



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113683779 B

(45) 授权公告日 2023.02.24

(21) 申请号 202111056320.5

A61K 8/73 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.09

A61K 47/36 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61Q 17/04 (2006.01)

申请公布号 CN 113683779 A

A61Q 19/08 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.11.23

(56) 对比文件

(73) 专利权人 苏州快乐猩球生物科技有限公司

CN 109517012 A, 2019.03.26

地址 215100 江苏省苏州市相城区高铁新

US 2003087877 A1, 2003.05.08

城南天成路88号天成信息大厦501-

CN 104788670 A, 2015.07.22

H018室

US 2002128512 A1, 2002.09.12

(72) 发明人 周广静 葛剑 韦锦珍

US 2015150994 A1, 2015.06.04

(74) 专利代理机构 厦门原创专利事务所(普通

CN 105039465 A, 2015.11.11

合伙) 35101

专利代理师 郭金华

王汝娟. 基于透明质酸的多功能纳米粒用于抗乳腺癌的研究.《中国优秀博士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑》.2021,(第02期),E072-1621.

(51) Int.Cl.

审查员 喻丽莎

C08G 81/00 (2006.01)

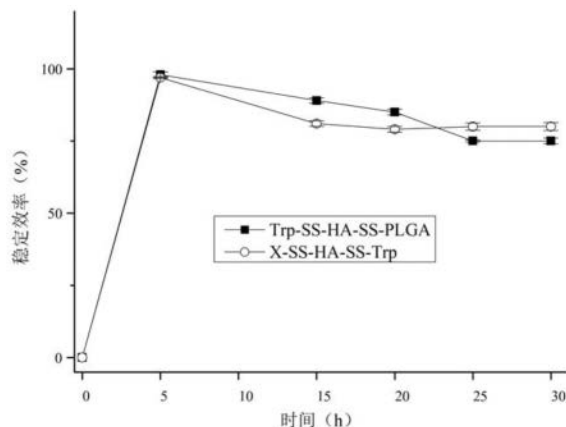
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种透明质酸光诱导载体、制备方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种透明质酸光诱导载体的制备方法,包括以下步骤:S1,将大分子透明质酸钠用透明质酸酶酶解成透明质酸钠寡糖分子;S2,将透明质酸钠寡糖分子在偶联剂存在的条件下与胱胺二盐酸盐缩合反应,制成透明质酸单二硫键产物;S3,取一份透明质酸单二硫键产物在酸性催化的条件下缓慢添加到一份透明质酸单二硫键产物中,脱水缩合形成透明质酸双二硫键产物;S4,取透明质酸双二硫键产物,加入色氨酸和X,进行羟氨基化反应,制备所述透明质酸光诱导载体。所述透明质酸光诱导载体的光诱导效率高。



1. 一种透明质酸光诱导载体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - S1,将大分子透明质酸钠用透明质酸酶酶解成透明质酸钠寡糖分子;
 - S2,将透明质酸钠寡糖分子在偶联剂存在的条件下与胱胺二盐酸盐缩合反应,制成透明质酸单二硫键产物;
 - S3,取一份透明质酸单二硫键产物在酸性催化的条件下缓慢添加到另一份透明质酸单二硫键产物中,脱水缩合形成透明质酸双二硫键产物;
 - S4,取透明质酸双二硫键产物,加入色氨酸,进行羟氨基化反应,制备所述透明质酸光诱导载体;所述透明质酸钠寡糖分子的分子量不大于10 kDa;
所述步骤S3的脱水缩合反应温度为14-18℃。
2. 根据权利要求1所述的透明质酸光诱导载体的制备方法,其特征在于,所述大分子透明质酸钠的分子量不小于1000kDa。
3. 根据权利要求1所述的透明质酸光诱导载体的制备方法,其特征在于,所述偶联剂选自1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或两种。
4. 根据权利要求1所述的透明质酸光诱导载体的制备方法,其特征在于,所述步骤S2包括:将透明质酸钠寡糖分子溶解于磷酸缓冲液中,再加入偶联剂,室温下搅拌1.5-2.5h,再加入胱胺二盐酸盐,透析22-26h,最后经冷冻干燥后得到透明质酸单二硫键产物。
5. 根据权利要求1所述的透明质酸光诱导载体的制备方法,其特征在于:所述透明质酸钠寡糖分子与胱胺二盐酸盐的质量比为1:0.4-6。
6. 一种权利要求1至5任一项所述的方法制备的透明质酸光诱导载体。
7. 一种权利要求6所述的透明质酸光诱导载体在光学成像非疾病诊断和治疗方面的应用。

