



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114634959 A

(43) 申请公布日 2022.06.17

(21) 申请号 202210349581.4

(22) 申请日 2022.04.02

(71) 申请人 中国科学院兰州化学物理研究所
地址 730000 甘肃省兰州市城关区天水中路18号

申请人 烟台中科先进材料与绿色化工产业
技术研究院

(72) 发明人 周峰 麻拴红 杨鲁民 赵晓铎
马正峰

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 王苗苗

(51) Int. Cl.

C12P 21/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

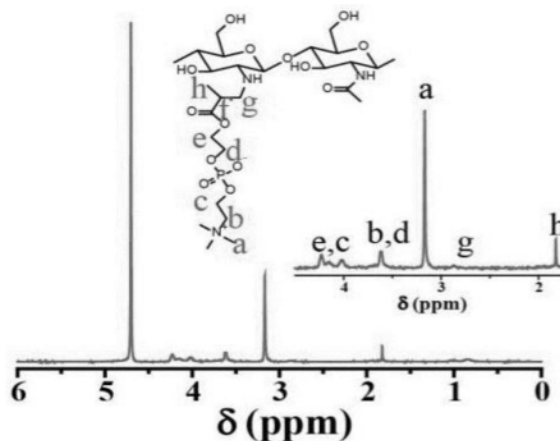
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种双功能仿生润滑剂及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物医药技术领域,提供了一种双功能仿生润滑剂及其制备方法和应用。本发明首先通过迈克尔加成反应在CS边链接枝2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱;然后在酶催化下在CS边链接枝乳酸链球菌肽,从而制备得到一种兼备润滑和抗菌功能的壳聚糖基大分子润滑剂。本发明制备的双功能仿生润滑剂在人工关节和天然软骨上具有较低的摩擦系数,且对金黄色葡萄球菌有优异的抑制作用,在制备生物医药方面具有广阔的前景,尤其是在制备治疗感染性关节炎的药物方面具有广阔的应用前景。



1. 一种双功能仿生润滑剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将壳聚糖醋酸溶液和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱混合进行迈克尔加成反应,得到中间产物;

将所述中间产物、乳酸链球菌肽和酶混合进行酶催化反应,得到双功能仿生润滑剂。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述壳聚糖的分子量为200kDa~1000kDa,脱乙酰度为90~98%,黏度为100~200mpa·s。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述壳聚糖和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的质量比为100~200:150~300。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述迈克尔加成反应的时间为12~24h,反应温度为60~75℃。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述酶为转谷酰胺酶;所述中间产物、乳酸链球菌肽和转谷酰胺酶的质量比为100~200:150~350:120~250。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述酶催化反应的温度为25~50℃,反应时间为1~6h。

7. 根据权利要求1或6所述的制备方法,其特征在于,所述酶催化反应用溶剂为去离子水。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述迈克尔加成反应后,还包括将所得反应料液依次进行透析和冷冻干燥;

所述酶催化反应后,包括将所得反应料液依次进行透析和冷冻干燥。

9. 权利要求1~8任意一项所述制备方法制备得到的双功能仿生润滑剂,所述双功能仿生润滑剂为壳聚糖、2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽的接枝共聚物,其中壳聚糖为主链,2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽为支链,所述2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽分别接枝在所述壳聚糖的N-氨基-D-葡萄糖胺单元上,与氨基通过共价键连接。

10. 权利要求9所述的双功能仿生润滑剂在制备生物医疗药物中的应用。

一种双功能仿生润滑剂及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及感染性关节炎治疗药物技术领域,尤其涉及一种双功能仿生润滑剂及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 感染性关节炎是一种导致膝关节功能失常的疾病,主要与细菌尤其是金黄色葡萄球菌的感染有关。在我国有上千万人忍受着感染性关节炎疾病的痛苦。严重的感染性关节炎患者导致软骨病变退化,关节系统的润滑功能也丧失,甚至需要进行人工关节置换手术,给患者带来很大的痛苦和经济压力。因此,迫切需要既有抗菌功能同时兼具润滑功效的润滑剂来抑制感染性关节炎的病情发展。

