



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107407673 B

(45)授权公告日 2019.07.16

(21)申请号 201580074177.9  
 (22)申请日 2015.08.21  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107407673 A  
 (43)申请公布日 2017.11.28  
 (30)优先权数据  
 62/107,378 2015.01.24 US  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2017.07.21  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2015/046420 2015.08.21  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 WO2016/118191 EN 2016.07.28  
 (73)专利权人 中央研究院  
 地址 中国台湾台北市南港区研究院路2段  
 128号  
 (72)发明人 翁启惠 吴宗益  
 (74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限  
 责任公司 11287  
 代理人 林斯凯

(51)Int.Cl.  
 G01N 33/53(2006.01)  
 (56)对比文件  
 CN 102215862 A,2011.10.12,  
 WO 2014210564 A1,2014.12.31,  
 CN 102065868 A,2011.05.18,  
 Lee,HY等.Immunogenicity Study of  
 Globo H Analogues with Modification at  
 the Reducing or Nonreducing End of the  
 Tumor Antigen.《JOURNAL OF THE AMERICAN  
 CHEMICAL SOCIETY》.2014,第136卷(第48期),第  
 16844-16853页.  
 Huang,YL等.Carbohydrate-based  
 vaccines with a glycolipid adjuvant for  
 breast cancer.《PROCEEDINGS OF THE  
 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE  
 UNITED STATES OF AMERICA》.2013,第110卷(第  
 7期),第2517-2522页.  
 审查员 刘莉丹

权利要求书10页 说明书52页 附图7页

(54)发明名称

新颖聚糖结合物及其使用方法

(57)摘要

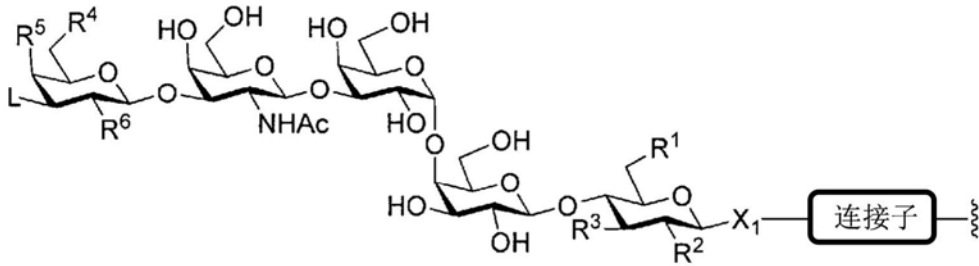
本发明涉及靶向SSEA3/SSEA4/GloboH相关抗原决定基(天然及经修饰)的疫苗、抗体及/或免疫原性结合物组合物,其诱发抗体及/或结合片段产生用于调节球系列鞘糖脂合成。本发明涉及可调节球系列鞘糖脂合成的方法及组合物。特定言之,本发明涉及可调节生物合成路径中的球系列鞘糖脂SSEA3/SSEA4/GloboH合成的糖酶抑制剂化合物及其组合物及使用方法;特定言之,糖酶抑制剂靶向球系列合成路径中的 $\alpha$ -1,4-半乳糖基转移酶; $\beta$ -1,4-N-乙酰半乳糖基转移酶-I;或 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶-V。此外,本发明亦关于使用本文所述的组合物治疗或侦测过度增

生性疾病及/或病状的方法。

1. 一种免疫原性组合物,其包含:

- (a) 包括载剂及一或多种聚糖的聚糖结合物;及视情况存在的  
(b) 佐剂;

其中所述一或多种聚糖中的每一者经由连接符与所述载剂结合,所述结合物具有式(III):



(III)

其中:

$X_1$ 为 $-OR$ 或 $-SR$ ,其中 $R$ 为氧或硫保护基、视情况经取代的 $C_{1-10}$ 烷基、视情况经取代的芳基、视情况经取代的酰基或视情况经取代的酰亚氨基;

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $L$ 的各实例独立地选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的芳基、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ;

其中:

$R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;且

$R^B$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;

$R^6$ 选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的芳基、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ;

其中:

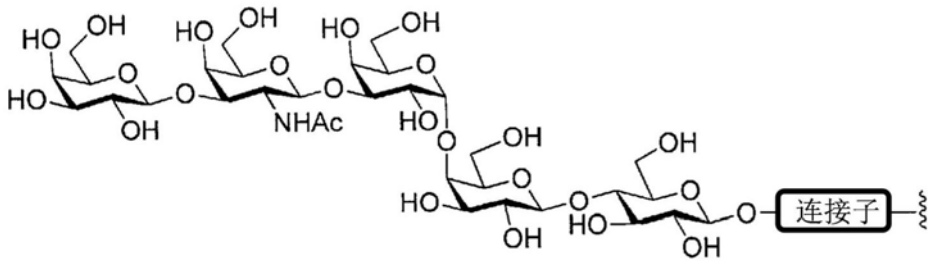
$R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;且

$R^B$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;或

$R^6$ 为 $-OR^A$ ;其中 $R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基及视情况经取代的芳基;

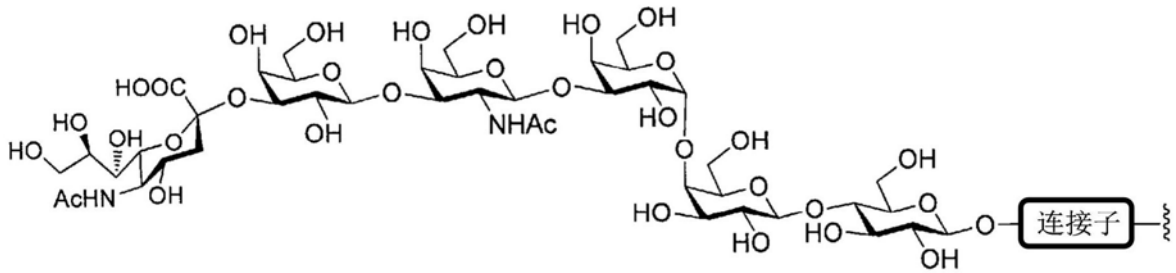
且

其限制条件为所述聚糖结合物不具有式(III-a)及(III-b):



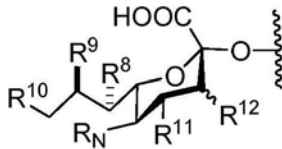
III-a

; 或



III-b。

2. 如权利要求1的免疫原性组合物,其中L为-OH。
3. 如权利要求2的免疫原性组合物,其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 的至少一个实例为 $-N_3$ 。
4. 如权利要求2的免疫原性组合物,其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及 $R^6$ 的至少一个实例为-F。
5. 如权利要求1的免疫原性组合物,其中L具有下式:



其中:

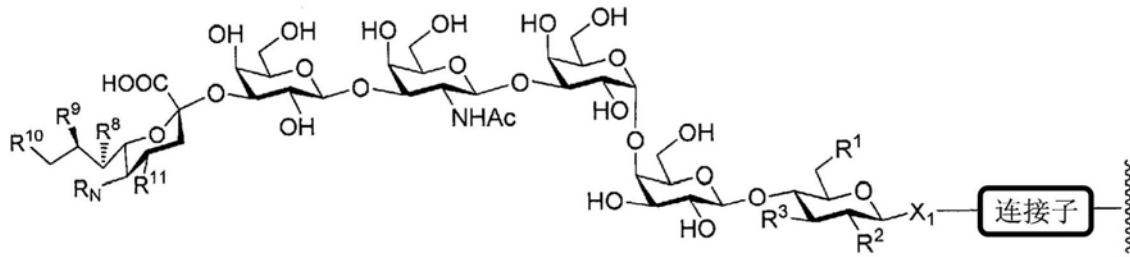
$R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 及 $R^{11}$ 的各实例独立地选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的芳基、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ;其中 $R^{12}$ 为H、OH或卤素;

$R_N$ 是选自 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ;

$R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;

$R^B$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基。

6. 如权利要求5的免疫原性组合物,其中所述聚醚结合物具有式(IV):



(IV)。

7. 如权利要求6的免疫原性组合物,其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 及 $R_N$ 的至少一个实例为 $-N_3$ 。

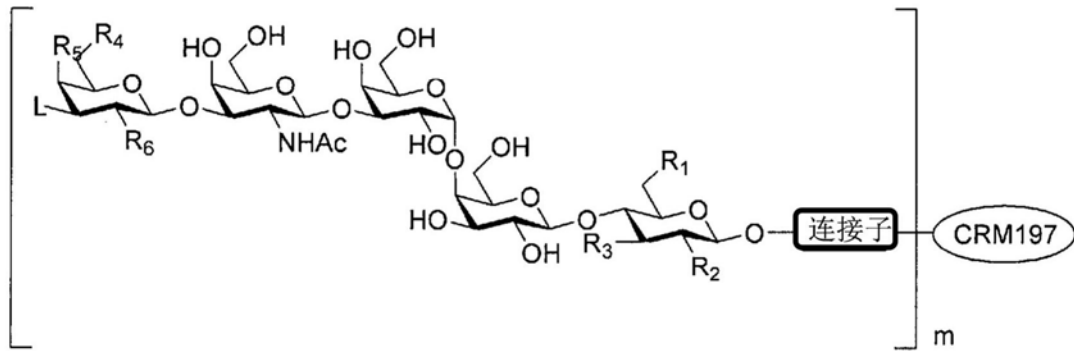
8. 如权利要求6的免疫原性组合物,其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 及 $R_N$ 的至少一个实例为 $-F$ 。

9. 如权利要求1至8中任一项的免疫原性组合物,其中所述载剂为蛋白质、脂质、脂质化蛋白质、病毒、肽或糖肽的树枝状聚合物。

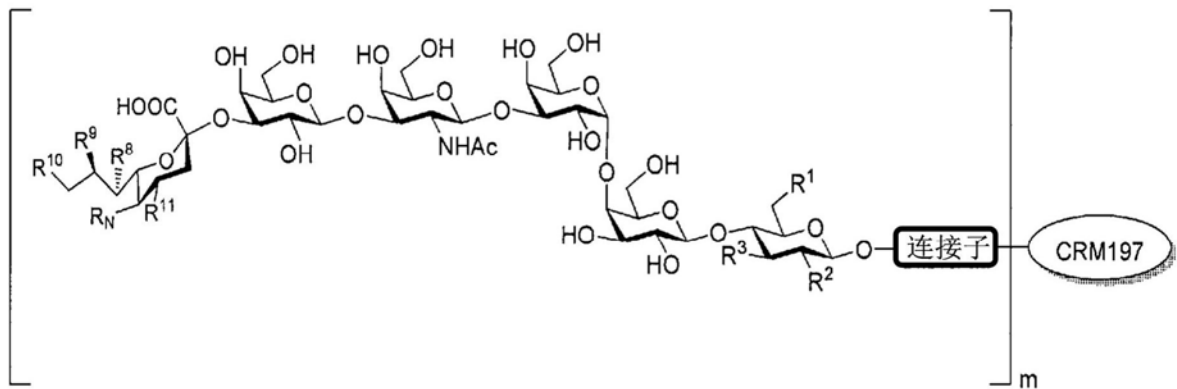
10. 如权利要求9的免疫原性组合物,其中所述载剂为选自由以下组成的群的蛋白质:破伤风类毒素、白喉类毒素、白喉毒素交叉反应物质197、TT的片段C、匙孔螺血氰蛋白、牛血清白蛋白、蛋白质D、外膜蛋白质及肺炎链球菌溶血素。

11. 如权利要求10的免疫原性组合物,其中所述载剂蛋白质选自由TT、DT及CRM197组成的群。

12. 如权利要求11的免疫原性组合物,其中所述聚糖结合物具有式(IV-a)或(IV-b):



(IV-a);



(IV-b)

其中m为整数1至40,包括端点。

13. 如权利要求1至8中任一项的免疫原性组合物,其中所述连接符为杂双官能连接符或均双官能连接符。

14. 如权利要求1至8中任一项的免疫原性组合物,其中所述佐剂为能够结合树突状细胞上的CD1d分子的酯脂。

15. 如权利要求1至8中任一项的免疫原性组合物,其中所述佐剂为C34、7DW8-5、C17、C23、G1c-C34、铝盐、角鲨烯、MF59或QS-21。

16. 如权利要求1至8中任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物能够诱发针对癌细胞的免疫反应。

17. 如权利要求16的免疫原性组合物,其中所述癌细胞选自由以下组成的群:脑癌细胞、肺癌细胞、乳癌细胞、口腔癌细胞、食道癌细胞、胃癌细胞、肝癌细胞、胆管癌细胞、胰腺癌细胞、结肠癌细胞、肾脏癌细胞、骨癌细胞、皮肤癌细胞、子宫颈癌细胞、卵巢癌细胞及前列腺癌细胞。

18. 如权利要求16的免疫原性组合物,其中所述免疫反应包括特异性结合至一或多种选自由SSEA3及SSEA4组成的群的抗原的抗体的产生。

19. 如权利要求18的免疫原性组合物,其中这些抗体中和癌细胞或癌症干细胞表面上所表达的SSEA3及SSEA4抗原中的一或多者。

20. 如权利要求18的免疫原性组合物,其中这些抗体包括IgG抗体。

21. 一种癌症疫苗,其包含治疗有效量的如权利要求1至15中任一项的免疫原性组合物

及医药学上可接受的赋形剂。

22. 如权利要求21的癌症疫苗,其中所述癌症疫苗能够诱导个体的抗癌免疫反应。

23. 一种如权利要求1至15中任一项的免疫原性组合物或如权利要求21或22的癌症疫苗的用途,其用于制备治疗有需要的个体的癌症的药剂。

24. 如权利要求23的用途,其中所述药剂与另一种治疗剂组合共投与。

25. 如权利要求23的用途,其中所述癌症选自由以下组成的群:脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、骨癌、皮肤癌、子宫颈癌、卵巢癌及前列腺癌。

26. 如权利要求25的用途,其中所述癌症的癌细胞在细胞表面上表达SSEA3及/或SSEA4抗原。

27. 如权利要求23的用途,其中所述个体为人类。

28. 如权利要求23的用途,其中所述药剂是皮下投与。

29. 一种经分离的单株抗体及/或其结合片段,其是针对如权利要求1的免疫原性组合物而产生。

30. 一种组合物,其包含有效量的如权利要求29的抗体或抗原结合片段及医药学上可接受的载剂。

31. 一种用于制备如权利要求1的免疫原性组合物的方法。

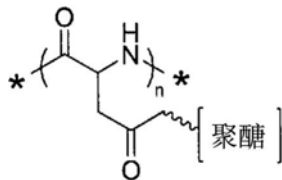
32. 如权利要求31的方法,其中所述方法包含:

提供载剂;

通过结合反应使一或多种聚醚与所述载剂结合;

其中所述一或多种聚醚中的每一者为S SEA3或SSEA4。

33. 一种免疫原性组合物,其包含靶向SSEA4及SSEA3及其类似物中的一或多者的多价构筑体,其中这些聚醚连接至模板;及载剂,



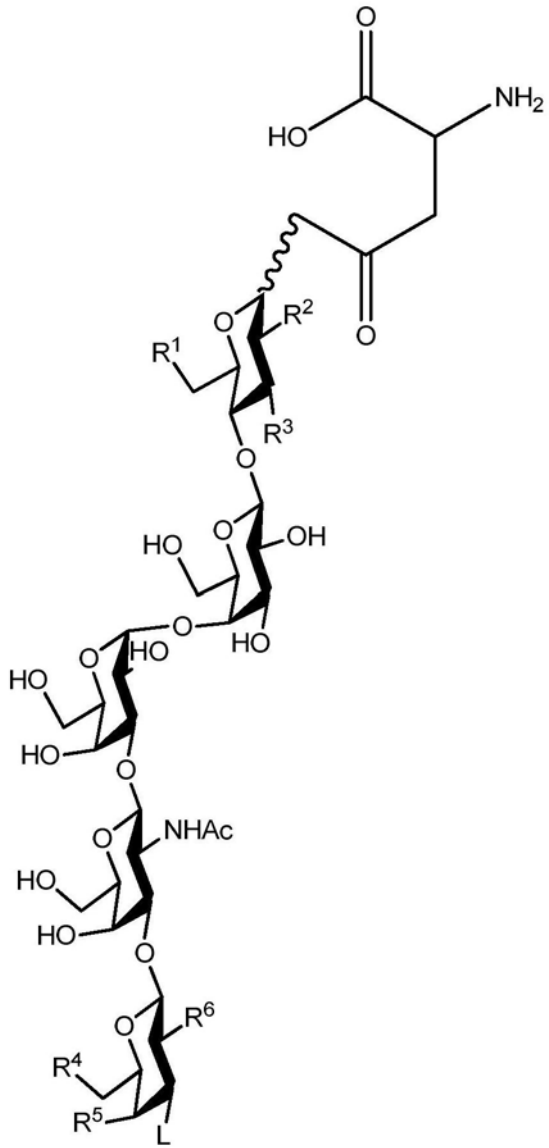
其中n可为整数1至10;

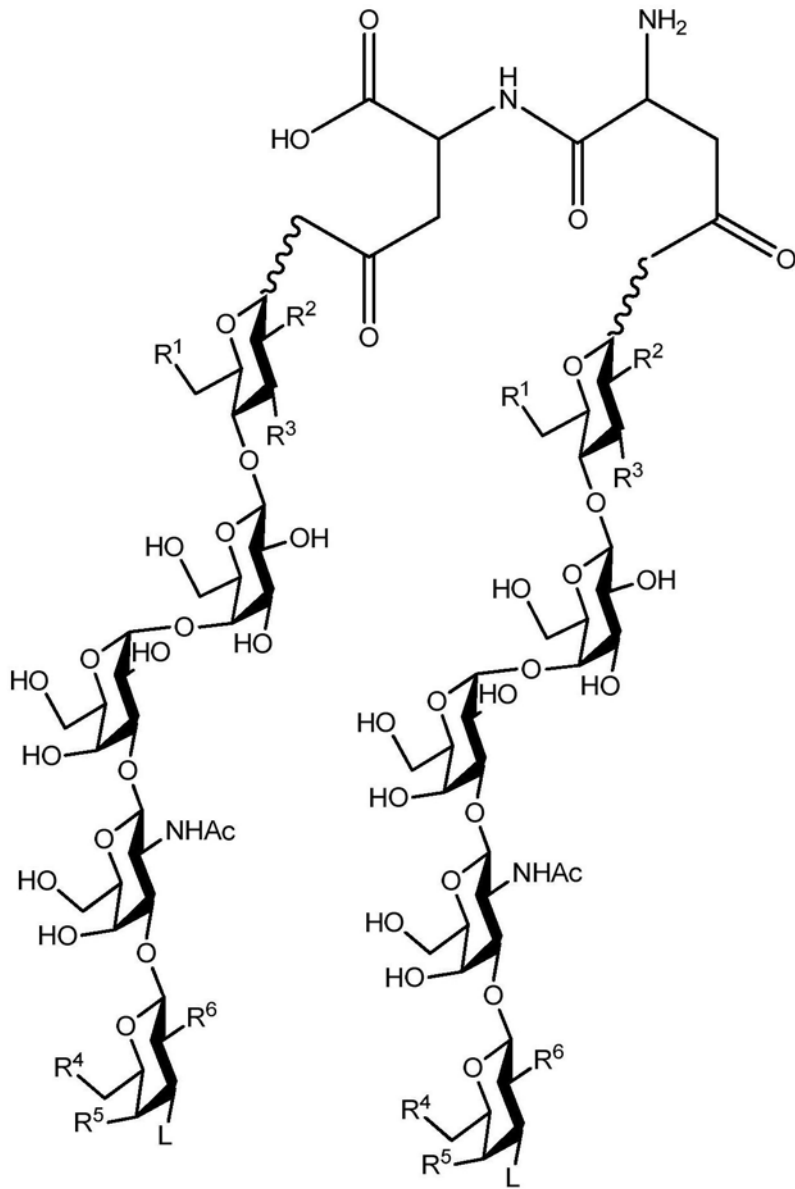
其中聚醚的结构如权利要求1中所描述的式III所示;

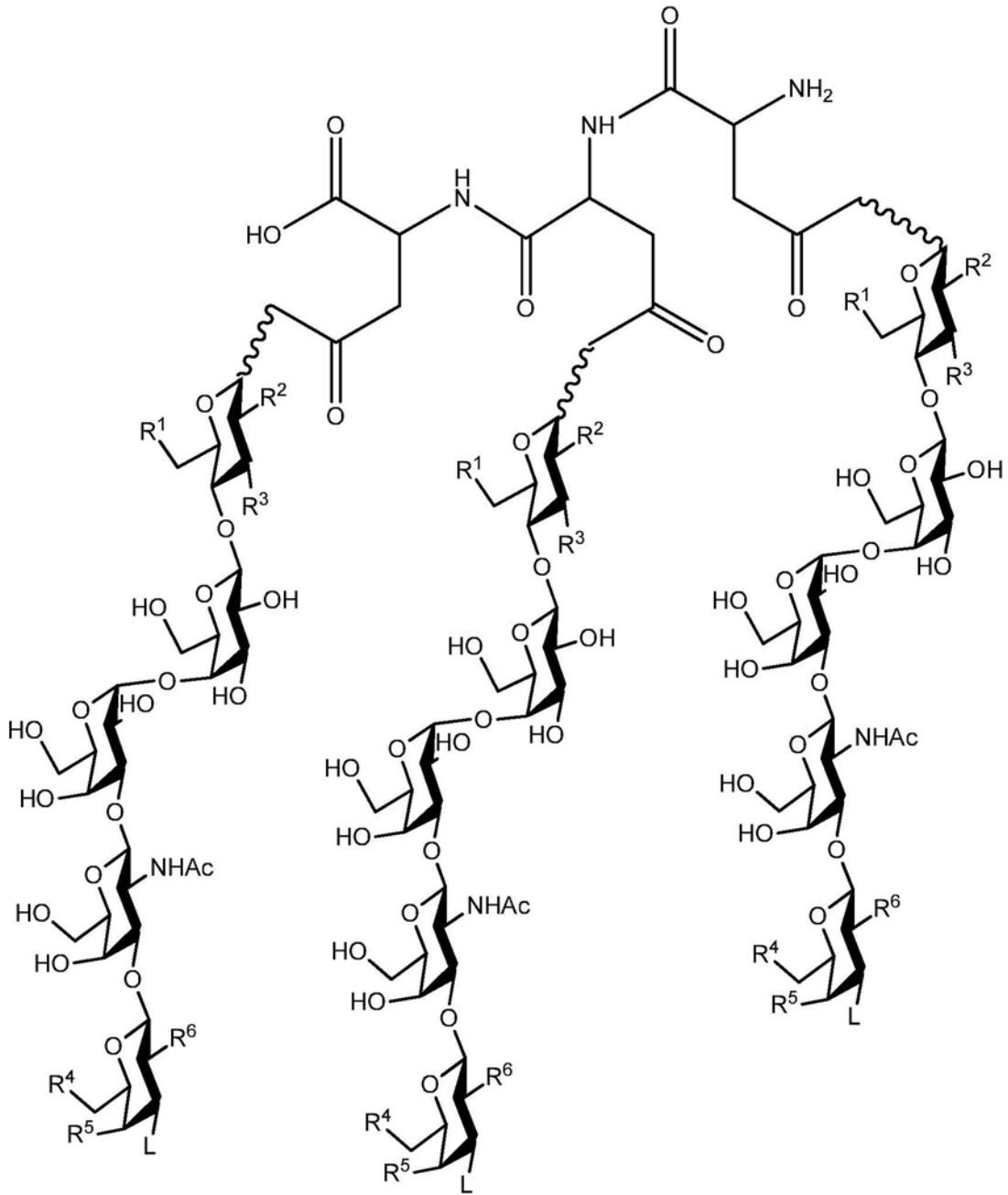
其中若n为2或大于2,则各聚醚可与天冬胺酰基肽上的另一聚醚或天冬胺酰基肽上的相异聚醚相同。

34. 如权利要求33的组合物,其中所述聚醚选自由SSEA3及SSEA4组成的群。

35. 如权利要求33的组合物,其中所述多价构筑体具有以下结构:

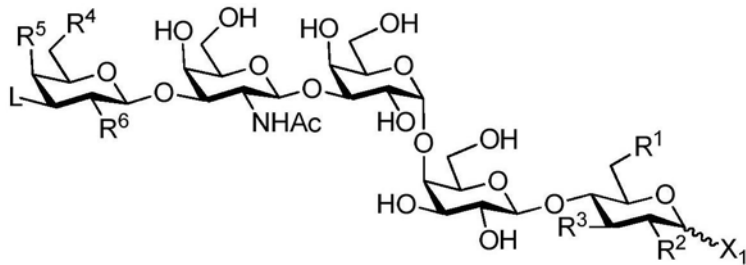






其中各聚糖部分上的R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>及L可为相同或不同的。

36. 一种化合物,其具有式(I):



(I)

或其盐,

其中:

$X_1$ 为-OR或-SR,其中R为氢、氧或硫保护基、视情况经取代的 $C_{1-10}$ 烷基、视情况经取代的芳基、视情况经取代的酰基或视情况经取代的酰亚氨基;

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 及L的各实例独立地选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的芳基、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ;

其中:

$R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;且

$R^B$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;

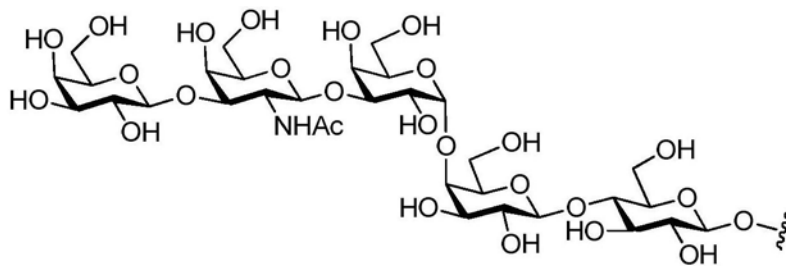
$R^6$ 选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的芳基、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ;

其中:

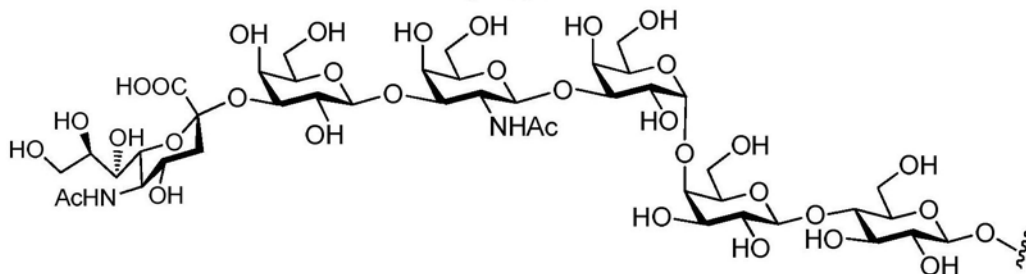
$R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;且

$R^B$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基;或 $R^6$ 为 $-OR^A$ ;其中 $R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基及视情况经取代的芳基;

且其限制条件为所述化合物不具有式(I-a)或(I-b):



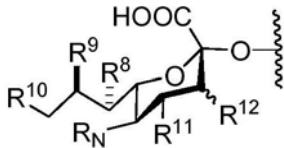
(I-a);



(I-b)。

37. 如权利要求35的化合物,其中L为-OH。

38. 如权利要求35的化合物,其中L具有下式:



其中：

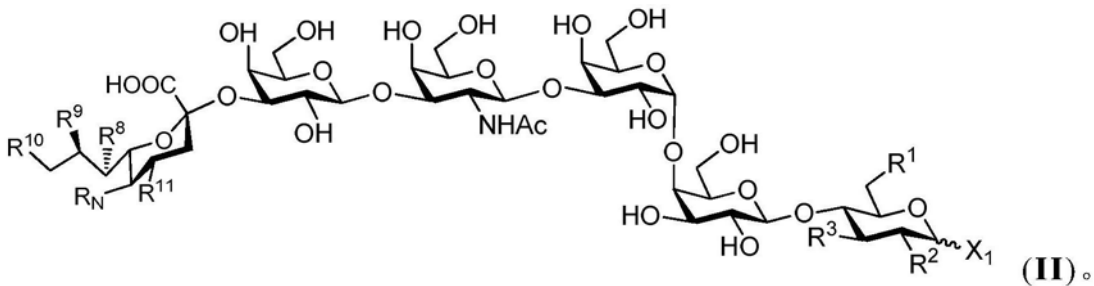
R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>及R<sup>11</sup>的各实例独立地选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的芳基、-N<sub>3</sub>、-NO<sub>2</sub>、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-N(R<sup>A</sup>)C(O)R<sup>A</sup>、-OR<sup>A</sup>、-OC(O)R<sup>A</sup>、-SR<sup>A</sup>、-C(O)N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-CN、-C(O)R<sup>A</sup>、-C(O)OR<sup>A</sup>、-S(O)R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>及-NHSO<sub>2</sub>R<sup>B</sup>；其中R<sup>12</sup>为H、OH或卤素；

R<sup>N</sup>是选自-N<sub>3</sub>、-NO<sub>2</sub>、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-N(R<sup>A</sup>)C(O)R<sup>A</sup>、-OR<sup>A</sup>、-OC(O)R<sup>A</sup>、-SR<sup>A</sup>、-C(O)N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-CN、-C(O)R<sup>A</sup>、-C(O)OR<sup>A</sup>、-S(O)R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>及-NHSO<sub>2</sub>R<sup>B</sup>；

R<sup>A</sup>的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基；及

R<sup>B</sup>的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基。

39. 如权利要求35的化合物，其中所述化合物具有式(II)：



40. 如权利要求39的化合物，其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>及R<sup>11</sup>的至少一个实例为-F。

41. 如权利要求39的化合物，其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>及R<sup>11</sup>的至少一个实例为-N<sub>3</sub>。

42. 一种如权利要求36或39的化合物的用途，其用于制备治疗过度增生性疾病或病状的药剂。

## 新颖聚糖结合物及其使用方法

### [0001] 相关申请案

[0002] 本发明依据35 U.S.C.119(e)主张美国临时申请案序号62/107,378的优先权,其申请于2015年1月24日,其发明名称为新颖聚糖结合物及其使用方法。其内容以全文引用方式并入本文中。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及可调节球系列鞘糖脂合成的方法及组合物。特定言之,本发明涉及可调节生物合成路径中的球系列鞘糖脂合成的糖酶抑制剂化合物及其组合物及使用方法;特定言之,糖酶抑制剂靶向球系列合成路径中的 $\alpha$ -1,4-半乳糖基转移酶; $\beta$ -1,4-N-乙酰半乳糖基转移酶-I;或 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶-V。另外,本发明亦关于靶向SSEA3/SSEA4/GloboH相关抗原决定基(天然及经修饰)的疫苗、抗体及/或免疫原性结合物组合物,其诱发抗体及/或结合片段产生用于调节球系列鞘糖脂合成。此外,本发明亦关于使用本文所述的组合物治疗或侦测过度增生性疾病及/或病状的方法。

### 背景技术

[0004] 碳水化合物抗原GloboH、阶段特异性胚抗原-3(SSEA3)及阶段特异性胚抗原-4(SSEA4)在结构或功能上彼此密切相关。GloboH、SSEA3及SSEA4为球系列鞘糖脂,其中SSEA3为GloboH的非海藻糖基化五糖前驱物结构,SSEA4为唾液酸 $\alpha$ 2-3连接至SSEA3半乳糖的非还原端的唾液酸化SSEA3。

[0005] 首先鉴别阶段特异性胚抗原-3(SSEA3)且根据经4至8个细胞期小鼠胚免疫的大鼠中所产生的IgM单株抗体的反应性来定义。此单株抗体与所有小鼠的植入前胚(自卵母细胞直至早期囊胚期)均反应,其中其在植入之后的原始内胚层中的表达受到更多限制。SSEA3抗原性决定子经测定为存在于糖脂及糖蛋白上的碳水化合物;在人类畸胎癌细胞及人类红血球上亦发现SSEA3抗原性决定子。在一组自2102Ep人类畸胎癌细胞株中分离的结构中,SSEA3抗体对于Gal $\beta$ (1-3)GalNAc $\beta$ (1-3)Gal $\alpha$ (1-4)Gal $\beta$ (1-4)Glc $\beta$ (1)Cer具有最高亲和力。此结构亦称为Gb5(半乳糖基-红血球糖苷脂或球状细胞五糖神经酰胺)。

