

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510029784.1

[51] Int. Cl.

A61K 47/42 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

C07H 15/203 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100368022C

[22] 申请日 2005.9.20

[21] 申请号 200510029784.1

[73] 专利权人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

[72] 发明人 胡晋红 苏 华 李凤前 盛春泉

[56] 参考文献

Albumin modified with mannose 6 - phosphate; a potential carrier for selective delivery of antifibrotic drugs to rat and human hepatic stellate cell. Beljaars L, Molema G, Weert B 等. Hepatology, Vol. 29 . 1999

Characteristics of the hepatic stellate cell - selective carrier mannose 6 - phosphate modified albumin (M6P28 - HSA). Beljaars L, Olinga P, Molema G 等. liver, Vol. 21 . 2001

审查员 陈晏晏

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 衷诚宣

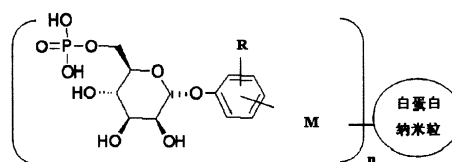
权利要求书 4 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

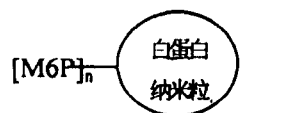
双重靶向抗肝纤维化药物载体拟糖蛋白纳米粒及其制法

[57] 摘要

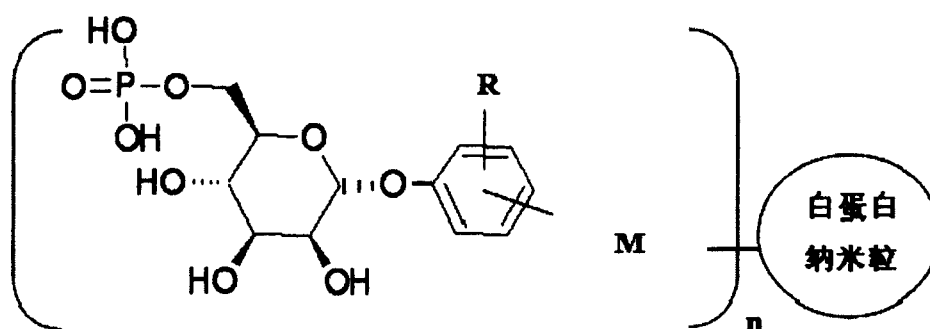
本发明涉及医药技术领域，是一种双重靶向抗肝纤维化药物载体——拟糖蛋白纳米粒，即 6 - 磷酸 - 甘露糖衍生物类白蛋白纳米粒及其制备方法。其化学结构通式如下：见右式，其中，R 代表芳环上的取代基，M 代表硫代碳酸二胺或偶氮基。本发明拟糖蛋白纳米粒可作为药物载体，首先通过肝、脾等处网状内皮系统的巨噬细胞的吞噬作用，将载有抗肝纤维化药物的纳米粒被动靶向于肝脏；还可通过结构修饰形成的特异性配体与肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 中甘露糖 - 6 - 磷酸/胰岛素样生长因子 (M6P/IGF II) 受体特异结合，在细胞摄粒作用下进入细胞内部。拟糖蛋白纳米粒作为药物到达 HSC 的有效转运载体，使抗肝纤维化药物在 HSC 内部充分发挥作用，从而大大提高药物疗效。



1. 一种双重靶向抗肝纤维化药物载体拟糖蛋白纳米粒



其中 M6P 表示 6-磷酸甘露糖衍生物，结构通式如下：



R 基团代表芳环上的取代基，取代基位置可位于邻、间、对位，可以无取代、单取代，也可以多取代，取代基选自：

(1) H、F、Cl、Br、I；

(2) 甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、戊基、叔戊基、仲戊基、异戊基、胺基、氰基、硝基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基；

