



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110452217 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 27

(21) 申请号 201910630434.2

(22) 申请日 2015.05.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110452217 A

(43) 申请公布日 2019.11.15

(30) 优先权数据
62/000,312 2014.05.19 US

(62) 分案原申请数据
201580026158.9 2015.05.19

(73) 专利权人 斯克利普斯研究院
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 金姆·D·扬达
乔纳森·W·洛克尼尔

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 李献忠 张静

(51) Int.Cl.
C07D 401/04 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2016375131 A1, 2016.12.29
WO 9961054 A1, 1999.12.02
CN 102933237 A, 2013.02.13
Pryde et al.. Selection of a Novel
Anti-Nicotine Vaccine: Influence of
Antigen Design on Antibody Function in
Mice.《PLOS ONE》.2013,第8卷(第10期),1-16.

审查员 李占成

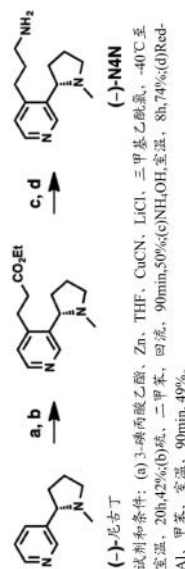
权利要求书1页 说明书18页 附图5页

(54) 发明名称

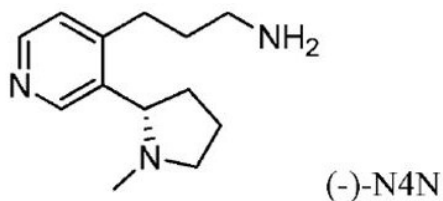
用于尼古丁疫苗开发的光学纯半抗原

(57) 摘要

本发明提供用于在(-)-尼古丁特异性患者中产生抗体的手性半抗原(-)-3'-AmNic和(-)-N4N。该半抗原可以与合适的载体蛋白缀合,并作为任选包含佐剂的抗原混合物施用到患有尼古丁或烟草成瘾或习惯症的患者。



1. 一种制备式(-)-N4N的化合物的方法

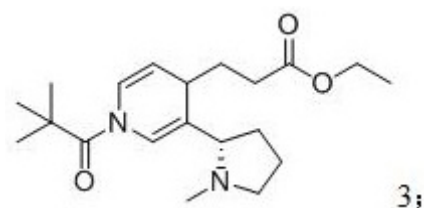


包含步骤:

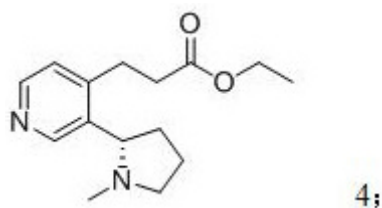
(A1) 用锌处理3-碘丙酸乙酯的THF溶液,然后用氰化铜(I)和氯化锂处理;

(A2) 使(-)-(S)-尼古丁与THF中的三甲基乙酰氯接触,其中(-)-(S)-尼古丁与三甲基乙酰氯的摩尔比为1:1;

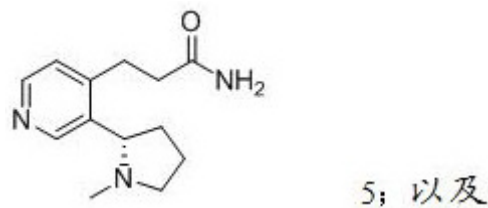
(A3) 将步骤A1和A2的产物混合,得到反应混合物,用10% NH_4OH 水溶液淬灭该反应混合物,用EtOAc萃取水层,并纯化合并的有机层,得到式3化合物:



(B) 将根据式3的化合物与硫在二甲苯中回流90分钟,其中硫与根据式3的化合物的摩尔比为1.3:1,冷却所得反应混合物,并纯化该混合物以产生根据式4的化合物:



(C) 将式4化合物的 NH_4OH 溶液搅拌8小时,纯化该溶液得到式5化合物:



(D) 使式5化合物的甲苯溶液与双(2-甲氧基乙氧基)氢化铝钠接触90分钟,其中双(2-甲氧基乙氧基)氢化铝钠与式5化合物的摩尔比为4.5:1,用水淬灭所得溶液,并纯化所得混合物以产生根据式(-)-N4N的化合物。

用于尼古丁疫苗开发的光学纯半抗原

[0001] 本申请是申请号为201580026158.9,申请日为2015年5月19日,申请人为斯克利普斯研究院,发明创造名称为“用于尼古丁疫苗开发的光学纯半抗原”的发明专利申请的分案申请。

背景技术

[0002] 根据世界卫生组织,全世界有超过10亿的吸烟者,并且吸烟每年造成近600万人死亡。(1)经济影响也发人深省:仅在美国,吸烟在医疗费用和损失的生产力上每年花费接近3,000亿美元。(2)很好理解长期使用烟草和各种疾病之间的流行病学联系,虽然许多吸烟者希望戒烟,但是目前可用的戒烟辅助没有多大帮助。合成的小分子激动剂或拮抗剂靶向尼古丁依赖性涉及的脑受体。(3-5)中枢作用的这些药物产生一系列副作用。(6)

[0003] 同时,我们一直在寻求药代动力学(基于抗体)取代药代动力学(基于药物)的策略来辅助吸烟者努力以戒烟。(7)尼古丁在对吸烟突然产生上瘾中发挥中心作用。尼古丁疫苗刺激免疫系统以识别尼古丁作为外源抗原,引发改变尼古丁药代动力学的抗体。抗尼古丁抗体降低血液中游离尼古丁的浓度并防止其进入中枢神经系统。阻断大脑奖励系统的激活可以有利于消除成瘾行为,产生更好的戒烟结果。临床批准的尼古丁疫苗将是对现有工具的补充,当适当利用时,可以提供显著更好的持续戒烟率。

[0004] **NicVAX[®]**代表迄今为止临床上最先进的尼古丁疫苗,持续发展通过III期。(8-11)它很安全并有良好的耐受性,但只对临床试验参与者中的一小部分有效。(12,13)然而,鉴于临床批准的尼古丁疫苗的巨大前景,研究仍在继续。近年来,许多设计和配方方面都进行了考查,以提供比 **NicVAX[®]** 更好的产品。所做努力包括通过使用较新的佐剂来增强免疫原性(14-17),通过替代给药途径改善实用性(18),以及采用多价策略(19-22)来增强抗尼古丁抗体结合能力。

[0005] 对于旨在赋予针对特定小分子(例如尼古丁)的保护性免疫的疫苗来说,重要的是疫苗具有足够的化学表位同源性。(23-25)其他疫苗可以被改造以便同时靶向多个主要表位,如白喉-破伤风-无细胞百日咳(DTaP)、麻疹-腮腺炎-风疹(MMR),和23价肺炎球菌组合疫苗。(26,27)

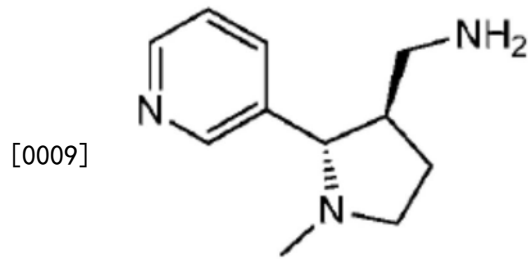
发明内容

[0006] 在各种实施方式中,本发明涉及适用于产生(-)-尼古丁的抗体的半抗原;包含该半抗原的抗原;使用包含该半抗原的抗原制备的抗体;包含抗尼古丁抗原的疫苗;以及包括使用抗尼古丁疫苗/抗原治疗患者的烟草习惯症或成瘾的方法。

[0007] 在各种实施方式中,半抗原与生物碱(-)-尼古丁(烟草(烟草属)的主要药物成分)具有充分的结构相似性,使得例如在人类患者中产生的针对包含本发明的半抗原的抗原的抗体也与(-)-尼古丁反应,因此该抗原可适合于施用到患者以便通过患者的免疫系统产生抗尼古丁抗体。这样的抗体可以用于结合尼古丁,例如来自烟草的吸烟或咀嚼形式,并且阻断对患者的药物作用,该药物作用用于加强患者的药物成瘾。此外,通过使用本发明的抗原

疫苗产生的抗体可以对(-)-尼古丁(即(S)-尼古丁)具有选择性。

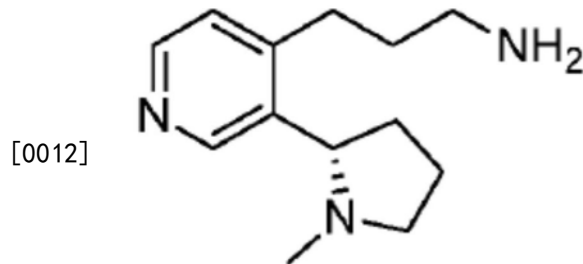
[0008] 在各种实施方式中,本发明提供式(-)-3'-AmNic的半抗原



(-)-3'-AmNic;

[0010] 缀合半抗原,其包括(-)-3'-AmNic,其中(-)-3'-AmNic半抗原经由接头与载体蛋白共价键合;用于施用到患者的抗原,其包括缀合半抗原和任选的佐剂;在患者体内产生的包含对(-)-尼古丁具有免疫亲和力的抗体的抗血清;以及治疗尼古丁或烟草成瘾或习惯症的方法,其包括对患有成瘾或习惯症的患者施用有效量的缀合半抗原或包含缀合半抗原的抗原混合物,使得在患者体内产生对(-)-尼古丁具有亲和力的抗体。

[0011] 在各种实施方式中,本发明提供式(-)-N4N的(-)-尼古丁半抗原



(-)-N4N;

[0013] 缀合半抗原,其包括(-)-N4N,其中(-)-N4N半抗原经由接头与载体蛋白共价键合;用于施用到患者的抗原,其包括缀合半抗原和任选的佐剂;在患者体内产生的包含对(-)-尼古丁具有免疫亲和力的抗体的抗血清;以及治疗尼古丁或烟草成瘾或习惯症的方法,其包括对患有成瘾或习惯症的患者施用有效量的缀合半抗原或包含缀合半抗原的抗原混合物,使得在患者体内产生对(-)-尼古丁具有亲和力的抗体。

附图说明

[0014] 图1示出了用于制备(-)-3'-AmNic和(+)-3'-AmNic的合成方案,然后经由琥珀酸盐接头使它们与破伤风毒素("TT")缀合,并评估其对(-)-尼古丁的特异性。

