



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114831967 A

(43) 申请公布日 2022.08.02

(21) 申请号 202210445934.0

A61P 39/06 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.26

C07K 14/435 (2006.01)

(71) 申请人 深圳湾实验室

C07K 1/107 (2006.01)

地址 518132 广东省深圳市光明区玉塘街
道田寮社区光侨路高科创新中心

C07K 1/34 (2006.01)

(72) 发明人 彭琴 钱智勇

(74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务
所(普通合伙) 11308

专利代理师 黎昌莉

(51) Int. Cl.

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

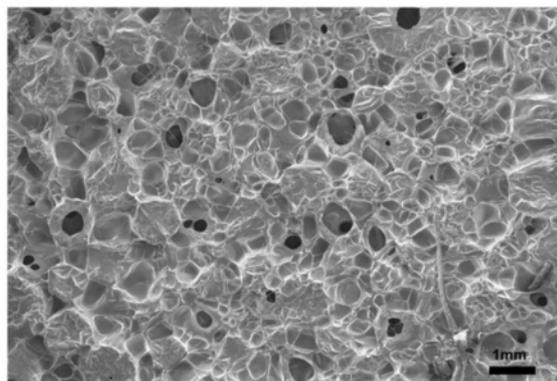
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

广谱抗氧化丝素蛋白创口贴及其制备和应用

(57) 摘要

本发明属于医疗技术领域,具体涉及的是广谱抗氧化丝素蛋白创口贴及其制备和应用。该创口贴由内层的隔离膜、外层的粘性背衬和中间的药物层组成,药物层包括丝素蛋白和制备创口贴药物层的辅料,其质量比为1:2~15。本专利发明的抗氧化丝素蛋白创口贴具有广谱抗氧化作用,通过降低创面氧化应激反应从而加速创面愈合,该创口贴保湿性好,透气性强,具有阻隔性和易揭性,是一种广谱抗氧化的新型创口贴。该创口贴通过冻干制备完成,制备工艺简单、成本低廉、治疗效果突出、生物安全性好,弥补现有市售创口贴不足,具有显著的医用价值和产业化潜力。



1. 用于制备丝素蛋白创口贴的药物层的组合物,其特征在于,所述组合物包括丝素蛋白和制备创口贴药物层的辅料,其质量比为1:2~15;所述辅料组分包括壳聚糖和吸水聚合物;

所述丝素蛋白为天然丝素蛋白和/或改性丝素蛋白;所述改性丝素蛋白为部分去除或完全去除钙的丝素蛋白、加热处理的丝素蛋白及其衍生物、紫外照射的丝素蛋白及其衍生物、有机溶剂处理的丝素蛋白及其衍生物中的任一种或几种。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述辅料组分壳聚糖和吸水聚合物的质量比为1:0.1~5。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其特征在于,所述吸水聚合物选自天然吸水聚合物和/或人工合成吸水聚合物;所述天然吸水聚合物为胶原、明胶或纤维素及其衍生物;所述人工合成吸水聚合物为聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸钠或聚乙烯醇。

4. 根据权利要求1-3所述的组合物,其特征在于,所述组合物中丝素蛋白、壳聚糖和明胶的质量比为1:2~10:0.1~5。

5. 在制备权利要求1所述的创口贴时所述丝素蛋白作为抗氧化剂中的应用。

6. 权利要求1所述的创口贴的药物层的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

S1: 将权利要求1所述的丝素蛋白和所述辅料混合并冷冻,制备抗氧化多孔海绵;

S2: 在S1所述抗氧化多孔海绵的光滑表面上均匀滴入硬脂酸溶液,得权利要求1所述的丝素蛋白创口贴的药物层。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述丝素蛋白选用改性丝素蛋白时,所述改性丝素蛋白的改性方法为未改性丝素蛋白通过添加钙的螯合剂或能与钙发生螯合作用的氨基酸制备所述改性丝素蛋白;所述钙的螯合剂为EDTA及其衍生物、EGTAAM及其衍生物、BAPTA及其衍生物;所述能与钙发生螯合作用氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种;

或通过加热处理制备所述改性丝素蛋白;

或通过紫外照射制备所述改性丝素蛋白;

或通过有机溶剂处理制备所述改性丝素蛋白。

8. 权利要求6-7所述的制备方法制备的创口贴的药物层。

9. 根据权利要求8所述的药物层,其特征在于,所述药物层为多孔结构,其孔隙率为70~85%,其孔径大小为0.5~2mm。

10. 根据权利要求8所述的药物层,其特征在于,所述药物层的吸水倍率为15~20倍;吸水倍率Q计算公式如下: $Q = (M2 - M1) / M1$,单位为g/g;M1为吸液前试样质量,单位为g;M2为吸液后试样质量,单位为g。

11. 根据权利要求8所述的药物层,其特征在于,所述药物层在水中吸水倍率为11~17;在盐水中吸水倍率为10~15;在磷酸缓冲液中吸水倍率为6~12;在细胞培养液中吸水倍率为4~10;在血清中吸水倍率为3~8。

