

## (12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118955516 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202411170917.6

(22) 申请日 2024.08.26

(71) 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区凌云路街道梅  
陇路130号

(72) 发明人 张伟安 时腾飞 郑家豪 汪媛

(51) Int. Cl.

C07D 487/22 (2006.01)

A61K 41/00 (2020.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图5页

### (54) 发明名称

一种由半胱氨酸功能化五氟苯基菌绿素的  
制备方法及其在光动力抗菌中的应用

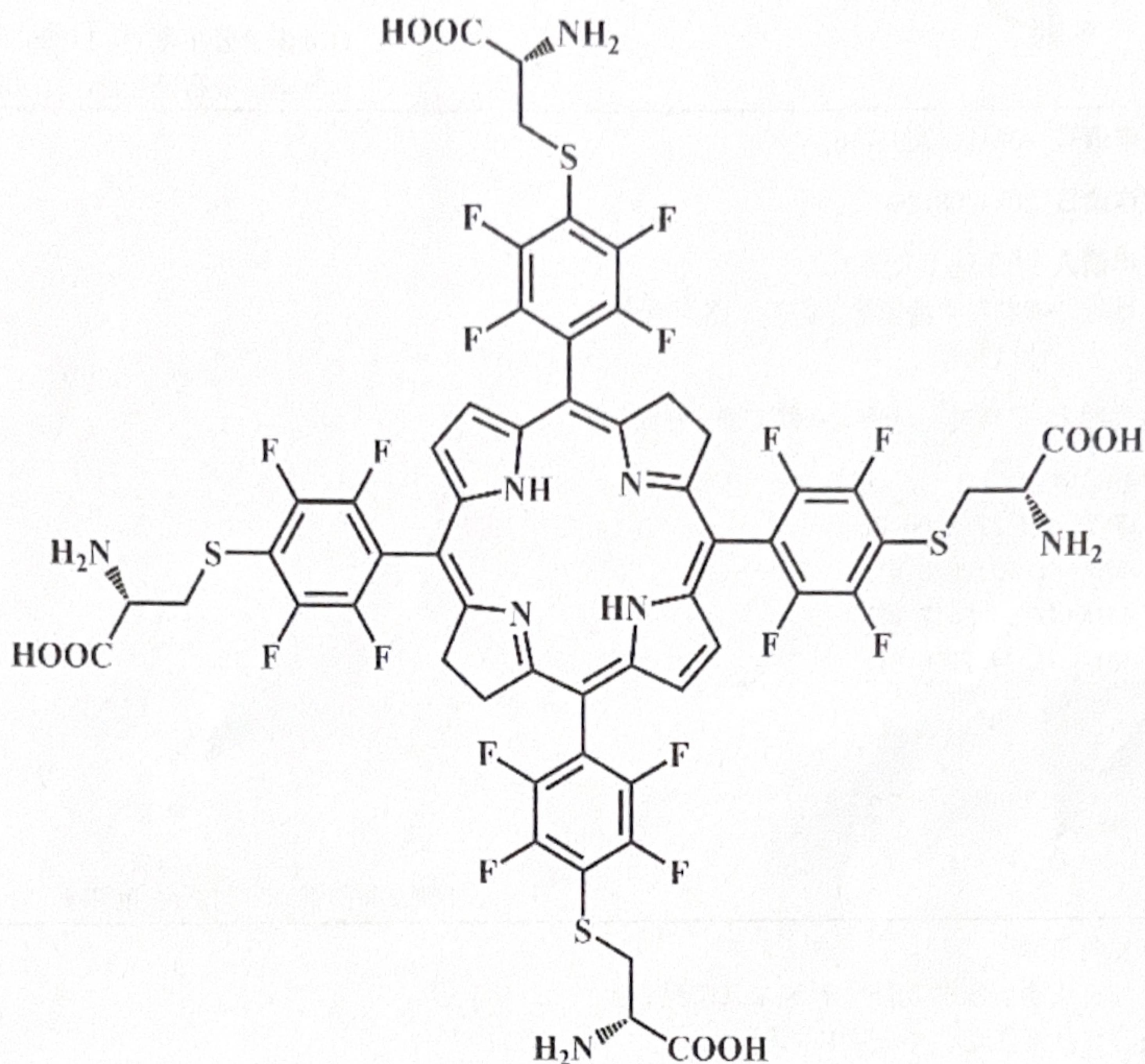
### (57) 摘要

本项发明涉及有机合成和生物医学材料领域,具体介绍了一种近红外抗菌光敏剂的制备方法和应用,即半胱氨酸功能化修饰五氟苯基菌绿素(FBC-Cy)。制备的FBC-Cy通过利用细菌在细胞壁合成过程中能够整合氨基酸使光敏剂能够靶向并积聚在细菌细胞壁上的特性,实现在细胞和细菌共存情况下对细菌的精准杀伤。同时,FBC-Cy具有优异的生物相容性、水溶性以及激发光穿透能力,提高治疗效率并减少组织损伤。本发明能有效提高光动力抗菌治疗效果,并且精准杀伤细菌。

CN 118955516 A



1. 一种由FBC-Cy光敏剂, 其特征在于, 使用半胱氨酸修饰, 制备得到半胱氨酸功能化的五氟苯基菌绿素光敏剂, 其结构如下:



2. 根据权利要求1所述的FBC-Cy光敏剂的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤: S1: 称取一定量的五氟苯基菌绿素于DMF中, 加入一定量的半胱氨酸和碳酸钾, 室温反应12 h后透析, 得到半胱氨酸功能化的五氟苯基菌绿素光敏剂。

3. 根据权利要求2所述的FBC-Cy光敏剂的制备方法, 其特征在于, 所述步骤S1中所述光敏剂为五氟苯基菌绿素。

4. 根据权利要求2所述的FBC-Cy光敏剂, 其特征在于: 具有靶向细菌并且在光照下有效杀死细菌。

5. 如权利要求1-4所述的制备方法得到的半胱氨酸功能化的五氟苯基菌绿素 (FBC-Cy) 在制备抗菌药物中的应用。



## 一种由半胱氨酸功能化五氟苯基菌绿素的制备方法及其在光动力抗菌中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于有机合成和生物医学材料领域,具体涉及一种半胱氨酸功能化五氟苯基菌绿素(FBC-Cy)的制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 当前,细菌感染引发的一系列疾病已成为世界第二大致命原因,对人类社会正常运转造成严重影响。抗生素的问世在很大程度上减轻了细菌感染的危害。自1928年抗生素被发现和应用以来,曾致命的细菌感染得以治愈,例如,阿莫西林和环丙沙星等抗生素能有效抑制病原细菌生长,减少术后细菌感染的风险。然而,抗生素的滥用加速了抗微生物耐药性(AMR)的蔓延,让一些菌株演变成“超级细菌”,对人类和动物健康构成严重威胁。随着细菌对各类抗生素的耐药性不断增强,目前新型抗生素的研究似乎停滞不前,寻找适用于临床的新小分子抗生素变得困难。因此,开发有效的非抗生素治疗策略来对抗体内细菌感染至关重要。

[0003] 光动力治疗是一种新兴的无抗生素治疗方法,因其生物毒性低、作用快、可重复等优点而备受关注,能用于处理生物体表面的抗微生物问题。这种治疗方法被认为是一种具有广阔发展前景的新型疗法。PDT的原理在于光敏剂吸收特定波长的光而被激发,被激发的光敏剂能将其能量传递给周围的氧分子,从而产生高细胞毒性的单线态氧,随后形成有毒的活性氧(ROS),从而有效地消灭细菌。在光动力治疗中光敏剂扮演着至关重要的角色,但由于激发光的穿透深度有限和细菌靶向能力不足,PDT尚未广泛应用于体内细菌感染的治疗。

[0004] 近年来,发明人受到天然菌绿素的启发,成功合成了一种新型菌绿素类似物,即五氟苯基菌绿素(FBC)。FBC具有独特的刚性结构,其大环上拥有多个活性修饰位点,并且在波长为750 nm处紫外光照下表现出强烈吸收特性,具备深层组织穿透能力,且分子稳定性良好,是一种优秀的光敏剂。

[0005] 在光敏剂靶向细菌的多种策略中,包括:生物分子靶向、光敏剂与载体结合以及功能化修饰。功能化修饰通过在光敏剂分子上引入特定的功能基团,可以通过化学合成或生物合成方法实现,从而实现对细菌的高效靶向作用,本发明利用五氟苯基菌绿素与半胱氨酸巯基的共价键结合的优异性以及五氟苯基菌绿素较好的吸收激发波长,制备半胱氨酸功能化五氟苯基菌绿素光敏剂,从实现靶向细菌的效果,有效提高光敏剂的利用率。

