

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 47/48

A61K 39/35



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03821463.6

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1681535A

[22] 申请日 2003.9.2 [21] 申请号 03821463.6

[30] 优先权

[32] 2002.9.11 [33] DE [31] 10242076.9

[86] 国际申请 PCT/EP2003/009750 2003.9.2

[87] 国际公布 WO2004/030701 德 2004.4.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.10

[71] 申请人 弗雷泽纽斯卡比德国有限公司

地址 德国巴特洪堡

[72] 发明人 沃尔弗拉姆·艾克纳 德克·多尔曼

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 8 页

[54] 发明名称 羟烷基淀粉 - 变应原偶联物

[57] 摘要

本发明涉及羟烷基淀粉与变应原的偶联化合物，其中至少一个羟烷基淀粉与变应原共价偶联。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种羟烷基淀粉与变应原的偶联物，其中至少一个羟烷基淀粉与变应原共价偶联。
- 5 2. 如权利要求1所述的偶联物，其中所述羟烷基淀粉与变应原直接偶联或者通过接头偶联。
3. 如权利要求1或2所述的偶联物，其中所述羟烷基淀粉是羟乙基淀粉、羟丙基淀粉或羟丁基淀粉。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的偶联物，其中所述羟乙基淀
10 粉的平均分子量为1-300 kDa，优选平均分子量为5-200 kDa。
5. 如上述权利要求中任一项所述的偶联物，其中在所有情况下，对于羟乙基所述羟乙基淀粉具有0.1-0.8的摩尔取代水平，和2-20的C₂:C₆取代比。
6. 如上述权利要求中任一项所述的偶联物，其中所述变应原选
15 自多肽或蛋白质。
7. 如上述权利要求中任一项所述的偶联物，其中所述变应原是糖蛋白。
8. 如上述权利要求中任一项所述的偶联物，其中所述羟烷基淀粉与多肽链偶联，或者与糖蛋白的一条或多条糖链偶联。
- 20 9. 一种药物组合物，其含有如权利要求1-8中任一项所述的偶联物。
10. 如权利要求9所述的药物组合物，它还含有药学可接受的载体。
11. 如权利要求1-8中任一项所述的化合物在特异性免疫治疗、
25 特别是脱敏中的用途。
12. 如权利要求11所述的用途，其用于特异性免疫治疗检测到IgE-介导的致敏、观察到相应临床症状的变态反应患者。
13. 如权利要求11或12所述的用途，其中所述特异性免疫疗法用于治疗对花粉、螨、哺乳动物毛发(唾液)、真菌、昆虫、食物和天

然橡胶/乳胶的变态反应。

14. 如权利要求 11-13 中任一项所述的用途, 其中这种疗法用于治疗哮喘患者、枯草热患者和显示与速发型变应原临床相关的其它类型反应的患者。

5 15. 如权利要求 11-14 中任一项所述的用途, 其中经皮下、粘膜、口服、经口或舌下施用。

16. 如权利要求 11-15 中任一项所述的用途, 其中在季节前或常年进行针对空气传播变应原的免疫治疗。

10 17. 如权利要求 11-16 中任一项所述的用途, 其中用 rush 或 ultra-rush 法对昆虫过敏者进行免疫治疗。

羟烷基淀粉-变应原偶联物

- 5 本发明涉及含有羟烷基淀粉 (HAS) 与变应原的偶联物的化合物，其中 HAS 与变应原直接共价连接或者通过接头连接。本发明还涉及制备相应偶联物的方法，及所述偶联物作为药物的用途。

背景技术

- 10 现在，术语“变态反应”包括免疫系统对外源物质过度的特异性反应。根据 Coombs 和 Gell 的分类，变态反应可以被分为 I-IV 型，它们可以根据参与反应的抗体类型、所识别的抗原和诱导的效应机制加以区别。

- 因此，被称为变应原的化合物是能够在皮肤和粘膜诱导变应性免疫应答（狭义地指速发型变应性免疫应答 (I 型)）的化合物。变应原通常是分子量约为 5000 Da-约 80 000 Da 的多肽或蛋白质。这种多肽可以来源于植物、动物或微生物。另外，这种多肽也可以是室尘的组成成分。

- 变应原诱导 IgE 抗体，该抗体通过恒定区与肥大细胞表面结合，从而使肥大细胞脱颗粒。肥大细胞释放的物质（组胺、蛋白水解酶和炎症介质）直接和间接地引起变态反应的症状，通常是鼻炎、结膜炎和/或支气管哮喘。

- 15 IgE 介导的速发型变态反应 (I 型) 是目前为止最普遍的变态反应类型。在发达国家，高达 20% 的人口患有 I 型变态反应症状。当前除了用药物治疗变态反应患者外还利用被称为脱敏的特异性免疫疗法治疗 (Kleine-Tebbe 等人, Pneumologie, Vol. 5 (2001), 438-444)。

在常规脱敏中，皮下施用含量逐渐增加的特定变应原提取物，直到达到个体维持剂量。继续治疗时，使用不同的治疗方案，重复施用这个剂量 (Klimek 等人, Allergologie und Umweltmedizin,

Schattauer Verlag, 158 等等)。

在这种情况下，治疗结果似乎与维持阶段使用的变应原的量密切相关。然而，如果增加施用的变应原的量，变态反应患者发生 IgE 介导的反应的危险也总是增加。换句话说，对于过敏性休克患者，患者的变态反应和与之相关的危险也限制了该疗法的使用。

如果变态反应症状缓解，个体不再需要药物并且对变应原的耐受增加，则认为治疗是成功的。

已经提出，某些变应性多肽可以通过重组表达产生，并且可用于脱敏 (DE 100 41 541)。

为了获得 IgE 结合特性降低的变应原，用聚乙二醇 (PEG) 修饰变应原，并用于脱敏。有大量出版物描述了通过变应原与聚乙二醇共价键合制备 PEG-变应原偶联物。例如，Mosbech 等人 (Allergy, 1990, Vol. 45 (2): 130-141) 报告了使用 PEG-室尘偶联物治疗患有哮喘的过敏成人，以及治疗后的免疫应答。作者发现，只要变应原剂量足以减少特异性 IgE 的量，并且/或者诱导 IgG 应答特别是 IgG4 应答，则临床效果改善。

