



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101856497 A

(43) 申请公布日 2010.10.13

(21) 申请号 200910049174.6

(22) 申请日 2009.04.10

(71) 申请人 复旦大学附属华东医院

地址 200040 上海市延安西路 221 号

(72) 发明人 戴兆云 储艳秋 何晓俊 匡春香

黄伟达 蒋公羽 方明珠

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

A61K 39/385(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

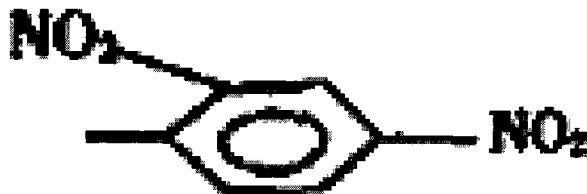
### (54) 发明名称

一种半抗原与含氨基载体的结合物及其制备方法  
和用途

### (57) 摘要

本发明属药物合成领域,涉及一种半抗原与含氨基载体的结合偶联物及其制备方法和用途。本发明通过 Sanger's 反应获得半抗原与含氨基载体的结合偶联物。利用半抗原的免疫性以及载体功能,结合使用针对半抗原的单抗,可在微量测定时放大信号,明显提高测定的灵敏度。含半抗原二硝基苯结构在体内诱导细胞免疫作为杀伤作用弹头,结合具有靶向作用的载体,对肿瘤,慢性感染具有特异识别力,在靶向病灶部位,在局部诱导多种免疫活化因子,改善局部免疫微环境,实现施强化免疫治疗肿瘤或感染。本发明的结合物可用于免疫微量测定,制备防治肿瘤的药物。

1. 一种半抗原与含氨基载体的结合物,其特征是所述的半抗原与含氨基载体的结合物所述结构包括其同分异构体,具有式(I)的结构:



2. 按权利要求1所述的半抗原与含氨基载体的结合物,其特征是所述的半抗原为二硝基氟苯或二硝基氯苯。

3. 按权利要求1所述的半抗原与含氨基载体的结合物,其特征是所述的含氨基载体,选自单抗或抗体或抗原或免疫表位或特异结合免疫球蛋白的物质,及其他具有靶向结合的物质。

4. 按权利要求3所述的半抗原与含氨基载体的结合物,其特征是所述的特异结合免疫球蛋白的物质是葡萄球菌蛋白。

5. 按权利要求3所述的半抗原与含氨基载体的结合物,其特征是所述的其他具有靶向结合的物质选自对肝癌具有较高亲和力的或人工结合了氨基乙醇的碘化油酯。

6. 权利要求1或2的半抗原与含氨基载体的结合物的制备方法,其特征是所述的半抗原与载体的结合是通过载体上的氨基,在微碱性条件下,二硝基苯部分置换氨基上的氢,与氨基共价结合反应得到。

7. 权利要求1的半抗原与含氨基载体的结合物在免疫微量测定中的应用。

8. 权利要求1的半抗原与含氨基载体的结合物在制备防治肿瘤药物中的用途。

9. 权利要求1的半抗原与含氨基载体的结合物在制备防治慢性感染疾病药物中的用途。

## 一种半抗原与含氨基载体的结合物及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属药物制剂领域,涉及一种半抗原与含氨基载体的结合物及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 已知半抗原为不完全性单一性抗原,机体皮肤外搽,或动物口服后可结合蛋白,约在 7-10 天后在生物体内诱导强烈的细胞免疫反应,半抗原如二硝基氟苯及二硝基氟苯均在生物体内不会自然生成,在自然界所有生物中,蛋白质的氨基酸残基中也不含二硝基苯结构,除非有人为标记。有研究公开了通过 Sanger's 反应,即 DNFB 或 DNCB 的二硝基苯置换氨基上的氢,在微碱性条件下,蛋白质与 DNFB 混合达到结合。该方法为大量共价结合标记到检测用的抗体或检测用的抗原上,利用针对二硝基苯单克隆抗体,产生免疫测定的信号放大作用,以及与靶向载体结合后,在机体内诱导,带动,强化免疫提供了化学基础。目前,针对单一抗原决定簇的单克隆抗体已广泛用微量抗原性物质的测定,虽然目前使用单抗或抗体的免疫测定方法已达到纳克级,但仍然不能满足临床及科学研究的需要,寻求更为敏感和特异的方法一直是研究人员孜孜不倦的追求。近十年来,有研究用单抗的靶向作用对肿瘤作为辅助治疗,如抗 HER-2 单抗赫赛丁 (Herceptin) 治疗乳房癌,头面部癌症,抗 CD22 单抗美罗华 (Rituximab) 治疗 B 细胞淋巴瘤,且已证实具有一定的疗效。但实践显示,总体上单纯使用单抗所诱导的靶向免疫作用有限,远不能达到防治慢性感染,尤其是防治恶性肿瘤。寻求一种在病灶部位可发挥更大免疫作用,防治效果好,能满足预防及治疗需要的药物一直是本领域研究人员的关注热点。

