



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107007875 B

(45) 授权公告日 2020.09.22

(21) 申请号 201710196525.0

A61K 47/42 (2017.01)

(22) 申请日 2017.03.29

A61L 26/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 唐敏健

申请公布号 CN 107007875 A

(43) 申请公布日 2017.08.04

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院

野战输血研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

(72) 发明人 王韞芳 柳娟 陈志强 施艳霞

闫舫

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

11322

代理人 鲁兵 郭凡

(51) Int. Cl.

A61K 9/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图4页

(54) 发明名称

一种酶与温度双响应性载药水凝胶及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种酶与温度双响应性载药水凝胶及其制备方法与应用,载药水凝胶包括纳米化的药物0.01-1%;明胶0.5-25%;泊洛沙姆F127 10-30%;泊洛沙姆F68 2-15%和余量的溶剂。本发明提供的载药水凝胶可在病灶周围富集;且在对病灶特征分子MMP9作用下,纳米化药物分级逐步缓释,富集于靶位点,发挥药理作用,可用于治疗烧伤、战创伤、手术伤口、冻伤、皮肤相关肿瘤、皮肤感染疾病、性传播疾病、口腔疾病、秃发、脚气等疾病,且能延长作用时间。本发明载药水凝胶使用方便,操作简单,不需要频繁换药,减少病患痛苦。

1. 一种酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,按质量百分含量,原料由以下成分组成:

纳米化的药物0.01-1%;  
明胶0.5-25%;  
泊洛沙姆F127 10-30%;  
泊洛沙姆F68 2-15%;和  
余量的溶剂;

所述溶剂选自生理盐水、磷酸盐缓冲液、葡萄糖溶液或培养基的等渗溶液;所述纳米化的药物的粒径为10-200nm;

所述纳米化的药物与明胶形成粒径为1-20 $\mu$ m的载药明胶微球;所述载药水凝胶的相变温度为33 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C。

2. 根据权利要求1所述酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,所述纳米化的药物与明胶形成粒径为5-20 $\mu$ m的载药明胶微球。

3. 根据权利要求1所述酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,所述纳米化的药物与明胶形成粒径为5-10 $\mu$ m的载药明胶微球。

4. 根据权利要求1所述酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,按质量百分含量,纳米化的药物0.05-0.5%,明胶1-15%,泊洛沙姆F127 15-25%,泊洛沙姆F68 4-10%。

5. 根据权利要求1所述酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,按质量百分含量,纳米化的药物0.1%,明胶10%,泊洛沙姆F127 20%,泊洛沙姆F68 6%。

6. 根据权利要求1所述酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,所述药物选自镇痛剂、退热剂、降压药、解热镇痛消炎药、抗肿瘤药、肿瘤并发症辅助治疗生物技术药物、抗微生物药、激素、蛋白质、核酸、红血球生成刺激剂、抗溃疡药物、抗反流药物、抗氧化药物中的一种。

7. 根据权利要求6所述酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,所述抗微生物药为抗菌剂或抗病毒药;所述抗菌剂为抗真菌药或多粘菌素B;所述抗氧化药物为姜黄素。

8. 根据权利要求1-7任一所述酶与温度双响应性载药水凝胶,其特征在于,所述纳米化的药物的粒径为10-100nm。

9. 一种制备权利要求1-8任一所述酶与温度双响应性载药水凝胶的方法,其特征在于,将药物纳米化后加入明胶形成水相,再与油相形成乳液,向乳液中加入交联剂反应形成载药明胶微球,最后将载药明胶微球与泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68和溶剂混合,得到所述酶与温度双响应性载药水凝胶。

10. 根据权利要求9所述方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)、药物的纳米化:将药物溶解于其良性溶剂中,形成浓度为0.1-5mg/ml的药物溶液;向搅拌转速为700-2000rpm的溶剂中加入药物溶液,药物溶液与溶剂的体积比为(1-10):100,继续搅拌10min-1h,形成药物纳米颗粒溶液;静置24h后,去除良性溶剂,然后真空冷冻干燥处理,得到药物纳米颗粒;

(2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到55 $^{\circ}$ C的双蒸水中,800-1500rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的药物纳米颗粒加入明胶溶液中,搅拌0.5-2h,形成水相;取液体石蜡加入55 $^{\circ}$ C的司盘-80(Span-80)中,液体石蜡与司盘-80的体积比为100:1,800-

1500rpm搅拌,形成油相;将水相滴加到 $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的油相中,水相和油相体积比为1:(2-20),搅拌速度为800-1500rpm,乳化30min,形成乳液;乳液移到 $4^{\circ}\text{C}$ 的冰水浴中,转速保持在800-1500rpm,乳化搅拌30min,加入25wt%戊二醛溶液交联30min,戊二醛溶液的加入体积为乳液体积的1-5%,1000-3000rpm离心,弃上清,得到明胶固态微球,再加入明胶固态微球体积10-20倍的异丙醇脱水20min,1000-6000rpm下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末, $40^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球;

(3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载药明胶微球与泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68混合,得到酶与温度双响应性载药水凝胶。

11. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中的良性溶剂选自四氢呋喃、乙醇、氯仿中的一种或几种。

12. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中所述药物溶液浓度为0.2-2mg/ml。

13. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中所述药物溶液浓度为0.2-1mg/ml。

14. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中所述药物溶液浓度为0.5mg/ml。

15. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中搅拌转速为1000-1800rpm。

16. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中搅拌转速为1300-1600rpm。

17. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中搅拌转速为1500rpm。

18. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(1)中真空冷冻干燥处理的真空度在10Pa以下,温度低于 $-50^{\circ}\text{C}$ 。

19. 根据权利要求18所述方法,其特征在于,步骤(1)中真空冷冻干燥处理的真空度在5Pa以下。

20. 根据权利要求18所述方法,其特征在于,步骤(1)中真空冷冻干燥处理的真空度在1Pa以下。

21. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(2)中加入异丙醇脱水20min,3000-5000rpm下离心。

22. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,步骤(2)中加入异丙醇脱水20min,3500-4500rpm下离心。

23. 权利要求1-8任一所述酶与温度双响应性载药水凝胶在制备伤口敷料中的应用。

24. 根据权利要求23所述应用,其特征在于,所述伤口敷料为用来治疗烧伤、战创伤、手术伤口、冻伤、皮肤相关肿瘤、皮肤感染疾病、性传播疾病、口腔疾病、秃发、脚气疾病的敷料。

## 一种酶与温度双响应性载药水凝胶及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及创伤敷料技术领域,具体涉及一种酶与温度双响应性载药水凝胶及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 常用的创伤敷料为水凝胶状,可以直接作用于病灶,作用于相应受体,发挥药理作用,产生临床疗效。但水凝胶状创伤敷料在接触病灶部位后,载有的药物会迅速进入体内,使得药物浓度超过发挥药效的浓度,达到毒性浓度;此外,由于药物过快地进入体内,并被代谢,产生临床疗效的时间过短,以至于病灶并未恢复,药物已代谢排出体外,需要通过频繁更换创伤敷料的方法来解决。为了避免药物短时间内达到药物峰值浓度对机体产生毒副作用,以及药物代谢太快造成多次换药带来的不便和痛苦,急需一种把药物分子包载于稳定载体中,形成缓释体系,在伤口部位逐渐释放的创伤敷料。

[0003] 但是,目前具有药物缓释体系的创伤敷料不能广泛使用,原因如下:首先,药物包载于稳定载体形成悬浮液的情况下,不易于贴合在创口表面,容易造成药物分子流失,导致药物不能到达病灶,最终造成单次使用剂量不能最大化,仍无法解决多次换药的问题。其次,由于许多药物分子水溶性较差,难以在机体内水溶性液体环境下有效溶解,达到起效浓度,从而不能发挥临床药理作用。再次,包载药物分子的载体在体内解体释放药物分子的效果不够理想,例如,载体在机体内不能溶解,造成药物分子无法释放并发挥药理作用;载体进入机体内即发生崩溃式溶解,药物分子释放无法控制;药物颗粒分子从创口表面局部富集之后,会进入微循环进而入全身循环系统,导致药物在病灶局部无法达到有效治疗浓度,而分布至身体其他组织可能引发非预期毒副作用。

[0004] 因此,一种能够缓释控释且使用安全的水凝胶敷料是目前急需的。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的缺陷,第一方面,提供一种能够分级逐步缓释并将药物颗粒富集在创口部位的酶与温度双响应性载药水凝胶,按质量百分含量,原料包括以下成分:

[0006] 纳米化的药物 0.01-1%;

[0007] 明胶 0.5-25%;

[0008] 泊洛沙姆F127 10-30%;

[0009] 泊洛沙姆F68 2-15%;和

[0010] 余量的溶剂;

[0011] 所述纳米化的药物与明胶形成粒径为1-20 $\mu\text{m}$  (优选5-20 $\mu\text{m}$ ,最优选5-10 $\mu\text{m}$ )的载药明胶微球;优选的,所述载药水凝胶的相变温度为 $33\pm 1^\circ\text{C}$ 。

