

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 31/725

A61K 31/73



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95195026.6

[43]公开日 1997年8月20日

[11] 公开号 CN 1157569A

[22]申请日 95.7.13

[30]优先权

[32]94.7.19 [33]SE[31]9402529-3

[86]国际申请 PCT/SE95/00856 95.7.13

[87]国际公布 WO96/02258 英 96.2.1

[85]进入国家阶段日期 97.3.12

[71]申请人 阿斯特拉公司

地址 瑞典南泰利耶

[72]发明人 H·A·汉森 G·约翰逊-鲁登

O·拉姆

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 抗粘连剂

[57]摘要

壳聚糖和固定于其并选自肝素、硫酸肝素和硫酸葡聚糖的多糖在生产可防止或基本上减少伤口愈合中受损组织与相邻或周围组织不必要粘连的药物中的用途；以及使用这种药剂的方法。

权 利 要 求 书

1.壳聚糖和固定于其并选自肝素、硫酸肝素和硫酸葡聚糖的多糖在生产可防止或基本上减少伤口愈合中受损组织与相邻或周围组织不必要粘连的药物中的用途。

5 2.权利要求1的用途,其特征在于多糖是通过离子键固定到壳聚糖上的。

3.权利要求1的用途,其特征在于多糖是通过共价键固定到壳聚糖上的。

10 4.前述权利要求任一权利要求的用途,其特征在于多糖是肝素或硫酸肝素。

5.前述权利要求任一权利要求的用途,其特征在于药物是薄膜或膜状形式。

6.权利要求1至4任一权利要求的用途,其特征在于药物是管状或胶管状形式。

15 7.权利要求6的用途,其特征在于药物是凝胶状。

8.权利要求6的用途,其特征在于药物是粉末、气雾剂或溶液形式。

9.前述权利要求任一权利要求的用途,其特征在于壳聚糖的N-乙酰化度为至多约90%,优选至多约50%。

20 10.一种防止或基本上减少伤口愈合中不必要组织粘连的方法,其特征是在伤口愈合处使用一种含有壳聚糖和固定于其的多糖的药剂,其中的多糖选自肝素、硫酸肝素和硫酸葡聚糖。

11.权利要求10的方法,其特征在于所述药剂是以薄膜或膜的形式使用。

12.权利要求10的方法,其特征在于所述药剂是以凝胶形式使用。

25 13.权利要求10的方法,其特征在于所述药剂是以管状或胶管形式施用。

14.权利要求10的方法,其特征在于所述药剂是以粉末状、气雾剂或溶液方式施用。

说明书

抗粘连剂

技术领域

- 5 本发明涉及新的抗粘连剂，即具有防止伤口愈合中不必要的组织粘连作用的产品。该产品也能通过刺激组织再生而改善愈合质量。

本发明也包括防止这种不必要组织粘连的方法。

发明背景

- 能够根据需要随心所欲地活动对我们的生活质量至关重要。与皮
10 肤、粘膜和神经组织紧密相关的肌骨骼系统的适当功能是我们活动能力的先决条件，它需要不同的结构例如骨、肌肉和腱可以彼此自由活动。这种活动需要滑动区以最小的磨擦及最大的自由度活动。例如相邻的肌肉和腱之间的滑动系统以及皮肤和相邻组织之间的滑动系统也需要最适的功能。内脏结构也如此，例如胃肠道、心、肺、大脑和脊髓。滑动
15 系统是通过腹部、胸腔、心包腔处疏松结缔组织的薄层形成的，大脑和脊髓由间皮细胞分界。腱旁组织具有相似的结构。

- 这些滑动系统对炎症和损伤十分敏感。疤痕组织易形成，从而导致功能损害，甚至丧失功能。腹腔中可形成粘连，即形成带，相邻或周围结构的膜状融合最终可导致肠梗阻 - 一种威胁生命的状态。实施外科手术
20 以治疗损伤、切除肿瘤或治疗其它疾病或者进行改造常常会导致疤痕的形成，因此使“天然原始的”滑动系统功能或多或少地损失。

- 皮肤及粘膜层伤口的愈合很复杂，一方面是由于结缔组织有限的再生能力，另是由于通过形成不成熟的肉芽组织，其后来达到正常组织的成熟性的能力有限。因此，除了少数例外，年轻人或成年人受到伤害
25 后不会重新形成真皮。通过产生相邻样的结构以及产生反应性肉芽组织来替代损失组织而使真皮的小和/或表面损伤愈合。更大范围的组织损失，例如深度烧伤、三度烫伤以及部分损失真皮后会不可避免地通过形成疤痕而愈合，虽然各不相同但是都会持续损失组织并且永久变型。疤痕组织中机械性抵抗成分主要由短纤维和低级组织的III型胶原组成，因此与正常的最佳I型胶原相比具有低级的机械特性。无定形成形基质部分
30 以及组织细胞构成减少。与正常组织相比，血管数目也减少，血管的