[0003] 与本发明相关的现有技术有下述参考文献:

[0004] 参考文献:

[0005] [1]. 杨国亮 王侠生 主编 现代皮肤病学 1996 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

[0006] [2]. Maja Aleksic, Camilla K, David A Basketter et al. Investigating protein haptentation mechanisms of skin sensitizers using human serum albumin as a modal protein. *Toxicology in vitro*. 2007, 21, 723-73

[0007] [3]. Bernard Metz, Gideon F. A. Kerstent, Peter Hoogerhout et al. Identification of formaldehyde-induced modifications of protein. *The journal of biological chemistry*. 2003, 279(8) :6235-6243

[0008] [4]. 吴仁蔚 胡思顺 肖运力 等 检测禽流感病毒抗体的重组核抗原间接 ELISA 方法的建立 畜牧兽医学报 2006, 37(10) :1067-72

[0009] [5]. 王弦 谢小强 曹亮 等 HER\_2\_neu 基因在乳腺癌中的研究进展 生物学杂志 2008, 25(1) :5-8

[0010] [6]. 孙婷婷 徐江平 刘辉 贝伐单抗对耐药鼻咽癌细胞凋亡的影响 解放军医学杂志 2008, 33(12) :1438-1440

[0011] [7]. 王磊 武士华 王松俊 单克隆抗体相关专利申请分析 中国预防医学杂志

2006,7(6):569-570

[0012] [8]. 刘端棋 战淑君 分子靶向治疗药物的研究进展 中国肿瘤 2008,17(11):942

### 发明内容

[0013] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种半抗原与含氨基载体的结合物。

[0014] 本发明所述的半抗原与含氨基载体的结合物具有式(I)的结构。

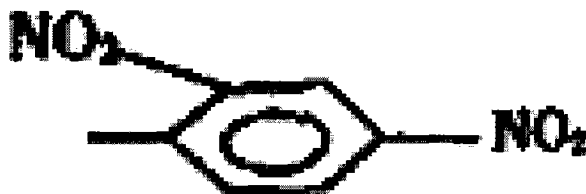
[0015] 所述结构包括其同分异构体;

[0016] 所述的半抗原为二硝基氟苯(DNFB)或二硝基氯苯(DNCB);

[0017] 所述的含氨基载体,可以是单抗或抗体或抗原或免疫表位或特异结合免疫球蛋白的物质,如葡萄球菌蛋白A(即SPA),以及其他具有靶向结合的物质,如对肝癌具有较高亲和力的、人工结合了氨基乙醇(作为连接桥)的碘化油酯等。

[0018] 所述的半抗原与含氨基载体的结合物把半抗原二硝基苯结构结合到慢性感染病原体的免疫抗原上,从而达到诱导,强化免疫防治肿瘤,慢性感染目的。

[0019]



(I)

[0020] 本发明中,所述的半抗原 DNFB 或 DNCB 与所述的载体的结合通过载体上的氨基, DNFB 在微碱性条件下,二硝基苯部分置换氨基上的氢,与氨基共价结合。

[0021] 本发明的进一步目的是提供所述半抗原与含氨基载体的结合物的制备方法。

[0022] 本发明经实验表明,在一定范围内, DNFB 的结合对 HBIG 的抗体效价没有影响,免疫球蛋白(抗体)抗体可以作为半抗原二硝基氟苯免疫靶向治疗的有效载体。本发明采用 Sanger's 反应,其中的半抗原 DNFB 或 DNCB 通过载体上的氨基, DNFB 在微碱性条件下,二硝基苯部分置换氨基上的氢,与氨基共价结合制得到半抗原与含氨基载体的结合物。

