

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07C237/00

C07F 9/09 A61K 31/66

A61P 37/02



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99807761.5

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1168702C

[22] 申请日 1999.6.23 [21] 申请号 99807761.5

[30] 优先权

[32] 1998.6.30 [33] FR [31] PCT/FR98/01396

[86] 国际申请 PCT/IB1999/001170 1999.6.23

[87] 国际公布 WO2000/000462 法 2000.1.6

[85] 进入国家阶段日期 2000.12.22

[71] 专利权人 OM 药业

地址 瑞士梅兰市

[72] 发明人 雅克·博埃

奥利维耶·里夏尔·马丁

审查员 沈琦

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司

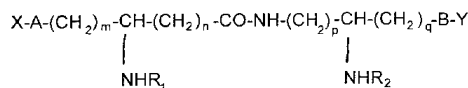
代理人 鲁兵

权利要求书 7 页 说明书 74 页 附图 32 页

[54] 发明名称 酰基 - 二肽类化合物,其制备方法以及含有前述化合物的药物组合物

[57] 摘要

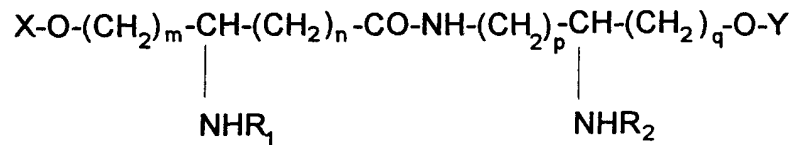
本发明涉及化学领域,更具体地讲,本发明涉及药物化学领域。本发明涉及通式 I 所示的 N - 酰基 - 二肽类化合物,其中取代基 A、B、X、Y、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>以及下标 n、m、p 和 q 具有权利要求中给出的含义。本发明还涉及含有至少一种通式 I 的化合物或其与有机或无机碱的酸或盐作为活性成分的药物组合物。本发明的化合物具有有价值的药理学特性,因此可用作药物。



(I)

ISSN 1008-4274

1. 通式 I' 所示的磷酸二肽类化合物:



5 (I')

其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 分别表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基, 它是未取代的或带有一个或多个选自羟基、烷基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和 (C<sub>1-24</sub>) 烷基硫代基团的取代基,

10 下标 m、p 和 q 是从 1 到 10 的整数,

下标 n 是从 0 到 10 的整数,

X 和/或 Y 是酸基团。

2. 权利要求 1 所述的通式 I' 化合物的盐, 其中 X 和 Y 分别表示氢原子或磷酰基, 用无机或有机碱制成的盐。

15 3. 权利要求 1 所述的化合物, 即 3-(3-十二烷酰氧基十四烷酰氨基) 9-(3-羟基十四烷酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1, 10-二醇 1 和/或 10-磷酸二氢酯。

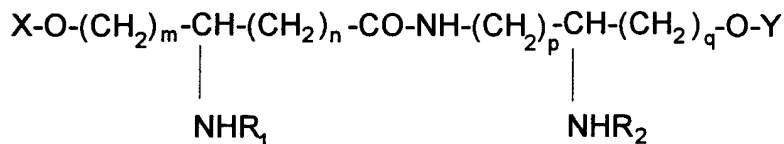
4. 权利要求 3 所述的化合物与有机或无机碱形成的加成盐。

5. 权利要求 1 所述的化合物, 即 3-(3-十二烷酰氧基-十四烷酰氨基)  
20 9-(3-羟基十四烷酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1, 10-二醇 1, 10-二-(磷酸二氢酯)。

6. 权利要求 5 所述的化合物与有机或无机碱形成的加成盐。

7. 权利要求 1 所述的化合物, 即 3-(3-羟基十四烷酰氨基) 9-(3-十二  
25 烷酰氧基十四烷酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1, 10-二醇 1, 10-二-(磷酸二氢酯)。

8. 权利要求 7 所述的化合物与有机或无机碱形成的加成盐。
9. 权利要求 1 所述的化合物, 即 3-(3-十二烷酰氧基十四烷酰氨基) 9-(3-羟基十四烷酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸 1,10-二醇单 1-磷酸二氢酯。
- 5 10. 权利要求 9 所述的化合物与有机或无机碱形成的加成盐。
11. 权利要求 1 所述的化合物, 即 3-(3-羟基十四烷酰氨基) 9-(3-十二烷酰氧基十四烷酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1,10-二醇单 1-磷酸二氢酯。
12. 权利要求 11 所述的化合物与有机或无机碱形成的加成盐。
- 10 13. 权利要求 1 所述的通式 I' 的化合物, 其含有具有 R 或 S 构型的元素, 或者是外消旋的。
14. 制备权利要求 1 所述的通式 I' 的磷酸二肽类化合物的方法:



(I')

- 15 其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 分别表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基, 它是未取代的或带有一个或多个羟基、烷基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和 (C<sub>1-24</sub>) 烷基硫代基团取代基,

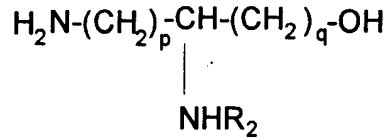
下标 m、p 和 q 是从 1 到 10 的整数,

- 20 下标 n 是从 0 到 10 的整数,

X 和 Y 分别表示氢原子或是中性或带电荷形式的磷酰基,

- 其中, 将式 H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CHNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q+1</sub>COOH 的二氨基酸的 (q+1) 和 ω 位的胺功能基分别用易于酸解和易于氢解的封闭试剂封闭, 将仍是游离形式的羧酸功能基与还原剂反应生成相应的醇, 将 (q+1) 位的胺功能基游离
- 25 然后用式 R<sub>2</sub>OH 的羧酸功能基衍生物进行酰基取代, 其中 R<sub>2</sub> 如上所定义,

随后将末端胺功能基通过氨解游离得到通式 II 的氨基醇

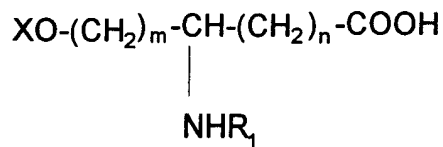


(II)

- 5 其中  $R_2$  表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个以上定义的取代基，

$p$  和  $q$  表示从 1 到 10 的整数，

- 然后将该氨基醇在肽缩合剂的存在下在惰性溶剂中与通式 III' 的  $\omega$ -羟基氨基酸衍生物缩合



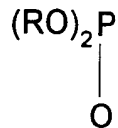
(III')

其中  $R_1$  是从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个取代基，

- 15  $m$  是从 1 到 10 的整数，

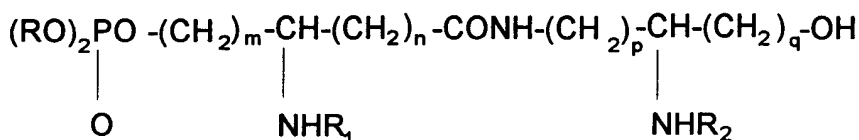
$n$  是从 0 到 10 的整数，

$X$  是下式的二烷氧基-或二芳氧基-磷酰基基团



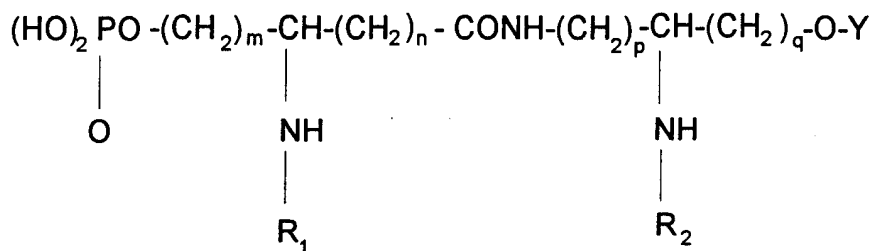
20

以得到通式 IV' 的肽类化合物，



(IV')

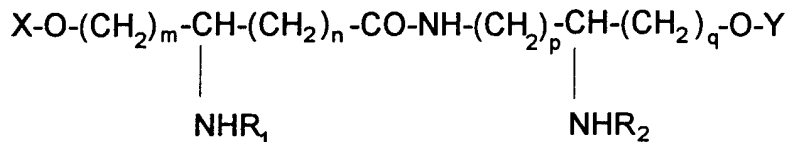
其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 分别表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直  
 5 链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个选自羟  
 基、烷基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和 (C<sub>1-24</sub>) 烷基硫代  
 基团的取代基，下标 m、p 和 q 是从 1 到 10 的整数，下标 n 是从 0 到  
 10 的整数，R 是易于氢解的基团，将它的醇功能基在偶联剂的存在下用  
 10 磷酸化试剂磷酸化，然后进行两步的催化氢化反应以将酰基 R<sub>2</sub> 上选择性  
 存在的醇功能基和磷酸酯功能基脱封闭，然后将第二个选择性存在的磷  
 酸酯功能基通过氢解进行脱封闭，以得到通式 V 的衍生物



(V)

15 其中 Y 表示氢原子或磷酰基。

15. 制备权利要求 2 所述的通式 I' 的化合物的盐的方法:



(I')

20 其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 分别表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直  
 链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个羟基、烷

基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和(C<sub>1-24</sub>)烷基硫代基团取代基，

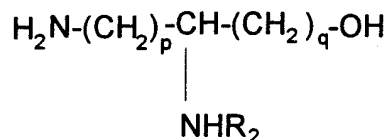
下标 m、p 和 q 是从 1 到 10 的整数，

下标 n 是从 0 到 10 的整数，

5 X 和 Y 分别表示氢原子或是中性或带电荷形式的磷酰基，

其中，将式 H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CHNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q+1</sub>COOH 的二氨基酸的 (q+1) 和 ω 位的胺功能基分别用易于酸解和易于氢解的封闭试剂封闭，将仍是游离形式的羧酸功能基与还原剂反应生成相应的醇，将 (q+1) 位的胺功能基游离

10 然后将末端胺功能基通过氢解游离得到通式 II 的氨基醇

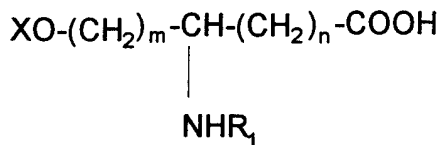


(II)

15 其中 R<sub>2</sub> 表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个以上定义的取代基，

p 和 q 表示从 1 到 10 的整数，

然后将该氨基醇在肽缩合剂的存在下在惰性溶剂中与通式 III' 的 ω-羟基氨基酸衍生物缩合



20

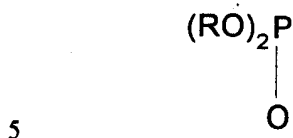
(III')

其中 R<sub>1</sub> 是从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个取代基，

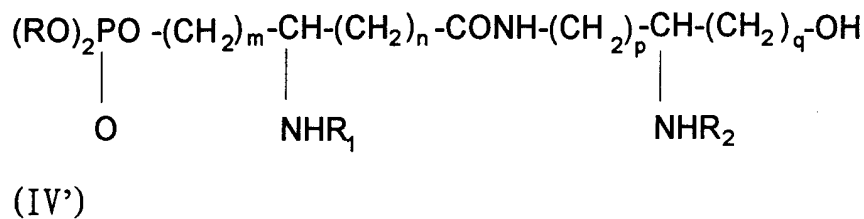
m 是从 1 到 10 的整数,

n 是从 0 到 10 的整数,

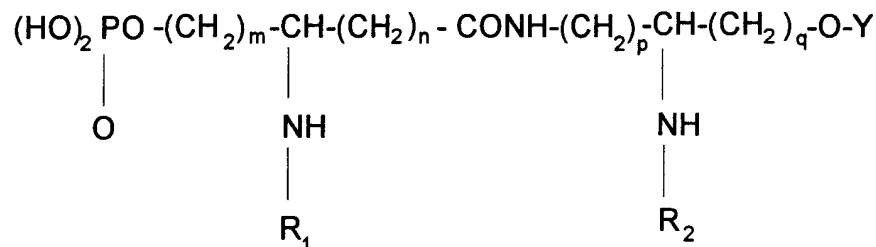
X 是下式的二烷氧基-或二芳氧基-磷酰基基团



以得到通式 IV' 的肽类化合物,



其中  $R_1$  和  $R_2$  分别表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基, 它是未取代的或带有一个或多个选自羟基、烷基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和  $(C_{1-24})$  烷基硫代基团的取代基, 下标 m、p 和 q 是从 1 到 10 的整数, 下标 n 是从 0 到 10 的整数, R 是易于氢解的基团, 将它的醇功能基在偶联剂的存在下用磷酸化试剂磷酸化, 然后进行两步的催化氢化反应以将酰基  $R_2$  上选择性存在的醇功能基和磷酸酯功能基脱封闭, 然后将第二个选择性存在的磷酸酯功能基通过氢解进行脱封闭, 以得到通式 V 的衍生物



## (V)

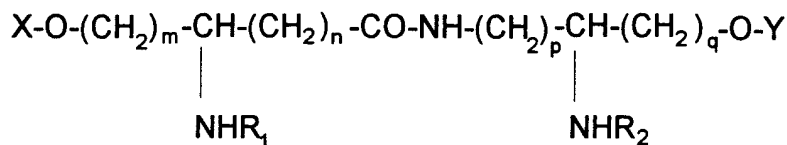
其中 Y 表示氢原子或磷酰基；  
与无机碱或有机碱反应生成盐。

16. 权利要求 15 所述的通式 I' 的化合物的盐的制备方法，其中所述有  
5 机碱或无机碱为适于治疗应用的有机碱或无机碱。

17. 权利要求 14 所述的通式 I' 的磷酸二肽类化合物的制备方法，其中  
的羧酸 R<sub>2</sub>OH 是 3-羟基十四烷酸。

18. 权利要求 15 或 16 所述的通式 I' 的化合物的盐的制备方法，其中的  
羧酸 R<sub>2</sub>OH 是 3-羟基十四烷酸。

10 19. 药物组合物，所述药物组合物含有至少一种权利要求 1 所述的通式  
I' 的化合物作为活性成份：



## (I')

15 其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 分别表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直  
链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个选自羟  
基、烷基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和 (C<sub>1-24</sub>) 烷基硫代  
基团的取代基，

下标 m、p 和 q 是从 1 到 10 的整数，

下标 n 是从 0 到 10 的整数，

20 X 和 Y 分别表示氢原子或磷酰基。

20. 权利要求 19 所述的药物组合物，其中的活性成分是所述化合物与  
适于治疗应用的有机碱或无机碱形成的盐。

21. 权利要求 19 或 20 所述的药物组合物，其中的活性成分是纯净的对  
映体形式或是立体异构体的混合物形式。



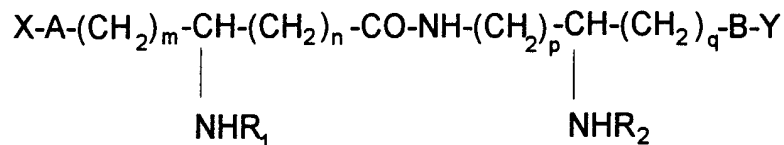
**酰基-二肽类化合物,****其制备方法以及含有前述化合物的药物组合物**

5 本发明涉及化学领域,更具体地讲,本发明涉及药物化学领域。

更具体地讲,本发明涉及从羟基化的氨基酸衍生的二肽类化合物,其游离的胺功能基用脂肪酸形成酰胺。

1994年11月17日申请、1995年5月26日公布、公布号为WO95/14026、国际申请号为PCT/EP94/03852、发明名称为“葡萄糖胺二糖、其制备方法、药物组份及其应用”的国际专利,公开了β(1-6)葡萄糖胺二糖的制备方法、β(1-6)葡萄糖胺二糖作为活性组份的药物组合物、以及这些二糖用作免疫调节剂、抗肿瘤剂以及疫苗组份。1994年3月9日申请、1995年8月23日公布、公布号为0668289A1、发明名称为“新型二糖衍生物”的欧洲专利,公开了一种新型二糖衍生物、其立体化学异构体及其盐、以及以此二糖衍生物为活性组份的药物组合物。该药物组合具有各种生物活性如有效的促有丝分裂的活性、辅佐活性、抗肿瘤活性等。

本发明涉及至少有一个羟基被中性或带电荷形式的酸基团酯化了的N-酰基-二肽类化合物,其具有通式I所示的结构



20

(I)

其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>分别表示从含有2至24个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基,它是未取代的或带有一个或多个选自羟基、烷基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和((C<sub>1-24</sub>)烷基)硫代基团的取代基,

25

下标m、p和q是从1到10的整数,

下标n是从0到10的整数,

X和Y分别表示氢或是中性或带电荷形式的酸基团,

条件是，取代基 X 和 Y 中至少有一个是表示中性或带电荷形式的酸基团，

A 和 B 彼此独立的分别表示氧原子、硫原子或亚氨基-NH-。

酸基团 X 和 Y 优选选自如下基团：

- 5 -羧基 [(C<sub>1-5</sub>) 烷基]  
 -CH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOH] [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH]，其中 m = 0-5，n = 0-5  
 -膦酰基 [(C<sub>1-5</sub>) 烷基]  
 -二羟基膦酰氧基 [(C<sub>1-5</sub>) 烷基]  
 -二甲氧基膦酰基  
 10 -膦酰基  
 -羟基磺酰基  
 -羟基磺酰基 [(C<sub>1-5</sub>) 烷基]  
 -羟基磺酰氧基 [(C<sub>1-5</sub>) 烷基]。

15 当取代基 X 和/或 Y 表示中性形式的酸基团时，是指游离的羧酸、磺酸或磷酸形式。当酸基团是带电荷的形式时，是指羧酸、磺酸或磷酸盐的形式，即通过与有机碱或无机碱、优选适于治疗应用的碱加成所形成的盐。当碱不适于治疗应用时，这些碱可以用来进行鉴定、纯化和分离。

20 当 X 和/或 Y 表示羧基烷基、链烯基二羧基、羟基磺酰基、羟基磺酰基烷基、羟基磺酰氧基烷基、膦酰基烷基、膦酰氧基烷基时也是如此。

25 适于治疗应用的成盐用碱主要包括碱金属碱如氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化锂、铵盐、碱土金属碱如氢氧化钙或氢氧化锶、镁盐、铁金属盐等，有机碱例如从伯胺、仲胺、叔胺衍生的碱如甲胺、二乙胺、一乙醇胺、二乙醇胺、苄胺、N-甲基苄基胺、藜芦胺、三甲氧基苄基胺、碱性氨基酸如赖氨酸和鸟氨酸或氨基糖。

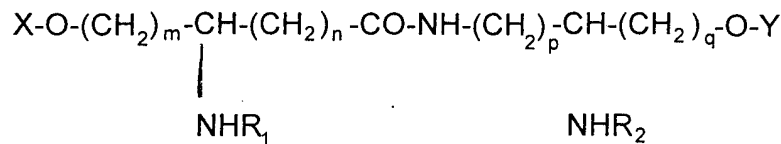
不适于治疗应用的碱的例子是布鲁辛、士的宁、胍丁胺、龙虾肌碱、氨基葡糖、N-甲基葡糖胺或 N-甲基吗啉。如前所述，由这些碱衍生的盐可以用于分离和鉴定。

当  $m$  等于 1 并且  $n$  等于 0 时, 所需的分子由丝氨酸衍生得到。当  $m$  等于 2 并且  $n$  等于 0 时, 所需的分子由高丝氨酸衍生得到。如果  $m$  等于 3 并且  $n$  等于 0, 可以参照戊高丝氨酸化合物。如果  $m$  等于 4 并且  $n$  等于 0, 可以参照己高丝氨酸化合物。

5. 当  $p$  等于 3 并且  $q$  等于 1 时, 所需产物可以是瓜氨酸、鸟氨酸或精氨酸化合物。当  $p$  等于 4 并且  $q$  等于 1 时, 可以参照高精氨酸或赖氨酸化合物。

在本文所述的二肽类化合物中, 特别值得注意的是如下优选的通式 I 化合物:

10



(I')

- 其中  $R_1$  和  $R_2$  分别表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基, 它是未取代的或带有一个或多个选自  
15 羟基、烷基、烷氧基、酰氧基、氨基、酰氨基、酰硫基和(( $C_{1-24}$ )烷基)硫代基团的取代基,

下标  $m$ 、 $p$  和  $q$  是从 1 到 10 的整数,

下标  $n$  是从 0 到 10 的整数,

$X$  和  $Y$  分别表示氢原子或磷酰基。

20

即

3-(3-十二酰氧基十四酰氨基) 9-(3-羟基十四酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1,10-二醇 1 和/或 10-磷酸二氢酯及其与有机或无机碱形成的加成盐,

- 25 3-(3-十二酰氧基-十四酰氨基) 9-(3-羟基十四酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1,10-二醇 1,10-二(磷酸二氢酯)及其与有机或无机碱形成的加成盐,

3-(3-羟基十四酰氨基) 9-(3-十二酰氧基十四酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1,10-二醇 1,10-二(磷酸二氢酯)及其与有机或无机碱形成的加成盐,

3-(3-十二酰氧基十四酰氨基) 9-(3-羟基十四酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1,10-二醇 1-磷酸二氢酯及其与有机或无机碱形成的加成盐,

5 3-(3-羟基十四酰氨基) 9-(3-十二酰氧基十四酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1,10-二醇 1-磷酸二氢酯及其与有机或无机碱形成的加成盐

3-(3-羟基十四酰氨基) 9-(3-十二酰氧基十四酰氨基) 4-氧代-5-氮杂癸烷-1,10-二醇 10-磷酸二氢酯及其与有机或无机碱形成的加成盐。

$R_1$  和  $R_2$  包括带有相同或不同性质的不同大小的链的饱和或不饱和、直链或支链的酰基衍生物, 它可带有一个或多个选自烷基、氨基、酰氨基、羟基、烷氧基、酰氧基、酰硫基和烷硫基的取代基。

所述酰基的例子是蓖麻油酰基、12-羟基硬脂酰基、2-羟基-3-甲基丁酰基、3-羟基-2-氨基戊酰基、棕榈酰基、反油酰基、桐酰基、二十烷酰基、花生四烯酸酰基、顺 9-二十碳烯酸酰基、二十二烷酰基、芥酰基、8-甲基癸酰基、9-甲基癸酰基、二十二碳六烯酸酰基或二十碳五烯酸酰基。

通式 I 的化合物及其单和二磷酰基化的化合物分别用代码 OM-294-MP (MP)和 OM-294-DP (DP)表示, 它们具有非常有价值的药理学性质, 特别是在免疫调节方面。根据所用的剂量, 它们可用于治疗与免疫防御系统缺陷有关的疾病或免疫应答的过表达。它们还可用于治疗癌症并在配方疫苗中用作佐剂或应答增强剂。

其它的应用包括用作治疗用分子的载体, 因为它们可以形成基于亲水性或疏水性相互作用的非共价配合物。它们的两性特点可以促进治疗用分子的配制以及向膜受体及细胞膜和细胞质的转运。可以将它们通过口服、胃肠外、直肠、局部、皮下或粘膜下途径给药单独使用或与治疗用的分子联合使用。可将它们单独使用或与治疗用的分子联

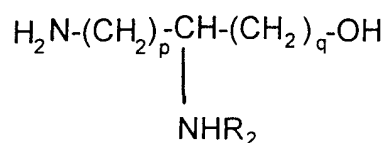
合使用，与血细胞一起进行现场的离体温育以促进免疫活性细胞的形成，然后再通过胃肠外给药将这些细胞注射回体内。

当在例如疫苗中用作免疫系统的佐剂、与适宜的抗原联合使用时、用于治疗病毒、寄生虫、微生物或真菌引起的疾病时，MP 和 DP 分子具有相似的特性。与此相反，本发明的化合物则显示完全不同的特性，它们可以诱导细胞因子的生产或从造血和淋巴器官衍生的免疫活性干细胞的成熟。

MP 化合物可以在存在或不存在适宜抗原的条件下促进单核细胞成熟和分化成功能性树状细胞并促进体液或细胞介导的免疫。而 DP 化合物则显示出抗肿瘤特性。

本发明的化合物由于毒性低而特别令人感兴趣。它们以 0.025mg 至 100mg/单位剂量的 0.05 至 200mg/天的剂量用于人和动物的治疗。

本发明还涉及通式 I 的二肽类化合物的制备方法，该方法包括如下步骤：将二氨基酸的(q+1)和 $\omega$ 位的胺功能基分别用易于酸解和易于氢解的封闭试剂封闭，将仍是游离的羧酸功能基与还原剂反应生成相应的醇，将(q+1)位的胺功能基游离然后用式 R<sub>2</sub>OH 的羧酸功能基衍生物进行酰化，其中 R<sub>2</sub> 如上所定义，随后通过氢解将末端胺功能基游离得到通式 II 的二氨基醇

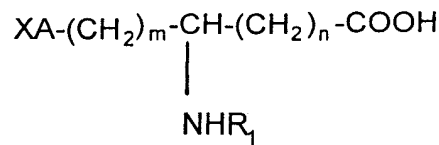


(II)

其中 R<sub>2</sub> 表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个以上定义的取代基，

p 和 q 表示从 1 到 10 的整数，

将该氨基醇在肽缩合剂的存在下在惰性溶剂中与通式 III 的  $\omega$ -羟基、 $\omega$ -氨基或 $\omega$ -巯基氨基酸化合物缩合



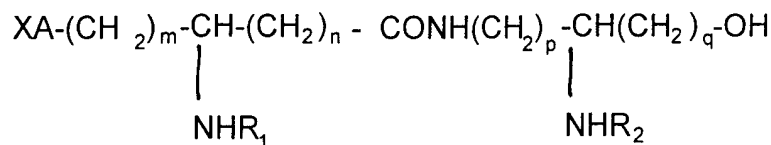
5 (III)

其中  $R_1$  表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个以上定义的取代基，

$m$  是从 1 到 10 的整数，

10  $n$  是从 0 到 10 的整数，

$X$  是以上定义的酸基团，该基团可以选择性地是酯的形式，以得到通式 IV 的二肽类化合物

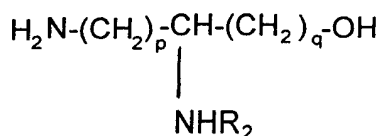


15 (IV)

其中的取代基  $R_1$ 、 $R_2$  和下标  $n$ 、 $m$ 、 $p$  和  $q$  具有与以上所述相同的含义，

如需要，可将它末端的游离醇功能基烷基化或酰基化，或者被烷基或酰基或其它取代试剂在偶联剂的存在下取代，然后进行催化氢化  
20 或其它的脱封闭方法，以得到通式 I 的衍生物



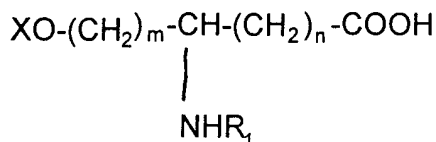


(II)

其中  $R_2$  表示从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个以上定义的取代基，

$p$  和  $q$  表示从 1 到 10 的整数，

然后将该氨基醇在肽缩合剂的存在下在惰性溶剂中与通式 III' 的  $\omega$ -羟基氨基酸功能基衍生物缩合



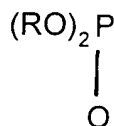
10 (III')

其中  $R_1$  是从含有 2 至 24 个碳原子的饱和或不饱和、直链或支链的羧酸衍生的酰基，它是未取代的或带有一个或多个取代基，

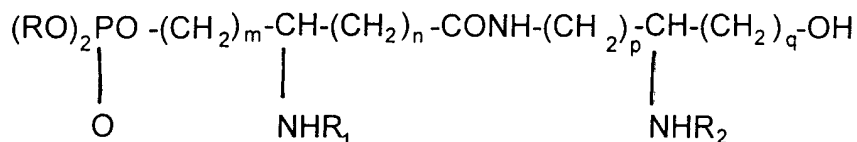
$m$  是从 1 到 10 的整数，

$n$  是从 0 到 10 的整数，

15 X 是下式的二烷氧基-或二芳氧基-磷酰基基团



以得到通式 IV' 的肽类化合物，

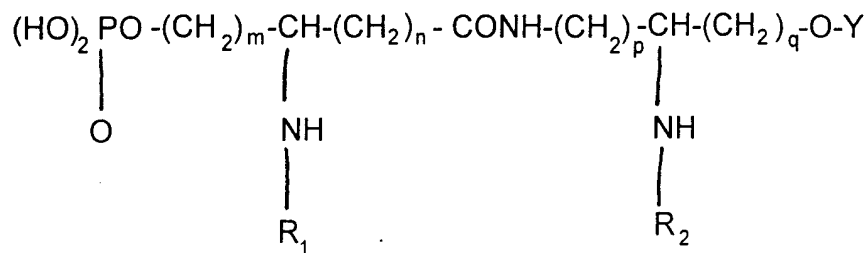


20

(IV')



其中的取代基  $R_1$ 、 $R_2$  以及下标  $m$ 、 $n$ 、 $p$  和  $q$  如上所定义， $R$  是易于氢解的基团，如需要，可将它的另一个醇功能基在偶联剂的存在下用磷酸化试剂磷酸化，然后进行催化氢化反应，一方面将酰基  $R_2$  上选择性存在的醇功能基脱保护，另一方面使磷酸酯功能基游离，然后通过氢解将第二个选择性存在的磷酸酯功能基脱保护，以得到通式 V 的衍生物



10 (V)

其中  $Y$  表示氢原子或磷酰基，然后用有机碱或无机碱选择性地成盐的步骤。

15 酰氨基的手性中心的立体化学由最初使用的氨基酸的构型决定，而酰氨基的立体化学取决于最初使用的脂肪酸的构型。可以用具有 L 或 D 构型或外消旋的二氨基酸作为原料。可以用 L、D 构型的羟基化的氨基酸或外消旋的混合物作为原料。所有这些立体异构体或非对映体均包括在本发明的范围内。

本发明的方法还可以由如下优选的操作步骤来定义，在反应方案 1、2 和 3(图 33、34 和 35)中对其进行了简要描述：

20 1. 按照“Organic Preparations and Procedures International”，23 (1992): 191 - 194 中公开的方法封闭鸟氨酸衍生物链上  $\omega$  位的胺功能基，该过程通过如下步骤来完成：首先将酸功能基与铜盐在碱性介质中反应，然后将该铜羧酸盐与氯甲酸苄酯反应进行 N-苄氧羰基取代，

通过将铜在酸性环境中螯合使酸功能基游离，得到 N-苄氧羰基取代的衍生物。

2. 用二碳酸烷基酯例如二碳酸叔丁酯在碱性介质中进行叔丁氧羰基取代来封闭鸟氨酸衍生物羧基部分 $\alpha$ 位的胺功能基。

5 二碳酸叔丁酯可与邻近的胺功能基反应生成 $\omega$ -苄氧羰基氨基  $\alpha$ -叔丁基羰基氨基酸衍生物。

3. 按照《四面体通讯》(Tetrahedron Letters), 32 (1991) 923 – 926 中公开的方法将羧基功能基转变成伯醇功能基，该方法包括，将羧酸衍生物与氯甲酸烷基酯例如氯甲酸异丁酯反应生成混合酸酐，将其用碱  
10 金属或碱土金属硼氢化物还原得到相应的带有伯醇功能基的羟基化衍生物。

4. 用三氟乙酸除去 $\alpha$ 位的叔丁氧羰基，形成三氟乙酸盐形式的胺功能基。

5. 用三氟乙酸盐作为原料，将游离的胺功能基用由  $R_2OH$  酸和氯  
15 甲酸烷基酯形成的混合酸酐进行酰化。

6. 通过在贵金属催化剂如铂、钯或铱载体材料的存在下进行氢解完成末端胺功能基的游离。

7. 式 II 的氨基化合物和式 III' 的磷酰基衍生物之间的肽偶联或连接在偶联剂如 1-异丁氧基-2-异丁氧羰基-1,2-二氢喹啉的存在下在惰性  
20 溶剂如含卤的溶剂中完成，或在碳二亚胺的存在下完成。

由此得到通式(IV')的二肽类化合物，其通过由酰基  $R_2$  被封闭选择性地产生的羟基功能基。

8. 酰基  $R_2$  的羟基功能基的游离涉及在贵金属如吸附在底物如碳上的钯的存在下氢解。

25 9. 磷酸基团的游离通过在贵金属氧化物如氧化铂的存在下催化氧化来完成。

10. 二肽类衍生物 IV' 的磷酸化通过两步法来完成(Helv. Chim. Acta, 70 (1987), 175)。在第一步中, 将式 IV' 的化合物与二烷基或二芳基-N,N-二烷基亚磷酰胺在偶联剂例如[1H]-四唑的存在下在极性溶剂如四氢呋喃中反应; 然后将形成的亚磷酸酯用芳香族过酸例如过苯二甲酸、间氯过苯甲酸或硝基过苯甲酸氧化成磷酸酯。磷酸基团 Y(式 V)的游离通过在贵金属例如钨的存在下催化氢化来完成。

11. 高丝氨酸衍生物的磷酸化用二苯基磷酰基卤化物在吡啶和 N,N-二烷基氨基吡啶的存在下完成(Helv. Chim. Acta, 58: (1975), 518), 用二碳酸叔丁酯在碱性介质中处理将胺功能基用叔丁氧羰基封闭, 然后, 在形成铯盐后, 用苄基卤化物在二甲基甲酰胺或二甲基乙酰胺中处理将羧基功能基封闭。

12. 高丝氨酸衍生物氮原子的酰化通过如下步骤来完成: 将胺功能基用三氟乙酸脱保护得到胺的三氟乙酸盐, 然后与通过将羧酸 R<sub>1</sub>OH 和氯甲酸烷基酯反应得到混合酸酐在活泼胺例如 N-甲基吗啉的存在下反应。

本发明还涉及通式 II 和通式 III 及 III' 的中间体, 包括其纯净的对映体形式或立体异构体混合物的形式。

本发明还涉及含有作为活性成分的至少一种中性或带电荷形式的通式 I 化合物以及无毒的可药用惰性赋形剂或载体的药物组合物。

20 本发明尤其涉及含有至少一种通式 I 的化合物与适于治疗应用的有机或无机碱的盐作为活性成分的药物组合物。

本发明还涉及含有纯净对映体形式或立体异构体混合物形式的通式 I 化合物以及药物赋形剂或载体的药物组合物。

25 在本文所述的药物制剂中, 应当提到的是那些适于通过粘膜、经皮、局部、胃肠外、消化道或吸入给药的药物制剂, 例如包衣或未包

衣的片剂、胶囊、注射溶液或混悬液、喷雾剂、凝胶、硬膏剂或迅速吸收的溶液。

优选将本发明的化合物通过注射以含水溶液或混悬液的形式给药，可选择性地将其用胺或羟基烷基胺中和。

- 5 以下非限定性实施例进一步描述了本发明。在反应方案 1-6 (图 33-38)中对其进行了简要描述。

### 实施例 I

#### 4-(二苯氧基磷酰氧基)-2-[(R)3-十二酰氧基十四酰氨基]丁酸

10 1. N $\alpha$ -叔丁氧羰基-DL-高丝氨酸

将 2g 高丝氨酸(16.78mmol)溶于 20ml 水，然后向溶液中加入 16.78ml 1M NaOH 和 3.006g 碳酸铯(9.23mmol)。搅拌 5 分钟后，将溶液在冰/水浴中冷却。然后加入 60ml 二氧六环和二碳酸叔丁酯。将反应混合物在冰冷的水浴中搅拌 1 小时，然后室温搅拌 5 小时。随后真空蒸除溶剂。将干燥的残余物直接用于下一步骤。

15 2. N $\alpha$ -叔丁氧羰基-苄基-DL-高丝氨酸酯

向步骤 1 的残余物中，加入 20ml 二甲基甲酰胺并将溶剂蒸发至干，然后向反应混合物中加入 60ml 二甲基甲酰胺和 4.5ml 苄基溴(20.13mmol)。此时有白色沉淀形成。将混合物搅拌 16 小时。真空蒸除溶剂。将残余物用 20ml 乙酸乙酯萃取两次。将有机层分别用水(20ml)和盐水(20ml)洗涤，然后用无水硫酸镁干燥。蒸除溶剂并将残余物直接用于随后的步骤。

20 3. 苄基 N $\alpha$ -叔丁氧羰基-O-(二苯氧基磷酰基)-DL-高丝氨酸酯

将上一步骤的残余物高真空干燥然后溶于二氯甲烷(60ml)。然后向溶液中加入 4.11g 4-二甲基氨基吡啶(33.56mmol)，将反应混合物搅拌 10 分钟，然后加入 12ml 吡啶和 6.95ml 氯代磷酸酯(33.56mmol)。将

溶液室温搅拌 18 小时, 然后用 1N 盐酸(5 x 20ml)、水(30ml)和盐水(30ml)洗涤。将有机层用无水硫酸镁干燥然后真空蒸除溶剂。将残余物通过快速色谱纯化(己烷/乙酸乙酯 = 4:1)。将主要馏份浓缩以使残余物结晶。由此得到 7.49g 磷酸化的产物, 收率 82.4%。熔点: 63.5-64.0 °C。

#### 4. 苄基 O-(二苯氧基磷酰基)-DL-高丝氨酸酯

将上一步骤的磷酸化的产物(7.88g, 15.4mmol)溶于 15ml 三氟乙酸然后将溶液室温搅拌 2.5 小时。真空蒸除溶剂, 将残余物通过快速色谱纯化(MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 10 : 1)。将主要馏份浓缩并使残余物在室温下结晶。由此得到 7.17g 磷酸化的产物(收率 88.9%)。该产物不经纯化直接用于随后的步骤。

#### 5. 苄基 2-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-(二苯氧基磷酰氧基)丁酸酯

将 4.284g(10.07mmol) (R) 3-十二酰氧基十四烷酸(按照 Bull. Chem. Soc. Jpn., 60 (1987), 2205-2214 中公开的方法制备)溶于 30ml 四氢呋喃并将溶液在冰冷的盐水浴中冷却至 -15 °C。然后加入 1.108ml(10.07mmol) N-甲基吗啉和 1.31ml(10.07mmol) 氯甲酸异丁酯。继续搅拌 30 分钟。向反应混合物中加入 5.724g(10.07mmol) 苄基 O-(二苯氧基磷酰基)-DL-高丝氨酸酯在 30ml 四氢呋喃和 5ml 三乙胺的混合物中的溶液。室温搅拌过夜后, 真空蒸除溶剂并向残余物中加入 20ml 水。然后将混合物用乙酸乙酯萃取(2 x 30ml)。合并有机层, 依次用水(20ml)和盐水(20ml)洗涤, 然后用硫酸镁干燥。蒸除溶剂并将残余物通过快速色谱纯化(己烷-乙酸乙酯 2:1, R<sub>f</sub> = 0.29); 收率 7.455g(87.1%) m.p. 31.0°C-32.1°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ ppm : 7.4-7.1 (m, 15H), 6.90 (2d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, NH), 5.3-5.1 (m, 3H), 4.7 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.4-2.1 (m, 4H), 1.6 (m, 4H), 1.4-1.1 (m, 34H), 0.9 (t, 6H). <sup>13</sup>C-

NMR (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz),  $\delta$  ppm : 173.01, 171.08, 169.66, 150.18, (d,  $^2J_{P,C}$  = 7.1 Hz), 135.01, 129.60, 128.33, 128.14, 127.96, 125.21, 119.80 (d,  $^3J_{P,C}$  = 5.0 Hz), 70.69, 67.05, 65.19 (d,  $^2J_{P,C}$  = 5.6 Hz), 49.13, 40.97, 40.77 (2种非对映体), 34.20, 33.98, 33.82, 31.70, 29.42, 29.34, 29.14, 28.94, 25.01, 24.47, 13.91.

