(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108619552 B
(45)授权公告日 2021.06.08

(21)申请号 201710176480.0
(22)申请日 2017.03.23
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108619552 A
(43)申请公布日 2018.10.09
(73)专利权人 苏州明镜医疗科技有限公司
地址 215011 江苏省苏州市苏州高新区锦峰路8号1号楼301-14室
(72)发明人 陈勇 凌中华 谈华平 蔡腾 谢发荣 范文斌 冯金柱
(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218
代理人 瞿网兰 邢贤冬
(51)Int.Cl.
C07K 14/78(2006.01)
A61L 15/32(2006.01)
A61L 15/40(2006.01)
A61L 15/42(2006.01)
A61L 15/64(2006.01)
A61L 15/26(2006.01)
A61L 15/28(2006.01)
A61L 15/48(2006.01)
C07K 1/14(2006.01)

审查员 周丹

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料，以GGTA1基因敲除猪肌腱为原料提取胶原；将胶原溶于乙酸溶液得胶原溶胀液，胶原溶胀液经真空脱泡后进行冷冻处理，在冷冻干燥机冻干获得胶原多孔海绵支架；将可吸收材料制成多孔海绵支架、膜或凝胶后覆盖在胶原多孔海绵支架上制成可吸收创面修复材料；或将胶原溶于乙酸溶液得胶原溶胀液，再将可吸收材料制成膜置于胶原溶胀液底部，经真空脱泡后进行冷冻处理，在冷冻干燥机冻干制成可吸收创面修复材料。本发明采用GGTA1基因敲除猪肌腱制备创面修复支架，能显著减少创面修复后瘢痕的形成，胶原表面覆盖可吸收材料，有利于胶原支架的吸附，防止胶原遇水后融化流失。

CN 108619552 B

1.一种吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料，其特征在于该可吸收创面修复材料以GGTA1基因敲除猪肌腱为原料，采用胰酶消化与酸抽提相结合的方法提取胶原；

将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液，胶原溶胀液经真空脱泡后进行冷冻处理，最后在冷冻干燥机冻干获得胶原多孔海绵支架；将可吸收材料制成的多孔海绵支架、膜或凝胶覆盖在胶原多孔海绵支架上制成可吸收创面修复材料；

或将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液，再将可吸收材料制成的膜置于胶原溶胀液底部，经真空脱泡后进行冷冻处理，最后在冷冻干燥机冻干制成可吸收创面修复材料。

2.根据权利要求1所述的可吸收创面修复材料，其特征在于所述的可吸收创面修复材料采用戊二醛进行交联处理，获得三维支架。

3.根据权利要求2所述的可吸收创面修复材料，其特征在于所述的交联处理为：将所述的可吸收创面修复材料浸泡0.2～0.3%w/v的戊二醛水溶液中，4～8℃交联10～12小时，取出，用超纯水漂洗以去除残留的戊二醛，最后经过冷冻干燥，即获得交联后的三维支架。

4.根据权利要求1、2或3所述的可吸收创面修复材料，其特征在于所述的胶原由以下方法制备而成：

(1)、取新鲜GGTA1 基因敲除猪肌腱，预处理后，于冷冻状态下，用手术刀将肌腱削为薄片，然后捣碎；肌腱粉碎物用醋酸洗必泰消毒，然后用生理盐水洗涤；

(2)、消毒后的肌腱浸泡于浓度为0.25%的胰酶/PBS消化液中在37℃下消化20～26小时；

(3)、消化结束后，加入肌腱质量0.3～0.5%的双氧水浸泡10～15分钟，然后用超纯水反复清洗；

(4)、按照步骤(1)中肌腱粉碎物：2～4%w/v乙酸溶液质量体积比1g：16～20mL，先往经过消化处理的肌腱中加入少量乙酸溶液搅拌混匀，再加入余量乙酸溶液，于4～8℃溶胀60～72小时；

(5)、过滤除去未溶胀的肌腱颗粒，溶胀物离心，以分离除去不溶物；上清液用5%NaCl溶液盐析，获得沉淀物；

(6)、沉淀物按照步骤(4)进行溶胀后，重复步骤(5)的操作；

(7)、在4～8℃下，步骤(6)获得的沉淀物于超纯水中用截留分子量为3000的透析袋透析，每隔12小时换一次水，换水4～6次；经过透析纯化后的胶原冷冻干燥，于-20℃下保存。

5.根据权利要求4所述的可吸收创面修复材料，其特征在于所述的GGTA1 基因敲除猪肌腱预处理为：去除肌肉、脂肪，去除筋膜，用超纯水反复清洗后，装于PE样品袋中-30℃保存。

