



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104288777 B

(45)授权公告日 2018.05.29

(21)申请号 201410480011.4

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2014.09.18

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104288777 A

CN 103214577 A,2013.07.24,
Heredia et al..In Situ Preparation of Protein-“Smart”Polymer Conjugates with Retention of Bioactivity.《J. AM. CHEM. SOC.》.2005,第127卷摘要、16956-16957页及图示1-2.

(43)申请公布日 2015.01.21

Heredia et al..In Situ Preparation of Protein-“Smart”Polymer Conjugates with Retention of Bioactivity.《J. AM. CHEM. SOC.》.2005,第127卷摘要、16956-16957页及图示1-2.

(73)专利权人 清华大学
地址 100084 北京市海淀区清华园1号

(72)发明人 高卫平 张立彬

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 宋合成

(51)Int.Cl.

A61K 47/68(2017.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

C08F 120/28(2006.01)

C08F 220/28(2006.01)

C08F 220/36(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

Weiping Gao et al..In situ growth of a PEG-like polymer from the C terminus of an intein fusion protein improves pharmacokinetics and tumor accumulation.《Proc. Natl. Acad. Sci.》.2010,第107卷(第38期),摘要及图1.

审查员 雷锋林

权利要求书3页 说明书18页 附图21页

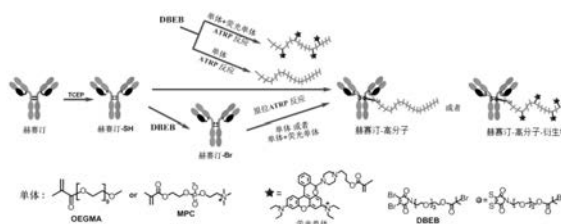
(54)发明名称

抗体-高分子结合体、其荧光衍生物及它们的制备方法

物与传统方法制备的抗体-荧光标记物相比,具有更强的荧光信号和检测信号强度。

(57)摘要

抗体-高分子结合体、其荧光衍生物及它们的制备方法。所述抗体包含至少一个二硫键或自由的巯基,所述高分子通过连接到所述抗体的二硫键或自由的巯基而结合到所述抗体上。所述方法通过在抗体的特定位点进行修饰并原位生长高分子及其荧光衍生物;或者预先制备了高分子及其荧光衍生物,再与抗体的特定位点偶联制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物。本发明的方法简便高效,并且所制备产物不仅保留抗体原有的生物活性而且提高抗体的水溶性、稳定性、药代动力学、生物分布和治疗功效,并降低其免疫原性,此外本发明制备抗体-高分子荧光衍生



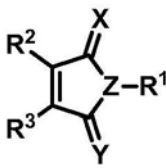
1. 一种制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,其中,所述抗体包含至少一个二硫键或自由的巯基,所述高分子通过连接到所述抗体的二硫键或自由的巯基而结合到所述抗体上,所述方法包括:

a1) 制备抗体-引发剂的结合体,其中所述引发剂结合到所述抗体的二硫键或自由的巯基上;

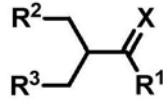
b1) 所述抗体-引发剂结合体在缓冲液中与高分子单体或者与高分子单体以及荧光单体混合,在催化剂作用下引发所述高分子单体聚合而制备出所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物,

在步骤a1)中,所述抗体的二硫键被还原成自由的巯基,然后所述引发剂连接到所述巯基上,

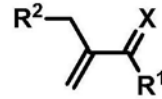
所述引发剂分子是化学式1、化学式2或化学式3中的至少一个:



(化学式 1)



(化学式 2)



(化学式 3)

化学式1~3中,

R¹为能够引发原子转移自由基聚合反应的官能团或其官能团衍生物;

其中,能够引发原子转移自由基聚合反应的官能团选自2-溴代-2-甲基丙酰胺、2-氯代-2-甲基丙酰胺、2-溴代丙酰胺、2-氯代丙酰胺、2-溴代-2-甲基丙酸酯、2-氯代-2-甲基丙酸酯、2-溴代丙酸酯、2-氯代丙酸酯;

R²和R³相同或不同,R²和R³各自独立地选自容易被亲核取代的官能团及所述官能团的衍生物,所述容易被亲核取代的官能团选自H、I、Br、Cl、C₆H₅S、CH₃C₆H₅S、对甲苯环磺酰基的至少一种,化学式2中R²和R³不能同时为H;

X和Y相同或不同,X和Y各自独立地选自NH、O、S、Se原子;

Z包括N或者CH,

所述高分子单体选自丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺中的至少一种,

所述荧光单体选自丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺中的至少一种,

所述荧光单体的荧光基团选自荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,花菁类荧光染料,香豆素类荧光染料,氟硼荧类荧光染料,酞菁类荧光染料中的至少一种,

其中,所述抗体选自医药、农业、科研以及其它工业领域相关的抗体。

2. 一种制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,包括:

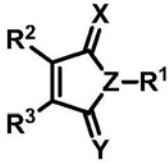
a2) 引发剂在催化剂作用下引发高分子单体或者高分子单体以及荧光单体聚合,生成所述高分子或高分子的荧光衍生物;

b2) 所述高分子通过所述引发剂与所述抗体的二硫键或自由的巯基偶联,制备所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物,

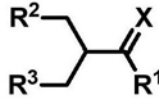
在步骤b2)中,所述抗体的二硫键被还原成自由的巯基,然后所述高分子通过所述引发剂连接到所述巯基上,制备出所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物

物，

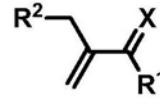
所述引发剂分子是化学式1、化学式2或化学式3中的至少一个：



(化学式 1)



(化学式 2)



(化学式 3)

化学式1~3中，

R¹为能够引发原子转移自由基聚合反应的官能团或其官能团衍生物；

其中，能够引发原子转移自由基聚合反应的官能团选自2-溴代-2-甲基丙酰胺、2-氯代-2-甲基丙酰胺、2-溴代丙酰胺、2-氯代丙酰胺、2-溴代-2-甲基丙酸酯、2-氯代-2-甲基丙酸酯、2-溴代丙酸酯、2-氯代丙酸酯；

R²和R³相同或不同，R²和R³各自独立地选自容易被亲核取代的官能团及所述官能团的衍生物，所述容易被亲核取代的官能团选自H、I、Br、Cl、C₆H₅S、CH₃C₆H₅S、对甲苯环磺酰基的至少一种，化学式2中R²和R³不能同时为H；

X和Y相同或不同，X和Y各自独立地选自NH、O、S、Se原子；

Z包括N或者CH，

所述高分子单体选自丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺中的至少一种，

所述荧光单体选自丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺中的至少一种，

所述荧光单体的荧光基团选自荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，花菁类荧光染料，香豆素类荧光染料，氟硼荧类荧光染料，酞菁类荧光染料中的至少一种，

其中，所述抗体选自医药、农业、科研以及其它工业领域相关的抗体。

3. 如权利要求1至2的任一项所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法，其中，所述二硫键选自链内的二硫键、链间的二硫键中的至少一种。

4. 如权利要求3所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法，其中，所述抗体包含通过选自基因突变、引入非天然氨基酸、氧化还原、酶催化的化学或生物修饰方法引入的所述二硫键或自由的巯基。

5. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法，其中，所述聚合选自原子转移自由基聚合反应。

6. 如权利要求5所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法，其中，用于引发所述原子转移自由基聚合反应的催化剂选自铜离子、二联吡啶及其衍生物配体、 π 受体衍生物配体、氮原子螯合配体以及脂肪多胺类配体的至少一种。

7. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法，其中，所述聚合在低氧或者惰性气体氛围下进行，反应时间为0.1至48个小时，反应温度是0至80℃。

8. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法，其中，所述引发剂的引发基团选自用于原子转移自由基聚合反应的引发剂的引发基团。

9. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法，其中，所述抗体-高分子结合体中的高分子选自均聚物、多杂聚合物、嵌段聚合物、共聚物、三元共聚物

的至少一种。

10. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,其中,所述高分子单体的侧基选自羧酸甜菜碱基、磺酸甜菜碱基、寡聚乙二醇、聚乙二醇、磷脂酸胆碱、温度响应性基团、pH响应性基团、光响应性基团、单糖或多糖基团。

11. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,其中,所述高分子单体进一步包括一个或多个在发生聚合反应时嵌入到高分子的骨架中的反应基团。

12. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,其中,所述高分子的聚合度为1至10万。

13. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,其中,所述高分子具有侧链,所述侧链选自内铵盐侧链、磷脂酸胆碱侧链、羧基内铵盐侧链、砷基内铵盐侧链、寡聚乙二醇侧链、聚乙二醇侧链、温度响应性侧链、pH响应性侧链、光响应性侧链、单糖或多糖侧链的至少一种。

14. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,其中,每一个所述抗体-高分子结合体及其荧光衍生物具有至少一条高分子链。

15. 如权利要求1或2所述的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,其中,所述抗体选自体外检测用单抗或多抗,如致病性病原体检测抗体、治疗药物作用靶点检测抗体、肿瘤标志物检测抗体、内分泌检测抗体、细胞因子检测抗体的一种或多种;体内成像和治疗单抗或多抗,如英夫利昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗、阿达木单抗、西妥昔单抗、帕利珠单抗、麦罗塔、替伊莫单抗和赫赛汀的一种或多种。

16. 一种抗体-高分子结合体及其荧光衍生物,所述抗体-高分子结合体及其荧光衍生物通过权利要求1至15的任一项的方法制备。

抗体-高分子结合体、其荧光衍生物及它们的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地涉及抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的制备方法。

背景技术

[0002] 抗体作为生物体内最重要的一种免疫蛋白,已经广泛应用于生物医药显影、靶向治疗以及临床诊断等多个领域。单独使用抗体存在半衰期短、溶解性差等问题。将高分子与抗体相连制备抗体-高分子结合体,可以有效的提高抗体的溶解性、稳定性、药代动力学和治疗功效并降低其免疫原性。传统的抗体-高分子结合体的合成方法是将预先制备好的高分子与抗体相连,往往存在着偶联位点不确定、效率低、产率差、产物难以分离、质量控制差、活性难以保持(反应位点靠近抗体活性位点)等诸多难题。因此,迫切需要设计一种通用的方法,以有效的解决上述难题。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供高效、高产率的合成位点特异的抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法,用以提高抗体的溶解性、稳定性、药代动力学和治疗功效并降低其免疫原性。

[0004] 本发明提供了位点特异的抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的制备方法,所述抗体包含至少一个二硫键或自由的巯基,所述高分子通过连接到所述抗体的二硫键或自由的巯基而结合到所述抗体上。

[0005] 所述制备方法可包括两种:第一种为原位聚合法,所述方法包括:a1)制备抗体-引发剂的结合体,其中所述引发剂结合到所述抗体的二硫键或自由的巯基上;b1)所述抗体-引发剂结合体在缓冲液中与高分子单体或者与高分子单体以及荧光单体混合,在催化剂作用下引发所述高分子单体聚合而制备出所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物。优选地,在步骤a1)中,所述抗体的二硫键被还原成自由的巯基,然后所述引发剂连接到所述巯基上。原位聚合法通过在抗体的特定位点进行修饰并原位生长高分子,具有高效、高产率、高活性保持率特点。

[0006] 第二种为接枝法,接枝法预先制备了高分子,再与抗体的特定位点偶联制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物,所述方法包括:a2)引发剂在催化剂作用下引发高分子单体或者高分子单体以及荧光单体聚合,生成所述高分子或高分子的荧光衍生物;b2)所述高分子通过所述引发剂与所述抗体的二硫键或自由的巯基偶联,制备所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物。优选地,在步骤b2)中,所述抗体的二硫键被还原成自由的巯基,然后所述高分子通过所述引发剂连接到所述巯基上,制备出所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物。

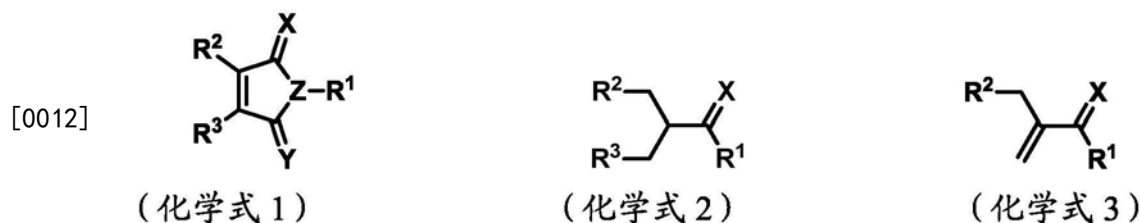
[0007] 所述二硫键选自链内的二硫键、链间的二硫键中的至少一种。所述二硫键或巯基通过选自基因突变、引入非天然氨基酸、氧化还原、酶催化的化学或生物修饰方法引入。

[0008] 所述聚合可选自原子转移自由基聚合反应(ATRP)、可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)、开环异位聚合(ROMP)、开环加成聚合以及它们的组合。可以通过加入催化剂调控聚合。例如,用于引发ATRP聚合反应的催化剂包括但不限于铜离子及其配体(配体包括:二联吡啶及其衍生物配体、 π 受体衍生物配体、氮原子螯合配体以及一些脂肪多胺类配体);引发RAFT聚合反应的催化剂包括但不限于水溶性的自由基引发剂,如4,4'-偶氮(4-氰基戊酸)、2,2'-偶氮[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]二盐酸盐、2,2'-偶氮[2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷]-无水焦硫酸盐、2,2'-偶氮(2-乙基丙脒)二盐酸盐等。引发ROMP聚合反应的催化剂包括但不限于水溶性的Grubbs催化剂等。

[0009] 所述聚合在低氧或者惰性气体氛围下进行,反应时间为5至48个小时,反应温度是0至80°C。

[0010] 所述引发剂可选自ATRP引发剂、RAFT引发剂、ROMP引发剂或和开环加成聚合的引发剂。所述ATRP引发剂可为2-(2-(2-(3,4-二溴代马来酰亚胺-N-乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基2-溴代-2-甲基丙酸酯(DBEB)。

[0011] 所述引发剂分子可以是化学式1、化学式2或化学式3的至少一个:



[0013] 所述化学式1中, R^1 为能够引发ATRP、RAFT或ROMP等聚合反应的官能团及其官能团衍生物。例如能够引发ATRP反应的官能团包括但不限于:N-(2-氨基乙基)-2-溴代-2-甲基丙酰胺、N-(2-氨基乙基)-2-氯代-2-甲基丙酰胺、2-溴代-N-(2-(2-胍基乙酰氨基)乙基)-2-甲基丙酰胺、2-氯代-N-(2-(2-胍基乙酰氨基)乙基)-2-甲基丙酰胺等。能够引发RAFT反应的官能团包括但不限于: $R' C(=S)SR$,其中R基团可以是半胱氨酸、胍、羟胺; R' 基团可以是苯基、烷基、酞酰亚氨基;以及能够同时引发ROMP反应的官能团包括但不限于A-B型官能团,A可以是半胱氨酸、胍、羟胺,B可以是烯烃。 R^2 和 R^3 可以是但不限于H、I、Br、Cl、 C_6H_5S 、 $CH_3C_6H_5S$ 、Ts等容易被亲核取代的官能团及其官能团衍生物; R^2 和 R^3 可以相同也可以不同; X 和 Y 可以是但不限于NH、O、S、Se等原子, X 和 Y 可以相同也可以不同, Z 包括但不限于N或者CH。

[0014] 所述化学式2中, R^1 为能够引发ATRP、RAFT或ROMP等聚合反应的官能团及其官能团衍生物。例如能够引发ATRP反应的官能团包括但不限于:N-(2-氨基乙基)-2-溴代-2-甲基丙酰胺、N-(2-氨基乙基)-2-氯代-2-甲基丙酰胺、2-溴代-N-(2-(2-胍基乙酰氨基)乙基)-2-甲基丙酰胺、2-氯代-N-(2-(2-胍基乙酰氨基)乙基)-2-甲基丙酰胺等。能够引发RAFT反应的官能团包括但不限于: $R' C(=S)SR$,其中R基团可以是半胱氨酸、胍、羟胺; R' 基团可以是苯基、烷基、酞酰亚氨基;以及能够同时引发ROMP反应的官能团包括但不限于A-B型官能团,A可以是半胱氨酸、胍、羟胺,B可以是烯烃。 R^2 和 R^3 可以是但不限于I、Br、Cl、 C_6H_5S 、 $CH_3C_6H_5S$ 、对甲苯环磺酰基的至少一种, R^2 和 R^3 不能同时为H; X 可以是但不限于NH、O、S、Se等原子。

[0015] 所述化学式3中, R^1 为能够引发ATRP、RAFT或ROMP等聚合反应的官能团及其衍生物。例如能够引发ATRP反应的官能团包括但不限于:N-(2-氨基乙基)-2-溴代-2-甲基丙酰胺、N-(2-氨基乙基)-2-氯代-2-甲基丙酰胺、2-溴代-N-(2-(2-胍基乙酰氨基)乙基)-2-甲基丙酰

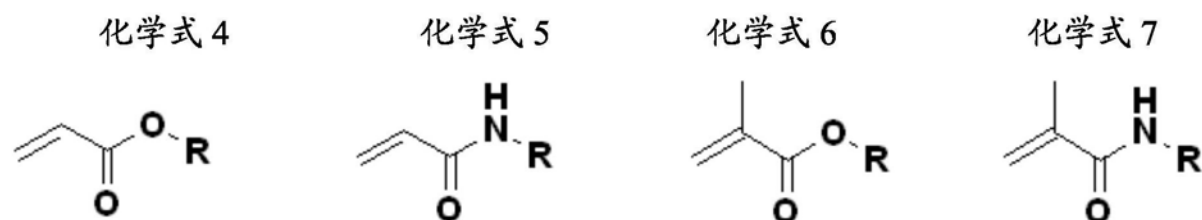
胺、2-氯代-N-(2-(2-胍基乙酰氨基)乙基)-2-甲基丙酰胺等。能够引发RAFT反应的官能团包括但不限于： $R^1C(=S)SR$ ，其中R基团可以是半胱氨酸，胍，羟胺； R^1 基团可以是苯基、烷基、酞酰亚氨基；以及能够同时引发ROMP反应的官能团包括但不限于A-B型官能团，A可以是半胱氨酸、胍、羟胺，B可以是烯烃。 R^2 可以是但不限于H、I、Br、Cl、 C_6H_5 、 $CH_3C_6H_5$ 、对甲苯环磺酰基的至少一种；X可以是但不限于NH、O、S、Se等原子。