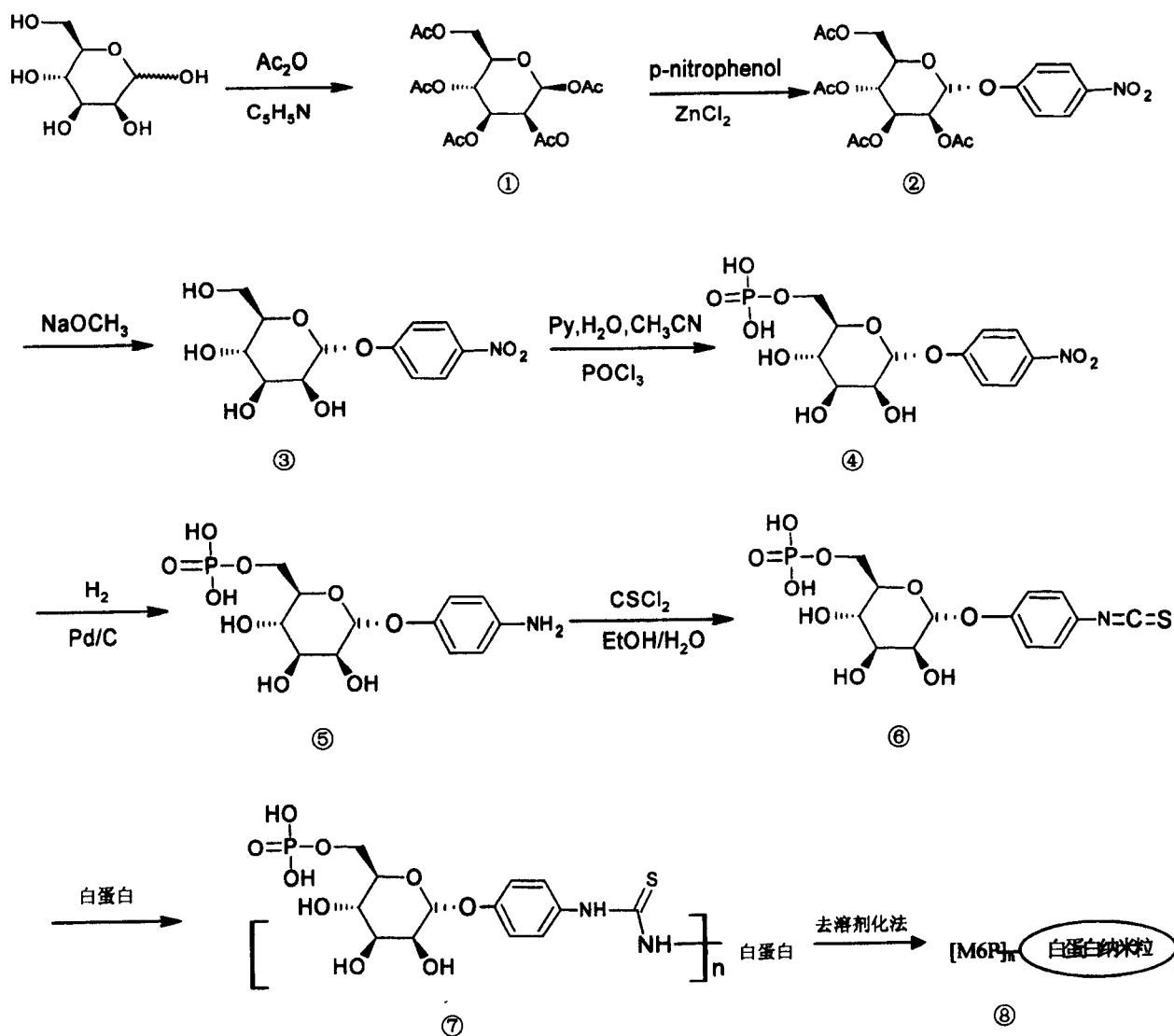
M 基团代表芳环上与白蛋白纳米粒表面氨基酸残基相连接的取代基硫代碳酰二胺或偶氮基；取代基位置可位于邻、间、对位，可以单取代，也可以多取代；

n 代表 1~60；

白蛋白选自血清白蛋白、卵白蛋白、乳白蛋白、豆白蛋白。

2. 按权利要求 1 所述的拟糖蛋白纳米粒，其特征在于 R 为 H，M 为 4-硫代碳酰二胺苯酚，白蛋白为人血白蛋白或牛血清白蛋白，其为 6-磷酸-1-(4-硫代碳酰二胺苯酚)- α -D-吡喃甘露糖蛋白纳米粒；

3. 权利要求 2 所述的 6-磷酸-1-(4-硫代碳酰二胺苯酚)- α -D-吡喃甘露糖蛋白纳米粒的制备方法，合成路线如下：



具体步骤为：

(1) 制备五氧乙酰-β-D-吡喃甘露糖①

D-甘露糖在乙酸酐:吡啶溶液=8~12:11~15, 在-20℃~-5℃条件下反应4h, 再置0℃2天, 得五氧乙酰-β-D-甘露吡喃糖①;

