



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117100905 A

(43) 申请公布日 2023.11.24

(21) 申请号 202311384551.8

C07K 1/107 (2006.01)

(22) 申请日 2023.10.25

(71) 申请人 润方(北京)生物医药研究院有限公司

地址 102600 北京市大兴区北京经济技术
开发区科创十四街99号19幢4层402室

申请人 润方(北京)生物科技有限公司

(72) 发明人 李文亮 张彦鹏 白珂 陈浩源
张天化

(74) 专利代理机构 北京牛思巴巴知识产权代理
有限公司 16203

专利代理师 陈义

(51) Int. Cl.

A61L 26/00 (2006.01)

C07K 14/80 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

促进伤口愈合的敷料

(57) 摘要

本发明公开了一种促进伤口愈合的敷料,包括细胞生长因子和载氧蛋白。本发明的敷料中,细胞生长因子通过与细胞表面的受体结合,激活细胞内的信号通路,促进细胞的DNA合成和细胞分裂繁衍,能够促进细胞生长和增殖,而载氧蛋白可以为细胞的生长和增殖提供有效的供氧,在细胞生长因子和载氧蛋白的协同配合下,可以有效促进难愈性创面的愈合。细胞生长因子作为一种蛋白因子,昂贵的价格限制了其使用,通过载氧蛋白的协同配合,可以极大的降低细胞生长因子的添加量,使得细胞生长因子起效用的最低添加量大幅降低的同时,达到协同加速慢性创面愈合的目的。结合测试例部分,可以看出,本发明的敷料能够有效促进糖尿病足溃疡(难愈性创面)的加速愈合。

1. 一种促进伤口愈合的敷料,其特征在于,包括细胞生长因子和载氧蛋白。
2. 根据权利要求1所述的敷料,其特征在于,所述细胞生长因子和所述载氧蛋白的质量比为1~20:30~130。
3. 根据权利要求2所述的敷料,其特征在于,所述敷料为液体敷料;
所述细胞生长因子的浓度为10mg/L~200mg/L,所述载氧蛋白的浓度为300mg/L~1300mg/L。
4. 根据权利要求1~3中任意一项所述的敷料,其特征在于,所述细胞生长因子选自表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、角质化细胞生长因子、血管内皮生长因子、转化生长因子和血小板源生长因子中的至少一种。
5. 根据权利要求4所述的敷料,其特征在于,所述载氧蛋白选自血红蛋白、修饰血红蛋白、肌红蛋白和修饰肌红蛋白中的至少一种。
6. 根据权利要求5所述的敷料,其特征在于,所述修饰血红蛋白通过如下操作制备得到:
从动物全血中提取得到红血球;
将所述红血球与稀释液充分混合,使得所述红血球完全裂解,得到血红蛋白裂解液;
对所述血红蛋白裂解液进行渗滤、纯化、除菌,得到血红蛋白溶液;
将所述血红蛋白溶液与蛋白质修饰剂混合反应,得到所述修饰血红蛋白;
或者,所述修饰肌红蛋白通过如下操作制备得到:
从骨骼肌中提取得到骨骼肌提取物;
对所述骨骼肌提取物进行渗滤、纯化、除菌,得到肌红蛋白溶液;
将所述肌红蛋白溶液与蛋白质修饰剂混合反应,得到所述修饰肌红蛋白。
7. 根据权利要求6所述的敷料,其特征在于,所述蛋白质修饰剂选自戊二醛、乙二醛、双阿司匹林、聚乙二醇、1,5-己二烯、葡聚糖、淀粉浆或血清白蛋白中的至少一种。
8. 根据权利要求4所述的敷料,其特征在于,所述敷料还包括辅料;
所述辅料选自电解质、黏合剂、抗氧化剂、止痛剂、渗透压调节剂、稳定剂、抑菌剂、pH值调节剂、絮凝剂和成膜剂中的至少一种。
9. 根据权利要求5所述的敷料,其特征在于,所述载氧蛋白中,氧合载氧蛋白的含量 \leq 60%。
10. 根据权利要求9所述的敷料,其特征在于,所述载氧蛋白中,所述氧合载氧蛋白的含量 \leq 10%。

促进伤口愈合的敷料

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗器械的敷料技术领域,尤其是涉及一种促进伤口愈合的敷料。