[0012] 按质量百分含量,纳米化的药物优选0.05-0.5%,最优选0.1%;明胶优选1-15%,最优选10%;泊洛沙姆F127优选15-25%,最优选20%;泊洛沙姆F68优选4-10%,最优选

6%。

[0013] 所述溶剂选自生理盐水、磷酸盐缓冲液、葡萄糖溶液或培养基等等渗溶液。

[0014] 所述药物选自镇痛剂、退热剂、抗真菌药、降压药、解热镇痛消炎药、抗肿瘤药、肿瘤并发症辅助治疗生物技术药物、抗菌剂(如多粘菌素B)、抗病毒药、抗微生物药、激素、蛋白质、核酸、红血球生成刺激剂、抗溃疡药物、抗反流药物、抗氧化药物(如姜黄素)等中的一种。

[0015] 所述纳米化的药物的粒径为10-200nm,优选10-100nm。

[0016] 第二方面,本发明提供一种制备上述酶与温度双响应性载药水凝胶的方法,将药物纳米化后加入明胶形成水相,再与油相形成乳液,向乳液中加入交联剂反应形成载药明胶微球,最后将载药明胶微球与泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68和溶剂混合,得到所述酶与温度双响应性载药水凝胶。

[0017] 所述载药明胶微球的粒径在1-20 $\mu\text{m}$ ,优选5-20 $\mu\text{m}$ ,最优选5-10 $\mu\text{m}$ 。

[0018] 包括如下步骤:

[0019] (1)、药物的纳米化:将药物溶解于其良性溶剂(良性溶剂可选自四氢呋喃、乙醇、氯仿等中的一种或几种)中,形成浓度为0.1-5mg/ml的药物溶液(浓度优选0.2-2mg/ml,更优选0.2-1mg/ml,最优选0.5mg/ml);向搅拌转速为700-2000rpm(优选1000-1800rpm,更优选1300-1600rpm,最优选1500rpm)的溶剂中加入药物溶液,药物溶液与溶剂的体积比为(1-10):100,继续搅拌10min-1h,形成药物纳米颗粒溶液;静置24h后,去除良性溶剂,然后真空冷冻干燥处理(真空度在10Pa以下,优选在5Pa以下,更优选在1Pa以下;温度低于-50 $^{\circ}\text{C}$ ),得到药物纳米颗粒;

[0020] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到55 $^{\circ}\text{C}$ 的双蒸水中,800-1500rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的药物纳米颗粒加入明胶溶液中,搅拌0.5-2h,形成水相;取液体石蜡加入55 $^{\circ}\text{C}$ 的司盘-80(Span-80)中,液体石蜡与司盘-80的体积比为100:1,800-1500rpm搅拌,形成油相;将水相滴加到55 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 的油相中,水相和油相体积比为1:(2-20),搅拌速度为800-1500rpm,乳化30min,形成乳液;乳液移到4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰水浴中,转速保持在800-1500rpm,乳化搅拌30min,加入25wt%戊二醛溶液交联30min(戊二醛溶液的加入体积为乳液体积的1-5%),1000-3000rpm离心,弃上清,得到明胶固态微球,再加入明胶固态微球体积10-20倍的异丙醇脱水20min,1000-6000rpm下(优选3000-5000rpm,更优选3500-4500rpm)离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,40 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球;

[0021] (3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载药明胶微球与泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68混合,得到酶与温度双响应性载药水凝胶。

[0022] 第三方面,本发明提供上述酶与温度双响应性载药水凝胶在制备伤口敷料中的应用。

[0023] 所述伤口敷料为用来治疗烧伤、战创伤、手术伤口、冻伤、皮肤相关肿瘤、皮肤感染疾病、性传播疾病、口腔疾病、秃发、脚气等疾病的敷料。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0025] 本发明提供的酶与温度双响应性载药水凝胶采用药理活性物质(即药物)二级自组装,第一级为药物自组装成纳米颗粒,第二级为纳米化药物与明胶溶液自组装为微米球,

微米球的粒径在1-20 $\mu\text{m}$ 范围内。二级自组装的水凝胶可分散于水溶性溶液中,外敷于病灶部位,药物可在病灶周围富集;且在病灶特征分子MMP9作用下,纳米化药物从第二级组装到第一级组装逐步缓释,富集于靶位点,发挥药理作用。采用本发明的载药水凝胶,其中纳米化药物对人皮肤上皮细胞Hacat和人皮肤成纤维细胞BJ的抗过氧化氢氧化作用和促细胞迁移作用明显优于未经处理的药物,且其药物具有缓慢释放的效果,作用时间得到有效延长。本发明载药水凝胶使用方便,操作简单,不需要频繁换药,减少病患痛苦。

### 附图说明

- [0026] 图1为本发明未载药明胶微球和载药明胶微球的光镜图。
- [0027] 图2为本发明未载药明胶微球和载药明胶微球的粒径分布图。
- [0028] 图3为本发明载药明胶微球的光镜图。
- [0029] 图4为温敏水凝胶泊洛沙姆F127和F68对Hacat和BJ细胞增殖的影响效果图。
- [0030] 图5为本发明载药明胶微球对MMP9的酶响应性效果图。
- [0031] 图6为本发明载药明胶微球随时间变化的药物释放情况。
- [0032] 图7为本发明载药水凝胶作用于小鼠伤口的效果图。

### 具体实施方式

[0033] 本发明提供了一种酶与温度双响应载药水凝胶,所负载的药理活性物质(即药物)需经纳米化处理,水凝胶既对基质金属蛋白酶9(MMP9)有响应性,又是温度敏感型水凝胶,从而实现对MMP9酶与温度的双响应。其中,

[0034] 基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9),属于基质金属蛋白酶超家族成员,又称明胶酶B(Gelatinase B);其基本结构包括信号肽区、N-末端前肽区、催化基团区、C-末端血红素结合蛋白样区和铰链区;主要表达于单核-巨噬细胞、角化细胞、中性粒细胞、成纤维细胞、破骨细胞、骨骼肌卫星细胞、软骨细胞、内皮细胞以及各种肿瘤细胞等。MMP9可以在正常生理pH值和金属锌离子的存在下,参与细胞外基质的降解与重建,其底物主要有IV、V、VII、X型胶原、明胶及弹性蛋白。因此,明胶作为MMP9的底物,可以形成对MMP9响应性载药体系,针对病灶部位MMP9表达而裂解释放药物。

[0035] 本发明水凝胶所负载的药物需经纳米化处理,原因有三:其一,纳米技术可以通过纳米颗粒本身在机体内药物代谢过程而改善药理活性成分在机体内药代药动过程。其二,纳米技术能够提高药物在病灶和靶点的富集程度,并且有利于其与靶位点结合,发挥药理作用。其三,纳米技术能够有效提高疏水药物的溶解度和溶解速度,提高药物的生物可利用度。可见,纳米技术对提高药物疗效有突出的价值。但是,纳米技术的使用必须考虑其安全性,即制备纳米组合物所使用的材料必须是临床安全的,制备得到的药物必须保持其稳定性。因此,经大量实验和探索得出,纳米化药物的粒径在10-200nm范围内,能够在纳米尺寸发挥更好的药理效果,并且适合分散于明胶固态微球中。

[0036] 本发明水凝胶对MMP9有响应性,原因有四:其一,选择病灶的标志分子作为被响应分子,药物分子作为响应分子,可形成一种动态平衡。即当标志分子的含量升高,对载体的溶解性能增强,可释放更多的药物;当标志分子含量降低,对载体的溶解性降低,药物的释放量降低。这样就形成了一种针对病灶标志分子的智能缓释体系。其二,作为能够载带药物

的载体,被酶降解后必须可以作为小分子活性物质继续发挥药理活性作用,包括细胞迁移和促进细胞增殖作用。其三,该酶响应性缓释系统可以对药物毒性有效控制,只要在病灶部位表达相应的活性物质,载体才被降解,药物释放;而在其它不存在该活性物质的部位,载体不能被降解,药物不能释放。这样可以减少药物在非病灶部位的释放而产生的毒性作用,还可以减少药物用量,节约成本,减少药物代谢负担,尽可能降低肝肾毒性。其四,药物酶响应性还要具有生物富集作用,并且在被酶降解之前载体分子粒径要在 $5\mu\text{m}$ 左右时,才可充分富集在病灶周围,而不至于进入血液循环系统被代谢。这种酶响应性缓释系统在药物缓释以及在病灶富集中起到突出作用。

[0037] 然而,酶响应性缓释体系的选择和制备必须考虑以下几点:第一,载体的生物安全性;第二,载体降解产物的生物安全性;第三,载体结构的稳定性;第四,载体对底物反应的敏感性和特异性;第五,载体的免疫原性。

[0038] 发明人在载体的制备过程中,尽量选择自然材料或者临床批准的材料作为原料,比如明胶,壳聚糖,改性淀粉等。这些原料与纳米化的药物组合,能够尽量保证药物具有较好的临床安全性;并最终确定载体粒径在 $1-20\mu\text{m}$ 时,在局部用药的情况下,可以富集到病灶周围,不进入血液循环系统。