[0016] 所述抗体-高分子结合体中的高分子选自均聚物、多杂聚合物、嵌段聚合物、共聚物、三元共聚物的至少一种。

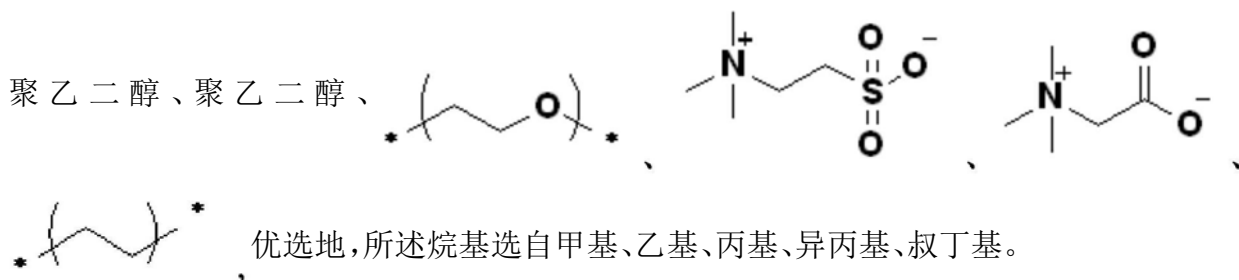
[0017] 所述高分子单体选自乳酸、表氯醇、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、降冰片烯以及氧杂降冰片烯中的至少一种。所述高分子单体可以是PEG类的单体。

[0018] 用于ATRP、RAFT和ROMP等聚合反应的高分子单体的可具有化学式4至7的任一个表示的结构：

[0019]



[0020] 其中，化学式4~7中的R基团选自烷基、苯基、苄基、羧甜菜碱基、磺酸甜菜碱基、寡



[0021] 所述高分子单体可包括两个反应基团，所述两个反应基团彼此反应形成所述高分子。所述高分子单体可进一步包括一个或多个在发生聚合反应时嵌入到高分子的骨架中的反应基团。所述高分子单体可为水溶性或生物可降解。

[0022] 所述高分子可选自POEGMA和PMPC的至少一种。所述高分子可具有侧链，所述侧链选自内铵盐侧链、羧基内铵盐侧链、磺基内铵盐侧链、寡聚乙二醇侧链、聚乙二醇侧链的至少一种。

[0023] 本发明所使用的聚合物荧光单体可以是上述聚合物单体的荧光衍生物，该荧光衍生物发光结构可以包括罗丹明结构、荧光素结构、苏丹红等结构。

[0024] 所述抗体的种类包括但并不限于医药、农业、科研以及其他工业领域相关的单克隆抗体、多克隆抗体等免疫蛋白，例如：英夫利昔单抗(infliximab)、利妥昔单抗(rituximab)、贝伐单抗(bevacizumab)、阿达木单抗(adalimumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、帕利珠单抗(palivizumab)、麦罗塔(Mylotarg)、阿仑单抗(Alemtuzumab)、替伊莫单抗(Zevalin)、赫赛汀(Herceptin)等。

[0025] 此外，如果需要，生物可降解的材料(聚合物单体、寡聚物或者多聚物)也可以引入到抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的结构中。

[0026] 本发明的制备方法有以下优点:首先,以往制备抗体-高分子结合体的方法往往选择抗体的表面赖氨酸作为偶联位点,进而导致了反应位点不可控,极大的影响了抗体的活性(抗体-抗原结合能力),本发明对抗体的特定位点进行修饰,最大限度的保留了抗体的活性;其次,本发明的制备方法可以简便高效地将反应产物(抗体-高分子结合体及其荧光衍生物)与原料(未反应的催化剂、聚合物单体以及荧光单体)进行分离。另外,本发明的原位聚合法步骤简便。

附图说明

[0027] 图1分别显示了原位聚合法和接枝方法制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物(赫赛汀-POEGMA、赫赛汀-PMPC、赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物和赫赛汀-PMPC-荧光衍生物)的步骤。

[0028] 图2显示了抗体赫赛汀、被还原后的抗体赫赛汀-SH和抗体-引发剂结合体赫赛汀-Br的照片。

[0029] 图3、4显示了抗体-引发剂结合体赫赛汀-Br的酶解肽段质谱。

[0030] 图5显示了抗体-引发剂结合体赫赛汀-Br的酶解肽段所在抗体位置的卡通图。

[0031] 图6显示了抗体-引发剂结合体赫赛汀-Br的酶解肽段质谱。

[0032] 图7显示了抗体-引发剂结合体赫赛汀-Br的酶解肽段所在抗体位置的卡通图。

[0033] 图8显示了赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2、赫赛汀-POEGMA-3的凝胶渗透色谱(GPC)检测曲线。

[0034] 图9显示了赫赛汀-PMPC-1、赫赛汀-PMPC-2、赫赛汀-PMPC-3的凝胶渗透色谱(GPC)检测曲线。

[0035] 图10显示了赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2、赫赛汀-POEGMA-3的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

[0036] 图11显示了赫赛汀-PMPC-1、赫赛汀-PMPC-2、赫赛汀-PMPC-3的SDS-PAGE检测。

[0037] 图12显示了动态光散射(DLS)测定赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2、赫赛汀-POEGMA-3的水合直径。

[0038] 图13显示了动态光散射测(DLS)定赫赛汀和赫赛汀-PMPC-1的水合直径。

[0039] 图14显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1的核磁共振氢谱。

[0040] 图15显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1的圆二色性曲线。

[0041] 图16显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2、赫赛汀-POEGMA-3的荧光免疫曲线。

[0042] 图17显示了赫赛汀和赫赛汀-PMPC-1、赫赛汀-PMPC-2、赫赛汀-PMPC-3曲线。

[0043] 图18显示了赫赛汀经过0~3次反复冷冻干燥后的荧光免疫曲线。

[0044] 图19显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1的经过3次反复冷冻干燥前后的活性。

[0045] 图20显示了赫赛汀和赫赛汀-PMPC-1的经过3次反复冷冻干燥前后的活性。

[0046] 图21显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1的经过酶水解前后的活性。

[0047] 图22显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1的经过酶水解前后的SDS-PAGE检测。

[0048] 图23显示了赫赛汀和赫赛汀-PMPC-1的经过酶水解前后的活性。

[0049] 图24显示了赫赛汀和赫赛汀-PMPC-1的经过酶水解前后的SDS-PAGE检测。

- [0050] 图25显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1加热前后的活性。
- [0051] 图26显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-2.9R的染色前后的SDS-PAGE检测。
- [0052] 图27显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-2.9R的凝胶渗透色谱(GPC)在280nm和568nm处的吸收峰检测。
- [0053] 图28显示了赫赛汀和赫赛汀-PMPC-12.6R的染色前后的SDS-PAGE检测。
- [0054] 图29显示了赫赛汀和赫赛汀-PMPC-12.6R的凝胶渗透色谱(GPC)在280nm和568nm处的吸收峰检测。
- [0055] 图30显示了赫赛汀-POEGMA-2.9R的荧光光谱。
- [0056] 图31显示了BCA法(607nm OD值)测定赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物和赫赛汀-PMPC-荧光衍生物的赫赛汀浓度的工作曲线。
- [0057] 图32显示了在568nm处(荧光分子最大吸收波长)测定赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物和赫赛汀-PMPC-荧光衍生物的荧光分子浓度的工作曲线。
- [0058] 图33显示了赫赛汀-PMPC-12.6R的荧光免疫曲线。
- [0059] 图34显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30R的染色前后的SDS-PAGE检测。
- [0060] 图35显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30R的凝胶渗透色谱(GPC)在280nm处的吸收峰检测。
- [0061] 图36显示了制备赫赛汀-TAM的示意图。
- [0062] 图37显示了相同浓度下赫赛汀-TAM、赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30R的相对荧光强度。
- [0063] 图38显示了赫赛汀-TAM、赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30R的活性荧光免疫曲线。
- [0064] 图39显示了赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R、赫赛汀-POEGMA-30R和赫赛汀-TAM对抗原HER2的荧光免疫检测曲线。
- [0065] 图40显示了赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30R检测抗原HER2的荧光信号强度,高出赫赛汀-TAM检测抗原HER2的荧光信号强度的倍数。
- [0066] 图41显示了赫赛汀-TAM和赫赛汀-POEGMA-13.6R的免疫荧光图片。
- [0067] 图42显示了赫赛汀-TAM和赫赛汀-POEGMA-13.6R的流式细胞仪曲线。

具体实施方式

[0068] 下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述,但本发明并不限于以下实施例。所述方法如无特别说明均为常规方法。所述反应物如无特别说明均能从公开商业途径而得。

[0069] 本发明提供了抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的制备方法,所述抗体包含至少一个二硫键,所述高分子通过连接到所述抗体还原的二硫键的引发剂结合到所述抗体上。

[0070] 具体地,所述制备方法可包括两种:第一种为原位聚合法,所述方法包括:a1)制备抗体-引发剂的结合体,其中所述引发剂结合到所述抗体的二硫键或自由的巯基上;b1)所述抗体-引发剂结合体在缓冲液中与高分子单体或者与高分子单体以及荧光单体混合,在

催化剂作用下引发所述高分子单体聚合而制备出所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物。第二种为接枝法,接枝法预先制备了高分子,再与抗体的特定位点偶联制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物,所述方法包括:a2) 引发剂在催化剂作用下引发高分子单体或者高分子单体以及荧光单体聚合,生成所述高分子或高分子的荧光衍生物;b2) 所述高分子通过所述引发剂与所述抗体的二硫键或自由的巯基偶联,制备所述抗体-高分子结合体或抗体-高分子结合体的荧光衍生物。

[0071] 聚合要在低氧或者惰性气体氛围下进行,反应时间可以是5分钟至48个小时,例如5分钟、15分钟、60分钟、12小时、24小时或者48小时。反应温度可以是20℃至100℃,例如20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃或者100℃。

[0072] 所述抗体-高分子结合体及其荧光衍生物中的高分子选自均聚物、多杂聚合物、嵌段聚合物、共聚物、三元共聚物。该高分子包括但不限于功能化高分子(例如5-乙炔基四唑聚合物),其分子量分布小于2.0。该高分子可以包括一个或多个星形嵌段共聚物、线性聚合物、接枝聚合物、刷状聚合物、瓶刷状共聚物、交联状共聚物(例如嵌入5-乙炔基四唑单体的嵌段共聚物)。

[0073] 所述抗体-高分子结合体及其荧光衍生物中的高分子包括但不限于聚酯类高分子、聚甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、聚醚、聚苯乙烯、聚降冰片烯等。例如聚烯烃类聚合物包括但不限于聚乙烯、聚丙烯、聚氯丁烯、聚乙烯酯、聚(醋酸乙烯酯)、聚乙烯卤化物、聚(氯乙烯)、聚硅氧烷、聚苯乙烯、聚氨酯、聚丙烯酸酯、聚((甲基)丙烯酸甲酯)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸正丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸叔丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八酯)、聚(丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酰胺)、聚(乙基丙烯酰胺)、聚(乙基甲基丙烯酰胺)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚(正、异、叔丁基丙烯酰胺)等。此外还包含这些高分子的其它功能化衍生物(如带有可以发生取代、加成反应、烷基化反应、烯基化反应、羟基化反应、氧化反应以及其它化学反应的官能团)。此外高分子侧链可以是内铵盐侧链、羧基内铵盐侧链、磺基内铵盐侧链、寡聚乙二醇侧链、聚乙二醇侧链等。例如,本发明可以利用POEGMA(聚(寡聚(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯))或者PMPC(聚2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱)制备赫赛汀-POEGMA(抗体-高分子)或者赫赛汀-PMPC(抗体-高分子)结合体。高分子POEGMA由于带有寡聚乙二醇侧链,因此具备亲水性、水溶性、无沉积性、低毒性以及低免疫原性等特点;高分子PMPC带有正负电荷的阴阳离子型高分子,因此具备非常好的水溶性、无沉积性、低毒性以及低免疫原性等特点。

[0074] 本发明所使用的高分子单体可以是水溶性,水溶性的高分子单体可以包含容易离去的反应基团,与亲核试剂发生取代反应。例如,在分子链增长的过程中可以加入环氧氯丙烷单体,环氧氯丙烷单体可以嵌入到高分子的骨架上,同时氯原子可以作为离去基团与亲核试剂发生取代反应。聚乙二醇(PEG)的末端被胺基取代,可以作为亲核试剂与高分子主链上的氯原子发生亲核取代反应,从而制备PEG化的高分子主链。本发明所涉及的高分子包括利用上述方法制备的多种功能化的亲水性高分子。

[0075] 高分子单体可以部分的参与高分子的链增长过程,通过相同的化学反应连接到高分子的主链上。所述高分子单体可以包括两个反应基团,这两个反应基团彼此反应形成高

分子。例如,乳酸羧基和羟基两个反应基团。本发明所使用的高分子单体可以进一步包括一个或多个另外的反应基团,在发生聚合反应时可嵌入到聚合物的骨架中。

[0076] 原位聚合法的步骤a1)和b1)中可以使用的缓冲溶液如下:

[0077] 步骤a1)中缓冲溶液为 Na_2HPO_4 ~柠檬酸缓冲溶液、 K_2HPO_4 ~ KH_2PO_4 缓冲溶液、Tris·HCl缓冲溶液、Hanks'缓冲溶液或PBS缓冲溶液,优选Tris·HCl缓冲溶液;pH值为6.0~8.0,优选7.4;抗体的浓度为10~200 μm ,优选10 μm ;还原剂为三(2-羧乙基)膦(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)、硼氢化钠、氰基硼氢化钠等,优选TCEP;还原剂与抗体的比例为1:1~200:1,优选5:1;反应温度为4~40 $^{\circ}\text{C}$,优选37 $^{\circ}\text{C}$;反应时间为0.5~24小时,优选3小时,制备还原型抗体。还原型抗体的浓度为10~200 μM ,优选10 μM ;引发剂与抗体的比例为1:1~200:1,优选50:1;反应温度为4~40 $^{\circ}\text{C}$,优选37 $^{\circ}\text{C}$;反应时间为0.5~24小时,优选14小时。

[0078] 所述步骤b1)制备抗体-高分子结合体的过程中,缓冲溶液为 Na_2HPO_4 ~柠檬酸缓冲溶液、 K_2HPO_4 ~ KH_2PO_4 缓冲溶液、Tris·HCl缓冲溶液、Hanks'缓冲溶液或PBS缓冲溶液,优选Tris·HCl缓冲溶液;pH值为6.0~8.0,优选7.4;抗体-引发剂结合体的浓度为10~200 μM ,优选20 μM ;高分子单体与抗体-引发剂结合体的比例为200:1~20000:1,优选1000:1、2000:1以及5000:1;催化剂为CuCl或者CuBr,优选CuCl;配体为TMEDA、bpy、 Me_6 -TREN、 PPh_3 、PMDTA、HMTETA,优选HMTETA;催化剂与配体的比例为2:1~10:1,优选10:1;反应温度为4~40 $^{\circ}\text{C}$,优选25 $^{\circ}\text{C}$;反应时间为0.5~24小时,优选3小时。

[0079] 所述步骤b1)制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的过程中,缓冲溶液为 Na_2HPO_4 ~柠檬酸缓冲溶液、 K_2HPO_4 ~ KH_2PO_4 缓冲溶液、Tris·HCl缓冲溶液、Hanks'缓冲溶液或PBS缓冲溶液,优选Tris·HCl缓冲溶液;pH值为6.0~8.0,优选7.4;抗体-引发剂结合体的浓度为10~200 μM ,优选20 μM ;高分子单体与抗体-引发剂结合体的比例为200:1~20000:1,优选1000:1;高分子单体与荧光单体的比例为1000:1~10:1,优选10:1、20:1以及50:1;催化剂为CuCl或者CuBr,优选CuCl;配体为TMEDA、bpy、 Me_6 -TREN、 PPh_3 、PMDTA、HMTETA,优选HMTETA;催化剂与配体的比例为2:1~10:1,优选10:1;反应温度为4~40 $^{\circ}\text{C}$,优选25 $^{\circ}\text{C}$;反应时间为0.5~24小时,优选3小时。

[0080] 图1显示了本发明分别采用接枝法(上面的分支)和原位聚合法(下面的分支)制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的具体实施方式。其中,在单克隆抗体赫赛汀的链间二硫键位点原位生长高分子聚(寡(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯)(POEGMA)或者聚2-甲基丙烯酸酞氧基乙基磷酸胆碱(PMPC)而制备赫赛汀-POEGMA及其荧光衍生物或者赫赛汀-PMPC及其荧光衍生物。其中,原位聚合法的具体步骤为:1)抗体的链间二硫键被还原剂打开(还原)生成自由的巯基(赫赛汀-SH);2)通过亲核取代反应,二溴代马来酰亚胺修饰的ATRP引发剂分子(DBEB)插入到链间的二硫键内,形成的抗体-引发剂结合体(赫赛汀-Br)3)赫赛汀-Br直接引发聚合物单体OEGMA(或者PMPC)通过原子转移自由基聚合反应(ATRP)以及引发聚合物单体OEGMA与荧光单体(或者PMPC与荧光单体)共聚,原位生长出高分子POEGMA(或者PMPC)及其荧光衍生物,制备赫赛汀-POEGMA(或者赫赛汀-PMPC)及其荧光衍生物。其中,接枝法制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的具体步骤为:1)抗体的链间二硫键被还原剂打开(还原)生成自由的巯基(赫赛汀-SH);2)二溴代马来酰亚胺修饰的ATRP引发剂分子(DBEB)引发聚合物单体OEGMA(或者MPC)的原子转移自由基聚合反应(ATRP)以及引发聚合物单体OEGMA与荧光单体(或者PMPC与荧光单体)共聚,制备高分子POEGMA(或者PMPC)及其

荧光衍生物;3)将步骤2)所得到高分子偶联到步骤1)所得到的赫赛汀-SH上,制备赫赛汀-POEGMA(或者赫赛汀-PMPC)及其荧光衍生物。

[0081] 实施例1和2具体说明了本发明的实施方式。

[0082] 本发明中的具体检测方法如下:

[0083] 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):制备1mg/ml浓度的样品80 μ L,加入20 μ L加样缓冲液>Loading Buffer)($\times 5$,不含 β 巯基乙醇)。将上述10 μ L样品加载到聚丙烯酰胺凝胶上,在80~120V、40mA的条件下电泳2~4小时(电泳液为:25mM Tris、250mM Glycine、0.1%SDS)。

