

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 47/48

C08B 31/18



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03805183.4

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1638808A

[22] 申请日 2003.2.28 [21] 申请号 03805183.4

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 6 [33] DE [31] 10209821.2

[86] 国际申请 PCT/EP2003/002083 2003.2.28

[87] 国际公布 WO2003/074087 德 2003.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.3

[71] 申请人 弗雷泽纽斯卡比德国有限公司

地址 德国巴特洪堡

[72] 发明人 于尔根·亨贝格尔 米歇尔·奥兰多

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

权利要求书 5 页 说明书 19 页

[54] 发明名称 蛋白质与修饰多糖的偶联

[57] 摘要

本发明涉及一种将蛋白质与一种淀粉衍生的修饰多糖偶联的方法。修饰多糖与蛋白质之间的结合作用以共价键为基础，该共价键是下列两种基团之间偶联反应的结果：修饰多糖分子的末端醛基或者通过该醛基化学反应产生的官能团，和能够与多糖分子的醛基或所产生的官能团反应的蛋白质官能团。偶联反应直接产生的键可以任选地通过进一步反应进行修饰形成上述共价键。本发明还涉及含有在该偶联过程中形成的偶联物的药物组合物，以及所述偶联物和组合物在人或动物体的预防或治疗中的用途。

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

1. 一种羟烷基淀粉-蛋白质偶联物，其特征在于羟烷基淀粉分子与蛋白质之间的结合作用是以共价键合为基础，该键合由下述两种基团偶联反应形成：(i)羟烷基淀粉分子的末端醛基，或通过化学反应由该醛基衍生的官能团，(ii)能够与羟烷基淀粉分子的该醛基或由其衍生的官能团反应的蛋白质的官能团，其中偶联反应直接产生的键合必要时可以通过进一步反应被适宜地修饰形成上述共价键合。

2. 如权利要求 1 所述的羟烷基淀粉-蛋白质偶联物，其特征在于通过化学反应由羟烷基淀粉分子的末端醛基衍生的官能团是已经与末端醛基反应的双功能接头分子的官能团之一。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的羟烷基淀粉-蛋白质偶联物，其特征在于该蛋白质的反应性官能团是已经与该蛋白质偶联的双功能接头分子的官能团之一。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的羟烷基淀粉-蛋白质偶联物，其特征在于该蛋白质的反应性官能团是通过对原始氨基酸序列进行重组修饰而引入蛋白质内。

5. 如权利要求 1、3 或 4 所述的羟烷基淀粉-蛋白质偶联物，其特征在于共价键合由下述两种基团的偶联反应形成：羟烷基淀粉分子的末端醛基通过选择性氧化形成的羧基或活化的羧基与蛋白质的伯氨基或硫醇基。

6. 如权利要求 5 所述的偶联物，其特征在于共价键合是由下述两种基团的偶联反应形成的酰胺键：羟烷基淀粉分子的末端醛基通过选择性氧化形成的活化羧基与蛋白质的伯氨基。

7. 如权利要求 1、3 或 4 所述的偶联物，其特征在于共价键合是如下形成的酰胺键：羟烷基淀粉分子的末端醛基与蛋白质的伯氨基之间的偶联反应形成希夫碱、再将希夫碱还原为胺。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的偶联物，其特征在于羟烷基淀粉分子的分子量为约 4 到约 1000 kD。

9. 如权利要求 8 所述的偶联物, 其特征在于羟烷基淀粉分子的分子量为约 4 到约 50 kD。

10. 如权利要求 8 所述的偶联物, 其特征在于羟烷基淀粉分子的分子量为约 70 到约 1000 kD。

5 11. 如权利要求 10 所述的偶联物, 其特征在于羟烷基淀粉分子的分子量约为 130 kD。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的偶联物, 其特征在于羟烷基淀粉分子的取代程度为约 0.3 到约 0.7。

10 13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的偶联物, 其特征在于羟烷基淀粉分子的 C2 与 C6 取代之比为 8 到 12。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的偶联物, 其特征在于羟烷基淀粉分子是一种羟乙基淀粉分子。

15 15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的偶联物, 其特征在于该蛋白质具有调节或催化功能、信号传导或转运功能、或在免疫应答或诱导免疫应答中的功能。

16. 如权利要求 15 所述的偶联物, 其特征在于该蛋白质选自: 酶、抗体、抗原、转运蛋白、生物粘附蛋白、激素和激素原、生长因子和生长因子受体、细胞因子、受体、抑制因子、激活剂、抑制剂或其功能衍生物或片段。

20 17. 如权利要求 15 或 16 所述的偶联物, 其特征在于该蛋白质是: α -、 β -或 γ -干扰素, 白介素, 血清蛋白质如白蛋白或凝血因子, 促红细胞生成素, 肌红蛋白, 血红蛋白, 纤溶酶原活化因子, BCGF, BDGF, EGF, FGF, NGF, PDGF, BDNF, CNTF, TGF- α , TGF- β , 集落刺激因子, BMP, 生长调节素, 促生长素, 促生长素抑制素, 胰岛素, 促性腺激素, α -MSH, 曲普瑞林, 催乳素, 降钙素, 胰高血糖素, 胰高血糖素样肽如 GLP-1 或 GLP-2, 肠促胰岛素类似物, 瘦素, 胃泌素, 促胰液素, 整联蛋白, 下丘脑激素如 ADH、催产素、释放素或抑制素, 甲状腺激素如甲状腺素、促甲状腺素、促甲状腺素释放素, 生长激素如人生长激素, LH, FSH, 色素激素, TNF- α 或 TNF- β , 水蛭素,

25

脂蛋白或载脂蛋白如 Apo-B、Apo-E、Apo-La, 寡赖氨酸蛋白, RGD 蛋白, 凝集素或蓖麻毒素, 蜂毒或蛇毒, 免疫毒素, 豚草变应原, E 抗原, 免疫球蛋白, 或这些蛋白质之一的受体, 或这些蛋白质或受体之一的功能衍生物或片段。

5 18. 如权利要求 15 或 16 所述的偶联物, 其特征在于该蛋白质是选自下列的酶: 天冬酰胺酶, 精氨酸酶, 精氨酸脱氨酶, 腺苷脱氨酶, 谷氨酰胺酶, 谷氨酰胺酶-天冬酰胺酶, 苯丙氨酸氨裂合酶, 色氨酸酶, 酪氨酸酶, 超氧化物歧化酶, 内毒素酶, 过氧化氢酶, 过氧化物酶, 激肽释放酶, 胰蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶, 弹性蛋白酶, 嗜热菌蛋白酶, 脂酶, 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, glucodase, 葡糖酸氧化酶, 半乳糖苷酶, 葡糖脑苷脂酶, 葡糖苷酸酶, 透明质酸酶, 组织因子, 组织纤溶酶原激活物, 链激酶, 尿激酶, MAP 激酶, DNase, RNase, 乳铁蛋白, 及其功能衍生物或片段。