分布和类型也改变。与相应的正常血管相比，增加了低功能的宽薄壁血管和不正常的淋巴管系统。因此，滑动系统最终被硬性纤维胶原结缔组织所替代。

另一复杂而又非常重要的因素是“纤维母细胞”的出现，即“普通”

- 5 结缔组织细胞（纤维细胞）及部分巨噬细胞中肌蛋白细胞质束数目增加，其可使细胞缓慢并有力地收缩而且可保持收缩状态很长时间。这可导致挛缩，其进一步可导致变性并限制受影响组织的功能。例如在乳房移植（用于增大乳房或者乳房再造的硅修复移植，C.Lossing & H-A Hansson在整形再造手术1993年，第91卷，1277-1286页中有详细描述）
- 10 周围以及缝线周围和其它外源移植周围可发现很多纤维母细胞。在某些风湿病关节周围常会发现许多纤维母细胞，这可导致手指偏斜，有时也会脱臼。这种细胞是引起杜普伊特伦氏挛缩手伤患者变形的病理因素。纤维母细胞和普通纤维细胞通过特异的异二聚受体连接到胶原丝上，该受体的一个单位通常由 $\beta 1$ -整合素组成。阻断整合素可消除挛缩。
- 15 炎症诱导性药物可影响整合素的表达。

- 因此，有或没有确定滑动表面的疏松结缔组织中的滑动系统只是修复小炎症。但是肉芽组织只在发炎过程中形成，其可导致形成不成熟细胞和组织成分。这种在接近正常分化水平的修复过程中不能形成新的组织即是疤痕组织与最初成熟但损失的组织相比为定量及定性地低级质量的原因。再生组织的成熟需要生长因子，其可控制并促进细胞、纤维和基质的分化。
- 20

背景技术

- 深入研究涉及解决诸如由外科手术、意外事故、炎症和肿瘤等引起的伤口愈合中避免不必要的组织粘连的问题。PCT申请US90/02406描述了这一特殊问题的技术，其包括了相对详细的背景技术。所述专利申请中描述的技术是以使用“三明治”式结构为基础的，其包括一个生物可降解性生物活性膜，膜反面有不同生物功能的不同组分。但是，相应的产品没有出现在市面上。
- 25

发明概述

- 30 因此，本发明的目的是提供一种抗粘连剂，使用其后仅有短期极少的炎症，而且所述药剂是生物可接受的并且是生物可降解的，其不产生干扰性降解产物。

本发明的另一目的是提供一种抗粘连剂，其具有诱导分界面的能力并且可使例如手术的机械和技术手段简化。

本发明的另一目的是提供防止或者基本上减少伤口愈合中相邻或周围组织和器官的不必要粘连。

5 本发明的另一目的是刺激伤口愈合中的组织再生。

这些以及其它目的将随下文的公开而明朗，为此通过本发明提供一种壳聚糖以及固定于其的多糖的新用途，所述多糖选自肝素、硫酸肝素和硫酸葡聚糖。用这种组成可生产出一种具有消除或基本上减少伤口愈合中受损组织和相邻或周围组织不必要粘连的药剂。

10 所用多糖可主要以三种不同的方式固定到壳聚糖上。因此，可通过离子结合、共价结合或者通过使壳聚糖从溶液中沉淀的机械包埋来固定。将相关多糖共价结合到氨基底物上的方法被描述在美国专利4,613,665中。

多糖特别优选使用肝素或硫酸肝素，其可从一些生产商市售而得。

15 也可使用多糖的部分水解形式，前提是可保持生物活性。

本发明的抗粘连剂可以不同物理形式存在，例如膜或薄膜、凝胶、管或胶管、粉末、气雾剂或溶液。当然，应根据所受损伤选择适当形式。大多数情况下可使用薄膜，管或凝胶可用于特殊情况，例如拉长的特定组织如肌肉和腱。

20 壳聚糖是线性1,4-结合的多糖，连接单位是 β -D-葡糖胺。通过将壳多糖（特别是从昆虫和贝类壳中形成的一种聚合物）N-脱乙酰化而生产壳聚糖。商业上，壳多糖是从渔业废弃物中的蟹和虾壳中回收而得。通过控制壳多糖的碱处理，可以生产出不同N-乙酰化程度的壳聚糖。当用强碱（通常是氢氧化钠）处理壳多糖时，可发生N-脱乙酰化，即乙酰氨基转化为氨基而形成壳聚糖。

