



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102552967 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201110365186. 7

(22) 申请日 2007. 12. 17

(30) 优先权数据

60/875, 150 2006. 12. 15 US

61/000, 887 2007. 10. 30 US

(62) 分案原申请数据

200780051215. 4 2007. 12. 17

(73) 专利权人 生命连结有限公司

地址 以色列凯撒里亚

(72) 发明人 奥莱恩·普里斯-布鲁姆

艾沙伊·艾塔 纳塔利·伊莱姆

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

(56) 对比文件

US 6007613 A, 1999. 12. 28, 全文.

Matrin K. et al.. Mechanical Properties of Biomimetic Tissue Adhesive Based on the Microbial Transglutaminase-Catalyzed Crosslinking of Gelatin.

《Biomacromolecules, American Chemical Society》. 2004, 第5卷 1270-1279.

审查员 傅晓亮

(51) Int. Cl.

A61L 15/32(2006. 01)

A61L 15/42(2006. 01)

A61L 15/44(2006. 01)

A61F 13/02(2006. 01)

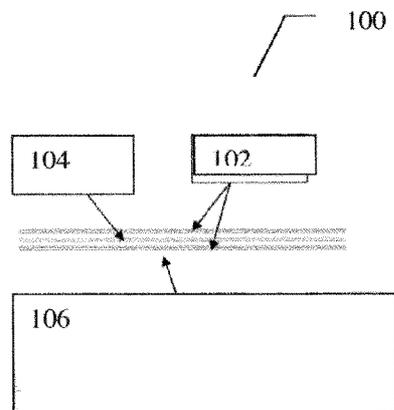
权利要求书2页 说明书58页 附图11页

(54) 发明名称

明胶-转谷氨酰胺酶止血敷料和密封材料

(57) 摘要

一种医用粘合材料,其包括明胶和无毒性交联材料(例如转谷氨酰胺酶)。本发明的可选择的实施方案包括其中转谷氨酰胺酶层夹在第一和第二明胶层之间的敷料。该止血产品对创伤组织的治疗是有用的。



1. 一种止血或体液密封剂,其中所述密封剂包括明胶和转谷氨酰胺酶组合物的组合,其中所述转谷氨酰胺酶组合物具有至少 40U/gm 的比活性水平,并且其中所述明胶与所述转谷氨酰胺酶组合物的重量比率是在 1:1 至 300:1 的范围内;

其特征在于,当所述密封剂被施用至创伤部位时,明胶链和组织细胞外基质的内生胶原蛋白之间交联以产生对流体渗出或流血的障碍物,其中所述转谷氨酰胺酶是微生物转谷氨酰胺酶。

2. 如权利要求 1 所述的止血或体液密封剂,其中所述明胶已经被修饰以具有降低的溶胶-凝胶转变温度或者其中所述组合物还包含添加剂以降低所述明胶的溶胶-凝胶转变温度,以便于所述明胶在低于标准动物明胶的天然溶胶-凝胶转变温度的温度与转谷氨酰胺酶形成溶液。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的止血或体液密封剂,其中所述转谷氨酰胺酶作为所述转谷氨酰胺酶组合物的一部分被加入,并且明胶与转谷氨酰胺酶组合物的重量比率在从 1:1 至 100:1 的范围内。

4. 如权利要求 3 所述的止血或体液密封剂,其中所述转谷氨酰胺酶组合物具有至少 200U/gm 转谷氨酰胺酶的比活性水平。

5. 如权利要求 3 所述的止血或体液密封剂,其中所述明胶包括具有至少 250 布卢姆的高分子量明胶。

6. 如权利要求 5 所述的止血或体液密封剂,其中所述组合物还包含增塑剂。

7. 如权利要求 6 所述的止血或体液密封剂,其中所述增塑剂选自多元醇、蔗糖、三乙醇胺、间苯二酚、硫二甘醇、甲苯磺酸的钠盐、丁二醇、硝酸脲、硫脲、脲、谷氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、甘氨酸、KSCN、KI 和 LiBr 组成的组。

8. 根据权利要求 7 所述的止血或体液密封剂,其中所述多元醇包括甘油、木糖醇和山梨糖醇。

9. 如权利要求 7 所述的止血或体液密封剂,其中所述增塑剂包括脲、丙三醇或山梨糖醇的至少一种,并且其中丙三醇的浓度比率范围是从 0.5:1 至 5:1 的丙三醇:明胶,重量/重量;其中山梨糖醇的浓度比率范围任选地是从 0.5:1 至 5:1 的山梨糖醇:明胶,重量/重量;其中脲的浓度比率范围任选地是从 1:2 至 2:2 的脲:明胶,重量/重量。

10. 如权利要求 9 所述的止血或体液密封剂,其中所述丙三醇的浓度比率范围是从 1:1 至 2:1 的丙三醇:明胶,重量/重量。

11. 如权利要求 9 所述的止血或体液密封剂,其中所述山梨糖醇的浓度比率范围是从 1:1 至 3:1 的山梨糖醇:明胶,重量/重量。

12. 如权利要求 10 所述的止血或体液密封剂,其中所述山梨糖醇的浓度比率是从 1:1 至 3:1 的山梨糖醇:明胶,重量/重量。

13. 如权利要求 1 所述的止血或体液密封剂,还包含选自 pH 调节剂、还原剂和离子浓度调节剂组成的组的调节剂。

14. 如权利要求 13 所述的止血或体液密封剂,其中所述 pH 调节剂提供从 1.5 至 5.0 或从 7.0 至 9.0 的范围内的 pH。

15. 如权利要求 14 所述的止血或体液密封剂,还包含一种或多种盐;海藻糖糖类、甘露醇糖类或其他糖类以便喷雾干燥、冷冻干燥或其他蛋白干燥的稳定;或变性剂;或其组合。

16. 如权利要求 15 所述的止血或体液密封剂,其中所述变性剂选自由盐酸胍和脲组成的组,且其中如果所述变性剂为所述盐酸胍,浓度比率范围是从 1:2 至 2:2 的盐酸胍:明胶,重量/重量;或其中如果所述变性剂为所述脲,浓度比率范围是从 0.5:1 至 1:1 的脲:明胶,重量/重量。

17. 如权利要求 13 所述的止血或体液密封剂,其中所述还原剂选自由氯化镁和氢醌组成的组;且其中如果所述还原剂为所述氢醌,所述氢醌以从 0.2M 至 0.5M 的浓度存在于所述组合物的溶液中;或如果所述还原剂为所述氯化镁,所述氯化镁以从 2M 至 4M 的浓度存在于所述组合物的溶液中。

18. 如权利要求 17 所述的止血或体液密封剂,其中所述氢醌以 0.3M 至 0.4M 的浓度存在于所述组合物的溶液中。

19. 如权利要求 17 所述的止血或体液密封剂,其中所述氯化镁以 2.5M 至 3.5M 的浓度存在于所述组合物的溶液中。

20. 如权利要求 18 所述的止血或体液密封剂,其中所述氯化镁以 2.5M 至 3.5M 的浓度存在于所述组合物的溶液中。

21. 如权利要求 1 所述的止血或体液密封剂,还包含放热剂,所述放热剂任选地包括氯化钙、其他钙盐、氯化镁、金属氧化物/沸石或其组合的一种或多种。

22. 如权利要求 21 所述的止血或体液密封剂,其中对高出环境温度的每一摄氏度的温度增加,所述氯化钙在溶液中以从 0.2g 至 0.7g 氯化钙每 mL 所述组合物的量存在。

23. 如权利要求 1 所述的止血或体液密封剂,还包含明胶特异性蛋白酶、蛋白酶抑制剂或另外的止血剂中的一种或多种。

24. 如权利要求 23 所述的止血或体液密封剂,其中所述另外的止血剂进一步包括白蛋白、胶原蛋白、纤维蛋白、凝血酶、壳聚糖、硫酸铁或其他金属硫酸盐中的一种或多种。

25. 一种止血的敷料或绷带,包括权利要求 1-24 任一项所述的止血或体液密封剂。

26. 一种用于插入人类或低等哺乳动物的体内的医疗装置,包括如权利要求 1-24 任一项所述的止血或体液密封剂。

明胶 - 转谷氨酰胺酶止血敷料和密封材料

[0001] 本申请是申请日为2007年12月17日,申请号为200780051215.4,发明名称为“明胶 - 转谷氨酰胺酶止血敷料和密封材料”的申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及包含可吸收或不可吸收的材料和 / 或凝固蛋白的止血敷料、装置和剂。所述止血装置对创伤组织的治疗是有用的。

[0003] 发明背景

[0004] 控制出血(流血)是急救和战地创伤治疗的关键步骤。遗憾的是,可及部位的过度流血或致命的出血常常发生(J. M. Rocko 等人(1982). J. Trauma 22 :635)。来自越南战争的死亡率数据表明10%的战斗死亡归因于未控制的肢体出血。越南战争期间多达三分之一的由于失血的死亡本可通过使用有效的战地出血控制法来避免。(SAS/STAT使用指导,第4版(Cary, N. C. :SAS Institute Inc ;1990))。

[0005] 尽管平民创伤死亡率统计没有提供由于肢体出血的院前死亡的确切数字,但实例和轶事性报道指出相似的发生率(J. M. Rocko 等人(1982). J. Trauma 22 :635)。这些数据表明通过院前使用简单并有效的出血控制的方法可实现存活的显著增加。遗憾的是,这种方法还没有通过使用商业上可获得的止血装置而被成功地证明过。

[0006] 个别地,外科手术创伤闭合目前通过有利于通过将组织拉在一起而愈合的缝合线和缝合钉来完成。然而,它们常常未能产生对避免流体渗出来说必需的足够的密封。因此,对避免外科手术后的渗出(包括常常沿缝合钉和缝合线的线发生的渗出)的设备和方法存在巨大的、未满足的需求。需要这种设备和方法作为缝合线和缝合钉的辅助以在外周血管重建、硬膜重建、胸部、心血管、肺、神经以及胃肠道的外科手术中实现止血或其他的流体淤滞(Fluid-stasis)。

[0007] 目前市场上的大多数高压止血装置如果真是粘合的,都是标称的。这种设备的好的实例为QuikClot® ACS™(Z-Medica, Wallington, CT) 和 HemCon™绷带(HemCon, Portland, OR),目前对美国武装部队成员提供的这两种止血装置。QuikClot 海绵中的矿物沸石晶体引起血液中水分子的吸收,因此浓缩了凝固因子并加快了血液凝固。构成 HemCon 绷带的壳聚糖混合物具有正电荷并吸引具有负电荷的红血球。红血球细胞被拉进敷料中,形成创伤上的密封并稳定创伤表面。

[0008] 上文提及的 HemCon 绷带产品是为了提供院前出血控制而开发的并已经在本领域内显示出一定的成功。然而构成 HemCon 绷带的壳聚糖网络可被血液饱和并在面对快的血流或在1-2小时后遇到创伤的中速血流时迅速失效(B. S Kheirabadi 等人(2005). J. Trauma. 59 :25-35 ;A. E. Pusateri 等人(2006). J. Trauma. 60 :674-682)。而且,HemCon 绷带片只可用作不能容易地适应不规则创伤的刚性片,进一步限制了其效用。

[0009] 已表明用于出血控制的其他基于多糖的止血设备是 RDH™(AcetylGlucosamine)、TraumaDEX™(MPH) 和 Chitoskin™(Chitosan&Gelatin)。然而,这些类型的绷带中没有一个是能够始终如一地显示出在面对大量血流时避免失效。其他近来介绍的止血设备包括

Celox™(Chitosan Crystals) 和 WoundStat™(TraumaCure Inc., MD) (蒙脱石矿物质和超级吸收性聚合物的颗粒状混合物)。然而,这两种产品都迅速膨胀以充满创伤部位,使得它们仅适于在特定类型的创伤中加快血液凝固并带来降低甚至清除周围血管中血液的危险。

[0010] 也是上文提及的 QuikClot ACS™也具有已证明的对中等水平的出血止血的效力。然而,矿物沸石的水吸收机制在没有大量的热释放时不能发生。因此,QuikClot ACS™的施用导致了创伤部位的高温和严重的烧伤,其损害了周围组织区域并使得之后的医疗护理复杂得多 (A. E. Pusateri 等人 (2006). J. Trauma. 60 :674-682)。明显地,没有这种显著副作用的止血溶液是更理想的。尽管 QuikClot 已经开发了一种在施用释放较少热的矿物混合物,但较冷的混合物的效力对严重的外伤治疗来说并不足够。此外,最初的或是较冷的矿物混合物都不能停止快速的动脉流血。

[0011] 所有上文提及的产品都依赖于自然凝固级联以控制流体从创伤部位渗出。因此,它们都只对停止血流有用并且每一种都只在适于该特定装置的条件有用。一般的创伤部位密封 (尤其是创伤部位渗出非血液的流体时) 超出了这些产品的范围。

[0012] 发明概述

[0013] 得到可被用于广泛应用 (包括但不限于外科手术应用、止血控制和创伤流血控制) 的无毒性的粘合材料是所需要并且有用的。得到可被用作止血绷带的部分的无毒性的粘合材料也是所需要并且有用的。得到可被用作的外科手术的密封材料的无毒性的粘合材料也是所需要并有用的。

[0014] 本发明通过提供包含可交联的蛋白和诱导所述可交联的蛋白交联的非毒性材料的粘合材料而克服了背景技术的缺陷。优选地,可交联的蛋白包括如本文所描述的明胶和任何明胶变体或变体蛋白。可选择并且优选地,无毒性材料包含可选择地包含微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 的转谷氨酰胺酶 (TG)。依照本发明的某些实施方案,粘合材料被提供于绷带中,该绷带优选地适用作止血绷带。依照其他的实施方案,它被提供为密封材料,该密封材料优选地适用作外科手术的密封材料。

[0015] 当通过转谷氨酰胺酶起作用时,蛋白胶原蛋白变性形式的明胶经历了迅速的交联而形成颤动的凝胶 (vibrant gel)。所发生的凝胶化过程与纤维蛋白在其与凝血因子 XIII 和钙接触时经历的自然的晚期凝固级联非常相似。而且所产生的凝胶表现出非常类似于 (如果不高于) 纤维蛋白胶的粘合能力 (M. K. McDermott, Biomacromolecules. 2004 年 7 月-8 月 ;5(4) :1270-9)。

[0016] 本发明利用了明胶-TG 交联与纤维蛋白凝固级联的相似性来模仿高级纤维蛋白敷料优良的止血性能。用凝胶-TG 层叠物取代纤维蛋白绷带的纤维蛋白-凝血酶层叠物的结果是产生了可控制出血而没有显著副作用的、新的、便宜并且稳定的敷料。这一新的绷带通过允许以防止 TG 蔓延至没有被绷带接触的区域的方式对创伤部位受控地应用大量混合物而将明胶-TG 混合物的粘合性最大化。因此,这一协作性的技术代表了高级纤维蛋白敷料领域和明胶-TG 粘合领域两者的进展。

[0017] 不像凝固的纤维蛋白网络,明胶-TG 网络因其可使用除此以外没有生理活性的特定蛋白酶特异性地溶解而具有额外益处 (T. Chen, Biomacromolecules. 2003 年 11 月-12 月 ;4(6) :1558-63)。因此,在明胶-mTG 止血层叠物敷料可复制纤维蛋白-凝血酶止血层叠物的性能的同时,它还可没有困难地按需要被除去。

[0018] 除了其作为用于创伤治疗的止血的战地敷料的应用外,本发明的基于明胶-TG 的止血装置在控制手术期间快的动脉流血,血管内导管插入(catherization)后的流血或者损伤后或做手术后其他体液的渗出上具有巨大的潜力。

[0019] 到目前为止,尽管交联的明胶-TG 的胶凝性质和明胶-TG 交联的粘合能力已经被分别研究,但是还没有做出努力来同时利用两种性质以形成止血的或组织密封的组合物。

[0020] 已在大鼠视网膜模型中体内证明了明胶-TG 化合物的粘合使用,其中将一滴明胶-TG 混合物用于视网膜附着(T.Chen, J Biomed Mater Res BAppl Biomater. 2006 年 5 月 ;77(2) :416-22)。

[0021] 还试验了明胶-TG 凝胶作为细胞疗法的支架的使用(美国专利 5,834,232。还有 Ito A, J Biosci&Bioeng. 2003 ;95(2) :196-99。还有 BroderickEP, J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005 年 1 月 15 日 ;72(1) :37-42)。

[0022] 这些研究强调了明胶-TG 混合物的生理使用的安全性,但它们每一种仅使用明胶-TG 交联的特性之一,并且未能教导或显示本发明提出的止血和组织密封的进展。

[0023] 用于止血或流体淤滞的明胶-TG 混合物的使用还标志着使用转谷氨酰胺酶、尤其是组织 TG 独立地作为外科手术粘合剂的大量证据充分的尝试的显著进步(USP 5736132, USP 61908196,及其他)。使用明胶作为 TG 的底物为 TG 活性增加了机械支架,提供了超过 TG 单独使用的大量优点。TG 与明胶一起与 TG 单独相比可被更精确施用,可精确适应创伤部位并容许受控的生物可吸收性。

[0024] 本发明克服了背景技术中的缺陷。之前所尝试的溶液使用了用于轻微至中度的止血的修饰的和未修饰的明胶网络的许多形式。然而,原位形成可控制快速流血动脉出血或其他显著的体液渗出的强力交联的明胶网络的方法是欠缺的。一种方法,例如可体内形成强力明胶网络的明胶-TG 交联增加了明胶基质的机械强度并使得它适于控制高压的动脉流血和其他体液渗出。除了改进的交联方法以外,本发明涉及许多其他的创新,其为它提供了具有超过现有的基于明胶的止血材料的优点。下文提供了非限制性的、示例性说明的部分列表:

[0025] 1) 明胶链和组织 ECM(细胞外基质)内生胶原蛋白之间的原位交联产生强力的止血的流体障碍物。

[0026] 2) 明胶和 TG 可通过以冻干的形式被施用以及被血液或其他体液重构而更有效实现止血或流体淤滞。

[0027] 3) 冻干形式的明胶-TG 混合物已经增加了保存期限。

[0028] 4) 层叠的冻干形式的明胶和 TG 提供了更迅速的重新构成,其对高压流体流动环境有帮助。

[0029] 5) 向基本的明胶-TG 混合物加入机械衬垫通过减缓流体以及使得明胶-TG 有更多时间交联并封闭流体渗出而增加了混合物的止血或流体控制能力。

[0030] 依照本发明的某些优选的实施方案,明胶-mTG 混合物在向创伤部位施用前或冻干前被部分交联。在另一个实施方案中,未交联的明胶或 mTG 与部分交联的明胶-mTG 一起存在。

[0031] 本质上是粘性的止血绷带是本领域已知的,它们的使用还有许多困难和缺陷。例如,纤维蛋白原和凝血酶的广泛的止血使用在第二次世界大战的最后一年中是普遍的,但

由于肝炎的传播而被放弃了 (D. B. Kendrick, 第二次世界大战中的血液计划 (Washington DC: 美国卫生总署办公室 (Office of the Surgeon General), 陆军部 (Department of Army); 1989), 363-368)。

[0032] 第一次世界大战期间在 Grey 和他的同事制得预先聚合的纤维蛋白薄片和粉末时, 纤维蛋白原敷料被创伤外科医生首次使用。第二次世界大战期间, 美国军队和美国红十字会使用纤维蛋白和纤维蛋白膜的预先聚合的泡沫聚苯乙烯状的薄片生产纤维蛋白胶。与对照相比较时, 基于纤维蛋白的敷料在控制流血时间和减少血液损失上显示出显著的差异 (Jackson, M., 等人 (1996). *J. of Surg. Res.* 60 :15-22 ;和 Jackson, M. 等人 (1997). *Surg. Forum.* XL, VIII :770-772)。

[0033] 尽管纤维蛋白原敷料在控制出血上的效力, 但当包含血液和血清源性疾病 (例如肝炎和 HIV) 常常被传播时, 终止了纤维蛋白原敷料的使用, 因为敷料包含纯化的人类或动物纤维蛋白原或其他纯化的血液产品 (Holcomb, J. B. 等人 (1997). *Surgical Clinics of North America.* 77 :943-952)。

[0034] 然而在过去的几年中, 血浆纯化技术已经大大减小了血液和血清源性疾病的风险, 对用于治疗创伤的基于纤维蛋白的产品已经有了恢复的兴趣。

[0035] 美国红十字会已经描述了一种止血的层叠物敷料, 它包含夹在纤维蛋白原层之间的凝血酶层 (参见, 例如 PCT/US99/10952, 美国专利第 6054122、6762336 号)。这种止血敷料已经在治疗可能致命的创伤上显示了很大的成功 (E. M. Acheson. (2005). *J. Trauma.* 59(4) :865-74 ; 讨论 874-5 ;B. S. Kheirabadi (2005). *J. Trauma.* 59(1) :25-34 ; 讨论 34-5 ;A. E. Pusateri. (2004). *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 15 ;70(1) :114-21)。事实上, 在这些对猪的研究中, 纤维蛋白层叠物敷料在治疗可能致命的创伤上性能大大超过 HemCon 和 QuikClot 产品, 相对于使用标准的军队战地绷带 HemCon 绷带或 QuikClot 粉末时的 0% 的存活, 显示出 > 75% 的 2 小时后存活率。

[0036] 尽管这些敷料可在用于治疗创伤组织的方法中被使用, 但这些传统的层叠物敷料可发生分层, 由此敷料的层的边缘不再彼此粘附。这种分层可导致敷料组成层的减少的相互作用, 以及敷料在防止出血上降低的效力。

[0037] 一种改进的基于纤维蛋白的止血层叠物敷料已经被描述, 其包括包含可吸收性物质和 / 或凝固蛋白的多个层。尤其是, 所述敷料 (参见 PCT/US03/28100, 美国专利申请第 0060155234 号) 包括夹在第一和第二层纤维蛋白原之间的凝血酶层, 其中凝血酶层不与第一和 / 或第二层纤维蛋白原共同扩张 (coextensive)。

[0038] 尽管纤维蛋白创伤敷料上的进展, 这些绷带还是具有许多的缺陷。必须从人类血浆中纯化用于制造绷带的冻干的纤维蛋白原。由于这是昂贵并且需要小心处理的方法, 所得的纤维蛋白原绷带对于生产来说极其昂贵并且在常温下只具有非常短的保存期限。向衬垫中加入的纤维蛋白原越多, 在停止流血时绷带产生的效果越好。然而, 向衬垫中加入的纤维蛋白原越多, 绷带越昂贵。此外, 绷带衬垫上大量的纤维蛋白原可增加绷带的脆性, 使得它易碎而难以操作。作为这些限制的结果, 没有有效的纤维蛋白绷带是商业上可获得的。

[0039] 因此, 尽管高级的纤维蛋白敷料可控制出血而没有显著的副作用并且弥补之前所提及的活性创伤治疗止血的不足, 但是价格和稳定性的限制为这种类型的敷料的使用带来明显缺点。

[0040] 液体纤维蛋白密封材料或胶已经作为出血控制的手术室辅助而被使用了许多年 (J. L. Garza 等人 (1990). J. Trauma. 30 :512-513 ;H. B. Kram 等人 (1990). J. Trauma. 30 :97-101 ;M. G. Ochsner 等人 (1990). J. Trauma. 30 :884-887 ;T. L. Matthew 等人 (1990). Ann. Thorac. Surg. 50 :40-44 ;H. Jakob 等人 (1984). J. Vase. Surg. 1 :171-180)。而且,临床上已经将单一供体纤维蛋白密封材料广泛地用于各种手术情况中。(W. D. Spotnitz. (1995). Thromb. Haemost. 74 :482-485 ;R. Lerner 等人 (1990). J. Surg. Res. 48 :165-181)

[0041] 尽管在外科手术领域目前使用大量可吸收的外科手术止血剂,但现有产品不够强大以提供控制严重的出血或其他生物流体的有力流动所必需的机械和生物支持。

[0042] 目前可获得的止血绷带例如胶原蛋白创伤敷料 (INSTAT™, Ethicon, Somerville, NJ 和 AVITENE™, CR Bard, Murray Hill, NJ) 或干燥的纤维蛋白凝血酶创伤敷料 (TACHOCOMB™, Hafslund Nycomed Pharma, Linz, Austria) 被限制在外科手术应用中使用,并且不足以抵抗大血流中的溶解。他们还未拥有足够的粘合性质以在严重血流的止血中起到任何实际的作用。这些现在可获得的外科手术的止血绷带还是需要小心处理的并且因此它们经弯曲或承载压力受损时容易失效。它们还容易在出血性流血中溶解。这些绷带的这种溶解和瓦解可能是灾难性的,因为其可以导致对创伤粘合的丧失并且使得流血持续不减弱。

[0043] 施用氧化的纤维素 (SURGICEL, Ethicon, Somerville, NJ) 或明胶海绵 (SURGIFOAM, Ethicon, Somerville, NJ) 可吸收性止血剂也不可处理动脉流血。这些产品意图控制经由骨和硬膜外静脉渗透的低压流血。明胶海绵不适于高压快速流动的动脉流血,因为它们不能与流血源形成紧密结合并因此容易被移去。氧化的纤维素也不适于控制动脉流血,因为它膨胀并且需要在完成止血时将其从施用部位除去。当血流过太时,在完成止血之前发生过多的膨胀 (M. Sabel 等人 (2004). Eur. Spine J. 13(1) :S97-101)。

[0044] 由于通常与轻微的毒性和在本领域中不能被容易的制备和应用有关的原因,最广泛使用的组织粘合剂通常不适于被用作止血或体内流体淤滞装置。这一粘合剂的好的实例是氰基丙烯酸酯家族的局部皮肤粘合剂,例如 Dermabond™、Indermil™、Liquiband™等。氰基丙烯酸酯当暴露于空气时迅速活化的性质使得基于氰基丙烯酸酯的产品不适于在活性止血的战地敷料中使用,并且它们不能结合至湿表面使得它们不适于体内止血或流体淤滞使用。

[0045] 意图用于体内流体淤滞使用的现有的产品还有显著的问题。BioGlue™ (Cryolife Inc.) 是强粘合剂和密封材料但是包含通过戊二醛交联的白蛋白,一种有毒并且高神经毒性的物质。这一毒性大大的限制了其使用。另一种密封材料是 CoSeal (Baxter), 其包含聚乙二醇 (PEG)。尽管它是无毒的,但它只有弱粘合力,大大限制了其应用。

[0046] 明胶已被用于各种创伤敷料中。由于明胶凝胶具有相对低的熔点,它们在体温时不是非常稳定。因此,通过建立蛋白链之间的交联而使这些凝胶稳定化是很重要的。实践中,这通常通过用戊二醛或甲醛处理明胶而获得。因此可将交联的明胶制成对在流血创伤中诱导止血有用的干燥的海绵。这种海绵的商业上可获得的实例包括 Spongostan (Ferrosan, Denmark)、Gelfoam (Upjohn, USA) 和 Surgifoam (Ethicon, Somerville, NJ)。这些海绵的主要的缺点在于所使用的交联剂 (戊二醛或甲醛) 对细胞来说是有毒的。例如通过 de Vries 等人 (WHS 第二次年会的摘要集, Richmond, USA, 第 51 页,

1992) 的发现来示例性说明戊二醛交联的负面影响。这些作者表示戊二醛交联的胶原蛋白网络结构对细胞来说是有毒的,而未交联的品种无毒。因此,即使它们具有有益于止血的性质,这些产品作为用于治疗有问题的创伤的创伤敷料还不是非常理想的。所以,使用不同的毒性更小的交联技术的基于明胶的创伤敷料是非常需要的。

[0047] 除了潜在的毒性之外,明胶网络独自不提供对于控制快速流血来说所必需的机械性质。他们更适于仅需要少量流体吸收的创伤治疗应用。在一个研究中,结论是戊二醛交联的明胶的薄片更适于作为用于尤其是需要较长时间的营养障碍组织的持续创伤愈合的敷料。可选择地,它们可用作细胞附着的支架,其中它们可在整个延长的原位存在期间激发差反应性微环境 (poorly reactive microenvironment) (MG Tucci. (2001). *J. Bioactive&Comp. Polymers.* 16(2) :145-157)。

[0048] 用多糖交联的明胶网络也已经被建议用于控制流血。这些止血化合物是不受戊二醛交联的明胶海绵的潜在的毒性所限制的。然而,明胶-多糖物质通常缺少机械强度并且主要意在手术期间控制小量的渗透流体或在延长的医疗护理后时期限制创伤渗透。

[0049] 明胶-多糖化合物的一个实例是原位交联的明胶-藻酸盐创伤敷料。这种敷料没有粘合功能并且主要被用于控制创伤部位的湿度。所述敷料膨胀至它的原始尺寸的90%,其大大减少了它的机械强度 (B Balakrishnan 等人 (2005). *Biomaterials.* 26(32) : 6335-42)。

[0050] 另一个更加广泛的实例是交联的明胶-壳聚糖创伤敷料 (美国专利 6,509,039、4,572,906 中的实例)。虽然某些人已经建议使用这种敷料用于创伤治疗 (Chitoskin™),但这一材料的止血性质完全不足以控制高压流血。而且,所述材料在面对大体积的体液时显著膨胀。这种敷料更适用于治疗慢性创伤和烧伤。

[0051] 还有另一个实例被提及 (美国专利 6,132,759),其中用氧化的葡聚糖交联增溶 (solubilized) 明胶。这一材料由于其表现出高吸收能力以及对于治疗物质的递送 (尤其是向创伤) 来说有利的控制释放性质而被建议用于创伤的覆盖和长期治疗。

[0052] 目前没有涉及交联的明胶网络的物质或与明胶交联的其他物质的网络能够独立地提供对快速的体内流血的止血,即使添加凝血酶。已经进行了对比浸泡在活性凝血酶溶液中的 FloSeal 明胶基质 (BioSurgery, Fremont, CA) 和 GelFoam 明胶基质的止血能力的研究。5 分钟后没有一种强化的止血装置能够在超过 2/3 的患者中停止流动特征的流血。脉动的动脉流血是远比流动流血更加快速的并且肯定给这些凝血酶浸泡的基质带来问题 (FAWeaver 等人 (2002). *Ann. Vase. Surg.* 16(3) :286-93)。

