



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107106695 B

(45) 授权公告日 2021.02.23

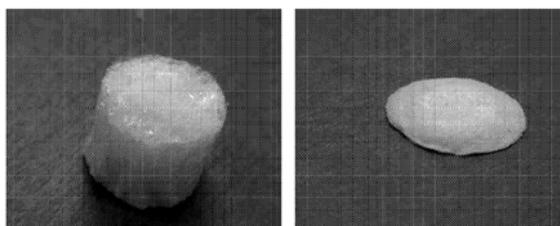
(21) 申请号 201580054031.8  
 (22) 申请日 2015.08.05  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107106695 A  
 (43) 申请公布日 2017.08.29  
 (30) 优先权数据  
 62/033599 2014.08.05 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2017.04.05  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2015/043789 2015.08.05  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02016/022670 EN 2016.02.11  
 (73) 专利权人 孟斐斯大学  
 地址 美国田纳西州  
 专利权人 笑微生物公司  
 (72) 发明人 G.L. 鲍林 I.A. 罗德里格斯  
 B.W. 伯格  
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
 司 72001  
 代理人 刘辛 万雪松

(51) Int.Cl.  
 A61K 47/42 (2017.01)  
 A61K 47/36 (2006.01)  
 A61K 9/70 (2006.01)  
 A61K 35/644 (2015.01)  
 A61P 17/00 (2006.01)  
 A61P 19/00 (2006.01)  
 (56) 对比文件  
 GB 2484319 A, 2012.04.11  
 CN 1994274 A, 2007.07.11  
 CN 101283783 A, 2008.10.15  
 CN 1077630 A, 1993.10.27  
 CN 1140089 A, 1997.01.15  
 CN 1709502 A, 2005.12.21  
 GB 2484319 A, 2012.04.11  
 Anyarat Watthanaphanit et al..Fabrication, Structure, and Properties of Chitin Whisker-Reinfor. 《Journal of Applied Polymer Science》.2008,第110卷第890-899页.  
 审查员 彭翠莲

权利要求书3页 说明书18页 附图12页

(54) 发明名称  
 用于增强骨和软组织的愈合和再生的组合物和方法

(57) 摘要  
 本发明的特征在于生物可降解材料,以及使用这些组合物促进骨和软组织生长和愈合的体外和体内方法。



非压缩和压缩明胶+ 10%CW + 30mg/mL蜂蜜海绵的一般大体外观的DinoLite图像。可以将海绵制备成任何尺寸(取决于模具)并随后压缩。

1. 一种组合物,其包含:
  - a) 100重量份的生物可降解聚合物,其中所述生物可降解聚合物包含胶原蛋白或明胶;
  - b) 蜂蜜,其中相对于100重量份的生物可降解聚合物,所述蜂蜜的存在量为1-300重量份;和
  - c) 填料,其中相对于100重量份的生物可降解聚合物,所述填料的存在量为1-300重量份,其中所述填料包括羟基磷灰石或几丁质晶须。
2. 权利要求1的组合物,其中所述生物可降解聚合物包含明胶。
3. 权利要求1的组合物,其中所述生物可降解聚合物包含胶原蛋白。
4. 权利要求1的组合物,其中所述填料包括几丁质晶须。
5. 权利要求1的组合物,其中所述填料包含羟基磷灰石。
6. 权利要求4的组合物,其中相对于100重量份的生物可降解聚合物,所述几丁质晶须的存在量为15重量份。
7. 权利要求4的组合物,其中所述几丁质晶须具有25-75nm的平均直径。
8. 权利要求4的组合物,其中所述几丁质晶须具有50nm的平均直径。
9. 权利要求4的组合物,其中所述几丁质晶须具有200-400nm的平均长度。
10. 权利要求4的组合物,其中所述几丁质晶须具有250-300nm的平均长度。
11. 权利要求4的组合物,其中所述几丁质晶须具有280nm的平均长度。
12. 权利要求4的组合物,其中所述几丁质晶须具有3 $\mu$ m或更小的平均直径。
13. 权利要求4的组合物,其中所述几丁质晶须具有1 $\mu$ m或更小的平均直径。
14. 权利要求1的组合物,其中相对于100重量份的生物可降解聚合物,所述蜂蜜的存在量为1重量份至15重量份。
15. 权利要求1的组合物,其中相对于100重量份的生物可降解聚合物,所述蜂蜜的存在量为5重量份至10重量份。
16. 权利要求1的组合物,其还包含至少一种另外的填料或至少一种另外的抗生素。
17. 权利要求5的组合物,其中所述羟基磷灰石具有1nm至10 $\mu$ m的平均直径。
18. 一种膜,包括:
  - a) 100重量份的生物可降解聚合物,其中所述生物可降解聚合物包含明胶或胶原蛋白;
  - b) 蜂蜜,其中相对于100重量份的生物可降解聚合物,所述蜂蜜的存在量为1-300重量份;和
  - c) 填料,其中相对于100重量份的生物可降解聚合物,所述填料的存在量为1-300重量份,其中所述填料包括羟基磷灰石或几丁质晶须。
19. 一种多层膜,其包含至少两层权利要求18的膜。
20. 根据权利要求19所述的多层膜,其中所述多层膜包含2-4层权利要求18的膜。
21. 根据权利要求19所述的多层膜,其中所述多层膜包含四层权利要求18的膜。
22. 根据权利要求19所述的多层膜,其中所述至少两层是交联的。
23. 根据权利要求22所述的多层膜,其中所述至少两层与1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、京尼平或戊二醛交联。
24. 一种制备权利要求1的组合物的方法,所述方法包括:
  - a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;和

b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合以形成权利要求1的组合物。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述溶剂是2,2,2-三氟乙醇、1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFP)或9:1的乙酸:水。

26. 一种纤维, 包含:

a) 100重量份的生物可降解聚合物, 其中所述生物可降解聚合物包含明胶或胶原蛋白;

b) 蜂蜜, 其中相对于100重量份的生物可降解聚合物, 所述蜂蜜的存在量为1-300重量份; 和

c) 填料, 其中相对于100重量份的生物可降解聚合物, 所述填料的存在量为1-300重量份, 其中所述填料包括羟基磷灰石或几丁质晶须。

27. 制备根据权利要求26所述的纤维的方法, 所述方法包括:

a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合以形成组合物; 和

c) 静电纺丝所述组合物以形成权利要求26的纤维。

28. 一种制备权利要求18的膜的方法, 所述方法包括:

a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合以形成组合物; 和

c) 静电纺丝所述组合物以形成纤维, 从而形成权利要求18的膜。

29. 一种制备权利要求18的膜的方法, 所述方法包括:

a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合;

c) 从分散体中除去溶剂以形成海绵; 和

d) 压缩所述海绵以形成权利要求18的膜。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述压缩步骤包括在至少3000磅的压力下压缩所述海绵。

31. 根据权利要求29所述的方法, 还包括加工所述膜以形成块、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或压缩膜。

32. 一种多层膜, 包括:

a) 100重量份的生物可降解聚合物, 其中所述生物可降解聚合物包含胶原蛋白或明胶;

b) 蜂蜜, 其中相对于100重量份的生物可降解聚合物, 所述蜂蜜的存在量为1-300重量份; 和

c) 填料, 其中相对于100重量份的生物可降解聚合物, 所述填料的存在量为1-300重量份, 其中所述填料包括羟基磷灰石或几丁质晶须。

33. 制备权利要求32的多层膜的方法, 所述方法包括:

a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合;

c) 静电纺丝所述组合物以形成纤维;

d) 收集所述纤维以形成至少两个非织造网眼膜; 和

e) 使所述至少两个非织造网眼膜贴在一起以形成权利要求32的多层膜。

34. 权利要求1的组合物、或权利要求18的膜、或权利要求19的多层膜、或权利要求26的

纤维或权利要求32的多层膜在制备用于促进骨再生的产品中的用途,包括使骨表面与所述产品接触。

35. 权利要求1的组合物、或权利要求18的膜、或权利要求19的多层膜、或权利要求26的纤维或权利要求32的多层膜在制备用于促进骨缺损愈合的产品中的用途,包括使骨缺损与所述产品接触。

36. 权利要求1的组合物、或权利要求18的膜、或权利要求19的多层膜、或权利要求26的纤维或权利要求32的多层膜在制备用于预防骨缺损感染的产品中的用途,包括使骨缺损与所述产品接触。

37. 权利要求1的组合物、或权利要求18的膜、或权利要求19的多层膜、或权利要求26的纤维或权利要求32的多层膜在制备用于在受损组织中促进软组织愈合的产品中的用途,包括使受损组织与所述产品接触。

38. 权利要求1的组合物、或权利要求18的膜、或权利要求19的多层膜、或权利要求26的纤维或权利要求32的多层膜在制备用于促进组织中的巨噬细胞响应的产品中的用途,包括使所述组织与所述产品接触。

## 用于增强骨和软组织的愈合和再生的组合物和方法

### 背景技术

[0001] 临床上,上颌骨和下颌骨中的骨吸收发生在齿列损失后。部分无齿影响40%的成年人群,并且估计在未来15年将增加到超过2亿人(*Facts and Figures*. 2012, American College of Prosthodontics)。在此情况下,骨吸收导致牙槽嵴在宽度和高度上减小,在牙齿损失后的第一年期间发生骨宽度减少50%,其中三分之二发生在最初的3个月(Schropp, L.等, *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2003. 23(4):第313-23页)。这样的结果是,在用牙植入物恢复患者齿列之前,需要单独的手术来替换这种损失的骨结构。有各种外科手术可用于移植高度和宽度上的缺损牙槽嵴。为此,将骨移植物,通常是同种异体移植骨粉/颗粒或块放置在空隙空间中,以提供用于靶向骨再生的骨传导性/骨诱导性信号。许多这些手术利用导向骨再生(GBR)膜将骨移植物以及软组织保持在适当位置。迄今为止,尚未开发用于大缺损的牙槽嵴骨移植的“理想”GBR膜(Bottino, M.C.等, *Dent Mater*, 2012. 28(7):第703-21页; Dimitriou, R.等, *BMC Med*, 2012. 10:第81页)。

[0002] 用作牙齿拔除中的膜屏障的目前的生物材料通常难以处理,快速降解,并且不提供增强的伤口再生,其对于在骨移植物上的组织完全和及时闭合是至关重要的。迫切需要一种能够支持骨生长、促进骨和软组织愈合并抑制感染的生物可降解材料。这种材料可用于治疗影响骨和软组织的损伤、病症和失调。

### 发明内容

[0003] 如本文所述,本发明的特征在于生物可降解屏障材料和使用这些材料促进骨和软组织生长和愈合的体外和体内方法。

[0004] 一方面,本发明提供一种组合物,其包含:

[0005] a) 生物可降解聚合物;和

[0006] b) 蜂蜜。

[0007] 在某些实施方案中,所述组合物另外包含c) 填料。

[0008] 在某些实施方案中,所述生物可降解聚合物包含蛋白。在某些实施方案中,所述蛋白是明胶。在某些实施方案中,所述蛋白是胶原蛋白。

[0009] 在某些实施方案中,所述生物可降解聚合物包含聚(乳酸)。

[0010] 在某些实施方案中,相对于100重量份的生物可降解聚合物例如明胶,蜂蜜的存在量为约1重量份至约300重量份。在某些实施方案中,相对于100重量份的生物可降解聚合物例如明胶,蜂蜜的存在量为约1重量份至约100重量份,约1重量份至约50重量份,约1重量份至约15重量份,或特别是约5重量份至约10重量份。

[0011] 在某些实施方案中,相对于100重量份的生物可降解聚合物,填料的存在量为1-300重量份。优选地,填料的存在量为约1-100重量份,5-50重量份,或特别是10-20重量份。

[0012] 在某些实施方案中,填料包括纳米填料、微细填料或其混合物。纳米填料的纳米级的平均直径范围为约1nm至约999nm,或小于约1 $\mu$ m。在某些实施方案中,纳米填料适当地具有小于约990nm,小于约900nm,小于约800nm,小于约700nm,小于约600nm,小于约500nm,小

于约400nm,小于约300nm,小于约200nm,或小于约100nm的平均直径。在某些实施方案中,纳米填料适当地具有约1-100nm,约10-80nm,约25-75nm,或特别是约50nm的平均直径。微细填料是微米尺寸的填料,其具有至少约1 $\mu$ m的微米级的平均直径。微细填料适宜地具有约小于约10 $\mu$ m,小于约9 $\mu$ m,小于约8 $\mu$ m,小于约7 $\mu$ m,小于约6 $\mu$ m,小于约5 $\mu$ m,小于约4 $\mu$ m,小于约3 $\mu$ m,小于约2 $\mu$ m,或特别是约1-2 $\mu$ m的平均直径。

[0013] 在某些实施方案中,所述填料包含几丁质晶须。在某些实施方案中,所述填料包含羟基磷灰石。在某些实施方案中,相对于100重量份的生物可降解聚合物,填料(例如几丁质晶须)的存在量为约15重量份。在某些实施方案中,几丁质晶须具有约25-75nm的平均直径,或特别是约50nm的平均直径。在某些实施方案中,几丁质晶须的平均长度为约200-400nm,约250-300nm,或特别是约280nm。