12. 一种含有权利要求8所述的药物层的创口贴,其特征在于,所述创口贴由内层的隔离膜、外层的粘性背衬和中间的权利要求8所述的药物层组成。

13. 权利要求1所述的组合物或权利要求8所述的药物层或权利要求12所述的创口贴在

制备用于伤口愈合的促进剂中的应用。

14. 根据权利要求13所述的应用,其特征在于,权利要求1所述的组合物或权利要求8所述的药物层或权利要求12所述的创口贴在制备用于伤口愈合的抗氧化剂中的应用。

15. 根据权利要求13所述的应用,其特征在于,权利要求1所述的组合物或权利要求8所述的药物层或权利要求12所述的创口贴在制备用于血管再生的促进剂中的应用。

广谱抗氧化丝素蛋白创口贴及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于医疗技术领域,具体涉及的是广谱抗氧化丝素蛋白创口贴及其制备和应用。

背景技术

[0002] 创口贴是人们生活中最常用的一种外科用药,具有止血和护创作用,适用于日常生活中皮肤擦挂伤、切割伤和面积较小、创伤表浅、伤口出血不多、不需要缝合的小伤口使用,起到应急治疗、暂时止血和保护创面作用,能够有效防止伤口感染。

[0003] 传统市场销售的创口贴分为不含药型和含药型。不含药物创口贴是由一块胶布中间附以一小块纱布构成,其结构简单,日常应用十分有限;含药型创口贴主要有云南白药创口贴、呋喃西林创口贴、苯扎氯铵创口贴等。现有的创口贴因其外层的胶布透气性差而不能持久使用,使用时间过长会使伤口和伤口周围的皮肤发白、变软,从而导致细菌继发性感染,加速伤口恶化。并且,创口贴本身没有促进创面愈合的功能,即使是载药创口贴也仅仅是防止创面感染,不能加速创面愈合。

[0004] 经过文献调研得知创伤会导致创面产生炎症反应,从而导致创面处于氧化应激状态。氧化应激反应是由于过量的活性氧对伤口部位的 DNA、脂质、蛋白质和碳水化合物造成严重破坏而造成的,不平衡的活性氧会改变细胞功能,导致信号传导通路异常,诱发炎症和瘢痕挛缩。

[0005] 现有研究证明,抗氧化剂治疗可以有效加速损伤组织修复。本发明通过对丝素蛋白的进一步研究发现,无钙或低钙的丝素蛋白具有良好的广谱抗氧化作用,经过加热处理、有机试剂处理、紫外照射和/或醇类改性修饰后的广谱抗氧化丝素蛋白,作为抗氧化剂可降低创面的氧化应激反应。

[0006] 针对现有市售创口贴产品的不足,本发明将丝素蛋白和/或改性丝素蛋白负载到壳聚糖-吸水聚合物中,制备出具有抗氧化作用的多孔海绵,然后以该海绵作药物层制备出具有广谱抗氧化作用的丝素蛋白创口贴。

[0007] 本专利发明的广谱抗氧化丝素蛋白创口贴可以有效清除羟基自由基、过氧化氢、超氧阴离子和单线态氧,促进创面愈合,血管再生和神经再生效果显著。该创口贴制备工艺简单,成本低廉,治疗效果突出,生物安全性好,并且具有吸水性、保湿性、透气性、阻隔性、止血作用和易揭性,弥补了现有市售创口贴不足,具有显著的医用价值和产业化潜力。

[0008] 公开号为CN108478850A的发明专利公开了一种再生丝素蛋白水凝胶创口贴。该创口贴为液体凝胶创口贴,具有三维网状结构,能够很好的锁水,保护创面的微环境,保护肉芽组织,加速伤口愈合,然而该发明专利主要利用丝素蛋白的成膜性,未公开丝素蛋白的抗氧化性能,无法快速有效地解决创伤引发的氧化应激反应。

发明内容

[0009] 本发明的目的之一在于提供的是具有高强度广谱抗氧化作用的改性丝素蛋白,该

改性丝素蛋白具有高强度广谱抗氧化作用,可以清除损伤器官微环境过量活性氧,加速修复因氧化应激导致的急性和慢性炎症损伤器官。

[0010] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0011] 具有高强度广谱抗氧化作用的改性丝素蛋白,其特征在于,所述改性丝素蛋白为部分去除钙或完全去除钙的丝素蛋白。

[0012] 去除丝素蛋白中的钙离子,可以提高丝素蛋白的抗氧化作用,从而有效清除羟基自由基、过氧化氢、超氧阴离子和单线态氧。

[0013] 本发明的目的之二在于提供用于改性丝素蛋白的试剂,该试剂可以将丝素纤维和/或丝素蛋白中的钙部分去除或者完全去除。

[0014] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0015] 用于改性丝素蛋白的试剂,其特征在于,所述试剂为钙的螯合剂或能与钙发生螯合作用的氨基酸。

[0016] 进一步,所述钙的螯合剂为EDTA及其衍生物、EGTA AM及其衍生物、BAPTA及其衍生物。

[0017] 进一步,所述能与钙发生螯合作用的氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种。

[0018] 更进一步,所述EDTA及其衍生物为EDTA及其衍生物水溶液、EDTA及其衍生物改性的大分子、EDTA及其衍生物改性的高分子中的任一种或几种;所述EGTA AM及其衍生物为EGTAAM及其衍生物水溶液、EGTA AM及其衍生物改性的大分子、EGTA AM及其衍生物改性的高分子中的任一种或几种;所述BAPTA及其衍生物为 BAPTA及其衍生物水溶液、BAPTA及其衍生物改性的大分子、BAPTA及其衍生物改性的高分子中的任一种或几种。

