



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1929865 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200580007791. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005. 03. 11

A61K 47/48(2006. 01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

04005875. 2 2004. 03. 11 EP
60/552, 069 2004. 03. 11 US

WO 03/074087 A1, 2003. 09. 12, 说明书第 20
页实施例 5, 第 5 页第 2 段, 第 16 页第 3 段.

(85) PCT 申请进入国家阶段日
2006. 09. 11

CN 1454097 A, 2003. 11. 05, 说明书第 5 页第
3 段.

(86) PCT 申请的申请数据

审查员 徐文亮

PCT/EP2005/002640 2005. 03. 11

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/092391 EN 2005. 10. 06

(73) 专利权人 费森尤斯卡比德国有限公司
地址 德国巴特洪堡

(72) 发明人 N·桑德尔 R·弗兰克

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 黄革生 安佩东

权利要求书 4 页 说明书 30 页 附图 2 页

(54) 发明名称

羟烷基淀粉和蛋白质的接合物

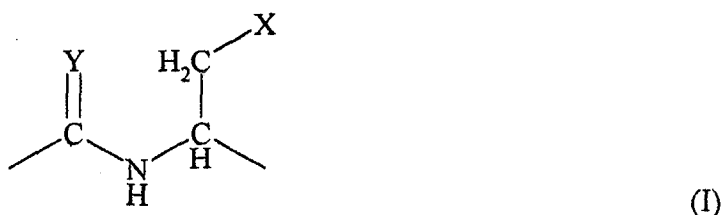
(57) 摘要

本发明涉及活性物质和羟烷基淀粉、优选羟乙基淀粉的接合物,其中所说的接合物是通过将羟烷基淀粉和活性物质共价连接的天然化学连接作用制得的,所说的共价连接是通过将硫代酸酯基与 α -X β -氨基进行反应进行的,其中 X 选



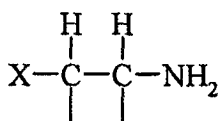
接合物的方法以及所说接合物的用途。

1. 一种制备活性物质和羟烷基淀粉的接合物的方法,其中所说的活性物质和羟烷基淀粉通过具有式(I)所示结构的化学残基被共价连接到一起



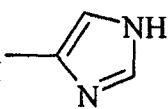
其中 Y 是选自 O 和 S 的杂原子,所说的方法包括:

将包含硫代酸酯基 $-(\text{C}=\text{Y})-\text{S}-\text{R}'$ 的羟烷基淀粉衍生物的硫代酸酯基与包含 α -X β 氨基



的活性物质衍生物的 α -X β 氨基进行反应,

其中 R' 选自氢、任选地被适当取代的直链、环状和 / 或支链烷基、芳基、杂芳基、芳烷

基和杂芳烷基,其中 X 选自 SH 和 

并且其中基团 $-(\text{C}=\text{Y})$ 得自硫代酸酯基 $-(\text{C}=\text{Y})-\text{S}-\text{R}'$, 基团 $\text{HN}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{X}$ 得自 α -X β 氨基,

其中的活性物质为蛋白质,

其中包含所述硫代酸酯基的羟烷基淀粉衍生物是通过如下方法获得的:

将羟烷基淀粉在其还原性端基上与至少双官能团的化合物进行反应,所述双官能团的化合物包含与羟烷基淀粉在其还原性端基上进行反应的官能团 M 和硫代酸酯基官能团 Q, 或者

将羟烷基淀粉在其还原性端基上与至少双官能团的化合物进行反应,所述双官能团的化合物包含与羟烷基淀粉在其还原性端基上进行反应的官能团 M 和官能团 Q,所述的官能团 Q 通过与另一种至少双官能团的化合物反应进行修饰而产生硫代酸酯基,所说的另一种至少双官能团的化合物包含与羟烷基淀粉衍生物的官能团 Q 进行反应的官能团和硫代酸酯基。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中将硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉与活性物质的 α -X β -氨基进行反应,其中所说的 α -X β -氨基包含于活性物质的半胱氨酸或组氨酸残基中。

3. 如权利要求 2 所述的方法,所说的方法包括通过如下方法制备硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉:将羟烷基淀粉在其还原性端基进行氧化和

(i) 将该被氧化的还原性端基转化成活化的羧酸衍生物并将该活化的羧酸衍生物与化合物 $\text{R}'-\text{SH}$ 进行反应;或者

(ii) 将被氧化的还原性端基与碳二亚胺和硫醇 $\text{R}'-\text{SH}$ 进行反应,从而得到硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 所说的方法包括将羟烷基淀粉在其还原性端基上进行氧化, 将被氧化的还原性端基与包含两个氨基的至少双官能团的化合物进行反应, 从而得到氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物, 然后将该衍生物的氨基与包含至少一个可与所述衍生物的氨基进行反应的官能团并包含至少一个硫代酸酯基的至少双官能团的化合物进行反应。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的官能团 M 是具有 R' -NH- 结构的基团, 其中 R' 是氢或烷基、烷氧基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基, 其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基被直接连接到 NH 基上或者通过氧桥被连接到 NH 基上。

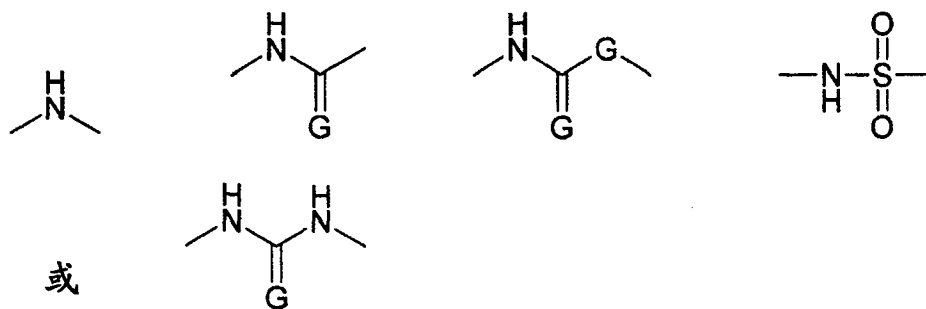
6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中 R' 是氢或烷基或烷氧基。

7. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的官能团 M 具有 R' -NH-R'' - 的结构, 其中 R' 是氢或烷基、烷氧基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基, 其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基被直接连接到 NH 基上或者通过氧桥被连接到 NH 基上, 并且其中 R'' 包含结构单元 -NH-。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的官能团 M 具有 R' -NH-R'' - 的结构, 其中 R' 是氢或烷基、烷氧基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基, 其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基被直接连接到 NH 基上或者通过氧桥被连接到 NH 基上, 并且其中 R'' 包含结构单元 -(C = G)-, 其中 G 是 O 或 S。

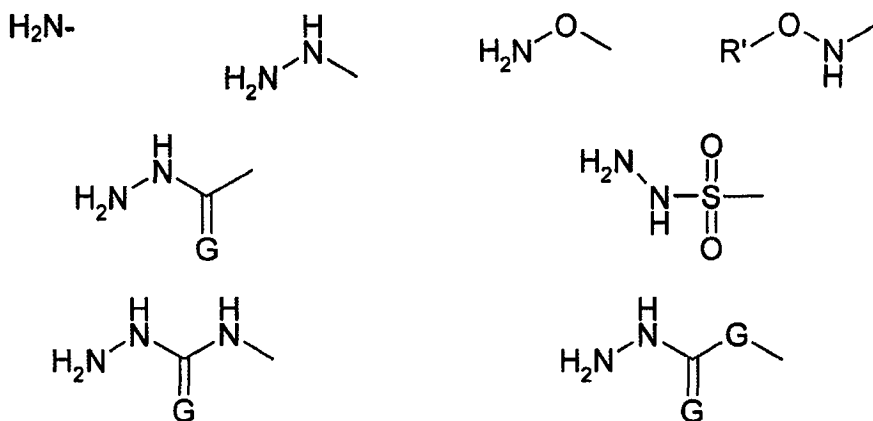
9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的官能团 M 具有 R' -NH-R'' - 的结构, 其中 R' 是氢或烷基、烷氧基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基, 其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基被直接连接到 NH 基上或者通过氧桥被连接到 NH 基上, 并且其中 R'' 包含结构单元 -SO₂-。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的官能团 M 具有 R' -NH-R'' - 的结构, 其中 R' 是氢或烷基、烷氧基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基, 其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基被直接连接到 NH 基上或者通过氧桥被连接到 NH 基上, 并且其中 R'' 是



其中, G 是 O 或 S, 并且如果 G 出现两次, 则其独立地是 O 或 S。

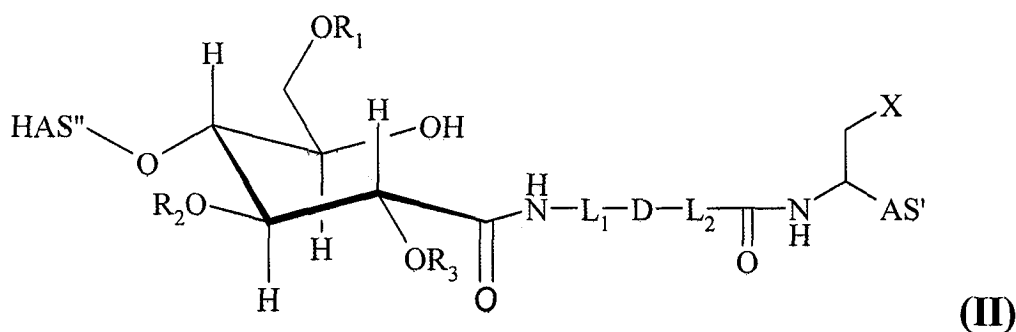
11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的官能团 M 选自



其中 G 是 O 或 S, 并且如果出现两次, 则其独立地是 O 或 S, 并且 R' 是甲基。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中的官能团 M 是氨基 $-NH_2$ 。

13. 活性物质和羟烷基淀粉的接合物, 所说的接合物具有式 (II) 的结构



其中 X 选自 SH 和 ,

R_1 、 R_2 和 R_3 独立地是氢或羟基烷基,

其中 HAS'' 指的是在其还原性端基上没有末端糖单元的 HAS 分子, 并且其中 L_1 和 L_2 独立地是任选地被取代的直链、支链和 / 或环状烃残基, 其任选地包含至少一个杂原子, 包含烷基、芳基、芳烷基杂烷基和 / 或杂芳烷基部分, 所说的残基具有 1 至 60 个碳原子, 并且

其中 D 是由与 L_1 相连的适宜官能团 F_2 和与 L_2 相连的适宜官能团 F_3 形成的共价键,

其中 F_2 包含氨基, F_3 包含 $-(C=O)-O$, D 是酰胺键,

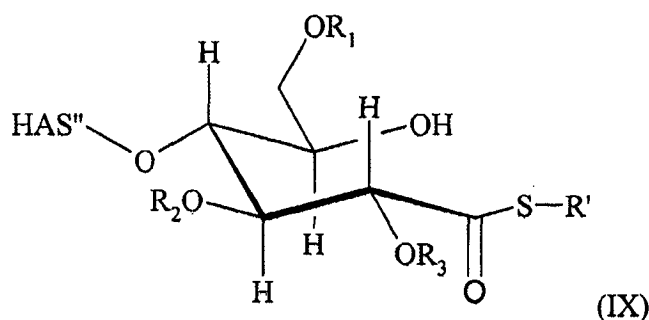
并且其中的活性物质为蛋白质。

14. 如权利要求 13 所述的接合物, 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 是羟基乙基。

15. 如权利要求 14 所述的接合物, 其中 L_1 和 L_2 独立地是 $-(CH_2)_n-$, 其中 $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 。

16. 如权利要求 13 所述的接合物, 其中所说的羟烷基淀粉是平均分子量为 1 至 300kD, 取代度为 0.1 至 0.8 的羟乙基淀粉。

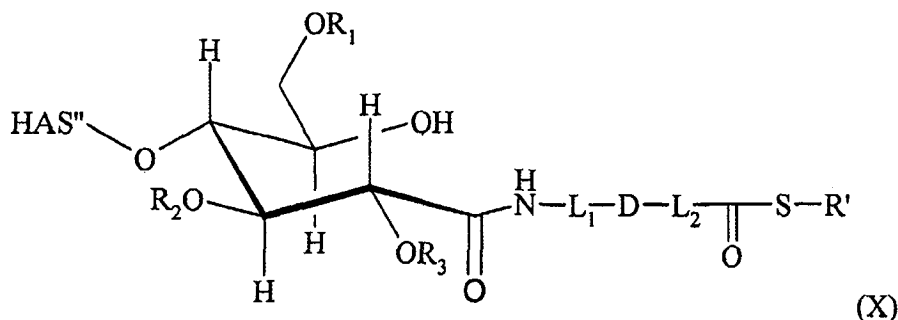
17. 式 (IX) 的硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉衍生物



其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地是氢或羟基烷基，
 其中 HAS'' 指的是在还原性端基上没有末端糖单元的 HAS 分子，
 其中 $S-R'$ 是亲电性离去基团。

18. 权利要求 17 所述的硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉衍生物，其中 R_1 、 R_2 和 R_3 是羟基乙基并且其中 $S-R'$ 选自得自取代或未取代的苯磺酚、巯基吡啶、苄硫醇、乙硫醇、甲硫醇、2-巯基乙磺酸、2-巯基乙酸、2-巯基乙酸甲酯或乙酯、3-巯基丙酸、3-巯基丙酸甲酯或乙酯、4-巯基丁酸和 4-巯基丁酸甲酯或乙酯的取代基。

19. 式 (X) 的硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉衍生物



其中 R_1 、 R_2 和 R_3 是羟基乙基，
 其中 HAS'' 指的是在还原性端基上没有末端糖单元的 HAS 分子，并且

其中 $S-R'$ 选自得自取代或未取代的苯磺酚、巯基吡啶、苄硫醇、乙硫醇、甲硫醇、2-巯基乙磺酸、2-巯基乙酸、2-巯基乙酸甲酯或乙酯、3-巯基丙酸、3-巯基丙酸甲酯或乙酯、4-巯基丁酸和 4-巯基丁酸甲酯或乙酯的取代基，其中 L_1 和 L_2 独立地是 $-(CH_2)_n-$ ，其中 $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ，并且

其中 D 是由与 L_1 相连的适宜官能团 F_2 和与 L_2 相连的适宜官能团 F_3 形成的共价键，其中 F_2 包含氨基， F_3 包含 $-(C=O)-O$ ， D 是酰胺键。

20. 一种包含如权利要求 13 至 16 中任意一项所述的接合物的药物组合物。

21. 如权利要求 20 所述的药物组合物，其还包含至少一种可药用的稀释剂、助剂或载体。

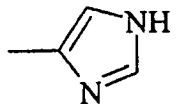
22. 包含如权利要求 13 至 16 中任意一项所述的活性物质和羟烷基淀粉的接合物的组合物。

23. 包含如权利要求 17 或 18 所述的硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉衍生物的组合物。

24. 包含如权利要求 19 所述的硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉衍生物的组合物。

羟烷基淀粉和蛋白质的接合物

[0001] 本发明涉及活性物质和羟烷基淀粉,优选羟乙基淀粉的接合物,其中所说的接合物是通过将羟烷基淀粉和活性物质共价连接的天然化学连接作用制得的,所说的共价连接

是通过将硫代酸酯基与 α -X β -氨基进行反应进行的,其中 X 选自 -SH 和 。

本发明还涉及制备这些接合物的方法以及所说接合物的用途。

[0002] 天然化学连接作用是一种十分有效的制备大分子肽和小分子蛋白质的方法,其中将肽硫代酸酯与带有 N-末端半胱氨酸残基的肽偶联,从而制得一种在该络合物形成部位包含酰胺键的产物。

[0003] WO 03/031581 A2 公开了一种将聚合物衍生物与在 N-末端具有半胱氨酸或组氨酸残基的多肽接合的方法,其中所说的方法包括提供一种在 N-末端具有半胱氨酸或组氨酸残基的多肽,提供一种硫代酸酯-封端的聚合物,该聚合物包含水溶性和非肽性聚合物主链,优选聚乙二醇聚合物,将该聚合物衍生物和多肽进行反应。就聚合物而言,例如有聚(亚烷基二醇)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(α 羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈类、聚吡啶、聚(N-丙烯酰基吗啉)、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、多糖、以及其共聚物、三元聚合物和混合物。清楚公开了的所有聚合物都是聚乙二醇聚合物。

