



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110573155 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201880027896.9

(22)申请日 2018.02.27

(30)优先权数据

2017900650 2017.02.27 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2018/050167 2018.02.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/152592 EN 2018.08.30

(71)申请人 阿德莱德大学

地址 澳大利亚南澳大利亚州

(72)发明人 莎拉·弗鲁德

彼得·约翰·沃马尔德

(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

代理人 李艳 臧建明

(51)Int.Cl.

A61K 31/4412(2006.01)

A61K 31/198(2006.01)

A61K 31/355(2006.01)

A61K 31/375(2006.01)

A61K 31/60(2006.01)

A61K 31/616(2006.01)

A61K 38/06(2006.01)

A61P 41/00(2006.01)

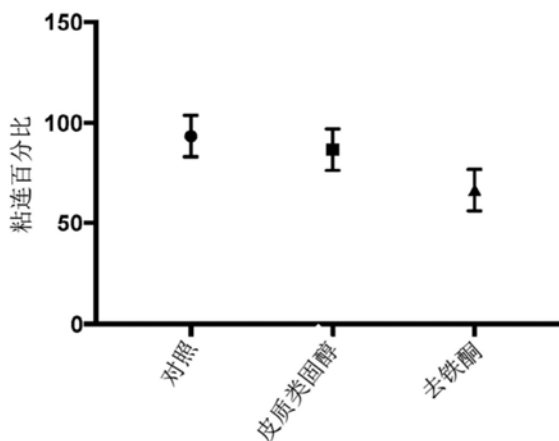
权利要求书3页 说明书30页 附图6页

(54)发明名称

用于减少粘连的方法和产品

(57)摘要

本公开涉及用于减少粘连的方法和产品。在某些实施方案中,本公开提供了一种减少受试者中粘连的方法,所述方法包括将受试者中易于形成粘连的区域暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂,从而减少受试者中的粘连。



1. 一种减少受试者中粘连的方法,所述方法包括将受试者中易于形成粘连的区域暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂,从而减少受试者中的粘连。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括将包含所述试剂的组合物施用至受试者中易于形成粘连的区域。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述组合物包括凝胶、溶液、乳剂、膏剂、纳米颗粒、微粒和/或脂质体中的任何一种或多种。

4. 根据权利要求2或3的方法,其中所述组合物包括水凝胶。

5. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述凝胶包括壳聚糖、葡聚糖、碳水化合物聚合物、透明质酸和/或其盐、胶原、羧甲基纤维素、明胶、聚酰化物和藻酸盐中的一种或多种。

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的方法,其中所述组合物在96小时内提供大于90%的所述试剂的释放,在72小时内提供大于90%的所述试剂的释放,在48小时内提供大于90%的所述试剂的释放,或在24小时内提供大于80%的所述试剂的释放。

7. 根据权利要求2至5中任一项所述的方法,其中所述组合物在3至14天的时间内提供所述试剂的持续释放。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述试剂包括活性氧物种抑制剂。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述活性氧物种抑制剂包括活性氧物种的清除剂和/或活性氧物种的生成的抑制剂。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述试剂包括去铁酮。

11. 根据权利要求2至10中任一项所述的方法,其中所述试剂包括去铁酮,并且所述组合物包括80mM或更小的去铁酮浓度。

12. 根据权利要求2至11中任一项所述的方法,其中所述试剂包括去铁酮,并且所述组合物包括20mM或更小的去铁酮浓度。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述粘连是由手术引起的粘连。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述粘连是由脊柱手术、腹部手术、盆腔手术、心脏手术、关节和肌腱手术、窦手术或整形手术引起的粘连。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述脊柱手术包括椎板切除术、椎间盘减压术、半椎板切除术、关节固定术、微椎间盘切除术、椎间盘切除术、椎板成形术、射频神经切断术和脊柱肿瘤切除术中的一种。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述腹部手术或盆腔手术包括胃肠手术、血管手术、肾脏手术、泌尿手术、妇科手术、肠手术、肝脏手术、肝移植术、阑尾切除术、腹腔镜检查、剖腹术、妇科附件手术、子宫内膜异位手术、卵巢手术、输卵管手术和纤毛手术中的一种。

17. 根据权利要求14所述的方法,其中所述心脏手术包括心脏瓣膜手术、冠状动脉搭桥手术、血管成形术、粥样斑块切除术、心肌成形术和心脏移植术中的一种。

18. 根据权利要求14所述的方法,其中所述关节和肌腱手术包括关节置换或关节成形术。

19. 根据权利要求14所述的方法,其中所述窦手术包括鼻旁窦手术、颅底手术和涉及肿瘤去除的颅底手术、泪道手术和眼眶手术中的一种。

20. 根据权利要求14所述的方法,其中所述整形手术包括涉及防止植入物例如乳房植入物上的纤维囊收缩的手术程序。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法, 其中所述受试者是患有现有粘连的受试者。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述方法包括: 对受试者进行粘连分解程序以治疗现有的粘连, 然后将所述试剂施用至易于形成粘连的区域。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法, 其中在受试者中易于形成粘连的所述区域包括手术部位和/或与所述手术部位重叠和/或邻近的区域。

24. 一种减少受试者中粘连的方法, 所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成粘连的区域, 从而减少受试者中的粘连。

25. 一种减少受试者中手术粘连的方法, 所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成手术粘连的区域, 从而减少受试者中的手术粘连。

26. 一种减少受试者中术后粘连的方法, 所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成术后粘连的区域, 从而减少受试者中的术后粘连。

27. 一种预防和/或治疗受试者的粘连的方法, 所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成粘连的区域, 从而预防和/或治疗受试者的粘连。

28. 一种治疗受试者的粘连的方法, 所述方法包括:

(i) 对受试者进行粘连分解程序; 和

(ii) 在粘连分解程序之后将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至易于形成粘连的区域, 以减少受试者中新的粘连的形成, 从而治疗受试者的粘连。

29. 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂在减少受试者中的粘连的用途。

30. 一种抗粘连组合物, 包括具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

31. 根据权利要求30所述的抗粘连组合物, 其中所述组合物包括凝胶、溶液、乳剂、膏剂、纳米颗粒、微粒和/或脂质体中的任何一种或多种。

32. 根据权利要求30或31所述的抗粘连组合物, 其中所述组合物包括水凝胶。

33. 根据权利要求31或32所述的抗粘连组合物, 其中所述凝胶包括壳聚糖、葡聚糖、碳水化合物聚合物、透明质酸和/或其盐、胶原、羧甲基纤维素、明胶、聚酰化物和藻酸盐中的一种或多种。

34. 根据权利要求30至33中任一项所述的抗粘连组合物, 其中所述组合物在96小时内提供大于90%的所述试剂的释放, 在72小时内提供大于90%的所述试剂的释放, 在48小时内提供大于90%的所述试剂的释放, 或在24小时内提供大于80%的所述试剂的释放。

35. 根据权利要求30至33中任一项所述的抗粘连组合物, 其中所述组合物在3至14天的时间内提供所述试剂的持续释放。

36. 根据权利要求30至35中任一项所述的抗粘连组合物, 其中所述试剂包括活性氧物种抑制剂。

37. 根据权利要求36所述的抗粘连组合物, 其中所述活性氧物种抑制剂包括活性氧物种的清除剂和/或活性氧物种的生成的抑制剂。

38. 根据权利要求30至37中任一项所述的抗粘连组合物,其中所述组合物为盐溶液。
39. 根据权利要求30至38中任一项所述的抗粘连组合物,其中所述试剂包括去铁酮。
40. 根据权利要求39所述的抗粘连组合物,其中所述组合物包括80mM或更小的去铁酮浓度。
41. 根据权利要求39或40所述的抗粘连组合物,其中所述组合物包括20mM或更小的去铁酮浓度。
42. 一种鼻和/或窦冲洗组合物,包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂以及液体载体。
43. 一种减少受试者中术后窦粘连的方法,所述方法包括使用根据权利要求42所述的鼻和/或窦冲洗组合物冲洗受试者的窦,从而减少受试者中术后窦粘连。
44. 一种抗粘连组合物,其包括基于壳聚糖的凝胶和具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。
45. 一种减少受试者中粘连的方法,所述方法包括将根据权利要求30至44中任一项所述的组合物施用至受试者中易于形成粘连的区域,从而减少受试者中的粘连。
46. 一种用于减少受试者中粘连的产品,所述产品包含以下成分:
- (i) 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂;和/或
 - (ii) 用于形成凝胶的一种或多种组分,所述凝胶包括具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂,所述凝胶适合应用于手术部位;和/或
 - (iii) 包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的预形成的凝胶,其中所述凝胶适合应用于手术部位;
- 以及可选地
- (a) 用于将包含所述试剂的凝胶分配到手术部位的涂药器;和/或
 - (b) 用于形成凝胶和/或将所述凝胶分配到手术部位的说明。
47. 一种基于壳聚糖的凝胶,包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。
48. 一种生产用于减少受试者中粘连的产品的的方法,所述方法包括形成包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的凝胶,其中所述凝胶适合应用于手术部位。
49. 一种识别用于减少粘连的试剂的方法,所述方法包括确定具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂减少受试者中粘连的能力,从而将所述试剂识别为用于减少粘连的试剂。
50. 一种根据权利要求49所述方法识别的抗粘连剂。

用于减少粘连的方法和产品

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求于2017年2月27日提交的澳大利亚临时专利申请2017900650的优先权,其全部内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于减少粘连的方法和产品。

背景技术

[0004] 粘连是在通常不连接的组织和器官之间形成纤维带。它们通常是在与手术相关的损伤后,两个或更多个表面(例如离散组织的表面)粘在一起时形成的。粘连是外科手术的常见并发症,它们的形成难以避免。

[0005] 尽管正常的伤口愈合是高度调整和协调的过程,但是造成粘连形成的原因是复杂的并且尚未完全理解。此外,许多病理过程会加剧粘连的形成。阻止多种类型粘连形成的临界时间间隔似乎是在初始损伤后的头48小时内,并且粘连形成的程度似乎至少部分取决于对这段时间内成纤维细胞增殖和/或迁移的抑制。

[0006] 在几乎所有类型的外科手术之后都可能发生粘连,并且能够在大多数解剖位置形成粘连。例如,腹腔内的肠切除术可能导致肠和腹壁之间的粘连。粘连会使患者产生疼痛和不适,损害受影响器官的功能,并阻碍随后在同一解剖区域进行手术。粘连也是脊柱外科手术的常见并发症,即使在脊柱外科手术成功后,粘连也是术后疼痛的主要原因。

[0007] 粘连的形成可能导致医疗费用增加。这些费用包括去除或分离粘连的后续手术、医生的额外就诊、止痛药和丧失生产力。此外,如果患者在同一手术部位进行后续手术,则现有的粘连会使手术复杂化。在开始新的手术之前,外科医生可能不得不花额外的时间去去除现有的粘连。

[0008] 因此,减少粘连仍然是外科手术实践的重要目标。已经采取了多种方法来治疗粘连,但是它们通常不能经受严格的临床检验,或者它们具有明显的实践局限性。

[0009] 例如,一种这样的方法是执行进一步的手术以去除现有的粘连。但是,这些手术很多时候都没有效果,因为粘连只是重新形成。防止粘连的另一种方法是使用例如抗炎剂、抗凝剂和纤溶剂等试剂。但是,这种方法并不是特别令人鼓舞。

[0010] 另一种方法是开发用于外科手术的屏障,其目的是物理地分离组织。液体屏障和凝胶通常不能很好地起作用,并且发现结构屏障的临床有效性低于所需的临床有效性。

[0011] 因此,需要减少粘连形成的新方法和产品。

发明内容

[0012] 本公开涉及用于减少粘连的方法和产品。

[0013] 本公开的某些实施方案提供了一种减少受试者中粘连的方法,所述方法包括将受试者中易于形成粘连的区域暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂,从而减少

受试者中的粘连。

[0014] 本公开的某些实施方案提供了一种减少受试者中粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用到受试者中易于形成粘连的区域,从而减少受试者的粘连。

[0015] 本公开的某些实施方案提供了一种减少受试者中手术粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成手术粘连的区域,从而减少受试者的手术粘连。

[0016] 本公开的某些实施方案提供了一种减少受试者中的术后粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成术后粘连的区域,从而减少受试者的术后粘连。

[0017] 本公开的某些实施方案提供了一种预防和/或治疗受试者的粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成粘连的区域,从而预防和/或治疗受试者的粘连。

[0018] 本公开的某些实施方案提供了一种治疗受试者的粘连的方法,所述方法包括:

[0019] (i) 对受试者进行粘连分解程序(adhesiolytic procedure);和

[0020] (ii) 在粘连分解程序之后将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至易于形成粘连的区域,以减少受试者中新的粘连的形成,

[0021] 从而治疗受试者的粘连。

[0022] 本公开的某些实施方案提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂在减少受试者的粘连中的用途。

[0023] 本公开的某些实施方案提供了用于治疗粘连的具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

[0024] 本公开的某些实施方案提供了一种抗粘连组合物,其包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

[0025] 本公开的某些实施方案提供了一种用于减少受试者的粘连的产品,该产品包括以下组分:

[0026] (i) 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂;和/或

[0027] (ii) 一种或多种用于形成包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的凝胶的组分,所述凝胶适合应用于手术部位;和/或

[0028] (iii) 包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的预形成的凝胶,其中所述凝胶适合应用于手术部位;

[0029] 以及可选地:

[0030] (a) 用于将包含所述试剂的凝胶分配到手术部位的涂药器;和/或

[0031] (b) 形成所述凝胶和/或将所述凝胶分配到手术部位的说明。

[0032] 本公开的某些实施方案提供了鼻和/或鼻窦冲洗组合物,其包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂以及液体载体。

[0033] 本公开的某些实施方案提供了基于壳聚糖的凝胶,其包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

[0034] 本公开的某些实施方案提供了一种抗粘连组合物,其包含基于壳聚糖的凝胶和具

有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

[0035] 本公开的某些实施方案提供了一种生产用于减少受试者的粘连的产品的的方法,所述方法包括形成包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的凝胶,其中该凝胶适合应用于手术部位。

[0036] 本公开的某些实施方案提供了一种识别用于减少粘连的试剂的方法,所述方法包括确定具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂减少受试者中粘连的能力,从而将所述试剂识别为减少粘连的试剂。

[0037] 本文公开了其他实施方案。

附图说明

[0038] 通过以下附图说明了某些实施方案。应当理解,以下描述仅出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制该描述。

[0039] 图1显示了使用阿拉马尔蓝增殖试验(Alamar Blue Proliferation assay)测量的成纤维细胞增殖(其被标准化以对照未处理的原代成纤维细胞),表明了用去铁酮(Def)治疗的成纤维细胞增殖中剂量和时间依赖性显著降低。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ 。

[0040] 图2显示了Def在48-72小时内对原代成纤维细胞增殖的剂量和时间依赖性效应。原代成纤维细胞用CytoX-Violet迁移染色,在对照细胞中(第一列,0mM Def),48小时后,成纤维细胞中的空隙被封闭,而在20mM Def处理的成纤维细胞中(最后一列,20mM Def),长达48小时的最小封闭。

[0041] 图3显示了加载有20mM去铁酮(Def)的凝胶的释放曲线。数据是3次重复的平均值 $\pm$ SD。

[0042] 图4显示,与无治疗的对照组或含皮质类固醇的凝胶相比,去铁酮凝胶可有效减少体内脊柱手术后的粘连形成。

[0043] 图5显示了来自CRS患者的HNEC和人鼻成纤维细胞单层的细胞存活率(cell viability)。来自CRS患者的HNEC(A)和原代人鼻成纤维细胞(B)中在应用去铁酮(1mM、5mM、10mM、20mM)后1小时、2小时、3小时、4小时、5小时和6小时、阴性对照(培养基)和阳性对照(0.5% Triton X-100),通过LDH分析确定的相对于无治疗对照细胞的存活率。相对于作为阴性对照的未处理的细胞,计算细胞存活率。数值显示为平均值 $\pm$ SEM, $n=3$ 。ANOVA,然后进行Tukey HSD事后测试(post hoc test)。 $(*p<0.05)$ 。

[0044] 图6显示了在存在不同的去铁酮浓度的情况下,原代人鼻上皮细胞和原代成纤维细胞随时间的划痕试验。在存在不同的去铁酮浓度(1mM, 5mM, 10mM, 20mM)或阴性(培养基)对照的情况下,原代人鼻上皮细胞(A)和鼻窦成纤维细胞(B)的刮擦测试中伤口面积随时间的平均百分比。数值显示为平均值 $\pm$ SEM, $n=3$ 。ANOVA,然后进行Tukey HSD事后测试。 $*p<0.05$ 。