[0053] 在任何一种实例中,都有在创伤治疗上的不同的缺陷,原因是没有能够控制出血而没有显著副作用的可获得的新的活性止血战地敷料。相似地,在手术护理上也有不同的缺陷,原因是没有能够承受快速流血并能够密封渗出非血液的体液的创伤部位的可获得的无毒性的密封材料。

[0054] 根据本发明的某些实施方案,提供了一种治疗创伤组织的方法,其包括对所述组织施用包含明胶和无毒性交联剂的组合物。

[0055] 可选择地,无毒性交联剂包括转谷氨酰胺酶。优选地,将转谷氨酰胺酶作为转谷氨酰胺酶组合物的一部分被包括,并且明胶与转谷氨酰胺酶组合物的重量比率是在从约 1 : 1 至约 300 : 1 的范围内。更优选地,转谷氨酰胺酶组合物具有至少约 40U/gm 的比活

性水平。最优选地,转谷氨酰胺酶组合物具有至少约 800U/gm 的比活性水平。

[0056] 可选择并且优选地,明胶-转谷氨酰胺酶组合物中的转谷氨酰胺酶的活性是从约 25 至约 400U/g 明胶。更优选地,所述活性是从约 40 至约 200U/g 明胶。

[0057] 可选择地,转谷氨酰胺酶包含除了血液来源的凝血因子 XIII 外的植物、重组动物或微生物来源的转谷氨酰胺酶。优选地,所述组合物具有从约 5 至约 8 范围内的 pH。

[0058] 可选择地,从动物来源、重组来源或其组合生产明胶。优选地,动物来源选自自由鱼和哺乳动物组成的组。更优选地,哺乳动物选自自由猪和牛组成的组。

[0059] 可选择地,明胶是 A 型(酸处理的)或 B 型(碱处理的)。更优选地,明胶包含高分子量明胶。

[0060] 可选择地,创伤的组织选自自由外科手术切割的组织、外科手术修复的组织 and 受外伤的组织组成的组。

[0061] 可选择地,方法进一步包括减少组织的流血或其他体液的渗出。可选择地,体液选自自由脑脊髓液、肠液、气(air)、胆汁和尿组成的组。优选地,方法进一步包括在组织中诱导止血或其他渗出的体液的淤滞。

[0062] 可选择地,创伤正在流血或渗出另一种体液,并且治疗创伤的组织包括对创伤部位施用所述组合物以促进明胶链和组织细胞外基质的内生胶原蛋白之间的原位交联以产生对流体渗出或流血的障碍物。

[0063] 可选择地,方法进一步包括形成仿生的血块。

[0064] 可选择地,施用所述组合物包括:将明胶和转谷氨酰胺酶混合以形成混合物;以及向组织施用混合物。

[0065] 依照本发明的其他实施方案,提供了一种用于在哺乳动物的创伤中诱导止血的方法,方法包括对创伤施用包含明胶和转谷氨酰胺酶的组合物。

[0066] 依照本发明的其他实施方案,提供了在受损伤的血管部位诱导仿生血块形成的方法,其包括对创伤施用包含明胶和转谷氨酰胺酶的组合物。

[0067] 依照本发明的其他实施方案,提供了包含明胶和转谷氨酰胺酶的组合的组合物,其中选择明胶的量和转谷氨酰胺酶的量的比率以在哺乳动物中诱导仿生血块的形成。

[0068] 依照本发明的其他的实施方案,提供了包含明胶和无毒性交联剂的组合的组合物,其中明胶的量和无毒性交联剂的量的比率足以在哺乳动物的创伤中减少流血。

[0069] 优选地,无毒性交联剂包括转谷氨酰胺酶。更优选地,将转谷氨酰胺酶作为转谷氨酰胺酶组合物的一部分加入并且明胶与转谷氨酰胺酶组合物的重量比率是在从约 1 : 1 至约 300 : 1 的范围内。更优选地,比率是在从约 1 : 1 至约 100 : 1 的范围内。最优选地,转谷氨酰胺酶组合物具有至少约 40U/gm 的比活性水平。同样最优选地,转谷氨酰胺酶组合物具有至少约 80U/gm 的比活性水平。同样最优选地,转谷氨酰胺酶组合物具有至少约 200、400 或 800U/gm 的比活性水平。

[0070] 可选择地,明胶-转谷氨酰胺酶组合物中的转谷氨酰胺酶的活性是从约 25 至约 400U/g 明胶。优选地,活性是从约 40 至约 200U/g 明胶。

[0071] 可选择地,转谷氨酰胺酶包含除了血液来源的凝血因子 XIII 外的植物、重组动物或微生物来源的转谷氨酰胺酶。优选地,所述组合物进一步包含稳定剂或填料。同样优选地,组合物具有从约 5 至约 8 范围内的 pH。

[0072] 可选择地,从动物来源、重组来源或其组合生产明胶。优选地,动物来源选自自由鱼和哺乳动物组成的组。更优选地,哺乳动物选自自由猪和牛组成的组。最优选地,明胶包含猪皮或猪骨或者其组合。同样最优选地,明胶是 A 型(酸处理的)或 B 型(碱处理的)。同样最优选地,明胶包含高分子量明胶。

[0073] 可选择地,明胶具有至少约 250 布卢姆(bloom)。优选地,所述鱼包括冷水种类

的鱼。

[0074] 可选择地,重组的明胶是使用细菌、酵母、动物、昆虫或植物系统或者任何类型的细胞培养物所生产的。

[0075] 可选择地,将明胶纯化以除去盐。

[0076] 可选择地,明胶具有至少一种调整、定制或预定的特性。可选择地,明胶没有经历热致可逆凝胶化。

[0077] 依照本发明的其他实施方案,提供了包含明胶和无毒性交联剂的组合的止血或体液密封剂。可选择地,无毒性交联剂包含转谷氨酰胺酶。优选地,所述组合包含聚集的明胶和转谷氨酰胺酶。

[0078] 如本文所描述的,一种方法或组合物,其中转谷氨酰胺酶可选择地从巴尔达齐链轮丝菌(*Streptoverticillium Baldaccii*)、吸水链霉菌(*Streptomyces Hygroscopicus*)菌株或大肠杆菌(*Escherichia Coli*)中的一种或多种中提取。

[0079] 依照本发明的其他实施方案,提供了在创伤组织中诱导止血和/或密封创伤组织的方法,其包括对组织施用包含交联的蛋白底物和无毒性交联剂的组合物。可选择地,无毒性交联剂包含转谷氨酰胺酶。优选地,底物包括以转谷氨酰胺酶交联位点为特征的一种或多种合成的聚合物序列。更优选地,底物包括修饰的包含至少一个转谷氨酰胺酶交联位点的多肽。

[0080] 依照本发明的其他实施方案,提供了诱导止血和/或密封创伤的组合物,其包括明胶和转谷氨酰胺酶的混合物,其中混合物被修饰以便明胶与转谷氨酰胺酶在低于标准动物明胶的正常的溶胶-凝胶转变温度下形成溶液。

[0081] 可选择地,明胶已经被修饰以具有降低的溶胶-凝胶转变温度。优选地,组合物进一步包括添加剂以增加混合物中明胶的稳定性。更优选地,组合物进一步包括添加剂以降低明胶的溶胶-凝胶转变温度。最优选地,组合物进一步包括增塑剂。可选择地并且最优选地,增塑剂选自多元醇、甘油(glycerine)、丙三醇(glycerol)、木糖醇、蔗糖、山梨糖醇、三乙醇胺、间苯二酚、硫二甘醇、甲苯磺酸(toluenesulphoacid)的钠盐、丁二醇、硝酸脲、硫脲、脲、谷氨酸、天冬氨酸(aspartic acid)、缬氨酸、甘氨酸、KSCN、KI 和 LiBr 组成的组。

[0082] 可选择地,丙三醇的浓度比率范围是从约 0.5 : 1 至约 5 : 1 的丙三醇:明胶,重量/重量。优选地,浓度比率范围是从约 1 : 1 至约 2 : 1 的丙三醇:明胶,重量/重量。可选择地,山梨糖醇的浓度比率范围是从约 0.5 : 1 至约 5 : 1 的山梨糖醇:明胶,重量/重量。优选地,浓度比率范围是从约 1 : 1 至约 3 : 1 的山梨糖醇:明胶,重量/重量。

[0083] 可选择地,脲的浓度比率范围是从约 1 : 2 至约 2 : 2 的脲:明胶,重量/重量。

[0084] 可选择地,组合物进一步包括选自自由 pH 调节剂和离子浓度调节剂组成的组的调节剂。优选地,pH 调节剂提供从约 1.5 至约 5.0 或从约 7.0 至约 9.0 的范围内的 pH。

[0085] 可选择地,组合物进一步包括盐。

[0086] 可选择地,组合物进一步包括海藻糖糖类、甘露醇糖类或其他糖类以便喷雾干燥、冷冻干燥或其他蛋白干燥的稳定。

[0087] 可选择地,组合物进一步包括变性剂。优选地,变性剂选自由盐酸胍和脲组成的组。更优选地,浓度比率范围是从约 1 : 2 至约 2 : 2 的 GuHCl : 明胶,重量 / 重量。同样更优选地,浓度比率范围是从约 0.5 : 1 至约 1 : 1 的脲 : 明胶,重量 / 重量。

[0088] 可选择地,组合物进一步包括还原剂。优选地,还原剂选自由氯化镁和氢醌组成的组。更优选地,氢醌以从约 0.2 至约 0.5M 的浓度存在于混合物的溶液中。最优选地,浓度是从约 0.3 至约 0.4M。

[0089] 可选择地,氯化镁以从约 2 至约 4M 的浓度存在于混合物的溶液中。优选地,浓度是从约 2.5 至约 3.5M。

[0090] 可选择地,组合物进一步包括放热剂。优选地,放热剂包括氯化钙、其他钙盐、氯化镁、金属氧化物 / 沸石或其组合中的一种或多种。更优选地,对高出室温的每一摄氏度的温度增加来说,氯化钙在溶液中以从约 0.2 至 0.7g 氯化钙每 mL 混合物的量存在。

[0091] 可选择地,组合物进一步包括明胶特异性蛋白酶。

[0092] 可选择地,组合物进一步包括蛋白酶抑制剂。

[0093] 可选择地,组合物进一步包括另外的止血剂。优选地,另外的止血剂进一步包括白蛋白、胶原蛋白、纤维蛋白、凝血酶、壳聚糖、硫酸铁或其他金属硫酸盐中的一种或多种。

[0094] 根据本发明其他的实施方案,提供了止血或密封敷料,其包括:(i) 第一明胶层;(ii) 与第一明胶层相邻的转谷氨酰胺酶层;以及(iii) 与转谷氨酰胺酶层相邻的第二明胶层,其中转谷氨酰胺酶层与第一明胶层和 / 或第二明胶层共同扩张或非共同扩张。

[0095] 根据本发明其他的实施方案,提供了止血或密封敷料,其包括:(i) 可吸收性或非可吸收性材料层;(ii) 与材料层相邻的第一明胶层;(iii) 与第一明胶层相邻的转谷氨酰胺酶层;以及(iv) 与转谷氨酰胺酶层相邻的第二明胶层,其中转谷氨酰胺酶层与第一明胶层和 / 或第二明胶层共同扩张或非共同扩张。

[0096] 根据本发明其他的实施方案,提供了止血或密封敷料,其包括:(i) 明胶层;(ii) 与明胶层相邻的转谷氨酰胺酶层,其中转谷氨酰胺酶层与明胶层共同扩张或非共同扩张。

[0097] 根据本发明其他的实施方案,提供了止血或密封敷料,其包括:(i) 可吸收性或非可吸收性材料层;(ii) 与材料层相邻的明胶层;(iii) 与明胶层相邻的转谷氨酰胺酶层,其中转谷氨酰胺酶层与明胶层共同扩张或非共同扩张。

[0098] 根据本发明其他的实施方案,提供了止血或密封敷料,其包括:(i) 明胶层;(ii) 与第一明胶层相邻的可吸收性或非可吸收性材料层;(iii) 与材料层相邻的转谷氨酰胺酶层,其中转谷氨酰胺酶层与明胶层共同扩张或非共同扩张。

[0099] 可选择地,敷料进一步包括衬垫材料。

[0100] 根据本发明其他的实施方案,提供了止血或密封装置,其包括:(i) 可吸收性或非可吸收性基质;(ii) 明胶;(iii) 转谷氨酰胺酶,其中明胶和转谷氨酰胺酶被包含于基质中。

[0101] 根据本发明其他的实施方案,提供了止血或密封装置,其包括:(i) 多孔的可吸收性或非可吸收性基质;(ii) 明胶;(iii) 转谷氨酰胺酶,其中明胶和转谷氨酰胺酶粘合于基质。

[0102] 根据本发明其他的实施方案,提供了用于插入人类或低等哺乳动物的体内的医疗装置,其包括如本文所描述的止血或密封剂或者组合物。优选地,装置包括血管导管。

[0103] 根据本发明其他的实施方案,提供了用于在人类或低等哺乳动物的身体上局部施用的医疗装置,其包括如本文所描述的止血或密封剂或者组合物。可选择地,装置包括加压的喷雾或泡沫。

[0104] 应当理解的是,之前的一般描述和下文的详细描述都仅仅是示例性和说明性的并且意图提供如所要求保护的本发明的进一步的说明。

[0105] 除非另有定义,本文所用的所有的技术和科学术语具有与本发明所属领域中的技术人员通常所理解的一样。本文所提及的所有专利、专利申请和出版物通过引用并入本文。

[0106] 如本文所用的,被说明为与明胶层“非共同扩张的”转谷氨酰胺酶层是其中转谷氨酰胺酶层的在两个维度上的空间边界小于一个或所有两个明胶层的空间边界以便转谷氨酰胺酶层独立地与止血敷料的第一明胶层表面积的仅仅约 5% 至约 95% 共同扩张和 / 或与止血敷料的第二明胶层表面积仅仅约 5% 至约 95% 共同扩张的转谷氨酰胺酶层。例如,转谷氨酰胺酶层可独立地与第一和第二明胶层中的每一个的表面积的约 10、20、30、40、50、60、70、75、80 或 90% 共同扩张。与明胶层“共同扩张的”转谷氨酰胺酶层提供了明胶层的完全覆盖并且与明胶层表面积的 100% 共同扩张。例如通过使用具有不同总表面积或形状的明胶层,转谷氨酰胺酶层可与第一明胶层非共同扩张但与第二明胶层共同扩张,反之亦然。

[0107] 本文所用的“患者”是指需要医疗护理和 / 或治疗的人类或动物个体。

[0108] 本文所用的“创伤”是指对患者的任何组织的任何损害,其导致循环系统的血液损失或其生理通路的任何其他体液的损失。组织可以是体内组织(例如器官或血管),或者是体外组织(例如皮肤)。血液或体液的损失可以是体内的(例如从破裂的器官),或者是体外的(例如从裂伤)。创伤可以在软组织(例如器官)中,或者在硬组织(例如骨)中。损害可由任何剂或任何来源(包括外伤性损伤、感染或外科手术介入)导致。损害可以是危及生命的或非危及生命的。

[0109] 本文所用的“可吸收性材料”是指自发和 / 或经由哺乳动物身体分解为组分的材料,所述组分以不显著干扰创伤愈合和 / 或组织再生的方式被消耗或消除,并且不会导致任何显著的代谢紊乱。

[0110] 本文所用的“稳定性”是指决定活性和 / 或功能的那些材料特性的保留。

[0111] 本文所用的“结合剂”是指增强止血敷料的一个层对一个或多个不同层的粘合和 / 或给定层的组分对该层其他组分的粘合的化合物或化合物的混合物。

[0112] 本文所用的“增溶剂”是指增加蛋白在(优选地)水性溶剂中的溶解的化合物或化合物的混合物。

[0113] 本文所用的“填料”是指对止血敷料的一层或多层提供松密度 / 或孔隙率的化合物或化合物的混合物。

[0114] 本文所用的“脱模剂”是指有助于止血敷料从制造模具上脱掉的化合物或化合物的混合物。

[0115] 本文所用的“发泡剂”是指当在适合的条件下水合时产生气体的化合物或化合物的混合物。

[0116] “TG”是指任何类型的转谷氨酰胺酶;根据上下文,“mTG”还可以指微生物转谷氨酰

胺酶和 / 或任何类型的转谷氨酰胺酶 (在下文的特定的实验性实施例中,所述术语是指微生物转谷氨酰胺酶)

[0117] 术语“哺乳动物”,尤其是涉及治疗方法和 / 或与装置和 / 或组合物的使用和应用时,除非另外具体说明,是指人类和低等哺乳动物。

[0118] 本文所用的“约”意指指示值的加或减大约十个百分比。

[0119] 根据以下详细说明和权利要求,本发明的其他特征和优点是明显的。

[0120] 附图简述

[0121] 参考附图,本文仅举例描述本发明。现在具体参考附图细节,所强调的是所展示的细节仅仅作为实例并且为示例性讨论本发明的优选的实施方案的目的,并且是为了提供被认为是本发明的原理和概念方面的最有用和最容易理解描述而提出。在这点上,没有试图以比本发明的基本理解所必需更详细地去显示本发明的结构细节,采用附图的说明使得如何在实践中具体实现本发明的几种形式对本领域技术人员来说是明显的。

[0122] 附图中:

[0123] 图 1 是根据本发明的示例性绷带的示意方框图;

[0124] 图 2 显示了根据本发明的示例性绷带的主视图,所述绷带用可选择的吸收性衬垫和可选择的塑料封套覆盖;

[0125] 图 3 是根据本发明的示例性止血装置的示意方框图,所述装置包含多孔基质;

[0126] 图 4 是显示了不同百分比的所测试的明胶对粘合强度的影响的图示;

[0127] 图 5 显示了温度对转谷氨酰胺酶活性的影响(所试验的温度范围是 32 ~ 150° F;最佳的范围是 122-131° F(50-55°C));

[0128] 图 6 显示基于组合物 A 的组织粘合剂的代表性的破裂压力测量;

[0129] 图 7 显示基于组合物 B 的组织粘合剂的代表性的破裂压力测量;

[0130] 图 8 是显示了凝胶的形成还有止血的诱导的照片(图 8A 显示完整面积而图 8B 显示为进一步细节而被放大的面积的一部分);

[0131] 图 9A 显示在对照溶液的施用之后血块形成的缺乏,而图 9B 显示实验性溶液的凝胶化和止血。

[0132] 图 10A-D 显示了当动脉正在被割破时动脉的照片(10A);大量地流血的割破的动脉的照片(10B);对割破的动脉施用本发明的组合物的照片(10C);以及伴有仿生血块形成的止血的照片(10D);

[0133] 图 11A 和 11B 显示了两组分止血密封材料的双注射器施用法的实例;以及

[0134] 图 12A 和 12B 显示了血管插入点闭合的实例,其中导管被本文所描述的组分覆盖。

[0135] 发明详述

[0136] 本发明涉及包含可交联蛋白和诱导可交联蛋白交联的无毒性材料的粘合材料。优选地,可交联的蛋白包括如本文所描述的明胶和任何明胶变体或变体蛋白。可选择地和优选地,无毒性材料包括转谷氨酰胺酶(TG),其可选择地包括任何类型的钙依赖性或非依赖性转谷氨酰胺酶(mTG),其可例如可选择地为微生物转谷氨酰胺酶。根据本发明的某些实施方案,将粘合材料提供于绷带中,所述绷带优选地适于作为止血绷带使用。下文更详细地在章节标题下描述本发明的各种实施方案,提供章节标题仅为了清楚的目的而没有以任何方式进行限制的任何意图。

[0137] 明胶和转谷氨酰胺酶

[0138] 根据本发明的优选的实施方案,提供了用于止血和组织密封的组合物,其中交联物质包括转谷氨酰胺酶,而可交联的蛋白包括明胶。

[0139] 根据优选的实施方案,转谷氨酰胺酶存在于具有至少约 100U/gm 的比活性水平的组合物中,尽管可选择地例如通过可选择地调节上文所描述的比率也可使用较低的活性水平。组合物的这种可选择地较低的活性水平优选地包括至少约 20U/gm,更优选地至少约 40U/gm,甚至更优选地至少约 60U/gm 以及最优选地至少约 80U/gm。

[0140] 优选地以一定量向明胶加入转谷氨酰胺酶(无论单独还是作为组合物的一部分)以便混合物中所得的转谷氨酰胺酶活性优选地为从约 25 至约 100U/g 明胶,并且更优选地从约 40 至约 60U/g 明胶。

[0141] 可通过对本领域技术人员来说已知并可用的方法中的任一种获得适合的明胶和转谷氨酰胺酶。明胶可选择地包括任何类型的明胶,所述明胶包括本领域已知的蛋白,优选地包括但不限于通过动物组织和/或从动物组织获得的胶原蛋白的部分水解获得的明胶,所述动物组织包括但不限于动物皮肤、结缔组织(包括但不限于韧带、软骨和类似组织)、鹿角或角质物以及类似物、和/或骨、和/或鱼的鳞和/或骨或其他组分;和/或使用细菌、酵母、动物、昆虫或植物系统或者任何类型的细胞培养物生产的重组明胶。

[0142] 根据本发明的优选的实施方案,来自动物来源的明胶优选地包括来自哺乳动物来源的明胶并且更优选地包括猪肉皮、猪肉和牛骨,或二层牛皮,或任何其他猪或牛来源中的一种或多种。更优选地,这种明胶包括猪明胶,因为其具有较低的过敏反应率。来自动物来源的明胶可选择地为 A 型(酸处理的)的或 B 型(碱处理的)的,但是其优选是 A 型的。

[0143] 优选地,来自动物来源的明胶包括在第一次提取期间获得的明胶,所述提取通常在较低的温度(50-60°C,但是这一提取温度的范围并不必须作为限制)下进行。以这一方式生产的明胶将在 250-300 布卢姆的范围内并且具有至少约 95-100kDa 的高分子量。优选地,使用 300 布卢姆的明胶。

[0144] 这种明胶的生产者的非限制性实例是 PB Gelatins(Tessenderlo Group, Belgium)。

[0145] 根据本发明的某些实施方案,来自动物来源的明胶可选择地包括来自鱼的明胶。可选择地,可使用任何类型的鱼,优选鱼的冷水种类例如鲤鱼、鳕鱼、或梭鱼或金枪鱼。这类明胶的 pH(在 10% 的溶液中测量)优选地范围从 4 至 6。

[0146] 10°C 时冷水鱼明胶在水中形成溶液并且因此所有冷水鱼明胶被认为是 0 布卢姆的。对于本发明来说,高分子量的冷水鱼明胶是优选使用的,更优选地包括至少约 95-100kDa 的分子量。这相当于 250-300 布卢姆动物明胶的分子量。作为其较低的脯氨酸和羟脯氨酸水平的结果,冷水鱼明胶在比动物明胶低得多的温度经历热致可逆凝胶化。每 1000 个氨基酸残基,与动物明胶中的 135-145 个脯氨酸和 90-100 个羟脯氨酸相比,冷水鱼明胶具有 100-130 个脯氨酸和 50-75 个羟脯氨酸基团(Haug IJ, Draget KI, Smidsrød O. (2004). Food Hydrocolloids. 18 :203-213)。

[0147] 这种明胶的生产者的非限制性实例是 Norland Products(Cranbury, NJ)。

[0148] 在本发明的优选的实施方案中,将明胶纯化以除去盐。这可根据之前描述的技术来完成。一种这类技术涉及在水中形成 20% w/v 的明胶溶液并将其在搅拌下加热至 60°C。

之后将混合物静置过夜。将所获得的凝胶经反复更换的去离子水透析以消除盐,搅拌并加热至 50℃以解聚物理网络。将最终溶液过滤并冷冻干燥 (Crescenzi V, Francescangeli A, Taglienti A. (2002). *Biomacromolecules*. 3 :1384-1391)。可选择地,可通过尺寸排阻柱将明胶去盐。

[0149] 根据本发明的某些实施方案,使用了重组的明胶。重组的明胶目前由 FibroGen (San Francisco, CA) 商业生产。目前优选的方法是使用重组的酵母系统 (*Pichia Pastoris*) 以表达 I 型、 $\alpha 1$ 人类序列胶原蛋白的特定片段。

[0150] 在本发明的可选择的但优选的实施方案中,重组的明胶是完全合成的分子,不包含来自人类或任何动物的掺杂组分。“合成的”意指明胶是优选根据选自化学合成,无细胞蛋白合成,细胞组织培养,任何类型的细菌、昆虫或酵母培养或者在植物中的方法生产的。合成的明胶的使用消除了组织来源的材料具有的许多可变因素和缺陷,包括引起不想要的免疫应答。例如,鱼明胶显示出高度的变应原性而动物明胶显示出低中度的变应原性,而重组明胶可无变应原性。在人类安全性研究中,未发现与重组明胶相关的不良事件。

[0151] 产生重组明胶的方法和它们的使用的益处被充分描述于美国专利 6,413,742 和 6,992,172 中,其通过引用并入本文,如同在本文完整陈述。

[0152] 可将重组明胶生产为高度 (99%) 纯化的。重组明胶生产允许可选择地生产具有至少一种限定的和预定的特性 (包括但不限于限定的分子量、pI (等电点),有保证的批次间的重复性以及调整分子量以匹配特定应用的能力) 的明胶。

[0153] 之前已经描述了调整分子量以匹配特定应用的实例,其中将明胶生产为高度亲水的 (Werten MWT 等人 (2001). *Protein Engineering*. 14(6) :447-454)。可选择地并优选地,根据本发明的明胶包括具有至少一种调整、定制或预定的特性的明胶。

[0154] 可选择地根据本发明这样定制的其他类型的特性的非限制性实例包括经历或不经历热致可逆凝胶化。可生产重组明胶以经历热致可逆凝胶化或不经历热致可逆凝胶化。具有天然动物明胶的一种或多种有益特性但未经历热致可逆凝胶化的明胶在于其正常经历热致可逆凝胶化的温度下通过其他方式使得明胶能够交联上具有巨大的效用。这种明胶还被本发明的某些实施方案所包括。

[0155] 动物 (牛、猪等等) 明胶,温水鱼明胶和重组明胶 (胶凝类型) 可在 35-40 度之间某点经历热致可逆凝胶化,尤其是在高分子量和 / 或高浓度 (> 20%) 和 / 或具有修饰和 / 或一种或多种附加物质时 (描述参见下文)。室温时,它们处于凝胶形式并且不能容易地与 mTG 混合。下文描述根据本发明的某些实施方案的化合物的各种修饰以在室温时将明胶溶液维持于液体形式。

[0156] 冷水鱼明胶和重组明胶 (非胶凝类型) 在室温时不形成热致可逆的凝胶,即使没有进一步的修饰和 / 或一种或多种附加物质的存在。它们具有远低于室温的转变点。室温时,它们保留在溶液中并且可与 mTG 反应而无需进一步修饰

[0157] 根据本发明的关于重组明胶的优选的实施方案,使用一种适合的体外培养系统以生产重组明胶。除了使用用于重组明胶生产的重组的甲基营养型酵母系统之外,其他微生物也被使用。

[0158] 已经在大肠杆菌中表达了重组的明胶样蛋白,但是通常在大肠杆菌中获得的表达水平相当低并且细胞内生产的蛋白的纯化可能是困难的。短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)

已经被用于明胶样蛋白的表达,其中序列段选自天然胶原蛋白基因并且被聚合以形成半合成的明胶(Werten MWT 等人, Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in Pichiapastoris(毕赤酵母中专门设计的高度亲水的明胶的分泌型生产). ProteinEngineering, 第 14 卷, 第 6 期, 447-454, 2001 年 6 月)。

[0159] 在生产重组明胶上的其他的成功的努力已经包括使用哺乳动物和昆虫细胞的重组明胶的生产。胶原蛋白和明胶还被表达在转基因番茄植物、转基因小鼠中。一种转基因的蚕系统已经被用于生产包含胶原蛋白序列的融合蛋白。这些系统缺少足以产生完全羟基化的胶原蛋白的内源脯氨酰羟化酶活性,这可通过脯氨酰羟化酶的过表达来克服(Olsen D 等人 Recombinant collagen and gelatin for drug delivery(用于药物递送的重组胶原蛋白和明胶). Adv Drug Deliv Rev. 2003 年 11 月 28 日 ;55(12) :1547-67)。也可选择地使用基于植物的系统;例如爱荷华州立大学正在和 Fibrogen 正在合作开发在转基因玉米中明胶的表达。

[0160] 止血敷料中使用的明胶可是明胶复合物或任何明胶,或者其衍生物或代谢物,或者根据单一工序或多个工序生产的明胶。例如明胶可选择地包括明胶 A 型或明胶 B 型或其组合。

[0161] 转谷氨酰胺酶可选择地包括优选除了血液来源的凝血因子 XIII 之外的任何植物、动物或微生物来源的转谷氨酰胺酶。优选地,使用来自茂原链轮丝菌(Streptoverticillium mobaraensis) 微生物转谷氨酰胺酶。

[0162] 转谷氨酰胺酶可选择地可在包含至少一种其他物质(例如稳定剂或填料)的组合物中。这种材料的非限制性实例包括麦芽糖糊精、水解的脱脂乳蛋白或任何其他蛋白质、氯化钠、红花油、磷酸三钠、酪蛋白酸钠或乳糖或者其组合。

[0163] 尽管天然转谷氨酰胺酶活性的最佳 pH 是 6.0,但在 pH5.0 至 pH8.0 的范围内它同样以高活性起作用。因此,用于止血的根据本发明的组合物优选地具有从约 5 至约 8 的范围内的 pH 值。

[0164] 转谷氨酰胺酶以负的温度系数为特征。在转谷氨酰胺酶活性的温度范围内,较高的温度时反应较短的时间而较低温度时需要较长的时间来开始起作用。下表显示对比与在 50°C、pH6.0 时十分钟内发生的反应相同的反应等级时不同温度下的不同反应时间:

[0165] 表 1- 转谷氨酰胺酶的反应温度

[0166] 温度	5°C	15°C	20°C	30°C	40°C
[0167] 时间(分钟)	240	105	70	35	20

[0168] 商业上可获得的转谷氨酰胺酶产品的非限制性实例包括由 AjinomotoCo. (Kawasaki, Japan) 所生产的那些。来自这一公司的这种产品的一个优选的实例是 Activa TG-TI(在欧洲:Activa WM)-成分:mTG 和麦芽糖糊精;活性:81-135U/gActiva。来自这一公司的适合的产品的其他非限制性实例包括 Activa TG-FP(成分:水解的脱脂乳蛋白、mTG;活性:34-65U/g ActivaTG-FP);Activa TG-GS(成分:氯化钠、明胶、磷酸三钠、麦芽糖糊精、mTG 和红花油(加工助剂);活性:47-82U/g Activa TG-GS);Activa TG-RM(在欧洲:Activa EB)-成分:酪蛋白酸钠、麦芽糖糊精和 mTG;活性:34-65U/g Activa;Activa MP(成分:mTG、乳糖和麦芽糖糊精;活性:78-126U/g Activa)。

[0169] 商业上可获得的转谷氨酰胺酶产品的其他非限制性实例包括由 Yiming

Biological Products Co. (Jiangsu, China) 所生产的那些。来自这一公司的这种产品的一个优选的实例是 TG-B (成分 :1% mTG, 99% 辅助蛋白 ;活性 :80-130U/g TG-B)。来自这一公司的适合的产品的其他非限制性实例包括 TG-A (成分 :0.5% mTG, 99.5% 辅助蛋白 ;活性 :40-65U/g TG-A)。

[0170] 对于所有的实例来说, 优选的转谷氨酰胺酶产品是具有高比活性和最简单的辅助成分的那些, 因为它们被认为 (不希望被单一的假设所限制) 在施用时具有最佳的反应性和对不期望的副反应来说较低的可能性。

[0171] 在另一个实施方案中, 转谷氨酰胺酶可选择地可从巴尔达齐链轮丝菌或吸水链霉菌菌株中提取以生产已经表现出在较低的温度 (分别在大约 37°C 和 37°C -45°C) 下起最佳作用的酶变体 (Negus SS. A Novel Microbial Transglutaminase Derived From *Streptovercillium Baldaccii* (产自巴尔达齐链轮丝菌的一种新的转谷氨酰胺酶). 博士论文. School of Biomolecular and Biomedical Science, Griffith University, Queensland, Australia 和 Cui L 等人 Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus* (来自新近分离的吸水链霉菌的转谷氨酰胺酶的纯化和鉴定). 2007 :105(2) 第 612-618 页)。为了在环境条件下获得较快和较强明胶交联, 较低的温度下较高的比活性是所期望的。

[0172] 根据某些实施方案, 可以任何一种上文所描述的组合物形式使用转谷氨酰胺酶, 可选择地包括任何一种商业上可获得的包含转谷氨酰胺酶的混合物。

[0173] 在另一个实施方案中, 可选择地将上文中的转谷氨酰胺酶混合物中的任何一种通过凝胶过滤、阳离子交换层析、空心纤维过滤或切向流动过滤纯化以除去它们的载体蛋白和 / 或糖类。之前已经描述过这些方法中的一些 (Bertoni F, Barbani N, Giusti P, Ciardelli G. :transglutaminase reactivity with gelatine :perspective applications in tissue engineering (转谷氨酰胺酶与明胶的反应性 :在组织工程中的应用前景) *Biotechnol Lett* (2006) 28 :697-702) (Broderick EP 等人 Enzymatic Stabilization of Gelatin-Based Scaffolds (基于明胶的支架的酶稳定化) *J Biomed Mater Res* 72B :37-42, 2005)。过滤所用的滤器孔径优选地为大约 10KDA。

[0174] 无论如何, 优选地在根据本发明的组合物的使用和 / 或制造之前用转谷氨酰胺酶反应性测定测量转谷氨酰胺酶的活性。这种测定可选择地包括但不限于异羟肟酸法、Nessler 测定、比色测定或的任何其他的转谷氨酰胺酶活性测定 (参见, 例如 Folk JE, Cole PW. transglutaminase :mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies (转谷氨酰胺酶 :通过动力学和抑制剂研究测定的活性位点的机械特征). *Biochim Biophys Acta*. 1966 ;122 :244-64 ;或 Bertoni F, Barbani N, Giusti P, Ciardelli G. transglutaminase reactivity with gelatine :perspective applications in tissue engineering (转谷氨酰胺酶与明胶的反应性 :在组织工程中的应用前景) *Biotechnol Lett* (2006) 28 :697-702 中所描述的 Nessler 测定)。

[0175] 通常, 用于止血组合物中的明胶和 / 或转谷氨酰胺酶的纯度和 / 或质量将具有对相关领域普通技术人员来说已知的适当的纯度以产生蛋白的效力和稳定性。

[0176] 除了明胶之外的交联蛋白底物

[0177] 如上文所表明的, 可交联的蛋白优选地包含明胶但是还可另外地或可选择地包含

另一种类型的蛋白。根据本发明的某些实施方案,蛋白也是转谷氨酰胺酶的底物并且优选地以转谷氨酰胺酶特异性多肽和聚合物序列为特征。这些蛋白可选择地可包括但不限于独立地具有形成生物粘合剂的性质的合成的聚合物序列,或已经更优选地用加强材料通过转谷氨酰胺酶被交联的能力的转谷氨酰胺酶特异性底物修饰过的聚合物。下文描述了这些类型的材料的每一种的非限制性的实例。

[0178] 已经开发了具有适当的转谷氨酰胺酶交联靶的合成的多肽和聚合物序列,其具有优选地从约 20 至约 40°C 的转变点。优选物理特性包括但不限于结合组织的能力和形成纤维的能力。像凝胶类型的明胶(上文所描述的)一样,这些多肽可选择地用于同样以降低它们的转变点的一种或多种物质为特征的组合物中。

[0179] 这种肽的非限制性实例被描述于均由 ZymoGenetics Inc 申请的美国专利第 5,428,014 和 5,939,385 号其,两项专利都通过引用并入本文,如同在本文完整陈述。美国专利第 5,428,014 号描述了生物相容的、生物粘合的、转谷氨酰胺酶可交联的多肽,其中已知转谷氨酰胺酶催化蛋白结合的谷氨酰胺酰基残基的 γ -甲酰胺基团和 Lys 残基的 ϵ -氨基基团之间的酰基转移反应,导致 ϵ -(γ -谷氨酰基)赖氨酸异肽键的形成。

[0180] 例如,描述了具有 13-120 个氨基酸残基、包含式 S1-Y-S2 的片段的多肽,其中:S1 是 Thr-Ile-Gly-Glu-Gly-Gln;Y 是 1-7 个氨基酸的间隔肽或不存在;并且 S2 是 Xaa-Lys-Xaa-Ala-Gly-Asp-Val。可选择地,间隔肽 Y 是 Gln-His-His-Leu-Gly、Gln-His-His-Leu-Gly-Gly 或 His-His-Leu-Gly-Gly。同样可选择地,S2 的 Xaa(氨基酸 1) 是 Ala 或 Ser。可选择地,间隔肽包含 His-His-Leu-Gly。可选择地并且优选地,Y 和 S2 中的至少一个没有 Gln 残基。可选择地,多肽的羧基末端氨基酸残基是 Pro 或 Gly。多肽的具体非限制性实例包括下列:Thr-Ile-Gly-Glu-Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, Thr-Ile-Gly-Glu-Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, Thr-Ile-Gly-Glu-Gly-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val 或 Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Gly。专利还描述了涉及这些肽的高分子量的、生物相容的、生物粘合的、转谷氨酰胺酶可交联的共聚物和均聚物。

[0181] 美国专利第 5,939,385 号描述了生物相容的、生物粘合的、转谷氨酰胺酶可交联多肽。这些多肽优选地具有约 9-120 个氨基酸残基,包含式 S1-Y-S2 的片段,其中:S1 选自 Ile-Gly-Glu-Gly-Gln、Gly-Glu-Gly-Gln、Glu-Gly-Gln 和 Gly-Gln 组成的组;Y 是 His-His-Leu-Gly-Gly 或 His-His-Leu-Gly;并且 S2 选自 Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp、Ala-Lys-Gln-Ala-Gly、Ala-Lys-Gln-Ala、Ala-Lys-Gln、Ala-Lys-Ala-Gly-Asp-Val、Ala-Lys-Ala 和 Ala-Lys 组成的组,其中所述多肽具有氨基末端和羧基末端并且可被转谷氨酰胺酶交联。优选的多肽是 Gly-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln。同样优选的是其中多肽氨基末端和羧基末端中的任一个或两个的侧翼具有弹性体多肽的多肽。进一步提供了弹性体多肽(其中弹性体多肽是五肽或四肽),尤其是加侧翼的多肽(其中侧翼弹性体多肽是 Val-Pro-Gly-Val-Gly、Ala-Pro-Gly-Val-Gly、Gly-Val-Gly-Val-Pro、Val-Pro-Gly-Gly 或其任何部分,优选使侧翼多肽的氨基末端是 Val 且侧翼多肽的羧基末端是 Gly)。专利还描述了涉及这些肽的高分子量的、生物相容的、生物粘合的、转谷氨酰胺酶可交联的共聚物和均聚物。

[0182] 这些专利认可所描述的肽和聚合物在创伤闭合和各种其他的医疗应用中作为组

织粘合剂使用的效用。然而,所有两项专利都表明这些肽和聚合物的所期望的转变点是 20-40°C 并且认可需要降低转变点以便肽 / 聚合物在创伤部位中能够和转谷氨酰胺酶反应。所有两项专利都声称:“聚合物的转变温度可通过能够通过转谷氨酰胺酶交联的多肽多肽单体的数目来调节。如本领域技术人员所应理解的,对于临床应用来说,应用时转变温度的降低将有助于创伤部位处基质的迅速凝固。”

[0183] 当然,为了确保想要作为生物粘合剂使用的交联的聚合物的最大的内聚和粘合强度,除去可交联的单体常常是不可能的。事实上,为了使这种粘合剂的内聚和粘合强度最大化,加入更多可交联的单体底物通常是优选的。因此,在这些专利中所描述的聚合物的生物粘合潜力明显受到聚合物溶液的转变温度的限制。

[0184] 本发明的优选的实施方案显著地提高了这些多肽或聚合物在止血、粘合和组织密封材料应用中使用的效用。例如对于降低在室温胶凝的聚合物的转变点,下文描述了可选择的实施方案。这些策略可被用于降低这些专利中所描述的肽序列和聚合物的转变点。

[0185] 同样如下文中所更详细地描述的,优选地,对于本发明的实施方案来说,相对于上文专利(其没有教导也没有建议本文描述的本发明的任何使用)中所描述的最初的使用,这些聚合物的量不同。例如,这些专利中教导的组织粘合剂试剂盒中使用的聚合物浓度范围是 5 至 100mg/ml 以及优选 35-50mg/ml。本发明的某些实施方案包括更高的聚合物浓度,例如在 150-250mg/ml 的范围内。对于本发明的某些实施方案来说,更高的转谷氨酰胺酶浓度也是优选的。

[0186] 根据本发明的某些实施方案,也可选择地提供其他的合成底物。优选地,合成短的转谷氨酰胺酶底物并且之后将其与大的聚合物分子连接和 / 或结合。所述转谷氨酰胺酶底物通常非常短(< 20 个氨基酸残基)。这种底物的溶解度和转变点是依赖于底物所连接的聚合物。例如,如果底物与胶凝的明胶连接,则这一新合成分子的溶液将需要加入另一种物质以在室温下维持为流体形式。

[0187] 这种类型的物质的非限制性实例描述于美国专利 7,208,171 中,其通过引用并入本文,如同在本文完整陈述,其描述了转谷氨酰胺酶底物肽的合理设计。设计策略是基于将用于转谷氨酰胺酶交联的可获得的酰基受体赖氨酸肽底物和可获得的酰基供体谷氨酰胺酰基肽底物的数量最大化。此外,Lys 和 Glu 底物肽被设计为具有转谷氨酰胺酶的已知的生物大分子和合成肽底物的特征。例如,基于随着不断增加的 Glu 重复序列长度,肽成为更好的转谷氨酰胺酶底物 (Gorman, J. J. ;Folk, J. E. J. Biol. Chem. 1980, 255, 419-427&Kahlem, P. ;Terre, C ;Green, H. ;Djian, P. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996, 93, 14580-14585) 和已知包含两个或更多个相邻的 Glu 残基的蛋白是好的底物 (Etoh, Y. ;Simon, M. ;Green, H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986, 136, 51-56&Hohenadl, C ;Mann, K. ;Mayer, U. ;Timpl, R. ;Paulsson, R. ;Aeschlimann, D. J. Biol. Chem. 1995, 270, 23415-23420) 的证据, Glu 底物肽包含 2-5 个相连的 Glu 残基。在几个肽中, Leu 残基被置于与 C- 末端附近的 Glu 相邻,因为这已经显示出导致 Glu 特异性的显著增加 (Gross, M. ;Whetzel, N. K. ;Folk, J. E. J. Biol. Chem. 1975, 250, 4648-4655)。关于 Lys 底物肽,已经显示出肽和蛋白底物中与赖氨酸残基相邻的氨基酸组成和序列对胺特异性有影响 (Groenen, P. ;Smulders, R. ;Peters, R. F. R. ;Grootjans, J. J. ;Vandenijsel, P. ;Bloemendal, H. ;Dejong, W. W. Eur. J. Biochem. 1994, 220, 795-799&Grootjans, J. J. ;Groenen, P. ;Dejong, W. W. J. Biol.

Chem. 1995, 270, 22855-22858)。最后,在所有肽中,在 C-末端侧加上 Gly 残基以起到肽-聚合物轭合物中的肽和聚合物之间的间隔的作用,以便轭合物中的肽对酶来说可更易接近。

[0188] 这一专利中描述的肽的转谷氨酰胺酶特异性测定表明,他们成功地制得了具有高转谷氨酰胺酶结合特异性的酰基受体和酰基供体底物。专利中表明,可将这些底物与 PEG、树状高分子、壳聚糖、明胶、可溶性胶原蛋白、透明质酸、藻酸盐和白蛋白共价轭合。专利继续表明,这些溶液或液体形式的聚合物-肽轭合物可被用作外科手术密封材料和/或医疗粘合剂。

[0189] 尽管这一专利描述了高特异性的转谷氨酰胺酶可交联的肽底物,但它没有教导或表明作为本发明一部分所描述的先进的施用方法或材料修饰,也没有教导或表明本发明的组合物。然而专利所教导的底物可选择地被用于增强通过转谷氨酰胺酶交联产生的生物粘合剂或另外从非转谷氨酰胺酶特异性的聚合物产生这样的生物粘合剂。这些底物将需要与本文所描述的一种或多种其他蛋白或支架组合以用于本发明。

[0190] 除转谷氨酰胺酶以外的交联材料

[0191] 如上文所表明的,交联材料优选地包含转谷氨酰胺酶,但是也可另外或可选择地包含另一种类型的交联材料。

[0192] 这种交联剂的非限制性实例包括碳二亚胺例如 N, N-(3-(二甲基氨基)丙基)-N-乙基碳二亚胺(EDC)、和 EDC 一起的 N-羟基丁二酰胺(NHS)或与聚(L-谷氨酸)(PLGA)和聚丙烯酸一起使用的碳二亚胺。在另一个实施方案中,这种交联剂可包括酪氨酸酶或与壳聚糖一起的酪氨酸酶。在另一个实施方案中,交联(聚合)是用紫外光或 γ -射线光起始的。在另一个实施方案中,交联剂可包括烯属烃(alkylene)、柠檬酸(碳酸)或纳米羟基磷灰石(Nano-hydroxyapatite)(n-HA)+聚(乙烯醇)(PVA)。

[0193] 在另一个实施方案中,交联剂是植物来源的多酚例如(即,水解的肉桂酸,例如咖啡酸(3,4-二羟基肉桂酸)、绿原酸(其奎尼酸酯)、咖啡酰酒石酸(其酒石酸酯)和类黄酮(即,如栎精和芸香苷)。在另一个实施方案中,另外的交联剂是氧化的单或二糖、氧代乳糖或基于糖部分的二醛(半乳己二醛糖)(GALA)。在另一个实施方案中,京尼平或其他环烯醚萜衍生物或类裂环烯醚萜、优选的橄榄苦苷构成交联剂。在另一个实施方案中,交联剂是硫醇反应性聚(乙二醇)。在另一个实施方案中,交联剂是葡聚糖、氧化的葡聚糖、葡聚糖二醛。在另一个实施方案中,交联剂是多铜氧化酶,例如漆酶或胆红素氧化酶。

[0194] 示例性说明的组合物

[0195] 上述交联底物和交联材料可选择地与一种或多种其他的材料组合以形成根据本发明的各种组合物。根据某些实施方案,粘合材料可选择地并优选地包含:(i)明胶;(ii)转谷氨酰胺酶;其中将明胶和转谷氨酰胺酶单独或一起形成颗粒。更优选地,以足以被用作密封、止血剂的量提供明胶和转谷氨酰胺酶。

[0196] 之前已经描述过每一种的不同量和它们的比率。可选择地将转谷氨酰胺酶含量增加以增加反应速率,或降低以增加安全性。根据本发明的某些实施方案,优选地施用明胶的 15-30% 的溶液,随后是转谷氨酰胺酶的 15-30% 的溶液。

[0197] 此外,止血产品中也可包含一种或多种补充物,例如药物诸如生长因子、多克隆和单克隆抗体和其他化合物。这种补充物的示例性说明的实例包括但不限于:抗生素,例如四环素和环丙沙星、羟氨苄青霉素和甲硝唑;抗凝血剂,例如活化的蛋白 C、肝素、前列环

素 (prostracyclin) (PGI₂)、前列腺素、白细胞三烯、抗转谷氨酰胺酶 III、ADP 酶和血纤维蛋白溶酶原活化剂;类固醇,例如地塞米松、抑制炎症的、前列环素、前列腺素、白细胞三烯和 / 或激肽的抑制剂;心血管药物,例如钙通道阻滞剂、血管扩张剂和血管收缩剂;化学引诱物;局部麻醉剂例如布比卡因;以及抗增殖 / 抗肿瘤药物,例如 5- 氟尿嘧啶 (5-FU)、紫杉醇和 / 或泰索替尔 (taxotere);抗病毒剂,例如更昔洛韦 (gancyclovir)、齐多夫定、金刚烷胺 (amantidine)、阿糖腺苷、利巴韦林 (ribaravin)、曲氟尿苷、无环鸟苷、二脱氧尿苷和抗病毒组分或基因产物的抗体;细胞因子,例如 α - 或 β - 或 γ - 干扰素、 α - 或 β - 肿瘤坏死因子和白细胞介素;集落刺激因子;红细胞生成素;抗真菌剂,例如大扶康、酮康唑 (ketaconazole) 和制霉菌素;抗寄生虫剂,例如戊烷脒;消炎剂,例如 α -1- 抗胰蛋白酶和 α -1- 抗胰凝乳蛋白酶;麻醉剂,例如布比卡因;止痛剂;防腐剂;以及激素。其他示例性补充物包括但不限于:维生素和其他营养补充物;糖蛋白;纤连蛋白;肽和蛋白;糖类(单一和 / 或复合的);蛋白多糖;抗血管生成素 (antiangiogenins);抗原;脂质或脂质体;以及寡聚核苷酸(正义和 / 或反义 DNA 和 / 或 RNA)。

[0198] 根据本发明的某些优选的实施方案,提供了以经历了热致可逆交联的明胶(如上文所描述的,某些但不是所有类型的明胶经历没有修饰和 / 或使用一种或多种另外材料的热致可逆交联)为特征的组合物。动物明胶的热致可逆凝胶化在将明胶溶液冷却至低于大约体温(37°C)时发生。在室温下的明胶-mTG 混合物中,这一凝胶化捕获了热致可逆凝胶中的 mTG 并避免其与明胶反应以形成不可逆的密封凝胶。由于手术室温度通常被保持在 22°C,在临床环境下如果没有将其持续地加热,那么明胶溶液的热致可逆凝胶化将发生得相当迅速。这在明胶-mTG 混合物的止血应用中带来问题,因为明胶溶液必须在其与 mTG 混合前被加热。由于例如加热器需要被加至敏感的手术室环境中,从后勤和安全性角度来看,必须在即将应用之前将明胶加热是所不希望的;在手术室外的紧急情况 and / 或急迫的医疗护理情况下这种加热的需求是更成问题的。

[0199] 除了其对组织粘合和止血的阻碍,明胶不能在室温时形成溶液并与微生物转谷氨酰胺酶混合对于明胶-mTG 混合物的其他可能的应用来说也带来了困难。例如当明胶-mTG 凝胶已经被用作组织工程中细胞封装的支架时,不得不需要特别小心以确保明胶溶液在细胞封装之前已经足够冷。此外,由于明胶的热致可逆凝胶化发生在将明胶-mTG 混合物安全地植入体内之前,封装的细胞的植入是相当复杂的。在局部药物递送方面存在相似的问题,其中某些药物的效力可由于与加热的明胶接触而受损害并且包含某些药物的明胶-mTG 凝胶的植入可被明胶的热致可逆凝胶化阻碍。

[0200] 幸运的是,经由 mTG 的明胶的交联通过连接 Lys 和 Gln 氨基基团而发生(Chen 等人 Biomacromolecules, 第 4 卷,第 6 期,2003),而明胶中负责其热致可逆凝胶化的氨基酸基团是 Pro&Hyp (Haug 等人 FoodHydrocolloids 18(2004) 203-213)。因此,存在减小明胶热致可逆凝胶化的倾向而不损害其通过 mTG 交联形成交联的凝胶的能力的可能。换句话说,可增加明胶-mTG 混合物中使用的明胶的溶解度并且降低其熔点,以使其与 mTG 形成室温溶液而不会负面影响所形成的交联的明胶-mTG 凝胶。

[0201] 根据本发明的某些实施方案,提供了明胶-mTG 混合物的物质组合物,其中所述混合物通过许多方法中的一种修饰以增加明胶的溶解度并且使明胶在低于标准动物明胶的正常熔点的温度下可以与 mTG 形溶液。这些组合物包括(i)使用已经被修饰减小其熔点的

标准明胶制得的明胶-mTG 混合物;(ii) 包含增加明胶-mTG 混合物本身中明胶的溶解度的添加剂的明胶-mTG 混合物;(iii) 使用商业上可获得的经处理而具有较低的转变温度的明胶产品制得的明胶-mTG 混合物;以及(iv) 在特定的,小心控制的降低明胶熔点的环境条件(温度、pH、离子浓度等)下形成溶液的明胶-mTG 混合物。

[0202] 这些新的组合物大大增加了明胶-mTG 凝胶的效用并且允许可利用可通过在室温混合明胶和 mTG 而形成的明胶-mTG 凝胶的广泛的应用(尤其是在医疗领域中)。此外,在许多情况中,明胶和用包含较低熔点的明胶的明胶溶液形成的明胶-mTG 溶液将具有降低溶液的初始粘度、使得 mTG 更自由的移动并增加明胶-mTG 反应发生的速度的附加的益处。

[0203] 根据本发明的某些实施方案,还对明胶-mTG 混合物提供了具有改善基于明胶-mTG 的产品的性质的潜力的另外的增强。例如本发明还以进一步将明胶-mTG 混合物中的 mTG 稳定化以增加其保存期限的方法为特征。

[0204] 在本发明的另一个实施方案中,将增塑剂加入明胶-mTG 溶液中。已经显示增塑剂降低明胶的熔点,使得其在较低的温度下形成溶液而无需经历热致可逆凝胶化。优先在明胶溶液与 mTG 或 mTG 溶液混合前向明胶颗粒或向明胶溶液加入一种或多种增塑剂以降低其熔点。在明胶和 mTG 溶液被冻干的情况下,在其冻干前向明胶溶液加入一种或多种增塑剂。在可选的实施方案中,如前文所描述的,向明胶溶液加入一种或多种增塑剂,使得可以在 mTG 不是高活性的较低温度下添加 mTG。之后可将明胶-mTG-增塑剂溶液以已经混合的形式冻干或以其它方式干燥。

[0205] 在一个优选的实施方案中,多元醇或多羟基化合物被用作增塑剂。这种多羟基化合物包括甘油、丙三醇、木糖醇、蔗糖和山梨糖醇。山梨糖醇使明胶-mTG 凝胶更有弹性并更粘。丙三醇使明胶-mTG 凝胶更硬并加速明胶的 mTG 交联。优选的丙三醇浓度比率范围优选地是从约 0.5 : 1 至约 5 : 1 的丙三醇:明胶,更优选地从约 1 : 1 至约 2 : 1 的丙三醇:明胶,重量/重量。优选的山梨糖醇浓度比率范围优选地是从约 0.5 : 1 至约 5 : 1 的山梨糖醇:明胶,更优选地从约 1 : 1 至约 3 : 1 的山梨糖醇:明胶,重量/重量。

[0206] 在与相似大小的一元醇相比较时,多元醇具有较高的沸点。在与相似大小的一元醇相比较时,多元醇的水溶解度较高,因为有更多吸引水分子的羟基基团。在食品工业中,如美国专利 2,558,065(其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述,其中用多元醇例如甘油浇灌明胶颗粒)和美国专利 3,939,001(其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述,其中使得明胶在以足以使明胶胶囊膨胀但未溶解的一段时间吸收多元醇)中所描述的,多元醇例如甘油被用来增加明胶的水溶解度,那些专利中所描述的这些技术和这些技术的变化将被认为是作为本发明的一部分描述多元醇用途的优先实施方案。

[0207] 不同浓度的增塑剂丙三醇、木糖醇、山梨糖醇、蔗糖和海藻糖对降低明胶的转变点的影响是得到充分证实的(D' Cruz NM, Bell LN. Thermal Unfolding of Gelatin in Solids as Affected by the Glass Transition(固体中的明胶在被玻璃转变影响时的热伸展). J Food Science 2005 :70(2), Kozlov PV, Burdygina GI. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification(固体明胶的结构和性质以及它们的修饰的原理). Polymer, 1983(24) :第 651-666 页)。

[0208] 尽管多元醇对明胶熔点的影响已经被充分证实,但在本发明之前,从未将它们与明胶或明胶溶液在其与 mTG 或与明胶-mTG 溶液混合前一起使用。

[0209] 在加入多羟基化合物增塑剂的实施方案中,增塑剂与明胶的重量比率的优选的范围优选为从约 0.5 : 1 至约 1 : 1,增塑剂:明胶。

[0210] 在使用明胶增塑剂降低溶液中明胶的熔点的另一个实施方案中,所用的增塑剂的种类可包括三乙醇胺、间苯二酚、硫二甘醇、甲苯磺酸的钠盐、丁二醇、硝酸脲、硫脲、脲、谷氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、甘氨酸、KSCN、KI 和 LiBr。

[0211] 之前已经研究了明胶溶液中脲的加入并证实其防止高分子量明胶 (99kDa) 在 25 °C 形成热致可逆凝胶的能力 (Otani Y, Tabata Y, Ikada Y. Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin-poly(L-glutamic acid) mixture (添加剂对明胶-聚(L-谷氨酸)混合物的凝胶化和组织粘合的影响). *Biomaterials* 19(1998)2167-2173)。

[0212] 使用脲防止明胶或明胶-mTG 溶液中在低于它们正常熔点的温度下热致可逆凝胶化的优选的实施方案中,以 0.25-0.2 重量/重量之间的脲:明胶的比率向溶液加入脲。甚至更优选地,以从约 1 : 2 至约 2 : 2 重量/重量的脲:明胶的比率向溶液加入脲。

[0213] 在本发明的另一个实施方案中,调节水性溶剂的 pH 水平和离子浓度以增加溶于溶剂中的明胶的溶解度。产品 pH 离等离子 pH 越远,明胶的溶解度将越好。这一技术中使用的优选的水性溶剂是磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。其他适合的缓冲剂包括硼酸盐、磷酸盐、HEPES (N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-乙基磺酸 (ethanesulfonic acid)]) 和类似物。

[0214] 通常,在将被用于活体器官的混合物中,将明胶溶于被缓冲于 pH5.0-9.0 并具有低至中度的离子强度 (相当于约 1 至 1000mM 的 NaCl, 优选地 100 至 150mM 的 NaCl) 的水性溶剂中是优选的。更优选地,溶液的 pH 为约 6.0-8.0, 更优选地约 7.4。尽管在这些 pH 和离子浓度下明胶是可溶的,但其溶解度可通过增加明胶的溶液 pH 和等离子 pH 之间的差异来提高其溶解度。

[0215] 可选择地加入一种或多种盐以降低明胶的转变温度。优选地,以适当的浓度范围加入盐以降低转变温度,更优选地至低于室温。例如,发现指明的浓度范围的下列盐降低明胶的转变点至低于室温:溴化钠 (1-2M)、硝酸钠 (1-2M)、硫氰酸钠 (0.5-1.5M)、碘化钠 (0.5-1.5M)、苯磺酸钠 (0.5-1.5M)、水杨酸钠 (0.25-1M)、二氯乙酸钠 (1-2M)、三氯乙酸钠 (0.5-1.5M)、二溴乙酸钠 (0.5-1.5M)、三溴乙酸钠 (0.25-1M)、二碘乙酸钠 (0.5-1.5M)、乙酰色氨酸钠 (0.5-1.5M)、乙炔二羧酸钠 (1-2M)、水杨酸锂 (1-2M)、二碘水杨酸锂 (Lithium Diiodosalicylate) (0.2-1M) (参见,例如 Bello J, Riese HCA, Vinograd JR. Mechanism of Gelation of Gelatin (明胶凝胶化的机制). Influence of Certain Electrolytes on the Melting Points of Gels of Gelatin and Chemically Modified Gelatins (某些电解对明胶和化学修饰的明胶的凝胶的熔点的影响). *Am Chem Soc.* 1956 年 9 月 (60). 第 1299-1306 页)。

[0216] 可选择并优选地,向组合物加入一种或多种酸性物质以降低 pH。降低明胶溶液的 pH 降低了其转变点。通常,降低明胶转变点对于 37 度在体内重新构成明胶是有用的。对于本文所用的某些优选种类的明胶来说,当例如来自哺乳动物来源时,降低 pH 为明胶的转变点提供了更好的结果。然而,对于某些种类的明胶来说,升高 pH 可选择地提供更好的结果。

[0217] 在增加明胶溶液和明胶等离子点之间的 pH 差异的另一个实施方案中,明胶本身被修饰。这可如美国专利 6,863,783 (其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈

述)中的通过在将它溶解在溶液之前将它处理以产生带静电的明胶或如美国专利 2,398,004(其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述)中的通过控制明胶的等电点来完成