(2) 制备对硝基苯酚-四氧乙酰-α-D-吡喃甘露糖②

将对硝基苯酚与五氧乙酰-β-D-甘露吡喃糖①以ZnCl₂为催化剂于160℃反应30min, 得对硝基苯酚-四氧乙酰-α-D-吡喃甘露糖②;

(3) 制备对硝基苯酚-α-D-吡喃甘露糖③

对硝基苯酚-四氧乙酰-α-D-吡喃甘露糖②在无水甲醇中, 加入NaOCH₃加热回流,

得对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖③；

(4) 制备 6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④

对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖③在吡啶:乙腈:水=5~15:20~30:0~2 溶液中与 POCl_3 反应得 6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④；

(5) 制备 6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤

6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④在甲醇:水=3~9:1~3 的混合液中，在 Pa-C 催化作用下，与 H_2 反应得 6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤；

(6) 制备 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥

6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤在乙醇与水=5~15:1~3 的混合液中，与 CSCl_2 反应得 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥；

(7) 制备拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白⑦

6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥水溶液，与牛血清白蛋白或人血白蛋白或其他白蛋白的硼酸盐缓冲液室温反应 18h，得拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白⑦，通过调整 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥与白蛋白的比例 1~800:1，可得糖基化程度不同的拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白，n 为 1~60；

(8) 制备拟糖蛋白纳米粒⑧

将拟糖蛋白⑦配制成水溶液或溶于 10mM NaCl 或 KCl 中性盐溶液，控制 pH 值 5-11，搅拌情况下持续加入适量去溶剂化剂，去溶剂化剂选自脱水剂乙醇、甲醇、丙酮，形成拟糖蛋白纳米粒后，加适量交联剂戊二醛或甲基聚乙烯-右旋糖苷或稳定剂乳酸，连续搅拌 12 小时以上促使纳米粒交联固化，得拟糖蛋白纳米粒胶体混悬液，将该混悬液微热至 20~37°C 过夜，去除去溶剂化剂后冻干即可，所得纳米粒粒径 50-300nm。

4. 按权利要求 1 或 2 或 3 所述的拟糖蛋白纳米粒在制备抗肝纤维化药物中的应用。

5. 载抗肝纤维化药物拟糖蛋白纳米粒制备方法，其特征在于将权利要求 3 所述的拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白⑦配成一定浓度水溶液或中性盐溶液，加入抗肝纤维化药物的水溶液或醇溶液，抗肝纤维化药物选自阿魏酸钠、华蟾蜍毒素、蟾蜍灵、秋水仙碱、马洛替酯，控制 pH 值 5-11，搅拌情况下持续加入适量去溶剂化剂，去溶剂化剂选自脱水剂乙醇、甲醇、丙酮，形成载药拟糖蛋白纳米粒后，加适量交联剂戊二醛或甲基聚乙烯-右旋糖苷或稳定剂乳酸，连续搅拌 12 小时以上促使纳米粒交联固化，将所得载药拟糖蛋白纳米粒胶体混悬液于 20~37°C 下微热过夜，去除去溶剂化剂后冻干即可。