[0014] 在某些实施方案中,所述组合物还包含至少一种或多种额外的填料或至少一种或多种治疗剂,例如抗生素。在某些实施方案中,所述治疗剂是治疗有效量的蜂蜜。在具体实施方案中,所述组合物还包含相对于100重量份生物可降解聚合物范围为约50重量份至约300重量份,或约100重量份至约200重量份的抗菌有效量的蜂蜜。在具体实施方案中,所述组合物还包含有效量的蜂蜜,用于刺激或增强再生(细胞增殖和迁移),其范围为约10重量份至约100重量份,约20重量份至约70重量份,或特别是约50重量份,相对于100重量份的生物可降解聚合物。用于治疗用途的蜂蜜与上述蜂蜜相同或不同。

[0015] 另一方面,本发明提供了一种膜,包括:

[0016] a) 生物可降解聚合物;

[0017] b) 蜂蜜。

[0018] 在某些实施方案中,所述膜可额外包含填料。

[0019] 另一方面,多层膜包含至少两层本发明的膜。

[0020] 在某些实施方案中,所述多层膜包含2-4层本发明的膜。在某些实施方案中,所述多层膜包括四层膜。在某些实施方案中,所述至少两层是交联的。在某些实施方案中,所述至少两层与1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、京尼平、戊二醛或其混合物交联。

[0021] 另一方面,本发明提供了制备本发明组合物(即,包含生物可降解聚合物和蜂蜜的组合物)的方法。该组合物可另外包含填料。该方法包括:通过将生物可降解聚合物和蜂蜜与溶剂结合来形成组合物。

[0022] 优选地,该方法包括:

[0023] a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;和

[0024] b) 将生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合以形成组合物。

[0025] 在某些实施方案中,所述溶剂是2,2,2-三氟乙醇,1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFP)或9:1的乙酸:水。在某些实施方案中,在用于形成和加工组合物、纤维和/或膜的条件所述溶剂不会使蜂蜜显著溶解。

[0026] 另一方面,本发明提供了一种纤维,包括:

[0027] a) 生物可降解聚合物;和

[0028] b) 蜂蜜。

[0029] 所述纤维还可以包含填料。

[0030] 在优选的方面,所述“纤维”可以包括纳米纤维、微纤维或纳米微纤维。所述纤维可

以形成为束,而限于包含所述纳米纤维、微纤维、纳米微纤维或其混合物的数量或其总厚度。在某些实施方案中,纳米纤维具有范围为约1nm至约950nm的纳米级的平均直径或厚度。优选地,纳米纤维适当地具有小于约100nm的平均直径或厚度。微纤维具有范围为约1 $\mu$ m至约950 $\mu$ m的微米级的平均直径或厚度。优选地,微纤维适当地具有约小于约10 $\mu$ m的平均直径或厚度。此外,纳米微纤维适宜地具有范围为约100nm至约10 $\mu$ m的平均直径或厚度。

[0031] 另一方面,本发明提供一种制备纤维的方法,所述纤维包含生物可降解聚合物和蜂蜜。所述纤维可以另外包含填料。该方法包括:

[0032] 通过使生物可降解聚合物和蜂蜜与溶剂结合来形成组合物;和

[0033] 静电纺丝所述组合物以形成纤维。

[0034] 优选地,该方法包括:

[0035] a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

[0036] b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合以形成组合物;和

[0037] c) 静电纺丝所述组合物以形成纤维。

[0038] 另一方面,本发明提供一种制备膜的方法,所述膜包含生物可降解聚合物和蜂蜜。所述膜可以另外包含填料。该方法包括:

[0039] 通过使生物可降解聚合物和蜂蜜与溶剂结合来形成组合物;和

[0040] 静电纺丝所述组合物以形成纤维,从而形成膜。

[0041] 优选地,该方法包括:

[0042] a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

[0043] b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合以形成组合物;和

[0044] c) 静电纺丝所述组合物以形成纤维,从而形成膜。

[0045] 另一方面,本发明提供制备本发明的膜的方法,所述方法包括:

[0046] a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

[0047] b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合;

[0048] c) 从分散体中除去溶剂以形成海绵;和

[0049] d) 压缩海绵以形成膜。

[0050] 在某些实施方案中,压缩步骤包括在至少3000磅的压力下压缩海绵。

[0051] 在某些实施方案中,所述膜被进一步加工以形成块、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或压缩膜。

[0052] 另一方面,本发明提供了一种多层膜,其包含:

[0053] a) 生物可降解聚合物;和

[0054] b) 蜂蜜。

[0055] 所述多层膜还可以包含填料。

[0056] 另一方面,本发明提供制备本发明多层膜的方法,该方法包括:

[0057] 通过使生物可降解聚合物和蜂蜜与溶剂结合来形成组合物;

[0058] 静电纺丝所述组合物以形成纤维;

[0059] 收集纤维以形成至少两个非织造网眼膜;和

[0060] 将所述至少两个非织造网眼膜贴在一起以形成多层膜。

[0061] 优选地,该方法包括:

[0062] a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

[0063] b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合;

[0064] c) 静电纺丝所述组合物以形成纤维;

[0065] d) 收集所述纤维以形成至少两个非织造网眼膜;和

[0066] e) 将所述至少两个非织造网眼膜贴在一起以形成所述多层膜。

[0067] 所述多层膜可以被压缩或可以不被压缩。

[0068] 另一方面,本发明提供一种促进骨再生的方法,所述方法包括使骨表面与本发明组合物、纤维、压缩膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0069] 另一方面,本发明提供一种促进骨缺损愈合的方法,所述方法包括使骨缺损与本发明组合物、纤维、压缩膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0070] 另一方面,本发明提供一种预防骨缺损感染的方法,所述方法包括使骨缺损与本发明组合物、纤维、压缩膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0071] 另一方面,本发明提供一种促进受损组织中的软组织愈合的方法,该方法包括使受损组织与本发明组合物、纤维、压缩膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0072] 另一方面,本发明提供一种促进组织中巨噬细胞响应的方法,该方法包括使组织与本发明组合物、纤维、压缩膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0073] 定义

[0074] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。以下参考文献向技术人员提供本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(第2版,1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编,1988);The Glossary of Genetics,第5版,R. Rieger等(编),Springer Verlag(1991);和Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。如本文所用,除非另有说明,以下术语具有下文给出的含义。

[0075] “试剂”是指任何小分子化学化合物、抗体、核酸分子、或多肽、或其片段。

[0076] “改善”是指减少、抑制、减弱、减小、控制或稳定疾病的发展或进展。

[0077] “改变”是指通过诸如本文所述的标准技术已知方法检测的变化(增加或减少)。如本文所用,改变包括10%、25%、40%、50%或更大的变化。

[0078] “软组织疾病或损伤”是指破坏一种或多种软组织的正常功能或连接性的任何疾病、失调或创伤。

[0079] 在本公开中,“包括”、“包含”、“含有”和“具有”等可以具有美国专利法赋予它们的含义,并且可以指“包括”、“包含”等。“基本上由...组成”或“基本上组成”同样具有美国专利法中赋予的含义,并且该术语是开放式的,允许存在比所记载的更多的存在,只要所记载的基本或新颖特征不会因比所记载的更多的存在而改变,而是排除现有技术的实施方案。

[0080] “疾病”是指损害或干扰包括骨在内的细胞、组织或器官的正常功能的任何病症或失调。

[0081] “有效量”或“治疗有效量”是指相对于未经治疗的受试者提供所需效果或解除疾病症状所需的本发明组合物的量。用于实施本发明供治疗性治疗疾病的细胞组合物的有效

量根据施用方式、受试者的年龄、体重和一般健康状况而变化。最终,主治医师或兽医将决定适当的量和剂量方案。这种量被称为“治疗有效”量。“移植”是指在体内细胞接触和并入现有的目标组织(例如骨或软组织)的方法。

[0082] “增强骨愈合”是指相对于对照条件增加骨生长或愈合的程度。优选增加至少2倍,2.5倍,3倍或更多。

[0083] “微米级”是指100nm和999 $\mu\text{m}$ 之间的尺寸。微米级的颗粒在尺寸上比纳米管大。

[0084] 如本文所用,“获得”如在“获得试剂”中包括合成、购买或以其他方式获取所述试剂。

[0085] “参考”是指标准或对照条件。

[0086] “受试者”是指哺乳动物,包括但不限于人或非人哺乳动物如牛、马、犬、羊或猫科动物。

[0087] 这里提供的范围被理解为在该范围内的所有值的简写。例如,1至50的范围被理解为包括以下的任何数字、数字组合或子范围:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50。

[0088] 如本文所用,术语“治疗”(treat)、“治疗”(treating)、“治疗”(treatment)等是指减少或改善与之相关的失调和/或症状。应当理解,尽管不排除,治疗疾病或病症不要求完全消除与其相关的失调、病症或症状。

[0089] 除非具体说明或从上下文中显而易见,如本文所使用的,术语“或”被理解为包含性的。除非具体说明或从上下文中显而易见,如本文所使用的,术语“一”、“一个”和“所述”被理解为单数或复数。

[0090] 除非具体说明或从上下文中显而易见,如本文所用,术语“约”应理解为在本领域的正常耐受范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。“约”可以理解为在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%内。除非从上下文中明显的,否则本文中提供的所有数值均被术语“约”修饰。

[0091] 在本文的变量的任何定义中记载化学基团的列表包括该变量作为任何单个组或列出的组的组合的定义。本文的变量或方面的实施方式的记载包括作为任何单个实施方式或与任何其它实施方式或其部分组合的实施方式。

[0092] 本文提供的任何组合物或方法可以与本文提供的任何其它组合物和方法中的一种或多种组合。

## 附图说明

[0093] 图1显示非压缩和压缩的静电纺丝明胶+ 15%CW +蜂蜜支架(非交联)的SEM图像。刻度条和放大倍数分别为10 $\mu\text{m}$ 和2kx。

[0094] 图2显示了使用来自图1的SEM图像的FibraQuant™自动纤维直径分析。上述直方图显示纤维尺寸分布以及平均值和标准偏差(微米)。

[0095] 图3A-3B显示了压缩的静电纺丝膜的单轴拉伸试验结果:A. 断裂应变,B. 弹性模量。

[0096] 图4显示了示例性可成型的水合10%蜂蜜压缩膜。

[0097] 图5显示了细胞化(HDF)压缩的静电纺丝膜的DAPI图像。刻度条和放大倍数分别为200 $\mu\text{m}$ 和10x。

[0098] 图6显示非压缩和压缩明胶+ 10% CW + 30mg/mL蜂蜜海绵的一般大体外观的DinoLite图像。

[0099] 图7显示了用于支架压缩的Carver液压单元。

[0100] 图8示意性地示出了示例性机械测试方法。

[0101] 图9显示了非压缩和压缩的明胶+ CW + MH膜的SEM图像,其包括分别为200 $\mu\text{m}$ 和100x的刻度条和放大倍数。

[0102] 图10A显示了包括明胶+ CW + MH降解结果(BCA测定)的图,如累积平均释放测量所示;和图10B显示了包括明胶+ CW + MH降解结果(BCA测定)的图,如累积百分比释放测量所示。

[0103] 图11显示了细胞化(HDF)的压缩明胶+ CW + MH膜的DAPI图像。刻度条和放大倍数分别为100 $\mu\text{m}$ 和10x。

[0104] 图12显示了示例性可成型的水合膜。

[0105] 发明详述

[0106] 本发明的特征在于包含蜂蜜的基于生物可降解聚合物的材料或基质(例如纤维或膜)以及使用这种组合物来改善损伤或病症(例如,与牙科手术相关的骨损伤或创伤)的体外和体内方法。

[0107] 本发明至少部分地基于以下发现:包含蜂蜜的生物可降解膜可以支持和促进骨和组织的生长和再生。此外,所述生物可降解膜包括抗菌有效量的蜂蜜,从而提供抗感染的抗菌屏障并促进伤口愈合的无菌环境。

[0108] 支架

[0109] 一般而言,本发明的材料包括生物可降解聚合物和蜂蜜(例如,抗菌、杀菌和/或伤口愈合量的蜂蜜)。优选地,所述材料可另外包含填料。

[0110] 各种生物可降解聚合物是本领域已知的。优选的生物可降解聚合物包括蛋白(如明胶和胶原蛋白),衍生自天然存在的单体的聚合物(如聚(乳酸(PLA)))和衍生自合成单体的聚合物(如聚二氧环己酮(PDO))。期望生物可降解材料将在不到一年的时间内降解,更优选不到六个月。一般来说,生物可相容的并且可以成形或形成为纤维和膜的任何生物可降解聚合物可用于本发明材料中。也可使用生物可降解聚合物的共聚物或混合物/共混物(多组分)。

[0111] 其他生物可相容的聚合物,其中一些是生物可降解的,包括,例如这种聚合物,其包括但不限于以下:聚(氨基甲酸酯)、聚(硅氧烷)或硅酮、聚(乙烯)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(甲基丙烯酸2-羟基乙酯),聚(N-乙烯基吡咯烷酮),聚(甲基丙烯酸甲酯),聚(乙醇醇),聚(丙烯酸),聚丙烯酰胺,聚(乙烯-共-乙酸乙酯),聚(乙二醇)、聚(甲基丙烯酸),聚乳酸(PLA),聚乙醇酸(PGA),聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA),尼龙,聚酰胺,聚酞,聚(乙烯-共-乙醇醇)(EVOH)、聚己内酯、聚(乙酸乙酯)(PVA),聚乙烯基氢氧化物、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚原酸酯或可被开发的生物可相容的任何其它类似的合成聚合物。一些优选的合成基质材料包括PLA、PGA、PLA和PGA的共聚物、聚己内酯、聚(乙烯-共-乙酸乙酯)、(EVOH)、PVA和PEO。另见美国专利号7,374,774(其通过引用并入本文)。

