



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103118682 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201180033022. 2

A61K 31/66 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 04. 29

A61K 9/16 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/14 (2006. 01)

61/343, 573 2010. 04. 30 US

A61P 17/00 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 12. 31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/000757 2011. 04. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02011/139348 EN 2011. 11. 10

(71) 申请人 加利福尼亚大学校务委员会

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 D·A·卡森 H·B·科塔姆 林公子

M·陈 C·C·N·吴

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

A61K 31/52 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书38页 附图22页

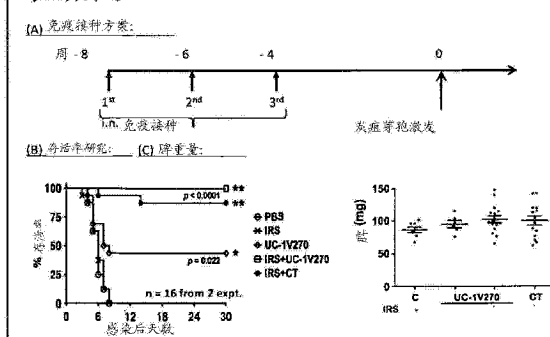
(54) 发明名称

合成 TLR7 激动剂的磷脂缀合物的用途

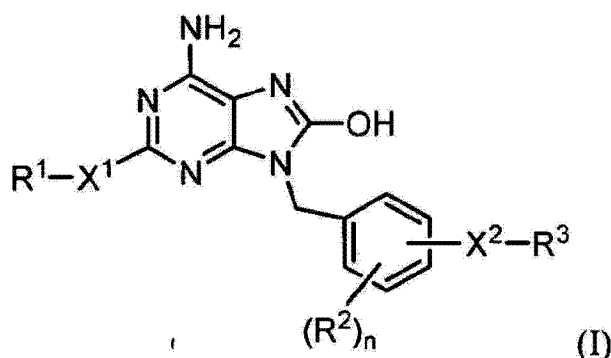
(57) 摘要

本发明提供了 TLR 激动剂的磷脂缀合物的用途,例如,在疫苗中,预防、抑制或治疗各种疾病,包括炎症、癌症和病原体例如微生物、感染。

图16-用UC-1V270作为炭疽疫苗佐剂的完全长期保护



1. 一种增强哺乳动物中免疫应答的方法,包括对所述哺乳动物给予有效量的组合物,所述组合物包括式(I)的化合物,或其互变异构体,或其可药用的盐或溶剂合物:



其中 X^1 为 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR^c-$;

R^1 为氢、 (C_1-C_{10}) 烷基、取代的 (C_1-C_{10}) 烷基、 C_{6-10} 芳基或取代的 C_{6-10} 芳基、 C_{5-9} 杂环基、取代的 C_{5-9} 杂环基;

R^c 为氢、 C_{1-10} 烷基或取代的 C_{1-10} 烷基;或 R^c 和 R^1 与它们所连接的氮一起形成杂环或取代的杂环;

每个 R^2 独立地为 $-OH$ 、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基(烷酰基)、取代的 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基(芳酰基)、取代的 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基、 $-C(O)OH$ (羧基)、 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基(烷氧基羰基)、取代的 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基、 $-NR^aR^b$ 、 $-C(O)NR^aR^b$ (氨基甲酰基)、卤素、硝基或氰基,或 R^2 不存在;

每个 R^a 和 R^b 独立地为氢、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、取代的 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_1-C_6) 烷酰基、取代的 (C_1-C_6) 烷酰基、芳基、芳基 (C_1-C_6) 烷基、Het、Het (C_1-C_6) 烷基、或 (C_1-C_6) 烷氧基羰基;

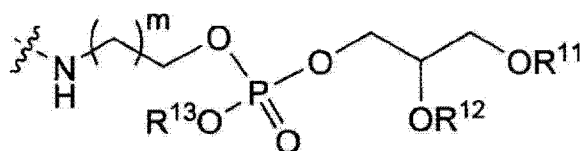
其中,在任意烷基、芳基或杂环基上的所述取代基为羟基、 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 亚烷基、氨基、氰基、卤素或芳基;

n 为 0、1、2、3 或 4;

X^2 为键或连接基团;和

R^3 为包括一个或两个羧酸酯的磷脂。

2. 权利要求 1 的方法,其中 R^3 包括下式的基团:



其中 R^{11} 和 R^{12} 各自独立地为氢或酰基, R^{13} 为负电荷或氢, m 为 1-8, 其中波浪线表示键合位置, 其中带有 OR^{12} 的碳原子处的绝对构型为 R、S 或其混合物。

3. 权利要求 2 的方法, 其中 m 为 1。

4. 权利要求 2 的方法, 其中 R^{11} 和 R^{12} 各自为油酰基。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述 R^3 的磷脂包括两个羧酸酯并且每个羧酸酯包括一个、两个、三个或四个不饱和位点、环氧化位点、羟基化位点或其结合。

6. 权利要求 1 的方法, 其中所述 R^3 的磷脂包括两个羧酸酯并且所述羧酸酯为相同或不

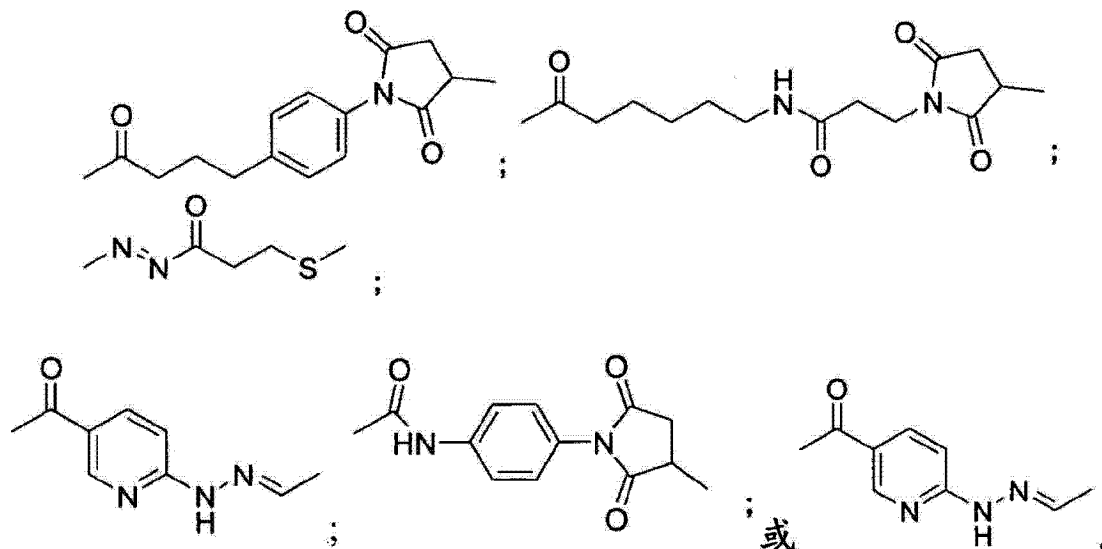
同。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述磷脂的每个羧酸酯为在 C8-C9 处具有不饱和位点的 C17 羧酸酯。

8. 权利要求 6 的方法,其中所述磷脂的每个羧酸酯为在 C9-C10 处具有不饱和位点的 C18 羧酸酯。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中 X^2 为键或在链中具有 1 至约 10 个原子的链,其中所述链的所述原子选自碳、氮、硫和氧,其中任意碳原子可用氧代基团取代,并且其中任意硫原子可用一个或两个氧代基团取代。

10. 权利要求 1-6 任一项的方法,其中 X^2 为 C(0)、



11. 权利要求 1-10 任一项的方法,其中 R^3 包括二油酰基磷脂酰乙醇胺。

12. 权利要求 1-11 任一项的方法,其中 R^3 为 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺并且 X^2 为 C(0)。

13. 权利要求 1-12 任一项的方法,其中 X^1 为氧。

14. 权利要求 1-13 任一项的方法,其中 X^1 为硫或 $-NR^c-$,其中 R^c 为氢、 C_{1-6} 烷基或取代的 C_{1-6} 烷基,其中所述烷基取代基为羟基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氨基、氰基或芳基。

15. 权利要求 14 的方法,其中 X^1 为 $-NH-$ 。

16. 权利要求 1-15 任一项的方法,其中 R^1 和 R^c 一起形成杂环或取代的杂环。

17. 权利要求 16 的方法,其中 R^1 和 R^c 一起形成取代的或未取代的吗啉环、哌啶环、吡咯烷环或哌嗪环。

18. 权利要求 1-15 任一项的方法,其中 R^1 为用 C_{1-6} 烷氧基取代的 C_{1-10} 烷基。

19. 权利要求 1-15 任一项的方法,其中 R^1 为氢、 C_{1-4} 烷基或取代的 C_{1-4} 烷基。

20. 权利要求 19 的方法,其中 R^1 为氢、甲基、乙基、丙基、丁基、羟基 C_{1-4} 亚烷基、或 C_{1-4} 烷氧基 C_{1-4} 亚烷基。

21. 权利要求 20 的方法,其中 R^1 为氢、甲基、乙基、甲氧基乙基或乙氧基乙基。

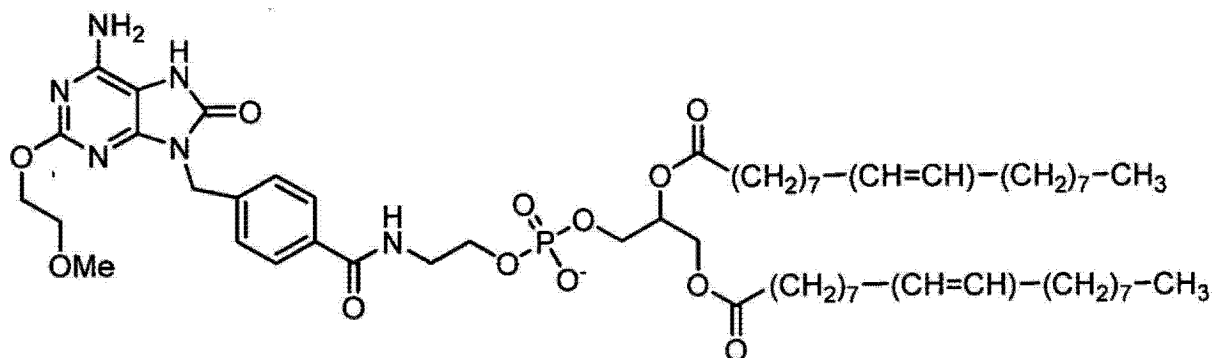
22. 权利要求 1-21 任一项的方法,其中 R^2 为卤素或 C_{1-4} 烷基,或 R^2 不存在。

23. 权利要求 22 的方法,其中 R^2 为氯、溴、甲基或乙基、或 R^2 不存在。

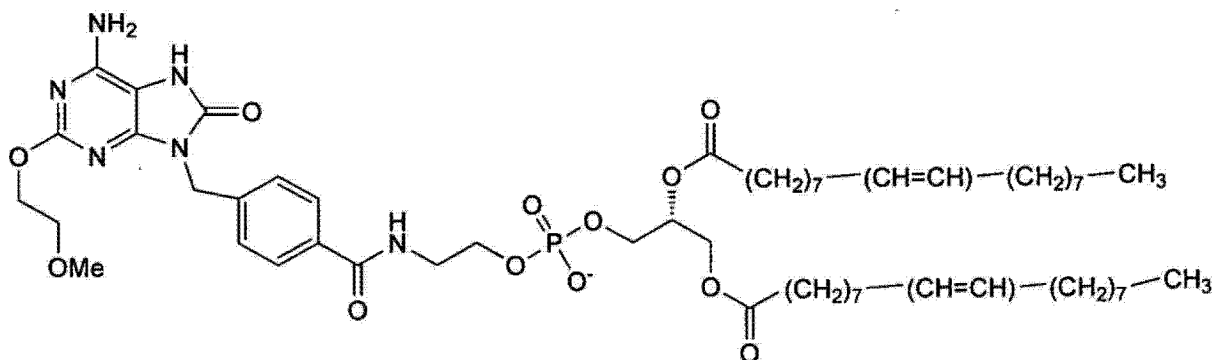
24. 权利要求 1-23 任一项的方法,其中 X^1 为 O, R^1 为 C_{1-4} 烷氧基乙基, n 为 0, X^2 为羰基,

以及 R^3 为二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

25. 权利要求 1-24 任一项的方法, 其中所述式(I) 化合物为:



26. 权利要求 1-25 任一项的方法, 其中所述式(I) 化合物为



27. 权利要求 1-26 任一项的方法, 其中所述组合物还包括一定量的抗原。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述抗原为微生物、蛋白质或芽孢。

29. 权利要求 1-26 任一项的方法, 还包括给予抗原。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述抗原与所述组合物同时给予。

31. 权利要求 29 的方法, 其中所述抗原在所述组合物之前或之后给予。

32. 权利要求 29 的方法, 其中所述抗原为微生物、蛋白质或芽孢。

33. 权利要求 28 或 29 的方法, 其中所述给药可有效预防、抑制或治疗微生物感染。

34. 权利要求 28、32 或 33 的方法, 其中所述微生物为细菌。

35. 权利要求 27 或 29 的方法, 其中所述抗原包括细菌芽孢。

36. 权利要求 1-35 任一项的方法, 其中所述哺乳动物为人。

37. 权利要求 1-36 任一项的方法, 其中所述组合物为鼻内给予。

38. 权利要求 1-36 任一项的方法, 其中所述组合物为皮肤给予。

39. 权利要求 1-38 任一项的方法, 其中所述给予的量可有效预防感染。

40. 权利要求 1-38 任一项的方法, 其中所述给予的量可有效预防、抑制或治疗膀胱病症。

41. 权利要求 1-38 任一项的方法, 其中所述给予的量可有效预防、抑制或治疗皮肤病症。

42. 权利要求 1-41 任一项的方法, 其中所述给予的量不会导致食欲缺乏或体温过低。

43. 权利要求 1-42 任一项的方法, 其中所述给予的量诱导 Th2 免疫应答但没有显著的 Th1 免疫应答。

44. 权利要求 1-11 任一项的方法,其中所述组合物包括形成脂质双层的纳米颗粒和所述化合物。

45. 一种包括组合物的疫苗,所述组合物包括抗原或与肿瘤相关的抗原和一定量的权利要求 1 所示的式(I)化合物,

或其互变异构体;

或其可药用的盐或溶剂合物。

46. 一种包括纳米颗粒的制品,所述纳米颗粒包括形成脂质双层的纳米颗粒和权利要求 1 所示的通式(I)的化合物。

47. 一种纳米颗粒分散剂,包括含权利要求 1-26 任一项中所述化合物的纳米颗粒和分散于水性介质中的脂质,所述纳米颗粒具有的平均粒径为至少 50nm 至约 300nm。

48. 权利要求 47 的纳米分散剂,其中所述脂质为磷脂。

合成 TLR7 激动剂的磷脂缀合物的用途

[0001] 相关申请的相互参引

[0002] 本申请要求 2010 年 4 月 30 日提交的第 61/343,573 号美国临时申请的优先权,该临时申请的公开内容以引用的方式纳入本说明书。

[0003] 政府权利声明

[0004] 本文所描述的发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的批准号为 AI056453 和 AI1077989 的政府基金资助下完成。美国政府对于本发明享有某些权利。

背景技术

[0005] 最近十年来对于微生物病原体的先天识别(innate recognition)的分子机理已经了解很多。普遍接受的是,许多体细胞表达一系列能检测潜在病原体的模式识别受体(pattern recognition receptors),而与适应性免疫系统(adaptive immune system)无关(参见 Janeway et al., *Annu. Rev. Immunol.*, **20**:197(2002))。据认为,这些受体与被称为病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)的微生物组分相互作用。PAMP 的实例包括肽聚糖(peptidoglycan)、革兰氏阳性细胞壁中的脂磷壁酸(lipotechoic acid)、甘露糖(其通常存在于微生物碳水化合物中,但是在人体中罕有)、细菌的 DNA、病毒的双链 RNA 以及真菌细胞壁中的葡聚糖(glucan)。PAMP 通常满足某些标准,所述标准包括:(a)它们由微生物而不是其哺乳动物宿主表达,(b)在多种病原体中的结构保守性,和(c)能够刺激先天免疫(innate immunity)的能力。已经发现 Toll 样受体(Toll-like Receptor, TLR)在 PAMP 检测中和对微生物感染的早期应答中起核心作用(参见 Underhill et al., *Curr. Opin. Immunol.*, **14**:103(2002))。

[0006] 已经识别了十种哺乳动物 TLR 和许多这些 TLR 的激动剂。例如,已经识别了富含鸟嘌呤和尿苷的单链 RNA 作为 TLR7 的天然配体(Diebold et al., *Science*, **303**:1529(2004))。此外,还识别了若干个低分子量的 TLR7 激活剂,包括咪唑并喹啉(imidazoquinoline)和类嘌呤(purine-like)分子(Hemmiet al., *Nat. Immunol.*, **3**:191(2002); Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **180**:6646(2003); Lee et al., *Nat. Cell Biol.*, **8**:1327(2006))。在类嘌呤分子中,9-苄基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)腺嘌呤(“SM”)已被识别作为有效的并且特异性的 TLR7 激动剂。合成的免疫调节剂 R-848 (雷西莫特(resiquimod))活化 TLR7 和 TLR8。尽管 TLR 刺激引发共有的信号传导级联(包括衔接蛋白 MyD88、转录因子 NF- κ B 以及促炎性细胞因子和效应细胞因子),但某些细胞类型仍倾向于产生特定的 TLR。例如,TLR7 和 TLR9 主要存在于树突状细胞(DC)和 B 淋巴细胞中的内体的内面上(在人体中;小鼠巨噬细胞表达 TLR7 和 TLR9)。另一方面,TLR8 存在于人血单核细胞中(参见 Hornung et al., *J. Immunol.*, **168**:4531(2002))。

发明内容

[0007] 本发明提供通过稳定的共价键与磷脂大分子相连的合成 TLR7 激动剂(缀合物)的

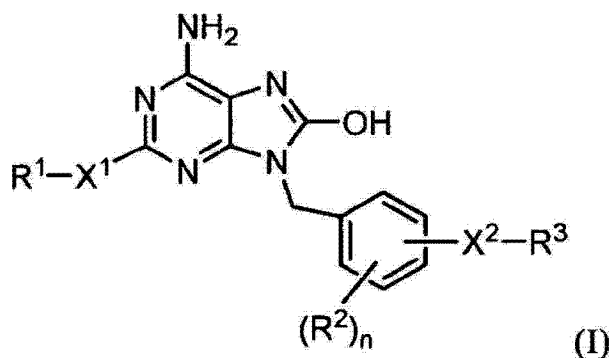
用途,即,所述缀合物不作为前药发挥作用。所述缀合物可包括与合成 TLR7 激动剂直接相连的磷脂大分子、或经由接头(例如氨基、羧基或丁二酰胺基团)与 TLR7 激动剂相连的磷脂大分子。本发明的缀合物为广谱、长效和无毒的合成免疫刺激剂,其可用于激活哺乳动物(例如,人类)的免疫系统,例如在体内通过刺激 TLR7 活性而激活。具体而言,本发明的缀合物可优化免疫应答,同时限制了与非缀合 TLR7 激动剂相关的不合需要的全身副作用。

[0008] 因此,本发明提供了增强免疫应答(例如对特异性抗原的免疫应答)的方法,或诱导全身性免疫应答(general immune response)(不存在特异性抗原的情况下)的方法。在一个实施方案中,所述缀合物作为佐剂起作用,并因此与特异性的免疫应答而非与全身性免疫应答相关。在一个实施方案中,所述缀合物作为全身性免疫刺激剂起作用。在一个实施方案中,所述方法包括对需要其的哺乳动物给予可有效预防、抑制或治疗疾病(包括但不限于,微生物感染、膀胱病症或皮肤病症)的量的抗原和本发明缀合物。可用于本发明中的抗原的非限制性实例包括,但不限于,分离的蛋白质或肽(例如二肽或三肽等)、碳水化合物(多糖)、核苷酸(例如 PNA、RNA 和 DNA 等)、细胞、脂质、微生物(例如病毒、细菌、真菌等)。所述抗原可包括灭活的完整的生物体或微生物,或其亚成分等。在一个实施方案中,对所述抗原和缀合物给药的免疫应答与对所述抗原给药(不存在所述缀合物的情况)或者对相应的未缀合 TLR7 激动剂给药或对其组合给药的免疫应答得到增强。在一个实施方案中,对哺乳动物给予包括所述抗原和所述缀合物的组合物。在一个实施方案中,所述组合物为局部给予,例如皮肤给药(dermal administration)或鼻内给药。在另一个实施方案中,所述组合物为全身给予。在另一个实施方案中,所述抗原和所述缀合物分别配制并且同时给予或顺序给予。

[0009] 因此,本发明提供了包括一定量本发明缀合物的免疫原性组合物,例如,可单独诱导炎症应答而且还可有效增强对抗原的免疫应答的组合物。在一个实施方案中,所述组合物不包括溶剂或防腐剂(如 DMSO 或乙醇),其可在例如人体中具有毒性效应。

[0010] 本发明的缀合物具有式(I),或其互变异构体,或其可药用的盐或溶剂合物:

[0011]



[0012] 其中 X^1 为 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR^c-$;

[0013] R^1 为氢、 (C_1-C_{10}) 烷基、取代的 (C_1-C_{10}) 烷基、 C_{6-10} 芳基或取代的 C_{6-10} 芳基、 C_{5-9} 杂环基、取代的 C_{5-9} 杂环基;

[0014] R^c 为氢、 (C_1-C_{10}) 烷基或取代的 (C_1-C_{10}) 烷基;或 R^c 和 R^1 与它们所连接的氮一起形成杂环或取代的杂环;

[0015] 每个 R^2 独立地为 $-OH$ 、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基(烷酰基)、取代的 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-C(O)-(C_6-C_{10})$

芳基(芳酰基)、取代的 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基、 $-C(O)OH$ (羧基)、 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基(烷氧基羰基)、取代的 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基、 $-NR^aR^b$ 、 $-C(O)NR^aR^b$ (氨基甲酰基)、卤素、硝基或氰基,或 R^2 不存在;

[0016] 每个 R^a 和 R^b 独立地为氢、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、取代的 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_1-C_6) 烷酰基、取代的 (C_1-C_6) 烷酰基、芳基、芳基 (C_1-C_6) 烷基、Het、Het (C_1-C_6) 烷基、或 (C_1-C_6) 烷氧基羰基;

[0017] 其中,在任意烷基、芳基或杂环基上的所述取代基为羟基、 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 亚烷基、氨基、氰基、卤素或芳基;

[0018] n 为 0、1、2、3 或 4;

[0019] X^2 为键或连接基团;和

[0020] R^3 为包括一个或两个羧酸酯的磷脂。

[0021] 在一个实施方案中,本发明的组合物包括含式(I)化合物的纳米颗粒。本说明书中所使用的纳米颗粒,具有的直径为约 30nm-约 600nm,或具有 30-600 之间的任意整数的范围,例如约 40nm-约 250nm,包括直径为约 40nm-约 80nm 或约 100nm-约 150nm。所述纳米颗粒可以通过以下方式形成:混合式(I)化合物(其可以自发形成纳米颗粒);或者将式(I)化合物与脂质制品(如磷脂,包括但不限于,磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸或胆固醇)混合,从而形成纳米脂质体。任选地,将式(I)化合物、脂质制品和二元醇(如丙二醇)结合。

[0022] 在一个实施方案中,单一剂量的所述缀合物可在刺激免疫应答方面显示出非常有效的活性。此外,因为所述缀合物的低毒性,所以在一些情况下可给予较高剂量,例如全身给予;而在其它情况下可给予较低剂量,例如,由于所述缀合物的局部化(localization)。

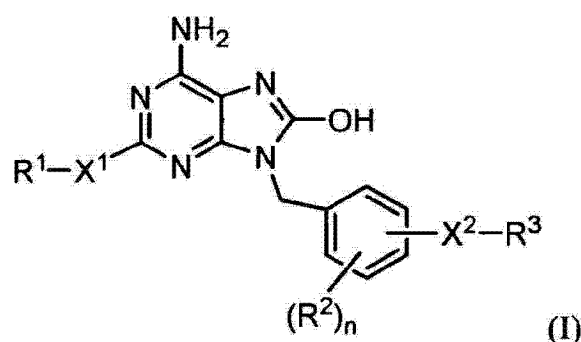
[0023] 因此,本发明提供了用于医学疗法的本发明的缀合物,例如,在疫苗中用于预防微生物感染(如细菌感染或病毒感染),以及用于制备治疗 TLR7 相关病症或症状(其中需要增强的免疫应答)例如癌症的药物。细菌感染包括,但不限于,葡萄球菌属(*Staphylococcus*),链球菌属(*Streptococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、诺卡菌属(*Nocardia*)、梭菌属(*Clostridium*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、李氏杆菌(*Listeria*)和放线菌(*Actinobacteria*);支原体属(*Mycoplasma*);大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)和其它肠杆菌科细菌(*Enterobacteriaceae*)、分枝杆菌(*Mycobacteria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、莫拉氏菌(*Moraxella*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)、乙酸菌(*acetic acid bacteria*)和军团杆菌属(*Legionella*)以及包括淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、麻风杆菌(*Mycobacterium leprae*)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenzae*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)和鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)感染。病毒感染包括,但不限于,慢病毒(lentivirus)、逆转

录病毒(retrovirus)、冠状病毒(coronavirus)、流感病毒(influenza virus)、肝炎病毒(hepatitis virus)、鼻病毒(rhinovirus)、乳头状瘤病毒(papilloma virus)、疱疹病毒(herpes virus)或流感病毒(influenza virus)感染。本发明的缀合物还可用于生物防御,例如抵抗炭疽杆菌(*B. anthrax*)。

[0024] 如下所述,在激发延长的生存期前6天,对小鼠单次给予本发明的缀合物和经辐照的炭疽杆菌芽孢(*Bacillus anthracis* spore),同时在激发后30天,多次给药导致100%的存活。

[0025] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种预防、抑制或治疗哺乳动物(如人、牛、马、猪、狗、羊或猫)中的细菌感染(例如,革兰氏阳性细菌感染)的方法。所述方法包括对所述哺乳动物给予有效量的组合物,所述组合物包括细菌病原体 and 一定量式(I)的化合物(或其互变异构体,或其可药用的盐或溶剂合物):

[0026]



[0027] 其中 X^1 为 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR^c-$;

[0028] R^1 为氢、 (C_1-C_{10}) 烷基、取代的 (C_1-C_{10}) 烷基、 C_{6-10} 芳基或取代的 C_{6-10} 芳基、 C_{5-9} 杂环基、取代的 C_{5-9} 杂环基;

[0029] R^c 为氢、 (C_1-C_{10}) 烷基或取代的 (C_1-C_{10}) 烷基;或 R^c 和 R^1 与它们所连接的氮一起形成杂环或取代的杂环;

[0030] 每个 R^2 独立地为 $-OH$ 、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基(烷酰基)、取代的 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基(芳酰基)、取代的 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基、 $-C(O)OH$ (羧基)、 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基(烷氧基羰基)、取代的 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基、 $-NR^aR^b$ 、 $-C(O)NR^aR^b$ (氨基甲酰基)、卤素、硝基或氰基,或 R^2 不存在;

[0031] 每个 R^a 和 R^b 独立地为氢、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、取代的 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_1-C_6) 烷酰基、取代的 (C_1-C_6) 烷酰基、芳基、芳基 (C_1-C_6) 烷基、Het、Het (C_1-C_6) 烷基、或 (C_1-C_6) 烷氧基羰基;

[0032] 其中,在任意烷基、芳基或杂环基上的所述取代基为羟基、 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 亚烷基、氨基、氰基、卤素或芳基;

[0033] n 为 0、1、2、3 或 4;

[0034] X^2 为键或连接基团;和

[0035] R^3 为包括一个或两个羧酸酯的磷脂。

[0036] 此外,本发明还提供了药物组合物,包括至少一种本发明的磷脂缀合物或其可药用的盐,以及可药用的稀释剂或载体,以及任选地选定抗原(如微生物抗原)的制品(例如,

灭活制品或提取物)、选定微生物的分离的蛋白质或选定微生物的分离的碳水化合物(多糖)。在一个实施方案中,药物组合物包括通过以下方式形成的纳米颗粒,即在水性溶剂(例如 PBS)中结合至少一种本发明的磷脂缀合物或其可药用的盐;或在例如水性溶剂中将至少一种本发明的磷脂缀合物或其可药用的盐与磷脂制品。

附图说明

[0037] 图 1 说明了用于合成脂质-(6)、PEG-(8) 或脂质-PEG(9) TLR7 缀合物的方案。(6)、(8) 和 (9) 是指化合物标识。

[0038] 图 2A-D 描述了在鼠巨噬细胞(murine macrophage)中 TLR7 缀合物的体外免疫学表征结果。通常,用缀合物的连续稀释液于 37°C 和 5%CO₂ 下将 RAW264.7 细胞(1x10⁶/mL) (A) 和来自野生型小鼠的 BMDM (B-D) 或来自 TLR7 缺陷小鼠(C-D)的 BMDM(0.5x10⁶/mL) 孵育 18 小时并且收集培养物上清液。制备以 10 μM 起始的 SM(三角形)、6(灰色圆形)、8(实心正方形)和 9(ex)的连续稀释液(1:5 的步骤);以 0.1 μM 起始连续稀释 4a(灰色菱形)(1:5 的步骤)。上清液中的细胞因子(IL-6、IL-12 或 TNF-α)水平通过 ELISA (BD Biosciences Pharmingen, La Jolla, CA)测定。数据为三次重复(triplicate)的平均值 ±SEM 并且代表三个独立的实验。使用邦弗朗尼事后检验(Bonferroni post hoc test)通过两因素 ANOVA (two-way ANOVA)比较 SM 和 6 之间的 P < 0.001。表示与野生型巨噬细胞相应数据相比,通过 t-分布检验(Student's t-test) P < 0.01。

