



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115920015 B

(45) 授权公告日 2024.04.26

(21) 申请号 202310168742.4

A61K 33/06 (2006.01)

(22) 申请日 2023.02.27

A61P 17/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 31/02 (2006.01)

申请公布号 CN 115920015 A

C08J 3/075 (2006.01)

C08J 3/24 (2006.01)

(43) 申请公布日 2023.04.07

C08L 89/00 (2006.01)

(73) 专利权人 广西师范大学

(56) 对比文件

地址 541004 广西壮族自治区桂林市七星区育才路15号

CA 2002480 A1,1991.05.08

CN 102492664 A,2012.06.13

(72) 发明人 蒋邦平 沈星灿 王瑗辉 汪怡沁

CN 112370567 A,2021.02.19

US 2009170973 A1,2009.07.02

(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

US 2020276057 A1,2020.09.03

专利代理师 杨雪梅

Antonio Aguanell等.Chitosan sulfate-lysozyme hybrid hydrogels as platforms with fine-tuned degradability and sustained inherent antibiotic and antioxidant activities.Carbohydrate Polymers.2022,第291卷第119611页. (续)

(51) Int.Cl.

审查员 刘应梅

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 33/00 (2006.01)

A61K 33/30 (2006.01)

A61K 33/26 (2006.01)

A61K 33/34 (2006.01)

A61K 33/32 (2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图4页

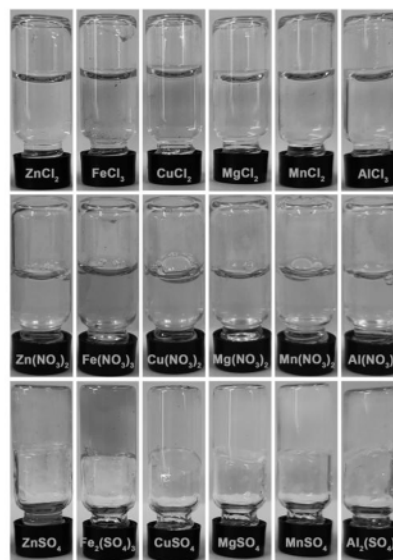
(54) 发明名称

一种硫酸盐交联的溶菌酶水凝胶及其制备方法

调节,在伤口愈合中发挥着各自不同的作用,从而加速伤口的愈合。

(57) 摘要

本发明公开了一种硫酸盐交联的溶菌酶水凝胶的制备方法,在pH为2.0的酸性环境下水解溶菌酶,获得溶菌酶淀粉纤维样;用透析袋透析除去溶菌酶淀粉纤维样未反应的溶菌酶和其他杂质;将除去杂质的溶菌酶淀粉纤维样冷冻干燥;干燥后配置浓度为20 mg/mL的溶菌酶淀粉纤维样溶液,随后往溶菌酶淀粉纤维样溶液中加入SO₄²⁻浓度为0.05 mmol/mL的各金属硫酸盐,混匀后得到系列硫酸盐交联的溶菌酶纤维水凝胶。该溶菌酶纤维水凝胶一方面在病原微环境下能够有效的激活其抗菌活性,从而达到杀灭细菌的效果并且不会产生细菌耐药性。另一方面各种金属离子参与伤口愈合中细胞代谢以及细胞因子的



CN 115920015 B

[接上页]

(56) 对比文件

Tianhao Chen等.Lysozyme Amyloid
Fibril-Integrated PEG Injectable Hydrogel
Adhesive with Improved Antiswelling and
Antibacterial

Capabilities.Biomacromolecules.2022,第23
卷第1376-1391页.

樊哲祥等.溶菌酶凝胶在毛发移植术后供区
创面的临床应用.中国美容整形外科杂志.2022,
第33卷(第5期),第296-298页.

1. 一种硫酸盐交联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,用0.1M的HCl调节溶液pH为2.0,在80℃油浴下水解,获得溶菌酶淀粉样纤维;

S2. 在二次水中将获得的溶菌酶淀粉样纤维,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样纤维冷冻干燥后备用;

S4. 干燥后取适量溶菌酶淀粉样纤维溶于二次水中,配置浓度为20 mg/mL的溶菌酶淀粉样纤维溶液,随后往溶菌酶淀粉样纤维溶液中加入 SO_4^{2-} 浓度为0.05 mmol/mL的各金属硫酸盐,混匀后得到系列硫酸盐交联的溶菌酶纤维水凝胶。