一种透明质酸光诱导载体、制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种透明质酸光诱导载体、制备方法及应用,属于光诱导载体制备技术领域。

背景技术

[0002] 在光学成像领域,通常使用的荧光素或染料作为标记物。但是,传统的荧光材料存在以下缺点:(1)通常无法直接用于生物体进行成像或;(2)水溶性差;(3)缺乏生物相容性;(4)粒径过小,通常小于10nm,在体内循环时容易被肾脏快速清除;(5)无法在皮肤表层受光驱动,而单纯的依靠主动运输进入皮肤表层,因而出现了利用率不高的问题。

[0003] 透明质酸HA具有良好的保水性、润滑性、黏弹性、生物降解性及生物相容性等理化性能和生物功能,在医疗、化妆品及功能性食品领域中应用十分广泛。透明质酸是公认的具有较好生物相容的载体材料,有望解决传统荧光材料存的缺点。但是,现有技术中还未见采用透明质酸制备荧光材料的报道。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种透明质酸光诱导载体、制备方法及应用,可以有效解决上述问题。

[0005] 本发明是这样实现的:

[0006] 一种透明质酸光诱导载体的制备方法,包括以下步骤:

[0007] S1,将大分子透明质酸钠用透明质酸酶酶解成透明质酸钠寡糖分子;

[0008] S2,将透明质酸钠寡糖分子在偶联剂存在的条件下与脘胺二盐酸盐缩合反应,制成透明质酸单二硫键产物;

[0009] S3,取一份透明质酸单二硫键产物在酸性催化的条件下缓慢添加到另一份透明质酸单二硫键产物中,脱水缩合形成透明质酸双二硫键产物;

[0010] S4,取透明质酸双二硫键产物,加入色氨酸,进行羟氨基化反应,制备所述透明质酸光诱导载体。

[0011] 作为进一步改进的,所述大分子透明质酸钠的分子量不小于1000kDa。

[0012] 作为进一步改进的,所述透明质酸钠寡糖分子的分子量不大于10kDa。

[0013] 作为进一步改进的,所述偶联剂选自1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或两种。

[0014] 作为进一步改进的,所述步骤S2包括:将透明质酸钠寡糖分子溶解于磷酸缓冲液中,再加入偶联剂,室温下搅拌1.5-2.5h,再加入脘胺二盐酸盐,透析22-26h,最后经冷冻干燥后得到透明质酸单二硫键产物。

[0015] 作为进一步改进的,所述透明质酸钠寡糖分子与脘胺二盐酸盐的质量比为1:0.4-6。

[0016] 作为进一步改进的,所述步骤S3的脱水缩合反应温度为14-18℃。

[0017] 一种上述的方法制备的透明质酸光诱导载体。

[0018] 一种上述的透明质酸光诱导载体在光学成像方面的应用。

[0019] 本发明的有益效果是：

[0020] 本发明制备的透明质酸光诱导载体，将Trp(色氨酸)通过羟氨基化反应接枝在透明质酸双二硫键产物上，形成双向可修饰哑铃状三联透明质酸光诱导载体，使其在光的驱动下发生迁移反应，可以利用自然光对载体进行驱动，极大的增强了使用的便捷性，使透明质酸光诱导载体的光诱导效率达到40%。

[0021] 本发明制备的透明质酸光诱导载体能够被细胞中的受体所识别，通过胞吞或者胞吐作用有选择性的被细胞摄取，其中外壳(X)可以携带药物清除体内超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基(OH^{\cdot})、有机自由基(R^{\cdot})和有机过氧基(ROO^{\cdot})等自由基，克服了药物暴露在皮肤部分吸收率较低的问题。

[0022] 本发明制备的透明质酸光诱导载体具有抗氧化的作用，既能高效利用组成成分的生物和化学功效，协同增效作用时长达到6-8h，又能在红移的同时促使透明质酸钠寡糖分子迁徙到皮肤的表皮内部，并能阻挡紫外线对肌肤的伤害。

