

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910146447.9

C08L 5/04 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/60 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 27 日

[11] 公开号 CN 101633749A

[22] 申请日 2009.6.4

[21] 申请号 200910146447.9

[30] 优先权

[32] 2008.6.4 [33] KR [31] 10-2008-0052671

[71] 申请人 启明大学产学协力团

地址 韩国大邱广域市

共同申请人 学校法人善牧学园 崔圣坤

[72] 发明人 朴瑾奎 朴智炫 李雨蓝 朴大焕

蔡美显 徐崇嫻 郑胜元 崔圣坤

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 吴贵明 张英

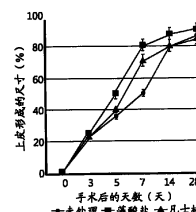
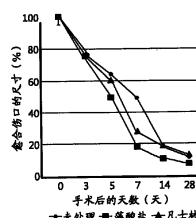
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 8 页

[54] 发明名称

用于处理伤口的藻酸和/或其盐组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种含有对于处理伤口有效的藻酸和/或其盐的组合物以及含有该组合物作为有效成分的用于处理伤口的藻酸和/或其盐敷料。当将本发明的藻酸和/或其盐敷料施用于受伤区域时，随着时间过去对伤口的尺寸的减小具有显著的效果，可使伤口的上皮形成速率增加并使 TGF- β 1、纤连蛋白和 VEGF 的表达量随胶原-I 的表达量增加而下降。



1. 具有伤口愈合活性的藻酸和/或其盐组合物，通过以下步骤制备：

从褐海藻中提取海藻酸；

将所述海藻酸溶于水中并对其进行脱色；

将经脱色的海藻酸溶液的 pH 调至 2~3 并使其沉淀以获得海藻酸凝胶；

向获得的所述海藻酸凝胶中加入乙醇并搅拌它们以将 pH 调至中性状态；以及

将所述海藻酸凝胶离心并将沉淀的所述海藻酸凝胶冷冻干燥以获得海藻酸凝胶粉末。

2. 根据权利要求 1 所述的藻酸和/或其盐组合物，其特征在于，进一步通过以下步骤来处理：

将所述藻酸和/或其盐组合物加入到 1M HCl 溶液中并对其进行热处理；

将藻酸和/或其盐组合物溶液的 pH 调至 7.0 并加入活性炭并对其进行搅拌和过滤；以及

向经过滤的藻酸和/或其盐组合物中加入乙醇，然后通过离心回收沉淀物并提取经离心的沉淀物。

3. 用于处理伤口的敷料，其经由以下步骤制备：由根据权利要求 1 所述的具有伤口愈合活性的藻酸和/或其盐组合物生产冻干的原敷料片材；以及用环氧乙烷（E.O.）气体对其进行灭菌。

用于处理伤口的藻酸和/或其盐组合物

技术领域

本发明涉及用于处理伤口的藻酸和/或其盐组合物 (alginate composition), 更具体地, 涉及含有对于处理伤口有效的藻酸和/或其盐的组合物和含有该组合物作为有效成分的用于处理伤口的藻酸和/或其盐敷料。

背景技术

伤口是解剖学上的持续组织破坏的状态和伤口愈合后形成的伤疤。在由创伤和烧伤引起的大面积皮肤丧失的情况下, 需要迅速并有效地进行治疗, 其中治疗例如是进行皮肤移植手术。

伤口愈合意指一种恢复受损组织的生物学过程, 其通过三种基本机制来实现, 包括基质沉积、上皮形成和收缩。这样的机制根据伤口的每一种情况而在不同地发生从而形成瘢痕或产生组织重建。然而, 伤口通常是通过形成瘢痕而不是通过重建而重新产生的。因此, 保持迅速的愈合速率使形成的瘢痕最小化是最理想的伤口愈合方法。至今研发的伤口愈合治疗方法对于由创伤和烧伤造成的大面积皮肤缺损的治疗方面未表现出令人满意的效果而且具有副作用和限制。因此, 需要开发更加有效且优异的伤口愈合治疗方法。

藻酸和/或其盐是一种具有较强人体亲和力的天然物质, 其构成褐海藻的细胞壁并且是由甘露糖醛酸和古洛糖醛酸 (guluronic acid) 单元组成的杂多糖。最近, 已经报道了各种能够促进伤口愈合和组

织活化再生的敷料，其中由于藻酸和/或其盐无毒且具有形成粘稠溶液和凝胶的机械性能，因此其具有增加皮肤水分的效果并促进伤口愈合。而且，其在凝血中还起到前体的作用从而表现出止血剂的功用。

迄今为止，作为将藻酸和/或其盐应用于伤口愈合的技术，涉及藻酸盐伤口敷料的韩国专利申请第 10-1996-7001623 号披露了含有藻酸盐的伤口敷料，其含有 50% 至 80% 的甘露糖醛酸盐（manuronate）且具有的分子量为 7000 至 40000，并且确定单价离子与二价离子的比率为 10-30:70-80；以及涉及伤口移植材料的韩国专利申请第 10-1994-0023549 号披露了含有藻酸盐衍生物的伤口移植材料；以及涉及用于包覆伤口的敷裹材料的韩国专利申请第 10-2004-0000989 号披露了含有纤维状吸收层的海藻酸钠的用于包覆伤口的敷裹材料。