类似地，Schafer 等人 (Ann. Allergie, 1992, Vol. 68 (4): 334-339) 报告了一项研究，其中用 PEG-修饰的青草花粉混合物的变应原组合物对成人进行脱敏。该治疗结果与使用部分纯化的青草花粉混合物脱敏的治疗结果相比较。治疗以双盲法进行。PEG 修饰使副作用的发生频率和程度下降约 50%。在两个治疗组中都发现超敏反应显著改善。

然而，PEG 偶联物不含已经了解其体内降解途径的任何天然存在的结构。

除了 PEG 偶联物之外，也曾经制备并研究了其它一些变应原衍生物。已知与羧甲基葡聚糖偶联产生的葡聚糖修饰的变应原。使用 β -乳球蛋白进行的一些研究表明，与未修饰的化合物相比，对葡聚糖偶联物的抗体应答显著减弱 (Kobayashi 等人, J Agric Food Chem 2001 Feb; 49 (2): 823-31; Hattori 等人, Bioconjug Chem 2000 Jan-Feb; 11 (1):

84-93)。

另外，也已经生产了交联的高分子量变应原，被称为类变应原。例如，可以通过用甲醛或戊二醛修饰变应原获得这些产物。相应的产品可以从 Allergopharma, Joachim Ganser KG, 21462 Reinbek; HAL
5 Allergie GmbH, 40554 Düsseldorf; 和 SmithKline Beecham Pharma GmbH, Benckard, 80716 München 获得。

G.T. Hermanson (Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego 1996) 对制备生物偶联物的不同方法进行了全面综述。对此，寡糖和多糖与蛋白质的连接主要通过赖氨酸 (-NH₂) 或半胱氨酸
10 (-SH) 侧链发生，较少通过天冬氨酸或谷氨酸 (-COOH) 或者酪氨酸 (芳基-OH) 侧链发生。然而到目前为止，还没有使用淀粉衍生物修饰变应原。

例如，羟乙基淀粉是碳水化合物聚合物支链淀粉的一种取代的衍生物，后者占玉米淀粉的 95%。HES 具有有利的流变学性质，目前在
15 临床上用于容量替代和血液稀释治疗 (Sommermeyer 等人, Krankenhauspharmazie, Vol. 8(8), (1987), 271-278; 和 Weidler 等人, Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, (1991) 494-498)。

支链淀粉由葡萄糖单元组成，其中主链中存在 α -1,4-糖苷键，在分支位点处可见 α -1,6-糖苷键。该分子的物理化学性质主要取决于糖
20 苷键的类型。由于 α -1,4-糖苷键有角度，形成每圈大约有 6 个葡萄糖单体的螺旋结构。

HES 聚合物的物理化学和生物化学性质能够通过取代而改变。可以通过碱性羟乙基化作用引入羟乙基。通过改变反应条件，可以利用非取代葡萄糖单体中各羟基对于羟乙基化的不同反应性，从而影响取
25 代模式。

HES 的特征主要在于分子量分布和取代水平。在这方面，取代水平可以用 DS (取代度) 或 MS (“摩尔取代”) 描述，DS 指取代的葡萄糖单体在所有葡萄糖单元中的比例，MS 指每葡萄糖单元的羟乙基数。

HES 溶液是多分散组合物，每个分子在聚合程度、分支点的数量

和排列以及取代型式方面彼此不同。因此 HES 是分子量不同的化合物的混合物。因此，以统计学变量为基础，用平均分子量定义具体的 HES 溶液。就此而言， M_n 被计算为取决于分子数(平均数)的简单算术平均值，而重量平均值 M_w 代表取决于质量的变量。

5 因此，本发明的目标是提供改进的变应原衍生物，特别是达到贮存效应从而不需频繁施用的变应原衍生物。

这一目标现在用羟烷基淀粉(HAS)与变应原的偶联物实现，其中至少一个羟烷基淀粉与变应原共价偶联。

因此，根据本发明意外地发现，HAS-变应原偶联物可以特别有利地用于特异性免疫治疗。本发明偶联物的应用提高了脱敏的安全性。同时，本发明偶联物具有更长的体内半衰期，因此与 HAS 偶联获得贮存效应，这对临床效果具有有利的影响。特别是与水性变应原提取物相比，本发明偶联物的贮存效应具有只需频率较低地施用偶联物即可达到治疗效果的优点。

15 本发明 HAS-变应原偶联物可以这样制备，使得它们与未修饰的变应原相比，与变应原特异性 IgE 的结合减少。在一个特别优选的实施方案中，HAS-变应原偶联物只显示与变应原特异性 IgE 极低的结合或者根本没有特异性结合。因此，本发明偶联物能够以更高的剂量施用，从而提高了成功脱敏的可能性。

20 与交联的类变应原相比，本发明 HAS-变应原偶联物具有能够提供与天然变应原相当之表位特征的优点。因此能够提高免疫治疗的效果。相反，使用甲醛或戊二醛聚合变应原产生确定性较差的高分子量化合物(Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1990; 6(4): 315-65)，这可能产生非天然的表位，因此它们的效果必须视具体情况而定。

25 在该偶联物中，至少一个羟烷基淀粉与变应原偶联。本发明范围当然也包括含有多个羟烷基淀粉分子和一个变应原或者含有多个变应原分子和一个羟烷基淀粉分子的偶联产物。

在与变应原直接偶联或者通过接头与变应原偶联的偶联物中可以含有羟烷基淀粉。羟烷基淀粉也可以与多肽链偶联，或者与变应原

糖蛋白的一条或多条糖链偶联。

羟烷基淀粉 (HAS)

对于本发明，术语“羟烷基淀粉”指被羟烷基取代的淀粉衍生物。

5 羟烷基优选地含有 2-4 个碳原子。因此被称为“羟烷基淀粉”的这类分子优选地包括羟乙基淀粉、羟丙基淀粉和羟丁基淀粉。对于本发明的所有实施方案，使用羟乙基淀粉 (HES) 作为偶联配偶体是特别优选的。