6. 按权利要求 5 所述的载药拟糖蛋白纳米粒制备方法，其特征在于在加入抗肝纤维化药物的同时，还加入适量表面活性剂泊洛沙姆或卵磷脂。

双重靶向抗肝纤维化药物载体拟糖蛋白纳米粒及其制法

技术领域

本发明涉及医药技术领域，是一种双重靶向抗肝纤维化的药物载体——拟糖蛋白纳米粒及其制备方法。


背景技术

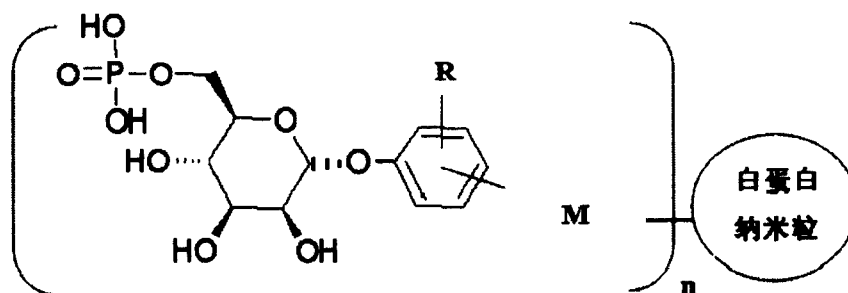
细胞表面有特异受体，利用特异性配体与微粒表面结合，使微粒导向细胞，可改变微粒的生物分布。这类配体对受体有强亲和力，包括细胞表面标记物，如糖、外源凝聚素等。研究者应用糖衍生物修饰微粒，可导致对白细胞、肺泡囊、肝细胞等的靶向作用。如肝细胞、肺/心细胞可识别半乳糖，纤维细胞可识别甘露糖-6-磷酸酯，白细胞可识别6-氨基-甘露糖，单核巨噬细胞可识别甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺。经研究发现肝星状细胞（hepatic stellate cell, HSC）在各种损伤因素下可被激活和增殖，使细胞外基质大量合成，直接导致肝纤维化的形成，HSC中甘露糖-6-磷酸/胰岛素样生长因子（M6P/IGF II）受体，在活化HSC中分布较多。约有10%-20% M6P/IGF II受体可直接在细胞表面表达，其在肝纤维化进程中的表达仍能进一步增加，使细胞表面的受体密度加大，Beljaars等以M6P对人血白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)进行修饰，得到新生糖蛋白载体（M6P-HSA），可由HSC内化，在细胞摄粒作用下进入细胞内部（Beljaars L, Molema G, Weert B, et al. Albumin modified with mannose 6-phosphate: a potential carrier for selective delivery of antifibrotic drugs to rat and human hepatic stellate cell. *Hepatology*, 1999,29:1486-1493.）。M6P-HSA与药物形成的复合物，可作为药物到达HSC的有效转运载体，使抗肝纤维化药物在HSC内部发挥作用。但至今仅限于糖基修饰白蛋白药物复合物的体外研究，未见有合适的制剂报道。

发明内容

本发明目的是提供一种双重靶向抗肝纤维化药物载体——拟糖蛋白纳米粒及其制备方法。

由于纳米粒载体系统具有独特的靶向性、缓控释特性和保护药物作用，白蛋白材料又安全无毒、无免疫原性、可生物降解、生物相容性好，因此本发明将白蛋白进行糖化结构修饰后，通过去溶剂化法制得新生糖蛋白纳米粒，即以拟糖蛋白为基质的纳米级微粒，将其载药后进入体内，利用肝脾等处丰富的网状内皮系统的巨噬细胞的吞噬作用，将载有抗肝纤维化药物的拟糖蛋白纳米粒被动靶向运输至肝脏等处，再利用拟糖蛋白纳米粒表面特异性配体与 HSC 中甘露糖-6-磷酸/胰岛素样生长因子 (M6P/IGF II) 受体特异结合作用，将药物主动靶向运输至 HSC，实现抗肝纤维化药物的主动与被动双重靶向，大大提高药物疗效，降低药物副作用。

本发明拟糖蛋白纳米粒结构简式为 $[M6P]_n$ —, M6P 代表 6-磷酸甘露糖衍生物，通式如下：



其中，R 基团代表芳环上的取代基，取代基位置可位于邻、间、对位，可以无取代、单取代，也可以多取代，取代基选自：

- (1) H、F、Cl、Br、I；
- (2) 甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、戊基、叔戊基、仲戊基、异戊基、胺基、氰基、硝基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基；

