



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106474147 B

(45) 授权公告日 2022.07.05

(21) 申请号 201610896425.4

A61K 47/32 (2006.01)

(22) 申请日 2016.10.14

A61K 47/34 (2017.01)

A61P 31/20 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106474147 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2017.03.08

WO 2014123880 A1,2014.08.14

CN 105748506 A,2016.07.13

(73) 专利权人 上海颀隆投资管理有限公司

CN 105431421 A,2016.03.23

地址 200131 上海市浦东新区自由贸易试

WO 2015151080 A2,2015.10.08

验区加太路29号2号楼西部404-A03室

Jie Wang et al..Inhibitory effect of

(72) 发明人 余乃绚

sulfated lentinan and lentinan against

tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

专利代理师 信建

seedlings.《International Journal of

Biological Macromolecules》.2013,第61卷第

264-269页.

(51) Int.Cl.

A61K 31/737 (2006.01)

A61K 31/085 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

苟清碧. 硫酸多糖抗病毒活性构效关系.《动

物医学进展》.2012, (第12期), 第187-190页.

审查员 李圩田

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

一种预防和控制人乳头状瘤病毒感染的敷料及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种预防和控制人乳头状瘤病毒感染的敷料及其制备方法,所述敷料中香菇菌多糖硫酸酯的质量百分比为0.01%-0.1%。本发明通过研究发现香菇菌多糖硫酸酯对清除HPV病毒具有很好的效果,而且香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率大小对香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒具有重要影响。在硫酸根修饰率较低时,香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒能力随着硫酸根修饰率的增大而增强;当硫酸根修饰率到达一定水平后,大约为20%左右,此时再增加硫酸根修饰率,则香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒能力将减小。

1. 香菇菌多糖硫酸酯在制备预防和治疗HPV病毒感染的药物中的应用，所述药物为香菇菌多糖硫酸酯敷料，质量百分比组成为：

香菇菌多糖硫酸酯	0.05%
卡波姆	2%
三氯生	0.15%
甘油	3%
EDTA 二钠	0.1%
泊洛沙姆	5%
水	余量，

所述的香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率不小于10%且小于等于20%，所述的香菇菌多糖硫酸酯敷料的制备方法，包括以下步骤：

- (1) 将香菇菌多糖硫酸酯溶于水中，膜过滤除菌；
- (2) 将卡波姆在水中充分溶胀、溶解；
- (3) 将泊洛沙姆、甘油、三氯生溶于水中，调节pH至三氯生完全溶解；
- (4) 将步骤(1) (2) (3) 所得溶液以及EDTA二钠混匀，补足水同时调节pH到4.5~6.5；

所述香菇菌多糖硫酸酯采用氯磺酸-吡啶法制备，氯磺酸与吡啶的体积比为1:1~5，酯化反应时间不少于2小时，酯化反应温度为30~90℃。

## 一种预防和控制人乳头状瘤病毒感染的敷料及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,特别是涉及一种预防和控制人乳头状瘤病毒感染的敷料及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 在科技不断进步的今天,人们仍然对癌症束手无策。随着科学家不断的努力探索,对癌症的发病机制仍不了解。但是有一种癌症发病机制被世卫组织所确认—宫颈癌,宫颈癌是由感染人乳头状瘤病毒(HPV病毒)所致。

[0003] HPV病毒是一种乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒A属,是球形双链DNA病毒,能引起人体皮肤及黏膜上皮的鳞状上皮增殖。会引起多样的病状,包括刺瘤、疣、生殖器扁平湿疣等。不同型别的HPV病毒会引起不同的病症,它们的分布存在组织特异性。例如HPV2主要引起皮肤疣。经过科学家不断的研究,目前已发现与人相关的HPV已达100多种,它们的核苷酸序列有着本质的区别,根据生物学和生存期的不同大致可分为两类: $\alpha$ 种属和 $\beta$ 种属;其中 $\alpha$ 种属仅存在于人类及灵长类动物,它们与宫颈癌的发生紧密相关,其中50%宫颈癌的发生与HPV16有关,20%的宫颈癌发生与HPV18有关。同时, $\alpha$ 种属又分为高危型HPV14种,其余的为低危型HPV。高危型HPV包括HPV-16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66和68。美国国家癌症研究所的一项研究指出,约10%感染HPV16型和18型的女性会在感染后3年内发展至高度宫颈癌前病变(感染其它高危型HPV的女性中约有4%会出现这种情况),20%的女性会在10年内发展至高度宫颈癌前病变(其它高危型HPV约7%)。低危型HPV不会引起宫颈癌,但是这些HPV会引起生殖道尖锐湿疣或非常微弱的宫颈细胞变化,如HPV-6、11、40、42、43、44、53、54、61、72、73和81。其中,HPV6和11是最常见的低危型HPV,90%的生殖道尖锐湿疣与之相关。因此,高危型HPV感染是引起宫颈病变尤其是恶性病变的首要原因。