背景技术

[0002] 难愈性创面目前尚无统一的定义,可因外伤、感染、肿瘤或结节溃破等多种病因所致关于其形态、大小、深浅也没有统一的定义。一般认为,难愈性创面为各种病因所致、经4周规范治疗未愈合或无愈合倾向的慢性创面。目前社会人口趋于老龄化,“高血糖、高血压和高血脂”人群基数越来越庞大,而与之相关的难愈性创面患者逐年增多。虽然难愈性创面对患者的生命安全不会立刻造成威胁,但对患者的身心健康和生活质量影响较大,并加重了家庭经济负担。尽管临床有多种方法治疗难愈性创面,但对于复杂的难愈性创面,传统治疗方法收效甚微,寻求新的有效方法促进难愈性创面的愈合是多学科领域共同研究探索的重要课题。

[0003] 创面局部细胞的严重损伤致使创面局部残留的修复种子细胞数量少、功能障碍或低下,创面局部血液供应差难以提供充足的营养以满足局部组织细胞再生修复的需要,随着基因治疗和干细胞工程技术的迅猛发展,实践证明,细胞生长因子能够进行分离,并应用于创面微环境的反应参与皮肤创伤愈合的一种重要的组织修复细胞。细胞生长因子p值为5.8,与人体完整名皮肤的酸碱度一致,能有效保护皮肤的微酸性环境,防止细菌的生成,但有创面的皮肤酸碱度可达7.4左右,长期使用会导致皮肤发黄,并且修复深度有限。难愈性创面一般都有感染并出现脓肿,在这方面细胞生长因子无能为力。

[0004] 创面的氧疗已经研究多年,氧气对创面可以起到杀菌、促进细胞修复、避免感染等作用。2003年,Sen等人首先提出伤口延迟愈合的主要原因为伤口出现低氧血症,以及创面氧疗等处理措施,认为确保创面正常氧合是促使创面闭合的关键节点。从生理条件看,在封闭创面过程中,需大量氧气,创面自身可引起低氧环境,低氧激发组织再生。临床上常采用高压氧治疗难愈性创面,通过增加全身组织氧含量来改善局部缺氧状态,促使创面愈合。这种方法备受争议,患者会引起氧中毒、气压伤、减压病等系列副作用,而且高压氧也存在很多禁忌症,导致难愈性创面患者无法在氧疗中获益。

发明内容

[0005] 基于此,有必要提供一种可以解决上述问题的促进伤口愈合的敷料。

[0006] 一种促进伤口愈合的敷料,包括细胞生长因子和载氧蛋白。

[0007] 在一个实施例中,所述细胞生长因子和所述载氧蛋白的质量比为1~20:30~130。

[0008] 在一个实施例中,所述敷料为液体敷料;

所述细胞生长因子的浓度为10mg/L~200mg/L,所述载氧蛋白的浓度为300mg/L~1300mg/L。

[0009] 在一个实施例中,所述细胞生长因子选自表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、角质化细胞生长因子、血管内皮生长因子、转化生长因子和血小板源生长因子中的至少一种。

[0010] 在一个实施例中,所述载氧蛋白选自血红蛋白、修饰血红蛋白、肌红蛋白和修饰肌红蛋白中的至少一种。

[0011] 在一个实施例中,所述修饰血红蛋白通过如下操作制备得到:

从动物全血中提取得到红血球;

将所述红血球与稀释液充分混合,使得所述红血球完全裂解,得到血红蛋白裂解液;

对所述血红蛋白裂解液进行渗滤、纯化、除菌,得到血红蛋白溶液;

将所述血红蛋白溶液与蛋白质修饰剂混合反应,得到所述修饰血红蛋白;

或者,所述修饰肌红蛋白通过如下操作制备得到:

从骨骼肌中提取得到骨骼肌提取物;

对所述骨骼肌提取物进行渗滤、纯化、除菌,得到肌红蛋白溶液;

将所述肌红蛋白溶液与蛋白质修饰剂混合反应,得到所述修饰肌红蛋白。

[0012] 在一个实施例中,所述蛋白质修饰剂选自戊二醛、乙二醛、双阿司匹林、聚乙二醇、1,5-己二烯、葡聚糖、淀粉浆或血清白蛋白中的至少一种。

[0013] 在一个实施例中,所述敷料还包括辅料;

