



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116327742 A

(43) 申请公布日 2023.06.27

(21) 申请号 202310404946.3

A61K 47/46 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.17

A61K 45/06 (2006.01)

(71) 申请人 华南理工大学

A61K 31/573 (2006.01)

地址 510635 广东省广州市天河区五山路  
381号

A61K 31/65 (2006.01)

申请人 中山大学中山眼科中心

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(72) 发明人 施雪涛 梁丹 黄海香 武培敏  
柴牧原

(74) 专利代理机构 北京博尔赫知识产权代理事  
务所(普通合伙) 16045

专利代理师 王灿

(51) Int. Cl.

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

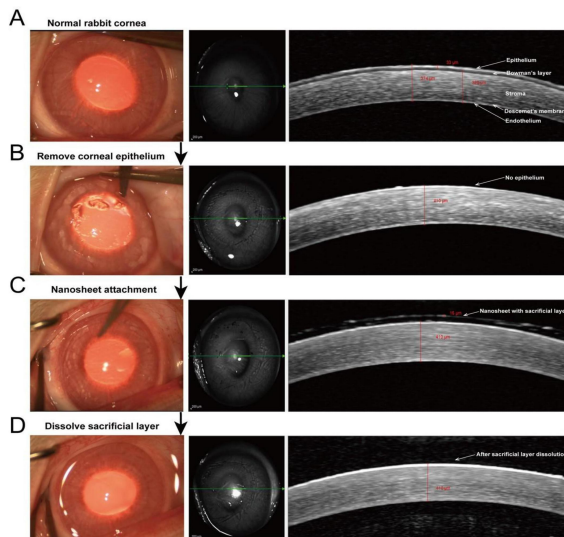
权利要求书2页 说明书14页 附图3页

(54) 发明名称

一种双组份多功能的纳米膜及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种双组份多功能的纳米膜及其制备方法和应用,涉及生物医用材料技术领域,所述纳米膜,由包括以下质量分数的组分制备而成:高分子基体组分一50~75%、高分子基体组分二24~49%、功能性组分1%;所述高分子基体组分一为透明质酸或透明质酸衍生物,所述高分子基体组分二为胶原、明胶、甲基丙烯酰化明胶或脱细胞基质中的一种,所述功能性组分包括药物和活性因子;所述药物负载于高分子基体组分一,活性因子负载于高分子基体组分二;所述纳米膜通过化学交联成型。本发明克服现有角膜碱烧伤和感染治疗手段的缺点与不足,提供一种生物安全性好、有效控制感染和抑制炎症反应,用于治疗角膜损伤的双组分多功能纳米膜。



1. 一种双组份多功能的纳米膜,其特征在于,由包括以下质量分数的组分制备而成:

高分子基体组分一50~75%、高分子基体组分二24~49%、功能性组分1%;

所述高分子基体组分一为透明质酸或透明质酸衍生物,所述高分子基体组分二为胶原、明胶、甲基丙烯酰化明胶或脱细胞基质中的一种,所述功能性组分包括药物和活性因子;所述药物负载于高分子基体组分一,所述活性因子负载于高分子基体组分二;

所述纳米膜通过化学交联成型。

2. 如权利要求1所述双组份多功能的纳米膜,其特征在于,所述透明质酸衍生物为透明质酸的一个或多个侧链基团进行功能化修饰得到的衍生物,所述一个或多个侧链基团为羧基、醛基、酰胺基团和接枝 $\beta$ -环糊精中的一种或多种;所述药物为地塞米松、地塞米松磷酸钠、强力霉素或盐酸强力霉素中的一种或几种;所述活性因子为抗菌多肽、抗血管生成多肽、促上皮生长因子中的一种。

3. 如权利要求1或2所述双组份多功能的纳米膜,其特征在于,所述纳米膜的厚度为20~500nm。

4. 权利要求1~3任意一项所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 高分子基体组分一、高分子基体组分二和水混合,震荡,得混合溶液,将药物溶解于所述混合溶液后,离心取上清液即为原料混合溶液;

2) 将步骤1)所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,第一风干,然后进行交联,第一真空冷冻干燥,得到预处理纳米膜;

3) 预处理纳米膜在4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡,然后用乙二醇四乙酸溶液清洗,再于活性因子的PBS溶液中浸泡,去离子水清洗,第二真空冷冻干燥,得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

4) 将PVA溶液滴加到步骤3)所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,第二风干,然后从硅片上剥离,即得纳米膜。

5. 如权利要求4所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,其特征在于,步骤1)中所述高分子基体组分一和高分子基体组分二混合的质量比为1~3:1,所述高分子基体组分一和高分子基体组分二的总质量与水的质量比为1:90~110;所述震荡的温度为40~60℃,所述震荡的频率为500~1000Hz,所述震荡的时间为90~120min。

6. 如权利要求4所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,其特征在于,步骤1)中所述药物与混合溶液的比例为10~200mg:1mL;所述离心的转速为2500~3500rpm,所述离心的时间为5~15min。

7. 如权利要求4所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,其特征在于,步骤2)中所述一次旋涂的加速度为1400~1600rad/s<sup>2</sup>,所述一次旋涂的转速为5000~8000rpm,所述一次旋涂的时间为20~40s;所述第一风干的温度为20~30℃;所述第一真空冷冻干燥的温度为-70~-80℃,所述第一真空冷冻干燥的真空度为10~100Pa,第一真空冷冻干燥的时间为6~12h。

8. 如权利要求4所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,其特征在于,步骤3)中所述4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液的浓度为1~3mg/mL,在4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中

的浸泡时间为0.5~1.5h;所述乙二胺四乙酸溶液的浓度为0.2~0.4mg/mL;

步骤3)中所述PBS溶液的浓度为0.5~3mg/mL,在PBS溶液中浸泡的温度为0~8℃,在PBS溶液中浸泡的时间为8~12h;所述第二真空冷冻干燥的温度为-60~-80℃,所述第二真空冷冻干燥的真空度为10~100Pa,所述第二真空冷冻干燥的时间为12~24h。

9.如权利要求4所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,其特征在于,步骤4)中所述PVA溶液的质量浓度为15~25%,PVA溶液的用量为0.5~1.5mL;所述二次旋涂的加速度为100~500rad/s<sup>2</sup>,所述二次旋涂的转速为2000~3000rpm,所述二次旋涂的时间为20~40s;所述第二风干的温度为15~25℃。

10.权利要求1~3任一项所述双组份多功能的纳米膜或权利要求4~9任一项所述制备方法所得纳米膜在制备治疗角膜损伤的产品中的应用。

## 一种双组份多功能的纳米膜及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用材料技术领域,尤其涉及一种双组份多功能的纳米膜及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 严重角膜损伤,如角膜碱烧伤和细菌或真菌造成的角膜感染存在组织损伤程度重、创面修复难度大、临床治疗效果差等致盲性难点,严重危害患者视力及生活质量。免疫炎症与持续感染是角膜烧伤和感染致盲的主要病理机制。目前角膜碱烧伤暂无疗效确切的治疗药物,临床上使用激素抗炎受限于激素相关并发症,如抑制上皮愈合和继发角膜变薄穿孔。使用羊膜覆盖治疗存在羊膜固定性差、需要缝线缝合且易吸收,需重复多次手术的局限性。细菌性或真菌性角膜感染需要联合全身和局部抗生素或抗真菌药物治疗,然而抗生素或抗真菌药物局部滴眼存在眼部穿透性差、易产生耐药、生物利用度低、需要多种药物联合,高浓度和高频率给药导致毒副作用等问题。因此需进一步研究有效的药物载体和新型材料用于优化眼部给药模式,提高角膜碱烧伤和感染的治疗疗效。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种双组份多功能的纳米膜及其制备方法和应用,克服现有角膜碱烧伤和感染治疗手段的缺点与不足,提供一种生物安全性好、有效控制感染和抑制炎症反应,可用于治疗角膜损伤如感染和碱烧伤的双组分多功能纳米膜及其制备方法。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了一种双组份多功能的纳米膜,由包括以下质量分数的组分制备而成:高分子基体组分一50~75%、高分子基体组分二24~49%、功能性组分1%;所述高分子基体组分一为透明质酸或透明质酸衍生物,所述高分子基体组分二为胶原、明胶、甲基丙烯酰化明胶或脱细胞基质中的一种,所述功能性组分包括药物和活性因子;所述药物负载于高分子基体组分一,所述活性因子负载于高分子基体组分二;所述纳米膜通过化学交联成型。

[0006] 优选的,所述透明质酸衍生物为透明质酸的一个或多个侧链基团进行功能化修饰得到的衍生物,所述一个或多个侧链基团为羧基、醛基、酰胺基团和接枝 $\beta$ -环糊精中的一种或多种;所述药物为地塞米松、地塞米松磷酸钠、强力霉素或盐酸强力霉素中的一种或几种;所述活性因子为抗菌多肽、抗血管生成多肽、促上皮生长因子中的一种。