[0112] 本文所用的术语“填料”是指向聚合物纤维、长丝或膜提供结构增强或刚性的有机或无机生物可相容材料。填料可以是结晶体、纤维或颗粒。或者，填料适当地具有棒、纤维、球体、椭圆体、多面体晶体等的形状，然而，填料的形状不特别限于此。该填料的纳米级（纳米填料）平均直径在约1nm至约950nm的范围内。纳米填料适当地具有约1-100nm，约10-80nm，约25-75nm，或特别是约50nm的平均直径。或者，填料具有大于至少约100nm的微米级（微填料）的平均直径。微填料适宜地具有约小于约10 $\mu$ m，小于约9 $\mu$ m，小于约8 $\mu$ m，小于约7 $\mu$ m，小于约6 $\mu$ m，小于约5 $\mu$ m，小于约4 $\mu$ m，小于约3 $\mu$ m，小于约2 $\mu$ m，或特别小于约1 $\mu$ m的平均直径。例如，所述填料是纳米结晶体或纤维材料，其平均直径或厚度小于约100nm，且有利地可以具有小于约500nm的平均长度。有利地，纳米填料可以具有静电荷，当植入或施加到伤口部位时，其可以粘附或吸引生长因子。适用于本发明材料的纳米填料材料的实例包括几丁质晶须和羟基磷灰石纳米晶体。也可以没有限制地使用包含纳米填料和微填料的填料的混合物。

[0113] 本发明的材料还包括蜂蜜。可以使用任何类型的蜂蜜。蜂蜜类型的实例包括麦卢卡蜂蜜、薄子木属 (*Leptospermum*) 蜂蜜或荞麦蜂蜜。也可以使用不同蜂蜜的混合物。例如，麦卢卡蜂蜜是UMF评级在10以上的活性或治疗性麦卢卡蜂蜜。蜂蜜以有效抑制细菌（例如病原菌）的生长或扩散的量存在于本发明的组合物和材料中。示例性细菌包括金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)（包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)）、牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) 和产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*)。此外，荞麦蜂蜜可以以愈合有效量包含在内。

[0114] 所使用的蜂蜜的量部分取决于待用本发明的组合物处理的伤口或损伤的性质；待抑制的细菌的类型；蜂蜜的浓度；以及所用的特定蜂蜜的抗菌性质。蜂蜜的抗菌、抗微生物和杀菌性质取决于各种因素，包括甲基乙二醛 (MGO) 的浓度、独特麦卢卡因子 (UMF)、蜂蜜中其它酚类化合物的存在、伤口pH值、蜂蜜的pH以及由蜂蜜施加的渗透压。本领域普通技术人员将仅使用常规实验就能够选择用于本发明组合物的蜂蜜的合适类型和量。在某些实施方案中，基于生物可降解聚合物的重量，蜂蜜的量为1重量份至15重量份 (1-15重量%)。

[0115] 在优选的实施方案中，本发明的组合物包括100重量份的生物可降解聚合物和约1重量份至约15重量份的蜂蜜。所述组合物可以另外包含10-20重量份的填料。如本文所述，也可以存在其它化合物或试剂。

[0116] 在优选的实施方案中，所述组合物还包含治疗有效量的蜂蜜。例如，将抗菌有效量的蜂蜜加入到组合物中，其相对于100重量份的生物可降解聚合物，范围为约50重量份至约300重量份，或约100重量份至约200重量份。此外，向组合物中加入额外量的蜂蜜以刺激或增强再生（细胞增殖和迁移），相对于100重量份的生物可降解聚合物，其范围为约10重量份至约100重量份，约20重量份至约70重量份，或特别是约50重量份。

[0117] 制备组合物的方法

[0118] 包含生物可降解聚合物、填料和蜂蜜的组合物可以通过任何合适的方法制备，其中一些是本领域已知的。一般而言，填料可以悬浮或分散在溶剂（其基本上不会溶解填料）中以形成分散体或悬浮液；然后将生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体或悬浮液混合以形成本发明的组合物。在某些实施方案中，向组合物中另外加入治疗有效量的蜂蜜用于抗

菌作用或增强再生。在某些实施方案中,所述溶剂是2,2,2-三氟乙醇、1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFP)或9:1的乙酸:水。所用溶剂的量应该被最小化以促进将所述组合物静电纺丝或其它加工成为纤维和膜。

[0119] 纤维和膜的制备方法

[0120] 包含生物可降解聚合物、填料和抗菌有效量的蜂蜜的组合物可用于通过任何合适的方法制备纤维和膜,其中一些是本领域已知的。在一个实施方案中,通过静电纺丝形成纤维或膜。静电纺丝是已知的技术(参见例如Li等人,Biomaterials. 2005年10月; 26(30): 5999-6008.)并且静电纺丝设备可以商购。例如,包含例如生物可降解聚合物的带电溶液通过小开口或喷嘴(通常是针或移液管吸头)进料。由于其电荷,将溶液作为喷射流拽向接地的收集板(例如,金属筛、板或旋转的心轴,通常在5-30cm外)。在喷射流运行期间,所述溶剂逐渐蒸发,并且带电纤维留在接地靶上积聚。纤维上的电荷最终消散到周围的环境中。如果允许靶相对于喷嘴位置移动,则可以实现特定的纤维取向(排列成一线或随机)。

[0121] 本发明的组合物可被制成静电纺丝的纤维组合物。

[0122] 在一个实施方案中,本发明提供了一种生产膜的方法,所述方法包括:

[0123] a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

[0124] b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合以形成组合物;和

[0125] c) 静电纺丝所述组合物以形成纤维,从而形成包含生物可降解聚合物、填料和抗菌有效量的蜂蜜的膜。

[0126] 在某些实施方案中,将填料加入到组合物中,使得步骤a)可以省略,并且生物可降解聚合物和蜂蜜可与溶剂结合以形成组合物。

[0127] 该方法可进一步包括在静电纺丝之前向组合物中加入至少一种另外的填料、至少一种治疗剂或治疗有效量的蜂蜜。静电纺丝的膜可以形成为多个层。例如,所述组合物可以在一个层或其它层的顶部另外静电纺丝,以产生多层静电纺丝的膜。

[0128] 在另一个实施方案中,可以从包含生物可降解聚合物、填料和抗菌有效量的蜂蜜的分散体中除去溶剂以形成海绵。可以通过蒸发或冻干(冷冻干燥)除去溶剂。因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种生产膜的方法,所述方法包括:

[0129] a) 将填料分散在溶剂中以形成分散体;

[0130] b) 使生物可降解聚合物和蜂蜜与所述分散体结合;

[0131] c) 从所述分散体中除去溶剂以形成海绵;和

[0132] d) 压缩所述海绵以形成包含生物可降解聚合物、填料和抗菌有效量的蜂蜜的膜。

[0133] 在某些实施方案中,将所述填料加入到组合物中,使得步骤a)可以省略,并且生物可降解聚合物和蜂蜜可与溶剂结合以形成组合物。

[0134] 该方法可以进一步包括向所述组合物中加入至少一种另外的填料、至少一种治疗剂或治疗有效量的蜂蜜。

[0135] 从上下文可以理解,术语“膜”在本文中用于指压缩静电纺丝垫/膜或压缩海绵之后的产品,如本文所述。因此,本文中的“膜”包括压缩纤维和压缩海绵两者(除非另外从上下文中清楚)。

[0136] 在压缩之前可以将海绵冻干。

[0137] 在某些实施方案中,取决于骨移植应用,海绵(冻干或非冻干的)可以在压缩之前

例如基于其应用以块或颗粒或磨碎形式进行适当的加工。

[0138] 或者,取决于骨移植应用,压缩的海绵、纤维或膜可以在压缩后以块或颗粒或磨碎形式适当地加工。

[0139] 或者,所述海绵不被压缩,或者以较小的压力或基本较小的压力,例如用手压缩,仅为了产生溶胀势。

[0140] 可以通过将至少两个膜贴在一起形成多层膜。

[0141] 在某些实施方案中,通过压缩多个层的海绵形成多层膜。在具体实施方案中,所述多层膜由多个冻干海绵通过压缩其多层而形成。多层膜可以被压缩或不被压缩。例如,可以通过压缩多个层的通过本文所述的任何方法形成的膜来形成多层膜。一般而言,在4,000-24,000磅压力下的两个表面(例如不锈钢板或块,例如在液压机中)之间的2-10个膜(更优选2-4个膜)的压缩通常将导致膜的压接以形成多层膜。

[0142] 或者,可以使用多种溶剂形成多层膜。在某些实施方案中,使用具有不同密度的至少两种或更多种溶剂来溶解填料并结合其它组分(例如生物可降解聚合物和蜂蜜)。例如,将由组合物和不同溶剂制成的溶液合并,并且基于溶剂的密度,所述合并的溶液可以形成不同的层。除去溶剂后,可以制备多层海绵和多层膜。所述多层膜可以被压缩或不被压缩。

[0143] 该膜可以使用交联试剂进行交联。因此,在某些实施方案中,本发明提供具有至少两个层的多层膜,其中所述至少两个层是交联的,例如以稳定多层膜结构。示例性交联试剂包括1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(或其它碳二亚胺)、京尼平或戊二醛。可以将膜浸入溶剂如乙醇中的交联剂(例如20-40mM)的溶液中。当发生所需量的交联时,该膜可以从溶液中移除并在使用前冲洗。

[0144] 用于本发明治疗方法的膜应具有足够的刚性以支持周围的软组织,在其玻璃化转变温度(T<sub>g</sub>)下可延展,但是在冷却时恢复刚性(即保持原位形成的形状),并且是生物可相容的,在于它将促进骨整合并且不会对周围软组织产生不利影响。所述膜应该在6-9个月内吸收,因为在下颌骨和上颌骨移植手术中同种异体移植骨需要大约6个月才能固结成新骨。本发明的膜是柔性的,在加热时可成形,在冷却时保持其形状,在降解过程中呈较小酸性,并且纤维结构将调节巨噬细胞(MAC)响应并相对于炎症的(M1 MAC表型),允许骨和组织再生(M2 MAC表型)。

[0145] 本发明的膜的尺寸和厚度可以根据预期用途而变化。可将膜纺成所需尺寸,或可将海绵浇铸成所需尺寸,然后压缩成所需的密度和厚度。例如,屏障膜的厚度通常在0.1-0.4mm之间,因此海绵可被适当地压缩至约0.1-0.4mm的厚度。

[0146] 所述膜可以具有任何形状(圆形、正方形、矩形、不规则)。在示例性实施方案中,本发明的膜具有1至20mm的宽度和1至20mm的长度。在某些实施方案中,膜的厚度小于1mm,厚度小于0.5mm,厚度小于0.3mm或厚度小于100微米。

[0147] 在某些实施方案中,本发明的膜具有至少90%、100%、110%或120%的断裂应变。在某些实施方案中,本发明的膜具有至少约5mPa,或10、15、20或25mPa的弹性模量。在某些实施方案中,本发明的膜具有至少约0.26N的最大压缩载荷。

[0148] 治疗和预防应用

[0149] 本发明提供了可用于改善与骨或软组织疾病或损伤相关的病症的材料的现成供应。将本发明的组合物和材料(例如,直接或间接地)施用于损伤或患病的组织或器官,其中

它们移植并与靶组织(例如骨、肌肉、齿龈、牙龈、粘膜、皮肤)建立功能性连接。在一个实施方案中,本发明的膜增强了骨愈合。用于修复受损组织或器官的方法可以在体外、体内或离体进行。在一个具体实施方案中,所述膜用于牙科应用,例如在下颌骨和上颌骨移植手术中。

[0150] 在另一个实施方案中,本发明提供促进骨再生的方法,该方法包括使骨表面与本发明的组合物、纤维、压缩膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。在某些实施方案中,该方法是在骨外科手术之后促进骨再生的方法,所述骨外科手术包括牙槽嵴保存、牙槽嵴增高、窦移植或骨移植。

[0151] 在另一个实施方案中,本发明提供促进骨缺损愈合的方法,所述方法包括使骨缺损与本发明的组合物、纤维、压缩膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0152] 在另一个实施方案中,本发明提供一种预防骨缺损感染的方法,所述方法包括使骨缺损与本发明的组合物、纤维、膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0153] 在又一个实施方案中,本发明提供一种促进受损组织中的软组织愈合的方法,所述方法包括使所述受损组织与本发明的组合物、纤维、膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0154] 在上述方面的某些实施方案中,该方法是在骨外科手术中促进骨再生的方法,所述骨外科手术包括牙槽嵴保存、牙槽嵴增高、窦移植或骨移植。

[0155] 在另一个实施方案中,本发明提供了促进组织中的巨噬细胞响应的方法,所述方法包括使所述组织与本发明的组合物、纤维、膜、颗粒、溶胀膜、非压缩膜或多层膜(压缩或非压缩的)接触。

[0156] 施用

[0157] 本发明的组合物、纤维和膜可以直接提供给目标组织或器官(例如通过直接施用于骨或组织表面,或通过手术植入)。膜可用于覆盖、包围、填充或以其它方式接触骨或组织缺损、伤口、皮肤/伤口愈合、牙龈萎缩或手术部位。

