



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102008732 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 24

(21) 申请号 201010534357. X

(22) 申请日 2010. 11. 08

(73) 专利权人 武汉华耀生物医药有限公司

地址 430072 湖北省武汉市东湖开发区关东
科技工业园七地块 7-5 栋 5198-4 室

(72) 发明人 刘颖 其他发明人请求不公开姓名

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 徐飞虎 徐关寿

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 47/42 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2002/0192157 A1, 2002. 12. 19, 说明书第
3-61 段.

US 2002/0192157 A1, 2002. 12. 19, 说明书第
3-61 段.

zhaowu zhang, et al. Conjugating
folic acid to gold nanoparticles through
glutathione for targeting and detecting
cancer cells. 《Bioorganic & Medicinal
Chemistry》. 2010, 第 18 卷 (第 15 期), 第
5528-5534 页.

项静英等. 叶酸偶联人血清清蛋白
(folate-HSA) 的制备. 《中国医药导报》. 2009,
第 6 卷 (第 28 期), 第 15-16 页.

项静英等. 叶酸偶联人血清清蛋白
(folate-HSA) 的制备. 《中国医药导报》. 2009,
第 6 卷 (第 28 期), 第 15-16 页.

zhaowu zhang, et al. Conjugating
folic acid to gold nanoparticles through
glutathione for targeting and detecting
cancer cells. 《Bioorganic & Medicinal
Chemistry》. 2010, 第 18 卷 (第 15 期), 第
5528-5534 页.

审查员 张慧艳

权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 1 页

(54) 发明名称

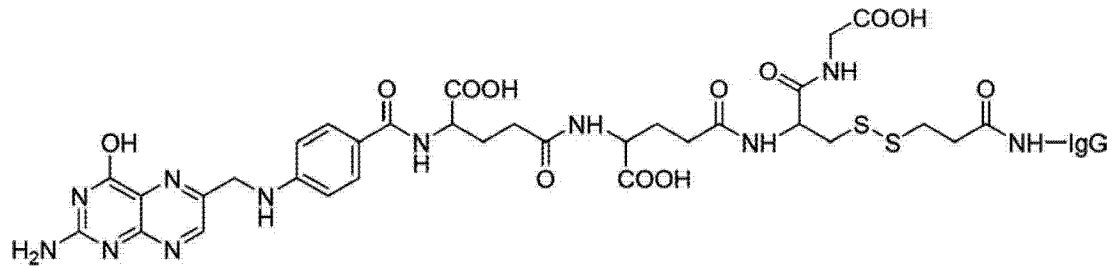
一种叶酸偶联抗体药物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种 FOLATE-GSH-IgG 偶联物、
其制备方法以及其在治疗肿瘤及自身免疫性疾
病中的应用。FOLATE 意指叶酸 (Folate) 或其类
似物, 将 FOLATE 与谷胱甘肽 (GSH) 通过酰胺键
生成 FOLATE-GSH; 同时, 对 IgG 末端的氨基进行
活化, 或通过将 IgG 还原处理为半抗体或重链抗
体, 这两种活化的 IgG 与 FOLATE-GSH 偶联后形成
FOLATE-GSH-IgG。所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物
在叶酸受体高表达类型的癌症患者或自身免疫性
疾病患者体内, 能特异性地与疾病细胞表面高表
达的叶酸受体结合, 然后通过 IgG 激活抗体或补
体系统介导细胞毒作用, 并增强生物应答调节, 而
对于叶酸受体几乎无表达的正常细胞并不会产生
细胞毒作用。这一发明提高了抗体药物和免疫增
强剂的靶向性, 解决了现有技术中癌症和自身免
疫性疾病治疗药物对正常细胞的损害问题。

CN 102008732 B

1. 一种 FOLATE-GSH-IgG 偶联物,其结构如下式所示:

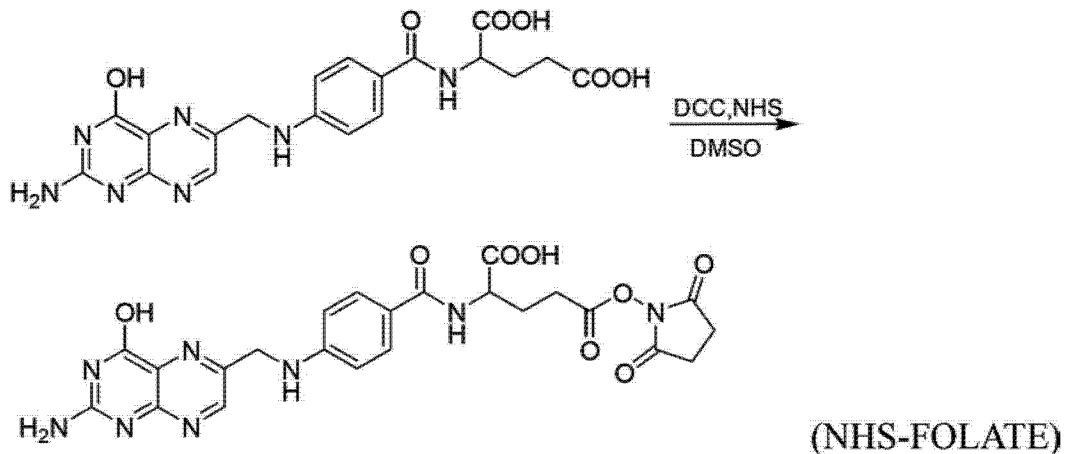


式中 IgG 代表动物来源的 IgG、人源 IgG 或重组人源 IgG。

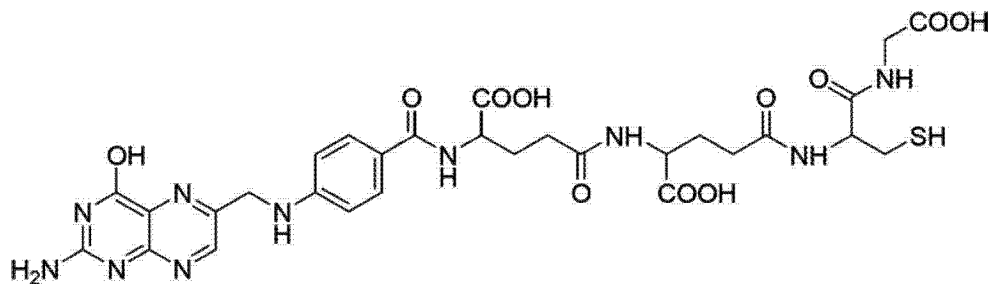
2. 根据权利要求 1 所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物,其特征在于,所述的 IgG 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

3. 权利要求 1 所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物的制备方法,包括如下步骤:

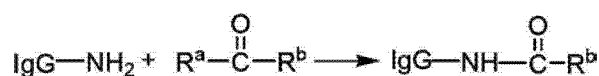
(1)、将 FOLATE 与羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS) 反应生成活化的 NHS-FOLATE;所述的 FOLATE 为叶酸,反应条件为将叶酸溶于二甲基亚砜(DMSO),与 0.5 ~ 2 倍摩尔量的二环己基碳二亚胺(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)及羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS) 反应 2 ~ 5 小时,反应副产物为不溶物,离心或过滤弃之,溶液中即为 NHS 活化的叶酸(NHS-叶酸),其反应式如下所示:



(2)、将 NHS-FOLATE 与 GSH 反应生成 FOLATE-GSH,两者通过酰胺键相连;反应条件为 NHS-叶酸在氩气(Ar)环境下与等摩尔量 GSH 避光反应过夜,即制得叶酸-GSH,结构如下所示:

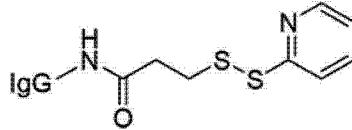


(3)、对 IgG N-末端的氨基进行活化,反应式如下所示:



活化连接物具有 R^aCOR^b 的结构, R^a 为离去基团, R^b 含有与 GSH 分子中游离巯基反应的基团,所述的活化连接物选自 SPDP(N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithiol)propionate),

反应后形成具有如下式所表征的 IgG 氨基端活化产物：



反应条件为将 IgG 溶于合适的溶液中,使其终浓度为 0.05 ~ 1mmol/L,与 10 ~ 30 倍摩尔量的活化连接物室温下反应 0.5 ~ 1 小时或 4℃ 反应 1 ~ 3 小时,即得到活化的 IgG ;

(4)、将 IgG 氨基端的活化产物与 FOLATE-GSH 偶联后,生成最终的 FOLATE-GSH-IgG 产物,其结构如权利要求 1 所示 ;反应条件为将 FOLATE-GSH 与 1 ~ 10 倍摩尔量活化的 IgG 室温反应 2 ~ 5 小时或 4℃ 反应 15 ~ 20 小时,即得 FOLATE-GSH-IgG 偶联物。

4. 根据权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于,所述方法步骤(3)中用分子筛分离产物,得到纯度较高的活化的 IgG。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于,所述的分子筛为 PD-10。

6. 根据权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于,所述方法步骤(3)中合适的溶液选自超纯水、DMSO 或 DMF。

7. 根据权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于,所述方法步骤(4) 中将产物过分子筛,收集产物即为纯化的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物。

8. 根据权利要求 3-7 任一项所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1) - (4) 中,步骤(3) 在步骤(1) 和(2) 之前或与其同步进行。

9. 一种药物组合物,其包含有效剂量的权利要求 1 所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物和药学上可接受的载体或辅料。

10. 根据权利要求 9 所述的药物组合物,其为冻干粉针或注射液。

11. 权利要求 1 所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在制备治疗肿瘤细胞叶酸受体高表达类型肿瘤药物中的用途,所述的肿瘤细胞叶酸受体高表达类型肿瘤为白血病、宫颈癌、乳腺癌、结肠癌或肝癌。

12. 根据权利要求 11 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物经注射途径给药。

13. 根据权利要求 12 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物经静脉、肌肉或皮下注射给药。

14. 根据权利要求 11 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物的人体治疗给药剂量按体重计为 1mg ~ 4g/kg。

15. 根据权利要求 14 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物的人体治疗给药剂量按体重计为 5mg ~ 100mg/kg。

16. 权利要求 1 所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在制备治疗叶酸受体高表达类型自身免疫性疾病药物中的用途,所述的叶酸受体高表达类型自身免疫性疾病为类风湿性关节炎、炎症性肠病、银屑病或红斑狼疮。

17. 根据权利要求 16 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物经注射途径给药。

18. 根据权利要求 17 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物经静脉、肌肉或皮下注射给药。

19. 根据权利要求 16 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物的人体治疗给药剂量按体重计为 1mg ~ 4g/kg。

20. 根据权利要求 19 所述的用途,其特征在于,所述的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物的人体治疗给药剂量按体重计为 5mg ~ 100mg/kg。

一种叶酸偶联抗体药物及其制备方法与应用

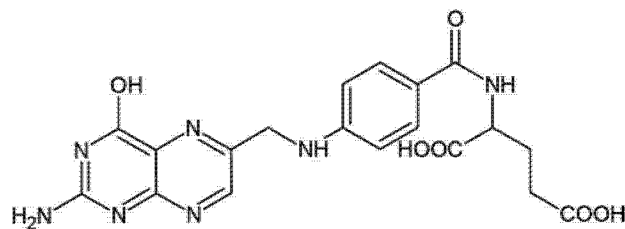
技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体的说,涉及一种叶酸偶联抗体药物(FOLATE-GSH-IgG 偶联物)、其制备方法以及其在治疗肿瘤及自身免疫性疾病中的应用。

背景技术

[0002] 叶酸(Folate)是 1941 年由米切尔(H. K. Mitchell)从菠菜中提取纯化的,由喋啶,对氨基苯甲酸和谷氨酸残基组成的一种水溶性 B 族维生素,其分子式为 $C_{19}H_{19}N_7O_6$,化学结构式如下所示:

[0003]



[0004] 叶酸是人体必需的一种物质,具有促进骨髓中幼细胞成熟的作用,如果缺少叶酸可导致红血球的异常未成熟细胞的增加及白血球减少。最新的研究表明叶酸可能会引发癌细胞的凋亡,对癌细胞的基因表达有一定影响,具有一定的抗癌作用。其最重要的原因在于叶酸在体内能与叶酸受体结合,叶酸受体(FR)分为 α 和 β 亚型,研究表明在 90% 的卵巢癌、晚期乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌、肺癌、脉络膜癌、室管膜细胞瘤中出现高表达的 FR- α ;在恶性增殖的白细胞(白血病)表面及类风湿关节炎等自身免疫性疾病患者体内激活的巨噬细胞表面有高表达的 FR- β ,而叶酸受体在正常组织中几乎不表达。因此叶酸和叶酸受体在靶向治疗技术中具有很好的研究前景,尤其是在肿瘤和自身免疫性疾病的治疗方面(Hilgenbrink, A. and P. Low(2005). " Folate receptor mediated drug targeting:From therapeutics to diagnostics." Journal of Pharmaceutical Sciences 94(10):2135-2146;Lu, Y. and P. Low(2002). " Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents." Advanced Drug Delivery Reviews 54(5):675-693. ;Leamon, C. and P. Low(2001). " Folate-mediated targeting:from diagnostics to drug and gene delivery." Drug Discovery Today 6(1):44-51. ;Lu, Y. and P. Low(2003). " Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors:review of recent advances and future prospects." Journal of Controlled Release 91(1-2):17-29.)。

[0005] 一、癌症治疗的现有技术

[0006] 国际卫生组织(WHO)指出在 2010 年癌症将超过心脏病成为世界第一大杀手,与 1990 年相比,全球癌症患者的发病率增长了 19%,死亡率增长了 18%,预计 2020 年全世界癌症发病率将增加 50%,全球每年新增癌症患者人数将达到 1500 万人。目前全世界发病率最高的癌症是肺癌,每年新增患者人数为 120 万;其次是乳腺癌,每年新增大约 100 万患者;

随后依次是肠癌(94万人)、胃癌(87万人)、肝癌(56万人)、子宫颈癌(47万人)、食道癌(41万人)等。此外,美国、意大利、澳大利亚、德国、荷兰、加拿大和法国等发达国家癌症发病率较高,北非、南亚及东亚一些发展中国家的发病率则较低,而发病率也呈逐年上升的趋势,严重威胁到了人类的正常生活。

