



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114126419 A

(43) 申请公布日 2022. 03. 01

(21) 申请号 202080034302.4

(22) 申请日 2020.03.17

(30) 优先权数据

62/820,477 2019.03.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/023185 2020.03.17

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/190959 EN 2020.09.24

(71) 申请人 UAB研究基金会

地址 美国阿拉巴马州

(72) 发明人 王鹏飞

(74) 专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658

代理人 王怡瑾 黄幸兒

(51) Int.Cl.

A23L 33/00 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

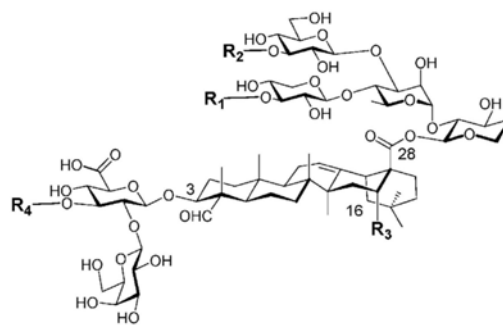
权利要求书6页 说明书34页 附图21页

(54) 发明名称

基于皂苷的疫苗佐剂

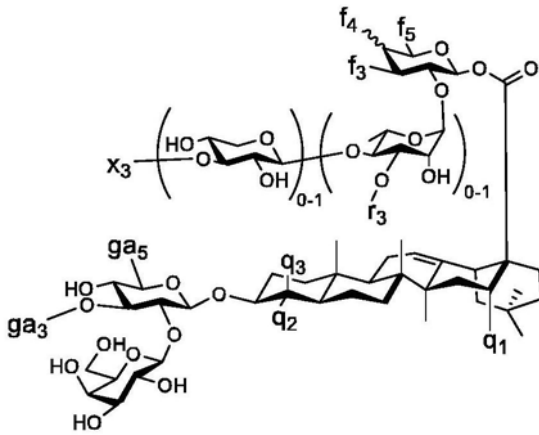
(57) 摘要

已经制备了许多基于MS和天然皂苷的疫苗佐剂候选物。MS衍生物是通过酰胺形成反应,将末端官能化的侧链并入天然皂苷MS I和II的C3葡糖醛酸单元中而制备的;QS类似物通过多步有机合成而制备的。这些非天然皂苷显示出明显不同的免疫刺激活性谱,表明侧链、三萜类核和寡糖结构域的结构一起协调了每种皂苷对免疫应答的特征性增强。



	R1	R2	R3	R4
MS I (3)	H	xyl	H	rha
MS II (4)	H	xyl	OH	rha

1. 一种衍生自木鳖果和具有下列化学结构式的修饰皂苷：



其中：

q_1 是H或OH；

q_2 和 q_3 各自独立地选自CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分；

f_3 和 f_4 各自独立地为OH或乙酰基，或C3和C4的岩藻糖基单元，其中， f_3 和 f_4 形成环状缩酮环或环状碳酸酯；

f_5 和 ga_5 各自独立地选自H、甲基、羧基、 $R_4NR_5-C(O)-$ 和 R_4-O- 组成的组，

其中， R_4 和 R_5 各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链，

其中， R_6 是H、OH、 $COO(CH_2)_{0-6}H$ 、 $COOBn$ 、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、 OBn 、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷脂脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元或载体的官能团；并且

其中， R_7 是H或烷基；

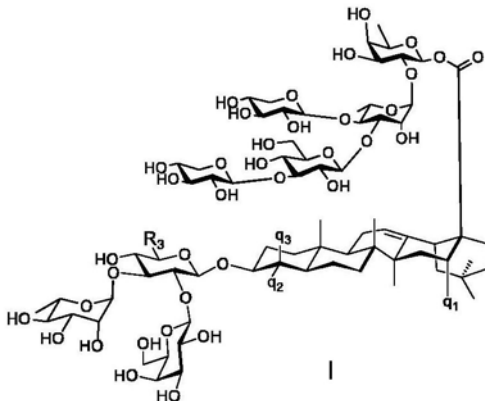
r_3 是H、单糖、二糖或三糖；

x_3 是H、单糖(木糖除外)或二糖；以及

ga_3 是H、单糖或二糖。

2. 如权利要求1所述的修饰皂苷，其中，所述载体选自多胺聚合物、聚乙二醇胺、聚乙烯亚胺、纳米碳或含氨基生物分子组成的组。

3. 如权利要求1所述的修饰皂苷，其中，所述修饰皂苷具有化学结构式I：



其中：

q_1 是H或OH;

q_2 和 q_3 各自独立地选自CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分;以及

R_3 选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$ 和 R_4-O- 组成的组,

其中, R_4 和 R_5 各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链,

其中, R_6 是H、OH、 $COO(CH_2)_{0-6}H$ 、 $COOBn$ 、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、 OBn 、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元或载体的官能团,

并且其中, R_7 是H或烷基。

4. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是羧基。

5. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是具有 $HOOC-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链脂肪酸。

6. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是具有 $H_3C-(CH_2)_{6-20}-O-CH_2$ 结构的烷氧基。

7. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是具有 $HO-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链醇。

8. 如权利要求7所述的修饰皂苷,其中, R_4 是用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氮基和芳基的官能团封端的长链烷基。

9. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是长链烷基 $R_6O(CH_2)_{6-20}-$,并且其中, R_6 选自糖单元,所述糖单元选自由单糖、二糖和三糖组成的组。

10. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是用单磷酸脂质A (MPL) 封端的长链烷基。

11. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,并且其中, R_4 是用二棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₂Cys) 或三棕榈酰基-s-甘油基半胱氨酸 (Pam₃Cys) 封端的长链烷基。

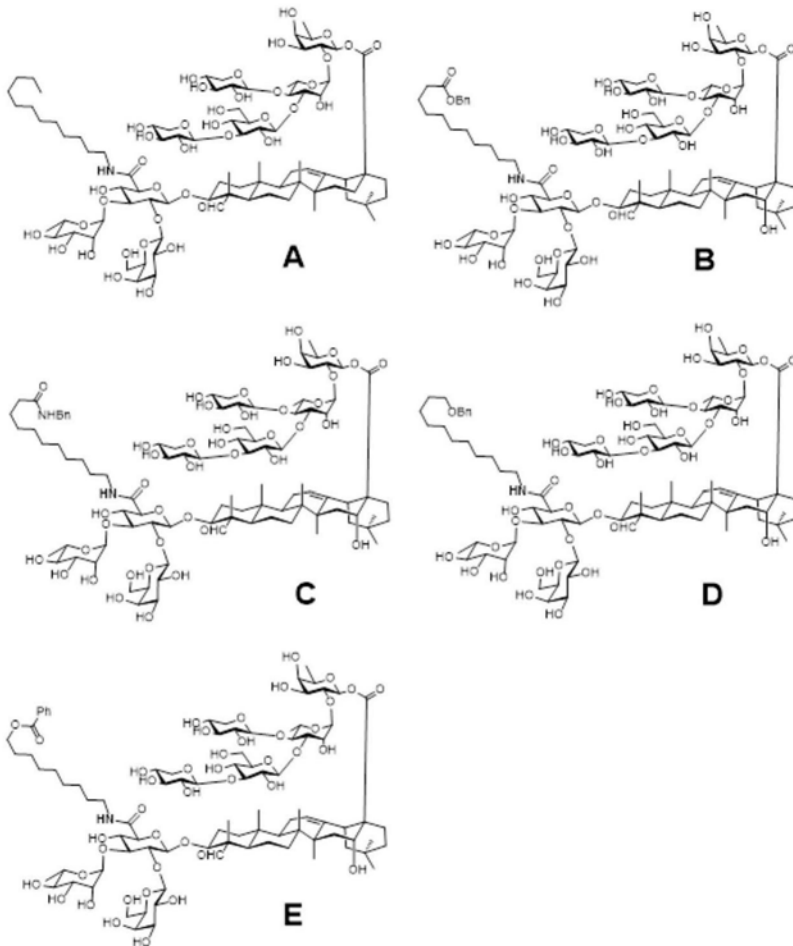
12. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是以胞壁酰二肽单元封端的长链烷基。

13. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是用 α -Galcer单元封端的长链烷基。

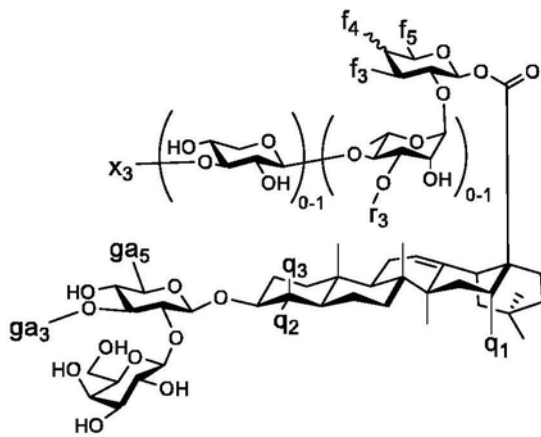
14. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是用MS I单元封端的长链烷基。

15. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是用MSII单元封端的长链烷基。

16. 如权利要求1所述的修饰皂苷,其中,所述修饰皂苷选自由化学结构式A-E组成的组:



17. 一种药物组合物,其包含衍生自木鳖果并具有下列化学结构式的修饰皂苷:



其中:

q₁是H或OH;

q₂和q₃各自独立地选自CH₀、CH₃、CH₂OH、H或缩醛基团的组分;

f₃和f₄各自独立地为OH或乙酰基,或C3和C4的岩藻糖基单元,其中f₃和f₄形成环状缩酮环或环状碳酸酯;

f₅和ga₅各自独立地选自H、甲基、羧基、R₄-NR₅-C(O)-、R₄-O-组成的组,

其中,R₄和R₅各自独立地为具有R₆(CH₂)₀₋₂₀-或R₆[(CH₂)₀₋₂₀O₀₋₂₀(CH₂)₀₋₂₀]₀₋₂₀结构的直链,其中R₆是H、OH、COO(CH₂)₀₋₆-H、COOBn、C(O)NR₇Bn、NR₇Bn、OBn、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞

壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元或载体的官能团;并且

其中, R_7 是H或烷基;

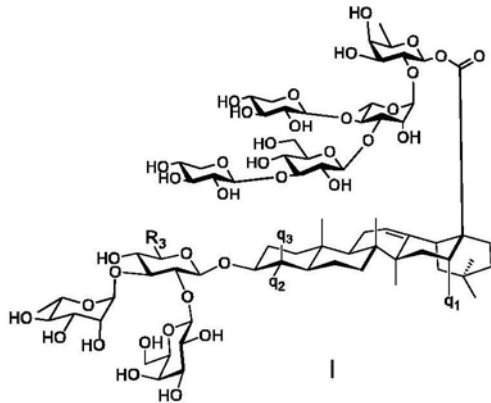
r_3 是H、单糖、二糖或三糖;

x_3 是H、单糖(木糖除外)或二糖;以及

ga_3 是H、单糖或二糖。

18. 如权利要求17所述的药物组合物,其中,所述载体选自:多胺聚合物、聚乙二醇胺、聚乙烯亚胺、纳米碳、或含氨基生物分子。

19. 如权利要求17所述的药物组合物,其中,所述修饰皂苷具有化学结构式I:



其中:

q_1 是H或OH;

q_2 是CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分;

q_3 是CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分;

R_3 选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$ 和 R_4-O- 组成的组,

其中, R_4 和 R_5 各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链,

其中, R_6 是H、OH、 $COO(CH_2)_{0-6}H$ 、 $COOBn$ 、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、 OBn 、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元或载体的官能团,

并且其中, R_7 是H或烷基。

20. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是羧基。

21. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是具有 $HOOC-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链脂肪酸。

22. 如权利要求17所述的药物组合物,其中,所述 R_3 为具有 $H_3C-(CH_2)_{6-20}-O-$ 结构的烷氧基。

23. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是具有 $HO-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链醇。

24. 如权利要求23所述的药物组合物,其中, R_4 是用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氮基和芳基的官能团封端的长链烷基。

25. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是具有 $H_3C-(CH_2)_{6-20}-O-CH_2-$ 结构的烷氧基。

基。

26. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中 R_4 是具有HO-(CH₂)₆₋₂₀-结构的长链醇。

27. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_4 是用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氮基和芳基的官能团封端的长链烷基。

28. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中, R_4 是长链烷基 R_6O (CH₂)₆₋₂₀-,并且 R_6 选自糖单元,所述糖单元选自由单糖、二糖和三糖组成的组。

29. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中, R_4 是以单磷酸脂质A(MPL)封端的长链烷基。

30. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中, R_4 是以二棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸(Pam₂Cys)或三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸(Pam₃Cys)封端的长链烷基。

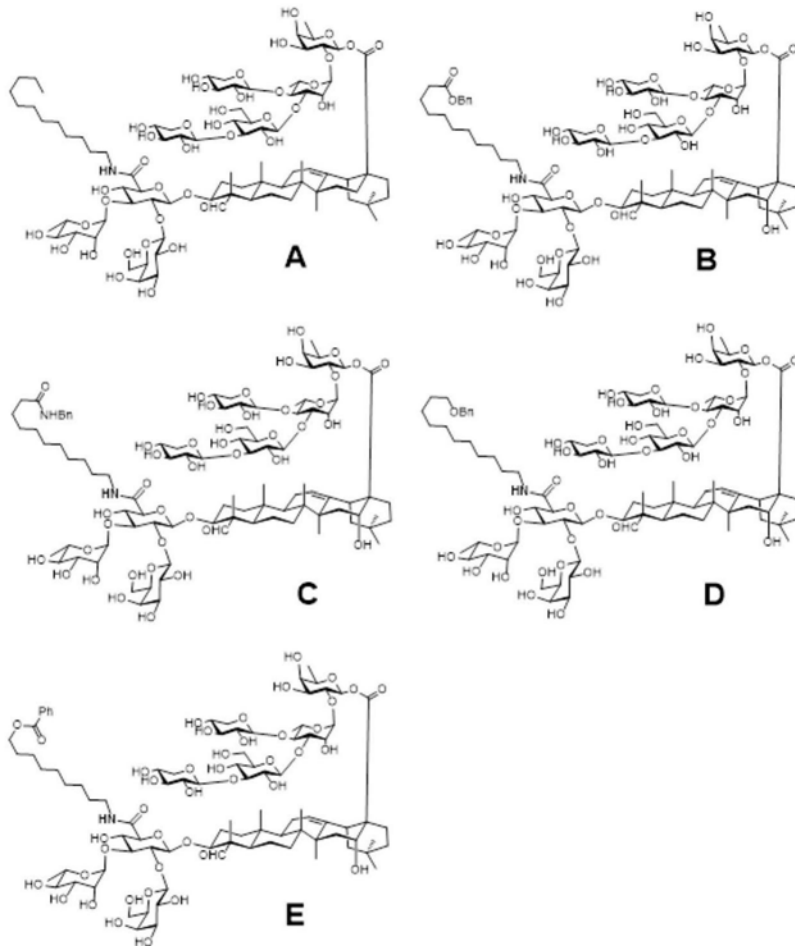
31. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中, R_4 是以胞壁酰二肽单元封端的长链烷基。

32. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中, R_4 是用 α -Galcer单元封端的长链烷基。

33. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中, R_4 是以MSI单元封端的长链烷基。

34. 如权利要求17所述的药物组合物,其中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-,其中, R_4 是以MS II单元封端的长链烷基。

35. 如权利要求17所述的药物组合物,其中,所述修饰皂苷选自由化学结构式A-E组成的组:



36. 如权利要求17所述的药物组合物,其中,所述组合物还包含至少一种免疫原。

37. 如权利要求36所述的药物组合物,其中,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

38. 如权利要求17所述的药物组合物,所述组合物被配制用于向动物或人受试者施用。

39. 如权利要求17所述的药物组合物,其中,所述组合物还包含至少一种癌症治疗剂和药学上可接受的载体,其中,所述至少一种化学治疗剂和所述皂苷衍生物混合在药学上可接受的制剂中或彼此共价连接。

40. 一种当施用于动物或人类受试者时增加免疫原的免疫原性的方法,所述方法包括向所述受试者施用疫苗的步骤,所述疫苗至少包含如权利要求36所述的药物组合物。

41. 一种用于合成所述的皂苷衍生物的合成路线,所述合成路线包括将天然皂苷与官能化侧链分子偶联,其中,所述官能化侧链包括氨基和烃基。

42. 如权利要求41所述的用于合成皂苷衍生物的合成路线,其中,所述天然皂苷获自木鳖果。

43. 如权利要求41所述的用于合成皂苷衍生物的合成路线,其中,所述天然皂苷通过酰胺形成反应或酯形成反应与所述官能化侧链分子偶联。

基于皂苷的疫苗佐剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年3月19日提交的题为“Saponin-Based Vaccine Adjuvants”的美国临时专利申请序列号62/820,477的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 关于美国政府提供资金的声明

[0004] 本发明是根据美国国立卫生研究院授予的合同R01 GM120159在政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0005] 疫苗佐剂是与疫苗一起使用的物质,该物质用于增强宿主对疫苗引入的特定抗原的免疫反应(Brunner等人,(2010) *Immunol. Lett.* 128:29-35;Kensil等人,(2004) *Frontiers Biosci.* 9:2972-2988;Leroux-Roels G. (2010) *Vaccine* 28 (增刊3):C25-36;Sharp&Lavelle (2012)《药理学与化学开发手册》John Wiley&Sons, Inc;第533-546页;Wang W. (2011) *World J. Vaccines* 1:33-78;Weeratna&McCluskie (2011) *Recent Advan. Vaccine Adjuvants* 第303-322页;Cox&Coulter (1997) *Vaccine* 15:248-256;Klebanoff等人,(2010) *Immunol.; Rev.* 239:27-44;Plotkin SA. (2005) *Nat. Med.* 11:S5-S11;Rappuoli&Aderem (2011) *Nature* 473:463-469;Kensil等人,(2005) *Vaccine Adjuvants: Immunological and Clinical Principles* 胡玛纳出版社,第221-234页)。

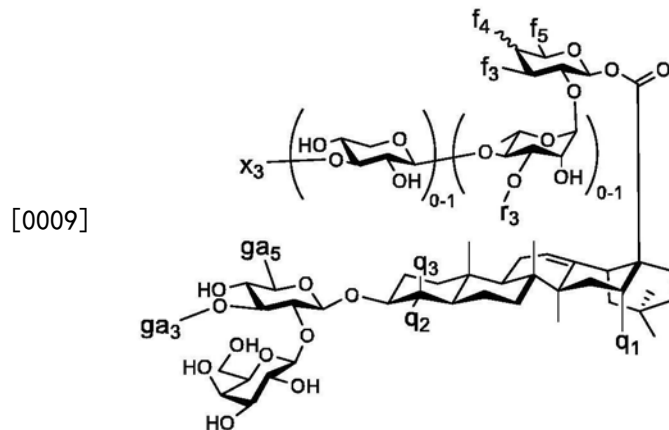
[0006] 疫苗佐剂还将免疫系统调节为对某些病原体的期望应答。例如, QS-21, 两种异构体的混合物, 是FDA批准的佐剂, 已知其具有增强平衡的Th1/Th2应答与抗原特异性CTL产生的能力, 这对于针对细胞内病原体 and 癌症的疫苗很有价值 (Ragupathi等人, (2011) *Expert Rev. Vaccines* 10:463-470;Deng等人, (2008) *Angew Chem. Int.* 47:6395-6398;Kensil CR. (1996) *Critical Revs. Therap. Drug Carrier Syst.* 13:1-55;Kensil等人, (1991) *J. Immun.* 146:431-437)。它具有广泛的临床应用潜力, 因此需求很高 (Kensil等人, (1991) *J. Immun.* 146:431-437)。QS-21的供应非常有限。这些天然产物是从智利中部暖温带的常绿树皂树 (*Quillaja saponaria* Molina (QS)) 的树皮中分离出来的。然而, 即使在当前需求下, 对自然资源的过度开发依然导致生态和经济后果 (Ragupathi等人, (2010) *Vaccine* 28:4260-4267)。此外, QS树皮提取物中QS-21的丰度低, 并且其分离也很费力 (Kensil等人, (1991) *J. Immun.* 146:431-437;Ragupathi等人, (2010) *Vaccine* 28:4260-4267;Wang等人, (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127:3256-3257)。QS-21还具有化学不稳定性问题, 这是由于它具有两个水解不稳定的酯部分, 使其制剂复杂化; 其剂量限制性毒性也使其无法达到完全效力。具有普通十二烷基侧链或具有末端羧基的侧链的QS-21类似物已显示具有不同的佐剂活性 (Adams等人, (2010)《美国化学会志》132:1939-1945;Chea等人, (2012)《美国化学会志》134:13448-13457)。

[0007] 苦瓜皂苷 (MS) I (2) 和II (3) 的衍生化已被证明是实现QS-21的实际替代物目标的潜在可行方式 (Wang等人, (2019)《医药化学期刊》62:9976-9982)。MS I和MS II是从生长于中国和东南亚的多年生木鳖果 (MC) 的种子中分离得到的 (Lieberman等人, (2009)

Clin.Vaccine Immunol.16:1332-1337)。该种子很容易买到,并且价格低廉。在C3葡萄糖醛酸处将脂肪族十二烷基链掺入MS I引起衍生物VSA-1 (4a),其具有与天然前体明显不同的佐剂活性谱(Slovin等人,(2005) Vaccine 23:3114-3122),特别是通过增强抗原特异性IgG2a应答。另一种MS II衍生物5a在IgG1和IgG2a应答及其天然皂苷前体3中没有这样的明显变化,即使两种MS衍生物4a和5a仅在4a的三萜类化合物核的C16处与5a的皂皮酸核的C16处各自的结构不同。

发明内容

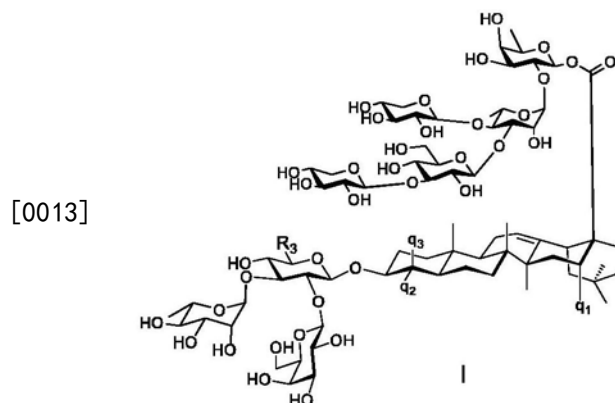
[0008] 本公开的一个方面包括具有下列化学结构式的修饰皂苷的实施例:



[0010] 其中: q_1 可以是H或OH; q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分; f_3 和 f_4 可以各自独立地为OH或乙酰基,或C3和C4的岩藻糖基单元,其中, f_3 和 f_4 可以形成环状缩酮环或环状碳酸酯; f_5 和 ga_5 可以各自独立地选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$ 和 R_4-O- 组成的组,其中, R_4 和 R_5 可以各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链,其中, R_6 可以是H、OH、 $COO(CH_2)_{0-6}H$ 、 $COOBn$ 、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、 OBn 、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A(MPL)单元、 α -Galcer单元,二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸(PamCys)单元,或载体的官能团;并且其中, R_7 可以是H或烷基; r_3 可以是H、单糖、二糖或三糖; x_3 可以是H、单糖(木糖除外)或二糖;以及 ga_3 可以是H、单糖或二糖。

[0011] 在本公开的该方面的一些实施例中,所述载体选自多胺聚合物、聚乙二醇胺、聚乙烯亚胺、纳米碳或含氨基生物分子组成的组。

[0012] 在本公开的该方面的一些实施例中,修饰皂苷可具有化学结构式I:



[0014] 其中: q_1 可以是H或OH; q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的

组分;以及 R_3 可以选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$ 和 R_4-O- 组成的组,其中, R_4 和 R_5 可以各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链,其中, R_6 可以是H、OH、 $COO(CH_2)_{0-6}H$ 、 $COOBn$ 、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、 OBn 、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元或载体的官能团,并且其中, R_7 可以是H或烷基。

[0015] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是羧基。

[0016] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 可以是具有 $HOOC-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链脂肪酸。

[0017] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是具有 $H_3C-(CH_2)_{6-20}-O-CH_2$ 结构的烷氧基基团。

[0018] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 是具有 $HO-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链醇。

[0019] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_4 可以用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氮基和芳基的官能团封端的长链烷基。

[0020] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 可以是长链烷基 $R_6O(CH_2)_{6-20}-$,并且其中, R_6 选白糖单元,所述糖单元选自由单糖、二糖和三糖组成的组。