[0019] 更进一步,所述氨基酸为氨基酸的水溶液、氨基酸改性大分子、氨基酸改性高分子中的任一种或几种。

[0020] 进一步,所述试剂还包括中性盐溶液。

[0021] 更进一步,所述中性盐溶液为溴化锂溶液、氯化钙三元液、硫氰酸锂溶液、氯化锌溶液中的任一种或几种。

[0022] 本发明的目的之三在于提供一种运用试剂提升丝素蛋白广谱抗氧化作用的方法。

[0023] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0024] 运用试剂提升丝素蛋白广谱抗氧化作用的方法,用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除,所述丝素蛋白来源于蚕茧、生丝或熟丝中的任一种或几种。

[0025] 进一步,用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除,再用所述中性盐溶液充分反应;

[0026] 或用所述中性盐溶液与丝素蛋白和/或丝素纤维充分反应后,再用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除。

[0027] 进一步,用所述钙的螯合剂处理丝素纤维后,用所述溴化锂溶液溶解丝素纤维获得的高强度广谱抗氧化作用丝素蛋白溶液;

[0028] 或用所述溴化锂溶液溶解丝素纤维制备的丝素蛋白溶液,再用所述钙的螯合剂处

理溴化锂提取的丝素蛋白溶液；

[0029] 或用所述氯化钙三元液溶解丝素纤维制备的丝素蛋白溶液，再用所述钙的螯合剂处理氯化钙提取的丝素蛋白溶液。

[0030] 本发明的目的之四在于提供的是改性丝素蛋白的制备方法，该方法工序简单，节约成本，方便质控，可以大规模生产。

[0031] 为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

[0032] 改性丝素蛋白的制备方法，具体包括以下步骤：

[0033] S1：用所述氯化钙三元液和/或溴化锂溶液溶解丝素纤维，经过除盐得到丝素蛋白溶液；

[0034] S2：将所述钙的螯合剂加入S1所得的丝素蛋白溶液中充分反应，除盐处理后得到低钙或者无钙的丝素蛋白溶液。

[0035] 其中，除盐方法为透析法；中性盐溶液溶解丝素纤维的温度条件优选为80℃；加入钙的螯合剂后，反应时间为0.1~24h。

[0036] 进一步，S1中所述氯化钙三元液为氯化钙、无水乙醇和水以摩尔比为1:1~5:1~20的比例配制而成。

[0037] 进一步，S1中所述溴化锂溶液浓度为1-20M。

[0038] 进一步，S2所述钙的螯合剂为EDTA或其衍生物，浓度为0.1~500mM。

[0039] 进一步，改性丝素蛋白在制备治疗或检测氧化应激导致的急性和慢性炎症疾病中的药物和设备中的应用。

[0040] 更进一步，所述设备为可穿戴设备。

[0041] 进一步，含有改性丝素蛋白制备的药学上可接受的载体的制剂。

[0042] 更进一步，所述制剂为喷剂、水凝胶、支架、药物载体。

[0043] 本发明的目的之五在于提供的是用于制备丝素蛋白创口贴的药物层的组合物，该组合物具有广谱抗氧化作用，可以有效清除创面微环境过量活性氧，加速创面愈合。

[0044] 为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

[0045] 用于制备丝素蛋白创口贴的药物层的组合物，所述组合物包括丝素蛋白和制备创口贴药物层的辅料，其质量比为1:2~15；所述辅料组分包括壳聚糖和吸水聚合物；

[0046] 所述丝素蛋白为天然丝素蛋白和/或改性丝素蛋白；所述改性丝素蛋白为部分去除或完全去除钙的丝素蛋白、加热处理的丝素蛋白及其衍生物、紫外照射的丝素蛋白及其衍生物、有机溶剂处理的丝素蛋白及其衍生物中的任一种或几种。

[0047] 进一步，丝素蛋白优选为脱丝胶高纯度丝素纤维、经过加热处理的丝素蛋白溶液、经过紫外照射的丝素蛋白溶液、经过有机溶剂处理的丝素蛋白溶液、经过丙烯酸酐修饰的丝素蛋白、经过甲基丙烯酸酐修饰丝素蛋白、经过衣康酸酐修饰的丝素蛋白、经过马来酸酐修饰的丝素蛋白中的任一种或几种。

[0048] 进一步，所述辅料组分壳聚糖、吸水聚合物的质量比为1:0.1~5。

[0049] 进一步，所述吸水聚合物选自天然吸水聚合物和/或人工合成吸水聚合物；所述天然吸水聚合物为胶原、明胶或纤维素及其衍生物；所述人工合成吸水聚合物为聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸钠或聚乙烯醇。

[0050] 更进一步，所述聚乙二醇优选为PEG-400、PEG-600、PEG-1500、PEG-4000、PEG-

6000、PEG-20000中的任一种或几种。

[0051] 进一步,所述壳聚糖为酸溶性壳聚糖、水溶性壳聚糖和酸酐类修饰的壳聚糖衍生物中的任一种或几种。

[0052] 更进一步,所述酸酐类化合物为丙烯酸酐、甲基丙烯酸酐、丙烯酸酐、马来酸酐和/或衣康酸酐。

[0053] 更进一步,所述壳聚糖优选为高脱乙酰度壳聚糖、经过丙烯酸酐修饰的壳聚糖、经过甲基丙烯酸酐修饰的壳聚糖、经过马来酸酐修饰的壳聚糖、经过衣康酸酐修饰的壳聚糖中的任一种或几种。