25 影响壳聚糖用途的物理性质取决于N-乙酰化程度、分子量和均匀性。壳多糖可以通过消化系统中的壳质酶以及体液中的溶菌酶和其它酶而被生物降解。

用于本发明时，优选壳聚糖的N-乙酰化程度最多约为90%，更优选最多约为50%。特别优选N-乙酰化程度少于约25%。

本发明还提供了防止或基本上减少伤口愈合中不必要粘连的方法。该方法包括将含有壳聚糖和固定于其的多糖的药剂施用于伤口愈合处，所述多糖选自肝素、硫酸肝素和硫酸葡聚糖。

- 5 根据所处理伤口的特性，可以使用膜状、凝胶状或者管状或胶管形式的药剂。根据相关的手术过程易于确定所选择使用的产品。

优选的实施例

通过以下非限定性实施例阐明本发明。实施例中所有的薄膜都是在表面积为 54cm^2 的培替氏培养皿中制备的。

实施例1

10 壳聚糖薄膜的制备

- 将5克壳聚糖的盐酸盐（50%乙酰化，Pronova）溶于蒸馏水（0.5L，1%v/w）。将10毫升所得溶液转入培替氏培养皿中，在烘箱中于 70°C 蒸发干燥24小时而形成壳聚糖薄膜。然后加入磷酸钠缓冲液（0.2M，pH 9.0）中和所得薄膜。室温下将薄膜放置在含有该缓冲液的培替氏培养皿中2-4小时，然后用水洗涤3-4次并干燥。

实施例2

壳聚糖薄膜的制备

- 20 将5克壳聚糖的盐酸盐（20%乙酰化，Pronova）溶于2%乙酸溶液（0.5L，1%v/w）。将该溶液于 125°C 高压灭菌1小时。冷却后在培替氏培养皿中形成薄膜，其中使用20毫升该溶液。然后将薄膜于室温干燥，向培养皿中加入磷酸钠缓冲液（0.2M，pH 9.0）而中和。室温下将薄膜放置在该缓冲液2-4小时，然后用蒸馏水洗涤3-4次并再次干燥。

实施例3

亚硝酸对肝素的降解

- 25 将1克肝素溶于300毫升水。将该溶液于冰水中冷却至 0°C 并保持冷却。首先加入10毫克亚硝酸钠。然后于搅拌下向溶液中加入2毫升乙酸。将反应混合物 0°C 保持在2小时，透析，冷冻干燥。产率为0.7克的降解肝素。

实施例4

30 过碘酸盐对肝素的氧化

如下制备高碘酸钠氧化的肝素钠溶液。将1克高碘酸钠 NaIO_4 溶于200毫升蒸馏水中。在高碘酸钠溶液中加入10克肝素钠并在暗处搅拌过

夜。在所得溶液中加入10毫升甘油并搅拌2小时后于水中透析。每1小时交换一次水。由此而得含有过碘酸盐氧化的肝素溶液，浓度约为19mg/ml。

实施例5

5 带有共价结合肝素的壳聚糖薄膜的制备（端点接合）

在如实施例1制备的中和壳聚糖薄膜中加入20毫升含有125毫克亚硝酸盐降解的肝素溶液（如实施例3所制备，溶于0.5L水并含有4.4克氯化钠）。在此溶液中加入15毫克氨基硼氢化钠。用0.5M盐酸或其它酸将该溶液的pH值调节至3.9。将含有壳聚糖膜的溶液于室温放置14小时，
10 然后用水洗涤所得薄膜3-4次并干燥。

实施例6

带有共价结合肝素的壳聚糖薄膜的制备（多点接合）

将如实施例2制备的中和壳聚糖薄膜在20毫升下述溶液中放置24小时。

15 将4.4克氯化钠和125毫克过碘酸盐氧化的肝素（如实施例4所制备）溶于0.5L水中，用0.5M盐酸将pH值调节至3.9。在此溶液中加入15毫克氨基硼氢化钠，将该溶液于室温放置10小时。然后将处理后的薄膜用水洗涤3-4次并干燥。有关肝素的共价结合技术的细节参考上述美国专利4,613,665。

