

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 25/30 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97199363.7

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1235640C

[22] 申请日 1997.9.30 [21] 申请号 97199363.7

[30] 优先权

[32] 1996.9.30 [33] US [31] 08/720,487

[86] 国际申请 PCT/US1997/017506 1997.9.30

[87] 国际公布 WO1998/014216 英 1998.4.9

[85] 进入国家阶段日期 1999.4.30

[71] 专利权人 茨诺瓦研究有限公司

地址 英国剑桥

[72] 发明人 P·A·斯温 J·L·格林斯泰恩

M·A·艾克丝雷 B·S·福克斯

S·P·帕沃斯 M·L·格夫特

审查员 张 伟

[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

代理人 李华英

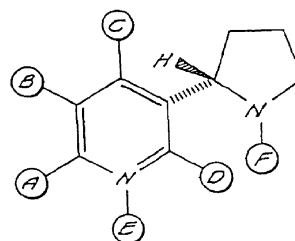
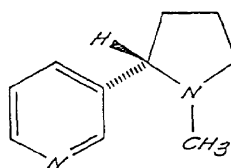
权利要求书 8 页 说明书 51 页 附图 12 页

[54] 发明名称

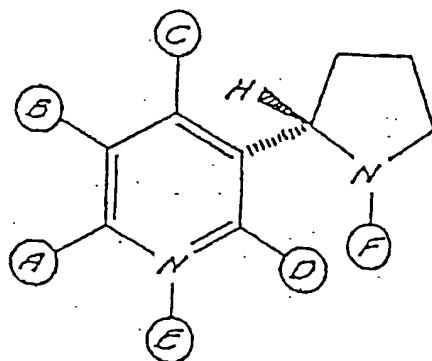
用于药物滥用治疗的半抗原载体轭合物及其
制备方法

[57] 摘要

本发明公开了能在体内激发抗半抗原抗体的半抗原载体轭合物。还公开了所述轭合物和治疗组合物的制备方法。当该半抗原是滥用的药物时,含有该半抗原载体轭合物的治疗组合物在药物成瘾的治疗中是特别有用的。该治疗组合物适于与其他常用药物一起共同治疗。还公开了利用针对本发明的半抗原载体轭合物而产生的抗体的被动免疫。



1. 一种半抗原载体轭合物，它包含以下结构



其中 A、B、C、D、E 和 F 是尼古丁的侧链，它们独立地选自以下化学基团，所述化学基团由 CJ 索引号确定：

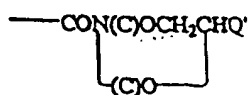
- | | |
|-------|---|
| CJ0 | Q |
| CJ1 | $(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ |
| CJ1.1 | CO_2Q |
| CJ1.2 | COQ |
| CJ1.3 | OCH_3 |
| CJ2 | $\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ |
| CJ2.1 | $\text{OCOCH}=\text{Q}$ |
| CJ2.2 | $\text{OCOCH}(\text{O})\text{CH}_2$ |
| CJ2.3 | $\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2$ |
| CJ3 | $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$ |
| CJ3.1 | $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$ |
| CJ4 | $\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$ |
| CJ4.1 | $\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$ |
| CJ5 | $\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$ |
| CJ5.1 | $\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$ |
| CJ6 | $\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ |
| CJ7 | $\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ |
| CJ7.1 | $\text{CH}_2\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ |

CJ8 $\text{OCOCH(OH)CH}_2\text{Q}$

CJ8.1 $\text{OCO(CH}_2)_n\text{CH(OH)CH}_2\text{Q}$

CJ9 OCOC_6H_5

CJ10



其中 Q' 是被
修饰的蛋白质

CJ10

CJ11 $\text{YCO(CH}_2)_n\text{COQ}$

其中 Y 是硫、氧或胺，其中 n 是 3-20 的整数，且 Q 选自下列成员：H, OH, OCH₃, CH₂, CH₃, COOH, 卤素, 活性酯, 酰卤, 酰叠氮, 烷基卤, N-马来酰亚胺, 亚氨基酯, 异氰酸酯, 异硫氰酸酯, 和含有 T 细胞表位的载体；但条件是：至少 A、B、C、D、E 或 F 之一中的 Q 包含一个含有至少一个 T 细胞表位的载体，所述载体选自下列成员：霍乱毒素 B, 白喉毒素, 破伤风类毒素, 百日咳毒素, 百日咳丝状血凝素, 志贺毒素, 蓖麻子白蛋白 B 亚单位, 相思豆毒素, 甜豌豆植物凝集素, 逆转录病毒核蛋白, 狂犬病核糖核蛋白, 烟草花叶病病毒, 豇豆花叶病病毒, 花椰菜花斑病病毒, 水疱口腔炎病毒-核壳蛋白, 重组痘病毒亚单位和载体, 塞姆利基森林病毒载体, 假单胞菌属内毒素, 多抗原肽, 酵母病毒样颗粒, 疟疾蛋白质抗原, 和微球。

2. 如权利要求 1 所述的半抗原载体轭合物，其中载体包含霍乱毒素 B。

3. 如权利要求 1 所述的半抗原载体轭合物，它是选自下列成员的半抗原载体轭合物：

I. 半抗原载体轭合物，其中侧链 A 为 CJ1，其中 Q=COOH 而 n=2-8；侧链 B 为 CJ0，其中 Q=H；侧链 C 为 CJ0，其中 Q=H；侧链 D 为 CJ0，其中 Q=H；侧链 F 为 CJ0，其中 Q=CH₃；

II. 半抗原载体轭合物，其中侧链 A 为 CJ1，其中 Q=CJ1.2，其中 Q = 含有 T 细胞表位的载体；侧链 B 为 CJ0，其中 Q=H；侧链 C 为

CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

III. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ1, 其中 $Q=COOH$ 而 $n=2-8$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

IV. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ1, 其中 $Q=CJ1.2$, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

V. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ1, 其中 $Q=COOH$ 而 $n=2-8$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

VI. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ1, 其中 $Q=CJ1.2$, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

VII. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ3, 其中 $Q=OH$, $n=2$;

VIII. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ3, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体而 $n=2$;

IX. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=H$, $n=3$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

X. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体而 $n=3$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XI. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=H$, $n=4$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XII. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体; 侧链 F

为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XIII. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=H, n=5$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XIV. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体, $n=5$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XV. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=H, n=7$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XVI. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 E 为 CJ1, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体而 $n=7$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XVII. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ11, 其中 $Y=NH, Q=OH, n=2-8$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XVIII. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ11, 其中 $Y=NH, Q=$ 含有 T 细胞表位的载体而 $n=2-8$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$;

XIX. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ1, 其中 $Q=COOH, n=2-8$;

XX. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 F 为 CJ1, 其中 $Q=CJ1.2$, 其中 $Q=$ 含有 T 细胞表位的载体而 $n=2-8$ 。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的半抗原载体轭合物, 其中至少有两个半抗原与载体联结。

5. 如权利要求 4 所述的半抗原载体轭合物, 其中的半抗原是相

同的。

6. 如权利要求 4 所述的半抗原载体轭合物，其中载体是多价的。

7. 一种治疗组合物，它包含至少一种如权利要求 1 所述的轭合物和药学上可接受的载体。

8. 如权利要求 7 所述的治疗组合物，它还含有佐剂。

9. 如权利要求 7 所述的治疗组合物，它包含至少一种如权利要求 3 所述的轭合物和药学上可接受的载体。

10. 如权利要求 9 所述的治疗组合物，它还含有佐剂。

11. 如权利要求 10 所述的治疗组合物，其中佐剂是明矾、MF59 或 RIBI 佐剂。

12. 如权利要求 7 所述的治疗组合物，其中该组合物可溶于生理学上可接受的 pH 范围内的水溶液。

13. 如权利要求 7 所述的治疗组合物，其中该组合物悬浮于生理学上可接受的 pH 范围内的水溶液中。

14. 权利要求 1 所述的轭合物用于制备治疗哺乳动物对尼古丁药物成瘾的药物的用途。

15. 权利要求 14 所述的用途，其中所述轭合物为权利要求 2 中所述的轭合物。

16. 权利要求 14 所述的用途，其中所述轭合物为权利要求 3 中所述的轭合物。

17. 权利要求 15 或 16 的用途，其中所述药物是肠内或胃肠外给药。

18. 权利要求 15 或 16 的用途，其中所述药物是口服或肌内给药。

19. 一种对权利要求 1 所述的轭合物特异性的抗体。

20. 如权利要求 19 所述的抗体，它选自多克隆抗体和单克隆抗体。

21. 如权利要求 19 所述的抗体，它对权利要求 1 所述的轭合物的半抗原部分是特异性的。

22. 对权利要求 1 所述的半抗原载体轭合物具有特异性的抗体用

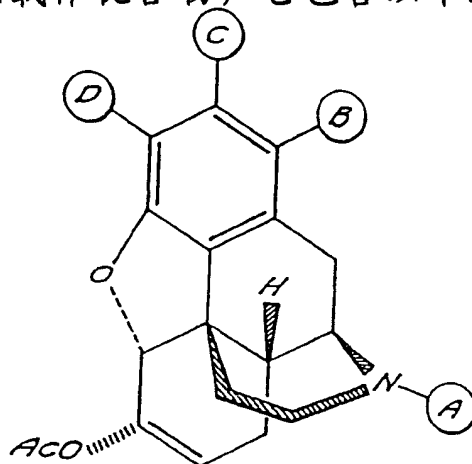
于制备向患病的哺乳动物施药以治疗哺乳动物尼古丁药物成瘾的药物的用途。

23. 如权利要求 22 所述的用途, 其中所述抗体选自多克隆抗体和单克隆抗体。

24. 如权利要求 22 所述的用途, 其中该抗体对权利要求 1 所述的轭合物的半抗原部分是特异性的。

25. 如权利要求 22 所述的用途, 其中所述抗体是对如权利要求 3 所述的半抗原载体轭合物的半抗原成分具有特异性的抗体。

26. 一种半抗原载体轭合物, 它包含以下结构:



其中 A、B、C 和 D 是海洛因的侧链, 它是选自下列成员的半抗原载体轭合物:

- I. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ1, 其中 $Q=CJ1.2$, 其中 Q = 含有 T 细胞表位的载体; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ2, 其中 $Q=H$ 而 $n=1$;
- II. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ1, 其中 $Q=CJ1.2$, 其中 Q = 含有 T 细胞表位的载体; 侧链 D 为 CJ2, 其中 $Q=H$ 而 $n=1$;
- III. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$; 侧链 B 为 CJ1, 其中 $Q=CJ1.2$, 其中 Q = 含有 T 细胞表位的载体; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ2, 其中 $Q=H$ 而 $n=1$;
- IV. 半抗原载体轭合物, 其中侧链 A 为 CJ0, 其中 $Q=CH_3$; 侧链 B 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 C 为 CJ0, 其中 $Q=H$; 侧链 D 为 CJ4, 其

中 $n=2$, Q =含有 T 细胞表位的载体。

27. 如权利要求 26 所述的半抗原载体轭合物, 其中至少有两个半抗原与载体联结。

28. 如权利要求 27 所述的半抗原载体轭合物, 其中半抗原是相同的。

29. 如权利要求 27 所述的半抗原载体轭合物, 其中载体是多价的。

30. 如权利要求 26 所述的轭合物, 其中含有 T 细胞表位的载体选自下列成员: 含有 T 细胞表位的蛋白质, 修饰的含有 T 细胞表位的蛋白质, 含有 T 细胞表位的肽, 修饰的含有 T 细胞表位的肽, 含有 T 细胞表位的拟肽, 含有 T 细胞表位的多抗原肽, 和至少一种由 CJ 索引号确定的、并包含至少一个 T 细胞表位的化学基团。

31. 如权利要求 30 所述的轭合物, 其中含有 T 细胞表位的载体选自下列成员: 霍乱毒素 B, 白喉毒素, 破伤风类毒素, 百日咳毒素, 百日咳丝状血凝素, 志贺毒素, 蓖麻子白蛋白 B 亚单位, 相思豆毒素, 甜豌豆植物凝集素, 逆转录病毒核蛋白, 狂犬病核糖核蛋白, 烟草花叶病病毒, 豇豆花叶病病毒, 花椰菜花斑病病毒, 水疱口腔炎病毒-核壳蛋白, 重组痘病毒亚单位和载体, 塞姆利基森林病毒载体, 假单胞菌属内毒素, 多抗原肽, 酵母病毒样颗粒, 疟疾蛋白质抗原, 和微球。

32. 如权利要求 31 所述的轭合物, 其中含有 T 细胞表位的载体包含霍乱毒素 B。

33. 如权利要求 31 所述的轭合物, 其中所述含有 T 细胞表位的载体选自下列成员: 霍乱毒素 B, 逆转录病毒核蛋白, 狂犬病核糖核蛋白, 水疱口腔炎病毒-核壳蛋白, 重组小痘病毒亚单位和载体, 以及多抗原肽。

34. 如权利要求 33 所述的轭合物, 其中 MAP 包含一个定义的含有 T 细胞表位的肽, 它还进一步与该肽的氨基末端处的多半抗原化赖氨酸分支结构结合。

35. 一种治疗组合物，它包含至少一种如权利要求 26 所述的轭合物和药理学上可接受的赋形剂。

36. 如权利要求 35 所述的治疗组合物，它还含有佐剂。

37. 如权利要求 36 所述的治疗组合物，其中佐剂是明矾、MF59 或 RIBI 佐剂。

38. 如权利要求 35 所述的治疗组合物用于制备治疗哺乳动物对海洛因药物成瘾的药物的用途。

39. 按照权利要求 38 所述的用途，其中所述药物是通过肠内或胃肠外给药。

40. 一种对如权利要求 32 所述的轭合物特异性的抗体。

41. 如权利要求 40 所述的抗体，它选自多克隆抗体和单克隆抗体。

42. 对权利要求 26 所述的轭合物的半抗原部分具有特异性的抗体用于制备向患病的哺乳动物给药以治疗哺乳动物对海洛因药物成瘾的药物的用途。

43. 如权利要求 42 所述的用途，其中所述抗体选自多克隆抗体和单克隆抗体。

用于药物滥用治疗的半抗原载体轭合物及其制备方法

发明领域

本发明涉及药物滥用的治疗。更具体地说，本发明涉及利用激发抗体应答的药物/半抗原载体轭合物和/或利用药物/半抗原载体轭合物的抗体治疗药物滥用的方法。

发明背景

药物在全世界范围内，特别是在美国的广泛使用和滥用已达到盛行的程度。合法和非法药品的过剩及其滥用已经成为公共政策中的严重焦点问题，其明显的医疗和社会后果影响到了社会的各个层面。一些使用者生活在与贫穷和非法行为相关的高危人群中。另一些使用者则可归为娱乐使用者，他们的危险在于(a)拥有使他们上瘾的药物，(b)易成为过度使用该药物的使用者，或者(c)多种因素的共同影响，包括个人情况，艰难状况，环境和可接近性。对药物滥用、包括对多种药物滥用的充分治疗要求干预手段的创新性和创造性。

尤其成问题的三种易上瘾药物是可卡因、海洛因和尼古丁。可卡因是从植物古柯 (*Erythroxylon coca*) 的叶子中提取出的生物碱。仅在美国，目前就有五百万以上的可卡因固定使用者，其中至少有六十万是严重上瘾者 (Miller 等, (1989) 纽约国家医学杂志 (*N. Y. State J. Med.*), 390 - 395 页; 和 Carroll 等, (1994) 药学新闻 (*Pharm. News.*) 1: 11-16)。在这些人群中，有相当大的一部分成瘾者正在积极寻求治疗。例如，在 1990 年，有 38 万人在寻求治疗可卡因上瘾问题，此数量目前还在上升。在那时，据估算每年有 10 万例与使用可卡因有关的急诊室病人入院。与可卡因累积效果相关的暴力犯罪、个人生产力的丧失、疾病和死亡已成为一个国际性的问题。

缺乏有效治疗可卡因成瘾问题的方法强烈地表明必须开发新的

途径。导致缺乏成功的治疗方法的其他因素是，随着时间的不同，可卡因滥用的方式也在变化。在一篇标题为“1994 年治疗可卡因滥用的化学方法”的文章中（Carroll 等，（1994）药学新闻，第 1 卷第 2 期），Carroll 等人报告说自八十年代中期以来，盐酸盐（可卡因）的静脉和鼻腔给药以及可卡因游离碱的吸入已经成为给药的常用途径，将导致持续 30 - 60 分钟的欣快和精神运动刺激。与其他一些滥用药物不同，可卡因可以导致持续数小时的狂欢。这种作用导致上瘾，在某些情况下，会导致毒性结果（Carroll 等人，药学新闻，同上）。

对药物滥用的治疗非常有限，并且对可卡因上瘾没有有效的长期治疗。治疗包括但不限于，在给予用作类阿片受体或药物的拮抗剂的药物的同时进行劝说以尝试减少与药物上瘾相关的嗜好。一种治疗方法是解毒疗法。即使是病人生理、社会和心理改善的暂时缓解都优于滥用的继续和升级及其相关的负面医疗和人际后果（Wilson 等，Harrison's 内科学原理，第 2 卷，第 12 版，McGraw-Hill 出版社（1991），第 2157-8 页）。更具体地说，有关可卡因滥用的药理学治疗方法通常涉及抗抑郁药的使用，例如可以帮助控制脱瘾的心理方面、但是通常不直接影响可卡因的生理学的地昔帕明或氟西汀。（Kleber（1995）临床神经药理学 18:96-109）。另外，它们的有效性变化很大（Brooke 等，（1992）药物酒精依赖性 *Drug Alcohol Depend.* 31:37-43）。在某些研究中，地昔帕明减少了自我服用（Tella（1994）关于药品依赖问题的大学会议摘要；Mello 等，（1990）药理学与实验治疗学杂志 254: 926-939；以及 Kleven 等，（1990）行为药理学 1: 365-373），但是在治疗后的戒瘾率不超过 70 %（Kosten（1993）药品依赖性问题，国立滥用药物研究所（NIDA）研究专刊 85）。也使用了加强多巴胺能传递的药品，例如溴隐亭，但是这些药品的好处部分受到其毒性的限制（Taylor 等，（1990）西部医学杂志 152:573-577）。旨在用美沙酮替换类阿片成瘾的新药，例如丁丙诺啡，已在与多巴胺能系统交叉干预的基础上得以使用，

但是仅有有限的临床研究信息（Fudula 等，（1991）国立滥用药物研究所研究专刊，105:587-588）。据报道丁丙诺啡能减少可卡因的自我服用（Carroll 等，（1991）精神药理学 106:439-446；Mello 等，（1989）科学 245:859-862；以及 Mello 等，（1990）药理学与实验治疗学杂志 254:926-939）；但是，治疗后的可卡因脱瘾率通常不超过 50%（Gastfried 等，（1994）关于药品依赖问题的大学会议摘要；和 Schottenfeld 等，（1993）药物依赖性问题的 NIDA，10 研究专刊 311）。