[0039] 图 3A-B 描述了在人 PBMC 中 TLR7 缀合物的体外免疫学表征结果。用缀合物的连续稀释液将人 PBMC(2x10⁶/mL) 孵育 18 小时。制备以 10 μM 起始的 SM(三角形)、6(灰色圆形)、8(实心正方形)和 9(ex)的连续稀释液(1:5 的步骤);以 0.1 μM 起始连续稀释 4a(灰色菱形)(1:5 的步骤)。培养物上清液中的 IL-6 (A)和 IFN-α 1 (B)水平通过 Luminex 测定法确定,两次重复。数据为平均值 ±SEM 并且代表三个独立的实验。效价(potency)顺序为 4b>6>9>SM=8(P<0.0005,通过化合物 4b、6、9 和 SM 的两因素方差分析;P=0.2,通过化合物 8 的两因素方差分析)。

[0040] 图 4A-B 说明了 TLR7 缀合物在体内的促炎性细胞因子诱导的动力学。对 C57B/6 小鼠(n=5/组)静脉注射 TLR7 缀合物(SM, 200nmol; 4a, 40nmol; 6, 200nmol; 8, 200nmol; 9, 200nmol)。注射后 2、4、6、24 和 48 小时采集血清样本。通过 Luminex 测定法测量 TNF-α (A) 和 IL-6 (B) 的水平。数据为五只小鼠的平均值 ±SEM 并且代表两个独立的实验。(C) 对照初次接受试验的小鼠。*表示与初次接受试验的小鼠相比,用邦弗朗尼事后检验通过单因素 ANOVA 得到 p < 0.05。

[0041] 图 5A-C 说明 TLR7 缀合物在体内的佐剂性(adjuvanticity,例如引发免疫应答的能力)。在第 0 天和第 7 天对 C57BL/6 小鼠组(n=5/组)用 20 μg OVA 和 TLR7 缀合物(10nmol 等效剂量/小鼠)的混合物进行皮下免疫接种。第 0、7、14、21、28、42 和 56 天采集血清。OVA 特异性的 IgG1 和 IgG2a 通过 ELISA 测量(A 和 B)。在第 56 天处死小鼠并且在 RPMI1640 中用 OVA (100 μg/mL) 培养脾细胞,持续 3 天。上清液中 IFN-γ 水平通过 ELISA 测量(C)。数据为五只小鼠/组的平均值 ±SEM 并且代表三个独立的实验。* 和 + 表示与用 OVA 和赋形剂(vehicle)的混合物免疫接种小鼠相比,用 Dunnett 事后比较通过单因素 ANOVA 分别得到 P < 0.05 和 P < 0.01。

[0042] 图 6A-C 描述了 TLR7 缀合物的可能不良作用的评价结果。将 C57BL/6 小鼠用 20 μ g OVA 与 TLR7 缀合物的混合物进行免疫接种。在第 56 天,处死小鼠并且测定脾细胞总数(A)。将脾采集并且提交用于组织学检查($\times 100$)(B)。注射后 24 小时检查注射位点处的皮肤(C)。用 OVA+TLR7 缀合物免疫接种的小鼠与只用 OVA 免疫的小鼠之间的脾细胞数没有明显差异(A)。来自用 OVA 与 TLR7 混合物免疫接种的小鼠的脾的组织学检查没有显示出任何白髓(white pulp)破裂或红髓(red pulp)中细胞构成(cellularity)增加(B)。注射位点处的皮肤没有任何可见的发红(C)。

[0043] 图 7A-B 显示了 1V270 的给药时间线和 1V270 诱导的膀胱炎症。

[0044] 图 8A-D 描述了与咪喹莫特相比,1V270 的乳膏制剂的细胞因子诱导的药效学。

[0045] 图 9A-F 说明了肺部给予磷脂缀合物后肺和血清中的局部细胞因子诱导。

[0046] 图 10A-B 描述了磷脂缀合的 TLR7 激动剂的持续的局部免疫激活。

[0047] 图 11A-B 显示了单次免疫接种和激发的时间线,以及磷脂缀合的 TLR7 激动剂的佐剂效果。

[0048] 图 12A-B 显示了多次免疫接种和激发的时间线,以及磷脂缀合的 TLR7 激动剂的佐剂效果。

[0049] 图 13 说明了 UC-1V270 的结构(图 1 中的化合物 6)。

[0050] 图 14 显示了 UC-1V270 的自发纳米颗粒形成。UC-1V270 在 PBS 中稀释至 50 μ M (A)或 100 μ M (B)并且在一段时间内测量颗粒尺寸。所述纳米颗粒通常随时间的推移是稳定的。在 100 μ M (其约为溶解度的上限)时看到一些聚集体。UC-1V270 在 PBS 中的颗粒尺寸为相对恒定的,平均直径为约 110nm,不考虑浓度。

[0051] 图 15A-F 显示了 UC-1V270 促进局部化的细胞因子释放,具有最小的全身副作用。对四只 A/J 小鼠鼻内(i. n.)给予各种剂量的 UC-1V270、未缀合的 TLR7 激动剂(UC-1V209)、磷脂或溶剂对照。24 小时后采集 BALF 和血浆,并且通过 multiplex Luminex 测定法确定细胞因子水平。条带表示平均值。

[0052] 图 16A-C 说明了用 UC-1V270 作为炭疽疫苗佐剂的完全长期保护。(A)对八只雌性 A/J 小鼠 / 组鼻内(i. n.)给予 PBS、单独的辐照的芽孢(IRS)、单独的 UC-1V270 (1nmol/ 小鼠)、IRS+UC-1V270 或 IRS+CT(霍乱毒素;1 μ g/ 小鼠),以两周间隔给予三次,并且在最后一次免疫接种四周后激发。(B)随后存活 30 天。进行 Kaplan-Meier 存活曲线和 log-rank 检验从而确定显著性。从两个单独的实验(共 16 只小鼠 / 组)中汇集结果。(C)在感染后 30 天处死小鼠。收获脾并将其进行称重。

[0053] 图 17A-E 显示了存活中的小鼠的芽孢特异性 T_H17 和 T_H1 应答。第 30 天处死接种后幸免于感染的小鼠。用 IRS (10^6 / 孔)培养上述小鼠的脾细胞(400,000/ 孔),持续 5 天,设三组重复。未接种的未感染的小鼠的脾细胞作为对照。通过 Luminex 测定法测量上清液中的 IL-12、IL-17 和 TNF- α 。通过 ELISA 测量 IFN- γ 。所示出的数据由两个独立的实验汇集。

[0054] 图 18 说明了 IFN- γ 和 IL-17 的消耗使已免疫接种小鼠易受感染。如图所示对雌性 A/J 小鼠鼻内(i. n.)给予 IRS+UC-1V270 (1nmol/ 小鼠)三次。在活炭疽芽孢激发前一天开始每日两次给予抗体(0.2mg 抗-IL-17 和 0.1mg 抗-IFN γ)。随后存活 24 天。进行 Kaplan-Meier 存活曲线和 log-rank 检验从而确定显著性。

[0055] 图 19 显示了在给予 Phosal50PG 配制的 UC-1V270 和不含 Phosal50PG 的 UC-1V270 (称为“未经配制的”)的动物中细胞因子水平的比较。对 A/J 小鼠鼻内 (i. n.) 给予所示剂量的未经配制的 UC-1V270 或 Phosal50PG 配制的 UC-1V270 或赋形剂 (V1=5%DMSO, V2=1.2%Phosal50PG)。24 小时后采集血浆和 BALF, 并且通过 Luminex 测定法分析细胞因子水平。与未经配制的 UC-1V270 相比, 配制的 UC-1V270 更有效地诱导局部细胞因子, 具有相似全身细胞因子诱导, 其除 IFN- γ 以外几乎不可检测。

[0056] 图 20 显示了在炭疽模型中感染后的存活。对 A/J 小鼠用单独的 PBS 或 2.5%Phosal50PG 赋形剂进行鼻内免疫接种, 或用 5×10^7 IRS 与所示各种量的配制的 UC-1V270 或 CT 进行鼻内免疫接种。最后一次免疫接种后三周 (以两周间隔进行 3 次免疫接种) 用活的炭疽芽孢激发小鼠。配制的 UC-1V270 的所有 3 个剂量均保护动物免遭炭疽感染。注意在使用溶于 DMSO 中的未经配制的 1V270 的先前研究中, 1nmol 剂量显示为有效的。相比之下, 配制的 UC-1V270 的低 10 倍的剂量提供高的存活率。

具体实施方式

[0057] 定义

[0058] 组合物包括“基本上所有”的具体化合物, 或化合物的具体形式 (如异构体), 此时组合物包括基于重量计至少约 90%、至少约 95%、99% 和 99.9% 的所述具体组合物。组合物包括多种化合物的“混合物”, 或相同化合物的多种形式的“混合物”, 此时每种化合物 (例如异构体) 基于重量计占所述组合物的至少约 10%。本发明的 TLR7 激动剂或其缀合物可以酸式盐或碱式盐以及游离酸或游离碱的形式制备。在溶液中, 本发明的某些化合物可作为两性离子的形式存在, 其中抗衡离子由溶剂分子自身提供, 或来自溶解于或悬浮于溶剂中的其它离子。

[0059] 本说明书中使用的术语“分离的 (isolated)”是指核酸分子、肽或蛋白质或其它分子的体外制备、分离和 / 或纯化, 使得其不与体内物质结合 (associate) 或者以不同于天然存在的形式存在。因此, 当术语“分离的”与核酸一同使用时, 如在“分离的寡核苷酸”或“分离的多核苷酸”中, 是指这样的核酸序列, 即其被从至少一种通常在其来源中与其结合的污染物中识别并分离出来。分离的核酸存在的形式或环境 (setting) 与其天然存在时的不同。相反, 非分离的核酸 (例如 DNA 和 RNA) 以其天然存在的状态存在。例如, 给定的 DNA 序列 (例如基因) 存在于宿主细胞染色体上靠近于邻近基因; RNA 序列 (例如编码特定蛋白质的特定 mRNA 序列) 以与编码各种蛋白质的大量其它 mRNA 的混合物形式存在于细胞中。因此, 就“分离的核酸分子”而言——其包括染色体组源、cDNA 源或合成源或它们某种结合的多核苷酸, 所述“分离的核酸分子” (1) 不与所述“分离的核酸分子”在天然状态存在于其中的多核苷酸的全部或部分结合, (2) 可操作连接至在天然状态下不与其相连的多核苷酸, 或 (3) 不以较大序列的一部分天然存在。所述分离的核酸分子可以以单链形式或双链形式存在。当核酸分子用于表达蛋白质时, 所述核酸最少含有正义链或编码链 (即所述核酸可为单链的), 但是也可以既含有正义链又含有反义链 (即所述核酸可为双链的)。

[0060] 本文中所使用的术语“氨基酸”, 包括 D 型或 L 型的天然氨基酸 (例如, Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Hyl、Hyp、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 和 Val) 残基以及非天然氨基酸 (例如, 磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸、羟基脯

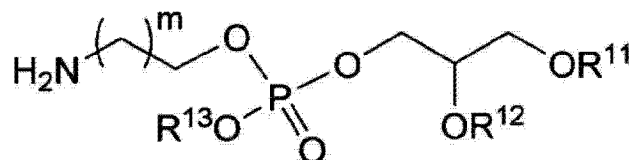
氨酸、 γ -羧基谷氨酸、马尿酸、八氢吡啶-2-羧酸、施德丁(statine)、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、青霉素、鸟氨酸、瓜氨酸、-甲基-丙氨酸、对苯甲酰基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、炔丙基甘氨酸、肌氨酸和叔丁基甘氨酸)残基。所述术语还包括带有常规氨基保护基(例如,乙酰基或苄氧基羰基)的天然氨基酸和非天然氨基酸,以及在羧基端被保护(例如,作为(C₁-C₆)烷基、苯基或苄基酯或酰胺;或作为-甲基苄基酰胺)的天然氨基酸和非天然氨基酸。其它合适的氨基保护基和羧基保护基为本领域技术人员已知(参见例如 T. W. Greene, *Protecting Groups In Organic Synthesis*; Wiley: New York, 1981, 及其中所引用的参考文献)。例如,氨基酸可以通过羧基端、氨基端或通过任何其它常规连接点(如,例如通过半胱氨酸的硫)连接至式 I 化合物的剩余部分。

[0061] 术语“Toll 样受体激动剂”(TLR 激动剂)是指结合至 TLR 的分子。合成的 TLR 激动剂为被设计成结合至 TLR 并且活化该受体的化学化合物。

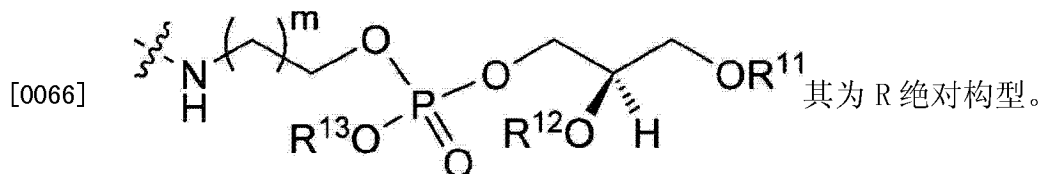
[0062] 本文中所使用的术语“核酸”是指 DNA、RNA (单链的、双链的或更高度聚集的杂交基序)及其任何化学修饰物。修饰物包括,但不限于,为核酸配体碱基或整个核酸配体提供附加电荷、极化度、氢键、静电相互作用和流变性的化学基团的那些化学修饰物。这些化学修饰物包括,但不限于肽核酸(PNA)、磷酸二酯基修饰物(例如硫代磷酸酯、甲基膦酸酯)、2'-位糖修饰物、5'-位嘧啶修饰物、7'-位嘌呤修饰物、8'-位嘌呤修饰物、9'-位嘌呤修饰物、环外胺的修饰物、4-硫代尿苷的取代物、5-溴尿嘧啶或 5-碘尿嘧啶的取代物、主链修饰物、甲基化物、异常碱基配对的结合物(如异碱基、异胞苷和异脒等)。核酸还可包括非天然碱基,例如,硝基吡啶。修饰物还可包括 3'-位修饰物和 5'-位修饰物,如用 BHQ、荧光团或另一部分帽化。

[0063] 本文中所使用的术语“磷脂”是指带有磷酸基的甘油单酯或甘油二酯,所述磷酸基键合至甘油羟基,同时链烷醇胺基团键合至所述磷酸基,形成酯,其通式为

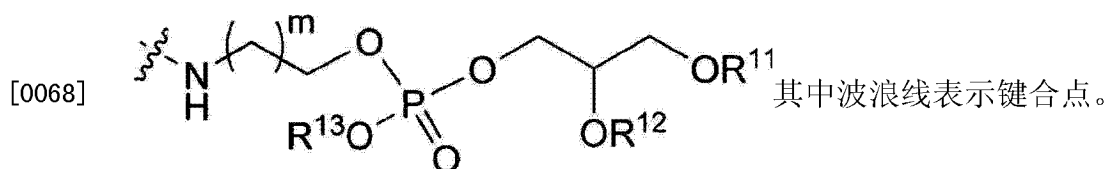
[0064]



[0065] 其中, R¹¹ 和 R¹² 各自独立为氢或酰基,并且取决于 pH, R¹³ 为负电荷或为氢。如果 R¹³ 为负电荷,则可存在合适的反离子,例如钠离子。例如,所述链烷醇胺部分可为乙醇胺部分,使得 m=1。还应理解,取决于 pH,所述 NH 基团可以为质子化的且带正电荷,或为非质子化的且为中性。例如,所述磷脂可以两性离子——带负电荷的磷酸酯的含氧负离子和带正电荷的质子化氮原子——形式存在。带 OR¹² 的碳原子为手性碳原子,因此所述分子可以 R 异构体、S 异构体或其任意混合物形式存在。当在式 (II) 化合物的样品中存在等量的 R 和 S 异构体时,所述样品称为“外消旋体”。例如,在下列实施例 I 中使用的市售产品 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺中,所述 R³ 基团为手性结构

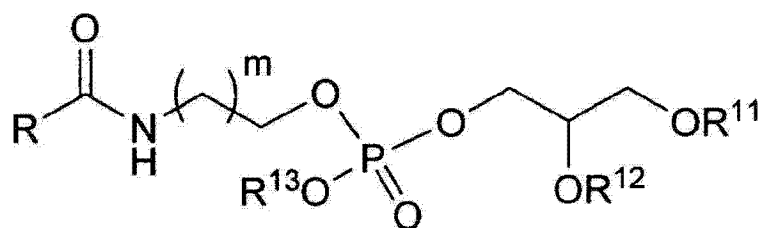


[0067] 磷脂可为游离分子,或共价连接至另一基团,例如所示



[0069] 因此,当取代基(如本文中式(I)化合物的 R^3)为磷脂时,其意为磷脂基团键合——如所述结构具体指明的——至另一基团上,例如键合至如本文中公开的 N- 苄基杂环体系。除非另外具体说明,例如通过结构描述,所述磷脂基团的连接点可处于任意化学上可行的位置。例如,在如上所示磷脂结构中,连接至另一化学部分的连接点可为经乙醇胺的氮原子,例如,通过键合至其它化学部分的羰基的酰胺基团,例如,

[0070]



[0071] 其中, R 代表所述磷脂所键合至的其它化学部分。在该键合的酰胺衍生物中,所述 R^{13} 基团可为质子或可为与抗衡离子(如钠离子)相关的负电荷。所述链醇胺基团上的酰化的氮原子不再为碱性胺,而是中性酰胺,因此其在生理 pH 下不被质子化。

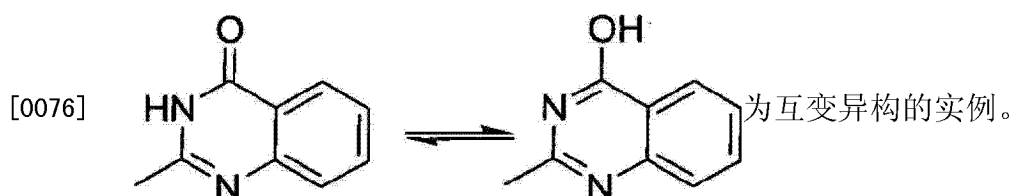
[0072] 本文中所使用的“酰基”基团是指带有羰基的有机结构,所述化学结构通过该羰基键合至例如磷脂的甘油羟基,形成“羧酸酯”基团。酰基基团的实例包括脂肪酸基团,如油酰基,其因此与甘油羟基形成脂肪(例如油酰基)酯。因此,当 R^{11} 或 R^{12} (但不同时)为酰基时,如上所示的磷脂为单羧酸酯;当 R^{11} 和 R^{12} 均为酰基时,如上所示的磷脂为二羧酸酯。

[0073] 在本发明的范围内,应该理解,式(I)化合物或其盐可以表现出互变异构现象,由此两种化学化合物通过交换两个原子间的氢原子(与所述两个原子中的一个原子形成共价键)而能够轻松互变。由于互变异构化合物彼此以可移动平衡存在,它们可被认为是相同化合物的不同异构形式。应该理解,本说明书中的结构式图仅可代表可能的互变异构形式之一。但是,还应该理解本发明包括任意互变异构形式,并且不仅限于在结构式图中所使用的任意一种互变异构形式。本说明书中的结构式图仅可代表可能的互变异构形式之一,并且应该理解本说明书包括所画出的化合物的所有可能互变异构形式而不只是那些在本文中已经方便地以图示列出的化合物。例如,可以通过如波浪线所示键合的吡唑基表现互变异构。尽管两个取代基均命名为 4- 吡唑基,但是明显在每个结构中不同氮原子均带有氢。

[0074]



[0075] 这样的互变异构现象还可出现在取代的吡唑上,如 3- 甲基吡唑、5- 甲基吡唑或 3, 5- 二甲基吡唑等。互变异构的另一个实例是酰氨基 - 亚氨基(当为环状时为内酰胺 - 内酰亚胺)互变异构,如在带有与环氮原子相邻的环氧原子的杂环化合物中所观察的。例如,平衡:



[0077] 因此,本文中所描述为一个互变异构体的结构示意图还包括另一个互变异构体。

[0078] 光学异构

[0079] 将会理解,当本发明的化合物含有一个或多个手性中心时,所述化合物可以以纯的对映形式或非对映形式或以外消旋混合物形式存在,并且可以以上述形式被分离。因此,本发明包括本发明化合物的任何可能的对映体、非对映体、外消旋体或其混合物。

[0080] 由手性中心的存在产生的异构体包括一对不能镜象重叠的异构体,其称为“对映异构体”。纯化合物的单一对映异构体具有光学活性,即它们能够旋转平面偏振光的平面。单一对映异构体根据 Cahn-Ingold-Prelog 体系命名。取代基的优先性是基于原子量排列的,由所述系统方法确定的较高原子量具有较高的优先排列。一旦四个基团的优选排列确定后,将所述分子标定方向使得最低排列的基团指向远离观察者的方向。然后,如果其它基团的降次顺序为顺时针,那么所述分子命名为(R);如果其它基团的降次顺序为逆时针,那么所述分子命名为(S)。在方案 14 的实施例中,其 Cahn-Ingold-Prelog 排列为 A>B>C>D。最低排列的原子 D 标定为远离观察者的方向。

[0081]



[0082] (R) 构型 (S) 构型

[0083] 本发明意在包括非对映异构体以及其外消旋且已拆分的非对映异构体的纯净形式和对映异构体的纯净形式及其盐。非对映异构体对可通过已知的分离技术拆分,包括正相色谱法和反相色谱法,以及重结晶。

[0084] “分离的光学异构体”意为基本上已从具有相同结构式的一个或多个相应光学异构体中纯化的化合物。在一个实施方案中,所述分离的异构体的纯度为至少约 80 重量%,例如,至少 90 重量%、98 重量%或 99 重量%。

[0085] 分离的光学异构体可以通过众所周知的手性分离技术从外消旋混合物中纯化。根据一种这样的方法,使用合适的手性柱(如 **DAICEL®CHIRALPAK®** 柱家族系列的一员, Daicel Chemical Industries 公司, 东京, 日本) 通过 HPLC, 将本发明化合物的外消旋混合物或其手性中间体分离为 99 重量%纯度的光学异构体。所述柱根据制造商的说明书进行操作。

[0086] 本文中所使用的“可药用盐”是指所公开的化合物的衍生物,其中母体化合物是通过制成其酸式盐或碱式盐来进行修饰。可药用的盐实例包括,但不限于,碱性残基(如胺)的无机酸盐或有机酸盐;酸性残基(如羧酸)的碱盐或有机盐等。所述可药用盐包括,例如,由无毒无机酸或无毒有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐或季铵盐。例如,这些常规无毒盐包括衍生自无机酸的那些盐以及由有机酸制备的那些盐,所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、

硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等；所述有机酸例如乙酸、丙酸、丁二酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、扑酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、山酸、水杨酸、对氨基苯磺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸等。

[0087] 在本发明中可用的化合物的可药用盐可从母体化合物通过常规化学方法制备，所述母体化合物含有碱性部分或酸性部分。通常，这些盐可通过以下方式制备：这些化合物的游离酸形式或游离碱形式与化学计量量的合适的碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应；通常，可以使用非水性介质，如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。合适的盐的列表见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton PA, p. 1418 (1985 年)，其公开内容以引用的方式纳入本说明书中。

[0088] 具有本文中所描述的结构式的化合物可为溶剂合物，在一些实施方案中为水合物。术语“溶剂合物”是指固体化合物，其具有一个或多个与其固体结构结合的溶剂分子。当化合物从溶剂中结晶时可形成溶剂合物。当一个或多个溶剂分子在凝固时变成所述固体晶体基质的组成部分时形成溶剂合物。具有本文中所描述的结构式的化合物可为溶剂合物，例如，乙醇溶剂合物。另一类的溶剂合物为水合物。类似地，“水合物”是指固体化合物，其具有在分子水平上与其固体结构或晶体结构直接结合的一个或多个水分子。当化合物在水中固化或结晶时，可形成水合物，此时一个或多个水分子变成固体晶体基质的组成部分。

[0089] 在本文中所使用的短语“可药用的”是指那些化合物、材料、组合物和 / 或剂型，其在合理的医疗判断范围内，适用于与人组织和动物组织接触而没有过度的毒性、刺激性、变应性应答或与合理的利益 / 风险比相称的其它问题或并发症。

[0090] 除非另有说明，使用下列定义：卤代或卤素为氟、氯、溴或碘。烷基、烷氧基、烯基、炔基等表示直链和支链两种基团；但是提及单个基团（如丙基）时，仅包括直链基团；支链异构基团（如异丙基）会被具体指出。芳基表示苯基或具有约九至十个环原子并且其中至少一个环为芳香族环的邻位耦合双环碳环基团。Het 可为杂芳基，其包括，经含五至六个环原子的单环芳香族环上的环碳原子连接的基团，所述环原子由碳原子和一至四个杂原子组成，所述杂原子均选自非过氧化物型氧、硫和 N(X)，其中 X 不存在或为 H、O、(C₁-C₄) 烷基、苯基或苯甲基；以及由上述基团衍生的具有约八至十个环原子的邻位耦合双环杂环基团，尤其是苯并衍生物或通过稠合亚丙基、三亚甲基或四亚甲基双基团而得到的衍生物。

[0091] 本领域的技术人员应理解，具有手性中心的本发明化合物可以光学活性形式和外消旋形式存在并且分离。一些化合物可表现出多晶型现象 (polymorphism)。应理解，本发明包括本发明化合物的任何外消旋形式、光学活性形式、多晶型形式或立体异构形式，或其混合物，它们具有本文所描述的有用性质；本领域公知如何制备光学活性形式（例如，通过采用重结晶技术拆分外消旋形式、由光学活性起始物质合成、手性合成或使用手性固定相进行色谱分离）以及如何使用本文所描述的标准试验、或使用本领域公知的其它相似试验确定激动剂活性。本领域的技术人员还应该理解，本文所描述的化合物包括其各种互变异构体，其可以各种彼此相互平衡的状态存在。

[0092] 本文中所使用的术语“治疗 (treat 或 treating)”是指 (i) 防止病理病症发生（例如预防）；(ii) 抑制病理病症或阻止其发展；(iii) 缓解病理病症；和 / 或 (iv) 改善、缓解、减轻和去除病症症状。本文中所描述的候选分子或化合物可以为一定量制剂或药剂，其为

可产生生物学作用的量或导致改善、缓解、减轻、解除、减少或去除病症(例如,疾病)症状的量。所述术语还可指降低或停止细胞增殖速率(例如,减慢或停止肿瘤生长)或降低正在增殖的癌细胞数(例如,去除部分或全部肿瘤)。这些术语还适用于降低受微生物感染的体系(例如细胞、组织或受试者)中的微生物滴度(titre),降低微生物繁殖速率、减少与微生物感染相关的症状数目或减少症状的效应、和/或从所述体系中移除可检测量的微生物。微生物的实例包括,但不限于,病毒、细菌和真菌。

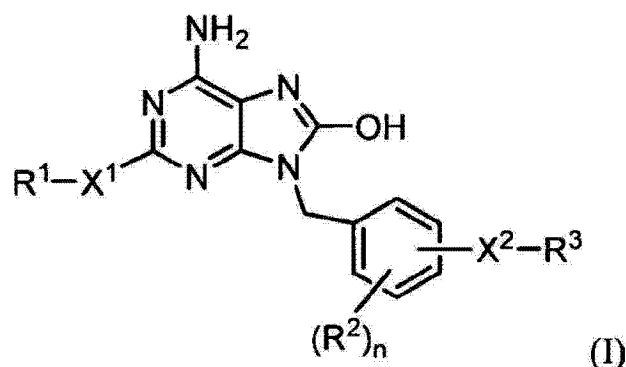
[0093] 本文中所使用的术语“治疗有效量”是指在受试者中用于治疗或预防疾病或障碍,或用于治疗疾病或障碍的症状的化合物的量或化合物结合物的量。本文中所使用的术语“受试者”和“患者”通常指将要接受或已经接受本文所述方法的治疗(例如,给予化合物)的个体。

[0094] “稳定化合物”和“稳定结构”意为指足够稳定的化合物以至于在从反应混合物中分离为可用纯度,并且配制成有效治疗剂后仍存在的化合物。本发明只考虑稳定化合物。

[0095] TLR7 激动剂及其缀合物和用途

[0096] 在多个实施方案中,本发明提供了一种预防、抑制或治疗哺乳动物中的微生物感染或病症(如与炎症相关的病症)的方法。所述方法包括将有效量的组合物给予需要其的哺乳动物,所述组合物包括一定量的式(I)化合物,或其互变异构体,或其可药用的盐或溶剂合物:

[0097]



[0098] 其中 X^1 为 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR^c-$;

[0099] R^1 为氢、 (C_1-C_{10}) 烷基、取代的 (C_1-C_{10}) 烷基、 C_{6-10} 芳基或取代的 C_{6-10} 芳基、 C_{5-9} 杂环基、取代的 C_{5-9} 杂环基;

[0100] R^c 为氢、 C_{1-10} 烷基或取代的 C_{1-10} 烷基;或 R^c 和 R^1 与它们所连接的氮一起形成杂环或取代的杂环;

[0101] 每个 R^2 独立地为 $-OH$ 、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基(烷酰基)、取代的 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基(芳酰基)、取代的 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基、 $-C(O)OH$ (羧基)、 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基(烷氧基羰基)、取代的 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基、 $-NR^aR^b$ 、 $-C(O)NR^aR^b$ (氨基甲酰基)、卤素、硝基或氰基,或 R^2 不存在;

[0102] 每个 R^a 和 R^b 独立地为氢、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、取代的 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_1-C_6) 烷酰基、取代的 (C_1-C_6) 烷酰基、芳基、芳基 (C_1-C_6) 烷基、Het、Het (C_1-C_6) 烷基、或 (C_1-C_6) 烷氧基羰基;

[0103] 其中,在任意烷基、芳基或杂环基上的所述取代基为羟基、 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 亚烷基、氨基、氰基、卤素或芳基;

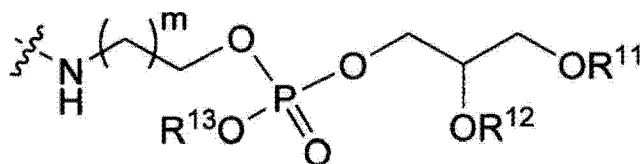
[0104] n 为 0、1、2、3 或 4;

[0105] X^2 为键或连接基团;和

[0106] R^3 为包括一个或两个羧酸酯的磷脂。任选地,所述组合物还包括抗原。在一个实施方案中,在给予具有式(I)化合物的组合物的同时、之前或之后,给予具有抗原的组合物。

[0107] 例如, R^3 可包括下式的基团

[0108]