[0045] 图7分别显示了在存在或不存促炎剂聚肌胞苷酸(Poly(I:C))或IL-1 β 的情况下,使用ELISA对人鼻上皮细胞(A)或鼻成纤维细胞(B)测量IL-6的产生。布地奈德用作护理对照的抗炎标准,培养基用作阴性对照。ANOVA,然后进行Tukey HSD事后测试。 $(*=p<0.05$, $**=p<0.001$, $***=p<0.0001)$;数值显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0046] 图8显示了在不存在(A)或存在L-抗坏血酸-2磷酸酯(ASC)(B)的情况下,通过ELISA测量了用去铁酮处理的原代鼻成纤维细胞中的胶原释放。用1mM、5mM、10mM和20mM去铁酮治疗原代人鼻成纤维细胞48小时。仅培养基和L-抗坏血酸2磷酸酯(ASC)分别用作阴性和阳性对照。条形表示平均值±标准偏差(n=4)。(**p<0.001(***p<0.0001)。ANOVA,然后进行Tukey HSD事后测试。

具体实施方式

[0047] 本公开涉及用于减少粘连的方法和产品。

[0048] 本公开至少部分基于以下认识:具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂可有效减少受试者的粘连。不囿于理论地,已证明抗氧化剂和铁螯合剂去铁酮能体外抑制成纤维细胞的增殖和迁移。另外,已经发现,基于凝胶的系统可用于在48小时内提供到手术部位的最大量的试剂递送,这与阻止粘连形成的临界时期一致。在大型动物椎板切除模型中,这种含去铁酮的凝胶系统可减少体内粘连。

[0049] 本公开的某些实施方案提供了减少受试者中的粘连的方法。

[0050] 在某些实施方案中,本公开提供了减少受试者中的粘连的方法,所述方法包括将受试者中易于形成粘连的区域暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂,从而减少受试者中的粘连。

[0051] 在某些实施方案中,所述受试者是人类受试者。例如,可以对经历过手术的人类患者进行治疗,以将易于形成粘连的区域暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

[0052] 在某些实施方案中,所述受试者是动物受试者、哺乳动物受试者、牲畜(例如马、牛、绵羊、山羊、猪),家畜(例如狗或猫)和其他类型的动物,例如猴、兔、小鼠、大鼠,和实验动物。考虑了本公开的兽医应用。例如,在马中,术后腹部粘连是一个重大问题。

[0053] 在某些实施方案中,受试者易于形成粘连。

[0054] 在某些实施方案中,所述受试者适于进行治疗以减少粘连的形成。

[0055] 在某些实施方案中,受试者具有增加的遭受粘连的风险或可能性。例如,受试者可能具有与增加的术后粘连形成的风险相关的一种或多种风险因素,例如某些遗传多态性、雌激素暴露增加、子宫内膜异位、糖尿病,代谢综合征、高血糖症、肥胖症、饮酒、使用某些药物进行治疗、激素疗法、怀孕和癌症。

[0056] 在某些实施方案中,受试者遭受现有的粘连。在某些实施方案中,所述受试者遭受现有的粘连并且适合于通过粘连分解程序去除现有的粘连并随后进行治疗以减少新的粘连的形成。

[0057] 在某些实施方案中,受试者中易于形成粘连的区域包括手术部位和/或与手术部位重叠、相邻或接近的部位。

[0058] 在某些实施方案中,受试者中易于形成粘连的区域包括非手术部位。在某些实施方案中,受试者中易于形成粘连的区域是炎症部位。

[0059] 在某些实施方案中,受试者中易于形成粘连的区域包括已经除去现有粘连或经历粘连分解程序的部位。

[0060] 在某些实施方案中,所述方法包括减少手术部位处的粘连、在非手术部位处形成的粘连,或在先前粘连溶解后形成的粘连。

[0061] 在某些实施方案中,粘连是由手术引起的粘连。

[0062] 手术后可能形成粘连的手术的例子包括脊椎手术,例如椎板切除术、椎间盘减压术、半椎板切除术、关节固定术、微椎间盘切除术、椎间盘切除术、椎板成形术、射频神经切断术和脊柱肿瘤切除;腹部手术或盆腔手术,例如胃肠手术、血管手术、肾脏手术、泌尿手术、妇科手术、肠手术、肝脏手术、肝移植术、阑尾切除术、腹腔镜检查、剖腹术、妇科附件手术、子宫内膜异位手术、卵巢手术、输卵管手术和纤毛手术;心脏手术,例如心脏瓣膜手术、冠状动脉搭桥手术、血管成形术、粥样斑块切除术、心肌成形术和心脏移植术;关节和肌腱手术,例如关节置换或关节成形术;窦手术,例如鼻旁窦手术、颅底手术和涉及肿瘤去除、泪道和眼眶手术的颅底手术;整形手术,例如涉及防止植入物(例如乳房植入物)上的纤维囊收缩的手术程序。

[0063] 在某些实施方案中,粘连是由脊柱手术、腹部手术、盆腔手术、心脏手术、关节和肌腱手术、窦手术或整形手术引起的粘连。还考虑了引起粘连的其他类型的手术。

[0064] 在某些实施方案中,脊柱手术包括椎板切除术、椎间盘减压术、半椎板切除术、关节固定术、微椎间盘切除术、椎间盘切除术、椎板成形术、射频神经切断术和脊柱肿瘤切除术中的一种。

[0065] 在某些实施例中,腹部手术或盆腔手术包括胃肠手术、血管手术、肾脏手术、泌尿手术、妇科手术、肠手术、肝脏手术、肝移植术、阑尾切除术、腹腔镜检查、剖腹术、妇科附件手术、子宫内膜异位手术、卵巢手术、输卵管手术和纤毛手术中的一种。

[0066] 在某些实施例中,心脏手术包括心脏瓣膜手术、冠状动脉搭桥手术、血管成形术、粥样斑块切除术、心肌成形术和心脏移植术中的一种。

[0067] 在某些实施例中,关节和肌腱手术包括关节置换或关节成形术。

[0068] 在某些实施例中,窦手术包括鼻旁窦手术、颅底手术和涉及肿瘤去除的颅底手术、泪道手术和眼眶手术中的一种。

[0069] 在某些实施例中,整形手术包括涉及防止植入物(例如乳房植入物)上的纤维囊收缩的手术程序。

[0070] 在某些实施例中,所述方法减少了粘连的形成、形成速率、数量或发生率。

[0071] 在某些实施方案中,所述方法将粘连的形成或数量减少至少10%,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%至少70%,至少80%或至少90%。在某些实施方案中,所述方法将粘连的形成或数量减少20%或更多,30%或更多,40%或更多,50%或更多,60%或更多,70%或更多,80%或更多,或90%以上。

[0072] 在某些实施方案中,所述方法降低了粘连的特性,例如粘连的强度、厚度、程度、严重性和/或血管化。

[0073] 在某些实施方案中,所述方法减少了粘连的分级。例如,粘连可分为膜状粘连、强粘连或非常强的血管化粘连。

[0074] 对于腹部粘连,一个标准化的分级系统如下:0—没有粘连;1—薄膜状粘连;2—多于一的这种粘连;3—具有焦点的厚粘连;4—带有平面附接的厚粘连;5—非常厚的血管化粘连或多于一个的平面粘连。

[0075] 在某些实施方案中,所述方法防止粘连的形成。

[0076] 评估粘连的方法是本领域已知的,例如使用本文所述的分级系统。

[0077] 在某些实施方案中,所述试剂具有铁螯合活性。

[0078] 用于确定铁螯合活性的方法是本领域已知的,例如用于评估试剂结合铁的能力的体外方法,或用于评估试剂体内结合铁的能力的方法。用于治疗的铁螯合剂描述于例如“铁螯合疗法”(2012) *Advances in Experiment Medicine and Biology*, 第509卷;Caim Hersko编辑;由美国Springer, Kluwer Academic/Plenum Publishers出版。

[0079] 具有铁螯合活性的试剂的实例包括去铁酮、去铁胺、去铁草胺、地拉罗司(deferasirox)、曲酸、特特拉姆酸(tetramic acid)、去铁硫菌素、8-羟基喹啉类似物、氯喹羟喹、0-trensox (三-N-(2-氨基乙基-[8-羟基喹啉5-磺酸基-7-酰胺基]胺)、他奇吡啶(N, N', N''-三(2-吡啶甲基)-顺,顺-1,3,5-三氨基环己烷)、地塞拉酮(Dexrazone)、缩氨基硫脲、Triapine® (3-氨基吡啶-2-羧醛缩氨基硫脲[3-AP])、吡哆醛异烟酰胺(PIH)及其类似物、植物化学物质、原花色素、表儿茶素、黄酮醇和花青素、姜黄素、香草乙酮(apocyanin)、柯拉维酮(kolaviron)、氟醇(flورانول)、次氨基三乙酸酯(nitrilotriacetate)、碧萝芷(pycnogenol)、原花青素(procyanidin)、黄芩素(baicalin)、黄芩甙(baicalin)、槲皮素、四甲基吡嗪、阿魏酸、川芎嗪、槲皮素、白杨素、3-羟基黄酮、3',4'-二羟基黄酮、芦丁和黄酮、铁三嗪、没食子酸、儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和原花色素、绿茶儿茶素、红茶茶黄素、乙二胺四乙酸/乙二胺四乙酸盐(EDTA)、柠檬酸、磷酸/磷酸酯及其类似物、氨基磷酸酯及其类似物、双磷酸酯及其类似物;和/或上述任何一种的可接受的盐、衍生物(例如化学取代的形式)、溶剂化物、水合物、互变异构体、前药或立体异构体。还可以考虑其他铁螯合剂。

[0080] 铁螯合剂可商购获得或通过本领域已知的方法合成。

[0081] 在某些实施方案中,所述试剂具有抗氧化剂活性。

[0082] 用于确定抗氧化剂活性的方法是本领域已知的,例如用于评估试剂抑制氧化的能力和/或评估试剂去除氧化剂或自由基(例如活性氧物种)的能力的方法。

[0083] 具有抗氧化剂活性的试剂的实例包括小分子化合物,例如谷胱甘肽、胆红素、泛醌、维生素C、维生素E、类胡萝卜素、植酸、草酸、单宁、β-胡萝卜素(beta-caroten)、丁香酚、视黄醇、大麻素、含二硫醇抗氧化剂、硫辛酸、DTT(二硫苏糖醇)、阿司匹林、水杨酸、谷胱甘肽、蛋硫醇(ovothiol)和酚类化合物,以及酶,例如SOD、GPX、PRDX和过氧化氢酶。还可以考虑具有抗氧化剂活性的其他试剂。

[0084] 抗氧化剂可商购获得或通过本领域已知的方法合成。

[0085] 在某些实施方案中,所述试剂具有铁螯合活性和抗氧化剂活性。

[0086] 在某些实施方案中,具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂包括活性氧物种抑制剂。在某些实施方案中,活性氧物种抑制剂包括活性氧物种的清除剂和/或产生活性氧物种的抑制剂。确定试剂用作ROS抑制剂的能力的方法是本领域已知的,例如Pavelescu等人(2015) *J. Med. Life* 8:38-42和Woolley等人(2013) *Trends Biochem Sci* (11):556-565中所述。

[0087] 在某些实施方案中,所述试剂包括去铁酮、去铁胺和去铁草胺中的一种或多种或其任何组合。这些试剂可商购获得或通过本领域已知的方法合成。例如,去铁酮可获自Apotex Pty Ltd或Selleckchem.com(产品编号#S4067),去铁胺(作为甲磺酸盐)可获自Merck(以前为Sigma-Aldrich;产品#D9533)。

[0088] 在某些实施方案中,所述试剂包括去铁酮。

[0089] 本文所用术语“暴露”以及相关术语例如其变形形式是指使易于形成粘连的区域与具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂直接和/或间接接触和/或用具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂处理易于形成粘连的区域。

[0090] 所述试剂可以以合适的形式暴露于受试者的区域。就这一点而言,所述试剂还可以是所述试剂的前体形式,或当暴露于受试者时将形成所述试剂的治疗有效形式的衍生物。

[0091] 在某些实施方案中,所述方法包括使所述区域与所述试剂接触。在某些实施方案中,所述方法包括将所述试剂施用到所述区域,例如通过用所述试剂涂覆所述区域,用所述试剂喷雾所述区域或通过将包含所述试剂的组合物施用到所述区域。例如,在窦手术的情况下,可将组合物施用于手术部位和/或可将组合物用于术后清洗窦。

[0092] 在某些实施方案中,所述的暴露于试剂利用治疗有效量的所述试剂。本文所用术语“治疗有效量”是指足以减少粘连或预防和/或治疗粘连的试剂量。治疗有效量将依据许多因素而变化,所述因素包括例如所用试剂的比活性、临床特征、年龄、身体状况、其他疾病状态的存在和受试者的营养状况。治疗量的实例如本文所述。

[0093] 用于递送具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的制剂描述于例如《雷明顿:药学科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy),由David B.Troy和Paul Beringer编辑(2006)Lipincott Williams&Wilkins以及Tiwari G等人编辑(2012)Int.J.Pharm.,Investig 2(1):2-11;

[0094] 在某些实施方案中,所递送的试剂的量为以下所选范围之一的量:1 μ g至100mg;1 μ g至10mg;1 μ g至1mg;1 μ g至100 μ g;1 μ g至10 μ g;10 μ g至100mg;10 μ g至10mg;10 μ g至1mg;10 μ g至100 μ g;100 μ g至100mg;100 μ g至10mg;100 μ g至1mg;1mg至10mg;1mg至100mg和10mg至100mg。递送的剂量和频率可以由本领域技术人员确定。

[0095] 在某些实施方案中,所递送的试剂的量为1mg至100mg。

[0096] 在某些实施方案中,所述的暴露于试剂是预防性暴露。在某些实施方案中,暴露于试剂包括在粘连形成之前和/或粘连形成期间暴露于试剂。

[0097] 在某些实施方案中,试剂暴露于区域包括通过凝胶、软膏、膏剂、洗剂、泡沫、乳液、悬浮剂、喷雾剂、气雾剂、溶液、液体、粉末、半固体、凝胶、固体、糊剂或酏剂递送试剂。

[0098] 在某些实施方案中,试剂的暴露包括通过颗粒,例如微粒或纳米颗粒递送试剂,或通过脂质体递送试剂。

[0099] 试剂的其他形式的递送包括通过支架的递送,例如生物材料支架,包括由胶原、羟基磷灰石、 β -磷酸三钙或其组合产生的支架。将试剂掺入此类基质中的方法是本领域已知的。

[0100] 在某些实施方案中,所述方法包括将包含本文所述试剂的组合物、制剂或药物施用于受试者中易于形成粘连的区域。组合物、制剂或药物可包括其他多种赋形剂、剂型和适于在关于试剂递送中使用的其他成分,并且可以呈例如固体形式、半固体形式、液体形式或泡沫形式。

[0101] 在某些实施方案中,所述方法包括将包含所述试剂的组合物施用至受试者中易于形成粘连的区域。产生组合物的方法是本领域已知的,例如,在《雷明顿:药学科学与实践》

由David B.Troy和Paul Beringer编辑(2006)Lipincott Williams&Wilkins以及Tiwari G等人编辑(2012) Int.J.Pharm.,Investig 2(1):2-11中;

[0102] 在某些实施方案中,所述组合物包括凝胶、溶液、冲洗剂、乳剂、膏剂、喷雾剂、纳米颗粒、微粒、脂质体、软膏、膏剂、洗剂、泡沫、悬浮剂、气雾剂、液体、粉末、半固体、固体、糊剂或酞剂中的一种或多种。

[0103] 凝胶是半固体体系,并且通常由分子在液体载体中的分散体构成,通过添加胶凝剂而呈果冻状。

[0104] 溶液是可溶性化学物质溶解在例如水、醇或丙二醇等溶剂中的液体制剂。例如,包含所述试剂的鼻腔冲洗剂可用于减少鼻窦的炎症或粘连。

[0105] 乳液是两相制剂,其中一相(分散相或内相)精细地分散在另一相(连续相或外相)中。分散相可以是疏水基的(水包油),或是水基的(油包水)。乳液可包括油包水乳液或水包油乳液。

[0106] 膏剂是溶解或悬浮在水可移除基质或润肤基质中的药物。膏剂通常分为油包水型或水包油型。洗剂通常是透明/半透明溶液。洗剂通常包含25%至50%的醇,还可包含防腐物、润肤物和止血物质。软膏是半固体制剂。水溶性软膏可以例如用聚乙二醇配制。糊剂是已经添加了高百分比(通常高达50重量%)的不溶性固体的软膏。