[0218] 如果明胶溶液的 pH 被升高而不是降低,那么溶液的 pH 将更接近明胶的等电点并且转变点将被升高。这一修饰可选择地被用来在植入体内后将未交联的明胶保持为热致可逆凝胶。

[0219] 在本发明的另一个实施方案中,明胶、mTG 或这两种物质在与海藻糖糖类或其他糖类混合后已经经历了干燥以稳定处于其活性形式的蛋白或酶,使其可以被容易地重新构成。干燥的不同的实施方案是冷冻干燥、喷雾干燥、滚筒干燥、空气干燥、加热干燥、真空干燥或干燥明胶-海藻糖或明胶-mTG-海藻糖溶液的任何其他方法。

[0220] 海藻糖在空气干燥和冷冻干燥中的优良的稳定化能力已经被充分证实了。已经显示当在已经向特定的材料或溶液加入海藻糖后进行干燥时干燥的材料经历更迅速的重新构成(Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. IsTrehalose Special for Preserving Dry Biomaterials? (海藻糖是专门用于保护干燥的生物材料的吗?)Biophysical Journal 1996(71):2087-2093)。

[0221] 在环境温度和大气压下干燥包含海藻糖的蛋白溶液已经被充分描述于美国专利 4,891,319 中。在那里所描述的实施例中,保护了干燥的蛋白的功能。

[0222] 在明胶的特定的实例中,向明胶溶液中加入海藻糖具有增加明胶凝胶的强度的另外的益处(Norie N, Kazuhiro M, Masami N, Yusuke O, Takashi O, Keiko N. Factors Affecting the Gelation of a Gelatin Solution in the Presence of Sugar(在糖存在的情况下,影响明胶溶液的凝胶化的因素). Journal of Home Economics of Japan. 55(2): 第 159-166 页(2004))。

[0223] 此外,明胶-mTG 交联反应与天然血液因子的交联反应具有许多相似性。海藻糖干燥来稳定血液因子近来已经被证实了(美国专利 6,649,386 和 7,220,836)并且处于被商业用于制备具有可容易地被重新构成的血液蛋白的产品的过程中(ProFibrix™, Leiderdorp)。

[0224] 在本发明的另一个实施方案中,在糖存在的情况下干燥明胶。这可包括在不同支持物(例如糖、麦芽糖糊精或淀粉)上的明胶的喷雾化。

[0225] 在本发明的一个可选的实施方案中,使用一种由 PB Gelatins(Tessenderlo Group, Belgium)生产的叫做 Cryogel™的商业明胶产品。Cryogel 在比等价但未处理的明胶低 5-6°C 的温度下是可溶的。用于 Cryogel 生产的精确处理过程是有专利权的。

[0226] 在本发明的又一个实施方案中,组合物可选择地以一种或多种其他物质为特征。例如,组合物可选择地包含变性剂,包括但不限于盐酸胍或脲中的一种或多种。组合物也可选择地、二选一地或另外地包含还原剂,包括但不限于氯化镁或氢醌中的一种或多种。组合物也可选择地、二选一地或另外地包含例如异丙醇的物质以便增加氢键形成。组合物也可选择地、二选一地或另外地包含质子极性溶剂,优选地是能够与蛋白在结构上相互作用并防止明胶中螺旋形成的溶剂,例如 DMSO(二甲基亚砜)。组合物也可选择地、二选一地或另外地包含在进入溶液时放热的干燥剂,诸如氯化钙。

[0227] 根据某些实施方案,本发明还以明胶特异性蛋白酶为特征,所述明胶特异性蛋白

酶包括可迅速破坏明胶分子链但是不会对基于天然纤维的凝固网络有不利影响的酶或酶的混合物。

[0228] 明胶特异性蛋白酶可选择地被用于从创伤部位除去绷带 / 敷料 / 可吸收性止血剂 / 密封材料而不会损害天然的内源纤维蛋白凝块并导致再次流血。与现有的产品相比,这一特征是本发明的另外的益处,并且解决了粘性足以良好粘合至创伤部位并停止流血的止血敷料不能在不除去或破坏纤维蛋白凝块的情况下被除去的技术难题。尽管根据本发明的绷带的至少某些实施方案是可吸收的,但可能有如果医生想要在创伤部位上进行手术则从创伤将其除去或将绷带放在不同位置的需要。

[0229] 一种示例性的非限制性的蛋白酶是蛋白酶 K(Chen, 等人 *Biomacromolecules* 2003, 4, 1558-1563)。但是可选择地,可使用其他蛋白酶,尤其是较快起作用的酶。

[0230] 根据其他的实施方案,可选择地加入一种或多种蛋白酶抑制剂,包括但不限于抑肽酶、凝血酸 (tranexamic acid)、 α -2 血纤维蛋白溶酶抑制剂、 α -1 抗胰蛋白酶或 α -1 抗胰蛋白酶的 Pittsburgh 突变体 (Arg-358 α -1 抗胰蛋白酶;参见 Owen 等人 *N. Engl. J. Med.* 309 :694-698, 1983 和美国专利第 4, 711, 848 号,其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述)。在优选的实施方案中,以足以提供 1500-20,000KIU/mL 的最终工作浓度的量包含抑肽酶。

[0231] 根据其他的实施方案,除了明胶和 TG,本发明的止血材料可进一步包含另外的止血物质。这种物质本质上可以是生物的或合成的并可包括但不限于一种或多种已知的止血剂,例如白蛋白、胶原蛋白、纤维蛋白、凝血酶、壳聚糖、硫酸铁或其他金属硫酸盐。

[0232] 根据又一些另外的实施方案,本发明的止血材料可进一步包括用于在将交联材料(诸如转谷氨酰胺酶)与明胶相结合时加快交联的促进剂。这种促进剂可选择地包括例如钙。

[0233] 钙是转谷氨酰胺酶 / 明胶交联反应的优选的组分。不同研究已经证实,不同的钙浓度和 / 或钙动员药物(包括但不限于刺尾鱼毒素 (MTX)) 的添加可加速转谷氨酰胺酶凝固反应。因此根据本发明的实施方案,包括钙和 / 或钙动员药物,但可选择地不使用钙和 / 或钙动员药物。使用钙的这些修改用于钙依赖性转谷氨酰胺酶而不用于不依赖钙的转谷氨酰胺酶。

[0234] 根据又一些另外的实施方案,本发明的止血材料可进一步包含用于优选地在将交联材料(诸如转谷氨酰胺酶)与明胶相结合时诱导放热反应的材料。放热反应的诱导可选择并优选地支持交联,甚至在周围环境的条件下,其中“周围”可选择地被定义为具有小于约 30°C 的温度的任何环境。这种放热剂可选择地包含例如钙、含氯分子(例如氯化钙或氯化镁)、金属氧化物 / 沸石或其组合中的一种或多种。

[0235] 组合物制备

[0236] 本文所描述的组合物可选择地根据本发明的各种实施方案的一种或多种不同的方法制备。在本发明的一个实施方案中,使明胶-mTG 混合物中的明胶在其与 mTG 混合之前经受涉及使用热的非常具体的干燥方法。这些干燥方法通过降低其熔点(优选地至低于手术室温度)而提高明胶的溶解度。干燥方法可提高明胶的溶解度而无需任何添加剂并且不会改变形成明胶或明胶-mTG 溶液的环境条件。但是,某些添加剂例如增塑剂或稳定剂的加入,或者某些环境因素例如明胶或明胶-mTG 溶液的温度、离子强度和渗透压的调控可被用

于进一步增强已经包含使用降低其熔点的技术干燥的明胶的明胶-mTG 混合物的性质。

[0237] 在热依赖性明胶干燥以制备可在降低的温度下与 mTG 形成溶液的明胶的优选的实施方案中,将具有至少 35%的水含量的纯明胶溶液在超过凝胶化和凝固温度的温度喷雾在包含少于 8%的水的过量细碎的固体明胶颗粒上。之后将颗粒在流化床中干燥至 8-13%的水含量。这一过程,以及也包括在本发明范围内的这一过程的变化,被详细描述于美国专利 4,889,920 中,其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述。

[0238] 在热依赖性明胶干燥以制备可在降低的温度下与 mTG 形成溶液的明胶的又一个优选的实施方案中,将具有基于明胶和水的总重量的超过 8%重量的水含量的明胶经受微波加热以除去至少 35%的所述水含量以获得具有基于明胶和水的总重量的不超过 16%重量的水含量的明胶。这一过程,以及也应当被认为是本发明的一部分的这一过程的变化,被详细描述于美国专利 4,224,348 中,其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述。

[0239] 在热依赖性明胶干燥以制备可在降低的温度下与 mTG 形成溶液的明胶的又一个优选的实施方案中,如美国专利 2,803,548(其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述)中所描述的,将明胶于 100°C 在减压下干燥。这一过程改变了明胶链本身,使得它们不能够被热致可逆凝胶化。尽管明胶的 mTG 交联不依赖于明胶形成热致可逆凝胶的能力,但这一干燥过程导致明胶链的削弱,以及因此在明胶-mTG 交联中使用这种明胶所产生的任何凝胶的削弱。

[0240] 在本发明的另一个实施方案中,使明胶-mTG 混合物中的明胶在其与 mTG 混合之前经受涉及冷冻干燥的使用的非常具体的干燥方法。这些干燥方法通过降低其熔点(优选地至低于手术室温度)提高了明胶的溶解度。干燥方法可提高明胶的溶解度而无需任何添加剂并且不会改变形成明胶或明胶-mTG 溶液的环境条件。但是,某些添加剂例如增塑剂或稳定剂的加入,或者某些环境因素例如明胶或明胶-mTG 溶液的温度、离子强度和渗透压的调控可被用于进一步增强已经包含使用降低其熔点的冷冻干燥技术干燥的明胶的明胶-mTG 混合物的性质。

[0241] 在冷冻干燥明胶干燥以制备可在降低的温度下与 mTG 形成溶液的明胶的优选的实施方案中,将以 0.1-2%重量的浓度溶于水的明胶在减压下冷冻干燥。这一过程,以及也应当被认为是本发明的一部分的这一过程的变化,被详细描述于美国专利 2,166,074 中,其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述。

[0242] 在本发明的另一个实施方案中,一旦明胶和 mTG 已经在溶液中被混合,就将明胶-mTG 混合物经受冷冻干燥。这降低明胶的熔点而产生均匀混合的冷冻干燥的明胶-mTG 混合物,其中干燥形式的明胶与干燥形式的 mTG 相接触。在这一实施方案中,明胶和 mTG 同时从冷冻干燥状态重新构成并立即在重新构成位点形成溶液。可优先将这一技术与已经具有比标准明胶低的熔点的明胶或明胶混合物一起使用,因为 mTG 的活性在较低的温度(低于约 37°C)时指数级下降。

[0243] 因此可在低温下形成由降低熔点的明胶和 mTG 组成的溶液而没有迅速的交联和凝胶化发生。之后可将这一溶液冷冻干燥,产生均质分布的明胶和 mTG 的干燥的混合物。这种混合物在与较温暖的溶剂接触时可被迅速重新构成以形成凝胶。可优先在创伤敷料中使用这种技术,其中体液在其 37°C 的正常温度下可重新构成明胶和 mTG。

[0244] 优选地,根据本发明的某些实施方案,提供了用于止血或组织密封材料目的的明

胶-mTG 颗粒混合物,其中将明胶和 mTG 一起喷雾干燥以产生包含适于止血或组织密封材料施用的浓度的明胶和 mTG 的良好分散的粉末。

[0245] 在本发明的另一个实施方案中,为了增加其溶解度。作为明胶-mTG 混合物的一部分所使用的明胶已经被水解、部分水解,或者一定百分比的明胶混合物已经被水解或部分水解。这种技术的一个实例已经在涉及用水解的明胶薄膜包被标准的明胶颗粒的过程中被成功地证实了(美国专利 4,729,897,其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述)。这一实施方案可包括在增塑剂存在下已经被水解或部分水解的明胶的使用,所述增塑剂可包括如前文所描述的多元醇、糖类或其他增塑剂。

[0246] 在本发明的另一个实施方案中,将包含预混的 mTG 和明胶或其他蛋白水解产物的溶液冷冻干燥以增加化合物的稳定性。这一技术,如在制备食品加工所使用的组合物中所使用的,被描述于美国专利 6,030,821 中,其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述。

[0247] 在本发明的另一个实施方案中,将作为明胶-mTG 混合物的一部分所使用的明胶在与酸混合形成稀释酸性的明胶溶液(其中酸被保持在明胶水平的 5-20%)后喷雾干燥,使得形成精细的小滴以进一步干燥。这一过程被描述于加拿大专利 896,965 中,其通过引用由此并入本文,如同在本文完整陈述。

[0248] 在本发明的又一个实施方案中,一起或顺序地使用用于加强包含明胶和 mTG 的产品的上文所描述的技术中的一种或多种。这可优先包括在明胶或明胶-mTG 溶液中一起使用两种或更多种增塑剂,在使用所描述的干燥方法中的一种将其干燥之前在明胶或明胶-mTG 溶液中使用一种或多种增塑剂。它还可包括使用一种干燥技术干燥明胶或明胶-mTG,在溶液中溶解干燥的明胶或明胶-mTG,之后再次干燥明胶或明胶-mTG。

[0249] 这些方法还可选择地被用于经历热致可逆凝胶化的组合物,优选地包括例如用于包含非明胶蛋白以及可选择地其他交联剂(除了转谷氨酰胺酶以外)的各种组合的组合物。

[0250] 绷带

[0251] 本发明的一个示例性实施方案是关于止血敷料的(例如用于治疗患者中的创伤组织的止血敷料),其包括明胶和转谷氨酰胺酶,优选地为分开的,直到为了绷带的活性而要求或需要它们的相互反应。绷带可选择地以非吸收性的衬垫例如塑料衬垫为特征。绷带可选择地以可吸收的材料层为特征。

[0252] 本发明的另一个示例性实施方案是关于用于治疗患者中的创伤组织的止血敷料的,其可选择并优选地包括:(i) 明胶层;(ii) 与所述明胶层相邻的转谷氨酰胺酶层,其中转谷氨酰胺酶层与明胶层共同扩张或非共同扩张。

[0253] 本发明的另一个示例性实施方案是关于用于治疗患者中的创伤组织的止血敷料的,其可选择并优选地包括:(i) 可吸收性或非可吸收性材料层;(ii) 与所述材料层相邻的明胶层;(iii) 与所述明胶层相邻的转谷氨酰胺酶层,其中转谷氨酰胺酶层与明胶层共同扩张或非共同扩张。

[0254] 本发明的另一个示例性实施方案是关于用于治疗患者中的创伤组织的止血敷料的,其包括:(i) 第一明胶层;(ii) 与第一明胶层相邻的可吸收性材料层;(iii) 与可吸收性材料层相邻的转谷氨酰胺酶层,以及(iv) 与转谷氨酰胺酶层相邻的第二明胶层,其中转

谷氨酰胺酶层与第一和 / 或第二明胶层非共同扩张。

[0255] 根据某些实施方案,本发明提供了包括夹在第一和第二明胶层之间的转谷氨酰胺酶层的止血敷料(例如绷带),其中转谷氨酰胺酶层可与第一和 / 或第二明胶层共同扩张或非共同扩张。这种止血敷料对于治疗创伤来说是有用的。与其中转谷氨酰胺酶层与整个第一和第二明胶层共同扩张的敷料相比,非共同扩张的模型提供了抑制层的分层的优点。但是共同扩张的模型的止血性能可优于非共同扩张的模型的止血性能

[0256] 根据本发明的其他实施方案,提供了本发明的敷料,其可选择并优选地包括:(i)可吸收性或非可吸收性基质;(ii)明胶;(iii)转谷氨酰胺酶,其中明胶和转谷氨酰胺酶层被包含于所述基质中。

[0257] 在另一个实施方案中,止血装置包括:(i)多孔的可吸收性或非可吸收性基质;(ii)明胶;(iii)转谷氨酰胺酶,其中明胶和转谷氨酰胺酶层粘合于所述基质。

[0258] 在各种实施方案中,可以多种形状和样式中任何一种将转谷氨酰胺酶层成形。例如,并且非限制性地,可将转谷氨酰胺酶层成形为包含转谷氨酰胺酶的点阵,或者成形为包含转谷氨酰胺酶的单一的点。可选择地,可将转谷氨酰胺酶层成形为包含转谷氨酰胺酶的多条线。

[0259] 止血敷料的每一层还可选择地包含一种或多种适当的填料、结合剂和 / 或增溶剂。此外,每一种止血敷料还可选择地进一步包括包含脱模剂和 / 或衬垫材料的脱模层。

[0260] 根据优选的实施方案,止血敷料的每一层可选择地包含一种或多种适合的填料例如蔗糖。止血敷料的每一层也可选择地包含一种或多种适合的结合剂例如蔗糖。每一种止血敷料也可选择地进一步包括包含脱模剂的脱模层。示例性的脱模剂是蔗糖。止血敷料的每一层也可选择地包含一种或多种适合的增溶剂例如蔗糖。

[0261] 不希望被单一的假设所限制,可选择地通过所加入的量至少部分地测定作为本发明的一部分的蔗糖的性质。在相对高的浓度(20-30%的蔗糖溶液)时,可将其喷雾至表面(例如绷带)上以制备为涂抹另一种待粘合溶液(例如明胶或 mTG 溶液)的表面。在较低的浓度(例如 2%左右)可将蔗糖加至明胶或 mTG 溶液以帮助这种溶液粘合至表面(例如绷带)。

[0262] 止血敷料的每一层也可选择地包含一种或多种适合的发泡剂例如柠檬酸和碳酸氢钠的混合物。

[0263] 每一种止血敷料也可在使用敷料时在与朝向创伤的面相反的面进一步包括衬垫材料。衬垫材料可用生理上可接受的粘合剂固定或可自我粘合(例如通过带有表面静电荷)。衬垫材料可是可吸收的材料或不可吸收的材料,例如硅酮片或塑料片,和 / 或可选择地被插入身体的装置例如血管导管和 / 或其他类型的医疗装置。

[0264] 可将转谷氨酰胺酶层涂抹于第一明胶层,以使它是与第一明胶层非共同扩张的和 / 或当涂抹第二明胶层时是与第二明胶层非共同扩张的。例如转谷氨酰胺酶层可占到第一明胶层的表面积的约 5%至约 95%和 / 或第二明胶层的表面积的约 5%至约 95%。可将转谷氨酰胺酶以明胶层上的单个点或一系列点涂抹于明胶层以使转谷氨酰胺酶点的总面积占到第一明胶层的表面积的约 5%至约 95%和 / 或第二明胶层的表面积的约 5%至约 95%。

[0265] 这种转谷氨酰胺酶的单个点或多个点可具有任何几何形状,例如填满的或未填满

的圆、矩形、三角形、线、不规则形状或其组合。可将这种点以有序或随机的样式涂抹于第一明胶层。以转谷氨酰胺酶的总表面积是第一明胶层的表面积的约 5% 至约 95% 和 / 或第二明胶层的表面积的约 5% 至约 95% 为条件, 多个点可形成各种形状和样式中的任何一种, 例如阵列、网格、系列同心点 (例如同心的圆或正方形)、交错的系列点 (例如交错的圆)、从一个轴放射出的辐线或任何其他构型。通常, 与少量的大点相比, 大量的小点是优选的。例如, 占同样的总表面积时, 20 乘 20 的点阵通常是比 10 乘 10 的点阵优选的。但是以转谷氨酰胺酶的总表面积是第一明胶层的表面积的约 5% 至约 95% 和 / 或第二明胶层的表面积的约 5% 至约 95% 为条件, 点可具有任何尺寸。例如, 取决于敷料的总尺寸, 点在直径、宽度或长度上可是 (非限制性的) 至少约 0.01、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10mm 或更大的。在一个实施方案中, 例如, 4 个具有 2-3mm 直径的圆形点每个可占一平方厘米的敷料。各种其他的构型是本发明范围内的并且容易被本领域的那些技术人员所使用。

[0266] 可选择地将敷料制备为各种尺寸和形状中的任何一种。通常敷料具有容易被本领域技术人员处理的尺寸和形状, 通常在沿任何一面的长度上小于 12", 例如 1" x 1"、1" x 2"、4" x 4" 等等。敷料的湿度水平通常小于 8% (例如, 小于 7、6、5、4、3、2 或 1%)。

[0267] 本发明中可选择地使用本领域技术人员已知的各种可吸收性材料中的任何一种。例如可吸收性材料可是蛋白质物质, 诸如纤维蛋白、角蛋白、胶原蛋白和 / 或明胶, 或者糖类物质, 诸如藻酸盐、甲壳质、纤维素、蛋白多糖 (例如聚-N-乙酰葡萄糖胺)、乙醇酸聚合物、乳酸聚合物或乙醇酸 / 乳酸共聚物。例如可吸收性材料可是糖类物质。可吸收性材料的示范性实例以商品名 VICRYL. TM. 和 DEXON. TM 被出售。

[0268] 通常, 止血敷料的不同层可通过本领域技术人员已知并可用的任何方式相互固定。例如, 可选择并优选地, 将明胶层和 / 或转谷氨酰胺酶层涂抹为一系列迅速冷冻的水性溶液层并随后冻干或冷冻干燥 (例如在每一层的涂抹之后以及在整体敷料的组装时)。可通过各种技术中的任何一种涂抹层, 所述技术包括喷雾、移液 (例如用多道移液器)、喷洒、使用障板、静电沉积、使用微量注射点阵系统或使用具有产生高密度点阵的孔的分散多支管进行分散。

[0269] 在本发明的某些实施方案中, 当使用模具制备敷料时, 在涂抹敷料的第一层之前将脱模剂例如蔗糖涂抹至模具。这种实施方案中, 止血敷料进一步包括包含所述脱模剂的脱模层。

[0270] 可选择地, 可将生理上可接受的粘合剂涂抹于随后固定在那里的可吸收性材料和 / 或衬垫材料 (当存在时) 和明胶层和 / 或转谷氨酰胺酶层。

[0271] 在敷料的一个实施方案中, 生理上可接受的粘合剂具有以便在向创伤组织施用敷料后可将可吸收性材料和 / 或衬垫材料与明胶层分离的剪切强度和 / 或结构。在另一个实施方案中, 生理上可接受的粘合剂具有以便在向创伤组织施用敷料后不可将可吸收性材料和 / 或衬垫材料与明胶层分离的剪切强度。

[0272] 每创伤面积的明胶浓度取决于许多因素, 包括但不限于绷带的最终结构、所使用的材料等等。

[0273] 根据本发明的其他实施方案, 提供了通过可选择并优选地提供第一明胶层, 向第一明胶层涂抹转谷氨酰胺酶层, 以及向转谷氨酰胺酶层涂抹第二明胶层来制备止血敷料的方法, 其中转谷氨酰胺酶层与第一明胶层非共同扩张和 / 或与第二明胶层非共同扩张。

[0274] 相似地,本发明的其他实施方案包括通过提供具有粘合于其上的第一明胶层的可吸收性或非可吸收性衬垫层;在明胶层的与可吸收性或非可吸收性衬垫层连接的侧面相反的侧面上向所述第一明胶层涂抹转谷氨酰胺酶层;以及向转谷氨酰胺酶层涂抹第二明胶层来制备止血敷料的方法,其中转谷氨酰胺酶层与第一明胶层非共同扩张和/或与第二明胶层非共同扩张。

[0275] 止血装置

[0276] 本发明的另一个示例性实施方案是关于止血装置(例如用于在快速流血的患者的外科手术环境下止血)的,其包括:(i)多孔可吸收性或非可吸收性基质;(ii)粉末、颗粒或其他固体形式的明胶;(iii)粉末、颗粒或其他固体形式的转谷氨酰胺酶;其中明胶和转谷氨酰胺酶包含在所述基质中。

[0277] 本发明的另一个实施方案是关于止血装置(例如用于在快速流血的患者的外科手术环境下止血)的,其包括:(i)多孔可吸收性或非可吸收性基质;(ii)明胶;(iii)转谷氨酰胺酶;其中明胶和转谷氨酰胺酶粘合于所述基质。

[0278] 本发明的其他实施方案包括通过已接受的密封材料施用的方法施用止血/密封材料混合物。这种方法可选择地包括作为明胶、泡沫或喷雾的一部分的混合物的施用。使用这些方法的止血/密封材料混合物的施用可选择地例如通过分开储存混合物组分并在施用前即时混合它们;和/或例如可选择地通过以无活性形式一起储存组分和在施用前即时活化它们来完成。无活性形式的密封材料组分可选择地被提供为冷冻溶液、需要重新构成的冻干的粉末、需要重新构成的喷雾干燥的粉末和/或任何其他适合的形式的无活性密封材料混合物中的一种或多种。

[0279] 止血装置制备

[0280] 根据本发明的某些实施方案,可选择地将冷冻干燥和/或冻干技术应用于将根据本发明的密封材料组分粘合或固定在任何导管、套管针或植入物或者实际上任何其他这种医疗装置的表面上。这可选择地促进穿透创伤处的止血和其闭合,这可选择地对例如动脉导管/装置来说是有用的。对于已经用抗凝药物治疗过的和更易于发生流血并发症的患者来说,动脉手术后的止血是关键的。本发明的止血组合物是不依赖于血液凝固的,因此对避免过度流血提供了额外的帮助。

[0281] 装置、组合物或绷带的使用

[0282] 在止血敷料、装置或剂的使用期间,可将明胶和转谷氨酰胺酶在敷料、装置或颗粒混合物被施用于创伤组织时通过出血的或渗出的创伤漏出的患者的内源流体(例如血液、气、胆汁、肠液)活化。可选择地,在从创伤组织损失的流体不足以提供蛋白层的充分的水合的情况下,可在向创伤组织施用止血敷料、装置或剂之前通过施用生理上可接受的液体(例如水、缓冲液、盐水)(可选择地包含任何必要的辅助因子和/或酶)而活化明胶和/或转谷氨酰胺酶。

[0283] 参考附图和随附说明,可更好的理解本发明的原理和操作。

[0284] 现在参考附图,图1是根据本发明的示例性绷带的示意方框图。如所示的,绷带100优选地以至少一个以及优选地多个明胶层102(仅为了示例性说明而无任何限制性意图的目的显为两个这样的层)为特征。还优选地提供至少一个转谷氨酰胺酶层104;在这一实例中,仅为了示例性说明而无任何限制性意图的目的,将转谷氨酰胺酶层104显示为

被夹在多个明胶层 102 之间。还显示了适合的衬垫 106, 其优选地为绷带 100 提供机械强度。可选择地将衬垫 106 做成多元醇酸网状物或片, 例如诸如作为 Dexon™ 或 Vicryl™ 所提供的。

[0285] 图 2 显示了根据本发明的示例性绷带的主视图, 所述绷带用可选择的吸收性衬垫和可选择的塑料封套覆盖;

[0286] 图 3 是根据本发明的示例性止血装置的示意方框图, 所述装置包含多孔基质。如所示的, 止血装置 300 优选地以至少一个以及优选地多个明胶层 302 (仅为了示例性说明而无任何限制性意图的目的显为两个这样的层) 为特征。还优选地提供至少一个转谷氨酰胺酶层 304; 在这一实例中, 仅为了示例性说明而无任何限制性意图的目的, 将转谷氨酰胺酶层 304 显示为被夹在多个明胶层 302 之间。还显示了适合的衬垫 306, 其优选地为绷带 300 提供机械强度。可选择地将衬垫 306 做成任何类型的生物可分解材料。

[0287] 现在参考下文的实施例, 构建根据本发明的各种组合物并测试它们减少流血和诱导止血的能力。在实验动物中, 发现所测试的组合物是非常强有力的并能够停止流血甚至是动脉流血。

[0288] 实施例 1

[0289] 示例性说明的粘合剂的制备

[0290] 这一实施例涉及根据本发明的示例性说明的、非限制性的粘合剂的制备。这一实施例使用具有 100U/gm 的比活性水平的不依赖钙的微生物转谷氨酰胺酶 (批号 L-04207, Ajinomoto USA, Chicago, IL)。并且, 所测试的明胶是来自猪皮的 A 型明胶, 300 布卢姆 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。

[0291] 下列方法被用于制备示例性说明的粘合剂: 制备 PBS 中的 20% w/w 的明胶 (磷酸盐缓冲盐水; 将 20g 明胶加入 80g 的 PBS 中)。接下来制备 PBS 中的 20% w/v 的 mTG (将 1mg 的 mTG 加入 5mL 的 PBS 中)。之后将 5g 明胶溶液和 0.5mL 的 mTG 溶液混合 (换句话说, 10 : 1 的比率)。

[0292] 图 4 显示不同百分比的明胶对粘合剂的粘合强度的影响。通过将猪皮样品粘合至第二个这样的样品, 在结合处上放置 47.5g 的重量, 并且之后立即将其浸没入水中 120 分钟来测量粘合强度。浸没期之后, 以 5mm/分钟施加拉力以测定最大的粘合强度 (Mcdermott 等人, Biomacromolecules 2004, 5, 1270-1279)。

[0293] 如图 5 中所证实的, 微生物转谷氨酰胺酶的最佳反应性水平是在 50-55°C 的范围内。在 37°C 的生理水平, 反应性水平仅为最佳水平的约 60%。这样, 使用放热剂升高反应的温度将升高反应性水平并由此加速明胶交联。因此, 可选择并优选地, 放热剂是本发明的一部分。

[0294] 钙可优选地被用作这种剂的一部分, 因为氯化钙在溶解时释放热但不足以热得损伤组织。并且, 如前文所述的, 钙可能以不依赖于其放热的溶解的其他方法帮助加速反应。

[0295] 可选择地, 具有一种或多种交联因素的绷带中可包括无毒性放热物质。可选或另外地, 如之前所描述的, 在绷带衬垫后可选择地加入一种或多种非可吸收性放热剂。

[0296] 实施例 2

[0297] 体外破裂压力试验

[0298] 这一实施例证明了依照本发明的组合物作为其耐高压动脉血流的代表的耐破裂的能力。如下文所描述的,为了模拟高压血流,开发了破裂压力系统,用热的 PBS 取代血液对猪皮样品上的创伤施加压力。因为生理血压几乎总是小于 200mmHg,耐 200mmHg 的压力 2 分钟被认为是成功标准。这些破裂试验结果证明根据本发明的组合物适合用于处理血流,包括高压动脉流。

