



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116898793 B

(45) 授权公告日 2024.05.24

(21) 申请号 202310588679.X

(22) 申请日 2023.05.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116898793 A

(43) 申请公布日 2023.10.20

(73) 专利权人 广西师范大学
地址 541004 广西壮族自治区桂林市七星
区育才路15号

(72) 发明人 蒋邦平 沈星灿 王瑗辉 李立群
刘星雨

(74) 专利代理机构 桂林市华杰专利商标事务所
有限责任公司 45112
专利代理师 杨雪梅

(51) Int. Cl.
A61K 38/47 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 33/32 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CA 1221046 A, 1987.04.28
CN 112370567 A, 2021.02.19
CN 113289502 A, 2021.08.24
CN 114634762 A, 2022.06.17
FR 1544730 A, 1968.11.08
JP H0827627 A, 1996.01.30
US 4139699 A, 1979.02.13
US 4243480 A, 1981.01.06
US 4853168 A, 1989.08.01

Yulun Chen等.Lysozyme amyloid fibril:
Regulation, application, hazard analysis,
and future perspectives.International
Journal of Biological
Macromolecules.2022,第200卷第151-161页.

董尧君.基于溶菌酶淀粉样纤维的双网络水
凝胶的制备与性能研究.中国优秀硕士学位论文
全文数据库工程科技I辑.2024,(第01期),第
B016-824页.

审查员 刘应梅

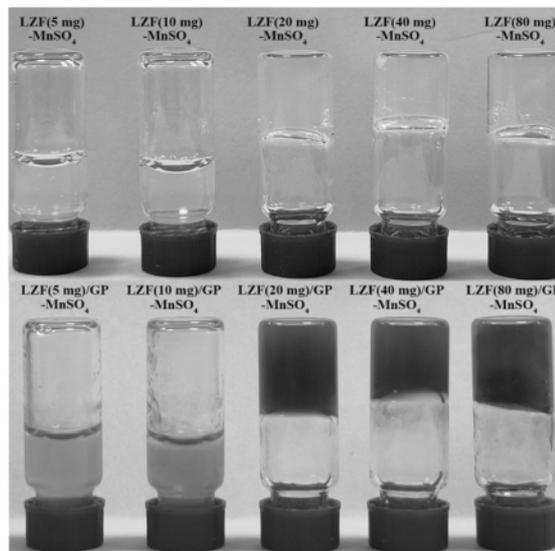
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于药物制剂领域,公开了一种用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶,制备时取溶菌酶溶于二次水,在水浴和酸性条件下反应,获得溶菌酶淀粉纤维样溶液;用透析袋透析除去其中未反应的溶菌酶和其他杂质;再冷冻干燥后备用;干燥后取溶菌酶淀粉纤维样与京尼平溶于二次水中,水浴反应得到蓝色液体,即LZF/GP;取LZF/GP加入MnSO₄进行交联,得到蓝色凝胶,即LZF/GP-MnSO₄水凝胶。本发明溶菌酶水凝胶中,锰离子增强cGSA对胞外DNA的敏感,激活Sting信号促进炎症反应清除残留细菌破坏生物膜,随后GP起到抗炎,降低血糖的作用,从而达到动态促炎抗炎平衡,促进糖尿病足溃疡的愈合。



1. 一种用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

S1. 取溶菌酶溶于二次水,随后在水浴和酸性条件下反应,获得溶菌酶淀粉纤维样溶液;

所述水浴反应温度为70-80℃,酸性条件是pH为2.0-4.0;

S2. 将S1获得的溶菌酶淀粉纤维样溶液,用透析袋透析除去其中未反应的溶菌酶和其他杂质;

S3. 将除去杂质的溶菌酶淀粉纤维样冷冻干燥后备用;

S4. 干燥后取溶菌酶淀粉纤维样与京尼平溶于二次水中,水浴反应得到蓝色液体,即LZF/GP;

所述溶菌酶淀粉纤维样溶液的浓度大于等于20 mg/mL;

S5. 取S4得到的LZF/GP加入 MnSO_4 进行交联,得到蓝色凝胶,即为用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶LZF/GP- MnSO_4 。