所述辅料选自电解质、黏合剂、抗氧化剂、止痛剂、渗透压调节剂、稳定剂、抑菌剂、pH值调节剂、絮凝剂和成膜剂中的至少一种。

[0014] 在一个实施例中,所述载氧蛋白中,氧合载氧蛋白的含量 $\leq 60\%$ 。

[0015] 在一个实施例中,所述载氧蛋白中,所述氧合载氧蛋白的含量 $\leq 10\%$ 。

[0016] 本发明的这种促进伤口愈合的敷料包括细胞生长因子和载氧蛋白,细胞生长因子通过与细胞表面的受体结合,激活细胞内的信号通路,促进细胞的DNA合成和细胞分裂繁衍,能够促进细胞生长和增殖,而载氧蛋白可以为细胞的生长和增殖提供有效的供氧,在细胞生长因子和载氧蛋白的协同配合下,可以有效促进难愈性创面的愈合。细胞生长因子作为一种蛋白因子,昂贵的价格限制了其使用,通过载氧蛋白的协同配合,可以极大的降低细胞生长因子的添加量,使得细胞生长因子起效用的最低添加量大幅降低的同时,达到协同加速慢性创面愈合的目的。

[0017] 结合测试例部分,可以看出,本发明的这种促进伤口愈合的敷料能够有效促进糖尿病足溃疡(难愈性创面)的加速愈合。

[0018] 此外,难愈性创面的创面成因比较复杂,往往会夹带血水并出现炎症反应,炎症反应也需要能量供应,而且本发明的促进伤口愈合的敷料中加入的载氧蛋白释放的氧气能够参与炎症反应,与细胞生长因子共同促使创面加速愈合。

[0019] 此外,创面愈合过程中,会改变皮肤的生长环境,导致细菌的感染,尤其是厌氧菌的大量产生,而本发明的促进伤口愈合的敷料中加入的载氧蛋白,与高压氧不同,其能够对厌氧菌感染具有良好的抑制和杀灭作用,可以促使创面加速愈合。

[0020] 优选的,与同样载氧的红细胞相比,载氧蛋白是一种纳米级蛋白,具有无需配型、工作温度范围广($2^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$)、无凝血风险和稳定性长达36个月等优势,并且其载氧能力是红细胞的7倍~9倍。

[0021] 优选的,本发明的促进伤口愈合的敷料为液体敷料,小剂量的局部灌注不会给创面带来灌注损伤,反而能够缓解创面血管引起的缺血,或炎症引起的血管闭塞造成的缺血。

[0022] 本发明的促进伤口愈合的敷料可以分装于喷剂瓶中使用,具有无刺激性、极低的毒性、起效快和长期保存的特点,能够促进组织细胞的修复和再生,减少感染的机率加速创面的愈合速度,同时可缓解瘙痒和不适的感觉。

[0023] 本发明的促进伤口愈合的敷料体积小,易于携带、便于使用,适合众多场景,院外就可自我治疗,轻易喷于伤口,促进伤口愈合。

具体实施方式

[0024] 下面将结合本发明具体实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0025] 本发明公开了一实施方式的促进伤口愈合的敷料,包括细胞生长因子和载氧蛋白。

[0026] 本发明的这种促进伤口愈合的敷料包括细胞生长因子和载氧蛋白,细胞生长因子通过与细胞表面的受体结合,激活细胞内的信号通路,促进细胞的DNA合成和细胞分裂繁衍,能够促进细胞生长和增殖,而载氧蛋白可以为细胞的生长和增殖提供有效的供氧,在细胞生长因子和载氧蛋白的协同配合下,可以有效促进难愈性创面的愈合。细胞生长因子作为一种蛋白因子,昂贵的价格限制了其使用,通过载氧蛋白的协同配合,可以极大的降低细胞生长因子的添加量,使得细胞生长因子起效用的最低添加量大幅降低的同时,达到协同加速慢性创面愈合的目的。

[0027] 结合测试例部分,可以看出,本发明的这种促进伤口愈合的敷料能够有效促进糖尿病足溃疡(难愈性创面)的加速愈合。

[0028] 此外,难愈性创面的创面成因比较复杂,往往会夹带血水并出现炎症反应,炎症反应也需要能量供应,而本发明的促进伤口愈合的敷料中加入的载氧蛋白释放的氧气能够参与炎症反应,促使创面加速愈合。