[0109] 其中, R^{11} 和 R^{12} 各自独立地为氢或酰基, R^{13} 为负电荷或为氢, m 为 1-8,其中,波浪线表示键合位置,其中在带 OR^{12} 的碳原子处的绝对构型为 R、S 或其任意混合物。

[0110] 例如, m 可为 1,提供甘油基磷脂酰乙醇胺。更具体地, R^{11} 和 R^{12} 可各自为油酰基。

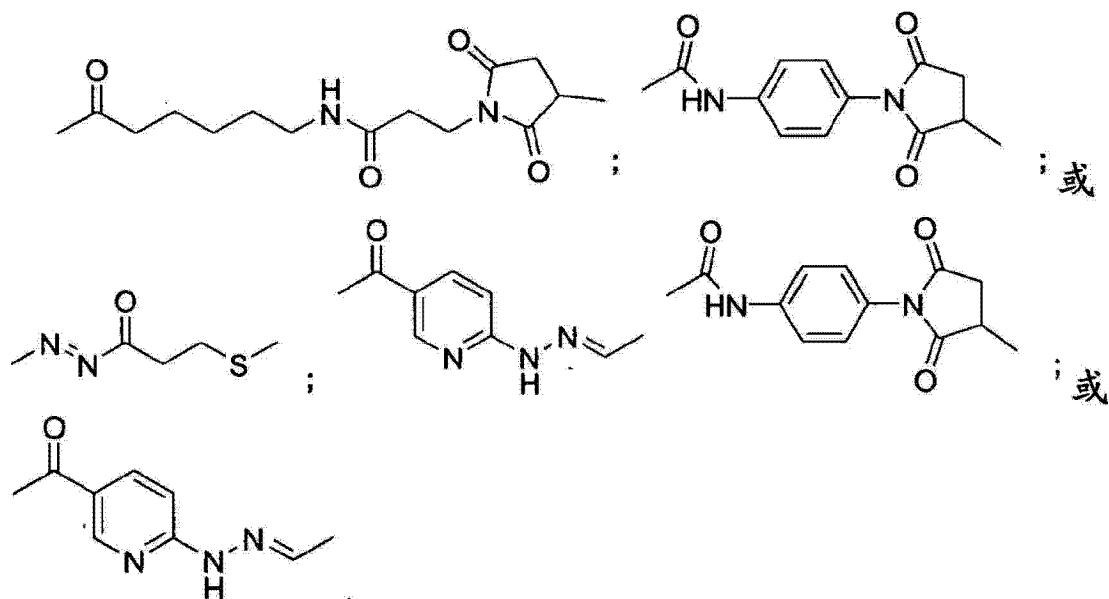
[0111] 在多个实施方案中, R^3 的磷脂可包括两个羧酸酯并且每个羧酸酯包括一个、两个、三个或四个不饱和位点、环氧化位点、羟基化位点或其组合。

[0112] 在多个实施方案中,所述 R^3 的磷脂可包括两个羧酸酯,并且所述羧酸酯可相同或不同。更具体而言,所述磷脂的每个羧酸酯可为 C_{17} 羧酸酯,其在 C_8-C_9 处具有不饱和位点。或者,所述磷脂的每个羧酸酯可为 C_{18} 羧酸酯,其在 C_9-C_{10} 处具有不饱和位点。

[0113] 在多个实施方案中, X^2 可为键或在链中具 1 至约 10 个原子的链,其中所述链的原子选自碳、氮、硫和氧,其中任意碳原子可用氧代基团取代,并且其中任意硫原子可用一个或两个氧代基团取代。所述链上可散布有一个或多个环烷基、芳基、杂环基或杂芳基环。

[0114] 在多个实施方案中, X^2 可为 $C(0)$,或可为任意以下基团

[0115]



[0116] 在多个实施方案中, R^3 可为二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0117] 在多个实施方案中, R^3 可为 1, 2- 二油酰基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺且 X^2 可为

C(0)。

[0118] 在多个实施方案中, X^1 可为氧。

[0119] 在多个实施方案中, X^1 可为硫, 或可为 $-NR^c$, 其中 R^c 为氢、 C_{1-6} 烷基或取代的 C_{1-6} 烷基, 其中所述烷基取代基为羟基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 烷氧基、氨基、氰基或芳基。更具体而言, X^1 可为 $-NH-$ 。

[0120] 在多个实施方案中, R^1 和 R^c 可一起形成杂环或取代的杂环。更具体而言, R^1 和 R^c 可一起形成取代的或未取代的吗啉环、哌啶环、吡咯烷环或哌嗪环。

[0121] 在多个实施方案中, R^1 可为用 C_{1-6} 烷氧基取代的 C_{1-10} 烷基。

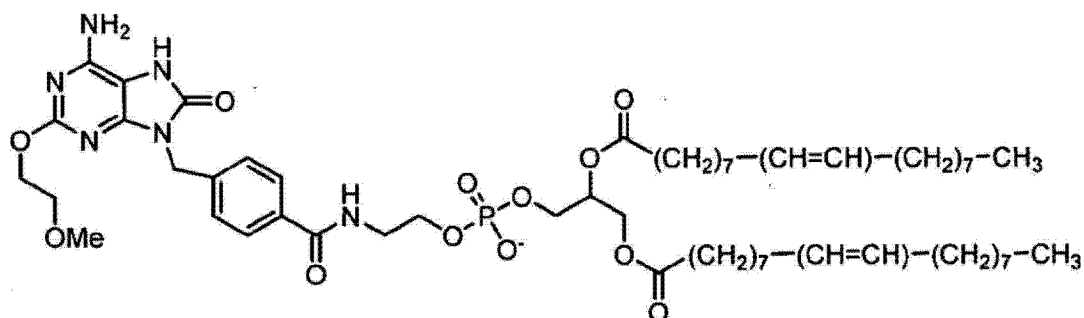
[0122] 在多个实施方案中, R^1 可为氢、 C_{1-4} 烷基或取代的 C_{1-4} 烷基。更具体而言, R^1 可为氢、甲基、乙基、丙基、丁基、羟基 C_{1-4} 亚烷基或 C_{1-4} 烷氧基 C_{1-4} 亚烷基。甚至更具体而言, R^1 可为氢、甲基、乙基、甲氧基乙基或乙氧基乙基。

[0123] 在多个实施方案中, R^2 可以不存在, 或 R^2 可为卤素或 C_{1-4} 烷基。更具体而言, R^2 可为氯、溴、甲基或乙基。

[0124] 在多个实施方案中, X^1 可为 O, R^1 可为 C_{1-4} 烷氧基-乙基, n 可为 1, R^2 可为氢, X^2 可为羰基, 以及 R^3 可为 1, 2-二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE)。

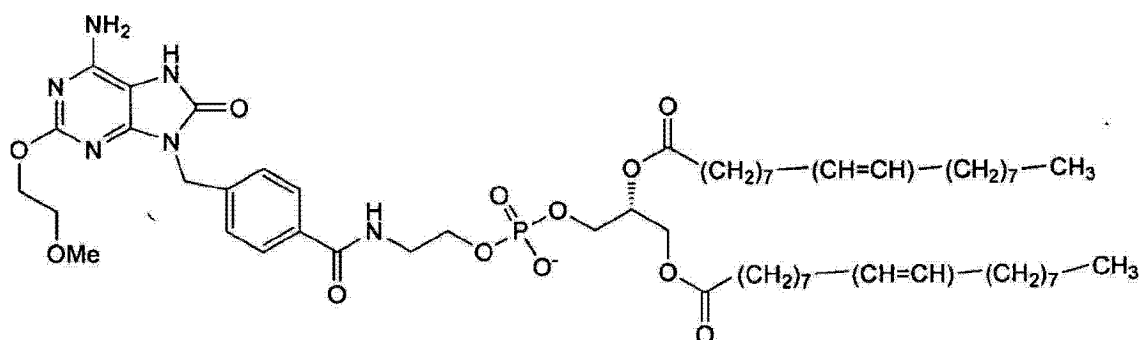
[0125] 在多个实施方案中, 式 (I) 化合物可以为:

[0126]



[0127] 在多个实施方案中, 式 (I) 化合物可为具有上述结构的 R- 对映异构体:

[0128]



[0129] 在多个实施方案中, 所述微生物为细菌, 或, 所述抗原可包括细菌芽孢。

[0130] 在多个实施方案中, 所述量可有效预防感染。

[0131] 在多个实施方案中, 所述哺乳动物可为人。

[0132] 在多个实施方案中, 所述组合物可鼻内给予, 或可皮肤给予。

[0133] 在多个实施方案中, 磷脂缀合物 (如 IV270) 可被纳入至纳米颗粒中, 例如 W02010/083337 所记载的那些, 所述专利的公开内容以引用的方式纳入本文中。

[0134] 在多个实施方案中,磷脂缀合物(如 IV270)可被制备为纳米颗粒悬液的形式,所述纳米颗粒悬液为所述磷脂缀合物与脂质和 / 或磷脂在水性介质中的纳米颗粒悬液(例如纳米脂质体)。纳米脂质体为亚微米双层脂质囊泡(参见 Mozafari in: *Liposomes, Methods in Molecular Biology*, vol. 605, V. Weissing(ed.), 第 2 章, Humana Press, 其公开内容以引用的方式纳入本文中)。纳米脂质体提供更多表面积并且可以增加溶解度、生物利用度和靶向性。

[0135] 脂质为具有多种首基(head group)部分的脂肪酸衍生物。甘油三酯为由三个脂肪酸分子与一个甘油分子(每个碳原子上具有一个羟基 [OH] 的三碳醇)制得的脂质。甘油单酯和甘油二酯为脂肪酸的甘油基单酯和甘油基二酯。磷脂与甘油三酯相似——除了甘油分子的第一个羟基具有一个极性含磷酸的基团而非脂肪酸。磷脂为两亲性,其既具有亲水(水溶性)基团又具有疏水(脂溶性)基团。磷脂的首基为亲水的且其脂肪酸尾部(酰基链)为疏水的。所述首基的磷酸部分为带负电荷。

[0136] 除了脂质和 / 或磷脂分子,纳米脂质体在其结构中可以含有其它分子,如固醇。固醇是大部分天然膜的重要组分,且将固醇纳入纳米脂质双层中可引起这些囊泡性质的较大变化。在脂质囊泡制备中最广泛使用的固醇为胆固醇(Chol)。胆固醇自身不形成双层结构,但是其可以极高浓度纳入磷脂膜中,例如,胆固醇与磷脂(如磷脂酰胆碱(PC))的比例为最高达 1:1 或甚至 2:1 摩尔比(11)。胆固醇用于纳米脂质体结构中,以便通过调节所述脂质双层的流动性而增加囊泡稳定性。通常,胆固醇通过防止磷脂的酰基链结晶并且针对磷脂运动提供立体位阻来调节磷脂膜的流动性。这有助于纳米脂质体的稳定性并且降低了脂质膜对溶质的渗透性。

[0137] 纳米脂质体的物理化学性质取决于一些因素,包括 pH、离子强度和温度。通常,脂质囊泡对被包埋的材料(the entrapped material)显示低渗透性。但是,在高温下,脂质囊泡经历相转变(phase transition),该转变改变了其渗透性。纳米脂质体的磷脂成分具有重要的热特性,即它们可在低于其最终熔点(T_m)的温度(T_c)下经历相转变。还已知作为凝胶至液体晶体转变温度, T_c 为脂质双层失去其许多有序堆积同时其流动性增加的温度。磷脂化合物和脂质双层的相转变温度取决于下列参数:极性首基;酰基链长度;烃链的饱和度;以及悬浮介质的性质和离子强度。通常,通过降低链长度、通过使酰基链不饱和,以及通过存在支链和大的首基(例如,环丙烷环)而降低 T_c 。

[0138] 水合磷脂分子经由范德华力和亲水 / 疏水相互作用将其自身排列为双层结构的形式。在这个过程中,所述磷脂分子的亲水首基面向水相而每个单层的疏水区在所述膜中间面向彼此。应注意,脂质体和纳米脂质体的形成不是自发过程,并且必须对体系投入足够能量以克服能垒。换言之,当将磷脂(如卵磷脂)置于水中并因此形成双层结构时,一旦提供足够量的能量即可形成脂质囊泡。投入能量(例如,以超声、均化、加热等形式)使得所述脂质分子以双层囊泡的形式排列,以在水相中达到热力学平衡。

[0139] 例如,包括本发明化合物(如本发明 IV270)的组合物,其作为与脂质(如胆固醇)或磷脂(如磷脂酰胆碱)的混合物,可分散形成纳米颗粒形式,其中,脂质纳米颗粒或磷脂纳米颗粒含有与其结合的所述 TLR7 配体缀合物。纳米颗粒组合物意为包括纳米颗粒的组合物,而本文中所使用的术语“纳米颗粒”是指直径为约 1-1000nm 的颗粒。如以下实施例 IV 所讨论,使用 IV270 和磷脂酰胆碱制品 Phosal50 **PG®**制备纳米颗粒 / 纳米脂质体组合物。

[0140] 在一个实施方案中,本发明提供用于在哺乳动物(如人)中预防或治疗病理病症或症状的预防方法或治疗方法,其中涉及 TLR7 激动剂的活性并且需要其作用。所述方法包括将抗原和有效量的本发明缀合物或其可药用盐给予需要所述治疗的哺乳动物。适合用于治疗的病理病症或症状的非限制性实例包括癌症、微生物感染或疾病,例如,

[0141] 皮肤疾病或膀胱疾病。在一个实施方案中,本发明的缀合物可用于制备对抗细菌、病毒、癌细胞、癌症-特异性肽的疫苗,或作为 CNS 刺激物,或者用于生物防御。因此,本发明提供了在医学疗法中单独使用或与其它治疗剂联合使用的缀合物(例如,用作抗癌剂;用于预防、抑制或治疗细菌性疾病;用于预防、抑制或治疗病毒性疾病,如丙型肝炎和乙型肝炎;以及通常作为增加免疫应答的试剂)。

[0142] 在一个实施方案中,本发明提供一种通过给予有效量的癌症抗原和本发明的 TLR7 激动剂磷脂缀合物而预防、抑制或治疗癌症的方法。所述癌症可以为干扰素敏感性癌症,例如白血病(leukemia)、淋巴瘤(lymphoma)、骨髓瘤(myeloma)、黑素瘤(melanoma)或肾癌(renal cancer)。可治疗的具体癌症包括黑素瘤(melanoma)、浅表性膀胱癌(superficial bladder cancer)、光化性角化病(actinickeratose)、上皮内瘤样病变(intraepithelial neoplasia)和基底细胞皮肤癌(basal cell skin carcinoma)、鳞状细胞癌(squamous)等。此外,本发明的方法包括治疗癌症前期疾病,例如,光化性角化病或上皮内瘤样病变、家族性息肉病(息肉)(familial polyposis, polyp)、宫颈非典型增生(cervical dysplasia)、宫颈癌(cervical cancer)、浅表性膀胱癌(superficial bladder cancer)、以及与感染相关的任何其他癌症(例如,淋巴瘤、卡波西氏肉瘤(lymphoma Karposi's sarcoma)或白血病(leukemia))等。

[0143] 在一个实施方案中,本发明提供一种预防或抑制哺乳动物中革兰氏阳性细菌感染的方法,其包括对所述哺乳动物给予有效量的组合物,所述组合物包括革兰氏阳性细菌的细菌性抗原和一定量的合成 TLR7 激动剂磷脂缀合物。在一个实施方案中,合成 TLR7 激动剂磷脂缀合物与一种或多种炭疽杆菌(*B. anthracis*)抗原一起给予。在一个实施方案中,合成 TLR7 激动剂磷脂缀合物与一种或多种金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)抗原一起给予。表 1 提供了金黄色葡萄球菌的示例性抗原。本发明的疫苗可以出乎意料地提供快速且有效的免疫应答。

[0144] 表 1

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 免疫原

攻击手段 (Weapon)

剥脱毒素 B (Exfoliative toxin B)

剥脱毒素 A (Exfoliative toxin A)

毒性休克综合征毒素 (Toxic shock-syndrome toxin)

肠毒素 A-E、H-U (Enterotoxin A-E, H-U)

骨唾液酸蛋白结合蛋白 (Bone sialoprotein-binding protein)

胶原结合蛋白 (Collagen-binding protein)

聚集因子 A (Clumping factor A)

聚集因子 B (Clumping factor B)

α -溶血素 (α -hemolysin)

γ -溶血素 (γ -hemolysin)

蛋白 A (Protein A)

聚集因子 A (Clumping factor A)

[0145] **纤连蛋白结合蛋白 A (Fibronectin-binding protein A)**

纤连蛋白结合蛋白 B (Fibronectin-binding protein B)

胶原结合蛋白 (Collagen-binding protein)

脂磷壁酸 (Lipoteichoic acid)

肽聚糖 (Peptidoglycan)

蛋白 A (Protein A)

纤连蛋白结合蛋白 B (Fibronectin-binding protein B)

α -溶血素 (α -hemolysin)

潘顿-瓦伦丁杀白细胞素 (Panton valentine leukocidin)

胶原结合蛋白 (Collagen-binding protein)

脂磷壁酸 (Lipoteichoic acid)

肽聚糖 (Peptidoglycan)

荚膜多糖 (Capsular polysaccharide)

聚集因子 A (Clumping factor A)

蛋白 A (Protein A)

纤连蛋白结合蛋白 (Fibronectin-binding proteins)

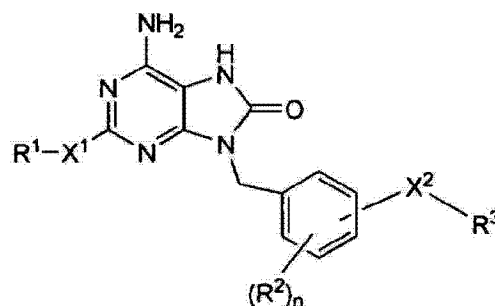
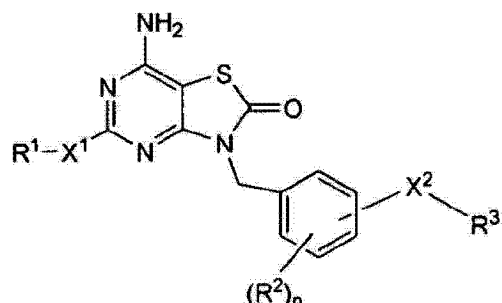
[0146] 可经受治疗的其它疾病包括,但不限于,多发性硬化症(Multiple Sclerosis)、狼疮(lupus)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、克罗恩病(Crohn's Disease)等,所述治疗包括本发明的 TLR7 激动剂磷脂缀合物或该化合物的可药用盐。

[0147] 所述 TLR 激动剂缀合物可包括同功能性(homofunctional)TLR 激动剂,例如由

TLR7 激动剂形成。所述 TLR7 激动剂可为 7- 硫代 -8- 氧代鸟苷基 (TOG) 部分、7- 去氮杂鸟苷基 (7DG) 部分、雷西莫特部分或咪喹莫特 (imiquimod) 部分。在另一个实施方案中,所述 TLR 激动剂缀合物可包括异功能性 TLR 激动剂聚合物。所述杂功能性 TLR 激动剂聚合物可包括 TLR7 激动剂和 TLR3 激动剂或 TLR9 激动剂,或所有三种激动剂。

[0148] 在一个实施方案中,本发明提供下列缀合物,其互变异构体,或其可药用盐

[0149]



[0150] 式(II)化合物 式(III)化合物

[0151] 噻唑并嘧啶 嘌呤

[0152] $X^1 = -O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR^c-$

[0153] 其中, R^c 为氢、 C_{1-10} 烷基、或由 C_{3-6} 环烷基取代的 C_{1-10} 烷基、或 R^c 和 R^1 与氮原子一起可形成杂环或取代的杂环,其中所述取代基为羟基、 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 亚烷基、或氰基;

[0154] 其中 R^1 为 (C_{1-10}) 烷基、取代的 (C_{1-10}) 烷基、 C_{6-10} 芳基或取代的 C_{6-10} 芳基、 C_{5-9} 杂环、取代的 C_{5-9} 杂环;其中在所述烷基、芳基或杂环基团上的取代基为羟基、 C_{1-6} 烷基、羟基 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 亚烷基、氨基、氰基、卤素或芳基。

[0155] 每个 R^2 独立地为 $-OH$ 、 (C_1-C_6) 烷基、取代的 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷氧基、取代的 (C_1-C_6) 烷氧基、 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基(烷酰基)、取代的 $-C(O)-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基(芳酰基)、取代的 $-C(O)-(C_6-C_{10})$ 芳基、 $-C(O)OH$ (羧基)、 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基(烷氧基羰基)、取代的 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基、 $-NR^aR^b$ 、 $-C(O)NR^aR^b$ (氨基甲酰基)、 $-O-C(O)NR^aR^b$ 、 $-(C_1-C_6)$ 亚烷基 $-NR^aR^b$ 、 $-(C_1-C_6)$ 亚烷基 $-C(O)NR^aR^b$ 、卤素、硝基或氰基;

[0156] 其中每个 R^a 和 R^b 独立地为氢、 (C_{1-6}) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_{1-6}) 烷氧基、卤代 (C_{1-6}) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基 (C_1-C_6) 烷基、 (C_{1-6}) 烷酰基、羟基 (C_{1-6}) 烷基、芳基、芳基 (C_{1-6}) 烷基、芳基、芳基 (C_{1-6}) 烷基、Het、Het (C_{1-6}) 烷基、或 (C_{1-6}) 烷氧基羰基;其中 X^2 为键或连接基团;其中 R^3 为包括一个或两个羧酸酯的磷脂;其中 n 为 0、1、2、3 或 4。

[0157] 在其中化合物的碱性或酸性足够形成酸式盐或碱式盐的情况下,将使用盐形式的所述化合物可能是合适的。可接受的盐的实例为与形成生理学上可接受的阴离子的酸形成的有机酸加成盐,例如,甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、丁二酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐和 α -甘油磷酸盐。还可形成合适的无机盐,包括盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐。

[0158] 可接受的盐可用本领域中公知的标准方法制备,例如,通过将具有足够碱性的化合物(如胺)与提供生理学上可接受的阴离子的合适酸反应。还可制备羧酸的碱金属(例如,钠、钾或锂)盐或碱土金属(例如钙)盐。

[0159] 烷基包括直链或支链的 C_{1-10} 烷基,例如,甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、异丙基、异丁基、1-甲基丙基、3-甲基丁基、己基等。

[0160] 低级烷基包括直链或支链的 C_{1-6} 烷基,例如,甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基、丁基、1-甲基丙基、2-甲基丙基、1,1-二甲基乙基、戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基等。

[0161] 术语“亚烷基”是指二价的直链或支链的烃链(例如亚乙基 $-CH_2CH_2-$)。

[0162] C_{3-7} 环烷基包括基团如:环丙基、环戊基、环己基、环庚基等,以及烷基取代的 C_{3-7} 环烷基,优选直链或支链的 C_{1-6} 烷基,如甲基、乙基、丙基、丁基或戊基,以及 C_{5-7} 环烷基,如环戊基或环己基等。

[0163] 低级烷氧基包括 C_{1-6} 烷氧基,如甲氧基、乙氧基或丙氧基等。

[0164] 低级烷酰基包括 C_{1-6} 烷酰基,如甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基或己酰基等。

[0165] C_{7-11} 芳酰基包括基团如苯甲酰基或萘甲酰基;

[0166] 低级烷氧基羰基包括 C_{2-7} 烷氧基羰基,如甲氧基羰基、乙氧基羰基或丙氧基羰基等。

[0167] 低级烷基氨基意为由 C_{1-6} 烷基取代的氨基,如甲基氨基、乙基氨基、丙基氨基、丁基氨基等。

[0168] 二(低级烷基)氨基意为由相同或不同的 C_{1-6} 烷基取代的氨基(例如,二甲基氨基、二乙基氨基、乙基甲基氨基)。

[0169] 低级烷基氨基甲酰基意为由 C_{1-6} 烷基取代的氨基甲酰基(例如,甲基氨基甲酰基、乙基氨基甲酰基、丙基氨基甲酰基、丁基氨基甲酰基)。

[0170] 二(低级烷基)氨基甲酰基意为由相同或不同的 C_{1-6} 烷基取代的氨基甲酰基(例如二甲基氨基甲酰基、二乙基氨基甲酰基、乙基甲基氨基甲酰基)。

[0171] 卤原子意为卤素原子,如氟原子、氯原子、溴原子或碘原子。

[0172] 芳基是指 C_{6-10} 单环芳基或稠环芳基,如苯基、茚基或萘基等。

[0173] 杂环基或杂环是指含有至少一个杂原子的饱和单环杂环基,或不饱和单环或稠合杂环基,所述杂原子例如为 0-3 个氮原子 NR^c 、0-1 个氧原子 $(-O-)$ 和 0-1 个硫原子 $(-S-)$ 。饱和单环杂环基的非限制性实例包括 5 或 6 元的饱和杂环基,如四氢呋喃基、吡咯烷基、吗啉基、哌啶基、哌嗪基或吡唑烷基。不饱和单环杂环基的非限制性实例包括 5 或 6 元的不饱和杂环基,如呋喃基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噻吩基、吡啶基或嘧啶基。不饱和稠合杂环基的非限制性实例包括不饱和的双环杂环基,如吲哚基、异吲哚基、喹啉基、苯并噻唑基、苯并二氢吡喃基、苯并呋喃基等。Het 可以为饱和杂环基或不饱和杂环基,如杂芳基。

[0174] R^c 与 R^1 可与它们连接的氮原子一起形成杂环。杂环的非限制性实例包括 5 或 6 元的饱和杂环,如 1-吡咯烷基、4-吗啉基、1-哌啶基、1-哌嗪基或 1-吡唑烷基,5 或 6 元的不饱和杂环如 1-咪唑基等。

[0175] 所述 R^1 的烷基、芳基、杂环基可任选被一个或多个取代基取代,其中所述取代基为相同或不同,并且包括低级烷基;环烷基、羟基;羟基 C_{1-6} 亚烷基,如羟基甲基、2-羟基乙基或 3-羟基丙基;低级烷氧基; C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基,如 2-甲氧基乙基、2-乙氧基乙基或 3-甲氧基丙基;氨基;烷基氨基;二烷基氨基;氰基;硝基;酰基;羧基;低级烷氧基羰基;卤素;

巯基 ;C₁₋₆ 烷硫基,如,甲硫基、乙硫基、丙硫基或丁硫基 ;取代的 C₁₋₆ 烷硫基,如甲氧基乙硫基、甲硫基乙硫基、羟基乙硫基或氯代乙硫基 ;芳基 ;取代的 C₆₋₁₀ 单环芳基或稠环芳基,如 4- 羟基苯基、4- 甲氧基苯基、4- 氟苯基、4- 氯苯基或 3, 4- 二氯苯基 ;5-6 元的不饱和杂环基,如呋喃基、吡咯基、吡啶基、咪唑基、噻唑基、噻吩基、吡啶基或嘧啶基 ;以及不饱和的双环杂环基,如吲哚基、异吲哚基、喹啉基、苯并噻唑基、苯并二氢吡喃基、苯并呋喃基或邻苯二甲酰亚氨基。在某些实施方案中,一种或多种上述基团被明确排除作为所述式的各种其它基团的取代基。

[0176] 所述 R² 的烷基、芳基、杂环基可任选被一个或多个取代基取代,其中,所述取代基为相同或不同,并且包括羟基 ;C₁₋₆ 烷氧基,如甲氧基、乙氧基或丙氧基 ;羧基 ;C₂₋₇ 烷氧基羰基,如甲氧基羰基、乙氧基羰基或丙氧基羰基 ;和卤素。

[0177] 所述 R^c 的烷基、芳基、杂环基可任选被一个或多个取代基取代,其中,所述取代基为相同或不同,并且包括 C₃₋₆ 环烷基 ;羟基 ;C₁₋₆ 烷氧基 ;氨基 ;氰基 ;芳基 ;取代的芳基,如 4- 羟基苯基、4- 甲氧基苯基、4- 氯苯基或 3, 4- 二氯苯基 ;硝基和卤素。

[0178] 所述由 R^c 和 R¹ 及它们所连接的氮原子一起形成的杂环可任选被一个或多个取代基取代,其中,所述取代基为相同或不同,并且包括 C₁₋₆ 烷基 ;羟基 C₁₋₆ 亚烷基 ;C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 亚烷基 ;羟基 ;C₁₋₆ 烷氧基 ;和氰基。X¹ 的一个具体含义为硫原子、氧原子或 -NR^c-。

[0179] 另一具体的 X¹ 为硫原子。

[0180] 另一具体的 X¹ 为氧原子。

[0181] 另一具体的 X¹ 为 -NR^c。

[0182] 另一具体的 X¹ 为 -NH-。

[0183] R^c 的一个具体含义为氢、C₁₋₄ 烷基或取代的 C₁₋₄ 烷基。

[0184] R¹ 和 R^c 一起的一个具体含义为二者形成杂环或取代的杂环。

[0185] R¹ 和 R^c 一起的另一具体含义为取代的或未取代的吗啉环、哌啶环、吡咯环或哌嗪环。

[0186] R¹ 的一个具体含义为氢、C₁₋₄ 烷基或取代的 C₁₋₄ 烷基。

[0187] 另一个具体的 R¹ 为 2- 羟基乙基、3- 羟基丙基、4- 羟基丁基、2- 氨基乙基、3- 氨基丙基、4- 氨基丁基、甲氧基甲基、2- 甲氧基乙基、3- 甲氧基丙基、乙氧基甲基、2- 乙氧基乙基、甲硫基甲基、2- 甲硫基乙基、3- 甲硫基丙基、2- 氟乙基、3- 氟丙基、2, 2, 2- 三氟乙基、氰基甲基、2- 氰基乙基、3- 氰基丙基、甲氧基羰基甲基、2- 甲氧基羰基乙基、3- 甲氧基羰基丙基、苄基、苯乙基、4- 吡啶基甲基、环己基甲基、2- 噻吩基甲基、4- 甲氧基苯基甲基、4- 羟基苯基甲基、4- 氟苯基甲基,或 4- 氯苯基甲基。

