



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104945448 B

(45)授权公告日 2018.06.19

(21)申请号 201510267009.3

(22)申请日 2015.05.22

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104945448 A

(43)申请公布日 2015.09.30

(73)专利权人 上海绿谷制药有限公司  
地址 201203 上海市张江高科技园区牛  
路421号

(72)发明人 张真庆 郝杰 孙世昶 张慧灵

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

代理人 陈文平

(51)Int.Cl.

C07H 15/04(2006.01)

C07H 1/00(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

C08B 37/02(2006.01)

(56)对比文件

US 5831043 A,1998.11.03,

WO 02/32913 A1,2002.04.25,

M. Schamann et al..Reaction of enamines and mediated anodic oxidation of carbohydrates with the 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxoammonium ion (TEMPO+).《Electrochimica Acta》.2005,第50卷4956-4972.

Cedric Delattre et al..Production of oligocellouronates by biodegradation of oxidized cellulose.《Cellulose》.2006,第13卷63-71.

Jean-Francois Thaburet et al..TEMPO-mediated oxidation of maltodextrins and D-glucose: effect of pH on the selectivity and sequestering ability of the resulting polycarboxylates.《Carbohydrate Research》.2011,第330卷21-29.

审查员 万玥

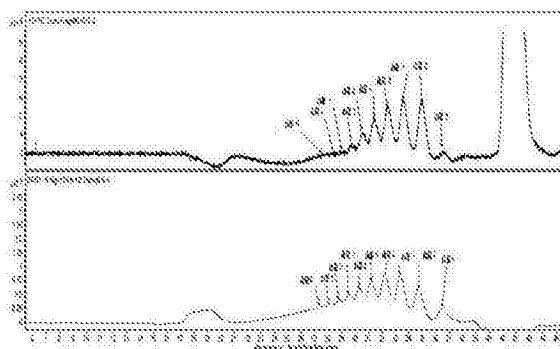
权利要求书1页 说明书6页 附图8页

(54)发明名称

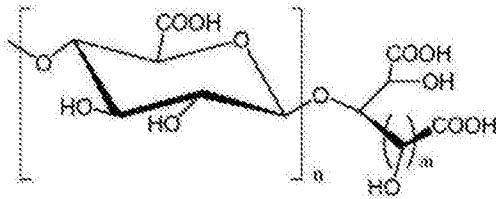
一种氧化型β-1,4-寡聚葡萄糖醛酸及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明揭示了一种氧化型β-1,4-寡聚葡萄糖醛酸及其制备方法和用途,属于医药化合物技术领域。本发明以自然界中丰富的纤维素为原料通过溴化钠(NaBr)-2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物(TEMPO)-次氯酸钠(NaClO)氧化体系作用,将纤维素这种β-1,4-多聚葡萄糖的所有6位羟基氧化成羧基形成葡萄糖醛酸,同时通过控制反应条件制备出氧化型寡聚葡萄糖醛酸,该类化合物有显著的抗脑缺血活性,可以发展成潜在的抗脑缺血药物。



1. 一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸,其特征在于,聚合度为3-20糖,其具有通式I的结构:



式 I

其中, $n=2-19$ ;  $m=0,1$ 或 $2$ 。

2. 一种根据权利要求1所述的氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸的制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取微晶纤维素粉末,丝光化处理制得丝光化后的微晶纤维素溶液,浓度为10-20mg/ml;

(2) 向步骤(1)中制得的丝光化后的微晶纤维素溶液中依次加入2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物和溴化钠,再使用碱性pH调节剂调节pH至10~11,之后加入次氯酸钠溶液于0~30℃条件下反应5~10小时,最后,加入有机溶剂终止反应,

其中微晶纤维素粉末与2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物的质量比为1000:(5~50),且溴化钠与2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物的质量比大于等于10:1;

(3) 置于500Da的透析袋中透析,浓缩、冻干得到所述氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中微晶纤维素粉末与次氯酸钠溶液的质量体积比为1g:(5~15)ml。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中的有机溶剂为无水乙醇或甲醇。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中碱性pH调节剂为5~50%NaOH溶液。

6. 一种根据权利要求1所述的氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸在研制抗脑缺血药物中的应用。

## 一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药化合物技术领域,尤其涉及一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 纤维素是一类聚合度为3000~5000,通过 $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4糖苷键结合的直链葡聚糖,分子结构呈直线状,具有一定的强度和刚性,不易被稀酸或碱水解,是植物细胞壁的主要组成成分。因为人类以及食肉类动物体内很少含有 $\beta$ 糖苷酶,故无法消化利用纤维素。微晶纤维素(MCC)是一种纯化的、部分解聚的纤维素,主要成分以 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键结合的直链式多糖类物质,白色、无臭、无味,由多孔微粒组成的结晶粉末,提高了纤维素的使用效率,由于具有较低聚合度和较大的比表面积等特殊性质,被广泛的应用于制药、化妆品、食品、轻化工等行业。

[0003] 葡萄糖醛酸是一种常见的糖类分子,在体内作为糖胺聚糖糖基组成的一部分,如硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素等;也出现在小分子糖苷的糖基部分,但是自然界中没有多聚或寡聚葡萄糖醛酸。

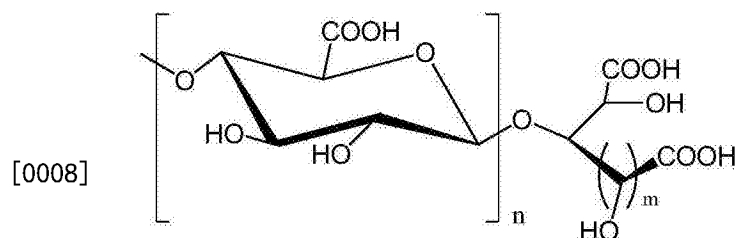
[0004] 近年来,随着生活水平的提高以及人口结构日益老龄化,脑血管疾病的发病率和死亡率正呈上升趋势,已成为其中一大死因。其中,缺血性脑血管病在脑血管疾病种类中占主要部分。目前具有良好治疗抗脑缺血疾病的药物种类有中药组合物、中药等,但是临床疗效有待确证,因此研究新的抗脑缺血疾病药物具有重要意义。