[0107] 粉末通常利用每单位重量具有较大表面积的小粒径。

[0108] 泡沫通常利用液体、半固体或固体基质中的截留气体。

[0109] 在某些实施方案中,所述组合物是凝胶。凝胶组合物的实例包括纤维蛋白凝胶、多糖凝胶(例如藻酸盐、琼脂糖、壳聚糖或果胶酸盐)、聚合物凝胶(例如聚乙烯醇聚合物)和蛋白质凝胶(例如明胶或胶原)。产生凝胶的方法是本领域已知的。

[0110] 在某些实施方案中,组合物包含水凝胶。生产水凝胶的方法是本领域已知的,例如,Gulrez等人(2011)“Hydrogels:Methods of Preparation,Characterisation and Applications”Angelo Carpi编辑,ISBN 978-953-307-268-5中所述。

[0111] 在某些实施方案中,凝胶包含壳聚糖、葡聚糖、碳水化合物聚合物、透明质酸和/或其盐、胶原、羧甲基纤维素、明胶、聚酰化物(polyacrylate)和藻酸盐中的一种或多种。

[0112] 在某些实施方案中,组合物包含基于壳聚糖的凝胶。基于壳聚糖的凝胶是本领域已知的,例如,国际专利申请W0/2009028965和Ahmad等人(2015)Res Pharm Sci 10(1):1-16中所述。

[0113] 在某些实施方案中,通过将所述试剂给药于受试者将所述试剂暴露于所述区域。

[0114] 本文所述的试剂可以以合适的形式给药于受试者。在这方面,术语“给药”或“提供”包括给药一种或多种试剂,或给药所述试剂的前药或所述试剂的衍生物,所述前药或衍生物将在受试者体内形成治疗有效量的所述试剂。所述术语包括例如全身性给药途径(例如,通过注射例如静脉内注射,以片剂、丸剂、胶囊或用于药物的全身性给药的其他剂型口服)和局部给药途径(例如,膏剂、溶液、凝胶等,以及例如漱口水、用于局部口服给药的洗剂等溶液)。

[0115] 给药试剂的方法是本领域已知的。

[0116] 所述试剂可以单独给药或可以与其他治疗物质和/或增强、稳定或维持所述试剂活性的其他物质的混合物形式递送。在某些实施方案中,给药载体(例如,丸剂、片剂、植入

物、可注射溶液等)包含一种或多种试剂和/或一种或多种其他物质。

[0117] 当给药于受试者时,有效剂量可以依据所使用的特定试剂、给药方式以及与所治疗的受试者有关的各种物理因素而变化。预期每日剂量随给药途径和所给药试剂的性质而变化。

[0118] 在某些实施方案中,一种或多种试剂是口服给药的。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂是局部给药的。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂通过注射例如静脉内注射给药。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂是肠胃外给药的。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂通过直接引入肺中来给药,例如通过气雾剂给药、通过雾化给药以及通过灌输到肺中给药。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂通过植入物施用。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂通过皮下注射、关节内、直肠、鼻内、眼内、阴道或经皮给药。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂通过生物或非生物植入物给药。

[0119] “静脉内给药”是将物质直接给药到静脉中。在某些实施方案中,该剂也可以静脉内给药。包含适于静脉内给药的本文所述试剂的组合物可以由技术人员配制,并且通常包含载体或赋形剂,例如等渗盐水。

[0120] “口服给药”是通过口腔摄取某种物质的给药途径,“口服给药”包括经颊、唇下和舌下给药,以及肠内给药,和通过呼吸道给药,除非是通过管道进行的以使药物不与任何口腔粘膜直接接触。口服给药治疗物质的典型形式包括使用片剂或胶囊剂。

[0121] 在某些实施方案中,可能期望以气雾剂形式将一种或多种试剂直接给药于气道。用于气雾剂形式给药的制剂是已知的。

[0122] 在某些实施方案中,还可以肠胃外(例如直接进入关节间隙)或腹膜内给药试剂。例如,可以在水中适当混合表面活性剂如羟丙基纤维素来制备非离子化形式或作为药理学上可接受的盐的试剂的溶液或悬浮液。分散液也可以在甘油、液体聚乙二醇及其在油中的混合物中制备。在普通的储存和使用条件下,这些制剂通常含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0123] 在某些实施方案中,所述一种或多种试剂也可以通过注射给药。适于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。载体可以是溶剂或分散培养基,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇)、其合适的混合物,和植物油。

[0124] 例如,用于铁螯合剂的静脉内使用的药物组合物可以如下:10-500mg在等渗盐水中的去铁酮,任选地包含一种或多种药学上可接受的添加剂和/或赋形剂。

[0125] 在某些实施方案中,所述一种或多种试剂也可以经皮给药。经皮给药应理解为经过身体表面以及包括上皮和粘膜组织在内的身体通道内层的所有给药。可以使用本文所述的试剂或其药学上可接受的盐,以洗剂、膏剂、泡沫、贴剂、悬浮液、溶液和栓剂(直肠和阴道)形式进行此类给药。

[0126] 经皮给药也可以通过使用含有活性化合物和载体(所述载体对活性化合物呈惰性、对皮肤无毒并且允许将用于全身吸收的试剂通过皮肤递送到血流中)的透皮贴剂来实现。载体可以采取多种形式,例如膏剂和软膏、糊剂、凝胶和闭塞装置。膏剂和软膏可以是水包油型或油包水型的粘性液体或半固体乳液。由分散在含有活性成分的石油或亲水石油中的吸收性粉末组成的糊剂也是合适的。可以使用多种闭塞装置将活性成分释放到血流中,

例如覆盖包含活性成分(有或没有载体)的储库或含有活性成分的基质的半透膜。

[0127] 在某些实施方案中,所述一种或多种试剂也可以通过栓剂给药。栓剂可以由传统材料制成,包括可可脂添加或不添加改变栓剂熔点的蜡,和甘油。也可以使用水溶性栓剂基质,例如各种分子量的聚乙二醇。

[0128] 在某些实施方案中,所述一种或多种试剂可以通过固体或半固体底物来给药或递送,所述底物例如被掺入基质、支架或载体例如可生物降解的基质或载体中。通过支架递送试剂的方法是本领域已知的。例如,包括由胶原、羟基磷灰石、 β -磷酸三钙或其组合产生的支架的生物材料支架可用于递送试剂。将试剂掺入此类底物中的方法是本领域已知的。

[0129] 在某些实施方案中,可以通过可植入组合物来给药或递送所示一种或多种试剂。制备可植入组合物的方法是本领域已知的。

[0130] 考虑了另外的多种赋形剂、剂型、分散剂等,适合用于试剂的给药和/或制成组合物、药物或药物组合物中的给药。

[0131] 制剂是已知的并且在例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton,Pa,1985中进行了描述,该文献在此全文引入作为参考。

[0132] 在某些实施方案中,本文所述的组合物包含所需的释放特性。

[0133] 用于控制活性剂释放的制剂,例如立即释制剂、持续释放制剂和延迟释放制剂,是本领域已知的,例如,Donald L Wise编辑的“药物控释技术手册”(“Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology”)(2000)Marcel Dekker Inc., 270Madison Avenue New York,NY10016中所述。例如,立即释放制剂可在崩解剂中使试剂立即释放,崩解剂例如交联的羧甲基纤维素、羟乙酸淀粉钠或聚乙烯吡咯烷酮,所述崩解剂提供片剂的迅速崩解,延迟释放制剂可以在依赖于pH的试剂涂层中延迟释放试剂(例如非铁金属卟啉),所述试剂涂层使用丙烯酸基树脂,例如Eudragit S(甲基丙烯酸共聚物B,NF)和/或Eudragit L(甲基丙烯酸共聚物A,NF)。

[0134] 在某些实施方案中,所述组合物包含的试剂的量为下列所选范围之一:1 μ g/ml至100mg/ml;1 μ g/ml至10mg/ml;1 μ g/ml至1mg/ml;1 μ g/ml至100 μ g/ml;1 μ g至10 μ g/ml;10 μ g至100mg/ml;10 μ g/ml至10mg/ml;10 μ g/ml至1mg/ml;10 μ g/ml至100 μ g/ml;100 μ g/ml至100mg/ml;100 μ g/ml至10mg/ml;100 μ g/ml至1mg/ml;1mg/ml至10mg/ml;1mg/ml至100mg/ml和10/ml mg至100mg/ml。也可以考虑其他范围。

[0135] 在某些实施方案中,所述组合物包含的试剂的量在1mg/ml至100mg/ml范围内。

[0136] 在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮的量在1mg/ml至100mg/ml范围内。

[0137] 在某些实施方案中,所述组合物包含的所述试剂的浓度范围为下列所选范围之一:1 μ M至1M;1 μ M至100mM;1 μ M至10mM;1 μ M至1mM;1 μ M至100 μ M;10 μ M至10 μ M;10 μ M至1M;10 μ M至100mM;10 μ M至10mM;10 μ M至1mM;10 μ M至100 μ M;100 μ M至1M;100 μ M至100mM;100 μ M至10mM;100 μ M至1mM;1mM至1M;1mM至100mM;1mM至10mM;10mM至1M;10mM至100mM;和100mM至1M。也可以考虑其他范围。

[0138] 在某些情况下,所述组合物包含的去铁酮浓度范围为下列所选范围之一:1mM至1M、1mM至100mM、1mM至10mM、10mM至1M、10mM至100mM,或100mM至1M。

[0139] 在某些实施方案中,所述试剂是去铁酮、去铁胺和/或去铁草胺中的一种或多种,或其任何组合。其他试剂如本文所述。

[0140] 在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮的浓度为1mM或更大、2mM或更大、3mM或更大、4mM或更大、5mM或更大、10mM或更大、20mM或更大、30mM或更大、40mM或更大、50mM或更大、100mM或更大、250mM或更大,或者500mM或更大。

[0141] 在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮的浓度为1mM或更小、2mM或更小、3mM或更小、4mM或更小、5mM或更小、10mM或更小、20mM或更小、30mM或更小、40mM或更小、50mM或更小、100mM或更小、250mM或更小、500mM或更小,或1M或更小。

[0142] 在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮浓度为200mM或更小。

[0143] 在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮浓度为80mM或更小。

[0144] 在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮浓度为50mM或更小。在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮浓度为20mM或更小。在某些实施方案中,所述组合物包含的去铁酮浓度为10mM或更小。

[0145] 在某些实施方案中,所述组合物在96小时内提供大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述组合物在72小时内提供大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述组合物在48小时内提供大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述组合物在24小时内提供大于80%的所述试剂的释放。

[0146] 确定试剂释放速率的方法是本领域已知的。

[0147] 在某些实施方案中,所述组合物提供长达14天、长达7天、长达3天、长达2天或长达1天的所述试剂的释放。

[0148] 在某些实施方案中,所述组合物提供至少14天、至少7天、至少3天、至少2天或至少1天的所述试剂的释放。

[0149] 在某些实施方案中,所述组合物在1至14天、1至7天、1至3天或1至2天的时间内提供试剂的释放。

[0150] 在某些实施方案中,所述组合物在0至14天、1至14天、2至14天、3至14天或7至14天的期间内提供试剂的持续释放。在某些实施方案中,所述组合物在3至14天的时期内提供试剂的持续释放。

[0151] 在某些实施方案中,所述组合物是立即释放组合物。在某些实施方案中,所述组合物是持续释放组合物。在某些实施方案中,所述组合物是受控释放组合物。在某些实施方案中,所述组合物是延迟释放组合物。在某些实施方案中,所述组合物是缓慢释放组合物。

[0152] 用于控制活性剂释放的制剂,例如立即释放制剂、持续释放制剂、缓慢释放和延迟释放制剂在本领域中是已知的,例如,在“Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology”Donald L Wise编辑(2000)Marcel Dekker Inc.,270 Madison Avenue New York,NY 10016中有描述。

[0153] 在某些实施方案中,可以将活性剂掺入颗粒中,所述活性剂提供所述试剂的持续释放。例如,持续释放颗粒可以包括PLGA(聚乳酸乙醇酸)。

[0154] 在某些实施方案中,所述方法包括将易于形成的区域进一步暴露于抗生素。暴露的方法如本文所述。

[0155] 抗生素的实例包括氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢菌素类、糖肽类、林可酰胺类(lincoasmides)、脂肽类、大环内酯类、单菌胺类(monobactams)、硝基咪唑类、恶唑烷酮类、青霉素类(penicillins)、多肽类(peolypeptides)、喹诺酮类、氟醌类(fluoroquinones)、

磺酰胺类和四环素类。抗生素是可商购的,并且其使用方法是本领域已知的,例如,如在“治疗指南-抗生素”(“Therapeutic Guidelsine-Antibiotic”),第15版,2014,eTG complete 出版中有描述。

[0156] 例如,具体的抗生素包括莫匹罗星(mupirocin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、氨苄西林(ampicillin)、阿莫西林(amoxycillin)、庆大霉素(gentamicin)、克拉维酸(clavulanate)、克林霉素(clindamycin)、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑(trimethoprim-sulfamethoxazole)、多西环素(doxycycline)、米诺环素(minocycline)、利福平(rifampin)、利奈唑胺(linezolid)、氟氯西林(flucloxacillin)、双氯西林(dicloxacillin)、头孢唑林(cefazolin)、头孢菌素(cephalothin)和头孢氨苄(cephalexin)、克林霉素(clindamycin)、林可霉素(lincomycin)、红霉素(erythromycin)、利福昔明(rifaximin)、左氧氟沙星(levofloxacin)、舒巴克坦(sulbactam)、头孢西丁(cefodoxitin)、左氧氟沙星加克林霉素或甲硝唑、氨曲南(aztreonam)、多粘菌素E(polymyxin E)、甲硝唑(metronidazole)、氨苄西林和阿莫西林(amoxicillin)、替卡西林(ticarcillin)和哌拉西林(piperacillin)中的一种或多种,或与 β 内酰胺酶抑制剂例如克拉维酸、舒巴克坦或他唑巴坦(azobactam)相组合。也可以考虑其他类型的抗生素。

[0157] 在某些实施方案中,抗生素包括莫匹罗星,庆大霉素,多西环素,甲硝唑,阿莫西林,哌拉西林,环丙沙星,甲氧苄啶-磺胺甲恶唑(复方新诺明(Bactrim))中的一种或多种,或其任何组合。

[0158] 在某些实施方案中,所述方法包括减少由腹部手术引起的粘连,并且将所述区域进一步暴露于本文所述的一种或多种抗生素。

[0159] 在某些实施方案中,所述方法包括减少由鼻窦手术引起的粘连,并且将所述区域进一步暴露于本文所述的一种或多种抗生素。

[0160] 在某些实施方案中,本文所述的组合物还包含抗生素。在某些实施方案中,本文所述的凝胶组合物还包含抗生素。抗生素如本文所述。

[0161] 在某些实施方案中,用于减少由腹部手术引起的粘连的组合物还包含一种或多种本文所述的抗生素。

[0162] 在某些实施方案中,用于减少由鼻窦手术引起的粘连的组合物还包含一种或多种本文所述的抗生素。

[0163] 在某些实施方案中,所述方法包括将所述区域进一步暴露于抗炎剂。抗炎剂的使用方法是本领域已知的。抗炎剂是可商购的或可以通过本领域已知的方法合成。

[0164] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括将所述区域暴露于非甾体抗炎药/试剂。

[0165] 非甾体抗炎药的实例包括例如视黄酸、奎纳克林(quinacrine)、双嘧达莫(dipyridamole)、阿司匹林(例如迪普林(Disprin))、布洛芬(例如努乐芬(Nurofen))、萘普生(例如甲氧基甲基萘乙酸(Naprosyn))、双氯芬酸(例如扶他林片(Voltaren))和塞来昔布(celecoxib)(例如西乐葆(Celebrex))、吲哚美辛(indomethacin)、奥沙普秦(oxaprozin)和吡罗昔康(piroxicam)等试剂。

[0166] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括将所述区域暴露于皮质类固醇。

[0167] 皮质类固醇的实例包括丙酸氟替卡松(fluticasone propionate)、糠酸氟替卡松(fluticasone furoate)、糠酸莫米松(mometasone furoate)、环索奈德曲安奈德

(ciclesonide triamcinolone acetonide)、氟尼缩松 (flunisolide)、倍氯米松 (beclomethasone)、布地奈德 (budesonide) 和地塞米松 (dexamethasone)。

