



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101868247 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

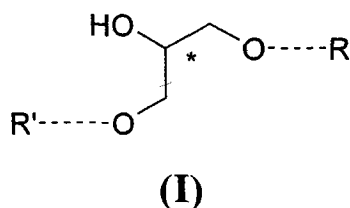
(21) 申请号 200880116784. 7 *A61K 39/39* (2006. 01)
(22) 申请日 2008. 10. 13 *C12Q 1/18* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *G01N 33/53* (2006. 01)
07291249. 6 2007. 10. 12 EP *G01N 33/569* (2006. 01)
A61P 31/06 (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2010. 05. 19
(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2008/063736 2008. 10. 13
(87) PCT申请的公布数据
W02009/047363 EN 2009. 04. 16
(71) 申请人 国家科研中心
地址 法国巴黎
(72) 发明人 G·普佐 E·莱尔 M·基勒隆
J·普兰迪 G·德里贝罗
S·斯滕格
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 罗菊华
(51) Int. Cl.
A61K 39/02 (2006. 01)

权利要求书 6 页 说明书 13 页 附图 18 页

(54) 发明名称
包含放线菌甘油酰基衍生物抗原的药物组合
物, 其提取方法以及其抗结核病的用途

(57) 摘要
本发明涉及放线菌甘油单分枝菌酸酯衍生物
作为抗原的治疗用途, 其提取方法及其用于治疗
或预防结核病的用途。

1. 药物组合物,其包含至少一种具有式(I)的化合物及其对映异构体、非对映异构体,其混合物:

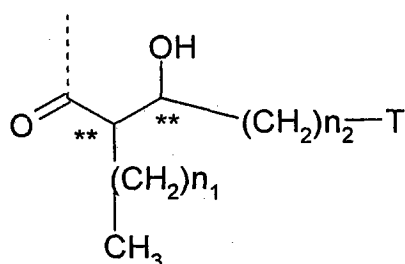


其中

R 为包含 20-90 个碳原子的 α -烷基化、 β -羟基化羧酸的残基;

R' 代表氢原子或酰基基团 ($-\text{C}(=\text{O})-\text{烷基}$),其中烷基包含 1-10 个碳原子;并且 * 表示不对称碳原子。

2. 根据权利要求 1 的药物组合物,其中 R 为具有式:



其中 (I) 通过 ---- 附着到 R 上;并且

T 代表甲基基团或者分支的或线性的 C10-C60 烃链,其任选地包含一个或多个双键、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 基团、环丙基和 / 或环氧基,和 / 或任选地由一个或多个选自 OH、O 甲基的基团所取代;

** 代表不对称碳原子;

n_1, n_2 为相同的或不同的,独立地代表整数。

3. 根据权利要求 2 的药物组合物,其中 n_1 为 5-40 之间包含的整数。

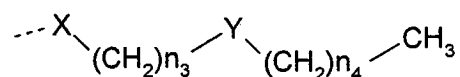
4. 根据权利要求 2 或 3 的药物组合物,其中 n_2 为 5-30 之间包含的整数。

5. 根据权利要求 2,3 或 4 的药物组合物,其中 T 选自:

- 甲基基团;或,

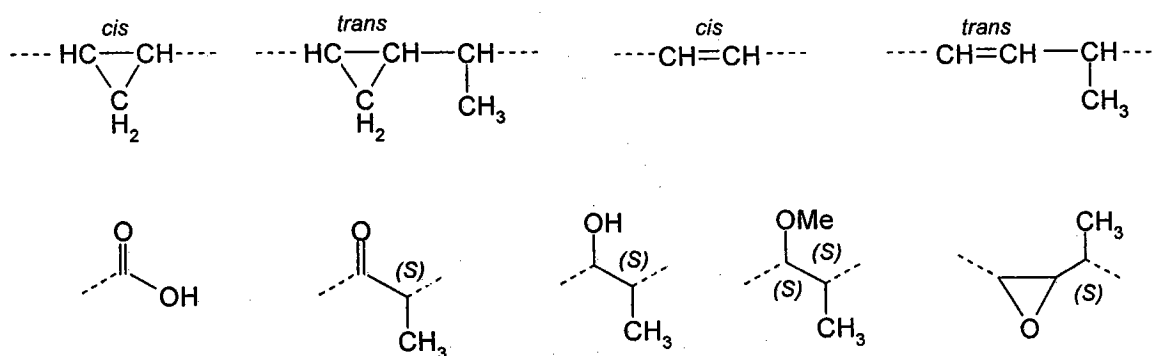
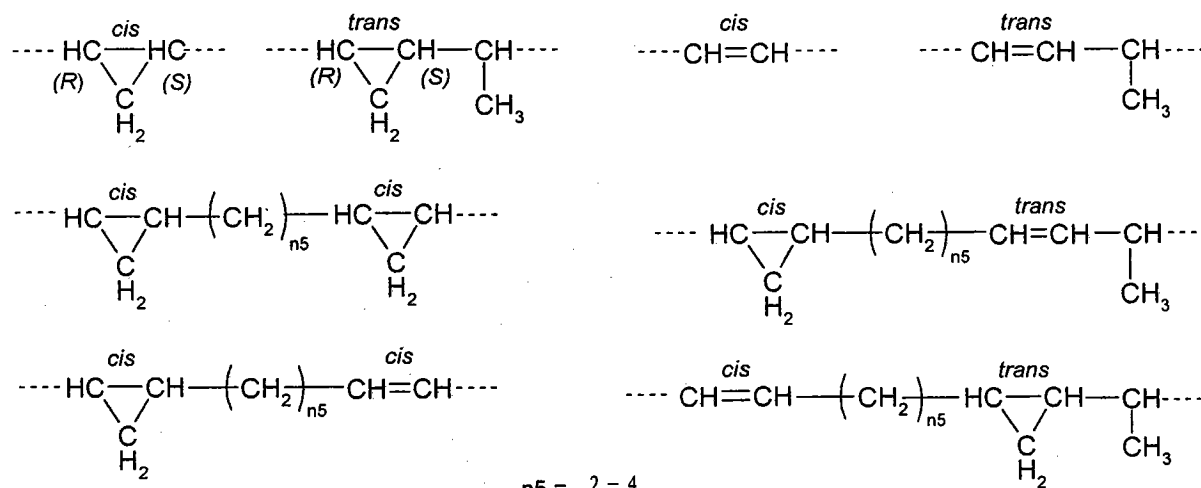
- 分支的或线性的 C10-C60,其任选地包含 1-5 个双键;或

- 具有下式的基团:



其中

X 选自:



并且 n_3, n_4 为相同的或不同的, 独立地代表 5-30 之间包含的整数, 条件是当 Y 为 $---C(=O)-OH$ 时, 则 T 为 $---(CH_2)_{n_3}-X-C(=O)-OH$ 。

6. 根据权利要求 5 的药物组合物, 其中 n_3 代表了 12-16 之间包含的整数。

7. 根据权利要求 5 或 6 的药物组合物, 其中 n_4 选自 11、13、15、17、18 和 19。

8. 根据以上权利要求中任何一项的药物组合物, 其包含如以上权利要求中任何一项中定义的式 (I) 的至少两种不同化合物。

9. 根据以上权利要求中任何一项的药物组合物, 其包含如以上权利要求中任何一项中定义的式 (I) 的化合物的混合物。

10. 根据以上权利要求中任何一项的药物组合物, 其特征在于其以旨在用于口服或可注射途径施用的形式存在。

11. 根据以上权利要求中任何一项的药物组合物, 其特征在于其包含一种或多种用于治疗或预防结核病的产品。

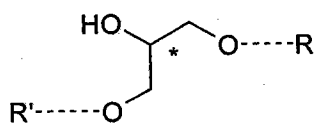
12. 根据权利要求 11 的药物组合物, 其中用于治疗或预防结核病的所述产品选自 BCG 或分枝杆菌脂质。

13. 根据权利要求 11 的药物组合物, 其中所述分枝杆菌脂质选自分枝杆菌磷脂, 分枝杆菌脂聚糖、分枝杆菌糖脂和磷脂。

14. 根据权利要求 11、12 或 13 的药物组合物, 其作为组合制备物用于在治疗或预防结核病中同时、分开或顺序使用。

15. 根据以上权利要求中任何一项的药物组合物, 其为疫苗。

16. 式 (I) 的化合物及其对映异构体, 非对映异构体, 其混合物：



(I)

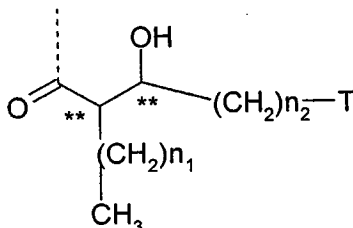
其中

R 为包含 20-90 个碳原子的 α -烷基化 β -羟基化羧酸的残基；

R' 代表酰基基团 ($-\text{C}(=\text{O})-\text{烷基}$)，其中烷基包含 1-10 个碳原子；并且

* 表示不对称碳原子。

18. 权利要求 17 的化合物，其中 R 为具有式：



其中 (I) 通过 ---- 附着到 R 上；且

T 代表甲基基团或者分支的或线性的 C10-C60 烃链，其任选地包含一个或多个双键、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 基团、环丙基和 / 或环氧基，和 / 或任选地由一个或多个选自 OH、O 甲基的基团所取代；

** 代表不对称碳原子；

n_1, n_2 为相同的或不同的，独立地代表整数。

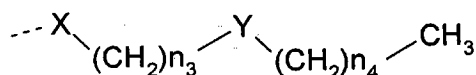
19. 根据权利要求 16、17 或 18 的化合物，其中 n_1 为 5-40 之间包含的整数， n_2 为 5-30 之间包含的整数。

20. 根据权利要求 18 或 19 的化合物，其中 T 选自：

- 甲基；或

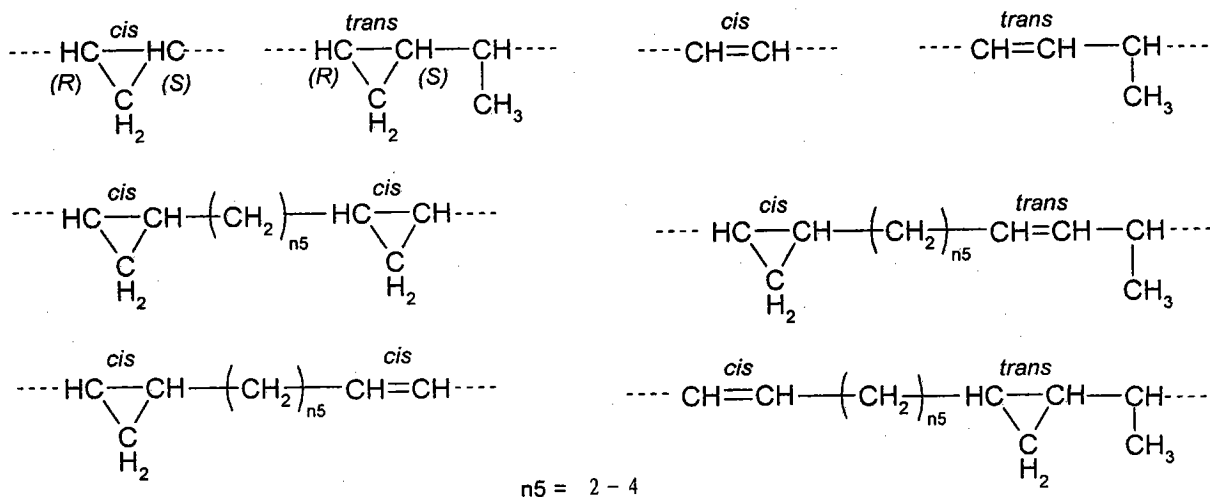
- 分支的或线性的 C10-C60，其任选地包含 1-5 个双键；或

- 具有下式的基团：

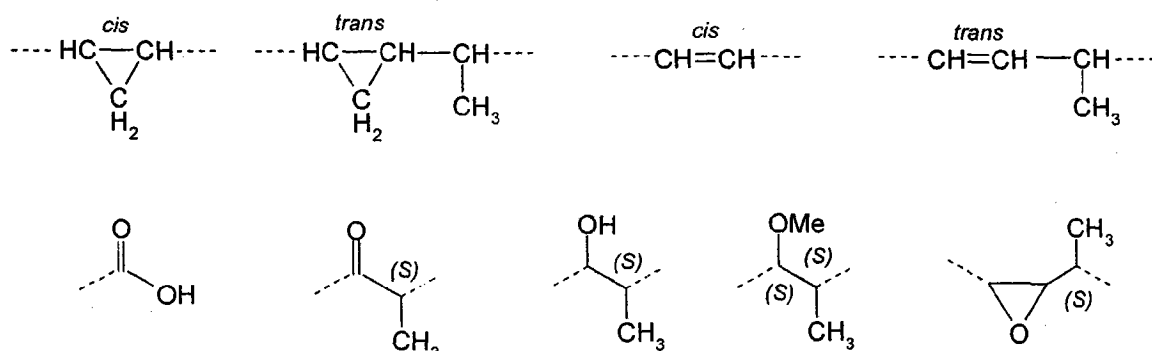


其中

X 选自：



Y 选自：



并且 n_3, n_4 为相同的或不同的，独立地代表 5-30 之间包含的整数，条件是当 Y 为 $---C(=O)-OH$ 时，则 T 为 $---(CH_2)_{n_3}-X-C(=O)-OH$ 。

21. 根据权利要求 16 或 20 的化合物，其中 n_3 代表 12-16 之间包含的整数， n_4 选自 11、13、15、17、18 和 19。

22. 如在权利要求 1-15 中任何一项中定义的化合物，其特征在于式 (I) 中 C^* 显示出 (R) 构象。

23. 至少一种如权利要求 1-22 中任何一项定义的式 (I) 的化合物在制备旨在用于治疗或预防结核病的药物中的用途。

24. 如权利要求 1-22 中任何一项定义的化合物，作为药物用于治疗或预防结核病。

25. 至少一种如权利要求 1-22 中任何一项定义的化合物作为免疫反应激活剂的用途。

26. 至少一种如权利要求 1-22 中任何一项定义的化合物诱导 T 淋巴细胞激活的用途。

27. 至少一种如权利要求 1-22 中任何一项定义的化合物诱导 $IFN-\gamma$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-2$ 、 $IL-4$ 、或 $GM-CSF$ 生产的用途。

28. 用于产生特异于如权利要求 1-22 中任何一项定义的式 (I) 的化合物的 T 细胞克隆的方法，其特征在于其包括以下步骤：

1) 将抗原呈递细胞 (APC)，显著地为树突细胞，与放线菌脂质制备物（结核分枝杆菌脂质制备物除外）或式 (I) 的化合物一起孵育。

2) 将外周血单核细胞与加载有被膜抗原的 APC 相接触以获得增殖性 T 细胞，

3) 通过有限稀释来克隆增殖性 T 细胞并选择与式 (I) 化合物接触时释放选自细胞因子如 $IFN-\gamma$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $GM-CSF$ 、 $IL-2$ 或 $IL-4$ 的分子的克隆。

29. 根据权利要求 28 的方法,其中在步骤 1) 中,放线菌脂质制备物为牛分枝杆菌 BCG 脂质制备物。

30. 通过根据权利要求 29 的方法可获得的 T 细胞克隆。

31. 用于筛选产品的方法,其特征在于其包括以下步骤:

- 将加载有待筛选的产品的树突细胞与根据权利要求 30 的 T 细胞克隆相接触,
- 检测选自细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-2 或 IL-4 的分子,其由 T 细胞克隆释放。

32. 用于从放线菌中提取如权利要求 1-22 中任何一项定义的化合物的方法,其特征在于其包括以下步骤:

- a. 用甲醇和氯仿混合物处理细菌以获得氯仿 / 甲醇提取物,
- b. 浓缩氯仿 / 甲醇提取物,之后是其在氯仿相(本文称为脂质级分)和水相之间的分配,
- c. 取走脂质级分。

33. 根据权利要求 32 的方法,其进一步包含以下附加的步骤:

- d. 蒸发大部分氯仿,之后向其中加入丙酮以获得沉淀以及可溶性丙酮相,
- e. 取丙酮不可溶相,之后将其浓缩,之后加入甲醇以获得沉淀及甲醇不可溶相,
- f. 取甲醇不可溶相,之后将其浓缩,并将浓缩的甲醇不可溶相应用到硅胶柱上,
- g. 从上文提到的硅胶柱上用氯仿、甲醇及其混合物洗脱级分,所述的级分对应上文定义的组合物,
- h. 如果需要,纯化从硅胶柱上洗脱的级分以获得不同的制备物,其分别基本上只含有一种上文定义的化合物。