[0158] 如果需要,可以在施用组合物、纤维或膜之前、期间或之后提供膨胀和分化剂,以增加、维持或增强体内细胞的产生或分化,所述细胞包括来自受试者骨的骨细胞或来自任何类型的骨移植材料/移植体,即同种异体、异种异体、异体或基因产生的骨的骨细胞。本发明的组合物包括药物组合物。当施用本发明的治疗组合物或材料(例如药物组合物)时,其通常将以单位剂型配制。另外的治疗剂可以在制造过程中施加到纤维上或并入纤维中。

[0159] 制剂

[0160] 本发明的组合物、纤维、膜或多层膜可以方便地作为无菌制剂提供。在一个实施方案中,本发明的组合物以液体、液体悬浮液、凝胶、粘性组合物或固体组合物提供。液体、凝胶和粘性组合物在某种程度上更方便施用,特别是通过注射。粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制,以便提供与特定组织更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,其可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)和其适合的混合物的溶剂或分散介质。

[0161] 无菌可注射溶液可以根据需要通过并入细胞(例如胚胎干细胞、神经元祖细胞、分

化神经元)来制备。这样的组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。根据施用途和所需制剂,组合物可以含有辅助物质,例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、颜料等。可以参考通过引用并入本文的标准文本例如“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”,第17版,1985,用以制备合适的制剂,无需过多的实验。

[0162] 可以加入增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保微生物活动的预防。所述组合物可以是等渗的,即它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。本发明组合物的期望等渗性可以使用氯化钠或其它药学上可接受的试剂如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其它无机或有机溶质来实现。优选氯化钠特别用于含有钠离子的缓冲液。

[0163] 如果需要,组合物的粘度可以使用药学上可接受的增稠剂保持在选定的水平。甲基纤维素是优选的,因为它容易且经济地可用并且易于使用。其它合适的增稠剂包括,例如,黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。此外,银盐可用作增稠剂。另见美国专利号8,367,094;美国专利号8,173,151;和美国专利号7,998,498(其通过引用并入本文)。可以加入银盐以进一步提高组合物的抗菌作用。增稠剂的优选浓度将取决于所选择的试剂。重要的是使用将达到所选粘度的量。显然,合适的载体和其它添加剂的选择将取决于确切的施用途和具体剂型的性质,例如液体剂型(例如,组合物是否配制成溶液、悬浮液、凝胶或另一种液体形式,例如随时间释放形式或液体填充形式)。

[0164] 可以将甘油或类似组分加入到混合物中以改善纤维和膜的柔性。

[0165] 可以与本发明的组合物、纤维、膜或多层膜一起递送的示例性试剂包括但不限于抗生素(包括例如抗菌银盐)、止痛剂、抗凝剂、免疫抑制剂、治疗物质,其选自麻醉药、安眠药、镇静剂、睡眠诱导剂、抗精神病药、抗抑郁药、抗过敏药、抗心绞痛药、抗关节炎药、抗哮喘药、抗糖尿病药、止泻药、抗惊厥药、抗痛风药物、抗组织胺药、止痒药、催吐药、止吐药、抗痉挛剂、食欲抑制剂、神经活性物质、神经递质激动剂、拮抗剂、受体阻滞剂、再摄取调节剂、 $\beta$ -肾上腺素能阻滞剂、钙通道阻滞剂、disulfarim、肌肉松弛剂、止痛剂、退热药、兴奋剂、抗胆碱酯酶剂、拟副交感神经药物、激素、抗血栓药、溶栓剂、免疫球蛋白、激素激动剂、激素拮抗剂、维生素、抗肿瘤药、抗酸剂、消化剂、轻泻剂、泻药、防腐剂、利尿剂、消毒剂、杀真菌剂、杀外寄生虫药、抗寄生虫药、重金属、重金属拮抗剂、螯合剂、生物碱、盐、离子、自体活性物质、洋地黄、强心苷、抗心律失常药、抗高血压药、血管扩张剂、血管收缩药、抗毒蕈碱药、神经节刺激剂、神经节阻滞剂、神经肌肉阻滞剂、肾上腺素能神经抑制剂、抗氧化剂、抗炎药、伤口护理产品、抗肿瘤剂、抗血管生成剂、抗原剂、伤口愈合剂、植物提取物、生长因子、生长激素、细胞因子、免疫球蛋白、润肤剂、保湿剂、抗排斥药物、杀精剂、调理剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗病毒剂、镇定剂、降胆固醇药、镇咳药、组胺-阻断药物和单胺氧化酶抑制剂。其它试剂包括蛋白,例如以下的任一种或多种:活化素A,肾上腺髓质素,酸性FGF,碱性成纤维细胞生长因子,血管生成素,促血管生成素-1,促血管生成素-2,促血管生成素-3,促血管生成素-4,血管增生抑制素,促血管素,血管紧张素-2,骨形态发生蛋白1、2或3,钙粘蛋白,胶原蛋白,集落刺激因子(CSF),内皮细胞衍生的生长因子,内皮糖蛋白,内皮素,内皮抑制素,内皮细胞生长抑制剂,内皮细胞活力维持因子,Ephrin,促红细胞生成素,肝细胞生长因子,人生

长激素, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , 血小板衍生的内皮细胞生长因子(PD-ECGF), 血小板衍生的内皮生长因子(PDGF), 胰岛素样生长因子-1或-2(IGF), 白介素(IL)-1或8, FGF-5, 纤连蛋白, 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), 血管细胞增殖的心源性抑制剂, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ , 整合素受体, LIF, 平滑肌瘤衍生的生长因子, MCP-1, 巨噬细胞衍生的生长因子, 单核细胞衍生的生长因子, MMP2, MMP3, MMP9, 神经纤毛蛋白, 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(neurothelin), 一氧化氮供体, 一氧化氮合酶(NOS), 干细胞因子(SCF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF和VEGF164。可以与本发明的细胞一起递送的其它试剂包括以下的一种或多种:LIF, 骨形态发生蛋白(BMP), 视黄酸, 反式视黄酸, 地塞米松, 胰岛素, 吡喹美辛, 纤连蛋白和/或10%胎牛血清, 或其衍生物。其它试剂包括小寡核苷酸, 例如包括治疗靶的至少一部分序列的SiDNA或SiRNA。

[0166] 本领域技术人员将认识到, 组合物的聚合物组分应选择为化学惰性的, 并且不会影响本发明所述的细胞的活力或功效。这对于化学和制药原则的技术人员将不会有任何问题, 或者通过参考标准文本或通过本公开和本文引用的文献的简单实验(不涉及不适当的实验)容易地避免问题。

[0167] 剂量

[0168] 本发明的组合物、纤维或膜可以以有效提供伤口愈合或其它性质的量施用或植入。在某些实施方案中, 本发明的膜提供了有效防止病原细菌渗入伤口部位的屏障。本领域技术人员可以容易地确定本发明方法中施用的本发明的组合物、纤维或膜的量。当然, 对于向动物或人施用的任何组合物, 并且对于任何特定的施用方法, 因此优选确定: 毒性, 例如通过在合适的动物模型例如, 啮齿动物如小鼠中测定致死量(LD)和LD<sub>50</sub>; 和组合物的剂量, 其中的组分浓度和施用组合物的时间, 其引起适当的响应。从本领域技术人员的知识、本公开和本文引用的文献, 这种确定不需要过度的实验。而且, 无需过多的实验即可确定连续施用的时间。

[0169] 递送方式

[0170] 本发明的组合物(例如, 包含细胞的支架)可以直接提供给目标组织或器官, 例如由于损伤或疾病而损坏的组织(例如通过施用进入中枢或周围神经系统中)。组合物可以通过各种施用途径施用于有其需要的受试者。一般来说, 施用方法可以使用医学上可接受的任何施用模式来实施, 意指产生有效水平的活性化合物而不引起临床上不可接受的不利影响的任何模式。这些施用方式包括手术移植或注射(例如, 肌内、心脏内、眼内、脑室内)。

[0171] 试剂盒

[0172] 本发明的组合物、纤维、膜或多层膜可以与试剂盒中的另外的试剂一起提供。该试剂盒可以包括制备材料(如膜)、治疗方案、试剂和设备(试管、反应容器、针、注射器等)的说明书。根据本发明的试剂盒中提供的说明书可以以标签或单独插入物的形式指示合适的操作参数。

[0173] 在一个实施方案中, 本发明的组合物、纤维、膜或多层膜可用于治疗或预防骨或软组织的损伤或疾病。本发明提供了治疗这样的损伤或疾病和/或其症状的组合物和方法, 所述损伤或疾病和/或其症状的特征在于细胞的损失或组织结构、功能或活性的损失。本发明的方法包括将治疗有效量的本文所述的组合物、纤维、膜或多层膜施用于受试者(例如哺乳动物, 例如人)。因此, 一个实施方案是治疗患有或易患特征在于细胞损失或组织结构、功能

或活性损失的疾病、病症或失调的受试者的方法。该方法包括在使得疾病、病症或失调或其症状被治疗的条件下,向哺乳动物施用足以治疗特征在于本文的细胞损失或组织结构、功能或活性损失的疾病、病症或失调或其症状的治疗量的步骤。

[0174] 本文的方法包括向受试者(包括鉴定为需要这种治疗的受试者)施用有效量的本文所述的组合物、纤维、膜或多层膜以产生这种效果。鉴定需要这种治疗的受试者可以是受试者或医疗保健专业人员的判断,并且可以是主观的(例如意见)或客观的(例如通过测试或诊断方法可测量)。

[0175] 本发明的治疗方法(其包括预防性治疗)通常包括向有其需要的受试者(例如动物,人),包括哺乳动物,特别是人施用治疗有效量的本文组合物,例如本文所述的组合物、纤维、膜或多层膜。这种治疗将适当地施用于患有、具有、易患疾病、病症或其症状或有患所述疾病、病症或其症状的风险的受试者,特别是人。可以通过诊断测试或受试者或医疗保健提供者的意见(例如遗传测试、酶或蛋白标记、标记(如本文定义)、家族史等)的任何客观或主观判断来确定那些受试者的“患病风险”。

[0176] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的测定、筛选和治疗方法的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是他们的发明的范围。

[0177] 实施例

[0178] 实施例1. 纤维和膜的制备

[0179] 本研究的目的是设计具有抗细菌和再生性质的膜,其在6-12周内降解,允许保留移植,同时促进上覆组织的更快速闭合。为了实现这一点,制造了静电纺丝明胶+几丁质晶须(CW)+蜂蜜膜并随后压缩。压缩膜具有增加的可操作性,较少孔隙,并保持非压缩纤维直径。这种应用需要较少的孔隙支架来提供用于组织闭合的引导再生。此外,据记录,较大的纤维和添加蜂蜜(天然抗微生物)可以独立地增强促再生响应。几丁质晶须(CW)是一种新兴的新型填料,其已证明能增强合成和天然聚合物结构。良好的生物可相容性和生物可降解性也使其成为最有希望的填料之一。

[0180] 在一些实验中,将明胶溶于1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFP)或9:1的乙酸:去离子(DI)水中,并用MEDIHONEY®或MANUKAGARD®(0-50重量%)静电纺丝。使用HFP或乙酸:DI水作为溶剂进行静电纺丝,分别产生具有微米级和纳米级纤维的支架。使用液压机将膜(与25mM 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺交联和非交联)压缩(一层或多个层)。压缩膜具有增加的可操作性,较少孔隙,并保持非压缩纤维直径。这种应用需要较少的孔隙支架来提供用于组织闭合的引导再生。此外,据记录,较大的纤维和添加蜂蜜(天然抗微生物)可以独立地增强促再生响应。本研究将进一步分析接种在复合膜上的人真皮成纤维细胞的再生响应。

[0181] 材料和方法

[0182] 根据Dufresne的方法进行轻微的修改(Ji,Y-L等人,*Carbohydrate Polymers*,87,2133-2319,2012)来制备CW。通过超声波将所需量的CW(15重量%的明胶)再分散在2,2,2-三氟乙醇(TFE)中。将明胶(B型)加入到140mg/mL的CW溶液中。然后将MEDIHONEY®(100%活性薄子木属蜂蜜)加入明胶+ CW溶液(0,5重量%、10重量%的明胶)。将溶液混合并在37°C下孵育过夜以确保所有组分的完全溶解/混合。将溶液装入5mL注射器并使用以下参数静电纺丝:5mL/hr,+ 22kV和5英寸气隙距离。在1英寸(直径)旋转的接地不锈钢心轴上收集纤维。

[0183] 将支架压缩以产生具有改善的机械完整性,同时保持纤维状纳米结构的多层膜。使用金属压板在液压机上以4500磅压缩30秒来压缩4层相同的支架。使用扫描电子显微镜(SEM)在+20kV处对每个支架(0.5重量%、10重量%蜂蜜)的非压缩和压缩样品进行成像,以观察纤维直径和一般孔隙率。通过使用FibraQuant™ 1.3软件(nanoScaffold Technologies,LLC)计算平均纤维直径和标准偏差进一步分析所有非交联支架类型的压缩和非压缩纤维直径。

[0184] 所有4层膜的交联通过将每个膜放置在含有乙醇中的40mM 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)的培养基培养皿中在室温下保持21小时来实现。完成后,将膜浸入乙醇中,并将6mm圆片冲压并用于细胞研究。