[0084] 凝胶渗透色谱(GPC):GPC分析使用的是Waters公司的高效液相色谱(HPLC)分析系统。使用紫外检测器(Waters 2489)在280nm和568nm。色谱柱为GS-520HQ和GS-320HQ(连有保护柱),流动相为50mM Tris \cdot HCl(150mM NaCl,pH=7.4),温度为25 $^{\circ}$ C,流速为0.5ml/min。

[0085] 动态光散射(DLS):DLS测试使用的是Malvern Zetasizer Nano-zs90。样品在测试前要通过0.22 μ m的滤膜,样品的浓度为15 μ M。数据处理使用软件Zetasizer software6.32。

[0086] 圆二色性测定:使用圆二色光谱仪(Photophysics Ltd.Pistar π -180)在25 $^{\circ}$ C下测定抗体-高分子结合体(赫赛汀-聚合物)。样品浓度约为1.4 μ M,紫外吸收波长扫描范围是195~260nm。

[0087] BCA法测定赫赛汀浓度:配置牛血清白蛋白(BSA)标准品0.5mg/mL(PBS),将标准品按0、1、2、4、8、12、16和20 μ L加到96孔板的标准品孔中,加PBS补足到20 μ L。加适当体积(2~20 μ L)样品到96孔板的样品孔中,加PBS补足到20 μ L。每孔加200 μ LBCA工作液,37 $^{\circ}$ C放置30分钟。测定562nm的OD值,根据标准曲线计算样品的蛋白浓度。

[0088] 赫赛汀-高分子结合体及其荧光衍生物的活性荧光免疫检测:在96孔板中加入抗原(HER2,1.3 μ g/mL)100 μ L,4 $^{\circ}$ C下静置过夜。移除抗原(HER2)后用PBS(200 μ L)洗涤3次,其后加入牛血清白蛋白(BSA,1%)200 μ L,室温下扰动3小时,移除BSA后用PBS(200 μ L)洗涤3次,加入连续稀释的赫赛汀以及赫赛汀-高分子结合体及其荧光衍生物(27 μ g/mL、9 μ g/mL、3 μ g/mL、1 μ g/mL、0.333 μ g/mL、0.111 μ g/mL、0.037 μ g/mL、0.012 μ g/mL)100 μ L,室温下扰动1小时,用PBS-T(0.1%吐温-20,200 μ L)洗涤2次,PBS(200 μ L)洗涤1次,加入荧光二抗(山羊抗人赫赛汀-PE,Santa Cruz biotechnology或在山羊中产生的抗人IgG(Fc特异的)-FITC抗体,Sigma-Aldrich)100 μ L,室温下扰动1小时,用PBS(200 μ L)洗涤2次后在酶标仪(Molecular Devices,SpectraMax M3)上读数。每个样品重复三次。

[0089] 赫赛汀-高分子结合体荧光衍生物检测抗原HER2的荧光免疫检测(直接法):在96孔板中加入连续稀释的抗原HER2(32.5 μ g/mL、6.5 μ g/mL、1.3 μ g/mL、0.26 μ g/mL、0.052 μ g/mL、0.0104 μ g/mL)100 μ L,4 $^{\circ}$ C下静置过夜。移除抗原(HER2)后用PBS(200 μ L)洗涤3次,其后加入牛血清白蛋白(BSA,1%)200 μ L,室温下扰动3小时,移除BSA后用PBS(200 μ L)洗涤3次,加入赫赛汀-高分子结合体荧光衍生物(10 μ g/mL)100 μ L,室温下扰动1小时,用PBS-T(0.1%吐温-20,200 μ L)洗涤3次,PBS(200 μ L)洗涤1次后在酶标仪(Molecular Devices,SpectraMax M3)上读数。每个样品重复三次。

[0090] 荧光光谱测定:使用荧光光谱仪在25 $^{\circ}$ C下测定抗体-高分子结合体荧光标记物(赫赛汀-POEGMA-染料或者赫赛汀-PMPC-染料)。样品浓度约为0.1 μ M,激发光波长为540nm,发

射波长扫描范围是560~700nm;发射波长为615nm,激发波长扫描范围是500~605nm。

[0091] 免疫荧光测定:将待测细胞(约1,000,000/mL)用PBS冲洗两次后(每次5分钟)加4%的多聚甲醛(PBS溶液)在室温下固定15分钟,PBS洗涤三次后(每次5分钟)加0.3% Triton-X100破膜(10min),PBS洗涤三次(每次5分钟),加10%山羊血清,室温下封闭30min后加抗体(9 μ g/mL,PBS溶液)37 $^{\circ}$ C孵育60分钟,PBS洗涤三次(每次5分钟,注意避光),蒸馏水洗一次(2min)后在荧光显微镜下观察并拍照记录实验结果。所使用的显微镜为Nikon Ti,成像及分析软件为NIS-Elements BR 3.2。

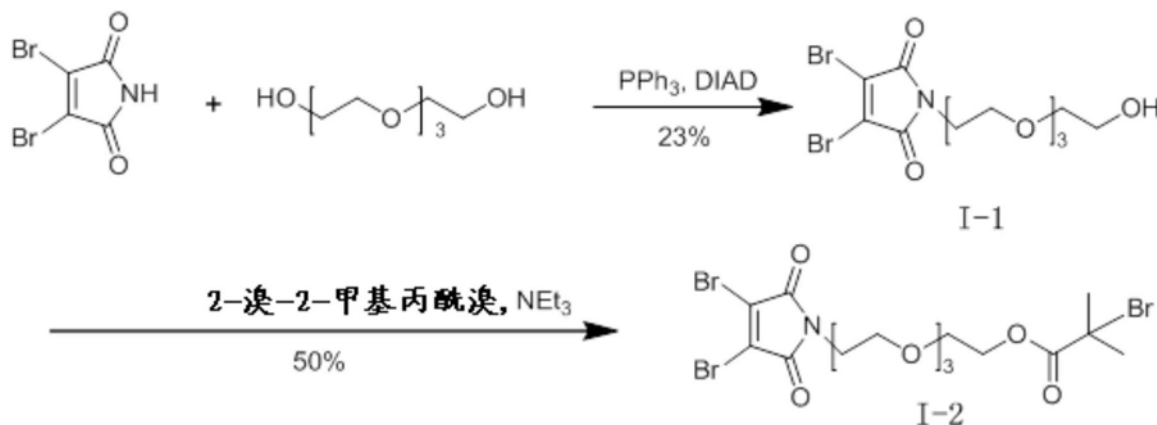
[0092] 流式细胞仪分析测试:将待测细胞(约200,000/mL,100 μ L,DMEM培养基,10%FBS)与抗体(10 μ g/mL,100 μ L,PBS溶液)在室温下孵育1小时,PBS洗涤两次(每次5分钟),用流式细胞仪进行分析。所使用的流式细胞仪为美国BD公司的FACSAria II,分析软件为FCS Express 4Research Edition。

[0093] 使用日本JEOL公司的核磁共振仪在25 $^{\circ}$ C下测定样品的 ^1H NMR。

[0094] 实施例1:

[0095] 1、制备ATRP引发剂DBEB(化学式I-2)。

[0096]



[0097] 制备3,4-二溴代-1-((2-(2-(2-羟乙氧基)乙氧基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯-2,5-二酮(化学式I-1):将二溴代马来酰亚胺(1.02g、4mmol)溶解于20ml干燥的四氢呋喃,室温下缓慢加入三苯基膦(1.05g、4mmol)、偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD,790 μ L、4mmol)和四聚乙二醇(1.4ml、8mmol)并搅拌20小时。用旋转蒸发器除去溶剂,干法上样,快速柱层析得到本发明提供的化学式I-1所述化合物(黄色油状物,398mg,产率为23%),同时回收了50%的二溴代马来酰亚胺。

[0098] 化学式I-1化合物为黄色油状物。 ^1H NMR(CDCl_3 ,400MHz) δ 3.59-3.71(m,14H),3.81-3.84(m,2H). ^{13}C NMR(CDCl_3 ,100MHz) δ 39.0,61.8,67.7,70.1,70.4,70.6,70.8,72.6,129.5,164.0.MS(IES)m/z:452[M+Na] $^+$,454[M+Na] $^+$,456[M+Na] $^+$ 。

[0099] 由上可知,上述化合物结构正确,为化学式I-1所示化合物。

[0100] 2-(2-(2-(3,4二溴代马来酰亚胺-N-乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基2-溴代-2-甲基丙酸酯(DBEB)(化学式I-2)的合成

[0101] 将化学式I-1所示化合物(215mg、0.5mmol)溶于3ml二氯甲烷中,0 $^{\circ}$ C下加入1ml NEt_3 并搅拌0.5小时。0 $^{\circ}$ C下缓慢滴加2-溴-2-甲基丙酰溴(138mg、0.6mmol)的DMF(0.3ml)溶液。搅拌3小时后缓慢升至室温,加入10ml水后用乙酸乙酯萃取(3 \times 25mL),合并有机相后用

无水硫酸镁干燥,过滤除去硫酸镁,用旋转蒸发仪除去溶剂,干法上样,快速柱层析得到本发明提供的化学式I-2所述化合物(黄色油状物,145mg,产率为50%)。

[0102] 化学式I-2化合物为黄色油状物。¹H NMR (CDCl₃,400MHz) δ1.94 (s,6H),3.61-3.81 (m,14H),4.33 (t,2H,J=4.8)。¹³C NMR (CDCl₃,100MHz) δ30.8,39.0,55.9,65.2,67.6,68.8,70.1,70.6,70.71,70.74,129.5,163.8,171.6,.MS (IES) m/z:602[M+Na]⁺,604[M+Na]⁺。

[0103] 由上可知,上述化合物结构正确,为化学式I-2所示化合物。

[0104] 2、ATRP引发剂DBEB插入到抗体链间的二硫键。

[0105] 将单克隆抗体赫赛汀(7.5mg、0.05μmol)溶解在1ml Tris·HCl(50mM,150mM NaCl,pH=7.4)中,37℃下加入还原剂三(2-羧乙基)膦(TCEP、50μl,5mM)的水溶液,孵育3小时。使用脱盐柱(AKTA、GE Healthcare,HiTrap™ Desalting Column5ml,流动相为50mM Tris·HCl,150mM NaCl,pH=7.4)将小分子除去得到纯化后的还原型赫赛汀(赫赛汀-SH)。将ATRP引发剂DBEB(5μL,50mM)的DFM溶液加入到上述赫赛汀-SH的Tris·HCl缓冲液中(溶液变成淡黄色,见图2),37℃下孵育14小时,经脱盐柱除去多余ATRP引发剂得到抗体-引发剂结合体(赫赛汀-Br)。经上述两步反应,成功的将ATRP引发剂插入到了抗体的链间二硫键上。图2显示了赫赛汀抗体、被还原后的抗体赫赛汀-SH和抗体-引发剂结合体赫赛汀-Br的照片,图2中,左侧、中间和右侧分别为赫赛汀抗体、被还原后的抗体赫赛汀-SH和抗体-引发剂结合体赫赛汀-Br。

[0106] 3、验证ATRP反应引发剂分子插入到了抗体赫赛汀的链间二硫键上

[0107] 使用胰蛋白酶将带有引发剂的抗体赫赛汀-Br水解,通过高效液相-质谱(LC-MS/MS)测试,检测到了引发剂分子插入到轻链与重链间的二硫键(SC223DK~GEC214)的多肽片段(如图3所示),同时检测到了引发剂分子仅链接到了该位置重链上的多肽片段(图4),图5为该多肽片段所在抗体位置的卡通图。此外,通过高效液相-质谱(LC-MS/MS)测试,检测到了引发剂分子链接到重链内部两个半胱氨酸残基之间(THTC229PPC232PAPELLGGPSVFLFPPKPK)的多肽片段,如图6所示。图7为该多肽片段所在抗体位置的卡通图。在高效液相-质谱(LC-MS/MS)测试过程中并没有发现其它位点连有引发剂分子的多肽片段。

[0108] 图3至图7说明,ATRP反应引发剂分子的确插入到了抗体(赫赛汀)的链间二硫键上。

[0109] 4、在抗体链间的二硫键位置原位引发ATRP聚合反应

[0110] 将CuCl(0.4mg)和六甲基三亚乙基四胺(4mg)溶于1ml去离子水中。将50~250mg OEGMA(或者MPC,60~300mg)溶于赫赛汀-Br(10μM,5ml)的Tris·HCl(50mM、150mM NaCl、pH=7.4)缓冲溶液中,赫赛汀-Br:OEGMA为1:1000、1:2000或者1:5000;赫赛汀-Br:MPC为1:2000、1:5000或者1:10000。分别向上述两个溶液中鼓入氩气30分钟(除氧),室温下将第一个溶液导入到第二个溶液中(通过双向针头),在氩气气氛下反应3小时后向反应液中鼓入空气(终止聚合反应)。

[0111] 5、检测抗体-高分子结合体(赫赛汀-POEGMA以及赫赛汀-PMPC)

[0112] 抗体-引发剂结合体引发单体OEGMA(或者MPC)发生原位ATRP聚合反应,反应过程通过凝胶渗透色谱(GPC)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行跟踪检测。图8显示了不同分子量的赫赛汀-POEGMA的GPC曲线(280nm)。左数第一、第二和第三条曲线分别代表赫赛

汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2和赫赛汀-POEGMA-3,第四条曲线代表赫赛汀-Br;第五条曲线代表赫赛汀。所测定的不同分子量的赫赛汀-POEGMA的重均分子量(M_w)分别为181.7kDa、334.8kDa和508.0kDa,其对应的分子量分布(PDI)分别为1.4、1.4和1.3。

[0113] 图9显示了不同分子量的赫赛汀-PMPC的GPC曲线(280nm)。左数第一、第二和第三条曲线分别代表赫赛汀-PMPC-1、赫赛汀-PMPC-2和赫赛汀-PMPC-3,第四条曲线代表赫赛汀-Br;第五条曲线代表赫赛汀。所测定的不同分子量的赫赛汀-PMPC的重均分子量(M_w)分别为184.2kDa、253.5kDa和556.2kDa,其对应的分子量分布(PDI)分别为1.3、1.3和2.1。

[0114] 通过在蛋白质的特征吸收峰280nm的检测,可以判断引发剂的插入以及原位聚合反应的产率(抗体-高分子结合体与未反应抗体的比例)。GPC(280nm的紫外吸收)检测发现ATRP聚合反应后,反应混合物的保留时间都小于未反应的抗体赫赛汀的保留时间(18.3分钟)。特征吸收峰的保留时间缩短表明经原位ATRP聚合反应生成了分子量更大的抗体-高分子结合体。通过对特征吸收峰(280nm)进行积分,可以计算出聚合反应后,抗体-高分子结合体(赫赛汀-POEGMA以及赫赛汀-PMPC)所占的比例超过99%。由此可以推断出引发剂的插入反应以及原位ATRP聚合反应的效率均大于99%。

[0115] 图10显示了不同分子量的赫赛汀-POEGMA的SDS-PAGE(非还原型)检测。泳道1为赫赛汀-Br,泳道2为蛋白质标签,泳道3为赫赛汀,泳道4~6分别为赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2和赫赛汀-POEGMA-3。图11显示了不同分子量的赫赛汀-PMPC的SDS-PAGE检测。泳道1为蛋白质标签,泳道2为赫赛汀,泳道3~5分别为赫赛汀-PMPC-1、赫赛汀-PMPC-2和赫赛汀-PMPC-3。SDS-PAGE分析同样表明,抗体-高分子结合体的分子量大于抗体本身,并且经引发剂的插入反应以及原位ATRP聚合反应后抗体几乎全部转化为抗体-高分子结合体。

[0116] 对纯化后的赫赛汀-POEGMA以及赫赛汀-PMPC做了进一步的表征。图12显示了动态光散射(DLS)测定赫赛汀和不同分子量的赫赛汀-POEGMA的水合半径,图12显示纯化后的赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2和赫赛汀-POEGMA-3均只有一个平滑的纳米颗粒分布特征峰(左数第二~第四个峰,水合直径分别为15.2nm、21.9nm和34.3nm,PDI分别为0.19、0.23和0.22),并没有赫赛汀(左数第一个峰)本身的纳米颗粒分布特征峰。图13显示纯化后的赫赛汀-PMPC-1只有一个平滑的纳米颗粒分布特征峰(水合直径为22.0nm,其PDI为0.3),并没有抗体本身的纳米颗粒分布特征峰。图14显示了赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1的核磁共振氢谱,图14显示赫赛汀-POEGMA-1有高分子POEGMA的特征氢信号,表明抗体(赫赛汀)的确与高分子(POEGMA)相连。图15显示了赫赛汀(实线)和赫赛汀-POEGMA-1(虚线)的圆二色性曲线,图15显示原位聚合反应前后抗体(赫赛汀)圆二色性曲线并无明显变化,表明与高分子(POEGMA)结合后,抗体(赫赛汀)的二级结构无明显变化。

[0117] 赫赛汀是一类常见的单抗药物,用于治疗人表皮生长因子受体2(HER2)过表达的乳腺癌和胃癌等癌症疾病。赫赛汀可以与HER2特异性的结合,结合能力的大小可以用来表征赫赛汀活性的高低。荧光免疫检测表明,与赫赛汀相比,赫赛汀-POEGMA以及赫赛汀-PMPC依然保持了很好的活性。图16显示了赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2和赫赛汀-POEGMA-3与抗原HER2结合的半结合浓度(EC_{50})分别为3.4 μ g/ml、4.1 μ g/ml和6.8 μ g/ml,赫赛汀本身与抗原HER2结合的 EC_{50} 为1.3 μ g/ml,其中上数第一条曲线为赫赛汀的荧光免疫曲线,上数第二~第四条曲线分别为赫赛汀-POEGMA-1、赫赛汀-POEGMA-2和赫赛汀-POEGMA-3的荧光免疫曲线。图17显示了赫赛汀-PMPC-1、赫赛汀-PMPC-2和赫赛汀-PMPC-3与抗原HER2结