M 基团代表芳环上与白蛋白纳米粒表面氨基酸残基相连接的取代基硫代碳酰二胺或偶氮基；取代基位置可位于邻、间、对位，可以单取代，也可以多取代；

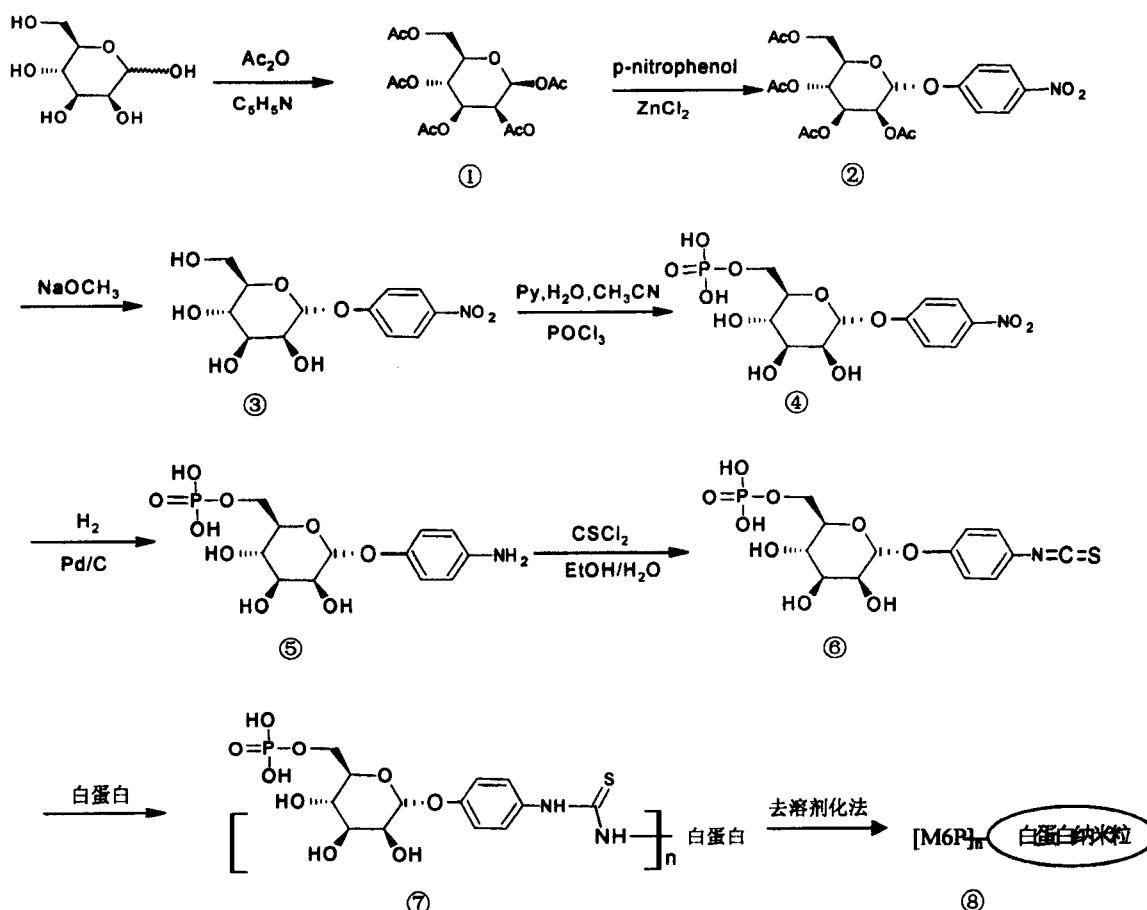
M6P 优选 6-磷酸-1-(4-硫代碳酰二胺苯酚)- α -D-吡喃甘露糖，其 R=H，M=4-硫代碳酰二胺苯酚；

n 代表 1~60；

白蛋白选自卵白蛋白、乳白蛋白、豆白蛋白、血清白蛋白，优选牛血清白蛋白 (Bovine

Serum Albumin, BSA), 人血白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)。

本发明优选的拟糖蛋白纳米粒为 6-磷酸-1-(4-硫代碳酰二胺苯酚)- α -D-吡喃甘露糖白蛋白纳米粒, 制备方法为: 通过对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖磷酸化后再硝基还原得对氨基苯酚-6-磷酸- α -D-吡喃甘露糖(pap-M6P), 用硫光气激活后与白蛋白偶联, 得对氨基苯酚-6-磷酸- α -D-吡喃甘露糖白蛋白, 再采用去溶剂化法即得。反应流程如下:



具体步骤为:

(1) 制备五氧乙酰- β -D-吡喃甘露糖①

D-甘露糖在乙酸酐:吡啶溶液=8~12:11~15, 在-20℃~-5℃条件下反应 4h, 再置 0℃ 2 天, 得五氧乙酰- β -D-甘露吡喃糖①;

(2) 制备对硝基苯酚-四氧乙酰- α -D-吡喃甘露糖②

将对硝基苯酚与五氧乙酰- β -D-甘露吡喃糖①以 $ZnCl_2$ 为催化剂于 160℃ 反应 30min, 得对硝基苯酚-四氧乙酰- α -D-吡喃甘露糖②;

(3) 制备对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖③

对硝基苯酚-四氧乙酰- α -D-吡喃甘露糖②在无水甲醇中,加入 NaOCH_3 加热回流,得对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖③;

(4) 制备 6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④

对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖③在吡啶:乙腈:水=5~15:20~30:0~2 溶液中与 POCl_3 反应得 6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④;