[0015] 图2示出了用于(-)-N4N的制备和缀合的合成方案。

[0016] 图3描绘了来自疫苗组的抗血清的相对ELISA效价,其是针对两种包被抗原测定的。由符号描绘的每个值是平均值(n=7)。(-)-N4N-SucFliC抗血清抗(-)-N4N-SucBSA包被抗原的平均效价归一化为1.0,并且所有其它数据点均表示相对于该抗血清/包被抗原组合的平均ELISA效价。

[0017] 图4示出放射免疫测定(RIA)(-)-3'-AmNic和(+)-3'-AmNic的结合亲和力曲线。

[0018] 图5是总结了在小鼠中四种尼古丁疫苗相对于盐水对照的抗伤害作用测定的结果的图。所示出的每个棒为平均值(n=7),误差棒为SEM(平均值标准误差)。使用未校正的Fisher's LSD进行常规单因素方差分析,(-)-N4N-SucFliC对比盐水:*P<0.05。

[0019] 图6总结了用于测定四种尼古丁疫苗在降低尼古丁在小鼠中的作用的功效的低温测定的结果。所示出的每个棒为平均值 ($n=7$)，误差棒为SEM (平均值标准误差)。使用Dunnett多重比较测试进行双因素随机方差分析，用于注释疫苗组对比盐水的 $*P<0.05$ ，用于注释疫苗组对比盐水 $**P<0.005$ ，用于注释疫苗组对比盐水 $***P<0.0001$ 。

具体实施方式

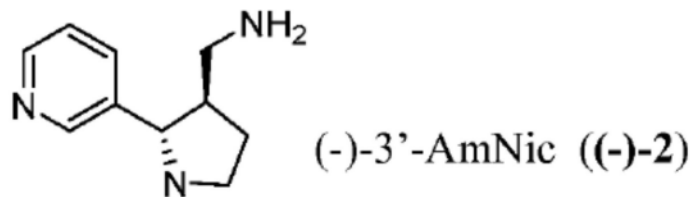
[0020] 本发明的半抗原-载体缀合物和抗原组合物特异地和选择性地仅靶向(-)-尼古丁；因此，根据本发明，根据本文所述的实施方式的疫苗有效地引发能够仅隔离(sequestering) (-)-尼古丁的抗体。在将近一个世纪前，Landsteiner首先认识到抗体能够对映体区分(enantiodifferentiate)的观点(28,29)，并且继续被利用到现在。这种工作包括对映选择性催化抗体(30-32)和对尼古丁(33)和可卡因的立体特异性mAb。(34-36)在尼古丁mAb研究的情况下，使用(S)-(-)-[3H]尼古丁选择杂交瘤，从而优化抗体对天然存在的异构体的特异性。(33)本发明在开发尼古丁疫苗中利用抗体对映体区分的能力。

[0021] 已经经历临床评价的许多尼古丁疫苗开始于处理外消旋反式可替宁羧酸((±)-1,图1)。然而，在制备将成为NicVAX[®]的半抗原-蛋白缀合物中没有包括手性分离步骤(也没有不对称合成步骤)。本发明令人惊讶地显示，非外消旋的、完全的(-)-尼古丁疫苗缀合物由于抗体对立体区分的精确能力而成为优越的免疫原。

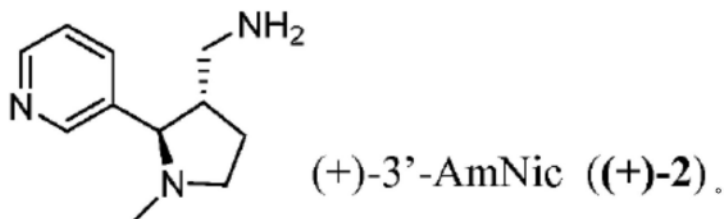
[0022] 半抗原

[0023] 本发明中使用的术语“半抗原”是低分子量有机化合物，其本身不能引起免疫应答。然而，一旦连接到载体分子，它将引发免疫应答。根据一些实施方式，半抗原经由接头连接到载体。

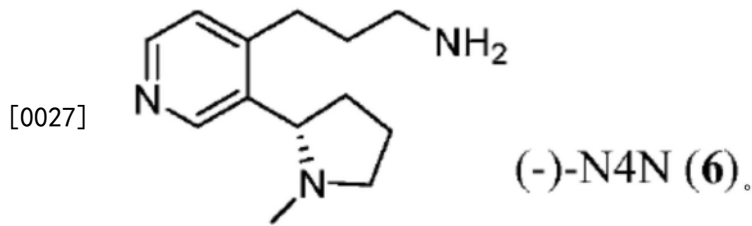
[0024] 根据一个实施方式，本发明的半抗原是尼古丁衍生物，即反式-3'-氨基甲基尼古丁(3'-AmNic)。根据一个实施方式，例如，半抗原是反式-3'-氨基甲基尼古丁的单一对映异构体，特别是(-)-3'-AmNic。两种对映体如下所示：



[0025]



[0026] 在其它实施方式中，半抗原是(S)-3-(3-(1-甲基吡咯烷-2-基)吡啶-4-基)丙-1-胺，(-)-N4N，如下所示：



[0028] 与上文所示的任一3'-AmNi半抗原中的吡咯烷环的3'-位上的接头连接位置对比,通过将接头连接位置定位在尼古丁的吡啶环上的C4位,没有引入新的sp³立体中心。因此,不会引入额外的立体化学复杂性。使用(-)-尼古丁作为合成(-)-N4N的起始材料,以及通过进行在该尼古丁半抗原的整个化学合成中保持对映体纯度的合成转化所得到的(-)-N4N的另一个优点:省去了手性分离步骤(图2)。此外,接头本身,亚甲基(连接至C4位的CH₂)的性质是优越的,因为其不以杂原子(例如氧)在该位置处的方式电子扰乱尼古丁的吡啶环。因此,考虑了空间和立体电子两方面,其目的是凭借这种新颖的尼古丁半抗原设计引起更好的抗尼古丁抗体应答(更高的效价或浓度、更高的亲和力和特异性、优异的尼古丁的药代动力学和药效动力学的功能拮抗作用)。

[0029] 缀合物

[0030] 根据一些实施方式,尼古丁半抗原使用或不使用接头而直接连接至载体。例如,单个尼古丁半抗原可以连接到载体蛋白上的每个可用的氨基。使用同双功能或异双功能交联剂将半抗原直接缀合到载体蛋白上的一般方法是本领域公知的,例如通过G.T.Hermanson在Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996) 中以及Dick和Beurret在Conjugate Vaccines. Contribu. Microbiol. Immunol., Karger, Basal (1989) vol. 10, 48-114中所公开的。

[0031] 使用双功能交联剂的直接缀合物通常导致半抗原与蛋白的摩尔比受到蛋白上可用于特异性缀合化学过程的官能团数目的限制。例如,具有n个赖氨酸部分的载体蛋白理论上存在可用于与交联剂羧基反应的n+1个伯胺(包括末端氨基)。因此,直接缀合导致形成n+1个酰胺键,即最多连接n+1个半抗原。本领域技术人员将认识到,缀合半抗原密度可以取决于用于将尼古丁半抗原与载体蛋白缀合的反应物的浓度和载体蛋白的性质。此外,在给定的尼古丁-载体缀合物制剂中,每种单独缀合物的半抗原/载体比率将存在变化。根据一些实施方式,半抗原密度(缀合的半抗原与蛋白载体的摩尔比)可以为约10至约70、约20至约60、以及约30至约50。

[0032] 载体蛋白

[0033] 根据本文所述的任何实施方式,一旦制备了尼古丁半抗原,接着就将半抗原与载体蛋白缀合,所产生的缀合物将用于产生针对尼古丁载体缀合物的抗体。在一些实施方式中,本发明的载体蛋白通常是任何合适的免疫原性蛋白或多肽。“免疫原性”分子是能够引发免疫应答的分子。例如,在一个实施方式中,载体蛋白是T细胞表位。

[0034] 在其它实施方式中,“载体蛋白”是多抗原肽(MAP),其是分支肽。通过使用MAP,半抗原密度和结合价由于多个分支氨基酸残基而最大化。可用于形成MAP的氨基酸的实例包括但不限于赖氨酸。

[0035] 在一些实施方式中,载体蛋白包括含有至少一个能刺激受试者的T细胞的T细胞表位的分子,其随后诱导B细胞产生针对整个半抗原-载体缀合物分子的抗体。本文使用的术

语“表位”包括抗原上的负责其与抗体分子的特异性相互作用的任何决定簇。表位决定簇通常由分子(如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面基团组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0036] 根据这些实施方式和其他实施方式,载体蛋白基于其引发强免疫原性应答的能力进行选择,使得可以通过本发明的半抗原-载体缀合物治疗多种患者群体。例如,载体蛋白必须是足够外源的,以引起对疫苗的强免疫应答。通常,在这方面,载体蛋白是能够赋予共价连接的半抗原免疫原性的大分子。

[0037] 本领域技术人员已知的缀合物疫苗中的许多蛋白适用于本发明。例如,在一些实施方式中,载体是用于制备治疗性缀合物疫苗的载体,例如许多病原性细菌的毒素及其类毒素。实例包括白喉和破伤风毒素及其医学上可接受的相应的类毒素。在其它实施方式中,载体是牛血清白蛋白(BSA)或钥孔血蓝蛋白(KLH),当在动物中进行实验时,这两者通常用作开发缀合物疫苗中的载体。在其它实施方式中,蛋白是鞭毛丝结构蛋白(FliC)。

[0038] 根据其他实施方式,载体是与细菌毒素在抗原性上相似的蛋白,通常称为交叉反应材料(CRM)。

[0039] 半抗原与载体蛋白的缀合

[0040] 根据一些实施方式,本发明的尼古丁半抗原-载体缀合物通过使一个或多个半抗原与载体蛋白反应以产生半抗原载体缀合物来制备。

[0041] 使用多种官能团以促进载体与本发明的半抗原的连接或缀合。这些包括官能部分例如羧酸、酸酐、混合酸酐、酰卤、酰基叠氮化物、烷基卤化物、N-马来酰亚胺、亚氨基酯、异氰酸酯、胺、硫醇和异硫氰酸酯以及能够与蛋白分子的反应性基团形成共价键的其他官能部分。根据一些实施方式,取决于所使用的官能部分,反应性基团是载体蛋白或修饰的载体蛋白分子上的赖氨酸残基的氨基或巯基,其在反应时导致酰胺、胺、硫醚、脒基脲或硫脲键形成。其它合适的活化基团和缀合技术是本领域公知的(Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press, Inc. (1991); Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press: 1996; 和 Dick and Beurret in Conjugate Vaccines. Contrib. Microbiol. Immunol., Karger, Basel (1989) vol. 10, 48-114.)

