



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02827842.9

[43] 公开日 2005 年 5 月 18 日

[11] 公开号 CN 1617735A

[22] 申请日 2002.12.4 [21] 申请号 02827842.9

[30] 优先权

[32] 2001.12.4 [33] US [31] 60/336,636

[86] 国际申请 PCT/US2002/038739 2002.12.4

[87] 国际公布 WO2003/047530 英 2003.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.4

[71] 申请人 克里斯托弗·J·伍尔弗顿

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 克里斯托弗·J·伍尔弗顿

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 唐晓峰

权利要求书 2 页 说明书 39 页

[54] 发明名称 贮存稳定性纤维蛋白密封剂

[57] 摘要

提供了经过补充和未经补充的、即时可用的纤维蛋白密封剂(FS)，是从随时使用型、贮存稳定性、浓缩的液体纤维蛋白原制备物制备的。所生产的FS产品在施用于组织时，提供防止血液损失、促进伤口愈合和很多其他治疗性与非治疗性应用所必需的弹性、拉伸强度和粘合性。进一步提供了本发明经过补充和未经补充的、贮存稳定性FS产品的试剂盒和制备方法，以及使用和递送它们的方法。

1、随时使用型、即时可用的纤维蛋白密封剂(FS)组合物，是从贮存稳定的、纤维蛋白原水溶液组分和活化的凝血酶或凝血酶样组分制备的。

2、权利要求1的FS组合物，向其中在纤维蛋白原与活化的凝血酶或凝血酶样组分的聚合之前、期间或之后不久加入至少一种额外组分。

3、体外使用权利要求1或2的FS组合物的方法。

4、体内使用权利要求1或2的FS组合物的方法。

5、制备任意权利要求1、3或4的FS组合物的方法，包含在水溶液中组合贮存稳定的、纤维蛋白原水溶液组分和活化的凝血酶或凝血酶样组分，再一起混合各组分直至纤维蛋白凝胶或溶胶生成。

6、制备任意权利要求2、3或4的FS组合物的方法，包含在水溶液中组合贮存稳定的、纤维蛋白原水溶液组分和活化的凝血酶或凝血酶样组分，向组合后的各组分加入至少一种额外组分，再一起混合全部组分直至纤维蛋白凝胶或溶胶生成。

7、递送权利要求1-6任意一项的FS组合物至组织的方法，其中贮存稳定性纤维蛋白原水溶液是与所有其他组分单独贮存的，直至在递送FS组合物之间不久。

8、权利要求7的方法，其中FS组合物是从双腔注射器中递送的，其中贮存稳定性纤维蛋白原水溶液组分单独贮存在一个腔中，而活化的凝血酶或凝血酶样组分的水溶液贮存在第二个腔中，其中一旦从注射器中递送，各组分混合生成FS组合物。

9、权利要求8的方法，其中至少一种额外组分是与活化的凝血酶或凝血酶样组分的水溶液贮存在双注射装置的第二个腔中的，其中一旦递送，各组分全部混合在一起生成FS组合物。

10、递送权利要求1-7任意一项的FS组合物至组织的方法，其中贮存稳定性纤维蛋白原水溶液组分和活化的凝血酶或凝血酶样组分的水溶液是单独贮存在单腔注射器中的，注射器被非多孔性材料分隔开，

将该材料刺穿、破坏、溶解或简单地除去，以便一旦从注射器中递送或者临递送之前，各组分混合生成 FS 组合物。

11、试剂盒，用于权利要求 1-10 任意一项的 FS 组合物的制备和递送，其中该试剂盒包含：一套关于 FS 组合物的制备、递送和使用的说明；和包含贮存稳定性纤维蛋白原水溶液的非玻璃小瓶。

12、权利要求 11 的试剂盒，进一步包含：包含活化的凝血酶或凝血酶样组分的水溶液的小瓶。

13、权利要求 11 或 12 的试剂盒，进一步包含一种装置，其中各组分混合生成 FS 组合物，并且从中递送该 FS 组合物。

14、权利要求 12 或 13 的试剂盒，其中至少一种额外组分是与活化的凝血酶或凝血酶样组分的水溶液贮存在第二只小瓶中的，其中一旦递送，各组分全部混合在一起生成 FS 组合物。

15、权利要求 11-14 任意一项的试剂盒，其中每只小瓶构成双腔注射器的一个腔。

16、试剂盒，用于权利要求 1-10 任意一项的 FS 组合物的制备和递送，其中该试剂盒包含：(1)一套关于 FS 组合物的制备、递送和使用的说明；(2)包含贮存稳定性纤维蛋白原水溶液组分和活化的凝血酶或凝血酶样组分的水溶液的非玻璃小瓶，它被非多孔性材料分隔开，将该材料刺穿、破坏、溶解或简单地除去，以便一旦从注射器中递送或者临递送之前，各组分混合生成 FS 组合物。

17、权利要求 16 的试剂盒，进一步包含一种装置，其中各组分混合生成 FS 组合物，并且从中递送该 FS 组合物。

18、权利要求 16 或 17 的试剂盒，其中至少一种额外组分是与活化的凝血酶或凝血酶样组分的水溶液贮存的，其中一旦递送，各组分混合在一起生成 FS 组合物。

贮存稳定性纤维蛋白密封剂

发明领域

本发明一般涉及经过补充和未经补充的、贮存稳定性纤维蛋白密封剂。更具体地，本发明涉及即时可用的纤维蛋白密封剂，是从贮存稳定性、随时使用型、浓缩的纤维蛋白原制备物制备的，还涉及制备这类纤维蛋白密封剂的方法，和使用它们防止血液损失、促进伤口愈合和很多其他治疗性与非治疗性应用的方法。

发明背景

人类的血凝块形成、也就是血液凝固，借助复杂的事件级联而发生，其中在最后的步骤中，纤维蛋白原的单体形式与凝血酶和活化的 XIII 因子在钙离子的存在下反应，生成包含交联纤维蛋白聚合物的纤维蛋白凝块。最近已经开发了生物粘合剂，包含纤维蛋白原、凝血酶和一种或多种其他组分，它们模仿自然凝固的最后阶段，从而生成纤维蛋白凝块。因而，纤维蛋白原类材料被称为纤维蛋白-或组织-密封剂、生物密封剂、纤维蛋白-或组织-胶、生物粘合剂、外科粘合剂等（本文统称为“纤维蛋白密封剂”或“FS”），能够用于将活组织连接在一起，并且保持连接以密封内部与外部伤口，例如组织、器官、肌肉、骨和皮肤中的伤口，以减少血液损失，同时产生止血作用（例如参见专利 FR-2448900）。这类粘合剂普遍用在外科中，特别是防止或终止出血，代替或加强缝合线、固定移植物（例如皮肤移植物）、密封经过切除的组织（例如肺或胃肠道手术）或者粘合假体各部分等。

FS 产品一般是从下列原料制备的：(1) 纤维蛋白原浓缩物，它还可以含有纤连蛋白、XIII 因子、冯威勒布兰特因子和痕量清蛋白；(2) 激活物组分，例如凝血酶（例如人或牛的）或凝血酶样材料；和(3) 凝血酶激活物，例如钙离子（例如 CaCl_2 ）。不过，每种 FS 的精确组成是用作原料的特定血浆部分的函数。例如，商业上所制备的 FS 产品经常含

有牛组分。在加拿大、欧洲和其他可能的地方，商业上可用的 FS 通常还含有抑肽酶作为稳定剂。然而，已经显示在拉伸强度与最终纤维蛋白原浓度之间有直接关系（日本专利未审公开申请 Kokai No. Sho 6-1-293443）。因而，浓缩纤维蛋白原的可用性是常规 FS 产品制备的重要因素。

澳大利亚专利 75097/87 描述了一种单组分粘合剂，它含有纤维蛋白原、XIII 因子、凝血酶抑制剂（例如抗凝血酶 III）、凝血酶原因子、钙离子和（如果必要的话）纤溶酶抑制剂的水溶液。美国专利 No. 4,427,650 和 4,427,651 (Stroetmann) 描述了粉末或可喷雾制备物形式的富集血浆衍生物的制备，用于增强伤口的关闭和愈合，它含有纤维蛋白原、凝血酶和/或凝血酶原和纤维蛋白分解抑制剂，还可以含有其他成分，例如血小板提取物。美国专利 No. 4,627,879 和 4,928,603 (Rose et al.) 公开了制备低温沉淀悬液的方法和它们制备 FS 的用途，它们含有纤维蛋白原和 XIII 因子。JP 1-99565 公开了纤维蛋白粘合剂的制备试剂盒，用于伤口愈合。

PCT 文献 WO 91/09641 描述了一种纤维蛋白胶，它含有纤维蛋白原，并且加入了凝血酶。这种 FS 含有所加入的凝血酶，但是是以凝血酶活性被抑制的方式制备的，在一种实施方式中它没有包含钙离子，因为直到使用之时才加入。不过，所公开的 FS 趋于在约 90 秒后自发凝固，即使没有加入钙离子也是如此。当加入钙离子时，它在不到 2 秒内凝固。在其他实施方式中，通过将产品酸化至 pH 小于 5.5 以抑制凝血酶活性，延缓胶的凝固。该文进一步提供在使用之时增加 pH 的手段，以取消该抑制作用。

另外，FS 递送系统已被公开在 Miller et al., 美国专利 No. 4,932,942 和 Morse et al., PCT 公报 WO 91/09641 中。FS 产品在商业上已经上市销售若干年，在欧洲有 Immuno AG (Vienna, Austria) 和 Behringwerke AG (Germany) (Gibble et al., Transfusion 30: 741-747 (1990)), 其他地方也有(例如参见美国专利 No. 4,377,572 和 4,298,598, 归 Immuno AG 所有)。

不过，大多数在美国以外临床使用的 FS 产品造成某些危险，结果还没有获得食品与药品管理局许可在美国使用。例如，如上所述，在欧洲可用的 FS 产品含有非人类来源的蛋白质，例如抑肽酶和牛凝血酶。所以，某些个体面临对这类非人类蛋白质添加剂产生变态反应的危险。美国专利 No. 6,183,498 报道了生物医学粘合剂的使用已被观察到诱发炎症组织反应。

而且，当使用热灭活使任何可能存在于 FS 中的病毒失活时，该过程可能导致变性蛋白质的生成，它们也可能是变应原。例如，欧洲热灭活方法不会使朊病毒失活，它们导致牛海绵状脑病（“疯牛病”），这在最近已经成为欧洲牛群的流行病，并且疾病可能被携带在用在外来 FS 产品的牛蛋白质中，当这些产品用于它们的预期目的时有感染人的危险。

Alterbaum (美国专利 No. 4,714,457) 和 Morse et al. (美国专利 No. 5,030,215) 公开了生产自体固有的 FS 的方法，其中没有使用牛产物。PCT 公报 WO 94/07548 描述了富集血小板因子的 FS，它能够在没有加入凝血酶的情况下，通过加入到再钙化胶、一种凝固激活物中而凝固，例如高岭土。不过，因为直到胶被使用时才掺入激活物，凝固时间是不确定的和难以预测或控制的。这是因为纤维蛋白原浓缩物是一种高粘性产物，它难以操控。而且，由于凝固与活化同时进行，难以从已活化的胶中分离激活物。

然而，在足够高的纤维蛋白原浓度下，FS 制备物在伤口愈合过程中提供安全的止血、良好的密封剂与伤口和/或组织表面的粘合、高强度的粘合和/或伤口密封和完全的粘合剂可吸收性 (Byrne et al., Br. J. Surg. 78: 841-843 (1991))。就最佳的粘合而言，在随时使用型组织粘合剂溶液中需要约 15 至 60mg/ml 的纤维蛋白原浓度 (MacPhee, personal communication)。FS 产品的临床用途已有评论 (Brennan, Blood Reviews 5: 240-244 (1991); Gibble et al., Transfusion 30: 741-747 (1990); Matras, J. Oral Maxillofac. Surg. 43: 605-611 (1985); Lerner et al., J Surg. Res. 48: 165-181 (1990))。

