



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1917896 B

(45) 授权公告日 2011.07.20

(21) 申请号 200480039489.8

(22) 申请日 2004.12.23

(30) 优先权数据

0303588-8 2003.12.30 SE  
60/606,130 2004.09.01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日  
2006.06.30

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/SE2004/002016 2004.12.23

(87) PCT申请的公布数据  
W02005/063278 EN 2005.07.14

(73) 专利权人 生物活性聚合体股份公司  
地址 瑞典隆德

(72) 发明人 S·本格马克 K·拉森 B·林德曼  
R·安德森

(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 11038  
代理人 李华英

(51) Int. Cl.  
A61K 38/16 (2006.01)  
A61P 41/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 9722371 A, 全文.  
Elbert, Donald L., et al..Reduction  
of fibrous adhesion formation by a  
copolymerpossessing an affinity for  
anionic surfaces..J Biomed Mater Res  
42. 1998, (42), 55-65.

审查员 苏林

权利要求书 1 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

暴露的生物组织的表面保护

(57) 摘要

本发明涉及生物可降解的屏障网络,包括至少两种多肽,一种是阴离子型的,另一种是阳离子型的。本发明还涉及涂药器和包括要用于形成所述生物可降解的屏障网络的试剂盒。本发明还涉及所述涂药器或试剂盒在治疗中的用途,如用于医学,兽医学和园艺。

1. 生物可降解的屏障网络,包括:
  - a) 聚-L-赖氨酸,
  - b) 聚-L-谷氨酸,和
  - c) 可以药用的载体。
2. 如权利要求1的生物可降解的屏障网络,其中,所述生物可降解的网络包括可以药用的载体。
3. 如权利要求1或2的生物可降解的屏障网络,其中,所述生物可降解的网络包括治疗剂。
  3. 如权利要求3的生物可降解的屏障网络,其中,所述治疗剂选自下列一组:青霉素,头孢菌素,碳头孢烯,四环素,大环内酯,碘,银,铜,氯己定,乙酰水杨酸,蛋白水解酶,维生素,谷胱甘肽,叶酸,姜黄素,白藜芦醇,表没食子儿茶精,花色素,糖皮质类固醇,胰岛素,地塞米松,类胡萝卜素,亚油酸和缀合的-亚油酸,褪黑激素,异硫氰酸盐,紫草素,边缘茄碱,哌立福辛,脱氧瓜萎镰菌醇,羧酰胺-三唑,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,生长因子,胰岛素,维生素E,视黄酸,草药成分去甲肾上腺素,明胶,胶原和氧化纤维素。
4. 一种涂药器,包括:
  - a) 聚-L-赖氨酸和可以药用的载体;
  - b) 聚-L-谷氨酸和可以药用的载体;所述聚-L-赖氨酸和聚-L-谷氨酸彼此是通过隔离物隔开的。
5. 如权利要求4的涂药器,其中,所述涂药器选自下列一组:注射器,一或多成分喷雾器,雾化器,贴剂,导管,粘合剂,植入物和绷带。
6. 如权利要求4的涂药器,其中,所述隔离物为胶凝化水溶液或膜。
7. 一种试剂盒,包括
  - a) 聚-L-赖氨酸和可以药用的载体
  - b) 聚-L-谷氨酸和可以药用的载体,和
  - c) 用于施用所述阳离子和阴离子多肽的装置。
8. 如权利要求7的试剂盒,其中,所述装置选自下列一组:注射器,贴剂,导管,粘合剂,植入物,绷带,一或多成分喷雾器,和雾化器。
9. 如权利要求4的涂药器或如权利要求7的试剂盒,包括治疗剂。
10. 如权利要求9的涂药器或如权利要求7的试剂盒,其中所述治疗剂选自下列一组:青霉素,头孢菌素,碳头孢烯,四环素,大环内酯,碘,银,铜,氯己定,乙酰水杨酸,蛋白水解酶,维生素,谷胱甘肽,叶酸,姜黄素,白藜芦醇,表没食子儿茶精,花色素,糖皮质类固醇,胰岛素,地塞米松,类胡萝卜素,亚麻酸和缀合的-亚油酸,褪黑激素,异硫氰酸盐,紫草素,边缘茄碱,哌立福辛,脱氧瓜萎镰菌醇,羧酰胺-三唑,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,生长因子,胰岛素,维生素E,视黄酸,草药成分去甲肾上腺素,明胶,胶原和氧化纤维素。
11. 如权利要求4的涂药器或如权利要求7的试剂盒,其中,所述治疗剂是与所述聚-L-赖氨酸和聚-L-谷氨酸分开的或者与所述聚-L-赖氨酸和聚-L-谷氨酸中的一种或两种混合。