[0185] 使用狗骨打孔器(最窄点为2.71mm宽,长度为18.63mm)进行机械测试。对具有100N载荷细胞的狗骨样品(n = 3)进行单轴拉伸试验,延伸速率为1mm/s,并且夹具之间的起始距离为7.7mm。由应力-应变输出计算弹性模量和断裂应变。

[0186] 在干燥和水合(0.9%NaCl,30分钟)条件下,口腔外科医生对膜的临床适应性/成形性进行评分。使用COLLAPLUG® 胶原蛋白膜(Zimmer Dental)作为对照,因为目前它是牙槽嵴保存手术的膜屏障标准之一。

[0187] 细胞活力(DAPI)

[0188] 在通过30分钟乙醇浸泡的交联,然后三次10分钟PBS洗涤之后,将6mm冲孔的压缩膜直接灭菌。在96孔板中将人真皮成纤维细胞(HDF)以5,000个细胞/孔接种在支架冲孔(n = 3)上。研究在7天内完成,时间点为1、3和7天。在每个时间点进行培养基变化。每个时间点后,细胞化支架固定在10%缓冲的福尔马林中。然后进行4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)细胞核染色。使用Olympus荧光显微镜对支架进行成像,以使活细胞可视化。

[0189] 结果、讨论和结论

[0190] 非压缩和压缩的静电纺丝明胶+ 15%CW +蜂蜜支架(非交联)的SEM图像在图1中显示。纤维尺寸分布如图2所示。图3显示了断裂应变(3A)和弹性模量(3B)测量。

[0191] 适应性/成形性

[0192] 表1显示了具有不同量蜂蜜的干燥和水合膜的临床适应性的评估。最佳膜(湿):0%和10%蜂蜜。最差膜(湿):CollaPlug对照(不保持形状,难以适应)。临床意义:压缩膜在使用前需水合。可以通过压缩更少或更多的层来调整成形性(图4)。

[0193] 表1.口腔外科医生评分(顶部)的干燥(D)和水合(湿,W)压缩膜和CollaPlug对照的临床适应性

	0	1	2	3	4
<b>0% 蜂蜜</b>		D			W
<b>5% 蜂蜜</b>		W	D		
[0194] <b>10% 蜂蜜</b>	D				W
<b>CoIIaPlug</b>	W				D
<b>等级</b>					
0 = 不可形成, 或脆性或撕开					
4 = 可容易形成, 当操作时保持结构					

[0195] 静电纺丝和压缩

[0196] 图5显示了压缩的静电纺丝膜的图像。在保持纤维结构和尺寸的同时实现了压缩。注意到在压缩后一些纤维熔接,其最有可能取决于蜂蜜的结晶状态。更多脱水的支架(在干燥器中)将导致结晶更多的蜂蜜结构,并且最终在压缩时形成更少的非熔接纤维。

[0197] 机械测试

[0198] 所有支架在90-120%应变之间失败(无显著性差异)。含有10%蜂蜜的支架与0%蜂蜜相比具有显著更高的模量值。首先这是意想不到的,因为从直观上讲,更多的蜂蜜会导致支架较少的刚性。推测是因为直接从乙醇中进行机械测试,蜂蜜处于脱水(结晶更多)状态,这导致模量增加。未来的工作将包括甘油和用PBS水合的样品的分析,这将最有可能诱导较少结晶的蜂蜜结构,并导致较不坚硬的支架。

[0199] 细胞活力

[0200] 对每个时间点,在每个支架的表面上可见活细胞(HDF)。从目视来看,很难确定任何差异。然而,未来的研究将分析细胞增殖和细胞分泌的再生标记和细胞外基质。

[0201] 实施例2. 制备海绵

[0202] 使用在去离子水中的30mg/mL明胶溶液制造海绵,并加热至37°C,以确保所有明胶都在溶液中。将10%CW(几丁质晶须)加入到明胶溶液中并进行超声处理。然后将0-30mg/mL蜂蜜加入到明胶+ CW溶液中。蜂蜜进入溶液后,将25mM 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)加入到该明胶+ CW +蜂蜜溶液中,立即转移到圆柱形模具中,在-80°C下冷冻,并冻干。使用液压机将干海绵以4500磅压缩30秒。

[0203] 图6显示非压缩和压缩明胶+ 10%CW + 30mg/mL蜂蜜海绵的一般大体外观的DinoLite图像。非压缩:5.5毫米厚度;压缩:0.3mm厚度。

[0204] 海绵可以任何尺寸(取决于模具)制造并随后压缩。

[0205] 通过附加步骤,与形成冻干膜类似,形成颗粒。所述颗粒可与冻干膜组合使用。复合溶液冷冻后,冷冻的材料可以被磨碎(例如使用搅拌机)以形成类似于“碎冰”的东西。然

后将该碎冰冻干过夜以形成颗粒。由于颗粒旨在用于骨再生,因此填料(例如羟基磷灰石)的浓度将增加(例如至50%或更多)以增强骨传导性。颗粒的开发和细化可以由优化制造过程来获得相当一致的粒度组成。这可以通过控制冷冻复合物的共混来实现碎冰或通过较大的冻干颗粒(在液氮中)低温粉碎成更小颗粒而实现。可以使用筛子或等效技术根据尺寸过滤粒度,以获得均匀/限定的粒度。为了优化粒度,可以进行多种实现粒度的方法(冻干“碎冰”相对低温粉碎较大(mm尺寸的)颗粒)。优选地,颗粒的尺寸或平均直径在约100 $\mu\text{m}$ 至约10mm,或特别是约1mm至约5mm的范围内。

[0206] 这种组合物的干燥和水合的压缩膜应在使用前水合,并且可以用剪刀容易地切割/依尺寸定制并且具有很好的可操作性。在水合时,膜变得更加柔性,并且可以在植入时容易地在手术部位内操纵。一旦开始水合,单独的可操作性是对现有膜如COLLAPLUG<sup>®</sup>的显著改善。甚至在水合几天之后,目前的天然生物可降解膜如BIO-GIDE<sup>®</sup>开始丧失其机械完整性。

[0207] 实施例3. 用于骨移植应用的压缩膜

[0208] 此外,优异的生物可相容性和生物可降解性也使其成为最有希望的填料之一。这些压缩膜结合了膜状材料与生物活性表面的优点,以进一步增强细胞响应和引导的组织再生(GTR)。明胶+ CW + MH膜表现出增强的生物可相容性和生物可降解性,这表明它们作为当前临床产品的替代品的用途。

[0209] 方法和材料

[0210] 支架制造

[0211] 使用30mg/mL明胶溶液制造支架。将10%CW(明胶的重量%)分散在DI水中,并以2%的幅度使用微尖端进行超声处理30秒。然后通过37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育1小时,将明胶和0.5%或25%MH(明胶的重量%)溶解在CW溶液中。获得均匀溶液后,加入40mM 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)交联剂,短暂混合,立即转移到小培养皿中,在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻过夜,并冻干。然后将冻干的海绵切成4mm厚的切片,并使用液压机(图8)以4500磅压缩30秒,以产生最终的膜(厚度在300-400 $\mu\text{m}$ 之间)。

[0212] 降解

[0213] 通过在14天内定量每个6mm支架的蛋白释放经释放动力学来研究支架降解。将支架在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在1x PBS中孵育,在每个时间点替换PBS。在1、4、7、11和14天后,使用Pierce BCA蛋白测定法分析释放物的总蛋白。明胶和MH不可区分,并且都有助于定量累积平均浓度结果。为说明这一点,通过使用完全降解的非交联支架作为总初始蛋白含量计算累积百分比释放量: $\% \text{释放} = (\text{释放}) / (\text{总初始含量}) * 100$ 。

[0214] 细胞粘附

[0215] 将每个支架类型的6mm圆片装载到96孔板中。将目前的临床膜GEISTLICH BIO-GIDE<sup>®</sup>(胶原蛋白)和KLS MARTIN RESORB-X(聚乳酸,PLA膜)冲压并用作临床对照。在细胞接种之前,将所有膜灭菌(30分钟乙醇和三次10分钟PBS洗涤)。将20,000个人真皮成纤维细胞(HDF)接种在膜上并培养14天。1、7和14天后,移除培养基并冷冻,同时将细胞化的膜固定在10%福尔马林中。固定的支架用4'-6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色,其细胞接种表面经荧光成像以显现细胞附着。

[0216] 机械测试

[0217] 使用单轴压板压缩系统分析水合无细胞支架以确定峰值负荷。切出矩形(2.5×0.5cm)并通过锚接相距1cm的端部(图9)将其固定在拱形位置。将上压板下降到支架表面,并使用以下参数:10mm/min测试速度和250个样品/秒数据采集速率。压缩是连续的,直到顶板到达锚。在该接触发生之前运行终止,并且以牛顿(N)记录支架施加的最大力。

[0218] 临床适应性/成形性

[0219] 水合后,所有明胶+ CW + MH膜均经口腔外科医生在干燥和水合(0.9%NaCl 30分钟)条件下进行评分。使用KLS MARTIN、BIO-GIDE和COLLAPLUG®(胶原蛋白膜,Zimmer Dental)作为临床对照膜。

[0220] 讨论与结论

[0221] 海绵和压缩

[0222] 所有明胶+ CW + MH支架都表现出相同的非压缩(多孔)和压缩(较少孔隙)表面结构,在支架类型之间没有视觉上可辨别的差异(图10)。与多孔膜相比,压缩表面提供了GTR的模板,其中细胞最初在整个支架中迁移。

[0223] 降解

[0224] 与0%MH相比,5%MH的添加生成相似的浓度释放曲线,两者在14天后开始平稳。+25%MH膜在14天内表现出更线性的释放曲线,表明以恒定的速率降解。1天后,0%、+5%和+25%MH分别释放17%、17%和22%的总初始含量。14天后,0%、+5%和加25%MH分别释放44%、34%和49%的总初始含量。累积百分比释放曲线图显示有趣的曲线,表明添加5%MH降低支架的降解速率。这是没有预期到的,因为添加任何量的MH被认为增加降解速率(在+25%MH图中显而易见)。该数据仅基于各种浓度的MH的并入提供了可定制的降解速率的见解。

[0225] 适应性/成形性

[0226] 干燥(D)和水合(湿,W)压缩膜和Bio-Gide、KLS Martin和CollaPlug对照的临床适应性由口腔外科医生评分。当水合时,所有明胶+ CW + MH膜的处理与Bio-Gide对照类似,其中并入的较高百分比的MH导致膜撕裂增加(表2)。然而,与对照相比,干明胶+ CW + MH膜具有更大的适应性。在外科医生的手中,压缩膜处理与临床胶原蛋白膜相似。

[0227] 表2. 适应性/可形成性

	1	2	3	4	5
0% MH			W		D
+5% MH		W			D
+25% MH		W			D
Bio-Gide		W	D		
KLS Martin		D		W	
CollaPlug	W				D

[0229] 等级

[0230] 0 = 不可形成,脆性或撕开

[0231] 5 = 可容易地形成,当操作时保持结构

[0232] 压缩试验

[0233] 所有明胶+ CW + MH膜施加在0.02-0.03N的范围内的最大的力,而Bio-Gide和KLS

Martin对照分别施加0N和0.75N。与不会保持测试拱形的Bio-Gide对照相比,明胶+ CW + MH膜显示改善的机械性能(表3)。由于KLS Martin是一种无孔的PLA膜,因此预计它的值更高。