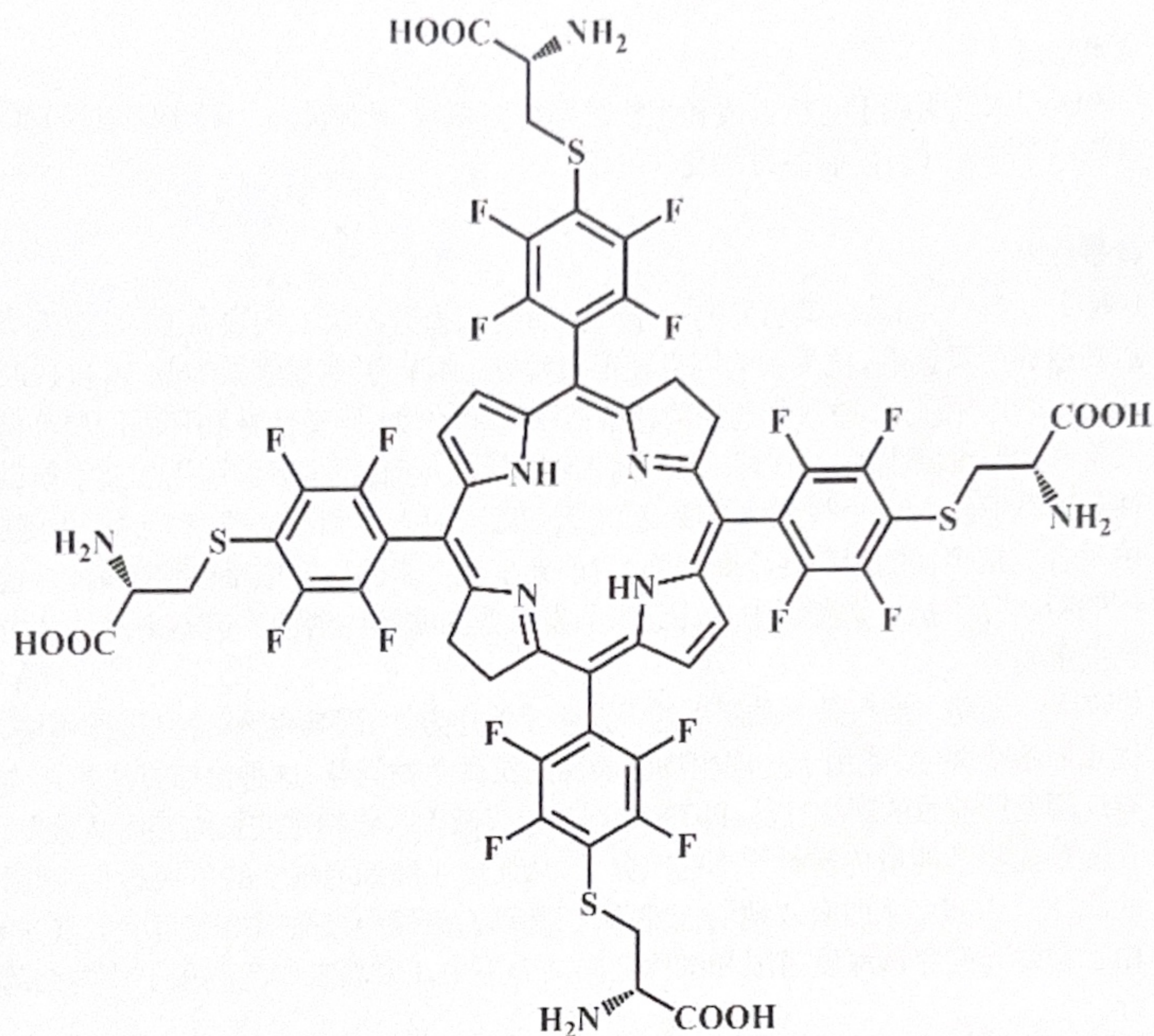
### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供了一种FBC-Cy的制备方法及其应用。通过化学反应在FBC上修饰半胱氨酸制备FBC-Cy光敏剂。这种光敏剂具有优异的生物相容性和水溶性,同时表现出显著的细菌靶向以及优异的抗菌效果等特点。这一特性让它能解决传统抗生素存在的问题:靶向性差,水溶性差、易聚集等问题。



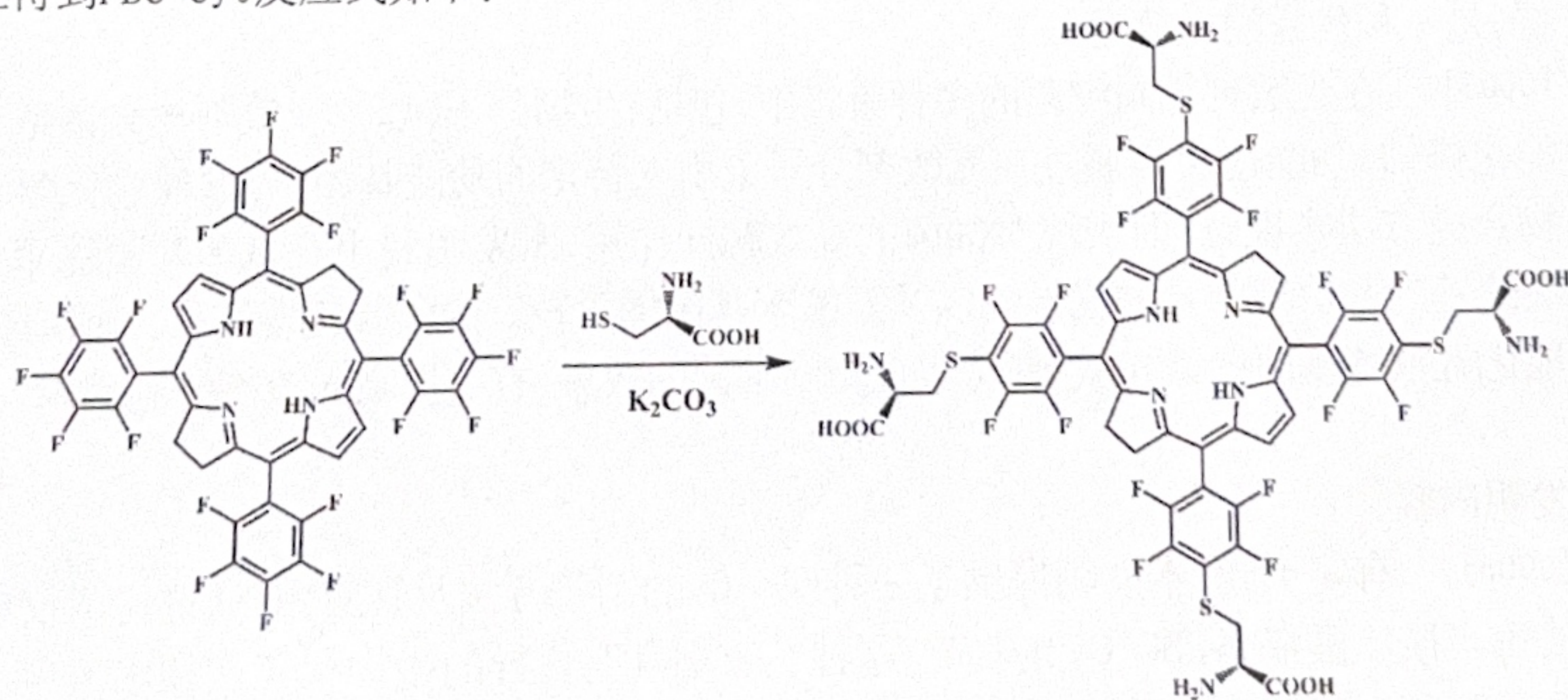
[0007] 为了达成上述技术目标,本项发明采用以下技术方案实现:

[0008] 本发明第一方面提供了一种由半胱氨酸功能化的五氟苯基菌绿素 (FBC-Cy) 光敏剂,其结构为:



[0009] 本发明第二方面提供了一种FBC-Cy制备方法,包括以下步骤:。

[0010] S1:以DMF为溶剂,五氟苯基菌绿素 (FBC) 和半胱氨酸为反应原料,碳酸钾为催化剂,反应得到FBC-Cy。反应式如下:



[0011] 步骤S1具体包括:称取一定量的五氟苯基叶绿素 (FBC) 于DMF中,加入一定量的半胱氨酸和碳酸钾,室温回流反应12 h后,得到FBC-Cy。



[0012] 步骤S2具体包括:把S1得到的产物放置于去离子水中透析,透析2天后就能得到分散在水中的FBC-Cy。

[0013] 本发明第三方面提供了FBC-Cy光敏剂在抗菌方面的应用。

[0014] 本项发明提供了一种由FBC-Cy光敏剂。该光敏剂具有出色的生物相容性和稳定性,其产生单线态氧的能力卓越,展现出杰出的抗菌效果,适用于抗菌治疗。

[0015] 所述应用包括以下测试:

[0016] S1:将FBC-Cy光敏剂配制成水溶液,用紫外-可见分光光度计和荧光分光光度计测试样品的紫外吸收光谱和荧光发射光谱。

[0017] S2:用单线态氧测试剂1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)溶液和光敏剂粒共混,光照,测试溶液在425 nm处的紫外吸收,用紫外吸收的下降率表征FBC-Cy光敏剂的单线态氧生成能力。

[0018] S3:以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为实验菌种,用噻唑蓝(MTT)测试FBC-Cy的抗菌效果。

[0019] S4:以成纤维细胞L929作为实验细胞,用噻唑蓝(MTT)测试FBC-Cy的生物安全性效果。

[0020] 本发明的有益效果:

[0021] 1.实验证明本发明提供的FBC-Cy光敏剂有着优秀的水溶性,呈现橙色溶液,未出现明显的沉淀。

[0022] 2.实验证明本发明提供的FBC-Cy光敏剂能够有效的抑制细菌的生长,同时对正常细胞没有毒副作用。

[0023] 3.实验证明本发明提供的FBC-Cy在共培养条件下能够更加有效的抑制细菌的生长。

[0024] 4.本发明中采用的五氟苯基菌绿素以及半胱氨酸都比较容易合成和获得,同时该方法简单易操作,适合大规模实施。

[0025] 5.本发明中五氟苯基菌绿素是通过化学制备得到的;FBC-Cy光敏剂的形成是五氟苯基菌绿素和半胱氨酸之间通过共价键的作用实现高效连接。这种组合利用卟啉的光动力治疗(PDT)进行抗菌治疗,在共培养条件下显著增强了抗菌效果,展现出广阔的应用前景。本发明不仅提高了治疗的效果和效率,还为光动力抗菌治疗开辟了新的方向。

#### 附图说明

[0026] 图1为FBC-Cy的<sup>1</sup>H NMR谱图。

[0027] 图2为FBC-Cy的<sup>19</sup>F NMR谱图。

[0028] 图3为FBC-Cy的紫外吸收光谱图。

[0029] 图4为FBC-Cy的荧光光谱图。

[0030] 图5为FBC-Cy处理后的DPBF紫外吸收降解曲线。

[0031] 图6为FBC-Cy抗菌试验结果图。

[0032] 图7为FBC-Cy的抗菌试验结果图(金黄色葡萄球菌)。

[0033] 图8为FBC-Cy的抗菌试验结果图(大肠杆菌)。

[0034] 图9为FBC-Cy的生物相容性试验结果图(L929细胞)。

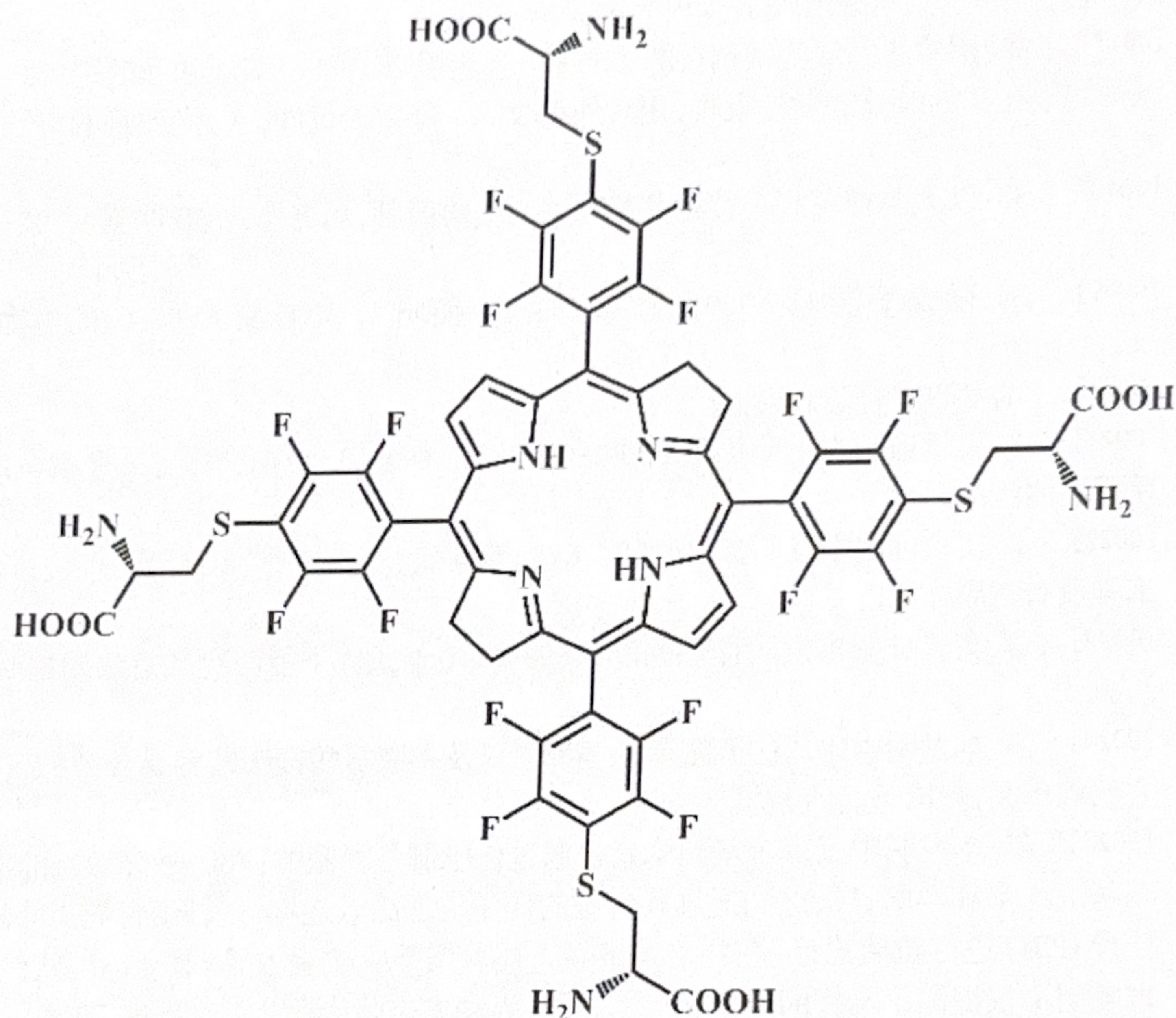


### 具体实施方式

[0035] 以下附图介绍说明书中的优选实施例展示了本发明的可行性,向技术人员全面展示了本发明,使其技术内容更为清晰易懂。为更好理解本发明的实质,通过具体操作过程来阐释本发明的理念,但并非对本发明的限制。技术人员可根据本发明的基本理念进行优化和改进,始终在本发明的范围内。

[0036] 实施例1

[0037] 本实施例1提供一种FBC-Cy光敏剂的制备方法,其结构如下:

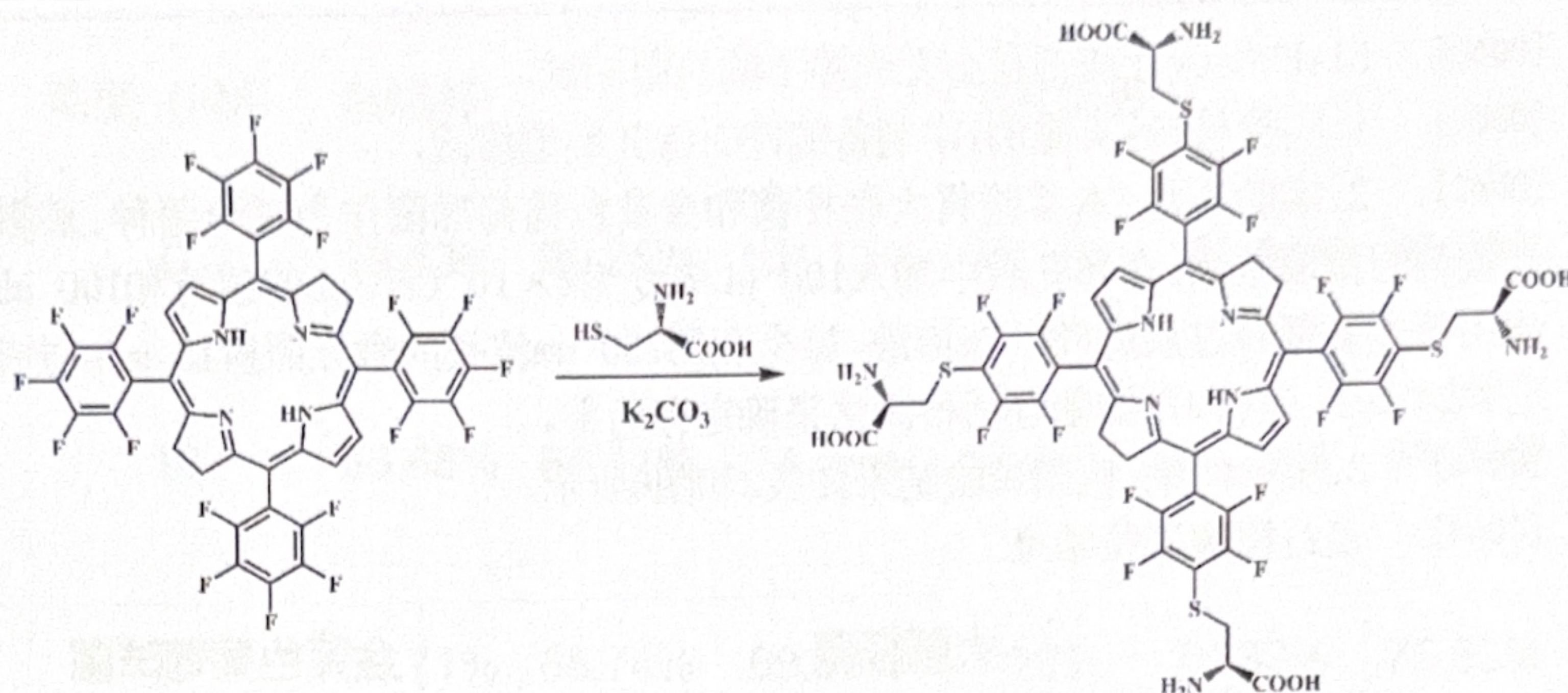


[0038] 上述FBC-Cy的制备方法为:

[0039] S1:对FBC-Cy光敏剂的合成。

[0040] 将五氟苯基菌绿素 (10 mg, 0.01 mmol) 溶解在 3 mL DMF 中,再往溶液中加入碳酸钾 (22 mg, 0.16 mmol)。与半胱氨酸 (10.3 mg, 0.06 mmol) 混合研磨充分,然后。然后将半胱氨酸 (10.3 mg, 0.06 mmol) 溶解在 DMF (2 mL) 中,室温下缓慢滴加到上述反应溶液中,在室温下反应 12 h。反应结束后,静置。将产物转移至透析袋中,去除未反应的原料,透析两天,每八小时换一次水,得到产物 FBC-Cy,为橙色溶液,产率:40.5 %。反应式如下:





## [0041] 实施例2

[0042] 本实施例2提供对实施例1中的FBC-Cy的性质表征。

[0043] S1:FBC-Cy的紫外吸收测试。

[0044] 1.实验材料:FBC-Cy水溶液。

[0045] 2.实验方法:将FBC-Cy配制去离子水溶液,先用去离子水扫描基线,再扫描FBC-Cy光敏剂的紫外吸收光谱,波长范围为400 nm-800 nm。

[0046] 3.实验结果:紫外吸收光谱如图3所示,FBC-Cy光敏剂的吸收峰在750 nm,与五氟苯基菌绿素光敏剂的吸收峰一致,说明FBC-Cy光敏剂的成功制备。

[0047] S2:FBC-Cy光敏剂的荧光测试

[0048] 1.实验材料:FBC-Cy光敏剂水溶液。

[0049] 2.实验方法:根据紫外吸收光谱,选择合适的激发波长,检测环FBC-Cy光敏剂水溶液的荧光发射光谱,设定参数如下:激发波长选择510 nm,接受波长选择720 nm-780 nm,狭缝宽度均设置为20 nm。

[0050] 3.实验结果:荧光光谱图如图4所示,FBC-Cy光敏剂的荧光发射峰值在755nm。

## [0051] 实施例3

[0052] 本实施例5提供对实施例3中的卟啉-抗生素超分子纳米颗粒的单线态氧产生能力检测。

[0053] 1.实验材料:实施例1中制备的FBC-Cy光敏剂溶液。

[0054] 2.实验方法:取实施例1中制备的FBC-Cy光敏剂与单线态氧检测试剂DPBF配成溶液,每组都使用波长750 nm的光源进行照射,每照30秒钟检测溶液在425 nm处的紫外吸收,试验重复3次。

[0055] 3.实验结果:紫外吸收所反应的单线态氧产生能力结果如表1和图7所示。

[0056] 表1:单线态氧产生能力结果

时间(s)	0 s	30 s	60 s	90 s	120 s
FBC-Cy	1	0.73	0.55	0.40	0.28

[0057] 由表1和图4中能够看出FBC-Cy有着较好的单线态氧产生能力,并且加入的半胱氨酸分子并不会明显的引起单线态氧产率下降。

## [0058] 实施例4

[0059] 本实施例4提供对实施例1中的FBC-Cy光敏剂的抗菌评价。



- [0060] S1:FBC-Cy光敏剂在有无光照下的抗菌测试。
- [0061] 1.实验材料:实施例1中制备的FBC-Cy光敏剂溶液。
- [0062] 2.实验方法:本实验将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为试验菌种,来测试FBC-CY光敏剂的抗菌效果。在96孔板中加入100 μL浓度为 $2\times 10^6$  CFU/mL的菌液和100 μL浓度为50 μM用培养基稀释过后的FBC-Cy溶液。每个孔用750 nm波长的激光照射15 min,并在37 ℃下培养24 h后,进行MTT细菌存活检测法来确定存活率。
- [0063] 3.实验结果:抗菌试验结果如表2和图6所示。
- [0064] 表2:抗菌试验结果

	大肠杆菌			金黄色葡萄球菌		
FBC-Cy+光照	63.79%	65.98%	64.92%	22.29%	22.80%	21.33%
FBC-Cy	87.23%	89.63%	93.88%	85.76%	77.84%	76.42%

- [0065] S2:FBC-Cy光敏剂在光照下的抗菌测试。
- [0066] 1.实验材料:实施例1中制备的FBC-CY光敏剂溶液。
- [0067] 2.实验方法:本实验将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为试验菌种,来测试FBC-CY光敏剂的抗菌效果。取两个96孔板A(共培养组)、B(非共培养组),分别在两个96孔板中加入100 μL浓度为 $2\times 10^6$  CFU/mL的菌液和依次加入100 μL浓度为0、10、20、30、40、50 μM用培养基稀释过后的FBC-Cy溶液。A组细菌与光敏剂进行共培养6 h,共培养后每个孔用750 nm波长的激光照射15 min,并在37 ℃下培养24 h;B组细菌在加入光敏剂后,每个孔用750 nm波长的激光照射15 min,并在37 ℃下培养24 h,进行MTT细菌存活检测法来确定存活率。。
- [0068] 3.实验结果:抗菌试验结果如表3、4和图6、7所示。
- [0069] 表3:大肠杆菌抗菌试验结果



浓度 ( $\mu\text{M}$ )	共培养			非共培养		
0	99.53%	99.35%	101.12%	95.11%	106.84%	98.05%
10	85.68%	85.41%	74.56%	93.91%	80.37%	86.84%
20	60.71%	68.74%	69.35%	75.8%	76.32%	75.63%
30	48.26%	57.61%	60.62%	63.04%	67.26%	67%
40	43.29%	33.79%	44.21%	60.1%	60.97%	58.38%
50	29.29%	28.59%	33.71%	53.89%	55.96%	60.19%

[0070] 表4:金黄色葡萄球菌抗菌试验结果



浓度 (μM)	共培养			非共培养		
0	100.07%	100.45%	99.47%	102.12%	105.36%	92.51%
10	70.57%	66.15%	70.02%	85.22%	93.09%	88.58%
20	46.14%	45.59%	50.94%	80.82%	86.26%	82.09%
30	33.87%	33.81%	29.83%	76.53%	70.05%	76.88%
40	28.36%	27.38%	23.78%	63.22%	54.77%	68.78%
50	24.98%	23.72%	22.69%	48.86%	50.48%	41.1%

[0071] 由表2、3、4和图6、7中结果能够看出,本发明实施例1中制备的FBC-Cy光敏剂能够有效的杀死大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,有很高的抗菌活性。这也能够说明在光动力治疗的协同作用下,产生了更出色的对抗普通细菌和耐药菌的效果。并且在没有光照的条件下,并不会产生细菌毒性以及抗生素的释放,说明该光敏剂具有较好的生物相容性和稳定性。

[0072] 实施例5

[0073] 本实施例5提供对实施例1中的FBC-Cy光敏剂的生物相容性评价。

[0074] 1.实验材料:实施例1中制备的FBC-CY光敏剂溶液。

[0075] 2.实验方法:本实验将成纤维细胞L929作为试验细胞,来测试FBC-CY光敏剂的生物相容性效果。将 L929 细胞分散在 96 孔板中,分别加入浓度为范围为0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μM用培养基稀释过后的FBC-Cy溶液,在培养箱中继续培养24小时。24h后除去旧培养基并重新加入含浓度为5mg mL-的MTT新培养基。4小时后去除培养基,重新加入150LDMSO并通过酶标仪测量每个孔在490nm处的OD值,以此来确定细胞存活率。