#### 6. 4-(二苄氧基磷酰氧基)-2-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-丁酸

在三颈圆底烧瓶中制备步骤得到的苄酯(2.23g, 2.6mmol)在 300ml HPLC 级甲醇中的溶液, 然后加入 1.0g 碳-10%钨。真空下排空圆底烧瓶中所含的空气, 然后在常压下向烧瓶中通入氢气。

10 将反应混合物室温搅拌 1 小时, 然后在膜上迅速滤除催化剂, 将滤液浓缩得到无色液体。经薄层色谱和 NMR 分析, 该产物是纯净的, 因此不经纯化将其直接用于偶联步骤; Rf = 0.75 (二氯甲烷-甲醇-三乙胺, 10 : 1 : 0.5).  $^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz),  $\delta$  ppm : 7.4-7.1 (m, 10H), 6.85 (2d, 1H, NH), 5.15 (m, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.4-15 2.15 (m, 4H), 1.6 (m, 4H), 1.4-1.1 (m, 34H), 0.9 (t, 6H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz),  $\delta$  ppm : 173.35, 171.30 (2种非对映体), 172.75, 170.37, 150.0 (d,  $^2J_{P,C}$  = 7.5 Hz), 129.55, 125.28, 119.71 (d,  $^3J_{P,C}$  = 4.4 Hz), 70.78, 65.65, (d,  $^2J_{P,C}$  = 5.9 Hz), 49.00, 40.77, 40.63 (2种非对映体), 34.13, 33.86, 33.76, 31.59, 29.31, 29.25, 29.03, 28.82, 24.88, 24.68, 22.36, 13.76.

20 4-(二苄氧基磷酰氧基)-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]-丁酸可以采用相同的反应方案, 通过在实施例 I 的步骤 5 中用(R)-3-苄氧基十四烷酸代替(R)-3-十二酰氧基十四烷酸制得。

## 实施例 II

### (2R)-5-氨基-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]-戊-1-醇

#### 1. D-鸟氨酸的铜盐

向 D-鸟氨酸(5.25g, 30mmol)的 30ml 1M 氢氧化钠溶液中, 加入  
5 50ml 五水硫酸铜(3.814g, 15.3mmol)的水溶液。继续搅拌 2 小时。将溶  
剂蒸发至干。加入 60ml 甲醇形成紫色固体, 分离出该固体并用二氧六  
环和甲醇洗涤。

#### 2. (2R)-5-氨基-5-苄氧羰基氨基)戊酸铜

将紫色的固体溶于 40ml 1M 氢氧化钠溶液和 70ml 二氧六环, 将溶  
10 液在冰冷的水浴中冷却并加入 5.14ml(36mmol)氯甲酸苄酯。继续在冰  
冷的水浴中搅拌 3 小时, 然后室温搅拌 15 小时。收集紫色的沉淀并用  
95%乙醇(40ml)、水(50ml)和乙醇(60ml)洗涤。将沉淀在烘箱中干燥( $T < 45^{\circ}\text{C}$ , 真空); 两步的收率为 8.27 g, 预期收率的 93%。

### 3. (2R)-5-(苄氧羰基氨基)-2-(叔丁氧羰基氨基)戊酸

将步骤 2 得到的铜盐溶于 2M 盐酸(400ml)并向其中加入 EDTA (8.15 g, 27.8mmol)。将混合物搅拌 2.5 小时, 然后加入氢氧化钠溶液(约 160ml)中和至 pH 7。形成白色沉淀。将混合物在冰冷的水浴中搅拌 2.5  
5 小时。滤出沉淀, 用冷水洗涤直至洗涤液无色, 然后在烘箱中于 60℃ 下干燥。将该固体溶于 156ml 1M NaOH, 然后将该溶液用冰冷的水浴冷却。向该溶液中加入 7.7g(35.2mmol)二碳酸叔丁酯的二氧六环 (160ml)溶液。将混合物于 0℃ 下搅拌 45 分钟, 然后室温搅拌 16 小时。蒸除有机溶剂, 向残余物中加入 70ml 乙酸乙酯。加入 2N 盐酸将  
10 水层酸化, pH 降至 $\approx$ 3。将水层再用 100ml 乙酸乙酯萃取一次。合并有机层并用水(30ml)和盐水(30ml)洗涤。真空蒸除溶剂, 经快速色谱纯化后得到无色油(收率: 两步 8.42g, 预期收率的 76.7%) ( $R_f = 0.19$ , 二氯乙烷-MeOH 20 : 1)。

### 4. (2R)-5-(苄氧羰基氨基)-2-(叔丁氧羰基氨基)戊-1-醇

15 向冷的(-15℃)步骤 3 得到的二氨基戊酸衍生物(5.45g, 14.8mmol)的 60ml THF 溶液中, 加入 1.654ml(14.8mmol) N-甲基吗啉和 9.6ml(14.8mmol)氯甲酸异丁酯(BCIF)。将溶液于 -15℃ 搅拌 1 分钟, 然后加入硼氢化钠(5.104g, 44.6mmol)的 10ml 水溶液。于 -15℃ 继续搅拌 10 分钟, 然后加入 400ml 水终止反应。将溶液用乙酸乙酯萃取  
20 (100ml x 2)。合并有机层并用 50ml 水和 60ml 盐水洗涤, 然后用无水硫酸镁干燥。蒸除溶剂并将残余物用乙酸乙酯/己烷混合物重结晶(4.95 g, 94.9%收率) m.p. 47.5-48℃。

### 5. 2,5-二氨基戊-1-醇衍生物的脱保护

25 将 6.32g(18mmol)步骤 4 得到的(2R)-5-(苄氧羰基氨基)-2-(叔丁氧羰基氨基)-戊-1-醇溶于 25ml 三氟乙酸, 然后室温搅拌 2.5 小时。蒸除溶剂并将残余物通过快速色谱纯化(MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 10 : 1)。得到无色玻



璃状的大块产物，其在室温下熔化。得到 5.45g 三氟乙酸盐，(收率 = 82.7%)。盐酸盐化合物于 133.0°C-134.3°C 熔化(甲醇重结晶)。

6. (2R)-5-(苄氧羰基氨基)-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]戊-1-醇

向预先冷却至-15°C 的 5.27g (15.8mmol) (R)-3-苄氧基十四烷酸(Bull. Chem. Soc., Jpn., 60 (1987), 2197-2204)的 30ml 四氢呋喃溶液中，加入 1.89ml (15.8mmol) N-甲基吗啉和 2.21ml IBCF (15.8mmol)。将反应混合物于-15°C 搅拌 30 分钟。然后，向溶液中加入 5.25g 前一实施例的三氟乙酸盐(14.4mmol)的 30ml 四氢呋喃溶液和 1.44ml 三乙胺。于室温下继续搅拌 16 小时，然后加入 30ml 水和 60ml 乙酸乙酯；分出有机层并将水层再次用乙酸乙酯(60ml)萃取。合并有机层并用水(30ml)和盐水(30ml)洗涤，然后用无水硫酸镁干燥。蒸除溶剂并将残余物用乙酸乙酯/己烷混合物重结晶(5.842g, 71.2%收率), m.p. = 117.5-118°C。Rf = 0.32, 乙酸乙酯-石油醚 3 : 1. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ ppm : 7.4-7.2 (m, 10H), 6.5 (2d, 1H, NH), 5.1 (s, 2H), 4.9 (m, 1H, NH), 4.5 (2d, AB, 2H), 3.8 (m, 2H), 3.5 (m, 2H), 3.1 (m, 2H), 2.4 (m, 2H), 2.4 (m, 2H), 1.6-1.4 (m, 6H), 1.4-1.2 (m, 18H), 0.9 (t, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ ppm : 172.24, 156.49, 138.06, 136.53, 128.46, 128.04, 127.87, 76.76, 71.39, 66.60, 65.44, 51.54, 41.43, 40.65, 33.76, 31.87, 29.61, 29.30, 28.01, 26.47, 25.05, 22.65, 14.09.

7. (2R)-5-氨基-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]戊-1-醇

在三颈烧瓶中，将 150mg 20% 钨/碳加入到(2R)-5-(苄氧羰基氨基)-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]戊-1-醇(3.0g, 5.27mmol)和 6ml 三乙胺的 300ml HPLC-级乙醇溶液中。在真空下排空空气，然后通入氢气。将反应混合物室温搅拌 2 小时，然后通过膜过滤滤除催化剂，将滤液浓缩得到经 TLC 证实为纯净的白色固体，该固体不经进一步的纯化直接用于下一步骤，Rf = 0.2, 二氯己烷-甲醇-三乙胺 5 : 10.5, m.p.= 47-48°C。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz),  $\delta$  ppm : 7.4-7.2 (m, 5H), 6.75 (d, 1H, NH) 4.5 (2d, AB, 2H), 3.9 (m, 2H), 3.5 (m, 2H), 2.3-2.6 (m, 7H), 1.7-1.2 (m, 24H), 0.9 (t, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  ppm : 171.86, 138.13, 128.37, 127.87, 127.75, 76.81, 71.50, 64.57, 51.38, 41.51, 41.17, 33.89, 31.82, 29.26, 28.57, 28.03, 25.07, 22.60, 14.04.

(2R)-5-氨基-2-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]戊-1-醇可以按照相同的反应方案, 通过在实施例 II 的步骤 6 中用(R)-3-十二酰氧基十四烷酸代替(R)-3-苄氧基十四烷酸制得。

### 10 实施例 III

3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰氨基]-癸烷-1,10-二醇 1-磷酸二氢酯。

#### 1. 肽偶联

在实施例 I 中得到的(2RS)-4-(二苄氧基磷酰氧基)-2-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]丁酸(1.0mmol)的 20ml 二氯甲烷溶液中悬浮 363.6mg (1.2mmol) IDQ(1-异丁氧基-2-异丁氧羰基-1,2-二氢喹啉)。搅拌 15 分钟后, 加入 1.0mmol 实施例 II 制得的(2R)-5-氨基-2-[(R)-苄氧基十四酰氨基]戊-1-醇的 10ml 二氯甲烷溶液并将反应混合物搅拌 4 小时。

将反应浓缩并将残余物通过快速色谱纯化( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /丙酮 = 5 : 2, Rf 0.23)。蒸除溶剂得到无色粘稠液体状(0.620g, 52.7%收率)磷酸化的二肽类化合物。Rf = 0.49, 二氯甲烷-甲醇-三乙胺, 10 : 1 : 0.5。  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz),  $\delta$  ppm : 7.40-7.15 (m, 15), 7.00 (m, 1H), 6.90 和 6.80 (2d, 2 种非对映体, 1H), 6.65 (d, 1H) (3 x NH), 5.15 (m, 1H), 4.50 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.41-2.14 (m, 8H), 1.6-1.4 (m, 8H), 1.4-1.1 (m, 54H), 0.9 (t, 9H, 3 $\text{CH}_3$ )。  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  ppm : 173.11, 171.68, 170.52 (2 种非对映体), 169.94 (2 种非对映

体), 150.0 (d,  $J_{PC} = 7.2$  Hz), 138.0 (2种非对映体), 129.58, 127.99, 127.49, 127.26, 125.24, 119.73 (t,  $J_{PC} = 5.0$  Hz), 76.48, 71.12, 70.71, 65.86 (宽自旋), 64.22, 50.96, 49.71 (宽自旋), 41.46, 41.05, 39.07, 34.13, 34.00, 32.70, 31.61, 29.34, 29.06, 28.87, 27.98, 25.25, 24.92, 24.72, 22.38, 13.80.

5        2. 1-(二苯氧基磷酰氧基)-3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰氨基]癸-10-醇

将以上得到的磷酸化的二肽类化合物(488mg, 0.42mmol)和乙酸(1.9ml)的 65ml HPLC-级乙醇溶液加入到三颈圆底烧瓶中并加入 200mg 含 10% Pd 的钯碳。在真空下排空空气, 然后向烧瓶中通入氢气。将反应混合物室温搅拌 2 小时, 然后通过膜过滤滤除催化剂, 真空蒸除溶剂得到粗产物, 收率 92%。将该产物的样品通过快速色谱纯化( $CH_2Cl_2$ /丙酮 5:4,  $R_f = 0.24$ )。得到玻璃状的固体。  $R_f = 0.68$ , 5 : 2 二氯甲烷-甲醇。 ( $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 63 MHz),  $\delta$  ppm (由于存在两种非对映体, 因此观察到了少量双峰形式的信号): 173.60, 173.15, 170.67, 170.60, 170.27, 10  
15 170.07, 150.24 (d), 129.92, 125.66, 120.05, 119.90 (2d), 71.11, 71.05, 68.83; 66.21 (宽自旋), 64.71, 51.38; 50.32, 50.12, 43.25, 43.12, 41.66, 41.57, 39.30, 37.26, 34.45, 32.84, 31.86, 29.62, 29.5, 29.29, 29.13, 28.08, 25.57, 25.19, 24.97, 22.62, 14.03.

20        3. 3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰氨基]癸烷-1,10-二醇 1-磷酸二氢酯

在三颈圆底烧瓶中, 将氧化铂(137mg)用氢气在无水乙醇(5ml)中预先活化 10 分钟。然后加入 1-(二苯氧基磷酰氧基)-3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰氨基]癸-10-醇(411mg, 0.38mmol)的无水乙醇(20ml)溶液。高真空下排空空气, 然后向烧瓶中  
25 通入氢气。将反应混合物室温搅拌 2-3 小时, 通过膜过滤滤除催化剂,

然后真空蒸除溶剂。最后得到白色固体状的粗产物。(粗产物收率: 98%)。Rf=0.50, 氯仿-甲醇-水, 6:4:0.6。

3-[(R)-3-羟基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-癸烷-1,10-二醇 1-磷酸二氢酯可以用 4-(二苄氧基磷酰氧基)-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]丁酸和(2R)-5-氨基-2-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]戊-1-醇作为原料按照同样的反应方案(反应方案 3) (图 35)制得。

或者, 3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰氨基]-癸烷-1,10-二醇 1-磷酸二氢酯可以用天冬氨酸作为原料按照如下反应方案(反应方案 1, 5 和 6) (图 33, 37 和 38)制得: 将(2R)-5-(苄氧羰基氨基)-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]戊-1-醇的游离 OH 功能基用苄氧基甲基保护, 通过氢解将该化合物的 5-氨基功能基游离, 进行该胺与单酯化的 D 或 L-天冬氨酸衍生物的肽偶联, 所述 D 或 L-天冬氨酸衍生物在其氨基功能基上带有保护基或(R)-3-十二酰氧基十四酰基, 用混合酸酐游离和还原末端羧基功能基, 如果需要的话, 脱保护, 然后将从天冬氨酸衍生的胺功能基用(R)-3-十二酰氧基十四烷酸衍生物进行 N-酰基化, 将 C<sub>1</sub> 上的羟基功能基磷酸化, 最后通过氢解将磷酸酯和羟基功能基脱保护。

#### 20 实施例 IV

##### 3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四酰氨基]癸烷-1,10-二醇 1,10-二(磷酸二氢酯)的制备

将 1-(二苄氧基磷酰氧基)-3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]癸-10-醇(985mg, 0.84mmol)与 N,N'-二乙基亚磷酰胺二苄酯(0.58ml, 纯度 85%)在[1H]-四唑(182mg)的存在下在四氢呋喃(35ml)中室温反应 30 分钟。通过加入间氯过苯甲酸(535mg)

的 25ml 二氯甲烷溶液在 0℃ 至 -20℃ 下将亚磷酸酯中间体氧化。20 分钟后，加入  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20ml) 以中和过量的氧化剂，然后将有机层用乙醚稀释。分出有机层，依次用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液(5 x 20ml)、 $\text{NaHCO}_3$  溶液(2 x 20ml) 和盐酸(20ml) 洗涤，用  $\text{MgSO}_4$  干燥然后浓缩。将粗产物通过快速  
5 硅胶色谱纯化( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -丙酮 10 : 3)。将得到的保护的二磷酸化衍生物(900mg, 75% 收率) ( $R_f$  0.64, 5 : 2 二氯甲烷-丙酮) 在 HPLC 级甲醇(1000ml) 中、在 10% 钨碳(300mg) 的存在下室温常压催化氢化 4 小时。通过膜过滤滤除催化剂，然后将滤液减压浓缩，由此得到 10-(二羟基磷酰氧基)-1-(二苄氧基磷酰氧基)-3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧  
10 代-5-氮杂-[(R)-3-羟基十四酰氨基]癸烷粗品( $R_f$  = 0.63, 氯仿-甲醇-水 6 : 4 : 0.6)，收率 89%。然后将该产物用氧化铂(380mg) 在 HPLC 级乙醇(130ml) 中室温常压催化氢化 24 小时。通过膜过滤滤除催化剂，然后将滤液减压浓缩得到游离的二磷酸二氢酯化合物 ( $R_f$  = 0.20, 氯仿-MeOH-水, 6 : 4 : 0.6)。

15 3-[(R)-3-羟基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-癸-1,10-二醇 1,10-二(磷酸二氢酯) 可以从 4-(二苄氧基磷酰氧基)-2-[(R)-苄氧基十四酰氨基]丁酸和(2R)-5-氨基-2-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]戊-1-醇按照相同的反应方案(反应方案 3) (图 35) 制得。

或者，3-[(R)-3-十二酰氧基十四酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基  
20 基十四酰氨基]癸-1,10-二醇 1,10-二(磷酸二氢酯) 可以用天冬氨酸作为原料用如下反应方案制得(反应方案 1、4 和 6)：通过氢解将(2R)-5-(苄氧羰基氨基)-2-[(R)-3-苄氧基十四酰氨基]戊-1-醇的 5-氨基功能基游离，进行该胺与单酯化的 D 或 L-天冬氨酸衍生物的肽偶联，所述 D 或 L-天冬氨酸衍生物在其氨基功能基上带有保护基或(R)-3-十二酰氧基十四酰  
25 基，用混合酸酐游离和还原末端羧基功能基，如果需要的话，脱保护，然后将从天冬氨酸衍生的胺功能基用(R)-3-十二酰氧基十四烷酸衍

生物进行 N-酰基化, 将 C<sub>1</sub> 和 C<sub>10</sub> 上的羟基功能基磷酸化, 最后通过氢解将磷酸酯和羟基功能基脱保护。

#### 实施例 V-本发明化合物的纯化和分析

##### 5        1. 一磷酸化和二磷酸化化合物的纯化

将一磷酸化和二磷酸化的合成产物溶于水-异丙醇混合物(1:1 vol./vol.), 用 0.1% 三乙胺将 pH 调至 8 到 9。随后加入所需量的 2M 碳酸氢铵达到 25mM 的浓度。

通过制备型反相 HPLC 在如下条件下进行纯化:

10       柱: Bondapack C18 Prep Pak, 40 x 200 mm, 15-20  $\mu$ m, 300 Å, Waters

流动相:

A: 异丙醇-水(1:1, vol./vol.), 50 mM 碳酸氢铵

B: 异丙醇-水(2:8, vol./vol.), 50 mM 碳酸氢铵

流速: 40ml/分钟

15       洗脱: 恒溶剂成分吸附在柱上: 40% B (60% A), 10 分钟。

A: B 梯度: 10 分钟内 40-80% B

恒溶剂成分洗脱: 80% B, 30 分钟

洗涤步骤: 100% B, 10 分钟

检测: UV, 210nm (波长)

20       在上述洗脱条件下, 一磷酸化化合物的保留时间从 25 到 30 分钟, 而二磷酸化化合物的保留时间从 18 至 25 分钟。如果观察到有一苯基产物存在(在最后的脱苯基化过程中脱保护不完全), 则需要更好的纯化步骤。该纯化按照如下条件进行:

柱: Kromasil C18, 21 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å, Macherey-Nagel

25       流动相:

A: 异丙醇-水(1:1-v/v), 50 mM 碳酸氢铵

B : 异丙醇-水(2 :8, v/v), 50 mM 碳酸氢铵

流速 : 10ml/分钟

洗脱 : 恒溶剂成分吸附在柱上: 40% B (60% A), 10 分钟

恒溶剂成分洗脱 :

5 一磷酸化的化合物 : 80% B, 30 分钟

二磷酸化的化合物 : 74% B, 30 分钟

洗涤步骤 : 100% B, 10 分钟

检测: UV; 210 和 254 nm (波长)

收集含有铵盐形式的一磷酸化或二磷酸化化合物的馏份然后浓缩  
10 吸附到 C18 相 Bondapack, 15-20  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$  上, Waters。通过用 10g/l  
NaCl 的水-异丙醇(9:1, v :v)溶液洗涤得到一磷酸化或二磷酸化化合物的  
钠盐。在流过柱子 5 倍体积的水-异丙醇混合物(9 :1, v/v)除去过量的氯  
化钠后, 将化合物用纯净的异丙醇洗脱。然后在 Rotavapor 上蒸除溶剂  
至干。最后用所需体积的水进行溶解(对于一磷酸化的化合物, 加入  
15 0.1%的三乙醇胺)以达到 2mg/ml 的目标浓度。然后在 0.2 $\mu\text{m}$  滤纸  
(Express Membrane, Millipore (如果体积小于 50ml : 建议采用 Steriflip 系  
统, 如果体积大于 50ml : 建议采用 Steritop 系统))上进行无菌过滤。

在处理一磷酸化的化合物时, 最好在无菌过滤前将溶液在室温  
下超声处理(3 x 10 秒)。

## 20 2. 纯化的监测和收率

在每一步骤结束后, 通过反相分析 HPLC 色谱按照如下条件对馏  
份进行分析:

柱: Supelcosil C18, 3  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm, 100  $\text{\AA}$ , Supelco

流动相 :

25 A : 水: 乙腈(1 : 1, v/v), 5 mM TBAP

B : 水-异丙醇 (1 : 9, v/v) 5 mM TBAP

TBAP : 四丁基磷酸铵

流速 : 1ml/分钟

洗脱 : A : B 梯度(75 : 25-0 : 100), 37.5 分钟内

检测 : UV, 210 和 254 nm (波长)

- 5 当按照上述条件机械能色谱分离时, 对一-和二磷酸化的化合物观察到的保留时间分别为  $25.5 \pm 0.5$  和  $20.8 \pm 0.5$  分钟。对于一磷酸化的化合物, 纯化的收率为 57 至 94%, 对于二磷酸化的化合物为 71 至 92%。分别达到 311mg 和 189mg 一-和二磷酸化的化合物。

### 3. 最终产物的检测和纯度水平分析

- 10 所得产物的定量检测和纯度水平分析通过 HPLC/UV 按照前述的色谱操作条件进行。根据所述检测, 对不同批次的一-和二磷酸化化合物测得的纯度水平为 99 至 100%。为了证实 UV 范围内的无活性杂质的存在, 进行 LC/ES-MS 分析(电子喷雾解离, 正性模式)。对于后者, 将(5mM)四丁基磷酸铵用(25mM)乙酸铵代替以满足解离和电子喷雾界  
15 面的需要。

- 采用其它测定方法来对最终的溶液进行检测。例如, 对总磷酸根的定量分析(改编自 Ames, B.N., 《酶学方法》(Methods in Enzymology) VII (1966), 115-117)、对氨基酸的定量分析(改编自 Hughes 等, 《色谱杂志》(J. Chromatography), 389 : (1987), 327-333)以及对酰基链的定量  
20 分析(改编自 Miller, L.T., Hewlett Packard Application Note (1984), 228-237)。

### 4. 光谱学分析

#### 4.1. 质谱法

- 用三种类型的质谱仪绘制一-和二磷酸化化合物的 ES-MS 波谱(负  
25 性和正性模式)。 (Finnigan LCQ, 离子阱; Micromass Quattro II, 三相四极;



Hewlett-Packard MSD, 单一四极)。还进行了互补 MS/MS 分析。表明所述产物的身份和纯度的波谱包括在附图中。

#### ES-MS 波谱(正性模式)

##### 二磷酸化的化合物:

5 (Micromass Quattro II : 波谱 1; HP-MSD : 波谱 3) (图 39 & 41)

在低能量水平下, 在  $m/z$  比为 1014.6 观察到了主要的假分子离子  $[M+H]^+$ 。还可以在  $m/z$  比为 1036.6 $[M+Na]^+$ 、1058.6 $[M-H+2Na]^+$  和 1080.5 $[M-2H+3Na]^+$  观察到钠加合物。

10 根据碎裂的程度, 观察到了两个 916.5 $[M-98+H]^+$  和 818.6 $[M-98-H]^+$   $m/z$  碎片, 这表明在分子中存在两个磷酸基。如波谱 3(图 41)所示, 所观察到的离子的相对强度随着所用能量的范围有很大变化。

##### 一磷酸化的化合物:

(Micromass Quattro II : 波谱 2) (图 40)

15 由于在分析溶液中存在三乙醇胺 (TEoA), 因此对一磷酸化的化合物得到了略微不同的解离图谱。在  $m/z$  比为 934.4 $[M+H]^+$  观察到了主要的假分子离子, 并且在  $m/z$  比为 956.3 和 972.3 分别观察到了钠加合物  $[M+H]^+$  和钾加合物  $[M+K]^+$ 。还可以在  $m/z$  比为 1083.4 $[M+TEA+H]^+$ 、 $m/z$  比为 1105.3 $[M+TeOH+Na]$  和  $m/z$  比为 1121.3 $[M+TeOH+K]^+$  看到第二组加合物。在高能量水平下检测到的  $m/z$  比为 836.4  $[M-98+H]^+$  的碎  
20 片证实了在分子内存在磷酸基。

#### ES-MS 波谱(负性模式)

在负性 ES-MS 波谱中观察到的一-和二磷酸化化合物的离子种类与在正性模式中得到的结果完全一致。

25 还进行了 FAB 解离分析(正性模式)。在低分辨率水平下, 一-和二磷酸化的化合物分别在 956.5 和 1036.5  $m/z$  比显示钠加合物  $[M+Na]^+$ 。

在高分辨率水平下(3-硝基苄醇基质), 对一磷酸酯化合物在  $m/z$  比为 956.667 观察到峰, 其对应于预期的分子式:  $C_{49}H_{69}O_{11}N_3PNa$  (预期质量: 956.668 amu).

对于二磷酸酯化合物, 在  $m/z$  比为 1036.635 观察到了峰, 其对应于预期的分子式  $C_{49}H_{97}O_{14}N_3P_2Na$  (质量的计算值: 1036.634 amu).

所有 MS 分析均证实了所得产物的高纯度。

#### 4.2 核磁共振

一-和二磷酸化化合物的  $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR 波谱用 DPX Bruker 型仪器(分别在 250.13 和 62.89 MHz 下操作)和 Varian Unity Inova 系统(分别在 500-499.87 和 125.7MHz 下操作)测得。  $^{31}P$ -RMN 波谱在 121.6mHz(DPX Bruker)下记录。证实这些产物身份和纯度的波谱包括在附图中。

##### $^1H$ -NMR 波谱(图谱 4 & 5) (图 42 & 43)

一-磷酸化的化合物: 在于  $CDCl_3 + 0.1\%$  三乙醇胺 (TEoA) 中记录的波谱(波谱 A)上, 在 7 和 9.5 ppm 之间观察到了与氮原子 N(5)、N(2a) 和 N(2b) 所携带的三个质子相对应的信号(参见放大的图谱窗口)。归属于 H-N(2a) 和 H-N(2b) 的信号以两个二重峰的形式出现, 这表明存在立体异构体的混合物。观察到其中的一种非对映体异构体占多数(由于不同的纯化步骤所引起的)。

二-磷酸化的化合物: 在于  $CDCl_3$ - $CD_3OD$  (3 : 1, v/v) 中记录的波谱(波谱 5)上, 由于在  $CD_3OD$  存在下的物质交换而无法看到对应于 H-N(5)、H-N(2a) 和 H-N(2b) 的信号。

关于不同信号归属的其它信息来自同核及异核相关实验( $^1H$ - $^1H$ -NMR : COSY,  $^1H$ - $^{13}C$ -NMR : HSQC & HMBC)。

$^{13}C$ -NMR 波谱(图谱 6 & 7) (图 44 & 45)

由于一-和二磷酸化化合物的溶解度非常低，记录  $^{13}\text{C}$ -NMR 波谱是非常困难的。

$^{31}\text{P}$ -NMR 波谱(图谱 8 & 9) (图 46 & 47)

对于一-和二磷酸化的化合物，均观察到了单峰。

5

## 实施例 V-本发明化合物的药理学研究

### 1. 通过鲎产色试验测定内毒性

通过产色的鲎变形细胞溶解物试验(Charles River Endosafe 的产色 LAL, 批号# EK412 E, Charleston, USA)。该试验是基于脂多糖(LPS)或结构类似的产物对 LAL 中存在的酶促级联反应的激活。该酶促激活通过在该酶促级联反应的最后阶段与肽连接的色原在蛋白酶的作用下裂解来证实，参见如下反应方案：

10



表(a) 鲎变形细胞溶解物(LAL)的激活

产物	LAL 活性, EU/mg	LPS 等同物的 LAL 活性 ng eq. LPS/mg
OM-294-DP	56 ± 48	6.2
OM-294-MP	13±2	1.4
大肠杆菌 LPS (对照)	7.7 ± 1.6 X 10 <sup>6</sup>	0.85 x 10 <sup>6</sup>

在 LAL 试验中, 本发明化合物的活性比 LPS 低 10<sup>6</sup> 倍。因此, 考  
5 虑到它们介导生物学活性和作为免疫调节剂(体内及体外)的能力, OM-  
294-DP 和 OM-294-MP 因其毒性低而是特别令人感兴趣的产物。

## 2. 由 LPS 刺激或本发明的化合物引起的小鼠骨髓干细胞增殖的测定

### 方法

10 将两只六周大的雄性 C57/BL6 小鼠通过吸入 CO<sub>2</sub> 然后进行颈部  
脱位处死。将小鼠用乙醇洗涤, 然后彻底除去背部的皮肤。通过关节  
分离除去髌骨、股骨和胫骨。用解剖刀粗略地除去肉。将骨清洗并将  
骨的末端用剪刀切开。通过注射三次 1ml Dulbecco's 改良 Eagle 培养液  
(DH 培养液)从用剪刀切开的末端将骨髓从骨腔中取出。将细胞悬浮在  
15 DH 培养液中然后以 300 x g 离心 5 分钟。弃除上清液并将干细胞悬浮  
在添加了 20%胎牛血清(FCS)的 DH 培养液中。将细胞浓度调至 500  
000 细胞/ml。

将预先溶于添加有 FCS、氨基酸和抗生素的 DH 培养液中的产物直接在 96-孔微滴定板中进行系列稀释。用稀释因子 3.16 进行 9 次稀释。用 6 个系列测试产物，每个微滴定板包括一个含空白培养基的阴性对照。每孔中的终体积是 100 $\mu$ l。将微滴定板在 8% CO<sub>2</sub>-100% RH 的保温箱中于 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时以缓冲培养基。1 小时后，将 100 $\mu$ l 细胞悬浮液加入到产物中并继续保温 7 天。

通过测量活细胞线粒体中产色底物(XTT)的氧化来确定增殖。

7 天后，将微滴定板以 400  $\times$  g 离心 5 分钟，抽出 100 $\mu$ l 上清液然后弃除。向各孔中加入 50 $\mu$ l 1mg/ml XTT 3-[1-苯基氨基-羧基)-3,4-四唑]-二[(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸]钠和 0.008mg/ml PMS ((N-甲基二苯并吡嗪，硫酸甲酯)在 RPMI 培养液中的溶液。在 8% CO<sub>2</sub>、100% RH 下在保温箱中于 37 $^{\circ}$ C 保温 8 小时后，将微滴定板用分光光度计在 480nm 下测定，对标准物在 690nm 下测定。

通过绘制剂量响应曲线将结果用平均值( $\pm$ 标准偏差)表示。将由 DH 培养基组成的阴性对照的数值(所有实验数据的平均值 $\pm$ 标准偏差)也用图表表示。

在该实验中，本发明的化合物可以明显诱导小鼠骨髓干细胞的细胞增殖。该响应的程度几乎与大肠杆菌 LPS 所诱导的相同，但仅需较小的浓度就可以引起较高的响应。一磷酸化的产物可以诱导比二磷酸化的产物更为温和的响应。图 1 描述了来自一套三组彼此独立地在不同细胞制备物上进行的研究的代表性实验。

### 3. 测定在巨噬细胞培养物上清液中一氧化氮的产生

#### 方法

将两只六周大的雄性 C57/BL6 小鼠通过吸入 CO<sub>2</sub> 然后进行颈部脱位处死。将小鼠用乙醇洗涤，然后彻底除去背部的皮肤。通过关节分离除去髌骨、股骨和胫骨。用解剖刀粗略地除去肉。将骨清洗并将