[0168] 在某些实施方案中,所述方法包括将所述区域进一步暴露于布地奈德。例如,所述方法可以进一步包括将所述区域暴露于在凝胶组合物中的布地奈德。

[0169] 在某些实施方案中,本文所述的组合物还包含抗炎剂,例如皮质类固醇。

[0170] 在某些实施方案中,本文所述的凝胶组合物还包含抗炎剂。

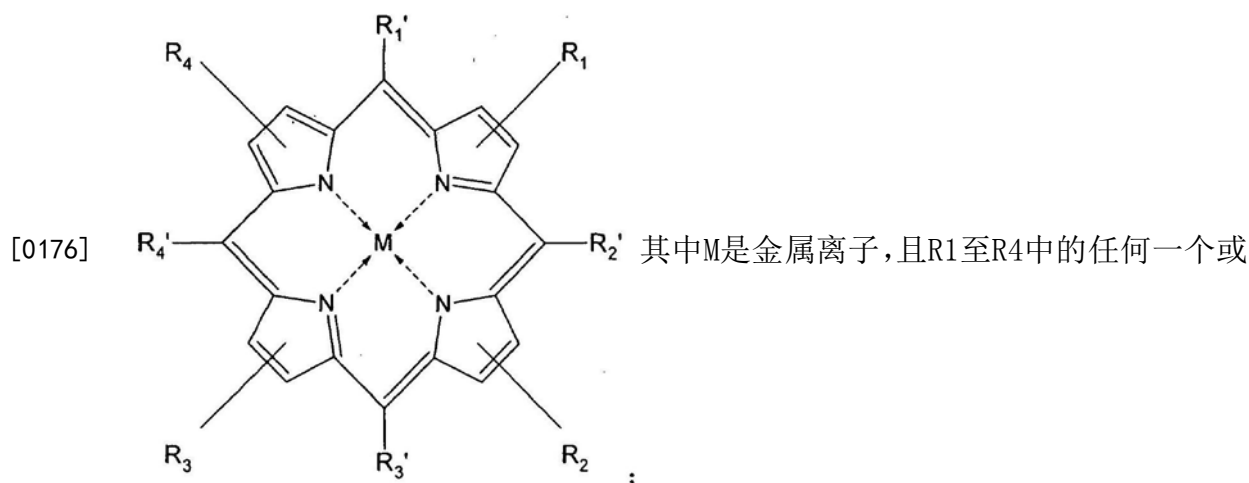
[0171] 在某些实施方案中,所述方法包括将所述区域进一步暴露于铁模拟物和/或血红素模拟物。术语“铁模拟物”是指这样的试剂:其为铁的类似物,并干扰细胞中铁的作用,包括干扰利用铁的酶(例如氧化还原酶)或干扰铁的代谢。术语“血红素模拟物”是指这样的试剂:其为血红素的类似物并干扰血红素活性、血红素合成或血红素代谢。这类化合物可以通过本领域已知的方法生产或可以商购获得。

[0172] 在某些实施方案中,为铁模拟物和/或血红素模拟物的试剂包括非铁卟啉。

[0173] 本文所用术语“卟啉”是指基于卟啉结构的分子,并且包括其衍生物。

[0174] 在某些实施方案中,非铁卟啉包含非铁金属卟啉。在某些实施方案中,非铁卟啉包含非铁金属原卟啉。

[0175] 术语“非铁金属卟啉”是指具有与金属离子(M)配位的卟啉基团的非含铁试剂,如下:

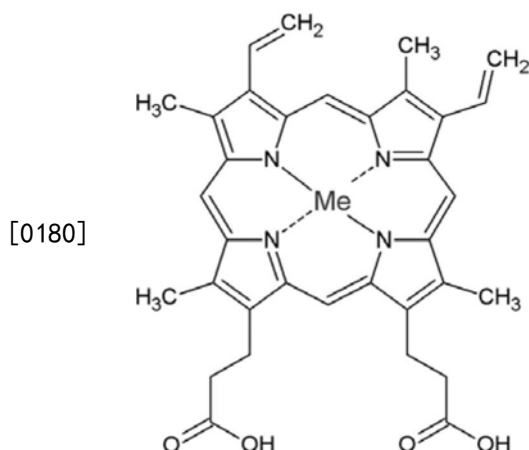


多个和/或R1'至R4'中的任何一个或多个是相同或不同的基团。

[0177] 在某些实施方案中,非铁卟啉包含镓原卟啉、锰原卟啉、锌原卟啉、铟原卟啉、钴原卟啉、钨原卟啉、银原卟啉或铜原卟啉中的一种或多种,或其任何组合。

[0178] 在某些实施方案中,非铁卟啉包含镓原卟啉。

[0179] 在某些实施方案中,非铁卟啉包含具有以下结构的化合物:



[0181] 其中Me选自镓、锰、锌、钬、钴、钕、银和铜；和/或其可接受的盐、取代的衍生物、溶剂化物、互变异构体或立体异构体。在某些实施方案中，Me是镓。

[0182] 在某些实施方案中，所述方法包括将所述区域暴露于为铁模拟物和/或血红素模拟物的试剂的如下浓度：100mM或更小、50mM或更小、20mM或更小、10mM小于或等于5mM或更少、4mM或更少、3mM或更少、2mM或更少、1.5mM或更少的去铁酮，1mM或更少、0.5mM或更少、0.4mM或更少、0.3mM或更少、0.2mM以下或0.1mM以下。

[0183] 在某些实施方案中，所述方法包括将所述区域暴露于为铁模拟物和/或血红素模拟物的试剂的如下浓度：1mg/ml或更少、500μg/ml或更少、200μg/ml或更少、100μg/ml或更少、50μg/ml或更少、25μg/ml或更少、10μg/ml或更少、5μg/ml或更少，或1μg/ml或更少。

[0184] 在某些实施方案中，所述方法包括将所述区域暴露于200μg/ml或更少、100μg/ml或更少、50μg/ml或更少、25μg/ml或更少、10μg/ml或更少、5μg/ml，或更少或1μg/ml或更少的非铁卟啉。

[0185] 在某些实施方案中，所述方法包括将所述区域暴露于200μg/ml或更少的非铁卟啉。

[0186] 在某些实施方案中，所述方法包括将所述区域暴露于非铁卟啉以下浓度范围：1至200μg/ml、5至200μg/ml、10至200μg/ml、25至200μg/ml、50至200μg/ml、100至200μg/ml、1至100μg/ml、5至100μg/ml、10至100μg/ml、25至100μg/ml、50至100μg/ml、1至50μg/ml、5至50μg/ml、10至500μg/ml、25至50μg/ml、1至25μg/ml、5至25μg/ml、10至25μg/ml、1至10μg/ml、5至10μg/ml，或1至5μg/ml。

[0187] 在某些实施方案中，本文所述的组合物还包含是铁模拟物和/或血红素模拟物的抗生素的试剂。

[0188] 在某些实施方案中，本文所述的凝胶组合物还包含为铁模拟物和/或血红素模拟物的试剂。

[0189] 在某些实施方案中，所述受试者是患有现有粘连的受试者。在某些实施方案中，所述方法包括对受试者进行粘连分解程序以治疗现有的粘连，然后将所述试剂施用至易于形成新粘连的区域。

[0190] 在某些实施方案中，本文所述的方法用于通过将包含所述试剂的组合物施用于易形成粘连的区域来减少受试者的粘连，用于通过将包含所述试剂的组合物施用于易形成粘连的区域来减少受试者的手术粘连，用于通过将包含所述试剂的组合物施用于易形成粘连

的区域来减少受试者的术后粘连,用于预防和/或治疗粘连,以及用于减少与粘连相关的炎症。

[0191] 在某些实施方案中,本公开提供了一种减少受试者的粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用于易在受试者中形成粘连的区域,从而减少受试者的粘连。

[0192] 在某些实施方案中,本公开提供了一种减少受试者的手术粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用于易在受试者中形成手术粘连的区域,从而减少受试者中的手术粘连。

[0193] 在某些实施方案中,本公开提供了一种减少受试者中的术后粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至受试者中易于形成术后粘连的区域,从而减少受试者的术后粘连。

[0194] 在某些实施方案中,本公开提供了一种预防和/或治疗受试者的粘连的方法,所述方法包括将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用于易在受试者中形成粘连的区域,从而预防和/或治疗受试者的粘连。

[0195] 本文所用术语“预防”以及其变形形式等相关术语是指在阻止或抑制受试者中一种或多种症状的出现方面获得期望的治疗和/或生理效果。

[0196] 本文所用术语“治疗”以及其变形形式等相关术语是指在改善受试者的状况,改善、阻止、抑制、减轻和/或减缓受试者体内一种或多种症状的进展,受试者的部分或完全稳定,一种或多种症状的消退或受试者的治愈方面获得期望的治疗和/或生理效果。

[0197] 在某些实施方案中,本文所述的方法可以用作治疗现有粘连的疗法的一部分,用作粘连分解程序的辅助。

[0198] 在某些实施方案中,本公开提供了一种治疗受试者的粘连的方法,所述方法包括:

[0199] (i) 对受试者进行粘连分解程序;和

[0200] (ii) 将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用于易形成粘连的区域,以减少受试者中新的粘连的形成,

[0201] 从而治疗受试者的粘连。

[0202] 应当理解,组合物的施用可以发生在以下中的一个或多个阶段:粘连分解程序之前、粘连分解程序期间和粘连分解程序之后。

[0203] 在某些实施方案中,所述组合物的施用发生在粘连分解程序之后。

[0204] 在某些实施方案中,本公开提供了一种治疗受试者的粘连的方法,所述方法包括:

[0205] (i) 对受试者进行粘连分解程序;和

[0206] (ii) 在粘连分解程序之后将包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物施用至易于形成粘连的区域,以减少受试者中新的粘连的形成,

[0207] 从而治疗受试者的粘连。

[0208] 本公开的某些实施方案提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的用途。

[0209] 在某些实施方案中,本公开提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂在减少或预防和/或治疗受试者的粘连中的用途。

[0210] 本公开的某些实施方案提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂在制备

用以预防和/或治疗受试者的粘连的组合物或药物中的用途。

[0211] 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂如本文所述。所述试剂用于减少粘连的用途如本文所述。

[0212] 在某些实施方案中,本公开提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂在制备用以减少受试者的粘连的组合物或药物中的用途。

[0213] 在某些实施方案中,本公开提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂在制备用以预防和/或治疗受试者的粘连的组合物或药物中的用途。

[0214] 含有具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物、制剂和药物如本文所述。

[0215] 本公开的某些实施方案提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的用于减少粘连的试剂。

[0216] 本公开的某些实施方案提供了具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的用于治疗粘连的试剂。

[0217] 本公开的某些实施方案提供了一种组合物。

[0218] 在某些实施方案中,本公开提供了一种包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的抗粘连组合物。

[0219] 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂如本文所述。

[0220] 用于评估组合物的抗粘连性能的方法如本文所述。

[0221] 包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物如本文所述。

[0222] 在某些实施方案中,抗粘连组合物包含凝胶、溶液、冲洗剂、乳剂、膏剂、纳米颗粒、微粒和/或脂质体中的一种或多种。

[0223] 在某些实施方案中,所述组合物包含凝胶。在某些实施方案中,所述组合物包含水凝胶。

[0224] 在某些实施方案中,所述组合物包含基于壳聚糖的凝胶。

[0225] 在某些实施方案中,凝胶包含壳聚糖、葡聚糖、碳水化合物聚合物、透明质酸和/或其盐,胶原、羧甲基纤维素、明胶、聚酰化物和藻酸盐中的一种或多种。

[0226] 在某些实施方案中,凝胶包含期望的释放特性。组合物的释放特性如本文所述。

[0227] 在某些实施方案中,所述抗粘连组合物在96小时内提供了大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述抗粘连组合物在72小时内提供了大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述抗粘连组合物在48小时内提供大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述抗粘连组合物在24小时内提供大于80%的所述试剂的释放。

[0228] 在某些实施方案中,所述抗粘连组合物在3至14天的时间内提供试剂的持续释放。

[0229] 在某些实施方案中,所述试剂包含活性氧物种抑制剂。在某些实施方案中,活性氧物种抑制剂包括活性氧物种的清除剂和/或生成活性氧物种的抑制剂。

[0230] 在某些实施方案中,所述试剂包含去铁酮、去铁胺和去铁草胺中的一种或多种,或其任何组合。

[0231] 组合物中所述试剂的量如本文所述。

[0232] 在某些实施方案中,所述组合物包含80mM或更少的去铁酮浓度。在某些实施方案中,所述组合物包含50mM或更少的去铁酮浓度。在某些实施方案中,所述组合物包含20mM或

更少的去铁酮浓度。在某些实施方案中,所述组合物包含10mM或更少的去铁酮浓度。

[0233] 在某些实施方案中,所述抗粘连组合物还包含抗生素。抗生素的实例包括氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢菌素类、糖肽类、林可酰胺类、脂肽类、大环内酯类、单菌胺类、硝基呋喃类、恶唑烷酮类、青霉素类(例如阿霉素(amoxillicin)、阿莫西林和克拉维酸)、多肽类、喹诺酮类、氟醌类、磺酰胺类和四环素类。抗生素可商购获得,并且它们的使用方法是本领域已知的,例如,在“治疗指南-抗生素”,第15版,2014,eTG complete出版中有描述。

[0234] 抗生素的实例包括氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢菌素类、糖肽类、林可酰胺类、脂肽类、大环内酯类、单菌胺类、硝基呋喃类、恶唑烷酮类、青霉素类、多肽类、喹诺酮类、氟醌类、磺酰胺类和四环素类。抗生素可商购获得,并且它们的使用方法是本领域已知的,例如,在“治疗指南-抗生素”,第15版,2014,eTG complete出版中有描述。

[0235] 例如,具体的抗生素包括莫匹罗星、环丙沙星、氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、克拉维酸、克林霉素、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑、多西环素、米诺环素、利福平、利奈唑胺、氟氯西林、双氯西林、头孢唑林、头孢菌素和头孢氨苄、克林霉素、林可霉素、红霉素、利福昔明、左氧氟沙星、舒巴克坦、头孢西丁、左氧氟沙星加克林霉素或甲硝唑、氨曲南、多粘菌素E、甲硝唑、氨苄西林和阿莫西林、替卡西林和哌拉西林中的一种或多种,或与β内酰胺酶抑制剂例如克拉维酸、舒巴克坦或他唑巴坦相组合。

[0236] 在某些实施方案中,抗生素包括莫匹罗星,庆大霉素,多西环素,甲硝唑,阿莫西林,哌拉西林,环丙沙星,甲氧苄啶-磺胺甲恶唑(复方新诺明)中的一种或多种,或其任何组合。

[0237] 在某些实施方案中,所述抗粘连组合物用于减少由腹部手术引起的粘连,并且所述组合物包含一种或多种本文所述的抗生素。

[0238] 在某些实施方案中,所述抗粘连组合物用于减少由鼻窦手术引起的粘连,并且所述组合物包含一种或多种本文所述的抗生素。

[0239] 在某些实施方案中,所述抗粘连组合物还包含抗炎剂。抗炎剂如本文所述。在某些实施方案中,所述抗粘连组合物包含皮质类固醇,例如布地奈德。

[0240] 在某些实施方案中,本文所述的组合物还包含抗炎剂,例如皮质类固醇。

[0241] 在某些实施方案中,本公开提供了包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的鼻和/或鼻窦冲洗组合物。

[0242] 冲洗剂如本文所述。

[0243] 在某些实施方案中,本公开提供了基于壳聚糖的凝胶,所述凝胶包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

[0244] 基于壳聚糖的凝胶是本领域已知的,例如,在Ahmad等人(2015) Res Pharm Sci 10 (1):1-16中有描述。

[0245] 在某些实施方案中,基于壳聚糖的凝胶还包含铁模拟物、抗生素和/或抗炎剂中的一种或多种。

[0246] 在某些实施方案中,本公开提供了一种抗粘连组合物,其包含基于壳聚糖的凝胶和具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂。

[0247] 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂及其在凝胶中的用途如本文所述。生产基于壳聚糖的凝胶的方法如本文所述。

[0248] 在某些实施方案中,所述凝胶还包含一种或多种抗生素,如本文所述。例如,凝胶组合物可以包含5 μ g/ml的环丙沙星。

[0249] 在某些实施方案中,所述凝胶进一步包含一种或多种抗炎剂,如本文所述。例如,凝胶组合物可以包含100 μ g/ml浓度的布地奈德。

[0250] 在某些实施方案中,所述凝胶还包含为铁模拟物和/或血红素模拟物的试剂。在某些实施方案中,为铁模拟物或血红素模拟物的试剂以以下所选范围之一的量存在于组合物中:1 μ g至1000mg,1 μ g至500mg;1 μ g至250mg;1 μ g至100mg;1 μ g至10mg;1 μ g至1mg;1 μ g至100 μ g;1 μ g至10 μ g;10 μ g至1000mg;10 μ g至500mg;10 μ g至250mg,10 μ g至10mg;10 μ g至1mg;10 μ g至100 μ g;100 μ g至1000mg,100 μ g至500mg,100 μ g至250mg,100 μ g至100mg;100 μ g至10mg;100 μ g至1mg;1mg至1000mg,1mg至500mg,1mg至250mg,1mg至100mg;1mg至10mg,10mg至1000mg,10mg至500mg,10mg至250mg,10mg至100mg,100mg至1000mg,100mg至500mg,100mg至250mg和500mg至1000mg。也可以考虑其他量。