然而，这样的披露的目的在于仅强调其吸收性的敷料而并未证实与用于伤口的藻酸和/或其盐的分子生物学活性有关的细胞因子类例如转化生长因子（TGF- β 1）、纤连蛋白、血管内皮生长因子（VEGF）和胶原-I 表达减少。

在本发明中，我们认真检查了对于治疗伤口区域有效并使瘢痕形成最小化的用于敷裹的材料，从而我们注意到了天然藻酸和/或其盐这样的特性并证实了其用于完成本发明的分子生物学活性。

发明内容

技术问题

因此本发明的目的是提供一种含有对于处理伤口有效的藻酸和/或其盐的组合物和含有该组合物作为有效成分的用于处理伤口的藻酸和/或其盐敷料。

技术方案

本发明的目的是这样实现的：制备藻酸和/或其盐组合物和含有该组合物的藻酸和/或其盐敷料并将其施加于皮肤损伤的大鼠模型，然后检查随时间伤口的大小和伤口的上皮形成速率，并且检验 TGF- β 1、纤连蛋白、VEGF 和胶原-I 的表达量。

本发明提供了用于处理伤口的藻酸和/或其盐组合物。

根据本发明的藻酸和/或其盐组合物（藻酸类组合物）是经由以下步骤来制备的：从褐海藻中提取海藻酸，将海藻酸溶于水并对其进行脱色，将该经脱色的海藻酸溶液调节至 pH 2 至 pH 3 并使其沉淀以得到海藻酸凝胶，向得到的海藻酸凝胶中加入乙醇并且在搅拌下调至中性 pH，以及将该海藻酸凝胶离心并将沉淀的海藻酸凝胶冷冻干燥，从而得到海藻酸凝胶粉末。

更具体地，根据本发明的藻酸和/或其盐组合物（藻酸类组合物）是经由以下步骤来制备的：将干的褐海藻进行研磨，将其在 0.025% H_2SO_4 溶液中沉淀 1 小时并用水清洗它们；向该溶液中加入 5% Na_2CO_3 溶液然后对其进行热处理；向溶液中加入水并进行搅拌以提取海藻酸；向所得的上清液中加入乙醇以获得海藻酸；将所得的海藻酸溶解于水中并加入 0.05% NaOCl 以对其进行脱色；将该经脱色的海藻酸溶液调节至 pH 2-3，然后使其沉淀为海藻酸凝胶；向所得的凝胶中加入乙醇并搅拌以调至中性 pH；以及用乙醇清洗该海藻酸凝胶并进行离心，然后对沉淀的海藻酸凝胶进行冷冻干燥以获得粉末。

为了除去离子物质，可以根据情况在对得到藻酸和/或其盐组合物（藻酸类组合物）粉末处理后再使用，该处理为将藻酸和/或其盐

粉末溶于水中并用乙醇进行渗析 (dialyzing) 和再沉淀并进行冷冻干燥。

尤其是, 可以利用酸性水解和热处理方法来制备低分子量的藻酸和/或其盐组合物。为此, 将藻酸和/或其盐组合物加入到 1M HCl 溶液中达到浓度为 0.5% W/V, 然后在 121°C 热处理 1.5 至 3 小时。将得到的海藻酸溶液调至 pH 7.0 然后加入量为 0.2% 的活性炭。将得到的混合物搅拌 12 小时并用孔径为 0.2 μm 的半透膜过滤器过滤 2 至 3 次。将经过滤的藻酸和/或其盐组合物加入到 2 倍量的乙醇中并将离心的沉淀物回收并进行萃取以得到最终的藻酸和/或其盐组合物。

本发明还提供了一种含有藻酸和/或其盐组合物 (藻酸类组合物) 作为有效成分用于处理伤口的敷料。

根据本发明的敷料可以是使用冻干的藻酸和/或其盐组合物 (藻酸类组合物) 制备的敷料的原片材 (original sheet of dressing)。在实际的试验中, 由于全层皮肤缺损中凝胶形式的海藻酸不能附着并保持, 因此可以使用由经过冷冻干燥并用环氧乙烷 (E.O.) 气体灭菌而制备的敷料的原片材。

为了研究根据本发明的用于处理伤口的藻酸和/或其盐组合物对于创伤区域上的治疗效果和瘢痕形成最小化, 用藻酸和/或其盐敷料对皮肤损伤的大鼠模型进行处理然后检查该皮肤损伤的大鼠模型的与伤口愈合有关的细胞因子 (例如是转化生长因子 (TGF- β 1)、纤连蛋白、血管内皮生长因子 (VEGF) 和胶原-I) 的表达量。结果, TGF- β 1 和纤连蛋白 (其是对于转化和构建瘢痕的重要生长因子) 的量和 VEGF (其在瘢痕形成中是重要的血管内皮生长因子) 的量下降, 并且胶原-I (其是一种在伤口愈合过程中由皮肤形成的上皮形成而得到的细胞因子) 的量增加, 从而期望本发明的藻酸和/或其

盐组合物能够对于处理创伤区域并使瘢痕形成最小化是有效的，并且能够用作一种新型的敷裹材料。

技术效果

本发明的藻酸和/或其盐敷料当施加于创伤区域时随时间推移而使伤口大小减小并且增加伤口的上皮形成速率，并使 TGF- β 1、纤连蛋白和 VEGF 的表达量降低而胶原-I 的表达量增加具有显著效果，从而本发明在医药工业中是有用的。

