



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101597337 B

(45) 授权公告日 2011. 09. 07

(21) 申请号 200910203522. 0

*C08B 31/00* (2006. 01)

(22) 申请日 2002. 03. 15

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

US 6083909 A, 2000. 07. 04, 说明书全文.

10112825. 8 2001. 03. 16 DE

审查员 封志强

(62) 分案原申请数据

02806722. 3 2002. 03. 15

(73) 专利权人 弗雷森纽斯卡比德国有限责任公司

地址 德国巴德霍姆堡

(72) 发明人 K·索默梅耶 W·艾克纳 S·弗里  
C·荣格海恩里奇 R·沙普夫  
K·鲁特贝克 J·海姆伯格  
M·奥兰多

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李连涛

(51) Int. Cl.

*A61K 47/48* (2006. 01)

*A61K 48/00* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 11 页

(54) 发明名称

羟烷基淀粉-活性物质-偶联物

(57) 摘要

本发明涉及一种含由羟烷基淀粉 (HAS) 和活性物质组成的偶联物的化合物, 其中羟烷基淀粉直接或经由连接基团共价连接在活性物质上。本发明还涉及制备共价的 HAS-活性物质-偶联物的方法, 其中 HAS 和活性物质在反应介质中相互反应, 其特征在于, 该反应介质是水或含水量至少是 10 重量% 的水和有机溶剂的混合物。

1. 一种制备共价的羟烷基淀粉 (HAS)-活性物质-偶联物的方法,其中 HAS 和至少一种活性物质在反应介质中相互反应,其特征在于该反应介质是水或含至少 10 重量%水的水与有机溶剂的混合物并且所述活性物质是核酸。
2. 权利要求 1 的方法,其中 HAS 直接或通过连接基团连接到活性物质上。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述核酸为 D- 或 L- 核酸。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述核酸为 D-DNA、L-DNA、D-RNA 或 L-RNA。
5. 权利要求 1 的方法,其中,在第一步中,将氨基或巯基作为活性基团引入活性物质中。
6. 权利要求 5 的方法,其中,在第一步中,将氨基作为活性基团引入活性物质中。
7. 权利要求 6 的方法,其中,其中活性物质的氨基与 HAS 反应,形成席夫碱。
8. 权利要求 7 的方法,其中席夫碱的偶氮次甲基  $-\text{CH}=\text{N}-$  被还原成亚甲基氨基  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 。
9. 权利要求 1 的方法,其中 HAS 为羟乙基淀粉。
10. 权利要求 9 的方法,其中羟乙基淀粉的重均分子量为 1-300kDa。
11. 权利要求 9 的方法,其中羟乙基淀粉的重均分子量为 5-200kDa。
12. 权利要求 9 的方法,其中羟乙基淀粉的摩尔取代度为 0.1-0.8,  $\text{C}_2$  :  $\text{C}_6$  取代的比例为 2-20,均以羟乙基计。
13. 权利要求 1 的方法,其中在与活性物质偶联前将 HAS 的还原性端基选择性氧化。
14. 权利要求 13 的方法,其中 HAS 的经氧化的还原性端基与活性物质的氨基反应以形成酰胺。
15. 一种 HAS-活性物质偶联物,其通过权利要求 1 的方法得到。
16. 一种药物组合物,其中含有权利要求 15 的偶联物。

## 羟烷基淀粉 - 活性物质 - 偶联物

[0001] 本申请是国际申请日是 2002 年 3 月 15 日 (国际申请号为 PCT/EP02/02928)、进入国家阶段申请号为 02806722.3 的题为“羟烷基淀粉 - 活性物质 - 偶联物”的专利申请的方案申请。

### 技术领域：

[0002] 本发明涉及化合物，它们含由羟烷基淀粉 (HAS) 和活化剂组成的偶联物 (Konjugate)，其中该羟烷基淀粉是直接或通过连接基团共价结合在活性物质上。本发明还涉及制备共价 HAS-活性物质偶联物的方法，在该方法中使 HAS 与活性物质在反应介质中相互反应，其特征在于，该反应介质是水或含至少 10 重量%水的水和有机溶剂的混合物。本发明还涉及该偶联物的医学应用。

### 背景技术：

[0003] 许多药物 - 活性物质的临床应用均受一系列问题的有害影响 (参见 Delgado 等人, *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier System*, 第 9 卷 (3,4), (1992), 249-304 页)。例如，肠胃外给药天然的蛋白质会通过网状内皮系统、肝、肾和脾的排泄而失去作用。这种排泄依碳水化合物链的电荷、适于该蛋白质的细胞受体的存在和分子的形式和大小而发生。例如肾小球过滤的排出限值约为 67kD。

[0004] 此外，蛋白水解降解的结果是可观察到的生物活性的快速损失。

[0005] 细菌表达的蛋白质以及其它的重组蛋白质具有高的免疫原性，并激发危及生命的过敏性。当然，相应的反应妨碍这些产物的医学应用。

[0006] 由此，在现有技术中，自 70 年代末以来系统研究了通过化学改性、特别是在大分子聚合物上的聚合或偶联以改进外源蛋白质的特性。大量工作集中于制备由蛋白质或其它活性物质和聚乙二醇的偶联物 (参看 US 4179337)。由该偶联反应所期待的优点包括蛋白质在体内的半衰期的改进、活性物质的毒性下降、稳定性改进及溶解度的改进 (Abuchowski 和 Davis, 作为药物的酶 (Enzymes as drugs), Holcenberg 和 Rubberts, Herausgeber, 367-383 页, John Wiley & Sons N. Y. (1981))。

[0007] 但是活性物质的偶联方法表明是有问题的。因为蛋白质的活性基通过在 PEG 上的偶联会失活，或者该反应的反应产物的收率不合适。为了实现活性物质的活性不受损的特殊结合，要将活性基引入 PEG 中或引入活性物质或这些化合物以连接基团互相相结合。对此，通常是 PEG 提供活性基，然后它与可偶联的蛋白质的基团经共价相结合。

[0008] 例如，曾描述过在其偶联到 PEG 上后抗体和其断片的结合活性的损失 (Kitamura 等, *Cancer Res.*, 第 51 卷 (1991), 4310-4315 页; Pedley 等, *Br. J. Cancer*, 第 79 卷 (1994), 1126-1130 页)。为解决这个问题，Chapman 等 (*Nature Biotech.*, 第 17 卷 (1999), 780-783 页) 建议，将 PEG 结合在抗体的某些结合位置上。

[0009] 此外，在 WO 95/13090 中描述过偶合组分 (partner) 的活性损失。为解决这一问题，曾建议活化具有反应性基团的 PEG，并且在有表面活性物质存在下通过该反应性基团使

PEG 结合在  $\alpha$ -干扰素上。优选的反应性基团是 N-琥珀酰亚胺-碳酸酯,在所述条件下,它与细胞溶素的  $\epsilon$ -氨基应形成氨酯键。

[0010] WO 96/41813 也公开了一种制备聚合物-多肽-偶联物的方法,其中,该聚合物(特别是 PEG)在特定位置被衍生化,接着结合到多肽上。优选是将氨基-氧-乙酰-基引入 PEG 中,接着将该化合物结合到多肽上,特别是 IL-8、hG-CSF 和 IL-1 上。

[0011] 在文献上可找到大量相应偶联物的实例;参看 US 4179337 中的 PEG-胰岛素-偶联物;US 4412989 中的牛-PEG-血红蛋白-偶联物;在 Veronese 等人的“应用生物化学和生物技术 (Applied Biochem. Biotech.)”,第 11 卷,141-152(1995) 中的 PEG-核糖核酸酶-偶联物和 PEG-超氧化物歧化酶-偶联物;US-4766106 中的 PEG-IL-2-偶联物或 PEG-IFN- $\beta$ -偶联物;WO 90/15628 中的 PEG-多粘菌素-偶联物;和 WO 90/07939 中的 PEG-IL-2-偶联物。一些偶联物现已用于临床应用中。例如天冬酰胺酶的特性可通过与 PEG 的共轭形成而得到改进,并且 PEG-天冬酰胺酶-偶联物可以商标 **Oncaspar<sup>®</sup>** 从市售得到而用于治疗癌。最近,美国食品和药物管理局批准了一种在 PEG 上偶联的 G-CSF (Pegfilgastim)。在临床研究的各个阶段还存在有大量的其它 pegylierter 产物,其中例如 PEG-CDP 870、PEG-屈大麻酚等(参看 [www.enzon.com](http://www.enzon.com) 或 [www.inhale.com](http://www.inhale.com) 中的 PEG-渠道)。

[0012] 不仅蛋白质,而且其它化合物都可按这种方法偶联到 PEG 和其它聚合物上。例如 WO 97/33552 和 WO 97/38727 中公开了紫杉醇在 PEG 上的偶联,以及该偶联物在治疗肿瘤上的应用。PEG-喜树碱-偶联物在治疗肿瘤上的应用已由 Euzon 公司研究,并处于第 I 期临床阶段。

[0013] 抗生素也已偶联到 PEG 上。Dowling 和 Russell 描述过关于土霉素-PEG-偶联物的药物动力学的实例 (J. Vet. Pharmacol. Ther, 第 23 卷 (2000), 107-110)。为了得到新的功能,在现有技术中也通过另外的方法来衍生化抗生素。例如制备了长效-青霉素,它是普鲁卡因-青霉素衍生物,即青霉素与普鲁卡因碱的盐。这种衍生物具有长的作用时间,并用来治疗梅毒。

[0014] 同样,还描述过与多于两种化合物的偶联反应。WO 93/23062 公开了例如由抗 B-细胞-淋巴瘤的抗体、活化的 PEG 和毒素组成的偶联产物的制备。

[0015] 但是 PEG-活性物质-偶联物不具有曾描述过其在体内分解途径的天然结构。为此,除 PEG-偶联物外,还制备了其它偶联物和蛋白质-聚合物来解决上述问题。由此有大量方法用于交联各种蛋白质和用于蛋白质在大分子上的结合(参看 Wong, S. S 的综述“Chemistry of protein conjugation and cross linking”, CRCS, Inc. (1993))。

[0016] 羟乙基淀粉 (HES) 作为天然存在的支链淀粉的衍生物在体内被  $\alpha$ -淀粉酶分解。现有技术已描述 HES-蛋白质-偶联物的制备(参看 DE2616086 和 DE 2646854 中的 HES-血红蛋白-偶联物)。

[0017] 血红蛋白是一种蛋白质,它作为血液代用剂和氧输送剂(所谓的“血红蛋白-基-氧载体”, HBOC) 在临床上有很大意义。但是尽管对这类产品的需要早就已知(参看 Rabiner, J. Exp. Med., 126, (1967) 1127),但至今还没有已知的 HBOC-产品达到批准作为药物使用的状态。

[0018] 该天然的血红蛋白由两条  $\alpha$ -肽链和  $\beta$ -肽链组成,它们作为辅基总是结合血红

素。但分离的血红蛋白分子非常不稳定,并在较稳定的  $\alpha$ ,  $\beta$ -二聚物 (MG 32kDa) 中快速分解。该分离的血红蛋白的生物半衰期在血液循环中约为 1 小时,因为该二聚物经肾快速排泄。这时二聚物产生肾中毒的副作用(参看 Bann 和 Jandl, *J. Exp. Med.*, 129(1967) 925-934)。因此,对衍生的血红蛋白分子的研究工作主要是分子内交联血红蛋白,为形成聚合的 HBOC- 形式,进行分子内偶联和 / 或在聚合物上偶联。

[0019] 已知的血红蛋白-偶联物描述于 Xue 和 Wong (*Meth. In Enzymol*, 231(1994), 308-322 页) 和 DE 2616086 和 DE 2646854 中。后者公开的方法是将血红蛋白结合在 HES 上,其中 HES 首先与高碘酸钠反应。这时得到血红蛋白结合其上的二醛。与此相反,DE 2616086 中描述了一种偶联血红蛋白到 HES 上的方法,其中将交联剂(如溴化氰)首先结合到 HES 上,接着将血红蛋白结合到中间产物上。

[0020] HES 是玉米淀粉中存在达 95% 的碳水化合物-聚合物即支链淀粉的取代衍生物。HES 具有有利的流变学特性,目前作为体液增量性补偿剂并临床用于血红素稀释治疗 (Sommermeyer 等, *医院药理学 (Krankenhauspharmazie)*, 第 8(8) 卷, (1987), 271-278 页; Weidler 等, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.*, 41(1991) 494-498)。

[0021] 支链淀粉由葡萄糖单元组成,其中在主链中有  $\alpha$ -1,4- 配糖键,但在分支位置上有  $\alpha$ -1,6- 配糖键。这种分子的物理化学特性主要由配糖键的种类来确定。由于弯曲的  $\alpha$ -1,4- 配糖键,形成每个螺族具有约 6 个葡萄糖单体的螺旋形结构。

[0022] 该聚合物的物理化学和生物化学性质可通过取代来改变。羟乙基的引入可通过碱性羟乙基化来实现。通过反应条件可利用在未取代葡萄糖单体上各种羟基对羟乙基化的不同反应性,由此就可对取代模式施加有限的影响。

[0023] 因此 HES 主要是由分子量分布和取代度来表征。该取代度可用 DS (“degree of Substitution”) 表示,它与所有葡萄糖单元中取代的葡萄糖单体的份额有关,也可用 MS (“摩尔取代”) 表示,它表明每葡萄糖单元中羟乙基的数目。

[0024] HES 溶液以多分散组合物存在,其中各个分子在聚合度、分支位置数及排列以及其取代模式均互不相同。因此 HES 是具有不同分子量的化合物的混合物。由此一定的 HES 溶液是由根据统计大小的平均分子量来确定。 $M_n$  是与分子数有关的简单的算术平均值(数均值),而  $M_w$  是以与重量有关的测量参数表示的重量平均值。

[0025] 但是蛋白质在 HES 上的选择性的化学结合至今受阻于 HES 的活化不能选择性地。所以在现有技术中已知的蛋白质-HES-偶联物均来自溴化氰活化的 HES 在血红蛋白上的非选择性偶联(参看 DE2616086)。相应方法可导致具有非单一性和有潜在毒性副作用的多分散产物。

[0026] Hashimoto (Hashimoto 等, “*Kunststoffe, Kautschuk, Fasern* (塑料、橡胶、纤维)”, 第 9 卷, (1992), 1271-1279 页) 首次公开过一种方法,其中糖类的还原性的醛端基可经选择性氧化,以得到反应性的酯(内酯)。

[0027] 基于这种方法,WO 98/01158 公开并制得一种血红蛋白-羟乙基淀粉-偶联物,其中,通过血红蛋白的游离氨基与以氧化形式存在的 HES 的还原端基之间的酰胺键而使血红蛋白在 HES 上选择性地相互偶联。但是 Hashimoto 等人公开的方法和按照 WO 98/01158 的方法都基于糖类(HES)和蛋白质(血红蛋白)在有机溶剂中的反应。具体地说,在该公开件中是采用二甲基亚砷(DMSO)。