[0004] 目前,宫颈癌是危害女性健康的主要杀手。研究表明90%以上的宫颈癌中都能检测到HPVDNA,这也是世界卫生组织确认宫颈癌是由HPV引起的主要证据。我国宫颈癌发病率居于世界第二,而且呈年轻化趋势,每年有将近15万新发病例,约占世界患者的1/3,约8万人因此死去。而人类是HPV病毒唯一宿主,从感染HPV病毒到发展成宫颈癌至少需要十年时间,其中病毒与细胞接触是HPV感染宿主的必要和先决条件;期间经过感染人粘膜上皮、上皮受损产生创伤、病毒接触并进入细胞(预防和清除的最佳时期)、病毒成熟并释放感染更多的组织上皮,进一步导致创伤扩大,最终导致病情加重恶化使免疫系统无法清除形成疣、宫颈糜烂、宫颈癌等。目前,国内外公认的预防HPV病毒最有效的方式是注射HPV病毒疫苗,经过大面积临床实验验证HPV疫苗的确可以预防一些HPV病毒的感染。市面上已有针对HPV16和HPV18葛兰素史克的二价疫苗和HPV-6、11、16、18、31、33、45、52、58默沙东的九价疫苗。但是,HPV疫苗不能预防所有型别的HPV,同时价格也比较昂贵。此外,在治疗上目前没有对应的特效药物治疗HPV病毒引起的病症,大部分采用诸如干扰素等治疗。干扰素类药物在不仅容易产生抗性,同时也存在着疗效不明显且价格昂贵等缺陷。因此,现阶段急需一种能有效清除人体内HPV病毒且对人无毒害作用的生物制剂及药物。

[0005] 近年来,抗HPV病毒的药物及生物制剂研究发展极为迅速。其中,传统中药在治疗HPV病毒方面发挥着重要作用,例如雄黄、黄连等可用于治疗持续性HPV病毒引起的宫颈上皮瘤变。另外一些中药复方在HPV治疗方面发挥着作用,例如清毒栓等。来源于动植物的天然产物如多糖、糖脂、多肽等物质,在抗流感病毒方面有着显著的活性。本发明发现一些多糖可以治疗和预防HPV感染,实验数据表明这些多糖类病毒清除率达到100%。本发明解决了市面上缺乏有效抗HPV病毒的生物制剂,给妇女同胞带来了福音。

[0006] 香菇担子菌纲伞菌属,含有多种生物活性物质,其中香菇菌多糖是其中重要活性成分。它在抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗感染以及提高人的免疫力方面发挥着重要的作用。香菇菌多糖是由葡萄糖聚合而成,侧链部分还含有其他的糖基、蛋白等基团可提高它的生物学活性。

### 发明内容

[0007] 本发明提供了香菇菌多糖硫酸酯在制备预防和治疗HPV病毒感染的药物中的应用。香菇菌多糖硫酸酯对HPV病毒具有很好的清除效果。

[0008] 香菇菌多糖硫酸酯在制备预防和治疗HPV病毒感染的药物中的应用。将香菇菌多糖与硫酸反应产生香菇菌多糖硫酸酯。由于该多糖携带了硫酸基团,而硫酸基团带有负电荷,使得香菇菌多糖硫酸酯表面带有大量的负电荷。HPV病毒蛋白外壳L1区C端和L2区N端带有正电荷,因此香菇菌多糖硫酸酯可以竞争性的结合HPV蛋白外壳L1区C端和L2区N端带有正电荷区域,占位阻断HPV与基底膜受体HSPG结合。阻断了HPV识别宿主细胞的唯一途径,从而使HPV病毒不能感染人。同时,经过验证,被修饰过的香菇菌多糖并不影响其原有的功能,如增强人体免疫力、诱发体内产生干扰素等。