骨的末端用剪刀切开。通过注射三次 1ml Dulbecco's 改良 Eagle 培养液 (DH 培养液) 从用剪刀切开的末端将骨髓从骨腔中取出。将细胞悬浮在 DH 培养液中然后以 300 x g 离心 5 分钟。弃除上清液并将细胞以 40000 细胞/ml 的密度重新悬浮在添加了 20% 马血清(HS)和 30% L929 培养物上清液的 DH 培养液中。L929 是一种鼠成纤维细胞系, 其上清液富含巨噬细胞生长因子(M-CSF)。将细胞悬浮液在培替氏培养皿中分成 12ml 的等份液, 然后在 8% CO<sub>2</sub> 和 100% RH 下在 37℃ 的保温箱中保温 8 天。8 天后, 干细胞分化成为成熟的巨噬细胞。通过在 4℃ 下在冰冷的 PBS 缓冲液中保温 45 分钟刮掉巨噬细胞。离心并除去上清液后, 将细胞重新悬浮在添加有 5% 胎牛血清(FCS)、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、叶酸、巯基乙醇和抗生素(青霉素和链霉素)的 DH 培养液中。收集干细胞并将细胞密度调至 700000 细胞/ml。

将预先溶于添加有 FCS、氨基酸和抗生素的 DH 培养液中的产物直接在 96-孔微滴定板中进行系列稀释。根据所处理的产物, 用稀释因子 3.16 进行 9 至 10 次稀释。将产物一式三份地进行测试, 每个微滴定板包括一个含空白培养基的阴性对照。每孔中的终体积为 100μl。将微滴定板在 8% CO<sub>2</sub> 和 100% RH 下在 37℃ 的保温箱中保温 1 小时以缓冲培养基。1 小时后, 将 100μl 细胞悬浮液加入到产物中并继续保温 22 小时。

22 小时后, 将微滴定板以 400 x g 离心 5 分钟, 抽出 100μl 上清液转移到微滴定板中。向各孔中加入 Griess 试剂[5mg/ml 磺胺 + 0.5mg/ml N-(1-萘基乙二胺)盐酸盐在 2.5% 磷酸水溶液中的溶液]。将微滴定板用分光光度计在 562nm 波长下测定, 参照物在 690nm 下测定。亚硝酸盐的浓度与一氧化氮的含量成比例。根据标准曲线测定亚硝酸盐的含量, 该曲线在 1 至 25μM 的范围内成线性相关。

在扣除阴性对照值后将结果用平均值±标准偏差表示并以剂量响应曲线绘图。

在该实验中，本发明的化合物以与剂量响应曲线一致的方式诱导鼠巨噬细胞产生一氧化氮。二磷酸化产物诱导的增殖远远高于大肠杆菌 LPS，但诱导显著响应所需的浓度较高。一磷酸化产物引起的响应比二磷酸化产物和大肠杆菌 LPS 弱。图 2 描述了来自一套三组彼此独立地在不同细胞制备物上进行的测量的代表性实验。

#### 4. 确定本发明化合物引发人肺泡巨噬细胞生产 $\alpha$ -TNF 的能力 方法

10 肺泡巨噬细胞的制备：通过洗涤来自肺癌患者的肺支气管肺泡 (BAL) 得到人肺泡巨噬细胞。在涉及肺叶健康部分的肺组织手术后，立即完成 BAL。用 50 ml 注射器用 0.8% NaCl 完成 BAL。回收的细胞中 85% 以上为巨噬细胞，其他细胞中的大部分是淋巴细胞。离心后，将细胞悬浮在 RPMI 培养基中，然后通过(研究级) Ficoll Pack 离心除去红  
15 细胞。将巨噬细胞用 HBSS 洗涤 3 次，然后以 1 ml/孔含 1000000 个细胞接种到 24-孔微滴定板中。在 37°C 保温 1 小时后，所得的巨噬细胞粘附，用 1 ml HBSS 将孔洗涤 3 次以除去未粘附的细胞。洗涤步骤后，将 1 ml RPMI 加到含巨噬细胞的各孔中。

与  $\alpha$ -TNF 产物保温并检测：在存在 0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml 和 10  
20  $\mu$ g/ml 下列产物的条件下，将肺泡巨噬细胞在 5%CO<sub>2</sub> 下于 37°C 保温：

- 阴性对照：RPMI
- 阳性对照：大肠杆菌 LPS (血清型 O5 : B5 , Difco, Detroit, U.S.A.)
- 单磷酸化的本发明化合物(OM-294-MP)
- 二磷酸化的本发明化合物(OM-294-DP)

25 24 小时后，回收培养上清液，然后分析灵敏度为 1 pg/ml 的  $\alpha$  TNF 含量(BioSource Cytoscreen Kit, Camarillo, CA, U.S.A.)。



### 结果

在从 10  $\mu\text{g/ml}$  这样低的浓度, 单磷酸化和二磷酸化的本发明衍生物可诱导中等程度地生产  $\alpha$  TNF。单磷酸化的本发明衍生物比二磷酸化衍生物能诱导更高层次的  $\alpha$  TNF 生产。在所检测的 3 个浓度, LPS 阳性对照均可诱导  $\alpha$  TNF 大量生产。

结果列于表(a)中

表 (a) 在人肺泡巨噬细胞中通过 OM-294-MP 和 OM-294-DP 诱导  $\alpha$  TNF 生产

10

产物	$\alpha$ TNF [pg/ml]			
	平均值 $\pm$ 3 个独立实验的标准偏差			
	0 $\mu\text{g/ml}$	0.1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
阴性对照: RPMI	195 $\pm$ 70			
阳性对照: 大肠杆菌 LPS		7667 $\pm$ 115	9858 $\pm$ 214 8	10390 $\pm$ 341 5
OM-294-MP-1		246 $\pm$ 38	353 $\pm$ 75	1049 $\pm$ 295
OM-294-MP-2		205 $\pm$ 62	291 $\pm$ 70	1124 $\pm$ 406
OM-294-DP-1		156 $\pm$ 66	117 $\pm$ 85	329 $\pm$ 141
OM-294-DP-2		171 $\pm$ 79	88 $\pm$ 61	

### 5. 在人肺泡巨噬细胞中确定本发明化合物对于抑制应答大肠杆菌脂多糖(LPS)的 $\alpha$ TNF 生产

#### 方法

肺泡巨噬细胞的制备: 通过洗涤来自肺癌患者的肺支气管肺泡 (BAL) 得到人肺泡巨噬细胞。在涉及肺叶健康部分的肺组织手术后, 立即完成 BAL。用 50 ml 注射器用 0.8% NaCl 完成 BAL。回收的细胞中 85% 以上为巨噬细胞, 其他细胞中的大部分是淋巴细胞。离心后, 将细胞悬浮在 RPMI 培养基中, 然后通过(研究级) Ficoll Pack 离心除去红细胞。将巨噬细胞用 HBSS 洗涤 3 次, 然后以 1 ml/孔含 1000000 个细胞接种到 24-孔微滴定板中。在 37°C 保温 1 小时后, 所得的巨噬细胞粘附, 用 1 ml HBSS 将孔洗涤 3 次以除去未粘附的细胞。洗涤步骤后, 将 1 ml RPMI 加到含巨噬细胞的各孔中。

10 与 $\alpha$ -TNF 产物保温并检测: 在存在 0.1  $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml 和 10  $\mu$ g/ml 下列产物的条件下, 将肺泡巨噬细胞在 5%CO<sub>2</sub> 下于 37°C 保温:

- 阴性对照: RPMI
- 单磷酸化的本发明化合物 (OM-294-MP)
- 二磷酸化的本发明化合物(OM-294-DP)

15 24 小时后回收培养上清液并分析灵敏度为 1 pg/ml 的 $\alpha$  TNF 含量 (BioSource Cytoscreen Kit, Camarillo, CA, U.S.A)。

### 结果

二磷酸化衍生物在相对大的程度上抑制正常由 LPS 诱导的 $\alpha$ TNF 生产。单磷酸化的衍生物部分抑制由 LPS 诱导的 $\alpha$  TNF 生产。

20 结果列于表 (a) 中

25

表 (a) 在人肺泡巨噬细胞中 OM-294-MP 和 OM-294-DP 对 LPS-诱导的  $\alpha$ -TNF 生产的抑制作用

产物	$\alpha$ TNF [pg/ml]	% 抑制作用
RPMI (阴性对照)	73	-
大肠杆菌 LPS (10 $\mu$ g/ml) (阳性对照)	8470	0
OM-294-MP-1 (10 $\mu$ g/ml) +大肠杆菌 LPS (1 $\mu$ g/ml)	4577	44
OM-294-MP-2 (10 $\mu$ g/ml) +大肠杆菌 LPS (1 $\mu$ g/ml)	4789	41
OM-294-DP-1 (10 $\mu$ g/ml) +大肠杆菌 LPS (1 $\mu$ g/ml)	1267	84
OM-294-DP-2 (10 $\mu$ g/ml) +大肠杆菌 LPS (1 $\mu$ g/ml)	1280	84

#### 5 6. OM-294-MP 和 OM-294-DP 产物对树状细胞成熟的影响

评估 OM-294-MP 和 OM-294-DP 产物诱导前树状细胞成熟为树状细胞的能力。测量下列参数: CD40, CD80, CD83, CD86 表面标记物的 FITC-葡聚糖结合物掺入和表达。

##### 方法

10 细胞: 从 6 名健康供体的血沉棕黄层分离外周血的单核细胞。在供血前供体未经过任何治疗。

细胞的制备: 将通过粘附筛选纯化的单核细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度重悬在含 10% 胎牛血清、GM-CSF (10 ng/ml; IM-HGMI, Immungenex Corp., Los Angeles, CA, U.S.A.) 和 IL-4 (10 ng/ml; No 204-

IL, R&D System, Minneapolis, MN, USA)的 RPMI-1640 培养基 (Sigma-Aldrich : St.-Louis, MO, U.S.A) 中, 然后分到直径为 10 cm 平皿(P10, Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK) ( $10 \times 10^6$  细胞/平皿 P10)中, 培养 6 天 (3 天后更换成新鲜的培养基)。这些细胞称为前树状细胞(DC-5 6)。通过将细胞与以下文产物节中的浓度的 OM-294-MP, OM-294-DP 或 LPS 培养 3 天使前树状细胞成熟为成熟的树状细胞。在第 9 天, 收集细胞(DC-9)然后分析树状细胞成熟的不同指标: 评估 CD40, CD80, CD83, CD86 表面标记以及其吸收 FITC-葡聚糖结合物的能力。用 EPICS-XL-MCL 型 FACS (Coulter Immunology, Hialeah, Finland)分析这 10 些参数。

Lanzavecchia 等, *J. Exp. Med.*, 179 (1994) 1109; Lanzavecchia 等., *J. Exp. Med.*, 182 (1995) 389.

数据分析: 将表面标记的表达表示为 LPS 刺激的细胞平均荧光 (阳性对照)的百分比; 根据在基础培养基中保持的细胞的吸收率来计算 15 FITC-葡聚糖结合物的吸收并以%表示。t-检测包括将从不同实验得到的数据与阳性对照的数据进行比较。数据显著水平设为  $p < 0.05$ 。

产物: 用 0.9% NaCl/水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-MP 和 OM-294-DP 储备液, 在 OM-294-MP 的情况下还加入 0.1% 三乙胺。将溶液在 37°保温 20 分钟, 剧烈振荡 3 分钟, 然后在 RPMI-1640 培养基 20 中稀释为 100  $\mu\text{g/ml}$ , 然后以 10 mg/ml (附图 3, 6, 7, 8)或者 0.02 - 25  $\mu\text{g/ml}$  (附图 4, 5)的浓度使用。

参考产物: 大肠杆菌脂多糖 (LPS, DIFCO, Detroit, MI, USA), 作为在 PBS 中的 5 mg/ml 储备液。用 RPMI 1640 培养基制备中间的 100  $\mu\text{g/ml}$  溶液。检测的浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$  (附图 3, 6, 7, 8) 或 0.02 - 10  $\mu\text{g/ml}$  25 (附图 4, 5)。

## 结果

通过 GM-CSF 和 IL-4 的连接作用, 从单核细胞分化产生的不成熟树状细胞能够掺入 FITC-葡聚糖结合物。在成熟过程中, 细胞丧失了掺入 FITC-葡聚糖结合物的能力。在 DC-9 分化阶段完成分析。

将结果表示为在非刺激细胞(基础培养基图 3 中观察到的)掺入 FITC-葡聚糖结合物的 %。用 LPS 或 OM-294-MP 处理的细胞分别仅保留 10% 和 19% 噬吞细胞的能力, 而用 OM-294-DP 刺激的细胞全部保留了其掺入 FITC-葡聚糖结合物的能力 (98 和 99%)。剂量对反应曲线表明在 0.02 %g - 25  $\mu$ g/ml, OM-294-MP 有显著的诱导 DC-6 分化成 DC-9 细胞的能力, 参见低浓度的附图(4)和已检测较高浓度的附图 (5)。

共刺激的表面标记的表达是评估 DC 成熟的另一指标。检测 CD40, CD80, CD83, CD86 的表达。将结果表示为基于以 LPS - 诱导的这些标记之表达的平均荧光的 %。

OM-294-MP 提高了所有被检测表面标记的表达: CD40(39%), CD80 (62%), CD83 (60%), CD86 (77%) 参见附图 (6, 7, 8, 9)。

OM-294-DP 对所研究标记的表达的影响与基本培养基的相同。所述影响不超过 LPS 作用的 20%。

### 7. 在 DC - 6 阶段 OM-294-MP 和 OM-294-DP 产物对单核细胞和前树状细胞的 $\alpha$ TNF 和 IL-12 p70 生产的影响

在 4 小时、6 小时和 24 小时的过程中, 用 LPS (10  $\mu$ g/ml) 或 by OM-294-MP (10  $\mu$ g/ml) 或 OM-294-DP (10  $\mu$ g/ml) 刺激 DC-6 细胞 ( $5 \times 10^5$ /500  $\mu$ l 培养基)。

#### 方法

体内实验条件: 从 6 名健康供体(在供血前供体未经任何治疗)的血沉棕黄层回收外周血的单核细胞。用 Ficoll 梯度分离单核细胞, 然后通过粘附筛选纯化。回收粘附不紧的单核细胞, 将一部分细胞作

为单核细胞贮存。将纯化的单核细胞以  $1 \times 10^6$  细胞/ml 重悬在含 10% FCS 的 RPMI -1640 培养基中，然后以  $10 \times 10^6$  细胞/P10 型平皿分到直径为 10 cm 的平皿(P10 - Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK)中。将细胞在含 GM-CSF (10 ng/ml) 和 IL-4 (10 ng/ml)的全 RPMI 1640 培养基  
5 培养 6 天。在第 6 天，收集细胞，用 HBSS 洗涤，然后以  $5 \times 10^5$  细胞/孔的密度接种到 500  $\mu$ l 全 RPMI 培养基中，然后用 LPS (10  $\mu$ g/ml), OM-294-MP (10  $\mu$ g/ml) 或 OM-294-DP (10  $\mu$ g/ml)刺激。在 4、6 和 24 小时后回收的培养上清液中用 ELISA 检测  $\alpha$  TNF 及 IL-12 p70。

产物：将 OM-294-MP 和 OM-294-DP 产物(在无菌水中的 1  
10 mg/ml 储备液)在 37 $^{\circ}$ C 培养 20 分钟，在 3 分钟内剧烈振荡，然后稀释到 100 mg/ml，以在 RPMI 1640 培养基中 10  $\mu$ g/ml 的终浓度使用。

参考产物：大肠杆菌脂多糖(LPS, DIFCO, Detroit, MI, USA), 在 PBS 中的 5 mg/ml 储备液，在培养基中的中间溶液：100  $\mu$ g/ml，以 10  $\mu$ g/ml 的终浓度使用。

$\alpha$  TNF 和 IL-12 p70 的检测：按照制造商的说明手册使用来自  
15 Biosource 的  $\alpha$  TNF KHC3012 试剂盒, # PP003-J061703 批 (Biosource International, Camarillo, CA, USA) ELISA。用人 IL-12 kit (No. D1200, 批次 990 6232, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)通过 ELISA 检测培养上清液中的 IL-12 p70。

## 20 结果

### $\alpha$ TNF

就时程生产率和  $\alpha$  TNF 浓度而言，OM-294-MP 与 LPS 相似的方式刺激 DC-6 细胞的  $\alpha$  TNF 生产。(图 10)。在 6 小时与 24 小时之间两种产物均有  $\alpha$  TNF 峰。

25 OM-294-DP 对 DC-6 细胞的  $\alpha$  TNF 生产仅有很微弱的刺激作用。

IL-12 p70

一般来说, 存在 $\gamma$  IFN (LPS +  $\gamma$  INF, OM-294-MP +  $\gamma$  IFN) 的条件下, 在单核细胞((图 (12)) 和 DC-6 细胞((图 11))中可诱导 IL-12.

5 8. 用 *Plasmodium berghei* 环孢子表面蛋白的 C 末端区的合成肽(Pb CS His<sub>6</sub>- 242 - 310)在鼠免疫模型中评估 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂特性

方法

抗原: Pb CS (HHHHHHGGMN NKNNNNDDSY

IPSAEKILEFVKQIRDSITE EWSQCNVTCG SGIRVRKRKRKG

10 SNKKAEDLTL EDIDTEI) 肽, 下文称作 His<sub>6</sub>-242-310, 对应于 *Plasmodium berghei* 环孢子表面蛋白的 242-310 氨基酸序列加 N 末端的 6 个组氨酸, 2 个甘氨酸和用 Merrifield 和 Atherton 合成方法 (Athenon 等, Bioorg Chem., 8: (1979) 350 - 351)得到的一个甲硫氨酸残基。在具有 0.4 mmol/g 取代率的对烷氧基苄醇树脂(Wang resin) 上制备  
15 所述多肽。使用 10 倍摩尔过量的 F-moc 氨基酸衍生物, 偶连时间为 30 分钟。依次通过大小排阻色谱(Sephadex G25, Pharmacia, Sweden)、反相色谱(W-Porex 5 C-4, 250 x 10 mm, Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A) 用 10-50% 乙腈-0.1% 三氟乙酸混合物(v/v)的 40 分钟的梯度, 以 3 ml/分钟流速纯化所述肽。按照 Knecht 和 Chang (*Anal. Chem.*, 58 (1986)  
20 2373-2379)的方法确定所述肽的氨基酸组成, 用 Voyager DE 型仪器 (Perspective Biosystem, Framingham, MA, USA)检测分子量。用 pH 8.0 的 0.9% NaCl/水制备浓度为 0.4 mg/ml 的抗原储备液。

佐剂: 用 0.9% NaCl-水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-DP 和 OM-294-MP 的储备液, 在 OM-294-MP 中掺入 0.1%三乙胺。阳性对照  
25 由不完全弗氏佐剂(IFA from Difco, Detroit, MI, USA)组成, 而阴性对照是 0.9% NaCl 溶液。

抗原 - 佐剂混合物：将 1 体积抗原和 1 体积佐剂通过旋转 3 分钟混合。

免疫接种方案：给 6-周龄的雌性 BALB/c 小鼠(每组 6 只小鼠)免疫接种 3 次，在尾末端皮下注射 0.1 下列混合物：

组	佐剂 0.05 mg/注射	抗原 0.02 mg/注射	小鼠数
1	-	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
2	IFA	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
3	OM-294-MP	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
4	OM-294-DP	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
5	OM-294-MP	-	6
6	OM-294-DP	-	6

5

免疫接种和取样方案：

周	0	3	4	7	9
免疫接种	↑	↑		↑	
抗体特异性反应	↑	↑		↑	↑
CTL 反应			↑		↑

淋巴样器官和血液取样：

10 血清取样：在 0, 3, 7 和 9 周完成取血样。将血液在 37℃ 放置 6 分钟，然后在 4℃ 保持过夜。随后将血清冷冻直至用于抗体检测。

腹股沟淋巴结和脾的回收：分别在 4 或 9 周将每组动物中的一部分杀死。取出腹股沟淋巴结和脾。

抗-Pb CS His<sub>6</sub> 242-310 抗体滴度的确定：



用 ELISA 检测特异性针对 Pb Cs His<sub>6</sub> 242-310 抗原的抗体。在 96 孔微滴定板(Maxisorp F96, Nunc, DK)中, 在 4℃ 的湿润室中保温过夜, 完成抗原的结合, 每孔含有 0.1 ml 含 0.001 mg/ml Pb CS His<sub>6</sub> 242-310 抗原的 PBS。用含 1% of 牛血清白蛋白(BSA, Fluka, Switzerland)的 PBS 完成微滴定板的阻断。用含 0.05% 吐温 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA)的 PBS 洗涤平板。将在 0, 3, 7 和 9 周收集的血清样品用稀释缓冲液(含 2.5% 脱脂奶粉和 0.05% 吐温 20 的 PBS)系列稀释, 然后转移到微滴定板中, 在室温(RT)放置 1 小时。然后用 PBS 洗涤平板, 然后将含有与碱性磷酸酶(Sigma, St. Louis, MO, USA)偶连的小鼠多克隆抗免疫球蛋白的稀释溶液加到各平板中, 然后在 RT 保温 1 小时。将平板用 PBS 洗涤, 加入碱性磷酸酶底物对硝基苯磷酸(Sigma, St. Louis, MO, USA)的颜色反应显示特异性抗体。用微滴定板阅读器(Dynatech 25000 ELISA 阅读器, Ashford, Middlesex, UK)读出在 405nm 的吸收值, 每个血清样品测量两次。结果是与各组中的小鼠有关的所有测量值的平均值。通过给出显著阳性反应的最高稀释度得到抗体滴度, 即大于本底噪音水平 $\pm 3$  SD 的 OD。

#### ELISPOT 检测:

通过在 4℃ 湿润室中保温过夜结合鼠 $\gamma$ -干扰素(O1E703B2)特异性的抗体, 将 50  $\mu$ g/ml 抗体溶液加到 ELISPOT 微滴定板中, 用硝酸纤维素(Millipore, Molsheim, France)覆盖孔底。通过加入含 10% of 胎牛血清(FCS, Fakola, Switzerland)的 DMEM 培养基 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 然后在 37℃ 放置 2 小时完成阻断步骤。将来自淋巴样器官(腹股沟淋巴结和脾)的细胞以 200000 细胞/孔的密度在微滴定板中培养, 然后在 37℃ 与用或未用短肽攻击的 Pb CS 245-252100 000 P815 细胞培养 24 小时。培养后, 取出细胞, 洗涤步骤后, 加入第二鼠抗- $\gamma$  IFN 抗体-生物素复合物(ANI, 在含 1% BSA 的 PBS 中, 2

5  $\mu\text{g/ml}$ ), 然后培养 2 小时。加入链霉抗生物素 - 碱性磷酸酶结合物 (Boehringer Mannheim, Mannheim, GFR) 然后在 37°C 保温 1 小时, 此后用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 洗涤 3 次, 再用 PBS 洗涤 3 次。通过加入 BCIP/NBT 底物 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 表明抗- $\gamma$  IFN 免疫复合物的存在。通过用自来水洗涤终止反应。在立体显微镜下计数为  $\gamma$  IFN 阳性的点。特异性的点计数是存在用肽攻击的细胞时计数的点与不存在肽时计数的点之间的差异。结果为各组中小鼠的平均测量值。将其表示为每 1 百万个培养的细胞的点数。

### 结果

10 抗体反应: 用图表示进行了 1、2 和 3 次免疫注射的小鼠的 Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 特异性抗体的生产, 用 ELISA 确定的。对照包括仅注射一次抗原, 产生很弱的抗体滴度。分别与 OM-294-MP 或 OM-294-DP 混合后注射一次抗原产生的抗体滴度几乎与用不完全弗氏佐剂(IFA) 与相同抗原混合注射得到的反应一样高(图 (13))。2 次注射后, OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂分别均能引发比 IFA 强的血清反应(图 (14))。3  
15 次注射后, OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂能够引发比 IFA 强的血清反应(图 (15))。

图 (13) ELISA, 在第一次免疫接种后 3 周进行。

图 (14) ELISA, 在第二次免疫接种后 4 周进行。

20 图 (15) ELISA, 在第三次免疫接种后 2 周进行。

图 (16) 在 1、2 和 3 次免疫注射前后测量的抗体滴度。

按平均值给出 1 次免疫注射前和 1、2 和 3 次免疫注射后各组动物的抗体滴度(图 (16))。

CTL 反应: 用 ELISPOT 试验清楚地表明了预先用于免疫接  
25 种的 Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 肽中存在的 T 细胞表位 Pb CS 245-252 的识别。通过  $\gamma$  干扰素 ( $\gamma$  IFN) 的阳性点计数的增加说明在免疫动物中记录

的 T 淋巴细胞反应(腹股沟淋巴结和脾, 分别在第 2 次注射后一周和第 3 次注射后 2 周记录的)。按用各稀释度和各组小鼠的测量平均值计算图(17, 18, 19 和 20)中的结果。将其表示为每 1 百万个培养细胞的点数。

- 5 在来自脾和腹股沟淋巴结的淋巴细胞的 CTL 反应中, OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂均有显著的提高。脾反应高于腹股沟淋巴结的反应。由 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂诱导的 CTL 活性明显优于 IFCTL 活性。

### 9. 通过毛细管电泳说明非共价 OM-294-抗原复合物

- 10 在本实施例中使用毛细管电泳说明在配制疫苗制品的过程中, OM-294-DP 与 Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 肽间非共价复合物的形成。

#### 方法

方法: 用 1N NaOH (Fluka N° 7207 调到 pH7.4 的 20 mM 硼酸钠缓冲液(四硼酸二钠十水合物, Merck, N°6306)

- 15 分区的毛细管(ungrafted), 长度 30 cm, 直径 50 μm。

用 Beckman PACE MDQ 型仪器(Beckman, Brea, CA, USA)在 200 nm 完成检测。

#### 分离条件

时间 [分钟]	过程	压力	溶剂
0.00	毛细管洗涤	20.0 psi	H <sub>2</sub> O
3.00	毛细管洗涤	20.0 psi	1N NaOH
6.00	样品注射	0.5 psi	硼酸盐缓冲液
6.08	分离	30.0 KV	硼酸盐缓冲液

20

抗原: 在 H<sub>2</sub>O 中 1 mg/ml 的 Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 合成肽

佐剂：在 H<sub>2</sub>O 中 1 mg/ml 的 OM-294-DP

抗原-佐剂混合物：250 µg/ml + 250 µg/ml

### 结果

在电泳图上，通过佐剂峰的消失和产生新峰的抗原峰的位移(这是新形成的复合物特异性的)说明在该疫苗制品配制过程中观察到的抗原-佐剂形成(图 (21)).

## 10. 通过在 BDIX 大鼠中注射来自 PROb 同基因肿瘤细胞系的细胞治疗腹膜癌

本实验的目的在于说明当给有数毫米大小肿瘤的大鼠静脉内系列注射时，OM-294-DP 的抗肿瘤效果。

### 方法

动物：近亲交配的 BDIX 大鼠品系是由 H. Druckrey 在 1937 建立的。一对来自 Fribourg Max Planck Institute (RFA) 大鼠是该品系的最初来源，该品系自 1971 年已被通过单系系统保持在实验室动物收藏中心(laboratory animal house facility)。按照该系统，筛选一对姐妹-兄弟个体产生下一代。在本研究中所用的大鼠来自 ffa-Credo (Arbresle, 法国) 的实验动物育种中心(Experimental Animal Breeding Center)，该中心可代表申请人的实验室完成育种。所用的大鼠为雄性，3 月±1 周。

### 通过注射 PROb 细胞诱导的肿瘤：

PROb 细胞源：DHD/K12 细胞系最初得自通过 1,2-二甲基胍处理在近亲交配的 BDIX 大鼠中诱导的结肠癌片段的移植物。将该细胞系的粘附系列再根据其对胰蛋白酶处理的敏感性分成亚系，将很难脱落的细胞称为 DHD/K12-TR。当注射到同基因 BDIX 大鼠中时，DHD/K12-TR 细胞产生稳定发展的肿瘤。克隆该细胞系，仅将称为 PROb 的 DHD/K12-TRb 克隆用于本发明的研究。

培养条件：在 37℃ 密封瓶(Falcon, Becton Dickinson, New Jersey, USA)中，在加入了 10% 胎牛血清 (FCS, Anval, Betton, France)的由 Ham's F10 培养基 (Bio-Whittaker, Walkersville, USA)组成的完全培养基中培养粘附的 PROb 细胞。每隔 3 天更换培养基。细胞汇合后，用 2 ml EDTA/胰蛋白酶溶液，然后用 2ml 相同的溶液漂洗 2-3 分钟，从支持物上释放细胞或者刮掉细胞；将细胞重悬在全培养基中，加入 FCS 终止胰蛋白酶的作用。以有规律的间隔，用 Hoechst 荧光染料 33258 (Aldrich Chimie, Steinheim, GFR)T 通过 DNA 染色检测在支原体和细胞细胞中是否有污染。

10 腹膜癌的诱导：按“培养条件”节所述从其支持物上是否 PROb 细胞，然后在台盼蓝染色溶液中计数作为评估细胞活力的方法。将细胞悬浮在 Ham's F10 培养基中。通过将  $10^6$  个活 PROb 细胞注射 (腹膜内)到乙醚麻醉的同基因 BDIX 大鼠中来诱导腹膜癌。在第 10 天完成肿瘤细胞注射。在这些条件下，所有大鼠都发展了腹膜癌以及血

15 腹水，并在细胞注射后第 6 天至第 12 天之间死亡。

腹膜癌的治疗：在肿瘤细胞注射后 13 天，当癌体积由直径数毫米的小结组成时，开始治疗。通过以 1 mg/kg 体重的速率并以溶于 0.9% NaCl 溶液 0.6 mg/ml 的剂量静脉内注射 10 次 OM-294-DP 进行治疗。每周向阴茎血管内注射 3 次。对照组仅用载体即 0.9% NaCl 治

20 疗。

评估治疗效果：在肿瘤细胞注射后的第 42 天、第 6 周，杀死大鼠并解剖，通过盲实验评估癌的发展。无法测量癌体积，但是可将癌分成 4 种不同的类似。根据小结所数目和直径定义了 5 类。

0 型：未看到小结

25 1 型：容易计数到直径为 0.1 - 0.2 cm 的小结

2 型：观察到无数 0.1 - 0.5 的小结

3型：腹腔被小结侵染，其中一些小结直径为 1 cm。

4型：腹腔完全被数厘米大小的肿瘤侵染。

腹水体积和动物体重的变化：通过两次测量动物体重来测量腹水体积。可评估仅通过注射 0.9% NaCl 进行治疗的对照组大鼠的正常  
5 癌发展和随访治疗。

评估治疗效果：将治疗组大鼠的存活率与对照的存活率进行比较；将治疗组大鼠的癌和腹水体积与对照大鼠的测量值进行比较。

统计学分析：用 Kruskal-Wallis 试验确定不同类型癌的免疫治疗效果  
10 的统计学显著性。另外，对腹水体积数据进行方差分析试验，对存活数据进行对数等级试验(log rank test)。

### 结果

癌：在该模型中，OM-294-DP 有显著的抗肿瘤活性。通过肿瘤-自由动物(class 0)更具体地说明了该活性，对于肿瘤体积来说，与 NaCl 对照的差异是显著的( $p < 0.05$ )。OM-294-DP 对腹水体积的治疗效  
15 果业是显著的( $p < 0.05$ )。

表(a) 癌分类和腹水体积

治疗	患某类癌的大鼠数				产物的效果 (*)	腹水体积 ml/大鼠		产物的效果 (**)	
	0	1	2	3		4	范围		平均值±σ
NaCl <sup>(1)</sup>	1	0	1	0	7	-	0-84	38±29	-
OM-294-DP <sup>(2)</sup>	4	1	2	1	2	p < 0.05	0-73	8±23	p < 0.05

(\*) : Kruskal-Wallis 试验, (\*\*) : 方差分析.