[0188] 另一具体的 R¹ 为氢、CH₃-、CH₃-CH₂-、CH₃CH₂CH₂-、羟基 C₁₋₄ 亚烷基,或 C₁₋₄ 烷氧基 C₁₋₄ 亚烷基。

[0189] R¹ 的另一个具体含义为氢、CH₃-、CH₃-CH₂-、CH₃-O-CH₂CH₂- 或 CH₃-CH₂-O-CH₂CH₂-。

[0190] R² 的一个具体含义为卤素或 C₁₋₄ 烷基。

[0191] R² 的另一个具体含义为氯、溴、CH₃- 或 CH₃-CH₂-。

[0192] 在烷基、芳基或杂环基上取代的具体取代基为羟基、C₁₋₆ 烷基、羟基 C₁₋₆ 亚烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 烷氧基 C₁₋₆ 亚烷基、C₃₋₆ 环烷基、氨基、氰基、卤素或芳基。

[0193] X² 的一个具体含义为键或具有最高达约 24 个原子的链 ;其中,所述原子选自碳、

氮、硫、非过氧化物氧和磷。任意碳原子可带有氧代基团,且任意硫原子可带有一个或两个氧代基团。所述链可散布有一个或多个环烷基、芳基、杂环基或杂芳环。

[0194] X^2 的另一具体含义为键或具有约 4 至约 12 个原子的链。

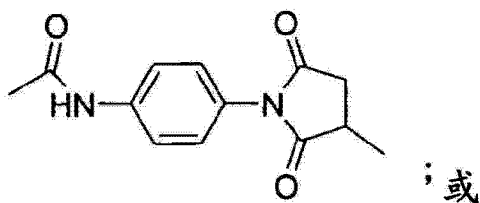
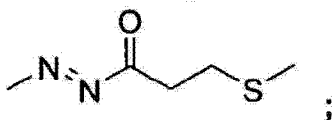
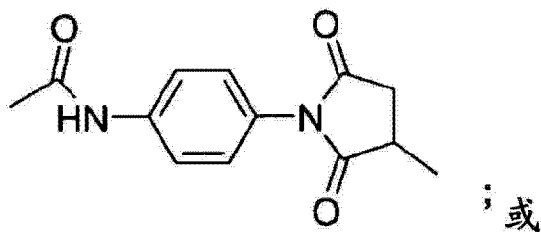
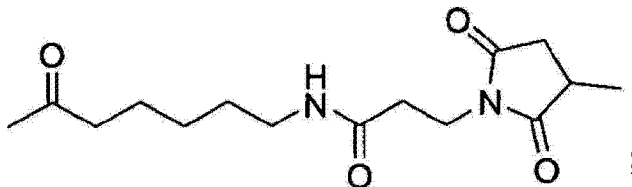
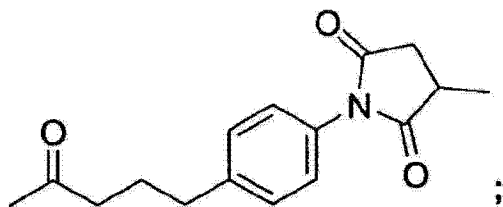
[0195] X^2 的另一具体含义为键或具有约 6 至约 9 个原子的链。

[0196] X^2 的另一具体含义为羰基(C(O))基团。

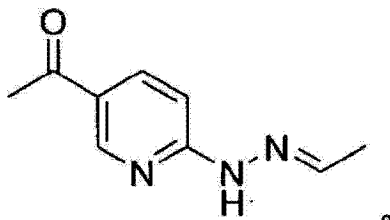
[0197] X^2 的一些非限制性实例包括 $-(Y)_y-$ 、 $-(Y)_y-C(O)N-(Z)_z-$ 、 $-(CH_2)_y-C(O)N-(CH_2)_z-$ 、 $-(Y)_y-NC(O)-(Z)_z-$ 、 $-(CH_2)_y-NC(O)-(CH_2)_z-$, 其中每个 y (下标) 和 z (下标) 独立地为 0-20, 并且每个 Y 和 Z 独立地为 C1-C10 烷基、取代的 C1-C10 烷基、C1-C10 烷氧基、取代的 C1-C10 烷氧基、C3-C9 环烷基、取代的 C3-C9 环烷基、C5-C10 芳基、取代的 C5-C10 芳基、C5-C9 杂环基、取代的 C5-C9 杂环基、C1-C6 烷酰基、Het、Het C1-C6 烷基、或 C1-C6 烷氧基羰基, 其中, 在所述烷基、环烷基、烷酰基、烷氧基羰基、Het、芳基或杂环基上的所述取代基为羟基、C1-C10 烷基、羟基 C1-C10 亚烷基、C1-C6 烷氧基、C3-C9 环烷基、C5-C9 杂环基、C1-6 烷氧基 C1-6 烯基、氨基、氰基、卤素或芳基。在一些实施方案中, 接头有时为 $-C(Y')(Z')-C(Y'')(Z'')$ 接头, 其中每个 Y'、Y''、Z' 和 Z'' 独立地为氢、C1-C10 烷基、取代的 C1-C10 烷基、C1-C10 烷氧基、取代的 C1-C10 烷氧基、C3-C9 环烷基、取代的 C3-C9 环烷基、C5-C10 芳基、取代的 C5-C10 芳基、C5-C9 杂环基、取代的 C5-C9 杂环基、C1-C6 烷酰基、Het、Het C1-C6 烷基、或 C1-C6 烷氧基羰基, 其中, 在所述烷基、环烷基、烷酰基、烷氧基羰基、Het、芳基或杂环基上的所述取代基为羟基、C1-C10 烷基、羟基 C1-C10 亚烷基、C1-C6 烷氧基、C3-C9 环烷基、C5-C9 杂环基、C1-6 烷氧基 C1-6 烯基、氨基、氰基、卤素或芳基。

[0198] X^2 的另一具体含义为

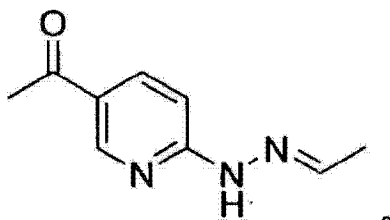
[0199]



[0200]

[0201] X^2 的另一具体含义为

[0202]



[0203] 一个具体的抗原包括氨基酸、碳水化合物、肽、蛋白质、核酸、脂质、机体物质或细胞如微生物。

[0204] 一个具体的肽具有 2 至约 20 个氨基酸残基。

[0205] 另一具体的肽具有 10 至约 20 个氨基酸残基。

[0206] 一个具体的抗原包括碳水化合物。

[0207] 一个具体的抗原为微生物。一个具体的微生物为病毒、细菌或真菌。

[0208] 具体的细菌为炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、土拉热弗朗西丝氏菌(*Francisella tularensis*)、沙门氏菌(*Salmonella*)或葡萄球菌(*Staphylococcus*)。具体的沙门氏菌(*Salmonella*)为鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)或肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)。具体的葡萄球菌(*Staphylococcus*)包括金黄色葡萄球菌。

[0209] 具体的病毒为RNA病毒,包括RSV病毒和流感病毒、RNA病毒的产物;或DNA病毒,包括疱疹病毒。具体的DNA病毒为乙型肝炎病毒。

[0210] 本发明包括这样的组合物,即其包括任选与可以为或不作为抗原的其它活性剂结合的本发明的TLR7激动剂磷脂缀合物,所述活性剂例如利巴韦林(ribavirin)、咪唑立宾(mizoribine)和麦考酚酸莫酯(mycophenolate mofetil)。其它非限制性实例为已知的并且公开于美国公开的专利申请20050004144。

[0211] 本发明的以下实施方案提供了用于制备中间体的方法,所述中间体可用于制备本发明化合物和具有所述一种或多种化合物的制剂。本发明的其它实施方案还提供了适用于制备本发明化合物的中间体。

[0212] 包括本发明缀合物的组合物的给药,例如,包括本发明磷脂缀合物和另一活性剂的组合物的给药或者包括本发明磷脂缀合物的组合物和包括另一活性剂的组合物的给药,可以是经由任何合适的给药途径,尤其是肠胃外给药,例如,静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌内或皮下途径。这些给药可以为单次快速注射、多次注射、或短期持续输注或长期持续输注。还可以使用植入式装置(例如,植入式输液泵)用于具体制剂的等剂量或可变剂量的随时间周期性肠胃外递送。对于这些肠胃外给药,所述化合物(缀合物或其他活性试剂)可配制在水中或另一种合适溶剂中或溶剂混合物中的无菌溶液。所述溶液可以含有其它物质,如盐、糖(尤其是葡萄糖或甘露糖),以使得所述溶液与血液、缓冲剂(如乙酸、柠檬酸和/或磷酸及其钠盐)以及防腐剂等渗。

[0213] 本发明的磷脂缀合物单独或与其它活性剂一起可被配制成药组合物并且以适于所选择的给药途径的各种形式给予(例如口服或肠胃外)哺乳动物宿主,如人类患者,所述给药途径例如静脉内、肌内、局部或皮下途径。

[0214] 因此,本发明的磷脂缀合物可单独或与另一活性剂(例如抗原)一起进行全身给药(例如口服给药),其可与药用赋形剂(如惰性稀释剂或可吸收的可食用载体)结合进行全身给药。它们可包入硬壳或软壳明胶胶囊中,可压缩成片剂,或可直接与患者饮食的食物相混合。对于治疗性口服给药,所述缀合物(任选地与活性化合物结合)可与一种或多种赋形剂(excipient)结合并且以以下形式使用:可吸收的片剂、口含片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬液、糖浆剂、薄片剂等。这些组合物和制品应该含有至少0.1%活性化合物。当然,所述组合物和制品的百分比可以变化,通常可方便地为给定单位剂型重量的约2%-约60%。所述缀合物和任选的其它活性化合物在这些可用的组合物中的量为使得能够获得有效剂量水平的量。

[0215] 所述片剂、锭剂、丸剂、胶囊剂等还可含有下列物质:粘合剂,如西黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,如磷酸氢二钙;崩解剂,如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等;润滑剂,如硬脂酸镁;和甜味剂,如蔗糖、果糖、乳糖或阿司帕坦;或者芳香剂,如薄荷、冬青

油,或可以添加樱桃芳香剂。当所述单位剂型为胶囊剂时,除了上述类型的物质外,其还可含有液体载体,如植物油或聚乙二醇。各种其它物质可作为包衣存在,或用于改变所述固体单位剂型的物理形态。例如,片剂、丸剂或胶囊剂可用明胶、蜡、紫胶或糖等进行包衣。糖浆剂或酏剂可含有所述活性化合物、作为甜味剂的蔗糖或果糖、作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯、染料和芳香剂(如樱桃或橙味芳香剂)。当然,用于制备任意单位剂型的任何物质应该为可药用的并且在所使用的量下基本上无毒。此外,所述磷脂缀合物(任选地与另一种活性化合物结合)可以被掺入持续释放的制品和装置中。

[0216] 所述磷脂缀合物(任选地与另一种活性化合物结合)还可以通过输注或注射进行静脉内或腹膜内给药。所述磷脂缀合物(任选地与另一种活性化合物结合)或其盐的溶液可在水中制备,任选地混合无毒的表面活性剂。分散液还可在甘油、液态聚乙二醇、三乙酸甘油酯及其混合物中,以及在油中制备。在常规贮存和使用条件下,这些制品含有防腐剂用于防止微生物生长。

[0217] 所述适用于注射或输注的药物剂型可包括无菌水溶液或分散液,或含有所述活性成分且适于即时配制为无菌可注射或可输注溶液或分散液的无菌粉末,所述无菌粉末任选地被包封在脂质体中。在所有情况下,所述最终剂型在生产和贮存条件下均应为无菌的、流动的并且稳定的。所述液体载体或赋形剂可为溶剂或液体分散介质,其包括,例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等)、植物油、无毒的甘油酯,及其合适的混合物。可通过以下方式保持适宜的流动性,例如,通过形成脂质体、在分散液的情况下通过维持所需的颗粒尺寸或者通过使用表面活性剂。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂在贮存期间预防微生物作用,所述抗菌剂和抗真菌剂例如羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,包括等渗剂(例如,糖、缓冲剂或氯化钠)是有用的。可通过在所述组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶),从而实现所述可注射组合物的长期吸收。

[0218] 无菌可注射溶液是通过(根据需要)将所需量的化合物与多种如上列举的其它成分一起加入适当溶剂中,随后进行过滤灭菌来制备。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况,一种制备方法包括真空干燥技术和冷冻干燥技术,该方法产生存在于前述过滤灭菌溶液中的所述活性成分与任何其他所需成分的粉末。

[0219] 对于局部给药,所述磷脂缀合物(任选地与另一种活性化合物结合)可以以纯的形式施用,例如,当它们为液体时。但是,通常希望将其与皮肤学上可接受的载体结合,以组合物或制品形式给药至皮肤上,所述皮肤学上可接受的载体可为固体或液体。

[0220] 可用的固体载体包括极细固体,如滑石、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等。可用的液体载体包括水、醇或二醇或水-醇/二醇掺混物,其中,本发明化合物可任选地借助于无毒的表面活性剂以有效水平溶解或分散于所述液体载体中。可加入佐剂(如香味剂和抗微生物剂)以优化针对给定用途的特性。所得液体组合物可通过吸收衬垫施用,用于浸渍绷带和其它敷料,或用泵型或气溶胶喷雾器喷洒至感染的区域。

[0221] 增稠剂,如合成聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和脂肪酸酯、脂肪醇、改性纤维素或改性矿物材料,也可与液体载体一起使用以形成可涂抹的糊剂、凝胶剂、乳膏、皂剂等,直接施用于使用者的皮肤。

[0222] 此外,在一个实施方案中,本发明提供了用于吸入递送的所述磷脂缀合物(任选地

与另一种活性化合物结合)的多种剂量剂型。例如,所述制品可设计成通过诸如定量剂量吸入器、干粉吸入器和喷雾器等装置中使用的气溶胶。

[0223] 可用于将化合物递送至皮肤的有用皮肤病学组合物的实例是本领域已知的;例如,参见 Jacquet et al. (美国专利 4,608,392)、Geria (美国专利 4,992,478)、Smith et al. (美国专利 4,559,157) 和 Wortzman (美国专利 4,820,508)。

[0224] 有用的剂量可通过以下方式确定:比较其体外活性和在动物模型中的体内活性。将小鼠及其他动物的有效剂量外推至人类的方法为本领域中已知的;例如,参见美国专利 4,938,949。本发明化合物作为 TLR 激动剂发挥作用的能力可使用本领域中公知的药理学模型确定,所述药理学模型包括 Lee et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:6646 (2003) 中公开的方法。

[0225] 通常,所述磷脂缀合物(任选地与另一种活性化合物结合)在液体组合物(如洗液)中的浓度可为约 0.1 重量%-25 重量%、约 0.5 重量%-10 重量%。在半固体或固体组合物(如凝胶或粉末)中的所述浓度可为约 0.1 重量%-5 重量%,例如,约 0.5 重量%-2.5 重量%。

[0226] 可给予所述活性成分以实现所述活性化合物的血浆峰浓度为约 0.5 μM -约 75 μM ,例如,约 1-50 μM ,如约 2 μM -约 30 μM 。这可以通过,例如静脉内注射所述活性成分的 0.05-5% 溶液(任选地在盐水中),或口服给予含有约 1-100mg 所述活性成分的大丸剂实现。可通过连续输注以提供约 0.01-5mg/kg/h 的活性成分,或通过间歇性输注含有约 0.4-15mg/kg 的活性成分,从而保持需要的血液水平。

[0227] 用于治疗所需的所述磷脂缀合物(任选地结合另一种活性化合物)或其活性盐或其衍生物的量,不仅随所选的具体盐而变化,而且随给药途径、所治疗病症的性质以及患者的年龄及状况而变化,并且最终由巡诊医生或临床医生决定。但是,通常合适的剂量为每日约 0.5mg/kg-约 100mg/kg 体重的范围,例如,约 10-约 75mg/kg 体重,如每日 3mg/kg-约 50mg/kg 受治疗者体重,例如 6-90mg/kg/天的范围,例如 15-60mg/kg/天的范围。

[0228] 所述磷脂缀合物(任选地与另一种活性化合物结合)可方便地以单位剂型给药;例如,每单位剂型含有 5-1000mg,方便地为 10-750mg,最方便地为 50-500mg 的活性成分。

[0229] 所需剂量可方便地以单一剂量或以合适的时间间隔给药的分次剂量存在,例如,每日两次、三次、四次或更多次的亚剂量。所述亚剂量自身可以进一步分成例如多个不连续的疏散间隔的给药;如通过吹药器多次吸入或通过多个液滴施用于眼中。所述剂量还根据个体患者的年龄、体重、病症和应答而改变,剂量频率可能也是如此。通常,对于本文所述病症而言,所述活性剂的日总剂量范围可为约 50mg-约 5000mg,并以单一剂量或分次剂量给药。在一个实施方案中,日剂量范围应为约 100mg-约 4000mg,例如,约 1000-3000mg,并以单一剂量或分次剂量给药,例如,每 6 小时 750mg 的口服给药化合物。这可达到约 500-750 μM 的血浆水平,该血浆水平可有效杀死癌细胞。在治疗患者的过程中,所述治疗应当以较低剂量开始并且根据患者的整体反应而增加。

[0230] 如上所述,含有与另一种活性化合物结合的磷脂缀合物的组合物可用于治疗或预防例如人类或其它哺乳动物(例如牛、犬、马、猫、羊和猪等动物)以及可能的其它动物中的疾病或障碍。根据具体的化合物,所述组合物将例如用于治疗癌症、感染、用于增强适应性免疫(例如,抗体生成、T 细胞活化等)、作为疫苗,和/或刺激中枢神经系统。

[0231] 可将磷脂缀合物与抗原共同给予需要其的受试者以治疗一种或多种炎症病

症。下文所使用的术语“治疗(treating、treatment)”和“疗效(therapeutic effect)”可指降低、抑制或停止(防止)炎症应答(例如,减缓或停止针对特定抗原的抗体的抗体生成或数量);减少发炎组织数量;和完全或部分地缓解炎症病症。炎症病症包括,但不限于,过敏(allergy)、哮喘(asthma)、自身免疫性疾病(autoimmune disorder)、慢性炎症(chronic inflammation)、慢性前列腺炎(chronic prostatitis)、肾小球性肾炎(glomerulonephritis)、超敏反应(hypersensitivities)、炎症肠病(inflammatory bowel disease)、肌病(myopathy)(例如,结合有全身性硬化症(systemic sclerosis)、皮肌炎(dermatomyositis)、多发性肌炎(polymyositis)、和/或包涵体肌炎(inclusion body myositis))、盆腔炎(pelvic inflammatory disease)、再灌注损伤(reperfusion injury)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、移植物排斥反应(transplant rejection)、血管炎(vasculitis)和白细胞异常(leukocyte disorder)(如切-东综合征(Chediak-Higashi syndrome)、慢性肉芽肿病(chronic granulomatous disease))。某些自身免疫性疾病也为炎症疾病(如类风湿性关节炎)。在一些实施方案中,炎症障碍选自慢性炎症、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、超敏反应、肌病、盆腔炎、再灌注损伤、移植物排斥反应、血管炎和白细胞异常。在某些实施方案中,炎症病症包括但不限于,支气管扩张(bronchiectasis)、细支气管炎(bronchiolitis)、囊性纤维化(cystic fibrosis)、急性肺损伤(acute lung injury)、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、动脉粥样硬化(atherosclerosis)和脓毒性休克(septic shock)(例如,带有多器官功能衰竭的败血症)。在一些实施方案中,炎症病症不是选自过敏、哮喘、ARDS和自身免疫性疾病的病症。在某些实施方案中,炎症病症不是选自胃肠道炎症(gastrointestinal tract inflammation)、脑炎症(brain inflammation)、皮肤炎症(skin inflammation)和关节炎症(joint inflammation)的病症。在某些实施方案中,炎症病症是嗜中性粒细胞介导的疾病(neutrophil-mediated disorder)。

[0232] 可将本文所描述的化合物给予需要其的受试者以有效地治疗一种或多种自身免疫性疾病。在这些治疗中,术语“治疗(treating、treatment)”和“疗效(therapeutic effect)”可指降低、抑制或停止自身免疫应答(例如,减缓或停止针对特定抗原的抗体的抗体生成或数量);减少发炎组织数量和完全或部分地缓解自身免疫性疾病。自身免疫性疾病包括,但不限于,自身免疫性脑脊髓炎(autoimmune encephalomyelitis)、结肠炎(colitis)、自身免疫性胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)(automimmune insulin dependent diabetes mellitus(IDDM))、韦格纳肉芽肿病(Wegener granulomatosis)和高安动脉炎(Takayasu arteritis)。测试用于这些疾病的化合物的模型包括,但不限于,(a)(i)髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)肽诱导的C5BL/6,(ii)SJL小鼠PLP139-151,或178-191EAE,和(iii)用于自身免疫性脑脊髓炎的由MOG或PLP肽诱导的EAE过继转移模型;(b)用于自身免疫性IDDM的非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠;(c)用于结肠炎的右旋糖酐硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎模型和三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎模型;和(d)全身性小血管炎疾病作为用于韦格纳肉芽肿病和高安大动脉炎的模型。可将本文所描述的化合物给予受试者以有效地治疗一种或多种下列障碍:急性播散性脑脊髓炎(Acute disseminated encephalomyelitis, ADEM)、阿狄森氏病(Addison's disease)、斑秃(alopecia areata)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、抗磷脂抗体综合

征(antiphospholipid antibody syndrome, APS)、自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia)、自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis)、自身免疫性内耳病(autoimmune inner ear disease)、大疱性类天疱疮(bullous pemphigoid)、乳糜泻(coeliac disease)、恰加斯病(Chagas disease)、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease)、克罗恩病(Crohns disease)(两种类型的特发性炎性肠病“IBD”(idiopathic inflammatory bowel disease“IBD”)之一)、皮炎(dermatomyositis)、1型糖尿病(diabetes mellitus type1)、子宫内膜异位症(endometriosis)、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)、桥本氏病(Hashimoto's disease)、化脓性汗腺炎(hidradenitis suppurativa)、特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura)、间质性膀胱炎(interstitial cystitis)、红斑狼疮(lupus erythematosus)、混合性结缔组织病(mixed connective tissue disease)、硬皮病(morphea)、多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)、重症肌无力(myasthenia gravis)、发作性睡病(narcolepsy)、神经性肌强直(neuromyotonia)、寻常型天疱疮(pemphigus vulgaris)、恶性贫血(pernicious anaemia)、多发性肌炎(polymyositis)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis)、类风湿性关节炎、精神分裂症(schizophrenia)、硬皮病(scleroderma)、斯耶格伦综合征(**Sjögren's syndrome**)、颞动脉炎(temporal arteritis)(也被称为“巨细胞动脉炎”(giant cell arteritis))、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)(两种类型的特发性炎性肠病“IBD”之一)、血管炎、白癜风(vitiligo)和韦格纳肉芽肿病。在一些实施方案中,自身免疫性障碍或疾病不是选自克罗恩病(或克罗恩氏病)、类风湿性关节炎、红斑狼疮和多发性硬化症的障碍或疾病。

[0233] 可将磷脂缀合物和抗原给予需要其的受试者以在所述受试者中诱导免疫应答。在某些实施方案中,所述免疫应答可以由所述受试者针对外源性抗原(例如病原体感染)自动产生。在一些实施方案中,抗原与本文中所描述的磷脂缀合物共同给予,其中在受试者中产生针对所述抗原的免疫应答中。在某些实施方案中,抗原是具体的细胞增殖性病症特异性的(例如,特定的癌抗原)或具体的病原体特异性的(例如,革兰氏阳性菌细胞壁抗原或金黄色葡萄球菌抗原)。在一些实施方案中,当给予受试者时,本文中所描述的化合物几乎不诱导或不诱导副作用(例如脾大)。在某些实施方案中,组合物形成约 10 纳米至约 1000 纳米的颗粒,并且有时,组合物形成平均尺寸或标称尺寸为约 100 纳米至约 400 纳米的颗粒。

[0234] 可将磷脂缀合物和抗原给予需要其的受试者以有效地治疗一种或多种细胞增殖性障碍。在这些治疗中,术语“治疗(treating、treatment)”和“疗效(therapeutic effect)”可指降低或停止细胞增殖速率(例如减缓或停止肿瘤生长);减少增殖癌细胞数(例如消除部分或整个肿瘤)和完全或部分地缓解细胞增殖性病症。细胞增殖性病症包括,但不限于,结肠直肠癌、乳癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、淋巴结癌、结肠癌、前列腺癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、肝癌、肾癌和心脏肿瘤。癌症的实例包括造血系统肿瘤性疾病(hematopoietic neoplastic disorder),其为包括造血源(例如来自骨髓、淋巴或红细胞系,或其前体细胞)的增生/肿瘤细胞的疾病。所述疾病可起因于低分化急性白血病(poorly differentiated acute leukemia),例如,成红细胞白血病(erythroblastic leukemia)和急性巨核细胞白血病(acute megakaryoblastic leukemia)。其它骨髓性疾

病包括,但不限于,急性早幼粒细胞白血病(acute promyeloid leukemia (APML))、急性髓性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)和慢性髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML) (综述见于 Vaickus, Crit. Rev. in Oncol./Hematol. 11:267-297(1991)); 淋巴恶性肿瘤(lymphoid malignancies) 包括,但不限于,急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL) —— 包括 B- 系 ALL 和 T- 系 ALL、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)、幼淋巴细胞白血病(prolymphocytic leukemia, PLL)、毛细胞白血病(hairy cell leukemia, HLL) 和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia, WM)。其它形式的淋巴恶性肿瘤包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma) 及其变体、外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T cell lymphoma)、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤(adult T cell leukemia/lymphoma, ATL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤(cutaneous T-cell lymphoma, CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病(large granular lymphocytic leukemia, LGL)、何杰金病(Hodgkin's disease) 和李-何病(Reed-Sternberg disease)。在一个具体的实施方案中,所述细胞增殖性疾病为非内分泌肿瘤(non-endocrine tumor) 或内分泌肿瘤(endocrine tumor)。非内分泌肿瘤的说明性实例包括,但不限于,腺癌(adenocarcinoma)、腺泡细胞癌(acinar cell carcinoma)、鳞状腺癌(adenosquamous carcinoma)、巨细胞瘤(giant cell tumor)、胰腺导管内乳头状粘液肿瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm)、粘液性囊腺癌(mucinous cystadenocarcinoma)、胰母细胞瘤(pancreatoblastoma)、浆液囊腺瘤(serous cystadenoma)、实性假乳头状瘤(solid and pseudopapillary tumor)。内分泌肿瘤可以是胰岛细胞瘤(islet cell tumor)。

[0235] 细胞增殖性疾病还包括炎症病症,例如皮肤炎症病症,其包括,例如,湿疹(eczema)、盘状红斑性狼疮(discoid lupus erythematosus)、扁平苔藓(lichen planus)、硬化性苔藓(lichen sclerosus)、蕈样肉芽肿病(mycosis fungoides)、光照性皮肤病(photodermatoses)、玫瑰糠疹(pityriasis rosea)和银屑病。此外,还包括与肥胖相关的细胞增殖性病症,例如脂肪细胞的增殖。

[0236] 细胞增殖性病症还包括病毒性疾病,其包括,例如,获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome)、腺病毒感染(adenoviridae infection)、甲病毒感染(alphavirus Infection)、虫媒病毒感染(arbovirus Infection)、博尔纳病(Borna disease)、布尼亚病毒感染(bunyaviridae Infection)、杯状病毒感染(caliciviridae Infection)、水痘(chickenpox)、冠状病毒感染(Coronaviridae Infection)、柯萨奇病毒感染(coxsackievirus Infection)、巨细胞病毒感染(cytomegalovirus Infection)、登革热(dengue)、DNA 病毒感染(DNA Virus Infection)、深脓疱病(ecthyma)、传染性脑炎(contagious encephalitis)、虫媒病毒(arbovirus)、爱泼斯坦巴尔病毒感染(Epstein-Barr virus infection)、传染性红斑(erythema infectiosum)、汉坦病毒感染(hantavirus infection)、出血热(hemorrhagic fever)、病毒性肝炎(viral hepatitis)、病毒性人单纯疱疹(viral human herpes simplex)、带状疱疹(herpes zoster)、耳带状疱疹(herpes zoster oticus)、疱疹病毒感染(herpesviridae infection)、传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis)、流感(influenza) 例如禽流感或人流感、拉沙热(Lassa fever)、麻疹(measles)、传染性软疣(Molluscum contagiosum)、腮腺炎(mumps)、

副粘病毒感染 (paramyxoviridae Infection)、白蛉热(phlebotomus fever)、多瘤病毒感染(polyomavirus infection)、狂犬病(rabies)、呼吸道合胞病毒感染(respiratory syncytial virus Infection)、裂谷热(Rift Valley fever)、RNA 病毒感染(RNA Virus Infection)、风疹(rubella)、慢病毒疾病(slow virus disease)、天花(smallpox)、亚急性硬化性全脑炎(subacute sclerosing panencephalitis)、肿瘤病毒感染(tumor virus infection)、疣(wart)、西尼罗河热(West Nile fever)、病毒性疾病(virus disease)和黄热病(Yellow Fever)。例如, SV40 转化病毒的大 T 抗原作用于 UBF、活化 UBF、并且将其它病毒蛋白募集至 P0II 复合物, 因此刺激细胞增殖以确保病毒传播。细胞增殖性病症还包括与血管生成相关的病症(例如癌症) 以及通过脂肪细胞和其它脂肪细胞的增殖而引起的肥胖症。

[0237] 细胞增殖性病症还包括由心脏应激导致的心脏疾病, 例如高血压(hypertension)、气囊血管成形术(balloon angioplasty)、心脏瓣膜病(valvular disease)和心肌梗死(myocardial infarction)。例如, 心肌细胞是在心脏中分化的肌细胞, 其构成大部分的心室壁和血管平滑肌细胞系血管。虽然两者均为肌细胞类型, 但是心肌细胞和血管平滑肌细胞的收缩、生长和分化机制不同。心脏形成后不久心肌细胞即成为终末分化的细胞, 因此失去分裂能力, 而血管平滑肌细胞不断经历从收缩表型到增殖表型的调整。例如, 在各种病理生理应激例如高血压、气囊血管成形术、心脏瓣膜病和心肌梗死下, 心脏和血管经历生长相关的形态学改变, 其可以降低心脏功能并且最终表现出心脏衰竭。因此, 本文提供了通过给予可有效治疗心脏疾病的量的磷脂缀合物和抗原而治疗心脏细胞增殖性病症的方法。所述磷脂缀合物和抗原可以在已经发生或已经发现心脏应激之前或之后给予, 或在发生或发现例如高血压、气囊血管成形术、心脏瓣膜病和心肌梗死之后给予。给药可以减少血管肌细胞和 / 或平滑肌细胞的增殖。