[0009] 经过实验发现,香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率的大小对香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒具有重要影响。在硫酸根修饰率较低时,香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒能力随着硫酸根修饰率的增大而增强;当硫酸根修饰率到达一定水平后,大约为20%左右,此时再增加硫酸根修饰率,则香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒能力将减小。优选的,所述的香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率不小于10%。进一步优选的,所述的香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率不小于20%。

[0010] 本发明又提供了一种香菇菌多糖硫酸酯敷料,质量百分比组成为:

香菇菌多糖硫酸酯 0.01%-0.1%

卡波姆 0.5-3%

三氯生 0.1-0.3%

[0011] 甘油 1-3%

EDTA 二钠 0.01-0.1%

泊洛沙姆 1-10%

水 余量。

[0012] 优选的,所述的香菇菌多糖硫酸酯敷料,质量百分比组成为:

	香菇菌多糖硫酸酯	0.05%
	卡波姆	2%
	三氯生	0.15%
[0013]	甘油	3%
	EDTA 二钠	0.1%
	泊洛沙姆	5%
	水	余量。

[0014] 优选的,所述的香菇菌多糖硫酸酯敷料中,所述的香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率不小于10%。进一步优选的,所述的香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率不小于20%。

[0015] 优选的,所述的香菇菌多糖硫酸酯敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 将香菇菌多糖硫酸酯溶于水中,膜过滤除菌;

[0017] (2) 将卡波姆在水中充分溶胀、溶解;

[0018] (3) 将泊洛沙姆、甘油、三氯生溶于水中,调节pH至三氯生完全溶解;

[0019] (4) 将步骤(1)(2)(3)所得溶液以及EDTA二钠混匀,补足水同时调节pH到4.5~6.5。

[0020] 优选的,所述的制备方法中,所述香菇菌多糖硫酸酯采用氯磺酸-吡啶法制备,氯磺酸与吡啶的体积比为1:1~5,酯化反应时间不少于2小时,酯化反应温度为30~90℃。

[0021] 本发明通过研究发现香菇菌多糖硫酸酯对清除HPV病毒具有很好的效果,而且香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率大小对香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒具有重要影响。在硫酸根修饰率较低时,香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒能力随着硫酸根修饰率的增大而增强;当硫酸根修饰率到达一定水平后,大约为20%左右,此时再增加硫酸根修饰率,则香菇菌多糖硫酸酯清除HPV病毒能力将减小。

## 具体实施方式

[0022] 实施例1~4

[0023] 香菇菌多糖购买自上海源叶生物科技有限公司(货号37339-90-5)。

[0024] 利用氯磺酸-吡啶法制备香菇菌多糖硫酸酯,无水吡啶10mL置于装有冷凝管和搅拌装置的三颈烧瓶中,经冰盐浴冷却后,剧烈搅拌,缓慢滴加4mL氯磺酸,继续搅拌30分钟,出现大量淡黄色固体,反应结束,即制得酯化反应试剂。称取精制的0.5g香菇菌多糖溶于25mL无水甲酰胺,涡旋制成均匀的悬液,倒入预热的酯化试剂的烧瓶中,不停搅拌,水浴温度维持在60℃,酯化反应时间t小时。反应结束后去除烧瓶冷却至室温,加入3倍体积的无水乙醇,静置离心,沉淀即为香菇菌多糖硫酸酯。

[0025] 将沉淀在双蒸水中透析3天,在PBS中透析一天,通过BaCl<sub>2</sub>-明胶法确定硫酸根的修饰率;使用葡萄糖标准曲线法确定最终多糖浓度。结果如表1所示,在一定范围内,增加酯化反应时间有利于增加所得香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率,而多糖回收率基本不影响。

[0026] 表1

[0027]	实施例	酯化反应时间t (h)	硫酸根修饰率 (%)	多糖回收率 (%)
	实施例1	1	8.9	63.4
	实施例2	2	17.3	66.5
	实施例3	4	21.9	65.2
	实施例4	6	25.2	64.5

[0028] 实施例5~7

[0029] 检测不同氯磺酸与吡啶比例对所得香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率的影响。其余参数与实施例3相同,仅氯磺酸与吡啶的体积比不一样,氯磺酸的用量均为4mL,所以只是吡啶的量有差别。分别检测硫酸根修饰率和多糖回收率,实验结果如表2所示,随着氯磺酸与吡啶的体积比降低,所得香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率也降低,但多糖回收率增加。

