



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104169305 B

(45)授权公告日 2016.07.27

(21)申请号 201380014214.8

A61K 47/36(2006.01)

(22)申请日 2013.03.12

A61K 9/51(2006.01)

(30)优先权数据

C08B 37/00(2006.01)

PL398450 2012.03.14 PL

C08B 37/02(2006.01)

C08B 37/08(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C08L 1/28(2006.01)

2014.09.15

C08L 5/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C08L 5/08(2006.01)

PCT/PL2013/000030 2013.03.12

C08B 11/12(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

(56)对比文件

W02013/137755 EN 2013.09.19

CN 1596129 A, 2005.03.16,

CN 1638808 A, 2005.07.13,

(73)专利权人 纳诺沃勒斯有限公司

WO 2011/069475 A2, 2011.06.16,

地址 波兰华沙

WO 2012/004007 A1, 2012.01.12,

(72)发明人 托马斯·凯驰 伊加·瓦斯阿克

CN 101273066 A, 2008.09.24,

(74)专利代理机构 北京市立方律师事务所

审查员 马俊魁

11330

代理人 王荣

(51)Int.Cl.

C08B 1/12(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

制备多糖纳米粒的方法

行,反应温度为10℃至100℃,其中氨基与醛基的总摩尔比为20至0.5。

(57)摘要

由多糖及其衍生物制备纳米粒的方法,是通过将多糖及其衍生物的特异性部分氧化产生醛基,并将化合物与氨基或其他能与醛基反应的具有R-NH₂键的基团连接,该方法包括用已知方法氧化多糖或其衍生物得到醛基,直到糖环的氧化度达到0.1%至80%,然后向氧化的多糖的水溶液或者氧化的多糖的水与有机溶剂的混合溶液中添加至少一种在与醛基连接后显示疏水性质的纳米粒形成剂,所述纳米粒形成剂选自包括以下的组:含有4至20个碳原子的脂肪族或芳香族有机胺、含有4至20个碳原子的脂肪族和芳香族有机酸的酰胺和酰肼、疏水氨基酸、磷脂酰乙醇胺,以及含有至少一个氨基、酰胺基或酰肼基的至少一种活性物质,反应在pH 1至9的溶液中进行。

1. 一种由多糖及其衍生物制备纳米粒的方法, 是通过将葡聚糖、淀粉、纤维素、肝糖、透明质酸、肝素、海藻酸、卡拉胶作为多糖的特异性部分氧化产生醛基, 并且附接与醛基基团反应的具有氨基或其他的具有R-NH₂键的基团的化合物, 其特征在于: 在水溶液中通过加入预定量的氧化剂将多糖预氧化而得到醛基, 直到糖环的氧化度达到0.1%至80%, 然后向氧化的多糖的水溶液或者氧化的多糖的水与有机溶剂的混合溶液中添加至少一种在与醛基连接后显示疏水性质的纳米粒形成剂, 所述纳米粒形成剂选自包括以下的组: 含有4至20个碳原子的脂肪族或芳香族有机胺、含有4至20个碳原子的脂肪族和芳香族有机酸的酰胺和酰肼、疏水氨基酸、磷脂酰乙醇胺, 以及含有至少一个氨基、酰胺基或酰肼基的至少一种活性物质, 制备纳米粒的方法在pH 1至9的溶液中进行, 制备纳米粒的方法的温度为10℃至100℃, 其中氨基与醛基的总摩尔比为20至0.5。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述纳米粒形成剂与所述活性物质同时加入。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述纳米粒形成剂在加入所述活性物质之后加入。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述纳米粒形成剂选自包括以下的组: 丁胺、戊胺、己胺、辛胺、癸胺、十二烷胺、十四烷胺、十六烷胺、环己胺、苄胺、乙苯胺、鞘氨醇、油酸酰胺、棕榈酸酰胺、硬脂酸酰肼、棕榈酸酰肼、油酸酰肼、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 使用含有氨基、酰胺基或酰肼基的药物, 或其中羧基被修饰为酰胺或酰肼的衍生的药物, 或适合基因疗法的RNA或DNA片段或其衍生物, 单色染料和荧光染料来作为所述活性物质。