## 暴露的生物组织的表面保护

### 发明领域

[0001] 本发明涉及生物可降解的屏障网络,它包括两种多肽,一种是阴离子型的,另一种是阳离子型的。本发明还涉及涂药器和试剂盒,所述试剂盒包括用于形成所述生物可降解的屏障网络的成分。本发明还涉及将所述涂药器或试剂盒用于治疗用途,如用于医学,兽医学和园艺。

### [0002] 发明背景

[0003] 组织表面根据接触化合物的类型和程度,以及它们通常磨损的程度需要保护。因此,身体上的所有细胞是由细胞膜双层覆盖的,该双层主要由脂类和蛋白组成。上皮表面与外部世界连接;呼吸道,胃肠道,以及在某种程度上还有泌尿生殖道会接触相当恶劣的环境。这样的上皮表面还通过黏液层覆盖,该层具有黏弹性,并且具有突出的保护特性。另一方面,诸如滑膜和间皮的组织不是由黏液保护的,因为它们不会接触相同程度的恶劣条件。

[0004] 另外,重要的上皮组织,如血管或血液器官,是由粘膜,浆膜,滑膜和细胞内皮膜包被的,以便它们各自能够独立地起作用。腹膜,心包和胸膜包括一层间皮细胞,它是由腹膜液薄膜覆盖的。所述膜的成分和流体的覆盖层具有若干种功能,例如,润滑其所包围的器官。

[0005] 保护性上皮膜是非常薄的,并且包括结缔组织的精细的层,在它上面覆盖了单层的间皮细胞,并且只有一个或少数几个磷脂双层。这使得滑膜和间皮特别容易受到感染和创伤。当所述膜遇到物理,化学或微生物刺激时,很多对所述膜有害的潜在物质,通常会响应对它的反应而释放。因此,所述膜的结构和功能容易因为创伤,局部缺血,和感染而受到破坏。在刺激胁迫敏感性膜,例如,在手术期间通过膜表面的脱水或摩擦之后,它很快就会被血纤维蛋白凝块覆盖。由于在创伤之后血纤维蛋白溶酶原激活活性(即,血纤维蛋白溶解能力)降低,所述血纤维蛋白凝块随后会机化形成纤维状粘连,即小的带或结构,因此相邻的浆膜或滑膜以异常的方式粘连。在由浆膜或滑膜包被的身体部位进行外科手术、感染或发炎,可能导致粘连性发炎,而无论受影响的部位有多大。重要的上皮组织之间的粘连是在手术创伤或感染之后头几天形成的,并且不仅会出现在身体的特定部位,而且还出现在所有重要组织中。在小肠之间或小肠与腹壁之间的接触部位的这种粘连,是由通常不引人注意的组织损伤,如干燥所造成的,并且它们因为多种原因而发生,包括与手术操作相关的重要组织的机械和化学刺激、手术后细菌感染、发炎或其他并发症。

[0006] 大或小的重要的上皮组织的粘连,可在大部分手术部位观察到。业已报导了在一家医院于4年时间内进行腹部手术的所有患者中的93%发现具有因为以前手术而产生的粘连。另外,在10年时间内,所有外科手术,相当于在每一个大陆每年进行的超过一百万次的手术的大约20%需要预防粘连。

[0007] 不过,所产生的外科手术后粘连是在手术期间发生的组织损伤的天然伤口愈合反应的结果。有多种因素在腹膜伤口愈合和粘连形成中发挥作用,其中,已知腹膜巨噬细胞在最初的腹膜修复中具有重要作用。

[0008] 因此,手术之后等待身体产生新的保护层时,希望以有效的方式从暴露的上皮表

面外部提供相应的保护作用。另外,重要的是预防或减少在手术之后产生的感染和 / 或发炎,以及与之相关的血纤维蛋白形成。

[0009] 业已报导了多种生物活性材料和大分子能够降低手术后腹部粘连的程度。类似地,业已研究了用于限制手术粘连形成的多种方法,取得了令人鼓舞的,但是通常是不明确的结果。不过,为了避免或减少手术后腹膜粘连的很多努力,最终都放弃了。在用于预防血纤维蛋白形成的方法中,可提及的包括减少血纤维蛋白形成,表面分离和外科技术。

[0010] 业已进行了多项研究,其中,将屏障放置在受损伤的部位,以便防止在受损伤的组织 and 相邻的器官之间形成血纤维蛋白连接。所述屏障包括可再吸收的材料,如酶促降解的氧化再生的纤维素,以及缓慢溶解生理化学交联的 Pluronic™ 型水凝胶。

[0011] 对暴露的上皮表面进行表面保护,以便限制手术后粘连形成的大部分方法都致力于通过在组织之间放置材料提供伤口的隔离。另外,业已在手术之前和 / 或结束时添加了若干种类型的各种聚合物溶液,如聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素钠、葡聚糖和透明质酸,以便控制在推测的组织损伤出现之后的伤口愈合情况。推测所述溶液通过提高润滑作用,以及抑制血纤维蛋白凝块附着在其他表面上或通过伤口愈合时机械分离受损伤的组织而起作用。