Baxter/Hyland (Los Angeles, Calif.)与 The American National Red Cross 协作, 已经共同开发了 Tisseel, 第一种在美国获得许可的商业化纤维蛋白密封剂(例如参见美国专利 No. 6, 054, 122、6, 117, 425 和 6, 197, 325 (MacPhee et al.))。这种 FS 产品优于欧洲产品, 因为它不含牛蛋白质。例如, 它含有人凝血酶, 并且不含抑肽酶, 从而减少变应原性的可能。另外, 借助溶剂洗涤法进行病毒灭活, 这产生很少的变应原性变性蛋白质。

从制备的观点来看, FS 的纤维蛋白原组分可以从血浆制备, 借助低温沉淀, 继之以分馏, 得到一种组合物, 在与活化凝血酶接触或混合之后生成纤维蛋白密封剂或凝块。在现有技术中, 纤维蛋白原和凝血酶浓缩物是以冻干形式贮存的, 它必须在使用前不久与 CaCl_2 溶液混合再生。在混合之后, 将组分施用于组织, 在那里它们凝固在组织表面上, 生成交联的纤维蛋白凝块。存在于纤维蛋白原浓缩物中的 XIII 因子催化交联。

按照美国专利 No. 5, 290, 552, 早期的外科粘合剂必然含有高含量纤维蛋白原(约 8-10%), 从中极难制备冻干产物。事实上, 浓缩纤维蛋白原的低温沉淀物已知在液体溶液中是非常不稳定的, 因而要求在 -20°C 下贮存备用

(http:

www.tissue sealing.com/us/products/biological/monograph.cfm);

也就是说, 含水形式的浓缩纤维蛋白原会自发凝固。所以, 商业上可用的冻干和/或冷冻干燥的纤维蛋白原浓缩物、例如 Tissucol, 在施用前必须被液化, 也就是缓慢融化(“融化”)或者从冻干产物再生。不过, 两种液化过程都与在产品能够用在 FS 产品中之前付出显著的努力和相当的时间迟延有关, 这可能使已经受伤的患者处于生命威胁性情形。

因此, 为了提高冻干纤维蛋白原制备物的溶解度已经付出了显著的努力。例如, 有一家制造商要求在蛋白质小瓶中加入磁搅拌器, 以在加热的同时提供显著的搅拌作用。这导致溶解时间快于同一产品没有搅拌所得溶解时间, 但是仅为获得随时使用型纤维蛋白原仍然需要 30-60

分钟的制备时间。

美国专利 No. 5,962,405 提供了贮存稳定性冻干或深度冷冻的液体纤维蛋白原制备物，它能够被再生和液化为随时使用型纤维蛋白原和/或组织粘合剂溶液，优选地没有使用额外的手段，例如加热和/或搅拌装置，得到纤维蛋白原浓度为至少 70mg/ml 的随时使用型组织粘合剂溶液。制备物包含纤维蛋白原和至少一种额外的物质，后者提高制备物的溶解度，和/或降低它的液化温度，并且减少随时使用型组织粘合剂溶液在室温下的粘度。不过，因为降低了液化温度，该 '405 专利要求保护深度冷冻的、浓缩纤维蛋白原溶液的液化有可能在 20 至 23°C 的周围温度（室温）中进行，与前面所要求的 37°C 温热条件相矛盾。然而，该方法仍然要求在深度冷冻条件下（温度维持在 -15°C 至 -25°C 以下）贮存，制备物仍然花费 15 分钟才液化。

前面提到的 Tisseel 纤维蛋白密封剂 (Baxter) 的教导表明，纤维蛋白原和凝血酶组分的制备至少花费 15 分钟。Baxter 密封剂的蛋白质浓缩物（纤维蛋白原）是以冷冻干燥粉末被提供的，通过与纤维蛋白分解抑制剂溶液混合而再生。Baxter 凝血酶组分也是冷冻干燥的浓缩物，使用氯化钙溶液再生。Baxter 试剂盒中每种组分的制备都能够利用可选提供的 Fibrinotherm 加热和搅拌装置半自动进行。为了适应蛋白质制备过程，每支密封剂蛋白质浓缩物小瓶含有磁搅拌杆，它匹配定制大小的搅拌池，用于在最佳生理学温度 (37°C) 下均匀混合。

不过，不仅缓慢液化蛋白质组分的需要导致生成 FS 制备物的显著延迟，而且一旦纤维蛋白原被增溶即引起显著的问题，因为它的不稳定性导致过早自凝固的趋势。事实上，一旦被制备，Baxter 的教导表明已再生的溶液能够在它们各自的小瓶或注射器中保存最长仅 4 小时，此后任何未使用的密封剂都必须弃去。其结果是，Baxter FS 不能在随时使用型条件下贮存任意有用的时间长度。

作为一种克服在使用前再生或液化冻干或深度冷冻的纤维蛋白原产品、尤其是浓缩制备物的需要的解决方案，已经介绍了某些在室温下可溶的纤维蛋白原制备物。不过不幸的是，这类现有技术产品已被证实

是细胞毒性的 (Beriplast, Biocol, Bolheal HG-4)。

在替代解决方案中,为了延迟纤维蛋白原在水溶液中过早凝固的趋势,美国专利 No. 5,985,315 提供了稳定的生物预活化粘合剂,它包含纤维蛋白原,并且加入有至少一种活化凝血因子,其活化不依赖于钙离子。预活化粘合剂在水溶液中是稳定的,也就是说溶液在 20°C 的温度下不会自发凝固达至少一小时;但是仅通过加入钙离子即能够使其在约 5 分钟内凝固。不需要额外的激活物。因而,所得生物粘合剂不要求加入凝血酶或凝血酶原来实现凝固。不过不幸的是,5 分钟是非常慢的凝固时间,使所得纤维蛋白密封剂的使用对任意类型流动性或搏动性伤口的用途而言都是不切实际的,例如吻合、血管、肺损伤中的气孔或者对薄壁或细支气管组织的损伤。

因此从医学观点来看,随时使用型生物组织粘合剂的快速可用性是必要的,尤其在外科急症情形中。尽管在创伤护理中已经取得连续进展,不过每年仍有显著比例的人口(军人和平民)患有致命或严重的出血。惊人数量的厄运是可防止的,因为借助适当的工具和训练,能够实现伤口的控制。因而,公认需要先进的、易用型止血制备物,不仅允许经过训练的医务人员、而且允许未经训练的个人迅速减少创伤受害人的出血。这种需要的影响是双重的:能够防止显著数量的创伤性死亡,也能够减少对可用血液供应的需求。

在防止大量受害人遭受严重的天然或人为灾难时,当地医院和诊所可能被大量需要创伤护理的个人搞得不知所措。所致对血液和血液制品的需求经常超过当地可用的供应;在很多情况下,对援助的需求超过经过训练的医务人员力所能及。不过,随时使用型自备的 FS 制备物将允许当地医务人员和救灾人员为伤者提供暂时的处理,直至可以获得最终的护理。这类随时使用型、贮存稳定性、FS 制备物将成为紧急护理提供者和救护车与援救车辆的重要工具。其结果是,随时使用型、贮存稳定性 FS 制备物将允许任何人处理伤者,甚至允许自我处理,直至能够获得医疗援助,使这样一种 FS 成为用于家庭、汽车、办公室或公共交通工具的急救试剂盒的重要组分。

理想的情况是，FS 产品应当在制备中要求尽可能少的操作，以减少危险和救助人员的负担。目前，纤维蛋白原类 FS 制备物需要纤维蛋白原组分，它仅仅作为冻干产物、深度冷冻浓缩物或与其他组分的混合物才是可用的，其他组分可能消极地改变出血或者人类患者的安全使用。因而，直至本发明仍然需要随时使用型 FS 组合物，它是从贮存稳定性、纤维蛋白原水溶液迅速制备的，尽管浓度高，也在流体形式下是可用的，可以容易加工成即时可用的 FS 产品，用于人或动物，既安全又有效，没有副作用的危险。

发明概述

本发明提供经过补充和未经补充的、随时使用型和即时可用的纤维蛋白密封剂 (FS)，是从随时使用型、贮存稳定性、浓缩的液体纤维蛋白制备物制备的。所生产的 FS 产品在施用于组织时，提供防止血液损失、促进伤口愈合和很多其他治疗性与非治疗性应用所必需的弹性、拉伸强度和粘合性。进一步提供了本发明经过补充和未经补充的、贮存稳定性 FS 产品的制备方法，和使用它们的方法。

本发明经过补充和未经补充的、贮存稳定性 FS 产品的独特之处在于它们有利地是即时可用的即用形式，因为用于制备它们的各组分是贮存稳定性和随时使用型。具体而言，本 FS 的纤维蛋白原组分是生物可相容的，在适当的浓度下、在流体形式下保持可用，允许 FS 的迅速和容易制备。无菌的、贮存稳定性纤维蛋白原是含水的和完全被增溶的，它的稳定性是 pH 与温度依赖性的，并且保留它的生物活性（也就是在与凝血酶和钙离子接触和剧烈混合后迅速生成纤维蛋白凝块的能力）。所制备和贮存的、随时使用型、浓缩的人纤维蛋白原溶液可以被中和，无需额外的步骤或过程即可用于生物可相容的即时可用的 FS 组合物的制备。

纤维蛋白密封剂的益处之一是天然的生物吸收，这发生在交联的纤维蛋白产品已经密封伤口之后。这种作用由纤溶酶介导的溶解所致，允许从体内天然地除去纤维蛋白密封剂，如果需要的话提供加速除去的方法。FS 产品的这种性质以及优异的粘合性和弹性有助于 FS 产品在

紧急处理中的价值和多用性，一旦接收患者或者作为外科手术的辅助手段，医院人员能够进行这种紧急处理。FS 产品可以有利地直接用在开放伤口上，或者它可以与其他包扎或缝合系统联合使用。

因此，本发明的目的是提供随时使用型 FS 组合物，它能够在分离的组织之间迅速形成强大而柔韧的生物可相容的结合，或者实现伤口或组织中不可取开口的涂层或密封，涂敷移植物，包涂假体材料，或者递送附加化合物至周围组织或循环系统。优选的是所得结合、覆盖或密封是不透水的。这类组合物有效用于人或动物患者体外以及体内组织。进而，本发明的目的是提供 FS 组合物，其中能够根据所需应用调整粘度和/或聚合时间，有利于组合物放置在组织部位上。

本发明的另一目的是提供使用 FS 组合物结合分离组织、密封或包涂伤口或组织以形成不透水密封、涂敷移植物或包涂假体材料的方法，该组合物是容易操控的，特别是在外科手术期间。

本发明的另一目的是提供配制这类 FS 产品的方法，以及体外或体内使用它们密封伤口、涂敷移植物、包涂假体或者递送附加化合物至周围组织或循环系统的方法。

本发明还有一个目的是提供施用即时 FS 组分和最终 FS 产品至组织或伤口部位的方法。本发明的特有优点是各组分的随时使用型可用性，包括贮存稳定性纤维蛋白原组分的水溶液。因而，在施用于组织或伤口部位前不久或者在与施用同时结合各组分，生成 FS 产品。能够容易使用双注射器递送装置，使用即时 FS 组合物的所述组分获得一致性结果，因为各组分被贮存在随时使用型条件下，事实上可以被单独和稳定地贮存在注射器腔中，易于递送。

在替代方式中，各组分可以被单独和稳定地贮存在单腔注射器内的分开小室中，以便确定的动作、例如按压活塞将导致屏障打开，允许预定量的组分混合。然后立即进行 FS 组合物的递送，从单一的出口或针头指向组织或伤口部位，允许纤维蛋白凝块的聚合和交联直接发生在该部位。在另一种替代方式中，注射装置（单腔或多腔）可以用于利用标准注射技术从更大的贮存容器中抽取贮存稳定性组分，再如上所述递送