[0029] 此外,创面愈合过程中,会改变皮肤的生长环境,导致细菌的感染,尤其是厌氧菌的大量产生,而本发明的促进伤口愈合的敷料中加入的载氧蛋白对厌氧菌感染具有良好的疗效,可以促使创面加速愈合。

[0030] 优选的,本实施方式中,细胞生长因子和载氧蛋白的质量比为1~20:30~130。

[0031] 细胞生长因子作为促进组织愈合的蛋白因子,成本高,几微克需要上千元,载氧蛋白的成本较低,通过控制二者比例,可以在控制成本的前提下实现二者的协同治疗效应。

[0032] 具体来说,本实施方式中,促进伤口愈合的敷料为液体敷料。

[0033] 本发明的促进伤口愈合的敷料为液体敷料,小剂量的局部灌注不会给创面带来灌注损伤,反而能够缓解创面血管引起的缺血,或炎症引起的血管闭塞造成的缺血。

[0034] 本发明的促进伤口愈合的敷料可以分装于喷剂瓶中使用,具有无刺激性、极低的毒性、起效快和长期保存的特点,能够促进组织细胞的修复和再生,减少感染的机率加速创面的愈合速度,同时可缓解瘙痒和不适的感觉。

[0035] 本发明的促进伤口愈合的敷料体积小,易于携带、便于使用,适合众多场景,院外就可自我治疗,轻易喷于伤口,促进伤口愈合。

- [0036] 优选的,本实施方式中,敷料为液体敷料,敷料的pH值为6.8~7.9。
- [0037] 优选的,本实施方式中,敷料为液体敷料,液体敷料以喷剂形式给药。
- [0038] 本实施方式中,敷料为液体敷料,液体敷料的溶剂为水或甘油。
- [0039] 需要指出的是,本发明中提及的水,一般指注射用水、灭菌注射用水或细胞培养注射用水;本发明中提及的甘油,一般指注射用甘油。
- [0040] 本实施方式中,敷料为液体敷料,其可以通过液体敷料定量,并以除菌过滤和/或最终灭菌方式制成无菌溶液后分装于瓶内。
- [0041] 本发明中,细胞生长因子的浓度综合考虑了成本和载氧蛋白的浓度,载氧蛋白的浓度根据其发挥作用、携氧量确定。
- [0042] 具体来说,本实施方式的液体敷料中,细胞生长因子的浓度为10mg/L~200mg/L,载氧蛋白的浓度为300mg/L~1300mg/L。
- [0043] 优选的,本实施方式中,细胞生长因子选自表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、角质化细胞生长因子、血管内皮生长因子、转化生长因子和血小板源生长因子中的至少一种。
- [0044] 与同样载氧的红细胞相比,载氧蛋白是一种纳米级蛋白,具有无需配型、工作温度范围广(2℃~40℃)、无凝血风险和稳定性长达36个月等优势,并且其载氧能力是红细胞的7倍~9倍。
- [0045] 优选的,本实施方式中,载氧蛋白选自血红蛋白、修饰血红蛋白、肌红蛋白和修饰肌红蛋白中的至少一种。
- [0046] 具体来说,修饰血红蛋白和修饰肌红蛋白中,修饰剂选自戊二醛、乙二醛、双阿司匹林、聚乙二醇、1,5-己二烯、葡聚糖、淀粉和血清白蛋白中的至少一种。
- [0047] 醛类与载氧蛋白的修饰原理为醛基与蛋白主链上的悬挂氨基发生席夫碱反应,双阿司匹林、聚乙二醇、1,5-己二烯、葡聚糖、淀粉与载氧蛋白的修饰原理为这些物质所带的羧基、羟基或烯键经过预活化,与蛋白主链上的悬挂氨基发生取代反应,血清蛋白可通过预活化,活化后的产物中含有羧基,可以与蛋白主链上悬挂的氨基发生酰胺反应。载氧蛋白经修饰后免疫源性大大降低,且分子量大,无法透过肾脏半透膜,肾毒性作用小。
- [0048] 具体来说,修饰血红蛋白可以通过如下操作制备得到:从动物全血中提取得到红血球;将红血球与稀释液充分混合,使得红血球完全裂解,得到血红蛋白裂解液;对血红蛋白裂解液进行渗滤、纯化、除菌,得到血红蛋白溶液;将血红蛋白溶液与蛋白质修饰剂混合反应,得到修饰血红蛋白。
- [0049] 具体来说,修饰肌红蛋白可以通过如下操作制备得到:从骨骼肌中提取得到骨骼肌提取物;对骨骼肌提取物进行渗滤、纯化、除菌,得到肌红蛋白溶液;将肌红蛋白溶液与蛋白质修饰剂混合反应,得到修饰肌红蛋白。
- [0050] 其中,从骨骼肌中提取得到骨骼肌提取物的操作,可以采用本领域常规技术进行。
- [0051] 更优选的,修饰血红蛋白和修饰肌红蛋白中,修饰剂选自戊二醛、乙二醛和葡聚糖中的至少一种。
- [0052] 需要指出的是,血红蛋白和肌红蛋白可以从天然组织中提取得到,也可以为人工合成。
- [0053] 具体来说,血红蛋白可以通过如下操作制备得到:从动物血中分离得到红血球;将