[0028] 但是,专业人员已知,许多蛋白质在有机溶剂中会遭受结构改变,这种改变在水溶液中是不会回复的。通常,随结构改变又引来活性损失。在所有情况下,有机溶剂必须经昂贵的分离,因为对所计划的医学应用,这种残余的有机溶剂是不可接受的。从所计划的应用来看,甚至蛋白质的污染和结构变化的可能危险都是要排除的。

#### 发明内容:

[0029] 因此,本发明的目的在于提供一种改进的羟烷基淀粉-活性物质-偶联物及其制备方法,它导致一种可在临床日常工作中应用的有生物活性的偶联物。本发明的另一目的在于,提供一种制备羟烷基淀粉-活性物质偶联物的方法,该方法不产生明显量的副产物,因为这些副产物在很大程度上也对产物的随后纯化有害。

[0030] 本发明的目的意外地是通过一种含由羟烷基淀粉和活性物质构成的偶联物的化合物解决的,其中羟烷基淀粉直接或经连接基团共价结合在活性物质上。相应的 HAS-活性物质偶联物例如可通过下述方法得到:使 HAS 与活性物质在反应介质中相互反应,其中反应介质是水或水含量至少为 10 重量%的水和有机溶剂的混合物。

[0031] 此外,本发明还涉及一种制备共价 HAS-活性物质偶联物的方法,其中使 HAS 与至少一种活性物质在水性反应介质中相互反应,其特征在于,该反应介质是水或水含量至少为 10 重%的水和有机溶剂的混合物。

[0032] 优选是 HAS 在键合到活性物质上之前先经氧化,其中还原性端基的特定氧化是特别优选的。或者, HAS 与带氨基的活性物质之间经席夫碱的键的偶联形成中间产物。该中间产物接着经还原而形成亚甲基氨基。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1 按方法 A. III 的 OX-HES 130 kD 和 HSA 之间的偶联反应的 GPC 色谱图;

[0035] OX-HES 130 kD 在 HSA 上的偶联 III 的 GPC 色谱图

[0036] 图 2 按方法 A. IV 的 OX-HES 130 kD 和 HSA 之间的偶联反应的 GPC 色谱图;

[0037] OX-HES 130 kD 在 HSA 上的偶联 IV 的 GPC 色谱图

[0038] 图 3 按方法 A. V 和反应时间为 2 小时的 OX-HES 130 kD 和 HSA 之间的偶联反应的 GPC 色谱图;

[0039] OX-HES 130 kD 在 HSA 上的偶联 V 的 GPC 色谱图(反应时间 2 小时)

[0040] 图 4 按方法 A. V 和反应过夜的 OX-HES 130 kD 和 HSA 之间的偶联反应的 GPC 色谱图;

[0041] OX-HES 130 kD 在 HSA 上的偶联 V 的 GPC 色谱图(完全反应后)

[0042] 图 5 按方法 A. V 的 2 小时后(图 5a)和过夜后(图 5b)的 OX-HES10 kD 和 HSA 之间的偶联反应的 GPC 色谱图;

[0043] 图 5a :OX-HES 10 kD 在 HSA 上的偶联 V 的反应动力学的 GPC-分析(2 小时后)

[0044] 图 5b :OX-HES 10 kD 在 HSA 上的偶联 V 的反应动力学的 GPC-分析(16 小时后)

[0045] 图 6 按方法 A. VII 的 24 小时反应时间后的 OX-HES 130 kD 和 HSA 之间的偶联反应的 GPC 色谱图;

[0046] OX-HES 130 kD 在 HSA 上的偶联 VII 在 24 小时温育后的反应混合物的 GPC-分析

[0047] 图 7 按方法 B. V 的 OX-HES 130 kD 和 HSA 之间的偶联反应的 GPC 色谱图;

[0048] HES 130 kD 在 HSA 上的偶联 V 和氢化硼还原的 GPC- 色谱图

[0049] 图 8 HES 和 HSA 之间的各种偶联反应的 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳) 和 Western Blot (蛋白质印迹);

[0050] 上图:分别为银着色的 HSA 和 OX-HES 130kD 和

[0051] HES 130 kD 之间的偶联反应 III (方法 A 和 B) 的

[0052] SDS-PAGE, (带 1:偶联 III, 方法 A);

[0053] 带 2:转铁蛋白;带 3:肌酸酶;带 4:未改性 HSA;

[0054] 带 5:偶联 III (方法 B);带 6:标记物

[0055] 下图:相同样品用聚糖证明的 Western Blot, 其中转铁蛋白 (带 2) 作为正对照, HSA (带 4) 作为负对照。

[0056] 图 9 HES 和 HSA 之间的各种偶联反应的 SDS-PAGE 和 Western Blot;

[0057] OX-HES 10kD 和 HSA 的偶联 V 的反应混合物银着色的 SDS-PAGE, 12% PAA (上) 和 Western Blot/ 聚糖 (下)

[0058] 图 10 制备 HES-DNA- 偶联物的反应路线;

[0059] 氨基-HES, SMCC 和硫代-DNA 之间的偶联反应图示

[0060] 图 11 用限制酶消化前和后的 HES-DNA- 偶联物的凝胶照片。

[0061] 本发明首次提供了一种包含羟烷基淀粉和活性物质的偶联物的化合物, 其中羟烷基淀粉直接或经连接基团共价结合到活性物质上。此外, 本发明还提供一种可通过下述方法制备的 HAS- 活性物质- 偶联物, 其中 HAS 和至少一种活性物质在水性反应介质中相互反应。此外, 该方法的特征在于, 该反应介质是水或水含量至少为 10 重量%的水和有机溶剂的混合物。

[0062] 在本发明的范围内, 当化合物是适用于治疗或诊断目的的任何药物的活性成分时, 将该化学化合物看作是活性物质。优选该活性物质是药物的活性成分, 即药剂配方内的化合物, 该化合物在给药后在受药者身上产生生理作用。

[0063] 在 Roten 目录上可找到有关批准的药物和其活性物质的概况。在 Roten 目录上所列的活性物质可用于按本发明方法制备 HAS- 活性物质偶联物。按本发明, 术语“活性物质”也包括在治疗和诊断应用上已知是适用的但又由于上述所提到的问题, 至今还未能用于此目的所有化合物。优选的活性物质包括维生素、疫苗、毒素、抗生素 (抗感染药)、抗心律失常药、抑食欲药、麻醉药、镇痛药、抗风湿药、抗变应药、平喘药、抗抑郁药、抗糖尿病药、抗组胺药、抗高血压药、或抗肿瘤剂。从结构上看, 可以是例如激素、甾类化合物、脂质、蛋白质、寡肽或多肽、核酸, 特别是 D- 核酸或 L- 核酸, 如 D-DNA、L-DNA、D-RNA 或 L-RNA。蛋白质、肽、D- 核酸或 L- 核酸作为 HAS- 偶联组分是特别优选的。

[0064] 按本发明制备的化合物保留了活化剂的活性及 HAS 的有利特性。本发明的偶联物的另一些优点是改进活化剂在体内的半衰期、减小毒性、改进活性物质的稳定性和 / 或改进其溶解度。

[0065] HAS 链在给药后于血浆中由  $\alpha$ - 淀粉酶变短。由此偶联产物的活性可用偶联产物本身的活性, 即偶联后的活性, 或可用代谢的偶联产物的活性, 即偶联产物在体内代谢后的活性来确定。体内代谢可通过体外分解来模拟。

[0066] 活性物质的活性可按现有技术中用于这些物质的已知方法来确定。在抗肿瘤

剂情况下,该活性例如用抑制浓度(IC)来确定,或在抗感染剂情况下,该活性用最小抑制浓度(MHK)来确定。该确定优选在体外以适用的靶细胞来进行(参看Chow等,Haematologica(血液病学),第86卷(2001),485-493页)。此外,体外效果可通过相关动物模型来确认(参看例如肾细胞癌的小鼠模型,由Changnon等人描述过,参看BJU Int.,第88卷(2001),418-424页)。

[0067] 与未偶联的物质相比较,偶联产物本身具有升高或降低的活性。但是,该活性的降低优选不大于5倍,特别优选不大于3倍或2倍。代谢产物优选具有与未偶联物质相当的活性,即代谢偶联物的活性是偶联前活性物质的至少50%,优选至少75%,其中特别优选保持该活性的至少95%。

[0068] 在本发明的范围内,术语“羟烷基淀粉”用于表示淀粉衍生物,它被具有1-3个碳原子的羟烷基取代。作为“羟烷基淀粉”包括羟甲基淀粉、羟乙基淀粉和羟丙基淀粉。对本发明实施方案,以羟乙基淀粉(HES)作为偶联组分是特别优选的。

[0069] 按照本发明,优选羟乙基淀粉的平均分子量(重均分子量)为1-300kDa,其中平均分子量为5-200kDa是特别优选的。此外,羟乙基淀粉的摩尔取代度为0.1-0.8;C<sub>2</sub>:C<sub>6</sub>-取代比为2-20,均按羟乙基计。

[0070] 为使活性物质在HAS上偶联,在第一步必须将活性基团引入到活性物质和/或HAS中。相应的活性基团例如是巯基或氨基(参看实施例)。

[0071] 此外,活性物质和HAS可用连接基团相偶联。可用任何交联剂作为连接基团。大量的交联剂如SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-甲酸酯,参看实施例7),是市售可得的,并是专业人员所熟知的(参看Perbio公司和www.piercenet.com的产品分类中“交联剂”顺序目录)。

[0072] 按本发明的一个实施方案,水溶性的具有氨基糖的抗生素衍生物,特别是HAS-柔红霉素和HAS-多柔比星-偶联物,以及其制备方法,只要在DE 10129369中公开的,在本发明中就不包括了。

[0073] 按一个优选实施方案,本发明涉及一种化合物,它包含由HAS和抗肿瘤活性物质组成的偶联物以及其在治疗肿瘤中的应用。

[0074] 肿瘤细胞与正常的体细胞不同在于,肿瘤细胞摆脱了生物生长控制,并因此具有增大的细胞分裂速率。在肿瘤治疗中抗肿瘤活性物质的治疗应用是基于这种区别,因为抗肿瘤活性物质的毒性活性主要是针对增殖的细胞。因此如果化合物具有对增殖细胞的毒性活性,将它们看作是抗肿瘤活性物质或细胞抑制药(肿瘤学基础及现今的治疗方案例如综述于Internistische Onkologie(内科肿瘤学),Schmoll等(编者),Springer,1996)。

[0075] 在化学上可将抗肿瘤活性物质归于非常不同的类。除增殖抑制外,在最近几年的讨论中细胞程序死亡具有重要的意义。抗肿瘤活性物质的分类例如可通过关键的目标分子来进行(Schmoll等,同上):

[0076] (1) 抑制DNS-生物合成的化合物,例如通过抗代谢药如MTX、5-FU、Ara-C或羟基脲。

[0077] (2) 影响DNS的化合物,例如通过诱导断链、嵌入、链间交联改变、拓扑异构酶毒物如烷化剂(Alkylantien)、铂配合物、蒽环类抗生素、博来霉素、放线霉素D或表鬼臼毒素。

[0078] (3) 影响RNS的化合物,例如通过嵌入或引入到RNS中来阻断mRNS合成,其中蒽环



类抗生素、博来霉素、放线霉素 D 或抗代谢物。

[0079] (4) 影响蛋白质的化合物,例如在受体结合水平上(例如激素或拮抗剂),通过阻止微管蛋白的聚合作用(如借助长春花生物碱),通过蛋白质交联作用(如借助烷化剂)或磷酸化作用(如借助蛋白激酶-C-抑制剂)。

[0080] 由于抗肿瘤活性,所有活性物质均具有大的副作用,明显的是主要起抑制快速增殖组织的作用。特别是抑制红细胞生成、白细胞生成和血小板生成,以及减退粘膜上皮的生成。结果,出现胃肠紊乱或不可逆的有害于精子形成或不排卵。通常也涉及皮肤和皮肤附属器官,例如使许多病人可逆性的脱发。

[0081] 在严重情况下,该副作用还会导致急性肾机能衰竭和对心脏、肺、肝和神经系统严重毒性的器官损伤。最后,由于免疫抑制作用必须考虑到各种的感染。

[0082] 因此,包含抗肿瘤活性物质的偶联物的制备和研究目的是要改进活性物质的耐受性,为此,在大分子如葡聚糖上偶联了各种抗肿瘤活性物质(参看 Kojima 等, J. Pharm. Sci., 第 32 卷(1980), 30-34 页; Nakane 等, J. Pharm. Sci., 第 40 卷(1988), 1-6 页; Nomura 等, J. Controlled Release 第 52 卷(1998), 239-252 页; Sato 等, "J. Pharm. Sci.", 第 78 卷(1989), 11-16 页)。在一些情况下,可确证偶联物的改进的抗肿瘤作用。

[0083] 另外,活性物质如丝裂霉素 C 也偶联到 N-琥珀酰脱乙酰壳多糖(Song 等, J. Controlled Release, 第 42 卷(1996), 93-100 页),羧甲基壳多糖(Song 等, Arch. Pract. Pharm. 第 53 卷(1993), 141-147 页)和低聚肽上(Soyez 等, J. Controlled Release, 第 47 卷(1997), 71-80 页)。在大多数分析中,与单独的抗肿瘤活性物质比较,偶联物再次显示改进的抗肿瘤活性。

[0084] 按本发明意外地发现,包含抗肿瘤活性物质的 HAS- 活性物质偶联物对肿瘤细胞有改进的毒性作用和/或对其它细胞有低的毒性。因此,该偶联物可具有较宽的治疗范围。

[0085] 偶联物的血浆半衰期明显增长。这就可通过较长时间接触使肿瘤细胞中的修复机制断裂。同时本发明可达到较长的起效期,特别是在健康组织中,因此对患者可达到较小峰浓度和改进的耐受性。

[0086] 可采用任意的抗肿瘤活性物质来制备本发明的偶联物。抗肿瘤活性物质例如可选自烷化剂、抗代谢物、抗生素或天然物质。

[0087] 按照一种优选实施方案,该抗肿瘤活性物质是丝裂霉素 C、环磷酰胺、博来霉素、苯丁酸氮芥、顺铂、阿糖胞苷、氟达拉滨、阿霉素、依托泊苷、5-FU、MTX、长春花碱、长春花新碱、长春地辛、羟基脲、6-MP 或 CCNU。