15 19. 一种药物组合物, 其含有有效量的权利要求 1-18 中任一项所述的偶联物, 和可药用载体, 和必要时其它赋形剂和活性成分。

20 20. 如权利要求 1-18 中任一项所述的偶联物或如权利要求 19 所述的组合物在人或动物治疗或预防中的用途。

20 21. 一种制备如权利要求 1-18 中任一项所述的羟烷基淀粉-蛋白质偶联物的方法, 其特征在于在水溶液中进行下述基团之间的偶联反应: 羟烷基淀粉分子的末端醛基、或通过化学反应由该醛基衍生的官能团, 以及能够与羟烷基淀粉分子的该醛基或由其衍生的官能团反应的蛋白质的官能团, 偶联反应直接形成的键合必要时通过进一步反应进行修饰。

25 22. 如权利要求 21 所述的方法, 其特征在于该偶联反应的反应介质是水或水与有机溶剂的混合物, 其中混合物的含水量至少为 80%。

26 23. 如权利要求 21 或 22 所述的方法, 其特征在于通过选择性氧化将羟烷基淀粉分子的末端醛基转化为相应的羧基官能团, 后者随后

在活化条件下在水溶液中与蛋白质的游离氨基反应,使得羟烷基淀粉分子通过酰胺键与该蛋白质连接。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其特征在于用碘或金属离子在碱性水溶液中进行醛基的选择性氧化。

5 25. 如权利要求 23 或 24 所述的方法,其特征在于偶联反应在碳二亚胺存在下进行。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于碳二亚胺是 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)。

10 27. 如权利要求 21 或 22 所述的方法,其特征在于羟烷基淀粉分子的末端醛基与蛋白质的游离氨基偶联形成希夫碱,形成的希夫碱被还原为胺,使得羟烷基淀粉分子通过胺键与该蛋白质连接。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于偶联和还原都在水溶液中发生。

15 29. 如权利要求 27 或 28 所述的方法,其特征在于还原剂是硼氢化钠、氰基硼氢钠或有机硼复合物。

30. 如权利要求 27-29 中任一项所述的方法,其特征在于偶联和还原反应同时进行。

20 31. 一种制备在末端醛基处被选择性氧化的羟烷基淀粉的方法,其特征在于羟烷基淀粉在碱性水溶液中与碘反应,碘与 HAS 的摩尔比为 2:1 到 20:1。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于碘与 HAS 的摩尔比为约 5:1 到 6:1。

33. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于:

25 a)一定量的羟烷基淀粉溶解于温蒸馏水中,加入略低于 1 摩尔当量的碘水溶液,

b)以几分钟的间隔,向反应溶液中逐滴缓慢加入摩尔浓度为碘溶液的约 5-15 倍的 NaOH 溶液,直到溶液在加入后再次开始变澄清,

c)再向反应溶液中加入略低于 1 摩尔当量的碘水溶液,

d)重新逐滴加入 NaOH 溶液,

e)重复步骤 b)-d), 直到加入了基于羟烷基淀粉约 5.5-6 摩尔当量的碘溶液和 11-12 摩尔当量的 NaOH 溶液,

f)然后终止反应, 使反应溶液脱盐, 进行阳离子交换层析, 通过冻干法获得反应产物。

5 34. 如权利要求 33 所述的方法, 其特征在于碘水溶液是约 0.05-0.5 N 的碘溶液。

35. 如权利要求 33 或 34 所述的方法, 其特征在于 NaOH 溶液的摩尔浓度约为碘溶液的 10 倍。

10 36. 一种制备在末端醛基处被选择性氧化的羟烷基淀粉的方法, 其特征在于 HAS 在碱水溶液中用摩尔过量的稳定化金属离子氧化, 该离子选自 Cu^{2+} 离子和 Ag^{+} 离子。

蛋白质与修饰多糖的偶联

5 最近几十年基因工程的快速发展已经导致新鉴定了大量具有潜在治疗效果的蛋白质基因，并且可以在生物表达系统的帮助下毫无困难相对大量地生产纯或几乎纯的相应基因产物。

 然而，这些蛋白质在实际中的应用，例如在诊断、治疗和生物转化中的应用常常遇到困难，因为它们的稳定性和可溶性通常不能令人
10 满意，特别是在生理 pH 值下。这些蛋白质的两个实例是肿瘤坏死因子 TNF- α 或白介素-2。

 另外，糖蛋白在原核系统如大肠杆菌中表达时经常出现可溶性问题，因为它们没有经过自然糖基化就被表达，在有些情况下导致溶解度大大降低。这可能要求必须使用成本高得多的真核表达系统。

15 在体内治疗的应用方面，多种蛋白质被极快地从血流中清除或降解。全身施用分子量大于约 70 kD 的蛋白质可能被网状内皮系统或者通过与细胞受体的特异性相互作用从循环中清除。分子量小于约 70 kD 的较小蛋白质还可以被肾脏的肾小球滤过而大量清除(排阻限度约为 70 kD)。

20 最近解决所述问题的一种方法包括将这些问题蛋白质与具有良好水溶性的生物相容聚合物(例如，聚乙二醇和葡聚糖)偶联。一方面，通过偶联能够使分子量升高到 70 kD 的阈值以上，使得较小蛋白质的血浆滞留时间能够显著延长，另一方面，亲水性聚合物部分能够提高蛋白质在水介质中的溶解度。

25 此外，可能与蛋白质与这些聚合物偶联有关的有利作用通常是基于结合的聚合物对蛋白质分子上蛋白酶识别位点和抗原决定簇的掩蔽。一方面，治疗性蛋白质基本上能够避免被水解降解，另一方面，基本上抑制了外源性治疗性蛋白质引起的变态反应的诱导。除了分子量增加外，聚合物的存在保护蛋白质免于酶降解，另外通常免于热变

性。在许多情况下，蛋白质的稳定性和体内半衰期显著增加，而免疫原性和抗原性降低。

迄今为止，大多数修饰用聚乙二醇或葡聚糖进行，通常优选 PEG，因为它产生较简单的产物。

5 目前只有少数关于蛋白质葡聚糖偶联的描述，例如：链激酶，纤溶酶、血红蛋白或抑酶肽。然而，葡聚糖偶联物通常显示可能由葡聚糖降解产物引起的高变应原性，低代谢稳定性，以及在许多情况下偶联反应的低产率。这使得这些葡聚糖偶联产物至今均未被批准用于人或动物的治疗。