[0030] 表2

[0031]	实施例	氯磺酸与吡啶的体积比	硫酸根修饰率 (%)	多糖回收率 (%)
	实施例5	1:1	25.3	43.4
	实施例6	1:2.5	19.2	66.5
	实施例7	1:5	12.1	71.8

[0032] 实施例8~10

[0033] 检测不同酯化反应温度对所得香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率的影响。其余参数与实施例3相同,仅酯化反应温度不一样。分别检测硫酸根修饰率和多糖回收率,实验结果如表3所示,酯化反应温度越高,香菇菌多糖硫酸酯的硫酸根修饰率越高,而多糖回收率则越低。

[0034] 表3

[0035]	实施例	酯化反应温度(°C)	硫酸根修饰率 (%)	多糖回收率 (%)
	实施例8	30	18.7	59.5
	实施例9	60	25.3	63.4
	实施例10	90	31.0	29.3

[0036] 实施例11

[0037] 1) 构建HPV假病毒

[0038] 假病毒是指一种反转录病毒能够整合另外一种不同种类病毒的囊膜糖蛋白,从而形成的具有外源性病毒的囊膜,而基因组保持着反转录病毒本身基因组特性的病毒。假病毒的感染能力与正常病毒没有区别,但是假病毒进入细胞不能进行正常增殖,而后会自行灭亡,对细胞没有危害。因此,这也是公认的模拟HPV病毒感染最有效的方式。据Buck等人报道(Buck,C.B.,D.V.Pastrana,D.R.Lowy,and J.T.Schiller,Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors.J Virol,2004.78(2):p.751-7.),他们将优化的HPV膜结构蛋白L1、L2的基因构建到真核生物表达载体与报告质粒同时转染真核细胞,他们发现L1、L2在真核细胞内能高效的表达且自我进行组装,形成具有免疫原性的假病毒颗粒。利用Buck等人的构建方法,不仅方便而且产生的假病毒滴度较高可达 $10^7$ TU。利用该方法包装的假病毒已成功应用于生产HPV疫苗和药物筛选。本发明利用该法构建了低危型HPV6和高危型的HPV16、HPV18三种HPV假病毒模型。具体构建方式如下:

[0039] 利用聚合酶链式反应(PCR)将优化好的HPV基因L1L2扩增,克隆到真核细胞表达载体,然后进行酶切和测序鉴定,形成稳定表达的pHPV6、pHPV16、pHPV18的表达载体。将测序鉴定正确的三个表达载体质粒和报告质粒pSEAP(内含碱性磷酸酶报告基因)大量扩增,备用。

[0040] 培养293FT细胞,分别传代至4个100mm培养板,37℃5%CO<sub>2</sub>培养待细胞生长至融合度至80%时,利用lipoFilter转染试剂分别将质粒pHPV6、pHPV16、pHPV18与pSEAP报告质粒共同转染293FT细胞,同时设对照组仅转染pSEAP报告质粒。将转染质粒后的细胞放置37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱继续培养12h后更换新鲜培养基,继续培养72h后去除培养基用DPBS洗2次,用0.25%的胰酶消化细胞3分钟,加入10mL培养基转入15mL离心管,1000g离心5分钟去除上清,加入与沉淀等体积的细胞裂解液(0.3%Brij58,0.2%Benzonase,0.2%plasmid safe ATP dependent DNase的DPBS)37℃24小时,然后置于冰上5分钟,加入0.17体积的5M NaCl,涡旋混匀,置于冰上20分钟,5000g 4℃离心10分钟,将上清分装备用置于-80℃。

[0041] 2) 病毒滴度测定

[0042] 将293FT细胞传代至96孔板,每孔细胞数为 $1 \times 10^5$ 个37℃5%CO<sub>2</sub>培养8h;

[0043] 将HPV假病毒进行梯度稀释,把96孔中的培养基去除,加入50uL假病毒稀释液,再加入50uL正常培养基,37℃5%CO<sub>2</sub>继续培养72h,取50uL培养液上清,利用Clontech碱性磷酸酶检测试剂盒检测,以此计算TCID<sub>50</sub>,当实验组与对照组之比达到 $10^6$ 即可收取假病毒。

[0044] 3) 香菇菌多糖硫酸酯对HPV6、HPV16和HPV18的抑制活性检测

[0045] 将293FT细胞传代至96孔板,每孔细胞数为 $1 \times 10^5$ 个37℃5%CO<sub>2</sub>培养8h;