[0021] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 可以用单磷酸脂质A (MPL) 封端的长链烷基。

[0022] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,并且其中, R_4 可以用二棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₂Cys) 或三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₃Cys) 封端的长链烷基。

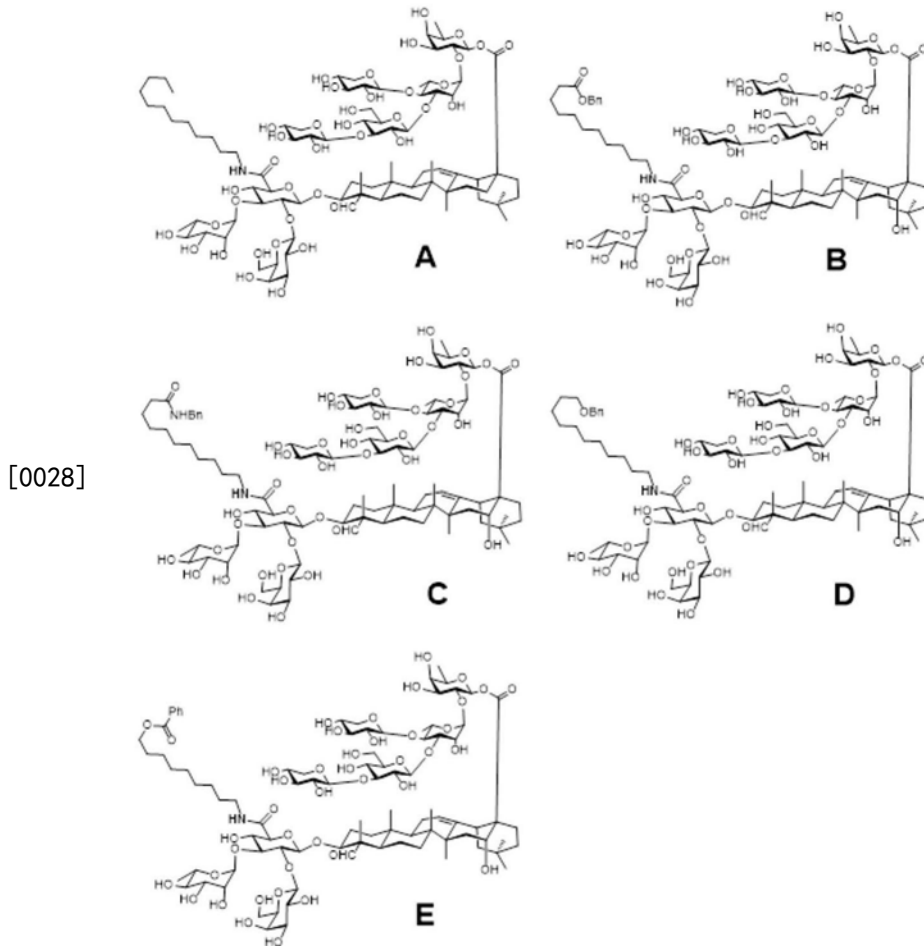
[0023] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 可以是以胞壁酰二肽单元封端的长链烷基。

[0024] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 可以用 α -Galcer单元封端的长链烷基。

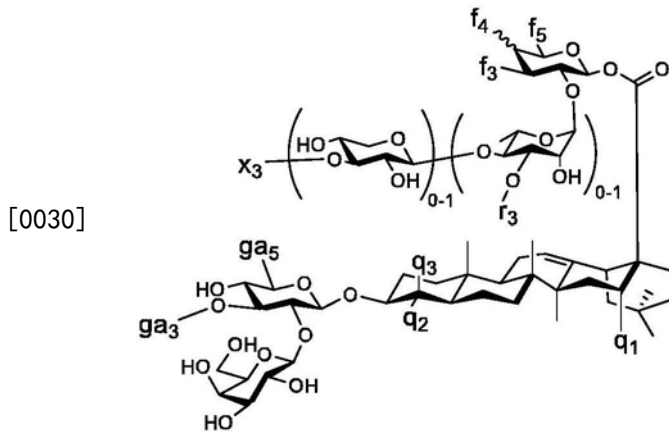
[0025] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 可以用MS I单元封端的长链烷基。

[0026] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$,其中, R_4 可以用MS II单元封端的长链烷基。

[0027] 在本公开的该方面的一些实施例中,修饰皂苷可以选自由化学结构式A-E组成的组:



[0029] 本公开的另一方面涵盖药物组合物的实施例,所述药物组合物可包含具有下列化学结构式的修饰皂苷:

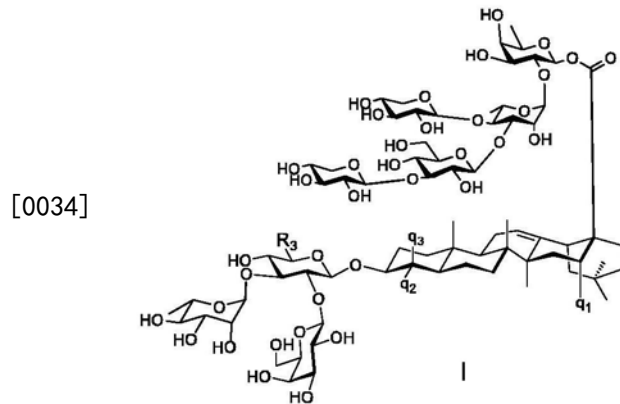


[0031] 其中: q_1 可以是H或OH; q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CH₀、CH₃、CH₂OH、H或缩醛基团的组分; f_3 和 f_4 可以各自独立地为OH或乙酰基,或C3和C4的岩藻糖基单元,其中 f_3 和 f_4 可以形成环状缩酮环或环状碳酸酯; f_5 和 ga_5 可以各自独立地选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$ 、 R_4-O- ,其中, R_4 和 R_5 可以各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}$ -或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链,其中 R_6 可以是H、OH、COO(CH₂)₀₋₆H、COOBn、C(O)NR₇Bn、NR₇Bn、OBn、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A(MPL)单元、 α -Galcer单元,二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸(PamCys)单元或载体的官能团;并且其中, R_7 可以是H或烷基; r_3 可以是H、单糖、二糖或三

糖; x_3 可以是H、单糖(木糖除外)或二糖; 以及 ga_3 可以是H、单糖或二糖。

[0032] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述载体可以选自: 多胺聚合物、聚乙二醇胺、聚乙烯亚胺、纳米碳、或含氨基生物分子。

[0033] 在本公开的该方面的一些实施例中, 修饰皂苷可具有化学结构式1:



[0035] 其中: q_1 可以是H或OH; q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CHO、CH₃、CH₂OH、H或缩醛基团的组分; 以及 R_3 可以选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$, 和 R_4-O- , 其中, R_4 和 R_5 可以各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链, 其中, R_6 可以是H、OH、COO(CH₂)₀₋₆、H、COOBn、C(O)NR₇Bn、NR₇Bn、OBn、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸(PamCys)单元或载体的官能团, 并且其中, R_7 可以是H或烷基。

[0036] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是羧基。

[0037] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中, R_4 可以是具有HOOC-(CH₂)₆₋₂₀-结构的长链脂肪酸。

[0038] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述 R_3 可以为具有H₃C-(CH₂)₆₋₂₀-O-结构的烷氧基。

[0039] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中, R_4 可以是具有HO-(CH₂)₆₋₂₀-结构的长链醇。

[0040] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_4 可以用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氮基和芳基的官能团封端的长链烷基。

[0041] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是具有H₃C-(CH₂)₆₋₂₀-O-CH₂-结构的烷氧基。

[0042] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中 R_4 可以是具有HO-(CH₂)₆₋₂₀-结构的长链醇。

[0043] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_4 可以用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氮基和芳基的官能团封端的长链烷基。

[0044] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中, R_4 可以是长链烷基 $R_6O(CH_2)_{6-20}-$, 并且 R_6 可以选自糖单元, 所述糖单元可以选自由单糖、二糖和三糖组成的组。

[0045] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中, R_4 可以是以单磷酸脂质A (MPL) 封端的长链烷基。

[0046] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以是以二棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₂Cys) 或三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₃Cys) 封端的长链烷基。

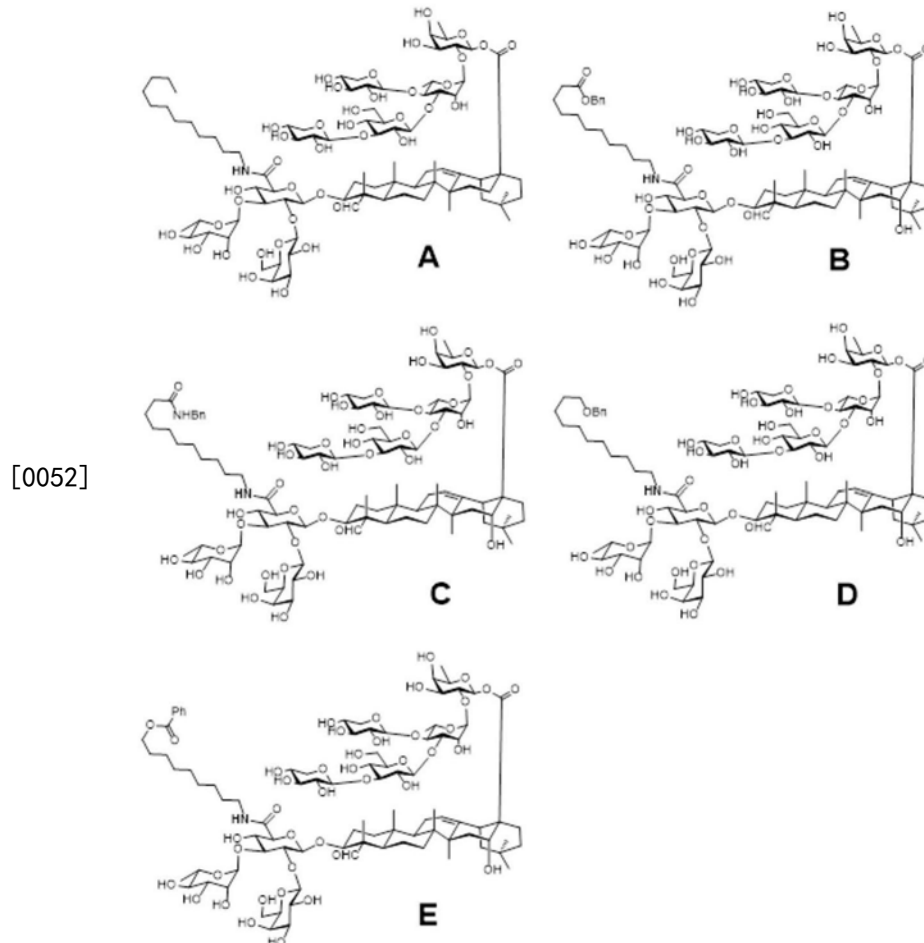
[0047] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以是以胞壁酰二肽单元封端的长链烷基。

[0048] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以用 α -Galcer 单元封端的长链烷基。

[0049] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以是以 MS I 单元封端的长链烷基。

[0050] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-, 其中 R_4 可以是以 MS II 单元封端的长链烷基。

[0051] 在本公开的该方面的一些实施例中, 修饰皂苷可以选自由化学结构式 A-E 组成的组:



[0053] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述药物组合物还可包含至少一种免疫原。

[0054] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述药物组合物还可包含药学上可接受的载体。

[0055] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述药物组合物可以被配制用于向动物或人受试者施用。

[0056] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述药物组合物还可包含至少一种癌症治疗

剂和药学上可接受的载体,其中,所述至少一种化学治疗剂和所述皂苷衍生物混合在药学上可接受的制剂中或彼此共价连接。

[0057] 本公开的另一个方面涵盖一种当施用于动物或人类受试者时增加免疫原的免疫原性的方法,所述方法包括向所述受试者施用疫苗的步骤,所述疫苗至少包含如本公开所述的药物组合物。

[0058] 本公开的另一个方面涵盖一种用于合成所述的皂苷衍生物的合成路线的实施例,所述合成路线包括将天然皂苷与官能化侧链分子偶联,其中,所述官能化侧链包括氨基和羟基。

[0059] 在本公开的该方面的一些实施例中,所述天然皂苷可获自木鳖果。

[0060] 在本公开的该方面的一些实施例中,所述天然皂苷可通过酰胺形成反应或酯形成反应与所述官能化侧链分子偶联。

附图说明

[0061] 在结合附图阅读下面描述的本公开的各种实施例的详细描述时,本公开的其他方面将是易于理解的。

[0062] 图1描述了天然皂苷MS I和MS II及其衍生物。

[0063] 图2描述了本公开的衍生物A-E。

[0064] 图3描述了天然皂苷MS I和MS II的化学衍生化以制备A和相关化合物。

[0065] 图4描述了天然皂苷MS I和MS II的化学衍生化以制备B和相关化合物。

[0066] 图5描述了侧链的示例。

[0067] 图6A至图6C描述了通过皮下途径单独用的卵清蛋白(OVA)、用GPI-0100和OVA与天然皂苷3或4或它们各自的衍生物5或6免疫的小鼠的血清IgG、IgG1和IgG2a抗OVA应答。

[0068] 图6A描述了通过皮下途径用单独的卵清蛋白(OVA)、用GPI-0100和OVA与天然皂苷3或4或它们各自的衍生物5或6免疫的小鼠的血清IgG抗OVA应答。

[0069] 图6B描述了通过皮下途径用单独的卵清蛋白(OVA)、用GPI-0100和OVA与天然皂苷3或4或它们各自的衍生物5或6免疫的小鼠的血清IgG1和IgG2a抗OVA应答。

[0070] 图6C描述了通过皮下途径用单独的卵清蛋白(OVA)、用GPI-0100和OVA与天然皂苷3或4或它们各自的衍生物5或6免疫的小鼠的血清IgG2a抗OVA应答。

[0071] 图7描述了结构3、结构4、结构5和结构6。

[0072] 图8描述了描述通过皮下途径用单独的rHagB、用rHagB与GPI-0100以及rHagB与天然皂苷3或4或它们各自的衍生物5或6免疫的小鼠的血清IgG、IgG1和IgG2a抗rHagB应答的图。

[0073] 图9A至图9D描述了通过皮下途径用单独OVA或用GPI-0100或MS衍生物免疫的小鼠的血清IgG、IgG1和IgG2a抗OVA应答。在第0、14和28天免疫小鼠。在每次免疫前和初次免疫后6周收集血清样品。数值表示为平均值 \pm SEM。通过t检验(未配对、非参数和Mann-Whitney检验)评估抗体应答的统计学明显性。与单独用OVA免疫的小鼠相比,* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$ 。

[0074] 图9A描述了通过皮下途径单独使用OVA或用GPI-0100或MS衍生物免疫的小鼠的血清IgG抗OVA应答。

[0075] 图9B描述了通过皮下途径单独使用OVA或用GPI-0100或MS衍生物免疫的小鼠的血清IgG1抗OVA应答。

[0076] 图9C描述了通过皮下途径单独使用OVA或用GPI-0100或MS衍生物免疫的小鼠中血清IgG2a抗OVA应答。

[0077] 图9D描述了示例性MS衍生物。

[0078] 图10A至图10D描述了通过皮下途径单独使用rHagB或用GPI-0100或皂苷佐剂免疫的小鼠的血清IgG、IgG1和IgG2a抗rHagB应答。在第0、14和28天免疫小鼠。在每次免疫前和初次免疫后6周收集血清样品。数值表示为平均值±SEM。通过t检验(未配对、非参数和Mann-Whitney检验)评估IgG、IgG1和IgG2a抗体应答的统计学明显性。与单独用rHagB免疫的小鼠相比,* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$,在指定组之间进行比较,# $P < 0.05$ 。

[0079] 图10A描述了通过皮下途径单独使用rHagB或用GPI-0100或皂苷佐剂免疫的小鼠的血清IgG抗rHagB应答。

[0080] 图10B描述了通过皮下途径单独使用rHagB或用GPI-0100或用皂苷佐剂免疫的小鼠的血清IgG1抗-抗-rHagB应答。

[0081] 图10C描述了通过皮下途径单独使用rHagB或用GPI-0100或皂苷佐剂免疫的小鼠的血清IgG2a抗-抗-rHagB应答。

[0082] 图10D描述了皂苷衍生物5b、皂苷衍生物5c、皂苷衍生物9b和皂苷衍生物9c。

[0083] 图11描述了纯化MS化合物的流程图。

[0084] 图12A描述了从木鳖果(葫芦科)的种子皂苷中分离的天然产物MS-I。

[0085] 图12B描述了从木鳖果(葫芦科)的种子皂苷中分离的天然产物MS-II。

[0086] 图12C描述了从木鳖果(葫芦科)的种子皂苷分离的天然产物MS-C。

[0087] 图13描述了用本公开的皂苷佐剂在小鼠体内由rHagB诱导的抗rHagB IgG抗体形成。

[0088] 图14描述了用本公开的皂苷佐剂在小鼠体内由rHagB诱导的抗rHagB Ig1抗体形成。

[0089] 图15描述了用本公开的皂苷佐剂在小鼠体内由rHagB诱导的抗rHagB Ig2a抗体形成。

[0090] 图16描述了用于衍生化苦瓜皂苷的方案1。

[0091] 图17描述了用于合成具有不同侧链的QS皂苷类似物的方案2。

[0092] 图18描述了血清抗rHagB IgG2a和IgG1活性的比率(IgG2a/IgG1)。数值表示为平均值±SD。与rHagB+VSA-2(5b)相比,统计学明显性通过t检验(用未配对、非参数和Mann-Whitney检验)评估统计学明显性。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

具体实施方式

[0093] 本公开不限于所描述的特定实施例,因此当然也可以变化。由于本公开的范围将仅由所附权利要求限制,因此本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并且不旨在是限制性的。

[0094] 在提供数值范围的情况下,除非上下文另有明确规定,否则在该范围的上限和下限之间的每个中间值(至下限的第十个单位)以及在所述范围内的任何其他所述值或中间

值都包括在本公开内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且也包含在本公开内,但要服从所述范围中任何具体排除的界限。当所述范围包括一个或两个极限时,排除这些包括的界限中的任何一个或两个的范围也包括在公开的范围之内。

[0095] 除非另有说明,否则本公开的实施例将采用医学、有机化学、生物化学、分子生物学、药理学等技术,这些技术在本领域的技术范围内。这些技术在文献中有充分解释。

[0096] 提出以下实施例以便向本领域普通技术人员提供如何进行方法和使用本文公开和要求保护的组合物和化合物的完整公开和描述。已努力确保关于数字(例如,数量、温度等)的准确性,但应考虑到一些错误和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,温度是摄氏度(°C),压力为大气压或约为大气压。标准温度和压力定义为20°C和1个大气压。

[0097] 在详细描述本公开的实施例之前,应当理解,除非另有说明,否则本公开不限于特定的材料、试剂、反应材料、制造工艺、尺寸、频率范围、应用等,因为这些是可以变化的。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不是限制性的。在本公开中还可能的是,可以以不同的顺序执行步骤,这在逻辑上是可能的。还可能的是,本公开的实施例可以应用于除了本文描述的示例之外的涉及测量的附加实施例,这些附加实施例不旨在是限制性的。此外,本公开的实施例可以与除了本文描述的示例之外的其他测量技术组合或集成,这并不是限制性的。

[0098] 应当注意,如在说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及“一支撑件”包括多个支撑件。在本说明书和随后的权利要求书中,将参照许多术语,这些术语应被定义为具有以下含义,除非有明显的相反意图。

[0099] 本文中引用的每个申请和专利,以及每个申请和专利中引用的每个文件或参考文献(包括在每个授权专利的审查期间的“申请引用文件”),以及对应于任何这些申请和专利和/或要求任何这些申请和专利的优先权的每个PCT和外国申请或专利,以及每个申请引用文件中引用或参考的每个文件,在此明确地通过引用并入本文。此外,在本文中、在权利要求书之前的参考文献列表中或在文本本身中引用的文献或参考文献;并且这些文献或参考文献(“本文引用的参考文献”)中的每一个,以及本文引用的参考文献中的每一个中引用的每篇文献或参考文献(包括任何制造商的用法说明、指导书等)在此明确地通过引用并入本文。

[0100] 在描述各种实施例之前,除非另有说明,否则应当使用以下定义。

[0101] 定义

[0102] 如本文单独或组合使用的,术语“酰基”意指与选自以下的基团键合的羰基或硫代羰基,例如任选取代的氢基、烷基(例如卤代烷基)、烯基、炔基、烷氧基(“酰氧基”包括乙酰氧基、丁酰氧基、异戊酰氧基、苯乙酰氧基、苯甲酰氧基、对甲氧基苯甲酰氧基和取代的酰氧基如烷氧基烷基和卤代烷氧基)、芳基、卤素、杂环基、杂芳基、磺酰基(例如烯丙基亚磺酰基烷基)、磺酰基(例如烷基磺酰基烷基)、环烷基、环烯基、硫代烷基、硫代芳基、氨基(例如烷基氨基或二烷基氨基)和芳烷氧基。“酰基”基团的说明性示例是甲酰基、乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、邻苯二甲酰基、丙二酰基、烟酰基等。如本文所用的术语“酰基”是指基团-C(O)R₂₆,其中,R₂₆是氢、烷基、环烷基、环杂烷基、芳基、芳基烷基、杂烷基、杂芳基和杂芳基烷基。示例包括但不限于甲酰基、乙酰基、环己基羰基、环己基甲基羰

基、苯甲酰基、苯甲酰基羰基等。

[0103] 如本文所用的术语“佐剂分子”是指能够在宿主中引发免疫应答的表面蛋白。在具体实施例中,佐剂分子是佐剂分子的“膜锚定形式”,这表明佐剂分子已被改造以包括信号肽(SP)和膜锚定序列,以指导蛋白质的转运和膜取向。因此,在实施例中,佐剂分子的膜锚定形式是重组蛋白,该重组蛋白包括与SP融合的蛋白质的一部分和膜锚定序列。

[0104] 如本文所用的术语“施用(administering)”和“施用(administration)”是指将本公开的组合物(例如,疫苗、佐剂或免疫原性组合物)引入受试者中。疫苗组合物的优选施用途径是静脉给药。

[0105] 本文所用的术语“烷氧基”或“烷氧基烷基”是指烷基-O-基团,其中烷基如前所述。如本文所用的术语“烷氧基”可以指 C_{1-20} (包括端值)、线性、支链或环状、饱和或不饱和的氧代烃链,包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、叔丁氧基和戊氧基。

[0106] 如本文所用,单独或在其它术语如“硫代烷基”和“芳基烷基”内的术语“烷基”意指单价饱和烃基,其可以是直链(即线性)或支链。用于本公开的烷基通常包含约1至20个碳原子,特别是约1至10个、1至8个或1至7个,更特别是约1至6个或3至6个碳原子。说明性烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、异丙基、异丁基、异戊基、戊基、仲丁基、叔丁基、叔戊基、正庚基、正乙酰基、正壬基、正癸基、十一烷基、正十二烷基、正十四烷基、十五烷基、正十六烷基、十七烷基、正十八烷基、十九烷基、二十烷基、十二烷基、正二十四烷基等,以及其支链变体。在本公开的某些方面,烷基是 C_1-C_6 低级烷基,其包含或选自甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、异丙基、异丁基、异戊基、戊基、三丁基、仲丁基、叔丁基、叔戊基和正己基。烷基基团可以任选地在不明显干扰本公开的化合物的制备并且不明显降低化合物的功效的位置处被如本文所定义的取代基取代。在本公开的某些方面,烷基被一至五个取代基取代,所述取代基包括卤素、低级烷氧基、低级脂族基、取代的低级脂族基、羟基、氰基、硝基、硫基、氨基、酮基、醛基、酯基、酰胺、取代的氨基、羧基、磺酰基、硫酰基、亚磺酰基、硫酸酯、亚砷、取代的羧基、卤代低级烷基(例如 CF_3)、卤代低级烷氧基、羟基羰基、低级烷氧基羰基、低级烷基羰基氧基、低级烷基羰基氨基、环脂族基、取代的环脂族基或芳基(例如苯基甲基苄基)、杂芳基(例如吡啶基)和杂环基(例如哌啶基、吗啉基)。烷基上的取代基本身可以被取代。

[0107] 如本文所用的术语“抗体”是指多克隆和单克隆抗体制剂,以及包括杂交抗体、改变的抗体、 $F(ab')_2$ 片段、 $F(ab)$ 片段、 Fv 片段、单结构域抗体、嵌合抗体、人源化抗体及其功能片段的制剂,其表现出亲本抗体分子的免疫结合特性。