10 PEG 衍生化已经被相当频繁地进行，因此该方法现在可以被认为是提高蛋白质分子量的标准方法。这些衍生物中的一些在美国处于临床试验的不同阶段或者已经被批准。PEG-血红蛋白和超氧化物歧化酶(SOD)的一种 PEG 加合物目前处于 III 期临床实验，后者是在聚合物偶联方面研究得最多的蛋白质。PEG 偶联的天冬酰胺酶已经被用于急性淋巴细胞白血病的治疗。2001 年，PEG-干扰素 α 被批准用于丙型肝炎患者的治疗。

15 然而，也报道了关于这些 PEG 偶联物使用的从不适到危险的副作用，如瘙痒、超敏反应和胰腺炎。另外，PEG 偶联后蛋白质的生物活性通常非常低，PEG 偶联物降解产物的代谢仍然基本上不为人知，并且可能是一种健康危险。

20 WO 99/49897 描述了血红蛋白的偶联物，该偶联物是由氧化开环多糖(如羟乙基淀粉或葡聚糖)的醛基与蛋白质的伯胺基反应形成。然而，在这种情况下，使用的多糖被用作多功能试剂，产生性质难以调节的非常不均匀的产物混合物。

25 美国专利 6,083,909 描述了在 DMSO 中将选择性氧化的羟乙基淀粉与血红蛋白偶联的一种方法。然而，我们的研究表明，在所述条件下不能获得希望的产物，因为血红蛋白在 DMSO 中变性，从而丧失了生物活性。

因此仍然需要生理上良好耐受的葡聚糖或 PEG 偶联蛋白质的替

代物，它们能够提高蛋白质的溶解度，或者能够延长蛋白质的血浆滞留时间。

因此，本发明的一个目的是提供这些替代物，以及发展制备这些替代蛋白质衍生物的简单、有效的方法。

5 用具有以下特征的羟烷基淀粉-蛋白质偶联物实现本发明的这个目的：羟烷基淀粉分子与蛋白质之间的结合作用是以以下基团之间偶联反应形成的共价键合为基础：羟烷基淀粉分子的末端醛基或通过化学反应由该醛基衍生的官能团，和能够与羟烷基淀粉分子的该醛基或由其衍生的官能团反应的蛋白质的官能团，其中偶联反应直接形成的
10 键合必要时可以通过进一步的反应进行修饰。

本发明还包括含有这些偶联物的药物组合物，以及这些偶联物和组合物在人或动物体预防或治疗中的用途，以及制备这些偶联物和组合物的方法。

令人吃惊地发现，通过适当选择条件，上述反应能够在水溶液中进行，从而使得蛋白质在许多情况下生物活性被完全或部分保留。
15

在这种情况下，用于偶联反应的水反应介质优选是水或水与有机溶剂的混合物，其中混合物中水的比例至少约为 70%（重量），优选至少约 80%（重量），更优选至少约 90%（重量）。

偶联反应中羟烷基淀粉(HAS)与蛋白质的摩尔比通常约为 20:1 到 1:1，优选约为 5:1 到 1:1。
20

基于蛋白质最初活性，本发明羟烷基淀粉-蛋白质偶联物的剩余生物活性通常为至少 40%，优选至少 50%，更优选至少 70%，进一步优选至少 90%，最优选至少 95%。

本发明使用的羟烷基淀粉(HAS)能够用已知的方法制备，例如用
25 烯化氧或 2-氯链烷醇如 2-氯乙醇，使淀粉在脱水葡萄糖单元的 C₂ 和/或 C₆ 位点处羟烷基化(关于淀粉的羟乙基化，参见例如 US 5,218,108)，它们具有希望的不同分子量范围和取代程度。也可以使用可以购到的任何制品。此处所用的“羟烷基淀粉”中烷基的定义包括甲基、乙基、异丙基和正丙基，特别优选乙基。HES 的一个基本优点是，它已经被

官方批准作为生物相容性血浆增容剂(expander),并在临床上大规模使用。

羟烷基淀粉的平均分子量可以是约 3 kD 到几百万道尔顿,优选约 4 kD 到约 1000 kD,更优选约 4 kD 到约 50 kD,或者约 70 kD 到约 1000 kD,特别优选约 130 kD。为了与小分子蛋白质偶联,优选地选择羟烷基淀粉的平均分子量,使得偶联物超过上述 70 kD 的阈值,而对于与大分子蛋白质的偶联,羟烷基淀粉的平均分子量优选在所述范围的较低区域。由于偶联可能在蛋白质的多个位点发生,因此偶联多个小聚合物链而不是一个高分子量聚合物也可能是有利的。取代程度(修饰的脱水葡萄糖单元的数量与脱水葡萄糖单元总数之比)同样可能不同,通常在约 0.2 到 0.8 范围内,优选约 0.3 到 0.7,更优选约 0.5。(注意:数值与介于 0 到 1 之间的“取代程度”有关)。C₂ 与 C₆ 取代之比通常在 4 到 16 范围内,优选 8 到 12 范围内。

这些参数可以用已知方法调整。使用羟乙基淀粉(HES)作为血液代用品的经验表明, HES 在血浆中的滞留时间取决于分子量和取代程度以及取代类型(C₂ 取代或 C₆ 取代),较高的分子量、较高的取代程度和较高比例的 C₂ 取代可延长滞留时间。

这些关系也适用于本发明的羟烷基淀粉-蛋白质偶联物,因此血浆中一种具体偶联物的滞留时间能够通过多糖的比例进行调节。

平均分子量为 130 kD、取代程度为 0.5 和平均分子量为 200 kD、取代程度为 0.25 的羟乙基淀粉产物已经在临床上用作血液代用品,也适于在本发明中使用。

适用于本发明的蛋白质原则上是具有与 HAS 分子官能团反应的必要官能团(例如游离氨基、硫醇基或羧基)的任何蛋白质。

也可以通过使蛋白质与一种适合的、生理耐受的双功能接头分子反应来引入希望的官能团。对于本发明目的而言,偶联的接头分子的剩余反应性官能团同样被看作“该蛋白质的反应性官能团”。

