



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108601675 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680052451.7

(22)申请日 2016.07.20

(30)优先权数据

62/194,423 2015.07.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/043166 2016.07.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/015387 EN 2017.01.26

(71)申请人 塔夫茨大学

地址 美国马萨诸塞州

申请人 麻省眼耳科医院

通用医院公司商业用名马萨诸塞综

合医院

(72)发明人 戴维·卡普兰 M·瓦伦

C·哈特尼克

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 张怡 顾云峰

(51)Int.Cl.

A61F 11/00(2006.01)

A61M 31/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页 附图10页

(54)发明名称

生物可降解的丝质耳管

(57)摘要

在一些实施方式中,本发明提供了制造可再吸收耳管的方法,其包括以下步骤:提供丝素蛋白溶液,并由丝素蛋白溶液形成丝质耳管,其中所述丝质耳管的长度小于2mm长度且具有小于1.5mm的外径,并且其中所述丝质耳管是可再吸收的。在一些实施方式中,本发明还提供了用于治疗中耳炎的方法,其包括将丝质耳管引入到受试者的耳道中的步骤,其中所述丝质耳管的长度小于2mm且具有小于1.5mm的外径,并且其中所述丝质耳管被受试者再吸收。

1. 一种制造可再吸收耳管的方法,其包括提供丝素蛋白溶液;和由所述丝素蛋白溶液形成丝质耳管,其中所述丝质耳管的长度小于2mm且具有小于1.5mm的外径,并且其中所述丝质耳管是可再吸收的。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述丝质耳管通过凝胶纺丝或凝胶沉积形成。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述丝质耳管通过浸涂或溶液沉积形成。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述丝质耳管通过微模塑形成。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括将多个孔引入所述丝质耳管。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中通过在形成所述丝质耳管之前将致孔剂与所述丝素蛋白溶液结合来引入所述孔。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述致孔剂选自聚环氧乙烷、NaCl、碱金属、碱土金属卤化物、磷酸盐、硫酸盐、糖晶体、水溶性微球体、多糖、蛋白质微球体、蜡粒子和合成聚合物粒子。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管包括至少两层。
9. 根据权利要求1所述的方法,还包括在形成所述丝质耳管之前或期间将至少一种治疗剂与所述丝素蛋白溶液相结合。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述至少一种治疗剂选自抗生素、镇痛剂和类固醇。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述丝素蛋白溶液含有1重量%-30重量%之间的丝素蛋白。
12. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管具有在一天和一周之间(包括端值)的再吸收率。
13. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管具有八天和两年之间(包括端值)的再吸收率。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管包含1-60%之间的 $\beta$ -片层含量。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述大量 $\beta$ 片层含量是通过高压灭菌、水蒸气退火和用甲醇处理中的至少一种引入的。
16. 一种治疗中耳炎的方法,其包括将丝质耳管引入受试者的耳道中,其中所述丝质耳管的长度小于2mm且具有小于1.5mm的外径,并且其中所述丝质耳管被所述受试者再吸收。
17. 根据权利要求16所述的方法,还包括在引入所述丝质耳管之前,向所述受试者施用至少一种治疗剂。
18. 根据权利要求16所述的方法,还包括在引入所述丝质耳管之后,向所述受试者施用至少一种治疗剂。
19. 根据权利要求16所述的方法,还包括基本上在引入所述丝质耳管的同时向所述受试者施用至少一种治疗剂。

20. 根据权利要求16-19中任一项所述的方法,其中所述至少一种治疗剂是抗生素、镇痛剂或类固醇。

21. 根据权利要求16-20中任一项所述的方法,其中所述中耳炎是急性中耳炎、渗出性中耳炎或慢性化脓性中耳炎。

22. 根据权利要求16-21中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管经一天和一周之间的时间段内(包括端值)被再吸收。

23. 根据权利要求16-21中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管经8天和2年之间的时间段内(包括端值)被再吸收。

24. 根据权利要求16-22中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管包含的 $\beta$ -片层含量在1-60%之间。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述大量 $\beta$ 片层含量是通过高压灭菌、水蒸气退火和用甲醇处理中的至少一种引入的。

26. 根据权利要求16-25中任一项所述的方法,其中所述丝质耳管包括至少两层。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述丝质耳管包括至少一个多孔层。

28. 根据以上权利要求中任一项所述的方法,其中所述丝素蛋白选自蜘蛛丝、蚕丝和重组丝。

## 生物可降解的丝质耳管

### 背景技术

[0001] 鼓膜造口管是插入到鼓膜中以保持中耳充气并防止流体在中耳中累积的小管。鼓膜造口管置入是儿童全身麻醉下进行的最常见的门诊手术,每年在美国进行667,000次手术,常作为中耳炎或气压伤的治疗。每次手术费用大约2,700美元,总体财务负担接近18亿美元,不包括围手术期就诊和额外的检查。到3岁时,将近7%的儿童将置有管。不幸的是,之前的鼓膜造口管已被证明因为许多原因而不令人满意,包括引发慢性炎症和瘢痕,以及需要进行重复手术干预。

