(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102159220 A
(43)申请公布日 2011.08.17

(21)申请号 200980118448.0

(22)申请日 2009.04.23

(30)优先权数据
61/047,590 2008.04.24 US
61/055,037 2008.05.21 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.11.16

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2009/041590 2009.04.23

(87)PCT申请的公布数据
WO2009/132226 EN 2009.10.29

(71)申请人 麦德托尼克公司
地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 M·N·冈萨雷斯 E·J·缇吉斯玛 N·沙夫豪森

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陈文青

(51)Int.Cl.
A61K 31/722(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61K 9/06(2006.01)
A61K 47/02(2006.01)
A61P 11/02(2006.01)
A61P 27/16(2006.01)
A61P 27/00(2006.01)

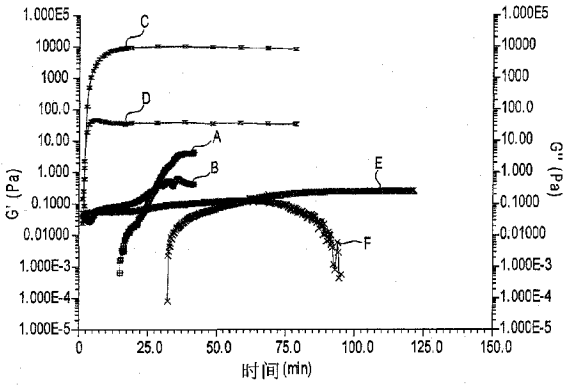
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 4 页

(54)发明名称

硫醇化的壳聚糖凝胶

(57)摘要

身体组织和结构可以用由两部分组合物制成的凝胶层包被，其第一部分含有硫醇化壳聚糖，其第二部分含有充足的氧化剂或外部交联剂以便当该两部分混合并包被到该组织或结构上时，该混合物将在少于30分钟的时间内形成保护性凝胶层。



CN 102159220 A

1. 在手术期间或手术之后立即治疗耳、鼻或喉中粘膜组织的方法，所述方法包括：

a) 在手术期间或手术后立即将含有硫醇化壳聚糖和氧化剂或外来交联剂的混合物的流体层施加到所述耳、鼻或喉中粘膜组织，和

b) 允许所述混合物在原位形成保护性凝胶层作为组织密封剂。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，包括将所述流体层施加到鼻腔。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，包括将所述流体层施加到窦腔。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，包括将所述流体层施加到中耳或内耳。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，包括通过喷雾、灌洗、雾化、擦拭、芯吸或滴注施加所述流体层。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述流体层含有过氧化氢。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述流体层含有京尼平。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中胶凝化在少于 30 分钟内发生。

9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中胶凝化在少于 10 分钟内发生。

10. 一种用于保护耳、鼻或喉中粘膜组织的二部分组合物，第一部分包含硫醇化壳聚糖，第二部分包含充足的氧化剂或外来交联剂以便当两部分混合并包被到所述粘膜组织上时，混合物在少于 30 分钟内形成保护性凝胶层。

11. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述第一和第二部分各自包装在多筒式注射器的筒中。

12. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述第一部分是自由流动的干燥粉末。

13. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述第一和第二部分各自为水溶液。

14. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述第二部分含有过氧化氢。

15. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述第二部分含有京尼平。

16. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中当所述二部分混合时，凝胶层将在少于 10 分钟内形成。

17. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中当所述二部分混合时，凝胶层将在少于 5 分钟内形成。

18. 一种在耳、鼻或喉中的粘膜组织顶上的流体层，所述层包含硫醇化壳聚糖和充足的氧化剂或外来交联剂以便保护性凝胶层将在少于 30 分钟内原位形成。

19. 根据权利要求 18 所述的流体层，其含有过氧化氢。

20. 根据权利要求 18 所述的流体层，其含有京尼平。

21. 根据权利要求 18 所述的流体层，含有约 1 ～约 20wt. %的硫醇化壳聚糖和约 0.01 ～约 1wt. %的氧化剂。

22. 根据权利要求 18 所述的流体层，含有约 1 ～约 20wt. %的硫醇化壳聚糖和约 0.1 ～约 10wt. %的外来交联剂。

硫醇化的壳聚糖凝胶

技术领域

[0001] 本发明涉及多糖和用于身体的材料。

背景技术

[0002] 某些多糖材料已经用于手术修复或药物递送。关于这些材料的文献包括美国专利号6,514,522(Domb)和7,053,068B2(Prinz)，美国专利申请公开号US 2005/0176620A1(Prestwych等人)和US 2005/0238702A1(Ishihara等人)，加拿大专利申请号2 348 842 A1(Bernkop-Schnürch)，公开的PCT申请号WO 98/31712A2(B.F.Goodrich Co.)、WO 01/00246A2(Bentley等人)和WO 03/020771A1(Mucobiomer Biotechnologische Forschungs-und Entwicklungs GmbH)，Mi等人，Synthesis and Characterization of a Novel Chitosan-Based Network Prepared Using Naturally-Occurring Crosslinker，J Polym Sci，Part A:Polym Chem,38,2804-2814(2000)，Mi等人，Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads，Polymer,44,6521-30(2003)，Roldo等人，Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery:synthesis and in vitro evaluation，European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,57,115-121(2004)，Krauland等人，Viscoelastic Properties of a New in situ Gelling Thiolated Chitosan Conjugate，Drug Development And Industrial Pharmacy,31,885-893(2005)，Bernkop-Schnürch，Thiomers:A new generation of mucoadhesive polymers，Advanced Drug Delivery Reviews,57,1569-1582(2005)，Bernkop-Schnürch等人，Thiomers:Preparation and in vitro evaluation of a mucoadhesive nanoparticulate drug delivery system，International journal of Pharmaceutics,317,76-81(2006)和Weng等人，Rheological Characterization of in Situ Crosslinkable Hydrogels Formulated from Oxidized Dextran and N-Carboxyethyl Chitosan，Biomacromolecules,8,1109-1115(2007)。

发明内容

[0003] 硫醇化壳聚糖能够进行自交联反应从而形成凝胶。报道的胶凝时间为30分钟或更长，并且有时表示以小时表示。如果在身体的某些部分中使用，则在胶凝化发生之前未凝胶化的材料的大部分(ample portion)可能从该部位排出或可被纤毛或其它自然防御物运走(carry away)。

[0004] 外来的交联剂已加入到一些壳聚糖材料中从而形成用于药物递送的纳米颗粒珠(nanoparticle bead)或片。珠和片，当用于一些应用时，将不在粘膜组织上提供保护性密封层。通过使硫醇化壳聚糖与适量的氧化剂和外来的交联剂中的一种或两种结合，可显著增加胶凝化发生的速率。如果将所得混合物在组织或结构顶上展开(spread)成层，以及如果氧化剂或外来的交联剂的量不是过量的，则可以形成保护性凝胶层。该保护性凝胶层可