附图说明

图 1 是示出了大鼠模型的创伤区域处的伤口愈合速率（左图）和伤口上皮形成速率（右图）的图表。

图 2 是示出了证实在大鼠模型的创伤区域处实施苏木紫和曙红染色的结果的照片（N：未处理，V：凡士林处理，A：藻酸和/或其盐处理）。

图 3 是示出了证实由藻酸和/或其盐在大鼠模型的创伤区域处产生的 TGF- β 1 的量的结果的照片（N：未处理，V：凡士林处理，A：藻酸和/或其盐处理）。

图 4 是示出了证实由藻酸和/或其盐在大鼠模型的创伤区域处产生的纤连蛋白的量的结果的照片（N：未处理，V：凡士林处理，A：藻酸和/或其盐处理）。

图 5 是示出了证实由藻酸和/或其盐在大鼠模型的创伤区域处产生的 VEGF 的量的结果的照片（N：未处理，V：凡士林处理，A：藻酸和/或其盐处理）。

图 6 是示出了证实由藻酸和/或其盐在大鼠模型的创伤区域处产生的胶原-I 的量的结果的照片 (N: 未处理, V: 凡士林处理, A: 藻酸和/或其盐处理)。

图 7 是示出了通过免疫组织化学染色证实在大鼠模型的创伤区域处产生的 TGF- β 1 量的结果的照片 (N: 未处理, V: 凡士林处理, A: 藻酸和/或其盐处理)。

图 8 是示出了通过免疫组织化学染色而证实在大鼠模型的创伤区域处产生的纤连蛋白量的结果的照片 (N: 未处理, V: 凡士林处理, A: 藻酸和/或其盐处理)。

图 9 是示出了通过免疫组织化学染色而证实在大鼠模型的创伤区域处产生的 VEGF 量的结果的照片 (N: 未处理, V: 凡士林处理, A: 藻酸和/或其盐处理)。

图 10 是示出了通过免疫组织化学染色而证实在大鼠模型的创伤区域处产生的胶原-I 量的结果的照片 (N: 未处理, V: 凡士林处理, A: 藻酸和/或其盐处理)。

具体实施方式

在以下实施例中更加具体地解释了本发明。然而, 这些实施例仅用于解释本发明, 本发明的范围不受它们的限制。

实施例 1: 藻酸和/或其盐组合物的制备

称量干的褐海藻 (Gijang, Busan, 韩国) 的干量然后研磨成小颗粒并浸于 0.025% H_2SO_4 溶液中, 用水洗涤几次。加入 5% Na_2CO_3 溶液并在 60°C 加热 3 小时, 然后加入三倍量的水并搅拌 12 小时, 以提取海藻酸。搅拌之后, 向由离心得到的上清液中加入等量的乙

醇以获得海藻酸。将该海藻酸溶于水中,并向溶液中加入 0.05% NaOCl 以将其脱色。将海藻酸溶液的 pH 调至 2~3 并得到沉淀的凝胶。然后,加入 50%的乙醇并搅拌 12 小时以将 pH 调至中性状态。分别用 60%和 90%乙醇洗涤凝胶,并进行离心以获得沉淀的海藻酸凝胶。将该沉淀的海藻酸凝胶冷冻干燥以获得粉末。

为了除去离子物质,根据情况将海藻酸粉末溶于水中并用乙醇进行渗析和再沉淀,并且进行冷冻干燥后再使用。尤其是,为了制备低分子量的海藻酸,采用了酸性水解和热处理方法。将海藻酸加入到 1M HCl 溶液中,浓度为 0.5% W/V,然后热处理 1.5 至 3 小时。将海藻酸溶液调至 pH 7.0 然后加入量为 0.2%的活性炭,然后搅拌 12 小时并用孔径为 0.2 μm 的半透膜过滤器过滤 2 至 3 次。将两倍量的乙醇加入到经过滤的海藻酸中并离心以回收沉淀物并且最后对其进行萃取。

实施例 2: 具有藻酸和/或其盐组合物的藻酸和/或其盐敷料的制备

对于藻酸和/或其盐敷料,制备冻干藻酸和/或其盐敷料的原片材并用于动物实验。由于凝胶状态的海藻酸难以附着并保持于全层切除部分,因此制备冻干藻酸和/或其盐敷料的原片材并用环氧乙烷气体进行灭菌以用于动物试验。

实验例 1: 藻酸和/或其盐敷料的伤口愈合效果

从 Samtaco Inc. 购买雄性 8 周龄斯普拉-道来大鼠 (Sprague-Dawley rat), 使其适应一周并用于进行实验。在大鼠的背部制造直径为 2 cm 的圆形皮肤全层创伤, 并根据施加于大鼠的敷裹材料分成 C 组 (未处理)、V 组 (凡士林处理, 对照组)、A 组

(藻酸和/或其盐处理)。处理后,必要时持续用敷料处理直至伤口完全痊愈。

在伤口处理后的第 1、3、5、7、14、28 和 40 天将伤口的轮廓画在灭菌的透明膜上,然后用计算机扫描和 NIH 图像分析系统 (Bio-optics Co. USA) 获得将伤口愈合的速率和伤口上皮形成速率。

如图 1 所示,作为证明创伤大鼠模型中的伤口愈合速率和伤口上皮形成速率的结果,其可以证明藻酸和/或其盐处理组而不是未处理组和对照组(凡士林处理)中的伤口面积大小随时间推移而减小(参见图 1 的左图),并且藻酸和/或其盐处理组中的伤口上皮形成速率也有所增加(参见图 1 的右图)。