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所述各金属硫酸盐为 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、 ZnSO_4 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 CuSO_4 、 MgSO_4 、 MnSO_4 或 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$;

所述溶菌酶淀粉样纤维溶液与各金属硫酸盐的用量比为9:1。

4. 权利要求1-3任一项所述制备方法制备的溶菌酶纤维水凝胶的应用,其特征在于:所述溶菌酶纤维水凝胶在制备促进创面愈合的药物中的应用。

一种硫酸盐交联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,具体是一类硫酸盐交联的溶菌酶水凝胶及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 自青霉素被发现以来,抗生素一直是治疗细菌感染的首要药物。然而,随着抗生素在临床上的广泛应用,细菌正迅速获得耐药性。他们进化出了药物外排泵、渗透屏障、灭活酶和靶向修饰机制等,以躲避抗生素的打击。

[0003] 研究表明,生物膜提供了一个物理屏障来抑制抗生素的渗透,并通过酶的分解或吸附来灭活抗生素来保护病原体免受抗菌素和宿主免疫系统的攻击。作为一种能够水解细菌细胞壁上多糖及肽聚糖的独特生物催化剂,溶菌酶(LYZ)可以减缓抗生素过量治疗引起的细菌耐药性,LYZ主要通过水解细胞壁的肽聚糖来引起细菌的自溶,并且不会产生耐药性细菌,但是在病原微环境下有效的激活溶菌酶的抗菌活性仍然极具挑战。幸运的是,溶菌酶淀粉样纤维(LZF)的抗菌活性表现出优于原生球状溶菌酶,这可以归因于正电荷的减少和疏水 β -折叠组件的增加,允许足够的物理接触微生物,促进肽聚糖的水解。

[0004] 目前,生物膜去除的主要治疗策略是手术清创和抗生素治疗。但在手术清创的过程中,术后细菌残留可导致感染复发。其次,带负电荷的生物膜不仅阻碍了抗生素进入生物膜,而且吸附了大量带正电荷的抗生素。因此,对生物膜感染的抗生素治疗面临着重大挑战,迫切需要开发一些治疗生物膜感染的创新策略。

发明内容

[0005] 伤口愈合的过程往往是由各种宏量和微量营养素所驱动的,任何关键营养素的缺乏都会导致受伤伤口愈合的延误。矿物质元素包括锰、镁、铁、铜、锌等在伤口愈合过程中的细胞代谢中起关键作用。

[0006] 在生理环境中, Zn^{2+} 能够促进胶原蛋白沉积。 Mg^{2+} 在酸性条件下可以有效激活脂肪细胞的肌动蛋白,在伤口愈合初始阶段加速愈合。 Cu^{2+} 也已经被证明可以刺激血管生成,在伤口愈合过程当中加速营养物质和氧气的递送。除了上述的金属离子外, Mn^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} 等在促进伤口愈合过程当中也发挥着重要的作用。

[0007] 基于此,本发明提供了一种硫酸盐交联的溶菌酶水凝胶及其制备方法和应用。

[0008] 本发明一种硫酸盐交联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,用0.1M的HCl调节溶液pH为2.0,在80℃油浴下水解,获得溶菌酶淀粉纤维样;

[0010] S2.在二次水中将获得的溶菌酶淀粉纤维样,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.干燥后取适量溶菌酶淀粉纤维样溶于二次水中,配置浓度为20 mg/mL的溶菌

酶淀粉纤维样溶液,随后往溶菌酶淀粉纤维样溶液中加入S042-浓度为0.05 mmol/mL的各金属硫酸盐,混匀后得到系列硫酸盐交联的溶菌酶纤维(LZF)水凝胶。

[0013] 进一步地,S2所述透析袋的分子量为8000-14000Da。

[0014] 进一步地,S4所述各金属硫酸盐为 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、 ZnSO_4 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 CuSO_4 、 MgSO_4 、 MnSO_4 或 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$,成凝条件是用硫酸根作为交联剂,而非金属离子;

[0015] 溶菌酶淀粉纤维样溶液与金属硫酸盐的用量比为9:1。

[0016] 采用上述制备方法制备的溶菌酶纤维水凝胶可用于制备促进创面愈合的药物。

[0017] 在治疗细菌伤口感染中,本发明溶菌酶纤维水凝胶一方面在病原微环境下能够有效的激活其抗菌活性,从而达到杀灭细菌的效果并且不会产生细菌耐药性。另一方面各种金属离子参与伤口愈合中细胞代谢以及细胞因子的调节,在伤口愈合中发挥着各自不同的作用,从而加速伤口的愈合。