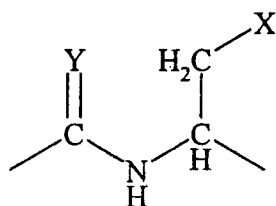
[0004] 尽管单官能团 PEG-分子的偶联方法和应用取得了进展,但是 PEG 化药物共同的缺点是还不十分清楚非天然聚合物 PEG 的代谢途径。

[0005] 因此,本发明的目的是要提供通过化学连接作用所形成的活性物质和聚合物的新型接合物,其中不用聚亚烷基二醇,尤其是不用聚乙二醇作为聚合物。

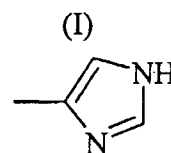
[0006] 因此,本发明的另一个目的是要提供一种制备这些接合物的方法。

[0007] 因此,本发明涉及活性物质和羟烷基淀粉的接合物,其中所说的活性物质和羟烷基淀粉是通过式 (I) 的化学残基进行连接的

[0008]

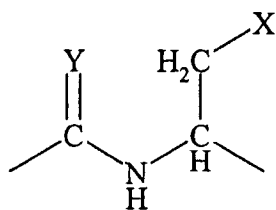


[0009] 其中 Y 是选自 O 和 S 的杂原子,并且其中 X 选自 -SH 和



[0010] 因此,本发明涉及一种制备共价连接的活性物质和羟烷基淀粉的接合物的方法,其中所说的活性物质和羟烷基淀粉是通过式 (I) 的化学残基进行连接的

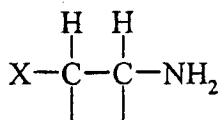
[0011]



(I)

[0012] 其中 Y 是选自 O 和 S 的杂原子,所说的方法包括将硫代酸酯基 $-(C = Y)-S-R'$ 与 $\alpha-X \beta$ -氨基进行反应

[0013]



[0014] 其中 R' 选自氢、任选地被适当取代的直链、环状和 / 或支链烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基,优选苄基。

[0015] 因此,在本发明上下文中所用的术语“ $\alpha-X \beta$ -氨基”指的是其中 X 被连接到碳原子上和伯氨基被连接到相邻碳原子上的亚乙基。

[0016] 在上面式 (I) 的化学部分中,基团 $-(C = Y)$ 得自硫代酸酯基 $-(C = Y)-S-R'$ 且基团 $HN-CH-CH_2-X$ 得自 $\alpha-X \beta$ -氨基。

[0017] 在本发明上下文中所用的术语“活性物质”涉及一种可以影响生物有机体的任何生理或生物化学性质的物质,所说的生物有机体非限制性地包括病毒、细菌、真菌、植物、动物和人。本发明上下文中所用的术语“活性物质”特别是涉及用于诊断、治疗缓解、治疗或预防人或动物的疾病的物质、或者增强人或动物的身体或精神舒适感的物质。生物学活性分子的实例非限制性地包括肽、蛋白质、酶、小分子药物、染料、脂类、核苷、寡核苷酸、多核苷酸、核酸、细胞、病毒、脂质体、微粒和胶束。蛋白质的实例非限制性地包括红细胞生成素 (EPO) 如重组人 EPO (rhEPO)、集落刺激因子 (CSF), 如 G-CSF 样重组人 G-CSF (rhG-CSF)、 α -干扰素 (IFN α)、 β -干扰素 (IFN β) 或 γ -干扰素 (IFN γ), 如 IFN α 和 IFN β 样重组人 IFN α 或 IFN β (rhIFN α 或 rhIFN β)、白介素, 例如 IL-1 至 IL-18 如 IL-2 或 IL-3 样重组人 IL-2 或 IL-3 (rhIL-2 或 rhIL-3)、血清蛋白如凝血因子 II-XIII 样因子 VIII、 α 1-抗胰蛋白酶 (A1AT)、激活蛋白质 C (APC)、纤溶酶原活化剂如组织型纤溶酶原活化剂 (tPA)、人组织纤溶酶原活化剂 (hTPA)、AT III 如重组人 AT III (rhATIII)、肌红蛋白质、白蛋白如牛血清白蛋白 (BSA)、生长因子, 如表皮生长因子 (EGF)、血小板生长因子 (PDGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、脑衍生长因子 (BDGF)、神经生长因子 (NGF)、B-细胞生长因子 (BCGF)、脑衍神经营养生长因子 (BDNF)、睫状神经营养因子 (CNTF)、转化生长因子如 TGF α 或 TGF β 、BMP (骨形态形成性蛋白)、生长激素如人生长激素、肿瘤坏死因子如 TNF α 或 TNF β 、生长抑素、生长素 (somatotropine)、生长调节素 (somatomedines)、血红蛋白、激素或前激素如胰岛素、促性腺激素、促黑色素细胞激素 (α -MSH)、曲普瑞林、下丘脑激素如血管加压素 (ADH) 和催产素以及释放激素和释放抑制激素、甲状旁腺激素、甲状腺激素如甲状腺素、促甲状腺素、促甲状腺素释放素、催乳素、降钙素、高血糖素、高血糖素样肽 (GLP-1、GLP-2 等)、胰高血糖素样肽的抑制剂 (exendin) 如胰高血糖素样肽的抑制剂 -4、来普汀、加压素、胃泌素、胰泌素、整联蛋白质、糖蛋白质激素 (例如 LH、FSH 等)、黑皮素 (melanoside)-刺激激素、脂蛋白和载脂蛋白如 apo-B、apo-E、apo-L_a、免疫球蛋白如 IgG、IgE、IgM、IgA、IgD 以及其

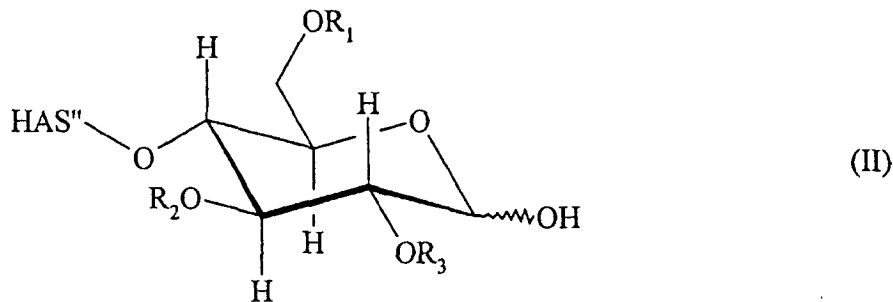
片段、水蛭素、组织途径抑制剂、植物蛋白如凝集素或蓖麻毒、蜂毒、蛇毒、抗毒素、E 抗原、 α -蛋白水解酶抑制剂、豚草变应原、黑素、低聚赖氨酸 (oligolysine) 蛋白、RGD 蛋白或者这些蛋白中的一种的任选的相应受体；或这些蛋白质或受体中任何一种的功能性衍生物或片段。酶的实例非限制性地包括碳水化合物特异性酶、蛋白水解酶、氧化酶、氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、激酶和连接酶。非限制性的特定实例有天冬酰胺酶、精氨酸酶、精氨酸脱氨基酶、腺苷脱氨基酶、谷氨酰胺酶、谷氨酰胺酶-天冬酰胺酶、苯丙氨酸、色氨酸酶、酪氨酸酶、超氧化物歧化酶 (SOD)、内毒素酶 (endotoxinase)、过氧化氢酶、过氧化物酶、血管舒缓素、胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、脂肪酶、尿酸酶、腺苷二磷酸酶、嘌呤核苷磷酸化酶、胆红素氧化酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖苷酶 (glucodase)、葡萄糖酸盐氧化酶、半乳糖苷酶、葡萄糖脑苷脂酶、葡萄糖醛酸苷酶、透明质酸酶、组织因子、链激酶、尿激酶、MAP-激酶、DNA 酶、RNA 酶、乳铁蛋白以及其功能性衍生物或片段。

[0018] 根据本发明的另一方面，所说的活性物质是小分子药物、肽和 / 或蛋白质。

[0019] 其中，可清楚地提及的有下面的蛋白质：红细胞生成素 (EPO) 如重组人 EPO (rhEPO)、集落刺激因子 (CSF)，如 G-CSF 样重组人 G-CSF (rhG-CSF)、血清蛋白如凝集因子 II-XIII 样因子 VII、第 VIII 因子、第 IX 因子、 α 1-抗胰蛋白酶 (A1AT)、激活蛋白质 C (APC)、纤溶酶原活化剂如组织型纤溶酶原活化剂 (tPA)，如人组织纤溶酶原活化剂 (hTPA)、AT III 如重组人 AT III (rhATIII)。

[0020] 在本发明的上下文中，术语“羟烷基淀粉” (HAS) 指的是被至少一个羟基烷基取代的淀粉衍生物。本发明优选的羟烷基淀粉具有式 (II) 的组成

[0021]



[0022] 其中在非氧化形式中表示了淀粉分子的还原性端基，在缩醛形式中表示了 HAS 的末端糖单位，根据例如溶剂，所说的缩醛形式可以处于与醛形式的平衡中。在本发明的上下文中所用的缩写 HAS'' 指的是在 HAS 分子的还原性端基上没有末端糖单位的 HAS 分子。

[0023] 本发明中所用的术语羟烷基淀粉并不限于其中末端碳水化合物部分包含羟基烷基（为了简单，所说的羟基烷基即式 (II) 中所述的 R_1 、 R_2 和 / 或 R_3 ）的化合物，而且还涉及其中在任何位置存在至少一个羟基烷基（在末端碳水化合物部分和 / 或淀粉分子的剩余部分、即 HAS'' 上被羟基烷基 R_1 、 R_2 、或 R_3 取代）的化合物。

[0024] 还可以是包含两个或多个不同羟基烷基的羟烷基淀粉。

[0025] HAS 中所含的至少一个羟基烷基可以包含两个或多个羟基。根据一个优选的实施方式，HAS 所包含的至少一个羟基烷基包含一个羟基。

[0026] “羟烷基淀粉”的表述还包括其中所说的烷基被单-或多取代的衍生物。在本文中，所说的烷基优选地被卤素，尤其是氟或者被芳基所取代。此外，羟基烷基的羟基还可以被酯化或醚化。

[0027] 此外,除烷基外,还可以使用直链或支链、被取代或未被取代的链烯烃基。

[0028] 羟烷基淀粉是淀粉的醚衍生物。除所说的醚衍生物外,在本发明的上下文中还可以使用其它淀粉衍生物。例如,所说的衍生物适用于包含被酯化羟基的物质。这些衍生物可以是例如未被取代的具有 2-12 个碳原子的单-或二羧酸的衍生物或其被取代衍生物的衍生物。尤其有用的是具有 2-6 个碳原子的未被取代的单羧酸的衍生物,尤其是乙酸的衍生物。在本文中,优选乙酰基淀粉、丁酰基淀粉和丙酰基淀粉。

[0029] 此外,还优选未被取代的具有 2-6 个碳原子的二羧酸的衍生物。

[0030] 在二羧酸衍生物的情况中,该二羧酸的第二个羧基也可以被酯化。此外,在本发明的上下文中二羧酸的单烷基酯衍生物也是适用的。

[0031] 对于被取代的单-或二羧酸而言,所说的取代基优选地与上述被取代的烷基残基的取代基相同。

[0032] 对淀粉进行酯化的技术在现有技术中是已知的(见例如 Klemm D. 等人,《综合纤维素化学》(Comprehensive Cellulose Chemistry),第 2 卷,1998, Wiley-VCH, Weinheim, 纽约,尤其是第 4.4 章,纤维素的酯化 (Esterification of Cellulose) (ISBN 3-527-29489-9))。

[0033] 根据本发明一个优选的实施方案,使用上述式 (II) 的羟烷基淀粉。HAS" 中所包含的其它糖环结构可以与清楚描述的糖环相同或不同。

[0034] 就式 (II) 的残基 R_1 、 R_2 和 R_3 而言,没有特殊限制。根据一个优选的实施方案, R_1 、 R_2 和 R_3 独立地是氢或在各烷基残基中具有 2 至 10 个碳原子的羟基烷基、羟基芳基、羟基芳烷基或羟基烷芳基或 $(CH_2CH_2O)_n-H$ (其中 n 是整数,优选地是 1、2、3、4、5、或 6)。优选氢和具有 2 至 10 个碳原子的羟基烷基。所说的羟基烷基更优选地具有 2 至 6 个碳原子,更优选地具有 2 至 4 个碳原子,并且更优选地具有 2 至 4 个碳原子。因此,“羟烷基淀粉”优选地包括羟乙基淀粉、羟丙基淀粉和羟丁基淀粉,其中特别优选羟乙基淀粉和羟丙基淀粉并且最优选羟乙基淀粉。

[0035] 所说的烷基、芳基、芳烷基和 / 或烷芳基可以是直链或支链的并且可以被适当地取代。

[0036] 因此,本发明还涉及其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地是氢或具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链羟基烷基的上述的方法和接合物。

[0037] 因此, R_1 、 R_2 和 R_3 可以优选地是羟基己基、羟基戊基、羟基丁基、羟基丙基如 2-羟基丙基、3-羟基丙基、2-羟基异丙基、羟基乙基如 2-羟基乙基、氢并且尤其优选地是 2-羟基乙基。

[0038] 因此,本发明还涉及其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地是氢或 2-羟基乙基的上述的方法和接合物,一个尤其优选的实施方案是其中至少一个残基 R_1 、 R_2 和 R_3 是 2-羟基乙基。

[0039] 对于本发明的所有实施方案而言,最优选羟乙基淀粉 (HES)。

[0040] 因此,本发明涉及其中所说的聚合物是羟乙基淀粉和所说的聚合物衍生物是羟乙基淀粉衍生物的上述的方法和接合物。

[0041] 羟乙基淀粉 (HES) 是天然存在的支链淀粉的衍生物,其在体内可以被 α -淀粉酶水解。HES 是碳水化合物聚合物支链淀粉被取代的衍生物,所述支链淀粉在玉米淀粉中的存在浓度高达 95% 重量。HES 表现出有利的生物学性质并且可被用作血容量替代剂,并且

在临床上可用于血液稀释疗法 (Sommermeyer 等人, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278; 和 Weidler 等人, 1991, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.*, 41, 494-498)。

[0042] 支链淀粉由多个葡萄糖部分组成, 其中在主链中存在 α -1,4-糖苷键并且发现在其分支部位存在 α -1,6-糖苷键。这种分子的理化性质主要是由糖苷键的类型确定的。由于该有缺口的 α -1,4-糖苷键, 产生了每圈具有约 6 个葡萄糖-单体的螺旋结构。可以通过取用来改变所说聚合物的理化性质以及生物化学性质。可以通过碱性羟乙基化来引入羟基乙基。通过调整反应条件, 对于羟乙基化而言, 可以利用未被取代的葡萄糖单体中各羟基不同的反应性。由于这种事实, 本领域技术人员能在有限程度上影响取代模式。

[0043] HES 的主要特征为分子量分布和取代度。在描述取代度时可以采取两种方式:

[0044] 1. 可以用相对于所有葡萄糖部分而言被取代的葡萄糖单体的部分来描述取代度。

[0045] 2. 可以用摩尔取代度来描述取代度, 其中描述了每个葡萄糖部分中的羟基乙基数。

[0046] 在本发明的上下文中, 被表示为 DS 的取代度涉及上述摩尔取代 (还可参见以上所引用的 Sommermeyer 等人, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278, 特别是第 273 页)。

[0047] HES 溶液是以多分散组合物的形式存在的, 其中各分子在聚合度、分支部位的数目和模式以及取代模式方面彼此有差异。因此, HES 是具有不同分子量的化合物的混合物。所以, 借助于统计方法用平均分子量来对特定 HES 溶液进行测定。在本文中, M_n 被计算为取决于分子数的算术平均值形式。或者, M_w (或 MW) — 重均分子量表示一种取决于 HES 质量的单位。

[0048] 在本发明的上下文中, 羟乙基淀粉优选地具有 1 至 300kD 的平均分子量 (重均分子量)。羟乙基淀粉的优选摩尔取代度为 0.1 至 0.8 并且对于羟基乙基而言, $C_2 : C_6$ 取代的优选比例为 2 至 20。

[0049] 在本发明上下文中所用的术语“平均分子量”指的是根据 Sommermeyer 等人, 1987, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278; 和 Weidler 等人, 1991, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.*, 41, 494-498 所述的 LALLS-(低角度激光散射)-GPC 法测定的重量。此外, 对于 10kD 和更低的平均分子量而言, 还用一种之前已经用 LALLS-GPC 校准的标准品进行校准。