[0012] 所采用的聚合物溶液主要基于高分子量聚合物的粘性,该粘性随着浓度的增加而增加。所述聚合物通常是多糖,如 US4, 994, 277 中所披露的多糖,其中,披露了存在于水溶液中的生物可降解的黄原酸胶的粘弹性凝胶,用于抑制重要组织之间的粘连。不过,上述聚合物在用于减轻,例如在手术期间作为保护性涂层或在手术之后作为表面隔离剂减轻腹膜粘连时的主要缺陷是,它们不能明显减轻粘连,因为它们在腹膜腔中具有很短的停留时间。其结果是,随后必须对所述患者实施手术。

[0013] 业已将较低黏性的聚合物溶液用作手术期间的组织保护涂层,以便保持组织和器官的天然光滑性,并且保护被膜。进行预先涂敷以便实现组织保护和预防粘连,包括在手术开始时,在大的组织操作和刺激可能发生之前对组织进行涂敷,并且在整个手术中持续地进行,以便能够在组织上保持保护性涂层。

[0014] US5, 366, 964 披露了用于促进伤口愈合的手术黏弹性溶液,它被用于直接和发生创伤愈合的细胞接触。所述溶液用于在手术期间起着细胞保护和细胞包被的作用,并且包括一种或几种聚合物成分。羟丙基甲基纤维素和硫酸软骨素被认为能润滑组织,而透明质酸钠能赋予所述溶液黏弹性特性。

[0015] 当今用于处理外科手术后粘连的若干种制剂含有透明质酸。例如, US5, 409, 904 披露了能减少细胞损失和组织损伤的溶液,以便在眼科手术期间保护内皮细胞。所使用的组合物包括黏弹性材料,包括透明质酸,硫酸软骨素,改性的胶原,和 / 或改性的纤维素。在 W09010031 中,披露了用于在手术之后预防组织粘连的组合物,它包括葡聚糖和透明质酸,其中,所述物质被认为能协同地起作用。在 W09707833 中披露了用于预防手术粘连的屏障材料,它包括透明质酸的苄酯或共价交联的衍生物。

[0016] 业已发现由 Pharmacia 公司生产的商标为 Healon 的最初希望用作眼内滴注的透明质酸型制剂是迄今为止最有效的制剂。不过,透明质酸是从公鸡的鸡冠中分离的,因此是非常昂贵的,并且即使是很小的用量也有可能引起过敏,这对于具有大约 2m<sup>2</sup> 面积的腹膜的较大面积来说问题更为严重。

[0017] 在 W09903481 中披露了用于润滑并且使组织和生物膜与相邻的膜或相邻的细胞或组织分离的组合物,该组合物包括由携带共价结合的疏水基团的生物学上可接受的水溶性阳离子聚合物形成的疏水性聚合物。

[0018] 同样,在 EP0,705,878 中披露了水不溶性生物兼容性组合物,它包括聚阴离子多糖,与疏水性生物可吸收的聚合物组合。

[0019] 在 US6,235,313 中比较了多种聚合物对黏膜表面的黏着力。测试了在表面上具有暴露的羧基基团的带负电荷的水凝胶,如藻酸盐和羧甲基纤维素,以及某些带正电荷的水凝胶,如壳聚糖。前面的选择是基于以下事实:大部分细胞膜实际上是带负电荷的。不过,仍然没有获得与胃肠道壁的良好生物粘连的最重要特性的明确结论。例如,壳聚糖被认为是通过聚合物上的带正电荷的氨基和所述膜上的带负电荷的唾液酸基之间的相互作用结合到膜上的。因此,聚阳离子分子,如壳聚糖和聚赖氨酸具有与暴露的上皮表面结合的很强的倾向,因为所述表面通常具有净负电荷。

[0020] 以上两种阳离子型分子的主要缺陷是,它们具有毒副作用。例如,聚赖氨酸被认为是钙通道的抑制剂,它能产生构像变化,并因此抑制跨膜离子流通。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明涉及新型的发明的生物可降解的屏障网络,它是无毒的,能够以低成本生产,是生物可降解的和无过敏性的。这种网络使得以有效的方式处理外科手术后粘连成为可能。

