縮混合物而不加熱。藉由矽膠層析用氯仿/甲醇/水 (80:20:1 (v/v)) 之混合物洗脫純化殘留物，從而得到期望化合物 (IX) (102 mg, 73%)。藉由 TLC 及 ^1H NMR 之分析顯示存在油脂及不明顯密集運行之斑點 (TLC，存於 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CMA}$ 中，4:1)。使殘留物經受層析 (12 g RediSep 管柱，用等梯度 CH_2Cl_2 之梯度洗脫，5 管柱體積 (CV)；至 25% CMA 之梯度

洗脫，10 CV；等梯度10 CV洗脫；至100% CMA之梯度洗脫，10 CV；於100% CMA下等梯度洗脫，10 CV，20 mL/min)，從而得到期望產物(57 mg, 25%)。合併並濃縮部分之TLC分析仍指示僅在期望產物上有極少量雜質流動。藉由矽膠層析(兩個串聯12 g RediSep管柱，與上文相同梯度)再純化殘留物，從而在溶解於甲醇/水/氯仿中並冷凍乾燥後提供8.9 mg期望產物(由TLC顯示純淨)及11.9 mg稍微不純產物。總產率(20.8 mg, 14%)，呈灰白色固體狀。 $R_f=0.40$ CMA。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.40-5.30 (br s, 2H), 4.10-4.00 (m, 4H), 3.70-3.60 (m, 4H), 2.83-2.76 (m, 1H), 2.75-2.20 (m, 13H), 2.10-1.90 (寬, 9H), 1.40-1.00 (寬, 106H), 0.90-0.70 (寬, 18H)。MS(多模式，負) $m/z=1632$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。

實例 27

3-側氧基十四烷酸甲酯(29)



向乙醇鎂(10.82 g, 94.61 mmol)存於1,4-二噁烷(100 mL)中之懸浮液中添加存於1,4-二噁烷(100 mL)中之甲基丙二酸氫(25.0 g, 189 mmol)。將所得漿液攪拌過夜。在真空中濃縮混合物。在單獨燒瓶中，將月桂酸(28, 20.85 g, 104.1 mmol)溶解於1,4-二噁烷(50 mL)中且於室溫下添加CDI(16.88 g, 104.1 mmol)存於1,4-二噁烷(150 mL)中之溶液。將所得溶液攪拌過夜。隨後將混合物轉移至甲基丙二酸鎂

燒瓶中。將所得懸浮液回流過夜。在真空中濃縮混合物。將殘留物重新溶解於DCM (300 mL)中並經由氧化矽塞(10 g)過濾。在降低之壓力下蒸發溶劑。藉由矽膠管柱層析(360 g RediSep管柱，用0%至30%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經80 min，100 mL/min)純化殘留物，從而獲得淺黃色糖漿狀產物29 (17 g, 61%)。

實例 28

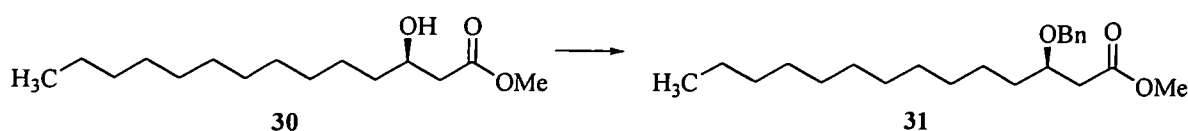
(R)-3-羥基十四烷酸甲酯(30)



將3-側氧基十四烷酸甲酯(29, 29.0 g, 113 mmol)存於甲醇(120 mL)中之漿液在300 mL高壓反應器玻璃套管中用N₂吹掃10分鐘。添加二氯-R-2,2'-雙(二苯基膦基)-1,1'-聯萘基鈦(897 mg, 1.10 mmol)。將混合物放置於Parr 5500系列集成反應器中。向反應器中充入H₂ (60 psi)且通風3次。向反應器中充入H₂ (60 psi)並攪拌(1200 rpm)並加熱至50℃並保持20 h。將反應器冷卻至室溫，且在真空中濃縮所得橙色溶液。藉由矽膠層析(120 g RediSep管柱，用0%至40%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經60 min，85 mL/min)純化殘留物，從而提供白色固體狀產物30(28.5 g, 97%產率)。

實例 29

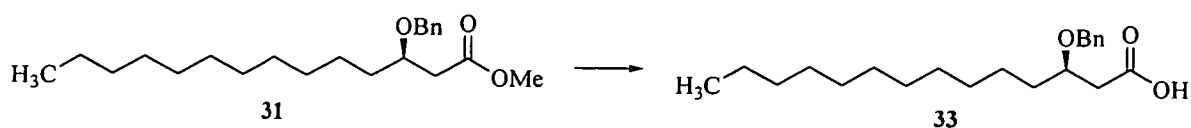
(R)-3-(苄基氧基)十四烷酸甲酯(31)



於 0°C 下向化合物 30 (2.8 g, 10.83 mmol) 及三氯乙醯亞胺
 苄酯 (3.4 g, 14 mmol) 存於 DCM (100 mL) 中之溶液中逐滴
 添加三氯甲烷磺酸 (0.24 mL, 2.7 mmol)。將所得混合物於
 0°C 下攪拌 6 h 並升溫至室溫。將混合物用飽和 NaHCO₃ 溶
 液 (300 mL) 及水 (300 mL) 洗滌並經 Na₂SO₄ 乾燥有機層。藉
 由過濾去除乾燥劑，且使用旋轉蒸發器去除溶劑。藉由矽
 膠上層析 (80 g RediSep 管柱，用 0% 至 30% 乙酸乙酯/己烷之
 梯度洗脫，經 60 min, 60 mL/min) 純化殘留物，從而得到
 無色液體狀產物 31 (1.2 g, 32%)。¹H NMR (300 MHz,
 CDCl₃) δ 7.30-7.05 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 3.90-3.80 (m,
 1H), 3.70 (s, 3H), 2.58-2.45 (m, 2H), 1.80-1.60 (m, 2H),
 1.50-1.20 (m, 18H), 0.85 (t, *J*=5.8 Hz, 3H)。

實例 30

(R)-3-(苄基氧基)十四烷酸 (33)

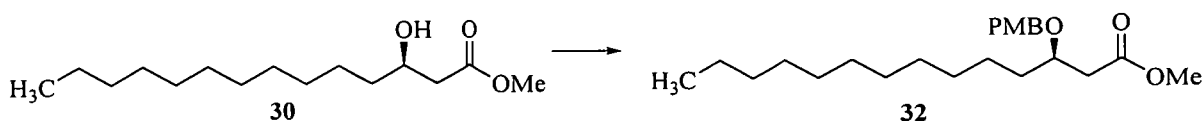


將酯 31 (1.3 g, 3.73 mmol) 溶解於 THF/MeOH/CH₃CN 混合
 物 (v/v/v, 1/1/1, 90 mL) 中。添加存於水 (30 mL) 中之溶液形
 式之氫氧化鋰單水合物 (235 mg, 5.6 mmol)，且將混合物攪
 拌過夜。在真空中將溶劑量減少為約 30 mL。向剩餘水溶
 液中添加 1 M 氫氯酸以使 pH 降低至 3。用二乙醚 (3×40 mL)

萃取水層。將合併之有機萃取物經硫酸鈉乾燥。藉由過濾去除乾燥劑，且使用旋轉蒸發器去除溶劑。藉由矽膠上層析(40 g RediSep管柱，用0%至50%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經40 min，40 mL/min)純化殘留物，從而得到無色液體狀產物33 (990 mg, 79%)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.05 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 3.90-3.80 (m, 1H), 2.58-2.45 (m, 2H), 1.80-1.60 (m, 2H), 1.50-1.20 (m, 18H), 0.85 (t, *J*=5.8 Hz, 3H)。

實例 31

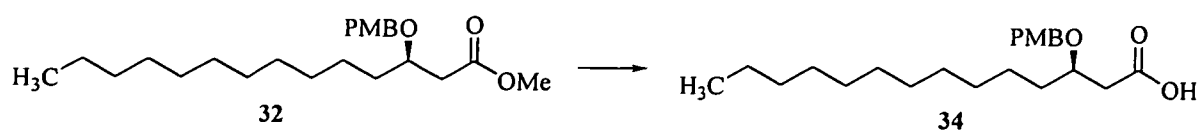
(R)-3-(4-甲氧基苄基氧基)十四烷酸甲酯(32)



向化合物30 (3.50 g, 12.9 mmol)及三氯乙醯亞胺4-甲氧基苄基酯(4.65 g, 17.3 mmol)存於DCM (100 mL)中之溶液中添加樟腦磺酸(450 mg, 1.92 mmol)。將混合物在室溫下攪拌過夜。將混合物用飽和NaHCO₃溶液(300 mL)及水(300 mL)洗滌並經Na₂SO₄乾燥。藉由過濾去除乾燥劑，且使用旋轉蒸發器去除溶劑。藉由矽膠上層析(120 g RediSep管柱，用0%至30%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經70 min，85 mL/min)純化殘留物，從而得到無色液體狀產物32 (4.01 g, 81%)。

實例 32

(R)-3-(4-甲氧基苄基氧基)十四烷酸(34)