[0238] 通过以下非限制性实施例将进一步说明本发明。

[0239] 实施例 I

[0240] 当提及图 1 中的化合物时, 本文中所述的化学合成方案使用圆括号中的数字; 以及当提及反应步骤时(例如, 加入的化学物质和 / 或反应条件), 使用圆括号中的字母。例如, (a) 是指包括加入反应物的反应步骤, 当其与化合物(1) 结合并反应时可以导致化合物(2) 的形成。每一步反应步骤的所述反应条件和加入的化合物为:(a) N, N'-甲基乙二胺氢铝锂(Lithium N, N'-methylethylenediaminoaluminum hydride) (Cha, J. et al., (2002)). 0°C, THF, 通过 N, N'-甲基乙二胺氢铝锂(Bull. Korean Chem. Soc. 23, 1697-1698)将芳香腈选择性转化成醛;(b) NaI, 三甲基氯硅烷, CH₃CN, 室温;(c) PBS, 室温;(d) NaOH:EtOH1:1, 回流;(e) DOPE, HATU, 三乙胺, DMF/DCM1:1, 室温;(f) O-(2-氨基乙基)-O'-(2-叠氮基乙基) 壬二醇, HATU, 三乙胺, DMF, 室温;(g) 4-戊炔酸, 抗坏血酸钠、Cu(OAc)₂, t-BuOH/H₂O/THF2:2:1, 室温;和(h) DOPE, HATU, 三乙胺, DMF/DCM1:1, 室温。

[0241] 4-((6-氨基-2-(2-甲氧基乙氧基)-8-氧代-7H-嘌呤基-9(8H)-基) 甲基) 苯甲酸(见图 1, 化合物 5)的合成。将 20mL1:1 的乙醇:水的混合物加入至 0.1g (0.28mmol) 4-((6-氨基-8-甲氧基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9基) 甲基) 苯甲腈中(见图 1, 化合物 1), 并且将所述结合物回流 8 小时。将所得反应混合物冷却并且用浓盐酸酸化至 pH2。将水溶液进一步用 DCM (3x20mL) 萃取, 用 MgSO₄ 干燥并且真空蒸发得到 8-氧代-9-苯甲

酸(化合物 5)、8-甲氧基-9-苯甲酸和苯甲酸-8-氧代-9-苯甲酸乙酯的混合物。所述产物在干燥后即溶于 CH_3CN (25mL) 并且加入 NaI (0.14g, 0.96mmol) (图 1, 反应步骤(b))。搅拌下向该溶液中滴加 12 μL (0.96mmol) 三甲基氯硅烷。所述反应混合物在 40℃ 加热 4 小时, 然后冷却、过滤并且用水 (20mL) 洗涤, 随后用乙醚 (20mL) 洗涤, 得到白色固体, 收率 85%。对所得产物进行核磁共振 (NMR) 分析, 得到以下结果, ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 10.33 (s, 1H), 7.89 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.37 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 6.65 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.24 (t, $J=4\text{Hz}$, 2H), 3.56 (t, $J=4\text{Hz}$, 2H), 3.25 (s, 3H)。HPLC 保留时间 (R_t)=14.3min。ESI-MS (正离子模式): $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_5\text{m/z}$ [M+1] 计算值 360.34; 实测值 360.24。

[0242] 2-(4-((6-氨基-2-(2-甲氧基乙氧基)-8-氧代-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苯甲酰氨基)乙基 2,3-双(油酰基氧基)丙基磷酸酯(见图 1, 化合物 6)的合成。向 0.022g (0.06mmol) 化合物 5 的 1mL 无水 N,N -二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中加入 0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)- N,N,N',N' -四甲基脲六氟磷酸酯 (0-(7-azabenzotriazol-1-yl)- N,N,N',N' -tetramethyluronium hexafluorophosphate, HATU) (0.026g, 0.067mmol) 和无水三乙胺 (TEA) (17 μL , 0.12mmol)。制备 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (0.05g, 0.067mmol) 的无水 1:1 二氧甲烷 (DCM):DMF (1mL) 溶液并且将其缓慢加入至所述反应混合物中 (图 1, 反应步骤(e))。将所得反应混合物室温搅拌至反应完成, 然后真空蒸发。所得产物使用 15% 甲醇 (MeOH) 的 DCM 溶液通过快速柱色谱法纯化, 得到 0.038g 白色固体, 收率 58%。对所得产物进行 NMR 分析, 得到以下结果, ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 9.7 (s, 1H), 7.87 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 7.32 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 6.61 (s, 2H), 5.30 (m, 4H), 5.05 (m, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.26 (m, 4H), 4.06 (m, 1H), 3.77 (m, 4H), 3.57 (m, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.26 (s, 3H), 2.23 (m, 4H), 1.95 (m, 8H), 1.46 (m, 4H), 1.22 (m, 40H), 0.83 (m, 6H)。ESI-MS (负离子模式): $\text{C}_{57}\text{H}_{92}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{P}$ m/z [M-1] 计算值 1083.35; 实测值 1083.75。

[0243] 4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)- N -(32-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧杂三十二烷基)苯甲酰胺(见图 1, 化合物 7)的合成。向化合物 5 (0.100g, 0.278mmol) 的无水 DMF (5mL) 溶液中加入 HATU (0.117g, 0.306mmol) 和无水 TEA (77.014 μL , 0.556mmol) (见图 1, 反应步骤(f))。制备 0-(2-氨基乙基)-0'-(2-叠氮基乙基)壬乙二醇 (0.150g, 0.303mmol) 的无水 DMF (1mL) 溶液并且将其缓慢加入至所述反应混合物中。将所得反应混合物室温搅拌直至反应完成, 然后真空蒸发。所得产物使用 5%MeOH 在 DCM 中的溶液通过快速柱色谱法纯化获得 0.224g 不透明油状物, 收率 93%。HPLC 保留时间=12 分钟。对所得产物进行 NMR 分析, 得到以下结果, ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 10.01 (s, 1H), 8.45 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 7.78 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 7.35 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 6.49 (s, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.25 (t, $J=4\text{Hz}$, 2H), 3.57 (m, 4H), 3.5 (m, 36H), 3.4 (m, 6H), 3.26 (s, 3H)。ESI-MS (正离子模式): $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{m/z}$ [M+1] 计算值 868.94; 实测值 868.59。

[0244] 3-(1-(1-(4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-十氧杂-2-氮杂三十四烷-34-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙酸(见图 1, 化合物 8)的合成。将化合物 7 (0.218g, 0.251mmol) 和 4-戊炔酸 (0.074g, 0.753mmol) 溶于 1:1 叔丁醇: H_2O (3mL) (见图 1, 反应步骤(g))。将溶于 1:1 叔丁醇: H_2O (1mL) 中的坏血酸钠 (0.02g, 100mmol) 和 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (0.009g,

50mmol) 缓慢加入至所述反应混合物中,并且在室温下搅拌直至通过 TLC 监测化合物 7 完全反应。所得产物用 DCM (10mL) 和 H₂O (10mL) 萃取并且有机层用 MgSO₄ 干燥得到 0.230g 不透明油状物, 收率 95%。HPLC 保留时间 = 11.5 分钟。对所得产物进行 NMR 分析, 得到以下结果, ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.48 (s, 1H), 7.76 (d, J=8.29Hz, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.23 (d, J=8.29, 2H), 4.88 (s, 2H), 4.41 (t, J=5.12Hz, 2H), 4.23 (t, J=4Hz, 2H), 3.74 (t, J=5.12Hz, 2H), 3.57 (t, J=4Hz, 2H), 3.51 (m, 8H), 3.42 (m, 36H), 3.26 (s, 3H), 2.79 (t, J=7.56Hz, 2H), 2.24 (t, J=7.56Hz, 2H)。ESI-MS (正离子模式): C₄₃H₆₇N₉O₁₆m/z [M+1] 计算值 966.04; 实测值 966.67。

[0245] 实施例 II

[0246] 分子量为 200-400kD 的多种嘌呤、嘧啶和咪唑并喹啉已经被证明可活化 TLR7, 并且作为特异性 TLR7 配体的化合物基于摩尔计比咪唑莫特强 100-1000 倍 (Lee et al., *infra*)。由于这些 TLR 激动剂在结构上与核苷酸的正常组分非常相似, 因此它们几乎不可能在重复给药后诱导半抗原免疫反应。

[0247] 实验方法

[0248] 体外 (invitro) 方法

[0249] 使用小鼠白血病单核巨噬细胞细胞系 RAW264.7 进行细胞因子诱导的体外测量。Raw264.7 小鼠获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, 罗克维尔, 马里兰州) 并且在 DMEM 完全培养基 [补充有 10% 热灭活胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和 100U/mL 青霉素 / 100 μg/mL 链霉素的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (Irvine Scientific, Irvine, CA)] 中培养。BMDM 由 C57BL/6 和 TLR7 缺陷小鼠制备, 如记载于 Wu, C. C et al., “Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor7ligand”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:3990 (2007)。

[0250] 通常, 将 RAW264.7 细胞和 BMDM 于 37°C, 5%CO₂ 下用多种浓度的缀合物孵育并且收集培养物上清液。上清液中的细胞因子 (IL-6、IL-12 或 TNF-α) 水平是通过 ELISA (BD Biosciences Pharmingen, La Jolla, CA) 测定 (Cho, H. J et al., “Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism” [见评论], Nat. Biotechnol., 18:509 (2000)), 结果示于图 2A-D。数据为三重复样的平均值 ± SEM 并且代表三个独立的实验。这些细胞因子的最低检测水平为 15pg/mL。

[0251] 如上所述, TNF α 水平 (见图 2A) 是通过用多种缀合物或对照物孵育约 1x10⁶/mL RAW264.7 细胞而测定。如上所述, IL-6 和 IL-12 水平 (见图 2B-D) 是通过用多种缀合物或对照物孵育约 0.5x10⁶/mLBMDM 而测定。缀合物作为储液 (SM、化合物 (6)、(8)、(9) 为 10 μm, 化合物 (4a) 为 0.1 μm) 制备, 并且由其制备连续稀释液 (1:5)。

[0252] BMDM 还用于评价使用本文所描述的合成路线合成的 TLR7 缀合物的内毒素污染水平。使用 TLR7 缀合物 (10 μM SM, 0.1 μM 化合物 (4a), 10 μM 化合物 (6), 10 μM 化合物 (8) 或 10 μM 化合物 (9)) 孵育 0.5x10⁶/mL 来自 C3H/HeJ (LPS 无应答突变体) 或 C3H/HeO_uJ (野生型) 的 BMDM 持续 18 小时。在培养物上清液中的 IL-6 或 IL-12 水平是通过 ELISA 测量, 结果示于图 2B。每个 TLR7 缀合物在 TLR4 突变小鼠和野生型小鼠中均诱导相似水平的 IL-6, 表明这些缀合物的 LPS 污染为最小。

[0253] 人外周血单核细胞(PBMC)分离自人棕黄层(buffy coat),购自 The San Diego Blood Bank(San Diego, CA),所述分离如记载于 Hayashi, T et al., “Enhancement of innate immunity against Mycobacterium avium infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase”, *Infect. Immun.*, 69:6156, (2001)。用多种浓度的 TLR7 缀合物在 37°C, 5%CO₂ 下孵育 PBMC (1X10⁶/mL)持续 18 小时并且收集培养物上清液。上清液中的细胞因子(IL-6、TNF- μ 或 IFN α 1)水平是通过 Luminex bead assay (Invitrogen, Carlsbad, CA)测定,结果示于图 3A-B。数据为三重复样的平均值 $\pm$ SEM 并且代表三个独立的实验。IL-6、TNF- μ 和 IFN α 1 的最低检测水平分别为 6pg/mL、10pg/mL 和 15pg/mL。

[0254] 体内(in vivo)方法

[0255] 使用 6 周至 8 周大的 C57BL/6 小鼠检测 TLR7 缀合物的促炎性细胞因子(pro inflammatory cytokine)的药代动力学。为所述小鼠静脉注射 TLR7 激动剂及其缀合物(每只小鼠 40nmol 化合物(4a)或 200nmol SM 和化合物(6)、(8)或(9))。注射后 2、4、6、24 或 48 小时收集血液样本。将血清分离并且于 -20°C 保存直至使用。血清中的细胞因子(例如, IL-6 和 TNF- α)水平是通过 Luminex bead microassay 测定,结果示于图 4A-B。数据为五只小鼠的平均值 $\pm$ SEM 并且代表两个独立的实验。IL-6 和 TNF- α 的最低检测水平分别为 5pg/mL 和 10pg/mL。

[0256] 还检测了通过 TLR7 缀合物进行的免疫反应启动(例如,佐剂性)。于第 0 天和第 7 天对 C57BL/6 小鼠组(n=5)用 20 μ g 混合有约 10nmol 的多种 TLR7 缀合物的卵白蛋白(OVA)进行皮下免疫接种,其中 10nmol 为所述缀合物的 TLR7 部分的剂量目标,实际量将会取决于每个缀合物的实际化学式。TLR9-活化的免疫刺激寡核苷酸序列(ISS-ODN;1018)用作 Th1 诱导佐剂的阳性对照(Roman, M et al., Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants, *Nat. Med.*, 3:849(1997))。第 0、7、14、21、28、42 和 56 天收集血清。将用盐水或混合有赋型剂的 OVA 免疫接种的小鼠作为对照。第 56 天处死小鼠并且采集脾用于制备脾细胞和组织切片。将约 200 微升的 2.5x10⁶/mL 脾细胞储液等分至圆底组织培养微量滴定板中(三个重复样),在总体积为 200 μ l RPMI1640 完全培养基[补充有 10% 热灭活 FCS、2mM L-谷氨酰胺和 100U/mL 青霉素/100 μ g/mL 链霉素的 RPMI1640 (Irvine Scientific/Irvine, CA)]中,并用单独的 100 μ g/mL 的 OVA 或用单独的培养基进行再刺激。在一些实施例中,免疫接种后 24 小时观察注射位点的炎症迹象或局部反应。观察小鼠活动力作为对免疫接种的潜在一疾病 || 应答的量度,然后每周称重。除了采集脾,还在第 56 天收集肺、肝、心和肾,其固定在 10% 缓冲的福尔马林(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)中并且用石蜡包埋。用苏木素(Hematoxylin)与伊红(Eosin)(H&E)对 5 μ m 厚的切片染色并且在显微镜下进行评价。

[0257] 通过 ELISA 测定 IgG 亚类(在一些实施方案中具体为 IgG1 和 IgG2)的抗 OVA 抗体,如记载于 Cho, H. J et al., “Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism”[see comments], *Nat. Biotechnol.*, 18:509(2000),结果示于图 5A 和 5B。每个 ELISA 板含有滴定的事先定量的血清以生成标准曲线。这一标准滴定量算作血清的最高稀释度,其给出背景的双倍吸光度计数。多种血清样品以 1:100 稀释度进行测试。结果以单位/mL 表示,基于

标准血清的单位 /mL 计算,并且表示在每组中五只动物的平均值 $\pm$ SEM。* 和 T 分别表示与用混合有赋形剂的 OVA 免疫接种的小鼠对比,通过单因素 ANOVA 得出 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

[0258] 脾细胞由采集的脾制备。然后在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 下孵育脾细胞培养物(以单独的 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ OVA 或单独的培养基再刺激),并且 72 小时后采集上清液。依据制造商的说明书通过 ELISA (BD Bioscience PharMingen) 测量培养液上清液中的 IFN α 水平,结果描述于图 5C (Kobayashi, H et al., Prepriming: a novel approach to DNA-based vaccination and immunomodulation”, *Springer Semin. Immunopathol.*, **22**:85 (2000))。计算每组的平均脾细胞总数并且与 PBS- 免疫接种组进行比较以监测脾细胞增殖。数据为五只小鼠的平均值 $\pm$ SEM 并且代表三个独立的实验。

[0259] 通过三重分析(three-fold analysis) (总脾细胞计数、组织学检查,以及肉眼观察受治疗小鼠的注射区域和一般整体健康和行为) 进行对 TLR7 缀合物的可能副作用的评价。对 C57BL/6 小鼠用 $20\text{ }\mu\text{g}$ 混合有 TLR7 缀合物、赋形剂或对照激动剂(寡核苷酸序列 ISS-ODN) 的 OVA 进行免疫接种。第 56 天处死小鼠并且计数总脾细胞数,结果示于图 6A。将脾收集并且提交用于组织学检查,如图 6B (放大倍数 = 100x) 所示。注射后 24 小时观察注射位点的皮肤,如图 6C 所示。用 OVA 加 TLR7 缀合物免疫接种的小鼠和单独用 OVA 免疫接种的小鼠之间所计数的脾细胞数没有显著差异(见图 6A)。对来自用混合有 TLR7 缀合物的 OVA 免疫接种的小鼠的脾的组织学检查没有显示出任何骨髓破裂或骨髓中细胞构成(cellularity) 增加(见图 6B)。注射位点的皮肤没有任何明显发红或青光眼反应(glaucomatous reaction) (见图 6C)。

[0260] 在一些实验中,进行了统计学评价以确定观察结果的统计学显著性。统计学软件包(Prism4.0, GraphPad, San Diego CA) 用于包括回归分析的统计学分析。将数据作图并且通过非线性回归拟合,假设各组间具有统一标准偏差的高斯分布。在所述佐剂性实验中,使用邦弗朗尼事后检验(Bonferroni post hoc test) 通过两因素 ANOVA 分析各组间的统计学差异,以比较对照小鼠和用 OVA 免疫接种的小鼠。 $P < 0.05$ 的值被认为具有统计学显著性。

[0261] 结果与讨论

[0262] 化学合成

[0263] 由化合物(1) 合成化合物(4) 获得 UC1V150 与 MSA 蛋白质的一致缀合比 5:1 (Wu, C. C et al., “Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**:3990 (2007))。化合物(1) 的 9- 苯甲腈的碱性水解(图 1, 反应步骤 (d)) 提供了多功能的苯甲酸官能团(化合物(5)) 并且允许组成缀合物(6)、(8) 和(9)。在无水 DMF 中,在 TEA 的存在下,通过使用 HATU 进行活化,将所述苯甲酸与 DOPE 偶联(图 1, 反应步骤 (e)) 生成化合物 6,其收率为 58%。

[0264] 由于化合物(6) 在测试用的合适的溶剂中溶解困难,偶联 PEG 间隔基以提供改进的溶解度。在无水 DMF 中,在 TEA 的存在下,通过使用 HATU 进行的活化,将易获得的胺 / 叠氮化物双官能 PEG 偶联至所述苯甲酸(见图 1, 反应步骤 (f)), 其生成化合物(7)。通过使用 4- 戊炔酸进行的铜(I) - 催化的叠氮化物 - 炔环加成形成 1, 2, 3- 三唑(图 1, 反应步骤 (g)) 得到化合物(8),其收率为 95%。最后,化合物(9) 是通过使用的 DOPE 和化合物(8) 的 HATU 活化酰胺形成而制备(图 1, 反应步骤 (h))。

[0265] 通过脂质缀合的 TLR7 激动剂进行的细胞因子诱导的体外测量

[0266] TLR 激动剂化合物(4a), 当其与小鼠血清白蛋白共价偶联时, 显示出与未缀合的药物(SM) 相比 10 倍或更高的体外或体内细胞因子诱导的效力 (Wu, C. C et al., “Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:3990 (2007)). 使用类似的测定法, 使用小鼠巨噬细胞系 RAW264 以及原代骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 比较所述脂质-TLR 激动剂缀合物(图 1, 化合物 6)、PEG-TLR7 激动剂缀合物(图 1, 化合物 8) 和 PEG-脂质(图 1, 化合物 9) 缀合物。用连续稀释的 TLR7 缀合物刺激各细胞持续 18 小时, 通过 ELISA 测量释放至培养基中的细胞因子水平并且将其与未缀合的 TLR7 激动剂(SM) 比较(见图 2A, 图 A-D)。

[0267] 当与未缀合的激动剂相比时, 化合物 (4a) (例如 TLR7-MSA 缀合物) 之前显示了作为细胞因子诱导物的强 100 倍的效力, 而当被标准化至未缀合激动剂的摩尔水平时, 所述脂质-TLR7 缀合物具有强 10 倍的效力。虽然与未缀合的 TLR7 (SM) 相比, PEG-TLR7 缀合物(化合物 8) 显示出较弱效力, 但是将脂质缀合至 PEG-TLR7 缀合物(脂质 PEG-TLR7) (化合物 9) 将其效力恢复至未缀合的 TLR7 (SM) 的相似水平。将基本上相似浓度——在缀合形式下的最高水平——的 MSA、脂质或无 TLR7 缀合的 PEG 用作阴性对照, 并且分别在 RAW264.7 细胞和 BMDM 中诱导最低的细胞因子水平或不诱导细胞因子水平(数据未给出)。

[0268] 为了评价 TLR7 激动剂的缀合形式是否单独诱导巨噬细胞刺激, 因为与非-TLR7 巨噬细胞刺激相反, 用化合物 (4a)、(6)、(8)、(9) 和 SM 处理来源于野生型和 TLR7 缺陷小鼠 (TLR7-KO 或敲除小鼠) 的 BMDM。化合物 (4a)、(6)、(8)、(9) 和 SM 诱导很少的或不诱导 IL-12 和 IL-6, 而这些缀合物在野生型 BMDM 中有活性, 表明所述激动剂活性是由于这些缀合物的 TLR7 活性(见图 2C-D)。内毒素评价(图 2B, 及如上所述)进一步支持了所述结论, 即激动剂活性是由于这些缀合物的 TLR7 活性(例如, 在所生成的 IL-6 水平下没有显著的统计学差异)。

[0269] 为了进一步研究在人细胞中的免疫活性, 用 TLR7 缀合物处理来自三个供体的人 PBMC, 并且通过 Luminex 测定法确定 IL-6 和 IFN α 1 的水平(图 3A-B)。在该实验中使用缀合至 TLR7 的人血清白蛋白(HSA) (4b) 代替 MSA-缀合物(4a)。TLR7 缀合物效力的顺序与在鼠巨噬细胞中观察到的顺序相似 ((4b) > (6) > (9) > SM > (8)) (图 3A)。在来自所有供体的 PBMC 中观察到一致的化合物效力(compound potency) 趋势。与化合物(4a) 不同, 化合物 (4b) (例如, TLR7-HSA 缀合物) 在人 PBMC 中诱导最低水平 IFN α 1 (如在三个供体中观察的) (图 3B)。

[0270] 通过 TLR 缀合物进行的促炎性细胞因子诱导的体内动力学

[0271] 为了比较 TLR7 缀合物的体内免疫特性, 对 C57BL/5 小鼠静脉给予 TLR7 激动剂缀合物, 并且研究血清中的促炎性细胞因子的动力学(图 4A 和 4B)。基于之前的研究 (Wu, C. C et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:3990 (2007)), 化合物 (4a) 以比化合物 SM、(6)、(8) 和 (9) (200nmol/ 动物) 更低的浓度 (40nmol/ 动物) 使用。注射后 2 小时观察到所有 TLR7 缀合物的 TNF α 和 IL-6 的最大诱导(分别见图 4A-B)。通过未缀合的 TLR7 (SM) 诱导的细胞因子水平在两小时后迅速下降。通过化合物 (4a)、(6) 和 (9) 进行的细胞因子诱导维持最高达 6 小时。在注射后的任意点, 化合物 (8) 仅诱导低水平 IL-6 (见图 4B), 并且不显著诱导 TNF α (见图 4B)。来自接受盐水、MSA 或 DOPE 的对照小鼠的血清显示很少的或没

有可检测的细胞因子水平(数据未给出)。

[0272] 脂质-TLR7 缀合物促进快速和长效的体液应答

[0273] 通过测量疫苗诱导的抗原-特异性 IgG (尤其是 IgG1 和 IgG2) 的同种型和水平评定佐剂性效能 (Mosmann, T. R., 和 Coffman, R. L., ‘TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties’, Annual Review Immunology, 7:145 (1989))。用混合有 TLR7 缀合物的 OVA (卵白蛋白) 对 C57BL/6 小鼠 (n=5 只动物/组) 进行皮下免疫接种。将 ISS-ODN 用作有效的 Th1 佐剂阳性对照。将用盐水或 OVA 加赋形剂 (0.1%DMSO) 免疫接种的小鼠用作阴性对照。在第 0、7、14、21、28、42 和 56 天通过 ELISA 监测 OVA-特异性 IgG1 和 IgG2a 血清诱导动力学 (图 5A-B)。早在第 14 天在用混合有化合物 (4a) 或化合物 (6) 的 OVA 免疫接种的小鼠中观察到 IG 亚类抗体的诱导 (见图 5A)。在用 OVA/化合物 (6) 混合物免疫接种的小鼠中, 抗 OVA IgG2a 水平连续增加, 而在用 OVA/化合物 (4a) 混合物免疫接种的小鼠中, 所述水平随后下降, 如描述于图 5A。这些数据与通过用结合有化合物 (4a) 或 (6) 的 OVA 免疫接种的小鼠脾细胞的 OVA-特异性 IFN α 分泌增强相一致 (见图 5C)。

[0274] 不利效应的体内评价

[0275] TLR7 激动剂 (SM) 可在小鼠中诱导厌食效应和低体温 (Hayashi, T et al., “Mast cell dependent anorexia and hypothermia induced by mucosal activation of Toll like Receptor7”, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 295:R123 (2008)), 引起小鼠体重下降。因此, 作为实验方案的一部分, 监测用脂质-TLR7 激动剂缀合物免疫接种的小鼠的体重和皮肤反应 (注射位点)。在小鼠中诱导厌食反应的未缀合 TLR7 激动剂 (SM) 的最小剂量为 50nmol/小鼠, 其为粘膜给予 (Hayashi, T et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 295:R123 (2008))。选择用于佐剂实验的剂量 (10nmol/小鼠) 以避免由 TLR7 激动剂引起的疾病反应 (sickness reaction)。在用混合有化合物 (6) 的 OVA 免疫接种的小鼠和注射有盐水的小鼠的平均体重之间没有观察到显著性差异 (数据未给出)。

[0276] 长期给予 TLR7 还可诱导髓系细胞增殖 (Baenziger, S et al., “Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology”, Blood, 113:377 (2009))。将脾细胞总数计算为脾髓系细胞增殖的指标 (见图 6A)。在用 OVA、TLR7 激动剂缀合物和盐水对照进行免疫接种的小鼠之间, 脾细胞总数没有显著性差异 (见图 6B)。来自用混合有 TLR7 激动剂的 OVA 免疫接种的小鼠的脾的组织学检查显示没有骨髓 (生发中心) 结构性破裂以及红髓中细胞构成没有增加 (见图 6B)。此外, 在对从每个组收集的肝、肺、心和肾样本的组织学检查中没有观察到显著性差异 (数据未给出)。在脂质-TLR7 缀合物的注射位点或其附近也没有肉眼可见的发红或青光眼反应 (glaucomatous reaction) (见图 6C)。

[0277] 结论

[0278] 未缀合的 TLR7 (SM) 在水溶液中不溶。水溶性在通过增加药物扩散或促进吸收至细胞来控制药物利用度中起重要作用。PEG 化 (PEGylation) 可改善药物溶解度并且降低免疫原性 (Veronese, F. M., 和 Mero, A., “The impact of PEGylation on biological therapies”, BioDrugs, 22:315 (2008))。PEG 化还可增加药物稳定性, 延长所述缀合物在血液中的保留时间并且可以减少蛋白水解和肾脏排泄 (Veronese, F. M., and

Mero, A, *BioDrugs*, 22:315 (2008))。当 TLR7 与 PEG 缀合(例如,化合物 (8))时,溶解度显著提高(数据未给出)。但是,与未改性的 TLR7 激动剂相比,体外(图 2A,图 A 和 B)和体内(图 4A 和 4B)的细胞因子诱导效力减弱。通过进一步缀合至 DOPE (化合物 (9))可恢复体外和体内二者的活性。化合物 (9) 可诱导 Th2 免疫应答(通过 IgG1 水平表明),同时表现出极低 Th1 应答(通过 IgG2a 水平表明)。

[0279] TLR7 激动剂缀合物化合物 (4a) (MSA 缀合物)和 (6) (脂质缀合物)促进了 IgG2a 效价的快速提高(图 5A)。用 MSA-TLR7 缀合物(化合物 (4a))免疫接种的小鼠中的 IgG2a 水平在最后一次免疫接种后三周下降,而用混合有脂质 TLR7 缀合物(化合物 (6))的 OVA 免疫接种的小鼠显示持续并进一步增强的抗原 - 特异性 IgG2a 水平(图 5A)。虽然化合物 (4a) 不能维持 IgG2a 水平,但是在用混合有化合物 (4a) 的 OVA 免疫接种的小鼠中由脾细胞分泌的 OVA- 特异性 IFN- γ 维持了相对高的水平(图 5C)。缀合至给出不同免疫性质的不同部分的相同 TLR7 激动剂,可用于设计佐剂以治疗不同病种,例如感染和自身免疫疾病。

[0280] 合成了多种 TLR7 激动剂缀合物并且发现它们均具有不同的体内和体外免疫性质。所报道的 TLR7 激动剂缀合物的物理性质的多样性可以使得其广泛的应用于治疗不同疾病。水溶性缀合物可提供一种全身给药的途径。含脂质的缀合物可适用于需要持续刺激邻近免疫细胞的局部给药(例如,用于感染性疾病的佐剂的施用)。脂质部分可以帮助药物渗透通过膀胱上皮或皮肤,因此可以有利于治疗膀胱疾病或皮肤疾病。TLR7 激动剂与脂质或 PEG 部分的缀合是一种前景广阔的策略,用于扩展感染、癌症或自身免疫性疾病的临床治疗。