帮助损伤的、发炎的或手术修复的表面恢复到正常状态，例如，通过一种或者多种痊愈机制诸如炎症反应的调节、吞噬作用、粘膜重塑、纤毛重生 (reciliation) 或其它正常功能的全部或部分修复。本发明一方面提供了治疗身体组织或结构的方法，该方法包含：

[0005] a) 将含有硫醇化壳聚糖和氧化剂或外来交联剂的混合物的流体层施加到其上，和

[0006] b) 允许该混合物原位形成保护性凝胶层。

[0007] 本发明另一方面提供了用于保护身体组织或结构的二部分组合物 (two-part composition)，第一部分包含硫醇化壳聚糖，第二部分包含充足的氧化剂或外来交联剂以便当该两部分混合并涂覆到该组织或结构上时，该混合物在少于 30 分钟的时间内形成保护性凝胶层。

[0008] 本发明又一方面提供了身体组织或结构顶上的流体层，该层包含硫醇化壳聚糖和充足的氧化剂或外来交联剂以便保护性凝胶层可以在少于 30 分钟内原位形成。

[0009] 所公开的保护性凝胶层期望地是内在抗菌的，不需添加单独的抗菌剂。所公开的两部分组合物期望地包装在多组件喷雾分配器、多筒式注射器或安瓿瓶中，其中可破裂或可除去的隔片 (septum) 位于该第一部分和第二部分之间。所公开的方法、组合物和层对于治疗耳、鼻或喉中的粘膜组织，以及肢体 (limb) 或脊柱中的开口 (opening)、隐窝 (recess)、通道 (passageway) 或关节特别有用。所公开的方法、组合物和流体层不是并且没有利用植入物或可植入的设备。

附图说明

[0010] 图 1 是显示所公开的方法的示意性视图；

[0011] 图 2 是可以在所公开的方法中使用的分配工具的立体图；

[0012] 图 3 是示出各种硫醇化壳聚糖溶液的胶凝化性能和流变性质的图表；

[0013] 图 4 是示出各种壳聚糖溶液粘度的图表；

[0014] 图 5 是原位交联的硫醇化壳聚糖凝胶层与胰胨豆胨培养液对照的抗菌性质比较的图表；和

[0015] 图 6 是示出各种硫醇化壳聚糖凝胶层降解的图表。

[0016] 在附图的各张图中类似的附图标记表示类似的元件。附图中的元件没有按比例绘制。

具体实施方式

[0017] 下面的详述描述了某些实施方式，并且不能认为具有限制性的意义。本文中的所有重量、量和比率为按重量计，除非另外具体地注明。下面显示的术语具有下列的含义：

[0018] 术语“粘附性”是指将身体结构或假体材料与组织粘在一起，指将组织与组织粘在一起使其紧密地接触持续延长的时间，或指形成将身体结构、假体材料或组织跨越正常开放的空间彼此连接的组织。

[0019] 术语“抗菌”是指在金黄色葡萄球菌、铜绿假单孢菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌或粘膜炎莫拉菌 (Moraxella catarrhalis) 的一种或多种的群体中导致大于 90％的数值减少（即，至少 1 个对数数量级的减少）的能力。

[0020] 术语“附着”和“粘附”当用来提及细菌生物膜和表面时是指该生物膜建立在和至

少部分地涂敷在或覆盖在该表面上，并且具有一些对从该表面上去除的抵抗力。因为此关系的性质是复杂的和理解甚少，因此这种使用并不意在有特殊的附着或粘附机制。

[0021] 术语“细菌生物膜”是指附着在表面上的细菌的群落，在该群体中的生物体包含在由该细菌产生的细胞外多糖 (EPS) 基质中。

[0022] 术语“生物相容的”当用来提及物质时是指该物质表现出对身体的不显著的有害或不良作用。

[0023] 术语“生物可降解的”当用来提及物质时是指该物质在体内将降解或蚀解以形成小的化学或物理种类。此类降解过程可以是酶促的、化学的或物理的。

[0024] 术语“生物可吸收的”当用来提及物质时是指该物质能够被身体吸收。

[0025] 术语“粘性的”当用来提及液体或凝胶时是指当置于水平面上时该液体或凝胶将趋于（但不一定在所有情况下）粘住其自身并且形成单一团块。

[0026] 术语“粉碎的”当用来提及颗粒物质时是指颗粒已经通过切割、磨碎、粉碎、捣碎或采用外部施加力量的其他颗粒破碎工艺被破碎并且尺寸减小。

[0027] 术语“共形的”当用来提及施用于组织或其他身体结构的组合物时是指该组合物可以在已经施用该组合物的区域上形成基本上连续的层。

[0028] 术语“分离”、“去除”和“破坏”当用于提及附着或粘附在表面上的细菌生物膜时是指至少显著量的最初存在于该表面上的生物膜不再附着或粘附于该表面。这种使用不意在有特殊的分离、去除或破坏机制。

[0029] 术语“流体”当用来提及物质时是指该物质是其损耗模量 (G″) 大于其储能模量 (G′) 且损耗角正切值 (tan δ) 大于 1 的液体。

[0030] 术语“凝胶”当用来提及物质时是指该物质是可变形的（即，不是固体），G″ 小于 G′ 且 tan δ 小于 1。

[0031] 术语“凝胶化”当用来提及凝胶层的形成时是指 G″ 等于 G′ 且 tan δ 等于 1 的时刻。

[0032] 术语“止血器”是指停止血流的装置或材料。

[0033] 术语“水凝胶”当用来提及凝胶时是指该凝胶是亲水的且含有水。

[0034] 术语“水合的”当用来提及装置或物质时是指该装置或物质含有均匀分布的化学键合的水。“完全水合的”装置或物质不能吸收额外的水化作用的水。“部分水合的”装置或物质能够吸收额外的水化作用的水。

[0035] 术语“植入物”表示无菌固体制品，其尺寸和形状适合一种或多种活性物质在一段时间内肠胃外植入和释放。

[0036] 术语“可植入设备”表示固体设备，其经手术程序被全部引入到人体中或代替上皮表面或眼睛表面，并且在该手术程序后保持在适当位置。通过手术程序被部分地引入到人体中并在手术程序之后保持在适当位置至少 30 天的任何固体设备也被认为是可植入设备。

[0037] 术语“内耳”是指半规管和耳蜗。

[0038] 术语“中耳”是指由鼓膜、内部结构诸如听骨链、周围衬里和边缘结构诸如乳突限定的区域。

[0039] 术语“粘膜附着剂”当用来提及装置或物质时是指该装置或物质将粘附于粘液被

覆上皮。

[0040] 术语“鼻腔或窦腔”是指在鼻和窦内限定正常充气通道和小室的各种组织，包括但不限于鼻孔、鼻甲 (nasal concha) 或鼻甲骨 (turbinate)、额窦、筛窦、蝶窦和上颌窦、窦口 (sinus ostia) 和鼻咽 (nasopharnyx)。