[0046] 将香菇菌多糖硫酸酯(实施例3中制备)和香菇菌多糖进行梯度稀释,把96孔板中的培养基去除,分别加入50uL香菇菌多糖硫酸酯稀释液和香菇菌多糖稀释液,37℃5%CO<sub>2</sub>培养30分钟,然后将50uL 100TCID<sub>50</sub>假病毒加入到96孔板中,继续培养12小时换新鲜培养基,培养72小时后,取50uL培养液上清,利用Clontech碱性磷酸酶检测试剂盒检测,利用SigmaPlot计算香菇菌多糖硫酸酯和香菇菌多糖的IC<sub>50</sub>(一定浓度的某种药物诱导细胞凋亡50%时的剂量),结果见表4,香菇菌多糖硫酸酯对三种HPV病毒均具有良好的去除率,而香菇菌多糖对三种HPV病毒的去除率均很差。

[0047] 表4

病毒清除率(%) 病毒种类	香菇菌多糖硫酸酯 (浓度: 单位 ug/ml)					香菇菌多糖 (浓度: ug/ml)				
	0	1	10	100	500	0	1	10	100	500
HPV6	0	30	80	100	100	0	0	0	0	5
HPV16	0	50	91	94	100	0	0	0	0	1
HPV18	0	35	75	99	100	0	0	0	0	2

[0049] 实施例12

[0050] 香菇菌多糖硫酸酯含有不同硫酸根含量对清除HPV的影响。

[0051] 仅硫酸根修饰率不同,其余实验方法与实施例11中相同,实验结果如表5所示,硫酸根修饰率不同的香菇菌多糖硫酸酯清除HPV的能力不同,而这种能力随着硫酸根修饰率

的增加而增强,但硫酸根修饰率达到一定程度后,再增加则对清除HPV的能力基本没影响。

[0052] 表5

香菇菌多糖硫酸酯 浓度 (ug/mL)	病毒 种类	HPV6	HPV16	HPV18
		IC50 ug/mL	IC50 ug/mL	IC50 ug/mL
硫酸根修饰率 (%)				
0 (阴性对照)		>500	>500	>500
8.9 (实施例 1 制备)		125	70	130
17.3 (实施例 2 制备)		5	3	6
25.2 (实施例 4 制备)		6	3	5

[0053] 实施例13

[0054] 不同种类的多糖硫酸酯对清除HPV的影响。

[0055] 以实施例3所用的方法(参数相同),分别制备香菇菌多糖硫酸酯、茯苓菌多糖硫酸酯和灵芝菌多糖硫酸酯,然后分别检测硫酸根修饰率和多糖回收率,结果如表6所示。

[0056] 表6

	香菇菌多糖硫酸酯	茯苓菌多糖硫酸酯	灵芝菌多糖硫酸酯
硫酸根修饰率 (%)	17.3	21.5	19.3
多糖回收率 (%)	63.4	66.5	64.5

[0057] 然后以实施例11相同的方法检测不同多糖硫酸酯对清除HPV的影响,结果如表7所示,在类似的硫酸根修饰率条件下,香菇菌多糖硫酸酯清除HPV的能力强于灵芝多糖硫酸酯以及茯苓多糖硫酸酯。

[0058] 表7

浓 度 (ug/mL)	病毒 种类	HPV6	HPV16	HPV18
		IC50 ug/mL	IC50 ug/mL	IC50 ug/mL
多糖硫酸酯				
香菇菌多糖硫酸酯		5	3	6
灵芝多糖硫酸酯		15	10	20
茯苓多糖硫酸酯		9	13	24

[0061] 实施例14

[0062] 以制备100kg敷料为例,

[0063] a) 称取10g香菇菌多糖硫酸酯溶于10kg水中,用0.22um滤膜真空过滤,备用;

[0064] b) 称取2kg卡波姆溶于10kg水中,高速搅拌混匀,过夜溶胀,然后高压灭菌121℃30分钟,备用;

[0065] c) 称取3kg甘油、1kg泊洛沙姆、100g三氯生溶于10kg水中,滴加2M NaOH搅拌至三氯生完全溶解,然后高压灭菌121℃30分钟,备用;



[0067] d) 将a) b) c) 所得溶液以及EDTA二钠10g混合在一起,搅拌均匀,调节pH至4.5,同时用无菌水补足至100kg。

[0068] 实施例15

[0069] 以制备100kg敷料为例,

[0070] a) 称取50g香菇菌多糖硫酸酯溶于10kg水中,用0.22um滤膜真空过滤,备用;