现行用于治疗可卡因成瘾的疗法至少有四个导致高复发率的主要局限。第一，也是最重要的是，在可卡因滥用和成瘾方面导致的神经化学事件很复杂（Carroll 等，（1994），同上）。结果，单独作用的神经药理学方法，例如抑制多巴胺摄取，不足以克服成瘾现象。第二，目前用于治疗可卡因成瘾的药品基本上有很大的副作用，限制了它们的功效。第三，在这些病人人群中药品治疗的顺从是有问题的。目前的疗法需要经常去造访医疗保健提供者和/或自我服用药品，以治疗其成瘾的习性。因为许多这些药能阻止与可卡因相关的欣快，因此会很不情愿服用这些药。（Carroll 等，（1994）同上；Kosten 等，（1993）药物依赖问题，NIDA 研究专刊 132:85；Schottenfeld 等，（1993）药物依赖问题，NIDA 研究专刊 132:311）。第四，由于涉及药理学治疗的化学问题很复杂，其中许多不能与现行使用的其他疗法或临床试验相容。最后，大多数药物疗法研究是针对低强度门诊病人进行的，与高强度门诊病人无关，也不与其他看上去为成功治疗可卡因依赖者所需要的其他精神社会治疗有关。（Rao（1995）精神病学纪事 26(6):363-368）。

海洛因是从罂粟中提取的一种类阿片药物。它是一种最被广泛滥用的类阿片药物，在美国的非法市场上可以获得。目前成瘾者能够获得的海洛因质量很高（45-80% 纯度），导致身体依赖程度比往年更高。海洛因更强的方式通常是通过吸入或嗅入服用。这种方式对于那些对用静脉注射这一通常给药方式不适的人来说更容易开始

上瘾。海洛因滥用者的死亡率很高，早死源于多种情况，例如因共用注射用具而导致的严重的细菌感染和 HIV。在美国，没有关于海洛因滥用者人数的准确数目，但是根据过量死亡者、被逮捕的成瘾者和那些申请治疗者人数的推断，海洛因滥用者人数在 75 - 100 万。

注射海洛因溶液会产生一种剧烈的，包括温暖、味道、高度等一系列的快感（可与性欲高潮相比）。海洛因迅速水解为 6-单乙酰基吗啡（6-MAM），然后再水解为吗啡。海洛因和 6-MAM 都是高液体可溶的，都比吗啡更易穿过血脑屏障。有一个能持续 45 秒至数分钟的欣快起始状态，接下来是平静期，根据剂量多少，该平静期可持续 3 - 5 小时，在此之后，当成瘾者变得急躁而富有攻击性时，出现戒瘾症状，并有一种“疾病”的通常感觉。

目前使用的治疗方法经常涉及旨在治疗戒瘾体征和症状的药理学干预。解毒通常通过给予服用长效类阿片，例如美沙酮开始。另一种方式是使用高血压药物可乐定，可以缓解戒瘾的许多症状，但不能缓解特征性的瘾和全身化疼痛。与大多数成瘾现象相似，其复发率很高。对病人的长时间的管理以及靠美沙酮稳定，是目前最为成功的治疗方法，它需要警醒和顺从。

尼古丁（1-甲基-2-(3-吡啶基)吡咯烷）是从烟叶中提取的一种生物碱。尼古丁在全球广泛使用，并能以多种形式合法获得，例如香烟、雪茄、吸管烟叶和无烟（咀嚼）烟叶。尽管尼古丁的成瘾特性和吸烟的危害已众所周知很多年（Slade 等，(1995)美国医学会杂志 *JAMA* 274(3):225-233），吸烟仍然十分流行。据估计，美国有 5100 万人吸烟，另据疾病控制和预防中心估计，每年死于与吸烟相关的疾病的人数为 42 万。

最为普遍的尼古丁输送系统是香烟。香烟含有 6 - 11mg 尼古丁，吸烟者一般吸入其中的 1 - 3mg。典型的每天一包烟的吸烟者每天吸入 20 - 40mg 尼古丁，血浆浓度达到 25 - 50ng/ml。尼古丁的血浆半衰期为 2 小时左右；主要代谢物可替宁的半衰期为 19 小时

(Henningfield(1995)新英格兰医学杂志 333(18):1196-1203)。

由于尼古丁能合法而广泛地获得，因此与可卡因和海洛因不同，反对其使用的压力相对较小。尽管大部分吸烟成瘾者明确表示戒烟，并且许多曾真的试图去戒，每年只有2% - 3%的吸烟者成为不吸烟者(Henningfield(1995)同上)。试着戒烟的吸烟者的复发率很高，这表明强大的尼古丁依赖作用(O'Brien等，(1996)柳叶刀 347:237-240)。

尼古丁成瘾是一个长期的、易复发的毛病。尼古丁作用于中缘应答(mesolimbic reward)系统，最终导致生理依赖。有证据表明，尼古丁结合到中枢和外周神经系统中的尼古丁乙酰胆碱受体的 α -亚单位上，导致多巴胺释放增加。脑中的尼古丁乙酰胆碱受体数目的增加加剧了对尼古丁的生理性依赖(Balfour(1994)成瘾 89:1419-1423)。尼古丁的这些生理作用是心理性成瘾的强有力的增强剂。尼古丁使用者提高了识别能力并改善了情绪，以及和成瘾相关的负面影响(例如成瘾症状)，是继续使用烟草的强有力的动因。

对尼古丁依赖缺乏有效的治疗方法以及试图和放弃使用其的人的低成功率表明强烈需要一种新的疗法。目前，两种最流行的疗法是尼古丁 polacrilex (“尼古丁口香糖”)和经皮释放系统(“尼古丁贴片”)。这些“替代药物治疗”在一段时间内向使用者提供少量的尼古丁并慢慢地使其戒除。这些方法将减少成瘾症状，并对那些以前依赖于香烟的使用者也有效果(例如所期望的情绪和注意力集中状态)。(Henningfield(1995)同上)。但是，这些方法也有其弱点，如低渗透性，无动机成瘾者的复发。并且，使用尼古丁口香糖也有负面效应，例如口腔刺激，颌骨肌肉溃疡，消化不良，恶心，呃逆，感觉异常。尼古丁贴片的负面效果，据报道包括皮肤反应(骚痒或红斑)，睡眠紊乱，胃肠道毛病，嗜睡，焦虑，头晕和出汗。(Haxby(1995)美国健康系统药理学杂志 *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 52: 265-281)。

有关治疗药物成瘾的实验性诊断方法和治疗方法已见诸文字，但

未实际使用。例如，用接种疫苗来作为治疗药物成瘾的方法，以前已经在理论上描绘过。Bonese 等人利用已对吗啡免疫的恒河猴研究了海洛因自我服用的变化 (Bonese 等, (1974) 自然 252: 708-710)。Bagasra 等人研究了将可卡因-KLH 疫苗作为防止上瘾的手段 (免疫药理学 (1992) 23:173-179)，虽然没有形成结论性的结果，Bagasra 所使用的方法也存有争议。(Gallacher (1994) 免疫药理学 27:79-81)。很明显，如果一个轭合物在治疗方案中很有用，那么它肯定能够升高可识别体内循环的游离可卡因、海洛因或尼古丁的抗体。Cerny (W092/03163) 公开了针对这些药品的疫苗和免疫血清。疫苗由结合在载体蛋白上产生抗体的半抗原组成。另外也披露了针对该药品的抗体的制备，以及这些抗体在那些已经服用这些药物的患者的解毒治疗中的使用。Carrera 等在自然 378:727-730 (1995) 中披露了诱导抗可卡因抗体的可卡因-KLH 疫苗的合成，这些抗体阻碍了药物在大鼠中的运动效果。Blincko 在美国专利 No. 5, 256, 409 中披露一种疫苗，它包含与得自地昔帕明/丙咪嗪类药物的一种半抗原相结合的一种载体蛋白，和与得自去甲替林/阿米替林类药物的另一种半抗原结合的一种载体蛋白。Liu 等在美国专利 No. 5, 283, 066 中披露了能诱导免疫应答的半抗原-聚合固体支持复合物的使用。

被动地服用单克隆抗体以治疗药物滥用，在以前已有所描述 (参见，Killian 等, (1978) 药理学, 生化学与行为 9:347-352; Pentel 等 (1991) 药物代谢与处置 19: 24-28)。在该方法中，针对选定药品的事先形成的抗体被动地给动物服用。虽然这些数据显示了对成瘾治疗的免疫学方法的可行性，被动免疫作为人类治疗的长期方法则具有一系列的重大缺陷，第一，如果用于被动治疗的抗体是从非人类途径获得的，或者是单克隆的抗体，这些制剂将被病人视为外来的蛋白质，因此将对外来抗体产生很快的免疫应答。这种免疫应答可中和被动服用的抗体，阻止其有效性，急剧减少随后的保护时间。另外，重新服用同类抗体会出现问题，因为会有潜在的高强度应答。这些问题可以通过从获得疫苗免疫的人类捐献者中生产免疫

球蛋白的方式得以克服。在实施例中，将更具体地讨论这种方法。第二，被动给药的抗体相对较快地从循环中被清除。所给抗体在体内的半衰期为 2.5-23 天，这将取决于同位型。因此当被动服用抗体而不是通过免疫诱导抗体时，只能获得短期的功效。

对药物成瘾采用的另外一种免疫学方法是使用催化抗体，该抗体能够帮助病人体内可卡因分子的水解（Landry 等，（1993）科学 259:1899-1901）。该催化抗体是通过用转运状态的与载体蛋白相联的可卡因类似物对实验动物进行免疫而产生的；然后选定一个单克隆抗体，其具有可期望的催化活性。虽然这一方式理论上很吸引人，它也存在一些严重的问题。催化抗体必须被动服用，因此它具有被动抗体治疗所具有的所有缺点。生成活性抗体的主动免疫是不可行的，因为针对转运态类似物的抗体中的酶活性很小，并且在多克隆制剂中，活性不能被识别。此外，这类催化抗体的普通酯酶样活性以及在基因多样化的个体中的活性免疫反应的不可控特性，使得它们成为潜在的毒性分子，特别是当它们在病人体内生成时。

Yugawa 等（EP 0 613 899 A2）提出使用含有用来生成抗体的可卡因衍生物的可卡因-蛋白羧合物来测定血样中的可卡因或可卡因衍生物。Syva 专利（美国专利 No. 3, 888, 866, No. 4, 123, 431 和 No. 4, 197, 237）公开了产生用于免疫测定的可卡因抗体的羧合物。所披露的是利用从苯甲酰基爱康宁和可卡因衍生的重氮盐的 BSA 的羧合物，利用可卡因和去甲可卡因的对亚氨基酯衍生物与载体羧合，从而制得羧合物。Biosite(WO 93/12111)公开了利用在各种可卡因衍生物的苯环的对位加入酰胺键而增强了其对水解的稳定性的可卡因的羧合物。Strahilevitz 专利（美国专利 No. 4, 620, 977; 4, 813, 924; 4, 834, 973 和 No. 5, 037, 645）公开了利用内源性物质和药物的蛋白羧合物治疗疾病，防止对于心理性半抗原的依赖，以及用于免疫测定，免疫透析和免疫吸收。

Bjerke 等（1987）在免疫学方法杂志 96:239-246 中描述了与聚 L-赖氨酸共价结合的可替宁 4'-羧酸的羧合物产生尼古丁代谢物可

替宁的抗体的用途，以用于测定可替宁在生理液体中的存在。另外，Abad 等(1993)在分析化学 65(22):3227-3231 中描述了与 BSA 轭合的 3'-(羟甲基)尼古丁半琥珀酸酯产生尼古丁抗体的用途，以用于用来测定吸烟者的烟雾冷凝物中的尼古丁的酶联免疫吸附测定(ELISA)。但是，参考文献中既没有教导也没有建议尼古丁载体轭合物作为对抗尼古丁滥用的疫苗的用途。

对于药物成瘾，特别是对于可卡因、海洛因和尼古丁成瘾的有效治疗方法还未形成。因此，需要开发一种药物成瘾，特别是可卡因和尼古丁成瘾的长期治疗方法，它总体上不依赖于成瘾个体的顺从和自我服用。

发明概述

本发明克服了上述缺点并提供了治疗药物滥用的方法。利用治疗组合物，特别是半抗原载体轭合物，本发明以上瘾者体内抗药物抗体的形式激发了免疫应答，随后与免疫接种后的个体内的药物接触，中和了这些药物，如果不清除，就会使预期的药理学作用降低。本发明提供了一种药物成瘾，特别是可卡因、海洛因和尼古丁成瘾的治疗方法，它是基于给受治疗者接种药物/半抗原载体轭合物，更具体地说，接种可卡因-蛋白、海洛因-蛋白或尼古丁-蛋白轭合物。本发明的治疗组合物包含至少一种半抗原和至少一种含有 T 细胞表位的载体，当它们结合形成半抗原载体轭合物时，能刺激抗半抗原抗体的产生。半抗原可以是药物或药物衍生物，特别是可卡因、海洛因或尼古丁。当给上瘾者服用含有药物/半抗原载体轭合物的治疗组合物时，该药物的特异性抗药物抗体被激发。治疗免疫方案足以激发并保持抗药物抗体的高效价，使得在通过治疗提供了保护的期间内，每次与药物接触后，抗药物抗体就中和足够量的药物，以减小，如果不是清除的话，药物的药理学作用。还提供了制备这些轭合物的新的方法。还提供了被动免疫方法，其中用通过用本发明的半抗原载体轭合物进行接种而在供体中产生的抗体治疗患者。

参照下列附图、说明书和权利要求书，本发明的这些以及其他特

性、内容和优点将变得更清晰可见和更好理解。

附图的简要描述

图 1a 表示多种可能的、随意标记的、半抗原载体-抗原复合物的“分支”，以便于理解在本发明中所使用的合适的化合物和抗原复合物。

图 1b 表示多种可能的、随意标记的、半抗原载体-抗原复合物的“分支”，以便于理解在本发明中所使用的合适的化合物和抗原复合物，其中 Q' 是修饰的含有 T 细胞表位的载体，例如修饰的蛋白质载体。

图 2 表示在本发明中有用的五种试剂的结构。

图 3 表示按照本发明的教导，适于抗原化和给药的四种供选择的滥用药物的结构。

图 4a 表示显示天然（单体和五聚体）和重组霍乱毒素-B（CTB）（单体）的相对分子量的凝胶。

图 4b 表示显示在 pH3-9 范围内的 CTB 五聚体稳定性的凝胶。

图 4c 是 Western Blot 凝胶图，表明利用能导致 CTB 五聚体的周质表达而得到的 35 峰值部分 rCTB#32 和 rCTB#53。

图 5a 是表明 ELISA 的图表，其中抗 CTB 抗体检测了 rCTB 在 ELISA 板上与神经节苷脂 GM1 结合的能力。

图 5b 是一个扫描图，它揭示了血细胞计数结合测定，其中 rCTB 与表达神经节苷脂 GM1 的真核生物细胞结合。

图 6a 是尼古丁结构分子式的简图。

图 6b 是表明在制备本发明的尼古丁-抗原复合物时的可变化位置图。这些可变化位置可任意地分配给易于指定的本发明的化合物和抗原复合物，它们不是必需的反应位置。图 7 中指出了这些可变化位置。

图 7 表示本发明的尼古丁-抗原复合物和中间产物的尼古丁分子中可变化位置上的“分支”。当 Q 为含有 T 细胞表位的载体时，图 7 所示表明了本发明的尼古丁-抗原复合物。

图 8 表示在本发明的某些抗原复合物的制备中有用的尼古丁代谢物。

图 9a-b 显示了与 PS-55 的抗原复合物及鸡卵溶菌酶蛋白（HEL）相

结合的抗体在小鼠血清中的 ELISA 测试结果。图 9a 中，小鼠已免疫接种了尼古丁-BSA 轭合物。图 9b 中，小鼠免疫接种了尼古丁-CTB 轭合物。

图 10 显示了在竞争性 ELISA 实验中抗尼古丁抗血清的测试结果，以确定当加入不同浓度的游离尼古丁和尼古丁代谢物、尼古丁和去甲尼古丁时，抗血清对游离尼古丁的特异性。该抗血清通过给小鼠注射尼古丁轭合物 PS-55 BSA 而制得。对尼古丁代谢物的识别很少或没有，这表明在抗血清中的抗尼古丁抗体对尼古丁是特异性的。用麻醉剂利多卡因作为阴性对照，它不能与抗体的结合竞争。尼古丁轭合物 PS-55 HEL 作为阳性对照，其与抗体的结合受到游离尼古丁的抑制。

图 11a 显示了海洛因结构分子式的简图。

图 11b 表明在制备本发明的海洛因轭合物时的可变性位置图。这些可变性位置可任意地分配给易于指定的本发明的化合物和轭合物，它们不是必需的反应位置。图 12 中指出了这些可变性位置。

图 12 表示本发明的海洛因轭合物和中间产物的海洛因分子中可变性位置上的“分支”。当 Q 为含有 T 细胞表位的载体时，所示表明了本发明的海洛因轭合物。

本发明的详细描述

本文中涉及的专利和科学文献中描述了本领域技术人员可得到的知识。本文中提到的公开的美国专利、PCT 申请，以及其他出版物均在此结合作为参考。

本发明提供了一种药物成瘾的疗法，它是基于给成瘾者接种药物/半抗原载体轭合物，更具体地说，接种海洛因-蛋白轭合物或尼古丁-蛋白轭合物。本发明的治疗组合物包含至少一种半抗原和至少一种含有 T 细胞表位的载体，当它们结合形成半抗原载体轭合物时，能刺激抗半抗原抗体的产生。本文中所用的术语“T 细胞表位”是指被 T 细胞受体识别的基本因子或最小单元，其中该表位包含受体识别所必需的氨基酸。摹拟 T 细胞表位和修正对蛋白质变应原的变应

反应的氨基酸序列也在本发明范围内。“拟肽”(peptidomimetic)可定义为模仿天然分子的从生物活性肽中得到的化学结构。半抗原可以是药物,如海洛因,尼古丁或药物衍生物。

当给上瘾者服用含有半抗原/药物(或其衍生物)的治疗组合物时,该药物的特异性抗药物抗体被激发。治疗免疫方案足以激发并保持抗药物抗体的高效价,使得随后与药物接触时,中和了与足够量的药物关联的抗体,以减小,如果没有清除的话,该药物的药理学作用。例如,当治疗组合物为海洛因载体轭合物时,治疗诱导了抗海洛因抗体应答,它能降低或中和患者的血流或粘膜组织中的海洛因,由此阻断了该药物的心理成瘾性能。既然在本发明中到达中枢神经系统的滥用药物的浓度延迟或降低了,上瘾者从使用的海洛因中接受的也就减少了或没有喜悦感。当服用尼古丁载体轭合物时,这种相同的作用机制将诱导抗尼古丁抗体并减少或消灭从尼古丁的使用中获得的喜悦感。采用本发明的治疗方法没有预期的副作用。例如,本申请的滥用药物是小的并且是单价的,因此不能交联抗体。于是,与滥用的药物接触后没有预期发生免疫复合物的形成和相关的病理变化。正是现在,可期望的是,与目前和将来的药理学疗法相一致。另外,有效的中和作用是长期持续的。例如,已知对抗病原体的中和抗体应答可持续数年。因此,可以期望利用本发明的治疗组合物激发的高效价的抗药物抗体能尽可能地保持较长的时间,至少一年。减少了顺从问题的该治疗组合物的这种长期作用减少了目前疗法中的复发倾向问题。

另外,本发明的对海洛因成瘾的治疗免疫方法与目前所使用的或临床实验中的其他疗法相适应。事实上,早期的共同疗法(co-therapy)是极其有希望的,因为达到最佳抗体效价所需的时间最合适。

与此类似,本发明对尼古丁成瘾的免疫治疗方法在将尼古丁脱瘾症状减至最小方面与其他疗法一致。例如,本发明的尼古丁载体轭合物可以用于与可乐定,丁螺环酮,和/或抗抑郁剂或镇静剂缀合。