根据本发明，用来制备偶联物的羟乙基淀粉的平均分子量优选是 1-300 kDa，5-200 kDa 的平均分子量是特别优选的。在所有情况下，
10 对于羟乙基，羟乙基淀粉可以具有 0.1-0.8 的摩尔取代水平，和 2-20 的 C₂:C₆ 取代比。

变应原

对于本发明，被称为变应原的化合物主要是能够诱导变应性免疫
15 应答（狭义地指 IgE-介导的超敏反应 (I 型)）的化合物。也包括来源于变应原序列的肽，例如酶切产生的酶切产物。特异性免疫治疗使用相应的变应原，它们可以作为商品获得。

变应原能够从天然来源中分离。因此，对于花粉变应原，例如可以
20 从特定花粉中获得变应原提取物。另外，例如也可以重组制备变应原。

变应原优选是选自多肽、蛋白质和糖蛋白的化合物。

制备方法

一方面，本发明涉及制备 HAS-变应原偶联物的方法，在该偶联物
25 中，HAS 与变应原直接共价偶联或者通过接头共价偶联。这种偶联能够以多种方式进行。图 1 显示了使用接头的通式结构新糖蛋白的合成。

在一个实施方案中，本发明涉及制备 HAS-变应原偶联物的方法，在该偶联物中，HES 与变应原的 ϵ -NH₂ 基、 α -NH₂ 基、SH 基、COOH 基或 -C(NH₂)₂ 基连接。

本发明也包括通过还原胺化将 HES 与蛋白质的 ϵ -NH₂基偶联的方法。作为它的备选方法，本发明涉及变应原与羟乙基淀粉的还原性末端基团偶联的方法。

在另外一个实施方案中，本发明涉及为了与变应原偶联向 HAS 中引入活性基的方法。该活性基可以是例如醛基、硫醇基或氨基。

变应原与寡糖或多糖可以直接偶联或者通过接头偶联在一起。可以使用任何交联剂作为接头。该接头可以是例如双功能接头如同双功能交联剂或异双功能交联剂。

多种交联剂，例如 SMCC (4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯)，可以作为商品获得并为技术人员公知(参见 Perbio 产品目录和 www.piercenet.com 上按字母顺序排列的“交联剂”列表)，可以用于本发明。

在另外一个实施方案中，本发明涉及可以通过上述方法获得的 HAS-变应原偶联物。

下文描述了合成 HAS-变应原偶联物的一些方法。生物偶联领域的普通技术人员可以从所述方法中选择特别适合达到目的(选择的变应原，选择的 HAS 等)的方法而不会有任何问题。

通过还原胺化，未修饰的 HAS 与变应原蛋白质的直接偶联：

在 NaCN/BH₃ 存在下，通过还原胺化，HAS 与变应原蛋白质的 ϵ -氨基直接偶联，这代表了不需要修饰 HAS 即能够进行的一种简单、温和的方法(G. R. Gray, Arch. Biochem. Biophys. 1974, 163, 426-28) (图 2.1a)。

也可以使用的还原剂有吡啶-硼烷和其它更稳定、更易于处理的氨基-硼烷复合物(J. C. Cabacungan 等人, Anal. Biochem. 1982, 124, 272-78)。与酰化不同，蛋白质被修饰的氨基在生理条件下仍然带正电荷。因此，还原胺化对蛋白质三级结构的影响较小。然而，在该方法中，还原性糖的环结构丢失。

修饰的 HAS 的偶联方法:

还原性末端氧化为醛糖酸

在较少使用的用碘(或溴)氧化为相应的醛糖酸时(G. Ashwell, Methods Enzymol. 1972, 28, 219-22), 还原性糖的环结构丢失(图 2.1b), 另外, 为了避免非特异性氧化, 必须小心控制反应。形成的羧酸官能团能够在 EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺)存在下(J. Lönngren, I. J. Goldstein, Methods Enzymol. 1994, 247, 116-118)与变应原蛋白质赖氨酸侧链的 ϵ -氨基偶联, 或者通过酰肼接头偶联(见图 3)。类似地也可以使用例如甘露糖醛酸、葡糖醛酸或唾液酸的多糖结构中所含羧基进行偶联。

本发明的一个特别优选的实施方案提供由 HES-变应原偶联物组成的化合物, 该偶联物中变应原与羟乙基淀粉的还原性末端基团特异性连接。为此, 该还原性末端基团可以被预先选择性氧化, 例如利用 Hashimoto 等人(Kunststoffe, Kautschuk, Fasern, Vol. 9, (1992) S. 1271-1279)所述的方法氧化糖类的还原性醛基末端。

HAS 的羟基官能团的活化

非特异性活化多糖的最有用的方法之一是与溴化氰(CNBr)反应(C. Chu 等人, Infect. Immun. 1983, 40, 245-56) (图 2.1c)。活化的羟基酰化蛋白质的赖氨酸、半胱氨酸和组氨酸侧链。但这种偶联方法可能具有高 pH、毒性和可操作性较差的缺点。

CNBr 的一种替代物是 CDAP (1-氰基-4-二甲基氨基吡啶鎓四氟硼酸盐)(A. Lees 等人, Vaccine 1996, 14, 190-98; D.E. Shafer 等人, Vaccine 2000, 18, 1273-81), 它可以提高氰基的反应性, 使反应能够在极其温和的条件下进行。

多糖的非特异活化通常可导致多重取代, 因此也可导致多糖与蛋白质之间的交联。然而, 这可以通过适当选择反应条件显著抑制。

醛的引入

通过用 NaIO_4 切割相邻的羟基, 也可以向非还原多糖内引入醛基官能团(J.M. Bobbit, Ad. Carbohydr. Chem. 1956, 11, 1-41) (图

2.1d), 通过高碘酸钠溶液的浓度可以获得充分的选择性。唾液酸特别易于氧化(S.M. Chamov 等人, *Biol. Chem* 1992, 267, 15916-22)。

引入不会环化为半缩醛的醛基可以提高用还原性多糖进行的直接还原胺化的反应速度。其可通过以下方法实现: 将还原性末端还原为糖醇, 随后选择性氧化打开的糖醇中相邻的二醇(Y. C. Lee, R. T. Lee, *Neoglycoproteins: Preparation and Application*, Academic Press, Sant Diego 1994) (图 2.1d)。