合的半结合浓度 (EC₅₀) 分别为2.2 μ g/ml、3.5 μ g/ml和16.3 μ g/ml,赫赛汀本身与抗原HER2结合的EC₅₀为1.1 μ g/ml,其中上数第一条曲线为赫赛汀的荧光免疫曲线,上数第二~第四条曲线分别为赫赛汀-PMPC-1、赫赛汀-PMPC-2和赫赛汀-PMPC-3的荧光免疫曲线。图16和图17共同表明,与赫赛汀相比,采用特定位点修饰并原位聚合的方法制备赫赛汀-POEGMA或者赫赛汀-PMPC均能保持较好的活性,其活性随着高分子的分子量的增大呈下降趋势。

[0118] 赫赛汀是一类重要的单抗药物(蛋白质药物),蛋白质药物由于其自身稳定性较差,在储存与运输过程中容易失活(失去疗效)。利用高分子修饰蛋白质可以有效的提高蛋白质的稳定性。与赫赛汀相比,赫赛汀-POEGMA-1和赫赛汀-PMPC-1大大提高了赫赛汀的稳定性。

[0119] 冷冻干燥是单抗药物(蛋白质药物)常用的保存方式。赫赛汀在经历三次反复冷冻干燥后,活性几乎完全丧失,如图18所示,最上面的圆形节点曲线为赫赛汀冷冻干燥前的荧光免疫曲线、正方形节点的曲线为赫赛汀经过1次冷冻干燥后的荧光免疫曲线、正三角节点的曲线为赫赛汀经过2次冷冻干燥后的荧光免疫曲线、倒三角形节点的曲线为赫赛汀经过3次冷冻干燥后的荧光免疫曲线。图19显示了在特定的浓度下(9 μ g/mL),经过3次反复冷冻干燥后,赫赛汀-POEGMA-1保持了79%的活性,赫赛汀则仅保持了15%的活性,与赫赛汀相比,赫赛汀-POEGMA-1经过3次反复冷冻干燥后稳定性提高了4.3倍。图20显示了在特定的浓度下(9 μ g/mL),经过3次反复冷冻干燥后,赫赛汀-PMPC-1保持了62%的活性,与赫赛汀相比,赫赛汀-PMPC-1经过3次反复冷冻干燥后稳定性提高了3.1倍。

[0120] 木瓜蛋白酶(papain)常用来水解抗体,制备抗体Fab片段和Fc片段。图21显示了在相同的条件(0.08%的papain在37 $^{\circ}$ C下水解16小时)下对赫赛汀和赫赛汀-POEGMA-1(0.5mg/ml)进行水解后,在特定的浓度下(9 μ g/mL),赫赛汀-POEGMA-1保持了60%的活性,赫赛汀则保持了11%的活性,与赫赛汀相比,赫赛汀-POEGMA-1的酶稳定性提高了4.5倍。

[0121] 图22为赫赛汀与赫赛汀-POEGMA-1木瓜蛋白酶解前后的SDS-PAGE(还原型)检测,泳道1为蛋白质标签,泳道2为赫赛汀(酶解前),泳道3为赫赛汀(酶解后),泳道4为赫赛汀-POEGMA-1(酶解前),泳道5为赫赛汀-POEGMA-1(酶解后)。图22的分析同样表明,赫赛汀绝大多数重链被酶解为两条肽段(与泳道2相比,泳道3出现了两条新的条带),而赫赛汀-POEGMA-1绝大多数重链并没有被酶解为两条肽段(与泳道4相比,泳道5出现了很浅的两条新的条带)。结合图21和图22可以充分说明,与赫赛汀相比,赫赛汀-POEGMA-1具有更好的酶稳定性。

[0122] 图23显示了在相同的酶解条件以及特定的浓度下(9 μ g/mL),赫赛汀-PMPC-1保持了34%的活性,与赫赛汀相比赫赛汀-PMPC-1的酶稳定性提高了2.4倍。

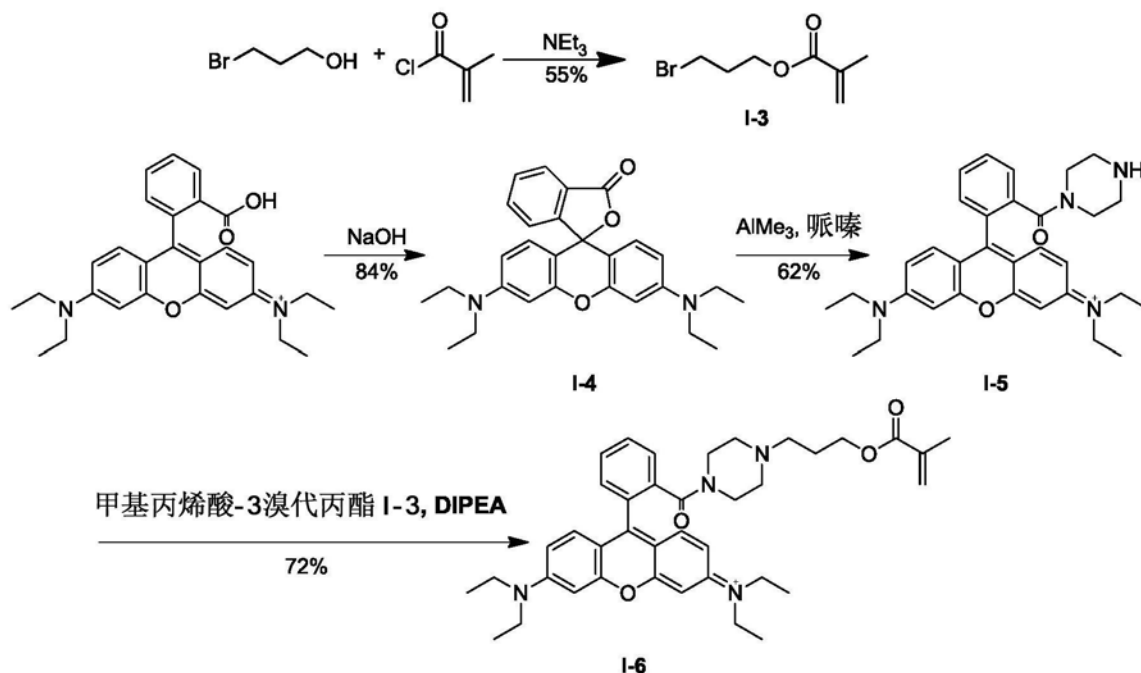
[0123] 图24为赫赛汀与赫赛汀-PMPC木瓜蛋白酶解前后的SDS-PAGE(还原型)检测,泳道1为蛋白质标签,泳道2为赫赛汀(酶解前),泳道3为赫赛汀(酶解后),泳道4为赫赛汀-PMPC-1(酶解前),泳道4为赫赛汀-PMPC-1(酶解后)。结合图23和图24可以充分说明,与赫赛汀相比赫赛汀-PMPC-1具有更好的酶稳定性。

[0124] 图25显示了在37 $^{\circ}$ C水域中孵育3天后,在特定的浓度下(9 μ g/mL)下赫赛汀-POEGMA-1保持了63%的活性,赫赛汀则保持了61%的活性。与赫赛汀相比,赫赛汀-POEGMA-1的热稳定性略有提高。

[0125] 实施例2:

[0126] 1、制备罗丹明B衍生物荧光单体(式I-6)

[0127]



[0128] 1) 甲基丙烯酸-3-溴代丙酯(化学式I-3)的合成。

[0129] 将甲基丙烯酰氯(1.04g, 10mmol)和3ml三乙胺缓慢滴加到3-溴丙醇(1.39g, 10mmol)的二氯甲烷(20ml)与DFM(1ml)的混合溶液中。室温下反应12小时后,将0.1M的稀盐酸缓慢滴加到反应液中,直到pH<7.0,用乙酸乙酯萃取(3×25mL),有机相用无水硫酸镁干燥,过滤后浓缩,快速柱层析得到本发明提供的化学式I-3所述化合物(无色油状物,1.13g, 55%)。

[0130] 化学式I-3化合物为黄色油状物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.95 (s, 3H), 2.21-2.27 (m, 2H), 3.49 (t, 2H, J=6.4), 4.29 (t, 2H, J=6.4), 5.58 (s, 1H), 6.11 (s, 1H)。MS (ESI) m/z: 229[M+Na]⁺。

[0131] 由上可知,上述化合物结构正确,为化学式I-3所示化合物。

[0132] 2) 罗丹明B碱(Rhodamine B base)(化学式I-4)的合成。

[0133] 将罗丹明B(6.6g, 13.8mmol)溶解在150ml乙酸乙酯中,加入氢氧化钠水溶液(1M, 150ml),充分搅拌。3小时后,分出有机相,水相用乙酸乙酯(50ml)萃取两次。合并有机相,分别用氢氧化钠水溶液和氯化钠水溶液洗涤有机相,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩得到本发明提供的化学式I-4所述化合物(红色泡状物,5.13g,84%)。

[0134] 化学式I-4所示化合物为红色泡状物。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 1.27 (t, 12H, J=6.8), 3.62 (q, 8H, J=6.8), 6.88 (d, 2H, J=2.4), 6.96 (dd, 2H, J=2.7, 9.6), 7.21-7.27 (m, 3H), 7.57-7.65 (m, 2H), 8.07-8.09 (m, 1H)。MS (ESI) m/z: 443[M+H]⁺。

[0135] 由上可知,上述化合物结构正确,为式I-4所示化合物。

[0136] 3) 罗丹明B哌嗪酰胺(Rhodamine B piperazine amide)(化学式I-5)的合成。

[0137] 将1M的三甲基铝的正己烷溶液(9mL, 9mmol)缓慢滴加到哌嗪(1.55g, 18mmol)的二氯甲烷(10ml)溶液中。室温下搅拌1小时后缓慢滴加I-4化合物(2g, 4.5mmol)的二氯甲烷

(4ml) 溶液, 加热至沸腾, 24 小时后缓慢滴加 0.1M 的稀盐酸。将上述反应液过滤, 用二氯甲烷和二氯甲烷与甲醇 (4:1) 的混合溶液洗涤。浓缩滤液后将剩余物溶于二氯甲烷, 过滤除去不溶物, 将剩余物用于稀碳酸氢钠水溶液与乙酸乙酯的混合溶液中, 分层后水相用乙酸乙酯萃取三次, 除去没有反应的原料。剩余的水相用氯化钠饱和, 加入 1M 盐酸调节 pH 为弱酸性, 用异丙醇/二氯甲烷 2:1 的混合溶液萃取三次, 直到水相中的红色消失。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤后浓缩, 干法上样, 快速柱层析得到本发明提供的式 I-5 所述化合物 (无色油状物, 1.42g, 62%)。

[0138] 式 I-5 化合物为紫黑色固体。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.34 (t, 12H, $J=7.2$), 2.79 (br s, 4H), 3.51 (br s, 4H), 3.59-3.74 (m, 8H), 4.18 (br s, 1H), 6.76 (d, 2H, $J=2.4$), 6.98 (dd, 2H, $J=2.4, 9.6$), 7.22 (d, 2H, $J=9.6$), 7.34-7.36 (m, 1H), 7.54-7.56 (m, 1H), 7.65-7.70 (m, 2H). MS (ESI) m/z : 511 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0139] 由上可知, 上述化合物结构正确, 为式 I-5 所示化合物。

[0140] 4) 罗丹明 B 4-(3-甲基丙烯酰氧丙基) 哌嗪酰胺 (RMPA) (化学式 I-6) 的合成。

[0141] 将 3-溴丙酰溴 (412mg, 2mmol) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (0.7ml) 缓慢滴加到罗丹明 B 哌嗪酰胺 (I-5) 的 DFM (10ml) 溶液中, 在 40°C 下搅拌 24 小时后冷至室温, 将上述溶液倒入二氯甲烷 (25ml) 和水 (25ml) 的两相体系中, 分层后在用二氯甲烷 (25ml) 萃取三次。收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩, 干法上样, 快速柱层析得到本发明提供的化学式 I-6 所述化合物 (紫黑色固体, 92mg, 72%)。

[0142] 式 I-6 化合物为紫黑色固体。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 1.29 (t, 12H, $J=7.2$), 1.75-1.81 (m, 2H), 1.89 (s, 3H), 2.19 (br s, 4H), 2.33 (t, 2H, $J=7.2$), 3.37 (br s, 4H), 3.68 (q, 8H, $J=7.2$), 4.13 (t, 2H, $J=6.4$), 5.59 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 6.96 (d, 2H, $J=2.0$), 7.06 (dd, 2H, $J=2.0, 9.6$), 7.26 (d, 2H, $J=9.6$), 7.48-7.51 (m, 1H), 7.62-7.66 (m, 1H), 7.72-7.77 (m, 2H). ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) δ 11.6, 17.1, 25.4, 45.6, 48.0, 54.5, 62.7, 96.0, 113.5, 114.1, 124.8, 127.5, 129.8, 130.0, 130.3, 130.7, 132.0, 135.5, 136.4, 155.7, 155.9, 157.9, 167.4, 167.9. MS (ESI) m/z : 637 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0143] 由上可知, 上述化合物结构正确, 为化学式 I-6 所示化合物。

[0144] 2、制备赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物和赫赛汀-PMPC-荧光衍生物

[0145] 将 CuCl (0.4mg) 和六甲基三亚乙基四胺 (4mg) 溶于 1ml 去离子水中。将 50mg OEGMA (或者 30mg PMPC) 和荧光单体 (式 I-6, 2.5mg, 5%) 溶于赫赛汀-Br (10 μM , 5ml) 的 Tris \cdot HCl (50mM, 150mM NaCl, pH=7.4) 缓冲溶液中。分别向上述两个溶液中鼓入氩气 30 分钟 (除氧), 室温下将第一个溶于导入到第二个溶液中 (通过双向针头), 在氩气气氛下反应 3 小时后向反应液中鼓入空气 (终止聚合反应)。

[0146] 抗体-引发剂结合体引发单体 OEGMA (或者 MPC) 和荧光单体发生原位 ATRP 共聚反应, 反应过程通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和凝胶渗透色谱 (GPC) 进行跟踪检测。

[0147] 图 26 显示了赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的 SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝染色前 (左侧), 考马斯亮蓝染色后 (右侧)。泳道 1 为蛋白质标签; 泳道 2 为赫赛汀; 泳道 3 为赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物。图 26 赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物位置 (泳道 3) 为红色条带, 表明红色的荧光单体共聚到了高分子的主链上; 考马斯亮蓝染色后的 SDS-PAGE 图片可以看到在抗体-高分子结合体荧光衍生物位置 (泳道 3) 有明显的蓝色条带, 其对应的分子量大于抗体

(泳道2)本身的分子量。比较考马斯亮蓝染色前后SDS-PAGE图片我们认为经原位ATRP共聚反应后抗体-引发剂结合体(赫赛汀-Br)几乎全部转化为赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物。

[0148] 图27显示了赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的凝胶渗透色谱图(GPC)在280nm和568nm处紫外吸收(荧光分子的最大吸收在568nm处)。右侧曲线为赫赛汀;左侧实线为赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物(280nm);左侧虚线为赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物(568nm)。通过在蛋白质的特征吸收峰280nm的检测,可以判断引发剂的插入以及原位聚合反应的产率(抗体-高分子结合体与未反应抗体的比例)。GPC(280nm的紫外吸收)检测发现ATRP聚合反应后,反应混合物的保留时间小于未反应抗体的保留时间。特征吸收峰的保留时间缩短表明经原位ATRP聚合反应生成了分子量更大的抗体-高分子结合体。通过对特征吸收峰(280nm)进行积分,可以计算出聚合反应后赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物所占的比例超过99%。由此可以推断出引发剂的插入反应以及原位ATRP聚合反应的效率均大于99%。吸收峰在568nm(荧光单体的最大紫外吸收)处的GPC检测发现ATRP聚合反应后,反应混合物的保留时间与吸收峰在280nm的相同,说明荧光单体的确共聚到了抗体-高分子结合体的高分子主链上,成功制备了赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物。

[0149] 图28显示了赫赛汀-PMPC-荧光衍生物的SDS-PAGE检测,考马斯亮蓝染色前(左侧),考马斯亮蓝染色后(右侧)。泳道1为蛋白质标签;泳道2为赫赛汀;泳道3为赫赛汀-PMPC-荧光衍生物。图28可以直接看到在赫赛汀-PMPC-荧光衍生物位置(泳道3)为红色条带,表明红色的荧光单体共聚到了高分子的主链上;考马斯亮蓝染色后的SDS-PAGE图片可以看到赫赛汀-PMPC-荧光衍生物位置(泳道3)有明显的蓝色条带,其对应的分子量大于赫赛汀(泳道2)本身的分子量。比较考马斯亮蓝染色前后SDS-PAGE图片我们认为经原位ATRP共聚反应后赫赛汀-Br几乎全部转化为赫赛汀-PMPC-荧光衍生物。

[0150] 图29显示了赫赛汀-PMPC-荧光衍生物的凝胶渗透色谱图(GPC)在280nm和568nm处紫外吸收。右侧曲线为赫赛汀;左侧实线为赫赛汀-PMPC-荧光衍生物(280nm吸收);左侧虚线为赫赛汀-PMPC-荧光衍生物(568nm吸收)。GPC(280nm的紫外吸收)检测发现ATRP聚合反应后,反应混合物的保留时间小于未反应抗体的保留时间。特征吸收峰的保留时间缩短表明经原位ATRP聚合反应生成了分子量更大的抗体-高分子结合体。通过对特征吸收峰(280nm)进行积分,可以计算出聚合反应后赫赛汀-PMPC-荧光衍生物所占的比例超过99%。吸收峰在568nm(荧光单体的最大紫外吸收)处的GPC检测发现ATRP聚合反应后,反应混合物的保留时间与吸收峰在280nm的相同,说明荧光单体的确共聚到了抗体-高分子结合体的高分子主链上,成功制备了赫赛汀-PMPC-荧光衍生物。

[0151] 经纯化(脱盐柱纯化)后对赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物和赫赛汀-PMPC-荧光衍生物做了进一步的表征。将赫赛汀-POEGMA-染料配制成大约为10nM的水溶液,在25℃下测定其荧光激发与发射光谱(选择540nm作为激发波长,在560nm~700nm进行发射光谱扫描;选择615nm作为发射波长,在500nm~605nm进行激发光谱扫描,图30)。荧光光谱表明,赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的最大荧光发生波长为589nm,赫赛汀-PMPC-荧光衍生物与赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的荧光光谱相同。

[0152] 赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物和赫赛汀-PMPC-荧光衍生物中每个抗体所连接的荧光分子的个数采用如下方法确定。