### [0002] 概述

[0003] 与先前制造鼓膜造口管(也称为“耳管”)的尝试不同,本发明提供了在受试者中不会导致实质炎症反应的生物可吸接管,并且可以伴随各种各样的物理和机械特性而产生。例如,根据各种实施方式,可以生产所提供的丝质耳管以在被吸收到患者体内之前在受试者中持续数周、数月或数年。而且,在一些实施方式中,所提供的丝质耳管包括多个层,其中每个层可以包括以下中的一种或多种:孔、治疗剂以及不同的机械和/或物理性质。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管沿其长度也可以具有不同的组成和/或性质。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管可以包括凸缘、斜角和/或其他特征。

[0004] 在一些实施方式中,本发明提供了制造可再吸收耳管的方法,其包括以下步骤:提供丝素蛋白溶液,并由丝素蛋白溶液形成丝质耳管,其中丝质耳管的长度小于2mm且具有小于1.5mm的外径,并且其中丝质耳管是可再吸收的。

[0005] 在一些实施方式中,本发明还提供了用于治疗中耳炎的方法,其包括将丝质耳管引入受试者的耳道中的步骤,其中丝质耳管的长度小于2mm且具有小于1.5mm的外径,并且其中丝质耳管被受试者再吸收。在一些实施方式中,中耳炎是急性中耳炎、渗出性中耳炎或慢性化脓性中耳炎。

[0006] 根据各种实施方式,所提供的丝质耳管可以通过任何已知的方法形成。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管通过凝胶纺丝或凝胶沉积形成。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管通过浸涂或溶液沉积形成。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管通过注塑、微模塑或机械加工形成。

[0007] 在一些实施方式中,所提供的方法可允许包括多层的丝质耳管。在一些实施方式中,丝质耳管包括至少两层(例如,至少3、4、5、6、7、8、9、10或更多层)。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管包括单层。

[0008] 在一些实施方式中,所提供的方法包括一个或多个附加步骤,例如以使特定的丝质耳管符合特定的应用和/或受试者。在一些实施方式中,所提供的方法还包括将多个孔引入所提供的丝质耳管的至少一层中。在一些实施方式中,通过在形成丝质耳管之前将致孔剂与丝素蛋白溶液结合来引入孔。在一些实施方式中,致孔剂选自聚环氧乙烷、NaCl、碱金属、碱土金属卤化物、磷酸盐、硫酸盐、糖晶体、水溶性微球体、多糖、蛋白质微球体、蜡粒子和合成聚合物粒子。在一些实施方式中,使用其他已知方法引入孔,例如冻干或气体透出方法。

[0009] 根据各种实施方式,丝素蛋白溶液的一种或多种性质可以变化,其包括但不限于(仅举几例)丝素蛋白溶液中丝素蛋白的量、丝素蛋白溶液中是否存在附加材料、以及丝素蛋白溶液中溶剂的组成。例如,在一些实施方式中,丝素蛋白溶液在水中含有1重量%-30重量%的丝素蛋白。在一些实施方式中,丝素蛋白溶液还可以含有一种或多种其他添加剂,包括例如甘油和/或乙二醇。在一些实施方式中,添加一种或多种添加剂可用于控制所提供的丝质耳管的形成和/或形态。

[0010] 在一些实施方式中,所提供的方法中使用的丝质耳管包含至少一种治疗剂。在一些实施方式中,所提供的方法还可以包括在形成丝质耳管之前或期间将至少一种治疗剂与丝素蛋白溶液结合。在一些实施方式中,所提供的方法还包括在引入丝质耳管之前向受试者施用至少一种治疗剂。在一些实施方式中,所提供的方法还包括在引入丝质耳管之后向受试者施用至少一种治疗剂。在一些实施方式中,所提供的方法还包括基本上在引入丝质耳管的同时向受试者施用至少一种治疗剂。在一些实施方式中,所述至少一种治疗剂选自抗生素、镇痛剂和类固醇。

[0011] 根据各种实施方式,所提供的丝质耳管在受试者中是可再吸收的(即,被分解并同化到受试者的身体中)。在一些实施方式中,丝质耳管具有一天和一周之间(包括端值)的再吸收率。在一些实施方式中,丝质耳管具有八天和2年之间(包括端值)的再吸收率。