适合的接头分子在一端含有一个能够与蛋白质的反应性官能团(例如氨基、硫醇基或羧基)共价键合的基团,在另一端含有一个能够

与末端醛基或通过化学反应由它衍生的官能团(例如羧基、活化的羧基、氨基或硫醇基)共价键合的基团。在接头分子的两个官能团之间有一个适当长度的生物相容的桥连分子,例如来源于链烷烃的基团、(寡)烷撑二醇基团或另一种适合的寡聚物基团。优选能够与氨基反应的基团是,例如: N-羧基琥珀酰亚胺酯、磺基-N-羧基琥珀酰亚胺酯、亚氨酸酯或其它活化的羧基;优选能够与硫醇基反应的基团是,例如: 马来酰亚胺和羧基;优选能够与醛基或羧基反应的基团是,例如: 氨基或硫醇基。

用于连接 SH 和 NH 官能团的接头分子的实例有:

- 10 AMAS (N- α (马来酰亚胺基乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯)
- BMPS (N- β (马来酰亚胺基丙氧基)琥珀酰亚胺酯)
- GMBS (N- γ (马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯)
- EMCS (N- ϵ (马来酰亚胺基己酰氧基)琥珀酰亚胺酯)
- MBS (m-(马来酰亚胺基苯甲酰)-N-羧基琥珀酰亚胺酯)
- 15 SMCC (4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯)
- SMPB (4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸琥珀酰亚胺酯)
- SPDP (3-(2-吡啶二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯)
- Sulfo-GMBS (N- γ (马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯)
- Sulfo-EMCS (N- ϵ (马来酰亚胺基己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯)

20

用于连接 SH 和 SH 官能团的接头分子的实例有:

- BMB (1,4-二-马来酰亚胺基丁烷)
- BMDB (1,4-二-马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷)
- BMH (二-马来酰亚胺基己烷)
- 25 BMOE (二-马来酰亚胺基乙烷)
- DTME (二硫代-二-马来酰亚胺基乙烷)
- HBVS (1,6-己烷-二-乙烯砜)
- BM(PEO)₃ (1,8-二-马来酰亚胺基三甘醇)
- BM(PEO)₄ (1,11-二-马来酰亚胺基四甘醇)

用于连接 NH 和 NH 官能团的接头分子的实例有：

BSOCOES (二-(2-琥珀酰亚胺基氧基羰氧基)乙基)砒

BS³ (辛二酸二-(磺基琥珀酰亚胺基)酯)

5 DFDNB (1, 5-二氟-2,4-硝基苯)

DMA (己二酰亚氨酸二甲酯 HCl)

DSG (戊二酸二琥珀酰亚胺基酯)

DSS (辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)

EGS (双(琥珀酰亚胺基琥珀酸)乙二醇酯)。

10

用于连接 SH 和 CHO 官能团的接头分子的实例有：

BMPH (N-β(马来酰亚胺基丙酸)酰肼 TFA)

EMCA (N-ε(马来酰亚胺基己酸)酰肼)

KMUH (N-κ(马来酰亚胺基十一烷酸)酰肼)

15 M₂C₂H (4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基酰肼 HCl)

MPBH (4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼 HCl)

PDPH (3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼)。

用于连接 SH 和 OH 官能团的接头分子的实例有：

20 PMPI (异氰酸 N-(对马来酰亚胺基苯基)酯)

用于将 SH 官能团转化为 COOH 官能团的接头分子的实例有：

BMPA (N-β-马来酰亚胺基丙酸)

EMCH (N-β-马来酰亚胺基己酸)

25 KMUA (N-κ-马来酰亚胺基十一烷酸)

用于将 NH 官能团转化为 COOH 官能团的接头分子的实例有
MSA(己二酸 N-琥珀酰亚胺基酯甲基酯)或其更长链的同系物或乙二醇的相应衍生物。

用于将 COOH 官能团转化为 NH 官能团的接头分子的实例有 DAB(1, 4-二氨基丁烷)或其更长链的同系物或乙二醇的相应衍生物。

与分子的氨基反应、并且为了避免空间位阻在距该分子较远距离处提供保护氨基的一个接头分子实例是 TFCS(N-ε(三氟乙酰己酰氧基)-琥珀酰亚胺酯)。

其它适合的接头分子为本领域技术人员公知，可以购到或者能够如需要进行设计，并且取决于将要偶联的 HAS 和蛋白质中存在和希望的官能团，利用已知的方法制备。

对于本发明目的，术语“蛋白质”包括含有至少 9-12 个氨基酸、优选至少 15 个氨基酸、更优选至少 25 个氨基酸、特别优选至少 50 个氨基酸的任何氨基酸序列，也包括天然衍生物，例如前(pre)或原(pro)形式的蛋白质、糖蛋白、磷蛋白或合成的修饰衍生物，例如融合蛋白、新糖蛋白，或通过基因工程方法修饰的蛋白质，例如融合蛋白、氨基酸交换引入优选偶联位点的蛋白质。

为了人或动物体的预防或治疗，有关蛋白质将在体内行使所希望的特定功能。因此，该蛋白质优选具有例如调节或催化功能、信号传导或转运功能、或者免疫应答或免疫应答诱导中的功能。

例如，该蛋白质可以选自：酶、抗体、抗原、转运蛋白、生物粘附蛋白、激素、生长因子、细胞因子、受体、抑制因子、激活剂、抑制剂或其功能衍生物或片段。就此而言，“功能衍生物或片段”是指全部或部分保留（例如至少 10-30%，优选 50%以上，更优选 70%以上，最优选 90%以上）希望的母体分子的生物学性质或活性的衍生物或片段。这种片段的特别优选实例是抗体片段。

具体例子有：α-、β-或γ-干扰素，白介素 - 例如 IL-1 到 IL-18，生长因子 - 例如表皮生长因子(EGF)、血小板生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、脑源性生长因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、B 细胞生长因子(BCGF)、脑源性神经营养生长因子(BDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)、转化生长因子如 TGF-α或 TGF-β，集落刺激因子(CSF) - 例如 GM-CSF、G-CSF，BMP(骨形态发生蛋白)，生长激素