[0108] 如本文所用的术语“抗体”还指与另一分子的特定空间和极性组织特异性结合并由此定义为与另一分子的特定空间和极性组织互补的免疫球蛋白。抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体,并且可以通过本领域熟知的技术制备,例如宿主的免疫和血清的收集(多克隆),或通过制备连续杂交细胞系和收集分泌的蛋白质(单克隆),或通过克隆和表达至少编码天然抗体特异性结合所需的氨基酸序列的核苷酸序列或其诱变形式。抗体可包括完整的免疫球蛋白或其片段,所述免疫球蛋白包括各种类别和同种型,例如IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3、IgM、IgY等。其片段可包括Fab、 Fv 和 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 $scFv$ 等。此外,在适当的情况下,可以使用免疫球蛋白或其片段的聚集体、聚合物和缀合物,只要保持对特定分子的结合亲和力即可。

[0109] 如本文所用的术语“抗原”是指具有一个或多个表位的分子,所述表位刺激宿主的免疫系统以产生分泌、体液和/或细胞抗原特异性应答,或指能够在脊椎动物中产生这种抗原的DNA分子。该术语也可与“免疫原”互换使用。例如,特异性抗原可以是完整蛋白、蛋白的部分、肽、融合蛋白、糖基化蛋白及其组合。为了与本公开的组合物一起使用,可以直接或作为重组核酸表达系统的一部分提供一种或多种PvDBPII抗原(天然蛋白质或蛋白质片段),以提供抗原性PvDBPII产物来触发宿主免疫应答。

[0110] 如本文所用的术语“抗原组分”是指衍生自能够在动物(优选哺乳动物,包括小鼠和人类)中刺激免疫应答的生物体的组分。抗原组分可以是免疫原性剂。抗原组分可以包括亚细胞组分,包括细胞器、膜、蛋白质、脂质、糖蛋白和源自生物体的其他组分。抗原组分可以衍生自整个生物体,例如整个寄生虫,或生物体的一部分,例如生物体的细胞或组织。此外,可以例如通过大小分级分离或亲和纯化来纯化蛋白质亚组,并重组。

[0111] 如本文所用的术语“糖”和“糖类”是指多羟基醛、多羟基酮及其衍生物。该术语包括单糖,例如赤藓糖、阿拉伯糖、阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、苏糖、木糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、己醛糖、果糖、己酮糖、核糖和戊醛糖。该术语还包括由单糖单元组成的碳水化合物,包括二糖、寡糖或多糖。二糖的示例是蔗糖、乳糖和麦芽糖。寡糖通常含有3-9个单糖单元,多糖含有10个以上的单糖单元。糖可以是D或L系列的成员,并且可以包括氨基糖、脱氧糖及其糖醛酸衍生物。在本公开的实施例中,碳水化合物是己糖,己糖是葡萄糖、半乳糖或甘露糖,或取代的己糖残基,例如氨基糖残基,例如己糖胺、半乳糖胺;氨基葡糖胺,特别是D-氨基葡萄糖(2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖)或D-半乳糖胺(2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖)。说明性戊糖包括阿拉伯糖、岩藻糖和核糖。糖残基可以从1,1键、1,2键、1,3键、1,4键、1,5键或1,6键连接至本公开的化合物。连接可以经由本公开的化合物的氧原子进行。氧原子可被-CH₂-或-S-基团取代一次或多次。

[0112] 如本文单独或组合使用的,术语“羧基”是指-C(O)OR₂₅-或-C(-O)OR₂₅,其中R₂₅是氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、氨基、硫醇、芳基、杂芳基、硫代烷基、硫代芳基、硫代烷氧基、杂芳基或杂环,其可以任选地被取代。在本公开的方面中,羧基呈酯化形式,并且可以含有低级烷基作为酯化基团。在本公开的特定方面,-C(O)OR₂₅提供酯或氨基酸衍生物。酯化形式在本文中特别称为“羧酸酯”。在本公开的方面,“羧基”可以被取代,特别是被烯丙基取代,所述烯丙基任选地被氨基、胺、卤素、烷基氨基、芳基、羧基或杂环中的一个或多个取代。羧基的示例是甲氧基羰基、丁氧基羰基、叔烷氧基羰基如叔丁氧基羰基、具有一个或两个芳基的芳基甲氧基羰基,包括但不限于任选被例如低级烷基、低级烷氧基、羟基、卤素和/或硝基取代的苯基,如苄氧基羰基、甲氧基苄氧基羰基、二苯基甲氧基羰基、2-溴乙氧基羰基、2-碘乙氧基羰基、叔丁基羰基、4-硝基苄氧基羰基、二苯基甲氧基羰基、苄羟基羰基、二-(4-甲氧基苯基)甲氧基羰基、2-溴乙氧基羰基、2-碘乙氧基羰基、2-三甲基甲硅烷基乙氧基羰基或2-三苯基甲硅烷基乙氧基羰基。酯化形式的其他的羧基是甲硅烷氧基羰基,包括有机甲硅烷氧基羰基。这些化合物中的硅取代基可以被低级烷基(例如甲基)、烷氧基(例如甲氧基)和/或卤素(例如氯)取代。硅取代基的示例包括三甲基甲硅烷基和二甲基叔丁基甲硅烷基。在本公开的方面,羧基可以是烷氧基羰基,特别是甲氧基羰基、乙氧基羰基、异丙氧基羰基、叔丁氧基羰基、叔戊氧基羰基、叔庚氧基羰基,尤其是甲氧基羰基或乙氧基羰基。

[0113] 如本文所用的术语“组合物”是指包含指定量的指定成分的产品,以及直接或间接

由指定量的指定成分的组合产生的任何产品。与药物组合物相关的这样的术语旨在涵盖包含活性成分和构成载体的惰性成分的产品,以及直接或间接地由任何两种或更多种成分的组合、络合或聚集,或由一种或多种成分的解离,或由一种或多种成分的其他类型的反应或相互作用产生的任何产品。因此,本公开的药物组合物涵盖通过混合本公开的化合物和药学上可接受的载体制备的任何组合物。

[0114] 当本公开的化合物与一种或多种其他药物同时使用时,除了本公开的化合物之外,还应考虑含有此类其他药物的药物组合物。因此,本公开的药物组合物包括除了本公开的化合物之外还含有一种或多种其他活性成分的组合。本公开的化合物与第二活性成分的重量比可以变化,并且将取决于每种成分的有效剂量。通常,将使用各自的有效剂量。因此,例如但不旨在限制,当本公开的化合物与另一种药剂组合时,本公开的化合物与其他药剂的重量比通常为约1000:1至约1:1000,优选约200:1至约1:200。本公开的化合物和其他活性成分的组合通常也在上述范围内,但在每种情况下,应使用每种活性成分的有效剂量。在这样的组合中,本公开的化合物和其他活性剂可以分开或联合施用。此外,一种成分的施用可以在其他药剂的施用之前、同时或之后进行。

[0115] 本公开的组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉末。组合物可以用传统的粘合剂和载体如甘油三酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体,例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本公开的组合物,例如包封在脂质体、微粒、微胶囊等中。

[0116] 本公开的治疗组合物可以包含载体,例如聚合物、碳水化合物、肽或其衍生物中的一种或多种,其可以直接或间接共价连接至化合物。载体可以被本文所述的取代基取代,所述取代基包括但不限于一个或多个烷基、氨基、硝基、卤素、硫醇、硫代烷基、硫酸根、磺酰基、亚磺酰基、亚砷、羟基。在本公开的方面,载体是氨基酸,包括丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、丙氨酰-丙氨酰、脯氨酰-甲硫氨酰或甘氨酰-甘氨酰。载体还可以包括将本公开的化合物靶向特定组织或器官的分子。

[0117] 考虑到该知识和本申请的公开内容(包括实施例),可以使用本领域普通技术人员通常已知的反应和方法制备本公开的化合物。反应在适合于所用试剂和材料并且适合于所进行的反应的溶剂中进行。有机合成领域的技术人员将理解,化合物上存在的官能度应与所提出的反应步骤一致。有时需要改变合成步骤的顺序或选择一种特定的方法方案而不是另一种,以获得本公开的所需化合物。还应认识到,在开发合成途径中的另一个主要考虑因素是选择用于保护本公开中描述的化合物中存在的反应性官能团的保护基团。Greene和Wuts(有机合成中的保护基,Wiley和Sons,1991)描述了本领域技术人员的许多替代方案。

[0118] 本公开的化合物可以配制成药物组合物,用于通过本领域已知的适当方法施用于受试者。本公开的药物组合物或其级分包含基于预期的施用形式选择的合适的药学上可接受的载体、赋形剂和媒介物,并且与常规药学实践一致。合适的药物载体、赋形剂和媒介物描述于标准文本,雷明顿:药学的科学与实践(21.sup.st 2005版,费城科学大学(编者),马克出版公司)和1999年出版的《美国药典》:美国国家处方集(USP 24NF19)中。举例来说,对于胶囊或片剂形式的口服施用,活性组分可以与口服无毒的药学上可接受的惰性载体组合,所述惰性载体例如乳糖、淀粉、蔗糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、葡萄糖、硫酸钙、磷酸二钙、甘露醇、山梨糖醇等。对于以液体形式口服施用,口服液组分可以与任何口服、无毒、药学上

可接受的惰性载体(例如乙醇、甘油、水等)组合。合适的粘合剂(例如明胶、淀粉、玉米甜味剂、天然糖(包括葡萄糖)、天然和合成树胶和蜡)、润滑剂(例如油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠和氯化钠)、崩解剂(例如淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土和黄原胶)、调味剂和着色剂也可以组合在组合物或其组分中。如本文所述的组合物可进一步包含润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0119] 如本文所用的术语“免疫原性组合物”是当注射到宿主中时导致特异性抗体产生或细胞免疫的组合物。

[0120] 本公开的免疫原性组合物和/或疫苗可通过本领域已知的任何方法配制。它们通常可以制备成注射剂或用于鼻内施用的制剂,例如液体溶液或悬浮液。也可以制备适于在注射或其他施用之前溶解或悬浮在液体中的固体形式。还可以例如将制剂乳化,或者将蛋白质/肽包封在脂质体中。

[0121] 活性免疫原性成分通常与赋形剂或载体混合,所述赋形剂或载体是药学上可接受的并且与活性成分相容。合适的赋形剂包括但不限于水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。免疫原性多肽在可注射、气雾剂或鼻用制剂中的浓度通常在约0.2至5mg/ml的范围内。可以将类似的剂量施用于其他粘膜表面。

[0122] 此外,如果需要,疫苗可以含有少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂和/或其他试剂,其增强疫苗的有效性。可能有效的试剂的示例包括但不限于氢氧化铝;N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP);N-乙酰基-去甲-胞壁酰基-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺(CGP 11637,简称为nor-MDP);N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸基-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酸氧基)-乙胺(CGP 19835A,称为MTP-PE);和RIBI,其含有在2%角鲨烯/吐温80乳液中从细菌提取的三种组分:单磷脂脂质A、海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS)。辅助物质的有效性可以通过测量针对免疫原的抗体(特别是IgG、IgM或IgA)的量来确定,所述抗体是由在包含所讨论的佐剂的疫苗中施用免疫原而产生的。还可以使用另外的制剂和施用方式。

[0123] 根据本领域已知的内容,本公开的免疫原性组合物和/或疫苗可以与剂量制剂相容的方式并且以预防和/或治疗有效的量和方式施用。待施用的量通常在每剂量约1至1,000微克病毒表面包膜糖蛋白和/或每剂量佐剂分子的范围内,更通常在每剂量约5至500微克糖蛋白和/或每剂量佐剂分子的范围内,这取决于抗原和/或佐剂分子的性质、待治疗的受试者、宿主免疫系统合成抗体的能力和所需的保护程度。需要施用的活性成分的精确量可以取决于医生或兽医的判断,并且可能因人而异,但这种确定在这种从业者的技能范围内。

[0124] 疫苗或免疫原性组合物可以单剂量给予;两剂量方案,例如间隔两至八周;或多剂量方案。多剂量方案是这样的方案,其中疫苗接种的主要疗程可以包括1至10个或更多个单独剂量,然后根据需要在后续时间间隔施用其他剂量以维持和/或增强免疫应答(例如,在1至4个月进行第二剂量,并且如果需要,在几个月后施用后续剂量)。

[0125] 如本文所用的术语“免疫原性片段”是指免疫原的片段,其包括一个或多个表位,并且因此可以调节免疫应答或可以充当共同施用的抗原的佐剂。可以使用本领域熟知的任何数量的表位作图技术鉴定此类片段(参见,例如,分子生物学方法中的表位定位协议,第66卷(莫里斯(德)1996版)新泽西州托托华,胡玛纳出版社)。

[0126] 免疫原性片段的长度可为至少约2个氨基酸,更优选地长度为约5个氨基酸,并且最优选地长度为至少约10至约15个氨基酸。片段的长度没有严格的上限,其可以包含几乎全长的蛋白质序列或甚至包含两个或更多个表位的融合蛋白。

[0127] 如本文所用的术语“免疫球蛋白”是指表现一类出抗体活性并以高度特异性结合其他分子(例如,抗原和某些细胞表面受体)的蛋白质。免疫球蛋白可分为五类:IgM、IgG、IgA、IgD和IgE。IgG是体内最丰富的抗体类别,并且呈现扭曲的“Y”形构型。除IgM外,免疫球蛋白由通过链内和链间二硫键连接的四条肽链组成。IgG由通过非共价二硫键偶联的两条多肽重链(H链)和两条多肽轻链(L链)组成。

[0128] 如本文所用的术语“免疫应答”是指受试者中对目标组合物中存在的抗原的体液和/或细胞免疫应答。出于本公开的目的,“体液免疫应答”是指由抗体分子介导的免疫应答,而“细胞免疫应答”是由T淋巴细胞和/或其他白细胞介导的免疫应答。

[0129] 细胞免疫的一个方面涉及溶细胞性T细胞(“CTL”)的抗原特异性应答。CTL对肽抗原具有特异性,所述肽抗原与由主要组织相容性复合物(MHC)编码并在细胞表面上表达的蛋白质结合呈递。CTL有助于诱导和促进细胞内微生物的破坏或被此类微生物感染的细胞的裂解。细胞免疫的另一方面涉及辅助T细胞的抗原特异性应答。辅助T细胞用于帮助刺激非特异性效应细胞针对在其表面上展示与MHC分子缔合的肽抗原的细胞的功能,并集中非特异性效应细胞的活性。“细胞免疫应答”还指由活化的T细胞和/或其他白细胞(包括衍生自CD4+和CD8+T细胞)产生的细胞因子、趋化因子和其他此类分子。因此,免疫应答可包括以下效应中的一种或多种:B细胞产生抗体;和/或特异性针对目标组合物或疫苗中存在的一种或多种抗原的抑制性T细胞和/或 γ δ T细胞的活化。这些应答可用于中和感染性,和/或介导抗体-补体、或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)以向免疫的宿主提供保护。此类应答可以使用本领域熟知的标准免疫测定和中和测定来确定。

[0130] 如本文所用的术语“免疫原性量”是指能够在已经施用疫苗的宿主中引发针对病毒的抗体产生的量。

[0131] 如本文所用的术语“免疫原性载体”是指增强来自本文所讨论的任何病毒的病毒体的免疫原性的组合物。此类载体包括但不限于蛋白质和多糖,以及使用例如可生物降解的聚合物(诸如DL-丙交酯-共乙交酯)、脂质体和细菌细胞和膜配制的微球。蛋白质载体可以通过重组或合成技术或通过化学偶联与蛋白酶或其衍生的肽连接以形成融合蛋白。有用的载体和将此类载体偶联至多肽抗原的方式是本领域已知的。

[0132] 如本文所用,术语“免疫增强剂”旨在意指当与免疫原混合时引发比单独的免疫原更强的免疫应答的物质。例如,免疫增强剂可增强免疫原性并提供优异的免疫应答。免疫增强剂可以例如通过增强巨噬细胞和其他抗原呈递细胞上的共刺激物的表达来起作用。

[0133] 如本文所用的术语“受试者”、“个体”或“患者”可互换使用,并且是指动物,优选温血动物,例如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于哺乳动物的任何成员。作为本公开中的受试者或患者的哺乳动物可以来自灵长类、食肉目、长尾目、奇蹄目、偶蹄目、啮齿目和兔形目。在一个具体实施例中,哺乳动物是人。在其他实施例中,可以治疗动物;动物可以是脊椎动物,包括鸟类和哺乳动物。在本公开的方面,该术语包括饲养用于食物或作为宠物的家畜,包括马、牛、绵羊、家禽、鱼、猪、犬科动物、猫科动物和动物园动物、山羊、猿(例如大猩猩或黑猩猩)和啮齿动物如大鼠和小鼠。

[0134] 如本文所用的术语“药学上可接受的载体”是指与本公开的探针一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物,其由联邦或州政府的管理机构批准或在美国药典或其他公认的药典中列出,用于动物,更特别是人。这样的药物载体可以是液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。药物载体可以是盐水、阿拉伯胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、尿素等。当施用于患者时,探针和药学上可接受的载体可以是无菌的。当静脉内施用探针时,水是有用的载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物载体还包括赋形剂,例如葡萄糖、乳糖、蔗糖、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,本发明的组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。本发明的组合物可有利地采取溶液、乳液、持续释放制剂的形式或适合使用的任何其他形式。

[0135] 如本文所用的术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0136] 如本文所用的术语“疫苗”是指免疫原性量的一种或多种病毒体、其片段或亚基。此类疫苗可包括一种或多种病毒表面包膜糖蛋白及其部分,以及病毒体表面上的佐剂分子及其部分,或与另一种蛋白质或其他免疫原组合,所述另一种蛋白质或其他免疫原诸如与病毒颗粒或由其衍生的表位肽天然相关的一种或多种另外的病毒组分。

[0137] Dalsgaard等人在1974年首次描述了从南美树种*Quillaja saponaria* Molina分离的皂苷制剂(“皂苷佐剂”,*Archiv.fur die gesamte Virusforschung*,第44卷,柏林施普林格出版社,第243-254页)具有佐剂活性。*Quil-A*的纯化片段已经通过HPLC分离,其保留佐剂活性,而没有与*Quil-A*相关的毒性(EP 0 362 278),例如QS7和QS21(也称为QA7和QA21)。QS-21是源自皂树的树皮的天然皂苷,其诱导CD8⁺细胞毒性T细胞(CTL)、Th1细胞和主要的IgG2a抗体应答。

[0138] 本公开的皂苷可以以每人体计量的佐剂组合物1至100 μ g的量使用,在约50 μ g,例如40至60 μ g,适当的是45 μ g至55 μ g或49 μ g至51 μ g或50 μ g之间量使用。在一些实施例中,用于人类的佐剂组合物的剂量可包含约25 μ g的QS21,例如20 μ g至30 μ g之间,适当的量是21 μ g至29 μ g或22 μ g至28 μ g或28 μ g至27 μ g或24 μ g至26 μ g,或25 μ g。

[0139] 当佐剂与液体形式的抗原组合物组合时,佐剂组合物的人体剂量适宜的体积约为人体剂量的预期最终体积的一半。例如,500 μ l的佐剂体积用于预定的最终人体剂量为1 μ l,或250 μ l的体积用于预定的最终人体剂量为0.5ml。当与抗原组合物组合时,佐剂组合物被稀释以提供最终人体计量的疫苗。当然,这种剂量的最终体积将根据佐剂组合物的初始体积和添加到佐剂组合物中的抗原组合物的体积而变化。在另一个实施例中,水性佐剂用于重构冻干的抗原组合物。在该实施例中,佐剂组合物的人体剂量适宜体积约等于人体剂量的最终体积。将液体佐剂组合物加入到含有冻干抗原组合物的小瓶中,并用于重构冻干抗原组合物。

[0140] 缩写词解释

[0141] IgG,免疫球蛋白G;Th,T辅助细胞;CTL,细胞毒性T淋巴细胞;rha,戊单糖;xyl,木糖;OVA,卵清蛋白;NMM,N-甲基吗啉;HOBt,羧基苯并三唑;EDC HCl,1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐;DCM,二氯甲烷;MeCN,乙腈;THF,四氢呋喃;rHagB,重组血凝素B;

s.c.,皮下;ESI-TOF,电喷雾电离飞行时间质谱;ELISA,酶联免疫吸附测定;

[0142] 讨论

[0143] 具有来自除皂树皮之外的天然来源的结构上限定的新皂苷佐剂的优点是多方面的。首先,植物木鳖果(*Momordica cochinchinensis* Spreng)是多年生藤本植物,并且易于生长,这避免了QS皂苷供应有限的缺点。其次,MS种子中皂苷的丰度(图1)高,并且它们的分离比QS皂苷更有效,因此成本有效。马钱子主要生长在中国和东南亚。籽(木鳖子)在中国已被用作中药1000多年,用于治疗溃疡、乳腺炎、疝、肛瘘、痔疮、湿疹和神经性皮炎。最近,评估了来自马钱子种子的提取物在针对口蹄疫(FMD)的实验性猪疫苗中的佐剂效果和安全性。MS皂苷与油乳剂在增强豚鼠抗原特异性IgG方面表现出协同作用。然而,在用抗原F4菌毛免疫的鸡中,在针对其他佐剂(即弗氏佐剂、Quil-A(QA)和蜂胶)的佐剂活性的比较中,MS皂苷在增强血清和蛋黄中的IgG应答方面显示出的能力低于弗氏佐剂和QA。这些结果与没有脂肪侧链的情况下,脱酰化QS-17/18仅显示体液免疫的观察结果一致。

[0144] 通过使用公开的方法分离来自木鳖果(Lour.)种子的两种天然MS皂苷,如图11所示。然后通过使用常规的一步酰胺形成反应合成分别来自天然皂苷3和4的两种MS衍生物,即5和6(图3)。

[0145] 在可获得纯天然皂苷3和4及其衍生物5和6(图7)的情况下,评估了它们对鸡蛋卵清蛋白(OVA)的抗体应答的增强能力。已知的皂苷佐剂GPI-0100用作阳性对照。因此,在第0、14和28天,通过皮下给药(s.c.)用单独的OVA(20 μ g)或用100 μ g剂量的GPI-0100、皂苷3-6免疫雌性BALB/c小鼠组(8-10周龄,每组6只)。在每次免疫前和初次免疫后6周,对小鼠称重并收集血清样品。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测定血清中OVA的IgG抗体的活性水平,如图6A-6C、9A-9C和表1所示。

[0146] 在初始免疫后第2周,在所有组中检测到血清IgG应答。在第二次免疫接种后接受OVA+佐剂的小鼠中,观察到IgG抗OVA抗体活性水平明显增加,并且在第三次免疫接种后应答的幅度继续增加(表1)。作为阳性对照,在第2周($P < 0.05$)、第4周($P < 0.001$)和第6周($P < 0.001$)时,GPI-0100增强了比仅用抗原观察到的明显更高的抗OVA IgG应答。与GPI-0100类似,佐剂VSA-1(5,天然MSI(3)的衍生物)显示出比在第2周($P < 0.01$)、第4周($P < 0.001$)和第6周($P < 0.01$)仅接受抗原的小鼠和在第2周($P < 0.001$)、第4周($P < 0.001$)和第6周($P < 0.01$)接受OVA+3的小鼠明显更高的抗OVA IgG应答。皂苷3在来自OVA组的IgG应答中没有显示出明显差异。皂苷4在第2周($P < 0.01$)和第4周($P < 0.001$)显示出来自OVA组的IgG应答的明显差异,但在第6周没有。佐剂6(天然MS II(4)的衍生物)在第4周($P < 0.001$)和第6周($P < 0.05$)显示出比OVA组明显更高的抗OVA IgG应答,但直到第6周($P < 0.05$)才显示出与其母体化合物4的明显差异。基于体重监测,在任何小鼠中均未观察到毒性迹象。

[0147] 然后分析由不同佐剂诱导的IgG亚类抗体应答。在第2周和第4周,所有佐剂显示出比OVA组小鼠明显更高的IgG1应答(表1)。然而,在第6周,仅GPI-0100($P < 0.001$)、在第5周,GPI-0100($P < 0.05$)和在第6周,GPI-0100($P < 0.01$)显示出比OVA组明显更高的IgG1应答。在IgG2a评估中(图6B),在第2周各组之间没有明显差异,但在第4周时GPI-0100($P < 0.001$)和VSA-1(5)($P < 0.001$)诱导的IgG2a明显比OVA组高。在第6周时,GPI-0100($P < 0.05$)和VSA-1(5)($P < 0.01$)仍然显示出比在单独使用OVA或使用佐剂3($P < 0.01$)、4($P < 0.01$)或6($P < 0.01$)的小鼠中观察到的明显更高的IgG2a滴度,但GPI-0100和VSA-1组之间没有明显