[0006] 当 $\beta$ -1,3-半乳糖苷基转移酶V( $\beta$ 3-GalT-V)使半乳糖转移至红血球糖苷脂的N-乙酰半乳糖胺上而形成Gb5或半乳糖基-红血球糖苷脂时,SSEA3的合成发生。已确定造血干细胞或间质干细胞不表达SSEA3。基于原发性肺癌患者的不朽化淋巴结淋巴细胞,产生融合瘤且选择抗体分泌纯系;接着由此等纯系中的两者(J309及D579)产生识别SSEA3抗原性决定子的单株抗体。抗体识别若干肿瘤细胞株(包括肺癌及乳癌细胞株,以及畸胎癌细胞株)上的SSEA3;在免疫黏附性分析中,与J309及D579抗体相同,啮齿动物单株SSEA3抗体(亦称为MC631)针对这些细胞株发生反应。亦已在睾丸生殖细胞肿瘤以及乳癌及BCSC(乳癌干细胞)上发现SSEA3。

[0007] Chang等人使用组织微数组来检视SSEA3在正常组织上的表达,原因在于其在癌症外的位置及发展基本上未知(Proc Natl Acad Sci U S A.2008 Aug 19;105(33):11667-

72, Expression of GloboH and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in GloboH synthesis)。所述研究组发现SSEA3表达于结肠、食道、小肠、肾脏、前列腺、直肠、皮肤、睪丸、胸腺及子宫颈的正常上皮。表达仅位于上皮细胞的顶表面上或位于细胞质中,此等位置被认为是免疫系统受限制或不可接近的位点。在对小鼠使用KLH与GloboH结合的单价疫苗的实验中,仅针对GloboH抗原发生抗体反应。当 $\alpha$ -GalCer作为佐剂添加时,总体抗体产生量增加且小鼠产生针对GloboH、SSEA3与SSEA4抗原结构的多株抗体,在缺乏佐剂的情况下不能产生接种疫苗。此结果显示,SSEA3、GloboH及SSEA4可有望成为癌症疫苗的标靶且可同时成为标靶。

[0008] 然而,大部分的肿瘤相关碳水化合物抗原具有不良的免疫原性且已经开发出多种方法来增强基于碳水化合物的疫苗的免疫反应,包括与载剂蛋白质结合、联合利用非天然糖苷键联的免疫佐剂投与、丛集抗原、单分子多价疫苗或杂聚糖多价疫苗。使用此等策略,设计出可诱发针对标靶聚糖结构的显着免疫反应的几种基于碳水化合物的疫苗用于癌症疗法且进入临床试验。其中,在患病时间之间及总体存活率之间,Theratope及GMK联合佐剂QS-21的临床试验未能产生统计显着性差异。这两种疫苗很可能不会在患者中诱发稳定的T细胞依赖性免疫反应。具体而言,Theratope及GMK在患者中诱导高含量的IgM,但不会诱导较强的IgG免疫反应,此为基于碳水化合物的疫苗开发中的主要问题。

[0009] 先前研究显示,对碳水化合物抗原结构(MCAS)的修饰可有效地诱发高水平的免疫反应。举例而言,在B群脑膜炎球菌的荚膜多糖的修饰研究中, $\alpha$ -(2,8)连接型聚唾液酸(PSA)的N-乙酰基经N-丙酰基置换且此修饰诱发的高抗体反应不仅识别N-丙酰基聚唾液酸,而且识别天然N-乙酰基聚唾液酸。为了产生针对修饰形式及天然形式的高抗体效价,对STn及GM3抗原应用类似方法。结果表明,聚糖抗原上的N-苄乙基、N-氟乙酰基或N-二氟乙酰基修饰可改良免疫原性。此外,舒尔茨(Schultz)研究组报导,将p-硝基苯丙胺酸并入肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )中会破坏免疫耐受性且针对TNF- $\alpha$ 诱导更多的抗体反应。使用聚糖作为抗原虽然已达成一些进展,但大部分情况为二糖(STn)、三糖(GM3)及聚唾液酸(PSA)的氨基修饰;而一些情况是基于氟化MUC1糖肽抗原。

## 发明内容

[0010] 本发明是基于以下发现:具有本文所揭示的某些基团的阶段特异性胚抗原(SSEA3及SSEA4)的修饰诱发可分别特异性地识别SSEA3及SSEA4的稳定IgG抗体反应。包含此类非天然聚糖部分的免疫原性组合物所诱导的抗体能够介导针对肿瘤细胞的补体依赖性细胞的细胞毒性。

[0011] 因此,本发明展示用于治疗癌症的针对SSEA3及/或SSEA4的抗体的设计。本发明亦展示由经修饰的碳水化合物抗原(SSEA3及SSEA4)组成的新颖化合物、包含此类化合物的聚糖结合物,及其免疫原性组合物及疫苗。

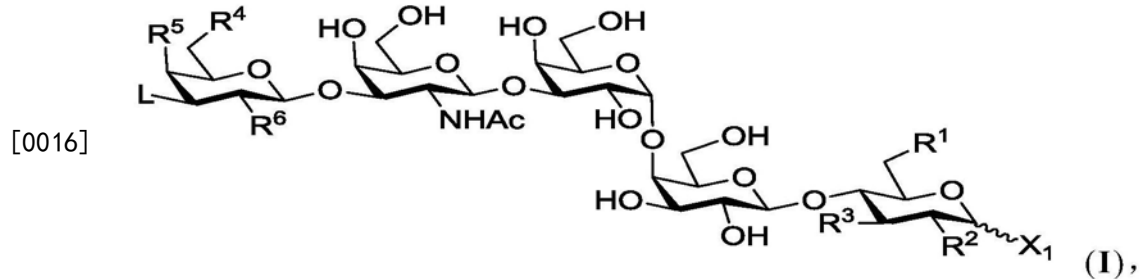
[0012] 本发明亦提供使用本文所述的合成聚糖结合物治疗或减轻过度增生性疾病(诸如癌症)的方法。

[0013] 另外,本发明亦关于靶向SSEA3/SSEA4/GloboH相关抗原决定基(天然及经修饰)的疫苗及/或免疫原性结合物组合物,其可诱发抗体及/或结合片段产生用于调节球系列鞘脂合成。此外,本发明亦关于使用本文所述的组合物治疗或侦测过度增生性疾病及/或病状

的方法。

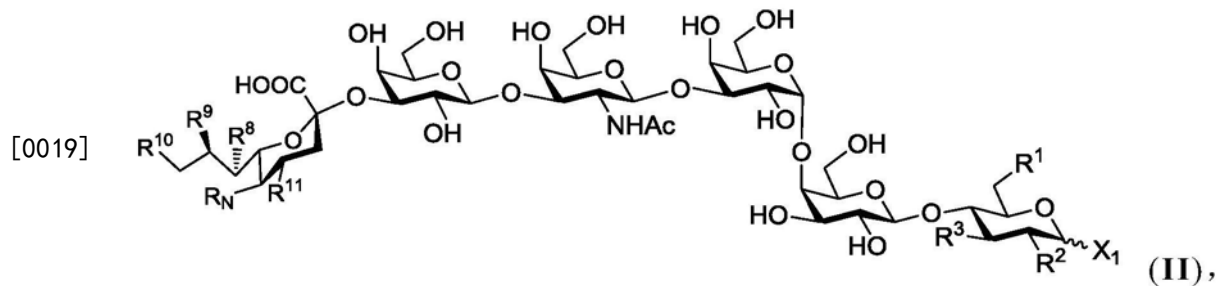
[0014] 因此,本发明展示用于治疗癌症的针对SSEA3的抗体的设计。本发明亦展示由经修饰的碳水化合物抗原 (SSEA3、SSEA4) 组成的新颖化合物、包含此类化合物的聚醚结合物,及其免疫原性组合物及疫苗。

[0015] 在一个态样中,本发明提供式 (I) 化合物:



[0017] 或其盐,其中 $X_1$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 及L如本文所述。在某些实施例中,式 (I) 化合物适用于制备供治疗癌症用的免疫原性组合物。

[0018] 在另一态样中,本发明提供式 (II) 化合物:

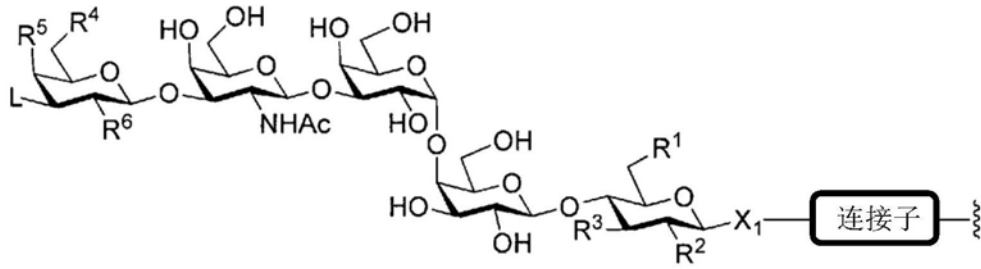


[0020] 或其盐,其中 $X_1$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 及 $R_N$ 如本文所述。在某些实施例中,式 (II) 化合物适用于制备供治疗癌症用的免疫原性组合物。

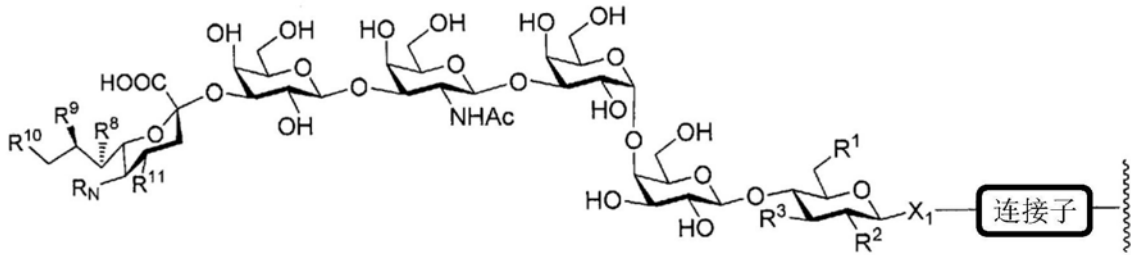
[0021] 在另一态样中,本发明提供一种免疫原性组合物,包含 (a) 包括载剂及一或多种聚醚的聚醚结合物,及视情况存在的 (b) 佐剂,

[0022] 其中:一或多种聚醚中的每一者经由连接符与载剂结合,其具有式 (III) 或 (IV):

[0023]



(III):

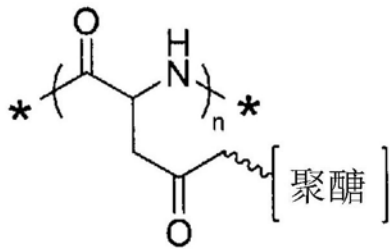


(IV)

[0024] 其中 $X_1$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $L$ 及 $R_N$ 如本文所述。

[0025] 在某些态样中,预期含有三种聚糖(SSEA3、SSEA4及GloboH)及其类似物的任一者或多者的任何比率的组合的任何疫苗构筑体可连接至载剂。

[0026]



[0027] 其中 $n$ 可为整数1至10;

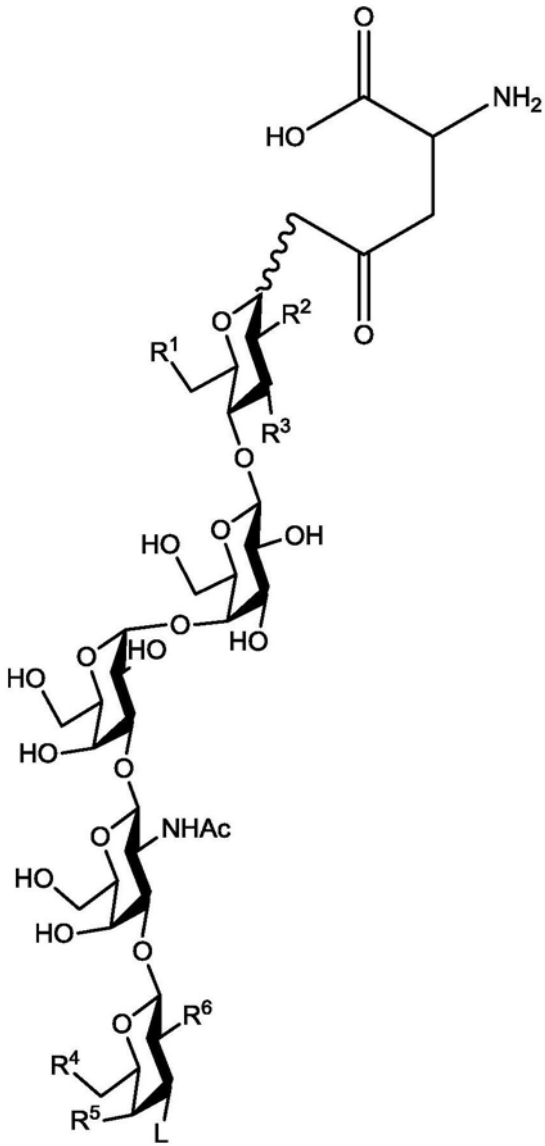
[0028] 其中聚糖可选自自由式I、II、III及IV组成的群;

[0029] 其中若 $n$ 为2或大于2,则各聚糖可与天冬胺酰基肽上的另一聚糖或天冬胺酰基肽上的相异聚糖相同。

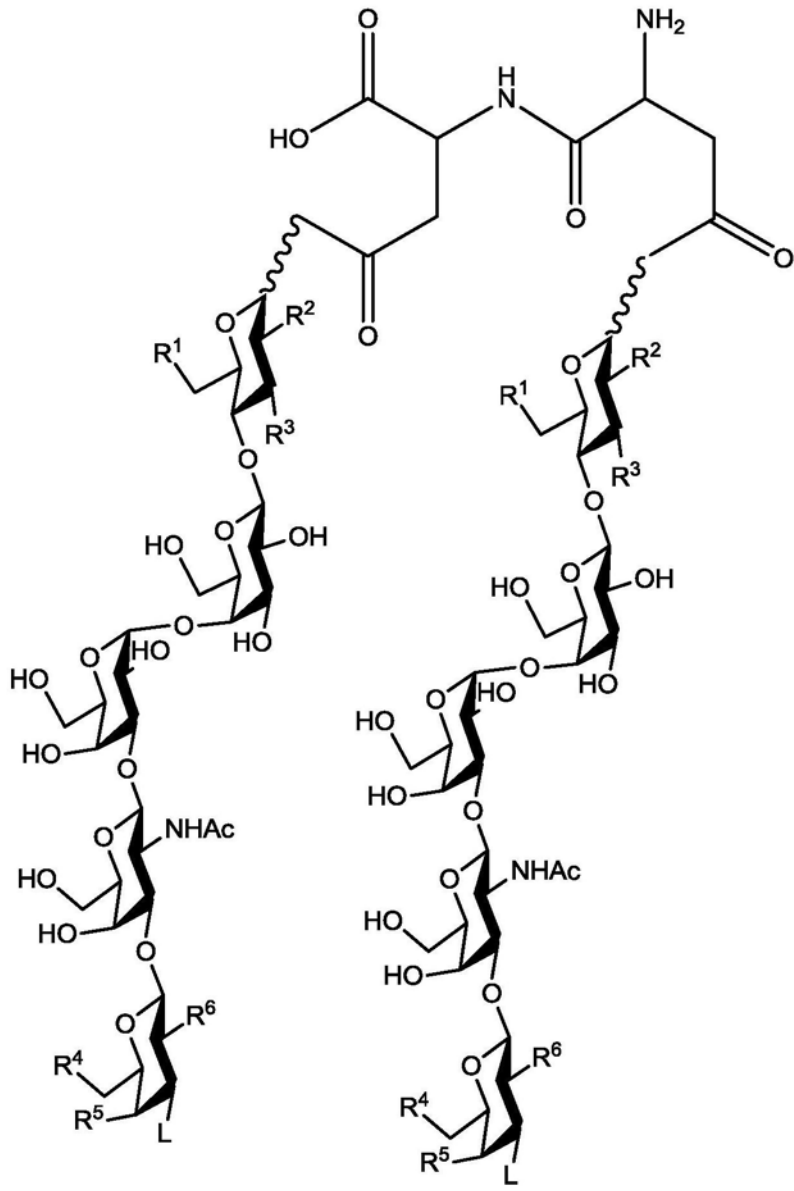
[0030] 在一些实施例中,聚糖可选自自由SSEA3、SSEA4及GloboH组成的群。

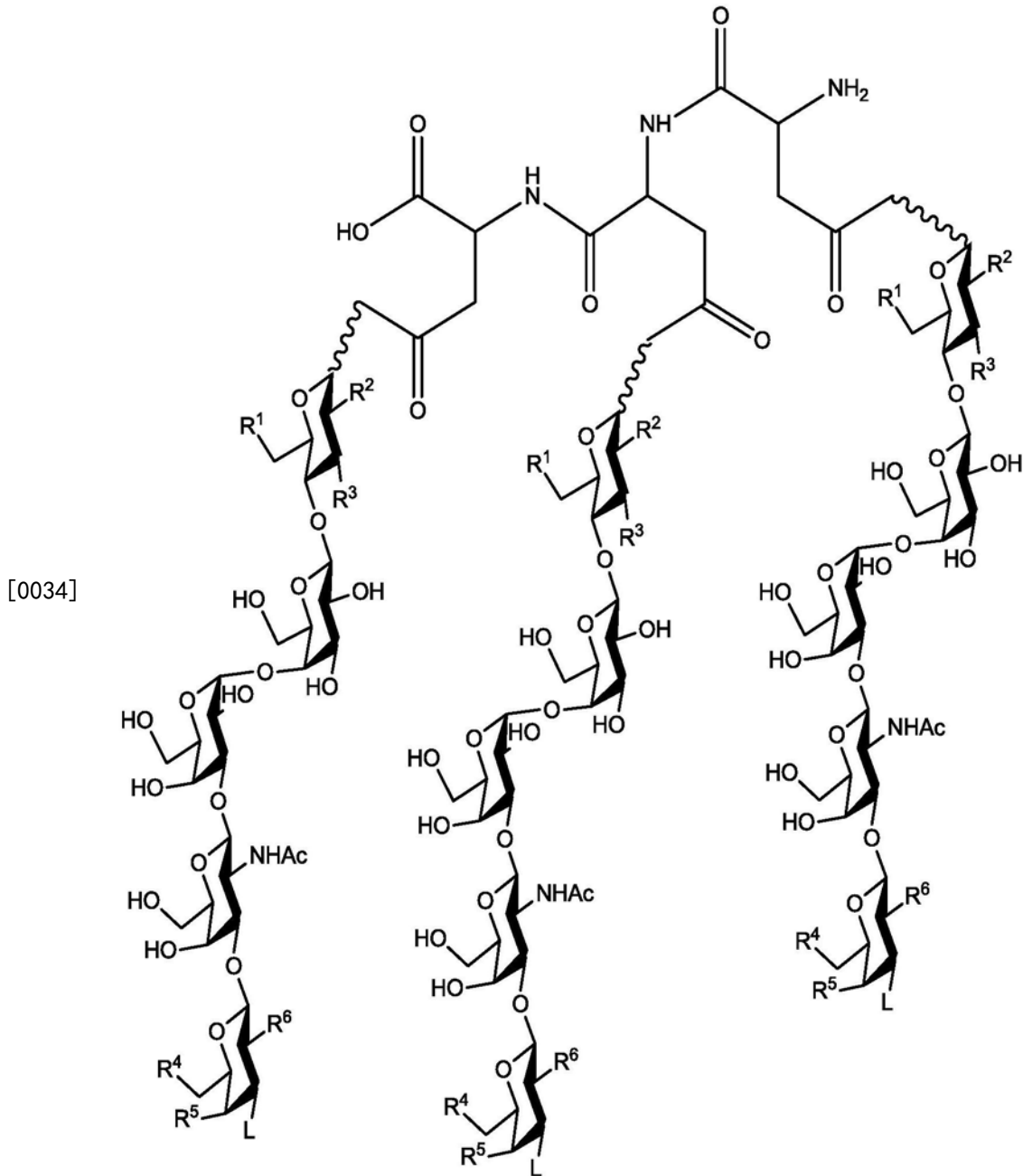
[0031] 在一些实施例中,例示性多价构筑体可为:

[0032]



[0033]





[0035] 其中各聚糖部分上的 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 及L可为相同或不同的。

[0036] 在某些实施例中,本发明的免疫原性组合物包含佐剂。适用于本发明的例示性佐剂如本文所述。

[0037] 在某些实施例中,免疫原性组合物能够在个体中诱发针对癌细胞的免疫反应。在某些实施例中,癌细胞选自由以下组成的群:脑癌细胞、肺癌细胞、乳癌细胞、口腔癌细胞、食道癌细胞、胃癌细胞、肝癌细胞、胆管癌细胞、胰脏癌细胞、结肠癌细胞、肾脏癌细胞、骨癌细胞、皮肤癌细胞、子宫颈癌细胞、卵巢癌细胞及前列腺癌细胞。

[0038] 在某些实施例中,免疫反应包括特异性结合至一或多种选自由GloboH、SSEA3及SSEA4组成的群的抗原的抗体的产生。在某些实施例中,开发出靶向癌细胞或癌症干细胞表面上所表达的GloboH、SSEA3及SSEA4中的一或多者且引发补体依赖性细胞毒性及/或抗体依赖性细胞介导细胞毒性杀死此等细胞的抗体。在某些实施例中,抗体主要包括IgG抗体。在

某些实施例中,本文所提供的免疫原性组合物主要诱导IgG1、IgG2b、IgG2c及IgG3。

[0039] 另外,本发明展示针对本文所述的免疫原性组合物所产生的单株抗体及结合片段。

[0040] 在一个实施例中,抗体为人类抗体。

[0041] 在一个实施例中,抗体为人类化抗体。

[0042] 在一个实施例中,抗体特异性靶向SSEA4、SSEA3或GloboH中的一或多者。

[0043] 在一个实施例中,抗体特异性靶向SSEA3。

[0044] 在一个实施例中,抗体特异性靶向SSEA4。

[0045] 在一个实施例中,抗体为具有双触角聚糖的均质抗体,所述双触角聚糖经两个唾液酸以 $\alpha$ -2,6-键联方式封端。

[0046] 在一个态样中,本发明提供一种医药组合物,其包含有效量的特异性靶向SSEA4、SSEA3或GloboH中的一或多者的抗体或抗原结合片段及医药学上可接受的载剂。

[0047] 在一个实施例中,医药组合物包含各自独立地靶向SSEA4、SSEA3及/或GloboH聚糖中的一或多者的抗体及/或其结合片段的组合。

[0048] 在一个实施例中,医药组合物适用于治疗癌症、感染性疾病及/或发炎性疾病。

[0049] 在一个实施例中,医药组合物包含具有通用双触角N-聚糖的抗体或其结合片段,所述通用双触角N-聚糖经唾液酸以 $\alpha$ -2,6-键联方式封端。

[0050] 在另一态样中,本发明提供包含本文所述的免疫原性组合物及医药学上可接受的赋形剂的癌症疫苗。

[0051] 在另一态样中,本发明提供治疗个体的癌症及/或降低个体的癌症风险的方法,包含向需要其的个体投与治疗有效量的如本文所述的免疫原性组合物或癌症疫苗。

[0052] 治疗可减小肿瘤尺寸、消除恶性细胞、预防癌转移、预防复发、减少或杀死播散性癌症、延长存活期及/或延长肿瘤癌症进展的时间。

[0053] 在一些实施例中,治疗进一步包含在投与本文所述的免疫原性组合物或癌症疫苗之前、期间或之后向所述个体投与另一种疗法。在一些实施例中,另一种疗法为用化学治疗剂治疗。在一些实施例中,另一种疗法为辐射疗法。

[0054] 本发明的另一态样展示一种用针对癌症的疫苗接种哺乳动物的方法,包含向哺乳动物投与药理学上有效量的如本文所述的免疫原性组合物或癌症疫苗。

[0055] 在一些实施例中,哺乳动物为人类。在一些实施例中,皮下投与本文所述的免疫原性组合物或癌症疫苗。

[0056] 癌症的实例包括(但不限于)脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、子宫颈癌、卵巢癌及前列腺癌。在一些实施例中,癌症为脑癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌或胰脏癌。

[0057] 在另一态样中,本发明提供合成如本文所述的本发明化合物的方法。

[0058] 在又一态样中,本发明展示制备如本文所述的免疫原性组合物或癌症疫苗的方法。

[0059] 本发明的某些实施例的细节阐述于本文中。本发明的其他特征、目标及优点根据实施方式、图式、实例及申请专利范围将显而易见。

## 附图说明

- [0060] 图1:球系列鞘糖脂的生物合成路径。
- [0061] 图2:自不同抗原决定基比率的SSEA4-CRM197或SSEA4-Gc-CRM197免疫接种的小鼠中所收集的经诱导GloboH-IgG抗体。
- [0062] 图3A:原生SSEA4以及所有八种SSEA4类似物当与Gal-C34组合使用时可诱发针对SSEA4的IgG抗体。
- [0063] 图3B:原生SSEA4以及所有八种SSEA4类似物当与Gal-C34组合使用时可诱发针对SSEA4的IgM抗体。
- [0064] 图4A:原生SSEA4以及所有八种SSEA4类似物当与Glc-C34组合使用时可诱发针对SSEA4的IgG抗体。
- [0065] 图4B:原生SSEA4以及所有八种SSEA4类似物当与Glc-C34组合使用时可诱发针对SSEA4的IgM抗体。
- [0066] 图5:聚糖-蛋白质结合方法影响免疫反应。

## 具体实施方式

- [0067] 本发明是基于如下惊人发现:阶段特异性胚抗原(SSEA3及SSEA4)经某些基团修饰可诱发分别特异性识别SSEA3及SSEA4的稳定IgG抗体反应。
- [0068] 在一些实例中,SSEA3的修饰包含SSEA3的葡萄糖的一或多个位置上的氟、迭氨基或O-苯基。在一些实例中,SSEA3的修饰包含非还原端半乳糖的一或多个位置上的氟、迭氨基或O-苯基。在一些实例中,SSEA4的修饰包含SSEA4的葡萄糖的一或多个位置上的氟、迭氨基或O-苯基。在一些实例中,SSEA4的修饰包含唾液酸残基的一或多个位置上的氟、迭氨基或O-苯基。
- [0069] 本文描述还原端及/或非还原端具有修饰的SSEA3类似物及SSEA4类似物。相较于原生SSEA3及SSEA4,此类SSEA3及SSEA4类似物可诱发更强的免疫反应(例如诱导针对SSEA3及/或SSEA4的IgG抗体)。包含此类非天然聚糖部分的免疫原性组合物所诱导的抗体能够介导针对肿瘤细胞的补体依赖性细胞的细胞毒性。
- [0070] 化学定义
- [0071] 下文更详细地描述特定官能基及化学术语的定义。化学元素是根据Handbook of Chemistry and Physics第75版内封面的元素周期表(CAS版)来鉴别,且特定官能基大体上如其中所述来定义。另外,有机化学的一般原理以及特定官能性部分及反应性描述于Thomas Sorrell,Organic Chemistry,University Science Books,Sausalito,1999; Smith及March,March's Advanced Organic Chemistry,第5版,John Wiley&Sons,Inc., New York,2001;Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers, Inc.,New York,1989;及Carruthers,Some Modern Methods of Organic Synthesis,第3版,Cambridge University Press,Cambridge,1987。此外,例示性聚糖及抗体方法描述于Wong等人的US20100136042、US20090317837及US20140051127中,其每一者的揭示内容以引用的方式并入本文中。
- [0072] 本文所述的化合物可包含一或多个不对称中心,且因此可以各种异构体形式(例如对映异构体及/或非对映异构体)存在。举例而言,本文所述的化合物可呈个别对映异构

体、非对映异构体或几何异构体形式,或可呈立体异构体的混合物形式,包括外消旋混合物及其中一或多种立体异构体增浓的混合物。异构体可利用熟习此项技术者已知的方法(包括对掌性高压液相层析(HPLC)及对掌性盐的形成及结晶)而自混合物中分离;或可通过不对称合成来制备优选异构体。参见例如Jacques等人,Enantiomers,Racemates and Resolutions(Wiley Interscience,New York,1981);Wilen等人,Tetrahedron 33:2725(1977);Eliel,Stereochemistry of Carbon Compounds(McGraw-Hill,NY,1962);及Wilen,Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions第268页(E.L.Eliel编,Univ.of Notre Dame Press,Notre Dame,IN 1972)。本发明另外涵盖呈实质上不含其他异构体的个别异构体形式及替代地呈各种异构体的混合物形式的本文所述化合物。

[0073] 当列举值范围时,希望涵盖此范围内的每个值及子范围。举例而言,「C1-6」意欲涵盖C1、C2、C3、C4、C5、C6、C1-6、C1-5、C1-4、C1-3、C1-2、C2-6、C2-5、C2-4、C2-3、C3-6、C3-5、C3-4、C4-6、C4-5及C5-6。

[0074] 「烷基」是指具有1至20个碳原子的直链或分支链饱和烃基(「C1-20烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至10个碳原子(「C1-10烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至9个碳原子(「C1-9烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至8个碳原子(「C1-8烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至7个碳原子(「C1-7烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至6个碳原子(「C1-6烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至5个碳原子(「C1-5烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至4个碳原子(「C1-4烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至3个碳原子(「C1-3烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1至2个碳原子(「C1-2烷基」)。在一些实施例中,烷基具有1个碳原子(「C1烷基」)。在一些实施例中,烷基具有2至6个碳原子(「C2-6烷基」)。C1-6烷基的实例包括甲基(C1)、乙基(C2)、正丙基(C3)、异丙基(C3)、正丁基(C4)、第三丁基(C4)、第二丁基(C4)、异丁基(C4)、正戊基(C5)、3-戊基(C5)、戊基(C5)、新戊基(C5)、3-甲基-2-丁基(C5)、第三戊基(C5)及正己基(C6)。烷基的其他实例包括正庚基(C7)、正辛基(C8)及其类似基团。除非另外说明,否则烷基的各实例独立地视情况经取代,亦即未经取代(「未经取代的烷基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的烷基」)。在某些实施例中,烷基为未经取代的C1-10烷基(例如-CH<sub>3</sub>)。在某些实施例中,烷基为经取代的C1-10烷基。

[0075] 「烯基」是指具有2至20个碳原子、一或多个碳-碳双键且无叁键的直链或分支链烃基(「C2-20烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至10个碳原子(「C2-10烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至9个碳原子(「C2-9烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至8个碳原子(「C2-8烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至7个碳原子(「C2-7烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至6个碳原子(「C2-6烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至5个碳原子(「C2-5烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至4个碳原子(「C2-4烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2至3个碳原子(「C2-3烯基」)。在一些实施例中,烯基具有2个碳原子(「C2烯基」)。一或多个碳-碳双键可位于内部(诸如2-丁烯基)或末端(诸如1-丁烯基)。C2-4烯基的实例包括乙烯基(C2)、1-丙烯基(C3)、2-丙烯基(C3)、1-丁烯基(C4)、2-丁烯基(C4)、丁二烯基(C4)及其类似基团。C2-6烯基的实例包括前述C2-4烯基以及戊烯基(C5)、戊二烯基(C5)、己烯基(C6)及其类似基团。烯基的其他实例包括庚烯基(C7)、辛烯基(C8)、辛三烯基(C8)及其类似基团。除非另外说明,否则烯基的各实例独立地视情况经取代,亦即,未经取代(「未经取代的烯基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的烯基」)。在某些实施例中,烯基为未经取代的C2-

10烯基。在某些实施例中，烯基为经取代的C2-10烯基。

[0076] 「炔基」是指具有2至20个碳原子、一或多个碳-碳叁键及视情况存在的一或多个双键的直链或分支链烃基(「C2-20炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至10个碳原子(「C2-10炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至9个碳原子(「C2-9炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至8个碳原子(「C2-8炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至7个碳原子(「C2-7炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至6个碳原子(「C2-6炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至5个碳原子(「C2-5炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至4个碳原子(「C2-4炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2至3个碳原子(「C2-3炔基」)。在一些实施例中，炔基具有2个碳原子(「C2炔基」)。一或多个碳-碳叁键可位于内部(诸如2-丁炔基)或末端(诸如1-丁炔基)。C2-4炔基的实例包括(但不限于)乙炔基(C2)、1-丙炔基(C3)、2-丙炔基(C3)、1-丁炔基(C4)、2-丁炔基(C4)及其类似基团。C2-6烯基的实例包括前述C2-4炔基以及戊炔基(C5)、己炔基(C6)及其类似基团。炔基的其他实例包括庚炔基(C7)、辛炔基(C8)及其类似基团。除非另外说明，否则炔基的各实例独立地视情况经取代，亦即未经取代(「未经取代的炔基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的炔基」)。在某些实施例中，炔基为未经取代的C2-10炔基。在某些实施例中，炔基为经取代的C2-10炔基。