將酯 32 (4.01 g, 10.4 mmol) 溶解於 THF/MeOH/CH₃CN 混合物 (v/v/v, 1/1/1, 90 mL) 中。添加存於水 (30 mL) 中之溶液形式之氫氧化鋰單水合物 (874 mg, 20.8 mmol)，且將混合物攪拌過夜。在真空中將溶劑量減少為約 30 mL。向剩餘水溶液中添加氫氯酸 (1 M) 以使 pH 降低至 3。用二乙醚 (3×40 mL) 萃取水層。將合併之有機萃取物經硫酸鈉乾燥。藉由過濾去除乾燥劑，且使用旋轉蒸發器去除溶劑。藉由矽膠上層析 (120 g RediSep 管柱，用 0% 至 50% 乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經 60 min, 85 mL/min) 純化殘留物，從而得到無色液體狀產物 34 (3.37 g, 89%)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.22 (d, *J*=6.1 Hz, 2H), 6.82 (d, *J*=6.1 Hz, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.81 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.65-2.49 (m, 2H), 1.80-1.60 (m, 2H), 1.50-1.20 (m, 18 H), 0.85 (t, *J*=5.8 Hz, 3H)。

實例 33

(R)-3-(4-甲氧基苄基氧基)十四烷酰氯 (35)

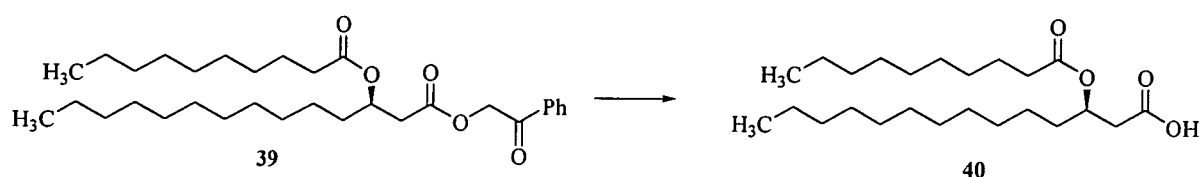


向酸 34 (500 mg, 1.37 mmol) 存於 DCM (5 mL) 中之溶液中添加二甲基甲酰胺 (DMF) (100 mg, 1.37 mmol)，且將所得混合物冷卻至 -10°C。逐滴添加存於 DCM (5 mL) 中之草

mL)洗滌並經Na₂SO₄乾燥。藉由過濾去除乾燥劑，且使用旋轉蒸發器去除溶劑。藉由矽膠上層析(120 g RediSep管柱，用0%至40%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經50 min，85 mL/min)純化殘留物，從而得到無色液體狀產物39 (6.68 g, 97%)。

實例 36

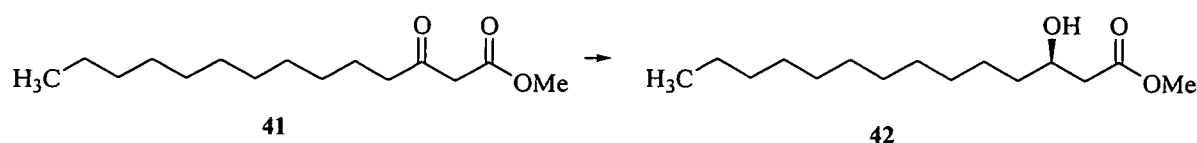
(R)-3-(癸酰基氧基)十四烷酸(40)



將酯39 (10.15 g, 20.77 mmol)溶解於乙酸(100 mL)中。添加鋅(15.5 g, 237 mmol)，且將混合物加熱回流4 h。在真空下去除乙酸且使殘留物與甲苯共沸至乾燥。藉由矽膠上層析(120 g RediSep管柱，用0%至60%乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫，經50 min，85 mL/min)純化殘留物，從而得到無色液體狀產物40 (7.2 g, 89%)。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.23-5.19 (m, 1H), 2.62-2.55 (m, 2H), 2.34-2.25 (m, 2H), 1.65-1.58 (m, 2H), 1.28-1.20 (m, 32H), 0.85 (m, 6H)。

實例 37

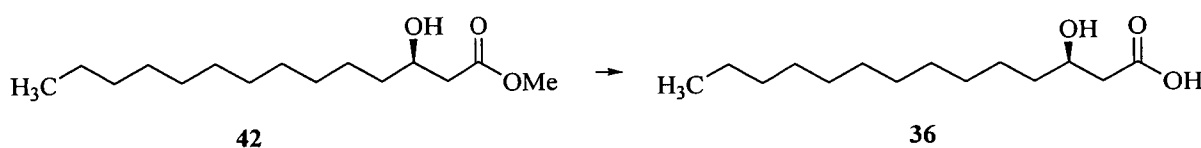
(R)-3-羥基十四烷酸甲酯(39)



向 300 mL 高壓反應器玻璃套管中之存於甲醇 (30 mL) 中的 3-側氧基十四烷酸甲酯 (41, 5.27 g, 20.6 mmol) 的漿液中通 N_2 10 分鐘。添加二氯-*R*-2,2'-雙(二苯基磷基)-1,1'-聯萘基鈦 (142 mg, 1.1 mmol) 且將混合物放置於 Parr 5500 系列集成反應器中。向反應器中充入 H_2 (60 psi) 且通風 3 次。隨後向反應器中充入 H_2 (60 psi) 之最後部分，攪拌 (600 rpm) 並加熱至 $50^\circ C$ 並保持 20 h。隨後將反應器冷卻至室溫且在真空中濃縮混合物。藉由矽膠層析用 0% 至 50% 乙酸乙酯 / 己烷之梯度洗脫純化所得殘留物，從而提供灰白色固體狀物 42 (3.97 g, 74%)。 1H NMR ($CDCl_3$) δ 4.00-3.98 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.82 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 2.62-2.30 (m, 2H), 1.54-1.39 (m, 3H), 1.27 (br s, 17H), (m, 20H), 0.86 (t, $J=7.0$ Hz, 3H)。

實例 38

(*R*)-3-羥基十四烷酸 (36)

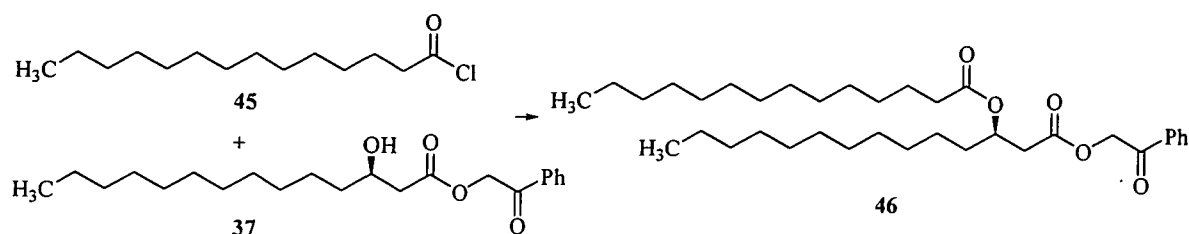


向 (*R*)-3-羥基十四烷酸甲酯 (42, 8.17 g, 31.5 mmol) 存於 THF (66 mL) 及水 (66 mL) 中之溶液中添加氫氧化鋰單水合物 (1.98 g, 47.2 mmol) 並於室溫下攪拌 2 h。隨後用二乙醚 (1 L) 稀釋混合物且用氫氯酸溶液 (1 N) 將 pH 調節至約 3。隨後用二乙醚 (200 mL) 萃取溶液，且合併有機部分並經 Na_2SO_4 乾燥。藉由過濾去除 Na_2SO_4 且在真空中濃縮濾液，

從而提供灰白色固體狀 (*R*)-3-羥基十四烷酸 (36, 7.59 g, 98%)。¹H NMR (CDCl₃) δ 3.99-3.94 (m, 1H), 2.45-2.39 (m, 2H), 1.47 (br s, 3H), 1.29 (br s, 17H), 0.89 (t, *J*=7.0 Hz, 3H)。

實例 39

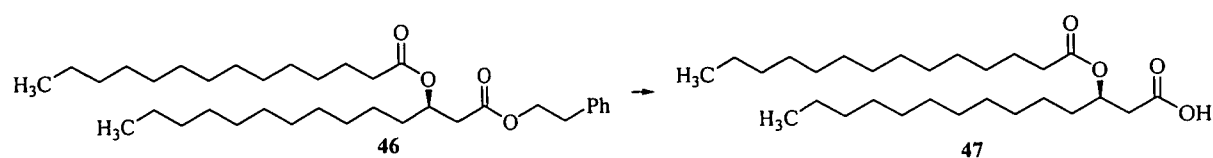
(*R*)-2-側氧基-2-苯乙基-3-十四烷鹽基氧基十四烷酸酯 (46)



向 3-羥基十四烷酸 (*R*)-2-側氧基-2-苯乙基酯 (37, 根據實例 34 製備, 10.8 g, 29.8 mmol) 存於吡啶 (40 mL) 中之溶液中添加肉豆蔻醯氯 (45, 8.83 g, 35.8 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌 14 h。隨後在真空中濃縮混合物, 且藉由將殘留物溶解於甲苯 (100 mL) 中並在真空中濃縮去除殘留吡啶。藉由矽膠層析用 0% 至 20% 乙酸乙酯/己烷之梯度洗脫純化所得殘留物, 從而提供無色油狀物 46 (16.31 g, 83%)。¹H NMR (CDCl₃) δ 7.90 (m, 2H), 7.64-7.57 (m, 1H), 7.50-7.45 (m, 2H), 5.33 (s, 2H), 5.31-5.27 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.33-2.26 (t, *J*=4.5 Hz, 2H), 1.65-1.58 (m, 2H), 1.31-1.21 (m, 40 H), 0.85 (t, *J*=10.0 Hz, 6H)。