[0050] 根据本发明一个优选的实施方案, 所用羟乙基淀粉的平均分子量为 1 至 300kD, 更优选地为 2 至 200kD, 更优选地为 4 至 130kD, 更优选地为 4 至 100kD 并且还更优选地为 4 至 70kD。

[0051] 因此, 本发明还涉及其中所说的羟烷基淀粉是平均分子量为 4 至 70kD 的羟乙基淀粉的上述方法和接合物。

[0052] 其平均分子量的优选范围例如, 4 至 70kD 或 10 至 70kD 或 12 至 70kD 或 18 至 70kD 或 50 至 70kD 或 4 至 50kD 或 10 至 50kD 或 12 至 50kD 或 18 至 50kD 或 4 至 18kD 或 10 至 18kD 或 12 至 18kD 或 4 至 12kD 或 10 至 12kD 或 4 至 10kD。

[0053] 根据本发明特别优选的实施方案, 所用羟乙基淀粉的平均分子量为高于 4kD 并低于 70kD, 如约 10kD, 或者为 9 至 10kD 或 10 至 11kD 或 9 至 11kD, 或约 12kD, 或者为 11 至 12kD 或 12 至 13kD 或 11 至 13kD, 或约 18kD, 或者为 17 至 18kD 或 18 至 19kD 或 17 至 19kD, 或约 50kD, 或者为 49 至 50kD 或 50 至 51kD 或 49 至 51kD。

[0054] 就摩尔取代度 (DS) 的上限而言,其值可以为最高 2.0 如可以为 0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 或 2.0,优选低于 2.0 的值,更优选低于 1.5 的值,还更优选低于 1.0 的值如 0.7、0.8 或 0.9。

[0055] 因此,所说摩尔取代度的优选范围为 0.1 至 2 或 0.1 至 1.5 或 0.1 至 1.0 或 0.1 至 0.9 或 0.1 至 0.8。更优选的摩尔取代度范围为 0.2 至 2 或 0.2 至 1.5 或 0.2 至 1.0 或 0.2 至 0.9 或 0.2 至 0.8。更优选的摩尔取代度范围为 0.3 至 2 或 0.3 至 1.5 或 0.3 至 1.0 或 0.3 至 0.9 或 0.3 至 0.8。更优选的摩尔取代度范围为 0.4 至 2 或 0.4 至 1.5 或 0.4 至 1.0 或 0.4 至 0.9 或 0.4 至 0.8。

[0056] 在涉及取代度 (DS) 时,DS 优选地为至少 0.1,更优选地为至少 0.2,更优选地为至少 0.3 并且更优选地为至少 0.4。DS 的范围优选地为 0.1 至 0.8,更优选地为 0.2 至 0.8,更优选地为 0.3 至 0.8 并且更优选地为 0.4 至 0.8,还更优选地为 0.1 至 0.7,更优选地为 0.2 至 0.7,更优选地为 0.3 至 0.7 并且更优选地为 0.4 至 0.7。DS 特别优选的值为例如,0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 或 0.8,更优选地为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 或 0.8,更优选地为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 或 0.8,还更优选地为 0.4、0.5、0.6、0.7 或 0.8 并且特别优选地为例如 0.4 和 0.7。

[0057] 在本发明的上下文中,摩尔取代度的给定值如 0.8 可以是精确值或者可以被理解为位于 0.75 至 0.84 的范围中。因此,例如,给定的值 0.1 可以是精确值 0.1 或者可以位于 0.05 至 0.14 的范围中,给定的值 0.4 可以是精确值 0.4 或者可以位于 0.35 至 0.44 的范围中,或者给定的值 0.7 可以是精确值 0.7 或者可以位于 0.65 至 0.74 的范围中。

[0058] 羟烷基淀粉,优选羟乙基淀粉的分子量以及其取代度 DS 的特别优选的组合为例如,10kD 和 0.4 或 10kD 和 0.7 或 12kD 和 0.4 或 12kD 和 0.7 或 18kD 和 0.4 或 18kD 和 0.7 或 50kD 和 0.4 或 50kD 和 0.7 或 100kD 和 0.7。

[0059] 平均分子量为约 130kD 的 HES 的实例为取代度为 0.2 至 0.8 如 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、或 0.8,优选 0.4 至 0.7 如 0.4、0.5、0.6、或 0.7 的 HES。

[0060] 平均分子量为约 130kD 的 HES 的实例为得自 Fresenius 的 Voluven[®]。Voluven[®] 是一种人造胶体,被用于例如治疗和预防血容量减少症时治疗适应症中所用的体积替换。Voluven[®] 的特征为平均分子量为 130,000+/-20,000D;摩尔取代度为 0.4 和 C₂:C₆ 的比例为约 9:1。

[0061] 在涉及 C₂:C₆ 取代比例时,所说的取代优选地位于 2 至 20,更优选 2 至 15 并且更优选 3 至 12 的范围中。

[0062] 根据本发明另一个实施方案,还可以使用具有不同平均分子量和 / 或不同取代度和 / 或不同 C₂:C₆ 取代比例的羟乙基淀粉的混合物。因此,可以使用具有不同平均分子量和不同取代度以及不同 C₂:C₆ 取代比例、或者具有不同平均分子量和不同取代度以及相同或大约相同的 C₂:C₆ 取代比例、或者具有不同平均分子量和相同或大约相同的取代度和不同 C₂:C₆ 取代比例、或者具有相同或大约相同的平均分子量和不同取代度以及不同 C₂:C₆ 取代比例、或者具有不同平均分子量和相同或大约相同的取代度以及相同或大约相同的 C₂:C₆ 取代比例、或者具有相同或大约相同的平均分子量和不同取代度以及相同或大约相同的 C₂:C₆ 取代比例、或者具有相同或大约相同的平均分子量以及相同或大约相同的取代度和不同 C₂:C₆ 取代比例、或者具有大约相同的平均分子量和大约相同的取代度以

及大约相同的 $C_2 : C_6$ 取代比例的羟乙基淀粉的混合物。

[0063] 在本发明不同的接合物和 / 或不同的方法中, 可以使用不同的羟烷基淀粉, 优选地使用不同羟乙基淀粉和 / 或不同羟烷基淀粉混合物, 优选地使用不同羟乙基淀粉混合物。

[0064] 在本发明的上下文中, 术语“反应性羧基”指的是反应性酯、羧酸酐, 可提及的有异硫氰酸酯或异氰酸酯。优选的反应性酯得自 N- 羟基琥珀酰亚胺类物质如 N- 羟基琥珀酰亚胺或磺基-N- 羟基琥珀酰亚胺, 被适当取代的苯酚如对-硝基苯酚、邻, 对-二硝基苯酚、o, o' - 二硝基苯酚、三氯苯酚如 2, 4, 6- 三氯苯酚或 2, 4, 5- 三氯苯酚、三氟苯酚如 2, 4, 6- 三氟苯酚或 2, 4, 5- 三氟苯酚、五氯苯酚、五氟苯酚或羟基唑系化合物如羟基苯并三唑。尤其优选的是 N- 羟基琥珀酰亚胺类物质, 尤其优选的是 N- 羟基琥珀酰亚胺和磺基-N- 羟基琥珀酰亚胺。所有的醇都可以单独使用或者以其两种或多种的适宜组合的形式进行应用。就反应性酯而言, 尤其优选五氟苯基酯和 N- 羟基琥珀酰亚胺酯。

[0065] 就硫代酸酯基 $-(C=Y)-S-R'$, 优选 $-(C=O)-S-R'$ 的基团 R' 而言, 不存在特殊的限制因素, 只要基团 $-S-R'$ 形成一种当与 $\alpha-X \beta$ -氨基反应时适于被置换的亲电性离去基团即可。优选的残基 SR' 非限制性地包括得自取代或未取代的苯硫酚、巯基吡啶 (thiopyridine)、苄硫醇、乙硫醇、甲硫醇、2- 巯基乙磺酸、2- 巯基乙酸、2- 巯基乙酸甲酯或乙酯、3- 巯基丙酸、3- 巯基丙酸甲酯或乙酯、4- 巯基丁酸、4- 巯基丁酸甲酯或乙酯的取代基。

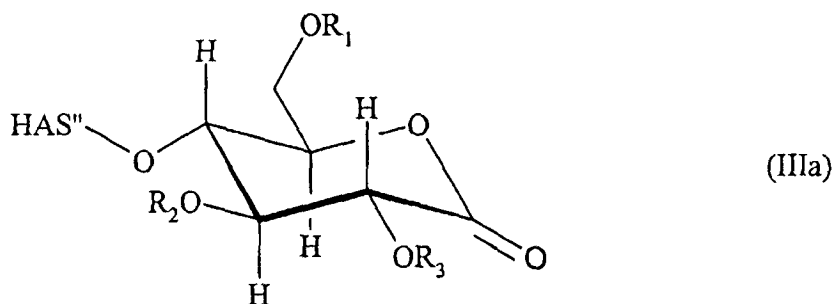
[0066] 根据本发明第一个供选择的方法, 在羟烷基淀粉中包含硫代酸酯基并且在活性物质中包含 $\alpha-X \beta$ -氨基。

[0067] 因此, 本发明还涉及上述方法, 其中将硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉与活性物质的 $\alpha-X \beta$ -氨基进行反应。

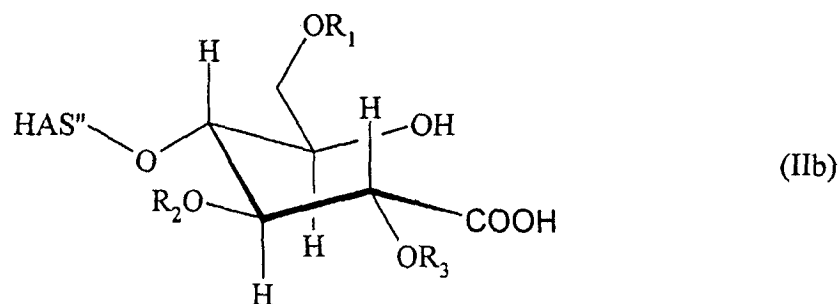
[0068] 可以用任何一种适宜的方法提供硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉, 优选羟乙基淀粉。

[0069] 根据本发明的一个实施方案, 本发明的方法包括将羟烷基淀粉在其还原性端基选择性氧化, 从而得到式 (IIIa) 和 / 或式 (IIIb) 的羟烷基淀粉,

[0070]



[0071]



[0072] 然后将在其还原性端基上被选择性氧化的羟烷基淀粉与至少一种适宜的化合物进行反应,从而得到硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉。

[0073] 羟烷基淀粉,优选羟乙基淀粉的氧化可以根据可以产生具有上述结构 (IIIa) 和 / 或 (IIIb) 的化合物的各种方法或一些方法的组合来进行。虽然可以用可以产生羟烷基淀粉被氧化的还原性端基的所有适宜方法来进行,但是优选按照例如 DE 19628705A1 中的描述用碱性碘溶液来进行,其各部分的内容(实施例 A,第 9 栏,第 6 至 24 行)在这里被引入作为参考。

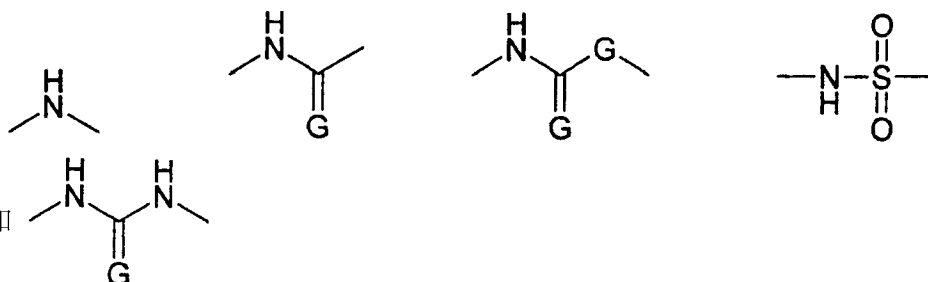
[0074] 根据本发明的一种供替代的选择,将羟烷基淀粉、优选在其还原性端基上被选择性氧化的羟烷基淀粉与至少双官能团的化合物进行反应、所述双官能团的化合物包含可与羟烷基淀粉反应,优选在其被氧化的还原性端基上进行反应的官能团 M,和硫代酸酯基或可以被修饰从而产生硫代酸酯基的官能团 Q。

[0075] 就与羟烷基淀粉进行反应的至少双官能团的化合物的官能团 M 而言,可提及的尤其是具有 R' -NH- 结构的基团,其中 R' 是氢或烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基,其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被直接连接到 NH 基上或者,根据另一个实施方案,可以通过氧桥被连接到 NH 基上。所说的烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被适宜地取代。就优选的取代基而言,可提及的有卤素如 F、Cl 或 Br。尤其优选的残基 R' 是氢、烷基和烷氧基,并且更优选的是氢和未被取代的烷基和烷氧基。

[0076] 在烷基和烷氧基中,优选具有 1、2、3、4、5、或 6 个 C 原子的基团。更优选的是甲基、乙基、丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和异丙氧基。尤其优选的是甲基、乙基、甲氧基、乙氧基,并且特别优选的是甲基或甲氧基。

[0077] 根据本发明的另一个实施方案,所说的官能团 M 具有 R' -NH-R'' - 的结构,其中 R'' 优选地包含结构单元 -NH- 和 / 或结构单元 -(C = G)-(其中 G 是 O 或 S) 和 / 或结构单元 -SO₂-。官能团 R'' 的特定实例为

[0078]



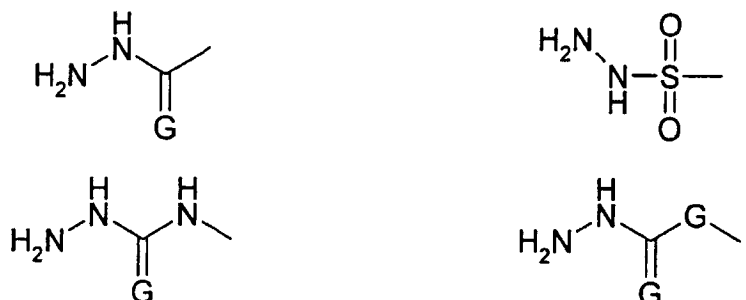
[0080] 其中,如果 G 出现两次,则其独立地是 O 或 S。

[0081] 因此,本发明还涉及上述方法和接合物,其中所说的官能团 M 选自

[0082]



[0083]



[0084] 其中 G 是 O 或 S, 并且如果出现两次, 则其独立地是 O 或 S, 并且 R' 是甲基。

[0085] 根据本发明一个特别优选的实施方案, 所说的官能团 M 是氨基 $-\text{NH}_2$ 。

[0086] 根据硫代酸酯基或可以被化学修饰从而给出硫代酸酯基官能团的基团 Q, 其中可提及的有下面的官能团:

[0087] - C-C- 双键或 C-C- 三键或芳族 C-C- 键;

[0088] - 巯基 (thio group) 或羟基;

[0089] - 烷基磺酰肼、芳基磺酰肼;

[0090] - 1,2- 二醇;

[0091] - 1,2 氨基 - 硫醇;

[0092] - 叠氮化物;

[0093] - 1,2- 氨基醇;

[0094] - 氨基 $-\text{NH}_2$ 或包含结构单元 $-\text{NH}-$ 的氨基衍生物如氨基烷基、氨基芳基、氨基芳烷基或烷芳基氨基;

[0095] - 羟基氨基 $-\text{O}-\text{NH}_2$, 或包含结构单元 $-\text{O}-\text{NH}-$ 的羟基氨基的衍生物, 如羟基烷基氨基、羟基芳基氨基、羟基芳烷基氨基或羟基烷芳基氨基;

[0096] - 烷氧基氨基、芳氧基氨基、芳烷氧基氨基或烷芳氧基氨基, 其各自包含结构单元 $-\text{NH}-\text{O}-$;

[0097] - 具有羰基的残基, $-\text{Q}-\text{C}(=\text{G})-\text{M}$, 其中 G 是 O 或 S, 并且 M 是例如,

[0098] -- $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$;

[0099] -- 烷氧基、芳氧基、芳烷氧基或烷芳氧基;

[0100] -- 烷硫基、芳硫基、芳烷硫基或烷芳硫基;

[0101] -- 烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、芳烷基羰基氧基、烷芳基羰基氧基;