由该方法产生的疫苗将适应于目前的尼古丁替代疗法，即口香糖和贴片。由于抗尼古丁抗体的产生需要数周时间，有一些程度的成瘾要利用尼古丁替代疗法来控制。

以下是本文中所用的术语，现给出它们的定义作为指导。本文中所用的“半抗原”是一种能与抗体特异性反应的低分子量的有机化合物，当它与含有 T 细胞表位的载体结合形成半抗原载体轭合物时，能是免疫原性的，但其本身不能激发免疫反应。另外，该半抗原以半抗原载体轭合物的特异性测定部分为特征，也就是，它能以游离状态与其特异性抗体反应。在未免疫接种的成瘾者中，没有形成半抗原的抗体。该治疗组合物用于寻求药物成瘾治疗的接种患者。在本发明中，术语半抗原将包括更特异的药物/半抗原的概念，它是药物，部分药物的类似物，或药物衍生物。治疗组合物或治疗抗药物疫苗当开始给药时，将产生“预期的可测量的结果”。开始，该预期的可测量的结果是高效价的抗药物抗体的产生。效价定义为由 ELISA 测定的 50% 最大抗体测量值所需的血清稀释度。不过，适于个体的剂量方案的操作法给出并保持了持续的预期治疗效果。“预期治疗效果”是足够部分的游离滥用药物被对该药物具有特异性的抗药物抗体中和，从而在后来与该药物接触时在可接受的治疗时间内，降低或消除了药物的药理学作用。本领域技术人员对要接受免疫的患者的特性、要进行中和的滥用药物、以及给药的方式等情况进行评估后，就可确定可接受的治疗时间为多长时可对所给药物产生足够的抗体应答，以及抗体应答能保持多长时间。利用这种以及其他免疫方案作为模型，该领域技术人员将预期免疫或保护时间持续数月，直到一年以上。

本文还公开了“被动免疫”，它包括服用或接触利用本发明的新轭合物制备的完整的抗药物抗体或多克隆抗体或单克隆抗体片段（例如 Fab, Fv, (Fab')₂ 或 Fab'）。如上所述，用本发明的抗海洛因或抗尼古丁抗体对人的被动免疫作为独立治疗的有效性不如主动免疫。被动免疫作为最初的治疗和/或附加的补充治疗（例

如，在最初给予疫苗后，但在身体自身抗体产生以前的时间内）或在紧急情况下用于防止死亡（例如，当某人服用过量药物时）将是特别有用的。在某些情况下，可优选仅采用被动疗法，例如当病人是无免疫应答的或需要迅速治疗时。

本发明的药物轭合物，以及本发明的组合物也可用作预防剂。即，该药物轭合物或组合物可以在哺乳动物与药物的任何接触之前给予以产生抗药物抗体。在服用了该轭合物或组合物之后，所产生的抗药物抗体将存在于哺乳动物体内与加入的任何药物结合，并由此减小或防止成为药物上瘾者的机会。

本发明的治疗组合物，更具体地说，治疗性抗药物疫苗是一种组合物，它含有至少一种药物/半抗原载体轭合物，该轭合物能激发对该药物/半抗原特异性的、具有足够高效价的抗体产生，使得在随后的药物/半抗原的攻击中，所述抗体能降低该药物的成瘾性能。对半抗原载体轭合物的预期的免疫应答是形成抗半抗原和抗载体抗体。当足够量的抗药物特异性抗体被激发并保持到封固了免疫后加入的药物的中和作用时，就达到了治疗水平。本发明的治疗方法允许有充分的时间在最初的疫苗接种和加强后产生抗体。另外，最佳的抗药物疫苗至少含有一种药物/半抗原载体轭合物，它包含作为半抗原的药物与载体的最佳结合，从而使抗药物抗体的产生能达到最佳治疗水平，也就是在体内维持足够高的效价以在数月内抵住随后的所选药物的攻击。更具体地说，该抗体效价在一定时间内保持足够高的水平以在随后与药物接触时提供一种有效的应答，一定的时间根据个体情况而定，可以是约两个月到约一年或一年以上，通常至少为三个月。这种最佳组合物由半抗原载体轭合物，赋形剂和任选的助剂组成。

当本发明用于治疗海洛因成瘾时定义了一种地抗原载体轭合物，其中半抗原是海洛因或海洛因衍生物，它能用于对哺乳动物，特别是人进行免疫，以激发能与游离药物结合并能防止该药物转运到大脑应答系统的抗海洛因抗体，由此消除上瘾的吸毒行为。如在

对可卡因和尼古丁相关部分所述，抗海洛因抗体预计能限制海洛因穿过血脑屏障向大脑的分布，从而降低其药理作用。

当本发明用于治疗尼古丁成瘾时定义了一种半抗原载体轭合物，其中半抗原是尼西丁或尼古丁衍生物，它能用于对哺乳动物，特别是人进行免疫，以激发能与游离药物结合并能防止该药物转运到大脑应答系统的抗尼古丁抗体，由此消除上瘾的吸毒行为（例如抽烟）。人们相信尼古丁与脑中的尼古丁乙酰胆碱受体的 α -亚单位结合，由此导致多巴胺的释放增加。据认为，脑中尼古丁乙酰胆碱受体的数目增加增强了尼古丁的生理依赖性。正如上面讨论的有关海洛因的情况一样，推测抗尼古丁抗体将限制尼古丁穿过血脑屏障向大脑中的分布，由此减小其药理学作用。

例如，有一些关于尼古丁释放的标准化水平，即，在抽每根平均含有 9mg 尼古丁的香烟时，有 1-3mg 尼古丁被有效地发散。另外，尼古丁的血浆浓度峰值为 25-50ng/ml，这比可卡因的血浆浓度峰值（0.3-1 μ g/ml）低得多。这样就提供了一个用中等高亲和力抗体进行干预的理想机会。

用本发明的治疗性半抗原载体缀合物进行的初始免疫在体内产生了高效价的半抗原特异性抗体。定期测试免疫接种者的血浆可有用地确定个体的有效剂量。效价水平通过定期加强来提高和维持。可以预料，该治疗方法将与目前的药物康复方案，包括劝说指导结合使用。另外，本发明的治疗组合物可以针对单一药物或同时或依次针对数种药物，并可与其他疗法结合使用。例如，本发明的治疗性半抗原载体缀合物及方法可以与常规的药理学方法和以前讨论过的“短期的”被动免疫结合使用以增强治疗的整体疗效，而相互间没有负面作用。

本发明的治疗性半抗原载体缀合物是通过下述方法制备的：将一种或多种半抗原分子联结到含有 T 细胞表位的载体上，得到能刺激 T 细胞（致免疫的）的半抗原载体轭合物，从而导致 T 细胞增生和递质的特征性释放，由此激活相关 B 细胞并刺激特异性抗

体产生。令人感兴趣的抗体是对该半抗原载体轭合物（也叫做半抗原载体复合物）的半抗原部分具有特异性的那些。还公开了含有或者与相同药物结合（交叉免疫），或者与多种药物结合（互免疫）的轭合物的治疗组合物。这种多种药物的轭合物的共混物在多种药物滥用的治疗中尤为有用。

在选择按照本发明适于缀合的药物时，本领域技术人员将选择可能具有激发高抗体效价性能的药物。但是，如果所选择的分子与个体内源性产生的那些分子相类似，则针对这种分子而生的抗体将与身体中的许多不同分子交叉反应，产生不期望的效果。因此，选择作为半抗原（药物/半抗原）的药物必须是充分外源性的，并足够大以避免激发在人体内经常发现的分子的抗体。基于这些原因，例如乙醇就不适于本发明的治疗方法。针对治疗组合物而生的抗体是高度特异性的，并有足够的量以便于在血流中或在粘膜中或在两者中中和药物。在不限本发明的前提下，适于治疗组合物的药物（不以重要性为序）是：

致幻剂，例如麦司卡林和 LSD；

大麻素，例如 THC；

兴奋剂，例如苯异丙胺、可卡因、芬美曲嗪、苯哌啶醋酸甲酯；尼古丁；

抑制剂，例如非巴比妥类药物（例如溴化物，水合氯醛等），甲喹酮，巴比妥类药物，地西洋，氟西洋，苯环利定和氟西汀；

阿片及其衍生物，例如海洛因，美沙酮，吗啡，哌替啶，可待因，喷他佐辛，丙氧芬；

“设计者药物”，例如“狂喜”。

图 3 显示了按照本发明适于轭合的四种药物的结构。

本发明的载体是含有至少一个能刺激患者的 T 细胞的 T 细胞表位的分子，它又帮助 B 细胞引发并在整个轭合物的某些部分，包括半抗原部分中保持持续的抗体产生。这样，由于选定的载体是致免疫的，因此可以看到，在不同的病人人群中对该疫苗的强免疫应答。

该载体，就象半抗原，必须是足够外源性的，以激发对该疫苗的强免疫应答。一个保守的，但不是至关重要的方式是，使用一种对大多数病人来说尚未接触过的载体，以避免载体诱导的表位抑制的现象。不过，即使发生了载体诱导的表位抑制，它也是可以控制的，如同它可以通过改变剂量（Dijohn 等，(1989)柳叶刀 1415-1418）和改变其他方式的方式（Etlinger 等，(1990)科学 249:423-425），包括使用 CTB（Stok 等，(1994)疫苗 12:521-526）得以克服。使用病人已对其获得免疫的载体蛋白质的疫苗是商业上可获得的。另外，含有大量赖氨酸的载体特别适合于根据本发明的方法所进行的缀合。合适的载体分子有许多，包括但不限于下列种类：

细菌毒素或产物，例如霍乱毒素 B（CTB），白喉毒素，破伤风类毒素，百日咳毒素，百日咳丝状血凝素，志贺毒素，假单胞菌属外毒素；

植物凝集素，例如蓖麻子白蛋白-B 亚单位，相思豆毒素和甜豌豆植物凝集素；

亚病毒，例如逆转录病毒核蛋白（逆转录 NP），狂犬病核糖核蛋白（狂犬病 RNP），植物病毒（例如 TMV，豇豆和花椰菜花斑病毒），水泡性口炎病毒-核壳蛋白（VSV-N），痘病毒载体和塞姆利基森林病毒载体；人造载体，例如多抗原肽（MAP），微球；

酵母病毒样颗粒（VLPs）；

疟疾蛋白抗原；

以及其他，例如蛋白质，肽，以及上述物质的任何变体、衍生物或类似物。

为了确定合适载体的特征进行了初始实验，该实验使用了牛血清白蛋白作为蛋白质载体。该蛋白质最适合于动物实验，因为它便宜并含有大量可用于缀合的赖氨酸。但是，它不大适合于人类免疫，因为抗-BSA 抗体的生成会产生副作用。因此，利用这些实验结果，上述标准被用于大量的候选载体。本结果是适合于在本发明中使用的载体的名录。

优选实施方案的载体是一种蛋白质或分支的肽（例如多抗原肽

(MAP))或单链肽。一个理想的载体是在疫苗接种时未被广泛使用的蛋白质或肽,在该国家使用该治疗方法,因而避免了潜在的“载体诱导的表位抑制”。例如在美国,标准的儿童期免疫包括白喉和破伤风,诸如破伤风类毒素和白喉类毒素等未修饰的蛋白质,可能不是特别合适的载体。此外,载体蛋白质不应是耐受的。对人类而言,应排除未经修饰的人血清白蛋白。另外,许多食物蛋白质在作为载体使用前应当进行认真的筛选,同样的,对人类来说,由于很多人吃牛肉,牛血清白蛋白不是一个很理想的载体。更进一步说,如果该载体有内在的免疫原性/佐剂活性,那么它就具有很高的优势。必须在载体的免疫原性的愿望和使抗半抗原抗体最大化的愿望之间获得精细的平衡。此外,优选载体应当能够产生系统性应答和接触部位的应答。这对于在粘膜中广泛服用的海洛因、可卡因和尼古丁来说更是如此。当吸食可卡因或海洛因时应答的速度特别重要。相应地,对可卡因、海洛因和尼古丁来说,一个优选的载体不仅激发系统的应答,也激发事先存在的粘膜抗体应答。在这种粘膜应答中,抗体与可卡因、海洛因和/或尼古丁会发生足够快的作用,以在其开始在血流中循环前抵消该药物。

这类优选的载体之一是霍乱毒素 B (CTB),它是一种能够产生很强的系统性和粘膜抗体应答的高致免疫性的蛋白质的亚单位 (Lycke, (1992)免疫学杂志 150: 4810-4821; Holmagren 等, (1994)美国热带医学与卫生学杂志 50:42-54; Silbart 等, (1988)免疫学方法杂志 109: 103-112; Katz 等, (1993)感染与免疫 61: 1964-1971)。这种联合 IgA 和 IgG 抗半抗原应答在阻止被嗅入或吸入的海洛因或可卡因、被通过嘴和肺吸收的尼古丁方面是极有希望的。此外,CTB 在有关霍乱疫苗的临床实验中显示出在人类的使用中是安全的 (Holmagren 等, 同上; Jertborn 等, (1994)疫苗 12: 1078-1082; “约旦关于疫苗的加速发展的报告” 1993, NIAID, 1993)。

其他有用的载体包括那些有能力加强粘膜应答,特别是 LTB 类的细菌毒素,逆转录病毒核蛋白 (逆转录 NP), 狂犬病核糖核蛋白

(狂犬病 RNP)，水泡性口炎病毒-核壳蛋白 (VSV-N)，和重组痘病毒亚单位。

在另外的实施方案中，变应原的不同的蛋白质衍生物、肽片段或类似物作为载体使用。这些载体被选择是因为它们激发了能帮助抗半抗原抗体的 B 细胞引发的 T 细胞应答。在 1995 年 10 月 19 日公布的 WO 95/27786 中披露了制备变应原蛋白质、肽及它们的序列的实例和方法。特别适合于作为载体的变应原是日本柳杉，更具体地说是重组日本柳杉 1，其序列在经细小变化后予以公布。在日本之外的其他国家，日本柳杉是不普遍的。因此，日本柳杉 1 变应原一般符合合适载体的其中一个标准，即是一种病人先前未接触过的载体。

使用本发明的方法和组合物，更具体地说，使用下列实施例中的技术，本领域技术人员将选用的药物/半抗原与选用的载体相联以制成本发明的半抗原载体轭合物。

在本发明的一个实施方案中，由治疗组合物诱导的抗体在一定时间内起作用，即该药物从肺经过心脏运行到大脑。激发此种抗体应答的能力要求仔细选择载体分子。

霍乱毒素的重组 B 亚单位的制备

霍乱毒素是由霍乱弧菌产生的肠毒素，它由五个完全相同的、分子量为 11.6KDa (103 个氨基酸) 的 B 亚单位，和一个 27.2KDa (230 个氨基酸) 的 A 亚单位组成 (Finkelstein (1988) *immunochem. Mol. Gen. Anal. Bac. Path.* 85-102)。结合亚单位 CTB 与细胞表面上的神经节甾脂 GM1 结合 (Sixma 等 (1991) 自然 351: 371-375; Orlandi 等, (1993) 生物化学杂志 268: 17038-17044)。CTA 是酶促亚单位，它进入细胞并催化 G 蛋白质的 ADP-核糖基化作用，实质性地活化腺苷酸环化酶 (Finkelstein (1988) *immunochem. Mol. Gen. Anal. Bac. Path.* PP85-102)。在缺少 A 亚单位时，霍乱毒素不具有毒性。

其他人已公开了 CTB 五聚体的高浓度重组表达的产生 (L'hoir

等 (1990) 基因 89: 47-52; Slos 等, (1994) *Protein Exp. Purif.* 5:518-526)。天然 CTB 可在商业上获得, 但是很难排除 CTA 的污染。因此, 重组 CTB 已在大肠杆菌中表达, 据说已经形成其特征。霍乱菌素构造已从美国典型培养物保藏中心购得 (根据美国专利 4,666,837)。重组 CTB 从原始载体 (pRIT10810) 克隆到表达质粒 (pET11d, Novagen) 上, 其具有一个含有 His6 标记的外部 N-末端序列, 并在大肠杆菌中表达达到培养物浓度为 25mg/升。该蛋白质利用标准技术经 Ni^{2+} 柱纯化, 并用 SDS-PAGE 进行分析 (参见图 4a, b, c)。重组 CTB 在该测试中是单体的, 由于 N-末端延长, 它比天然 CTB 单体更大。

五聚体的重组 CTB 可以伴有或不伴有 His 标记而生成, 方法是用 PCR 修饰的 cDNA 去包含 Pel b 前导序列。将 C-末端终止密码子插入以除去 His 标记。两种结构均用 pET22b 载体 (Novagen) 在大肠杆菌中表达。His 标记的蛋白质用上述 Ni^{2+} 亲和色谱法纯化 (13mg/L)。未标记的重组 CTB 用所述神经节甾脂 GM1 柱亲和色谱法纯化 (Tayot 等, (1981) 欧洲生物化学杂志 113:249-258)。重组 CTB 五聚体在 ELISA 中显示出与神经节甾脂 GM1 结合, 并与在蛋白质印迹及 ELISA 中的五聚体特异性抗体反应。重组 CTB 也可从其他途径获得, 例如 SBL 疫苗 AB。

CTB 的五聚体结构可优选地结合到神经节甾脂 GM1 上。只要样品未煮沸, 该五聚体对 SDS 就是稳定的, 这允许利用 SDS-PAGE 来评定五聚体化。图 4a 中的凝胶显示天然 CTB 是一个五聚体, 并与变性单聚物 CTB 相区别。五聚体结构的 pH 范围是 4-9 (参见图 4b), 这促进了大量缀和化学过程。最初表达的重组 CTB 是单体的。获得五聚体 CTB 的一种方式是通过改变适当折叠的五聚体 CTB 的表达。据发现, 胞质表达提供了一个更高水平的单体 CTB, 本领域普通技术人员会意识到将单体 CTB 折叠成五聚体 CTB 的方法 (参见, 例如 L'hoir (1990) 基因 89:47-52)。另一种将单体 CTB 重折叠以获得五聚体 CTB 的方式是周质表达, 它产生于能够通过 ELISA 与 GM1-神经

节甙酯相结合的五聚体重组 CTB。图 5a 和 5b 显示了支持这些发现的数据。本领域技术人员可以找出获得所描述的五聚体重组 CTB 的方法，包括具有前导序列的周质表达 (Slos 等，同上；Sandez 等，(1989)美国国家科学院院报 86:481-485；Lebens 等，(1993)生物技术 11:1574-1578) 或者翻译后重折叠 (L'hoir 等，同上；Jobling 等，(1991)分子微生物学 5:1755-1767)。

另一种有用的载体是能够提供对 CTB 有改进的粘膜应答的霍乱毒素。据报道，酶促活性 A 亚单位佐剂增强了活性 (Liang 等，(1988)免疫学杂志 141: 1495-1501；Wilson 等，(1993)疫苗 11:113-118；Snider 等，(1994)免疫学杂志 153:647)。

取得本发明的轭合物的一个方面涉及修饰半抗原，充分使其能够被轭合或加入到一个载体中，同时保留足够的结构，使其被视作游离态半抗原 (例如，游离海洛因或尼古丁)。接种后的个体具有能够识别游离半抗原 (海洛因或尼古丁) 的抗体是至关重要的。在实施例中详细解释的放射性免疫测定和竞争性 ELISA 测定实验能够测定游离半抗原的抗体效价。感兴趣的抗体是半抗原特异性抗体，在一些实施方案中，是海洛因特异性抗体或尼古丁特异性抗体。应该看到，用来描述优选方案的原则和方法可以从本说明书延伸到更为广泛的半抗原载体轭合物，这些轭合物在治疗许多药物成瘾和毒性应答方面是有用的。