[0054] 进一步,所述组合物中丝素蛋白、壳聚糖和明胶的质量比为1: 2~10:0.1~5。

[0055] 进一步,在制备创口贴时所述丝素蛋白作为抗氧化剂中的应用。

[0056] 丝素蛋白具有良好的广谱抗氧化作用,经过钙的螯合剂、加热、有机试剂或紫外线等处理过的改性丝素蛋白,抗氧化能力会增强,作为抗氧化剂,可以有效降低创面的氧化应激反应,促进创面愈合,血管再生和神经再生。

[0057] 本发明的目的之六在于提供的是创口贴的药物层的制备方法,该制备方法成本低廉,方便质控,可用于大规模生产。

[0058] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0059] 创口贴的药物层的制备方法,具体包括以下步骤:

[0060] S1:将所述丝素蛋白和所述辅料混合并冷冻,制备抗氧化多孔海绵;

[0061] S2:在S1所述抗氧化多孔海绵的光滑表面上均匀滴入硬脂酸溶液,得丝素蛋白创口贴的药物层。

[0062] S1中冷冻条件为:-4℃预冻1~24h,-20℃冷冻4~12h,-70℃冷冻6~12h。

[0063] 进一步,所述丝素蛋白选用改性丝素蛋白时,所述改性丝素蛋白的改性方法为未改性丝素蛋白通过添加钙的螯合剂或能与钙发生螯合作用的氨基酸制备所述改性丝素蛋白;所述钙的螯合剂为EDTA及其衍生物、EGTA AM及其衍生物、BAPTA及其衍生物;所述能与钙发生螯合作用氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种;

[0064] 或通过加热处理制备所述改性丝素蛋白;

[0065] 或通过紫外照射制备所述改性丝素蛋白;

[0066] 或通过有机溶剂处理制备所述改性丝素蛋白。

[0067] 进一步,丝素蛋白通过加热处理改性时,加热温度为 60℃~120℃,加热时间为1~12h。

[0068] 本发明的目的之七在于提供的是创口贴的药物层,该药物层具有良好的力学强度、柔性韧性、吸水功能和广谱抗氧化作用,可有效加速创面愈合。

[0069] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0070] 创口贴的药物层,所述药物层为多孔结构,其孔隙率为70~85%,其孔径大小为0.5~2mm。

[0071] 进一步,所述药物层的吸水倍率为15~20倍;吸水倍率Q计算公式如下: $Q = (M2 - M1) / M1$,单位为g/g;M1为吸液前试样质量,单位为g;M2为吸液后试样质量,单位为g。

[0072] 进一步,所述药物层在水中吸水倍率为11~17;在盐水中吸水倍率为10~15;在磷酸缓冲液中吸水倍率为6~12;在细胞培养液中吸水倍率为4~10;在血清中吸水倍率为3~8。

[0073] 进一步,所述药物层还包括增塑剂和/或乳化剂。

[0074] 进一步,所述增塑剂为甘油、丙二醇、山梨醇中的任一种或几种;所述乳化剂为硬脂酸钠、硬脂酸钾、油酸钠、脂肪酸山梨坦、十六烷基硫酸化蓖麻油中的任一种或几种。

[0075] 更进一步,丝素蛋白、壳聚糖、吸水聚合物和增塑剂的质量比为 1:2-10:0.1-2:1-5。

[0076] 本发明的目的之八在于提供的是一种含有药物层的创口贴,该药物层将广谱抗氧化剂负载到壳聚糖-吸水聚合物中,壳聚糖-吸水聚合物多孔海绵作为吸水和隔离层,使得含有该药物层的创口贴具有良好的抗氧化作用、力学性能、柔韧性、吸水性和保湿作用。

[0077] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0078] 一种含有药物层的创口贴,所述创口贴由内层的隔离膜、外层的粘性背衬和中间的药物层组成。

[0079] 进一步,所述粘性胶布层为粘性无纺布、粘性医用绷带、粘性 PE膜中的任一种;所述隔离膜层为PE塑料膜。

[0080] 进一步,所述的组合物或所述的药物层或所述的创口贴在制备用于伤口愈合的促进剂中的应用。

[0081] 更进一步,所述的组合物或所述的药物层或所述的创口贴在制备用于伤口愈合的抗氧化剂中的应用。

[0082] 更进一步,所述的组合物或所述的药物层或所述的创口贴在制备用于血管再生的促进剂中的应用。

[0083] 本专利发明的广谱抗氧化丝素蛋白创口贴由粘性胶面、隔离膜和药物层组成,药物层以保湿敷料作为载体,负载广谱抗氧化分子,降低创面微环境氧化应激反应,加速创面愈合。该药物层采用壳聚糖刚性的分子结使得药物层具有良好的力学强度,结合具有柔性结构和吸水能力的大分子或聚合物,使得该药物层具有良好柔韧性能和吸水功能,与皮肤接触舒适。