[0041] 术语“多糖”包括多糖的衍生物和改性多糖，以及各多糖种类和改性的各多糖种类的衍生物。例如，术语“羧甲基纤维素”包括羧甲基纤维素衍生物和改性的羧甲基纤维素，术语“壳聚糖”包括壳聚糖衍生物和改性的壳聚糖，术语“淀粉”包括淀粉衍生物和改性淀粉。

[0042] 术语“保护性的”当用来提及在组织或其他身体结构上的组合物层时是指该层有助于使损伤的、发炎的或手术修复的组织表面恢复至正常状态，例如，通过一种或多种愈合机制诸如炎性应答的调节、吞噬作用、粘膜重塑、纤毛再生或其他正常功能的完全或部分恢复。

[0043] 术语“停留时间”当用来提及在组织或其他身体结构上的保护性凝胶层时是指在肉眼观察下凝胶层或其一部分在体内仍然就位所持续的时间期限。

[0044] 术语“溶剂化”是指形成含有溶剂或其他载体的溶液或分散体，溶质溶解或悬浮在所述溶剂或载体内。

[0045] 术语“基本上不含胶原的”是指含有足够低量的胶原使得不会造成传播或感染牛海绵状脑病 (BSE) 或变异性克雅氏病 (variant Creutzfeldt-Jakob disease)(vCJD) 的潜在风险。

[0046] 术语“薄的”当用来提及在组织或其他身体结构上的保护层时是指具有小于约 2 毫米的平均厚度。

[0047] 参照图 1，所公开的治疗方法可以在例如患者的鼻腔或窦腔 100 中进行，窦腔包括上颌窦 110a、110b 和额窦 112a、112b，它们都可以通过鼻孔 114a、114b 进入。应当注意，患者的外部特征，包括鼻孔 114a、114b 以虚线显示。当患者患有例如慢性鼻窦炎时，与上颌窦 110a 的表面相关的一个或多个治疗部位诸如治疗部位 116 可以经医疗或如果需要经手术治疗。治疗部位 116 包括上颌窦 110a 的纤毛上皮并且可以包括栖息在相关的生物膜中的细菌的相关层（在图 1 中未显示）。治疗部位不必是自然组织并且可以改为人工结构（在图 1 中未显示）诸如窦填塞材料或支架，其也可以至少部分地用细菌生物膜层覆盖。如果存在，生物膜可以使用溶剂化系统（例如美国专利申请公开号 US2007/0264310A1 中所述的溶剂化系统）去除，该系统可以使用带有含有灌洗管（隐藏在图 1 中）的活节式 (articulatable) 输送管 122 的导引器 120 来施用至治疗部位 116，通过所述输送管 122，溶剂化系统可以流动至导引器 120 的远端处的喷嘴 124 并且因此流动至治疗部位。溶剂化系统和生物膜的残留物可以从治疗部位经吸引管（隐藏在图 1 中）被去除。所公开的硫醇化壳聚糖组合物可以同样地使用导引器 120 中的相同或不同的灌洗管在治疗部位处施用。本领域技术人员要理解，所公开的硫醇化壳聚糖组合物（和如果使用，溶剂化系统）可以使用其他方法或装置施用至治疗部位。示例性的其他方法包括动力喷雾或其他喷涂法、灌洗、喷雾 (misting)、涂抹 (mopping)、芯吸 (wicking)、滴落 (dripping) 和环钻术，并且示例性的其他装置包括喷雾嘴（例如，单个元件或多个元件的喷雾嘴）和注射器（例如，单管或多管玻璃或塑料注射器和冲洗球）。治疗方法还可以在其他身体部分中进行。治疗方法特别地用于非血管应用，包括治疗耳、咽喉、肢体或者脊柱内中或其附近的组织（例如粘膜组织）

或结构。

[0048] 图 2 显示示例性的工具 200，其可以用于所公开的治疗方法中。工具 200 包括手柄 202 和导引器 222，其远端 224（总体参考）包括喷嘴、灌洗和吸引管（在图 2 中未单独编号）。工具 200 可以任选地进一步包括第一致动器组件 226（总体参考）和第二致动器组件 228（总体参考）。第一致动器组件 226 中的控制轮 230 可以由用户操作以实现导引器 222 的弯曲，并且第二致动器组件 228 中的控制轮 232 可以由用户操作以实现从导引器 222 的远端 224 喷出的液体相对于导引器 222 的移动或旋转。手柄 202 通常用作工具 200 的各种其他元件的外壳并且作为导引器 222 的支撑。手柄 202 可以具有手枪柄样的形状，限定把手部 234 和机头 236。把手部 234 的大小和形状制成为适于用户的手抓握，而机头 236 则适于与导引器 222 连接。扳机 238 和相关的传感器和阀门（图 2 中未显示）可以用来控制所公开的可再水化凝胶（和如果使用，公开的溶剂化系统）通过灌洗管 240 和然后通过远端 224 的喷嘴并到所需的治疗部位上的流动。扳机 238 可以设置以多向运动范围并且与一个或多个附加的传感器和阀门（图 2 中未显示）相关联以控制溶剂化系统、生物膜残留物和其他碎片从治疗部位通过远端 224 的吸引管去除并且从此进入至吸引管 242 中。扳机 238 还可以用来控制所公开的可再水化凝胶通过灌洗管 240 中的独立腔的流动并且从此通过远端 224 的喷嘴流动至所需治疗部位上。

[0049] 施用的硫醇化壳聚糖组合物可以填充治疗部位（例如，鼻腔或窦腔，或一部分肢体或脊柱中的开口、隐窝、通道或关节），在此情况下，所公开的凝胶层可以是非常厚的，并且不暴露于空气或其他附近的气体，并且在整个层上具有不同的厚度。硫醇化壳聚糖组合物还可以作为薄膜或其他共形涂层施用，在此情况下所公开的层可以是相对薄的，并且暴露于空气或其他附近的气体，并且在整个层上具有基本上均一的厚度。在凝胶化之后，保护性凝胶层可以是粘性的、弹性的或粘弹性的。该保护凝胶层理想地粘附于治疗部位处的粘膜或其他天然组织（例如，软骨或骨）并且抵抗分离或其他破坏直至凝胶层发生天然的降解或吸收，例如，在 1 天至几天（例如，2、3、或 4 天）、几周或几个月的体内停留时间后。同时细菌再建群 (recolonization) 或再感染可以显著地减少或避免，并且可以发生改善的愈合和纤毛再生 (reciliation)。保护性凝胶层可以提供多种治疗优势，包括但不限于抵抗细菌粘附、抗感染特性、局部免疫调节、组织保护、减少或消除疼痛或出血、减少炎症、优化纤毛再生环境、减少与重要解剖结构的粘附等等。这些优势可以由多种机制引起，包括 a) 杀死细菌，b) 抑制细菌建群，c) 抑制细菌与组织的粘附，d) 减少组织发病或脓肿形成，e) 减少或防止疾病复发（例如，特别是减少与细菌毒素和 EPS 相关的慢性炎症），f) 在愈合期间涂敷和保护组织，诸如通过保持湿润的伤口，从而促进血小板聚集，或通过闭合干性伤口而不会形成过度粗糙的结构，g) 止血，h) 优化粘膜纤毛再生的环境，i) 加速纤毛的生长或再生和 j) 将一种或多种治疗剂递送至治疗部位。理想地保护性凝胶层将粘附于一部分粘膜，而使未粘附部分中的纤毛游离以经历自然的有节律的纤毛运动（即，纤毛摆动），如果需要也将抗菌剂或其他的治疗剂递送至治疗部位，并且理想地将阻碍或阻止细菌粘附于治疗部位。