[0007] 现在治疗癌症的代表性方法包括外科疗法、放射线疗法、化学疗法、免疫疗法及,以上治疗方法常常联合应用对抗癌症,其中化疗药物不可避免的副作用使得新的化疗药物的开发显得尤为必要。近来,基于单克隆抗体的靶标治疗药物受到肿瘤患者的青睐,如 Herceptin™、Avastin™ 和 Rituxan™,与常规化疗药物相比,其最大的优势在于高效、低毒(Adams,G. and L.Weiner(2005). " Monoclonal antibody therapy of cancer. " Nature Biotechnology 23(9):1147-1157;Reichert, J. and V. Valge-Archer(2007). " Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. " Nature Reviews Drug Discovery 6(5):349-356.),据统计,其市场已达到 120 亿美元/年。但此类药物开发至临床投入巨大且市场价格昂贵,另外,仍有诸如生产质量控制要求高、临床使用时易引发超敏反应、靶向性不高的弊端(Kuus-Reichel, K., L. Grauer, et al.(1994). " Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? " Clinical and Vaccine Immunology 1(4):365;Ito, T., T.Griffin, et al.(1992). " Intratumoral and whole-body distributions of C110 anti-carcinoembryonic antigen radioimmunotoxin after intraperitoneal and intravenous injection:a quantitative autoradiographic study. " Cancer Research 52(7):1961.)。

[0008] 二、自身免疫性疾病治疗的现有技术

[0009] 自身免疫性疾病(Autoimmune diseases)是指对正常机体组成成分的抗体或有免疫功能的细胞,致使机体发生器质性或功能性的障碍而引起的疾病。同时,从临床来看,自身免疫性疾病可能出现以下特征:

[0010] (1) 血浆 γ -球蛋白在 1.5% 以上。

[0011] (2) 检出病变脏器的自身抗体。

[0012] (3) 见到变性的 γ -球蛋白或其相应的抗原等沉积在肾小球等部位。

[0013] (4) 在病变组织见有大量淋巴细胞和浆细胞浸润。

[0014] (5) 应用肾上腺皮质激素能够得到一度或持续的良好效果。

[0015] (6) 见到一种以上的自身免疫性损害和症状。

[0016] (7) 检出能在常温下对病变脏器发生反应的自身抗体。

[0017] (8) 检出的抗体能特异性的作用于相应的自身抗原。

[0018] (9) 用同样的抗原在实验动物中能产生相应的抗体。

[0019] (10) 实验动物的病变与临床病例相类似。

[0020] (11) 通过含抗体的血清,或用免疫学的方法所激活的淋巴活性细胞,可引起类似的疾病。

[0021] 以上标准,提示了自身抗体对病变部位的侵袭,仅仅是临床标准,没有涉及其病因的作用。

[0022] 自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎症性肠病、银屑病等:

[0023] (1) 炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD) 主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC) 和克隆氏病(Crohn's disease, CD) 两种。第十届欧洲胃肠病学年会上, 欧洲克隆氏病与炎性肠病联合会主席 Rod Mitchell 指出, 目前在欧洲有 100 万 IBD 患者, 在西方国家大部分地区溃疡性结肠炎发病率稳定, 最高到 10 例 / 10 万人口 (Qin, O. Y., Tandon, R., et al. (2006). "Management consensus of inflammatory bowel disease for the Asia-Pacific region." Journal of Gastroenterology and Hepatology 21, 1772-1782.)。而克隆氏病的发病率在过去 30 年升高了 600%, 我国发病率也呈明显的上升趋势, 此病症可导致患者发生结直肠癌的风险显著升高, 严重威胁人类的健康。尽管研究多年, 人类目前仍然无法完全治愈该病。

[0024] (2) 类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA) 是一种以慢性进行性关节滑膜病变为特征的全身性自身免疫性疾病。主要表现为进行性侵蚀性关节炎及晨僵, 部分患者可以出现发热、贫血、皮下结节和淋巴结肿大, 如不给予及时治疗, 最终会导致受累关节强直、畸形和功能丧失, 严重影响生活质量。类风湿性关节炎在全世界成人中的发病率约占 0.5% ~ 1% (Paulos, C., M. Turk, et al. (2004). "Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis." Advanced Drug Delivery Reviews 56(8):1205-1217.), 并随着年龄的增长而增高, 35 岁以下成人的发病率约 0.3%, 而 65 岁以上者发病率超过 10%。我国按照美国风湿病学诊断标准对人群普查, 调查结果显示, 成人患病率为 0.32% ~ 0.4%, 按此数字估计, 我国有类风湿性关节炎患者约 400 万左右。

[0025] (3) 红斑狼疮(lupus erythematosus, LE) 是一种自身免疫性疾病, 发病缓慢, 隐袭发生, 临床表现多样、变化多端, 分为盘状红斑狼疮(DLE), 系统性红斑狼疮(SLE)、亚急性皮肤型红斑狼疮、深部红斑狼疮等类型。此病能累及身体多系统、多器官, 在患者血液和器官中能找到多种自身抗体。

[0026] (4) 银屑病是一种有特征鳞屑性红斑的复发性、慢性皮肤病, 可能与遗传、感染、代谢障碍、内分泌影响、神经精神因素和免疫异常等有关。临床表现以皮肤上出现丘疹及斑块, 上覆以银白色鳞屑为主。因其皮损厚硬, 状如牛皮, 所以又有“牛皮癣”的俗称; 因其鳞屑层层脱落, 就象粗的松树皮, 故中医学称之为“松皮癣”。银屑病在临床上四种类型: 寻常型、脓疱型、关节病型和红皮病型, 本病在自然人群中的发病率为 0.1%-3%, 根据全国银屑病流行病学调查显示, 我国银屑病平均患病率为 0.167%。其病因和发病机理至今仍不清楚, 其治疗目前大多只能达到近期效果。

[0027] 治疗自身免疫性疾病的常用药物包括:

[0028] (1) 非甾体类抗炎药(NSAIDs): 如水杨酸制剂、吲哚美辛、丙酸衍生物、灭酸类药物等, 用于初发或轻症病例, 其作用机理主要抑制环氧化酶使前列腺素生成受抑制而起作用, 以达到消炎止痛的效果, 但不能阻止类风湿性关节炎病变的自然过程。本类药物因体内代谢途径不同, 彼此间可发生相互作用不主张联合应用。

[0029] (2) 金制剂: 常用硫代苹果酸金钠, 金制剂用药愈早, 效果愈著。金制剂的作用慢, 3 ~ 6 个月始见效, 不宜与免疫抑制剂或细胞毒药物并用。口服金制剂效果与金注射剂相似。副作用有大便次数增多, 皮疹, 口腔炎等, 但停药后有复发可能。

[0030] (3) 青霉胺: 能选择性抑制某些免疫细胞使 IgG 及 IgM 减少。副作用有血小板减

少,白细胞减少,蛋白尿,过敏性皮疹,食欲不振,视神经炎,肌无力,转氨酶增高等。(4) 氯喹:可作为水杨酸制剂或递减皮质类固醇剂量时的辅助药物。疗程中常有较多胃肠道反应如恶心、呕吐和食欲减退等。长期应用会发生视网膜的退行性变和视神经萎缩等。

[0031] (5)左旋咪唑:可减轻疼痛、缩短关节僵硬的时间。副作用有眩晕、恶心、过敏性皮疹、视力减退、嗜睡、粒细胞减少、血小板减少、肝功能损害、蛋白尿等。

[0032] (6)免疫抑制剂:适用在其它药物无效的严重类风湿性关节炎患者,副作用有骨髓抑制、白细胞及血小板下降,肝脏毒性损害及消化道反应、脱发、闭经、出血性膀胱炎等。

[0033] (7)肾上腺皮质激素:肾上腺皮质激素对关节肿痛,控制炎症,消炎止痛作用迅速,但效果不持久,对病因和发病机理毫无影响。一旦停药短期可即复发。对 RF、血沉和贫血也无改善,长期应用将导致严重副作用。

[0034] 虽然现在已有很多药物与治疗手段共同开展用于治疗癌症,但高昂的治疗费用、治疗的无效性或是其令人生畏的毒副作用,让患者痛苦不堪。另一方面,免疫性疾病,其病程绵长反复,现今阶段没有特效治疗药物,许多患者自患病以来终身难以康复。

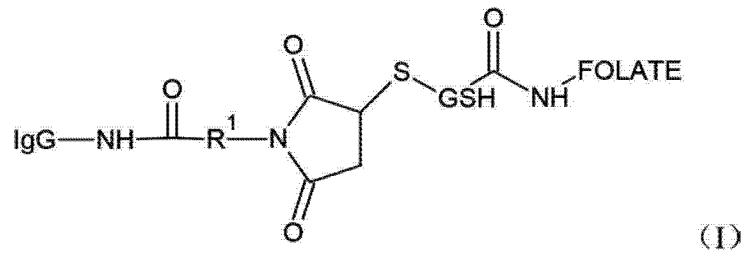
[0035] 如前所述,多种肿瘤细胞表面具有高表达的 FR- α ;在恶性增殖的白细胞(白血病)表面及类风湿关节炎等自身免疫性疾病患者体内激活的巨噬细胞表面有高表达的 FR- β ,而叶酸受体在正常组织中表达非常保守。因此,国际上已经在尝试利用叶酸-放射性核显像剂偶联物,如叶酸与 ^{125}I 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 的偶联物能非侵入性的探测人体高表达叶酸受体的肿瘤组织。同时,目前国际上已广泛就叶酸-蛋白毒素、叶酸-小分子化疗药物、叶酸-脂质体(脂质体内包化疗药物或基因药物)及叶酸-免疫治疗剂等展开了深入研究(相关文献可参考 Hilgenbrink, A. and P. Low (2005). " Folate receptor mediated drug targeting:From therapeutics to diagnostics." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(10):2135-2146. ;Lee, R. and L. Huang(1999).Lipidic vector for nucleic acid delivery, Google Patents. Pan, X., H. Wang, et al. (2002). " Boron-containing folate receptor-targeted liposomes as potential delivery agents for neutron capture therapy. " *Bioconjugate Chem* 13(3):435-442. ;Li, H., Y. Lu, et al. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, 21 (5):961-968 ;Armstrong, D., A. Bicher, et al. (2008).Exploratory phase II efficacy study of MORAb-003, a monoclonal antibody against folate receptor alpha, in platinum-sensitive ovarian cancer in first relapse ;Hassan, R., W. Ebel, et al. (2007). " Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin. " *Cancer Immunol*, 7:20)。

发明内容

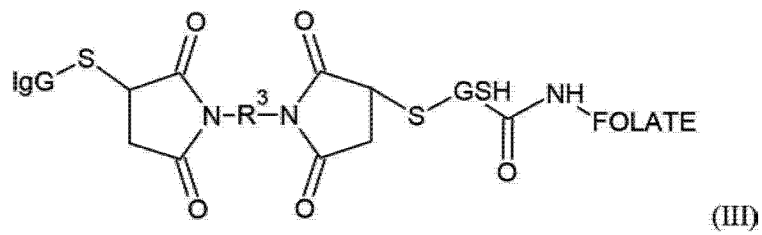
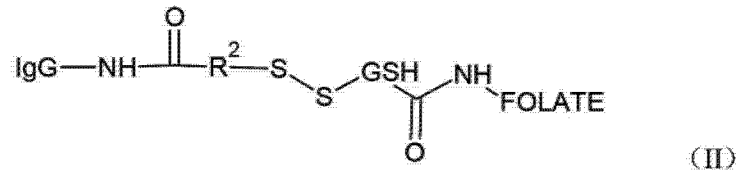
[0036] 针对现有技术的缺陷,本申请的发明人提供了一种高效的叶酸偶联抗体药物(FOLATE-GSH-IgG 偶联物),其制备方法以及其在制备治疗肿瘤药物和治疗自身免疫性疾病药物中的应用。

[0037] 本发明的第一个目的是提供了一种高效的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物,该偶联物的特征在于通过 GSH 将活化的 FOLATE 与 IgG 连接起来,其结构如式(I)、(II)或(III)所示:

[0038]



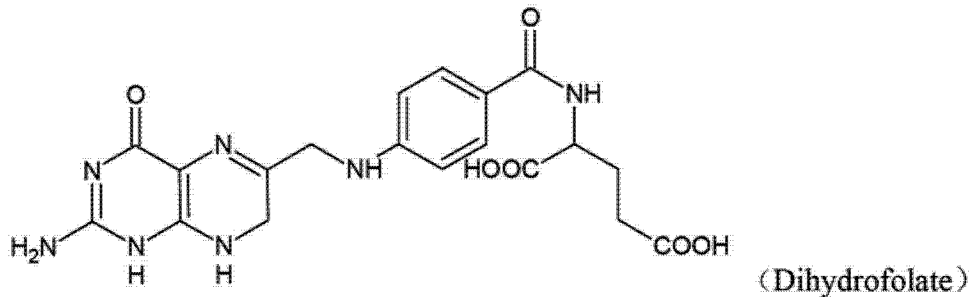
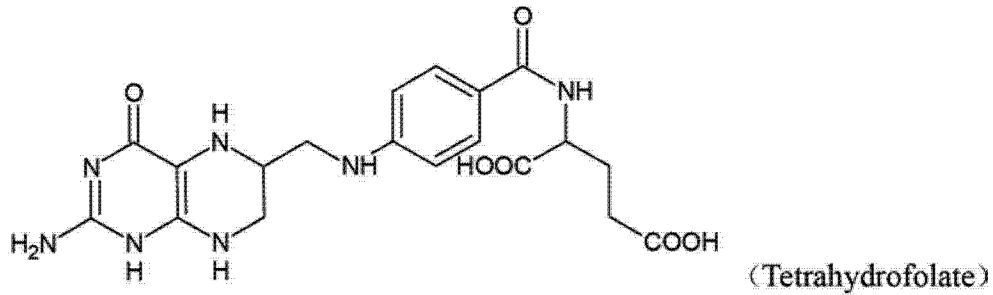
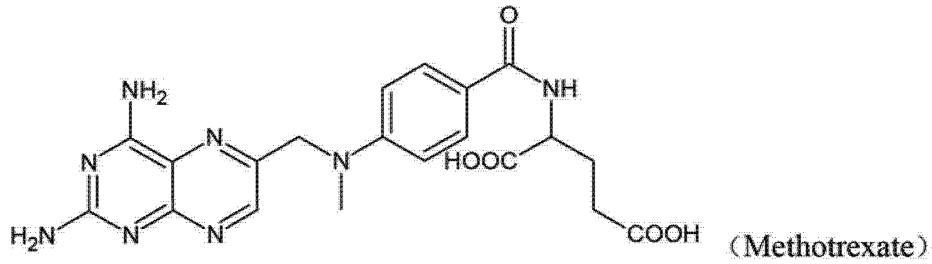
[0039]