[0007] 优选的,所述纳米膜的厚度为20~500nm。

[0008] 本发明还提供了所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,包括以下步骤:1) 高分子基体组分一、高分子基体组分二和水混合,震荡,得混合溶液,将药物溶解于所述混合溶液后,离心取上清液即为原料混合溶液;

[0009] 2) 将步骤1) 所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,第一风干,然后进行交联,第一真空冷冻干燥,得到预处理纳米膜;

[0010] 3) 预处理纳米膜在4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡,然后用乙二胺四乙酸溶液清洗,再于活性因子的PBS溶液中浸泡,去离子水清洗,第二真空冷冻干燥,得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0011] 4) 将PVA溶液滴加到步骤3)所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,第二风干,然后从硅片上剥离,即得纳米膜。

[0012] 优选的,步骤1)中所述高分子基体组分一和高分子基体组分二混合的质量比为1~3:1,所述高分子基体组分一和高分子基体组分二的总质量与水的质量比为1:90~110;所述震荡的温度为40~60℃,所述震荡的频率为500~1000Hz,所述震荡的时间为90~120min。

[0013] 优选的,步骤1)中所述药物与混合溶液的比例为10~200mg:1mL;所述离心的转速为2500~3500rpm,所述离心的时间为5~15min。

[0014] 优选的,步骤2)中所述一次旋涂的加速度为1400~1600rad/s<sup>2</sup>,所述一次旋涂的转速为5000~8000rpm,所述一次旋涂的时间为20~40s;所述第一风干的温度为20~30℃;所述第一真空冷冻干燥的温度为-70~-80℃,所述第一真空冷冻干燥的真空度为10~100Pa,第一真空冷冻干燥的时间为6~12h。

[0015] 优选的,步骤3)中所述4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液的浓度为1~3mg/mL,在4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中的浸泡时间为0.5~1.5h;所述乙二胺四乙酸溶液的浓度为0.2~0.4mg/mL;步骤3)中所述PBS溶液的浓度为0.5~3mg/mL,在PBS溶液中浸泡的温度为0~8℃,在PBS溶液中浸泡的时间为8~12h;所述第二真空冷冻干燥的温度为-60~-80℃,所述第二真空冷冻干燥的真空度为10~100Pa,所述第二真空冷冻干燥的时间为12~24h。

[0016] 优选的,步骤4)中所述PVA溶液的质量浓度为15~25%,PVA溶液的用量为0.5~1.5mL;所述二次旋涂的加速度为100~500rad/s<sup>2</sup>,所述二次旋涂的转速为2000~3000rpm,所述二次旋涂的时间为20~40s;所述第二风干的温度为15~25℃。

[0017] 本发明还提供了所述双组份多功能的纳米膜或所述制备方法所得纳米膜在制备治疗角膜损伤的产品中的应用。

[0018] 本发明提供了一种双组份多功能的纳米膜及其制备方法和应用,以临床需求为导向,基于纳米膜优异的载药性能、可修饰性能和粘附性能,提出将纳米膜用于角膜碱烧伤和感染的修复,根据角膜碱烧伤和感染的病理损伤特点和临床治疗需求,使用双组分,即两种不同的生物大分子作为基底材料,负载活性因子和抗炎药物,为更安全有效治疗角膜损伤如碱烧伤和感染,预防严重并发症,防止盲目提供新途径;双组分多功能纳米膜通过范德华力或氢键作用力自发黏附在受损角膜上,在伤口处持续释放负载的药物和活性因子,与传统滴眼液治疗相比,大大提高了药物在眼表的停留时间;此外,选用天然生物大分子作为基底材料,有利于促进受损角膜上皮的愈合;本发明制备得到了一种生物相容性好、操作简便快速、与受损角膜紧密贴合、有效抗菌或抗血管、抑制角膜烧伤和感染的炎症反应、促进受损角膜修复的纳米膜,突破临床中局部滴眼的频繁多次给药、抗菌药物眼部渗透性差、羊膜载体需缝线缝合的治疗局限性,具有较大的实际推广价值。

## 附图说明

[0019] 图1为体内兔角膜上纳米膜粘附的操作步骤和厚度变化(A为正常兔角膜的光学照片和OCT结构层次图;B为刮除角膜上皮后角膜的光学照片和OCT结构层次图;C为纳米膜贴在角膜表面的光学照片和OCT结构层次图;D为牺牲层溶解后的光学照片和OCT结构层次图);

[0020] 图2为纳米膜在新西兰兔角膜碱烧伤模型中的治疗效果(A和C为碱烧伤造模后7天角膜情况;B和D为碱烧伤造模后7天角膜上皮修复情况);

[0021] 图3为纳米膜在新西兰兔铜绿假单胞菌性角膜炎中的治疗效果(A和C为铜绿假单胞菌性角膜炎造模7天后情况;B和D为铜绿假单胞菌性角膜炎造模后7天角膜上皮修复情况;E为各组角膜取材后透明度比较;F和G为各组角膜匀浆后进行培养和CFU计数图)。

## 具体实施方式

[0022] 本发明提供了一种双组份多功能的纳米膜,由包括以下质量分数的组分制备而成:高分子基体组分一50~75%、高分子基体组分二24~49%、功能性组分1%;所述高分子基体组分一为透明质酸或透明质酸衍生物,所述高分子基体组分二为胶原、明胶、甲基丙烯酰化明胶或脱细胞基质中的一种,所述功能性组分为药物和活性因子;所述药物负载于高分子基体组分一,活性因子负载于高分子基体组分二;所述纳米膜通过化学交联成型。

[0023] 在本发明纳米膜中,所述高分子基体组分一的质量分数为50~75%,进一步优选为55~70%,再进一步优选为60~65%;所述高分子基体组分二的质量分数为24~49%,进一步优选为28~45%,再进一步优选为32~41%;所述功能性组分的质量分数为1%。

[0024] 在本发明纳米膜中,所述高分子基体组分一为透明质酸或透明质酸衍生物,进一步优选为透明质酸衍生物,所述透明质酸衍生物优选为透明质酸的一个或多个侧链基团进行功能化修饰得到的衍生物,所述一个或多个侧链基团优选为醛基、酰胺基团和接枝 $\beta$ -环糊精中的一种或多种;具体的为甲基丙烯酰化透明质酸、透明质酸环糊精衍生物或醛基化透明质酸。

[0025] 在本发明纳米膜中,所述高分子基体组分二为胶原、明胶、甲基丙烯酰化明胶或脱细胞基质中的一种,进一步优选为明胶、甲基丙烯酰化明胶、或脱细胞基质中的一种。

[0026] 在本发明纳米膜中,所述功能性组分包括药物和活性因子,所述药物优选为地塞米松、地塞米松磷酸钠、强力霉素或盐酸强力霉素中的一种或几种,所述活性因子优选为抗菌多肽、抗血管生成多肽、促上皮生长因子中的一种。

[0027] 在本发明中,所述纳米膜的厚度优选为20~500nm,进一步优选为100~400nm,再进一步优选为200~300nm。

[0028] 本发明还提供了所述双组份多功能的纳米膜的制备方法,包括以下步骤:1)高分子基体组分一、高分子基体组分二和水混合,震荡,得混合溶液,将药物溶解于所述混合溶液后,离心取上清液即为原料混合溶液;

[0029] 2)将步骤1)所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,第一风干,然后进行交联,第一真空冷冻干燥,得到预处理纳米膜;

[0030] 3)预处理纳米膜在4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡,然后用乙二胺四乙酸溶液清洗,再于活性因子的PBS溶液中浸泡,去

离子水清洗,第二真空冷冻干燥,得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0031] 4)将PVA溶液滴加到步骤3)所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,第二风干,然后从硅片上剥离,即得纳米膜。

[0032] 在本发明所述制备方法中,步骤1)高分子基体组分一、高分子基体组分二和水混合,震荡,得混合溶液;所述高分子基体组分一和高分子基体组分二混合的质量比优选为1~3:1,进一步优选为1.5~2.5:1,再进一步优选为2:1;所述高分子基体组分一和高分子基体组分二的总质量与水的质量比优选为1:90~110,进一步优选为1:95~105,再进一步优选为1:98~102;所述震荡的温度优选为40~60℃,进一步优选为45~55℃,再进一步优选为48~52℃,所述震荡的频率优选为500~1000Hz,进一步优选为700~900Hz,再进一步优选为750~800Hz;所述震荡的时间优选为90~120min,进一步优选为95~115min,再进一步优选为100~110min。