<sup>(1)</sup>: 在被处死前 8 - 10 大鼠死于癌症, 在第 34 天 1 只大鼠有小结和黄疸但不能进行准确的分类(嗜食同类, 在 D37, 1 只大鼠属于(4型), 在 D38, 2 只大鼠属于(4型); 在 D39, 1 只大鼠属于(4型), 在 D40, 2 只属于(4型) 和 D41, 1 只属于(4型)。1 只 0 型大鼠在解剖后有皮下肿瘤, 可能是癌细胞注射失败。

<sup>(2)</sup>: 在 D14, 1 只大鼠在治疗注射时死亡, 后者未患癌。在 0 型中, 一只被处死的大鼠有皮下肿瘤(癌细胞注射失败)。

存活：

在第 42 天处死动物。在注射肿瘤细胞后第 42 天确定存活率，90% 用 OM-294-DP 治疗的动物存活，而未治疗组仅有 20% 存活。

OM-284-DP 显著提高了大鼠的存活率 ( $p < 0.001$ )。

- 5 体重： 根据表(b)中的数据，与仅用 NaCl 治疗的动物相比，OM-294-DP 对体重变化有没有显著影响。

表 (b)大鼠的体重变化(平均值+标准偏差)

天	NaCl	OM-294-DP
0	314± 19	277 ± 19
13	337± 18	310 ± 21
20	342± 20	304 ± 23
29	361± 23	317 ± 24
41	314± 38	327 ± 26

10

11. 在鼠免疫模型中通过鼻施用幽门螺杆菌脲酶 B 亚单位评估 OM-294-DP 佐剂特性

已表明在存在霍乱毒素(CT)为基础的佐剂时，当经口或鼻施用幽门螺杆菌的脲酶 B 亚单位进行免疫可使小鼠不感染幽门螺杆菌。

- 15 Corthésy-Teulaz I., 等, 肠胃病学(Gastroenterology), 109: (1995): 115; Michetti P. 等, 肠胃病学(Gastroenterology), 116: (1999) 804; Saldinger P.F. 等, 肠胃病学(Gastroenterology) 115: (1998) 891。按照在免疫小鼠血清中测量的，这种抗-Ure B 体液反应主要是 IgG1 (Th2 反应)。
- 20 用以 1 周的间隔通过鼻施用重组幽门螺杆菌脲酶 B 亚单位(UreB)和 OM-294-DP 将 BALB/c 小鼠(n=6)免疫 4 次来评估 OM-294-DP 的佐



剂作用。将 BALB/c 对照小鼠仅用 OM-294-DP 佐剂免疫。最后一次加强注射 2 周后，从每只小鼠取血样以通过 ELISA 检测血清抗-UreB 免疫球蛋白(总 IgG, IgG1 和 IgG2a)。

### 方法

5 动物: BALB/c/Ola/HsD 小鼠 (Harland, Horst, Netherlands): 24 只小鼠。

抗原: HpUreB 1-569, 按照前述方法(Michetti 等, 肠胃病学 (Gastroenterology), 107: (1994) 1002)在大肠杆菌(M15 菌株, Qiagen, Hilden, GFR) 表达为重组蛋白。

10 佐剂: OM-294-DP (2.2 mg/ml 储备液)

免疫方案:

每组含 6 只小鼠:

A 组: 每周一次连续 4 周鼻施用 25  $\mu$ g OM-294-DP (每剂量 25  $\mu$ l)给 6 只 BALB/c 小鼠免疫接种 4 次。

15 B 组: 每周一次连续 4 周鼻施用 50  $\mu$ g Ure B 1-569 + 25  $\mu$ g OM-294-DP (每剂量 25  $\mu$ l)给 6 只 BALB/c 小鼠免疫接种 4 次。

最后一次鼻免疫 2 周后，通过尾针刺从 A 和 B 组中的每只小鼠取血。

血清 IgG 的检测:

20 包被缓冲液(pH 9.6): 每 1 升,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (15 mM, 1.59 g),  $\text{NaHCO}_3$  (34.8 mM, 2.93 g), 硫汞撒(0.01%); PBS-吐温缓冲液 pH 7.4: 每 1 升,  $\text{NaCl}$  (137 mM, 8.0 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.5 mM, 0.2 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (8.0 mM, 1.15 g),  $\text{KCl}$  (2.7 mM, 0.2 g), 吐温 20 (0.1% 1 ml); 柠檬酸/磷酸缓冲液 pH 5.0: 每 1 升, 柠檬酸(44.4 mM, 9.32 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (103 mM, 14.6 g); 底物溶液  
25 10x (O-苯二胺= OPD) (10-倍浓缩的): (10 mg/ml 在柠檬酸缓冲液中);

叠氮化钠溶液：1%，终止溶液：在柠檬酸/磷酸缓冲液 0.1 M pH 5.0 中的 0.01% 叠氮化钠

方法：用包被缓冲液 pH9.6 (500  $\mu$ l UreB 溶液/ 50 ml 缓冲液) 制备浓度为 5  $\mu$ g/ml 的抗原溶液 (在 1999 年 5 月 26 日制备的 UreB 1-569, 0.5 mg/ml 储备液)。将 100  $\mu$ l 移取到 3 个圆底 96-孔平板的每个孔中 (0.5  $\mu$ g UreB /孔)。将平板在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。从平板中弃去上清液。通过加入 100  $\mu$ l PBS-0.1% 吐温溶液+ 5% 奶粉/孔阻断孔。将平板在 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。弃去阻断溶液，将孔用 100  $\mu$ l PBS-吐温洗涤 3 次。弃去上清液。用 PBS- 0.1% 吐温缓冲液 (5  $\mu$ l 血清在 1 ml PBS-吐温中) 制备 1: 200 稀释的各待测小鼠的血清。将血清 (100  $\mu$ l) 一式两份分在 3 个平板中 (1 个平板检测总 IgG, 1 个平板检测 IgG1 和 1 个平板检测 IgG2a)。在 4 $^{\circ}$ C 保温过夜。用 100  $\mu$ l PBS-吐温将孔洗涤 3 次。PBS-吐温缓冲液逐个制备 1: 500 稀释的生物素-结合的-抗-IgG 总抗体 (Amersham, Cat # RPN 1177), 抗-IgG1 抗体 (Amersham Cat # RPN 1180) 和抗-IgG2a 抗体溶液 (Pharmingen Cat #~02012D)。将 100  $\mu$ l 抗-IgG 总抗体溶液加到 N $^{\circ}$  1 平板中，将 100  $\mu$ l 抗-IgG1 溶液加到 N $^{\circ}$  2 平板中，将 100  $\mu$ l 抗-IgG2a 抗体溶液加到 N $^{\circ}$  3 平板中。在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。用 PBS-吐温将孔洗涤 3 次。用 PBS-吐温缓冲液制备的 1:1000 稀释的链霉抗生物素-HRP (Dako, Cat # p0397)，然后向每个孔中加入 100  $\mu$ l 溶液。在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。用 PBS-吐温将孔洗涤 3 次。通过用 0.1 M 柠檬酸/磷酸缓冲液稀释 10 倍 OPD 溶液 (10x) 制备底物溶液。向稀释的 OPD 溶液中加入 1  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。向每孔加入 50  $\mu$ l 底物溶液。10 - 20 分钟出现颜色。通过加入 50  $\mu$ l 终止缓冲液终止反应。用阴性对照作为空白在 492 nm (用在 620 nm 读的标准) 读出吸收值。

统计学分析：数据为平均值  $\pm$  SD (n=6)。P 值来自 t-试验。数据显著水平设在  $p < 0.05$ 。

## 结果

用 UreB-1-569+ OM-294-DP 通过鼻给药免疫的小鼠发展了抗-UreB 体液免疫性：在血液中存在抗-UreB 1-569 IgG1。

通过 ELISA 检测小鼠血清中特异性抗 Hp UreB 的抗体的存在。

- 5 将 UreB (0.5  $\mu$ g/孔)与碳酸盐缓冲液 pH 9.6 一起分散到圆底 96 孔平板中。通过兔抗-IgG 总抗体、抗-IgG1 和 IgG2a 抗体检测特异性抗体。结果为在 492 nm 的光密度(OD)。如果在首次用于试验的小鼠血清中，OD 值比测量值大 3 倍，则认为是阳性。在仅用 OM-294-DP 免疫的小鼠血清中没有检测到抗 UreB 抗体。已用 Ure+OM-294-DP 免疫的小鼠
- 10 也发展了总抗-UreB IgG 抗体(OD =  $0.274 \pm 0.130$ ,  $p < 0.05$ ) 和抗-UreB IgG1 (OD =  $0.212 \pm 0.128$ ,  $p < 0.05$ ), 但未发展抗-UreB IgG2a 抗体(OD =  $0.008 + 0.005$ , 不显著)。

- 通过鼻施用(UreB) + OM-294-DP, 用幽门螺杆菌的脲酶 B 亚单位免疫的 BALB/c 小鼠发展了主要为 IgG1 的抗-UreB 体液反应。因此,
- 15 此, OM-294-DP 可作为经鼻施用的佐剂并促进 Th2 型体液免疫的发展。

## 12. OM-294-MP 和 OM-294-DP 与 H1N1 抗原结合：确定 1 或 2 次皮下给药后在小鼠中产生的特异性抗体

### 方法

- 20 本研究的目的在于说明 OM-294-MP 和 OM-294-DP 对流感抗原 H1N1 (262195 A/B Beijing haemagglutinin, Solvay Duphar, Weesp, NL)的佐剂作用。为了达到该目的, 将 60 只 BALB/c 小鼠(雌性, 在治疗开始时 8 周龄)分成如下 6 组:

组	抗原 终浓度: 2.5 µg /动物/ 注射	佐剂 终浓度: 50 µg /动物/ 注射	NaCl (0.9% )	注射的体 积
A: NaCl	-	-	150 µl	150 µl
B: H1N1	H1N1 (100 µl)	-	50 µl	150 µl
C: H1N1+ OM- 294-MP	H1N1 (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	-	150 µl
D: H1N1+ OM- 294-DP	H1N1 (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	100 µl	150 µl
E: OM-294-MP	-	OM-284-MP (50 µl)	100 µl	150 µl
F: OM-294-DP	-	OM-284-DP (50 µl)	100 µl	150 µl

抗原: 用 0.9% NaCl 制备浓度为 25 µg/ml 的 H1N1 储备液。

佐剂: 用注射用水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-DP 和 OM-294-MP 储备液, 向 OM-294-MP 中加入 0.1% 三乙醇胺。阴性对照为不含抗原的 0.9% NaCl 溶液。

抗原-佐剂混合物: 在旋转 3 分钟前, 将佐剂在 37°C 保持 20 分钟。然后, 按上表说明加入抗原和 NaCl (0.9%), 将抗原 - 佐剂混合物旋转混合物, 然后在室温下放在旋转搅拌器上 15 分钟, 最后将全部混合物旋转 3 分钟。

免疫方案: 在 0 和 14 天进行注射。通过皮下施用上表中的混合物(一边 75 µl, 每只动物共 150 µl)。在第 14 和 18 天取血(针刺眼眶)。

抗-H1N1 免疫球蛋白的检测：通过 ELISA 一式两份检测特异性抗 H1N1 的下列血清免疫球蛋白：IgG1, IgG2a, 和 IgM。简而言之，在 4°C 将微滴定板(NUNC Immunoplate, Roskilde, DK)与在碳酸氢盐缓冲液 pH 9.6 中的 100 µl H1N1 (0.5 µg)一起保温(过夜包被)。用 0.5% 吐温-20 (Merck Hohenbrunn, D)洗涤后，将血清稀释 50-, 200- 和 800-倍(稀释溶液：磷酸缓冲的盐 (PBS) + 1% 牛血清白蛋白(BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0.02% 吐温-20))。将 100 µl 各稀释的血清样品加到孔中。在 37°C 保温 45 分钟。

第二次洗涤步骤后，在 37°C，将特异性抗 H1N1 的 IgG1, IgG2a 和 IgM 与预先用 PBS/BSA/吐温缓冲液(分别稀释 250-, 1000-, 500-倍稀释的)100 µl 抗-IgG 1 抗体(抗-小鼠大鼠 抗体)-过氧化物酶结合物 (Serotec, Oxford, UK)、IgG2a-过氧化物酶结合物(Pharmingen, San Diego, CA, USA)和 IgM-生物素结合物(Pharmingen, San Diego, CA, USA)一起保温 30 分钟。对于 IgM，额外的洗涤步骤后，需要与 1:100 稀释的链霉抗生物素 - 过氧化物酶结合物(Dako, Glostrup, DK)第三次保温(30 分钟, 37°C)。

洗涤步骤后，加入 100 µl 亚苯基 1,2-二胺溶液(OPD, Merck, Darmstadt, GFR) 以检测过氧化物酶 - 结合的抗-IgG1 和抗-IgG2 二级抗体(而对于 IgM，所用的试剂是 3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB, Sigma, St. Louis, MO, USA)。在室温保温 20 分钟后，通过加入 100 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。用 Bio-Rad 3550 型平板阅读器读出在 490 nm 的吸收值。

### 结果

在 490 nm 的各读数以绝对单位(A.U.)/ml 给出。这是通过将各样品标准进行比较而得到的，所述标准是从在第 28 天从 B 组(仅注射 H1N1 的动物)收集的样品池的不同稀释物制备的。如该术语是指，稀释 50 倍的样品池的浓度为 1000 A.U./ml。然后用相应的稀释因子(50,

200, 或 800 倍)校正每个结果。本文仅报告各的平均值和标准偏差 (SD)。

表 a) 针对 H1N1 的 IgG1 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位 /ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	3 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0
B: H1N1	11161 $\pm$ 5755	53950 $\pm$ 23403
C: H1N1 + OM-294-M	34411 $\pm$ 13719	228467** $\pm$ 109123
D: H1N1 + OM-294-D	30101 $\pm$ 19061	382325** $\pm$ 201314
E: OM-294-MP	69 $\pm$ 34	59 $\pm$ 31
F: OM-294-DP	59 $\pm$ 21	38 $\pm$ 25

表 b) 针对 H1N1 的 IgG2a 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位/ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
B: H1N1	26883 $\pm$ 20779	50352 $\pm$ 30846
C: H1N1 + OM-294-M	179344** $\pm$ 139781	1622722** $\pm$ 986195
D: H1N1 + OM-294-D	103630 $\pm$ 96257	681441 $\pm$ 1072710
E: OM-294-MP	1619 $\pm$ 743	1767 $\pm$ 1034
F: OM-294-DP	452 $\pm$ 584	782 $\pm$ 857

10

表 c) 针对 H1N1 的 IgM 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位/ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	22102±5862	21531±3693
B: H1N1	37787±15001	57306±26886
C: H1N1 + OM-294-M	67936**±21334	95108±38669
D: H1N1 + OM-294-D	598100*±18324	92920±26971
E: OM-294-MP	19065±4069	18018±1016
F: OM-294-DP	20756±7160	20944±9065

这些结果表明 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂在所研究的模型中是有活性的，因为在 1 或 2 次注射后，它们都能显著提高小鼠中针对 H1N1 特异性产生的抗体滴度(见图 22, 23, 24)，而与考虑的免疫球蛋白亚型(IgG1a, IgG2a 和 IgM)无关。

13. OM-294-OM 和 OM-294-DP 与卵清蛋白抗原联用：确定在 1 或 2 次皮下给药后在小鼠中产生的特异性抗体

#### 方法

本研究的目的是和面 OM-294-MP 和 OM-294-DP 对卵清蛋白抗原(Fluka Chemie, Buchs, Switzerland)抗体的佐剂效果。为了达到该目的，将 50 只 BALB/c 小鼠(雌性，在治疗开始时 8 周龄)按如下分成 5 组：

组	抗原 终浓度: 50 µg/动物/ 注射	佐剂 s 终浓度: 50 µg/动物/注射	NaCl	注射的 体积
A: NaCl	-	-	150 µl	150 µl
B: Ova	Ova (100 µl)	-	50 µl	150 µl
C: Ova + OM- 294-MP	Ova (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	-	150 µl
D: Ova + OM- 294-DP	Ova (100 µl)	OM-294-DP (50 µl)	-	150 µl
E: OM-294-MP	-	OM-294-MP (50 µl)	100 µl	150 µl

抗原: 用 0.9% NaCl 制备浓度为 0.5 mg/ml 的卵清蛋白储备液。

佐剂: 用注射用水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-DP 和 OM-294-MP 储备液, 对于 OM-294-MP, 加入 0.1% 三乙醇胺。阴性对照是  
5 不含抗原的 0.9% NaCl 溶液。

抗原-佐剂混合物: 将佐剂在 37°C 保持 20 分钟, 然后旋转混合 3 分钟。然后, 按上表说明加入抗原和 NaCl (0.9%), 将抗原-佐剂混合物旋转混合物, 然后在室温下放在旋转搅拌器上 15 分钟, 最后将全部混合物旋转 3 分钟。

10 免疫方案: 在 0 和 14 天进行注射。通过皮下施用上表中的混合物(一边 75 µl, 每只动物共 150 µl)。在第 14 和 18 天取血(针刺眼眶)。

抗-卵清蛋白免疫球蛋白的检测: 通过 ELISA 一式两份检测特异性抗卵清蛋白的下列血清免疫球蛋白: IgG1, IgG2a, 和 IgM。简而言之, 在 4°C 将微滴定板(NUNC Immunoplate, Roskilde, DK)与在碳酸氢



盐缓冲液 pH 9.6 中的 100  $\mu$ l 卵清蛋白(0.5  $\mu$ g)一起保温(过夜包被)。用 0.5% 吐温-20 (Merck Hohenbrunn, D)洗涤后, 将血清稀释 50-, 200- 和 800-倍(稀释溶液: 磷酸缓冲的盐 (PBS) + 1% 牛血清白蛋白(BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0.02% 吐温-20))。将 100  $\mu$ l 各稀释的血清  
5 样品加到孔中。在 37 $^{\circ}$ C 保温 45 分钟。

第二次洗涤步骤后, 在 37 $^{\circ}$ C, 将特异性抗卵清蛋白的 IgG1, IgG2a 和 IgM 与预先用 PBS/BSA/吐温缓冲液(分别稀释 250-, 1000-, 500-倍稀释的)100  $\mu$ l 抗-IgG 1 抗体(抗-小鼠大鼠 抗体)-过氧化物酶结合物(Serotec, Oxford, UK)、IgG2a-过氧化物酶结合物(Pharmingen, San  
10 Diego, CA, USA)和 IgM-生物素结合物(Pharmingen, San Diego, CA, USA)一起保温 30 分钟。对于 IgM, 额外的洗涤步骤后, 需要与 1:100 稀释的链霉抗生物素 - 过氧化物酶结合物(Dako, Glostrup, DK)第三次保温(30 分钟, 37 $^{\circ}$ C)。

洗涤步骤后, 加入 100  $\mu$ l 亚苯基 1,2-二胺溶液(OPD, Merck,  
15 Darmstadt, GFR)以检测过氧化物酶 - 结合的抗-IgG1 和抗-IgG2 二级抗体(而对于 IgM, 所用的试剂是 3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB, Sigma, St. Louis, MO, USA)。在室温保温 20 分钟后, 通过加入 100  $\mu$ l 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。用 Bio-Rad 3550 型平板阅读器读出在 490 nm 的吸收值。

### 结果

20 在 490 nm 的各读数以绝对单位(A.U.)/ml 给出。这是通过将各样品标准进行比较而得到的, 所述标准是从在第 28 天从 B 组(仅注射卵清蛋白的动物)收集的样品池的不同稀释物制备的。从该术语可清楚地理解, 稀释 50 倍的样品池的浓度为 1000 A.U./ml。然后用相应的稀释因子(50, 200, 或 800 倍)校正每个结果。本文仅报告各的平均值和标准  
25 偏差 (SD)。

表 a) 针对卵清蛋白的 IgG1 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位/ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	6 $\pm$ 6	16 $\pm$ 12
B: ova	728 $\pm$ 589	47743 $\pm$ 46294
C: ova + OM-294-MP	4361** $\pm$ 2513	284121** $\pm$ 164822
D: ova + OM-294-DP	3240** $\pm$ 1794	277025** $\pm$ 173737
E: OM-294-MP	19 $\pm$ 8	40 $\pm$ 69

5 表 b) 针对卵清蛋白的 IgG2a 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位/ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	2996 $\pm$ 898	5414 $\pm$ 1554
B: ova	5201 $\pm$ 1880	73162 $\pm$ 107954
C: ova + OM-294-MP	9524 $\pm$ 6809	625663* $\pm$ 681232
D: ova + OM-294-DP	18108** $\pm$ 14958	601434* $\pm$ 624166
E: OM-294-MP	11253 $\pm$ 12169	4192 $\pm$ 2104

表 c) 针对卵清蛋白的 IgM 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位/ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	14009 $\pm$ 6158	12288 $\pm$ 7136
B: ova	19423 $\pm$ 13778	47998 $\pm$ 34035
C: ova + OM-294-MP	21652 $\pm$ 9524	38240 $\pm$ 8822
D: ova + OM-294-DP	25762 $\pm$ 10975	74399 $\pm$ 119781
E: OM-294-MP	19742 $\pm$ 5667	9827 $\pm$ 2021

- 5 这些结果表明 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂在所研究的模型中是有活性的, 因为在 1 或 2 次注射后, 它们都能显著提高小鼠中针对卵清蛋白特异性产生的抗体滴度(见图 25, 26, 27)。

**14. OM-294-MP 和 OM-294-DP TT 抗原(破伤风类毒素)联用:**  
确定在 1 或 2 次皮下给药后小鼠中产生的特异性抗体

10 **方法**

本研究的目的在于说明 OM-294-MP 和 OM-294-DP 对于 TT 抗原 (Massachusetts Biologic Laboratoires, MA, USA) 的佐剂效果。为了达到该目的, 将 40 只 BALB/c 小鼠(雌性, 在治疗开始时 8 周龄)按如下分成 4 组:

15

组	抗原 终浓度: 50 µg/动物/ 注射	佐剂 s 终浓度 50 µg/动物/注射	NaCl (0.9%)	注射的 体积
A: NaCl	-	-	150 µl	150 µl
B: TT	TT (100 µl)	-	50 µl	150 µl
C: TT + OM-294- MP	TT (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	-	150 µl
D: TT + OM-294- MP	TT(100 µl)	OM-294-DP (50 µl)	-	150 µl

抗原: 用 0.9% NaCl 制备浓度为 0.2 mg/ml 的 TT 储备液。

佐剂: 用注射用水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-DP 和 OM-294-MP 储备液, 对于 OM-294-MP, 加入 0.1% 三乙醇胺。阴性对照是  
5 不含抗原的 0.9% NaCl 溶液。

抗原-佐剂混合物: 将佐剂在 37°C 保持 20 分钟, 然后旋转混合 3 分钟。然后, 按上表说明加入抗原和 NaCl (0.9%), 将抗原-佐剂混合物旋转混合物, 然后在室温下放在旋转搅拌器上 15 分钟, 最后将全部混合物旋转 3 分钟。

10 免疫方案: 在 0 和 14 天进行注射。通过皮下施用上表中的混合物(一边 75 µl, 每只动物共 150 µl)。在第 14 和 18 天取血(针刺眼眶)。

抗-TT 免疫球蛋白的检测: 通过 ELISA 一式两份检测特异性抗 TT 的下列血清免疫球蛋白: IgG1, IgG2a, 和 IgM。在 4°C 将微滴定板 (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) 与在碳酸氢盐缓冲液 pH 9.6 中的  
15 100 µl TT(0.5 µg) 一起保温(过夜包被)。用 0.5% 吐温-20 (Merck Hohenbrunn, D) 洗涤后, 将血清稀释 50、200 和 800 倍(稀释溶液: 磷

酸缓冲的盐 (PBS) + 1% 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0.02% 吐温-20)。将 100  $\mu$ l 各稀释的血清样品加到孔中。在 37 $^{\circ}$ C 保温 45 分钟。

第二次洗涤步骤后，在 37 $^{\circ}$ C，将特异性抗 TT 的 IgG1, IgG2a 和  
5 IgM 与预先用 PBS/BSA/吐温缓冲液(分别稀释 250、1000 500 倍稀  
释)100  $\mu$ l 抗-IgG 1 抗体(抗-小鼠大鼠 抗体)-过氧化物酶结合物(Serotec,  
Oxford, UK)、IgG2a-过氧化物酶结合物(Pharmingen, San Diego, CA,  
USA)和 IgM-生物素结合物(Pharmingen, San Diego, CA, USA)一起保温  
30 分钟。对于 IgM，额外的洗涤步骤后，需要与 1:100 稀释的链霉抗  
10 生物素 - 过氧化物酶结合物(Dako, Glostrup, DK)第三次保温 (30 分钟，  
37 $^{\circ}$ C)。

洗涤步骤后，加入 100  $\mu$ l 亚苯基 1,2-二胺溶液(OPD, Merck,  
Darmstadt, GFR) 以检测过氧化物酶 - 结合的抗-IgG1 和抗-IgG2 二级抗  
体(而对于 IgM，所用的试剂是 3',3',5',5'--四甲基联苯胺(TMB, Sigma, St.  
15 Louis, MO, USA)。在室温保温 20 分钟后，通过加入 100 $\mu$ l 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终  
止反应。用 Bio-Rad 3550 型平板阅读器读出在 490 nm 的吸收值。

### 结果

在 490 nm 的各读数以绝对单位(A.U.)/ml 给出。这是通过将各样  
品标准进行比较而得到的，所述标准是从在第 28 天从 B 组(仅注射 TT  
20 的动物)收集的样品池的不同稀释物制备的。从该术语可清楚地理解，  
稀释 50 倍的样品池的浓度为 1000 A.U./ml。然后用相应的稀释因子  
(50、200 或 800 倍)校正每个结果。本文仅报告各的平均值和标准偏差  
(SD)。

就检测 T 特异性的 IgM 而言，由于该检测方法的本底噪音太  
25 高，按照用于 IgG1 和 IgGa2 的方法测量特异性 IgM 不能清楚划清 B 组  
(仅 TT)和 C 组和 D 组(TT 与佐剂)间的差异。然而用连续稀释的各样品

(而不是前述 A.U.)可以确定特异性 IgM 的滴度, 并将每个样品的结果表示为产生大于 A 组(NaCl)的平均吸收值 $\pm 3$  SD 最高稀释度。因此, 所得的滴度表明在血清样品的吸收值不再区别于本底噪音水平前, 可对血清样品进行稀释的倍数。

5

表(a)针对 TT 的 IgG1 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位/ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 1
B: TT	2871 $\pm$ 1633	34367 $\pm$ 15018
C: TT + OM-294-MP	8502** $\pm$ 2020	78506** $\pm$ 21660
D: TT + OM-294-DP	11620** $\pm$ 2348	136463** $\pm$ 41025

10

表 (b) 针对 TT 的 IgG2a 亚型特异性产生的免疫球蛋白(绝对单位/ml  $\pm$  SD, \*\*  $p < 0.01$  (Anova & (两侧) Dunnetts 试验)。

组	第 14 天	第 28 天
A: NaCl	351 $\pm$ 506	536 $\pm$ 1046
B: TT	2547 $\pm$ 2539	61387 $\pm$ 82269
C: TT + OM-294-MP	8869 $\pm$ 6979	65881 $\pm$ 46635
D: TT + OM-294-DP	21969** $\pm$ 25067	148365 $\pm$ 134196

表(c) 针对 TT 的 IgM 亚型特异性产生的免疫球蛋白的滴定(在 490 nm 产生大于 A 组平均值 $\pm$ 3 SD 值的各样品的稀释度)。

组	第 14 天	第 28 天
A : NaCl	标准	标准
B : TT	9 动物 < 25 1 动物 < 50	10 动物 < 25
C : TT + OM-294-MP	9 动物 < 25 1 动物 > 1600	7 动物 < 25 1 动物 < 100 2 动物 > 1600
D : TT + OM-294-DP	7 动物 < 25 1 动物 < 200 2 动物 > 1600	10 动物 < 25

- 5 这些结果表明 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂在所研究的模型中是有活性的，因为在 1 或 2 次注射后，它们都能显著提高小鼠中针对 TT 特异性产生的 IgG1 和 IgG2 抗体滴度(见图 28, 29)。相反，仅有几只动物产生 TT 特异性的 IgM。

### 10 15. 通过皮下给药利什曼虫属 gp63 抗原在 CBA 小鼠免疫模型中评估 OM-294-MP 的佐剂特性

#### 方法

- 15 对 CBA 小鼠在尾部皮下注射剂量为 2 $\mu$ g 的 gp63 两次，间隔 8 天。将 OM-294-MP 佐剂与两次剂量的抗原混合，而 BCG 仅在第一次给药时混合。每只小鼠接受 2 x 50 $\mu$ g 的 OM-294-MP 或 200 $\mu$ g 的 BCG。对照组仅注射抗原(无佐剂)。第二次注射 10 天后，将腹股沟和主动脉周的淋巴结细胞(每组 3 只小鼠)进行培养并通过测定( $^3$ H-TdR)胸

腺嘧啶核苷的摄取分析对纯化的 gp63 抗原的增殖反应。在加入  $^3\text{H}$ -TdR 前, 通过 ELISA(MIF100 IFN 和 M4000 IL-4 试剂盒, R&D Systems, Europe Ltd., Abingdon, UK)确定每个淋巴结淋巴细胞培养上清液样品由用 gp63 抗原体外再攻击的淋巴结淋巴细胞分泌的  $\gamma$  IFN 和 IL-4 细胞因子的体外生产。

在表中报告的  $^3\text{H}$ -TdR 摄取值代表以 cpm 表示的算术平均 $\pm$ 标准偏差(一式三份)和上清液中的细胞因子对应于以 pg/ml 表示的算术平均 $\pm$ 标准偏差(一式三份)。

抗原: 用 0.9% NaCl 制备的浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 gp63 储备液。

10 佐剂: 用注射用水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-MP 储备液, 加入 0.1% 三乙醇胺。阴性对照是不含抗原的 PBS 溶液。

抗原-佐剂混合物: 将佐剂在 37 $^{\circ}\text{C}$  保持 10 分钟, 然后旋转混合 3 分钟。然后, 将抗原 (1 体积)和佐剂 (1 体积)混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 20 分钟后旋转混合, 最后将全部混合物旋转 3 分钟。

## 15 结果

在用 gp63 抗原免疫的小鼠中, OM-294-MP 佐剂可以比 BCG 更好地诱导淋巴细胞增殖反应(表(a)和图 30 (a))。事实上, 与不用佐剂免疫的动物的培养物相比, OM-294-MP 产物使增殖速率增加了 3.1 至 6 倍, 而 BCG 则不超过 3.5 倍(2.6-3.5)。

20 在这些淋巴细胞培养物中, 在上清液中测定细胞因子的生产(表(b)和图(30 (b)))。我们发现, 抗原 gp63 诱导的  $\gamma$  IFN 分泌在数量上与 OM-294-MP 或 BCG 佐剂处理的小鼠相当。然而, OM-294-MP 佐剂似乎更倾向于由(抗-gp63)免疫淋巴细胞分泌大量的 IL-4, 而 BCG 处理的小鼠淋巴细胞仅分泌少量甚至检测不到的所述细胞因子。

25



表(a) OM-294-MP 佐剂对于对 gp63 抗原免疫应答的影响, 通过 gp63 抗原在体外引起的鼠 T 淋巴细胞增殖反应测定

gp63 体外 ( $\mu\text{g/ml}$ )	无佐剂 ( $\text{cpm} \times 10^{-3}/\text{ml}$ )	OM-294-MP ( $\text{cpm} \times 10^{-3}/\text{ml}$ )	BCG ( $\text{cpm} \times 10^{-3}/\text{ml}$ )
0	1.4 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 1.1
0.16	18 $\pm$ 5	65 $\pm$ 11	47 $\pm$ 9
0.31	17 $\pm$ 5	92 $\pm$ 11	57 $\pm$ 17
0.62	16 $\pm$ 4	93 $\pm$ 13	54 $\pm$ 13
1.25	13 $\pm$ 2	39 $\pm$ 7	44 $\pm$ 9

- 5 表(a)中报道的数值表示算术平均摄取量 $\pm$ 标准偏差(一式三份培养)

表(b) 体内给药 OM-294-MP 佐剂和 gp63 抗原对淋巴结淋巴细胞体外生产细胞因子的影响

$\gamma$ IFN 浓度(pg/ml)			
gp63 体外	无佐剂	294-MP	BCG
0	< 9	< 9	27
0.3	78	135	200
0.6	38	120	105
IL-4 浓度(pg/ml)			
gp63 体外	无佐剂	294-MP	BCG
0	< 8	< 8	< 8
0.3	< 15	125	15
0.6	< 8	83	< 8

- 5 通过淋巴细胞增殖和抗原诱导的 $\gamma$  IFN 和 IL-4 生产进行分析, OM-294-MP 佐剂可以在体外在用 gp63(利什曼虫属寄生虫的两染性抗原)免疫的 CBA 小鼠中增强特异性 T 应答。

16. 当通过皮下给药 *Leishmania mexicana* LmCPb 抗原时 OM-294-MP 佐剂在 CBA 小鼠免疫模型中在抗-LmCPb T-初级应答过程中的效力

方法

- 对 CBA 小鼠通过尾部注射一次与 50  $\mu$ g OM-294-MP 佐剂混合或不混合的剂量为 2 $\mu$ g 的 LmCPb。对照组仅注射一次生理盐水缓冲液(未免疫的个体)。11 天后, 培养腹股沟和主动脉周的淋巴结(每组 3 只小鼠)的细胞并通过测定含氘胸腺嘧啶核苷( $^3$ H-TdR)的摄取评估对纯化的 LmCPb 抗原的增殖反应, 或者对整个 *Leishmania mexicana* 无鞭

毛体制备物或刀豆球蛋白 A(ConA)的增殖反应。在加入  $^3\text{H-TdR}$  前, 用每个淋巴结淋巴细胞培养上清液样品通过 ELISA(MIF100 IFN 和 M4000 IL-4 试剂盒, R&D Systems, Europe Ltd., Abingdon, UK)确定由用 *Leishmania mexicana* LmCPb 抗原或无鞭毛体体外再攻击的淋巴结淋巴细胞

5 细胞的 $\gamma$  IFN 和 IL-4 细胞因子生产。

在表中报告的  $^3\text{H-TdR}$  摄取值代表以 cpm 表示的算术平均 $\pm$ 标准偏差(一式三份)和上清液中的细胞因子对应于以 pg/ml 表示的算术平均 $\pm$ 标准偏差(一式三份)。

抗原: 用 PBS(2x)制备的浓度为 40  $\mu\text{g/ml}$  的 LmCPb 储备液。

10 佐剂: 用注射用水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-MP 储备液, 加入 0.1% 三乙醇胺。阴性对照是不含抗原的 PBS 溶液。

抗原-佐剂混合物: 将佐剂在 37 $^{\circ}\text{C}$  保持 10 分钟, 然后旋转混合 3 分钟。然后, 将抗原 (1 体积)和佐剂 (1 体积)混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 20 分钟后旋转混合, 最后将全部混合物旋转 3 分钟。

## 15 结果

在培养基中不存在任何刺激的情况下, OM-294-MP 佐剂可促进经历了自发增殖(表(a)和图 31 (a))并分泌痕量 $\gamma$  IFN (表(b)和图 31(b))的淋巴细胞的发育。当将纯化的 LmCPb 抗原或全寄生虫提取物加到培养基中时, 该反应显著增强。在本试验中, 观察到这种佐剂对诱导可分泌大量 IL-4 的敏化淋巴细胞(抗-LmCPb)有显著的影响 (表(b)和图 31

20 (b))。

表(a)用 LmCPb 体内免疫的淋巴结细胞的体外增殖反应：OM-294-MP  
佐剂的影响

体外抗原	<sup>3</sup> H-TdR 摄取(cpm x 10 <sup>-3</sup> /ml)		
	未免疫的	不含佐剂	OM-294-MP
无刺激剂	0.9±0.3	2.2±0.7	11±2
LmCPb 0.6 µg/ml	0.8±0.4	1.7±0.1	19±4
LmCPb 1.7 µg/ml	0.9±0.1	4.6±1.6	40±4
LmCPb 5 µg/ml	1.3±0.8	7.2±0.6	80±5
LmCPb 15 µg/ml	2.6±0.4	16.2±2.1	140±10
无鞭毛体 1.9 x 10 <sup>-6</sup> /ml	0.8±0.2	1.7±0.1	44±7
无鞭毛体 6 x 10 <sup>-6</sup> /ml	1.5±0.2	4.6±0.6	79±6
无鞭毛体 17 x 10 <sup>-6</sup> /ml	2.9±0.6	7.2±0.6	119±4
Con A 5 µg/ml	123±33	193±17	196±10

表(b)用 LmCPb 体内免疫的淋巴结淋巴细胞体外分泌细胞因子: OM-294-MP 佐剂对处级反应的影响

$\gamma$ IFN 生产(pg/ml)			
体外刺激剂	未免疫的	不含佐剂	OM-294-MP
无刺激剂	< 9	< 9	25
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	< 9	46	480
无鞭毛体 $17 \times 10^{-5}$ /ml	< 9	95	320
Con A 5 $\mu$ g/ml	> 1800	> 1800	> 1800
IL-4 生产 (pg/ml)			
体外刺激剂	未免疫的	不含佐剂	OM-294-MP
无攻击	< 8	< 8	< 8
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	< 8	< 8	130
无鞭毛体 $17 \times 10^{-5}$ /ml	< 8	< 8	65
Con A 5 $\mu$ g/ml	92	190	360

- 5 在初级 T 反应(一次免疫注射后)中, OM-294-MP 佐剂也是非常有效的。该佐剂对该反应的影响特性(淋巴细胞增殖的增强, 细胞因子生产的诱导)与在对两次免疫注射过程中观察到的相似。

17. 通过皮下给药 *Leishmania mexicana* LmCPb 抗原在 CBA 小鼠免疫模型中评估 OM-294-MP 和 OM-294-DP 的佐剂特性: 与 BCG 比较

10 方法

对 CBA 小鼠(每组 8 只小鼠)在尾部皮下注射 3-5 $\mu$ g 纯化的 LmCPb 两次, 间隔 8 天。将 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂与两次剂量的抗原混合, 而 BCG 仅在第一次混合。每只小鼠接受 2 x 50 $\mu$ g 的 OM 佐剂或 200 $\mu$ g 的 BCG。第二次注射 8 天后, 取出主动脉周和腹股

沟的淋巴结(每组 3 只小鼠)并培养细胞以分析对纯化的 LmCPb 抗原的增殖反应, 或者对整个 *Leishmania mexicana* 无鞭毛体制备物或刀豆球蛋白 A(ConA)的增殖反应。增殖反应通过测定含氚胸腺嘧啶核苷( $^3\text{H-TdR}$ )的摄取进行评估。在加入  $^3\text{H-TdR}$  前, 用每个淋巴结淋巴细胞培养上清液样品通过 ELISA(MIF100 IFN 和 M4000 IL-4 试剂盒, R&D Systems, Europe Ltd., Abingdon, UK)确定由用 *Leishmania mexicana* 的 LmCPb 抗原或无鞭毛体或 Con A 抗原体外再攻击的淋巴结淋巴细胞分泌的  $\gamma$  IFN 和 IL-4 细胞因子的生产。

在表中报告的值表示以抗体滴度标准的百分比表示的算术平均 $\pm$ 标准偏差,  $^3\text{H-TdR}$  摄取值为以 cpm 表示的算术平均 $\pm$ 标准偏差(一式三份)和细胞因子生产为以 pg/ml 表示的算术平均 $\pm$ 标准偏差(一式三份)。

抗原: 用 0.9% NaCl 制备的浓度为 60  $\mu\text{g/ml}$  - 100 $\mu\text{g/ml}$  的 LmCPb 储备液。

佐剂: 用注射用水制备浓度为 1 mg/ml 的 OM-294-MP 和 OM-294-DP 储备液, 对于 OM-294-MP, 加入 0.1% 三乙醇胺。阴性对照是不含抗原的 PBS 溶液。

抗原-佐剂混合物: 将佐剂在 37 $^{\circ}\text{C}$  保持 10 分钟, 然后旋转混合 3 分钟。然后, 将抗原 (1 体积)和佐剂 (1 体积)混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 20 分钟后旋转混合, 最后将全部混合物旋转 3 分钟。