[0251] 在某些实施方案中,本公开提供了一种抗粘连组合物,其包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂以及包含抗生素、抗炎剂和铁模拟物中的一种或多种。

[0252] 例如,所述组合物可以是基于壳聚糖的凝胶,其包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂(例如去铁酮)和包含抗生素(例如环丙沙星)、抗炎剂(例如布地奈德)和铁模拟物(例如镓原卟啉)中的一种或多种,或其任何组合。

[0253] 本公开的某些实施方案提供了一种使用本文所述的组合物减少粘连的方法。

[0254] 在某些实施方案中,本公开提供了一种减少受试者中的粘连的方法,所述方法包括将本文所述的组合物施用至受试者中易于形成粘连的区域,从而减少受试者中的粘连。

[0255] 在某些实施方案中,粘连包括术后窦粘连。

[0256] 在某些实施方案中,本公开提供了一种减少受试者的术后窦粘连的方法,所述方法包括使用本文所述的鼻和/或窦冲洗组合物去冲洗受试者的窦,从而减少受试者的术后窦粘连。

[0257] 本公开的某些实施方案提供了使用本文所述的组合物减轻炎症的方法。

[0258] 本公开的某些实施方案提供了试剂盒或产品。

[0259] 在某些实施方案中,试剂盒或产品包含:(i)具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂;和/或(ii)一种或多种用于形成组合物的组分;和/或(iii)本文所述的一种或多种其他试剂;和/或(iv)用于执行本文所述方法的说明。

[0260] 本公开的某些实施例提供了一种用于执行本文所述方法的试剂盒或产品。

[0261] 本公开的某些实施方案提供了用于减少粘连,或用于预防和/或治疗粘连的产品。

[0262] 在某些实施方案中,本公开提供了一种用于减少受试者的粘连的产品,该产品包括以下组分:

[0263] (i)具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂;和/或

[0264] (ii)一种或多种用于形成包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的凝胶的组分,所述凝胶适合应用于手术部位;和/或

[0265] (iii)包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的预形成的凝胶,其中所述凝胶适合应用于手术部位;

[0266] 以及任选地

- [0267] (a) 用于将包含所述试剂的凝胶分配到手术部位的涂药器；和/或
- [0268] (b) 形成所述凝胶和/或将所述凝胶分配到手术部位的说明。
- [0269] 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂如本文所述。
- [0270] 在某些实施方案中，所述试剂包含去铁酮、去铁胺和去铁草胺中的一种或多种，或其任何组合。
- [0271] 可以以合适的形式提供所述试剂。在某些实施方案中，所述试剂可以固体或冻干形式提供，并且可以任选地与一种或多种其他试剂混合。
- [0272] 在某些实施方案中，所述试剂可以以液体形式供应，并且可以任选地与一种或多种其他试剂(例如稳定剂)组合。
- [0273] 例如，具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂可以是适于引入用于形成凝胶的一种或多种其他组分的形式。
- [0274] 在某些实施方案中，用于形成凝胶的一种或多种组分包括以下：
- [0275] (i) 一种或多种基础溶液，并且任选地所述基础溶液中的一种或多种还可包含具有螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂；和
- [0276] (ii) 用于与基础溶液组合形成凝胶的胶凝剂或胶凝溶液。
- [0277] 例如，为了形成壳聚糖葡聚糖凝胶，所述产品可以包含去铁酮(以合适浓度提供，所述合适浓度为以所需的最终浓度形成凝胶时的浓度)溶液、壳聚糖溶液和葡聚糖溶液。
- [0278] 预先形成的凝胶的一个实例是含有合适浓度的去铁酮的壳聚糖-葡聚糖凝胶。其他类型的凝胶如本文所述。
- [0279] 在某些实施例中，涂药器是注射器。也可以考虑其他类型的涂药器。
- [0280] 所述产品可进一步包含一种或多种其他组分，例如用于辅助凝胶分配的一种或多种其他组分，例如注射器的分配尖端，和/或用于使施用凝胶的区域或部位可视化的一种或多种染料。。
- [0281] 在某些实施方案中，所述产品是鼻和/或窦冲洗剂。
- [0282] 在某些实施方案中，本公开提供了鼻和/或窦冲洗溶液，所述溶液包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂和液体载体。
- [0283] 在某些实施方案中，本公开提供了鼻和/或窦冲洗溶液，所述溶液包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂和盐溶液。
- [0284] 在某些实施方案中，本公开提供了一种用于减少受试者的术后窦粘连的产品，该产品包括以下组分：
- [0285] (i) 包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的溶液(通常含有约1-2%的盐水)；
- [0286] 以及任选地
- [0287] (a) 将溶液递送到鼻和/或窦通道的涂药器；和/或
- [0288] (b) 使用涂药器递送所述溶液的说明。
- [0289] 本公开的某些实施方案提供了一种生产抗粘连产品的方法。生产抗粘连产品的方法如本文所述。
- [0290] 在某些实施方案中，抗粘连产品包含凝胶。在某些实施方案中，抗粘连产品包括溶液或冲洗剂。

[0291] 在某些实施方案中,本公开提供了一种生产用于减少受试者的粘连的产品的的方法,所述方法包括形成包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的凝胶,其中所述凝胶适于应用于易于形成粘连的区域或部位。

[0292] 形成凝胶的方法如本文所述。

[0293] 易于形成粘连的区域或部位如本文所述。在某些实施例中,所述区域是手术部位。

[0294] 本公开的某些实施方案提供了一种筛选或识别用于减少粘连的试剂的方法或者筛选或识别用于预防和/或治疗粘连的试剂的方法。

[0295] 在某些实施方案中,本公开提供了一种识别用于减少粘连的试剂的方法,所述方法包括确定具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂减少受试者中的粘连的能力,从而将所述试剂识别为减少粘连的试剂。

[0296] 在某些实施方案中,本公开提供了一种识别用于预防和/或治疗粘连的试剂的方法,所述方法包括确定具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂减少受试者中的粘连的能力,以及从而确定所述试剂为预防和/或治疗粘连的试剂。

[0297] 用于确定试剂减少粘连或者预防或治疗粘连的能力的方法如本文所述。

[0298] 在某些实施方案中,所述方法包括使用动物模型。

[0299] 在某些实施方案中,所述方法包括确定铁螯合剂减少受试者中粘连的能力。在某些实施方案中,所述方法包括确定抗氧化剂减少受试者中粘连的能力。在某些实施方案中,所述方法包括确定同时具有铁螯合活性和抗氧化剂活性的试剂减少受试者中粘连的能力。

[0300] 本公开的某些实施方案提供了使用本文所述的筛选方法识别的抗粘连剂。

[0301] 如本文所述,本公开的某些实施方案提供了一种通过将成纤维细胞暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂来抑制成纤维细胞增殖和/或迁移的方法。

[0302] 在某些实施方案中,本公开提供了一种抑制成纤维细胞增殖和/或迁移的方法,所述方法包括使成纤维细胞暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂,从而抑制成纤维细胞的增殖和/或迁移。

[0303] 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂如本文所述。在某些实施方案中,所述试剂包括活性氧物种抑制剂。在某些实施方案中,活性氧物种抑制剂包括活性氧物种清除剂和/或活性氧物种生成抑制剂。在某些实施方案中,所述试剂包含去铁酮、去铁胺和去铁草胺中的一种或多种。

[0304] 将成纤维细胞暴露于试剂的方法如本文所述。

[0305] 在某些实施方案中,所述方法包括将成纤维细胞暴露于80mM或更小的去铁酮浓度。在某些实施方案中,所述方法包括将成纤维细胞暴露于50mM或更小的去铁酮浓度。在某些实施方案中,所述方法包括将成纤维细胞暴露于20mM或更小的去铁酮浓度。在某些实施方案中,所述方法包括将成纤维细胞暴露于10mM或更小的去铁酮浓度。

[0306] 在某些实施方案中,所述方法包括在成纤维细胞暴露于试剂的48小时内抑制成纤维细胞的增殖至少30%。在某些实施方案中,所述方法包括在成纤维细胞暴露于试剂的72小时内抑制成纤维细胞的增殖至少50%。

[0307] 在某些实施方案中,将成纤维细胞暴露于试剂包括将成纤维细胞暴露于包含试剂的组合物。

[0308] 包含具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的组合物在本文进行了描述。

[0309] 在某些实施方案中,所述组合物包含凝胶、溶液、冲洗剂、乳剂、膏剂、纳米颗粒、微粒和/或脂质体中的一种或多种。

[0310] 在某些实施方案中,所述组合物包含凝胶。在某些实施方案中,所述组合物包含水凝胶。凝胶如本文所述。

[0311] 在某些实施方案中,所述凝胶包含壳聚糖、葡聚糖、碳水化合物聚合物、透明质酸和/或其盐,胶原、羧甲基纤维素、明胶、聚酰化物和藻酸盐中的一种或多种。也可以考虑用于形成凝胶的其他试剂。

[0312] 在某些实施方案中,所述组合物在96小时内提供大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述组合物在72小时内提供大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述组合物在48小时内提供大于90%的所述试剂的释放。在某些实施方案中,所述组合物在24小时内提供大于80%的所述试剂的释放。

[0313] 在某些实施方案中,所述组合物包含所需的释放特性。所述组合物的释放特性如本文所述。

[0314] 在某些实施方案中,所述组合物在3至14天的时间内提供试剂的持续释放。

[0315] 在某些实施方案中,成纤维细胞是人成纤维细胞。在某些实施方案中,成纤维细胞是动物成纤维细胞。

[0316] 在某些实施方案中,成纤维细胞是体外的。例如,所述细胞可以是培养的成纤维细胞。

[0317] 在某些实施方案中,成纤维细胞是体内的。本文描述了将体内成纤维细胞暴露于具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂的方法。

[0318] 在某些实施方案中,成纤维细胞增殖和/或迁移与受试者中粘连的形成有关。

[0319] 在某些实施方案中,成纤维细胞包括在手术部位、靠近手术部位或手术部位附近的成纤维细胞。

[0320] 本公开的某些实施方案提供了用于筛选或识别成纤维细胞增殖和/或迁移的抑制剂的方法。

[0321] 在某些实施方案中,本公开提供了识别成纤维细胞增殖和/或迁移的抑制剂的方法,所述方法包括确定具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂抑制成纤维细胞的增殖和/或迁移的能力,从而识别所述试剂为成纤维细胞增殖和/或迁移的抑制剂。

[0322] 本公开的某些实施方案提供了使用本文所述的筛选方法识别的抗成纤维细胞剂。

[0323] 通过以下实施例进一步描述本公开。应当理解,以下描述仅出于描述特定实施例的目的,而无意于对以上描述进行限制。

[0324] 实施例1—去铁酮抑制成纤维细胞的增殖

[0325] 我们首先选择使用体外增殖试验研究抗氧化剂和铁螯合剂去铁酮对成纤维细胞增殖的作用和时机。

[0326] 1. 材料和方法

[0327] Alamar Blue增殖试验

[0328] 成纤维细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度接种在96孔板(Nunc, 澳大利亚悉尼)中,并在37°C, 5%CO₂下培养24小时。

[0329] 吸出培养基,并将细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤两次。使用了以下处理:

[0330] (i) 无处理对照 (NTC) ——DMEM (Invitrogen, 澳大利亚悉尼), 其含有500U/mL的青霉素、0.5mg/mL的链霉素 (Streptomycin) 和两性霉素 (Amphotericin) B (Sigma-Aldrich, MO), 10%胎牛血清。

[0331] (ii) 5mM的去铁酮, 溶解在对照培养基中。

[0332] (iii) 10mM去铁酮, 溶解在对照培养基中。

[0333] (iv) 20mM去铁酮, 溶解在对照培养基中。

[0334] 在4、24、48和72小时进行读数。在每个时间点吸出培养基, 并加入具有10%Alamar Blue的新鲜对照培养基, 并在黑暗中于37℃5%CO₂中培养6小时。然后根据制造商的说明在570和595nm处读取所述板。

[0335] 2. 结果

[0336] 抗增殖作用

[0337] 使用阿拉马尔蓝 (Alamar Blue) 还原试验测量成纤维细胞的增殖。该试验基于刃天青的使用, 刃天青是一种无毒的、细胞可渗透的化合物, 其颜色为蓝色且无荧光。刃天青被还原为试卤灵 (resorufin), 其为红色且高度荧光的化合物。活细胞不断地将刃天青素转化为试卤灵, 从而增加细胞周围培养基的整体荧光和颜色。

[0338] 结果显示在图1中。数据表明, 去铁酮在抑制成纤维细胞增殖方面具有显著的剂量依赖作用, 如通过双向方差分析 (ANOVA) 所测量。

[0339] 此外, 发现, 增殖的抑制是时间依赖性的, 并且在至少24至72小时的时间段内发生。

[0340] 先前的研究表明, 阻断粘连形成的临界时间间隔主要在初始损伤后的前48小时内, 并且粘连形成的程度取决于在这段时间内对成纤维细胞增殖和迁移的抑制作用。

[0341] 去铁酮至少在24至72小时的测量时间段内抑制成纤维细胞的增殖, 这与阻止粘连形成的临界时间间隔一致。

[0342] 实施例2——去铁酮对原代成纤维细胞迁移的剂量和时间依赖作用

[0343] 使用成纤维细胞伤口愈合方案来研究去铁酮对成纤维细胞迁移的影响。

[0344] 1. 成纤维细胞伤口愈合方案

[0345] 成纤维细胞用CellTrace增殖试剂盒 (Thermo-Fisher Scientific, Life Technologies, CA) 染色, 并制成3x10⁵细胞/mL DMEM (Invitrogen, 澳大利亚悉尼) 的悬浮液, 所述DMEM含有500U/mL青霉素、0.5mg/mL的链霉素和两性霉素B (Sigma-Aldrich, MO)、10%胎牛血清。将70uL该悬浮液接种到Ibidi培养物插入物24 (Ibidi GmbH, 德国慕尼黑) 的每个室插入物中, 并在37℃、5%CO₂下培养12小时。然后用无菌钳取出插入物, 并将细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤两次。

[0346] 使用了以下处理:

[0347] (i) 无处理对照 (NTC) ——DMEM (Invitrogen, 澳大利亚悉尼), 其含有500U/mL的青霉素、0.5mg/mL的链霉素和两性霉素B (Sigma-Aldrich, MO)、10%胎牛血清。

[0348] (ii) 5mM去铁酮, 溶解在对照培养基中。

[0349] (iii) 10mM去铁酮, 溶解在对照培养基中。

[0350] (iv) 20mM去铁酮, 溶解在对照培养基中。

[0351] 在37℃、5%CO₂下实时记录对细胞的影响, 并使用Zeiss LSM700 Confocal (Carl

Zeiss,德国上科亨)以0、8、24和48小时的间隔成像,直至间隙闭合。图像属性:DAPI蓝色信号;405nm激光;线步长2;线平均4;位12;放大0,5;512x512像素;时间序列。

[0352] 结果显示在图2中,其表明了去铁酮在48至72小时内对原代成纤维细胞增殖的剂量和时间依赖作用。与在20mM去铁酮处理过的成纤维细胞(最后一列,20mM去铁酮)中高达48小时的最少封闭相比,原代成纤维细胞在对照细胞(第一列,0mM去铁酮)中48小时后迁移并关闭成纤维细胞中的空隙。

[0353] 这样,我们还发现去铁酮在48小时内抑制了成纤维细胞迁移,这与阻止体内粘连形成的临界时间间隔相一致。

[0354] 实施例3——凝胶制剂和释放特性

[0355] 如W0/2009028965和Paramasivan S, Jones D, Baker L, Hanton L, Robinson S, Wormald PJ, Tan L, Am J Rhinol Allergy 2014, 28, 361中有描述制备水凝胶制剂,并加载20mM的去铁酮(3-羟基-1,2-二甲基吡啶-4(1H)-酮, Sigma Aldrich, Steinheim, 德国)。