### 发明内容

[0005] 鉴于上述现有技术存在的缺陷,本发明的目的是提出一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸及其制备方法和用途,该化合物在 $1\mu\text{M}$ 下已经显著性提高了缺氧缺糖海马细胞的增值率,并且有着明显的剂量依赖关系,该类化合物有显著的抗脑缺血活性,可以成为一种抗脑缺血的潜在药物。

[0006] 本发明的目的将通过以下技术方案得以实现:

[0007] 一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸,聚合度为1-20糖,其具有通式I的结构:



式 I

[0009] 其中, $n=0-19$ ;  $m=0,1$ 或 $2$ 。

[0010] 一种上述的氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸的制备方法,包括以下步骤:

- [0011] (1) 称取微晶纤维素 (MCC) 粉末, 丝光化处理制得丝光化后的 MCC 溶液, 浓度为 10~20mg/ml;
- [0012] (2) 向步骤 (1) 中制得的丝光化后的 MCC 溶液中依次加入 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶氧化物 (TEMPO) 和溴化钠, 再使用碱性 pH 调节剂调节 pH 至 10~11, 之后加入次氯酸钠溶液于 0~30℃ 条件下反应 5~10 小时, 最后加入有机溶剂终止反应;
- [0013] (3) 置于 500Da 的透析袋中透析, 浓缩、冻干得到所述氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸。
- [0014] 优选的, 上述的制备方法, 其中, 所述步骤 (2) 中 MCC 粉末与 TEMPO 的质量比为 1000:(5~50)。
- [0015] 优选的, 上述的制备方法, 其中, 所述步骤 (2) 中溴化钠与 TEMPO 的质量比大于等于 10:1。
- [0016] 优选的, 上述的制备方法, 其中, 所述步骤 (2) 中 MCC 粉末与次氯酸钠溶液的质量体积比为 1g:(5~15)ml。
- [0017] 优选的, 上述的制备方法, 其中, 所述步骤 (2) 中的有机溶剂为无水乙醇或甲醇。
- [0018] 优选的, 上述的制备方法, 其中, 所述步骤 (2) 中碱性 pH 调节剂为 5~50% NaOH 溶液。
- [0019] 一种上述的氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸在研制抗脑缺血药物中的应用。
- [0020] 本发明的突出效果为: 将自然界中丰富的纤维素作为原料用于制备氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸, 制备方法简单, 条件温和, 成本较低, 易于产业化。同时该类化合物有显著的抗脑缺血活性, 在 1 $\mu$ M 下已经显著性提高了缺氧缺糖海马细胞的增值率, 并且有着明显的剂量依赖关系, 可成为一种抗脑缺血的潜在药物。
- [0021] 以下便结合实施例附图, 对本发明的具体实施方式作进一步的详述, 以使本发明技术方案更易于理解、掌握。

## 附图说明

- [0022] 图1是实施例5中氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸总离子流图 (TIC) 和在 210nm 下的紫外色谱图;
- [0023] 图2为实施例5中峰0的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸11和10糖质谱图;
- [0024] 图3为实施例5中峰1的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸9糖质谱图;
- [0025] 图4为实施例5中峰2的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸8糖质谱图;
- [0026] 图5为实施例5中峰3的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸7糖质谱图;
- [0027] 图6为实施例5中峰4的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸6糖质谱图;
- [0028] 图7为实施例5中峰5的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸5糖质谱图;
- [0029] 图8为实施例5中峰6的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸4糖质谱图;
- [0030] 图9为实施例5中峰7的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸3糖质谱图;
- [0031] 图10为实施例5中峰8的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸2糖质谱图;
- [0032] 图11为实施例5中峰8的一级质谱图即氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸1糖质谱图;
- [0033] 图12为实施例5中氧化型  $\beta$ -1, 4-寡聚葡萄糖醛酸 dp12-dp20 质谱图;

- [0034] 图13为实施例6中氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸核磁共振氢谱图；
- [0035] 图14为实施例6中氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸核磁共振碳谱图；
- [0036] 图15为实施例7中氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸对正常小鼠海马细胞的作用；
- [0037] 图16为实施例7中氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸对缺糖缺氧小鼠海马细胞的作用。

### 具体实施方式

[0038] 下面通过具体实施例对本发明的方法进行说明,但本发明并不局限于此。下述实施例中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述试剂和材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0039] 实施例1一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸的制备方法

[0040] (1) 称取1g MCC粉末,以50ml 10%NaOH溶液进行丝光化处理制得丝光化后的MCC溶液;

[0041] (2) 向步骤(1)中制得的丝光化后的MCC溶液中依次加入5mg TEMPO和50mg溴化钠,使用10%NaOH溶液调节pH至10,加入5ml次氯酸钠溶液,于0℃条件下反应5小时,加入无水乙醇终止反应;

[0042] (3) 置于500Da的透析袋中透析,浓缩、冻干得到氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸。

[0043] 实施例2一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸的制备方法

[0044] (1) 称取1g MCC粉末,以50ml 10%NaOH溶液进行丝光化反应制得丝光化后的MCC溶液;

[0045] (2) 向步骤(1)中制得的丝光化后的MCC溶液中依次加入20mg TEMPO和250mg溴化钠,使用10%NaOH溶液调节pH至10,加入10ml次氯酸钠溶液,于10℃条件下反应8小时,加入无水乙醇终止反应;

[0046] (3) 置于500Da的透析袋中透析,浓缩、冻干得到氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸。

[0047] 实施例3一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸的制备方法

[0048] (1) 称取1g MCC粉末,以100ml 10%NaOH溶液进行丝光化反应制得丝光化后的MCC溶液;

[0049] (2) 向步骤(1)中制得的丝光化后的MCC溶液中依次加入50mg TEMPO和500mg溴化钠,使用30%NaOH溶液调节pH至11,加入15ml次氯酸钠溶液,于25℃条件下反应10小时,加入甲醇终止反应;