对于大鼠进行组织学分析,伤口处理后第 1、3、5、7、14、28 和 40 天取出的伤口组织样品固定在 10%中性福尔马林溶液中并埋入石蜡中,然后切成厚度为 6 μ m 并通过苏木紫和曙红染色鉴定上皮再形成和血管形成的程度。

图 2 中示出了三组(未处理组、对照组和藻酸和/或其盐处理组)中的伤口区域的形状以及愈合和瘢痕的大小。可以确定藻酸和/或其盐处理组的伤口区域比未处理组和对照组(凡士林组)随时间推移治疗得更快。

将根据天数从创伤大鼠模型取下的伤口组织样品于-70°C 储存。然后,在除去蛋白质后通过酶联印迹法(western-blot)分析 TGF- β 1(其是一种与炎症有关的细胞因子并且与瘢痕的形成密切相关)的表达量。如图 3 所示,证实了与未处理组和对照组(凡士林处理组)相比,藻酸和/或其盐处理组中的 TGF- β 1 的量下降。

将根据天数从创伤大鼠模型取下的伤口组织样品于-70℃ 储存。然后，在除去蛋白质后通过蛋白质印迹法分析纤连蛋白（其是一种与瘢痕形成和构建有关的细胞因子）的表达量。如图 4 所示，证实了与未处理组和对照组（凡士林处理组）相比，藻酸和/或其盐处理组中的纤连蛋白的量显著下降。

将根据天数从创伤大鼠模型取下的伤口组织样品于-70℃ 储存。然后，在除去蛋白质后通过蛋白质印迹法分析 VEGF（其是在形成瘢痕过程中形成新生血管的重要因子）的表达量。如图 5 所示，证实了与未处理组和对照组（凡士林处理组）相比，藻酸和/或其盐处理组中的 VEGF 的量下降。

将根据天数从创伤大鼠模型取下的伤口组织样品于-70℃ 储存。然后，在除去蛋白质后通过蛋白质印迹法分析胶原-I（其是在伤口愈合过程中产生皮肤的上皮形成）的表达量。如图 6 所示，证实了与未处理组和对照组（凡士林处理组）相比，藻酸和/或其盐处理组中的胶原-I 的量增加。

对 5 天后从创伤大鼠模型取下的伤口组织样品实施免疫组织化学染色并用光学显微镜进行分析。如图 7 至图 9 所示，证实了与未处理组和对照组（凡士林处理组）相比，藻酸和/或其盐处理组中的 TGF- β 1、纤连蛋白和 VEGF 的量显著下降。

对 5 天后从创伤大鼠模型取下的伤口组织样品实施免疫组织化学染色并用光学显微镜进行分析。如图 10 所示，证实了与未处理组和对照组（凡士林处理组）相比，藻酸和/或其盐处理组中的胶原-I 的量增加。