[0050] 示例性硫醇化壳聚糖可以从各种商业来源获得，包括 ThioMatrix Forschungs Beratungs GmbH 和 Mucobiomer Biotechnologische Forschungs-und Entwicklungs GmbH，或可以通过壳聚糖与适合的硫醇化反应物的反应制备，例如，如上述公开的

PCT 申请 WO 03/020771A1 或上述 Roldo 等人、Krauland 等人、Bernkop-Schnürch 和 Bernkop-Schnürch 等人的论文中描述的。示例性硫醇化反应物包括巯基乙酸、半胱氨酸、硫代丁基脒 (thiobutylamidine)、谷胱甘肽和硫代乙基脒。

[0051] 硫醇化壳聚糖可以具有各种数均分子量，例如，约 5 ～约 2000kDa、约 10 ～约 500kDa 或约 10 ～约 100kDa。硫醇化壳聚糖可以为，例如数均分子量小于约 50kDa 的超低分子量材料、数均分子量为约 50 ～约 200kDa 的低分子量材料、数均分子量为约 200 ～约 500kDa 的中分子量材料，或数均分子量在约 500kDa 以上的高分子量材料。硫醇化壳聚糖典型地含有多个侧硫羟基团，它们经由包括一个或多个羰基或胺位点 (site) 的短链结构连接到壳聚糖环上的胺基，并且该硫醇化壳聚糖可以具有例如，约 50 ～约 1000，或约 400 ～约 1000 的硫醇化度（以 μmol SH/g 表示）。

[0052] 该硫醇化壳聚糖期望地以干燥颗粒形式获得，例如，以自由流动细粒形式，其平均粒径小于约 1mm、小于约 100μm、约 1 ～约 80μm，或小于 1μm。硫醇化壳聚糖优选以此种干燥颗粒形式包装和运送给用户，以便减少硫醇化壳聚糖在持续很久的储存期间的降解。例如，在即将使用之前，可以通过将硫醇化壳聚糖溶解在水或另外合适的溶剂中形成该硫醇化壳聚糖溶液。推荐的硫醇化壳聚糖的量取决于硫醇化壳聚糖分子量，并且可以为，例如所得溶液的约 1 ～约 20％、约 1 ～约 10％或约 1 ～约 5％。2008 年 4 月 24 日提交的共同未决的美国专利临时申请 No.61/047,598 描述了使硫醇化壳聚糖再水合的优选技术，通过将自由流动的硫醇化壳聚糖颗粒分散在生物相容的水混溶性极性分散剂中，并使分散体与该颗粒的充足的水性溶剂结合从而将它们转化成粘合性水凝胶。硫醇化壳聚糖可以是粉碎的但期望是非粉碎的。

[0053] 同时，通常保持氧化剂或外来交联剂（其各自也可以为溶液形式）与硫醇化壳聚糖分开直至即将使用之前。可使用的示例性氧化剂包括 http://www.organic-chemistry.org/chemicals/oxidations 中列出的那些，例如过氧化氢、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase)、蘑菇酪氨酸酶 (mushroom tyrosinase)、氧气、高碘酸盐，及其混合物。可使用的示例性外部交联剂包括低分子量醛，例如京尼平 (genipin) 和戊二醛，以及聚合醛，例如氧化的多糖。如果需要，可以使用含有氧化剂和外来交联剂的混合物。期望采用充足的氧化剂或外来交联剂，以便在混合之后保护性凝胶层将在少于 30 分钟内形成，更优选在少于 20 分钟、少于 10 分钟、少于 5 分钟的时间内或者混合之后基本立即形成。例如，当使用诸如过氧化氢的氧化剂时，以含有硫醇化壳聚糖的最终混合物重量为基准，推荐量包括约 0.01 ～约 1％或约 0.1 ～约 1％。当使用诸如京尼平的外来交联剂时，推荐量包括该混合物的约 0.1 ～约 10％或约 0.25 ～约 1％。过多量的氧化剂或外来交联剂可以不期望地降低混合物的粘度，或者使敏感组织发炎或以其它方式刺激敏感组织。所公开的硫醇化壳聚糖组合物期望基本不含胶原。优选地，硫醇化壳聚糖组合物充分不含胶原（例如，根本不含胶原），以便适于全世界范围内销售，并不限于人类使用。

[0054] 所公开的硫醇化壳聚糖组合物可以任选地包括多种其它成分。在使这些其它成分混合在两部分组合物中的第一部分、第二部分或两部分中之前，可以对它们进行处理。示例性其它成分包括水和其它溶剂（例如，醇）、酸、碱、缓冲剂、抗菌剂、治疗剂和其它助剂。酸、碱或缓冲剂可以例如将组合物维持在适于接触人组织的 pH，例如大于 5 的 pH、接近中性的 pH 或小于 8.5 的 pH。示例性缓冲剂包括巴比妥钠、甘氨酰胺、甘氨酸、氯化钾、磷酸钾、邻苯

二甲酸氢钾、乙酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠和它们的共轭酸。

[0055] 所公开的硫醇化壳聚糖组合物期望地是内在抗菌的，而不需要添加单独的抗菌剂。但如果需要，可以采用单独的抗菌剂。例如，在上述美国专利申请公开 No.US 2007/0264310A1 中可以找到此种抗菌剂的有用列表。