各组分或混合后的 FS 组合物，只要纤维蛋白的聚合和交联发生在伤口部位即可。

进一步的目的是提供用于即时 FS 组合物的随时使用型递送的试剂盒，包含至少两只小瓶。一只小瓶含有贮存稳定性纤维蛋白原水溶液，浓度适合于在与激活物溶液混合时生成 FS，例如活化的凝血酶或凝血酶样组合物，第二只小瓶含有激活物溶液（优选凝血酶），浓度适合于在与第一只小瓶中贮存稳定性纤维蛋白原成分混合时生成 FS。向至少两只小瓶中的一只加入 CaCl_2 并与内容物混合，加入量有效确保纤维蛋白的聚合，或者在替代方式中，在另外一只小瓶中供应 CaCl_2 组分。额外的组分、例如稳定剂和/或 XIII 因子，和/或添加剂、例如生长因子、药物、抗生素等，是由另外一只或多只小瓶供应的，或者向至少两只小瓶加入这类额外组分并与内容物混合。

不过，本文所提供的试剂盒小瓶显然尤其打算还包括注射装置腔。因此，在一种实施方式中，试剂盒包括在分开的单腔或多腔注射装置中所提供的所述组分，只要纤维蛋白原组分和激活物组分保持分开直至即时 FS 组合物被混合和递送即可。

在下列说明、实施例和附图中将描述本发明的一部分额外目的、优点和新特征，另一部分将为本领域技术人员在检查下文之后所显而易见，或者可以借助发明的实施而获知。

优选发明实施方式的说明

本发明包含经过补充和未经补充的、贮存稳定性纤维蛋白密封剂 (FS)，是从随时使用型、贮存稳定性、浓缩的液体纤维蛋白原溶液制备的。本 FS 是新颖的，因为它是即时可用的，由于各组分是贮存稳定性和随时使用型。确切而言，纤维蛋白原组分是备用的水溶液，它是“贮存稳定性”，也就是说，在数天、数周、数月或更长时间之后，它保持稳定的液体形式，它不会自发地凝结（也就是说它不会生成“自发的凝块”，即使在没有激活物的存在下也是如此，例如凝血酶/ Ca^{++} ），并且它保留它的生物活性（也就是在与凝血酶和 Ca^{++} 接触和剧烈搅拌之后迅速生成纤维蛋白凝块的能力）。因此，所公开的方法描述了这样一种

条件，在该条件下，FS 组分、包括纤维蛋白原被贮存在随时使用型水溶液中达数天时间，并且保持活性和稳定性（贮存稳定性）。

本发明的 FS 组合物是非感染性的，提供了一种组织结合，具有较高的拉伸强度、弹性、变形性、水不透性、粘度和粘合性，用于大量的外科手术。该组合物还能够用于包涂可植入的装置，以增强它们的强度和流体抗性，密封材料植入装置的编织孔，和减少致血栓形成性。在本文中，除非另有限定，本文所用的全部科技术语都具有普遍为本发明所属领域普通技术人员所理解的含义。

本发明的 FS 组合物包含从任意形式纤维蛋白单体制备的纤维蛋白聚合物。在优选的本发明实施方式中，FS 纤维蛋白聚合物“立即”或者在活化的数秒内生成贮存稳定性制备物纤维蛋白原组分。

纤维蛋白原向纤维蛋白的酶转化作用是一种两步过程。首先，活化的凝血酶或凝血酶样分子裂解纤维蛋白原分子的外部 A 和 B 末端肽，生成可溶性单体、即纤维蛋白 I，它易受内部催化的影响。活化的 XIII 因子（它被凝血酶原向凝血酶的转化作用所增量调节）催化在纤维蛋白原单体中一对氨基酸之间生成酰胺键，生成最终交联的、不溶性纤维蛋白 II 基质。裂解作用仅略微地将纤维蛋白原的分子量从 340,000 道尔顿减少至 334,000 道尔顿，但是该过程暴露必需的聚合部位，允许所装配和交联的纤维蛋白凝块的生成。参见 Jackson, Ann. Rev. Biochem. 49: 765-811 (1980); Furie et al., Cell 53: 505-518 (1988)。

纤维蛋白原向纤维蛋白经由活化凝血酶与 XIII 因子的酶活性的转化发生在精确的生理条件下。具备天然纤维蛋白的优越凝结性质的基质的外源性生成要求必须满足这些必要的生理条件。在一种实施方式中，通过在递送之时混合两种被活化或自我活化的组分，活化本发明的 FS。第一种组分是浓缩的纤维蛋白原制备物，它在某些实施方式中进一步包含蛋白酶抑制剂，例如抑肽酶。它同样与第二种激活物组分混合，该组分包含凝血酶或凝血酶样等价物和钙，例如 CaCl_2 ，尽管该第二种激活物组分可能在不需额外组分的伤口部位是充分可用的。对每一种组分和向其中加入的任意化合物都加以选择和制备，以确保在 FS 产品中尽

可能接近地重现生理性纤维蛋白原生成作用。

纤维蛋白单体的非限制性实例包括纤维蛋白 I 单体、纤维蛋白 II 单体或 des BB 纤维蛋白单体或者它们的组合。在技术上，术语“FS 组合物”用于表示纤维蛋白原与活化凝血酶或凝血酶样激活物（以及其他必需的和/或添加的组分）在纤维蛋白凝块生成之前数秒内的混合物。一旦 FS 纤维蛋白凝块已经不可逆地生成，本文使用术语“FS 产品”或者简单的“纤维蛋白密封剂”或“FS”。然而，由于从 FS 组合物向 FS 产品的转变发生在短短几秒钟内，并且它是一种连续的凝块生成过程，从“组合物”到“产品”没有明显的界线，因此这些术语在本质上是可互换的。更重要地，这些术语用于表示从 FS 组合物中各组分混合物向所得 FS 产品中最终 FS 凝块的暂时转变。

而且，出于本发明的目的，“纤维蛋白聚合物”包括由纤维蛋白单体的聚合所致任意聚合物。因而例如，纤维蛋白 I 单体向纤维蛋白聚合物的转化作用可以生成纤维蛋白 I 聚合物，它是交联的或非交联的，和/或纤维蛋白 II 聚合物，它是交联的或非交联的，这依赖于如何进行转化步骤。

FS 组合物组分的粘度以及在 FS 组分的活化之后所生成的 FS 纤维蛋白制备物的粘度可以是各不相同的，以便在聚合期间的递送、定位和稳定性恰当地提供所选择的 FS 应用所必要的密封能力、弹性和强度。这类属性允许比缝合或已知的无缝合手术更快、更有效地外科修复受损伤或削弱的组织。FS 产品优选地以溶液形式（最优选为水溶液）被递送至伤口部位，必须提供必要的拉伸强度，将组织焊接在一起，连接分离的组织或者在组织、假体或重要表面上提供水不透性、柔韧性密封。

可选地，根据需要可以如下所述向组合物加入粘度改性剂和/或结合增强剂。所得组合物提供这样一种 FS 产品，它具有优异的强度和优越的操控特征。组合物特别适合于激光焊接，形成强大的、均匀的、有弹性的焊接处或涂层。

本发明的 FS 组合物包含蛋白质组分，选自天然或合成的肽，包括全长分子、其经过酶活性修饰的、裂解的或缩短的变体或者其交联的衍

生物(Coller et al, J. Clin. Invest. 89: 546-555 (1992))以及它们的混合物。在肽中包括简单的蛋白质、缀合的蛋白质和它们的混合物。这类蛋白质的实例包括球蛋白和纤维或结构蛋白。球蛋白的实例包括合成或天然的血清蛋白、天然或合成的其衍生物、盐、其经过酶、化学或以其他方式修饰的、裂解的、缩短的或交联的、氧化的或水解的衍生物或亚单位和它们的混合物。

FS 组合物的制备形式从可流动的液体至溶胶至粘性凝胶不等,这依赖于应用和组分浓度。例如,组合物优选地采用粘性凝胶的形式,用于结合分离的组织,其中该凝胶快速聚合成耐久的、水不溶性、不可逆交联的凝块,以保证组织在一起。另一方面,使用较低粘性的组合物可能最有效地实现水不透性或防水性密封在组织或假体材料上的形成。在有些情况下,贮存稳定性纤维蛋白原组分的活化将自发地形成焊接。在其他情况下,可能有必要利用能量和/或光子激活组合物。

即时纤维蛋白密封剂的组分

贮存稳定性纤维蛋白原组分

如果限定本发明的 FS 组合物并且区别于可以用于相似应用的现有技术组合物,那么特征在于制备本 FS 的各组分的性质。优选的本 FS 发明实施方式的主要组分是高度浓缩的纤维蛋白原溶液。本 FS 组合物的关键是其预期目的备用即时可用性,采用贮存稳定性、随时使用型含水纤维蛋白原组分的制剂使其成为可能,例如参见美国专利申请 No. 10/267,104 和 10/263,987,其内容结合在此作为参考。

贮存稳定性纤维蛋白原组分可以最初是从任意纤维蛋白原制备物制备的,无论是否是从血浆中分离纯化的,借助细胞培养技术生产的,重组制备的,还是从冻干或深度冷冻的血浆类制备物中新鲜分离或新鲜制备的。与来源无关,一旦浓度和组分相当,即可按照本质上相同的方式操控和使用纤维蛋白原制备物。纤维蛋白原组分的贮存稳定性与纤维蛋白原的最初来源无关;事实上,它是导致纤维蛋白原溶液维持稳定的贮存方法和水溶液条件,其他不能产生适合的贮存稳定性纤维蛋白原溶液。

向随时使用型纤维蛋白原溶液加入凝血酶/ Ca^{++} 之后，所见到的迅速的粘度增加和液体运动减少被称为“凝胶”。在凝胶状态下，纤维蛋白原溶液不再自由流动，但是在搅拌下能够被迫运动。尽管这种量度是主观性的，不过所估计的差异仅为 ± 2 秒。

“凝块”生成是纤维蛋白原溶液的突然固化，此后搅拌不能迫使液体从固体材料中流出。静止不动的材料通常变为肉眼可见的不透明白色和粘塑性。典型的生理性或非生理性纤维蛋白凝块的电子扫描显微图(SEM)例如 Redl et al., Medizinische Welt 36: 769-76 (1985)所示。凝块一般粘附于试管壁，不能被利刃从试管上割下在固体表面上。这种量度比凝胶生成较少主观性，所估计的不确定性就迅速凝结样本(8-12秒)而言仅为 ± 1 秒，不过就较慢凝结样本(>100秒)而言可能略微大些。

制备纤维蛋白原组分

当从冻干或深度冷冻的血浆类制备物制备纤维蛋白原组分时，纤维蛋白原制备物被冻干或深度冷冻的时间长度在本发明 FS 组合物的制备中不是因素，只要新鲜制备的纤维蛋白原溶液的生物活性等同于相当的从新鲜血浆分离和纯化的纤维蛋白原样本即可，在溶液中不会诱发自发凝结。

当从全血制备纤维蛋白原组分时，通常将一定体积的血液、例如 100ml 收集在标准的商业上可得到的血袋中，其中含有抗凝剂。可以使用任意抗凝剂，非限制性地例如肝素、EDTA、水蛭素、柠檬酸盐或任意其他试剂，它们能够直接或间接防止凝血酶的生成。柠檬酸盐是优选的，普遍见于商业上可得到的纤维蛋白原制备物中。然后从全血中分离含有纤维蛋白原组分的血浆。

目前可用的商业化纤维蛋白原含有用在分离和纯化过程中的盐。如实施例所述，这包括柠檬酸钠和氯化钠，但是这类盐作为纤维蛋白原纯化过程残余部分的存在似乎不会影响所得制备物的贮存稳定性或其在在本 FS 组合物制备中的有效性。由于贮存稳定性、随时使用型纤维蛋白原溶液仅仅在保留相当的、新鲜制备的纤维蛋白原溶液的特征时才是有