[0033] 在本发明所述制备方法中,步骤1)将药物溶解于所述混合溶液后,离心取上清液即为原料混合溶液;所述药物与混合溶液的比例优选为10~200mg:1mL,进一步优选为20~180mg:1mL,再进一步优选为40~160mg/mL;所述溶解优选的进行搅拌处理,搅拌优选的在避光条件下进行,搅拌的转速优选为1000~5000r/min,进一步优选为2000~4000r/min,再进一步优选为2500~3000r/min;所述离心的转速优选为2500~3500rpm,进一步优选为2600~3400rpm,再进一步优选为2800~3200rpm,离心的时间优选为5~15min,进一步优选为6~14min,再进一步优选为8~12min。

[0034] 在本发明所述制备方法中,步骤2)将步骤1)所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,第一风干,然后进行交联,第一真空冷冻干燥,得到预处理纳米膜;所述硅片优选为三氯(1H,1H,2H,2H-十三氟正辛基)硅烷疏水处理过的硅片,所述一次旋涂的加速度优选为1400~1600rad/s<sup>2</sup>,进一步优选为1450~1550rad/s<sup>2</sup>,再进一步优选为1480~1520rad/s<sup>2</sup>,一次旋涂的转速优选为5000~8000rpm,进一步优选为6000~7000rpm,再进一步优选为6200~6800rpm,一次旋涂的时间优选为20~40s,进一步优选为25~35s,再进一步优选为28~32s,所述旋涂优选为旋涂仪完成,旋涂仪为市售可得,型号为KW-4C(北京赛德凯斯电子有限责任公司);所述第一风干的温度优选为20~30℃,进一步优选为22~28℃,再进一步优选为24~26℃,所述风干优选在超净台中进行;所述交联为通过EDC-NHS或紫外光引发的聚合反应;所述第一真空冷冻干燥的温度优选为-70~-80℃,进一步优选为-72~-78℃,再进一步优选为-74~-76℃,第一真空冷冻干燥的真空度优选为10~100Pa,进一步优选为15~40Pa,再进一步优选为18~20Pa,第一真空冷冻干燥的时间优选为6~12h,进一步优选为7~11h,再进一步优选为8~10h。

[0035] 在本发明所述制备方法中,步骤3)预处理纳米膜在4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡,然后用乙二醇四乙酸溶液清洗,再于活性因子的PBS溶液中浸泡,去离子水清洗,第二真空冷冻干燥,得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;所述4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液的浓度优选为1~3mg/mL,进一步优选为1.5~2.5mg/mL,再进一步优选为1.8~2.2mg/mL,在4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中的浸泡时间优选为0.5~1.5h,进一步优选为0.6~1.4h,再进一步优选为0.8~1.2h;所述乙二醇四乙酸溶液的浓度优选为0.2~0.4mg/mL,进一步优选为0.25~0.35mg/mL,再进

一步优选为0.28~0.32mg/mL;所述PBS溶液的浓度优选为0.5~3mg/mL,进一步优选为1~2.5mg/mL,再进一步优选为1.5~2mg/mL,在PBS溶液中浸泡的温度优选为0~8℃,进一步优选为2~6℃,再进一步优选为3~5℃,在PBS溶液中浸泡的时间优选为8~12h,进一步优选为9~11h,再进一步优选为9.5~10.5h;所述第二真空冷冻干燥的温度优选为-60~-80℃,进一步优选为-65~-75℃,再进一步优选为-68~-72℃,第二真空冷冻干燥的真空度优选为10~100Pa,进一步优选为12~40Pa,再进一步优选为15~20Pa,第二真空冷冻干燥的时间优选为6~12h,进一步优选为8~12h,再进一步优选为10~12h。

[0036] 在本发明所述制备方法中,步骤4)将PVA溶液滴加到步骤3)所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,第二风干,然后从硅片上剥离,即得纳米膜;所述PVA溶液的质量浓度优选为15~25%,进一步优选为16~24%,再进一步优选为18~22%,PVA溶液的用量优选为0.5~1.5mL,进一步优选为0.6~1.4mL,再进一步优选为0.8~1.2mL;所述二次旋涂的加速度优选为100~500rad/s<sup>2</sup>,进一步优选为150~350rad/s<sup>2</sup>,再进一步优选为200~300rad/s<sup>2</sup>,二次旋涂的转速优选为2000~3000rpm,进一步优选为2200~2800rpm,再进一步优选为2400~2600rpm,二次旋涂的时间优选为20~40s,进一步优选为25~35s,再进一步优选为26~34s,所述旋涂优选的在旋涂仪中进行,旋涂仪为市售可得,旋涂仪的型号为KW-4C(北京赛德凯斯电子有限责任公司);所述第二风干的温度优选为15~25℃,进一步优选为16~24℃,再进一步优选为18~22℃,所述第二风干优选的在超净台中进行。

[0037] 本发明还提供了所述双组份多功能的纳米膜的制备方法或所述纳米膜在制备治疗角膜损伤的产品中的应用,使用时将纳米膜与角膜粘合,使用去离子水除去牺牲层即可。

[0038] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

#### [0039] 实施例1

[0040] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一50%、高分子基体组分二49%、功能性组分1%。

[0041] 1) 甲基丙烯酰化透明质酸(EFL,货号EFL-HAMA-400K)与甲基丙烯酰化明胶(EFL,货号EFL-GM-90)按照质量比1:1混合,溶解在去离子水中,甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶的总质量浓度为1%,温度为40℃震荡,震荡的频率为1000Hz,震荡的时间为120min,得混合溶液,按照地塞米松磷酸钠与混合溶液按照比例1mg:100mL混合,同时加入占溶液总体质量分数0.5%的光引发剂I2959(Sigma-Aldrich,货号410896),(只有部分原料需要使用光引发剂,有些原料使用的是其他交联方法);转速为1000r/min搅拌,然后3000rpm离心10min,取上清液即为原料混合溶液;

[0042] 2) 将步骤1)所得原料混合溶液滴加到单晶硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为1500rad/s<sup>2</sup>,一次旋涂的转速为5500r/min,一次旋涂的时间为20s,温度为25℃第一风干,然后进行光交联,在紫外照射下交联10min,温度为-75℃进行第一真空冷冻干燥,真空度为10Pa,时间为6h,得到预处理纳米膜;

[0043] 3) 预处理纳米膜在浓度为2mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐(ACMEC,货号N65560)溶液中浸泡1h,然后用浓度为0.3mg/mL的乙二胺四乙酸(ACMEC,货号SA03307)溶液清洗,再于浓度为0.5mg/mL的抗菌多肽(强耀生物



科技有限公司)的PBS溶液中浸泡温度为4℃,时间为10h;去离子水清洗,-80℃第二真空冷冻干燥,真空度为10Pa,干燥的时间为12h;得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0044] 4)将1mL质量浓度为20%的聚乙烯醇(缩写为PVA,麦克林,货号P815725)溶液滴加到步骤3)所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为 $500\text{rad/s}^2$ ,二次旋涂的转速为2500rpm,二次旋涂的时间为30s;第二风干成膜,第二风干的温度为20℃,干燥后在保护层的支撑下将纳米膜从单晶硅片上剥离,裁成所需的形状和尺寸,封装。获得具有保护层、负载地塞米松磷酸钠和抗菌多肽的双组分多功能纳米膜。

[0045] 实施例2

[0046] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一60%、高分子基体组分二39%、功能性组分1%。

[0047] 在透明质酸的侧链羧基上接枝环糊精,具体的制备方法为:3g透明质酸钠(源叶生物,货号S24592)溶解于60mL PBS溶液,搅拌溶解后加入1.75mmol的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(缩写为EDC,麦克林,货号N808856)和1.75mmol的N-羟基琥珀酰亚胺(缩写为NHS,麦克林,货号H6231),室温下搅拌30min。0.25mmolβ-CD-EDA(麦克林,货号C6289)先在10mL PBS中溶解,将两种溶液混合后,室温下搅拌24h;得到的溶液在去离子水中透析5天。 -20℃预冻后放入冻干机冻干,得到的白色粉末即透明质酸环糊精衍生物。

[0048] 1)透明质酸环糊精衍生物与胶原蛋白(源叶生物,货号S25686)按照质量比为2:1混合,所得混合物用去离子水配置成水溶液,水溶液中透明质酸环糊精衍生物与胶原蛋白的总质量浓度为1%,震荡,震荡的温度为50℃,震荡的频率为800Hz,震荡的时间为100min,得混合溶液,加入地塞米松磷酸钠,药物与混合溶液的比例为10mg/mL;搅拌,转速为2500r/min,搅拌24h;然后离心取上清液即为原料混合溶液,离心的转速为2500rpm,离心的时间为15min;

[0049] 2)将步骤1)所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为 $1400\text{rad/s}^2$ ,一次旋涂的转速为5000rpm,一次旋涂的时间为20s,第一风干,第一风干的温度为20℃;然后进行化学交联,旋涂后的硅片置于EDC/NHS的乙醇溶液中进行化学交联24h,其中EDC浓度为14.4mM,NH S浓度为5.6mM;第一真空冷冻干燥,第一真空冷冻干燥的温度为-70℃,第一真空冷冻干燥的真空度为40Pa,第一真空冷冻干燥的时间为8h;得到预处理纳米膜;