34. 通过根据权利要求 32 或 33 的方法可获得的组合物。

包含放线菌甘油酰基衍生物抗原的药物组合物,其提取方法以及其抗结核病的用途

[0001] 本发明涉及放线菌甘油酰基衍生物抗原的治疗用途,其提取方法以及其治疗或预防结核病的用途。

[0002] 据估计每年结核病引起 200 万例死亡。该疾病的致病因子是一种细菌,结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*),全世界每三个人中有一个被这种细菌感染。其由被感染的人的喷嚏或咳嗽通过空气传播。该细菌可以以无活性状态藏匿于受感染的人中,该受感染的人永远不会发展该疾病。然而,在特定条件下,如年老或免疫系统受抑制,该细菌会变得有活性并引起活性结核病的发生。

[0003] 分枝杆菌的被膜似乎是分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 属的细菌毒力的重要部分。事实上,多至分枝杆菌 40% 的干重由脂质组成。已经显示这些脂质参与了宿主免疫应答的调制。一些脂质为对于 CD1 蛋白质刺激非常规的 α β T 细胞的抗原。大部分分枝杆菌脂质抗原由 CD1b 同种型所呈递。一大组结构上非常不同的分子都是这种情况,如分枝菌酸,葡糖单分枝菌酸酯 (monomycolate), 硫代甘油脂及磷脂酰肌醇甘露糖苷 (phosphatidyl-myo-inositol mannosides, PIM)。

[0004] 特异于几种最丰富的分枝杆菌脂质的 CD1 限制性 T 细胞的存在强烈暗示着 CD1 蛋白质在对结核分枝杆菌的宿主应答中是重要的。

[0005] 目前,有两种对抗结核病的方式: 抗生素治疗和疫苗接种。

[0006] 用于预防结核病的疫苗由牛结核杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 物种的活减毒细菌构成。以在 20 世纪初首先涉及它的两位科学家将其命名为 BCG (*Bacillus of Calmette and Guerin*)。显著地,用于免疫接种的 BCG 的不同菌株在 Behr M. A. 等人 *Science* (1999) 284: 1520-1523 中有所描述。

[0007] 除了其为活疫苗(这使之不能用于免疫抑制的患者)这一缺陷之外,其针对结核病的保护作用是有争议的。因此,根据不同研究,BCG 在成人中的保护性效力范围为从 0% -80%,此外,其不能针对肺结核——成人中最流行的疾病进行保护。

[0008] 此外,已经在超过 35 个国家发现结核分枝杆菌的抗生素抗性菌株。

[0009] 因此,本发明的一个主题是提供治疗和 / 或预防结核病的更有效方式。

[0010] 因此非常需要提供进一步的新的免疫原性化合物。

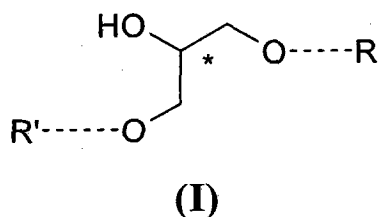
[0011] 显著地,本发明提供了新抗原,已显示其在体外刺激 CD1- 限制性 T 淋巴细胞。所述抗原为甘油单分枝菌酸酯衍生物,已经从放线菌如分枝杆菌中分离出来。

[0012] 分枝菌酸衍生物的特征已经有大量报道 (Laval 等人, *Anal Chem* 2001, 73(18) : 4537-4544; Villeneuve M. 等人, *Biochim Biophys Acta* 2005, 1715(2) : 71-80; Villeneuve M. 等人, *Biochim Biophys Acta* 2007, 1768(7) : 1717-1726; Watanabe M. 等人, *Microbiology* 2001, 147(Pt7) : 1825-1837)。

[0013] 这些化合物是已知的,尽管其治疗用途还没被公开或指出,这是本发明的一个目的。此外,根据本发明的一个进一步的目的,其对应的乙酰化形式和还原形式以及这些化合物的特异性 (R) 对映异构体是新型的。

[0014] 更具体而言,本发明涉及下列通式 (I) 的化合物,及其对映异构体、非对映异构体,其混合物,以及其治疗用途:

[0015]



[0016] 其中:

[0017] R 为包含 20-90 个碳原子的 α -烷基化、 β -羟基化羧酸的残基;

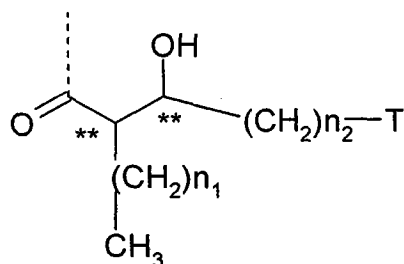
[0018] R' 代表氢原子或酰基基团 ($-\text{C}(=\text{O})-\text{烷基}$), 其中烷基包含 1-10 个碳原子; 并且

[0019] * 表示不对称碳原子。

[0020] 优选地,甘油骨架的不对称碳 (*) 显示出 (R) 构象。

[0021] 优选地, R 为具有式:

[0022]



[0023] 其中 (I) 通过 ---- 附着到 R 上; 并且

[0024] T 代表甲基基团或者分支的或线性的 C10-C60 烃链, 或其衍生物, 其另外包含一个或多个双键、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 基团、环丙基和 / 或环氧基 (epoxy), 和 / 或另外由一个或多个选自 OH、O 甲基的基团所取代;

[0025] ** 代表不对称碳原子;

[0026] n1, n2 为相同的或不同的, 独立地代表整数。

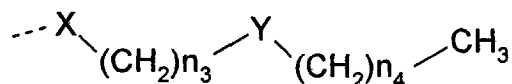
[0027] 优选地, n1 为 5-40, 更优选地 5-30 之间包含的整数;

[0028] 优选地, n2 为 5-30; 更优选地 10-20 之间包含的整数;

[0029] 优选地, 两个 **C 不对称碳原子都显示出 (R) 构象;

[0030] 优选地, T 选自甲基基团或者分支的或线性的 C10-C60, 优选地为 C15-C50 烃链, 其任选地包含 1-5 个双键, 和 / 或代表下式的基团:

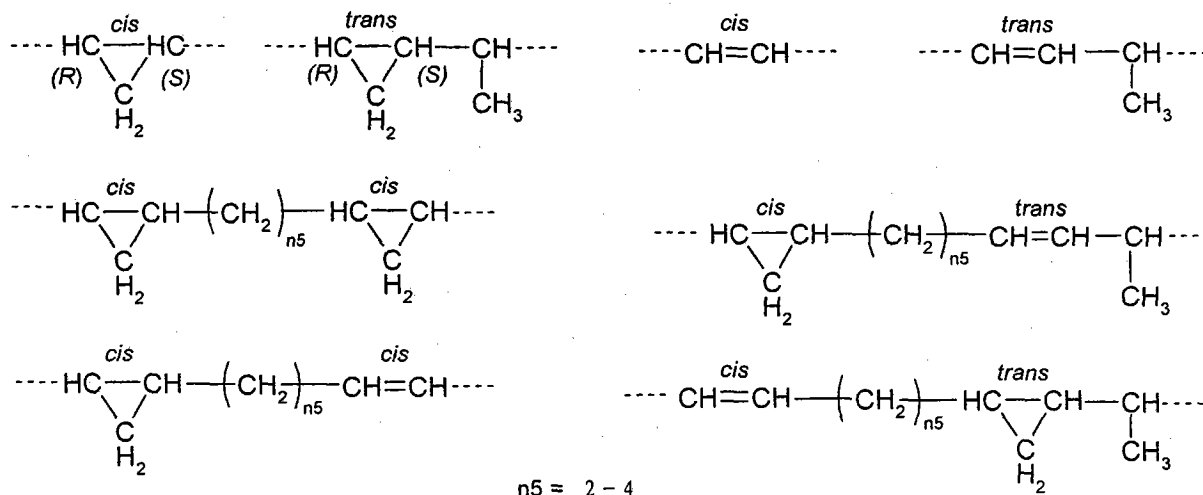
[0031]



[0032] 其中

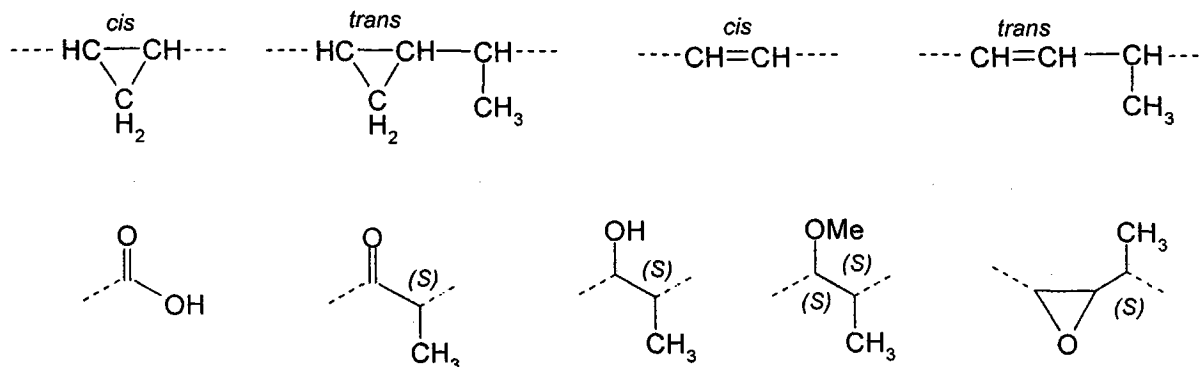
[0033] X 选自:

[0034]



[0035] Y 选自：

[0036]



[0037] 并且 n_3, n_4 为相同的或不同的, 独立地代表 5-30 之间包含的整数; 优选地 n_3 代表 12-16 之间包含的整数且 n_4 选自 11、13、15、17、18 和 19,

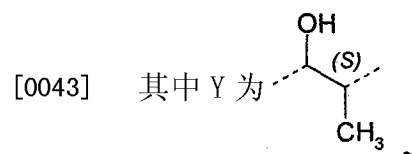
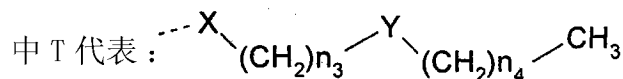
[0038] 条件是当 Y 为 ---C(=O)-OH 时, 则 T 为 $\text{---(CH}_2\text{)}_{n_3}\text{-X-C(=O)-OH}$ 。

[0039] 分枝菌酸衍生物由 Laval 等人, Anal Chem 2001, 73(18):4537-4544; Villeneuve M. 等人, Biochim Biophys Acta 2005, 1715(2):71-80; Villeneuve M. 等人, Biochim Biophys Acta 2007, 1768(7):1717-1726; Watanabe M. 等人, Microbiology 2001, 147(Pt7):1825-1837 定性。

[0040] 根据一个优选的实施方式, 本发明涉及如上文定义的式 (I) 的化合物本身, 其中 R' 代表 -C(=O)- 烷基基团。

[0041] 这些化合物可通过应用或采用任何一般使用的已知酰基化方法, 具体而言是通过与乙酸酐反应, 由相应的上文描述的式 (I) 的相应化合物获得。

[0042] 根据另一个优选的实施方式, 本发明涉及如上文定义的式 (I) 的化合物本身, 其中 T 代表:



[0044] 对应的化合物在本文中称为“还原的化合物”。

[0045] 这些化合物可通过应用或采用任何一般使用的已知还原方法,由相应的上文描述的式(I)的相应化合物获得。优选地,该反应可通过 NABH_4 处理的方式进行。

[0046] 根据另一个优选的实施方式,本发明涉及如上文定义的式(I)的化合物本身,其中 C^* 显示出(R)构象。

[0047] 本文的 GroMM 指的是甘油单分枝菌酸酯。

[0048] 根据一个进一步的实施方式,本发明涉及药物组合物,其包含如上文定义的式 I 的化合物。

[0049] 本发明进一步涉及药物组合物,其特征在于其含有选自式 I 化合物的化合物的混合物。

[0050] 本发明还涉及药物组合物,其含有至少一种上文定义的化合物或上文定义的组合物,其与药学可接受载体联合。

[0051] 例如,所述的药物组合物为疫苗。

[0052] 进一步地,本发明还涉及一种或多种式 I 的化合物与一种或多种分枝杆菌脂质的组合,如选自分枝杆菌磷脂、分枝杆菌脂聚糖、分枝杆菌糖脂和磷脂的化合物,以及包含这些的药物组合物。

[0053] 这些脂质在本领域是已知的,且在 Nigou 等人 (2003) *Biochimie*, 85, 153-166 中公开。

[0054] 出乎意料地,已经发现上述组合显示了协同活性,这从以下结果中清楚可见。

[0055] 具体而言药学可接受载体包括脂质体。

[0056] 所述的药物组合物用于治疗 and / 或预防放线菌的感染,具体而言是分枝杆菌属,如结核分枝杆菌或皮肤分枝杆菌的感染。

[0057] 组合物还可包含疫苗佐剂。用于人个体或动物的疫苗佐剂对本领域技术人员已熟知,例如可在“A compendium of vaccine adjuvants and excipients”(第 2 版, Vogel 等人)中找到这些盐的列表。具体而言,疫苗佐剂显著地包括例如铝盐或 M59。

[0058] 本发明具体而言涉及上文定义的药物组合物,其特征在于其以旨在通过口服或注射途径施用的形式。

[0059] 本发明更具体而言涉及上文定义的药物组合物,特性在于其包含一种或多种其他用于治疗或预防结核病的产品,如 BCG 或分枝杆菌蛋白质或放线菌脂质。

[0060] 词语“放线菌甘油酰基衍生物”指的是发现于棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 和诺卡氏菌属 (*Nocardia*, CMN) 的细菌中,优选地发现于牛分枝杆菌 BCG、结核分枝杆菌,耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)、胃分枝杆菌 (*Mycobacterium gastri*)、海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*)、偶发分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*)、蟾分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)、堪萨斯分枝杆菌 (*Mycobacterium kansasii*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 和星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*) 中的脂质。根据一个优选的实施方式,所述的脂质为牛分枝杆菌 BCG 抗原。

[0061] 用于治疗或预防结核病的其他产品显著地包括免疫调制剂如细胞因子,编码结核分枝杆菌抗原的 DNA 片段,活的结核分枝杆菌缺失突变体如缺失了毒力基因的突变体,或活的重组 BCG 如表达结核分枝杆菌抗原的 BCG。

[0062] 如本文使用的,结核病指的是由细菌结核分枝杆菌引起的人中的疾病,还指动物中相应的疾病。

[0063] 根据另一个实施方式,本发明涉及产品,其包含:

[0064] - 至少一种如上文定义的化合物,以及

[0065] - 至少一种用于治疗或预防结核病的其他产品,如 BCG 或分枝杆菌蛋白质,

[0066] 作为组合的制备物用于在治疗或预防结核病中同时、分开或顺序使用。

[0067] 本发明还涉及至少一种上文定义的化合物或上文提到的组合物,用于制备旨在用于治疗或预防结核病的药物,显著地为疫苗的用途。

[0068] 本发明还涉及上文定义的化合物,作为用于治疗或预防结核病的药物。

[0069] 可选地,疫苗可包含例如上文所描述的疫苗佐剂。

[0070] 本发明涉及至少一种上文定义的化合物或根据上文定义的组合物作为免疫反应激活剂,更优选地作为炎性反应激活剂的用途。

[0071] 通过“免疫反应激活剂”,意指具有在体外或体内激活免疫反应的组分或过程的能力的化合物,具体而言是在免疫系统细胞,如 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞, 抗原呈递细胞 (APC), 如树突细胞或巨噬细胞, 单核细胞或粒细胞。

[0072] 通过“炎性反应激活剂”意指具有在体外或体内激活炎性反应(如血球渗出, 毛细血管通透, 巨噬细胞激活或发烧发生)的组分或过程的能力的化合物。

[0073] 本发明还涉及至少一种上文定义的化合物或上文定义的组合物的用途,以诱导 T 淋巴细胞的激活,显著地为 CD1- 限制性 T 淋巴细胞的激活。激活能在体外或体内进行。

[0074] T 淋巴细胞的激活能通过几种方法评估,如测量细胞增殖或细胞因子如 IFN- γ (干扰素- γ)、IL-2 (白介素-2)、IL-4 (白介素-4)、或 TNF- α (肿瘤坏死因子 α)、或 GM-CSF 的生产。