[0056] 可用在所公开的硫醇化壳聚糖组合物中的示例性治疗剂包括适用于预期治疗部位的任何材料，包括镇痛剂、抗胆碱能药物、抗真菌剂、抗组胺剂、甾族或非甾族抗炎剂、抗寄生虫药 (anti-parasitic agent)、抗病毒剂、生物稳定型 (biostatic) 组合物、化学治疗剂 / 抗肿瘤剂、细胞因子、解充血药、止血剂 (例如，凝血酶)、免疫抑制剂、粘液溶解剂 (mucolytics)、核酸、肽、蛋白质、类固醇、血管收缩剂、维生素、其混合物，以及所属领域技术人员已知的其它治疗材料。例如，在上述美国专利申请公开 No.US 2007/0264310A1 中可以找到此种治疗剂的有用列表。可包括在所公开的硫醇化壳聚糖组合物中的其它助剂包括染料、色素或其它着色剂 (例如，FD&C Red No.3、FD&C RedNo.20、FD&C Yellow No.6、FD&C Blue No.2、D&C Green No.5、D&C Orange No.4、D&C Red No.8、焦糖、二氧化钛、水果或蔬菜着色剂如甜菜粉末或 β- 胡萝卜素、姜黄、辣椒粉和所属领域技术人员可以得知的其它材料) ；指示剂 ；调味剂或甜味剂，其中包括但不局限于茴香油、樱桃、肉桂油、柑橘油 (例如，柠檬油、莱檬油或橙油)、可可 (cocoa)、桉树、草药芳香烃 (例如，丁香油、鼠尾草油或桂皮油)、乳糖、麦芽糖、薄荷醇、薄荷油、糖精、环己氨磺酸钠、留兰香油、山梨糖醇、蔗糖、香草醛、冬青油、木糖醇及其混合物 ；抗氧化剂 ；防泡剂 ；和流变改性剂，其中包括增稠剂和触变胶 (thixotrope)。所公开的硫醇化壳聚糖组合物期望不含有可能潜在损害粘膜组织或结构，例如鼻腔或窦腔中的组织的成分。

[0057] 在期望从组织中除去水的那些情况下，例如从息肉或水肿组织中除去流体，在所公开的硫醇化壳聚糖组合物中可以采用高渗剂 (hyperosmolar agent)。示例性高渗剂包括呋塞米 (furosemide)、氯化钠凝胶和从组织中吸取水的其它盐制剂或者直接或间接改变粘膜层渗透含量 (osmolar content) 的物质。如果治疗剂的持续释放或延迟释放是期望的，则也可以包括脱模剂改性剂。

[0058] 典型地，所公开的组合物在运送给最终用户之前将被灭菌并放置在合适的密封包装 (例如，多组件注射器、小瓶或多个小瓶，或由合适材料制成的多室袋 (multi-chamber pouch)) 中。另外的性能定制可通过使用诸如 γ 辐射或电子束 (E- 束) 处理的灭菌程序进行，从而控制断链。可以采用冷电离辐射灭菌 (例如，冷 E- 束灭菌)，从而限制断链程度，如与本发明同日提交的共同未决的 PCT 申请号 (代理人案号 :P0035142.00 和 151-P-35142W001) 中描述的。不论是否灭菌，含有硫醇化壳聚糖的第一部分通常与含有氧化剂或外来交联剂的第二部分保持分开直至即将使用之前。

[0059] 所公开的硫醇化壳聚糖组合物可以期望地用作破坏细菌生物膜和阻碍其恢复的多步治疗方案中的一部分。例如，可以进行一系列步骤，这些步骤大体可分为清洗 / 破坏、杀死、通气、保护 / 包被，和愈合。清洗 / 破坏步骤可以通过结合图 1 和图 2 施用如上讨论的溶剂化体系进行。杀死步骤可以通过将合适的抗菌剂施加到治疗部位进行。这可以，例如通过在溶剂化体系中包括抗菌剂作为单独施加的组合物，或在该溶剂化体系和单独施加的组合物中都包括抗菌剂完成。抗菌剂也可以在术后施加或施用。通气步骤可以通过打开堵塞或部分堵塞的通路，例如，鼻应用中的鼻窦或窦口而提供通往治疗组织的空气通道

或改善通往治疗组织的空气通道进行。这可以，例如通过手术除去阻塞组织结构或可通过手动移动 (displace) 此种结构来完成。保护 / 包被步骤可以通过用所公开的硫醇化壳聚糖组合物包被至少一部分如此治疗的组织进行。愈合步骤可以通过允许经过清洗、保护和密封的组织表面恢复到正常状态来进行，例如，通过一种或多种愈合机制，如炎症反应的调节、吞噬作用、粘膜重塑、纤毛重生或正常功能的全部或部分修复。该多步治疗方案可以包括或其后接着清除步骤，其中所公开的硫醇化壳聚糖组合物是生物可充分降解的或生物可充分吸收的从而在期望时间段，例如 1 天以上、3 天以上，或约 4 ～ 7 天内从治疗部位消失，并期望地没有流出大固体块。所公开的方法可以有利地在不需手术的情况下完成，例如通过施加和除去可选的溶剂化体系和通过经由正常的抽吸 / 吸出技术施加所公开的硫醇化壳聚糖组合物或通过简单地冲洗受影响的组织进行。可比系列的步骤可以在中耳或内耳的一部分的多步治疗方案中进行。关于此方案的进一步详细信息可在美国专利申请公开号 US 2007/0264310A1 中找到。

[0060] 下非面限制性实例进一步说明本发明。

[0061] 实施例 1

[0062] 从 ThioMatrix Forschungs Beratungs GmbH(Innsbruck，奥地利）处获得冻干形式的硫醇化壳聚糖原料。按照 Kast 等人，Thiolated polymers-thiomers :development and in vitro evaluation of chitosan -thioglycolic acid conjugates,Biomaterials, 22,2345-2352(2001) 中描述的制备巯基乙酸修饰的 (TGA- 修饰的）壳聚糖原料。硫代丁基脒 - 修饰的 (TBA- 修饰的）原料按照上述 Roldo 等人论文中描述的方法制备。壳聚糖原料的特性在下表 1 中示出。

[0063] 表 1

[0064] 硫醇化壳聚糖原料

[0065]

原料 [1]	硫醇化类型	硫醇化度（μ mol SH/g）
ULCS-TGA 低	巯基乙酸	59
HCS-TGA 低	巯基乙酸	57
ULCS-TBA 低	硫代丁基脒	72
HCS-TBA 低	硫代丁基脒	54
ULCS-TGA 高	巯基乙酸	310
HCS-TGA 高	巯基乙酸	265
ULCS-TBA 高	硫代丁基脒	425
HCS-TBA 高	硫代丁基脒	226

[0066]