[0299] 大多数样品 (8/10) 耐受 200mmHg 的施压 2 分钟。没有通过的那些样品可能与人为或系统误差有关,平均破裂压力是 320 ± 50 mmHg,但这一数字是保守的,因为由于 354mmHg 是通过实验室设备能够测量的最大压力,没有破裂的样品被指定为 354mmHg 的数值。这些结果证明根据本发明的某些实施方案的粘合组合物被用于止血目的的能力,甚至是在严格的试验条件下。

[0300] 材料

[0301] 从 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 获得的明胶 (来自猪的 A 型,布卢姆值 300)。不依赖钙的微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 混合物 TG-TI 是从 Ajinomoto 获得的并且没有进一步纯化而被使用。制造商报道这些酶具有 100U/gm 的比活性。猪皮组织是从当地食杂店购买的。

[0302] 样品制备

[0303] 在将猪皮切割成直径约 6-6.5cm 的圆盘形状之前,用稀释的 NaOH 处理猪皮一小时。用外科手术刀除去皮上的脂肪。在皮切片的中心打一个 2mm 的孔以模仿创伤。将皮用大量的水和 PBS 缓冲液清洗,并且储存在具有约 1mL 的 PBS 缓冲液的培养皿中以使皮保湿直到使用。对于本文所描述的所有的实验,使用具有 7.4 的 pH 的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水作为 PBS 缓冲液。

[0304] 每天新鲜制备于 PBS 缓冲液的明胶溶液 (25% w/w) 并在使用前于 65°C 储存。制备于 PBS 缓冲液的 mTG (20% w/w) 的储存液并分装在 2ml 的小瓶中,储存于 -18°C。使用前将酶溶液于室温解冻。

[0305] 在施用粘合剂前用实验室组织擦拭布将皮表面擦干。在 2ml 小瓶中通过将 1ml 明胶和 0.5ml 的 mTG 混合制备粘合剂。制备了两种不同的组合物。组合物“A”使用了来自 Ajinomoto 的转谷氨酰胺酶,而组合物“B”使用了来自 (Yiming Biological Products Co. (Jiangsu, China; 如上文所述的优选的产品) 的转谷氨酰胺酶。将 0.6ml 所得的混合物 (根据本发明的示例性组织粘合剂) 施用在猪皮表面上,覆盖孔。施用粘合剂后,将皮组织于 37°C 孵育 30 分钟。孵育后立即进行破裂试验。

[0306] 破裂试验

[0307] 组装前将自制的装置在温缓冲液 (~44°C) 中平衡。迅速地将孵育的皮装进装置后,将约 50ml 的 42°C 的 PBS 缓冲液倒入装置,在皮组织上。手动控制氮流以增加压力。破裂试验的整个程序如下:

[0308] 步骤 1- 将压力增加至 200mmHg 并保持 2 分钟;

[0309] 步骤 2- 将压力增加至 300mmHg 并保持 2 分钟;

[0310] 步骤 3- 将压力增加至 > 354mmHg (可测量的最大压力)。

[0311] 作为对照,纯的明胶溶液被施用在皮上并被允许在室温下通过形成物理凝胶而凝胶 (即定型) 30 分钟。明胶-温的是指能溶解物理明胶凝胶的 42°C 缓冲溶液的使用。

[0312] 结果

[0313] 图 6 显示基于组合物 A 的组织粘合剂的代表性的破裂压力测量。图 6 中显示了样品 #4 和 #5 的数据。表 2 中给出了组合物 A 的破裂试验结果的概要,而表 3 中显示样品的完整列表。

[0314] 表 2. 化合物 A 的破裂试验结果的概要

[0315]

所测试的样品的总数		10
	未破裂	5
	在步骤#2后破裂	1
	在步骤#1后破裂	2
	在步骤#1期间破裂	2
	平均破裂压力*	320 ± 50 mmHg

[0316] * “未破裂”的样品采用了 354mmHg(可测量的最大压力)的数值。

[0317] 表 3. 组合物 A 的样品的破裂试验结果

[0318]

样品#	200 mmHg	300 mmHg	破裂压力 (mmHg)	破裂类型	备注
1	2分钟	-	325	内聚的	
2	2分钟	2分钟	>354		
3	2分钟	2分钟	>354		
4	2分钟	2分钟	>354		
5 ^a	30秒	-	232	内聚的	装置漏气
6	2分钟	2分钟	>354		
7	2分钟	2分钟	348	内聚的	
8	2分钟	-	250	内聚的	44 °C PBS
9	2分钟	2分钟	>354		
10	10秒	-	245	内聚的	44 °C PBS
对照: 明胶- 温的					
13	-	-	181	熔化的	42 °C PBS
14	-	-	45	熔化的	37 °C PBS
15	-	-	93	熔化的	
16	-	-	105	熔化的	
17	-	-	84	熔化的	
18	-	-	45	熔化的	
19	-	-	15	熔化的	
20	-	-	140	熔化的	

[0319] ^a在~ 200mmHg 时装置开始漏气。收紧装置增加了压力但可能也使皮变形, 导致在 232mmHg 时粘合剂破裂。

[0320] 图 7 显示基于组合物 B 的组织粘合剂的代表性的破裂压力测量; 图 7 中显示了样品 #4 和 #5 的数据。表 4 中显示样品的完整列表的结果。

[0321] 表 4. 组合物 B 的样品的破裂试验结果。

[0322]

样品#	200 mmHg	300 mmHg	破裂压力 (mmHg)	破裂类型	备注
1*		2分钟	最大		
2	2分钟	2分钟	最大		
3*			最大, 2分钟		
4	2分钟	-	315	内聚的	44 °C PBS
5	2分钟	2分钟	最大		

[0323] * 因为压力是手动控制的并且没有压力释放阀, 不慎将这些样品的压力设置在 200mmHg 以上。

[0324] 实施例 3

[0325] 大鼠模型中的止血

[0326] 这一实施例提供了根据本发明的用于在活体动物中实现止血的明胶 -mTG 组合物的最初的体内证明。大鼠是成年的雌性 Syrian 大鼠。

[0327] 材料

[0328] 使用了以于 pBS 中的 25 % w/w 的明胶 (猪的, A 型, 30 布卢姆, 来自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)) 为特征的明胶溶液。通过用抹刀人工搅拌的同时将加热的 (50 °C) PBS 混合进明胶粉末中来混合溶液。施用前, 将明胶溶液储存在浸没在 50 °C 的水浴中的加帽的 5mL 注射筒里以维持其液相。

[0329] 转谷氨酰胺酶 (mTG) 溶液是以于 PBS 中的 20 % w/w 的微生物转谷氨酰胺酶 (Activa WM, Ajinomoto™) 为特征的。将 mTG 溶液保持在室温。

[0330] 施用前, 在 2mL Leppendorf 管中将 1mL 的明胶溶液加至 0.5mL 的 mTG 溶液。将管颠倒 2-3 次以混合溶液并且之后用 1mL 的移液头将溶液施用在创伤部位。这是实验溶液。

[0331] 对于对照溶液来说, 重复该流程但是不加入 mTG 溶液, 以使明胶被单独施用。

[0332] 对于实验和对照的施用来说, 将移液头从末端切掉约 $\frac{1}{2}$ cm 以扩大开口并且使黏性的明胶 -mTG 溶液能够通过。

[0333] 肝脏创伤

[0334] 对于实验和对照的施用来说, 使用外科手术刀以嘴侧至尾侧 (rostral-to-caudal) 的方向切割肝脏的左叶, 产生 1cm 长、 $\frac{1}{2}$ cm 深的矢状切口。流血约 10 秒后, 在明胶 (对照) 或明胶 -mTG (实验) 溶液的施用前即时使用棉纱除去蓄积的血液。

[0335] 首先, 将实验溶液施用于叶左侧上的切口。施用后大约两分钟凝胶形成并且施用后在小于约 2.5 分钟内流血被完全停止。5 分钟后, 用力摇动组织并且使用镊子横过创伤部位施加拉力, 但是凝胶依然完好并且创伤闭合。图 8 是显示了凝胶的形成以及止血的诱导的照片 (图 8A 显示全部面积而图 8B 显示面积的一部分, 其为了进一步的细节而被放大)。

[0336] 之后, 将对照溶液施用于叶右侧上的切口。没有凝胶形成而且溶液几乎都被血流冲出了创伤部位。甚至 6-7 分钟后, 还没有血块形成并且肝脏继续流血 (图 9A)。

[0337] 除去对照溶液并且之后不除去蓄积血液而向创伤部位施用实验溶液。尽管蓄积的

血液明显阻碍了实验溶液向肝脏的粘合,但凝胶还是形成了,其在约一分钟后显著减缓了血流并且在 4.5 分钟之后完全停止了血流(图 9B)。这证明了本发明的组合物即使在蓄积的血液存在的情况下也能减缓血流并诱导止血。

[0338] 股动脉切割

[0339] 使用外科手术刀切断了大鼠的左侧股动脉。重度流血约 10 秒钟之后,在明胶 -mTG(实验)溶液的施用前即时使用棉纱除去蓄积的血液。当施用溶液时,血液与实验凝胶在其经历凝胶化时混合。在这种严格的条件下,凝胶依然在小于 3 分钟内完全停止了流血。5 分钟后,使用镊子手动检测凝胶。当凝胶与血液大量混合时凝胶明显比较不硬和不粘,但仍然在切断的动脉部位上形成了强力的血块。图 10A-D 显示了当动脉正在被割破时动脉的照片(10A);割破的动脉,大量地流血的照片(10B);对割破的动脉施用本发明的组合物的照片(10C);以及随着仿生血块的形成的止血的照片(10D)。

[0340] 使用外科手术刀切断了大鼠的右侧股动脉。流血约 10 秒钟之后,在明胶 -mTG(实验)溶液的施用前即时使用棉纱除去蓄积的血液。观察到重度流血但几乎立即被凝胶停止并且在小于 1 分钟内流血被完全停止。凝胶保持得非常牢并且很容易观察到被凝胶困住的血液。5 分钟后,使用镊子手动检测凝胶。尽管在形成的凝胶中存在困住的血液,但在动脉的区域它对组织粘合得非常牢。

[0341] 因此,明显地根据本发明的组合物能够在体内模型中减缓流血的速度并诱导止血,甚至是在蓄积的血液和 / 或重度流血(如,例如从动脉和 / 或血管化器官,包括但不限于例如肝脏、胃、肾脏、心脏、肺和 / 或皮肤)存在的情况下。

[0342] 实施例 4

[0343] 猪模型中的止血

[0344] 这一实施例提供了根据本发明的明胶 -mTG 组合物在大型动物模型中实现止血的最初的体内证明。清楚地证明了在大型动物模型中的止血效用的潜力。

[0345] 材料

[0346] 明胶溶液以于 PBS(pH7.4) 的 25% w/w 的明胶(猪的, A 型, 300 布卢姆, 来自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)) 为特征并如本文所述来制备。当逐渐加入明胶粉末时,使用热板磁搅拌器于 60°C 持续搅拌 PBS。偶尔使用玻璃棒进行手动搅拌以增加粉末的溶解速度并以获得均质溶液。在整个实验期间,将明胶溶液储存在调节至 ~ 50°C 的恒温槽中以保持其液相并防止热致可逆凝胶的形成。

[0347] mTG 溶液是以溶于 PBS(pH7.4) 的 20% w/w 的微生物转谷氨酰胺酶 (Activa WM, Ajinomoto™) 为特征的。其按照下文制备。使用磁搅拌器搅拌室温 (RT) 的 PBS 溶液并逐渐加入 mTG 粉末。在整个实验期间,除了实际使用时,将 mTG 溶液储存在调节至 ~ 30°C 的恒温槽中。

[0348] 开始实验前使成年的雌性的体重 45kg 的猪处于全身麻醉。在整个实验期间,给猪通风换气并监测它的生命体征。

[0349] 在如前文所述的向创伤部位施用前,制备根据本发明的明胶 -mTG 溶液并使用涂布器将密封材料置于创伤部位上。作为绷带的支持材料检验了几种不同的涂布器。除非另有陈述,在将其立即施用于创伤部位上之前,将 6mL 新的外科手术密封材料溶液遍布在涂布器上并使其在 RT 冷却 1 分钟。这一包含密封材料的垫被认为是“绷带原型”。对于“对

照绷带”遵照相似的流程,但对照溶液遍布涂布器。

[0350] 新的外科手术密封材料溶液 - 制备了 2 : 1 的明胶 : mTG 的混合物。除非另有陈述,通过在 15mL 管中向 4mL 明胶溶液加入 2mL 的 mTG 溶液制备混合物并且将管颠倒 5 次以混合溶液。

[0351] 对照溶液 - 对于对照溶液来说,重复了为新的外科手术密封材料制备所描述的程序,除了使用单独的 PBS 替代 mTG 溶液。相应地,浸没在 ~ 30°C 的恒温槽中,明胶用 PBS(pH7.4) 以 2 : 1 的比率稀释。除非另有陈述,通过在 15mL 管中向 4mL 明胶溶液加入 2mL 的 PBS 溶液制备混合物并且将管颠倒 5 次以混合溶液。

[0352] 如下使用涂布器 :

[0353] 1. 4cmx4cm 的棉纱垫。

[0354] 2. 4cmx4cm 一次性塑料衬背的吸收性垫。将溶液遍布在垫的塑料的非吸收面上。

[0355] 3. 硅模具。

[0356] 4. 放置在硅模具内的 4cmx4cm 一次性塑料衬背吸收性垫。将溶液遍布在垫的塑料的非吸收面上。

[0357] 5. 具有高边际的透明的柔韧的塑料模具。

[0358] 6. 使用注射器或从 15mL 管泼出而将密封材料直接施用在创伤部位上。

[0359] 通过外科医生使用不同的涂布器手动地将密封材料置于创伤部位上来完成在本研究中新的外科手术密封材料的施用。如果需要,在施用前即时用棉纱除去蓄积的血液。在绷带的反面施加止血压力 3 分钟。3 分钟后,外科医生减轻压力并观察创伤部位的止血。如果没有发生完全的止血,通过公认的外科手术止血技术闭合创伤部位。遵照同样的技术施用对照溶液,如果在除去对照绷带后没有观察到止血则立即使用公认的止血技术。

[0360] 臀部肌肉创伤

[0361] 使动物处于俯卧的姿势并且除去臀部肌肉上的皮。总共进行了 7 个实验,其中检验了止血和组织粘合。除非另有陈述,在每个测试中,使用 #15 外科手术刀向肌肉中 2cm 深度切割 3cmx3cm 的正方形肌肉。如所需的从创伤区域除去过量的血液并且如之前所描述的施用新的外科手术密封溶液或者对照溶液。

[0362] 表 5 和 6 概括并描述了每一个实验的实验程序和结果。表 5 涉及止血而表 6 涉及组织粘合性。

[0363] 首先看止血,使用棉纱垫向创伤部位施用对照溶液(表 5,对照 #1)。将对照溶液施用在棉纱上并使其在其即时施用前冷却 1 分 20 秒。创伤部位仅轻微地流血并且在对照绷带施用后 2 分钟观察到完全止血。虽然在创伤部位没有观察到仿生血块,但对创伤部位施加的止血压力足以促进止血。

[0364] 在不同的创伤部位重复试验,差异在于所使用的涂布器是一次性塑料衬背的吸收性垫并将对照溶液在其施用前静置 30 秒(表 5,对照 2)。创伤部位表现出非常少的流血,并且在施用对照绷带 2 分钟后观察到完全的止血。如同在之前的实例中,这可能是由于施用绷带时在部位上施加的止血压力。在创伤部位没有观察到仿生血块。

[0365] 由于在前两次对照实验期间观察到少量的流血,重复试验,除了做了更深的 4cm 的切口(表 5,对照 #3)。因此,观察到了重度的流血。将对照溶液施用在可吸收的垫上并使其静置 50 秒。外科医生从创伤区域除去过量的血液并施用对照绷带。3 分钟后,流血减

少了但是没有观察到完全的止血。

[0366] 使用棉纱垫从之前的实验所产生的创伤部位除去对照溶液。依然观察到流血。对创伤区域施用新的外科手术密封材料以实现止血（表 5, 密封材料 #1）。将密封材料溶液置于可吸收垫上, 静置 1 分钟并施用于创伤部位。3 分钟后, 观察到完全的止血。密封材料在创伤部位形成了仿生血块。使用镊子摇动凝胶并观察到对组织的强力粘合。通过施加一些力将凝胶除去并且其看起来像膜。因此, 这些结果证明了根据本发明的组合物的止血性质。

[0367] 表 5- 臀部肌肉

[0368]

实验	RT (°C)	心 率	施用 技术	描述	止血 时间 (分钟)	结果
对照 1#1	21	99	棉纱 垫	切开后创伤部位出现很少的流血。在施用前, 将对照溶液置于涂布器上并静置冷却 1 分 20 秒。	2	注意到切开后观察到创伤区域很少的流血。可能通过仅在创伤部位上施加压力就实现了止血。
对照 1#2	21	98	一次 性的 塑料 衬背 吸收 性垫	切开后创伤部位表现出很少的流血。在施用在创伤部位之前, 将对照溶液置于涂布器上并静置冷却 30 秒。	2	注意到切开后观察到创伤区域很少的流血。可能通过仅在创伤部位上施加压力就实现了止血。
对照 1#3	22	98	一次 性的 塑料 衬背 的吸 收性 垫	做了 4cm 深的切口。观察到大量的流血。将对照绷带静置冷却 50 秒。在其施用于创伤部位上之前, 除去过量的血液。	-	由于大量的流血, 外科医生施加了止血压力。3 分钟后, 流血减少但没有停止。

[0369]

密封 材料 #1	22	99	一次 性的 塑料 衬背 吸收 性垫	从进行了对照 3#的创伤部位除去对照溶液。除去过量的血液。将密封材料置于流血的创伤部位上。	3	在创伤部位上形成了牢固的仿生血块。观察到完全的止血和密封材料的牢固的粘合。
----------------	----	----	----------------------------------	---	---	---------------------------------------

[0370] 在臀部肌肉模型中证明了密封材料的止血能力之后, 检验了组织粘合（表 6）。做了外科手术切口以从肌肉床提出一片组织, 开放创伤部位。

[0371] 在第一个粘合试验（表 6, 密封材料 #2）, 将密封材料直接施用于创伤部位上并且外科医生即时在组织的上部施加强压力 3 分钟, 从创伤部位的排出所有密封材料并且没有产生粘合。

[0372] 重复试验,除了在施用密封材料之后外科医生仅施加中度的压力(表 6,密封材料 3)。3 分钟后组织似乎被粘合。当摇动组织的上部时,感受到对其完全除去的中量的阻力。

[0373] 重复实验,特别小心不要在施加压力时从创伤部位排出密封材料(表 6,密封材料 #4)。在不同的创伤部位,将密封材料施用在组织的两个部分上并静置 10 秒。之后,归位组织的上部并施加中度的压力。3 分钟后,观察到强力的组织粘合。需要大量的力以之后分开粘合的组织。

[0374] 表 6- 组织粘合

[0375]

实验	RT (°C)	心 率	施用 技术	描述	组织粘合	结果
密封 材料 #2	23	99	从管 直接 施用	用棉纱垫除去过量的血液。将密封材料置于创伤部位上并立即由外科医生施加排出压力。	N/A	创伤部位中没有密封材料保留
密封 材料 #3	23	94	从管 直接 施用	用棉纱垫除去过量的血液。将密封材料置于创伤部位上并由外科医生施加中度压力。	+	观察到具有轻微阻力的粘合
密封 材料	24	95	从管 直接	将密封材料溶液置于组织的两部分上的创	+	观察到牢固的粘合。只有施加强力后才移走

[0376]

#4			施用	伤部位,并静置~10秒。之后将组织的上侧面归位并施加非常低的压力。		组织。
----	--	--	----	-----------------------------------	--	-----

[0377] 肝脏中的止血

[0378] 使猪处于仰卧并通过中线剖腹术暴露其肝脏。进行系列的切割以除去越来越深的肝的活组织检查,由此暴露较大的血管。总共进行了 5 个活组织检查。当需要时,在施用根据本发明的组合物之前即时用棉纱除去蓄积的血液。

[0379] 对于最初系列的活组织检查,在绷带反面上对对照绷带施加止血压力 3 分钟。3 分钟后,外科医生减轻压力并观察创伤部位的止血。当没有发生完全的止血时,进行更深的活组织检查,之后施用新的外科手术密封材料。再一次,在绷带反面上对密封材料施加止血压力 3 分钟并且之后检验止血。当观察到完全的止血,除去更深的肝脏活组织检查并用密封材料重复实验。这证明了密封材料对较高的血压的止血能力。表 7 概括了每个实验的实验程序和结果。

[0380] 从肝脏的左叶除去 4cm 深的活组织检查(表 7,对照 #1)。将对照溶液施用在放置在硅模具中的可吸收垫上并静置 1 分钟。用止血压力将对照绷带施用在创伤部位上。3 分钟后,除去压力并且没有观察到止血。

[0381] 通过施用对照绷带没有实现止血后,除去 1cm 更深的活组织检查并使其流血 30 秒。之后用新的密封材料重复实验(表 7,密封材料 #1)。将新的密封材料置于在硅模具中的垫上并且 1 分钟后用止血压力施用于创伤部位。3 分钟后,减轻压力,剥落原型绷带并检验止血。密封材料产生了可见的仿生薄膜。实现了止血但不完全,因为密封材料没有覆盖整个创伤。可见到由密封材料覆盖的区域停止了流血。当几分钟之后除去仿生薄膜时,流血重新开始。

[0382] 接下来除去 1cm 更深的活组织检查,产生重度流血。重复试验,除了将硅模具用作涂布器并在施用前除去过量血液(表 7,密封材料 #2)。之后外科医生对创伤部位施加压力 3 分钟。当外科医生移开他的手,创伤部位上仿生血块是可见的。推挤仿生血块的血液压力是明显的,并且在又几分钟之后,血液从仿生密封材料的边缘突破。破口穿过没有被密封材料覆盖的创伤部位的侧面部分。这表明,在这一阶段,密封材料的止血能力依赖于覆盖整个创伤部位。

[0383] 为了避免突破,重复之前的实验;除了将更大量的密封材料施用在创伤部位上(表 7,密封材料 #3)。从肝脏叶除去 0.5cm 更深的活组织检查。将 9mL 密封材料用压力施用在创伤部位上。不幸的是,在施用期间,几乎所有的密封材料都滴到创伤部位的侧面上,在由外科医生施加压力后,在创伤部位上没有留下可辨别的密封材料。

[0384] 重复实验(表 7,密封材料 #4)。除去又一个 1cm 的活组织检查并观察到大量的流血。这时,使用使密封材料保持在适当位置的具有高边际的透明的塑料模具将 15mL 的密封材料施用在创伤部位上。将密封材料置于涂布器上并冷却 1 分 20 秒。将密封材料施用在创伤部位上并且 4 分钟后,观察到厚的仿生血块层并实现了完全的止血。50 分钟后,再次检验组织仍能观察到止血。这表明当向创伤部位施用足够的密封材料并将其保持在适当位置时密封材料的强止血能力。形成的仿生膜难以去除,因为它牢固粘合于组织表面,并且除去膜导致小量的流血。

[0385] 表 7- 左肝脏叶中的止血

[0386]

实验	RT (°C)	心 率	施用 技术	描述	止血时间 (分钟)	结果
对照 #1	25	87	硅模具中的一次性的塑料衬背吸收性垫	除去 4cm 的活组织检查。对照溶液被置于涂布器上,静置 1 分钟并以止血压力在创伤部位施用 3 分钟。	-	施用后大量流血。没有观察到止血或仿生膜。
密封材料 #1	24	86	硅模具中的一次性的塑料衬背吸收性垫	除去又一个 1cm 的活组织检查并静置流血 30 秒。	3	新的密封材料通过产生仿生膜部分地停止了大量的流血。由于密封材料没有覆盖整个创伤而没有实现止血。

[0387]

密封材料 #2	24	86	硅模具	除去又一个 1cm 的活组织检查并除去过量的血液。将密封材料以止血压力施用	3	密封材料没有覆盖整个创伤区域，但是在密封材料存在的地方实现了止血。
密封材料 #3	24	84	硅模具	除去又一个 0.5cm 的活组织检查并在施用密封材料前除去过量的血液。施用了 9mL 的密封材料。	-	在施用过程中所有的密封材料被排出。
密封材料 #4	24	80	具有高边的透明的柔韧的塑料模具	除去又一个 1cm 的活组织检查。15mL 密封材料被涂抹在涂布器上，静置 1 分 20 秒以冷却并且之后被放置在创伤部位上。	4	形成厚的仿生血块层。实现了完全的止血。50 分钟后再次检查组织并仍然观察到止血。所形成的膜很难被除去并且在除去后一定的流血继续。

[0388] 股动脉中的止血

[0389] 接下来，检验了本发明的组合物在动脉尤其是股动脉的创伤或外伤中诱导止血的能力。暴露动物的右股动脉。之后使用外科手术刀片进行一个圆形的 2mm 的纵向切割。观察到大量的流血，因此使用了止血钳。在施用密封材料前即时用棉纱垫除去过量的血液。制备约 9mL 的新的外科手术密封材料并使用注射器将其施用在创伤区域上。4 分钟后，轻轻移开止血钳并且检验经由密封材料的止血。观察到仿生血块并且达到了完全的止血。表 9 概括了这一实验的实验程序和结果。

[0390] 表 9- 股动脉中的止血

[0391]

实验	RT (°C)	心率	施用技术	描述	止血时间 (分钟)	结果
密封材料 #1	24	96	注射器	进行 2 mm 打孔并使用止血钳停止大量流血。使用注射器将 ~9mL 密封材料溶液施用于创伤部位。4	3	移开止血钳后，观察到完全的止血。密封材料在创伤部位产生仿生血块，其设法阻止大量流血。

[0392]

				分钟后，轻轻移开止血钳。		
--	--	--	--	--------------	--	--

[0393] 实施例 5

[0394] 流程 - 盐酸胍对凝胶化和交联的影响

[0395] 这一实施例涉及示例性变性剂盐酸胍（本文中描述为“GuCl”）对根据本发明的某些实施方案的组合物的影响。优选的浓度比率范围如下：从约 1 : 2 至约 2 : 2 的 GuHCl : 明胶,重量 / 重量。

[0396] 溶液制备

[0397] 1) 将 10g 的 GuCl (Fluka, St. Louis, MO) 于室温 (RT) 溶于 30mL 的 Dulbecco' s PBS (Biological Industries, Israel) 中。单独称取 10g 的 A 型、300 布卢姆的猪明胶粉末 (Sigma, St. Louis, MO), 之后在适当搅拌下混合明胶和 GuCl 溶液以形成均质溶液, 所得的溶液具有 1 : 1 的明胶 : GuCl 比率 (w : w)。

[0398] GuCl 的分子量 (MW) 是 95.53。在这一溶液中, GuCl 的最终浓度因此是 3.489M。最终的溶液是于 PBS 中的 20% 的明胶 w/w, 但是根据体积, 相当于 25% w/w 的明胶溶液。

[0399] 2) 将 2g 的 GuCl 于 RT 溶于 30mL 的 PBS。单独称取 10g 的 A 型、300 布卢姆的猪明胶粉末, 之后在适当搅拌下混合明胶和 GuCl 溶液以形成均质溶液, 所得的溶液具有 5 : 1 的明胶 : GuCl 比率 (w : w)。GuCl 的最终浓度是 698mM。最终的溶液是于 PBS 中的 23.8% 的明胶 w/w, 但是根据体积, 相当于 25% w/w 的明胶溶液。

[0400] 3) 将 6g 的 GuCl 于 RT 溶于 30mL 的 PBS。单独称取 10g 的 A 型、300 布卢姆的猪明胶粉末, 之后在适当搅拌下混合明胶和 GuCl 溶液以形成均质溶液, 所得的溶液具有 5 : 3 的明胶 : GuCl 比率 (w : w)。GuCl 的最终浓度是 2.09M。最终的溶液是于 PBS 中的 21.7% 的明胶 w/w, 但是根据体积, 相当于 25% w/w 的明胶溶液。

[0401] 4) 将 4g 的 GuCl 于 RT 溶于 30mL 的 PBS。单独称取 10g 的 A 型、300 布卢姆的猪明胶粉末, 之后在适当搅拌下混合明胶和 GuCl 溶液以形成均质溶液, 所得的溶液具有 5 : 2 的明胶 : GuCl 比率 (w : w)。GuCl 的最终浓度是 1.40M。最终的溶液是于 PBS 中的 22.7% 的明胶 w/w, 但是根据体积, 相当于 25% w/w 的明胶溶液。

[0402] 5) 将 8g 的 GuCl 于 RT 溶于 30mL 的 PBS。单独称取 10g 的 A 型、300 布卢姆的猪明胶粉末, 之后在适当搅拌下混合明胶和 GuCl 溶液以形成均质溶液, 所得的溶液具有 5 : 4 的明胶 : GuCl 比率 (w : w)。GuCl 的最终浓度是 2.79M。最终的溶液是于 PBS 中的 20.8% 的明胶 w/w, 但是根据体积, 相当于 25% w/w 的明胶溶液。

[0403] 加入 mTG

[0404] 制备于 PBS 的 1% 的微生物转谷氨酰胺酶粉末 (mTG) (AjinomotoActive TI-WM, Japan) 的 20% w/w 的溶液

[0405] A) 在透明的 4mL 塑料管中的将 2mL 的每种明胶 -GuCl 溶液与 1mL 的 mTG 溶液混合。将 mTG 溶液注入明胶 -GuCl 溶液中。将每个管颠倒若干次并且之后使其静置。

[0406] B) 在塑料称量皿中将 2mL 的每种明胶 -GuCl 溶液与 1mL 的 mTG 溶液混合。混合物用移液头手动混合。

[0407] C) 将明胶 -GuCl 溶液加热至 43°C 并且之后在塑料称量皿中将明胶 -GuCl 溶液的 2ml 的小份与 1mL 的 mTG 溶液混合。混合物用移液头手动混合。

[0408] D) 将明胶 -GuCl 溶液 1 (10g GuCl) 和 5 (8g GuCl) 加热至 43°C 并且之后在塑料称量皿中将明胶 -GuCl 溶液的 2ml 的小份与 2mL 的 mTG 溶液混合。混合物用移液头手动混合。