2. 根据权利要求1所述的溶菌酶水凝胶的制备方法,其特征在于:S2所述透析袋的分子量为8000-14000Da。

3. 根据权利要求1所述的溶菌酶水凝胶的制备方法,其特征在于:S4所述溶菌酶淀粉纤维样与京尼平的质量比为:20-200 mg:0.113-11.3 mg,水浴反应温度为30-60℃。

4. 根据权利要求1所述的溶菌酶水凝胶的制备方法,其特征在于:S5所述LZF/GP与 MnSO_4 的体积比为9:1, MnSO_4 的浓度为0.01-0.2 mmol/mL。

5. 权利要求1-4任一项所述制备方法制备的用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶。

一种用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,具体是一种用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶及其制备方法。

背景技术

[0002] 随着全球老龄化社会的出现,糖尿病足溃疡(DFUs)的治疗压力越来越大。其中约25%的糖尿病患者在其一生中都会出现糖尿病足溃疡,并且40%的足溃疡患者在治疗之后又会复发,因此糖尿病足溃疡已成为糖尿病最常见和最严重的并发症之一。局部高血糖会诱导慢性炎症和细菌入侵,这使得使用现有的化学疗法治愈糖尿病足溃疡变得更加困难。

[0003] 减轻DFUs的炎症反应可能有助于其愈合,但会损害局部先天免疫的抗菌活性,导致持续的生物膜相关感染。相反,适当的炎症在伤口修复中是必不可少的,通过抗菌促炎反应的激活,能促进炎症清除致病菌、细胞碎片和受损的基质。然而过度激活的促炎反应可能导致高氧化应激,阻碍伤口愈合。

[0004] 目前,糖尿病足溃疡的主要治疗策略是手术清创、切除病变肢体并结合抗生素治疗。要想根治根本的途径要从增强身体素质、提高免疫能力着手。干扰素基因刺激剂(Sting)作为另一类独立的先天免疫危险传感器,已成为癌症、病毒和细菌感染免疫治疗的一个有希望的靶点。因此,对耐药细菌引起的糖尿病足溃疡的免疫治疗面临着重大挑战,迫切需要探索免疫治疗足溃疡的创新策略。

[0005] 在过去的二十年中,通过识别微生物病原体的核酸来感知微生物病原体的能力已经成为哺乳动物细胞先天免疫的一个关键特征。此外,干扰素基因刺激剂(STING)作为另一类独立的先天免疫危险传感器,已成为癌症免疫治疗的一个有希望的靶点。 Mn^{2+} 是现有报道的唯一一种能够增加环状GMP-AMP合酶(cGAS)对细胞外DNA的敏感度的金属离子,能够促进Sting的激活并被广泛用于肿瘤、病毒和细菌感染治疗当中。那么在Sting激活炎症反应后,又如何实现糖尿病足溃疡的抗炎是一个亟待解决的问题。

[0006] 京尼平(GP)被报道具有抗炎,下调胰岛素,保护肝脏,神经等生物学特性。此外,京尼平是一种天然衍生的交联剂,作为水溶性双官能交联剂,它与含胺分子(如蛋白质)能够快速反应,生成深蓝色物质,因此也被用于光热治疗当中。

发明内容

[0007] 本发明针对糖尿病足溃疡的抗炎问题,提供了一种溶菌酶纤维样水凝胶及其制备方法。

[0008] 本发明一种用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶的制备方法,包括如下步骤:

[0009] S1.取溶菌酶溶于二次水,随后在水浴和酸性条件下反应,获得溶菌酶淀粉纤维样(LZF)溶液;

[0010] S2.将S1获得的溶菌酶淀粉纤维样溶液,用透析袋透析除去其中未反应的溶菌酶和其他杂质;