實例 40

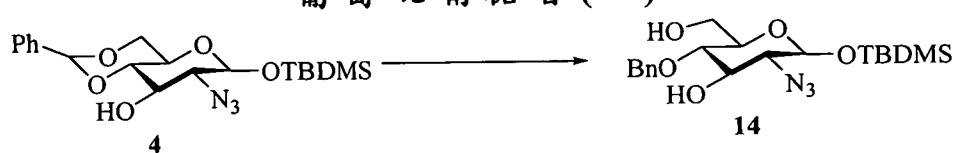
(*R*)-3-(十四烷鹽基氧基)十四烷酸 (47)



向 46 (16.28 g, 28.42 mmol) 存於乙酸 (150 mL) 中之溶液中添加鋅粉 (24.42 g, 373.3 mmol)。隨後將混合物加熱至回流溫度 (115°C) 並保持 3 h。隨後在真空中濃縮混合物，且藉由將殘留物溶解於甲苯 (100 mL) 中並在真空中濃縮去除殘留吡啶。藉由矽膠層析用 0% 至 30% 乙酸乙酯 / 己烷之梯度洗脫純化所得殘留物，從而提供無色油狀 (*R*)-苄基 3-(十四烷鹽基氧基) 十四烷酸 (47, 11.14 g, 86% 產率)。¹H NMR (CDCl₃) δ 5.29-5.18 (m, 1H), 2.62-2.55 (m, 2H), 2.34-2.25 (m, 2H), 1.65-1.58 (m, 3H), 1.28-1.20 (m, 40 H), 0.85 (m, 6H)。

實例 41

第三丁基二甲基甲矽烷基-2-疊氮基-4-*O*-苄基-2-去氧-β-D-葡萄糖吡喃糖苷 (47)



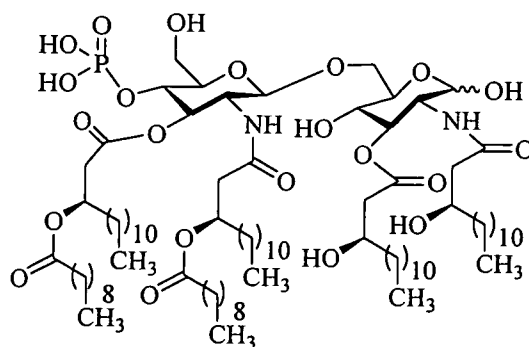
將化合物 4 (根據實例 3 製備, 1.32 g, 3.36 mmol) 溶解於 BH₃ (1 M) 存於 THF (18.1 mL, 18.1 mmol) 中之溶液中。在將混合物於 0°C 下攪拌 5 min 後，逐滴添加三氟甲磺酸二丁硼 (1 M, 存於 DCM 中, 3.62 mL, 3.62 mmol)，且將反應混合物於 0°C 下再攪拌 1 h。隨後，添加三乙胺 (0.5 mL) 及甲醇 (~0.5 mL) 直至停止釋放 H₂ 氣體為止。在真空中蒸發溶

劑，且將殘留物與甲醇(3×50 mL)一起共蒸發。藉由矽膠管柱層析(己烷/乙酸乙酯，8:1 (v/v))純化殘留物，從而得到無色油狀物 14 (0.67 g, 49%)。 $R_f = 0.40$ (己烷/乙酸乙酯，3:1(v/v))。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.32-7.31 (m, 5H), 4.81 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H, $J=12.0, 1.5$ Hz, 1H), 3.49-3.43 (m, 2H), 3.33 (br s, 1H), 3.22-3.17 (m, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.14 (s, 6H)。

實例 42

活體內 TH1-型免疫應答之誘發

此實例證實本發明之闡釋性 GLA 化合物的活體內 Th1-型免疫刺激劑活性，該化合物具有以下結構(IX)：



IX

化合物 IX 用於含有結核分枝桿菌抗原性多肽(稱作 ID83)之疫苗中。採用標準免疫方法及試劑(Current Protocols in Immunology, Coligan 等人(編輯) 2006 John Wiley & Sons, NY)。將小鼠(四隻 C57BL/6 動物/組)用存於水中之 ID83 抗原(每次接種免疫 8 μg /動物)、調配於穩定乳液媒劑中之 ID83 抗原(每次接種免疫 8 μg /動物)、或調配於含有 (i) GLA-SE(每次接種免疫 10 μg /動物)或 (ii) 化合物 IX(每次接種免疫 10 μg /動物)之穩定乳液中的 ID83 抗原(每次接種免

疫 8 μg /動物)以三周之間隔接種免疫三次。

在每次注射一周後，對小鼠實施取血以評價抗原特異性抗體(IgG1及IgG2c)應答。在最後一次接種免疫三周後，將小鼠處死且採集脾以根據已公開方法(同一出處)藉由ELISPOT分析對活體外抗原刺激之T細胞依賴性IFN- γ 細胞因子應答。IFN- γ 細胞因子應答與抵抗結核分枝桿菌感染之TH1保護性表現型相關。

圖1顯示在使用與10 μg 化合物IX之穩定乳液(SE)一起調配之ID83抗原及ID83組份抗原(Rv2608、Rv1813及Rv3620)與調配於GLA-SE、SE或水中之ID83相比第三次接種免疫後三周在小鼠中誘發之抗-ID83 IFN- γ 細胞因子產生的ELISPOT數據。顯示各組中之IFN- γ 分泌細胞/百萬脾細胞的平均值及SEM。本文實例中所用「GLA-SE」係指如共同擁有之美國專利公開案第20080131466號中所述化合物之穩定乳液，其中 R^1 、 R^3 、 R^5 及 R^6 係 C_{11} 直鏈烷基；且 R^2 及 R^4 係 C_{13} 直鏈烷基。

所有動物均對ConA、強效細胞活化劑及分裂素等效地應答。ID83+化合物IX疫苗接種誘發有力ID83抗原特異性細胞因子應答，而在ID83 +水或ID83+SE對照組中觀察到極少或未觀察到該等應答。在用ID83組份抗原、Rv2608、Rv1813及Rv3620重新刺激時，自用ID83 +化合物IX或ID83+GLA-SE免疫接種之小鼠純化之脾細胞中激發IFN- γ 分泌細胞之類似位準。

總之，具有結核分枝桿菌疫苗抗原候選物ID83之穩定油

調配物中的化合物IX主要誘發與保護性TH1表現型相關之細胞類型(T細胞)的抗原特異性免疫應答。

實例 43

活體內 TH1-及 TH2-型免疫應答之誘發

此實例證實含有結核分枝桿菌抗原(稱作ID83)之疫苗中的化合物IX之活體內Th1-及Th2-型免疫刺激劑活性。採用標準免疫方法及試劑(Current Protocols in Immunology, Coligan等人(編輯) 2006 John Wiley & Sons, NY)。

將小鼠(四隻C57BL/6動物/組)用單獨使用或調配於含有化合物IX(每次免疫接種10 μ g/動物)之穩定乳液中的ID83抗原(每次免疫接種8 μ g/動物)以三周間隔免疫接種三次。藉由在每次免疫接種一周後使動物流血採集血清，且藉由ELISA根據已公開方法(同一出處)檢驗對ID83具有特異性之IgG1及IgG2c抗體的血清含量。IgG1或IgG2c抗體同型物之優勢分別與TH2或TH1應答相關。已證實保護抵抗結核分枝桿菌感染必需TH1應答。

如圖2中所示，用存於水中之ID83疫苗接種來主要誘發抗原特異性IgG1抗體。相反，ID83+SE、ID83 +化合物IX-SE或ID83+GLA-SE疫苗接種誘發較高IgG2c抗體效價，並將表現型轉化為混合IgG1:IgG2c抗原特異性抗體應答。

實例 44

人類細胞中 TLR4依賴性免疫刺激之誘發

此實例證實化合物IX在人類細胞中之免疫刺激活性。在活體外使用具有編碼1) TLR4、MD-2及CD14、或2) TLR2

及TLR6之表現載體的HEK 293細胞(InvivoGen)測試化合物IX以界定化合物活性及對TLR4之依賴性並排除TLR2之活化。該等HEK 293細胞系進一步經NF-kB報告載體pNifty-2穩定轉染以使在活化TLR信號傳導途徑時鹼性磷酸酶分泌至生長介質中。將經轉染細胞系以 5×10^4 個細胞/孔平鋪於96孔板中並刺激16-24小時，在含有一系列稀釋之化合物IX及其他佐劑的培養基中培養。在培養基中使用QUANTIBLue®分析(InvivoGen)量測所分泌鹼性磷酸酶活性。數據量測為超出PBS陰性對照之NF-kB增強。使用此分析，化合物IX顯示於低達 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 之濃度下NF-kB增強兩倍以上(圖3)。該等實驗之結果證實化合物IX之清晰TLR4激動劑活性，其似乎不與TLR2之誘發相關。基於MD2及TLR4之報告原子結構的結構考慮因素設計化合物IX。因此，其結合並激發類似於商業批准之TLR4激動劑(MPL®)之曲線的曲線之事實係令人驚訝且意想不到的結果。更具體而言，在預計細胞因子位準升至其自身可施加不良副作用之程度之前，化合物IX之曲線隨濃度增大有利地快速地趨於平穩。因而，預期本發明之化合物IX及其他闡釋性化合物可寬濃度範圍內安全地投與，此在患者中臨床結果的重現性的情形下及對於變化成人及兒童之劑量的安全性係高度合意的。就此而言，化合物IX之較低細胞因子活性係將進一步有利於其在臨床調配物中之安全使用之令人吃驚且合意的結果。