[0023] 本发明所述的载体可以是用于免疫测定的抗体或抗原,结合利用针对单一抗原(如 DNFB)的单抗,可使测定信号放大;重复间隔循环使用,可使测定信号扩增;衔接有关的量化显示方法,可使检测微量靶向载体的靶向物(如抗原性,抗体性物质)的敏感性提高。

[0024] 本发明中,每个载体结合半抗原分子数由载体所含有的游离氨基数决定,载体在最大量结合半抗原分子的同时,必须不影响载体的靶向结合功能,该最大有效结合数是决定免疫信号扩增的最大因素。

[0025] 本发明的进一步目的是提供所述以上物质在微量检测以及防治肿瘤,慢性感染方面的用途。

[0026] 本发明利用半抗原在一定范围内,在一个蛋白、抗原或抗体中结合 2-200 半抗原 DNFB 分子后其免疫性不变的特性,并以抗 DNFB 的单抗测定可提高测定信号的方法,提供一

种对免疫测定（如 ELISA）明显提高灵敏度 1-200 倍的方法及诊断用试剂。

[0027] 本发明中，半抗原二硝基苯结构共价结合到靶向抗体、抗原或单抗，或肿瘤抗原，或肿瘤抗原表位，或感染病原体的抗原，或病原体抗原表位，或特异结合免疫球蛋白的物质，如葡萄球菌蛋白 A (SPA)，肿瘤高亲和力蛋白或短肽，及其他具有导向或靶向作用的结构中含氨基的物质中产生偶联体，能发挥半抗原免疫的靶向治疗作用，可作为治疗剂，或防治用疫苗，可诱导，带动，强化特异免疫，对防治肿瘤，慢性感染性疾病实施免疫预防或治疗。

[0028] 所述的慢性感染疾病可以是慢性乙型肝炎，慢性丙型肝炎等。

[0029] 本发明的结合物还用于微量定性定量分析检测，组织组化染色。

[0030] 本发明中，含半抗原二硝基苯结构在体内诱导细胞免疫作为杀伤作用弹头，结合具有靶向作用的载体，对癌瘤，慢性感染具有特异识别力，在靶向病灶部位，利用其强有力的半抗原细胞免疫，在局部诱导多种免疫活化因子，改善局部免疫微环境，实现施强化免疫治疗癌瘤或感染。

[0031] 本发明经实验显示，所述的半抗原二硝基氟苯在体外没有免疫系统参与的情况下，可直接抑制肝癌细胞，以 MTT 法测定其 IC<sub>50</sub> 为 32.22 μM，IC<sub>90</sub> 为 49.53 μM，虽然同时测定的 5 氟尿嘧啶 (5-FU) 的 IC<sub>50</sub> 虽较 DNFB 明显为小，为 3.62 μM，但 IC<sub>90</sub> 却 > 200 μM，提示半抗原二硝基苯结构可作为前药 (prodrug) 结构设计药物，表明二硝基苯结构共价结合后的化合物具有直接抗癌作用。本发明的半抗原 DNFB 或 DNCB 与含氨基载体的结合物可进一步制备防治肿瘤的药物。

[0032] 与现有抗癌药相比，本发明可明显有激活，诱导，强化特异免疫发挥作用，通过注射或血管介入治疗，适用于肝癌、直肠癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌和肺癌及淋巴瘤，局部浸润性型白血病等的治疗，也可直接与其他药物混合用于局部治疗，腹腔，胸腔等腔隙治疗等。

## 附图说明

[0033] 图 1 是小鼠肝癌瘤内注射抑瘤效果，

[0034] 其中显示，DNFB 瘤内注射小鼠皮下移植瘤结果，D 溶液为 DNFB 1mg 溶 0.1ml 磷酸缓冲液 (PBS)，无水乙醇 (ETH) 为 0.1ml，对照组为 0.1ml 的 PBS 溶液。D 溶液及 ETH 组抑瘤率分别为 74.43%，59.2%，两者与对照组相比均有显著差异 (p 分别 < 0.01 及 < 0.05)。