[0067] [1]ULCS ＝超低分子量壳聚糖 ;HCS ＝高分子量壳聚糖

[0068] 硫醇化壳聚糖的原位胶凝。将 150mg ULCS-TBA High 溶解在 4mL 去离子水中。利用 0.5M NaOH 将溶液 pH 调节到 6.0 并将其稀释到 9mL，接着加入 1mL 1％ (m/m) 过氧化氢溶液。所得制剂含有 1.5％硫醇化壳聚糖并在少于 30 分钟的时间内形成凝胶，如采用流变测量法测定的 (G′ ≥ G″，见图 3 中 G′ 的曲线 A 和 G″ 的曲线 B)。含有 50mgULCS-TBA High(5％) 和过氧化氢的制剂在 5 分钟内胶凝化 (见图 3 中 G′ 的曲线 C，和 G″ 的曲线 D)，而含有 500mg ULCS-TBA High(5％) 但不含过氧化氢的制剂需要 60 分钟胶凝 (见图 3 中 G′ 的曲线 E，和 G″ 的曲线 F)。含有 500mg ULCS-TBA High(5％) 和过氧化氢的制剂表现出非常有利的 (favorable) 流变性质，包括开始混合时的低起始 G′ 值 (小于 0.1Pa) 和约 10 分钟内的大得多的 G″ 值 (大于 8,000Pa)。

[0069] 在醛交联剂京尼平的存在下，利用含有 1.5％ HCS-TBA Low 或 1.5％ HCS-TBA High 的制剂进行另外的胶凝化实验。在每种情况下，凝胶均在 5-10 分钟内形成，其中 G′ 值为约 100-200Pa。

[0070] 实施例 2

[0071] 喷雾性

[0072] 硫醇化壳聚糖溶液的粘度。在 25℃下，在去离子水中测定分别利用高和低分子量壳聚糖盐制备的两种未硫醇化的壳聚糖溶液 (图 4 中的曲线 A 和 B)，和分别利用 2.5％ HCS-TGA Low 和 10％ ULCS-TGA Low 制备的两种硫醇化壳聚糖溶液 (图 4 中的数据点 C 和 D) 的粘度。HCS-TGA Low 溶液的粘度相对高，约为 650cP，而 ULCS-TGA Low 溶液的粘度非常低，约为 10cP。从这些结果和利用其它壳聚糖溶液进行的喷雾实验来看，似乎 ULCS-TGA Low 溶液在 10％的浓度下是可喷射的并且在 10％以上可能很好。

[0073] 实施例 3

[0074] 抗菌特性

[0075] 硫醇化壳聚糖凝胶的抗菌特性。测定了利用 1.5 和 5％ ULCS-TBAHigh 制剂和 0.1％过氧化氢制得的凝胶对金黄色葡萄球菌 (S.Areus) 的抗菌活性。在无菌条件下，将该硫醇化壳聚糖凝胶制剂一式两份直接放到 24 孔聚苯乙烯组织培养板中。每孔用 1mL(500,000 菌落形成单位) 金黄色葡萄球菌的细菌悬浮液 (ATCC 25923) 温育。阳性对照用 1mL 胰胨豆胨培养液 (TSB) 温育。在 37℃下温育 6 小时之后，将培养基转移到新管中，并进行连续的十倍稀释。采用稀释跟踪方法 (Jett B.D 等人，Biotechniques，23，648-650(1997))，将适当稀释液的 10μl 等份试样一式三份置于胰胨豆胨琼脂板中。在 37℃下温育该板 24 小时并计数菌落形成单位 (CFU)。如图 5 中所示，与胰胨豆胨培养液 (TSB) 对照 (条 A) 相比，5％凝胶 (条 B) 显示细菌被完全杀死 (大于 6 个 log 的减少)。利用 1.5％凝胶获得类似结果 (6 个 log 的减少)。

[0076] 实施例 4

[0077] 降解

[0078] 硫醇化 CS 凝胶的降解。在溶菌酶 (1mg/mL) 的存在下，通过将利用 1.5％ (见图 6 中的曲线 A) 和 5％ (见图 6 中的曲线 B)ULCS-TBA High 和 0.1％过氧化氢制得的凝胶放置在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中，测试它的降解特性。在多达 28 天的各个时间点测定重量损失。如图 6 中所示，观察到显著的重量损失。28 天之后，该样品没有完全降解。

[0079] 实施例 1-4 中的结果表明硫醇化壳聚糖可以用来制备可注射或可喷射的制剂，其可以快速地原位胶凝从而形成内在抗菌的保护层。

[0080] 虽然本文为了说明优选实施例而对具体实施例进行了说明和描述，但是所属领域技术人员应当理解，为实现相同目的而设计的各种供替换或等价的实施方式都可以代替所示和所述的具体实施例而不背离本发明的范围。本申请意在涵盖本文所讨论的优选实施例的所有改变或变体。因此，明显地，本发明仅由权利要求及其等价形式所限定。