實例 45

人類血細胞中免疫刺激細胞因子之誘發

在此實例中，用化合物IX刺激人類全血細胞且實施ELISA分析以檢測免疫刺激細胞因子之誘發。用磷酸鹽緩衝鹽水在96孔板中實施化合物IX及其他佐劑之一系列稀釋(1:5)，總共稀釋7次。混合自兩個不同供體新鮮採取之100 μ l人類血液並與100 μ l佐劑稀釋物一起培育。在培育20小時後，對板進行離心並收集上清液(~70 μ l)，避免收集紅血細胞，且儲存於-20°C下，之後使用標準生物化學程序實施MIP-1- α 及TNF- α ELISA。該等實驗結果進一步證明化合物IX在主要人類血細胞中具有免疫刺激活性(圖4)。因此，該等主要供體結果模擬人類細胞系中觀察到之結果且擴大與可能劑量範圍及此化合物之安全曲線有關之該等重要發現。

本說明書中所提及及/或本申請案資料清單中所列示之所有上述美國專利、美國專利申請公開案、美國專利申請案、外國專利、外國專利申請案及非專利出版物之全部內容皆以引用方式併入本文中。

自上文應瞭解，儘管本文出於闡釋之目的已對本發明之具體實施例予以闡述，但可對其實施各種修改，此並不背離本發明之精神及範疇。因此，除隨附申請專利範圍外，本發明不受其他限制。

【圖式簡單說明】

圖1證實在小鼠用包含抗原及GLA之本發明組合物免疫接種之後活體內誘發之IFN- γ 細胞因子產生；

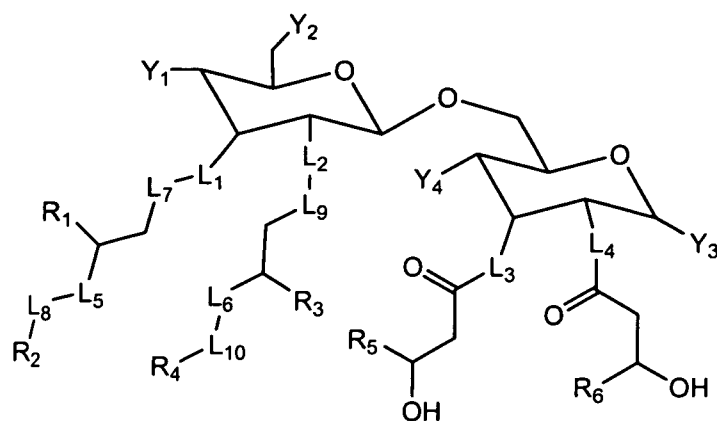
圖 2A-2F 顯示在小鼠用包含抗原及 GLA 之本發明組合物免疫接種之後活體內誘發之抗體應答；

圖 3 顯示於本發明闡釋性 GLA 化合物(化合物 IX)之不同濃度下觀察到的 NF-kB 增強；及

圖 4A-4D 顯示於本發明闡釋性 GLA 化合物(化合物 IX)之不同濃度下免疫刺激細胞因子(MIP-1b 及 TNFa)的誘發。

七、申請專利範圍：

1. 一種具有以下結構(I)之GLA化合物：



(I)

或其醫藥上可接受之鹽，其中：

L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 及 L_6 相同或不同且獨立地係-O-、-NH-或-(CH₂)-；

L_7 、 L_8 、 L_9 及 L_{10} 相同或不同且獨立地不存在或為-C(=O)-；

Y_1 係酸官能團；

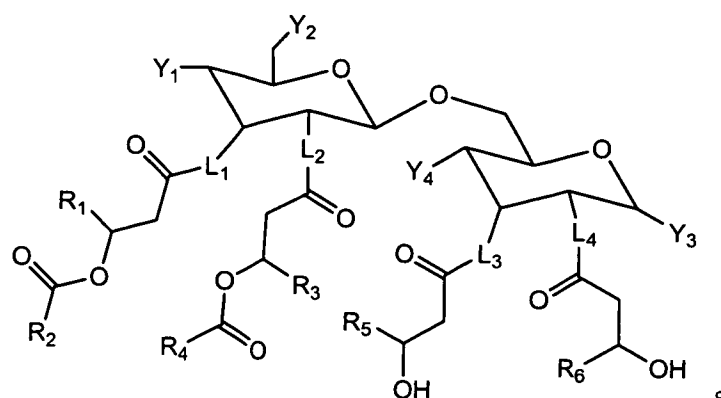
Y_2 及 Y_3 相同或不同且獨立地係-OH、-SH或酸官能團；

Y_4 係-OH或-SH；

R_1 、 R_3 、 R_5 及 R_6 相同或不同且獨立地係C₁₀₋₁₂烷基；且

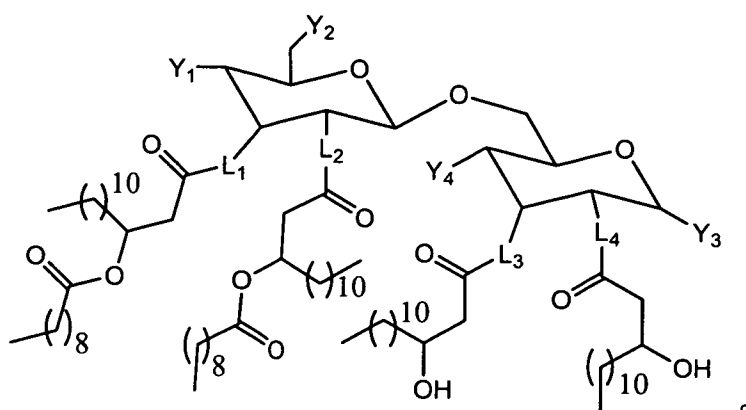
R_2 及 R_4 相同或不同且獨立地係C₈₋₁₀烷基。

2. 如請求項1之GLA化合物，其中 L_5 及 L_6 二者均係-O-， L_7 、 L_8 、 L_9 及 L_{10} 各自係-C(=O)-，且該GLA化合物具有下式(II)：



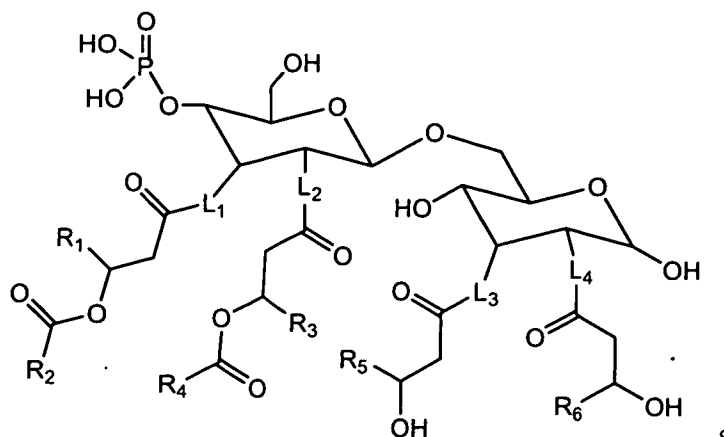
(II)

3. 如請求項1之GLA化合物，其中該GLA化合物具有以下結構(IV)：



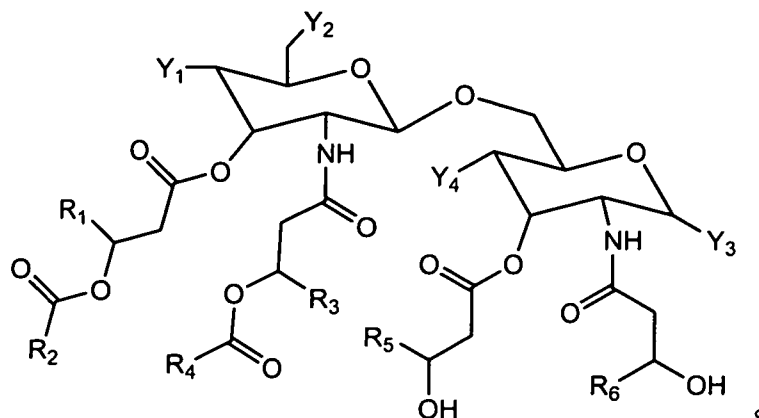
(IV)

4. 如請求項2之GLA化合物，其中 Y_1 係 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 且 Y_2 、 Y_3 及 Y_4 各自係 $-\text{OH}$ ，且該等GLA化合物具有下式(V)：



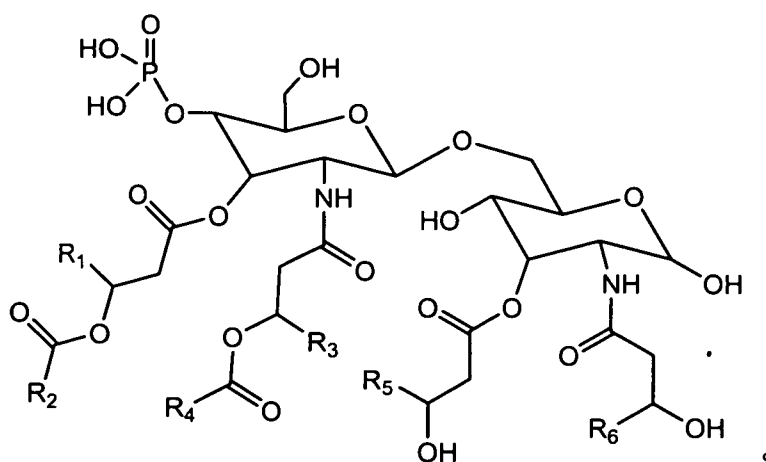
(V)