[0042] 在一些实施方式中,接头是用于半抗原与载体蛋白缀合的线性部分。例如,接头是琥珀酰基部分。接头的另一个实例是己二酸二酰肼(ADH)。

[0043] 抗血清和抗体

[0044] 根据一些实施方式,本发明的抗血清包含响应于抗原产生的抗体,抗原本身包含本文所述的半抗原-载体缀合物。在本文中,制备单克隆抗体的技术是本领域公知的。例如,单克隆抗体可以通过以下来获得:用包含尼古丁半抗原-载体缀合物的组合物注射小鼠,随后通过去除血清样品来验证抗体产生的存在,去除脾脏以获得B淋巴细胞,使B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤,克隆杂交瘤,选择产生针对半抗原-载体缀合物的抗体的阳性克隆,培养产生针对抗原的抗体的克隆,以及从杂交瘤培养物中分离抗体。

[0045] 或者,可以通过多种成熟的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化单克隆抗体。所述技术包括使用蛋白-A琼脂糖的亲和色谱、尺寸排阻色谱和离子交换色谱(Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3; Baines等人, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104

(The Humana Press, Inc. 1992))。

[0046] 用于制备多克隆抗体的技术也是本领域公知的。通常,例如,向动物注射免疫原性物质,然后收集富含抗体的血清,其中含有针对注射的免疫原的许多表位的抗体混合物。合适的用于产生抗体的宿主哺乳动物包括但不限于人、大鼠、小鼠、兔和山羊。

[0047] 根据本发明的一些实施方式,也可以利用功能性抗体片段。通过包括用酶(如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)消化和/或通过化学还原裂解二硫键的方法产生片段。

[0048] 或者,本发明包括的抗体片段可以使用自动化肽合成仪合成,例如由Applied Biosystems、Multiple Peptide Systems等商业供应的那些自动化肽合成仪,或者它们可以使用本领域公知的技术人工产生(Geysen等人J. Immunol. Methods 102:259(1978))。根据本发明的单克隆抗体的重链和轻链的可变区的氨基酸序列的直接测定可以使用常规技术进行。

[0049] 根据本发明的一些实施方式的片段是F_v片段。抗体的F_v片段由抗体的重链(V_h)的可变区和抗体的轻链(V_l)的可变区组成。抗体的蛋白水解切割可产生双链F_v片段,其中V_h和V_l区保持非共价缔合并保留抗原结合能力。F_v片段还包括重组单链抗体分子,其中轻链和重链可变区通过肽接头连接(Skerra等人Science, 240, 1038-41(1988))。根据本发明的其它实施方式的抗体片段包括缺少完整抗体的Fc片段的Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂。

[0050] 治疗方法

[0051] 因为尼古丁在穿过血脑屏障后会发挥它的许多显著效果,所以本发明提供了用于防止尼古丁穿过血脑屏障的治疗方法和用途。尤其是,向患者施用尼古丁半抗原-载体缀合物产生针对患者血流中的尼古丁的抗体。

[0052] 或者,在合适的宿主哺乳动物中和将被治疗的患者体外产生的抗尼古丁抗体可以施用于患者。如果患者抽烟,他的血液中的尼古丁将被循环的抗尼古丁抗体结合,从而防止尼古丁到达大脑。因此,抗体防止在大脑中产生的尼古丁的生理和心理作用。因为吸烟者将经历这些作用的减轻或停止,他/她将失去吸烟的愿望。如果患者在用本发明的尼古丁半抗原-载体缀合物免疫后使用无烟烟草,则产生相同的治疗效果。此外,本发明的缀合物和抗体通过影响尼古丁刺激外周神经系统的能力发挥其作用。

[0053] 半抗体-载体缀合物的施用

[0054] 本发明的缀合物适合用于治疗 and 预防尼古丁成瘾。为了治疗尼古丁成瘾,向患有尼古丁成瘾的患者施用本发明的尼古丁-载体缀合物。为了防止尼古丁成瘾,用根据本发明的缀合物治疗具有发展尼古丁成瘾风险的患者,例如青少年。向患者直接施用缀合物称为“主动免疫”。

[0055] 本发明的疫苗组合物包含至少一种尼古丁半抗原-载体缀合物,其量足以引起对其的免疫应答。所述尼古丁半抗原载体缀合物能够以足以对随后摄入的尼古丁具有活性的浓度保留在体内。

[0056] 用本发明的尼古丁半抗原载体缀合物初次接种产生高效价的对尼古丁具有特异性的抗体。施用于需要治疗尼古丁成瘾的患者的缀合物的治疗有效量由本领域技术人员容易地确定。合适的剂量范围是1-1000μg/剂。通常需要患者服用一至数周以产生针对外来抗原的抗体。可以通过使用本领域技术人员熟知的技术,例如ELISA、放射免疫测定(RIA)和Western印迹方法,监测患者血液中抗体的产生。还可以通过评估尼古丁的各种物理效应

(例如血压)来监测治疗有效性。

[0057] 如下面详细描述,可以加工本发明的尼古丁半抗原-载体缀合物以提供向患者施用的组合物。根据一些实施方式,施用模式包括但不限于鼻内、气管内、口服、皮肤、经粘膜、皮下注射和静脉内注射。本领域技术人员将认识到,初次注射之后可以随后施用一或多次缀合物的“加强剂(booster)”。加强剂增加针对本发明的尼古丁半抗原-载体缀合物的抗体的产生。

[0058] 在一些实施方式中,本发明的疫苗或抗血清组合物包含至少一种佐剂。选择佐剂使得不抑制载体蛋白的作用。佐剂是人类生理上可接受的佐剂;这些包括但不限于明矾、QS-21、皂苷和MPLA(单磷酸脂质A)。

[0059] 根据其它实施方式的疫苗组合物任选地包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。例如,赋形剂包括无菌水、盐溶液(如盐水)、磷酸钠、氯化钠、乙醇、阿拉伯树胶、植物油、苜蓿醇、聚乙二醇、明胶、甘露醇、碳水化合物、硬脂酸镁、粘性石蜡(viscous paraffin)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素和缓冲剂中的一种或多种。本领域技术人员已知的任何其它赋形剂可用于本发明。

[0060] 将本发明的半抗原-载体缀合物掺入用于施用到需要治疗或预防尼古丁成瘾的患者的药物组合物中。当含有半抗原-载体缀合物的组合物用于注射时,例如,将半抗原-载体缀合物溶解在药学上可接受的pH下的水性盐溶液中。然而,可以使用半抗原-载体缀合物的可注射悬浮液。除了通常的药学上可接受的赋形剂之外,所述组合物可以含有任选的组分以确保纯度、增强生物利用度和/或增加渗透。

[0061] 在一些实施方式中,疫苗组合物任选地含有至少一种助剂,例如分散介质、包衣、微球、脂质体、微胶囊、脂质、表面活性剂、润滑剂、防腐剂和稳定剂。本领域技术人员已知的任何另外的助剂在本发明中是有用的。本文还可用的是起到协同本发明疫苗组合物的作用的任何试剂。

[0062] 本发明的药物组合物是无菌的,并且足够稳定以耐受储存、分配和使用。另外,组合物可以含有另外的组分,以保护组合物免受微生物的感染和生长。例如,所述组合物以冻干粉末的形式制造,所述冻干粉末仅在给药之前由药学上可接受的稀释剂复溶(reconstituted)。制备无菌可注射溶液的方法是本领域技术人员公知的,包括但不限于真空干燥、冷冻干燥和旋转干燥。这些技术产生活性成分以及掺入预混物中的任何额外的赋形剂的粉末。

[0063] 施用抗体

[0064] 被动免疫包括施用或暴露于响应于本发明的尼古丁半抗原载体缀合物而产生的多克隆抗体或单克隆抗体。这样的抗体可以在动物或人体产生。可以施用响应于本发明的尼古丁缀合物而产生的抗体以防止对尼古丁的成瘾。例如,可以将这样的抗体施用给被认为有发展尼古丁成瘾风险的人,例如青少年。抗体也适合于治疗对尼古丁成瘾的患者。如上所述,抗体结合血液中的尼古丁,并防止尼古丁穿过血脑屏障。根据一些实施方式,通过施用本发明的半抗原-载体缀合物产生的抗体具有约150kDa至约1,000kDa的分子量范围。

[0065] 施用于需要治疗尼古丁成瘾的患者的本发明的治疗性抗体的治疗有效量由本领域技术人员容易地确定。合适的剂量范围是1-1000 μ g/剂。

[0066] 根据本发明的一些实施方式的治疗组合物包含响应于本发明的尼古丁载体缀合

物而产生的至少一种抗体。组合物任选地含有一种或多种药学上可接受的赋形剂。有用的赋形剂包括无菌水、盐溶液(如盐水)、磷酸钠、氯化钠、醇、阿拉伯树胶、植物油、苜醇、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、羟甲基纤维素和缓冲剂。本领域技术人员已知的任何其它赋形剂可用于本发明。

[0067] 为了被施用到需要治疗或预防尼古丁成瘾的患者,将本发明的抗体掺入药物组合物中。包含抗体的组合物可以在药学可接受的pH下于水性盐溶液中配制以用于注射。然而,可以使用抗体的可注射悬浮液。除了通常的药学上可接受的赋形剂之外,组合物含有任选的组分以确保纯度、增强生物利用度和/或增加渗透。

[0068] 包含本发明的抗体的药物组合物是无菌的,并且足够稳定以经受储存、分配和使用。另外,组合物任选地含有另外的组分,以保护组合物免受微生物的感染和生长。制备无菌可注射溶液的方法是本领域技术人员公知的,包括但不限于真空干燥、冷冻干燥和旋转干燥。这些技术产生活性成分以及掺入预混物中的任何额外的赋形剂的粉末。