[0039] 明胶是猪皮经过酸变性而成的细胞外基质的类似物。由于脊椎动物(甚至包括某些无脊椎动物)细胞外基质在进化上的保守性(比如胶原从低等动物到人类都保持着Gly-X-Y的结构模式),在生物体内引起免疫排斥的可能性较低。明胶是变性的细胞外基质,可以作为基质金属蛋白酶(MMP)的底物,具有响应性和特异性,而且体内细胞外基质重排很普遍,存在大量的细胞外基质降解产物,这些降解产物生理毒性在机体可以承受的范围之内。明胶的降解产物和细胞外基质的降解产物是相同的,其成分对机体的安全性可以预测。而使用壳聚糖或者改性淀粉等其它常用物质作为载体,会产生以下后果:其一,壳聚糖或者改性淀粉不能形成针对MMP9的智能响应体系,药物不能在MMP9的作用下缓慢释放;其二,壳聚糖和改性淀粉等的降解产物不能形成小分子短肽梯度,不利于细胞迁移,难以使特定细胞在特定部位聚集,不能产生生理活性,改变疾病进展过程;而明胶来源于皮肤固有成分,且其细胞外基质成分与人类细胞外基质成分同源性较高,没有免疫排斥;且其蛋白成分含有RGD多肽片段,能诱导成纤维细胞迁徙;其三,壳聚糖和改性淀粉分别来源于无脊椎动物和植物,在进化上和人距离较远,易发生免疫排斥反应。

[0040] 本发明水凝胶为温度敏感型,原因有三:其一,作为温度响应性制剂,在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存时呈现液态,使低温保存到方便使用过程成为可能,而在体表温度时迅速凝结为固态,便于敷贴,延长药物与创口的接触时间。其二,温敏水凝胶可以结合体外皮肤喷枪使用,给药途径方便,适合单次大剂量给药。其三,温敏水凝胶的固液两相性可以使药物成为均匀的分散系。

[0041] 温敏水凝胶在作为体外用药载体中起到突出作用,但应用于药物载体时必须考虑两个方面,一方面是其生物安全性,一方面是其药物释放的性能。

[0042] 本发明选择泊洛沙姆F127和泊洛沙姆F68的混合物作为温敏水凝胶的基质,是因为泊洛沙姆F127和泊洛沙姆F68均具有热固性,但泊洛沙姆F127在最低成胶浓度时,无法达到体表温度的要求,加入泊洛沙姆F68制成两种物质的混合物后,通过调节配比,可以使其相变温度在 $33^{\circ}\text{C}$ 左右,略低于成人体表温度,利于在皮肤表面贴合;而在低温时表现为均

一液相,方便在低温保存和药物分散。此外,两者皆为FDA批准的食品药品添加剂,在生物安全性能上符合要求。

[0043] 本发明的设计理念为:假使载体是病灶内部某种物质的底物,就可以实现有针对性的缓释,直至疾病痊愈,药物分子将不再释放的智能释放形式。在此基础上,本发明提出了一种酶与温度双响应性载药水凝胶,按质量百分含量,其原料包括以下成分:

[0044] 纳米化的药物 0.01-1%,优选0.05-0.5%,最优选0.1%;

[0045] 明胶 0.5-25%,优选1-15%,最优选10%;

[0046] 泊洛沙姆 F12710-30%,优选15-25%,最优选20%;

[0047] 泊洛沙姆 F682-15%,优选4-10%,最优选6%;

[0048] 余量的溶剂,溶剂可选生理盐水、磷酸盐缓冲液、葡萄糖溶液或培养基等等渗溶液。

[0049] 其中,药物可以选自以下种类:

[0050] 解热镇痛消炎药:如,阿斯匹林,对乙酰氨基酚,布洛芬,萘普生钠,盐酸叔丁啡,盐酸丙氧酚,萘磺酸丙氧酚,盐酸哌替啶,盐酸二氢吗啡酮,硫酸吗啡,盐酸羟考酮,磷酸可待因,酒石酸二氢可待因,盐酸镇痛新,重酒石酸二氢可待因酮,酒石酸左啡诺,二氟尼酸,水杨酸三乙醇胺,盐酸纳布啡,甲芬那酸,环丁吗喃醇酒石酸盐,水杨酸胆碱,布他比妥,柠檬酸苄苯醇胺,柠檬酸苯海拉明,甲氧异丁嗪,盐酸桂麻黄碱眠尔通,等。

[0051] 抗生素:如,新霉素,链霉素,氯霉素,头孢菌素,氨比西林,青霉素,四环素,等);抗糖尿病药(如,胰岛素,双胍类,激素,硫酰脲衍生物类,等)。

[0052] 抗真菌药:如,灰黄霉素,酮康唑,两性霉素B,制霉菌素,杀念菌素,等。

[0053] 降压药:如,普萘洛尔,普罗帕酮,烯丙氧心安,硝苯吡啶,利血平,樟脑磺酸咪噻芬,盐酸酚苄明,帕吉林盐酸盐,脱甲氧利血平,二氮嗪,硫酸胍乙啶,长压定,萝芙木碱,硝普钠,缓脉灵,蛇根混合碱,甲磺酸酚妥拉明,利血平,等。

[0054] 抗肿瘤药:如,紫杉醇(Taxol)及其衍生物,多西紫杉醇(taxotere)及其衍生物,盐酸阿霉素,阿霉素,表阿霉素,柔红霉素,多柔比星,佐柔比星,苯丁酸氮芥(chlorambucil),苯乙酸氮芥,美法伦(melphalan),乌拉莫司汀(uranustine),磷酸雌莫司汀(estramustine),泼尼莫司汀(prednimustine),氮甲(formylmerphalan),异芳芥(betamerphalan),邻脂芳芥(ocaphane),环磷酰胺(cyclophosphamide),异环磷酰胺(ifosfamide),曲磷胺(trofosfamide),放线菌素,博来霉素,正定霉素,曲他胺(tretamine),替哌(triethylenephosphoramidate,TEPA),塞替派(thiotepa),亚胺醌(solaziquone),三亚胺醌(triaziquone),卡波醌(carboquone),丝裂霉素,米托蒽醌,比生群(bisantrene),依托泊苷,依托泊苷磷酸酯,替尼泊苷,5-氟尿嘧啶,替加氟(tegafur),双喃氟啶(tegadifur),去氧氟尿苷(doxifluridine),卡莫氟(carmofur),卡培他滨(capecitabine),盐酸阿糖胞苷(cytarabine hydrochloride),阿糖胞苷(cytarabine),单磷酸阿糖胞苷,二磷酸阿糖胞苷,三磷酸阿糖胞苷,依诺他宾(enocitabine),棕榈酰阿糖胞苷(N-palmitoyl-ara-C),安西他滨(ancitabine),阿扎胞苷(azacitidine),吉西他滨(gemcitabine),6-嘌呤硫醇一水合物,6-硫代次黄嘌呤核苷酸,磺硫嘌呤钠(sulfomercaprime sodium),硫鸟嘌呤,硫唑嘌呤,喷司他丁(pentostatin),氨基蝶呤(aminopterin),甲氨蝶呤(methotrexate),金属铂类衍生物(卡铂,顺铂,奥沙利铂,奈达

铂,舒铂,等),高三尖杉酯碱(homoharringtonine)及其衍生物,白消安(busulfan),卡莫司汀(BCNU),洛莫司汀(lomustine,CCNU),司莫司汀(semustine,Me-CCNU),尼莫司汀(nimustine,ACNU),尼莫司汀盐酸盐,雷莫司汀(ranimustine),链佐星(链脲霉素,streptozotocin),氯脲霉素(chlorozotocin,DCNU),雷替曲塞(raltitrexed),培美曲塞(pemetrexed),秋水仙碱(colchicine),秋水仙胺,鬼臼乙叉甙,干扰素,喜树碱及其衍生物(喜树碱,伊立替康,盐酸伊立替康,10-羟基喜树碱,拓扑替康,7-乙基-10-羟基喜树碱,盐酸拓扑替康,10-羟基喜树碱,等),苯芥胆甾醇,长春碱及其衍生物(长春碱,长春新碱,长春地辛(vindesine),长春瑞滨(vinorelbine),酒石酸长春瑞滨,盐酸长春瑞滨,等),甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate),达沙替尼(dasatinib),吉非替尼(gefitinib),厄洛替尼(erlotinib),索拉菲尼(sorafenib),苹果酸舒尼替尼(sunitinib malate),硼替佐米(bortezomib),三苯氧胺,鬼臼乙叉甙,哌酰硫烷,吡吩姆钠,二氢吡吩e6(Chlorin e6, Ce6),5-氨基酮戊酸(5-aminolaevulinic acid,ALA),维替泊芬(Verteporfin),替莫泊芬(temoporfin),酞菁硅,二氯酞菁硅,酞菁锌,靶向CD52重组人源化单抗(Campath, MabCampath),重组靶向人上皮生长因子受体IgG2K单抗(Vectibix),<sup>111</sup>In-标记和<sup>90</sup>Y-标记靶向CD20鼠单抗(Zevalin),靶向CD20<sup>131</sup>I-标记和非标记鼠单克隆抗体(BEXXAR),碘[<sup>131</sup>I]肿瘤细胞核人鼠嵌合单克隆抗体(唯美生,Vivatuxin),靶向CD33结合化疗药单抗(Mylotarg),靶向白介素2(白喉毒素融合蛋白(Ontak,Onzar),Kadcyla(ado-trastuzumab emtansine),天然LHRH多肽(布舍瑞林,Buserelin)及其衍生物,那法瑞林(Nafarelin),亮丙瑞林(Leuprolide),戈舍瑞林(Goserelin),曲普瑞林(Triptorelin),天冬酰胺酶,聚乙二醇化天冬酰胺酶,重组白介素2,重组肿瘤坏死因子,干扰素α2a,干扰素α2b,内皮抑制素),等。