差异。

[0148] 第6周时抗OVA应答的IgG2a/IgG1比率的分析揭示,佐剂5具有比单独的OVA或具有3、4或6的OVA明显更高的比率 ($P < 0.01$),但与GPI-0100无明显差异(图8)。来自不含佐剂或含佐剂3、4或6的组的可忽略的IgG2a应答表明在这些组中选择性地诱导了Th2偏向性免疫应答。由于已知GPI-0100具有增强混合Th1/Th2应答和CTL产生的能力,GPI-0100(0.194,表1,条目2)和佐剂5(0.312,表1,条目5)之间相似的IgG2a/IgG1分布表明这两种佐剂可具有相似的活性谱。

[0149] 表1:在第6^a周的血清IgG亚类抗OVA活性

项目	佐剂	IgG1 (mg/mL)	IgG2a (mg/mL)	IgG2a/IgG1
1	无	113±37	0.1	0.001**
2	GPI-0100	1,047±292	166±50	0.194±0.060 (ns)
3	3	233±74	0.2	<0.001**
4	4	262±37	0.1	<0.001**
5	5	713±293	208±81	0.312±0.126
6	6	869±334	1	<0.001**

[0151] ^a值表示为平均值±SEM。与OVA+5相比具有统计学明显性,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

[0152] 作为比较,如图8A-8C所示,还评估了佐剂3-6在增强对rHagB(一种来自牙龈卟啉单胞菌的重组非菌毛粘附血凝素B)的免疫应答中的作用。该抗原是牙周病的病原体,并且已经证明rHagB在实验动物模型中诱导针对牙龈卟啉单胞菌诱导的牙槽骨损失的保护性免疫应答的有效性。通过使用相同的程序,使用rHagB抗原(35 μ g剂量)的结果与使用OVA抗原的结果相似,并且IgG、IgG1和IgG2a数据总结在图8A-8C中。

[0153] 抗原rHagB刺激强烈的体液免疫应答。尽管没有佐剂的组中的IgG和IgG1滴度在第2周和第4周低于具有佐剂的组,但差异在第6周变得不明显(除了具有佐剂5的组的IgG ($P < 0.05$)) (分别为图8A和8B)。就IgG2a而言(图8C),在第2周 ($P < 0.001$)、第4周 ($P < 0.001$) 和第6周 ($P < 0.05$),具有GPI-0100或佐剂5的小鼠显示出比单独具有rHagB的组明显更高的活性,这与用OVA抗原观察到的一致。有佐剂6的小鼠在第2周 ($P < 0.05$) 和第4周 ($P < 0.01$) 也显示出比rHagB对照组明显更高的IgG2a滴度,但在第6周没有。

[0154] 这些结果表明,通过将简单且化学稳定的脂肪侧链掺入天然苦瓜皂苷I(3),新衍生物(5)不仅保留并增强佐剂3的IgG1免疫力,而且还通过诱导明显的IgG2a免疫应答来调节其佐剂活性谱。然而,当将相同的策略应用于苦瓜皂苷II(4)时,没有观察到IgG2a的明显增加。虽然不希望受任何一种理论的束缚,鉴于两种MS衍生物之间的唯一结构差异在于三萜核,即丝石竹皂苷元($R_1 = H$)与皂皮酸($R_1 = OH$),可以看出三萜核的结构而不是皂苷结构的亲水-亲脂平衡在影响衍生物5和6的佐剂活性中起重要作用。

[0155] 通过使用与GPI-0100相同的程序评估佐剂VSA-1(5)的急性毒性。因此,将10周龄

的雌性BALB/c小鼠在颈部后方皮下注射0.1mL PBS中的佐剂,剂量如表2所示。

[0156] 表2. 佐剂5、Quil-A和GPI-0100^a的急性毒性比较

[0157] 剂量 (mg)	VSA-1 (5)	GPI-0100 ^b	Quil-A
对照	5/5	5/5	5/5
100	5/5	5/5	0/5
200	5/5	5/5	0/5
500	5/5	5/5	
1000	5/5	5/5	
2000	5/5	4/5	
5000	0/5	0/5	

[0158] ^a结果表示为注射后5天每组5只小鼠存活的小鼠数

[0159] ^b文献结果,16周龄的雌性BALB/c小鼠。

[0160] 用佐剂5 (5000μg) 和Quil-A处理的组中的所有小鼠在注射后五天内死亡。存活的小鼠表面看起来健康,并且表现正常。到第7天,存活小鼠中看起来没有任何倦怠感,并且在任何小鼠上均未观察到病变形。表2中的数据显示,佐剂5的急性毒性与GPI-0100的急性毒性相似,但远低于Quil-A的急性毒性。

[0161] 苦瓜皂苷I和II已经通过将它们与十二烷基胺在C3葡糖醛酸位点偶联而衍生化。所获得的衍生物显示出与其天然亲本皂苷明显不同的免疫刺激活性谱。特别地,佐剂VSA-1 (5),苦瓜皂苷I (3) 的衍生物,诱导比相应的天然产物明显更高的IgG2a应答。其IgG1和IgG2a产生与GPI-0100相似,表明针对特异性抗原的潜在混合Th1/Th2免疫应答,不同于由天然皂苷诱导的Th2免疫。毒性评估表明,VSA-1 (5) 具有与GPI-0100相似的毒性特征,并且毒性比广泛使用的天然皂苷混合物Quil-A低得多。这些结果证明,衍生化木鳖果皂苷是容易获得对混合的Th1/Th2免疫应答具有低毒性的结构上确定的皂苷免疫刺激剂的可行方法。鉴于MS皂苷容易获得且易于分离的事实,其将可用于大规模制备MS衍生物以用于潜在的临床前研究和临床应用。

[0162] 制备两种MS I (2) 衍生物4b和4c (方案1,图16)。4b的侧链具有末端酯基,而4c具有与QS-21类似物7相同的侧链。类似地,还制备了两种相应的MS II (3) 衍生物5b和5c。这两种天然MS皂苷 (2和3) 通过使用公开的方法从市售且廉价的MC种子中分离。衍生物4b和5b是通过常规的酰胺形成法从各自的天然皂苷和侧链中合成的。4b和5b的氢解分别产生高产率的4c和5c。在氢解条件下,皂皮酸核中的C12烯烃部分保持完整。

[0163] 然后评估它们增强对鸡蛋卵清蛋白 (OVA) 的抗体应答的能力。已知的皂苷佐剂GPI-0100是阳性对照之一。还使用最近报道的MS衍生物VSA-1 (4a) 作为另一个阳性对照。其高IgG1/IgG2a产量和低毒性与GPI-0100相似。因此,在第0、14和28天,通过皮下给药 (s.c.) 用单独的OVA (20μg) 或与100μg剂量的GPI-0100或MS皂苷衍生物一起免疫雌性BALB/c小鼠组 (8-10周龄,每组6只)。在每次免疫之前和最后一次免疫后2周,对小鼠称重并收集血清样品。用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血清抗OVA抗体水平。

[0164] 所有组的小鼠在初始免疫后第2周具有血清抗OVA IgG应答,并且IgG滴度的水平在第4周和第6周继续增加 (图9A)。在第4周和第6周,所有佐剂组显示出比不含佐剂的OVA对照明显更高的IgG活性。在抗OVA IgG1活性中出现相同的趋势 (图9B),但在第6周,OVA+5c

组与OVA对照组没有显示统计学差异。就IgG2a活性而言(图9C),OVA对照组随时间保持相同的活性,而具有佐剂的其他组(OVA+5c组除外)在第4周和第6周显示IgG2a滴度的稳定增加。在第6周,佐剂VSA-2(5b)增强了比OVA组($P < 0.01$)、OVA+4b($P < 0.05$)和OVA+5c组($P < 0.01$)明显更高的IgG2a活性,但与阳性对照组和OVA+4c组相比没有显示出明显差异。

[0165] 鉴于MS I/II(图1)和脱酰化的QS-17/18(8)(方案2,图17)之间的结构相似性,合成了类似于5b/5c的QS-17/18衍生物,以便观察具有相同侧链的C3和C28寡糖结构域的轻微差异如何影响佐剂性。先前合成并评估了QS-17/18衍生物9a,并且通过使用相同的合成路线,制备了新的衍生物9b和9c。因此,完全保护的中间体10首先进行脱苄基化以除去所有苄基保护基团。暴露C3葡糖醛酸处的羧基。在氢解条件下,所有的三乙基甲硅烷基也被除去。随后的酰胺键形成反应如4b和5b的合成中那样安装侧链。在碱性条件下除去岩藻糖基单元上C28位置的两个乙酰基后,获得佐剂候选物9b。9b的脱苄基化产生佐剂候选物9c。

[0166] 将9b和9c增强抗原特异性抗体活性的能力与5b和5c的能力进行比较。使用rHagB抗原(来自牙龈卟啉单胞菌的重组和非菌毛粘附血凝素B)。在早期的研究中,其显示出诱导针对牙龈卟啉单胞菌诱导的牙槽骨丢失的保护性免疫的有效性。在第0、14和28天,通过皮下给药(s.c.)用单独的rHagB(35 μ g)或用100 μ g剂量GPI-0100(皂苷佐剂)免疫雌性BALB/c小鼠组(8-10周龄,每组6只)。使用与OVA抗原相同的免疫和ELISA评估程序。

[0167] 所有组的小鼠在初始免疫后第2周显示血清抗rHagB IgG、IgG1和IgG2a应答,并且抗体滴度的水平在第4周和第6周继续生长(图10A-图10C)。在第2周和第4周,所有组均显示出比没有佐剂的rHagB对照组明显更高的IgG滴度,但在第6周,仅GPI-0100组显示出与rHagB组的统计学差异。IgG1应答具有与IgG中所见相似的趋势(图10B),但在第6周,OVA+9a和OVA+9b组显示出与rHagB组的统计学差异。对于IgG2a应答,所有组在第2、4和6周显示出比rHagB对照组明显更高的活性(图10C)。

[0168] 在第4周($P < 0.05$)和第6周($P < 0.05$),VSA-2(5b)比阳性对照GPI-0100增强更高的IgG2a。VSA-2(5b)在第2周($P < 0.01$)、第4周($P < 0.01$)和第6周($P < 0.01$)也显示出比QS-17/18衍生物9b更高的IgG2a活性,并且在第2周($P < 0.05$)、第4周($P < 0.01$)和第6周($P < 0.01$)也显示出比QS-17/18衍生物9c更高的IgG2a活性。与OVA抗原不同(图10C),VSA-2(5b)在增强IgG2a应答方面与5c没有显示出明显差异。

[0169] 由于小鼠中IgG1或IgG2a的产生被相应的Th2或Th1细胞因子增强,因此它们的相对量可用作佐剂增强的Th2和Th1免疫参与的试验性指示。使用rHagB抗原,VSA-2(5b)在第2、4和6周显示出比其它组(5c除外)明显更高的IgG2a/IgG1比率(图18)。这些结果表明,5b(和5c)能够比GPI-0100更能增强Th1免疫力,这在需要强Th1免疫力时将是有价值的。

[0170] 半合成MS衍生物和合成QS类似物的免疫学评估显示,对于不同的蛋白质抗原(即OVA或rHagB),VSA-2(5b)显示出比GPI-0100相当或更高的IgG2a/IgG1比率,具有相似的总IgG产量。在使用OVA抗原的情况下,MS衍生物4a增强的IgG2a产量显著高于5a。图4a和5b也显示类似的IgG2a产生(无明显差异,图10C)。5a和5b之间的唯一差异是它们的侧链,这表明侧链的结构影响诱导的免疫应答的抗体活性谱。此外,对于不同的侧链,衍生物5b和5c在与OVA抗原组合时也显示出不同的抗体活性,但在与rHagB抗原组合时显示出相似的活性。在侧链相同的情况下,具有不同核结构的皂苷4b、5b和9b显示出不同的抗体诱导刺激活性。两种皂苷4b和5b仅在它们各自的三萜类化合物核方面不同,其中与4b的丝石竹皂苷配基核相

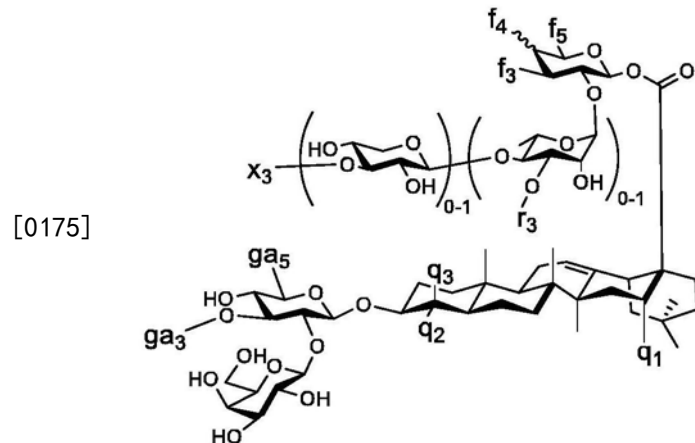
比,5b具有额外的C₁₆OH(皂皮酸核)。皂苷5b和9b具有相同的三萜类核(即皂皮酸)和侧链,但它们在C3和C28寡糖结构域略有不同。所有这些皂苷具有相似的亲水-亲油平衡(HLB),并且它们显示出相似的总体IgG活性。然而,它们增强IgG2a产生的能力明显不同,这表明皂苷的特定结构,即侧链、三萜类核和寡糖结构域的结构细节会影响免疫应答的细节。

[0171] 已经制备了许多基于MS-和QS-皂苷的疫苗佐剂候选物。通过酰胺形成反应将末端官能化的侧链并入天然皂苷MS I和MS II的C3葡萄糖醛酸单元中来制备MS衍生物;QS类似物通过多步有机合成制备。这些非天然皂苷显示出明显不同的免疫刺激活性谱,表明侧链、三萜类核和寡糖结构域的结构一起协调了每种皂苷对免疫应答的特征性增强。

[0172] 在各种调节物候选物中,当与OVA或rHagB抗原共同递送时,VSA-2(5b)(MS II的衍生物)不断增强IgG2a的产生。与阳性对照GPI-0100(一种来源于QS皂苷并经过充分研究的半合成皂苷佐剂,以其诱导Th1/Th2平衡免疫的能力而闻名)相比,rHagB抗原诱导的IgG2a应答显著更高。苦瓜皂苷是用于通过简单的化学衍生制备具有不同佐剂活性的非天然皂苷佐剂的皂苷的可行天然来源,并将VSA-2(5b)鉴定为有用的基于MS的免疫刺激剂(除了已知的VSA-1(4a)之外),并且特别有用的是其增强IgG2a应答的能力。

[0173] 因此,本公开的化合物和药物组合物可以与一种或多种其他治疗剂组合用于治疗病毒感染和其他疾病。例如,本公开的化合物和本文提供的药物组合物可以与其他抗病毒剂组合使用以治疗病毒感染。

[0174] 本公开的一个方面包括具有下列化学结构式的修饰皂苷的实施例:

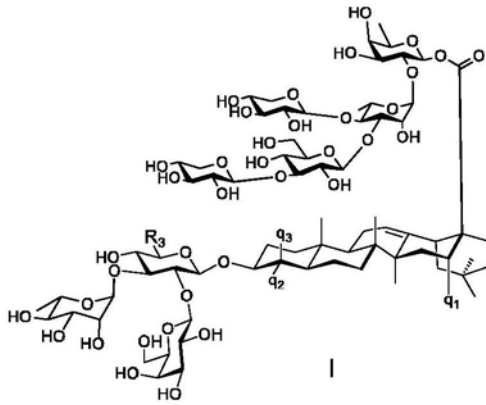


[0176] 其中: q_1 可以是H或OH; q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CHO、CH₃、CH₂OH、H或缩醛基团的组分; f_3 和 f_4 可以各自独立地为OH或乙酰基,或C3和C4的岩藻糖基单元,其中, f_3 和 f_4 可以形成环状缩酮环或环状碳酸酯; f_5 和 ga_5 可以各自独立地选自H、甲基、羧基、R₄-NR₅-C(O)-和R₄-O-组成的组,其中,R₄和R₅可以各自独立地为具有R₆(CH₂)₀₋₂₀-或R₆[(CH₂)₀₋₂₀O₀₋₂₀(CH₂)₀₋₂₀]₀₋₂₀结构的直链,其中,R₆可以是H、OH、COO(CH₂)₀₋₆-H、COOBn、C(O)NR₇Bn、NR₇Bn、OBn、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A(MPL)单元、 α -Galcer单元,二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸(PamCys)单元,或载体的官能团;并且其中,R₇可以是H或烷基; r_3 可以是H、单糖、二糖或三糖; x_3 可以是H、单糖(木糖除外)或二糖;以及 ga_3 可以是H、单糖或二糖。

[0177] 在本公开的该方面的一些实施例中,所述载体选自多胺聚合物、聚乙二醇胺、聚乙烯亚胺、纳米碳或含氨基生物分子组成的组。

[0178] 在本公开的该方面的一些实施例中,修饰皂苷可具有化学结构式I:

[0179]



[0180] 其中： q_1 可以是H或OH； q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分；以及 R_3 可以选自H、甲基、羧基、 $R_4-NH-C(O)-$ 和 R_4-O- ，其中， R_4 和 R_5 可以各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链，其中， R_6 可以是H、OH、COO、 $(CH_2)_{0-6}$ H、COOBn、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、OBn、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元或载体的官能团，并且其中， R_7 可以是H或烷基。

[0181] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是羧基。

[0182] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以是具有 $HOOC-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链脂肪酸。

[0183] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是具有 $H_3C-(CH_2)_{6-20}-O-CH_2$ 结构的烷氧基基团。

[0184] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以是具有 $HOOC-(CH_2)_{6-20}-$ 结构的长链醇。

[0185] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_4 可以用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氮基和芳基的官能团封端的长链烷基。

[0186] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以是长链烷基 $R_6O(CH_2)_{6-20}-$ ，并且其中， R_6 选自糖单元，所述糖单元选自自由单糖、二糖和三糖组成的组。

[0187] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以用单磷酸脂质A (MPL) 封端的长链烷基。

[0188] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，并且其中， R_4 可以用二棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₂Cys) 或三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₃Cys) 封端的长链烷基。

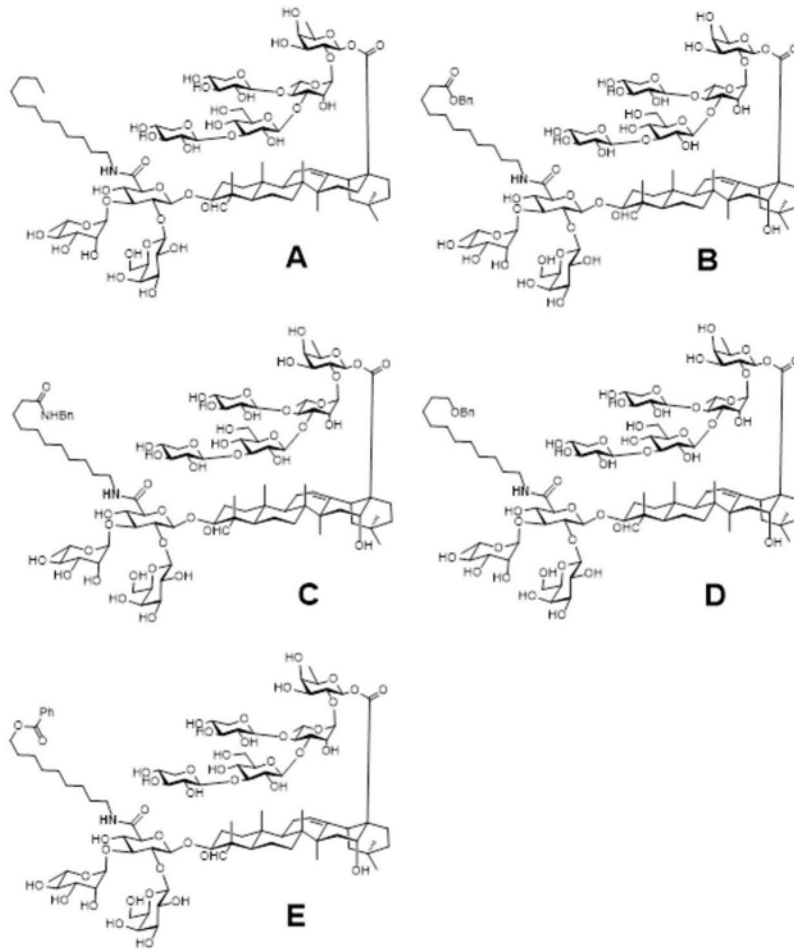
[0189] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以是以胞壁酰二肽单元封端的长链烷基。

[0190] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以用 α -Galcer单元封端的长链烷基。

[0191] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以用MS I单元封端的长链烷基。

[0192] 在本公开的该方面的一些实施例中， R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$ ，其中， R_4 可以用MS II单元封端的长链烷基。

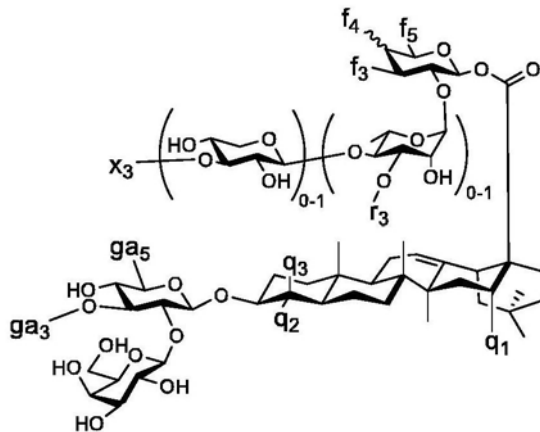
[0193] 在本公开的该方面的一些实施例中,修饰皂苷可以选自由化学结构式A-E组成的组:



[0194]

[0195] 本公开的另一面涵盖药物组合物的实施例,所述药物组合物可包含具有下列化学结构式的修饰皂苷:

[0196]

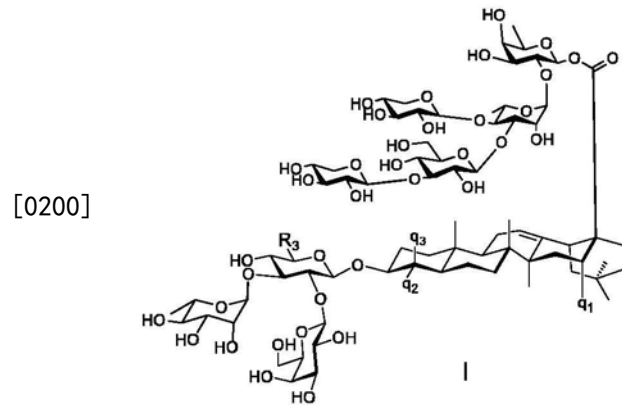


[0197] 其中: q_1 可以是H或OH; q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CH₀、CH₃、CH₂OH、H或缩醛基团的组分; f_3 和 f_4 可以各自独立地为OH或乙酰基,或C3和C4的岩藻糖基单元,其中 f_3 和 f_4 可以形成环状缩酮环或环状碳酸酯; f_5 和 ga_5 可以各自独立地选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$ 、和 R_4-O- 组成的组,其中, R_4 和 R_5 可以各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}-$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O]_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链,其中 R_6 可以是H、OH、COO(CH₂)₀₋₆H、COOBn、C(O)NR₇Bn、NR₇Bn、OBn、

糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元, 二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元, 或载体的官能团; 并且其中, R_7 可以是H或烷基; r_3 可以是H、单糖、二糖或三糖; x_3 可以是H、单糖 (木糖除外) 或二糖; 以及 ga_3 可以是H、单糖或二糖。

[0198] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述载体可以选自: 多胺聚合物、聚乙二醇胺、聚乙烯亚胺、纳米碳、或含氨基生物分子。

[0199] 在本公开的该方面的一些实施例中, 修饰皂苷可具有化学结构式I:



[0201] 其中: q_1 可以是H或OH; q_2 和 q_3 可以各自独立地选自CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分; 以及 R_3 可以选自H、甲基、羧基、 $R_4-O-C(O)-$, 和 R_4-O 组成的组, 其中, R_4 和 R_5 可以各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链, 其中, R_6 可以是H、OH、 $COO(CH_2)_{0-6}$ 、H、 $COOBn$ 、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、 OBn 、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元、二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元或载体的官能团, 并且其中, R_7 可以是H或烷基。

[0202] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是羧基。

[0203] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中, R_4 可以是具有 $HOOC-(CH_2)_{6-20}$ 结构的长链脂肪酸。