轭合物

本发明的新的尼古丁载体轭合物是从尼古丁和尼古丁代谢物衍生而制得的。图 8 显示了尼古丁及其代谢物的结构。本发明的新的海洛因载体轭合物是从海洛因和海洛因代谢物衍生而制得的。图 11a 和 11b 显示了为制备海洛因轭合物所使用的海洛因及其可变位点的结构。

半抗原载体键的长度和性质使得半抗原与抗体结构域有足够的距离，允许它被起先针对它而产生的抗体最优识别。键的长度通过改变 $-CH_2-$ 基团的数目得以优化， $-CH_2-$ 基团被策略性地放置在选自下

列成员的“分支”中：

CJ0	Q
CJ1	$(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ1.1	CO_2Q
CJ1.2	COQ
CJ2	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ2.1	$\text{OCOCH}=\text{Q}$
CJ2.2	$\text{OCOCH}(\text{O})\text{CH}_2$
CJ2.3	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2$
CJ3	$\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$
CJ3.1	$\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$
CJ4	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$
CJ4.1	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$
CJ5	$\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$
CJ5.1	$\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$
CJ6	$\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ7	$\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ7.1	$\text{CH}_2\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ8	$\text{OCOCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Q}$
CJ8.1	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Q}$
CJ9	OCOC_6H_5
CJ10	如图 2b 所示
CJ11	$\text{YCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$

以及本文中图 1a 和 1b 中显示的那些。关于上述分支，n 优选为约 2 到约 20 的整数，更特别是约 2 到约 8，最优选 3-5；Y 优选自 S，O 和 NH；而 Q 优选自下列成员：

- (1) -H
- (2) -OH
- (3) -CH₂

- (4) $-\text{CH}_3$
- (4a) $-\text{OCH}_3$
- (5) $-\text{COOH}$
- (6) 卤素
- (7) 蛋白质或肽载体
- (8) 修饰蛋白质或肽载体
- (9) 活性酯, 例如 2-硝基-4-磺苯基酯和 N-氧琥珀酰亚氨基酯

酯

(10) 对载体或修饰载体具有活性的物质, 例如混合酐, 酰卤, 酰基叠氮, 烷基卤, N-马来酰亚胺, 亚氨基酯, 异氰酸酯, 异硫氰酸酯; 或

(11) 由其“CJ”索引号识别的另一种“分支”。

含有 T 细胞表位的载体 (例如蛋白质或肽载体) 可以用本领域技术人员熟知的方法进行修饰, 以有利于其与半抗原的缀和 (例如, 通过硫化作用 (thiolation))。例如与 2-亚氨基硫烷 (Traut's 试剂) 或利用琥珀酰化作用, 等等。为简单起见, 其中 $\text{Q} = \text{H}$ 的 $(\text{CH}_2)_n\text{Qi}$ 可被称为 (CH_3) , 甲基或 Me, 不过, 应当理解, 它适合图 1a 和 1b 中所示“分支”所确定的要点。

本文中所用的其他商业上可获得的化合物的简写包括:

BSA = 牛血清白蛋白

DCC = 二环己基碳化二亚胺

15 DMF = N,N-二甲基甲酰胺

EDC (或 EDAC) = 盐酸 N-乙基-N'-(3-(二甲氨基)丙基)碳化二亚胺

EDTA = 乙二胺四乙酸, 二钠盐

HATU = O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯

NMM = N-甲基吗啉

HBTh = 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯

TNTU = 2-(5-降冰片烯-2,3-二羧亚氨基)-1,1,3,3-四甲基脲
四氟硼酸酯

PyBroP® = 溴-三-吡咯烷-磷六氟磷酸盐

HOBt = N-羟基苯并三唑

几种命名化合物的其他 IUPAC 名称是:

尼古丁 1-甲基-2-(3-吡啶基)吡咯烷

可替宁 N-甲基-2-(3-吡啶基)-5-吡咯烷酮

反应

在一个实施方案中, 轭合物 PS-54 的前体通过在两当量二异丙基乙胺的存在下, 在二氯甲烷中, 用琥珀酸酐将外消旋去甲尼古丁酰化而合成。然后该反应的产物利用 HATU 联结到载体蛋白质的赖氨酸残基上, 得到轭合物 PS-54 (参见实施例 1, 方法 B)。

在另一个实施方案中, 通过用 3-溴丁酸乙酯、5-溴戊酸、6-溴己酸或 8-溴辛酸分别将在无水甲醇中的 (S)-(-)-尼古丁中的吡啶氮选择性地烷基化而合成 PS-55, PS-56, PS-57 和 PS-58 的前体(参见实施例 2, 方法 A、B、C 和 D)。这些反应的产物利用 HATU 缀和到载体蛋白上, 得到轭合物 PS-55, PS-56, PS-57 和 PS-58 (参见实施例 3, 方法 A)。

表 1

轭合物	载体蛋白	半抗原/单体	轭合方法
PS-54	BSA	19.5	实施例 1, 方法 B
PS-54	HEL	3.2	实施例 1, 方法 B
PS-55	BSA	33.2	实施例 3, 方法 A
PS-55	HEL	1.09	实施例 3, 方法 A
PS-56	BSA	27	实施例 3, 方法 A
PS-56	HEL	2.2	实施例 3, 方法 A
PS-57	BSA	81	实施例 3, 方法 A
PS-57	HEL	8	实施例 3, 方法 A
PS-58	BSA	66.8	实施例 3, 方法 A

PS-58 HEL 7.4 实施例 3, 方法 A

这是非限制性的轭合物列表。其他轭合物用与含有 T 细胞表位的载体联结的一个以上的半抗原制成。优选的是, 1 - 100 个半抗原与含有 T 细胞表位的载体联结。更优选的是, 1 - 70 个半抗原与含有 T 细胞表位的载体联结。

实施例中公开了化合物 PS-54, PS-55, PS-56, PS-57 和 PS-58 的合成方法。按照所公开的方法, 例如, 在含水条件下利用活化剂, 本领域技术人员可合成任何一种期望的化合物。

已开发出许多化合物来促进蛋白质/肽的交联或蛋白质对衍生分子的轭合, 例如半抗原。这些包括但不限于: 羧酸衍生的活性酯(活性化合物), 混合酐, 酰卤, 酰叠氮, 烷基卤, N-马来酰亚胺, 亚氨基酯, 异氰酸酯和异硫氰酸酯, 它们都是本领域技术人员已知的。它们能与蛋白质分子的反应基形成共价键。根据活化基的不同, 该反应基是蛋白质分子上赖氨酸残基的氨基, 或是载体蛋白或修饰载体蛋白分子中的巯基, 当反应时, 它们形成酰胺, 胺, 硫醚, 腓脲或硫脲键。本领域技术人员可确定其他合适的活化基, 例如, 在象《蛋白质轭合和交联化学》(Wong(1991)CRC 出版公司, Boca Raton, FL) 这样的常用参考书中。理想的是经赖氨酸侧链氨基轭合。多数试剂优选与赖氨酸反应。尤为合适的载体是 CTB, 因为其天然形式中每个单体有 9 个赖氨酸残基。为了确定轭合的 CTB 五聚体是否保留了其结构和活性, 可以评定 GM1 神经节甙酯结合情况。

申请人已表达并精制了大量重组 CTB, 它们一旦完善后就大批量发酵生产。表达和纯化重组蛋白质的方法是本领域中已知的, 参见, 例如 USSN07/807529。例如, CTB 可以利用亲和色谱法纯化(Tayot 等, (1981)欧洲生物化学杂志 113:249-258), 轭合到海洛因或尼古丁衍生物上, 然后该轭合物可以进一步精制。分析纯化 CTB 和所得轭合物的纯度以及 CTB 的五聚体结构的保持情况。所用的技术包括 SDS-PAGE, 天然 PAGE, 凝胶过滤色谱法, 蛋白质印迹, 直接和 GM1-捕捉 ELISA, 以及与生物素酰化 CTB 竞争的 ELISA。半抗原化

(haptentation) 水平利用质谱, 反相 HPLC, 并通过分析因半抗原的存在而导致的 UV 吸收的增加来测量。轭合物的溶解性和稳定性在全面配制的制备中达到最佳。实施例给出了这些分析测定中的一些详细情况。

尽管五聚体结构的 CTB 是实施本发明时的优选载体, 且 G_{M1} 结合是确定 CTB 的五聚体形式是否存在的一种有效测试, 但本发明并不限于使用五聚体形式的 CTB。本发明中也包括其他 T 细胞表位载体, 以及可在本发明中使用的其他形式的 CTB (例如, 单体, 二聚体等)。如果使用 CTB 五聚体形式以外的一种载体, 那么本领域技术人员将使用合适的测试方法以确定所需要的载体的存在和活性 (例如, 使用 G_{M1} 结合来确定 CTB 五聚体形式的存在)。

为了改变半抗原化水平, 可以采取其他方式。在一个实施方案中, 载体是用一个多价海洛因或尼古丁结构半抗原化的。这种想法是基于多抗原肽 (MAP) 的概念 (Lu 等, 分子免疫学 28:623-630(1991))。在该系统中, 利用多分支的赖氨酸残基使半抗原密度和效价最大化。该方法的前提是, 如果有多个半抗原连接在同一肽或蛋白质分子, 免疫应答将被增强。因此, 需要吸附在载体 CTB 五聚体的一个或两个位点的多价半抗原按本文中列出的方法制备。该多抗原半抗原的核芯是由 Tam 所建议的分支的聚赖氨酸核芯 (Lu 等, 同上)。通过引入一个被护 Cys 残基可以保留一种化学活性方法。当所有可获得的氨基的海洛因或尼古丁半抗原化后, Cys 的巯基未被屏蔽, 并可通过数种双功能巯基/氨基特异性交联剂与蛋白质联结 (Yoshitake 等, (1979) 欧洲生物化学杂志 101:395-399)。许多树状化合物结构作为核芯使用。

佐剂

不会对载体的作用产生屏蔽的任何佐剂在本发明的海洛因和尼古丁治疗疫苗中都是有用的 (参见, Edelman(1980) 传染病评论 2:370-373)。申请人最初进行的旨在证明针对可卡因成瘾的治疗疫苗的可行性的试验使用了有力的佐剂 CFA。但是, CFA 对人类来说不

是优选的，目前许可用在人体上的有用的佐剂是明矾，包括氢氧化铝（Spectrum Chem. Mtg. 公司，New Brunswick，新泽西）或磷酸铝（Spectrum）。具有典型意义的是，疫苗被吸收到明矾上，其溶解性是非常有限的。鼠模型的预试数据表明，明矾能够诱导一种很强的抗可卡因抗体应答，MF59（Chiron，Emeryville，CA）或者RIBI 佐剂也是合适的。

用 CTB 作为载体蛋白的有效的免疫不要求强有力的佐剂。正如实施例中所示，高效价抗尼古丁抗体应答是通过用 CTB-尼古丁轭合物免疫化而诱导的，它可以是使用明矾作为佐剂，或者不需要任何附加的佐剂。对于 CTB 之外的载体，本领域技术人员能够确定合适的佐剂，如果需要的话。

赋形剂和辅助剂

治疗组合物可选地含有一个或多个药学上可接受的赋形剂，包括但不限于无菌水，盐溶液如盐水，磷酸钠，氯化钠，乙醇，阿拉伯胶，植物油，苧醇，聚乙二醇，明胶，甘露醇，碳水化合物，硬脂酸镁，粘性石蜡，脂肪酸酯，羟甲基纤维素，以及缓冲液。其他合适的赋形剂可以由本领域普通技术人员使用。该治疗组合物可选地包括至少一种辅助剂，例如分散介质，包衣，例如类脂和脂质体，表面活性剂如湿润剂和乳化剂，润滑剂，防腐剂如抗菌剂和抗真菌剂，稳定剂和本领域技术人员熟知的其他试剂。本发明的组合物还可含有其他佐剂，试剂和/或惰性的药理学上可接受的赋形剂，它们可以加入以增强该药物的治疗性能或使得能选择其他的给药方式。

上面所讨论的高度纯化的半抗原载体轭合物能够配制成本发明的治疗组合物，并适合于人体治疗。如果本发明的治疗组合物是通过注射给药的（即皮下注射），则优选该高度纯化的半抗原载体轭合物溶于在药学上可接受的 pH（即，pH 值约为 4-9）的水溶液，这样，该组合物是液体，并易于给药。但是，也有可能给予一个组合物，其中高度纯化的半抗原载体轭合物在水溶液中是悬浮的，该

悬浮液是在本发明的范围内。该组合物也可以可选地包括药学上可接受的赋形剂、佐剂和辅助剂，或补充活性组合物。根据给药的方式，可选的成分将确保治疗组合物的可期望的性能，例如合适的流动性，阻止不希望的微生物作用，提高的生物利用度或延长的吸收。

本发明的治疗组合物应该在生产、储存、销售和使用时无菌、稳定的。在保存时，不被微生物，例如细菌和真菌感染。为了保持组合物的完整，生产本发明的治疗组合物的优选方法是，制备能够使得该组合物以冷冻干燥粉末的形式出现的组合物和药学上的赋形剂，该粉末可在赋形剂或辅助剂中再形成，例如就在使用前用无菌水。在制备无菌的可注射的溶液时，制备无菌粉末的优选方法是真空干燥，冷冻干燥，或旋转干燥，它们将产生活性成分加上从先前其无菌过滤溶液中获得的其他预期成分的粉末。

本发明的活性化合物可以按照盖伦药剂学的常规方法加工成适于向患者给药的治疗组合物，例如哺乳动物包括人服用的治疗组合物。优选的给药方式包括鼻内的，气管内的，口服，皮肤的和/或注射。一种特别合适的给药方式的结合包括以注射开始，同时鼻内加强。

对于胃肠外应用方式来说，特别合适的是可注射的无菌溶液，优选油性或水溶液，以及悬浮液，乳液，或植入物，包括栓剂。安瓿是方便的单位剂量。对于肠内应用来说，特别合适的是片剂，糖衣丸，液体制剂，悬浮液，滴剂，栓剂，或胶囊，它们可包括肠溶衣。在糖浆剂，酏剂或类似制剂中可使用甜化赋形剂。

持续或直接释放的组合物可以配制成脂质体或者其中活性化合物（组合物）被可不同降解的包衣，例如被微胶囊，多层包衣等所保护的。也可能通过冷冻干燥该新化合物和使用所获得的冷冻干燥物来制备注射产品。

对于局部应用来说，可用非喷雾形式，粘性至半固体或固体状，包含可与局部应用相适应的载体，并具有比水更大的动态粘度。适合的制剂包括但不限于溶液，悬浮液，乳液，霜剂，油膏剂等，

如果需要的话，它们是无菌的或者与辅助剂相混合。对于局部应用来说合适的是可喷射的气雾剂制剂，其中活性化合物，优选与合适的赋形剂或辅助剂结合，装在一个塑料挤瓶中或与压缩的挥发性的、通常为气体状的推进剂混合。

通过本发明的组合物和方法所产生的抗体的分子量在 150KDa 到 1000KDa 之间。当病人用治疗组合物中的最佳轭合物进行接种后与游离海洛因或尼古丁接触时，该游离海洛因或尼古丁以海洛因特异性或尼古丁特异性抗体为目标。该抗体在识别体内药物时无需改变药物的形状或结构。在不限本发明的前提下，应相信当接种疫苗的个体与海洛因或尼古丁接触时，抗药物抗体将阻断海洛因和尼古丁的作用。人们相信，至少有三种机制导致了这种阻断活性。第一，抗体不能穿过血脑屏障，因此可以相信，当与抗海洛因或抗尼古丁抗体结合时，海洛因或尼古丁不能穿过血脑屏障，也不能对类阿片受体和多巴胺转运蛋白产生影响。第二，在不限定任何特定理论的情况下，人们相信抗体通过简单的空间阻滞来阻止药物结合到其受体上。这个机制在阻断药物的一些非-CNS 作用方面（例如心脏毒性）以及抗体在针对其他带有非-CNS 目标药物的活性时是有用的。第三，海洛因和尼古丁由于酶促和非酶促降解而在体内具有相对较短的半衰期，这产生了非活性代谢物。特别地海洛因和尼古丁是足够充分小的药物，因此它们极不可能交联抗体，这样，就不太可能形成两种药物中任一种的生理学上显著的免疫复合物。

在实施本发明时，还可使用其他粘膜应用方案，例如，用共聚物微球来诱导或增强粘膜免疫应答。这些细小的、可生物降解的微球将该轭合物包裹并保护起来，并利用粘膜免疫系统促进摄取。尽管它们最广泛地用于口头免疫，它们也有报道在鼻内免疫时也是有效的（Walker(1994)疫苗 12:387-399）。惰性聚合物诸如 1-10 μ m 直径的聚（丙交酯-共-乙交酯）(PLG)在这方面是特别有用的（Holmgren 等，(1994) 美国热带医学与卫生学杂志 50: 42-54; Serva(1994)科学 265:1522-1524）。

除了优选的轭合物外,用不同的轭合物进行交叉免疫以将抗体交叉反应性减至最小。小鼠用一种轭合物进行初始免疫,然后在第14天用与相同载体联结的不同轭合物进行加强。只有识别海洛因或尼古丁轭合物的抗体分泌B细胞的亚型被最大刺激和膨胀。人们相信,由于这两种轭合物附着到药物分子上的部位不同,识别的特异性增加了。然后利用竞争性ELISA确认所诱导的抗血清的特异性。

此外,含有一种以上轭合物的治疗组合物刺激多克隆抗体,由此在随后的攻击中增强抗体应答。

剂量

中和抗病原体的抗体应答已知多年了,并且有可能实现高效价的抗海洛因或抗尼古丁抗体应答维持至少一年。基于用常规疫苗所得到的数值,应该有可能实现中和海洛因或尼古丁血浆浓度所需要的特异性抗体的浓度。小鼠的药物动力学数据,数据未显示出来,清楚地表明可以达到生理学上适当的中和抗体浓度。最终,母源抗体穿过对海洛因成瘾的妇女和/或吸烟妇女的胎盘,并由此保护胎儿的能力体现了治疗性海洛因和/或尼古丁疫苗接种的另一种期望的作用。对广泛人群有效的最优治疗总是引起争论的,然而本领域技术人员通过对各种因素的仔细领会来确定合适的治疗剂量。另外,抗体应答可以利用实施例下列出的特异性ELISA和其他基于抗体的测试来监控。

消除速率中遗传上的变化,与其他药物的相互作用,在消除和分配中诱导疾病的变化,以及其他因素共同作用,使得给予相同剂量的病人对疫苗浓度的应答范围很广。临床指示剂能帮助一些药物滴定到预期范围,而没有化学测定能代替对治疗所产生的应答的仔细观察。由于清除率、半留存期蓄积、和稳态血浆浓度难以表述,因此将对抗滥用药物抗体的产生的测量用作最优剂量的标示。评估本发明的每种轭合物/载体/佐剂的诱导抗体应答的能力,该抗体应答是最能结合循环中的游离海洛因或游离尼古丁的。