[0035] 图 2 是吸光度变化，

[0036] 其中显示了，在 500ul 磷酸氢钠 (PBS) 缓冲溶液体系中，2mg, 4mg, 0mg (即对照组) DNFB 与 13mg 高效价乙肝免疫球蛋白 (HBIG) 结合后对半系列稀释测定的效价比较，经双因素方差分析无差异 (p < 0.05)，以紫外分光光度法测定，结合内标定量，2mg, 4mg 结合体系中，分别有 6.12%，7.86% 的氨基酸残基实现了与 HBIG 的结合。

## 具体实施方式

[0037] 下述通过实施例进一步说明本发明，但不能限制本发明的内容。

[0038] 实施例 1

[0039] 以半抗原二硝基氟苯和抗乙型肝炎表面抗原的单克隆抗体为反应原料，在弱碱性条件下，通过 Sanger's 反应，氟脱落结合单抗中氨基上的氢，把二硝基苯部分置换共价结

合到氨基上,获得目标产物二硝基苯共价结合的乙肝表面抗原单抗,其中一个目标产物中,结合率为:二硝基苯有 1-200 个,该结合量不影响单抗的特异识别功能。

[0040] 上述半抗原也可采用二硝基氯苯,二硝基溴苯,或二硝基碘苯。

[0041] 经免疫测定(如 ELISA),结果显示,免疫反应测定信号放大高达 200 倍,明显提高免疫测定的灵敏度。

[0042] 常温下把结合乙肝免疫球蛋白(HBIG(13mg/500u1 PBS)水溶液分别与不同剂量(2,4,8mg)的半抗原二硝基氟苯(DNFB)混合,分别组成二毫克管,四毫克管,八毫克管,混匀过夜后离心,仅见八毫克管的 HBIG 水溶液出现沉淀,二毫克管,四毫克管及未加 DNFB 的 HBIG 水溶液对照管,各取半量作对半稀释后分别以 HiTrap 分子筛柱脱盐,三个洗脱液再分别作对半系列稀释 11 次,使二毫克管,四毫克管及对照组分别各组成 12 个标本,共 36 个标本。以 ELISA 法分别检测乙肝表面抗体的效价。取二毫克管,四毫克管的另一半分别予饱和硫酸铵沉淀后取上清,分别以紫外光光度分析仪测定  $A_{340}$ ,与加入不同剂量 DNFB 的五个系列浓度作内标的对照管上清相比较,推算二毫克管,四毫克管上清中 DNFB 的剩余含量,从而计算相应管中 HBIG 结合掉的 DNFB 量。

[0043] 结果显示:二毫克管,四毫克管及对照组,经双因素方差分析及 q 检验,三组间同稀释度间吸光差值( $OD_{450}-OD_{630}$ )无差异( $p > 0.05$ ),而各稀释度间则有非常显著差异( $p < 0.01$ )。饱和硫酸铵沉淀结合分光光度法测定证实二毫克管,四毫克管中 6.5mg HBIG 分别结合了 0.67mg 和 0.86mg 的 DNFB,相当于每 mg 的 HBIG 分别结合了 0.104mg 及 0.132mg 的 DNFB,即每一个 HBIG 分子分别结合了 88.72 及 113.48 个 DNFB 半抗原分子,约占 HBIG 氨基酸残基的 6.12% 和 7.86%。实验证实:在一定范围内, DNFB 的结合对 HBIG 的抗体效价没有影响,免疫球蛋白(抗体)可作为半抗原 DNFB 免疫靶向治疗慢性病毒感染或肿瘤的一种有效载体。

[0044] 实施例 2

[0045] 按实施例 1 的制备方法,采用二硝基苯共价结合的肿瘤或感染靶向制剂,制备由半抗原诱导的免疫靶向治疗肿瘤药物,或/和由二硝基氟苯作为原药直接具有的抗癌作用。结果显示,结合比率同实施例 1;DNFB 瘤内注射小鼠皮下移植瘤抑瘤率良好。

[0046] 所述的肿瘤或感染靶向制剂可选自抗 HER-2 单抗赫赛丁或乙肝单抗。

[0047] 实施例 3

[0048] 按实施例 1 的制备方法,采用二硝基苯共价结合的肿瘤或慢性感染病原体的免疫抗原或抗原表位制备由半抗原诱导建立,或强化特异免疫的防治药物。如 DNFB 结合乙肝表面抗原, DNFB 结合黑色素瘤肿瘤消退抗原表位等,可用于特异性预防或作为肿瘤治疗性疫苗等,结果显示,其结合比率同实施例 1。所述的靶向治疗肿瘤或慢性感染药物其特征是以具有靶向作用的化合物作为结合肿瘤的导向部分,与半抗原决定簇部分以共价结合,实施肿瘤或慢性感染的靶向治疗。