[0055] 肿瘤并发症辅助治疗生物技术药物:如,重组角化细胞生长因子Palifermin,重组尿酸氧化酶Rasburicase,等。

[0056] 抗菌剂:如,硫酸丁胺卡那霉素,氨曲南,氯霉素,棕榈酸氯霉素,琥珀酸氯霉素钠,盐酸环丙沙星,盐酸克林霉素,棕榈酸克林霉素,磷酸克林霉素,甲硝唑,盐酸甲硝唑,硫酸庆大霉素,盐酸林可霉素,硫酸妥布拉霉素,盐酸万古霉素,硫酸多粘菌素B,多粘菌素E甲磺酸钠,硫酸多粘菌素E,银纳米粒子,等。

[0057] 抗病毒药:如,γ干扰素,叠氮胸苷,盐酸金刚烷胺,利巴韦林,无环鸟苷,等。

[0058] 抗微生物药:如,头孢菌素(头孢唑啉钠,头孢拉定,头孢克罗,头孢匹林钠,头孢唑肟钠,头孢哌酮钠,头孢替坦二钠,头孢呋肟酯,头孢噻肟钠,一水合头孢羟氨苄,头孢他啶,头孢氨苄,头孢噻吩钠,盐酸一水合头孢氨苄,头孢孟多钠,头孢西丁钠,头孢尼西钠,头孢雷特,头孢三嗪钠,头孢他啶,头孢羟氨苄,头孢拉定,头孢呋新钠,等);青霉素类(氨苄西林,阿莫西林,苄星青霉素G,邻氯青霉素,氨苄青霉素钠,青霉素G钾,青霉素V钾,氧哌嗪青霉素钠,苯唑青霉素钠,盐酸氨苄青霉素碳酯,邻氯青霉素钠,替卡西林钠,阿洛西林钠,羧苄青霉素钠卡茛西林,青霉素G钾,普鲁卡因青霉素G,甲氧西林钠,新青霉素III钠,等);

[0059] 红霉素类(琥乙红霉素,红霉素,无味红霉素,乳糖醛酸红霉素,红霉素硬脂酸酯,琥乙红霉素,等);

[0060] 四环素类(盐酸四环素,盐酸强力霉素,盐酸二甲胺四环素,等)。

[0061] 抗感染药:如,GM-CSF,等。

[0062] 激素:雄性激素类(如:达那唑,环戊丙酸睾酮,氟甲睾酮,乙基睾酮,庚酸睾酮,甲基睾酮,氟甲睾酮,环戊丙酸睾酮);

[0063] 雌激素类(如:雌二醇,雌酮,结合雌激素);

[0064] 孕酮类(如:醋酸甲氧孕酮,醋酸炔诺酮);

[0065] 皮质类固醇类(如:去炎松,倍他米松,磷酸倍他米松钠,地塞米松,磷酸地塞米松钠,醋酸地塞米松,强的松,甲基强的松龙悬液,去炎松缩酮,甲基强的松龙,磷酸强的松龙钠,琥珀酸甲基强的松龙钠,琥珀酸氢化考的松钠,琥珀酸甲基强的松龙钠,六氯化曲安缩松,氢化可的松,环戊丙酸氢化可的松,强的松龙,醋酸氟化可的松,醋酸帕拉米松,强的松龙叔丁乙酯,强的松龙醋酸酯,强的松龙磷酸钠,琥珀酸氢化可的松钠,等);

[0066] 甲状腺激素类(如:左旋甲状腺素钠,等)。

[0067] 蛋白质:如,脱氧核糖核酸酶,藻酸酶,超氧化歧化酶,脂肪酶,等。

[0068] 核酸:如,编码任何治疗用蛋白质的正义或反义核酸,包括这里提到的任何蛋白质,CPG寡核苷酸,等。

[0069] 红血球生成刺激剂:如,红细胞生成素,等。

[0070] 抗溃疡/抗反流药物:如,法莫替丁,甲氧咪胍,盐酸雷尼替丁,等。

[0071] 抗氧化药物:如,姜黄素等。

[0072] 在临床使用中,姜黄素可以用作促进伤口愈合,抗氧化,抗肿瘤,促进细胞迁移的作用,但是其溶解度较低,易于降解,姜黄素改性药物分子出现药效不完全和成本过高等问题。又由于肿瘤、创伤等部位基质金属蛋白酶9(MMP9)表达量升高,MMP9的底物主要是细胞外基质成分,包括IV型胶原等。于是,本发明试图使用明胶作为载体,搭载纳米化的姜黄素颗粒,在MMP9的作用下,明胶微米球降解,释放姜黄素颗粒,作用于病灶,姜黄素产生药理作用,MMP9降低,最终导致明胶微米球降解减少,使姜黄素纳米球释放减少,最终达到一种平衡状态。在病灶周围达到这种平衡状态有利于针对病灶的治疗,可以根据病灶的需要而释放相应量的药物,组成智能酶反馈缓释载药体系。这一过程中需要控制明胶微米球的粒径在1-20 $\mu\text{m}$ ,主要集中在5-15 $\mu\text{m}$ ,略小于细胞直径,不至于被细胞内吞。

[0073] 本发明还提供了一种制备上述酶与温度双响应性载药水凝胶的方法,适用于水溶性差、易于降解、生理活性持续时间短、共同作用于受体发挥作用的药物;先按以上质量百分含量称取各原料,制备方法包括如下步骤:

[0074] (1)、药物的纳米化:将药物溶解于其良性溶剂中,形成浓度为0.1-5mg/ml的药物溶液(浓度优选0.2-2mg/ml,更优选0.2-1mg/ml,最优选0.5mg/ml),良性溶剂根据药物理化性质选择,可选自四氢呋喃、乙醇、氯仿等中的一种或几种;在溶剂的搅拌转速为700-2000rpm(优选1000-1800rpm,更优选1300-1600rpm,最优选1500rpm)的条件下,缓慢加入药物溶液(药物溶液与溶剂的体积比为(1-10):100),搅拌10min-1h,通过药物自组装作用,形成药物纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除良性溶剂,然后真空冷冻干燥处理(真空度在10Pa以下,优选在5Pa以下,更优选在1Pa以下;温度低于-50 $^{\circ}\text{C}$ ),得到药物纳米颗粒。药物纳米颗粒的平均粒径为10-200nm,这样易于包被于微米级载体中,实现缓释功能;该纳米颗粒在今后的溶液稀释、冷冻干燥处理过程中不解离且不聚集。

[0075] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55 $^{\circ}\text{C}$ ,800-1500rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的药物纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌0.5-

2h,形成水相。取液体石蜡加入司盘-80 (Span-80) 中,55℃,800-1500rpm搅拌均匀,形成油相;液体石蜡与司盘-80的体积比为100:1。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55±1℃,搅拌速度为800-1500rpm,乳化30min,形成均匀的乳黄色乳液(水相和油相体积比为1:(2-20)),然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在800-1500rpm,乳化搅拌30min,加入乳黄色乳液体积1-5%的25wt%戊二醛溶液交联30min(即戊二醛溶液的加入体积为乳黄色乳液体积的1-5%),1000-3000rpm离心,弃上清,得到明胶固态微球,加入明胶固态微球10-20倍体积的异丙醇脱水20min(即异丙醇的加入体积为明胶固态微球体积的10-20倍),用离心机1000-6000rpm下(优选3000-5000rpm,更优选3500-4500rpm)离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5μm左右。该载药明胶微球在今后的冷冻干燥和溶液稀释过程中不解离、不团聚。

[0076] (3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载药明胶微球与泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68混合,得到酶与温度双响应性智能型缓释载药体系,即酶与温度双响应性载药水凝胶。

[0077] 用本发明方法制备得到的酶与温度双响应性载药水凝胶,是将纳米化的药物(或游离、配伍的药物)包被于明胶固态微球载体内部形成的均一三维网格结构中,可避免使用两种以上药物相互接触而产生化学反应影响药效,并能保证载药明胶微球作为MMP9的底物而酶解时,使载药明胶微球逐步降解并逐步释放药物,达到缓释的目的。