[0012] 预期所提供的丝质耳管的一种或多种物理性质可以变化以适应具体的应用和/或受试者的需求。例如,在一些实施方式中,所提供的丝质耳管包含大量的β片层含量。在一些实施方式中,通过高压灭菌、水蒸气退火和用甲醇处理中的至少一种来引入大量β片层含量。在一些实施方式中,β-片层含量可以是在1-75%之间(例如1-10%,1-20%,1-30%,1-40%,1-50%,1-60%,10-20%,10-30%,10-40%,10-50%,10-60%,20-60%,20-50%,20-40%,20-30%或0-60%)。不希望受到特定理论的限制,预期较高的β-片层含量将导致所提供的丝质耳管在体内的较慢降解。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管的β片层含量可以以任何应用适当的方式变化。例如,在一些实施方式中,所提供的丝质耳管可以包含β片层含量的梯度。在一些实施方式中,梯度可以包括多层丝质耳管,其中至少一层具有与至少一个其他层不同(例如更高或更低)的β片层含量。

[0013] 根据各种实施方式,任何丝素蛋白可用于所提供的方法和丝质耳管中。在一些实施方式中,丝素蛋白选自蜘蛛丝(例如来自络新妇蛛(*Nephila ciavipe*))、蚕丝(例如来自家蚕(*Bombyx mori*))和来自蚕或蜘蛛丝的重组丝。

[0014] 对本文中的出版物、专利或专利申请的任何引用通过引用整体并入。本申请中使用的具有或不具有约/大约的任何数字意味着涵盖相关领域普通技术人员所理解的任何正常波动。

[0015] 本发明的其他特征、目的和优点在下面的详细描述中是显而易见的。然而,应当理解的是,尽管指出了本发明的实施方式,但是该详细描述仅仅是作为说明而非限制而给出的。根据该详细描述,本发明范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0016] 定义

[0017] 在本申请中,除非上下文另有清楚说明,否则(i)术语“一个(a)”可以理解为是指“至少一个”;(ii)术语“或”可以理解为是指“和/或”;(iii)术语“包括”和“包含”可以理解

为包括分项组件或步骤,无论其是自身呈现还是与一个或多个附加组件或步骤一起呈现;和(iv)术语“约”和“大约”用作等同物,并且可以理解为允许如本领域普通技术人员将会理解的标准偏差;和(v)在提供范围的情况下,包括端点。

[0018] 试剂:如本文所用的术语“试剂”可以指任何化学类别的化合物或实体,包括例如多肽、核酸、糖类、脂质、小分子、金属或其组合。从上下文中可以明显看出,在一些实施方式中,试剂可以是或包含细胞或生物体,或其部分、提取物或组分。在一些实施方式中,试剂是或包含天然产物,因为它存在于自然界和/或从自然界获得。在一些实施方式中,试剂是或包含一种或多种人造的实体,因为它通过人手的作用设计、策划和/或生产的和/或未见于自然界中。在一些实施方式中,试剂可以以分离或纯的形式使用;在一些实施方式中,试剂可以以粗制形式使用。在一些实施方式中,潜在的试剂被提供为集合或库,例如其可以经筛选以识别或表征它们中的活性剂。可以根据本发明使用的试剂的一些具体实施方式包括小分子、抗体、抗体片段、适体、核酸(例如,siRNA、shRNA、DNA/RNA杂合体、反义寡核苷酸、核酶)、肽、肽模拟物等。在一些实施方式中,试剂是或包含聚合物。在一些实施方式中,试剂不是聚合物和/或基本上不含任何聚合物。在一些实施方式中,试剂含有至少一个聚合物部分。在一些实施方式中,试剂缺乏或基本上不含任何聚合物部分。

[0019] 大约:如本文所用的,应用于一个或多个感兴趣值的术语“大约”或“约”是指与所述参考值类似的值。在某些实施方式中,术语“大约”或“约”是指落在参考值的任一方向(大于或小于)的25%,20%,19%,18%,17%,16%,15%,14%,13%,12%,11%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,1%或更小范围内的数值范围,除非另有说明或从上下文中另外显而易见(除非该数字超过可能值的100%)。

[0020] 相关联:如果一个事件或实体的存在、水平和/或形式与另一个事件或实体的存在、水平和/或形式相关,则两个事件或实体彼此“相关联”,如该术语在本文中所使用的。例如,如果特定实体(例如,多肽、遗传标志、代谢物等)的存在、水平和/或形式与特定疾病、紊乱或病症的发生率和/或易感性(例如跨相关人群)相关,则认为该实体与该疾病、紊乱或病症相关联。在一些实施方式中,如果两个或更多个实体直接或间接地相互作用以使它们彼此处于和/或保持物理接近,则两个或更多个实体在物理上彼此“关联”。在一些实施方式中,彼此物理关联的两个或更多个实体彼此共价连接;在一些实施方式中,彼此物理关联的两个或更多个实体彼此不是共价连接的,却是非共价关联的,例如通过氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁性及其组合。

[0021] 生物相容的:如本文所用的术语“生物相容的”是指当与活体组织接触(例如在体内)时,不会对此组织造成显著伤害的材料。在某些实施方式中,如果材料对细胞无毒,则该材料是“生物相容的”。在某些实施方式中,如果材料在体外添加至细胞导致小于或等于20%的细胞死亡,和/或它们的体内施用不会诱导显著的炎症或其他此类不良反应,则该材料是“生物相容的”。