[0040] 其中：

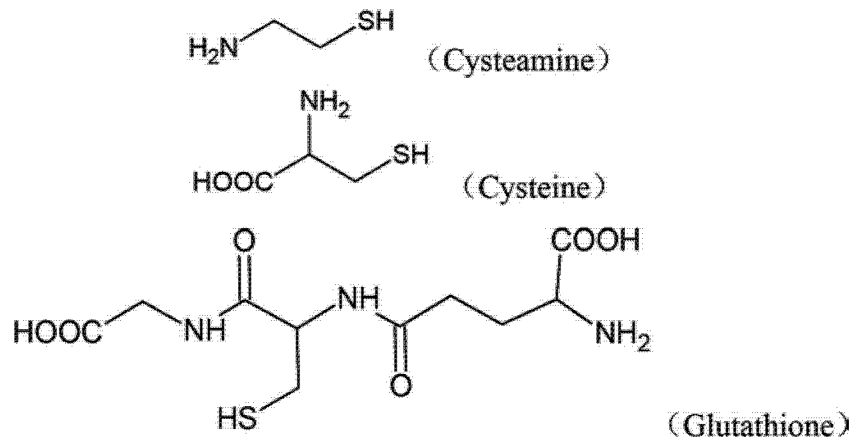
[0041] FOLATE 表征叶酸(Folate) 或叶酸类似物, 如 Methotrexate、Tetrahydrofolate、Dihydrofolate 等, 结构式如下所示：

[0042]



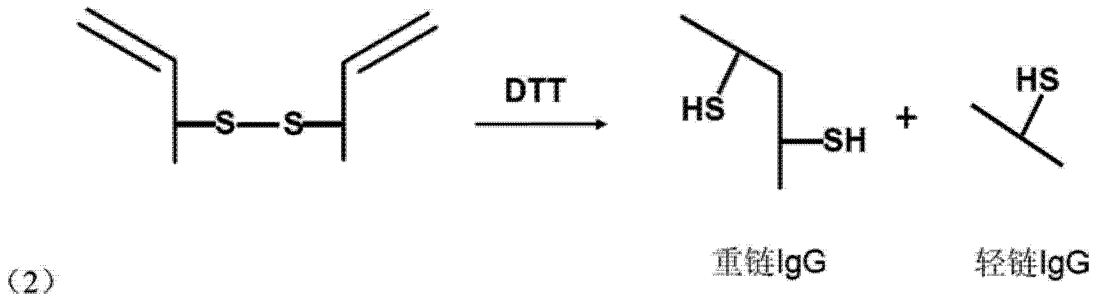
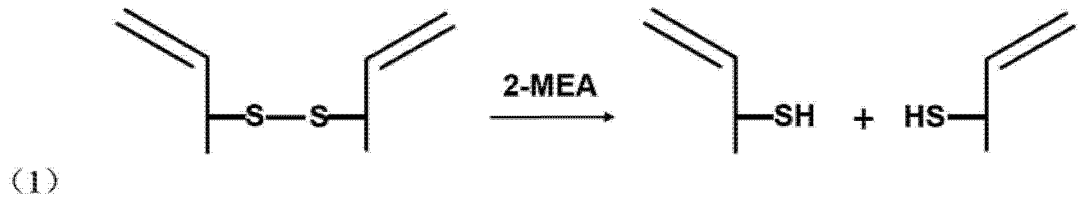
[0043] GSH 表征谷胱甘肽 (Glutathione) 或具有游离的巯基 (-SH) 及氨基 (-NH₂) 的化合物, 如 Cysteamine, Cysteine 等, 谷胱甘肽的分子式为 C₁₀H₁₇N₃O₆S, 其化学结构如下所示:

[0044]



[0045] 式(I)和式(II)中 IgG 代表动物来源的 IgG、人源 IgG、重组人源 IgG 或上述 IgG 的 Fc 段, 也可以是经还原得到的 IgG 半抗体或重链; 式(III)中 IgG 代表具有反应活性巯基 (-SH) 的动物来源的 IgG、人源 IgG 或重组人源 IgG 的半抗体或 IgG 重链。IgG 包括四个亚型: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, 本发明可选用这四个亚型中的任意一个。其中, IgG 以弱还原剂, 如 2-Mercaptoethylamine · HCl (2-MEA), 可还原为 IgG 半抗体; 以强还原剂, 如 1,4-Dithiothreitol (DTT), 可还原为 IgG 重链。其反应式如下所示:

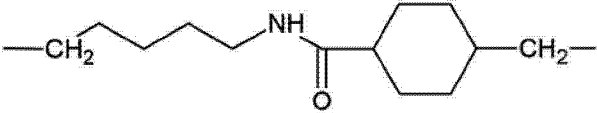
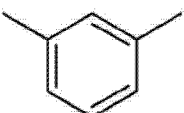
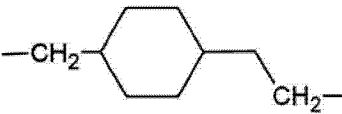
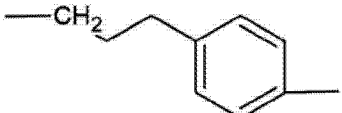
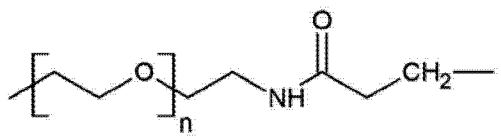
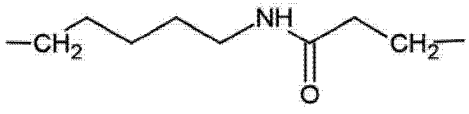

[0046]



[0047] 式(I)中, R1 选自如下的基团:

[0048] 表 1 结构式(I)中 R1 所示基团

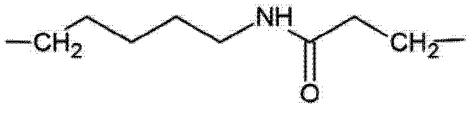
[0049]

R1 来源	结构式
AMAS	$-\text{CH}_2-$
BMPS	$-\text{CH}_2\text{CH}_2-$
EMCS、Sulfo-EMCS	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$
GMBS、Sulfo-GMBS	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$
LC-SMCC	
MBS、Sulfo-MBS	
SMCC、Sulfo-SMCC	
SMPB、Sulfo-SMPB	
SM(PEG) _n NHS-PEG-Maleimide Crosslinkers	
SMPH	
Sulfo-KMUS	

[0050] 式(II)中, R2 选自如下的基团, 如下表所示:

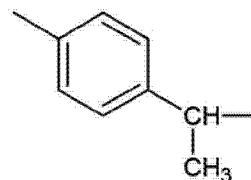
[0051] 表 2 结构式(II)中 R2 所示基团

[0052]

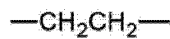
R2 来源	结构式
LC-SPDP、Sulfo-LC-SPDP	

[0053]

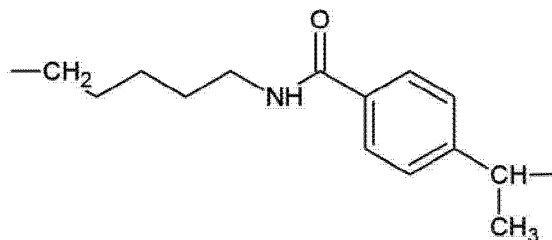
SMPT



SPDP



Sulfo-LC-SMPT



[0054] 式(III)中, R3 选自如下的基团,如下表所示:

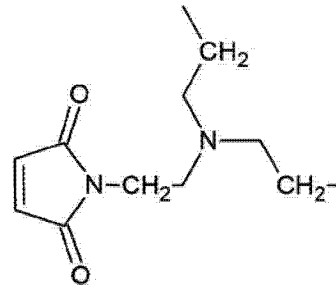
[0055] 表 3 结构式(III)中 R3 所示基团

[0056]

R3 来源	结构式
BM(PEG)2	
BM(PEG)n PEG Crosslinkers	
BMB	
BMDB	
BMH	
BMOE	
DPDPB	
DTME	

[0057]

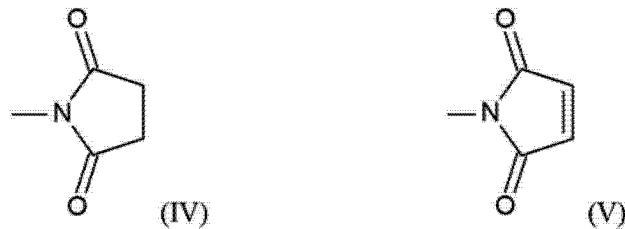
TMEA



[0058] 在形成 FOLATE-GSH-IgG 结构时, FOLATE 经由 DCC、NHS 反应活化, 并与 GSH 通过酰胺键生成 FOLATE-GSH; 同时, 对 IgG N-末端的氨基进行活化, 或通过 IgG 还原处理为半抗体或重链抗体, 这两种活化的 IgG 均可以经活化连接物与 FOLATE-GSH 偶联。

[0059] 首先, 对 IgG N-末端的氨基进行活化, 所述的活化连接物具有类似 R^aCOR^b 的结构, 其共性为羰基所连接的 R^a 为离去基团, 优选如 Succinimide, 其分子共性结构如式 (IV) 所示, R^b 含有与 GSH 分子中游离巯基反应的基团, 优选如 Maleimide, 其分子结构式如式 (V) 所示;

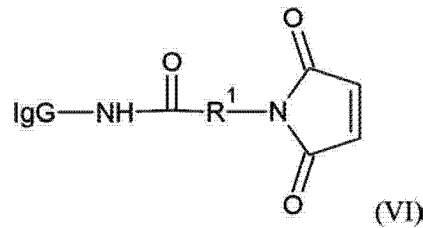
[0060]



[0061] 具体的, 所述的活化连接物选自 Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl 6-[3' (2-pyridyldithiol)-propionamido]hexanoate)、LC-SPDP (succinimidyl 6-[3' (2-pyridyldithiol)-propionamido]hexanoate)、SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithiol)propionate)、SMPT (4-Succinimidyl oxycarbonyl-methyl- α -(2-pyridyldithiol)toluene)、Sulfo-LC-SMPT (4-Sulfosuccinimidyl-6-methyl- α -(2-pyridyldithiol)toluamido]hexanoate)、Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate)、SM (PEG)_n NHS-PEG-Maleimide Crosslinkers、SMCC (Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate)、LC-SMCC (Succinimidyl 4-[N-Maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxy-[6-amidocaproate])、Sulfo-EMCS ([N- ϵ -Maleimidocaproyloxy]sulfosuccinimide ester)、EMCS ([N- ϵ -Maleimidocaproyloxy]succinimide ester)、Sulfo-GMBS (N-[γ -Maleimidobutyryloxy]sulfosuccinimide ester)、GMBS (N-[γ -Maleimidobutyryloxy]succinimide ester)、Sulfo-KMUS (N-[κ -Maleimidoundecanoyloxy]sulfosuccinimide ester)、Sulfo-MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester)、MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)、Sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrate)、SMPB (Succinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrate)、AMAS N-(α -Maleimidoacetoxy)succinimide ester)、BMPS (N-[β -Maleimidopropoxy]succinimide ester)、SMPH (Succinimidyl-6-[β -maleimidopropionamido]hexanoate) 或其他具有能与游离巯基反应的基团。

[0062] 其中, Sulfo-SMCC、SM(PEG)_n NHS-PEG-Maleimide Crosslinkers、SMCC、LC-SMCC、Sulfo-EMCS、EMCS、Sulfo-GMBS、GMBS、Sulfo-KMUS、Sulfo-MBS、MBS、Sulfo-SMPB、SMPB、AMAS、BMPS、SMPH 等与 IgG 反应后具有如结构式(VI)所表征的共性结构:

[0063]

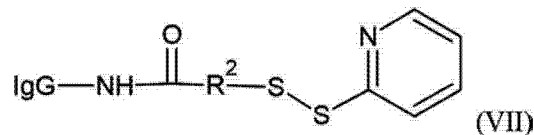


[0064] 其中 R1 代表不同的基团,如表 1 所示。

[0065] 式(VI)的 IgG 活化物与 FOLATE-GSH 反应后,生成最终的 FOLATE-GSH-IgG 产物,其结构如式(I)所示。

[0066] Sulfo-LC-SPDP、LC-SPDP、SPDP、SMPT 及 Sulfo-LC-SMPT 等与 IgG 反应后具有如结构式(VII)所表征的共性结构:

[0067]

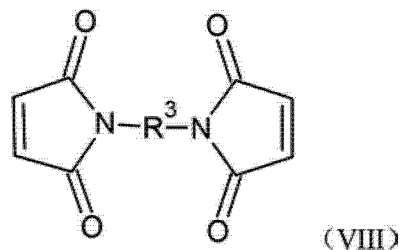


[0068] 其中 R2 代表不同的基团,如表 2 所示。

[0069] 式(VII)的 IgG 活化物与 FOLATE-GSH 反应后,生成最终的 FOLATE-GSH-IgG 产物,其结构如式(II)所示。

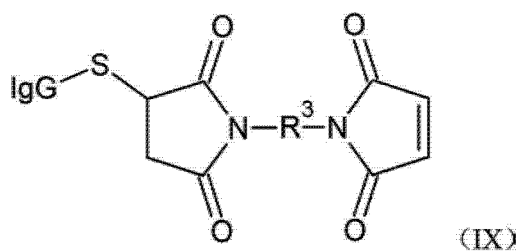
[0070] 当上述 FOLATE-GSH-IgG 结构中 IgG 为具有反应活性巯基(-SH)的 IgG 半抗体或 IgG 重链时,也可以通过巯基连接物对其进行活化,所述的巯基连接物选自 1,8-bis-Maleimidodiethyleneglycol (BM(PEG)₂)、BM(PEG)_nPEG Crosslinkers、1,4-bismaleimidobutane (BMB)、1,4bismaleimidyl-2,3-dihydroxybutane (BMDB)、bismaleimidoethane (BMH)、Bis-Maleimidoethane (BMOE)、1,4-Di-[3'-(2'-pyridyldithio)-propionamido]butane (DPDPB)、Dithio-bismaleimidoethane (DTME)、Tris[2-maleimidoethyl]amine (TMEA) 及其结构类似物,其具有式(VIII)所示的共性结构,其中 R3 代表不同的基团,如表 3 所示。