[0049] 表 1:体外对 SMMC-7721 肝癌细胞株 48 小时细胞存活率(MTT 法,六孔值的均数)。

[0050] 测试终浓度      二硝基氟苯(DNFB)      五氟尿嘧啶(5-FU)

[0051]	0uM	100	100
[0052]	2uM	102.99	53.03
[0053]	10uM	101.32	38.08

[0054] 50uM 8.92 17.82

[0055] 100uM 1.54 16.55

[0056] 200uM 1.34 13.37

[0057] 估计 IC50 32.22uM 3.62uM

[0058] 估计 IC90 49.53uM > 200uM

[0059] 表 2 :DNFB 及 5-FU 分别对 SMMC-7721 肝癌细胞株 48 小时细胞存活率 : ( 在 0, 2, 10, 50, 100, 200uM 时, MTT 法测定的六孔具体数值 )

[0060] DNFB 组

[0061] 1.062 1.072 1.066 1.124 1.213 1.231

[0062] 1.107 1.114 1.176 1.145 1.121 1.297

[0063] 1.126 1.074 1.210 1.144 1.135 1.164

[0064] 0.192 0.148 0.147 0.145 0.142 0.140

[0065] 0.065 0.079 0.085 0.067 0.074 0.070

[0066] 0.063 0.067 0.076 0.071 0.076 0.074

[0067] 5-FU 组

[0068] 1.204 1.190 1.156 1.222 1.282 1.391

[0069] 0.662 0.675 0.666 0.677 0.726 0.702

[0070] 0.484 0.507 0.476 0.480 0.520 0.579

[0071] 0.235 0.250 0.279 0.258 0.279 0.306