[0356] 药物释放:在Falcon管中制备5毫升含去铁酮的凝胶,使其固化,然后添加10ml释放培养基(磷酸盐缓冲盐水, Sigma Aldrich)。将试管在旋转平台上于37℃培养20天。在特定的时间点(0.5、1、2、8、16、24、48、72、96、120、170、220、290、460小时)取0.5ml等分试样,并用新鲜的释放培养基代替。通过从标准曲线内插,分别在280nm和405nm通过UV可见光谱法(Evolution 201UV可见光分光光度计, Thermo Fisher Scientific, Scoresby, VIC, 澳大利亚)对去铁酮的浓度进行定量。

[0357] 数据显示在图3中。释放培养基中的去铁酮的浓度表示为在凝胶中的原始浓度的百分比。

[0358] 去铁酮在48小时内有效地从凝胶中释放。该凝胶提供了用于立即完全释放下铁酮的载体,最大释放发生在48小时后(图3)。大约48-72小时后,去铁酮的释放达到100%。

[0359] 这样,水凝胶制剂提供了一种药物递送系统,该系统促进了去铁酮的释放与阻断体内粘连形成的临界时间间隔相一致。

[0360] 用于粘连的合适的水凝胶为1%琥珀酰-壳聚糖、3%葡聚糖醛(dextran aldehyde)在0.24%磷酸钠缓冲液中,pH 7.4并且包含合适浓度的试剂。

[0361] 实施例4——在绵羊模型中嵌入水凝胶的去铁酮减少了椎板切除术后(post-laminectomy)的粘连

[0362] 椎板切除术后模型用作研究动物中粘连形成的模型。

[0363] 椎板切除术后粘连被认为是术后背痛的重要原因。据信其背后的一种可能机制包括术后血肿的存在以及随后的成纤维细胞向该区域的迁移。然后,成纤维细胞导致粘连形成,对该区域中的感觉神经产生牵引。

[0364] 在这项研究中,我们试图确定水凝胶联合去铁酮在降低椎板切除术后粘连的发生率和严重性方面的作用。

[0365] 方法:

[0366] 使用静脉注射的氯胺酮(ketamine)和地西洋(diazepam)进行诱导,并使用异氟烷(isoflurane)进行维持,对六(6)只美利奴绵羊进行全身麻醉,并使用先前描述的方法将所述绵羊俯卧放置,使压力点在豆袋上被充分保护(Rajiv等人(2013) Acta Neurochirurgica 155 (7):1361-6)以防止间隔综合征(compartment syndrome)。对每只绵羊进行一个20厘米

长的中线后切口,并对椎板进行骨膜下中线解剖。以3个水平去除棘突(spinous processes),并使用高速钻和咬骨钳(rongeurs)结合去除椎板。暴露脊膜并将2ml高岭土与生理盐水混合放置在完整脊膜上。已知高岭土在局部给药后诱导粘连,并且已在硬膜内使用(Wong等人(2012)Neurosurgery.71(2):474-80)。

[0367] 施用高岭土后,将每个部位随机分配为不接受任何东西(对照)、接受具有去铁酮(20mM)的凝胶或具有皮质类固醇(布地奈德,100 μ g/ml)的凝胶。水凝胶如实施例3中所述。

[0368] 然后以分层的方式闭合伤口,以通过溶解薇乔(vicryl)缝合线消除手术死角。使动物恢复。术后5天给予抗生素和全身性非甾体类抗炎药。将动物放回围场3个月,在那里可以自由漫游。在三个月末,对动物进行脊柱MRI检查。对整个脊柱进行矢状和横向自旋回波T1和快速自旋回波T2。脊柱顺序是T1矢状(TR/TE 503/11;厚度3mm)、T2矢状(TR/TE 2830/102;厚度3mm)、STIR矢状(TR/TE 4840/63;厚度3mm)、T2 GRE矢状(TR/TE 750/26;厚度3mm)和T2轴向(TR/TE 6970/118;厚度4mm)。

[0369] 通过使用Rajiv等人(2013)Acta Neurochirurgica 155(7):1361-6使用的评分系统评估硬膜外区域的低强度区域来对纤维化进行评分。每个水平分为15个切片。1级——无异常,2级——小于8片的异常,3级——大于8片但厚度小于1mm的异常,4级——大于8片且厚度大于1mm的异常。

[0370] 在MRI之后,对绵羊进行人道杀害。用高速钻和咬骨钳去除腹侧和背侧肌肉组织,并去除脊椎脊膜和脊髓(cord)之前的骨骼。然后由不了解处理条件的外科医生将鞘囊向前拉。使用Richards等人(2010)Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials.92B:439-46描述的评分系统对遇到的去除阻力进行分级。0级——无粘连;1级——细膜状线,易拆开;2级——轻微粘连,仅需最小限度的钝剥离;3级——中度粘连,需要一些锐剥离;4级——严重粘连,需要广泛的锐剥离。然后将样本固定在福尔马林中并切片和染色以进行组织学检查。使用Richards等人使用的组织学分级系统对粘连进行分级(Richards等人(2010)Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials.92B:439-46)。0级——无粘连,1级——<25%受影响;2级——25-50%受影响;3级——>50%但<100%受影响,4级——致密的100%粘连。

[0371] 样本是福尔马林固定的并嵌入石蜡块中。进行苏木素和曙红染色。

[0372] 在手术后的三个月内,所有绵羊的术后恢复和临床检查均顺利进行。MRI和组织病理学表明,去铁酮凝胶治疗的绵羊在手术后三个月时,没有毒性,并且脊椎旁肌纤维对脊膜的粘连分数明显降低。

[0373] 在对照样本中,在粘连于脊膜表面的肌肉纤维上观察到致密的粘连。还可观察到大量的折射性(refractile)异物,并伴有与巨噬细胞浸润的急性、花样多形核反应(flourid polymorphonuclear reaction)。可见大量的成纤维细胞浸润脊膜。

[0374] 在皮质类固醇组中,粘连具有较少的花样,但仍然很明显。可见大量成纤维细胞浸润脊膜。有明显的多形核反应。

[0375] 在去铁酮组中,与其他两组相比,成纤维细胞向脊膜的迁移明显减少,发炎和粘连较少。脊膜层保持有组织的。

[0376] 结果在图4中定量。发现去铁酮凝胶在减少脊柱手术后体内的粘连形成方面是安全有效的,并且不影响骨骼或脊膜的愈合。

[0377] 结果显示对照手术部位严重粘连,而去铁酮凝胶处理的部位的粘连明显减少(对于未经处理的对照治疗手术部位平均粘连评分为 $93.33\% \pm 10.33$,与之相比,对于皮质类固醇凝胶为 $86.67\% \pm 10.33$,并且与之相比,对于去铁酮凝胶处理的部位为 $66.67\% \pm 10.33$, $P=0.0076$,Kruskal-Wallis)。在任何绵羊中,在骨骼或脊膜的愈合中均未观察到差异。

[0378] 这些结果一起证明了去铁酮凝胶在体内具有强效的抗粘连特性(无毒性)。

[0379] 实施例5——用于减少粘连的医疗产品

[0380] 具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂可用于减少粘连形成的医疗产品中。

[0381] 使用具有所述试剂的凝胶制剂的医疗产品的实例描述如下。

[0382] 1. 用于脊柱手术的产品

[0383] 所述凝胶意于在例如椎板切除术、椎板切开术和/或椎间盘切除术等手术过程之后放置在组织部位。

[0384] 产品可以包含用于与具有铁螯合活性和/或抗氧化剂活性的试剂形成凝胶的一种或多种组分,和/或可以包含与所述试剂预先形成的凝胶。用于形成凝胶或预形成的凝胶的组分通常将以无菌方式提供且仅可单次使用。

[0385] 在使用预先形成的凝胶的情况下,可以将凝胶预加载到注射器中以分配到手术部位。

[0386] 为了在即将施用之前形成凝胶,可以将固体葡聚糖醛与琥珀酰-壳聚糖的溶液以及包含所述试剂(例如去铁酮)的缓冲液混合以产生在0.24%磷酸钠缓冲液pH 7.4中的1%琥珀酰-壳聚糖、3%葡聚糖醛。

[0387] 然后可以将形成的凝胶吸到注射器中。

[0388] 在分配之前,将注射器上的盖移除,并且可以将涂药器尖端固定到注射器上以辅助分配。

[0389] 在主要手术过程之后,并且在即将闭合切口之前,可以施用凝胶以沿其背侧和腹侧表面涂覆脊膜和外叶神经根(exiting nerve root)。该凝胶通常将被施用于椎板切除术/椎板切开术的部位,以将手术部位的深度填充至椎板的腹面的水平。然后根据标准技术实践来结束手术过程。

[0390] 供应的产品/试剂盒可具有以下内容:

[0391] (a) 3至5mL注射器(鲁尔锁(luer lock))-可以预装含凝胶的试剂。

[0392] (b) 涂药器尖端(鲁尔锁)

[0393] (c) 预先形成的含凝胶的试剂,和/或用于形成凝胶的各单独组分(例如,壳聚糖溶液、葡聚糖醛固体/溶液、缓冲液和试剂的储备溶液)。

[0394] (d) 使用说明,包括产品跟踪标签

[0395] 2. 用于肌腱手术的产品

[0396] 包含具有铁螯合剂和/或抗氧化剂的试剂的凝胶可以用于预防由于肌腱和/或周围神经手术(例如肩部和手部手术)而引起的粘连。

[0397] 为了在即将施用之前形成凝胶,可以将固体葡聚糖醛与琥珀酰-壳聚糖的溶液和包含所述试剂(例如去铁酮)的缓冲液混合以产生在0.24%磷酸钠缓冲液pH 7.4中的1%的琥珀酰-壳聚糖、3%的葡聚糖醛。

[0398] 凝胶也可以预先形成。

[0399] 通常,凝胶将由无菌组分制成或以无菌形式提供。

[0400] 外科医生打算将凝胶放置在肌腱和周围神经组织的周围,以减少粘连形成。

[0401] 对于预先装入注射器中供应的预形成的凝胶,要取下注射器盖,并将涂抹器尖端固定到注射器上。

[0402] 对于即将在施用之前形成的凝胶,之后可以将形成的凝胶吸到注射器中并将涂药器尖端固定到注射器上。

[0403] 在肌腱和周围神经修复之后,并且在封闭进入部位切口之前,可以在肌腱和鞘之间以及沿着肌腱和神经以及周围组织的表面,通过用凝胶覆盖组织表面,来施用凝胶。

[0404] 供应的产品/试剂盒可具有以下内容:

[0405] (a) 3至5mL注射器(鲁尔锁)-可以预装含凝胶的试剂。

[0406] (b) 涂药器尖端(鲁尔锁)

[0407] (c) 预先形成的含凝胶的试剂,和/或用于形成凝胶的各单独组分(例如,壳聚糖溶液、葡聚糖醛固体/溶液、缓冲液和试剂的储备液)。

[0408] (d) 使用说明,包括产品跟踪标签。

[0409] 3.在窦手术后使用的窦冲洗剂

[0410] 用于手术后冲洗窦的溶液可通过将溶液施用到鼻和窦而用于减少粘连的形成。去铁酮还具有抗炎特性,特别是对人的鼻上皮细胞和人的鼻窦成纤维细胞具有抗炎特性,这有助于在窦手术后使用冲洗剂进行处理。

[0411] 提供的产品/试剂盒可具有以下内容:

[0412] (a) 用于溶解的固体铁螯合剂和/或抗氧化剂;和/或

[0413] (b) 含有铁螯合剂和/或抗氧化剂的预形成的冲洗溶液(通常含有1-2%的盐和任选地缓冲液);以及任选地

[0414] (c) 挤压瓶或注射器;和/或

[0415] (d) 使用说明。

[0416] 实施例6——筛选用于减少粘连的治疗剂

[0417] 用于研究候选试剂减少粘连的能力的筛选试验的一个实施方案如下:

[0418] (i) 可以如实施例1和2中所述研究候选试剂抑制成纤维细胞增殖和/或迁移的能力。

[0419] (ii) 对于发现的具有抑制成纤维细胞增殖和/或迁移能力的候选试剂,可以生产含有该候选试剂的组合物,例如含有该试剂的凝胶组合物,用于在动物的粘连模型中进行测试,例如在实施例4中所述。

[0420] (iii) 在动物模型中具有抑制粘连能力的候选试剂可能是用于减少粘连的治疗试剂。此类试剂可进行进一步的安全性和有效性试验。

[0421] 应当理解,可以将测试候选试剂抑制成纤维细胞增殖和/或迁移能力的步骤用作预筛选步骤,并且可以在动物模型中直接测试候选试剂。

[0422] 实施例7——去铁酮对人原代鼻成纤维细胞和人原代鼻上皮细胞的作用

[0423] 1.方法

[0424] 研究人群

[0425] 该研究得到了伊丽莎白女王医院人类伦理委员会 (Queen Elizabeth Hospital Human Ethics Committee) 的批准,并获得了组织收集和临床信息使用的所有参与者的书面知情同意。招募至该研究的患者包括接受内窥镜鼻窦手术治疗CRS的患者。排除标准包括主动吸烟、年龄小于18岁、怀孕和全身性疾病(免疫抑制疾病)。

[0426] 体外收获和培养原代人鼻成纤维细胞。

[0427] 从鼻旁窦粘膜活检鼻窦组织,并将其转移至具有2ml达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's medium;DMEM,Invitrogen,UK) 的6孔培养板并进行培养,所述培养基补充有1:100L-谷氨酰胺、10%胎牛血清 (FBS,Sigma-Aldrich)、1:100的抗坏血酸2-磷酸酯和1:100的青霉素链霉素 (Gibco,Life Technologies)。每2-3天,用1ml磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 轻轻清洗组织,并将该培养基用1.5ml新鲜培养基更换,直到大约2周后成纤维细胞融合为止。

[0428] 成纤维细胞的纯化

[0429] 一旦融合,将成纤维细胞用2ml PBS洗涤,胰蛋白酶消化并收集,然后在400×g离心8分钟。除去上清液,将沉淀 (pellet) 连同50μl免疫磁珠上皮富集液 (Dynabeads Epithelial Enrich) (Invitrogen,USA) 一起重悬于1ml PBS中。将试管包裹在石蜡膜中,并在室温 (RT) 下置于转子混合器上20分钟。将含有成纤维细胞的上清液转移至T25组织培养瓶中,弃去含有剩余珠的试管。

[0430] 体外收获和培养人鼻上皮细胞

[0431] 在Ramezanzpour等人 (2016) “Th17 cytokines disrupt the airway mucosal barrier in chronic rhinosinusitis”*Mediators of inflammation*;2016:9798206.doi:10.1155/2016/9798206描述的方法中,通过轻轻刷洗从鼻息肉中收获原代人鼻上皮细胞 (HNEC)。将提取的细胞悬浮在补充有2%Ultrosor G (Pall Corporation,Port Washington,NY,USA) 的支气管上皮生长培养基 (BEGM,CC-3170,Lonza,Walkersville,MD,USA) 中。使用抗CD68 (Dako,Glostrup,Denmark) 涂覆的培养皿清除细胞悬浮液中的巨噬细胞,并将HNEC用B-ALI™生长培养基 (Lonza,Walkersville,USA) 保持在胶原涂覆的烧瓶 (Thermo Scientific,Waltham,MA,USA) 中,所述烧瓶位于37℃,5%CO₂的细胞培养箱中。

[0432] 气液界面培养

[0433] HNEC生长直到80%融合,然后收获,以每孔5×10⁴细胞的密度接种到涂覆有胶原的6.5mm可渗透Transwell板 (BD Biosciences, San Jose, California, USA) 上。将细胞用B-ALI™生长培养基在37℃,5%CO₂的细胞培养箱中保持2-3天。接种后第3天,除去顶端 (apical) 培养基,并用B-ALI™分化培养基代替基础培养基,使顶端细胞表面暴露于大气中。气液界面处的人鼻上皮培养物 (HNEC-ALI) 最少要维持14天用于形成紧密连接部,维持28天生成纤毛。

[0434] 细胞毒性研究

[0435] 人原代成纤维细胞或上皮细胞分别在DMEM和BEGEM (Lonza,Walkersville,USA) 培养基中生长。在进行细胞毒性研究之前,将细胞保持在37℃,5%CO₂的全湿培养箱中。在不同的时间将细胞暴露于不同浓度的去铁酮 (3-羟基-1,2-二甲基-4 (1H)-吡啶酮, Sigma, USA), 然后用细胞毒性试验试剂盒 (Promega, Madison, U.S.) 测定乳酸脱氢酶 (LDH)。简而言之,将来自每个孔的50μL上清液与50μL LDH试剂混合,并在黑暗中于室温培养30分钟。在

FLUOstar OPTIMA板读数仪(BMG Labtech,Ortenberg,Germany)上在490nm测量光密度(OD)。以三个独立的实验进行细胞培养研究。