[0204] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述 R_3 可以为具有 $H_3C-(CH_2)_{6-20}-O-$ 结构的烷氧基。

[0205] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中, R_4 可以是具有 $HO-(CH_2)_{6-20}$ 结构的长链醇。

[0206] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_4 可以用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氨基和芳基的官能团封端的长链烷基。

[0207] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是具有 $H_3C-(CH_2)_{6-20}-O-CH_2-$ 结构的烷氧基。

[0208] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中 R_4 可以是具有 $HO-(CH_2)_{6-20}$ 结构的长链醇。

[0209] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_4 可以用选自酯基、醚基、氨基、氰基、羰基、叠氨基和芳基的官能团封端的长链烷基。

[0210] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 $R_4-NH-C(O)-$, 其中, R_4 可以是长链烷基 $R_6O(CH_2)_{6-20}$, 并且 R_6 可以选自糖单元, 所述糖单元可以选自由单糖、二糖和三糖组成的组。

[0211] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以是以单棕榈酰脂质A (MPL) 封端的长链烷基。

[0212] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以是以二棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₂Cys) 或三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸 (Pam₃Cys) 封端的长链烷基。

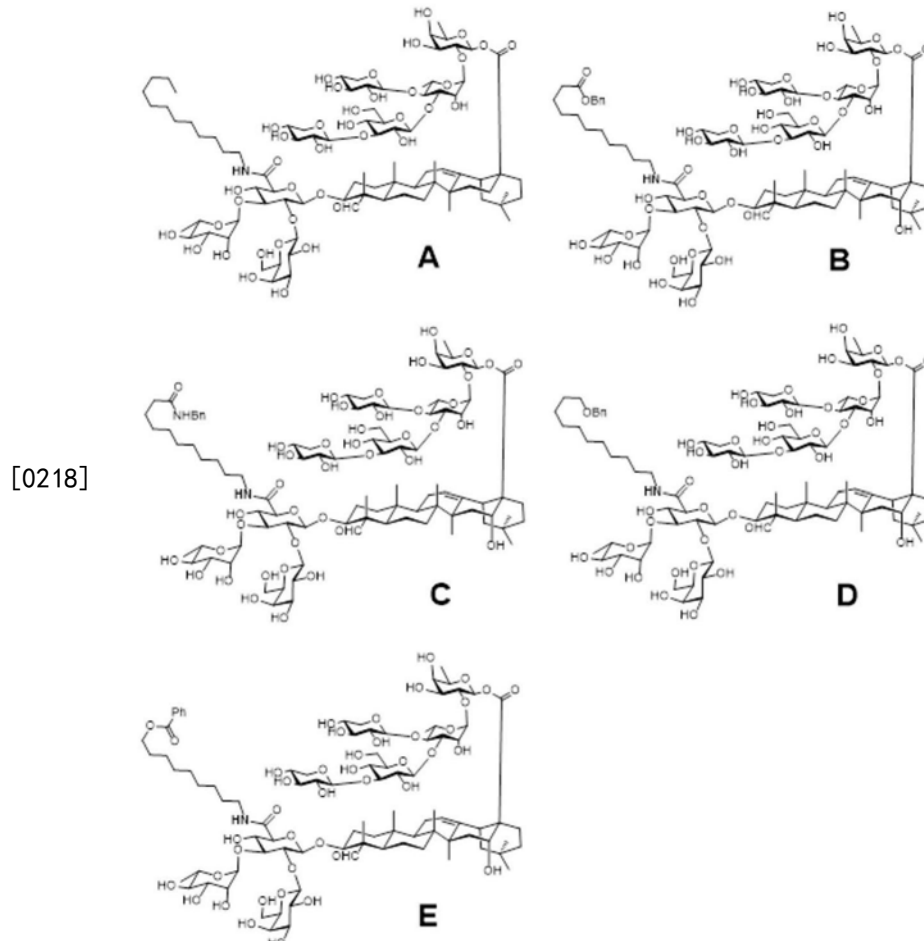
[0213] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以是以胞壁酰二肽单元封端的长链烷基。

[0214] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以用 α -Galcer 单元封端的长链烷基。

[0215] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 可以是 R_4 -NH-C(O)-, 其中, R_4 可以是以 MS I 单元封端的长链烷基。

[0216] 在本公开的该方面的一些实施例中, R_3 是 R_4 -NH-C(O)-, 其中 R_4 可以是以 MS II 单元封端的长链烷基。

[0217] 在本公开的该方面的一些实施例中, 修饰皂苷可以选自由化学结构式 A-E 组成的组:



[0219] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述药物组合物还可包含至少一种免疫原。

[0220] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述药物组合物还可包含药学上可接受的载体。

[0221] 在本公开的该方面的一些实施例中, 所述药物组合物可以被配制用于向动物或人

受试者施用。

[0222] 在本公开的该方面的一些实施例中,所述药物组合物还可包含至少一种癌症治疗剂和药学上可接受的载体,其中,所述至少一种化学治疗剂和所述皂苷衍生物混合在药学上可接受的制剂中或彼此共价连接。

[0223] 本公开的另一个方面涵盖一种当施用于动物或人类受试者时增加免疫原的免疫原性的方法,所述方法包括向所述受试者施用疫苗的步骤,所述疫苗至少包含根据本公开所述的药物组合物。

[0224] 本公开的另一个方面涵盖一种用于合成所述的皂苷衍生物的合成路线的实施例,所述合成路线包括将天然皂苷与官能化侧链分子偶联,其中,所述官能化侧链包括氨基和羟基。

[0225] 在本公开的该方面的一些实施例中,所述天然皂苷可获自木鳖果。

[0226] 在本公开的该方面的一些实施例中,所述天然皂苷可通过酰胺形成反应或酯形成反应与所述官能化侧链分子偶联。

[0227] 虽然结合实施例和相应的文本和附图描述了本公开的实施例,但并不意图将本公开限制于这些描述中的实施例。相反,意图是覆盖包括在本公开的实施例的精神和范围内的所有替代、修改和等同物。

[0228] 示例

[0229] 示例1

[0230] 一般情况下,通过在约12托下旋转蒸发浓缩有机溶液。使用230-400目硅胶进行快速柱色谱。使用预涂覆有用荧光指示剂(254nm)浸渍的230-400目硅胶至0.25mm深度的玻璃板进行薄层色谱。红外(IR)数据表示为吸收频率(cm^{-1})。在400、700和850MHz NMR光谱仪上记录质子和碳-13核磁共振(^1H NMR或 ^{13}C NMR)光谱;化学位移以从四甲基硅烷低场的百万分率(δ 标度)表示,并且参考NMR溶剂(CHCl_3 ; $\delta=7.26$)中的残留气。数据呈现如下:化学位移,多重性(s=单峰,d=双峰,t=三重峰,q=四重峰,m=多重峰和/或三重共振,AB=AB四重峰),以赫兹(Hz)计的耦合常数,积分。无水溶剂不经蒸馏而使用。用于后处理和柱色谱的溶剂从商业供应商获得,并且不经进一步纯化而使用。通过HPLC和 ^1H NMR的组合测定用于免疫学研究的产物的纯度,并且发现 $\geq 95\%$ 。

[0231] 示例2

[0232] 本公开的佐剂的前体从木鳖果(葫芦科)的种子皂苷中分离,与其他皂苷系列的佐剂相比,这是一种更容易获得的佐剂和佐剂前体的来源。

[0233] 图12A-12C中分别描述了根据图11中所示的流程图从木鳖果(葫芦科)的种子皂苷中分离得到的天然产物MS-I、MS-II和MS-C。

[0234] 示例3

[0235] 侧链的选择:侧链(例如,如图5所示)可以用标准酰胺形成程序掺入以产生各种皂苷衍生物。初步研究表明,掺入的侧链的结构在刺激的免疫应答的大小和性质方面对佐剂活性具有明显影响。因此,可以合成具有不同侧链的类似物。掺入以极性官能团封端的侧链的QS-21类似物明显改善了衍生物的佐剂活性。侧链a具有末端羧基。在早期的研究中,末端羧基可以改变IgG亚类分布,导致更多的IgG2a产生,这可能与增强的Th1免疫有关。侧链b和c可以微调整个分子的亲水性和疏水性之间的平衡,这可能与佐剂活性相关。侧链d-f可以

提供与侧链a-c类似的见解。QS-21类似物的早期SAR研究还表明,具有末端糖单元的侧链h也明显改善了类似物的佐剂活性。侧链g是侧链h的简化形式。侧链i具有末端醛部分。SAR研究表明,天然QS-21的皂皮酸核上的羰基对QS-21的非凡佐剂活性至关重要。提示羰基可与T细胞表面受体上的氨基形成亚胺。这种席夫碱形成可能提供共刺激信号并导致T细胞活化和Th1免疫。掺入额外的醛部分可以增强佐剂分子和T细胞表面受体之间的席夫碱诱导的相互作用,从而增强Th1免疫。侧链i具有带有芳族羰基的末端妥卡雷琐部分。已经研究了妥卡雷琐作为佐剂;其增强抗原特异性体液和细胞免疫应答。侧链k和l(各自具有两个顺式/反式异构体)源自天然皂苷,例如七叶皂苷和石头花皂苷,它们与已经显示出高体液免疫的天然皂苷的重组可导致细胞介导的免疫的增强。

[0236] QS-MPL组合佐剂的MPL侧链23d:末端基团也可以衍生自己建立的佐剂部分。QS-21及其变体可以在动物模型中与其他佐剂如单磷酸脂质A(MPL,一种TLR4激动剂)协同作用(Ashtekar等人,(2012)期刊PloS one.7:e50460)。已知MPL激活TLR4,明显增强Th1型细胞和体液免疫应答。当与单独的疫苗相比时,它通常将血清Ab滴度提高10-20倍。人类疫苗试验表明MPL具有类似于明矾的安全性特征(Wang等人,(2016)《有机化学》期刊81:9560-9566)。因此,可以将MPL侧链23d掺入皂苷衍生物中,产生相应的QS-MPL单分子组合佐剂。

[0237] QS-Pam2Cys组合佐剂的Pam₂Cys侧链23e:Pam₂Cys和Pam₃Cys(细菌脂肽的合成类似物)是在临床前研究中用作疫苗佐剂的两种TLR2激动剂。这些脂质佐剂可增强体液和细胞介导的应答,但在增强CTL应答方面不太有效。已经显示它们对于基于表位的疫苗是有效的,并且不表现出通常与许多其他佐剂制剂相关的有害副作用。将Pam₃Cys化学掺入完全合成的基于碳水化合物的抗癌疫苗中的结果表明化学连接TLR2激动剂对于增强免疫应答是可行的。适当保护的Pam₂Cys部分的合成是常规操作,并且在文献中是已知的。

[0238] 示例4

[0239] 对于4b(14.4mg,78%),¹H NMR(600MHz,CD₃OD)(特征质子)δ9.49(s,1H),7.41-7.37(m,4H),7.35(m,1H),5.36(d,J=1.5Hz,1H),5.34(d,J=8.2Hz,1H),5.29(t,J=3.3Hz,1H),5.15(s,2H),5.05(d,J=1.5Hz,1H),4.67(d,J=7.9Hz,1H),4.60(d,J=7.8Hz,1H),4.52(d,J=7.6Hz,1H),4.51(d,J=6.9Hz,1H),4.48(d,J=7.2Hz,1H),4.29(t,J=2.4Hz,1H),4.04(dd,J=3.2,1.9Hz,1H),4.01(dd,J=11.4,5.3Hz,1H),3.16(t,J=10.9Hz,1H),3.07(dd,J=9.1,8.0Hz,1H),2.83(dd,J=12.9,3.6Hz,1H),2.40(t,J=7.4Hz,2H),2.07(td,J=12.8,2.3Hz,1H),1.02(s,3H),0.94(s,3H),0.93(s,3H),0.83(s,3H);¹³C NMR(150.9MHz,CD₃OD)δ209.3,176.5,173.8,169.9,169.8,143.6,136.4,128.2,127.9,127.8,121.8,104.6,103.9,103.7,102.8,102.5,101.8,100.0,94.0,87.3,84.4,84.1,81.5,77.7,77.6,76.6,76.1,76.0,75.4,74.8,74.5,74.0,73.6,73.0,72.8,72.4,72.2,71.6,71.3,70.8,70.7,70.5,70.1,69.9,69.6,69.2,69.1,68.1,67.4,65.8,65.7,65.6,60.8,54.9,46.6,46.0,41.8,41.6,39.6,38.9,38.7,38.0,35.7,33.7,33.5,32.2,32.1,31.5,30.1,29.2,29.1,29.0,28.9,28.8,27.5,26.5,24.8,24.7,24.4,23.2,22.8,22.6,20.2,17.1,16.5,16.4,15.1,15.0,9.5;高分辨率质谱仪(High Resolution Mass Spectrometer)(电喷雾电离飞行时间质谱(ESI-TOF))m/z:C₉₄H₁₄₈NO₄₁的[M+H]⁺计算值946.9527;实测值1946.9496。

[0240] 示例5

[0241] 对于4c (56.0mg, 98%), ^1H NMR (600MHz, CD_3OD) (特征质子) δ 9.48 (s, 1H), 5.35-5.32 (m, 2H), 5.28 (s, 1H), 5.05 (s, 1H), 4.46 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 4.60 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 4.51 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 4.48 (m, 1H), 4.28 (s, 1H), 4.05 (s, 1H), 4.01 (dd, $J=11.3, 5.1\text{Hz}$, 1H), 3.16 (t, $J=11.0\text{Hz}$, 1H), 3.07 (t, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 2.83 (d, $J=10.4\text{Hz}$, 1H), 2.31 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 2.07 (t, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 1.02 (s, 3H), 0.81 (s, 3H); ^{13}C NMR (150.9MHz, CD_3OD) δ 209.4, 176.5, 176.3, 169.8, 143.5, 121.8, 104.6, 103.9, 103.6, 102.8, 102.5, 101.9, 100.0, 94.0, 87.2, 84.4, 84.2, 81.5, 77.6, 76.6, 76.1, 76.0, 75.4, 74.8, 74.5, 74.0, 73.6, 73.01, 72.98, 72.4, 72.2, 71.6, 71.3, 70.8, 70.6, 70.5, 70.1, 69.9, 69.6, 69.2, 69.1, 68.1, 67.5, 65.7, 65.6, 60.8, 54.9, 46.6, 46.0, 41.8, 41.6, 39.6, 38.8, 38.0, 35.7, 33.6, 32.2, 31.6, 30.2, 29.4, 29.2, 29.14, 29.11, 28.9, 27.5, 26.5, 24.9, 24.7, 24.4, 23.2, 22.8, 22.7, 20.2, 17.1, 16.6, 16.4, 15.2, 15.0, 9.5; 高分辨率质谱仪 (High Resolution Mass Spectrometer) (电喷雾电离飞行时间质谱 (ESI-TOF)) m/z : $\text{C}_{87}\text{H}_{142}\text{NO}_{41}$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 1856.9057; 实测值 1856.8998。

[0242] 示例6

[0243] 对于5b (12.5mg, 72%), ^1H NMR (700MHz, CD_3OD) (特征质子) δ 9.51 (s, 1H), 7.39-7.38 (m, 4H), 7.34 (m, 1H), 5.44 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 5.34 (t, $J=3.2\text{Hz}$, 1H), 5.24 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.05 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 4.75 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 4.57 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.52-4.47 (m, 2H), 4.46 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 4.26 (t, $J=3.2, 1.8\text{Hz}$, 1H), 4.06-4.02 (m, 2H), 3.19 (t, $J=10.7\text{Hz}$, 1H), 3.15 (dd, $J=9.2, 8.1\text{Hz}$, 1H), 2.92 (dd, $J=9.4, 4.2\text{Hz}$, 1H), 2.40 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 2.31 (t, $J=13.6\text{Hz}$, 1H), 1.44 (s, 3H), 1.26 (d, $J=6.2\text{Hz}$, 3H), 1.24 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (150.9MHz, CD_3OD) δ 209.6, 175.5, 173.8, 169.8, 143.5, 136.4, 128.2, 128.1, 127.9, 127.8, 121.5, 104.7, 103.8, 103.5, 102.8, 102.7, 101.9, 99.3, 94.0, 87.4, 84.6, 84.5, 82.1, 77.3, 76.8, 76.4, 76.0, 75.42, 75.38, 75.1, 74.2, 74.0, 73.6, 73.3, 73.0, 72.4, 72.3, 71.6, 71.51, 71.45, 70.8, 70.7, 70.5, 70.1, 70.0, 69.6, 69.2, 69.1, 68.0, 67.4, 65.8, 65.7, 60.8, 60.6, 54.8, 48.5, 46.6, 41.6, 41.1, 39.7, 38.7, 38.0, 35.7, 35.2, 33.7, 32.8, 32.0, 30.5, 29.9, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.7, 26.5, 25.9, 24.7, 23.3, 23.1, 20.0, 17.0, 16.5, 16.4, 15.1, 9.6; 高分辨率质谱仪 (High Resolution Mass Spectrometer) (电喷雾电离飞行时间质谱 (ESI-TOF)) m/z : $\text{C}_{94}\text{H}_{148}\text{NO}_{42}$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 1962.9476; 实测值 1962.9436。

[0244] 示例7

[0245] 对于5c (11.0mg, 96%), ^1H NMR (700MHz, CD_3OD) (特征质子) δ 9.51 (s, 1H), 5.44 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 5.35 (t, $J=3.4\text{Hz}$, 1H), 5.25 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 5.05 (s, 1H), 4.75 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 4.57 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.45-4.47 (m, 2H), 4.46 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.06-4.00 (m, 2H), 3.19 (t, $J=11.3\text{Hz}$, 1H), 3.15 (dd, $J=9.3, 8.1\text{Hz}$, 1H), 2.31 (t, $J=13.9\text{Hz}$, 1H), 2.29 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.82 (s, 3H); 高分辨率质谱仪 (High Resolution Mass Spectrometer) (电喷雾电离飞行时间质谱 (ESI-TOF)) m/z : $\text{C}_{87}\text{H}_{142}\text{NO}_{42}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 1872.9006; 实测值 1872.9016。

[0246] 示例8

[0247] 9b和9c的制备:使在1.5mL的THF/MeOH(2:1)中的缀合物10(30.0mg,7.9mmol)和10%Pd/C(6.0mg)在55psi下通氢气16小时。然后将悬浮液通过硅藻土塞过滤,浓缩,并再溶解于0.6mL EtOH/H₂O(体积比为5:1)中。在室温下向该溶液中加入11-氨基十一酸苄酯盐酸盐(6.4mg,20 μ mol)、N-甲基吗啉(NMM)(13.0mg,127 μ mol)、羟基苯并三唑(HOBt)(8.8mg,58 μ mol)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)(11.4mg,58 μ mol)。将反应混合物搅拌1天,然后过滤。将滤液用RP HPLC通过使用semi-Prep C18,250x10mm,5微米柱和H₂O/MeCN梯度(在30分钟内90%-10%H₂O,3mL/min流速)纯化。所需产物的保留时间为23分钟,并将级分在旋转蒸发器上在室温下浓缩以除去MeCN,然后在冻干机上除去剩余的水,经两步提供中间体,为白色固体(8.0mg,52%)。将中间体溶于甲醇(0.5mL)和H₂O(0.3mL)中,并用K₂CO₃(20mg)处理过夜。将反应混合物用乙酸中和,并用RP HPLC通过使用semi-Prep C18,250x10mm,5微米柱和H₂O/MeCN梯度(在45分钟内90%-10%H₂O,3mL/min流速)纯化。所需产物的保留时间为23分钟,并将级分在旋转蒸发器上在室温下浓缩以除去MeCN,然后在冻干机上除去剩余的水,得到9b(4.4mg,57%),为白色固体。通过使用针对4c/5c所述的相同脱苄基程序,获得呈白色固体的9c(4.0mg,96%)。

[0248] 示例9

[0249] 对于9b,¹H NMR(600MHz,CD₃OD)(特征质子) δ 9.38(s,1H),7.87(t,J=5.5Hz,1H),7.27-7.24(m,4H),7.22(m,1H),5.22-5.19(m,2H),5.17(d,J=8.2Hz,1H),5.03(s,2H),4.71(d,J=7.7Hz,1H),4.63(d,J=7.9Hz,1H),4.48(d,J=7.8Hz,1H),4.44(d,J=7.7Hz,1H),4.41(d,J=7.5Hz,1H),4.38(s,1H),4.34(d,J=7.4Hz,1H),4.16(dd,J=2.9,1.9Hz,1H),2.85(dd,J=13.9,4.0Hz,1H),2.28(t,J=7.3Hz,2H),2.21(t,J=13.3Hz,1H),1.29(s,3H),1.11(d,J=6.4Hz,3H),1.07(s,3H),0.90(s,3H),0.84(s,3H),0.78(s,3H),0.66(s,3H);¹³C NMR(176.0MHz,CD₃OD) δ 211.4,177.1,175.2,170.8,145.0,137.8,129.6,129.3,129.2,123.1,105.9,105.3,105.0,104.8,104.7,103.7,101.7,95.3,95.2,88.3,87.0,86.3,83.0,78.9,78.23,78.20,78.0,77.8,77.7,77.0,76.4,76.3,75.37,75.34,75.26,75.0,74.9,74.6,73.6,73.5,72.7,71.4,71.3,71.1,71.0,70.7,69.9,68.9,67.2,66.6,62.3,61.9,56.3,42.7,42.2,41.1,40.1,39.4,37.1,36.6,36.5,35.1,33.8,33.4,32.1,31.3,30.8,30.6,30.52,30.45,30.3,30.2,27.9,27.3,26.1,26.0,24.8,24.5,21.6,18.7,17.8,16.52,16.45,11.0;高分辨率质谱仪(High Resolution Mass Spectrometer)(电喷雾电离飞行时间质谱(ESI-TOF))m/z:C₉₃H₁₄₅NO₄₂Na[M+Na]⁺计算值1970.9139;实测值1970.9172。

[0250] 示例10

[0251] 对于9c,¹H NMR(700MHz,CD₃OD)(特征质子) δ 9.50(s,1H),7.95(t,J=5.9Hz,1H),5.36-5.32(m,2H),5.30(d,J=8.2Hz,1H),4.75(d,J=7.9Hz,1H),4.60(d,J=7.8Hz,1H),4.56(d,J=7.7Hz,1H),4.54(d,J=7.6Hz,1H),4.50(s,1H),4.46(d,J=7.5Hz,1H),4.29(dd,J=3.2,1.7Hz,1H),2.98(dd,J=14.1,3.8Hz,1H),2.33(t,J=13.8Hz,1H),2.33(t,J=7.4Hz,2H),1.41(s,3H),1.31(d,J=6.2Hz,3H),1.24(d,J=6.4Hz,3H),1.21(s,3H),1.03(s,3H),0.98(s,3H),0.91(s,3H),0.79(s,3H);高分辨率质谱仪(High Resolution Mass Spectrometer)(电喷雾电离飞行时间质谱(ESI-TOF))m/z:C₈₆H₁₃₉NO₄₂Na[M+Na]⁺计算

值1880.8669;实测值1880.8645。

[0252] 示例11

[0253] 抗原:用于体内使用的鸡蛋白蛋白 (Vac-pova) 购自InvivoGen。如先前所述制备重组牙龈卟啉单胞菌HagB (Zhang等人, (2003) Vaccine 21:4559-4471;Zhang等人, (2004) Infect.Immun.72:637-644;Zhang等人, (2005) Infect.Immun.73:3990-3998)。简言之,将HagB基因从牙龈卟啉单胞菌381克隆到含有lac启动子和组氨酸标签的pET载体中,并在大肠杆菌JM109中表达。在异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导后诱导蛋白质表达。根据制造者的使用说明 (Novagen, Madison, WI), 通过使用His-bind树脂柱从细菌裂解物的可溶性级分中纯化rHagB。使用兔抗rHagB抗体通过银染色和蛋白质印迹分析证实rHagB的纯度。使用牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准, 通过二辛可宁酸蛋白质测定测定 (Pierce, Rockford, IL) 估计rHagB的浓度。

[0254] 示例12

[0255] 小鼠和免疫:本研究中使用的BALB/c小鼠来自弗雷德里克癌症研究 (Fredrick, MD)。来评估基于MS皂苷的免疫佐剂的佐剂活性, 在第0、14和28天, 通过皮下 (s.c.) 途径用单独的OVA (20 μ g) 或rHagB (35 μ g), 或用抗原加适当的佐剂如GPI-0100 (100 μ g) 或MS佐剂 (100 μ g) 免疫雌性小鼠组 (8-10周龄, 每组6只小鼠)。在每次免疫之前和最后一次免疫后两周, 将小鼠称重并通过使用肝素化毛细管移液管从侧尾静脉收集血液样品。离心后获得血清, 并储存在-20 $^{\circ}$ C, 直至进行分析。