[0075] CD1- 限制性 T 淋巴细胞为由 CD1 分子呈递的抗原所激活的 T 淋巴细胞。

[0076] 本发明还涉及至少一种上文定义的化合物或上文定义的组合物诱导细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、或 GM-CSF 生产的用途。

[0077] 此生产的诱导能在体外或体内完成。细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、或 GM-CSF 的生产能例如通过免疫测定如 ELISA (酶联免疫吸附测定) 或 EIA (酶免疫测定) 进行测量。

[0078] 根据另一个实施方式,本发明涉及产生特异于式 (I) 的化合物的 T 细胞克隆的方法,其特征在于其包括以下步骤:

[0079] 1) 将抗原呈递细胞 (APC), 显著地为树突细胞, 与放线菌脂质制备物 (结核分枝杆菌脂质制备物除外) 或式 (I) 的化合物一同孵育,

[0080] 2) 将外周血单核细胞与加载有被膜抗原的 APC 相接触以获得增殖性 T 细胞,

[0081] 3) 通过有限稀释来克隆增殖性 T 细胞, 并选择与式 (I) 化合物接触时释放选自细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-2 或 IL-4 的分子的克隆。

[0082] 优选地,在步骤 1) 中,放线菌脂质制备物为牛分枝杆菌 BCG 脂质制备物。

[0083] 本发明进一步涉及如通过上文提到的方法获得的 T 细胞克隆。这种 T 细胞克隆在如 Z5B71 的实例中有所描述。

[0084] 根据另一个实施方式,本发明涉及筛选产品,如从放线菌 (如分枝杆菌属,棒状杆

菌属和诺卡氏菌属)中提取的放线菌甘油酰基衍生物的方法,其特征在于其包括以下步骤:

[0085] - 将加载有待筛选的产品(显著地为提取自牛分枝杆菌 BCG 的甘油酰基衍生物)的树突细胞与上文定义的 T 细胞克隆相接触,

[0086] - 检测选自细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-2 或 IL-4 的分子,其由 T 细胞克隆释放。

[0087] 本发明还涉及用于从放线菌(如分枝杆菌属、棒状杆菌属和诺卡氏菌属)中提取上文定义的化合物或上文定义的组合物的方法,其特征在于其包括以下步骤:

[0088] a. 用甲醇和氯仿的混合物处理细菌以获得氯仿/甲醇提取物,

[0089] b. 浓缩氯仿/甲醇提取物,之后是其在氯仿相(本文称为脂质级分)和水相之间的分配(partition),

[0090] c. 取走脂质级分。

[0091] 根据一个优选的方面,所述的方法进一步包含以下附加的步骤:

[0092] d. 蒸发大部分氯仿,之后向其中加入丙酮以获得沉淀以及可溶性丙酮相,

[0093] e. 取丙酮不可溶相,之后将其浓缩,之后加入甲醇以获得沉淀及甲醇不可溶相,

[0094] f. 取甲醇不可溶相,之后将其浓缩,并将浓缩的甲醇不可溶相应用到硅胶柱上,

[0095] g. 从上文提到的硅胶柱上用氯仿、甲醇及其混合物洗脱级分,所述的级分对应上文定义的组合物,

[0096] h. 如果需要,纯化从硅胶柱上洗脱的级分以获得不同的制备物,其分别基本上只含有一种上文定义的化合物。

[0097] 本发明还涉及可通过上述方法获得的组合物和包含其的药物组合物,以及如上所述,所述组合物在制备用于预防或处理结核病的药物中的用途,所述组合物作为免疫激活剂的用途,所述的组合物诱导 T 淋巴细胞激活的用途,所述的组合物诱导产生细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、或 GM-CSF 的用途。

[0098] 附图简述

[0099] 图 1 显示来自 CMN 组的多种细菌种的脂质级分的抗原性效力。脂质级分对 Z5B71 T 细胞克隆的刺激通过 IFN- γ ELISA 进行测量。条表示 SD。

[0100] 谷氨酸棒状杆菌(■),诺卡氏菌属(●),牛分枝杆菌 BCG(▲),结核分枝杆菌 H37Rv(◆),耻垢分枝杆菌(□),偶发分枝杆菌(○),结核分枝杆菌 H37Ra(△)

[0101] 图 2 显示牛分枝杆菌 BCG “甲醇可溶性”脂质库的分级以及用 Z5B71 T 细胞克隆获得的不同级分的反应性。

[0102] (A) 中显示了通过硅色谱纯化“甲醇不可溶”级分获得的八个代表性级分(级分 1, 3, 5, 10, 18, 19, 28 和 34)的 TLC 分析。圈起来的化合物对应活性化合物。通过测量 IFN- γ 释放就对 Z5B71 T 细胞克隆的刺激测试相同的级分(B)。条表示 SD。

[0103] 图 3 显示牛分枝杆菌 BCG GroMM(A)中以及牛分枝杆菌 BCG GroMM 皂化作用后获得的分枝菌酸(B)的阳性形式中 MALDI-ToF-MS 分析。星号对应污染物。(C)中的表详细描述了不同预期的分枝菌酸类型和对应 GroMM 的钠加合物的计算质量。

[0104] 图 4 代表了由 ^1H NMR 分析($\delta^1\text{H}$: -0.7-5.4)确定的牛分枝杆菌 BCG GroMM 的结构(A)。特异性 GroMM 质子信号注释为 a-k,并指定为牛分枝杆菌 BCG GroMM 主要形式的结构,

即,通过氧代分枝菌酸 (ketomycolic acid) 的酯化,在 (B) 中显示。 $n_1 = 19, 21$ 或 23 ; n_2 和 $n_4 = 15, 17$ 或 19 ; $n_3 = 12-17$ 。

[0105] 图 5 显示合成 GroMM(A) 中以及用于合成的结核分枝杆菌 H37Rv 分枝菌酸 (B) 的阳性形式中 MALDI-ToF-MS 分析。星号对应污染物。(C) 中的表详细描述了不同预期的分枝菌酸类型和对应 GroMM 的钠加合物的计算质量。

[0106] 图 6 表示由 ^1H NMR 分析 ($\delta ^1\text{H}: 3.0-4.4$) 确定的合成 GroMM 结构 (B 和 C), 相比于牛分枝杆菌 BCG GroMM(D)。牛分枝杆菌 BCG GroMM 主要形式的结构, 即, 通过氧代分枝菌酸的酯化, 在 (A) 中显示。 $n_1 = 19, 21$ 或 23 ; n_2 和 $n_4 = 15, 17$ 或 19 ; $n_3 = 12-17$, 甘油质子信号注释为 a-c。

[0107] (B) 和 (C) 中显示的结构分别对应于 (S)-1-0-分枝酰-甘油 (1-0-分枝酰-sn-甘油) 以及 (R)-1-0-分枝酰-甘油 (3-0-分枝酰-sn-甘油)。R 对应于分枝菌酸。

[0108] 图 7 表示半合成的 GroMM 的生物学活性。在 C32 或 C80s (S)- 或 s (R)-GroMM 中, C32 对应于棒状杆菌酸, C80 对应于分枝菌酸而 (S) 对应于 (S)-1-0-分枝酰-甘油 (1-0-分枝酰-sn-甘油), (R) 对应于 (R)-1-0-分枝酰-甘油 (3-0-分枝酰-sn-甘油)。Z5B71 T 细胞克隆释放的 IFN- γ 通过 ELISA 进行测量。条表示 SD。

[0109] 图 8 表示 GroMM 的 CD1b- 限制性以及 CD1e- 不依赖性的呈递, 使用 THP-1 转染的细胞 (A) 和 CD1a-c 抗体 (B)。在 (C) 中, 使用了 THP-1-CD1b(■) 和 THP-1-CD1b-CD1e(●) 细胞。Z5B71 T 细胞克隆释放的 TNF- α (A 和 B) 或 IFN- γ (C) 通过 ELISA 进行测量。条表示 SD。

[0110] 图 9 表示特异于 Ac_2SGL (A), PIM_6 (B) 及 GroMM(C) 以及感染了活的结核分枝杆菌 (D) 的 CD1b- 限制性 T 细胞对用热灭活结核分枝杆菌冲击 (pulse) 的 DC 细胞的识别。Z5B71 T 细胞克隆释放的 IFN- γ 通过 ELISA 进行测量。条表示 SD。

[0111] 图 10 表示对 PPD- 阴性和 PPD- 阳性供体的 GroMM 的反应性: 在自体的表达 CD1 的 DC 存在下, 用 GroMM 刺激人供体的 PBMC。六天后, 收集培养物上清液并通过 ELISA 确定 IFN- γ 浓度: (A) 在原初 (**naïve**) ($n = 10$), BCG 免疫的 ($n = 22$) 或隐性感染 ($n = 19$) 的健康供体及 TB 患者 ($n = 11$) 之间比较对 GroMM 的反应性。(B) 为研究限制元素, 在十名 PPD 阳性健康供体中, 在有或无 CD1b 阻断抗体的情况下测试 GroMM 的反应性。黑圈显示了个体供体, 水平条代表每组的平均。

[0112] 图 11 表示从牛分枝杆菌 BCG 的 GroMM 纯化方案 (A)。纯化后是脂质级分抗原性效力 (B 和 C)。Z5B71 T 细胞克隆释放的 IFN- γ 通过 ELISA 进行测量。条表示 SD。脂质级分指的是氯仿相。

[0113] 图 12 表示 (S)-1-0-分枝酰-甘油 (1-0-分枝酰-sn-甘油) 和 (R)-1-0-分枝酰-甘油 (3-0-分枝酰-sn-甘油) 的合成方案。

[0114] 图 13 表示获自牛分枝杆菌 BCG 的分枝杆菌产品以及获自还原反应的对应还原产品的生物学活性。

[0115] 图 14 表示获自 BCG 的分枝杆菌产品与多种脂质的混合物的生物学活性。分枝杆菌脂质: LAM (脂阿拉伯甘露聚糖), LM (脂甘露聚糖, lipomannan), PIM_2 和 PIM_6 (包含 2 或 6 个甘露糖单位的磷脂酰肌醇甘露糖苷)。磷脂: PS: 磷脂酰丝氨酸, PE: 磷脂酰乙醇胺, PC: 磷脂酰胆碱, PI: 磷脂酰肌醇。

实施例

[0116] 材料和方法

[0117] 试剂。L-1,3-0- 异丙叉 -sn- 甘油及 D-1,2-0- 异丙叉 -sn- 甘油, 甘油三棕榈酸酯, 1,2 二棕榈酰 -sn- 甘油和单棕榈酰甘油购自 Sigma。心肌磷脂从牛分枝杆菌 BCG 脂质提取物中纯化得来, 如 Gilleron 等人 (2001) *J Biol Chem* 276, 34896-904 中描述的。

[0118] 细菌菌株和培养条件。星状诺卡氏菌及谷氨酸棒状杆菌分别在 Luria Broth 和心脑浸出液培养基中于 32°C 下悬浮生长 2-3 天。分枝杆菌在 Sauton 培养基上于 37°C 下以表面生物膜生长 4-8 周。从培养基中收获并分离细胞, 室温下置于氯仿 / 甲醇 (2 : 1, v/v) 中以灭活细菌。

[0119] 细胞培养。通过电穿孔, 使用 BCMGS-Neo 和 -Hygro 载体以人 CD1A、或 CD1B、或 CD1C 的 cDNA 转染或人 CD1B 和 CD1E 的 cDNA 双转染人早幼粒细胞 THP-1。细胞在补充有 10% 胎牛血清 (FCS)、10mM HEPES、2mM 超谷氨酰胺 II、MEM 非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠 (均来自 Cambrex, 布鲁塞尔, 比利时) 和 100 μ g/ml 卡那霉素 (Invitrogen, 巴塞尔, 瑞士) 的 RPMI-1640 中生长。DC 分离自健康供体的外周血单核细胞 (PBMC), 通过将其在存在重组 IL-4 和 GM-CSF 下培养, 如 Porcelli 等人 (1992), *Nature* 360, 593-7 先前描述的。如 De Libero (1997), ed. Butcher, N. F. a. G. (IRL, Oxford), pp. 123-40 描述的, 产生 T 细胞克隆, 并在补充有 5% AB 人血清 (瑞士红十字)、10mM HEPES、2mM 超谷氨酰胺 II、MEM 非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠、100 μ g/ml 卡那霉素和 100 单位 /ml 人重组 IL-2 的 RPMI-1640 中生长。

[0120] T 细胞激活测定。在加入 T 细胞 (10^5 /孔, 一试三份) 之前, 将 DC (3×10^4 /孔) 或 CD1 转染的 THP-1 细胞 (3×10^4 /孔) 与不同浓度的经超声的抗原一起在含有 10% FCS 的 RPMI-1640 中 37°C 下孵育 2 小时。孵育 36 小时后收集上清液, 并使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (IFN- γ 来自 Instrumentation Laboratory, Schlieren, 瑞士; TNF- α 来自 BD Pharmingen, 巴塞尔, 瑞士) 测量细胞因子释放。数据表示为一试三份的平均 pg/ml \pm 标准差 (SD)。

[0121] CD1 限制性的分析。加入 T 细胞之前 30 分钟, 通过以 10 μ g/ml 使用以下单克隆抗体 (mAb) 抑制 T 细胞激活来研究 CD1 限制性: OKT6 (抗 -CD1a, 美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) ATCC CRL-8019), WM-25 (抗 -CD1b; Immunokontakt, 卢加诺, 瑞士), L161 (抗 -CD1c; Instrumentation Laboratory), W6-32 (抗 -I 类 MHC, ATCC) 及 L243 (抗 -II 类 MHC, ATCC)。抗 -TCRV γ 9 (B3) mAb 用作不相关 mAb。

[0122] 结核分枝杆菌对 DC 的冲击和感染。结核分枝杆菌在 80°C 下 20 分钟以被杀死, 在加入 T 细胞 (10^5 /孔, 一试三份) 前, 在含有 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基中 37°C 下与 DC (3×10^4 /孔) 一起孵育 2 小时。按 De Libero 等人 (2005) *Immunity* 22, 763-72 先前所描述的感染 DC, 并通过 ELISA 监视 IFN- γ 释放。

[0123] 用于产生 T 细胞克隆的脂质级分。以先前获得的牛分枝杆菌 BCG 富含 PIM₂ 的级分产生 Z5B71T 细胞克隆, Gilleron 等人 (2001) *J Biol Chem* 276, 34896-904。简言之, 将牛分枝杆菌 BCG 细胞悬浮于氯仿 / 甲醇 (1 : 1, v/v) 中, 并过滤四次。浓缩氯仿 / 甲醇提取物并构成脂质级分, 其进一步在水和氯仿之间分配。蒸发氯仿相并将其悬浮于最小体积的氯仿中。4°C 下加入丙酮过夜使之形成沉淀, 离心 (3,000g, 4°C, 15 分钟) 而产生“丙酮可溶

性”相以及“丙酮不溶性”相。将“丙酮可溶性”相应用到 QMA-Spherosil M(BioSeptra SA, Villeneuve-la-Garonne, 法国) 柱, 用氯仿、氯仿 / 甲醇 (1 : 1, v/v)、甲醇进行连续洗脱, 以洗脱中性化合物, 然后以含 0.1M 醋酸铵的氯仿 / 甲醇 (1 : 2, v/v) 洗脱负电化合物 (如 PIM₂)。

[0124] 来自几种放线菌的脂质级分。从几种放线菌物种制备不同的脂质级分 (如上文描述的), 并针对 Z5B71T 细胞克隆进行测试: 来自耻垢分枝杆菌、结核分枝杆菌 H37Ra、偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌 (*M. chelonae*)、蟾分枝杆菌、星状诺卡氏菌和谷氨酸棒状杆菌的脂质级分, 来自耻垢分枝杆菌、结核分枝杆菌 H37Rv、胃分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和牛分枝杆菌 BCG 的“丙酮可溶性”相, 以及来自结核分枝杆菌 H37Rv、胃分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和牛分枝杆菌 BCG 的“丙酮不可溶”相。

[0125] 从牛分枝杆菌 BCG 纯化 GroMM。对按上文描述获得的来自牛分枝杆菌 BCG 的“丙酮可溶性”级分进行甲醇沉淀, 得到“甲醇可溶性”及“甲醇不溶性”级分。“甲醇不溶性”级分 (150mg) 在硅胶柱 (1.3x23cm) 上进行分级, 用 7x175ml 氯仿 (1-7 级分)、8x200ml 的氯仿 - 甲醇 (95 : 5, v/v) (8-15 级分)、9x225ml 氯仿 - 甲醇 (9 : 1, v/v) (16-24 级分)、7x175ml 氯仿 - 甲醇 (85 : 15, v/v) (25-31 级分) 和 7x175ml 氯仿 - 甲醇 (7 : 3, v/v) (32-38 级分) 进行洗脱。发现 5-8 级分含有 GroMM, 并将其合并。

