



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111588837 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 06

(21) 申请号 202010409350.9

A61K 33/38 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.14

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

AU 2002333155 A1, 2003.05.12

申请公布号 CN 111588837 A

CN 102596992 A, 2012.07.18

(43) 申请公布日 2020.08.28

US 2007014755 A1, 2007.01.18

(73) 专利权人 中南大学湘雅三医院

US 2013274190 A1, 2013.10.17

地址 410000 湖南省长沙市岳麓区桐梓坡路138号

WO 2018015976 A1, 2018.01.25

审查员 张影

(72) 发明人 彭程

(74) 专利代理机构 北京维正专利代理有限公司

11508

专利代理师 苏龙

(51) Int. Cl.

A61K 38/39 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

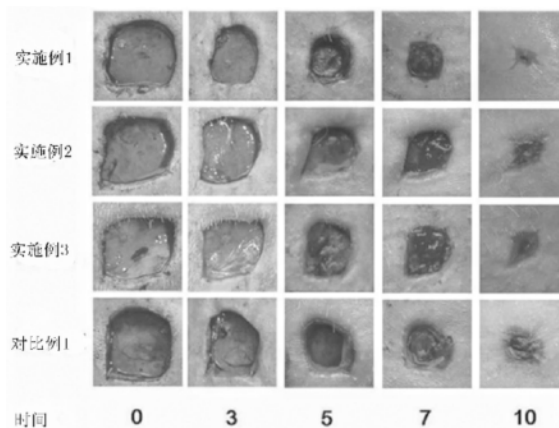
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种蛋白-纳米银复合物的制备方法及制备的复合物和用途

(57) 摘要

本发明提供了一种蛋白-纳米银复合物的制备方法及制备的复合物和用途,属于纳米技术领域,其制备方法包括纳米银颗粒的制备及纳米银颗粒与纤连蛋白的复合;同时还提供了其制备成的复合物及在制备促进伤口愈合的药物中的应用。其制备的蛋白-纳米银复合物具有快速愈合伤口的作用,另外,本发明的制备方法制备成的蛋白-纳米银复合物性能稳定,无毒副作用。



1. 一种蛋白-纳米银复合物的制备方法,其特征在于,其由蛋白和纳米银颗粒复合而成;

所述纳米银颗粒由如下方法制备而成:

1) 将80-120 mg I型胶原蛋白支架和40-60 mg明胶溶解在250mL、0.05 mol / L、pH 3.2的乙酸溶液中,在4℃以18000 r / min搅拌90分钟,真空抽吸后在4℃储存过夜;

2) 将20-100 ppm纳米银溶液以1:8的体积比添加到充分混合的明胶胶原蛋白悬浮液中,倒入硅胶管中,两端密封,然后以 2×10^{-5} m / s的速度沿轴浸入冷凝剂中;

3) 将硅胶管放入预冷的铝盘中,取下两端的密封,并在-40℃、100毫托下冷冻干燥48小时,然后将干燥形式的纳米银胶原支架材料与京尼平苷交联,用钴-60消毒并在使用前密封;制备成纳米银颗粒;

所述蛋白和纳米银颗粒的复合方法如下:

1) 将50 μ l的pH8.2的硼酸缓冲液和20 μ l的浓度为0.2 mM的巯基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯混合在一起,连续搅拌3小时后添加到(1.4-1.6) μ l 浓度为 $(2.0-3.0) \times 10^{-6}$ M 的蛋白溶液中,得蛋白溶液;

2) 将纳米银颗粒浸泡在30-50 μ l的蛋白溶液中,继续搅拌3小时,加入5 μ l浓度为20 mM的甲氧基-聚乙二醇-巯基,继续搅拌5-8小时;

3) 以6000转/分的条件离心三次,每次10分钟,最后将蛋白-纳米银颗粒复合物重悬于200 μ l的去离子水中;

所述的胶原蛋白支架和明胶溶液的质量比为2:1;所述的蛋白为纤连蛋白。

2. 根据权利要求1所述的蛋白-纳米银复合物的制备方法,其特征在于,所述的硅胶管为直径3 mm,长度10 cm的两端密封管。

3. 根据权利要求1所述的蛋白-纳米银复合物的制备方法,其特征在于,步骤1)为:50 μ l的pH8.2的硼酸缓冲液和20 μ l的浓度为0.2 mM的巯基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯混合在一起,连续搅拌3小时后添加到1.5 μ l 浓度为 2.8×10^{-6} M 的蛋白溶液中,得蛋白溶液。