6. 根据权利要求1或5所述的方法, 其特征在于: 所述活性物质选自包括以下的组: 柔红霉素、阿霉素、氨基吡啶和它们的衍生物、顺铂及其衍生物、氨甲蝶呤、阿糖胞苷、吉西他滨、氨苯砒、阿昔洛韦、齐多夫定、5-氟嘧啶、巯基嘌呤、伊马替尼、舒尼替尼、博来霉素、放线菌素、丝裂霉素、更生霉素、美法仑、替莫唑胺、塞来昔布、奈拉滨、克拉屈滨、异烟肼、9-氨基吡啶和其他吡啶染料、DAPI、罗丹明及其衍生物、中性红、台盼蓝。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述形成剂和所述活性物质两者以易溶盐的形式加入到反应中。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其特征在于: 使用盐酸盐、硝酸盐或硫酸盐作为盐。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述淀粉为羧甲基淀粉、直链淀粉或者羟乙基淀粉。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述纤维素为羟乙基纤维素或者羧甲基纤维素。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述制备纳米粒的方法在水/DMSO、水/乙醇、水/醚的溶剂混合物中进行。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述氧化在氧化剂的存在下进行, 所述氧化剂包括高碘酸盐离子、氧化数为4的铅盐、氧化数为2的铜化合物或在氧化钒存在下氧化的水。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 在所述制备纳米粒的方法完成后, 将所形

成的键进行还原。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其特征在于: 所述还原在水溶液中使用 NaBH_4 或 NaBH_3CN 进行。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 从所述制备纳米粒的方法中获得的纳米粒水性悬浮液通过透析、沉淀、离心来纯化, 或被直接使用。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所获得的纳米粒使用抗体、肽或蛋白质进行修饰, 也通过已氧化的多糖的醛基与肽氨基的反应。

17. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 将所获得的纳米粒的溶液冻干。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其特征在于: 加入冷冻保护剂进行冻干。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其特征在于: 所述冷冻保护剂是未修饰的多糖。

制备多糖纳米粒的方法

[0001] 本发明提供了由多糖及其衍生物制备纳米粒的方法,其经由特异性氧化多糖链并连接包括药物在内的疏水性化合物来进行。

[0002] 来源于多糖类别的化合物与显示治疗活性且包括氨基的化学物质的共轭物是已知的。例如,WO 2012/004007公开了淀粉的羟乙基化衍生物与不同药物的共轭物。WO 03/000738公开了抗生素/淀粉共轭物,其中抗生素通过一个肽键连接于多糖的还原端。连接是通过在碱的水溶液中用I₂氧化淀粉衍生物的还原端,随后在有机溶液中将氧化的衍生物与抗生素偶联来获得。进一步地,根据国际申请WO 03/15826,已知一种用于抑制恶性癌症转移或预防其复发的药物组合物,其包含作为有效组分的多糖,该多糖具有通过氨基酸或由2-8个氨基酸组成的肽连接于有抗癌活性的活性物质的羧基。申请W003/074087涉及蛋白质与由淀粉衍生的修饰的多糖的偶联,修饰的多糖与蛋白质之间结合的相互作用包括共价键,该共价键由修饰的多糖的末端醛基与能够与所述醛基反应的蛋白质的官能团之间的偶联反应产生。本发明还提供了包括通过偶联制备的偶联化合物的药物制剂,以及所述化合物用于人或动物预防性或治疗性治疗的用途。

[0003] 根据国际申请W02011/069475,已知一种用于制备氧化的透明质酸衍生物的方法和修饰此类衍生物的方法。根据该申请的方法,用特异性氧化剂TEMPO来氧化透明质酸,获得了具有醛基的酸衍生物。然后将该衍生物用于与胺、二胺、氨基酸、肽和其他含有氨基的化合物连接。此类连接通过在水或水和有机溶剂的混合物中使用NaBH₃CN进行还原性胺化来实现。