附图说明

[0018] 图1为实施例制备的系列LZF在钠盐和钾盐作为交联剂下的成凝效果;

[0019] 图2为实施例制备的系列LZF在氯盐,硝酸盐和硫酸盐作为交联剂下的成凝效果;

[0020] 图3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;

[0021] 系列硫酸盐交联的LZF凝胶的抗菌活性

[0022] 图4为实施例制备的系列硫酸盐交联的LZF水凝胶对E. coli和MRSA的体外抗菌活性照片和相应的菌落统计数据;

[0023] 图4 (A) 为系列硫酸盐交联的LZF水凝胶对E. coli的体外抗菌活性照片;

[0024] 图4 (B) 为系列硫酸盐交联的LZF水凝胶对E. coli的菌落统计数据;

[0025] 图4 (C) 为系列硫酸盐交联的LZF水凝胶对MRSA的体外抗菌活性照片;

[0026] 图4 (D) 为系列硫酸盐交联的LZF水凝胶对MRSA的的菌落统计数据;

[0027] 图5实施例制备的硫酸盐交联的LZF水凝胶的时间依赖离子释放曲线。

具体实施方式

[0028] 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

[0029] 制备硫酸盐交联的溶菌酶水凝胶:

[0030] 1) 溶菌酶淀粉纤维样(LZF)的制备

[0031] 取4 g溶菌酶(鸡蛋清溶菌酶,购于源叶生物科技)溶于100 mL二次水当中,用0.1 M的HCl调节溶液pH至pH = 2,随后在80°C油浴下水解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);

[0032] 2) 系列LZF水凝胶的制备

[0033] 取适量干燥后的LZF溶于二次水中,配置浓度为20 mg/mL的LZF溶液,随后往450 mL LZF溶液中加入50 mL 阴离子浓度为0.05 mmol/mL的各金属盐,结果如图1所示,在阴离

子浓度相同的情况下,LZF在 Cl^- 和 NO_3^- 交联下都不能形成凝胶,而二价的 SO_4^{2-} 和 CO_3^{2-} 交联下能够形成凝胶。因此,进一步探究了系列硫酸盐作为LZF的交联剂的成凝效果,如图2所示,在系列硫酸盐作为交联剂下,LZF都能够形成凝胶,而系列氯盐和硝酸盐作为交联剂下,LZF却不能形成水凝胶,因此选择硫酸盐作为交联剂。

[0034] 实施例进一步探究了硫酸盐交联的LZF水凝胶的流变性能:

[0035] 取0.3 mL所制备的系列LZF水凝胶于旋转流变仪的载样台,分别利用动态时间扫描和动态频率扫描对系列LZF水凝胶的成凝时间和机械性质进行了探究。其中,时间区间为0-600 s,频率区间为1-100 rad/s。结果如图3所示,系列硫酸盐交联的LZF凝胶能够快速成凝($G_c > G^*$),并且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。

[0036] 实施例进一步探究了硫酸盐交联的LZF水凝胶的抗菌效果:

[0037] 通过选用大肠杆菌 (*E. coli*) 和耐甲氧西林葡萄球菌 (*MRSA*) 作为抗菌模型,探究了系列硫酸盐交联的LZF凝胶的抗菌活性,如图4所示,图4为实施例制备的系列硫酸盐交联的LZF水凝胶对*E. coli* (图4A)和*MRSA* (图4C)的体外抗菌活性照片和相应的*E. coli* (图4B)和*MRSA* (图4D)菌落统计数据;从图4可见,硫酸盐交联的LZF水凝胶都表现出了各自独有的抗菌活性。

[0038] 实施例进一步探究了硫酸盐交联的LZF水凝胶的离子释放情况:

[0039] 取1 mL各硫酸盐交联的LZF水凝胶于39 mL去离子水当中,在37°C环境中静置,并且分别在0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h各取1 mL水溶液(取出1 mL水溶液后再补加1 mL去离子水,使溶液体积保持在40 mL)进行ICP-MS测试。结果如图5所示,一价钠离子和钾离子在12 h之后释放的最快,而三价的铁离子和铝离子释放的最慢,二价的金属离子次之。