效的，因此纤维蛋白原纯化过程的效果在本质上都是相同的，与本发明无关。然而，极高浓度的柠檬酸盐和/或钠可能影响所贮存的纤维蛋白原制备物的凝结。

FS 组分的非限制性来源有血液，优选哺乳动物血液，进而更优选人血；细胞培养物，它分泌纤维蛋白原和重组纤维蛋白原，血浆是优选的。血液能够是任意形式的血液，例如包括全血。而且，血液能够用于制备自体固有的纤维蛋白密封剂（来自患者自身的血液制品）。自体固有的纤维蛋白原可以利用美国专利申请 No. 10/267,104 和 10/263,987 的贮存稳定性方法加以制备和贮存，以后为人类或兽医患者所用。

可以采用任意分离技术，例如沉降、离心或过滤。例如，利用离心，将血液转移至适合离心的容器，在室温和 3,000g 下离心 10 分钟。离心澄清的上清液血浆（大约 50ml），弃去细胞组分。不过，如果需要得到富集血小板的血浆，那么可以在较低的 g 力下进行离心，例如 500g 下约 20 分钟。借助标准技术可以除去含有血浆的上清液。然后从所得血浆中分离纤维蛋白原，处理以保存稳定性，例如按照美国专利申请 No. 10/267,104 和 10/263,987，直至需要制备本发明的 FS。

在一种实施方式中，借助过滤从全血制备血浆类纤维蛋白原组分。过滤可以这样进行，使全血通过适合的滤器，从血浆中分离血细胞。优选的是滤器是一种多微孔的膜，表现良好的蛋白质传输性。如上，将 100ml 全血收集在含有适合抗凝剂的袋子中，然后借助蠕动泵使血液经过表现良好蛋白质传输性的滤器进行循环。跨膜压降导致血浆被迫通过，而细胞组分停留在循环中的血液中。收集血浆（50ml），如上所述进行进一步加工。

在替代的实施方式中，任意能够分泌纤维蛋白原的细胞培养物都可以用在本发明中。培养和供养过程在本质上是如哺乳动物细胞培养的标准教科书所述进行的。例如，HEPG2 细胞可以用于该目的（例如参见 Liu et al., *Cytotechnology* 5: 129-139 (1991)）。在烧瓶中，将细胞接种在极限必需培养基中，分裂比在 1:4 至 1:8 之间，培养基含有 10% 小牛血清，并且用 5% CO₂ 缓冲，供养在约 37°C 下。24 - 36 小时后，除去

培养基，用无血清培养基代替，培养基含有适合的蛋白酶抑制剂和 2IU/ml 肝素。继续培养另外 24 小时，连续三次更换无血清培养基。将条件培养基在 3,000g 下离心 10 分钟，除去任何细胞碎屑，澄清的上清液含有纤维蛋白原，根据需要利用已知方法进一步鉴别。

本 FS 组合物的纤维蛋白原组分还可以从重组 DNA 技术制备（例如参见 Roy et al., J. Biol. Chem. 266: 4758-4763 (1991)）。Roy 等教导了表达全部三条纤维蛋白原链的方法，并且教导了 COS 细胞以能够生成凝血酶诱导的凝块的方式表达、装配和分泌链。一旦制备好，如上关于细胞培养所述借助离心或过滤除去细胞碎屑，然后将纤维蛋白原浓缩。

用在本发明中的贮存稳定性纤维蛋白原组分的细胞培养或重组技术制备在某些实施方式中可能是优选的，因为消除了血浆污染物对病毒的污染，并且对最终 FS 中其他组分的存在有更完全的控制。例如，XIII 因子经常存在于来自血浆的纤维蛋白原制备物中。不过，除非明显加入的，借助细胞培养所制备的纤维蛋白原中没有 XIII 因子存在，允许向 FS 组合物加入的导致纤维蛋白链交联的量可以被精确量化。

优选的发明实施方式适用于制备过程中的粗纤维蛋白原产物，或者适用于最终的、浓缩的纤维蛋白原制备物，具有大于 90% 的蛋白质纯度和大于 95% 的可凝结蛋白质，或者适用于其间任意浓度的纤维蛋白原。例如，在下列实施例中，人纤维蛋白原制备物具有 53% 的蛋白质纯度和 95% 的可凝结蛋白质，而牛纤维蛋白原制备物具有 61% 蛋白质纯度和 97% 的可凝结蛋白质。然而，二者都适用于本发明 FS 组合物的制备。

在优选的发明实施方式中，本发明的贮存稳定性纤维蛋白原制备物尽管是高度浓缩的，也仍然增溶在水溶液中，使纤维蛋白原特别适合用于制备经过补充或未经补充的、随时使用型 FS 组合物。在用于制备随时使用型 FS 组合物时，纤维蛋白原的最佳贮存浓度为 10 - 85mg/ml，更优选 15 - 75mg/ml，进而更优选 30 - 70mg/ml，最优选 40 - 65mg/ml。而且，纤维蛋白原或含有纤维蛋白原的蛋白质在本发明的贮存稳定性水溶液中的浓度一般为 2 至 10w/v%，优选 4 - 7w/v%。在 280nm 下测量蛋

白质吸光度，测定纤维蛋白原的浓度（使用 14 作为 1%纤维蛋白原溶液的消光系数）。

在优选的发明实施方式中，贮存稳定性纤维蛋白原是有生物活性的（也就是在凝血酶和 Ca 离子的存在下凝结），具有本质上与新鲜样本相同的物理特征。在制备和使用 FS 组合物时，使用新鲜制备的纤维蛋白原产生相同类型的纤维蛋白凝块生成控制。纤维蛋白原（和凝血酶）浓度决定了凝块生成、凝块强度、凝块粘合性和止血的时间。出于讨论的目的，这种类型的凝块在本文中简称为“纤维蛋白凝块”，以区分“自发凝结”的过程，其中后者可以发生在不稳定的、浓缩的纤维蛋白原溶液中，即使没有凝血酶或另一种激活物的存在也是如此。

不过，这些术语在本文中仅用于区分从贮存稳定性纤维蛋白原溶液——其中在等量纤维蛋白原和凝血酶/Ca⁺⁺被剧烈混合时，纤维蛋白凝块的迅速生成快速证明了组合物的活性——和从自发凝结——这提示了现有技术纤维蛋白原溶液的不稳定性——制备的 FS 组合物的目的。现有技术的、纤维蛋白原水溶液已知是非常不稳定的，并且在贮存时趋于自发凝结，这样的事实使纤维蛋白原以随时使用型液体形式贮存是不切实际的，利用以前公认的方法仅为一或两天。

在优选的发明实施方式中，在使用之前，将贮存稳定性纤维蛋白原贮存在聚合物的、塑料或塑料类容器中，不过更优选地，塑料容器是聚丙烯。不使用玻璃贮存纤维蛋白原或血小板，因为玻璃增强自发凝块的生成。

本发明的纤维蛋白原溶液在理想情况下适合于在接触激活物溶液时生成生理性纤维蛋白结构，迅速生成纤维蛋白凝块。证实这一点的是将所贮存的纤维蛋白原溶液与等体积凝血酶/CaCl₂溶液（例如包含 2.5 单位/mg 纤维蛋白原(100 单位/ml)凝血酶和 3-6mM 过量于柠檬酸盐或其他可能加入到溶液中的螯合剂的 CaCl₂），如下所述。如果所得凝块证明有生理性纤维蛋白结构，那么它将具有典型的、空间分支的原纤维结构，如借助凝血酶对新鲜制备或新鲜分离与纯化的人纤维蛋白原的作用在生理条件下生成凝块时所示，也就是大约 0.15 的离子强度和大约

中性的 pH。

在先实验已经通过连续观察和测试证实，当在室温(约 23°C)或冷冻(约 4°C)下贮存时，本发明的纤维蛋白原水溶液在优选条件下、在 pH 6.3 至 8.0 下保持稳定(活性，不自发凝结)达至少 97 天。事实上，各组分已经显示稳定性达极长时间，与已知的浓缩蛋白质的深度冷冻或冻干制备物相比，维持活性没有实质性丧失(也就是说，在混合后仍然迅速生成纤维蛋白原/凝血酶纤维蛋白凝块)，即使最初的纤维蛋白原产品在贮存数年之后也是如此。因而，“长期贮存”表示纤维蛋白原溶液、优选人纤维蛋白原溶液以随时使用的方式在本文所公开的条件下的贮存，没有蛋白质活性的实质性丧失达至少 3 天，优选至少 3 周，更优选至少 10 周，进而更优选至少 6 个月，进而更优选至少 1 年，进而更优选至少 2 年(假定它被冷冻 1 年以上，然后在约 4°C 下贮存另外 1 年以上)。因此，在最佳条件下，纤维蛋白原溶液将保持稳定达至少或大于 2 年。

尽管按照本发明的方法，在 FS 应用中优选使用“人”纤维蛋白原用于人类患者，不过来自其他物种、最优选其他哺乳动物物种的贮存稳定性、随时使用型、纤维蛋白原水溶液的使用也是适用的。事实上，似乎不存在所贮存的人纤维蛋白原与哺乳动物物种的物种相容性问题。例如，人纤维蛋白原可以在水溶液中贮存之后例如用于制备生物相容性组织粘合剂制备物，用在任何哺乳动物物种之中或之上。不过可以理解的是，人纤维蛋白原制备物的有利应用由其对人类受治疗者的随时使用型适应性所致。

纤维蛋白原贮存条件：温度和 pH

贮存稳定性纤维蛋白原组分的最佳温度和 pH 按照本发明将是已知的或者能够为本领域普通技术人员利用已知手段迅速确定。不过，水性凝胶也能用在本发明中，只要这类材料允许其中所含有的纤维蛋白原的完全增溶，并且只要制备物足够是流体，以便允许随时使用型生物组织粘合剂的迅速制备或者在按照本文公开方法贮存之后的其他应用。本 FS 发明的关键是纤维蛋白原组分是以随时使用型流体形式贮存的这一事

实。在它的随时使用的方式中，它既不是作为冻干制备物、也不是以深度冷冻状态被贮存的。

在贮存期间溶液的温度不受特别的限制，只要其中所含有的纤维蛋白原保持稳定即可（也就是既不失活也不自发凝结）。本发明纤维蛋白原溶液的优选贮存温度为 1 至 25°C，更优选约 4 至约 23°C。在冷冻时，最佳温度为约 4°C±1°C，在该温度下产品已被证实稳定达至少 1 年（数据未显示）。当在室温下贮存时，最佳温度为约 20 至 25°C，更优选约 22 至 24°C，最优选地，温度为 23°C±1°C，在该温度下产品已被证实稳定达至少 3 个月（数据未显示）。而且，预先冷冻的样本（长达至少 1 年）随后被稳定贮存在 4°C 下达至少另外 1 年，使产品的随时使用的方式可以使用至少 2 年。

优选地在贮存期间将纤维蛋白原水溶液的 pH 值调至大约 pH 6.0 至 8.2，更优选 pH 6.2–8.0，进而更优选 pH 6.3–7.5，最优选 pH 6.5–7.36，牛纤维蛋白原例如 pH 7.24，人纤维蛋白原最优选 pH 6.32 至 7.13。

贮存稳定性纤维蛋白原溶液的 pH 取决于它被贮存其中的缓冲液。在优选的发明实施方式中，贮存稳定性纤维蛋白原溶液是在组氨酸缓冲液中制备的，不过本领域已知的其他公认的、生理学上可接受的缓冲液也可以用于制备贮存稳定性纤维蛋白原，只要所得纤维蛋白原溶液的 pH 保持在指定范围内，以便维持它的活性，但是保持不会自发凝结。适合的缓冲液、例如 0.1M，包括但不限于达到例如下述 pH 水平：组氨酸，pH 6.0 或 7.2 至 7.24；Tris，pH 8.16；甘氨酸，pH 9.3；或碳酸盐，pH 9.05 至 9.31 或 pH 9.86 至 9.9。

特定纤维蛋白原溶液的最佳贮存 pH 在部分程度上依赖于材料的贮存温度，如下实施例附表所示。不过，鉴于本文所提供的信息，本领域普通技术人员将能够基于计划贮存温度和条件选择纤维蛋白原溶液的最佳 pH，知道决定因素是无论如何使其中所含有的蛋白质保持稳定（也就是既不失活也不自发凝结）。