[0076] 3.实验结果:L929细胞生物相容性试验结果如表5和图9所示。

[0077] 表5:L929细胞生物相容性试验结果



浓度 (μM)	细胞存活率		
0	97.04%	100.01%	102.96%
3.125	92.99%	98.38275%	86.52%
6.25	97.03%	98.65229%	99.19%
12.5	92.18%	92.18329%	99.46%
25	101.34%	95.68733%	92.18%
50	86.253%	91.6442%	94.87%
100	94.609%	89.75741%	96.49%

[0078] 由表5和图9中结果能够看出,本发明实施例1中制备的FBC-Cy光敏剂具有高的生物相容性。其优良的ROS产生能力,有潜力用于杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤的生长和扩散。FBC-Cy光敏剂凭借其良好的生物相容性和卓越的抗肿瘤潜力,展示出在肿瘤治疗领域的重要应用价值,未来可能成为肿瘤光动力治疗的新选择。

[0079] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于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其他实施例,也应视为本发明的保护范围。



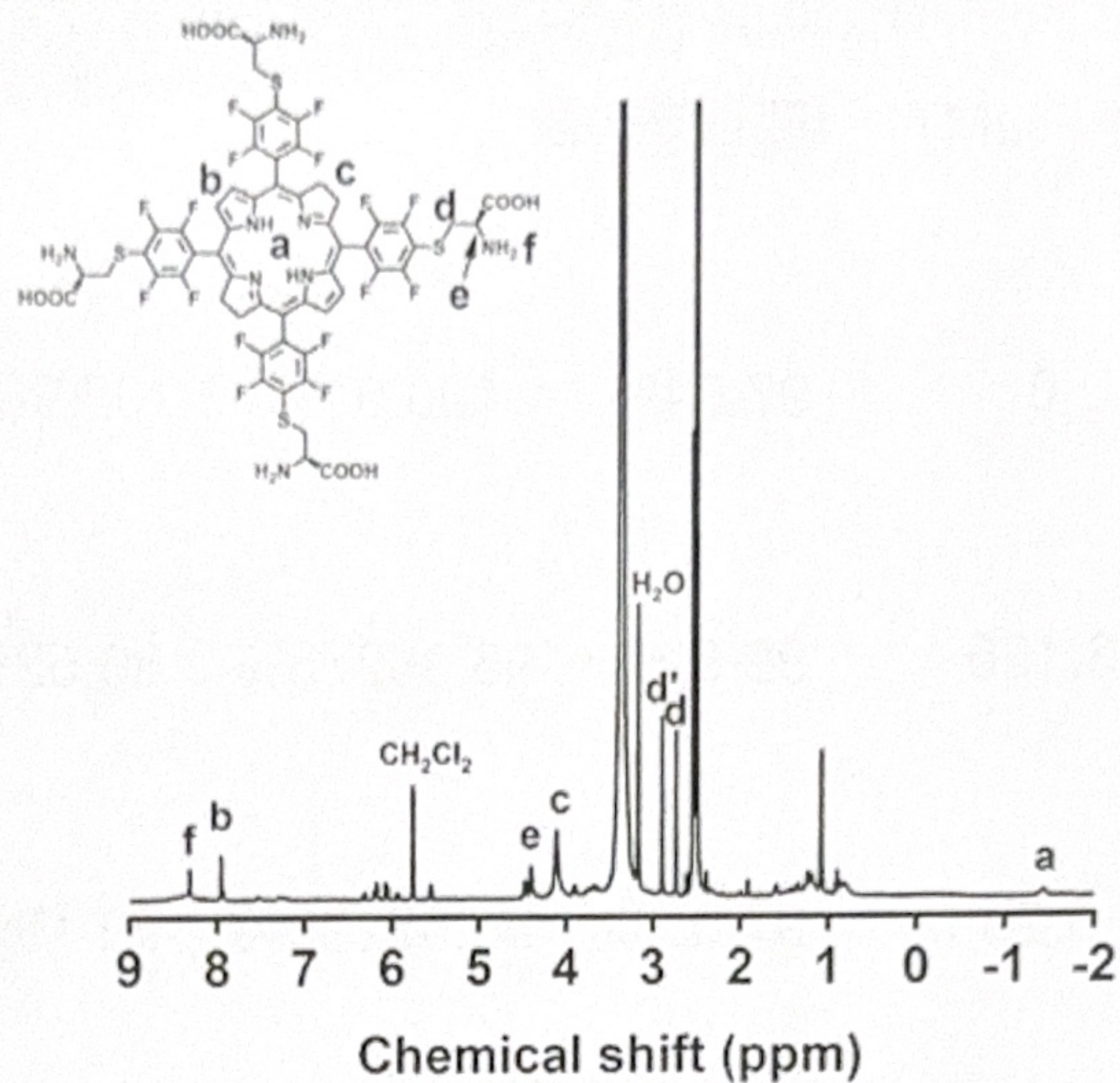


图 1

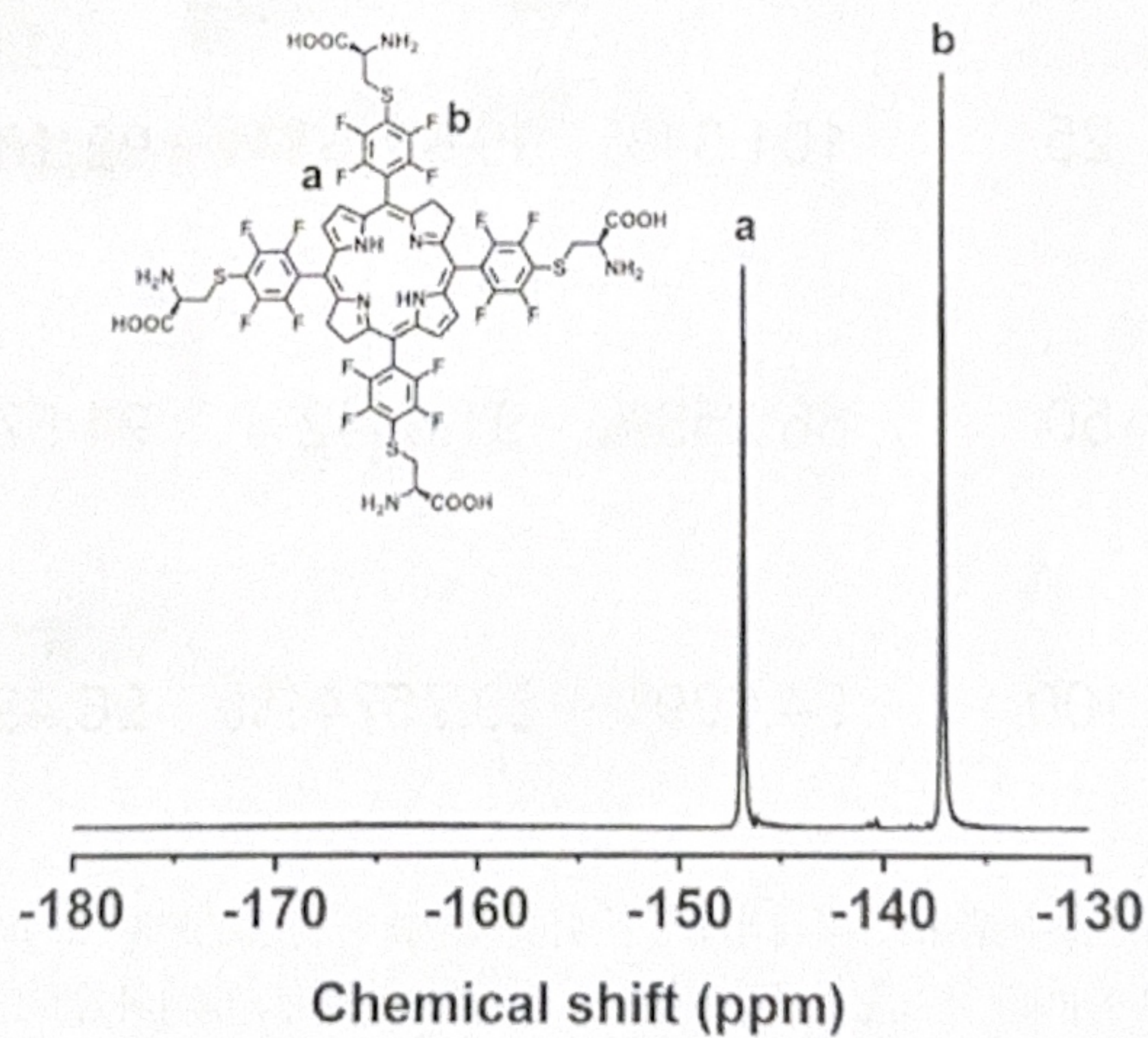


图 2



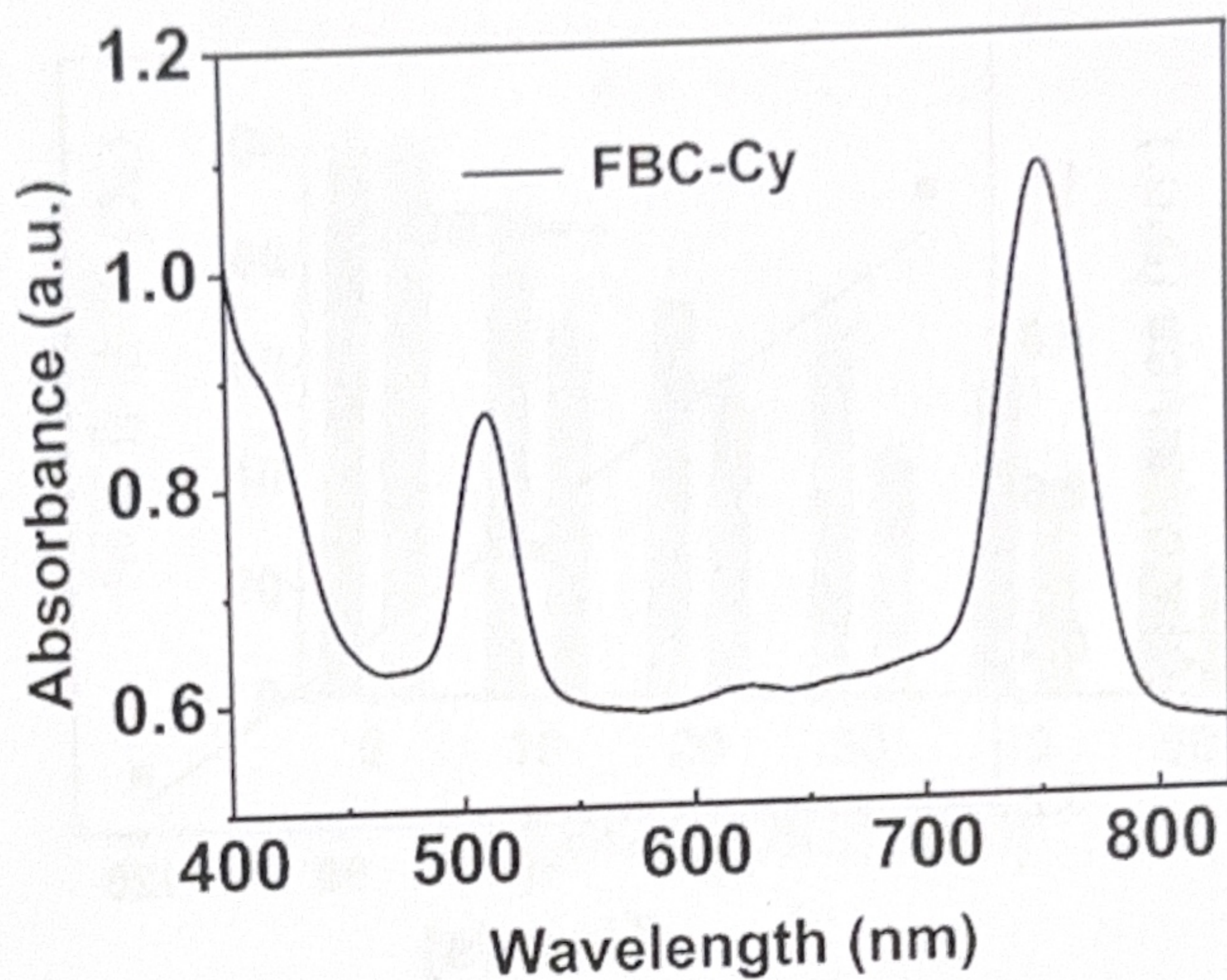


图 3

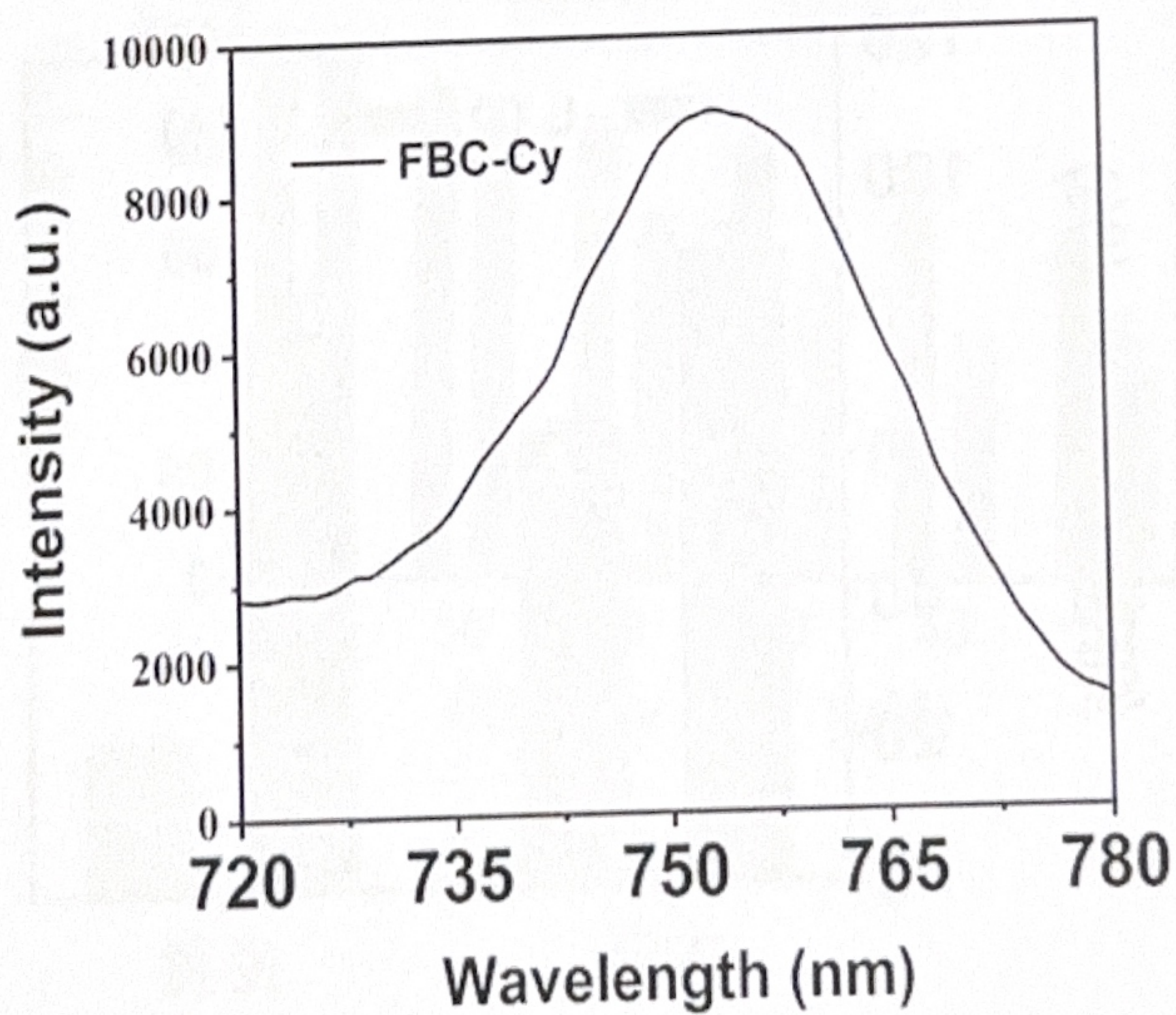