[0071] b) 称取0.5kg卡波姆溶于10kg水中,高速搅拌混匀,过夜溶胀,然后高压灭菌121℃ 30分钟,备用;

[0072] c) 称取3kg甘油、5kg泊洛沙姆、150g三氯生溶于10kg水中,滴加2M NaOH搅拌至三氯生完全溶解,然后高压灭菌121℃ 30分钟,备用;

[0073] d) 将a) b) c) 所得溶液以及EDTA二钠50g混合在一起,搅拌均匀,调节pH至6.0,同时用无菌水补足至100kg。

[0074] 实施例16

[0075] 以制备100kg敷料为例,

[0076] a) 称取100g香菇菌多糖硫酸酯溶于10kg水中,用0.22um滤膜真空过滤,备用;

[0077] b) 称取3kg卡波姆溶于10kg水中,高速搅拌混匀,过夜溶胀,然后高压灭菌121℃ 30分钟,备用;

[0078] c) 称取1kg甘油、10kg泊洛沙姆、300g三氯生溶于10kg水中,滴加2M NaOH搅拌至三氯生完全溶解,然后高压灭菌121℃ 30分钟,备用;

[0079] d) 将a) b) c) 所得溶液以及EDTA二钠100g混合在一起,搅拌均匀,调节pH至6.5,同时用无菌水补足至100kg。

[0080] 实施例17

[0081] 敷料稳定性实验。

[0082] 将上述实施例(实施例14~16)配制的敷料,制备完成后立即评估,从形态颜色、有无颗粒物以及pH等方面进行评估。将上述三种各取三份分别置于4℃、25℃、37℃存放一个月,每周观察。最终结果显示,制备的敷料在各个温度条件及时间下,无论从形态还是pH方面均保存完好。

[0083] 时间点:0周

	4℃				25℃				37℃			
	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态
[0084] 实施例 14	6.0	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状
实施例 15	5.9	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状
实施例 16	6.0	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状

[0085] 时间点:1周

	4℃				25℃				37℃			
	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态
[0086] 实施例 14	6.0	透明	无	胶状	5.8	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状
实施例 15	5.9	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状
实施例 16	6.0	透明	无	胶状	6.1	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状

[0087] 时间点:2周

	4℃				25℃				37℃			
	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态
[0088] 实施例 14	6.0	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状
实施例 15	5.9	透明	无	胶状	5.8	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状
实施例 16	5.8	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状

[0089] 时间点:3周

	4℃				25℃				37℃			
	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态
[0090] 实施例 14	6.1	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状
实施例 15	6.0	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状
实施例 16	5.9	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状	5.8	透明	无	胶状

[0091] 时间点:4周

	4℃				25℃				37℃			
	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态	pH	颜色	颗粒物	形态
[0092] 实施例 14	6.0	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状	6.0	透明	无	胶状
实施例 15	5.8	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状	6.1	透明	无	胶状
实施例 16	5.9	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状	5.9	透明	无	胶状

[0093] 实施例18

[0094] 动物安全实验。

[0095] 通过动物特定部位给药,观察药物对该部位的影响,例如是否发生刺激反应,是否引起皮肤红肿等症状。选取皮肤和阴道部分,进行完整皮肤和破损皮肤给敷料,以及阴道给敷料,在一定时间内观察给敷料情况,结果如下:

[0096] 实施例14~16制得的敷料经GLP单位实验室验证安全性良好,动物安全实验如下:

[0097] 1、复给小鼠完好皮肤及破损皮肤给敷料,涂药部位为背部脊柱两侧区脱毛(8%硫化钠将毛脱去,脱毛面积为30cm<sup>2</sup>);破损皮肤用细砂纸在脱毛部位造成擦伤,以皮肤轻度密集渗血点为度,即刻涂药,按5.0g/kg,每天2次,连续四周,未见皮肤刺激反应。

[0098] 2、重复给新西兰兔完好皮肤及破损皮肤给敷料,涂药部位为背部脊柱两侧区脱毛(8%硫化钠将毛脱去,脱毛面积为30cm<sup>2</sup>);破损皮肤用细砂纸在脱毛部位造成擦伤,以皮肤轻度密集渗血点为度,即刻涂药,按5.0g/kg,每天2次,连续四周,未见皮肤刺激反应。

[0099] 3、同时重复给小鼠及新西兰兔阴道给敷料,按5.0g/kg,每天2次,连续四周,未见阴道刺激反应。