[0004] 以上提及的发明提供了多糖与不同种类治疗物质的偶联物(共轭物),但是任一上述方案的目的是为了获得多糖纳米粒。同时由于许多新颖的期望的特性,纳米粒作为潜在的药物载体目前被广泛研究[Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines,Mahaparto A.,Singh K.,Journal of Nanobiotechnology,9,2011]。直径为约50nm至约200nm、具有适合的表面性质的纳米粒,可在血液中长期循环,避免被肾脏、肝脏或脾脏过滤清除(长循环颗粒、隐秘颗粒)。此类纳米粒的表面既不诱导免疫系统的反应也不诱导小血浆蛋白质-调理素的聚集。在那种情况下,通过高度亲水聚合物例如聚乙二醇、多糖、聚乙烯醇产生的水凝胶的表面特性,是特别满足需要的。多糖尤其满足需要,因为它们通常是天然来源、生物可降解并且与身体存在的物质相似。此类长循环纳米粒倾向于在肿瘤或炎症区域累积(被动靶向)[Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer,Kwangjae Cho,Xu Wang,Shuming Nie,Zhuo Chen,Dong M.Shin,Clin.Cancer Res.,200814;1310]。该效果是由于这样的事实,即堵塞循环系统的内皮细胞的细胞膜被适当的蛋白质紧紧密封并且它们之间的缝隙只有几个纳米宽。在肿瘤或炎症区域,该缝隙宽得多,达到几百纳米宽。这使得纳米粒累积在该缝隙并由循环“渗”进附近的患病组织,包括肿瘤。纳米粒在患病区域的此类被动累积可增加该区域的药物浓度,提高治疗效果和减少副作用。纳米粒另外的特点是它们能够用适合的蛋白质、代谢物或抗体进行表面修饰,显示出对特定细胞类型,包括肿瘤细胞的亲和性。这使得将药物主要递送到患病细胞。由多糖制备的纳米粒表面是满足要求的,这

基于肿瘤细胞显示对糖的需求的显著增加(瓦博格效应),这反过来能够增加多糖纳米粒与肿瘤细胞的亲和性。此类具有药物的多糖纳米粒将更有效渗透至癌细胞并杀死它们,当用荧光标记物标记时,它们成为有效的诊断工具。纳米粒的另一种重要应用是基因疗法。含有RNA或DNA片段的纳米粒能够渗透至细胞并影响发生在细胞中的基因阅读过程。由此产生治愈遗传疾病的希望。

[0005] 有很多制备纳米粒的方法,但不幸地是其中很多方法非常复杂并需要应用剧烈的条件(超声,高温)、腐蚀性的化学化合物、毒性有机溶剂或表面活性化合物[Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines, Mahapatra A., Singh K., Journal of Nanobiotechnology, 9, 2011]。用于治疗用途的纳米粒应当无毒并且大部分优选生物可降解。多糖由于其生物相容性和生物可降解性是制备此类纳米粒的很好的材料[Lemarchand C., R. Gref, P. Couvreur, Polysaccharide-decorated nanoparticles, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58, 2004]。但是已知的通过连接疏水基团由多糖制备纳米粒的方法是复杂的,并且需要使用表面活性材料或腐蚀性化学物质[Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier system, Aumelas A., Serrero A., Durand, E., Dellacherie E., Leonard M., Colloids and Surfaces B, 59, 2007]。由于化合物的毒性,如此制备的纳米粒必须进一步纯化很长一段时间。

[0006] 本发明涉及一种在温和条件下制备多糖纳米粒的方法,使得能够共价结合对剧烈环境敏感的治疗化合物。

[0007] 由多糖及其衍生物制备纳米粒的方法,通过将它们的特异性部分氧化产生醛基,并将化合物与氨基或其他具有R-NH₂键的能与本发明的醛基反应的基团连接来进行,其特征在于,用已知方法氧化多糖或其衍生物得到醛基,直到糖环的氧化度达到0.1%至80%,然后向氧化的多糖的水溶液或氧化的多糖的水与有机溶剂的混合溶液中添加至少一种纳米粒形成剂和至少一种含有至少一个R-NH₂或N-H键的活性物质,其中所述纳米粒形成剂是具有R-NH₂键的在连接醛基后显示疏水性质的有机化合物,该反应在pH为1至9的溶液中进行,反应温度在10℃至100℃,最优选20-60℃,其中胺基与醛基的总摩尔比为20至0.5。纳米粒形成剂选自包括以下的组:含有4至20个碳原子的脂肪族或芳香族有机胺、含有4至20个碳原子的脂肪族和芳香族有机酸的酰胺和酰肼、疏水氨基酸、磷脂酰乙醇胺。活性物质含有氨基、酰胺基或酰肼基。

[0008] 纳米粒形成剂可与活性物质同时加入或在活性物质后加入。优选首先加入活性物质,因为反应在纳米粒包起来之后发生更慢,可能导致加入的活性物质反应不完全并且在产品纯化时损失。有时候,活性物质可能会以纳米结晶形式累积在纳米粒中,沉淀在由包裹剂产生的疏水区域中,此时不是共价结合,而是物理结合,这可能需要加入更大量的活性物质。此种情况下,中性pH左右是难溶于水的,在pH低于7时溶解良好。