[0078] 本发明提供一种智能型病灶自控制药物缓释系统,载药明胶微球可以对创伤和肿瘤为代表的表达MMP9的病灶表现出酶响应性。载药明胶微球粒径在1-20μm,可以悬浮于生理盐水、培养基等等渗溶液中,与其他黏性溶剂混合贴合于病灶表面,可形成局部富集;并在富集部位形成药物释放和病灶MMP9表达的正反馈动态平衡,病灶MMP9表达升高,则载药明胶微球降解量升高,使药物释放量增加,富集至受体部位;反之亦然;实现了智能地调节药物释放,既可以减少药物对正常组织的毒性,又可以根据病灶需要释放有效剂量的药物。

[0079] 上述酶与温度双响应性载药水凝胶外敷于病灶表面后,首先固化为膏状,紧密贴合于病灶周围,并在病灶所释放的MMP9的作用下,载药明胶微球逐步裂解,并释放药物,药物分阶段逐步释放,并在病灶周围富集,发挥药理活性。本发明的载药水凝胶充分结合了纳米技术、酶响应性智能缓释体系和温度响应性热固贴合系统的三个优点(现有技术则不能同时具备这三个优点),使药物富集于病灶周围,并具有酶响应性缓释特点,与病灶靶位点特异性结合,减少药物富集在血液中,从而减少肝脏和肾脏负担。

[0080] 本发明制备得到的酶与温度双响应性载药水凝胶可用来载带抗菌药,消炎药,抗真菌药,抗病毒药,抗氧化药物,抗癌药等,使用时紧密贴合创伤表面,为机体缓慢释放上述药物,发挥药理作用,可用于烧伤、战创伤、手术伤口、冻伤、皮肤相关肿瘤、皮肤感染疾病、性传播疾病、口腔疾病、秃发、脚气等疾病。

[0081] 以下结合具体实施例,更具体地说明本发明的内容,并对本发明作进一步阐述,但这些实施例绝非对本发明进行限制。

[0082] 本发明特别研究生理盐水作为溶剂的水凝胶,其中,含1mg/ml纳米化的药物的生理盐水中,纳米化的药物粒径在100nm左右,包载纳米药物的明胶微米球粒径在1μm以上,优选为5-20μm,最优选5-10μm。

[0083] 按本发明方法制备得到一系列酶与温度双响应性载药水凝胶,其中各成分的终浓

度见表1所示。

[0084] 表1各实施例的水凝胶中成分的质量百分含量

	药物	明胶	泊洛沙姆 F127	泊洛沙姆 F68	溶剂	
实施例 1	0.01%	0.5%	30%	15%	54.49%	葡萄糖溶液
实施例 2	1%	25%	10%	2%	62%	磷酸盐缓冲液
实施例 3	0.1%	10%	20%	6%	63.9%	生理盐水
实施例 4	0.05%	1%	25%	10%	63.95%	生理盐水
实施例 5	0.5%	15%	15%	4%	65.5%	葡萄糖溶液
实施例 6	0.3%	20%	22%	5%	52.7%	生理盐水
实施例 7	0.8%	0.8%	24%	8%	66.4%	葡萄糖溶液
实施例 8	0.08%	5%	17%	3%	74.92%	磷酸盐缓冲液
实施例 9	0.4%	8%	12%	13%	66.6%	葡萄糖溶液
[0085] 实施例 10	0.2%	3%	28%	7%	61.8%	生理盐水
实施例 11	0.06%	13%	20%	9%	57.94%	磷酸盐缓冲液
实施例 12	0.7%	9%	18%	6%	66.3%	生理盐水
比较例 1	0.1%	10%	20%	6%	63.9%	生理盐水
比较例 2	0.1%	10%	20%	6%	63.9%	生理盐水
比较例 3	0.05%	1%	25%	10%	63.95%	生理盐水
比较例 4	0.05%	1%	25%	10%	63.95%	生理盐水
比较例 5	0.3%	20%	22%	5%	52.7%	生理盐水
比较例 6	0.3%	20%	22%	5%	52.7%	生理盐水
比较例 7	0.1%	40%	5%	30%	24.9%	生理盐水
比较例 8	0.1%	0.2%	40%	30%	29.7%	生理盐水

[0086] 实施例1:

[0087] (1)、药物的纳米化:将姜黄素作为药物溶解于四氢呋喃中,形成浓度为0.1mg/ml的药物溶液,转速为2000rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌30min,形成姜黄素的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除THF,然后在9Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到姜黄素纳米颗粒。姜黄素纳米颗粒的平均粒径为50-100nm。

[0088] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,800rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的姜黄素纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌2h,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45μl的司盘-80(Span-80),55℃,800rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55±1℃,搅拌速度为800rpm,乳化30min,形成均匀的乳黄色乳液,然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在800rpm,乳化搅

拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机6000rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5μm左右。

[0089] (3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载药明胶微球与泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68混合,得到酶与温度双响应性载药水凝胶,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0090] 实施例2:

[0091] (1)、药物的纳米化:将姜黄素作为药物溶解于乙醇中,形成浓度为5mg/ml的药物溶液,转速为700rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌2h,形成姜黄素的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除乙醇,然后在7Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到姜黄素纳米颗粒。在扫描电镜下观察姜黄素纳米颗粒的平均粒径为100nm。

[0092] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,1500rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的姜黄素纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌0.5h,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45μl的司盘-80(Span-80),55℃,1500rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55±1℃,搅拌速度为1500rpm,乳化30min,形成均匀的乳黄色乳液,然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在1500rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机1000rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5μm左右。

[0093] (3)、同实施例1,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0094] 实施例3:

[0095] (1)、药物的纳米化:将姜黄素作为药物溶解于THF中,形成浓度为0.5mg/ml的药物溶液,转速为1500rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌1h,形成姜黄素的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除THF,然后在1Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到姜黄素纳米颗粒。在扫描电镜下观察姜黄素纳米颗粒的平均粒径为50-100nm。

[0096] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,1000rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的姜黄素纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌1h,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45μl的司盘-80(Span-80),55℃,1000rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55±1℃,搅拌速度为1000rpm,乳化30min,形成均匀的乳黄色乳液,然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在1000rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机4000rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5μm左右。

[0097] (3)、同实施例1,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0098] 实施例4:

[0099] (1)、药物的纳米化:将10-羟基喜树碱作为药物溶解于四氢呋喃中,形成浓度为0.2mg/ml的药物溶液,转速为1000rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌45min,形成10-羟基喜树碱的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除四氢呋喃,然后在4Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到10-羟基喜树碱纳米颗粒。在扫描电镜下观察10-羟基喜树碱纳米颗粒的平均粒径为50-100nm。

[0100] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,900rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的10-羟基喜树碱纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌1.5h,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45 $\mu$ l的司盘-80(Span-80),55℃,900rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55 $\pm$ 1℃,搅拌速度为900rpm,乳化30min,形成均匀的乳白色乳液,然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在900rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机5000rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5 $\mu$ m左右。

[0101] (3)、同实施例1,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0102] 实施例5:

[0103] (1)、药物的纳米化:将10-羟基喜树碱作为药物溶解于四氢呋喃中,形成浓度为2mg/ml的药物溶液,转速为1800rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌1.5h,形成10-羟基喜树碱的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除四氢呋喃,然后在3Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到10-羟基喜树碱纳米颗粒。在扫描电镜下观察10-羟基喜树碱纳米颗粒的平均粒径为50-100nm。

[0104] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,1100rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的10-羟基喜树碱纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌100min,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45 $\mu$ l的司盘-80(Span-80),55℃,1100rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55 $\pm$ 1℃,搅拌速度为1100rpm,乳化30min,形成均匀的乳白色乳液,然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在1100rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机3000rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5 $\mu$ m左右。

[0105] (3)、同实施例1,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0106] 实施例6:

[0107] (1)、药物的纳米化:将紫杉醇作为药物溶解于无水乙醇中,形成浓度为0.2mg/ml的药物溶液,转速为1300rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌100min,形成紫杉醇的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除无水乙醇,然后在2Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到紫杉醇纳米颗粒。在扫描电镜下观察紫杉醇纳米颗粒的平均粒径为50-200nm。

[0108] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,1200rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的紫杉醇纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌50min,形成

水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45 $\mu$ l的司盘-80 (Span-80),55 $^{\circ}$ C,1200rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C,搅拌速度为1200rpm,乳化30min,形成均匀的乳白色乳液,然后快速移到4 $^{\circ}$ C的冰水浴中,转速保持在1200rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机4500rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40 $^{\circ}$ C下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5 $\mu$ m左右。

[0109] (3)、同实施例1,其相变温度为33 $^{\circ}$ C,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0110] 实施例7:

[0111] (1)、药物的纳米化:将紫杉醇作为药物溶解于无水乙醇中,形成浓度为1mg/ml的药物溶液,转速为1600rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌50min,形成紫杉醇的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除无水乙醇,然后在5Pa真空度,温度低于-50 $^{\circ}$ C冷冻干燥,得到紫杉醇纳米颗粒。在扫描电镜下观察紫杉醇纳米颗粒的平均粒径为50-200nm。