[0071]



[0072] 在形成 FOLATE-GSH-IgG 结构时,FOLATE 经由 DCC、NHS 反应活化,并与 GSH 通过酰胺键生成 FOLATE-GSH;IgG 半抗体或 IgG 重链上的游离巯基与式(VIII)反应后形成式(IX)所示的结构:

[0073]

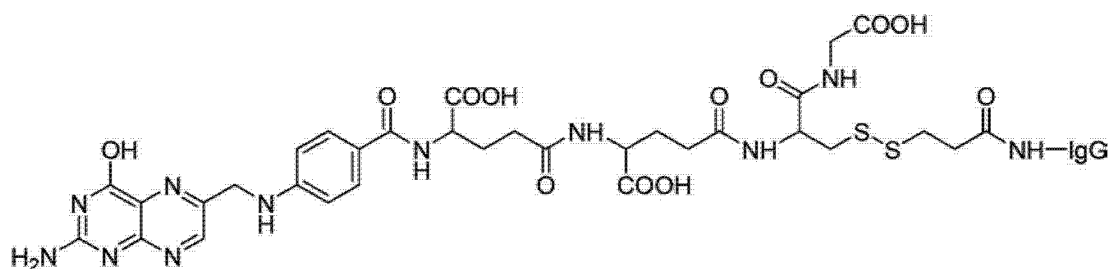


[0074] 式(IX)再与 FOLATE-GSH 反应后生成式(III)所示结构的偶联物。

[0075] 为便于本领域技术人员的理解,作为优选,发明人列出一系列具有如下化学结构式的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物:

[0076] (1) 由 SPDP 偶联叶酸-GSH 与 IgG 得到的叶酸-GSH-IgG 偶联物;

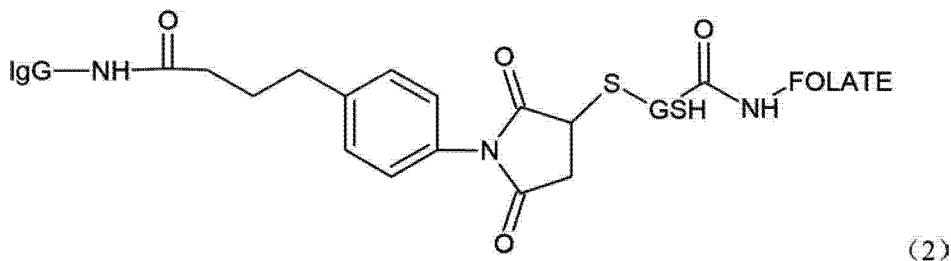
[0077]



[0078] 上述结构式简写为(后同): IgG-NH-CO-CH₂-CH₂-CH₂-S-S-GSH-NH-FOLATE (1)

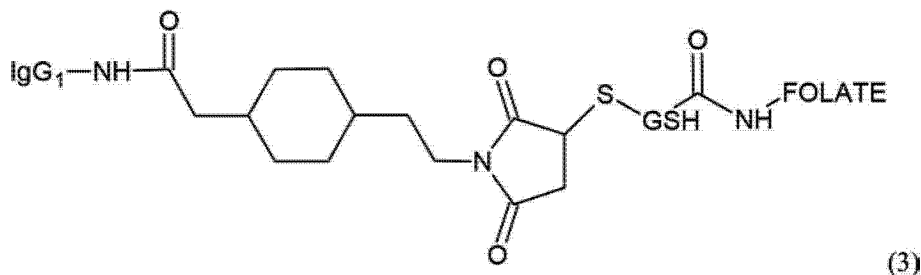
[0079] (2) 由 SMPB 偶联叶酸-GSH 与 IgG 得到的叶酸-GSH-IgG 偶联物;

[0080]



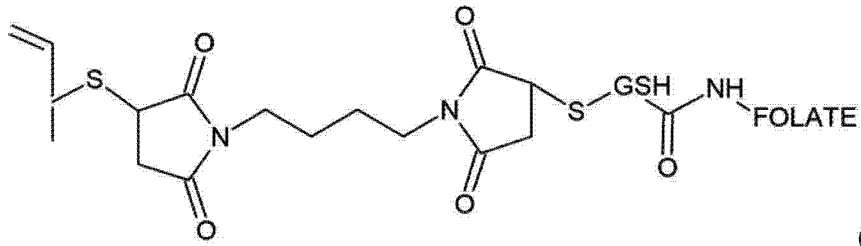
[0081] (3) 由 SMCC 偶联叶酸-GSH 与 IgG 得到的叶酸-GSH-IgG 偶联物;

[0082]



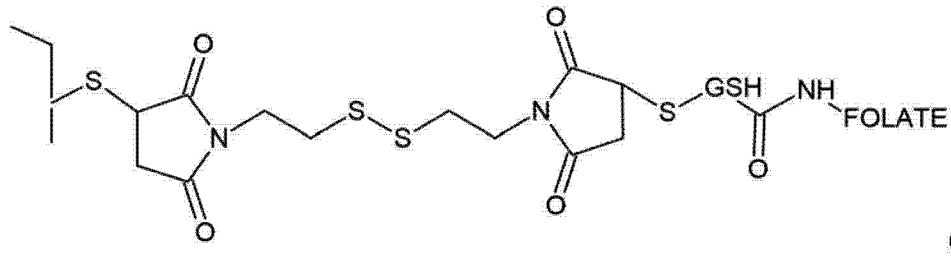
[0083] (4) 由 BMB 偶联叶酸-GSH 与还原型 IgG (弱还原剂) 得到的叶酸-GSH-IgG 偶联物;

[0084]



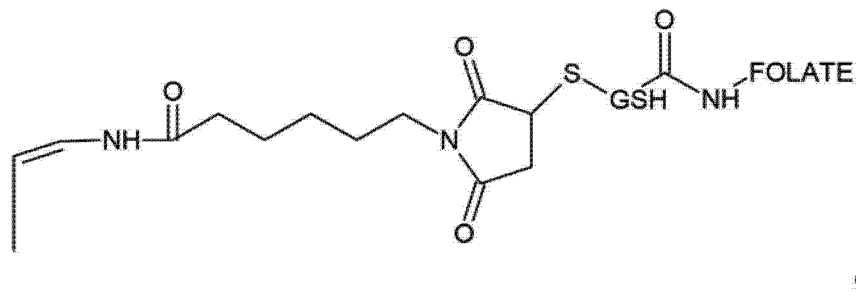
[0085] (5) 由 DTME 偶联叶酸 -GSH 与还原型 IgG (强还原剂) 得到的叶酸 -GSH-IgG 偶联物 ;

[0086]



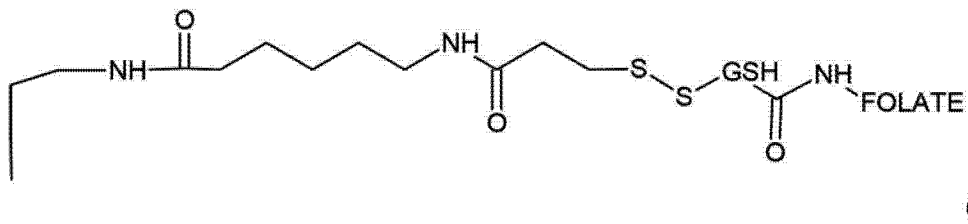
[0087] (6) 由 EMCS 偶联叶酸 -GSH 与还原型 IgG (弱还原剂) 得到的叶酸 -GSH-IgG 偶联物 ;

[0088]



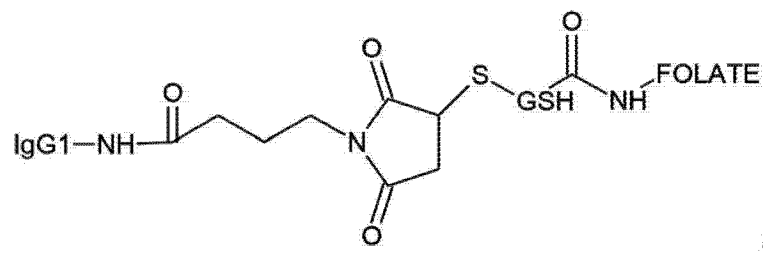
[0089] (7) 由 LC-SPDP 偶联叶酸 -GSH 与还原型 IgG (强还原剂) 得到的叶酸 -GSH-IgG 偶联物 ;

[0090]



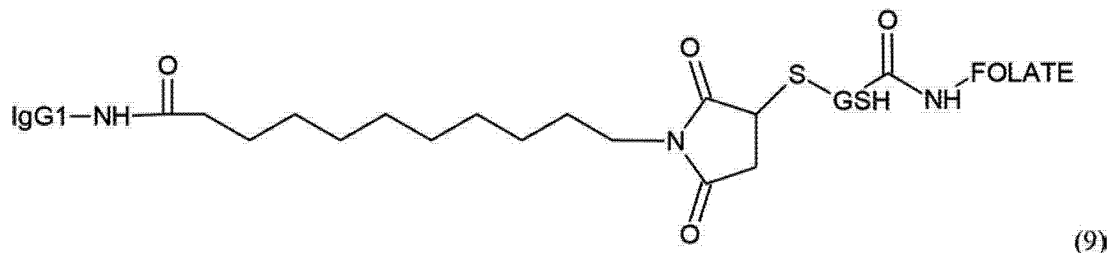
[0091] (8) 由 Sulfo-GMBS 偶联叶酸 -GSH 与 IgG1 得到的叶酸 -GSH-IgG 偶联物 ;

[0092]



[0093] (9) 由 Sulfo-KMUS 偶联叶酸 -GSH 与 IgG1 得到的叶酸 -GSH-IgG 偶联物 ;

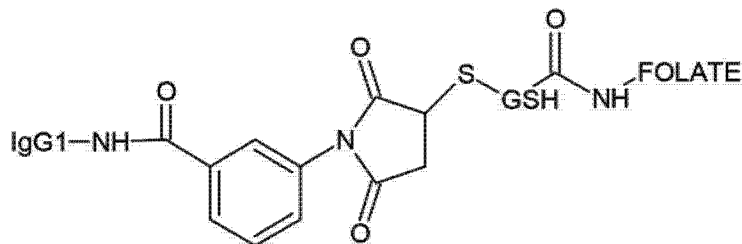
[0094]



(9)

[0095] (10) 由 Sulfo-KMUS 偶联叶酸类似物(Methotrexate)-GSH 与 IgG1 得到的叶酸-GSH-IgG 偶联物；

[0096]



(10)

[0097] 其中,式(1)-(9)中的 FOLATE 为叶酸,式(10)中的 FOLATE 为 Methotrexate。

[0098] 如前所述,多种肿瘤细胞具有高表达的 FR- α ;在恶性增殖的白细胞(白血病)表面及类风湿关节炎等自身免疫性疾病患者体内激活的巨噬细胞表面有高表达的 FR- β ,而叶酸受体在正常组织中表达非常保守。本发明提供的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在癌症患者(肿瘤细胞叶酸受体高表达类型)及自身免疫性疾病患者体内,能特异性的与癌细胞或是激活的巨噬细胞表面高表达的叶酸受体结合,然后通过 IgG 激活效应细胞的抗体或补体系统,并增强生物应答调节剂,如白细胞介素-2(IL-2)等作用,产生细胞毒作用杀灭肿瘤细胞。而对于叶酸受体几乎无表达的正常细胞并不会产生细胞毒作用。这一发现解决了现有技术中癌症治疗和自身免疫性疾病药物对正常细胞的损害问题。

[0099] 以此作为出发点,发明人提出了 FOLATE-GSH-IgG 偶联物用于治疗癌症与自身免疫性疾病的观点,并以相关试验结果证实了此法的可操作性与较好的疗效。偶联物无外源性蛋白质序列,不会导致人体内的异源抗体中和反应。同时,IgG 是一个大分子蛋白质,能有效提高偶联物药效,而且该偶联物不需要被细胞吞噬,仅需要吸附到细胞表面,激活下一步级联反应即可。对其深入研究还发现,FOLATE-GSH-IgG 偶联物由于在分子结构中引入谷胱甘肽(GSH),一方面增加了游离羧基数量,提高了该分子的亲水性,另一方面延长了叶酸与 IgG 分子间的分子链,利于叶酸靶向特性的表征,明显提高了治疗效果。

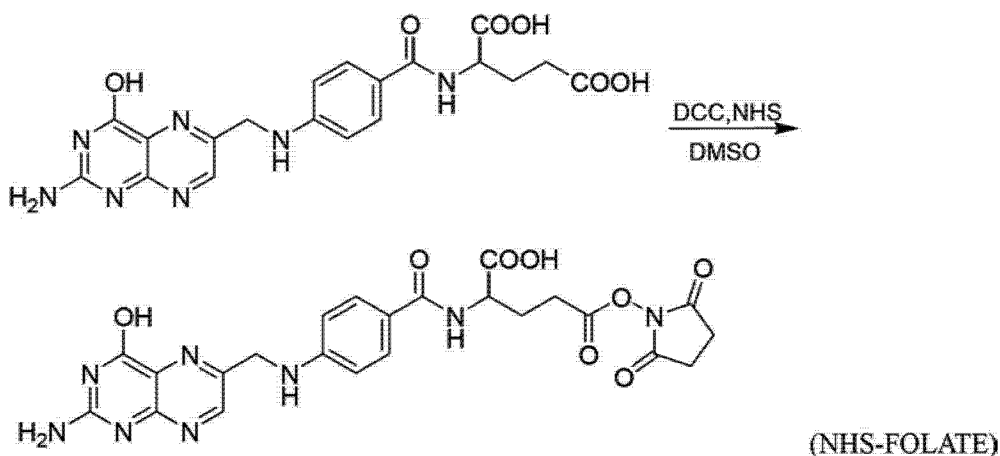
[0100] 本发明的第二个目的是提供此稳定的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物的制备方法,包括如下步骤:

[0101] (1) 将 FOLATE 与羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS) 反应生成活化的 NHS-FOLATE;

[0102] 其中 FOLATE 的定义如前所述。作为一个优选的反应条件,可将叶酸或其类似物溶于二甲基亚砜(DMSO),与 0.5 ~ 2 倍量(摩尔量)的二环己基碳二亚胺(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCC) 及羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS) 反应 2 ~ 5 小时,反应副产物为不溶物,离心或过滤弃之,溶液中即为 NHS 活化的叶酸

(NHS-叶酸),其反应式如下所示(以 Folate 为例):

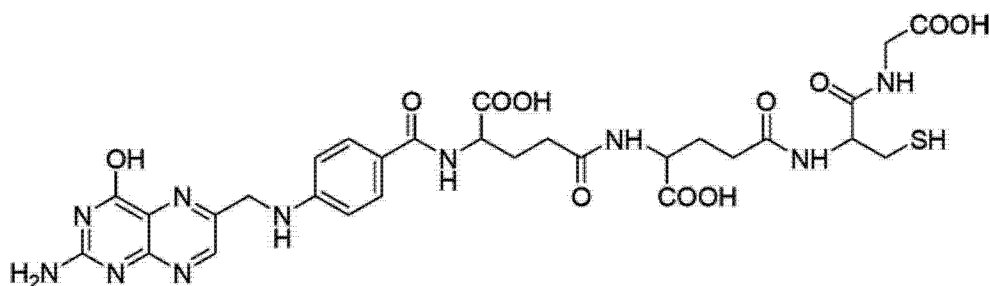
[0103]



[0104] (2) 将 NHS-FOLATE 与 GSH 反应生成 FOLATE-GSH,两者通过酰胺键相连;

[0105] 作为一个优选的反应条件,NHS-叶酸可在氩气(Ar)环境下与等摩尔量 GSH 避光反应过夜,即制得叶酸-GSH,结构如下所示:

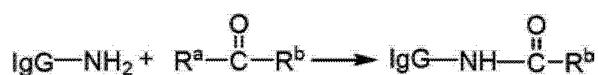
[0106]



[0107] (3) 制备活化的 IgG:活化 IgG 可由氨基端通过酰胺键偶联活化基团活化,或是通过还原 IgG 为半抗体型 IgG 或重链型 IgG 得到,如下所述:

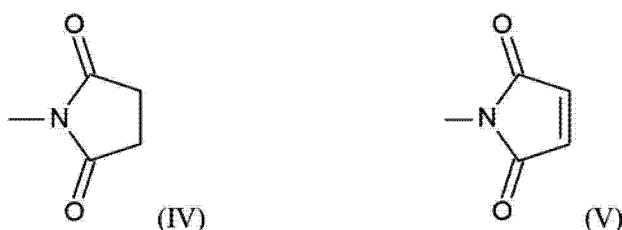
[0108] ① IgG 氨基端的活化,反应式如下所示:

[0109]



[0110] 其中 IgG-NH₂ 表示 IgG N-末端的氨基, IgG 可选自人源 IgG、重组 IgG 或 IgG 的 Fc 段,也可以是经还原得到的 IgG 半抗体或重链。其中 IgG 还包括四个亚型: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4,本发明可选用这四个亚型中的任意一个;R^aCOR^b 为 IgG 活化物,其共性为羰基所连接的 R^a 为离去基团,优选为 Succinimide,其分子结构如式(IV)所示,R^b 包括与 GSH 分子中游离巯基反应的基团,优选为 Maleimide,其分子结构如式(V)所示;

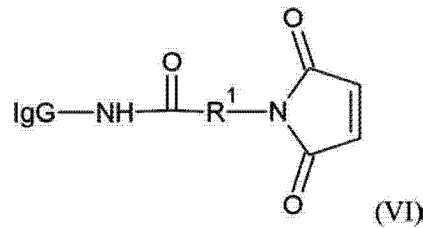
[0111]



[0112] IgG 活化物的种类如前所述。其中,当活化物为 Sulfo-SMCC、SM(PEG)

nNHS-PEG-Maleimide Crosslinkers、SMCC、LC-SMCC、Sulfo-EMCS、EMCS、Sulfo-GMBS、GMBS、Sulfo-KMUS、Sulfo-MBS、MBS、Sulfo-SMPB、SMPB、AMAS、BMPS、SMPH 等时,其与 IgG 反应后具有如结构式(VI)所表征的共性结构:

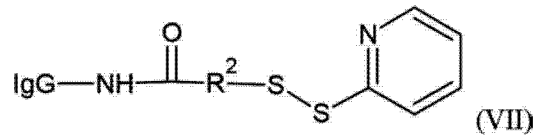
[0113]



[0114] 其中 R1 代表不同的基团,如表 1 所示。

[0115] 当活化物为 Sulfo-LC-SPDP、LC-SPDP、SPDP、SMPT 及 Sulfo-LC-SMPT 等时,其与 IgG 反应后具有如结构式(VII)所表征的共性结构:

[0116]



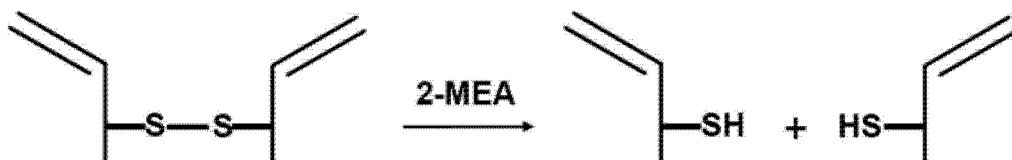
[0117] 其中 R2 代表不同的基团,如表 2 所示。

[0118] 作为一个优选的实施条件,可将 IgG 溶于合适的溶液中,使其终浓度为 0.05 ~ 1mmol/L,与 10 ~ 30 倍量(摩尔量)的上述活化物室温下反应 0.5 ~ 1 小时或 4℃ 反应 1 ~ 3 小时,即得到活化的 IgG。反应后可以相应分子筛,如 PD-10(Amersham Biosciences 公司)分离产物,得到纯度较高的活化的 IgG。上述的合适的溶液可选自 10 ~ 30mmol/L PBS-EDTA 溶液(pH6.5 ~ 9.0)、超纯水、DMSO 或 DMF,优选 10 ~ 30mmol/L PBS-EDTA 溶液(pH6.5 ~ 9.0)。

[0119] ② IgG 的还原:经还原剂处理的 IgG 分子其重链或重链与轻链间的二硫键得以断裂,暴露出具有反应活性的巯基(-SH)。

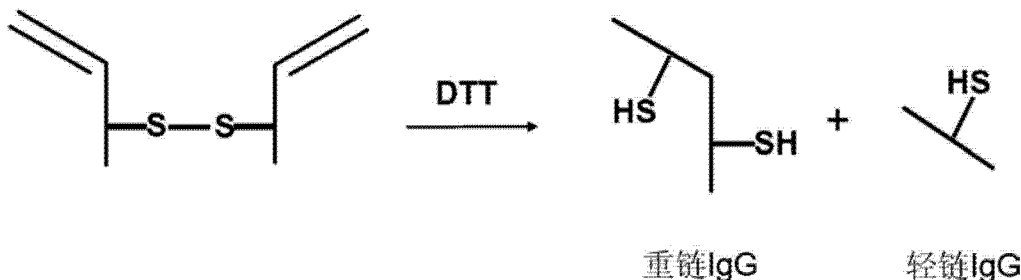
[0120] 以弱还原剂,如 2-Mercaptoethylamine · HCl (2-MEA) 还原 IgG 为半抗体型 IgG:将 1ml 2 ~ 20mg/ml IgG 的 PBS-EDTA 缓冲液(20 ~ 100mM 磷酸钠,150mM 氯化钠,1 ~ 10mM 乙二胺四乙酸(EDTA),pH 6.0 ~ 8.0)与 6mg 2-MEA 或其他弱还原剂混合均匀后置 37℃ 1 ~ 3h (此时,若 IgG 样品溶液少于 1ml,则先将 6mg 2-MEA 溶于适量 PBS-EDTA 溶液中,并迅速与 IgG 溶液按 1000 ~ 400 :1 的摩尔比混合)。反应结束后将冷却至室温的混合物过脱盐柱,如 PD-10,收集半抗体型 IgG 即可,其反应可表征为:

[0121]



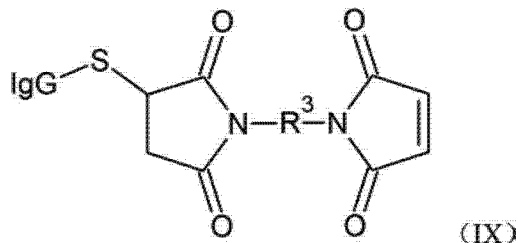
[0122] 以强还原剂,如 1,4-Dithiothreitol (DTT) 还原 IgG 为重链型 IgG:将 DTT 或其他强还原剂以 pH 6.5 ~ 9.0 溶液溶解,并与 IgG 溶液混合,DTT 终浓度为 0.1 ~ 20mM,室温下混合 1 ~ 4h,反应结束后立即过脱盐柱,如 PD-10,即可收集到重链型 IgG,其反应可表征为:

[0123]



[0124] 可以通过巯基连接物对其进行活化，所述的巯基连接物选自 1,8-bis-Maleimido diethyleneglycol (BM(PEG)₂)、BM(PEG)_nPEG Crosslinkers、1,4-bismaleimidobutane (BMB)、1,4bismaleimidyl-2,3-dihydroxybutane (BMDB)、bismaleimidoethane (BMH)、Bis-Maleimidoethane (BMOE)、1,4-Di-[3'-(2'-pyridyldithio)-propionamido] butane (DPDPB)、Dithio-bismaleimidoethane (DTME)、Tris[2-maleimidoethyl]amine (TMEA) 及其结构类似物，其共性结构如式(VIII)所示，其中 R³ 代表不同的基团，如表 3 所示。反应后生成如下结构的偶联物：

[0125]



[0126] (4) 将 FOLATE-GSH 与活化的 IgG 偶联生成 FOLATE-GSH-IgG 偶联物。

[0127] 如前所述，IgG 氨基端的活化产物与 FOLATE-GSH 偶联后，生成最终的 FOLATE-GSH-IgG 产物，其结构如式(I)或式(II)所示。巯基连接物活化的 IgG 半抗体或 IgG 重链与 FOLATE-GSH 偶联后，生成最终的 FOLATE-GSH-IgG 产物如式(III)所示。

[0128] 作为优选的实施条件，可将 FOLATE-GSH 与 1 ~ 10 倍量(摩尔量)活化的 IgG 室温反应 2 ~ 5 小时或 4℃ 15 ~ 20 小时即得 FOLATE-GSH-IgG 偶联物。将产物过分子筛，收集产物即为纯化的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物。

[0129] 上述步骤(1) - (4)中，步骤(3)可在步骤(1)和(2)之前或与其同步进行。

[0130] 本发明的第三个目的是提供一种适合临床应用的药物组合物，包含有效剂量的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物和药学上可接受的载体或辅料，其剂型为冻干粉针或注射液。下表列出了其中的一种具体制剂，组分如下：

组分	重量配比
FOLATE-GSH-IgG 偶联物	1 ~ 20 %
麦芽糖	10 %
葡萄糖 (或氯化钠)	5 ~ 10 % (0.9 %)
维生素 C (或其他抗氧化剂)	0.01 ~ 2.0 %
灭菌注射用水	加入余量凑成 100%

[0131]

[0132] 本发明的第四个目的是提供本发明制备的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在制备治疗肿瘤药物中的用途。

[0133] 如前所述,本发明提供的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在肿瘤患者(肿瘤细胞叶酸受体高表达类型)及自身免疫性疾病患者体内,能特异性的与癌细胞或是激活的巨噬细胞表面高表达的叶酸受体结合,然后通过 IgG 激活抗体或补体系统,并增强生物应答调节剂,如白细胞介素-2 (IL-2) 等作用,产生细胞毒作用杀灭肿瘤细胞。而对于叶酸受体几乎无表达的正常细胞并不会产生细胞毒作用。根据上述机理,只要是叶酸受体高表达的肿瘤类型,如白血病、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、肝癌、脉络膜癌、室管膜细胞瘤等,本发明制备的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在合适剂量范围内均可给予有效治疗。本发明制备的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物可经注射途径给药,如静脉、肌肉或皮下注射给药。人体治疗给药剂量范围按体重计为 1mg ~ 4g/kg, 优选可为 5mg ~ 100mg/kg (体重)。

[0134] 本发明的第五个目的是提供本发明制备的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在制备治疗自身免疫性疾病药物中的应用。

[0135] 自身免疫性疾病以复杂的病理特征,及反复发作难以自愈而使患者深受痛苦,其病理过程中涉及大量免疫细胞的激活及细胞因子的释放,其中,巨噬细胞在疾病的发生、发展中有着关键性的作用。本发明中 FOLATE-GSH-IgG 偶联物能高效特异地与自身免疫性疾病患者体内激活的巨噬细胞表面的 FR 结合。首先, FOLATE-GSH-IgG 偶联物能竞争性的结合激活的巨噬细胞表面 IgG 的 Fc 受体,减弱其吞噬功能,并减少炎症性因子的分泌;其次, FOLATE-GSH-IgG 偶联物有效抑制了巨噬细胞抗原递呈功能,继而抑制了 T 淋巴细胞的激活与炎症性因子的分泌,同时也抑制了细胞毒性 T 细胞(TC) 的杀伤效应;最后, FOLATE-GSH-IgG 偶联物封闭了巨噬细胞表面的 Fc 受体后,能保护已与自身抗体(如抗血小板抗体)结合的自身组织不被吞噬。