[0153] 首先通过BCA法测定抗体的浓度,其次以已知梯度浓度的抗体作为标准品,采用

BCA法(在607nm处测定标准品以及未知样品的OD值)测定赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物(或者赫赛汀-PMPC-荧光衍生物)的抗体浓度。如图31所示,标准品的工作曲线有很好的线性关系。然后在荧光分子的最大紫外吸收波长(568nm)处测定已知梯度浓度荧光分子标准品的OD值,以OD值为纵坐标,荧光分子的浓度为横坐标绘制工作曲线,由该工作曲线测定赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物(或者赫赛汀-PMPC-荧光衍生物)的荧光分子浓度。如图32所示,荧光分子标准品的工作曲线有很好的线性关系。赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物(或者赫赛汀-PMPC-荧光衍生物)的荧光分子浓度与抗体浓度的摩尔比则是赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物(或者赫赛汀-PMPC-荧光衍生物)中每个抗体所连接的荧光分子的个数。

[0154] 表1显示了赫赛汀-POEGMA-30R和赫赛汀-PMPC-12.6R的参数。如表1所示,平均每个赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物连有30.0个荧光分子,平均每个赫赛汀-PMPC-荧光衍生物连有12.6个荧光分子。

[0155] 表1赫赛汀-POEGMA-30R和赫赛汀-PMPC-12.6R的参数

[0156]

样品名称	荧光分子R浓度(μM)	赫赛汀Her浓度(μM)	R/Her
赫赛汀-POEGMA-30R	135.1	4.5	30
赫赛汀-PMPC-12.6R	59.1	4.7	12.6

[0157] 荧光免疫实验表明,与赫赛汀相比赫赛汀-PMPC-荧光衍生物依然保持了很好的活性。图33显示了赫赛汀-PMPC-荧光衍生物与抗原HER2结合能力的 EC_{50} 为 $1.9\mu\text{g}/\text{ml}$, Herceptin本身与抗原HER2结合的 EC_{50} 为 $1.1\mu\text{g}/\text{ml}$,上面的曲线为赫赛汀的荧光免疫曲线,下面的曲线为赫赛汀-PMPC-荧光衍生物的荧光免疫曲线。图33表明采用特定位点修饰并原位聚合的方法制备赫赛汀-PMPC-荧光衍生物可以保持较好的活性。

[0158] 通过改变OEGMA、荧光单体以及赫赛汀-Br的比例,可以制备含有不同荧光分子个数的赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物。

[0159] 图34显示了赫赛汀-POEGMA-2.9R(平均每个赫赛汀上连有2.9个荧光分子,以下类同)、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R以及赫赛汀-POEGMA-30R的SDS-PAGE检测,考马斯亮蓝染色前(左侧),考马斯亮蓝染色后(右侧)。泳道1为蛋白质标签;泳道2为赫赛汀;泳道3为赫赛汀-POEGMA-2.9R;泳道4为赫赛汀-POEGMA-7.2R;泳道5为赫赛汀-POEGMA-13.6R;泳道6为赫赛汀-POEGMA-30R。图34显示原始的赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物位置(泳道3~6)均为红色条带;考马斯亮蓝染色后的SDS-PAGE图片可以看到在抗体-高分子结合体荧光衍生物位置(泳道3~6)有明显的蓝色条带,其对应的分子量大于抗体(泳道2)本身的分子量。比较考马斯亮蓝染色前后SDS-PAGE图片我们认为经原位ATRP共聚反应后抗体-引发剂结合体(赫赛汀-Br)几乎全部转化为赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物。

[0160] 图35显示了不同赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的凝胶渗透色谱(280nm)。左数第一、第二、第三条和第四条曲线分别代表赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30R,第五条曲线代表赫赛汀。赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30R的重均分子量(M_w)分别为209.8kDa、194.1kDa、182.9kDa和177.6kDa,其对应的分子量分布(PDI)分别为1.3、1.3、1.2和1.2。

[0161] 将荧光分子偶联到抗体上制备抗体-荧光标记物(或衍生物),已经广泛用于实验

室以及临床检测。

[0162] 为了将本发明制备的赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物与常规方法(直接将荧光分子偶联到抗体链间二硫键)制备抗体-荧光标记物相比较,我们使用常规方法制备了赫赛汀-荧光标记物。制备方法如下:

[0163] 首先,根据前述方法制备还原型赫赛汀(赫赛汀-SH)。然后,将荧光标记物TAMRA-C6-马来酰亚胺的DFM溶液(20倍当量)加入到上述赫赛汀-SH的Tris·HCl缓冲液中,37℃下孵育14小时,经脱盐柱除去多余荧光标记物TAMRA-C6-马来酰亚胺得到抗体-荧光标记物(赫赛汀-TAM),并确定了每个抗体平均与2.9个荧光分子相连,如图36。

[0164] 图37显示了不同赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物与赫赛汀-TAM在相同浓度(27ng/mL)下的相对荧光强度。如图所示,第一到第五根柱状图分别表示赫赛汀-TAM、赫赛汀-POEGMA-2.9R、赫赛汀-POEGMA-7.2R、赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30.0R的相对荧光强度。荧光强度随着赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物中荧光分子个数的增加而增加,当荧光分子个数为13.6时荧光强度达到最高(约为赫赛汀-TAM的19.8倍),当荧光分子达到30.0时荧光强度有所下降(约为赫赛汀-TAM的17.4倍)。

[0165] 荧光免疫实验表明,赫赛汀-TAM与赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物依然保持了较好的活性。如图38所示上数第一条曲线为赫赛汀的荧光免疫曲线,第二条曲线为赫赛汀-TAM的荧光免疫曲线,第三、四条曲线分别为赫赛汀-POEGMA-2.9R和赫赛汀-POEGMA-7.2R的荧光免疫曲线,第五、六条曲线分别为赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-POEGMA-30.0R的荧光免疫曲线。由图38可知,随着赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的荧光分子个数的增加,其活性呈下降趋势。

[0166] 通过荧光免疫(直接法)比较了赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物与赫赛汀-TAM对抗原HER2检测的荧光信号强度。

[0167] 图39显示了不同赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物与赫赛汀-TAM对抗原HER2检测的荧光免疫曲线。上数第一、第二、第三和第四条曲线分别代表赫赛汀-POEGMA-30R、赫赛汀-POEGMA-13.6R、赫赛汀-POEGMA-7.2R和赫赛汀-POEGMA-2.9R,第五条曲线代表赫赛汀-TAM。图39表明采用本发明的方法制备的赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物与常规方法相比,对抗原HER2检测的荧光信号强度有了明显的提高。

[0168] 选取抗原HER2的用量为650ng/well,根据图40所对应的数据作图(以赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物中所连接的荧光分子的个数(n)为横坐标,以赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的荧光信号强度与赫赛汀-TAM的荧光信号强度的比值为纵坐标),如图40所示,随着荧光分子个数的增加,赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的荧光信号强度与赫赛汀-TAM的荧光信号强度的比值逐渐增大。当赫赛汀-POEGMA-荧光衍生物的荧光分子个数达到30时,荧光信号强度是赫赛汀-TAM的13.1倍。

[0169] 图41显示了赫赛汀-POEGMA-13.6R与赫赛汀-TAM对过表达抗原HER2细胞的免疫荧光检测照片。左侧两张(A和C)照片为阴性对照组(A431,抗原HER2低表达细胞),右侧两张(B和D)照片为阳性实验组(SK-BR-3,抗原HER2过表达细胞)。上面两张(A和B)照片分别为赫赛汀-TAM对两组细胞染色,下面两张(C和D)照片分别为赫赛汀-POEGMA-13.6R对两组细胞染色。由图41可知,赫赛汀-TAM可以选择性地对SK-BR-3染色,但是荧光信号较低;赫赛汀-POEGMA-13.6R同样可以选择性地对SK-BR-3染色,同时表现出非常高的荧光信号。

[0170] 图42显示了赫赛汀-POEGMA-13.6R与赫赛汀-TAM对SK-BR-3细胞的流式细胞仪检测。左数第一条曲线为阴性对照,第二条曲线为赫赛汀-TAM染色的细胞,第三条曲线为赫赛汀-POEGMA-13.6R染色的细胞。其中门1 (M1) 内细胞为阴性组,门2 (M2) 内细胞为阳性组。

[0171] 表2显示了赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-2.9TAM的参数。如表2所示,仅有12.2%的细胞可以被赫赛汀-2.9TAM染色,平均每个被染色细胞的荧光强度为90.8;有48.0%的细胞可以被赫赛汀-POEGMA-13.6R染色,平均每个被染色细胞的荧光强度为305.1,被赫赛汀-POEGMA-13.6R染色的细胞的荧光强度加和值是赫赛汀-2.9TAM的13.2倍。

[0172] 表2赫赛汀-POEGMA-13.6R和赫赛汀-2.9TAM的流式细胞仪检测参数

样品名称	%细胞 (M1)	%细胞 (M2)	平均荧光强度 (M2)	荧光强度加和 (M2)	倍数
赫赛汀	99.2	0.8	-----	----	----
赫赛汀-TAM	87.8	12.2	90.8	1107.2	1
赫赛汀-POEGMA-13.6R	52.0	48.0	305.1	14615.3	13.2

[0174] 本发明提供的制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物的方法可以至少将10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以及>99%的抗体与高分子相连,并且每一个抗体可以连接一个或多个(1~10个)高分子。抗体与高分子的连接位点可以是链内的二硫键、链间的二硫键以及自由的巯基(半胱氨酸)或者通过化学修饰引入的二硫键(或者自由巯基)等位点。

[0175] 本发明制备的抗体-高分子结合体及其荧光衍生物可以有多重不同的用途。例如,当选用有治疗功效的抗体时,结合体可以提高药用抗体在患病位置的聚集时间因而提高治疗效果。与单纯的抗体相比,抗体-高分子结合体及其荧光衍生物可以提高抗体的水溶性、稳定性、药代动力学和生物分布并降低其免疫原性。

[0176] 抗体与高分子结合(抗体-高分子结合体)可以有效提高抗体在体内或者血液中的半衰期。半衰期的提高可以达到25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%,甚至20、30、40、50倍等。抗体与高分子结合(抗体-高分子结合体)可以有效提高抗体在水溶液中的溶解性,溶解性的提高可以达到25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,甚至更多。抗体与高分子结合(抗体-高分子结合体)可以有效提高抗体的药代动力学。例如,抗体-高分子结合体能够减缓活性物质的新陈代谢或者刺激非活性物质加速新陈代谢形成代谢产物从而降低活性物质的代谢。抗体与高分子结合(抗体-高分子结合体)可以通过降低抗体在体内的免疫应答从而有效降低抗体的免疫原性。免疫原性的降低可以达到10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,甚至更多。