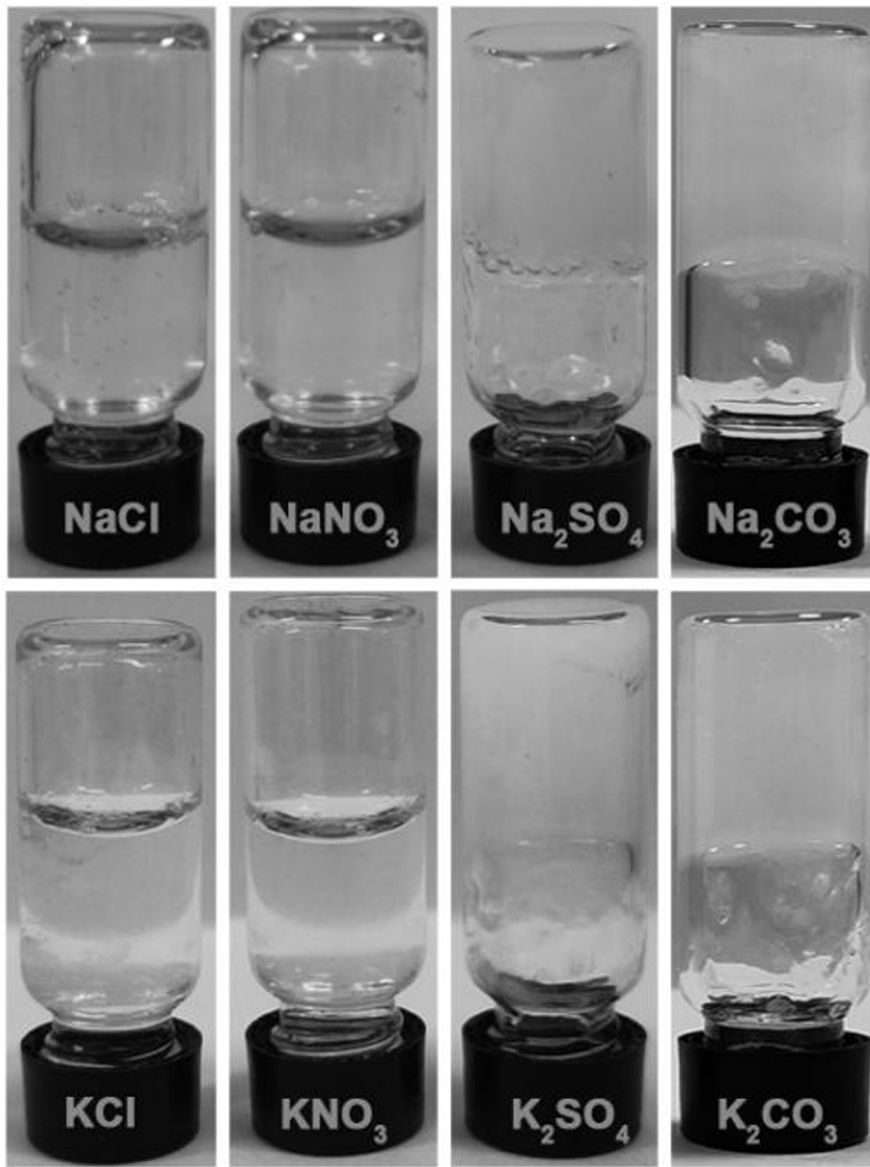


图 1

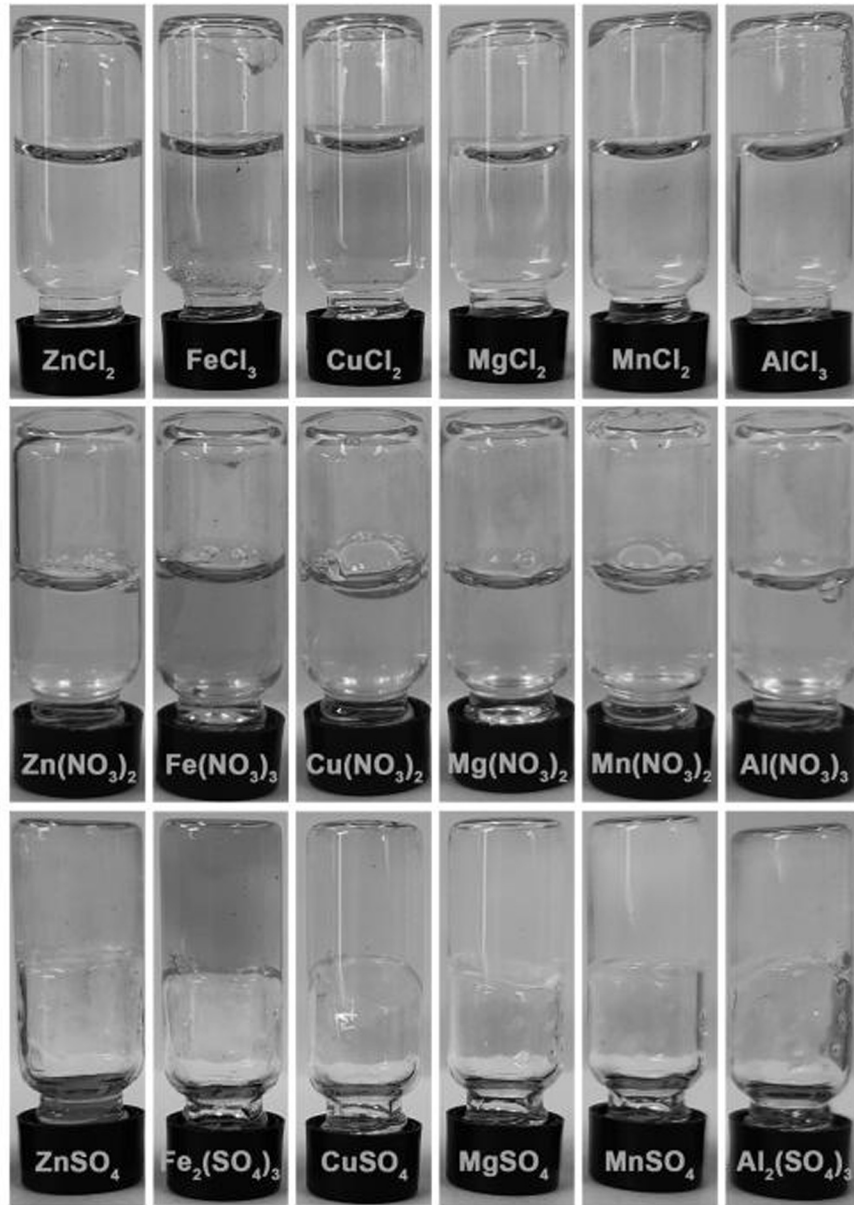