[0256] 示例13

[0257] 抗体应答的评估:通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定每组中针对OVA或rHagB的特异性血清IgG和IgG亚类的水平。将Maxisorpmicrotiter板 (NUNC International, Roskilde, DK) 用rHagB (1 μ g/ml)、OVA (0.1 μ g/ml) 或最佳量的山羊抗小鼠IgG、IgG1或IgG2a在硼酸盐缓冲盐水 (BBS; 100mM NaCl, 50mM硼酸, 1.2mM Na₂B₄O₇, pH 8.2) 中于4 $^{\circ}$ C包被过夜。将板用1%牛血清白蛋白 (BSA) 和在BBS中的0.02%叠氮化钠在室温下封闭2小时。将血清样品的连续两倍稀释液一式两份加入板中。为了产生标准曲线, 将小鼠免疫球蛋白参考血清 (MP Biomedicals, Solon, OH) 的连续稀释液加入到每个板中的两行孔中, 所述孔已经用适当的抗小鼠IgG或IgG亚类试剂包被。孵育 (在4 $^{\circ}$ C过夜) 并洗涤板后, 将辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG或IgG亚类抗体加入到适当的孔中。在室温下孵育4小时后, 洗涤板并用过氧化氢通过邻苯二胺底物显色。在490nm下记录显色。通过使用小鼠免疫球蛋白参考血清产生并通过基于四参数逻辑运算的计算机程序 (Softmax/Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA) 构建的标准曲线上的插值来确定抗体的浓度。

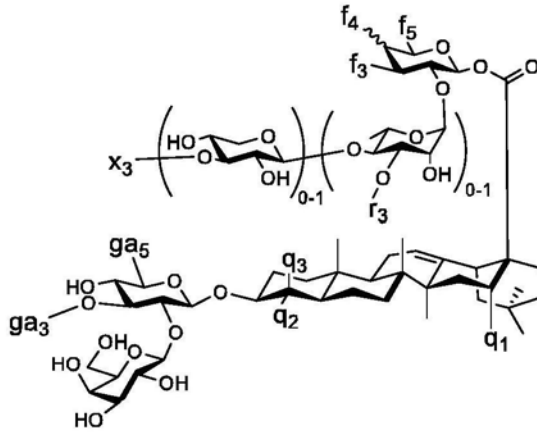
[0258] 示例14

[0259] 统计分析:使用GraphPad Prism 8通过t检验 (使用未配对、非参数和Mann-Whitney检验) 评估抗体应答的统计显著性。在P值<0.05时, 差异被认为是明显的。

[0260] 示例15

[0261] 通用结构

[0262]

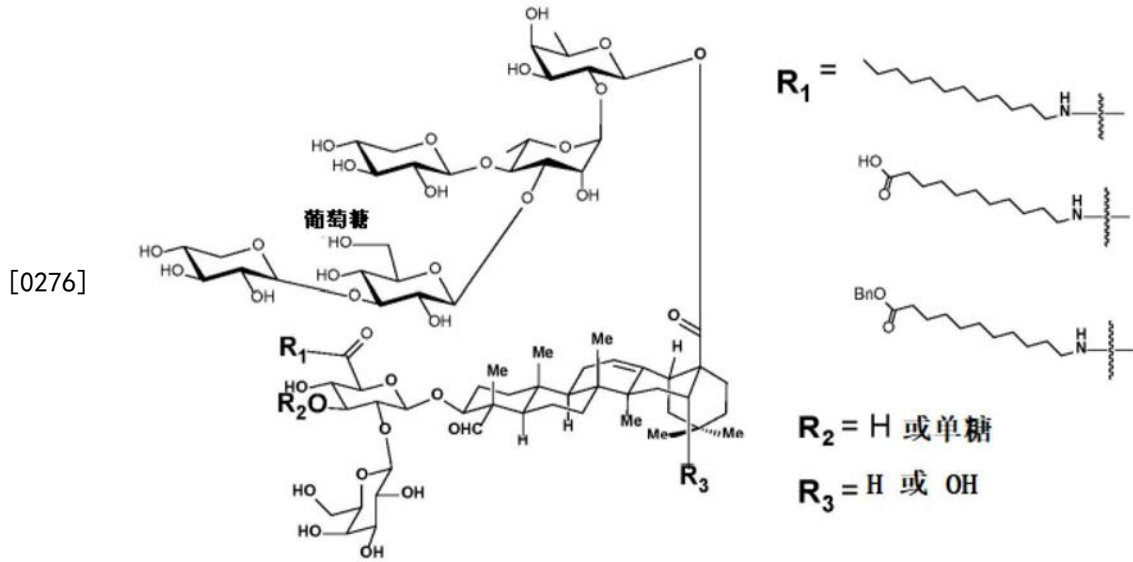


[0263] 其中：

[0264] q_1 是H或OH；[0265] q_2 和 q_3 各自独立地选自CHO、 CH_3 、 CH_2OH 、H或缩醛基团的组分；[0266] f_3 和 f_4 各自独立地为OH或乙酰基，或C3和C4的岩藻糖基单元，其中， f_3 和 f_4 形成环状缩酮环或环状碳酸酯；[0267] f_5 和 ga_5 各自独立地选自H、甲基、羧基、 $R_4-NR_5-C(O)-$ 、和 R_4-O- 组成的组，[0268] 其中， R_4 和 R_5 各自独立地为具有 $R_6(CH_2)_{0-20}$ 或 $R_6[(CH_2)_{0-20}O_{0-20}(CH_2)_{0-20}]_{0-20}$ 结构的直链，[0269] 其中， R_6 是H、OH、 $COO(CH_2)_{0-6}H$ 、 $COOBn$ 、 $C(O)NR_7Bn$ 、 NR_7Bn 、 OBn 、糖单元、苦瓜皂苷I或II、胞壁酰二肽、单磷酸脂质A (MPL) 单元、 α -Galcer单元，二棕榈酰-S-甘油基半胱氨酸 (PamCys) 单元，或载体的官能团；[0270] 并且其中， R_7 是H或烷基；[0271] r_3 是H、单糖、二糖或三糖；[0272] x_3 是H、单糖(木糖除外)或二糖；以及[0273] ga_3 是H、单糖或二糖。

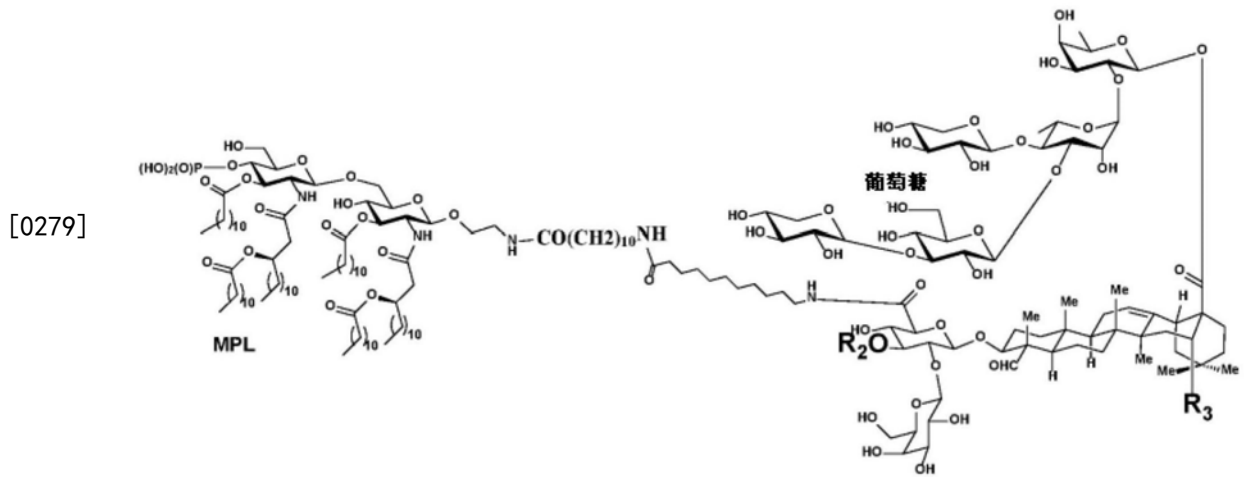
[0274] 示例16

[0275] 合成衍生物：通过在葡糖醛酸单元的羧基处衍生天然产物 (MS-A、MS-B和MS-C，(分别为图12A-12C) 来制备这些半合成产物。



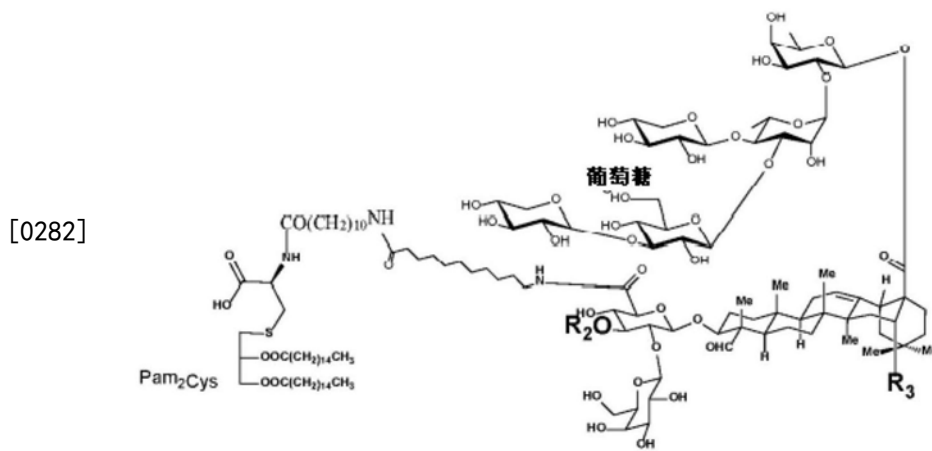
[0277] 示例17

[0278] 皂苷-MPL缀合物



[0280] 示例18

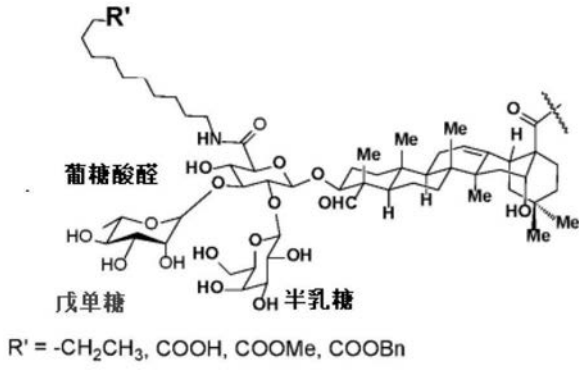
[0281] 皂苷-Pam₂Cys缀合物



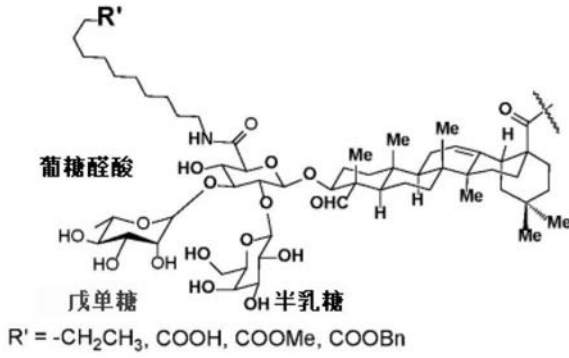
[0283] 示例19

[0284] 合成衍生物:

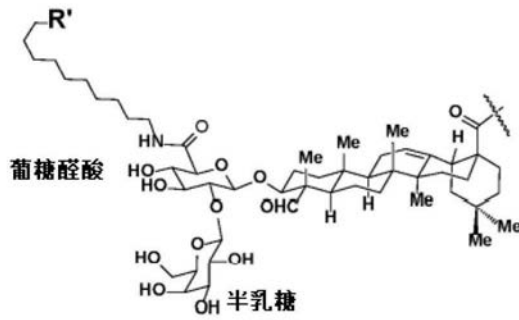
[0285]



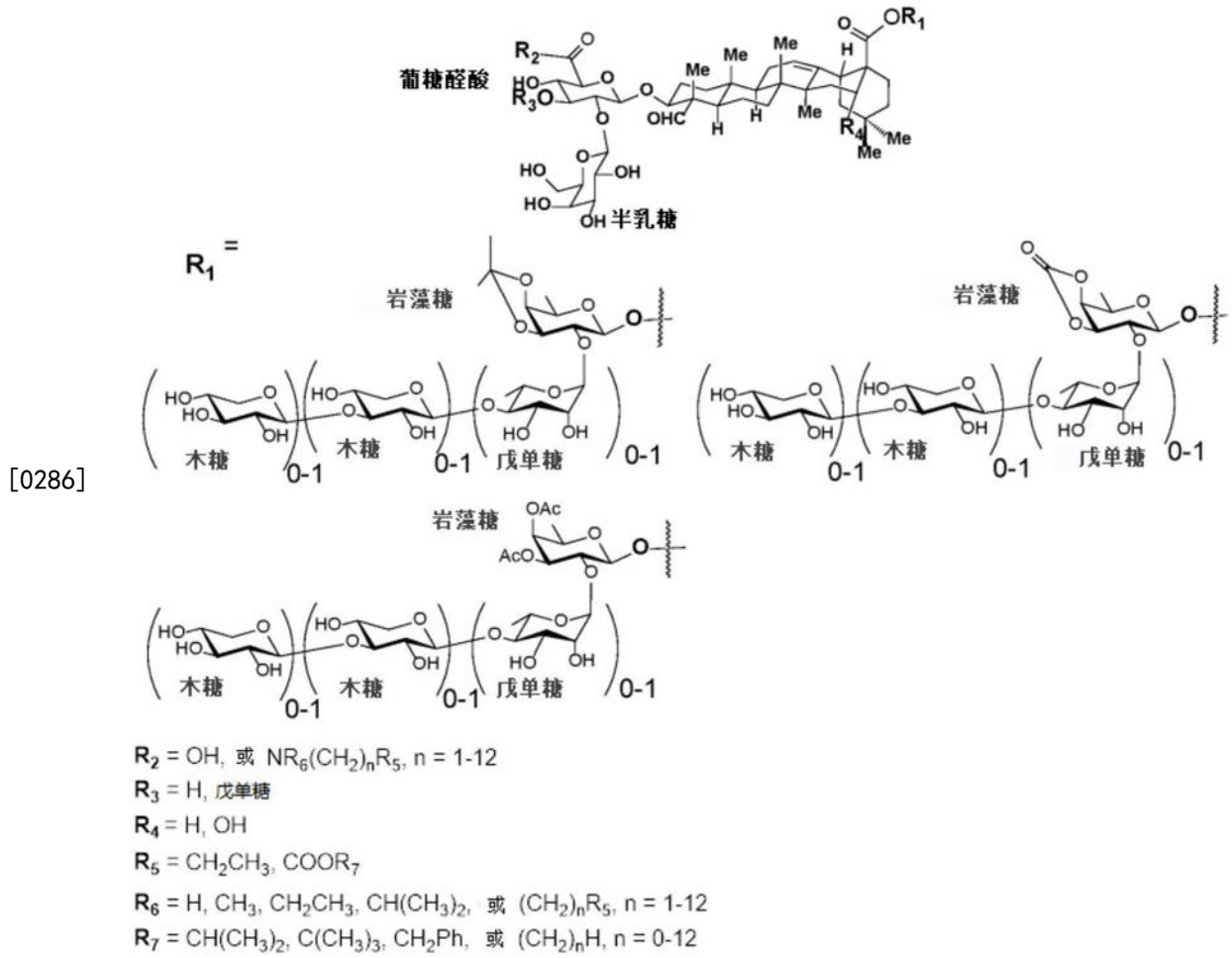
	R'
MA-N	CH ₂ CH ₃
MA-X	COOH
MA-XMe	COOMe
MA-XBn	COOBn

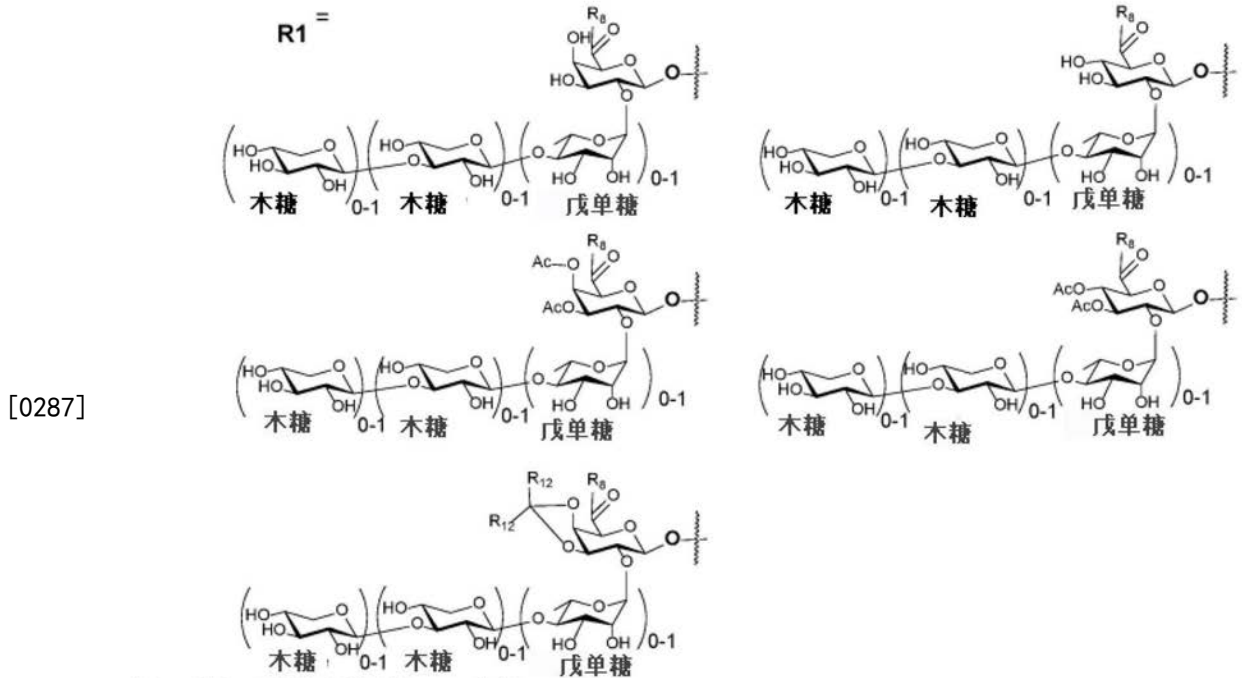
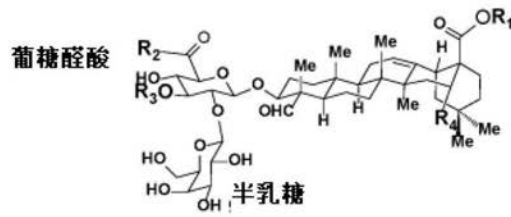


	R'
MB-N	CH ₂ CH ₃
MB-X	COOH
MB-XMe	COOMe
MB-XBn	COOBn



	R'
MB-N	CH ₂ CH ₃





- R₂ = OH, 或 NR₆(CH₂)_nR₅, n = 1-12
- R₃ = H, 戊单糖
- R₄ = H, OH
- R₅ = CH₂CH₃, COOR₇
- R₆ = H, CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, 或 (CH₂)_nR₅, n = 1-12
- R₇ = CH(CH₃)₂, C(CH₃)₃, CH₂Ph, 或 (CH₂)_nH, n = 0-12
- R₈ = OH, 或 NR₁₀(CH₂)_nR₉, n = 1-12
- R₉ = CH₂CH₃, COOR₁₁
- R₁₀ = H, CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, 或 (CH₂)_nR₉, n = 1-12
- R₁₁ = CH(CH₃)₂, C(CH₃)₃, CH₂Ph, 或 (CH₂)_nH, n = 1-12
- R₁₂ = CH₃, 或 O

[0288] 示例20

[0289] 用本公开的各种皂苷佐剂在小鼠中由rHagB诱导的抗rHagB抗体形成:图13-15分别显示了在背部皮下免疫 (200μl/小鼠, 100μl/位点, 2个位点/小鼠) 的雌性BALB/c小鼠 (6只小鼠/组) 中IgG、Ig1和Ig2a的产生情况。

[0290] 用以下免疫:A, 20μg rHagB; B, 20μg rHagB+100μg GPI-0100; G, 20μg rHagB+100μg MA; H, 20μg rHagB+100μg MB; J, 20μg rHagB+100μg MA-N; K, 20μg rHagB+100μg MA-X; L, 20μg rHagB+100μg MA-XBn; M, 20μg rHagB+100μg MB-N; N, 20μg rHagB+100μg MB-X; O, 20μg rHagB+100μg MC-N。