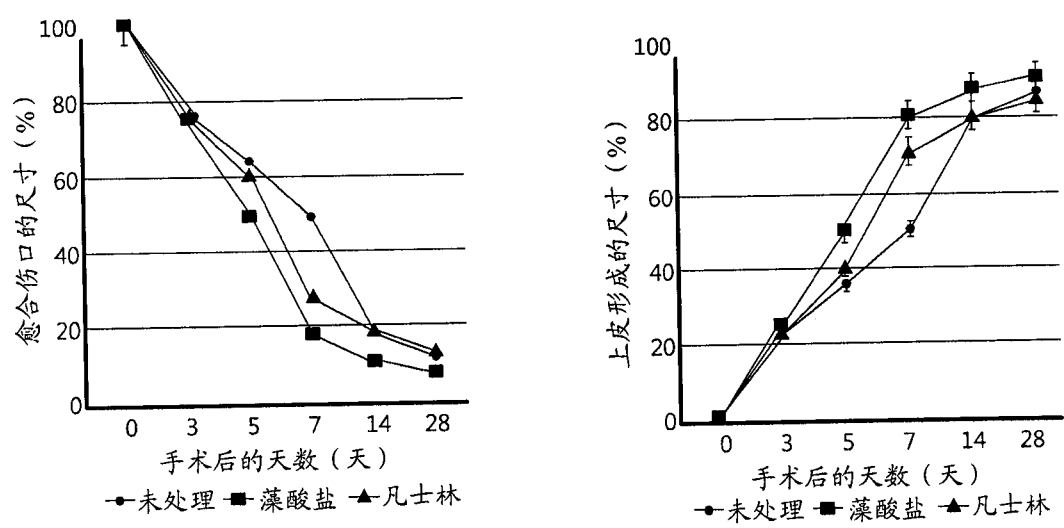


图 1

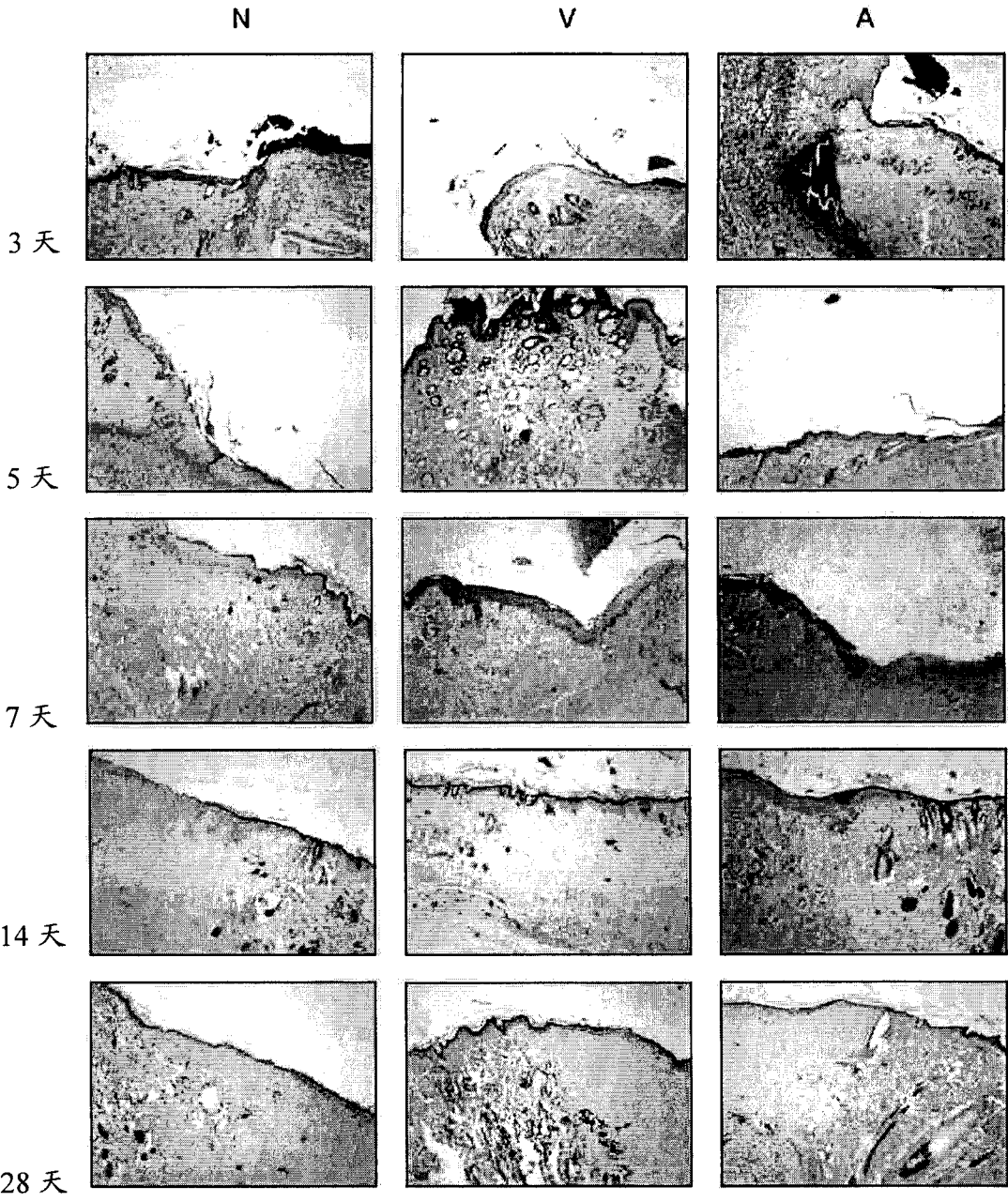


图 2

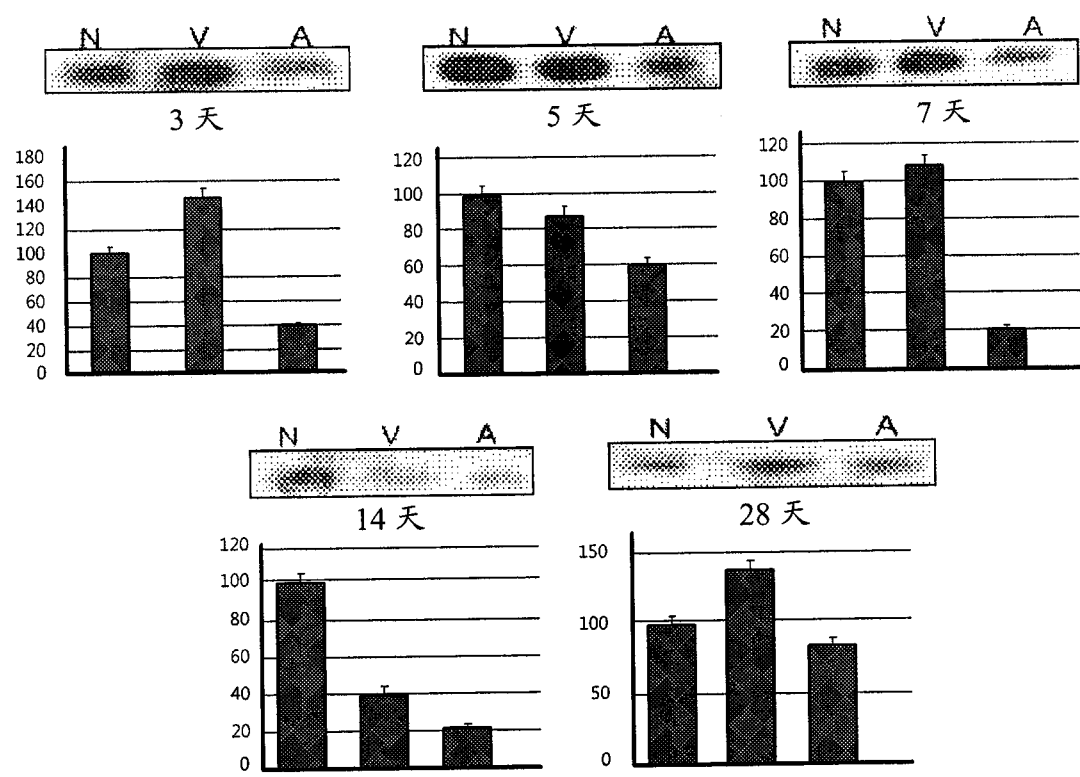