[0077] 「杂环基」或「杂环」是指具有环碳原子及1至4个环杂原子的3元至10元非芳环系统的基团，其中各杂原子独立地选自氮、氧、硫、硼、磷及硅(「3至10元杂环基」)。在某些实施例中，杂原子独立地选自氮、硫及氧。在含有一或多个氮原子的杂环基中，价数允许时，连接点可为碳或氮原子。杂环基可为单环(「单环杂环基」)或稠合、桥连或螺环系统，诸如双环系统(「双环杂环基」)，且可为饱和或部分不饱和。杂环基双环系统可在一个或两个环中包括一或多个杂原子。「杂环基」亦包括其中如上文所定义的杂环与一或多个碳环基稠合的环系统，其中连接点位于碳环基或杂环上；或其中如上文所定义的杂环与一或多个芳基或杂芳基稠合的环系统，其中连接点位于杂环上，且在此等情况下，环成员数继续表示杂环系统中的环成员数。除非另外说明，否则杂环基的各实例独立地视情况经取代，亦即，未经取代(「未经取代的杂环基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的杂环基」)。在某些实施例中，杂环基为未经取代的3至10元杂环基。在某些实施例中，杂环基为经取代的3至10元杂环基。

[0078] 「芳基」是指单环或多环(例如双环或三环)  $4n+2$  芳族环系统(例如环状数组中共享6、10或14个 $\pi$ 电子)的基团，所述芳族环系统中具有6至14个环碳原子及零个杂原子(「C6-14芳基」)。在一些实施例中，芳基具有6个环碳原子(「C6芳基」；例如苯基)。在一些实施例中，芳基具有10个环碳原子(「C10芳基」；例如萘基，诸如1-萘基及2-萘基)。在一些实施例中，芳基具有14个环碳原子(「C14芳基」；例如蒽基)。「芳基」亦包括其中如上文所定义的芳基环与一或多个碳环基或杂环基稠合的环系统，其中连接基团或连接点位于芳基环上，且在此等情况下，碳原子数继续指示芳基环系统中的碳原子数。除非另外说明，否则芳基的各实例独立地视情况经取代，亦即未经取代(「未经取代的芳基」)或经一或多个取代基取代(「经取代的芳基」)。在某些实施例中，芳基为未经取代的C6-14芳基。在某些实施例中，芳基为经取代的C6-14芳基。

[0079] 如本文所定义的作为二价桥接基团的烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基另外使用后缀-伸基提及，例如伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸碳环基、伸杂环基、伸芳基及伸杂芳基。

[0080] 术语「烷氧基」或「烷基氧基」是指-O-烷基,其中烷基视情况经如本文所定义的烷基取代。烷氧基的实例包括(但不限于)甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、第二丁氧基及第三丁氧基。

[0081] 术语「芳氧基」是指-O-芳基,其中芳基视情况经如本文所定义的芳基取代。

[0082] 如本文所使用,术语「视情况经取代」是指经取代或未经取代的部分。

[0083] 如本文所定义的烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基视情况经取代(例如「经取代」或「未经取代」的烷基、「经取代」或「未经取代」的烯基、「经取代」或「未经取代」的炔基、「经取代」或「未经取代」的碳环基、「经取代」或「未经取代」的杂环基、「经取代」或「未经取代」的芳基或「经取代」或「未经取代」的杂芳基)。一般而言,术语「取代」,不论是否位于术语「视情况」之前,均意谓存在于基团上的至少一个氢(例如碳或氮原子)经可允许取代基(例如取代时产生稳定化合物(例如不能自发地经历转化(诸如重排、环化、消除或其他反应)的化合物)的取代基)置换。除非另外指明,否则「经取代」的基团在所述基团的一或多个可取代位置具有取代基,且当任何既定结构中的一个以上位置经取代时,取代基在各位置相同或不同。术语「经取代」预期包括经有机化合物的所有容许取代基、引起稳定化合物形成的本文所述任何取代基取代。本发明涵盖任何及所有此类组合以便获得稳定化合物。出于本发明的目的,杂原子(诸如氮)可具有氢取代基及/或满足杂原子价数且引起稳定部分形成的如本文所描述的任何适合取代基。

[0084] 「卤基」或「卤素」是指氟(氟基、-F)、氯(氯基、-Cl)、溴(溴基、-Br)或碘(碘基、-I)。

[0085] 如本文所用,「酰基」是指选自由以下组成的群的部分: $-C(=O)R_{aa}$ 、 $-CHO$ 、 $-CO_2R_{aa}$ 、 $-C(=O)N(R_{bb})_2$ 、 $-C(=NR_{bb})R_{aa}$ 、 $-C(=NR_{bb})OR_{aa}$ 、 $-C(=NR_{bb})N(R_{bb})_2$ 、 $-C(=O)NR_{bb}SO_2R_{aa}$ 、 $-C(=S)N(R_{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR_{aa}$ 及 $-C(=S)SR_{aa}$ ,其中 $R_{aa}$ 及 $R_{bb}$ 如本文所定义。

[0086] 价数允许时,氮原子可经取代或未经取代,且包括一级、二级、三级及四级氮原子。例示性氮原子取代基包括(但不限于)氢、 $-OH$ 、 $-OR_{aa}$ 、 $-N(R_{cc})_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)R_{aa}$ 、 $-C(=O)N(R_{cc})_2$ 、 $-CO_2R_{aa}$ 、 $-SO_2R_{aa}$ 、 $-C(=NR_{bb})R_{aa}$ 、 $-C(=NR_{cc})OR_{aa}$ 、 $-C(=NR_{cc})N(R_{cc})_2$ 、 $-SO_2N(R_{cc})_2$ 、 $-SO_2R_{cc}$ 、 $-SO_2OR_{cc}$ 、 $-SOR_{aa}$ 、 $-C(=S)N(R_{cc})_2$ 、 $-C(=O)SR_{cc}$ 、 $-C(=S)SR_{cc}$ 、 $-P(=O)_2R_{aa}$ 、 $-P(=O)(R_{aa})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R_{cc})_2$ 、 $-P(=O)(NR_{cc})_2$ 、C1-10烷基、C1-10全卤烷基、C2-10烯基、C2-10炔基、C3-10碳环基、3-14元杂环基、C6-14芳基及5-14元杂芳基,或连接至氮原子的两个 $R_{cc}$ 基团连接而形成3-14元杂环基或5-14元杂芳基环,其中各烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基及杂芳基独立地经0、1、2、3、4或5个 $R_{dd}$ 基团取代且其中 $R_{aa}$ 、 $R_{bb}$ 、 $R_{cc}$ 及 $R_{dd}$ 如上文所定义。

[0087] 在某些实施例中,存在于氧原子上的取代基为氧保护基(在本文中亦称为「羟基保护基」)。氧保护基包括(但不限于) $-R_{aa}$ 、 $-N(R_{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR_{aa}$ 、 $-C(=O)R_{aa}$ 、 $-CO_2R_{aa}$ 、 $-C(=O)N(R_{bb})_2$ 、 $-C(=NR_{bb})R_{aa}$ 、 $-C(=NR_{bb})OR_{aa}$ 、 $-C(=NR_{bb})N(R_{bb})_2$ 、 $-S(=O)R_{aa}$ 、 $-SO_2R_{aa}$ 、 $-Si(R_{aa})_3$ 、 $-P(R_{cc})_2$ 、 $-P(R_{cc})_3$ 、 $-P(=O)_2R_{aa}$ 、 $-P(=O)(R_{aa})_2$ 、 $-P(=O)(OR_{cc})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R_{bb})_2$ 及 $-P(=O)(NR_{bb})_2$ ,其中 $R_{aa}$ 、 $R_{bb}$ 及 $R_{cc}$ 如本文所定义。氧保护基在此项技术中已熟知且包括Protecting Groups in Organic Synthesis, T.W. Greene及P.G.M. Wuts, 第3版, John Wiley&Sons, 1999中所述的氧保护基团,所述文献以引用的方式并入本文中。

[0088] 例示性氧保护基团包括(但不限于)甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲硫基甲基(MTM)、第三丁基硫甲基、(苯基二甲基硅烷基)甲氧基甲基(SMOM)、苯甲氧基甲基(BOM)、对甲氧基苯

甲氧基甲基 (PMBM)、(4-甲氧基苯氧基) 甲基 (p-AOM)、邻甲氧基苯酚甲基 (GUM)、第三丁氧基甲基、4-戊烯氧基甲基 (POM)、硅烷氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基 (MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、双(2-氯乙氧基) 甲基、2-(三甲基硅烷基) 乙氧基甲基 (SEMOR)、四氢哌喃基 (THP)、3-溴四氢哌喃基、四氢硫代哌喃基、1-甲氧基环己基、4-甲氧基四氢哌喃基 (MTHP)、4-甲氧基四氢硫代哌喃基、4-甲氧基四氢硫代哌喃基S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基) 苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基 (CTMP)、1,4-二恶烷-2-基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-甲醇苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基) 乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苯甲氧基乙基、1-甲基-1-苯甲氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基硅烷基乙基、2-(苯基氧硒基) 乙基、第三丁基、烯丙基、对氯苯基、对甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苯甲基 (Bn)、对甲氧基苯甲基、3,4-二甲氧基苯甲基、邻硝基苯甲基、对硝基苯甲基、对卤基苯甲基、2,6-二氯苯甲基、对氰基苯甲基、对苯基苯甲基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基N-氧离子基、二苯甲基、对,对'-二硝基二苯甲基、5-二苯并环庚基、三苯甲基、 $\alpha$ -萘基二苯基甲基、对甲氧基苯基二苯基甲基、二(对甲氧基苯基) 苯基甲基、三(对甲氧基苯基) 甲基、4-(4'-溴苯甲酰甲基氧基苯基) 二苯甲基、4,4',4''-参(4,5-二氯邻苯二甲酰亚氨基苯基) 甲基、4,4',4''-参(菊芋糖基氧基苯基) 甲基、4,4',4''-参(苯甲酰氧基苯基) 甲基、3-(咪唑-1-基) 双(4',4''-二甲氧基苯基) 甲基、1,1-双(4-甲氧基苯基)-1'-苈基甲基、9-蒎基、9-(9-苯基) 二苯并哌喃基、9-(9-苯基-10-侧氧基) 蒎基、1,3-苯并二硫杂环戊烷-2-基、苯并异噻唑基S,S-二氧离子基、三甲基硅烷基 (TMS)、三乙基硅烷基 (TES)、三异丙基硅烷基 (TIPS)、二甲基异丙基硅烷基 (IPDMS)、二乙基异丙基硅烷基 (DEIPS)、二甲基第三己基硅烷基、第三丁基二甲基硅烷基 (TBDMS)、第三丁基二苯基硅烷基 (TBDPS)、三苯甲基硅烷基、三-对二甲苯基硅烷基、三苯基硅烷基、二苯基甲基硅烷基 (DPMS)、第三丁基甲氧苯基硅烷基 (TBMPS)、甲酸酯、苯甲酰基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯氧基乙酸酯、对氯苯氧基乙酸酯、3-苯基丙酸酯、4-侧氧基戊酸酯(乙酰丙酸酯)、4,4-(伸乙基二硫基) 戊酸酯(乙酰丙酰基二硫缩醛)、新戊酸酯、金刚酸酯、巴豆酸酯、4-甲氧基巴豆酸酯、苯甲酸酯、对苯基苯甲酸酯、2,4,6-三甲基苯甲酸酯(均三甲基苯甲酸酯)、碳酸甲酯、碳酸9-苄基甲酯 (Fmoc)、碳酸乙酯、碳酸2,2,2-三氯乙酯 (Troc)、2-(三甲基硅烷基) 碳酸乙酯 (TMSEC)、碳酸2-(苯基磺酰基) 乙酯 (Psec)、2-(三苯基磷鎓基) 碳酸乙酯 (Peoc)、碳酸异丁酯、碳酸乙烯酯、碳酸烯丙酯、碳酸第三丁酯 (BOC)、碳酸对硝基苯酯、碳酸苯甲酯、碳酸对甲氧基苯甲酯、碳酸3,4-二甲氧基苯甲酯、碳酸邻硝基苯甲酯、碳酸对硝基苯甲酯、硫代碳酸S-苯甲酯、碳酸4-乙氧基-1-萘基酯、二硫代碳酸甲酯、2-碘苯甲酸酯、4-迭氮基丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、邻(二溴甲基) 苯甲酸酯、2-甲酰基苯磺酸酯、2-(甲基硫代甲氧基) 乙基、4-(甲基硫代甲氧基) 丁酸酯、2-(甲基硫代甲氧基甲基) 苯甲酸酯、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸酯、2,6-二氯-4-(1,1,3,3-四甲基丁基) 苯氧基乙酸酯、2,4-双(1,1-二甲基丙基) 苯氧基乙酸酯、氯二苯基乙酸酯、异丁酸酯、单丁二酸酯、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、邻(甲氧基酰基) 苯甲酸酯、 $\alpha$ -萘甲酸酯、硝酸酯、N,N,N',N'-四甲基二氨基磷酸烷基酯、N-苯基氨基甲酸烷基酯、硼酸酯、二甲基磷基亚硫酸基、2,4-二硝基苯基亚磺酸烷基酯、硫酸酯、甲烷磺酸酯(甲磺酸酯)、苯甲基磺酸酯及甲苯磺酸酯(Ts)。

[0089] 亦必须注意,除非上下文另有明确规定,否则如在本文中及在随附申请专利范围

中所用,单数形式「一(a)」、「一(an)」及「所述(the)」包括多数个提及物。同样,术语「一(a)」(或「一(an)」)、「一或多个」及「至少一个」在本文中可互换使用。亦应注意,术语「包含」、「包括」及「具有」可互换使用。

[0090] 除非另外指明,否则将使用属于此项技术的技能范围内的分子生物学、微生物学、重组DNA及免疫学公知技术实施本发明。这些技术在文献中充分解释。参见例如Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Sambrook,Fritsch及Maniatis编(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989);DNA Cloning,第I及II卷(D.N.Glover编,1985);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning (1984);论文Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller及M.P.Calos编,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Methods In Enzymology,第154卷及第155卷(Wu等人编),Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer及Walker编,Academic Press,London,1987);Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow and Lane s(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988);及Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷(D.M.Weir及C.C.Blackwell编,1986)。

[0091] 如本文所使用,术语「聚糖」是指多糖,或寡糖。聚糖在本文中亦用于指糖结合物的碳水化合物部分,诸如糖蛋白、糖脂、糖肽、糖蛋白质组、肽聚糖、脂多糖或蛋白聚糖。聚糖通常仅由单糖之间的O-糖苷键联组成。举例而言,纤维素为由 $\beta$ -1,4-连接型D-葡萄糖组成的聚糖(或更特定而言,葡聚糖),且甲壳素为由 $\beta$ -1,4-连接型N-乙酰基-D-葡糖胺组成的聚糖。聚糖可为单糖残基的均聚物或杂聚物,且可为线性的或分枝的。可发现聚糖连接至蛋白质,如糖蛋白及蛋白聚糖。其通常发现于细胞外表面上。O连接型及N连接型聚糖在真核生物中很常见,而且可发现于原核生物中(然而不常见)。发现N连接型聚糖连接至序列子中的天冬酰胺的R族氮(N)。序列子为Asn-X-Ser或Asn-X-Thr序列,其中X为除坚果糖的外的任何氨基酸。

[0092] 如本文所使用,术语「抗原」定义为能够诱发免疫反应的任何物质。

[0093] 如本文所使用,术语「免疫原性」是指免疫原、抗原或疫苗刺激免疫反应的能力。

[0094] 如本文所使用,术语「CD1d」是指各种人类抗原呈递细胞表面上所表达的糖蛋白的CD1(分化丛集1)家族的一员。CD1d呈递的脂质抗原活化天然杀手T细胞。CD1d具有供糖脂抗原结合于其中的较深抗原结合凹槽。树突状细胞上所表达的CD1d分子可结合及呈递糖脂,包括 $\alpha$ -GalCer类似物,诸如C34。

[0095] 如本文所使用,术语「抗原决定基」定义为抗原分子的一部分,此部分接触抗体或T细胞受体的抗原结合位点。

[0096] 如本文所使用,术语「疫苗」是指含有抗原的制剂,其由完整致病生物体(杀死或减毒)或这些生物体的组分(诸如蛋白质、肽或多糖)组成,用于赋予针对这些生物体所致的疾病的免疫力。疫苗制剂可为天然的、合成的或通过重组DNA技术获得。

[0097] 如本文所使用,术语「抗原特异性」是指细胞群的一种特性,其使得特定抗原或抗原片段的供应引起特异性细胞增殖。

[0098] 如本文所用,术语「特异性结合」是指结合对(例如抗体与抗原)之间的相互作用。

在各种情形下,特异性结合可体现为约 $10^{-6}$ 莫耳/公升、约 $10^{-7}$ 莫耳/公升或约 $10^{-8}$ 莫耳/公升或小于 $10^{-8}$ 莫耳/公升的亲合力常数。

[0099] 如本文所用,术语醣酶至少部分地指球系列生物合成路径中的酶;例示性醣酶包括 $\alpha$ -1,4-半乳糖基转移酶; $\beta$ -1,4-N-乙酰半乳糖基转移酶-I;或 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶-V。

[0100] 如本文所使用,术语「球系列路径」包括图1中所述的生物合成及酶促路径。

[0101] 「分离」抗体为已鉴别且自其天然环境的组分分离且/或回收的抗体。其天然环境的污染物组分为会干扰抗体的研究、诊断或治疗用途的物质,且可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一个实施例中,抗体将纯化(1)至大于95wt%,如通过例如洛瑞方法(Lowry method)所测定,且在一些实施例中超过99wt%;(2)至足以通过使用例如旋杯式测序仪获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)至均质,此是通过使用例如库马斯蓝(Coomassie blue)或银染剂、在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE所达成。经分离抗体包括原位存在于重组细胞内的抗体,因为抗体的天然环境中的至少一种组分将不存在。然而,通常,经分离抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0102] 「结合亲和力」一般是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合搭配物(例如抗原)之间非共价相互作用力的总和。除非另外指明,否则如本文所使用,「结合亲和力」是指反映结合对(例如抗体与抗原)成员之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其搭配物Y的亲合力一般可由解离常数(Kd)表示。可通过此项技术中已知的常用方法(包括本文所述的方法)量测亲和力。低亲和力抗体一般缓慢结合抗原且倾向于容易解离,而高亲和力抗体一般较快结合抗原且倾向于较长时间保持结合状态。此项技术中已知多种量测结合亲和力的方法,其中任一者可用于本发明的目的。特定说明性实施例描述于下文中。

[0103] 「抗体片段」仅包含完整抗体的一部分,其中所述部分保留与彼部分当其存在于完整抗体中时正常相关的功能中的至少一功能,及大部分或全部功能。在一个实施例中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点且因此保留结合抗原的能力。在另一实施例中,抗体片段(例如包含Fc区域者)保留当存在于完整抗体中时通常与Fc区域相关的至少一个生物学功能,诸如FcRn结合、抗体半衰期调节、抗体依赖细胞介导的细胞毒杀功能及补体结合。在一个实施例中,抗体片段为具有实质上类似于完整抗体的活体内半衰期的单价抗体。举例而言,所述抗体片段可包含连接至Fc序列的抗原结合臂,其能够对所述片段赋予活体内稳定性。

[0104] 本文的单株抗体特定包括「嵌合」抗体,其中一部分重链及/或轻链与得自特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而所述(这些)链的其余部分与得自另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源;以及这些抗体的片段,只要其展现出所需生物学活性即可(美国专利第4,816,567号;及Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0105] 「人类化」形式的非人类(例如鼠科)抗体为含有自非人类免疫球蛋白获得的最小序列的嵌合抗体。在一个实施例中,人类化抗体为人类免疫球蛋白(受体抗体),其中将获自接受者的高变区的残基置换为获自具有所要特异性、亲合力及/或容量的非人类种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物)的高变区的残基。在一些情况下,人类免疫球蛋白的构架区(FR)残基经相应的非人类残基置换。此外,人类化抗体可包含受体抗体或供者抗体中未见的残基。进行此等修饰以进一步改善抗体效能。一般而言,人类化抗体将包含

实质上所有至少一个且通常两个可变域,其中所有或实质上所有高变环对应于非人类免疫球蛋白的高变环,且所有或实质上所有FR为人类免疫球蛋白序列的FR。人化抗体视情况亦将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人类免疫球蛋白的恒定区。欲知详情,参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。亦参见以下评述论文及其中所引用的参考文献:Vaswani及Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle及Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994)。

[0106] 「阻断」抗体或「拮抗剂」抗体为抑制或降低所结合的抗原的生物活性的抗体。某些阻断抗体或拮抗剂抗体大体上或完全地抑制抗原的生物活性。

[0107] 如本文中所使用的「促效剂抗体」为一种模拟所研究的多肽的至少一种功能活性的抗体。

[0108] 「病症」为经本发明的抗体治疗可好转的任何病状。此包括慢性及急性病症或疾病,包括使哺乳动物易患所述病症的彼等病理病况。本文所治疗病症的非限制性实例包括癌症。

[0109] 术语「细胞增生性病症」及「增生性病症」是指与某种程度的异常细胞增殖相关的病症。在一个实施例中,细胞增殖病症为癌症。

[0110] 如本文所使用的「肿瘤」是指所有赘生性细胞(恶性或良性)的生长及增殖,及所有癌前及癌细胞及组织。如本文中所引述,术语「癌症」、「癌变」、「细胞增殖性病症」、「增殖性病症」及「肿瘤」并非互相排斥的。

[0111] 术语「癌症」及「癌性」是指或描述哺乳动物体内通常以不受调控的细胞生长/增殖为特征的生理病况。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤(例如霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤)、胚细胞瘤、肉瘤及白血病。这些癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、白血病及其他淋巴组织增生性病症,以及各种类型的头颈癌。

[0112] 术语「球系列相关病症」是指或描述特征典型地为或导致路径功能发挥或呈递发生异常的病症。此类病症的实例包括(但不限于)过度增生性疾病,包括癌症。

[0113] 免疫缺乏症候群的实例包括但不限于共济失调毛细血管扩张、白细胞黏着缺乏症候群、淋巴细胞减少症、异常 $\gamma$ 球蛋白血症、人类免疫缺陷病毒或 $\delta$ 逆转录病毒感染、常见变异性免疫缺乏、严重联合免疫缺陷、巨噬细胞杀菌功能异常、无 $\gamma$ 球蛋白血症、狄乔治症候群(DiGeorge syndrome)及韦斯科特-阿德里奇症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)。过敏症的实例包括但不限于变态反应、哮喘、皮肤炎、麻疹、过敏症、韦斯勒氏症候群(Wissler's syndrome)及血小板减少性紫癜。

[0114] 如本文所使用的「治疗」是指试图改变所治疗的个体或细胞的自然过程的临床干预,且可出于预防的目的或临床病理学过程中进行。理想的治疗效果包括防止疾病发作或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理性后果、防止或减缓炎症及/或组织/器官伤害、降低疾病行进速度、改善或减缓疾病状态及症状缓解或预后改良。在一些实施例中,

使用本发明的抗体推迟疾病或病症的发展。

[0115] 「个体(individual)」或「个体(subject)」为脊椎动物。在某些实施例中,脊椎动物为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于农畜(诸如牛)、运动型动物、宠物(诸如猫、狗及马)、灵长类动物、小鼠及大鼠。在某些实施例中,脊椎动物为人类。

[0116] 用于治疗目的的「哺乳动物」是指归类为哺乳动物的任何动物,包括人类、驯养动物及农耕动物,以及动物园、运动或宠物动物,诸如狗、马、猫、母牛等。在某些实施例中,哺乳动物为人类。

[0117] 「有效量」是指有效达成所需治疗或预防结果所必需的剂量及时间量。

[0118] 本发明的物质/分子的「治疗有效量」可根据诸如以下因素而变:个体的疾病状态、年龄、性别及体重,以及所述物质/分子在个体中诱发所要反应的能力。治疗有效量亦为一种治疗有益效应超过所述物质/分子的任何毒性或有害效应的量。「预防有效量」是指有效达成所需预防结果所必需的剂量及时间量。由于预防剂量是在患病之前或在患病早期的个体中使用,因此预防有效量通常(但不一定)小于治疗有效量。

[0119] 本文所用的术语「细胞毒性剂」是指一种抑制或阻止细胞功能及/或引起细胞破坏的物质。所述术语意欲包括放射性同位素(例如At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>及Lu的放射性同位素);化学治疗剂,例如甲胺蝶呤、阿霉素(adriamycin)、长春生物碱类(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)、阿霉素(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道诺霉素(daunorubicin)或其他插入剂、酶及其片段(诸如核酸分解酶、抗生素及毒素,诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶促活性毒素,包括其片段及/或变体),以及下文所揭示的各种抗瘤剂或抗癌剂。其他细胞毒性剂在下文中描述。杀肿瘤剂可使肿瘤细胞毁坏。

[0120] 「化学治疗剂」为可用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的实例包括:烷化剂,诸如硫替派(thiotepa)及CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸盐类,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类,诸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa);伸乙基亚胺类及甲基密胺类,包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基密胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三伸乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)及三甲密胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰类(acetogenins)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone)); $\Delta$ -9-四氢大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol, MARINOL®)); $\beta$ -拉帕酮(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙碱(colchicine);桦木酸(betulinic acid);喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊诺替康(irinotecan;CAMPTOSAR®)、乙酰基喜树碱(acetylcampothecin)、斯考普莱叮(scoplectin)及9-氨基喜树碱);苔藓虫素(bryostatin);卡利斯塔叮(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)及比折来新合成类似物);足叶草毒素(podophyllotoxin);足叶草酸(podophyllinic acid);替尼泊甙(teniposide);念珠藻环肽(cryptophycin)(尤其念珠藻环肽1及念珠藻环肽8);海兔毒素(dolastatin);多卡米辛(duocarmycin)(包括合成类似物,KW-2189及CB1-TM1);艾榴素(eleutherobin);

盘克斯塔叮 (pancratistatin); 沙考的汀 (sarcodictyin); 海绵素 (spongistatin); 氮芥类, 诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥 (chlornaphazine)、环磷酰胺、雌氮芥 (estramustine)、异环磷酰胺、二氯甲二乙胺、盐酸二氯甲二乙胺氧化物 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新氮芥 (novembichin)、胆固醇苯乙酸氮芥 (phenesterine)、松龙苯芥 (prednimustine)、氯乙环磷酰胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 硝基脲, 诸如亚硝脲氮芥 (carmustine)、氯脲霉素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、环己亚硝脲 (lomustine)、嘧啶亚硝脲 (nimustine) 及拉宁司汀 (ranimustine); 抗生素, 诸如烯二炔抗生素 (例如刺孢霉素 (calicheamicin), 尤其刺孢霉素  $\gamma$  1 及刺孢霉素  $\omega$  1 (参见例如 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); 达米辛 (dynemicin), 包括达米辛 A; 艾斯帕米辛 (esperamicin); 以及新制癌菌素 (neocarzinostatin) 发色团及相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、克拉斯米辛 (aclacinomysins)、放线菌素 (actinomycin)、奥斯拉米辛 (authramycin)、重氮丝胺酸 (azaserine)、博莱霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、卡拉比辛 (carabycin)、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、克罗米辛 (chromomycinis)、放线菌素 (dactinomycin)、道诺霉素、地托比星 (detorubicin)、6-重氨基-5-侧氧-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN® 阿霉素 (包括吗啉并-阿霉素 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉并-阿霉素 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯并-阿霉素及脱氧阿霉素 (deoxydoxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (mitomycins) (诸如丝裂霉素 C)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺加霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycins)、培洛霉素 (peplomycin)、泼非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、奎那霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链脲霉素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物, 诸如甲胺蝶呤及 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) (5-FU); 叶酸类似物, 诸如傣诺特呤 (denopterin)、甲胺蝶呤、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、噻咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如环胞苷 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、氮尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿核苷 (floxuridine); 雄性激素, 诸如二甲睾酮 (calusterone)、屈他雄酮丙酸酯 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺剂, 诸如氨基苯乙哌啶酮 (aminogluthetimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如夫罗林酸 (frolinic acid); 醋葡内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺葡萄糖甙 (aldophosphamide glycoside); 氨基果糖酸 (aminolevulinic acid); 伊利卢拉 (eniluracil); 胺苯吡啶 (amsacrine); 倍思塔布 (bestrabucil); 比生群 (bisantrene); 埃达曲克 (edatraxate); 得弗伐胺 (defofamine); 秋水仙胺 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 艾弗利散 (elfornithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃坡霉素 (epothilone); 乙环氧啶 (etoglucid); 硝酸镓 (gallium nitrate); 羟基脲 (hydroxyurea); 香菇糖 (lentinan); 罗尼达宁 (lonidainine); 美登素类

(maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 及胺沙托辛 (ansamitocins); 丙脒脎 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫比达摩 (mopidanmol); 硝拉维林 (nitraerine); 喷司他丁 (pentostatin); 凡那明 (phenamet); 比柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼 (2-ethylhydrazide); 普鲁苄肼 (procarbazine); **PSK®**多醣复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 丙亚胺 (razoxane); 根霉菌素 (rhizoxin); 西佐糖 (sizofiran); 螺锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2.2'-2"-三氯三乙基胺; 单端孢霉烯族毒素 (trichothecenes) (尤其T-2毒素、弗纳库林A (verracurin A)、杆孢菌素A (roridin A) 及胺癸叮 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 去乙酰长春酰胺 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**); 氮烯唑胺 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 双溴丙基哌嗪 (pipobroman); 甲托辛 (gacytosine); 阿糖胞苷 (arabinoside) (「Ara-C」); 硫替派 (thiotepa); 紫杉醇 (taxoids), 例如**TAXOL®**太平洋紫杉醇 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.); **ABRAXANETM**无Cremophor-太平洋紫杉醇的白蛋白设计纳米微粒调配物 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 及**TAXOTERE®**多西他赛 (doxetaxel) (**Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France**); 克罗南布 (chloranbucil); 吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**); 6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲胺蝶呤; 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin) 及卡铂 (carboplatin); 长春花碱 (vinblastine) (**VELBAN®**); 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**); 奥沙利铂 (oxaliplatin); 卢考弗文 (leucovorin); 长春瑞宾 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**); 诺凡特龙 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素; 氨基蝶呤; 伊班膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟胺酸 (difluoromethylornithine) (DMFO); 类视色素类, 诸如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**); 以上任一种治疗剂的医药学上可接受的盐、酸或衍生物; 以及以上两种或两种以上治疗剂的组合, 诸如CHOP (环磷酰胺、阿霉素、长春新碱与泼尼松龙 (prednisolone) 的混合治疗的缩写) 及FOLFOX (奥沙利铂 (oxaliplatin) (ELOXATINTM) 与5-FU及卢考弗文组合治疗方案的缩写)。

[0121] 除非另外界定, 否则本文中所使用的所有技术及科学术语具有与一般熟习本发明所属的技术者通常所理解的意义相同的意义。虽然类似或等效于本文中所描述的彼等方法及材料的任何方法及材料可用于实践或测试本发明中, 但现在描述优选方法及材料。本文特别提及的所有公开案及专利以引用的方式并入本文中用于所有目的, 包括描述及揭示公开案中所报导、可联合本发明使用的化学品、细胞株、载体、动物、仪器、统计学分析及方法。本说明书中所引用的所有参考文献视为此项技术中的技能水平的指示。本文不应解释为承认本发明无权先于先前发明的此类揭示内容。

[0122] 在一个态样中, 本发明是基于如下惊人发现: 阶段特异性胚抗原 (SSEA3及SSEA4) 经某些基团修饰可诱发分别特异性地识别SSEA3及SSEA4的稳定IgG抗体反应。