[0003] 壳聚糖(CS)作为一种天然的多糖,由于具有良好的生物相容性、生物降解性和抗菌特性,已被广泛应用于组织工程,如给药系统、伤口敷料等生物医学领域。但是,CS只能在酸性条件下溶解,这限制了其在生物领域中的应用。因此,对壳聚糖的亲水性及溶解性进行改性,制备水溶性壳聚糖衍生物具有重要意义。目前,羧甲基壳聚糖由于良好的润滑特性已经成为临床上治疗关节炎症的理想材料。然而,与未改性的CS相比,由于氨基官能团的消耗,羧甲基壳聚糖衍生物的抗菌活性大大降低,不具备针对性治疗感染性关节炎的功能。此外,羧甲基壳聚糖衍生物带负电荷,尽管其具有优异的水化效果,但并未消除其对离子和蛋白的特异性吸附问题,水化抗污性能有待提升。

[0004] 因此,急需开发一种具有优异水化抗污和抗菌功能的新型润滑剂材料。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供了一种双功能仿生润滑剂及其制备方法和应用。本发明提供的双功能仿生润滑剂具有优异的水润滑性能,水化抗污性能好,且具有良好的生物相容性和抗菌性能,在感染性关节炎的治疗中具有良好的应用前景。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 一种双功能仿生润滑剂的制备方法,包括以下步骤:

[0008] 将壳聚糖醋酸溶液和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱混合进行迈克尔加成反应,得到中间产物;

[0009] 将所述中间产物、乳酸链球菌肽和酶混合进行酶催化反应,得到双功能仿生润滑剂。

[0010] 优选的,所述壳聚糖的分子量为200kDa~1000kDa,脱乙酰度为90~98%,黏度为100~200mpa·s。

[0011] 优选的,所述壳聚糖和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的质量比为100~200:150~300。

[0012] 优选的,所述迈克尔加成反应的时间为12~24h,反应温度为60~75℃。

[0013] 优选的,所述酶为转谷酰胺酶;所述中间产物、乳酸链球菌肽和转谷酰胺酶的质量

比为100~200:150~350:120~250。

[0014] 优选的,所述酶催化反应的温度为25~50℃,反应时间为1~6h。

[0015] 优选的,所述酶催化反应用溶剂为去离子水。

[0016] 优选的,所述迈克尔加成反应后,还包括将所得反应料液依次进行透析和冷冻干燥;

[0017] 所述酶催化反应后,包括将所得反应料液依次进行透析和冷冻干燥。

[0018] 本发明还提供了上述方案所述制备方法制备得到的双功能仿生润滑剂,所述双功能仿生润滑剂为壳聚糖、2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽的接枝共聚物,其中壳聚糖为主链,2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽为支链,所述2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽分别接枝在所述壳聚糖的N-氨基-D-葡萄糖胺单元上,与氨基通过共价键连接。

[0019] 本发明还提供了上述方案所述的双功能仿生润滑剂在制备生物医疗药物中的应用。

[0020] 本发明提供了一种双功能仿生润滑剂的制备方法,包括以下步骤:将壳聚糖醋酸溶液和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱混合进行迈克尔加成反应,得到中间产物;将所述中间产物、乳酸链球菌肽和酶混合进行酶催化反应,得到双功能仿生润滑剂。磷脂酰胆碱(MPC)是一种两性功能结构分子,在天然关节软骨系统广泛存在,已被证明具有优异的水化抗污和润滑效果;乳酸链球菌肽(Nisin)在水溶液中具有良好的溶解性和稳定性,被认为是一种安全的抗菌肽,可以抑制或杀死革兰氏阳性细菌,如引起感染性关节炎的主要细菌金黄色葡萄球菌。本发明以壳聚糖(CS)大分子为主链,首先通过迈克尔加成反应在CS边链接枝2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC),然后在酶催化下在CS边链接枝乳酸链球菌肽(Nisin),从而制备得到一种兼备润滑和抗菌功能的壳聚糖基大分子润滑剂。本发明制备的双功能仿生润滑剂在人工关节和天然软骨上均具有较低的摩擦系数,且对金黄色葡萄球菌有优异的抑制作用,在制备生物医疗的药物方面具有广阔的前景,尤其是在制备治疗感染性关节炎的药物方面具有广阔的应用前景。

附图说明

[0021] 图1为实施例1制备的CS-MPC的核磁图谱;

[0022] 图2为实施例1制备的CS-MPC和CS-MPC-N的热重分析图;

[0023] 图3为CS,CS-MPC与CS-MPC-N在去离子水中的溶解分散情况和稳定性测试图;

[0024] 图4为CS,CS-N,CS-MPC以及CS-MPC-N的水溶液在初始状态的透光率测试图;