4. 一种由权利要求1-3中任一项所述的蛋白-纳米银复合物的制备方法制备成的蛋白-纳米银复合物。

5. 一种由权利要求4所述的蛋白-纳米银复合物制备的制剂,其特征在于,其包含有蛋白-纳米银复合物。

6. 根据权利要求5所述的由蛋白-纳米银复合物制备的制剂,其特征在于,所述制剂为混悬剂、乳剂、胶丸、凝胶剂或针剂中的一种。

7. 权利要求6所述的蛋白-纳米银复合物在制备伤口愈合药物中的应用。

一种蛋白-纳米银复合物的制备方法及制备的复合物和用途

技术领域

[0001] 本发明属于纳米技术领域,具体涉及一种蛋白-纳米银复合物的制备方法、采用该方法制备的复合物及其用途。

背景技术

[0002] 伤口会给患者带来沉重的痛苦和经济负担,慢性伤口在老年人群中非常普遍,尤其是在糖尿病患者中发病率非常高,且治愈时间非常长,往往需要数月甚至数年的时间才能治愈,这可能会导致感染或死亡。

[0003] 在伤口愈合的治疗过程中,往往使用促进皮肤细胞生长的细胞生长因子如角质细胞生长因子、纤连蛋白、胶原蛋白等等制备成的药剂,作为激活伤口细胞增殖和迁移的触发剂,促进伤口的愈合。伤口颗粒扩散并迁移,伤口边缘残留的基底角质形成细胞,直到整个伤口区域重新上皮化,即伤口愈合。

[0004] 然而,由于蛋白酶对细胞生长因子的生物利用度的影响,在伤口上局部施用生长因子的结果并不令人满意。大剂量重复给药生长因子可能会改善结果,但会增加治疗费用并导致非目标组织的血管生成或肿瘤的生长。因此,如何提高皮肤细胞生长因子的生物利用度,以实现伤口的快速愈合是亟需要解决的技术问题。

发明内容

[0005] 针对以上技术问题,本发明的第一个目的是提供一种蛋白-纳米银复合物的制备方法,其制备成的蛋白-纳米银复合物具有促进伤口快速愈合的效果。本发明的第二个目的是提供一种蛋白-纳米银复合物。本发明的第三个目的是提供一种蛋白-纳米银复合物制剂。本发明的第四个目的是提供蛋白-纳米银复合物在制备伤口愈合药物中的应用。

[0006] 为实现第一个发明目的是提供一种蛋白-纳米银复合物的制备方法,采用了如下的技术方案:

[0007] 一种蛋白-纳米银复合物的制备方法,其由蛋白和纳米银颗粒复合而成;

[0008] 所述纳米银颗粒由如下方法制备而成:

[0009] 1)将80-120 mg I型胶原蛋白支架和40-60 mg明胶溶解在250mL、0.05 mol / L、pH 3.2的乙酸溶液中,在4℃以18000 r / min搅拌90分钟,真空抽吸后在4℃储存过夜;

[0010] 2)将20-100 ppm纳米银溶液以1:8的体积比添加到充分混合的明胶胶原蛋白悬浮液中,倒入硅胶管中,两端密封,然后以 2×10^{-5} m / s的速度沿轴浸入冷凝剂中;

[0011] 3)将硅胶管放入预冷的铝盘中,取下两端的密封,并在-40℃、100毫托下冷冻干燥48小时,然后将干燥形式的纳米银胶原支架材料与京尼平苷交联,用钴-60消毒并在使用前密封;制备成纳米银颗粒。

[0012] 通过采用以上的技术方案,制备成的纳米银颗粒粒径均匀,分散性好、性质较为稳定,较易与蛋白复合制备成目标产物,制备成的蛋白复合物的性能稳定性好。

[0013] 进一步的,所述的蛋白-纳米银复合物的制备方法,所述蛋白和纳米银颗粒的复合

方法如下：

[0014] 1) 将50 μ l的pH8.2的硼酸缓冲液和20 μ l的浓度为0.2 mM的巯基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯混合在一起,连续搅拌3小时后添加到(1.4-1.6) μ l 浓度为 $(2.0-3.0) \times 10^{-6}$ M 的蛋白溶液中,得蛋白溶液;