除了醛修饰的多糖与蛋白质的氨基官能团通过还原胺化直接偶联之外, 也可以用双功能酰肼接头修饰多糖(见下文)。

10 氨基官能团的引入

寡糖(含有可达 20 个碳水化合物单体)与多糖相比, 通过还原胺化使还原性糖反应产生 glycamine 或者产生具有完整环结构的糖基胺的可能性较大, 因为其反应性略高(图 2.2)。

使用双功能接头适合偶联氨基修饰的多糖与蛋白质的不同侧链官能团(见下文)。

通过还原胺化引入氨基官能团

与使用 NH_3 或脂族胺通过还原胺化合成 glycamine(B. Kuberan 等人, *Glycoconj. J.* 1999, 16, 271-81) 不同, 在相当条件下, 使用芳族胺例如苄胺(T. Yoshida, *Methods Enzymol.* 1994, 247, 55-64)、2-(4-氨基苯基)乙胺(APEA)(H. D. Grimmecke, H. Brade, *Glycoconj. J.* 1998, 15, 555-62)或 4-三氟乙酰氨基苯胺(E. Kallin, *Methods Enzymol.* 1994, 247, 119-23), 能够获得更高的产率(图 2.2a)。

对于 APEA, 利用脂族氨基与芳族氨基的反应性不同进行选择性反应, 可获得 4-三氟乙酰氨基苯胺形式的单保护的化合物(此外, 也可以使用苄氧羰基氨基苯胺(M. Barström 等人, *Carbohydr. Res.* 2000, 328, 525-31)), 随后除去三氟乙酰基就释放出芳族氨基官能团。另外也表明, 在除去 TFA 保护基之前, 用乙酸酐进行简单的 N-乙酰化能够稳定 glycamine。

通过 N-糖基化引入氨基官能团

N-糖基化(图 2.2b)提供了保留还原性糖之环状环结构的可能性。与碳酸氢铵反应获得的不稳定的 β -糖基胺(I. D. Manger 等人, Biochemistry 1992, 31, 10724-32; I. D. Manger 等人, Biochemistry 1992, 31, 10733-40; S. Y. C. Wong 等人, Biochem. J. 1993, 296, 817-25, E. Meinjohannes 等人, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1998, 549-60), 可以通过随后用氯乙酸酐酰化来稳定, 并且通过氨解转化为含有游离氨基的 1-N-甘氨酸化合物。类似也可以用烯丙胺进行 N-糖基化, 并且在通过 N-酰化稳定后, 可以向双键上光化学添加半胱胺(D. Ramos 等人, Angew. Chem. 2000, 112, 406-8)。

10 由醛糖酸制备氨基官能团

通过与二胺反应, 可以向氧化还原性多糖获得的醛糖酸中引入游离氨基官能团。这可以通过酸与碳二亚胺和二胺反应实现。此外, 醛糖酸脱水获得的内酯也可以与二胺反应(S. Frie, 毕业论文, Fachhochschule Hamburg, 1998)。

15 使用双功能接头, 修饰的 HES 与变应原蛋白质的偶联反应

通过接头连接在一起的修饰的 HES 和蛋白质侧链的官能团多样性与可以进行的反应可能性相对应(图 3 显示普通的接头活化)。

可以区别反应基团对氨基(NHS 酯、酰亚胺酯和芳基叠氮化物)、醛和(在 EDC 存在下)羧酸(酰肼)或 SH 基(马来酰亚胺、卤代乙酸酯或吡啶基二硫醚)的反应性。

20 具有胺反应性的试剂

最有用的偶联剂是胺反应性的交联剂。而且, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯(图 3.1a)是最常见的活化形式。在这种情况下, 通过除去 NHS 形成酰化的化合物。酰亚胺酯提供了修饰伯胺的另外一种可能性(F. C. Hartman, F. Wold, Biochemistry 1967, 6, 2439-48) (图 3.1b), 形成酰亚胺酰胺(脒)。通常用酰亚胺酯作为蛋白质交联剂, 根据对它其它亲核试剂的最小反应性加以区别。另外, 也可以使用不同的芳基叠氮化物接头(光反应性交联剂), 它们通过光解形成短寿命的氮宾。通过环扩展(代替非特异性插入)由其产生脱氢氮杂卓, 它们优选地与亲

核试剂特别是与胺反应(图 3.1c)。

由于可以商业获得大量具有氨基活性的偶联剂和各种接头,其它反应的可能性(例如与异氰酸酯和异硫氰酸酯的反应)逐渐失去重要性。

5 具有对羰基或羧基的反应性的试剂

利用酰肼接头偶联含有羰基或羧基的化合物(D. J. O'Shanessy, M. Wilchek, *Anal. Biochem* 1990, 191, 1-8)(图 3.2)。醛被转化为腙,腙可以用 NaCN/BH₃还原稳定化,在 EDC 存在下羧基反应形成酰亚胺键。酰肼活化的接头是还原胺化和用零长度交联剂(如羰基二咪唑(CDI))活化羧基的通用替代方案。

10 具有巯基反应性的试剂

具有 SH 反应性的偶联剂是第二大类交联剂。偶联反应主要包括两种反应途径:烷化(图 3.3a-b)或二硫醚交换(图 3.3c)。除了用 α -卤代乙酸酯烷化之外,通过 Michael 加成,马来酰亚胺的双键能够与 SH 基选择性反应,形成稳定的硫醚键。硫醇二硫醚交换是另外一种巯基特异性反应。在这种情况下,与吡啶基二硫醚的反应(J. Carlsson 等人, *Biochem J.* 1978, 173, 723-37)证明是特别有利的,因为通过除去 2-吡啶酮能够完全转化为混合的二硫醚。

交联剂

20 使用不同的同双功能交联剂和异双功能交联剂,利用上述偶联反应合成本发明的 HAS-变应原生物偶联物。

同双功能交联剂

25 对称的同双功能接头(参见,例如,图 4.1 所示)在两端含有相同的反应基,适合连接含有相同官能团的化合物。根据可以进行的偶联反应,含有例如二亚胺酯、二琥珀酰亚胺、二酰肼和二马来酰亚胺官能团的相应双功能接头可以作为商品获得。