- [0011] S3.将除去杂质的溶菌酶淀粉纤维样冷冻干燥后备用;
- [0012] S4.干燥后取溶菌酶淀粉纤维样与京尼平(GP)溶于二次水中,水浴反应得到蓝色液体,即LZF/GP;
- [0013] S5.取S4得到的LZF/GP加入 $MnSO_4$ 进行交联,得到蓝色凝胶,即为用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶LZF/GP- $MnSO_4$ 。
- [0014] 进一步地,S1所述水浴反应温度为70-80℃,酸性条件是pH为2.0-4.0,二次水的用量以能溶解溶菌酶为宜。
- [0015] 进一步地,S2所述透析袋的分子量为8000-14000Da。
- [0016] 进一步地,S4所述溶菌酶淀粉纤维样与京尼平的质量比为:20-200 mg:0.113-11.3 mg,水浴反应温度为30-60℃,二次水的用量以能溶解参加反应的原料为宜。
- [0017] 进一步地,S5所述LZF/GP与 $MnSO_4$ 的体积比为9:1, $MnSO_4$ 的浓度为0.01-0.2 mmol/mL。
- [0018] 进一步地,当溶菌酶淀粉纤维样浓度大于等于20 mg/mL时,可得到LZF/GP- $MnSO_4$ 水凝胶。
- [0019] 水凝胶是一种极为亲水的三维网络状结构,能够提供物理隔离和创造湿润环境的作用。采用本发明方法制备的LZF/GP- $MnSO_4$ 水凝胶,可用以解决耐药细菌感染引起的糖尿病足溃疡。在治疗糖尿病足溃疡过程当中,溶菌酶纤维样(LZF)独特的抗菌活性和光热能够有效的杀灭致病菌,此外,锰离子能够增加环状GMP-AMP合酶(cGAS)对细胞外DNA的敏感度,促进干扰素基因刺激剂Sting的激活,促进炎症反应清除残留细菌破坏生物膜。随后GP起到抗炎,降低血糖的作用,从而达到动态促炎抗炎平衡,促进糖尿病足溃疡的愈合。本发明LZF/GP- $MnSO_4$ 水凝胶可广泛用于肿瘤、病毒和细菌感染治疗当中。

附图说明

- [0020] 图1为实施例制备的不同浓度LZF的LZF- $MnSO_4$ 水凝胶和LZF/GP- $MnSO_4$ 水凝胶的成凝效果;
- [0021] 图2为实施例制备的系列硫酸盐LZF凝胶的动态时间扫描和动态频率扫描图;
- [0022] 图2(a)为动态时间扫描图,图2(b)为动态频率扫描图;
- [0023] 图3为实施例制备的LZF- $MnSO_4$ 水凝胶和LZF/GP- $MnSO_4$ 水凝胶的紫外吸收图;
- [0024] 图4为实施例制备的LZF- $MnSO_4$ 水凝胶和LZF/GP- $MnSO_4$ 水凝胶的抗菌活性图。

具体实施方式

- [0025] 下面结合实施例和附图对本发明内容作进一步的详细说明,但不是对本发明的限定。

实施例

- [0026] 制备用于糖尿病足溃疡的溶菌酶水凝胶:
- [0027] (1)制备溶菌酶淀粉纤维样(LZF):
- [0028] 取4 g溶菌酶(鸡蛋清溶菌酶,购于源叶生物科技)溶于200 mL二次水当中,随后在80℃水浴和pH = 2的酸性条件下水解反应24 h;待冷却至室温之后,装入分子量为8000-

14000Da的透析袋透析3天以除去未反应的溶菌酶和其他杂质;除去杂质后经冷冻干燥得到溶菌酶淀粉纤维样(LZF);

[0029] (2) 制备LZF/GP-MnSO₄水凝胶:

[0030] 取干燥后的LZF(20-80 mg)与1.13 mg京尼平(GP)溶于900 uL的二次水中,随后在45℃水浴反应12 h,得到了蓝色液体(LZF/GP);

[0031] 将LZF/GP加入100 uL MnSO₄ (0.05 mmol/mL)中进行交联,得到蓝色的凝胶,即为LZF/GP-MnSO₄水凝胶。

[0032] 实施例进一步制备不同浓度LZF的LZF-MnSO₄水凝胶和LZF/GP-MnSO₄水凝胶,探究了其成凝效果。水凝胶中LZF浓度分别为5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、40 mg/mL、80 mg/mL,如图1所示,当LZF浓度大于等于20 mg/mL时,可得到LZF-MnSO₄水凝胶和LZF/GP-MnSO₄水凝胶。

[0033] 参照图2,实施例还对系列LZF-MnSO₄水凝胶和LZF/GP-MnSO₄水凝胶的流变性质进行了探究,如图2(a)所示,从动态时间扫描图可见,LZF-MnSO₄水凝胶和LZF/GP-MnSO₄水凝胶都能够快速成凝($G_c > G^2$);图2(b)所示,从动态频率扫描图可见,在动态频率扫描区间始终保持着凝胶的结构,这也说明了系列硫酸盐交联的LZF水凝胶具有快速成凝的特点,满足伤口敷料的基本要求。