[0123] 在一些实例中, SSEA3的修饰包含SSEA3的葡萄糖的一或多个位置上的氟、迭氨基

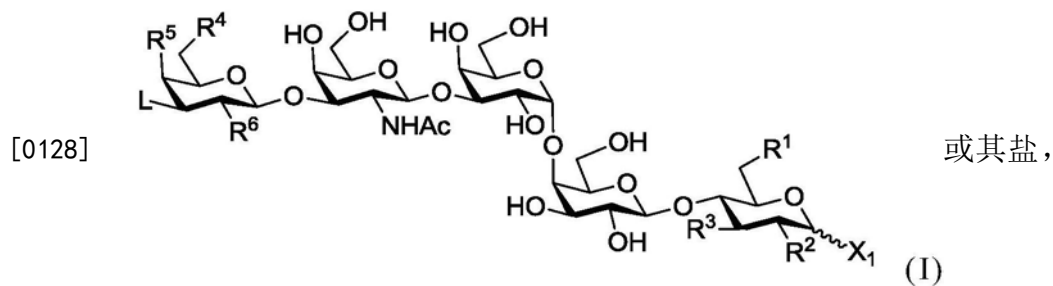
或O-苯基。在一些实例中，SSEA3的修饰包含非还原端半乳糖的一或多个位置上的氟、迭氮基或O-苯基。在一些实例中，SSEA4的修饰包含SSEA4的葡萄糖的一或多个位置上的氟、迭氮基或O-苯基。在一些实例中，SSEA4的修饰包含唾液酸残基的一或多个位置上的氟、迭氮基或O-苯基。

[0124] 在某些态样中，本发明提供在还原端及/或非还原端具有修饰的SSEA3及SSEA4类似物。相较于原生SSEA3及SSEA4，此类SSEA3及SSEA4类似物可诱发更强的免疫反应(例如诱导针对SSEA3及/或SSEA4的IgG抗体)。包含此类非天然聚糖部分的免疫原性组合物所诱导的抗体能够介导针对肿瘤细胞的补体依赖性细胞的细胞毒性。

[0125] 化合物

[0126] 因此，本发明亦展示由经修饰的碳水化合物抗原(SSEA3及SSEA4)组成的新颖化合物、包含此类化合物的聚糖结合物，及其免疫原性组合物及疫苗。

[0127] 在一个态样中，本发明提供式(I)化合物：



[0129] 其中：

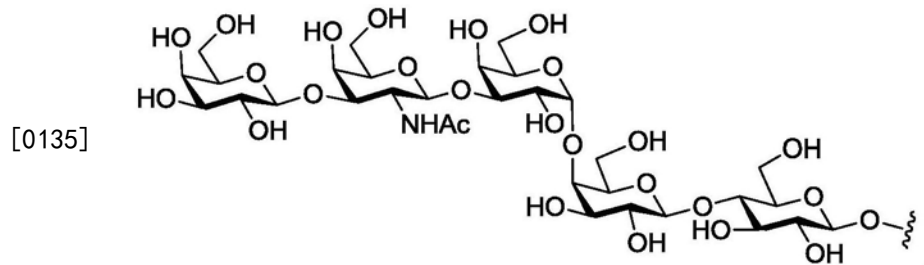
[0130]  $X_1$ 为-OR或-SR，其中R为氢、氧或硫保护基、视情况经取代的C1-10烷基、视情况经取代的芳基、视情况经取代的酰基或视情况经取代的酰亚氨基；

[0131]  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 及L的各实例独立地选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的芳基、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ；

[0132]  $R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基；

[0133]  $R^B$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基；及

[0134] 其限制条件为化合物不具有下式：



[0136] 在某些实施例中， $X_1$ 呈 $\alpha$ 组态。在某些实施例中， $X_1$ 呈 $\beta$ 组态。

[0137] 在一些实施例中， $X_1$ 为 $-OR^A$ 。在一些实施例中， $X_1$ 为 $-OH$ 。在一些实施例中， $X_1$ 为 $-O-$ (保护基)。在一些实施例中， $X_1$ 为 $-OR^A$ ，其中 $R^A$ 为未经取代的C1-10烷基。在一些实施例中， $X_1$

为-OR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的C1-10烷基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-OR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为未经取代的芳基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-OR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的芳基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-OR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为未经取代的酰基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-OR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的酰基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-OR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为未经取代的酰亚氨基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-OR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的酰亚氨基。

[0138] 在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SH。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-S-(保护基)。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为未经取代的C1-10烷基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的C1-10烷基。在某些实施例中,X<sub>1</sub>为-SCH<sub>3</sub>。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为未经取代的芳基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的芳基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为未经取代的酰基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的酰基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为未经取代的酰亚氨基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为-SR<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>为经取代的酰亚氨基。

[0139] 在一些实施例中,X<sub>1</sub>为C1-10烷氧基。在一些实施例中,X<sub>1</sub>为C1-3烷氧基。

[0140] 在一些实施例中,X<sub>1</sub>选自由以下组成的群:α-硫基甲基、β-硫基甲基、α-硫基甲基苯基、β-硫基甲基苯基、α-第三丁基二苯基硅烷基氧基、β-第三丁基二苯基硅烷基氧基及α-甲氧基。

[0141] 在一些实施例中,R<sup>1</sup>为-N<sub>3</sub>或-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-N<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-NH<sub>2</sub>。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-NHRW,其中RW为氮保护基。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW为氮保护基。在某些实施例中,R<sup>1</sup>选自由以下组成的群:-N<sub>3</sub>、-NH(Cbz)、-NH(Boc)、-NH(Fmoc)、-NHC(O)CCl<sub>3</sub>、-NHC(O)CH<sub>3</sub>及-N(C(O)CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-NH(Cbz)。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-NH(Fmoc)。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-NHC(O)CCl<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-NHC(O)CH<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>1</sup>为-N(C(O)CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0142] 在一些实施例中,R<sup>2</sup>为-N<sub>3</sub>或-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-N<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-NH<sub>2</sub>。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-NHRW,其中RW为氮保护基。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW为氮保护基。在某些实施例中,R<sup>2</sup>选自由以下组成的群:-N<sub>3</sub>、-NH(Cbz)、-NH(Boc)、-NH(Fmoc)、-NHC(O)CCl<sub>3</sub>、-NHC(O)CH<sub>3</sub>及-N(C(O)CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-NH(Cbz)。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-NH(Fmoc)。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-NHC(O)CCl<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-NHC(O)CH<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>2</sup>为-N(C(O)CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0143] 在一些实施例中,R<sup>3</sup>为-N<sub>3</sub>或-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-N<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-NH<sub>2</sub>。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-NHRW,其中RW为氮保护基。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW为氮保护基。在某些实施例中,R<sup>3</sup>选自由以下组成的群:-N<sub>3</sub>、-NH(Cbz)、-NH(Boc)、-NH(Fmoc)、-NHC(O)CCl<sub>3</sub>、-NHC(O)CH<sub>3</sub>及-N(C(O)CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-NH(Cbz)。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-NH(Fmoc)。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-NHC(O)CCl<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-NHC(O)CH<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>3</sup>为-N(C(O)CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0144] 在一些实施例中,R<sup>4</sup>为-N<sub>3</sub>或-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,R<sup>4</sup>为-N<sub>3</sub>。在某些实施例中,R<sup>4</sup>为-N(RW)<sub>2</sub>,其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些

实施例中,  $R^4$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^4$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0145] 在一些实施例中,  $R^5$  为  $-N_3$  或  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^5$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0146] 在一些实施例中,  $R^6$  为  $-N_3$  或  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^6$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0147] 在一些实施例中,  $R^1$ 、 $R^2$  及  $R^3$  相同。在一些实施例中,  $R^1$ 、 $R^2$  及  $R^3$  为  $-OH$ 。在一些实施例中,  $R^4$ 、 $R^5$  及  $R^6$  相同。在一些实施例中,  $R^4$ 、 $R^5$  及  $R^6$  为  $-OH$ 。

[0148] 在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$ 。

[0149] 在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$  且  $R^1$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$ ,  $R^1$  为  $-N_3$ , 且  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  及  $R^6$  的各实例为  $-OH$ 。

[0150] 在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$  且  $R^2$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$ ,  $R^2$  为  $-N_3$  且  $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  及  $R^6$  的各实例为  $-OH$ 。

[0151] 在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$  且  $R^3$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$ ,  $R^3$  为  $-N_3$ , 且  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  及  $R^6$  的各实例为  $-OH$ 。

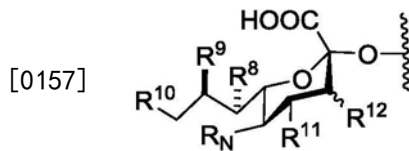
[0152] 在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$  且  $R^4$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$ ,  $R^4$  为  $-N_3$ , 且  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$  及  $R^6$  的各实例为  $-OH$ 。

[0153] 在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$  且  $R^5$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$ ,  $R^5$  为  $-N_3$ , 且  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  及  $R^6$  的各实例为  $-OH$ 。

[0154] 在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$  且  $R^6$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $L$  为  $-OH$ ,  $R^6$  为  $-N_3$ , 且  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  及  $R^5$  的各实例为  $-OH$ 。

[0155] 在某些实施例中,  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$  及  $L$  的各实例为  $-F$ 。在某些实施例中,  $R^1$  为  $-F$ 。在某些实施例中,  $R^2$  为  $-F$ 。在某些实施例中,  $R^3$  为  $-F$ 。在某些实施例中,  $R^4$  为  $-F$ 。在某些实施例中,  $R^5$  为  $-F$ 。在某些实施例中,  $R^6$  为  $-F$ 。在某些实施例中,  $L$  为  $-F$ 。

[0156] 在某些实施例中,  $L$  具有以下结构:



[0158] 其中：

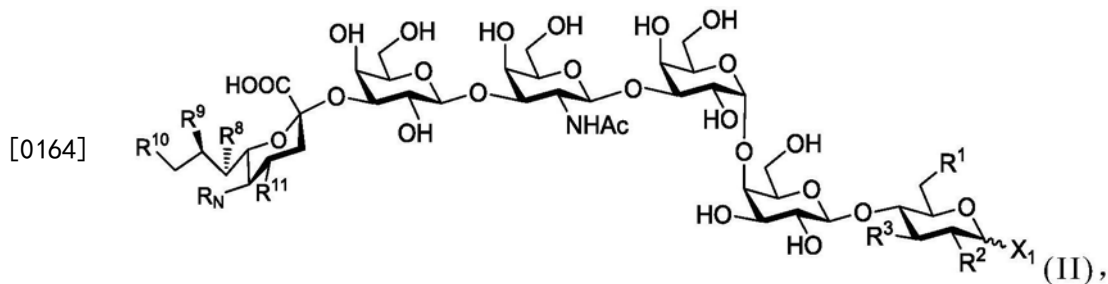
[0159]  $R^8, R^9, R^{10}$ 及 $R^{11}$ 的各实例独立地选自氢、卤素、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的芳基、 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ；

[0160]  $R_N$ 选自 $-N_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ；

[0161]  $R^A$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基；及

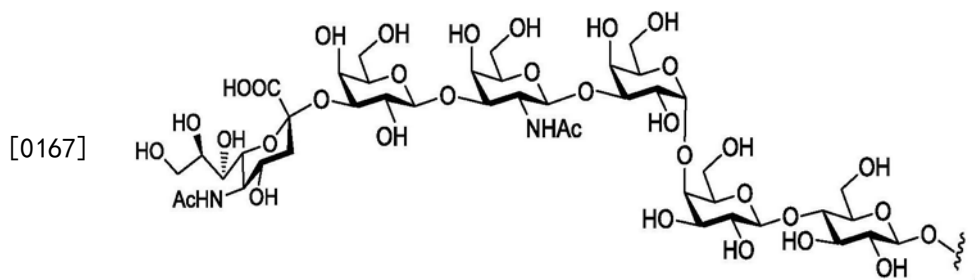
[0162]  $R^B$ 的各实例独立地选自氢、视情况经取代的烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的杂环基及视情况经取代的芳基。

[0163] 在一些实施例中，化合物具有式 (II)



[0165] 其中： $R^1, R^2, R^3, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}$ 及 $R_N$ 及 $X_1$ 如本文所述，及

[0166] 其限制条件为化合物不具有下式：



[0168] 在一些实施例中， $R^8$ 为 $-N_3$ 或 $-N(RW)_2$ ，其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-N_3$ 。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-N(RW)_2$ ，其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-NH_2$ 。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-NHRW$ ，其中RW为氮保护基。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-N(RW)_2$ ，其中各RW为氮保护基。在某些实施例中， $R^8$ 选自由以下组成的群： $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$ 及 $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中， $R^8$ 为 $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0169] 在一些实施例中， $R^9$ 为 $-N_3$ 或 $-N(RW)_2$ ，其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中， $R^9$ 为 $-N_3$ 。在某些实施例中， $R^9$ 为 $-N(RW)_2$ ，其中各RW独立地为氢或氮保护基。在某些

实施例中,  $R^9$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R^9$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^9$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^9$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R^9$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R^9$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R^9$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R^9$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R^9$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0170] 在一些实施例中,  $R^{10}$  为  $-N_3$  或  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^{10}$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R^{10}$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0171] 在一些实施例中,  $R^{11}$  为  $-N_3$  或  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^{11}$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R^{11}$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0172] 在一些实施例中,  $R^{12}$  为  $-N_3$  或  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R^{12}$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R^{12}$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

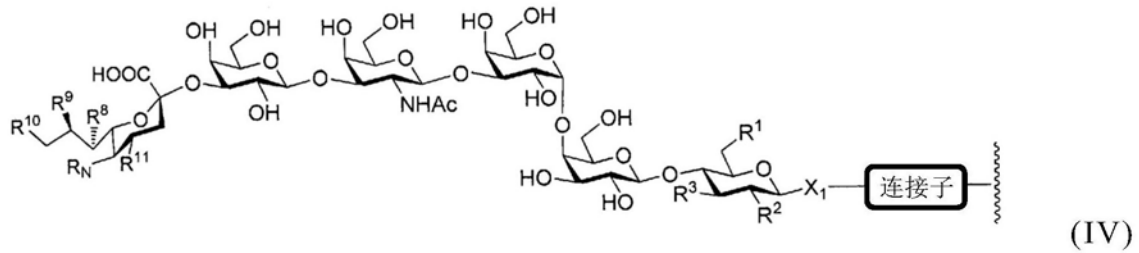
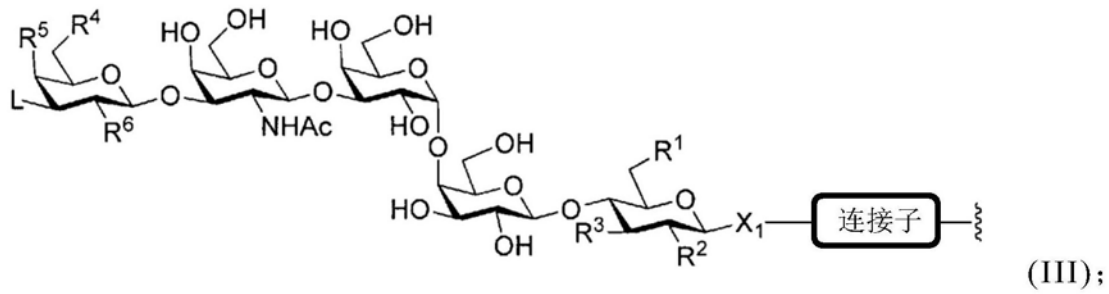
[0173] 在一些实施例中,  $R_N$  为  $-N_3$  或  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-N_3$ 。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  独立地为氢或氮保护基。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-NH_2$ 。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-NHRW$ , 其中  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-N(RW)_2$ , 其中各  $RW$  为氮保护基。在某些实施例中,  $R_N$  选自由以下组成的群:  $-N_3$ 、 $-NH(Cbz)$ 、 $-NH(Boc)$ 、 $-NH(Fmoc)$ 、 $-NHC(O)CCl_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$  及  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-NH(Cbz)$ 。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-NH(Fmoc)$ 。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-NHC(O)CCl_3$ 。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-NHC(O)CH_3$ 。在某些实施例中,  $R_N$  为  $-N(C(O)CH_3)_2$ 。

[0174] 免疫原性组合物

[0175] 在另一态样中, 本发明提供一种免疫原性组合物, 包含 (a) 包括载剂及一或多种聚糖的聚糖结合物, 及视情况存在的 (b) 佐剂,

[0176] 其中: 一或多种聚糖中的每一者经由连接符与载剂结合, 其具有式 (III) 或 (IV):

[0177]



[0178] 其中 $X_1$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $L$ 及 $R_N$ 如本文所述。

[0179] 在某些实施例中,连接符为杂双官能连接符或均双官能连接符。

[0180] 在某些实施例中,连接符为均双官能对硝基苯基连接符。

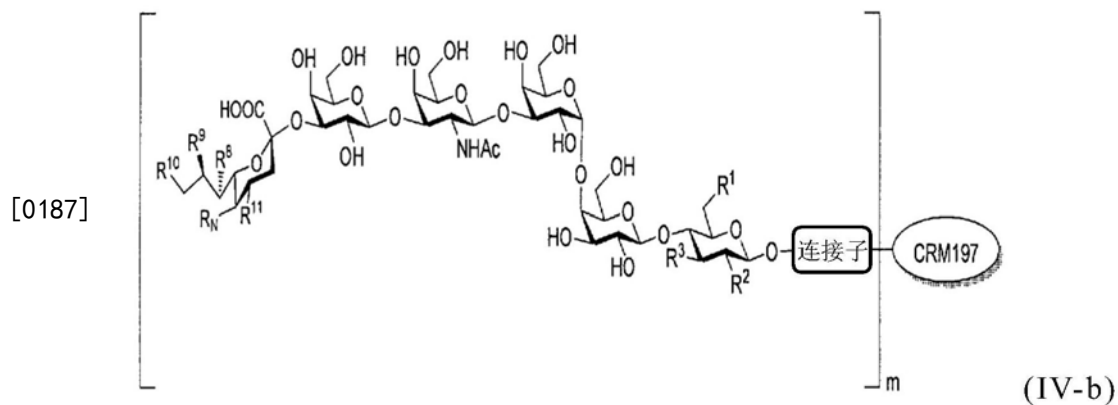
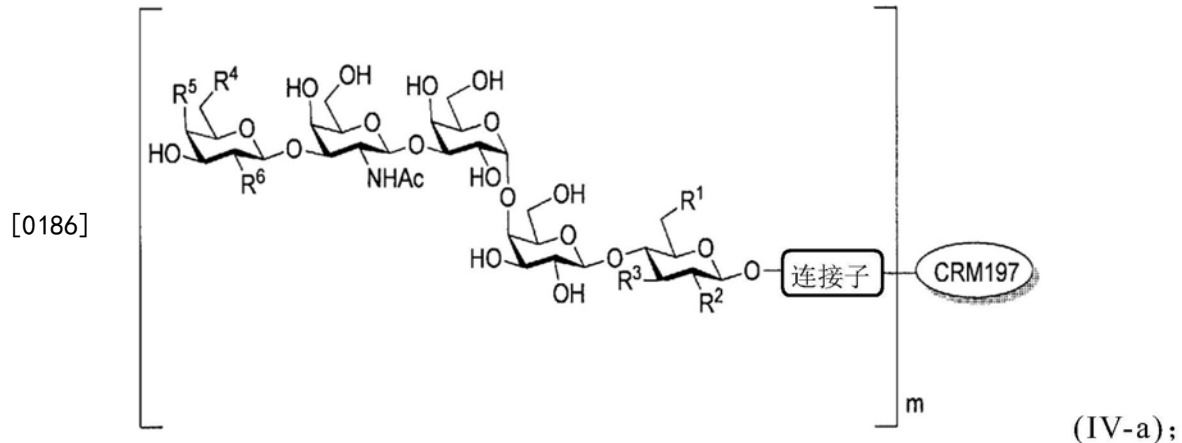
[0181] 在某些实施例中,连接符包括至少一个硫原子、羧酸酯基团、酰氨基团、氨基甲酸酯基团、碳酸酯基团、硫代氨基甲酸酯基团、硫代碳酸酯基团、硫醚基团、顺丁烯二酰亚氨基团、*N*-羟基顺丁烯二酰亚氨基团,或其任何组合。

[0182] 在某些实施例中,连接符为 $-L^1-L^2-$ ,其中 $L^1$ 为一键、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NRL1a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NRL1aC(=O)-$ 、 $-NRL1aC(=O)O-$ 、 $-C(=O)NRL1a-$ 、 $-OC(=O)NRL1a-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-NRL1aC(=S)-$ 、 $-C(=S)NRL1a-$ 、反- $CRL1b=CRL1b-$ 、顺- $CRL1b=CRL1b-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-OC(RL1b)_2-$ 、 $-C(RL1b)_2O-$ 、 $-NRL1aC(RL1b)_2-$ 、 $-C(RL1b)_2NRL1a-$ 、 $-SC(RL1b)_2-$ 、 $-C(RL1b)_2S-$ 、 $-S(=O)_2O-$ 、 $-OS(=O)_2-$ 、 $-S(=O)_2NRL1a-$ 、 $-NRL1aS(=O)_2-$ ;或视情况经取代的C1-20烃链,视情况其中所述烃链的一或多个碳单元经以下置换: $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NRL1a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NRL1aC(=O)-$ 、 $-NRL1aC(=O)O-$ 、 $-C(=O)NRL1a-$ 、 $-OC(=O)NRL1a-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-NRL1aC(=S)-$ 、 $-C(=S)NRL1a-$ 、反- $CRL1b=CRL1b-$ 、顺- $CRL1b=CRL1b-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-S(=O)_2O-$ 、 $-OS(=O)_2-$ 、 $-S(=O)_2NRL1a-$ 或 $-NRL1aS(=O)_2-$ ,其中 $RL1a$ 为氢、视情况经取代的C1-6烷基或氮保护基,或 $RL1a$ 与相邻碳原子连接而形成视情况经取代的杂环,且其中每次出现的 $RL1b$ 独立地选自由以下组成的群:氢、卤素、视情况经取代的C1-10烷基、视情况经取代的烯基、视情况经取代的炔基、视情况经取代的碳环基、视情况经取代的杂环基、视情况经取代的芳基及视情况经取代的杂芳基,或 $RL1b$ 与相邻碳或氮或氧原子连接而形成视情况经取代的碳环或杂环,或两个 $RL1b$ 基团连接而形成视情况经取代的碳环或视情况经取代的杂环;且 $L^2$ 为能够使载剂与 $L^1$ 交联的交联试剂所衍生的部分。

[0183] 载剂可为蛋白质、脂质、脂质化蛋白质、病毒、肽,或糖肽的树枝状聚合物。在某些实施例中,载剂为包含T细胞抗原决定基的肽。

[0184] 可用于本发明中的载剂蛋白质实例为破伤风类毒素 (TT)、白喉类毒素 (DT)、白喉毒素交叉反应物质197 (CRM197)、TT的片段C、匙孔螺血氰蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA)、蛋白质D、外膜蛋白质 (OMP) 及肺炎链球菌溶血素、白喉毒素交叉反应物质197 (CRM197) 或其他DT点突变体, 诸如CRM176、CRM228、CRM45 (Uchida等人, J.Biol.Chem.218;3838-3844, 1973); CRM9、CRM45、CRM102、CRM103及CRM107, 以及此项技术中描述的其他突变。

[0185] 在某些实施例中, 聚糖结合物具有式 (IV-a) 或 (IV-b) :



[0188] 其中m为整数1至40(包括端点)。

[0189] 在某些实施例中, m为整数1至30(包括端点)。如本文一般性定义, m为整数1至20(包括端点)。在某些实施例中, m为1。在某些实施例中, m为2。在某些实施例中, m为4。在某些实施例中, m为6。在某些实施例中, m为8。在某些实施例中, m为10。在某些实施例中, m为15。在某些实施例中, m为20。在某些实施例中, m为30。在某些实施例中, m为40。

[0190] 在另一态样中, 本发明提供包含如本文所述的聚糖结合物中的至少两者的聚糖结合物混合物。在某些实施例中, 聚糖混合物中的w平均值为约1.0至约40.0。在某些实施例中, 聚糖混合物中的w平均值为约1.0至10.0。在某些实施例中, 聚糖混合物中的w平均值为约5.7、4.9、2.9、2.8或3.1。在某些实施例中, 聚糖混合物中的w平均值为约4.9、2.9、2.8或3.1。

[0191] 在某些实施例中, 本文所述的免疫原性组合物包括免疫学上有效量的本发明聚糖结合物。在某些实施例中, 免疫原性组合物包括医药学上有效量的本发明聚糖结合物。

[0192] 本发明化合物可使用本文所述的程序合成且亦参见US20140051127。

[0193] 本发明的免疫原性结合物可包括相同或不同SSEA3及/或SSEA4类似物及/或相关

衍生物的一或多种分子(例如1-40、1-20、1-25、1-30种)。用于产生聚醚结合物的其他描述及相关程序描述如下。亦参见美国专利第8,268,969号。其内容以引用的方式并入本文中。

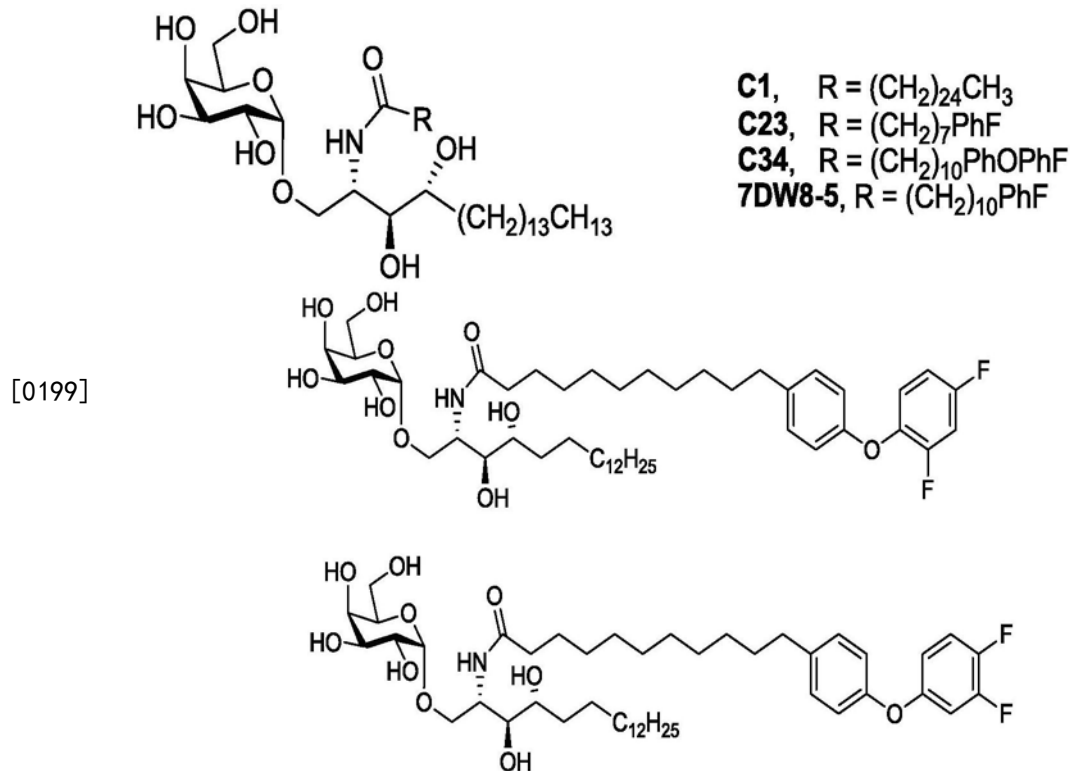
[0194] 在某些实施例中,本发明的免疫原性组合物可包括一或多种佐剂。适合佐剂可包括例如C34、7DW8-5、C17、C23、C-30、 $\alpha$ -半乳糖神经酰胺、Glc-C34、铝盐、角鲨烯、MF59及QS-21)。

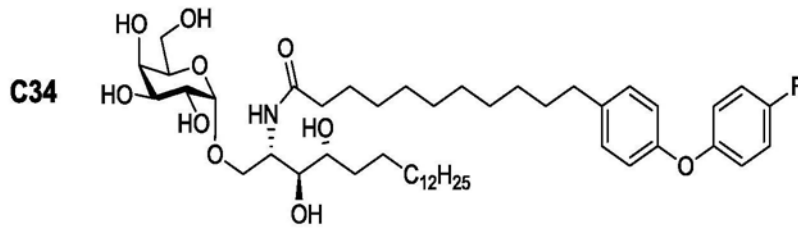
[0195] 如本文所使用,术语「铝佐剂」是指具有免疫佐剂活性的铝盐。此药剂吸附溶液中的蛋白质抗原且使其沉淀;所得沉淀物通过促进接种位点处所形成的疫苗储槽中的抗原缓慢释放来改良疫苗免疫原性。

[0196] 如本文所使用,术语「免疫佐剂」是指结合免疫原使用的增强或调节针对免疫原的免疫反应的物质。本发明的 $\alpha$ -GalCer类似物是用作调节或增强疫苗作用的免疫佐剂,其通过刺激疫苗所投与的患者的免疫系统以对疫苗产生更强烈的反应。在例示性实施例中,使用类似物C34作为佐剂。C34及其他 $\alpha$ -半乳糖神经酰胺类似物的结构及其用作佐剂的用途揭示于美国专利第7,928,077号中。

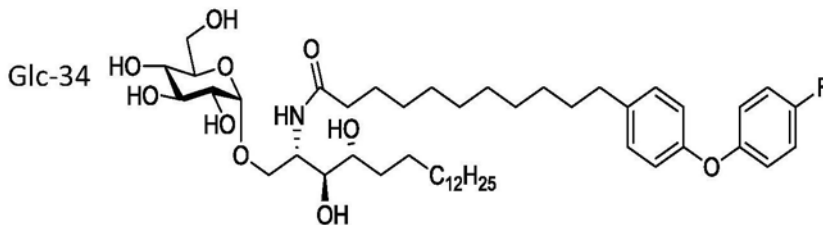
[0197] 如本文所使用,术语「醚脂」是指碳水化合物连接的脂质,其充当细胞识别的标记。

[0198] 醚脂C34、Glc-C34、C23及7DW8-5具有以下结构:





[0200]



[0201] 免疫原性组合物可进一步包括医药学上可接受的赋形剂。在某些实施例中，本文所述的免疫原性组合物包括医药学上有效量的本发明聚醚结合物。

[0202] 在另一态样中，本发明提供包含本文所述的免疫原性组合物及医药学上可接受的赋形剂的癌症疫苗。

[0203] 本发明的癌症疫苗可包括单次剂量或多次剂量的本发明聚醚结合物、其聚醚结合物混合物，或其免疫原性组合物。所提供的癌症疫苗可适用于治疗癌症或降低癌症风险。癌症疫苗亦可包括包装信息，其描述用途或处方信息供个体或健康照护专业人士用。监管机构，诸如美国食品及药物管理局 (U.S. Food and Drug Administration; FDA)，可能需要此类信息。癌症疫苗亦可视情况包括投与化合物或组合物的器件，例如非经肠投药用的注射器。

[0204] 医药调配物

[0205] 免疫组合物是以与剂型兼容的方式且以治疗上具有有效性、保护性及免疫原性的量投与。投药量视所治疗的个体而定，包括例如个体免疫系统合成抗体及必要时产生细胞介导免疫反应的能力。投药所需的活性成分的准确量视从业者判断而定。然而，熟习此项技术者容易确定适合的剂量范围。初始投药及加打剂量的适合方案亦为可变的，但可包括初始投药、随后再投药。疫苗剂量亦可视投药途径而定且根据宿主体型而变。

[0206] 本发明的免疫组合物亦可用于在用于产生抗体的动物中产生可用于癌症治疗与诊断的抗体。用动物 (例如小鼠、兔、山羊、绵羊或马) 产生单株及多株抗体及其片段的方法在此项技术中已熟知。参见例如 Harlow 及 Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 术语「抗体」包括完整免疫球蛋白分子及其片段，诸如 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv (单链抗体) 及 dAb (域抗体; Ward 等人, (1989) *Nature*, 341, 544)。

[0207] 本文所揭示的组合物可与熟习此项技术者经阅读本发明而可鉴别的其他活性剂、载剂、媒剂、赋形剂或助剂一起包括于医药组合物中。

[0208] 医药组合物优选包含至少一种医药学上可接受的载剂。在此类医药组合物中，本文所揭示的组合物形成「活性化合物」，亦称为「活性剂」。如本文所用，语言「医药学上可接受的载剂」包括与投药相容的溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收