红血球与稀释液混合,使得红血球裂解,得到裂解液;对裂解液进行纯化、除菌,得到血红蛋白溶液。

[0054] 稀释液可以为纯化水、生理盐水或注射用水。

[0055] 优选的,红血球与稀释液的重量比可以为1:1。

[0056] 具体来说,对裂解液纯化后过滤去除病毒的操作可以为:通过渗滤或色谱的方法,对裂解液进行纯化,接着过滤去除细菌。

[0057] 优选的,载氧蛋白中,氧合载氧蛋白的含量 $\leq 60\%$ 。

[0058] 更优选的,载氧蛋白中,氧合载氧蛋白的含量 $\leq 10\%$ 。

[0059] 具体来说,可以通过向载氧蛋白溶液中通入惰性气体,使得载氧蛋白溶液中的氧合载氧蛋白的含量低于60%(更优选低于10%),其中,惰性气体为二氧化碳、一氧化碳或氮气。

[0060] 动物血可以为哺乳动物血,优选人血、猪血、牛血或马血。

[0061] 优选的,本实施方式的敷料还包括辅料。

[0062] 辅料占敷料的重量百分比为5%~35%。

[0063] 具体来说,辅料选自电解质、黏合剂、抗氧化剂、止痛剂、渗透压调节剂、稳定剂、抑菌剂、pH值调节剂、絮凝剂和成膜剂中的至少一种。

[0064] 优选的,电解质为无机盐。具体来说,电解质含有钠离子、钾离子、镁离子、钙离子、氯离子、乳酸根离子和碳酸氢根中的至少一种。

[0065] 优选的,黏合剂选自羟丙基甲基纤维素、聚乙二醇、乙基纤维素、聚乙烯醇、淀粉浆、壳聚糖、甘油、葡萄糖和明胶浆中的至少一种。

[0066] 更优选的,黏合剂选自聚乙二醇、淀粉浆、壳聚糖、甘油或葡萄糖中的至少一种。

[0067] 优选的,抗氧化剂选自亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、蛋氨酸、硫代甘油、半胱氨酸、硼氢化钠和维生素C中的至少一种。

[0068] 更优选的,抗氧化剂选自硫代硫酸钠、蛋氨酸、半胱氨酸和维生素C中的至少一种。

[0069] 优选的,止痛剂选自布洛芬、吲哚美辛、曲马多、可待因、利多卡因、曲马多、芬太尼和双氯芬酸钠中的至少一种。

[0070] 更优选的,止痛剂选自布洛芬、吲哚美辛、可待因、利多卡因、芬太尼和双氯芬酸钠中的至少一种。

[0071] 优选的,渗透压调节剂选自氯化钠、硼酸、葡萄糖、硼砂、磷酸盐和枸橼酸盐中的至少一种。

[0072] 更优选的,渗透压调节剂选自氯化钠和葡萄糖中的至少一种。

[0073] 优选的,稳定剂选自聚乙二醇、2-羟丙基- β -环糊精、甘油、白蛋白、色氨酸、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸和半胱氨酸中的至少一种。

[0074] 更优选的,稳定剂选自聚乙二醇、2-羟丙基- β -环糊精、甘油、白蛋白和组氨酸中的至少一种。

[0075] 优选的,抑菌剂选自苯扎氯铵、苯扎溴铵、苯甲醇、苯甲酸、乳酸、三氯叔丁醇、羟甲基酯、羟基乙酯、尼泊金甲酯、洗必泰、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、甘油、薄荷油和山梨酸中的至少一种。