[0009] 形成剂和活性物质优选以易溶于水的盐形式,例如盐酸盐的形式引入。如果胺作为更易溶的盐(例如盐酸盐)引入,则反应过程的pH降低,然后需用碱性水溶液缓慢中和。最佳pH取决于所用的胺的碱性。通常氢离子浓度增加会激活醛基,而且会使游离非质子胺浓度下降;第一级反应的最佳pH介于4至6之间,pH的进一步增加允许通过减少胺阳离子浓度来完成该方法。

[0010] 制备纳米粒的方法还可以在有机溶剂或混合溶剂,例如水/DMSO、水/乙腈、水/醚中进行。为了增加所得纳米粒对水解的抵抗,用 NaBH_4 或 NaBH_3CN 在温和条件下在水溶液中还原形成的键。

[0011] 优选地,作为纳米粒形成剂,使用下述物质:丁胺、戊胺、己胺、辛胺、癸胺、十二烷胺、十四烷胺、十六烷胺、环己胺、苄胺、乙苯胺、鞘氨醇、油酸酰胺、棕榈酸酰胺、硬脂酸酰肼、棕榈酸酰肼、油酸酰肼、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸或脑磷脂(磷脂酰乙醇胺)。优选地,以胺盐,例如盐酸盐、硝酸盐或硫酸盐的水溶液形式加入形成剂,因为速溶胺盐通常在水里溶解更好。

[0012] 优选地,作为含有氨基、酰胺基或酰肼基的活性物质,使用含有此类基团的药物,例如柔红霉素、阿霉素、氨基吡啶和它们的衍生物(如安吡啶)、顺铂及其衍生物、氨甲蝶呤、阿糖胞苷、吉西他滨、氨苯砒、阿昔洛韦、齐多夫定、5-氟嘧啶、巯基嘌呤、伊马替尼、舒尼替尼、博来霉素、放线菌素、丝裂霉素、更生霉素、美法仑、替莫唑胺、塞来昔布、奈拉滨、克拉屈滨、异烟肼或衍生的药物,其中羧基转化成酰胺或酰肼;适合基因疗法的RNA或DNA片段,或其衍生物;单色染料和荧光染料,例如9-氨基吡啶和其他吡啶染料、DAPI、罗丹明及其衍生物、中性红、台盼蓝。优选以胺盐的水溶液形式向反应介质中加入活性物质,所述胺盐例如盐酸盐、硝酸盐或硫酸盐,因为速溶胺盐通常在水里溶解更好。如果此类活性物质在酸性环境中溶解于水中,但是其在中性环境难溶于水,那么所述活性物质只能通过物理相互作用结合在纳米粒中。随pH增加,其将会以纳米晶体形式沉淀在纳米粒的疏水区域。

[0013] 优选地,作为多糖,使用可溶于水或其他溶剂的、分子量达1000kDa的多糖,最优选葡聚糖、淀粉及其衍生物(羟乙基淀粉)、直链淀粉及其衍生物、纤维素衍生物(羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素)、肝糖、透明质酸、肝素、海藻酸、卡拉胶。

[0014] 优选地,氧化进行至多糖的氧化糖环的氧化度为0.5%至80%。

[0015] 优选地,在氧化剂的参与下进行氧化,氧化剂包括高碘酸盐离子(例如高碘酸钠或高碘酸钾)、氧化数为4的铅盐、氧化数为2的铜化合物或在适合催化剂例如氧化钒的存在下氧化的水。

[0016] 而且,所获得的纳米粒可以用抗体或肽或蛋白质修饰,其也是通过氧化多糖的醛基与肽的胺基的反应。

[0017] 所获得的纳米粒水性悬浮液通过透析、沉淀、离心来纯化,或直接使用。所获得的纳米粒溶液可进行冻干。冻干时,可加入起保护剂(冷冻保护剂)作用的物质,例如未修饰的多糖-例如葡聚糖。所获得的纳米粒显示出自组织的能力,如果冻干成干粉,在水或盐水中悬浮后,能几分钟内形成纳米粒。