[0088] 丝裂霉素 C 作为活性物质的应用是特别优选的。丝裂霉素 C 属抗生素类,并含氮丙啶基以及醌基和白消安环。该活性物质用于治疗肾细胞癌、膀胱肿瘤和其它泌尿疾病。该化合物仅在低氧(即优选肿瘤)细胞内代谢后通过苯醌的细胞内的酶还原或自行化学还原并去掉甲氧基而达到活性。HAS 可优选通过连接基团偶联到该甲氧基上。在细胞内该取代基分裂后,细胞内仍存在同样的活性物质,它起到 DNA 烷基化交联作用,并由此发挥毒性作用。或者,HAS 也可偶联到一个或两个  $\text{NH}_2$  基上。丝裂霉素 C 具有典型的组织特异性。按照本发明,优选的是这种特异性,特别是对排泄器官的特异性通过 HAS- 偶联来提高。

[0089] 按本发明,抗肿瘤活性物质可按任意方法偶联到 HAS 上。但是,在 HAS 还原性端基上的特定偶联是优选的,因为通过此过程产生特定的偶联物。

[0090] 按本发明的一个实施方案,使羟乙基淀粉偶联在丝裂霉素 C 的甲氧基上。对此,在丝裂霉素 C 的甲氧基上的偶联是经由连接基团实现的。

[0091] 按照另一实施方案,本发明涉及一种制备含由 HAS 和抗肿瘤活性物质组成的偶联物的化合物的方法。该方法包括使 HAS 直接或经由连接基团共价偶联到抗肿瘤活性物质上的步骤,并分离该偶联物。

[0092] 此外,本发明涉及一种含化合物的药物组合物,所述化合物含有由 HAS 和抗肿瘤活性物质组成的偶联物。此外,该药物组合物还含有可药用载体和 / 或细胞因子。该细胞因子优选是 IL-2、 $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素。

[0093] 该药物组合物可以在现有技术中已知的任意应用形式存在。例如可配制成口服或胃肠外给药的组合物。组合物的配制可按现有技术的常规方法进行。除活性物质外,该组合物还含有通常的可药用载体和一种或多种助剂,以及任选的防腐剂、增溶剂等。

[0094] 最后,本发明涉及含由 HAS 和抗肿瘤活性物质组成的偶联物的化合物在制备治疗下述疾病的药物中的应用:肿瘤和 / 或其转移灶,特别是治疗泌尿科肿瘤和 / 或泌尿科肿瘤转移灶、肾细胞癌转移灶,或淋巴系统的疾病如 CLL、淋巴网状细胞瘤、NHL、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏病。此外,按本发明实施方案,该药物也可包含细胞因子如 IL-2、 $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素。

[0095] 本发明的化合物在制备用于治疗泌尿科肿瘤和 / 或泌尿科肿瘤转移灶,如治疗肾细胞癌转移灶的药物中的应用是特别优选的。目前肾细胞癌的有效治疗既不能以联合-化疗也不能以单独的丝裂霉素 C 达到。这可能是由于化合物的不合适的药物动力学,因为肾的排出量仅约 18%。由于 HAS 几乎完全经肾排出,所以与非偶联物质相比,该偶联物有高的肾排出的百分数。本发明的该实施方案利用 HAS 的细胞内的中间储存。特别是高取代的 HAS 类型 (HAS 200/0.62) 具有增强的细胞内储存,在极端情况下甚至具有过量储存。这种现象在近端肾小管范围内也观察到 (Peron 等, *Clinical Nephrology*, 第 55 卷 (2001), 408-411 页)。

[0096] 因此,按该实施方案,本发明提供一种抗肿瘤活性物质在某些靶细胞或靶组织中的浓集作用。偶联物的改进的药物动力学可在低的全身浓度下在靶器官的细胞中达到明显高的浓度。这种医学应用优选用于透明细胞肾癌和易染细胞肾癌,这些癌一起构成约 90% 的组织型癌。

[0097] 按另一实施方案,本发明涉及本发明的化合物在制备治疗淋巴系统疾病的药物中的用途,这些病如 CLL、淋巴网状细胞瘤、NHL、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏病。通过 HAS 在抗肿瘤活性物质上按本发明的偶联,该活性物质的细胞内的吸收将依链长和取代度而减慢。此外,放射性动力学研究表明, HAS 在某些器官,对此为淋巴器官中的储存比在全身中储存更长 (参看 Bepperling 等, *Crit. Care*, 第 3 卷, 增补 1, (1999), 153 页)。由此达到该偶联物在靶细胞中的浓集,这就在较小的全身毒性下得到改进的药物动力学。

[0098] 采用氟达拉滨作为活性物质来治疗淋巴系统疾病是优选的。氟达拉滨是一种卤化的腺嘌呤类似物,它有抗脱氨作用。

[0099] 此外,本发明涉及本发明化合物在制备用于治疗皮肤 / 局部原生恶性肿瘤或其转移灶的药物中的应用。其中利用其两种效应,即靶向增大由所述组织的吸收和延缓 HAS 偶联物从该组织中排出。这二者导致该偶联物在靶细胞中的浓集。

[0100] 此外,本发明还涉及本发明化合物在制备用于治疗血液系统疾病或肿瘤学疾病的药物中的应用,这些病如非-小细胞和小细胞的支气管癌、乳腺癌、食管鳞状细胞癌、肾细胞癌、睾丸癌、恶性黑素瘤、ALL 或 CML。特别是在用偶联物治疗肾细胞癌的情况下,由于化合物在相关组织中的强浓集,通过偶联物的较大亲水性及由此达到的较强的肾排出就产生了其优点。长春地辛作为活性物质的特别适于本发明的这一实施方案。

[0101] 此外,本发明还涉及本发明化合物在制备药物中的应用,其中该化合物用于与一种或多种其它抗肿瘤活性物质或细胞因子的联合治疗。该联合治疗可通过给药一种含所有活性物质的药物,或通过给药 2 种不同的或多种其中各配有活性物质的药物进行。

[0102] 此外,本发明还提供一种制备药物的方法,该药物包含细胞因子和本发明的化合物,并适用于新的联合治疗。相应的药物特别适用于治疗继发性的肾细胞癌。

[0103] 按本发明的另一个特别优选的实施方案,本发明提供由 HAS 和抗心律失常活性物质组成的偶联物以及其在治疗心律失常中的应用。

[0104] 心律失常意指心动周期一时的和有规律地偏离正常的心率。在多数情况下,这种偏离是由于心脏兴奋形成障碍或兴奋传导障碍引起的。作为抗心律失常活性物质或抗心律失常药物是适用于治疗心律失常,特别是心室心律失常的物质。

[0105] 按抗心律失常活性物质的作用类型可区分为钠通道阻断剂(奎尼丁、普鲁卡因酰胺、双异丙吡胺等)、 $\beta$ -受体阻断剂(阿替洛尔(atenolol)、普奈洛尔等)、选择性复极化延长剂(胺碘酮、索他洛尔等)、钙-拮抗剂(维拉帕米、加罗帕米等)和局部麻醉药。

[0106] 但是在现有技术中通常的抗心律失常的活性物质一部分具有短的作用时间。例如阿糖腺苷是一种具有非常短的半衰期的抗心律失常的活性物质。这种物质的作用时间仅几分钟。在许多情况下需要延长半衰期和作用时间。

[0107] 一些抗心律失常的活性物质具有促心律不齐的副作用,部分甚至会增加死亡率。

[0108] 本发明特别提供一种改进的抗心律失常的活性物质,例如它具有延长的作用时间。本发明意外发现,HAS-抗心律失常药-偶联物在体内血浆中有明显较长的半衰期,并且该活性物质的活性不会由于在 HAS 上的偶联而明显受损。

[0109] 在本发明范围内,任何抗心律失常的活性物质均可用于制备偶联物。该活性物质可选自钠通道阻断剂、 $\beta$ -受体阻断剂、选择性复极化延长剂、钙-拮抗剂和局部麻醉药。优选的活性物质为阿糖腺苷、奎尼丁、普鲁卡因酰胺、双异丙吡胺、利多卡因、苯妥因、美西律、西罗莫木碱、Parjmalium、普罗帕酮、阿替洛尔、普奈洛尔、胺碘酮、索他洛尔、维拉帕米、加罗帕米或地尔硫 草,其中特别优选阿糖腺苷。

[0110] 按本发明的一个实施方案,抗心律失常活性物质与 HAS 之间的连接是经 HAS 的还原性端基实现的。

[0111] 在采用阿糖腺苷时,这种活性物质例如是经氨基与 HAS 连接的,其中阿糖腺苷的氨基与 HAS 的还原性端基之间的偶联是特别优选的。优选的偶联方案是在经代谢(HAS 解离)后存在本来的阿糖腺苷。

[0112] 另外,该活性物质经所谓的连接基团偶联在 HAS 上。

[0113] 本发明还涉及一种含本发明化合物的药物组合物。该药物组合物还包含通常的可药用载体,例如可能制成用于静脉应用的药物组合物。

[0114] 最后,本发明涉及本发明化合物在制备用于治疗心律失常,特别是治疗心室心律

失常的药物中的应用。

[0115] 按另一实施方案,本发明涉及本发明化合物在制备用于诱导细胞程序死亡,例如在肿瘤组织或炎症组织中的细胞程序死亡的药物中的应用。

[0116] 本发明涉及含由 HAS 和抗感染活性物质或抗生素组成的偶联物的化合物,以及其在治疗传染病中的应用。

[0117] 微生物(病毒、细菌、真菌、原虫)侵入大生物(植物、动物、人)中并在其中繁殖称为感染。传染病的发生及病程主要与微生物的致病性和大生物的免疫性有关。

[0118] 为了防治传染病,数十年来应用抗感染活性物质作为化疗剂。1928 年根据在培养皿中无葡萄球菌的区域形成的活性物质的特性,A.Flemings 鉴定出青霉素。青霉素曾是第一个能以工业规模生产的并在临床实践中具有重要性的抗生素。

[0119] 现在,来自  $\beta$ -内酰胺类的活性物质也看作青霉素,它们是由青霉素类(例如黄曲霉素和青霉菌)的真菌形成的。该杀菌剂的作用是基于阻滞细菌细胞壁的合成。青霉素使细菌酶,即转肽酶失活,由此,阻碍了细胞壁的胞壁质的多糖链的交联。

[0120] 自从发现以来,已分离出和合成了无数的可抑制微生物生长和杀死这些微生物的活性物质。大多数的抗生素均来源于由土壤分离出的链霉菌属(约 65%)。设想可利这种微生物物质来压制土壤中的竞争者。

[0121] 分离出的抗生素数目估计约为 8000 种,其中约 100 种可用于医学上。将活性物质分成不同的物质类是按不同的观点进行的,例如按化学结构或作用机理来分。

[0122] 目前,抗生素不仅用于防治传染病,也作为免疫抑制剂、抗肿瘤治疗中的细胞抑制药,作为植物保护剂,用于食品的防腐,作为动物饲料的催肥助剂。

[0123] 近年来,出现大量耐抗生素的微生物菌种。除简单的抗性菌种外,还发现众多的多重的抗性菌种,它使得防治某些疾病特别困难。

[0124] 在针对某些病原体的各种抗生素的活性的研究中发现,某些活性物质(如阿莫西林或氨苄西林)几乎只在细胞外起作用(Scaglione 等, *Chemotherapie*, 第 39 卷(1993), 416-423 ;Ballaud 等, *J. Antimicrob. Chemother.*, 第 37 卷(1996), 105-115)。因此,这些活性物质不能用于抗主要存在于细胞内的微生物。为改进细胞内的活性,生产了氨苄西林-纳米微粒(参看 Balland 等,同上)。

[0125] 正如结核病或其它分支杆菌病感染的情况下,由于总是希望联合治疗,所以展览治疗可能性的范围是希望的。在另一些细胞内的感染如衣原体感染情况下,近来已认识到它对关节硬化的发病机理有可能的意义(Stille 和 Dittmann, Herz, 第 33 卷(1998), 185-192 页),由此细胞内的具有长效作用的各种抗生素在治疗和预防上可能具有重要意义。

[0126] 根据本发明,现已意外地发现,抗感染活性物质在 HAS 上的偶联导致了活性物质药物动力学特性的改进,特别是延长了体内半衰期、改进了细胞内的吸收和/或活性物质的有效性。

[0127] 按本发明,可采用任何抗感染活性物质或任何抗生素。优选是该活化剂选自氨基青霉素、头孢菌素和氨基头孢菌素、 $\beta$ -内酰胺-抗生素、碳青霉烯、氨基苷、四环素、大环内酯-抗生素、回旋酶抑制剂、糖肽抗生素、林可霉素、链阳性菌素、晚霉素、噁唑烷酮、硝基咪唑、磺胺类药物、复方新诺明、局部抗生素、抑病毒药、抗霉菌药、抗结核菌药。

[0128] 其中可涉及氨苄西林、阿莫西林、头孢氨噻、头孢他定、万古霉素、氯林可霉素、甲硝唑、异烟肼、利福平、利福布丁、利福喷丁、乙胺丁醇、吡拉辛酰胺 (pyracinamid)、链霉素、丙硫异烟胺或氨基青霉素, 其中优选采用氨基青霉素如氨苄西林、阿莫西林、大环内脂或链霉素。

[0129] 按本发明的一个实施方案, 采用氨基青霉素作为活性物质, 它直接或经氨基青霉素的氨基共价偶联到羟乙基淀粉上。

[0130] 按本发明的另一实施方案, 采用氨基头孢菌素代替氨基青霉素, 由此达到小的过敏性。另一实施方案是大环内脂-HAS 偶联, 它涉及红霉素或其衍生物, 特别是红霉素胺。另外, 可采用链霉素作为活性物质。

[0131] 按本发明的特别优选的实施方案, 抗感染活性物质与羟乙基淀粉之间的偶联是经羟乙基淀粉的还原性端基进行的。

[0132] 按本发明另一实施方案, 抗感染活性物质通过连接基团偶联到羟乙基淀粉上。

[0133] 本发明还包括具有本发明化合物的药物组合物。通常该药物组合物还含有可药用载体。

[0134] 最后本发明涉及本发明化合物在制备用于治疗传染病的药物中的应用。该药物组合物特别适于治疗通过细胞内病原体引起的传染病。它涉及病原的和兼性病原的病原体整个范围, 如细菌的、病毒的或寄生的病原体、支原体属、分支杆菌属、衣原体属、立克次体属等。

[0135] 在本发明的另一方面, 提供 HAS- 核酸 - 偶联物。目前的核酸库在很大范围内研究了具有一定活性的核酸。相应的活性可以是例如所述核酸在某些其它核酸、受体或病毒蛋白质上结合的能力。通过结合可以刺激或抑制生物信号。为此, 除了天然存在的 D-DNA 分子和 D-RNA 分子外, 还采用 L-DNA 分子和 L-RNA 分子, 其与天然存在的分子的区别在于, 其具有 L- 核糖或 L- 脱氧核糖代替 D- 形式作为核酸的成分 (参看 W0 98/08856)。在本发明范围内可表明, 可制备 HAS- 核酸 - 偶联物, 该偶联物保持了天然的功能性 (参看实施例 7)。