附图说明

[0023] 为了更清楚地说明本发明实施方式的技术方案，下面将对实施方式中所需要使用的附图作简单地介绍，应当理解，以下附图仅示出了本发明的某些实施例，因此不应被看作是对范围的限定，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0024] 图1是本发明试验例1提供的稳定性测试图。

[0025] 图2是本发明试验例2提供的相对感光效率图。

具体实施方式

[0026] 为使本发明实施方式的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明实施方式中的附图，对本发明实施方式中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施方式是本发明一部分实施方式，而不是全部的实施方式。基于本发明中的实施方式，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式，都属于本发明保护的范围。因此，以下对在附图中提供的本发明的实施方式的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围，而是仅仅表示本发明的选定实施方式。基于本发明中的实施方式，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式，都属于本发明保护的范围。

[0027] 在本发明的描述中，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。在本发明的描述中，“多个”的含义是两个或两个以上，除非另有明确具体的限定。

[0028] 本发明实施例提供一种透明质酸光诱导载体的制备方法，包括以下步骤：

[0029] S1，将大分子透明质酸钠用透明质酸酶酶解成透明质酸钠寡糖分子；所述大分子透明质酸钠的分子量不小于1000kDa，所述透明质酸钠寡糖分子的分子量不大于10kDa。优

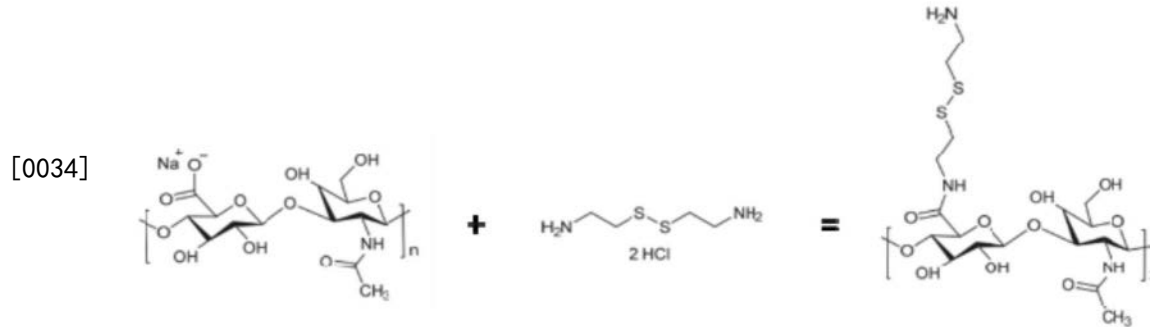
选的,所述酶解的温度为45-55℃,pH为4.8-5.2。

[0030] S2,将透明质酸钠寡糖分子在偶联剂存在的条件下与胱胺二盐酸盐缩合反应,制成透明质酸单二硫键产物。优选的,所述偶联剂选自1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或两种。

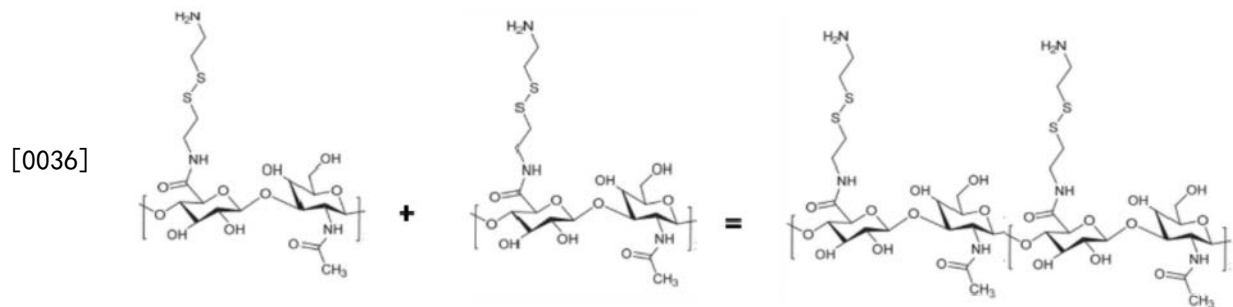
[0031] 优选的,所述步骤S2包括:将透明质酸钠寡糖分子溶解于磷酸缓冲液中,再加入偶联剂,室温下搅拌1.5-2.5h,再加入胱胺二盐酸盐,透析22-26h,最后经冷冻干燥后得到透明质酸单二硫键产物。