20 实施例7

带有离子结合肝素的壳聚糖的制备

如实施例2制备中和壳聚糖薄膜。加入肝素溶液（125克的0.5L水溶液，含有4.4克氯化钠）。3小时后，于室温用2×0.5L水漂洗薄膜并干燥。

实施例8

25 生物试验，对照

将按照实施例2制备的薄膜用作以下动物模型中的抗粘连膜。

打开大鼠的腹壁，在矢状线每侧切开约12×10mm的伤口。将一侧的伤口用实施例2的薄膜（约18×15mm）覆盖，而另一侧的伤口保持开放状态。用Dexon®7-0缝合薄膜，缝合后在腹腔中没有缝线。

30 2周和4周后评价结果。观察到腹腔对膜有中度粘连，而没有用膜覆盖的组织缺损处有大块粘连。

膜下腹部的缺损主要随疤痕组织的形成而愈合，在膜周围有炎症反应和荚膜的形成。

实施例9

本发明的生物试验

5 将按照实施例3制备的薄膜用作以下动物模型中的抗粘连膜。

打开大鼠的腹壁，在矢状线每侧切开约 $12 \times 10\text{mm}$ 的伤口。

将一侧的伤口用约 $18 \times 15\text{mm}$ 的膜覆盖，而另一侧的伤口保持开放状态。按照实施例8将膜缝合。

10 开放状态的伤口区域与用膜覆盖的伤口（几乎没有粘连）相比有一些粘连。

实施例10

带有离子结合肝素的壳聚糖薄膜的制备

15 将5克壳聚糖的盐酸盐（45%乙酰化，Pronova）溶于蒸馏水（0.5L，1%v/w）。将该溶液于 125°C 高压灭菌1小时。冷却后在培替氏培养皿中制备薄膜，其中使用20毫升该溶液。然后将薄膜于室温干燥，加入肝素溶液（125克的0.5L水溶液）。3小时后于室温用 $2 \times 0.5\text{L}$ 水漂洗薄膜并干燥。

实施例11

壳聚糖薄膜的制备

20 将5克壳聚糖的盐酸盐（45%乙酰化，Pronova）溶于水（0.5L，1%v/w）。将该溶液于 125°C 高压灭菌1小时。冷却后在培替氏培养皿中制备薄膜，其中使用20毫升该溶液。然后将薄膜于室温干燥，向培养皿中加入磷酸钠缓冲液（0.2M，pH 9.0）中和。室温下将薄膜放置在该缓冲液2-4小时，然后用蒸馏水洗涤3-4次并再次干燥。

25

实施例12

本发明的生物实验

30 将如上实施例10从壳聚糖-肝素制备的薄膜用于覆盖上述腹侧壁伤口（ $10 \times 12\text{mm}$ ，厚度1mm）。在腹壁对侧制备相同伤口并用实施例11所述壳聚糖薄膜覆盖。2周后评价粘连形成的发生率。用肝素-壳聚糖薄膜覆盖的伤口没有粘连，而用普通壳聚糖薄膜覆盖的伤口有少许粘连。对肝素-壳聚糖薄膜的光学显微检测表明，伤口愈合有所改善，其中包括

间皮样细胞覆盖的程度；与用普通壳聚糖薄膜覆盖的相应区域相比，在肝素-壳聚糖薄膜和受伤腹壁组织之间的界面处仅有少量炎症细胞浸润。

实施例13

5 壳聚糖-肝素薄膜的制备

将5克壳聚糖的盐酸盐（16%乙酰化，Pronova）溶于2%的乙酸溶液（0.5L, 1%v/w）。将该溶液于125℃高压灭菌1小时。冷却后在培替氏培养皿中制备薄膜，其中使用20毫升该溶液。然后将薄膜于70℃烘箱中蒸发16小时。室温下用0.1M氢氧化钠溶液处理薄膜，然后用蒸馏水洗10 涤3-4次，再于70℃干燥2小时。然后将所得薄膜转入培替氏培养皿中，加入30毫升天然肝素（1% w/v, 猪粘膜, Kabivitrum）的0.2M磷酸(fosphate)盐缓冲液（pH 6.4）的灭菌溶液。将薄膜于室温放置过夜，然后用灭菌水漂洗并在LAF工作台中干燥。如上再制备4个薄膜，只是分别使用0.5%、0.1%、0.01%和0.001%的肝素溶液。将肝素化薄膜用于元素分析，15 结果表明表明分别含有1.2%、0.9%、1.3%、0.23%和0.007%的硫。这些值相应的肝素含量分别为9.2%、7.7%、10.8%（分成6组，活检1.9%和0%）。