[0102] -- 活性酯如具有酰亚胺结构的羟基胺如 N- 羟基琥珀酰亚胺或具有结构单元 $\text{O}-\text{N}$ 并且其中 N 是杂芳基化合物的一部分的羟基胺的酯, 或者 $\text{G} = \text{O}$ 且 Q 不存在, 如具有被取代的芳基残基如五氟苯基、对硝基苯基或三氯苯基的芳氧基化合物;

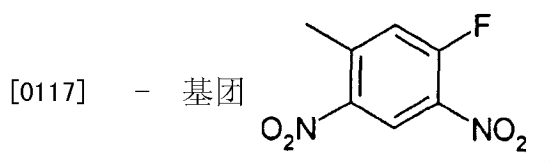
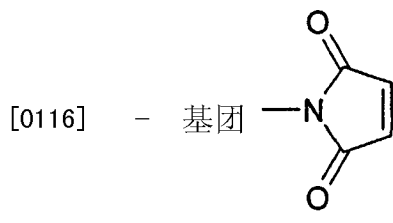
[0103] 其中 Q 不存在或者是 NH 或杂原子如 S 或 O;

[0104] - $-\text{NH}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{NH}-\text{NH}-$;

[0105] - $-\text{NO}_2$;

[0106] - 腈基;

- [0107] - 羰基如醛基或酮基；
 [0108] - 羧基；
 [0109] - $-N=C=O$ 或 $-N=C=S$ 基；
 [0110] - 卤化乙烯基如碘乙烯或溴乙烯基或三氟甲磺酸酯；
 [0111] - $-C\equiv C-H$ ；
 [0112] - $-(C=NH_2Cl)-O$ 烷基
 [0113] - $-(C=O)-CH_2-Hal$, 其中 Hal 是 Cl、Br 或 I；
 [0114] - $-CH=CH-SO_2-$ ；
 [0115] - 包含结构 $-S-S-$ 的二硫化物基团；



[0118] 根据第一种供替代的选择,官能团 Q 是硫代酸酯基。

[0119] 根据第二种供替代的选择,官能团 Q 是可以被进一步修饰从而得到硫代酸酯基的基团。根据这一个实施方案,将由羟烷基淀粉(优选地在其还原性端基上被选择性氧化)与至少双官能团的化合物进行反应所产生的羟烷基淀粉衍生物与另一种至少双官能团的化合物进行反应,所说的另一种至少双官能团的化合物包含可以与羟烷基淀粉衍生物的官能团 Q 和硫代酸酯基进行反应的基团。

[0120] 就所说的可以与官能团 Q 进行反应的另外化合物的官能团而言,可提及的有得自以上关于官能团 Q 所列举的官能团的所有适宜的官能团,只要其可以与 Q 进行反应即可。

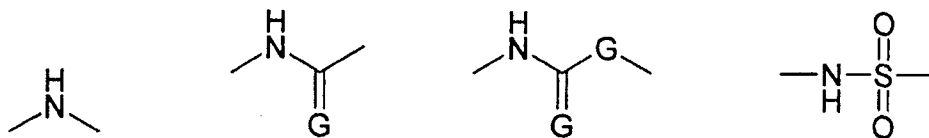
[0121] 根据本发明的一个实施方案,官能团 Q 包含化学结构 $-NH-$ 。

[0122] 根据本发明一个优选的实施方案,官能团 Q 是具有结构 $R'-NH-$ 的基团,其中 R' 是氢或烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基,其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被直接连接到该 NH 上,或者,根据另一个实施方案,可以通过氧桥被连接到该 NH 上。所说的烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被适当取代。就优选的取代基而言,可提及的卤素如 F、Cl 或 Br。尤其优选的残基 R' 是氢、烷基和烷氧基,并且更优选地为氢和未被取代的烷基和烷氧基。

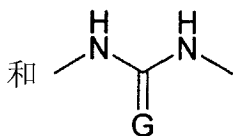
[0123] 在所说的烷基和烷氧基中,优选具有 1、2、3、4、5 或 6 个 C 原子的基团。更优选的是甲基、乙基、丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基 和异丙氧基。尤其优选的是甲基、乙基、甲氧基、乙氧基,并且特别优选的是甲基或甲氧基。

[0124] 根据本发明的另一个实施方案,官能团 Q 具有结构 $R'-NH-R''-$, 其中 R'' 优选地包含结构单元 $-NH-$ 和 / 或结构单元 $-(C=G)-$ 和 / 或结构单元 $-SO_2-$, 其中 G 是 O 或 S。根据更优选的实施方案,官能团 R'' 选自

[0125]



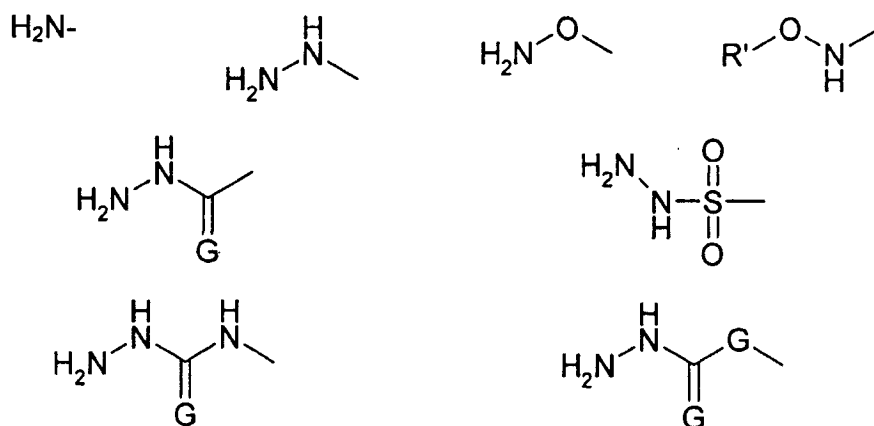
[0126]



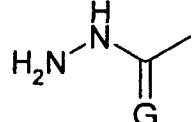
[0127] 其中,如果 G 出现两次,则其独立地是 O 或 S。

[0128] 因此,本发明还涉及上述方法和接合物,其中官能团 Q 选自

[0129]

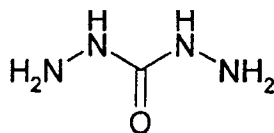


[0130] 其中 G 是 O 或 S,并且如果出现两次,则其独立地是 O 或 S,并且 R' 是甲基。

[0131] 根据本发明一个特别优选的实施方案,官能团 Q 是氨基 -NH₂。[0132] 根据本发明的一个实施方案,M 和 Q 都包含氨基 -NH-。根据一个优选的实施方案,M 和 Q 都是氨基 -NH₂。[0133] 根据本发明一个优选的实施方案,所说的包含 M 和 Q 的化合物是同双官能团化合物,更优选地是包含作为官能团的 M 和 Q 的更优选地为氨基 -NH₂,或者根据其它实施方案,为羟基氨基 -O-NH₂ 或基团  的同双官能团化合物,G 优选地是 O。包含 M 和 Q

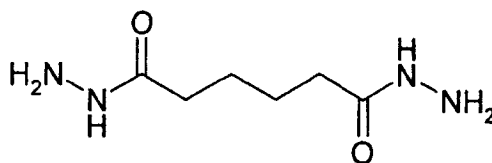
的这些化合物的特定实例有

[0134]



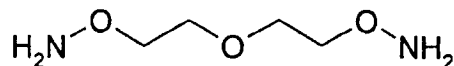
[0135] 或

[0136]



[0137] 或

[0138]



[0139] 在优选的情况下, M 和 Q 都是氨基 $-NH_2$, M 和 Q 可以被适宜的间隔基隔离开。其中, 所说的间隔基可以是任选地被取代的直链、支链和 / 或环状烃残基。该烃残基通常具有 1 至 60, 优选 1 至 40, 更优选 1 至 20, 更优选 2 至 10, 更优选 2 至 6 并且尤其优选 2 至 4 个碳原子。如果存在杂原子, 则该分隔基团通常包含 1 至 20, 优选 1 至 8 并且尤其 1 至 4 个杂原子。所说的烃残基可以包含任选地有分支的烷基链或芳基或具有例如 5 至 7 个碳原子的环烷基, 或芳烷基、其中所说的烷基可以是直链和 / 或环状烷基的烷芳基。根据一个更优选的实施方案, 所说的烃残基是 1 至 20, 优选 2 至 10, 更优选 2 至 6, 并且尤其优选 2 至 4 个碳原子的烷基链。

[0140] 因此, 本发明还涉及其中将所说的羟烷基淀粉与 1,4-二氨基丁烷、1,3-二氨基丙烷或 1,2-二氨基乙烷进行反应, 从而得到氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物的上述方法和接合物。

[0141] 根据本发明的另一种选择, 使用具有被氧化的还原性端基的羟烷基淀粉。根据本发明的另一种选择, 使用还原性端基未被氧化的羟烷基淀粉。根据本发明的另一种选择, 所说的羟烷基淀粉通过选择性氧化的还原性端基与官能团 M 进行反应。根据本发明的另一方面, 所说的羟烷基淀粉通过未被氧化的还原性端基与官能团 M 进行反应。根据本发明的另一种选择, 所说的羟烷基淀粉在 HAS 分子适宜的化学部分上与官能团 M 进行反应。根据另一种选择, 羟烷基淀粉在未被氧化的还原性端基和 HAS 分子的至少一个另外的化学部分或被选择性氧化的还原性端基和 HAS 分子的至少一个另外的化学部分上与官能团 M 进行反应。

[0142] 在本发明上下文中所用的术语“羟烷基淀粉通过还原性端基进行反应”或者“羟烷基淀粉通过选择性氧化的还原性端基进行反应”涉及一种羟烷基淀粉主要通过其(被选择性氧化的)还原性端基进行反应的过程。

[0143] 术语“主要通过其(选择性氧化的)还原性端基”指的是统计学上高于 50%, 优选至少 55%, 更优选至少 60%, 更优选至少 65%, 更优选至少 70%, 更优选至少 75%, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 并且更优选至少 95% 如 95%、96%、97%、98% 或 99% 用于给定反应的羟烷基淀粉分子通过每个羟烷基淀粉分子的至少一个(选择性氧化的)还原性端基进行反应的过程, 其中给定的通过至少一个还原性端基进行反应的羟烷基淀粉分子可以在相同的给定反应中通过所说羟烷基淀粉分子中所包含的至少另一个适宜的而不是还原性端基的官能团进行反应。如果一个或多个羟烷基淀粉分子通过至少一种还原性官能团进行反应并且同时通过这种(这些)羟烷基淀粉分子中所包含的至少另一个不是还原性端基的官能团进行反应, 则这些羟烷基淀粉分子的所有参与反应的官能团(包括还原性端基)中, 统计学上优选高于 50%, 优选至少 55%, 更优选至少 60%, 更优选至少 65%, 更优选至少 70%, 更优选至少 75%, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 并且还更优选至少 95% 如 95%、96%、97%、98% 或 99% 的是还原性端基。

[0144] 本发明上下文中所用的术语“还原性端基”涉及可以以醛基和 / 或相应缩醛形式存在的羟烷基淀粉的末端醛基。在还原性端基被氧化的情况中, 所说的醛基或缩醛基为羧基和 / 或相应的内酯形式。

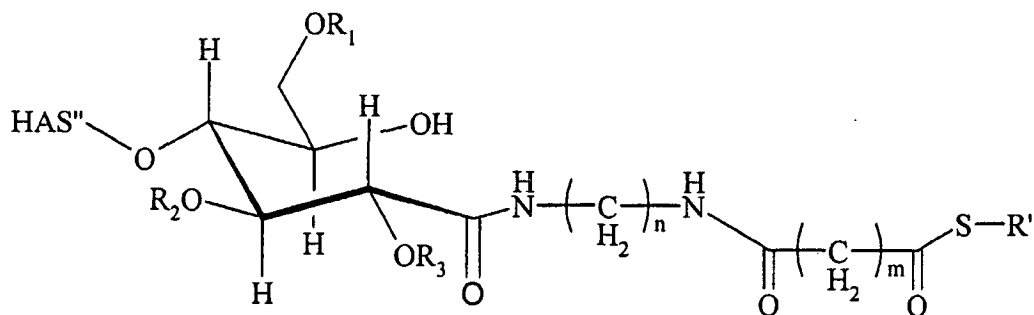
[0145] 如上所述的那样,所说的氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物优选地进一步与包含与可氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物的氨基进行反应的官能团和硫代酸酯基的至少双官能团的化合物进行反应。

[0146] 就与氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物进行反应的优选化合物而言,可提及的化合物有包含可与氨基进行反应的反应性羧基和硫代酸酯基的化合物。就反应性羧基而言,可提及的有反应性酯、异硫氰酸酯或异氰酸酯。优选的反应性酯得自 N- 羟基琥珀酰亚胺如 N- 羟基琥珀酰亚胺或磺基 -N- 羟基琥珀酰亚胺、被适当取代的苯酚如对 - 硝基苯酚、邻,对 - 二硝基苯酚、o, o' - 二硝基苯酚、三氯苯酚如 2, 4, 6- 三氯苯酚或 2, 4, 5- 三氯苯酚、三氟苯酚如 2, 4, 6- 三氟苯酚或 2, 4, 5- 三氟苯酚、五氯苯酚、五氟苯酚或羟基唑系化合物如羟基苯并三唑。

[0147] 所说的反应性羧基和硫代酸酯可以被任何适宜的间隔基隔离开。其中,所说的间隔基可以是任选地被取代的直链、支链和 / 或环状烃残基。该烃残基通常具有 1 至 60, 优选 1 至 40, 更优选 1 至 20, 更优选 2 至 10, 更优选 2 至 6 并且尤其优选 2 至 4 个碳原子。如果存在杂原子, 则该间隔基团通常包含 1 至 20, 优选 1 至 8 并且尤其是 1 至 4 个杂原子。所说的烃残基可包含任选地具有分支的烷基链或芳基或具有例如 5 至 7 个碳原子的环烷基, 或者可以是芳烷基、其中的烷基部分是直链和 / 或环状烷基的烷芳基。根据本发明的一个实施方案, 所说的反应性羧基和硫代酸酯基被具有 2、3、或 4 个碳原子的烷基残基如亚乙基、亚丙基或亚丁基隔离开。

[0148] 作为一个实例, 在羟烷基淀粉, 优选羟乙基淀粉的情况下, 用其被氧化的还原性端基与二氨基链烷烃如 1, 4- 二氨基丁烷、1, 3- 二氨基丙烷或 1, 2- 二氨基乙烷进行反应, 将所得的羟烷基淀粉衍生物进一步与包含硫代酸酯基 $-S-R'$ 和反应性羧基的化合物 (其中所说的硫代酸酯基和反应性羧基被亚乙基、亚丙基、或亚丁基隔离开) 进行反应, 得到下式的硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉

[0149]



[0150] 其中 n、m 独立地是 2、3、4。

[0151] 因此, 本发明还涉及上述方法和接合物, 所说的方法包括将羟烷基淀粉在其还原性端基上进行氧化, 将该被氧化的还原性端基与包含两个氨基的至少双官能团的化合物进行反应, 从而得到一种氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物, 将该衍生物的氨基与包含至少一个可与该衍生物的氨基进行反应的官能团 (优选反应性羧基) 和至少一个硫代酸酯基 (优选一个硫代酸酯基 $-SR'$) 的至少双官能团的化合物进行反应。

[0152] 根据本发明的另一个实施方案, 硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉是通过如上所述的那样将羟烷基淀粉在其还原性端基上选择性氧化然后进行如下反应制得的:

[0153] - 用相对酸性的硫醇将该羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基转化成羧酸的酰基咪唑 (imidazolide) (其是通过例如将相应的羧酸与例如 N,N- 羰基二咪唑进行反应制得的) (Masamune, S. 等人, J. Am. Chem. Soc. 98(1976)7874), 或者

[0154] - 用二硫化物和三苯基膦将该羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基转化成相应的硫代酸酯 (Mukaiyama, T. 等人, Bull. Chem. Soc. Jpn. 43(1970)1271), 或者

[0155] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与芳基异硫氰酸酯进行反应 (Grieco, P. 等人, Tetrahedron Lett. 43(1979)1283), 或者

[0156] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与硫代吡啶基氯甲酸酯进行反应 (Corey, E. J., 等人, Tetrahedron Lett. (1979), 2875), 或者

[0157] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与 2- 氟 -N- 甲基吡啶鎓甲苯磺酸盐和硫醇进行反应 (Watanabe, Y., 等人, Chem. Lett. (1976)741), 或者