[0136] 本发明还提供一种制备共价的 HAS- 活性物质 - 偶联物的方法。该方法可在水性或有机反应介质中进行, 但是在水相中进行偶联是优选的。

[0137] 因此, 提供一种制备共价的 HAS- 活性物质 - 偶联物的方法, 其中 HAS 和至少一种活性物质在反应介质中相互反应。其特征在于该反应介质是水或含至少 10 重量% 的水与有机溶剂的混合物。

[0138] 本发明方法的反应介质包括至少 10 重量%, 优选至少 50 重量%, 特别优选至少 80 重量%, 如 90 重量% 或甚至达 100 重量% 的水, 和相应最高 90 重量%, 优选最高 50 重量%, 特别优选最高 20 重量%, 如 10 重量% 或甚至达 0 重量% 的有机溶剂。该反应也可在含水相中进行。优选的反应介质是水。

[0139] 因此本发明方法的优点在于, 因为不是必须用有毒性危害的有机溶剂, 并由此在本发明制备的产物情况下, 就不需分离掉至少少量残余的有毒性危害的溶剂, 但在按已知方法的生产中, 为了避免溶剂带来的不希望污染, 分离工作总是必须要做的。此外, 按至今的方法必须附加的对残余的有毒性危害的溶剂的质量控制就不需要了, 因为本发明方法优选使用无毒性危害的溶剂。本发明优选的溶剂例如有无毒性危害的质子溶剂如乙醇或丙

二醇。

[0140] 此外,本发明方法的优点是,基本上避免了由有机溶剂引起的蛋白质或肽的不可逆或可逆的结构变化,而在有机溶剂的方法中,不能完全排除这一点。由此按本发明方法得到的多肽就和在 DMSO 中制备的不一样。

[0141] 本发明还意外地发现,在水溶液中可进行 HAS 与活性物质的偶联,对此,不会产生明显量的副产物。由此,本发明方法直接得到高纯度的改进产物。本发明方法首次使得简单地制备 HAS-活性物质-偶联物成为可能,并在该偶联物中活性物质以活性形式存在,同时保持了 HAS 的有利特性。为从反应混合物中分离 HAS-活性物质-偶联物不需特殊方法,因为该反应是在水相进行,也就不一定必须要纯化去除有机溶剂。

[0142] 本发明优选使 HAS 直接连接在活性物质的  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 基、 $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 基、SH-基、COOH 基或 -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-基团上。另外,也可将其它反应性基团引入 HAS 中或 HAS 与活性物质之间的连接通过连接基团进行。在 PEG 上连接活性物质所用的相应的连接基团是现有技术已知的。优选采用氨基酸,特别是甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸以及胍的衍生物和羟胺 (Oxylamin) 的衍生物作为连接基团,如在 WO 97/38727 和 EP 605963 中所公开的。

[0143] 按本发明方法的一个实施方案, HAS 在连接到活性物质上前要经氧化。氧化可按一种现有技术已知方法进行,优选是选择性氧化 HAS 的还原性端基。该过程就使得如下方法成为可能,即 HAS 的经氧化的还原性端基与活性物质的氨基反应以形成酰胺。该实施方案具有特别的优点,即 HAS 和活性物质之间达到特定连接,并由此得到特别均匀的产物。

[0144] 使具有经氧化的还原性端基的 HAS 和活性物质相互反应至少 12, 优选至少 24 小时。此外,希望的是加入任意的活化剂如乙基二甲基-氨基丙基-碳二亚胺 (EDC)。反应期间的 HAS 与活性物质的摩尔比可任意选定,通常 HAS : 活性物质为 20 : 1-1 : 20, 优选 6 : 1-1 : 6。当 HAS : 活性物质的摩尔比约为 2 : 1 时达到最好结果。

[0145] 活性物质的氨基与 HAS 之间的其它偶联反应当然也包括在本发明的范围内。例如 HAS 与活性物质直接互相反应的方法,其中得到 HAS 与活性物质之间的席夫碱作为中间产物。接着席夫碱的偶氮次甲基 -CH=N- 在随后 <2H> 的缩醛加成 (formal addition) 下还原成亚甲基氨基 -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-。对此反应,专业人员可采用大量现有技术中已知的还原剂,其中优选的还原剂是 BH<sub>4</sub>。

[0146] HAS 可在活性物质的任意基团上偶联。偶联优选如此进行,即,使代谢的偶联物具有至少 50%, 优选至少 75% 的偶联前活性物质的活性,特别优选保持至少 95% 的活性。该偶联反应当然也可如此控制,即,使 HAS 的结合仅在活性物质的一个或多个确定的基团上进行,例如在肽的赖氨酸基团或半胱氨酸基团上进行。当 HAS 通过氧化的还原性端基结合到活性物质的一个或多个确定的基团上时出现特别的优点,因为在相应的过程中得到均匀的 HAS-活性物质-偶联物。

[0147] 按本发明方法的一个优选实施方案,采用 HAS 和蛋白质或肽作为反应的原料。也可应用天然的或重组来源的任意的治疗蛋白质或诊断蛋白质。在 Pharma Business, 2000 年 7 月 /8 月, 45-60 页中可找到现时市场上可买到的重组生产的活性物质的目录。本发明包括制备包含该出版物中提到的任一种活性物质的 HAS-活性物质-偶联物。

[0148] 特别优选的是应用细胞因子如干扰素、白细胞介素、生长因子、酶、酶-抑制剂、受体、受体-断片、胰岛素、因子 VIII、因子 IX、抗生素 (或抗感染剂)、肽-抗生素、病毒鞘-蛋

白质、血红蛋白、红细胞生成素、白蛋白、hTPA、抗体、抗体断片、单链抗体、DNA、RNA 或其衍生物来制备偶联物。在本发明方法中应用重组蛋白质或肽是特别有利的。如已提到的，相应的蛋白质由于其对人体的抗原特性经常不能作为活性物质。但通过本发明方法在 HAS 上偶联后就减少了重组蛋白质的免疫原性，这就可在医学上用于人体。

[0149] 此外，HAS 在短链蛋白质和较小的肽上偶联是特别有利的。现已建立了大量的肽库，例如噬菌体 - 展示库，其中将短的低聚肽（例如 3-20 聚物）表达在噬菌体的表面上。此外，将来自单一多肽链（所谓的单链抗体）的抗体表达在细菌中或噬菌体的表面上。可在这些库中查找某些活性物质的活性或结合活性。但是，相应的肽 - 活性物质和抗体的治疗或诊断应用至今是失败的，这是因为其较小，在机体中很快被排出了（参看 Chapman 等，1999，同上）。按本发明方法，将这种肽有利地偶联在 HAS 上，就具有可作为活性物质应用的体内半衰期。

[0150] 另外的实施方案是可应用激素、甾类激素、从氨基酸衍生的激素或从脂肪酸衍生的激素作为活性物质。在个别情况下，可能需在连接到 HAS 上之前在激素中引入活性基如借助于连接基团连接。

[0151] 按本发明，可应用任意的在生理上相容的 HES 作为原料。平均分子量（重均分子量）为 1-300kDa，特别是 1-150kDa 的 HES 是优选的。特别优选平均分子量为 2-40kDa 的 HES。优选地，HES 的摩尔取代度为 0.1-0.8，C<sub>2</sub> : C<sub>6</sub>- 取代的比为 2-20，均以羟乙基计。

[0152] 本发明还涉及按上述方法制备的 HAS- 活性物质 - 偶联物。该偶联物具有有利的特性，即高的活性物质活性、小的免疫原性、长的体内停留时间和优异的流变学特性，这就提高了该偶联物在医学上的适用性。

[0153] 因此，本发明还包括制备药剂或诊断剂的方法，其中按上述方法之一制备 HAS- 活性物质 - 偶联物，并用现有技术已知的可药用载体、佐剂或助剂混合，以及按此方法得到药剂和诊断剂。

[0154] 相应药剂的医学应用与活性物质的种类有关。例如在应用血红蛋白作活性物质时，该偶联物可用作载氧剂。另外，在应用细胞因子作为制备用的活性物质时，该偶联物例如可用在肿瘤治疗中。所有情况下，在药剂中所用的偶联物的浓度可由一般专业人员毫无困难地按剂量 - 效应试验确定。

[0155] 该诊断剂可在体内或体外用于诊断疾病和障碍。当用抗体或抗体片断作为活性物质时，则该偶联物例如适用于实施在现有技术中通常的 ELISA- 检测法。

#### 具体实施方式：

[0156] 在实施例中，应用下面所述的材料：

[0157] 人血清白蛋白 (HSA) :Sigma-Aldrich A3782

[0158] HES 130kD : 130/0.5 型，由 T91SEP 制备 (Fresenius Kabi)

[0159] 数据 : Mw :130000 ± 20000D

[0160] Mn : 42600D

[0161] HES 10kD : HHH 4-2 型，(Fresenius Kabi)

[0162] 数据 : Mw 9800D

[0163] Mn : 3695D

[0164] EDC: Sigma-Aldrich No. 16.146-2

[0165] (乙基二甲基-氨基丙基-碳二亚胺)

[0166] HOBT: Sigma-Aldrich No. 15.726-0

[0167] (1-羟基-1H-苯并三唑水合物)

[0168] DIG-聚糖测定试剂盒:Roche-Boehringer No.1142 372

[0169] 下列的实施例 1-6 描述 HSA 和二氨基丁烷在具有氧化的还原性端基的 HES 上的偶联或 HSA 直接在 HES 上的偶联。HSA 和二氨基丁烷仅是对上述定义的活性物质的举例。实施例 7 描述低聚核苷酸在 HES 上的偶联。

[0170] 实施例 1:羟乙基淀粉的还原性端基的选择性氧化:

[0171] 为选择性氧化羟乙基淀粉 (130kD 和 10kD) 的还原性端基,将其溶于最少量的水中,并加入不同量的碘溶液和 KOH 溶液。

[0172] 搅拌该混合物,直到证实 I<sub>2</sub> 的颜色消失。多次重复该程序,以达到加入大量的碘溶液和 KOH 溶液。接着将该溶液通过 Amberlite IR120Na<sup>+</sup> 型阳离子交换树脂纯化,相对水进行渗析(具有 4-6kD 排出限值的渗析小管)20 小时,并冷冻干燥。

[0173] 其氧化度总是用 Somoyi, N. 公开的方法 (Method in Carbohydride Chemistry, 第 1 卷 (1962), 384-386 页) 测定。氧化反应记录列于表 1。

[0174] 表 1 HES (130kD 和 10kD) 的还原性端基在各种条件下的氧化

[0175]

方法	HES (Mn)	碘溶液 0.1N	KOH-溶液 0.1N	溶剂	反应时间	产率
氧化 HES 130 (1)	1 g 2.4x10 <sup>-5</sup> mol	0.3 ml 3.0x10 <sup>-6</sup> mol	0.5 ml 5.0x10 <sup>-6</sup> mol	水 4.0 ml	4 h 25°C	30.1%
氧化 HES 130 (2)	4 g 9.4x10 <sup>-6</sup> mol	1.0 ml 1.0x10 <sup>-4</sup> mol	1.5 ml 1.5x10 <sup>-4</sup> mol	水 6.0 ml	25°C 过夜	24.8%
氧化 HES 130 (3)	5 g 1.2x10 <sup>-4</sup> mol	1.2 ml 1.2x10 <sup>-4</sup> mol	1.5 ml 1.5x10 <sup>-4</sup> mol	水 7.5 ml	25°C 过夜	24.3%
氧化 HES 130 (4)	5 g 1.2x10 <sup>-4</sup> mol	3.0 ml 3.0x10 <sup>-4</sup> mol	4.5 ml 4.5x10 <sup>-4</sup> mol	水 7.5 ml	25°C 过夜	60.8%
氧化 HES 130 (5)	5 g 1.2x10 <sup>-4</sup> mol	4.0 ml 4.0x10 <sup>-4</sup> mol	5 ml 5.0x10 <sup>-4</sup> mol	水 7.5 ml	25°C 过夜	80.0%
氧化 HES 130 (6)	8 g 1.9x10 <sup>-4</sup> mol	7.0 ml 7.0x10 <sup>-4</sup> mol	11.5 ml 1.2x10 <sup>-3</sup> mol	水 7.5 ml	25°C 过夜	88.4%
氧化 HES 130 (7)	10 g 2.4x10 <sup>-4</sup> mol	10 ml 1.0x10 <sup>-3</sup> mol	20 ml 2.0x10 <sup>-3</sup> mol	水 7.5 ml	25°C 过夜	100%
氧化 HES 10 (1)	5 g 1.4x10 <sup>-3</sup> mol	2.0 ml 2.0x10 <sup>-4</sup> mol	2.0 ml 2.0x10 <sup>-4</sup> mol	水 10.0 ml	20 h 25°C	3.0%
氧化 HES 10 (2)	5 g 1.4x10 <sup>-3</sup> mol	3.5 ml 3.5x10 <sup>-4</sup> mol	4.5 ml 4.5x10 <sup>-4</sup> mol	水 10.0 ml	25°C 过夜	5.3%
氧化 HES 10 (3)	15 g 4.1x10 <sup>-3</sup> mol	21.0 ml 2.1x10 <sup>-3</sup> mol	31.0 ml 3.1x10 <sup>-3</sup> mol	水	25°C 过夜	10.5%
氧化 HES 10 (4)	8 g 2.2x10 <sup>-3</sup> mol	83.0 ml 8.3x10 <sup>-3</sup> mol	180.0 ml 1.8x10 <sup>-2</sup> mol	水	25°C 过夜	80.0%
氧化 HES 10 (5)	7 g 1.9x10 <sup>-3</sup> mol	95.0 ml 9.5x10 <sup>-3</sup> mol	210.0 ml 2.1x10 <sup>-2</sup> mol	水	25°C 过夜	100.0%
氧化 HES 10 (6)	6.4 g 1.7x10 <sup>-3</sup> mol	50 ml 5.0x10 <sup>-3</sup>	150 ml 1.5x10 <sup>-2</sup>	水	25°C 过夜	100.0%



[0176] 下面详细重复表中综述记录中的氧化 (6), HES 10 kD: 将 6.4g HES 10 kD (1.7 毫摩尔) 在反应容器中于搅拌下溶于数毫升的水中。向其中加入 50ml 的 0.1N 碘溶液 (5.0 毫摩尔) 和 150ml 的 0.1N KOH 溶液 (15 毫摩尔)。将该混合物在 25°C 下放置过夜。该混合物经 Amberlite IR 120 (Na<sup>+</sup> 型) 纯化, 并相对水渗析 (渗析管, 纤维素乙酸酯; 除去 4-6kD)。渗析产物经冷冻干燥 (Heraeus-ChristAlpha, 烧瓶干燥过夜)。