[0177] 在不脱离本发明构思的前提下,进行任何可能的变化或替换均属于本发明的保护范围。

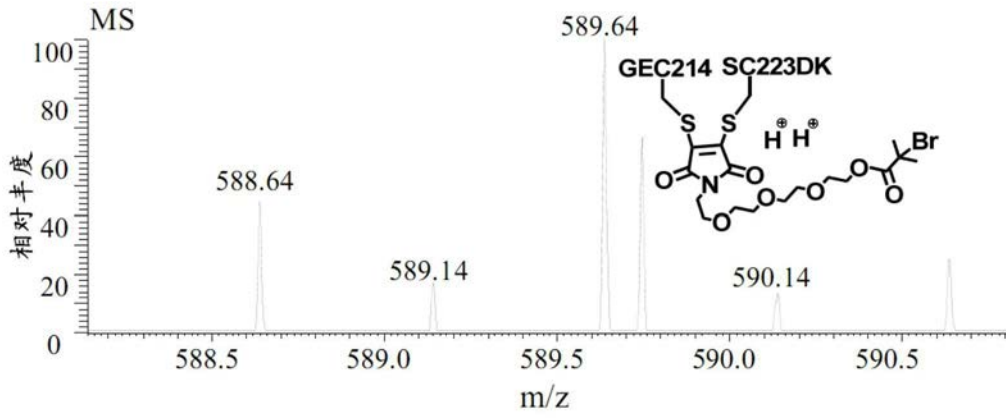


图3

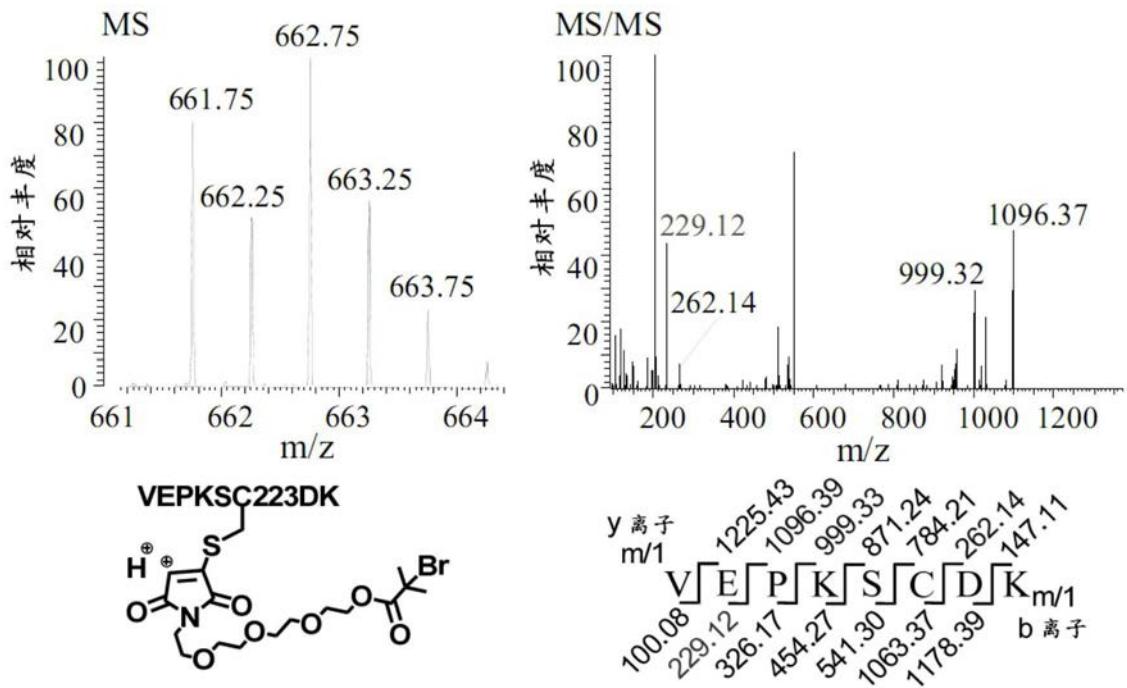


图4

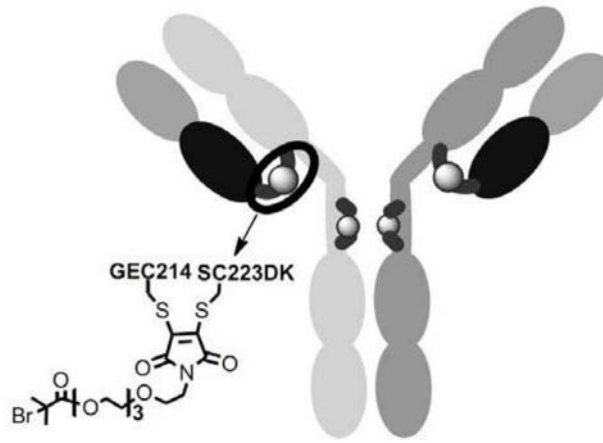


图5

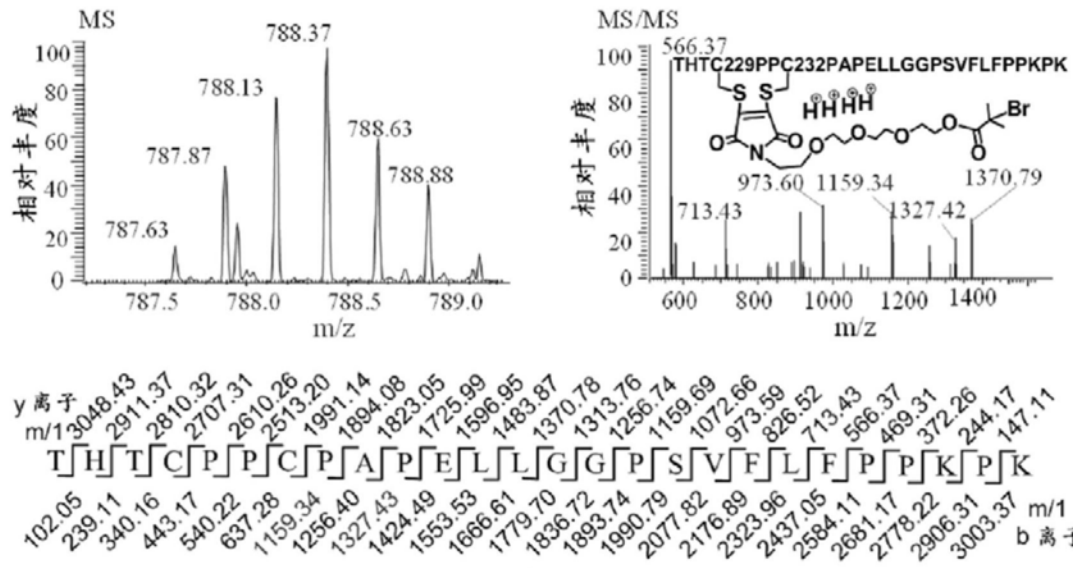


图6

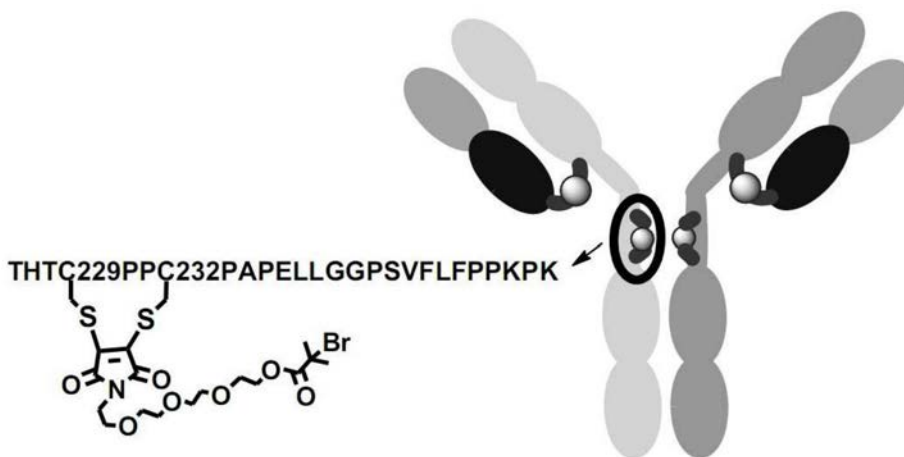


图7

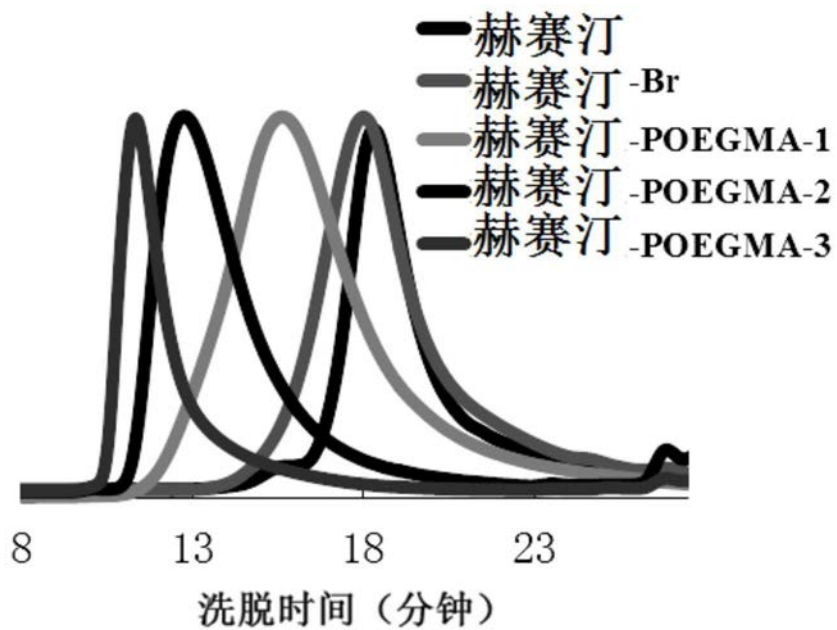


图8

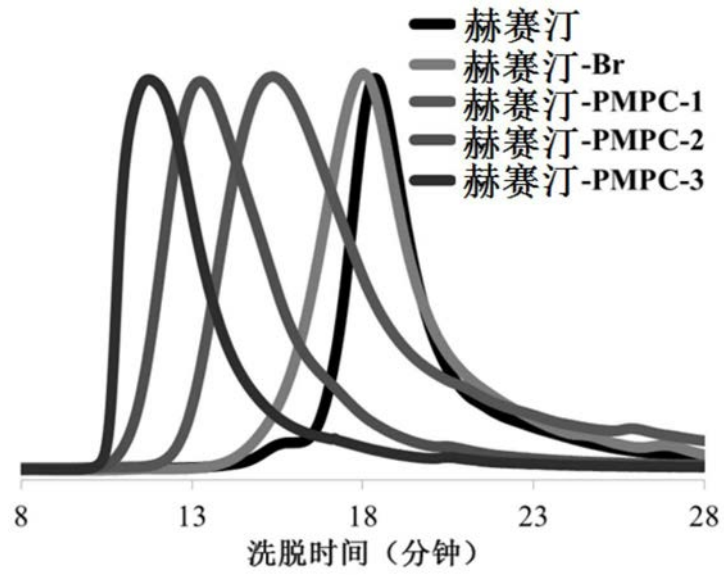


图9

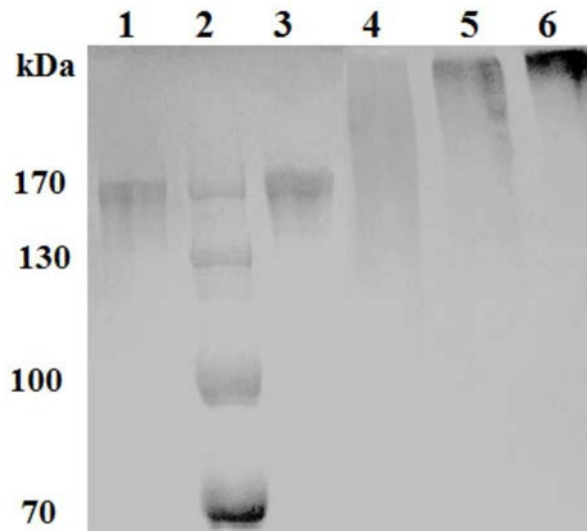


图10

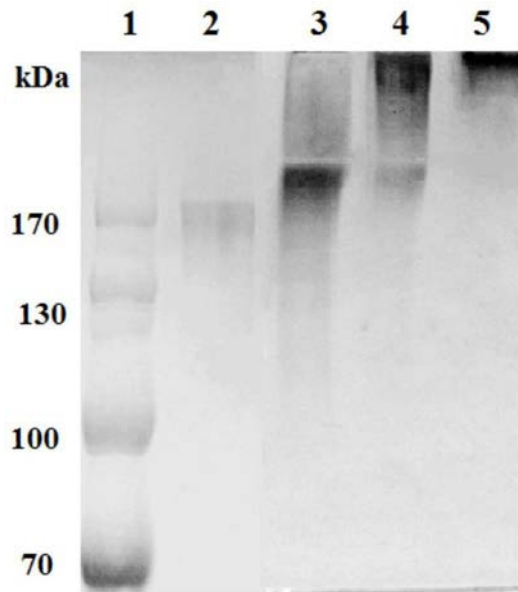


图11

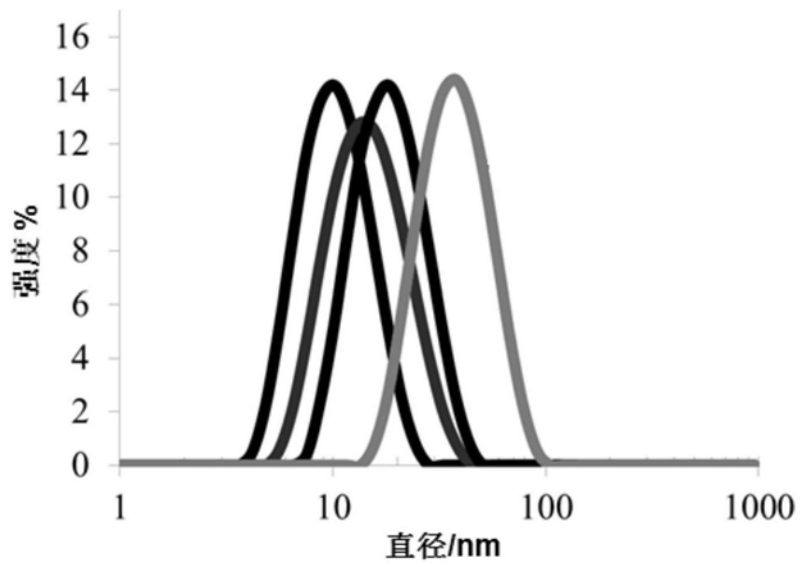


图12

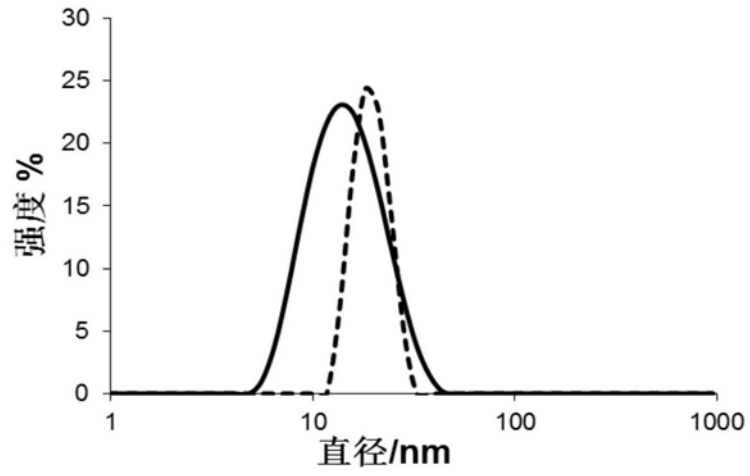


图13

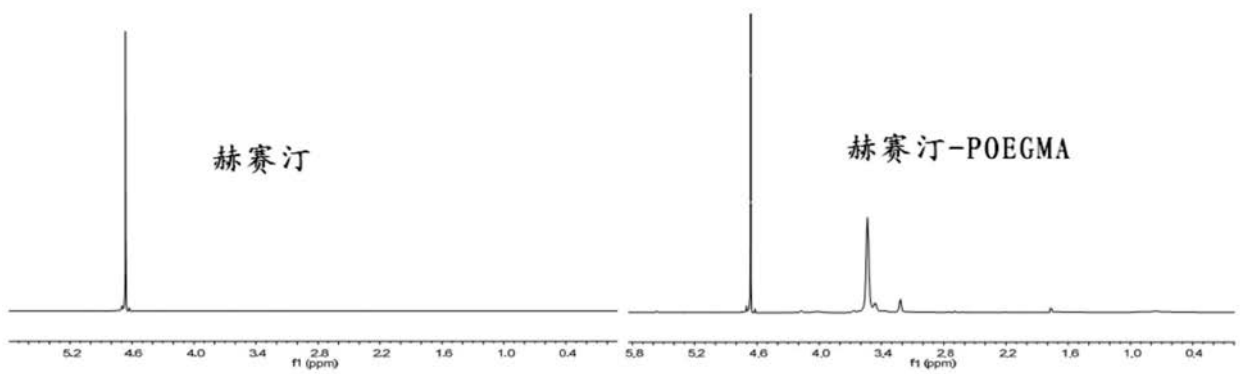


图14

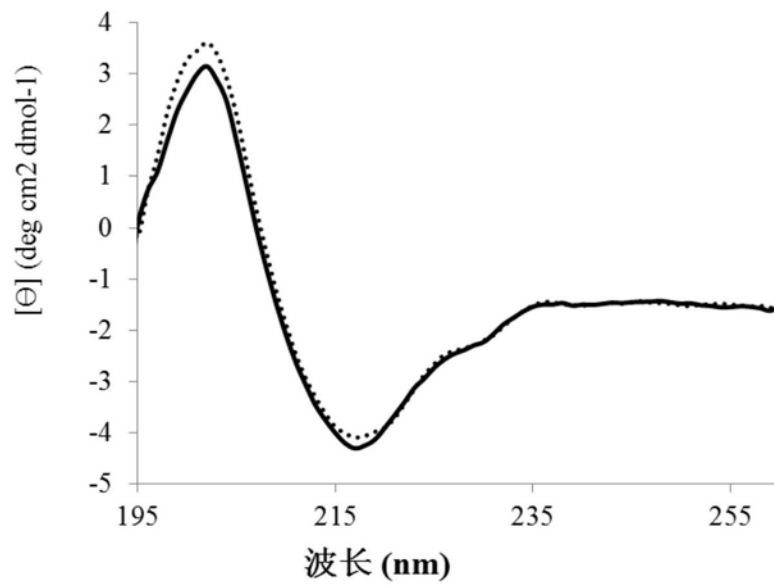


图15

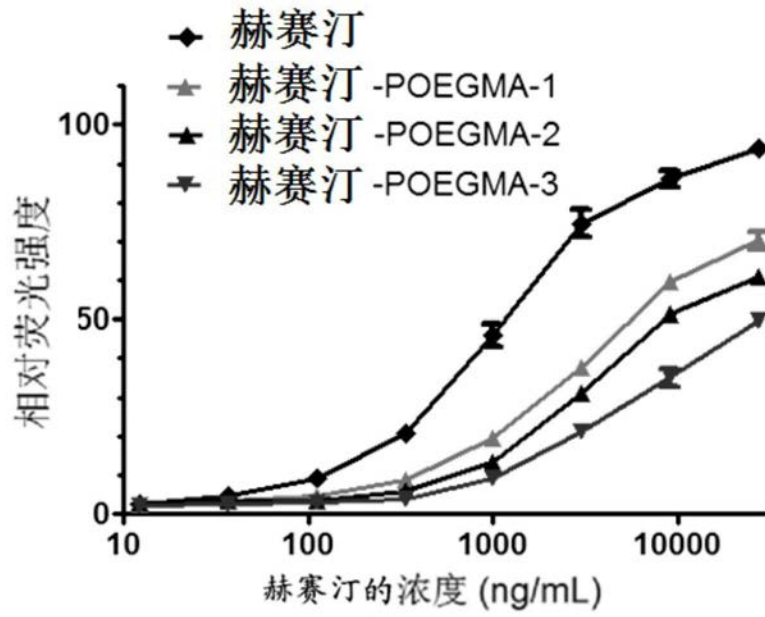


图16

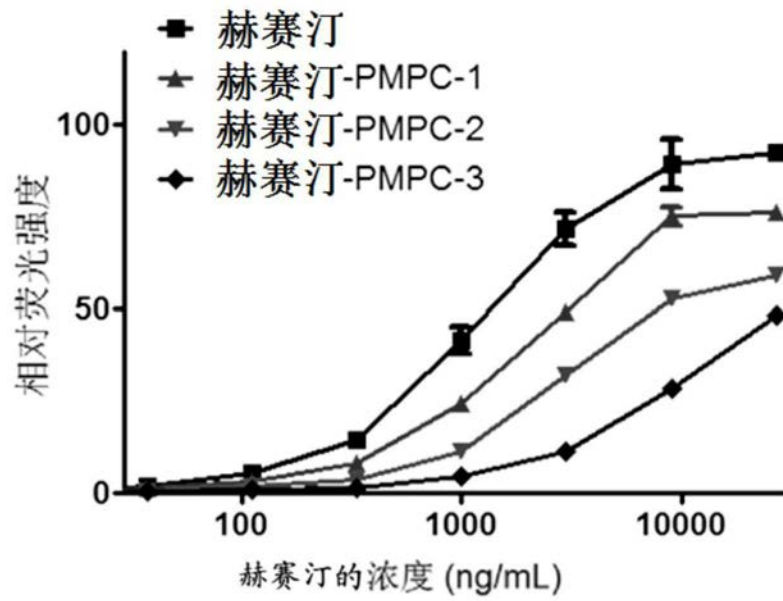


图17

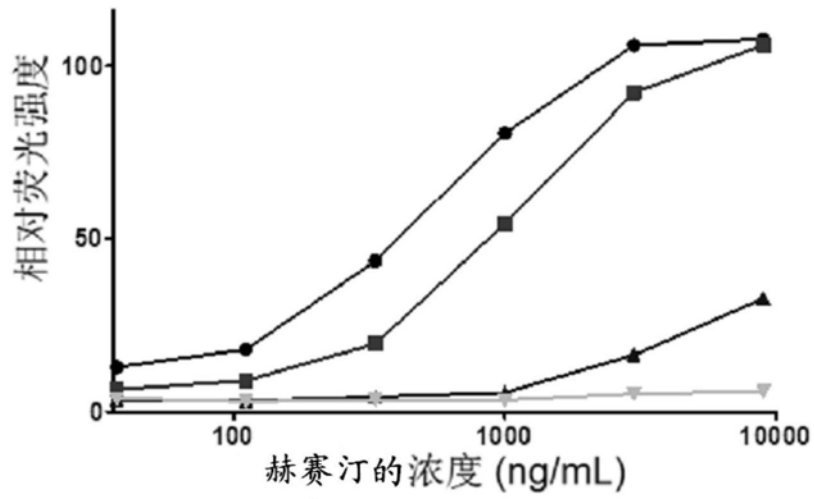


图18

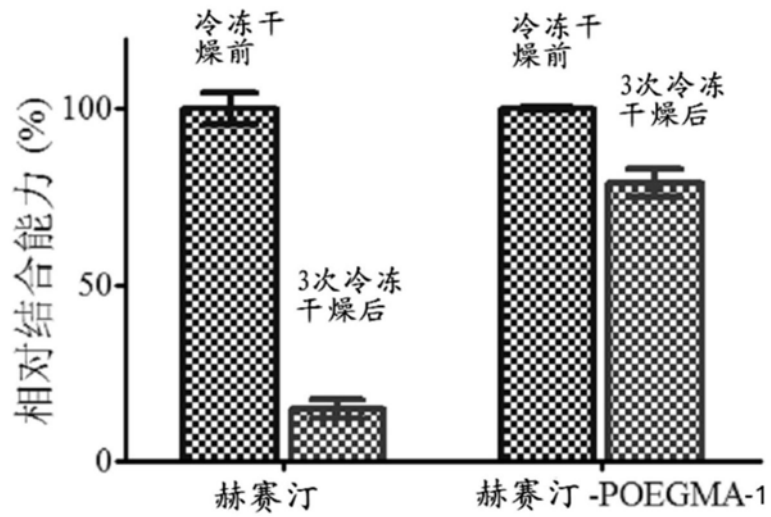


图19

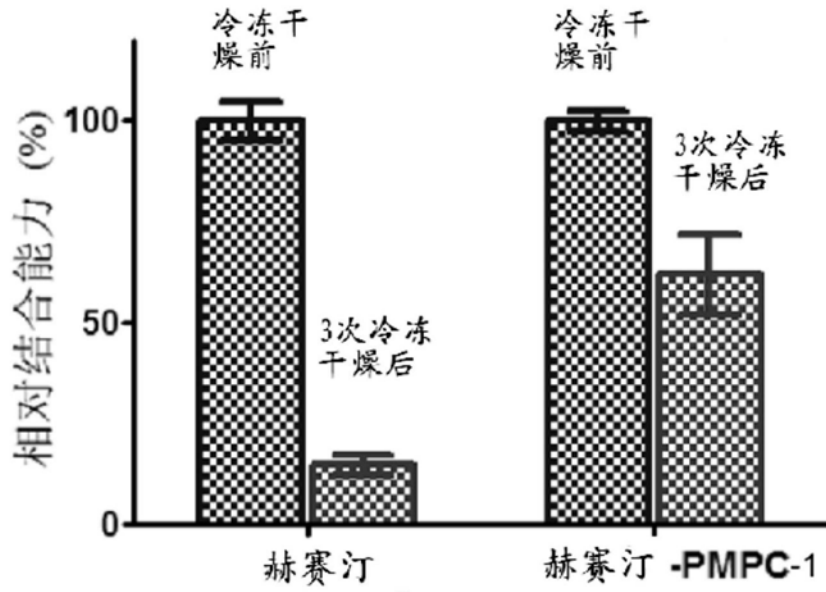


图20