6.根据权利要求1、2或3所述的可吸收创面修复材料，其特征在于所述的可吸收材料为丝蛋白、聚乳酸、壳聚糖及其衍生物、透明质酸或藻酸盐。

7.权利要求1所述的吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1)、以GGTA1基因敲除猪肌腱为原料，采用胰酶消化与酸抽提相结合的方法提取胶原；

(2)、将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液，胶原溶胀液经真空脱泡后进行冷冻处理，最后在冷冻干燥机冻干获得胶原多孔海绵支架，将可吸收材料制成的多孔海绵支架、膜或凝胶覆盖在胶原多孔海绵支架上制成可吸收创面修复材料；

或将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液，再将可吸收材料制成的膜置于胶原溶胀液底部，经真空脱泡后进行冷冻处理，最后在冷冻干燥机冻干制成可吸收创面修复材料。

8.根据权利要求7所述的可吸收创面修复材料的制备方法，其特征在于所述的可吸收创面修复材料采用戊二醛进行交联处理，获得三维支架。

9.根据权利要求7所述的可吸收创面修复材料的制备方法，其特征在于所述的胶原的制备方法具体步骤如下：

(1)、取新鲜GGTA1 基因敲除猪肌腱，预处理后，于冷冻状态下，用手术刀将肌腱削为薄片，然后捣碎；肌腱粉碎物用醋酸洗必泰消毒，然后用生理盐水洗涤；

(2)、消毒后的肌腱浸泡于浓度为0.25%的胰酶/PBS消化液中在37℃下消化20～26小时；

(3)、消化结束后，加入肌腱质量0.3～0.5%的双氧水浸泡10～15分钟，然后用超纯水反复清洗；

(4)、按照步骤(1)中肌腱粉碎物：2～4%w/v乙酸溶液质量体积比1g：16～20mL，先往经过消化处理的肌腱中加入少量乙酸溶液搅拌混匀，再加入余量乙酸溶液，于4～8℃溶胀60～72小时；

(5)、过滤除去未溶胀的肌腱颗粒，溶胀物离心，以分离除去不溶物；上清液用5%NaCl溶液盐析，获得沉淀物；

(6)、沉淀物按照步骤(4)进行溶胀后，重复步骤(5)的操作；

(7)、在4～8℃下，步骤(6)获得的沉淀物于超纯水中用截留分子量为3000的透析袋透析，每隔12小时换一次水，换水4～6次；经过透析纯化后的胶原冷冻干燥，于-20℃下保存。

10.根据权利要求7所述的可吸收创面修复材料的制备方法，其特征在于所述的可吸收材料为丝蛋白、聚乳酸、壳聚糖及其衍生物、透明质酸或藻酸盐。

吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料及其制备方法。

背景技术

[0002] VSD技术是将传统的负压引流方法与封闭负压引流填充敷料相结合的产物，它通过在创面形成负压，产生机械和生物学效应，促进创面愈合。因此必须使用专用的创面填充敷料，敷料是能够起到暂时保护伤口、防止感染和促进愈合的医用材料。

[0003] 人工敷料一般可分为三大类：传统敷料、合成敷料和生物敷料。传统敷料是临床上使用的主要敷料：其缺点在于：无法保持创面湿润，创面愈合延迟；敷料纤维易脱落，造成异物反应；肉芽组织易长如敷料网眼中致粘连结痂，换药时导致新生组织损伤；敷料更换时易导致外源性感染；换药工作量大。合成敷料常用聚乙烯醇、聚氨酯、丙烯酰胺和羧甲基纤维等材料制成，其不足之处主要为易碎、机械性能差、水蒸汽透过率低而大量保持液体，易导致膜下积液加重感染。生物敷料是一种接近于理想要求的敷料，主要分为天然生物敷料、人工生物敷料和组织工程覆盖物，天然生物敷料包括自体皮、同种异体皮和异种皮。生物敷料除了具有一定的强度、刚度、韧性和生物学相容性外，还必须具有一定的降解性，以便被生物体吸收和排泄。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料及其制备方法，采用GGTA1基因敲除猪肌腱制备创面修复支架，显著减少创面修复后瘢痕的形成，在胶原表面覆盖可吸收材料，有利于胶原支架的吸附，防止胶原遇水后融化流失，避免揭除敷料时将胶原支架撕脱，避免与周围组织粘连，可吸收材料可存留体中。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的：