[0032] 优选的,所述透明质酸钠寡糖分子与胱胺二盐酸盐的质量比为1:0.4-6。

[0033] 此步骤的反应式如下:



[0035] S3,取一份透明质酸单二硫键产物在酸性催化的条件下缓慢添加到另一份透明质酸单二硫键产物中,脱水缩合形成透明质酸双二硫键产物;所述步骤S3的脱水缩合反应温度为14-18℃。此步骤的反应式如下:



[0037] S4,取透明质酸双二硫键产物,加入色氨酸,进行羟氨基化反应,制备所述透明质酸光诱导载体。将Trp(色氨酸)通过羟氨基化反应接枝在透明质酸双二硫键产物上,形成双向可修饰哑铃状三联透明质酸光诱导载体,使其在光的驱动下发生迁移反应,可以利用自然光对载体进行驱动,极大的增强了使用的便捷性,提高了透明质酸光诱导载体的光诱导效率。

[0038] 进一步改进的,所述透明质酸光诱导载体上还可以连接亲水官能团或亲脂疏水官能团或不做进一步的修饰。所述亲水官能团或亲脂疏水官能团选自PLGA、聚乳酸(PLA)、脱氧胆酸(DOCA)、(2-(4-(乙基苯氧基)-N,N-二乙基烟酰胺)(oligo(VBODENA))等。

[0039] 本发明实施例还提供一种上述的方法制备的透明质酸光诱导载体。

[0040] 本发明实施例还提供一种上述的透明质酸光诱导载体在光学成像方面的应用。

[0041] 实施例1

[0042] (1) 1000kDa透明质酸钠溶解液:准确称量1000kDa的透明质酸钠分子10g,用去离子水进行搅拌溶解,制备成浓度为10g/L的溶液。放置在4℃冰箱冷藏备用。

[0043] (2) 酶解:去制备好的1000kDa透明质酸钠溶解液100ml,调节pH到5.0,隔水加热温度至50℃,加入100u1活性为150000U/L的透明质酸酶(CAS:37259-53-3),酶解反应时间为4h,反应过程中用磁力搅拌器轻微的搅拌,随后冷冻干燥。

[0044] (3) 透明质酸钠寡糖分子液制备:取酶解反应完成的1000kDa透明质酸溶液,灭活后使用超声波进行振荡,随后放置在4℃的冰箱中进行冷藏。用改性的透析膜进行透析,确保分子量低于10kDa,并进行质谱检测,制备成透明质酸寡糖分子,随后冷冻干燥。

[0045] (4) 取分子量为10kDa的透明质酸钠200mg溶解在40mL0.02M, pH=6.8的PBS中(浓度为5mg/mL),搅拌均匀后,加入一定量的偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC(m=14.4-287.6mg)和N-羟基琥珀酰亚胺NHS(m=8.6-172.6mg),在室温下搅拌2h后加入脒胺二盐酸盐(m=84.4-563.0mg),移入3500Da的透析袋中,在去离子水中(2L)进行透析,透析24h,期间换水3次,经冷冻干燥后得到棉花状的产物HA-SS(透明质酸链接一个二硫键)。

[0046] (5) 取少量HA-SS溶解在PBS缓冲液中,制备成10ug/ml的溶液,另用移液枪吸取100u1制备成的溶液,在酸性催化的条件下缓慢添加到HA-SS溶解的PBS缓冲液中,控制反应温度为16℃,脱水缩合形成SS-HA-SS(透明质酸链接两个二硫键),冷冻干燥。

[0047] (6) 随后称取SS-HA-SS冻干粉,将其溶解在PBS缓冲液中,制备成浓度为20ug/ml的混合溶液。随后加入聚(乳酸-共-乙醇酸)PLGA,组建成SS-HA-SS-PLGA(二硫键-透明质酸-二硫键-PLGA(亲脂疏水官能团))。