延迟剂及其类似物。亦可将补充活性化合物并入组合物中。医药组合物经调配可与其预期的投药途径兼容。投药途径的实例包括非经肠,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(局部)、经黏膜及直肠投药。用于非经肠、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、生理食盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;及张力调节剂,例如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。非经肠制剂可封装于由玻璃或塑料制成的安瓿、抛弃式注射器或多剂量小瓶中。

#### [0209] 临床应用

[0210] 本发明提供适用于治疗个体的增生性疾病的聚糖结合物、免疫原性组合物或疫苗,增生性疾病诸如癌症(例如肺癌、大肠癌、胰脏癌、胆道癌或子宫内膜癌)、良性赘瘤或血管生成。

[0211] 本文所述的免疫原性组合物或疫苗亦可用于在用于产生抗体的人类或动物中产生可用于癌症治疗与诊断的抗体。在一些实施例中,本文所述的免疫原性组合物或疫苗亦可用于引起GloboH、SSEA3及/或SSEA4抗体产生。用动物(例如小鼠、兔、山羊、绵羊或马)产生单株及多株抗体及其片段的方法在此项技术中已熟知。参见例如Harlow及Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。术语「抗体」包括完整免疫球蛋白分子及其片段,诸如Fab、F(ab)<sub>2</sub>、Fv、scFv(单链抗体)及dAb(域抗体;Ward等人, (1989) *Nature*, 341, 544)。

[0212] 提供包含至少一种抗SSEA3/SSEA4/GloboH抗体或至少一种含有编码抗SSEA3/SSEA4/GloboH抗体的序列的聚核苷酸的组合物。在某些实施例中,组合物可为医药组合物。如本文所使用,组合物包含一或多种结合至一或多种SSEA3/SSEA4/GloboH的抗体及/或一或多种含有编码一或多种结合至一或多种SSEA3/SSEA4/GloboH的抗体的序列的聚核苷酸。此等组合物可另外包含此项技术中熟知的适当载剂,诸如医药学上可接受的赋形剂(包括缓冲液)。

[0213] 亦提供经分离的抗体及聚核苷酸。在某些实施例中,经分离的抗体及聚核苷酸为实质上纯的。

[0214] 在一个实施例中,抗SSEA3/SSEA4/GloboH抗体为单株抗体。在另一个实施例中,提供抗SSEA3/SSEA4/GloboH抗体的片段(例如Fab、Fab'-SH及F(ab')<sub>2</sub>片段)。此等抗体片段可通过诸如酶促消化的传统方式产生,或可通过重组技术产生。此等抗体片段可为嵌合抗体、人化抗体或人类抗体。此等片段可用于达成下文所述的诊断及治疗目的。

#### [0215] 医药调配物

[0216] 包含本发明医药剂的治疗性调配物通过将具有所要纯度的抗体与视情况存在的生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(Remington's *Pharmaceutical Sciences*第16版, Osol, A. 编(1980))混合、以水溶液、冻干型或其他干燥型调配物的形式制备。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量及浓度下对接受者无毒性,且包括缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、组胺酸及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸及甲硫胺酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵、氯化六羟季铵、氯化苯甲羟铵、苜索氯铵、苯酚、丁醇或苯甲醇、对羟基苯甲酸烷酯(诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、

环己醇、3-戊醇及间甲酚)；低分子量(小于约10个残基)多肽；蛋白质，诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯啉酮；氨基酸，诸如甘氨酸、麸酰胺酸、天冬酰胺酸、组胺酸、精胺酸或离胺酸；单糖、双糖及其他糖，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如EDTA；糖，诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐抗衡离子，诸如钠；金属络合物(例如锌-蛋白络合物)；及/或非离子表面活性剂，诸如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0217] 本文中的调配物亦可含有超过一种为治疗特定适应症所需的活性化合物，包括(但不限于)具有彼此无不利影响的补充活性的彼等物。这些分子适合以可有效地达成预期目的的量组合存在。

[0218] 举例而言，活性成分亦可捕集于微胶囊中，例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微胶囊，例如分别为羟基甲基纤维素或明胶微胶囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊；胶状药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒及纳米胶囊)或巨乳液中。这些技术揭示于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980)中。

[0219] 欲用于活体内投药的调配物必须无菌。其可容易通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0220] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适当实例包括含有本发明免疫球蛋白的固体疏水性聚合物的半渗透性基质，这些基质为成形物品的形式，例如薄膜或微胶囊。持续释放型基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟基乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙醇醇))、聚乳酸交酯(美国专利第3,773,919号)、L-麸胺酸与 $\gamma$ 乙基-L-麸胺酸酯的共聚物、非降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(诸如LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(由乳酸-乙醇酸共聚物与亮丙瑞林乙酸盐组成的可注射微球体))及聚D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物(诸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸)使分子能够释放100天，但某些水凝胶释放蛋白质的时期较短。当囊封抗体长时间保留于体内时，其可能因暴露于37°C的水分而变性或聚集，导致生物活性丧失且可能使免疫原性发生变化。视所涉及的机制而定，可设计合理策略以达成稳定化。举例而言，若发现聚集机制为经由硫醇-二硫化物互换形成分子间S-S键，则可通过修饰硫氢基残基、自酸性溶液冻干、控制水分含量、使用适当添加剂及开发特定聚合物基质组合物来达成稳定。

[0221] 本发明的医药组合物可用于治疗、抑制、延迟进展、预防/延迟复发、改善或预防与SSEA3/SSEA4/G1oboH及SSEA3/SSEA4/G1oboH相关蛋白质的异常表达及/或活性有关的疾病、病症或病状，包括(但不限于)癌症、肌肉病症、泛素路径相关遗传病症、免疫/发炎病症、神经病症，及其他泛素路径相关病症。

[0222] 在一个态样中，本发明的阻断性抗体对SSEA3/SSEA4/G1oboH具有特异性。

[0223] 本发明的医药组合物在治疗中可单独或与其他组合物组合使用。举例而言，本发明的抗体可与其他抗体及/或佐剂/治疗剂(例如类固醇)共投药。举例而言，本发明抗体在治疗方案中可与消炎剂及/或防腐剂组合，例如治疗本文所述的任何疾病，包括癌症、肌肉病症、泛素路径相关遗传病症、免疫/发炎病症、神经病症及其他泛素路径相关病症。以上所说明的这些组合疗法包括组合投与(其中两种或两种以上药剂包括于同一或分开的调配物中)，及分开投与，在此情况下，本发明抗体的投与可在佐剂疗法投与之前及/或之后进行。

[0224] 本发明的医药组合物(及辅助治疗剂)可通过任一适当方式(包括非经肠、皮下、腹膜内、肺内及鼻内)投药，且若需要局部治疗，则为病灶内投药。非经肠输液包括肌肉内、静

脉内、动脉内、腹膜内或皮下投药。另外,医药组合物宜通过脉动输注投与,尤其是在抗体剂量下降的情况下。可通过任何适当途径(例如注射,诸如静脉内或皮下注射)给药,此部分地视投药的短期或长期性而定。

[0225] 在抗体制备及投药时可考虑本发明抗体的结合标靶的位置。当结合标靶为细胞内分子时,本发明的某些实施例提供可引入结合标靶所位于的细胞中的抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中,本发明的抗体可作为胞内抗体表达于细胞内。如本文所使用的术语「胞内抗体」是指细胞内表达且能够选择性结合至靶分子的抗体或其抗原结合部分,如以下文献中所述:Marasco, Gene Therapy 4:11-15 (1997); Kontermann, Methods 34:163-170 (2004); 美国专利第6,004,940号及第6,329,173号;美国专利申请公开案第2003/0104402号及PCT公开案第W02003/077945号。胞内抗体的细胞内表达是通过将编码所需抗体或其抗原结合部分的核酸(缺乏野生型前导序列及通常与编码抗体或抗原结合片段的基因有关的分泌信号)引入靶细胞中来实现。可使用任一种将核酸引入细胞内的标准方法,包括(但不限于)微量注射、弹道注射、电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质体及用携有所关注核酸的逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒及牛痘载体转染。

[0226] 本发明的医药组合物以符合良好医学实务的方式调配、给药且投与。在此背景下考虑的因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个别患者的临床病状、病症的起因、药剂的递送位点、投药方法、投药时程及从医者已知的其他因素。抗体无需但视情况与一或多种当前用于预防或治疗所述病症的药剂一起调配。此等其他药剂的有效量视存在于调配物中的本发明抗体的量、病症或治疗的类型及上文所讨论的其他因素而定。这些药剂通常以相同剂量且利用本文中所述的投药途径使用,或以本文中所述剂量的约1%至99%使用,或以任意剂量且凭经验/临床上确定为适当的任何途径使用。

[0227] 预防或治疗疾病时,本发明医药组合物(单独使用或与诸如化学治疗剂的其他药剂组合使用时)的适当剂量视治疗的疾病类型、抗体类型、疾病严重程度及病程、抗体投药是否为预防性或治疗性目的、先前疗法、患者临床史及对抗体的反应及主诊医师的判断而定。抗体适于一次性或经一系列治疗投与患者。视疾病类型及严重程度而定,约1 $\mu$ g/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)抗体可为投与患者的初始候选剂量,无论例如通过一或多次分开投药或通过连续输注。一种典型的日剂量可在约1 $\mu$ g/kg至100mg/kg或超过100mg/kg的范围内,此视上文所提及的因素而定。对于数天或更长时间的重复投药而言,视病状而定通常可持续治疗,直至疾病症状出现所要抑制。抗体的一种例示性剂量在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此,可将约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg的一或多种剂量(或其任何组合)投与患者。这些剂量可间歇地投与,例如每周或每三周(例如使得患者接受约二至约二十次或例如约六次剂量的抗体)。最初可投与较高负荷剂量,随后可投与一或多次较低剂量。例示性给药方案包含投与约4mg/kg初始负荷剂量的抗体,随后投与约2mg/kg的每周维持剂量的抗体。然而,可使用其他给药方案。此疗法的进程易于通过公知技术及分析监测。

[0228] 制品

[0229] 在本发明的另一态样中,提供一种含有可用于治疗、预防及/或诊断上述病症的物质的制品。所述制品包含容器及附于或系于所述容器的标签或药品说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由诸如玻璃或塑料的各种材料形成。所述容器容纳单

独组合物或与另一种有效治疗、预防及/或诊断病状的组合物组合的组合物,且所述容器可具有无菌进出口(例如所述容器可为静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针穿孔的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂为本发明的抗体。卷标或药品说明书指示所述组合物用于治疗所选病状。此外,所述制品可包含(a)内含组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;及(b)内含组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一种细胞毒性剂或治疗剂。本发明的实施例中的制品可另外包含药品说明书,所述药品说明书指示组合物可用于治疗特定病状。或者或另外,所述制品可进一步包含一包含医药学上可接受的缓冲液(诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格尔氏溶液(Ringer's solution)及葡萄糖溶液)的第二(或第三)容器。其可另外包括就商业及使用观点而言所需的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针及注射器。

[0230] 以下为本发明的方法及组合物的实例。应了解,考虑到上文提供的一般说明,可实施各种其他实施例。

[0231] 在一些实施例中,所提供的聚糖结合物、免疫原性组合物或疫苗适用于治疗或诊断癌症,包括(但不限于)听觉神经瘤、腺癌、肾上腺癌、肛门癌、血管肉瘤(angiosarcoma)(例如淋巴管肉瘤、淋巴内皮肉瘤、血管肉瘤(hemangiosarcoma))、附件癌、良性单株球蛋白症、胆道癌(例如胆管癌)、膀胱癌、乳癌(例如乳房腺癌、乳房乳头状癌瘤、乳腺癌、乳房髓质癌)、脑癌(例如脑膜瘤;神经胶质瘤,例如星形细胞瘤、寡树突神经胶质瘤;神经管胚细胞瘤)、支气管癌、类癌瘤、子宫颈癌(例如子宫颈腺癌)、绒膜癌、脊索瘤、颅咽管瘤、结肠直肠癌(例如结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌腺癌)、上皮癌、室管膜瘤、内皮肉瘤(例如卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、多发性特发性出血性肉瘤)、子宫内膜癌(例如子宫癌、子宫肉瘤)、食道癌(例如食道腺癌、巴雷特氏腺癌(Barrett's adenocarcinoma))、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)、眼癌(例如眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤)、家族性嗜伊红血球增多症、胆囊癌、胃癌(例如胃腺癌)、胃肠基质肿瘤(GIST)、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、口腔癌(例如口腔鳞状细胞癌(OSCC)、咽喉癌(例如喉癌、咽癌、鼻咽癌、口咽癌))、造血癌症(例如白血病,诸如急性淋巴细胞性白血病(ALL)(例如B细胞ALL、T细胞ALL)、急性骨髓细胞性白血病(AML)(例如B细胞AML、T细胞AML)、慢性骨髓细胞性白血病(CML)(例如B细胞CML、T细胞CML)及慢性淋巴细胞性白血病(CLL)(例如B细胞CLL、T细胞CLL);淋巴瘤,诸如霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma;HL)(例如B细胞HL、T细胞HL)及非霍奇金淋巴瘤(NHL)(例如B细胞NHL,诸如弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)(例如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL))、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区B细胞淋巴瘤(例如黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、淋巴浆细胞淋巴瘤(亦即「瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia)」)、毛细胞白血病(HCL)、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前驱B淋巴母细胞性淋巴瘤及原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;及T细胞NHL,诸如前驱T淋巴母细胞性淋巴瘤/白血病、周边T细胞淋巴瘤(PTCL)(例如皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)(例如蕈样真菌病、塞扎莱症候群(Sezary syndrome))、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、结外天然杀手T细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、皮下脂层炎样T细胞淋巴瘤、多形性大细胞淋巴瘤);一或多种上述白血病/淋巴瘤的混合;及多发性骨髓瘤(MM)、重链疾病(例如 $\alpha$ 链疾病、 $\gamma$ 链疾病、 $\mu$ 链疾病)、血管母细胞瘤、发炎性肌纤维母细胞

性肿瘤、免疫细胞性淀粉样变性、肾脏癌症(例如肾母细胞瘤,亦称为威尔姆斯氏肿瘤(Wilms'tumor)、肾细胞癌)、肝癌(例如肝细胞癌(HCC)、恶性肝癌)、肺癌(例如支气管癌、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌)、平滑肌肉瘤(LMS)、肥大细胞增多症(例如全身性肥大细胞增多症)、骨髓发育不良症候群(MDS)、间皮瘤、骨髓增生性病症(MPD)(例如真性红血球增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)、原因不明性骨髓细胞化生(AMM)(亦称为骨髓纤维化(MF)、慢性特发性骨髓纤维化、慢性骨髓细胞性白血病(CML)、慢性嗜中性白血病(CNL)、嗜伊红白血球增多症候群(HES))、神经母细胞瘤、神经纤维瘤(例如1型或2型神经纤维瘤(NF)、许旺氏瘤病(schwannomatosis))、神经内分泌癌症(例如胃肠胰神经内分泌肿瘤(GEP-NET)、类癌瘤)、骨肉瘤、卵巢癌(例如囊腺癌、卵巢胚胎癌、卵巢腺癌)、乳头状腺癌、胰脏癌(例如胰腺癌、管内乳头状黏液性赘瘤(IPMN)、胰岛细胞瘤)、阴茎癌(例如阴茎及阴囊的佩吉特氏病疾病(Paget's disease)、松果体瘤、原始神经外胚层瘤(PNT)、前列腺癌(例如前列腺腺癌)、直肠癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌(例如鳞状细胞癌(SCC)、角化棘皮瘤(KA)、黑色素瘤、基底细胞癌(BCC))、小肠癌(例如附件癌)、软组织肉瘤(例如恶性纤维组织细胞瘤(MFH)、脂肪肉瘤、恶性周边神经鞘肿瘤(MPNST)、软骨肉瘤、纤维肉瘤、黏液肉瘤)、皮脂腺癌瘤、汗腺癌、滑膜瘤、睾丸癌(例如精原细胞瘤、睾丸胚胎癌)、甲状腺癌(例如甲状腺的乳头状癌、乳头状甲状腺癌(PTC)、髓质甲状腺癌)、尿道癌、阴道癌及外阴癌(例如外阴的佩吉特氏病)。在某些实施例中,所提供的聚糖结合物、免疫原性组合物或疫苗适用于治疗脑癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、胰脏癌、结肠癌、肾脏癌、骨癌、皮肤癌、子宫颈癌、卵巢癌及前列腺癌。

[0232] 为了执行本文所述的治疗方法,可经由如上文所述的适合途径将有效量的本文所述任一种聚糖结合物或免疫原性组合物或疫苗投与需要治疗的个体。个体,诸如人类个体,可为患有癌症、怀疑患有癌症或易患癌症的患者。投与个体的聚糖结合物或免疫原性组合物的量可有效诱发特异性针对结合物或组合物中的聚糖部分的免疫反应。在一些实施例中,聚糖结合物或免疫原性组合物的量足以诱发抑制癌症生长及/或减小肿瘤块的免疫反应。在其他实施例中,聚糖结合物或免疫原性组合物的量可有效延迟目标癌症的发作或降低出现癌症的风险。为达成有效量必需的所提供聚糖结合物、免疫原性组合物或疫苗的确切量将因个体而异,此视例如以下而定:个体的物种、年龄及一般状况、副作用或病症的严重程度、特定化合物的身分、投药模式及类似因素。所要剂量的递送可为一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每隔两天、每周、每两周、每三周或每四周。在某些实施例中,所要剂量可使用多次投药递送(例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或超过十四次投药)。

[0233] 在某些实施例中,所提供的聚糖结合物、免疫原性组合物或疫苗向70kg成年人投与一或多次的有效量可包含每个单位剂型约0.0001mg至约3000mg、约0.0001mg至约2000mg、约0.0001mg至约1000mg、约0.001mg至约1000mg、约0.01mg至约1000mg、约0.1mg至约1000mg、约1mg至约1000mg、约1mg至约100mg、约10mg至约1000mg,或约100mg至约1000mg化合物。

[0234] 在某些实施例中,所提供的聚糖结合物、免疫原性组合物或疫苗可经口或非经肠,以足以递送约每天每公斤个体体重0.001mg至约100mg、约0.01mg至约50mg、优选约0.1mg至约40mg、优选约0.5mg至约30mg、约0.01mg至约10mg、约0.1mg至约10mg及更佳约1mg至约

25mg的剂量水平,一天投与一或多次,以获得所要治疗作用。

[0235] 应了解如本文所述的剂量范围提供关于向成人投与所提供的聚醚结合物、免疫原性组合物或疫苗的指南。投与例如儿童或青少年的量可由从医者或熟习此项技术者确定且可低于投与成人的量或与投与成人的量相同。

[0236] 亦应了解,所提供的聚醚结合物、免疫原性组合物或疫苗可与一或多种其他治疗活性剂组合投与。所提供的聚醚结合物、免疫原性组合物或疫苗可与改良其生物可用性、减少及/或修改其代谢、抑制其排泄及/或修改其在体内的分布的其他治疗活性剂组合投与。亦应了解,所用疗法可针对相同病症达成所要作用,且/或其可达成不同作用。

[0237] 所提供的聚醚结合物、免疫原性组合物或疫苗可与一或多种其他治疗活性剂同时、在其的后或的后投与。一般而言,各药剂将依根据所述药剂所确定的剂量及/或时程来投与。另外应了解,此组合中所用的其他治疗活性剂可在单一组合物中一起投与或在不同组合物中分开投与。疗法中使用的特定组合将考虑本发明化合物与其他治疗活性剂的兼容性及/或欲达成的所要治疗作用。一般而言,预期组合中所用的其他治疗活性剂的用量不超过其个别使用时的量。在一些实施例中,组合用量将低于个别使用量。

[0238] 在某些实施例中,所提供的聚醚结合物、免疫原性组合物或疫苗与一或多种本文所述其他医药剂组合投与。在某些实施例中,其他医药剂为抗癌剂。抗癌剂涵盖生物治疗抗癌剂以及化学治疗剂。

[0239] 例示性生物治疗抗癌剂包括(但不限于)干扰素、细胞激素(例如肿瘤坏死因子、干扰素 $\alpha$ 、干扰素 $\gamma$ )、疫苗、造血生长因子、单株血清疗法、免疫刺激剂及/或免疫调节剂(例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-6或IL-12)、免疫细胞生长因子(例如GM-CSF)及抗体(例如赫赛汀(Herceptin)(曲妥珠单抗(trastuzumab))、T-DM1、阿瓦斯汀(AVASTIN)(贝伐单抗(bevacizumab))、艾必妥(ERBITUX)(西妥昔单抗(cetuximab))、维克替比(Vectibix)(帕尼单抗(panitumumab))、美罗华(Rituxan)(rituximab)、百克沙(Bexxar)(托西莫单抗(tositumomab))。

[0240] 例示性化学治疗剂包括(但不限于)抗雌激素(例如他莫昔芬(tamoxifen)、雷诺昔酚(raloxifene)及甲地孕酮(megestrol))、LHRH促效剂(例如膏斯克林(goserelin)及亮丙立德(leuprolide))、抗雄激素(例如氟他胺(flutamide)及比卡鲁胺(bicalutamide))、光动力疗法(例如弗妥珀芬(vertoporfin)(BPD-MA)、酞花青(phthalocyanine)、感光剂Pc4及去甲氧基-竹红菌素A(demethoxy-hypocrellin A)(2BA-2-DMHA))、氮芥(nitrogen mustards)(例如环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、曲磷胺(trofosfamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、雌氮芥(estramustine)及美法仑(melphalan))、亚硝基脲(nitrosoureas)(例如卡莫司汀(carmustine)(BCNU)及洛莫司汀(lomustine)(CCNU))、烷基磺酸酯(例如白消安(busulfan)及曲奥舒凡(treosulfan))、三氮烯(例如达喀尔巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide))、含铂化合物(例如顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin))、长春花生物碱(例如长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春地辛(vindesine)及长春瑞宾(vinorelbine))、类紫杉醇(例如太平洋紫杉醇或太平洋紫杉醇等效物,诸如纳米粒子白蛋白结合太平洋紫杉醇(阿布拉生(Abraxane))、二十二碳六烯酸结合太平洋紫杉醇(DHA-太平洋紫杉醇,他克普辛(Taxoprexin))、聚赖氨酸结合太平洋紫杉醇(PG-太平洋紫杉醇,

太平洋紫杉醇聚羧胺酸,CT-2103,XYOTAX)、肿瘤活化前药(TAP)ANG1005(Angiopep-2结合至三个太平洋紫杉醇分子)、太平洋紫杉醇-EC-1(太平洋紫杉醇结合至识别erbB2的肽EC-1),及葡萄糖结合的太平洋紫杉醇,例如2'-太平洋紫杉醇2-葡萄糖吡喃糖基丁二酸甲酯;多西他赛(docetaxel),紫杉醇(taxol)、表鬼臼脂(epipodophyllins)(例如依托泊苷(etoposide)、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、替尼泊忒(teniposide)、拓朴替康(topotecan)、9-氨基喜树碱、开普替康(camptoirinotecan)、伊立替康(irinotecan)、克立那托(crisnatol)、丝裂霉素C(mytomycin C)、抗代谢物、DHFR抑制剂(例如甲胺喋呤(methotrexate)、二氯喋酰羧胺酸(dichloromethotrexate)、曲美沙特(trimetrexate)、依达曲沙(edatrexate)、IMP去氢酶抑制剂(例如霉酚酸(mycophenolic acid)、噻唑呋林(tiazofurin)、病毒唑(ribavirin)及EICAR)、核糖核苷酸还原酶抑制剂(例如羟脲(hydroxyurea)及去铁胺(deferoxamine)、尿嘧啶类似物(例如5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(floxuridine)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、雷替曲赛(ratitrexed)、喃氟啶-尿嘧啶(tegafur-uracil)、卡培他滨(capecitabine)、胞嘧啶类似物(例如阿糖胞苷(cytarabine)(ara C)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)及氟达拉滨(fludarabine)、嘌呤类似物(例如巯基嘌呤(mercaptapurine)及硫鸟嘌呤(Thioguanine)、维生素D3类似物(例如EB 1089、CB 1093及KH 1060)、异戊烯化抑制剂(例如洛伐他汀(lovastatin)、多巴胺激导性神经毒素(例如1-甲基-4-苯基吡啶离子)、细胞周期抑制剂(例如星形孢菌素(staurosporine)、放线菌素(actinomycin)(例如放线菌素D、放线菌素d)、博莱霉素(bleomycin)(例如博莱霉素A2、博莱霉素B2、培洛霉素(peplomycin)、蒽环霉素(anthracycline)(例如道诺霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、聚乙二醇化脂质体阿霉素、埃达霉素(idarubicin)、表柔比星(epirubicin)、吡柔比星(pirarubicin)、左柔比星(zorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、MDR抑制剂(例如维拉帕米(verapamil)、Ca<sup>2+</sup>ATP酶抑制剂(例如毒胡萝卜毒素(thapsigargin)、伊马替尼(imatinib)、沙立度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)、酪氨酸激酶抑制剂(例如阿西替尼(axitinib)(AG013736)、伯舒替尼(bosutinib)(SKI-606)、西地尼布(cediranib)(RECENTINTM,AZD2171)、达沙替尼(dasatinib)(SPRYCEL®,BMS-354825)、埃罗替尼(erlotinib)(TARCEVA®)、吉非替尼(gefitinib)(IRESSA®)、伊马替尼(imatinib)(Gleevec®,CGP57148B,STI-571)、拉帕替尼(lapatinib)(TYKERB®,TYVERB®)、来他替尼(lestaurtinib)(CEP-701)、来那替尼(neratinib)(HKI-272)、尼罗替尼(nilotinib)(TASIGNA®)、司马沙尼(semaxanib)(司马西尼(semaxinib),SU5416)、舒尼替尼(sunitinib)(SUTENT®,SU11248)、妥赛兰尼(toceranib)(PALLADIA®)、凡德他尼(vandetanib)(ZACTIMA®,ZD6474)、凡塔蓝尼(vatalanib)(PTK787,PTK/ZK)、曲妥珠单抗(trastuzumab)(HERCEPTIN®)、贝伐单抗(bevacizumab)(AVASTIN®)、利妥昔单抗(rituximab)(RITUXAN®)、西妥昔单抗(cetuximab)(ERBITUX®)、帕尼单抗(panitumumab)(VECTIBIX®)、兰尼单抗(ranibizumab)(Lucentis®)、尼罗替尼(nilotinib)(TASIGNA®)、索拉非尼(sorafenib)(NEXAVAR®)、依维莫司

(everolimus)(AFINITOR®)、阿仑单抗(alemtuzumab)(CAMPATH®)、吉妥单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin)(MYLOTARG®)、坦罗莫司(temsirolimus)(TORISEL®)、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、乳酸多韦替尼(dovitinib lactate)(TKI258,CHIR-258)、BIBW 2992(TOVOKTM)、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF 1120(VARGATEF®)、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、替沃扎尼(tivozanib)(AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647及/或XL228)、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米(bortezomib)(万珂(Velcade)))、mTOR抑制剂(例如雷帕霉素(rapamycin)、坦罗莫司(temsirolimus)(CCI-779)、依维莫司(everolimus)(RAD-001)、地磷莫司(ridaforolimus)、AP23573(Ariad)、AZD8055(AstraZeneca)、BEZ235(Novartis)、BGT226(Novartis)、XL765(Sanofi Aventis)、PF-4691502(Pfizer)、GDC0980(Genentech)、SF1126(Semafoe)及OSI-027(OSI))、奥利默森(oblimersen)、吉西他滨(gemcitabine)、洋红霉素(carminomycin)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、培美曲塞(pemetrexed)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、达喀尔巴嗪(dacarbazine)、丙卡巴肼(procarbazine)、泼尼龙(prednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、卡普热新(campathecin)、普卡霉素(plicamycin)、天冬酰胺酶(asparaginase)、氨基喋呤(aminopterin)、甲胺喋呤(methopterin)、泊非罗霉素(porfiromycin)、美法仑(melphalan)、异长春碱(leurosidine)、环氧长春碱(leurosine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、曲贝替定(trabectedin)、丙卡巴肼(procarbazine)、迪斯德莫来(discodermolide)、洋红霉素(carminomycin)、氨基喋呤及六甲基三聚氰胺(hexamethyl melamine)。

[0241] 在某些实施例中,所治疗的个体为哺乳动物。在某些实施例中,个体为人类。在某些实施例中,个体为驯养动物,诸如狗、猫、牛、猪、马、绵羊或山羊。在某些实施例中,个体为伴侣动物,例如狗或猫。在某些实施例中,个体为家畜动物,诸如牛、猪、马、绵羊或山羊。在某些实施例中,个体为动物园动物。在另一个实施例中,个体为研究动物,诸如啮齿动物、狗或非人类灵长类动物。在某些实施例中,个体为非人类转殖基因动物,诸如转殖基因小鼠或转殖基因猪。

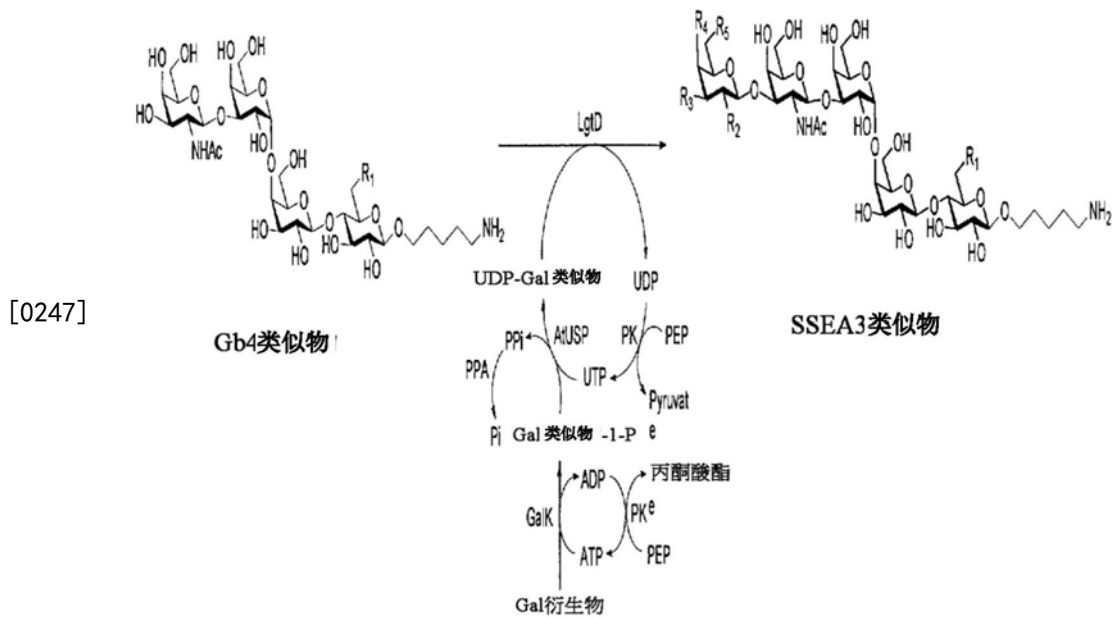
[0242] 实例

[0243] 包括以下实例以展示本发明的优选实施例。熟习此项技术者应了解,以下实例中所揭示的技术代表本发明显在在本发明实施中起良好作用的技术,且因此可视为构成其优选实施方式。然而,根据本发明,熟习此项技术者应了解,在不背离本发明的精神及范畴的情况下可对所揭示的特定实施例作出许多改变且仍获得相同或类似结果。