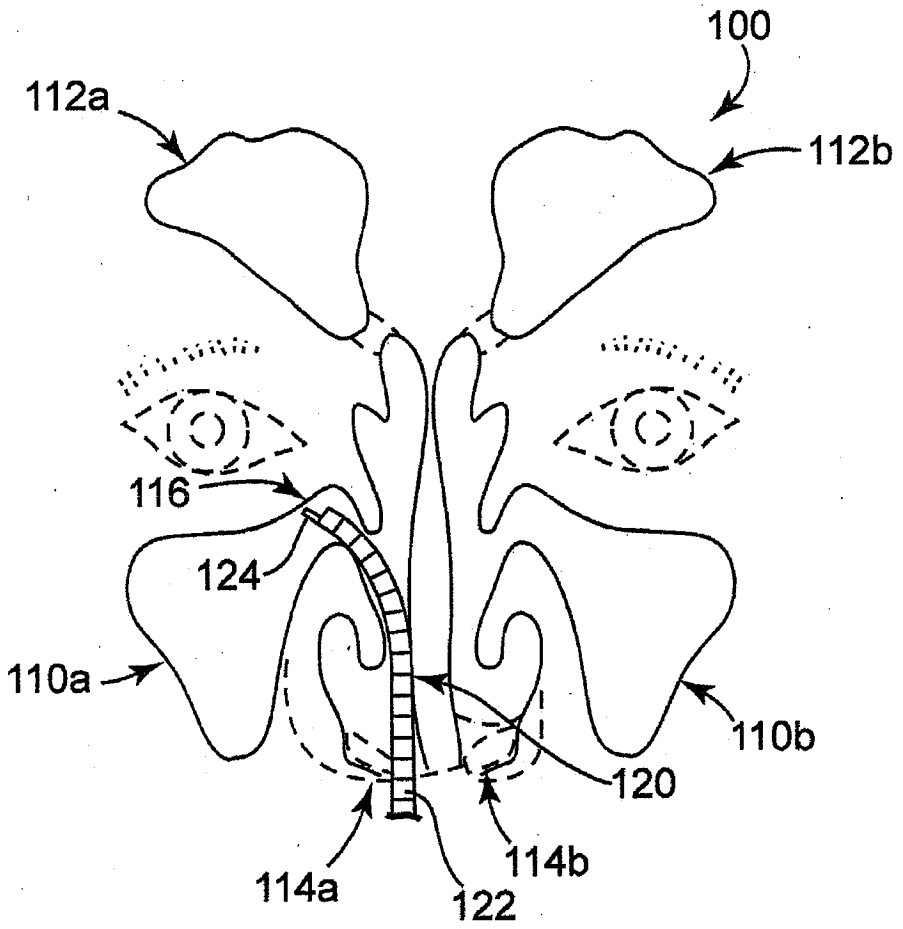


图 1

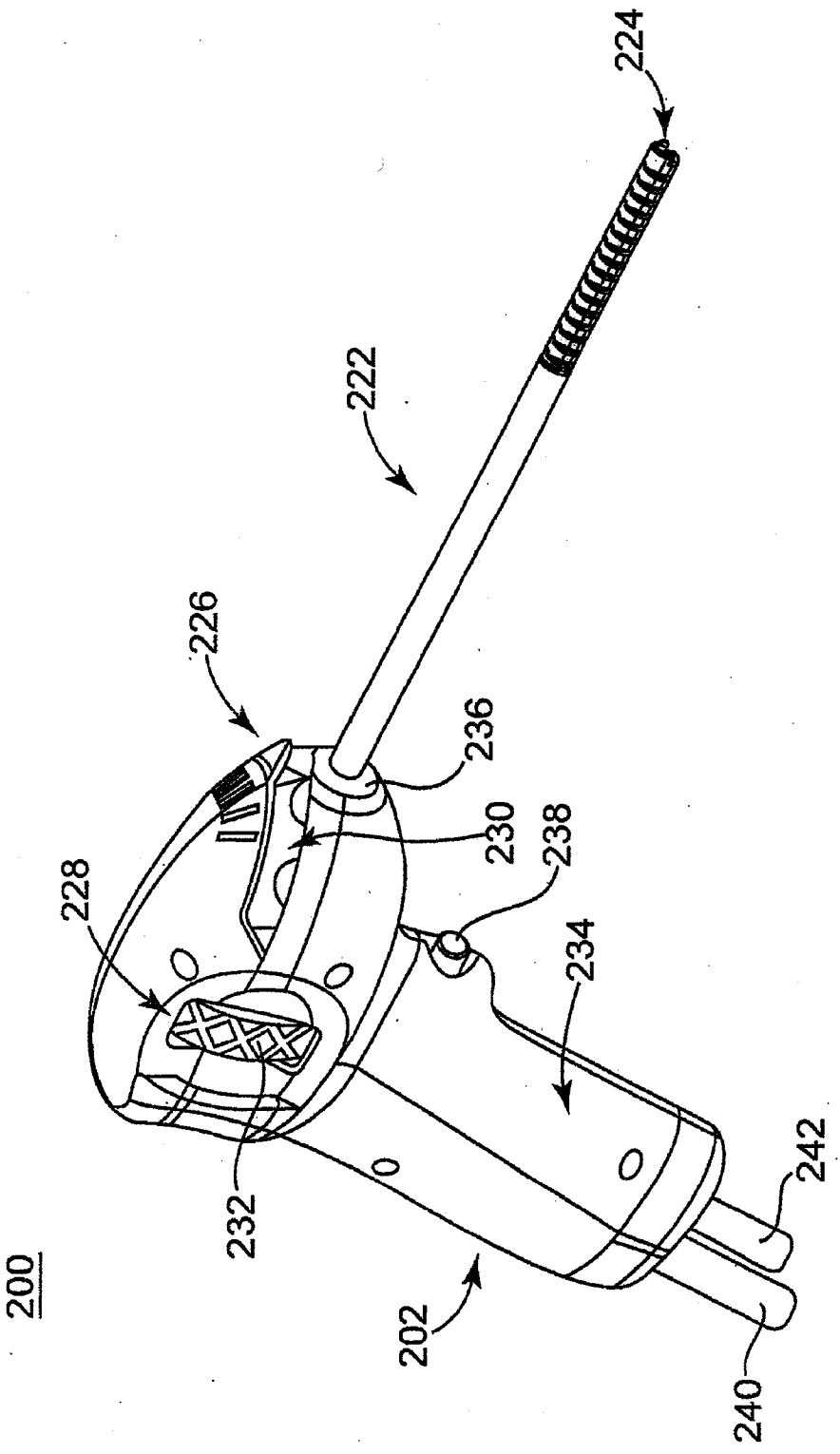


图 2

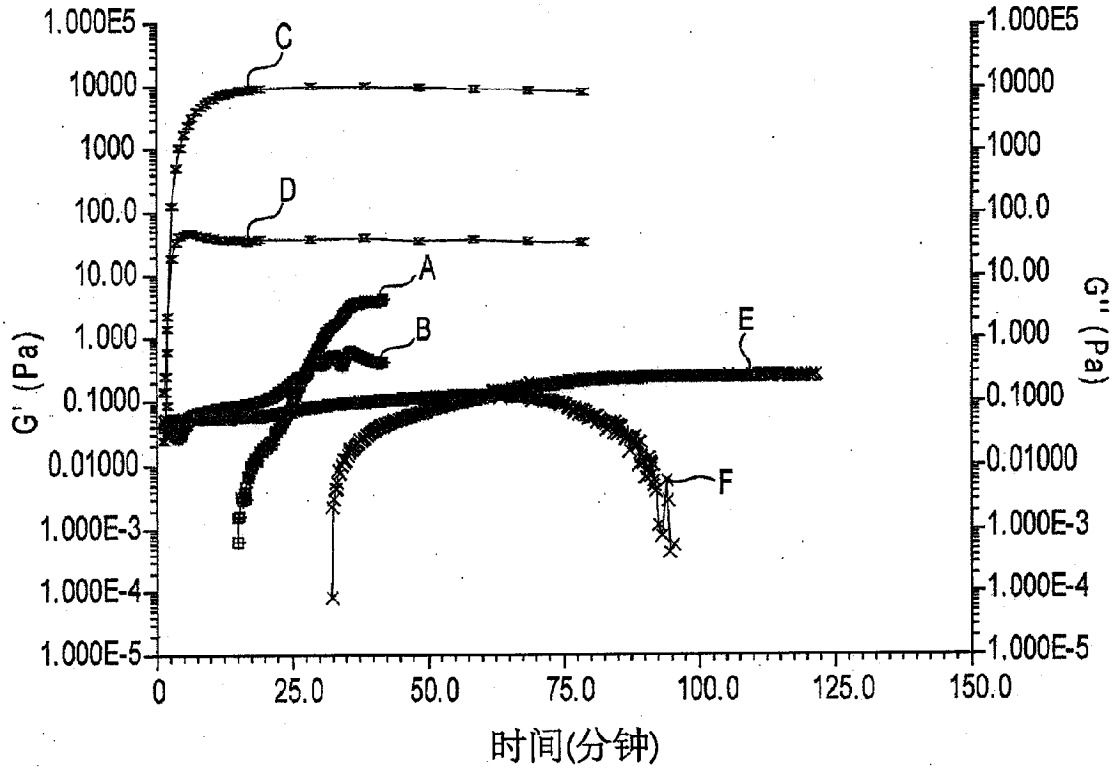

1.000E5
10000
1000
100.0
10.00
1.000
0.1000
0.01000
1.000E-3
1.000E-4
1.000E-5
G' (Pa)
G'' (Pa)
C
D
A
B
E
F
0
25.0
50.0
75.0
100.0
125.0
150.0
时间(分钟)