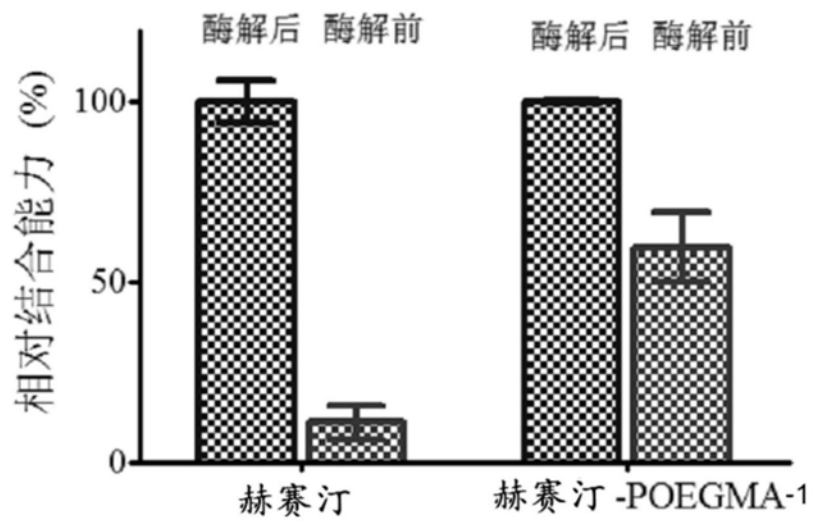


图21

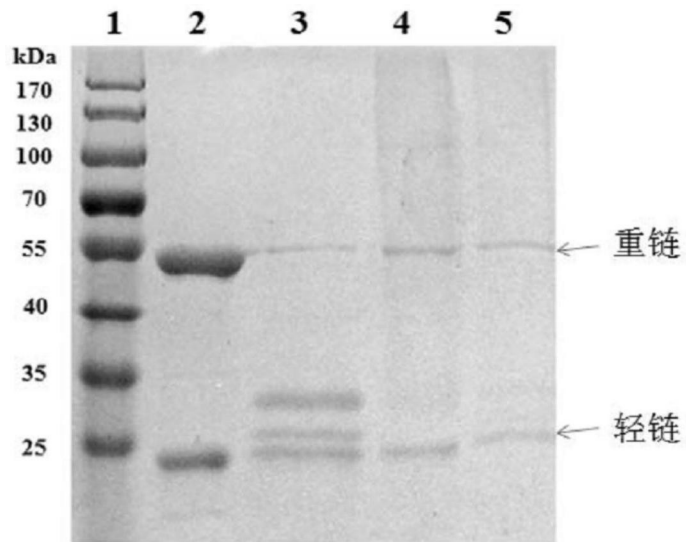


图22

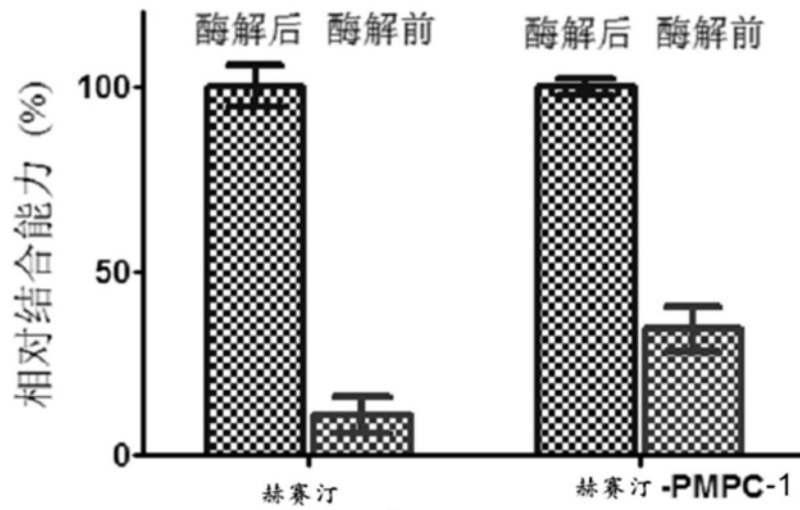


图23

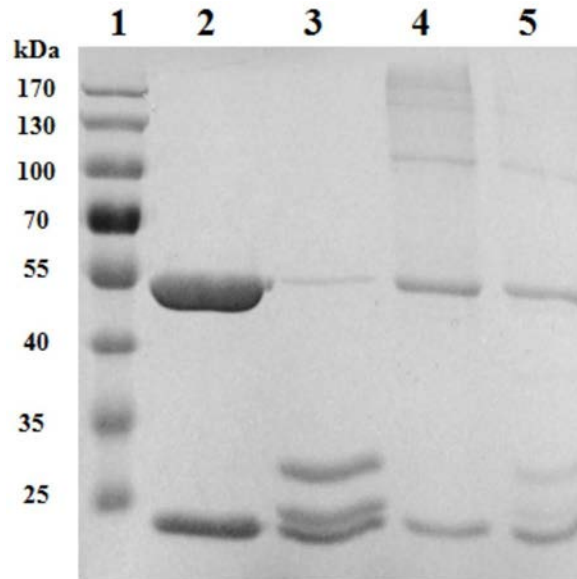


图24

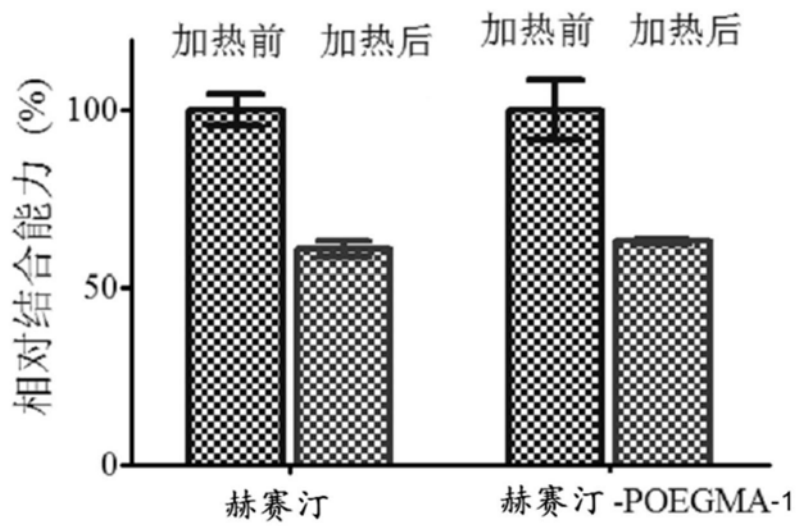


图25

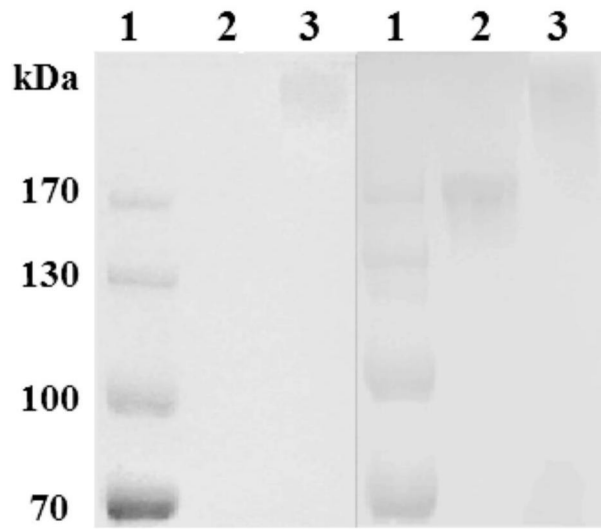


图26

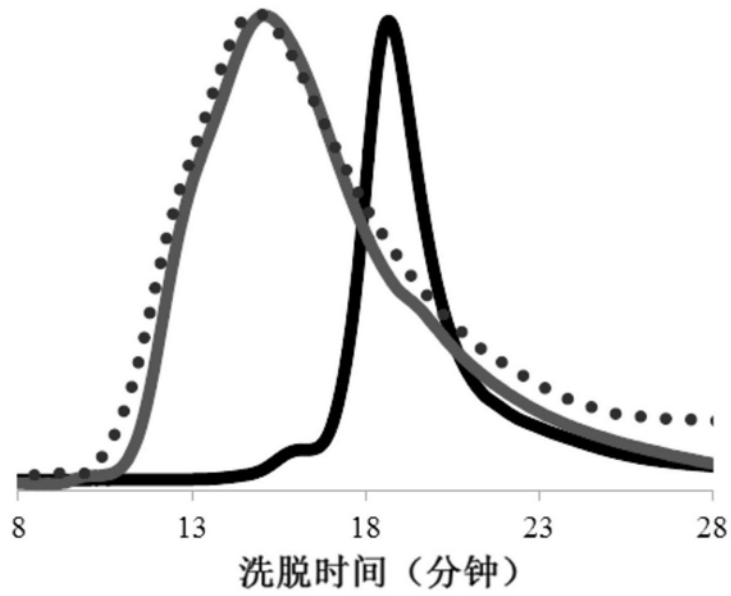


图27

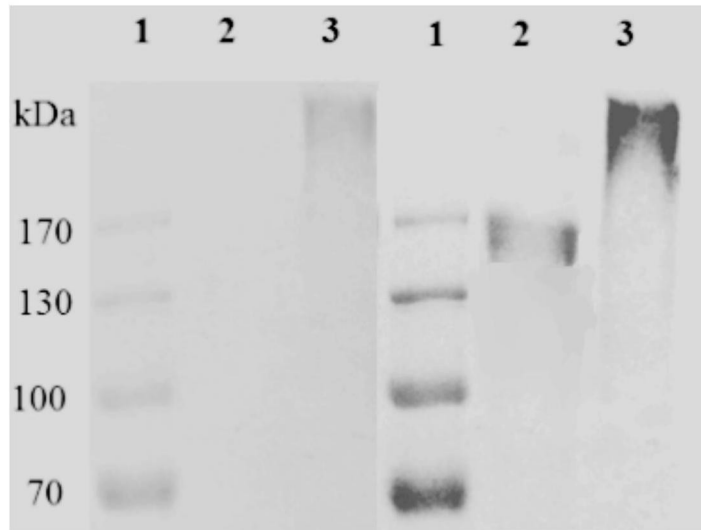


图28

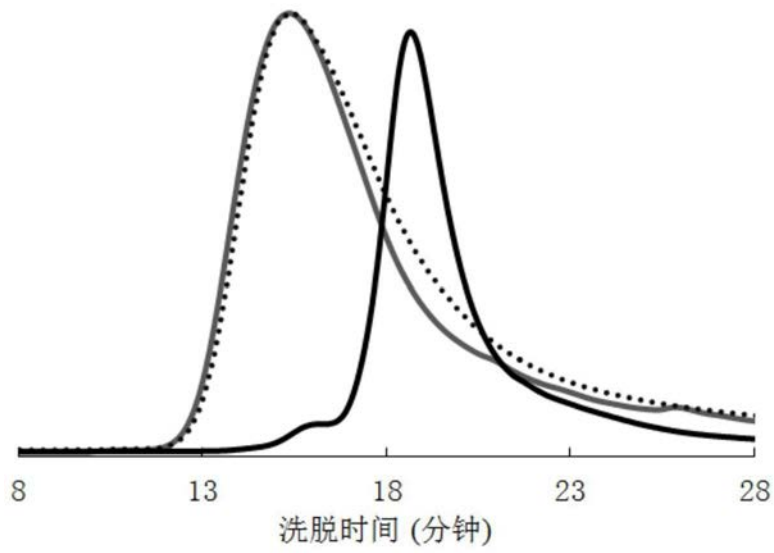


图29

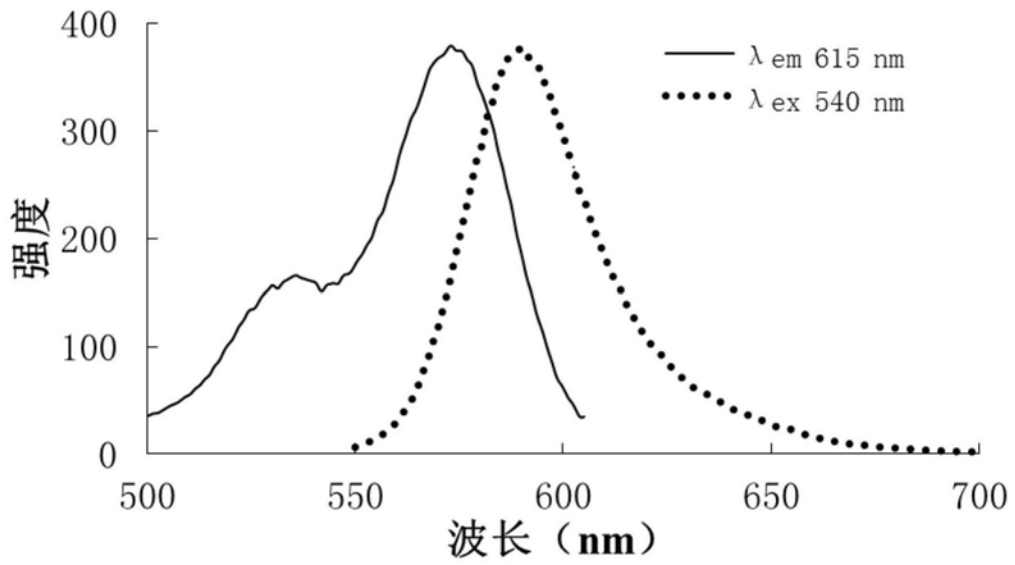


图30

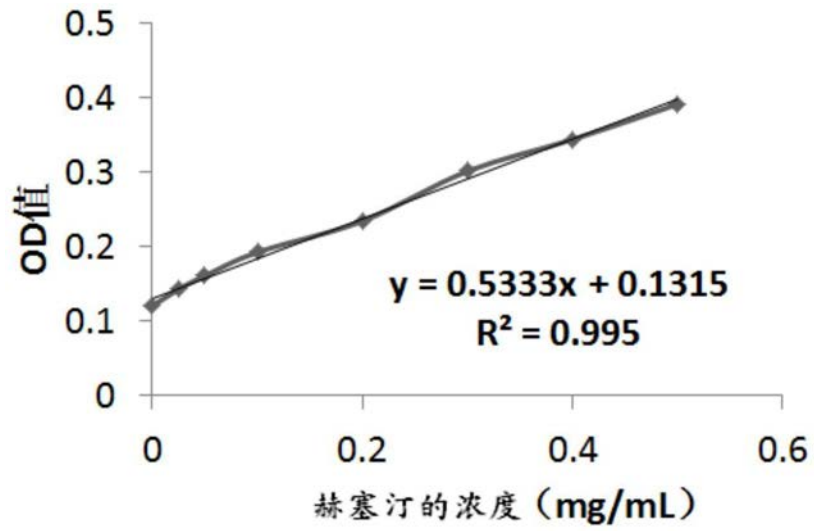


图31

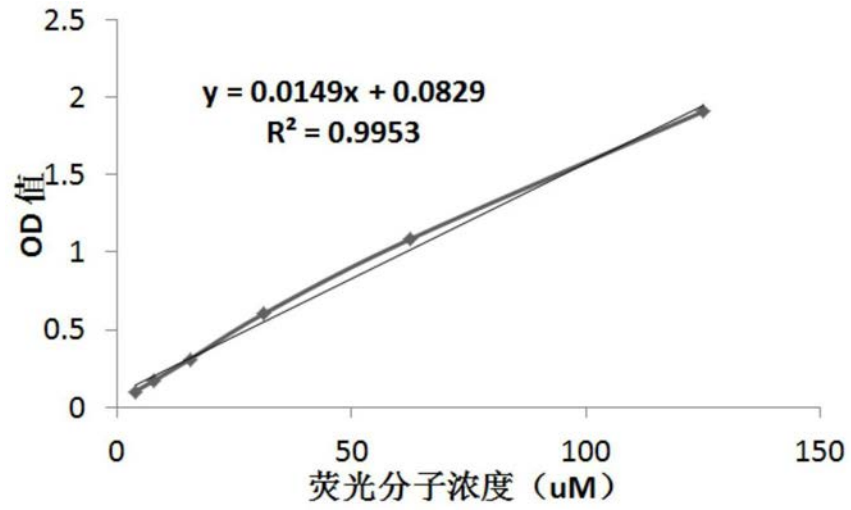


图32

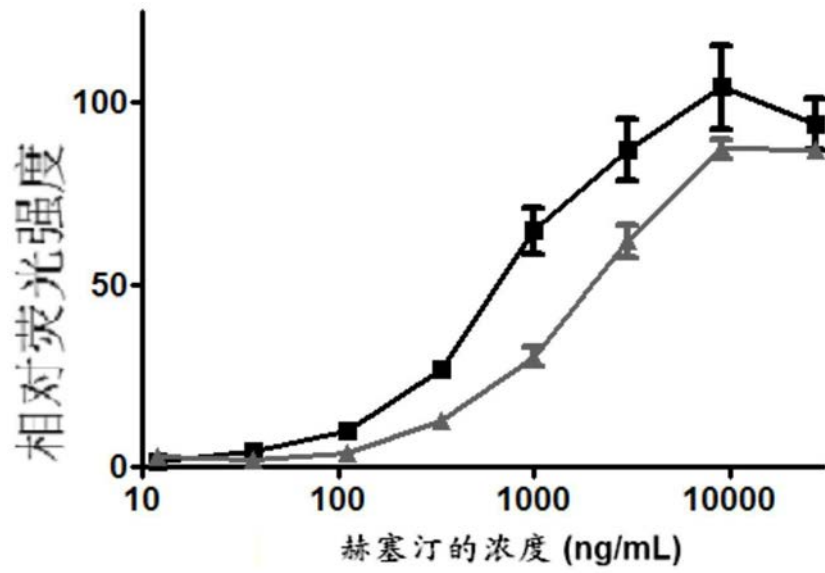


图33

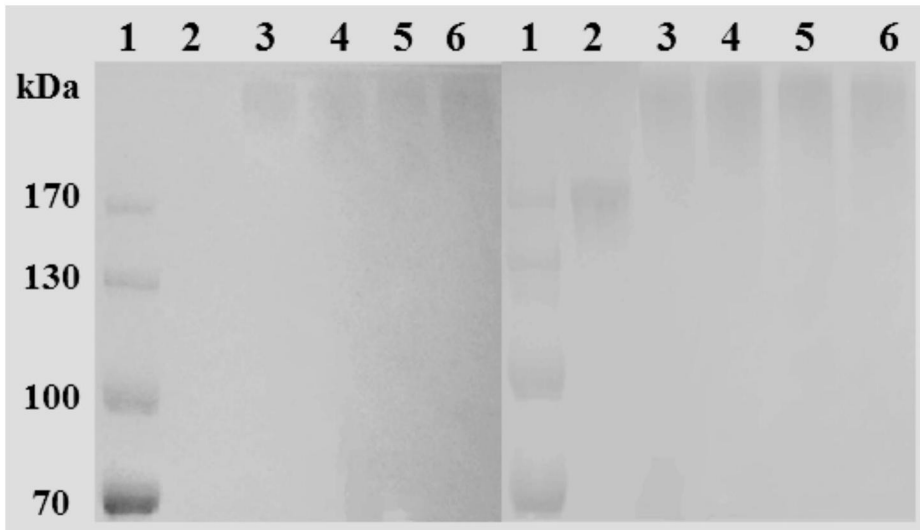


图34

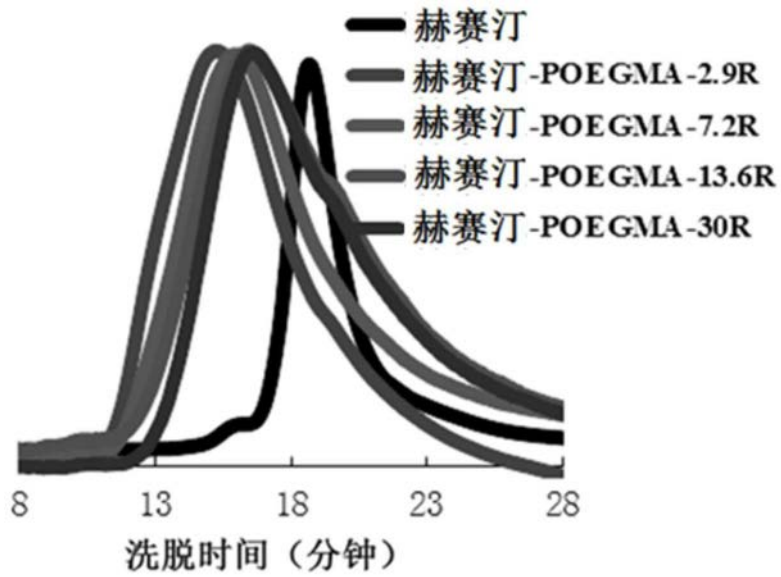


图35

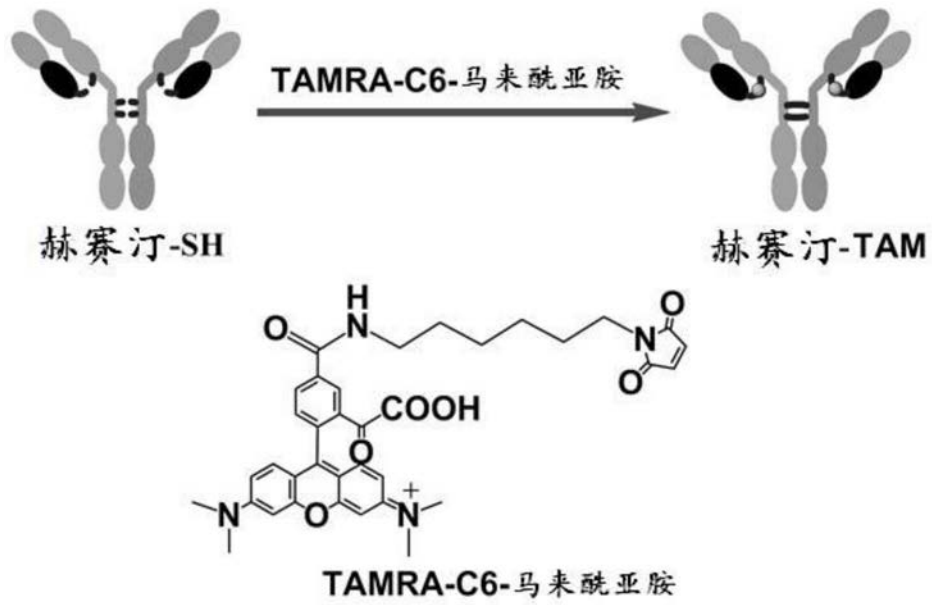


图36

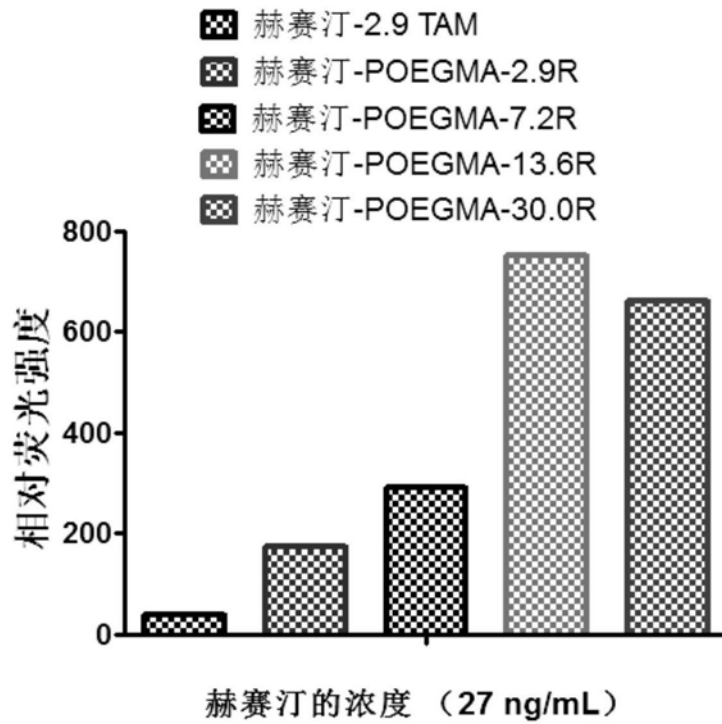


图37

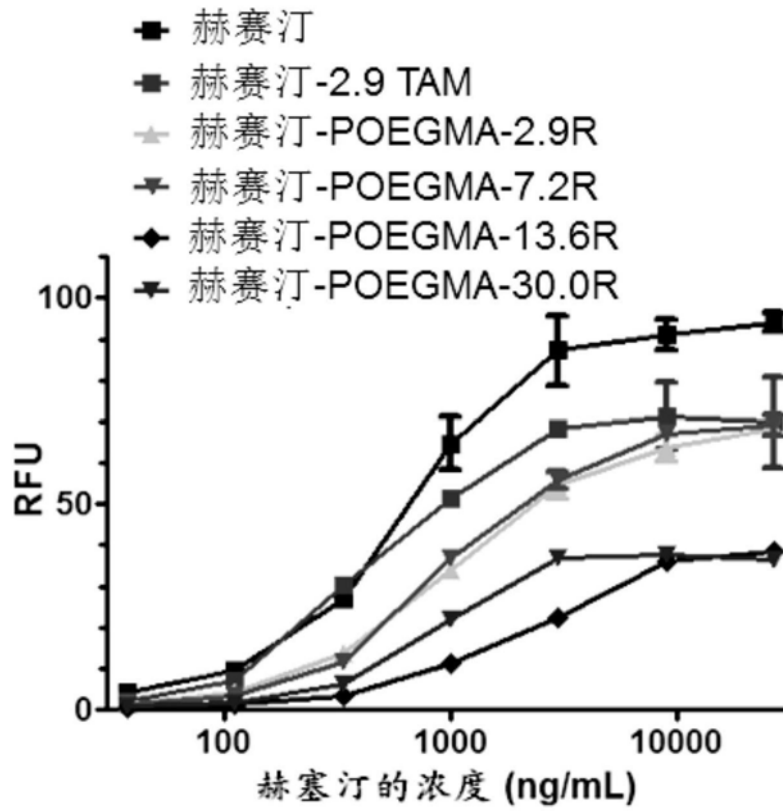


图38

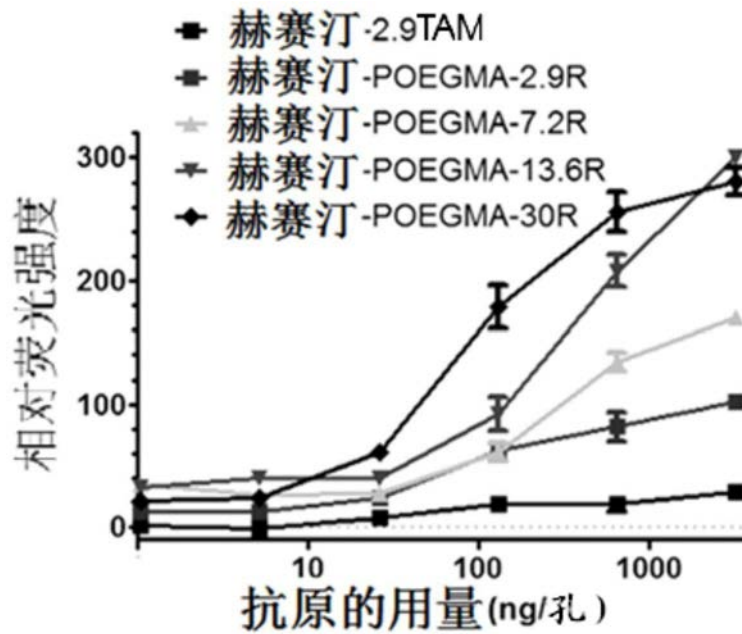


图39