[0436] 伤口愈合(迁移)试验

[0437] 在成纤维细胞伤口闭合试验中,将成纤维细胞接种在24孔板中,用CellTrace™紫罗兰(Invitrogen/Life Technologies,USA)染色,并在24小时内得到80%的融合。使用200 μ l移液管尖端,通过成纤维细胞和HNEC-ALI细胞单层向下做出直线垂直划痕。小心吸出培养基和细胞碎片,并将每个孔中加入了具有不同浓度去铁酮(1mM、5mM、10mM、20mM)的培养基或仅加入了培养基(阴性对照)培养72小时。在零时刻,用1 μ g/ml丝裂霉素(Accord Healthcare Inc,NDC 16729-108-11,USA)处理细胞以抑制细胞增殖。使用时延LSM700共聚焦扫描激光显微镜(Zeiss Microscopy,德国)记录伤口闭合(细胞迁移),每4小时在一个温度和CO₂受控的室内记录一次图像。使用ImageJ分析数据。

[0438] 增殖试验

[0439] 在24孔板中以 0.5×10^6 细胞/ml建立成纤维细胞,并培养过夜以使其粘连。在37℃,5%CO₂中,用不同浓度的去铁酮(1mM,5mM,10mM,20mM)处理细胞48小时。通过胰蛋白酶消化来收获细胞,然后将细胞在-20℃用3ml冰冷的70%乙醇固定过夜。将细胞沉淀重悬于在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的1ml混合溶液(20 μ g/ml碘化丙锭(PI)和200 μ g/ml核糖核酸酶(RNase)(R-5503,Sigma,美国)在0.1%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)中)并在黑暗中于室温培养30分钟。使用BD FACSCanto™II流式细胞仪分析样品。

[0440] 酶联免疫吸附试验(ELISA)

[0441] 分别在存在/不存在促炎剂聚肌胞苷酸(Poly(I:C))(10 μ g/ml)或IL-1 β (10ng/ml Sigma,Saint Louis,USA)的情况下,暴露于不同浓度的去铁酮24小时后,从HNEC和成纤维细胞中收集上清液。根据制造商的说明,使用大鼠抗人IL-6抗体(BD Biosciences,New Jersey,USA),用ELISA试剂盒评估白介素6(IL-6)蛋白水平。所有测量均使用FLUOstar OPTIMA板读数仪(BMG Labtech,Ortenberg,Germany)进行一式两份。从标准曲线来计算组织样品浓度并校正蛋白质浓度。

[0442] 胶原试验

[0443] 将原代人鼻成纤维细胞以在DMEM中生长的 5×10^5 的密度接种到24孔组织培养板中直至融合。在存在/不存在L-抗坏血酸2磷酸酯(100mM)(113170-55-1,Sigma-Aldrich)的情况下,在DMEM中以1mM、5mM、10mM和20mM的去铁酮刺激各重复的孔48小时。处理后,收集上清液,并使用前胶原I型C肽ELISA试剂盒(Takara Bio Inc,Otsu,日本)测量I型胶原的蛋白水平。实验过程遵循制造商的说明。简而言之,将20 μ l的培养基和100 μ l的抗体-POD共轭溶液依次添加到微量滴定板中,并在37℃反应3小时。用洗涤缓冲液(1x PBST)洗涤4次后,添加100 μ l底物溶液,在室温下培养15分钟。最后,添加终止液(100 μ l),并使用FLUOstar OPTIMA板读数仪(BMG Labtech,Ortenberg,德国)在450nm记录相应吸光度。

[0444] 统计分析

[0445] 数据以平均值 $\pm$ SEM表示。使用t检验进行统计分析,并使用ANOVA进行所有其他分析,然后使用SPSS(版本22)进行Tukey的HSD事后检验。使用Microsoft Excel 2010和Graphpad Prism v 5进行数据处理和统计分析。

[0446] 2.结果

[0447] 去铁酮的体外细胞毒性

[0448] 通过LDH试验测定不同浓度的去铁酮(1mM、5mM、10mM、20mM)的细胞毒性效应,来评估HNEC(图5A)和成纤维细胞(图5B)随时间的存活率。不同的暴露时间(1h、2h、3h、4h、5h和6h)显示,在HNEC或成纤维细胞中用任何浓度去铁酮,LDH的释放均没有显著增加($p>0.05$)。阳性对照(0.5%聚乙二醇辛基苯基醚(Tritonx-100))和阴性对照(培养基)显示了预期毒性值。

[0449] 去铁酮对人鼻上皮细胞和原代成纤维细胞体外迁移的影响。

[0450] 为了检查去铁酮对鼻窦伤口体外再密封的影响,在主动伤口闭合过程中进行了时程研究。在划痕试验中,用不同浓度的去铁酮或阴性对照处理HNEC-ALI培养物和原代成纤维细胞。在HNEC-ALI培养物中,未经处理的(对照)伤口在68小时后伤口愈合,完全表皮细胞再生。用四种不同浓度的去铁酮培养长达68小时并未显示出任何明显的伤口愈合延迟(图6A)。未经处理的原代成纤维细胞在44小时后使伤口闭合。用20mM去铁酮培养导致在28小时以及随后测量的所有时间点的显著延迟的伤口闭合。此外,较低的10mM和5mM的去铁酮浓度显著延迟44小时后的愈合(图6B)。

[0451] 去铁酮对人鼻上皮细胞和人鼻窦成纤维细胞中炎症应答的影响

[0452] 为了确定去铁酮减弱促炎应答的潜能,分别在存在或不存在促炎剂聚肌胞苷酸(Poly(I:C))或IL-1 β 的情况下,将不同浓度的去铁酮应用于HNEC或成纤维细胞。使用布地奈德作为护理对照的抗炎标准,在存在促炎剂的情况下,布地奈德明显降低了HNEC($p=0.03$)和成纤维细胞($p=0.001$)中的IL-6。在HNEC中,与阴性对照相比,在聚肌胞苷酸(Poly(I:C))LMW的存在下,应用10mM和20mM的去铁酮24小时显著降低了IL-6蛋白浓度(分别降低80%, $p=0.001$ 和降低96%, $p=0.0001$)(图7A)。相反,在存在或不存在IL-1 β 的情况下24小时后,去铁酮未改变鼻成纤维细胞中IL-6的分泌(图7B)。

[0453] 这些研究表明,去铁酮具有抗炎特性,这将有助于粘连的治疗,特别是用于鼻窦手术后粘连的治疗。

[0454] 去铁酮对原代鼻成纤维细胞胶原释放的影响

[0455] 应用不同浓度的去铁酮24小时显著降低了源自CRS患者的成纤维细胞单层的上清液中的胶原蛋白浓度($p<0.0001$)(图8A)。另外,在L-抗坏血酸-2磷酸酯(ASC)(已知其用于诱导成纤维细胞产生胶原)的存在下,将不同浓度的去铁酮施用至成纤维细胞。在ASC的存在下,去铁酮以剂量依赖性方式显著抑制胶原的分泌(图8B)。

[0456] 尽管已经参考特定实施方案描述了本公开,但是应当认识到,本公开可以以许多其他形式实现。还应当认识到,本文所述的公开内容除了具体描述的内容之外还可以进行变化和修改。应当理解,本公开包括所有这样的变化和修改。本公开还单独地或共同地包括在本说明书中提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及任何两个或更多个步骤或特征的任何和所有组合。

[0457] 此外,应注意,如本文所用,单数形式的“一”、“一个”和“所述”包括复数方面,除非上下文已经另外指出。

[0458] 在整个说明书中,除非上下文另外要求,否则词语“包括”或例如“含有”或“包含”等变体将被理解为暗示包括陈述的元素或整数或者元素组或整数组但不排除任何其他元素或整数或者元素组或整数组。

[0459] 在本说明书中对任何现有技术的提及不是,也不应被视为承认或以任何形式暗示该现有技术构成任何国家的公知常识的一部分。

[0460] 本文使用的主题标题仅是为了便于读者参考而包括的,并且不应用来限制在整篇公开或权利要求书中发现的主题。不应将本主题标题用于解释权利要求的范围或用于权利要求的限制。

[0461] 本文提供的描述涉及可以共享共同的特点和特征的若干实施方案。应该理解,一个实施方案的一个或多个特征可以与其他实施例的一个或多个特征结合。另外,实施方案的单个特征或特征的组合可以构成附加的实施方案。

[0462] 除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序执行。除非另外要求,否则本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(如“例如”)的使用仅旨在更好地阐明示例实施方案,并且不对所要求保护的发明的范围构成限制。说明书中的语言不应解释为指明任何未要求保护的要素为必不可少的。

[0463] 可以基于本申请,例如通过要求来自本申请的优先权、通过要求分案状态和/或通过要求继续状态来提交未来专利申请。应当理解,所附权利要求仅以示例的方式提供,并且无意于限制任何可能在此类未来申请中所要求保护的范围。权利要求也不应视为限制对本公开的理解(或排除对本公开的其他理解)。以后可能会在示例权利要求中添加或删除特征。