[0244] 实例1:SSEA3类似物的例示性合成

[0245] A:SSEA3类似物-氨基的化学酶促合成

[0246] 流程1.通过再生系统合成SSEA3类似物-氨基

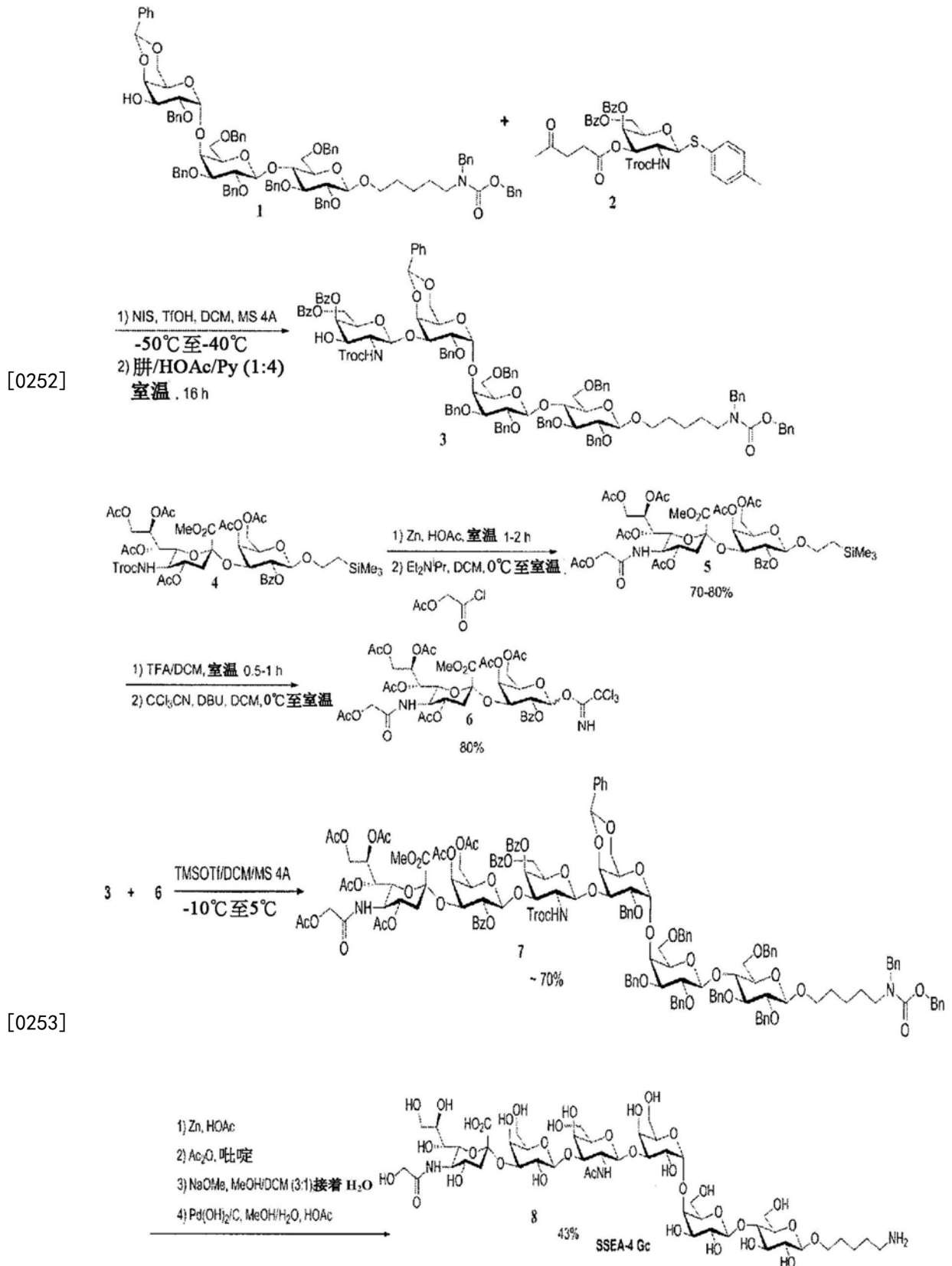


[0248] 合并化合物Gb4类似物、ATP、UTP、半乳糖类似物、磷酸烯醇丙酮酸酯、氯化镁与酶半乳糖激酶 (GalK)、UDP糖焦磷酸化酶 (AtUSP)、 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶 (LgtD)、丙酮酸激酶 (PK) 及无机焦磷酸酶 (PPA) 于溶液中,在室温下开始反应,并控制pH值为7.0,且通过薄膜层析板监视反应直至不再观察到产物。反应完成后,通过加热30分钟来移除反应混合物中的蛋白质,随后离心且用0.22 $\mu$ m过滤器过滤。接着通过C-18凝胶层析纯化滤液。收集溶离份且通过薄膜层析板监测。

[0249] 实例2:SSEA4类似物的例示性合成

[0250] A:SSEA4-Gc-氨基的化学合成

[0251] 流程2:通过化学合成法来合成SSEA4-Gc-氨基



[0254] 将粉末状分子筛(4A, 0.5g)添加至受体3(93mg, 0.045mmol)及酰亚胺酯6(76mg, 0.068mmol)于6mL二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)中的溶液中。在室温下搅拌混合物2小时。接着冷却至-10℃之后,添加TMSOTf(5μL, 0.03mmol),且混合物在5℃(冷室)搅拌一夜。反应混合物通过添加三乙胺(0.5mL)淬灭,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释且经由硅藻土垫过滤。滤液用饱和碳酸氢钠

(NaHCO<sub>3</sub>) 水溶液洗涤,经硫酸钠(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)除水,过滤且浓缩。通过二氧化硅凝胶层析(冲提液为50-100%乙酸乙酯/正己烷)纯化残余物,得到六糖7,其混杂有来自二糖酰亚胺酯6的杂质。通过NMR测定产量(90mg,68%)。

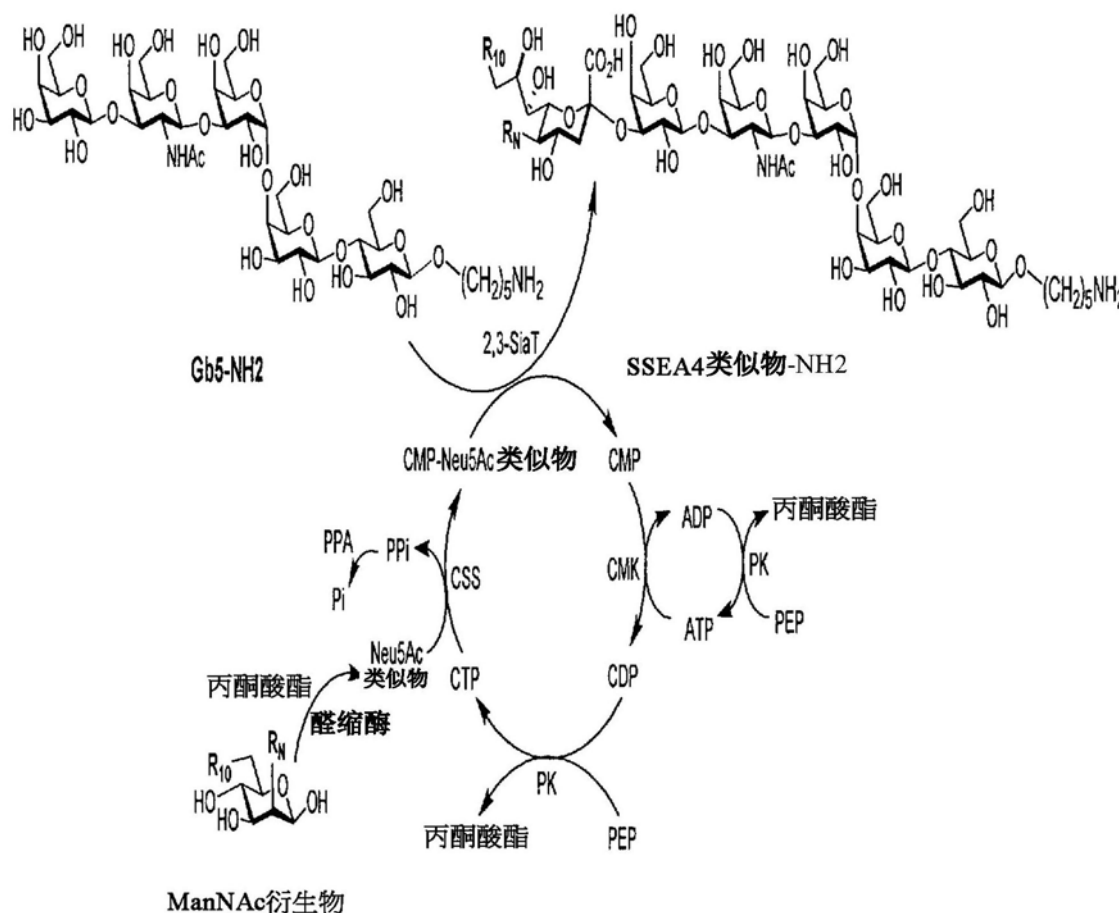
[0255] 将锌粉(1g)添加至六糖7(90mg,0.03mmol)于冰乙酸(5.0mL)中的溶液中且搅拌混合物1至2小时,根据薄膜层析板分析直至化合物7耗尽。反应混合物用二氯甲烷稀释,经由硅藻土垫过滤且在减压下浓缩。将残余物溶解于吡啶/乙酸酐(1:1,2.0mL)中,搅拌1小时且浓缩。通过二氧化硅凝胶层析来纯化残余物。将酰基物质溶解于无水二氯甲烷及甲醇(2:8,10mL)中且用甲醇钠(45mg)处理。在室温下搅拌4小时之后,添加水(0.2mL),且搅拌所得混合物16小时。反应混合物用阳离子交换树脂amberlyst IR-120中和,过滤且浓缩。通过逆相层析法(RP-18)纯化残余物。

[0256] 将氢氧化钡(20%,于木炭中,50mg)与纯化物添加至甲醇/水/乙酸(10:10:0.5,6mL)混合液中,并在室温一大气压的氢气下搅拌16小时。混合物经由硅藻土垫过滤且浓缩。通过逆相层析法纯化残余物,得到化合物8(17mg,43%)。

[0257] B:SSEA4类似物-氨基的化学酶促合成

[0258] 流程3.通过再生系统产生SSEA4类似物-氨基的合成路径

[0259]



[0260] SSEA4类似物-氨基是经由如流程3中所述的酶促再生策略合成。在此系统中,使N-乙酰-D-甘露糖胺衍生物与丙酮酸酯反应且通过醛缩酶催化而转化成乙酰神经氨酸类似物,随后与Gb5-氨基在再生系统中合并(J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14831-14839),获得范例的SSEA4类似物-氨基。

[0261] 反应条件详细描述如下:Gb5-氨基(18 $\mu$ mol)、CTP(5 $\mu$ mol)、N-乙酰-D-甘露糖胺衍生物(27 $\mu$ mol)、丙酮酸钠(81 $\mu$ mol)、PEP(55 $\mu$ mol)及ATP(5 $\mu$ mol)溶解于50mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中。将 $\alpha$ -(2,3)-唾液酸转移酶(20个单位)、唾液酸醛缩酶(20个单位)、CMK酶(10个单位)、Pykf酶(10个单位)、PPA酶(10个单位)及PmcSS酶(10个单位)添加至溶液中,且在37 $^{\circ}$ C反应8小时且通过薄膜层析板监视。在反应结束时,通过在100 $^{\circ}$ C加热5分钟来使酶变性。所要的SSEA4类似物-氨基通过G25、DEAE及SP管柱纯化,产率约80%。

[0262] SSEA4类似物-氨基的 $^1\text{H}$  NMR

[0263] B-1.SSEA4-戊胺( $R_N=\text{NHAc}$ ,  $R_{10}=\text{OH}$ )

[0264]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 4.94(d,  $J=3.8\text{Hz}$ , 1H), 4.72(d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 1H), 4.54-4.50(m, 3H), 4.40(t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H), 4.27(d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 4.20(d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 4.10-3.54(m, 37H), 3.34-3.31(m, 1H), 3.02(t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 2.78(dd,  $J=12.4, 4.6\text{Hz}$ , 1H), 2.05(m, 6H), 1.80(t, 12.2Hz, 1H), 1.74-1.67(m, 4H), 1.51-1.45(m, 2H)

[0265] B-2.Neu5Gc\_SSEA4-戊胺( $R_N=\text{NHGc}$ ,  $R_{10}=\text{OH}$ )

[0266]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 4.89(d,  $J=3.6\text{Hz}$ , 1H), 4.66(d,  $J=8.2\text{Hz}$ , 1H), 4.52-4.45(m, 3H), 4.37(t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H), 4.23(d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H), 4.15(d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 4.10-3.48(m, 35H), 3.27(m, 1H), 2.98(t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 2.73(dd,  $J=4.8, 12.4\text{Hz}$ , 1H), 2.00(s, 3H), 1.77(t,  $J=12.0\text{Hz}$ , 1H), 1.72-1.61(m, 4H), 1.48-1.39(m, 2H)。

[0267] B-3.Ac-炔基\_SSEA4-戊胺( $R_N=\text{NHCOC}_2\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $R_{10}=\text{OH}$ )

[0268]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 4.89(d,  $J=4.0\text{Hz}$ , 1H), 4.67(d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 4.52-4.45(m, 3H), 4.37(t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H), 4.23(d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H), 4.08-3.54(m, 38H), 3.28(m, 1H), 2.99(t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 2.53-2.4(m, 4H), 2.37(s, 1H), 2.01(s, 3H), 1.77(t,  $J=12.0\text{Hz}$ , 1H), 1.72-1.62(m, 4H), 1.49-1.41(m, 2H)。

[0269] B-4.Ac-氟化物\_SSEA4-戊胺( $R_N=\text{NHCOCH}_2\text{F}$ ,  $R_{10}=\text{OH}$ )

[0270]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 4.90(d,  $J=46.4\text{Hz}$ , 2H), 4.90(d,  $J=4.0\text{Hz}$ , 1H), 4.67(d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 1H), 4.53-4.46(m, 3H), 4.37(t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H), 4.24(d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 2H), 4.16(d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H), 4.09-3.51(m, 34H), 3.28(m, 1H), 2.99(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 2.75(dd,  $J=4.8, 12.4\text{Hz}$ , 1H), 2.01(s, 3H), 1.79(t,  $J=12.0\text{Hz}$ , 1H), 1.72-1.62(m, 4H), 1.48-1.40(m, 2H)。

[0271] B-5.Ac-苯基\_SSEA4-戊胺( $R_N=\text{NHCOCH}_2\text{Ph}$ ,  $R_{10}=\text{OH}$ )

[0272]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 7.39-7.30(m, 5H), 4.90(d,  $J=4.0\text{Hz}$ , 1H), 4.66(d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 4.52-4.46(m, 3H), 4.37(t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H), 4.23(d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 4.15(d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H), 4.08-3.47(m, 38H), 3.36(dd,  $J=1.6, 9.2\text{Hz}$ , 1H), 3.28(m, 1H), 2.99(t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 2.73(dd,  $J=4.8, 12.4\text{Hz}$ , 1H), 2.00(s, 3H), 1.76(t,  $J=12.0\text{Hz}$ , 1H), 1.72-1.61(m, 4H), 1.51-1.40(m, 2H)。

[0273] B-6.Ac-迭氮基\_SSEA4-戊胺( $R_N=\text{NHCOCH}_2\text{N}_3$ ,  $R_{10}=\text{OH}$ )

[0274]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 4.88(d,  $J=3.6\text{Hz}$ , 1H), 4.66(d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 4.52-4.44(m, 3H), 4.36(t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H), 4.23(d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H), 4.08-3.54(m, 35H), 3.27(m, 1H), 2.98(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 2.73(dd,  $J=4.8, 12.4\text{Hz}$ , 1H), 2.00(s, 3H), 1.77(t,  $J=12.4\text{Hz}$ , 1H), 1.72-1.60(m, 4H), 1.48-1.39(m, 2H)。

[0275] B-7.5'-迭氮基\_SSEA4-戊胺( $R_N=\text{N}_3$ ,  $R_{10}=\text{OH}$ )

[0276]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$ 4.90 (d,  $J=3.6\text{Hz}$ , 1H) , 4.67 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.51-4.47 (m, 3H) , 4.37 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.23 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H) , 4.15 (d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H) , 4.08-3.44 (m, 35H) , 3.31-3.27 (m, 1H) , 2.99 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H) , 2.73 (dd,  $J=4.8, 12.4\text{Hz}$ , 1H) , 2.01 (s, 3H) , 1.76 (t,  $J=12.0\text{Hz}$ , 1H) , 1.72-1.63 (3, 4H) , 1.48-1.41 (m, 2H) ; HRMS (ESI-TOF, M-H-)  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33}$  计算值1228.4579, 实验值1228.4621。

[0277] B-8.9'-迭氨基\_SSEA4-戊胺 ( $\text{R}_\text{N}=\text{NHAc}$ ,  $\text{R}_{10}=\text{N}_3$ )

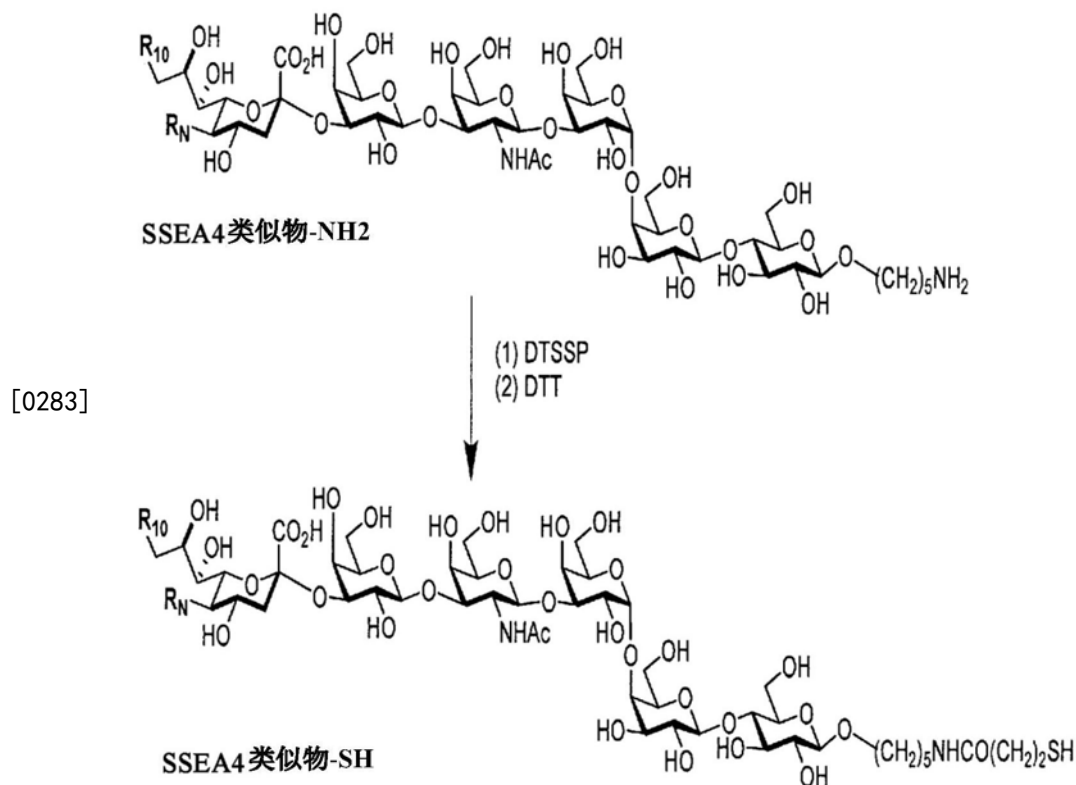
[0278]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 4.85 (d,  $J=3.8\text{Hz}$ , 1H) , 4.67 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.51-4.44 (m, 3H) , 4.37 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.23 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H) , 4.10-3.40 (m, 33H) , 3.27 (m, 1H) , 2.98 (t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H) , 2.72 (dd,  $J=4.8, 12.8\text{Hz}$ , 1H) , 2.00 (s, 3H) , 2.00 (s, 3H) , 1.75 (t,  $J=12.4\text{Hz}$ , 1H) , 1.72-1.60 (m, 4H) , 1.58-1.38 (m, 2H) 。

[0279] B-9.NHBz\_SSEA4-戊胺 ( $\text{R}_\text{N}=\text{NHBz}$ ,  $\text{R}_{10}=\text{OH}$ )

[0280]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 7.80-7.73 (m, 2H) , 7.63 (m, 1H) , 7.56-7.51 (m, 2H) , 4.92 (d,  $J=4.0\text{Hz}$ , 1H) , 4.70 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.58-4.47 (m, 3H) , 4.40 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H) , 4.26 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H) , 4.19 (d,  $J=3.2\text{Hz}$ , 1H) , 4.15-3.53 (m, 36H) , 3.31 (m, 1H) , 3.01 (t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H) , 2.82 (dd,  $J=4.4, 12.4\text{Hz}$ , 1H) , 2.00 (s, 3H) , 1.87 (t,  $J=12.0\text{Hz}$ , 1H) , 1.72-1.60 (m, 4H) , 1.48-1.39 (m, 2H) 。

[0281] C:SSEA4类似物-硫醇的交联反应

[0282] 流程4:经由DTSSP交联反应来合成SSEA4类似物-硫醇



[0284] 在某些实施例中,将DTSSP (2.0eq) 及SSEA4类似物-氨基 (1.0eq) 混合于0.1M磷酸盐缓冲液pH 7.4 (约3mg/mL) 中。在室温下搅拌溶液一夜。接着将反应混合物升温至40℃且添加DTT (9.0eq)。在40℃搅拌1.5小时之后,真空浓缩反应混合物,且通过LH-20管柱纯化残余物,得到白色固体SSEA4类似物-硫醇。(流程4)

[0285] SSEA4类似物-硫醇的<sup>1</sup>H NMR

[0286] C-1:SSEA4-硫醇(R<sub>N</sub>=NHAc,R<sub>10</sub>=OH)

[0287] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ4.88 (d, J=4.0Hz, 1H), 4.65 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.50-4.44 (m, 3H), 4.36 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.22 (d, J=2.9Hz, 1H), 4.14 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.04-3.55 (m, 35H), 3.26 (t, J=8.5Hz, 1H), 3.18 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.74-2.70 (m, 3H), 2.49 (t, J=6.8Hz, 2H), 1.994 (s, 3H), 1.992 (s, 3H), 1.75 (t, J=12.2Hz, 1H), 1.61 (tt, J=6.7, 6.7Hz, 2H), 1.52 (tt, J=7.1, 7.1Hz, 2H), 1.40-1.36 (m, 2H);

[0288] C-2:Neu5Gc\_SSEA4-硫醇(R<sub>N</sub>=NHGc,R<sub>10</sub>=OH)

[0289] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ4.89 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.66 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.53-4.43 (m, 3H), 4.36 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.22 (d, J=3.0Hz, 1H), 4.15 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.11-3.48 (m, 38H), 3.27 (t, J=8.4Hz, 1H), 3.19 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.78-2.71 (m, 3H), 2.51 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.78 (t, J=12.1Hz, 1H), 1.61 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.52 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.39 (q, J=8.0Hz, 2H)。

[0290] C-3:Ac-炔基\_SSEA4-硫醇(R<sub>N</sub>=NHCOC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>C≡CH,R<sub>10</sub>=OH)

[0291] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ4.94 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.72 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.58-4.48 (m, 3H), 4.41 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.30-4.26 (m, 1H), 4.21 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.14-3.54 (m, 37H), 3.32 (t, J=8.6Hz, 1H), 3.24 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.83-2.74 (m, 3H), 2.59-2.49 (m, 5H), 2.43 (s, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.82 (t, J=12.1Hz, 1H), 1.67 (p, J=6.9Hz, 2H), 1.58 (p, J=6.9Hz, 2H), 1.48-1.38 (m, 2H)。

[0292] C-4:Ac-氟化物\_SSEA4-硫醇(R<sub>N</sub>=NHCOCH<sub>2</sub>F,R<sub>10</sub>=OH)

[0293] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ4.90 (d, J=46.4Hz, 2H), 4.95 (d, J=4.0Hz, 1H), 4.72 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.59-4.48 (m, 3H), 4.41 (t, J=6.6Hz, 1H), 4.31-4.26 (m, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.14-3.54 (m, 36H), 3.36-3.29 (m, 1H), 3.25 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.80 (m, 3H), 2.57 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.84 (t, J=12.2Hz, 1H), 1.67 (p, J=6.9Hz, 2H), 1.58 (p, J=7.0Hz, 2H), 1.43 (q, J=8.3Hz, 2H)。

[0294] C-5:Ac-苯基\_SSEA4-硫醇(R<sub>N</sub>=NHCOCH<sub>2</sub>Ph,R<sub>10</sub>=OH)

[0295] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ7.48-7.32 (m, 5H), 4.94 (d, J=3.6Hz, 1H), 4.73-4.68 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.52 (m, 3H), 4.41 (t, J=6.4Hz, 1H), 4.29-4.26 (m, 1H), 4.20 (d, J=3.0Hz, 1H), 4.13-3.51 (m, 37H), 3.39 (dd, J=9.0, 1.8Hz, 1H), 3.32 (t, J=8.6Hz, 1H), 3.25 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.83-2.74 (m, 3H), 2.56 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.80 (t, J=12.1Hz, 1H), 1.67 (q, J=7.2Hz, 2H), 1.57 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.48-1.38 (m, 2H)。

[0296] C-6:Ac-迭氮基\_SSEA4-硫醇(R<sub>N</sub>=NHCOCH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>,R<sub>10</sub>=OH)

[0297] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ4.88 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.66 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.52-4.43 (m, 3H), 4.36 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.22 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.14 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.08-3.47 (m, 38H), 3.26 (t, J=8.4Hz, 1H), 3.19 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.74 (m, 3H), 2.51 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.76 (t, J=12.1Hz, 1H), 1.61 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.53 (p, J=7.0Hz, 2H), 1.38 (q, J=8.3Hz, 2H)。

[0298] C-7:5'-迭氮基\_SSEA4-硫醇(R<sub>N</sub>=N<sub>3</sub>,R<sub>10</sub>=OH)

[0299] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ4.90 (d, J=4.0Hz, 1H), 4.67 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.51-4.46 (m,

3H), 4.37 (t, J=6.4Hz, 1H), 4.24 (d, J=2.8Hz, 1H), 4.15 (d, J=2.8Hz, 1H), 4.01-3.44 (m, 35H), 3.28 (t, J=8.4Hz, 1H), 3.21 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.78-2.72 (m, 3H), 2.52 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.77 (t, J=12.0Hz, 1H), 1.67-1.60 (m, 2H), 1.58-1.50 (m, 2H), 1.43-1.37 (m, 2H)

[0300] C-8:9'-迭氨基\_SSEA4-硫醇 ( $R_N = \text{NHAc}$ ,  $R_{10} = \text{N}_3$ )

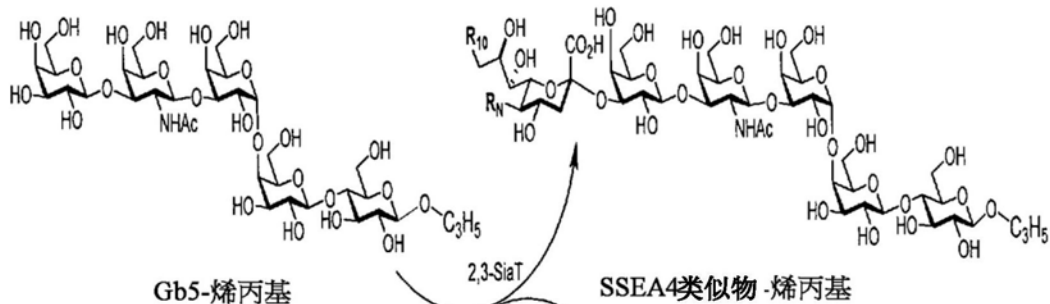
[0301]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.90 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.68 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.48 (dd, J=13.2, 7.9Hz, 3H), 4.37 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.26-4.22 (m, 1H), 4.16 (d, J=3.3Hz, 1H), 4.09-3.44 (m, 36H), 3.31-3.24 (m, 1H), 3.20 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.79-2.70 (m, 3H), 2.52 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.02 (d, J=2.0Hz, 6H), 1.76 (t, J=12.1Hz, 1H), 1.63 (p, J=6.9Hz, 2H), 1.54 (p, J=6.9Hz, 2H), 1.39 (q, J=8.3Hz, 2H)。

[0302] C-9:NHBz\_SSEA4-硫醇 ( $R_N = \text{NHBz}$ ,  $R_{10} = \text{OH}$ )

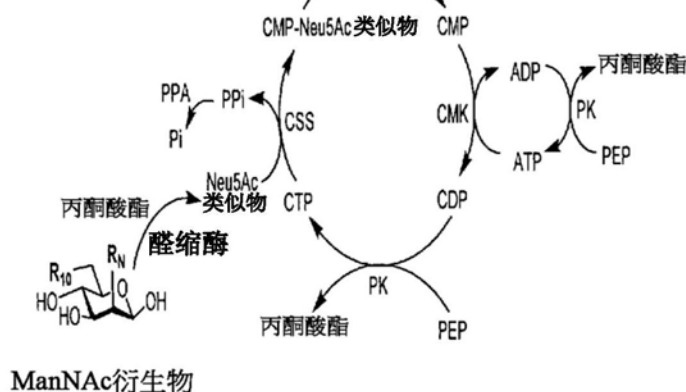
[0303]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.80-7.73 (m, 2H), 7.66-7.58 (m, 1H), 7.52 (dd, J=8.4, 7.0Hz, 2H), 4.91 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.69 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.57-4.44 (m, 3H), 4.38 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.27-4.22 (m, 1H), 4.18 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.16-3.52 (m, 36H), 3.29 (t, J=8.5Hz, 1H), 3.20 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.84-2.72 (m, 3H), 2.52 (t, J=6.7Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.89 (t, J=12.2Hz, 1H), 1.63 (p, J=6.8Hz, 2H), 1.53 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.40 (q, J=8.2Hz, 2H)。

[0304] D:SSEA4类似物-烯丙基的化学酶促合成

[0305] 流程5. 通过再生系统产生SSEA4类似物-烯丙基的合成路径



[0306]



[0307] 经由如流程5中所述的酶促再生策略来合成SSEA4类似物-烯丙基。在此系统中,使N-乙酰-D-氨基甘露糖衍生物与丙酮酸酯反应且通过醛缩酶催化而转化成乙酰神经氨酸类似物,随后与Gb5-烯丙基在再生系统中合并 (J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14831-14839), 获得范例的SSEA4类似物-烯丙基。(流程5)

[0308] 反应条件详细描述如下:将Gb5-烯丙基(18 $\mu$ mol)、CTP(5 $\mu$ mol)、N-乙酰-D-氨基甘露糖衍生物(27 $\mu$ mol)、丙酮酸钠(81 $\mu$ mol)、PEP(55 $\mu$ mol)及ATP(5 $\mu$ mol)溶解于50mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中。将 $\alpha$ -(2,3)-唾液酸转移酶(20个单位)、唾液酸醛缩酶(20个单位)、CMK酶(10个单位)、Pykf酶(10个单位)、PPA酶(10个单位)及Pmcss酶(10个单位)添加至溶液中,且在37 $^{\circ}$ C反应8小时且通过薄膜层析板监视。在反应结束时,通过在100 $^{\circ}$ C加热5分钟来使酶变性。所要SSEA4类似物-烯丙基通过G25、DEAE及SP管柱纯化,产率约80%。

[0309] SSEA4类似物-烯丙基的 $^1\text{H}$  NMR

[0310] D-1.SSEA4-烯丙基( $R_1=\text{OH}$ , $R_N=\text{NHAc}$ , $R_{10}=\text{OH}$ )

[0311]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 6.00(m,1H),5.40-5.37(d, $J=17.3\text{Hz}$ ,1H),5.30-5.28(d, $J=10.4\text{Hz}$ ,1H),4.92(d, $J=3.9\text{Hz}$ ,1H),4.70(d, $J=8.5\text{Hz}$ ,1H),4.54-4.51(m,3H),4.40-4.38(m,2H),4.25-4.18(m,3H),4.10-3.52(m,34H),3.35-3.32(t, $J=8.6\text{Hz}$ ,1H),2.77(dd, $J=12.5,4.6\text{Hz}$ ,1H),2.03(s,6H),1.80(t, $J=12.1\text{Hz}$ ,1H)

[0312] D-2.Neu5Gc\_SSEA4-烯丙基( $R_1=\text{OH}$ , $R_N=\text{NHGc}$ , $R_{10}=\text{OH}$ )

[0313]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 5.99(m,1H),5.38(dd, $J=1.2,17.2\text{Hz}$ ,1H),5.29(dd, $J=1.2,10.0\text{Hz}$ ,1H),4.93(d, $J=4.0\text{Hz}$ ,1H),4.69(d, $J=8.4\text{Hz}$ ,1H),4.58-4.51(m,3H),4.43-4.37(m,2H),4.28-4.17(m,3H),4.14-3.52(m,34H),3.33(t, $J=8.8\text{Hz}$ ,1H),2.77(dd, $J=4.8,12.4\text{Hz}$ ,1H),2.03(s,3H),1.81(t, $J=12.0\text{Hz}$ ,1H)。