[0015] 2) 将纳米银颗粒浸泡在30-50 μ l的蛋白溶液中,继续搅拌3小时,加入5 μ l浓度为20 mM的甲氧基-聚乙二醇-巯基,继续搅拌5-8小时;

[0016] 3) 以6000转/分的条件离心三次,每次10分钟,最后将蛋白-纳米银颗粒复合物重悬于200 μ l的去离子水中。

[0017] 通过采用上述的纳米银与蛋白的复合方法,可以制备出性能稳定的蛋白-纳米银复合物。

[0018] 进一步的,纳米银颗粒制备的步骤1)中,所述的胶原蛋白支架和明胶溶液的质量比为2:1。

[0019] 进一步的,所述的硅胶管为直径3 mm,长度10 cm的两端密封管。

[0020] 进一步的,所述的蛋白为纤连蛋白。

[0021] 进一步的,纳米银与蛋白复合的步骤1)为:50 μ l的pH8.2的硼酸缓冲液和20 μ l的浓度为0.2 mM的巯基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯混合在一起,连续搅拌3小时后添加到1.5 μ l浓度为 2.8×10^{-6} M 的蛋白溶液中,得蛋白溶液。

[0022] 通过对制备条件的优化,使制备成的复合物的性能更加稳定。

[0023] 本发明的第二个目的是提供一种蛋白-纳米银复合物,其由上述的蛋白-纳米银复合物的制备方法制备而成。

[0024] 本发明制备的蛋白纳米银复合物,其性能稳定,具有较优的修复愈合后伤口的作用。

[0025] 本发明的第三个目的是提供一种由蛋白-纳米银复合物制备的制剂,其组成中包含有蛋白-纳米银复合物。

[0026] 进一步的,所述制剂为混悬剂、乳剂、胶丸、凝胶剂、水针剂或粉针剂中的一种。

[0027] 本发明可以在蛋白-纳米银复合物的基础上,再加入其它的有效成分或者药学上适宜的辅料,制备成相应的制剂,从而满足不同患者的需求。

[0028] 本发明的第四个目的是提供蛋白-纳米银复合物在制备伤口愈合药物中的应用。

[0029] 本发明提供的蛋白-纳米银复合物具有显著的愈合伤口的作用。

[0030] 综上所述,本发明提供的技术方案具有如下的有益效果:

[0031] 1、本技术方案提供的制备方法可行性良好,制备成的蛋白-纳米银复合物分散性好,性能稳定。

[0032] 2、本技术方案制备的蛋白-纳米银复合物,具有显著的促进伤口愈合的功效。

[0033] 3、本技术方案制备的蛋白-纳米银复合物,无毒副作用。

[0034] 4、本发明可以加入药学上适宜的辅料,制备成相应的制剂,从而扩大复合物的应用。

附图说明

[0035] 图1为动物药效试验图。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例对本发明做进一步的说明。

[0037] 实施例1

[0038] 一种蛋白-纳米银复合物,由以下方法制备而成:

[0039] (一)所述纳米银颗粒由如下方法制备而成:

[0040] 1)将80 mg I型胶原蛋白支架和40 mg明胶溶解在250mL、0.05 mol / L、pH 3.2的乙酸溶液中,在4℃以18000 r / min搅拌90分钟,真空抽吸后在4℃储存过夜;

[0041] 2)将100 ppm纳米银溶液以1:8的体积比添加到充分混合的明胶胶原蛋白悬浮液中,倒入硅胶管中,两端密封,然后以 2×10^{-5} m / s的速度沿轴浸入冷凝剂中;

[0042] 3)将硅胶管放入预冷的铝盘中,取下两端的密封,并在-40℃、100毫托下冷冻干燥48小时,然后将干燥形式的纳米银胶原支架材料与京尼平苷交联,用钴-60消毒并在使用前密封;制备成纳米银颗粒;

[0043] (二)蛋白和纳米银颗粒的复合:

[0044] 1)将50 μ l的pH8.2的硼酸缓冲液和20 μ l的浓度为0.2 mM的巯基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯混合在一起,连续搅拌3小时后添加到1.5 μ l浓度为 2.8×10^{-6} M的纤连蛋白溶液中,得蛋白溶液;

[0045] 2)将纳米银颗粒浸泡在30-50 μ l的蛋白溶液中,继续搅拌3小时,加入5 μ l浓度为20 mM的甲氧基-聚乙二醇-巯基,继续搅拌5-8小时;

[0046] 3)以6000转/分的条件离心三次,每次10分钟,最后将蛋白-纳米银颗粒复合物重悬于200 μ l的去离子水中。

[0047] 实施例2

[0048] 一种蛋白-纳米银复合物,由以下方法制备而成:

[0049] (一)所述纳米银颗粒由如下方法制备而成:

[0050] 1)将100 mg I型胶原蛋白支架和50mg明胶溶解在250mL、0.05 mol / L、pH 3.2的乙酸溶液中,在4℃以18000 r / min搅拌90分钟,真空抽吸后在4℃储存过夜;

[0051] 2)将20 ppm纳米银溶液以1:8的体积比添加到充分混合的明胶胶原蛋白悬浮液中,倒入硅胶管中,两端密封,然后以 2×10^{-5} m / s的速度沿轴浸入冷凝剂中;

[0052] 3)将硅胶管放入预冷的铝盘中,取下两端的密封,并在-40℃、100毫托下冷冻干燥48小时,然后将干燥形式的纳米银胶原支架材料与京尼平苷交联,用钴-60消毒并在使用前密封;制备成纳米银颗粒;

[0053] (二)蛋白和纳米银颗粒的复合:

[0054] 1)将50 μ l的pH8.2的硼酸缓冲液和20 μ l的浓度为0.2 mM的巯基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯混合在一起,连续搅拌3小时后添加到1.4 μ l浓度为 3.0×10^{-6} M的纤连蛋白溶液中,得蛋白溶液;

[0055] 2)将纳米银颗粒浸泡在30-50 μ l的蛋白溶液中,继续搅拌3小时,加入5 μ l浓度为20 mM的甲氧基-聚乙二醇-巯基,继续搅拌5-8小时;

[0056] 3)以6000转/分的条件离心三次,每次10分钟,最后将蛋白-纳米银颗粒复合物重悬于200 μ l的去离子水中。

[0057] 实施例3

[0058] 一种蛋白-纳米银复合物,由以下方法制备而成:

[0059] (一)所述纳米银颗粒由如下方法制备而成:

[0060] 1)将120 mg I型胶原蛋白支架和60 mg明胶溶解在250mL、0.05 mol / L、pH 3.2的乙酸溶液中,在4℃以18000 r / min搅拌90分钟,真空抽吸后在4℃储存过夜;

[0061] 2)将60 ppm纳米银溶液以1:8的体积比添加到充分混合的明胶胶原蛋白悬浮液中,倒入硅胶管中,两端密封,然后以 2×10^{-5} m / s的速度沿轴浸入冷凝剂中;

[0062] 3)将硅胶管放入预冷的铝盘中,取下两端的密封,并在-40℃、100毫托下冷冻干燥48小时,然后将干燥形式的纳米银胶原支架材料与京尼平苷交联,用钴-60消毒并在使用前密封;制备成纳米银颗粒;

[0063] (二)蛋白和纳米银颗粒的复合:

[0064] 1)将50 μ l的pH8.2的硼酸缓冲液和20 μ l的浓度为0.2 mM的巯基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯混合在一起,连续搅拌3小时后添加到1.6 μ l浓度为 2.0×10^{-6} M的纤连蛋白溶液中,得蛋白溶液;

[0065] 2)将纳米银颗粒浸泡在30-50 μ l的蛋白溶液中,继续搅拌3小时,加入5 μ l浓度为20 mM的甲氧基-聚乙二醇-巯基,继续搅拌5-8小时;