例如，贮存在室温（约 23°C）下的随时使用型人纤维蛋白原的最佳

pH 维持在 6.3 至 7.1, 优选大约 pH 6.32, 以在中和所贮存的制备物和接触凝血酶/ Ca^{++} 时保留迅速生成凝块的能力。当在冷冻(约 4°C)下贮存随时使用型人纤维蛋白原时, 最佳 pH 也最好维持在 pH 6.32 至 8.0, 优选大约 pH 6.3 至 7.5, 以在中和所贮存的制备物和接触凝血酶/ Ca^{++} 时保留迅速生成 FS 凝块的能力(见表 2)。

类似地, 贮存在室温(约 23°C)下的随时使用型牛纤维蛋白原的最佳 pH 维持在 6.5 至 9.0, 优选大约 pH 6.5 至 8.2, 以在中和所贮存的制备物和接触凝血酶/ Ca^{++} 时保留迅速生成凝块的能力。当在冷冻(约 4°C)下贮存随时使用型牛纤维蛋白原时, 最佳 pH 也最好维持在 pH 6.5 至 9.0, 优选大约 pH 6.5 至 8.2, 更优选 pH 6.5 至 7.07, 以在中和所贮存的制备物和接触凝血酶/ Ca^{++} 时保留迅速生成凝块的能力(见表 1 和 2)。

激活物组分, 例如凝血酶或凝血酶样酶

本发明的“激活物”是凝血酶或凝血酶样酶。“凝血酶样酶”包括凝血酶, 表示任意能够催化从纤维蛋白原生成纤维蛋白的酶。除了来自哺乳动物血液来源的凝血酶以外, 优选来自人类来源, 用于人类患者, 酶还可以借助细胞培养或重组手段加以生产, 如下关于纤维蛋白原组分所述加以分离。牛凝血酶在商业上适宜从多种来源获得, 包括 Parke-Davis。

凝血酶充当从纤维蛋白原生成纤维蛋白的催化剂, 纤维蛋白是一种不溶性聚合物。凝血酶在 FS 组合物中的含量足以催化纤维蛋白原的聚合。凝血酶还激活 XIII 因子, 后者是一种血浆蛋白, 它催化纤维蛋白中的共价交联, 赋予所得凝块以不溶性。

作为凝血酶或凝血酶类似物的替代方式, 普通来源的凝血酶样酶是从蛇毒凝血酶凝固剂纯化的, 也就是蛇的毒液(例如参见 Pirkle et al., *Thrombosis and Haemostasis*, 65(4): 444-450 (1991))。优选的凝血酶样酶非限制性地是巴曲酶, 尤其来自 B. Moojeni, B. Maranhao 和 B. atrox, 和 ancrod, 尤其来自 A. rhodostoma。根据凝血酶样酶的选择, 这类凝血酶样酶能够释放血纤肽 A, 后者生成纤维蛋白, 不过速率

不同于凝血酶。

应当注意，如果本 FS 制备物的贮存稳定性纤维蛋白原组分与患者血液接触，也就是在伤口部位，那么患者自身的凝血酶和 XIII 因子可能足以将纤维蛋白聚合物转化为交联的纤维蛋白聚合物。因而，在本发明的 FS 中能够采用内源性凝血酶原和 XIII 因子作为包含纤维蛋白单体或非交联纤维蛋白的组合物的组分。不过应当注意，足量内源性凝血酶和 XIII 因子通常没有保留一定的含量，足以以适合于形成有效纤维蛋白密封的反应速率将贮存稳定性纤维蛋白原组分转化为交联的纤维蛋白。在较大伤口中，较重的血流将洗去内源性材料，将不发生凝结。在同等的反应速率下，似乎转化纤维蛋白原为交联的纤维蛋白比转化非交联的纤维蛋白为交联的纤维蛋白需要更多的凝血酶。

凝血酶组分在本发明 FS 组合物中的浓度可以从低至溶液中 150 μ g 凝血酶每 40mg 纤维蛋白原至溶液中凝血酶与纤维蛋白原比例相等，这依赖于应用、周围条件（例如温度、pH、混合）和所需聚合速率。在 FS 组合物而非纤维蛋白原组分的意义上，每 ml FS 组合物加入约 4 单位至约 500 单位凝血酶。作为替代选择，凝血酶组分可以是由伤口部位提供的。不过，可用于激活溶液中每个纤维蛋白原分子的凝血酶越多，纤维蛋白原组分的聚合将进行得越快，直至达到最大，此时加入单独的凝血酶不可能增加聚合。

钙离子源、例如 CaCl_2 ，是本 FS 组合物在凝血酶组分能够激活纤维蛋白原组分之前激活凝血酶组分所必需的。不过，可以向所贮存的凝血酶组分掺入钙离子。作为替代选择，可以在聚合之前向 FS 组合物加入 CaCl_2 ，或者在伤口部位的内源性钙离子可以是足够用的。

在无 XIII 因子的 FS 制备物中，最好加入 XIII 因子，以激活纤维蛋白的交联。可以向 FS 组合物加入活化的 XIII 因子，最终浓度为约 1.0 至约 20 单位 XIII 因子每 ml FS 组合物。作为替代选择，XIII 因子可以是由伤口部位的血液或体液所供应的，或者是由自体固有血浆的加入所供应的。

在一种本发明实施方式中，激活物酶被固定在载体上。这可以借助

任意适合的技术进行。例如，各种可用于衍生载体的活化化学有：重氮翁基团、异氰酸酯基团、酰氯基团、酸酐基团、磺酰氯基团、二硝基氟苯基团、异硫氰酸酯基团、羟基基团、氨基基团、N-羟基琥珀酰亚胺基团、三嗪基团、胍基基团、碳二亚胺基团、硅烷基团和溴化氰。例如参见 Dean, *Affinity Chromatography--A practical Approach*, Johnson and Middle (Eds) (1991) IRL Press Oxford, 其工艺结合在此作为参考。低 pH 值、例如 pH 4-6 可以用于酶的偶联，以防止酶的降解。

可以使用琼脂糖作为载体，不过也可能使用二氧化硅。一般而言，用高度反应性化合物激活载体，随后与配体的官能团反应，例如-OH、-NH₂、-SH、-COOH、-CHO，生成共价键。

在某些发明实施方式中，通过能量和/或光子的应用激活 FS 组合物。能量优选地在电磁光谱中具有一定的波长，选自 X-射线、紫外光、可见光、红外光和无线电波。可以使用热能，例如通过直接与电加热探针、例如电烙器或通过顶端气体压缩加热的探针接触或者使加热的气体或液体通过顶端而递送。还可以采用超声频率中的声能或微波范围中的无线电波。能量是以连续或不连续方式递送的，电磁波长带或窄或宽。光子源的实例包括单色与多色光、连贯或不连贯光，以连续或不连续方式递送。不连续的能量和/或光子递送的实例包括单和/或多脉冲的一连串递送。光子能够以极化或非极化方式递送，直接的或反射的，有或没有内部或外部干扰。在优选的实施方式中，使用激光，包括但不限于紫外、可见或红外范围中的那些。

在加入凝血酶和钙离子并且剧烈搅拌时不会凝结的随时使用型人纤维蛋白原的贮存溶液被称为“凝血酶不敏感性”。凝血酶不敏感性制备物保持液体状态（具有与水相似的粘度）。不过，这类凝血酶不敏感性纤维蛋白原样本的 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析显示，纤维蛋白原蛋白质已经不可逆地被降解为小分子量的片段。因而，制备物不再含有活性纤维蛋白原，也就不是本发明的主题。

补充物和添加剂

如上所述，根据组合物的最终用途，本发明 FS 组合物可以另外含

有粘度调节剂和/或结合增强剂。例如，粘度调节剂的加入为 FS 组合物提供特别适合于被修复或密封组织的粘度。高粘度组合物优选地用于结合分离的组织，而低粘度组合物最好适合于形成连续组织和假体材料水的不透性密封涂层，例如 Gortex™ 血管移植物等。这类粘度调节剂非限制性地包括非细胞基质材料，例如透明质酸及其盐（例如透明质酸钠或软骨素钠）；糖类，例如果糖、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、葡聚糖、琼脂糖、藻酸或果胶；多元醇，例如甘油；蛋白质凝胶，例如胶原和酪蛋白酸盐；或其混合物。

还可以使用结合增强剂，以提高组合物的结合强度。这类结合增强剂可以 (i) 在与贮存稳定性纤维蛋白原组分混合之前被加入到激活物组分中，或者 (ii) 在聚合之前被加入到活化的纤维蛋白原/纤维蛋白混合物中，或者 (iii) 在 FS 材料的应用之前铺在伤口表面。结合增强剂一般选自极性化合物，例如带电的糖胺聚糖、低聚糖与多糖、多元醇和极性染料。很多这些化合物尤其也可充当粘度调节剂。这类极性化合物的实例非限制性地包括透明质酸、硫酸软骨素、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、甘油、吲哚菁绿和荧光素钠。多价阳离子、例如钙，也可以通过键合 FS 组合物蛋白质组分的带负电部分、例如清蛋白和糖胺聚糖，而增强结合，例如透明质酸和硫酸软骨素。

当伤口表面含有粘蛋白时，例如胃肠道和肺系，粘液粘合剂是特别有用的结合增强剂。粘液粘合剂的实例包括羧甲基纤维素和藻酸钠。这些材料具有高浓度的羟基，在高胶原含量伤口表面上的使用也可以有利于促进结合的形成。正如 Robinson et al., Ann. NY Acad. Sci. 507: 307-314 (1987) 所报道的，高电荷密度是肿胀和氢键所优选的，从而允许紧密附着于所需组织表面。还可以采用其他将为本领域技术人员所显而易见的粘液粘合剂。

组合物可以根据需要另外含有 pH 调节剂、表面活性剂、抗氧化剂、渗透剂和防腐剂。pH 调节剂的实例例如非限制性地包括乙酸、硼酸、氢氟酸、乙酸钠、硫酸氢钠、硼酸钠、碳酸钠、柠檬酸钠、氢氧化钠、硝酸钠、磷酸钠、亚硫酸钠和硫酸。表面活性剂的实例例如包括苯扎氯铵。

抗氧化剂的实例例如包括硫酸氢盐。渗透剂的实例例如包括氯化钠。防腐剂的实例例如包括氯丁醇、山梨酸盐、苯扎氯铵、硫汞撒、羟苯甲酯、羟苯丙酯、EDTA（乙二胺四乙酸）和 polyquad。

通常，pH 调节剂、表面活性剂、抗氧化剂、渗透剂和防腐剂的浓度为约 0.001 至 5 重量%。

组合物组分按一定量组合在一起，提供所需的结合强度以及粘度，特别适合于预期最终用途。一般而言，肽在 FS 组合物中的含量为约 1 至 99 重量%，优选约 5 至 80 重量%，更优选约 6 至 70 重量%，进而更优选约 6 至 50 重量%，最优选约 8 至 35 重量%。如果含有糖类，含量为约 0.1 至 70 重量%。如果含有糖胺聚糖，含量优选为约 0.1 至 20 重量%。如果含有多元醇，加入量可以为约 0.1 至 90 重量%。

添加剂、例如粘度调节剂和结合增强剂的含量一般不超过约 65 重量%。

FS 组合物的粘度是根据所进行的特定外科手术加以选择的。就分离组织的结合而言，约 1,000 至 1,000,000 厘泊的粘度是有利的，优选约 20,000 至 200,000 厘泊。粘度在优选范围内的 FS 组合物可以被容易置于分离组织上，通过皮下注射器或双注射装置排出，再通过移动注射器顶端而铺在伤口部位。在该粘度范围内，FS 组合物不会脱离组织，保持固定，即使施用能量以形成组织焊接也是如此。

就需要形成水不透性涂层以密封组织或假体材料的应用而言，本发明 FS 组合物的粘度优选地是较低的。为此，包涂所优选的粘度在 10 至 1,000 厘泊的范围内。较低的粘度是优选的，以便随时能够铺开组合物，以有效覆盖所包涂的组织或材料。