[0018] 根据本发明,在水溶液中通过加入预定量的氧化剂将多糖预氧化。在特异性氧化过程中,单糖,例如葡萄糖环被裂解而不是多糖链,并且氧化的环形成醛基。这是有机化学中使用的典型特异性氧化反应之一,如用高碘酸盐氧化单糖或多糖方法所例示。[Jeanes, Allene and Wilham, C.A. Periodate Oxidation of Dextran, Journal of American Chemical Society 72.6, (1950):2655-2657]。在氧化过程中,在邻近碳上具有-OH基团的碳-碳键断裂,在形成的两末端形成醛基。还可使用其他部分氧化的方法,这些方法沿着多糖链通过裂解单糖(葡萄糖)环来形成醛基,且不伴随裂解多糖链。氧化度-醛基的数目,可通过已知方式测定,例如通过使醛与盐酸羟胺反应并滴定释放的盐酸[Zhao, Huiru,

Heindel, Ned D., Determination of Degree of Substitution of Formyl groups in Polyaldehyde Dextran by the Hydroxylamine Hydrochloride Method, *Pharmaceutical Research*, 8.3(1991):400-402]. 通过使醛基与氨基反应来将形成的化合物连接至所制备的多糖分子, 同时形成纳米粒。

[0019] 根据本发明, 氧化的多糖同时通过至少两种具有胺性质的物质来修饰: 性质上疏水的纳米粒形成剂, 以及其余的物质是治疗剂或着色剂, 然而, 在同一纳米粒中同时使用几种不同的活性物质也是可能的。这使得可以获得几种药物的组合活性的协同效果。同时使用几种药物显著减少肿瘤产生药物耐受的可能, 并能够主动破坏与细胞周期阶段无关的细胞。在本发明的方法中, 由于疏水-亲水相互作用, 所形成的多糖纳米粒内部含有活性物质和疏水的包裹剂, 其外层包括亲水组分, 主要是多糖。还可以使用形成剂、药物和增加对具体细胞类型的亲和性的醛基反应组分来同时修饰多糖, 所述反应组分如抗体、核苷酸碱基或代谢物, 例如叶酸。纳米粒形成时, 疏水剂在内部, 亲水剂定位于纳米粒外部。

[0020] 本发明的反应在温和的温度条件下, 于含水环境中进行, 且无需有机溶剂或表面活性剂。如此制备的纳米粒无毒(如果不用有毒药物来制备的话)并且可用作药物和着色剂或荧光指示剂的载体, 特别是在肿瘤的治疗和诊断中。纳米粒可含有一种或多种形成剂或几种药物的不同组合, 它们还可含有助剂(二吡啶甲烷), 可以促进药物的效力。

[0021] 所制备的大分子通常具有足够的稳定性, 在含水环境中可以达到几周至十二周以上。冻干后的干粉稳定性显著更高, 使用适合的贮存条件可以超过一年。氨基和醛基之间形成的键的稳定性可通过还原醛-胺键来另外增强。

[0022] 在工作实施例中更详细地说明了本发明的方法。

[0023] 实施例1

[0024] 用高碘酸钠氧化分子量为70kDa的葡聚糖, 使约5%的葡萄糖环氧化, 然后纯化。进行时, 制备葡聚糖水溶液并向其中加入高碘酸钠。反应的化学计量取决于氧化条件、分子量, 并且, 通常取决于葡聚糖的来源, 每摩尔氧化的葡萄糖相当于1至2摩尔高碘酸盐(形成两个醛基), 这通常必须通过实验校正。葡聚糖氧化方法是在室温下在由暗色玻璃制造的容器中进行1小时。然后, 中和溶液并通过对蒸馏水透析进行纯化, 随后在真空中剥离水分。通过已知的羟胺滴定法测量醛基的数目。制备5%的葡聚糖蒸馏水溶液, 然后, 根据所使用的氧化的葡聚糖量中醛基的摩尔数, 以15mol%添加盐酸柔红霉素。在30℃搅拌溶液20分钟。然后, 根据使用的氧化葡聚糖的量中醛基的初始摩尔量, 添加85mol%的5%的盐酸十二烷基胺水溶液并将温度升至35℃, 继续搅拌反应60分钟。所进行的反应引起反应环境pH的降低。然后, 通过添加5%NaOH水溶液开始升高pH。以在30分钟内将pH升高至pH 9的方式添加。在达到pH=9时, 继续反应额外30分钟。然后, 根据所使用的氧化的葡聚糖的量中初始的醛基的摩尔量, 添加15mol%的丙氨酸, 来与所有未反应的醛基结合。搅拌15分钟后, 溶液用5%盐酸中和至pH=7, 并通过透析纯化24小时。然后, 加入20重量%(基于氧化的葡聚糖的初始重量)纯化的未氧化葡聚糖作为冷冻保护剂, 将溶液冻干。将粉末在水中重新悬浮得到纳米粒悬浮液。通过Malvern Zeta Sizer装置测量所得纳米粒的直径分布, 示于图1。使用具有405nm激光的NanoSight装置进行的测量揭示了较低的平均粒径和更窄的直径分布。