## 20 结果

在用 LmCPb 抗原免疫的小鼠中(表 s (a)和(b), Figures 32 (a)和(b)), 产物 OM-294-MP 和 OM-294-DP 产生与发展了抗 gp63 免疫反应的小鼠中观察到的相似的作用。因此, 存在 LmCPb (15  $\mu\text{g/ml}$ )的条件下, 衍生于已用抗原加 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂免疫之小鼠的培养物的增殖程度比仅用抗原(不含佐剂)免疫之小鼠的培养物分别高 23 和 28 倍。在这些条件下, BCG 的影响较小, 因为增殖的增加仅仅

为 11 倍。在用纯化抗原或者利什曼虫属寄生虫全提取物攻击的培养物中，对于所检测的所有抗原浓度均观察到类似的作用。

5 应答 LmCPb 抗原加 OM-294-DP 比应答 LmCPb 抗原加 BCG 的  $\gamma$  IFN 生产略高(表(b)和图 32 (b))。应注意，在本试验中，即使不向培养基中加入抗原，淋巴细胞可能也会增殖并分泌大量的  $\gamma$  IFN。在这种情况下，OM-294-DP 佐剂似乎比 BCG 更有效。按照上述能够产生 IL-4 的淋巴细胞的发育情况，观察到 OM-294-MP, OM-294-DP 与 BCG 佐剂有显著差异。在 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂的影响下，所生产的 IL-4 的数量是显著的，因为它与由接触 Con A(淋巴细胞的一种强的非  
10 特异性刺激剂)的淋巴细胞分泌的数量相匹配(见表(a)和(b))。

表(a)对来自用 LmCPb 体内免疫的小鼠的淋巴结细胞的体外增殖响应:  
不同佐剂的影响

体外刺激剂	<sup>3</sup> H-TdR 摄取 (cpm x 10 <sup>-3</sup> /ml)			
	无佐剂	OM-294- DP	OM-294- MP	BCG
无刺激剂	1.7±0.6	21.8±2.2	17.1±2.5	18.6±4.8
LmCPb 0.6 µg/ml	0.8±0.3	40.9±12.7	22.9±2.8	19.0±7.4
LmCPb 1.7 µg/ml	2.4±0.1	57.2±10.9	34.1±4.1	39.8±5.7
LmCPb 5 µg/ml	2.8±0.6	70.2±9.2	70.3±6.4	44.0±10.4
LmCPb 15 µg/ml	4.3±0.1	100.0±6.5	124.2±12.0	46.2±0.3
无鞭毛体 2 x 10 <sup>-6</sup> /ml	2.4±0.6	61.0±1.7	28.4±8.3	24.4±4.3
无鞭毛体 6 x 10 <sup>-6</sup> /ml	2.3±0.7	81.5±5.5	66.1±4.5	23.6±2.5
无鞭毛体 17 x 10 <sup>-6</sup> /ml	1.7±0.4	78.2±7.8	68.7±2.3	23.4±4.0
Con A 5 µg/ml	188.1±21.0	135.9±3.7	151.4±3.7	119.7±28.5

表中所报道的数值表示示踪剂摄取的算术平均值±标准偏差(一式三份

5 培养物)



表(b) 来自用 LmCPb 抗原体内免疫的小鼠的淋巴结淋巴细胞的体外细胞因子生产: 不同佐剂的影响

$\gamma$ IFN 浓度(pg/ml)				
体外刺激剂	无佐剂	OM-294- DP	OM-294- DP	BCG
无刺激剂	< 9	460	240	280
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	44	520	360	460
无鞭毛体 17 x 10 <sup>-6</sup> /ml	14	> 600	> 600	480
Con A 5 $\mu$ g/ml	1200	1200	1900	> 3000
IL-4 浓度(pg/ml)				
体外刺激剂	无佐剂	OM-294- DP	OM-294- DP	BCG
无刺激剂	< 15	< 8	< 8	< 8
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	< 15	110	88	36
无鞭毛体 17 x 10 <sup>-6</sup> /ml	< 8	130	110	29
Con A 5 $\mu$ g/ml	40	230	85	105

- 5 OM-294-MP 和 OM-294-DP 佐剂可以有效地增强对利什曼虫属的可溶性抗原 LmCPb 蛋白酶的免疫应答。这在体外表现在通过诱导显著量的 $\gamma$  IFN 和 IL-4 生产引起增殖反应的增加。

**实施例 VI**注射用水溶液

实施例 III 的化合物	1 g
吐温 80	0.2 g
氯化钠	9 g
注射用双蒸水适量至	1000ml

- 5 将溶液用 0.1M HCl 调至 pH 7.5, 然后通过 0.22 $\mu$ m Steritop Express 1000 膜(PES 膜, 90mM, SCGP T10 RE, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)上膜过滤进行灭菌。将无菌水溶液分装到 1ml 的无菌安瓿中。

冷冻干燥产物

10

实施例 IV 的产物	2 g
吐温 80	0.2 g
氯化钠	9 g
甘露糖醇	10 g
抗坏血酸	0.1 g
注射用双蒸水适量至	1000ml

- 15 将溶液用 0.1M HCl 调至 pH 7.4, 然后通过 0.22 $\mu$ m Steritop Express 1000 膜(PES 膜, 90mm, SCGP T10 RE, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)上膜过滤进行灭菌。将无菌溶液通过分成每瓶 1ml 分装到无菌多剂量瓶中, 然后冷冻干燥。

图1  
诱导骨髓干细胞增殖

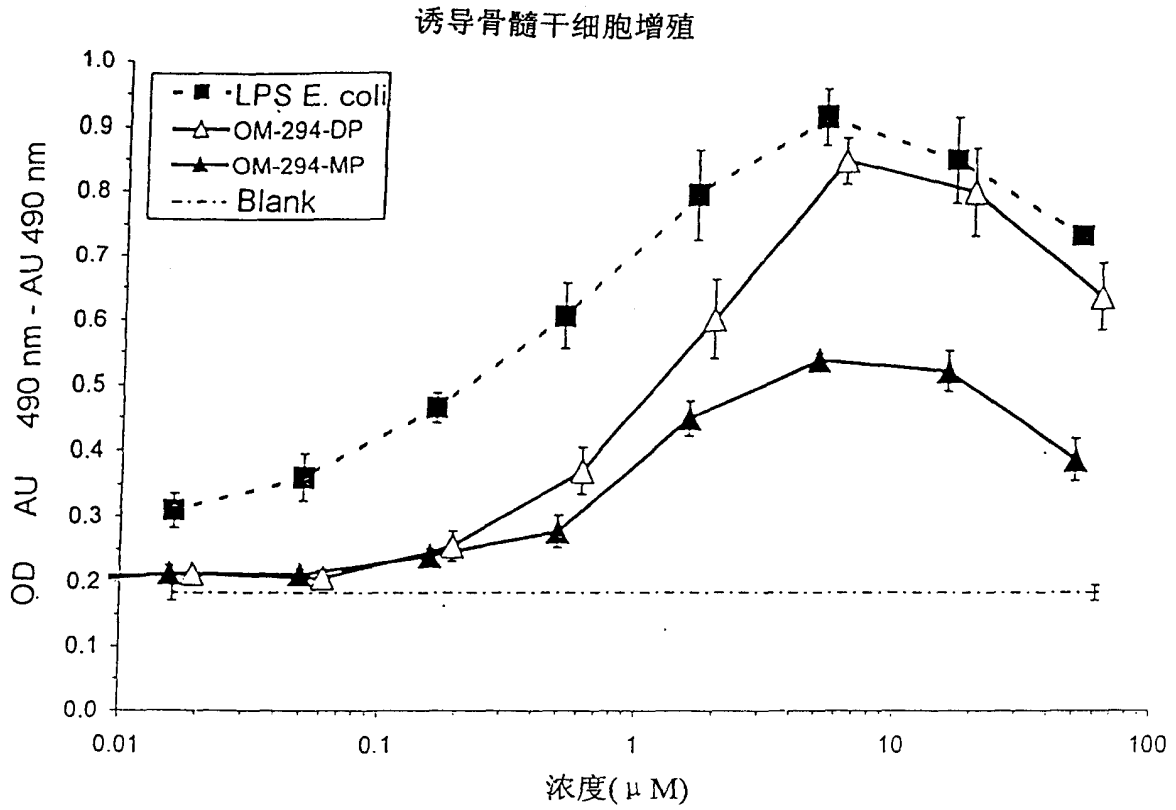


图2  
在鼠巨噬细胞中诱导 NO 的生产

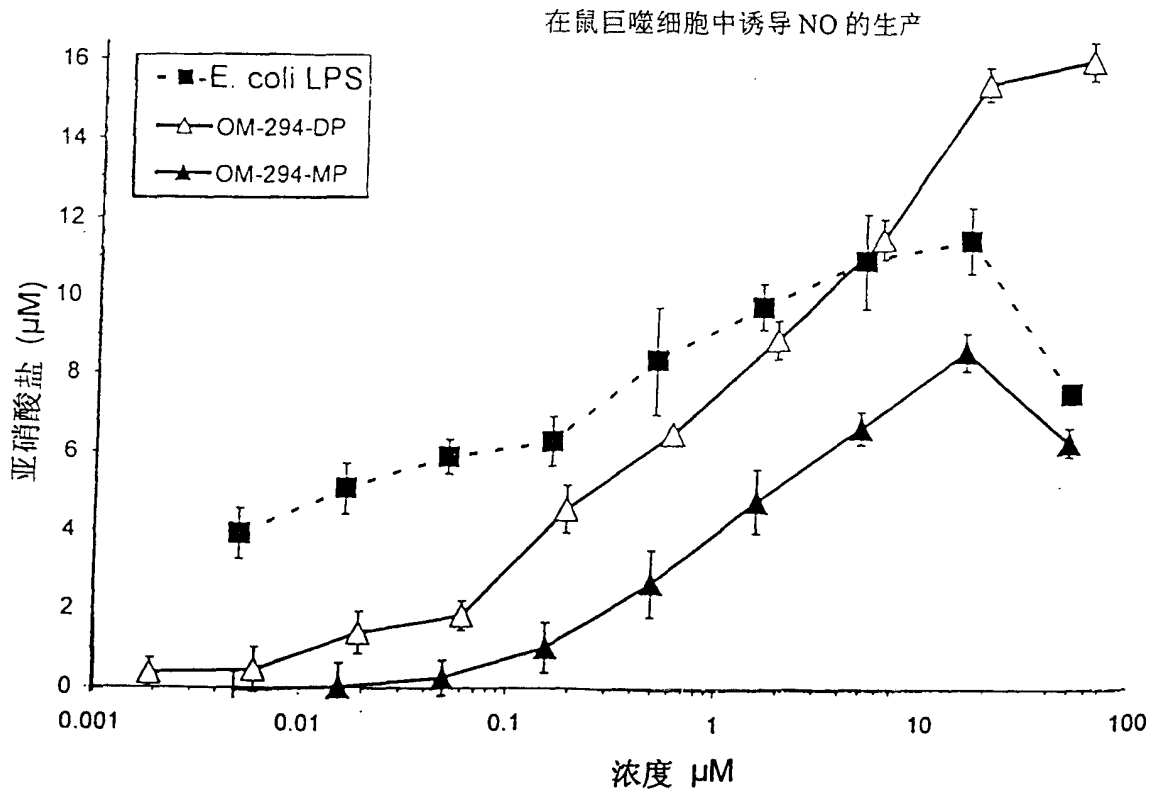


图 3

诱导葡聚糖-FITC 结合物

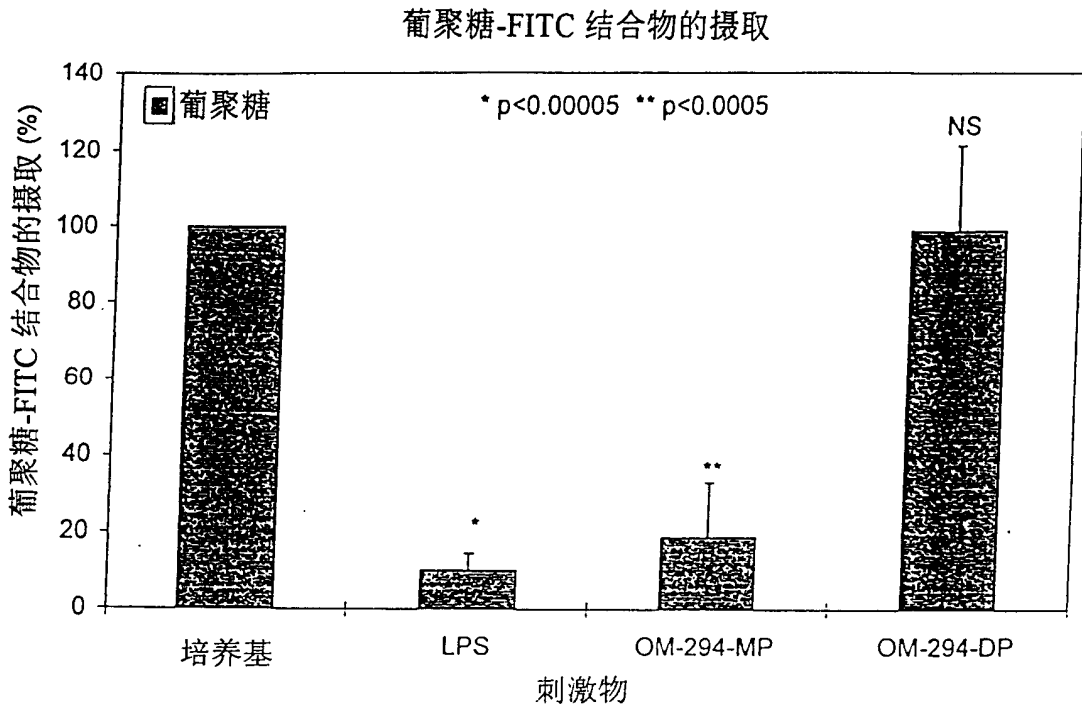


图 4

葡聚糖-FITC 结合物摄取：在低浓度下的剂量相关性影响

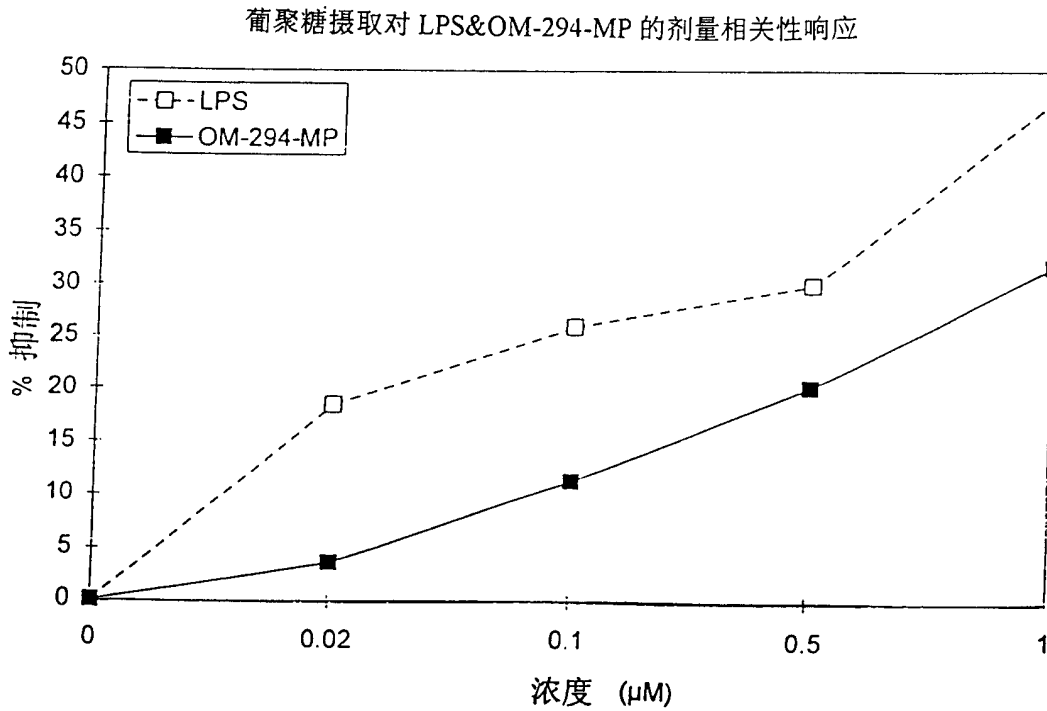


图 5

高浓度下葡聚糖-FITC 结合物摄取的剂量相关性影响

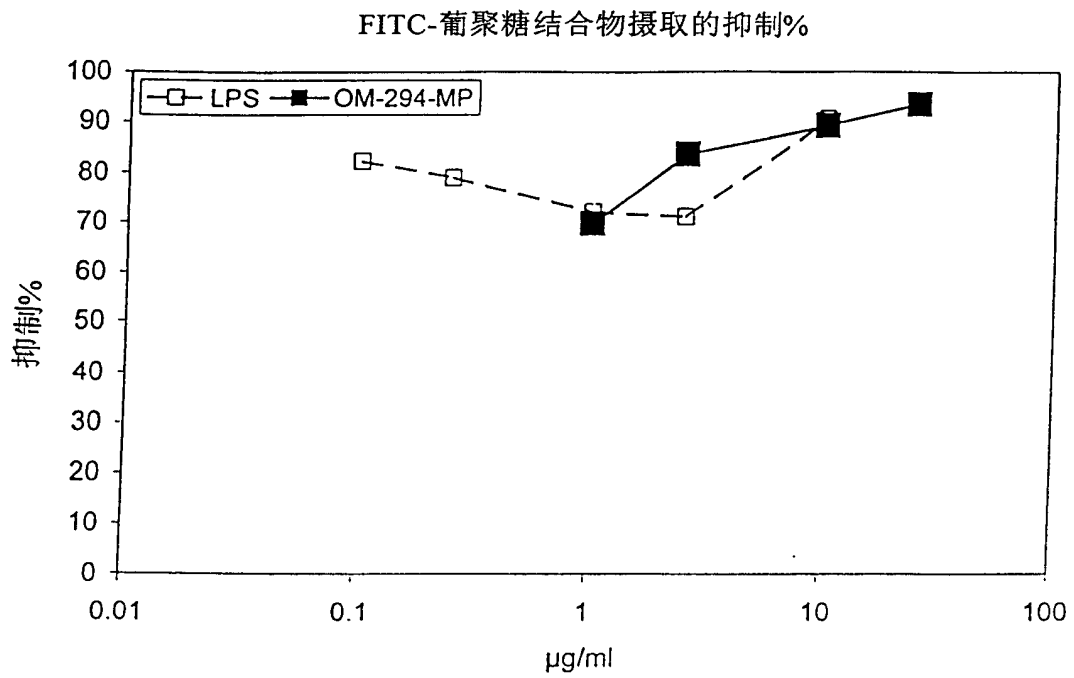


图 6

CD40 共刺激表面标记物表达

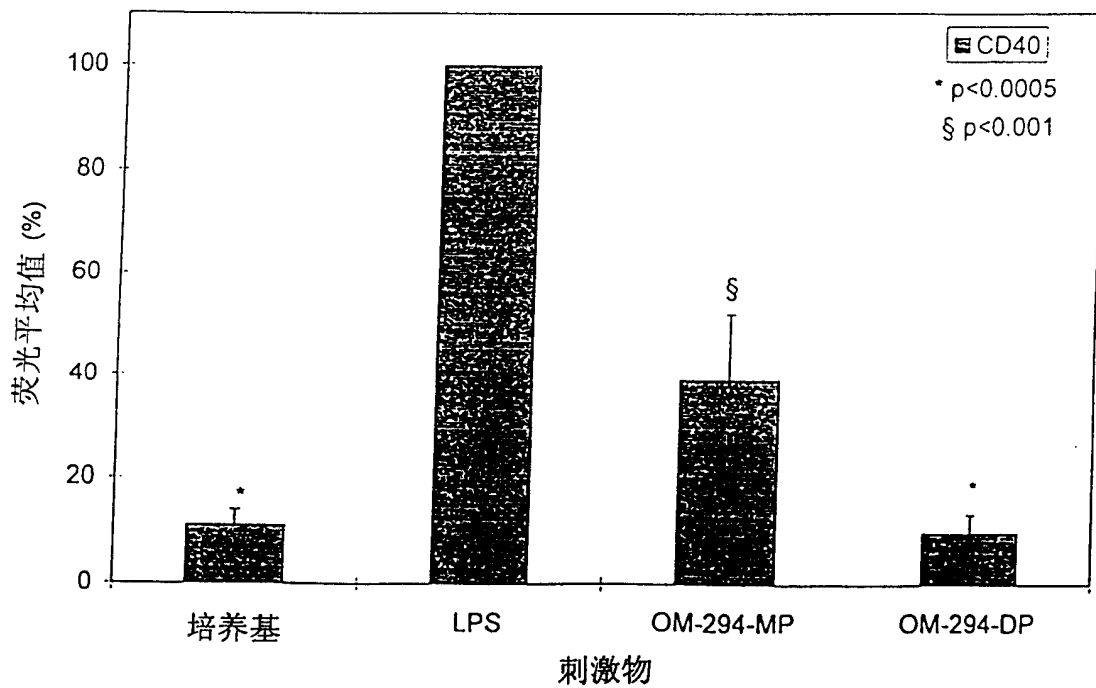


图 7

CD86 共刺激表面标记物的表达

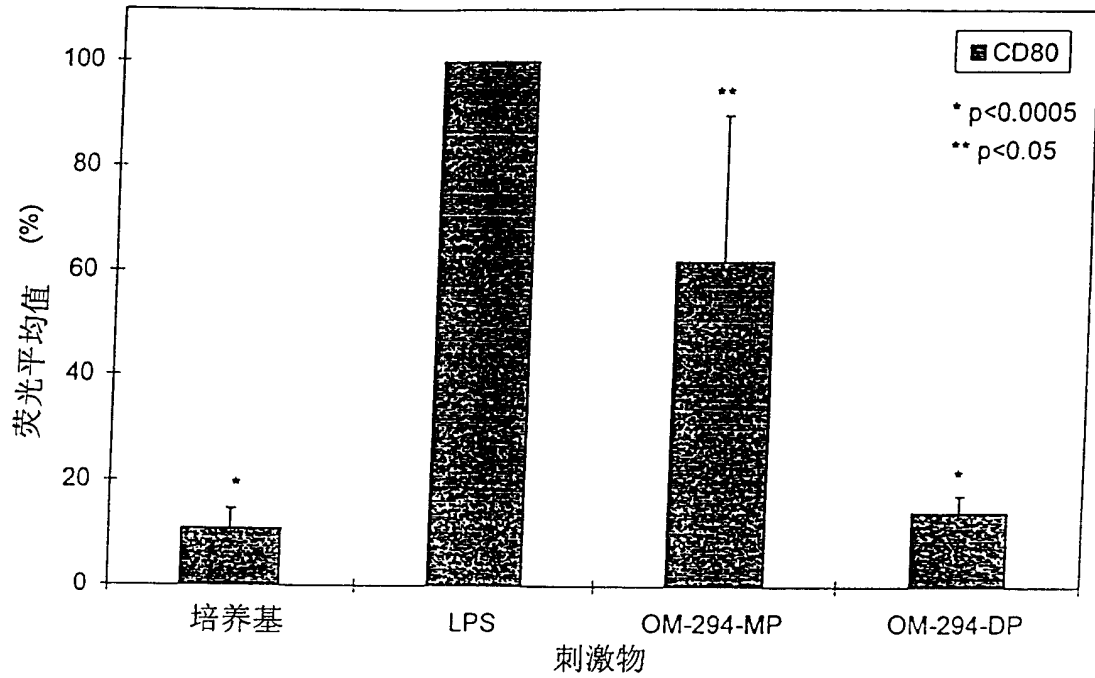


图 8

共刺激表面标记物的表达

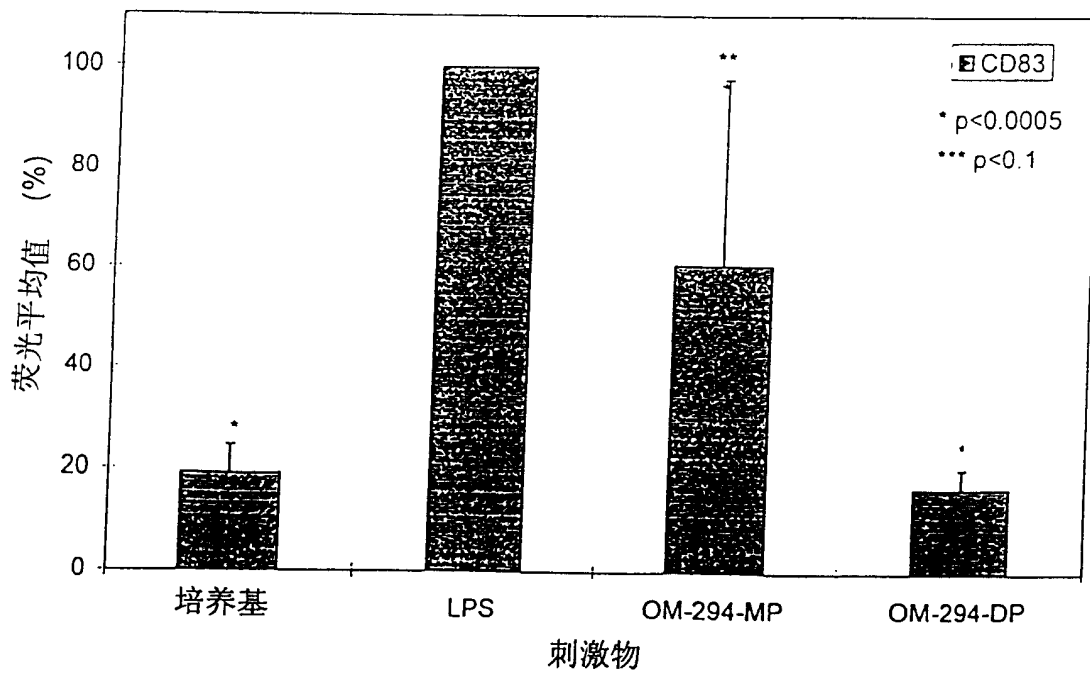


图 9  
共刺激表面标记物的表达

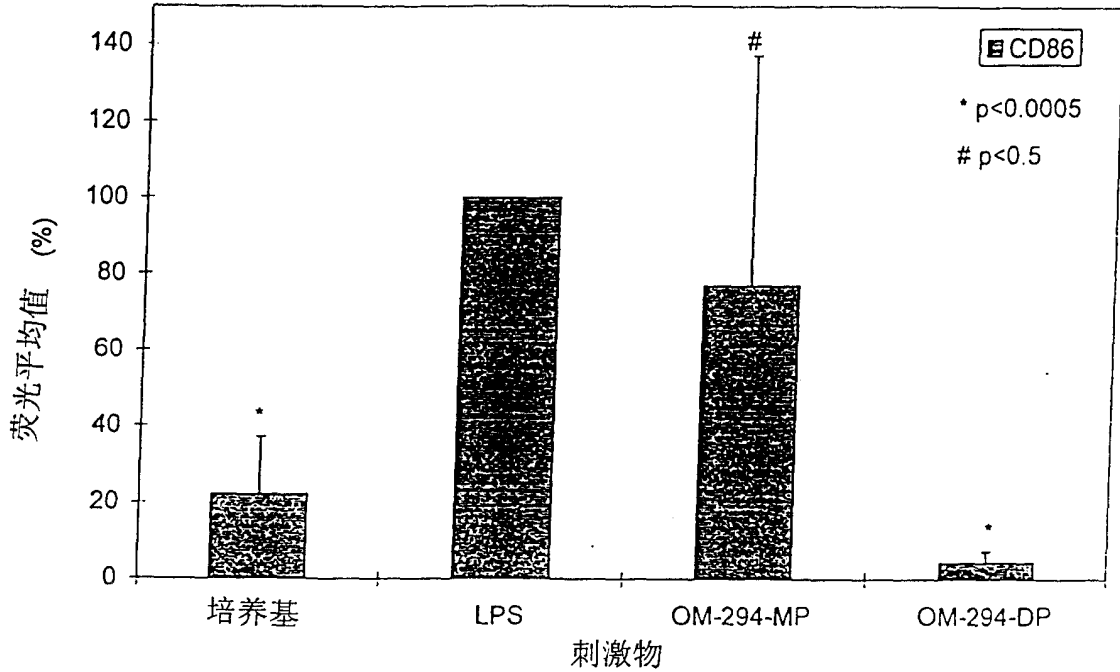


图 10  
OM-294-MP 和 OM-294-DP 产物对 DC-6 阶段的前树状细胞生产  $\alpha$  TNF 的影响

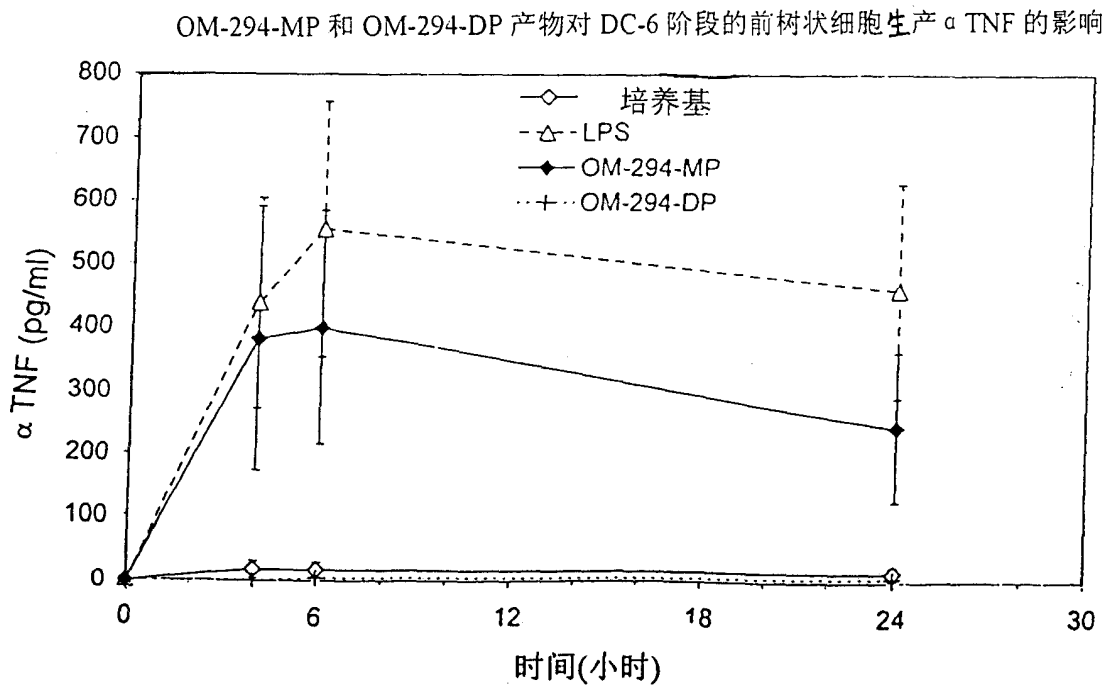


图 11

OM-294-MP 和 OM-294-DP 产物对 DC-6 阶段前树状细胞生产 IL-12 p70 的影响  
(IFN =  $\gamma$  IFN)

树状细胞 DC-6 上清液中的 IL-12 p70

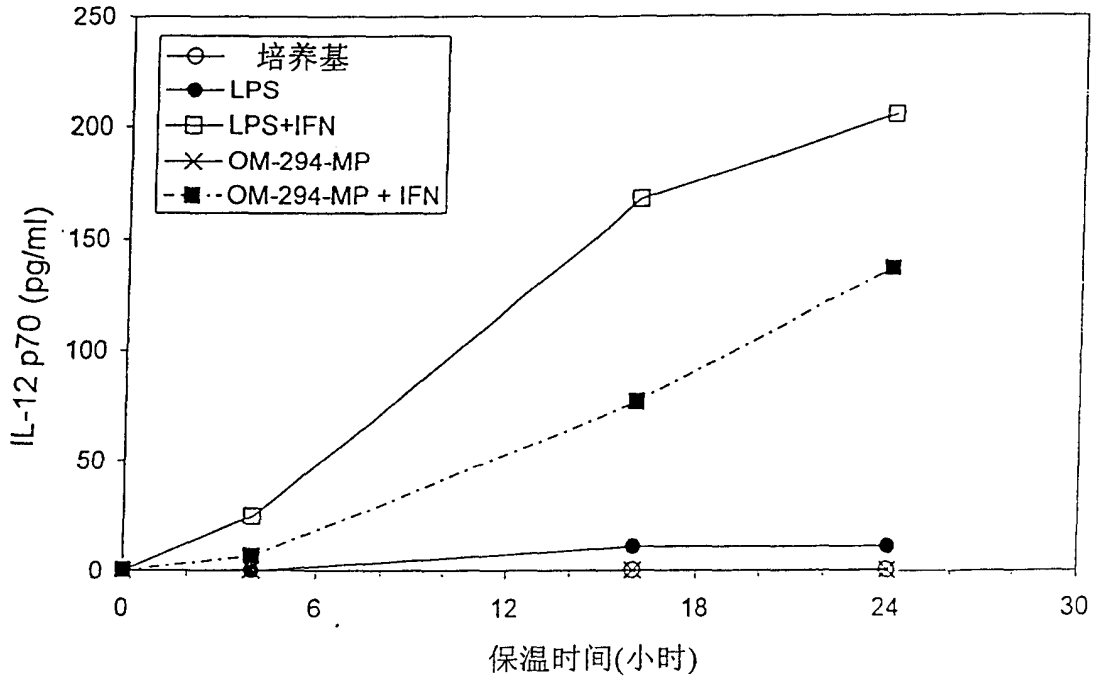


图 12

OM-29-MP 产物对单核细胞生产 IL-12 p70 的影响

(IFN =  $\gamma$  IFN)

单核细胞 上清液中的 IL-12 p70

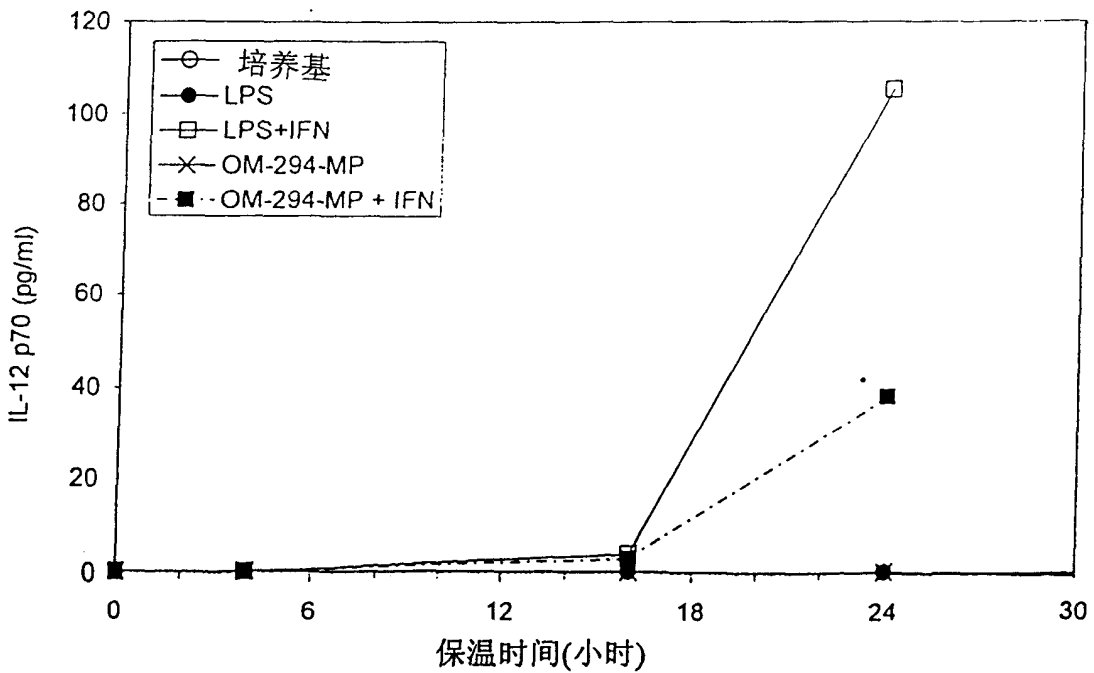




图 13

第一次免疫处理后的 ELISA2

第一次注射 3 周后检测特异性针对

Pb CS His<sub>6</sub> 242-310 的抗体 (ELISA N° 2)