[0022] 生物可降解的:如本文所用,术语“生物可降解的”是指当被引入细胞时被分解(例如通过细胞机器,例如通过酶促降解、通过水解和/或通过其组合)为细胞可以再使用或处理而不对细胞产生显著毒性效应的组分的物质。在某些实施方式中,由生物可降解材料的分解产生的组分是生物相容性的,因此不会在体内诱导显著的炎症和/或其他副作用。在一些实施方式中,生物可降解聚合物材料分解成其组分单体。在一些实施方式中,生物可降解

材料(包括例如生物可降解聚合物材料)的分解涉及酯键的水解。替代或另外地,在一些实施方式中,生物可降解材料(包括例如生物可降解聚合物材料)的分解涉及氨基甲酸酯键的切割。示例性的生物可降解聚合物包括例如羟基酸如乳酸和乙醇酸的聚合物,包括但不限于聚(羟基酸)、聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)以及与PEG的共聚物、聚酸酐、聚(原酸酯)、聚酯、聚氨酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(己内酯)、聚(羟基烷酸酯)、聚(丙交酯-共-己内酯)、其共混物和共聚物。许多天然存在的聚合物也是生物可降解的,包括例如蛋白质如白蛋白、胶原蛋白、明胶和醇溶谷蛋白,例如玉米蛋白,和多糖如藻酸盐、纤维素衍生物和聚羟基烷酸酯,例如聚羟基丁酸酯共混物及其共聚物。本领域普通技术人员将会理解或能够确定此类聚合物何时是生物相容的和/或生物可降解的衍生物(例如,与母体聚合物相关在于如本领域已知的仅在取代或添加特定化学基团方面不同的实质相同的结构)。

[0023] 组合疗法:如本文所用,术语“组合疗法”是指其中受试者同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如,两种或更多种治疗剂)的那些情况。在一些实施方式中,两种或更多种药剂或可以同时施用;在一些实施方式中,此类药剂可以顺序施用;在一些实施方式中,此类药剂以重叠的给药方案施用。

[0024] 组合物:根据本发明的“组合物”或“药物组合物”是指如本文所述的两种或更多种试剂的组合,用于共同施用或作为同一方案的一部分施用。在所有的实施方式中并不要求试剂的组合导致物理混合,即,组合物的每种组分作为独立的助剂施用是可能的;然而,本领域的许多患者或从业者可能发现制备组合物是有利的,所述组合物是药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂中的两种或更多种成分的混合物,使得可以将组合的组分成分在同一时间施用。

[0025] 改善、增加或减少:如本文所用的或其语法等同物指示相对于基线测量的值,例如在开始本文所述的治疗之前在同个体中的测量,或在没有本文所述的治疗的情况下在对照个体(或多个对照个体)中的测量。在一些实施方式中,“对照个体”是患有与待治疗个体相同形式的疾病或损伤的个体。

[0026] 受试者:“受试者”是指哺乳动物(例如人)。在一些实施方式中,受试者患有相关的疾病、紊乱或病症。在一些实施方式中,受试者易患疾病、紊乱或病症。在一些实施方式中,受试者显示疾病、紊乱或病症的一种或多种症状或特征。在一些实施方式中,受试者不显示疾病、紊乱或病症的任何症状或特征。在一些实施方式中,受试者是具有一种或多种特征为对疾病、紊乱或病症具有易感性或风险的特征的人。在一些实施方式中,受试者是患者。在一些实施方式中,受试者是正在和/或已经给予诊断和/或治疗的个体。

[0027] 基本上:如本文所用的,术语“基本上”是指展现出感兴趣的特性或性质的总程度或近似总程度的定性条件。生物领域的普通技术人员将会理解,生物学和化学现象很少(如果有的话)会完成和/或继续完成或达到或避免绝对结果。因此,术语“基本上”在本文中用于捕捉许多生物和化学现象固有的完整性潜在缺乏。

[0028] 治疗剂:如本文所用,短语“治疗剂”通常是指当施用于生物体时引发所需药理学作用的任何试剂。在一些实施方式中,如果试剂在合适的群体中显示出统计学显著的效果,则该试剂被认为是治疗剂。在一些实施方式中,适当的群体可以是模型生物体的群体。在一些实施方式中,可以通过各种标准来定义适当的群体,例如某一年龄组、性别、遗传背景、预

先存在的临床状况等。在一些实施方式中,治疗剂是可用于缓解、改善、减轻、抑制、预防病症、紊乱和/或病症的一种或多种症状或特征、延缓其发作、减少其严重度和/或减少其发生。在一些实施方式中,“治疗剂”是已经或需要由政府机构批准才能将其销售给人施用的试剂。在一些实施方式中,“治疗剂”是需要医疗处方以施用于人的试剂。