[0050] 3)预处理纳米膜在浓度为1mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡0.5h,然后用浓度为0.2mg/mL的乙二胺四乙酸溶液清洗,再于浓度为2mg/mL的抗血管生成多肽的PBS溶液中浸泡温度为0℃,时间为8h;去离子水清洗,第二真空冷冻干燥,温度为-65℃,第二真空冷冻干燥的真空度为40Pa,第二真空冷冻干燥的时间为18h;得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0051] 4)将0.5mL质量浓度为15%的PVA水溶液滴加到步骤3)所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为 $300\text{rad/s}^2$ ,二次旋涂的转速为2000rpm,二次旋涂的时间为20s;第二风干,第二风干的温度为15℃,然后从硅片上剥离,剪裁,即得纳米膜。

[0052] 实施例3

[0053] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一75%、高分子基

体组分二24%、功能性组分1%。

[0054] 牛跟腱来源的脱细胞基质由实验室自行制备,具体的制备方法为:从当地屠宰场收集新鲜的牛跟腱,使用组织剪将其剪碎成1-2mm大小的小块,先用质量分数1%的十二烷基硫酸钠(BioReagent,货号L3771)水溶液浸泡72h,然后用质量分数1%的TritonX-100(Sigma-Aldrich,货号X100)溶液浸泡2h。经过上述处理的脱细胞组织用异丙醇进一步浸泡2小时,然后用1:1000质量比的PBS浸泡清洗3天,每天换2次新的PBS。使用0.1%过氧乙酸溶液对组织进行灭菌处理4h,然后用无菌去离子水洗涤6h,将灭菌的脱细胞组织-20℃预冻后放入冻干机冷冻干燥,得到白色块状脱细胞组织。用研钵和研杵将脱细胞组织研磨粉碎,粉碎的组织样品按照10:1的质量比加入胃蛋白酶(源叶生物,货号S10027),在1:10质量比的醋酸溶液中消化72h。消化后溶液使用40 $\mu$ m的筛网(Corning)过滤除去未消化的杂质,所得溶液在-20℃预冻后放入冻干机冻干,得到的白色粉末即为脱细胞基质。

[0055] 1)透明质酸与脱细胞基质按照质量比3:1混合,用水溶解,水中透明质酸和脱细胞基质的总质量浓度为1%,震荡,震荡的温度为60℃,震荡的频率为1000Hz,震荡的时间为90min,得混合溶液,加入盐酸强力霉素,其与混合溶液的比例为100mg/mL;搅拌,转速为5000r/min;然后离心取上清液即为原料混合溶液,离心的转速为3500rpm,离心的时间为15min;

[0056] 2)将步骤1)所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为1600rad/s<sup>2</sup>,一次旋涂的转速为8000rpm,一次旋涂的时间为40s,第一风干,第一风干的温度为30℃;然后进行化学交联,浸泡在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的乙醇溶液中交联24h,其中EDC浓度为14.4mM,NHS浓度为5.6mM;第一真空冷冻干燥,第一真空冷冻干燥的温度为-80℃,第一真空冷冻干燥的真空度为100Pa,第一真空冷冻干燥的时间为12h;得到预处理纳米膜;

[0057] 3)预处理纳米膜在浓度为3mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡1.5h,然后用浓度为0.4mg/mL的乙二醇四乙酸溶液清洗,再于浓度为3mg/mL的促上皮生长因子的PBS溶液中浸泡温度为8℃,时间为12h;去离子水清洗,第二真空冷冻干燥,温度为-75℃,第二真空冷冻干燥的真空度为100Pa,第二真空冷冻干燥的时间为24h;得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0058] 4)将1.5mL质量浓度为25%的PVA溶液滴加到步骤3)所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为100rad/s<sup>2</sup>,二次旋涂的转速为3000rpm,二次旋涂的时间为40s;第二风干,第二风干的温度为25℃,然后从硅片上剥离,剪裁,即得纳米膜。

[0059] 实施例4

[0060] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一75%、高分子基体组分二24%、功能性组分1%。

[0061] 1)醛基化透明质酸(CreativePEGWorks,货号ZCR-HA-311)与明胶(Sigma-Aldrich,货号V900863)按照质量比3:1混合,用水溶解,水中醛基化透明质酸和明胶的总质量浓度为1%,震荡,震荡的温度为60℃,震荡的频率次数为1000Hz,震荡的时间为90min,得混合溶液,加入盐酸强力霉素(Sigma-Aldrich,货号D3072),其与混合溶液的比例为100mg/mL;搅拌,转速为3000r/min;然后离心取上清液即为原料混合溶液,离心的转速为3500rpm,

离心的时间为15min;

[0062] 2) 将步骤1) 所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂, 一次旋涂的加速度为 $1600\text{rad/s}^2$ , 一次旋涂的转速为8000rpm, 一次旋涂的时间为40s, 第一风干, 第一风干的温度为 $30^\circ\text{C}$ ; 然后进行化学交联, 浸泡在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的乙醇溶液中交联24h, 其中EDC浓度为 $14.4\text{mM}$ , NHS浓度为 $5.6\text{mM}$ ; 第一真空冷冻干燥, 第一真空冷冻干燥的温度为 $-80^\circ\text{C}$ , 第一真空冷冻干燥的真空度为50Pa, 第一真空冷冻干燥的时间为10h; 得到预处理纳米膜;

[0063] 3) 预处理纳米膜在浓度为 $3\text{mg/mL}$ 的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡1.5h, 然后用浓度为 $0.4\text{mg/mL}$ 的乙二胺四乙酸溶液清洗, 再于浓度为 $3\text{mg/mL}$ 的抗菌多肽的PBS溶液中浸泡温度为 $8^\circ\text{C}$ , 时间为12h; 去离子水清洗, 第二真空冷冻干燥, 温度为 $-75^\circ\text{C}$ , 第二真空冷冻干燥的真空度为50Pa, 第二真空冷冻干燥的时间为24h; 得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0064] 4) 将 $1.5\text{mL}$ 质量浓度为25%的PVA溶液滴加到步骤3) 所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂, 二次旋涂的加速度为 $100\text{rad/s}^2$ , 二次旋涂的转速为3000rpm, 二次旋涂的时间为20s; 第二风干, 第二风干的温度为 $15^\circ\text{C}$ , 然后从硅片上剥离, 剪裁, 即得纳米膜。

[0065] 实施例5

[0066] 一种双组份多功能的纳米膜, 组分的质量分数: 高分子基体组分一50%、高分子基体组分二49%、功能性组分1%。

[0067] 1) 甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶按照质量比1:1混合, 溶解在去离子水中, 甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶的总质量浓度为1%, 温度为 $40^\circ\text{C}$ 震荡, 震荡的频率为1000Hz, 震荡的时间为120min, 得混合溶液, 按照地塞米松磷酸钠(ACMEC, 货号D32140)与混合溶液按照比例 $1\text{mg}:100\text{mL}$ 混合, 同时加入占溶液总体质量分数0.5%的光引发剂I2959(Sigma-Aldrich, 货号410896); 转速为1000r/min搅拌, 然后3000rpm离心10min, 取上清液即为原料混合溶液;

[0068] 2) 将步骤1) 所得原料混合溶液滴加到单晶硅片进行一次旋涂, 一次旋涂的加速度为 $1500\text{rad/s}^2$ , 一次旋涂的转速为5500r/min, 一次旋涂的时间为20s, 温度为 $25^\circ\text{C}$ 第一风干, 然后进行光交联, 在紫外照射下交联10min, 温度为 $-75^\circ\text{C}$ 进行第一真空冷冻干燥, 真空度为10Pa, 时间为6h, 得到预处理纳米膜;

[0069] 3) 预处理纳米膜在浓度为 $2\text{mg/mL}$ 的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡1h, 然后用浓度为 $0.3\text{mg/mL}$ 的乙二胺四乙酸溶液清洗, 再于浓度为 $0.5\text{mg/mL}$ 的抗血管生成肽(强耀生物科技有限公司)的PBS溶液中浸泡温度为 $4^\circ\text{C}$ , 时间为10h; 去离子水清洗,  $-80^\circ\text{C}$ 第二真空冷冻干燥, 真空度为10Pa, 干燥的时间为12h; 得负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0070] 4) 将 $1\text{mL}$ 质量浓度为20%的PVA溶液滴加到步骤3) 所得负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂, 二次旋涂的加速度为 $500\text{rad/s}^2$ , 二次旋涂的转速为2500rpm, 二次旋涂的时间为30s; 第二风干成膜, 第二风干的温度为 $20^\circ\text{C}$ , 干燥后在保护层的支撑下将纳米膜从单晶硅片上剥离, 裁成所需的形状和尺寸, 封装。获得具有保护层、负载地塞米松磷酸钠和抗血管生成多肽的双组分多功能纳米膜。