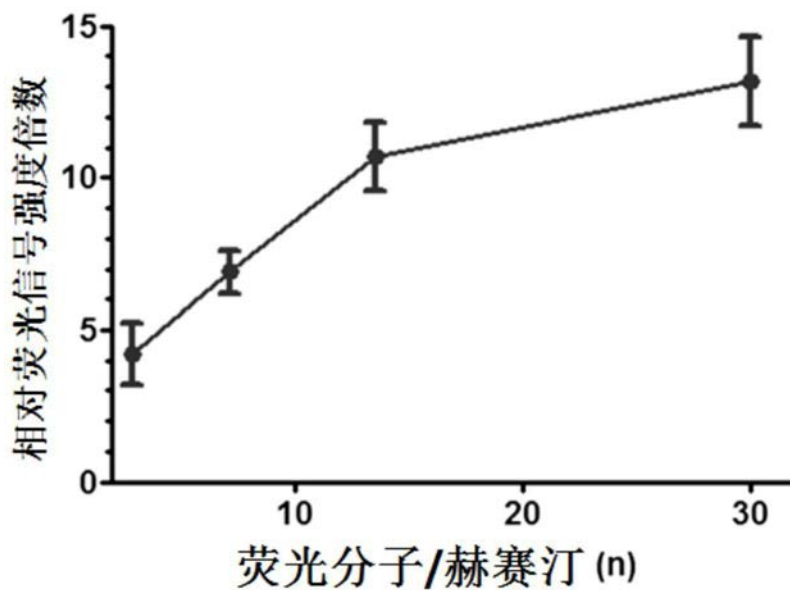


图40

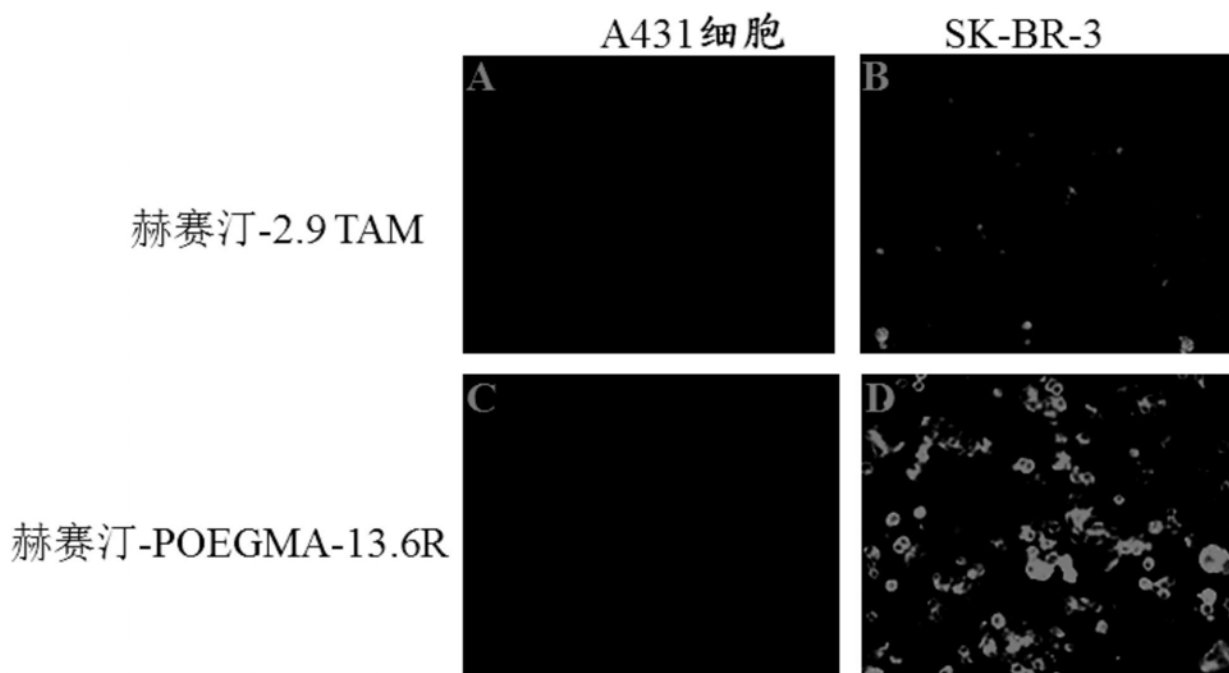


图41

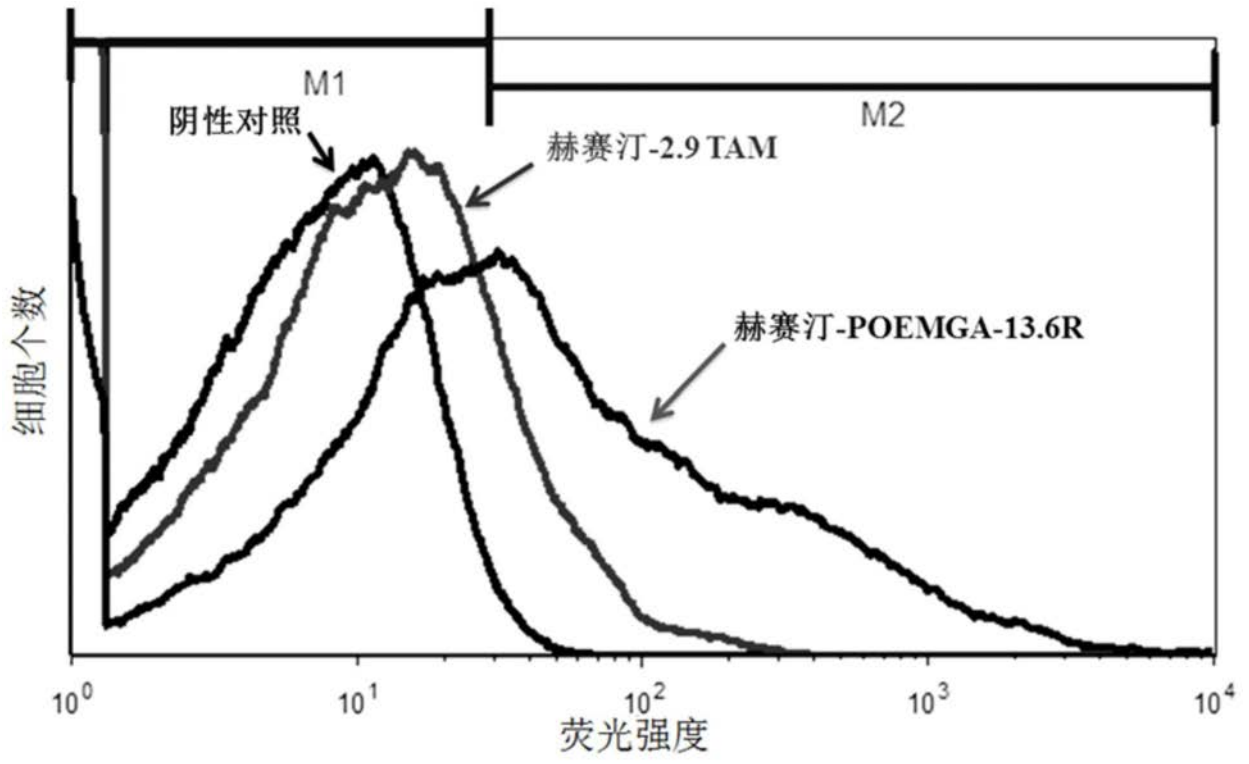


图42

专利名称(译)	抗体-高分子结合体、其荧光衍生物及它们的制备方法		
公开(公告)号	CN104288777B	公开(公告)日	2018-05-29
申请号	CN201410480011.4	申请日	2014-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	高卫平 张立彬		
发明人	高卫平 张立彬		
IPC分类号	A61K47/68 A61K39/395 A61K49/00 C08F120/28 C08F220/28 C08F220/36 C09K11/06 G01N21/64 G01N33/531		
CPC分类号	C09B11/24 A61K47/60 A61K49/0058 C07K16/32 C08F220/28 C09B69/103 C09K11/06 G01N21/6428 G01N33/52 G01N2021/6439		
其他公开文献	CN104288777A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

抗体-高分子结合体、其荧光衍生物及它们的制备方法。所述抗体包含至少一个二硫键或自由的巯基，所述高分子通过连接到所述抗体的二硫键或自由的巯基而结合到所述抗体上。所述方法通过在抗体的特定位点进行修饰并原位生长高分子及其荧光衍生物；或者预先制备了高分子及其荧光衍生物，再与抗体的特定位点偶联制备抗体-高分子结合体及其荧光衍生物。本发明的方法简便高效，并且所制备产物不仅保留抗体原有的生物活性而且提高抗体的水溶性、稳定性、药代动力学、生物分布和治疗功效，并降低其免疫原性，此外本发明制备抗体-高分子荧光衍生物与传统方法制备的抗体-荧光标记物相比，具有更强的荧光信号和检测信号强度。