#### [0029] 附图简述

[0030] 图1显示了使用浸涂生成的丝管的图像。(a栏)浸涂3次,(b-d栏)浸涂5次,(a,b栏)断裂的横断面,(c栏)放大的断裂的横断面,(d栏)侧视图。

[0031] 图2示出了示例性制造工艺的部分。(A栏)制造凝胶纺丝管的数字图片。在左图中,聚丙烯管(外径1090 $\mu\text{m}$ )被组装成管的一端具有较大的内腔配件。在中间的图像中,在旋转的金属丝上纺丝高度浓缩的丝溶液。在右图中,冷冻干燥后获得凝胶纺丝管。(B栏)丝导管的示意图。通过将一端浸入浓缩的丝溶液并干燥,将管的另一端用丝封盖。(C栏)图片显示,即使干燥时,凝胶纺丝管也是柔性的。

[0032] 图3示出了用于耳管制造所提供的示例性方法。(A栏)显示了通过所提供的喷射模塑法工艺生产耳管的示意图。在注射、冷冻干燥、甲醇处理、干燥(B栏)和机械加工的制造步骤之后制造管(以侧视图(C栏)和顶视图(D栏)示出)。(E栏)SEM图像显示出该示例性实施方式中的低孔隙度。

[0033] 图4(A)栏示出了对图3中所示的示例性耳管进行Instron机械测试的结果并计算压缩模量(在图3、C、D和E栏中示出)。(B)栏示出了示例性压缩模量,(C)栏与市场上现有PTFE管的压缩模量一样,其比使用类似方法制造的丝骨螺丝小得多(C栏)。

[0034] 图5示出了(A栏)示例性耳管的台式冻干结果,(B栏)和(C栏)示出了在-20 $^{\circ}\text{C}$ 和-30 $^{\circ}\text{C}$ 之间的温度下对所提供的耳管进行示例性的6小时基于甲醇的脱水,(B栏)示出了用25%丝素蛋白溶液制成的耳管的结果,且(C栏)示出了用33%丝素蛋白溶液制成的耳管的结果。

[0035] 图6示出了所提供的涂布方法的示例性照片,其包括混合PEO/丝溶液(A栏),用漆刷涂布涂层(B栏),甲醇处理(C栏)和干燥(D栏)步骤以实现具有多孔涂层的耳管。

[0036] 图7示出了根据图6中所示方法制备的某些所提供的组合物的示例性照片,其包括在耳管上的PEO涂层,其尤其为鼓膜附着和降解提供了多孔层。

[0037] 图8示出了如在灭菌后在ImageJ软件中测量的图7中所示的某些提供的实施方式的示例性图像和尺寸(内径被调节至1.1mm)。

[0038] 图9示出了与 $5.21 \times 10^7$ CFU/mL革兰氏阴性卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)细菌菌株在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育24小时后,通过浸涂法的某些药物洗脱管的功效有关的示例性结果(首行)。如图9首行中所示,与没有药物涂层的相似管(管-D)和具有革兰氏阴性菌(LB,G-)的溶原培养基(lysogeny broth)的阳性对照相比,涂布有涂覆药物(管+D)的示例性的所提供的丝质耳管显示出抗微生物活性。随后的培养基再培养24小时显示药物洗脱管与不含药物的管(底行,中)和阳性对照(底行,左)相比,有效防止细菌生长和杀死细菌(底行,右)。

#### [0039] 某些实施方式的详细描述

[0040] 本发明尤其提供了具有高度可定制的物理和机械性能的可再吸收丝质耳管,以及制造和使用所提供的丝质耳管的方法。

[0041] 根据各种实施方式,本发明提供了制造可再吸收耳管的方法,其包括以下步骤:提供丝素蛋白溶液,并由丝素蛋白溶液形成丝质耳管,其中丝质耳管的长度小于2mm且具有小

于1.5mm的外径,并且其中丝质耳管是可再吸收的。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管基本上完全可再吸收。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管仅部分可再吸收。

[0042] 丝素蛋白溶液

[0043] 本文所述的方法和组合物中使用的丝素蛋白溶液可以从含有溶解的蚕丝的溶液中获得,所述蚕丝例如来自家蚕 (*Bombyx mori*)。或者,丝素蛋白溶液可以从含有溶解的蜘蛛丝(例如来自络新妇蛛 (*Nephila clavipes*))的溶液获得。丝素蛋白溶液还可以从含有如来自细菌、酵母、哺乳动物细胞、转基因动物或转基因植物的基因工程丝的溶液获得。参见例如W0 97/08315和美国专利5,245,012。在一些实施方式中,基因工程丝可以例如包含治疗剂,例如与细胞因子、酶或任何数量的基于激素或肽的药物、抗微生物剂和相关底物的融合蛋白。