[0071] 对比例1

[0072] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一50%、高分子基体组分二49%、功能性组分1%。

[0073] 1) 甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶按照质量比1:1混合,溶解在去离子水中,甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶的总质量浓度为1%,温度为40℃震荡,震荡的频率为1000Hz,震荡的时间为120min,得混合溶液,按照地塞米松磷酸钠与混合溶液按照比例1mg:100mL混合,同时加入占溶液总体质量分数0.5%的光引发剂I2959 (Sigma-Aldrich,货号410896);转速为1000r/min搅拌,然后3000rpm离心10min,取上清液即为原料混合溶液;

[0074] 2) 将步骤1)所得原料混合溶液滴加到单晶硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为1500rad/s<sup>2</sup>,一次旋涂的转速为5500r/min,一次旋涂的时间为20s,温度为25℃第一风干,然后进行光交联,在紫外照射下交联10min,温度为-75℃进行第一真空冷冻干燥,真空度为10Pa,时间为6h,得到预处理纳米膜;

[0075] 3) 预处理纳米膜在浓度为2mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡1h,然后用浓度为0.3mg/mL的乙二胺四乙酸溶液清洗;去离子水清洗,-80℃第二真空冷冻干燥,真空度为10Pa,干燥的时间为12h;得负载药物的预处理纳米膜;

[0076] 4) 将1mL质量浓度为20%的PVA溶液滴加到步骤3)所得负载药物的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为500rad/s<sup>2</sup>,二次旋涂的转速为2500rpm,二次旋涂的时间为30s;第二风干成膜,第二风干的温度为20℃,干燥后在保护层的支撑下将纳米膜从单晶硅片上剥离,裁成所需的形状和尺寸,封装。获得纳米膜。

[0077] 对比例2

[0078] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一50%、高分子基体组分二49%、功能性组分1%。

[0079] 1) 甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶按照质量比1:1混合,溶解在去离子水中,甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶的总质量浓度为1%,温度为40℃震荡,震荡的频率为1000Hz,震荡的时间为120min,得混合溶液,同时加入占溶液总体质量分数0.5%的光引发剂I2959 (Sigma-Aldrich,货号410896);转速为1000r/min搅拌,然后3000rpm离心10min,取上清液即为原料混合溶液;

[0080] 2) 将步骤1)所得原料混合溶液滴加到单晶硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为1500rad/s<sup>2</sup>,一次旋涂的转速为5500r/min,一次旋涂的时间为20s,温度为25℃第一风干,然后进行光交联,在紫外照射下交联10min,温度为-75℃进行第一真空冷冻干燥,真空度为10Pa,时间为6h,得到预处理纳米膜;

[0081] 3) 预处理纳米膜在浓度为2mg/mL的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡1h,然后用浓度为0.3mg/mL的乙二胺四乙酸溶液清洗,再于浓度为0.5mg/mL的抗血管生成肽的PBS溶液中浸泡温度为4℃,时间为10h;去离子水清洗,-80℃第二真空冷冻干燥,真空度为10Pa,干燥的时间为12h;得负载活性因子的预处理纳米膜;

[0082] 4) 将1mL质量浓度为20%的PVA溶液滴加到步骤3)所得负载活性因子的预处理纳

米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为 $500\text{rad/s}^2$ ,二次旋涂的转速为 $2500\text{rpm}$ ,二次旋涂的时间为 $30\text{s}$ ;第二风干成膜,第二风干的温度为 $20^\circ\text{C}$ ,干燥后在保护层的支撑下将纳米膜从单晶硅片上剥离,裁成所需的形状和尺寸,封装。获得纳米膜。

[0083] 对比例3

[0084] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一 $50\%$ 、高分子基体组分二 $49\%$ 。

[0085] 1) 甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶按照质量比 $1:1$ 混合,溶解在去离子水中,甲基丙烯酰化透明质酸与甲基丙烯酰化明胶的总质量浓度为 $1\%$ ,温度为 $40^\circ\text{C}$ 震荡,震荡的频率为 $1000\text{Hz}$ ,震荡的时间为 $120\text{min}$ ,得混合溶液,同时加入占溶液总体质量分数 $0.5\%$ 的光引发剂I2959(Sigma-Aldrich,货号410896);转速为 $1000\text{r/min}$ 搅拌,然后 $3000\text{rpm}$ 离心 $10\text{min}$ ,取上清液即为原料混合溶液;

[0086] 2) 将步骤1)所得原料混合溶液滴加到单晶硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为 $1500\text{rad/s}^2$ ,一次旋涂的转速为 $5500\text{r/min}$ ,一次旋涂的时间为 $20\text{s}$ ,温度为 $25^\circ\text{C}$ 第一风干,然后进行光交联,在紫外照射下交联 $10\text{min}$ ,温度为 $-75^\circ\text{C}$ 进行第一真空冷冻干燥,真空度为 $10\text{Pa}$ ,时间为 $6\text{h}$ ,得到预处理纳米膜;

[0087] 3) 预处理纳米膜在浓度为 $2\text{mg/mL}$ 的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡 $1\text{h}$ ,然后用浓度为 $0.3\text{mg/mL}$ 的乙二胺四乙酸溶液清洗;去离子水清洗, $-80^\circ\text{C}$ 第二真空冷冻干燥,真空度为 $10\text{Pa}$ ,干燥的时间为 $12\text{h}$ ;得不负载药物和活性因子的预处理纳米膜;

[0088] 4) 将 $1\text{mL}$ 质量浓度为 $20\%$ 的PVA溶液滴加到步骤3)所得不负载药物和活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为 $500\text{rad/s}^2$ ,二次旋涂的转速为 $2500\text{rpm}$ ,二次旋涂的时间为 $30\text{s}$ ;第二风干成膜,第二风干的温度为 $20^\circ\text{C}$ ,干燥后在保护层的支撑下将纳米膜从单晶硅片上剥离,裁成所需的形状和尺寸,封装,获得纳米膜。

[0089] 对比例4

[0090] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一 $75\%$ 、高分子基体组分二 $24\%$ 、功能性组分 $1\%$ 。

[0091] 1) 醛基化透明质酸与明胶按照质量比 $3:1$ 混合,用水溶解,水中醛基化透明质酸和明胶的总质量浓度为 $1\%$ ,震荡,震荡的温度为 $60^\circ\text{C}$ ,震荡的频率次数为 $1000\text{Hz}$ ,震荡的时间为 $90\text{min}$ ,得混合溶液,加入盐酸强力霉素,其与混合溶液的比例为 $100\text{mg/mL}$ ;搅拌,转速为 $3000\text{r/min}$ ;然后离心取上清液即为原料混合溶液,离心的转速为 $3500\text{rpm}$ ,离心的时间为 $15\text{min}$ ;

[0092] 2) 将步骤1)所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为 $1600\text{rad/s}^2$ ,一次旋涂的转速为 $8000\text{rpm}$ ,一次旋涂的时间为 $40\text{s}$ ,第一风干,第一风干的温度为 $30^\circ\text{C}$ ;然后进行化学交联,浸泡在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)的乙醇溶液中交联 $24\text{h}$ ,其中EDC浓度为 $14.4\text{mM}$ ,NHS浓度为 $5.6\text{mM}$ ;第一真空冷冻干燥,第一真空冷冻干燥的温度为 $-80^\circ\text{C}$ ,第一真空冷冻干燥的真空度为 $50\text{Pa}$ ,第一真空冷冻干燥的时间为 $10\text{h}$ ;得到预处理纳米膜;

[0093] 3) 预处理纳米膜在浓度为 $3\text{mg/mL}$ 的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡 $1.5\text{h}$ ,然后用浓度为 $0.4\text{mg/mL}$ 的乙二胺四乙酸溶液

清洗;去离子水清洗,第二真空冷冻干燥,温度为 $-75^{\circ}\text{C}$ ,第二真空冷冻干燥的真空度为 $50\text{Pa}$ ,第二真空冷冻干燥的时间为 $24\text{h}$ ;得负载药物的预处理纳米膜;

[0094] 4) 将 $1.5\text{mL}$ 质量浓度为 $25\%$ 的PVA溶液滴加到步骤3)所得负载药物的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为 $100\text{rad/s}^2$ ,二次旋涂的转速为 $3000\text{rpm}$ ,二次旋涂的时间为 $20\text{s}$ ;第二风干,第二风干的温度为 $15^{\circ}\text{C}$ ,然后从硅片上剥离,剪裁,即得纳米膜。