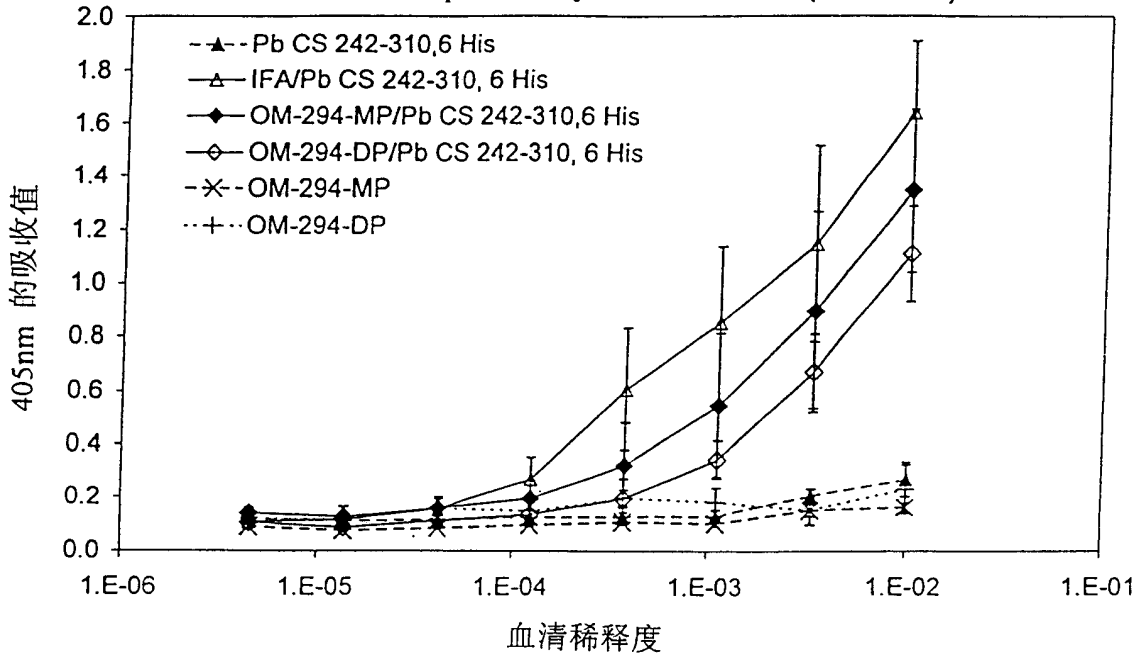


图 14

第二次免疫处理后的 ELISA3

在第二次注射后 4 周检测特异性针对

Pb CS His<sub>6</sub> 242-310 的抗体 (ELISA N° 3)

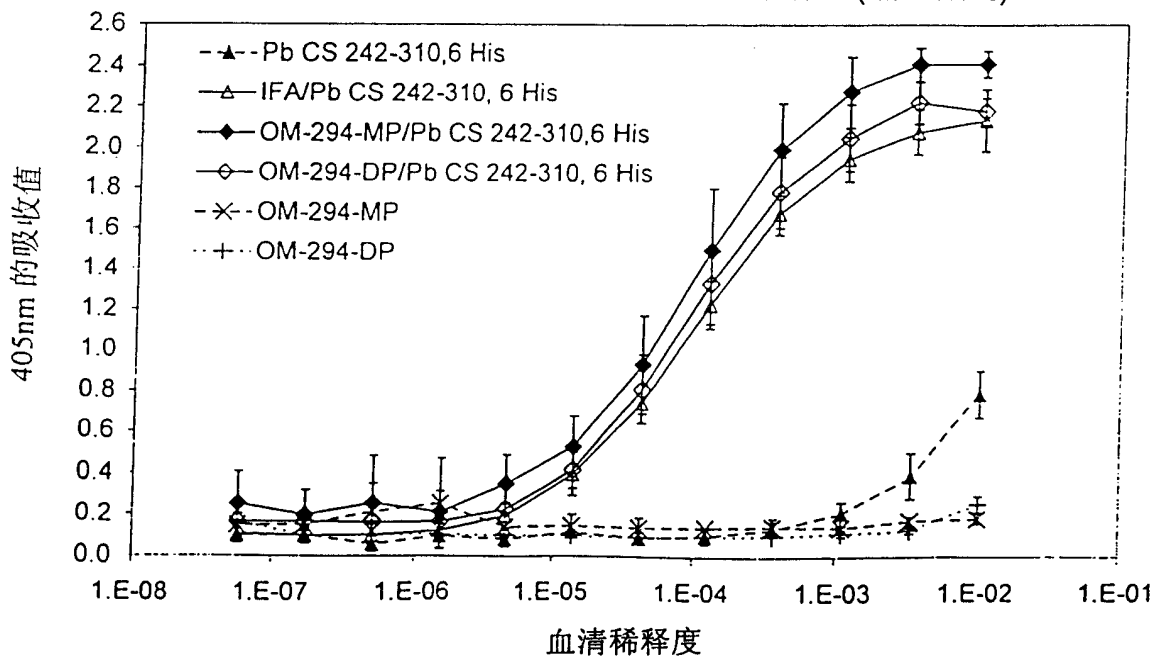


图 15

第三次免疫处理后的 ELISA4

第三次注射后 2 周检测特异性针对  
pb CS His<sub>6</sub> 242-310 的抗体 (ELISA N° 4)

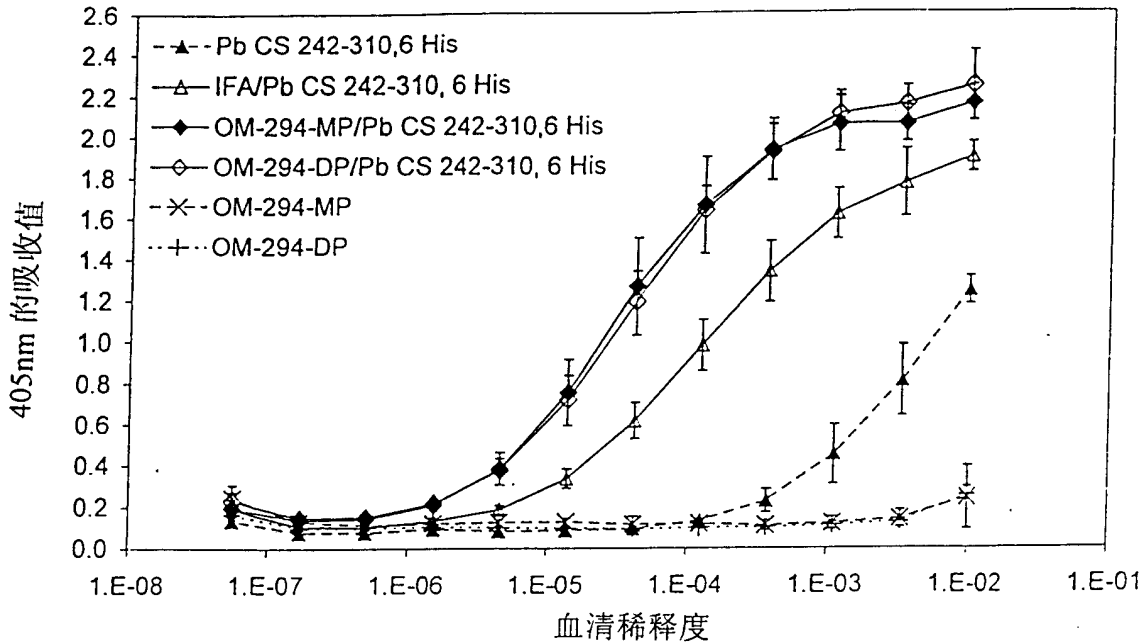


图 16

在 1、2 和 3 次免疫处理前后的抗体滴度

在 1、2 和 3 次注射后特异性针对  
pb CS His<sub>6</sub> 242-310 的抗体滴度的改变

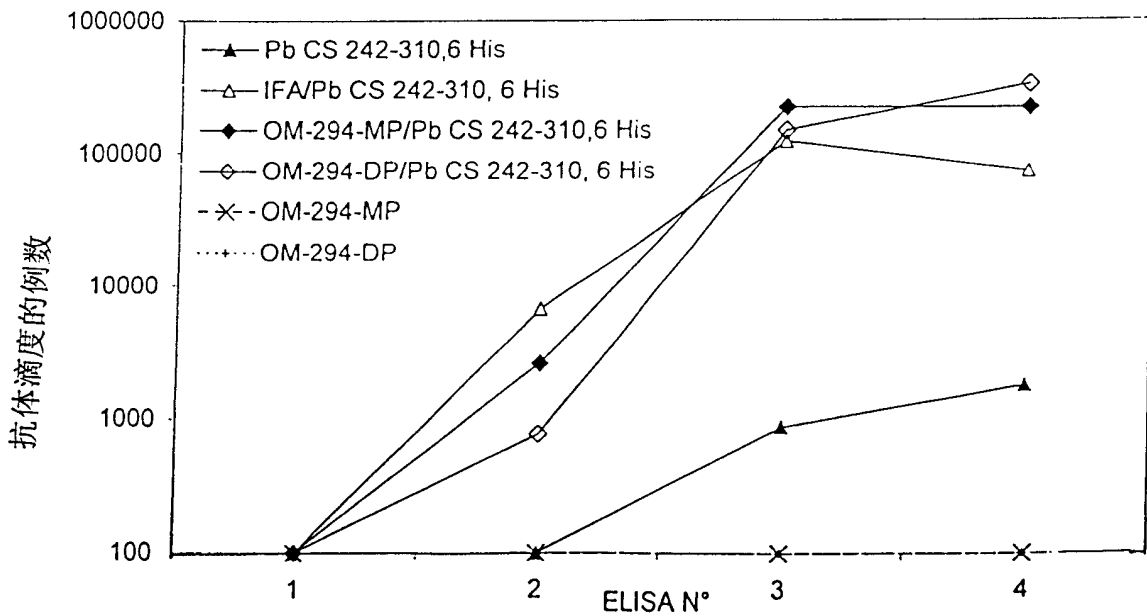


图 17

在第二次免疫处理后 1 周，用 pb CS245-252 刺激的腹股沟淋巴结的生产  $\gamma$  IFN 的淋巴细胞

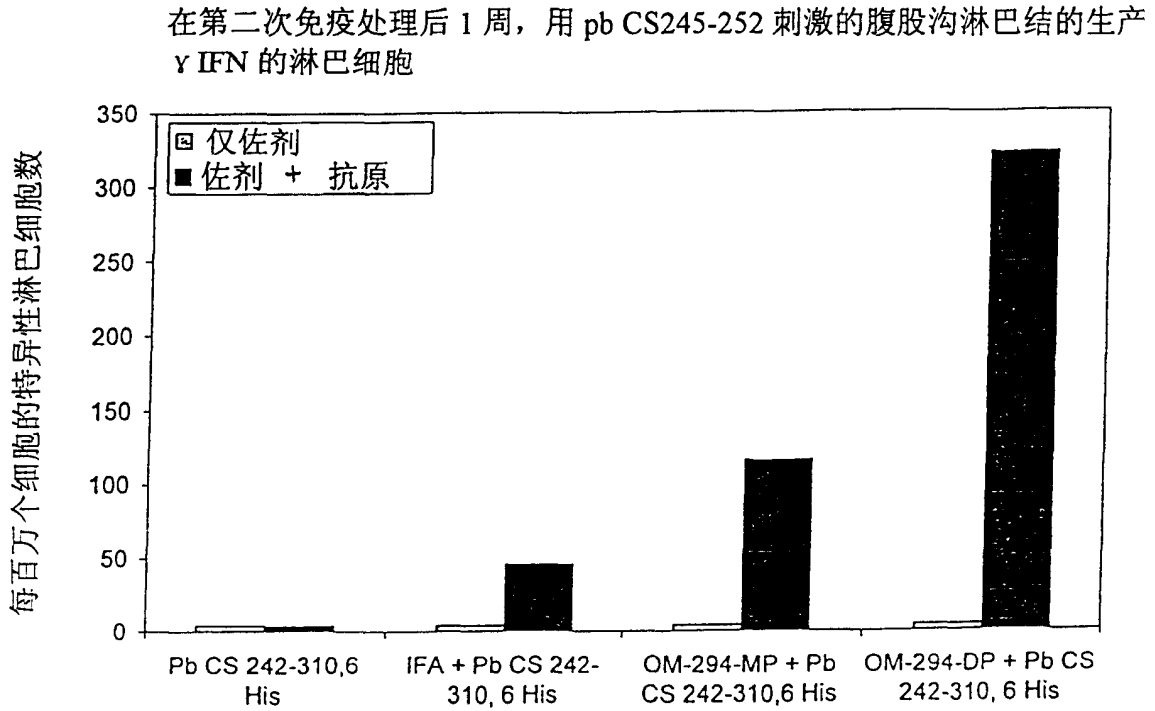


图 18

第二次免疫 1 周后用 Pb CS 245-252 刺激的生产  $\gamma$  IFN 的脾淋巴细胞

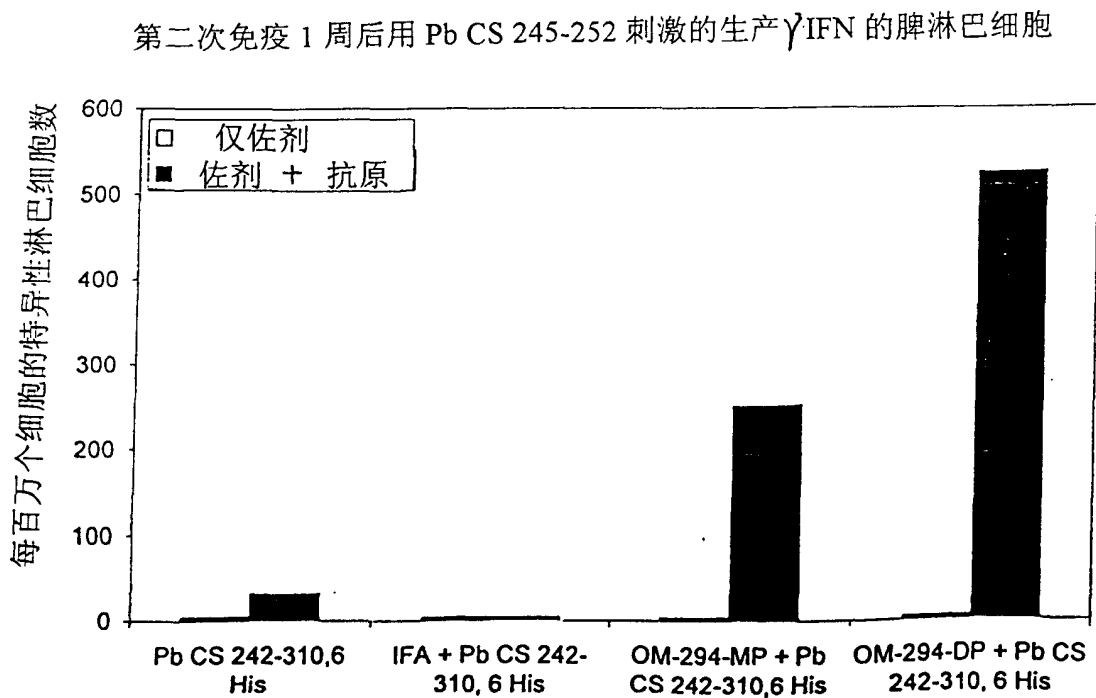


图 19

第二次免疫后 1 周，用 pb CS 245-252 刺激的生产  $\gamma$  IFN 的脾淋巴细胞

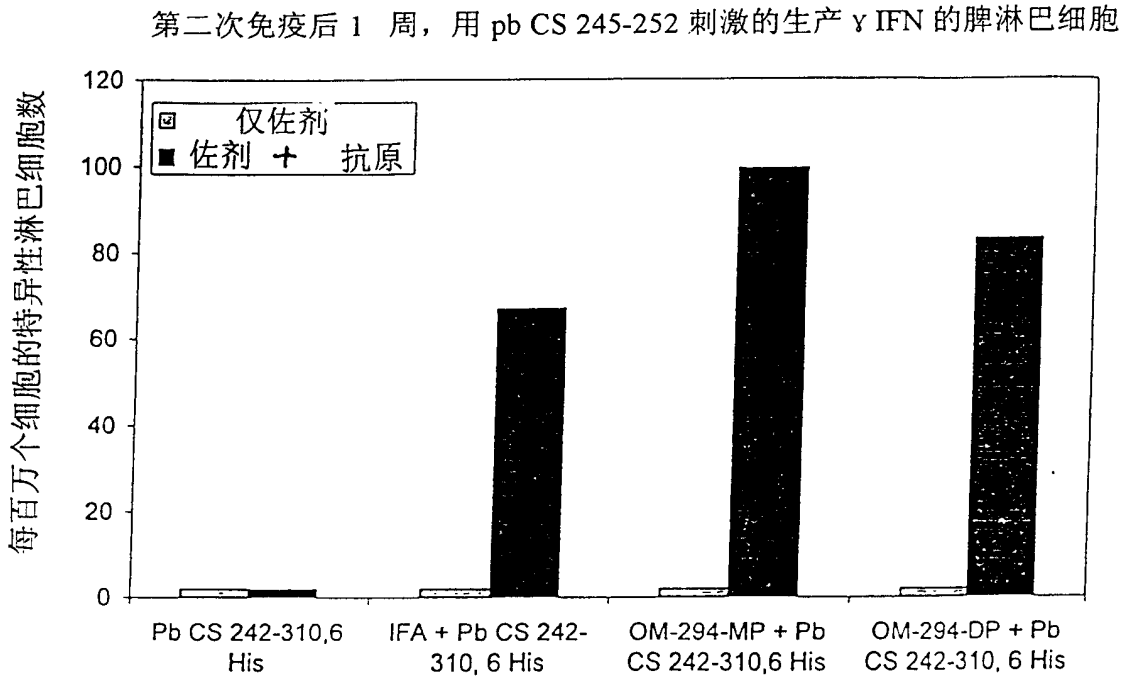


图 20

第三次免疫 3 周后用 Pb CS 245-252 刺激的生产  $\gamma$  IFN 的脾淋巴细胞

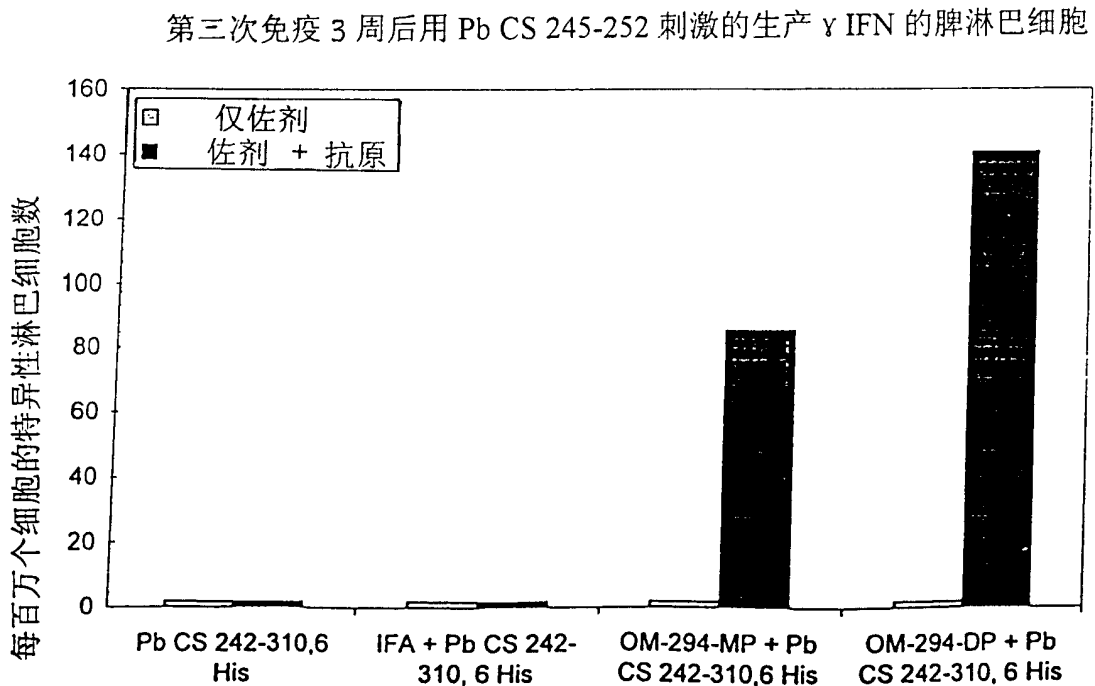


图 21

单独 OM-294-DP、单独 Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 抗原以及 Pb CS His<sub>6</sub>-310-OM-294-DP 复合物的电泳图

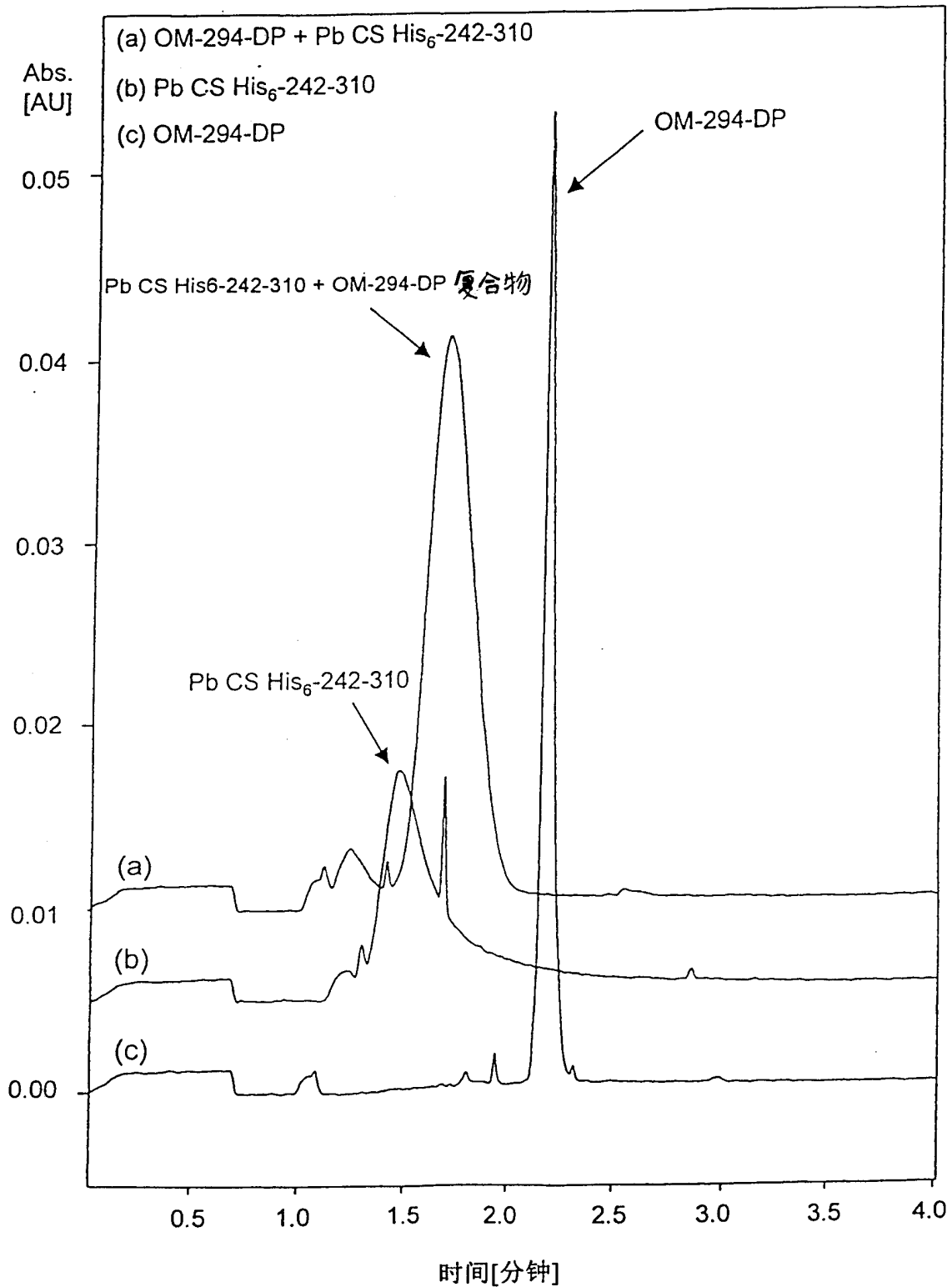


图 22

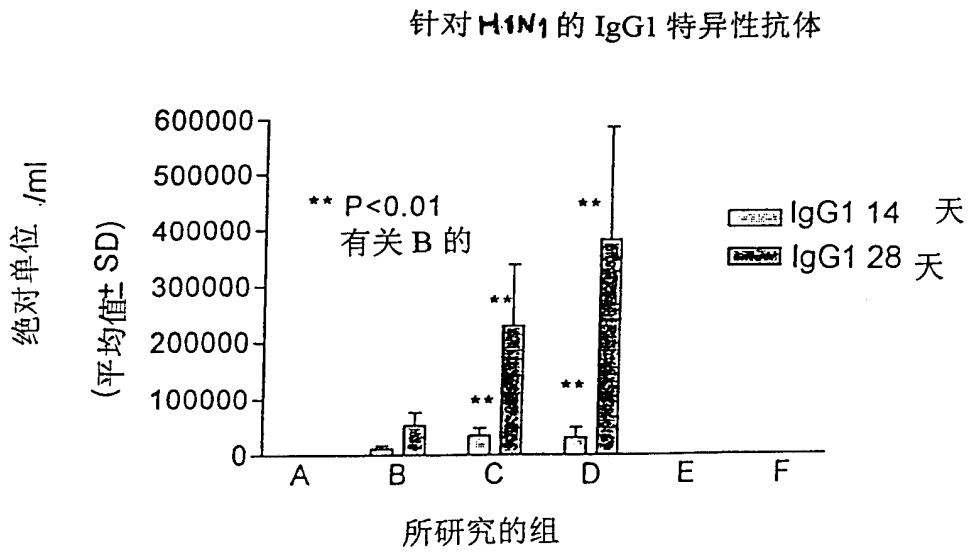


图 23

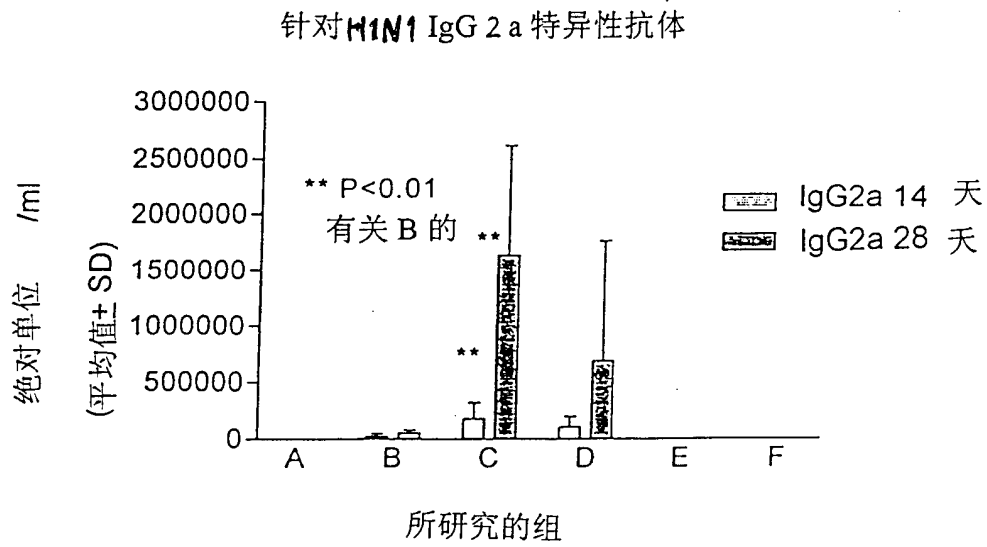


图 24

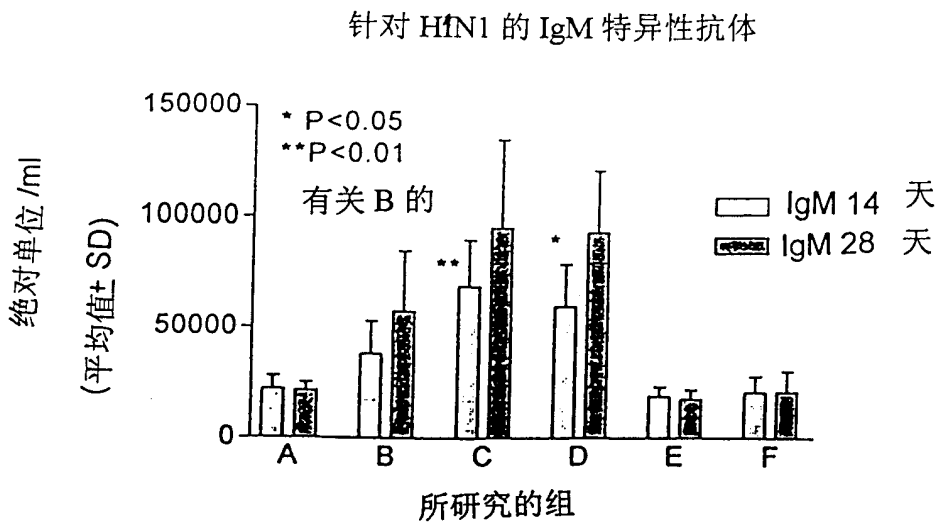


图 25

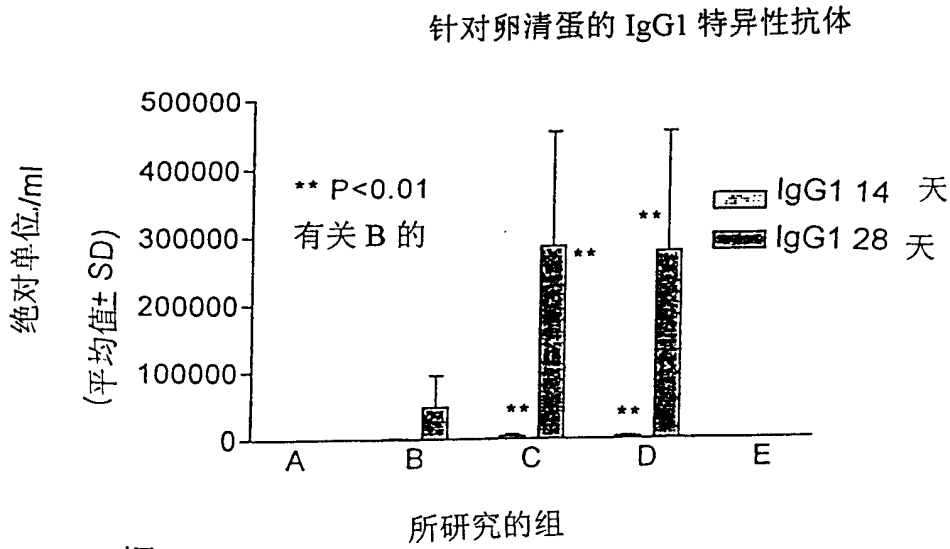


图 26

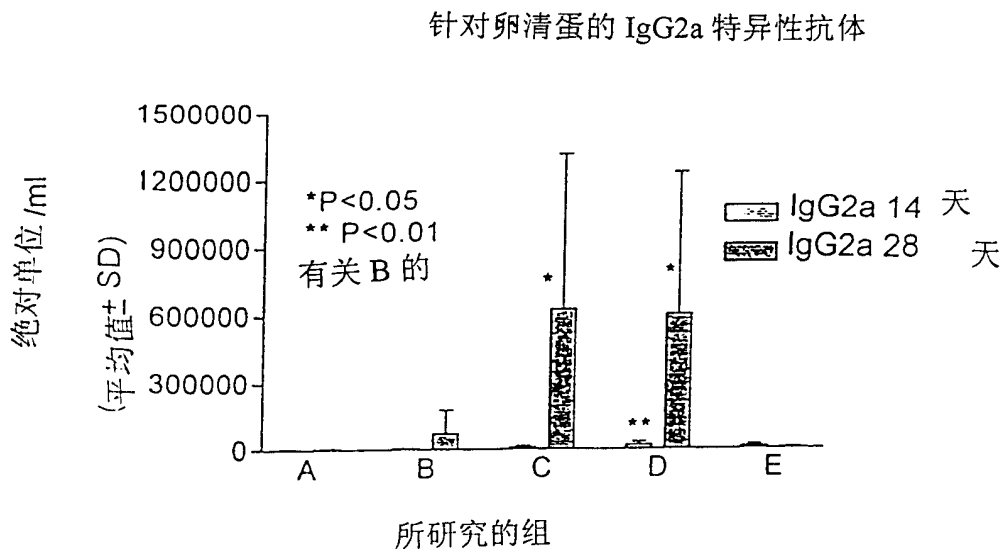


图 27

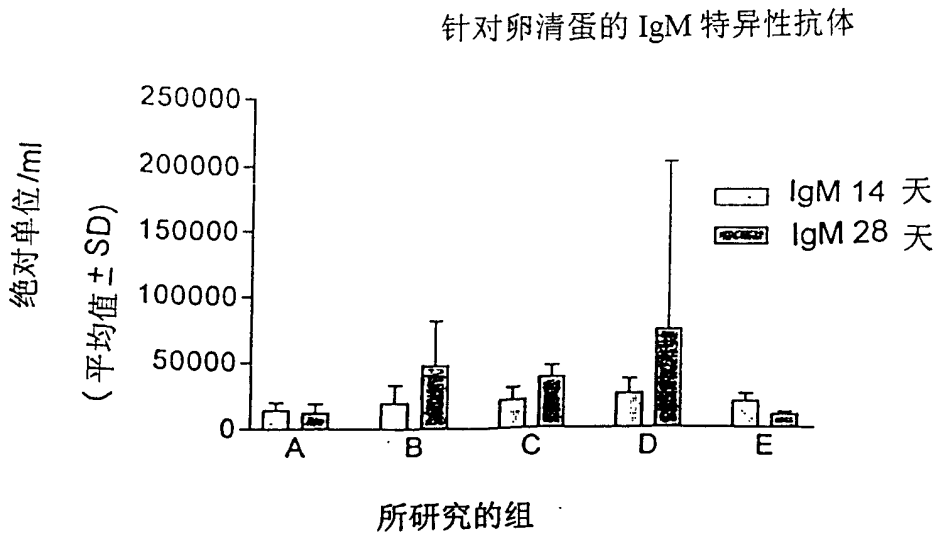


图 28

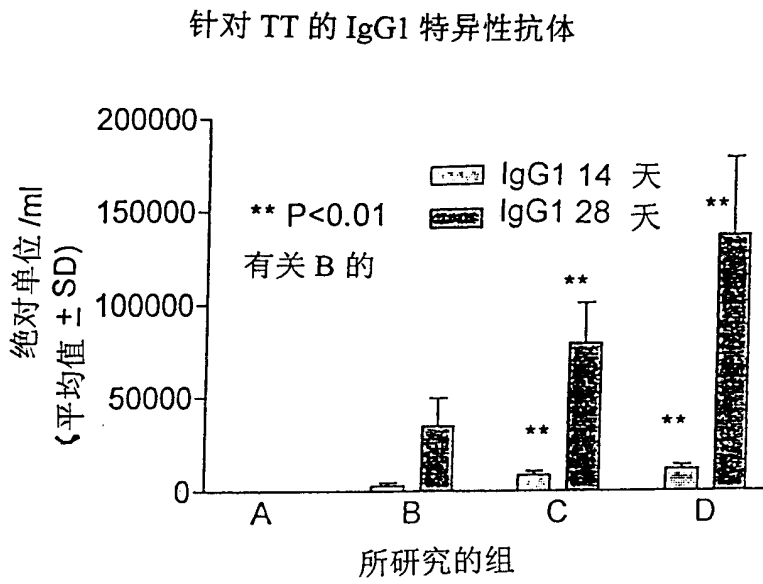


图 29

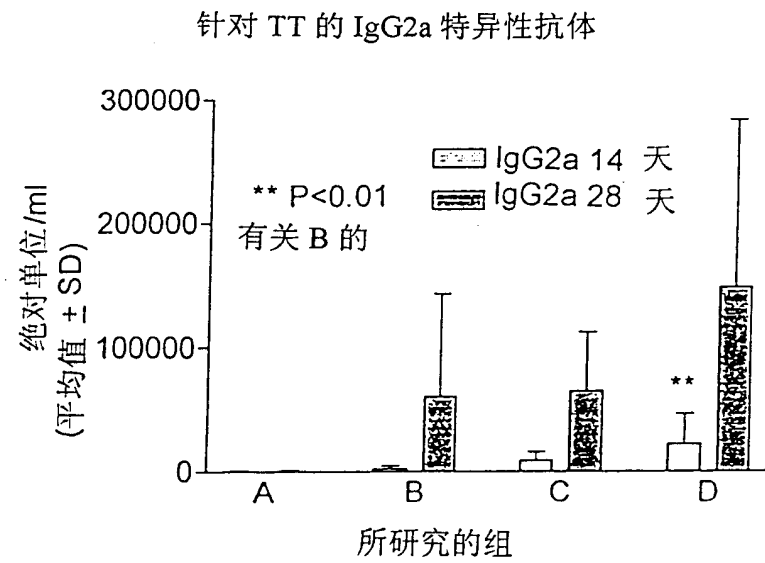




图 30 (a)