[0409] 结果

[0410] 1) 1 : 1 的明胶 : GuCl 的溶液于室温在 2 分钟之内形成均质溶液。形成后随即, 溶液包含许多气泡。于 RT 静置 2 小时后几乎所有的气泡已离开溶液。像标准的明胶溶液一样, 溶液保持为液体形式并且呈现带有黄色的透明。24 小时后, 溶液性质未改变并且没有看到更多的气泡。

[0411] 2) 5 : 1 的明胶 : GuCl 于 RT 未形成均质溶液。如同于 PBS 的明胶于 RT 所通常发生的那样, 明胶颗粒膨胀但未溶解。将溶液加热到 42°C 直到它形成溶液。当冷却到 RT 时, 它于约 32°C 形成凝胶。

[0412] 3) 5 : 3 的明胶 : GuCl 于室温在有力地搅拌 5-6 分钟之后形成均质溶液。形成后随即, 溶液包含许多气泡。于 RT 静置 2 小时后几乎所有的气泡已离开溶液。像标准的明胶溶液一样, 溶液保持为液体形式并且呈现带有黄色的透明。溶液为液体形式但是比 1 : 1 的明胶 : GuCl 的溶液更粘。但是仍然可以将它没有困难地进行移液。24 小时后, 溶液性质未改变并且没有看到更多的气泡。

[0413] 4) 5 : 2 的明胶 : GuCl 于室温在有力地搅拌 10 分钟之后形成稍微细粒状的溶液。形成后随即, 溶液包含许多许多气泡。形成后随即, 溶液显得非常粘但仍为液体形式。但是于 RT 静置 2 小时后, 溶液中仍然可以见到许多气泡并且溶液是凝胶状的。不容易将溶液进行移液并且溶液太黏以致于不能与其他溶液混合。24 小时后, 许多气泡仍然保留在溶液中并且溶液已经形成热致可逆凝胶。

[0414] 5) 5 : 4 的明胶 : GuCl 于室温在搅拌 2-3 分钟之后形成均质溶液。形成后随即, 溶液包含许多气泡。于 RT 静置 2 小时后几乎所有的气泡已离开溶液。像标准的明胶溶液一样, 溶液保持为液体形式并且呈现带有黄色的透明。溶液为液体形式, 比 1 : 1 的明胶 : GuCl 的溶液更粘但没有 5 : 3 的明胶 : GuCl 的溶液粘, 并且可以没有困难地将它进行移液。24 小时后, 溶液性质未改变并且没有看到更多的气泡。

[0415] mTG 结果

[0416] A) 室温 4mL 的管中 2mL 的明胶 -GuCl 溶液、1mL 的 mTG 溶液

[0417] 1) 对于 1 : 1 的明胶 : GuCl 的溶液, 4 分钟后在接近管的顶部形成小的凝胶状的凝块。除去凝块并且加入另外的 1mL 的 mTG 溶液。35 分钟后, 形成柔软 - 中度的凝胶。微波加热证实, 凝块不是热致可逆的。但是它也不像交联的凝胶一样是强内聚的。使用微波加热证实柔软 - 中度的凝胶是热不可逆的。

[0418] 2) 5 : 1 的明胶 : GuCl 的溶液太粘以致于不能与 mTG 溶液混合。

[0419] 3) 对于 5 : 3 的明胶 : GuCl 的溶液, 4 分钟后在接近管的顶部形成小的凝胶状的凝块。没有除去凝块。20 分钟后, 整个溶液形成中度的凝胶。凝块具有与其余的凝胶明显不同的稠度。如上文, 尽管微波加热证实它不是热致可逆的, 但它也不是非常内聚的并且在触碰时容易裂开。所形成的中度的凝胶在微波中加热时变得稍稍柔软, 但是是热不可逆的。

[0420] 4) 由于在 mTG 加入后的前几分钟内溶液由于热致可逆凝胶化而变得非常粘 (由没有加入 mTG 的对照溶液表明), 5 : 2 的明胶 : GuCl 的溶液的结果非常不一致。15 分钟后, 形成中等结实的凝胶但它是部分热致可逆的并且在加热时变得柔软得多。

[0421] 5) 对于 5 : 4 的明胶 : GuCl 的溶液, 4 分钟后在接近管的顶部形成小的凝胶状的凝块。没有除去凝块。30 分钟后, 整个溶液形成中度的凝胶。凝块具有与其余的凝胶明显不同的稠度。如上文, 尽管微波加热证实它不是热致可逆的, 但它也不是非常内聚的并且在

触碰时容易裂开。所形成的中度的凝胶在微波中加热时变得稍稍柔软,但是是热不可逆的。

[0422] B) 室温塑料皿中 2mL 的明胶 -GuCl 溶液、1mL 的 mTG 溶液

[0423] 从在塑料皿中混合的溶液得到的凝胶化时间结果与在 4mL 塑料管中混合的溶液中发现的结果几乎一致:35 分钟后 1 : 1 的明胶 : GuCl 形成柔软 - 中度的凝胶,20 分钟后 5 : 3 的明胶 : GuCl 形成中度的凝胶,30 分钟后 5 : 4 的明胶 : GuCl 形成中度的凝胶。

[0424] 但是当将 mTG 注入明胶 -GuCl 溶液时所观察到的凝胶状的凝块在这些实验中没有观察到。

[0425] C) 塑料皿中 2mL 的 43°C 的明胶 -GuCl 溶液、1mL 的 mTG 溶液 - 结果如下:对于 1 : 1 的明胶 : GuCl 的溶液,35 分钟后没有凝胶形成;对于 5 : 3 的明胶 : GuCl 的溶液,17 分钟后形成中度凝胶;对于 5 : 4 的明胶 : GuCl 的溶液,25 分钟后形成中度凝胶。

[0426] D) 塑料皿中 2mL 的 43°C 的明胶 -GuCl 溶液、2mL 的 mTG 溶液,结果如下:对于 1 : 1 的明胶 : GuCl 的溶液,25 分钟后没有凝胶形成;对于 5 : 4 的明胶 : GuCl 的溶液,9 分钟后形成中度凝胶。

[0427] 从上面的结果发现,GuCl 显著提高了 PBS 中明胶的溶解度。对于 PBS 中 25% w/w 的浓度的明胶,以 5 : 4 和 1 : 1 的明胶 : GuCl 的比率加入 GuCl 使得明胶可以几乎立即溶解于室温 PBS 中。在 5 : 3 的明胶 : GuCl 的比率时这一影响显著降低。对于 PBS 中 25% w/w 的浓度的明胶,以 5 : 3、5 : 4 和 1 : 1 的明胶 : GuCl 的比率加入 GuCl 可将明胶 -GuCl 溶液永久地保持为液体形式。在 5 : 2 的明胶 : GuCl 的比率时,溶液经历了延迟的热致可逆凝胶化并且在 2 小时后形成完全的凝胶。明胶 -GuCl 溶液 : mTG 溶液为 2 : 1 的比率时,如果明胶 : GuCl 溶液比率是 1 : 1,则没有凝胶形成。在较低的 GuCl 浓度时,形成交联的凝胶。凝胶化时间似乎依赖于 GuCl 浓度。

[0428] 当明胶 : GuCl 的比率是 5 : 4 和 5 : 3 时,在与 mTG 混合前将明胶 -GuCl 溶液加热至 43°C 加速交联过程。这是预期的,因为 mTG 活性随反应温度增加至 55°C 而增加。可能如果增加 mTG 活性,明胶 : GuCl 溶液将会被 mTG 更快地交联。

[0429] 明胶 -GuCl 溶液 : mTG 溶液为 1 : 1 的比率时,形成交联的凝胶,甚至是当明胶 : GuCl 溶液比率为 1 : 1 时。mTG 量的增加显著减少了 2 : 1 的明胶 -GuCl 溶液 : mTG 溶液的比率时形成凝胶的凝胶的凝胶化时间。观察到凝胶化时间依赖于 GuCl 浓度。这是预期的,因为 GuCl 可能将一定量的 mTG 变性。对于交联明胶来说上文所加的 mTG 的量是随意的。

[0430] 不希望被单一的假设所限制,可能如果加入更多的 mTG 酶,明胶 : GuCl 溶液将被 mTG 迅速得多地交联。这可例如可选择地通过从 mTG 粉末除去载体并形成酶本身的浓缩的溶液来实现。

[0431] 实施例 6

[0432] 流程 : 向明胶加入 MgCl₂ 对凝胶化和交联的影响

[0433] 这一实施例涉及一种示例性的还原剂氯化镁对根据本发明的某些实施方案的组合物的影响。将明胶溶解于氯化镁 -PBS 溶液的优选的浓度范围是优选地从约 2 至约 4M,更优选地从约 2.5 至约 3.5M。

[0434] 材料和方法

[0435] 材料

[0436] A型300布卢姆的猪明胶和MgCl₂粉末,-325目是从Sigma-Aldrichcorporation(St.Louis,MO)获得的。由Ajinomoto(Japan)提供ActivataTI-WM微生物转谷氨酰胺酶(mTG)。从Biological Industries(Kibbutz BeitHaEmek,Israel)获得Dulbecco's PBS(pH 7.4)。

[0437] mTG溶液制备:

[0438] 通过溶于Dulbecco's PBS形成20% w/w的溶液来制备新鲜的ActivaTI-WM(Ajinomoto,Japan)微生物转谷氨酰胺酶(mTG)混合物。实验过程中,将溶液保持在室温(RT)。

[0439] 明胶-MgCl₂溶液制备:

[0440] 如下将明胶溶于不同浓度的MgCl₂溶液。

[0441] 溶液A-将5gr的MgCl₂溶于15mL的Dulbecco's PBS至3.5M的终浓度。MgCl₂的溶解反应是放热反应,达到90°C,将溶液静置冷却至室温。通过将5gr的明胶溶于15gr的3.5M的MgCl₂溶液并于RT搅拌来制备25%的明胶小份(w/w)。

[0442] 溶液B-将2.5gr的MgCl₂溶于15mL的Dulbecco's PBS至1.75M的终浓度。MgCl₂的溶解反应是放热反应,达到63°C,将溶液静置冷却至室温。通过将5gr的明胶溶于15gr的63°C的1.75M的MgCl₂溶液并搅拌来制备25%的明胶小份(w/w)。

[0443] MgCl₂对明胶的凝胶化的影响:

[0444] 将溶于不同浓度的MgCl₂溶液的明胶静置冷却至RT。用温度计监测每个溶液的温度。随着温度降低通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估明胶-MgCl₂溶液的外观和粘度。

[0445] MgCl₂对使用mTG的明胶溶液的化学交联的影响:

[0446] 测试明胶-MgCl₂“溶液A”的使用mTG的化学交联。在4ml的technicon管中将1或2ml的20% w/w的mTG溶液与2ml的明胶-MgCl₂溶液混合。在室温或使用水浴预加热至50°C下加入明胶-MgCl₂溶液。通过用移液头轻轻搅拌并颠倒管4次混合溶液,并测量凝胶化时间。通过观察和通过用玻璃棒触碰溶液来评估明胶-MgCl₂溶液与mTG混合后的外观和粘度。当形成凝胶时,通过用水浴将凝胶加热至50°C测试其热致可逆性。

[0447] 结果

[0448] MgCl₂对明胶的凝胶化的影响:

[0449] 溶液A-3.5M的MgCl₂溶液降低了明胶的转变点。室温时明胶-MgCl₂溶液是粘性的。溶液显得相当不透明并且包括小的黑色颗粒。这些颗粒可能是已经氧化的镁颗粒。溶液B-1.75M的明胶-MgCl₂溶液于室温胶凝。转变点是29°C。凝胶是不透明的并且包括很少的可能通过Mg的氧化形成的黑色颗粒。

[0450] MgCl₂对使用mTG的明胶溶液的化学交联的影响:

[0451] 如下,用溶液A测试MgCl₂对交联的影响。将2ml的RT的溶液A与1ml的mTG溶液混合-90分钟后产生不可逆凝胶。凝胶非常粘并且有点软。将2ml的50°C加热的溶液A与1ml的mTG溶液混合-70分钟后产生不可逆凝胶。将2ml的50°C的加热的溶液A与2ml的mTG溶液混合-25分钟后产生不可逆凝胶。凝胶相当脆弱。将其在50°C的水浴中加热后凝胶的粘度增加。

[0452] 从上文中,显示出向明胶溶液中加入氯化镁显著降低了明胶的转变点。显示出转变点与氯化镁的浓度成反比。通过加入3.5M的氯化镁将转变点降至RT以下。在1.75M的

氯化镁的情况下,明胶溶液的转变点稍微高于 RT。应当将向明胶加入氯化镁最优化以找到将明胶转变点降至 RT 以下的最小浓度。

[0453] 还显示出在氯化镁存在的情况下使用 mTG 的明胶的交联是可能的。氯化镁对明胶的交联比率具有不利的影响。可选择地进行加入更多量的 mTG 以克服这一影响。

[0454] 50°C 时 mTG 活性远远大于 RT 时 mTG 活性。这证实了理论数据并且表明将放热元素加入明胶 -mTG 混合物中以确保高于 RT 的反应温度的效用。

[0455] 从上文的数据来看,氯化镁的放热溶解可选择地用于液化明胶和增加 mTG 的活性。

[0456] 实施例 7

[0457] 流程:向明胶加入氢醌 - 对凝胶化和交联的影响

[0458] 这一实施例涉及一种示例性的还原剂氢醌对根据本发明的某些实施方案的组合物的影响。氢醌是天然存在的水溶性还原剂。还原剂可增加明胶的溶解度,使其可以在室温 (RT) 保持液态。将明胶溶解于对苯二酚 -PBS 溶液的优选的浓度范围优选确定为约 0.2 至约 0.5M、更优选约 0.3 至约 0.4M 的浓度。

[0459] 材料和方法

[0460] 材料

[0461] 从 Sigma-Aldrich corporation (St. Louis, MO) 获得 A 型 300 布卢姆的猪的明胶和氢醌 (ReagentPlus™, > 99%)。由 Ajinomoto (Japan) 提供 Activata TI-WM 微生物转谷氨酰胺酶 (mTG)。从 Biological Industries (Kibbutz Beit HaEmek, Israel) 获得 Dulbecco's PBS (pH 7.4)。

[0462] mTG 溶液制备:

[0463] 通过溶于 Dulbecco's PBS 形成 20% w/w 的溶液来制备新鲜的 Activata TI-WM (Ajinomoto, Japan) 微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 混合物。实验过程中,将溶液保持在室温 (RT)。

[0464] 明胶 - 氢醌溶液制备:

[0465] 如下将明胶溶于不同浓度的氢醌溶液。溶液 A- 将 2.75gr 的氢醌溶于 Dulbecco's PBS 至 0.5M 的终浓度。整个实验中,将溶液保持在用铝箔包裹的密封的烧杯中,以避免其暴露于空气和光。通过将 5gr 的明胶与 15gr 的 0.5M 的氢醌溶液混合并搅拌来制备于 0.5M 的氢醌溶液的 25% 的明胶小份 (w/w)。

[0466] 溶液 B- 将 1.32gr 的氢醌溶于 Dulbecco's PBS 至 0.4M 的终浓度。整个实验中,将溶液保持在用铝箔包裹的密封的烧杯中,以避免其暴露于空气和光。通过将 5gr 的明胶与 15gr 的 0.4M 的氢醌溶液混合来制备于 0.4M 的氢醌溶液的 25% 的明胶小份 (w/w)。将混合物搅拌并且之后在 50°C 的水浴中加热。

[0467] 氢醌对明胶的凝胶化的影响:

[0468] 将溶于不同浓度的 MgCl₂ 溶液的明胶保持在 RT 或者于 50°C 的水浴加热之后冷却至 RT。用温度计监测每个溶液的温度。随着温度降低通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估明胶 - 氢醌溶液的外观和粘度。

[0469] 氢醌对使用 mTG 的明胶溶液的化学交联的影响:

[0470] 测试明胶 - 氢醌“溶液 B”的使用 mTG 的化学交联。在 4ml 的 technicon 管中将

1ml 的 20% w/w 的 mTG 溶液与 2ml 的明胶 - 氢醌溶液混合, 加热至 50°C。通过用移液头轻轻搅拌并颠倒管 4 次混合溶液, 并测量凝胶化时间。通过观察和通过用玻璃棒触碰溶液来评估明胶 - 氢醌溶液在与 mTG 混合后的外观和粘度。当形成凝胶时, 通过用水浴将凝胶加热至 50°C 测试其热致可逆性。

[0471] 结果

[0472] 氢醌对明胶的凝胶化的影响:

[0473] 溶液 A-0.5M 的氢醌溶液室温时没有溶解明胶。将明胶粉末浸在氢醌溶液中, 产生细粒状的棕色的均质溶液。溶液 B-0.4M 的氢醌溶液设法降低明胶的转变点。氢醌溶液在室温时没有溶解明胶。在 50°C 水浴加热混合物后, 明胶溶解并且获得均质溶液。将溶液冷却至 RT。28°C 明胶保持可溶但是非常粘。当冷却至室温时形成凝胶。凝胶是棕色的。

[0474] 氢醌对使用 mTG 的明胶溶液的化学交联的影响:

[0475] 用溶液 B 测试对交联的影响。将 2ml 加热至 50°C 的溶液 B 与 1ml 的 mTG 溶液混合。4 分钟后, 形成不可逆的凝胶。凝胶是坚固的, 类似于由 25% (w/w) 的明胶单独与 20% (w/w) 的 mTG 的混合物形成的交联凝胶。

[0476] 从上文, 显示出向明胶溶液加入氢醌降低了明胶的转变点。在 0.4M 的氢醌的情况下, 明胶溶液的转变点稍稍高于 RT (28°C)。

[0477] 与已经作为降低明胶的转变点的方法测试过的其他物质相反, 氢醌对明胶与 mTG 的交联没有明显的抑制影响。

[0478] 如上文的数据所证明的, 可选择地使用氢醌降低明胶的溶胶 - 凝胶转变温度而不会对明胶的 mTG 交联产生不利影响。如之前所描述的, 这对本发明的许多实施方案来说是非常理想的。

[0479] 实施例 8

[0480] 流程: 向明胶加入 CaCl_2 对凝胶化和交联的影响

[0481] 这一实施例涉及一种示例性的还原剂氯化钙对根据本发明的某些实施方案的组合作用的影响。将明胶溶解于氯化钙 - PBS 溶液的优选的浓度范围是优选地从约 1 至约 2M 的范围, 以降低明胶的转变点。为了产生能够帮助溶解明胶或增加 mTG 活性的放热反应, 对于高于环境温度的每一摄氏度的温度增加来说, 可选择并优选地加入大约 0.2-0.7g 氯化钠每 ml 的溶液, 但确切的量取决于若干因素。

[0482] 如下制备于 DPBS 的明胶 - 氯化钙溶液: 通过在搅拌下将 44.396g 的 CaCl_2 (97%, MW = 110.99, Alfa Aesar, Lancaster) 溶于 100mL 的 Dulbecco's PBS (Biological Industries, Israel) 制备 4M 的 CaCl_2 储存液。溶解后, 作为放热的 CaCl_2 溶解反应的结果, 溶液达到 80°C 的峰值温度。

[0483] 如下制备溶液 1。称量 5g 的 A 型、300 布卢姆的猪明胶粉末 (Sigma, St. Louis, MO)。通过向 5g 的明胶加入 15g 的不同浓度的 PBS- CaCl_2 溶液形成于 PBS- CaCl_2 的 25% w/w 的明胶溶液。用搅拌棒以及偶尔的手动搅拌混合明胶 - CaCl_2 以使凝块散开。所测试的 CaCl_2 浓度是:

[0484] a. 于 PBS 的 2M 的 CaCl_2 溶液。

[0485] b. 于 PBS 的 2M 的 CaCl_2 溶液。

[0486] c. 于 PBS 的 1M 的 CaCl_2 溶液。

[0487] 对于 a&b 两者, 每一个在 4mL 的塑料管中将 2mL 的明胶 -CaCl₂ 溶液与 1mL 的 20% w/w 的微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 粉末溶液混合。所使用的 mTG 产品 (Activa TI-WM, Ajinomoto, Japan) 具有约 100U/g 的 mTG 产品粉末比活性。

[0488] 如下制备溶液 2。通过将 10g 的 mTG 粉末溶于 40mL 的 PBS 中形成 mTG 的 20% w/w 的基本溶液。

[0489] a. 通过在微波中加热明胶 -PBS 混合物 5 秒以及之后的 15 秒而将 5g 的明胶溶于 15mL 的 PBS 来制备 25% w/w 的明胶溶液。每次微波加热时间段后立即搅拌溶液。第二次加热后的温度是 72°C。之后加入 3.325g 的 CaCl₂ 以形成 2M 的 CaCl₂ 溶液。CaCl₂ 加入后的温度是 74°C。CaCl₂ 溶解并且测量温度后立即在 4mL 的塑料管中将 2mL 的明胶 -CaCl₂ 溶液与 1mL 的 20% w/w 的微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 粉末溶液混合。

[0490] b. 将 5g 的明胶粉末与 3.33g 的 CaCl₂ 粉末混合。之后将 30mL 的 PBS 搅入这一混合物以形成溶液。溶解时溶液温度达到 42°C。形成均质溶液后, 在 4mL 的塑料管中将 2mL 的明胶 -CaCl₂ 溶液与 1mL 的 20% w/w 的微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 粉末溶液混合。

[0491] 如下制备溶液 3。使于 2M 的 CaCl₂-PBS 的 25% 的明胶溶液 (1a, 上文) 静置 2 小时。之后在 4mL 的塑料管中将 2mL 的明胶 -CaCl₂ 溶液与 2mL 的 20% w/w 的 mTG 溶液混合。

[0492] 如下制备溶液 4。搅拌两小时之后, 将于 2M 的 CaCl₂-PBS 的 25% 的明胶溶液 (1b, 上文) 加热至 43°C。之后将 2mL 的明胶 -CaCl₂ 溶液与 a. 1mL 的 20% w/w 的 mTG 溶液或 b. 2mL 的 20% w/w 的 mTG 溶液混合; 每一种于 4mL 的塑料管中。

[0493] 结果

[0494] 以所有的 CaCl₂ 浓度形成溶液。使用 2M 的 CaCl₂ 溶液 (1a), 形成均质溶液并将其保持为液体形式。溶液是中度粘性的并且包含许多气泡。在与 mTG 溶液混合前, 使明胶 -CaCl₂ 溶液静置 30 分钟以使气泡消散。

[0495] 第二个 2M 的溶液 (1b) 与第一个是相同的, 除了它需要更多的手动搅拌以分散已形成的明胶凝块。

[0496] 使用 1M 的 CaCl₂ (1c) 溶液, 均质溶液形成但在几分钟后开始胶凝。2 小时后已经形成完全的热致可逆的凝胶。但是这一凝胶与室温时由明胶正常形成的热致可逆明胶相比较软得多。半小时后溶液太粘以致于不能与 mTG 溶液混合。

[0497] 向 2M 的明胶 -CaCl₂ 溶液加入 mTG 溶液后, 在 20 分钟时间内溶液渐渐变得更粘但是没有形成内聚的凝胶。

[0498] 加热明胶 -CaCl₂ 溶液增加了 mTG 的胶凝影响。微波加热的溶液渐渐变得更粘。20 分钟后, 已经形成了非常软的、不可逆的 (如通过加热至 50°C 所证实的) 凝胶。CaCl₂ 加热的溶液渐渐变得更粘。20 分钟后, 已经形成了非常软的、不可逆的 (如通过加热至 50°C 所证实的) 凝胶。

[0499] 对于与 2mL 的 20% w/w 的 mTG 溶液混合的明胶 -CaCl₂ 溶液 (2M), 10 分钟后形成柔软的凝胶。20 分钟后, 形成中度强度的明胶, 35 分钟后形成中度 - 结实强度的凝胶。

[0500] 对于被加热至 43°C 的明胶 -CaCl₂ 溶液 (2M), 在与 1mL 的 20% w/w 的 mTG 溶液混合后, 10 分钟后形成柔软的凝胶而 20 分钟后形成柔软 - 中度强度的凝胶。但是, 在与 2mL 的 20% w/w 的 mTG 溶液混合后, 10 分钟后形成中度强度的凝胶而 20 分钟后形成中度 - 结实强度的凝胶

[0501] 实施例 9

[0502] 流程：明胶的微波干燥 - 对凝胶化和交联的影响

[0503] 这一实施例检验了在微波中干燥明胶对溶解度的影响。观察到增加的溶解度。可选择并优选的微波辐射能量范围优选地从约 1 至 100mW/ 立方厘米,更优选地从约 30 至约 60mW/ 立方厘米的整体比吸收率 (SAR) 为特征。如下进行所述方法。

[0504] 明胶制备和干燥

[0505] 称量 10gr 份的 A 型、300 布卢姆的猪明胶粉末 (Sigma, St.Louis, MO) 放入 50mL 或 250mL 的烧杯中。之后在 700W 和 2,450MHz 的微波 (Kennedy 型 KN-949, China) 中将明胶加热下列时间量：

[0506] 样品 A :30 秒,50mL 烧杯

[0507] 样品 B :60 秒,250mL 烧杯

[0508] 样品 C :120 秒,250mL 烧杯

[0509] 样品 D :180 秒,250mL 烧杯

[0510] 对照 :没有经过微波加热的明胶

[0511] 加热后,将 30mL 的 37°C 的 Dulbecco' s PBS (Biological Industries, Israel) 加入明胶并在 37°C 搅拌混合物。对于样品 A,在将明胶从微波中移开后立即加入 PBS。对于其余的样品,在加入 PBS 之前将明胶冷却至室温 (RT)。

[0512] 对于样品 C,在明胶与 PBS 混合后,分离部分混合物,加热至 50°C 并且之后依照 2 : 1 的明胶溶液 : mTG 溶液比率与 20% w/w 的微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) (Ajinomoto Activa TI-WM, Japan) 溶液混合。

[0513] 明胶 /PBS 混合物的微波加热

[0514] 在样品 F 中,没有将明胶以粉末形式加热。而是将明胶直接倒入 50mL 烧杯中的 30mL 的 RT 的 PBS 中并且之后将混合物在微波中连续两次加热 15 秒,加热时间段之间有 5 秒的停顿。加热后,将其手动搅拌。之后依照 2 : 1 的明胶溶液 : mTG 溶液比率将明胶溶液与 20% w/w 的 mTG 溶液混合。

[0515] mTG 的加热

[0516] 将 20% w/w 的 mTG 溶液在微波中连续两次加热 15 秒,加热时间段之间有 5 秒的停顿。之后以 1 : 2 的 mTG : 明胶溶液比率将 mTG 加至 25% w/w 明胶溶液。

[0517] 结果

[0518] 样品 A :明胶容易地溶于 PBS 中,形成粘性溶液。在冷却至 RT 时,明胶溶液形成与 RT 时由标准明胶溶液形成的热致可逆凝胶差不多的结实的热致可逆的凝胶。

[0519] 对照 :明胶没有完全溶于 PBS。尽管它被完全浸泡在 PBS 中,但明胶依旧保持为非常细粒状。

[0520] 样品 B :明胶没有完全溶于 PBS。尽管它被完全浸泡在 PBS 中,但明胶依旧保持为非常细粒状。

[0521] 样品 C :明胶没有完全溶于 PBS。它被完全浸泡在 PBS 中,但明胶依旧保持为非常细粒状。之后将细粒状的明胶 -PBS 混合物在微波中加热 30 秒。当从微波中移开时温度是 76°C。之后手动搅拌混合物以形成均质溶液。使溶液冷却至室温并且溶液形成与 RT 时由标准明胶溶液形成的热致可逆凝胶差不多的热致可逆的凝胶。

[0522] 当将溶液加热至 50°C 并与 mTG 混合时,3 分钟后形成结实并且粘的明胶。将这一凝胶在微波中加热 10 秒以证实其不可逆性。在从微波中离开时,凝胶更粘但更坚固。它似乎有点干。

[0523] 样品 D:加热期间,明胶形成碳化的气泡。通过燃烧明胶在明胶粉末内部形成气泡。伴随着这一事件有强烈的烧焦味。

[0524] 加热的明胶 /PBS 混合物:通过微波中加热明胶 /PBS 混合物形成液体溶液。向溶液中加入 mTG 产生结实的不可逆的凝胶。

[0525] 加热的 mTG:已经在微波中加热的 mTG 没有交联明胶。

[0526] 从上文中,显示出如同明胶重量上的显著减少(数据未显示)所表明,在微波中加热明胶粉末降低了明胶的水分含量。在微波中加热明胶粉末,之后立即加入 37°C 的 PBS,减少了明胶的溶解时间。但是如果将明胶粉末冷却至 RT,那么没有发生明胶溶解时间上的改善。

[0527] 如果微波加热的明胶是在其已经与 PBS 混合后被加热的,那么所形成的溶液可被 mTG 交联。将明胶溶解于 RT 的 PBS 中并且之后在微波中通过加热 15 秒之后再加热 15 秒而将其加热是可能的。以这种方法将其溶解不会不利影响 mTG 的交联。

[0528] 如果将干燥的明胶在微波中加热超过 2 分钟,其会燃烧。在微波中加热 mTG 显著地降低它的活性。

[0529] 实施例 10

[0530] 脲对明胶的凝胶化和交联的影响

[0531] 这一实施例涉及作为根据本发明的示例性组合物的一部分的脲的影响。发现脲降低明胶溶液的转变点。下文的数据证实它将甚至高浓度的明胶溶液的转变点充分降低至室温以下以致溶液在室温时仍然是液体形式。发现转谷氨酰胺酶甚至在脲存在的情况下能够交联明胶。

[0532] 明胶溶液制备:

[0533] 使用 A 型、300 布卢姆的猪明胶 (Sigma, St. Louis, MO)。在 50°C 的热板上搅拌的同时,通过将 50gr 和 30gr 的明胶分别溶于 150mL 和 170mL 的 Dulbecco' s PBS (Biological Industries, Israel) 制备 25% 和 15% w/w 的明胶溶液。将明胶逐渐加至 PBS 并用玻璃棒手动搅拌。在实验过程中将明胶溶液放在 50°C 的水浴中。

[0534] 转谷氨酰胺酶溶液制备:

[0535] 将 Aactiva TI-WM (Ajinomoto, Japan) 微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 混合物溶于 Dulbecco' s PBS 以形成 20% w/w 的溶液。实验过程中将溶液保持在室温 (RT)。