[0126] 纯化物在覆铝的硅胶板 (Alugram Sil G; Macherey-Nagel) 上通过 TLC 进行检查, 使用氯仿 / 甲醇 (95 : 5, v/v) 作为迁移溶剂。用溶于 85% 的 H₂SO₄ 的 0.2% 蒽酮 (9,10-二氢-9-加氧-蒽) (Sigma) 检测糖脂。

[0127] GroMM 乙酰化。在 200 μg 的 GroMM 上实现全乙酰化 (peracetylation), 将上述 GroMM 溶解于乙酸酐 / 无水吡啶 (1 : 1, v/v) 中并在 80°C 加热 30 分钟。反应混合物在氮气流下干燥, 并溶于氯仿中用于 MALDI-Tof-MS 分析。为选择性乙酰化 GroMM 羟基官能团, 将 16 μl 乙酸酐加入溶于 150 μl 吡啶的 10mg GroMM 中, 在 0°C 下放置 3 小时。用 CHCl₃ 提取单-和二-乙酰化的 GroMM, 并在硅胶上进行纯化, 用 CHCl₃ 和 CHCl₃/CH₃OH (95/5, v/v) 进行连续洗脱。通过 MALDI-Tof-MS 以及 NMR 分析确定乙酰取代物的数量及其在 GroMM 上的位置。

[0128] GroMM 皂化。将 800 μl 的 20% 甲氧乙醇 / KOH (7 : 1, v/v) 加至 500 μg 的 GroMM。然后在炉子中以 100°C 加热混合物 3 小时。在冷却以及用 pH3 硫酸水溶液进行酸化之后, 分枝菌酸用二乙醚 (v/v) 提取三次。合并乙醚相, 用水洗涤五次, 在氮气流下干燥。将分枝菌酸重新溶解于 100 μl 氯仿中, 用于 MALDI-Tof-MS 分析。

[0129] GroMM 还原。纯化自 BCG 的 1mg GroMM 与 1,3mg 的 NaBH₄ 在 140 μl THF 中反应, 在室温下搅拌 15 分钟。通过加入乙酸终止反应。蒸发反应混合物, 加二氯甲烷搅拌并用水洗涤两次。

[0130] GroMM 合成。在氩气下于水性溶剂中进行反应。1-0-(4-甲苯磺酰基)-2,3-0,0-异丙叉-sn-甘油 (Sowden 等人 (1942) J Am Chem Soc 42, 1291-3) : 在 0°C 下将 p-甲苯磺酰氯 (0.3g, 1.57mmol) 加入溶于无水吡啶 (0.8ml) 的 2,3-0,0-异丙叉-sn-甘油 (230mg, 1.74mmol)。室温下 24 小时后, 将二乙醚加至反应混合物, 并使用冷的 1M 盐酸、水、饱和碳酸氢钠和水顺序洗涤有机相。乙醚提取物在硫酸镁上进行干燥并浓缩。在硅胶上进行色谱 (用石油醚 / 乙酸乙酯 4/1, v/v 进行洗脱) 得到产品 (大约 100mg, 0.35mmol)。以相同的

方式从 1,2-0,0- 异丙叉 -sn- 甘油中获得 3-0-(4 甲苯磺酰基)-1,2-0,0- 异丙叉 - 甘油。

[0131] 分枝菌钾 (potassium mycolates): 根据 Laval 等人 (2001) 在 *AnalChem* 73, 4537-44 中描述的方法, 从结核分枝杆菌 H37Rv 细胞中释放分枝菌酸 (由 M. A. Lanéelle, IPBS, Toulouse 惠赠)。用 10mM 盐酸和 5M 氢氧化钾连续洗涤溶于氯仿中的分枝菌酸, 而获得分枝菌钾。在用氯仿提取之后, 分枝菌钾在硫酸镁上进行干燥并浓缩。

[0132] 1-0- 分枝酰 -2,3-0,0- 异丙叉 -sn- 甘油 (Defaye 等人 (1956) *Bull SocChim Biol(Paris)* 38, 1301-4): 将分枝菌钾 (8mg, 大约 $6 \mu\text{mol}$) 加至溶于无水二甲基亚砜 (0.150ml) 的 1-0-(4 甲苯磺酰基)-2,3-0,0- 异丙叉 -sn- 甘油 (2mg, $7 \mu\text{mol}$) 中, 在 135°C 下搅拌 3 天。反应混合物用 1M 盐酸进行酸化并用二乙醚进行提取。然后用水洗涤乙醚提取物, 在硫酸镁上进行干燥并浓缩。在硅胶上进行色谱 (用石油醚 / 乙酸乙酯 5/1, v/v 洗脱) 得到产品 (大约 4mg, $2.9 \mu\text{mol}$)。以相同的方式从 3-0-(4 甲苯磺酰基)-1,2-0,0- 异丙叉 - 甘油中获得 3-0- 分枝酰 -1,2-0,0- 异丙叉 -sn- 甘油。

[0133] 1-0- 分枝酰 -sn- 甘油 (GroMM) (Sowden 等人 (1942) *J Am Chem Soc* 42, 1291-3): 将 $100 \mu\text{l}$ 浓缩的盐酸 ($d = 1.017$) 加至溶于二乙醚 (0.1ml) 的 1-0- 分枝酰 -2,3-0,0- 异丙叉 -sn- 甘油 (4mg, $2.9 \mu\text{mol}$) 中。在室温下搅拌 10 分钟后, 将水加至反应混合物, 并用二乙醚提取产品 (3mg, $2.3 \mu\text{mol}$)。乙醚提取物在硫酸镁上进行干燥并浓缩。不必须进行补充纯化。使用 3-0- 分枝酰 -1,2-0,0- 异丙叉 -sn- 甘油也获得 3-0- 分枝酰 -sn- 甘油。

[0134] MALDI-Tof-MS。MALDI-Tof-MS 分析是在 4700 蛋白质组分析仪 (具有 Tof-Tof Optics, Applied Biosystems) 上用反射器模式进行的。用来自 Nd:YAG 激光器的脉冲 UV 光 (355nm) 的辐射实现电离。GroMM 样品通过该设备进行分析, 在 20kV 下以正离子模式进行, 使用的提取延迟时间设定为 20ns。一般地, 加合 100-250 的激光发射的光谱以获得最终光谱。HABA(2-[4- 羟基 - 苯偶氮基] - 苯甲酸) 基质 (Sigma-Aldrich) 以乙醇 / 水 (1 : 1, v/v) 中 $\sim 10\text{mg/ml}$ 的浓度使用。然后, 将 $0.5 \mu\text{l}$ 样品溶液及 $0.5 \mu\text{l}$ 基质溶液加到靶标上, 用微量吸头混合, 在轻柔的热空气气流中进行干燥。在两点上以分枝杆菌 PIM 对测量进行外部校准。

[0135] 核磁共振 (NMR) 分析。以装有 Origin 200 SGI 的 Avance DMX500 质谱仪 (Bruker), 使用 Xwinmx 2.6 来记录 NMR 谱。将 GroMM 溶于 $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, (9 : 1, v/v) 并在 298K 下于 $200 \times 5\text{mm}$ 535-PP NMR 管中进行分析。质子化学位移表示为来自氯仿信号的每百万低场的部分 ($\delta_{\text{H}}/\text{TMS}$ 7.27)。所有涉及所使用的相关光谱学和同核 Hartmann-Hahn 谱序列以及实验步骤的细节都按先前描述的 (Gilleron 等人 (2003) *J Biol Chem* 278, 29880-9)。

[0136] 来自结核病患者和健康供体的淋巴细胞对 GroMM 的识别。得到知情同意后, 从健康供体和结核病人的血液中纯化得到 PBMC。所有本研究中包括的患者都患有被证明是肺结核的培养物, 并在供血时已经用抗结核病药物处理 2-8 周。PBMC ($10^5/\text{孔}$) 与自体 DC ($2 \times 10^4/\text{孔}$) 在 $10 \mu\text{g/ml}$ GroMM 存在或不存在的情况下一起培养。6 天后收集上清液并用夹心 ELISA 就 IFN- γ 的存在情况进行测试。在自体单核细胞分化成 DC 的 2 天中, PBMC 放置在 37°C 下补充的 RPMI 1640 培养基 (见上文) 中。与 GroMM 平行, PBMC 用 $10 \mu\text{g/ml}$ PPD (Chiron) 和重组 ESAT6 (Lionex) 进行刺激。有应答的健康供体 (在对 PPD 应答时至少释放 250pg/ml IFN- γ) 被评分为 BCG 免疫。对两种抗原都有应答的供体被认为是隐性结核分枝杆菌感染的。那些对 PPD 不应答的评分为 PPD- 阴性。对于各自的实验, 在 GroMM 前

30 分钟加入 CD1b- 和 CD1c- 阻断抗体 (BCD1b3.1 和 F10- 各 10 μ g/ml) 的混合物以阻断 CD1 呈递。

[0137] 结果

[0138] 脂质反应性 T 细胞克隆的定性

[0139] 为了鉴定结核分枝杆菌 CD1- 限制性 T 细胞脂质抗原的全部 (repertoire), 开发了一项策略, 其基于受根据其极性和电荷的三种不同粗分枝杆菌脂质级分刺激的 T 细胞系的产生 (Gilleron 等人 (2004) *J Exp Med* 199, 649-59)。从这些衍生自一名高度 PPD- 反应性健康供体的 PBMC 的细胞系, 通过有限稀释建立了 T 细胞克隆, 对 10 个被发现为 CD1- 限制性的单克隆进行进一步研究。这些克隆中的一个 (叫做 Z5B71), 为 CD4⁺, 对其进行研究。其是针对富含磷酸胺-肌-肌醇二甘露糖苷 (PIM₂) 的级分而获得的, 所述级分获自牛分枝杆菌 BCG 细胞壁提取物。该克隆对来自不同分枝杆菌物种 (牛分枝杆菌 BCG、耻垢分枝杆菌、胃分枝杆菌、海分枝杆菌、偶发分枝杆菌、蟾分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌及结核分枝杆菌 H37Ra) 以及来自谷氨酸棒状杆菌和星状诺卡氏菌的脂质提取物起反应 (图 1)。这样, 被识别的脂质抗原明显地广泛分布于分枝杆菌属, 还在 CMN 组的细菌中存在。有趣的是, 在所测试的脂质提取物中, 来自牛分枝杆菌 BCG 的似乎是最具刺激性的, 暗示此抗原在这些细菌中更丰富。

[0140] 纯化刺激 Z5B71 细胞的脂质抗原

[0141] 使用牛分枝杆菌 BCG 脂质提取物进行脂质抗原的纯化, 因为其显示了最强的刺激活性, 也因为该种属的细胞被膜中的糖脂多样性低于结核分枝杆菌的。脂质提取物通过丙酮 (已知沉淀磷脂的试剂) 沉淀进行分配。“丙酮可溶性”和“丙酮不溶性”级分 (图 11A) 刺激 Z5B71 T 细胞克隆 (图 11B), 这暗示了: i) 该抗原不是偏好于分配在一个级分中或 ii) 具有共同表位的不同抗原被这些 T 细胞识别。由于在“丙酮不溶性”级分上观察到更强的反应性, 此级分进一步用甲醇进行沉淀。再一次地, Z5B71 T 细胞对两相都有反应 (图 11C), 尽管“甲醇不溶性”级分的应答更高。

[0142] 然后在硅胶柱上对“甲醇不溶性”级分进行分级, 用含有增加量的甲醇的氯仿进行洗脱 (图 11A)。Z5B71 T 细胞由 5-9 级分进行刺激 (图 2B), 用氯仿或氯仿/甲醇 (95/5, v/v) 进行洗脱。当由 TLC 分析时, 活性级分似乎含有均质产品 (图 2A)。合并 5-9 级分, 并通过 MALDI-Tof-MS 和 NMR 进一步分析所得的级分。

[0143] 一种新型分枝杆菌脂质抗原的化学特征

[0144] 阳性模式 MALDI 质谱显示了指定于阳离子化钠分子离子 [M+Na]⁺ 的峰的复杂模式 (图 3A)。整块上的主峰为 28 个质量单位远, 暗示着不同分子物类间两个甲基单位的差异, 可能是脂肪酸长度的异质性的结果。为证实该设想, 产品在碱性条件下羟基化, 通过 GC (数据未显示) 和 MALDI-Tof-MS (图 3B) 分析脂肪酸。阳性模式 MALDI 谱突出显示了一系列分枝杆菌酸特征性的峰 (Laval 等人, (2001) *Anal Chem.* 73(18):4537-44)。根据多种化学官能团在部分分枝杆菌酸链 (meromycolic chain) 上的存在情况, 将分枝杆菌酸细分为 α -分枝杆菌酸、甲氧分枝杆菌酸及氧代分枝杆菌酸 (Daffe 和 Draper (1998) *Adv. Microb. Physiol.* 39:131-203)。结核分枝杆菌含有的 α -分枝杆菌酸/氧合分枝杆菌酸 (甲氧分枝杆菌酸 + 氧代分枝杆菌酸) 比率为 1/1, 而牛分枝杆菌 BCG 主要含有氧代分枝杆菌酸 (Watanabe 等人 (2001) *Microbiology* 147, 1825-37)。与这些数据一致, m/z 1232、1260、1274、1288 和 1302 处的峰 (图 3B) 指定

为氧代分枝菌酸的 $[M+Na]^+$ 形式 (图 3C)。

[0145] 原初产品及碱处理后所得的分枝菌酸之间的质量差异 ($\Delta 74\text{amu}$) 暗示分枝菌酸将甘油残基酯化。该分子的全乙酰化以及对反应产品的 MALDI MS (未显示) 分析证明了分子上乙醇官能团的数量。126 质量单位的取代证明来有三个乙醇官能团的存在。然后, 指定新型抗原为甘油单分枝菌酸酯 (GroMM), 这进一步得到 1D ^1H NMR 分析的支持 (图 4A)。根据发表的研究 (Watanabe 等人 (2001) *Microbiology* 147, 1825-37; Schroeder 等人 (2001) *Bioorg Chem* 29, 164-77; Quemard 等人 (1997) *Eur J Biochem* 250, 758-63) 指定了分枝菌酸典型的共振。能容易地解释部分分枝菌酸链上的一些质子: 在 COSY 谱 (未显示) 上共同关联的质子 d ($\delta 2.31$) 和 e ($\delta 3.53$, 多重谱线) 分别指定为携带 α -链和 β -羟基基团的亚甲基。也在 COSY 谱上共同关联的 j ($\delta 2.41$, 多重谱线) 和 k ($\delta 0.92$, 双重谱线) 分别指定为在部分分枝菌酸链末端级分携带一个甲基基团的亚甲基, 以及此甲基。信号 l ($\delta 0.75$, 三重谱线) 指定为 α -链和部分分枝菌酸链的末端甲基基团的质子。在 COSY 谱上共同关联的 $\delta -0.46$ 、 $\delta 0.44$ 和 $\delta 0.52$ (标记为 h) 处的多重谱线, 为环丙烷基官能团质子的特征信号。5ppm ($\delta 5.16$ 的 g 和 $\delta 4.83$ 的 f) 周围的信号对应烯基的质子, 表明一小部分的分枝菌酸含有乙烯基。在 HOHAHA 谱上共同关联 (未显示) 的质子 a ($\delta 4.11$ 、 4.06 和 3.99), b ($\delta 3.75$) 及 c ($\delta 3.47$), 指定为甘油质子。然而, 质子 a 被划分为两种独立的系统, a1 ($\delta 4.11$ 和 3.99) 及 a2 ($\delta 4.06$), 对合成的 GroMM 类似物的 NMR 分析使其确切的指定变得可能。

[0146] 半合成的 GroMM (sGroMM) 是免疫原性的

[0147] 为了证实抗原的结构, 使用分离自结核分枝杆菌 H37Rv 的分枝菌酸化学合成了 GroMM 类似物 (图 12)。通过 MALDI-MS 对结核分枝杆菌 H37Rv 分枝菌酸的分析 (图 5B) 显示了 m/z 1248、1276、1304 和 1332 处的甲氧分枝菌酸的 $[M+Na]^+$ 形式为主要类型。也观察到了对应于氧代分枝菌酸 (峰在 m/z 1260、1288、1302 和 1316 处) 以及 α -分枝菌酸 (峰在 m/z 1160、1188 和 1216 处) 的离子, 其丰度较低, 如 Laval 等人 (2001) *Anal Chem* 73, 4537-44 之前描述的。