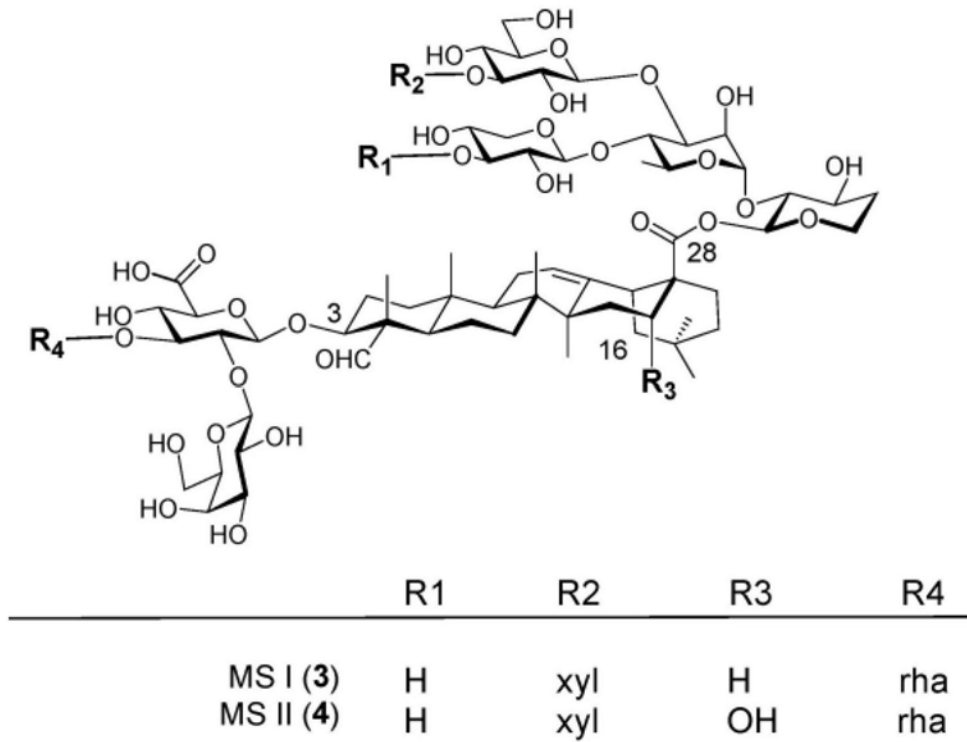


图1

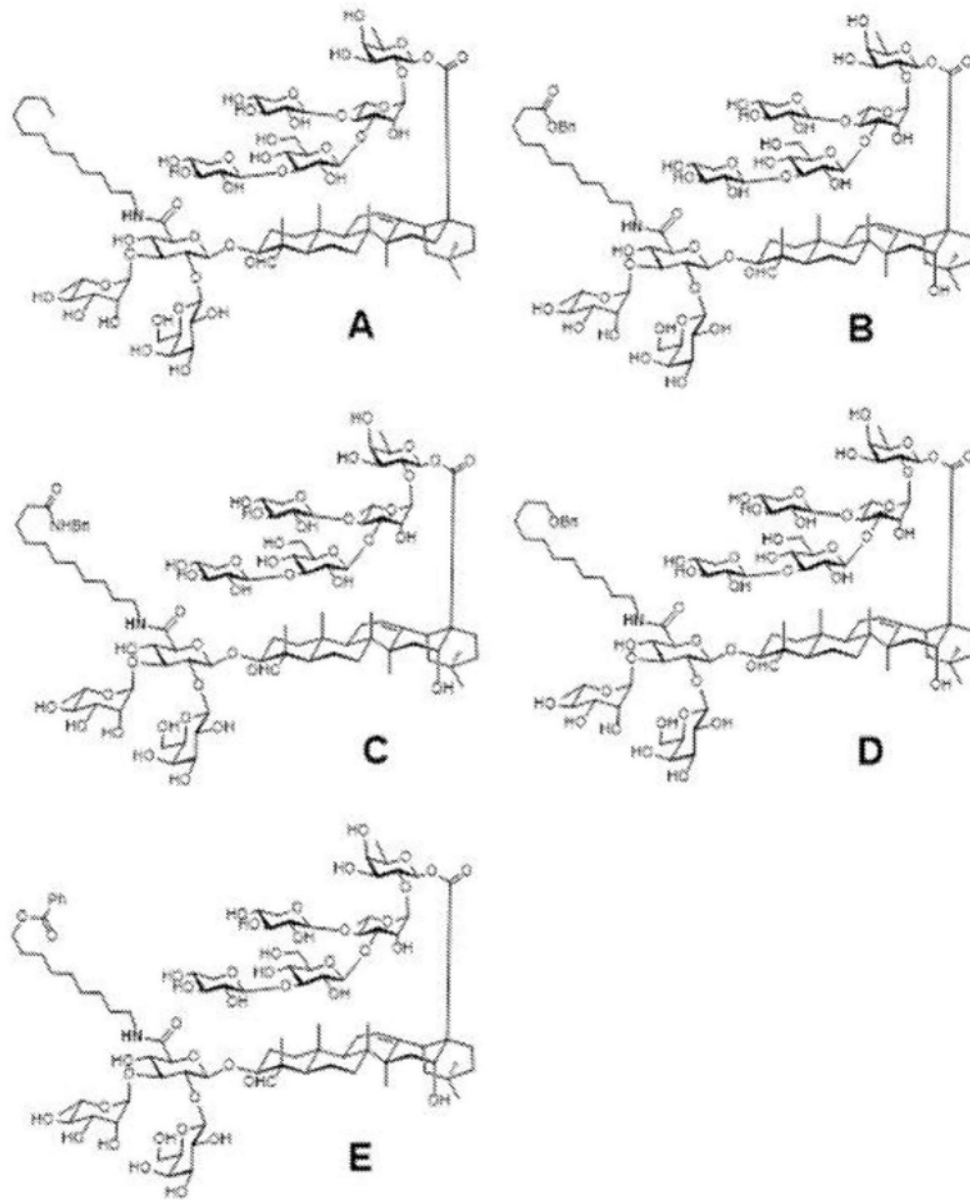


图2

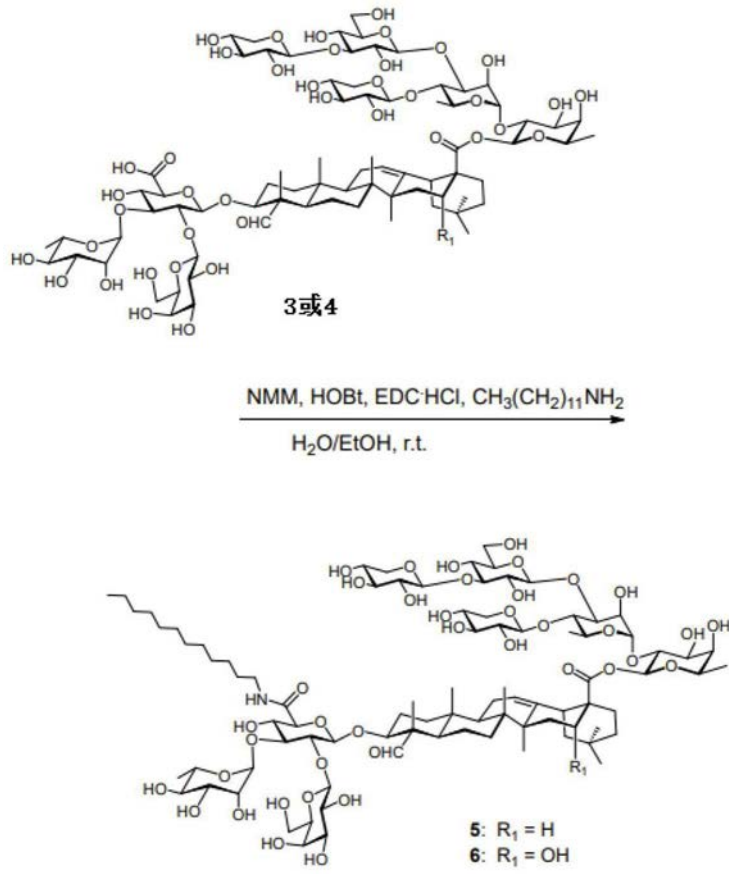


图3

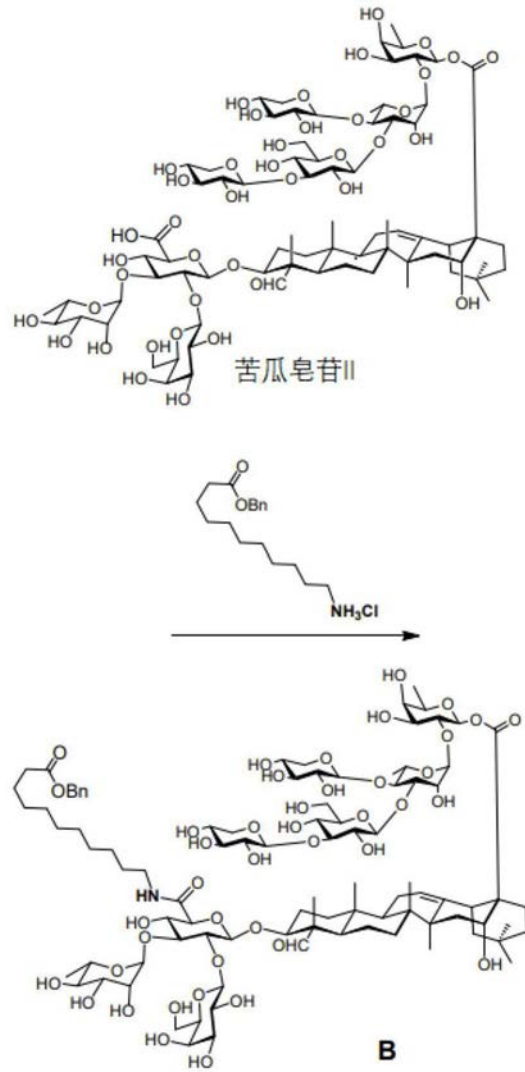


图4

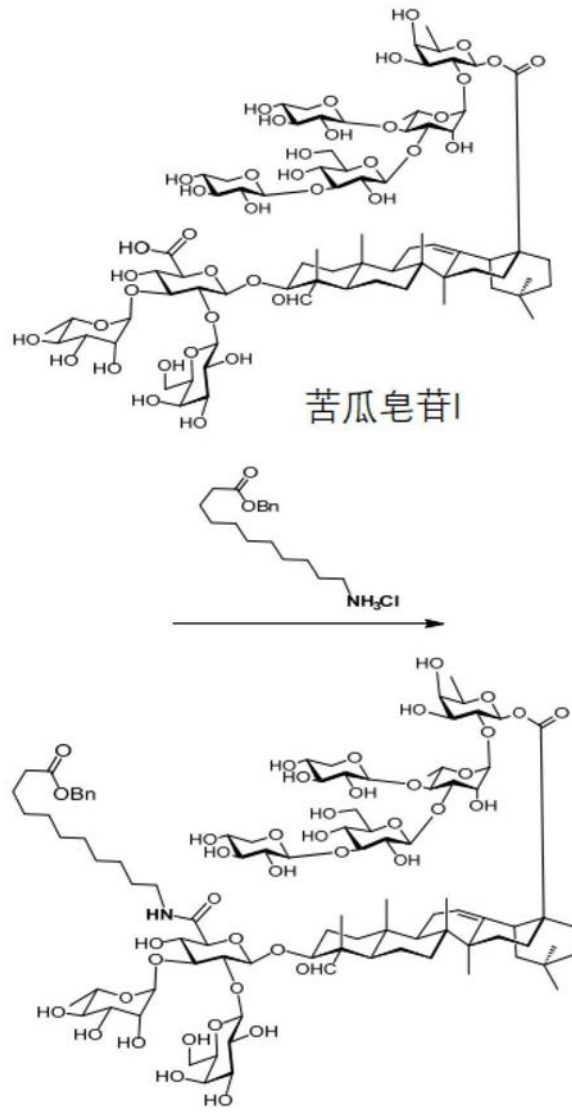


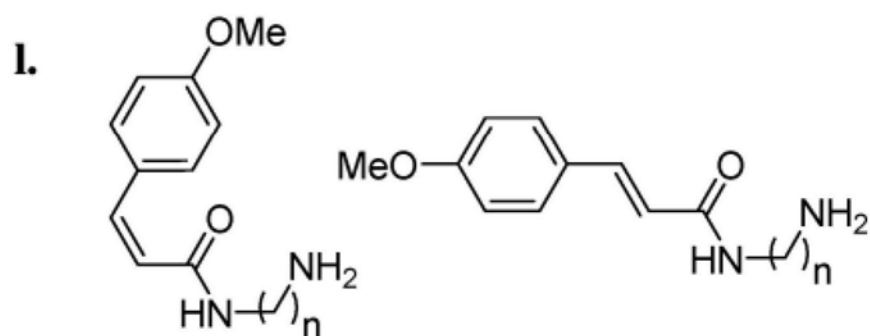
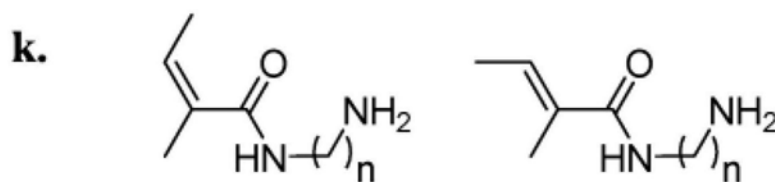
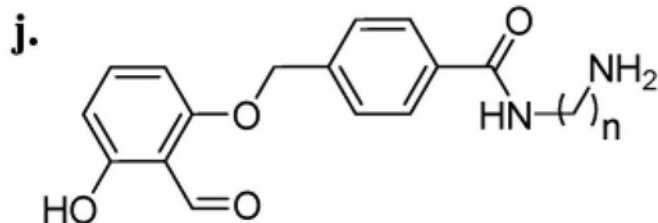
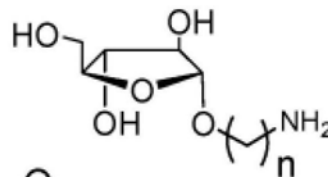
图4(续)

a-c. $\text{ROOC}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{R} = \text{H}, \text{Me}, \text{Bn}$

d-f. $\text{RCONH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{R} = \text{H}, \text{Me}, \text{Ph}$

g. $\text{OH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ **h.**

i. $\text{OHC}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$



$n = 8-12$

图5

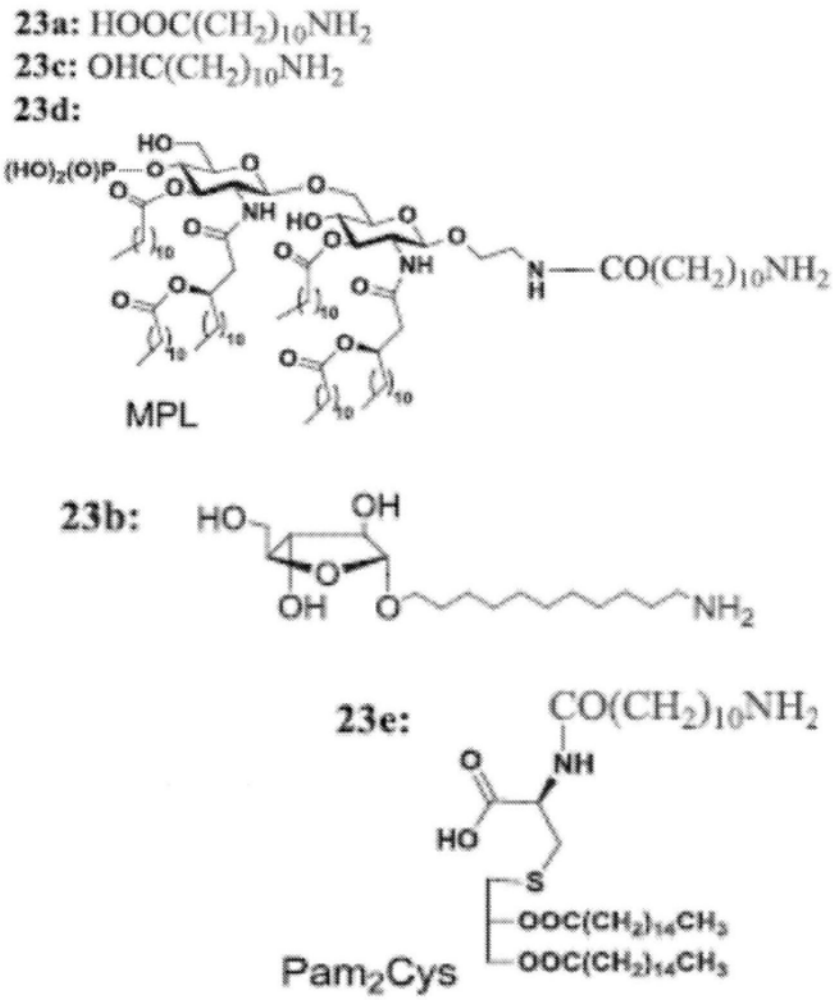


图5 (续)

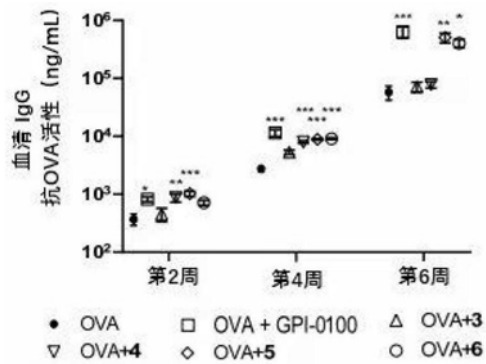
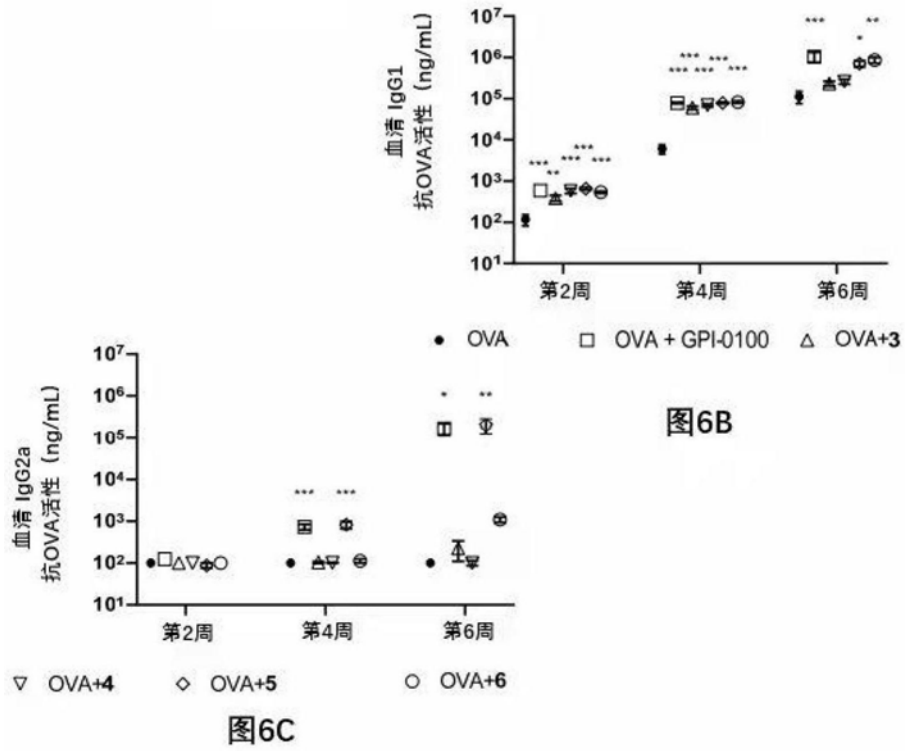