(5) 制备 6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤

6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④在甲醇:水=3~9:1~3 的混合液中,在 Pa-C 催化作用下,与 H_2 反应得 6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤;

(6) 制备 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥

6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤在乙醇与水=5~15:1~3 的混合液中,与 CSCl_2 反应得 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥;

(7) 制备拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白⑦

6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥水溶液,与牛血清白蛋白或人血白蛋白或其他白蛋白的硼酸盐缓冲液室温反应 18h,得拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白⑦,通过调整 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥与白蛋白的比例(1~800:1)可得糖基化程度不同的拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白, n 为 1~60;

(8) 制备拟糖蛋白纳米粒⑧

将拟糖蛋白⑦配制成水溶液或溶于 10mM NaCl 或 KCl 中性盐溶液,控制 pH 值 5-11,搅拌情况下持续加入适量去溶剂化剂,去溶剂化剂选自脱水剂乙醇、甲醇、丙酮等,形成拟糖蛋白纳米粒后,加适量交联剂戊二醛或甲基聚乙烯-右旋糖苷或稳定剂乳酸,连续搅拌 12 小时以上促使纳米粒交联固化,得拟糖蛋白纳米粒胶体混悬液,将该混悬液微热至 20~37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,去除去溶剂化剂后冻干即可,所得纳米粒粒径 50-300nm。

载抗肝纤维化药拟糖蛋白纳米粒的制备方法为:

在拟糖蛋白[M6P]n-白蛋白⑦的水溶液或中性盐溶液 10mM NaCl 或 KCl 中,加入抗肝纤维化药的水或醇溶液,抗肝纤维化药选自阿魏酸钠、华蟾蜍毒素、蟾蜍灵、秋水仙碱、马洛替酯,控制 pH 值 5-11,搅拌情况下持续加入适量去溶剂化剂,去溶剂化剂选自脱水剂乙醇、甲醇、丙酮等,形成载药拟糖蛋白纳米粒后,加适量交联剂戊二醛或甲基聚乙烯-右旋糖苷或稳定剂乳酸,连续搅拌 12 小时以上促使纳米粒交联固化,将所得载药拟糖蛋白纳米粒胶体混悬液于 20~37 $^{\circ}\text{C}$ 下微热过夜,去除去溶剂化剂后冻干,得粒

径为 50-300nm 的纳米粒。制备过程中若与抗肝纤维化药物同时加入适量表面活性剂泊洛沙姆或卵磷脂等，可提高纳米粒包封率和载药率。

具体实施方式

现结合实施例，对本发明作详细描述

实施例 1：五氧乙酰-β-D-吡喃甘露糖①的制备

于 500ml 圆底烧瓶中加入乙酸酐 200ml，吡啶 260ml，冰盐浴冷却至-15℃，半小时内分批加入 D-甘露糖 24g，搅拌 4h，所得无色澄清溶液置 0℃ 2 天，其间振摇几次。溶液用力摇匀后缓慢倒入含碎冰的 3L 水中，搅拌 45min，结晶析出，过滤，滤饼用水洗后干燥过夜，得白色粉末五氧乙酰-β-D-甘露吡喃糖①40.3 g，产率 77.5 %。ESI-MS (positive-ion mode): 413.02 (M+Na⁺, 100%)。1H NMR(D₂O): 1.94-2.17 (m, 15H, CH₃CO), 4.07-5.97 (m, 7H, C₁₋₆-H)。

实施例 2：对硝基苯酚-四氧乙酰-α-D-吡喃甘露糖②的制备

于 500ml 圆底烧瓶中加入对硝基苯酚 15g，五氧乙酰-β-D-甘露吡喃糖①15g，ZnCl₂ 0.6g，油浴加热至 160℃，搅拌 30min，黑色熔融物冷却至 70℃，缓慢加入苯溶液 240ml，所得褐色溶液用水洗后，接着用 1mol/l NaOH 洗至水层几乎无色，再用水洗，无水 CaCl₂ 干燥，于 35℃减压蒸干至橘黄色糖浆状液，加入适量无水乙醇溶解，活性炭脱色（35℃,20min），再次减压浓缩至有晶体析出，室温冷却后置于-20℃过夜，析出大量晶体过滤得白色粉末，即对硝基苯酚-四氧乙酰-α-D-吡喃甘露糖②，母液可进一步浓缩重结晶得产物②，共计 11.3g，产率 62.8%，([α]²⁰_D+93° c1,氯仿)。亦可将活性炭脱色所得溶液于 30℃减压蒸干后用柱色谱分离纯化（乙酸乙酯-石油醚,1:2），洗脱液于 30℃减压干燥得白色粉末。（薄层层析展开剂：乙酸乙酯-石油醚, 1:2, R_f=0.38）。ESI-MS (positive-ion mode):492.15(M+Na⁺, 100%)。1H NMR(CDCl₃): 8.23(d, 2H, J=9.1Hz, Ar-H-meta), 7.21(d, 2H, J=9.1Hz, Ar-H-ortho), 2.11(m, 12H, CH₃CO), 4.00-5.63(m, 7H, C₁₋₆-H)。