[0006] 一种吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料，它以GGTA1基因敲除猪肌腱为原料，采用胰酶消化与酸抽提相结合的方法提取胶原；将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液，胶原溶胀液经真空脱泡后进行冷冻处理，最后在冷冻干燥机冻干获得胶原多孔海绵支架，将可吸收材料制成的多孔海绵支架、膜或凝胶覆盖在胶原多孔海绵支架上制成可吸收创面修复材料；或将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液，再将可吸收材料制成的膜置于胶原溶胀液底部，经真空脱泡后进行冷冻处理，最后在冷冻干燥机冻干制成可吸收创面修复材料。

[0007] 作为本发明吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料进一步的优选方案，所述的可吸收创面修复材料采用戊二醛进行交联处理，获得三维支架，以提高稳定性。交联处理的操作步骤为：将所述的可吸收创面修复材料浸泡在0.2～0.3％(w/v)，优选为0.25％的戊二醛水溶液中，4～8℃交联10～12小时，取出，用超纯水漂洗以去除残留的戊二

醛，最后经过冷冻干燥，即获得交联后的三维支架。

[0008] 优选的，交联处理的操作步骤为：将所述的可吸收创面修复材料浸泡在0.25％的戊二醛水溶液中，4℃交联12小时，取出，用超纯水漂洗以去除残留的戊二醛，最后经过冷冻干燥，即获得交联后的三维支架。

[0009] 本发明胶原多孔海绵支架表面覆盖可吸收材料后，为了保持胶原蛋白生物活性，亦可不进行戊二醛交联。

[0010] 所述的胶原由以下方法制备而成：

[0011] (1)、取新鲜GGTA1基因敲除猪肌腱，预处理后，于冷冻状态下，用手术刀将肌腱削为薄片，然后捣碎；肌腱粉碎物用醋酸洗必泰消毒，然后用生理盐水洗涤；

[0012] (2)、消毒后的肌腱浸泡于浓度为0.25％的胰酶/PBS消化液中在37℃下消化20～26小时；

[0013] (3)、消化结束后，加入肌腱质量0.3～0.5％的双氧水浸泡10～15分钟，然后用超纯水反复清洗；所述的双氧水的质量分数为3％；

[0014] (4)、按照步骤(1)中肌腱粉碎物：2～4％(w/v)乙酸溶液质量体积比1：16～20(单位g：mL)，先往经过消化处理的肌腱中加入少量乙酸溶液搅拌混匀，再加入余量乙酸溶液，于4～8℃溶胀60～72小时；

[0015] (5)、过滤除去未溶胀的肌腱颗粒，溶胀物离心，以分离除去不溶物；上清液用5％NaCl溶液盐析，获得沉淀物；

[0016] (6)、沉淀物按照步骤(4)进行溶胀后，重复步骤(5)的操作；

[0017] (7)、在4～8℃下，步骤(6)获得的沉淀物于超纯水中用截留分子量为3000的透析袋透析，每隔12小时换一次水，换水4～6次；经过透析纯化后的胶原冷冻干燥，最后于-20℃下保存。

[0018] 步骤(1)中，所述的GGTA1基因敲除猪肌腱预处理包括：去除肌肉、脂肪，去除筋膜，用超纯水反复清洗后，装于PE样品袋中-30℃保存。

[0019] 步骤(4)中，所述的乙酸溶液的浓度优选为3％，溶胀温度优选为4℃，溶胀时间优选为72小时。

[0020] 步骤(7)中，透析温度优选为4℃；每隔12小时换一次水，透析72h；所述的冷冻干燥温度-10～-50℃，压力1.3～13Pa。

[0021] 所述的可吸收材料为丝蛋白、聚乳酸、壳聚糖及其衍生物如羧甲基壳聚糖、透明质酸、藻酸盐。具体的，丝蛋白、聚乳酸、藻酸盐可以制成多孔海绵支架；丝蛋白、聚乳酸可以制成膜；壳聚糖、透明质酸可以制成凝胶。可吸收材料制成的多孔海绵支架、膜或凝胶为丝蛋白多孔海绵支架、丝蛋白膜、聚乳酸多孔海绵支架、聚乳酸膜、藻酸盐多孔海绵支架、壳聚糖-藻酸盐多孔海绵支架、壳聚糖或其衍生物多孔海绵支架、壳聚糖或其盐生物凝胶、透明质酸凝胶。可吸收材料可以按照本领域公知方法制成多孔海绵支架、膜或凝胶，也可以直接购买得到。

[0022] 具体的：丝蛋白制成多孔海绵支架的方法为：将丝蛋白粉溶于2～4％(w/v)、优选为3％的乙酸溶液中，搅拌均匀形成浓度为0.5％(w/v)的溶胀液；经过真空脱泡处理后，于-20℃下冷冻1小时，最后于冷冻干燥机中冻干24小时，即获得蛋白多孔海绵支架。优选的，按照可吸收材料：甘油质量比8～12：1加入甘油塑化。