[0112] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55 $^{\circ}$ C,1300rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的紫杉醇纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌45min,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45 $\mu$ l的司盘-80 (Span-80),55 $^{\circ}$ C,1300rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C,搅拌速度为1300rpm,乳化30min,形成均匀的乳白色乳液,然后快速移到4 $^{\circ}$ C的冰水浴中,转速保持在1300rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机3500rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40 $^{\circ}$ C下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5 $\mu$ m左右。

[0113] (3)、同实施例1,其相变温度为33 $^{\circ}$ C,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0114] 实施例8:

[0115] (1)、药物的纳米化:将紫杉醇作为药物溶解于无水乙醇中,形成浓度为1mg/ml的药物溶液,转速为1600rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌50min,形成紫杉醇的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除无水乙醇,然后在5Pa真空度,温度低于-50 $^{\circ}$ C冷冻干燥,得到紫杉醇纳米颗粒。在扫描电镜下观察紫杉醇纳米颗粒的平均粒径为50-200nm。

[0116] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55 $^{\circ}$ C,1300rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的伊曲康唑纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌45min,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45 $\mu$ l的司盘-80 (Span-80),55 $^{\circ}$ C,1300rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C,搅拌速度为1300rpm,乳化30min,形成均匀的乳黄色乳液,然后快速移到4 $^{\circ}$ C的冰水浴中,转速保持在1300rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机3500rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40 $^{\circ}$ C下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球,备用,载药明胶微球的粒径在5 $\mu$ m左右。

[0117] (3)、同实施例1,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0118] 实施例9:

[0119] (1)、药物的纳米化:按实施例3的步骤(1)得到姜黄素纳米颗粒;按实施例4的步骤(1)得到10-羟基喜树碱纳米颗粒。

[0120] (2)、形成载药明胶微球:按实施例3的步骤(2)得到载姜黄素明胶微球;按实施例4的步骤(2)得到载10-羟基喜树碱明胶微球。

[0121] (3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载姜黄素明胶微球、载10-羟基喜树碱明胶微球、泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68、生理盐水混合,得到酶与温度双响应性载药水凝胶,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0122] 实施例10:

[0123] (1)、药物的纳米化:按实施例3的步骤(1)得到姜黄素纳米颗粒;按实施例6的步骤(1)得到紫杉醇纳米颗粒。

[0124] (2)、形成载药明胶微球:按实施例3的步骤(2)得到载姜黄素明胶微球;按实施例6的步骤(2)得到载紫杉醇明胶微球。

[0125] (3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载姜黄素明胶微球、载紫杉醇明胶微球、泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68、生理盐水混合,得到酶与温度双响应性载药水凝胶,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0126] 实施例11:

[0127] (1)、药物的纳米化:按实施例5的步骤(1)得到10-羟基喜树碱纳米颗粒;按实施例7的步骤(1)得到紫杉醇纳米颗粒。

[0128] (2)、形成载药明胶微球:按实施例4的步骤(2)得到载10-羟基喜树碱明胶微球;按实施例7的步骤(2)得到载紫杉醇明胶微球。

[0129] (3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载10-羟基喜树碱明胶微球、载紫杉醇明胶微球、泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68、生理盐水混合,得到酶与温度双响应性载药水凝胶,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0130] 实施例12:

[0131] (1)、药物的纳米化:按实施例2的步骤(1)得到姜黄素纳米颗粒;按实施例5的步骤(1)得到10-羟基喜树碱纳米颗粒;按实施例6的步骤(1)得到紫杉醇纳米颗粒。

[0132] (2)、形成载药明胶微球:按实施例2的步骤(2)得到载姜黄素明胶微球;按实施例5的步骤(2)得到载10-羟基喜树碱明胶微球;按实施例6的步骤(2)得到载紫杉醇明胶微球。

[0133] (3)、形成载药水凝胶:步骤(2)得到的载姜黄素明胶微球、载10-羟基喜树碱明胶微球、载紫杉醇明胶微球、泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68、生理盐水混合,得到酶与温度双响应性载药水凝胶,其相变温度为33℃,涂布于皮肤表面并能迅速凝固。

[0134] 比较例1:

[0135] (1)、药物的纳米化:将姜黄素作为药物溶解于THF中,形成浓度为0.5mg/ml的药物溶液,转速为300rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌1h,形成姜黄素的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除THF,然后在1Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到姜黄素纳米颗粒。在扫描电镜下观察姜黄素无法形成均匀的纳米颗粒,不能进行后续步骤。

[0136] 比较例2:

[0137] (1)、药物的纳米化:将姜黄素作为药物溶解于THF中,形成浓度为0.5mg/ml的药物溶液,转速为2500rpm的条件下搅拌生理盐水,然后向其中缓慢加入药物溶液,均匀搅拌1h,形成姜黄素的纳米颗粒溶液;静置24h后,旋蒸去除THF,然后在1Pa真空度,温度低于-50℃冷冻干燥,得到姜黄素纳米颗粒。在扫描电镜下观察姜黄素纳米颗粒的平均粒径为10-150nm,颗粒大小极不均一,不能进行后续步骤。

[0138] 比较例3:

[0139] (1)、药物的纳米化:同实施例4。

[0140] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,300rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的多粘菌素B纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌1.5h,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45μl的司盘-80(Span-80),55℃,300rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55±1℃,搅拌速度为300rpm,乳化30min,形成均匀的乳黄色乳液,然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在300rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机5000rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球。载药明胶微球的粒径大部分在大于20微米的区间范围内,且粒径分布不均一,会聚集成团,在超声作用下也难解聚,不能进行后续步骤。

[0141] 比较例4:

[0142] (1)、药物的纳米化:同实施例4。

[0143] (2)、形成载药明胶微球:将明胶加入到双蒸水中,55℃,2000rpm搅拌,得到10wt%的明胶溶液;将步骤(1)得到的多粘菌素B纳米颗粒缓慢加入明胶溶液中,充分搅拌1.5h,形成水相。取4.5ml的液体石蜡,加入45μl的司盘-80(Span-80),55℃,2000rpm搅拌均匀,形成油相。将水相缓慢均匀滴加到油相中,滴加时油相保持在55±1℃,搅拌速度为2000rpm,乳化30min,形成均匀的乳黄色乳液,然后快速移到4℃的冰水浴中,转速保持在2000rpm,乳化搅拌30min,加入2ml 25wt%戊二醛溶液交联30min,加入20ml异丙醇脱水20min,用离心机5000rpm转速下离心,乙醚、异丙醇交替冲洗三次,得到流动性粉末,把流动性粉末平铺在表面皿上,40℃下真空干燥去除有机溶剂,得到载药明胶微球。载药明胶微球有明显的聚集成团现象,经超声处理也不能明显改善,不能进行后续步骤。

[0144] 比较例5

[0145] (1)、药物的纳米化:同实施例6。

[0146] (2)、形成载药明胶微球:同实施例6,仅是离心机转速为8000rpm,得到载药明胶微球。载药明胶微球有明显的聚集成团的现象,经超声处理不能明显解聚,不能进行后续步骤。

[0147] 比较例6:

[0148] (1)、药物的纳米化:同实施例6。

[0149] (2)、形成载药明胶微球:同实施例6,仅是离心机转速为500rpm,有机相和无机相不能得到很好的分离,无法得到载药明胶微球,不能进行后续步骤。

[0150] 比较例7:

[0151] 步骤(1)-步骤(3)均同实施例3,仅是各原料的质量百分含量有调整,见表1。此条件下,无法形成相变温度在 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的温敏水凝胶。

[0152] 比较例8:

[0153] 步骤(1)-步骤(3)均同实施例3,仅是各原料的质量百分含量有调整,见表1。此条件下,无法形成相变温度在 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的温敏水凝胶。

[0154] 比较例9:

[0155] 按实施例3的步骤(2),不加入步骤(1)的药物纳米颗粒,得到不载药明胶微球。

[0156] 步骤(3)均同实施例3,得到不载药水凝胶。

[0157] 由于比较例1-8均不能形成载药水凝胶,因此未进行以下检测。

[0158] 检测例1:

[0159] 将实施例1-12步骤(2)所得到的载药明胶微球、比较例9得到的不载药明胶微球分别与生理盐水按1:1000-1:10000稀释,超声混匀作用360s,取10-50 $\mu\text{L}$ 悬浮液滴于载玻片,在普通光学显微镜观察并拍摄明胶微球照片。同时,随机选取5-10张不同区域、不同批次明胶微球的照片,使用Nano measurer 1.2软件测量明胶微球粒径,并使用Excel软件对数据进行处理,得出明胶微球粒径分布。

[0160] 以实施例3的结果为例,如图1和图2所示。从图1可以看出,本发明的载药明胶微球和不载药明胶微球颗粒均一,其粒径均在10 $\mu\text{m}$ 左右,与细胞直径在同一数量级且略小于细胞直径,适合作为药物载体使用。从图2可以看出,本发明的载药明胶微球的粒径分布在8.5-16 $\mu\text{m}$ 。以实施例1的结果如图3所示,可以看出,本发明可成功制备出载药明胶微球,其粒径为20 $\mu\text{m}$ 左右,略微大于细胞直径。