实施例 3：对硝基苯酚-α-D-吡喃甘露糖③的制备

于 250ml 三颈瓶中加入无水甲醇 96ml，对硝基苯酚-四氧乙酰-α-D-吡喃甘露糖②8g，搅拌得混悬液，加入 0.2mol/l NaOCH₃ 1.2ml，加热至回流 8min，于 30℃减压蒸干至晶体析出，室温冷却后置于-20℃，过夜，过滤后干燥得白色粉末，即对硝基苯酚-α-D-吡喃甘露糖③3.5g，产率 68.7%。（[α]²⁰_D+145° c 0.2, 水），（薄层层析展开剂：CHCl₃/MeOH/H₂O, 13:8:2, R_f=0.86）。ESI-MS (negative-ion mode) :346.05(M+HCOOH-1,

100%)。¹H NMR(D₂O): 8.25(d, 2H, J=9Hz, Ar-H-meta), 7.28(d, 2H, J=9Hz, Ar-H-ortho), 5.77(s, 1H, C₁-H), 3.61-4.19(m, 6H, C₂₋₅, 6a, 6b-H)。

实施例 4: 6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④的制备

于 25ml 圆底烧瓶中加入吡啶 2.8ml, 乙腈 7ml, 水 0.28ml, 搅拌均匀后加入对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖③2.1g, 冰浴条件下缓慢滴加入 POCl₃ 2.8ml, 搅拌 1.5h, 所得澄清溶液倒入装有 84g 的冰上, 融化后, 用 2.5mol/l NaOH 调节 pH 为 7.0, 于 30℃减压蒸干后用柱色谱分离纯化(MeOH-DCM,1:1) (展开剂: CHCl₃/MeOH/H₂O, 13:8:2, Rf=0.29), 洗脱液于 30℃减压干燥得白色粉末, 即 6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④1.85g, 产率 69.5%。ESI-MS(negative-ion mode):380.00(M-1, 100%)。¹H NMR(D₂O): 8.12(d, 2H, J=8.7Hz, Ar-H-meta), 7.15(d, 2H, J=8.9Hz, Ar-H-ortho), 5.63(s, 1H, C₁-H), 3.60-4.07(m, 6H, C₂₋₅, 6a, 6b-H)。

实施例 5: 6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤的制备

于 100ml 三颈瓶中加入 49ml 甲醇与水的混合液(6:1,v/v), 6-磷酸-对硝基苯酚- α -D-吡喃甘露糖④0.7g, 10%Pa-C 0.075g, 所得混悬液室温、常压、搅拌下通 H₂ 流 4h, 薄层色谱(TLC)监测反应。于 30℃减压蒸干至 3-4ml, 有白色晶体析出, 抽滤去除, 滤液浓缩至 2ml, 加入适量甲醇, 大量黄褐色固体析出, 抽滤, 滤饼用甲醇洗, 滤液继续减压蒸干得褐色固体, 与之前干燥滤饼合并即产物 6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤0.55g, 产率 85.9%。(薄层层析展开剂: CHCl₃/MeOH/H₂O, 13:8:2, Rf=0.14)。ESI-MS(negative-ion mode):350.00(M-1, 100%)。¹H NMR(D₂O): 7.07(d, 2H, J=8.9Hz, Ar-H-meta), 7.02(d, 2H, J=8.9Hz, Ar-H-ortho), 5.48(s, 1H, C₁-H), 4.12-3.49(m, 6H, C₂₋₅, 6a, 6b-H)。