[0148] 使用 (R)- 及 (S)- 异丙叉 - 甘油开始化学合成, 由 p- 甲苯 - 磺酰基激活 (Sowden 等人 (1942) *J Am Chem Soc* 42, 1291-3) (图 12)。分枝菌酸对甘油的酯化是通过在分枝菌钾存在下加热 (R) 或 (S)- 异丙叉 - 甘油而实现 (Defaye 等人 (1956) *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 38, 1301-4)。然后将两种异丙叉 - 分枝酰 - 甘油同种型在酸性条件下去保护, 得到合成的 (R)- 或 (S)-GroMM (分别为 s(R)-GroMM 和 s(S)-GroMM)。两种 sGroMM 的 MALDI 质谱 (图 5A) 与具有结核分枝杆菌 H37Rv 分枝菌酸的 GroMM 的预期质量分布一致 (图 5C)。然后两种 sGroMM 通过 1D ^1H NMR (图 6B 和 C) 进行分析。对 1-0- 分枝酰 -sn- 甘油 (s(S)-GroMM) 的分析显示了 4.05ppm 处的 a 质子 (指定为 a1) (图 6B), 而对 3-0- 分枝酰 -sn- 甘油 (s(R)-GroMM) 的分析显示了 4.00 和 4.12ppm 处的 a 质子 (指定为 a2) (图 6C)。这些数据使得之后能解释天然 GroMM 谱上甘油质子 a 的整体 (massif) 复杂性, 其对应着两种同种型的混合物 (图 6D)。从 a1 和 a2 共振的强度 (图 6D), 可推论天然 GroMM 由两种立体异构体以相同比例组成。

[0149] s(R)-GroMM 比 s(S)-GroMM 更有效地刺激 Z5B71 T 细胞, 而纯化的天然化合物具有中等活性 (图 7)。综合而言, NMR 分析和 T 细胞反应性证实了天然抗原的结构。

[0150] GroMM 由 CD1b 呈递且不需要 CD1e 的存在

[0151] GroMM 的 CD1 限制元素是通过使用一组 CD-1 转染的 APC 刺激 T- 细胞而进行研究的。只有表达 CD1b 的细胞能够刺激 T 细胞 (图 8A)。而且,CD1b 限制进一步得到阻断实验的支持,其中只有抗 -CD1b mAb 能够抑制克隆的反应性 (图 8B)。由于先前证明 CD1e 能帮助分枝杆菌脂质的呈递 (de la Salle 等人, (2005) Science 310 (5752) :1321-4), 还用表达 CD1b 和 CD1e 两者, 或仅 CD1b 的 APC 测试 GroMM 的抗原性, 以研究 CD1e 可能的参与情况。两种 APC 都诱导了非常类似的 T 细胞应答 (图 8C), 因此排除了 CD1e 参与 GroMM 呈递。

[0152] 受感染细胞中的 GroMM 免疫原性

[0153] 一个重要的问题是分枝杆菌脂质抗原在感染期间, 即, 当其从居留在吞噬体中的细菌的细胞壁中释放时, 是否维持其抗原性。这通过使用 DC 进行研究, 其用热灭活结核分枝杆菌冲击或用活的细菌感染。用热灭活细菌冲击的 DC 用于刺激识别三种不同结核分枝杆菌脂质抗原的三个 T 细胞克隆, 即 GroMM (Z5B71)、Ac₂SGL (Z4B27) 和 PIM₆ (Z5B11)。Ac₂SGL 和 PIM₆- 反应性细胞 (de la Salle 等人 (2005) Science 310, 1321-4; Gilleron 等人 (2004) J Exp Med 199, 649-59) 在之前有描述。高剂量热灭活细菌 (100 μg/ml) 诱导了强烈的 T 细胞应答 (图 9A-C), 证实了所有三种脂质在与细菌细胞壁结合时可用于 CD1b 加载。当用活的结核分枝杆菌感染 APC 时 GroMM 也是高度免疫原性的, 显示 GroMM 在感染过程中由 DC 呈递 (图 9D)。

[0154] 来自 PPD- 阳性的健康供体的 T 细胞对 GroMM 的识别

[0155] 为直接测试人供体外周血中的 T 细胞是否识别新型脂质化合物, 从结核病患者 (n = 11)、PPD- 阴性 (n = 10) 和 BCG 免疫的 (n = 22) 以及隐性结核分枝杆菌感染的 (n = 19) 健康供体中收集血液样品, 并在 GroMM 刺激后测量 IFN- γ 释放。显著的应答仅仅在 BCG 免疫的或隐性感染的健康供体中观察到 (平均值分别为 73pg/ml 和 117pg/ml ;图 10A)。尽管来自结核病患者 PBMC 有力地对 PPD (数据未显示) 应答, 但 GroMM 没有在该供体群中诱导出背景水平以上的 IFN- γ 分泌。类似地, 没有在原初 PPD- 阴性供体中观察到应答。GroMM 诱导的 IFN- γ 分泌是 CD1 限制的, 因为与 MHC-I 阻断抗体 (数据未显示) 相反, 直接针对 I 型 CD1 分子的阻断抗体消除了反应性 (图 10B)。因此, GroMM 特异性、CD1- 限制性 T 细胞在人供体外周血中的存在代表了分枝杆菌诱导的 T 细胞记忆。然而, 这仅适用于健康供体, 而有活性结核病的患者不能识别 GroMM。

[0156] 还原的化合物的活性增加

[0157] 为测试还原的化合物的活性, 通过测量 GroMM 和还原 GroMM 的 IFN- γ 释放而对 Z5B71 T 细胞克隆的刺激进行测量。图 13 中显示的结果示例说明了还原的 GroMM 的活性增加。

[0158] 分枝杆菌 GroMM 与脂质的组合的协同活性

[0159] 为测试脂质是否强化分枝杆菌 GroMM 的活性, 对于多种分枝杆菌脂质 (A) 或磷脂 (B), 通过测量两种试剂单独或组合的 IFN- γ 释放而对 Z5B71 T 细胞克隆的刺激进行测量。图 14 中显示的结果说明了协同效应。