[0044] 根据各种实施方式,丝素蛋白溶液可以通过本领域技术人员已知的任何常规方法来制备。在一些实施方式中,该溶液是水溶液。例如,桑蚕茧在水溶液中煮沸约30分钟。在一些实施方式中,水溶液是约0.02M的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 。例如可以用水漂洗茧以提取丝胶蛋白,并将提取的丝溶解在盐水溶液中。可用于此目的的示例性盐包括溴化锂、硫氰酸锂、硝酸钙或能够溶解丝的其他化学品。优选地,在一些实施方式中,将提取的丝溶于约9-12M LiBr溶液中。因此使用例如透析除去盐。

[0045] 如果需要,然后可以使用例如针对吸湿性聚合物(例如PEG、聚环氧乙烷、直链淀粉或丝胶)的透析来浓缩溶液。优选地,PEG的分子量为8,000-10,000g/mol并且具有25-50%的浓度。优选使用slide-a-lyzer透析盒(Pierce, MW CO 3500)。但是,可以使用任何透析系统。持续透析一段时间,其足以使水性丝溶液的最终浓度在10-30%之间。在大多数情况下,透析2-12小时是足够的。

[0046] 根据各种实施方式,丝溶液可以包含任意各种浓度的丝素蛋白。在一些实施方式中,丝溶液可以包含0.1至40重量%的丝素蛋白。在一些实施方式中,丝溶液可包含约0.5%和40重量%之间(例如0.5%至25%,0.5%至20%,0.5%至15%,0.5%至10%,0.5%至5%,0.5%至1.0%)的丝素蛋白(包括端点)。在一些实施方式中,丝溶液可包含15-30重量%之间(例如20-25重量%)的丝素蛋白(包括端点)。在一些实施方式中,丝溶液可包含至少0.1重量%(例如,至少0.5%,1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%)的丝素蛋白。在一些实施方式中,丝溶液可包含至多30重量%(例如,至多40%,35%,30%,25%,20%,15%,14%,13%,12%,11%,10%,5%,4%,3%,2%,1%)的丝素蛋白。

[0047] 在一些实施方式中,本文所述的丝质耳管组合物以及使用它们的方法可以在不存在任何有机溶剂的情况下进行。因此,这些组合物和方法特别适合掺入不稳定分子如生物活性剂或治疗剂,并且在某些实施方式中可用于生产控释生物材料。优选地,该方法仅在水中进行。

[0048] 或者,在一些实施方式中,丝素蛋白溶液可以使用有机溶剂例如六氟异丙醇(HFIP)来生产。此类方法描述在例如Li, M.等人, *J. Appl. Poly. Sci.* 2001, 79, 2192-2199; Mm, s.等人 *Sen I Gakkaishi* 1997, 54, 85-92; Nazarov, R.等人, *Biomacromolecules* 2004, 5月-6月; 5(3): 71 8-26中。

[0049] 在一些实施方式中,还可以将非丝生物相容性聚合物添加到丝溶液中以在本文所

述的丝质耳管中生成复合基质。可用于本文所述组合物中的生物相容性聚合物包括例如聚环氧乙烷 (PEO) (US 6,302,848)、聚乙二醇 (PEG) (US 6,395,734)、胶原蛋白 (US 6,127,143)、纤连蛋白 (US 5,263,992)、角蛋白 (US 6,379,690)、聚天冬氨酸 (US 5,015,476)、聚赖氨酸 (US 4,806,355)、藻酸盐 (US 6,372,244)、壳聚糖 (US 6,310,188)、壳聚糖 (US 5,093,489)、透明质酸 (US 387,413)、果胶 (US 6,325,810)、聚己内酯 (US 6,337,198)、聚乳酸 (US 6,267,776)、聚乙醇酸 (US 5,576,881)、聚羟基链烷酸酯 (US 6,245,537)、葡聚糖 (US 5,902,800) 和聚酞 (US 5,270,419)。在一些实施方式中,可以使用两种或更多种生物相容性聚合物。

#### [0050] 外形尺寸

[0051] 所提供的丝质耳管的外径可根据特定应用和/或受试者的需要而变化,例如从约 0.1mm 至约 4mm 或更多。如本文所述,在一些实施方式中,丝质耳管或特定内腔直径的构造可以通过在制造丝质耳管的过程中使用具有所需直径的棒来制备。具体尺寸包括例如 0.1mm, 0.2mm, 0.3mm, 0.4mm, 0.5mm, 0.6mm, 0.7mm, 0.8mm, 0.9mm, 1.0mm, 1.2mm, 1.4mm, 1.6mm, 1.8mm, 2.0mm, 2.2mm, 2.4mm, 2.6mm, 2.8mm, 3.0mm, 3.2mm, 3.4mm, 3.6mm 和 3.8mm。优选的尺寸也可以表示为范围,例如 0.1 至 2.9mm, 0.1 至 2.5mm, 0.1 至 2mm, 0.1 至 1.5mm, 0.1 至 1mm, 1.0 至 3mm, 1.0 至 2mm, 1.0 至 1.5mm 等。在一些实施方式中,所提供的实施方式可以自这些值中的一个或多个值变化至多 20% (例如,至多 15%, 10%, 5%)。