[0023] 丝蛋白制成膜的方法为:可丝蛋白粉和甘油按照质量比8～12:1搅拌均匀形成糊状,晾干呈膜状。

[0024] 壳聚糖或其衍生物制成凝胶的方法为:壳聚糖或其衍生物溶于PBS制成浓度为4%(m/v)溶液,氧化羧甲基纤维素溶于PBS制成浓度为4%(m/v)溶液;将两种溶液按体积比2～1:1制成凝胶。

[0025] 本发明所述的吸附GGTA1基因敲除猪胶原的可吸收创面修复材料的制备方法,包括以下步骤:

[0026] (1)、以GGTA1基因敲除猪肌腱为原料,采用胰酶消化与酸抽提相结合的方法提取胶原;

[0027] (2)将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液,胶原溶胀液经真空脱泡后进行冷冻处理,最后在冷冻干燥机冻干获得胶原多孔海绵支架,将可吸收材料制成的多孔海绵支架、膜或凝胶覆盖在胶原多孔海绵支架上制成可吸收创面修复材料;

[0028] 或将胶原溶于乙酸溶液获得胶原溶胀液,再将可吸收材料制成的膜置于胶原溶胀液底部,经真空脱泡后进行冷冻处理,最后在冷冻干燥机冻干制成可吸收创面修复材料。

[0029] 作为本发明进一步优选的技术方案,所述的可吸收创面修复材料采用戊二醛进行交联处理,获得三维支架。

[0030] 本发明中用于溶胀的乙酸溶液,也可以用盐酸代替。

[0031] 本发明的有益效果:

[0032] 本发明采用GGTA1基因敲除猪肌腱制备创面修复支架,能显著减少创面修复后瘢痕的形成,胶原表面覆盖可吸收材料,有利于胶原支架的吸附,防止胶原遇水后融化流失,避免揭除敷料时将胶原支架撕脱,避免与周围组织粘连,可吸收材料可存留体中。

[0033] 可吸收材料包括:丝蛋白,聚乳酸,壳聚糖,透明质酸,藻酸盐,材料可制成多孔结构,与封闭式负压引流配合使用,制成膜或凝胶,防组织粘连,保持伤口湿润促进生长。

具体实施方式

[0034] 下面通过具体实施方式对本发明的技术方案做进一步说明。

[0035] 实施例1 肌腱胶原的提取

[0036] 采用胰酶消化与酸抽提相结合的方法提取胶原,具体过程如下:

[0037] (1)、购买新鲜GGTA1基因敲除猪肌腱,去除肌肉、脂肪,并尽可能去除筋膜,用超纯水反复清洗后,装于PE样品袋中-30℃保存;于冷冻状态下,用手术刀将肌腱削为薄片,然后于组织捣碎机中捣碎;称取60克左右肌腱粉碎物,用0.05%(w/v)的醋酸洗必泰浸泡5min消毒,然后用生理盐水(0.9%NaCl水溶液)洗涤多次,尽可能洗去残留的醋酸洗必泰,纱布过滤;

[0038] (2)、37℃下,将消毒后的肌腱浸泡于浓度为0.25%的胰酶/PBS(pH 7.4)消化液中消化24小时;

[0039] (3)、消化结束后,加入肌腱质量0.5%的双氧水(质量分数3%)浸泡10～15分钟,去除残留的胰酶,然后用超纯水反复清洗,洗去H_2O_2;

[0040] (4)、取1000毫升3%(w/v)的乙酸溶液(测得pH 2.78),往消化后的肌腱中加入少量乙酸溶液,用组织捣碎机搅拌为粘稠状混合物,再加入余量乙酸溶液,于4℃溶胀72小时;

[0041] (5)、用布氏漏斗将未溶胀的肌腱颗粒分离，溶胀物于离心机中2000r离心15min，以分离不溶物；上清液用5％NaCl溶液盐析，析出含有胶原蛋白的沉淀物；

[0042] (6)、沉淀物再按照步骤(4)经3％的乙酸溶胀，重复步骤(5)的操作；

[0043] (7)、得到的沉淀物于超纯水中用透析袋(截留分子量为3000)4℃透析72h，每12h换水；透析纯化后的肌腱胶原冷冻干燥，于-20℃下保存。

[0044] 实施例2 胶原多孔海绵支架的制备

[0045] 将实施例1制得的肌腱胶原溶于3％(w/v)的乙酸溶液(pH 2.78)中，搅拌均匀形成浓度为0.5％(w/v)的胶原溶胀液；经过真空脱泡处理后，于-20℃下冷冻1小时，最后于冷冻干燥机中冻干24小时，即获得胶原多孔海绵支架。