[0076] 更优选的,抑菌剂选自苯甲酸、苯甲醇、乳酸、甘油和薄荷油中的至少一种。

[0077] 优选的,pH值调节剂选自枸橼酸钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、醋酸钠或氨水,优选碳酸钠、碳酸氢钠和氢氧化钠中的至少一种。

[0078] 更优选的,pH值调节剂选自碳酸钠、碳酸氢钠和氢氧化钠中的至少一种。

[0079] 优选的,絮凝剂选自聚合氯化铁、液体聚合硫酸铁、氯化铁、壳聚糖、淀粉、纤维素、木质素、单宁、聚丙烯酰胺和聚丙烯酸钠中的至少一种。

[0080] 更优选的,絮凝剂选自氯化铁、壳聚糖、淀粉、纤维素、聚丙烯酰胺和聚丙烯酸钠中的至少一种。

[0081] 优选的,成膜剂选自聚维酮K30、羧甲淀粉钠、聚乙烯醇、阿拉伯树胶粉和羟丙纤维素中的至少一种。

[0082] 更优选的,成膜剂选自聚维酮K30、羧甲淀粉钠和聚乙烯醇中的至少一种。

[0083] 以下为具体实施例。

[0084] 实施例中使用的碱性成纤维细胞生长因子为市售产品,级别为药品级。

[0085] 实施例1

1) 牛源血红蛋白的制备

选取健康合格来源的鲁西黄牛(青岛润伟牛业有限公司),用无菌采血针在颈动脉穿侧采集牛全血。取收集到的牛全血1000mL转移到3L柔性袋中,加入pH7.4的柠檬酸钠溶液,使柠檬酸钠的质量浓度为2.63wt%。

[0086] 柠檬酸钠抗凝后的牛全血以500mL/min的流速通过100kDa的中空纤维膜,开始渗滤,弃掉渗滤液,收集分离出来的红细胞,通过0.4 μ m的过滤膜,收集过滤后的液体,以1L/min的流速通过0.2 μ m的中空纤维膜,收集渗滤产物,在搅拌状态下加入等体积的注射用水,得到牛血红蛋白。

[0087] 将牛血红蛋白以200mL/min的速度泵入30kDa的中空纤维膜,弃掉渗滤液,直到渗滤液中的牛血红蛋白浓度小于0.5mg/mL。

[0088] 2) 纯化:将上步渗滤后的牛血红蛋白溶液经10kD膜过滤,然后经过阴离子层析柱系统,使用3g/L的Tris缓冲液过柱,收集洗脱液,连续经过0.22 μ m的滤膜脱氧,直到溶解的氧度数低于0.05mg/mL。得到纯化后的牛血红蛋白。

[0089] 3) 聚合:在通氮气条件下,将纯化后的牛血红蛋白20g/L 100mL加入到聚合釜中,控制釜内压力为0.3Mpa以内,然后加入3g/L的戊二醛溶液 40mL,升温至42 $^{\circ}$ C反应30min,然后将至室温,用硼酸盐缓冲液调节pH为8~10,加入300mL的硼氢化钠溶液反应30min,然后将釜内产物经过30kD滤膜除去小分子。得到戊二醛聚合牛血红蛋白,然后通过0.22 μ m滤膜过滤除菌,即得。

[0090] 4) 液体敷料的制备

称取戊二醛聚合牛血红蛋白11.3g置无菌铝塑复合袋中,溶解于100mL注射用水中,得到戊二醛聚合牛血红蛋白溶液,称取10mg碱性成纤维细胞生长因子溶解于100mL注射用水中。将二者混合,然后分别加入2.5g氯化钠、180mg半胱氨酸、40mg氢氧化钠,搅拌溶解,然后加入700mL注射用水。将铝塑复合袋内料液以1L/min的速度经过0.22 μ m滤膜除菌过滤脱氧后分装与铝质金属喷瓶中,得到液体敷料。

[0091] 对比例1

1) 牛源血红蛋白的制备

选取健康合格来源的鲁西黄牛(青岛润伟牛业有限公司),用无菌采血针在颈动脉穿侧采集牛全血。取收集到的牛全血1000mL转移到3L柔性袋中,加入pH7.4的柠檬酸钠溶液,使柠檬酸钠的质量浓度为2.63%。