[0050] (3) 置于500Da的透析袋中透析,浓缩、冻干得到氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸。

[0051] 实施例4一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸的制备方法

[0052] (1) 称取1g MCC粉末,以100ml 10%NaOH溶液进行丝光化反应制得丝光化后的MCC溶液;

[0053] (2) 向步骤(1)中制得的丝光化的MCC中依次加入50mg TEMPO和600mg溴化钠,使用50%NaOH溶液调节pH至11,加入15ml次氯酸钠溶液,于30℃条件下反应10小时,加入甲醇终止反应;

[0054] (3) 置于500Da的透析袋中透析,浓缩、冻干得到氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸。

[0055] 实施例5一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸质谱检测

### [0056] 5.1方法

[0057] 称取2mg的氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸用1ml的纯水溶解后,用0.22 $\mu$ m的微孔滤膜过滤后,进行超高效液相串联四级杆飞行时间质谱(UHPLC/Q-TOF-MS)分析。

[0058] UHPLC/Q-TOF-MS分析使用Agilent 6540UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS(安捷伦公司,美国)系统。其色谱条件如下:ACQUITY UPLC BEH125分子排阻色谱柱(4.6 $\times$ 300mm, Waters);检测波长:210nm;流动相:A为50mM乙酸铵水溶液,B为甲醇,比例为80%A;流速:0.1ml/min。质谱条件如下:负离子模式;扫描范围:100~3000;干燥气温度:350 $^{\circ}$ C;干燥气流速:8L/min;毛细管电压:3500V;碎裂电压:80V。

### [0059] 5.2结果

[0060] 氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸通过UHPLC/Q-TOF-MS分析后,得到如下的TIC图和紫外色谱图(见图1)。从图1中可以看出,各峰呈规则的波浪状分布,因为使用的是分子排阻色谱柱,推测波浪峰应是按照聚合度由大到小分布。进一步通过各色谱峰对应的一级质谱图(图2~11)推测其结构:图2为峰0的一级质谱图,其中 $m/z$  655.7744、645.7753和635.7728都带3个电荷,经计算后得到这三个信号代表的化合物分子量分别为1970、1940和1910Da,对应的结构为氧化型糖醛酸寡糖11糖,如式I( $n=10, m=0, 1$ 或2)。此外,该质谱图中还有带3个电荷的质谱信号 $m/z$  597.0981、587.0991和577.0951与2电荷的896.1517、881.1502和866.1462,经计算后确认它们分别为三种分子量为1794、1764和1734Da的氧化型糖醛酸寡糖10糖,对应式I( $n=9, m=0, 1$ 或2)。同理,图3~11为峰1~9的质谱图,经解析结构分别为氧化型糖醛酸寡糖9到1糖,如式I( $n=8\rightarrow 0, m=0, 1$ 或2)。在色谱图中12到20糖没有得到有效的分离,但是质谱中较清晰的信号,如图12所示。

### [0061] 实施例6一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸核磁结构确认

#### [0062] 6.1方法

[0063] 准确称取25mg样品用0.5ml重水( $D\geq 99.96\%$ )溶解,内标三甲基硅烷基丙酸钠(TSP)浓度为0.2 $\mu$ g/ml,用600MHz核磁共振仪(Agilent,美国)分析。氢谱扫描时间1h,试验温度为室温。碳谱扫描时间12h以上,试验温度为室温。

#### [0064] 6.2结果

[0065] 核磁结果如图13( $^1\text{H-NMR}$ )、图14( $^{13}\text{C-NMR}$ )所示。从氢谱中可以看出,a(4.70~4.71ppm)表示与开环糖醛酸直接相连或邻近的闭环的 $\beta$ 构型葡萄糖醛酸1位H。区域b(4.47~4.60ppm)表示与开环糖醛酸相隔较远的闭环的 $\beta$ 构型葡萄糖醛酸1位H和葡萄糖醛酸还原端开环脱2个 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 后的羧基 $\alpha$ 位H。从碳谱中可以进一步看出区域1为羧基碳峰,而区域2为不同化学环境下的闭环糖醛酸1位C。结合氢谱、碳谱分析可以得出, $\beta$ 葡萄糖结构单元中的6位被成功氧化成羧基,且葡萄糖醛酸寡糖的还原端发生开环并伴随着一定程度的降解,进一步验证了质谱分析结果。

[0066] 实施例7一种氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸在缺氧缺糖(OGD)条件下对HT-22细胞的影响

#### [0067] 7.1 OGD模型的建立及实验分组

[0068] 取正常培养的HT-22细胞,调整细胞数目至 $2\times 10^4$ 个/ml,按100 $\mu$ l/孔接种在96孔培养板上,每组设4个平行( $n=4$ )。预培养12h后,给药组分别加入10 $\mu$ L的用培养基配置的不同浓度的样品(1、10、100 $\mu$ M),正常组加入相同体积的培养基。将培养板置于5% $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}$ C恒

温培养箱中培养12h,观察并测定细胞存活率以确定样品对正常培养的HT-22细胞的影响。

[0069] 取正常培养的HT-22细胞,吸去原培养液,细胞用无糖DMEM培养液洗涤2次,加入DMEM无糖培养液调整细胞数目至 $2 \times 10^4$ 个/ml。按100 $\mu$ l/孔接种在96孔培养板上。给药组分别加入10 $\mu$ l的用培养基配置的不同浓度的样品(1、10、100 $\mu$ M),模型组加入相同体积的培养液。将培养板置于缺氧罐中(冲入95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)、37℃恒温培养12h,观察并测定细胞存活率以确定样品在OGD下对HT-22细胞的影响。

[0070] 7.2 MTT法测定细胞存活率

[0071] 待上述各组细胞培养完毕后,每孔加入10 $\mu$ L MTT(5mg/ml)溶液,继续培养4h,加入100 $\mu$ l 10%SDS,待紫色结晶完全溶解后,测定其在570nm的OD值,并计算出细胞存活率。