[0234] 表3. 压缩测试

	0% MH	+5% MH	+25% MH	Bio-Gide	KLS Martin
[0235]	0.03 N	0.03 N	0.02 N	0 N	0.75 N

[0236] 细胞粘附

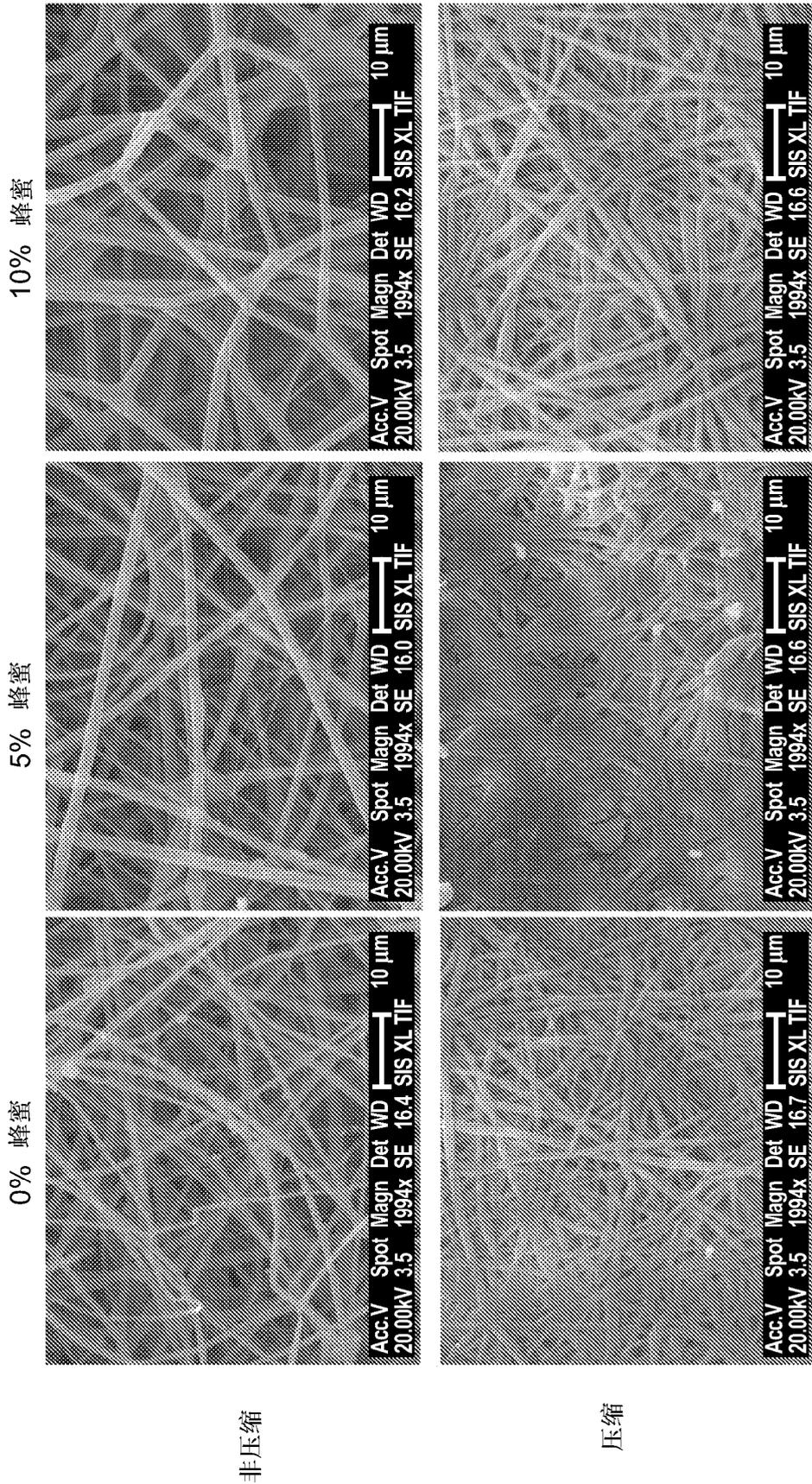
[0237] 与0%MH和Bio-Gide膜相比,添加MH显著增加了第1天的细胞附着(图12)。KLS Martin膜也附着了大量的细胞,这是由于它的2D膜表面类似于组织培养塑料。KLS Martin (PLA)的缺点是其降解,所述降解导致酸性微环境。7天和14天后,所有明胶+ CW + MH膜都覆盖在细胞中,其中Bio-Gide对照中还没有可见的细胞附着。荧光成像在7天和14天变得更加困难,最有可能是由于细胞在改造膜时的一些迁移。未来的研究将分析细胞增殖、活力、分泌的再生标记和细胞外基质产生。

[0238] 其它实施方案

[0239] 从前面的描述可以看出,可以对本文描述的发明作出各种变化和修改,以将其用于各种用途和条件。这些实施方案也在以下权利要求的范围内。

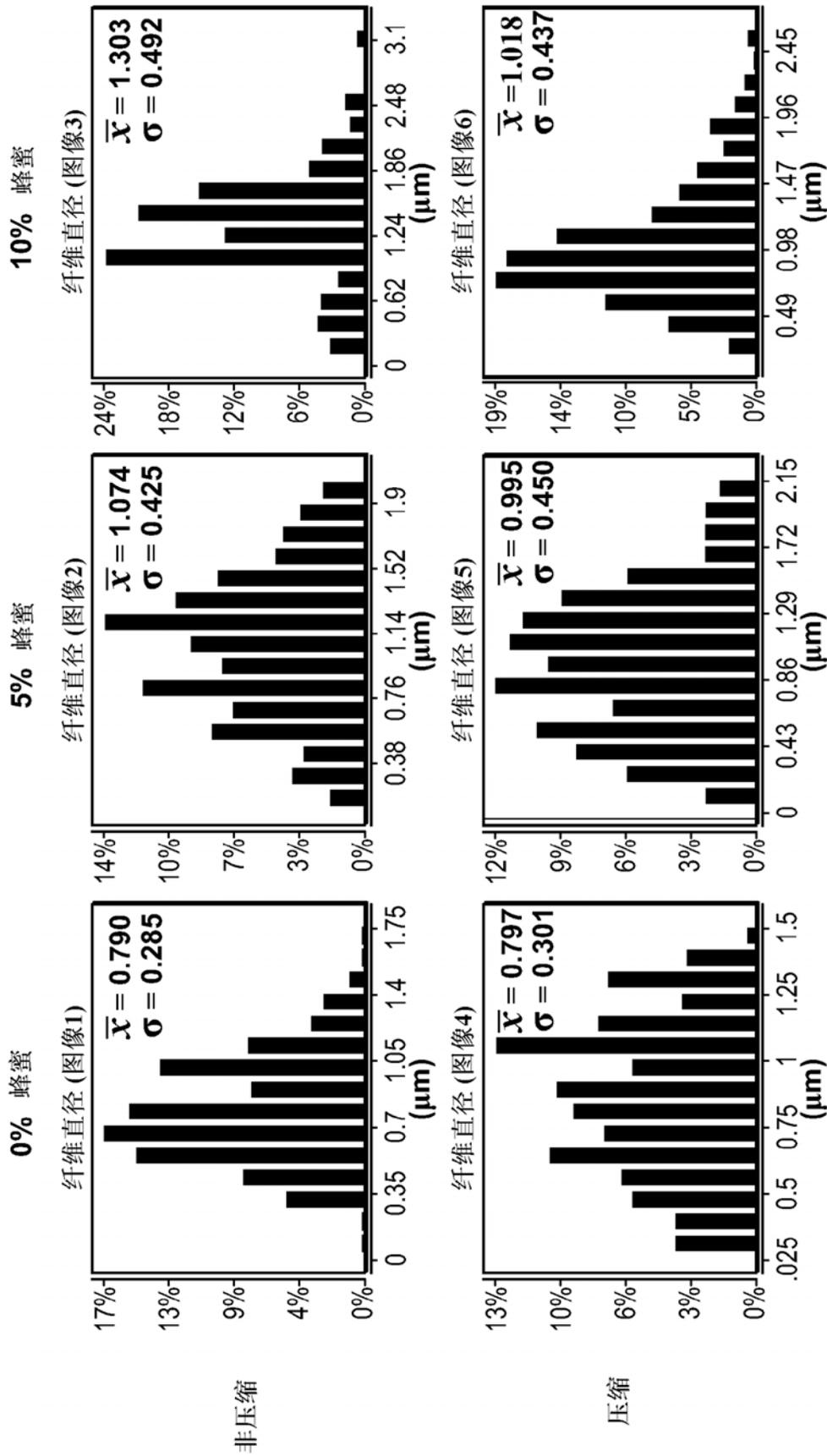
[0240] 本文的变量的任何定义中记载的元素的列表包括作为列出的元素的任何单个元素或组合(或子组合)的该变量的定义。本文的实施方案的记载包括作为任何单个实施方案或与任何其它实施方案或其部分的组合的实施方案。