[0025] 实施例2

[0026] 用高碘酸钠氧化分子量为40kDa的葡聚糖, 使大约20%的葡萄糖环氧化, 然后纯

化。制备此葡聚糖10%的蒸馏水溶液。然后,根据使用的氧化葡聚糖的量中醛基的摩尔数,添加20mol%的盐酸柔红霉素。30℃下搅拌溶液20分钟。然后,根据使用的氧化葡聚糖的量中初始的醛基的摩尔数量加入80mol%的5%盐酸辛胺水溶液,升温至40℃,继续反应60分钟。所进行的反应引起pH的降低。然后,通过添加5%NaOH水溶液开始升高pH。以在30分钟内将pH升高至pH 8的方式添加。在达到pH=8后,继续反应额外30分钟。然后,根据所使用的氧化的葡聚糖的量中初始的醛基摩尔数添加10mol%的丙氨酸。搅拌15分钟后,溶液用5%盐酸中和至pH=7,根据初始的醛基量加入10mol%过量的NaBH₃CN。然后,反应进行12小时。中和溶液并通过充分透析48小时来纯化,然后基于葡聚糖的初始重量加入50重量%的葡聚糖并将溶液冻干。在水中重新悬浮后,使用具有405nm激光的NanoSight装置测量所得纳米粒的直径分布,示于图2。

[0027] 实施例3

[0028] 制备分子量为约100kDa和氧化数为5%的羧甲基纤维素的4%水溶液,调节pH至pH 5。然后,基于所使用的纤维素衍生物的初始醛基数量,加入50mol%的9-氨基吡啶的盐酸盐水溶液。然后,基于初始的醛基摩尔量,加入55mol%的辛胺水溶液。在40℃进行反应1小时。然后,通过在15分钟内升高pH至pH 9来中和溶液,放置30分钟并透析。获得平均直径为150nm的荧光纳米粒。

[0029] 实施例4

[0030] 用高碘酸钠氧化分子量为70kDa的葡聚糖,使大约15%的葡萄糖环氧化,然后纯化。制备此葡聚糖10%的蒸馏水溶液。然后,基于使用的氧化葡聚糖的量中醛基的摩尔量添加25mol%的盐酸柔红霉素。35℃搅拌溶液20分钟。然后,基于初始的醛基的量加入5mol%的叶酸以提高纳米粒对肿瘤细胞的亲和性。15分钟后,基于使用的氧化葡聚糖的量中初始醛基的摩尔数量添加80mol%的5%的盐酸异亮氨酸水溶液,升温至40℃,继续反应60分钟。然后,通过添加5%NaOH水溶液开始升高pH。以在30分钟内将pH升高至pH 9.5的方式添加。继续反应额外30分钟。然后,中和溶液并通过透析24小时来纯化。所得纳米粒平均直径为140nm。

[0031] 实施例5

[0032] 在四磺基铁酞菁(tetra-sulfo iron-phthalocyanine)催化剂存在条件下,用过氧化氢在水溶液中氧化羧甲基纤维素钠盐[Weber, J.H. et al, Complexes derived from strong field ligands..., Inorganic Chemistry, 1965, 4, 469-471]。所述过程在40℃进行12小时,然后依次通过过滤和透析来纯化产品。通过已知的羟胺滴定法来确定所得的羧甲基纤维素醛衍生物中醛基的量。制备5%所得衍生物的蒸馏水溶液。然后,基于使用的氧化的葡聚糖量中醛基的摩尔数量加入10mol%的盐酸柔红霉素。30℃搅拌溶液20分钟。然后,基于使用的氧化葡聚糖的量中初始的醛基的摩尔数量加入90摩尔%的5%盐酸十二烷胺水溶液,升温至35℃,继续反应60分钟。然后,通过添加5%NaOH水溶液开始升高pH。以在30分钟内将pH升高至pH9的方式添加。在达到pH=9后,继续反应额外30分钟。然后,基于所使用的氧化的葡聚糖的量中初始的醛基摩尔数量添加30mol%的丙氨酸,来与所有未反应的醛基结合。搅拌15分钟后,溶液用5%盐酸中和至pH=7,通过透析24小时来纯化。通过Malvern Zeta Sizer装置测量所得纳米粒的平均直径是110nm。