[0084] 本专利发明的抗氧化丝素蛋白创口贴可用于治疗日常生活中皮肤擦伤、割伤、面积较小、创伤表浅、伤口出血不多、不需要缝合的小伤口,起到应急治疗、暂时止血和保护创面的作用。

[0085] 本发明的有益之处在于:

[0086] (1) 本专利发明的创口贴的药物层中含有抗氧化丝素蛋白,使用时创面与药物层直接接触,可以有效降低创面氧化应激反应,恢复机体的修复功能,加速创面的愈合。

[0087] (2) 本专利发明的创口贴的药物层含有的吸水大分子或聚合物具有一定吸水作用,其吸水倍率为1-20倍,遇水后瞬时吸收。当药物层与体液接触时,材料自身溶胀形成凝胶状,可以有效将创面与外界隔绝,同时具有良好的透气性。吸水功能有助于创面止血,与血液接触时,血液中的血小板、凝血酶、纤维蛋白等止血成分高度浓缩,从而加速和加强血凝块的形成,同时药物层可以吸收多余的渗出物,减少细菌滋生。

[0088] (3) 本专利发明的创口贴的药物层含有的吸水大分子或聚合物具有一定锁水作

用。药物层中吸水大分子富含羧基或者羟基,以氢键与水分子结合,因而具有分子内锁水特性,通过外力不能将吸收的水分挤出。药物层的锁水作用使接触面保持一定的湿度,从而有利于加速上皮组织形成、减轻疼痛、分解坏死组织。

[0089] (4) 本专利发明的抗氧化丝素蛋白创口贴具有广谱抗氧化作用,可以清除创面微环境中过量自由基加速伤口愈合,并有效防止创面感染。该创口贴可以用于治疗日常生活中皮肤擦伤、割伤、面积较小、创伤表浅、伤口出血不多以及不需要缝合的小伤口,弥补了现有市售创口贴的不足,具有显著的医用价值和产业化潜力。

[0090] (5) 本专利发明的抗氧化丝素蛋白创口贴采用冻干法制备,中间无须分离纯化过程,既节约成本,方便质控,又利于大规模生产。

附图说明

[0091] 图1为实施例1制备的抗氧化丝素蛋白创口贴的照片;

[0092] 图2为实施例1中药物层的扫描电镜照片。

具体实施方式

[0093] 所举实施例是为了更好地对本发明进行说明,但并不是本发明的内容仅局限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整所获得的技术方案,仍属于本发明的保护范围。

[0094] 如无特殊说明,实施例中的百分数表示溶剂的质量分数。

[0095] 实施例1

[0096] 制备抗氧化丝素蛋白创口贴样品1,具体步骤如下:

[0097] (1) 取20mL 4%丝素蛋白溶液95℃加热处理2h,加入1mL甘油,机械搅拌10分钟,加入10mL 5%明胶溶液,机械搅拌10min形成白色乳液,加入10mL 2%壳聚糖溶液,机械搅拌30分钟;

[0098] (2) 将步骤(1)制备的白色乳液倒入100×150mm容器中,4℃放置1h,-20℃放置4h,-70℃放置6h,冻干机冻干,获得CTS-GEL/SF 海绵备用;

[0099] (3) CTS-GEL/SF海绵充分吸收去离子水,-20℃放置4h,将8mL 硬脂酸溶液均匀地浇在CTS-GEL/SF海绵的光滑表面上,冷冻2小时,20℃下用无水乙醇冲洗CTS-GEL/SF海绵的光滑表面3次,获得创口贴的药物层(CTS-GEL/SF/SA海绵);

[0100] (4) 将步骤(3)制得的药物层裁切合适尺寸,粘贴于粘性无纺布胶面层,覆盖隔离膜,包装,塑封辐照灭菌,得抗氧化丝素蛋白创可贴样品1。

[0101] 实施例2

[0102] 制备抗氧化丝素蛋白创口贴样品2,具体步骤如下:

[0103] (1) 取20mL 4%丝素蛋白溶液95℃加热处理2h,加入1mL甘油,机械搅拌10分钟,加入10mL 5%聚乙二醇溶液,机械搅拌10min 形成白色乳液,加入10mL 2%壳聚糖溶液,机械搅拌30分钟;

[0104] (2) 将步骤(1)制备的混合溶液倒入100×150mm容器中,4℃放置1h,-20℃放置4h,-70℃放置6h,冻干机冻干,获得CTS-PEG/SF 海绵备用;

[0105] (3) CTS-PEG/SF海绵充分吸收去离子水,-20℃放置4h,将8mL 硬脂酸溶液均匀地

滴在CTS-PEG/SF海绵的光滑表面上,冷冻2小时,20℃下用无水乙醇冲洗CTS-PEG/SF海绵的光滑表面3次,得到创口贴的药物层(CTS-PEG/SF/SA海绵);

[0106] (4)将步骤(3)制备的药物层裁切合适尺寸,粘贴于粘性无纺布胶面层,覆盖隔离膜,包装,塑封辐照灭菌,得抗氧化丝素蛋白创可贴样品2。

[0107] 实施例3

[0108] 制备抗氧化丝素蛋白创口贴样品3,具体步骤如下:

[0109] (1)取20mL 4%丝素蛋白溶液95℃加热处理2h,加入1mL甘油,机械搅拌10分钟,加入10mL 5%聚乙烯醇溶液,机械搅拌10min 形成白色乳液,再加入10mL 2%壳聚糖溶液,机械搅拌30分钟;

[0110] (2)将步骤(1)制备的混合溶液倒入100×150mm容器中,4℃放置1h,-20℃放置4h,-70℃放置6h,冻干机冻干,获得CTS-PVA/SF 海绵备用;

[0111] (3)CTS-PVA/SF海绵充分吸收去离子水,-20℃放置4h,将8mL 硬脂酸溶液均匀地浇在CTS-PVA/SF海绵的光滑表面上,冷冻2小时,20℃下用无水乙醇冲洗CTS-PVA/SF海绵的光滑表面3次,得到创口贴的药物层(CTS-PVA/SF/SA海绵);包装,裁切,钴60辐照灭菌;

[0112] (4)将步骤(3)制备的药物层裁切合适尺寸,粘贴于粘性无纺布胶面层,覆盖隔离膜,包装,塑封辐照灭菌,得抗氧化丝素蛋白创可贴样品3。

[0113] 实施例4

[0114] 制备抗氧化丝素蛋白创口贴样品4,具体步骤如下:

[0115] (1)取20mL 4%丝素蛋白溶液95℃加热处理2h,加入1mL甘油,机械搅拌10分钟,加入10mL 5%羧甲基纤维素溶液,机械搅拌 10min形成白色乳液,再加入10mL 2%壳聚糖溶液,机械搅拌30分钟;

[0116] (2)将步骤(1)制备的混合溶液倒入100×150mm容器中,4℃放置1h,-20℃放置4h,-70℃放置6h,冻干机冻干,获得CTS-CMC/SF 海绵备用;

[0117] (3)CTS-CMC/SF海绵充分吸收去离子水,-20℃放置4h,将 8mL硬脂酸溶液均匀地浇在CTS-CMC/SF海绵的光滑表面上,冷冻 2小时,20℃下用无水乙醇冲洗CTS-CMC/SF海绵的光滑表面3次,得到创口贴的药物层(CTS-CMC/SF/SA海绵);

[0118] (4)将步骤(3)制备的药物层裁切合适尺寸,粘贴于粘性无纺布胶面层,覆盖隔离膜,包装,并对其进行塑封辐照灭菌获得抗氧化丝素蛋白创口贴样品4。

[0119] 实施例5.抗氧化丝素蛋白创口贴外观表征

[0120] 图1为实施例1样品的外观结构拍照,对创口贴的药物层进行表面结构表征。采用扫描电子显微镜进行微观结构观察,如图2所示,电镜下样品为相互连通的多孔道结构,其孔隙率在60%-75%之间。互相贯穿的孔道结构与体液接触后其孔隙结构迅速将体液吸入孔内,吸水聚合物迅速凝胶化,一方面使得孔道壁吸水后增厚并凝胶化,管腔变无,可有效阻隔空气微生物侵染伤口。

[0121] 实施例6.物理性能表征

[0122] 测试实施例1-4样品的溶胀性能。具体方法如下:分别准确称取实施例1-4中的试样0.1g,将其浸于pH7.0的去离子水、生理盐水、磷酸缓冲液、DMEM培养基和血清液中,37℃吸水完全溶胀,吸去表面水分,称取试样吸液后质量,计算样品的吸水倍率。吸水倍率计算公式如下: $Q = (m_2 - m_1) / m_1$,Q为吸水(盐水)倍率,单位为g/g; m_1 为吸液前试样质量(g); m_2

为吸液后试样质量(g)。

[0123] 表1不同介质吸水倍率

[0124] 材料	去离子水	生理盐水	PBS	DMEM	血清
实施例1样品	14±1.45	11±2.53	8±1.71	6±1.86	4±1.31
实施例2样品	12±1.82	9±1.51	7±2.11	5±1.53	4±2.11
实施例3样品	15±2.31	13±1.64	11±1.31	8±1.31	6±2.02
实施例4样品	16±2.71	14±2.42	11±1.86	9±1.91	7±1.91

[0125] 结果如表1所示,样品1-4表现出相近的吸水性。以实施例1样品为例,该药物层在水中溶胀倍率为11~17;盐水中溶胀倍率为10~15;磷酸缓冲液中溶胀倍率为6~12;细胞培养液中溶胀倍率为4~10;血清中溶胀倍率为3~8。

[0126] 检测实施例1-4样品的保湿性能。结果表明,对照组保湿时间小于10h,而实施例1-4样品保湿时间超过16h。

[0127] 检测实施例1-4样品的孔隙率。结果表明实施例1-4样品和对照组样品孔隙率接近,孔隙率在70~85%之间。

[0128] 实施例7.体外广谱抗氧化性能实验

[0129] 测试实施例1-4样品的广谱抗氧化能力。将实施例1-4样品、谷胱甘肽溶液和水与含有超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 反应,用超氧阴离子测试试剂盒、羟基自由基测试试剂盒和过氧化氢定量分析试剂盒检验6组样品分别清除超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 的能力。结果如表2所示,实施例1-4样品和谷胱甘肽有良好的抗氧化作用。