图 2

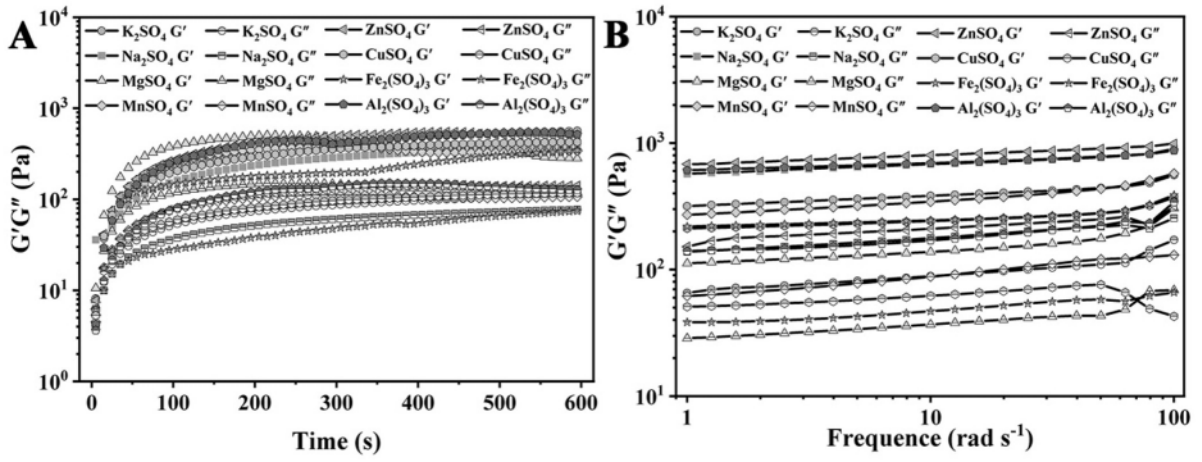


图 3