[0052] 所提供的丝质耳管的长度也可以以应用和/或受试者特异性方式变化。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管可以具有 0.5 和 3mm 之间的长度 (例如, 0.5 和 2.5mm, 0.5 和 2mm, 0.5 和 1mm, 1 和 2.5mm, 1 和 2mm, 1 和 1.5mm 之间)。具体长度包括例如 0.1mm, 0.2mm, 0.3mm, 0.4mm, 0.5mm, 0.6mm, 0.7mm, 0.8mm, 0.9mm, 1.0mm, 1.2mm, 1.4mm, 1.6mm, 1.8mm, 2.0mm, 2.2mm, 2.4mm, 2.6mm, 2.8mm 和 3.0mm。在一些实施方式中,所提供的实施方式可以自这些值中的一个或多个值变化至多 20% (例如,至多 15%, 10%, 5%)。

[0053] 如本文所用,浓度、量、尺寸、孔隙率和其他数值数据可以以范围的形式呈现在本文中。应当理解的是,此种范围格式仅仅为了方便和简洁而使用,并且应该被灵活地解释为不仅包括作为范围界限明确列举的数值,而且还包括所有单个数值或包含在该范围内的子范围,就好像每个数值和子范围被明确列举一样。

[0054] 例如,约 1.0 至约 3.0mm 的范围应被解释为不仅包括 1.0 至约 3.0mm 的明确列举的尺寸范围,而且还包括个体尺寸,例如 1.4mm, 1.8mm, 2.0mm 和 2.7mm, 以及诸如 1.0-1.4mm, 1.0-1.8mm, 1.8-2.4mm, 1.4-3.0mm 等的子范围。此外,无论该范围的宽度或所描述特征如蛋白质浓度、管状孔隙率、管腔直径、致孔剂浓度以及其他成分或试剂的量和浓度如何,都应适用此种解释。

[0055] 根据各种实施方式,所提供的丝质耳管可以以任意各种方式来改变形状。例如,在一些实施方式中,所提供的丝质耳管可以包括在一端或两端上的斜角边缘、包括具有比另一端更大的外径的一端、包括一个或多个凸缘、和/或包括光滑的内表面和多孔的外表面。

#### [0056] 层

[0057] 根据各种实施方式,所提供的丝质耳管可以包括两层或更多层。在一些实施方式中,尤其还可以通过调节用于形成该层的丝素蛋白溶液中的丝素蛋白的浓度来控制每个沉积层的厚度。例如,在所提供的丝质耳管通过浸涂而形成的实施方式中,丝素蛋白在丝素蛋

白水溶液中的浓度越高,沉积在棒上或丝素蛋白前一层上的丝素蛋白越多,并且形成更紧密的结构。

[0058] 在一些实施方式中,丝质耳管的每一层具有基本相似的厚度和/或官能化。在一些实施方式中,丝质耳管的至少一层具有与至少一个其他层不同的厚度和/或官能化。根据各种实施方式,官能化可包括添加一种或多种治疗剂。

[0059] 在一些实施方式中,丝质耳管可以具有1至10层(例如,1至9层、1至8层、1至7层、1至6层、1至5层、1至4层、1至3层、或1至2层之间)。在一些实施方式中,提供的丝质耳管包括单层。在一些实施方式中,丝质耳管的每一层可以在1纳米(nm)和1毫米(mm)之间。例如,在一些实施方式中,丝质耳管的每一层可以在10nm和1mm之间(例如,在25nm和1mm之间,50nm和1mm之间,100nm和1mm之间,200nm和1mm之间,30nm和1mm之间,400nm和1mm之间,500nm和1mm之间,或者600nm和1mm之间)。在一些实施方式中,丝质耳管的每一层可以在10nm和1mm之间(例如,在10nm和900nm之间,10nm和800nm之间,10nm和700nm之间,10nm和500nm之间,10nm和400nm之间,10nm和300nm之间,或者10nm和200nm之间)。

[0060] 孔

[0061] 在一些实施方式中,可以通过使用一种或多种致孔剂而将所提供的丝质耳管制成多孔的。预期任何已知的致孔剂可适于根据各种实施方式而使用。在一些实施方式中,致孔剂可以是或包含晶体(例如氯化钠晶体、糖晶体)、微米球和/或纳米球、聚合物(例如聚环氧乙烷或PEO)、冰晶、硫酸盐、磷酸盐、碱金属、碱土金属卤化物、多糖、蜡粒子、合成聚合物粒子和/或激光。在一些实施方式中,致孔剂可以包括孔的机械引入(例如,使用针或其他物品或装置一次或多次刺穿丝质耳管,或使用应力在丝质耳管中引入一个或多个裂口)。