图 3

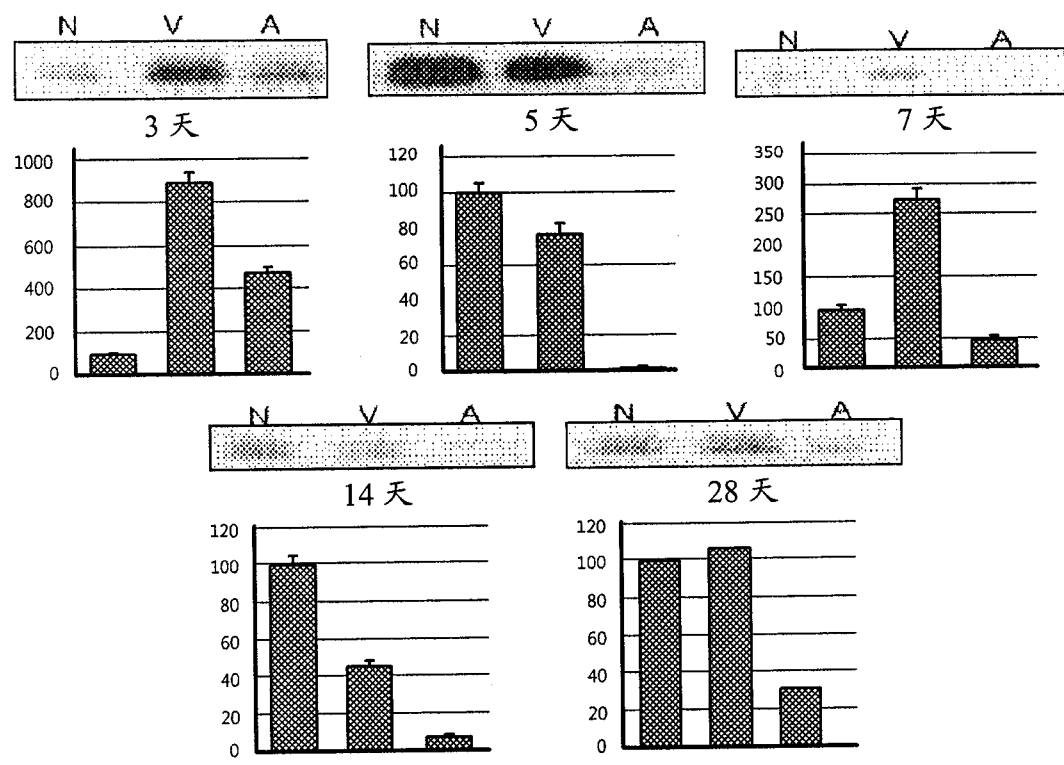


图 4

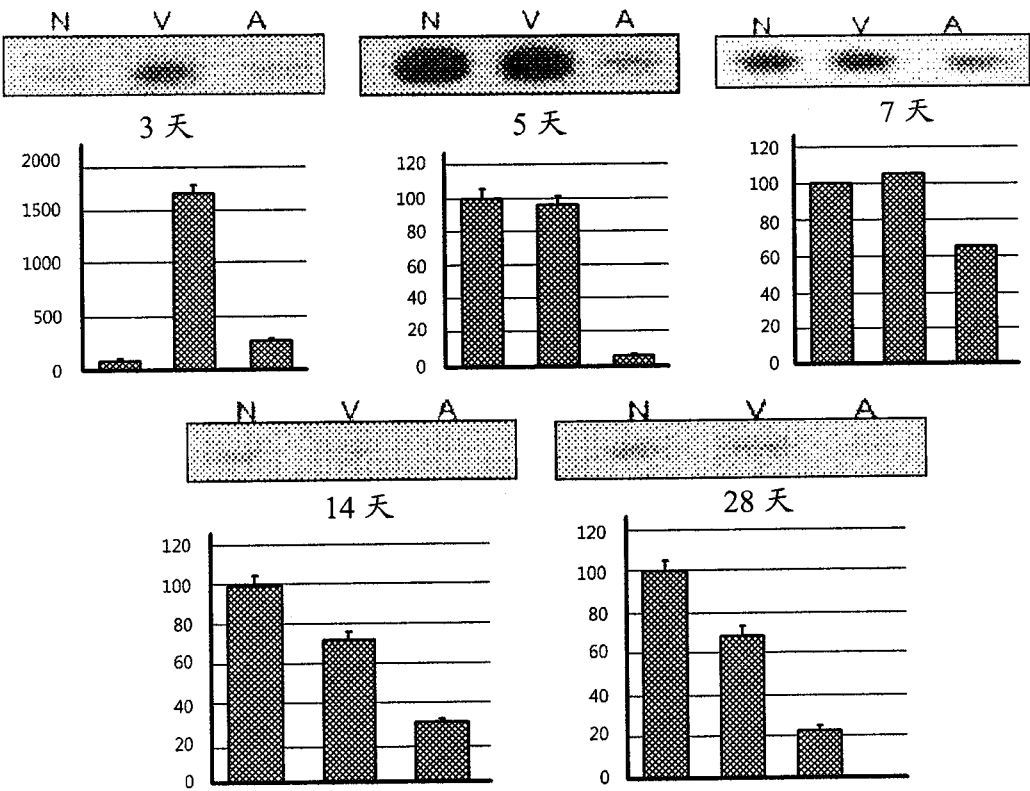


图 5