[0536] 明胶 - 脲溶液制备

[0537] 将 25% 或 15% w/w 的明胶溶液的 40g 小份转移至 100mL 的烧杯中并在 50°C 搅拌。如下文表格中所详述的,将脲 (98%, AlfaAesar, Lancaster, UK) 以不同的比率加至这些烧杯中:

明胶%		明胶: 脲的比率	所加的 脲的量 (gr)
25%	溶液1	1:0	0 (对照)
	溶液2	1:1	10
15%	溶液3	1:0	0 (对照)
	溶液4	1:0.5	2.65
	溶液5	1:1	5.3
	溶液6	1:1.5	8.025

[0539] 脲加入后,将明胶-脲溶液在 50℃ 搅拌 5 分钟以确保均质性并且之后转移到 37℃ 的水浴。

[0540] 脲对明胶的热致可逆凝胶化的影响:

[0541] 依次从 37℃ 的水浴中将每个明胶-脲溶液移出并静置冷却至 RT。用温度计监测每个溶液的温度降低。随着温度降低通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估明胶-脲溶液的外观和粘度。这一实验的结果描述于下列表格:

[0542]

明胶 % (w/w)		明胶: 脲的比率	结果
25%	溶液1	1:0	在 25℃ 时, 明胶形成结实的热致可逆凝胶
	溶液2	1:1	在 25℃ 时, 溶液保持为液体形式。尽管稍粘, 但可容易地将其移液
15%	溶液3	1:0	在 25℃ 时, 明胶形成结实的热致可逆凝胶
	溶液4	1:0.5	温度 > 26℃ 时, 溶液保持比单独的明胶明显更加液态的。但在 RT (23-25℃) 时, 溶液形成凝胶。
	溶液5	1:1	在 25℃ 时, 明胶保持液体形式的。在 4℃ 冷却并恢复 25℃ 时, 明胶恢复液体形式
	溶液6	1:1.5	在 25℃ 时, 明胶保持液体形式的。在 4℃ 冷却并恢复 25℃ 时, 明胶恢复液体形式

[0543] 使用 mTG 的明胶-脲溶液的交联:

[0544] 使用 mTG 交联明胶-脲溶液。在塑料皿中将 1 或 2ml 的 20% w/w 的 mTG 溶液与 2ml 的明胶-脲溶液手动混合。于室温或预加热至 50℃ 后加入明胶-脲溶液。在某些测试中, 将其加热至 50℃ 以便于同需要被加热以与 mTG 混合的单独的明胶进行比较。通过用移液头轻轻的搅拌混合溶液并使其交联几分钟。如热致可逆凝胶形成的检验中, 通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估与 mTG 混合后的明胶-脲溶液的外观和粘度。将结果概括于下列表格:

[0545]

明胶 % (w/w)		明胶: 尿素 的比例	溶液的TC	所加的mTG 的量 (ml)	结果	
25%	溶液1	1:0	50°C	1	正常的交联: 3分钟之后凝胶化。	
	溶液2	1:1	RT	1	没有凝胶形成, 甚至在30分钟后。	
				2	30分钟后形成柔软的粘的凝胶。	
				50°C	1	没有凝胶形成, 甚至在30分钟后。
					2	10分钟后形成柔软的粘的凝胶。30分钟后观察到结实的稍微易碎的凝胶。
	15%	溶液3	1:0	50°C	1	正常的交联: 3分钟之后凝胶化。
溶液4		1:0.5	50°C	1	6分钟后观察到凝胶化。20分钟后观察到完全的凝胶化。将凝胶在50°C的水浴中加热但仍是结实的凝胶。	
溶液5		1:1	RT	1	12分钟后凝胶化开始, 产生柔软的凝胶。30分钟后凝胶显得结实。甚至在50°C的水浴中加热后凝胶依然是结实的。	

[0546] 上文的研究显示向明胶溶液加入脲显著降低了明胶的转变点。对于 15% 和 25% w/w 的明胶溶液, 通过以 1 : 1 的脲 : 明胶和以上的比率加入脲将转变点降至 RT 以下。在 0.5 : 1 的脲 : 明胶的比率的情况下, 明胶溶液的转变点稍稍高于 RT。可能在 0.5 : 1 和 1 : 1 之间的脲 : 明胶的比率将足以将明胶的转变点降至 RT 以下。

[0547] 还显示了在脲存在的情况下使用 mTG 的明胶的交联是可能的。然而脲具有对 mTG 活性的不利影响。似乎这一影响与脲的浓度相关, 以致脲存在的情况下 mTG 活性与脲浓度成反比。

[0548] 如所预料的, 50°C 时转谷氨酰胺酶活性远大于 RT 时的 mTG 活性。可将向明胶加入脲最优化以找出将明胶转变点降至 RT 以下的最小浓度。如果加入足量的 mTG, 其将能够克服脲的不利影响。

[0549] 实施例 11

[0550] pH 对明胶转变点的影响

[0551] 这一实施例证明变化明胶溶液的 pH 对那些明胶溶液的转变点的影响。

[0552] 溶液制备

[0553] 将 58.82gr 的 99% 的二水合柠檬酸钠 (Alfa Aesar, Lancaster, UK) 溶于 100ml 的双蒸水以产生 2M 的柠檬酸钠储存液。使用 A 型、300 布卢姆的猪明胶 (Sigma, St. Louis,

M0) 制备于 Dulbecco PBS(Biological Industries, Israel) 的 25% w/w 的明胶溶液的基本溶液。将明胶溶液持续搅拌并保持在 50℃。将 19.21gr 的无水柠檬酸 (Frutarom, Israel) 溶于 50mL 的双蒸水以产生 2M 的柠檬酸储存液。

[0554] pH 测量

[0555] 使用具有玻璃电极的 pH 计 (Eutech pH510, Singapore) 测量溶液的 pH。实验之前使用具有 4.01、7 和 10.01 的 pH 值的校准溶液校准 pH 计。实验过程中定期测定 pH 测量的准确度。2M 的柠檬酸钠溶液的 pH 是 8.54。2M 的柠檬酸溶液的 pH 是 1.4。

[0556] 加入柠檬酸钠

[0557] 将 25% w/w 的明胶溶液的 20mL 的小份分离至 100mL 烧杯中, 将其保持在 50℃ 并适度搅拌。测量明胶溶液的最初的 pH 为 4.89。将不同量的 2M 的柠檬酸钠溶液加至 20mL 的明胶溶液以形成下列溶液:

[0558] 溶液 1 :5.87 的 pH-2mL 的柠檬酸钠溶液

[0559] 溶液 2 :6.55 的 pH-4mL 的柠檬酸钠溶液

[0560] 溶液 3 :6.7 的 pH-6mL 的柠檬酸钠溶液

[0561] 之后将每个溶液冷却至 RT。

[0562] 加入柠檬酸

[0563] 将 25% w/w 的明胶溶液的 100mL 的小份分离至 250mL 烧杯中, 将其保持在 50℃ 并适度搅拌。测量明胶溶液的最初的 pH 为 5.19。

[0564] 将不同量的 2M 的柠檬酸溶液加至明胶溶液以形成下列溶液:

[0565] 溶液 1 :3.99 的 pH

[0566] 溶液 2 :3.54 的 pH

[0567] 溶液 3 :2.72 的 pH

[0568] 溶液 4 :2.35 的 pH

[0569] 溶液 5 :2.17 的 pH

[0570] 溶液 6 :2.04 的 pH

[0571] 溶液 7 :1.7 的 pH

[0572] 之后将每个溶液冷却至 RT。

[0573] 柠檬酸钠结果

[0574] 当加入柠檬酸钠, 加入物在明胶溶液中形成混浊的白色凝块。强力搅拌将凝块首先分散成较小的凝块, 之后成均质溶液。所形成的均质溶液是混浊并且不透明的。

[0575] 5.87 的 pH 值时, 允许冷却的明胶溶液小份在与单独的明胶形成热致可逆明胶大约相同的时间量内形成热致可逆的凝胶。

[0576] 6.55 的 pH 值时, 允许冷却的明胶溶液小份在不到一分钟内非常迅速地形成热致可逆凝胶。这远远快于单独的明胶。

[0577] 6.70 的 pH 值时, 小份几乎立刻形成热致可逆凝胶。在将明胶 - 柠檬酸钠溶液在 50℃ 保持几分钟后, 整个溶液形成凝胶。转变点已经升高至高于 50℃ 的点。

[0578] 在所有的 pH 值, 由于当沉浸在 60℃ 的水中后凝胶都回复至液体形式, 凝胶被证明是热致可逆的。

[0579] 柠檬酸结果

[0580] 在高于 3.54 的 pH 值没有观察到转变点上的明显差异。在 3.54 的 pH 值,从 50°C 直到约 32°C (形成非常粘的凝胶的点) 明胶溶液保持液体形式。

[0581] 在 2.72 的 pH 值,转变点是约 31°C 并且所形成的明胶是疏松的:细粒状的,具有许多气泡。

[0582] 在 2.04 的 pH 值,转变点降至 29°C。所形成的凝胶是比在 2.72 的 pH 值所形成的凝胶更疏松的。

[0583] 在 1.7 的 pH 值,转变点降至 27-28°C。所形成的凝胶是相当疏松的。

[0584] 在所有的 pH 值,由于当沉浸在 50°C 的水中后凝胶都回复至液体形式,凝胶被证明是热致可逆的。

[0585] 然而,将凝胶在 50°C 的水中保持 30 分钟后,形成没有回复到液体形式的凝胶。这可能已经表明 50°C 时柠檬酸导致明胶在 30 分钟后交联。

[0586] 上文显示通过加入柠檬酸降低明胶溶液的 pH 可显著地降低明胶转变点。柠檬酸的加入(其将明胶溶液 pH 降低至 2)没有导致明胶的交联。50°C 时进一步加入柠檬酸以将 pH 降低至低于 2 可导致明胶在 30 分钟后交联。

[0587] 实施例 12

[0588] 多元醇对明胶的凝胶化和交联的影响

[0589] 这一实施例涉及多元醇例如山梨糖醇对明胶交联的影响。

[0590] 材料和方法

[0591] 材料

[0592] 从 Sigma-Aldrich corporation (St. Louis, MO) 获得 A 型 300 布卢姆的猪明胶和 97% 的 D- 山梨糖醇。从 Frutarom (Israel) 购买丙三醇 99%。Activata TI-WM 微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 由 Ajinomoto (Japan) 提供。从 Biological Industries (Kibbutz Beit HaEmek, Israel) 获得 Dulbecco's PBS (pH 7.4)。

[0593] mTG 溶液制备:

[0594] 通过溶于 Dulbecco's PBS 制备新鲜的 Aactiva TI-WM Ajinomoto (Japan) 微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 混合物以形成 20% w/w 的溶液。实验过程中将溶液保持在室温 (RT)。

[0595] 明胶 - 多元醇溶液制备:

[0596] 溶液 A- 将 10gr 的丙三醇溶于 30ml 的 PBS。之后在 RT 将 10gr 的明胶沉浸在丙三醇溶液中 1.5 小时。1.5 小时的浸泡后加入 10ml 的 PBS 并且将混合物加热至 50°C。手动搅拌混合物直到均质的液体溶液 (1 : 1 的丙三醇 : 明胶比) 形成。

[0597] 溶液 B- 随着搅拌,将 27.5ml 的 20% w/w 的明胶溶液加热至 50°C。向明胶溶液加入 11gr 的丙三醇 (2 : 1 的丙三醇 : 明胶比率)。之后将丙三醇 - 明胶溶液冷却。使 2 : 1 的丙三醇 : 明胶的溶液在 50°C 浸泡 1.5h。之后移走溶液并使其在 RT 冷却。

[0598] 溶液 C- 随着搅拌,将以 2 : 1 的丙三醇 : 明胶比率包含丙三醇的 20% 的明胶溶液加热至 50°C。加入 11gr 的山梨糖醇形成均质溶液 (2 : 2 : 1 的丙三醇 : 山梨糖醇 : 明胶比率)

[0599] 溶液 D- 向 50°C 的 20ml 的 20% w/w 的明胶溶液加入 12gr 的山梨糖醇以形成具有 3 : 1 的山梨糖醇 : 明胶比率的均质溶液。之后使溶液冷却。

[0600] 溶液 E- 通过向 50°C 的 20ml 的 20% w/w 的明胶溶液加入 25gr 的 RT 的丙三醇制

备 5 : 1 的丙三醇 : 明胶的溶液。于 50°C 通过搅拌混合混合物。

[0601] 溶液 F- 向 20ml 的 20% 的明胶溶液加入 20gr 的山梨糖醇, 产生 5 : 1 的山梨糖醇 : 明胶的比率。于 50°C 将混合物混合。之后将混合物在 RT 冷却。

[0602] 多元醇对明胶的凝胶化的影响 :

[0603] 按照上文的描述所制备的包含多元醇的 2ml 的明胶溶液 (参见上文的溶液 A-F) 被移走并冷却至 RT。用温度计测定每个溶液的温度。随着温度降低通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估明胶 - 多元醇溶液的外观和粘度。

[0604] 多元醇对使用 mTG 的明胶溶液的交联的影响 :

[0605] 测试明胶 - 多元醇溶液的使用 mTG 的化学交联。在小的塑料皿中将 1ml 的 20% w/w 的 mTG 溶液与 2ml 的明胶 - 多元醇溶液混合。在 RT 或使用水浴预加热至 50°C 后加入明胶 - 多元醇溶液。通过用移液头轻轻的搅拌手动混合溶液并测量凝胶化的时间。通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估与 mTG 混合后的明胶 - 多元醇溶液的外观和粘度。当形成凝胶时, 通过使用水浴将凝胶加热至 50°C 测试其热致可逆性。

[0606] 结果

[0607] 多元醇对明胶的凝胶化的影响 :

[0608] 溶液 A- 在丙三醇中浸泡后, 明胶颗粒簇集在一起形成非常易碎的固态的细粒状物质。丙三醇的存在似乎根本没有减慢热致可逆的明胶凝胶化。如没有丙三醇的 20% w/w 的明胶溶液所发生的, 2-3 分钟内形成热致可逆的凝胶。在 35°C 时, 明胶 - 丙三醇溶液是非常粘的, 接近凝胶化。如同冷却至室温一样, 明胶 - 丙三醇的相转变与单独的明胶的相转变几乎一致。

[0609] 溶液 B- 如同 1 : 1 的丙三醇 : 明胶溶液一样, 2 : 1 的丙三醇 : 明胶的比率的丙三醇没有降低明胶的转变温度。溶液在 35°C 时极粘并在 33-34°C 时形成内聚凝胶。浸泡 2 : 1 的丙三醇 : 明胶溶液 1.5 小时对明胶转变点没有影响。34°C 时热致可逆凝胶开始形成。

[0610] 溶液 C- 50°C 时, 明胶 - 丙三醇 - 山梨糖醇溶液比单独的明胶 - 丙三醇溶液更粘并且不透明得多。将这一混合物冷却时, 35°C 时形成凝胶。作为山梨糖醇和丙三醇的结果, 转变点根本没有降低。

[0611] 溶液 D- 40°C 时明胶 - 山梨糖醇溶液开始胶凝, 表明高浓度的山梨糖醇确实升高了明胶转变点。在 RT 时, 所形成的热致可逆凝胶比单独的明胶凝胶有弹性得多。

[0612] 溶液 E- 甚至是在非常高浓度的 5 : 1 的丙三醇 : 明胶比率时, 明胶的转变温度没有被降低。如同用单独的明胶所形成的形成了热致可逆明胶。

[0613] 溶液 F- 40°C 时形成热致可逆凝胶。在 3 : 1 和 5 : 1 的山梨糖醇 : 明胶的溶液的性质之间观察到非常少的差异。两种溶液稍稍升高了明胶的转变点但产生了极其粘和弹性的热致可逆凝胶。

[0614] 多元醇对使用 mTG 的明胶溶液的交联的影响 :

[0615] 溶液 A- 经由 mTG 明胶 - 丙三醇溶液在 3 分钟内变成了硬的凝胶。3 分钟后所形成的凝胶比没有丙三醇时由明胶和 mTG 在相同的时间段内形成的凝胶更内聚。使用水浴将凝胶再加热至 50°C 而凝胶保持固态, 证实 mTG 交联是凝胶化的机制。

[0616] 溶液 B- 3 分钟后, 形成不可逆的凝胶。使用水浴将凝胶再加热至 50°C 而凝胶保持

固态,证实 mTG 交联是凝胶化的机制。如同在 1 : 1 的丙三醇 : 明胶比率的溶液中所注意到的,3 分钟后丙三醇的存在产生了更结实的凝胶。在 2 : 1 的丙三醇 : 明胶比率的溶液中,还观察到所形成的凝胶比用单独的明胶所形成的凝胶明显地更易碎并且也比从具有 1 : 1 的比率的丙三醇 : 明胶的溶液形成的凝胶显著地更加易碎。

[0617] 溶液 C-3 分钟后,形成固态的、粘的、非常有弹性的凝胶。这一凝胶根本不易碎也不容易被分开。由于仅用丙三醇的交联的凝胶是非常易碎的,因此这被认为是非常重要的结果。山梨糖醇大大增加了原本为易碎的材料弹性。用水浴将凝胶再加热至 50°C 而凝胶保持固态,证实 mTG 交联是凝胶化的机制。

[0618] 溶液 E- 结果与 2 : 1 的丙三醇 : 明胶的比率的丙三醇的结果非常相似 : 丙三醇的存在导致比由单独的明胶形成的凝胶易碎得多的凝胶的形成。但是,在 mTG 存在的情况下,3 分钟后,所形成的凝胶比使用 mTG 在 3 分钟后由单独的明胶形成的凝胶更结实。

[0619] 溶液 F-3 分钟后,通过明胶 - 山梨糖醇溶液的 mTG 交联形成固态但极其有弹性并且粘的凝胶。除了大大增加 mTG 交联的明胶凝胶的弹性和粘性外,山梨糖醇似乎对明胶的 mTG 交联没有影响。

[0620] 从上文发现向明胶加入丙三醇似乎根本没有降低明胶的转变点。将明胶浸泡在丙三醇中似乎没有显著改变其形成热致可逆凝胶的倾向。在明胶溶液与 mTG 混合 3 分钟后,丙三醇的存在似乎导致了更硬的凝胶。这可表明当明胶中有丙三醇存在时明胶的 mTG 交联的加速。

[0621] 在明胶的 mTG 交联过程中高浓度的丙三醇的存在似乎使得到的交联凝胶比由单独的明胶的交联形成的凝胶更易碎。丙三醇似乎加速的明胶的 mTG 交联。

[0622] 配合丙三醇加入山梨糖醇没有降低明胶的转变点。然而山梨糖醇大大增加了明胶凝胶的弹性和粘性。山梨糖醇可能能够被用于增加由于加入其它物质而显得更易碎的明胶凝胶的弹性。山梨糖醇似乎没有抑制明胶的 mTG 交联。尽管山梨糖醇似乎稍稍提高了明胶的转变点,但它大大增加了明胶凝胶的弹性和粘性。

[0623] 将丙三醇 : 明胶的比率增加到 5 : 1 使得交联的明胶凝胶比用 2 : 1 的丙三醇 : 明胶的溶液制得的那些更易碎但对明胶转变点没有进一步影响。在这一较高的丙三醇 : 明胶比率下轻微交联加速影响依然发生但没有比 1 : 1 和 2 : 1 的丙三醇 : 明胶的比率时的影响更显著。

[0624] 具有 5 : 1 的山梨糖醇 : 明胶的比率的溶液增加了明胶转变点但是没有比具有 3 : 1 的山梨糖醇 : 明胶的比率的溶液增加的更多。然而由 5 : 1 的溶液形成的交联的明胶凝胶甚至更有弹性和更粘。这进一步表明可变化山梨糖醇的量以改变交联的明胶凝胶的弹性。

[0625] 实施例 13

[0626] 喷雾干燥对明胶的凝胶化和交联的影响

[0627] 这一实施例涉及喷雾干燥对明胶的凝胶化和交联的影响。经由使用喷雾干燥形成的粒度的优选的范围优选地如下 : 从约 20 至约 140 μm , 更优选地从约 60 至约 100 μm (直径)。

[0628] 可选择地考虑颗粒形成的各种策略。一种可能的策略是分别使用为达到此目的的专门的干燥技术或通过包含添加剂并且之后将包含添加剂的明胶和 mTG 干燥为颗粒而形

成容易重新构成的明胶和 mTG 的颗粒。另一种可能的策略是形成将明胶和 mTG 包括在一起的容易重新构成的颗粒。可仅通过使用专门的干燥技术或通过包含改善这些颗粒的可重新构成性的添加剂而形成这些颗粒。此外,可在明胶和 mTG 没有经历任何交联时或在它们已经经历部分交联后产生这些颗粒。

[0629] 材料和方法

[0630] 材料

[0631] 从 Sigma-Aldrich corporation (St. Louis, MO) 获得 A 型 300 布卢姆的猪明胶。Activata TI-WM 微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 由 Ajinomoto (Japan) 提供。从 Biological Industries (Kibbutz Beit HaEmek, Israel) 获得 Dulbecco' s PBS (pH 7.4)。从 Alfa Aesar (Lancaster, UK) 获得脲, 98%。

[0632] mTG 溶液制备:

[0633] 通过用 16gr 的 Dulbecco' s PBS 溶解 4gr 的 mTG 制备 20% (w/w) 的微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 溶液。在实验过程中将溶液保持在室温 (RT)。

[0634] 通过用 50gr 的 Dulbecco' s PBS 溶解 2.04gr 的 mTG 制备 4% (w/w) 的微生物转谷氨酰胺酶 (mTG) 溶液。在实验过程中将溶液保持在室温 (RT)。

[0635] 明胶溶液制备:

[0636] 通过将 10.52gr 的明胶粉末溶于 200gr 的 Dulbecco' s PBS 中制备 5% (w/w) 的明胶溶液。将混合物加热至 50°C 并且搅拌直到形成均质溶液。溶液 1 以 50ml 的 5% 的明胶溶液为特征。溶液 2- 通过向 50ml 的 5% 的明胶溶液加入 2.63gr 的甘露醇制备 1 : 1 (w/w) 的明胶 - 甘露醇溶液。将溶液搅拌并放在 50°C 水浴中。整个实验过程中, 将溶液放在 ~50°C 的水盘中以防止热致可逆凝胶化。

[0637] 溶液 3- 通过将 2.63gr 的海藻糖溶于 50ml 的 5% 的明胶溶液中制备 1 : 1 (w/w) 的明胶 - 海藻糖溶液, 同时搅拌加热至 50°C。整个实验过程中, 将溶保持在 50°C。

[0638] 溶液 4- 通过将 2.63gr 的脲溶于 50ml 的 5% 的明胶溶液中制备 1 : 1 (w/w) 的明胶 - 脲溶液, 同时搅拌并加热至 50°C。整个实验过程中, 将溶保持在 50°C。

[0639] 溶液 5- 将 40gr 的 5% 的明胶溶液与 20gr 的 4% 的 mTG 溶液混合。整个实验过程中, 将溶保持在 50°C。

[0640] 明胶溶液的喷雾干燥

[0641] 为了制备喷雾干燥的明胶颗粒, 制备溶于 Dulbecco' s PBS 的不同的 5% 的明胶溶液 (溶液 1-5)。使用 BÜCHI 微型喷雾干燥器将明胶溶液喷雾干燥。流动类型是并流, 空气和液体在喷头处混合。将抽吸率 (aspirator rate) 和进口温度分别保持恒定在 100% 和 100°C。液体进料速度是根据加工条件变化的, 影响如下文所给出的出口温度。

[0642] 溶液 1- 将 50ml 的 5% (w/w) 的明胶溶液持续加热并以 15% 的进料速度喷雾干燥, 出口温度 57°C。

[0643] 溶液 2- 将 50ml 的 1 : 1 (w/w) 的明胶 - 甘露醇溶液在 50°C 的水浴中保持可溶。液体进料速度是 15%, 出口温度 62°C。

[0644] 溶液 3- 将 50ml 的 1 : 1 (w/w) 的明胶 - 海藻糖溶液在 50°C 的水浴中保持可溶。液体进料速度是 15%, 出口温度 54°C。

[0645] 溶液 4- 将 50ml 的 1 : 1 (w/w) 的明胶 - 脲溶液在 50°C 的水浴中保持可溶。将液

体进料速度设为 15%，出口温度 57℃。在整个实验期间，将液体进料速度变化至 20%，出口温度 54℃，以使得能够形成粉末。

[0646] 溶液 5- 将与 4% 的 mTG 溶液混合的 40ml 的 5% 的明胶溶液以 20% 的液体进料速度和 56℃ 的出口温度喷雾干燥。在整个实验期间，将溶液放在 37℃ 的水盘中。

[0647] 喷雾干燥对明胶溶液的凝胶化的影响：

[0648] 在 4ml 小瓶中将喷雾干燥的明胶粉末用 Dulbecco' s PBS 溶解并通过颠倒管 4 次来混合。将沉淀的溶液在 50℃ 的水浴加热并手动混合，直到溶解。然后将溶液于 RT 冷却并随着温度降低通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估每个溶液的外观和粘度。

[0649] 溶液 1- 将 0.33gr 的 5% 的喷雾干燥的明胶溶液溶于 1ml 的 RT 的 Dulbecco' s PBS 中至最终 25% (w/w) 明胶。之后加入另外 1ml 的 Dulbecco' s PBS，将明胶含量降低至 12.5% (w/w)。

[0650] 溶液 2- 将 0.33gr 的喷雾干燥的 1 : 1 的明胶 - 甘露醇溶液溶于 1ml 的 RT 的 Dulbecco' s PBS 中。

[0651] 溶液 3- 将 0.33gr 的喷雾干燥的 1 : 1 的明胶 - 海藻糖溶液溶于 1ml 的 RT 的 Dulbecco' s PBS 中。

[0652] 溶液 4- 明胶 - 脲喷雾干燥未能产生粉末。

[0653] 溶液 5- 将 0.25gr 的喷雾干燥的明胶 - mTG 溶液溶于 0.75ml 的 37℃ 的 Dulbecco' s PBS 中。

[0654] 喷雾干燥对使用 mTG 的明胶溶液的化学交联的影响：

[0655] 如之前的章节中所描述的将喷雾干燥的明胶粉末溶解并放在 50℃ 的水浴中。以 2 : 1 的明胶和 mTG 的比率加入 20% 的 RT 的 mTG 溶液并使用移液头和通过颠倒管 4 次轻轻的混合。测量凝胶化时间并通过观察和用玻璃棒触碰溶液来评估与 mTG 混合后的溶液的外观和粘度。当形成凝胶时，通过用水浴将凝胶加热至 50℃ 测试其热致可逆性。

[0656] 结果：

[0657] 明胶溶液的喷雾干燥

[0658] 明胶溶液的喷雾干燥产生了不同量的精细白色粉末。溶液 1- ~ 50ml 的 5% 的明胶溶液产生 0.78gr。溶液 2- 与甘露醇以 1 : 1 的比率 (w/w) 混合的 ~ 40ml 的 5% 的明胶溶液产生 0.73gr。溶液 3- 与海藻糖以 1 : 1 的比率 (w/w) 混合的 ~ 50ml 的 5% 的明胶溶液产生 1.135gr。溶液 4- 没有产生粉末。由于与脲混合的明胶产生无法收集的极粘的糊状物，因此结束了实验。溶液 5- 与 4% 的 mTG 溶液混合的 ~ 40ml 的 5% 的明胶溶液产生 1.27gr。

[0659] 喷雾干燥对明胶溶液的凝胶化的影响：

[0660] 溶液 1- 明胶粉末部分溶于 RT 的 PBS 中以至最终 25% (w/w) 的明胶，形成白色不可溶的沉淀。50℃ 的水浴加热后，粉末溶解产生均质溶液。在冷却至 RT 时，溶液胶凝，加入另外 1ml 的 PBS，以将明胶降低至 12.5 (w/w)。12.5% 的明胶溶液在 26-27℃ 胶凝。

[0661] 溶液 2- 将明胶 - 甘露醇粉末部分溶于 RT 的 PBS 中以至最终 ~ 12.5% (w/w) 的明胶（预计明胶为所生产的粉末的 $\frac{1}{2}$ 的量，但明胶的准确的百分比未知）。形成白色的不可溶的沉淀。50℃ 的水浴加热后，粉末溶解产生均质溶液。在冷却至 RT 时，溶液在 28-29℃ 胶凝。

[0662] 溶液 3- 将明胶 - 海藻糖粉末部分溶于 RT 的 PBS 中以至最终 ~ 12.5% (w/w) 的明胶 (预计明胶为所生产的粉末的 $\frac{1}{2}$ 的量, 但明胶的准确的百分比未知)。形成白色的不可溶的沉淀。50°C 的水浴加热后, 粉末溶解产生均质溶液。在冷却至 RT 时, 溶液在 28-29°C 胶凝。

[0663] 溶液 4- 溶液包含交联剂因此检验了溶液的交联而不是凝胶化。

[0664] 喷雾干燥对使用 mTG 的明胶溶液的化学交联的影响:

[0665] 溶液 1- 向 2ml 的 12.5% 的明胶溶液加入 500u1 的 20% 的 mTG 溶液。4 分钟后形成结实的白色凝胶。凝胶不可逆。

[0666] 溶液 2- 向 1ml 的 12.5% 的包含甘露醇的明胶溶液加入 250u1 的 20% 的 mTG 溶液。2.5 分钟后形成结实的白色凝胶。凝胶不可逆。

[0667] 溶液 3- 向 1ml 的 12.5% 的包含海藻糖的明胶溶液加入 250u1 的 20% 的 mTG 溶液。3 分钟后形成结实的白色凝胶。凝胶不可逆。

[0668] 溶液 4- 将 mTG- 明胶溶液溶于加热至 37°C 的 1ml 的 Dulbecco' s PBS 中。立即形成白色的脆弱的明胶, 妨碍了在 PBS 中的完全溶解。所形成的凝胶是不可逆的。

[0669] 从上文中, 显示出明胶溶液的喷雾干燥是可能的。例如, 可将 5% 的明胶溶液喷雾干燥, 产生精细的白色粉末。可将以 1 : 1 (w/w) 的明胶与甘露醇或海藻糖的比率包含甘露醇或海藻糖的明胶喷雾干燥。与喷雾干燥的单独的明胶相比喷雾干燥的明胶 - 甘露醇的溶液具有较高的转变点。与喷雾干燥的单独的明胶相比喷雾干燥的明胶 - 海藻糖具有较低转变点。