[0048] (7) 随后称取SS-HA-SS-PLGA冻干粉,将其溶解在PBS缓冲液中,制备成浓度为20ug/ml的混合溶液。在通入氮气的条件下,逐滴加入Trp,反应过程中避免剧烈震荡,组建成Trp-SS-HA-SS-PLGA。

[0049] 实施例2

[0050] (1) 1000kDa透明质酸钠溶解液:准确称量1000kDa的透明质酸钠分子10g,用去离子水进行搅拌溶解,制备成浓度为10g/L的溶液。放置在4℃冰箱冷藏备用。

[0051] (2) 酶解:去制备好的1000kDa透明质酸钠溶解液100ml,调节pH到5.0,隔水加热温度至50℃,加入100u1活性为150000U/L的透明质酸酶(CAS:37259-53-3),酶解反应时间为4h,反应过程中用磁力搅拌器轻微的搅拌,随后冷冻干燥。

[0052] (3) 透明质酸钠寡糖分子液制备:取酶解反应完成的1000kDa透明质酸溶液,灭活后使用超声波进行振荡,随后放置在4℃的冰箱中进行冷藏。用改性的透析膜进行透析,确保分子量低于10kDa,并进行质谱检测,制备成透明质酸寡糖分子,随后冷冻干燥。

[0053] (4) 取分子量为10kDa的透明质酸钠200mg溶解在40mL 0.02M, pH=6.8的PBS中(浓度为5mg/mL),搅拌均匀后,加入一定量的偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC(m=14.4-287.6mg)和N-羟基琥珀酰亚胺NHS(m=8.6-172.6mg),在室温下搅拌2h后加入脒胺二盐酸盐(m=84.4-563.0mg),移入3500Da的透析袋中,在去离子水中(2L)进行透析,透析24h,期间换水3次,经冷冻干燥后得到棉花状的产物HA-SS(透明质酸链接一个二硫键)。

[0054] (5) 取少量HA-SS溶解在PBS缓冲液中,制备成10ug/ml的溶液,另用移液枪吸取100u1制备成的溶液,在酸性催化的条件下缓慢添加到HA-SS溶解的PBS缓冲液中,控制反应温度为16℃,脱水缩合形成SS-HA-SS(透明质酸链接两个二硫键),冷冻干燥。

[0055] (6) 随后称取SS-HA-SS冻干粉,将其溶解在PBS缓冲液中,制备成浓度为20ug/ml的混合溶液。随后将聚乳酸(PLA),组建成PLA-SS-HA-SS。(7) 随后称取PLA-SS-HA-SS冻干粉,将其溶解在PBS缓冲液中,制备成浓度为20ug/ml的混合溶液。随后加入色氨酸Trp,组建成PLA-SS-HA-SS-Trp(X-SS-HA-SS-Trp)。

[0056] 试验例1

[0057] 稳定性测试

[0058] 选择X-SS-HA-SS-Trp(实施例2制备)与Trp-SS-HA-SS-PLGA(实施例1制备)进行测试,测试稳定效率。

[0059] 使用步骤为:取二者的溶液,将其滴加在弱碱(pH=7.8)的环境中测试其在碱性环境中的稳定性,置于暗处进行放置,随后每隔一段时间取出测试其吸光值。结果图1。发现在碱性环境中该合成物质依然具有一定的稳定性。X-SS-HA-SS-Trp随之间的损失效率为20%以内,远低于当前市面上感光材料的水平。

[0060] 试验例2

[0061] 相对感光效率

[0062] 选择X-SS-HA-SS-Trp(实施例2制备)和Trp-SS-HA-SS-PLGA(实施例1制备)与被HA修饰后的卟啉(获赠)进行比对其在外部环境中的感光效率。

[0063] 将X-SS-HA-SS-Trp、Trp-SS-HA-SS-PLGA和被HA修饰后的卟啉(对照组)均配置成不同浓度的溶液,用PBS进行溶解。在测试时间为8小时的范围内,测试在外界光照(自然光)的情况下其感光效率,如图2所示。可以发现,随着浓度的增加,暴露在外界环境时的光损伤效率越低。光损伤效率越高,表示其受外界环境影响越大,相对感光效率越低。