[0069] 实施例

[0070] 以下实施例构成本发明的另外的实施方式。因此,实施例旨在说明,而不以任何方式限制本文所述的发明。

[0071] 一般程序

[0072] 化学。除非另有说明,否则所有反应均使用无水条件用干燥溶剂在氩气气氛下进行。大多数化学品购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)并按原样使用。鞭毛蛋白(FliC)在内部制备。破伤风类毒素(TT)购自Statens Serum Institut(Copenhagen,Denmark)。产率是指色谱(HPLC)和光谱(^1H NMR)同质($\geq 95\%$)材料。通过使用UV光作为可视化试剂在0.25mm E.Merck硅胶板(60F-254)上进行薄层色谱(TLC)监测反应。使用E.Merck硅胶(60,粒径0.040-0.063mm)进行快速柱色谱法。将有机溶剂在旋转蒸发器上减压浓缩,然后使用双级机械泵进一步抽空。NMR谱在具有DCH CryoProbe(600MHz)仪器或Bruker BioSpin DRX(500MHz)仪器的Bruker Avance III HD上记录,并使用残留的未氘代溶剂作为内标进行校准(CD_3OD @ $\delta 4.87\text{ppm}$ ^1H NMR, $\delta 49.00\text{ppm}$ ^{13}C NMR)。以下缩写(或其组合)用于解释 ^1H NMR多重性:s=单峰,d=双峰,t=三重峰,m=多重峰。通过电喷雾离子化飞行时间反射器实验在Agilent LC/MSD TOF质谱仪上记录高分辨率质谱(HRMS)。在Thermo Scientific Nicolet 380FTIR光谱仪上记录IR光谱。

[0073] 生物学。将每种半抗原-蛋白缀合物与硫代磷酸化的胞嘧啶-硫代磷酸酯-鸟嘌呤寡脱氧核苷酸("CpG ODN")1826(Eurofins MWG Operon)混合,并在pH 7.4PBS中稀释至1.0mg/mL。然后,逐滴加入等体积的2%的铝胶(Alhydrogel)(vac-alu-50,InvivoGen),然后轻轻倒置10分钟。以这种方式制备的疫苗,每100 μL 的完整制剂包含50 μg 的缀合物、50 μg 的CpG和20 μL 的铝胶。

[0074] 实施例1:(-)-3'-AmNic的合成

[0075] 首先,从市售可得的外消旋反式-尼古丁羧酸((\pm)-1)制备外消旋反式-3'-氨基甲基尼古丁(3'-AmNic,(\pm)-2)。接下来,使用手性超临界流体色谱法(SFC),将约600mg的(\pm)-2分离成约250mg的每种对映异构体(图1)。

[0076] 实施例2:(-)-3'-AmNic破伤风类毒素缀合物和疫苗

[0077] A.缀合物。鉴于我们以前将含羧酸盐的尼古丁半抗原偶联到载体蛋白上的经验

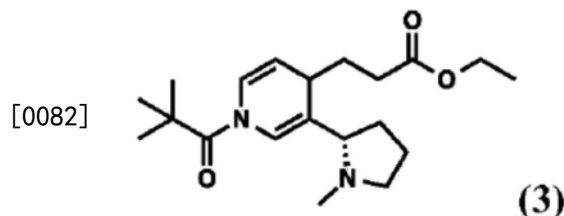
(37-39), 我们试图在本文中做同样的事。为此, 将根据实施例1制备的2的每种对映异构体用琥珀酸酐酰化。然而, 琥珀酰化的半抗原的活化和与破伤风类毒素 (“TT”) 混合使得到的缀合物具有低的半抗原密度。

[0078] 因此, 我们采用另一种编排 (方案1, 插图), 其中载体蛋白 (而不是半抗原) 首先被琥珀酰化。(17, 40, 41) 因此, 用琥珀酸酐在 pH 8.65 Tris 缓冲液中处理 TT 得到 SucTT。然后, 在 pH 5.80 的 2- (N-吗啉代) 乙磺酸 (“MES”) 缓冲液中用 1-乙基-3- (3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 和 (-) -2 或 (+) -2 处理 SucTT, 用 pH 7.4 的 PBS 进行最终透析。该方法产生适合于如下所述的具有佐剂的制剂的分别量的 (-) -3'-AmNicSucTT 和 (+) -3'-AmNicSucTT (通过 MALDI-TOF 分析得出半抗原密度 > 40)。

[0079] B. 疫苗。将如上所述的两种半抗原-蛋白缀合物中的每一种与硫代磷酸化的 CpG ODN 1826 (42-44) (Eurofins) 混合, 并在 pH 7.4 的 PBS 中稀释至 1.0 mg/mL。然后, 小心地逐滴加入等体积的 2% 的铝胶 (InvivoGen), 随后轻轻倒置较短时间 (10 分钟)。以这种方式制备的疫苗每 200 μ L 的完整制剂包含 100 μ g 的缀合物、100 μ g 的 CpG 和 100 μ 的 L 铝胶。(45)

[0080] 实施例3: (S) -3- (3- (1-甲基吡咯烷-2-基) 吡啶-4-基) 丙-1-胺 ((-) -N4N, 6)

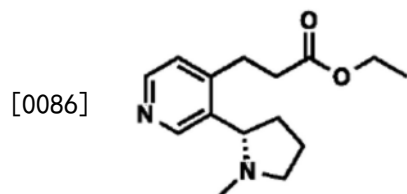
[0081] A. 3- (3- ((S) -1-甲基吡咯烷-2-基) -1-新戊酰-1,4-二氢吡啶-4-基) 丙酸乙酯 (3)



[0083] 用锌粉 (2.04g, 31.2mmol) 处理于 THF (40mL) 中的 3-碘丙酸乙酯 (5.93g, 26mmol) 溶液。然后, 加入于 THF (40mL) 中的氰化铜 (I) (1.79g, 20mmol) 和氯化锂 (1.78g, 42mmol)。同时, 在单独的烧瓶中, 用三甲基乙酰氯 (2.41g, 20mmol) 处理于 THF (80mL) 中的 (-) - (S) -尼古丁 (3.24g, 20mmol)。将两个烧瓶的内容物混合并搅拌过夜。

[0084] 将反应混合物冷却至 0 $^{\circ}$ C, 然后通过加入 10% NH_4OH 水溶液 (150mL) 淬灭。将混合物过滤, 并将滤液真空浓缩。用 EtOAc (3 \times 100mL) 萃取剩余的水层, 并用 10% NH_4OH 水溶液 (100mL)、饱和 NaHCO_3 水溶液 (100mL) 和盐水 (100mL) 洗涤经合并的有机层, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并真空浓缩。通过快速色谱法 (硅胶, 90:10:1EtOAc/MeOH/ NH_4OH) 纯化, 得到浅黄色半固体状的标题化合物 (2.93g, 42%)。 $R_f = 0.70$ (硅胶, 90:10:1EtOAc/MeOH/ NH_4OH)。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.23 (s, 1H), 7.12 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H), 4.98 (dd, $J = 8.0, 5.0\text{Hz}$, 1H), 4.09 (q, $J = 7.3\text{Hz}$, 2H), 1.34 (s, 9H), 1.23 (t, $J = 7.0\text{Hz}$, 3H)。 LCMS (ES-API) 正离子模式: 观察到 349.2 $[\text{M} + \text{H}^+]$ 。

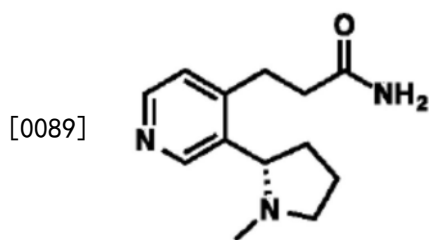
[0085] B. (S) -3- (3- (1-甲基吡咯烷-2-基) 吡啶-4-基) 丙酸乙酯 (4)



[0087] 在室温下用硫粉 (0.35g, 10.8mmol) 处理 3 (2.93g, 8.32mmol) 于二甲苯 (12.5mL) 中的溶液。将所得混合物在回流下搅拌 90 分钟, 然后冷却至室温。通过快速色谱 (硅胶, 90:10:

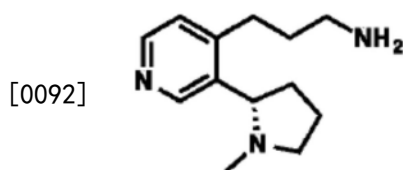
0→90:10:1EtOAc/MeOH/NH₄OH) 纯化, 得到浅黄色油状的标题化合物 (1.09g, 50%)。R_f=0.58 (硅胶, 90:10:1EtOAc/MeOH/NH₄OH)。 $[\alpha]_D = -115^\circ$ (c 2.0, EtOH)。IR (纯) ν_{\max} 2969, 2939, 2777, 1730, 1592, 1178, 1158, 1042, 831 cm⁻¹。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 8.77 (s, 1H), 8.39 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.05 (d, J=5.1Hz), 4.14 (q, J=7.1Hz, 2H), 3.46-3.36 (m, 1H), 3.34-3.26 (m, 1H), 3.00 (t, J=7.9Hz, 2H), 2.60 (t, J=7.9Hz, 2H), 2.36-2.24 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.06-1.95 (m, 1H), 1.90-1.80 (m, 1H), 1.77-1.66 (m, 1H), 1.25 (t, J=7.2Hz, 3H)。¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 172.4, 149.5, 148.0, 147.3, 136.7, 123.3, 65.6, 60.8, 57.0, 40.7, 34.7, 34.6, 26.8, 22.9, 14.3。C₁₅H₂₂N₂O₂H⁺ [M+H⁺] 的 HRMS (ESI-TOF) 计算值为 263.1754, 实测值为 263.1755。LCMS (ES-API) 正离子模式: 观察到 263.2 [M+H⁺]。

[0088] C. (S)-3-(3-(1-甲基吡咯烷-2-基)吡啶-4-基)丙酰胺 (5)



[0090] 将4 (52mg, 0.20mmol) 于NH₄OH (0.5mL) 中的溶液在室温下搅拌8小时。将溶液真空浓缩。通过快速色谱法 (硅胶, 90:10:0→80:20:2EtOAc/MeOH/NH₄OH) 纯化, 得到无色玻璃状的标题化合物 (35mg, 74%)。R_f=0.17 (硅胶, 90:10:1EtOAc/MeOH/NH₄OH)。 $[\alpha]_D = -110^\circ$ (c 1.14, EtOH)。IR (纯) ν_{\max} 3182, 2954, 1664, 1598, 1411, 1039, 836 cm⁻¹。¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 8.66 (s, 1H), 8.37 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.06 (d, J=5.0Hz, 1H), 5.86 (br s, 1H), 5.52 (br s, 1H), 3.34 (t, J=8.5Hz, 1H), 3.24 (t, J=7.8Hz, 1H), 3.12-2.96 (m, 2H), 2.52 (t, J=7.9Hz, 2H), 2.33-2.21 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.01-1.92 (m, 1H), 1.87-1.80 (m, 1H), 1.73-1.65 (m, 1H)。¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 174.0, 149.8, 148.1, 148.0, 136.5, 123.6, 66.2, 57.1, 40.8, 36.1, 34.4, 27.0, 23.0。C₁₃H₁₉N₃OH⁺ [M+H⁺] 的 HRMS (ESI-TOF) 计算值为 234.1601, 实测值为 234.1601。LCMS (ES-API) 正离子模式: 观察到 234.2 [M+H⁺]。