[0023] 首先,本发明涉及生物可降解的屏障网络,它包括阳离子多肽,阴离子多肽和可以药用的载体。

[0024] 其次,本发明涉及涂药器,它包括阳离子多肽和可以药用的载体,阴离子多肽和可以药用的载体,所述阳离子和阴离子肽是通过隔离物彼此隔离的。

[0025] 第三,本发明涉及试剂盒,它包括阳离子多肽和可以药用的载体,阴离子多肽和可以药用的载体,以及用于施用所述阳离子和阴离子多肽的装置。

[0026] 最后,本发明涉及用于治疗受到损伤的哺乳动物的方法,包括利用本发明的涂药器或试剂盒产生本发明的生物可降解的屏障网络。

[0027] 通过提供这样的网络、涂药器和试剂盒,可以向市场上推出一种可用于伤口愈合的新型的改进产品。

[0028] 发明的详细说明

[0029] 定义

[0030] 在本发明的文本中,采用了以下定义:

[0031] 术语“生物可降解的屏障网络”用于表示一种屏障,它能抑制受损伤部位的组织之间的粘连,并且对受损伤组织提供,例如,抵抗发炎和感染原的作用。

[0032] 另外,所述屏障在损伤的愈合过程中随着时间的推移是能够降解的。

[0033] “网络”用于表示在至少两种多肽的混合物之间形成的网络,其中,至少一种多肽是阳离子型的,另一种是阴离子型的。

[0034] “相同类型的氨基酸残基”用于表示多肽上的氨基酸残基,例如,仅有 H(H-H-H-H-H-H-H)。

[0035] 在本文中,氨基酸残基的名称是以 Protein DataBank (PDB) ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) 中的定

义使用的,它是基于 IUPAC 命名 (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides), Eur J Biochem., 138, 9-37 (1984), 以及在 Eur J Biochem., 152, 1 (1985) 中对它们进行的订正。术语“氨基酸”用于表示来自下列一组的氨基酸:精氨酸 (Arg, 或 R), 组氨酸 (His 或 H), 赖氨酸 (Lys 或 K), 天冬氨酸 (Asp 或 D) 和谷氨酸 (Glu 或 E)。

[0036] 生物可降解的屏障网络

[0037] 本发明涉及生物可降解的屏障网络。生物可降解的屏障网络是在受损伤的部位产生的。所述网络包括阳离子多肽、阴离子多肽和可以药用的载体。所述网络是通过在组织上依次涂敷至少一种阳离子和至少一种阴离子多肽而形成的。所述阳离子多肽载体是胶凝化的,以便集中使用。所述组织受到损伤,并且保护性膜被部分或完全地去掉。因此,暴露出下面的组织,并且所述网络能起到保护哺乳动物,如人或动物的暴露的上皮细胞表面的作用。

[0038] 所述阳离子多肽可以是选自下列一组的氨基酸残基:R, H, K, 合成和半合成变体及其混合物,如聚-赖氨酸,聚-精氨酸或聚-组氨酸。所述多肽可以是 L 形式的。所述多肽可以是包括一种相同的氨基酸残基的多肽,如 R-R-R-R 或 H-H-H-H 或其混合物,如 R-H-R-R-H 等。在所述多肽中还可以存在一种或多种合成的或半合成的氨基酸残基。

[0039] 所述阴离子多肽可以是选自下列一组的氨基酸残基:D, E, 合成和半合成变体,如聚-谷氨酸或聚-天冬氨酸。所述多肽可以是 L 型的。所述多肽可以是包括一种相同的氨基酸残基的多肽,如 D-D-D-D 或 E-E-E-E 或其混合物,如 D-D-E-D-E。所述多肽中还可以存在一种或多种合成的或半合成的氨基酸残基。

[0040] 根据要形成的生物可降解的屏障网络,即,根据将应用在什么组织上,所述多肽的长度可以相同或不同。所述大小可以至少为 5.000Da, 如大约 5.000- 大约 50.000Da。其实例包括 6.000, 7.000, 8.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 40.000 及其混合物。

[0041] 另外,上述多肽中的至少一种可以与至少一种不同的中性氨基酸残基,其他肽或其他物质,如能清洁受损表面、提供抗氧化剂、调节细胞凋亡、促进愈合、抑制纤维发生和肿瘤生长、控制出血、抑制发炎、提高稳定性或防止感染的物质结合。其实例包括抗微生物剂,抗炎药,清洁剂,抗氧化剂,细胞凋亡调节剂,修补剂,纤维发生抑制剂,抗肿瘤抑制和抗出血药。

[0042] 因此,所述多肽可以通过酰胺化,酯化,酰化,乙酰化,PEG 化或烷基化进行修饰。

[0043] 上述网络还可以包括可以药用的稀释剂或缓冲剂。

[0044] “可以药用的载体”表示不会影响所述多肽的表面保护活性的效果的无毒物质。所述可以接受的缓冲剂或稀释剂为本领域所熟知(参见 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990))。