[0241] 本说明书中提及的所有专利和出版物通过引用并入本文,其程度如同每个独立专利和出版物被具体和单独地指明通过引用并入。



非压缩和压缩的静电纺丝明胶+15%CW+蜂蜜支架(非交联)的SEM图像。  
 刻度条和放大倍数分别为10μm和2kx。

图 1



使用来自图1的SEM图像的 FibrQuant™ 自动纤维直径分析。  
 上述直方图显示纤维尺寸分布以及平均值和标准偏差（微米）。

图 2

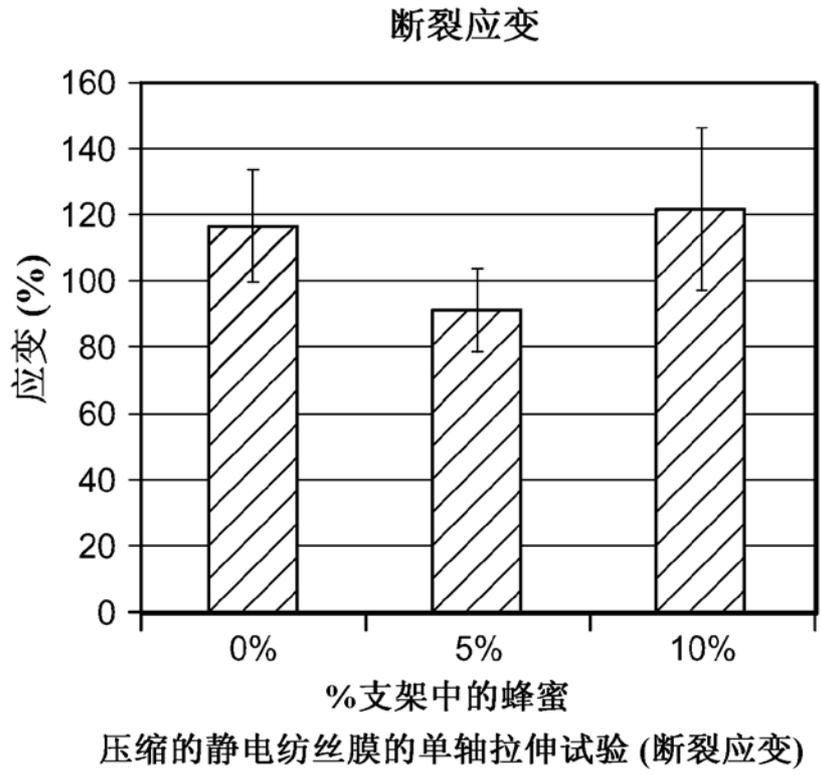


图 3A

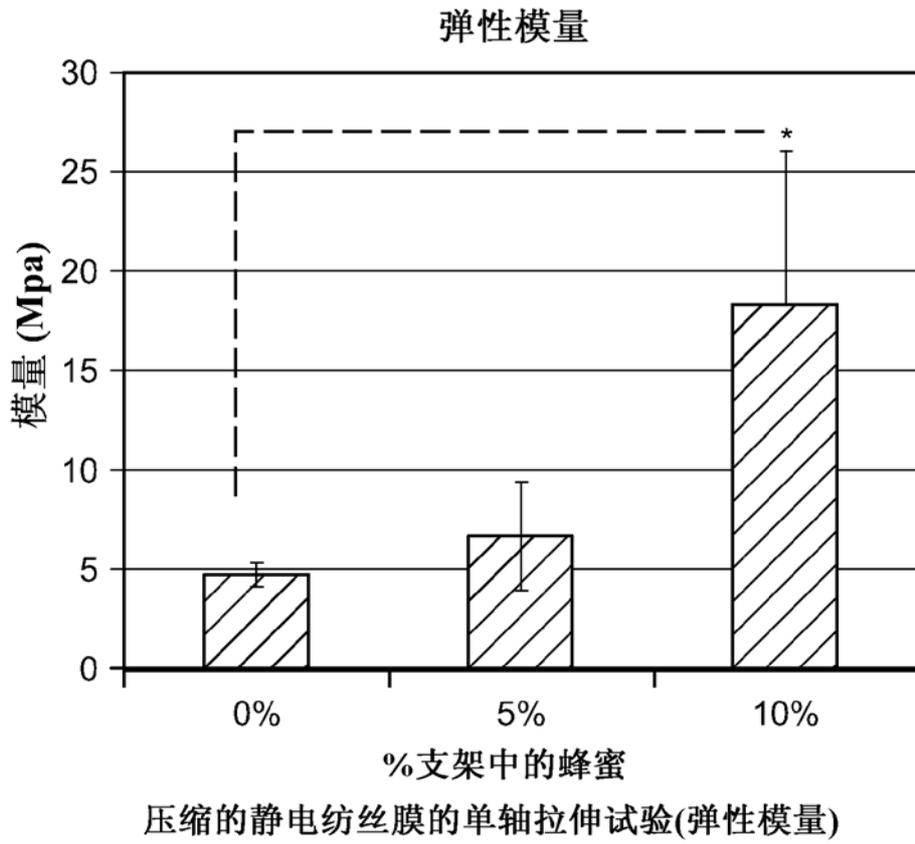
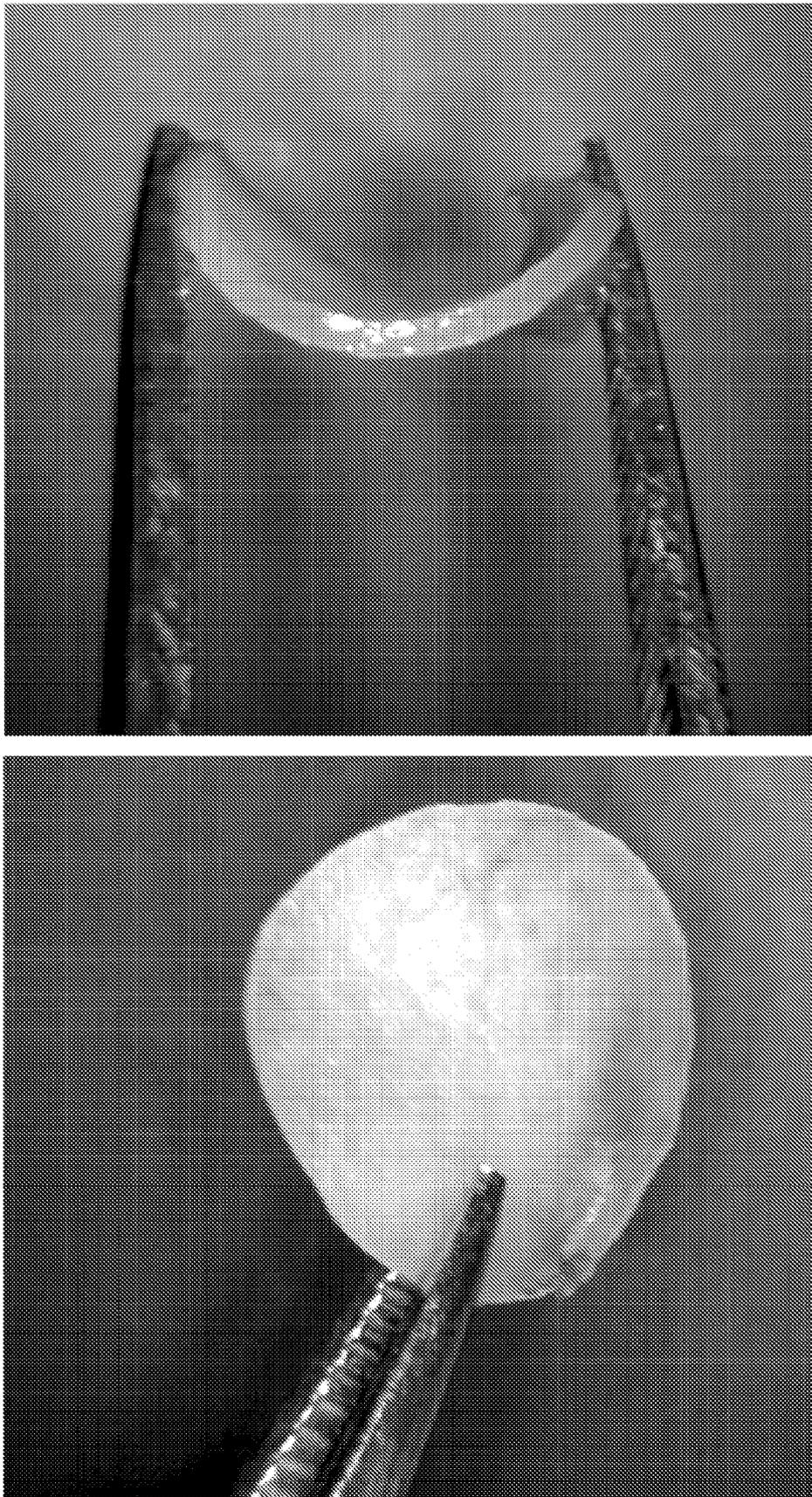
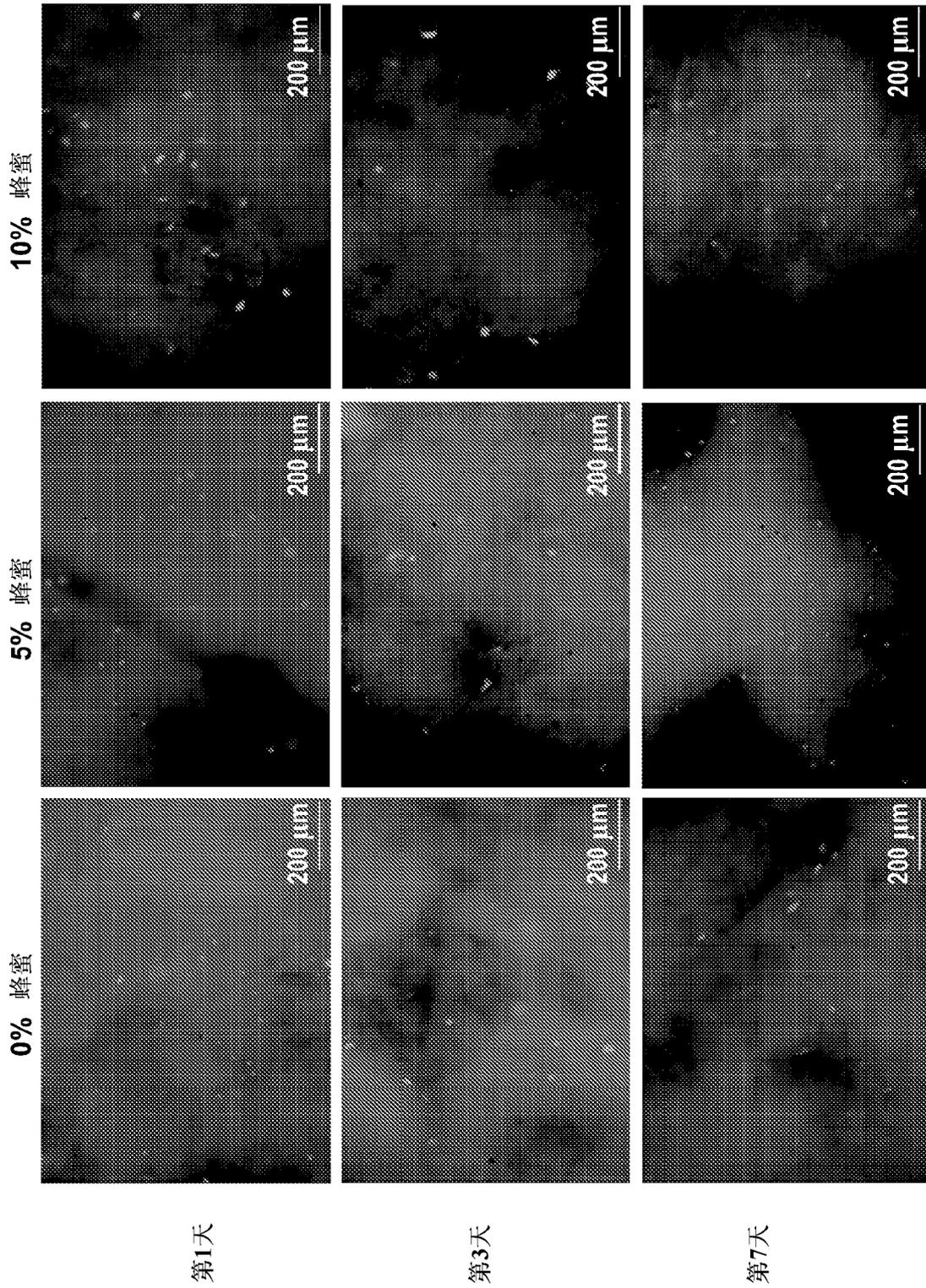


图 3B



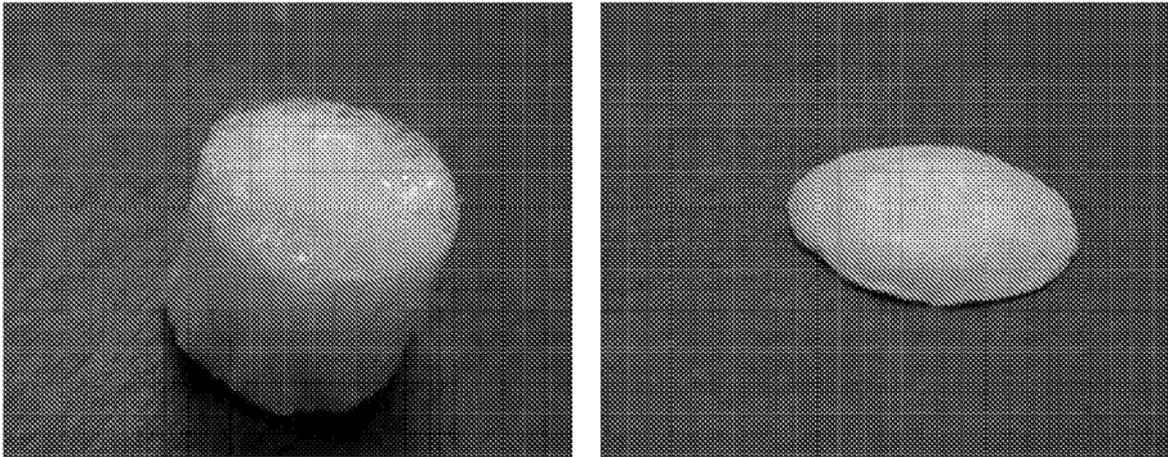
可成形的水合10%蜂蜜压缩膜。

图 4



细胞化 (HDF) 压缩的静电纺丝的膜的DAPI图像。  
刻度条和放大倍数分别为200μm和10x。

图 5

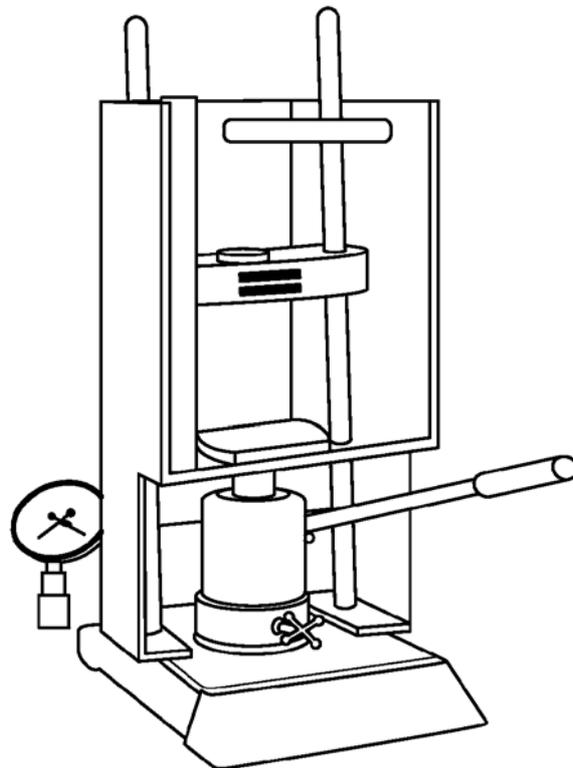


非压缩  
(5.5mm厚)

压缩  
(0.3mm厚)

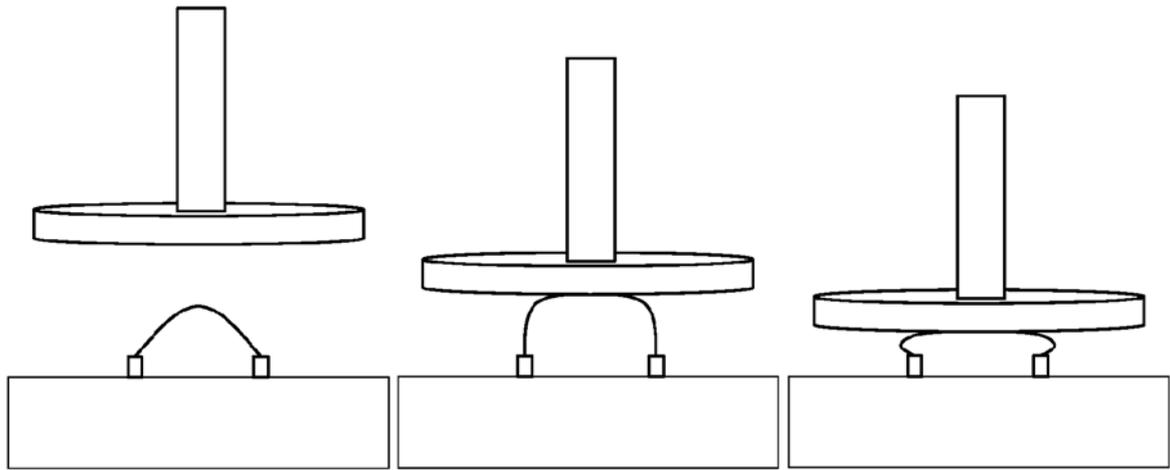
非压缩和压缩明胶+ 10% CW + 30mg/mL蜂蜜海绵的一般大体外观的DinoLite图像。可以将海绵制备成任何尺寸（取决于模具）并随后压缩。