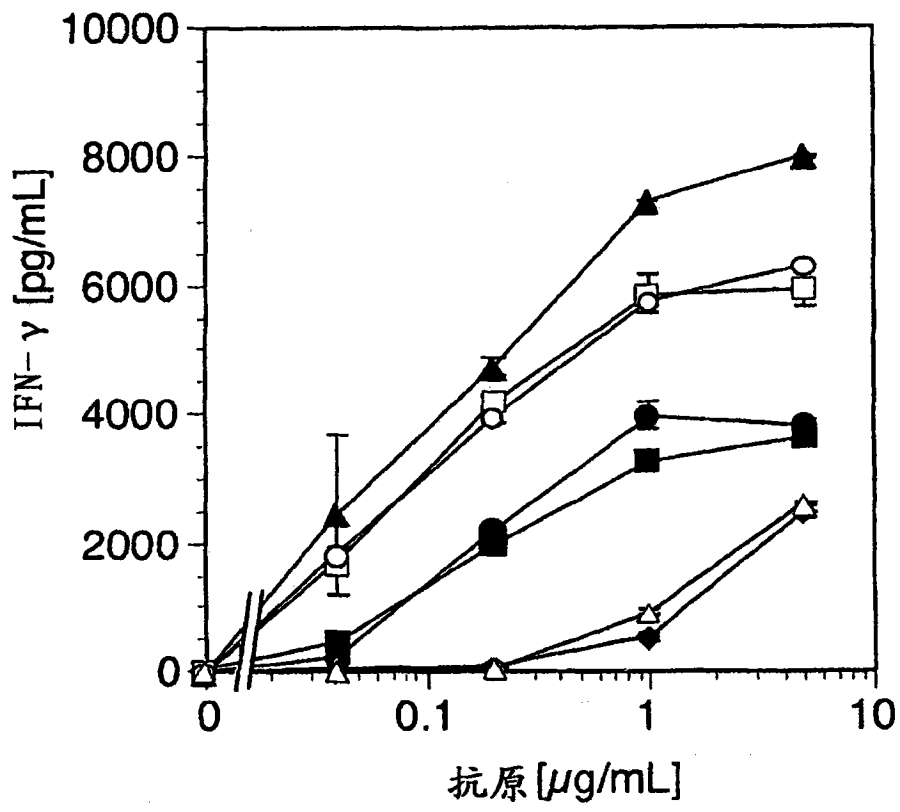


图 1

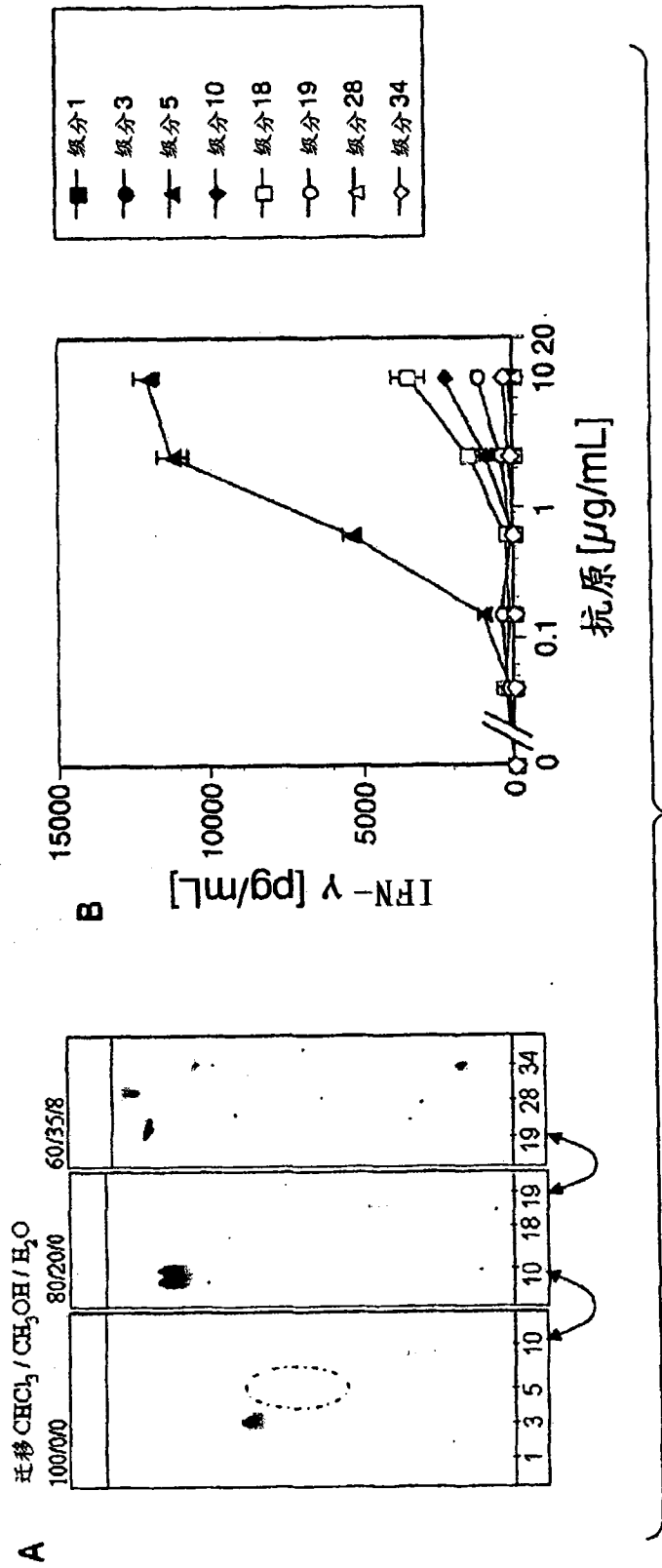


图 2

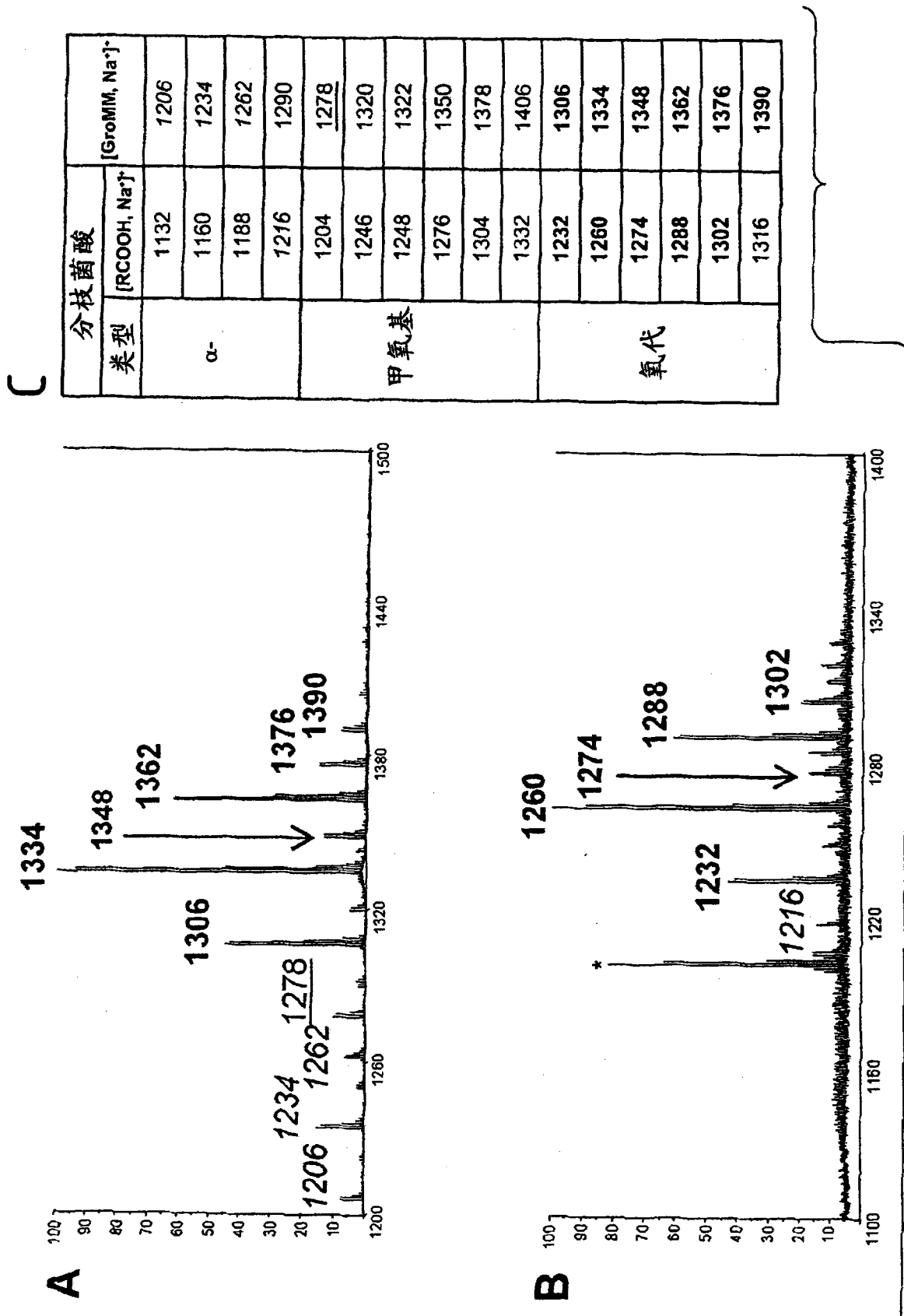


图 3

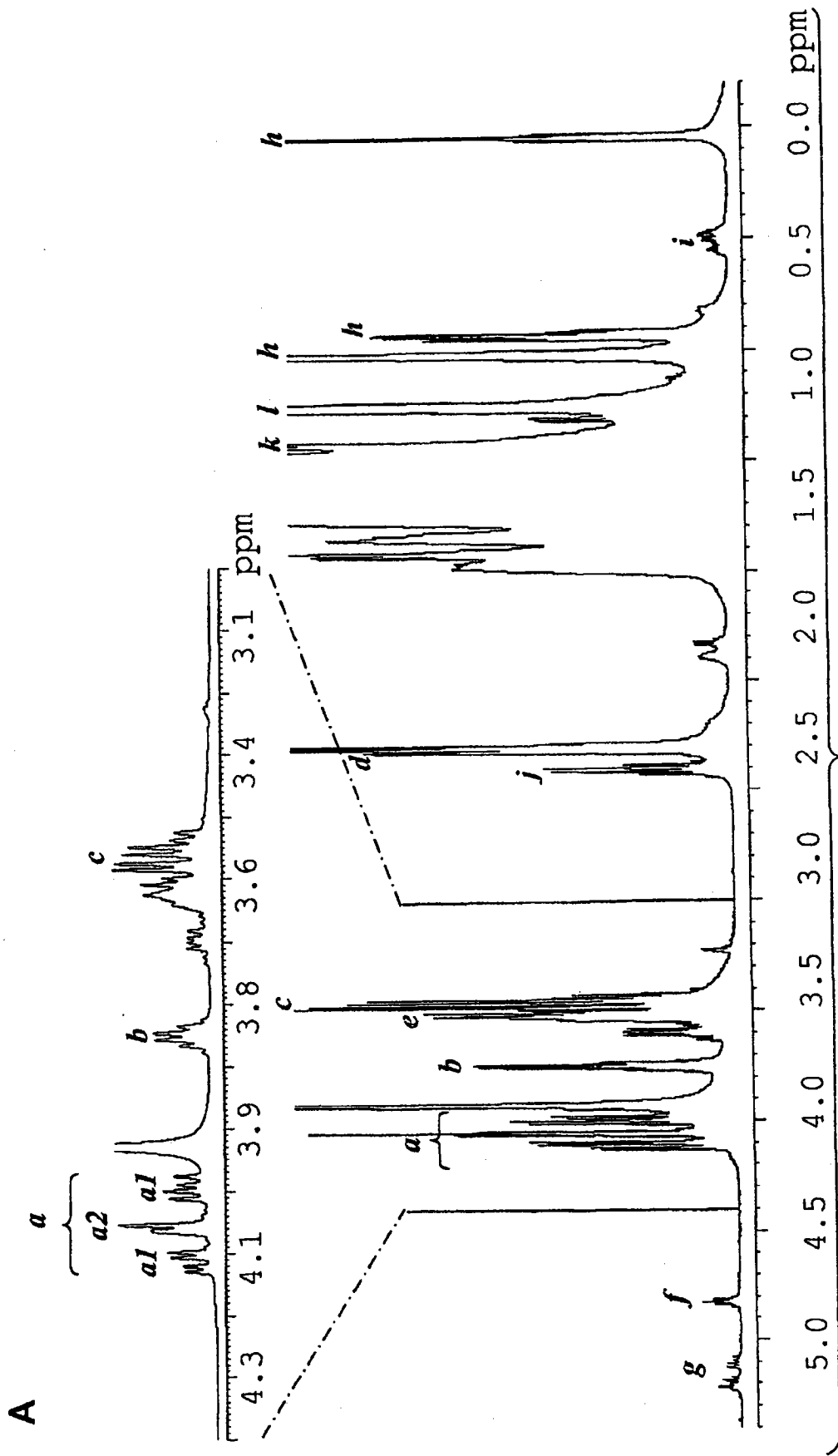


图4(开始)

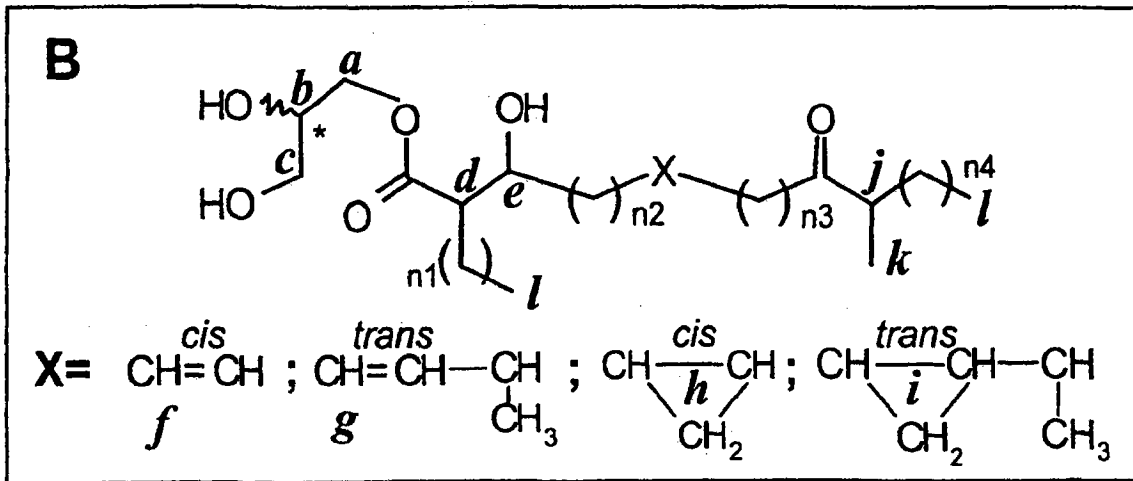


图4(结束)