5. 如請求項2之GLA化合物，其中 L_1 及 L_3 二者均係-O-且 L_2 及 L_4 二者均係-NH-，且該GLA化合物具有下式(VI)：



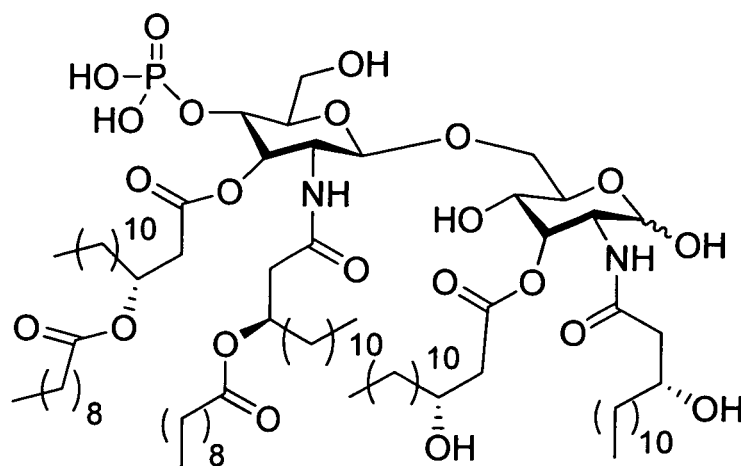
(VI)

6. 如請求項2之GLA化合物，其中 Y_1 係-OP(O)(OH)₂， Y_2 、 Y_3 及 Y_4 各自係-OH， L_1 及 L_3 二者均係-O-，且 L_2 及 L_4 二者均係-NH-，且該GLA化合物具有下式(VII)：



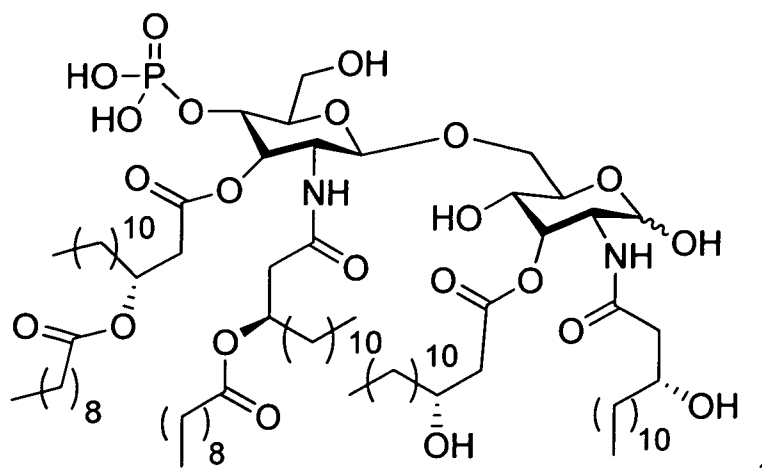
(VII)

7. 如請求項1之GLA化合物，其中該GLA化合物具有以下結構(IX)：



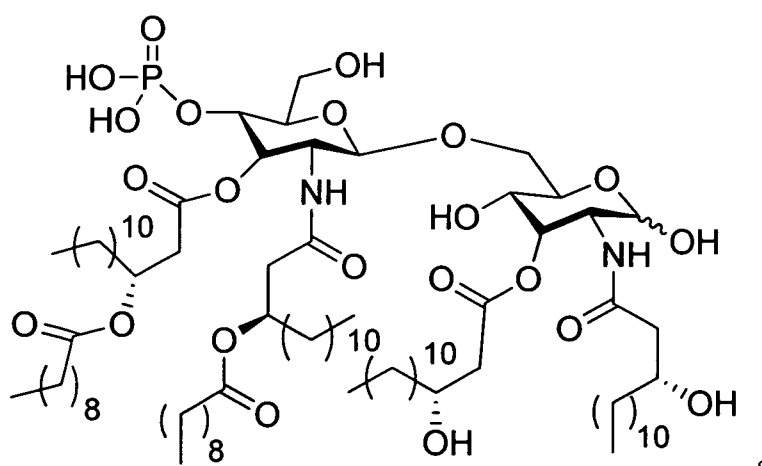
(IX)

8. 一種疫苗組合物，其包含如請求項1至7中任一項之化合物、與抗原或編碼抗原之重組表現載體的組合。
9. 如請求項8之疫苗組合物，其中重組表現構築體係病毒載體。
10. 如請求項9之疫苗組合物，其中該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、皰疹病毒載體、慢病毒載體、痘病毒載體及逆轉錄病毒載體組成之群。
11. 一種如請求項1至7中任一項之化合物於製備藥物之用途，其係用於激發或增強個體之抗原特異性免疫應答。
12. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至7中任一項之化合物及醫藥上可接受之載劑或賦形劑。
13. 一種如請求項12之醫藥組合物於製備藥物之用途，該藥物係用於刺激個體之非特異性免疫應答。
14. 一種用於刺激個體之免疫應答之疫苗組合物，其包含如請求項1至7中任一項之化合物。
15. 如請求項14之疫苗組合物，其中該化合物具有下式：



(IX)

16. 如請求項14之疫苗組合物，其實質上無抗原。
17. 一種如請求項1至7中任一項之化合物於製備藥物之用途，該藥物係用於激發個體之免疫應答。
18. 如請求項17之用途，其中該化合物具有下式：

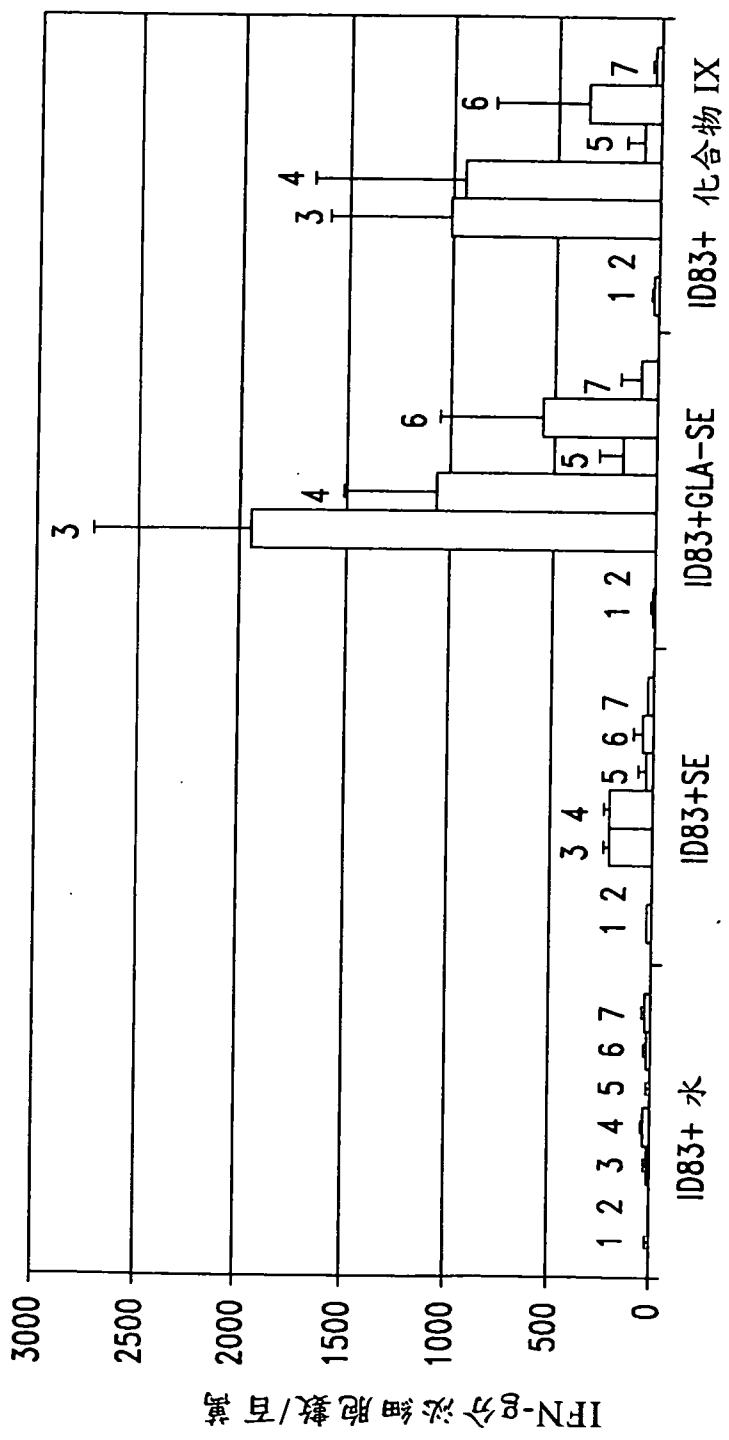


(IX)

19. 如請求項17之用途，其中該藥物實質上無抗原。

八、圖式：

第 63 天 IFN- γ ELISPOT



1= 介質 4=Rv2608
2=conA 5=Rv1813
3=ID83 6=Rv3620
7=PPD

圖 1

Stat IgG1 ID83
(第7天)