使用同双功能接头的一个缺点是,即使使用过量的交联剂也不能完全防止第一种化合物活化中的交联(S. Bystrick 等人, *Glycoconj. J.* 1999, 16, 691-95)。与第二种化合物偶联之前完全除去交联的第

一种化合物是必要的，如果活化的中间产物不稳定，则可能比较困难（例如 NHS 活化的化合物对水解敏感）。随着 pH 提高，胺反应性和 NHS 酯的水解都提高，这就是为什么在生理条件 (pH 7) 下在缓冲液中进行反应的原因 (NHS 酯 DSP 在 0°C 和 pH 7 下的半衰期为 4-5 小时，但是在 pH 8.6 下只有 10 分钟; A. J. Lomant, G. Fairbanks, J. Mol. Biol. 1976, 104, 243-261)。

异双功能交联剂

可以利用异双功能交联剂 (参见, 例如图 4.2 所示) 连接含有不同官能团的化合物。这类接头含有两种不同的反应基, 通过组合不同的偶联反应, 可以在该交联剂的一端选择性反应。因此, 例如, 该接头的一侧具有氨基活性, 另一侧具有巯基活性, 获得比同双功能接头更好的反应控制可能性。

异双功能接头的更具反应性或者更不稳定的一侧首先反应。由于 NHS 酯不仅能够与氨基反应形成稳定的酰胺键也可以与巯基和羟基反应, 异双功能接头最初与氨基化合物反应。与之相比, 马来酰亚氨基在水溶液中不仅显示更高的选择性, 而且显示更高的稳定性, 因此能够纯化活化的中间物, 随后与具有巯基活性的化合物选择性反应。

交联剂的选择不仅取决于用于偶联的官能团的性质, 而且取决于间隔区所希望的长度和组成, 被称为交联桥。因此, 一些间隔区, 特别是具有刚性环结构的间隔区, 例如 SMCC 或 MBS, 引发特异性抗体应答 (J.M. Peeters 等人, J. Immunol. Methods 1989, 120, 133-43), 因此可能较不适于半抗原-载体免疫原和体内使用。

图 4 中的接头中省略了可以通过二硫醚切割 (例如 DSP、DTME 或 DTBP) 或高碘酸盐切割 (二醇, 如 BMDB 或 DET) 打开并用于研究生物特异性相互作用、或者用于纯化未知靶结构的可特异性切割的接头。

可作为商品获得的偶联剂所使用的缩写来自这些化合物的系统命名, 例如 DMA (己二亚胺酸二甲酯 (dimethyl adipimidate))、DMS (辛二亚胺酸二甲酯 (dimethyl suberimidate))、GMBS (N-(γ -马来酰亚氨基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯) 等。

图 5 中总结了例如用于巯基偶联的各种异双功能交联剂。

马来酰亚胺活化的接头在此提供了最大的通用性，通常与 NHS 酯活化相结合。具有巯基和氨基反应性的这些接头是不溶于水的烷基桥接的线性接头，例如 AMAS、GMBS 和 EMCS，或者象 SMCC、SMPB 或 MBS 一样含有刚性环结构。免疫化学方法如 ELISA 检测通常使用两种 UV 活性接头，SMPB 和 MBS。

另外， M_2C_2H 也是一种接头，它具有与 SMCC 相同的刚性桥，但是用酰肼活化，以便连接含有巯基和羰基或羧基活性的化合物。

不溶于水的接头在反应之前首先需要溶解于一种有机溶剂如 DMF 或 DMSO 中，与之不同，另外还有一些接头的水溶性变体如亲水性磺基-NHS 酯 (J. V. Staros, *Biochemistry* 1982, 21, 3950-55)，例如磺基-GMBS、磺基-EMCS 和磺基-SMCC。

除了马来酰亚胺活化的异双功能接头之外，巯基偶联也可以使用多种卤代乙酸酯，例如 SIA (以及溴类似物)、SIAB 和 SBAP (图 5.2)，和吡啶基二硫醚，如 SPDP 和 LC-SPDP 和磺基-LC-SPDP (图 5.3)，也与 NHS 酯活化相结合进行氨基偶联。通过与游离酸和水溶性碳二亚胺反应 (N. J. Davies, S. L. Flitsch, *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 6793-6796)，或者与相应的酸酐反应 (I. D. Manger 等人, *Biochemistry* 1992, 31, 10733-40; S. Y. C. Wong 等人, *Biochem. J.* 1994, 300, 843-850)，也可以将卤代乙酸酯引入胺化的多糖中 (见图 2.2b)。

合成寡糖与蛋白质的 SH 侧链通过异双功能马来酰亚胺接头偶联的许多例子在文献中可见 (V. Fernandez-Santana 等人, *Glycoconj. J.* 1998, 15, 549-53; G. Ragupathi 等人, *Glycoconj. J.* 1998, 15, 217-21; W. Zou 等人, *Glycoconj. J.* 1999, 16, 507-15; R. Gonzalez-Lio, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* 1999, 317, 180-90)。另外，寡糖之碘乙酰胺衍生物的直接偶联也可以用于蛋白质的特异性糖基化 (N. J. Davies, S. L. Flitsch, *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 6793-6796; S. Y. C. Wong 等人, *Biochem. J.* 1994, 300, 843-850)。

用多糖和寡糖在糖部分修饰糖蛋白:

对于糖蛋白,连接的寡糖也为形成本发明的偶联物提供了更多的连接点,作为蛋白质氨基酸侧链的替代途径(J. J. Zara 等人, Anal. Biochem. 1991, 194, 156-62)。

5 通过高碘酸钠氧化引入醛

通过用高碘酸钠氧化,可以向非还原性寡糖内引入醛。根据选择的氧化条件,存在的唾液酸可以被选择性氧化,或者岩藻糖、甘露糖、半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺残基较低选择性地被氧化(S. M. Chamov 等人, J. Biol. Chem. 1992, 267, 15916-22)。一种可能的副反应是由 N-
10 端丝氨酸、半胱氨酸或苏氨酸形成醛(D. J. O'Shanessy, M. Wilchek, Anal. Biochem. 1990, 191, 1-8)。