[0072] 7.3结果

[0073] 通过MTT法计算出各组细胞存活率如表1、2和图15、16所示。从表1和图15中可以看出,加入低、中、高剂量的氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸后细胞的存活率与正常组相比,无显著性差异,表明氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸对HT-22细胞无毒性。

[0074] 从表2中可以看出,模型组与对照组相比HT-22细胞的存活率显著降低( $p < 0.001$ ),表明OGD对细胞的存活有明显的抑制作用。而加入氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸后细胞存活率与模型组相比显著升高( $p < 0.01$ ),并伴随着较好的剂量依赖关系,表明氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸有促进HT-22细胞生长存活的作用。

[0075] 表1氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸对正常HT-22细胞存活率的影响

组别	浓度( $\mu$ M)	细胞存活率(%)
对照组		100.00 $\pm$ 2.20
[0076] 氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸	1	97.39 $\pm$ 1.77
	10	96.07 $\pm$ 0.96
	100	94.78 $\pm$ 3.12

[0077] 数据以mean $\pm$ SEM表示

[0078] 与对照组比较: $p < 0.05$ 有显著性差异(LSD test)

[0079] 表2氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸对OGD下HT-22细胞存活率的影响

组别	浓度( $\mu$ M)	细胞存活率(%)
对照组		100.00 $\pm$ 2.09
模型组		62.98 $\pm$ 1.88 <sup>###</sup>
[0080] 氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸	1	81.13 $\pm$ 1.86 <sup>**</sup>
	10	85.97 $\pm$ 3.92 <sup>***</sup>
	100	93.44 $\pm$ 4.67 <sup>***</sup>

[0081] 数据以mean $\pm$ SEM表示

[0082] <sup>###</sup>表示与对照组比较 $p < 0.001$ (LSD test)

[0083] <sup>\*\*</sup>表示与模型组比较 $p < 0.01$ (LSD test)

[0084] <sup>\*\*\*</sup>表示与模型组比较 $p < 0.001$ (LSD test)