[0177] 如表 1 所示, 在碘量从  $3.0 \times 10^{-5}$  摩尔提高到  $1.0 \times 10^{-3}$  摩尔后, 达到了 HES 130 kD 还原性端基的完全氧化 (相应产率 100%)。

[0178] 对于 HES 10 kD 的还原性端基的完全氧化需继续提高碘量到大于  $2.1 \times 10^{-3}$  摩尔。

[0179] 实施例 2: 具有氧化的还原性端基的 HES 在水相中与 HSA 的连接:

[0180] 为进行偶联, 将具有氧化的还原性端基的羟乙基淀粉 (ox-HES) 和 HSA 完全溶于水中。当溶液透明时, 将乙基二甲基-氨基丙基-碳二亚胺 (EDC) 加到水中溶解。在适度搅拌下经 EDC 活化后, 再进一步加入 EDC。需要时用 HOBt 活化该反应, 并且放置过夜。将该产物对蒸馏水渗析 15 小时以纯化, 并接着经冷冻干燥 (此后称为方法 A)。偶联反应的记录列于表 2。

[0181] 表 2 具有氧化的还原性端基的 HES (130kD 和 10kD) 与 HSA 在不同条件下的偶联反应 (方法 A, 在 HES 栏的括号中的数给出按表 1 的氧化方法)

[0182]

方法 A	HSA	ox-HES (Mn)	EDC	HOBt	溶剂	活化剂	反应
偶联 I ox-HES 130	300 mg $4.4 \times 10^{-6}$ mol	100 mg (1) $2.4 \times 10^{-6}$ mol	25 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/二噁烷 13 ml/2 ml	1.5 h 3-4°C	4 h 25°C
偶联 II ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	300 mg (2) $7.0 \times 10^{-6}$ mol	15 mg $9.7 \times 10^{-5}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/二噁烷 10 ml/3 ml	1.5 h 3-4°C	25°C 过夜
偶联 III ox-HES 130	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	3.8 g (5) $8.9 \times 10^{-3}$ mol	46.5 mg $3.0 \times 10^{-3}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/二噁烷 10 ml/3 ml	0 h	24 h 25°C
偶联 IV ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	1.9 g (5) $4.5 \times 10^{-3}$ mol	25 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	水	1.5 h 3-4°C	25°C 过夜
偶联 V ox-HES 130	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	4.3 g (5) $1.0 \times 10^{-4}$ mol	100 mg $6.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	水	0 h	25°C 过夜
偶联 VI ox-HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	130 mg (7) $3.0 \times 10^{-6}$ mol	50 mg $3.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	水 5ml + 10ml	0 h	5 h 25°C
偶联 VII ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	130 mg (7) $3.0 \times 10^{-6}$ mol	200 mg $3.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	水 5ml + 2x 10ml	0 h	24 h 25°C
偶联 I ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	300 mg (1) $8.1 \times 10^{-6}$ mol	5 mg $3.0 \times 10^{-5}$ mol	100 mg $7.7 \times 10^{-4}$ mol	H <sub>2</sub> O/二噁烷 13 ml/2 ml	1.5 h 3-4°C	25°C 过夜
偶联 II ox-HES 10	70 mg $1.0 \times 10^{-6}$ mol	1.0 g (2) $2.7 \times 10^{-3}$ mol	15.5 mg $1.0 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	水	10 ml 0 h	25°C 过夜
偶联 III ox-HES 10	200 mg $3.0 \times 10^{-6}$ mol	3.0 g (3) $6.1 \times 10^{-3}$ mol	77.5 mg $5.0 \times 10^{-3}$ mol	20 mg $1.5 \times 10^{-4}$ mol	水	0 h	6 h 25°C
偶联 IV ox-HES 10	50 mg $7.4 \times 10^{-7}$ mol	7.4 g (4) $2.0 \times 10^{-3}$ mol	282 mg $1.5 \times 10^{-3}$ mol	0 mg	水	0 h	25°C 过夜
偶联 V ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	103 g (6) $2.8 \times 10^{-3}$ mol	93 mg $5.6 \times 10^{-4}$ mol	0 mg	水 4 ml	0 h	20 h 25°C
偶联 VI ox-HES 10	100 mg $1.5 \times 10^{-6}$ mol	103 g (6) $2.8 \times 10^{-3}$ mol	200 mg $1.2 \times 10^{-3}$ mol	0 mg	水 3x5 ml	0 h	30 h 25°C

[0183] - 在 60 分钟内用滴液漏斗加 EDC- 溶液。

[0184] 下面详细说明 ox-HES 130 kD 和 HSA 之间的偶联反应 VII: 在圆底烧瓶中将 130mg

的 ox-HES 130 kD (氧化度约 100%) 和 100mg 的 HSA 于室温、搅拌中溶于约 5ml 水中。一旦溶液透明,在各种情况下将溶于 5-10ml 水中的 200mg EDC 以 3 份在 1 小时内滴入该溶液中。每次加入之间要在室温下搅拌约 4 小时。24 小时反应后,将该混合物相对水渗析(渗析管,纤维素乙酸酯,除去 4-6kD)。接着冷冻干燥该产物。

[0185] 实施例 3:在水相中 HES 直接连接到 HSA 上:

[0186] 此反应的原理是基于在 HES 和蛋白质的氨基之间形成席夫碱,该反应通过席夫碱借助于  $\text{NaBH}_4$  生成相应胺的反应来控制(下面称为方法 B)。

[0187] 为此,将 HES 完全溶于少许水中。并加入在硼酸盐缓冲液 (pH 9.0) 溶解的 HSA。在该溶液中加入  $\text{NaBH}_4$  并在室温下搅拌。加入另一份 HES130kD,接着加入另外的  $\text{NaBH}_4$ 。反应结束后,进行所述的渗析和冷冻干燥。

[0188] 各实验记录列于表 3。

[0189] 表 3 HES (130kD 和 10kD) 与 HSA 在各种条件下的直接偶联(方法 B)

[0190]

方法 B	HSA	HES (Mn)	$\text{NaBH}_4$	缓冲液 pH	反应时间
偶联 I HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	500 mg $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol}$	500 mg $1.3 \times 10^{-2} \text{ mol}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . 0 ml 7.4	48 h 25°C
偶联 II HES 130	100 mg $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol}$	1.0 g $2.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$	60 mg $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . 1 ml 7.4	20 h 25°C
偶联 III HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	9.8 g $2.3 \times 10^{-4} \text{ mol}$	285 mg $7.5 \times 10^{-3} \text{ mol}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . 1 ml 7.4	36 h 25°C
偶联 IV HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	2.0 g $4.7 \times 10^{-5} \text{ mol}$	180 mg $4.7 \times 10^{-3} \text{ mol}$	Borat 0.1M 9.0	30 h 25°C
偶联 V HES 130	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	4.0 g $9.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$	60 mg $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$	Borat 0.1M 9.0	100 h 25°C
偶联 I HES 10	50 mg $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$	2.8 g $9.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$	28 mg $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol}$	Borat 0.1M 9.0	80 h 25°C

[0191] 详细描述是,为了与 HES 130 kD 偶联,将 2.0g 这种化合物完全溶于水中(约 5ml)。再加入 50mg 的溶于 1ml 的 0.1M 硼酸盐缓冲液 (pH 9.0) 中的 HSA。向此溶液中加入 30mg 的  $\text{NaBH}_4$ ,并在室温下搅拌。18 小时后再加入另一份 2.0g 的 HES 130 kD,并接着加另外的 30mg 的  $\text{NaBH}_4$ 。在总共 100 小时的反应时间后,对其进行渗析和冷冻干燥(偶联 V, HES 130 kD)。

[0192] 对于与 HES 10 kD 的偶联,将 1.4g 此种化合物完全溶于水中(约 5ml),再加入 50mg 的溶于 1ml 0.1M 的硼酸盐缓冲液 (pH 9.0) 中的 HSA。向此溶液中加入 14mg  $\text{NaBH}_4$ ,并在室温下搅拌。18 小时后,再加入另一份 1.4g 的 HES 10 kD,并接着加另外的 14mg 的  $\text{NaBH}_4$ 。在总共 80 小时的反应时间后,对其进行渗析和冷冻干燥(偶联 I, HES 10 kD)。

[0193] 实施例 4:借助 GPC 对偶联产物的分析:

[0194] 首先应用凝胶-渗透-色谱 (GPC) 对反应产物进行分析。

[0195] 4.1. 对 GPC,采用 FPLC 仪器 (Pharmacia),该仪器与 HPLC UV

[0196] 检测器相连。此外采用下列条件:

[0197] 柱:Superose 12 HR 10/30 (1×30cm) (Pharmacia)

[0198] UV 检测器:280nm

[0199] 泵 :0.2ml/min

[0200] 缓冲液 :50mM 磷酸盐 /150mM 氯化钠, pH 7.2

[0201] 在此条件下, HSA- 峰通常在 63 分钟后出现, 另外, 在约 57 分钟时测到一小峰, 它是来自 HSA- 二聚物。由 GPC 得到的色谱图可分析如下 :

[0202] 4.2. 图 1 是 ox-HES 130 kD 在 HSA 上偶联后的产物大小分布的色谱图 (偶联 III)。在此偶联方法中, 无 HOBt- 活化也得到很好的结果。在 37 分钟时测到分明的单宽峰, 在 45 分钟时测到另一小的带, 它表明其分子量高于 HSA 的偶联产物。同时发现痕量未改性的 HSA。

[0203] 图 2 是 ox-HES 130 kD 在 HSA 上偶联后的产物大小的分布 (偶联 IV)。该反应用 HOBt 活化。结果表明, 这种活化使产率下降, 可能是有助于副反应的结果。

[0204] 图 3 和 4 表示 ox-HES 130 kD 在 HSA 上偶联反应期间和反应后的反应产物大小的分布 (偶联 V)。反应 2 小时后, 未改性的 HSA 是具有最高浓度的产物, 此外, 还发现第一个有较高分子量的偶联产物。反应结束后, 发现停留时间约 35 分钟的高浓度的均匀偶联产物。未改性的 HSA 和其它偶联产物均以较小的浓度存在。

[0205] 图 5 表示 ox-HES 130 kD 在 HSA 上偶联反应期间和反应后的反应产物大小的分布 (偶联 V)。结果表明, 其分子量大于 HSA 的偶联产物的浓度在反应过程中增加。

[0206] 最后在图 6 中表明几乎所有 HSA 分子均能转变成均匀偶联产物的偶联反应 (偶联 VII 的反应产物)。

[0207] 4.3. 图 7 表明 HES 在 HSA 上直接偶联所得到的分析色谱图 (方法 B, HES 130 kD, 偶联 V)。在约 65 分钟得到分明的峰 (HSA)。此外, 还检测到了一种偶联产物 (约 42 分钟时的峰)。

[0208] 实施例 5 借助 SES-PAGE 和 Western Blot 的偶联产物分析 :

[0209] 5.1. PAGE 是在十二烷基硫酸钠 (SDS) 存在下应用 Miniprotean II 仪器 (Biorad 公司) 和 7.5% 的丙烯酸酰胺凝胶进行的。电泳是按制造商的规定实施的。按照 Blum 方法 (Elektrophoresis, 第 8 卷, (1997), 93-99 页), 该凝胶用银着色, 以可目视蛋白质。

[0210] 聚糖的存在可借助 Western-Blot 和 Roche-Boehringer 公司的聚糖 - 试剂盒来证实。产物用 SDS-PAGE 分离后, 应用 Miniprotean II 的 Blotting 仪器, 将其转移到硝基纤维素膜上的电泳单元上。接着该膜在仅能将邻位 OH 基氧化的条件下用高碘酸盐氧化。然后与氨基官能化的异羟基洋地黄毒苷元 (Digoxigenin) 反应。结合的异羟基洋地黄毒苷元通过结合在碱性磷酸酶上的特异性单克隆抗体来证实。为此, 加入磷酸酶的底物 (4- 硝基 - 四唑鎓 - 氯化物 /5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基磷酸酯), 它产生难溶的蓝 - 紫色产物。这种产物沉淀在膜上, 并使该带可以目视。未改性的 HSA 和肌酸酶用作负对照, 而转铁蛋白作为正对照。

[0211] 准确的方法程序描述在该试剂盒的附单中。

[0212] 5.2. 图 8 和 9 表明银 - 着色的 SDS-PAGE- 凝胶 (上) 的吸收和转移到膜上后相应产物的吸收和聚糖的检测 (下)。如图所示, 在偶联反应中作为反应产物形成了相对均匀的聚糖, 而同时未改性的 HSA 的浓度下降。

[0213] 实施例 6. 可能的副反应的确证

[0214] 为了弄清副反应是否以具有氧化的还原性端基的 HES 的自缩合形式产生, 制备了

下列反应混合物：

[0215] 表 4. 为确证副反应的反应混合物

[0216]

	ox-HES	EDC	HOBt	水	反应时间
HES 130 kD	500 mg $1.2 \times 10^{-5}$ mol	15 mg $7.8 \times 10^{-5}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	500 mg $1.2 \times 10^{-5}$ mol	15 mg $7.8 \times 10^{-5}$ mol	饱和溶液	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 10 kD	100 mg $2.7 \times 10^{-5}$ mol	3.4 mg $1.8 \times 10^{-5}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 10 kD	100 mg $2.7 \times 10^{-5}$ mol	3.4 mg $1.8 \times 10^{-5}$ mol	饱和溶液	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	700 mg $1.6 \times 10^{-5}$ mol	31 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	-	5.0 ml	30 h 25 °C
HES 130 kD	700 mg $1.6 \times 10^{-5}$ mol	31 mg $1.6 \times 10^{-4}$ mol	饱和溶液	5.0 ml	30 h 25 °C

[0217] 这些实验的目的是为证实在有或无 HOBt 的存在下 HES 可能的自缩合发生到何种程度。样品经冷冻干燥和分析。

[0218] 借助 GPC 和散射光测量,在数个百分点的测量极限内未发现分子量增大的证据。

[0219] 实施例 7:氧化的 HES 在 DNA 上的偶联和偶联产物官能度的分析

[0220] 反应原理：

[0221] 反应图示例于图 10。在第一步中,胺 -HES 12 kD 3 的氨基与 SMCC 4 的 N-羧基琥珀酰亚胺基反应生成偶联物 5。通过用离心-渗析部件的离心处理,分离未反应的 SMCC 4。然后偶联物 5 的马来酰亚胺基与硫代 -DNA 1 的巯基反应以形成所需的产物 6。在 6 中的粗体标出的区域仅是间隔基,并可以是任何形式。

[0222] 偶联物 6 的生物活性的检测是由通过限制酶 EcoR1 的分裂进行的。限制酶仅切断具有完整识别序列的双链 DNA。

[0223] DNA：

[0224] 应用由 MWG 生物技术公司, Ebersberg, 合成的双链 DNA, 单链的序列是：

[0225] SEQ ID NO. 1 : 5' -GTAGAGACAGGAGGCAGCAGTTGAATTTCGCAGGGT-GAGTAGCAGTAGAGC-3' ;