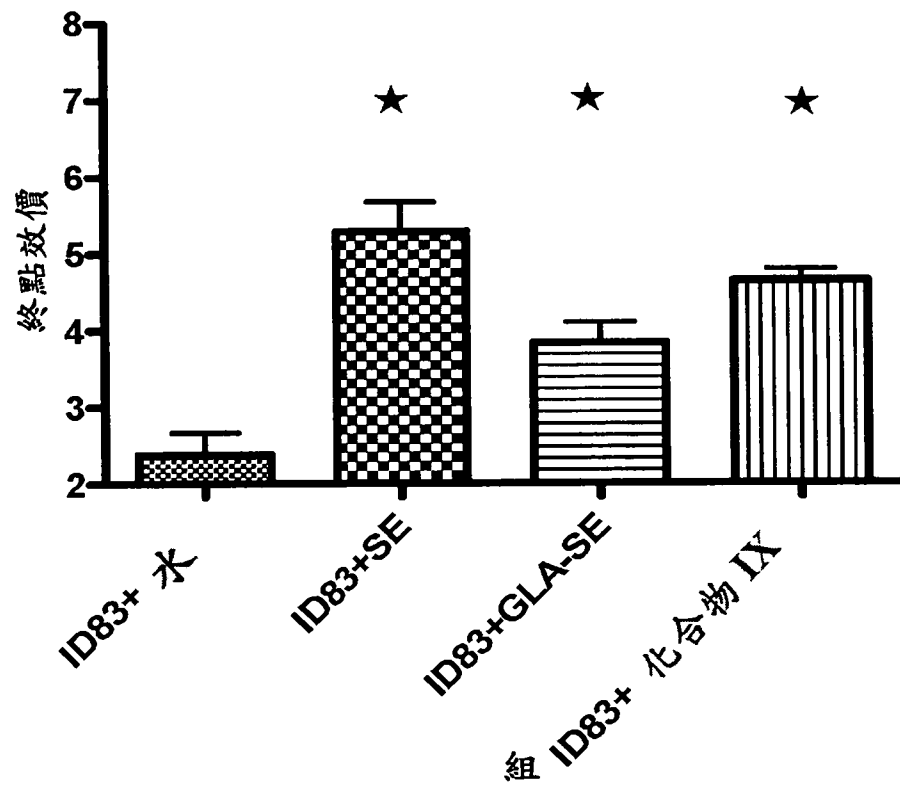


圖2A

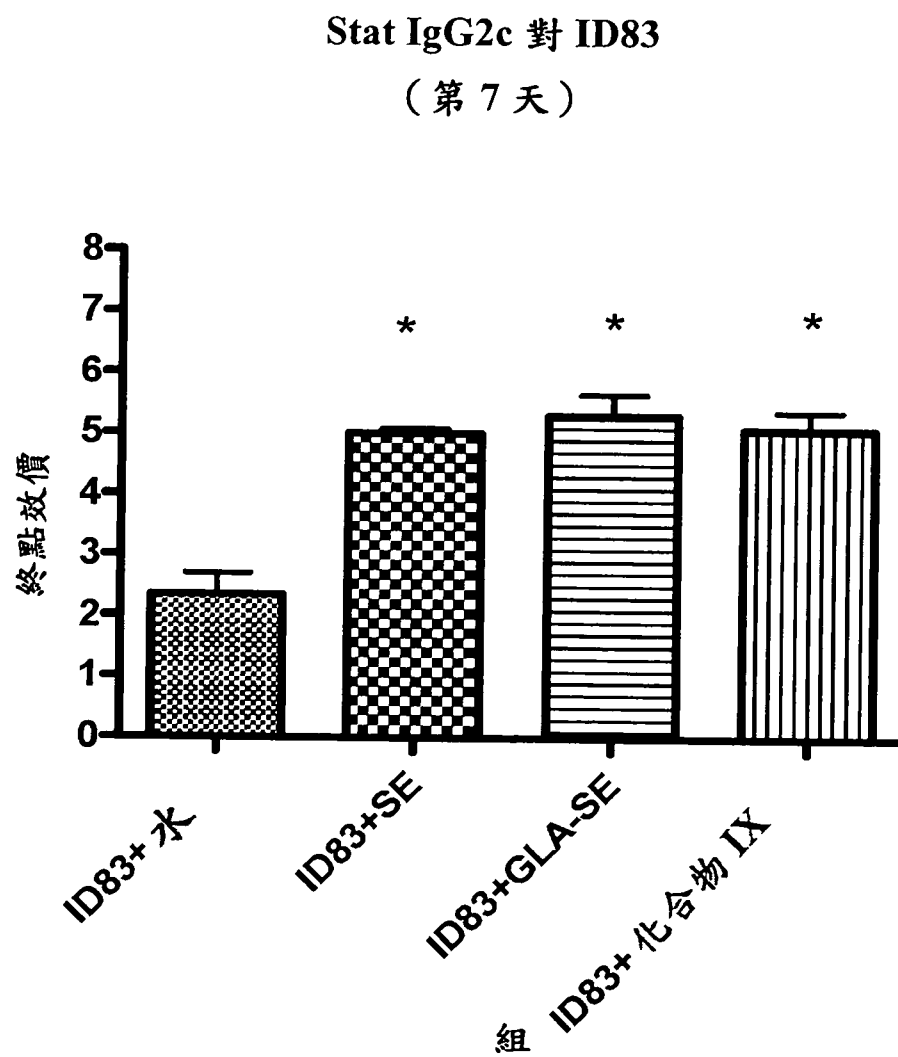


圖 2B

Stat IgG1 ID83

(第 21 天)