实施例14

体外伤口的制备

20 从masectomy样品中获取无菌人皮肤。每个实验只使用单一供者的皮肤。在无菌条件下，用活检打孔器（Stiefel实验室，UK）切开直径为6mm的圆环。在每块中心的表皮面用3mm活检打孔器打出部分伤口，然后将小块表皮朝上置于12孔板（Costar）中。用Dulbeccos改良Eagles培养基(DMEM)填充每个孔，使表皮伤口处于气体/液体分界面。在所有25 样品中加入小牛血清（2%，FCS）和抗生素（青霉素50微克/毫升和链霉素50微克/毫升）。

实施例15

体外愈合试验

30 将实施例14所述的体外伤口分成5组，每组10个活检。用实施例13所述的肝素化膜覆盖每个伤口。每日更换培养基。7天后，用4%中性缓冲甲醛固定小块，用乙醇-二甲苯系列脱水并包埋在石蜡中。用苏木紫和

曙红将切片（厚度为10-20mm）染色，通过光学显微镜检测上皮再形成的程度。只有完全用角化细胞覆盖的伤口才能被认为愈合。

从图1可明显看出，肝素含量低于2%的薄膜不能刺激细胞增殖。

实施例16

5 凝胶组合物的制备

使用含有0.9%氯化钠的水制备以下四种凝胶组合物：

A = 2% 甲基纤维素

B = 2% 甲基纤维素 + 0.2% 肝素钠

C = 0.5% 甲基纤维素 + 1% 壳聚糖（16% 乙酰化）

10 D = 0.5% 甲基纤维素 + 1% 壳聚糖（16% 乙酰化） + 0.2% 肝素钠

实施例17

体外愈合试验

将实施例14所述的体外伤口分成6组，每组10个活检。用实施例16所述的凝胶组合物将5个组中的每一伤口覆盖。剩下一组仅用培养基（2% FCS）处理。每日更换培养基。7天后，用4% 中性缓冲甲醛固定小块，用乙醇-二甲苯系列脱水并包埋在石蜡中。用苏木紫和曙红将切片（厚度为10-20mm）染色，通过光学显微镜检测上皮再形成的程度。只有完全用角伦细胞覆盖的伤口才能被认为愈合。

20 从图2可明显看出，由壳聚糖和肝素联合组成的凝胶比仅有壳聚糖或仅有肝素的凝胶使伤口更好愈合。

实施例18

本发明生物试验

用实施例7制备的薄膜重复实施例9。

25 从以上生物实验可明显看出，使用本发明的技术可从防止粘连并刺激生长而明显改善愈合特性。本发明并不局限于以上实施例，本发明的范围通过所附权利要求书限定。

30 关于本发明的实施，可在伤口或缺损处或者以下器官和结构中使用薄膜或膜、凝胶或如上制备的粉末或者溶液：腹壁、胸壁、肺、心包、中枢血管、肠道、泌尿生殖道、颅骨、脑膜、脊髓、腱、神经、肌肉、骨骼、粘膜、角膜、皮肤等。

管或胶管或者凝胶状产品可用于刺激生长，同时由于避免了与周围的粘连而保持了滑动面。这些产品可用于神经、腱和韧带、肠道、泌尿生殖道、血管等。

将本发明与生长因子结合也可更好地刺激愈合质量。

说明书附图

图1

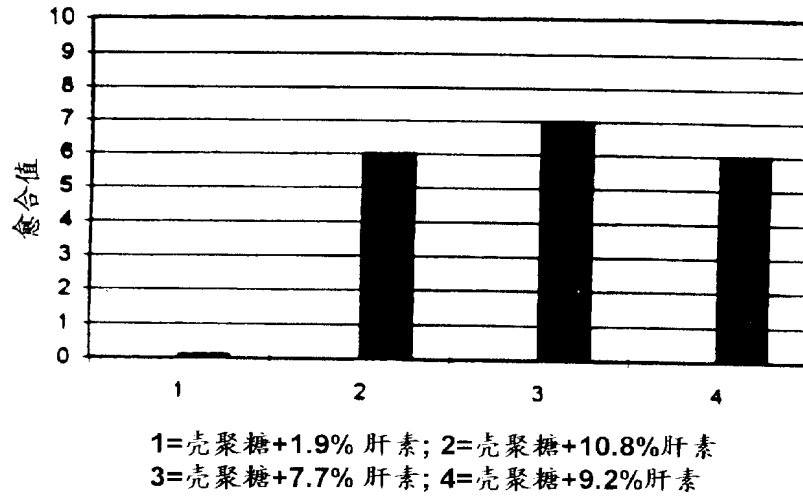


图 2