[0066] 3)以6000转/分的条件离心三次,每次10分钟,最后将蛋白-纳米银颗粒复合物重悬于200 μ l的去离子水中。

[0067] 对比例1

[0068] 所述蛋白为角质细胞生长因子,其他同实施例1

[0069] 动物药效实验

[0070] 把实施例1-3和对比例1制备成的复合物,加入5%的凝胶制备成水凝胶。

[0071] 所用雌性Sprague Dawley (SD)大鼠(6-8周大)圈养在中南大学湘雅三医院的动物设施中。每组使用6只大鼠,将所有动物单独饲养并使其适应实验室条件1周。手术前24小时,将背毛修剪并脱毛。在手术当天,将动物称重并用50mg / kg的戊巴比妥麻醉。用70%酒精对背部进行消毒,并切除1.0平方厘米的皮肤,制作全层背侧切除伤口。分别用实施例1,实施例2或实施例3水凝胶处理各组创面,将对比例1水凝胶处理的伤口作为对照组。然后用半封闭的聚氨酯敷料覆盖每个伤口。每周进行3次伤口处理和替加贴皮换药。收集整个伤口组织,包括伤口周围皮肤0.5cm的区域。用10%中性甲醛溶液将组织固定24小时,然后在4℃的70%酒精中保存,最后将伤口中央横截面包埋在石蜡中切片。实验效果图如图1所示,在图1中可看出,与对比例相比,3个实施例伤口愈合的速率都显著高于对比例组,实施例1的效果最优,说明本发明制备的复合物具有显著的促进伤口愈合的作用。

[0072] 本具体实施例仅仅是对本发明的解释,其并不是对本发明的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本发明的权利要求范围内都受到专利法的保护。

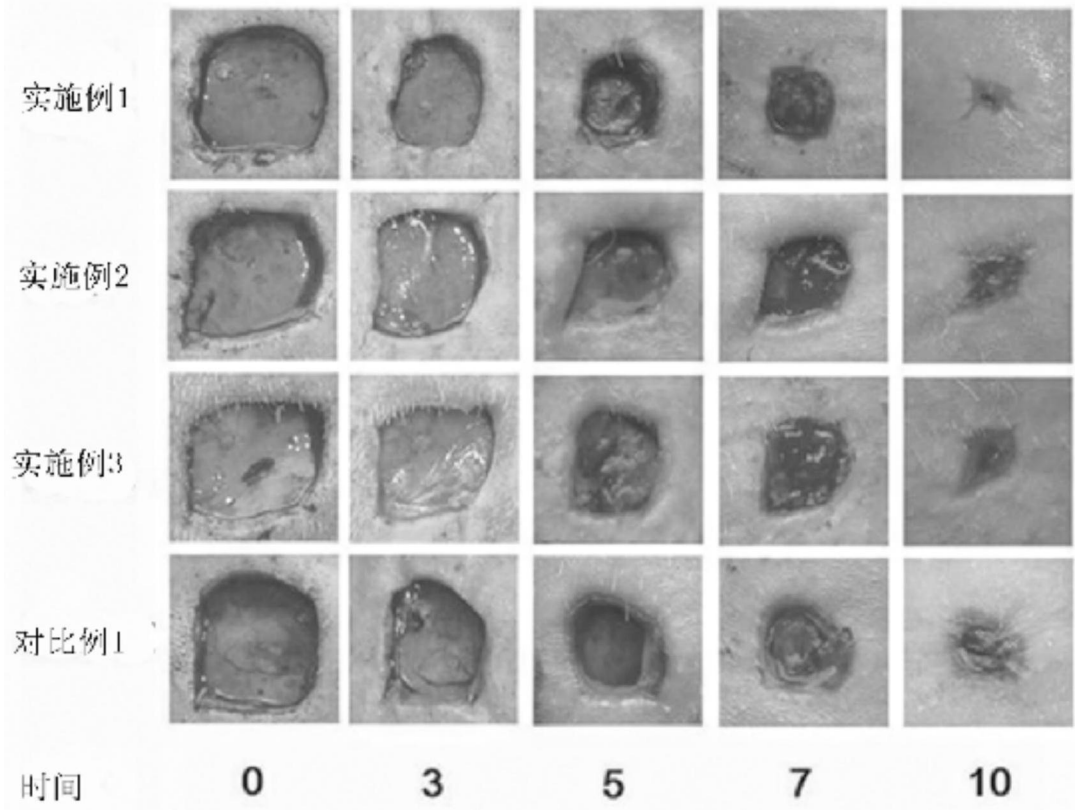


图1