[0045] 术语“缓冲剂”用于表示包括用来稳定 pH 的酸碱混合物的水溶液。缓冲剂的实例有氨基丁三醇, N, N-二(羟乙基)甘氨酸,两性离子缓冲剂, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, 磷酸盐, 碳酸盐, 乙酸盐, 柠檬酸盐, 乙醇酸盐, 乳酸盐, 硼酸盐, ACES, ADA, 酒石酸盐, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, 甲次砷酸盐, CHES, DIPSO, EPPS, 乙醇胺, 甘氨酸, HEPPSO, 咪唑, 咪唑乳酸, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO, TES, 两性离子缓冲剂。

[0046] 术语“稀释剂”用于表示用来稀释药用制剂中的肽的水溶液或非-水溶液。所述

稀释剂可以是盐水,水,聚乙二醇,丙二醇,乙醇或油(如红花油,玉米油,花生油,棉籽油或芝麻油)中的一种或多种。

[0047] 本发明的网络还可以包括一种或多种治疗剂,如抗菌剂、抗炎药、能清洁受伤表面、提供抗氧化剂、调节细胞凋亡、促进愈合、抑制纤维发生和肿瘤生长或控制出血的物质。

[0048] 治疗剂的实例包括青霉素、cephalosporins、碳头孢烯、四环素、大环内酯、碘、银、铜、氯己定、乙酰水杨酸、清洁物质的实例是蛋白水解酶。

[0049] 具有抗氧化活性的制剂的实例是各种维生素、谷胱甘肽、叶酸、姜黄素、白藜芦醇、表没食子儿茶精、花色素和多种其他制剂。

[0050] 能够调节细胞凋亡,抑制纤维发生和肿瘤生长的制剂的实例是糖皮质类固醇、胰岛素、地塞米松、类胡萝卜素、亚麻酸和缀合的-亚油酸、褪黑激素、异硫氰酸盐、紫草素、边缘茄碱、哌立福辛、脱氧瓜萎镰菌醇、羧酰胺-三唑(CAI)、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂和多种其他制剂。

[0051] 能促进愈合的制剂的实例是各种生长因子、胰岛素、维生素E、视黄酸、草药成分和多种其他制剂、而能控制出血的制剂的实例是去甲肾上腺素、明胶、胶原、氧化纤维素和多种其他制剂。

[0052] 上述多肽可以通过标准化学方法合成,包括通过自动化方法合成。一般,肽类似物是根据标准的固相Fmoc保护方法合成的,用HATU(N-[二甲基氨基-1H-1,2,3-三唑[4,5-B]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲紫(METHYLMETHANAMINIUM)六氟磷酸盐N-氧化物)作为偶合剂,或者使用其他偶合剂,如HOAt-1-羟基-7-氮杂苯三唑。用含有合适清除剂的三氟乙酸将所述肽从固相树脂上分离,它还能保护侧链官能团。用制备性反相层析进一步纯化粗制的肽。可以使用其他纯化方法,如分配层析法,凝胶过滤,凝胶电泳,或离子交换层析。本领域已知的其他合成技术,如tBoc保护方法,或利用不同的偶合剂等可用于生产相同的肽。

[0053] 本发明的涂药器或试剂盒

[0054] 另外,本发明涉及涂药器,它包括阳离子多肽和可以药用的载体,阴离子多肽和可以药用的载体,所述阳离子和阴离子多肽是通过隔离物彼此隔开的。所述多肽是如上文所定义的,且所述溶液是上文所定义的可以药用的溶液。

[0055] 涂药器可以是注射器,一种或两种成分的喷雾器,雾化器(nebulators),贴剂,导管,粘合剂,植入物和绷带。

[0056] 在涂到受伤组织上之前隔离阳离子和阳离子多肽的隔离物可以是任何隔离物,只要它是无毒的,并且不会影响所述多肽的效果就行。所述隔离物可以是生物可降解的。两种多肽溶液之间的隔离层的主要功能是,在施用聚阴离子肽之前洗净所有的阳离子肽,并且避免在涂药器中出现沉淀。因此,它只包括用于所述多肽溶液中的蒸馏水或缓冲剂。不过,该水溶液应当不会稀释多肽溶液,并因此不会用在第一次涂敷的阳离子多肽上。所述隔离物可以是胶凝状态的水溶液。另外,所述隔离物可以是膜。

[0057] 另外,所述涂药器可以包括一种或多种治疗剂,如上文所披露的治疗剂。这些治疗剂是(与以上两种多肽分离或)与上述多肽中的一种或两种混合的。

[0058] 所述治疗剂可以选自下列一组:青霉素,头孢菌素,碳头孢烯,四环素,大环内酯,碘,银,铜,氯己定和抗炎药,如乙酰水杨酸。

[0059] 因此,本发明涉及试剂盒,它包括阳离子多肽和可以药用的载体,阴离子多肽和可以药用的载体,以及用于施用所述阳离子和阴离子多肽的装置。所述多肽如上文所述。