[0095] 对比例5

[0096] 一种双组份多功能的纳米膜,组分的质量分数:高分子基体组分一 $75\%$ 、高分子基体组分二 $24\%$ 、功能性组分 $1\%$ 。

[0097] 1) 醛基化透明质酸与明胶按照质量比 $3:1$ 混合,用水溶解,水中醛基化透明质酸和明胶的总质量浓度为 $1\%$ ,震荡,震荡的温度为 $60^{\circ}\text{C}$ ,震荡的频率次数为 $1000\text{Hz}$ ,震荡的时间为 $90\text{min}$ ,得混合溶液;搅拌,转速为 $3000\text{r/min}$ ;然后离心取上清液即为原料混合溶液,离心的转速为 $3500\text{rpm}$ ,离心的时间为 $15\text{min}$ ;

[0098] 2) 将步骤1)所得原料混合溶液滴加到硅片进行一次旋涂,一次旋涂的加速度为 $1600\text{rad/s}^2$ ,一次旋涂的转速为 $8000\text{rpm}$ ,一次旋涂的时间为 $40\text{s}$ ,第一风干,第一风干的温度为 $30^{\circ}\text{C}$ ;然后进行化学交联,浸泡在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的乙醇溶液中交联 $24\text{h}$ ,其中EDC浓度为 $14.4\text{mM}$ ,NHS浓度为 $5.6\text{mM}$ ;第一真空冷冻干燥,第一真空冷冻干燥的温度为 $-80^{\circ}\text{C}$ ,第一真空冷冻干燥的真空度为 $50\text{Pa}$ ,第一真空冷冻干燥的时间为 $10\text{h}$ ;得到预处理纳米膜;

[0099] 3) 预处理纳米膜在浓度为 $3\text{mg/mL}$ 的4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-3-硫代-N-琥珀酰亚胺酯钠盐溶液中浸泡 $1.5\text{h}$ ,然后用浓度为 $0.4\text{mg/mL}$ 的乙二胺四乙酸溶液清洗,再于浓度为 $3\text{mg/mL}$ 的抗菌多肽的PBS溶液中浸泡温度为 $8^{\circ}\text{C}$ ,时间为 $12\text{h}$ ;去离子水清洗,第二真空冷冻干燥,温度为 $-75^{\circ}\text{C}$ ,第二真空冷冻干燥的真空度为 $50\text{Pa}$ ,第二真空冷冻干燥的时间为 $24\text{h}$ ;得负载活性因子的预处理纳米膜;

[0100] 4) 将 $1.5\text{mL}$ 质量浓度为 $25\%$ 的PVA溶液滴加到步骤3)所得负载活性因子的预处理纳米膜表面进行二次旋涂,二次旋涂的加速度为 $100\text{rad/s}^2$ ,二次旋涂的转速为 $3000\text{rpm}$ ,二次旋涂的时间为 $20\text{s}$ ;第二风干,第二风干的温度为 $15^{\circ}\text{C}$ ,然后从硅片上剥离,剪裁,即得纳米膜。

[0101] 实验例1

[0102] 采用本发明实施例1制备所得纳米膜治疗角膜疾病的眼表操作及OCT检查

[0103] 采用新西兰大白兔正常角膜进行纳米膜的眼表操作演示,并通过光学相干断层扫描(OCT)检查角膜各层次结构及纳米膜贴附情况。

[0104] 如图1所示,图1中A为正常兔角膜的光学照片和OCT结构层次图,显示正常角膜厚度约为 $374\mu\text{m}$ ,有5层结构;上皮层 $33\mu\text{m}$ ,前弹力层,基质层 $320\mu\text{m}$ ,后弹力层和内皮层;B为刮除角膜上皮后,角膜变得水肿,OCT上的厚度为 $410\mu\text{m}$ ;C为纳米膜贴附在角膜表面,OCT上显示带有牺牲层的功能性纳米膜的厚度约为 $16\mu\text{m}$ ;D为用生理盐水冲洗角膜后,牺牲层溶解,OCT分辨率无法检测到纳米级别的功能性纳米膜,角膜厚度仍为 $410\mu\text{m}$ ;纳米膜可以无需缝线直接贴附在角膜表面,水溶性牺牲层便于操作,贴附后通过生理盐水即可去除牺牲层,保留纳米膜与角膜的紧密贴合。

[0105] 实验例2

[0106] 纳米膜治疗角膜碱烧伤的实验

[0107] 采用新西兰大白兔角膜碱烧伤模型,研究纳米膜中不同活性成分(主要包含地塞米松和/或抗血管生成肽组分)对角膜碱烧伤的治疗效果,重点关注其抗炎、抗新生血管和促进上皮修复作用。

[0108] 成熟的新西兰大白兔(2.0~2.5kg)右眼造模,利用毛细管取等量的1M氢氧化钠溶液,完全润湿直径为6mm的滤纸,并将滤纸浸润至右眼角膜中央30s,建立稳定均一的角膜碱烧伤模型。

[0109] 造模成功后随机分为5组,每组4只,分别予以空白对照组(即为模型组)、地塞米松纳米膜(对比例1)、抗血管生成肽纳米膜(对比例2)、未添加药物或活性成分的纳米膜(对比例3)、地塞米松抗血管生成肽纳米膜处理(实施例5),通过观察角膜混浊、角膜炎症、新生血管及上皮修复情况评价对角膜碱烧伤的治疗效果。

[0110] 结果如图2中的A、C所示,A和C为利用裂隙灯显微镜眼前段照相观察碱烧伤造模后7天角膜混浊、眼表充血和角膜新生血管情况,进行评分。

[0111] 角膜中央碱烧伤区域评分标准0-5分:0分,角膜完全透明,用任何裂隙灯检查法也不能见到浑浊。1分,极轻微的角膜浑浊,仅能通过裂隙灯的间接宽切线照明法才能见到。2分,轻度的角膜混浊,用裂隙灯直接照明法或弥散光照射法仔细观察时才能见到的低密度浑浊,可见瞳孔和虹膜静脉。3分,中度的角膜混浊,用裂隙灯检查可直接观察到中密度混浊,只可见瞳孔。4分,重度角膜混浊,混浊明显遮挡裂隙灯光线穿过角膜,仅可见前房存在。5分,极重度混浊,混浊完全遮挡裂隙灯光线穿过角膜,无法观察到前房结构。

[0112] 结膜及角膜缘充血评分标准0-3分:0分,无充血;1分,在角膜边缘有轻微充血;2分,在角膜边缘出现中度充血;3分,角膜边缘严重充血,有明显静脉。

[0113] 新生血管评分标准0-4分:0分,无角膜内血管,角膜巩膜缘正常;1分,小于5个血管祥,不大于0.3mm;2分,5~15个血管祥,不大于0.3mm;3分,15条以上血管或血管祥大于0.3mm;4分,2个或以上血管祥大于0.5mm。

[0114] 未添加药物或活性成分的纳米膜(对比例3)组角膜中央碱烧伤区域混浊评分 $4.2 \pm 0.27$ 、结膜及角膜缘充血评分 $2.5 \pm 0.5$ 和新生血管评分 $3.4 \pm 0.54$ 与空白对照组角膜中央碱烧伤区域呈现瓷白色圆形混浊,中央区域的眼内结构窥不入,角膜混浊评分: $4.5 \pm 0.05$ ,结膜及角膜缘充血评分: $2.5 \pm 0.5$ ,新生血管评分: $3.8 \pm 0.44$ 无明显差异( $P > 0.05$ )。

[0115] 地塞米松纳米膜(对比例1)组角膜中央碱烧伤区域混浊评分 $3.6 \pm 0.41$ ,结膜及角膜缘充血评分 $1.5 \pm 0.61$ ,新生血管评分 $1.8 \pm 0.83$ ;抗血管生成肽纳米膜(对比例2)组角膜中央碱烧伤区域混浊评分 $3.7 \pm 0.44$ ,结膜及角膜缘充血评分 $2.4 \pm 0.41$ ,新生血管评分 $1.8 \pm 0.44$ ,均有明显减轻;其中地塞米松透明质酸纳米膜组充血明显减轻;地塞米松透明质酸纳米膜组和抗血管生成肽透明质酸纳米膜组新生血管均明显减轻。地塞米松抗血管生成肽纳米膜处理(实施例5)组组角膜中央碱烧伤区域混浊评分 $2.6 \pm 0.42$ 、结膜及角膜缘充血评分 $0.6 \pm 0.41$ 和新生血管评分 $0.4 \pm 0.55$ 均明显减轻,其评分低于其他4组( $P < 0.05$ )。

[0116] 如图2中的B、D所示,利用荧光素钠染色观察碱烧伤造模后7天角膜上皮修复情况。角膜上皮缺损处被荧光素钠染成边界清楚的绿色区域。利用Image J对染色区域进行识别和面积计算,获得缺损面积结果。