[0314] D-3.Ac-氟化物\_SSEA4-烯丙基( $R_1=\text{OH}$ , $R_N=\text{NHCOCH}_2\text{F}$ , $R_{10}=\text{OH}$ )

[0315]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 5.96(m,1H),5.36(dd, $J=1.6,17.2\text{Hz}$ ,1H),5.25(dd, $J=1.6,10.4\text{Hz}$ ,1H),4.89(d, $J=46.4\text{Hz}$ ,2H),4.88(d, $J=3.6\text{Hz}$ ,1H),4.65(d, $J=8.4\text{Hz}$ ,1H),4.53-4.45(m,3H),4.39-4.32(m,2H),4.22-3.51(m,37H),3.30(t, $J=8.4\text{Hz}$ ,1H),2.73(dd, $J=4.4,12.4\text{Hz}$ ,1H),2.00(s,3H),1.85(t, $J=12.4\text{Hz}$ ,1H)。

[0316] D-4.Ac-苯基\_SSEA4-烯丙基( $R_1=\text{OH}$ , $R_N=\text{NHCOCH}_2\text{Ph}$ , $R_{10}=\text{OH}$ )

[0317]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 7.45-7.34(m,5H),6.02(m,1H),5.42(dd, $J=1.2,17.2\text{Hz}$ ,1H),5.32(dd, $J=1.2,10.4\text{Hz}$ ,1H),4.94(d, $J=4.0\text{Hz}$ ,1H),4.72(d, $J=8.4\text{Hz}$ ,1H),4.59-4.52(m,3H),4.46-4.38(m,2H),4.30-3.50(m,38H),3.42-3.32(m,4H),2.77(dd, $J=4.4,12.8\text{Hz}$ ,1H),2.05(s,3H),1.90(t, $J=12.0\text{Hz}$ ,1H)。

[0318] D-5.Ac-迭氮基\_SSEA4-烯丙基( $R_1=\text{OH}$ , $R_N=\text{NHCOCH}_2\text{N}_3$ , $R_{10}=\text{OH}$ )

[0319]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 5.95(m,1H),5.35(dd, $J=1.6,17.2\text{Hz}$ ,1H),5.25(dd, $J=1.2,10.4\text{Hz}$ ,1H),4.88(d, $J=3.6\text{Hz}$ ,1H),4.65(d, $J=8.4\text{Hz}$ ,1H),4.52-4.46(m,3H),4.40-4.32(m,2H),4.23-4.18(m,3H),4.12-3.50(m,36H),3.30(t, $J=5.6\text{Hz}$ ,1H),2.72(dd, $J=4.8,12.8\text{Hz}$ ,1H),2.00(s,3H),1.84(t, $J=12.4\text{Hz}$ ,1H)。

[0320] D-6.5'-迭氮基\_SSEA4-烯丙基( $R_1=\text{OH}$ , $R_N=\text{N}_3$ , $R_{10}=\text{OH}$ )

[0321]  $^1\text{H}$ NMR(400MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ): $\delta$ 5.99(m,1H),4.40(dd, $J=1.6,17.2\text{Hz}$ ,1H),5.29(d, $J=10.4\text{Hz}$ ,1H),4.92(d, $J=3.6\text{Hz}$ ,1H),4.70(d, $J=8.4\text{Hz}$ ,1H),4.56-4.51(m,3H),4.43-4.38(m,2H),4.26(d, $J=3.6\text{Hz}$ ,2H),4.22(d, $J=6.4\text{Hz}$ ,1H),4.10-3.46(m,35H),3.36-3.32(m,1H),2.74(dd, $J=4.8,12.4\text{Hz}$ ,1H),2.04(s,3H),1.79(t, $J=12.4\text{Hz}$ );HRMS(ESI-TOF,M-H) $\text{C}_{44}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_{33}$ 计算值1183.4001,实验值1183.4056。

[0322] D-7.9'-迭氮基\_SSEA4-烯丙基( $R_1=\text{OH}$ , $R_N=\text{NHAc}$ , $R_{10}=\text{N}_3$ )

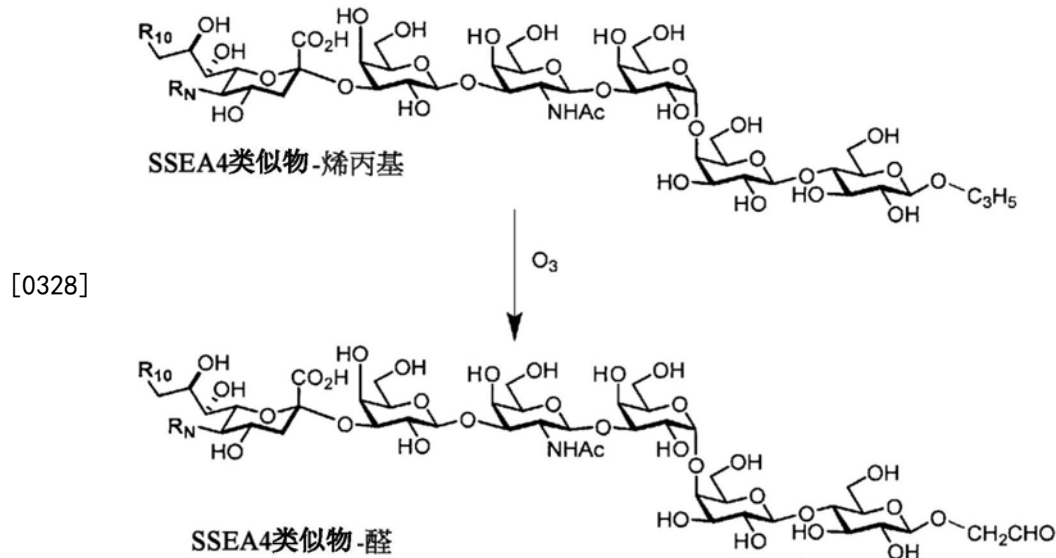
[0323]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.96 (m, 1H), 5.36 (dd,  $J=1.6, 17.3\text{Hz}$ , 1H), 5.26 (dd,  $J=1.6, 10.4\text{Hz}$ , 1H), 4.90 (d,  $J=3.6\text{Hz}$ , 1H), 4.68 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 4.55-4.47 (m, 3H), 4.41-4.35 (m, 2H), 4.25-4.14 (m, 3H), 4.10-3.41 (m, 34H), 3.31 (t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H), 2.72 (dd,  $J=4.8, 12.8\text{Hz}$ , 1H), 2.02 (s, 3H), 1.79 (t,  $J=12.0\text{Hz}$ , 1H)。

[0324] D-8.NHBz\_SSEA4-烯丙基 ( $\text{R}_1=\text{OH}$ ,  $\text{R}_\text{N}=\text{NHBz}$ ,  $\text{R}_{10}=\text{OH}$ )

[0325]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.76-7.73 (m, 2H), 7.59 (m, 1H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.90 (m, 1H), 5.30 (dd,  $J=1.6, 17.2\text{Hz}$ , 1H), 5.25 (dd,  $J=1.6, 10.8\text{Hz}$ , 1H), 4.89 (d,  $J=3.6\text{Hz}$ , 1H), 4.67 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 1H), 4.55-4.45 (m, 3H), 4.39-4.38 (m, 2H), 4.24-3.50 (m, 34H), 3.30 (t,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 2.77 (dd,  $J=4.4, 12.4\text{Hz}$ , 1H), 2.01 (s, 3H), 1.90 (t,  $J=12.4\text{Hz}$ , 1H)。

[0326] E:SSEA4类似物-醛的氧化反应

[0327] 流程6.



[0329] 在某些例示性实施例中,使SSEA4类似物-烯丙基于甲醇及水中的经搅拌溶液在臭氧气体氛围下、在 $-70^\circ\text{C}$ 进行臭氧分解15分钟。通过甲硫醚 ( $\text{Me}_2\text{S}$ ) 淬灭反应混合物,接着真空蒸发溶液。所要SSEA4类似物-醛接着通过G15管柱纯化。(流程6)

[0330] SSEA4类似物-醛的 $^1\text{H}$  NMR

[0331] E-1:SSEA4-醛 ( $\text{R}_\text{N}=\text{NHAc}$ ,  $\text{R}_{10}=\text{OH}$ )

[0332]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.19 (t,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 4.89 (d,  $J=3.9\text{Hz}$ , 1H), 4.66 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 4.54-4.45 (m, 3H), 4.36 (t,  $J=6.5\text{Hz}$ , 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 4.15 (d,  $J=3.1\text{Hz}$ , 1H), 4.08-3.47 (m, 32H), 3.37-3.30 (m, 1H), 2.73 (dd,  $J=12.4, 4.6\text{Hz}$ , 1H), 2.00 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 6H), 1.76 (t,  $J=12.1\text{Hz}$ , 1H)。

[0333] E-2:Neu5Gc\_SSEA4-醛 ( $\text{R}_\text{N}=\text{NHGc}$ ,  $\text{R}_{10}=\text{OH}$ )

[0334]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.20 (t,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 4.91 (d,  $J=3.9\text{Hz}$ , 1H), 4.68 (d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 1H), 4.52 (dt,  $J=8.5, 4.5\text{Hz}$ , 3H), 4.38 (t,  $J=6.5\text{Hz}$ , 1H), 4.27-4.22 (m, 1H), 4.17 (d,  $J=3.1\text{Hz}$ , 1H), 4.13-3.51 (m, 34H), 3.38-3.32 (m, 1H), 2.76 (dd,  $J=12.4, 4.6\text{Hz}$ , 1H), 2.02 (s, 3H), 1.80 (t,  $J=12.1\text{Hz}$ , 1H)。

[0335] E-3:Ac-氟化物\_SSEA4-醛 ( $\text{R}_\text{N}=\text{NHCOCH}_2\text{F}$ ,  $\text{R}_{10}=\text{OH}$ )

[0336]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.21 (t,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 4.90 (d,  $J=46.4\text{Hz}$ , 2H), 4.69 (d,  $J=$

8.5Hz, 1H), 4.52 (t, J=8.0Hz, 3H), 4.38 (t, J=6.4Hz, 1H), 4.24 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.17 (d, J=3.2Hz, 1H), 4.10-3.45 (m, 33H), 3.40-3.32 (m, 1H), 2.78 (dd, J=12.4, 4.6Hz, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.81 (t, J=12.2Hz, 1H)。

[0337] E-4:Ac-苯基\_SSEA4-醛 ( $R_N = \text{NHCOCH}_2\text{Ph}$ ,  $R_{10} = \text{OH}$ )

[0338]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.48-7.27 (m, 5H), 5.22 (t, J=4.9Hz, 1H), 4.92 (d, J=4.0Hz, 1H), 4.69 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.56-4.49 (m, 3H), 4.39 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.10-3.45 (m, 34H), 3.43-3.34 (m, 1H), 2.76 (dd, J=12.4, 4.6Hz, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.78 (t, J=12.3Hz, 1H)。

[0339] E-5:Ac-迭氮基\_SSEA4-醛 ( $R_N = \text{NHCOCH}_2\text{N}_3$ ,  $R_{10} = \text{OH}$ )

[0340]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.20 (t, J=4.9Hz, 1H), 4.90 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.68 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.54-4.48 (m, 3H), 4.38 (t, J=6.4Hz, 1H), 4.24 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.17 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.13-3.51 (m, 34H), 3.39-3.32 (m, 1H), 2.75 (dd, J=12.4, 4.6Hz, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.79 (t, J=12.2Hz, 1H)。

[0341] E-6:9'-迭氮基\_SSEA4-醛 ( $R_N = \text{NHAc}$ ,  $R_{10} = \text{N}_3$ )

[0342]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.20 (t, J=4.9Hz, 1H), 4.91 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.69 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.52 (t, J=8.0Hz, 3H), 4.38 (t, J=6.4Hz, 1H), 4.24 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.17 (d, J=3.2Hz, 1H), 4.10-3.45 (m, 32H), 3.39-3.32 (m, 1H), 2.74 (dd, J=12.5, 4.6Hz, 1H), 2.03 (d, J=2.1Hz, 6H), 1.77 (t, J=12.1Hz, 1H)。

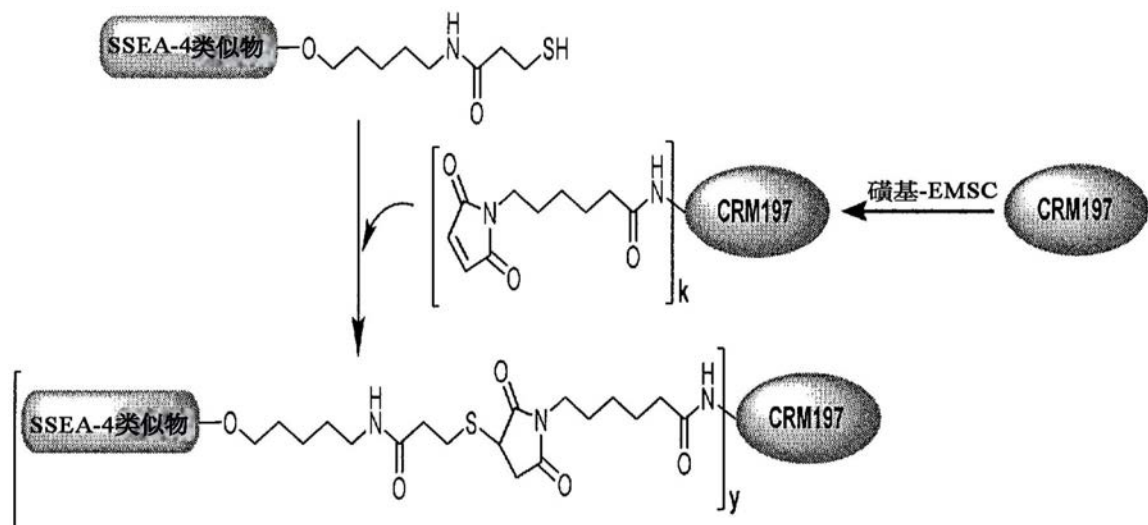
[0343] E-7:NHBz\_SSEA4-醛 ( $R_N = \text{NHBz}$ ,  $R_{10} = \text{OH}$ )

[0344]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.83-7.76 (m, 2H), 7.63 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.53 (t, J=7.7Hz, 2H), 5.21 (t, J=4.9Hz, 1H), 4.92 (d, J=3.8Hz, 1H), 4.70 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.57-4.49 (m, 3H), 4.39 (t, J=6.5Hz, 1H), 4.26 (d, J=3.1Hz, 1H), 4.19 (d, J=3.3Hz, 1H), 4.16-3.52 (m, 32H), 3.40-3.34 (m, 1H), 2.82 (dd, J=12.4, 4.6Hz, 1H), 2.04 (d, J=4.7Hz, 3H), 1.87 (t, J=12.1Hz, 1H)。

[0345] 实例3:经由磺基-EMCS交联来合成SSEA3/SSEA4类似物-CRM197结合物

[0346] 流程7

[0347]



[0348] 一般方法:

[0349] 步骤A. 将SSEA3类似物-氨基或SSEA4类似物-氨基修饰成SSEA3类似物-硫醇或SSEA4类似物-硫醇

[0350] 为了合成SSEA3/4类似物CRM197结合物,使胺封端的SSEA3/4类似物与DTSSP连接符在PBS缓冲液(pH 7.4)中在室温下反应。通过pH纸监测溶液pH值;当溶液变成偏酸性时,添加一些氢氧化钠溶液至反应溶液中。在室温下搅拌反应物12小时之后,在室温下向溶液中添加DTT。溶液在40℃保持搅拌,接着通过减压浓缩移除溶剂。最后通过LH-20管柱层析纯化残余物,得到SSEA3/4类似物-硫醇。

[0351] 步骤B:将CRM197修饰为CRM197-顺丁烯二酰亚胺。

[0352] 经由反复地加水及透析(Amicon Ultra-0.5,10kDa)移除市售CRM197(1.0mg)的盐之后,将残余物溶解于PBS缓冲液(pH 6.5,1.0mL)中且转移至样品小瓶中。向溶液中添加磺基-EMCS(1.0mg, $8.22 \times 10^{-6}$ mol),接着反应物在室温下保持搅拌2小时。通过Amicon Ultra-0.5(10kDa)纯化混合物。使用MALDI-TOF检查分子量且用BCA分析计算蛋白质含量之后,将CRM197-顺丁烯二酰亚胺储存于PBS缓冲液(pH 7.2,1.0mg/mL)中以用于下一步骤。根据MALDI-TOF资料,可计算顺丁烯二酰亚胺官能基的量。举例而言,当CRM197-顺丁烯二酰亚胺的分子量为61841时,CRM197-顺丁烯二酰亚胺上的顺丁烯二酰亚胺官能基数目为 $(61841-58326)/193=18.2$ 。

[0353] 步骤C:合成SSEA3/4类似物-CRM197结合物

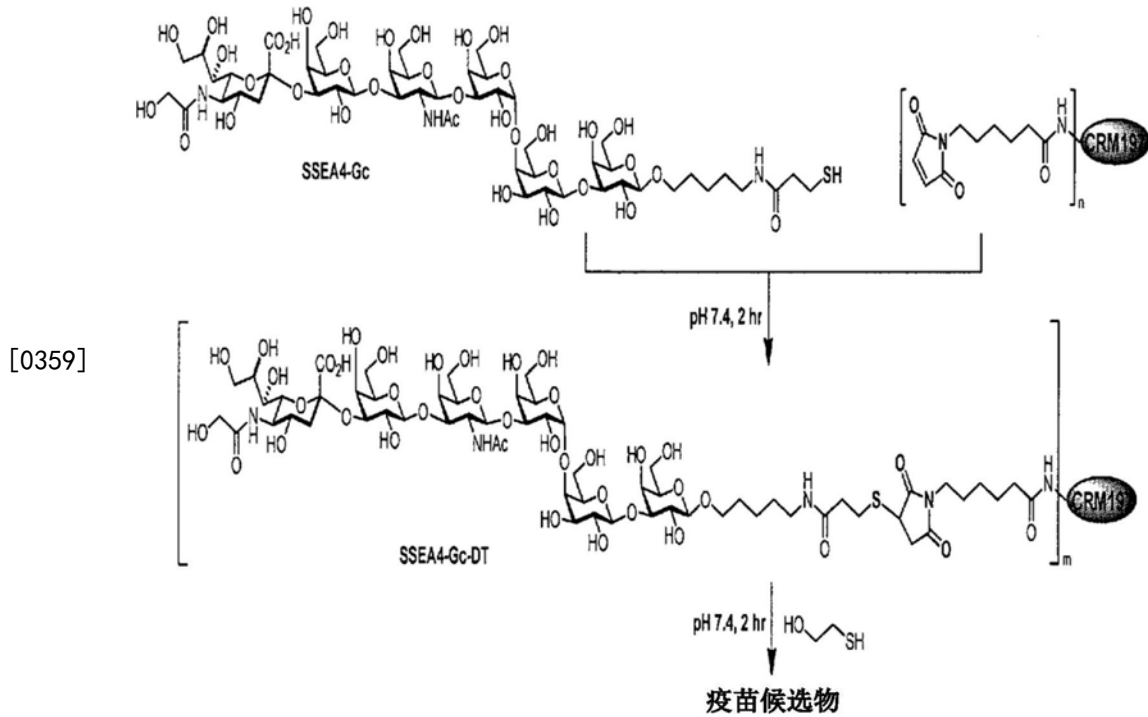
[0354] 将CRM197-顺丁烯二酰亚胺溶解于PBS缓冲液(pH 7.2,浓度为1.0mg/mL)中,接着向溶液中添加不同量的SSEA3/4类似物-硫醇(5.0mg/mL,于PBS缓冲液中,pH 7.2)。在室温下搅拌混合物2小时。使用Amicon Ultra-0.5(10kDa)纯化SSEA3/4类似物-CRM197结合物,以经由透析来移除未反应的SSEA3/4类似物-硫醇及磷酸钠盐。所得SSEA3/4类似物-CRM197结合物可通过MALDI-TOF分析加以表征以测定碳水化合物合并率。与DTT反应且通过LH-20管柱层析纯化之后,可回收未反应的SSEA3/4类似物-硫醇。

[0355] 表1. 经由磺基-EMCS产生的SSEA4类似物与CRM-197结合物中的碳水化合物接合数

代码	聚糖	蛋白质糖基化之后的分子量	(y)平均接合数
M1	SSEA4	75465	8.84
M2	Neu5Gc_SSEA4	70750	5.83
M3	Ac-炔基_SSEA4	68965	5.94
M4	Ac-氟化物_SSEA4	69190	4.59
M5	Ac-苯基_SSEA4	75454	8.10
M6	Ac-迭氮基_SSEA4	70274	5.30
M7	9'-迭氮基_SSEA4	76596	9.87
M8	Glc-迭氮基_SSEA4	73047	8.00

[0357] 实例4:经由磺基-EMCS交联来合成SSEA4-Gc-CRM197结合物

[0358] 流程8.



[0360] 步骤A:将SSEA4-Gc-氨基修饰为SSEA4-Gc-硫醇

[0361] 在室温下,将DTSSP ( $5.0\text{mg}, 8.22 \times 10^{-6}\text{mol}$ ) 添加至含有SSEA4-Gc-氨基 ( $5.0\text{mg}, 4.01 \times 10^{-6}\text{mol}$ ) 于PBS缓冲液 (pH 7.4,  $1.0\text{mL}$ ) 中的烧瓶中。通过pH纸监测溶液pH值,当溶液变成偏酸性时,向溶液中添加氢氧化钠溶液 (1莫耳浓度/水) 至反应溶液中。在室温下搅拌反应物12小时之后,在室温下向溶液中添加DTT ( $5.0\text{mg}, 32.41 \times 10^{-6}\text{mol}$ )。溶液在 $40^\circ\text{C}$ 保持搅拌1小时,接着通过减压浓缩移除溶剂。最后通过LH-20管柱层析来纯化残余物,得到SSEA4-Gc-硫醇 ( $5.0\text{mg}, 93\%$ )。

[0362] 步骤B:将CRM197修饰为CRM197-顺丁烯二酰亚胺。

[0363] 经由反复地加水且透析 (Amicon Ultra-0.5,  $10\text{kDa}$ ) 来移除市售CRM197 ( $1.0\text{mg}$ ) 中的盐之后,将残余物溶解于PBS缓冲液 (pH 6.5,  $1.0\text{mL}$ ) 中且转移至样品小瓶中。向溶液中添加磺基-EMCS ( $1.0\text{mg}, 8.22 \times 10^{-6}\text{mol}$ ) ,接着反应物在室温下保持搅拌2小时。通过Amicon Ultra-0.5 ( $10\text{kDa}$ ) 纯化混合物。使用MALDI-TOF检查分子量且用BCA分析计算蛋白质量之后,CRM197-顺丁烯二酰亚胺于PBS缓冲液 (pH 7.2,  $1.0\text{mg/mL}$ ) 中储存用于下一步骤。根据MALDI-TOF资料,可计算顺丁烯二酰亚胺官能基的量。举例而言,当CRM197-顺丁烯二酰亚胺的分子量为 $61841$ 时,CRM197-顺丁烯二酰亚胺上的顺丁烯二酰亚胺官能基数目为  $(61841 - 58326) / 193 = 18.2$ 。

[0364] 将CRM197-顺丁烯二酰亚胺溶解于PBS缓冲液 (pH 7.2, 浓度为 $1.0\text{mg/mL}$ ) 中,接着向溶液中添加不同量的SSEA4Gc-硫醇 ( $5.0\text{mg/mL}$ , 于PBS缓冲液中, pH 7.2)。在室温下搅拌混合物2小时。使用Amicon Ultra-0.5 ( $10\text{kDa}$ ) 纯化SSEA4-Gc-CRM197结合物,以经由透析来移除未反应的SSEA4-Gc-硫醇及磷酸钠盐。所得SSEA4-Gc-CRM197结合物可通过MALDI-TOF分析来表征以测定碳水化合物合并率,如表2中所示。与DTT反应且通过LH-20管柱层析纯化之后,可回收未反应的SSEA4-Gc-硫醇。

[0365] 步骤C:捕捉CRM197-顺丁烯二酰亚胺中的未反应顺丁烯二酰亚胺

[0366] 将SSEA4-Gc-CRM197结合物溶解于PBS缓冲液 (pH 7.2, 浓度为 $1.0\text{mg/mL}$ ) 中且向溶

液中添加10.0当量的2-巯基乙醇(5mg/mL,PBS缓冲液,pH 7.2)。在室温下搅拌混合物2小时。使用Amicon Ultra-0.5(10kDa)纯化SSEA4-Gc-CRM197结合物,以经由透析移除未反应的2-巯基乙醇及磷酸钠盐,接着冻干为白色粉末。

[0367] 表2

[0368] CRM197与SSEA4-Gc的结合

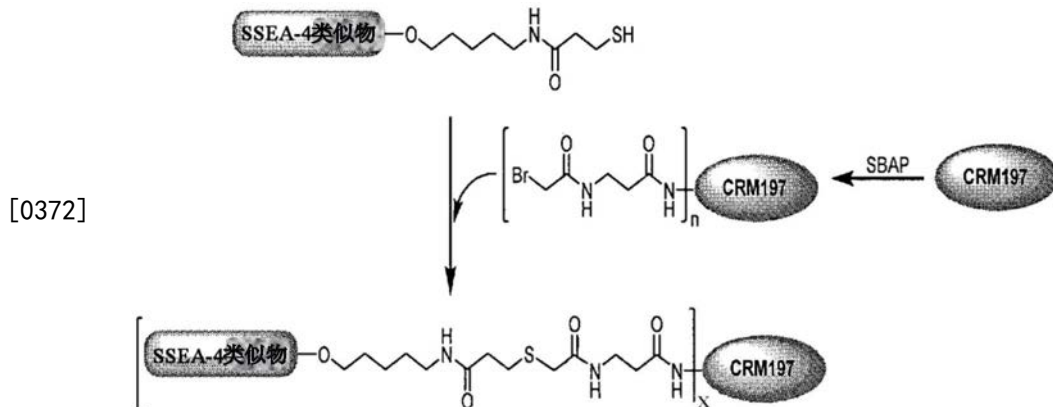
[0369]

	CRM197 ( $\mu\text{g}$ )	连接 符数 目	连接符的 量 (mol)	PBS缓冲液 (pH7.4, $\mu\text{L}$ )	SSEA4-硫醇 (5 mg/mL)	反应 时间	聚醚 数目	HSC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH (5 mg/mL) 10.0 eq.	CRM197 ( $\mu\text{g}$ )
1	1388	21.9	$5.21 \times 10^{-7}$	1000	28.1 $\mu\text{L}$ (0.2 eq.)	2小时	2.0	81.4 $\mu\text{L}$	1550.4
2	694	21.9	$2.61 \times 10^{-7}$	500	28.2 $\mu\text{L}$ (0.4 eq.)	2小时	4.2	40.8 $\mu\text{L}$	657.4
3	694	21.9	$2.61 \times 10^{-7}$	500	56.4 $\mu\text{L}$ (0.8 eq.)	2小时	6.5	40.8 $\mu\text{L}$	665.0
4	694	21.9	$2.61 \times 10^{-7}$	500	84.5 $\mu\text{L}$ (1.2 eq.)	2小时	6.9	40.8 $\mu\text{L}$	627.0
5	694	21.9	$2.61 \times 10^{-7}$	500	140.9 $\mu\text{L}$ (2.0 eq.)	2小时	7.1	40.8 $\mu\text{L}$	615.6
6	694	21.9	$2.61 \times 10^{-7}$	500	281.8 $\mu\text{L}$ (4.0 eq.)	2小时	7.0	40.8 $\mu\text{L}$	665.0
7	694	21.9	$2.61 \times 10^{-7}$	500	704.4 $\mu\text{L}$ (10.0 eq.)	2小时	6.8	40.8 $\mu\text{L}$	695.4

a) CRM197分子量 = 58:326  $\rightarrow$  1000  $\mu\text{g}$ ; =  $0.1715 \times 10^{-7}$  mol  
b) SSEA4-Gc-硫醇分子量 = 1349.479  $\rightarrow$  5 mg/mL =  $37.051 \times 10^{-7}$  mol/mL  
c) 2-巯基乙醇分子量 = 78.13  $\rightarrow$  5 mg/mL =  $639.91 \times 10^{-7}$  mol/mL

[0370] 实例5:经由SBAP交联产生的SSEA4类似物-CRM197结合物

[0371] 流程9.