[0025] 图5为实施例1制备的CS-MPC-N在牛软骨界面的摩擦系数测试装置(左)和测试结果(右);

[0026] 图6为实施例1制备的CS-MPC-N对软骨细胞的生物相容性测试结果;

[0027] 图7为实施例1制备的CS-MPC-N对金黄色葡萄球菌的抑制作用测试结果。

具体实施方式

[0028] 本发明提供了一种双功能仿生润滑剂的制备方法,包括以下步骤:

[0029] 将壳聚糖醋酸溶液和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱混合进行迈克尔加成反应,得

到中间产物；

[0030] 将所述中间产物、乳酸链球菌肽和酶混合进行酶催化反应，得到双功能仿生润滑剂。

[0031] 本发明将壳聚糖(CS)醋酸溶液和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC)混合进行迈克尔加成反应，得到中间产物。在本发明中，所述壳聚糖的分子量优选为200kDa~1000kDa，更优选为500kDa~800kDa，所述壳聚糖的脱乙酰度优选为90~98%，更优选为95%，所述壳聚糖的黏度优选为100~200mpa·s，更优选为130~150mpa·s；所述壳聚糖醋酸溶液通过将壳聚糖溶解于醋酸水溶液中得到，所述醋酸水溶液的质量分数优选为0.5~5%，更优选为1~2%，所述溶解的温度优选为60℃，本发明对所述壳聚糖醋酸溶液中壳聚糖的浓度没有特殊要求，能够使壳聚糖完全溶解即可。

[0032] 在本发明中，所述壳聚糖和2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的质量比优选为100~200:150~300，更优选为130~150:200~250。

[0033] 在本发明中，所述迈克尔加成反应的时间优选为12~24h，更优选为15~20h，所述迈克尔加成反应的温度优选为60~75℃，更优选为65~70℃；所述迈克尔加成反应优选在氮气气氛下进行。本发明通过迈克尔加成反应将MPC接枝到壳聚糖的边链上，赋予壳聚糖亲水性。

[0034] 在本发明的具体实施例中，优选将MPC溶解于水中，得到MPC溶液，然后再将所述MPC溶液滴加至壳聚糖醋酸溶液中进行迈克尔加成反应；所述MPC溶液的浓度优选为4mg/mL；所述迈克尔加成反应的时间自MPC溶液滴加完毕时开始计。

[0035] 迈克尔加成反应完成后，本发明优选将所得反应料液依次进行透析和冷冻干燥，得到中间产物。在本发明中，所述透析优选在PBS溶液中进行，所述透析的时间优选为3天，所述透析用透析袋为截留分子量优选为3500KDa；通过透析去除醋酸和未反应的MPC；所述冷冻干燥的温度优选为-70℃，时间优选为1天；所得中间产物为壳聚糖与2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的接枝聚合物，记为CS-MPC。

[0036] 得到中间产物后，本发明将所述中间产物、乳酸链球菌肽(Nisin)和酶混合进行酶催化反应，得到双功能仿生润滑剂(记为CS-MPC-N)。在本发明中，所述酶优选为转谷酰胺酶；所述中间产物、乳酸链球菌肽和转谷酰胺酶的质量比优选为100~200:150~350:120~250，更优选为120~160:200~300:150~200。

[0037] 在本发明中，所述酶催化反应的温度优选为25~50℃，更优选为30~37℃，所述酶催化反应的时间优选为1~6h，更优选为2~4h；所述酶催化反应用溶剂优选为去离子水，本发明对所述去离子水的用量没有特殊要求，能够保证酶催化反应顺利进行即可，在酶催化反应过程中，乳酸链球菌肽在转谷酰胺酶的催化作用下，接枝在壳聚糖的边链上，赋予壳聚糖抗菌性。