[0060] 所述装置可以选自下列一组:注射器,喷雾器,贴剂,导管,粘合剂,植入物和绷带。

[0061] 另外,所述试剂盒可以包括一种或多种治疗剂,如抗菌剂和抗炎药。其他合适的治疗剂如上文所定义。所述治疗剂选自下列一组:青霉素,头孢菌素,碳头孢烯,四环素,大环内酯,碘,银,铜,氯己定和乙酰水杨酸。

[0062] 上述涂药器或试剂盒中的治疗剂可以与以上两种多肽分开或者与上述多肽中的一种或两种混合。

[0063] 上述涂药器和/或试剂盒可用于治疗,如用于医学,兽医学和园艺。

[0064] 最后,本发明涉及用于治疗受到损伤的哺乳动物的方法,包括利用上述涂药器和/或试剂盒形成所披露的网络。可以应用本发明的领域的实例包括眼球损伤和感染,鼻子创伤,损伤和感染,皮肤损伤和感染,阳光灼伤,热造成的皮肤损伤/烧伤,褥疮,慢性腿部溃疡,阴道创伤,尿道膀胱发炎,食道和胃溃疡,肠道发炎和溃疡,关节发炎和浆膜损伤,固体器官,如肺,肝和脾的切割表面或损伤,骨骼损伤,腹膜缺陷和发炎。

[0065] 实施例

[0066] 下面将通过以下实施例进一步解释和说明本发明。不过,应当指出的是,这些实施例不应当认为是以任何方式对本发明的限定。

[0067] 实施例 1

[0068] 预防粘连

[0069] 采用了可再现的标准化的大鼠和兔子模型。将重量为大约 25-30g 的四十八只雌性 MRI 小鼠用于诱导粘连,并且将四十二只用于进一步试验。所述动物保持在标准化条件下,并且可以自由地取食和饮用自来水。

[0070] 通过肌肉注射氯胺酮 150mg/kg (Ketalar, Parke Davis) 和 zylazine 7.5mg/kg (Rompun, Bayer Sverige AB) 进行麻醉,在消毒之后形成 25mm 长的中线剖腹切口。暴露腹壁侧面的两侧的腹膜表面,并且在距离中线相等的距离上进行 2×15mm 长的锋利切口,包括肌肉。立即用 5.0 聚丙烯 (Prolene, Ethicon, Johnson&Johnson), 2×4 单一缝合线以相等的距离缝合所述伤口。利用连续的 5.0 聚丙烯缝合线两层封闭中线剖腹手术。在评估时间,施用过量的麻醉剂,通过 U 形切口将腹部完全打开,该 U 形切口的底部朝向右侧。利用金属卡钳在两侧测定粘连的长度,并且数据是以由粘连覆盖的伤口的百分比形式表达的。

[0071] 0.5% 聚-L-谷氨酸,和聚-L-赖氨酸的水溶液是在实验当天刚制备的,并且在冰箱中保存待用。FITZ- 标记的聚赖氨酸与聚赖氨酸以 1 : 10(wt) 的比例混合。所有化合物和细胞培养基质都是从 Sigma-Aldrich, St Louis, USA 购买的;荧光微型颗粒 (Nile Blue Labeled) 是从 Microparticles GmbH, (Berlin, Germany) 购买的。

[0072] 根据处理和评估时间将所述动物随机地分成四组。对照组用 2ml 的生理氯化钠溶液进行腹膜内注射。两个处理组接受 1ml 聚-L-赖氨酸溶液,并且在 5 分钟之后接受 1ml 聚-L-谷氨酸溶液。对照组和处理组中的 - 组 (2×14 个动物) 在手术后一周处死,并且计算粘连的长度。其余两组 (2×10 动物) 保持四周时间,然后对它们进行评估。

[0073] 利用 Kruskal Wallis 试验确定不同处理组之间的粘连数量的差异,并且利用 Mann Whitney U 试验比较每一组。

[0074] 与相应的对照相比 (Mann-Whitney U 试验) 在腹膜刺激一周和一个月之后检测到了粘连形成的显著减弱 (\*\* $p \leq 0.001$ )。在对照组之间, 在一个月之后获得了可见的 (22%), 尽管是不明显的 ( $p = 0.235$ ) 减弱, 而此时在处理组之间没有差别。

[0075] 没有发现与由于伤口本身产生的在不同部位的重化合物沉积而造成的粘连。在 24 小时之后, 在提供了聚-L-赖氨酸和聚-L-谷氨酸的动物身体的腹膜创口部位出现了大量的保护层, 并且在腹膜表面的其余部分形成了薄膜。不过, FITZ- 标记过的化合物仅在一天之后在伤口部位可以见到, 并且可以在伤口外面和内部检测到。直到 6 天观察期结束, 所述沉积是逐渐建立的。