[0130] 表2样品的广谱抗氧化能力

试样	清除率			
	羟基自由基清除率(%)	过氧化氢清除率(%)	超氧阴离子清除率(%)	氧化物清除率(%)
加热丝素蛋白	80.5	80.6	80.9	82.2
丝素蛋白	62.5	73.9	63.9	68.3
[0131] 实施例样品1	52.9	59.1	62.2	64.2
实施例样品2	53.6	57	50.4	53.4
实施例样品3	36.3	56.8	45.3	50
实施例样品4	39.9	40	37.2	46.1
谷胱甘肽	84.7	52.6	41	41.9
H_2O	0	0	0	0

[0132] 实施例8.全层皮肤损伤修复体内评估

[0133] 体内动物实验经深圳湾实验室动物伦理委员会批准。将120只 BALB/c小鼠,雄性,每只约重 $18g \pm 2g$,随机分为6组,每组20只小鼠;腹腔注射戊巴比妥钠(20mg/kg)麻醉小鼠,脱除皮毛,在每只小鼠背部做成 $\Phi 1cm$ 全层皮肤损伤;分别用本发明实施例1-4样品和无菌

纱布紧密覆盖创面,每周进行2次更换。

[0134] 通过BALB/c小鼠创面修复情况,对本发明抗氧化丝素蛋白创伤创口贴进行伤口愈合效应的评价。5组治疗下的创面均有不同程度的结痂,并且创面开始收缩,其中本发明实施例1样品修复的创面收缩较为明显,治疗效果最佳,结果如表3所示。

[0135] 术后第3天,实施例1-4样品治疗组伤口愈合分别达到 48.62 ± 1.51 、 40.51 ± 1.31 、 46.11 ± 1.42 和 41.73 ± 1.72 ,纱布组仅达到 24.78 ± 1.88 ;实施例1-4样品治疗组创面边缘未见红肿发生,纱布组仍可见部分感染渗出物。

[0136] 术后第7天,实施例1-4样品治疗组愈合率为 $65.71 \pm 1.32 \sim 77.04 \pm 1.62$,纱布组肉芽生长明显,存在部分炎性渗出物。

[0137] 术后第12天,实施例1样品治疗组治疗效果最佳,愈合率高达 97.25 ± 1.42 ,实施例2-4样品治疗组愈合率分别为 91.62 ± 1.31 、 93.53 ± 1.93 和 91.13 ± 2.31 。此时三组的愈合率具有显著的统计学差异 (Table1 $p < 0.01$),结果说明实施例1-4样品治疗组最佳,纱布组次之。

[0138] 表3创面愈合率

[0139] 试样	愈合率			
	0d	3d	7d	12d
纱布	0	24.78 ± 1.88	38.12 ± 2.91	80.54 ± 2.51
实施例 1 样品	0	48.62 ± 1.51	77.04 ± 1.62	97.25 ± 1.42
[0140] 实施例 2 样品	0	40.51 ± 1.31	66.73 ± 2.31	91.62 ± 1.31
实施例 3 样品	0	46.11 ± 1.42	72.62 ± 1.31	93.53 ± 1.93
实施例 4 样品	0	41.73 ± 1.72	65.71 ± 1.32	91.13 ± 2.31

[0141] 实施例9. 制备丝素蛋白样品①

[0142] (1) 丝素纤维10g,加入100mL氯化钙三元液,于80℃条件下溶解,透析3天,每天换去离子水3次,得丝素蛋白溶液;

[0143] (2) 取丝素蛋白溶液20mL,加入2mL浓度为100mmol/L的 EDTA水溶液反应1h,透析3天,每天换水3次,得低钙或无钙的丝素蛋白溶液,即样品①。

[0144] 实施例10. 制备丝素蛋白样品②

[0145] (1) 丝素纤维10g,加入100mL浓度为10mol/L的溴化锂溶液,于80℃条件下溶解,透析3天,每天换去离子水3次,得丝素蛋白溶液;

[0146] (2) 取丝素蛋白溶液20mL,加入浓度为100mmol/L的EDTA 水溶液反应1h,透析3天,每天换水3次,得低钙或无钙的丝素蛋白溶液,即样品②。

[0147] 实施例11. 制备丝素蛋白样品③

[0148] (1) 丝素纤维1g,加入20ml浓度为100mmol/L的EDTA水溶液反应24h,透析3天,每天换水3次;50℃烘干,得低钙或无钙的丝素纤维。

[0149] (2) 取10g低钙或无钙的丝素纤维,加入100mL浓度为10mol/L 的溴化锂溶液,80℃反应24h,透析3天,每天换水3次,得低钙或无钙的丝素蛋白溶液,即样品③。

[0150] 实施例12. 制备丝素蛋白的部分优选条件

[0151] 表4

优选条件		试剂			蛋白含钙量
		溴化锂溶液浓度 (mol/L)	EDTA 水溶液浓度 (mmol/L)	氯化钙三元液 (氯化钙、无水乙醇和水的摩尔比)	
[0152]	1	1	0.1	-	低钙
	2	20	500	-	无钙
	3	-	0.1	1:1:1	低钙
	4	-	500	1:5:20	无钙
	5	1	-	-	无钙
	6	20	-	-	无钙