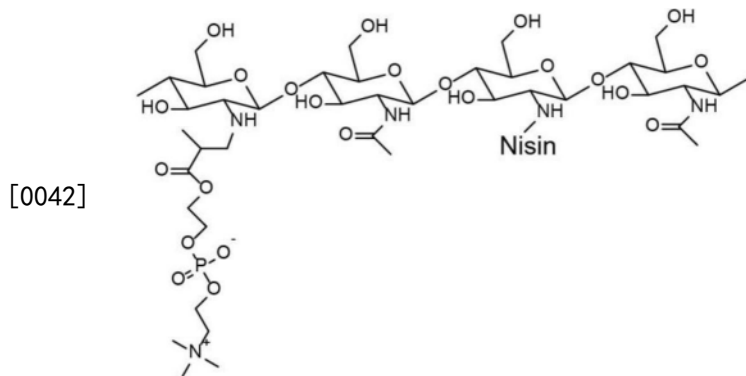
[0038] 在本发明的具体实施例中，优选先将所述中间产物溶解于去离子水中，得到中间产物溶液，将乳酸链球菌肽用1wt%的醋酸溶液溶解，得到乳酸链球菌肽溶液，将转谷酰胺酶溶解于去离子水中，得到转谷酰胺酶溶液，然后将依次将所述乳酸链球菌肽溶液和转谷酰胺酶溶液加入至中间产物溶液中进行反应。

[0039] 酶催化反应完成后，本发明将所得反应料液依次进行透析和冷冻干燥。在本发明中，优选先采用氢氧化钠溶液将酶催化反应所得反应料液的pH值调节至10.0，使转谷酰胺

酶失活,然后沉淀出未反应的乳酸链球菌肽并过滤,再将所得滤液进行透析。在本发明中,所述透析优选在去离子水中进行,所述透析用透析袋为截留分子量优选为3500KDa;所述透析的时间优选为3天,通过透析去除杂质。所述冷冻干燥的温度优选为-70℃,时间优选为1天。

[0040] 本发明还提供了上述方案所述制备方法制备得到的双功能仿生润滑剂,所述双功能仿生润滑剂为壳聚糖、2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽的接枝共聚物,其中壳聚糖为主链,2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽为支链,所述2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和乳酸链球菌肽分别接枝在所述壳聚糖的N-氨基-D-葡萄糖胺单元上,与氨基通过共价键连接。

[0041] 在本发明中,所述壳聚糖的脱乙酰度为90~98%,即壳聚糖结构中还有部分N-乙酰氨基-D-葡萄糖胺单元,在所得接枝共聚物中,N-乙酰氨基-D-葡萄糖胺单元没有接枝支链,具体的,所述双功能仿生润滑剂的结构表示如下:



[0043] 本发明还提供了上述方案所述的双功能仿生润滑剂在制备生物医疗药物领域中的应用,如用于制备治疗关节炎、角膜炎、组织溃疡的药物以及抗黏连药物等。在本发明中,所述生物医疗药物优选为治疗感染性关节炎的药物;本发明提供的双功能仿生润滑剂在人工关节和天然软骨上均具有较低的摩擦系数,且对金黄色葡萄球菌有优异的抑制作用,在开发制备治疗感染性关节炎的药物等方面具有广阔的前景。本发明对所述应用的具体方法没有特殊要求,采用本领域技术人员熟知的方法即可。

[0044] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0045] 下列实施例中使用的壳聚糖分子量均为500KDa,脱乙酰度均为95%,黏度均为120mpa·s。

[0046] 实施例1

[0047] (1) 将100mg壳聚糖溶于100mL 1%醋酸溶液中,在60℃下搅拌30min,使其充分溶解。然后,滴加40mL (5mg/mL) MPC溶液,氮气气氛下60℃反应24h。之后,将得到的混合物在PBS中透析3天以去除醋酸和未反应的MPC,最后将透析液冻干得到干燥的具有亲水性的壳聚糖衍生物CS-MPC。

[0048] (2) 将100mg CS-MPC溶于50mL去离子水中,将150mg Nisin用1%的醋酸溶液溶解,然后缓慢加入到CS-MPC溶液中。将120mg转谷酰胺酶溶解于10mL去离子水中,加入CS-MPC溶

液中,在40℃下搅拌反应2h。将反应后的混合物用氢氧化钠溶液调节pH至10.0,使转谷酰胺酶失活,并沉淀出未反应的Nisin。最后过滤,滤液在去离子水中透析3天去除杂质。通过冻干得到预期产物CS-MPC-N。

[0049] 另外,制备仅接枝Nisin的壳聚糖润滑剂,在后续的性能测试中作为对比,制备步骤如下:其他条件和上述步骤(2)相同,仅将CS-MPC的水溶液替换为壳聚糖的醋酸溶液(100mg壳聚糖溶于100mL 1%醋酸溶液中得到),最终所得产物记为CS-N。

[0050] 结构表征与性能测试:

[0051] 1、结构表征

[0052] 图1为实施例1制备的CS-MPC的核磁图谱,根据图1可知,实施例成功将MPC接枝到了CS的侧链上。

[0053] 2、热重测试

[0054] 图2为实施例1制备的CS-MPC和CS-MPC-N的热重图谱。根据图2中的质量损失数据可以看出,实施例成功将Nisin接枝到了CS的侧链上,Nisin接质量大约为6.4%。

[0055] 3、分散稳定性和溶解性测试

[0056] 将CS、CS-MPC和CS-MPC-N分别溶解或分散于水中,制备成1mg/mL的CS溶液、CS-MPC溶液和CS-MPC-N溶液,将三种溶液进行静置,观察溶液的分散稳定性。结果显示,CS起初为浑浊分散液,放置0.5h后发生沉降;CS-MPC起初为半透明浑浊分散液,放置12h后状态未发生变化;CS-MPC-N起初为溶解透明状态,放置12h后状态仍未发生变化,表明其良好的溶解和分散稳定性,具体的观察结果如图3所示。

[0057] 使用紫外光度计测定1mg/mL的CS、CS-N、CS-MPC以及CS-MPC-N的水溶液在初始状态的透光率,结果如图4所示。根据图4可以看出,CS-MPC-N在水溶液中的透光率最高,进一步表明其具有良好的溶解性。

[0058] 4、摩擦系数测试

[0059] 测试实施例1制备的双功能仿生润滑剂(CS-MPC-N)以及CS-N在牛软骨界面的摩擦系数,具体步骤如下:将购买自市场的新鲜牛软骨切割成两块1厘米的方形块,以保证测试区域的相对平坦,作为上摩擦副的软骨用3M双面胶固定,作为下摩擦副的软骨用摩擦机自带的夹具固定,测试装置如图5左侧的图所示。摩擦条件为:频率:1Hz;载荷:5N,润滑剂的浓度为1mg/mL,溶剂为生理盐水,同时采用不添加润滑剂的生理盐水作为空白对照。测试结果如图5右侧的图所示。根据测试结果可以看出,CS-MPC-N在牛软骨界面的摩擦系数明显低于生理盐水和CS-N,说明其具有良好的润滑能力。

[0060] 5、生物相容性测试

[0061] 评估实施例1制备的双功能仿生润滑剂(CS-MPC-N)对软骨细胞的生物相容性,具体步骤如下:将原代软骨细胞以 2×10^4 细胞/孔的密度接种于24孔板上,并在37℃和5%CO₂的无菌条件下与浓度为1mg/mL的CS-N和CS-MPC-N溶液共培养。然后分别在第一天,第二天和第四天向每孔注入100μL MTT溶液,在相同条件下继续培养4h。弃去上层溶剂,形成的甲臞用二甲基亚砷溶解。最后将溶解后的溶液转移到96孔板中,用酶标仪记录波长为492nm处的吸光度并计算细胞存活率。测试结果如图6所示。根据图6可以看出,在共培养4天后,软骨细胞的生物存活率仍能达到100%左右,说明该双功能仿生润滑剂具有优异的生物相容性。

[0062] 6、抗菌作用测试

[0063] 测试实施例1制备的双功能仿生润滑剂(CS-MPC-N)对金黄色葡萄球菌的抑制作用,具体步骤如下:分别向10mg CS、CS-N、CS-MPC-N中加入菌液浓度为 10^6 CFU/mL的金黄色葡萄球菌液,随后放于37℃恒温培养箱中,振荡培养6h。培养结束后用无菌PBS将共培养液做分别做 10^4 、 10^5 、 10^6 倍稀释,然后取100 μ L稀释后的溶液均匀涂布于固体肉汤培养基上。放于37℃恒温培养箱中培养18h,最后取出拍照并记录菌落数。

[0064] 所得结果如图7所示。根据图7可以看出,CS-MPC-N的实验组中,在稀释倍数为 10^4 、 10^5 、 10^6 倍的情况下,均没有观察到菌落,而CS、CS-N的实验组中有大量的菌落,说明本发明制备的CS-MPC-N具有优异的抗菌作用。

[0065] 实施例2

[0066] 其他条件和实施例1相同,仅将MPC溶液的用量改为30mL,Nisin的用量改为120mg。

[0067] 实施例3

[0068] 其他条件和实施例1相同,仅将步骤(1)中的反应时间改为12h,步骤(2)中的反应时间改为1h。

[0069] 对实施例2~3制备的双功能仿生润滑剂进行摩擦系数、生物相容性以及抗菌性能测试,所得结果和实施例1相似,表明本发明提供的双功能仿生润滑剂具有优异的润滑性能、生物相容性和抗菌性。