[0226] SEQ ID NO. 2 : 5' -GCTCTACTGCTACTCACCTTGC GAATT-CAACTGCTGCCTCCTGTCTCTAC-3' ;

[0227] 它是用 5' 硫羟 C6 S-S 通过 MWG 改性的 (参看图 10)。

[0228] 将两种 DNA 单链溶于二次蒸馏水中,其浓度均为  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,并以 1 : 1 在  $96^\circ\text{C}$  下杂交成浓度为  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的双链硫代 -DNA 1。

[0229] 产物分析：

[0230] 该分析是在 4% 琼脂糖凝胶中通过凝胶电泳进行的,用含有 45mM Tris- 硼酸盐、1mM EDTA、pH 8.0 的 TBE- 洗脱缓冲液,每  $1 \mu\text{g}$  DNA,有每 100ml 凝胶、 $50 \mu\text{g}$  溴化 3,8- 二氨基 -5- 乙基 -6- 苯基菲啶鎓。其图片是在 312nm 用 CCD- 系统模块 (INTAS 成象仪, **Göttingen**, D) 和 UV- 透照仪 UVT-20S/M/L (Herolab 公司, Wiesloch, D) 摄取的。

[0231] 从反应混合物中取出  $1 \mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{g}$  DNA),并用  $1 \mu\text{l}$  (20U) EcoR1- 限制酶 (New

England Biolabs 公司, Schwalbach/Taunus, D)、1  $\mu$ l 反应缓冲液 (50mM 氯化钠、100mM Tris-HCl、10mM 氯化镁、0.025% Triton X-100, pH 7.5, New England Biolabs) 和 7  $\mu$ l 二次蒸馏水在 37°C 下酶解 3 小时。

[0232] HES 的改性：

[0233] 将平均摩尔重量为 12000g/ 摩尔的 HES12KD (Fresenius, Charge 2540 SR 2.5P) 用碘溶液氧化成 Oxo-HES12KD<sub>2</sub> 的氧化按 DE 19628705 所公开的方法进行。

[0234] 1,4- 二氨基丁烷与 Oxo-HES12KD<sub>2</sub> 的反应：

[0235] 将 1.44g (0.12mmol) 的 Oxo-HES12KD<sub>2</sub> 溶于 1ml 无水的二甲亚砜 (DMSO) 中, 在氮气下滴加到由 1.5ml (1.50mmol) 的 1,4- 二氨基丁烷的溶液中, 并在 40°C 下搅拌 19 小时。再将该反应混合物加到由 80ml 乙醇和 80ml 丙酮组成的混合物中。所形成的沉淀经离心分离, 并加到 40ml 水中。将该溶液相对水渗析 4 天 (SnakeSkin 渗析管, 截断值 3.5KD, Perbio Science Dentschland 公司, Bonn, D), 并接着冷冻干燥。产率为 80% (1.06g) 的氨基-HES 12 KD<sub>3</sub>。

[0236] 氨基-HES12KD<sub>3</sub> 在硫代-DNA<sub>1</sub> 上的偶联：

[0237] 将溶于 50  $\mu$ l 无水 DMSO 中的 1mg SMCC<sub>4</sub> 加到在由 10mM 磷酸钠和 150mM 氯化钠组成的 pH 为 7.44 的缓冲液中的 400  $\mu$ l 浓度为 10mg/ml 的氨基-HES12KD<sub>3</sub> 的溶液中, 将该混合物在室温下处理 80 分钟及在 46°C 下处理 10 分钟。然后离心该混合物, 取出上清液并重新离心。从上清液中取出 200  $\mu$ l, 并用 MI CROCON YM-3 (Amicon, Millipore 公司, Eschborn, D) 离心渗析部件在 14000g 下离心 45 分钟。加入 400  $\mu$ l 由 10mM 磷酸钠和 150mM 氯化钠组成的 pH 为 7.44 的缓冲液后, 再离心 45 分钟, 再加 400  $\mu$ l 缓冲液, 并再离心 60 分钟。将在渗析部件中保留的偶联物溶液量补至 50  $\mu$ l。将 10  $\mu$ l 该溶液加到 10  $\mu$ l 硫代-DNA 溶液<sub>1</sub> 中, 并在室温下反应 14 小时。取 1  $\mu$ l 进行分析。结果列于图 11 的带 2 和 3 中。

[0238] 上述实验的反应条件和按变化的反应条件所作的实验的反应条件综述于表 1, 结果列于图 11。

[0239] 结果综述：

[0240] 对下列条件进行研究：

[0241] 1. SMCC 的量 : 1mg (带 2、6、10、14) 或 5.6mg (带 4、8、12、16) ；

[0242] 2. 与硫代-DNA<sub>1</sub> 的反应温度：

[0243] 室温 (带 2、4、6、8) 或 37°C (带 10、12、14、16) ；

[0244] 3. 缓冲条件：

[0245] 10mM 磷酸盐、150mM NaCl, 无 EDTA, pH 7.44 (带 2、4、10、12) ；或

[0246] 100mM 磷酸盐、150mM NaCl+50mM EDTA, pH 7.23 (带 6、8、14、16)

[0247] 在图 11 中, 带 2-18 表示借助 SMCC 进行的氨基-HES12KD<sub>3</sub> 在硫代-DNA<sub>1</sub> 上的 8 个偶联实验的结果。对此表示的是直接由反应或反应后和接着剪切 DNA 得到的结果。在带 1 中是各种对比-DNA 的混合物作为长度标记载上的, 带 18 和 19 表示硫代-DNA<sub>1</sub> 或切断的硫代-DNA<sub>1</sub>。除了未起反应的硫代-DNA<sub>1</sub> 外, 所有实验还表明较高质量的偶联产物 (带 2、4、6、8、10、12、14、16)。因为 HES12KD 是不同大小分子的混合物, 所以偶联产物也显示出摩尔重量的分布。所有偶联产物均含完整的 DNA, 因为它们能由 EcoR I 完全消化。这表现在剪切后相应扩散带的几乎完全消失 (带 3、5、7、9、11、13、15、17)。

[0248] 表 1. 氨基-HES12KD 3 在硫代-DNA 1 上的偶联的反应条件

[0249]

号	实验	温度 [°C]	SMCC[mg]	DNA	HES12KD	缓冲液	
1	标记物						
2	19A1	RT		1 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.44, 10mM	
3							切断
4	19B1	RT		5.6 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.44, 10mM	
5							切断
6	19C1	RT		1 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.23, 100mM	
7							切断
8	19D1	RT		5.6 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.23, 100mM	
9							切断
10	19A2	37°C		1 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.44, 10mM	
11							切断
12	19B2	37°C		5.6 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.44, 10mM	
13							切断
14	19C2	37°C		1 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.23, 100mM	
15							切断
16	19D2	37°C		5.6 硫代-DNA	氨基-HES12KD	7.23, 100mM	
17							切断
18				硫代-DNA			
19							切断

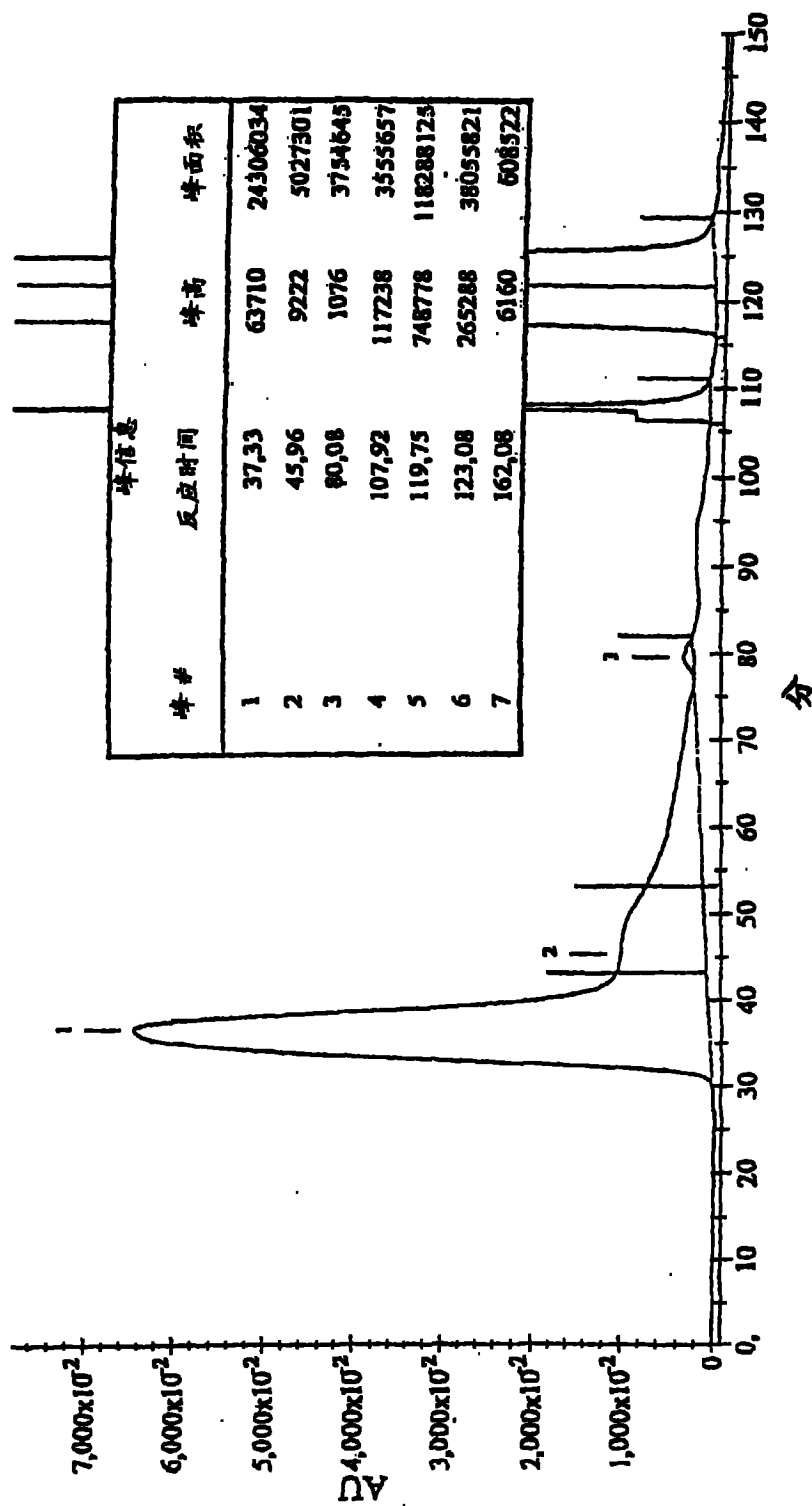


图 1:

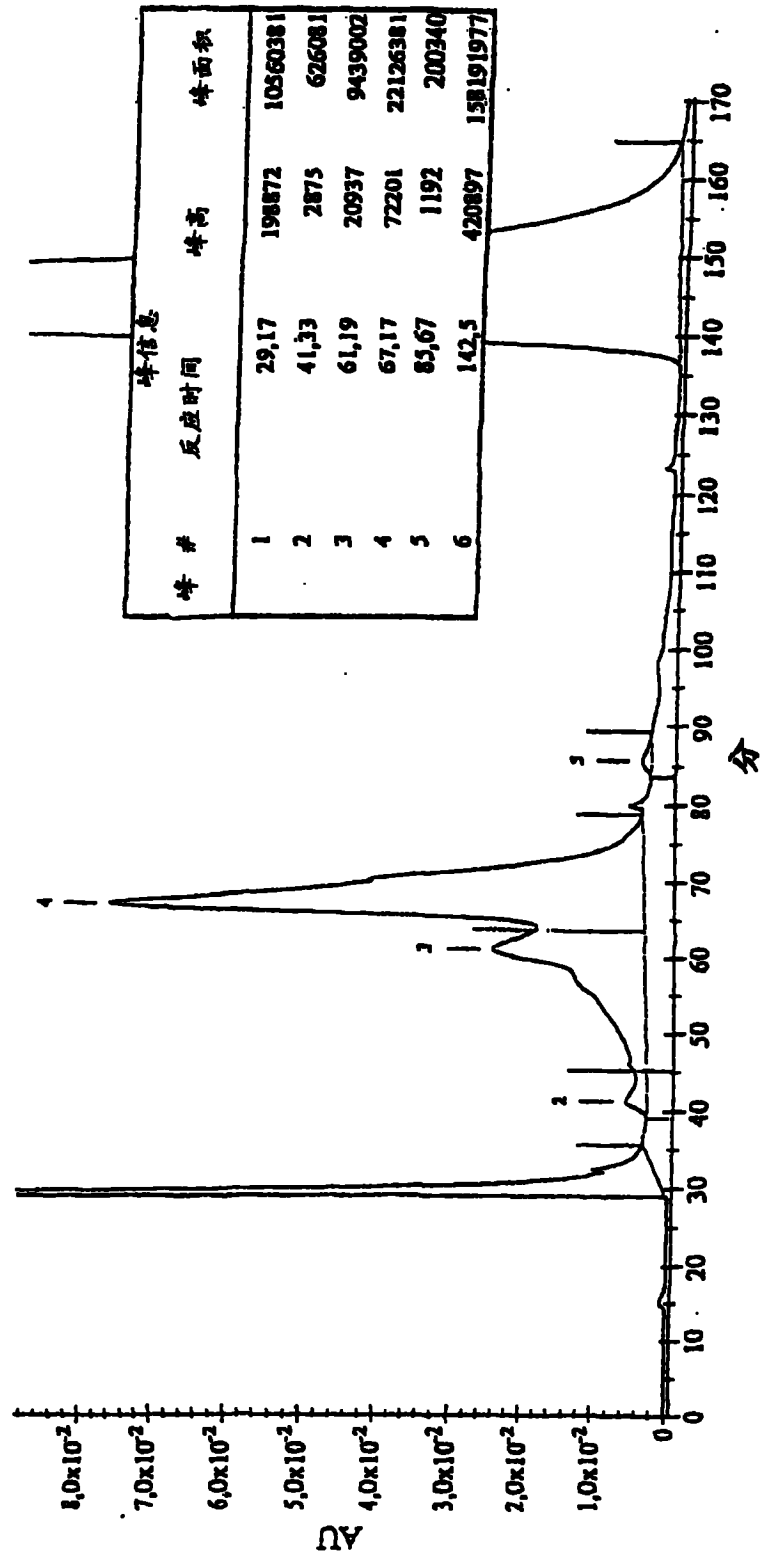


图 2 :