在 OM-294-MP 佐剂的影响下抗 gp63 免疫反应的增强：与 BCG 相比

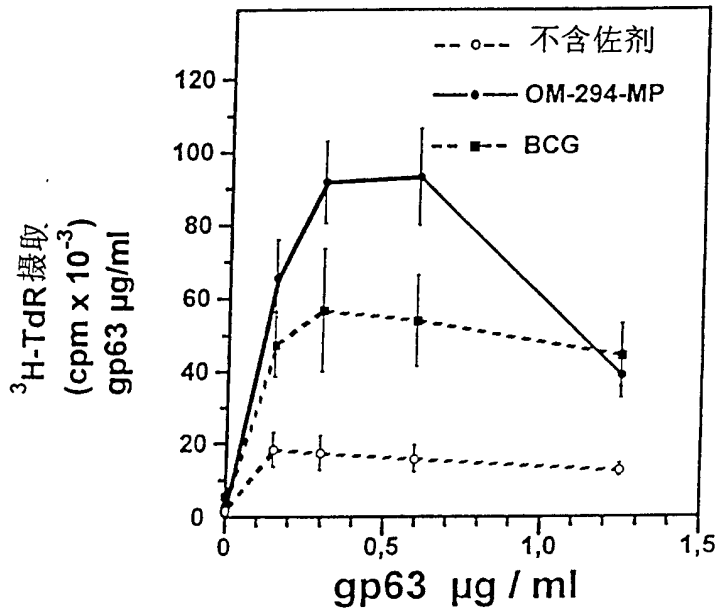


图 30 (b)

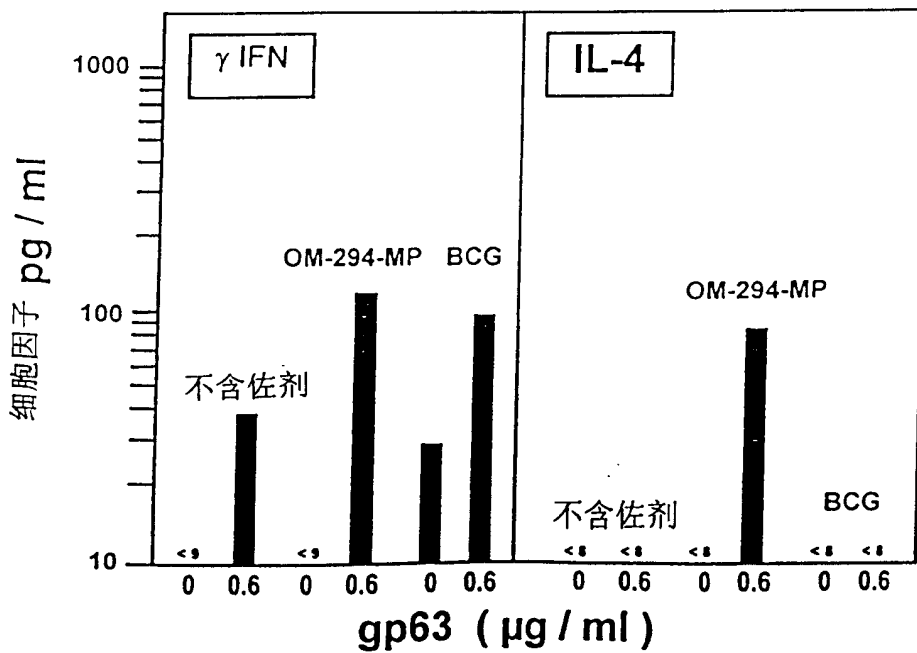


图 31 (a)

衍生于预先用 LMCPb 抗原体内免疫之小鼠的体外淋巴结淋巴细胞反应：  
在初级反应过程中 OM-294-M 佐剂的影响

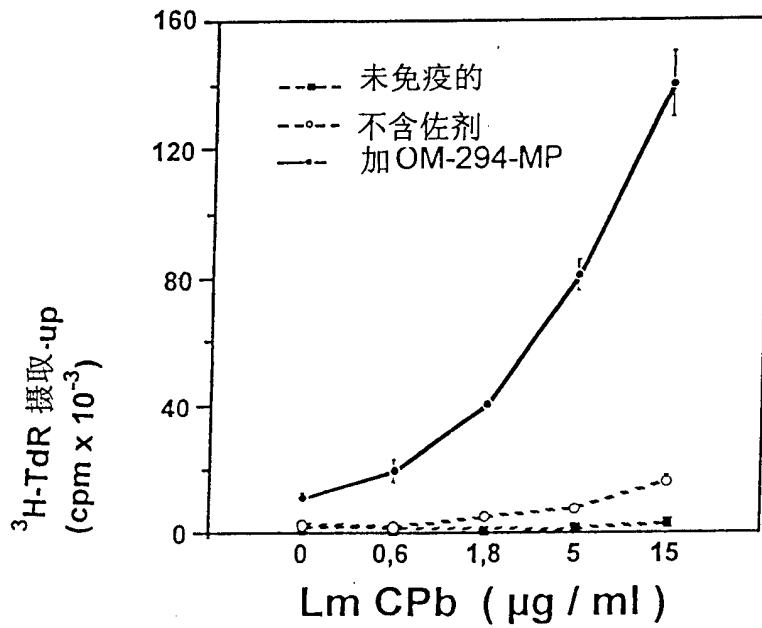


图 31 (b)

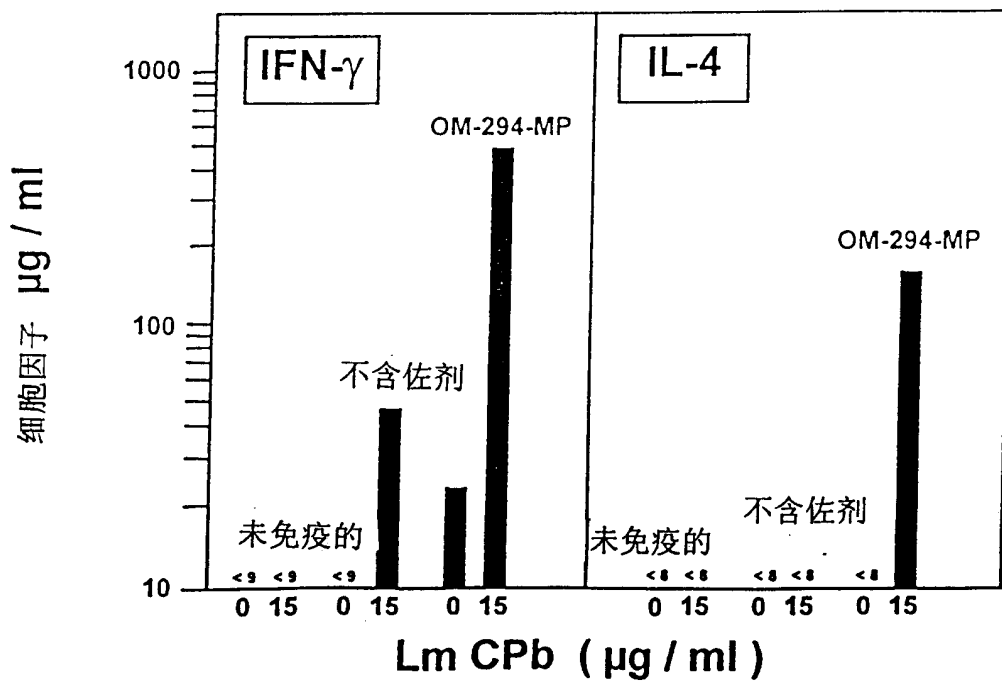


图 32(a)

在 OM-294-MP 佐剂的影响下抗-LmCPb 免疫应答的增加：与 BCG 比较

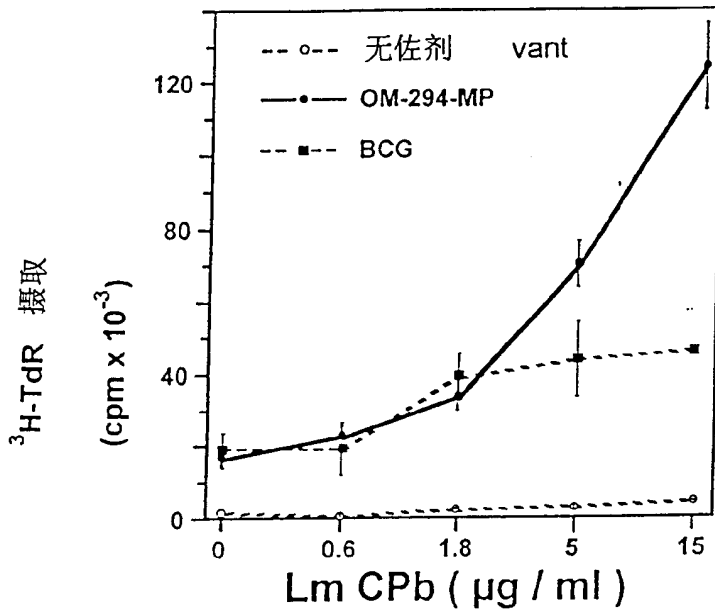


图 32(b)

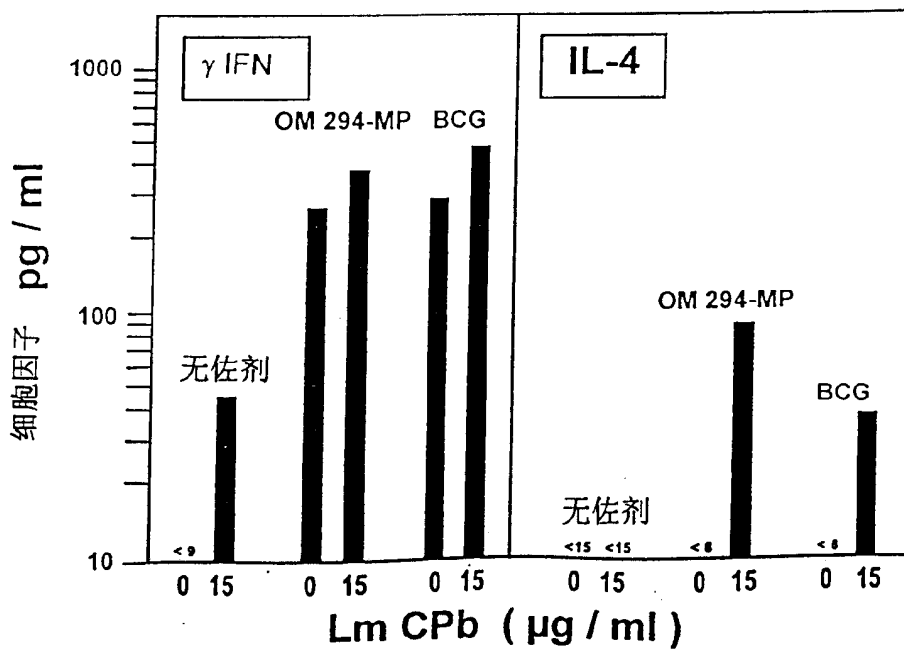
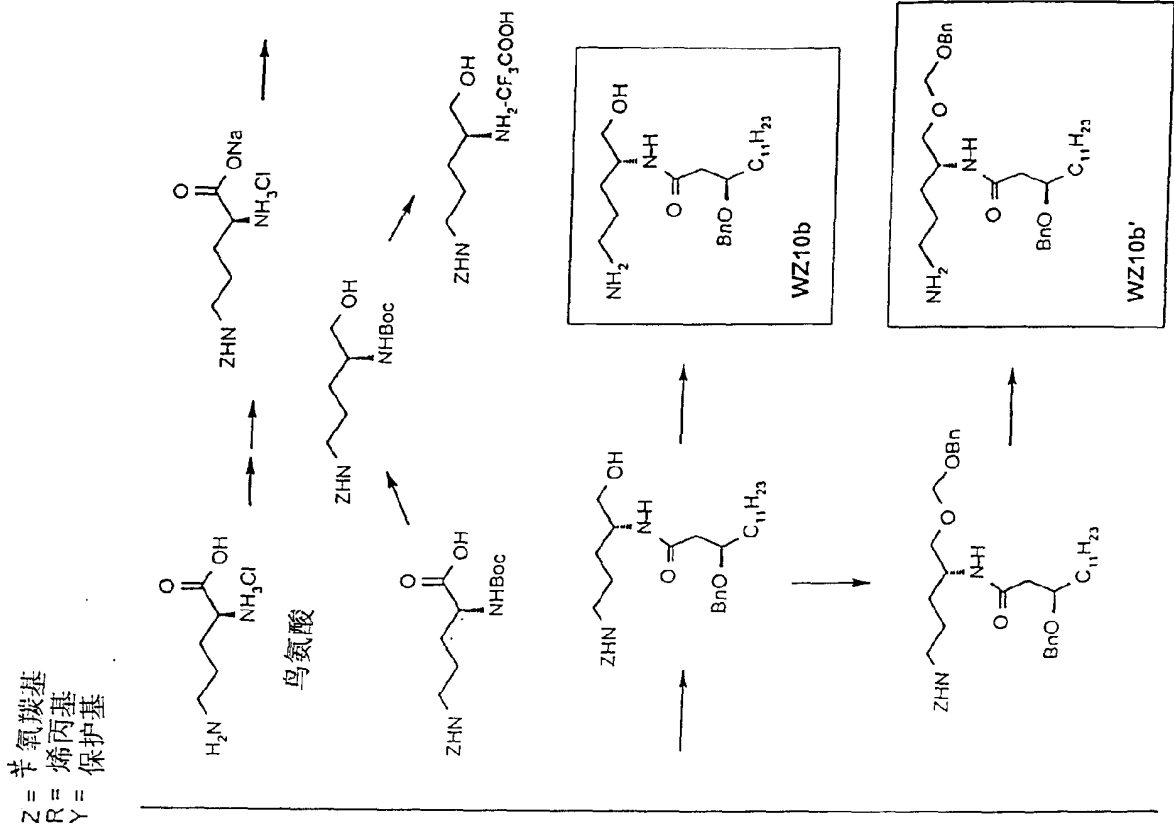
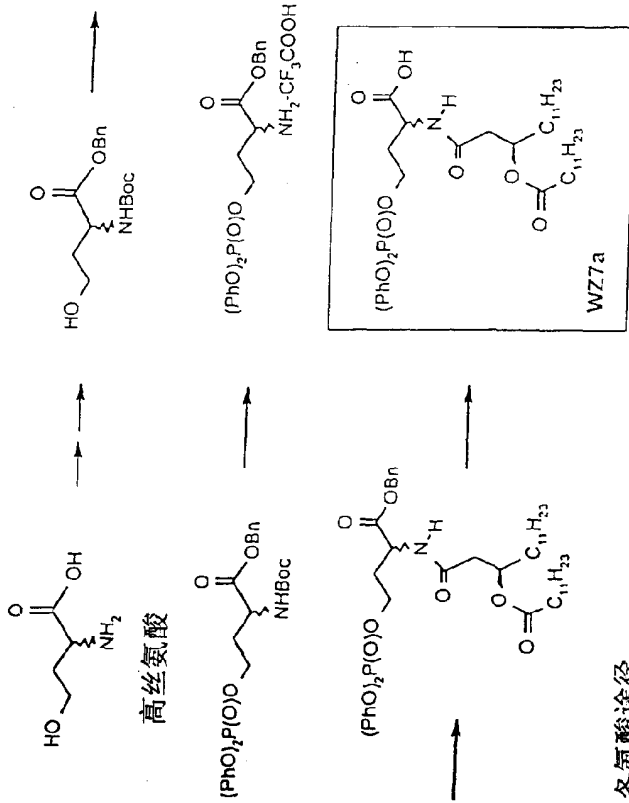


图 33



合成路线 I

高丝氨酸途径



天冬氨酸途径

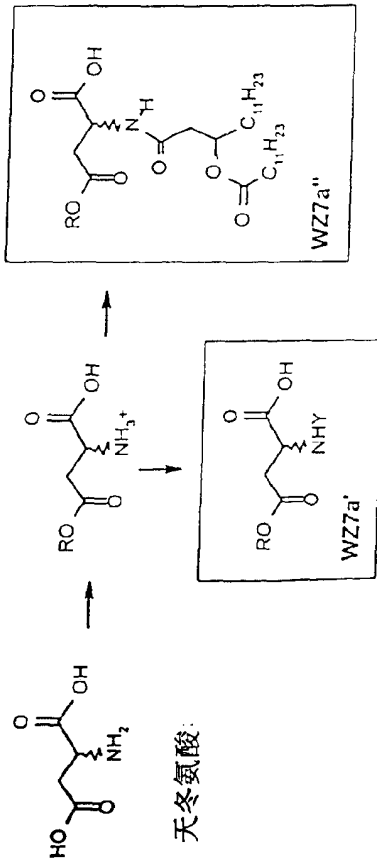


图 34

合成方案 2

Bn = 苄基  
Ph = 苯基

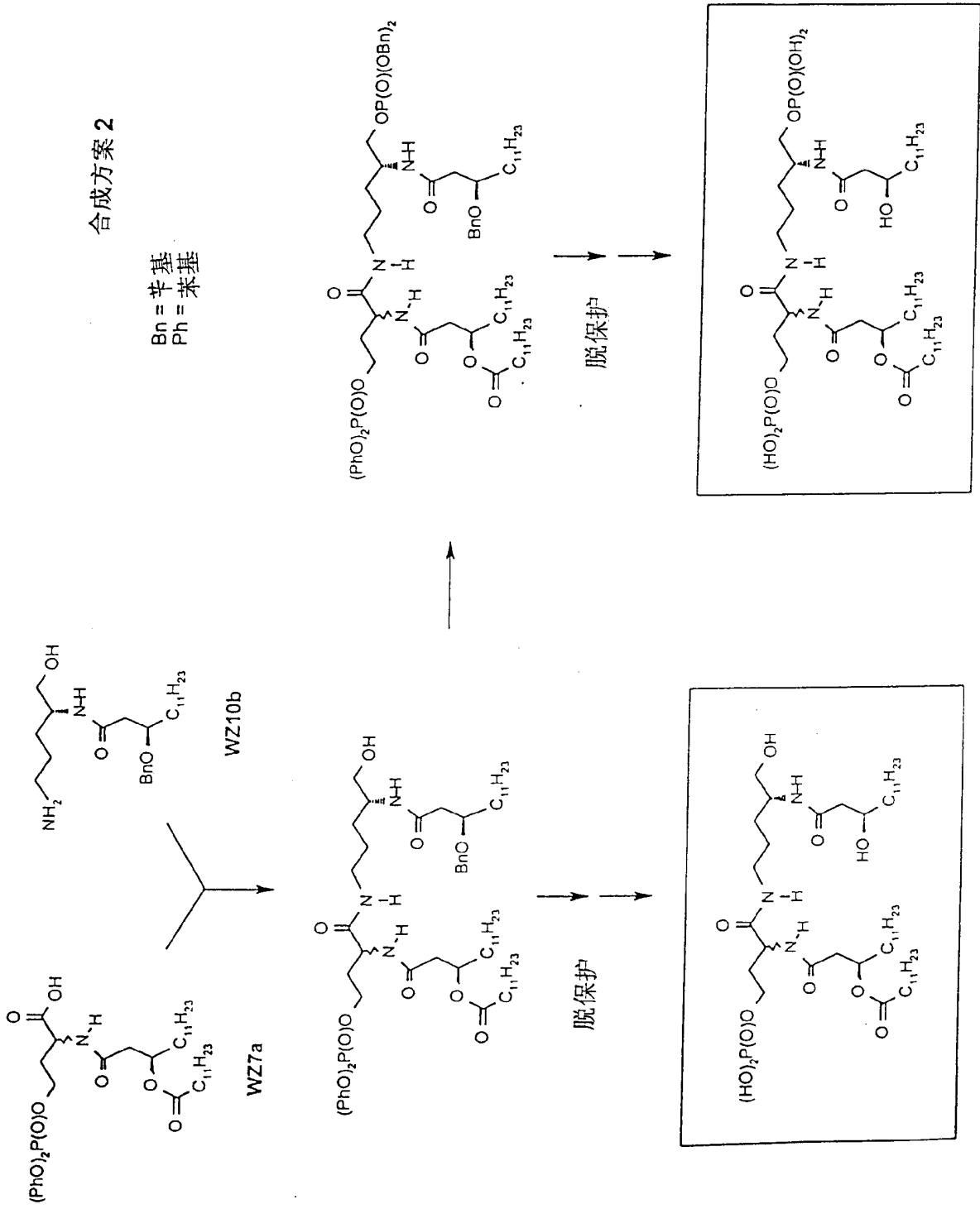


图 35

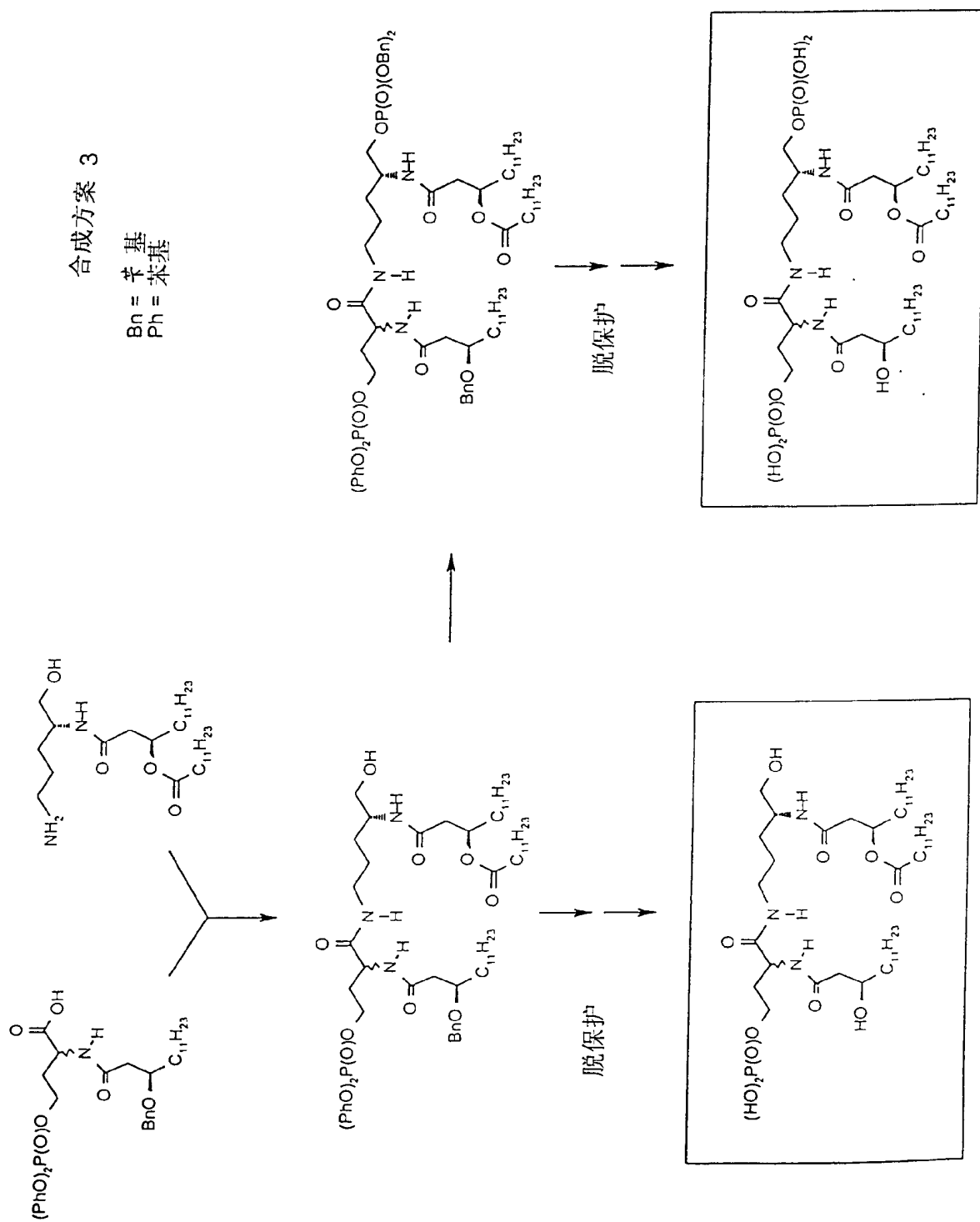


图 36

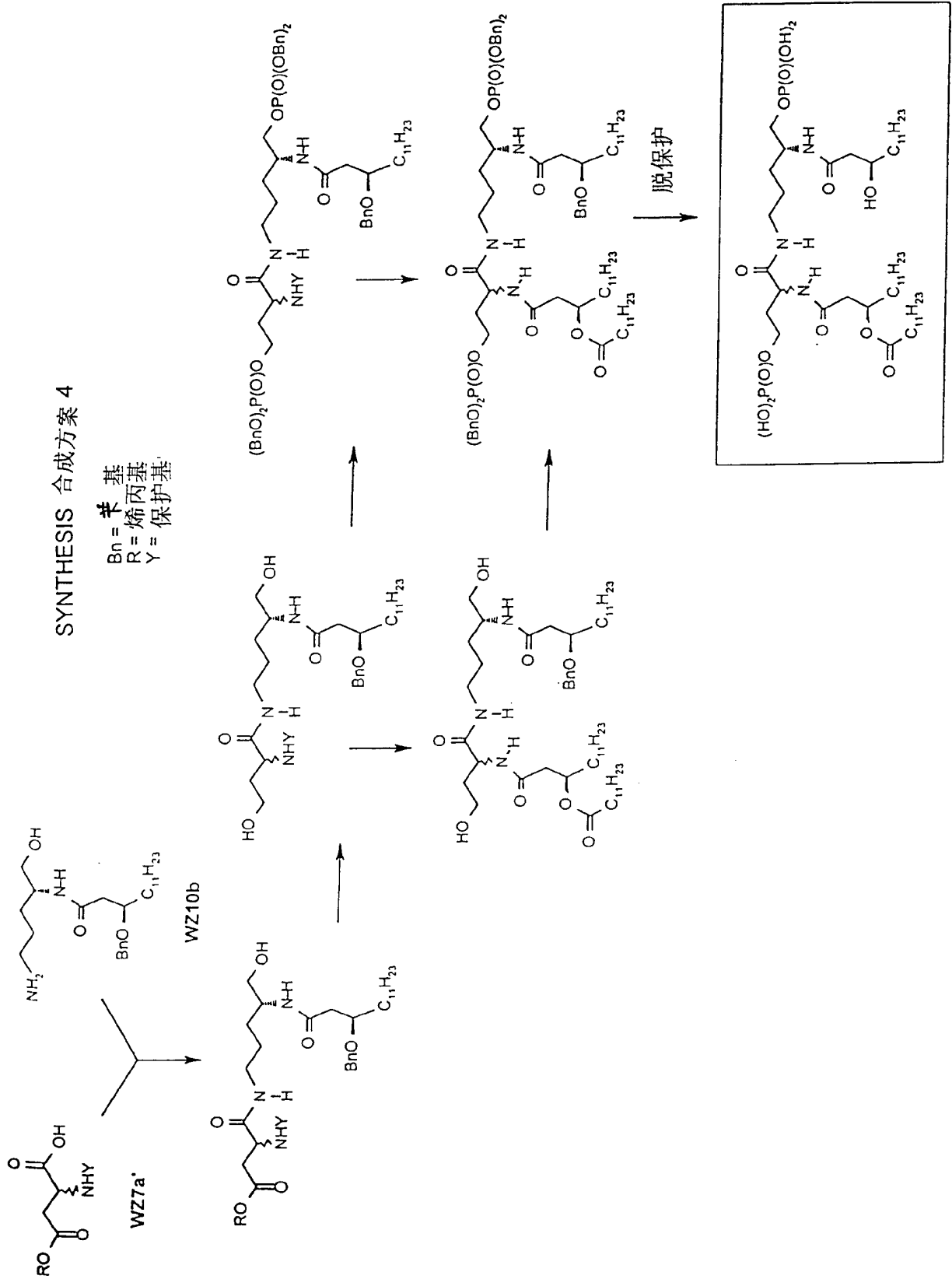


图 37

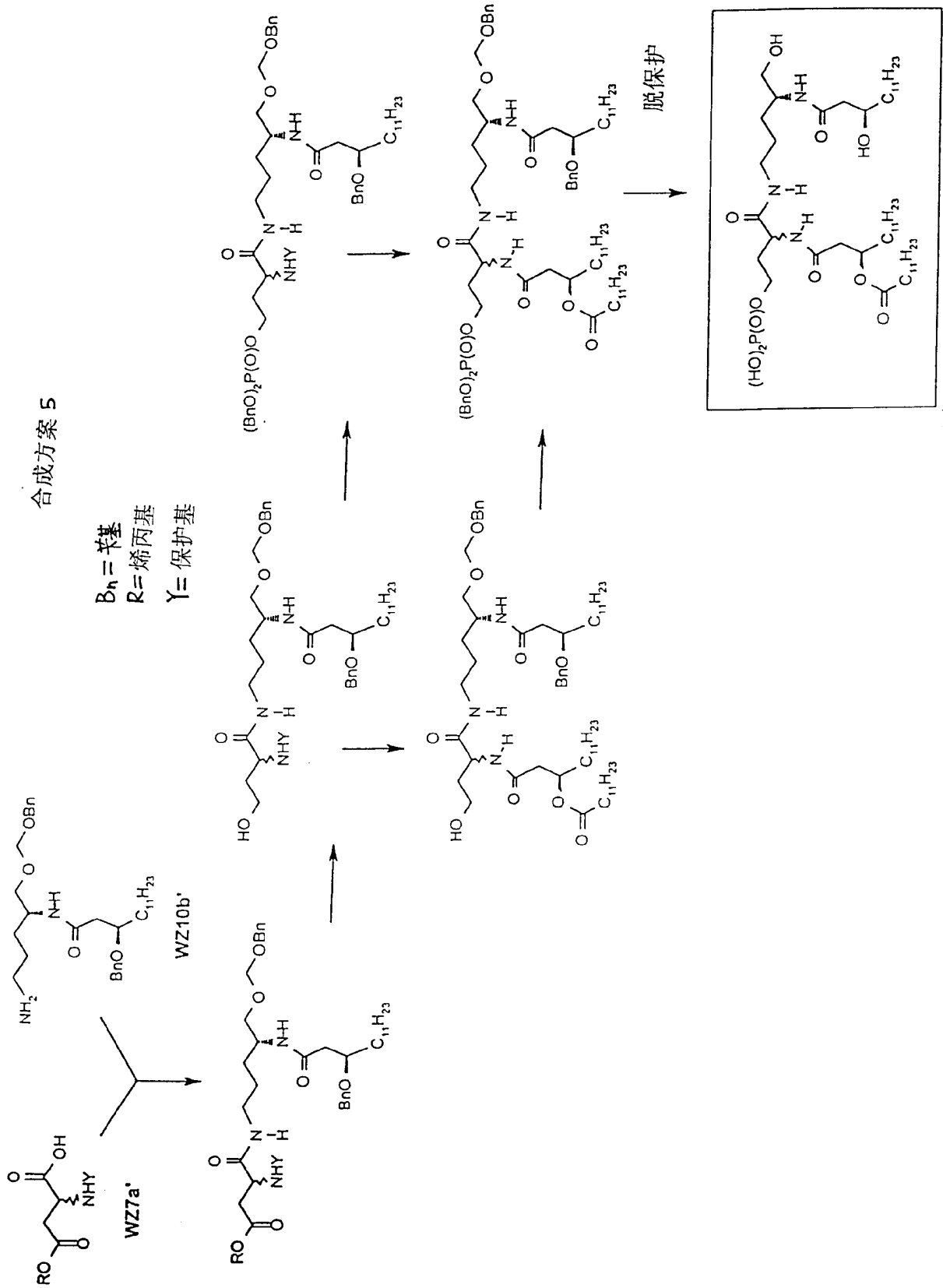




图 38

合成方案 6

Bn = 苄基

R = 烯丙基

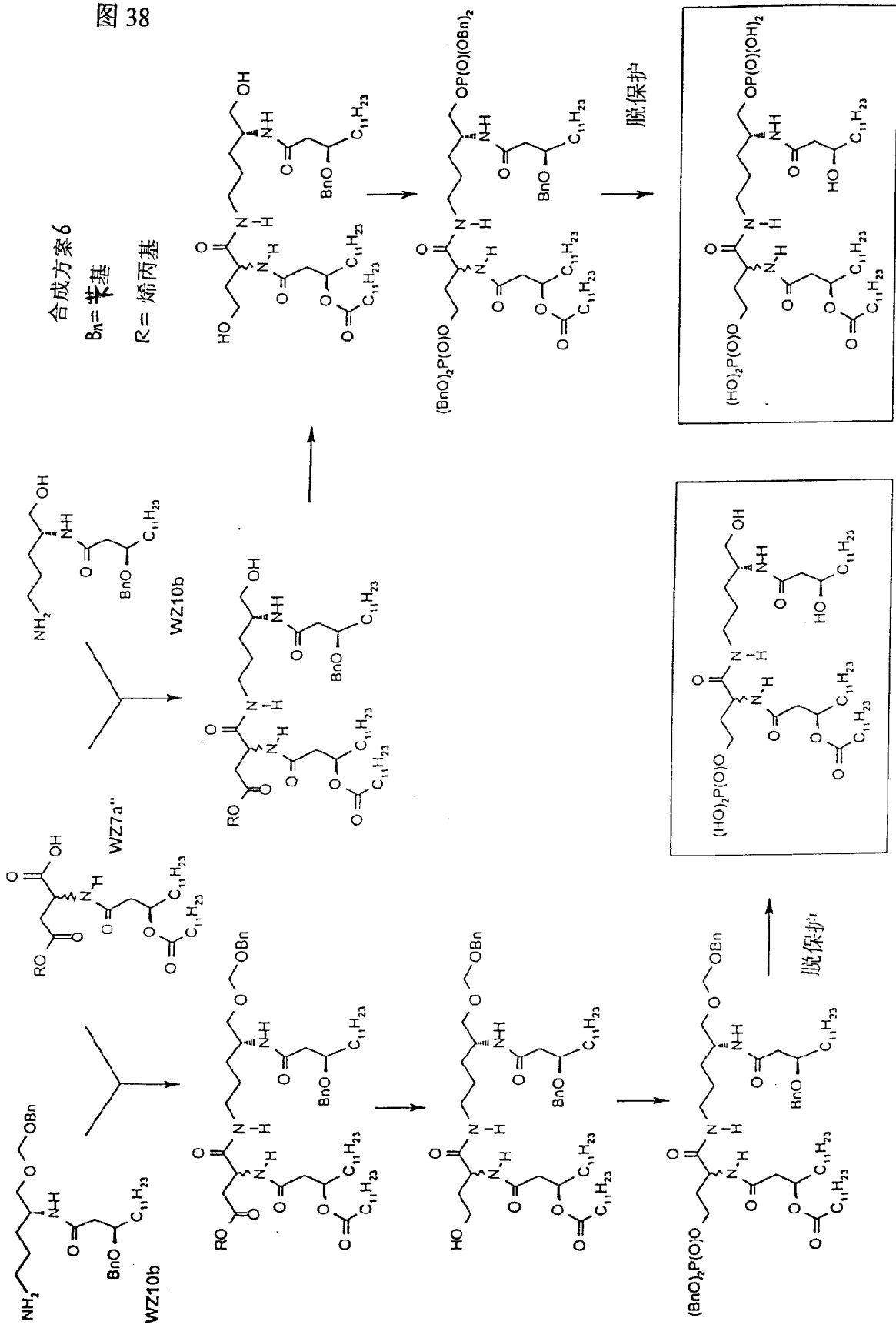
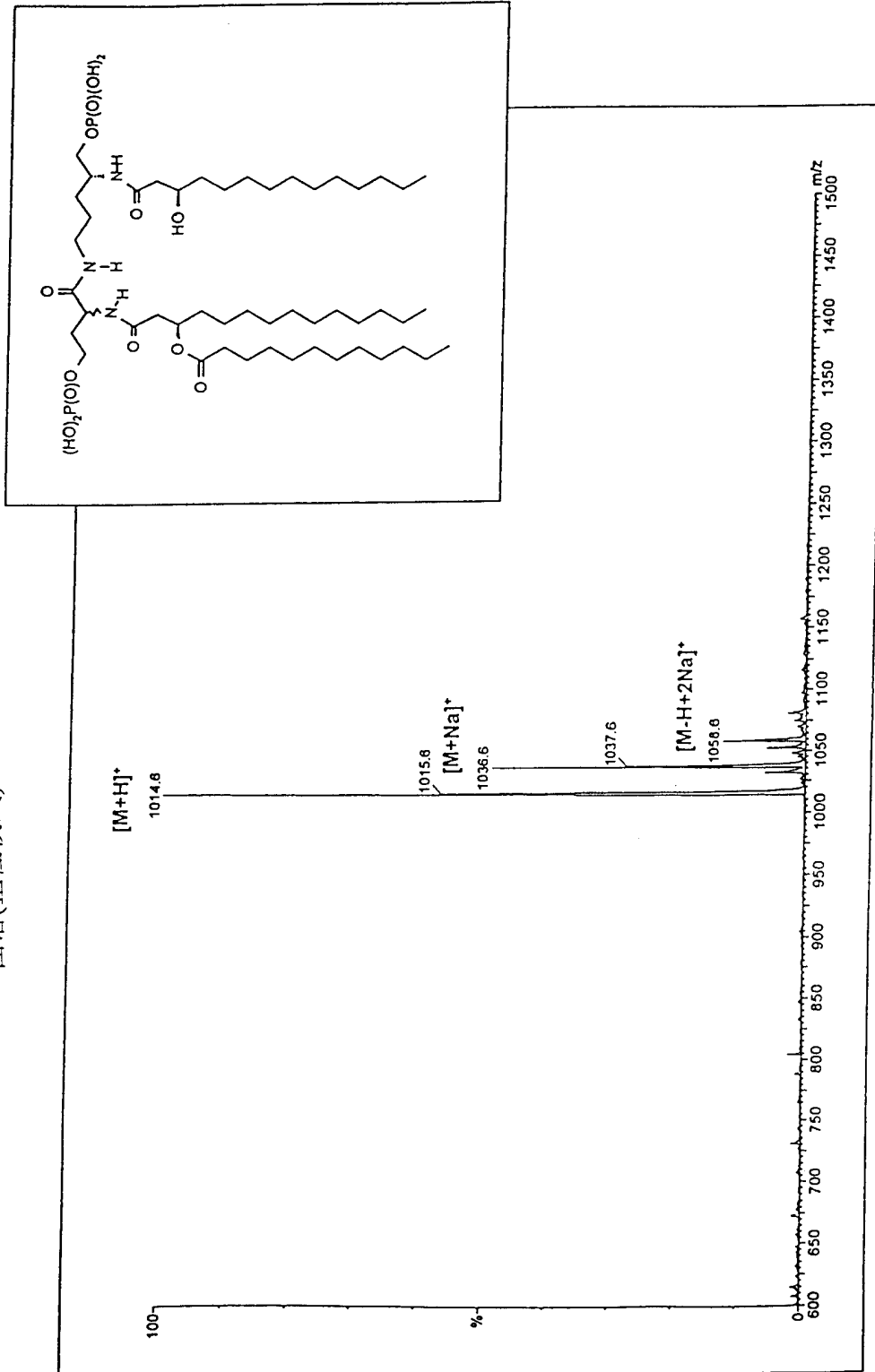