[0072] 0.223 0.244 0.244 0.241 0.270 0.295

[0073] 0.200 0.214 0.207 0.228 0.222 0.220

[0074] 无细胞对照组

[0075] 0.054 0.057 0.060 0.051 0.054 0.065。

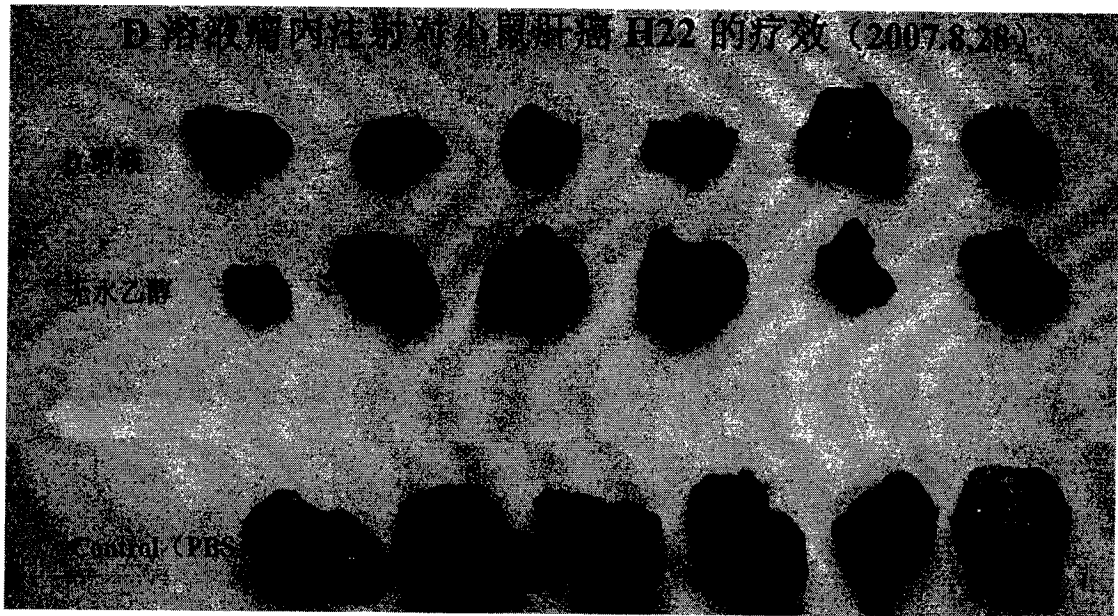


图 1

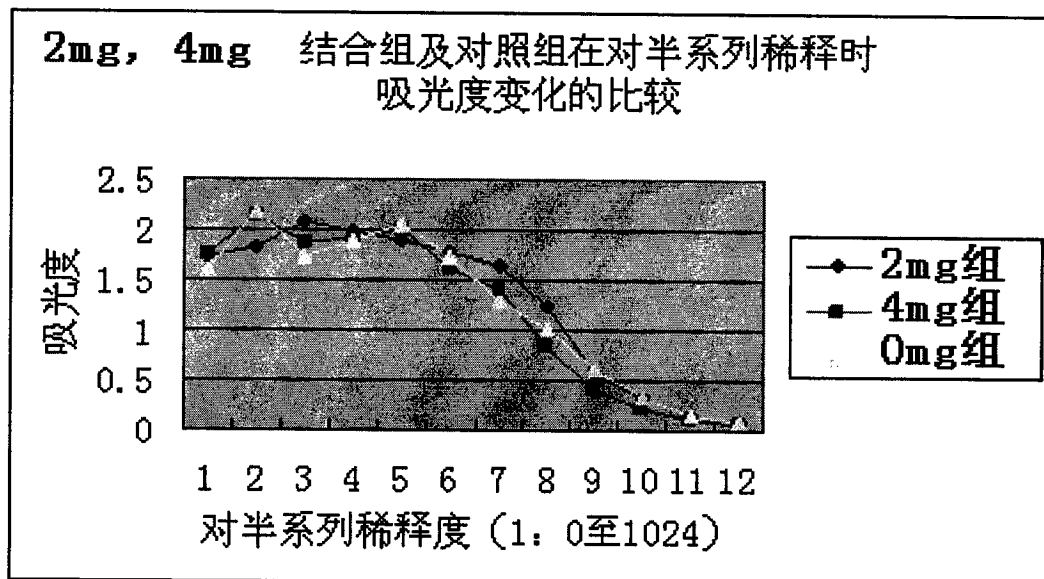
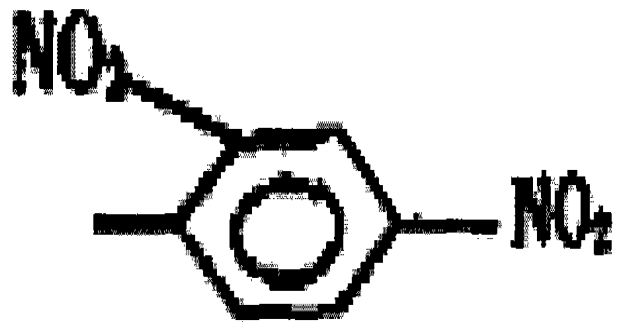


图 2

专利名称(译)	一种半抗原与含氨基载体的结合物及其制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101856497A</a>	公开(公告)日	2010-10-13
申请号	CN200910049174.6	申请日	2009-04-10
[标]发明人	戴兆云 储艳秋 何晓俊 匡春香 黄伟达 蒋公羽 方明珠		
发明人	戴兆云 储艳秋 何晓俊 匡春香 黄伟达 蒋公羽 方明珠		
IPC分类号	A61K39/385 A61P35/00 A61P29/00 G01N33/53		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属药物合成领域，涉及一种半抗原与含氨基载体的结合偶联物及其制备方法和用途。本发明通过Sanger's反应获得半抗原与含氨基载体的结合偶联物。利用半抗原的免疫性以及载体功能，结合使用针对半抗原的单抗，可在微量测定时放大信号，明显提高测定的灵敏度。含半抗原二硝基苯结构在体内诱导细胞免疫作为杀伤作用弹头，结合具有靶向作用的载体，对癌瘤，慢性感染具有特异识别力，在靶向病灶部位，在局部诱导多种免疫活化因子，改善局部免疫微环境，实现施强化免疫治疗癌瘤或感染。本发明的结合物可用于免疫微量测定，制备防治肿瘤的药物。



(I)