实施例中给出了载体和佐剂对抗体应答的诱导的作用的其他详

细情况。因此，人们将理解，在特定情况下活性化合物的实际优选量将根据所使用的特异性轭合物、所形成的特定组合物、应用的方式、以及所治疗的特定部位和器官而变化。例如，在一个实施方案中，含有合适载体的治疗组合物首先经胃肠外途径给予，并经粘膜加强。正如本文中更详细讨论的那样，用最佳半抗原和载体结合物这种类型的免疫在系统性的初级 IgG 和局部的初级 IgA 的产生中是非常有效的。

如实施例所示，鼠模型已用于证明和测量抗体应答的不同特征，包括抗体效价，识别游离尼古丁的能力，尼古丁结合容量，对尼古丁的亲合力，抗体应答的特异性，抗体异型，抗体组织局部化，和尼古丁给药后抗体的生理学作用。

抗体效价

对免疫接种的第一次筛选是看所感兴趣的轭合物是否诱导了高效价的抗体应答。抗体效价可以利用本领域中熟知的 ELISA 测试来确定。例如，将尼古丁-HEL 轭合物涂覆到平板上，充分洗涤，并用不同稀释度的测试血清孵育。再次洗涤这些平板并用酶标记的抗-小鼠 IgG 次级抗体使其发育。效价定义为产生 50% 最大应答时血清稀释度的倒数。

抗体效价取决于抗体的浓度和抗体亲合力。在预估所需的抗体效价时，本领域技术人员考虑的是该抗体的浓度和亲合力。

抗体亲合力反映了与未结合抗体和未结合滥用药物平衡的抗体-药物复合物的量，因此：

$$K_{eq} = [Ab + \text{药物复合物}] / [Ab] \times [\text{药物}]$$

其中 $[Ab]$ = 空着的抗体结合位点的摩尔浓度； $[\text{药物}]$ = 未结合药物的摩尔浓度； $[Ab + \text{药物}]$ = 抗体-药物复合物的摩尔浓度。

抗体应答的特异性

为了最有效地阻滞成瘾药物的活性，所诱导的抗体对这些药物的药理学上的惰性代谢物的亲合力必须最小。抗体与药物的药理学上的惰性代谢物的结合将降低疫苗的效能。用竞争性 ELISA 并利用放

射标记的免疫测试来确定抗血清对代谢物的特异性。此外，如果所诱导的抗体与药物的药理学上的活性代谢物及衍生物结合，则疫苗的效力就会升高。

另外，所产生的抗体与在成瘾治疗和其他医疗过程中使用的其他药物的相互作用应减至最小。特别是，应避免对海洛因和多种药物滥用者通常所服用的药物的交叉反应。以下药物用作共同治疗剂，丁丙诺啡，地昔帕明，纳洛酮，氟哌啶醇，氯丙嗪(chlorproazine)，马吲哚和溴隐亭，以及其他可能相关的药物。

对海洛因 LD₅₀ 的作用

进一步评估在诱导高效价特异性抗体应答时最有效的那些组合物和免疫方案的改变海洛因 LD₅₀ 的能力。在该实验中，给对海洛因免疫的和对对照载体免疫的小鼠静脉注射海洛因，剂量在先前定义的 LD₅₀ 附近。每个点用 10 只小鼠，数据利用 Cochran-Mantel-Haenzel χ^2 检验进行分析。

此外，用一种失效时间模型来分析海洛因导致的死亡时间。用该模型测量抗海洛因抗体将(a)致死率所需的海洛因的量和(b)死亡时间增加到何种程度，即测量抗体的效能。这些提供了抗体的体内效能的迅速而精确的检验。

对人类的生理学作用的观察

在海洛因滥用发作期间寻求医疗关注的人会出现呼吸浅，瞳孔收缩，心搏徐缓，体温下降和对外部刺激的响应能力基本消失。当用药过量的程度高时，这些症状会发展到发绀和死亡。当用疫苗对人进行主动免疫或抗体的被动免疫时，除了海洛因的血液浓度以外，还要考虑将要评定的所有这些因素和将要确立的特定标准。

在不限制本发明范围的条件下，现在将以尼古丁和海洛因为例详细描述本发明的组合物及方法，以及具体的实施方式。

以下实施例中有许多具体描述了尼古丁和抗尼古丁抗体。不过，这些实施例也适用于海洛因。例如，通过给免疫的小鼠注射用氘标记的尼古丁（可从 NEN 获得），从而监控海洛因的再分配（即脑中

减少的量)，接着在不同的时间点施断头术。抗海洛因抗体对海洛因的代谢及清除的作用的分析测定可以通过对取自³H海洛因注射的小鼠的血浆的TLC分析或通过HPLC进行。

应当理解，本文中描述的实施例和实施方案仅是为了阐明本发明，并且本领域技术人员参照其将可提出各种修正。因此，提供以下非限制性的实施例来指导本发明的实施。

实施例 1

尼古丁轆合物的制备

方法 A 向去甲尼古丁(50mmol)的二氯甲烷溶液中加入三乙胺(75mmol)，接着加入琥珀酸酐(100mmol)。将该溶液回流加热18小时。该反应混合物按顺序用10%盐酸水溶液、饱和碳酸氢钠溶液、盐水和水洗滌。干燥(MgSO₄)并减压除去溶剂后，残余物利用硅胶快速色谱法进行纯化得到预期产物。

方法 B 然后用琥珀酰化的去甲尼古丁来合成尼古丁轆合物PS-54(图7)。向琥珀酰化的去甲尼古丁(5μm)的DMF溶液(0.1ml)中依次加入二异丙基乙胺(10μm)和HATU(5.5μm)。10分钟后，将该淡黄色溶液滴加到HEL或BSA(500μg)在pH8.8的0.1M硼酸钠缓冲液中的溶液(0.9ml)中，并且将该混合物在室温下搅拌18小时。仔细地加入0.1M盐酸水溶液将该轆合物溶液的pH调节到pH7.0，接着利用PBS渗析进行纯化。渗析液通过0.2μm过滤器过滤，并利用质谱分析或UV吸光度测量半抗原化水平。

尼古丁特异性抗体应答的诱导

为了诱导对小分子或半抗原诸如尼古丁的特异性抗体应答，需要将其与含有T细胞表位的载体，例如蛋白质载体连接。该载体由T细胞识别，它们是由尼古丁特异性B细胞产生的抗体的引发和维持所必需的。在本实施例中，所用的载体是BSA。制备一板结构清楚的尼古丁-BSA轆合物，它们通过尼古丁分子的不同部分与几种不同类型的连接剂相连(图6b)。轆合物的不同构造使得检验尼古丁分子的不同变化和外观成为可能。既然所给出的任何尼古丁轆合物都

能诱导不定量的识别游离半抗原（尼古丁）、载体、或仅识别轭合物（并且不识别尼古丁本身）的抗体，于是如下列实施例中所述对轭合物进行筛选。

给四只 2-3 月龄的 Balb/c 雌性小鼠腹腔注射在弗氏完全佐剂中的 50 μ g 尼古丁-BSA 轭合物，PS-55-BSA，进行免疫接种。在研究中这些动物有对抗原的良好的计划再现应答。第 21 天时第二次注射 PS-55-BSA，并在第 35 天给小鼠放血。如图 9a 中所示，用 ELISA 检验血清，测定与 PS-55 的轭合物结合的抗体和鸡卵溶菌酶蛋白（HEL）。这些数据表明该尼古丁-BSA 轭合物能诱导强烈的抗体应答。

将第二组 10 只 2-3 月龄的 Balb/cbyj 雌性小鼠免疫接种来制备抗尼古丁抗血清的血清混合液。在该实验中，所用载体是 CTB。小鼠通过肌肉注射在铝胶中的 10 μ g PS-55-CTB 进行免疫接种，并用相同物质加强三次。给小鼠放血，血清分别处理。从每只小鼠获得的血清首先用直接尼古丁 ELISA 进行检验，测定抗尼古丁抗体，然后用竞争性 ELISA 测定所诱导的抗体是否能识别游离尼古丁。

如下所述，从每只小鼠获得的血清用抗尼古丁直接 ELISA 进行检验，以测量所产生的抗体。Immulon 2 96 孔 ELISA 板在 4 $^{\circ}$ C 下用 1 $\times$ PBS 稀释的 50 μ l 10 μ g/ml 次级轭合物尼古丁和 HEL，PS-55-HEL 涂覆过夜。这些板用 0.5% PBS 中的明胶在室温下封闭 1 小时。然后它们用含有 0.05% 吐温-20 的 1 $\times$ PBS (PBS-T) 洗涤三次。以对 PS-55-HEL 涂覆板 1/300 稀释度的量开始将血清样品加入这些板中。血清用 3 倍稀释度稀释并在室温下在封闭板上孵育 2 小时。然后这些板用 PBS-T 洗涤三次。生物素化的山羊抗小鼠 IgG (Lot#J194-N855B 或 C) 以 1/10000 稀释于 PBS-T 中，向每孔中加入 100 μ l 并在室温下孵育 1 小时。将抗生蛋白链菌素-HRP 稀释 1/10000 倍并加入到这些孔中，30 分钟后用 PBS-T 洗涤。这些板用 PBS-T 洗涤三次，然后向每孔中加入 TMB 底物使其反应。5 分钟后用 1M 磷酸终止该反应。利用 ELISA 阅读器在 O.D. 450nm 读取这些板。

然后用竞争性 ELISA 检验在该直接 ELISA 中产生抗尼古丁抗体的血清。

游离尼古丁的识别

为了测定诱导的抗体是否能识别游离尼古丁分子，进行竞争性 ELISA 测试。在该测定中，游离尼古丁与涂覆到 ELISA 板上的 PS-55 HEL 竞争以与血清中的抗体结合。如果对尼古丁具有高亲和力的抗体包括与 PS-55 HEL 结合的多数抗体，则低浓度的尼古丁就能有效地抑制抗体结合。

上述用 PS-55 BSA 注射的 4 只小鼠中的 3 只，与 PS-55 HEL 结合的抗体受到游离尼古丁的抑制（数据未显示）。注意不期望仅对轭合物具有特异性的抗体的存在干扰抗尼古丁抗体的作用。这表明在这些血清中均存在识别游离尼古丁的抗体。在竞争性 ELISA 中还检测了尼古丁的主要代谢物可替宁，除非它的浓度非常高，否则它不能与任何血清中的抗体竞争。为了验证所诱导的抗体是否能识别游离尼古丁分子，用 RIA 来测量与 [^3H]-尼古丁的特异性结合。从上述实验中获得的免疫者血清用 [^3H]-尼古丁和蛋白质-G-轭合琼脂糖珠 (Gammabind-G 琼脂糖, Pharmacia) 孵育，它们结合血清样品中的 IgG。将这些珠子离心，从而分离出抗体结合的 [^3H]-尼古丁，并通过对这些珠子闪烁计数来进行检测。4 只小鼠中有 3 只小鼠的血清显著与游离 [^3H]-尼古丁结合（数据未显示）。预先用 50 倍过量的未标记尼古丁孵育的这些血清完全抑制了 [^3H]-尼古丁与这些抗体的结合。这些数据表明，已经合成了诱导尼古丁特异性抗体应答的尼古丁载体轭合物，它们应该能防止体内尼古丁向脑中的分布。

对于第二组利用 PS-55-CTB 免疫的 10 只小鼠，与 PS-55 HEL 结合的抗体受到游离尼古丁的抑制（图 10）。用一份稀释血清来表示 50% 点效价。Immulon 2 96 孔 ELISA 板在 4℃ 下用以 1×PBS 稀释的 50μl 10μg/ml PS-N-3.2 HEL 涂覆过夜。这些板在室温下用 PBS 中的 0.5% 明胶封闭 1 小时，然后它们用含有 0.05% 吐温-20 的 1×PBS (PBS-T) 洗涤三次。这些板在不同浓度的游离尼古丁以及代

谢物、药物和相关化合物的存在下，用抗血清在室温下孵育 2 小时。然后再用 PBS-T 将这些板洗涤三次。生物素化的山羊抗小鼠 IgG (Lot#J194-N855B 或 C) 用 PBS-T 稀释 1/10000 倍，向每孔中加入 100 μ l 并在室温下孵育 1 小时。将抗生蛋白链菌素-HRP 稀释 1/10000 倍并加入到这些孔中，30 分钟后用 PBS-T 洗涤。这些板用 PBS-T 洗涤三次，然后向每孔中加入 TMB 培养基使其发育。5 分钟后用 1M 磷酸终止该反应。利用 ELISA 阅读器在 0. D. 450nm 读取这些板。图 10 中显示了测试的每种血清混合液的竞争曲线。X 轴表示竞争者浓度的升高，Y 轴表示 450nm 处的吸收。

如图 10 中所示，对尼古丁代谢物可替宁或去甲尼古丁识别很少或没有。用麻醉剂利多卡因作为阴性对照，它不能与抗体的结合竞争。该甙合物自身也用作竞争剂，它能与该抗体的结合竞争。

为了最有效地阻断尼古丁的活性，应将所诱导的抗体对尼古丁代谢物的亲和力减至最小。这些抗体与更稳定的代谢物的结合将降低疫苗的效能。在对抗血清集合体的筛选中，仅有尼古丁能抑制抗体与甙合物的结合。在该实验中，很少或没有看到对代谢物（可替宁和去甲尼古丁）和麻醉剂（利多卡因）的识别。因此，尼古丁-CTB 甙合物诱导了识别尼古丁而不识别较低活性代谢物的抗体。该尼古丁-CTB 甙合物也不识别具有相关结构的化合物和目前用于治疗尼古丁成瘾的药物（数据未显示）。

尼古丁特异性抗体的特异性

为了分析尼古丁疫苗诱导的抗尼古丁抗体的特异性，用竞争性 ELISA 检验用尼古丁-CTB 甙合物接种的小鼠的血清。检验不同浓度的尼古丁代谢物和相关分子的平板。如果该抗体对代谢物有高亲和力，则低浓度就能有效地竞争该测定。相对反应性表达为 IC_{50} ，即：使 ELISA 信号降低 50% 的抑制剂的浓度。检测下列代谢物的反应性：葡萄糖醛酸化尼古丁，可替宁，葡糖苷酸可替宁，反式-3'-羟基可替宁，反式-3'-羟基可替宁葡糖苷酸，尼古丁 1'-N-氧化物，N-氧化可替宁，和去甲尼古丁。

尼古丁特异性抗体在抑制尼古丁分布中的作用

体内尼古丁向脑中分布的抑制

为了评定由尼古丁特异性抗体引起的尼古丁在组织中分布的变化,对比 ^3H -尼古丁在尼古丁-CTB-免疫的小鼠和在天然(未免疫的)对照小鼠体内的分布。免疫者和对照免疫的小鼠用 $0.08\text{ mg/kg } ^3\text{H}$ -尼古丁静脉注射,然后在注射后 1.0 分钟时处死。将脑和血液(血浆)除去,用于随后的组织和血浆尼古丁浓度的分析。将血液集中到含有EDTA的试管中以防止凝固。将脑和血浆样品放置到含有组织稳定剂的闪烁瓶中,样品在室温下消化三天。将这些样品脱色并向每个样品中加入闪烁混合液。加入冰乙酸使样品澄清。这些样品用闪烁计数器计数后,将数据转化为 ng/g 或 ng/ml 组织。在注射了 ^3H -尼古丁后,尼古丁-CTB免疫小鼠的脑组织中的尼古丁浓度显著低于天然对照小鼠的脑组织的尼古丁浓度(数据未显示)。

实施例 2

方法 A (S)-尼古丁的 N'-丁酸加合物

在氩气下,在冰水温度下,在 10 分钟内向(S)-尼古丁(0.031 摩尔)的无水甲醇溶液(50ml)中滴加4-溴丁酸乙酯(0.0341 摩尔)。使所得橙色溶液恢复到室温并搅拌 18 小时。减压除去溶剂,剩下的棕色残余物用己烷沉淀,得到预期酯的分析纯样品。

将该酯(36mg)溶于甲醇(3ml)和 1M 氢氧化钠溶液(5ml)并在室温下搅拌 18 小时。减压除去溶剂,将残余物溶于 10% 盐酸并用乙酸乙酯萃取。干燥(MgSO_4)后,减压除去溶剂,得到预期化合物。

方法 B (S)-尼古丁的 N'-戊酸加合物

在氩气下,在冰水温度下,在 10 分钟内向(S)-尼古丁(0.031 摩尔)的无水甲醇溶液(50ml)中滴加1-溴戊酸(0.0341 摩尔)。使所得橙色溶液恢复到室温并搅拌 18 小时。减压除去溶剂,剩下的棕色残余物用己烷沉淀,得到预期化合物的分析纯样品。

方法 C (S)-尼古丁的 N'-己酸加合物

在氩气下，在冰水温度下，在 10 分钟内向 (S)-尼古丁 (0.031 摩尔) 的无水甲醇溶液 (50ml) 中滴加 1-溴己酸 (0.0341 摩尔)。使所得橙色溶液恢复到室温并搅拌 18 小时。减压除去溶剂，剩下的棕色残余物用己烷沉淀，得到预期化合物的分析纯样品。

方法 D (S)-尼古丁的 N'-辛酸加合物

在氩气下，在冰水温度下，在 10 分钟内向 (S)-尼古丁 (0.031 摩尔) 的无水甲醇溶液 (50ml) 中滴加合适的 1-溴辛酸 (0.0341 摩尔)。使所得橙色溶液恢复到室温并搅拌 18 小时。减压除去溶剂，剩下的棕色残余物用己烷沉淀，得到预期化合物的分析纯样品。

实施例 3

方法 A PS-55, PS-56, PS-57 和 PS-58 的通用制备

向尼古丁的合适的 N'-链烷酸类似物 (6.27×10^{-5} 摩尔) (来自实施例 1) 的 DMF 溶液 (1.6ml) 中加入 DIEA (1.25×10^{-4} 摩尔) 和 HAUT (7.53×10^{-5} 摩尔)。室温下 10 分钟后，将该淡黄色溶液加入在 0.1M 碳酸氢钠，pH8.3 (14.4ml) 中的 HEL 或 BSA (16.5mg) 中并搅拌 18 小时。该轭合物溶液在 4℃ 利用 PBS 渗析过夜进行纯化。这些轭合物利用激光解析质谱分析进行测定，以确定半抗原的数量。

方法 B PS-55 的制备

向尼古丁的 N'-丁酸加合物 (39mg, 1.56×10^{-4} 摩尔) (来自实施例 2, 方法 A) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中加入 DIEA (54ml, 3.10×10^{-4} 摩尔) 和 HAUT (71mg, 1.87×10^{-4} 摩尔)。室温下 10 分钟后，将该淡黄色溶液滴加到在 4ml 0.1M 硼酸钠，0.15M 氯化钠，pH8.5 缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.6×10^{-6} 摩尔赖氨酸]) 中，然后搅拌 1 小时。该轭合物在 4℃ 利用 PBS 渗析过夜进行纯化。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定，以确定半抗原的数量。

方法 C PS-56 的制备

向尼古丁的 N'-戊酸加合物 (2mg) (来自实施例 2, 方法 B) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中加入 DIEA (2ml) 和 HAUT (2mg)。室温下 10 分钟后，将该淡黄色溶液滴加到在 4ml 0.1M 硼酸钠，0.15M 氯化钠，

pH8.5 缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.6×10^{-6} 摩尔赖氨酸]) 中, 然后搅拌 1 小时。该轭合物在 4℃ 利用 PBS 渗析过夜进行纯化。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定, 以确定半抗原的数量。