图 3

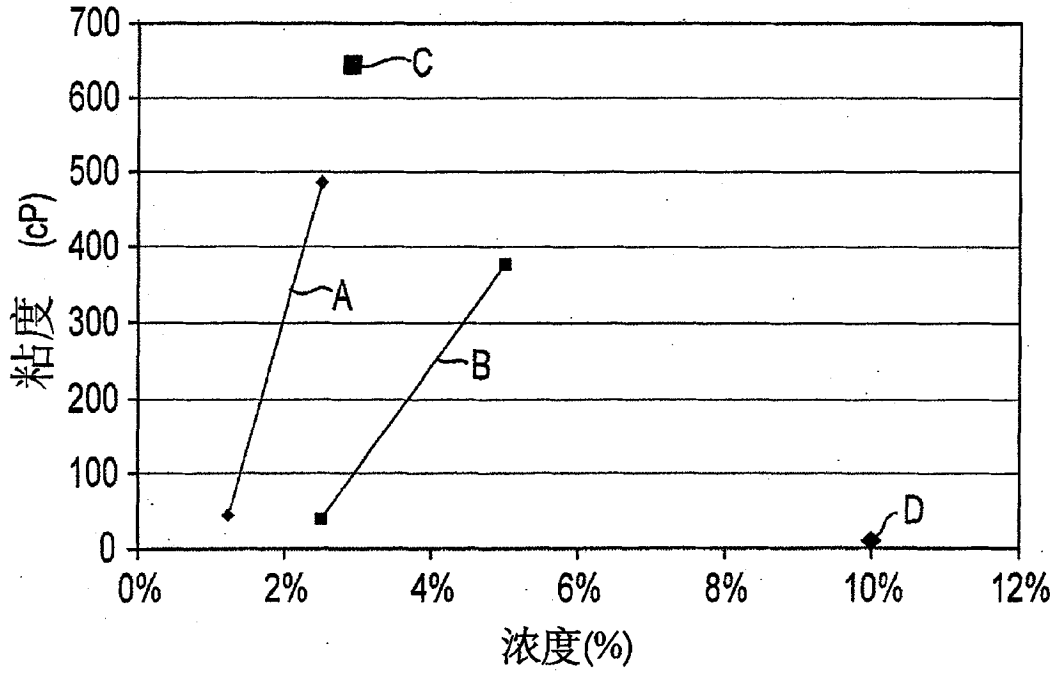

700
600
500
400
300
200
100
0
粘度 (cP)
C
A
B
D
0%
2%
4%
6%
8%
10%
12%
浓度(%)

图 4

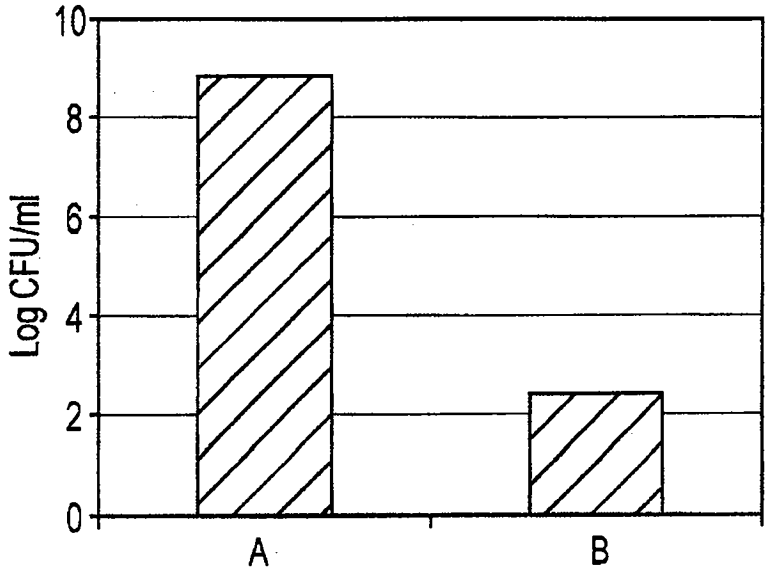

10
8
6
4
2
0
Log CFU/ml
A
B

图 5

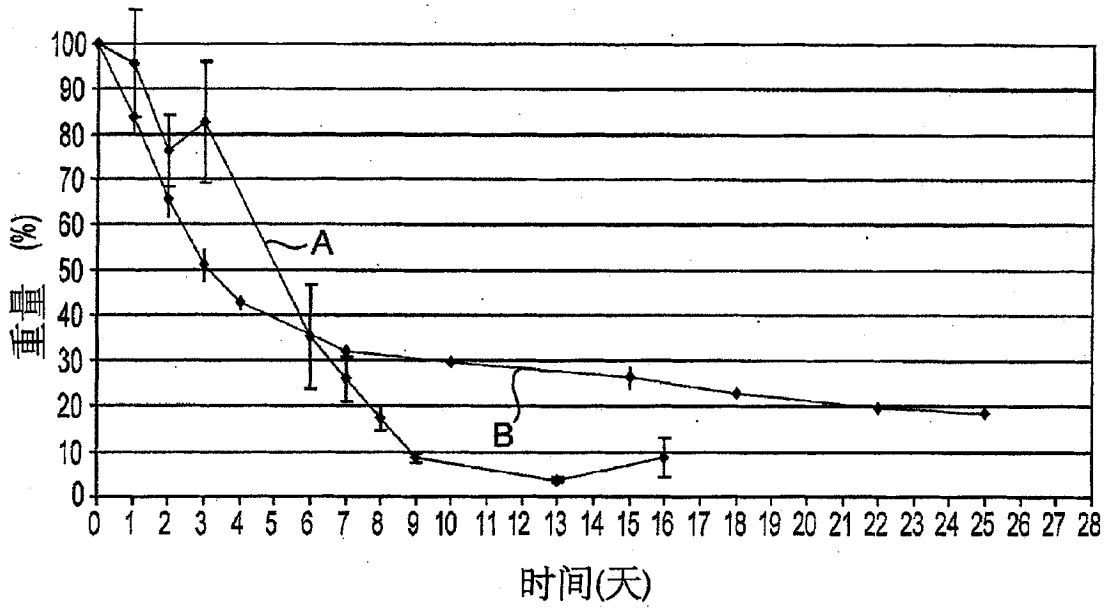

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
重量 (%)
A
B
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
时间(天)

图 6