当向 FS 组合物加入透明质酸或其他非牛顿流体时，随着剪切力增加，粘度降低。因此，在组合物施用于伤口表面时，可以通过改变剪切力来调整 FS 组合物的粘度。例如，能够以迅速或高剪切速率注射非常厚的 FS 组合物穿过移植物，以减少过渡期间的粘度，其中用赋予假塑性的材料包涂移植物。这使非常粘的 FS 材料理想地用于焊接在聚合过程期间不受剪切力的部位。在注射组合物时，剪切力是较高的，粘度降

低，使注射容易。沉积在组织上之后，剪切力下降至零，组合物的粘度相应迅速增加。其结果是，组合物保持定位在组织上。

在某些本发明实施方式中，向 FS 组合物补充充当载体媒介或递送媒介的、任意数量的化合物，单独或者两种或多种的组合，例如但不限于生长因子、药物、血液因子或其他化合物或其混合物，只要是上面提到的即可，在整个贮存期间维持纤维蛋白原溶液的活性，不会诱发自发凝结。例如，通过向 FS 组合物或 FS 组合物的一种组分、例如贮存稳定性纤维蛋白原组分补充生长因子，FS 组合物在施用于人类患者或动物受治疗者时，特别是在伤口部位，能够加速、促进或提高伤口愈合、组织（再）生成等。

补充物可以与纤维蛋白原或纤维蛋白组分混合，或者与其组合混合，或者与最终的 FS 组合物混合，这依赖于添加剂的性质、FS 聚合速率、组分之间的相互作用等。据信这类补充物的剂量与用在常规纤维蛋白密封剂中的剂量相同。

经过补充的 FS 组合物在用作载体或递送媒介时最好能够：(1) 加强、刺激或介导生长因子、药物或其他添加剂或组分的生物活性；(2) 降低经过补充的 FS 组合物或用在其中的贮存稳定性纤维蛋白原组分的一种或多种添加剂或组分的活性，其中这类活性将抑制或破坏制备物中的生长因子；(3) 延长添加剂或组分从本发明 FS 组合物或贮存稳定性纤维蛋白原组分中递送；和 (4) 具备其他可取的性质。有关添加剂或补充物打算还包括任意突变体、衍生物、其截短形式或其他改性形式，它们具有与衍生前的化合物或组合物相似的生物活性或其子集。

可以向本发明 FS 组合物同时加入或提供一种以上添加剂或补充物。尽管这类添加剂和/或补充物在 FS 组合物中的浓度将因目的而异，不过浓度必须足以允许这类化合物和/或组合物达到它们的预期或既定目的。这类补充物的加入量可以由本领域普通技术人员凭经验加以确定，先测试不同的浓度，再选择对预期目的和应用部位有效者。还可以加入染料、示踪剂、标识剂等，例如检查 FS 组合物的随后递送。

经过补充的 FS 制备物例如可以包含药物、抗体、抗凝剂、凝血因

子（例如 VII、VIII、IX、X 和 XIII 因子和冯威勒布兰特因子）以及生长因子和/或其他化合物，它们借助其他可能不会有效发挥本发明作用的递送装置或机理在不久之后递送给需要它们的人类或动物患者。可以加入多种组分，它们募集或扩充白细胞或内皮总数，抑制白细胞、内皮细胞等的途径，或者调节新颖的肽。有生物学价值的化合物非限制性地包括生长因子，例如 EGF、TGF α 、TGF β 、TGF-I 与 TGF-II、FGF、PDGF 等；细胞因子，例如 IFN- α 、IFN β 、IL-2、IL-2、IL-3、IL-6、造血因子等；免疫球蛋白；代谢物质，例如胰岛素、皮质类固醇、激素等。其他材料包括结构材料，例如生理学上可接受的异质成形材料，例如聚合物、玻璃、金属、陶瓷、其复合物等。

还可以使用其他材料，例如纤连蛋白、纤维蛋白分解抑制剂，例如抑肽酶、 α -2 抗纤维蛋白溶酶、PAI-1、PAI-2、6-氨基己酸、4-氨基甲基环己酸或胶原。

FS 材料可以与细胞混合，这些细胞是自体固有的、经过培养或改性的、同种异体的或异种的，例如上皮细胞、表皮细胞、成纤维细胞、成骨细胞、间质细胞、肝细胞、胰细胞（例如巨噬细胞、血小板、T-细胞、B-细胞、粒细胞、单核细胞、角质细胞等）或经过培养改性的细胞，以递送治疗性或生长增强性物质。

就牙科或整形应用而言，可以向制剂加入无机矿物质或无机矿物质混合物，它们是天然存在的或合成的，可取地是羟磷灰石或见于骨粉或骨屑的矿物质。矿物质与纤维蛋白原组分的体积比为约 1:2 至约 4:1，这依赖于所需的流动特征或预期用途和部位。去矿质化骨基质 (DBM) 是已知称为骨形态发生蛋白 (BMP) 的骨诱导性蛋白质的来源，包括骨生成素和调节祖代骨细胞增殖的生长因子（例如参见 Hauschka et al., J. Biol. Chem. 261: 12665-12674 (1986) and Canalis et al., J. Clin. Invest. 81: 277-281 (1988)）。不幸的是，除非与微粒骨髓抑制物组合，DBM 材料没有其他临床用途，并且能够用外科方法置于受体骨中以产生治疗效果的 DBM 数量是有限的。另外，DBM 粉末和骨生成素可能在表现它们的骨诱导能力之前就被组织液洗去。而且，组织液渗透至 DBM

包装的骨腔中或者软组织萎缩成伤口床是两种可能显著影响DBM和骨生成素的骨诱导性质的因素。软组织萎缩成伤口床同样可以抑制osteocompetent干细胞向伤口床的恰当移行。

FS还能够充当“脚手架”，这些细胞能够用于移动至受伤区域，以生成新的组织。另外，可以从供体部位收获活的成骨细胞，掺入到用于移植术的组合物中。还可以使用其他微粒形式的骨恢复材料。适合的异质成形材料有聚乳酸与聚乙醇酸、聚异丁烯酸酯、聚HEMA、bioglass、cervital与其他玻璃、Al、Ti、Co、Cr与其他金属、Al₂O₃与其他陶瓷等，及其组合和复合物。它们可以使用与骨材料相同的体积-体积比。还可以使用其他恢复材料，例如蛋白质粒子或者从胶原、纤维蛋白、纤维蛋白原、清蛋白等制备的珠粒，这依赖于组织修复部位。还可以掺入脂质体。

如前面所述，FS组合物可以另外含有抗生素，以减少或防止感染，例如庆大霉素、头孢噻肟、nebacetin和西索米星，组胺H₂拮抗剂，例如雷尼替丁，和抗癌药（例如参见Gersdorff et al., *Laryngoscope* 95: 1278-80 (1985); Ederle et al., *Ital. J. Gastroenterol.* 23: 354-56 (1991); Ronfard et al., *Burns* 17: 181-84 (1991); Sakurai et al., *J. Control. Release* 18: 39-43 (1992); Monden et al., *Cancer*, 69: 636-42 (1992); Greco, *J. Biomed. Materials Res.* 25: 39-51 (1991); Kram et al., *J. Surgical Res.* 50: 175-178 (1991)）。如果抗生素是液体，那么可以在聚合之前将抗生素掺入到FS的液体组分或所得FS组合物中，或者如果它是粉末形式，那么将其悬浮在液体组分中。用在药物递送系统中的多种抗生素的治疗剂量水平是熟知的（例如参见Biomaterials, G. D. Winter, D. F. Gibbons, H. Plank (Eds.), John Wiley & Sons, New York (1980), pp. 669-676)。抗微生物剂特别可用于这样的组合物，它们施用于暴露的伤口修复部位，例如口中部位，或者受损的伤口部位，例如灼伤。

发色团和指示剂组合物

在一种实施方式中，本发明组合物进一步包括内源性或外源性发色

团，以有利于在置于温血动物体内期间的可视化观察。发色团的使用可以可视化观察 FS 定向于伤口部位。它还提供一种快速的手段，用于鉴别任意从所需施用部位替换的材料，允许随后使用纤维素海绵、纱布垫或其他吸收材料除去外来材料。内源性发色团、例如血红蛋白的使用公开在 Krueger et al., *Lasers Surg. Med.* 5: 55-60 (1985) 中。外源性发色团的使用有助于生物粘合剂的放置，以前已经描述过（例如参见 Nasaduke et al., *Ann. Ophth.* 18: 324-327 (1986)）。

可以使用的发色团包括但不限于荧光素异硫氰酸酯、吲哚菁绿、银化合物（例如硝酸银）、玫瑰红、尼罗蓝、伊文思蓝、Q-Switch™ (Kodak, Inc.)、苏丹 III、苏丹黑 B 和印度墨汁。发色团的浓度优选为约 0.01 至 50 重量%，基于组合物的总重量而言。还可以采用为本领域技术人员所显而易见的其他类型发色团。

这类物质还可以改变组合物的吸收特征，以便组合物在低能量水平下吸收能量。这能够利用某些电磁光谱波长加热材料，这些波长被能量吸收性化合物所选择性吸收。例如，这将允许利用某些激光加热材料，这些激光的能量将不被本发明组合物所吸收，允许利用这些激光使组合物与目标结合。选择这样的染剂，在指定波长下具有峰光吸收，并且与从光源、例如激光束发出的光的波长相匹配，以便组合物在包涂或密封部位被选择性活化，同时基本上减少不可取的对邻近组织的热损伤。

外源性染剂、例如吲哚菁绿或荧光素，和内源性发色团、例如血红蛋白和黑色素等，特别适合于该目的。这些染剂还可以增加粘合性、结合强度和/或粘度。这类染剂在组合物中的含量优选为约 0.01 至 50 重量%，基于组合物的总重量而言。

离液剂

在需要延缓 FS 产品纤维蛋白的生成的情况下，加入一种离液剂以防止纤维蛋白单体的自发聚合，该单体是在纤维蛋白原与激活物的接触之后生成的。将离液剂与这类纤维蛋白原组合物混合，然后搅拌约 1 至 2 分钟，生成改性的纤维蛋白原溶液。纤维蛋白原然后可以如上所述被转化为纤维蛋白单体，但是聚合作用被延迟了。

适合的离液剂例如包括尿素、溴化钠、盐酸胍、KCNS、碘化钾和溴化钾。优选的离液剂浓度为约 0.2 至约 6.0 摩尔,最优选约 0.3 至约 2.0 摩尔。优选的是利用最少量的离液剂,只要仍然有可能防止纤维蛋白单体自发聚合即可。更优选地,直到需要纤维蛋白单体的聚合时才应当向离液剂加入钙离子源。这确保了纤维蛋白单体将不会由于内源性凝血因子的活化而交联。

如果向纤维蛋白原或纤维蛋白组分的含水缓冲液加入离液剂,那么例如通过用水稀释组合物,能够将所得纤维蛋白组合物转化为交联的纤维蛋白。稀释是这样进行的,以便使用最少量的稀释剂。一般而言,在稀释后所得离液剂的浓度应当为约 0.5 至约 0.1 摩尔。

缓冲 FS 组合物

在施用于伤口部位之后,在一种实施方式中优选地将 FS 组合物用 pH 小于约 5 的酸缓冲液缓冲至酸性。适合的酸性缓冲溶液的非限制性实例包括乙酸、琥珀酸、葡糖醛酸、半胱磺酸、巴豆酸、衣康酸、谷氨酸、甲酸、天冬氨酸、己二酸及其盐。琥珀酸、天冬氨酸、己二酸和乙酸的盐是优选的,乙酸钠是更优选的。优选的酸缓冲液浓度为约 0.02M 至约 1M,更优选约 0.1M 至约 0.3M。这类优选的浓度赋予组合物的离子强度以更多生物可相容性。

因此,在一种本发明实施方式中,包含纤维蛋白单体的组合物基本上不含激活物酶。“基本上不含”意味着全部凝血酶或凝血酶样酶都已被除去,或者任何剩余在组合物中的凝血酶样酶的水平不足以提供不可取的药理作用。因而,基本上不含激活物酶的本发明组合物可以含有少量激活物酶,含量在常见于纤维蛋白凝块中的酶的约零与 10%之间,优选在约零与 2%之间。