[0034] 实施例进一步通过紫外分光光度计探究了LZF-MnSO₄水凝胶和LZF/GP-MnSO₄水凝胶的紫外吸收,结果如图3所示,LZF在与GP反应之后,在600 nm处出现了一个新的紫外吸收带,这为LZF/GP-MnSO₄水凝胶通过光热杀灭致病菌提供了基础。

[0035] 实施例进一步通过选用耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)作为抗菌模型,探究了LZF-MnSO₄水凝胶和LZF/GP-MnSO₄水凝胶的抗菌活性,如图4所示,LZF/GP-MnSO₄水凝胶在650 nm激光器照射下,能够杀灭98.7%的MRSA和96.0%的*P. aeruginosa*。

[0036] 作为伤口敷料,水凝胶具有优异的组织黏附能力,因此本发明LZF/GP-MnSO₄水凝胶,能够通过涂抹的方式直接应用在伤口表面,用以治疗耐药细菌感染所引起的糖尿病足溃疡。

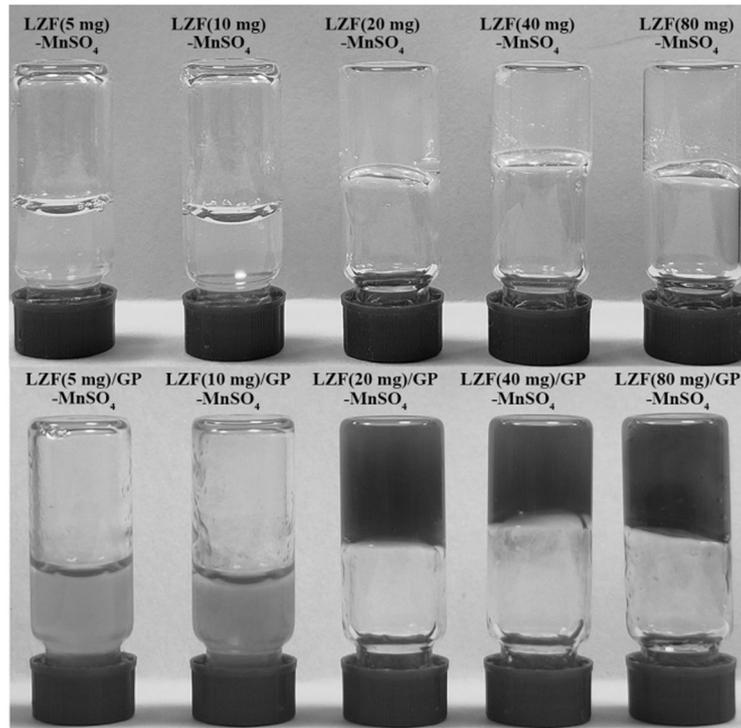


图 1

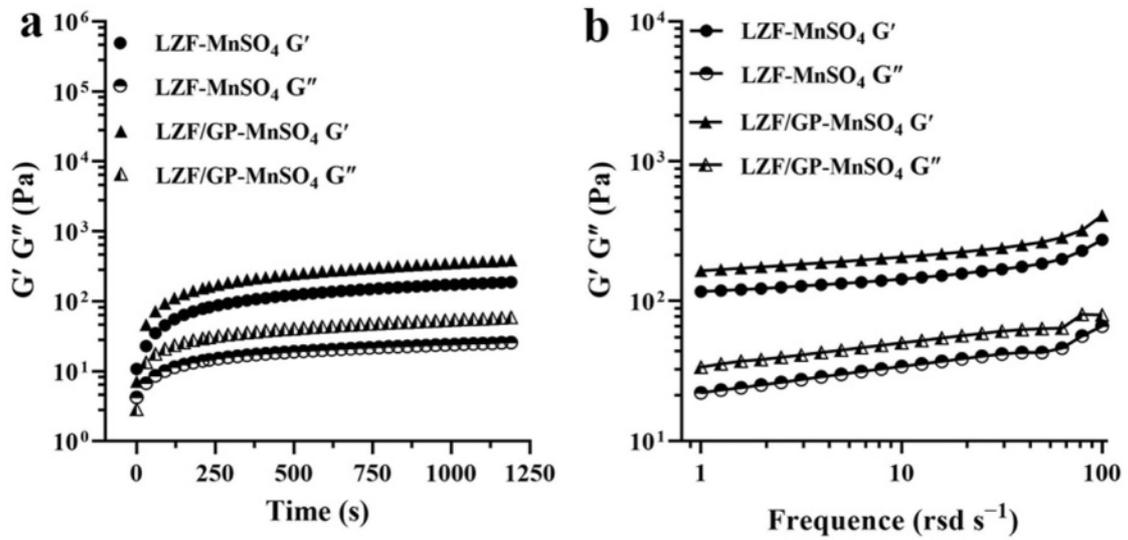


图 2

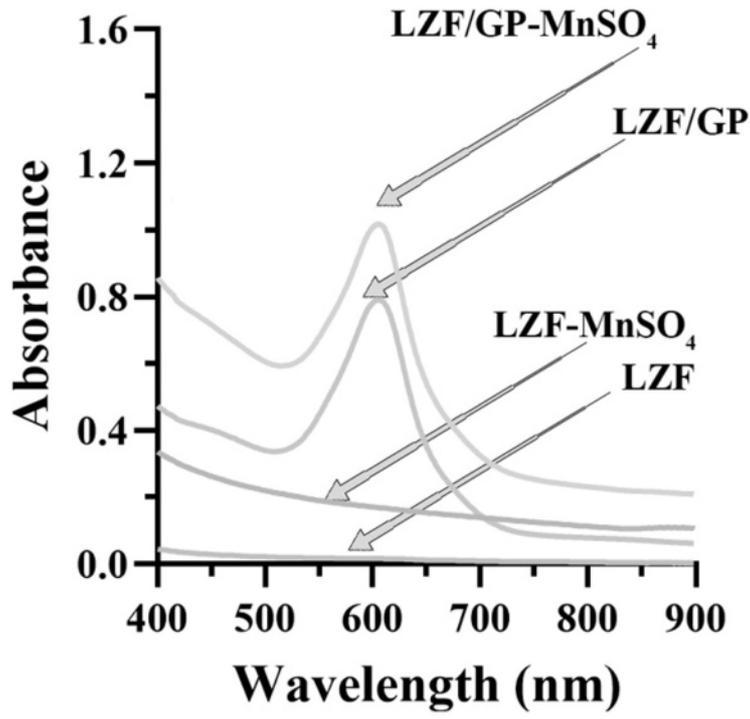


图 3

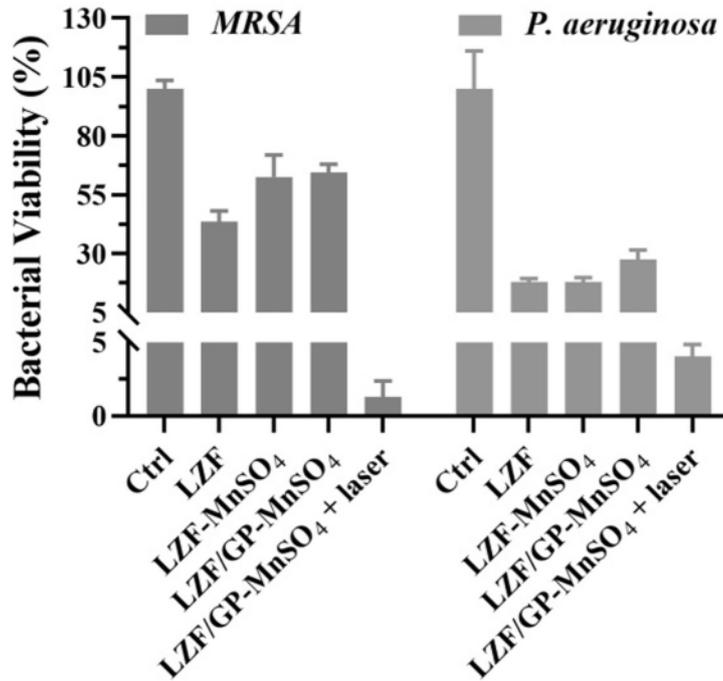


图 4