[0085] 由上可见,本发明中的氧化型 $\beta$ -1,4-寡聚葡萄糖醛酸具有抗脑缺血的作用,在制备抗脑缺血药物中的可以得到应用。

[0086] 本发明尚有多种实施方式,凡采用等同变换或者等效变换而形成的所有技术方

案,均落在本发明的保护范围之内。



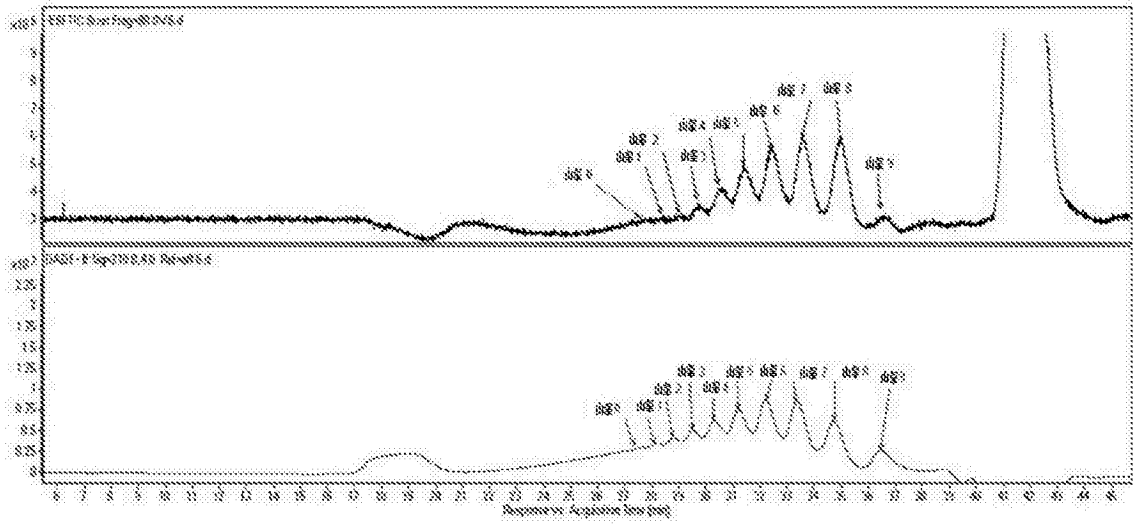


图1

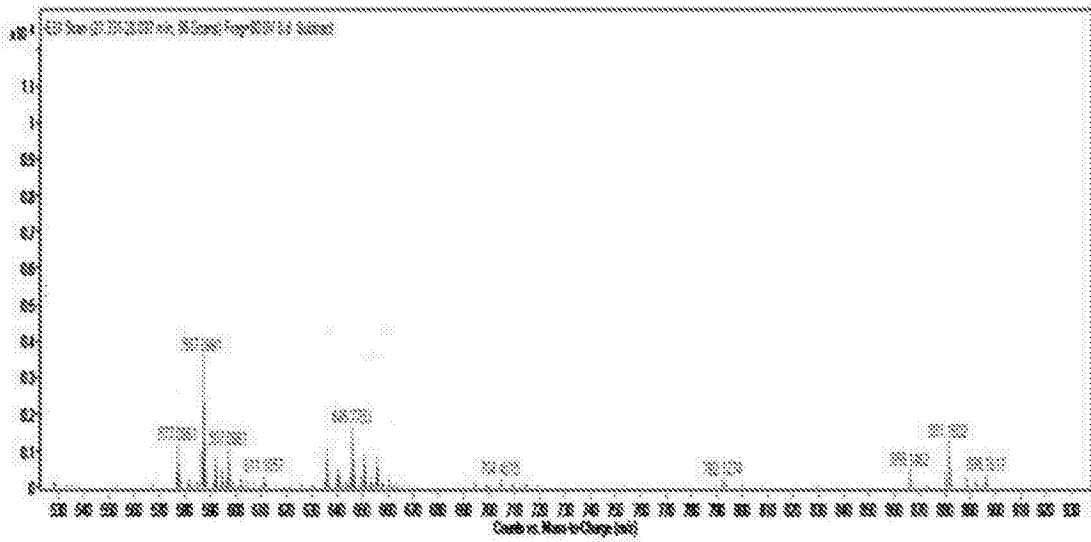