[0070] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

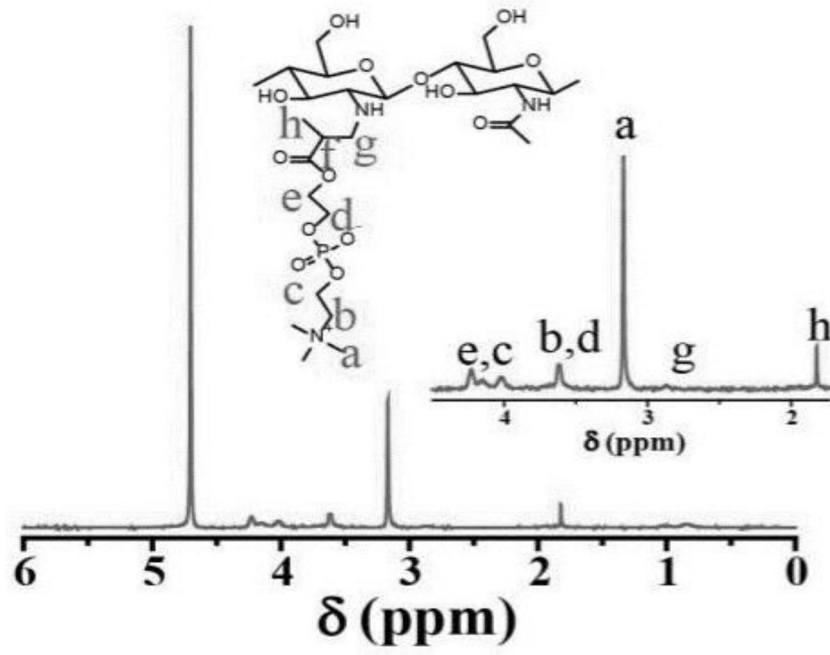


图1

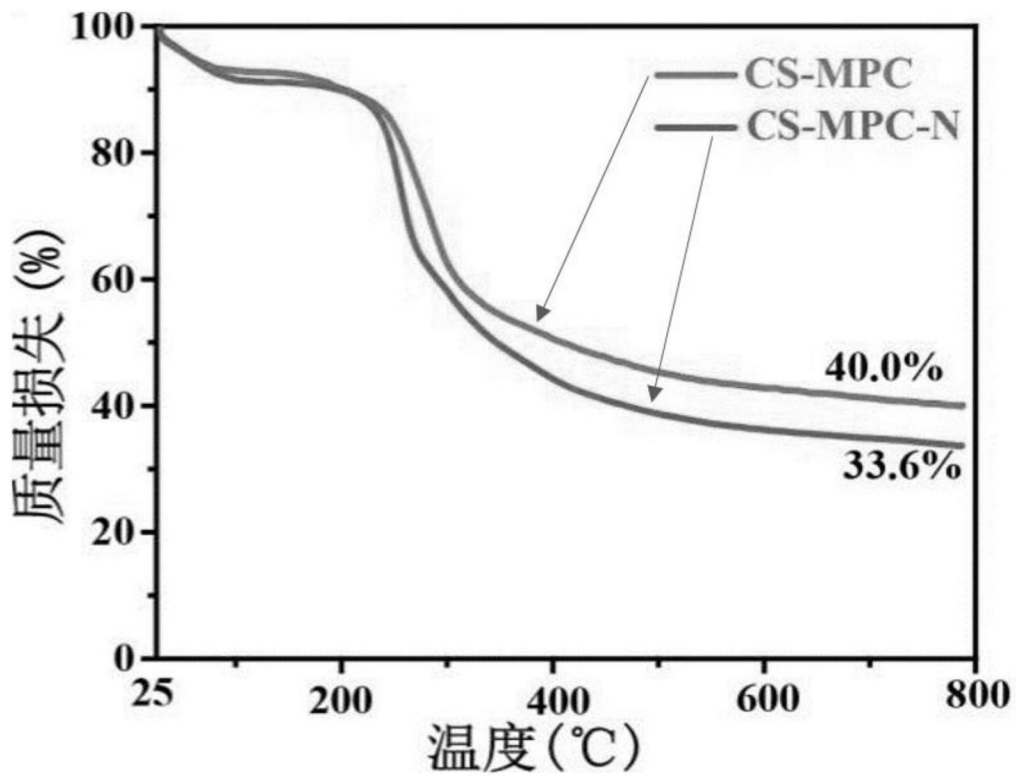


图2