方法 D PS-57 的制备

向尼古丁的 N'-己酸加合物 (2mg) (来自实施例 2, 方法 C) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中加入 DIEA (2ml) 和 HAUT (2mg)。室温下 10 分钟后, 将该淡黄色溶液滴加到在 4ml 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠, pH8.5 缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.6×10^{-6} 摩尔赖氨酸]) 中, 然后搅拌 1 小时。该轭合物在 4℃ 利用 PBS 渗析过夜进行纯化。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定, 以确定半抗原的数量。

方法 E PS-58 的制备

向尼古丁的 N'-辛酸加合物 (2mg) (来自实施例 2, 方法 D) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中加入 DIEA (2ml) 和 HAUT (2mg)。室温下 10 分钟后, 将该淡黄色溶液滴加到在 4ml 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠, pH8.5 缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.6×10^{-6} 摩尔赖氨酸]) 中, 然后搅拌 1 小时。该轭合物在 4℃ 利用 PBS 渗析过夜进行纯化。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定, 以确定半抗原的数量。

方法 F PS-60 的制备

i) N-吡咯烷加合物的制备

向去甲尼古丁 (10mmol) 的甲醇溶液中滴加 5-溴戊酸乙酯 (10mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗完后, 减压除去溶剂, 残余物用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期的 N-吡咯烷加合物。

ii) 轭合物的制备

将该酯 (15mmol) 溶于 5% 甲醇水溶液并向其中加入氢氧化钠 (15mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗完后, 通过仔细加入 1M 盐酸水溶液将 pH 调节到 pH2, 然后用乙酸乙酯萃取。干燥 (MgSO_4)

并减压除去溶剂后, 该产物用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期的游离酸。

向该游离酸 (1.55×10^{-4} 摩尔) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中依次加入 DIEA (3.1×10^{-4} 摩尔) 和 HATU (1.86×10^{-4} 摩尔)。室温下 10 分钟后, 将该淡黄色溶液滴加到在 4ml pH8.5 的 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.5×10^{-6} 摩尔赖氨酸]) 中。该混合物在室温下放置 1 小时, 在 4℃ 用 PBS 中和并充分渗析, 得到 PS-60。

方法 G PS-51 的制备

i) 6-甲基烟酸甲酯的制备

将 6-甲基烟酸 (0.375mol) 加入浓硫酸 (25ml) 的回流的甲醇溶液 (250ml) 中并在回流下搅拌 3 小时。然后再加入甲醇 (250ml) 并将所得混合物回流加热 18 小时。将该反应混合物冷却并减压浓缩成浆, 将其加入碳酸氢钠 (80g) 的水溶液 (450ml) 中。将该混合物减压浓缩以除去多数甲醇。所得混浊混合物用二氯甲烷萃取, (MgSO_4) 干燥, 过滤并减压浓缩。所得粗产物通过减压蒸馏纯化, 得到预期酯。

ii) 6-甲基肌氨酸 (6-methylmyosmine) 的制备

在氩气下, 在 -70℃, 向二异丙胺 (0.33mol) 的二乙醚溶液 (500ml) 中加入正丁基锂 (0.247mol, 1.6M 己烷溶液)。向所制得的二异丙胺锂 (LDA) 中加入 N-(三甲硅烷基) 吡咯烷酮 (0.265mol), 并将该溶液在 -70℃ 下搅拌 15 分钟。向该溶液中加入 6-甲基烟酸甲酯 (0.165mol) 的二乙醚溶液 (25ml), 并使该混合物恢复到室温过夜。之后, 该混合物在冰浴中冷却, 加入水 (33ml) 并将醚层轻轻倒出。加入另外的醚, 并重复倾倒过程两次。向水层中加入浓盐酸, 所得溶液回流过夜。该酸性溶液用二乙醚洗涤, 减压浓缩, 在冰浴中冷却并用 50% 氢氧化钾水溶液碱化。该水层用二乙醚萃取 ($3 \times 150\text{ml}$), (Na_2SO_4) 干燥, 减压浓缩并通过减压蒸馏纯化, 得到预期的 6-甲基肌氨酸。

iii) 6-甲基肌氨酸的戊酸乙酯加合物的制备

向 6-甲基肌氨酸 (10mmol) 的无水甲苯溶液中加入氨基钠 (15mmol)。10 分钟后, 加入 5-溴戊酸乙酯 (20mmol), 并将该混合物搅拌直到用 TLC 检测表明起始物已消耗完。该混合物在冰浴中冷却, 用无水乙醇使骤冷, 用乙酸乙酯萃取, (MgSO_4) 干燥并减压浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期产物。

iv) 6-甲基去甲尼古丁的戊酸加合物的制备

向从上述 (iii) 获得的加合物 (10mmol) 的甲醇溶液中加入氰基硼氢化钠 (10mmol), 微量溴甲酚绿指示剂和足量的 2N HCl/甲醇, 使该溶液的颜色由蓝色变为黄色并保持黄色。将该溶液搅拌数小时, 之后加入 6N 盐酸, 并将该混合物减压浓缩。用碳酸氢钠溶液碱化后, 用二乙醚萃取并干燥 (MgSO_4), 该物质利用减压蒸馏纯化, 得到预期化合物。

v) 6-甲基尼古丁的戊酸加合物的制备

向从上述 (iv) 中获得的去甲尼古丁 (10mmol) 加合物的二乙醚溶液中加入碘代甲烷 (20mmol)。该溶液在氩气下利用有效冷凝器回流, 直到用 TLC 检测表明起始物已消耗。减压除去溶剂, 残余物用快速色谱法纯化, 生成预期化合物的外消旋混合物。该异构体利用手性 HPLC 分离, 得到预期的 (S)-异构体。

vi) 轭合物的制备

向从上述 (v) 中获得的 6-甲基尼古丁衍生物 (1.53×10^{-5} 摩尔) 的 (S)-异构体的 DMF 溶液中依次加入 DIEA (3.06×10^{-5} 摩尔) 和 HATU (1.86×10^{-5} 摩尔)。室温下 10 分钟后, 将该淡黄色溶液加入在 4ml 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠, pH8.5 缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.40×10^{-8} 摩尔蛋白质, 1.53×10^{-6} 摩尔赖氨酸) 中。室温下 1 小时后, 该溶液在 4℃ 下用 PBS 充分渗析, 并利用质谱分析测定半抗原的数目。

方法 H PS-52 的制备

i) 5-甲基烟酸甲酯的制备

将 5-甲基烟酸 (0.375mol) 加入浓硫酸 (25ml) 的回流的甲醇溶液 (250ml) 中并在回流下搅拌 3 小时。然后再加入甲醇 (250ml) 并将所得混合物回流加热 18 小时。将该反应混合物冷却并减压浓缩成浆, 将其加入碳酸氢钠 (80g) 的水溶液 (450ml) 中。将该混合物减压浓缩以除去多数甲醇。所得混浊混合物用二氯甲烷萃取, (MgSO_4) 干燥, 过滤并减压浓缩。所得粗产物通过减压蒸馏纯化, 得到预期酯。

ii) 5-甲基肌氨酸 (5-methylmyosmine) 的制备

在氩气下, 在 -70°C , 向二异丙胺 (0.33mol) 的二乙醚溶液 (500ml) 中加入正丁基锂 (0.247mol, 1.6M 己烷溶液)。向所制得的二异丙胺锂 (LDA) 中加入 N-(三甲硅烷基) 吡咯烷酮 (0.265mol), 并将该溶液在 -70°C 下搅拌 15 分钟。向该溶液中加入 6-甲基烟酸甲酯 (0.165mol) 的二乙醚溶液 (25ml), 并使该混合物恢复到室温过夜。之后, 该混合物在冰浴中冷却, 加入水 (33ml) 并将醚层轻轻倒出。加入另外的醚, 并重复倾倒过程两次。向水层中加入浓盐酸, 所得溶液回流过夜。该酸性溶液用二乙醚洗涤, 减压浓缩, 在冰浴中冷却并用 50% 氢氧化钾碱化。该水层用二乙醚萃取 ($3 \times 150\text{ml}$), (Na_2SO_4) 干燥, 减压浓缩并通过减压蒸馏纯化, 得到预期的 5-甲基肌氨酸。

iii) 5-甲基肌氨酸的戊酸乙酯加合物的制备

向 5-甲基肌氨酸 (10mmol) 的无水甲苯溶液中加入氨基钠 (15mmol)。10 分钟后, 加入 5-溴戊酸乙酯 (20mmol), 并将该混合物搅拌直到用 TLC 检测表明起始物已消耗完。该混合物在冰浴中冷却, 用无水乙醇使骤冷, 用乙酸乙酯萃取, (MgSO_4) 干燥并减压浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期产物。

iv) 5-甲基去甲尼古丁的戊酸加合物的制备

向从上述 (iii) 获得的加合物 (10mmol) 的甲醇溶液中加入氰基硼氢化钠 (10mmol), 微量溴甲酚绿指示剂和足量的 2N HCl /甲醇, 使该溶液的颜色由蓝色变为黄色并保持黄色。将该溶液搅拌数小

时, 之后加入 6N 盐酸, 并将该混合物减压浓缩。用碳酸氢钠溶液碱化后, 用二乙醚萃取并干燥 (MgSO_4), 该物质利用减压蒸馏纯化, 得到预期化合物。

v) 5-甲基尼古丁的戊酸加合物的制备

向从上述 (iv) 中获得的去甲尼古丁 (10mmol) 加合物的二乙醚溶液中加入碘代甲烷 (20mmol)。该溶液在氩气下利用有效冷凝器回流, 直到用 TLC 检测表明起始物已消耗。减压除去溶剂, 残余物用快速色谱法纯化, 生成预期化合物的外消旋混合物。该异构体利用手性 HPLC 分离, 得到预期的 (S)-异构体。

vi) 轭合物的制备

向从上述 (v) 中获得的 5-甲基尼古丁衍生物 (1.53×10^{-5} 摩尔) 的 (S)-异构体的 DMF 溶液中依次加入 DIEA (3.06×10^{-5} 摩尔) 和 HATU (1.86×10^{-5} 摩尔)。室温下 10 分钟后, 将该淡黄色溶液加入在 4ml 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠, pH8.5 缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.40×10^{-8} 摩尔蛋白质, 1.53×10^{-6} 摩尔赖氨酸) 中。室温下 1 小时后, 该溶液在 4℃ 下用 PBS 充分渗析, 并利用质谱分析测定半抗原的数目。

方法 I PS-53 的制备

(i) 4-甲基烟酸甲酯的制备

将 4-甲基烟酸 (0.375mol) 加入浓硫酸 (25ml) 的回流的甲醇溶液 (250ml) 中并在回流下搅拌 3 小时。然后再加入甲醇 (250ml) 并将所得混合物回流加热 18 小时。将该反应混合物冷却并减压浓缩成浆, 将其加入碳酸氢钠 (80g) 的水溶液 (450ml) 中。将该混合物减压浓缩以除去多数甲醇。所得混浊混合物用二氯甲烷萃取, (MgSO_4) 干燥, 过滤并减压浓缩。所得粗产物通过减压蒸馏纯化, 得到预期酯。

(ii) 4-甲基肌氨酸 (4-methylmyosmine) 的制备

在氩气下, 在 -70℃, 向二异丙胺 (0.33mol) 的二乙醚溶液 (500ml) 中加入正丁基锂 (0.247mol, 1.6M 己烷溶液)。向所制

得的二异丙胺锂 (LDA) 中加入 N-(三甲硅烷基)吡咯烷酮 (0.265mol), 并将该溶液在 -70°C 下搅拌 15 分钟。向该溶液中加入 6-甲基烟酸甲酯 (0.165mol) 的二乙醚溶液 (25ml), 并使该混合物恢复到室温过夜。之后, 该混合物在冰浴中冷却, 加入水 (33ml) 并将醚层轻轻倒出。加入另外的醚, 并重复倾倒过程两次。向水层中加入浓盐酸, 所得溶液回流过夜。该酸性溶液用二乙醚洗涤, 减压浓缩, 在冰浴中冷却并用 50% 含水氢氧化钾碱化。该水层用二乙醚萃取 ($3 \times 150\text{ml}$), (Na_2SO_4) 干燥, 减压浓缩并通过减压蒸馏纯化, 得到预期的 4-甲基肌氨酸。

实施例 4

海洛因轭合物的制备

PS-61 的制备

I) 去甲海洛因的制备

在 0°C 下, 向海洛因 (10mmol) 的水溶液中加入高锰酸钾 (12mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗后, 使该悬浮液恢复至室温。然后通过过滤除去二氧化锰, 并减压除去溶剂, 得到预期产物去甲海洛因。

ii) 轭合物前体的制备

向去甲海洛因 (10mmol) 的 THF 溶液中逐滴加入 5-溴戊酸乙酯 (20mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗后, 减压除去溶剂。然后残余物用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期的去甲海洛因的酯加合物。

iii) 轭合物的制备

将该酯 (15mmol) 溶于 5% 甲醇并向其中加入氢氧化钠 (15mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗后, 通过仔细加入 1M 盐酸将 pH 调节到 pH2, 然后用乙酸乙酯萃取。(MgSO_4) 干燥并减压除去溶剂后, 该产物利用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期游离酸。

向该游离酸 (1.55×10^{-4} 摩尔) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中依次加入 DIEA (3.1×10^{-4} 摩尔) 和 HATU (1.86×10^{-4} 摩尔)。室温下 10

分钟后,将该淡黄色溶液滴加到在 4ml pH8.5 的 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠缓冲液中的 rCTB(2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.5×10^{-6} 摩尔赖氨酸])中。该混合物在室温下保持 1 小时,然后在 4℃下用 PBS 中和并充分渗析得到 PS-61。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定,以确定半抗原的数目。

实施例 5

PS-62 和 PS-63 的制备

(I) 前体的制备

在 0℃, 向海洛因 (10mmol) 的干燥 THF 溶液中滴加正丁基锂 (1.5mmol, 1.6M 己烷溶液)。所得混合物在 0℃放置 2 小时,然后在 10 分钟内滴加 4-溴丁酸乙酯 (22mmol) 的 THF 溶液。将所得混合物加热,直到用 TLC 检验表明起始物已消耗。之后,将该反应混合物冷却到 0℃并仔细加入 10% 盐酸。将两层分离,水层用乙酸乙酯萃取。合并后的有机萃取液依次用 1M 氢氧化钠水溶液、水和盐水洗涤。干燥 (MgSO_4) 后,减压除去溶剂,残余物用硅胶快速色谱法纯化,得到两种产物,一种邻位和一种间位的芳香乙酸酯基。

(ii) PS-62 的制备

将邻位加合物的酯 (5mmol) 溶于 5% 甲醇并向其中加入氢氧化钠 (5mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗后,通过仔细加入 1M 盐酸将 pH 调节到 pH2,然后用乙酸乙酯萃取。(MgSO_4) 干燥并减压除去溶剂后,该产物利用硅胶快速色谱法纯化,得到预期游离酸。

向该游离酸 (1.55×10^{-4} 摩尔) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中依次加入 DIEA (3.1×10^{-4} 摩尔) 和 HATU (1.86×10^{-4} 摩尔)。室温下 10 分钟后,将该淡黄色溶液滴加到在 4ml pH8.5 的 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠缓冲液中的 rCTB(2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.5×10^{-6} 摩尔赖氨酸])中。该混合物在室温下保持 1 小时,然后在 4℃下用 PBS 中和并充分渗析得到 PS-62。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定,以确定半抗原的数目。

(iii) PS-63 的制备

将间位加合物的酯 (5mmol) 溶于 5% 甲醇并向其中加入氢氧化钠 (5mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗后, 通过仔细加入 1M 盐酸将 pH 调节到 pH2, 然后用乙酸乙酯萃取。(MgSO₄) 干燥并减压除去溶剂后, 该产物利用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期游离酸。

向该游离酸 (1.55×10^{-4} 摩尔) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中依次加入 DIEA (3.1×10^{-4} 摩尔) 和 HATU (1.86×10^{-4} 摩尔)。室温下 10 分钟后, 将该淡黄色溶液滴加到在 4ml pH8.5 的 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.5×10^{-6} 摩尔赖氨酸]) 中。该混合物在室温下保持 1 小时, 然后在 4℃ 下用 PBS 中和并充分渗析得到 PS-63。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定, 以确定半抗原的数目。

实施例 6

PS-64 的制备

I) 乙酰化可待因的制备

向可待因 (10mmol) 的二氯甲烷溶液中加入三乙胺 (12mmol), 接着加入乙酸酐 (12mmol)。用 TLC 检测表明起始物已消耗后, 减压除去溶剂, 残余物用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期的乙酰化产物。

ii) 乙酰化可待因的脱甲基化

向该乙酰化产物 (10mmol) 的二氯甲烷溶液中滴加三溴化硼 (12mmol, 1.0M 二氯甲烷溶液)。用 TLC 检测表明起始物已消耗后, 仔细加入无水甲醇并将该混合物减压浓缩。将残余物溶于甲醇, 再次减压浓缩, 然后用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期的醇。

iii) 脱甲基乙酰化可待因的琥珀酰化

向该醇 (10mmol) 的二氯甲烷溶液中依次加入三乙胺 (20mmol) 和琥珀酸酐 (20mmol)。所得混合物回流加热直到用 TLC 检验表明起始物已消耗。之后, 减压除去溶剂, 残余物用硅胶快速色谱法纯化, 得到预期的半琥珀酸酯。

iv) PS-64 的制备

向该半琥珀酸酯 (1.55×10^{-4} 摩尔) 的 DMF 溶液 (0.4ml) 中依次加入 DIEA (3.1×10^{-4} 摩尔) 和 HATU (1.86×10^{-4} 摩尔)。室温下 10 分钟后, 将该淡黄色溶液滴加到在 4ml pH8.5 的 0.1M 硼酸钠, 0.15M 氯化钠缓冲液中的 rCTB (2mg, 3.4×10^{-8} 摩尔 [15.5×10^{-6} 摩尔赖氨酸]) 中。该混合物在室温下保持 1 小时, 然后在 4℃ 下用 PBS 中和并充分渗析得到 PS-64。该轭合物利用激光解析质谱分析进行测定, 以确定半抗原的数目。

实施例 7

检测 CTB 的功能活性的测定

为了检验单独的 CTB 的功能活性, 进行两种测定试验。首先, 利用流式细胞计测量 CTB 对细胞的结合。细胞用 CTB 孵育后, 接着用商业上获得的抗-CTB 山羊抗血清和异硫氰酸荧光素 (FITC)-标记的抗山羊次级抗体孵育 (图 13)。天然五聚体的 CTB 与细胞结合, 使得荧光强度显著位移。在该测定中单体 CTB 不能与细胞结合。其次, 用 ELISA 来测量 CTB 结合神经节甾酯 GM1 的能力。ELISA 板用 GM1-神经节甾酯涂覆并用不同浓度的 CTB 孵育。利用抗-CTB 抗体 (或用盐水作为对照) 检测结合情况, 接着用酶标记的次级抗体进行检测, 并用培养基使其发育。该测定提供了对五聚体的 CTB 结合 GM1 神经节甾酯的能力的定量和极灵敏的测量。这些测定用来在进行体内试验前监控重组和半抗原化 CTB 轭合物的功能活性。