[0670] 喷雾干燥的明胶的溶液的交联是可能的。1 : 1 (w/w) 的明胶 - 甘露醇溶液的喷雾干燥改善了交联。1 : 1 (w/w) 的明胶 - 海藻糖溶液的喷雾干燥没有改善交联。

[0671] 与 mTG 混合的明胶溶液的喷雾干燥是可能的。所形成的颗粒可在重新构成时立即形成凝胶。

[0672] 实施例 14

[0673] 施用密封材料的涂布器

[0674] 这一实施例涉及用于施用根据本发明的某些实施方案的止血密封材料的示例性说明性的涂布器。图 11A 显示双注射器涂布器 1700 的实例, 其以两个注射器 1702 和 1704 为特征, 以便容纳两组止血密封材料的每一种组分。注射器 1702 可选择地包含如本文所描述的明胶或替代物, 而注射器 1704 可选择地包括如本文描述的转谷氨酰胺酶或替代物。小瓶体积上的差异将反映两种组分之间的混合的相关比率。两种组分可在喷嘴 1705 中混合。为了改善混合, 喷嘴 1705 可包含产生涡旋的元件 1706 (图 11B 中更详细的显示)。可注射器涂布器 1700 可选择地在喷嘴 1705 处与加压空气系统 1708 相连, 以产生喷雾效果。根据所需要的施用, 加压空气可选择地进入喷嘴 1705 的近侧或远侧末端。

[0675] 实施例 15

[0676] 导管和其使用方法

[0677] 这一实施例涉及根据本发明的某些实施方案的示例性、说明性导管和其使用方法。图 12A 显示血管插入点闭合的实例, 其中导管 1200 优选地以包含本文所描述的密封材料组分的涂层 1202 为特征。涂层 1202 可选择并优选地以至少一个明胶层 1204 为特征, 仅为了示例性说明而没有任何限制性意图地显示了两个所述明胶层 1204。明胶层 1204 可选

择地被如本文所描述的另一种蛋白底物所取代。涂层 1202 还可选择并优选地以至少一个转谷氨酰胺酶层 1206 为特征,其也可选择地被如本文所描述的另一种交联剂所取代。涂层 1202 优选包裹也被称为套针的血管导引套 1208。

[0678] 套 1208 可选择地被另一个外套 1209 覆盖,外套 1209 在干燥的密封材料和体液之间产生机械障碍物,如图 12B 中所示。一旦外套 1209 被移开,密封材料组分可被体液活化以产生血管周围进入点的闭合栓。

[0679] 已经参考其前文的详细描述和优选的实施方案而描述了本发明,但前文描述意图示例性说明而不是限制由包括的权利要求的范围所限定的本发明。其他的方面、优点和改变在那些权利要求的范围内。

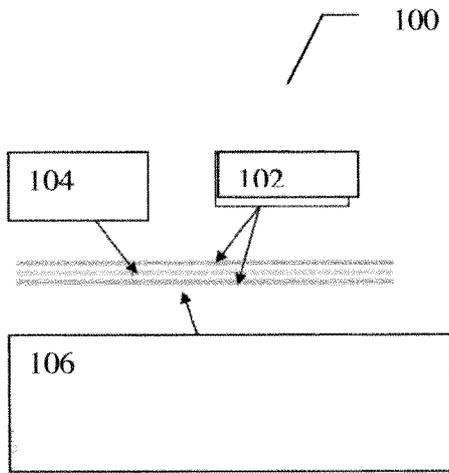


图 1

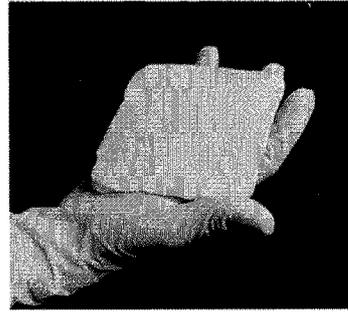


图 2

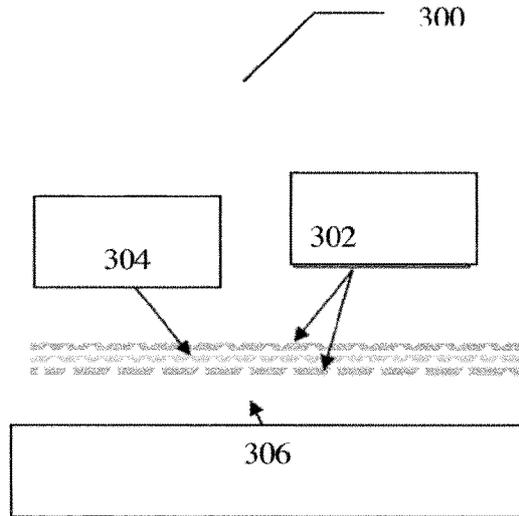


图 3

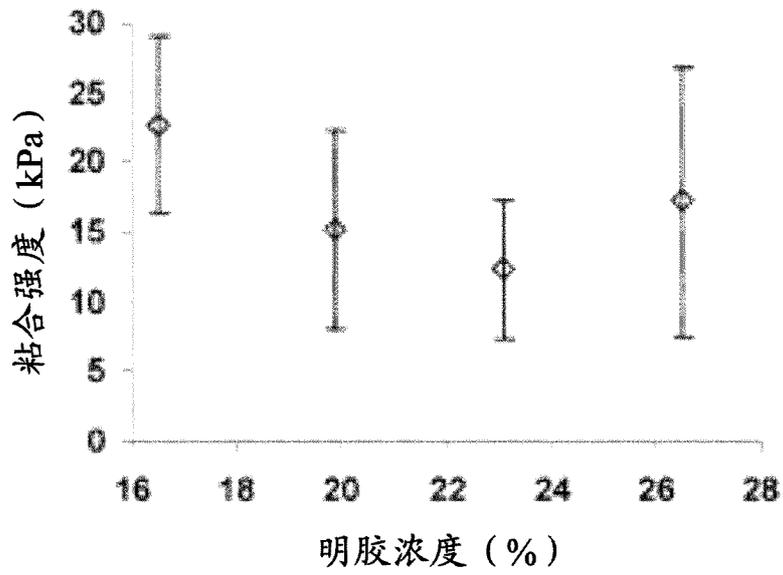


图 4

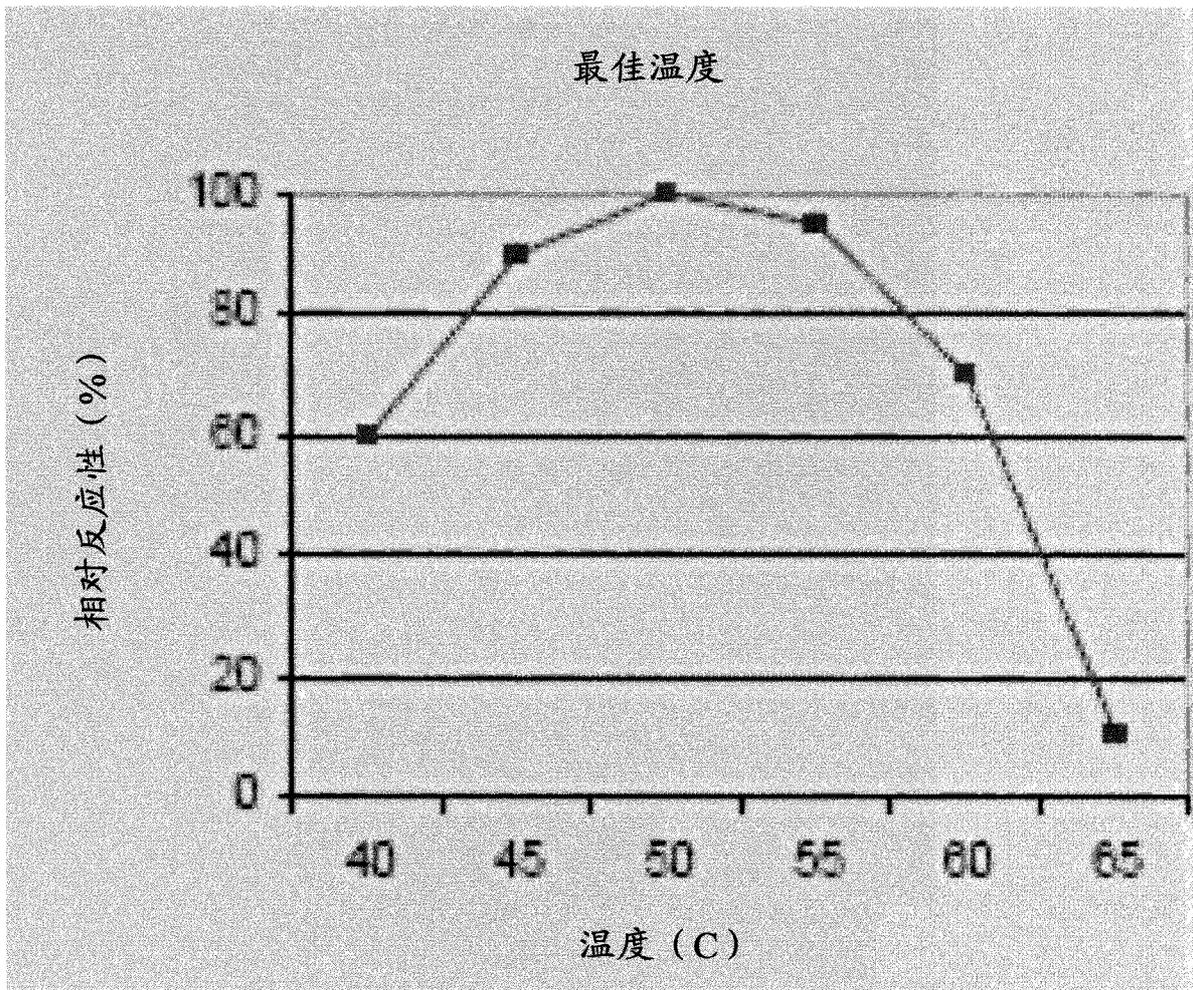


图 5

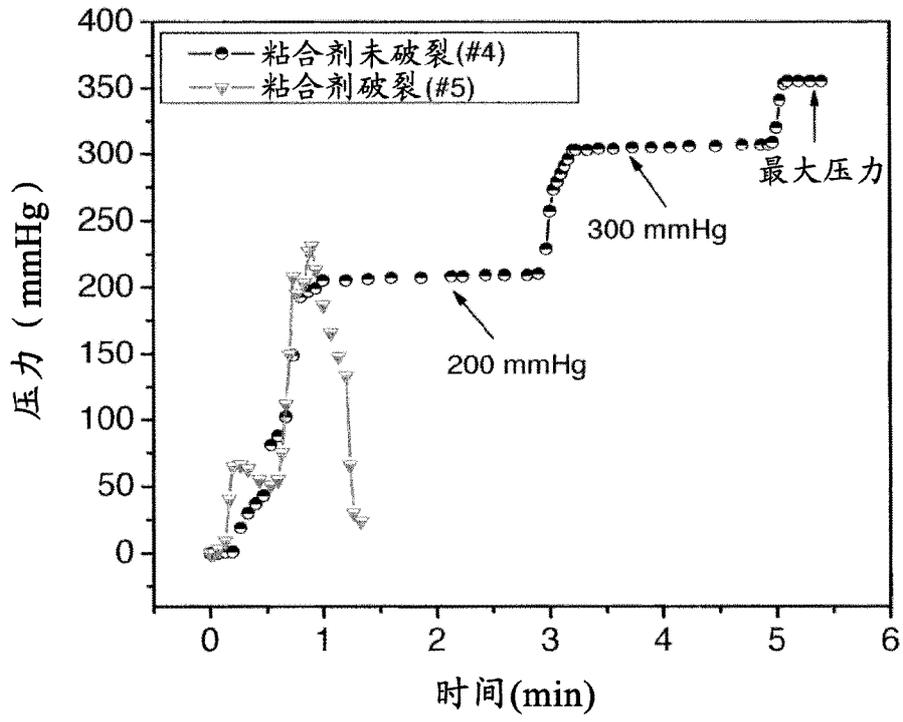


图 6

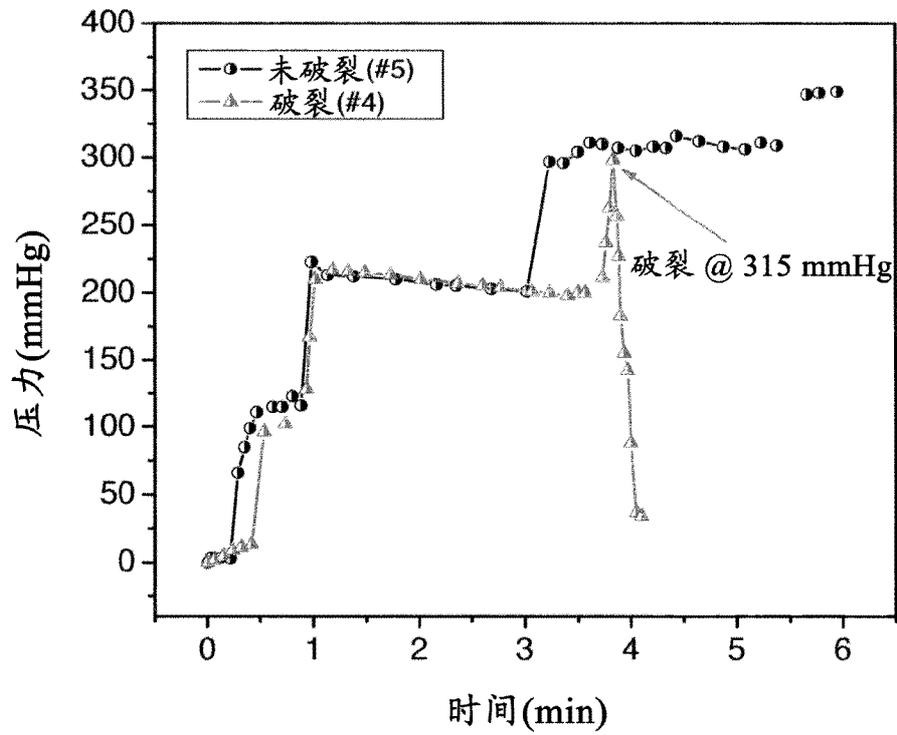


图 7

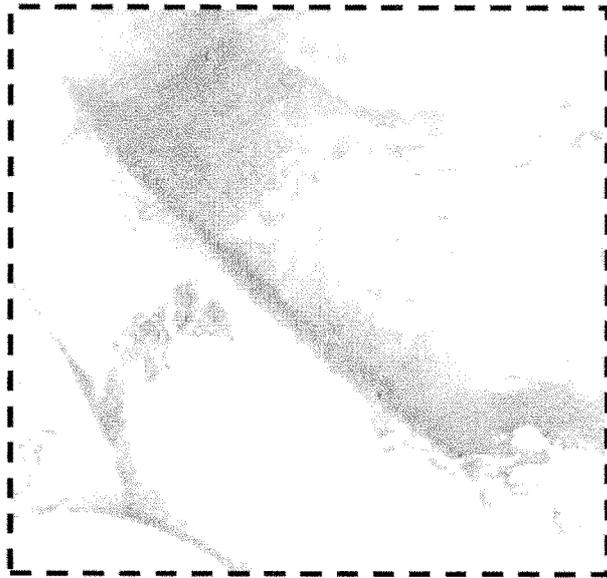


图 8B

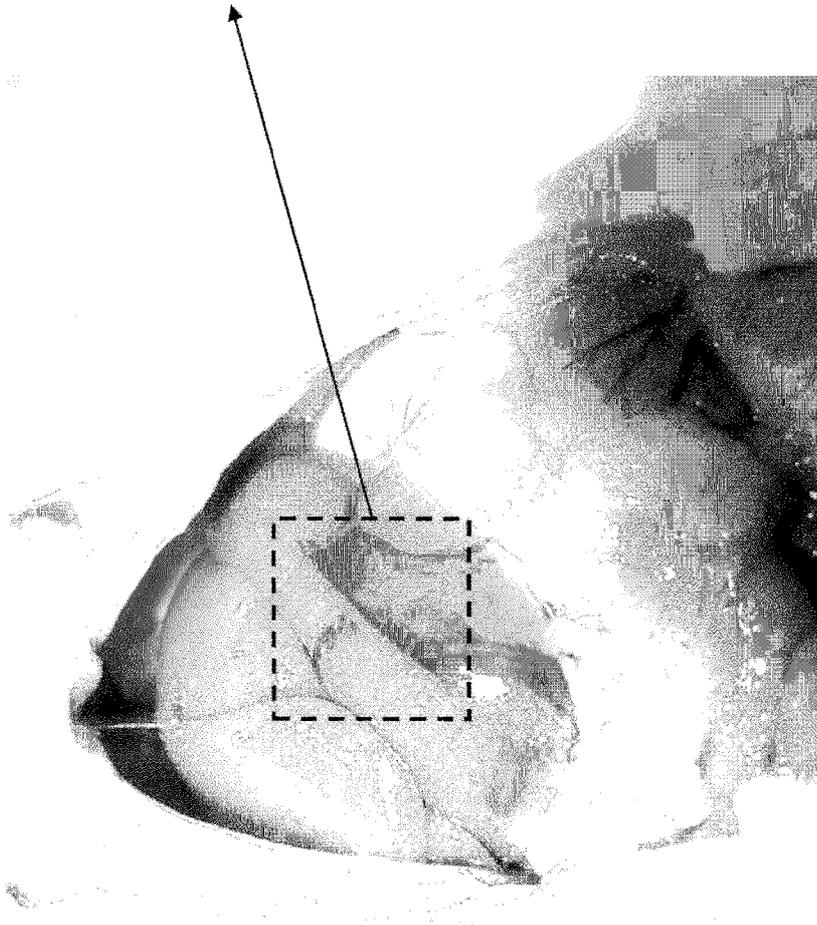


图 8A

图 8



图 9A



图 9B

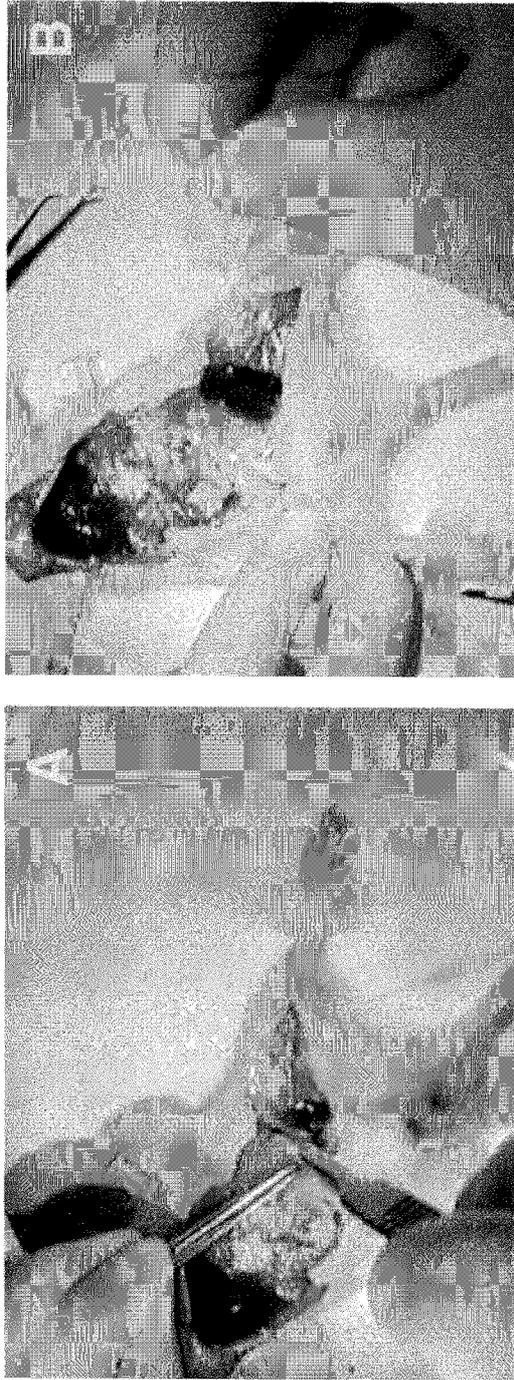


图 10



图10D

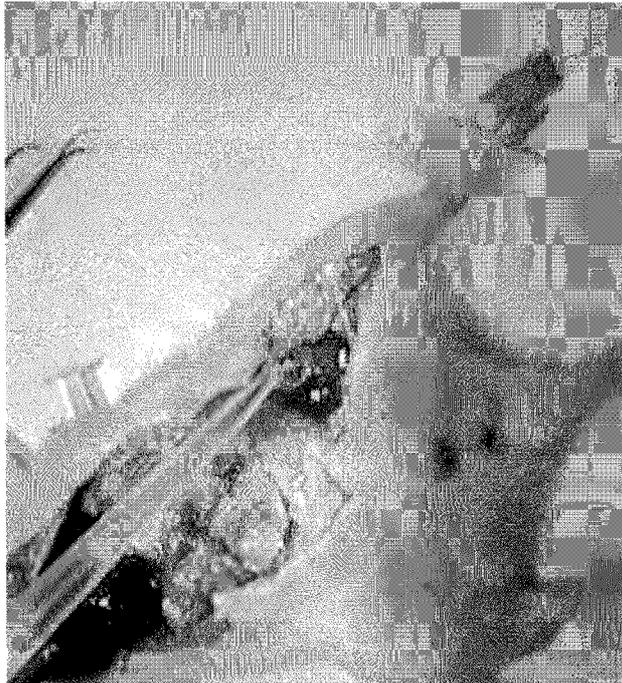


图10C

图10(续)

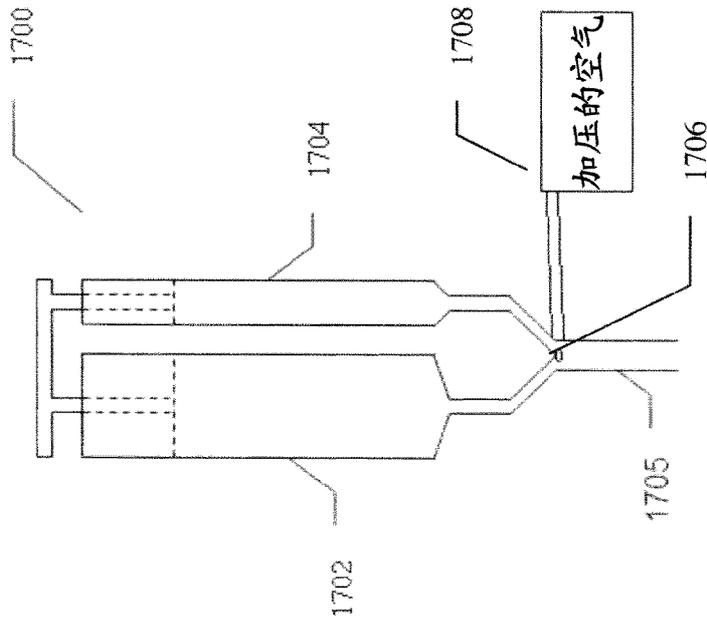


图11a

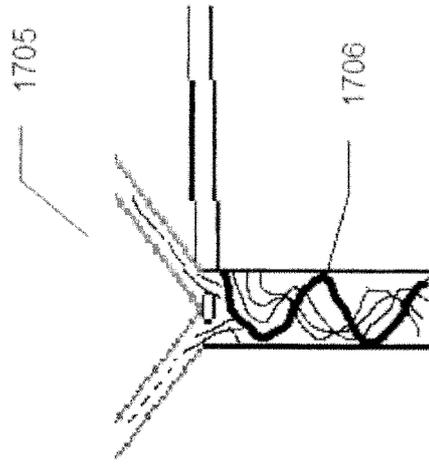


图11b

图 11

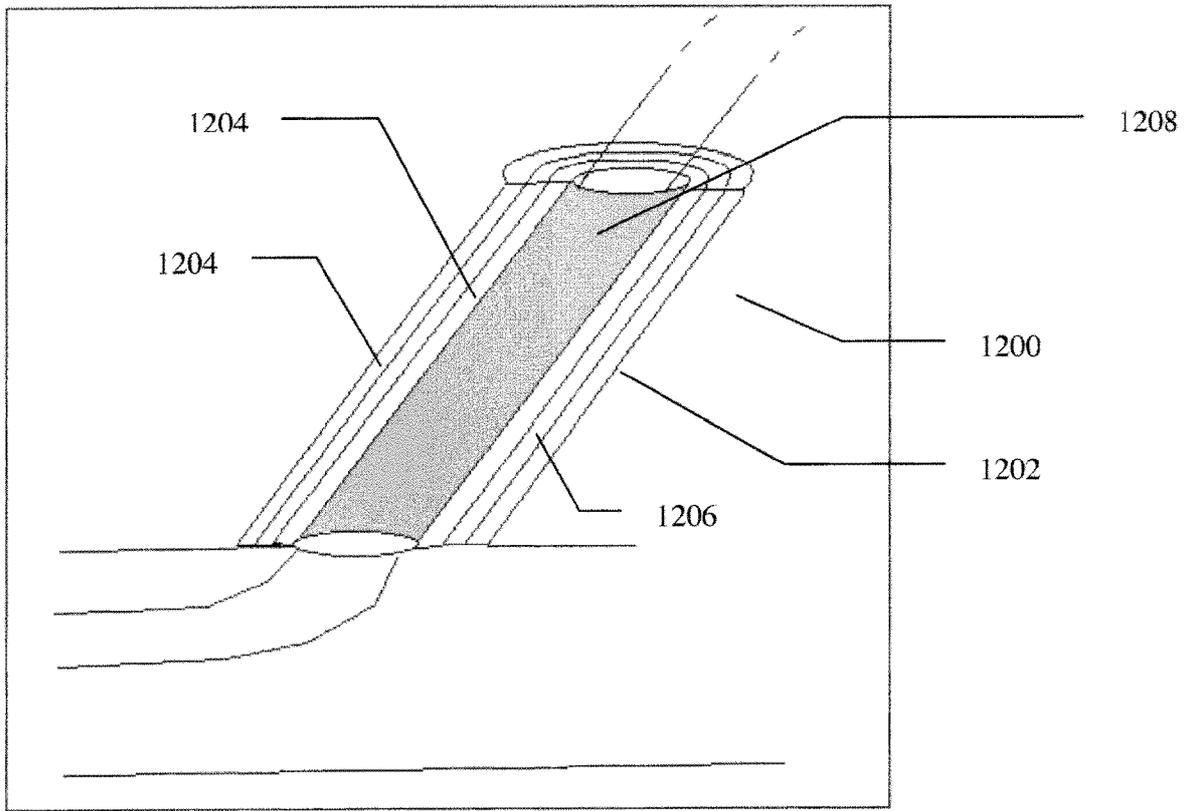


图 12A

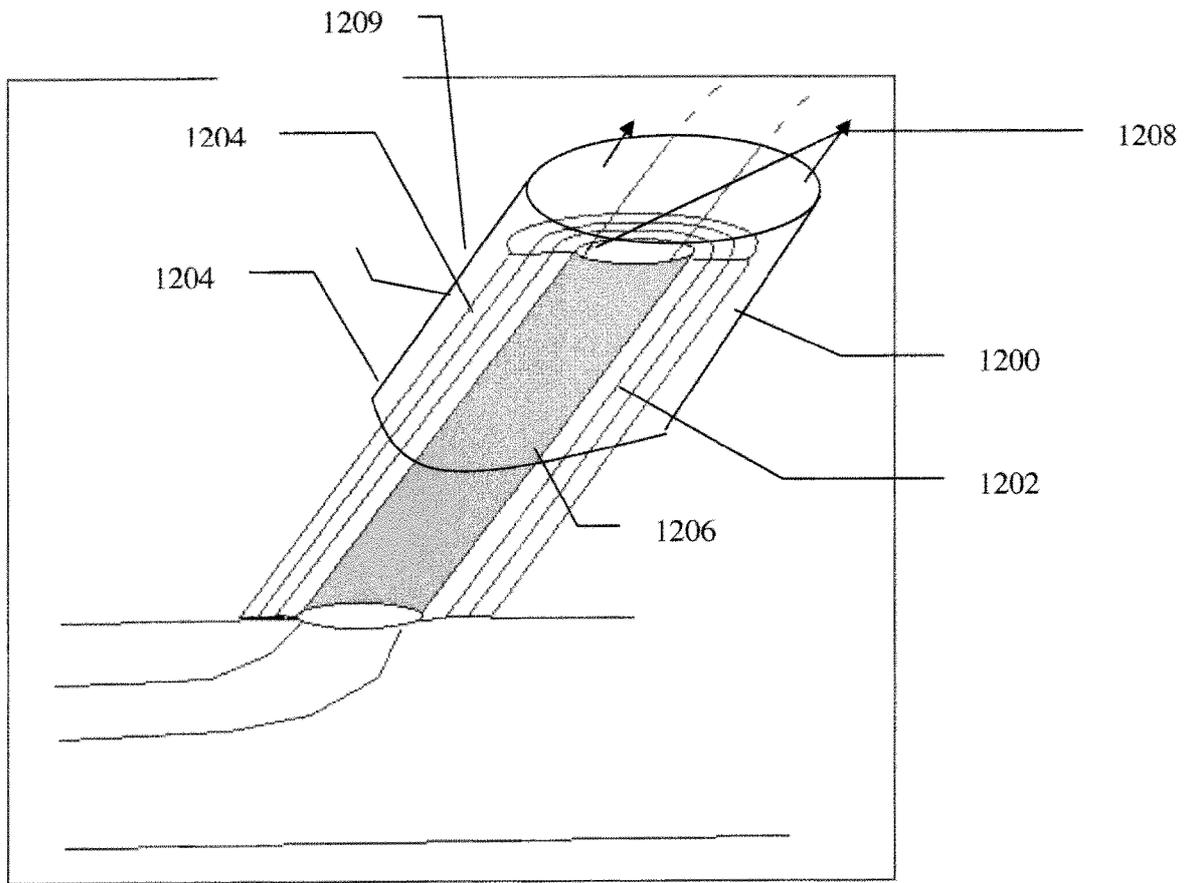


图 12B