图2

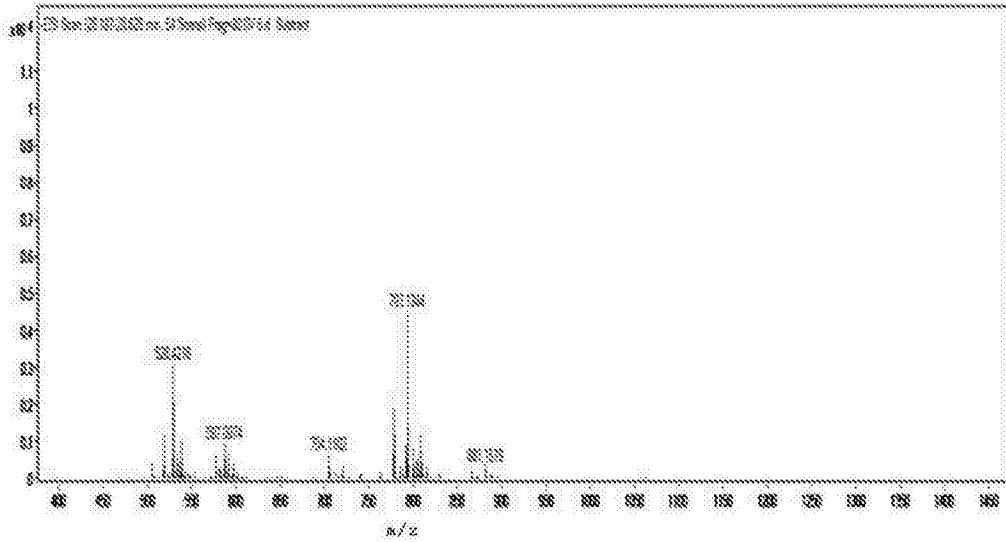


图3

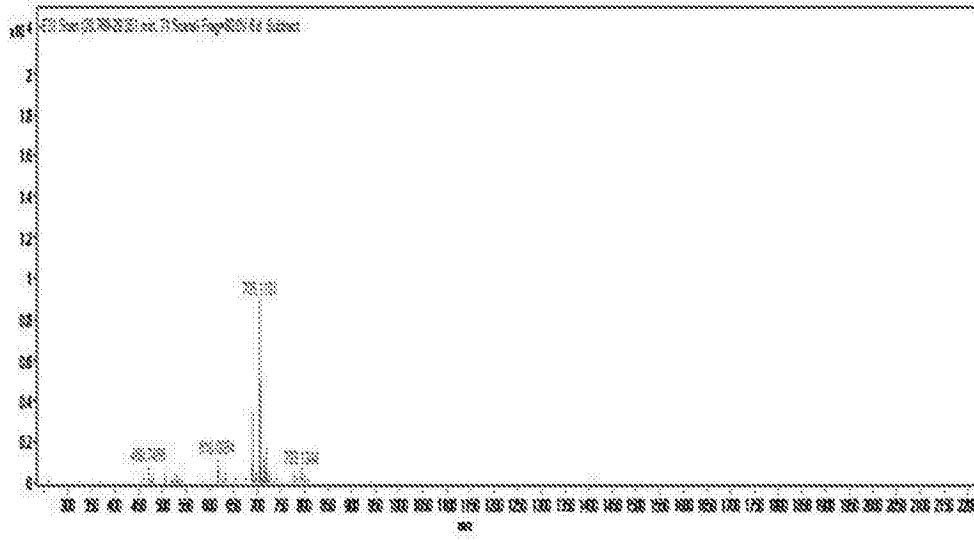


图4

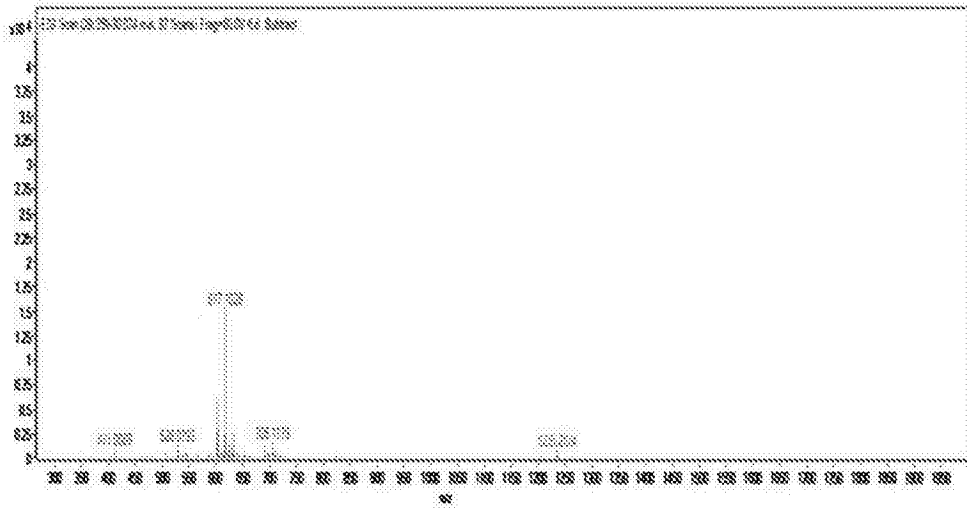


图5

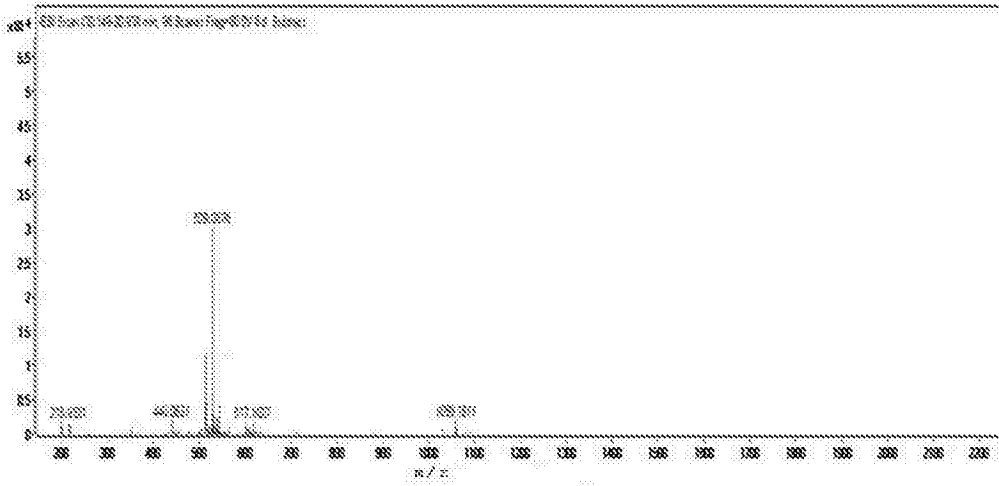


图6

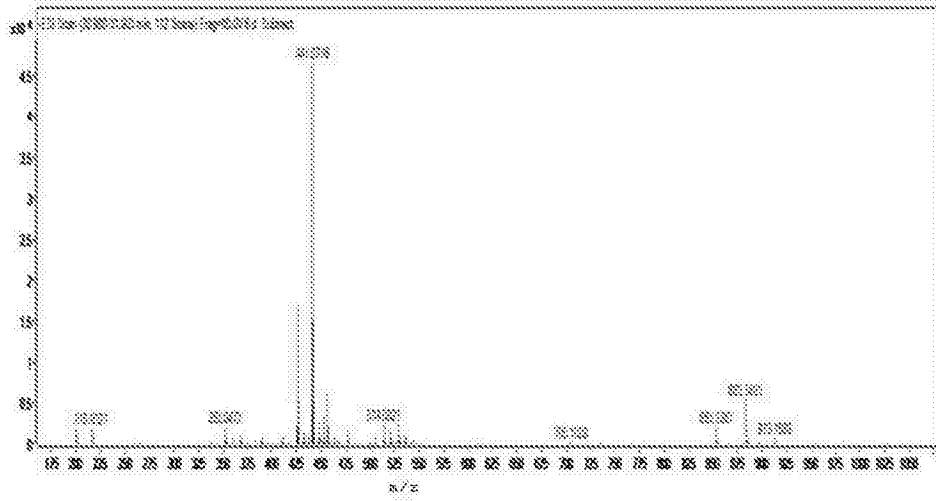