图 4



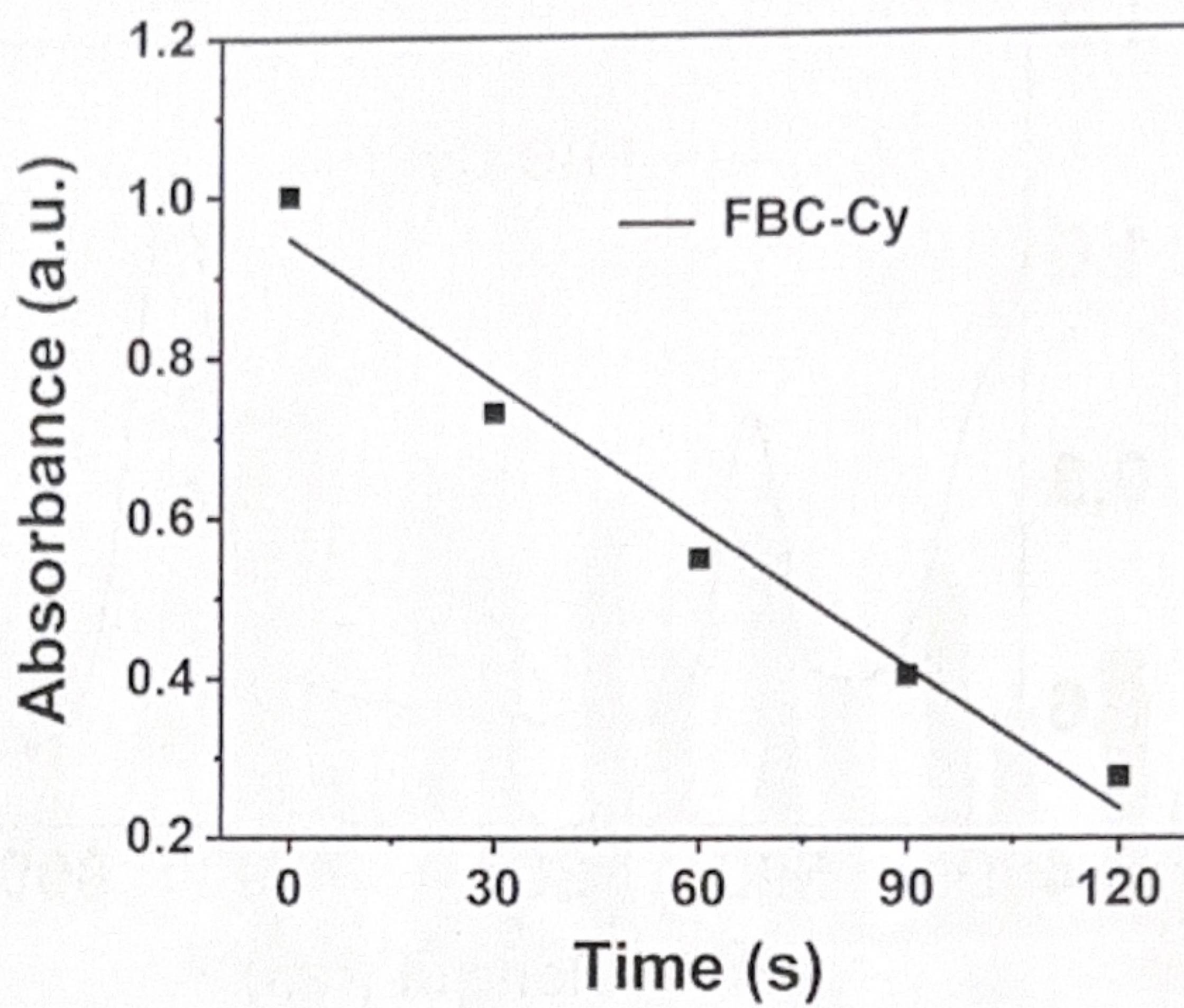


图 5

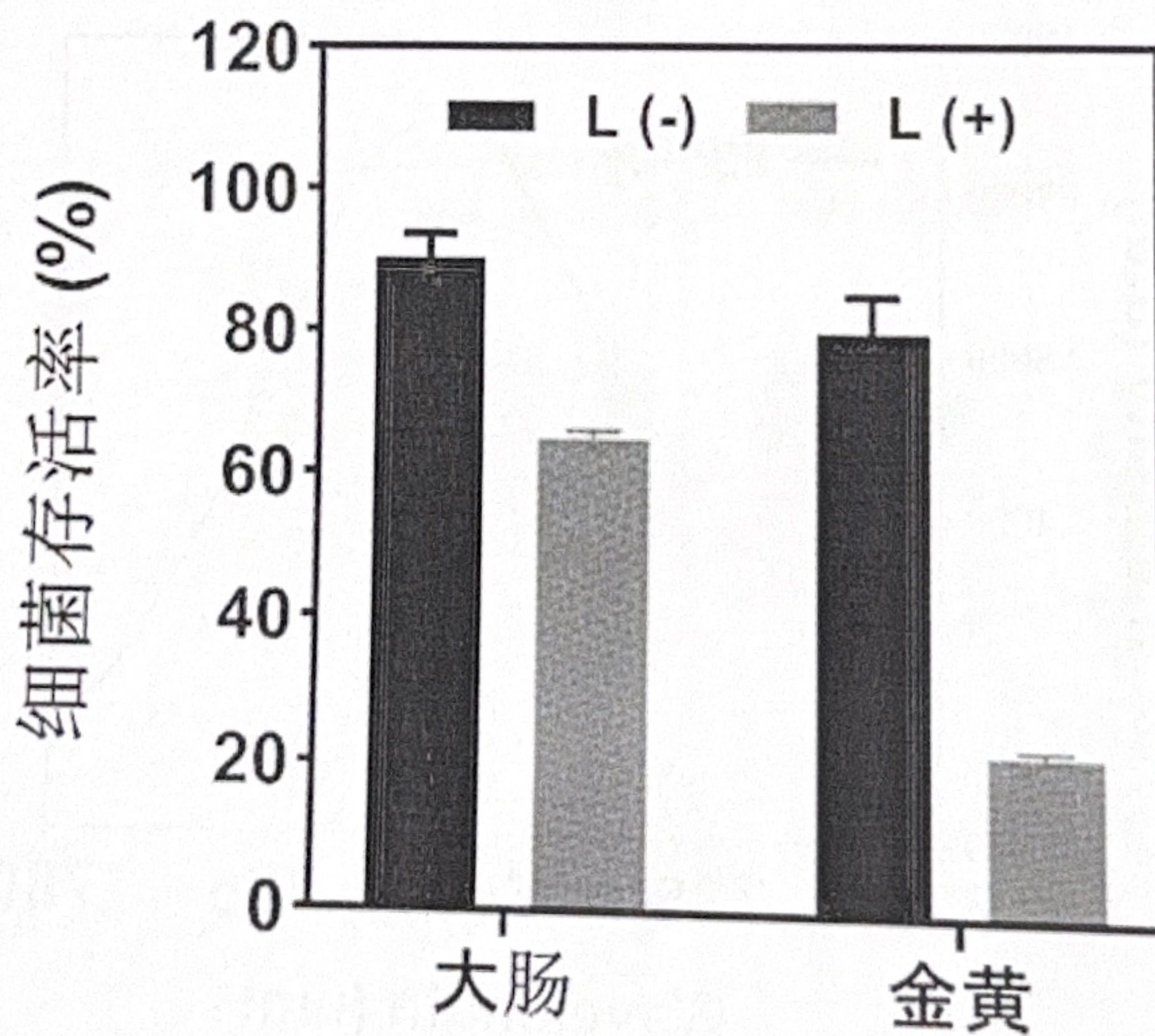


图 6



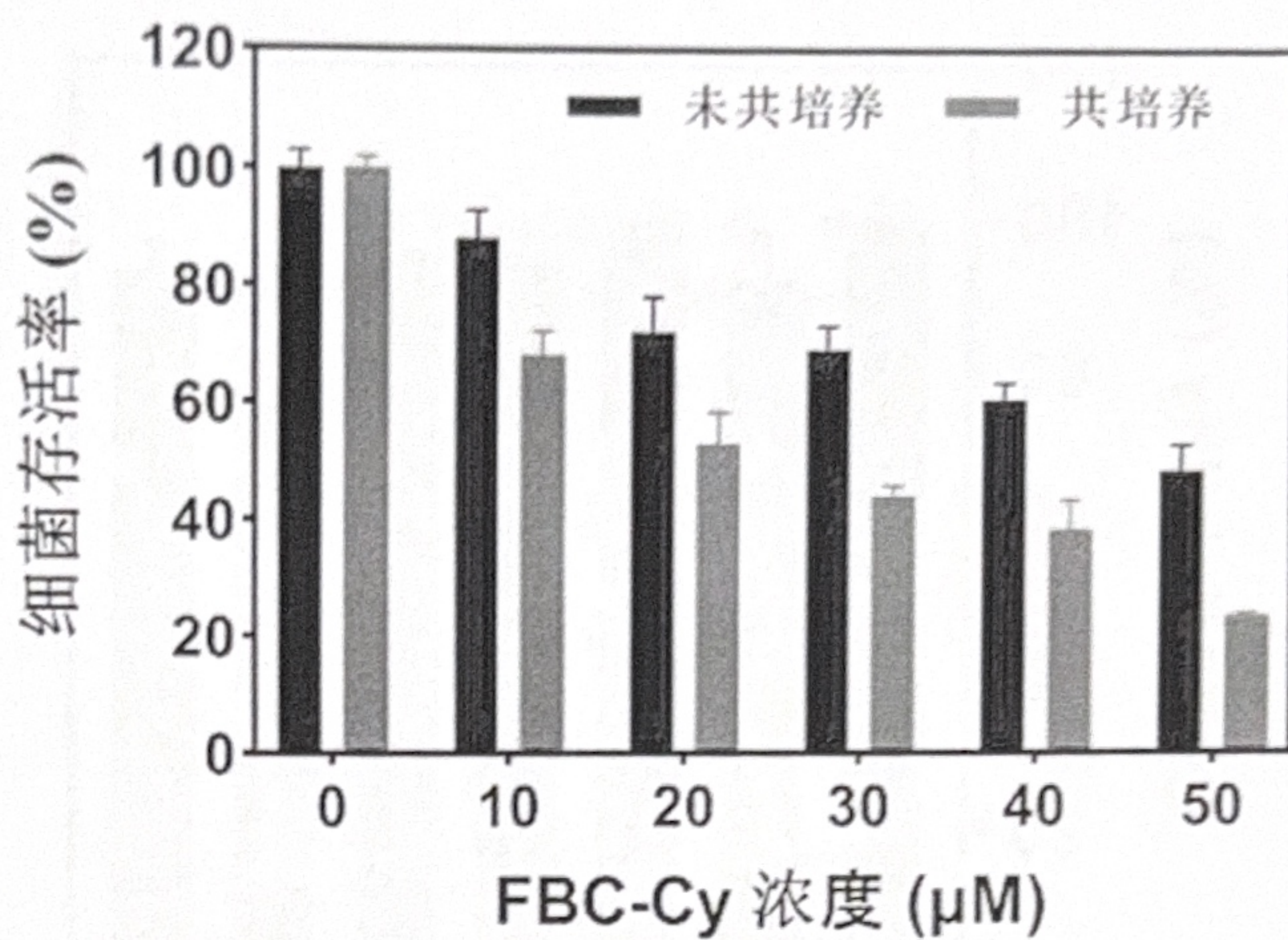


图 7

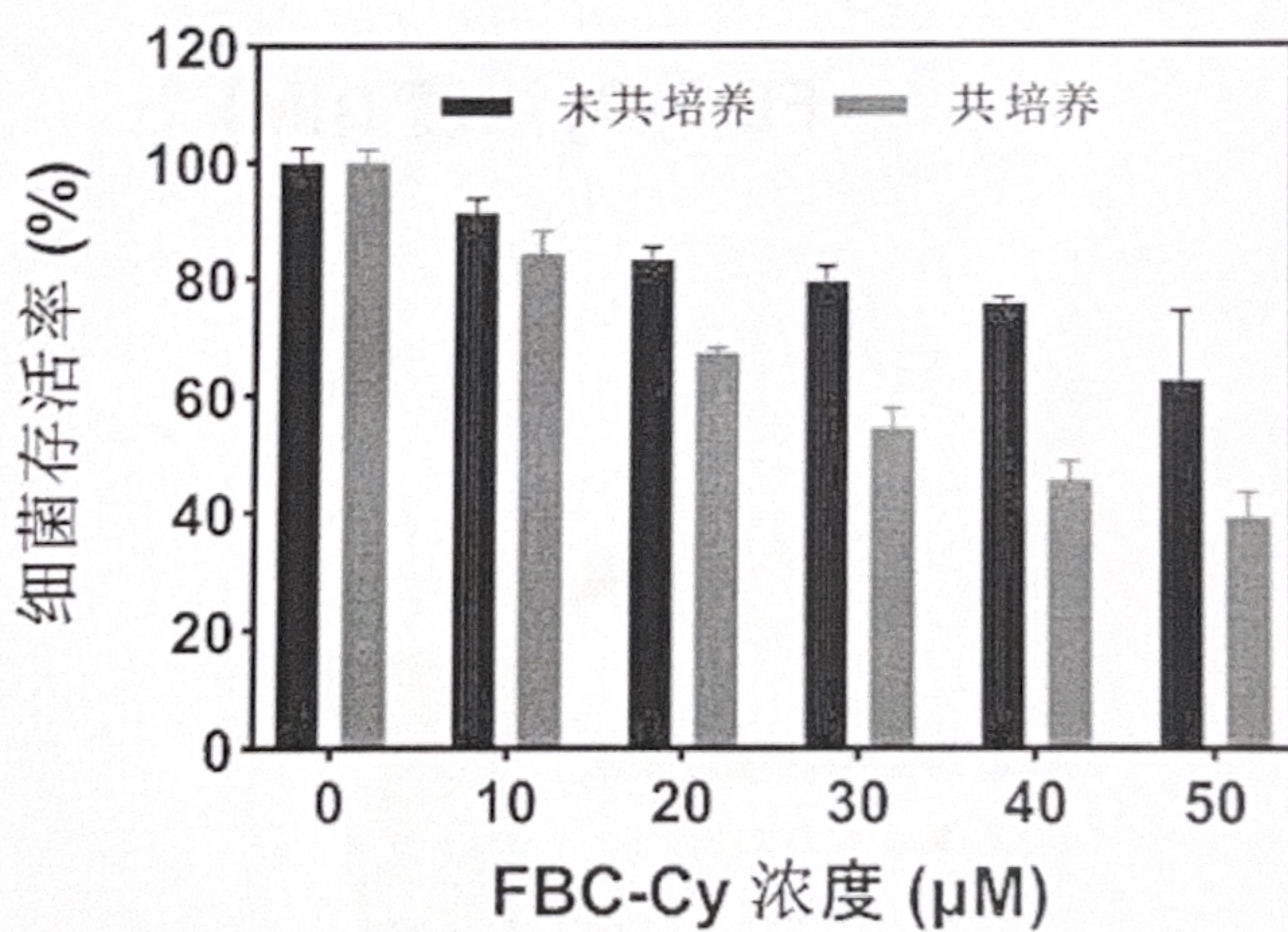


图 8



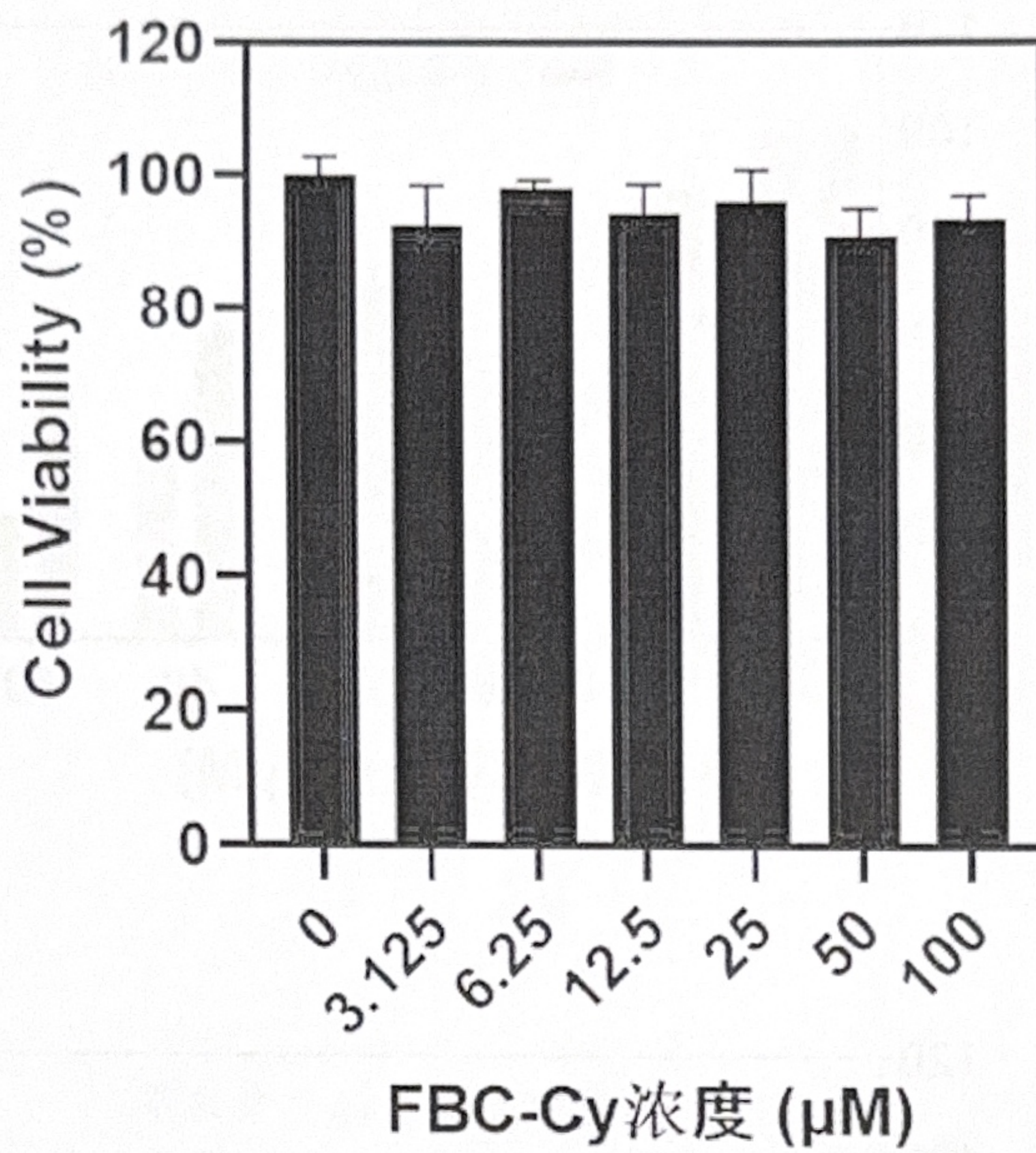


图 9