- 例如人生长激素, 肿瘤坏死因子 - 例如 $\text{TNF-}\alpha$ 或 $\text{TNF-}\beta$, 促生长素抑制素, 促生长素, 生长调节素, 血清蛋白 - 例如凝血因子 II-XIII, 白蛋白, 促红细胞生成素, 肌红蛋白, 血红蛋白, 纤溶酶原活化因子 - 例如组织纤溶酶原活化因子, 激素或激素原 - 例如胰岛素, 促性腺激素, 黑素细胞刺激素(α -MSH), 曲普瑞林, 下丘脑激素 - 例如抗利尿激素(ADH)和催产素, 释放素和抑制素, 甲状旁腺激素, 甲状腺激素 - 例如甲状腺素、促甲状腺素、促甲状腺素释放素, 催乳素, 降钙素, 胰高血糖素, 胰高血糖素样肽(GLP-1、GLP-2 等), 肠促胰岛素类似物(exendin) - 例如肠促胰岛素类似物-4, 瘦素(leptin), 加压素, 胃泌素, 促胰液素, 整联蛋白(integrin), 糖蛋白激素(例如 LH、FSH 等), 色素激素, 脂蛋白和载脂蛋白 - 例如 Apo-B、Apo-E、Apo-L_a, 免疫球蛋白 - 例如 IgG、IgE、IgM、IgA、IgD 或其片段, 水蛭素, 组织途径抑制剂, 植物蛋白 - 例如凝集素或蓖麻毒素, 蜂毒, 蛇毒, 免疫毒素, E 抗原, butroxbina, α -蛋白酶抑制剂, 豚草变应原, 黑色素, 寡赖氨酸蛋白(oligolysine protein), RGD 蛋白, 或适当时这些蛋白质之一的相应受体; 或这些蛋白质或受体之一的功能衍生物或片段。

例如, 适合的酶可选自: 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。具体的非限制性实例有: 天冬酰胺酶, 精氨酸酶, 精氨酸脱氨酶, 腺苷脱氨酶, 谷氨酰胺酶, 谷氨酰胺酶-天冬酰胺酶, 苯丙氨酸-氨裂合酶, 色氨酸酶, 酪氨酸酶, 超氧化物歧化酶, 内毒素酶(endotoxinase), 过氧化氢酶, 过氧化物酶, 激肽释放酶, 胰蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶, 弹性蛋白酶, 嗜热菌蛋白酶, 脂酶, 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, glucodase, 葡糖酸氧化酶, 半乳糖苷酶, 葡糖脑苷脂酶, 葡糖苷酸酶, 透明质酸酶, 组织因子, 组织纤溶酶原激活物, 链激酶, 尿激酶, MAP 激酶, DNase, RNase, 乳铁蛋白, 及其功能衍生物或片段。

如上所述, HAS 分子参与偶联反应的官能团是末端醛基或通过化

学反应由其衍生的基团。

这种化学反应的一个实例是，利用一种温和氧化剂，例如碘、溴或某些金属离子，或者通过电化学氧化，将该醛基选择性氧化为羧基或活化的羧基，例如酯、内酯、酰胺，该羧基必要时在第二次反应中被转化为活化的衍生物。该羧基或活化羧基然后可与蛋白质的伯氨基或硫醇基偶联，形成酰胺键或硫酯键。

在一种特别优选的制备方法中，该醛基用摩尔过量的碘在碱性水溶液中选择性氧化，碘与 HAS 的摩尔比优选为 2:1 到 20:1，特别优选约 5:1 到 6:1。在实施例 1 描述的优化方法中，开始时将一定量的羟烷基淀粉溶解于热蒸馏水中，加入优选浓度为约 0.05-0.5 N、特别优选约 0.1 N 的略低于 1 摩尔当量的碘水溶液。之后，以几分钟的间隔，向反应溶液中逐滴缓慢加入摩尔浓度为碘溶液的约 5-15 倍、优选约 10 倍的 NaOH 水溶液，直到溶液在加入后再变澄清。再向反应溶液中加入略低于 1 摩尔当量的上述碘水溶液，再次逐滴加入 NaOH 溶液，重复加入碘和 NaOH，直到已经加入了基于羟烷基淀粉的约 5.5-6 摩尔当量的碘溶液和 11-12 摩尔当量的 NaOH 溶液。然后终止反应，使反应溶液脱盐（例如通过透析或超滤），进行阳离子交换层析，通过冻干法获得反应产物。利用该方法，获得与 HAS 分子量无关的基本定量的产率。

在另一个特别优选的实施方案中，用碱稳定的金属离子（例如 Cu^{++} 或 Ag^{+} ）溶液进行选择氧化，也得到基本定量的产率（实施例 2）。在这种情况下优选使用约 3-10 倍摩尔过量的氧化剂。

已经形成的选择性氧化的羟烷基淀粉(ox-HAS)随后在活化试剂存在下与所需蛋白质的游离氨基反应，形成酰胺键。适合的活化试剂的实例有：N-羟基琥珀酰亚胺，N-羟基邻苯二甲酰亚胺，苯硫酚，对硝基酚，邻,对-二硝基酚，三氯苯酚，三氟苯酚，五氯苯酚，五氟苯酚，1-羟基-1H-苯并三唑(HOBt)，HOObt，HNSA，2-羟基嘧啶，3-羟基嘧啶，3,4-二氢-4-氧代苯并三嗪-3-醇，4-羟基-2,5-二苯基-3(2H)-噻吩酮 1,1-二氧化物，3-苯基-1-(对硝基苯基)-2-吡唑啉-5-酮)，[1-苯

并-三唑基-N-氧三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐](BOP), [1-苯并三唑基氧三吡咯烷基磷六氟磷酸盐](PyBOP), [O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脌鎓六氟磷酸盐(HBTU), [O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脌鎓四氟硼酸盐(TBTU), [O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-二(亚戊基)脌鎓六氟磷酸盐], [O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-二(四亚甲基)脌鎓六氟磷酸盐, 羰基二咪唑(CDI), 或者优选碳二亚胺, 例如 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC), 二环己基碳二亚胺(DCC), 二异丙基碳二亚胺(DIPC), 特别优选 EDC。与关于类似偶联反应的文献中描述的常规方法相反, 令人吃惊地发现常规使用碳二亚胺后不必使用其它
5 必须的活化剂如三唑(例如 HOBt), 它们甚至使产量降低。在 EDC 的存在下和在不含 HOBt 的情况下, ox-HES 与各种典型化合物进行的本发明偶联反应能够获得基本与 HES 分子量无关的高产率(参见实施例)。

除羧基或活化羧基与蛋白质的(例如赖氨酸或精氨酸残基的)游离伯氨基反应外, 与蛋白质的(半胱氨酸的)硫醇基的类似反应在原则上也是可能的。然而, 就这一点而言, 必须考虑半胱氨酸通常参与 S-S 键, 因此不能用于偶联反应。另一方面, 如果存在游离半胱氨酸, 它们通常在催化中起重要作用, 或者与亚单位的接触位点有关。对这些半胱氨酸的修饰将导致生物活性部分或完全丧失。可以利用常规基因
15 工程方法解决这一问题, 例如在已知不参与活性的蛋白质位点处进行定点诱变或化学肽合成, 导入游离半胱氨酸。这样对偶联位点进行最佳控制成为可能。同样, 也可以向蛋白质内定向引入其它反应氨基酸, 例如 Lys、His、Arg、Asp、Glu。