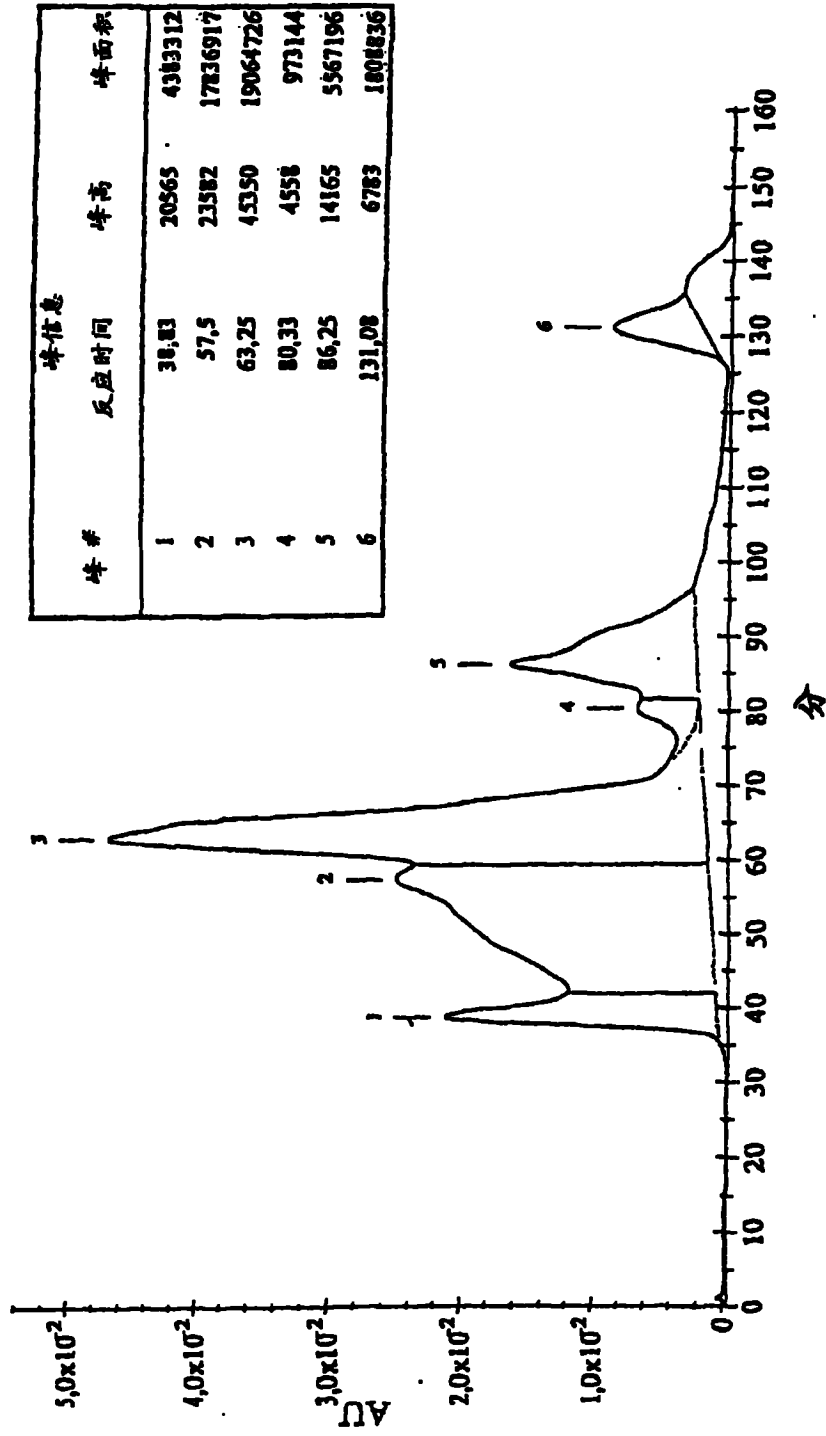


图 3 :

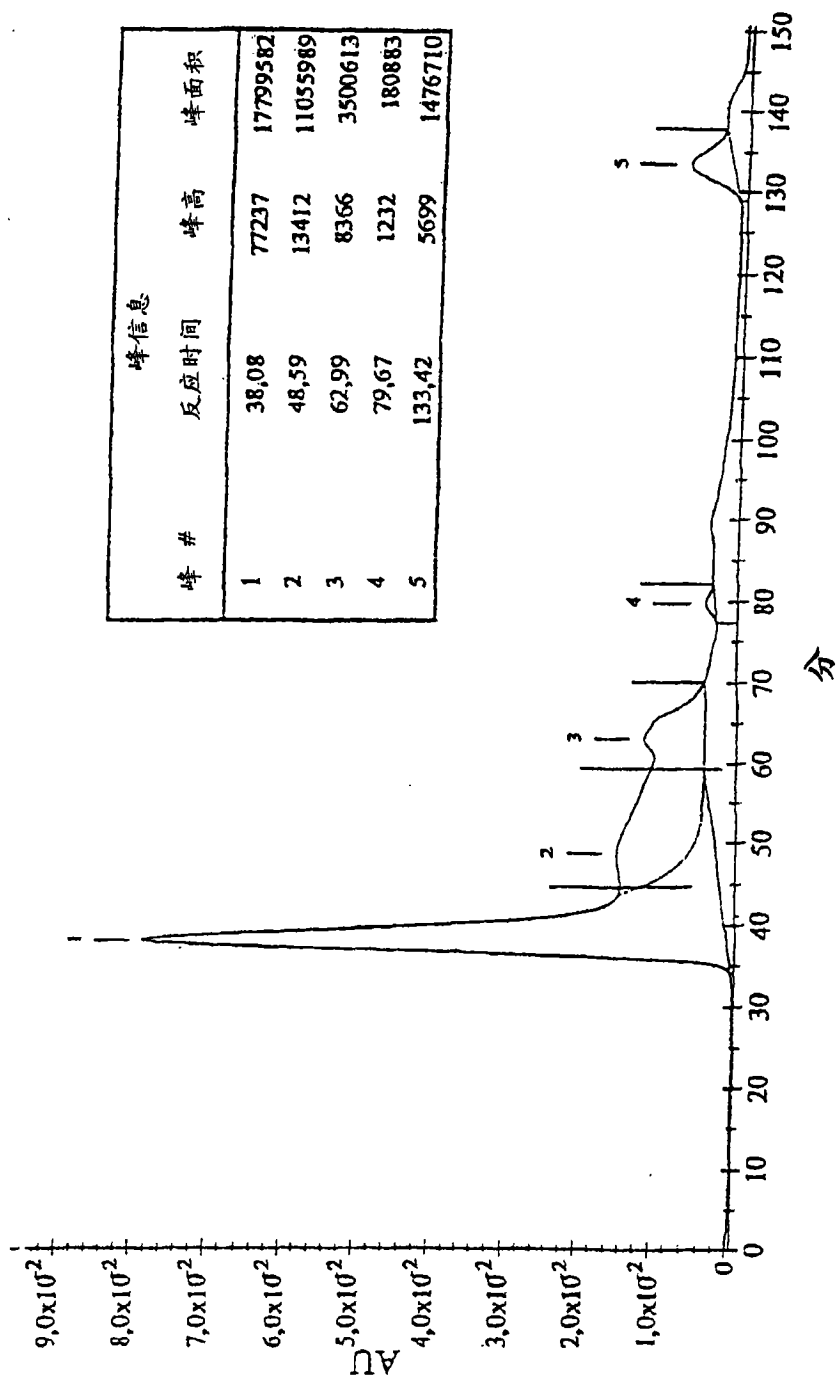


图 4 :

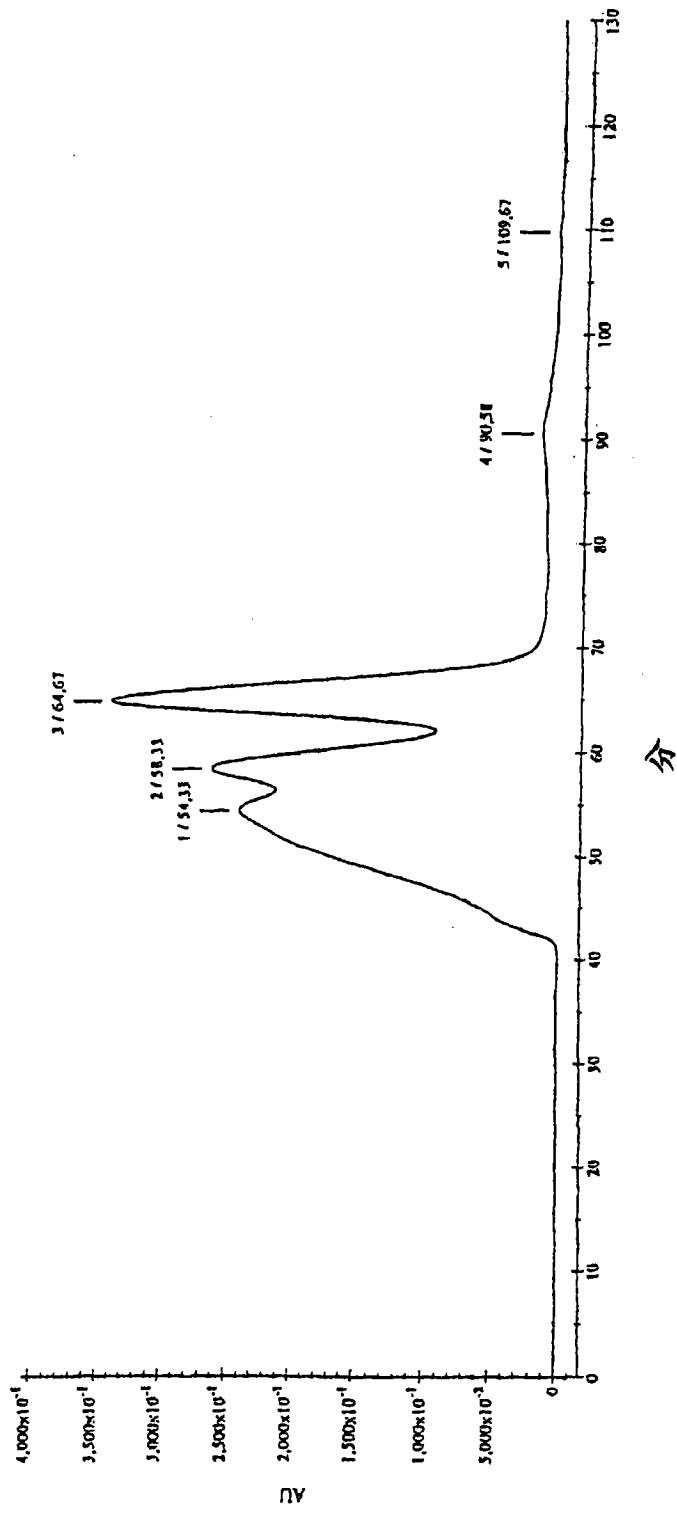


图 5a :

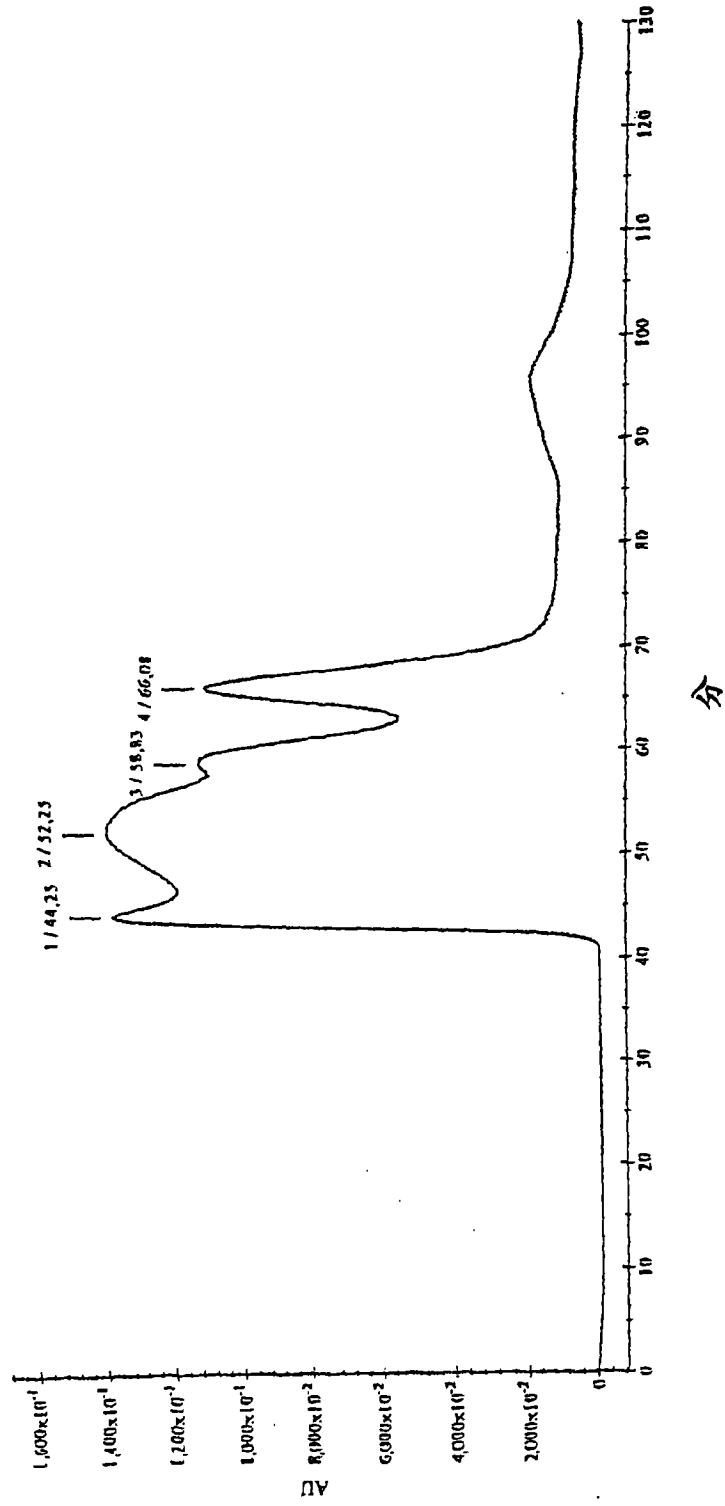


图 5b :