[0153] 实施例13. 体外广谱抗氧化性能实验

[0154] 将实施例9-11中制备的低钙或无钙的丝素蛋白溶液样品进行广谱抗氧化性能测试。具体方法为：将实施例9制备所得样品①、实施例10制备所得样品②、实施例11制备所得样品③、谷胱甘肽和水分别与超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 反应，然后用超氧阴离子测试试剂盒、羟基自由基测试试剂盒和过氧化氢定量分析试剂盒检验5组样品各自清除超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 的能力。样品抗氧化作用评价记载于表5。

[0155] 表5抗氧化作用评价

样品	羟基自由基	过氧化氢	超氧阴离子	单线态氧
[0156] 去离子水	-	-	-	-
谷胱甘肽	+++	+	++	++
[0157] 样品①	++	+++	++	+++
样品②	+	++	++	++
样品③	++	++	++	+

[0158] 注：“-”表示无抗氧化作用；“+”表示清除率10%~50%；“++”表示清除率50%~90%；“+++”表示清除率>90%。

[0159] 通过表5可以看出，不同制备工艺制备出的丝素蛋白溶液清除超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 的能力不同，但采用本发明的三种工艺制备出的3组样品均具有良好的抗氧化作用。

[0160] 本专利从细胞水平检测了丝素蛋白的抗氧化能力，二氯二氢荧光素作为细胞活性氧指示探针，绿色荧光越强说明细胞内活性氧含量越高。当用过氧化氢刺激细胞时，二氯二氢荧光素发出很强的绿色荧光。谷胱甘肽具有良好的抗氧化作用。将谷胱甘肽、实施例制备

样品1、实施例制备样品2和实施例制备样品3加入细胞发现,绿色荧光含量很低,统计学结果表明实施例制备样品1、实施例制备样品2和实施例制备样品3抗氧化作用与谷胱甘肽相同,无显著性差异,详见表6。

[0161] 表6

[0162]

样品	胞内活性氧清除效率(%)
对照	64.54
H ₂ O ₂	0
谷胱甘肽	81.64
实施例样品1	80.07
实施例样品2	83.75
实施例样品3	76.18

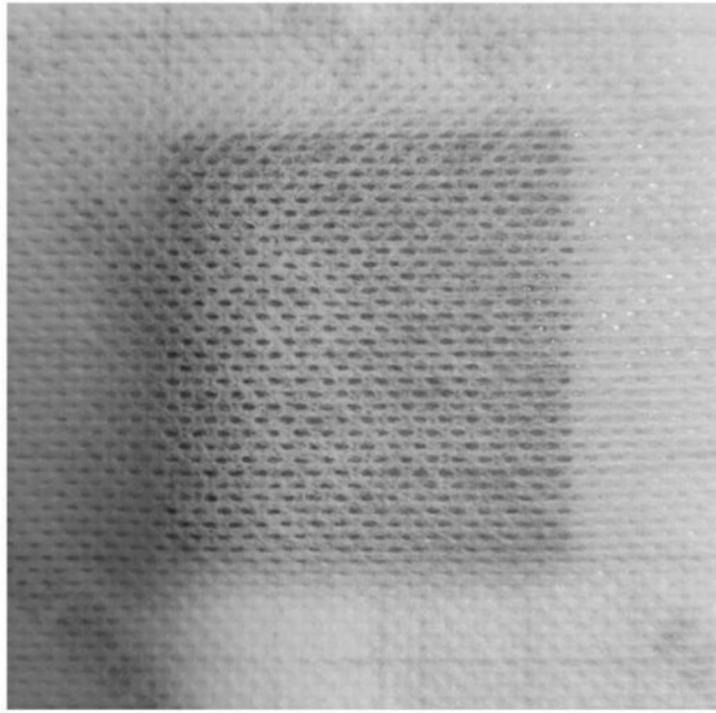


图1

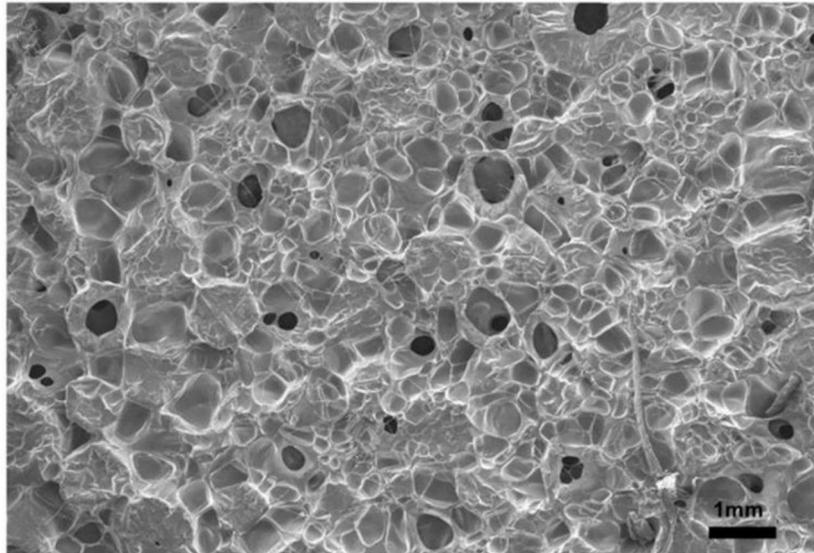


图2