[0161] 其它实施例与实施例1结果类似,不再一一赘述。

[0162] 检测例2:

[0163] 将实施例1-12步骤(2)所得到的载药明胶微球冷冻干燥,并称重。把获得冷冻干燥的载药明胶微球使用四氢呋喃分别以1:1000、1:10000、1:100000和1:1000000的比例稀释,使用Ensignht对上述样品在432nm处进行吸光度实验,得出吸光度数值。并且代入标准曲线公式,根据上述稀释比例选择在线性区间内的数据计算得出药物浓度,并计算药物含量。根据如下公式计算包封率和载药量。

[0164] 包封率=实验测得药物质量/投药量 $\times 100\%$ ;

[0165] 载药量=实验测得药物质量/载药明胶微球总质量 $\times 100\%$ 。

[0166] 以实施例3为例,所得结果为:包封率:94.82%,载药量:24.75%

[0167] 所得结果完全满足药物载体的要求,包封率接近95%,说明在制剂制备的过程中可以做到最小程度的药物的浪费;载药量接近25%,说明单个载姜黄素明胶微球含药量较大,较少引入药物之外的其他成分,对疾病治疗、药物利用率有积极影响。

[0168] 检测例3:

[0169] 将实施例1-12中所需原料泊洛沙姆F127、泊洛沙姆F68分别以0.1、1、10、100、1000mg/mL的浓度添加至DMEM和 $\alpha$ -MEM培养基中,分别于BJ和Hacat细胞共培养24h,使用MTT法检测细胞活性。以实施例3为例,结果如图4所示,表明在使用剂量下,泊洛沙姆F127、F68是生物安全的。

[0170] 检测例4:

[0171] 将实施例1-12步骤(2)中所得载药明胶微球以1毫克/毫升的浓度溶解至磷酸盐缓冲液(PBS溶液)中,分别与0、1、5、10、20、50纳摩/升的MMP9在100rpm、37℃的摇床上共同孵育72h。待微米颗粒沉淀,吸取上清液使用四氢呋喃以1:100、1:1000、1:10000倍比稀释,使用Ensignt对上述样品在432nm处进行吸光度实验,将合适浓度代入标准曲线公式,根据上述稀释比例选择在线性区间内的数据计算得出药物浓度,并计算药物含量。根据如下公式计算载药明胶微球其中药物释放量。

[0172] 药物释放量=测得药物含量/载药明胶微球所含药物总量。

[0173] 以实施例3为例,所得实验结果如图5。图5结果显示MMP9对载药明胶微球的降解可以通过姜黄素释放表征,包载于明胶微球中的姜黄素不表现光谱特征,姜黄素释放到溶液中,其吸光度与其浓度呈正相关。由此可以推测姜黄素在体内可高表达于病灶区域,药物分子可以通过MMP9作用于载姜黄素明胶微球而促使药物分子释放。

[0174] 检测例5:

[0175] 将实施例1-12步骤(2)中所得载药明胶微球以1mg/mL的浓度溶解至含有10nM MMP9的磷酸盐缓冲液(PBS溶液)中,取1mL置于透析袋中,透析介质为含有10nM MMP9的PBS溶液,在100rpm、37℃的摇床上孵育,在10min、30min、1h、2h、4h、10h、24h、48h、72h分别取透析外液,使用Ensignt对上述样品在432nm处进行吸光度实验,将合适浓度代入标准曲线公式,根据上述稀释比例选择在线性区间内的数据计算得出药物浓度,并计算药物含量。根据如下公式计算载药明胶微球其中药物释放量。

[0176] 药物释放量=测得药物含量/载药明胶微球所含药物总量。

[0177] 以实施例3为例,所得实验结果如图6。图6结果显示不同时间下,载药明胶微球中姜黄素药物的释放情况,随着时间延长,检测到的药物释放量增多,呈现缓释的效果。

[0178] 检测例6:

[0179] 将实施例1-12步骤(3)中所得到的酶与温度双响应性载药温敏水凝胶和比较例9得到的不载药水凝胶分别给予糖尿病模型小鼠伤口治疗。具体如下:采用STZ造糖尿病模型,Ba1B/C小鼠连续注射STZ5天,并连续观察14天以上至小鼠血糖值稳定在280毫克/分升以上,在无菌条件下在小鼠背部做直径1厘米的环形切口,给予药物并使用3M创伤贴包扎;每天观察测量伤口面积。