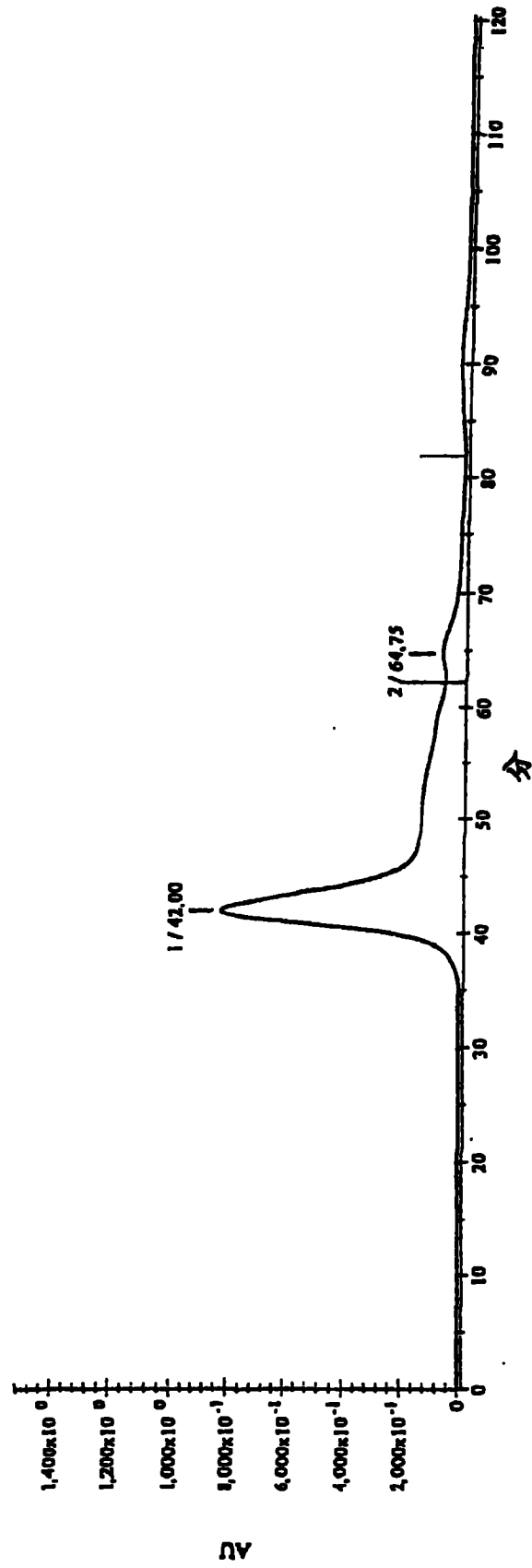


图 6 :

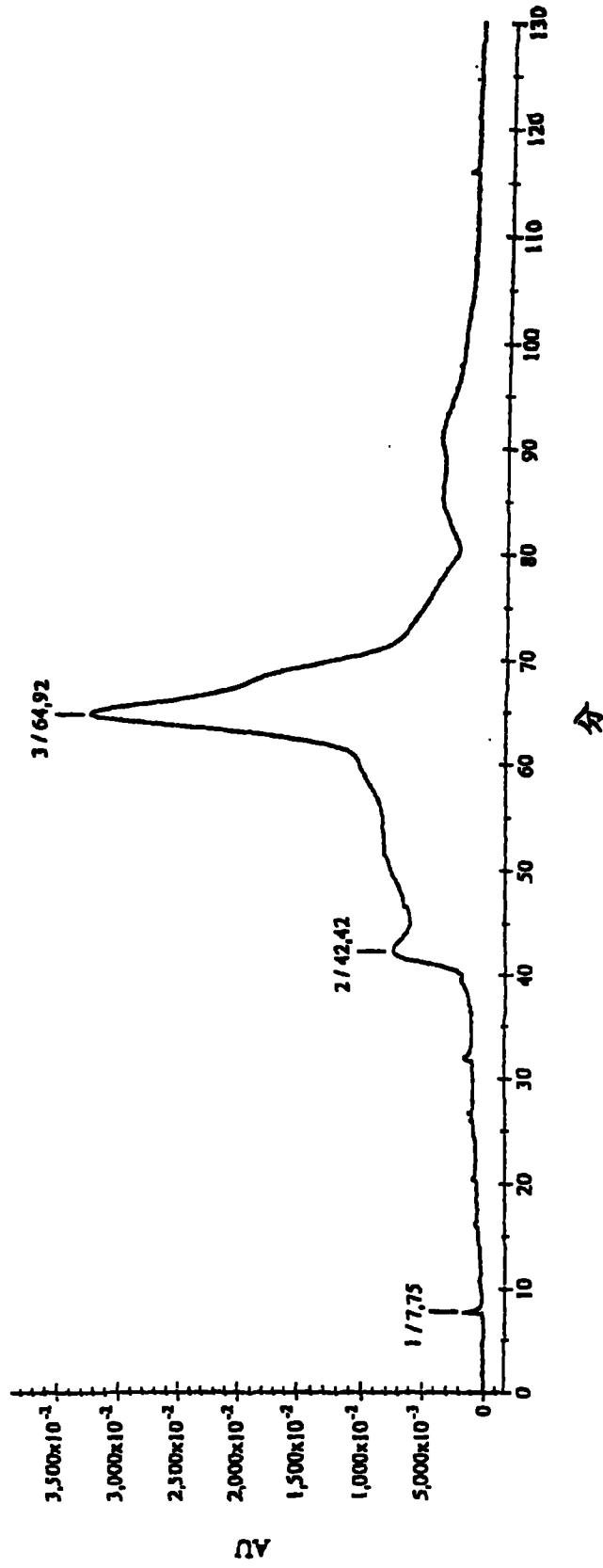


图 7 :

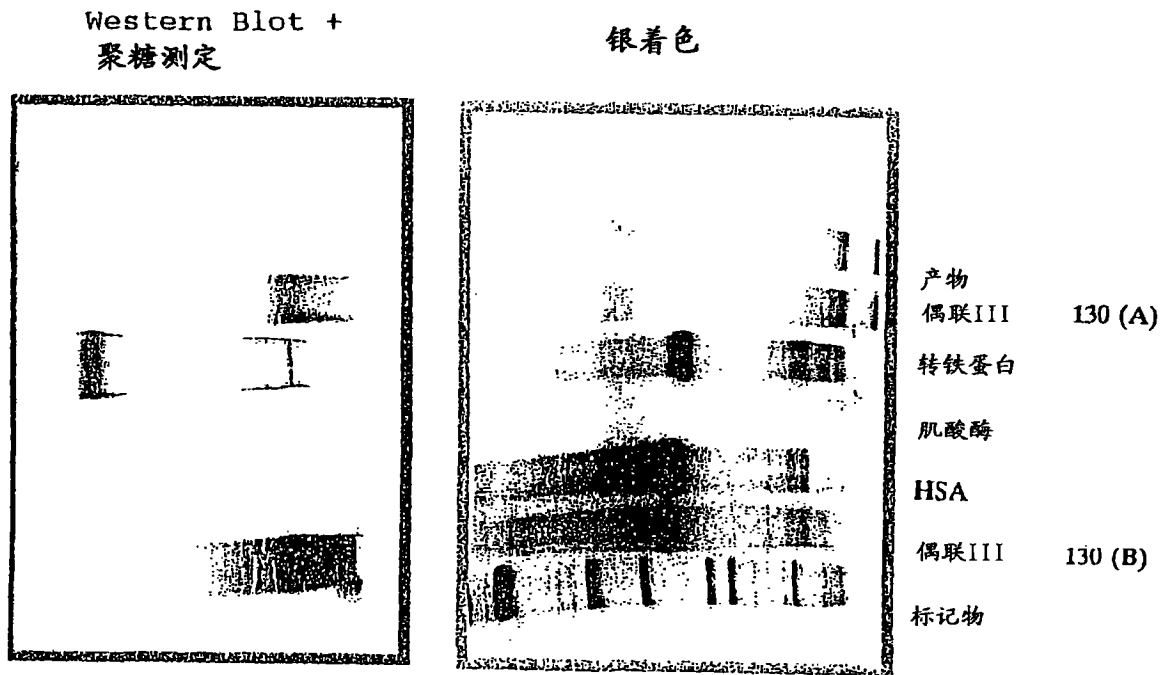


图 8:

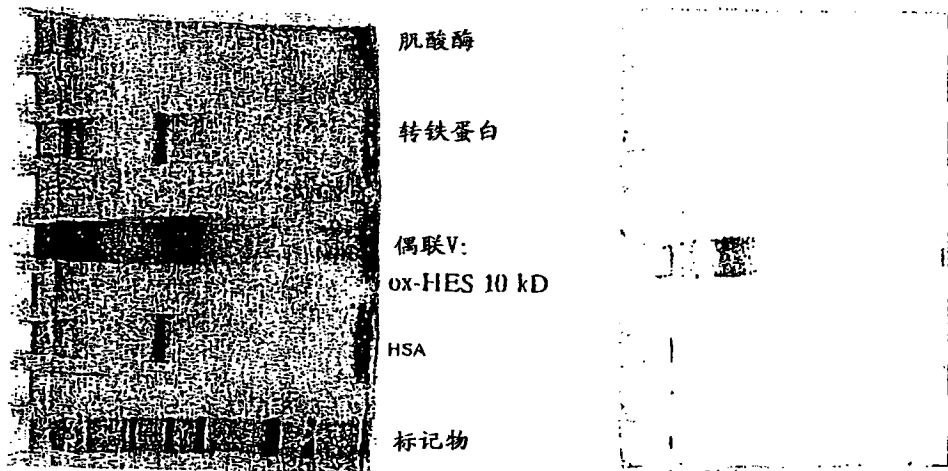
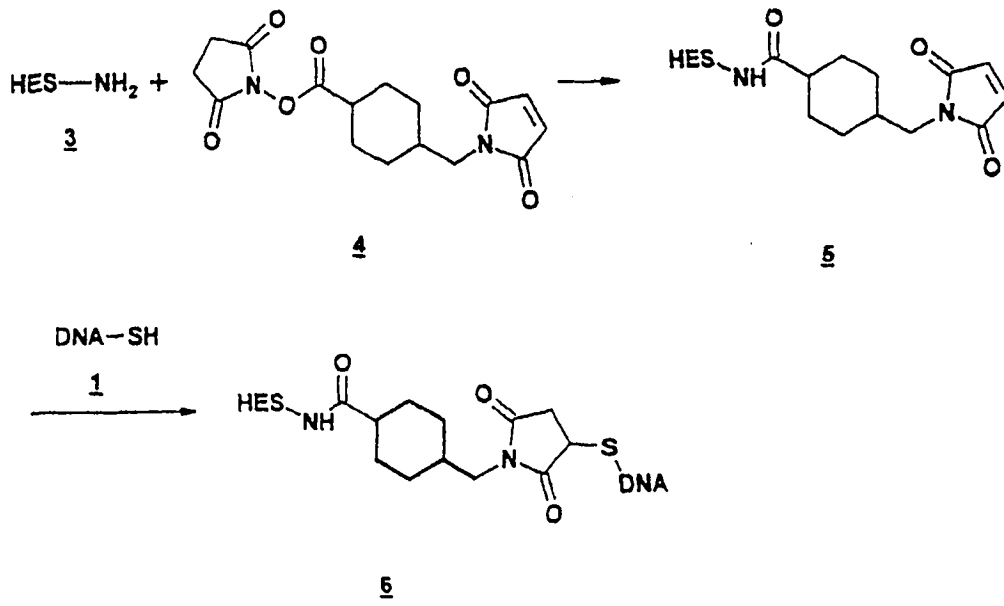
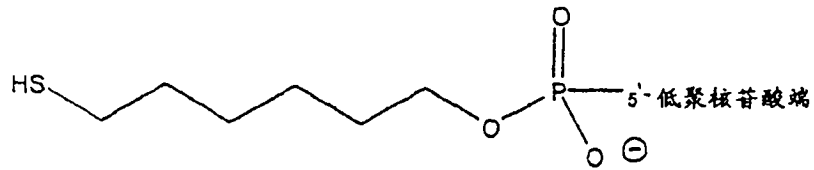


图 9



DNA的硫代改性结构



SMCC的结构

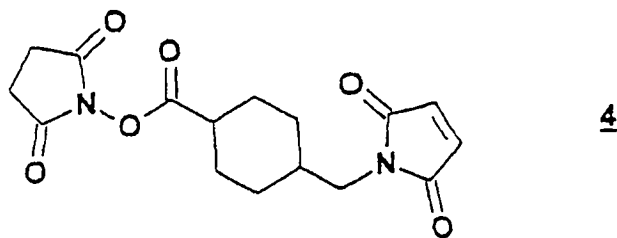


图 10



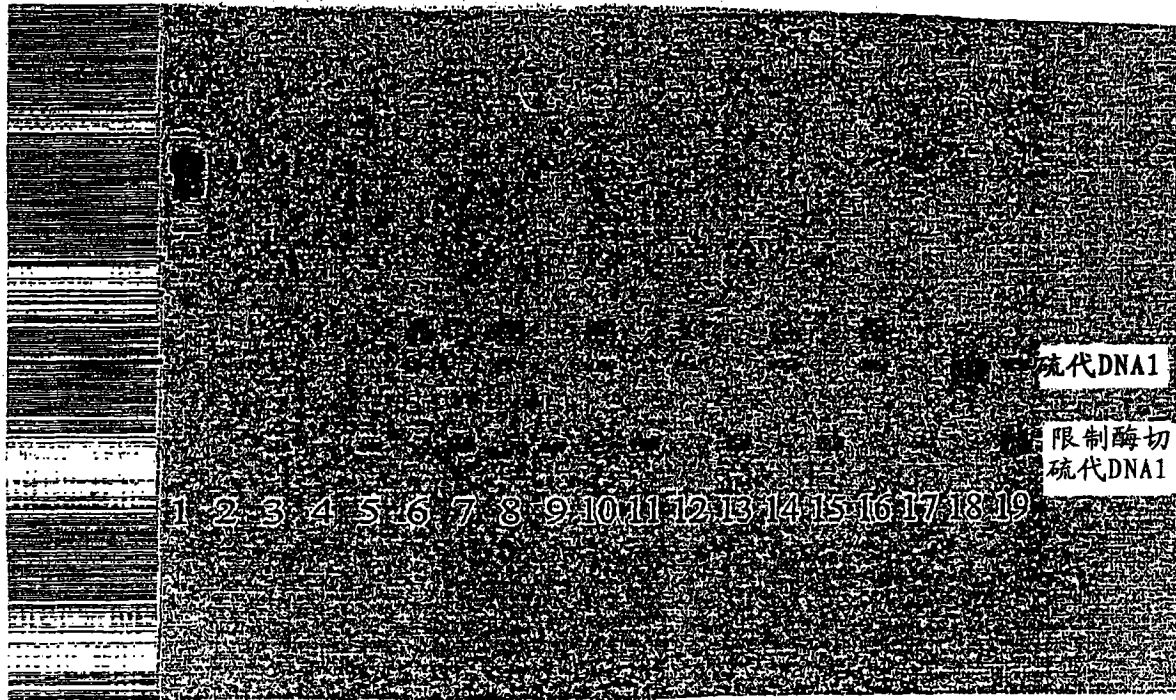


图 11