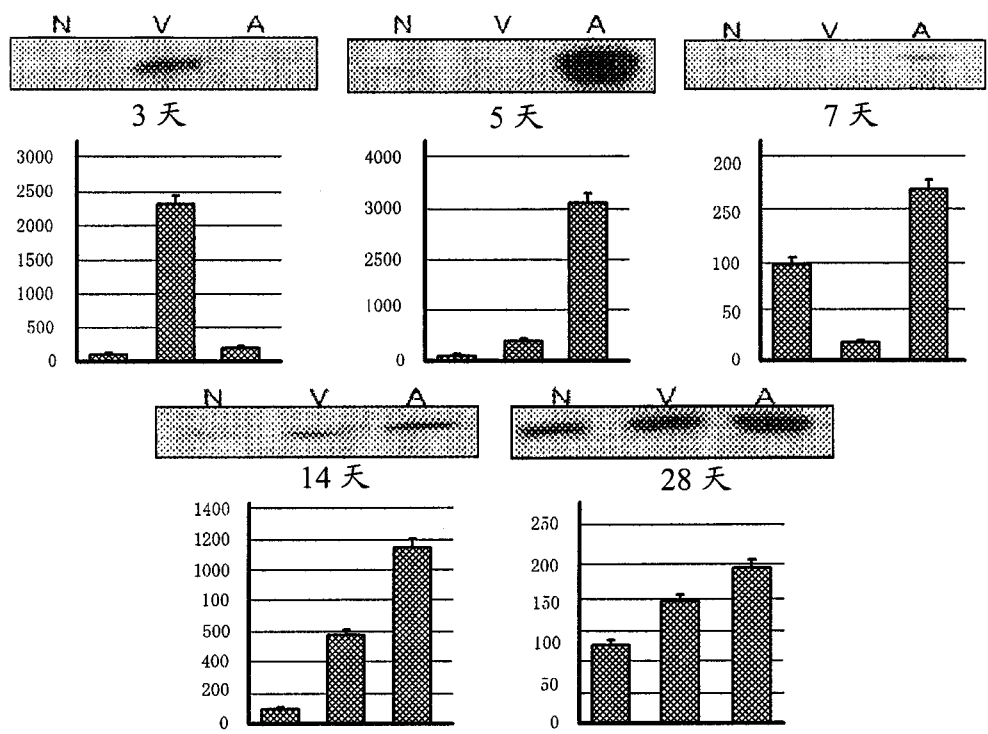


图 6

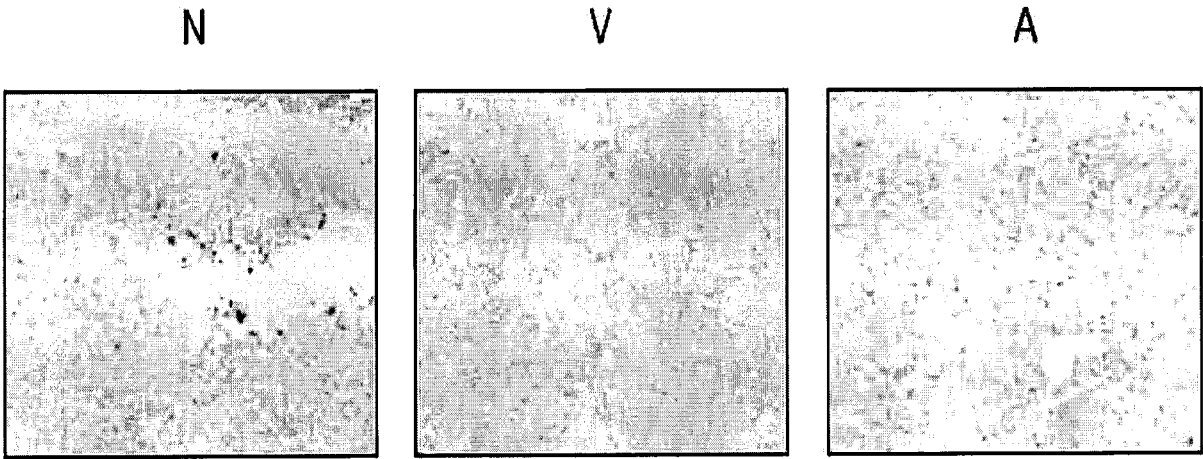


图 7

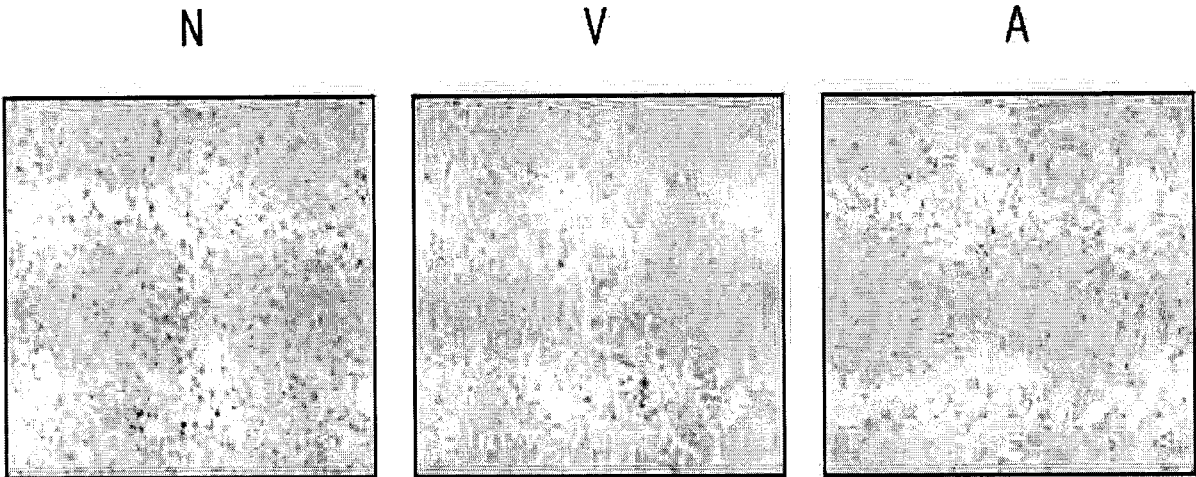