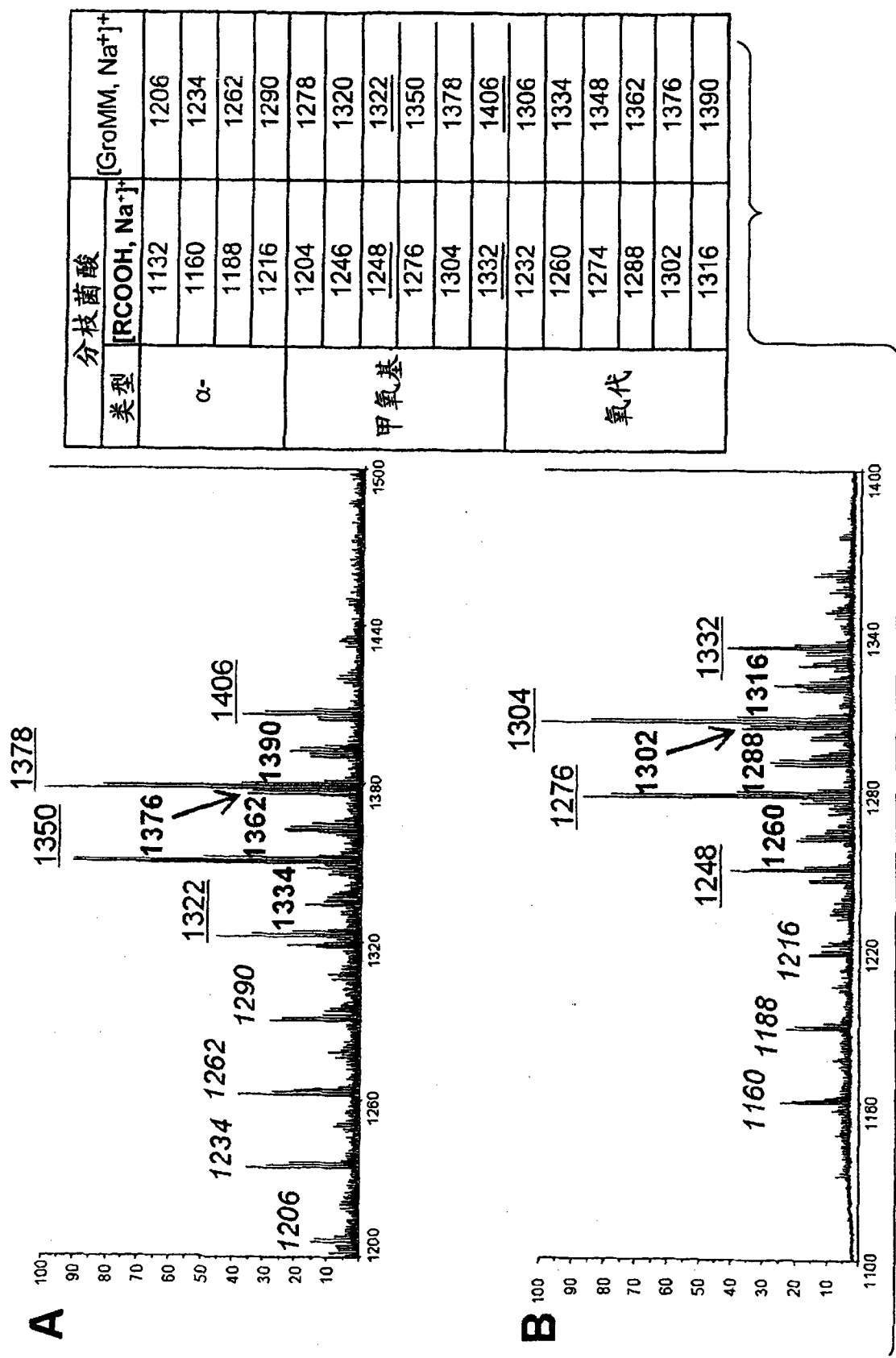


图 5

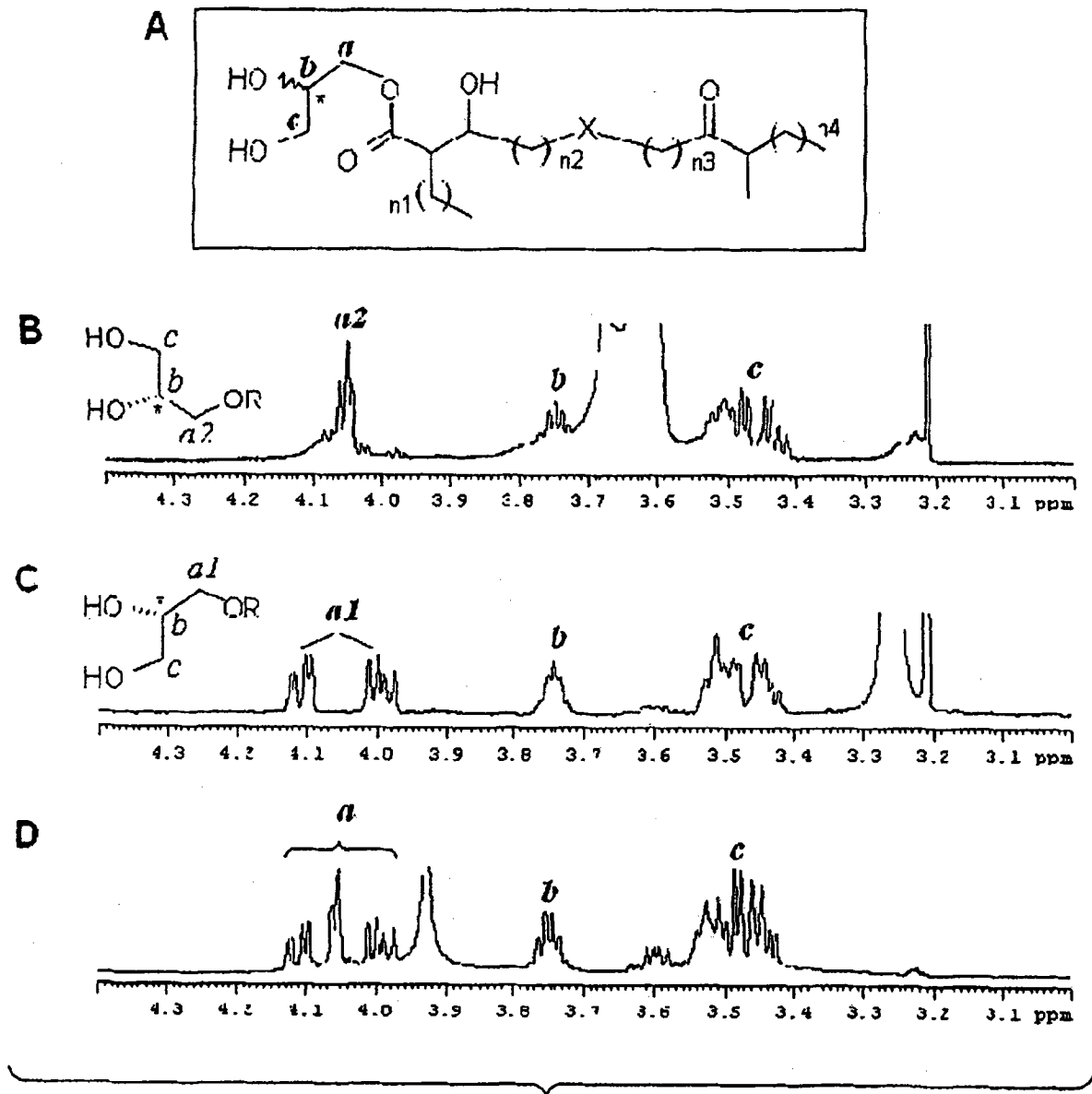


图 6

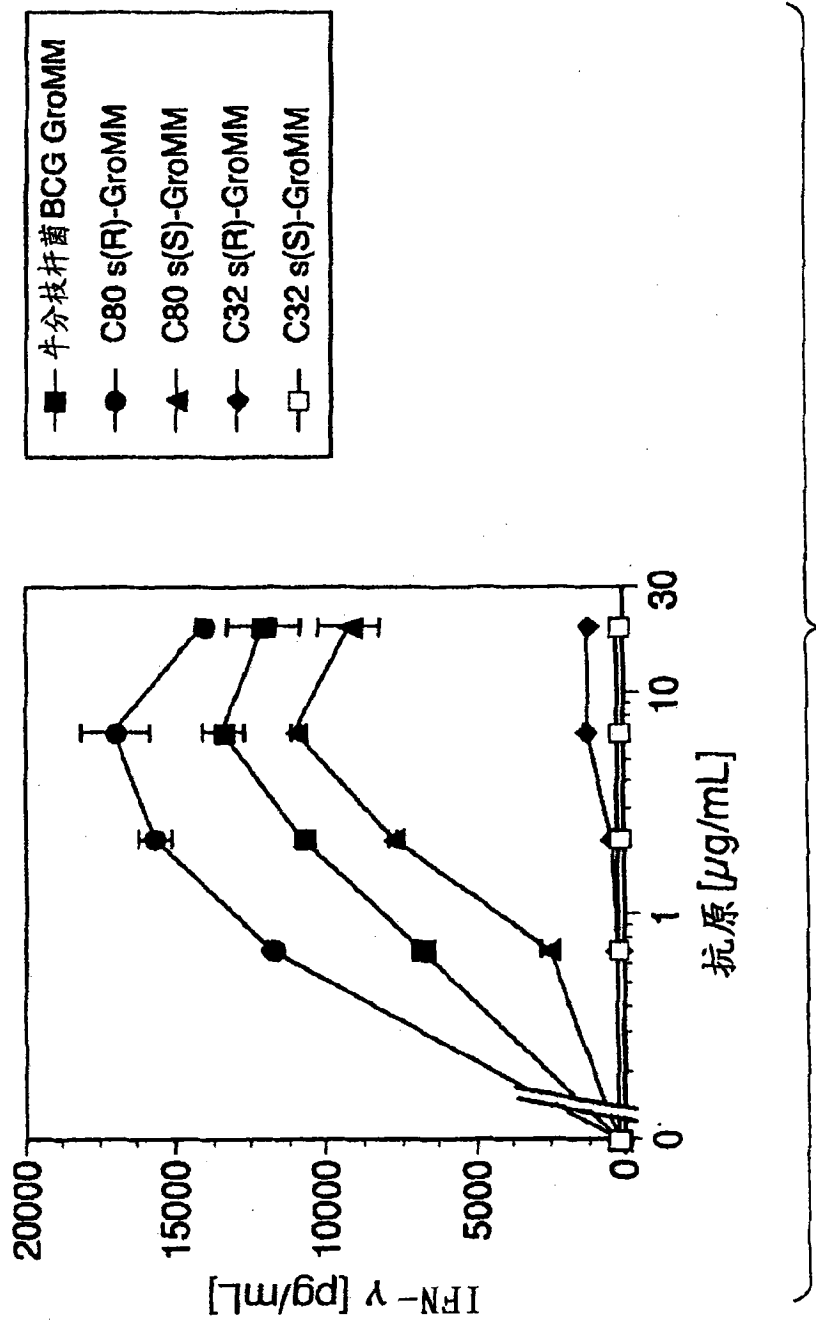


图 7

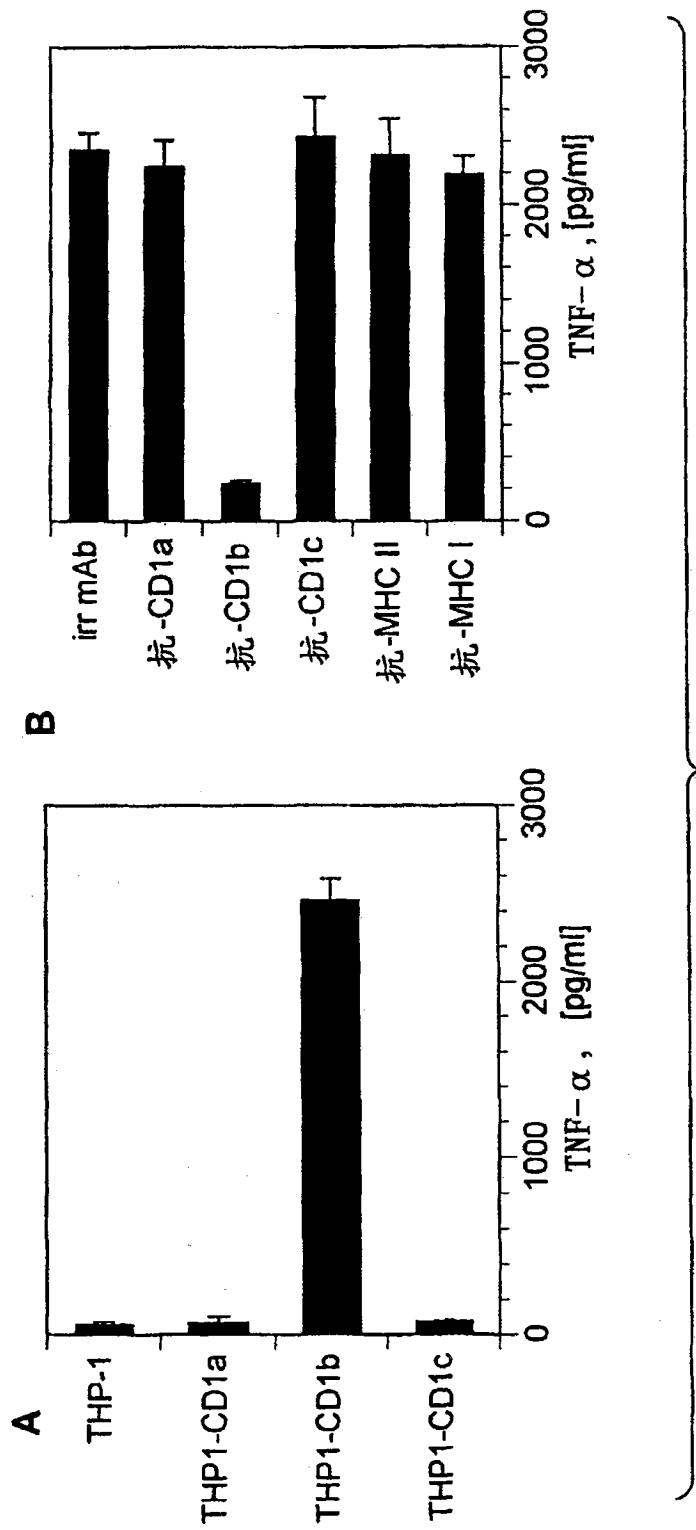


图8(开始)

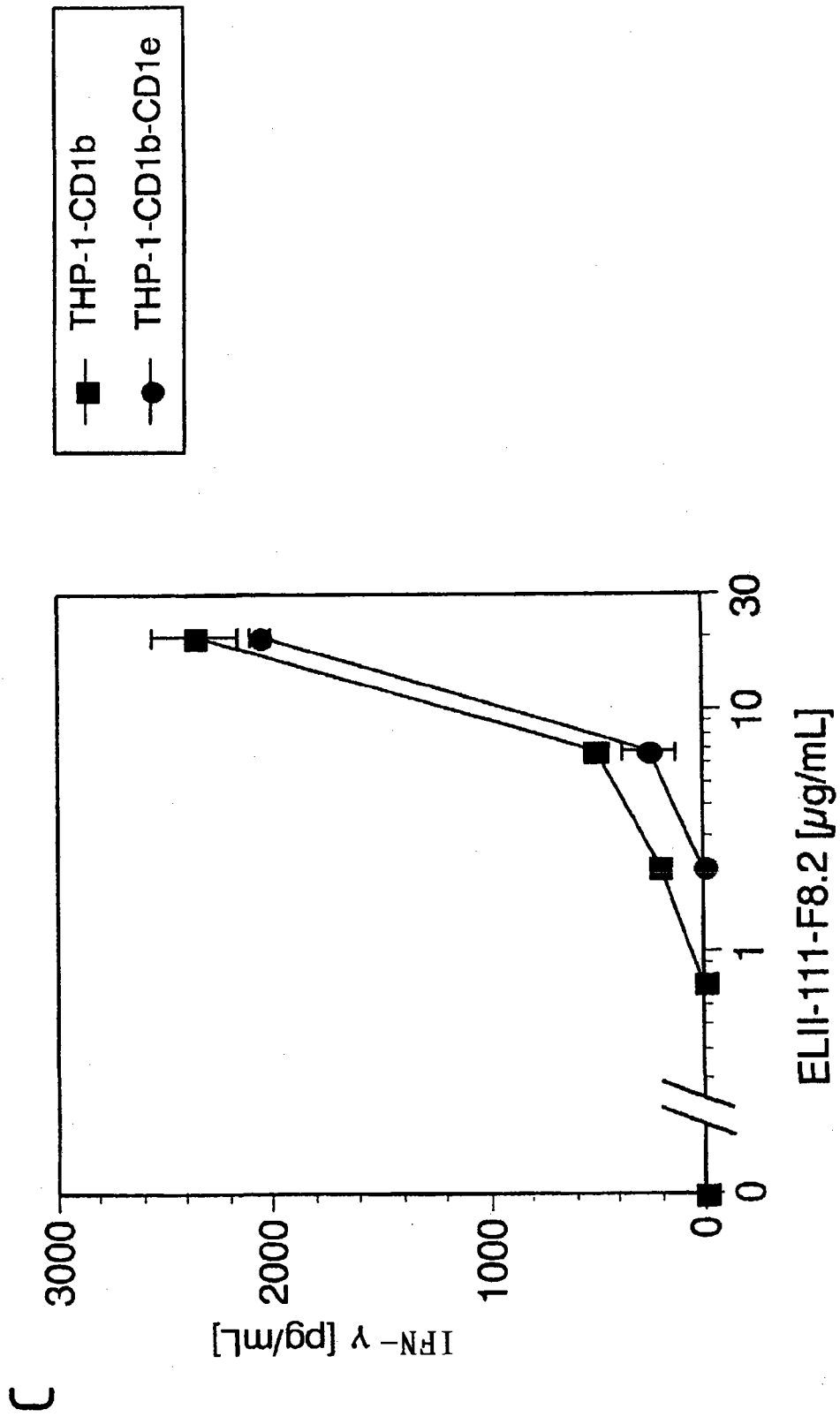
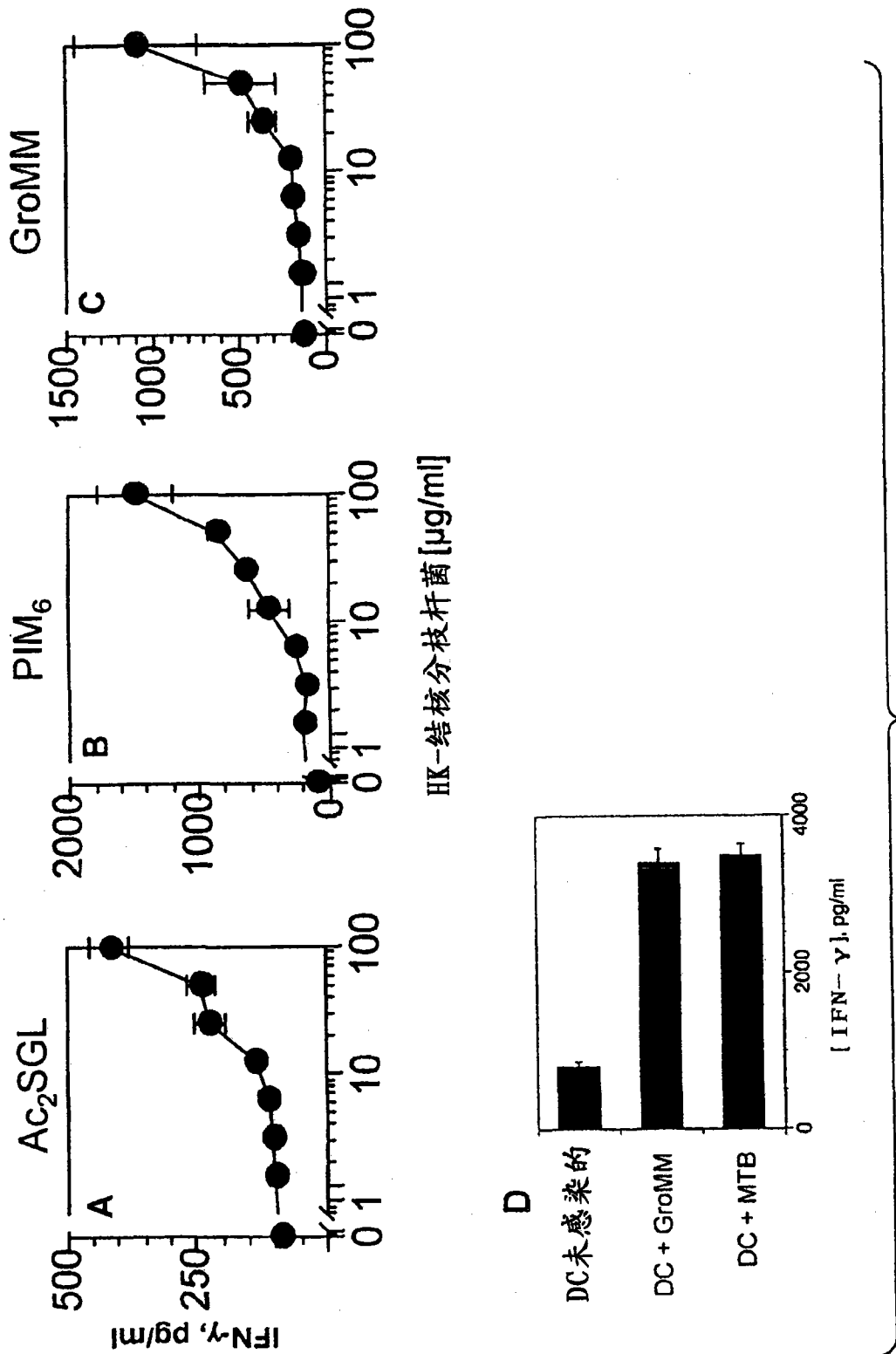


图8(结束)



HK-结核分枝杆菌 [μg/ml]

图 9

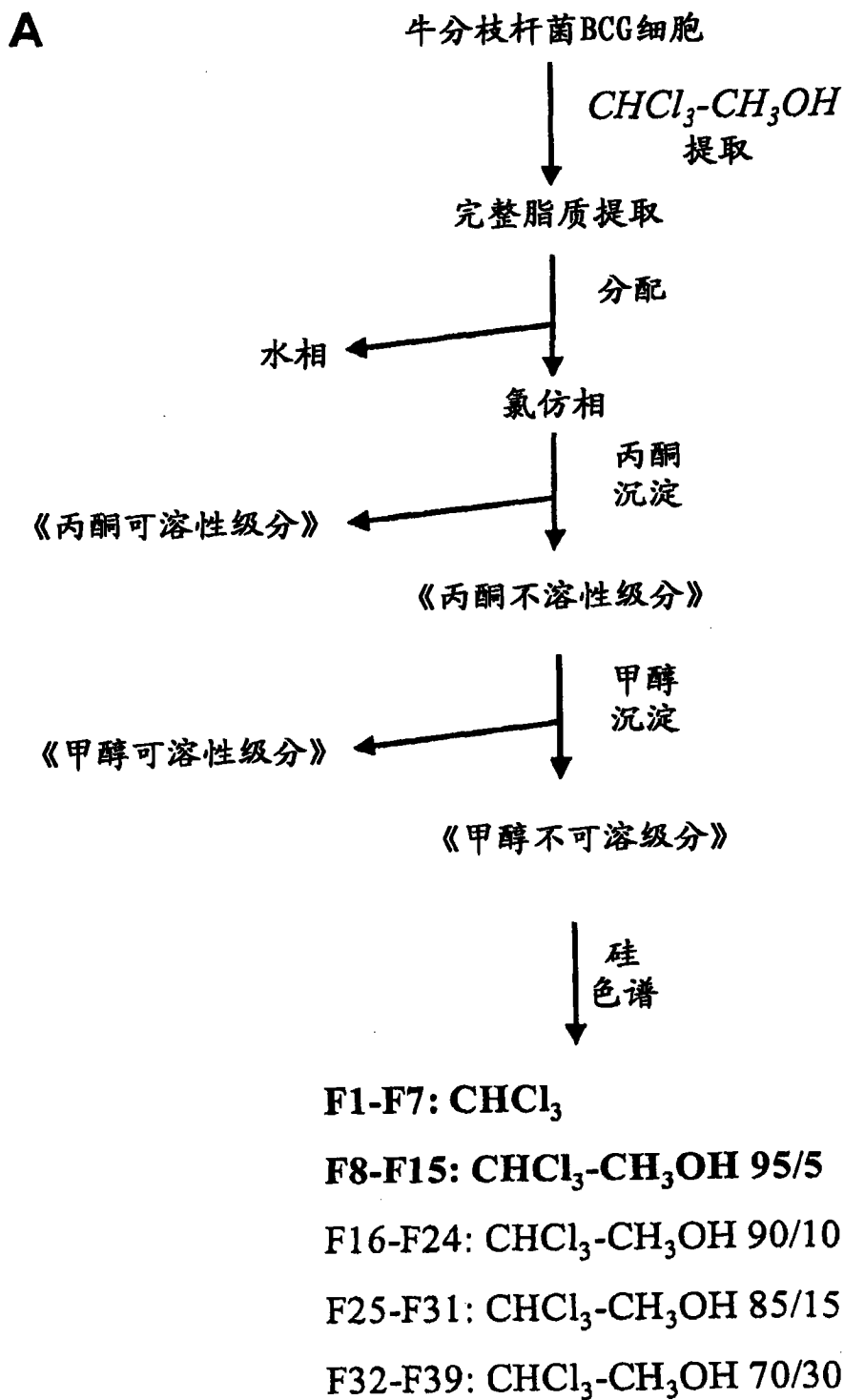


图 11(开始)

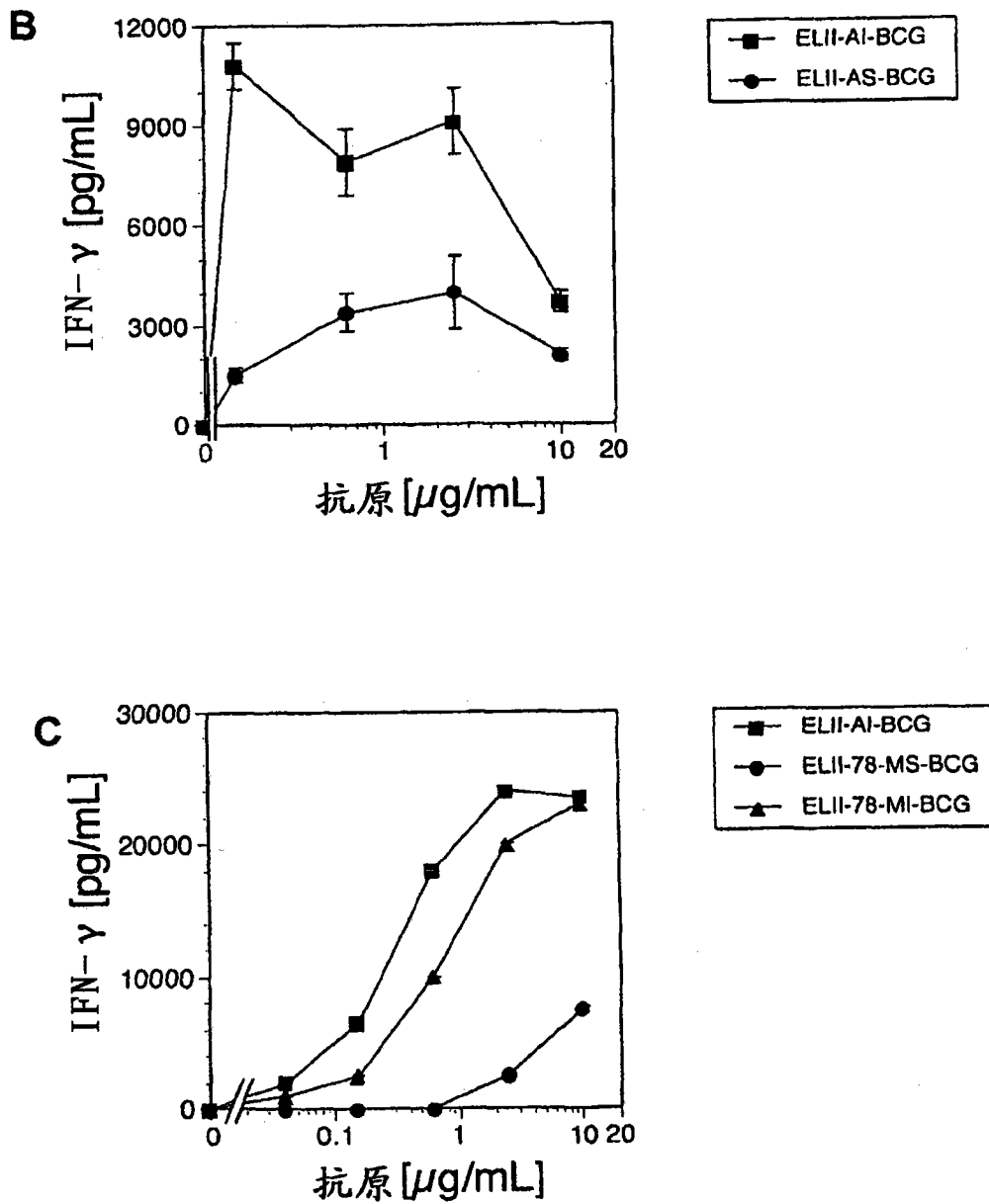


图 11(结束)