羟烷基淀粉分子的反应性基团也可能是通过末端醛基的化学反应产生的胺或硫醇基团。例如, 在氢和催化剂存在下、或者在氰基硼氢化钠存在下, 通过与氨反应能够进行醛基的还原胺化。产生的氨基或硫醇基然后可与蛋白质(例如任选活化的谷氨酸或天冬氨酸)的游离羧基反应, 形成酰胺或硫酯键。
25

羟烷基淀粉分子的末端醛基或通过化学反应由其衍生的官能团

也可以与合适的生理耐受的双功能接头分子反应。在这种情况下，参与偶联反应的“通过化学反应由羟烷基淀粉分子的末端醛基衍生的官能团”是与末端醛基或由其衍生的官能团反应的双功能接头分子的剩余反应性官能团。这样，就可以将末端醛基转化为希望的官能团。

5 适合的接头分子在一端含有一个能够与末端醛基或通过化学反应由它衍生的官能团(例如羧基、活化的羧基、氨基或硫醇基)共价键合的基团，在另一端含有一个能够与蛋白质的反应性官能团(例如氨基、硫醇基或羧基)共价键合的基团。在接头分子的两个官能团之间有一个适当长度的生物相容的桥连分子，例如来源于链烷烃的基团、
10 (寡聚)亚烷基二醇基团或另一种适合的寡聚物基团。能够与氨基反应的优选基团是，例如：N-羧基琥珀酰亚胺酯、磺基-N-羧基琥珀酰亚胺酯、亚氨酸酯或其它活化的羧基；能够与硫醇基反应的优选基团是，例如：马来酰亚胺和羧基；能够与醛基或羧基反应的优选基团是，例如：氨基或硫醇基。

15 适合的接头分子的多个具体非限制性实例已经在上文关于接头分子与蛋白质偶联的部分中列出。

在本发明的另一种偶联方法中，末端醛基直接与蛋白质的(例如赖氨酸或精氨酸残基的或N端的)伯氨基反应，形成希夫碱。形成的希夫碱随后或者平行地通过与适合的还原剂反应被还原，形成在水介
20 质中稳定的蛋白质与HAS的键合。优选的还原剂是硼氢化钠、氰基硼氢化钠、有机硼复合物，例如4-(二甲基氨基)吡啶-硼复合物、N-乙基二异丙基胺-硼复合物、N-乙基吗啉-硼复合物、N-甲基吗啉-硼复合物、N-苯基吗啉-硼复合物、卢剔啶-硼复合物、三乙基胺-硼复合物、三甲基胺-硼复合物；适合的立体选择性还原剂有，例如：三乙酸硼
25 氢化钠、三乙基硼氢化钠、三甲氧基硼氢化钠、三仲丁基硼氢化钾(K-Selectride)、三仲丁基硼氢化钠(N-Selectride)、三仲丁基硼氢化锂(L-Selectride)、三戊基硼氢化钾(KS-Selectride)和三戊基硼氢化锂(LS-Selectride)。

通过适当改变反应条件能够提高产率。这些优化实验的参数包括

反应混合物的 pH (碱性硼氢化物引起的可能的蛋白质降解)、温度和温育时间,和一锅反应的还原剂的性质。另一个选择是分两步进行反应,在此情况下还原步骤可以使用固定化的还原剂。

偶联反应的产物可以用已知方法进行研究,可以测定偶联效率。

5 因此,例如可以在与三硝基苯磺酸偶联之前和之后测定蛋白质中游离的伯氨基(Habeeb, ASAF, Anal. Biochem. 14,328-336 (1966))。伯胺反应的偶联产率也可以通过用荧光胺衍化非反应性胺及测定荧光来检测。分子量分布可以通过 SDS-PAGE 和凝胶渗透来测定。偶联物中的蛋白质含量可以通过 SDS-PAGE 和随后的银染色检测,而糖含量可以通过将 SDS-PAGE 分离的带印迹到膜上后进行聚糖特异性染色来确定。也可以进行定量聚糖测定。通过作肽图和/或 MALDI-TOF 质谱法或电喷雾电离质谱法能够准确地鉴定蛋白质上的偶联位点。这样就可以优化偶联、预先确定分子量分布、甚至可能预先确定(例如,如果蛋白质上的反应性基团的反应性不同)产物的偶联位点。

15 本发明的偶联物适当时可以直接使用,或者以药物组合物的形式用于人或动物体的预防或治疗。

这种类型的组合物包括药学有效量的作为活性成分的本发明偶联物,和可药用载体,以及必要的其它治疗剂或药学成分或赋形剂。赋形剂可包括,例如:稀释剂、缓冲剂、调味剂、粘合剂、表面活性剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂(包括抗氧化剂)和用来使制剂与目的受体的血液等渗的物质。药学有效量是在在治疗过程中一次或多次施用
20 后足以显示所需有效效果以缓解、治愈或预防一种病理状态的量。可药用载体是与药物活性成分和患者身体均相容的载体。

组合物的形式因希望或适合的给药途径而不同。一种优选途径是
25 肠胃外给药,例如:皮下、肌肉内、静脉内、动脉内、关节内、鞘内、硬膜外注射或必要时输注。也可以鼻内、气管内或局部给药。例如,局部施用根据本发明偶联的生长因子可以加速创伤愈合。药物组合物可以方便地以剂量单位的形式提供,用药学领域众所周知的任何方法生产。

本发明的偶联物也可以用于已经使用其它蛋白质-聚合物偶联物(例如 PEG-蛋白质偶联物)的其它所有领域。一些具体的非限制性实例包括使用 HAS-蛋白质偶联物作为在不均相中反应的固定化催化剂或反应物, 或者作为(免疫)亲和层析的柱材料。了解此处公开的本发明

5 HAS-蛋白质偶联物性质的熟练技术人员应当知道其它可能的用途。

下列实施例旨在更详细地说明本发明, 而非限制本发明。具体而言, 也可以用羟甲基淀粉和羟丙基淀粉进行类似的反应, 并且能够获得类似的结果。

10 实施例 1

用碘选择性氧化羟乙基淀粉(HES)

通过在圆底烧瓶中加热, 将 10 g HES-130 kD 溶解于 12 ml 去离子水中。向该溶液中加入 2 ml I₂ 溶液(0.1 N)。含有 2 ml 1.0 N NaOH 的一个移液管通过一个双向连接器与该烧瓶连接, 以每 4 分钟约 1 滴