实施例 8

与其他药物的联合治疗

关于海洛因滥用的治疗, 我们进行了筛选以确定用第二种药物一起治疗的药物疗法是否将增强该治疗疫苗的活性。我们期望用阿片制剂拮抗剂诸如纳洛酮和纳曲酮, 以及其他拮抗剂诸如纳洛芬、左洛啡烷、环佐辛、丁丙诺啡和喷他佐辛一起治疗与用海洛因轭合物的治疗是相容的。一种或多种治疗剂可能是免疫抑制的, 因此抑制高效价的抗海洛因抗体应答的产生。为了了解这种可能性, 大鼠在有或没有共同治疗药物的条件下用海洛因载体轭合物进行免疫接

种，并在不同时间测量抗体效价。被发现将显著免疫抑制的联合治疗药物将作为配伍禁忌的治疗而排除。该筛选试验用于考虑联合治疗的任何药物。

如果没有看到免疫抑制，将进行进一步的筛选以确定这两种方法是否有协同作用。经过培养、免疫接种和检验后，用两种模型在药物的存在下进一步对大鼠进行评定。大鼠在接受不同剂量的海洛因之前将接受药物。用对照的载体免疫的大鼠进行初始试验以选择出不会完全消灭自我服用行为或药物辨别系统的药物的剂量。对数据进行评估以确定共同治疗是否增加了治疗疫苗的作用。

实施例 9

粘膜应答的产生

霍乱毒素的 B 亚单位 (CTB) 已在许多系统中显示出能保留完整霍乱毒素的活性，包括产生粘膜抗体应答。因此，该载体应诱导强烈的抗-海洛因或抗-尼古丁 IgA 抗体应答。另外，口服初期应诱导强烈的系统性 IgG 抗体应答。

在呼吸道中引发免疫应答的有效方式是将抗原直接递送到这些部位。该抗原加入盐水中给药，CTB 作为自身佐剂。为了确认 CTB 给药后在粘膜 IgA 表面引发的能力，单独用载体进行初始试验。小鼠通过口头、鼻或气管内三种途径用 50 μ g CTB 或者海洛因-CTB 或尼古丁-CTB 轭合物引发。对于口服给药的小鼠，胃内给予 250 μ g 海洛因-CTB 或尼古丁-CTB 轭合物或者单独的 CTB，或者通过使用一个钝的 23G 针直接给到胃。引发后第 14 天，利用相同的方案给小鼠加强免疫。经鼻给药是一种简单而常用的引发途径。将抗原应用到轻度麻醉的小鼠的每只鼻孔，每只小鼠所用的总体积为 50 μ l。引发后第 14 天，利用相同的方案给小鼠加强免疫。经鼻给药适于作为鼻喷雾剂应用于人。经鼻免疫已成功地用于活流感疫苗 (Walker 等, (1994) 疫苗 12:387-399)。

气管内免疫直接将抗原应用到下呼吸道，由此增强肺中的免疫性。用氯胺酮和赛拉嗪的混合物将小鼠麻醉。将这些动物安置在一

个设备上，使它们的嘴张开并暴露出气管；用光导纤维灯探针对气管进行目测检验。用一个钝的 23 号针将 50 μ l 溶液递送到肺中。引发后第 14 天，利用相同的方案给小鼠加强免疫。

在加强免疫后的不同时间点（14、21 或 28 天）通过 CO₂ 窒息将这些动物处死，收集鼻和支气管肺泡的灌洗液并测定对所给予的轭合物特异性的 IgA。如（Tamura 等，（1989）疫苗 7:257-262）所述，用总量 1ml PBS 将鼻腔洗涤四次而得到鼻洗液。如（Nedrud 等，（1987）免疫学杂志 139:3484-3492）所述，通过手术暴露出气管，将 0.5ml PBS 注射到肺中并冲洗三次，从而得到支气管肺泡的灌洗液。离心除去细胞后，利用 IgA-特异性次级抗体通过 ELISA 测定这些样品的抗原-特异性 IgA。测量鼻和肺洗液中的海洛因-特异性或尼古丁-特异性 IgG，正如已经报道的那样，IgG 在肺中可频繁地检测到且是重要的（Cahill 等，（1993）FEMS 微生物学快报 107:211-216）。

口头免疫途径是用于评估其在肠洗液中产生海洛因-特异性或尼古丁-特异性 IgA 的能力，并与其他途径比较其产生对海洛因或尼古丁具有特异性的血清 Ig 的能力。口服给药在人类中是特别优选的，因为其给药容易。直接对比鼻内和气管内给药途径，比较它们在肺或鼻灌洗液中诱导 IgA 应答的能力。无论哪种途径是最有力的，优选其并用于剩余试验。如果两种途径效力差不多，则优选经鼻免疫，因为其简单。

为了最大地保护性对抗海洛因或尼古丁，可将系统性 IgG 和粘膜 IgA 应答最大化。因此，用在明矾（或其他一些佐剂）中的海洛因-CTB 或尼古丁-CTB 轭合物系统性注射和用轭合物粘膜攻击都是优选的以有效地引发两个隔间。用三组进行对比。第一组，将小鼠系统性引发，14 天后粘膜攻击。第二组，小鼠用粘膜引发，14 天后系统性攻击。第三组，它们在相同时间系统性和粘膜引发，14 天后同样加强。对照小鼠仅粘膜引发或仅系统性引发。在每种情况下，通过测量 IgG 和 IgA 抗体效价来确定攻击效力。

作为粘膜抗-海洛因或抗-尼古丁抗体的体内效力的初步测量，分别测量粘膜给予的海洛因或尼古丁的药物动力学变化。

实施例 10

小鼠的免疫的免疫球蛋白的被动转移

小鼠利用实施例中所所述的最佳免疫方案用海洛因轭合物进行免疫。在不同时间将小鼠放血并用 ELISA 评定抗-海洛因抗体的效价。将抗体效价约为 54,000 或以上的动物处死并通过心脏穿刺采血。对照小鼠用单独的载体蛋白进行免疫。将多个（至少 20 只）小鼠的血清集中并通过硫酸铵沉淀分离出 IgG 部分。渗析除去硫酸铵后，利用 ELISA 定量测定集中的免疫球蛋白部分中可卡因-特异性抗体的水平。原初小鼠腹腔或静脉注射不同量的免疫球蛋白，24 小时后，对这些接受小鼠采血并测定血清以确定可卡因-特异性抗体的水平。用这种方法，确定了必须转移以达到所给效价的抗体的量。给各组小鼠免疫的免疫球蛋白并在不同时间采血以确定抗原-特异性抗体的清除率。其他组小鼠如实施例中所所述用放射标记的海洛因攻击，并测量分布到脑中的海洛因。对照小鼠接受来自载体免疫的小鼠的 IgG。这些实验证明了被动转移的免疫的免疫球蛋白抑制海洛因进入脑中的能力。

实施例 11

人体中免疫的免疫球蛋白的被动转移

利用实施例中所所述的最佳免疫方案用本发明的轭合物对受试者进行免疫接种。在不同时间，对这些供体通过静脉穿刺术采血并用 ELISA 测定抗-半抗原抗体的效价。将从多个供体获得的超免疫血浆集中并通过冷乙醇分馏分离出 IgG 级分。象人类使用的超免疫抗体制备需要的那样通过缓冲、稳定化、保护和标准化来制备抗体。利用 ELISA 或其他基于抗体的测定将抗-半抗原抗体的水平标准化。

将合适剂量的纯化抗体肌肉或静脉注射给予 20 名患者，伴有或不伴有半抗原-CTB 疫苗，但作为疫苗不是在相同的解剖学部位。合适的剂量通过利用 ELISA 或其他基于抗体的测定检测试验患者人群

中接受者的血清水平来确定,测定在注射超免疫抗体制剂后 24 小时或其他合适的时间点进行,和/或通过测定抑制海洛因或尼古丁作用的不同剂量的有效性来确定。

被动转移的免疫球蛋白抑制了患者体内海洛因或尼古丁的作用。供体库中人供体、多克隆抗体和大量供体的使用限制了患者对转移的抗体的免疫应答的机会。

实施例 12

rCTB 的制备级纯化

将由 SBL Vaccin AB 提供的从霍乱弧菌获得的、在 0.22M 磷酸盐 pH7.3, 0.9% NaCl 缓冲液中的 rCTB 渗滤到 20mM 磷酸钠, pH6.5 中。样品利用阳离子交换色谱在 Pharmacia SP 琼脂糖快速流动树脂上纯化,用缓冲液 A: 20mM 磷酸钠, pH6.5 和缓冲液 B: 20mM 磷酸钠, pH6.5, 1.0M NaCl 作为洗脱缓冲液。纯化的部分利用 SDS-PAGE 进行分析测定,用 Daichi 银染色剂染色。纯化的样品通过 0.22 微米过滤器过滤并在 4℃ 下无菌储存。

实施例 13

方法 A (分析的) 用下述方法制备用于分析型反相 HPLC (RP HPLC) 的样品: 通过加入 1.0ml 绝对乙醇并在 -80℃ 冷冻过夜使 100μl 轭合物 CTB-5.200 沉淀。该轭合物在 4℃ 以 14000rpm 的速度旋转 20 分钟,然后轻轻倒出乙醇并将所得沉淀空气干燥。将这些小丸再悬浮于 25μl 带有 0.1% 三氟乙酸(TFA)的 20% 乙腈中,并通过 Pierce Mixro BCA 测定测量蛋白质浓度。

该轭合物利用 C18 反相柱 (Vydac No. 218TP5215 窄孔) 2.1×150mm; 颗粒大小: 5U, 流速: 200μl/分钟; 缓冲液 A: 100% 水 0.1% TFA; 缓冲液 B: 80% 乙腈, 0.08% TFA 进行分析测定。梯度从 16% 开始,在 50 分钟内升高到 56%, 60 分钟时升高到 80%, 并保持 10 分钟。

方法 B (半制备) 如下制备用于半制备型 RP HPLC 的样品: 将两瓶亲液的 CTB-5.200 再悬浮于 20% 乙腈 0.1% TFA 中, 无菌过滤,

并利用 Pierce Micro BCA 定量。利用 C18 柱 (Vydac No. 218TP1520) 10 × 50mm; 颗粒大小: 5U1, 流速: 1.8ml/分钟; 缓冲液 A: 水中的 0.1% TFA; 缓冲液 B: 80% 乙腈中的 0.08% TFA 制备用于半制备型 RP HPLC 系统的两种 1.24mg 注射剂。使用下述逐步梯度: 20% B 10 分钟, 35% B 40 分钟, 55% B 5 分钟, 用 100% B 洗涤 5 分钟结束。合并最高值并立即冷冻干燥。

实施例 14

半抗原化对免疫原性的水平

轭合物中药物半抗原与载体蛋白的比例可改变该轭合物刺激半抗原-特异性抗体产生的能力。改变轭合反应以生成具有数种不同半抗原化水平的海洛因-CTB 轭合物。利用该轭合物的质谱分析计算半抗原化程度。筛选这些轭合物在免疫原性试验中的生物学活性并利用质谱分析半抗原化水平。通过不同方法利用与载体蛋白相比不同比例的半抗原化试剂制备轭合物。对比半抗原化和免疫原性的水平。

等同物

本领域技术人员至多利用常规实验就可识别出,或能确定本文中描述的特异性物质和方法的大量等同物。这样的等同物也被认为在本发明的范围内,并由以下权利要求所覆盖。

CJ#	分支	变量
CJ0	Q	Q=H, OH, CH ₂ , 卤素, COOH, 载体蛋白, 修饰载体蛋白
CJ1	(CH ₂) _n Q	Q=H, COOH, 卤素, 2-硝基-4-磺苯基酯, N-羟丁二酰亚氨基(N-oxysuccinimidyl)酯, 载体蛋白, 修饰载体蛋白, CJ1.2
CJ1.1	CO ₂ Q	Q=H, CH ₃
CJ1.2	COQ	Q=H, 卤素, 1-氧-2-硝基-4-磺苯基, N-羟丁二酰亚氨基, N-马来酰亚氨基, 载体蛋白, CJ10
CJ2	OCO(CH ₂) _n Q	Q=COOH, 卤素, 2-硝基-4-磺苯基酯, N-羟丁二酰亚氨基酯, 载体蛋白, 修饰载体蛋白
CJ2.1	OCOCH=Q	Q=H
CJ2.2	OCOCH(O)CH ₂	
CJ2.3	OCO(CH ₂) _n CH(O)CH ₂	
CJ3	CO(CH ₂) _n COQ	Q=H, OH, 卤素, 1-氧-2-硝基-4-磺苯基, N-羟丁二酰亚氨基, N-马来酰亚氨基, 载体蛋白, CJ10
CJ3.1	CO(CH ₂) _n CNQ	Q=OCH ₃ 或载体蛋白
CJ4	OCO(CH ₂) _n CNQ	Q=H, OH, 卤素, 1-氧-2-硝基-4-磺苯基, N-羟丁二酰亚氨基, N-马来酰亚氨基, 载体蛋白, CJ10
CJ4.1	CO(CH ₂) _n CNQ	Q=OCH ₃ 或载体蛋白
CJ5	CH ₂ OCO(CH ₂) _n COQ	Q=H, OH, 卤素, 1-氧-2-硝基-4-磺苯基, N-羟丁二酰亚氨基, N-马来酰亚氨基, 载体蛋白, CJ10
CJ5.1	CO(CH ₂) _n CNQ	Q=OCH ₃ 或载体蛋白
CJ6	CONH(CH ₂) _n Q	Q=H, COOH, 卤素, 2-硝基-4-磺苯基酯, N-羟丁二酰亚氨基酯, 载体蛋白, 修饰载体蛋白
CJ7	Y(CH ₂) _n Q	Y=S, O, NH; Q=卤素, COOH, 载体蛋白, 修饰载体蛋白
CJ7.1	CH ₂ Y(CH ₂) _n Q	Y=S, O, NH; Q=卤素, COOH, 载体蛋白, 修饰载体蛋白
CJ8	OCOCH(OH)CH ₂ Q	Q=载体蛋白, 修饰载体蛋白
CJ8.1	OCO(CH ₂) _n CH(OH)CH ₂ Q	Q=载体蛋白, 修饰载体蛋白
CJ9	OCOC ₆ H ₅	
CJ11	YCO(CH ₂) _n COQ	Y=S, O, NH; Q=OH, 载体蛋白, 修饰载体蛋白或卤素

图 1A

所选分支的可供选择的表示

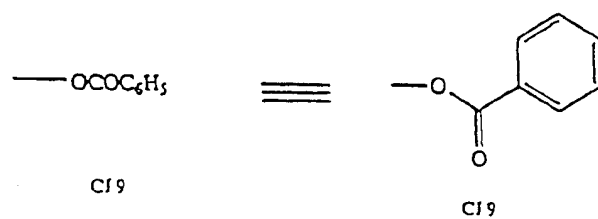
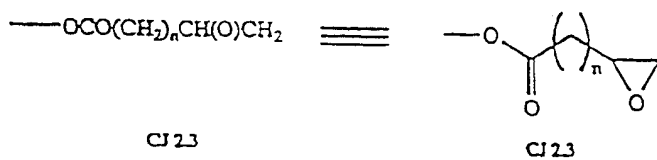
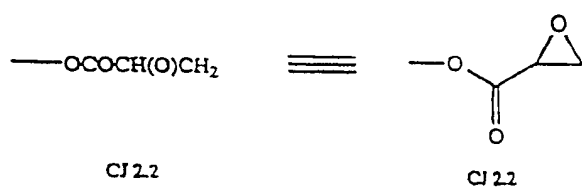
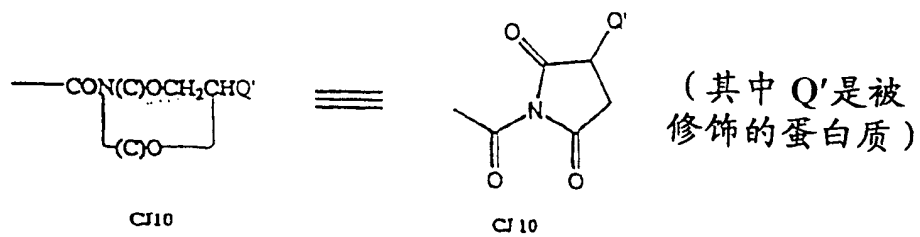