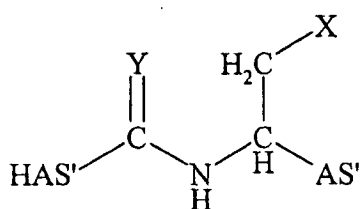
[0158] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与碳二亚胺如二异丙基碳二亚胺 (DIC)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC)、在固体支撑物上的固定的 EDC 和硫醇进行反应 (C. E-Lin 等人 Tetrahedron Lett. 43(2002)4531-34; M. Adamczyk, Tetrahedron Lett. 37(1996)4305-8, J. Hovinen, NucleosidesNucleotides 18(1999)1263-4)。

[0159] 因此, 本发明还涉及上述方法和接合物, 所说的方法包括将羟烷基淀粉在其还原性端基上进行氧化并将其被氧化的还原性端基与碳二亚胺如二异丙基碳二亚胺 (DIC)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) (优选 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC)) 和硫醇进行反应, 从而得到硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉。

[0160] 然后, 将上述硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉衍生物与活性物质的 α -X β - 氨基进行反应。

[0161] 因此, 本发明还涉及式 (IV) 的上述接合物

[0162]



(IV)

[0163] 其中 HAS' 是与硫代酸酯基相连的羟烷基淀粉或其衍生物的残基, 并且其中 AS' 是与 α -X β - 氨基相连的活性物质或其衍生物的残基。

[0164] 根据本发明一个优选的实施方案, α -X β - 氨基被包含于活性物质, 优选小分子药物、肽或蛋白质的半胱氨酸残基或组氨酸残基中。

[0165] 因此, 本发明还涉及上述方法和接合物, 其中所说的 α -X β - 氨基被包含于活性物质的半胱氨酸残基或组氨酸残基中。

[0166] 所说的活性物质的半胱氨酸或组氨酸残基更优选地是肽或蛋白质的 N- 末端半胱氨酸或组氨酸。该 N- 末端半胱氨酸或组氨酸残基可以是天然存在的 N- 末端半胱氨酸或组氨酸残基或者可以通过对肽或蛋白质序列进行适宜修饰而被引入到肽或蛋白质

的 N- 末端。就肽而言,可以在合成期间引入所述的氨基酸。肽合成在现有技术中是已知的 (W. Chang, P. D. White ;《Fmoc 固相肽合成,一种实用的方法》(Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach) ;Oxford University Press, Oxford, 2000, ISBN0199637245)。

[0167] 重组的多肽可以用标准的分子生物学技术获得,所说的技术例如在《分子克隆 : 实验室手册》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual),第 3 版, Sambrook 等人编辑, CSHL Press 2001 中所述的技术。简单地说,多肽可以由重组表达载体进行表达,所说的重组表达载体包含编码所需多肽的核酸,通过进行操作而将该核酸连接到至少一种可以使得所需多肽进行表达的调节序列上。例如,可以分离出编码所需多肽的核酸序列并将其克隆到表达载体中,然后将该表达载体转移到用于使所说多肽进行表达的适宜宿主细胞中。该类载体可以是质粒、噬菌粒或粘粒。例如,可以以适宜的方式将核酸分子克隆到原核或真核表达载体中(《分子克隆》(MolecularCloning),见上)。该类表达载体包含至少一个启动子并且还可以包含用于开始进行翻译的信号并且 - 在原核表达载体的情况中 - 还可以包含用于结束翻译的信号,而在真核表达载体的情况中,优选地包含用于结束转录和用于多核苷酸化的表达信号。原核表达载体的实例有,对于在大肠杆菌中的表达而言,例如如 US 4, 952, 496 中所述的以 T7 RNA 聚合酶所识别的启动子为基础的表达载体、对于在酿酒酵母中表达的真核表达载体而言,例如载体 G426/Met25 或 P526/Gal1 (Mumberg 等人, (1994) Nucl. Acids Res. ,22,5767-5768)、对于在昆虫中的表达而言,例如杆状病毒载体,如例如在 EP-B1-0127839 或 EP-B1-0549721 中所述的载体或 Ciccarone 等人 (“用杆状病毒穿梭载体在大肠杆菌中产生重组杆状病毒 DNA (Generation of recombinant Baculovirus DNA in E. coli using Baculovirus shuttle vector)” (1997) 第 13 卷, U. Reischl 主编 (Totowa, NJ :Humana Press Inc.) 所述的载体,和对于在哺乳动物细胞中的表达而言,例如载体 Rc/CMW 和 Rc/ASW 以及 SW40- 载体 (这些载体通常是已知的或者可以通过商业途径获得)、或实施例 4 中所述的 EBNA- 系统、基于 Sindbis 复制子的 pCytTS (Boorsma 等人 (2002) Biotechnol. Bioeng. 79 (6) :602-609)、Sindbis 病毒表达系统 (Schlesinger (1993) Trends Biotechnol. 11 (1) :18-22) 或腺病毒表达系统 (He 等人 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :2509-2514)。制备这些表达载体的分子生物学方法以及用于对宿主细胞进行转染和对这类被转染细胞进行培养的方法以及由所说的被转化的宿主细胞制备和获得本发明多肽的条件对于本领域技术人员而言都是众所周知的。

[0168] 具有所需 N- 末端 Cys 或 His 残基的多肽可得自如上所述那样进行表达和纯化的多肽,将感兴趣的多肽克隆到 N- 末端引导序列后面,除去该 N- 末端引导序列从而得到具有所需 N- 末端 Cys 或 His 残基的多肽。

[0169] 其例如可以通过对如上所述那样进行表达和纯化的多肽进行蛋白水解性裂解来进行。在该类情况中,克隆、表达一种融合多肽并对其进行纯化,其中 Cys 或 His 残基紧邻一种高选择性蛋白酶裂解部位,例如 His 或 Cys 残基紧邻因子 Xa 裂解部位 :Ile (Glu/Asp) Gly Arg | (Cys/His), 或 His 或 Cys 残基紧邻胰凝乳蛋白酶裂解部位 :Asp Asp Asp Asp Lys | (Cys/His), 其中 | 表示被蛋白酶裂解的部位。

[0170] 其还可以通过例如在表达期间对多肽进行裂解,例如在 ER 易位阶段被信号肽酶裂解来完成。在该类情况中,克隆并表达一种融合多肽,其中 Cys 或 His 残基紧邻将该重组

多肽指向分泌途径的信号肽（其综述可参见 Rapoport 等人, *Annu Rev Biochem.* 1996 ;65 : 271-303）。

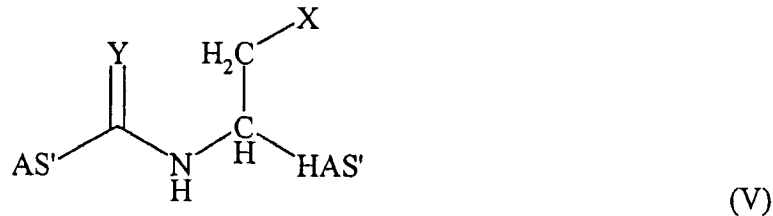
[0171] 操纵重组多肽的编码序列从而使得可以产生在所需位置具有所需 Cys 或 His 残基多肽的编码序列的分子生物学方法在现有技术中是众所周知的（Sambrook, 同上）。

[0172] 根据本发明的天然化学连接反应, 硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉和具有半胱氨酸或组氨酸残基（优选 N- 末端半胱氨酸或组氨酸残基）的 α -X β -氨基官能化的活性物质（优选肽或蛋白质）的反应的中间产物是一种硫代酸酯, 该硫代酸酯可以通过分子内转乙酰作用被不可逆地转化成包含通过酰胺键与活性物质相连的羟烷基淀粉衍生物的本发明的接合物。

[0173] 根据另一种选择, 本发明还涉及一种其中将硫代酸酯官能化的活性物质与羟烷基淀粉衍生物的 α -X β -氨基进行反应的上述方法。

[0174] 因此, 本发明还涉及一种具有式 (V) 结构的如上所述的接合物,

[0175]

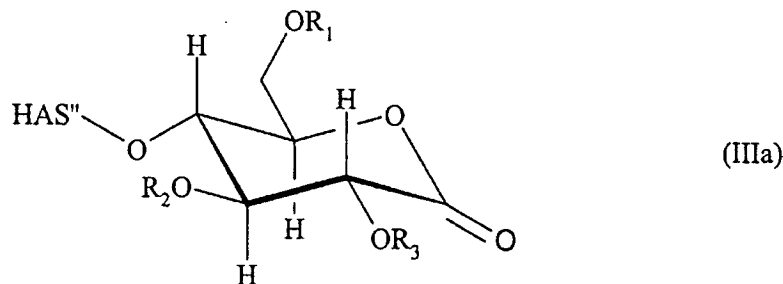


[0176] 其中 HAS' 是与 α -X β -氨基相连的羟烷基淀粉或其衍生物的残基, 其中 AS' 是与硫代酸酯基相连的活性物质或其衍生物的残基。

[0177] 可以用任何适宜的方法来制备 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉。根据本发明的一个实施方案, 所说的 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉是用一种包含在羟烷基淀粉的还原性端基上对其选择性进行氧化并对其被氧化的还原性端基进行适宜的化学修饰, 从而获得 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物的方法来进行制备的。

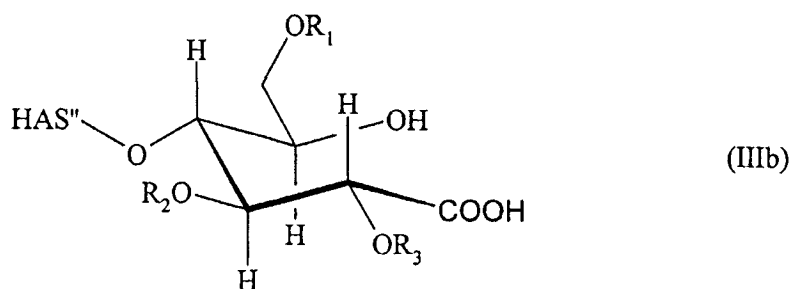
[0178] 因此, 根据本发明的一个实施方案, 本发明的方法包括将羟烷基淀粉在其还原性端基上选择性进行氧化, 从而得到式 (IIIa) 的羟烷基淀粉

[0179]



[0180] 和 / 或式 (IIIb) 的羟烷基淀粉,

[0181]



[0182] 将被选择性氧化的羟烷基淀粉在其还原性端基上适宜地进行反应,从而得到硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉。

[0183] 羟烷基淀粉,优选羟乙基淀粉的氧化可以根据可产生具有上述结构 (IIIa) 和 / 或 (IIIb) 化合物的各种方法或一些方法的组合来进行。虽然可以用可以产生羟烷基淀粉被氧化的还原性端基的所有适宜方法来进行,但是优选按照例如 DE 196 28 705 A1 中的描述用碱性碘溶液来进行,其各部分的内容 (实施例 A, 第 9 栏, 第 6 至 24 行) 在这里被引入作为参考。

[0184] 根据本发明的一个实施方案,将在其还原性端基上被选择性氧化的羟烷基淀粉与至少双官能团的化合物进行反应,所说的至少双官能团的化合物包含与被氧化的还原性端基进行反应的官能团 Z 和可进一步与包含可以与 W 进行反应的官能团 V 并包含 α -X β -氨基的化合物进行反应的官能团 W。

[0185] 因此,本发明还涉及一种上述的方法,所说的方法包括将羟烷基淀粉在其还原性端基上进行氧化,将其被氧化的还原性端基与除 Z 外还包含另外的官能团 W 的化合物的官能团 Z 进行反应,从而得到第一种羟烷基淀粉衍生物,将该第一种羟烷基淀粉衍生物的官能团 W 与除 V 外还包含 α -X β -氨基的化合物的官能团 V 进行反应,从而得到 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物。

[0186] 根据一个实施方案, Z 和 W 都包含化学结构 -NH-。

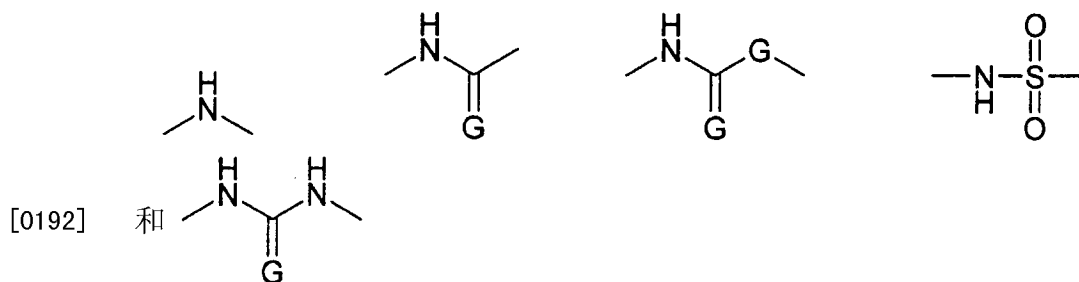
[0187] 根据本发明一个优选的实施方案,官能团 Z 和 W 是具有结构 R' -NH- 的官能团,其中 R' 是氢或烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基,其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被直接连接到该 NH 上,或者,根据另一个实施方案,可以通过氧桥被连接到该 NH 上。该烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被适当取代。就优选的取代基而言,可提及的有卤素如 F、Cl 或 Br。尤其优选的残基 R' 是氢、烷基和烷氧基,并且更优选的是氢和未被取代的烷基和烷氧基。

[0188] 在烷基和烷氧基中,优选具有 1、2、3、4、5、或 6 个 C 原子的基团。

[0189] 更优选的是甲基、乙基、丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和异丙氧基。尤其优选的是甲基、乙基、甲氧基、乙氧基,并且特别优选的是甲基或甲氧基。

[0190] 根据本发明的另一个实施方案,官能团 Z 和 W 具有结构 R' -NH-R'' -, 其中 R'' 优选地包含结构单元 -NH- 和 / 或结构单元 -(C = G)- 和 / 或结构单元 -SO₂-, 其中 G 是 O 或 S。根据更优选的实施方案,官能团 R'' 选自

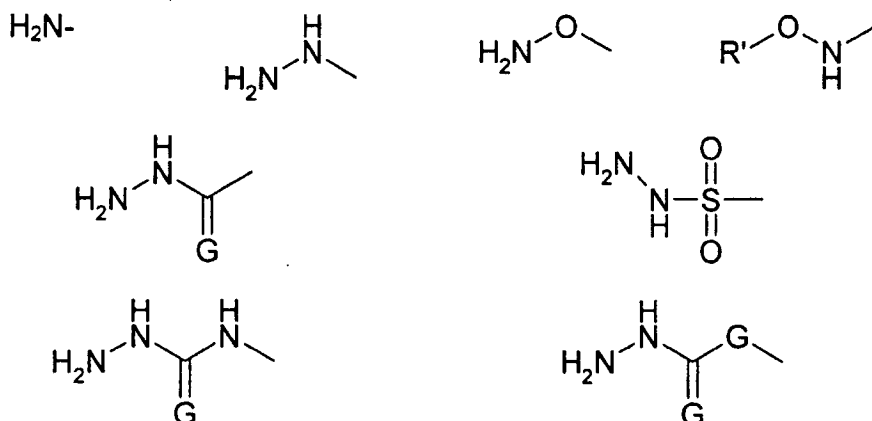
[0191]



[0193] 其中, 如果 G 出现两次, 则其独立地是 O 或 S。

[0194] 因此, 本发明还涉及上述方法和接合物, 其中官能团 Z 和 W 独立地选自

[0195]



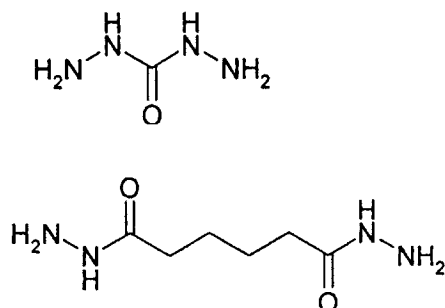
[0196] 其中 G 是 O 或 S, 并且如果出现两次, 则其独立地是 O 或 S, R' 是甲基。

[0197] 包含 Z 和 W 的化合物的具体实例有

[0198]

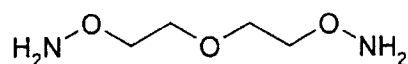
[0199] 或

[0200]



[0201] 或

[0202]