[0033] 实施例6

[0034] 制备1%透明质酸钠盐水溶液并如实施例1用高碘酸钠氧化至氧化度为5%。调节pH至pH 5,加入盐酸柔红霉素和盐酸阿糖胞苷,每种药物的添加量为氧化的透明质酸的全部醛基的10mol%,反应在30度进行15分钟。然后,基于初始醛基的摩尔数量加入85mol%的盐酸癸胺的水溶液。反应在40℃进行1小时。然后,在20分钟内将pH升高至pH为9,中和溶液并透析。获得的多糖纳米粒水悬浮液含有两种作用机制不同的药物。

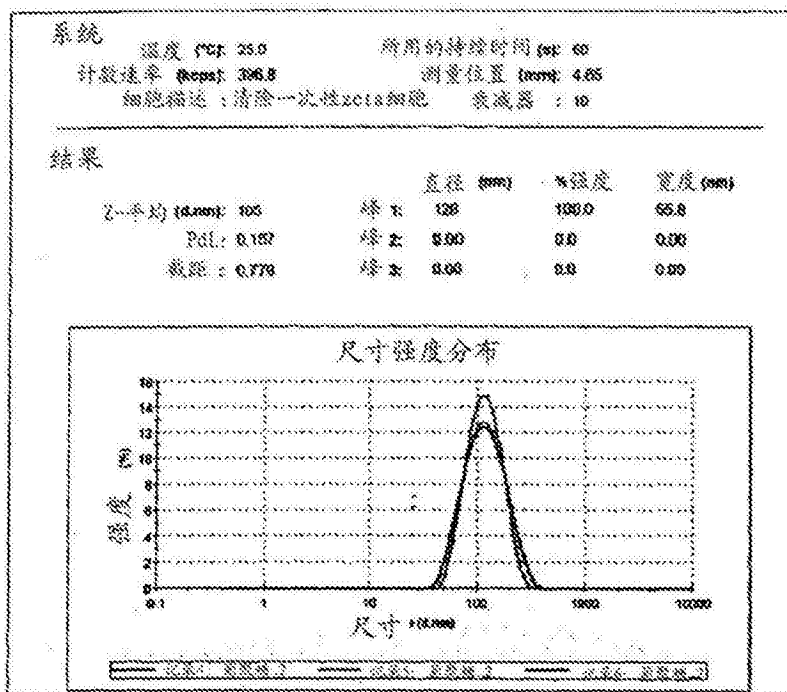


图1

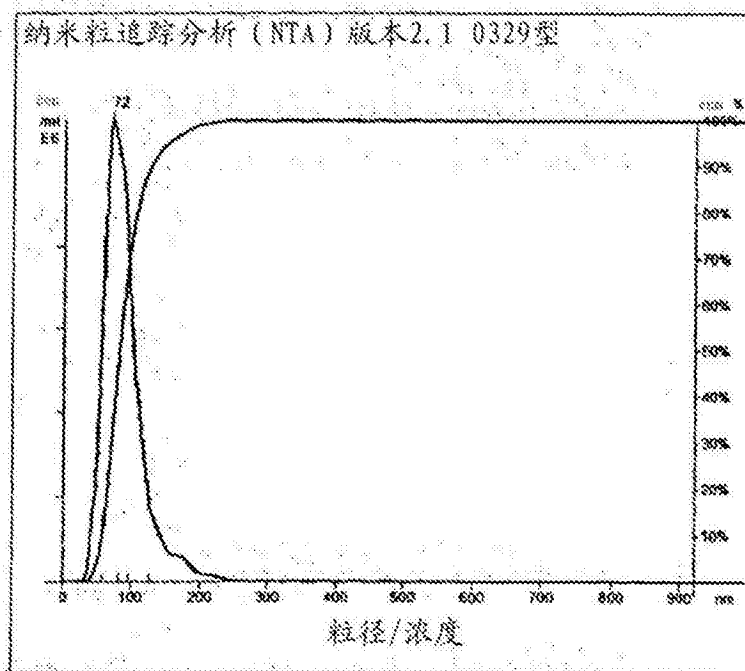


图2