[0117] 空白对照组角膜中央上皮呈圆形缺损。对比例3透明质酸纳米膜组 ( $7.18 \pm 7.37\text{mm}^2$ ) 与空白对照组 ( $14.68 \pm 8.85\text{mm}^2$ ) 相比,角膜上皮缺损面积减少 ( $P < 0.05$ )。地塞米松纳米膜(对比例1)组 ( $7.87 \pm 5.56\text{mm}^2$ ) 和抗血管生成肽纳米膜(对比例2)组 ( $7.35 \pm 4.64\text{mm}^2$ ) 角膜上皮缺损面积进一步减少,且均小于对照组。地塞米松抗血管生成肽纳米膜处理(实施例5)组 ( $0.94 \pm 0.92\text{mm}^2$ ) 无明显荧光素染色区域,提示角膜上皮修复良好;其缺损面积均低于其他4组 ( $P < 0.05$ )。

[0118] 以上结果表明:未添加药物或活性成分的纳米膜(对比例3)对角膜碱烧伤的上皮修复具有促进作用。地塞米松纳米膜(对比例1)对角膜碱烧伤具有抗炎作用,减轻眼表充血。抗血管生成肽纳米膜(对比例2)对角膜碱烧伤具有阻止血管生成的作用,能够抑制新生血管形成。地塞米松抗血管生成肽纳米膜(实施例5)具备促进上皮修复、抗炎和抑制新生血管的多功能作用,能够有效治疗角膜碱烧伤。

[0119] 实验例3

[0120] 纳米膜治疗铜绿假单胞菌性角膜炎的实验

[0121] 采用新西兰大白兔铜绿假单胞菌性角膜炎模型,研究纳米膜(负载药物为盐酸强力霉素和/或抗菌多肽组分)对铜绿假单胞菌性角膜炎的治疗效果,重点关注其抗菌作用。

[0122] 成熟的新西兰大白兔(2.0-2.5kg)右眼造模,中央角膜区域用 $6 \times 6$ 毫米环钻轻压做标记,30G胰岛素针在中央角膜标记区域做浅角膜基质隧道,注 $10\mu\text{L}$ 含有 $10^3\text{CFU}$ 的铜绿假单胞菌悬浮液到隧道。随机分为4组,每组4只,分别予以空白对照(即为模型组)、盐酸强力霉素纳米膜(对比例4)、抗菌多肽纳米膜(对比例5)、盐酸强力霉素抗菌多肽纳米膜(实施例4)处理。通过观察角膜感染控制情况并进行临床评分、对角膜上皮缺损区域用Image J进行面积提取和计算、取材检测细菌含量评价对铜绿假单胞菌性角膜炎的治疗效果。

[0123] 铜绿假单胞菌性角膜炎模型临床评分标准0-4分:0分,角膜透明,无混浊,表面规则。1分,角膜混浊范围1%-25%,角膜轻度不规则,角膜轻微混浊,虹膜血管及瞳孔清晰可见。2分,角膜混浊范围26%-50%,角膜基质水肿,表面隆起或凹陷,角膜轻度混浊,虹膜血管及瞳孔清晰可见。3分,角膜混浊范围51%-75%,角膜基质明显水肿,明显凹陷或后弹力层膨出,角膜不均匀混浊,其后结构不可见。4分,角膜混浊范围76%-100%,角膜穿孔,角膜均匀一致的混浊,其后结构不可见。

[0124] 结果如图3所示,图3中A和C为利用裂隙灯显微镜眼前段照相观察铜绿假单胞菌性角膜炎造模后7天,空白对照组(模型组)角膜充血伴大片灰白色溃疡病灶,临床评分为: $3.65 \pm 0.47$ ;盐酸强力霉素纳米膜(对比例4,临床评分为: $2.25 \pm 0.28$ )和抗菌多肽纳米膜(对比例5,临床评分为: $1.87 \pm 0.25$ )明显抑制角膜感染,溃疡病灶明显减轻,临床评分降低 ( $P < 0.05$ )。盐酸强力霉素抗菌多肽纳米膜(实施例4,临床评分为: $0.62 \pm 0.47$ )有效抑制角膜感染,临床评分明显低于盐酸强力霉素纳米膜和抗菌多肽纳米膜组 ( $P < 0.05$ )。

[0125] 图3中B和D表明,利用荧光素钠染色观察铜绿假单胞菌性角膜炎造模后7天角膜上皮修复情况。角膜上皮缺损处被荧光素钠染成边界清楚的绿色区域。利用Image J对染色区域进行识别和面积计算,获得缺损面积结果。

[0126] 空白对照组(模型组)角膜中央上皮大片染色,角膜上皮缺损面积 $19.58 \pm 8.13\text{mm}^2$ 。盐酸强力霉素纳米膜(对比例4)角膜上皮缺损面积 $5.48 \pm 4.55\text{mm}^2$ ,抗菌多肽纳米膜组(对比例5)角膜上皮缺损面积 $6.04 \pm 3.53\text{mm}^2$ ,盐酸强力霉素纳米膜(对比例4)和抗菌



多肽纳米膜组角膜中央边界清晰的缺损染色区域。盐酸强力霉素抗菌多肽纳米膜组(实施例4)角膜上皮缺损面积 $0.7 \pm 0.96 \text{mm}^2$ ,无明显染色,角膜上皮修复良好( $P < 0.05$ )。

[0127] 图3中E为各组角膜取材后透明度比较,盐酸强力霉素抗菌多肽纳米膜组(实施例4)透明度最好。

[0128] 图3中F和G各组角膜匀浆后进行培养和CFU计数,空白对照组(模型组)培养后可见明显菌落形成,盐酸强力霉素纳米膜(对比例4)和抗菌多肽纳米膜组(对比例5)菌落明显减少,盐酸强力霉素抗菌多肽纳米膜组(实施例4)几乎无明显菌落形成,CFU计数最少。

[0129] 以上结果表明:盐酸强力霉素纳米膜和抗菌多肽纳米膜均能有效抑制铜绿假单胞菌性角膜炎感染病灶,促进角膜上皮修复。盐酸强力霉素和抗菌多肽结合的多组分的纳米膜(实施例4)能够更有效地治疗铜绿假单胞菌性角膜炎。

[0130] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,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。