[0091] D. (S)-3-(3-(1-甲基吡咯烷-2-基)吡啶-4-基)丙-1-胺 (6, (-)-N4N)



[0093] 将5 (11mg, 0.05mmol) 于甲苯 (0.65mL) 中的溶液用Red-A1 (65wt% 于甲苯中, 64 μ L, 0.21mmol, 4.5当量) 处理, 并在室温下搅拌90分钟。得到绿色反应溶液。加入硅藻土 (11mg)、Darco G-60 (6mg) 和H₂O (110 μ L), 并过滤混合物。通过制备薄层色谱 (0.5mm硅胶板, 含2% NH₄OH的4:1CHCl₃/MeOH, 主谱带R_f=0.4) 纯化, 得到浅黄色油状的标题化合物 (5.1mg, 49%)。R_f=0.38 (硅胶, 4:1CHCl₃/MeOH (含2% NH₄OH))。 $[\alpha]_D = -139^\circ$ (c 1.29, EtOH)。IR (纯) ν_{\max} 3332, 3231, 2944, 2873, 2361, 1598, 1560, 1460, 1320 cm⁻¹。¹H NMR (600MHz, CD₃OD) δ 8.61 (s, 1H), 8.29 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.25 (d, J=5.1Hz, 1H), 3.47 (t, J=8.6Hz, 1H), 3.24 (t, J=8.4Hz, 1H), 2.85-2.74 (m, 4H), 2.38-2.32 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.01-1.93 (m, 1H), 1.91-1.86 (m, 1H), 1.85-1.80 (m, 2H), 1.68-1.62 (m, 1H)。¹³C NMR (150MHz, CD₃OD) δ 151.6, 149.4,

148.1, 138.4, 125.6, 66.5, 57.9, 41.5, 40.8, 35.6, 32.8, 29.9, 23.5。 $C_{13}H_{21}N_3H^+[M+H^+]$ 的HRMS (ESI-TOF) 计算值为220.1808, 实测值为220.1808。LCMS (ES-API) 正离子模式: 观察到220.2 $[M+H^+]$ 。

[0094] 实施例4: 半抗原-载体缀合物的制备

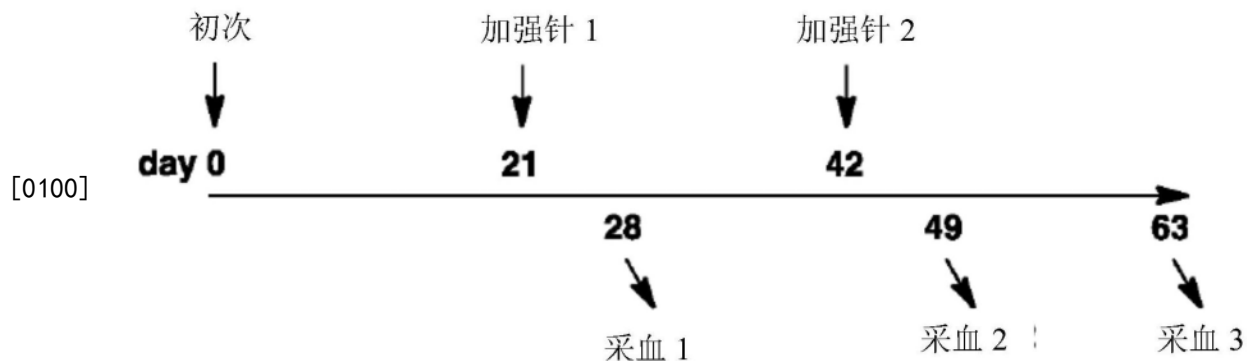
[0095] 在上述实施例2 (A) 中的琥珀酰化步骤后, 将(-)-N4N(6) 和(-)-3'-AmNic((-)2) 分别单独缀合到三种蛋白BSA、FliC和TT。最终半抗原-载体缀合物的半抗原密度为约30至40。

[0096] 免疫接种和免疫测定

[0097] 一般方法。所有动物管理和使用都是在斯克里普斯研究所根据NIH指南并根据实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee) 批准的方案进行。从内部设施获得雄性BALB/c小鼠(每组n=7, 25-30g) 并随机分配至疫苗组或盐水组。在免疫接种时间表期间, 小鼠自由获得食物和水, 免疫接种时间表包括在第0天、第21天和第42天的三次(100 μ L) 皮下注射。在第28天和第49天, 通过尾静脉抽血获得血清样品。在第63天, 将动物麻醉, 通过心脏穿刺放血, 并使其安乐死。

[0098] 实施例5: 免疫接种

[0099] 在实施例2 (A) 和2 (B) 的步骤之后, 制备四种半抗原-蛋白缀合物((-)-N4N-SucFliC、(-)-N4N-SucTT、(-)-3'-AmNic-SucFliC和(-)-3'-AmNic-SucTT), 然后评估为引发抗尼古丁抗体的疫苗免疫原。每种缀合物用铝胶和CpG ODN 1826配制, 并在第0天、第21天和第42天皮下施用到BALB/c小鼠。在第28天、第49天和第63天收集采血, 如下所示:



[0101] 实施例6: 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0102] A. 3'-AmNic缀合物

[0103] 使用(-)-3'-AmNicSucBSA或(+)-3'-AmNicSucBSA进行ELISA和交叉反应性ELISA, 其以与如上所述的TT缀合物类似的方式制备。对于ELISA, 针对它们各自的半抗原测定血浆样品: 在(-)-3'-AmNicSucBSA板上测定来自(-)-3'-AmNicSucTT组的大鼠血浆, 并且在(+)-3'-AmNicSucBSA板上测定来自(+)-3'-AmNicSucTT组的大鼠血浆。

[0104] 对于交叉反应性ELISA, 针对其对映体测定血浆样品: 在(+)-3'-AmNicSucBSA板上测定来自(-)-3'-AmNicSucTT组的大鼠血浆, 在(-)-3'-AmNicSucBSA板上测定(+)-3'-AmNicSucTT组的大鼠血浆。

[0105] 将(-)-3'-AmNic和(-)-3'-AmNic衍生的抗原的ELISA和交叉反应性ELISA的结果总结在下表1中。通过采血2(第49天), 效价约为100,000。此外, 交叉反应性ELISA结果表明效价差异约为3至5倍, 显示在这两组大鼠中产生的血浆抗体具有可测量水平的对映体区分。重要的是, 来自(-)-3'-AmNicSucTT组的血浆具有由(-)-3'-AmNicSucBSA展示的优越的

结合天然(-)-尼古丁的能力。

[0106] 表1. 来自酶联免疫吸附测定(ELISA)的抗体效价的总结

疫苗 ^a	采血 1		采血 2		采血 3	
	自反应	交叉反应	自反应	交叉反应	自反应	交叉反应
[0107] (-)-3'-AmNicSucTT	66,586	15,378	127,450	23,274	164,264	35,120
(+)-3'-AmNicSucTT	40,617	17,220	87,580	27,353	135,964	44,691

[0108] ^a用CpG ODN 1826和铝胶配制;ELISA一式两份(用SEM),每组n=12,中点效价

[0109] B. 抗血清对于同源抗原的特异性

[0110] (-)-N4N-SucBSA和(-)-3'-AmNic-SucBSA被用作ELISA的包被抗原。图3描述了针对两种包被抗原测定的来自每个疫苗组的抗血清的相对ELISA效价。

[0111] 实施例7:放射免疫测定

[0112] 放射免疫测定(RIA)提供了测定可溶性配体的平均结合亲和力和平均抗体浓度的方法。因为配体在分析环境中是可溶的并且自由地缔合/解离,所以其提供超过ELISA的显著优点,其中配体固定在板表面上,更不用说与载体蛋白(例如BSA)缀合。因此,在RIA实验中模拟的平衡环境更接近地模拟在烟草使用期间分布在血液和脑中的游离尼古丁的平衡环境。该领域的研究人员应该常规地进行RIA以评价滥用疫苗制剂的药物的免疫原性功效。

[0113] 通过使用Müller描述的程序的改编的竞争性(RIA)来确定尼古丁-特异性血浆抗体结合亲和力和抗体浓度。(46)首先,测定结合~50%的3H-标记的尼古丁的血浆稀释度。然后,通过与未标记的尼古丁竞争来计算亲和常数。因为针对以上实施例5中描述的每个疫苗组汇集血浆样品,所以所测量的亲和常数是每组的平均亲和力。

[0114] 如图4所示,获得平均结合亲和力(K_{davg})和平均抗尼古丁抗体浓度([Ab]_{avg}),并示于下表2中。通过采血2,在(-)-3'-AmNicSucTT组和(+)-3'-AmNicSucTT组之间观察到约4倍的[Ab]_{avg}差异。在采血2中观察到的约4倍的抗体浓度差异在采血3中仍然保持。有趣的是,注意到ELISA/交叉反应性ELISA结果显示3至5倍的效价差异;这两种免疫测定(ELISA和RIA)的结果彼此相关。

[0115] (-)-组产生优异的ELISA效价和RIA抗体浓度,在整个过程中观察到大约4倍的差异。令人惊讶的是,(+)-组中的(-)-尼古丁的亲和力较高。ELISA结果和RIA结果的研究可能暗示相互矛盾的解释。特别地,似乎令人惊讶的是,对于接受(+)-疫苗的大鼠,尼古丁的结合亲和力更好(更低的K_{davg})。换句话说,(+)-组的血浆抗体似乎比(-)-组的血浆抗体具有略高的对(-)-尼古丁的结合亲和力。这个特征与其他人的发现(47)相一致,他们报道了人类抗尼古丁mAb结合(+)-尼古丁的亲和力比结合(-)-尼古丁的亲和力略高。顺便提及,该mAb(Nic12)来源于另一种临床评价的尼古丁疫苗NicQβ(48),其在II期不符合标准。

[0116] 考虑到尼古丁(不同于可卡因和海洛因)具有更大的构象灵活性,因为其由通过单个碳-碳键连接的两个杂环构成,可以使对测量的K_{davg}值的似乎反直觉的结果合理化。鉴

于这种灵活性,尼古丁的任一对映异构体可以采取适合与抗体的结合位点进行关键结合相互作用的适当构象。对于尼古丁,这些包括用作氢键受体的吡啶基氮和参与电荷-电荷和/或阳离子- π 相互作用的吡咯烷鎓氮。