[0136] 本发明所述的自身免疫性疾病是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损伤引起的疾病,根据上述机理,只要是叶酸受体高表达的自身免疫性疾病类型,包括类风湿性关节炎、炎症性肠病、银屑病、红斑狼疮、肺纤维化、肉样瘤病(或结节病、Boeck 肉样瘤、Schaumann 良性淋巴肉芽肿病、Besnier 冻疮样狼疮),本发明制备的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物在合适剂量范围内均可给予有效治疗。本发明制备的 FOLATE-GSH-IgG 偶联物可经注射途径给药,如静脉、肌肉或皮下注射给药。人体治疗给药剂量范围按体重计为 1mg ~ 4g/kg, 优选可为 5mg ~ 100mg/kg (体重)。

[0137] 以下结合实施例对本发明进行进一步说明。需要指出的是, 实施例中的用于动物实验的叶酸-GSH-IgG 偶联物中 IgG 为鼠源性 IgG, 这是为避免人源 IgG 在动物体内的免疫反应影响。今后在应用于人体实验时,相应的将转为由人源 IgG 制备的叶酸-GSH-IgG 偶联物。

附图说明

[0138] 图 1 为叶酸-GSH-IgG 偶联物反应示意图。叶酸经由 DCC、NHS 反应活化后,与 GSH 通过酰胺键生成叶酸-GSH;同时,利用 MBS 和 SPDP 分别对 IgG N-末端的氨基进行活化,这两种活化的 IgG 与叶酸-GSH 偶联后生成不同的叶酸-GSH-IgG 偶联物。

具体实施方式

[0139] 实施例 1

[0140] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由叶酸、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为重组 IgG; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、SPDP 购自 Sigma, 重组 IgG 购自 Leinco Technologies 公司。其制备方法如下:

[0141] 将 0.1mol Folate 与 0.1mol DCC、0.1mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 2 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 0.1mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将 SPDP 配制成 20mmol/L 的溶液, IgG 与 10 倍量(摩尔量)的 SPDP 室温下反应 0.5 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到经 SPDP 活化的 IgG。Folate-GSH 与 0.1 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG) 室温反应 15 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0142] 实施例 2

[0143] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folate、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为人源 IgG 的 Fc 段; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、SMPB 购自 Sigma, 人 IgG 的 Fc 段购自 Sino Biological 公司。其制备方法如下:

[0144] 将 30mol Folate 与 40mol DCC、30mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 5 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 30mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将 SMPB 配制成 20mmol/L 的溶液, IgG 与 30 倍量(摩尔量)的 SMPB 室温下反应 1 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到活化的 IgG。Folate-GSH 与 20 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG) 4℃ 反应 20 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0145] 实施例 3

[0146] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folate、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为人源 IgG1; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、SMCC 购自 Sigma, 人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0147] 将 10mol Folate 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将 SMCC 配制成 20mmol/L 的溶液, IgG 与 20 倍量(摩尔量)的 SMCC 室温下反应 1 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到活化的 IgG。Folate-GSH 与 10 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG) 室温反应 20 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0148] 实施例 4

[0149] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folate、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为人源 IgG1; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、2-MEA、BMB 购自 Sigma, 人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0150] 将 1ml 2 ~ 20mg/ml IgG 的 PBS-EDTA 缓冲液(20 ~ 100mM 磷酸钠, 150mM 氯化钠, 1 ~ 10mM 乙二胺四乙酸(EDTA), pH 6.0 ~ 8.0)与 6mg 2-MEA 混合均匀后置 37℃ 1h。反应结束后将冷却至室温的混合物过脱盐柱,如 PD-10,收集半抗体型 IgG 即可。

[0151] 将 10mol Folate 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将巯基交联剂 BMB 溶于 DMF 中,反应时于 PBS 缓冲溶液(pH 7.5)与 1 倍摩尔量的还原型 IgG 室温反应 2h,并以脱盐柱 PD-10 分离收集样品,即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0152] 实施例 5

[0153] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folate、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为人源 IgG1; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、DTT、DTME 购自 Sigma, 人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0154] 将 DTT 以 pH 7.5 PBS-EDTA 缓冲液溶解,并与 IgG 溶液混合, DTT 终浓度为 5mM,室温下混合 2h,反应结束后立即过脱盐柱,如 PD-10,即可收集到重链型 IgG。

[0155] 将 10mol Folate 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将巯基交联剂 DTME 溶于 DMF 中,反应时于 PBS 缓冲溶液(pH 7.5)与 1 倍摩尔量的还原型 IgG 室温反应 2h,并以脱盐柱 PD-10 分离收集样品,即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0156] 实施例 6

[0157] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folate、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为人源 IgG1; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、EMCS、2-MEA 购自 Sigma,人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0158] 将 1ml 2 ~ 20mg/ml IgG 的 PBS-EDTA 缓冲液(20 ~ 100mM 磷酸钠,150mM 氯化钠,1 ~ 10mM 乙二胺四乙酸(EDTA),pH 6.0 ~ 8.0)与 6mg 2-MEA 混合均匀后置 37°C 1h。反应结束后将冷却至室温的混合物过脱盐柱,如 PD-10,收集半抗体型 IgG 即可。

[0159] 将 10mol Folate 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将 EMCS 配制成 20mmol/L 的溶液, IgG 与 20 倍量(摩尔量)的 EMCS 室温下反应 1 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到活化的 IgG。Folate-GSH 与 10 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG)室温反应 20 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0160] 实施例 7

[0161] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folate、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为人源 IgG1; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、LC-SPDP、DTT 购自 Sigma,人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0162] 将 DTT 以 pH 7.5 PBS-EDTA 缓冲液溶解,并与 IgG 溶液混合, DTT 终浓度为 5mM,室温下混合 2h,反应结束后立即过脱盐柱,如 PD-10,即可收集到重链型 IgG。

[0163] 将 10mol Folate 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将 LC-SPDP 配制成 20mmol/L 的溶液, IgG 与 20 倍量(摩尔量)的 LC-SPDP 室温下反应 1 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到活化的 IgG。Folate-GSH 与 10 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG)室温反应 20 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0164] 实施例 8

[0165] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folic acid、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folic acid 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$; IgG 为人源 IgG1; GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、Sulfo-GMBS 购自 Sigma,人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0166] 将 10mol Folic acid 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜。将 Sulfo-GMBS 配制成 20mmol/L 的溶

液, IgG 与 20 倍量(摩尔量)的 Sulfo-GMBS 室温下反应 1 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到活化的 IgG。Folate-GSH 与 10 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG)室温反应 20 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0167] 实施例 9

[0168] 叶酸-GSH-IgG 偶联物,由 Folate、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Folate 的分子式为: $C_{19}H_{19}N_7O_6$;IgG 为人源 IgG1;GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。叶酸、GSH、Sulfo-KMUS 购自 Sigma,人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0169] 将 10mol Folate 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜,制得 Folate-GSH。将 Sulfo-KMUS 配制成 20mmol/L 的溶液,IgG 与 20 倍量(摩尔量)的 Sulfo-KMUS 室温下反应 1 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到活化的 IgG。Folate-GSH 与 10 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG)室温反应 20 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为叶酸-GSH-IgG 偶联物。

[0170] 实施例 10

[0171] 叶酸类似物-GSH-IgG 偶联物,由 Methotrexate(叶酸类似物)、GSH 与人源 IgG 偶联构成。Methotrexate 的分子式为: $C_{20}H_{22}N_8O_5$;IgG 为人源 IgG1;GSH 的分子式为: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ 。Methotrexate、GSH、SMCC 购自 Sigma,人源 IgG1 购自 AXXORA 公司。其制备方法如下:

[0172] 将 10mol Methotrexate 与 20mol DCC、10mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 3 小时,离心去沉淀,在 Ar 环境下与 10mol GSH 避光反应过夜,制得 Methotrexate-GSH。将 SMCC 配制成 20mmol/L 的溶液,IgG 与 20 倍量(摩尔量)的 SMCC 室温下反应 1 小时,以分子筛 PD-10 分离产物,得到活化的 IgG。Methotrexate-GSH 与 10 倍量(摩尔量)活化的 IgG (巯基化的 IgG)室温反应 20 小时,将反应物过分子筛 PD-10,收集产物即为 Methotrexate-GSH-IgG 偶联物。

[0173] 实施例 11 两种合成方法制备的叶酸-IgG 偶联物与叶酸-GSH-IgG 偶联物稳定性比较

[0174] 试验材料:

[0175] 1. 药品及试剂:叶酸-GSH-IgG 偶联物,依实施例 3 的方式制备;胎牛血清、MEM 培养基由 Hyclone 公司提供,叶酸、DCC、NHS、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC) 购自 Sigma。

[0176] 2. 乳腺癌细胞 MCF-7 购自武汉大学菌种典藏中心。

[0177] 3. 仪器 TG328A 型分析天平,倒置荧光显微镜,荧光分光光度计等。

[0178] 试验方法:

[0179] 制备叶酸-IgG 偶联物:将 30mol 叶酸与 40mol DCC、30mol NHS 在室温下于 DMSO 中反应 5 小时,离心弃沉淀,与 2.0 倍量的重组 IgG 室温反应 5 小时后,将反应物过 PD-10 分子筛,收集产物即为叶酸-IgG 偶联物。

[0180] 将制得的叶酸-IgG 偶联物(FIG)与叶酸-GSH-IgG 偶联物(FGIG)分别与 5 倍量(摩尔量)的 FITC 室温孵育两小时后,将反应物过 PD-10 分子筛,收集产物即为 FITC 荧光标记的偶联物,分别为 FIG-FITC 与 FGIG-FITC,并各取一半置 4℃,避光保存 3 个月。检验细胞荧光标记强度的方法如下:

[0181] 取对数生长期的 MCF-7 细胞,用含 10%胎牛血清的 MEM 培养液重悬,配成单细

胞悬液,以每孔 5×10^4 /ml 接种于 96 孔培养板中,每孔 $200 \mu\text{l}$ 。将细胞分为阴性对照组, FIG-FITC 组、FGIG-FITC 组、FIG-FITC-3(FIG 置 4°C , 避光保存 3 个月)组、FGIG-FITC-3(FGIG 置 4°C , 避光保存 3 个月)组及叶酸干扰组(Folate+FIG-FITC 组, 及 Folate+FGIG-FITC 组), 每组平行设 3 个复孔。各孔加入 FIG 或 FGIG-FITC 溶液 $20 \mu\text{l}$, 叶酸干扰组加入叶酸 PBS 溶液,使叶酸终浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 。之后置 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 培养 3h 后弃上清,每孔以 PBS 溶液 $200 \mu\text{l}$ 清洗 3 次,胰酶消化后,置倒置荧光显微镜下观察。或以胰酶破碎, 1000rpm , 20min 离心后以荧光分光光度计检测细胞摄取的荧光素量。

[0182] 试验结果:

[0183] 由荧光显微镜观察可知, FITC 标记的叶酸-IgG、叶酸-GSH-IgG 都能有效的结合到肿瘤细胞表面,使肿瘤细胞发出绿色荧光,而细胞中加入叶酸干扰可有效的降低细胞的荧光强度,说明叶酸-IgG 与叶酸-GSH-IgG 与肿瘤细胞结合的特异性,且叶酸-GSH-IgG 与叶酸-IgG 相比,有效提高了细胞摄取率(提高了 45.2%);另外, 4°C 下保存 3 个月的偶联物的细胞结合试验结果表现出了差异(参见表 4),叶酸-IgG 组细胞荧光强度弱于叶酸-GSH-IgG 组,细胞摄取率仅为叶酸-GSH-IgG 偶联物的 69.8% ,说明经改良的制备方法更加突出了叶酸-GSH-IgG 偶联物的靶向性,并提高了此分子的稳定性。

[0184] 表 4 叶酸-IgG 偶联物与叶酸-GSH-IgG 偶联物细胞摄取率比较

	组别	细胞摄取率 (%)
[0185] 即时测	细胞对照组	2.53 ± 0.23
	FIG-FITC 组	64.23 ± 12.43
	FIG-FITC+Folate 组	34.82 ± 2.43
	FGIG-FITC 组	$93.23 \pm 21.74^{**}$
	FGIG-FITC+Folate 组	29.34 ± 3.25
4 $^\circ\text{C}$, 3 个月	细胞对照组	4.72 ± 0.38
	FIG-FITC 组	58.82 ± 13.12
	FIG-FITC+Folate 组	20.93 ± 2.28
	FGIG-FITC 组	$84.29 \pm 18.39^{\Delta\Delta}$
	FGIG-FITC+Folate 组	24.20 ± 2.49

[0186] 与 FIG-FITC 组即时测得的数据相比: $**P < 0.01$; 与 FIG-FITC 组 4°C 避光保存 3 个月后测得的数据相比: $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

[0187] 实施例 12 叶酸-GSH-IgG 偶联物作为抗乳腺癌药物的应用

[0188] 试验材料:

[0189] 1. 药品及试剂叶酸-GSH-IgG 偶联物(FGIG),按实施例 1 的方式制备,其中 IgG 为小鼠源性 IgG,购自 Sigma 公司;叶酸-IgG 偶联物(FIG),按实施例 11 的方法制备;胎牛血清、MEM 培养基由 Hyclone 公司提供。

[0190] 2. 乳腺癌细胞 MCF-7 购自武汉大学菌种典藏中心。

[0191] 3. 动物:健康成熟雌性 DBA/2 小鼠 50 只,体重 18 ~ 22g,由南京大学模式动物提供,生产许可证号:SCXK(苏)2005-0002。小鼠饲料,购于武汉大学实验动物中心。