#### [0076] 实施例 2

[0077] 吞噬作用和颗粒摄取指数

[0078] 吞噬细胞功能的时程是在来自小鼠的腹膜上的巨噬细胞进行体外检测的, 所述检测是在用聚-L-赖氨酸 + 聚-L-谷氨酸 (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 和 / 或荧光颗粒 (1  $\mu\text{m}$ ) 培养 0.5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h, 12h, 16h, 和 24h 之后进行的。

[0079] 通过用 10ml 冰镇 DMEM- 溶液进行腹部灌洗采集巨噬细胞样品。培养基中的样品立即以 1200rpm 的速度离心 10 分钟。将细胞重新悬浮在含有 10% FBS 和青霉素 / 链霉素的 DMEM 中, 然后铺平板到 48 孔细胞培养平板上; 每孔  $5 \times 10^5$  个细胞。在 1.5 小时之后, 将非贴壁细胞洗掉, 同时向  $12 \times 5$  的孔中添加颗粒 (100/ 细胞) 和测试药物 (聚-L-赖氨酸 + 聚-L-谷氨酸), 用量为 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 并且将颗粒仅添加到其余的  $12 \times 5$  个孔中。另外, 在每一个时间点进行阴性对照。培养所述细胞 (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ), 并且分离, 并且在评估时间通过使用 250  $\mu\text{l}$  5mM EDTA 和等体积的 2% 低聚甲醛进行固定。进行 FACS 分析 (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA), 同时在每一次测定中记录  $1.5 \times 10^4$  个细胞的细胞大小 (正向分散, FSC), 粒度 (侧面分散, SSC) 和荧光强度 (在 FL3 通道中)。在手动确定分选中, 吞噬细胞 / 总的巨噬细胞的比例是以来自每个时间点和处理组的 (对照和聚-L-赖氨酸 + 聚-L-谷氨酸) 的五个孔的数据平均值的百分比表示的。

[0080] 未处理过的细胞结合更多的颗粒。因此, 它们的荧光强度 (FL3) 和 SSC 的最大平台 (平均) 值被设定为 100%。所有测量结果都表示为平台水平的平均百分比, 并且被称作颗粒摄取指数, 因为它表示所摄取的颗粒数量。

[0081] 利用 Mann Whitney U 试验检查吞噬作用的平台期, 并且利用 Wilcoxon Signed Ranks 试验检测处理对 (分别为对照和聚-L-赖氨酸 + 聚-L-谷氨酸) 之间吞噬作用和颗粒摄取指数之间的差异。

[0082] 尽管未处理过的巨噬细胞的吞噬作用指数在大约 5 小时达到了吞噬作用的平台期 (在 4 和 5 小时之间的差别下降到低于不显著水平,  $p = 1$ ), 处理过的群体需要 8 小时时间达到相同的效果 (8 和 10 小时之间的差异是不明显的,  $p = 0.058$ )。在 24 小时之后, 观察到了吞噬作用指数的低但是显著的 ( $p = 0.043$ ) 差异 (分别为 97.3% 和 94.3%)。

[0083] 表示由巨噬细胞吞噬的颗粒数量的摄取指数的时程在 1-2 小时之间变得显著 ( $p = 0.008$ )。对照细胞群体在 16-24 小时之间达到了平台期 (在 12 和 24 小时指数之间的差异不明显 ( $p = 0.841$ )), 而处理过的细胞群体在本研究的前 24 小时根本就没有达到平台期。另外, 处理组在所有时间摄取颗粒的数量都明显更低 ( $p = 0.043$ )。

[0084] 流式细胞测量证实了巨噬细胞吞噬测试化合物颗粒, 它导致了显著的细胞生长和

大的吞噬泡。

[0085] 实施例 3

[0086] 透射电子显微镜术

[0087] 从上文所述的两个健康的未处理过的动物体内收集腹膜巨噬细胞,并且铺平板到细胞培养平板上 (Thermanox, Naperville, IL, USA)。在 1.5 小时之后,将细胞洗掉,并且在补充的 DMEM 溶液中先后添加聚-L-赖氨酸+聚-L-谷氨酸 (40  $\mu$ g/ml),然后培养 24 小时。去掉培养基,并且在 2.5%磷酸缓冲的戊二醛中固定细胞,然后用 Millonig's 磷酸溶液漂洗。然后在 1%四氧化锇中对样品进行后固定,随后用梯度系列乙醇进行脱水,然后包埋在 Araldite 502 试剂盒中。用钻石刀获得垂直切片,并且用乙酸铀酰和柠檬酸铅在 LKB Ultrastainer 中染色。用 JEOL1200 EX 透射电子显微镜 (TEM) 检查样品。