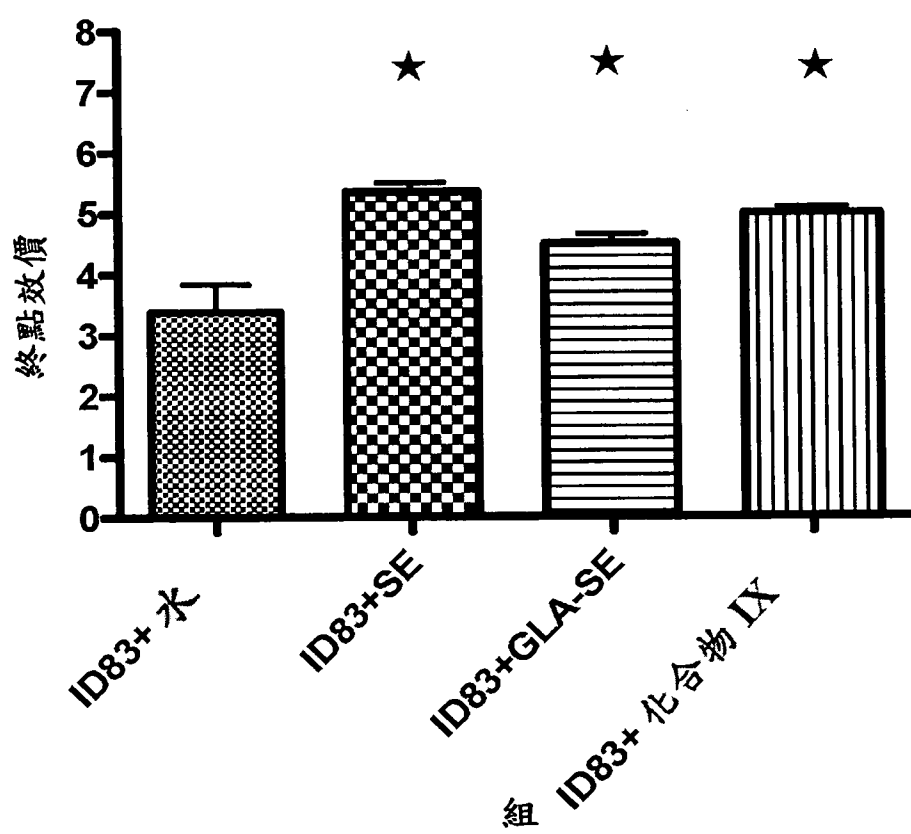


圖2C

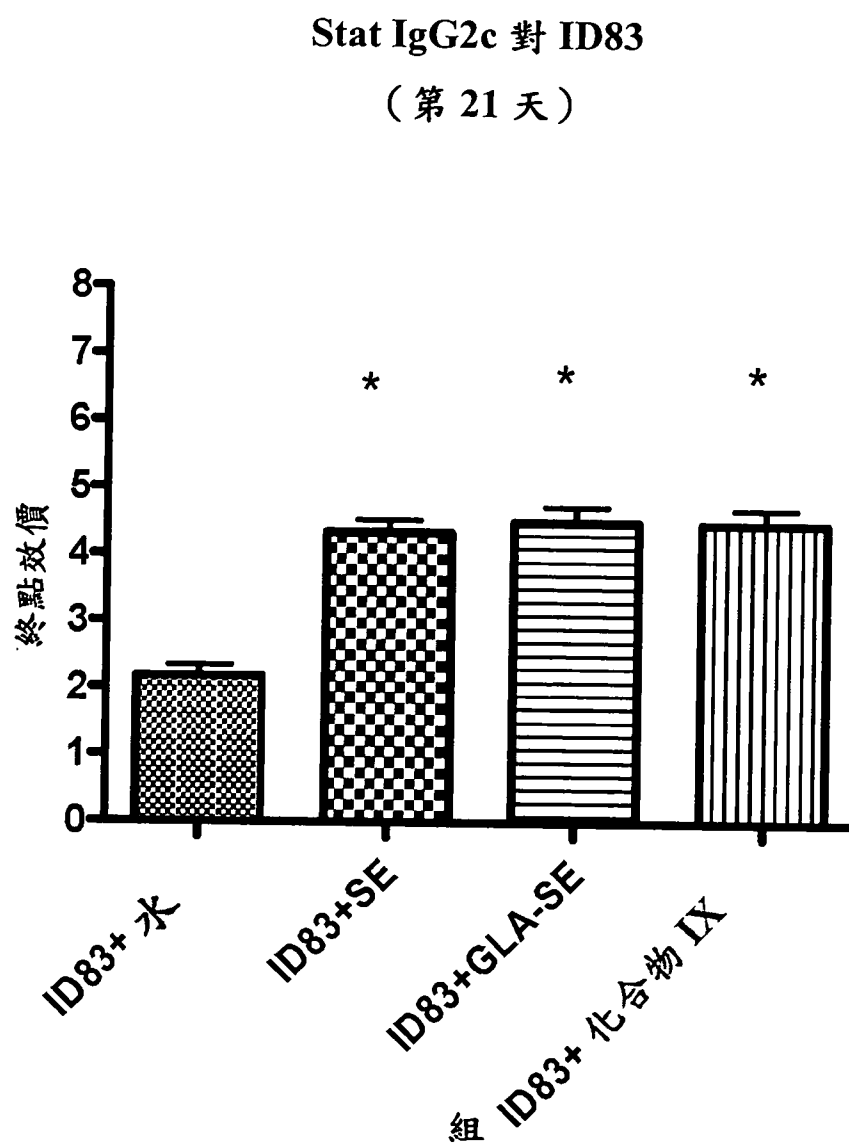


圖 2D

Stat IgG1 ID83

(第 42 天)

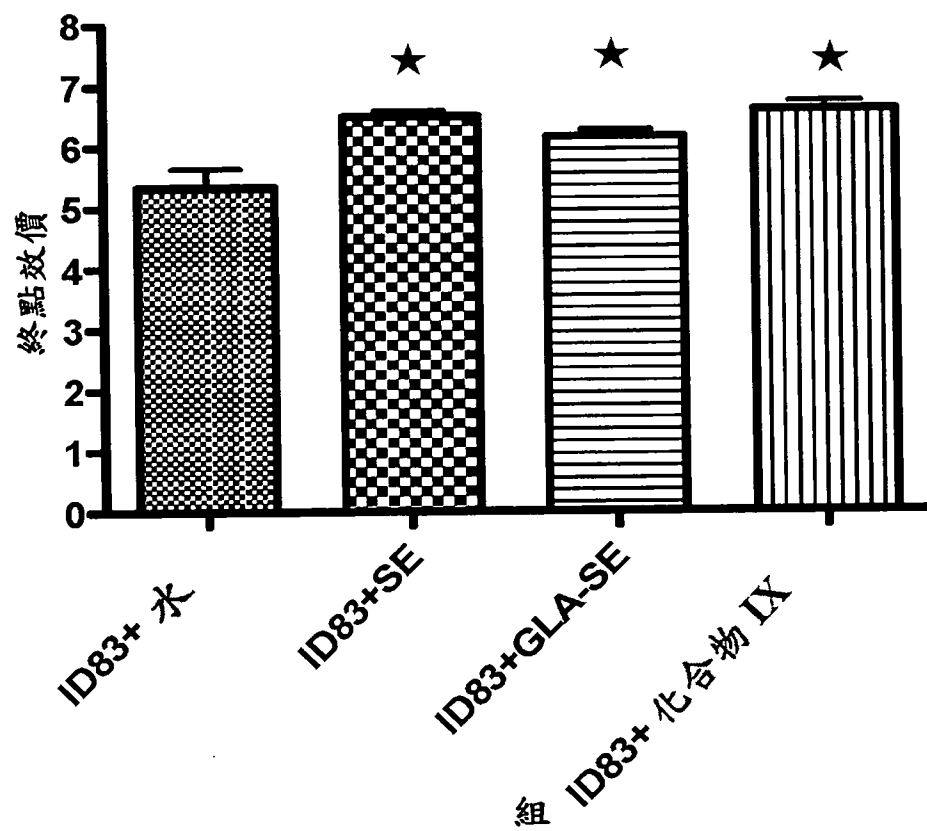


圖 2E

Stat IgG2c 對 ID83
(第 42 天)