15 的速度逐滴加入 NaOH 溶液。在加入约 0.2 ml NaOH 溶液后使该溶液脱色, 同时加入第二部分 2 ml 0.1 N 碘溶液。在加入总共 14 ml 碘溶液和 2.8 ml NaOH 溶液后完成反应。然后用去离子水透析反应混合物。

内酯化:

20 为了将醛糖酸盐基团转化为醛糖酸基团, 部分脱盐的溶液在阳离子交换柱(Amberlite IR-120, H⁺型)上进行层析。随后通过冻干除去水, 获得内酯形式。

氧化程度的测定:

25 每次将 1 ml 碱性铜试剂(3.5 g Na₂PO₄、4.0 g 酒石酸钾钠溶于 50 ml H₂O 中, 加 10 ml 1 N NaOH, 8.0 ml 10%浓度(重量/体积)CuSO₄ 溶液和溶于 10 ml H₂O 中的 0.089 g 碘酸钾, 加入 18 g 硫酸钠后, 补水至 100 ml)在 N₂ 气环境下移液到 1 ml 样品溶液中。将该混合物在 100℃下加热 45 分钟。冷却后, 加入 0.2 ml 2.5%浓度的 KI 溶液和 0.15

ml 1 M H₂SO₄。5 分钟后加入 1 滴酚红指示剂溶液(1%重量/体积), 用 5 mM Na₂S₂O₃ 溶液进行滴定直到颜色消失。未反应醛基的浓度可以根据滴定剂的消耗量来计算。

获得近乎定量的产率(>98%)。通过该方法, 能够像氧化较低分子量(例如 10 kD、25 kD、40 kD)的羟乙基淀粉一样以类似高产率氧化较高分子量(例如 130 kD、250 kD、400 kD)的羟乙基淀粉。

实施例 2

用 Cu²⁺离子选择性氧化 HES

10 通过加热在 10 ml 去离子水中制备 0.24 mmol HES-130 kD 的溶液。将该溶液在 100 ml 圆底烧瓶中加热至 70-80°C, 加入 1.17 mmol 稳定化 Cu²⁺(例如使用作为稳定剂的罗谢尔盐或其它稳定剂)和稀 NaOH 水溶液(终浓度为 0.1 N NaOH)。然后升高温度至 100°C, 继续反应直到出现微红色。终止反应, 将反应混合物冷却到 4°C, 过滤除
15 去微红色沉淀。滤液用去离子水透析, 然后如实施例 1 所述转化为内酯并冻干。氧化是定量进行的(产率>99%)。通过该方法也能够氧化低分子量 HES(例如 HES-10 kD、HES-25 kD、HES-40 kD)和较高分子量的 HES 类。

实施例 3

选择性氧化的高分子量 HES(ox-HES-130 kD)与人血清白蛋白(HSA)的偶联

20 通过在具有磁力搅拌器的圆底烧瓶中温和加热, 使 4.3 g ox-HES-130 kD 和 200 mg HAS (Sigma, Taufkirchen)完全溶解于水中。
25 向该溶液中加入溶于水的 30 mg 乙基二甲基氨丙基碳二亚胺(EDC)。非常温和地搅拌 2 小时后, 加入第二部分 30 mg EDC。非常温和地再搅拌 2 小时后, 加入第三部分 40 mg 碳二亚胺。将反应混合物在这些条件下放置过夜, 用蒸馏水透析 15 小时, 然后冻干。通过凝胶渗透层析、SDS-PAGE 和印迹到 PVDF 膜后进行碳水化合物特异性染色

(Glyco-Dig 试剂盒, 来自 Roche-Boehringer, Basle)证实偶联成功。偶联产物的产率约为 90%。

实施例 4

5 选择性氧化的低分子量 HES(ox-HES-10 kD)与人血清白蛋白(HSA)的偶联

在有磁力搅拌器的圆底烧瓶中使 7.4 g ox-HES-10 kD 和 50 mg HAS 完全溶解于水中。通过上述对高分子量 HES 的方法进行反应, 分三份加入总共 282 mg EDC。将反应混合物如上所述透析并冻干。
10 分析(见上)表明获得偶联产物, 但是产率略低于与高分子量 ox-HES 的偶联。

实施例 5

ox-HES-130 kD 与肌红蛋白(Mb)的偶联

15 将 4.3 g ox-HES-130 kD 完全溶解于水(6-7 ml)中, 然后加入溶解于 10 ml 0.1 M 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)的 100 mg Mb (Sigma, Taufkirchen)。加入 30 mg EDC 开始偶联反应。每 2 小时重复加入 EDC, 直到消耗总共 90 mg 碳二亚胺。反应混合物然后用 50 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.0 透析, 冻干。GPC 显示在 450 nm 处的滞留体积中检测到一个明确的产物峰。可以据此计算出偶联产率为 88%。HES 化肌红蛋白的氧气结合能力约为未修饰 Mb 结合能力的 76%。
20

实施例 6

ox-HES-10 kD 与超氧化物歧化酶(SOD)的偶联

25 将一体积份的 ox-HES-10 kD 水溶液(1.05 g/ml)与一体积份的 7 mg/ml SOD 溶液(Sigma, Taufkirchen)在 50 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.6 中室温温育。在 24 小时内分 5 份加入 280 mg EDC 开始偶联反应。在磷酸盐缓冲液中进行 GPC 分析, 并在 280 nm 下检测, 跟踪反应的进程。24 小时后, 在分离柱的较高分子量区域内发现 81%的蛋白质,

之后终止反应。反应混合物用 30 kD 膜透滤，然后冻干。产物的质谱分析显示 HES 与蛋白质的平均摩尔比约为 3:1。

实施例 7

5 **ox-HES-130 kD 与链激酶(SK)的偶联**

将 3.8 mg ox-HES-130 kD 与 35 mg 链激酶(Sigma, Taufkirchen)一起溶解于最小量的 50 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.2 中。在室温下，加入 46.5 mg EDC 和 20 mg 水合 1-羟基苯并三唑(HOBt)，轻轻搅拌维持反应总共 24 小时。透析并冷冻干燥后，经 GPC 分析发现约 78%的蛋白质为 HES 偶联物。在银染色的 SDS-PAGE 中，可以观察到链激酶分子量明显提高。与之平行，利用洋地黄毒苷法在 10 高分子波段中明显检测到碳水化合物结构。

实施例 8

15 **ox-HES-130 kD 与人白介素-1(IL-2)的偶联**

温和加热，使 45 mg ox-HES-130 kD 完全溶解于 0.5 ml 50 mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.5 中。加入 0.25 mg 人 IL-2(Sigma, Taufkirchen)，后者使溶液不透明，在室温下搅拌混合物 4-6 小时。然后以 2 小时的时间间隔分 4 份加入 5 mg EDC，持续搅拌过夜，形成澄清的溶液。GPC 20 分析显示偶联产率约为 65%。