图 39

二磷酸化的化合物

图谱

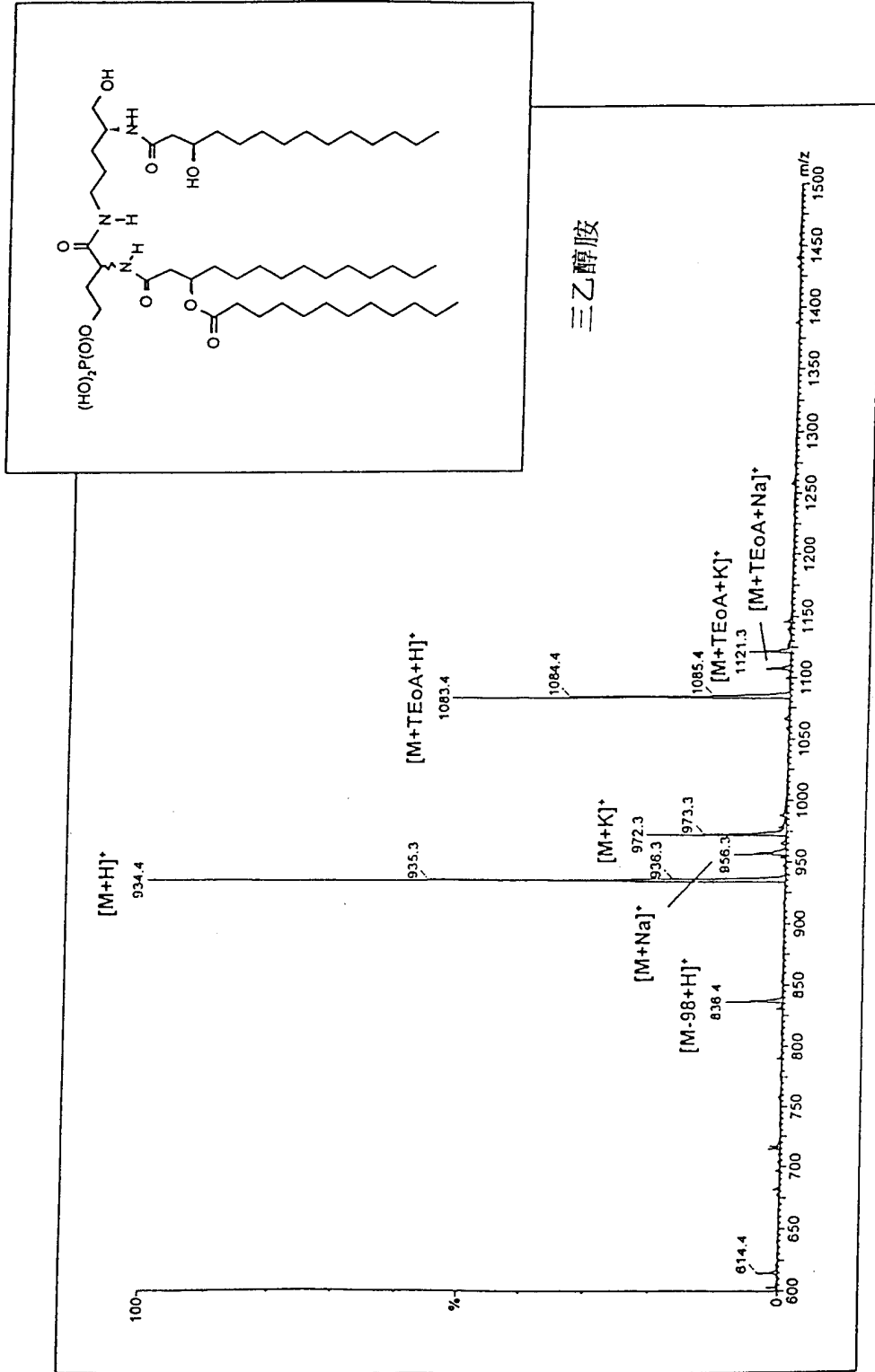
图谱(正性模式)



仪器 : Micromass Quattro II (乙喷雾), 三相四极

图 40

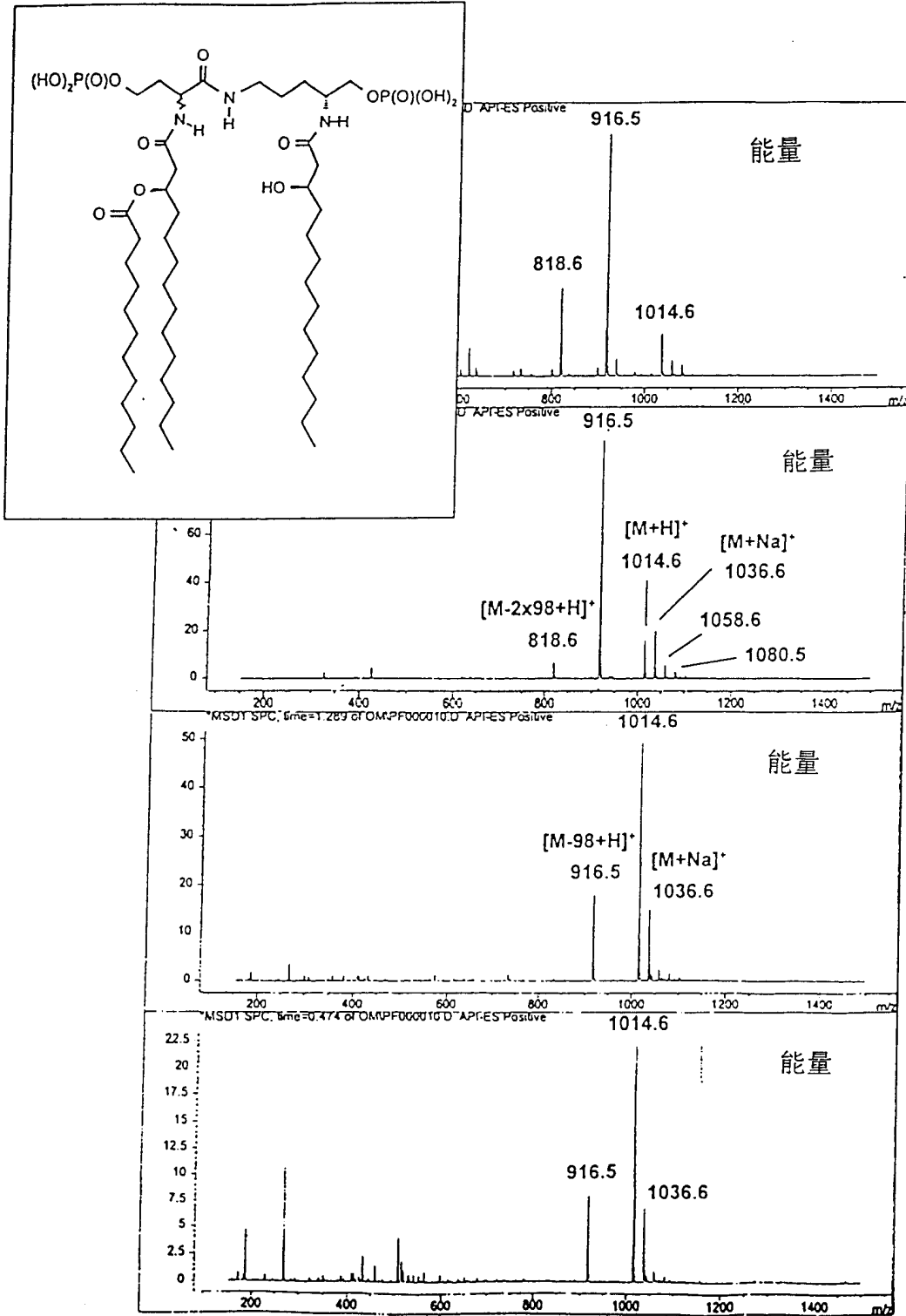
一磷酸化的化合物  
图谱(正性模式)



仪器 : Micromass Quatro II (Z 喷雾 三相四极)

图 41

图谱 3  
二磷酸化的化合物  
ES-MS 图谱 (正性模式裂解)



仪器 : Hewlett-Packard MSD, 单一四极

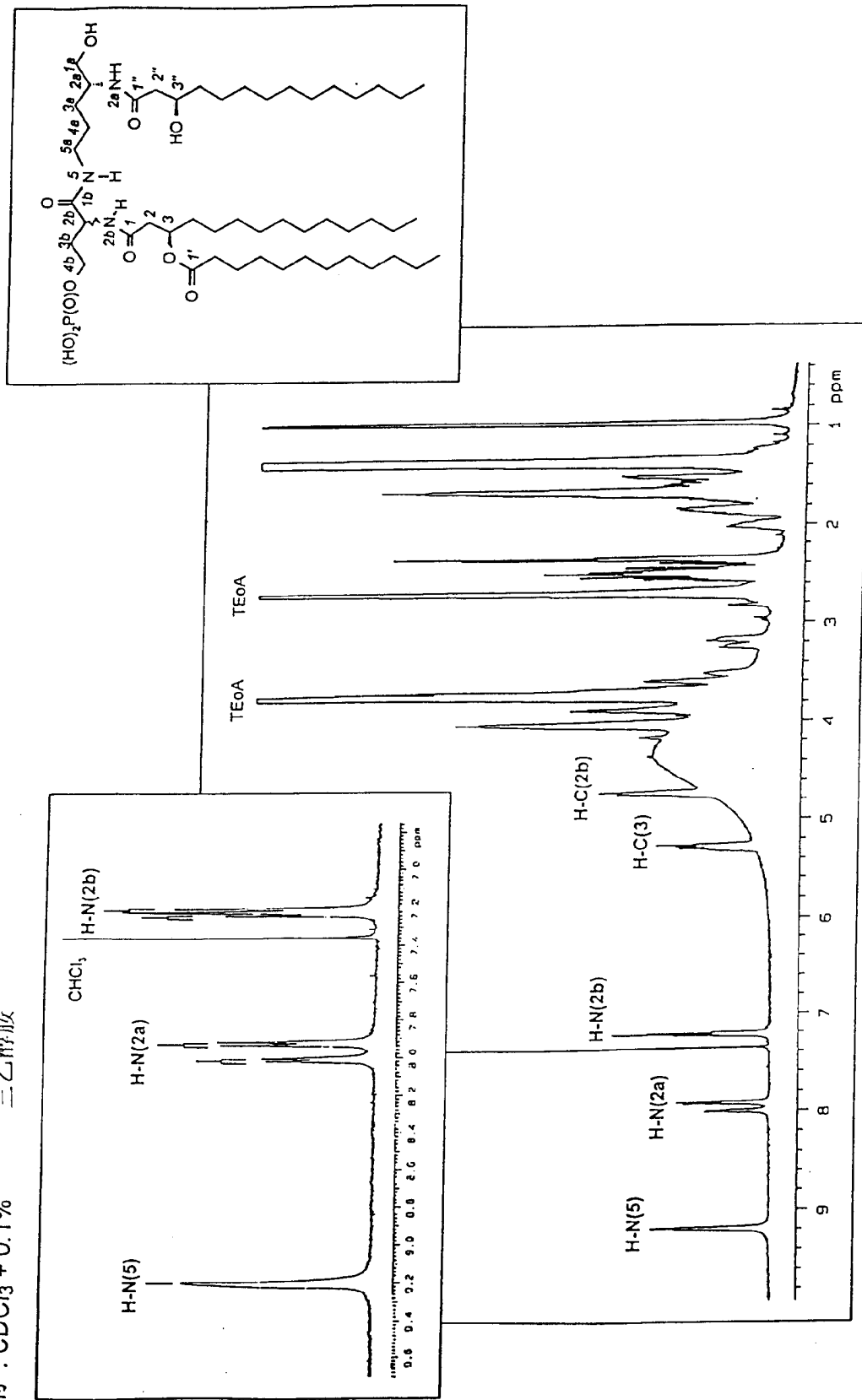
一磷酸化的化合物

图谱 4

<sup>1</sup>H-NMR 图谱

溶剂 : CDCl<sub>3</sub> + 0.1% 三乙醇胺

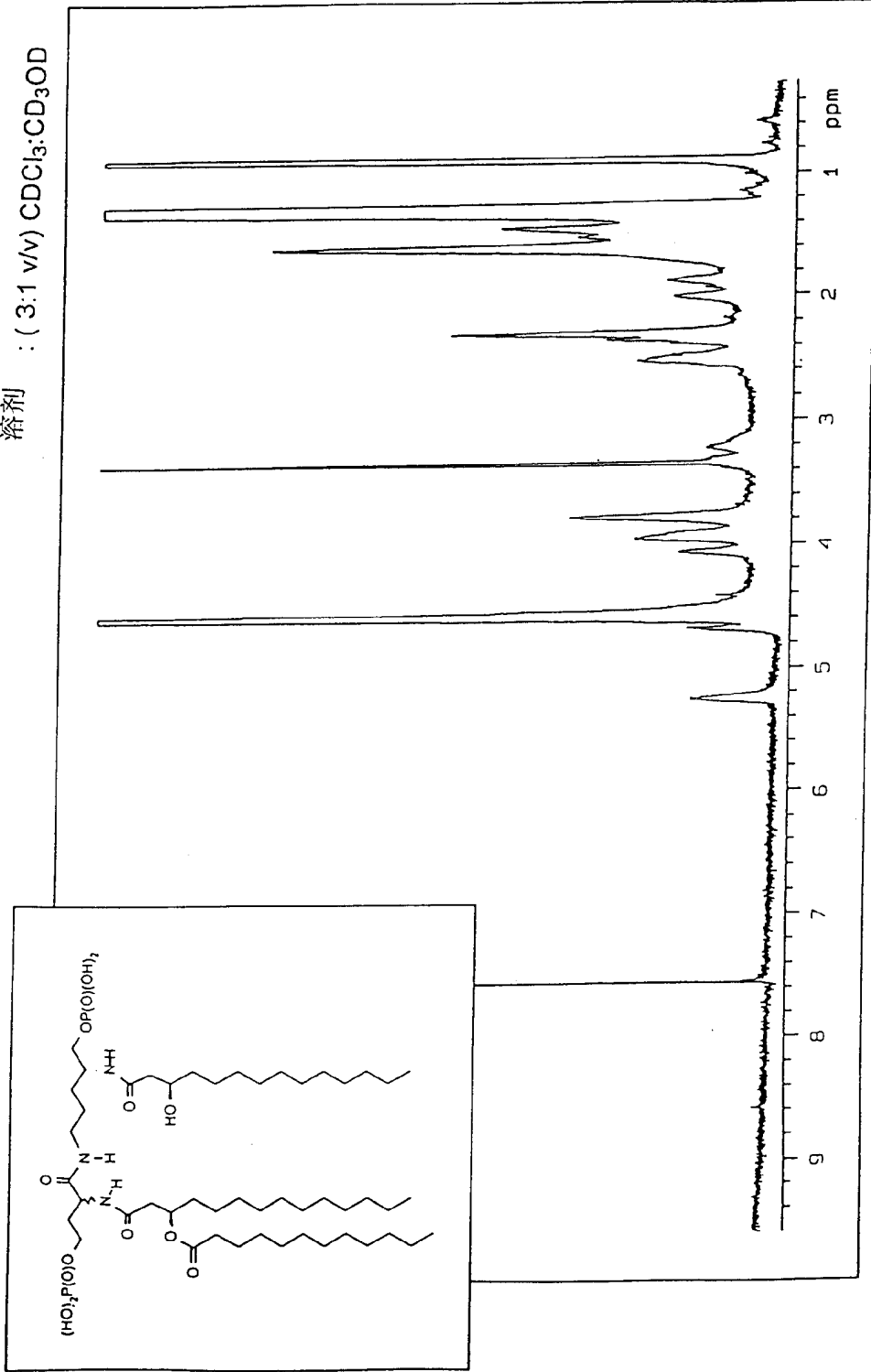
图 42



仪器 : Varian Unity INOVA 500 MHz

图谱 5 一磷酸化的化合物

<sup>1</sup>H-NMR 图谱



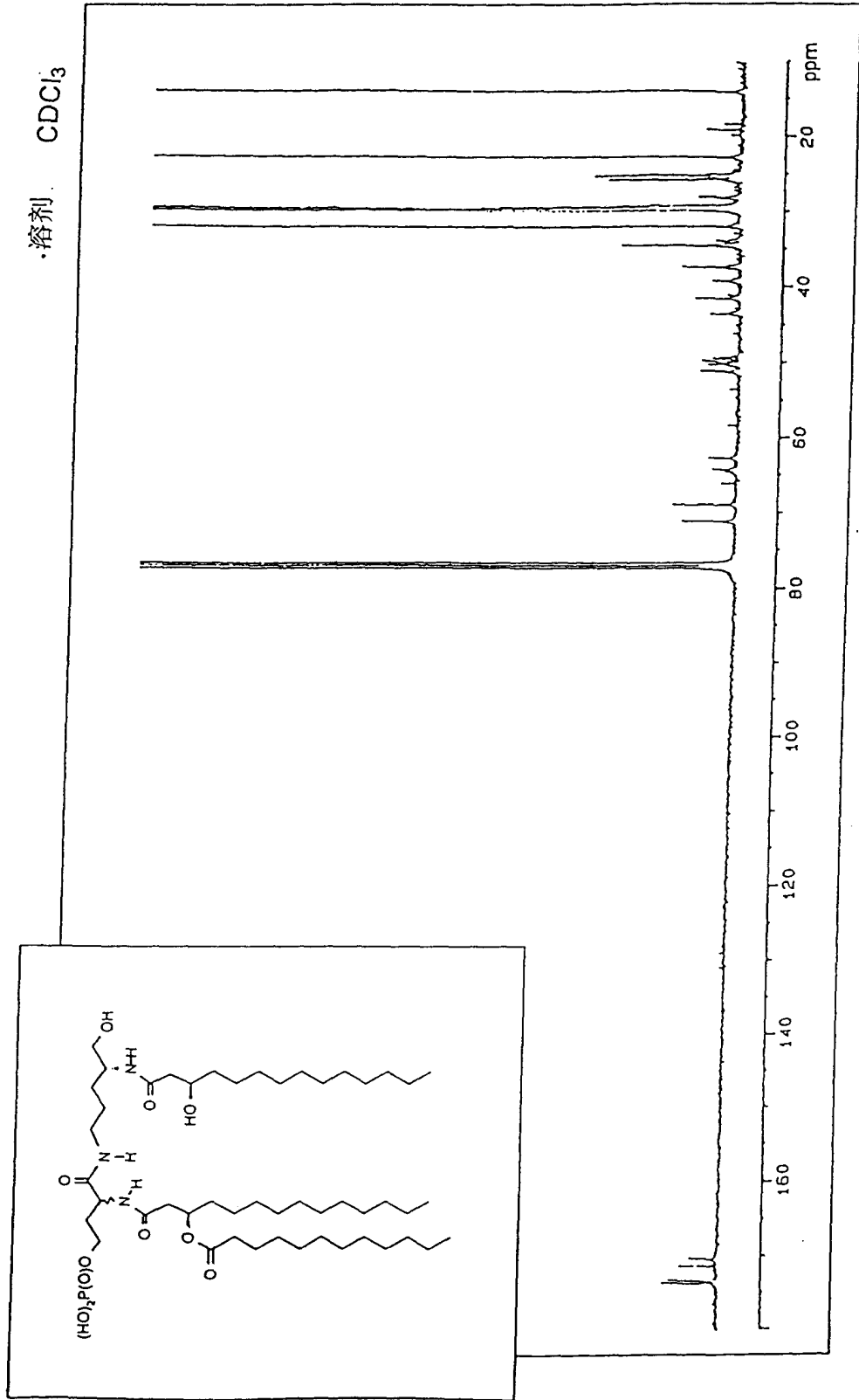
仪器 : Varian Unity INOVA 500 MHz

图 43

一磷酸化的化合物

图谱 6  
<sup>13</sup>C-NMR 图谱

图 44



二磷酸化的化合物

图谱7

<sup>13</sup>C-NMR 图谱

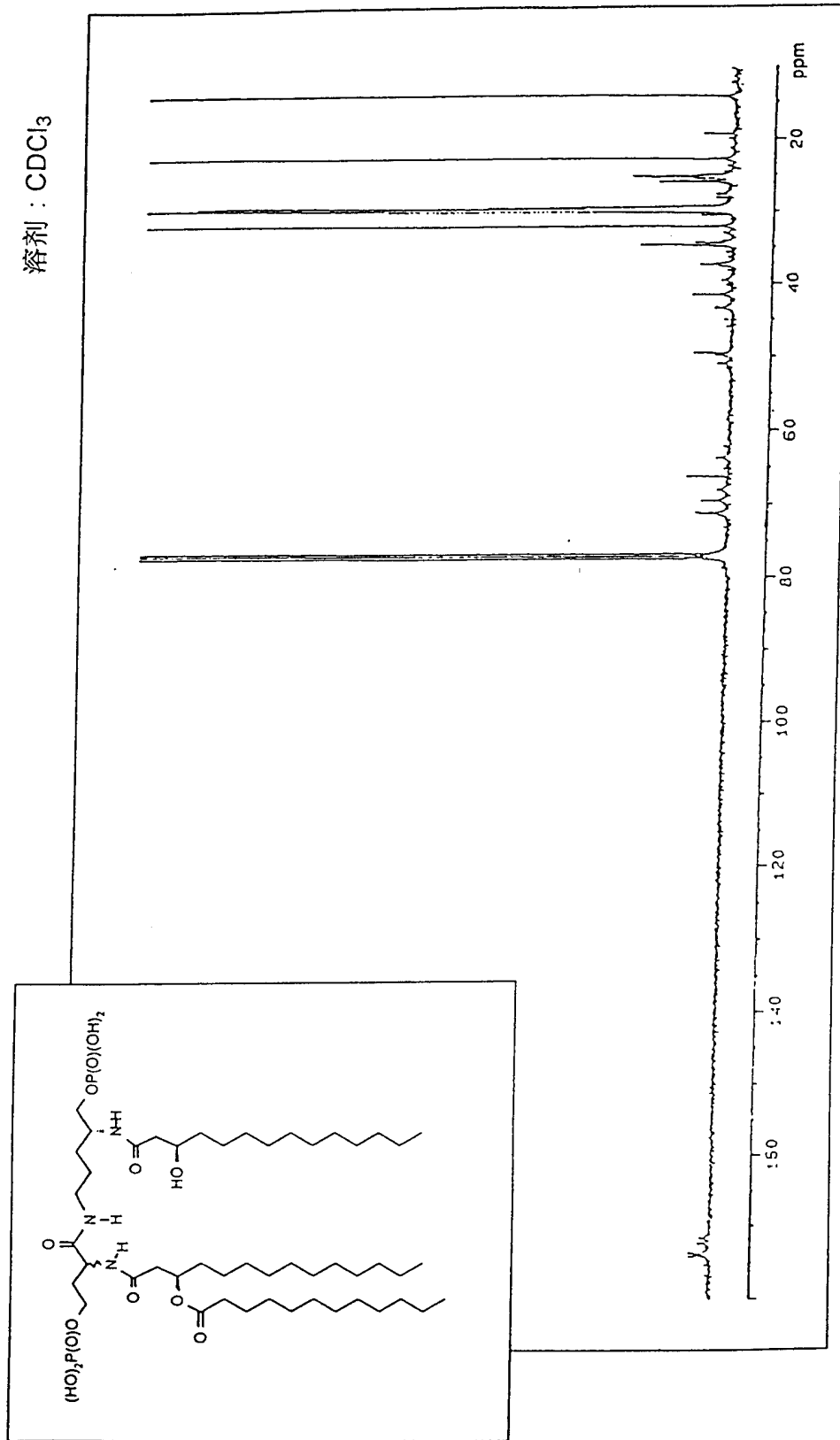


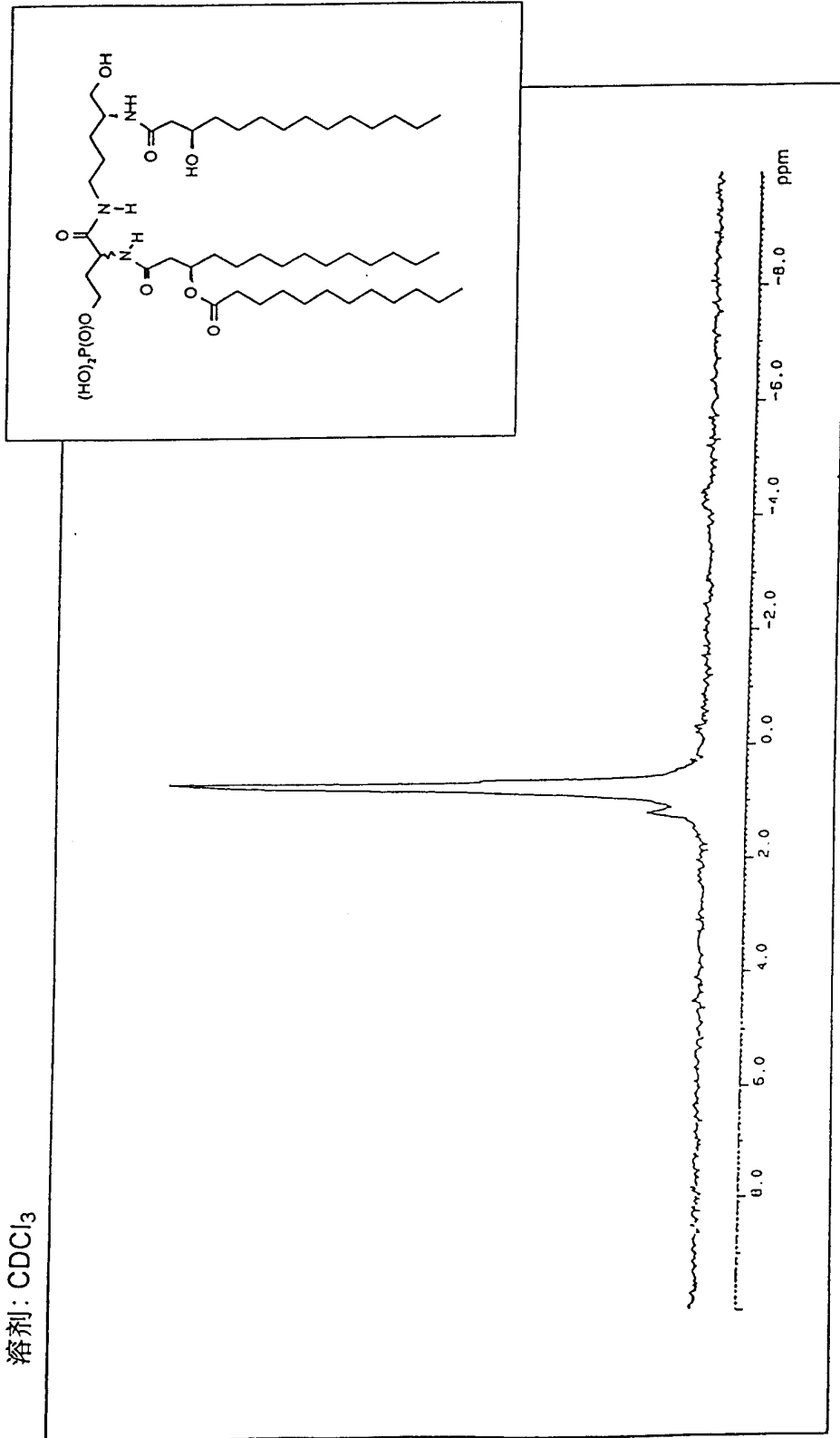


图 46

一磷酸化的化合物  
 $^{31}\text{P}$ -NMR 图谱

图谱 8

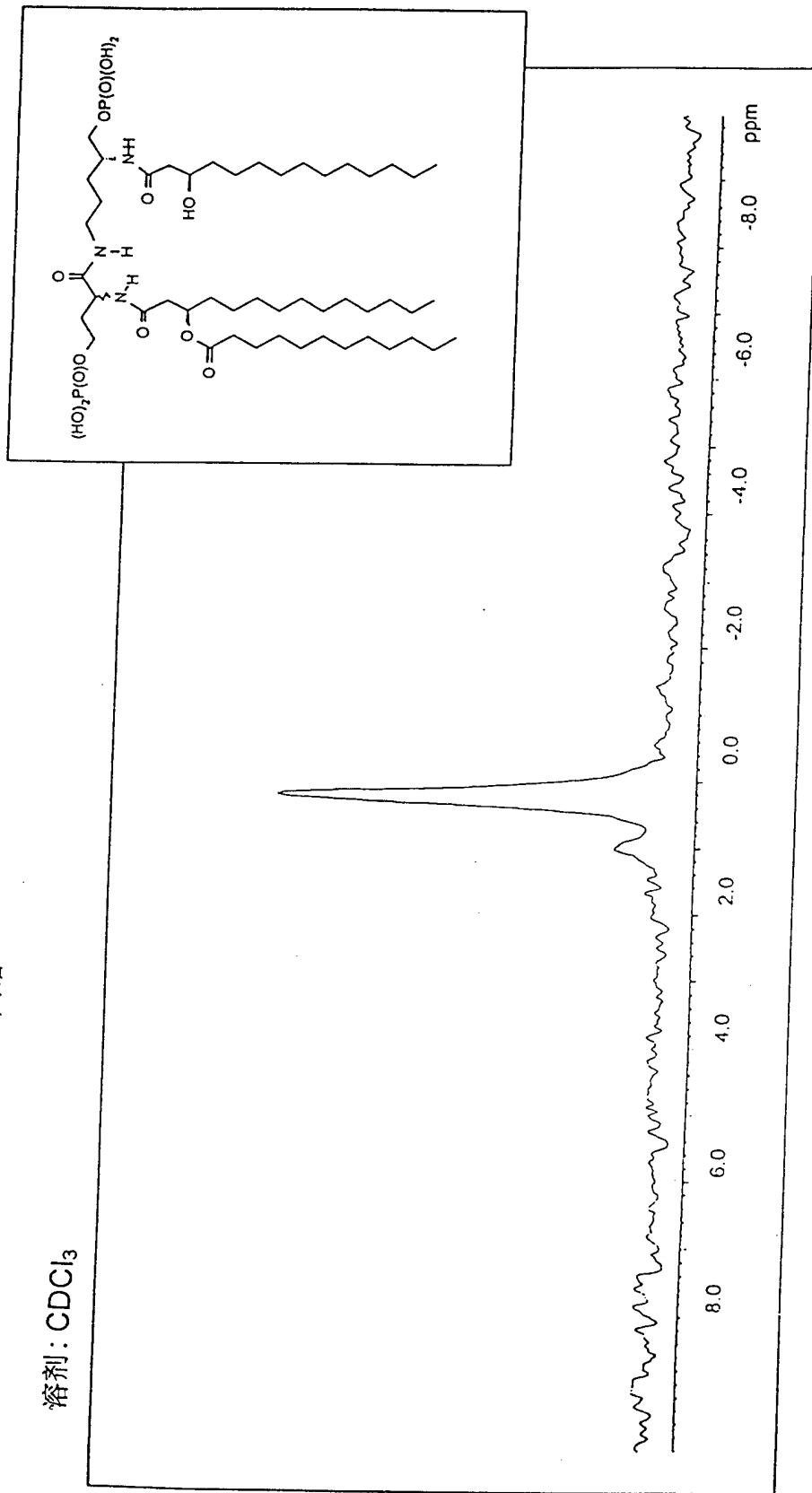
溶剂:  $\text{CDCl}_3$



仪器: Bruker DPX 300 MHz

图 47

图谱 9 二磷酸化的化合物  
 $^{31}\text{P}$ -NMR 图谱



仪器: Bruker DPX 300 MHz