图 1B

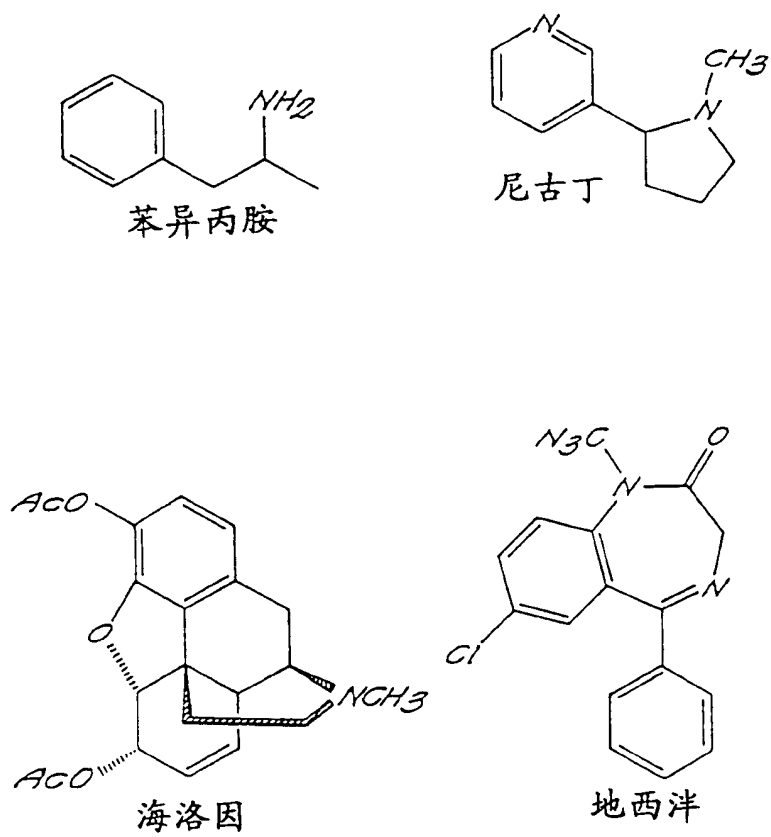


图 3

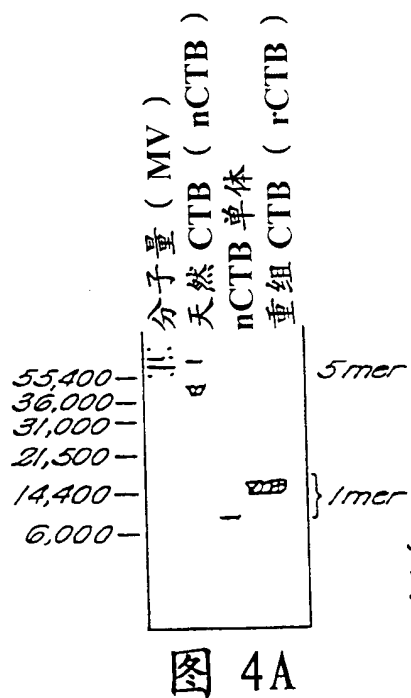


图 4A

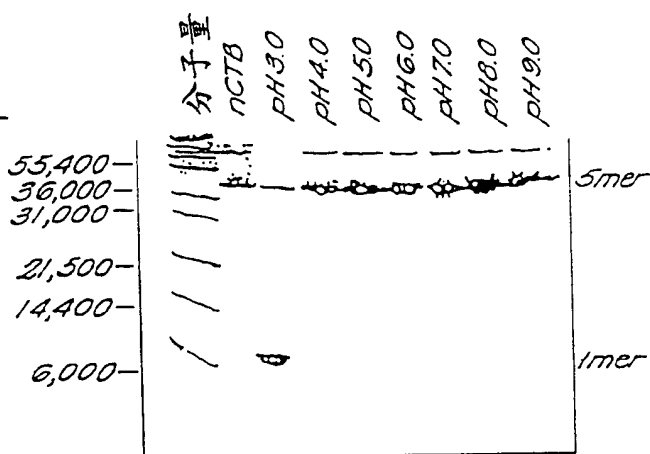


图 4B

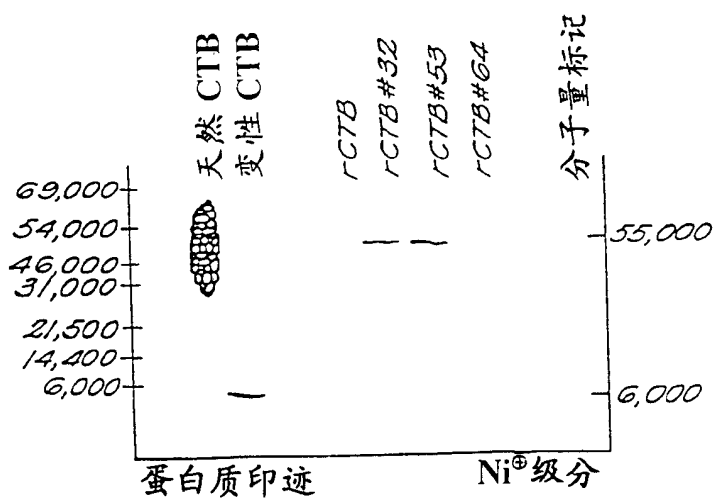


图 4C

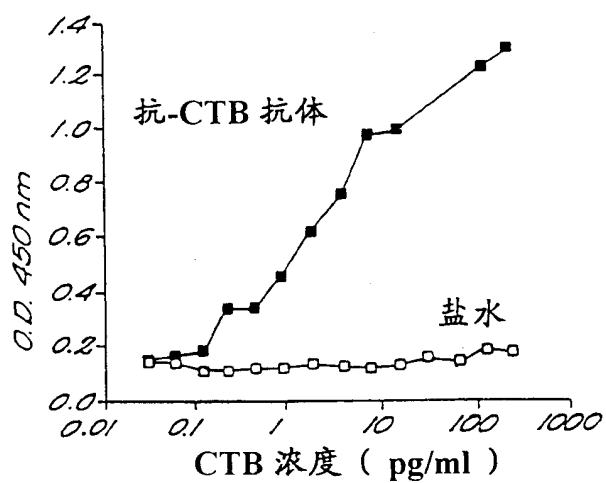


图 5A

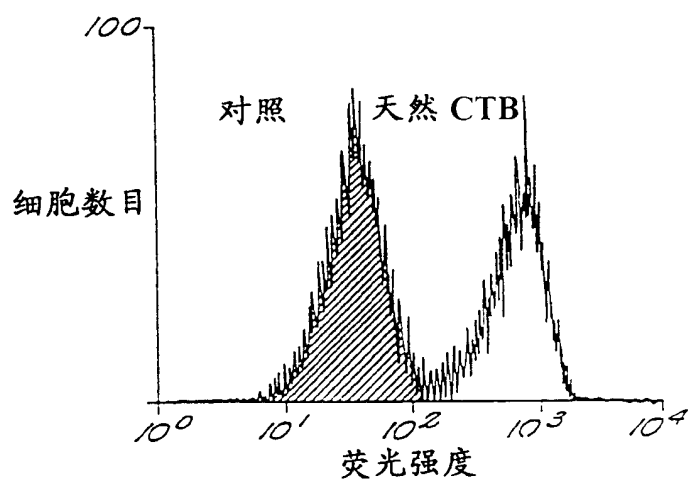


图 5B

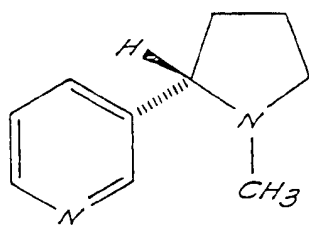


图 6A

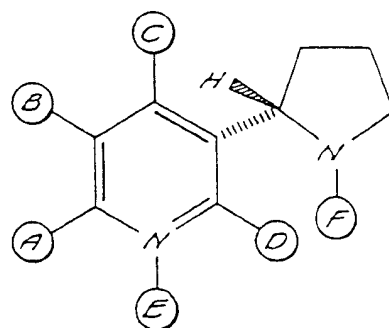


图 6B

	A	B	C	D	E	F
PS-51	CJ1, 其中 Q=C00H 而 n=2-8, 优选 n=4; 或 Q=CJ1.2, 其中 Q=含有 T 细胞表位的载体	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	-	CJ0, 其中 Q=CH ₃
PS-52	CJ0, 其中 Q=H	CJ1, 其中 Q=C00H 而 n=2-8, 优选 n=4; 或 Q=CJ1.2, 其中 Q=含有 T 细胞表位的载体	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	-	CJ0, 其中 Q=CH ₃
PS-53	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ1, 其中 Q=C00H 而 n=2-8, 优选 n=4; 或 Q=CJ1.2, 其中 Q=含有 T 细胞表位的载体	CJ0, 其中 Q=H	-	CJ0, 其中 Q=CH ₃
PS-54	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	-	CJ3, 其中 Q=OH 或含有 T 细胞表位的载体, n=2
PS-55	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ1, 其中 Q=H 或含有 T 细胞表位的载体, n=3	CJ0, 其中 Q=CH ₃
PS-56	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ1, 其中 Q=H 或含有 T 细胞表位的载体, n=4	CJ0, 其中 Q=CH ₃

图 7A

	A	B	C	D	E	F
PS-57	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ1, 其中 Q=II 或含有 T 细胞表位的载体, n=5	CJ0, 其中 Q=Cl ₃
PS-58	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ1, 其中 Q=II 或含有 T 细胞表位的载体, n=7	CJ0, 其中 Q=Cl ₃
PS-59	CJ11, 其中 Y=NI _{II} , Q=OI _{II} 或含有 T 细胞表位的载体, n=2-8, 优选 n=3	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	-	CJ0, 其中 Q=Cl ₃
PS-60	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	CJ0, 其中 Q=II	-	CJ1, 其中 Q=C00II 或 Q=CJ1.2, 其中 Q=含有 T 细胞表位的载体, n=2-8, 优选 n=4

图 7B

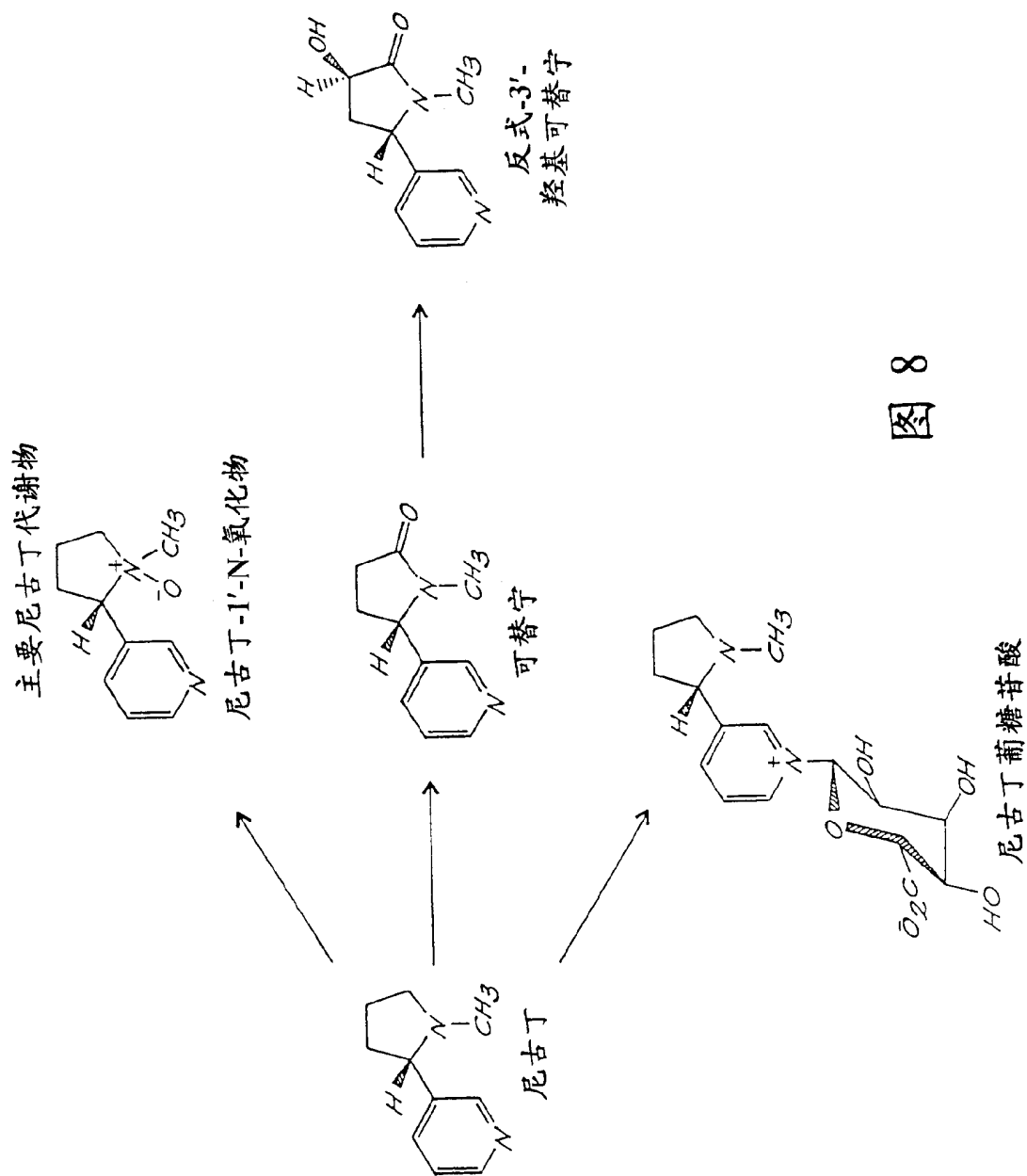


图 8

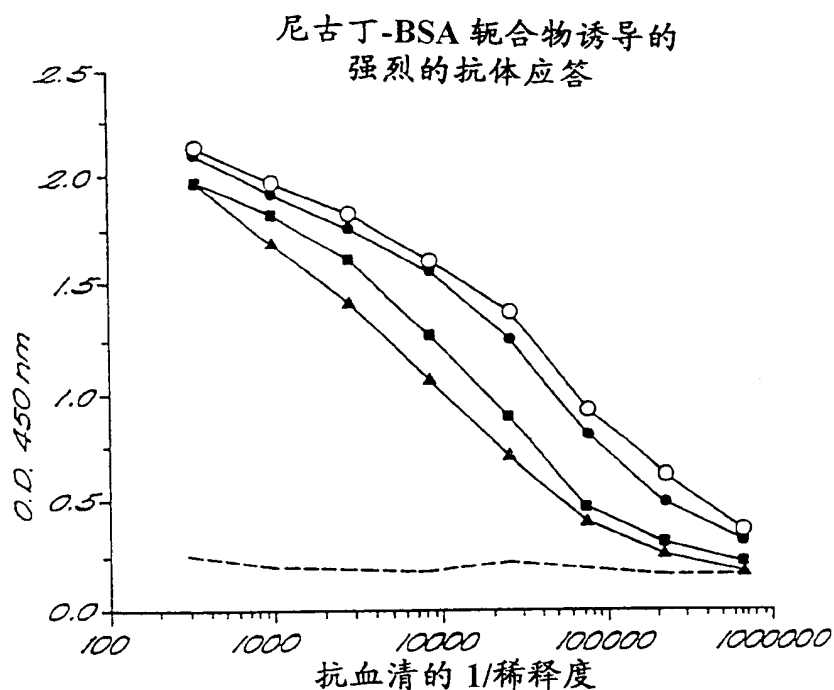


图 9A

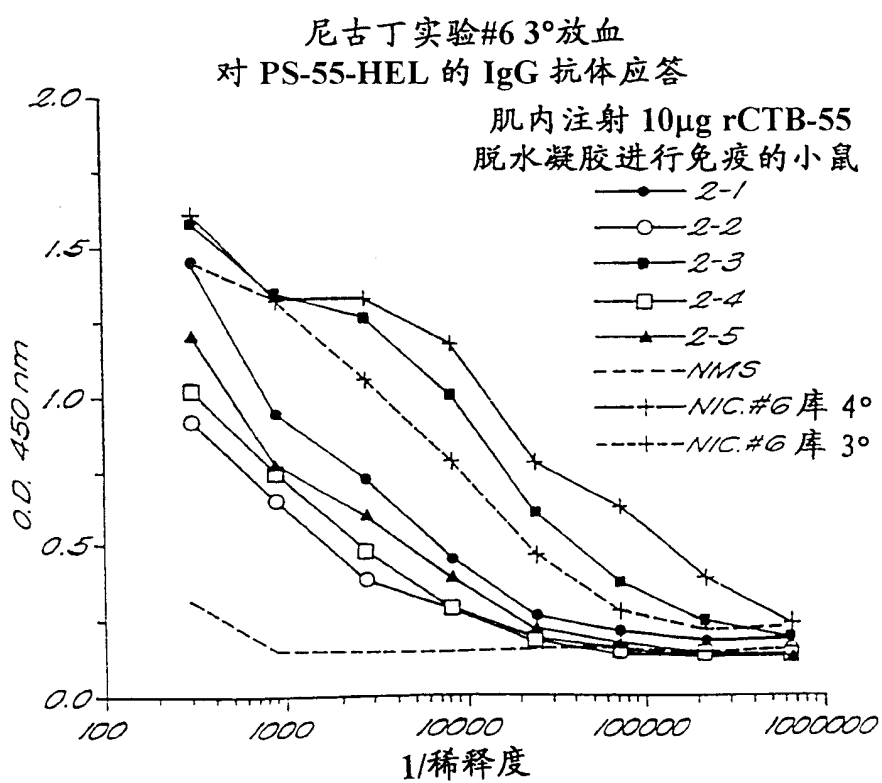


图 9B

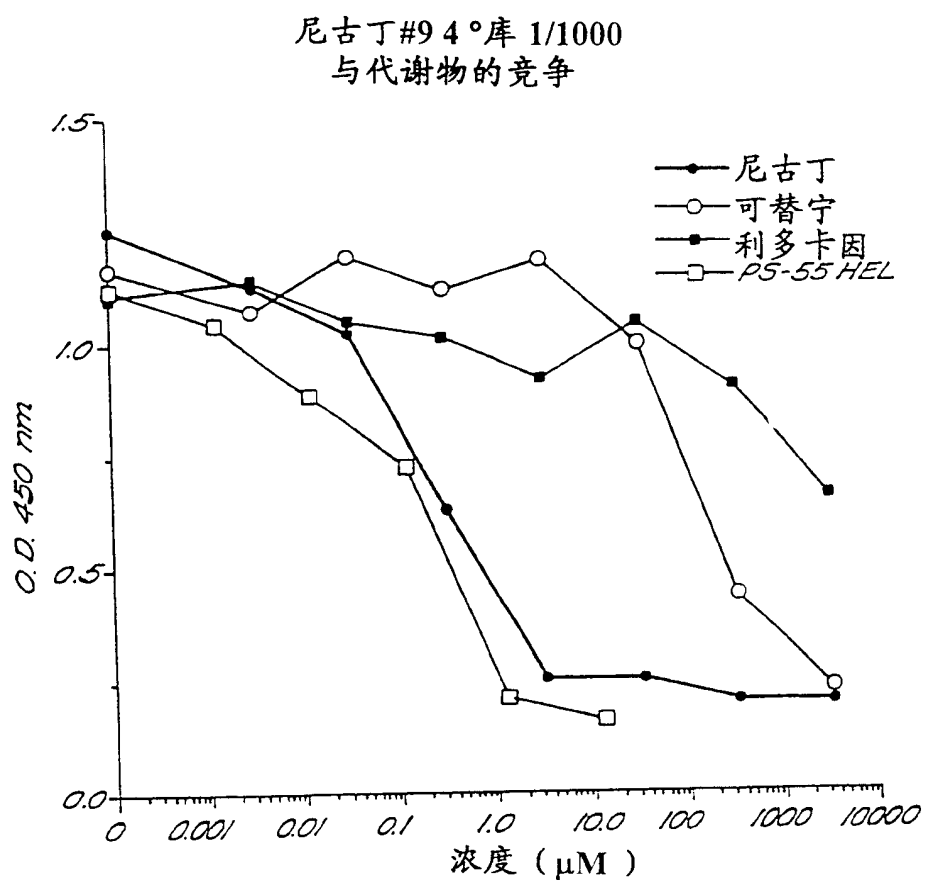


图 10

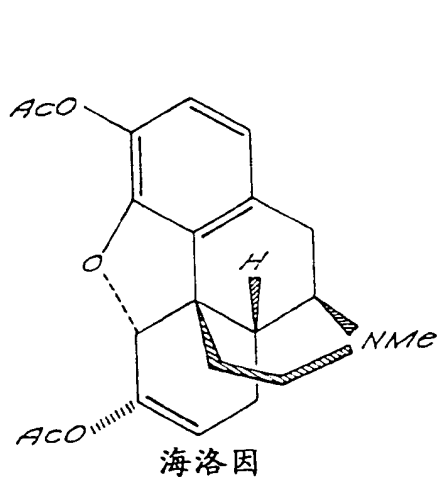


图 11A

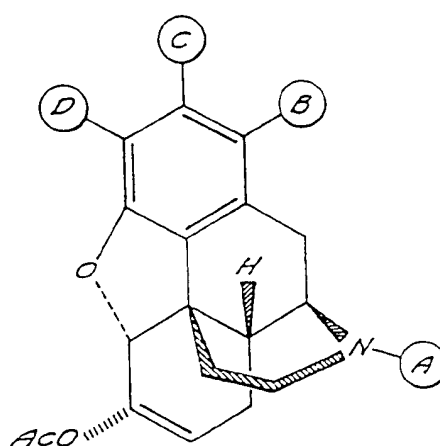


图 11B

	A	B	C	D
PS-61	CJ1, 其中 Q=C00H 或 Q=CJ1.2 而 n=2-8, 优选 n=4, 其中 Q=含有 T 细胞表位的载体	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ2, 其中 Q=H 而 n=1
PS-62	CJ0, 其中 Q=CH ₃	CJ0, 其中 Q=H	CJ1, 其中 Q=C00H 或 Q=CJ1.2 而 n=2-8, 优选 n=4, 其中 Q=含有 T 细胞表位的载体	CJ2, 其中 Q=H 而 n=1
PS-63	CJ0, 其中 Q=CH ₃	CJ1, 其中 Q=C00H 或 Q=CJ1.2 而 n=2-8, 优选 n=4, 其中 Q=含有 T 细胞表位的载体	CJ0, 其中 Q=H	CJ2, 其中 Q=H 而 n=1
PS-64	CJ0, 其中 Q=CH ₃	CJ0, 其中 Q=H	CJ0, 其中 Q=H	CJ4, 其中 n=2 而 Q=0H 或 Q=含有 T 细胞表位的载体

图 12