[0180] 以实施例3为例,其结果如图7,表明包载姜黄素的明胶微球的治疗效果优于单独使用温敏水凝胶。

[0181] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

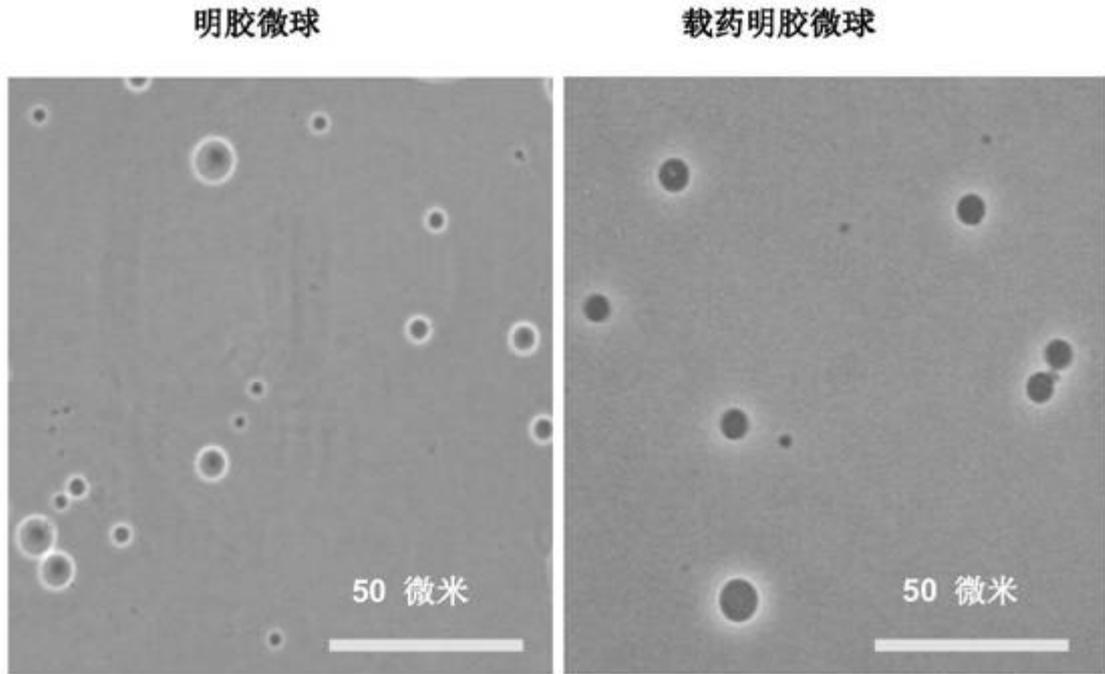


图1

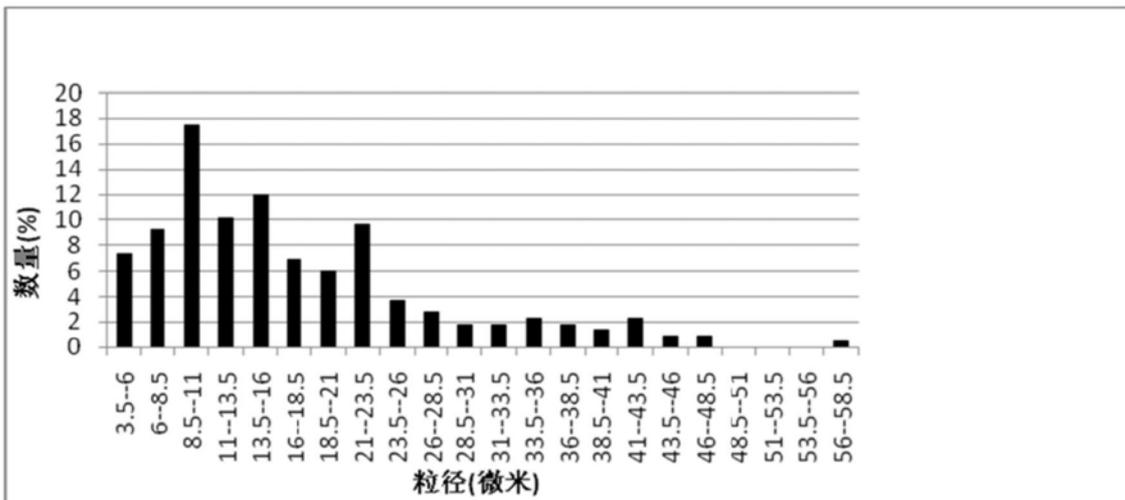


图2

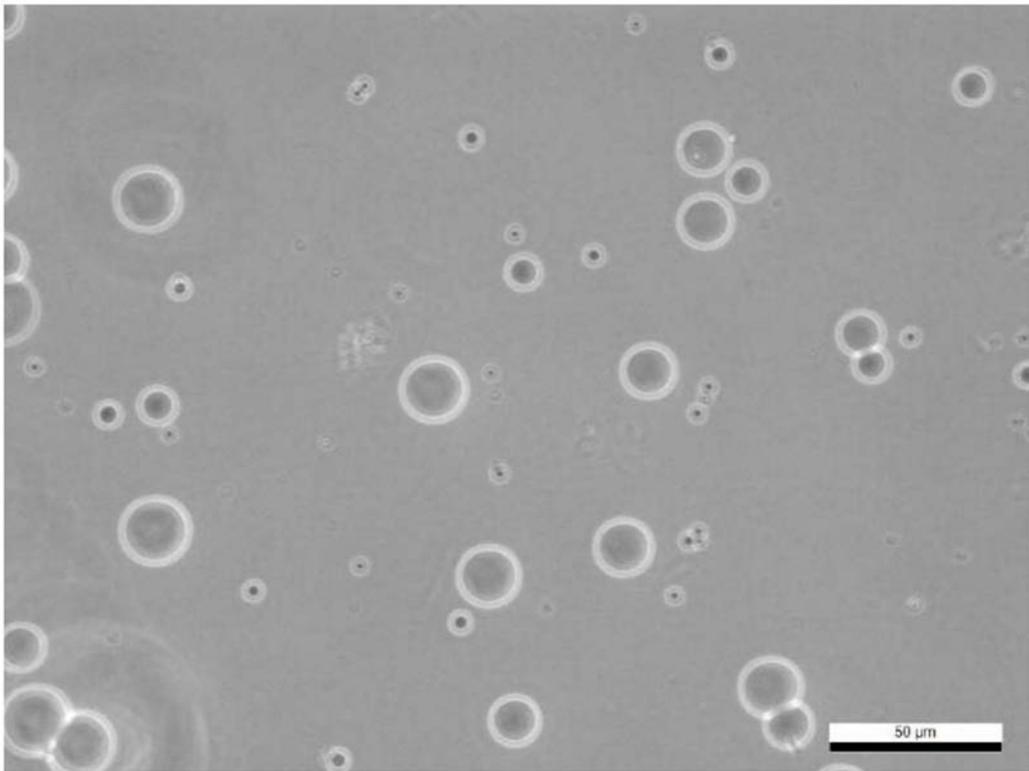


图3

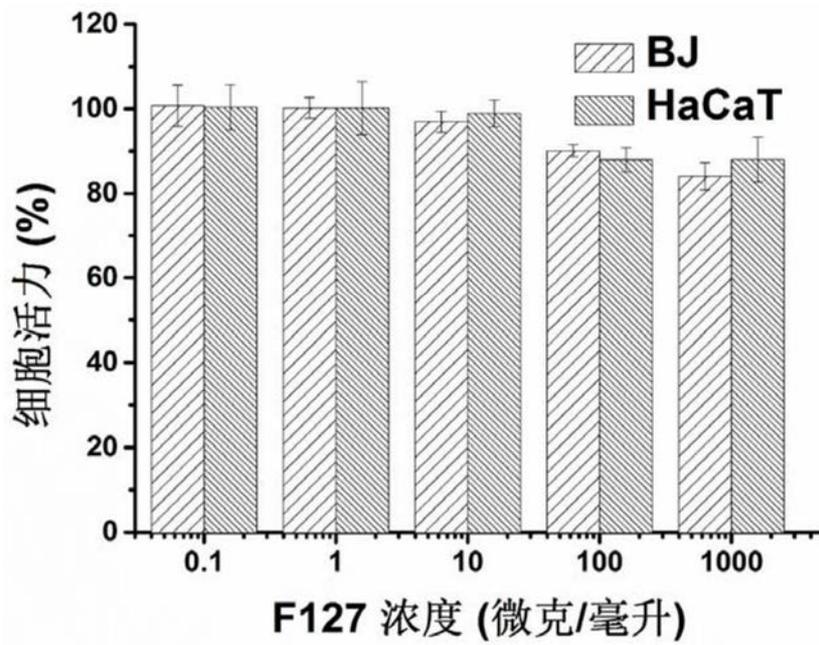


图4

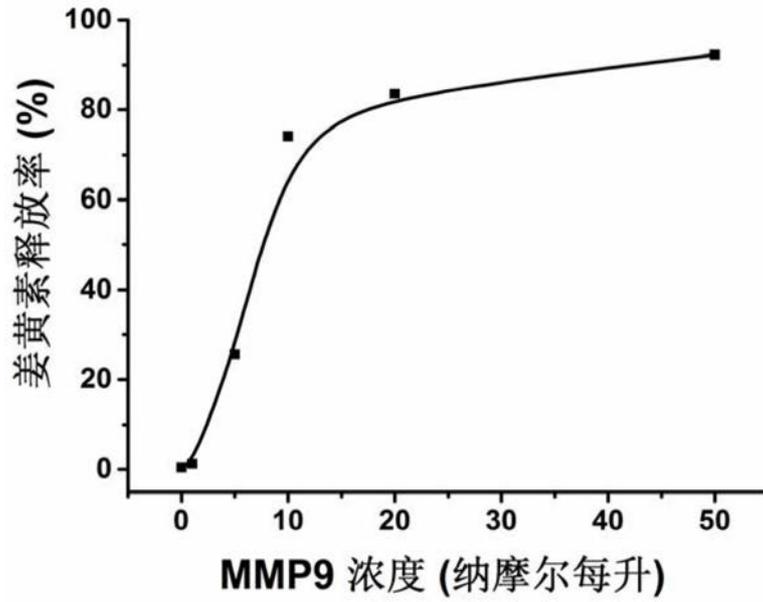


图5

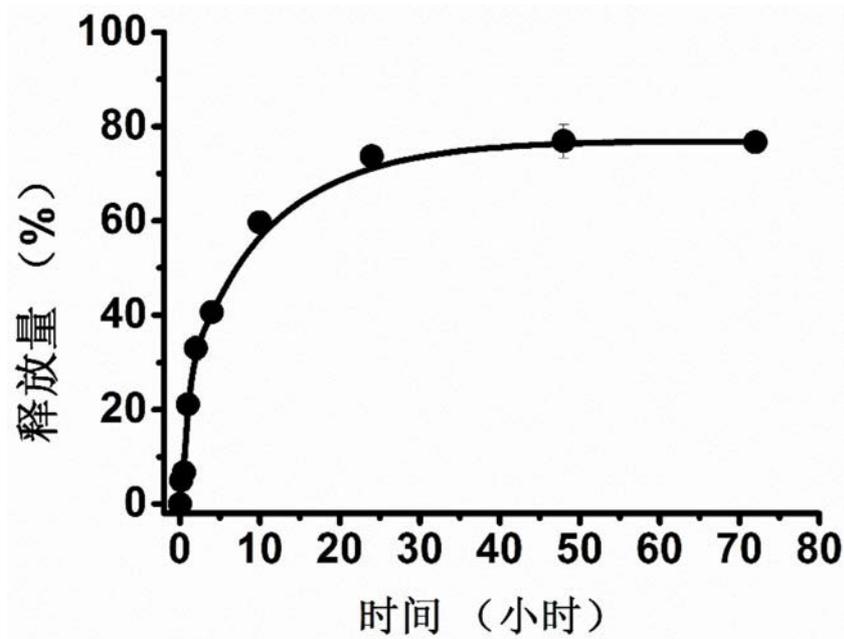


图6

温敏水凝胶

姜黄素明胶微球

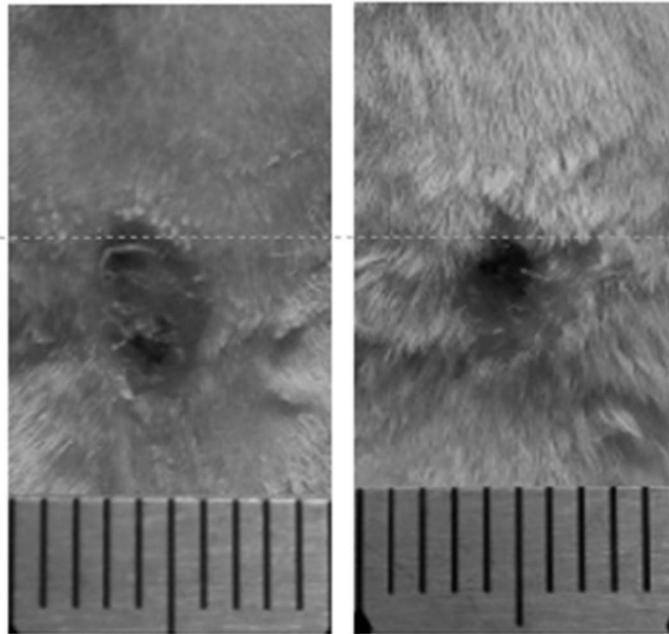


图7