[0117] 接头连接位置也可以在指导抗半抗原抗体数量和质量中起作用。在其他地方,显示如果吗啡通过其C-3位与载体蛋白偶联,则可待因(3-甲基吗啡)是所得吗啡抗血清的(比吗啡)更有效的抑制剂。(49)在本研究中,尼古丁通过吡咯烷环上的3'-位与蛋白载体连接。(+) -3'-AmNic缀合物中的这种3'-连接可以对抗体引发施加约束,使得测量的抗尼古丁抗体虽然具有较低的量(如预期的),但是对游离(-)-尼古丁比由(-)-3'-AmNic缀合物引发的抗体表现出稍微较高的亲和力。

[0118] 表2. 来自放射免疫测定的抗体结合亲和力和浓度的总结

疫苗 ^a	采血 2			采血 3		
	Kdavg (nM)	[Ab]avg ($\mu\text{g/mL}$)	X (g/mol)	Kdavg (nM)	[Ab]avg ($\mu\text{g/mL}$)	X (g/mol)
[0119] (-)-3'- AmNicSucTT	23.9 \pm 3.2	47.5 \pm 6.6	1.99	250 \pm 22	118 \pm 2.7	0.47
(+)-3'- AmNicSucTT	23.8 \pm 3.2	12.0 \pm 1.2	0.50	111 \pm 9	30.4 \pm 2.6	0.27

[0120] ^a用CpG ODN 1826和铝胶配制;RIA一式三份(使用SEM),每组n=12;X的单位($\mu\text{g/mL/nM}$)简化为g/mol,但不应与摩尔质量混淆

[0121] 作为调节平均抗体亲和力和平均抗体浓度之间的这种表面上差异的方法,我们提出使用复合参数X,其定义为对于给定的抗血清库,[Ab]avg与Kdavg的比率。假设改善疫苗性能的两种方式是引起更高的[Ab]avg(抗体丰度)和更低的Kdavg(抗体效用)值,则当在这些术语中的任一个或两者中进行改进时,比率(X)将变大。因此,对于采血3,(-)-组的X=0.47,而(+)-组的X=0.27。目的是优化给定配体靶的蛋白设计(“抗体效率”);反向(inverse)广泛应用于药物化学:优化给定蛋白靶的配体设计(例如,“配体效率”)。因此,比率(X)是用于评估抗体效率,进而评估疫苗功效的手段。

[0122] 上述数据证明了手性在疫苗设计中的重要性,特别是强调模仿小分子(即(-)-可卡因、(-)-海洛因、(-)-尼古丁或任何其他预期目标)的天然立体化学。因为尼古丁作为配体可以在抗尼古丁抗体的结合位点内以各种取向结合,大概是由于尼古丁本身的构象灵活性的结果,疫苗设计以及接头位置在尼古丁的情况下更具有细微差别。相比之下,可卡因或海洛因中的额外结构约束施加更大的构象刚性,并且观察到抗体对于天然对映异构体与非天然对映异构体的相对结合亲和力的意料之内的结果。

[0123] 实施例8:抗感受伤害测定

[0124] 本实施例的目的是通过测定小鼠爪从热板撤回的潜伏期来证明如上所述的尼古丁疫苗对尼古丁的拮抗作用。

[0125] 根据如上文实施例5中所述的免疫接种时间表,分别用四种疫苗免疫接种四组测试组的小鼠。第五组未接种疫苗(vaccine-naïve)的小鼠在免疫接种时间表期间接受盐水

注射。然后给所有五组小鼠施用尼古丁,然后在热板上测定,以测量爪从热板撤回的潜伏期。

[0126] 每种尼古丁疫苗的抗感受伤害表示为最大可能效应的百分比(“%MPE”)。 $\%MPE = (\text{测试} - \text{基线}) / (\text{截止} - \text{基线}) \times 100$,其中“测试”是治疗后响应的潜伏期;“基线”是在治疗之前响应的潜伏期;以及“截止”是在没有反应的情况下测试结束的预设时间。在上述免疫接种方案之前,获得在五组中每只动物的基线测量值。

[0127] 将结果总结在图5中,显示了尼古丁疫苗相对于盐水在拮抗小鼠受试组中尼古丁的疼痛缓解作用中的功效。

[0128] 实施例8:低体温测定

[0129] 在施用尼古丁后10分钟、30分钟和60分钟测量上述实施例7中所述的5组小鼠的体温。相对于经历最显著的温度下降的盐水对照组,四种测试的尼古丁疫苗通过减轻体温抑制来拮抗尼古丁的作用。结果总结在图6中。

[0130] 引用文件

[0131] (1)World Health Organization.WHO Report on the Global Tobacco Epidemic,2011;World Health Organization:Geneva:World Health Organization, 2011.

[0132] (2)U.S.Department of Health and Human Services.The Health Consequences of Smoking—50Years of Progress:A Report of the Surgeon General; Atlanta:U.S.Department of Health and Human Services,Centers for Disease Control and Prevention,National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion,Office on Smoking and Health,2014.

[0133] (3)Aubin,H.J.;Karila,L.;Reynaud,M.Pharmacotherapy for smoking cessation:present and future.Curr.Pharm.Des.2011,17,1343-50.

[0134] (4)Harmey,D.;Griffin,P.R.;Kenny,P.J.Development of novel pharmacotherapeutics for tobacco dependence:progress and future directions.Nicotine Tob.Res.2012,14,1300-18.

[0135] (5)Aubin,H.J.;Luquiens,A.;Berlin,I.Pharmacotherapy for smoking cessation:pharmacological principles and clinical practice.Br.J.Clin.Pharmacol.2014,77,324-36.

[0136] (6)Hays,J.T.;Ebbert,J.O.Adverse effects and tolerability of medications for the treatment of tobacco use and dependence.Drugs 2010,70, 2357-72.

[0137] (7)Gorelick,D.A.Pharmacokinetic strategies for treatment of drug overdose and addiction.Future Med.Chem.2012,4,227-43.

[0138] (8)Hatsukami,D.K.;Rennard,S.;Jorenby,D.;Fiore,M.;Koopmeiners,J.;de Vos,

[0139] A.;Horwith,G.;Pentel,P.R.Safety and immunogenicity of a nicotine conjugate vaccine in current smokers.Clin.Pharmacol.Ther.2005,78,456-67.

[0140] (9)Wagena,E.J.;de Vos,A.;Horwith,G.;van Schayck,C.P.The

immunogenicity and safety of a nicotine vaccine in smokers and nonsmokers: results of a randomized, placebo-controlled phase 1/2 trial. *Nicotine Tob. Res.* 2008, 10, 213-8.

[0141] (10) Hatsukami, D.K.; Jorenby, D.E.; Gonzales, D.; Rigotti, N.A.; Glover, E.D.; Oncken, C.A.; Tashkin, D.P.; Reus, V.I.; Akhavain, R.C.; Fahim, R.E.; Kessler, P.D.; Niknian, M.; Kalnik, M.W.; Rennard, S.I. Immunogenicity and smoking-cessation outcomes for a novel nicotine immunotherapeutic. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011, 89, 392-9.

[0142] (11) Hoogsteder, P.; Kotz, D.; Viechtbauer, W.; Brauer, R.; Kessler, P.; Kalnik, M.; Fahim, R.; Spiegel, P.V.; Schayck, O.V. The efficacy and safety of a nicotine conjugate vaccine (NicVAX (R)) or placebo co-administered with varenicline (Champix (R)) for smoking cessation: study protocol of a phase 1b, double blind, randomized, placebo controlled trial. *BMC Public Health* 2012, 12, 1052.

[0143] (12) Nabi Biopharmaceuticals announces results of first NicVAX phase III clinical trial: smoking cessation immunotherapy failed to meet primary endpoint. Nabi Biopharmaceuticals: Rockville, MD, July 18, 2011.

[0144] (13) Nabi Biopharmaceuticals announces results of second NicVAX phase III clinical trial: smoking cessation immunotherapy failed to meet primary endpoint. Nabi Biopharmaceuticals: Rockville, MD, November 7, 2011.

[0145] (14) Selecta Biosciences initiates phase 1 clinical study of SEL-068, a first-in-class synthetic nicotine vaccine for smoking cessation and relapse prevention. Selecta Biosciences: Watertown, MA, November 21, 2011.

[0146] (15) Pittet, L.; Altreuter, D.; Ilyinskii, P.; Fraser, C.; Gao, Y.; Baldwin, S.; Keegan, M.; Johnston, L.; Kishimoto, T. Development and preclinical evaluation of SEL-068, a novel targeted Synthetic Vaccine Particle (tSVP (TM)) for smoking cessation and relapse prevention that generates high titers of antibodies against nicotine. *J. Immunol.* 2012, 188.

[0147] (16) Lockner, J.W.; Ho, S.O.; McCague, K.C.; Chiang, S.M.; Do, T.Q.; Fujii, G.; Janda, K.D. Enhancing nicotine vaccine immunogenicity with liposomes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23, 975-8.

[0148] (17) McCluskie, M.J.; Pryde, D.C.; Gervais, D.P.; Stead, D.R.; Zhang, N.; Benoit, M.; Robertson, K.; Kim, I.J.; Tharmanathan, T.; Merson, J.R.; Davis, H.L. Enhancing immunogenicity of a 3'aminomethylnicotine-DT-conjugate anti-nicotine vaccine with CpG adjuvant in mice and non-human primates. *Int. Immunopharmacol.* 2013, 16, 50-56.

[0149] (18) Chen, X.; Pravetoni, M.; Bhayana, B.; Pentel, P.R.; Wu, M.X. High immunogenicity of nicotine vaccines obtained by intradermal delivery with safe adjuvants. *Vaccine* 2012.

[0150] (19) Keyler, D.E.; Roiko, S.A.; Earley, C.A.; Murtaugh, M.P.; Pentel,

P.R.Enhanced immunogenicity of a bivalent nicotine vaccine.Int.Immunopharmacol.2008,8,1589-94.

[0151] (20)Pravetoni,M.;Keyler,D.E.;Pidaparathi,R.R.;Carroll,F.I.;Runyon,S.P.;Murtaugh,M.P.;Earley,C.A.;Pentel,P.R.Structurally distinct nicotine immunogens elicit antibodies with non-overlapping specificities.Biochem.Pharmacol.2012,83,543-50.

[0152] (21)de Villiers,S.H.;Cornish,K.E.;Troska,A.J.;Pravetoni,M.;Pentel,P.R.Increased efficacy of a trivalent nicotine vaccine compared to a dose-matched monovalent vaccine when formulated with alum.Vaccine 2013,31,6185-93.