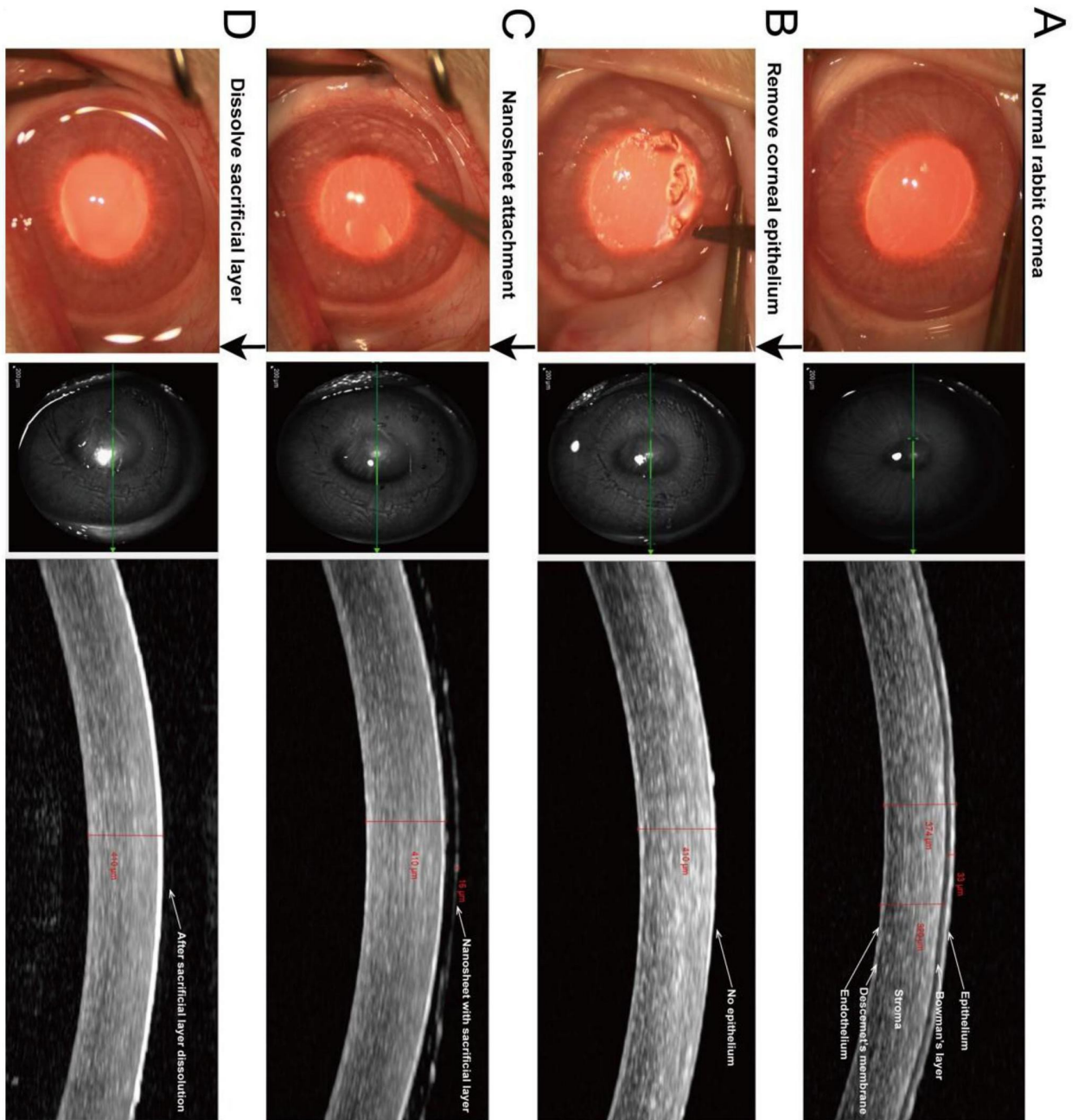


图1

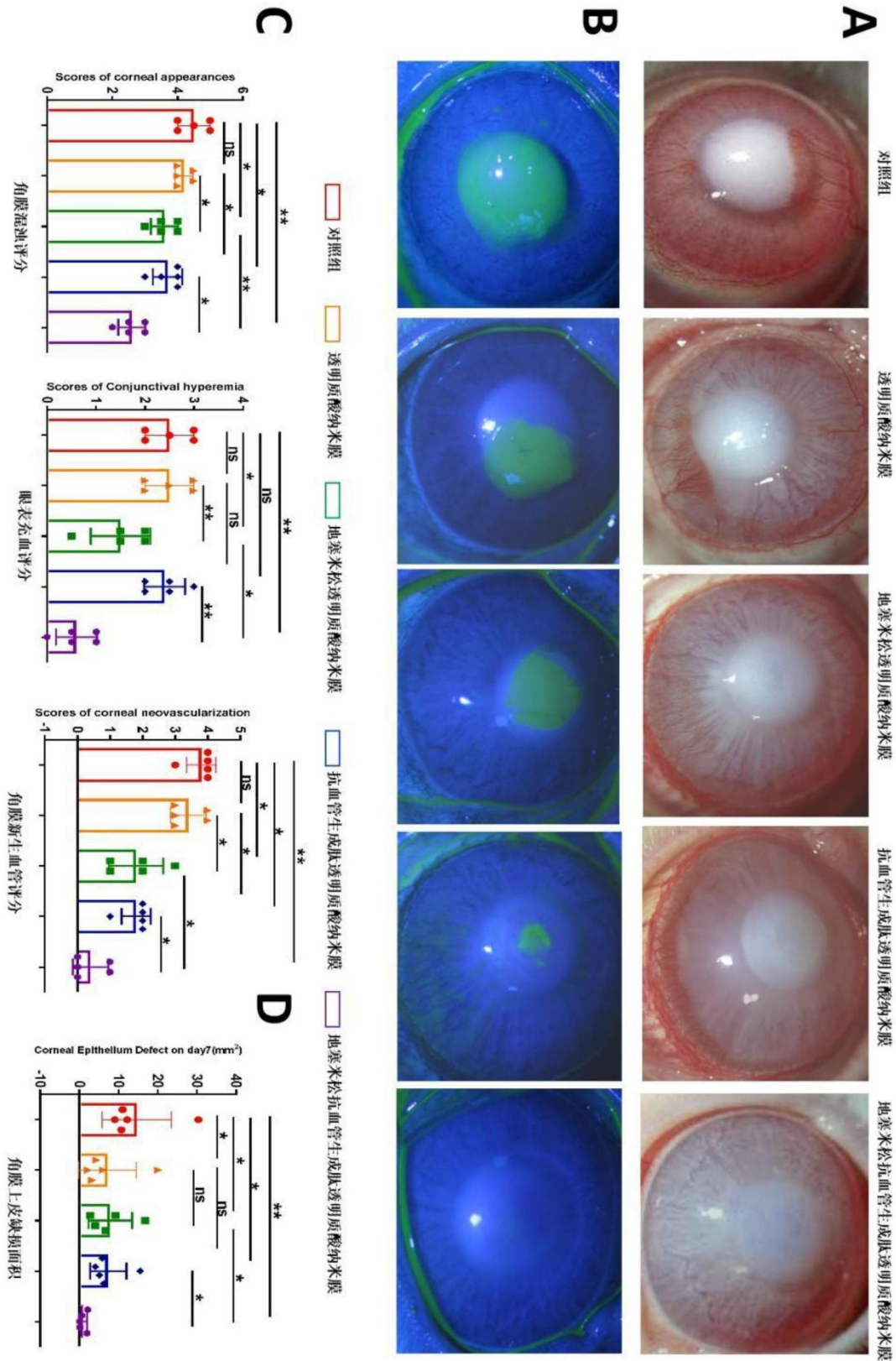


图2

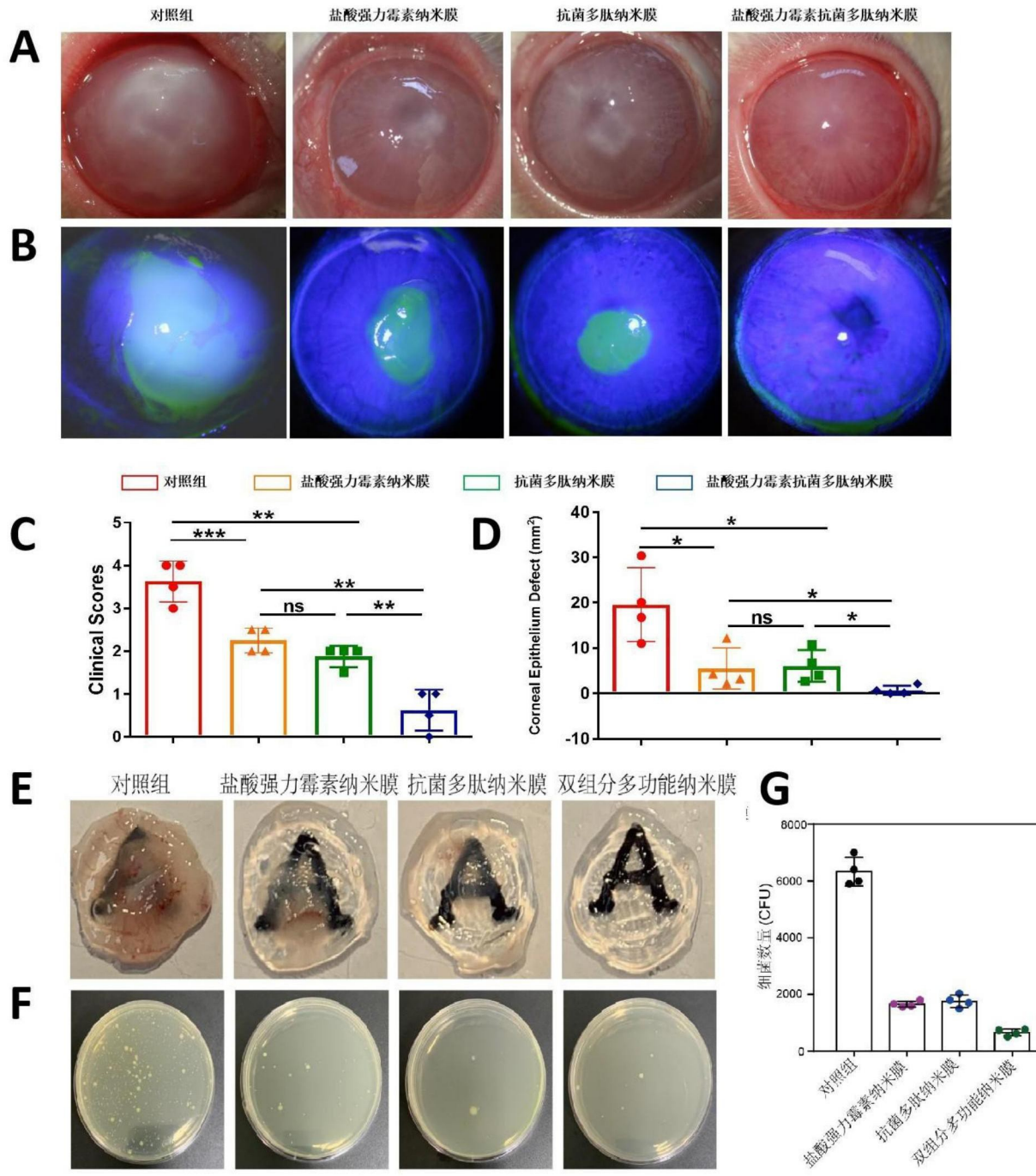


图3