[0192] 4. 仪器 TG328A 型分析天平,紫外分光光度计,高速匀浆器等。

[0193] 试验方法

[0194] 动物分组与处理:将上述小鼠按体重随机分为正常对照组、模型组、表阿霉素阳性对照组、FIG 5mg/kg 组和 FIG 40mg/kg 组、FGIG 5mg/kg 组和 FGIG 40mg/kg 组,试验开始前 7 天给予不含叶酸的鼠料。表阿霉素阳性对照组、模型组、FIG 组和 FGIG 组于试验第 0 天皮下注射 1×10^6 MCF-7/只,第 5 天开始给药,FIG5mg/kg 组及 FIG 40mg/kg 组分别腹腔注射 FIG 5mg/kg、40mg/kg,四日一次;FGIG5mg/kg 组及 FGIG 40mg/kg 组分别腹腔注射 FGIG 5mg/kg、40mg/kg,四日一次;表阿霉素阳性对照组小鼠腹腔注射表阿霉素 200mg/kg,四日一次;正常对照组和模型组小鼠腹腔注射等量的生理盐水,四日一次。小鼠于给药后第 15 日禁食,次日给药后,以游标卡尺测量肿瘤体积,并计算第 16 天每组小鼠的平均存活时间。

[0195] 检测指标:

[0196] 1. 肿瘤体积(Volume):以游标卡尺测量实体瘤的长(L)、宽(W)和高(H),按如下公式计算: $V=0.5 \times L \times W \times H$ 。

[0197] 2. 平均存活时间(MST):求得每组小鼠的平均存活时间。

[0198] 试验结果:

[0199] 1. FGIG 对 MCF-7 在 DBA/2 小鼠体内增殖的抑制作用

[0200] 由表 2 可见,FGIG 5mg/kg、40mg/kg 腹腔注射给药均可显著抑制 MCF-7 在 DBA/2 小鼠体内的增殖。16 天后,FGIG 5mg/kg、40mg/kg 组实体瘤体积分别下降 50.8%、63.3%,且小于 FIG 各组。表明相对于叶酸-IgG 偶联物,叶酸-GSH-IgG 偶联物腹腔给药对 MCF-7 在 DBA/2 小鼠体内的增殖有更明显的抑制作用。

[0201] 2. FGIG 对 DBA/2 荷瘤小鼠平均存活时间的影响

[0202] FGIG 5mg/kg、40mg/kg 腹腔注射给药均可提高荷瘤小鼠的平均存活时间,分别为 2.0、3.0 倍,具体数据见表 5,与叶酸-IgG 偶联物相比没有显著性差异。可见叶酸-GSH-IgG 偶联物能明显延长荷瘤小鼠的存活时间。

[0203] 表 5 FIG 对 DBA/2 荷瘤小鼠肿瘤体积及小鼠平均存活时间的影响 ($\bar{X} \pm SD, n=10$)

[0204]

组别	肿瘤体积 (cm ³)	平均存活时间 (天)
正常对照组	-	16
模型组	13.95 ± 3.89**	3**
FGIG 5mg/kg	6.87 ± 1.84 ^{▲▲}	9 ^{▲▲}
FGIG 40mg/kg	5.12 ± 2.12 ^{▲▲}	12 ^{▲▲}
FIG 5mg/kg	7.35 ± 1.39 ^{▲▲}	8 ^{▲▲}
FIG 40mg/kg	6.83 ± 1.94 ^{▲▲}	9 ^{▲▲}
阳性对照组	6.18 ± 1.34 ^{▲▲}	9 ^{▲▲}

[0205] 与正常对照组比较：^{*}P<0.01；与模型组相比^{▲▲}P<0.01。

[0206] 实施例 13 叶酸-GSH-IgG 偶联物作为抗癌药物的体外试验

[0207] 选择叶酸-GSH-IgG 偶联物作为抗癌药物，利用噻唑蓝(MTT)比色法检测叶酸-GSH-IgG 偶联物对人白血病细胞 K562、宫颈癌 HeLa、乳腺癌 MCF-7、结肠癌 Caco-2、肝癌 HepG2 细胞株的体外细胞毒性，并测定其半数抑制浓度值(IC50)。

[0208] 试验材料：

[0209] 1. 药品及试剂叶酸-GSH-IgG 偶联物，按实施例 1 的方式制备；叶酸-IgG 偶联物(FIG)，按实施例 11 的方法制备；胎牛血清、MEM 培养基由 Hyclone 公司提供。

[0210] 2. 细胞人白血病细胞 K562、宫颈癌 HeLa、乳腺癌 MCF-7、结肠癌 Caco-2、肝癌 HepG2 细胞株购自武汉大学菌种典藏中心。

[0211] 3. 仪器 TG328A 型分析天平，紫外分光光度计等。

[0212] 检测指标：

[0213] 1. 肿瘤细胞抑制率(CI):CI=(对照组 OD 值 - 试验组 OD 值)/ 对照组 OD 值 × 100%。

[0214] 2. 半数抑制浓度(IC50):以同一样品的不同浓度对肿瘤细胞生长抑制率作图可得到剂量反应曲线，从中求出样品的半数抑制浓度 IC50。

[0215] 试验结果：

[0216] 本发明叶酸-GSH-IgG 偶联物对 K562、HeLa、MCF-7、Caco-2、HepG2 细胞的增殖均表现出明显的抑制作用，且细胞抑制率呈浓度依赖关系。此试验说明叶酸-GSH-IgG 偶联物体外能有效抑制 K562、HeLa、MCF-7、Caco-2、HepG2 细胞的增殖，其机制可能与叶酸-GSH-IgG 偶联物靶向结合到肿瘤细胞表面后诱导其凋亡有关。试验中发现叶酸-GSH-IgG 偶联物，相对于叶酸-IgG 偶联物，有提高细胞毒作用的趋势，结果见表 6。

[0217] 表 6. 叶酸-GSH-IgG 偶联物的 IC50

[0218]

细胞株	叶酸-GSH-IgG 偶联物 (nmol/L)	叶酸-IgG 偶联物 (nmol/L)
K562	1.40 ± 0.27	2.82 ± 0.21
Hela	3.32 ± 0.02	4.54 ± 0.05
MCF-7	5.53 ± 0.32	6.12 ± 0.83
Caco-2	8.29 ± 3.82	9.39 ± 5.29
HepG2	8.23 ± 1.39	10.39 ± 2.82

[0219] 实施例 14 叶酸-GSH-IgG 偶联物作为抗炎症性肠病的药物的应用

[0220] 通过建立炎症性肠病的动物模型,探讨叶酸-GSH-IgG 偶联物对炎症性肠病的影响及药物作用机制。

[0221] 试验材料:

[0222] 1. 药品及试剂:叶酸-GSH-IgG 偶联物(FGIG),按实施例 1 的方式制备,其中 IgG 为小鼠源性 IgG,购自 Sigma 公司;叶酸-IgG 偶联物(FIG),按实施例 11 的方法制备;美沙拉秦缓释颗粒剂(艾迪莎),购自法国爱的发制药集团;MPO 检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

[0223] 2. 动物:健康成熟雄性昆明小鼠 50 只,体重 18~22g,由武汉大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(鄂)2003-2004。小鼠饲料,购于武汉大学实验动物中心。

[0224] 3. 仪器 TG328A 型分析天平,紫外分光光度计,高速匀浆器等。

[0225] 试验方法:

[0226] 1. 动物分组与处理:

[0227] 将上述小鼠随机分为正常对照组,模型组、艾迪莎阳性药物对照组、FGIG5mg/kg 组和 FGIG 40mg/kg 组、FIG 5mg/kg 组和 FIG 40mg/kg 组。其中,FIG5mg/kg 组、FIG 40mg/kg 组分别腹腔注射给予 FIG 5mg/kg、40mg/kg,一日一次;FGIG 5mg/kg 组、FGIG 40mg/kg 组分别腹腔注射给予 FGIG 5mg/kg、40mg/kg,一日一次;艾迪莎组小鼠经口给予艾迪莎 600mg/kg,一日一次;正常对照组和模型组小鼠腹腔注射给予等量的生理盐水,一日一次。

[0228] 除正常对照组外,其余各组均采用乙酸刺激造结肠炎模型,小鼠于第 9 日给药后禁食,次日给药后,乙醚吸入麻醉,用聚乙烯管给小鼠直肠注入乙酸,注入前先排清肠内大便,将聚乙烯管插入小鼠肛门约 1.5cm,注入 0.1ml 6% 的乙酸,1min 后用等张生理盐水冲洗两次,让动物保持平躺,自然苏醒。正常对照组直肠注入等体积的生理盐水。各组小鼠持续给药至第 10 天,末次给药后 24h,颈椎脱臼处死,冰上解剖,取全段结肠,称重,计算结肠脏器指数,进行结肠炎症 (CMDI) 评分。取结肠组织用 Tris 缓冲液制成 5% 的匀浆液,供检测 MPO。

[0229] 检测指标:

[0230] 1. 结肠损伤指数 (CMDI):取全段结肠,沿肠系膜剪开肠腔,肉眼观察腹腔粘连及结肠溃疡、充血情况,按表 7 结肠评分标准 (CMDI) 进行评分。

[0231] 2. 髓过氧化物酶 (MPO):准确称取组织重量,按重量体积比为 1:19 加入 Tris 缓冲匀浆液,高速匀浆后反复冻融,制成 5% 的肠匀浆液,按 MPO 检测试剂盒严格操作,并以 Lowry

法检测蛋白量。

[0232] 表 7. 结肠损伤指数 (CMDI) 评分标准

[0233]

大体形态	评分
腹腔粘连:	
无粘连	0
轻度粘连	1
重度粘连	2
结肠溃疡及炎症:	
无明显异常	0
结肠充血, 无溃疡	1
充血, 无溃疡, 肠壁明显增厚	2
溃疡 1 处, 不伴有充血或肠壁增厚 (表面坏死)	3
肠壁有出血点	4
溃疡 1 处, 伴充血、炎症	5
溃疡 2 处, 伴充血、炎症	6
溃疡 2 处以上	7
穿孔一处	8
穿孔多于 1 处	9
动物死亡	10

[0234] 两项分数相加为结肠评分级数。

[0235] 试验结果:

[0236] 由表 8 可见叶酸-GSH-IgG 偶联物能明显减轻炎症性肠病小鼠结肠炎症症状, 叶酸-GSH-IgG 偶联物 5mg/kg、40mg/kg 腹腔注射给药, 结肠系数分别下降 42.0%、64.8%, 炎症评分级别分别下降 1.44 倍、4.93 倍, MPO 活性分别下降 58.3%、71.3%, 均优于叶酸-IgG 偶联物; 同时, 叶酸-GSH-IgG 偶联物低、高剂量均明显的保护乙酸导致的小鼠结肠损伤, 小鼠结肠评分级别分别为 3.4 级、1.4 级; 模型组可见重度粘连, 溃疡多于 2 处以上, 评分级别 8.3 级, FIG 组小鼠结肠仍有轻度红肿与粘连情况; 阳性对照组未见明显溃疡及粘连, 轻度红肿, 评分级别 1.9 级。表明叶酸-GSH-IgG 偶联物腹腔注射给药对炎症性肠病有明显的保护作用。

[0237] 表 8 叶酸-GSH-IgG 偶联物对炎症性肠病小鼠结肠脏器系数、炎症评分、MPO 活性的影响 ($\bar{X} \pm SD$, n = 10)

[0238]

组别	结肠系数 (g/100g)	炎症评分级别	MPO (U/mg.pro.)
正常对照组	0.72 ± 0.34	0 ± 0	1.24 ± 0.35
模型组	1.93 ± 0.58**	8.3 ± 1.3**	7.49 ± 0.43**
FGIG 5mg/kg 组	1.12 ± 0.20 ^{▲▲}	3.4 ± 0.7 ^{▲▲}	3.12 ± 0.25 ^{▲▲}
FGIG 40mg/kg 组	0.68 ± 0.21 ^{▲▲}	1.4 ± 0.3 ^{▲▲}	2.15 ± 0.33 ^{▲▲}
FIG 5mg/kg 组	2.39 ± 0.37 ^{▲▲}	4.9 ± 1.3 [▲]	5.20 ± 1.20 [▲]
FIG 40mg/kg 组	1.20 ± 0.39 ^{▲▲}	2.7 ± 0.5 ^{▲▲}	3.29 ± 0.42 ^{▲▲}
阳性对照组	1.21 ± 0.13 ^{▲▲}	1.9 ± 0.5 ^{▲▲}	2.42 ± 0.11 ^{▲▲}

[0239] 与正常组相比 **P<0.01; 与模型组相比^{▲▲}P<0.01

[0240] 实施例 15 叶酸-GSH-IgG 偶联物作为抗类风湿性关节炎的药物的应用

[0241] 通过建立类风湿性关节炎的动物模型,探讨叶酸-GSH-IgG 偶联物对类风湿性关节炎的影响及药物作用机制。旨在选择一种疗效确切、毒性小的抗类风湿性关节炎的药物。

[0242] 试验材料:

[0243] 1. 药品及试剂:叶酸-GSH-IgG 偶联物(FGIG),按实施例 1 的方式制备,

[0244] 其中 IgG 为大鼠源性 IgG,购自 Sigma 公司;叶酸-IgG 偶联物(FIG),按实施例 11 的方法制备;双氯芬酸钠肠溶片,购自北京诺华制药有限公司;弗氏完全佐剂,购自 sigma 公司;RF 检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

[0245] 2. 动物:健康成熟 Wistar 大鼠 50 只,体重 150 ~ 200g,雌雄兼备,购自武汉大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(鄂)2003-2004。大鼠饲料,购于武汉大学实验动物中心。

[0246] 3. 仪器:PV-200 足趾容积仪等。

[0247] 试验方法:

[0248] 1. 动物分组与处理:

[0249] 将上述大鼠随机分为正常对照组,模型组、双氯芬酸钠阳性药物对照组、FGIG 2mg/kg 组和 FGIG 8mg/kg 组、FIG 2mg/kg 组和 FIG 8mg/kg 组。其中,FGIG2mg/kg 组、FGIG 8mg/kg 组分别腹腔注射给予 FGIG 8mg/kg、8mg/kg,一日一次;FIG 2mg/kg 组、FIG 8mg/kg 组分别腹腔注射给予 FIG 2mg/kg、8mg/kg,一日一次;双氯芬酸钠组大鼠灌胃给予双氯芬酸钠 10mg/kg,一日一次;正常对照组和模型组大鼠腹腔注射给予等量的生理盐水,一日一次。第 0 天测量各组大鼠右足体积,并在右足踝部皮下注射弗氏完全佐剂 0.1ml。各组大鼠持续给药至第 21 天,末次给药后测定右足足趾容积,乙醚吸入麻醉后摘眼球取血,离心分离血清检测内风湿因子 RF。