实施例 9

ox-HES-25 kD 与人肿瘤坏死因子 α (TNF α)的偶联

将 0.3 mg hTNF α (Sigma, Taufkirchen)加入 86 mg ox-HES-25 kD 在 25 约 0.4 ml 0.1 M 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中的溶液中。将该浑浊的溶液搅拌约 2 小时，之后加入 1 mg EDC 和 0.5 mg HOBt。继续搅拌约 6 小时，溶液在反应时间内变得澄清。偶联产物通过超滤分离、冷冻干燥，通过 GPC 和在 280 nm 处的检测进行分析。发现本反应的偶联产率约为 74%。

实施例 10

ox-HES-130 kD 与胰高血糖素样肽(GLP-1)的偶联

通过加热和轻柔搅拌将 7.4 g ox-HES-130 kD 溶解于最小体积的水中。用移液管加入 10 mg 酰胺形式的 GLP-1(Bachem, 瑞士)在 50 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.4 中的溶液。加入 35 mg EDC 开始反应, 小心搅拌 2 小时。该步骤重复两次, 在这之后, 在 GPC 分析中 280 nm 处的肽峰不再明显, 即几乎完全转化为偶联产物。该偶联产物用 30 kD 膜透滤, 从磷酸盐缓冲液中冻干。根据 MALDI 质谱分析的结果能够推断肽与 HES 的化学定量为 1:1。

实施例 11

高分子量 HES(HES-130 kD)与人血清白蛋白(HSA)的偶联

将 9.75 g HES-130 kD 完全溶解于水(6-7 ml)中, 然后加入溶解于 1 ml 0.1 M 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中的 50 mg HSA。反应混合物用磁力搅拌器搅拌。该溶液然后与 NaBH₃CN(50-70 mg)混合, 轻轻搅拌几分钟。每 2 小时进一步搅拌该溶液 15 分钟。然后加入另一等份 NaBH₃CN(约 50 mg)。最终(接近 36 小时的反应时间之后)使用了总量为 285 mg 的 NaBH₃CN。然后将该溶液透析并冻干。如实施例 4 所述进行分析。偶联效率约为 65%。

实施例 12

低分子量 HES(HES-130 kD)与人血清白蛋白(HSA)的偶联

将 4.5 g HES 完全溶解于水(4-5 ml)中, 加入溶解于 1 ml 0.1 M 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中的 50 mg HSA。当溶液澄清时(必要时用磁力搅拌器搅拌实现), 加入 NaBH₄(50-70 mg), 轻轻搅拌混合。将该溶液不加搅拌静置 2 小时, 然后如同与高分子量 HES 的反应一样每 2 小时搅拌 15 分钟。当溶液不再有任何气泡时(生成 H₂), 加入另一份 NaBH₄(约 50 mg)。最终使用了总量为 180 mg 的 NaBH₄。然后将该

溶液透析并冻干。通过凝胶渗透层析(GPC)进行分析,产率约为 15%。

实施例 13

HES-40 kD 与天冬酰胺酶的偶联

- 5 将 3.0 g HES-40 kD 完全溶解于水(约 4 ml)中。加入 80 mg 天冬酰胺酶(Sigma, Taufkirchen)在 6 ml 0.1 M 硼酸盐缓冲液 pH 9.0 中的溶液,搅拌直到反应混合物澄清。然后使温度升高到 37°C,2 小时后加入约 50 mg NaBH₃CN。该反应循环再重复 3 次。反应混合物用 0.1 M 磷酸盐缓冲液 pH 7.4 透析,获得产物。偶联产物的产率约为 61%,
10 约 73%的天冬酰胺酶活性保留。

实施例 14

HES-130 kD 与人白介素-2(IL-2)的偶联

- 将 50 mg HES-130 kD 完全溶解于水(约 0.2 ml)中。加入 0.25 mg
15 人 IL-2(Sigma, Taufkirchen)在 0.2 ml 0.1 M 硼酸盐缓冲液 pH 9.0 中的悬液,搅拌直到反应混合物澄清(4 小时)。以每 4 小时的间隔加入 1 mg 份的 NaBH₃CN,持续搅拌。再经过 24 小时的反应时间后,混合物用 0.1 M 磷酸盐缓冲液 pH 7.4 透析,冻干。根据 GPC 分析,偶联产物的产率约为 42%。

20

实施例 15

HES-130 kD 与胰岛素的偶联

- 将 4.0 g HES-130 kD 完全溶解于水(约 6 ml)中。加入溶于 7.5 ml
0.1 M 硼酸盐缓冲液(pH 9.0)的 55 mg 来自牛胰腺的胰岛素(Sigma,
25 Taufkirchen),在 37°C 下搅拌约 24 小时。在 8 小时内缓慢逐滴加入还原剂 NaBH₃CN (60 mg, 30 ml)。然后再搅拌反应混合物 24 小时,通过超滤(30 kD)除去无关物质和未反应的试剂。冻干产生稳定的偶联产物。使用的胰岛素中约有 55%作为 HES 偶联物回收。

实施例 16

ox-HES-130 kD 与超氧化物歧化酶(SOD)的偶联

将 130 mg ox-HES-130 kD 完全溶解于 6 ml PBS pH 6 中，然后加入溶于 1 ml PBS pH 6 的 10 mg SOD(Roche, Mannheim)。加入 10 mg
5 EDC 开始偶联反应。每 3 小时重复加入 EDC，直到消耗 39 mg 碳二亚胺。通过 GPC 在 258 nm 处监测反应。24 小时后，在分离柱的高分子量区域内发现 50% 的蛋白质，终止反应。反应混合物用 25 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.2 透析，冻干。SOD 活性是最初活性的 95%。通过
10 GPC-光散射联合测定 HES 蛋白质样品的质量分布，显示 HES 与蛋白质的摩尔比为 1:1。

实施例 17

ox-HES 70 kD 与胰高血糖素的偶联

将胰高血糖素(66×10^{-9} mol, 0.23 mg)、ox-HES 70 kD(6.6×10^{-6} mol, 123 mg)在圆底烧瓶中溶解于磷酸盐缓冲液(1 ml, pH 5)中。以 1 小时的间隔分 10 份加入 26 mg EDC。在 24 小时反应时间后，加入 10 ml 水终止反应。用水透析后通过 GPC 和离子交换层析纯化偶联产物。
15 冷冻干燥产生 88 mg 白色偶联产物(73%)。