[0281] 先天性免疫系统的细胞上 Toll 样受体 (TLR) 的活化引发、放大并指导抗原 - 特异性获得性的免疫应答。因此,刺激 TLR 的配体代表了潜在的免疫佐剂。每个具有经由多功能苯甲酸官能团与聚乙二醇 (PEG)、脂质或脂质 - PEG 缀合的有效 TLR7 激动剂的缀合物,可表现出不同的体外和体内免疫性质。例如,在小鼠巨噬细胞和人外周血单核细胞中,所述脂质 - TLR7 缀合物与游离的 TLR7 配体相比效力强至少 100 倍。与未改性的 TLR7 激活剂相比,所述脂质和脂质 - PEG TLR7 缀合物当在体内全身给予时在血清中提供持续的免疫刺激细胞因子水平。这些数据显示 TLR7 配体的免疫刺激活性可通过缀合而放大和聚集,因此潜在地扩大了这些试剂的潜在治疗应用。

[0282] 实施例 III

[0283] 通过 1V270 诱导膀胱炎症

[0284] 以两天的间隔,用 150 纳摩尔 1V270 或仅用赋形剂对 C57BL/6 小鼠或半胱天冬酶 (caspase) 1 缺陷小鼠进行膀胱内处理三次。第一次处理后 24 小时处死一组小鼠(图 7)。第三次处理后 24 小时处死另一组小鼠。初次处理后,观察到单核细胞浸润并在第三次处理后所述浸润增强。在半胱天冬酶 1 缺陷小鼠中没有检测到这一炎症。

[0285] 通过皮肤施用 1V270 进行的细胞因子全身诱导

[0286] 制备 5%1V270 的阿夸弗尔 (Aquaphor) 溶液,并且与购自 UCSD 穆尔斯癌症中心 (UCSD Moores Cancer Center) 药房的 5%咪喹莫特 (Aldara) 乳膏比较药效学。研究前一天,将 6 至 8 周大的雌性 C57BL/6 小鼠剃去侧腹毛。将所述软膏 / 乳膏施用在 1 平方英寸的面积上。施用后 2、4、6、24 和 48 小时收集血清。5%1V270 全身性诱导与咪喹莫特乳膏 (5%) 的诱导水平相当的 IL-6 和 TNF α 水平(图 8)。

[0287] 肺部(粘膜)施用 1V270 以预防炭疽感染

[0288] 通过肺部给予 1V270 诱导局部炎症。为研究磷脂缀合的 TLR7 引发局部炎症的能力,对 6 至 8 周大的雌性 A/J 小鼠鼻内给予在溶于 PBS 中的 5%DMSO 中的 1V270(0.5、1、2 或 4 nmol/动物)。给药二小时后处死小鼠并且收集血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)。通过 Luminex beads assay 测定 IL-6、IL-12 和 TNF α 水平。在所述 BALF 中,2-4 nmol 1V270 诱导局部促炎性细胞因子(图 9)。这些细胞因子的水平高于在血清中的细胞因子水平。

[0289] 1V270 诱导的炎症是持久的。还研究了通过 1V270 引发的炎症是否比非缀合的 TLR7 激动剂更持久。A/J 小鼠鼻内接受 10 nmol/只动物 1V270 并且在给药后 24、48 和 72 小时收集 BALF。1V270 可诱导 IL-12 和 TNF α 最高达 48 小时(图 10)。

[0290] 1V270 用于预防炭疽感染的疫苗应用。当与抗原、卵白蛋白一起给予时,1V270 是有效力的佐剂。为评价 1V270 抗炭疽感染的佐剂效力,对小鼠给予混合有 1V270 的经辐照的炭疽芽孢(IRS)(Wu et al., PNAS, 104:3990 (2007))。为了优化接种方案,进行两个实验:短期实验(图 11)和长期实验(图 12)。

[0291] 在短期实验中(图 11),A/J 小鼠用 IRS 和 0.5、1 或 2 nmol 1V270 处理,并且在接种后 6 天后用炭疽 Sterne 菌株芽孢激发。对照组小鼠接受 IRS 或 1V270 (4 nmol/动物)。用 1 nmol 混合有 IRS 的 1V270 处理的小鼠在第 15 天有半数以上存活,但是用 0.5 nmol 或 2 nmol 处理的小鼠并非如此。因此,在随后的长期实验中使用 1 nmol/动物。

[0292] 在长期实验中(图 12),以两周的间隔,用混合有 IRS 的 1V270 对小鼠鼻内处理三次。因为霍乱毒素(Cholera toxin)是已知的有效粘膜佐剂,因此使用其作为阳性对照。用 1V270、IRS 或赋形剂(PBS)处理对照小鼠。在最后一次接种四周后用炭疽芽孢鼻内激发所有小鼠。在第 30 天,在用混合有 1V270 的 IRS 接种的小鼠中观察到 100% 存活,其与接受 CT 作为佐剂的小鼠相比稍微更加有效。

[0293] 实施例 IV

[0294] 1V270 的纳米颗粒制剂

[0295] Phosal50PG 制剂。将 1V270 溶于 Phosal50PG(Phospholipid Gmbn, 科隆, 德国)制成 20x 浓缩溶液。所述 Phosal50PG-1V270 混合物用超纯水(nanopure water)进一步稀释(1:19)制成 5%Phosal50PG: 水悬液。将所述悬液剧烈涡旋并在超声浴中超声 10 分钟。所述悬液进一步用探针超声仪(Branson 超声细胞破碎仪 185)以 30% 功率且以 10 秒的间隔共超声 30 秒,之间间歇 10 秒以防悬液过热。最后,将所述悬液使用注射器挤出器通过 100nm 过滤器,总共来回 10 次。使用马尔文纳米粒度仪(Malvern Zetasizer)分析最终纳米颗粒以检验尺寸分布。所得颗粒可称为纳米脂质体(亚微米双层脂质囊泡)(参见 Mozafari in: *Liposomes, Methods in Molecular Biology*, vol. 605, V. Weissing(ed.), Humana Press, 第二章;其公开内容以引用的方式纳入本文中)。纳米脂质体提供更大的表面积并且可以增加溶解度、生物利用度和靶向性。

[0296] 将 UV-1V270 颗粒在 PBS 中稀释至 50 μ M (A)或 100 μ M (B)并且随时间的推移测量颗粒尺寸。如图 14 所示,所述纳米颗粒基本上随时间的推移而保持稳定。在 100 μ M(约为溶解度的上限)下观察到一些聚集体。所述 UV-1V270 在 PBS 中的颗粒尺寸相对恒定,平均为约 110nm,

[0297] 不考虑浓度。

[0298] 实施例 V

[0299] 对四只 A/J 小鼠鼻内给予 UC-1V270 (纳米颗粒)、非缀合的 TLR7 激动剂 (UC-1V209)、单独的磷脂或溶剂对照 (PBS 或低于 5%DMSO)。24 小时后收集 BALF 和血浆,并且通过 multiplex luminex assay 确定细胞因子水平。UC-1V270 促进局部细胞因子释放,具有最小的全身副反应(图 15)。

[0300] 为了确定 UC-1V270 作为炭疽疫苗佐剂的功效,以两周的间隔,对每组 8 只雌性 A/J 小鼠鼻腔给予单独的 PBS、单独的 IRS、单独的 UC-1V270 (纳米颗粒;1nmol/小鼠)、IRS+UC-1V270 或 IRS+CT (霍乱毒素;1 μ g/小鼠)三次,并且在最后一次免疫接种后四周进行激发(图 16A)。然后生存 30 天(图 16B)。将来自感染后第 30 天处死的小鼠的脾收集并称重(图 16C)。

[0301] 为了确定来自接种后幸免于感染的小鼠的存活小鼠脾细胞(4000,000/孔)的芽孢-特异性 T_H17 和 T_H1 应答,以三个重复样用 IRS (10⁶/孔)培养 5 天,并且将未接种的未感染的小鼠的脾细胞用作对照。测定 IL-12、IL-17、TNF- α 和 IFN- γ 应答(图 17)。

[0302] 为检测 IFN- γ 和 IL-17 对生存是否重要,从活性炭疽芽孢激发前一天开始对雌性 A/J 小鼠每日两次鼻内给予 IRS+UC-1V270 (1nmol/小鼠)和抗 IL-17 抗体和抗 IFN- γ 抗体。IFN- γ 和 IL-17 的消耗使已免疫接种的小鼠易受感染(图 18)。

[0303] 总而言之,用 UC-1V270 和灭活性炭疽芽孢进行的粘膜免疫接种完全保护小鼠免受肺部炭疽感染。粘膜免疫诱导了芽孢-特异性 Th1 和 Th17 细胞免疫应答,并且发现需要干扰素- γ 和白介素-17 用于对抗感染。

[0304] Phosal 配制的 1V270 作为单一试剂诱导局部细胞因子,除了 IFN-g 外检测到极少量的全身性细胞因子诱导(图 19)。当与经辐照的芽孢(IRS)一起用作佐剂时,所有 3 个剂量均可保护动物(图 20)。与使用在 DMSO 中的 1V270 (其中 1nmol 剂量显示出功效)相比,使用更低剂量的 Phosal 配制的 1V270 提供了显著的保护。

[0305] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利文件以引用的方式纳入本文中,如同逐一地通过引用而纳入一样。在任何不一致的情况中,将以本发明的公开内容为准,包括其中的任何定义。已参照多种具体的和优选的实施方案和技术已对本发明进行了描述。但是,应理解可作出多种变化方案和改进方案而依然在本发明的主旨和范围内。