[0046] 改变冷冻温度、冷冻时间、溶液浓度和溶液pH值等参数，可获得不同微观结构的胶原多孔海绵支架。

[0047] 实施例3

[0048] 丝蛋白多孔海绵支架的制备

[0049] 将丝蛋白粉溶于3％(w/v)的乙酸溶液(pH 2.78)中，可按照丝蛋白粉：甘油质量比10：1加入甘油塑化，搅拌均匀形成浓度为0.5％(w/v)的丝蛋白溶胀液；经过真空脱泡处理后，于-20℃下冷冻1小时，最后于冷冻干燥机中冻干24小时，即获得丝蛋白多孔海绵支架。

[0050] 改变冷冻温度、冷冻时间、溶液浓度和溶液pH值等参数，可获得不同微观结构的丝蛋白多孔海绵支架。

[0051] 丝蛋白-胶原多孔海绵支架制备

[0052] 将实施例2制成面状的胶原多孔海绵支架和丝蛋白海绵支架面-面贴合，进一步用戊二醛交联海绵支架，提高稳定性。步骤：将海绵支架浸泡于0.25％(w/v)的戊二醛水溶液中4℃交联12小时，随后用超纯水充分漂洗6次，每次10分钟，以去除残留的戊二醛，最后经过冷冻干燥，即获得交联后的三维支架。

[0053] 实施例4

[0054] 丝蛋白膜-胶原多孔海绵支架制备

[0055] 丝蛋白粉和甘油按照质量比10：1搅拌均匀形成糊状，晾干呈膜状。将实施例2制成面状的胶原多孔海绵支架和丝蛋白膜面-面贴合，进一步用戊二醛交联海绵支架，可提高稳定性。步骤：将海绵支架浸泡于0.25％(w/v)的戊二醛水溶液中4℃交联12小时，随后用超纯水充分漂洗6次，每次10分钟，以去除残留的戊二醛，最后经过冷冻干燥，即获得交联后的三维支架。

[0056] 实施例5

[0057] 聚乳酸膜-胶原多孔海绵支架制备

[0058] 将肌腱胶原溶于3％(w/v)的乙酸溶液(pH 2.78)中，搅拌均匀形成浓度为0.5％(w/v)的胶原溶胀液；将聚乳酸膜置入溶胀液底部。经过真空脱泡处理后，于-20℃下冷冻1小时，最后于冷冻干燥机中冻干24小时，即获得聚乳酸膜-胶原多孔海绵支架。

[0059] 进一步用戊二醛交联聚乳酸膜-胶原多孔海绵支架，可提高稳定性。步骤：将聚乳酸膜-胶原多孔海绵支架浸泡于0.25％(w/v)的戊二醛水溶液中4℃交联12小时，随后用超纯水充分漂洗6次，每次10分钟，以去除残留的戊二醛，最后经过冷冻干燥，即获得交联后的三维支架。

[0060] 实施例6

[0061] 壳聚糖凝胶-胶原多孔海绵支架制备

[0062] OCMC(氧化羧甲基纤维素):4％(m/v),PBS溶解;CMCS(羧甲基壳聚糖):4％(m/v),PBS溶解。将两种溶液按体积比1:1制成凝胶,将实施例2制成面状的胶原多孔海绵支架和凝胶面-面贴合。

[0063] 进一步用戊二醛交联海绵支架,可提高稳定性。步骤:将海绵支架浸泡于0.25％(w/v)的戊二醛水溶液中4℃交联12小时,随后用超纯水充分漂洗6次,每次10分钟,以去除残留的戊二醛,最后经过冷冻干燥,即获得交联后的三维支架。

[0064] 实施例7

[0065] OCMC(氧化羧甲基纤维素):4％(m/v),PBS溶解;CMCS(羧甲基壳聚糖):4％(m/v),PBS溶解。将两种溶液按体积比1:2制成凝胶,将实施例2制成面状的胶原多孔海绵支架和凝胶面-面贴合。

[0066] 进一步用戊二醛交联海绵支架,可提高稳定性。步骤:将海绵支架浸泡于0.25％(w/v)的戊二醛水溶液中4℃交联12小时,随后用超纯水充分漂洗6次,每次10分钟,以去除残留的戊二醛,最后经过冷冻干燥,即获得交联后的三维支架。