[0203] 根据本发明一个特别优选的实施方式, 官能团 Z 和 W 都是氨基 -NH₂。

[0204] 因此, 本发明还涉及其中包含 Z 和 W 的化合物是二氨基官能化的化合物的上述方法。

[0205] 在 Z 和 W 都是氨基 -NH₂ 的情况下, Z 和 W 可以被任何适宜的间隔基隔离开。其中, 所说的间隔基可以是任选地被取代的直链、支链和 / 或环状烃残基。该烃残基一般具有 1 至 60, 优选 1 至 40, 更优选 1 至 20, 更优选 2 至 10, 更优选 2 至 6 并且尤其优选 2 至 4 个碳原子。如果存在杂原子, 则该间隔基团通常包含 1 至 20, 优选 1 至 8 并且尤其优选 1 至 4 个杂原子。所说的烃残基可包含任选地具有分支的烷基链或芳基或具有例如 5 至 7 个碳原子

的环烷基,或者可以是芳烷基、其中的烷基部分是直链和 / 或环状烷基的烷芳基。根据一个更优选的实施方案,该烃残基是 1 至 20, 优选 2 至 10, 更优选 2 至 6, 并且尤其优选 2 至 4 个碳原子的烷基链。

[0206] 因此,本发明还涉及其中将羟烷基淀粉,优选地在其被氧化的还原性端基上与 1, 4-二氨基丁烷、1,3-二氨基丙烷或 1,2-二氨基乙烷进行反应,从而得到氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物的上述方法和接合物。

[0207] 因此,根据第一种选择,将是氨基 NH_2 的官能团 Z 与羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基进行反应,从而得到将羟烷基淀粉与包含 Z 和 W 的化合物连接起来的酰氨基。

[0208] 根据第二种选择,通过还原性胺化将是氨基 NH_2 的官能团 Z 与羟烷基淀粉未被氧化的还原性端基进行反应,从而得到一种亚氨基,随后优选地将其氢化,从而得到氨基,该亚氨基和氨基分别将所说的羟烷基淀粉和包含 Z 和氨基 W 的化合物连接起来。在这种情况下,包含 Z 和 W 的化合物优选地是一种伯胺,就官能团而言,该伯胺仅包含一个氨基。在这种情况下,虽然该化合物仅包含一个官能团,但是其被看作包含 Z 和 W 的双官能团化合物,其中 Z 是与聚合物的还原性端基进行还原性胺化的化合物中所包含的氨基,并且其中 W 是由还原性胺化和随后的氢化所产生的仲氨基。

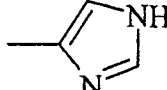
[0209] 根据第三种选择,通过还原性胺化将该聚合物未被氧化的还原性端基与氨进行反应,从而产生了聚合物的末端亚氨基,随后优选地将其氢化,从而得到该聚合物的末端氨基并由此获得末端伯氨基。在这种特定情况下,氨被看作是包含 Z 和 W 的双官能团化合物,其中 Z 是所用氨中所包含的 NH_2 , 并且其中 W 是由还原性胺化和随后的氢化所产生的伯氨基。

[0210] 根据本发明,将优选的氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物进一步与包含官能团 V 和 α -X- β -氨基的化合物进行反应,所说的官能团 V 与 W 进行反应。

[0211] 根据一个优选的实施方案,所说的包含能与 W 反应的官能团 V 和 α -X- β -氨基的化合物是半胱氨酸或组氨酸衍生物。

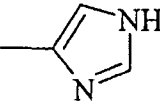
[0212] 根据另一个优选的实施方案,用适宜的活化剂将所说的半胱氨酸衍生物或组氨酸衍生物预活化。其中,适宜的活化剂有碳二亚胺如二异丙基碳二亚胺 (DIC)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC), 尤其优选二异丙基碳二亚胺 (DIC)。

[0213] 当将半胱氨酸衍生物与羟烷基淀粉衍生物的氨基进行反应时,应当适宜地对该半胱氨酸衍生物的 SH 基和氨基进行保护。对于各自的保护基而言,可以使用现有技术中已知的

所有适宜的化合物。因此,如果需要的话,应当适宜地对基团  进行保护。

[0214] 就 SH 基的保护基而言,优选乙酰氨基甲基-(Acm)、叔-丁硫基-(StBu)、4-甲氧基苄基-(4-MeOBzl)、4-甲氧基三苯甲基-(Mmt)、三苯甲基(Trt)-和 4-甲基三苯甲基-(Mtt), 尤其优选 StBu。

[0215] 就氨基的保护基而言,优选叔-丁氧基羰基-(Boc)、苄氧基羰基-(Fmoc)、4-甲氧基三苯甲基-(Mmt)、三苯甲基(Trt)-和 4-甲基三苯甲基-(Mtt), 尤其优选 Fmoc。

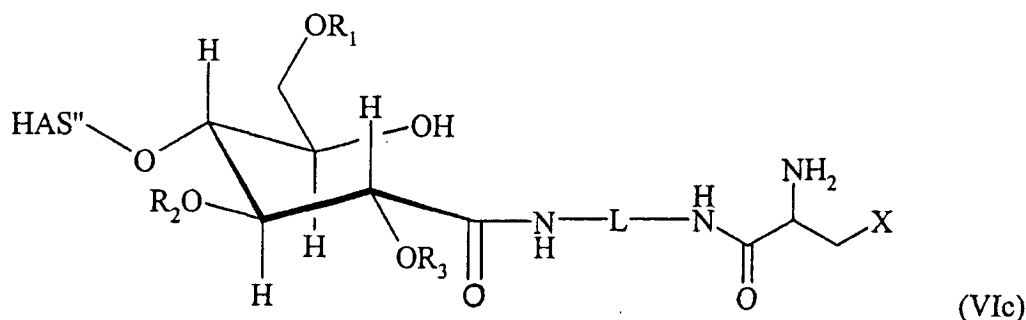
[0216] 就  的保护基而言,优选叔-丁氧基羰基-(Boc)、苄氧基甲基 (Bom)、

二硝基苯基-(Dnp)、4-甲基三苯甲基-(Mtt)、甲苯磺酰基-(Tos)和三苯甲基(Trt)-, 尤其优选 4-甲基三苯甲基-(Mtt)和三苯甲基(Trt)。

[0217] 因此, 本发明还涉及其中包含 V 和 α -X β -氨基的化合物是半胱氨酸或组氨酸或其衍生物, V 是羧基的上述方法。

[0218] 因此, 本发明还涉及式 (VIc) 的 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物

[0219]



[0220] 其中 L 是任选地被适当取代的直链、环状和 / 或支链烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基残基, 其在各自的烷基残基中具有 2 至 10 个碳原子,

[0221] 其中 HAS'' 指的是在还原性端基上没有末端糖单元的 HAS 分子, 并且其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地是氢或羟基烷基, 优选地是羟基乙基。

[0222] 根据另一个实施方案, 本发明还涉及一种上述方法, 其中羟烷基淀粉在其还原性端基上被选择性氧化, 优选地用上述方法选择性氧化, 将所得的羟烷基淀粉与除 Z 外还包含 α -X β -氨基的化合物的官能团 Z 进行反应。

[0223] 因此, 本发明还涉及一种上述方法, 所说的方法包括将羟烷基淀粉在其还原性端基上进行氧化并将该被氧化的还原性端基与除 Z 外还包含 α -X β -氨基的化合物的官能团 Z 进行反应。

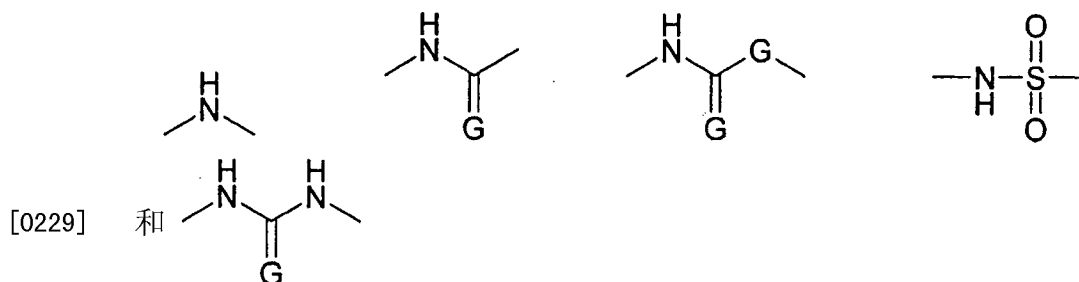
[0224] 根据一个优选的实施方案, Z 包含化学结构 -NH-。

[0225] 根据本发明一个优选的实施方案, 所说的官能团 Z 是具有结构 R' -NH- 的基团, 其中 R' 是氢或烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基, 其中所说的环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被直接连接到该 NH 上, 或者, 根据另一个实施方案, 可以通过氧桥被连接到该 NH 上。该烷基、环烷基、芳基、芳烷基、芳基环烷基、烷芳基或环烷基芳基残基可以被适当取代。就优选的取代基而言, 可提及的有卤素如 F、Cl 或 Br。尤其优选的残基 R' 是氢、烷基和烷氧基, 并且更优选的是氢和未被取代的烷基和烷氧基。

[0226] 在烷基和烷氧基中, 优选具有 1、2、3、4、5、或 6 个碳原子的基团。更优选的是甲基、乙基、丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和异丙氧基。尤其优选的是甲基、乙基、甲氧基、乙氧基, 并且特别优选的是甲基或甲氧基。

[0227] 根据本发明的另一个实施方案, 官能团 Z 具有结构 R' -NH- R'' - , 其中 R'' 优选地包含结构单元 -NH- 和 / 或结构单元 -(C=G)- 和 / 或结构单元 -SO₂-, 其中 G 是 O 或 S。根据更优选的实施方案, 官能团 R'' 选自

[0228]

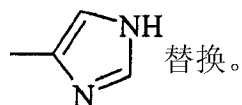


[0230] 其中,如果 G 出现两次,则其独立地是 O 或 S。

[0231] 根据本发明一个特别优选的实施方案,官能团 Z 是氨基 $-NH_2$ 。

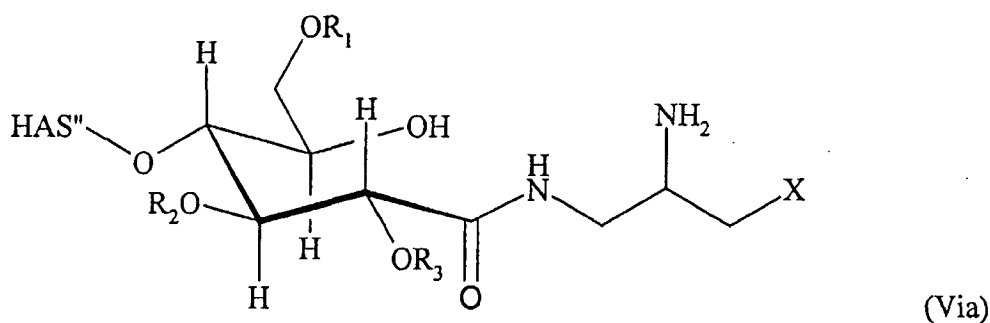
[0232] 该氨基 Z 和 α -硫醇 β -氨基可以被任何适宜的间隔基隔离开。其中,所说的间隔基可以是任选地被取代的直链、支链和 / 或环状烃残基。该烃残基一般具有 1 至 60, 优选 1 至 40, 更优选地为 1 至 20, 更优选地为 1 至 10, 更优选地为 1 至 6 并且尤其优选 1 至 4 个碳原子。如果存在杂原子,则该间隔基团通常包含 1 至 20, 优选 1 至 8 并且尤其优选 1 至 4 个杂原子。该烃残基可包含任选地具有分支的烷基链或芳基或具有例如 5 至 7 个碳原子的环烷基,或者是芳烷基,其中烷基部分可以是直链和 / 或环状烷基的烷芳基。根据一个更优选的实施方案,该烃残基是 1 至 4 个碳原子的烷基链如亚甲基、亚乙基、亚丙基或亚丁基残基。特别优选的是亚甲基残基。

[0233] 因此,本发明还涉及一种上述方法,其中所说的包含 Z 和 α -X β -氨基的化合物是 1,3-二氨基-2-巯基丙烷或 2,3-二氨基-1-巯基丙烷,其中该硫羟基可以被基团

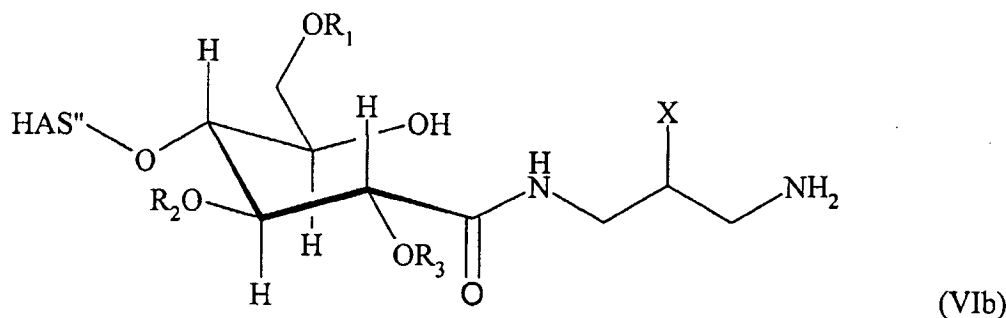


[0234] 因此,本发明还涉及式 (VIa) 或式 (VIb) 的 α -硫羟基 β -氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物

[0235]



[0236]



[0237] 其中 HAS'' 指的是在还原性端基上没有末端糖单元的 HAS 分子,并且其中 R_1 、 R_2 和

R₃ 独立地是氢或羟基烷基, 优选地是羟基乙基。

[0238] 然后, 将该 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物与硫代酸酯官能化的活性物质进行反应。

[0239] 根据本发明的天然化学连接作用反应, 该硫代酸酯官能化的活性物质和 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉反应的中间产物是一种硫代酸酯, 该硫代酸酯通过分子内转乙酰作用被不可逆地转化成包含通过酰胺键与羟烷基淀粉衍生物相连的活性物质的本发明的接合物。

[0240] 硫代酸酯官能化的化合物, 即硫代酸酯官能化的活性物质或硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉或其衍生物与 α -X β -氨基官能化的化合物即 α -X β -氨基官能化的羟烷基淀粉或其衍生物或 α -X β -氨基官能化的活性物质的反应可以在任何适宜的溶剂或至少两种溶剂的混合物中和在适宜的 pH 以及适宜的反应温度下进行。

[0241] 其反应温度优选地为 0 至 40°C, 更优选地或者为 10 至 30°C 如约 20 至 25°C, 如 20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、或 25°C。

[0242] 进行反应的 pH 范围优选地为 5 至 9, 优选地为 6 至 8 并且更优选地为 6.5 至 7.5。

[0243] 就缓冲介质而言, 可提及的有乙酸盐缓冲液如乙酸钠缓冲液, 例如浓度为约 0.1 M 的乙酸钠缓冲液、碳酸氢盐缓冲液如碳酸氢铵缓冲液, 例如浓度为约 0.5M 的碳酸氢铵缓冲液和 / 或磷酸盐缓冲液如磷酸钠缓冲液, 例如浓度为约 0.1 M 的磷酸钠缓冲液。

[0244] 反应时间优选地为最多 48 小时, 更优选地为 1 至 48 小时, 更优选地为 8 至 32 小时并且更优选地为 20 至 24 小时。

[0245] 该反应可以在任何适宜的溶剂中进行。优选的溶剂是水。可以向硫代酸酯官能化的化合物和 / 或 α -X β -氨基官能化的化合物的溶液中加入至少一种适宜的催化剂和 / 或至少一种助剂。

[0246] 其中, 优选的催化剂为浓度为约例如 2 至 6% v/v, 优选地为 3 至 5% v/v 的苯硫酚、或苯硫醇、或浓度为约 0.4 至 0.6M 如约 0.5M 的 MESNA 和 / 或三(羧基乙基)膦或其中两种或多种的混合物。

[0247] 其中, 优选的助剂为浓度为约 1 至 8M, 优选 1 至 7M, 更优选 1 至 6M, 更优选 1 至 5M, 更优选 1 至 4M, 更优选 1 至 3M 如约 2M 的脲、或浓度为约 4 至 8M, 优选 5 至 7M 如约 6M 的盐酸胍, 适宜的有机溶剂如 DMF 或浓度为约 20 至 40% v/v, 优选约 25 至 35% v/v 的乙腈、或浓度为约 2 至 8% v/v, 优选 3 至 7% v/v, 更优选 4 至 6% v/v 如约 5% v/v 的 3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐 (CHAPS)、或浓度为 0.1 至 0.5M, 优选 0.2 至 0.4M 如约 0.3M 的氯化钠。