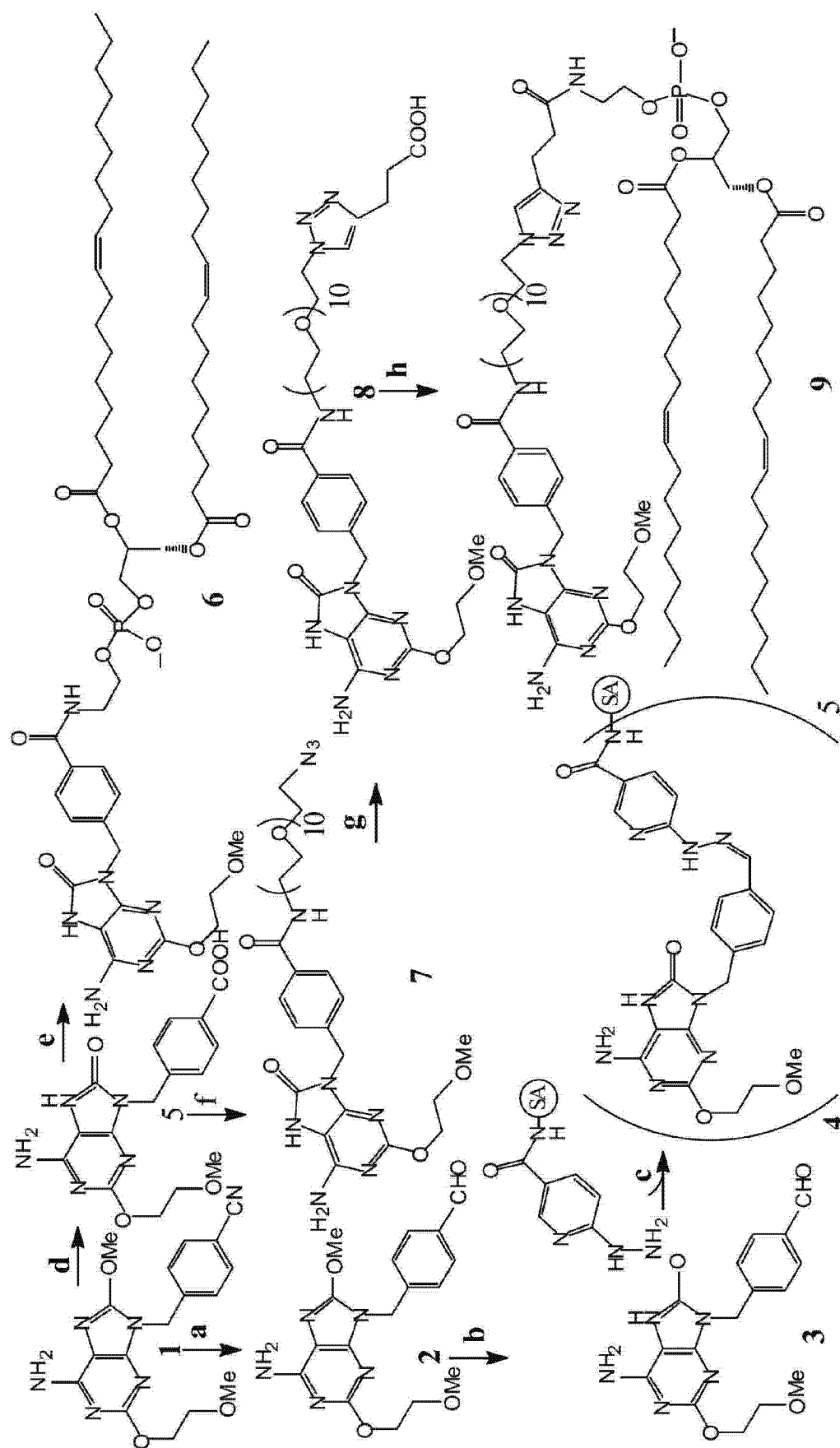


图 1

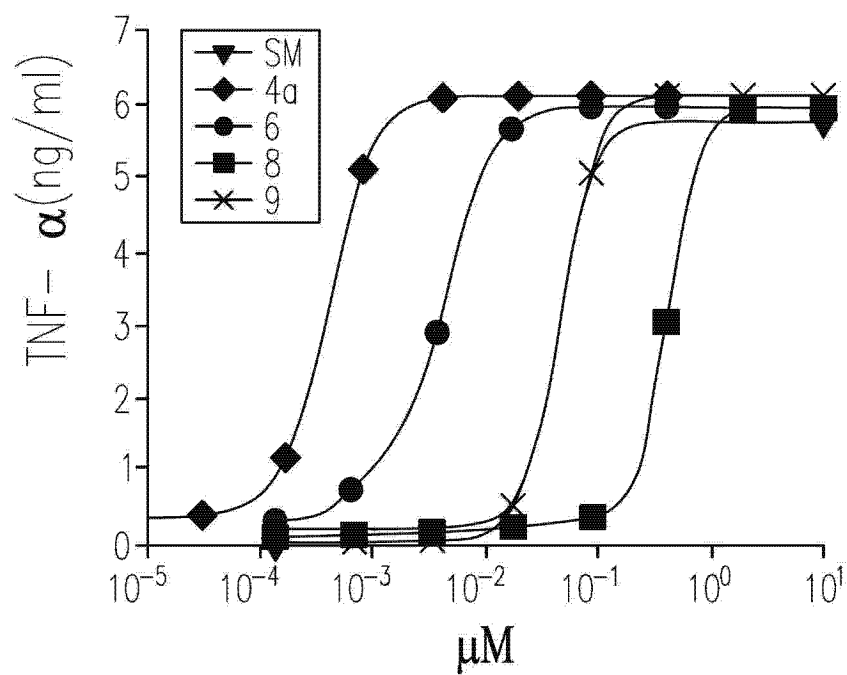


图 2A

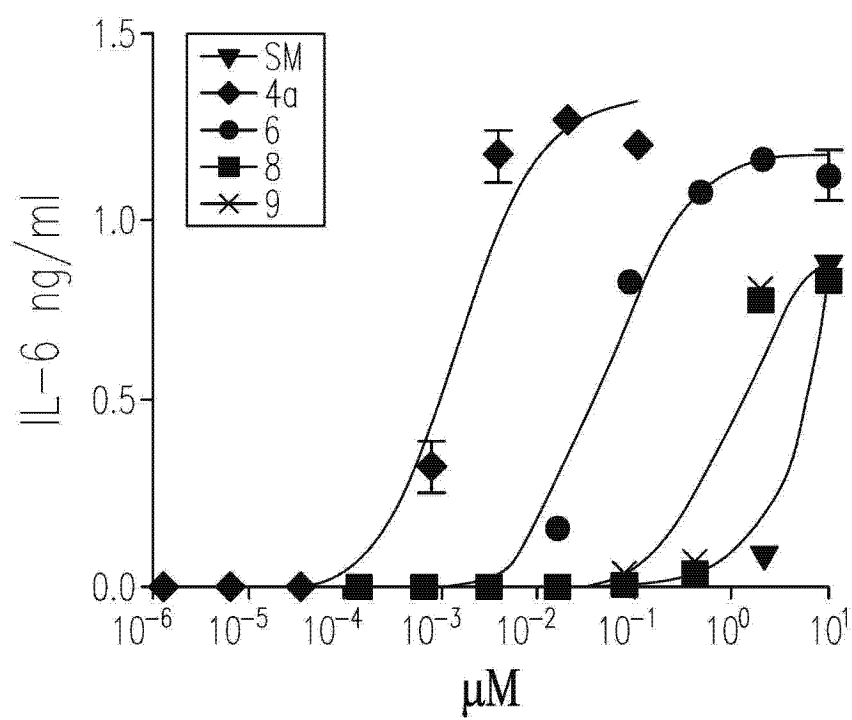


图 2B

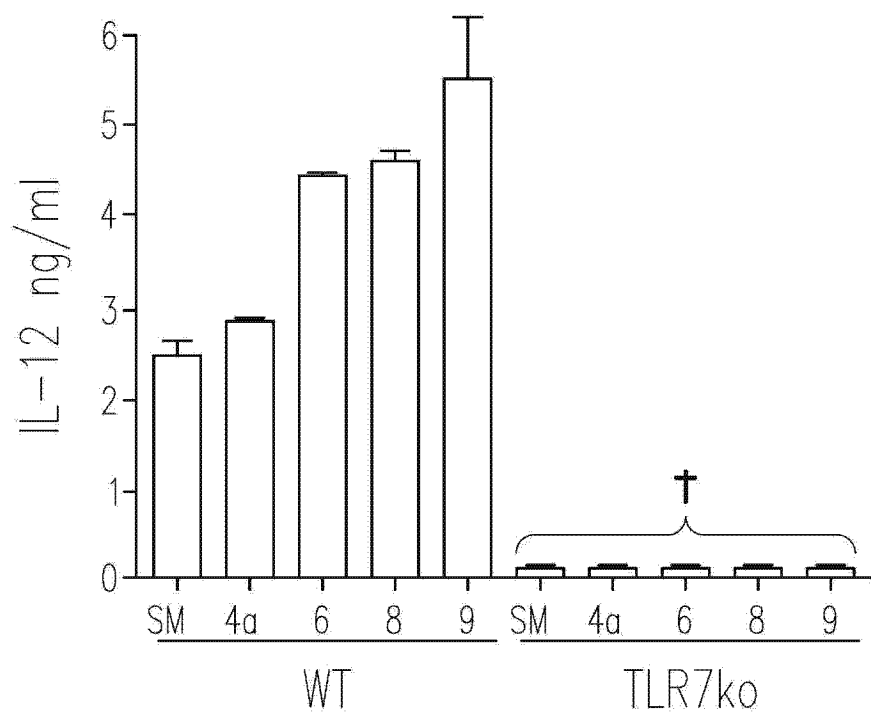


图 2C

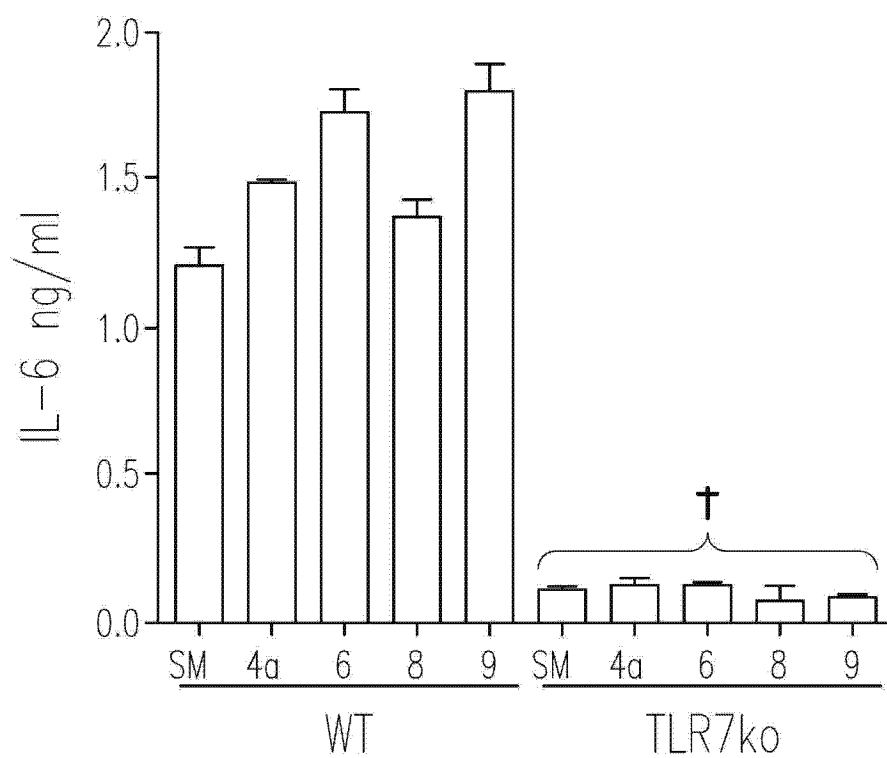


图 2D

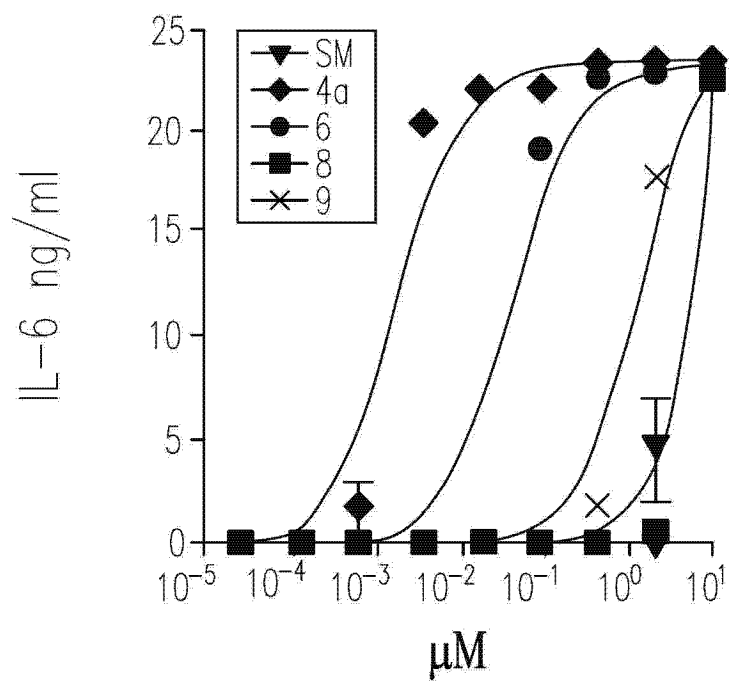


图 3A

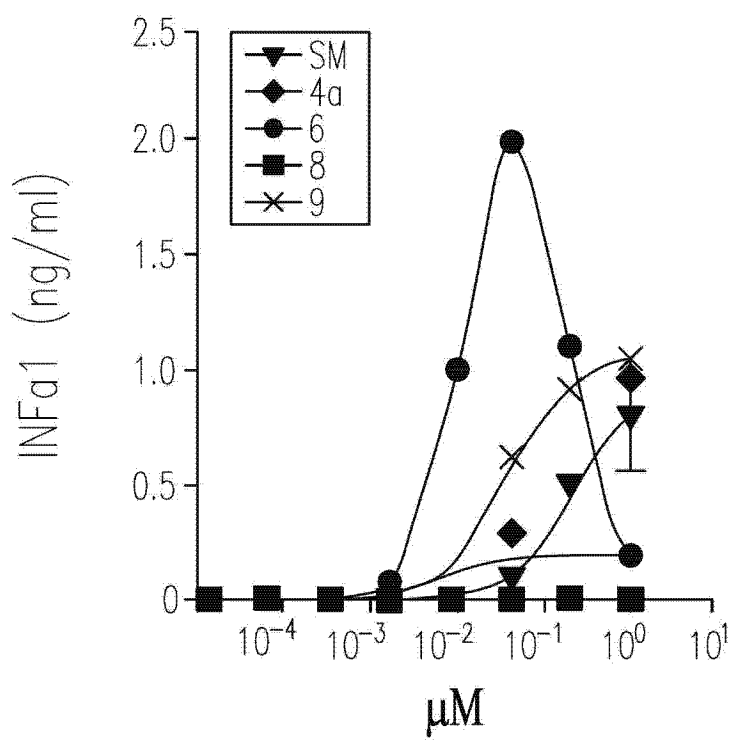


图 3B

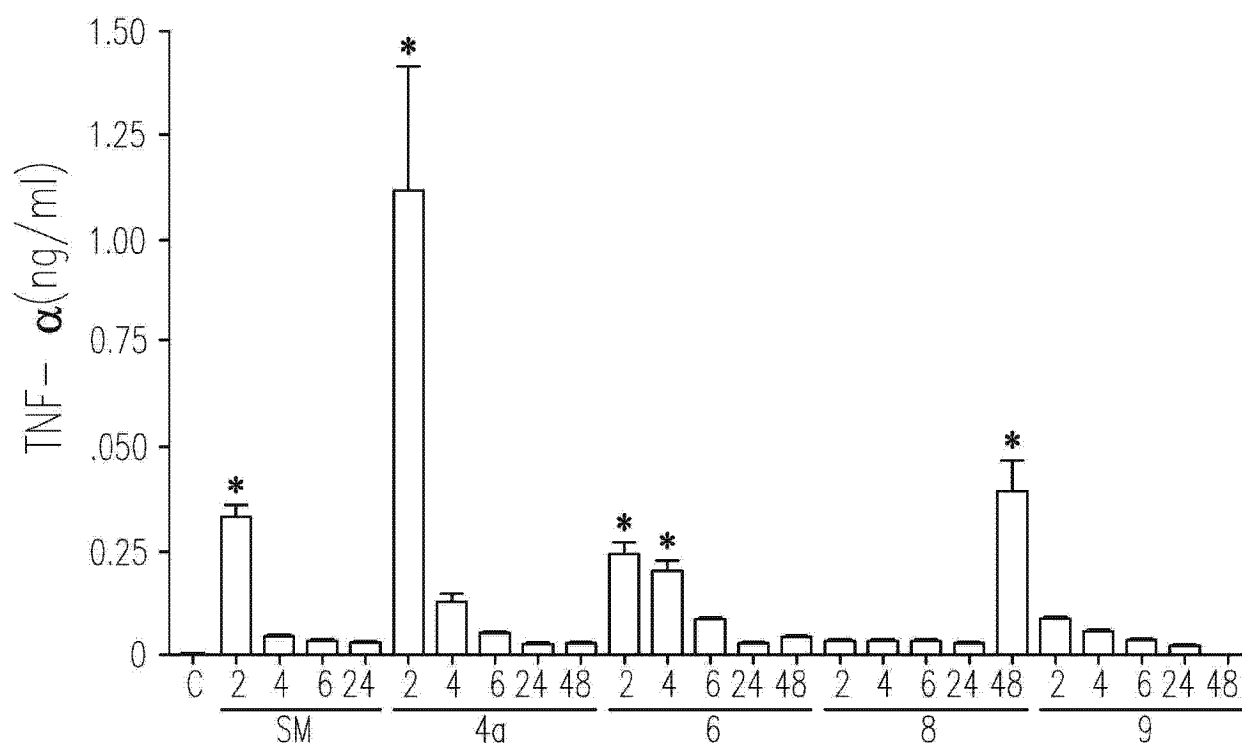


图 4A

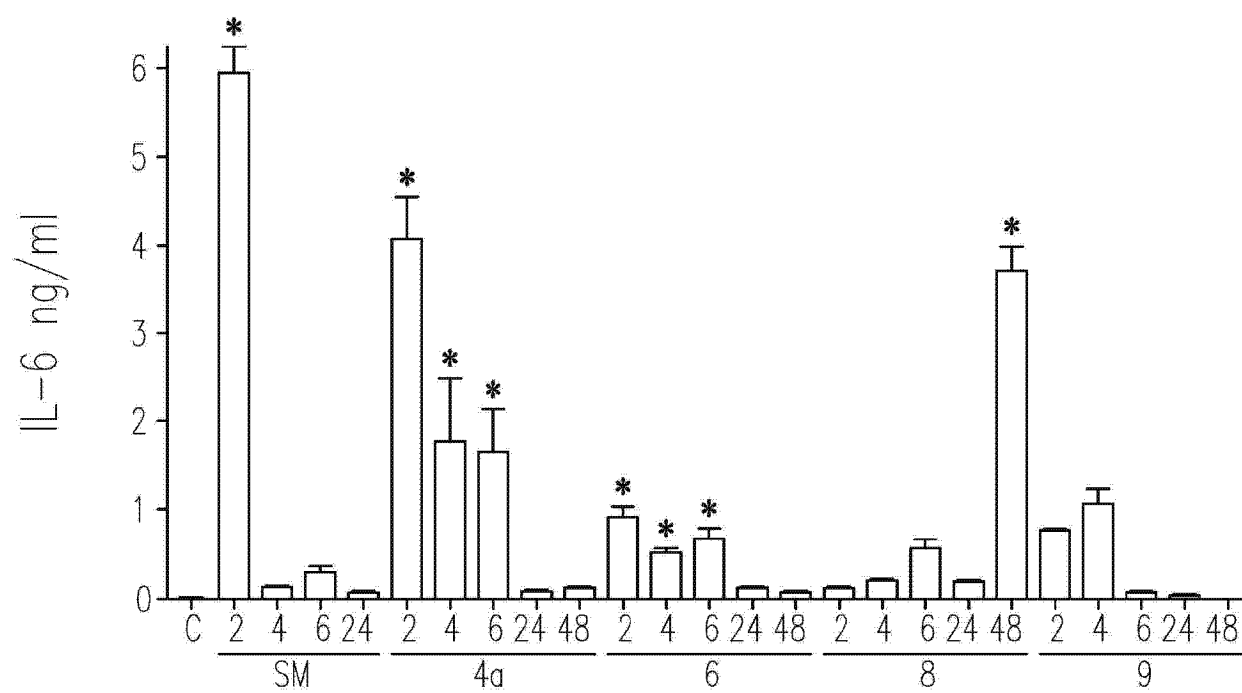


图 4B

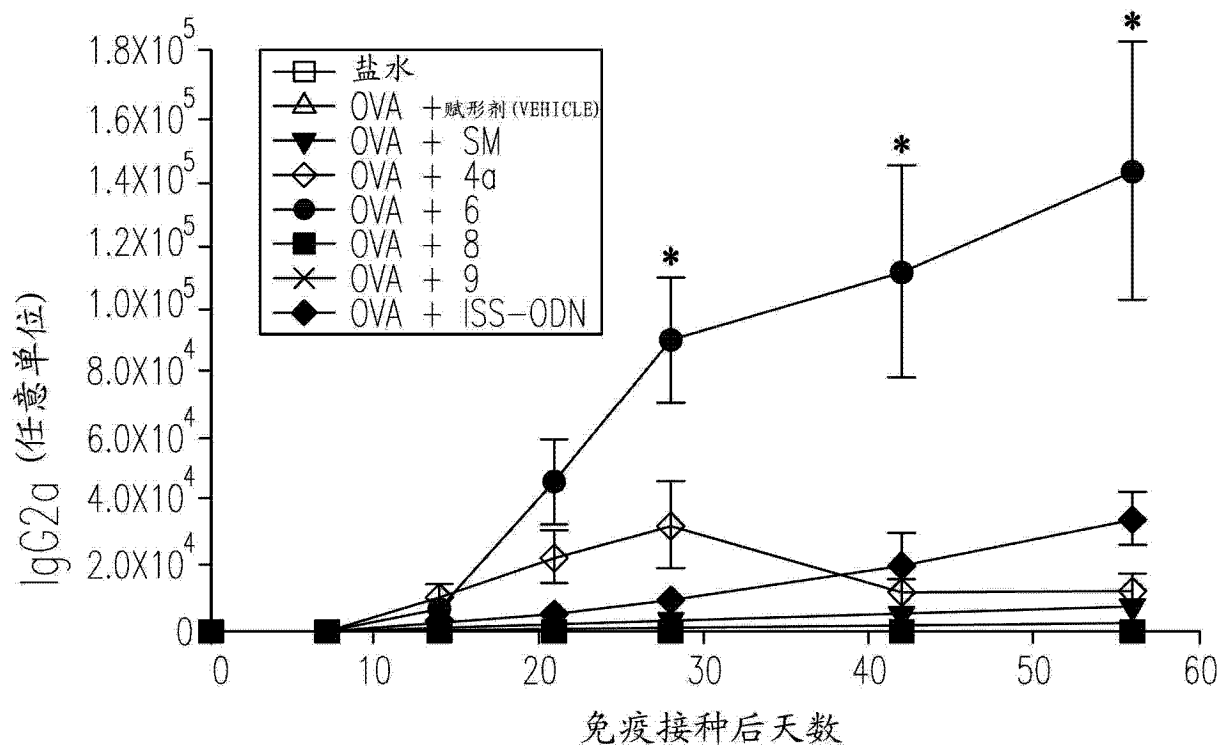


图 5A

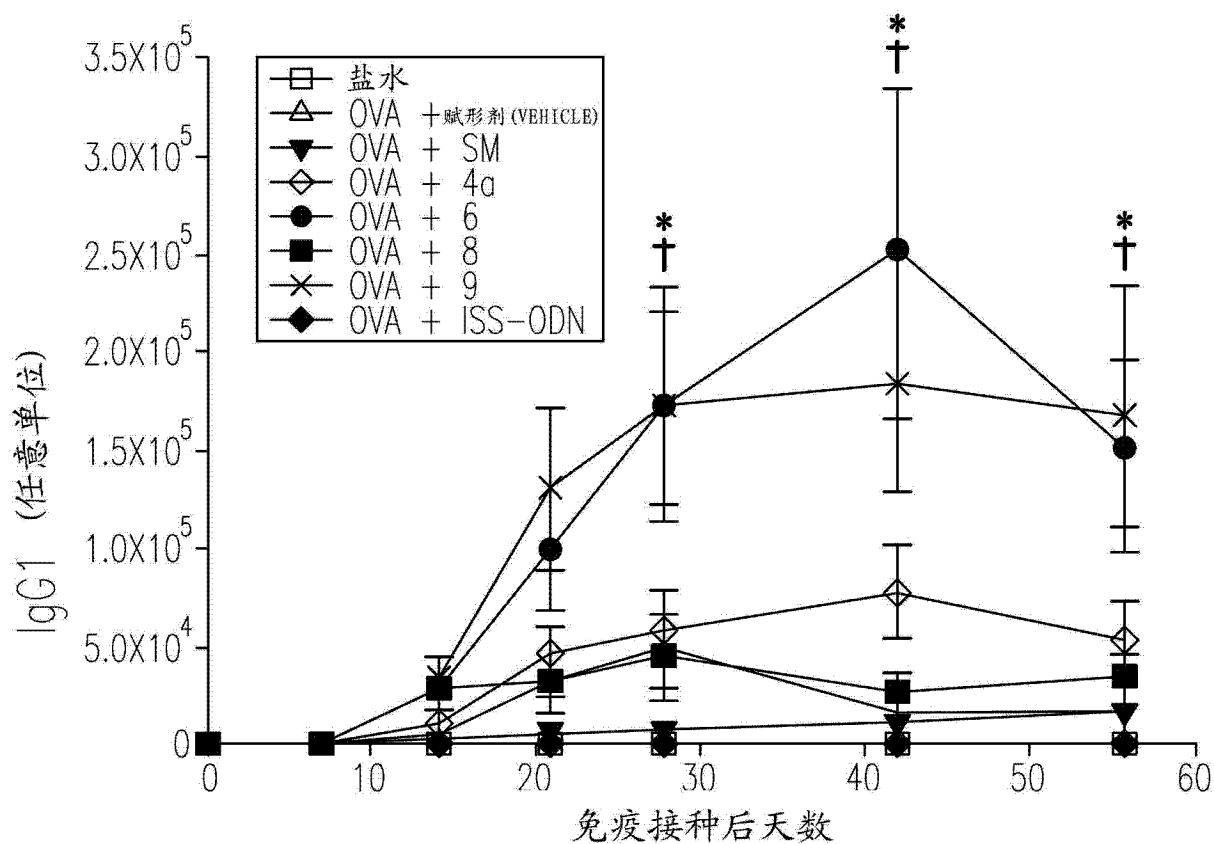


图 5B

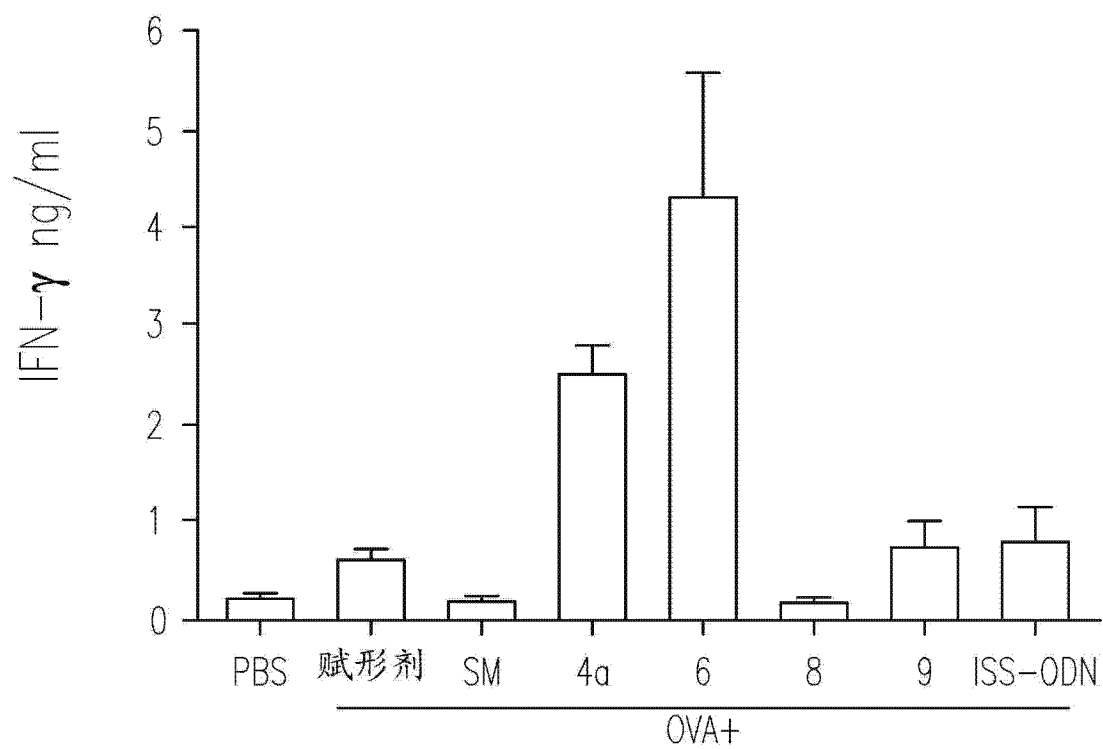


图 5C

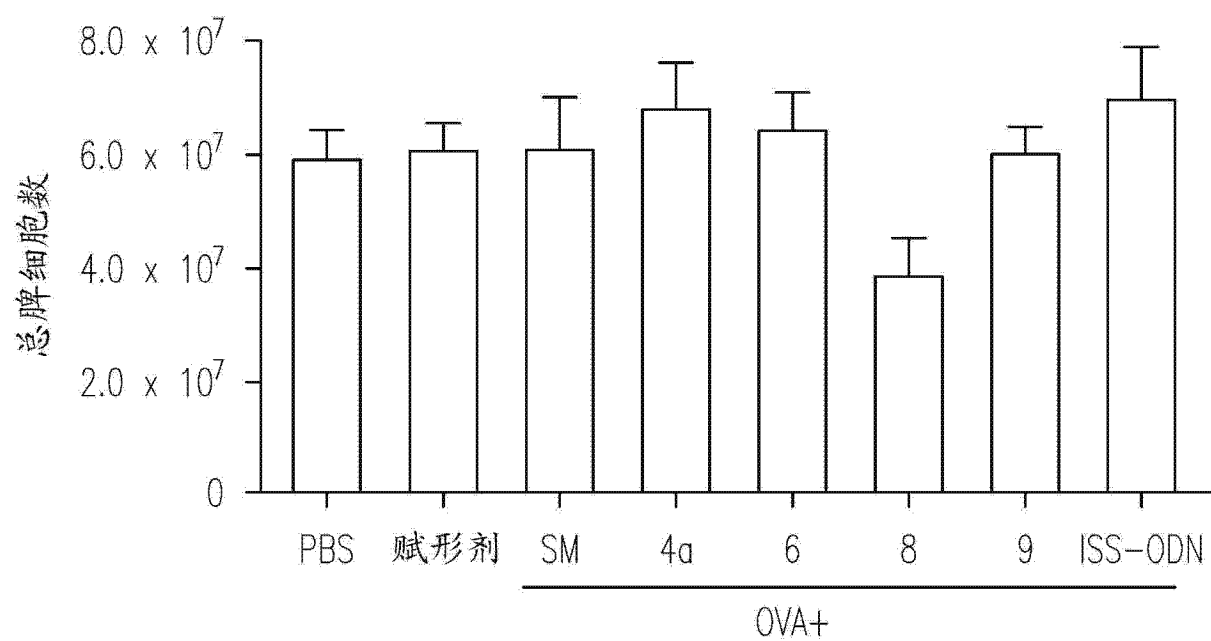
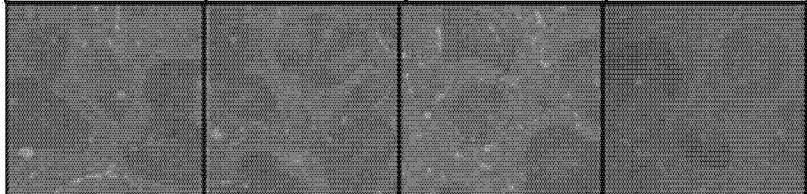


图 6A

PBS	OVA +		
	赋形剂	SM	4a
			

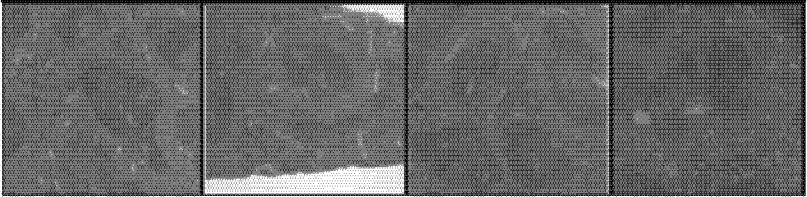
6	8	9	ISS-ODN
			

图 6B

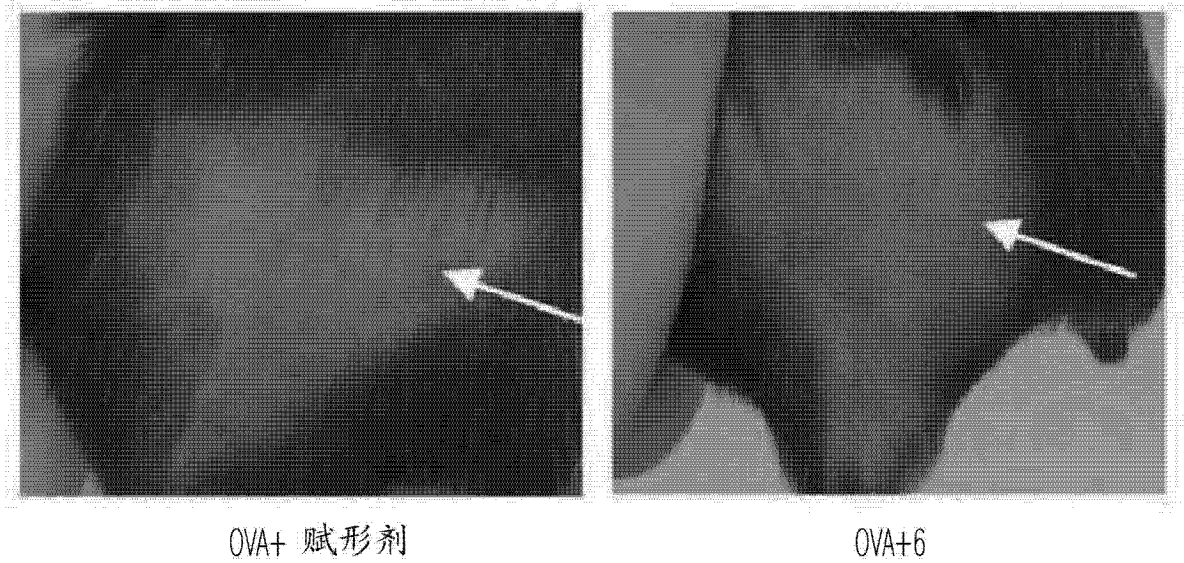


图 6C

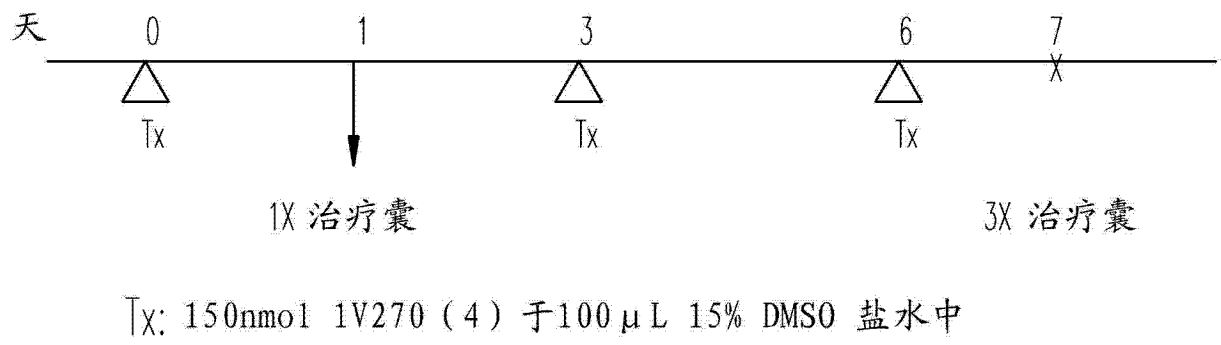


图 7A

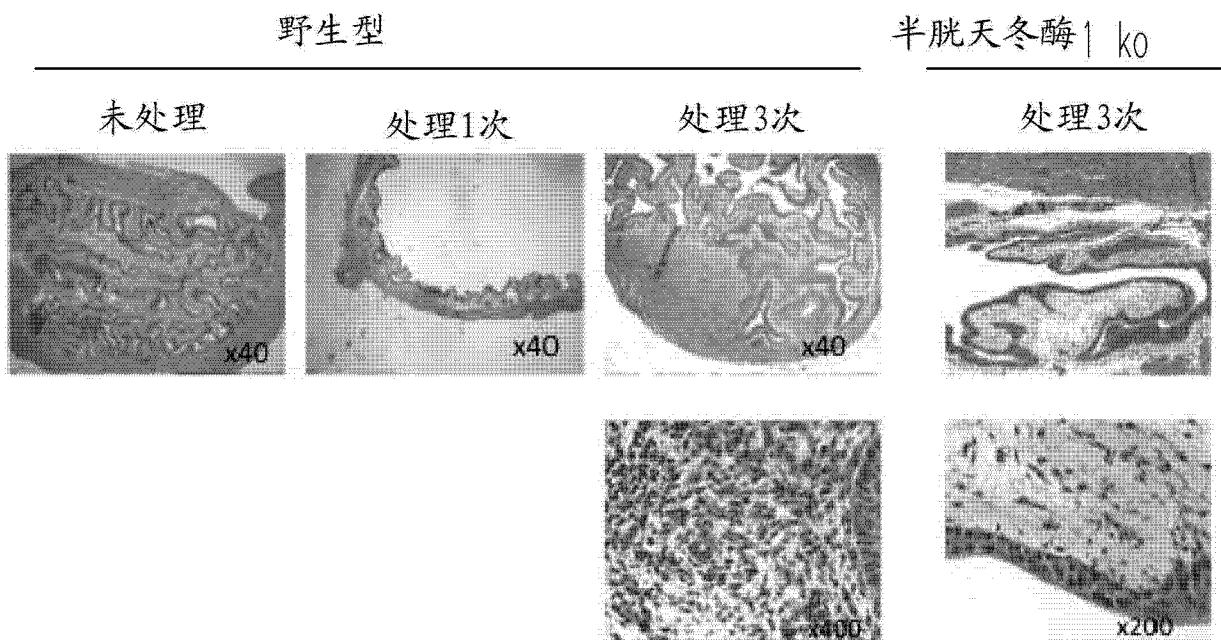


图 7B

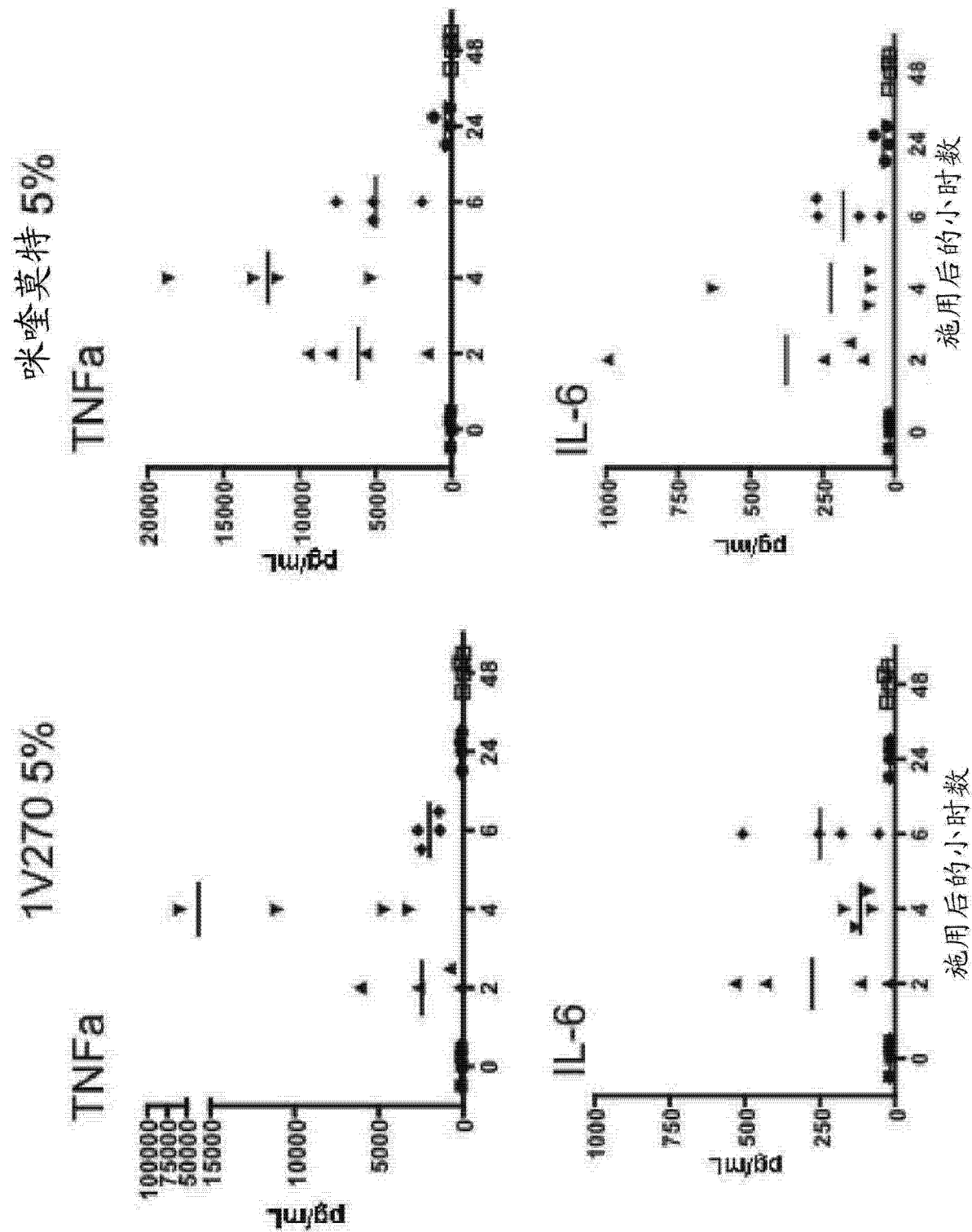


图 8

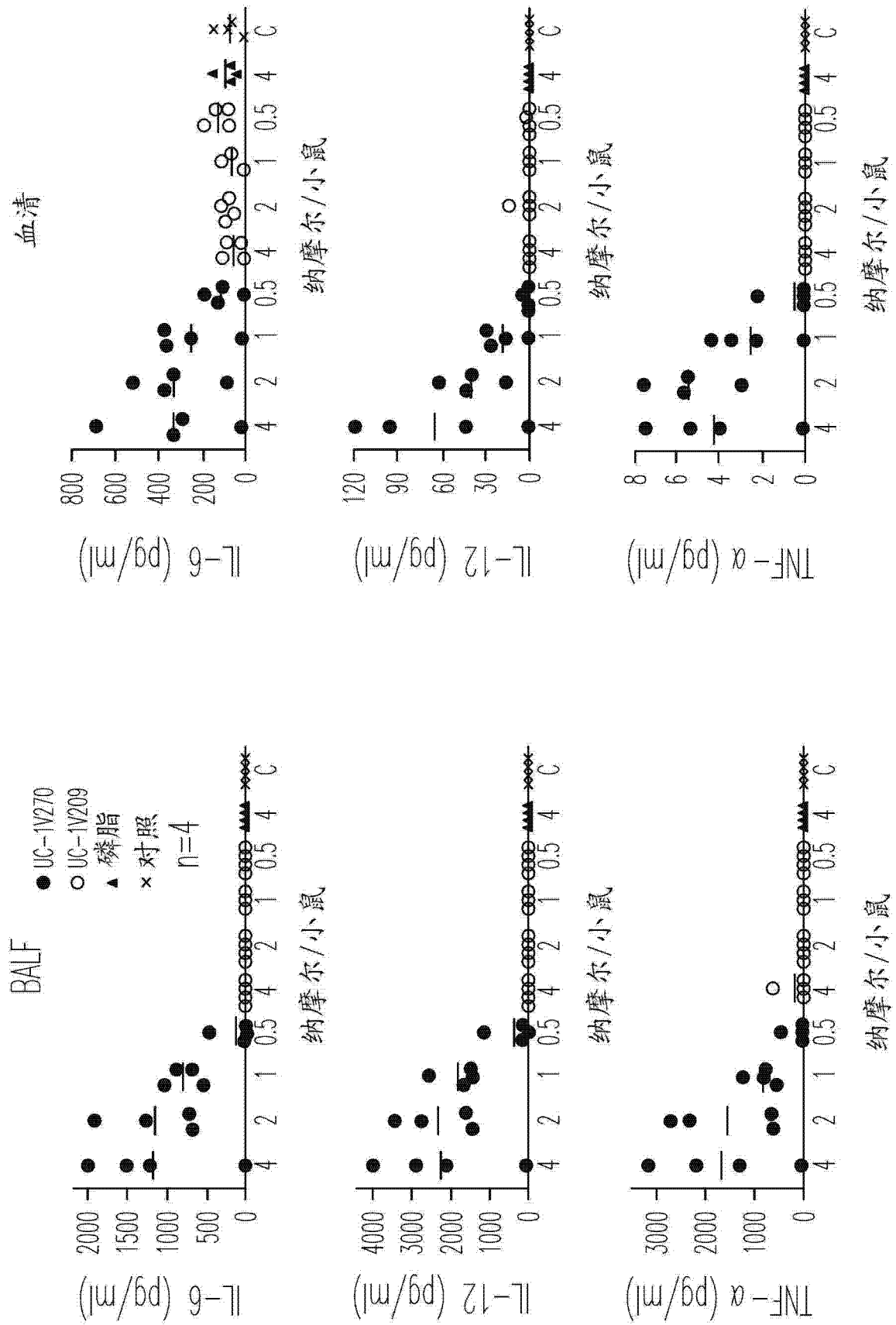
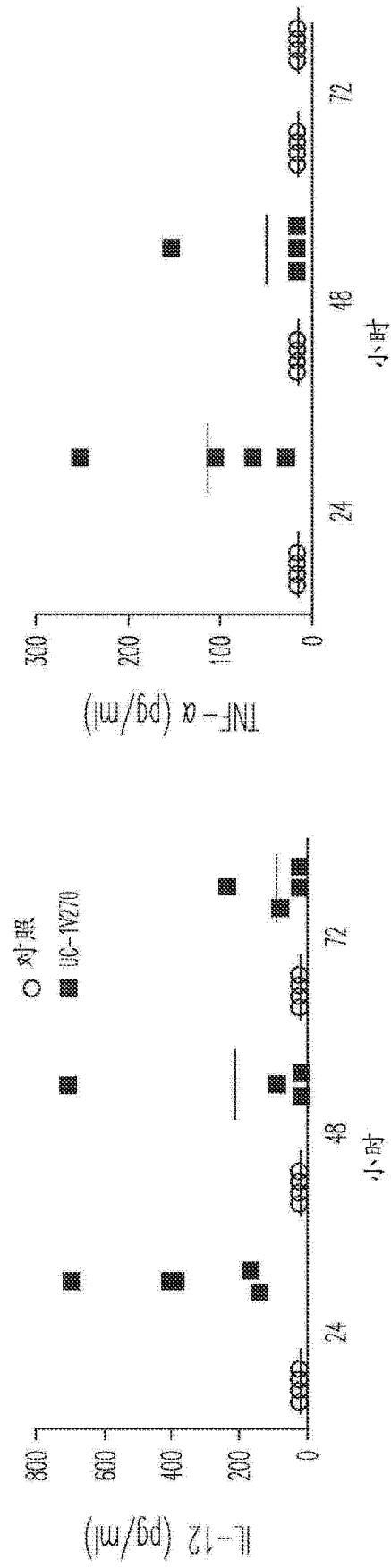


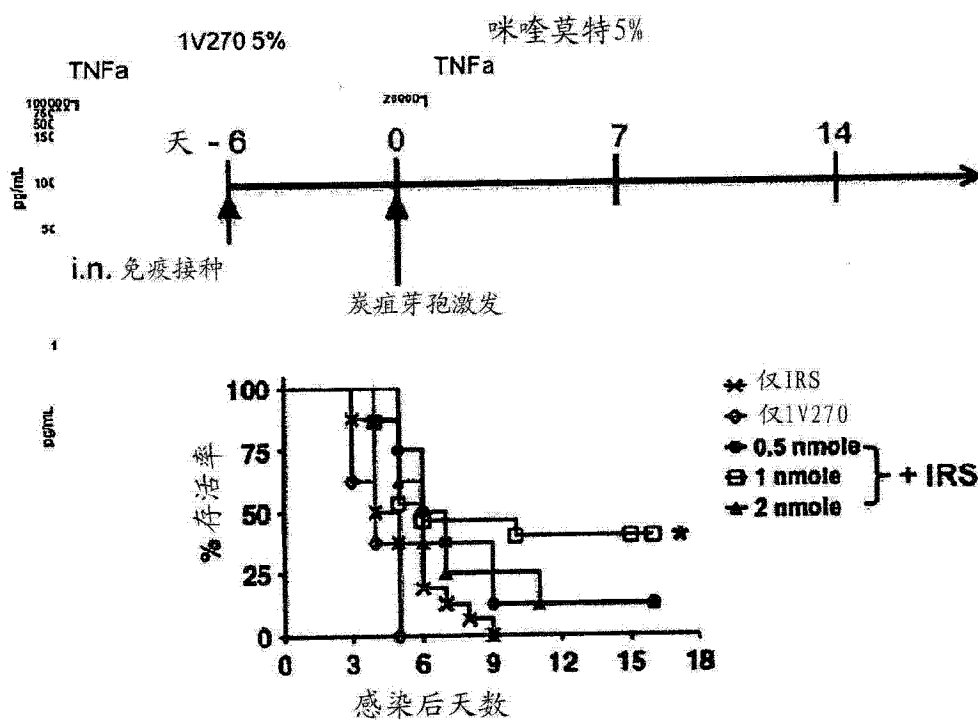
图 9



磷脂缀合的TLR7激动剂的持续局部免疫活化。

n=4/组

图 10.



磷脂缀合的TLR7激动剂的佐剂效果——单次免疫接种。
N=5-7/组

图 11.