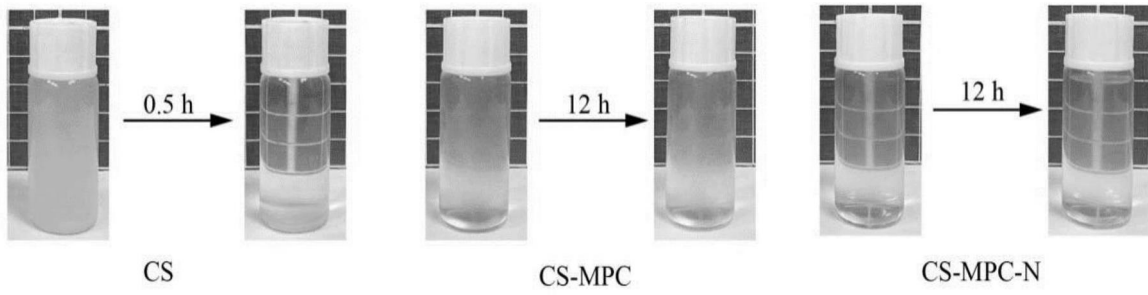


图3

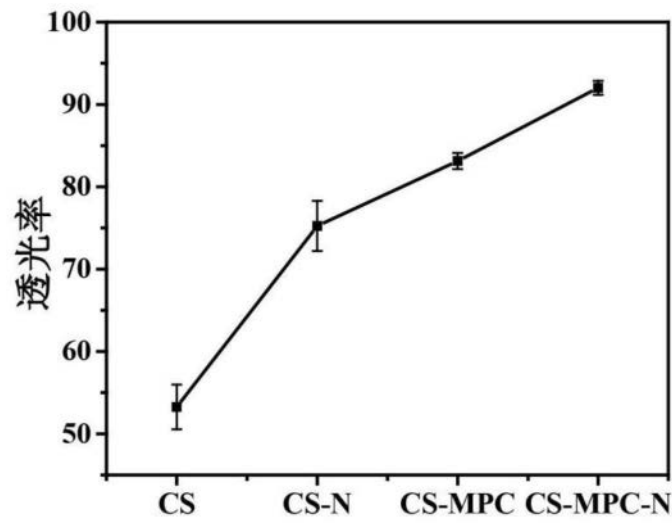


图4

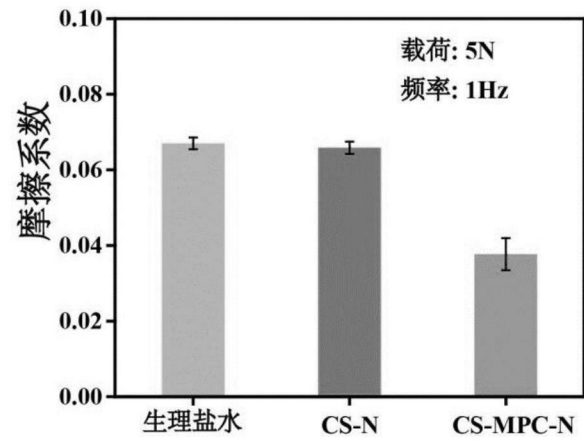
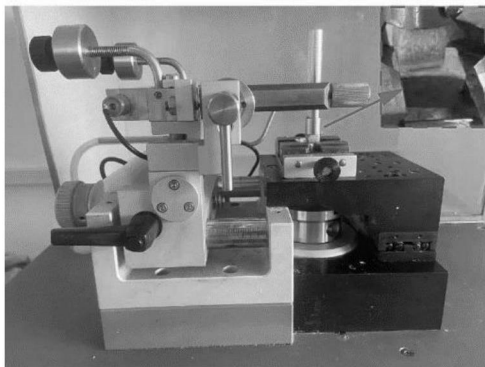