酶法引入醛

用半乳糖氧化酶氧化糖蛋白导致在末端半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺处形成 C6 醛。然而,这些糖不是末端,特别是在来自动物细胞的
15 糖蛋白中,因此它们必须首先在前一个步骤中被释放出来(D. J. O'Shanessy, M. Wilchek, Anal. Biochem. 1990, 191, 1-8)。

药物组合物

本发明最后涉及含有本发明 HAS-变应原偶联物的药物组合物。本
20 发明的偶联物特别适于生产可以用于变态反应患者脱敏的药物组合物。这些药物组合物特别适于治疗检测到 IgE-介导的致敏并且观察到相应临床症状的变态反应患者。

因此,本发明的偶联物尤其可以用于生产对如下患者进行特异性免疫治疗的药物组合物:对速发型变应原有临床相关反应的患者,例
25 如对花粉、螨、哺乳动物毛发(唾液)、真菌、昆虫、食物和天然橡胶/乳胶过敏者。因此该免疫治疗特别适合哮喘患者和枯草热患者的治疗。

本发明的组合物可以用于各种形式的特异性免疫治疗,特别是脱敏。因此,可以通过皮下、粘膜、口服、经口或舌下施用本发明的 HES

偶联物进行脱敏。脱敏也可以以各种治疗方案进行(季节前/常年)。

通过 rush 或 ultra-rush 方法进行治疗可能特别适合对于昆虫过敏的人(参见, Kleine-Tebbe 等人, Pneumologie, Vol. 5 (2001), 438-444)。

- 5 通过将本发明的偶联物与适用于脱敏的载体和/或赋形剂混合, 产生药物组合物。

HES 与变应性糖蛋白的偶联物

能够用于偶联制备 HES-糖蛋白偶联物的糖蛋白化学官能团类型的例子包括:

- 10 A: 半胱氨酸侧链的硫醇基
B: 氧化的半乳糖残基的醛基。

因此, B 不适合未糖基化的蛋白质。

可以根据单个还原性末端区别 HES。由于这种结构特征, HES 特别适合本发明靶向区域选择性连接。

- 15 能够用于 HES-蛋白质偶联物合成的化学连接方法是那些为了由未受保护的肽片段构建较大蛋白质而发展出的方法。这些方法以在各种情况下在将要连接的片段中选择独特的反应官能团为基础, 在天然蛋白质中含有大量其它官能团的情况下, 这些反应官能团彼此选择性作用, 产生稳定的终产物。

- 20 HES 制品通常首先被转化为确定的、高度纯化的且良好表征的中间物(反应性 HES), 然后在生理条件下能够自发地、区域选择性地与变应原的靶官能团反应。

- 25 HES 的还原性末端选择性转化为伯氨基(1-氨基-HES)官能团是优选的。这种“1-氨基-HES”可以灵活地适应与蛋白质的连接反应, 可以按照不同的合成途径, 并且通过预制的试剂(接头)将多个反应步骤组合为一步。

HS-反应性 HES

下文示意性描述并评价了制备 HS-反应性 HES 的备选方法:

1. - 用双功能接头 M_2C_2H (图 5.1. b) 还原胺化 HES, 产生 HS 反应性 HES (A);

- 通过透析和冻干纯化;
- 通过 Michael 加成来偶联 HS-蛋白质。

5 这种合成具有特别的优点, 因为它非常简单(1步), 而且与靶蛋白质的反应有极高的选择性。如果由于胍衍生物的毒性而发生问题, 则必须随后用本领域公知的纯化方法纯化。

2. - HES 内酯(氧化的 HES)与双功能接头 M_2C_2H 反应(图 5.1. b), 产生 HS 反应性 HES (B);

- 10
- 通过透析和冻干纯化;
 - 通过 Michael 加成来偶联 HS-蛋白质。

该反应与以上 1 所述的反应不同, 因为另外还需要制备 HES 内酯。

3. - HES 与碳酸氢铵反应, 产生 1-氨基-HES (C);

- 15
- 通过冻干纯化;
 - 不需要碱催化, 用溴/碘乙酸酐酰化 1-氨基, 产生溴/碘乙酰胺(HS-反应性 HES D);

- 通过透析和冻干纯化; 通过烷基化与 HS-蛋白质偶联。

20 该方法也是有利的; 它只包括两步, 并且只使用非常简单的试剂。因此该方法的成本效率非常高。合成规模易于放大。与靶蛋白质的反应具有很高的选择性。

4. - 如 Frie (S. Frie, Diplomarbeit, Fachhochschule Hamburg, 1998) 所述, HES 内酯(氧化的 HES)与二胺(1,4-二氨基丁烷)反应, 产生氨基-HES (E);

- 25
- 不需要碱催化, 用溴/碘乙酸酐酰化氨基-HES, 产生溴/碘乙酰胺(HS-反应性 HES F);

- 通过透析和冻干纯化; 通过烷基化与 HS-蛋白质偶联。

该合成途径与以上 3 所述不同, 因为另外还需要制备 HES 内酯。

CHO-反应性 HES

下文示意性描述并评价了制备 CHO-反应性 HES 的备选方法:

1. - 使用氨基-HES (E) 作为 CHO-反应性 HES G;

- 通过还原胺化与 CHO-蛋白质偶联。

5 这种合成非常简单且成本效率高。与内部赖氨酸的竞争可能产生问题, 可以通过选择反应条件来控制。

2. - HAS 内酯(氧化的 HES) 与胍反应, 产生酰胍(CHO-反应性 HES H);

- 通过透析和冻干纯化;

10 基氧化形成(酶或化学)过程中, 偶联反应优选地应当就地进行; 随后任选地用 NaCN/BH₃ 进行还原稳定化;

- 半乳糖的酶氧化优选地应当用与聚合物结合的酶进行, 以利于酶的去除。

15 这种合成非常简单且具有选择性(与内部赖氨酸没有竞争)。由于胍衍生物的毒性可能产生问题。

3. - D 或 F 进一步与碳酸氢铵反应, 产生甘氨酸酰胺(CHO-反应性 HES H 和 I);