[0373] 将CRM197溶解于0.1M磷酸盐缓冲液pH 7.4(约1mg/mL)中,且向溶液中添加SBAP(1.0mg)。在室温下轻缓地搅拌溶液2小时。混合物接着用PBS缓冲液稀释且通过Amicon Ultra-0.5(10kDa,2X)离心浓缩,接着加入0.1M磷酸盐缓冲液至浓缩液中并离心,重复5次。所得经修饰的CRM-197可通过MALDI-TOF(阳离子模式,基质为芥子酸,水)分析加以表征以测定SBAP合并率。

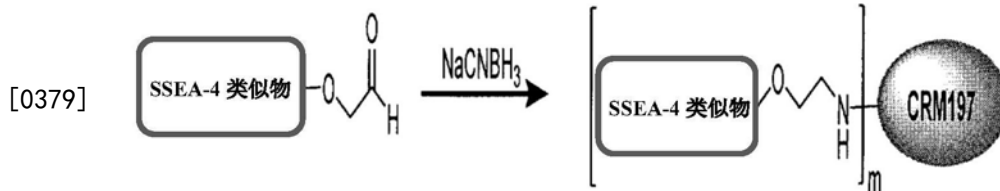
[0374] 将经修饰的CRM197溶解于0.1M磷酸盐缓冲液pH 8.0(约1mg/mL)中,且向溶液中添加SSEA4-硫醇类似物。混合物在室温下搅拌1天。混合物接着用PBS缓冲液稀释且通过Amicon Ultra-0.5(10kDa)离心浓缩,接着加入0.1M磷酸盐缓冲液至浓缩液中并离心,重复5次。所得聚醚-蛋白质结合物可通过MALDI-TOF(阳离子模式,基质为芥子酸,水)分析加以表征以测定碳水化合物合并率。(流程9)

[0375] 表3. 经由SBAP产生的SSEA4类似物与CRM197结合物中的碳水化合物合并率

代码	聚糖	蛋白质糖基化之后的分子量	(x)平均接合数
S1	SSEA4	68212	4.79
S2	Neu5Gc_SSEA4	67651	4.84
S3	Ac-炔基_SSEA4	70308	5.70
S4	Ac-氟化物_SSEA4	69309	5.01
S5	Ac-苯基_SSEA4	68891	5.05
S6	Ac-迭氮基_SSEA4	68359	4.50
S7	5'-迭氮基_SSEA4	71638	7.06
S8	9'-迭氮基_SSEA4	72545	7.90
S9	Glc-迭氮基_SSEA4	67131	3.9
S10	NHBz_SSEA4	69636	5.50

[0377] 实例6:经由还原胺化交联产生的SSEA4类似物-CRM197结合物

[0378] 流程10



[0380] 在某些实施例中,将CRM197溶解于0.1M磷酸盐缓冲液(pH 6-9,约1mg/mL)中,且向溶液中添加足量的SSEA4-醛类似物及氰基硼氢化钠。在室温下轻缓地搅拌溶液3天。混合物接着用去离子水稀释且通过Amicon Ultra-0.5 (10kDa离心浓缩,接着加入0.1M磷酸盐缓冲液至浓缩液中并离心,重复5次。所得聚糖-蛋白质结合物通过MALDI-TOF(阳离子模式,基质为芥子酸与水)分析加以表征以测定碳水化合物接合数。(流程10)

[0381] 表4:经由还原胺化产生的SSEA4类似物与CRM197结合物中的碳水化合物接合数

代码	聚糖	蛋白质糖基化之后的分子量	(m)平均接合数
R1	SSEA4	69025	8.89
R2	Neu5Gc_SSEA4	65154	5.6
R3	Ac-氟化物_SSEA4	69315	9
R4	Ac-苯基_SSEA4	71329	10.1
R5	Ac-迭氮基_SSEA4	67765	7.6
R6	9'-迭氮基_SSEA4	67635	7.58
R7	NHBz_SSEA4	67124	6.95

[0383] 实例7:SSEA4类似物-CRM197结合物的免疫测定

[0384] 例示性方法

[0385] 为了证明SSEA4类似物-CRM197结合物(S1至S10)的功效/免疫原性,雌性C57BL/6小鼠(各组n=5)肌内接种0.5μg SSEA4类似物CRM197结合物(与2.0μg酯脂佐剂组合使用)。对照小鼠仅给予磷酸盐缓冲生理盐水与2.0μg酯脂佐剂。疫苗接种2个月,隔两周一次且每次接种疫苗之后一周收集免疫小鼠的抗血清。使用SSEA4所固着的96孔滴定盘检查针对SSEA4的抗体效价。使用SSEA4所固着的96孔滴定盘进行酵素连结免疫吸附法(ELISA)。简言

之,将稀释的抗血清与所固着的SSEA4一起在室温下培育2小时。洗涤循环之后,接着使用HPR结合的抗IgG或IgM特异性抗体侦测所捕获的抗SSEA4抗体。

[0386] 为了确定聚糖-蛋白质结合方法是否会干扰免疫反应,使原生SSEA4与CRM197经由EMCS连接符(M1)、SBAP连接符(S1)或还原胺化法(R1)结合且用于如上文所述的免疫原性研究。

[0387] 代表性结果

[0388] 四次免疫接种之后,原生SSEA4以及所有八种SSEA4类似物当与Gal-C34佐剂组合使用时可积极地诱发针对SSEA4的IgG(图3A)与IgM(图3B)抗体。在不同类似物群组中,抗SSEA4IgG及IgM抗体的效价无显著差异。另外,Glc-C34当与原生SSEA4及其它类似物共投与时,亦可用作诱导针对SSEA4的IgG(图4A)与IgM(图4B)的疫苗佐剂。

[0389] 此外,图5中所示的结果表明聚糖-蛋白质结合方法可影响免疫反应。与Gal-C34组合使用时,SSEA4-EMCS-CRM197(M1)诱发的抗SSEA4IgG抗体效价高于SSEA4-SBAP-CRM197(S1)及SSEA4-CRM197(经由还原胺化法结合,R1)。

[0390] 实例8:SSEA4类似物CRM197结合物的免疫原性研究

[0391] 为了证明SSEA4类似物CRM197结合物的免疫原性,五只雌性BALB/c小鼠肌肉内免疫接种2 $\mu$ g SSEA4类似物-CRM197结合物及2 $\mu$ g醚脂佐剂C34三次,隔两周一次。在先前研究中,在无任何佐剂的单独SSEA4类似物-蛋白质结合物的情况下,抗GloboH抗体效价较低。第三次免疫接种之后十天,获得来自各免疫原的抗血清且针对含有94种化学合成聚糖的聚糖微数组加以测试,包括球系列聚糖及其他肿瘤相关碳水化合物抗原。由于对聚糖进行一些化学修饰,因此为了检查交叉反应性而在聚糖数组中包括一些官能性连接符。

[0392] SSEA4-Gc-CRM197结合物所诱导的抗体被SSEA4-Gc、原生SSEA4或SSEA4四糖片段特异性识别,但不被其他TACA及官能性连接符特异性识别。获自醚结合物的血清诱导高IgG抗体效价,表明T细胞依赖性免疫反应。有趣的是,对于SSEA4-Gc或原生SSEA4而言,未观察到显著IgM产生。关于针对GloboH的IgG含量,SSEA4-Gc CRM197所诱导的抗体效价比天然形式原生SSEA4-CRM197结合物高得多。其中,6.9个SSEA4-Gc分子与1个CRM197分子的结合物可诱导最高的抗体效价。

[0393] 小鼠剂量及免疫接种时程

[0394] 为了比较SSEA4类似物CRM197的免疫原性,十组五只小鼠(8周龄雌性BALB/c小鼠,BioLASC0,台湾)肌肉内免疫接种醚脂C34。免疫接种三次,隔2周一次。各疫苗含有2 $\mu$ g SSEA4类似物及2 $\mu$ g C34。对照小鼠注射磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)。小鼠首次免疫接种之前(免疫前)及第三次免疫接种之后10天放血。通过4,000 $\times$ g离心10分钟来获得所有血清。通过聚糖微数组来分析血清反应。

[0395] 使用聚糖数组的血清学分析

[0396] 用1%BSA/PBST缓冲液(PBST缓冲液:PBS及0.05%Tween-20,pH 7.4)稀释小鼠血清。聚糖微数组在4 $^{\circ}$ C用Superblock阻断缓冲液(Pierce)阻断1小时且在使用之前用PBST缓冲液洗涤三次。接着将血清稀释液引入聚糖微数组中且在4 $^{\circ}$ C培育1小时。洗去过量血清抗体且微数组个别地与Alexa Fluor 647结合的山羊抗小鼠IgG抗体或DyLight 649结合的山羊抗小鼠IgM抗体作为二次抗体,一起在4 $^{\circ}$ C在暗处培育1小时。载片接着用PBST洗涤三次且用微数组荧光芯片读取器(GenePix 4300A;Molecular Devices Corporation)在635nm波

长下扫描且经扫描的影像用GenePix Pro-6.0分析软件(Axon Instruments,Union City,CA,USA)加以分析。

[0397] 其他实施例

[0398] 本说明书中揭示的所有特征可以任何组合形式组合。本说明书中揭示的各特征可经用于相同、等效或类似目的的替代性特征置换。因此,除非另外明确说明,否则所揭示的各特征仅为一系列等效或类似通用特征的一个实例。根据以上描述,熟习此项技术者可容易确定所述实施例的基本特征,且在不背离其精神及范畴的情况下可对实施例作出各种变化及修改以使其适应各种用途及条件。因此,其他实施例亦属于申请专利范围内。

鞘糖脂的生物合成途径

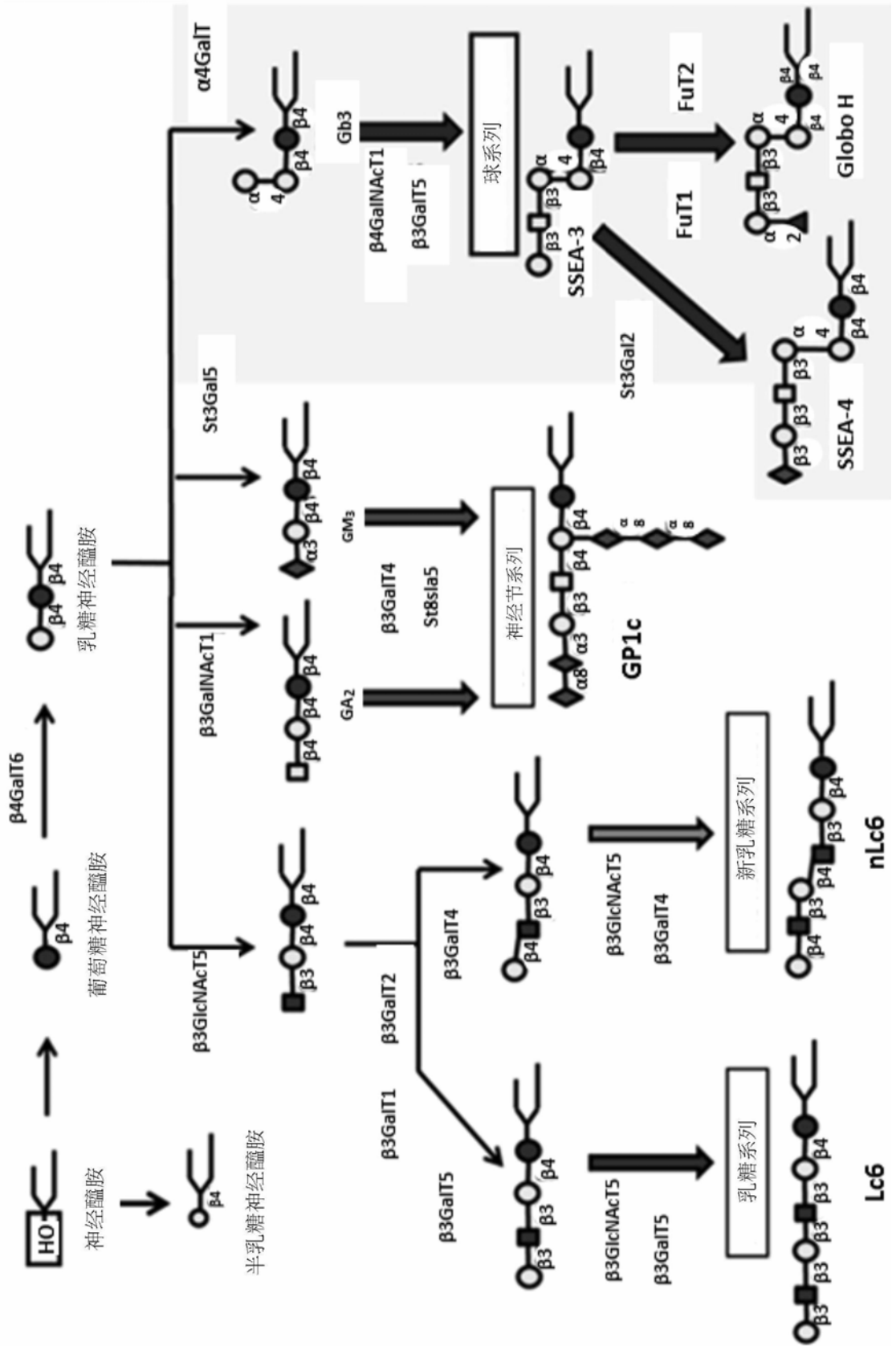


图1

自不同抗原决定基比率的SSEA4-DT或SSEA4-Gc免疫接种的小鼠中所收集的经诱导GH-IgG

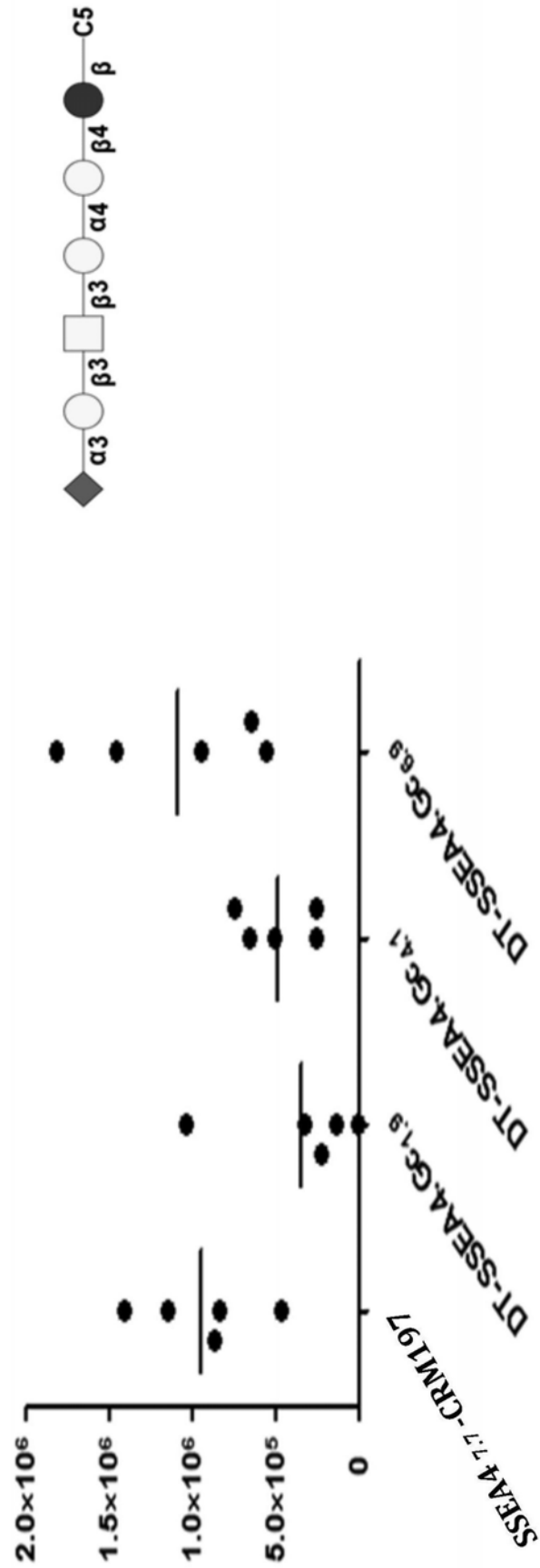


图2

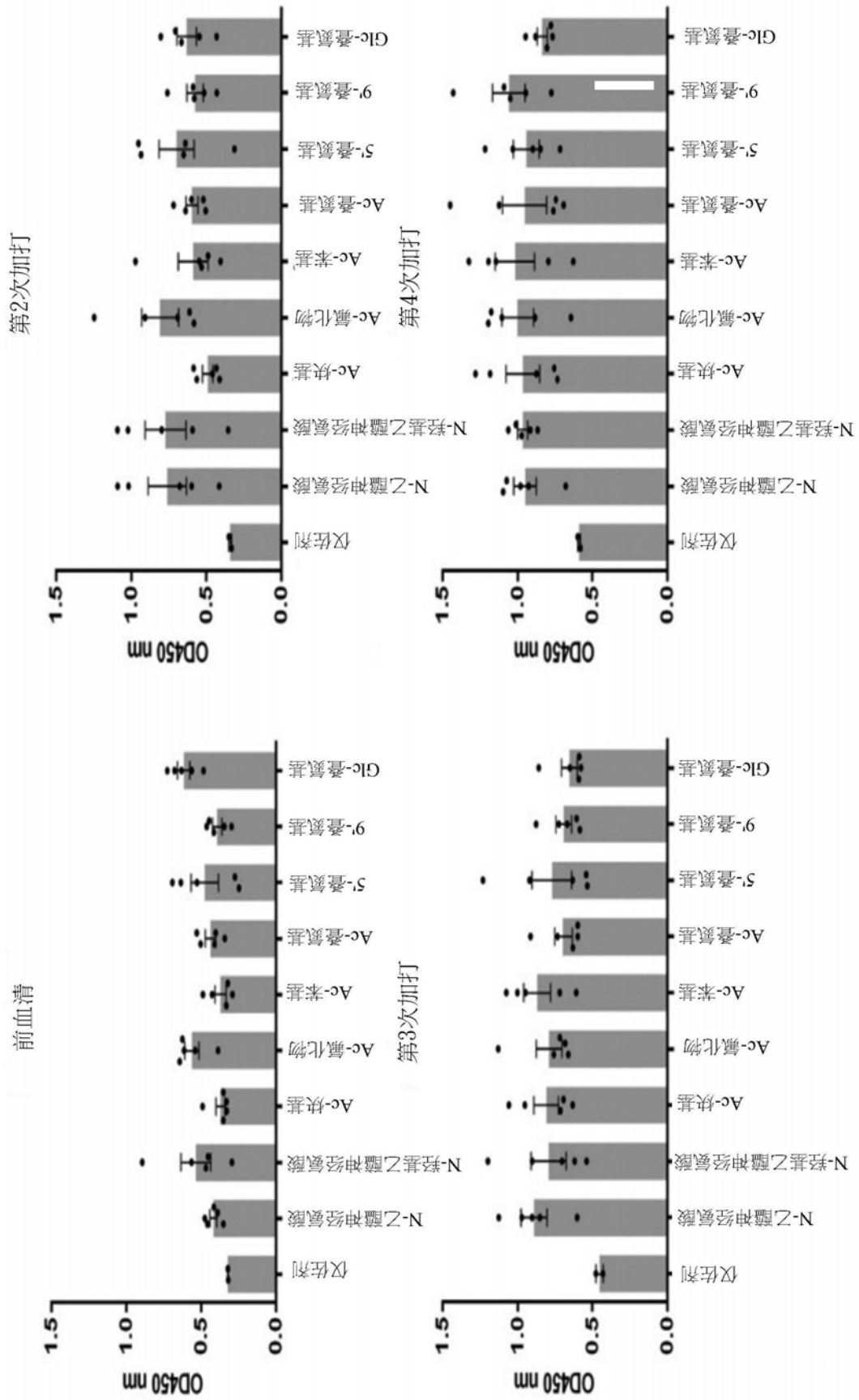


图3A

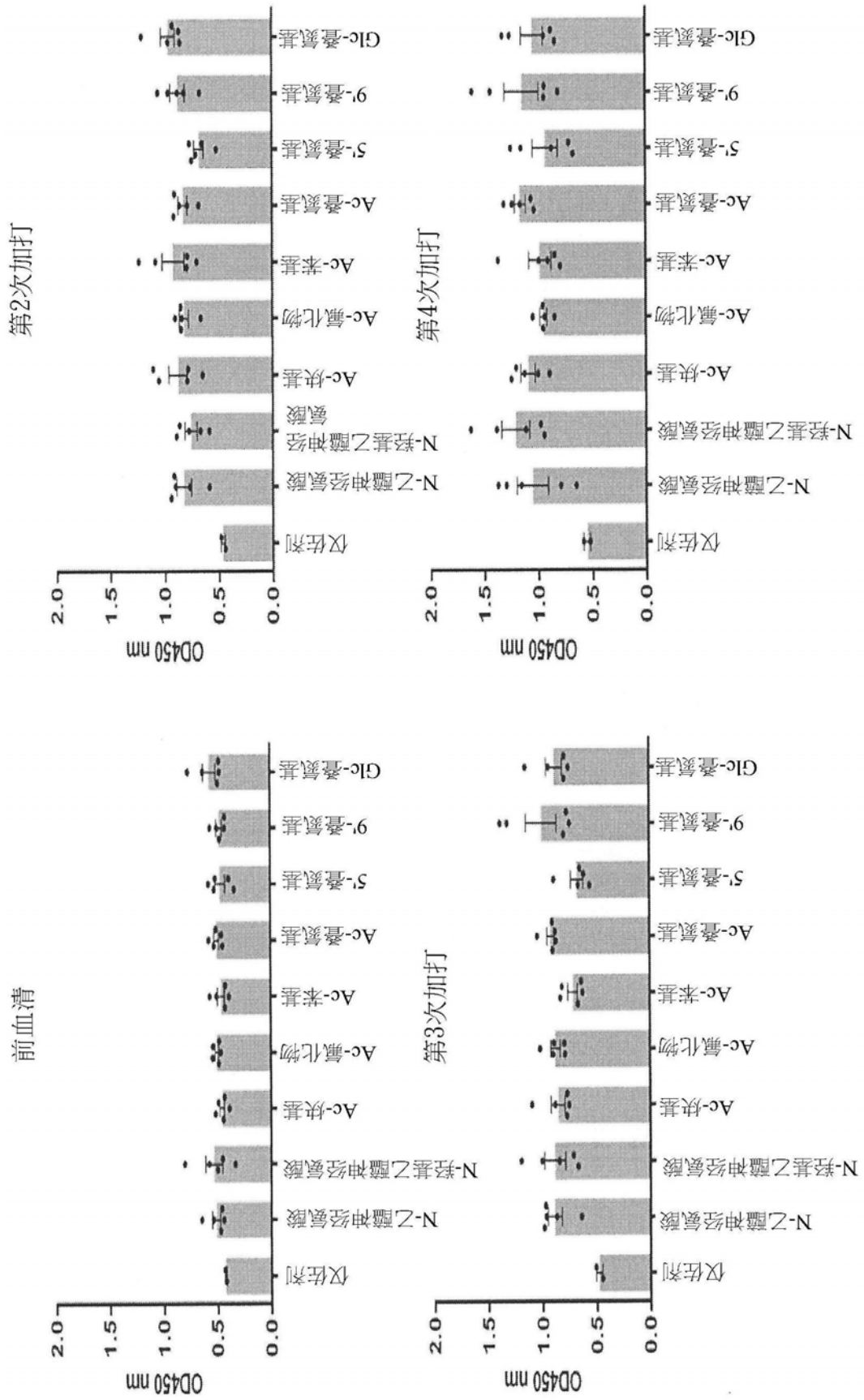


图3B

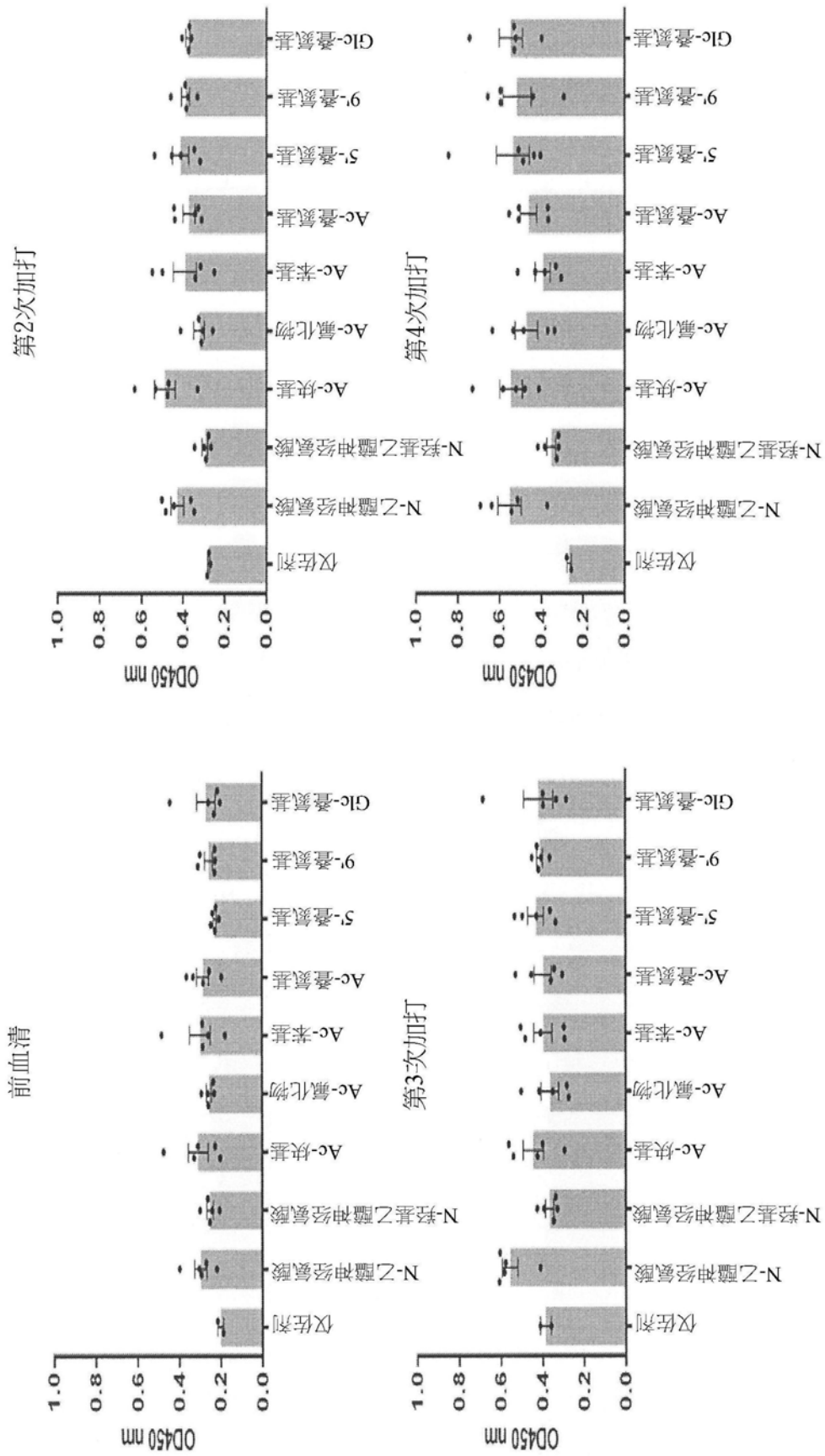


图4A

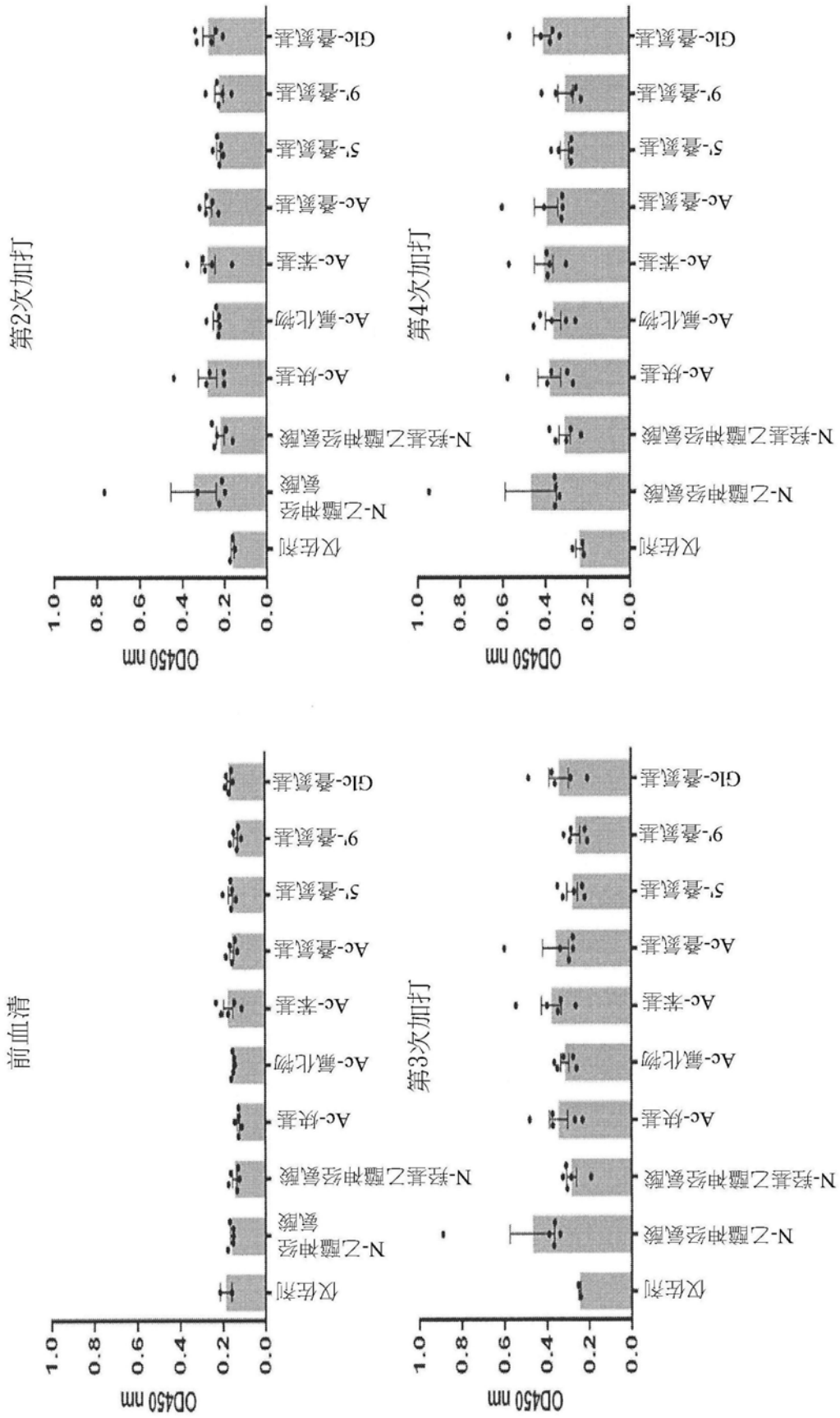


图4B

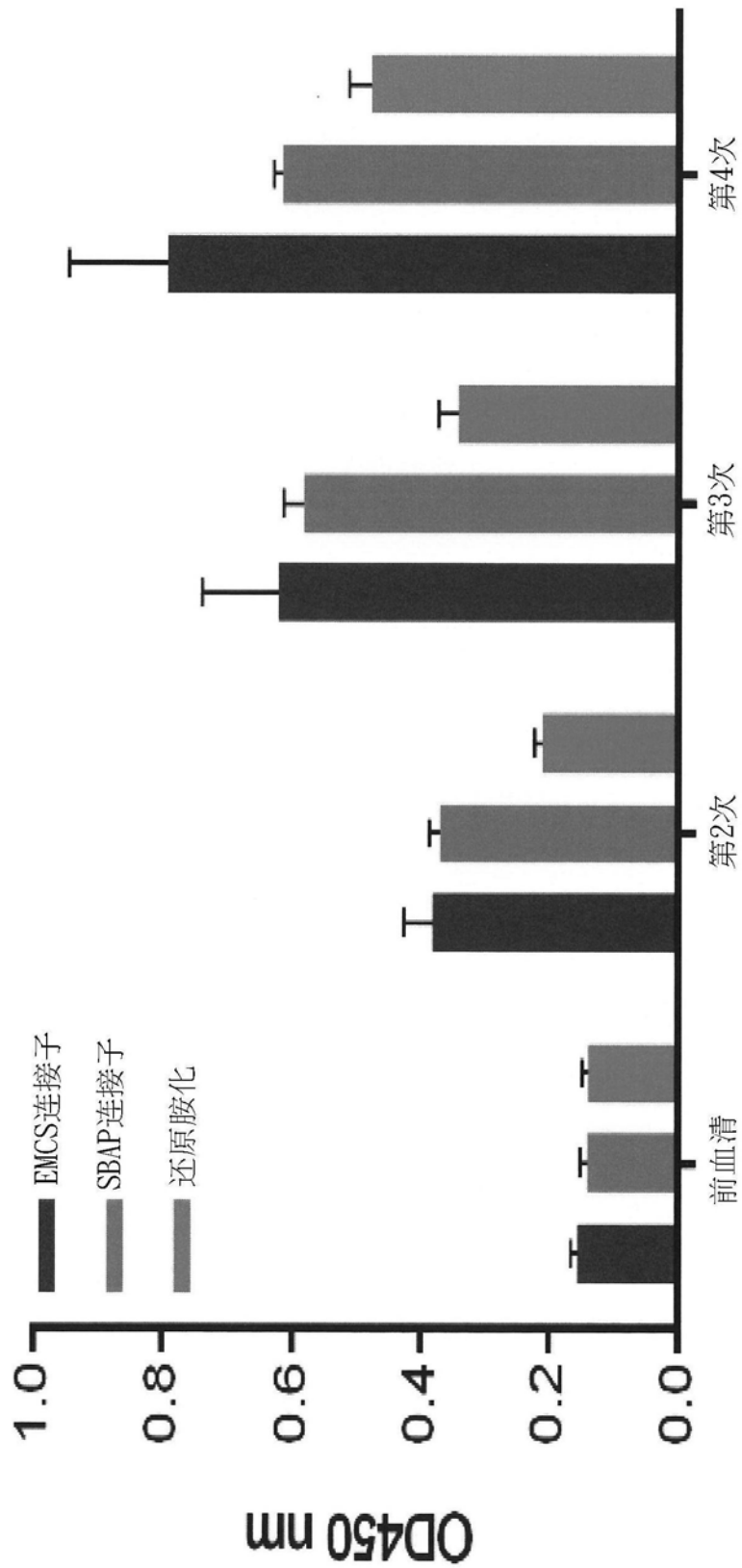


图5

专利名称(译)	新颖聚糖结合物及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107407673B</a>	公开(公告)日	2019-07-16
申请号	CN201580074177.9	申请日	2015-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	中央研究院		
申请(专利权)人(译)	中央研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中央研究院		
[标]发明人	翁启惠 吴宗益		
发明人	翁启惠 吴宗益		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	林斯凯		
优先权	62/107378 2015-01-24 US		
其他公开文献	CN107407673A		
外部链接	<a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及靶向SSEA3/SSEA4/GloboH相关抗原决定基(天然及经修饰)的疫苗、抗体及/或免疫原性结合物组合物,其诱发抗体及/或结合片段产生用于调节球系列鞘糖脂合成。本发明涉及可调节球系列鞘糖脂合成的方法及组合物。特定言之,本发明涉及可调节生物合成路径中的球系列鞘糖脂SSEA3/SSEA4/GloboH合成的糖酶抑制剂化合物及其组合物及使用方法;特定言之,糖酶抑制剂靶向球系列合成路径中的 $\alpha$ -1,4-半乳糖基转移酶;  $\beta$ -1,4-N-乙酰半乳糖基转移酶-I; 或 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶-V。此外,本发明亦关于使用本文所述的组合物治疗或侦测过度增生性疾病及/或病状的方法。