[0464] 尽管已经参考特定实施例描述了本公开,但是本领域技术人员应理解,可以以许多其他形式来实现本公开。

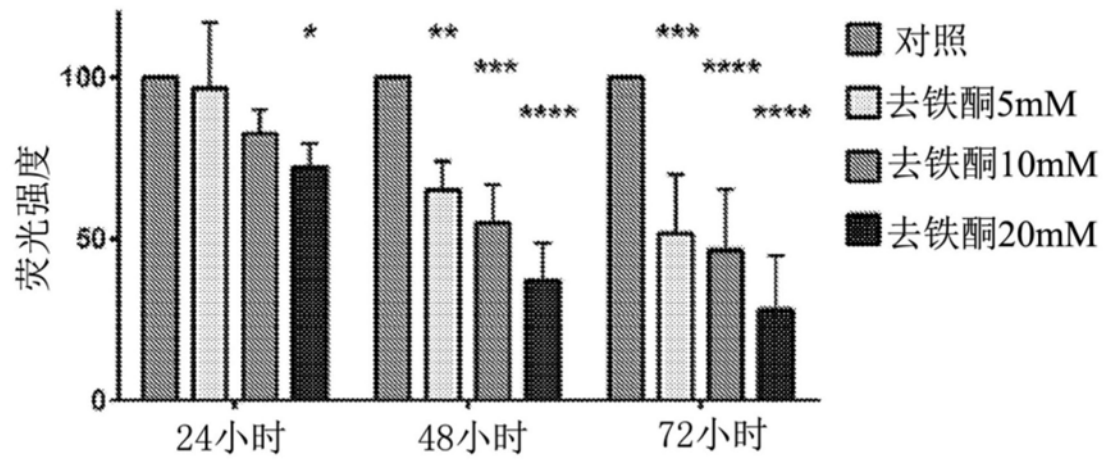


图1

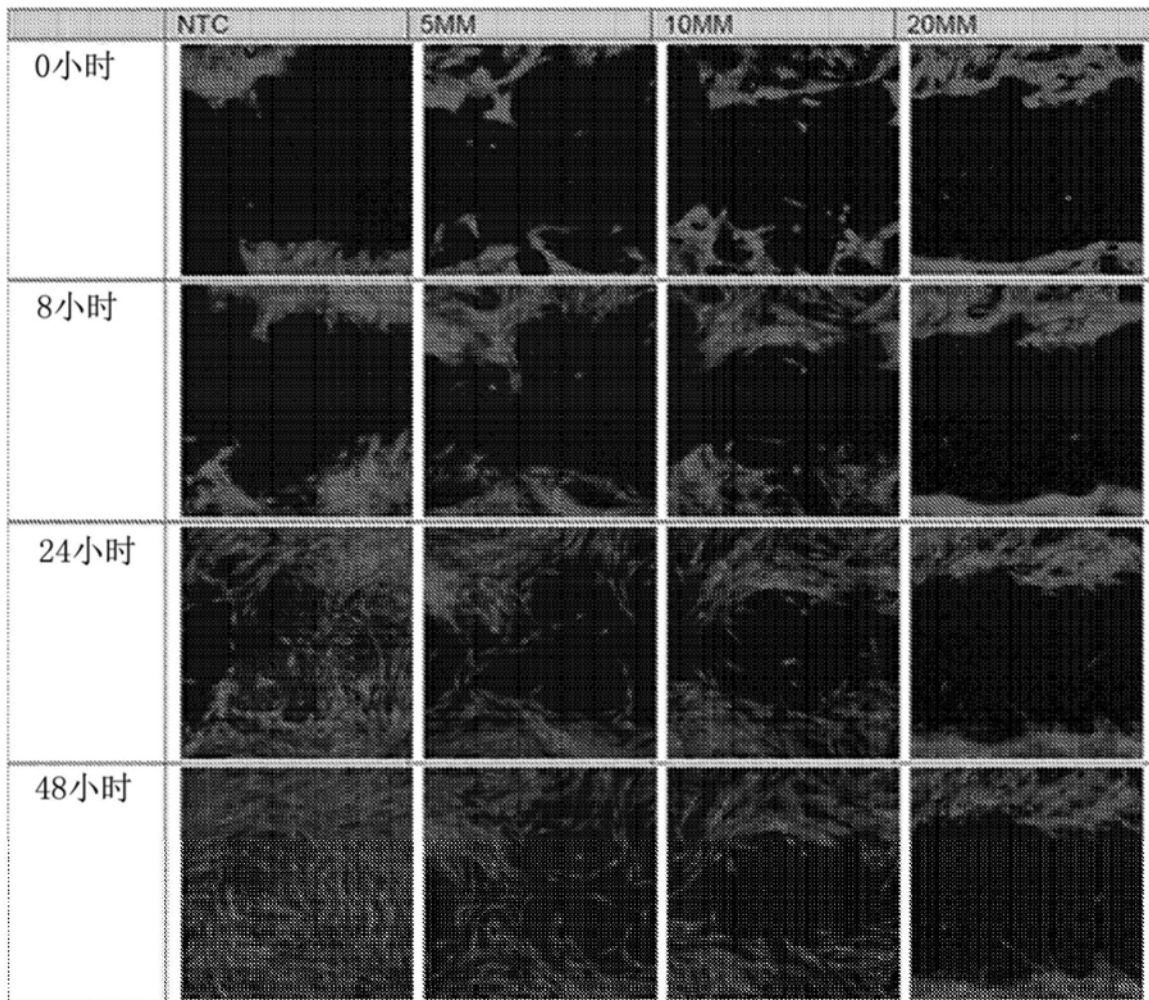


图2

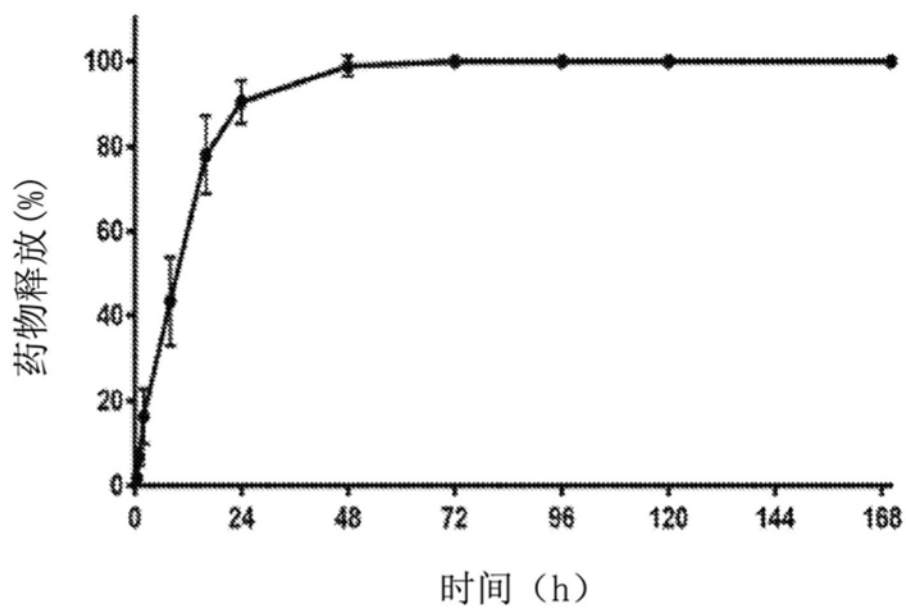


图3

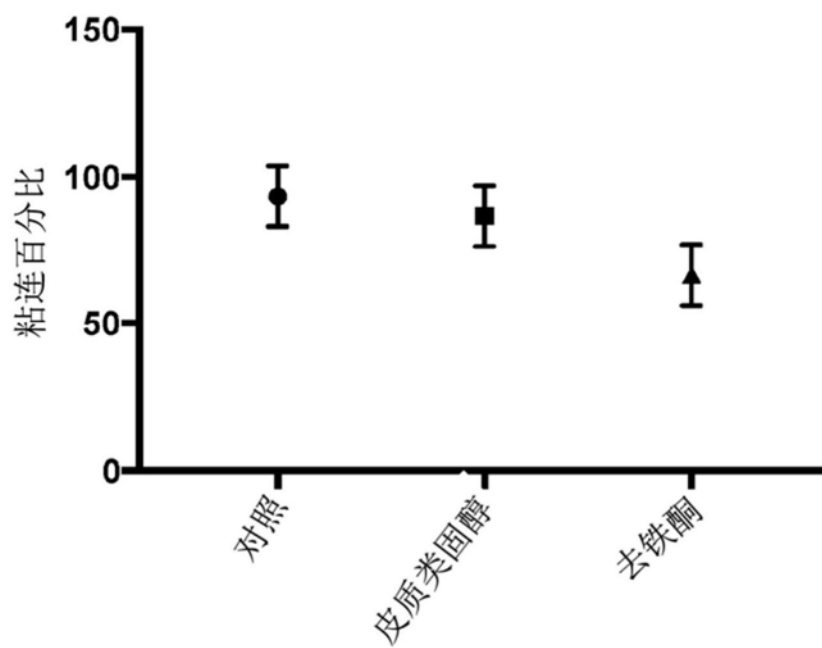


图4

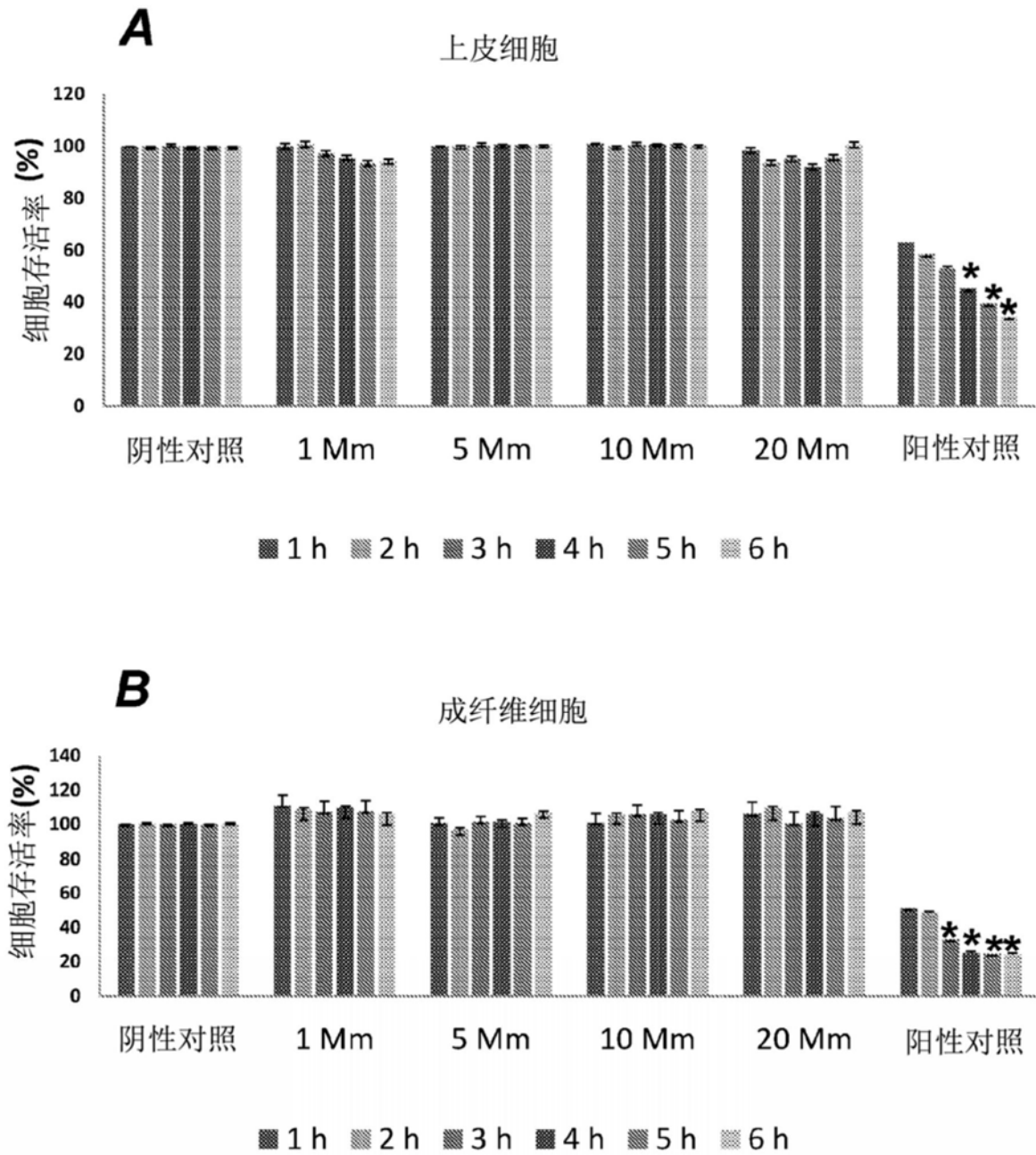


图5

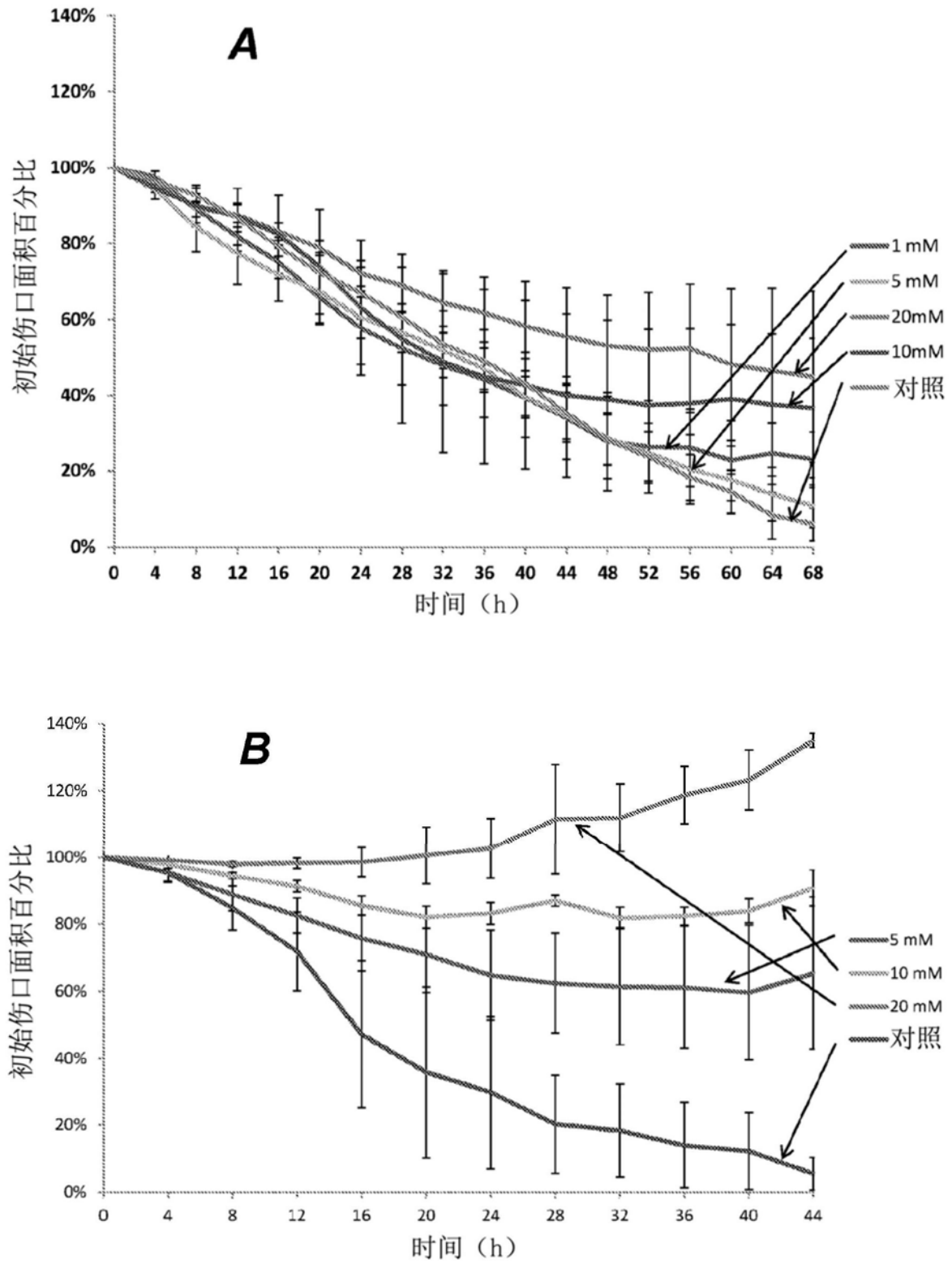


图6

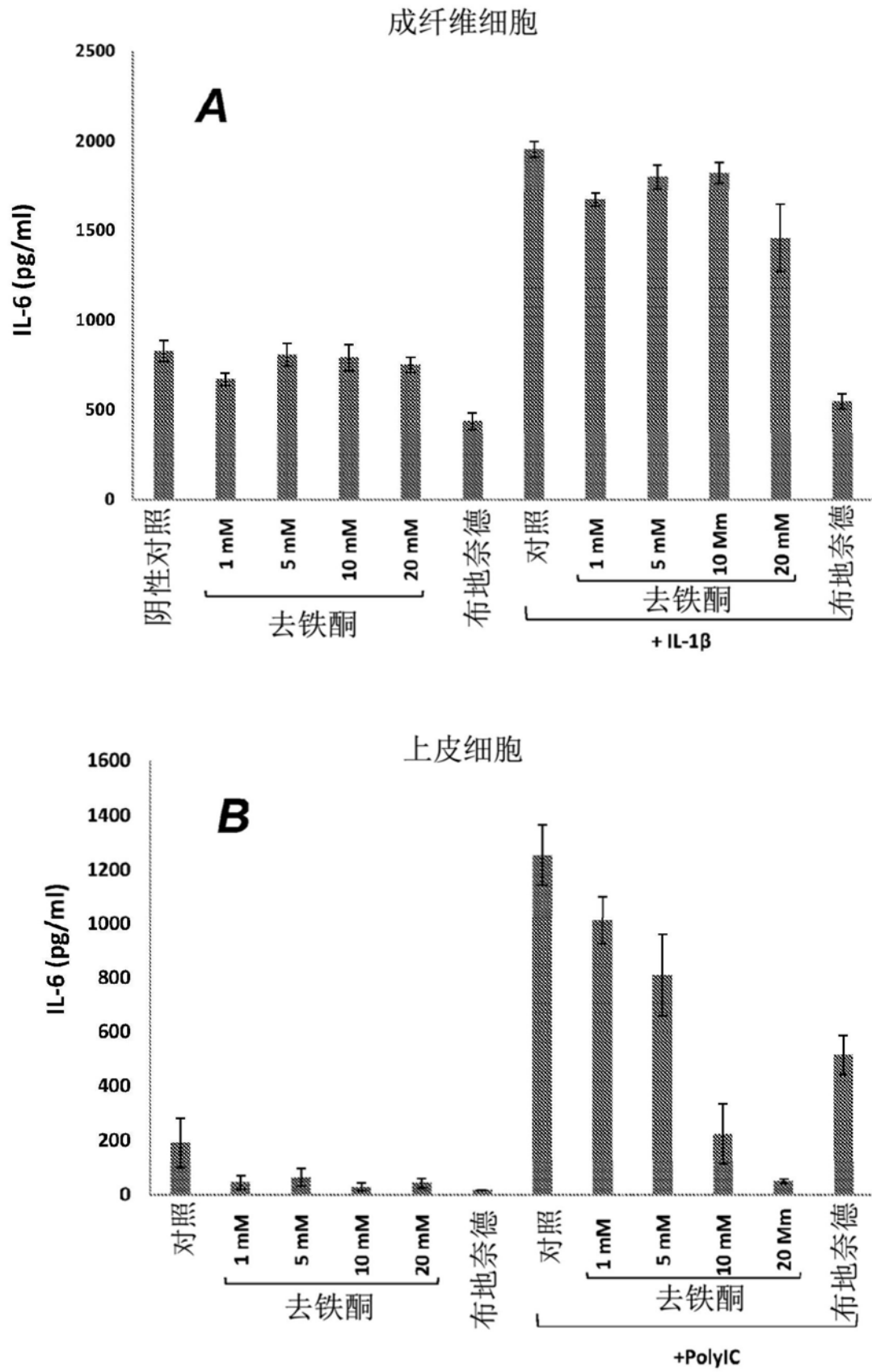


图7

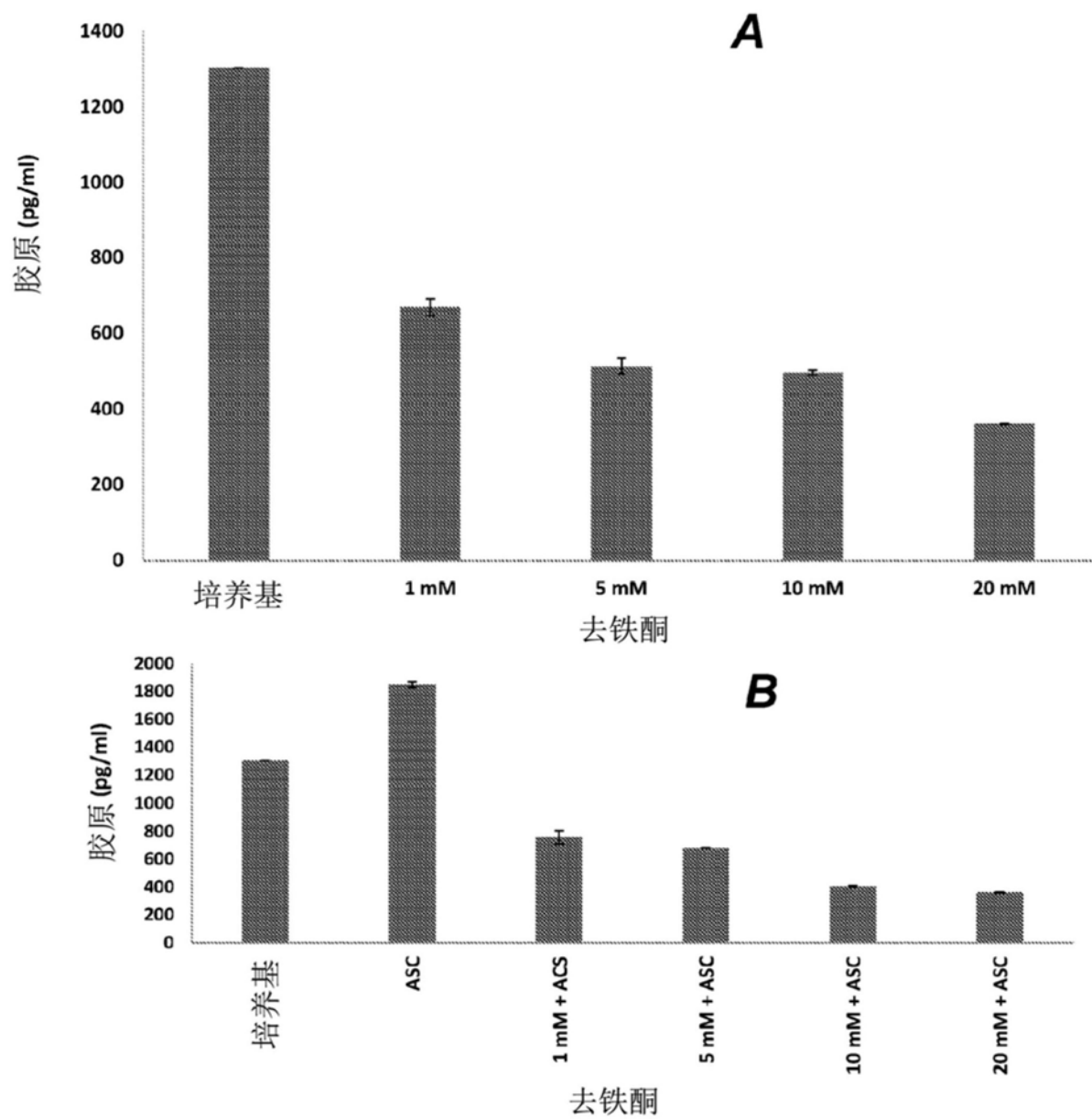


图8