图5

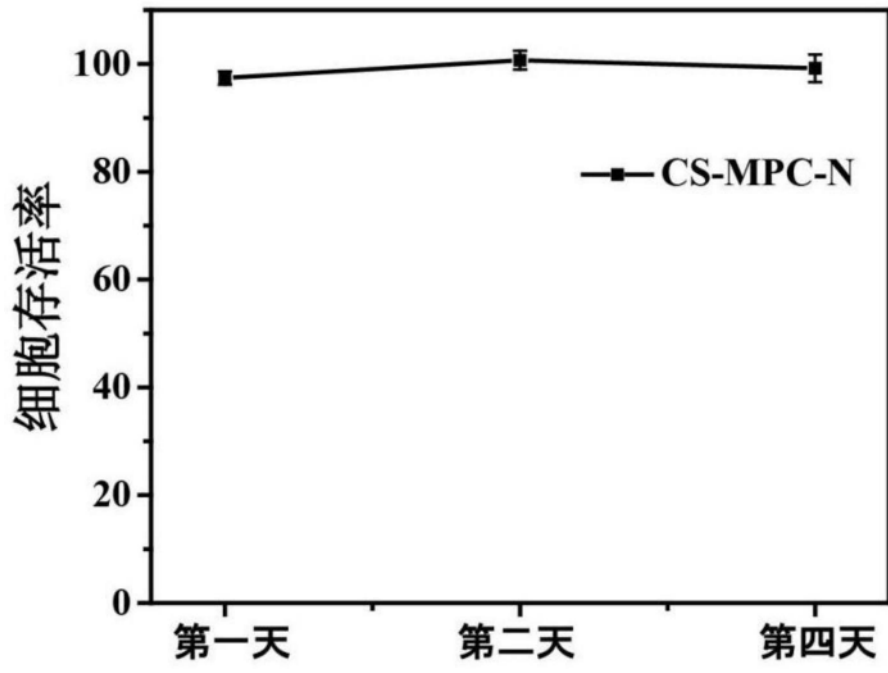


图6

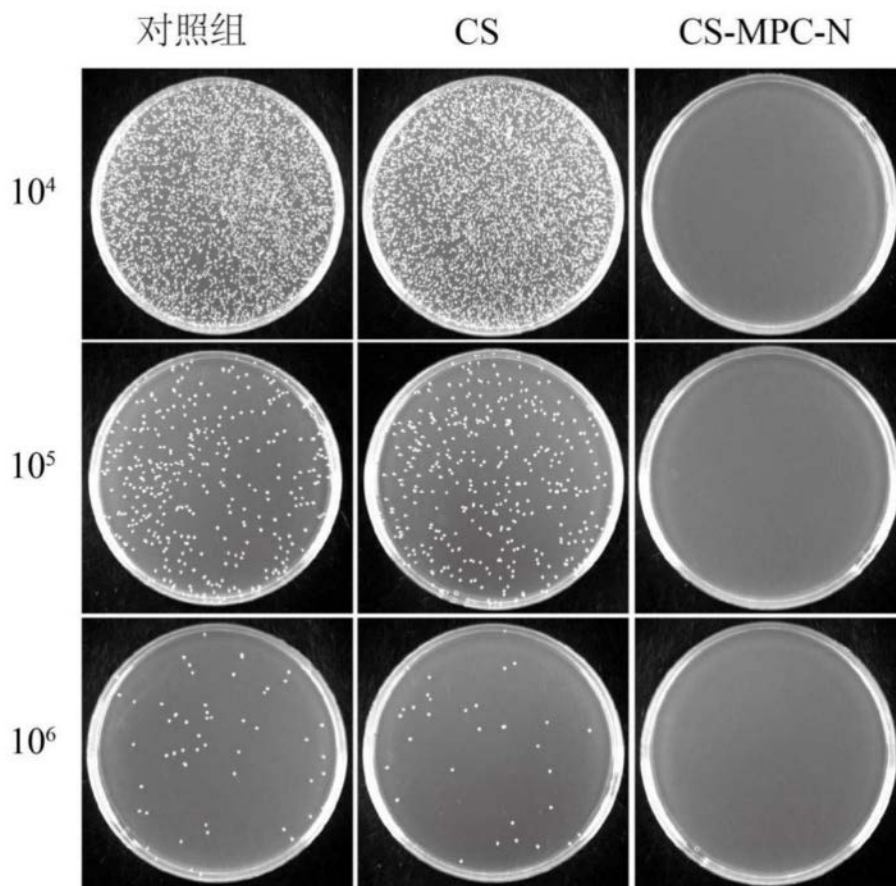


图7