图6A



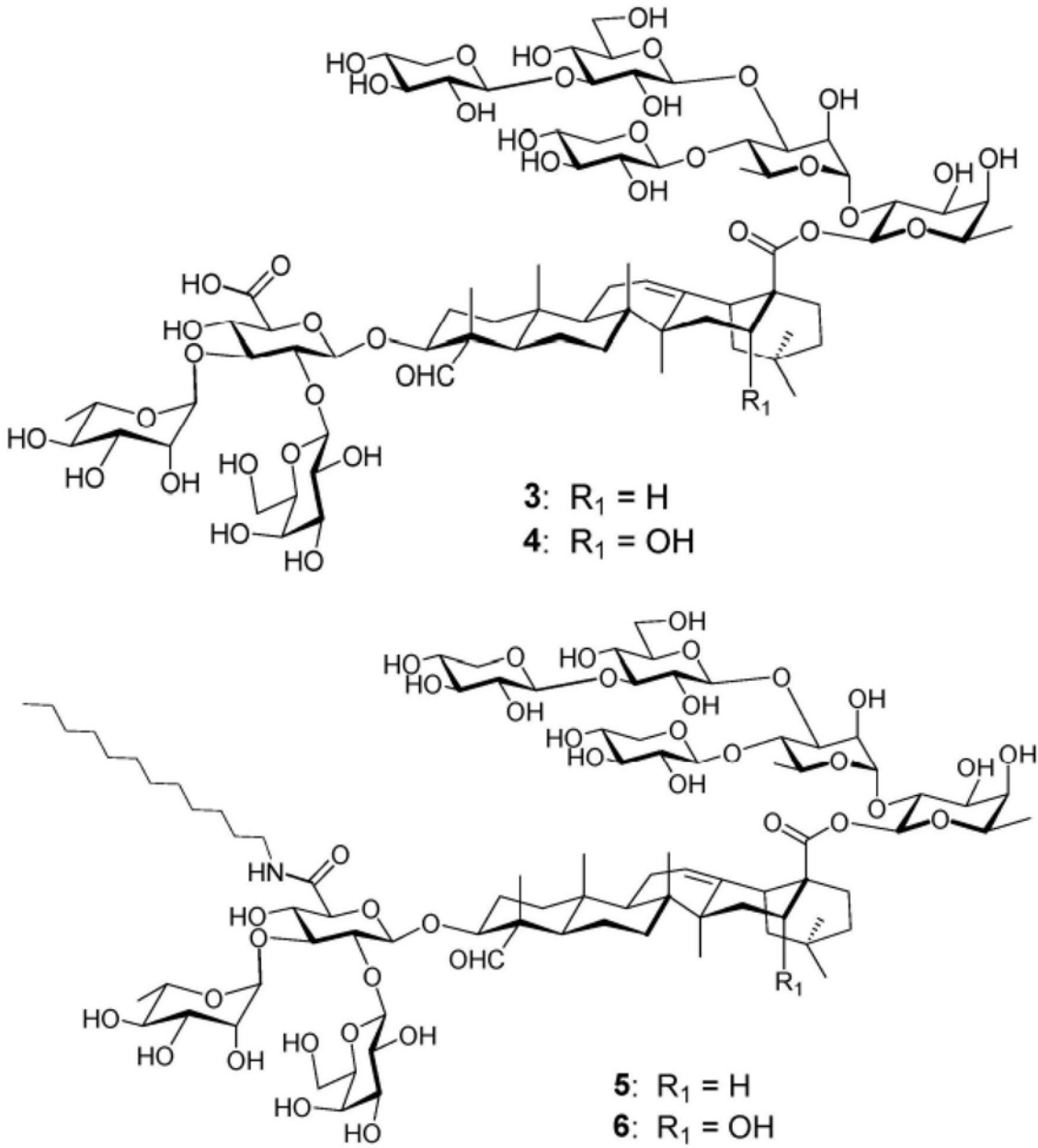


图7

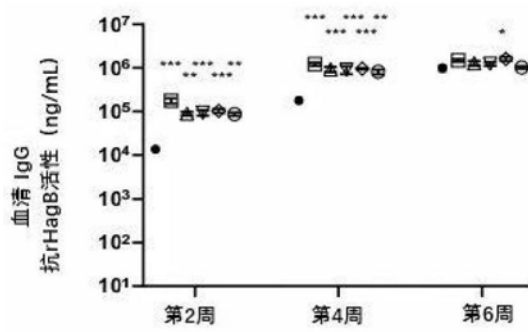


图8A

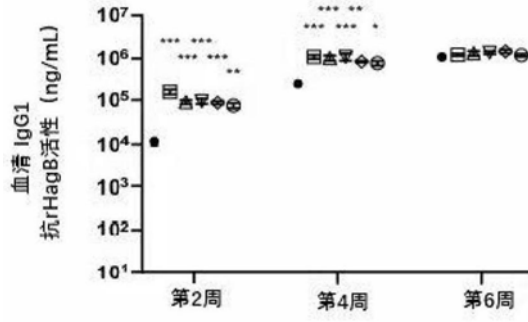


图8B

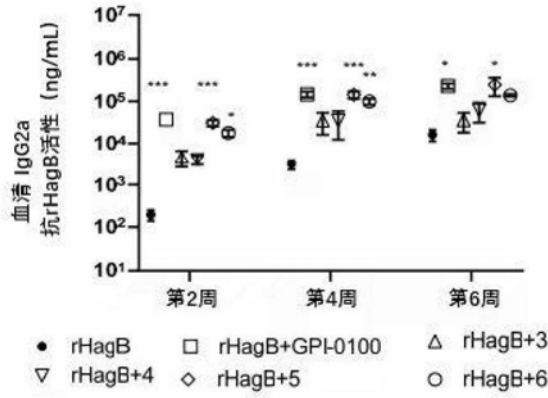


图8C

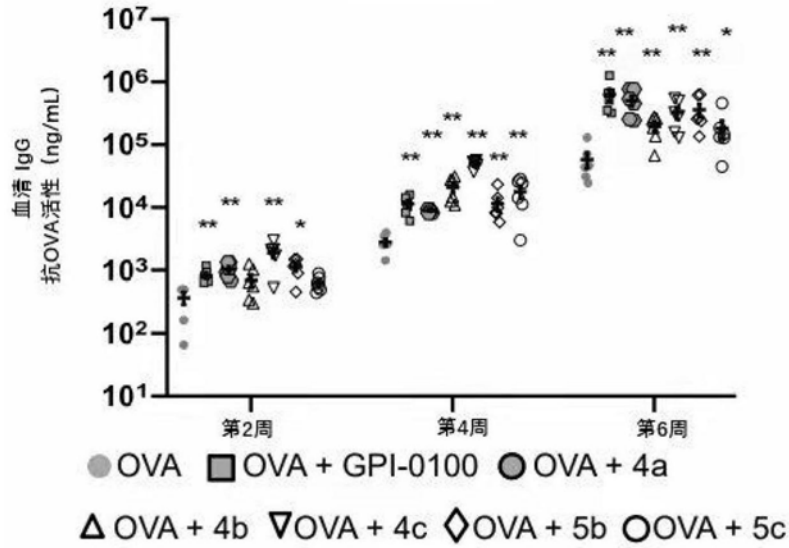


图9A

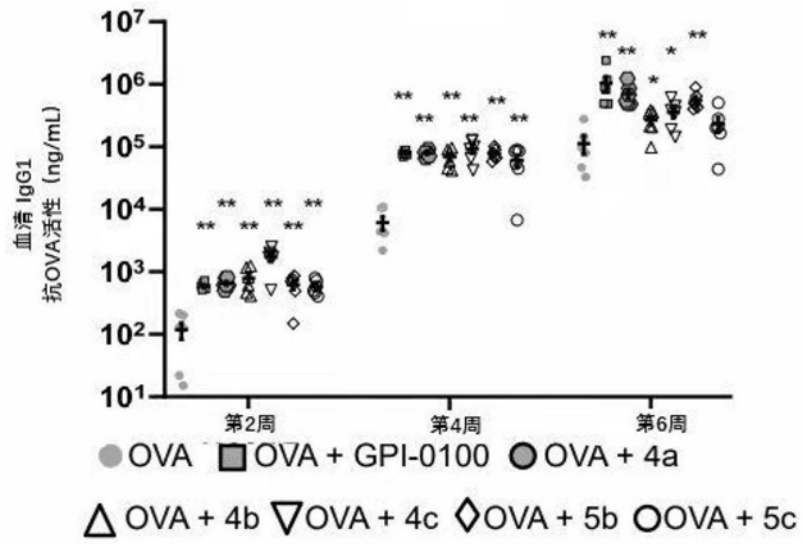


图9B

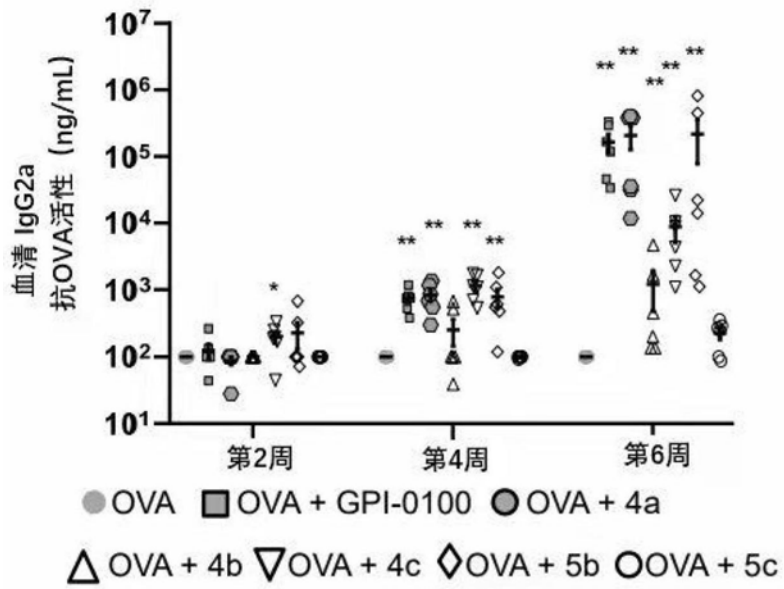


图9C

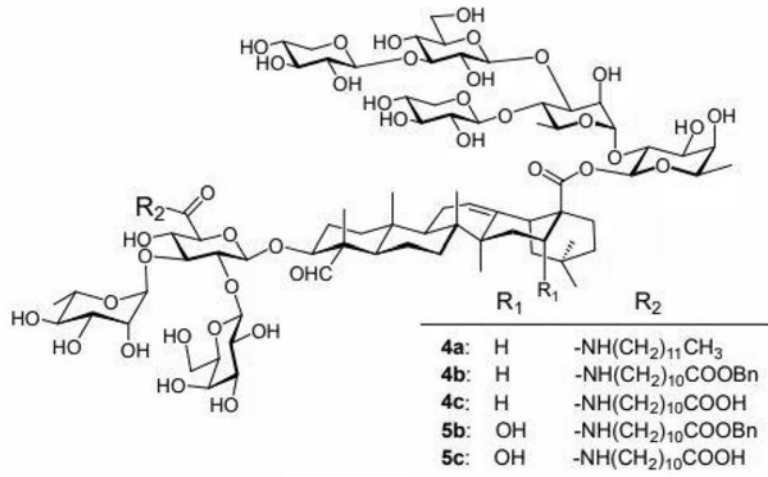


图9D

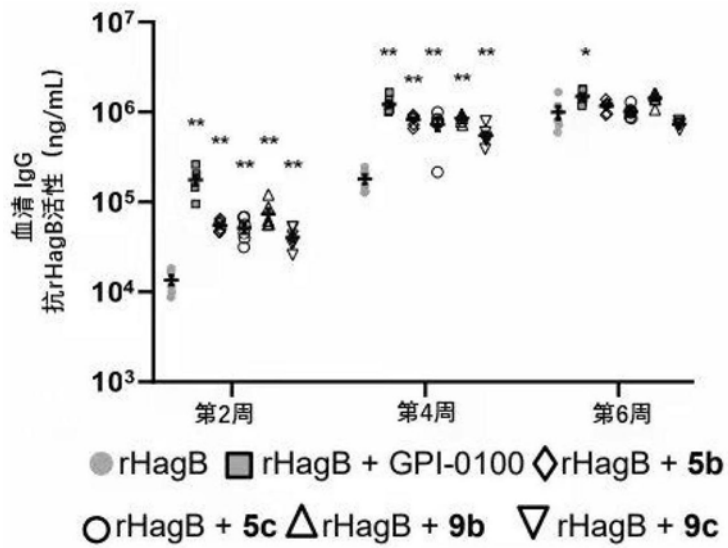


图10A

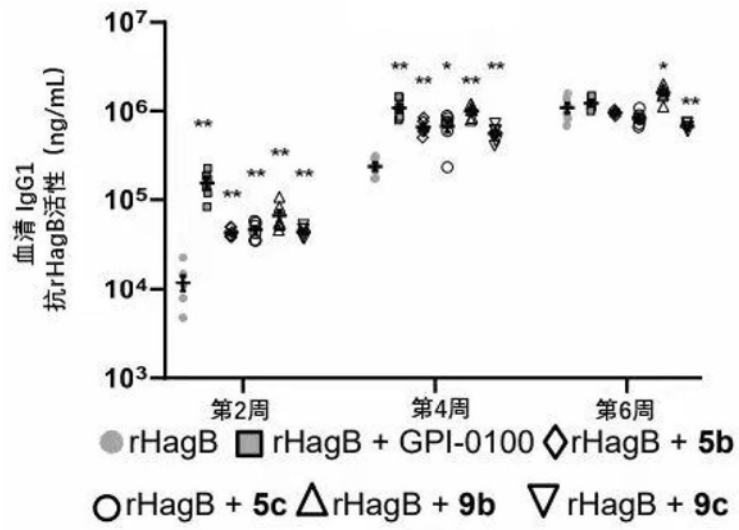


图10B

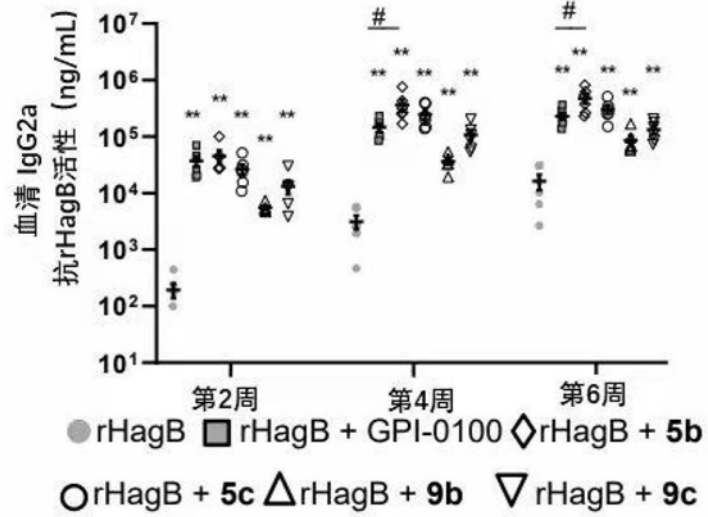


图10C

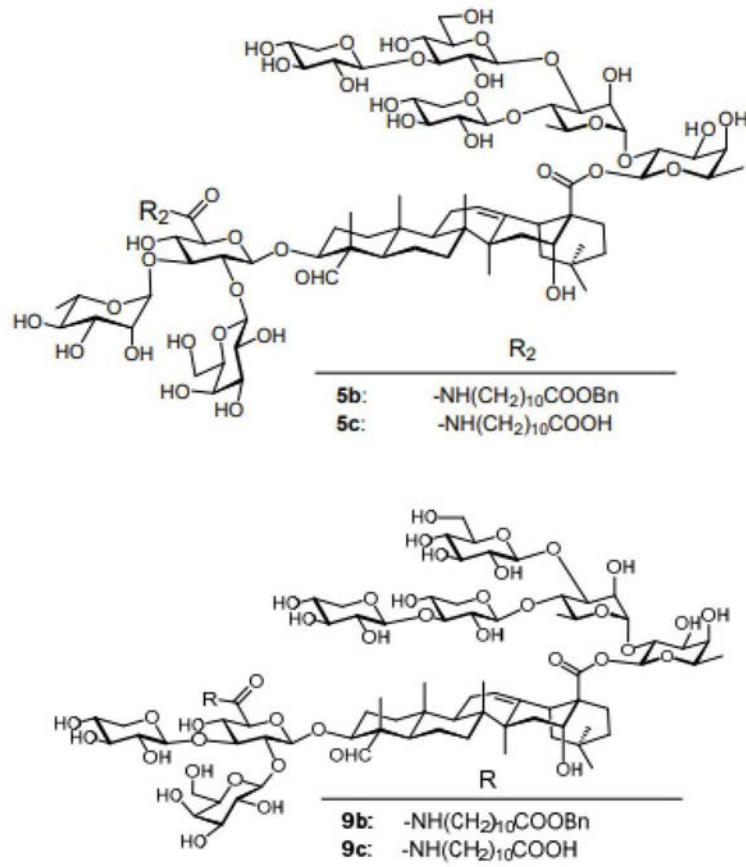


图10D

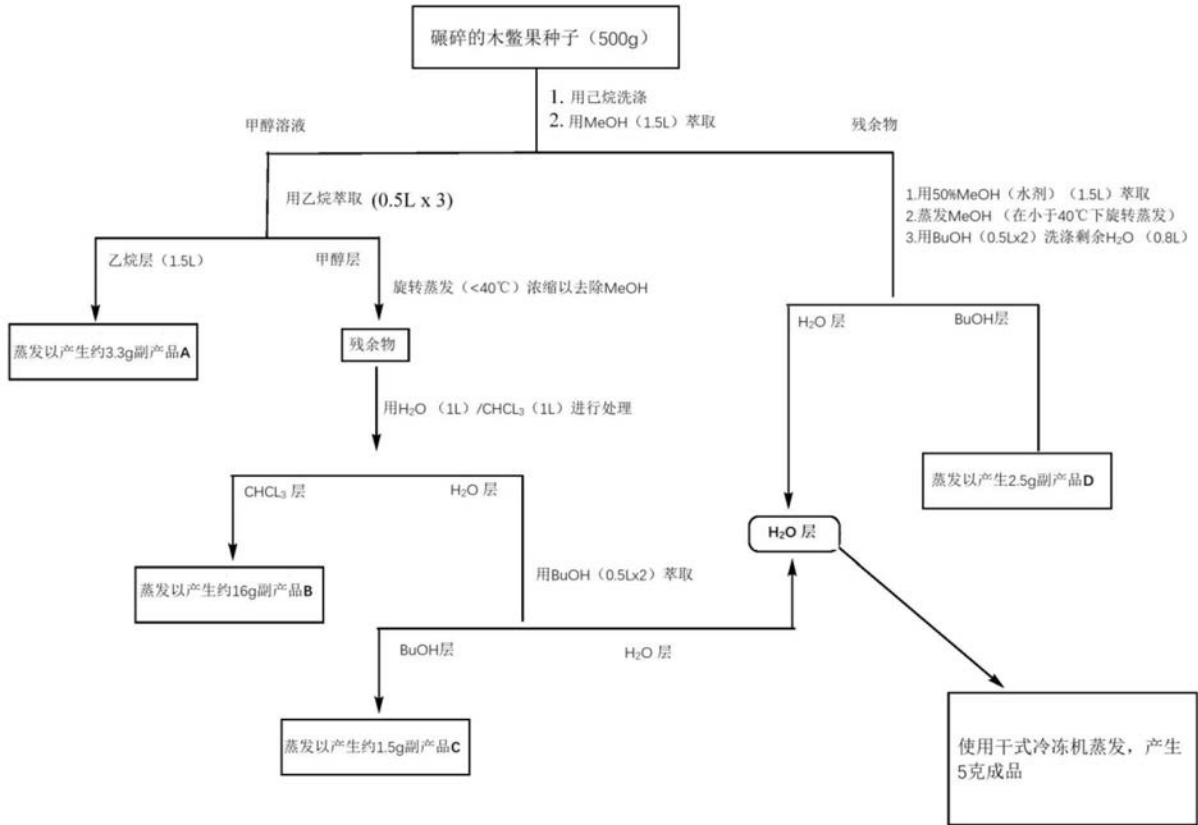


图11

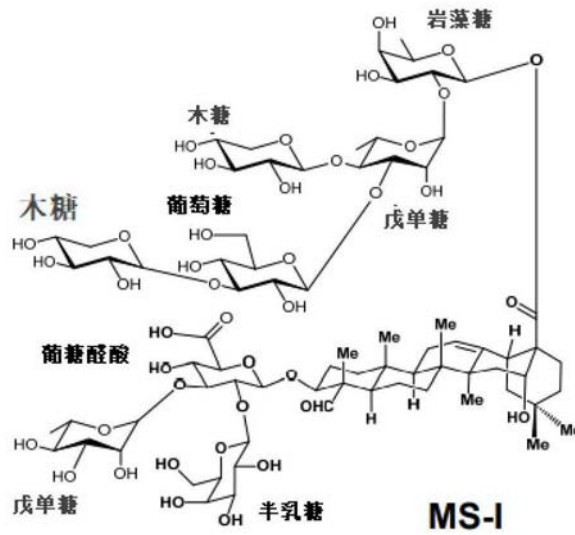


图12A

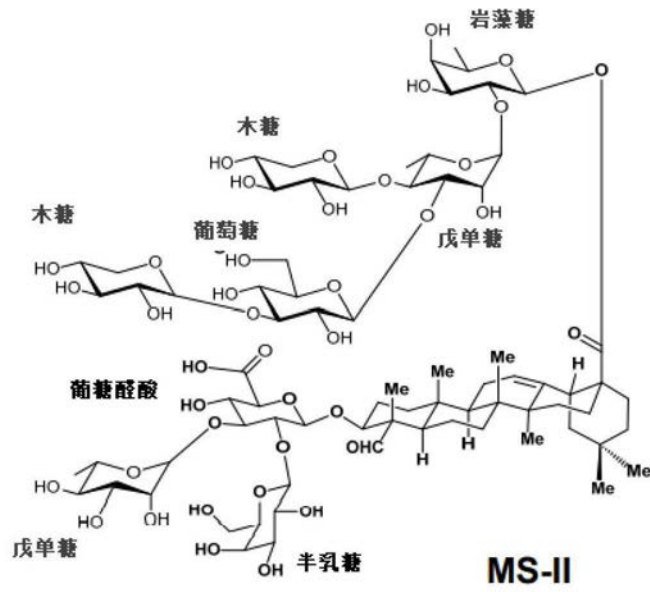


图12B

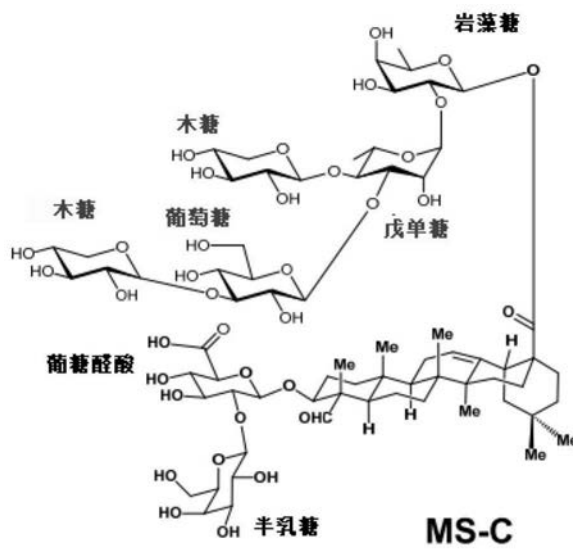


图12C

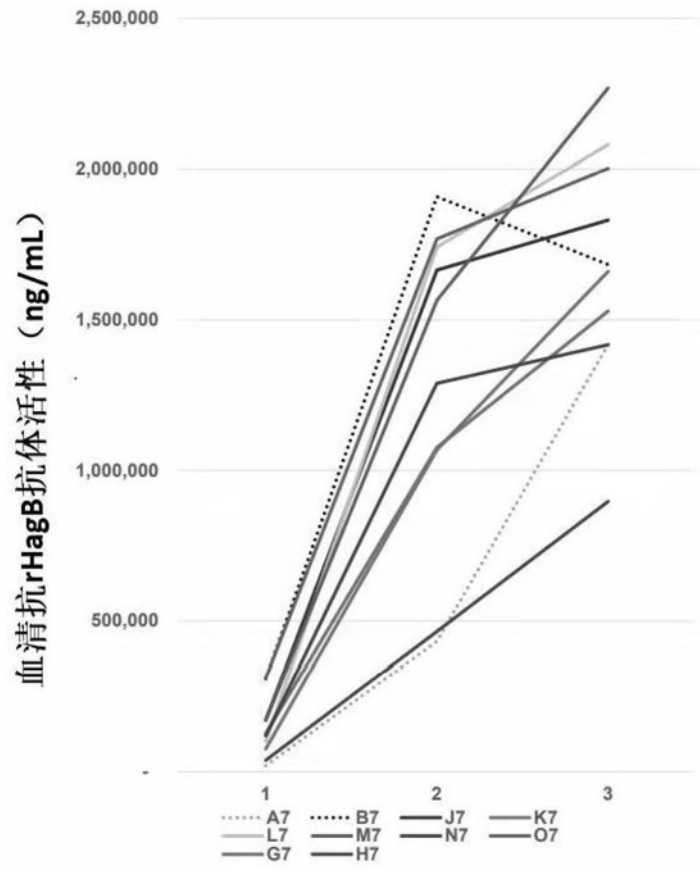


图13

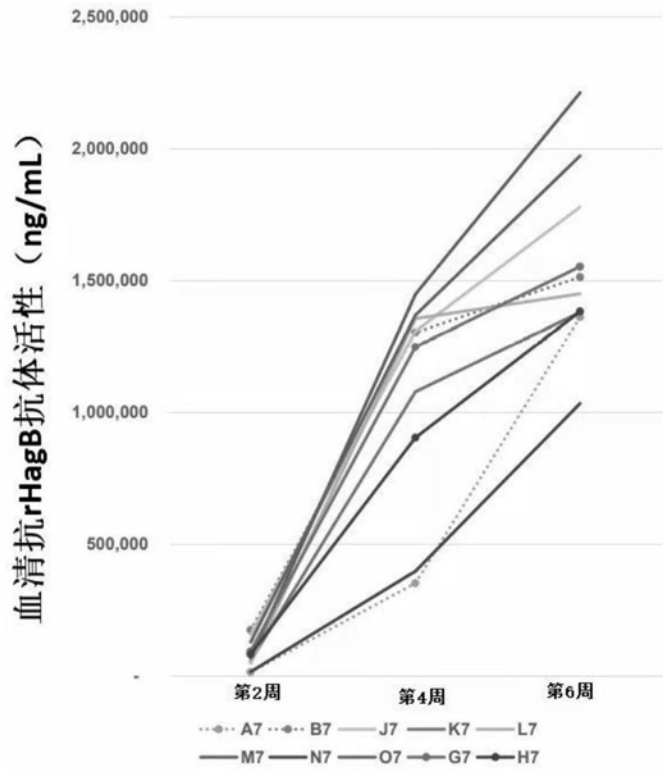


图14

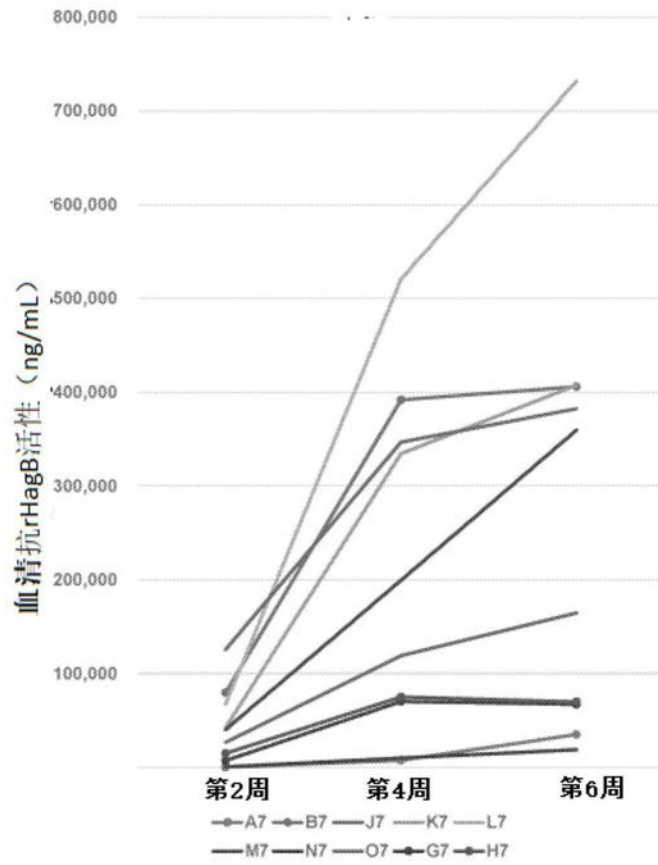
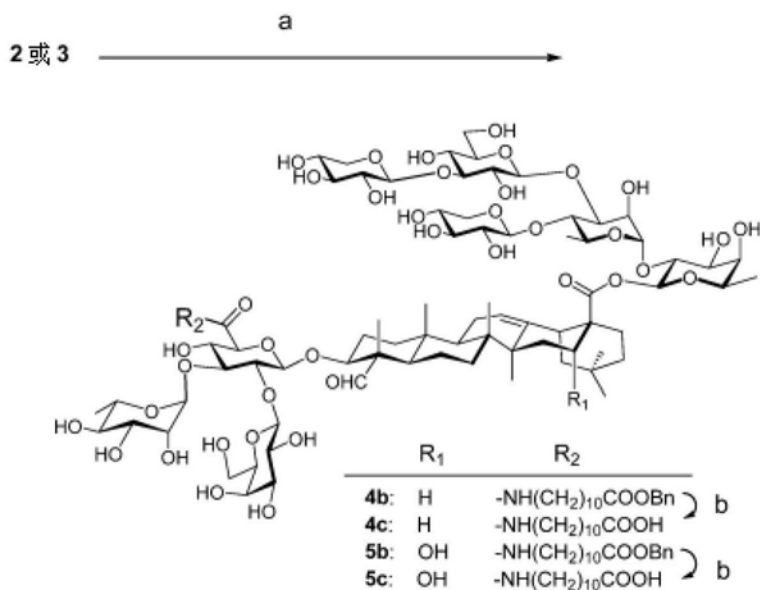
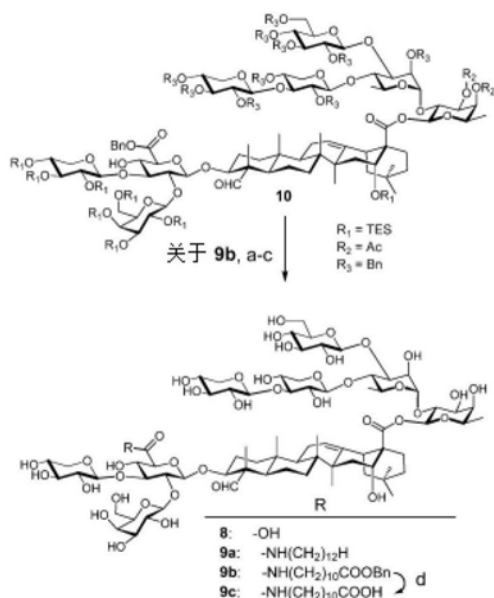


图15



^a 试剂和条件: (a) NMM, HOBT, EDC HCL, NH₂(CH₂)₁₀COOBn, H₂O/EtOH, 室温, 78% 用于 **4b** 和 72%用于 **5b**; (b) Pd/C, H₂ (55 psi), 98%用于 **4c** 和 96%用于 **5c**

图16



^a 试剂和条件: (a) Pd/C, H₂ (55 psi); (b) NMM, HOBT, EDC.HCL, NH₂(CH₂)₁₀COOBn, H₂O/EtOH, 室温, 52% 经两个步骤; (c) K₂CO₃, MeOH/H₂O, 57%; (d) Pd/C, H₂ (50 psi), 96%。

图17

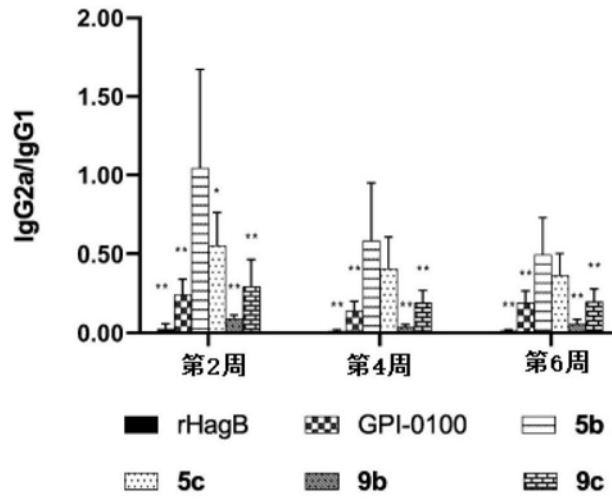


图18