[0248] 硫代酸酯官能化的化合物和 α -X β -氨基官能化的化合物在反应溶液中的浓度分别优选地为 0.001 至 0.5M, 更优选的为 0.02 至 0.4M, 更优选地为 0.05M 至 0.3M, 更优选地为 0.1 至 0.2M。

[0249] 根据本发明的一个实施方案, 所说的活性物质是包含羧基的小分子药物。在这种情况下, 该活性物质的羧基被适宜地转化成硫代酸酯基 -S-R', 例如用下述方式进行转化:

[0250] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基适当地转化成酰基氯并通过烷硫基-脱卤作用将该酰基氯与硫醇 R' -SH 进行反应 (J. March, 高等有机化学 (Advanced Organic

Chemistry), 第 4 版, John Wiley 和 Sons, 纽约 (1992) 409 或其中所引用的其它方法 (第 0-37 段), 或

[0251] - 通过与硫醇铈 (I) 盐进行反应而将该羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基转化成酰基氯 (Spessard, G. 等人, 有机合成集 (Organic Synthesis Collection), 第 7 卷, 87), 或

[0252] - 通过将羧酸封端的羟烷基淀粉与二烷基或二苯基氯代磷酸酯进行反应而形成一种酸酐, 然后将该酸酐转化成相应的硫代酸酯 (Masamune, S., 等人, Can. J. Chem. 53(1975) 3693), 或者

[0253] - 用相对酸性的硫醇将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基转化成羧酸的酰基咪唑 (例如, 其是通过将相应的羧酸与例如 N, N- 羰基二咪唑进行反应制得的) (Masamune, S., 等人, J. Am. Chem. Soc. 98(1976) 7874), 或者

[0254] - 用二硫化物和三苯基膦将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基转化成相应的硫代酸酯 (Mukaiyama, T. 等人, Bull. Chem. Soc. Jpn. 43(1970) 1271), 或者

[0255] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与芳基异硫氰酸酯进行反应 (Grieco, P. 等人, Tetrahedron Lett. 43(1979) 1283), 或

[0256] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与硫代吡啶基氯甲酸酯进行反应 (Corey, E. J., 等人, Tetrahedron Lett. (1979), 2875), 或

[0257] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与 2- 氟 -N- 甲基吡啶鎓甲苯磺酸盐进行反应 (Watanabe, Y., 等人, Chem. Lett. (1976) 741), 或

[0258] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与 1- 羟基苯并三唑进行反应 (Pelter, A., 等人, J. Chem. Soc., Perkin trans I(1977) 1672)。

[0259] 优选下述方式将活性物质的羧基转化成硫代酸酯基 -S-R' :

[0260] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基适当地转化成酰基氯并将该酰基氯与硫醇 R' -SH 通过烷硫基 - 脱卤作用进行反应 (J. March, 《高等有机化学》 (Advanced Organic Chemistry), 第 4 版, John Wiley 和 Sons, 纽约 (1992) 409, 和其中所列举的其它方法 (第 0-37 段), 或者

[0261] - 将羟烷基淀粉的被氧化的还原性端基与碳二亚胺如二异丙基碳二亚胺 (DIC)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC)、在固体支撑物上的固定的 EDC 和硫醇进行反应 (C. E-Lin 等人 Tetrahedron Lett. 43(2002) 4531-34; M. Adamczyk, Tetrahedron Lett. 37(1996) 4305-8, J. Hovinen, Nucleosides Nucleotides 18(1999) 1263-4)。

[0262] 根据本发明的另一个实施方案, 所说的活性物质是人工制造的肽。根据本发明一种优选的选择, 所说的硫代酸酯官能化的肽是用适于硫代酸酯官能化的肽的适宜合成树脂来进行制备的。

[0263] 硫代酸酯官能化的肽可以用 Boc 化学以及 Fmoc 化学来合成。Tam 等人描述了用 Boc 化学在酸不稳定的 Trt- 巯基 - 丙酰基 - MBHA 树脂上进行的硫代酸酯官能化的肽的合成 (Tam., J. P., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(1995) 12485)。根据一个尤其优选的实施方案, 用 TFA/DCM 除去 Trt 基。然后, 对其进行洗涤并用 DIPEA 进行中和, 用 DIPCDI/HOBt 活化给该树脂负载肽的 C- 末端残基。然后, 优选地用 AcCl/DIPEA 在 DCM 中对未进行反应的硫醇酯部位进行封端。在用标准 Boc 方案进行链延长后, 进行 HF 裂解, 得到侧链去保护

的硫代酸酯官能化的肽。

[0264] Li 等人描述了用 Fmoc 化学进行的硫代酸酯官能化的肽的合成 (Li, X. 等人, (1998) *Tetrahedron Letters* 39 (47) :8669-8672)。在一个优选的实施方案中,用 1- 甲基吡咯烷、六亚甲基亚胺和 HOBt 的混合物作为除去 Fmoc 的解封剂,优选地在 NMP 和 DMSO 的混合物中进行解封,其中更优选地为 NMP 和 DMSO 的摩尔比为 1 : 10 至 10 : 1,更优选地为 1 : 5 至 5 : 1,最优选地为 1 : 2 至 2 : 1 的混合物。所用的树脂可以是例如 Li 等人所列举的树脂或者在 Goldstein 和 Gelb (2000) *Tetrahedron Letters* 41 (16) :2797-2800 中所列举的树脂。

[0265] 另一种制备硫代酸酯官能化的肽的方法也是以 Fmoc 化学为基础的,并且采用了使用硫解裂解的氨磺酰基丁酰基安全截留 (safety-catch) 联结子,例如得自 4- 氨磺酰基丁酰基 NovaSyn TG 树脂 (Shin, Y., 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999), 11684 ;Ingenito, R., 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 11369)。用于 Boc 化学和 Fmoc 化学的用所述联结子修饰的合成树脂都可以通过商业途径获得 (例如可得自 Novabiochem, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, 德国)。

[0266] 因此,本发明还涉及一种制备硫代酸酯官能化的肽的方法,所说的方法包括通过化学固相肽合成在一种合成树脂上制备所说的肽,所说的树脂使得在侧链去保护后在从固体支撑物上裂解下来的最后步骤中可以形成 C- 末端硫代酸酯。

[0267] 根据本发明的另一个实施方案,所说的活性物质是蛋白质。

[0268] 所说的蛋白质可以用化学合成操作来进行制备或者可以是任何人或其它哺乳动物来源的,并且可以通过对天然来源如人或动物来源的蛋白质进行纯化来获得。在这种情况下,可以通过将所说蛋白质的至少一个官能团与包含至少一个可以与所说蛋白质的官能团进行反应的官能团和至少一个是硫代酸酯基的其它官能团或可以被化学修饰从而得到硫代酸酯基的基团 G 的适宜化合物进行反应来制备该蛋白质的衍生物。该类化学修饰可以是这种官能团 G 与另一种包含可与 G 反应的官能团和是硫代酸酯基 -S-R' 的另一种官能团的化合物的反应。

[0269] 就蛋白质的官能团而言,可提及的有羟基、氨基、硫羟基、羧基、酮基、醛基或半缩醛基。

[0270] 所说的酮基或醛基或半缩醛可以通过将蛋白质的糖单元如糖基化蛋白质的碳水化合物侧链的糖单位化学或酶促氧化来产生。

[0271] 根据蛋白质官能团的化学性质,可以与蛋白质的官能团进行反应的适宜化合物的官能团有例如:

[0272] - C-C- 双键或 C-C- 三键或芳族 C-C- 键;

[0273] - 巯基或羟基;

[0274] - 烷基磺酰肼、芳基磺酰肼;

[0275] - 1,2- 二醇;

[0276] - 1,2- 氨基 - 硫醇;

[0277] - 叠氮化物;

[0278] - 1,2- 氨基醇;

[0279] - 氨基 -NH₂ 或包含结构单元 -NH- 的氨基衍生物如氨基烷基、氨基芳基、氨基芳

烷基或烷芳基氨基；

[0280] - 羟基氨基 $-O-NH_2$ ，或包含结构单元 $-O-NH-$ 的羟基氨基的衍生物，如羟基烷基氨基、羟基芳基氨基、羟基芳烷基氨基或羟基烷芳基氨基；

[0281] - 烷氧基氨基、芳氧基氨基、芳烷氧基氨基或烷芳氧基氨基，其各自包含结构单元 $-NH-O-$ ；

[0282] - 具有羰基的残基， $-Q-C(=G)-M$ ，其中 G 是 O 或 S，并且 M 是例如，

[0283] -- $-OH$ 或 $-SH$ ；

[0284] -- 烷氧基、芳氧基、芳烷氧基或烷芳氧基；

[0285] -- 烷硫基、芳硫基、芳烷硫基或烷芳硫基；

[0286] -- 烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、芳烷基羰基氧基、烷芳基羰基氧基；

[0287] -- 活性酯如具有酰亚胺结构的羟基胺如 N-羟基琥珀酰亚胺或具有结构单元 $O-N$ 并且其中 N 是杂芳基化合物的一部分的羟基胺的酯，或者 $G=O$ 且 Q 不存在，如具有被取代的芳基残基如五氟苯基、对硝基苯基或三氯苯基的芳氧基化合物；

[0288] 其中 Q 不存在或者是 NH 或杂原子如 S 或 O；

[0289] - $-NH-NH_2$ 或 $-NH-NH-$ ；

[0290] - $-NO_2$ ；

[0291] - 腈基；

[0292] - 羰基如醛基或酮基；

[0293] - 羧基；

[0294] - $-N=C=O$ 或 $-N=C=S$ 基；

[0295] - 卤化乙烯基如碘乙烯或溴乙烯基或三氟甲磺酸酯；

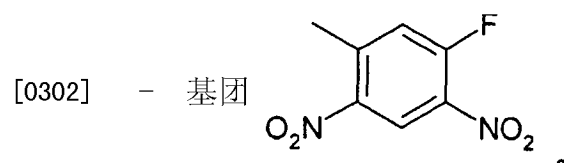
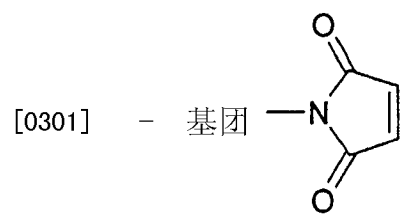
[0296] - $-C \equiv C-H$ ；

[0297] - $-(C=NH_2Cl)-O$ 烷基

[0298] - $-(C=O)-CH_2-Hal$ ，其中 Hal 是 Cl、Br 或 I；

[0299] - $-CH=CH-SO_2-$ ；

[0300] - 包含结构 $-S-S-$ 的二硫化物基团；



[0303] 所说适宜化合物的官能团和硫代酸酯基或基团 G 可以被任何适宜的间隔基隔离开。其中，所说的间隔基可以是任选地被取代的直链、支链和 / 或环状烃残基。该烃残基一般具有 1 至 60，优选 1 至 40，更优选 1 至 20，更优选 2 至 10，更优选 2 至 6 并且尤其优选 2 至 4 个碳原子。如果存在杂原子，则该间隔基团通常包含 1 至 20，优选 1 至 8 并且尤其优选 1 至 4 个杂原子。该烃残基可包含任选地具有分支的烷基链或芳基或具有例如 5 至 7 个碳

原子的环烷基,或者是芳烷基、其中烷基部分可以是直链和 / 或环状烷基的烷芳基。

[0304] 在用包含可与 G 反应的官能团和是硫代酸酯基 -S-R' 的另外的官能团的另外的化合物对基团 G 进行化学修饰的情况中,可以与 G 反应的官能团适宜地选自关于 Q 所描述的上述官能团。硫代酸酯基和与 G 反应的基团可以被任何适宜的间隔基隔离开。其中,所说的间隔基可以是任选地被取代的直链、支链和 / 或环状烃残基。该烃残基一般具有 1 至 60,优选 1 至 40,更优选 1 至 20,更优选 2 至 10,更优选 2 至 6 并且尤其优选 2 至 4 个碳原子。如果存在杂原子,则该间隔基团通常包含 1 至 20,优选 1 至 8 并且尤其优选 1 至 4 个杂原子。该烃残基可包含任选地具有分支的烷基链或芳基或具有例如 5 至 7 个碳原子的环烷基,或者是芳烷基、其中烷基部分可以是直链和 / 或环状烷基的烷芳基。

[0305] 所说的蛋白质优选地是重组制得的。其包括通过基因或 cDNA 克隆或 DNA 合成获得的外源性 DNA 序列的原核或真核宿主表达。蛋白质的重组制备在现有技术中是已知的。其一般包括将宿主细胞用适宜的表达载体转染、将宿主细胞在能制备蛋白质的条件下进行培养和由该宿主细胞对蛋白质进行提纯。

[0306] 根据另一个优选的实施方案,使用可以产生硫代酸酯官能化的蛋白质,优选 C-末端多肽 - 硫代酸酯的表达载体。在一个实施方案中,所说的硫代酸酯官能化的蛋白质通过 C-末端硫代酸酯键被键合到内蛋白质多肽上,优选地被键合到内蛋白质亲和标记物融合多肽上。该类硫代酸酯官能化的蛋白质可通过用优选是突变型的内蛋白质 -CBD 多肽对感兴趣的蛋白质进行框内融合而获得,例如在可通过商业途径获得的载体 IMPACT(TM) -CN 系统如 pCYB 或 pTYB(New England Biolabs, Frankfurt/Main, 德国) 的背景内。通过硫代酸酯键被键合到内蛋白质上的硫代酸酯官能化的蛋白质 (TFPI) 优选地包含与内蛋白质的 C-末端融合的亲和标记物,所说的亲和标记物更优选地是甲壳质 - 结合结构域 (CBD)、聚组氨酸 - 标记物、Strep- 标记物或 GST。在一个实施方案中,该 TFPI 通过一种亲和标记物进一步被结合到相应的亲和树脂上,例如通过一种与内蛋白质融合的 CBD 被结合到甲壳质 - 小珠上 (见,例如, Muir 等人 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :6705-6710)。在一个优选的实施方案中,在可以保持硫代酸酯键完整性的条件下在亲和树脂上对 TFPI 进行纯化 (见 Muir 等人,同上)。然后,可以将与亲和树脂结合的 TFPI 与 α -X β -氨基官能化的 HES 进行反应,优选与 α -X β -氨基官能化的 HES 如平均分子量为约 10kD 的 α -X β -氨基官能化的 HES 进行反应。

[0307] 优选产生一种通过硫代酸酯键与烷基 -、芳基 - 或芳烷基 - 残基结合的硫代酸酯官能化的蛋白质 (TFPA),例如通过将所说的 TFPI 与烷基硫醇、芳基硫醇或芳烷基硫醇进行反应来产生该蛋白质。在一个优选的实施方案中,所说的烷基硫醇不是二硫醇并且选自甲基 -、乙基 -、丙基 - 或丁基硫醇;特别优选乙基硫醇。该烷基硫醇还可以是巯基烷基碳酸或巯基烷基磺酸。特别优选地是 2- 巯基乙磺酸。在另一个实施方案中,所说的芳基硫醇不是二硫醇并且可以是例如,苯硫酚、1- 硫代 -2- 硝基苯酚、2- 巯基 - 苯甲酸、2- 巯基吡啶、4- 巯基 -2- 吡啶甲酸或 4- 巯基 -2- 硝基吡啶。可以如例如 US2002/0151006A1 实施例 3 中所述的对 Ab1-SH3 乙基 - 硫代酸酯进行分离的方法将 TFPA 分离出来,可以将其直接用于与 α -X β -氨基官能化的 HES 进行反应,或者可以对其进一步进行纯化,然后用其来进行反应,或者可以将其储存起来然后以后用其来进行反应。TFPA 的另一个实例如 Iakovenko, A., 等人, FEBS Letters 468 (2000) 155-158 所述,其中在第 2.2 节制备了一种硫代酸酯官