- 通过透析和冻干纯化;

- 通过还原胺化与 CHO-蛋白质偶联。

20 该方法分三步进行, 但是只使用非常简单的试剂, 因此成本效率高。合成的规模易于放大。然而, 可能发生与内部赖氨酸的竞争(见上文)。

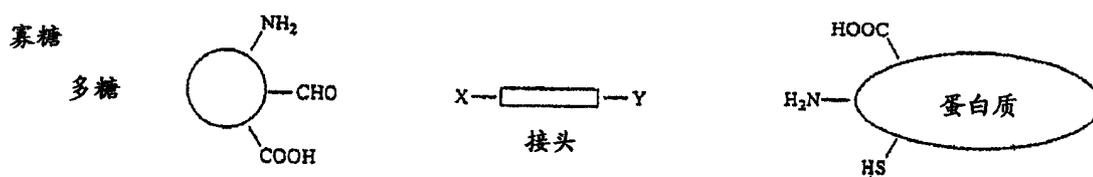
4. - 用 cBz-氨基氧乙酸酰化氨基-HES C 或 E, 随后氢化为氨基氧-HES(CHO-反应性 HES K);

25 - 在 pH 5-6 下通过形成肟与 CHO-蛋白质偶联; 在由半乳糖残基氧化形成(酶或化学)过程中, 偶联反应优选地应当就地进行;

- 半乳糖的酶氧化优选地应当用与聚合物结合的酶进行, 以利于酶的去除。

这种合成复杂, 但是与靶蛋白质的偶联与 2 所述的反应一样具有

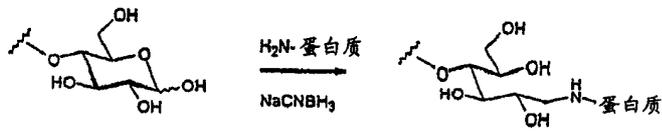
选择性(与内部赖氨酸没有竞争)。



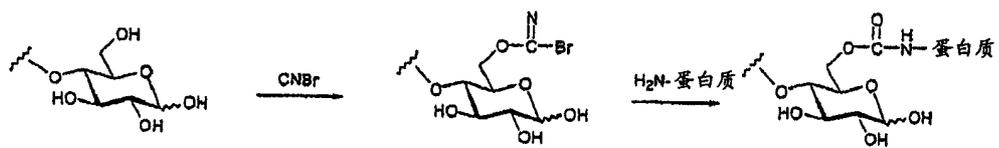
新糖蛋白的合成

图 1

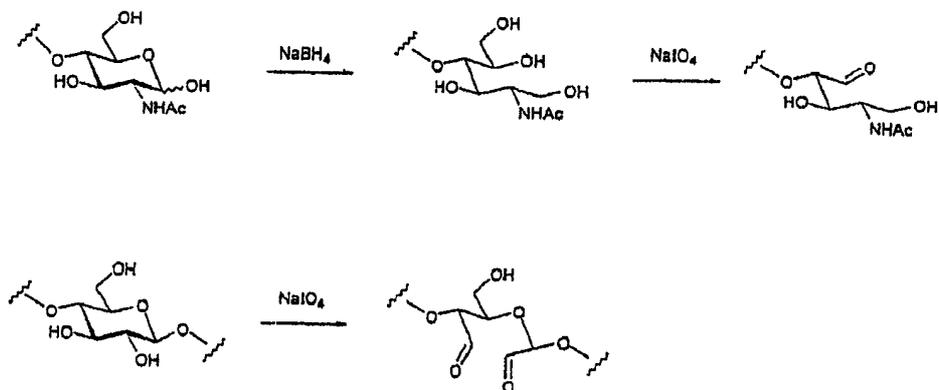
a) 还原胺化

b) I₂-氧化

c) CNBr-活化



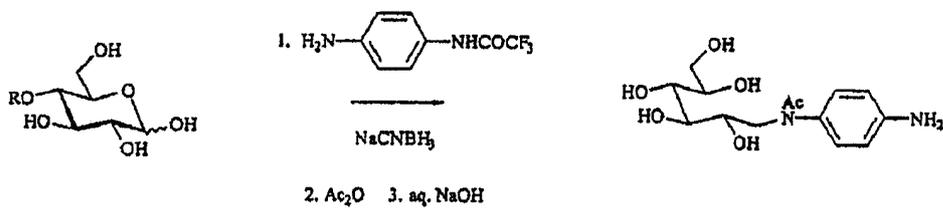
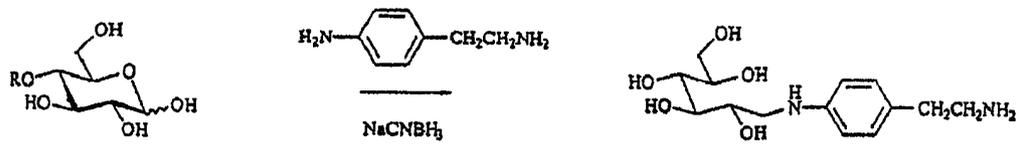
备选: 用 CDAP 活化

d) NaIO₄-切割

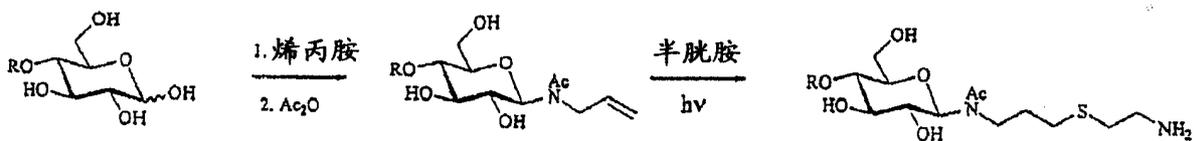
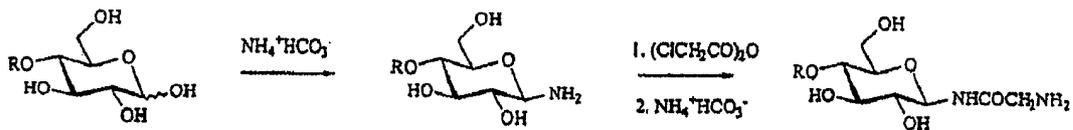
多糖修饰