[0092] 柠檬酸钠抗凝后的牛全血以500mL/min的流速通过100kDa的中空纤维膜,开始渗滤,弃掉渗滤液,收集分离出来的红细胞,通过0.4 μ m的过滤膜,收集过滤后的液体,以1L/min的流速通过0.2 μ m的中空纤维膜,收集渗滤产物,在搅拌状态下加入等体积的注射用水,得到牛血红蛋白。

[0093] 将牛血红蛋白以200mL/min的速度泵入30kDa的中空纤维膜,弃掉渗滤液,直到渗滤液中的牛血红蛋白浓度小于0.5mg/mL。

[0094] 2) 纯化:将上步渗滤后的牛血红蛋白溶液经10kD膜过滤,然后经过阴离子层析柱系统,使用3g/L的Tris缓冲液过柱,收集洗脱液,连续经过0.22 μ m的滤膜脱氧,直到溶解的氧度数低于0.05mg/mL。得到纯化后的牛血红蛋白。

[0095] 3) 聚合:在通氮气条件下,将纯化后的牛血红蛋白20g/L 100mL加入到反应釜中,控制釜内压力为0.3Mpa以内,然后加入3g/L的戊二醛溶液 40mL,升温至42 $^{\circ}$ C反应30min,然后将釜内产物经过30kD滤膜除去小分子。得到戊二醛聚合牛血红蛋白,然后通过0.22 μ m滤膜过滤除菌,即得。

[0096] 4) 液体敷料的制备

称取戊二醛聚合牛血红蛋白11g置无菌铝塑复合袋中,溶解于100mL注射用水中,得到戊二醛聚合牛血红蛋白溶液,分别称取2.5g氯化钠、180mg半胱氨酸、40mg氢氧化钠加入戊二醛聚合牛血红蛋白溶液中,搅拌溶解,然后加入700mL注射用水。将铝塑复合袋内料液以1L/min的速度经过0.22 μ m滤膜除菌过滤脱氧后分装与铝质金属喷瓶中,得到液体敷料。

[0097] 实施例2 糖尿病顽固性皮肤溃疡大鼠的治疗

试验动物:16只SD糖尿病(\geq 8周)的雄性大鼠。

[0098] 1. 实验方法

1.1 分组

将16只实验大鼠按体重随机分为试验组和对照组,试验组敷料中含有细胞生长因子,每组8只。

[0099] 1.2 建模

糖尿病足溃疡是糖尿病的一种严重并发症,由于下肢远端神经异常、血管病变导致的足部感染、溃疡或深层组织破坏,属于难愈性慢性伤口的一种。此处建模旨在大鼠建立糖尿病足溃疡的慢性伤口模型。

[0100] SD糖尿病大鼠均打耳标。

[0101] 大鼠经高脂饲料诱导6周,出现抗胰岛素。然后经腹腔注射2%的链脲佐菌素的柠檬酸溶液,注射剂量15~30mg/kg,在大鼠背部皮肤进行全层切除术,诱导糖尿病足溃疡/创面模型制作完成。

[0102] 1.3 治疗

各组实验大鼠按下表1所示的方案进行治疗。

[0103] 表1 试验分组

组别	实验材料	治疗方式和频率
试验组	实施例1制备的液体敷料	先分别用双氧水和生理盐水对创面进行清理，然后将液体敷料均匀喷洒于创面，每天上午无下午各1次
对照组	对比例1制备的液体敷料	

1.3 评估

肉眼观察背部切除术的部位的伤口大小，测量溃疡部位大小。

[0104] 2. 结果

具体测试结果如下表2所示。

[0105] 表2 试验结果

组别	试验组	对照组
4d	溃疡面积缩小10%	溃疡面积缩小4%
12d	溃疡面积缩小62%	溃疡面积缩小39%
16d	伤口愈合	溃疡面积缩小56%
30d	伤口愈合	伤口愈合

由表2可以看出，对照组和试验组均可以实现促进大鼠溃疡皮肤的愈合，但是试验组促进大鼠溃疡皮肤的愈合速度明显快于对照组。

[0106] 这说明碱性成纤维细胞生长因子对皮肤溃疡有明显的改善作用，但碱性成纤维细胞生长因子和戊二醛聚合牛血红蛋白的液体敷料，可以在碱性成纤维细胞生长因子和戊二醛聚合牛血红蛋白的协同配合下，更有效地加速皮肤溃疡的愈合。

[0107] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对申请专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。