能化的 Rab7 Δ C6 (一种与 2-巯基乙磺酸形成的硫代酸酯), 对其进行了纯化, 在用其进行最后的偶联步骤之前将其储存起来。

[0308] 因此, 本发明还涉及一种上述方法, 其中所说的活性物质是用可以产生硫代酸酯官能化蛋白质的表达体制得的蛋白质。

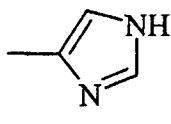
[0309] 本发明另一方面还涉及一种用上述方法获得的接合物。

[0310] 认为本发明的方法是一种有化学选择性 (chemoselective) 的方法, 即根据上述选择, 使羟烷基淀粉或其衍生物, 优选羟乙基淀粉或其衍生物在活性物质的特定部位进行偶联, 如在活性物质具有 N-末端半胱氨酸残基的情况中, 如上所述的那样选择在活性物质的 N-末端进行偶联, 或者在活性物质具有 C-末端硫代酸酯基的情况中, 如上所述那样选择在活性物质的 C-末端进行偶联, 其中分别将活性物质与硫代酸酯官能化的羟烷基淀粉衍生物和 α -硫羟 β -氨基官能化的羟烷基淀粉衍生物进行反应。

[0311] 在本发明上下文中所用的术语“在末端选择性地”指的是在统计学上 50% 以上, 优选至少 55%, 更优选至少 60%, 更优选至少 65%, 更优选至少 70%, 更优选至少 75%, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 并且更优选至少 95% 如 95%、96%、97%、98% 或 99% 的活性物质分子仅通过各自的末端进行反应。

[0312] 本发明还包括其中 α -硫羟 β -氨基的硫羟基被下式基团所替代的实施方案

[0313]



[0314] 因此, 除半胱氨酸外, 还可以使用组氨酸, 优选 N-末端半胱氨酸或组氨酸。

[0315] 在制备本发明接合物的方法中, 上述方法中的转化率可以为至少 50%, 更优选的为至少 70%, 更优选地为至少 80% 并且特别是 95% 或更高, 如至少 98% 或 99%。

[0316] 本发明另一方面还涉及用于对人或动物体进行治疗的方法中的上述接合物或用上述方法获得的接合物。

[0317] 本发明接合物的纯度为至少 50%, 更优选地为至少 70%, 更优选地为至少 90%, 特别是至少 95% 或至少 99%。在一个最优选的实施方案中, 该接合物的纯度为 100%, 即不存在其它副产物。

[0318] 因此, 本发明另一方面还涉及包含本发明接合物的组合物, 其中所说接合物的量为至少 50 重量%, 更优选地为至少 70 重量%, 更优选地为至少 90 重量%, 特别是至少 95 重量% 或至少 99 重量%。在一个最优选的实施方案中, 该组合物由所说的接合物所组成, 即接合物的量为 100 重量%。

[0319] 因此, 本发明还涉及包含上述接合物或用上述方法获得的接合物的药物组合物。

[0320] 此外, 本发明还涉及一种包含上述接合物或用上述方法获得的接合物的药物组合物, 所说的药物组合物还包含至少一种可药用的稀释剂、助剂、或载体。

[0321] 附图简要描述

[0322] 图 1 表示用凝胶电泳对实施例 2.1 的肽-硫代酸酯 Cys-HES 接合物粗品进行的分析。

[0323] 对于凝胶电泳而言, 使用 XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH,

Karlsruhe, D) 和 Consort E143 电源 (CONSORTnv, Turnhout, B)。根据制造商的指导使用 12% Bis-Tris 凝胶和在还原条件下使用 MES SDS 运行缓冲剂 (二者都来自 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) :

[0324] 泳道 A :Roti [®] -Mark STANDARD (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D) 从顶端到底部的分子量标记 :200 KD, 119 KD, 66 KD, 43KD, 29 KD, 20 KD, 14.3 KD ;

[0325] 泳道 B :用苯硫酚作为催化剂的肽 - 硫代酸酯 A 与 H-Cys (S-tBu) -HES10/0.4 的接合 ;

[0326] 泳道 C :用苯硫醇作为催化剂的肽 - 硫代酸酯 A 与 H-Cys (S-tBu) -HES10/0.4 的接合 ;

[0327] 泳道 D :Roti [®] -Mark STANDARD ;

[0328] 泳道 E :没有催化剂的肽 - 硫代酸酯 A 与 H-Cys (S-tBu) -HES10/0.4 的接合。

[0329] 图 2 表示用凝胶电泳对实施例 2.2 的 Cys- 肽硫代酸酯 -HES 接合物粗品进行的分析。

[0330] 对于凝胶电泳而言, 使用 XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) 和 Consort E143 电源 (CONSORTnv, Turnhout, B)。根据制造商的指导使用 12% Bis-Tris 凝胶和在还原条件下使用 MES SDS 运行缓冲液 (二者都来自 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) :

[0331] 泳道 A :Roti [®] -Mark STANDARD (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D) 从顶端到底部的分子量标记 :200 KD, 119 KD, 66 KD, 43KD, 29 KD, 20 KD, 14.3 KD ;

[0332] 泳道 B :用苯硫酚作为催化剂的硫代酸酯 -HES 10/0.4 与 GM-CSF 抑制剂肽 (54-78) 的接合 ;

[0333] 泳道 C :GM-CSF 抑制剂肽 (54-78)。

[0334] 图 3 表示用凝胶电泳对实施例 2.3 的 EPO 硫代酸酯 -HES 接合物粗品进行的分析。

[0335] 对于凝胶电泳而言, 使用 XCell Sure Lock Mini Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) 和 Consort E143 电源 (CONSORTnv, Turnhout, B)。根据制造商的指导使用 10% Bis-Tris 凝胶和在还原条件下使用 MOPSSDS 运行缓冲液 (二者都来自 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)。

[0336] 泳道 A :Roti [®] -Mark STANDARD (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D) 从顶端到底部的分子量标记 :200 KD, 119 KD, 88 KD, 43KD, 29 KD, 20 KD, 14.3 KD ;

[0337] 泳道 B :用苯硫酚作为催化剂的 6.9 当量硫代酸酯 -HES 与 EPO 的接合 ;

[0338] 泳道 C :用苯硫酚作为催化剂的 34.5 当量硫代酸酯 -HES 与 EPO 的接合 ;

[0339] 泳道 D :用苯硫酚作为催化剂的没有硫代酸酯 -HES 的 EPO。

[0340] 实施例

[0341] 实施例 1 :官能化的 HES 的合成 :

[0342] 实施例 1.1 由被氧化的 HES 进行的氨基 -HES 的合成

[0343] 将 5.122g 根据 DE 19628705 A1 的描述在其还原性端基选择性氧化的 HES (MW = 14,500 D, DS = 0.41, Supramol Parenteral Colloids GmbH, Rosbach-Rodheim, D) 在 80°C 下在真空下加热 15.5 小时并且将其在氮气下溶解于 25mL 无水 DMSO (Fluka, Sigma-Aldrich

Chemie GmbH, Taufkirchen, D) 中。向所得的溶液中加入 51.22mmol 1,4-二氨基丁烷 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D)。在将其在 40°C 下保温 17 小时后, 将该反应混合物加入到 150mL 冰冷的 1 : 1 的乙醇 (DAB, Sonnenberg, Braunschweig, D) 和丙酮 (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D) (v/v) 混合物中并将其在 -20°C 下保温 1 小时。通过在 4°C 下离心收集沉淀出来的产物, 用 40ml 相同的混合物对其进行洗涤, 将其重新溶解于 80mL 水中, 用水透析 40 小时 (SnakeSkin 透析管, 3.5 kD 截留值, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D), 然后将其冷冻干燥。以 67% 的收率分离获得产物。

[0344] 实施例 1.2 由实施例 1.1 的氨基-HES 进行的 H-Cys(S-tBu)-HES 的合成

[0345] 将 86.3mg Fmoc-Cys(S-tBu)-OH (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) 和 45.9mg 1-羟基-1H-苯并三唑 (Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) 溶解于 2mL N,N-二甲基甲酰胺 (肽合成级, Biosolve, Valkenswaard, NL) 中并向其中加入 40.7 μ LN,N'-二异丙基碳二亚胺 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D)。

[0346] 在将其在 21°C 下保温 30 分钟后, 向其中加入 206mg 如实施例 1.1 所述那样合成的氨基-HES。在将其在 22°C 下振摇 19 小时后, 将该反应混合物加入到 14mL 冰冷的 2-丙醇 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) 中。通过在 4°C 下离心收集沉淀出来的产物, 将其重新混悬于 8ml 2-丙醇中并如上所述的那样对其进行离心。将沉淀溶解于 20mL 水中, 向其中加入 20ml 二氯甲烷 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) 并将该混合物涡旋。在离心后, 将上面的水层分离出来, 用水透析 43 小时 (SnakeSkin 透析管, 3.5kD 截留值, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) 并将其冷冻干燥。以 67% 的收率分离获得 Fmoc-Cys(S-tBu)-HES。

[0347] 将 100.7mg Fmoc-Cys(S-tBu)-HES 溶解于 1mL 20% 的位于 DMF(v/v) 中的哌啶 (Acros Organics, Geel, B) 中。在将其在 22°C 下振摇 15 分钟后, 将该反应混合物加入到 20mL 叔-丁基甲基醚 (Acros Organics, Geel, B) 中。通过在 4°C 下离心收集沉淀出来的产物, 将其重新混悬于 10ml 叔-丁基甲基醚中并将其离心。在干燥后, 将沉淀溶解于 10mL 水中并将其用水透析 31 小时 (SnakeSkin 透析管, 3.5 kD 截留值, Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D) 并将其冷冻干燥。以 80% 的收率分离获得 H-Cys(S-tBu)-HES。

[0348] 实施例 1.3 由实施例 1.1 的氨基-HES 进行的硫代酸酯-HES 的合成

[0349] 将 29.3mg 五氟苯基 S-苄基硫代琥珀酸酯 (Link technologies, Bellshill, UK) 和 10.1mg 1-羟基-1H-苯并三唑 (Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) 溶解于 1.5mL N,N-二甲基甲酰胺 (肽合成级, Biosolve, Valkenswaard, NL) 中, 向其中加入 75mg 如实施例 1.1 所述那样合成的氨基-HES。在将其在 22°C 下振摇 15 小时后, 将该反应混合物加入到 15mL 叔-丁基甲基醚 (Acros Organics, Geel, B) 中。通过在 4°C 下离心收集沉淀出来的产物, 将其重新混悬于 8ml 叔-丁基甲基醚中并对其离心。将该沉淀在氮气流下进行干燥。

[0350] 实施例 2 通过化学连接作用进行的蛋白质-HES 接合物的合成:

[0351] 实施例 2.1 由 H-Cys(S-tBu)-HES 和肽-硫代酸酯 A 进行的肽-硫代酸酯 A-HES 接合物的合成

[0352] 在 22°C 下, 向 5 μ L 10mg/mL 肽-硫代酸酯 A (GBF, Braunschweig, D, 氨基酸序列:

H-SPFGADTTVCCFNYSVRKLPQNHVKDYFYTSSK- 硫代丙酸乙酯 ;MW = 3,920g/mol) 在 1 : 1(v/v) 的 N, N- 二甲基甲酰胺 (肽合成级, Biosolve, Valkenswaard, NL) 和 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 的混合物中的溶液中加入 5 μ L 255mg/mL 如实施例 1.2 所述那样合成的 H-Cys(S-tBu)-HES 溶液和 5 μ L 1.5 M 位于 DMF 中的催化剂溶液。就催化剂而言, 使用苯硫酚 (图 1, 泳道 B) 或苯硫醇 (图 1, 泳道 C)。作为一种反应对照, 用 5 μ L 缓冲液代替催化剂溶液加入到 HES- 衍生物和肽的混合物中 (图 1, 泳道 E)。

[0353] 将该混合物在室温下放置一整夜并用凝胶电泳对其进行分析 (图 1)。

[0354] 实施例 2.2 由硫代酸酯 -HES 和 GM-CSF 抑制剂肽进行的 GM-CSF 抑制剂肽 -HES 接合物的合成

[0355] 在 22°C 下, 向 10 μ L 2.82mg/mL N- 末端 Cys- 肽 GM-CSF 抑制剂肽 (54-78) (Bachem AG, Order-No. H-3438, Bubendorf, CH, 氨基酸序列: H-Cys-Leu-Gln-Thr-Arg-Leu-Glu-Leu-Tyr-Lys-Gln-Gly-Leu-Arg-Gly-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-Lys-Gly-Pro-Leu-Thr-OH ;MW = 2,816.4g/mol) 在 0.1M 的含有 150mM 氯化钠和 5mM EDTA 的磷酸钠缓冲液 (pH7.2) 中的溶液中加入 32 μ L 156mg/mL 如实施例 1.3 所述那样合成的硫代酸酯 -HES 在相同缓冲液中的溶液和 1.7 μ L 苯硫酚 (图 2, 泳道 B)。

[0356] 将该混合物在室温下放置一整夜并用凝胶电泳对其进行分析 (图 2)。实施例 2.3 反应对照 - 用硫代酸酯 -HES 与 EPO 一起进行保温

[0357] 在 22°C 下, 向 19.2 μ L 0.78mg/mL EPO (重组制得的具有人 EPO 氨基酸序列并且具有与商业获得的 Erypo [®] (Ortho Biotech, Jansen-Cilag) 或 NeoRocormon [®] (Roche) 的特性基本相同特性的 EPO, 参见 EP 0 148 605、EP 0 205 564、EP 0 411 678) 在 10mM 的含有 150mM 氯化钠的磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 中的溶液中加入 1.7 μ L 苯硫酚和 5 μ L 10 或 50mg/mL 如实施例 1.3 所述那样获得的硫代酸酯 -HES 在 0.1M 的含有 150mM 氯化钠和 50mMEDTA 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 中的溶液 (图 3, 泳道 B 和 C)。作为反应对照, 进行不存在硫代酸酯 -HES 的相同反应 (图 3, 泳道 D)。

[0358] 将该混合物在室温下放置一整夜并用凝胶电泳对其进行分析。

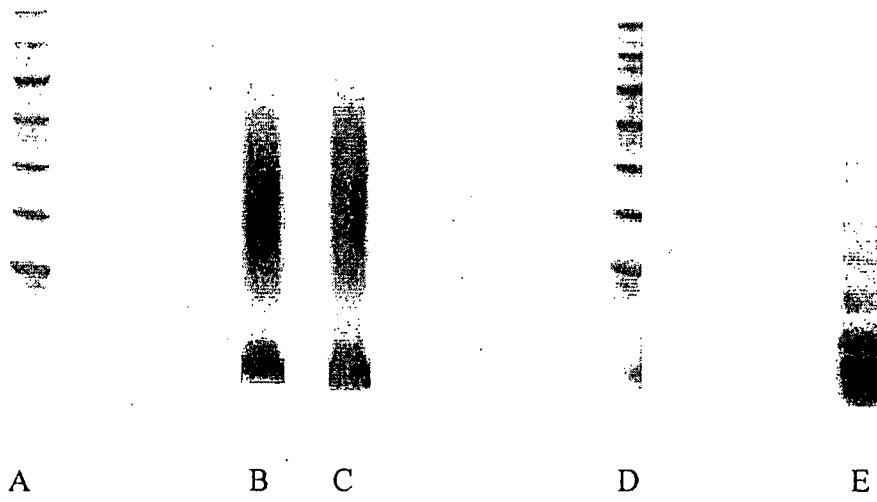


图 1

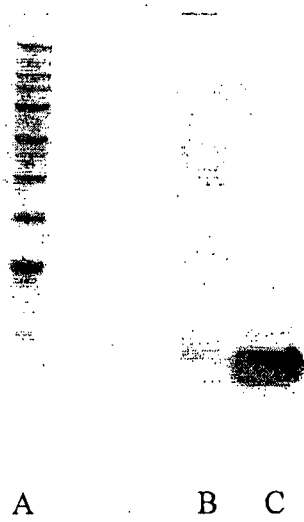


图 2

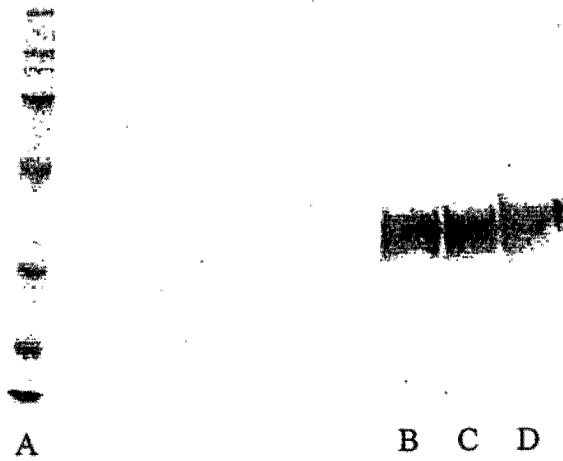


图 3