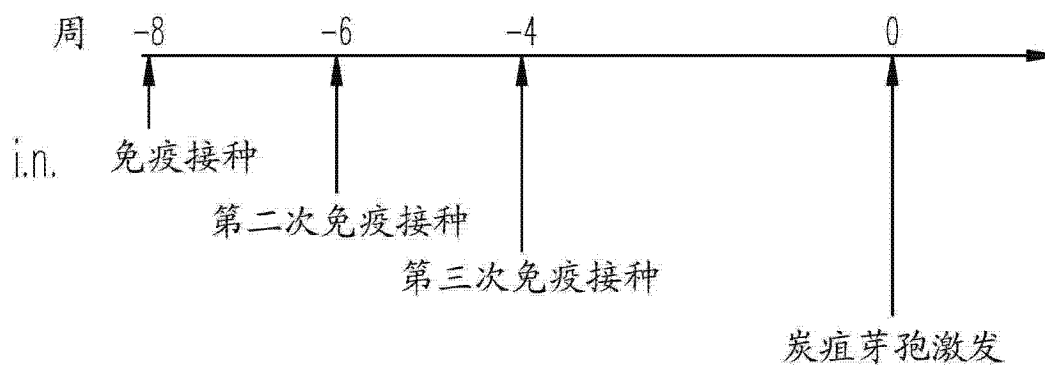
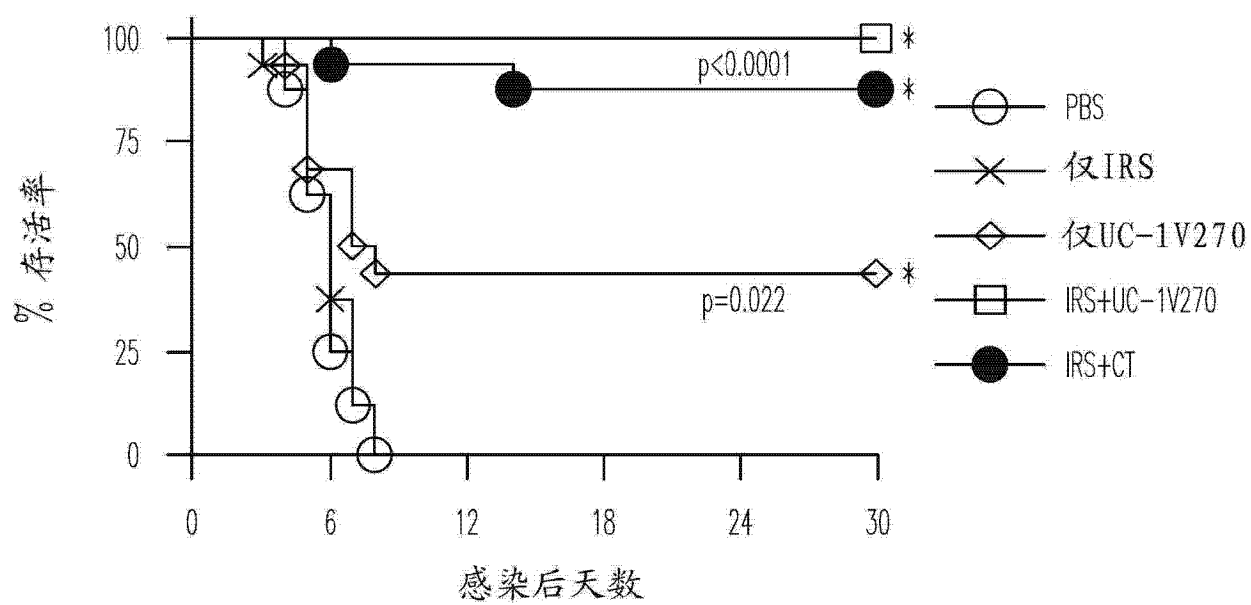


图 12A



磷脂缀合的TLR7激动剂对炭疽感染的佐剂效果（多次免疫）

图 12B

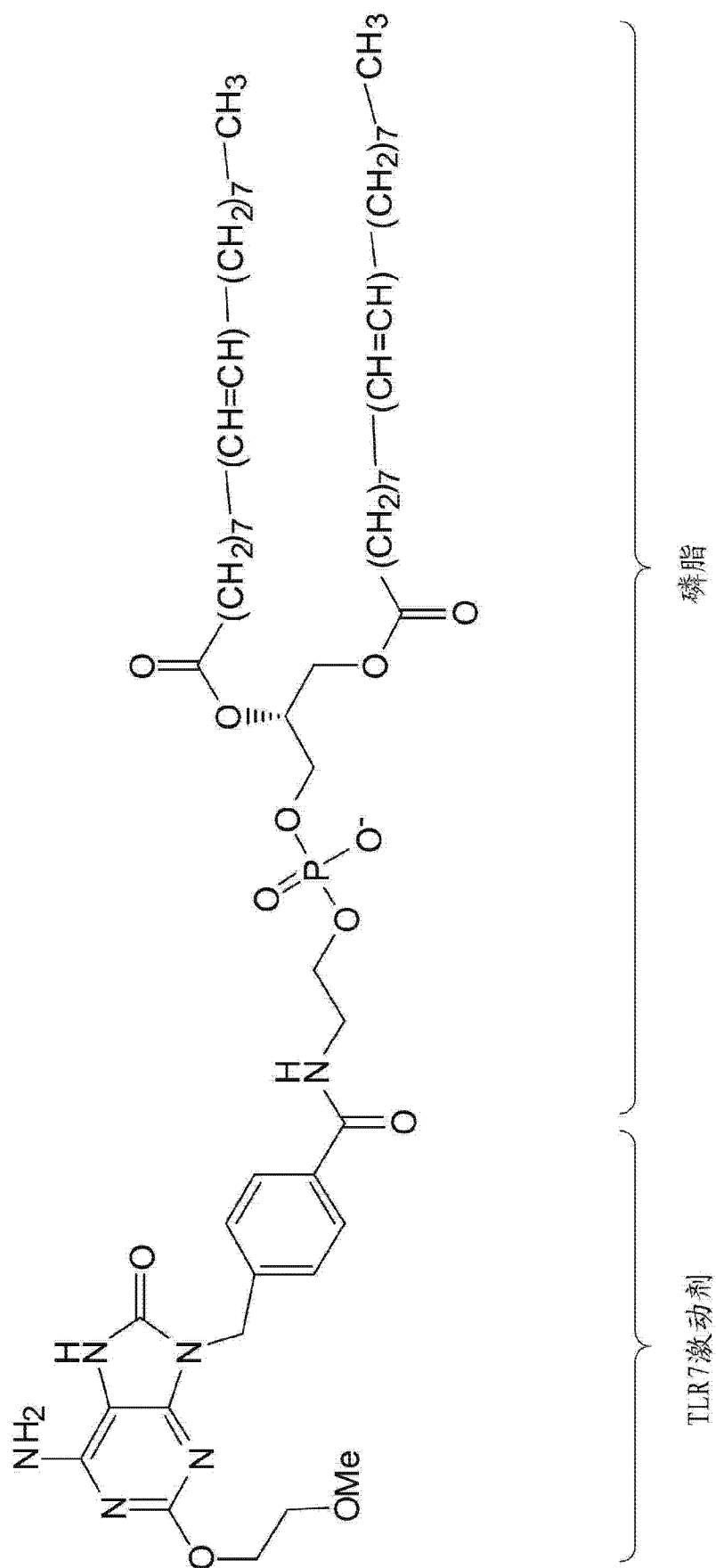


图 13

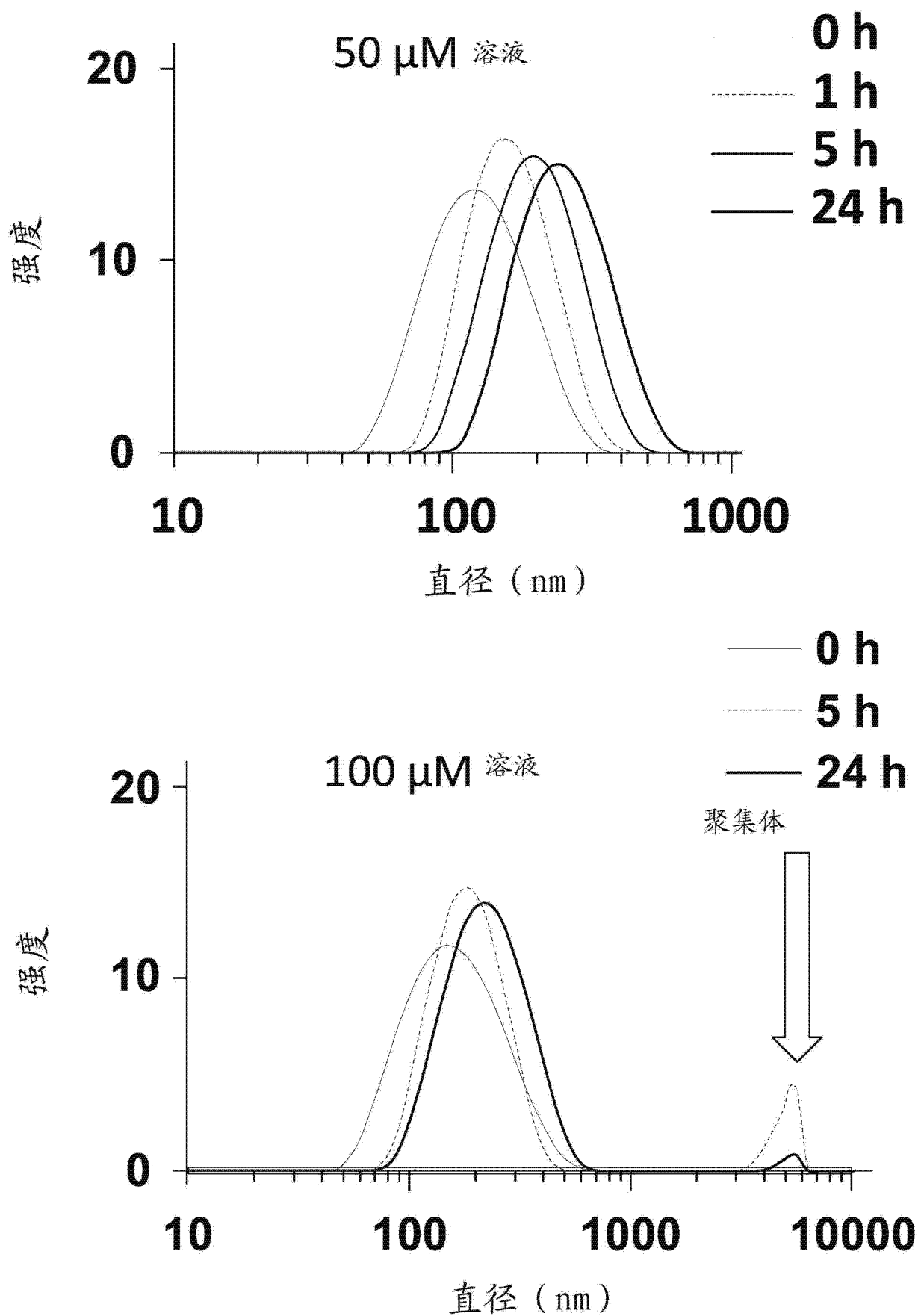


图 14

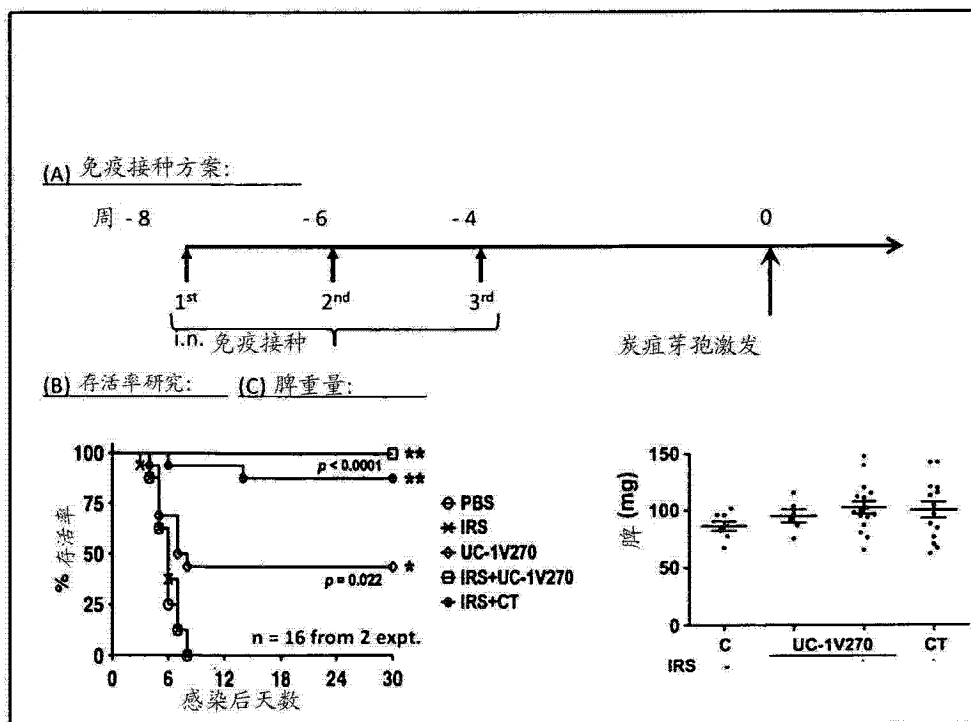


图 16- 用 UC-1V270 作为炭疽疫苗佐剂的完全长期保护

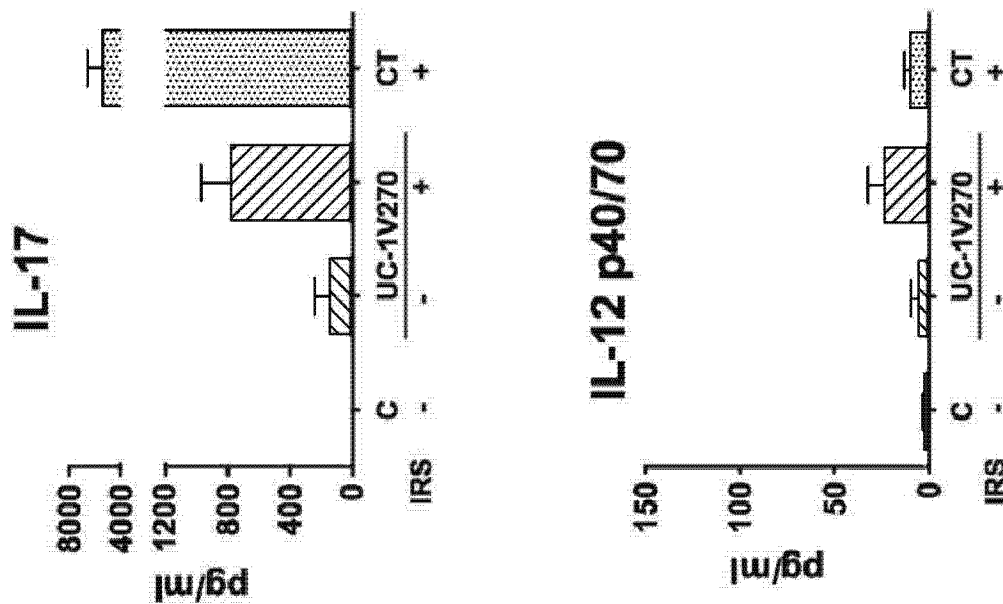


图 17A

图 17B

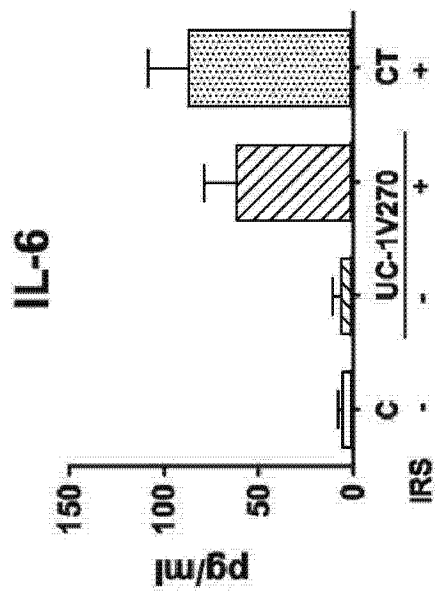


图 17C

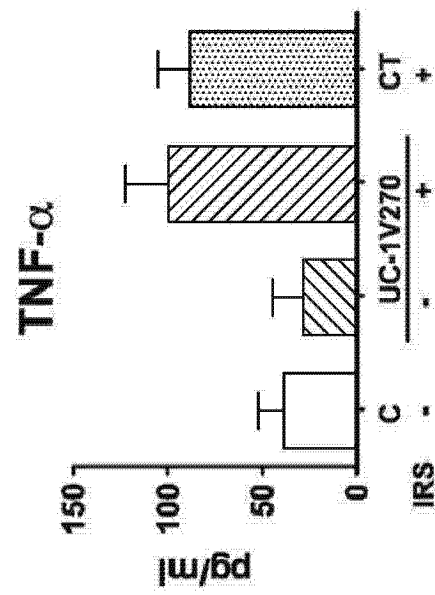


图 17D

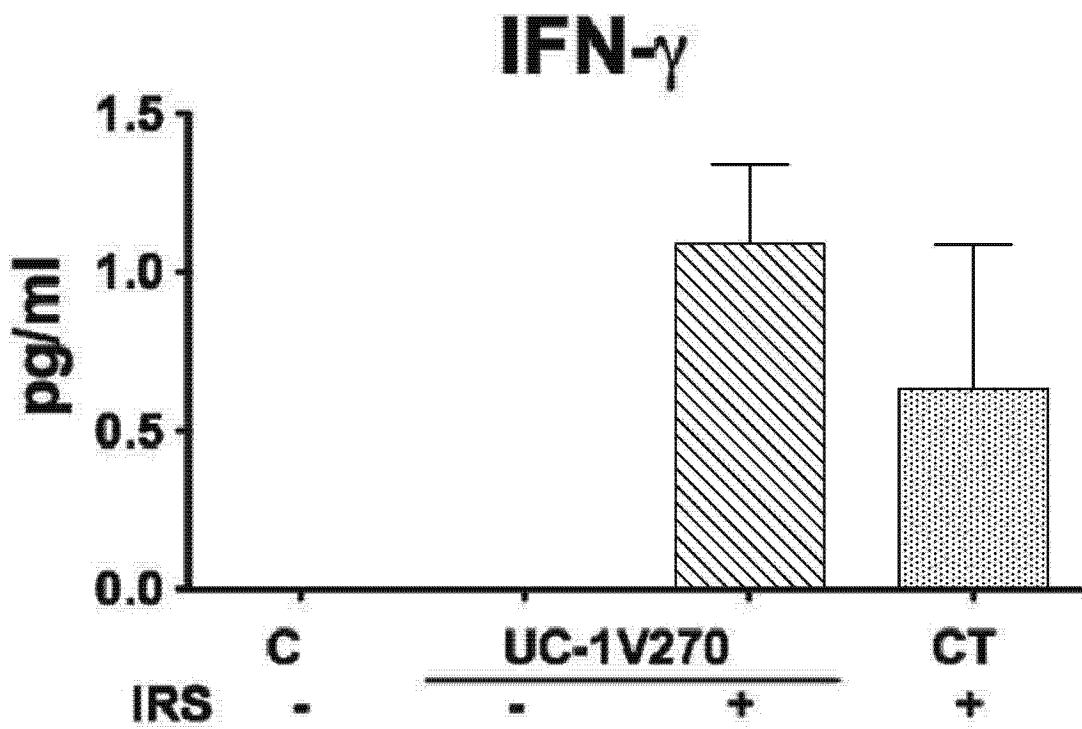


图 17E

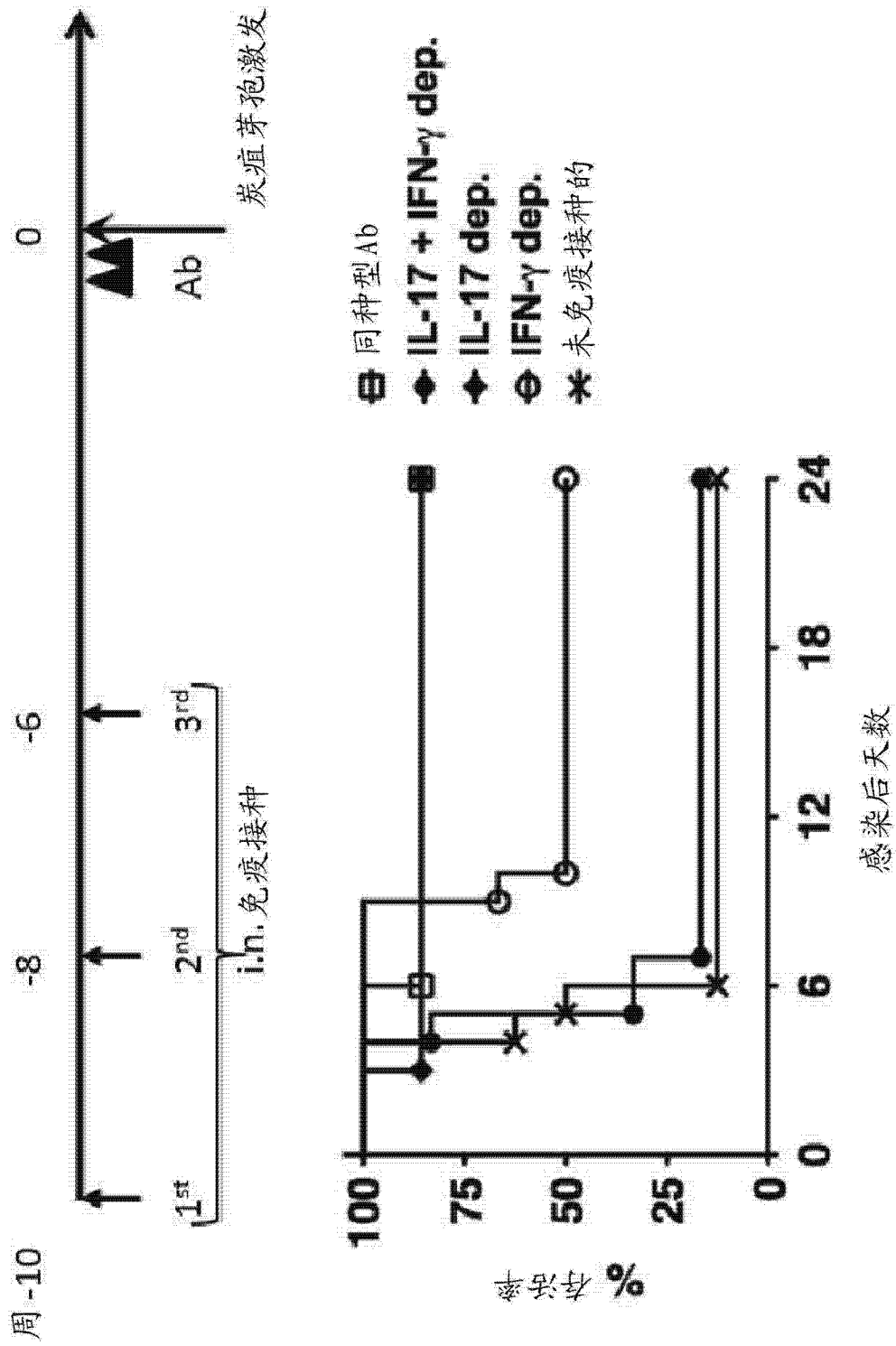


图 18

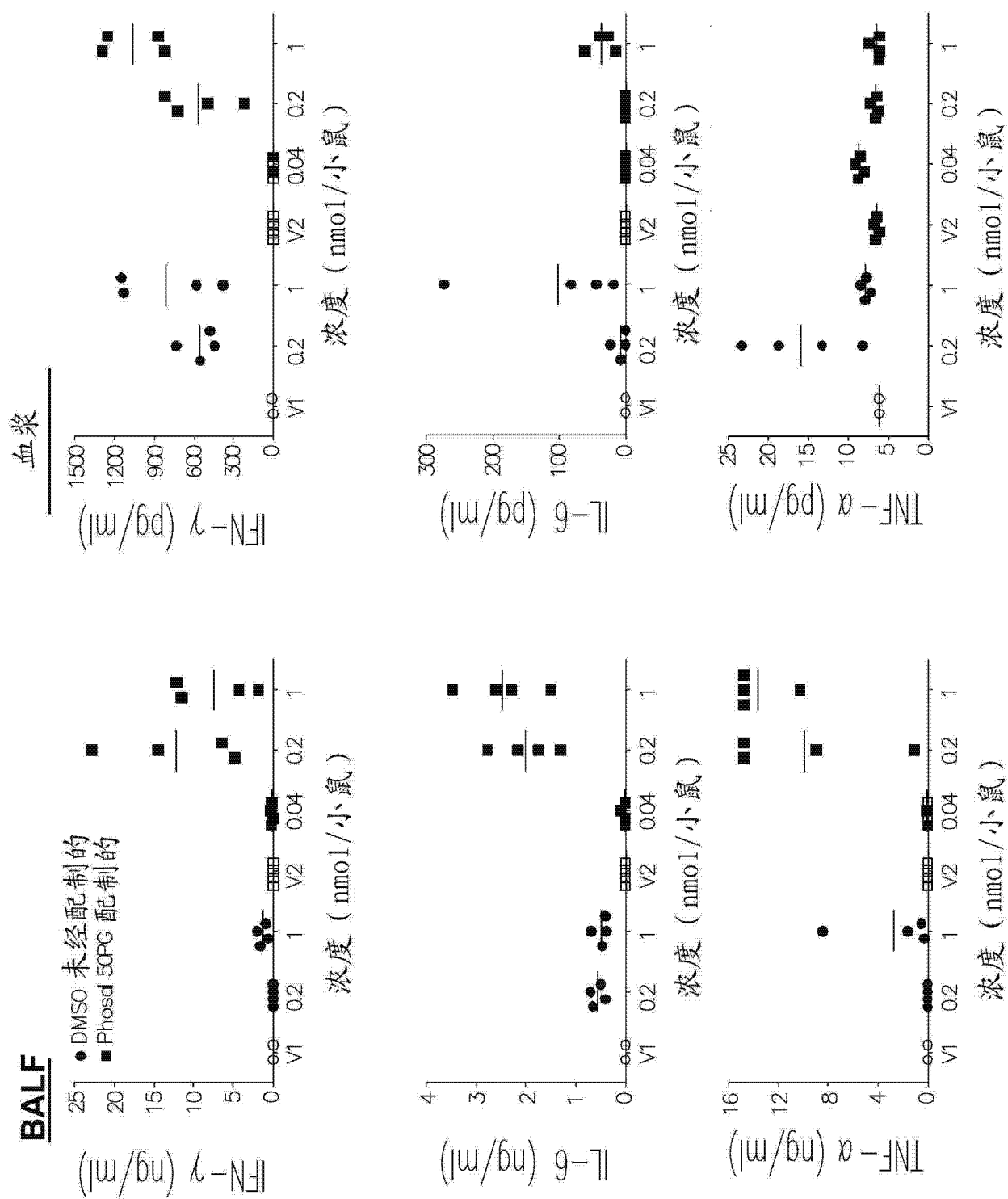


图 19

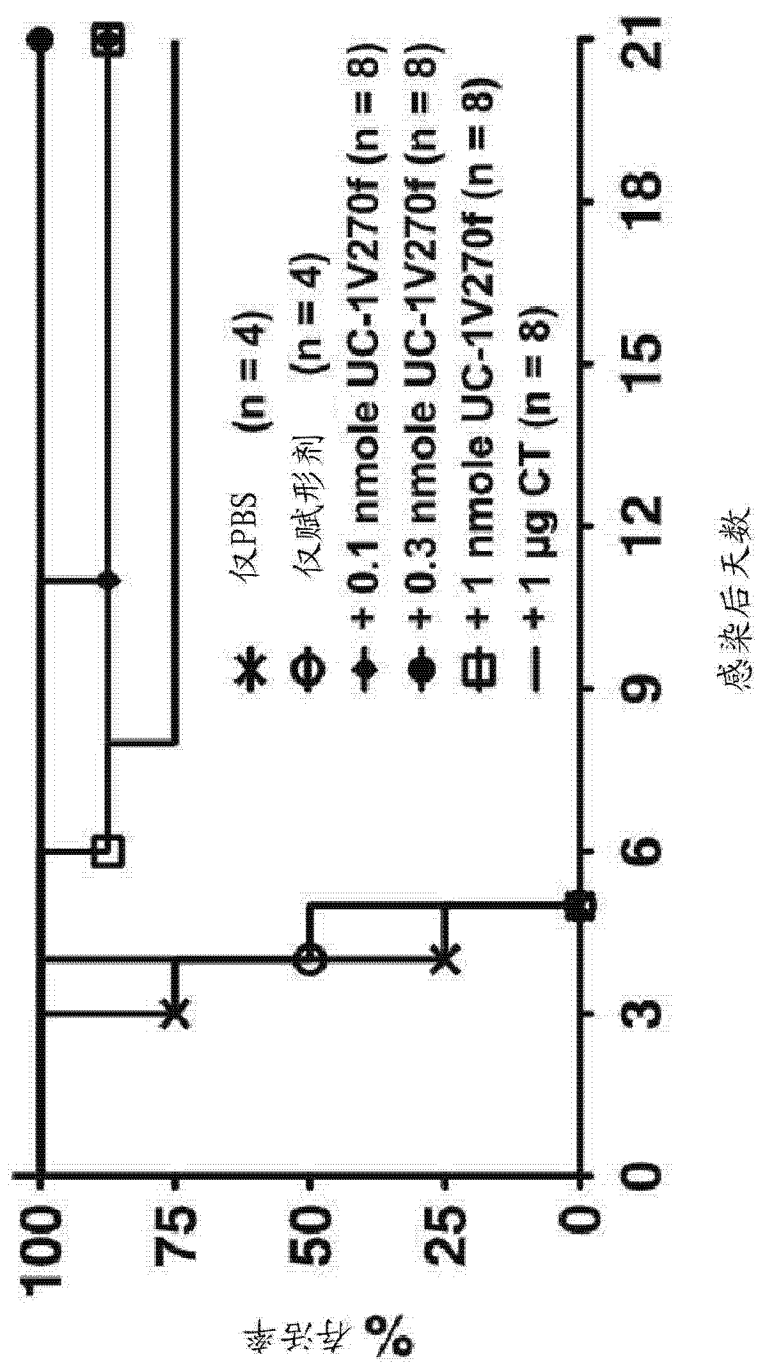


图 20