图 8

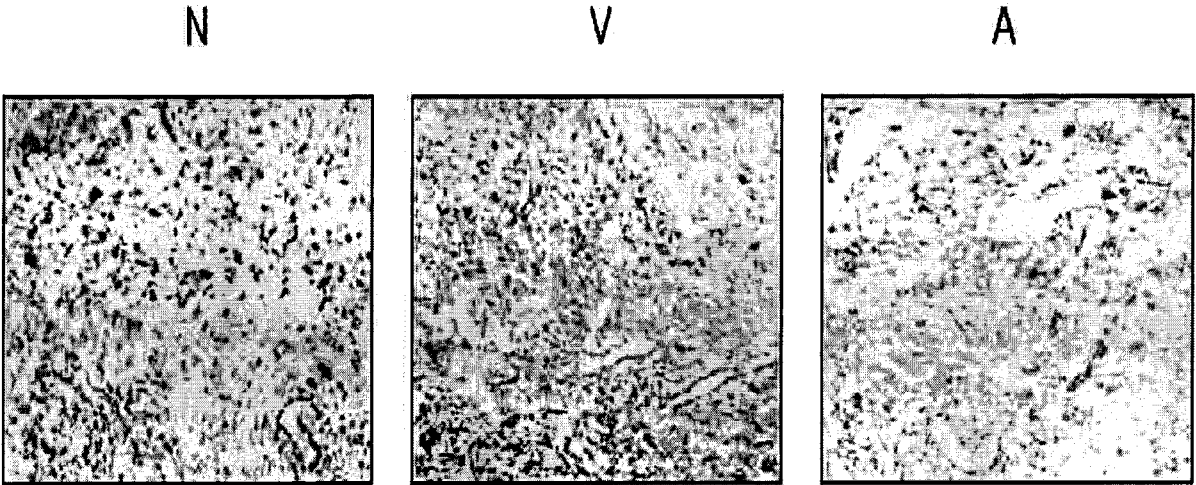


图 9

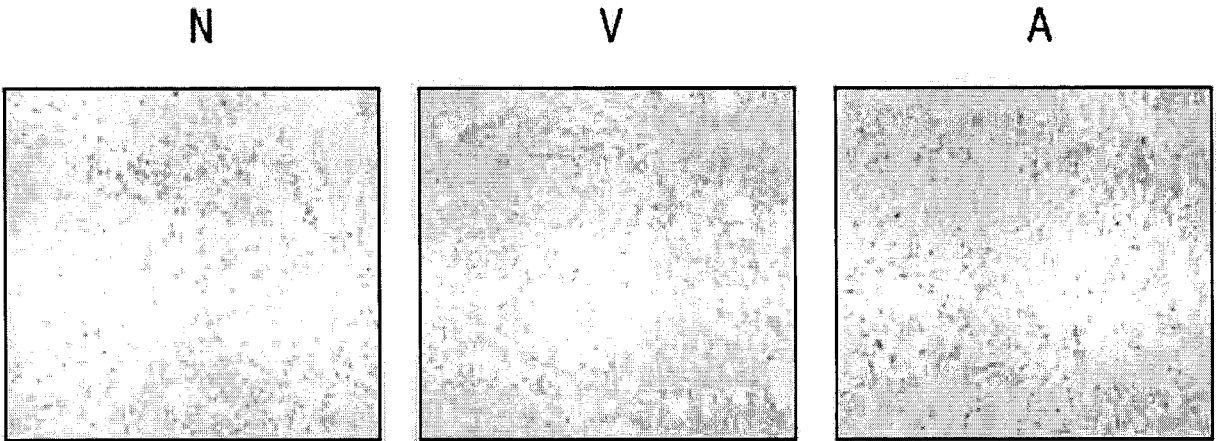


图 10