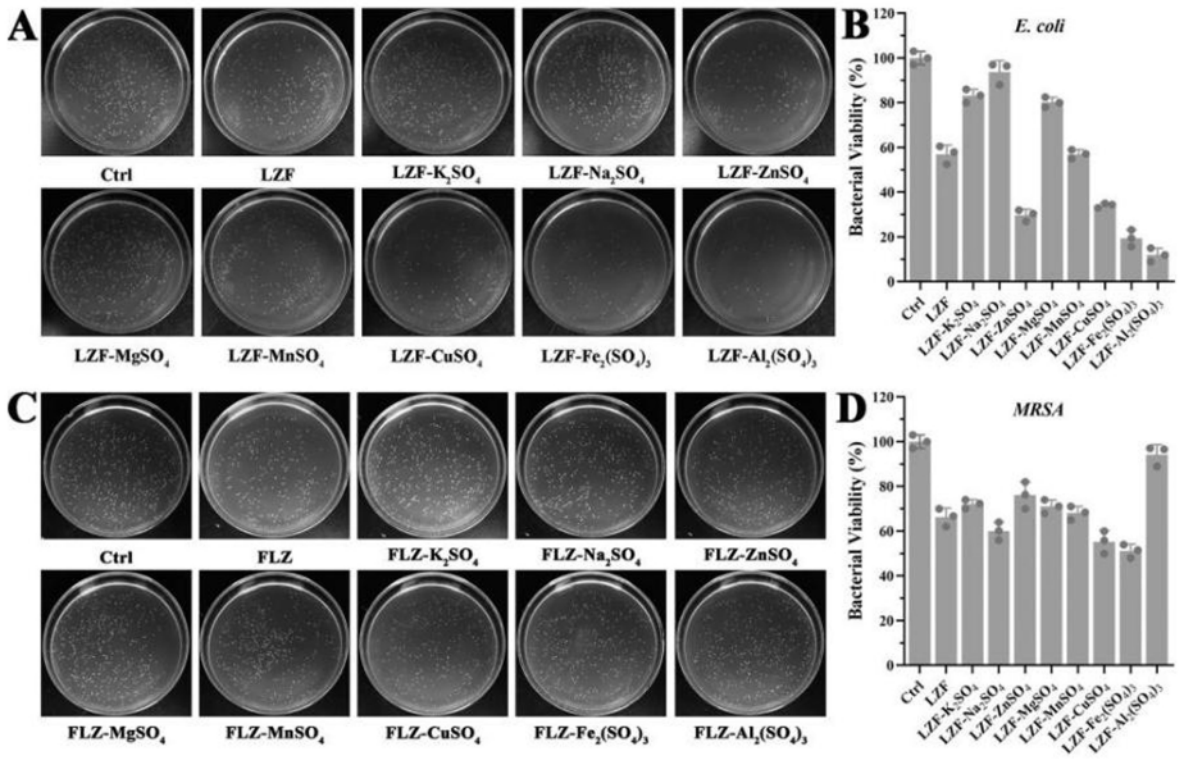


图 4

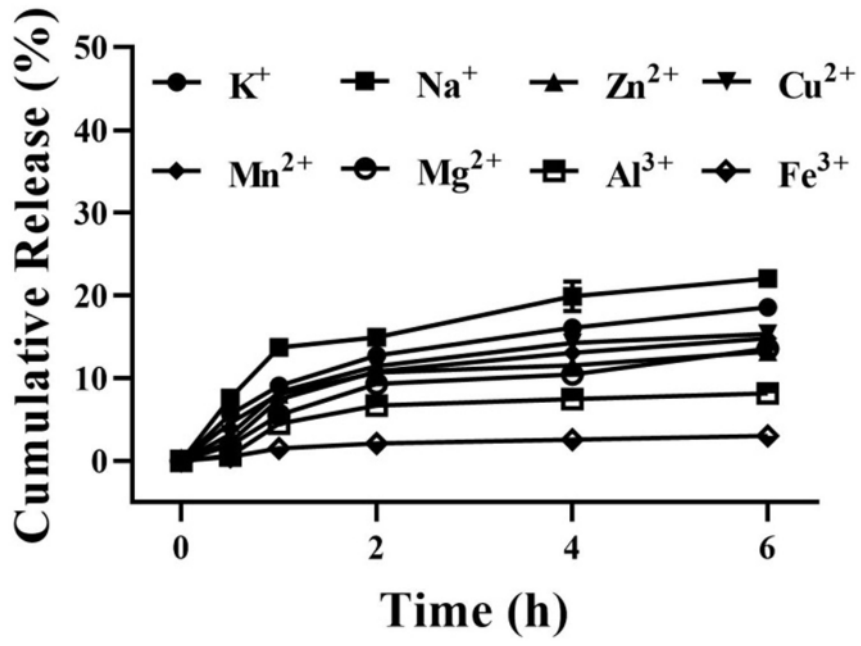


图 5