[0153] (22)Cornish,K.E.;de Villiers,S.H.;Pravetoni,M.;Pentel,P.R.Immunogenicity of individual vaccine components in a bivalent nicotine vaccine differ according to vaccine formulation and administration conditions.PLoS ONE 2013,8,e82557.

[0154] (23)Berzofsky,J.A.;Schechter,A.N.The concepts of crossreactivity and specificity in immunology.Mol.Immunol.1981,18,751-63.

[0155] (24)Nowak,M.A.Immune responses against multiple epitopes:A theory for immunodominance and antigenic variation.Semin.Virol.1996,7,83-92.

[0156] (25)Langman,R.E.The specificity of immunological reactions.Mol.Immunol.2000,37,555-61.

[0157] (26)Skibinski,D.A.;Baudner,B.C;Singh,M.;O'Hagan,D.T.Combination vaccines.J.Glob.Infect.Dis.2011,3,63-72.

[0158] (27)Andrews,N.J.;Waight,P.A.;George,R.C;Slack,M.P.;Miller,E.Impact and effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in the elderly in England and Wales.Vaccine 2012,30,6802-8.

[0159] (28)Landsteiner,K.;van der Scheer,J.Serological differentiation of steric isomers.J.Exp.Med.1928,48,315-20.

[0160] (29)Landsteiner,K.The Specificity of Serological Reactions.Charles C.Thomas:Springfield,Illinois,1936.

[0161] (30)Napper,A.D.;Benkovic,S.J.;Tramontano,A.;Lerner,R.A.A stereospecific cyclization catalyzed by an antibody.Science 1987,237,1041-3.

[0162] (31)Benkovic,S.J.;Napper,A.D.;Lerner,R.A.Catalysis of a stereospecific bimolecular amide synthesis by an antibody.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1988,85,5355-8.

[0163] (32)Janda,K.D.;Benkovic,S.J.;Lerner,R.A.Catalytic antibodies with lipase activity and R or S substrate selectivity.Science 1989,244,437-40.

[0164] (33)Bjercke,R.J.;Cook,G.;Rychlik,N.;Gjika,H.B.;Van Vunakis,H.;Langone,J.J.Stereospecific monoclonal antibodies to nicotine and cotinine and their use in enzyme-linked immunosorbent assays.J.Immunol.Methods 1986,90,

203-13.

[0165] (34) Paula, S.; Tabet, M.R.; Farr, C.D.; Norman, A.B.; Ball, W.J., Jr. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship modeling of cocaine binding by a novel human monoclonal antibody. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 133-42. (35)

Treweek, J.B.; Roberts, A.J.; Janda, K.D. Immunopharmacotherapeutic manifolds and modulation of cocaine overdose. *Pharmacol., Biochem. Behav.* 2011, 98, 474-84.

[0166] (36) Treweek, J.B.; Janda, K.D. An antidote for acute cocaine toxicity. *Mol. Pharmaceutics* 2012, 9, 969-78.

[0167] (37) Isomura, S.; Wirsching, P.; Janda, K.D. An immunotherapeutic program for the treatment of nicotine addiction: hapten design and synthesis. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 41 15-21.

[0168] (38) Meijler, M.M.; Matsushita, M.; Altobelli, L.J., 3rd; Wirsching, P.; Janda, K.D. A new strategy for improved nicotine vaccines using conformationally constrained haptens. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 7164-5.

[0169] (39) Moreno, A.Y.; Azar, M.R.; Warren, N.A.; Dickerson, T.J.; Koob, G.F.; Janda, K.D. A critical evaluation of a nicotine vaccine within a self-administration behavioral model. *Mol. Pharmaceutics* 2010, 7, 431-41.

[0170] (40) Pentel, P.R.; Malin, D.H.; Ennifar, S.; Hieda, Y.; Keyler, D.E.; Lake, J.R.; Milstein, J.R.; Basham, L.E.; Coy, R.T.; Moon, J.W.; Naso, R.; Fattom, A. A nicotine conjugate vaccine reduces nicotine distribution to brain and attenuates its behavioral and cardiovascular effects in rats. *Pharmacol., Biochem. Behav.* 2000, 65, 191-8.

[0171] (41) Pryde, D.C.; Jones, L.H.; Gervais, D.P.; Stead, D.R.; Blakemore, D.C.; Selby, M.D.; Brown, A.D.; Coe, J.W.; Badland, M.; Beal, D.M.; Glen, R.; Wharton, Y.; Miller, G.J.; White, P.; Zhang, N.; Benoit, M.; Robertson, K.; Merson, J.R.; Davis, H.L.; McCluskie, M.J. Selection of a novel anti-nicotine vaccine: influence of antigen design on antibody function in mice. *PLoS ONE* 2013, 8, e76557.

[0172] (42) Davis, H.L.; Weeratna, R.; Waldschmidt, T.J.; Tygrett, L.; Schorr, J.; Krieg,

[0173] A.M. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998, 160, 870-6.

[0174] (43) Hartmann, G.; Weeratna, R.D.; Ballas, Z.K.; Payette, P.; Blackwell, S.; Suparto, I.; Rasmussen, W.L.; Waldschmidt, M.; Sajuthi, D.; Purcell, R.H.; Davis, H.L.; Krieg, A.M. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2000, 164, 1617-24.

[0175] (44) Bremer, P.T.; Schlosburg, J.E.; Lively, J.M.; Janda, K.D. Injection route and TLR9 agonist addition significantly impact heroin vaccine

efficacy. *Mol. Pharmaceutics* 2014, 11, 1075-80.

[0176] (45) Cervi, L.; Borgonovo, J.; Egea, M.; Chiapello, L.; Masih, D. Immunization of rats against *Fasciola hepatica* using crude antigens conjugated with Freund's adjuvant or oligodeoxynucleotides. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 97, 97-104.

[0177] (46) Muller, R. Determination of affinity and specificity of anti-hapten antibodies by competitive radioimmunoassay. *Methods Enzymol.* 1983, 92, 589-601.

[0178] (47) Tars, K.; Kotelovica, S.; Lipowsky, G.; Bauer, M.; Beerli, R.R.; Bachmann, M.F.; Maurer, P. Different binding modes of free and carrier-protein-coupled nicotine in a human monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.* 2012, 415, 118-127.

[0179] (48) Beerli, R.R.; Bauer, M.; Buser, R.B.; Gwerder, M.; Muntwiler, S.; Maurer, P.; Saudan, P.; Bachmann, M.F. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105, 14336-41.

[0180] (49) Spector, S.; Parker, C.W. Morphine: radioimmunoassay. *Science* 1970, 168, 1347-8.

[0181] 本文提及的所有专利和出版物通过引用并入本文,如同每个单独的出版物被具体地和单独地指示通过引用整体并入本文。

[0182] 虽然已经使用的术语和表达被用作描述而不是限制的术语,并且不意图在使用这些术语和表达时排除所示和所描述的特征或其部分的任何等同物,但是认识到在所要求保护的发明的范围内的各种修改是可能的。因此,应当理解,虽然本发明已经通过优选实施方式和任选特征具体公开,但是本文公开的概念的修改和变化可以由本领域技术人员采取,并且这样的修改和变化被认为落入在由所附权利要求限定的本发明的范围内。