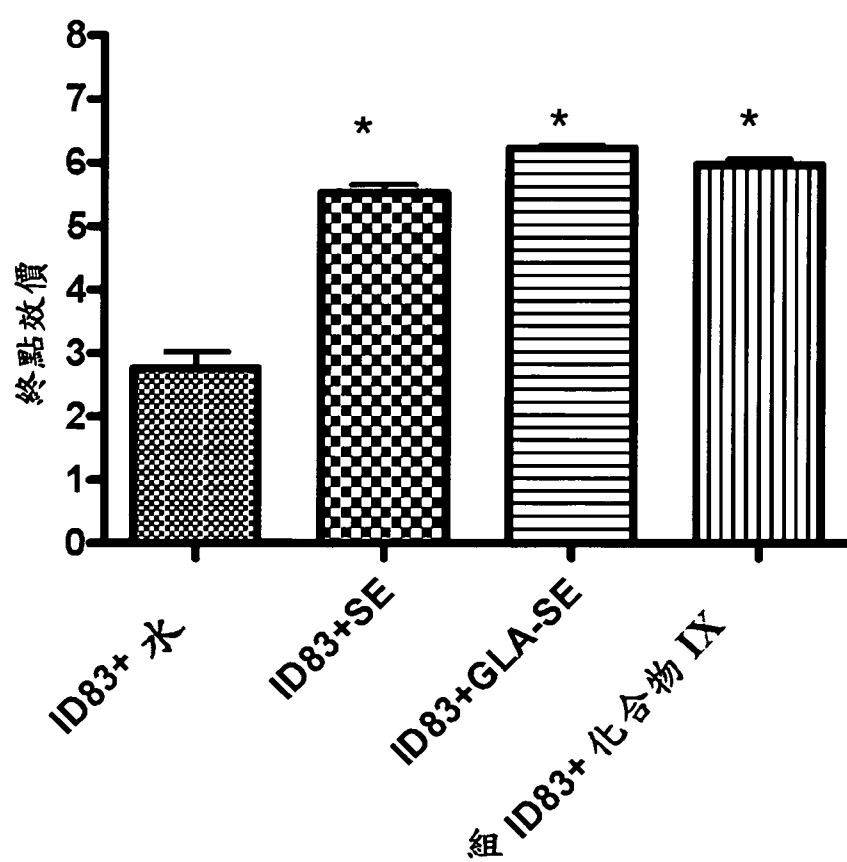


圖 2F

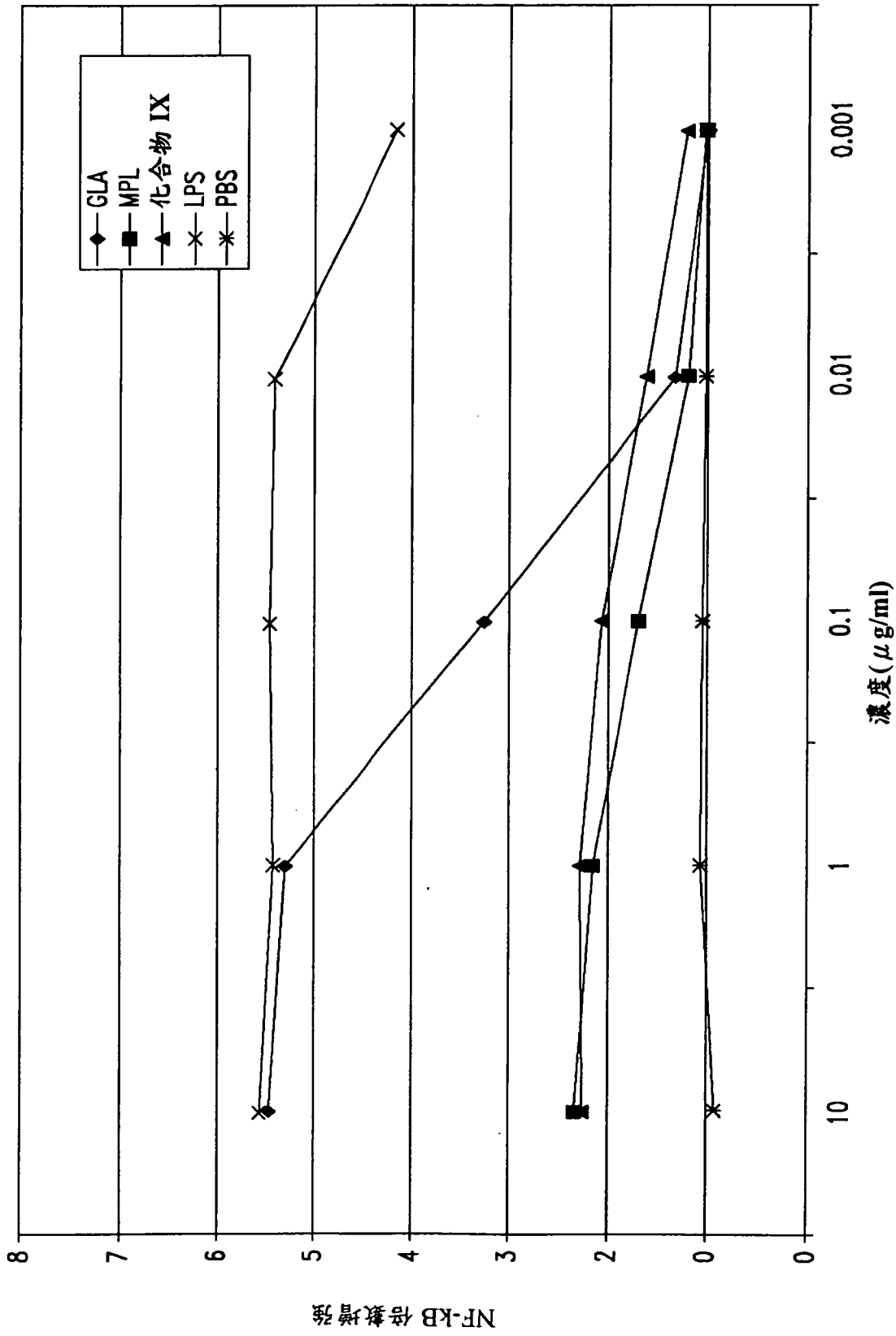


圖 3

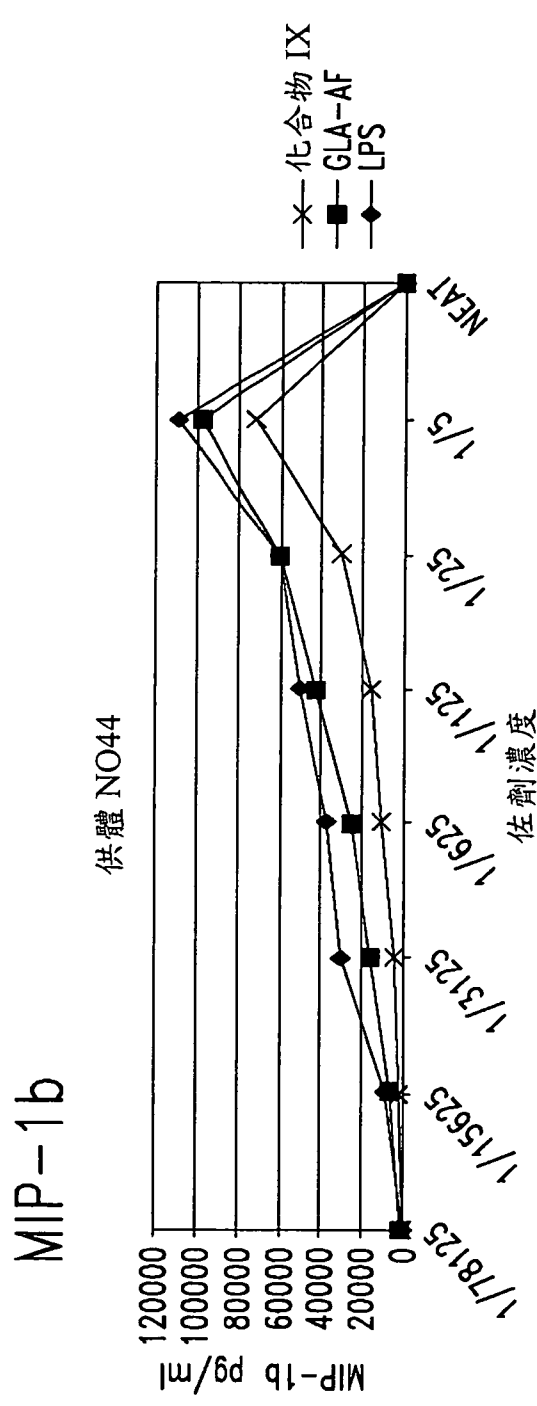


圖 4A

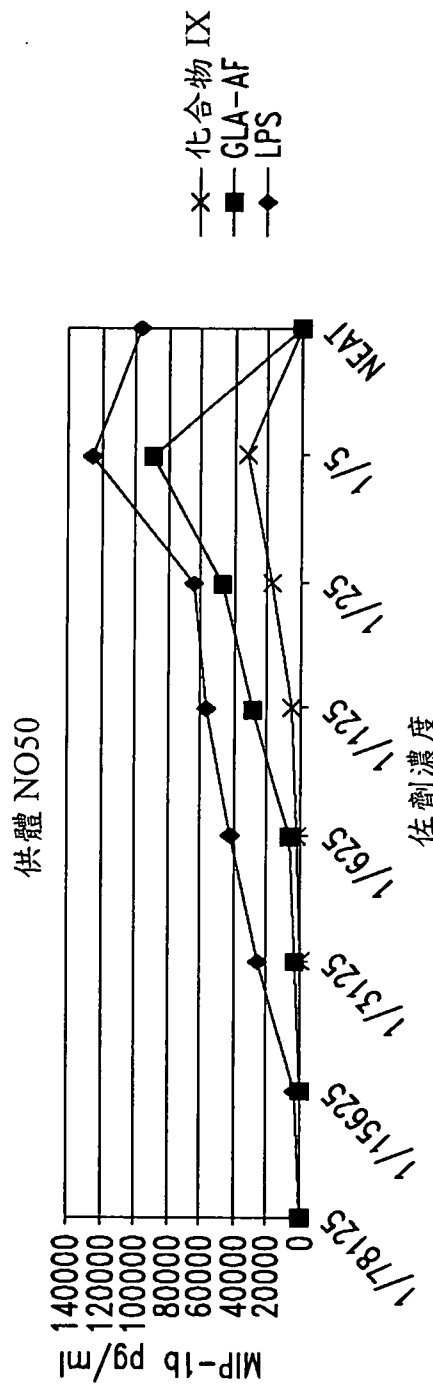


圖 4B

TNF α

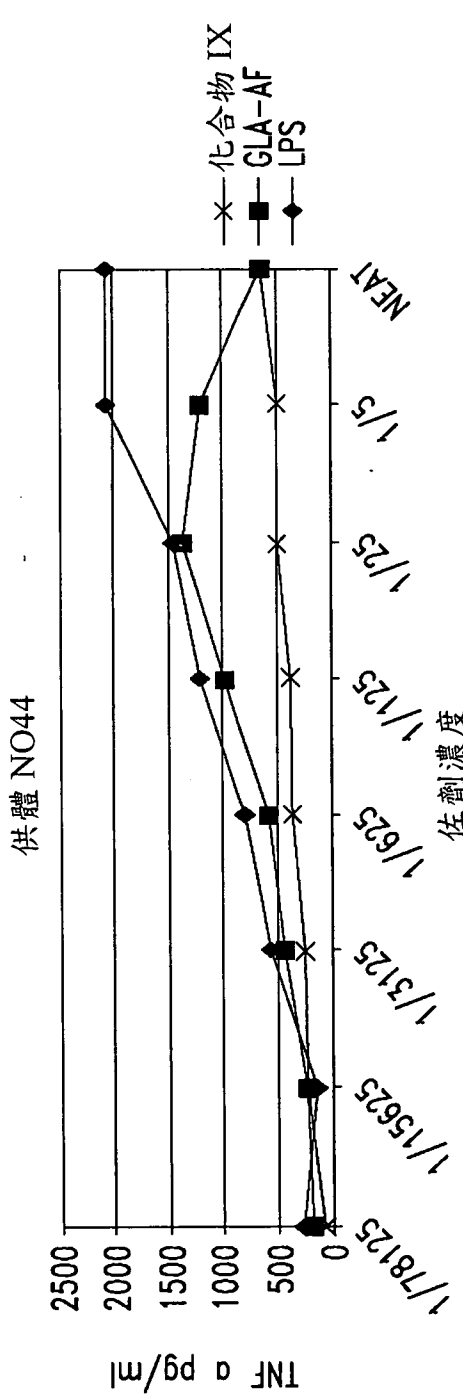


圖 4C

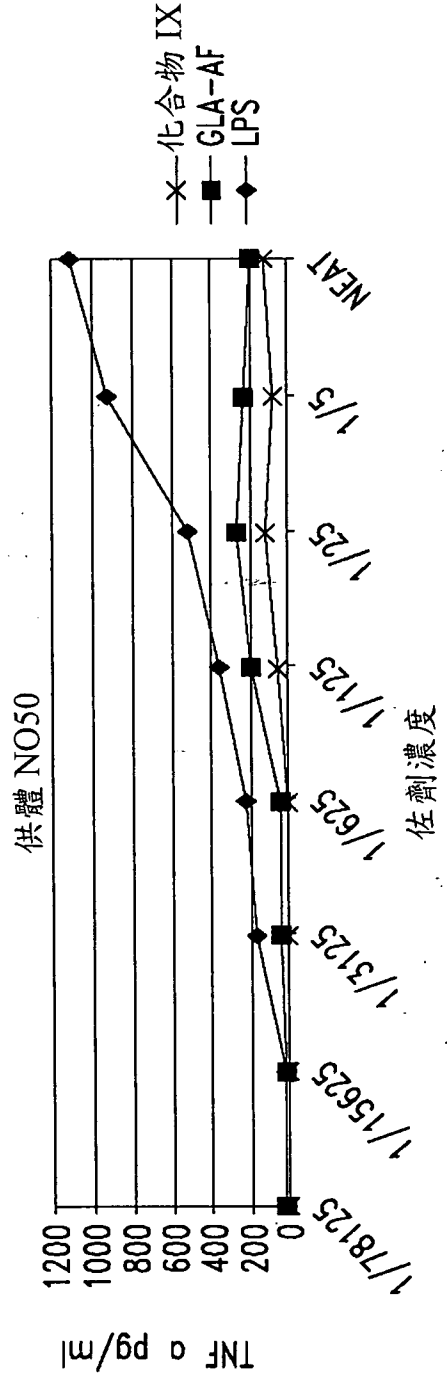


圖 4D