图7

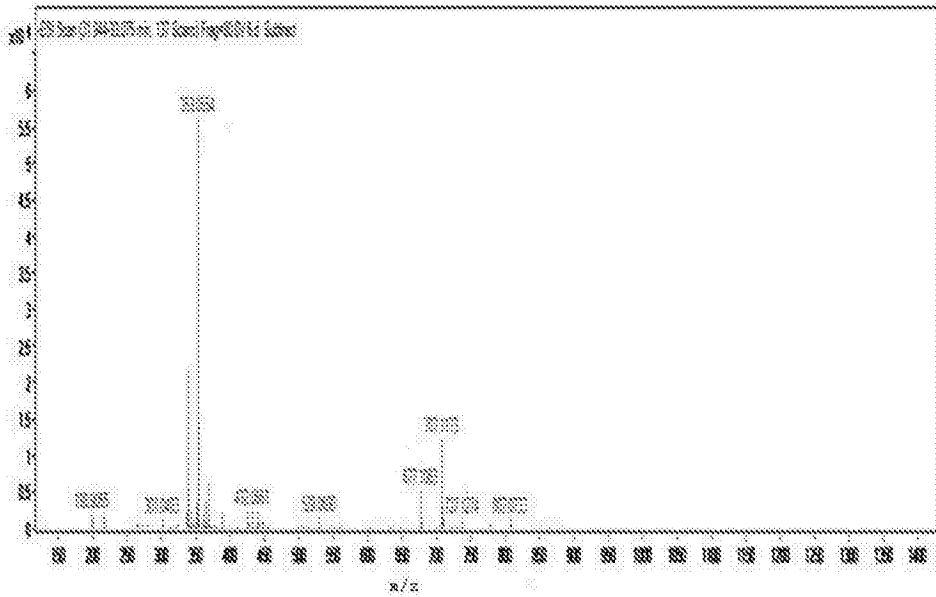


图8

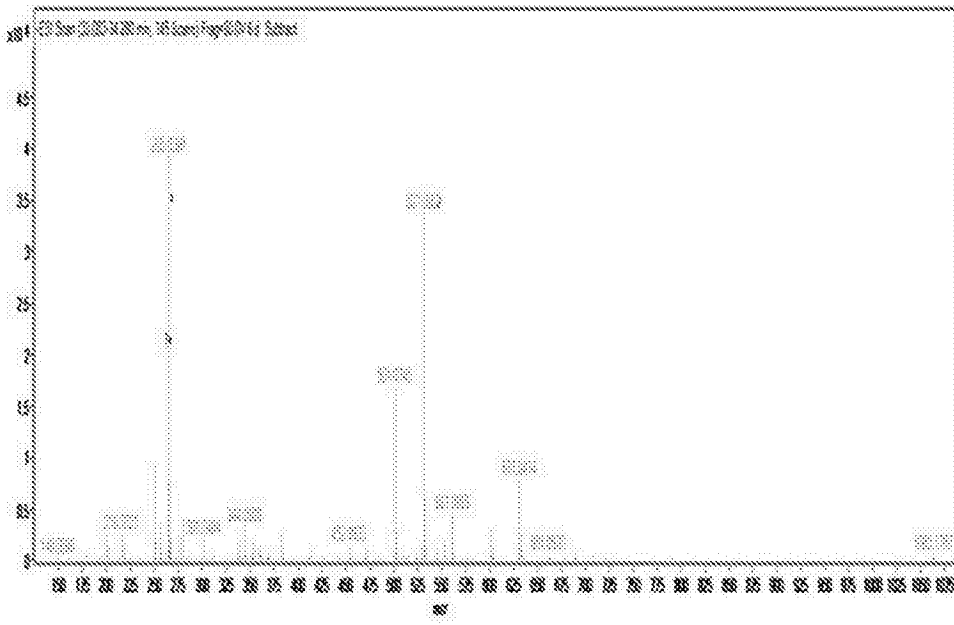


图9

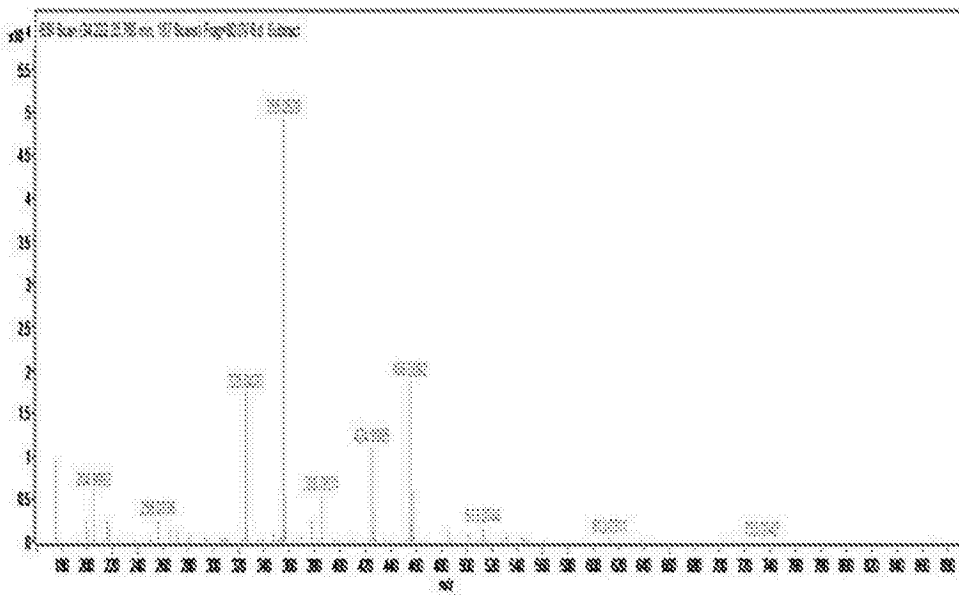


图10

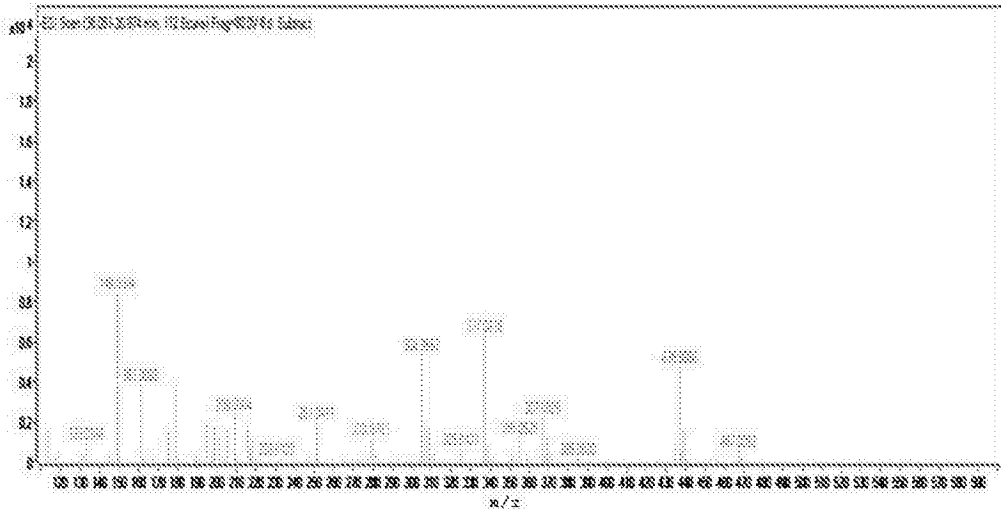


图11