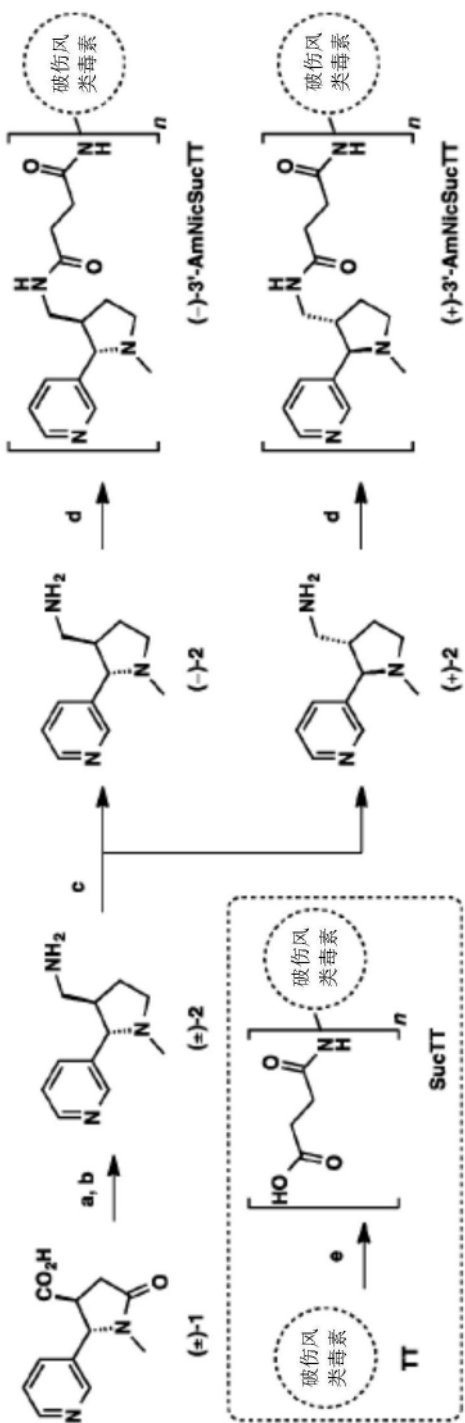


图1

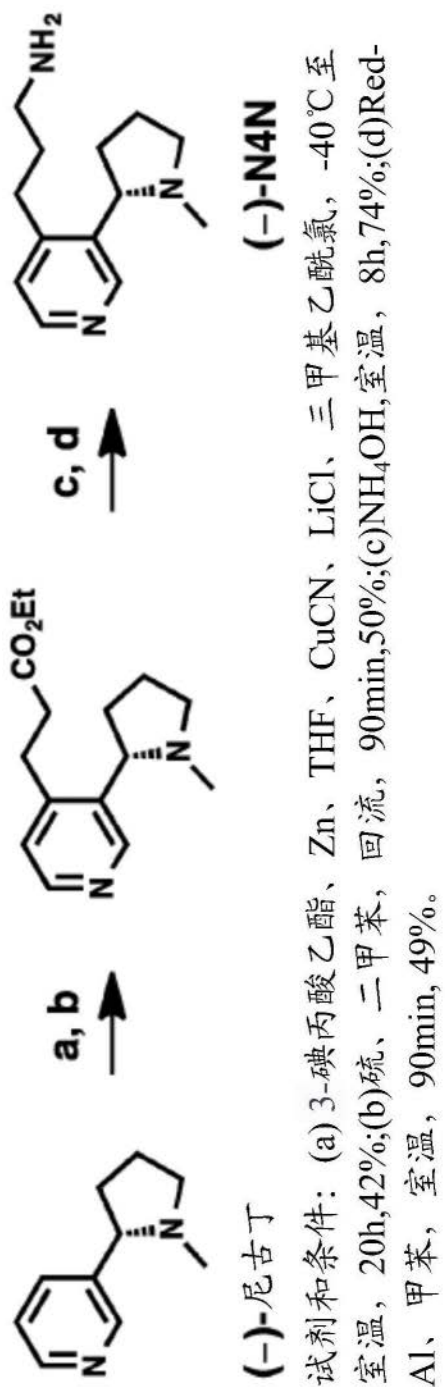


图2

抗血清对同源抗原的特异性

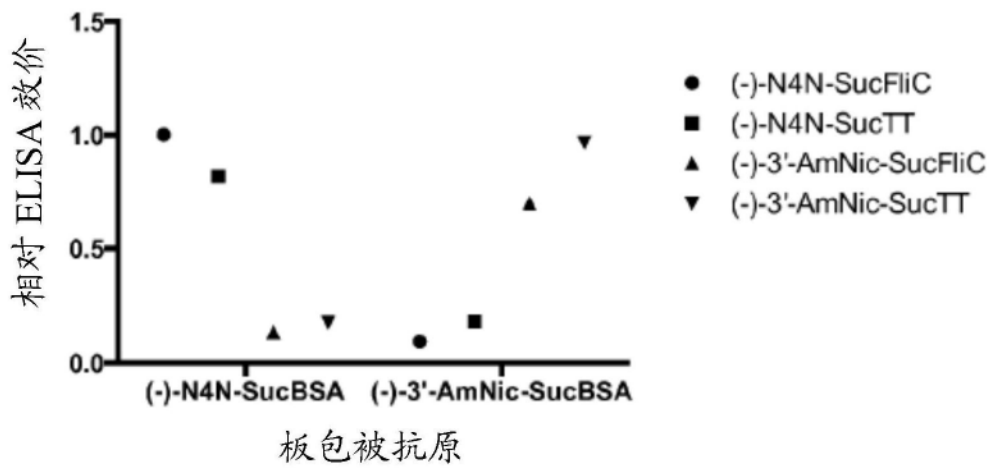


图3

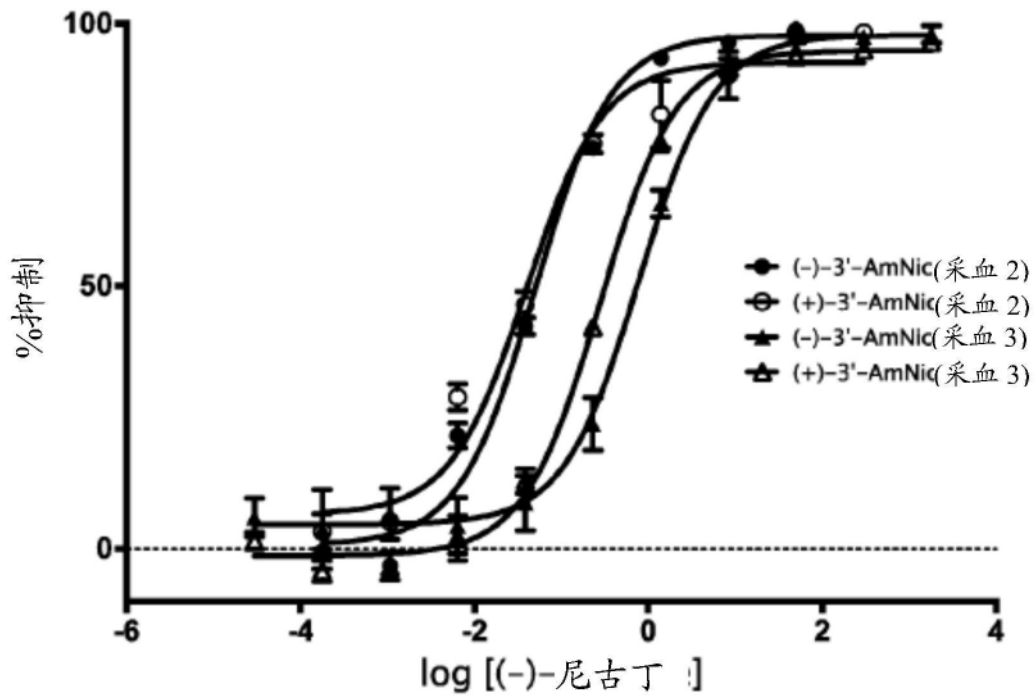


图4

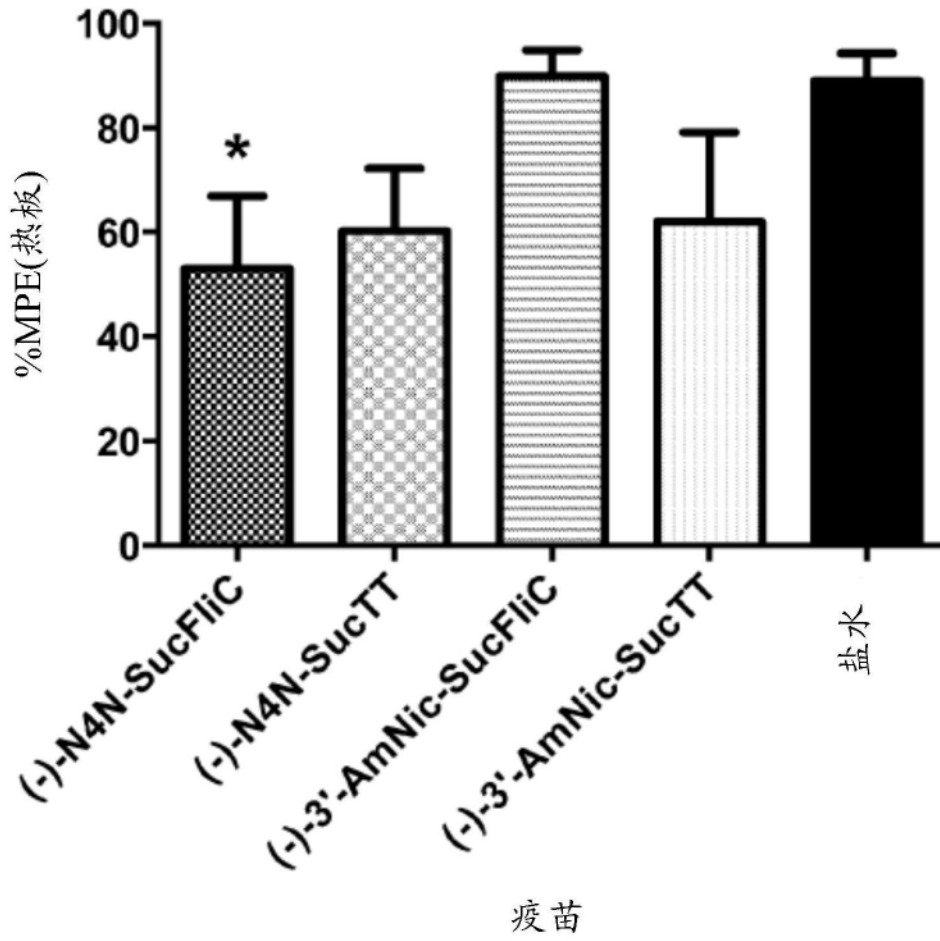


图5

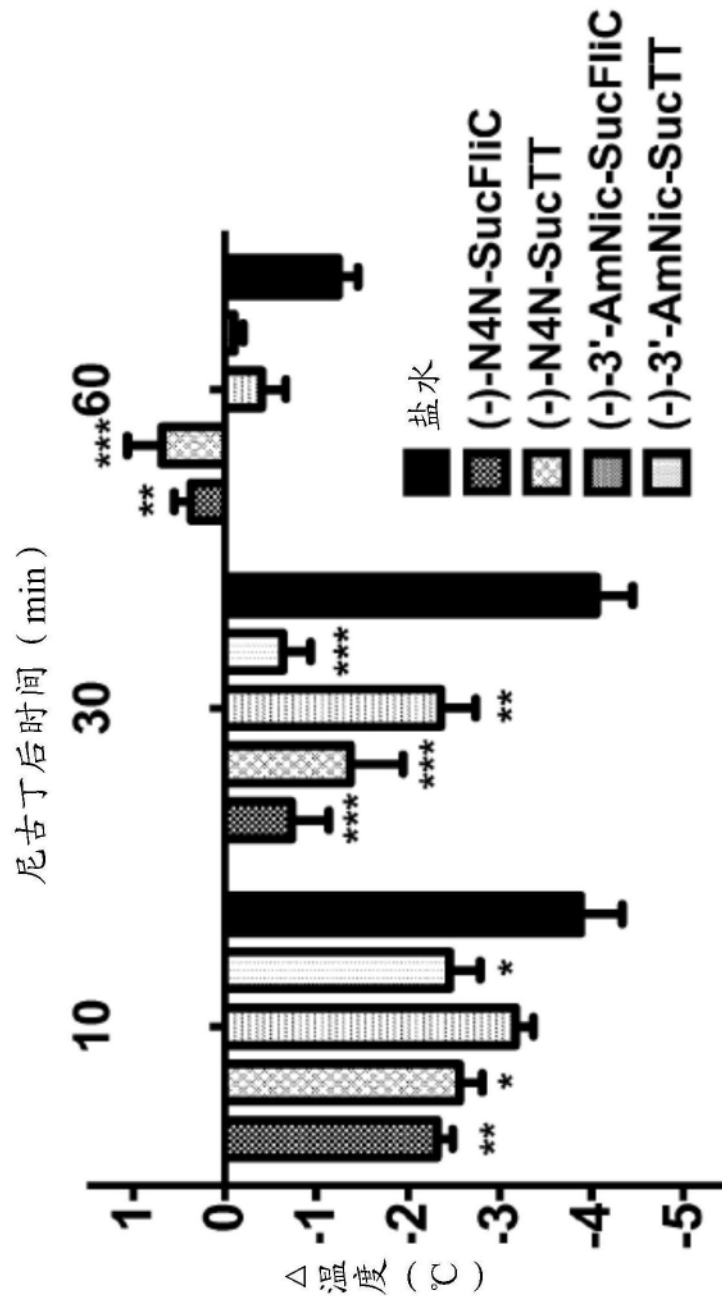


图6