实施例 6: 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥的制备

于 100ml 圆底烧瓶中加入 50ml 无水乙醇与水的混合液(9:1,v/v), 6-磷酸-对氨基苯酚- α -D-吡喃甘露糖⑤0.217g (0.62mmol), 冰浴条件下缓慢滴加入 CSCl₂ 0.27ml (3.5mmol), 搅拌 2h, 敞口通 N₂ 搅拌 3h, 冰浴条件下用 0.1mol/l NaOH 调 pH 为 6.0, 于 30℃减压蒸干得黄色固体, 用柱色谱分离纯化(CHCl₃/MeOH/H₂O, 13:8:2) (展开剂: CHCl₃/MeOH/H₂O, 13:8:2, Rf=0.43), 洗脱液于 30℃减压蒸干得浅黄色粉末, 即产物 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥0.225g, 产率 92.2%, 于-20℃保存。ESI-MS(negative-ion mode):392.03(M-1,100%)。¹H NMR(D₂O):7.26(d, 2H, Ar-H-meta),

7.10(d, 2H, Ar-H-ortho), 5.54(s, 1H, C₁-H), 3.45-4.09(m, 6H, C₂₋₅, 6a, 6b-H)。

实施例 7: 拟糖蛋白[M6P]_n-BSA 冻干粉的制备

取 6-磷酸-1-(4-异硫氰酸酯苯酚)- α -D-吡喃甘露糖⑥35.37mg (0.09mmol), 溶于 5ml 蒸馏水, 得糖衍生物溶液。于 20ml 圆底烧瓶中加入 BSA 21.78mg(0.23 μ mol), 硼酸盐缓冲液 7.5ml(pH 9.0), 再缓慢加入糖衍生物溶液, 室温搅拌 18h, 所得溶液用 0.15mol/l NaCl (1000ml), 蒸馏水 (2000ml) 透析, 透析液冻干得白色粉末, 即目标产物拟糖蛋白[M6P]₃-BSA。粗产物经 sephadex G-25 柱分离纯化, 0.15 mol/l NaCl 为洗脱液, 冻干即得。

实施例 8: 拟糖蛋白纳米粒⑧的制备

精密称取 30mg 拟糖蛋白冻干粉, 溶解于 4.0ml 蒸馏水, pH 值为 8.5, 室温搅拌下以 0.5ml/min 的速率持续加入 7.0ml 95%乙醇, 即可形成拟糖蛋白纳米粒。去溶剂化后, 加入 8% 戊二醛水溶液 30 μ l 使微粒交联, 交联过程中同时搅拌 12h 以上。所得拟糖蛋白纳米粒⑧, 粒径为 50-300nm。

拟糖蛋白冻干粉溶于中性盐溶液 10mMNaCl (或 KCl) 中, 方法同上, 亦可制得拟糖蛋白纳米粒, 粒径为 50-300nm。

实施例 9: 载抗肝纤维化药阿魏酸钠拟糖蛋白纳米粒的制备

精密称取 30mg 拟糖蛋白冻干粉⑦, 溶解于 4.0ml 蒸馏水中, 再加入 5mg/ml 的抗肝纤维化药阿魏酸钠水溶液 (或醇溶液) 2.0ml, pH 值为 8, 室温搅拌下以 0.5ml/min 的速率持续加入 5.0ml 95%乙醇, 即可形成阿魏酸钠拟糖蛋白纳米粒。去溶剂化后, 加入 8% 戊二醛水溶液 10 μ l 使微粒交联, 交联过程中同时搅拌 12h 以上。所得阿魏酸钠拟糖蛋白纳米粒粒径为 50-300nm。

拟糖蛋白冻干粉溶于中性盐溶液 10mMNaCl (或 KCl) 中, 方法同实施例 9, 亦可制得阿魏酸钠拟糖蛋白纳米粒, 粒径为 50-300nm。

其他抗肝纤维化药如华蟾蜍毒素、蟾蜍灵、秋水仙碱、马洛替酯拟糖蛋白纳米粒的制备方法同实施例 9。

在 4.0ml 蒸馏水或中性盐溶液中拟糖蛋白 10~300mg 与抗肝纤维化药 1~200mg 以 > 1 的任意比例, 采用与实施例 9 相同的方法进行制备, 同样可获得抗肝纤维化药拟糖蛋白纳米粒, 粒径为 50~300nm。

普通抗肝纤维化药物制剂进入体内全身分布, 用药量就大, 不仅浪费药物, 而且

会引起毒副反应。而本发明实现了双重靶向给药，使药物浓集于 HSC，可减少用药量，不仅充分发挥了药物的治疗作用，而且减少了药物毒副作用，对肝纤维化的有效防治具有重要意义。