图 2.1

a) 还原胺化



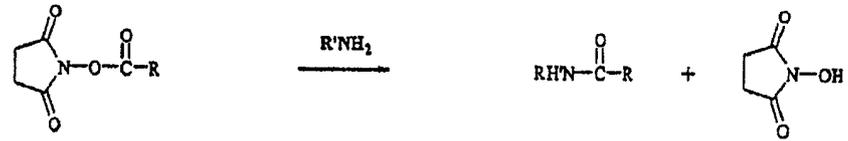
b) N-糖基化



寡糖修饰

图 2.2

1a: N-羟基琥珀酰亚胺酯



1b: 亚胺酸酯



1c: 芳基叠氮化物



2: 酰肼

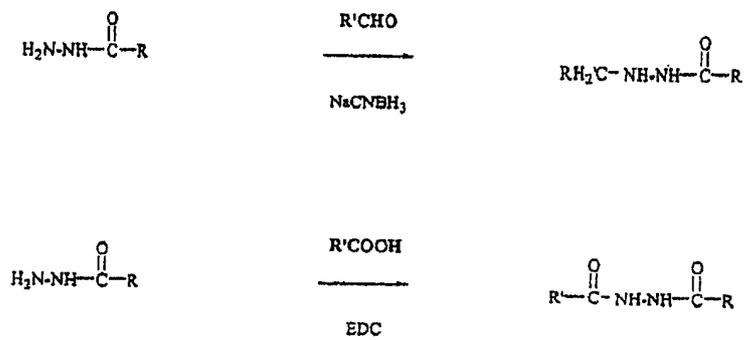
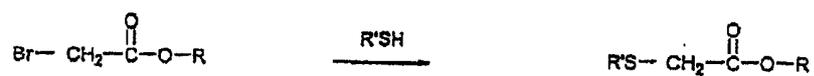
NH₂-和 CHO/COOH- 偶联反应

图 3

3a: 卤代乙酸酯



3b: 马来酰亚胺



3c: 吡啶基二硫醚

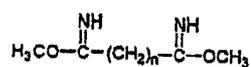


SH- 偶联反应

图 3

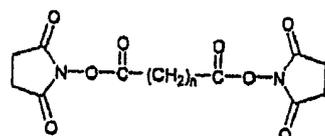
1: 同双功能交联剂

a)



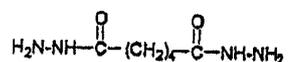
DMA (n = 4)
DMP (n = 5)
DMS (n = 6)

b)



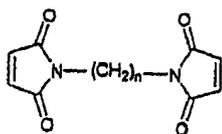
DSG (n = 3)
DSS (n = 6)

c)



ADH

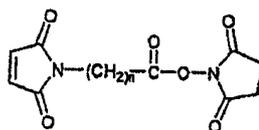
d)



BMOE (n = 2)
BMB (n = 4)
BMH (n = 6)

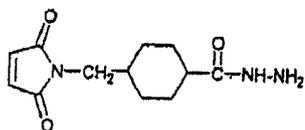
2: 异双功能交联剂

a)

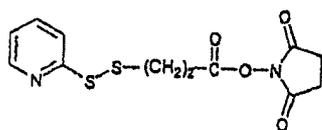


AMAS (n = 1)
GMBS (n = 3)
EMCS (n = 5)

b)

M₂C₂H

c)



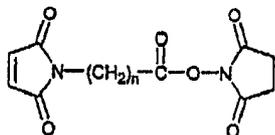
SPDP

交联剂

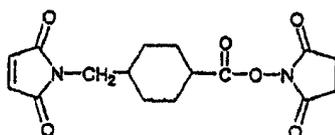
图 4

1: 马来酰亚胺

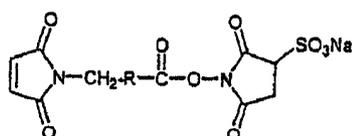
a)



AMAS ($n = 1$)
 GMBS ($n = 3$)
 EMCS ($n = 5$)

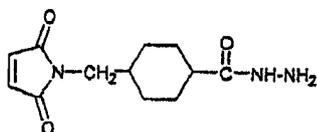


SMCC

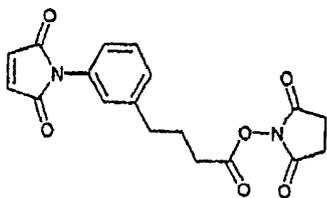


Sulfo-GMBS
 Sulfo-EMCS
 Sulfo-SMCC

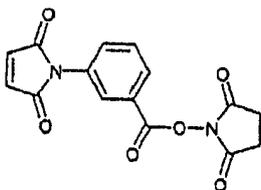
b)

M₂C₂H

c)



SMPB

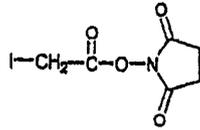


MBS

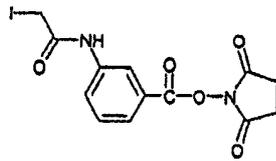
用于 SH 偶联的接头

图 5

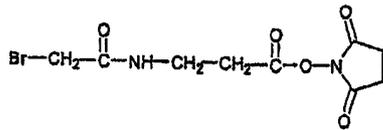
2: 卤代乙酸酯



SIA

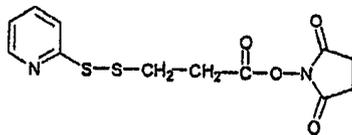


SIAB

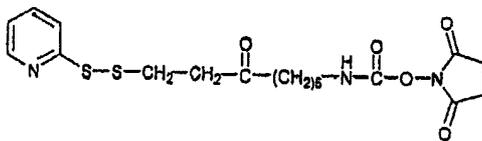


SBAP

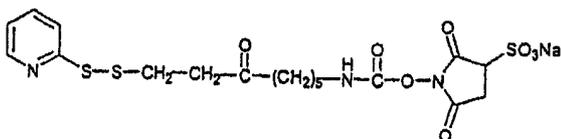
3: 吡啶基二硫醚



SPDP



LC-SPDP



Sulfo-LC-SPDP

用于 SH 偶联的接头

图 5