[0088] 电子显微镜术证实,巨噬细胞吞噬了测试化合物颗粒,导致显著的细胞生长,和大的吞噬泡。

[0089] 实施例 4

[0090] 扫描电子显微镜术

[0091] 在手术后一天和七天从处理过的 (4) 和未处理过的 (4) 八个动物体内获得腹膜擦拭液和伤口。按上述方法进行细胞培养。在室温下,在 2.5%磷酸缓冲的戊二醛中固定样品,然后在 1% OsO<sub>4</sub> 中进行后固定。用丙酮对所述样品进行脱水,临界点干燥,并且用金进行溅射涂膜,然后用 LE0420 电子显微镜进行研究。

[0092] SEM 数据表明,从第一天起间皮细胞就覆盖了化合物表面。

[0093] 实施例 5

[0094] 组织学

[0095] 切开八只动物,然后腹膜内注射聚-L-赖氨酸+聚-L-谷氨酸。在手术后第一,第二,第三和第六天处死两只动物,并且切除所述伤口。快速冷冻样品并且包埋,并且立即将所获得的包埋块切割成 7  $\mu$ m 的切片。让所述切片在室温下于黑暗中干燥 30 分钟,然后用 100  $\mu$ g/14' 6' -二氨基-2-苯基吲哚氢氯酸盐 (DAPI) 溶液染色 10 分钟。用 FITZ 和 DAPI 滤镜进行荧光显微镜检查,并且将图像进行数字合并 (OpenLab, Improvision)。通过采用透射,混合的环境室内光线,UV 照明获得有关切除伤口的放大照片。

[0096] 组织学研究发现,从第一天起,所添加的材料就出现在伤口中。另外,每天可检查到越来越多的细胞,直到完全重建基质。

[0097] 实施例 6

[0098] 生物降解

[0099] 按实施例 1 所述方法通过腹膜内注射处理健康的未动手术的动物,并且在两个月之后处死。

[0100] 检测不到可见的聚-L-赖氨酸和聚-L-谷氨酸的残余物。在随后一个月的发现支持了生物降解能力,通过使用双倍剂量的聚-L-赖氨酸+聚-L-谷氨酸获得了相同的结果。不过,这导致了在评估的第七天与所述化合物相关的某些额外的粘连。

[0101] 实施例 7

[0102] 生物降解

[0103] 1%和 2%溶菌酶,聚-L-谷氨酸,聚-L-赖氨酸,以及聚-L-谷氨酸,和 0.25%透

明质酸的水溶液是新制备的。然后按实施例 1 所述给动物施用溶菌酶, 聚谷氨酸, 溶菌酶 + 聚谷氨酸和聚赖氨酸 + 聚谷氨酸溶液。

[0104] 与对照相比, 在所有四个处理组中, 在手术一周之后腹部粘连程度显著减弱 ( $p \leq 0.001$ )。不过, 用透明质酸没有获得明显的变化 ( $p = 0.264$ )。组合的聚-L-赖氨酸 / 溶菌酶似乎产生了不溶性产物。

[0105] 实施例 8

[0106] 聚-L-赖氨酸本身的作用

[0107] 0.5% 聚-L-赖氨酸的水溶液是新制备的, 并且按实施例 1 所述方法给动物施用。

[0108] 这种单独施用聚-L-赖氨酸导致了在 30 分钟内, 即在动物从麻醉中苏醒之前抽搐和死亡。症状似乎与开放的钙通道影响相关, 血浆钙离子含量迅速降低。

[0109] 实验方法的费用

[0110] a. 在十只小鼠的后背上的两侧产生标准化的热损伤。一个伤口用所述组合物处理, 另一个用作对照。在处理过的伤口上观察到了较低的感染率, 更快的愈合速度和较少的后遗症。

[0111] b. 在十只大鼠后背的每一侧形成一厘米长的切口。在一个切口中填充所述组合物, 另一个切口用作对照。在处理过的伤口上观察到了均匀的和更快的愈合。

[0112] c. 在十只大鼠的肝脏和脾脏上形成标准切口。将另外十只大鼠用作对照。在处理过的动物中出血量显著减少。所述处理将受损伤的部位粘贴在一起, 导致了更快的愈合和较少的后遗症。

[0113] d. 通过几种方法, 如乙酸灌注, 氨甲蝶呤和硫酸葡聚糖在大鼠上诱导结肠黏膜发炎和创伤。用所述组合物“涂抹”所述发炎的表面和伤口。观察到了较轻的炎症和增强了的愈合。

[0114] e. 用所述组合物处理人类鼻腔黏膜创伤和感染, 观察到了对伤口的快速清洁和愈合。

[0115] f. 通过所述组合物处理人类褥疮。观察到了受感染的和坏死表面的快速清洁。在长时间内重复所述处理。

[0116] g. 用所述组合物处理人类慢性腿部溃疡, 观察到了受感染和坏死表面的快速清洁。在较长时间内重复所述处理。