图 6



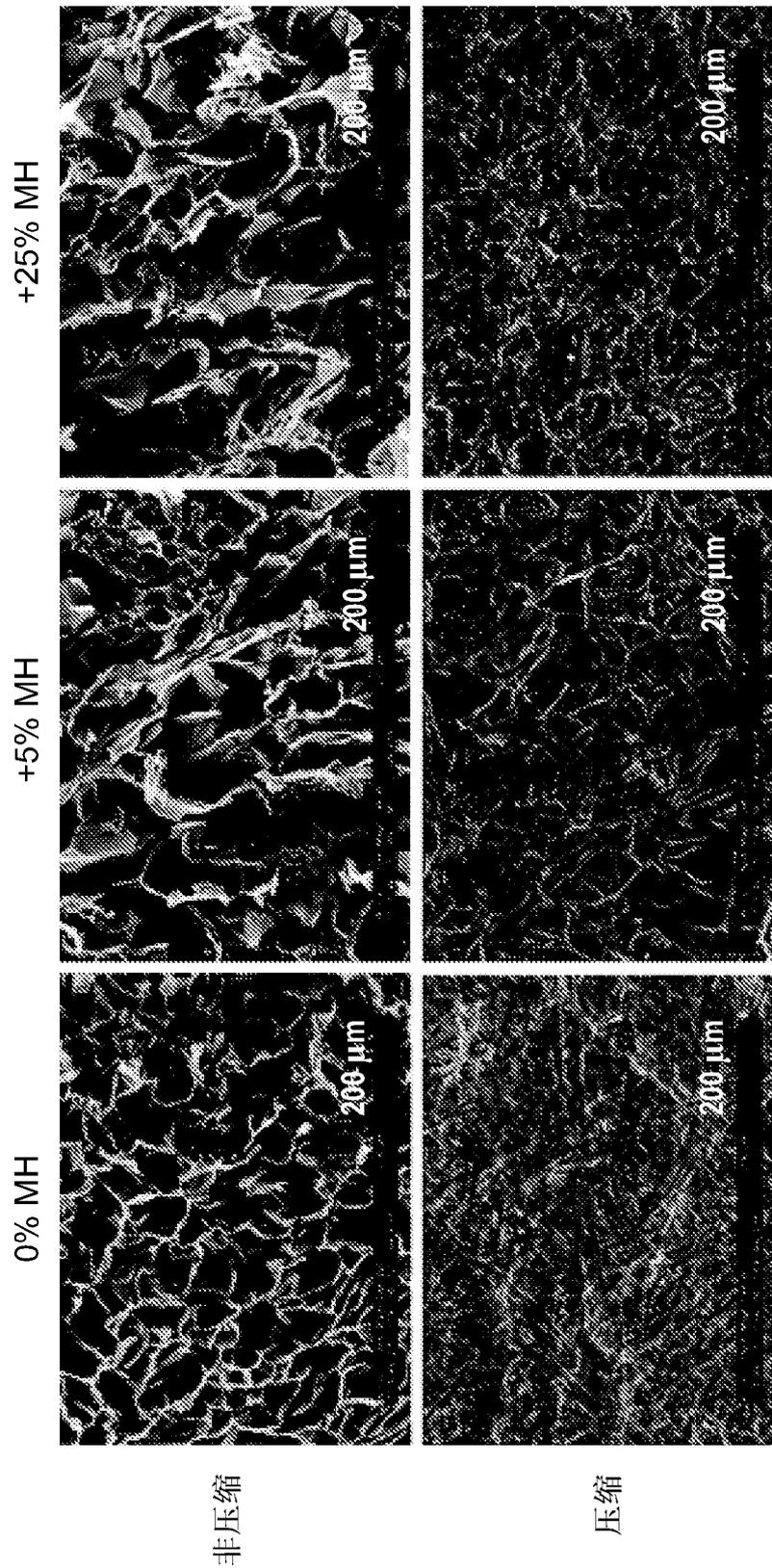
用于支架压缩的Carver液压单元。

图 7



机械测试示意图。

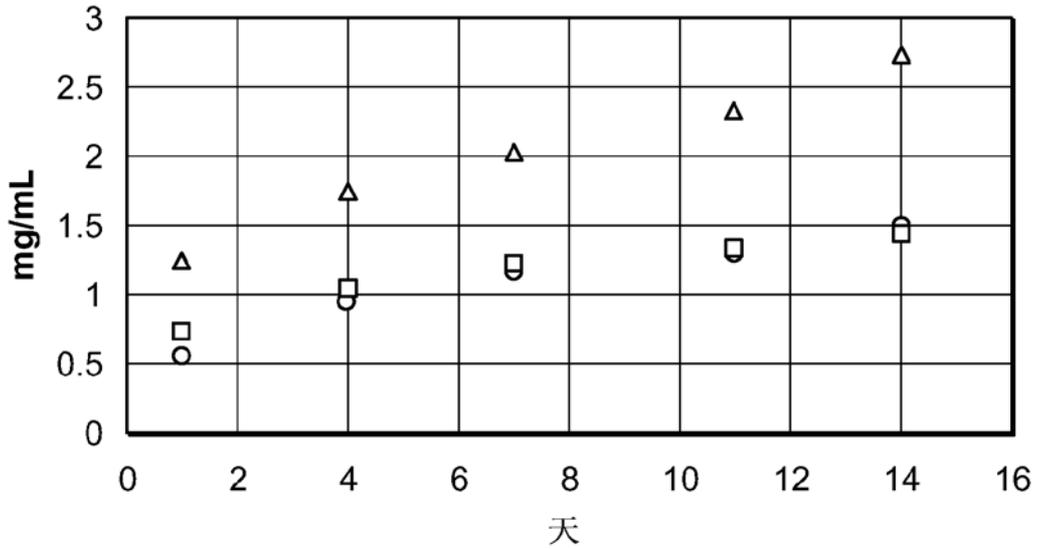
图 8



非压缩和压缩的明胶+ CW + MH膜的SEM图像。  
刻度条和放大倍数分别为200μm和100x。

图 9

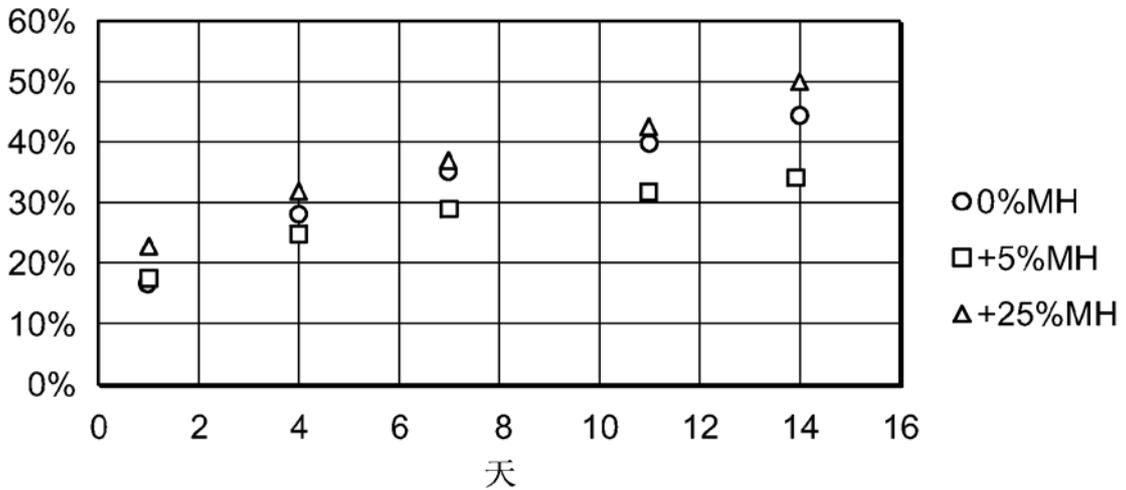
累积平均释放



明胶+ CW + MH降解结果(BCA测定), 如累积平均释放测量所示

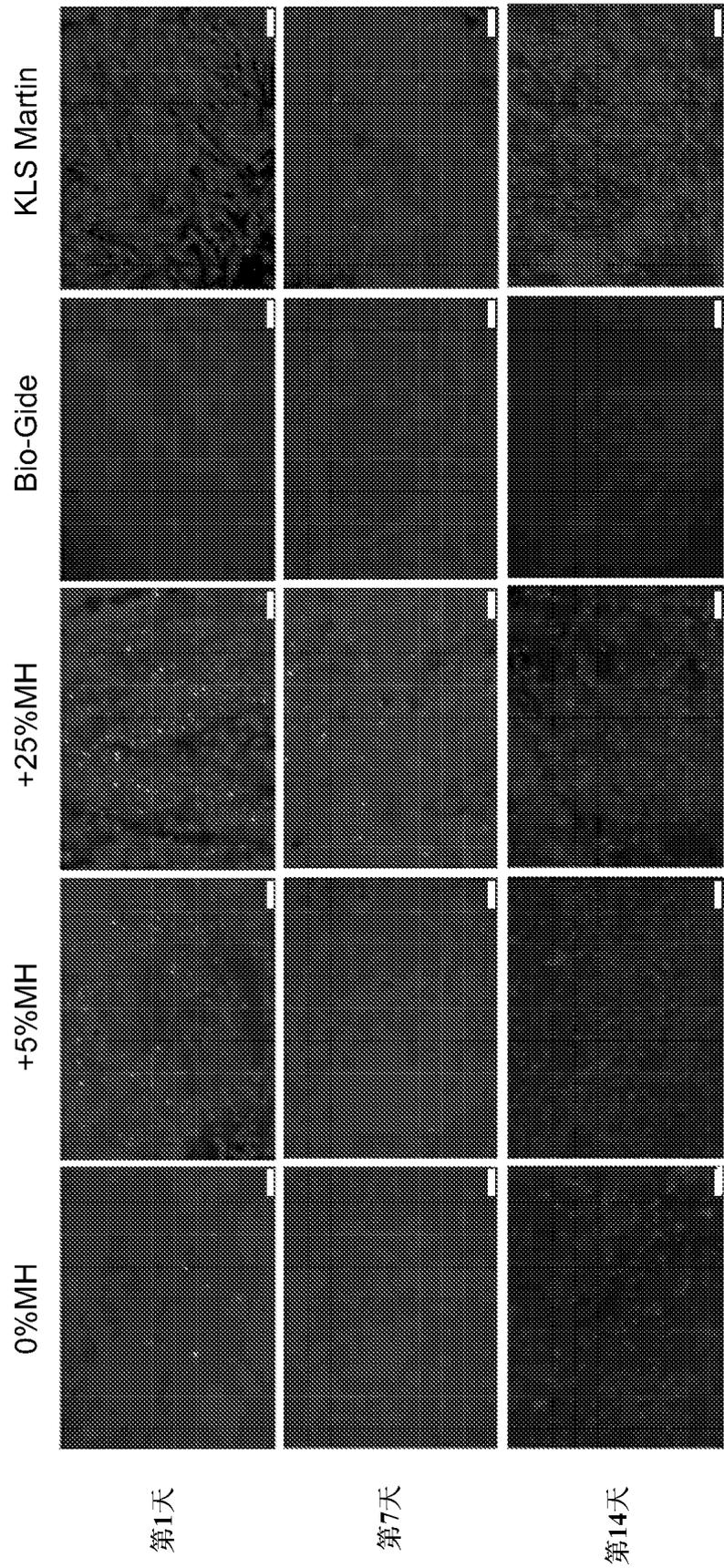
图 10A

累积百分比释放



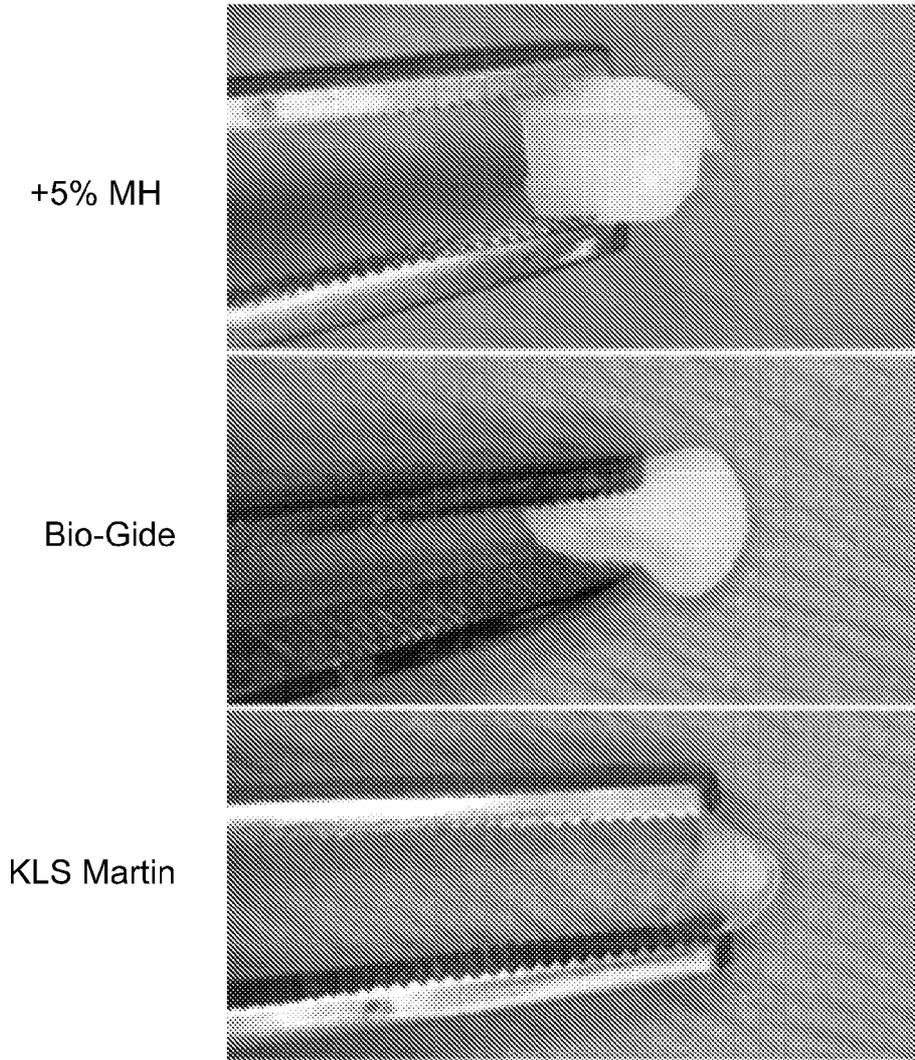
明胶+ CW + MH降解结果(BCA测定)的图, 如累积百分比释放测量所示

图 10B



细胞化(HDF)的压缩明胶+ CW + MH膜的DAPI图像。刻度条和放大倍数分别为100μm和10x。

图 11



可成型的水合膜。

图 12