[0064] 以上所述仅为本发明的优选实施方式而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

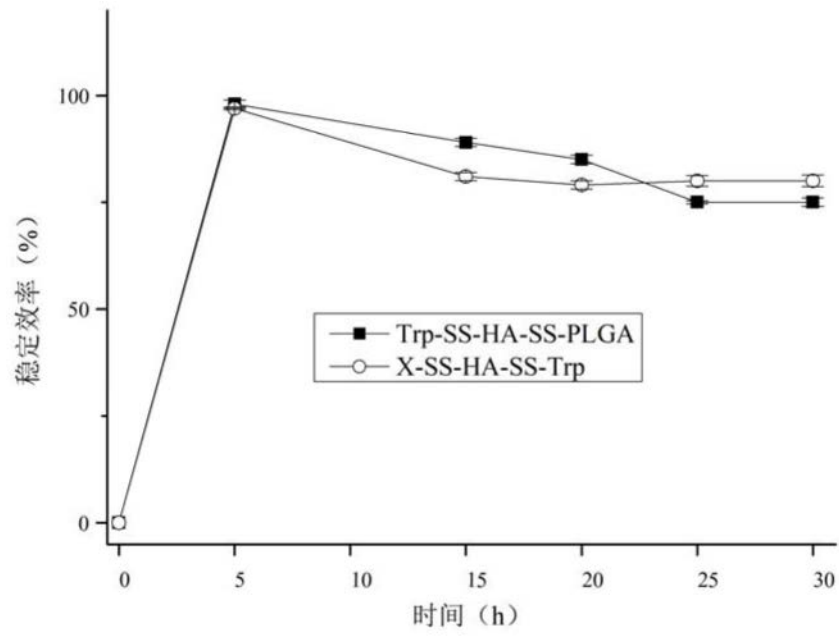


图1

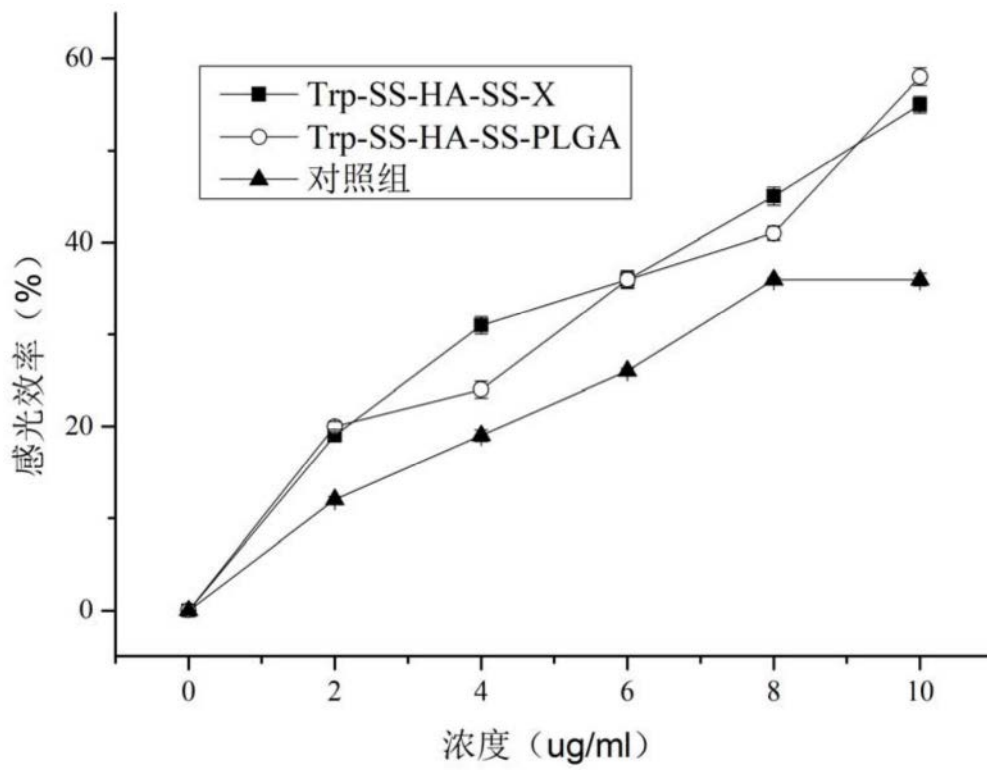


图2