优选的本发明实施方式进一步提供按照前述定义制备本即时 FS 组合物的方法。

在另外一种优选的实施方式中,本发明 FS 组合物是用一种适合的碱性缓冲液制备的。适合的碱性缓冲液的非限制性实例包括 HEPES、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、碳酸氢盐缓冲液(例如碳酸氢钠和碳酸

氢钾)、柠檬酸的三金属盐、乙酸的盐和硫酸的盐。优选的碱性缓冲液包括: 0.5-0.75M 碳酸钠/碳酸氢钠 pH 10-10.5、0.5-0.75M 碳酸氢钠/NaOH pH 10.0、1.5M 甘氨酸/NaOH pH 10.0、0.5-1.0M 双羟乙氨基乙磺酸(BES) pH 7.5、1M 羟乙基哌嗪丙磺酸(EPPS) pH 8.5、0.5M 苜蓿素 pH 8.5、1M 吗啉代丙磺酸(MOPS) pH 8.0、1M 三羟甲氨基乙磺酸(TES) pH 8.0 和 0.5M 环己氨基乙磺酸(CHES) pH 10.0; 其中 0.5-0.75M 碳酸钠/碳酸氢钠 pH 10-10.5、0.5-1.0M 双羟乙氨基乙磺酸(BES) pH 7.5、1M 羟乙基哌嗪丙磺酸(EPPS) pH 8.5 和 1M 三羟甲氨基乙磺酸(TES) pH 8.0 是最优选的。

碱性缓冲液的用量应当足以使纤维蛋白聚合。优选的是将约 10 份至约 1 份包含纤维蛋白单体的组合物与约 1 份碱性缓冲液混合。进而更优选的是该比例为约 9:1, 不过优选的比例依赖于缓冲液的选择和纤维蛋白聚合物的所需“强度”。当然, 纤维蛋白聚合物的所需强度取决于 FS 组合物的预期最终用途。

激活 FS 聚合

除了升高包含纤维蛋白单体的组合物的 pH 或者稀释离液剂以外, 还优选的是活化这类组合物的凝血酶原和 XIII 因子, 生成交联的纤维蛋白。这类活化可以这样进行, 使 FS 组合物的组分与钙离子源接触。钙离子源可以被包括在纤维蛋白原或纤维蛋白缓冲液中。如上所述, 非限制性钙离子源包括氯化钙, 优选地浓度为约 30mM。作为替代选择, 不过不是优选的, 钙离子源可以是由伤口部位的血液所供应的。

如果使用碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液, 那么必须在增溶步骤期间向酸缓冲液加入钙离子源。这是因为氯化钙不溶于碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液。优选地, 钙离子在酸缓冲溶液中的浓度为约 5 毫摩尔至约 150 毫摩尔, 更优选约 5mM 至约 50mM。

产品安全性

除非借助细胞培养制备, FS 组合物包含血浆蛋白质, 其结果是伴有被血液病原体污染的危险, 例如有可能污染人血浆蛋白质的那些, 特别是肝炎病毒或 HIV。利用已知的病毒灭活方法, 还没有关于从商业化纤

维蛋白密封剂传输病毒报道，即使在用于大面积出血时也是如此。在从所汇集的人血浆制造血浆衍生物时，病毒被分配成为分馏过程的一部分。因为特定的病毒分配在一些馏分中而非其他，所以在某些情况下单独的分配可能足以除去血浆衍生物中的特定感染剂。不过，现在从 AIDS 传染病已知，尽管 HIV 可以被有效地从免疫球蛋白中除去，不过它仍然能够存在于抗血友病因子浓缩物中。因此非常重要的一点是，假定全部血浆馏分都被污染，并且采用剧烈的灭活方法。

在现有技术文献中已经研究和描述了大量病毒灭活策略。例如，血液制品中的病毒灭活方法包括但不限于透析、超滤、两步蒸汽加热（累积性）、高温高压灭菌、溶剂洗涤剂（例如磷酸三（正丁基）酯（TNBP）或吐温 80）、光化学品（例如补骨脂素类似物）、巴氏消毒（加热）、放射和紫外光处理。尽管高热或蒸汽法的病毒灭活就生物活性蛋白质溶液而言是不切实际的，包括本纤维蛋白原溶液，不过纳米过滤是可选的处理手段，不会导致本发明组分、例如人纤维蛋白原溶液的灭活，然后再将其置于无菌的贮存容器中。

减少感染性达 5 个对数单位的病毒灭活方法应当提供这样的保证，制备物不再是有感染性的。例如，用在 Tisseel VH 纤维蛋白密封剂生产中的蒸汽加热过程已经显示就两步过程的每个蒸汽加热步骤而言，减少病毒效价达至少 6.4 个对数减少单位，使污染的危险可忽略不计。可以借助本领域已知的方法采用多个洗涤步骤来除去稳定化添加剂。可以使用现有技术纤维蛋白密封剂组合物已知的有效提供病毒灭活的方法，对本发明的即时 FS 产品而言也将是同等有效的。

制备和使用 FS 组合物的方法

配制本发明 FS 组合物的方法可以按多种方式进行，包括但不限于下列制备技术，它们一般生成配制良好的组合物。制备一般是在不超过 22.5 - 30°C 下进行的。首先，将纤维蛋白原和激活物组分按所需浓度配制成无菌水溶液。以前不可能实现的本发明优点是水溶液然后能够被稳定地贮存数天、数周或数月，在组合时生成本发明 FS 组合物的活性或能力没有显著的改变。当需要 FS 组合物时，将纤维蛋白原组分中和，

与激活物组分组合，后者还可以含有 CaCl_2 、XIII 因子和其他添加剂，这依赖于 FS 的预期目的。各组分是按一定比例组合的，比例取决于组合物的预期最终用途。为了提高主要组分分子的混合，一般有利的是内部或外部搅拌组合物，通常是剧烈搅拌或摇动，如下实施例所述，直至生成溶胶或凝胶。

在替代的实施方式中，可以在各组分组合之后加入增强材料的粘度、结合或可视化程度的添加剂。此时可以加入其他组分，例如 pH 调节剂、稳定剂、蛋白酶抑制剂、表面活性剂、抗氧化剂、渗透剂、防腐剂等，以及本身不会影响 FS、但是用于体外或体内递送至患者或组织的组分。

在优选的本发明实施方式中，没有向纤维蛋白原加入抗微生物剂，而是利用已知技术保持无菌。不过，在替代的实施方式中，在所例证的程度上加入抗微生物剂，以避免纤维蛋白原溶液组分在长期贮存中被微生物污染。任意公认的、生理学抗微生物剂出于本发明目的都是可接受的，只要在整个贮存期间维持纤维蛋白原溶液的活性，不会诱发自发凝结，并且不是人用禁忌即可。

本发明的即时纤维蛋白密封剂是从贮存稳定性纤维蛋白原组分制备的，例如人纤维蛋白原，因而可以按照任意已知的使用这类生物学制备的、经过补充或未经补充的组织粘合剂的方式使用，例如药理学或化妆品用途，包括输注目的，例如抗生素、抗肿瘤剂、麻醉剂等递送；在塑料再造外科中用作软组织促进素或软组织代用品；用于附着皮肤移植于受体部位，无需使用缝合或者减少缝合数量；或者在骨修复和再造中用作所移植的完整成骨细胞的生长基质。FS 还能够用于小骨再造、神经吻合或其中缝合修复是不可能的或不可取的其他情形，或者用作伤口敷料。

FS 可以按多种方式应用，这取决于外科适应症和技术，用于患者的伤口愈合、凝血和纤维蛋白原血症；用于手术性或术后后遗症的抑制；用于包涂假体；用于可敷用的伤口密封和用于安全与持续的止血，也就是密封流体和/或空气溢漏等。某些优选的发明实施方式提供直接使用

本即时 FS 组合物连接组织或器官的方法，非限制性地例如终止出血、愈合伤口、密封外科伤口，用在血管外科中，包括提供止血，用于远端冠状动脉吻合术、左心室缝合线、主动脉切开术与套管插入术部位的缝合孔出血，扩散见于二次手术中的心肌外出血和从静脉出血部位渗血。本发明还可用于在插入之前密封涤纶和其他移植物，用于包涂假体，终止脾、肝和其他实质器官的出血，密封气管与支气管吻合术口和肺的漏气或裂口，密封支气管残株、支气管瘘和食管瘘；用于无缝合的无缝愈合，脑内 AVM、肝 AVM 的血管放射栓塞，结肠的血管发育异常，试管静脉曲张，密封继发于消化性溃疡的“泵式”胃肠出血点等。本发明进一步可用于提供角膜移植、鼻出血、扁桃体切开术、拔牙的止血和其他应用。

在每种上述应用中，患者的正常组织完整性有所破坏。破坏或者 FS 应用部位的位置在本文中统称为“伤口部位”，不过可以不总是伤口本身。例如，漏气不必是伤口，也不是假体的加入，但是出于简便的目的，它们在本文中被统称为“伤口”，因为各自出现在正常组织的破坏处，并且各自借助本发明 FS 组合物的应用加以密封或处理。

在优选的本发明实施方式中，FS 组合物被配制和“即时”转化，意味着与伤口部位接触并行地，或者在 300 秒内，优选在 180-240 秒内，更优选在 150-180 秒内，进而更优选在 100-150 秒内，最优选不到 100 秒，纤维蛋白单体生成，并被转化为聚合的或部分聚合的纤维蛋白，和/或非交联的纤维蛋白被转化为交联的纤维蛋白。事实上，通常在 60 秒以下生成即时 FS 凝块，经常在 30 秒以下，在本文所提供的实施例中，FS 凝块始终在 8 至 30 秒内生成，经常在 9 至 12 秒内。

因而，“即时”或“并行”也表示纤维蛋白生成步骤发生在贮存稳定性纤维蛋白原组分的活化之后 300 秒内，优选在 180-240 秒内，更优选在 150-180 秒内，更优选在 100-150 秒内，更优选小于 100 秒，更优选小于 60 秒，更优选小于 30 秒，最优选 8 至 30 秒，通常 9 至 12 秒。不过，即使在最长的时间中，本发明的 FS 与任意现有技术制备物相比也是“即时”的，因为纤维蛋白原在水溶液中总是随时使用型，其

他组分也不会消耗时间、难以测量、或者从冻干或冷冻制剂中或者从新鲜的血液或血浆样本中单独混合和制备这类组分的制备物。

在一种优选的实施方式中，纤维蛋白生成步骤和接触步骤在伤口部位是“并行的”，意味着是同时的，尽管聚合作用可能在上述时间范围内还花费额外的时间才能完成。不过，FS 组合物组分向纤维蛋白的转化步骤发生在活化和/或接触的 60 秒内，优选在 30 秒内，更优选在 15 秒内，进而更优选在 10 秒内，最优选在 0-10 秒内。否则，FS 组合可能从预期部位流失。

最后，即时和并行还可以意味着转化步骤开始于接触步骤之前，尽管不是比接触步骤提前很多，以致全部纤维蛋白单体（由贮存稳定性纤维蛋白原的活化所生成）已被聚合或者转化为交联的纤维蛋白。例如，这种发明实施方式可能发生在这种时候，在所得组合物施用于伤口部位之前，在注射器型装置中，在钙离子的存在下，贮存稳定性纤维蛋白原组分因接触凝血酶或凝血酶样酶而活化。如果在接触步骤之前全部所得纤维蛋白已被聚合或者转化为交联的纤维蛋白，那么组合物不再保留任何流动性，也不再能够生成令人满意的纤维蛋白密封剂，也不再能够用于这类目的。由于贮存稳定性纤维蛋白原组分转化为 FS 纤维蛋白组合物的时间理想上小于 30 秒，转化步骤应当开始于接触步骤之前不超过约 30 秒，优选不超过 3-10 秒，除非已经加入一种组分、例如离液剂使转化延迟。这种实施方式是优选的，因为它确保了最大量的 FS 组合物将在所需部位聚合，与此同时生成优异的纤维蛋白凝块。其结果是，从贮存稳定性纤维蛋白原制备的本发明 FS 组合物消除了很多可能的密封剂制备中的变异性，允许 FS 组合物在密切控制的条件下即时施用于伤口部位。