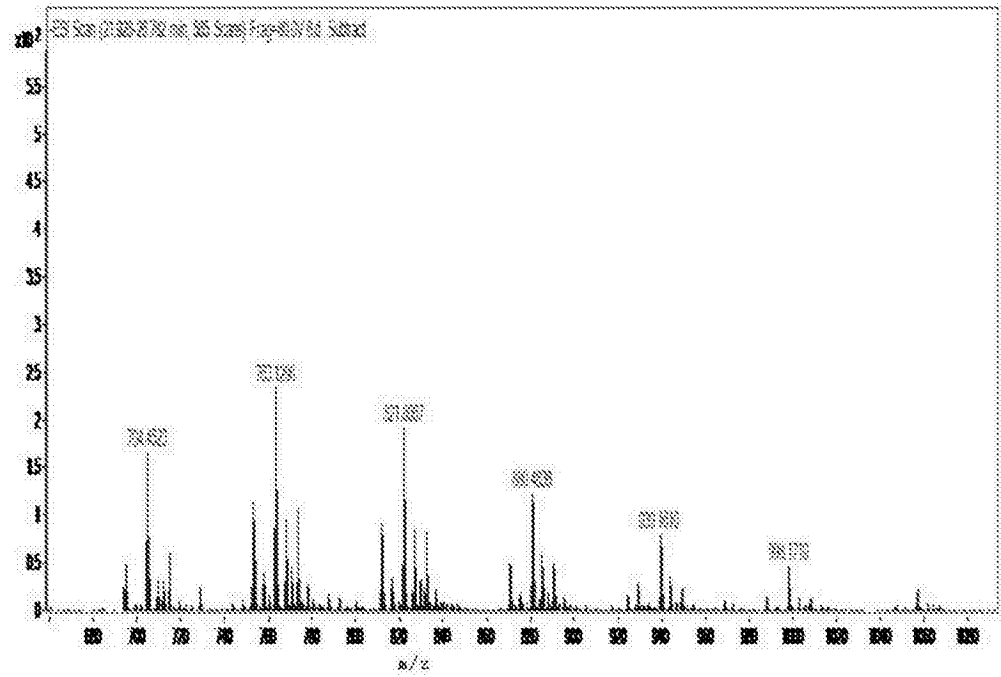


图12

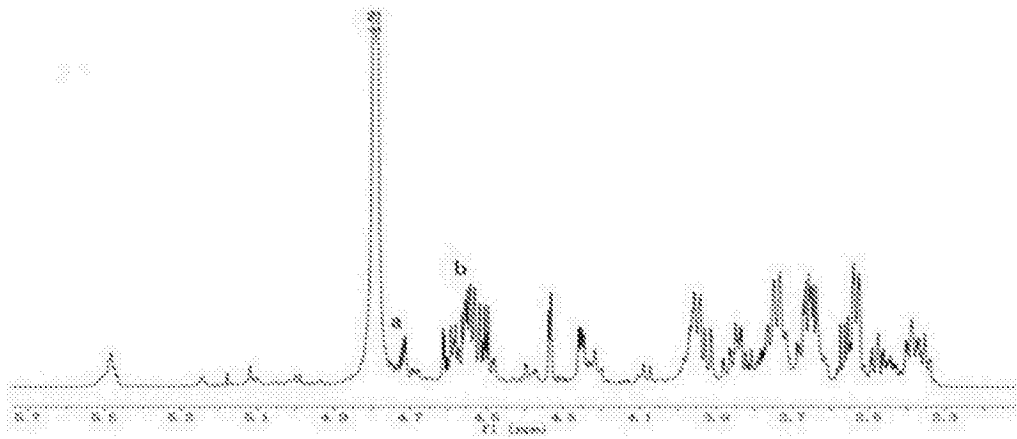


图13

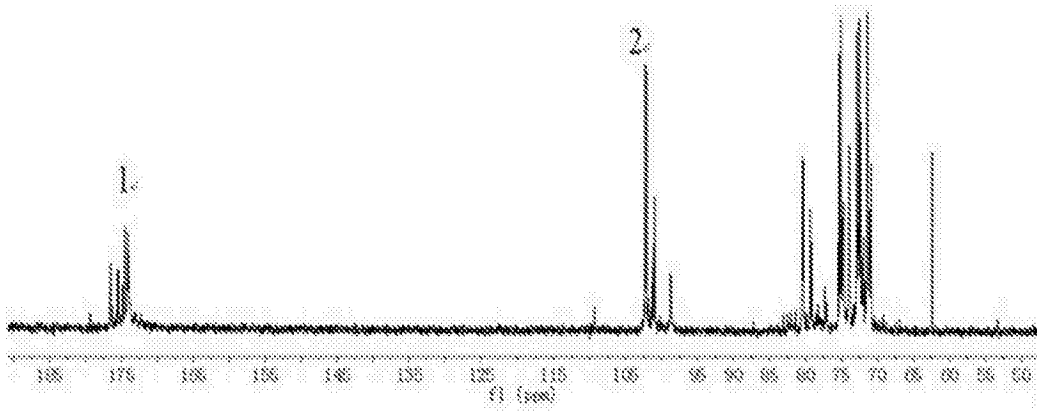


图14

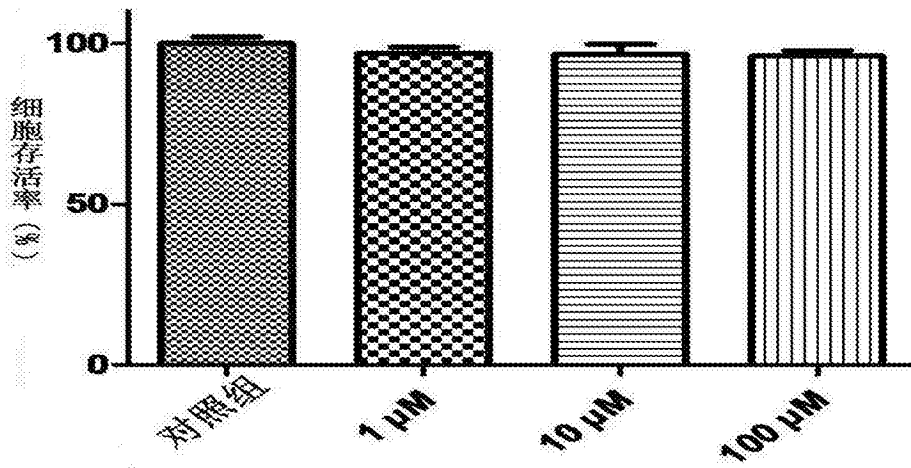


图15

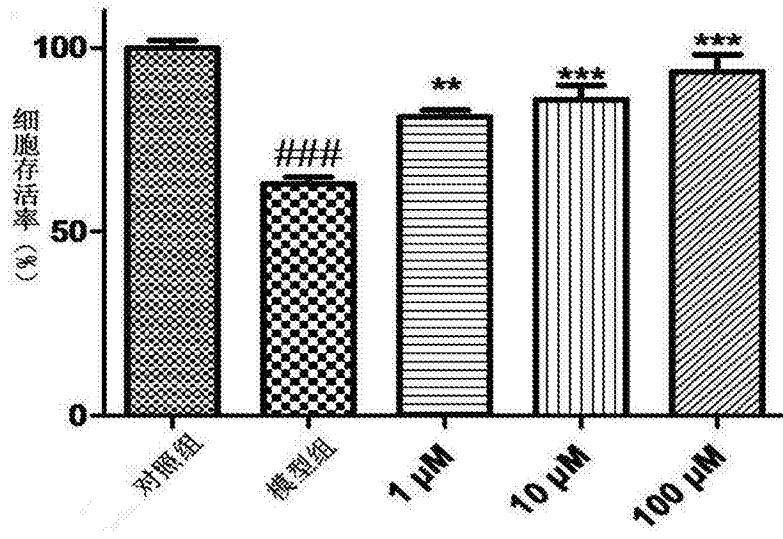


图16