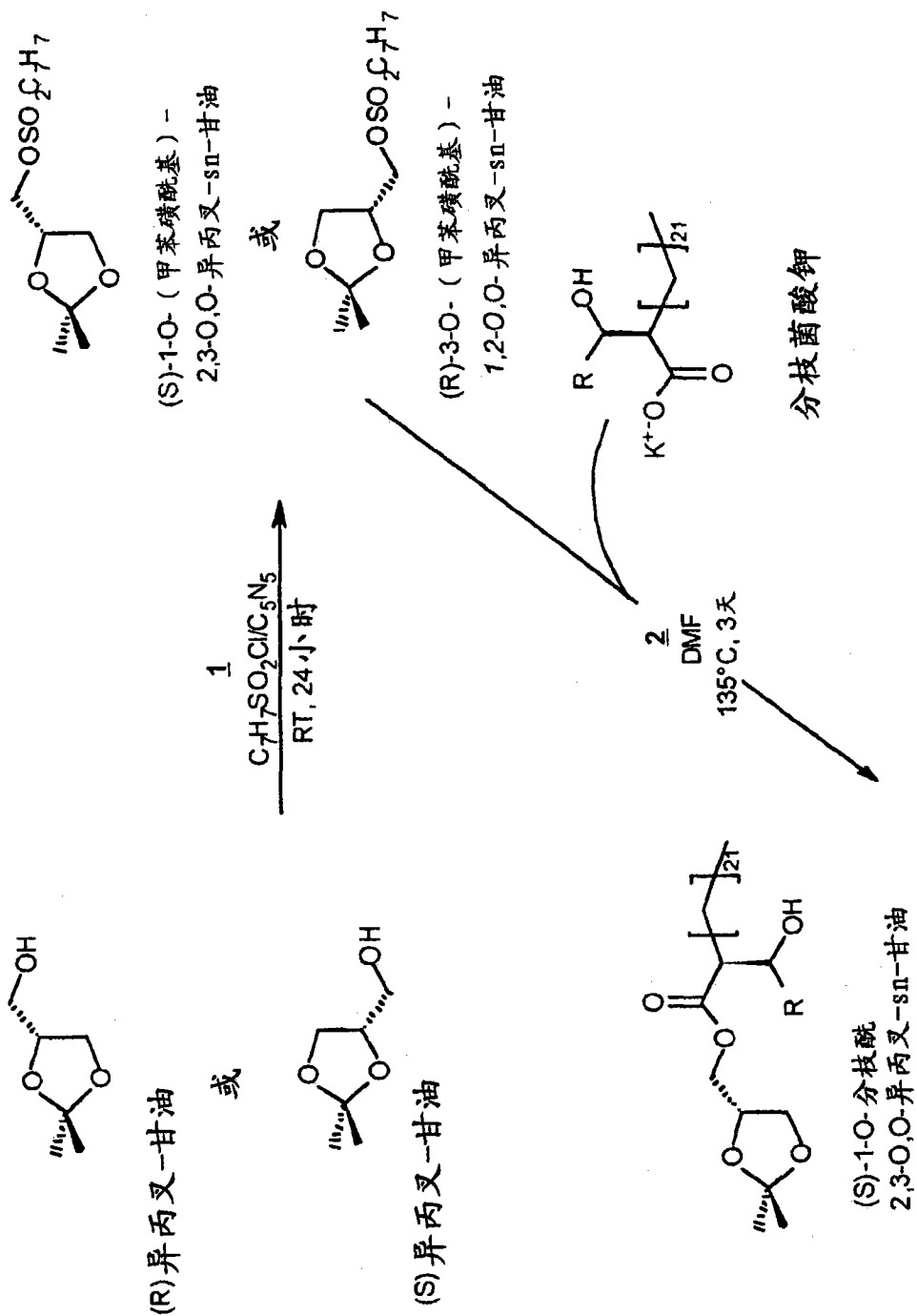


图 12(开始)

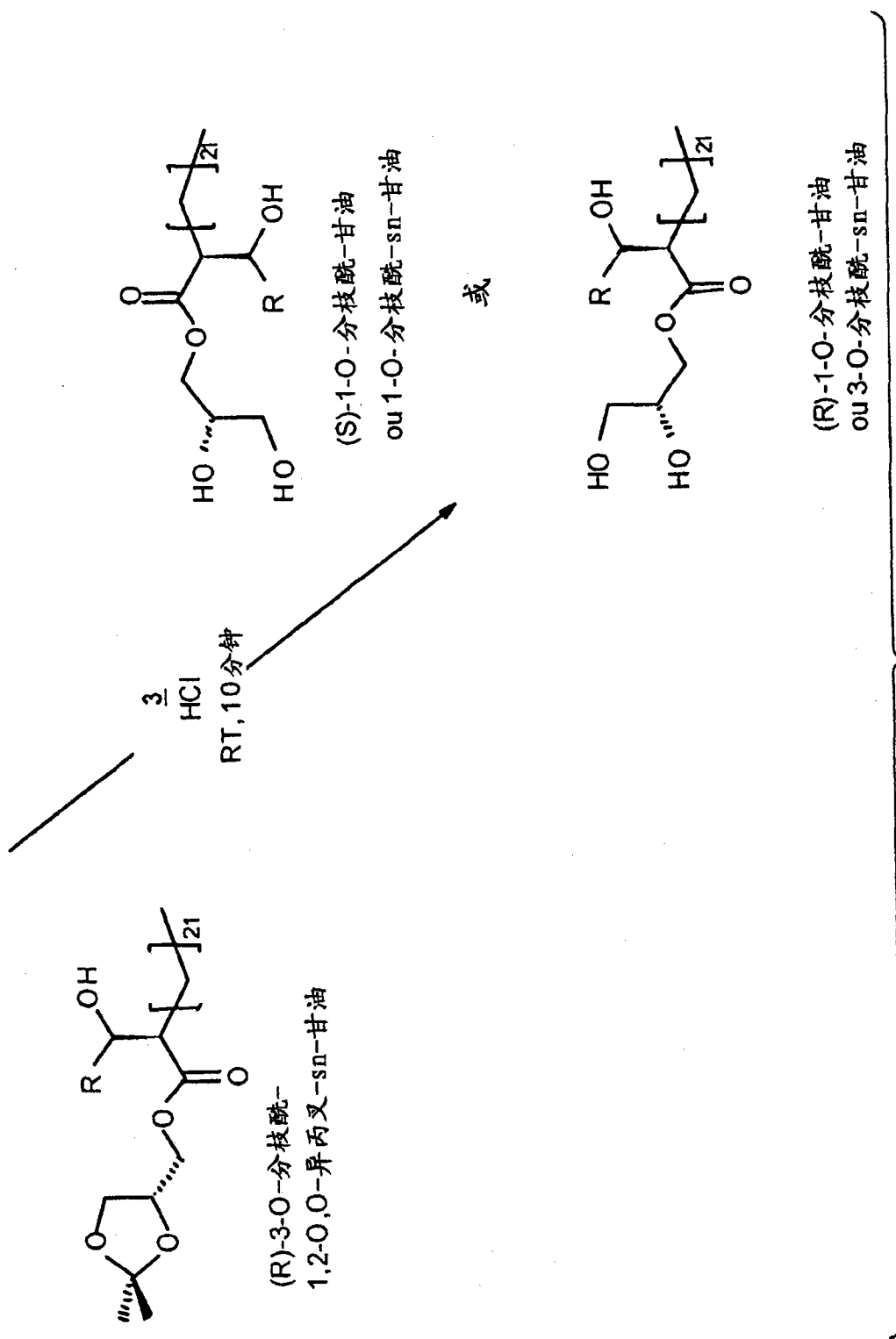


图 12(结束)

● 还原的GroMM

■ GroMM

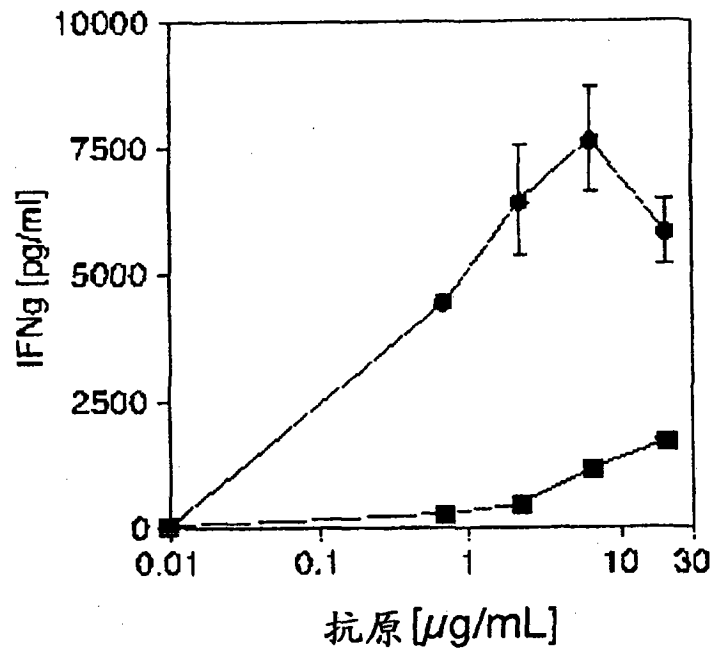


图 13

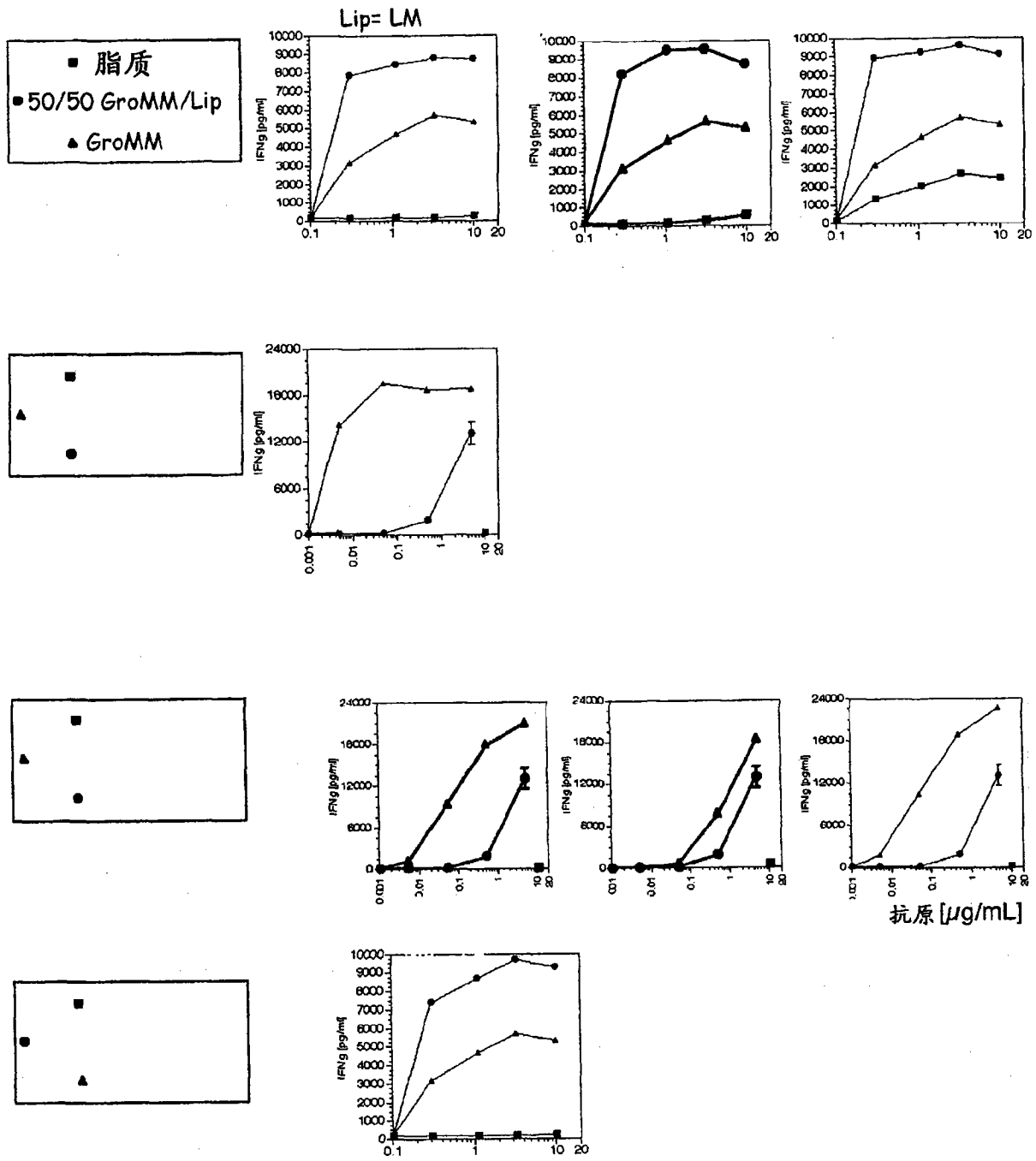
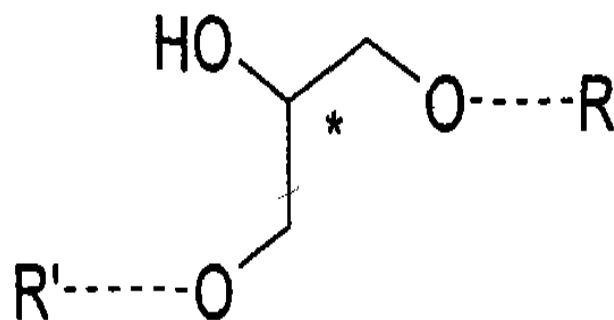


图 14

专利名称(译)	包含放线菌甘油酰基衍生物抗原的药物组合物,其提取方法以及其抗结核病的用途		
公开(公告)号	CN101868247A	公开(公告)日	2010-10-20
申请号	CN200880116784.7	申请日	2008-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	国家研究中心		
申请(专利权)人(译)	国家研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家研究中心		
[标]发明人	G 普佐 E莱尔 M 基勒隆 J 普兰迪 G德里贝罗 S 斯滕格		
发明人	G·普佐 E·莱尔 M·基勒隆 J·普兰迪 G·德里贝罗 S·斯滕格		
IPC分类号	A61K39/02 A61K39/39 C12Q1/18 G01N33/53 G01N33/569 A61P31/06		
CPC分类号	G01N33/5047 A61K39/04 G01N33/505 G01N33/6863 A61P11/00		
优先权	2007291249 2007-10-12 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及放线菌甘油单分枝菌酸酯衍生物作为抗原的治疗用途，其提取方法及其用于治疗或预防结核病的用途。



(I)