FS 递送

本发明 FS 产品适宜在临使用前混合至少两种组分而成。第一组分包含贮存稳定性纤维蛋白原的随时使用型水溶液，第二组分是激活物组分，通常为凝血酶或凝血酶样激活物和钙离子。还可以包括 XIII 因子和/或其他添加剂组分，如本说明书另处所述。一般而言，各组分适宜

利用双注射器系统递送，其中各注射器通过一种注射器用连接器连接，开口直径约 1mm 或以下。利用简单的、普遍可用的设备可以实现基本均匀。

现有技术中的 FS 应用包括双注射装置，随着纤维蛋白原和凝血酶从注射器端口中出来而混合，通常利用大针头直接流在伤口上。不过，这类递送系统已知生成凝块导致针头和管子堵塞。已知的双注射器系统在填充和操作上也是笨拙的，如果纤维蛋白原与凝血酶组分的混合不充分，那么所得凝块可能缺乏强度或弹性。因为很多伤口部位渗漏大量流体，不恰当形成的纤维蛋白密封可能变得无效或者被冲走。不过，这些问题被本发明所克服，因为稳定的纤维蛋白原是以水溶液、随时使用的方式被贮存的，没有混合、测量或时间延迟，可以被直接贮存在笔型注射器递送装置中。

本发明中，在聚合之前不久混合各组分。配制各组分的浓度允许以适当体积混合各组分，以简化最终的粘合剂制备，优选地体积是基本上相等的。适宜地，可以使用带有一次性混合顶端的双腔注射器支架。作为替代选择，可以利用两只注射器混合两种组分，如上所述，或者可以将各组分直接施用于伤口部位，在那里发生混合。不过优选地，在递送之前或者作为递送过程的一部分使各组分充分混合，在递送至部位之时生成 FS 组合物。

双腔注射器可以是 Y 形的，从而允许从贮存稳定性组分混合成 FS 组合物，转化步骤的活化与接触步骤同时或者在其之前不久。在替代方式中，与 Y 形双腔注射器不同，可以采用带有两个开口的双腔注射器。这允许同时接触伤口部位和从贮存稳定性组分转化为 FS 聚合物。在另外一种替代实施方式中，双腔注射器的贮存稳定性组分可以被喷在所需部位上(参见 Kram et al., Amer. Surgeon, 57: 381 (1991))。在另外一种替代实施方式中，贮存稳定性组分被容纳在单腔注射器中，注射器被非多孔性材料所分隔开，将该材料刺穿、破坏、溶解或简单地除去，以便在所转化的 FS 的临递送之前混合各组分。

在替代方式中，利用标准的药物递送技术，容易从更大的容器中抽

取纤维蛋白原与由注射器递送的药物一起至递送装置中。

纤维蛋白密封剂试剂盒

本发明进一步提供试剂盒，用于即时 FS 组合物的随时使用型递送，包含至少两只小瓶。一只小瓶如前所述不是玻璃的，含有贮存稳定性纤维蛋白原的水溶液，浓度适合于在与激活物溶液混合时生成 FS，激活物例如凝血酶或凝血酶样组合物，第二只小瓶含有激活物溶液，它优选地是凝血酶，浓度适合于在与第一只小瓶中的贮存稳定性纤维蛋白原内容物混合时生成 FS。“小瓶”在本文中打算包括注射器的腔，多只小瓶包括多腔注射装置。

可以调节激活物溶液的 pH，以便在与纤维蛋白原组分混合时它将中和后者，或者可以提供单独含有中和缓冲液的小瓶，在与激活物组分混合之前中和纤维蛋白原组分。

向至少两只小瓶其中之一的内容物加入钙离子源，例如 CaCl_2 ，并为之贮存，加入量有效确保纤维蛋白的聚合，优选地它是与凝血酶激活物组分组合的。在替代方式中，在额外的小瓶中供应钙 (CaCl_2) 组分。由一只或多只额外的小瓶供应额外的组分，例如稳定剂和/或 XIII 因子，和/或添加剂，例如生长因子、药物、抗生素等，或者作为替代选择，向至少两只小瓶的内容物加入这类额外组分并为之贮存。

在优选的发明实施方式中，贮存稳定性纤维蛋白原组分的供应浓度为约 75 - 115mg/ml，凝血酶的供应浓度为大约 500IU/ml。如果存在的话， CaCl_2 的供应浓度为大约 40mmol/升。如果存在的话，纤维蛋白分解抑制剂、例如抑肽酶的供应浓度为大约 3000KIU/ml。额外的组分如果存在的话，按照适合的浓度供应，这取决于它们的加入目的。例如，打算使 FS 组分本身稳定的抗微生物组分是按本文所例证的低浓度供应的，而打算缓释递送至接受 FS 的患者的抗微生物组合物将按照高得多的浓度供应。这类剂量或浓度可以由医药制剂领域技术人员加以确定或者为其所知。类似地，这样一名人员将知道两种或多种特定组分或添加剂是否能够被组合和贮存在单一的小瓶中而没有禁忌，或者如果在独立的小瓶中单独供应，同一组分或添加剂是否将保持更独立的活性和贮存稳定

性。

下列实施例进一步描述发明。不过，仅仅出于阐述的目的而为本领域技术人员提供实施例，不打算作为限制。而且，实施例不被解释为限制权利要求的范围。因而，本发明决不当被解释为受下列实施例所限，而是应当被解释为涵盖任意和全部变化，作为本文所提供的教导的结果，这些变化是显而易见的。

实施例

实施例 1: 使用在室温和中性 pH 下贮存在水溶液中的纤维蛋白原进行制备物的 FS 凝结测定

为了评价从纤维蛋白原的贮存稳定性、随时使用型水溶液迅速制备 FS 组合物的能力，评价了用纤维蛋白原制备的纤维蛋白密封剂的凝结活性，该纤维蛋白原已经在水溶液中贮存了很长时间。

牛纤维蛋白原、牛凝血酶、缓冲溶液、氯化钙、氢氧化钠和盐酸购自 Sigma Chemical Company, St. Louis, MO。检验人纤维蛋白原含有 53% 蛋白质（95% 可凝结）和 47% 盐。检验牛纤维蛋白原含有 61% 蛋白质（97% 可凝结）和 39% 盐。

标准研究级纤维蛋白原含有用在分离和纯化过程中的盐，包括柠檬酸钠和氯化钠。因而，纤维蛋白原的 40mg/ml 溶液例如含有 54mM 柠檬酸钠和 419mM 氯化钠，此外还有纤维蛋白原。另外，向每份样本加入叠氮化钠（0.025%）作为抗微生物剂，尽管在优选的本发明实施方式中，没有向纤维蛋白原加入抗微生物剂，而是利用已知技术保持无菌。

以下列方式完成凝结测定，一般按照 Kasper, Proc. Symposium on Recent Advances in Hemophilia Care, Los Angeles, CA April 13-15, 1989 (in Liss, New York, 1990)。向 4ml 聚丙烯试管加入每份纤维蛋白原样本的等分试样（100 μ l）。将每份样本用 0.1M 氢氧化钠、0.2M 组氨酸缓冲液（pH 6.0）或 0.1M 盐酸中和（pH 7.0-7.5）（在初步研究中使用更大的体积测定）。凝血酶被制成 200 单位/ml，含有 1M 氯化钙（3-6mM 过量于纤维蛋白原制备物中的柠檬酸钠的钙）。然后将凝血酶制备物用 0.1M 组氨酸缓冲液（pH 7.2）稀释至最终凝血酶浓度为 100 单位

/ml (2.5 单位凝血酶每 mg 纤维蛋白原)。在室温 ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) 下测定全部样本。

在向纤维蛋白原样本 ($100\mu\text{l}$) 加入 $100\mu\text{l}$ 凝血酶并使混合物剧烈混合时发生反应, 计时测量凝结。记录溶液变为粘性凝胶 (被混合液体突然流动缓慢) 和固体凝块 (一旦混合全部液体停止移动) 的时间。固体凝块生成时间经常是凝胶生成时间的两倍。

按照所述工艺, 在 25°C 下进行人工凝结测定: 中和所贮存的纤维蛋白原溶液, 加入凝血酶 (125 单位/mg 纤维蛋白原) 和 3-5mM 过量于纤维蛋白原溶液中的柠檬酸钠的 CaCl_2 。使制备物剧烈混合, 如上所述测量凝块生成所需的时间。

使用在室温 (约 23°C) 下贮存在水溶液中的、牛纤维蛋白原的组氨酸缓冲液 pH 7.24 所得凝结结果如下: 贮存 3 天的纤维蛋白原在 9 秒内生成凝块, 贮存 36 天的在 10 秒内生成凝块, 贮存 72 天 (10 周以上) 的在 9.5 秒内生成凝块。因而, 凝结测定结果与在从纤维蛋白原制备的制备物中生成 FS 凝块所需时间是一致的, 该纤维蛋白原已在室温 (中性 pH) 下以随时使用型水溶液贮存很长时间。

实施例 2: 使用在两种温度和一定 pH 值范围下贮存的纤维蛋白原溶液进行的 FS 凝结测定

为了评价从纤维蛋白原的贮存稳定性、随时使用型水溶液迅速制备 FS 组合物的能力, 评价了用纤维蛋白原制备的纤维蛋白密封剂的凝结活性, 该纤维蛋白原已经在一定 pH 值范围 (pH 6.50 至 pH 9.87)、室温 (约 23°C) 与冷藏 (4°C) 下、在水溶液中贮存很长时间。如实施例 1 稳定性研究所述, 在凝结测定法中评价纤维蛋白原溶液, 一式两份。

凝结结果如表格所示, 表 1 为牛纤维蛋白原 (39mg 蛋白质/ml), 表 2 为人纤维蛋白原 (40mg 蛋白质/ml), 分别制备贮存在下列 0.1M 缓冲液之一中: 组氨酸 pH 6.0 或 7.2; Tris pH 8.16。

表 1: 在 23°C 和 4°C 下贮存的牛纤维蛋白原的凝结时间

天数	温度°C	凝结时间 (秒)				
		pH 6.5	pH 7.36	pH 8.2	pH 9.04	pH 9.87
4	23	12	13	15	12	210
	4	10	9	15	10	凝结
7	23	10	10	11	11	240
	4	11	10	10	10	凝结
22	23	9	10	10	>300	>300
	4	部分凝结	部分凝结	凝结	凝结	凝结
97	23	10	100	>300	>300	凝结
	4	凝结	凝结	凝结	凝结	凝结

NT = 未测试。“凝结”表示自发凝结，没有加入凝血酶

表 2: 在 23°C 和 4°C 下贮存的人纤维蛋白原的凝结时间

天数	温度°C	凝结时间 (秒)				
		pH 6.32	pH 7.13	pH 8.04	pH 8.79	pH 9.43
4	23	10	10	11	12	120
	4	10	10	9	10	凝结
7	23	10	10	9	11	240
	4	10	9	8	9	12
22	23	10	8	10	>300	>300
	4	10	8	9	NT	NT
97	23	30	>300	>300	>300	>300
	4	18	10	10	11	>300
149	23	NT	>300	>300	NT	NT
	4	15	135	30	>300	>300

NT = 未测试。“凝结”表示自发凝结，没有加入凝血酶

上述说明所引用的每份专利、专利申请和出版物全文结合在此作为参考。

尽管已经就某些优选的实施方式对上述说明书进行了描述，并且出

于阐述的目的已经提供了很多细节，不过将为本领域技术人员所显而易见的是，本发明可以有各种修饰和额外的实施方式，某些本文所描述的细节可以有相当的变化，而不背离发明的精神和范围。这类修饰、等价变化和额外实施方式也打算落入权利要求的范围。