[0250] 检测指标:

[0251] 1. 关节损伤指数评分:观察各组大鼠右足,肉眼观察足趾红肿情况,按表 9 关节损伤评分标准进行评分。

[0252] 2. 类风湿因子(RF):取各组大鼠血清 100 μl,按 RF 检测试剂盒严格操作。

[0253] 表 9. 关节损伤指数评分标准

	大体形态	分值
	无明显异常	0
[0254]	足趾关节轻度红肿	1
	足趾关节中度红肿	2
	足趾关节严重红肿	3
	足趾关节对侧红肿	4

[0255] 试验结果：

[0256] 由表 10 可见叶酸 -GSH-IgG 偶联物能明显减轻类风湿关节炎大鼠关节的红肿现象,叶酸 -GSH-IgG 偶联物 2mg/kg、8mg/kg 腹腔注射给药,足趾容积差值与模型组相比分别下降 70.9%、78.8%,关节损伤评分级别分别下降 1.58 倍、5.20 倍,RF 含量分别下降 19.1%、25.8%,均优于叶酸 -IgG 偶联物组,其中,FGIG 8mg/kg 组关节损伤指数评分较之 FIG 8mg/kg 组,下降了 54.5%,足趾容积差值下降了 36.9%。表明叶酸 -GSH-IgG 偶联物腹腔注射给药对类风湿关节炎有明显的保护作用。

[0257] 表 10 叶酸 -GSH-IgG 偶联物对类风湿性关节炎大鼠关节损伤评分、足趾容积差值和 RF 的影响 ($\bar{X} \pm SD$, n =10)

组别	关节损伤 指数评分	足趾容积差值 (ml)	RF (pg/ml)
正常对照组	0.0 ± 0.0	0.052 ± 0.022	14.3 ± 0.73
模型组	3.1 ± 0.21**	0.419 ± 0.089*	22.5 ± 1.23**
[0258] FGIG 2mg/kg 组	1.2 ± 0.11 [▲]	0.122 ± 0.112 [▲]	18.2 ± 1.16 [▲]
FGIG 8mg/kg 组	0.5 ± 0.36 ^{▲▲}	0.089 ± 0.063 ^{▲▲}	16.7 ± 1.97 ^{▲▲}
FIG 2mg/kg 组	1.7 ± 0.21 [▲]	0.187 ± 0.125 [▲]	20.2 ± 2.14
FIG 8mg/kg 组	1.1 ± 0.57 ^{▲▲}	0.141 ± 0.103 [▲]	19.7 ± 1.39 ^{▲▲}
阳性对照组	0.6 ± 0.22 ^{▲▲}	0.090 ± 0.052 ^{▲▲}	15.2 ± 1.99 ^{▲▲}

[0259] 与正常组相比 *P<0.05, **P<0.01 ;与模型组相比[▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01。

[0260] 实施例 16 叶酸 -GSH-IgG 偶联物作为抗红斑狼疮的药物的应用

[0261] 通过建立红斑狼疮的动物模型,探讨叶酸 -GSH-IgG 偶联物对红斑狼疮的影响及药物作用机制。

[0262] 试验材料：

[0263] 1. 药品及试剂：叶酸 -GSH-IgG 偶联物(FGIG),按实施例 1 的方式制备,

[0264] 其中 IgG 为小鼠源性 IgG,购自 Sigma 公司;叶酸 -IgG 偶联物(FIG),按实施例 11 的方法制备;弗氏完全佐剂(CFA),购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,购自卫生部北京生物制品研究所;IL-1、RF 检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

[0265] 2. 动物:健康成熟雌性昆明小鼠 50 只, 体重 18 ~ 22g, 购自武汉大学实验动物中心, 生产许可证号:SCXK (鄂) 2003-2004。小鼠饲料, 购于武汉大学实验动物中心。

[0266] 3. 仪器:紫外分光光度计等。

[0267] 试验方法:

[0268] 将上述小鼠随机分为正常对照组, 模型组、雷公藤阳性药物对照组、FGIG1mg/kg 组和 FGIG 10mg/kg 组、FIG 1mg/kg 组和 FIG 10mg/kg 组。其中, FGIG1mg/kg 组、FGIG 10mg/kg 组分别腹腔注射给予 FGIG 1mg/kg、10mg/kg, 一日一次; FIG 1mg/kg 组、FIG 10mg/kg 组分别腹腔注射给予 FIG 1mg/kg、10mg/kg, 一日一次; 雷公藤组大鼠灌胃给予雷公藤 10mg/kg, 一日一次; 正常对照组和模型组大鼠腹腔注射给予等量的生理盐水, 一日一次。

[0269] 取甲醛化空肠弯曲菌悬液 (3×10^{12} CFU/L) 与等量 CFA 混匀, 完全乳化后, 取 50 μ l 给小鼠足跖注射, 免疫后第 3 周, 取上述细菌悬液 0.2ml, 给小鼠尾静脉注射, 加强免疫 1 次, 同时设正常对照。小鼠致敏后 28 天, 测血清抗组蛋白 IgG 型自身抗体。

[0270] 检测指标:

[0271] 抗组蛋白 IgG 型自身抗体:将 1:100 稀释的鼠血清加入已包被好的 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 加入辣根过氧化物酶结合的羊抗鼠 IgG (1:100) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 加入底物液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 以 2mol/L H_2SO_4 终止反应, A490 测 A 值, 酶指数 EI 表示。

[0272] 试验结果:

[0273] 由表 11 可见叶酸-GSH-IgG 偶联物能明显降低红斑狼疮小鼠抗组蛋白 IgG 型自身抗体的生成, 叶酸-GSH-IgG 偶联物 1mg/kg、10mg/kg 腹腔注射给药, 抗组蛋白 IgG 型自身抗体分别下降 38.7%、47.1%, 其高剂量组与阳性对照药相比作用显著。其中 10mg/kg 组中, 与叶酸-IgG 相比较, 叶酸-GSH-IgG 偶联物降低小鼠抗组蛋白 IgG 型自身抗体 12.5%, 说明叶酸-GSH-IgG 偶联物能有效降低红斑狼疮小鼠抗组蛋白 IgG 型自身抗体, 优于叶酸-IgG。

[0274] 表 11 叶酸-GSH-IgG 偶联物对红斑狼疮小鼠抗组蛋白 IgG 型自身抗体的影响 ($\bar{X} \pm SD$, n = 10)

组别	抗组蛋白 IgG 型自身抗体 (EI)
正常对照组	53 \pm 12
模型组	119 \pm 31**
[0275] FGIG 1mg/kg 组	73 \pm 20 ^{▲▲}
FGIG 10mg/kg 组	63 \pm 13 ^{▲▲}
FIG 1mg/kg 组	85 \pm 32 [▲]
FIG 10mg/kg 组	72 \pm 21 ^{▲▲}
阳性对照组	60 \pm 11 ^{▲▲}

[0276] 与正常组相比 **P<0.01; 与模型组相比[▲]P<0.5; ^{▲▲}P<0.01。

[0277] 实施例 17 叶酸-GSH-IgG 偶联物作为抗银屑病的药物的应用

[0278] 通过建立银屑病的动物模型, 探讨叶酸-GSH-IgG 偶联物对银屑病的影响及药物作用机制。

[0279] 试验材料：

[0280] 1. 药品及试剂：叶酸-GSH-IgG 偶联物(FGIG)，按实施例 1 的方式制备，其中 IgG 为小鼠源性 IgG，购自 Sigma 公司；叶酸-IgG 偶联物(FIG)，按实施例 11 的方法制备；醋酸曲安奈德软膏，购自天津药业公司；

[0281] 2. 动物：健康成熟昆明小鼠 40 只，体重 18 ~ 22g，雌雄各半，购自武汉大学实验动物中心，生产许可证号：SCXK（鄂）2003-2004。小鼠饲料，购于武汉大学实验动物中心。

[0282] 3. 仪器：XSP-11CD 倒置型系统显微镜等。

[0283] 试验方法：

[0284] 将上述小鼠随机分为正常对照组，醋酸曲安奈德软膏阳性药物对照组、FGIG1mg/kg 组和 FGIG 10mg/kg 组、FIG 1mg/kg 组和 FIG 10mg/kg 组。其中，FGIG1mg/kg 组、FGIG 10mg/kg 组分别腹腔注射给予 FGIG 1mg/kg、10mg/kg，一日一次；FIG 1mg/kg 组、FIG 10mg/kg 组分别腹腔注射给予 FIG 1mg/kg、10mg/kg，一日一次；醋酸曲安奈德软膏组小鼠在尾根部涂抹给予醋酸曲安奈德软膏 0.05g，一日一次；正常对照组和模型组大鼠腹腔注射给予等量的生理盐水，一日一次。连续给药 15d 后杀死小鼠，取距根部约 1.8cm 处尾部皮肤一长条，用 100ml/L 甲醛溶液固定，石蜡包埋，HE 染色，在光学显微镜下观察每个小鼠的尾部鳞片。

[0285] 检测指标：

[0286] 有颗粒层的鳞片数计数：凡两个毛囊口之间的鳞片表皮有排列成行的颗粒层者，称为有颗粒层的鳞片，计数每 100 个鳞片中有颗粒层的鳞片数，对各组的数据进行比较，并作统计学处理。

[0287] 试验结果：

[0288] 由表 12 可见叶酸-GSH-IgG 偶联物较之叶酸-IgG 偶联物能明显提高有颗粒层的鳞片数生成，叶酸-GSH-IgG 偶联物 1mg/kg、10mg/kg 腹腔注射给药，有颗粒层的鳞片数分别提高 1.64、2.21 倍。

[0289] 表 12 叶酸-GSH-IgG 偶联物对小鼠尾部有颗粒层的鳞片数的影响 ($\bar{X} \pm SD$, n=10)

组别	有颗粒层的鳞片数
正常对照组	10.3 ± 3.44
FGIG 1mg/kg 组	27.2 ± 5.12**
[0290] FGIG 10mg/kg 组	33.1 ± 11.21**
FIG 1mg/kg 组	18.8 ± 3.29 *
FIG 10mg/kg 组	29.4 ± 8.30 **
阳性对照组	28.5 ± 6.86**

[0291] 与正常组相比 **P<0.01。

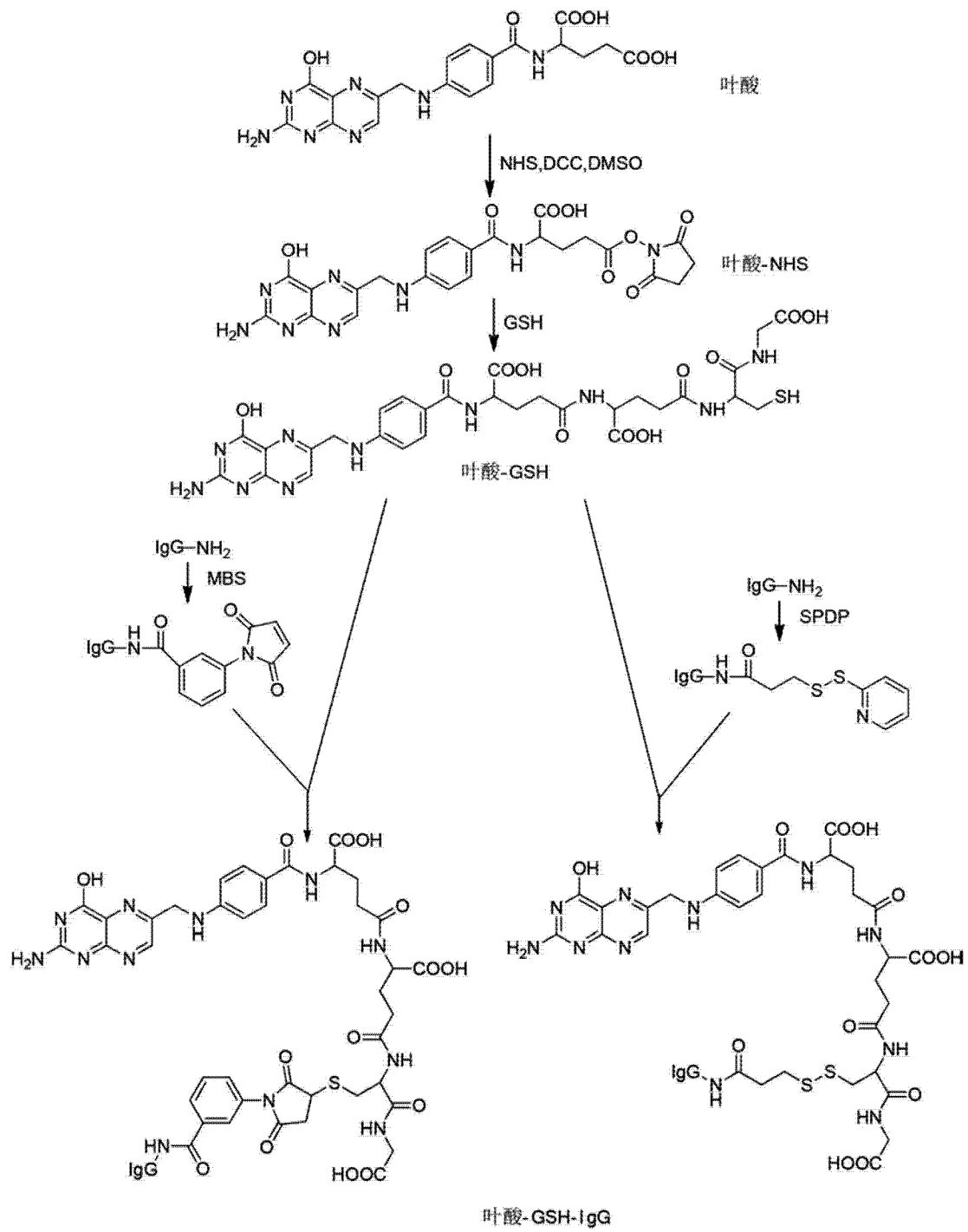


图 1