[0062] 如本文所用,术语“多孔”是指本文所述的丝质耳管的至少一层允许材料通过管壁(与它们穿过或沿着管的内腔通过形成对照)的性质。本文所述的丝质耳管可涵盖一定范围的孔隙,从那些基本上不允许细胞或蛋白质通过的孔隙到那些基本上允许蛋白质通过但不允许细胞通过的孔隙,到那些允许两者通过的孔隙。如本文所用,术语“非多孔”是指如本文所述的管在20分钟测定的过程中基本上不允许Alexa-Fluor-488标记的BSA通过管壁。“基本上不允许”是指在本文所述的检测条件下,在20分钟测定后,在管外未检测到来自管内的经标记的BSA。或者,如本文所述的管状组合物的孔隙度可以根据如本文所述测量/计算的渗透系数或本领域中已知的其他渗透系数表示。如果Alexa-Fluor-488标记的BSA的渗透系数为 $7.3 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ 或更低,则如本文所述的管状组合物被认为对蛋白质或细胞的通过是“非多孔的”。如本文所用,术语“蛋白质可渗透”是指如本文所述的管状组合物允许Alexa-Fluor-488标记的BSA以如本文所述测量的至少 $8.9 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ 的渗透系数通过管壁。其他孔隙度评估模式可包括扫描电子显微镜评估所提供的丝质耳管的横截面,随后进行图像处理;或汞孔隙度测量。

[0063] 各种实施方式可以包括具有各种尺寸孔的丝质耳管。在一些实施方式中,丝质耳管中的孔可具有约1-100 $\mu\text{m}$ 之间(包括端值)的直径。在一些实施方式中,丝质耳管中的孔可具有约1-50 $\mu\text{m}$ 之间(例如1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15 $\mu\text{m}$ ) (包括端值)的直径。在一些实施方式中,丝质耳管中的孔可具有约5-25 $\mu\text{m}$ 之间的直径(包括端值)。在一些实施方式中,丝质耳管中的孔可具有约1-10 $\mu\text{m}$ 之间的直径(包括端值)。

[0064] 形成丝质耳管的方法

[0065] 根据各种实施方式,所提供的丝质耳管可以通过任何适用的方法形成。在一些实施方式中,例如,制造所提供的丝质耳管的方法包括但不限于注塑、浸涂、凝胶纺丝、3D印刷和机械加工、逐层技术和填充模具。另外,在以下实施例中示出了用于形成丝质耳管的某些示例性方法。

[0066] 在一些实施方式中,可以使用常规灭菌方法例如基于辐射(即 $\gamma$ 射线)的灭菌、基于化学的灭菌或高压灭菌来对如本文所述的所提供的丝质耳管进行灭菌。在一些实施方式中,灭菌方法可以是在52-55 $^{\circ}$ C之间的温度下用环氧乙烷处理8小时或更少的时间。在一些实施方式中,可以使用高温和高压通过高压灭菌对所提供的丝质耳管进行灭菌。灭菌后,生物材料可以包装在合适的用于装运的无菌防潮包装中。

[0067] 治疗剂

[0068] 在一些实施方式中,所提供的丝质耳管包含一种或多种治疗剂。在一些实施方式中,可以在形成丝质耳管之前使丝素蛋白溶液与治疗剂接触,或者可以在形成丝质耳管之后将丝素蛋白溶液加载到其上(例如作为涂层)。在一些实施方式中,在形成丝质耳管期间将至少一种治疗剂包埋在丝中,例如在一些实施方式中,用气流干燥含水丝素蛋白层,例如用 $N_2$ 气体脱水丝素蛋白层诱导了丝素蛋白的构象变化为捕获试剂的 $\beta$ 片层结构。在一些实施方式中,可以采用相同的试剂、不同的试剂或无试剂添加另外的层。在一些实施方式中,这种逐步沉积方法还允许在各层内截留不同浓度的治疗剂。根据各种实施方式,可以任选地使用不溶解丝材料的任何药物载体。在一些实施方式中,治疗剂可以以液体、细碎固体或任何其他适当的物理形式存在。

[0069] 可以与本发明的丝质耳管结合使用的各种不同的治疗剂是广泛的,并且包括小分子、蛋白质、肽和核酸。通常,可与本文所述的管状组合物结合的治疗剂包括但不限于:抗感染剂例如抗生素(例如环丙沙星)和抗病毒剂;抗排斥剂;镇痛药和镇痛药组合;抗炎剂(例如地塞米松);激素如类固醇;生长因子(骨形态发生蛋白(即BMP17)、骨形态发生样蛋白(即GFD-5、GFD-7和GFD-8)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(即FGF1-9)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子(IGF-I和IGF-II)、转化生长因子(即TGF- $\beta$ -III)、血管内皮生长因子(VEGF));神经生长因子、抗血管生成蛋白如内皮抑素、以及其他天然来源或基因工程蛋白、多糖、糖蛋白或脂蛋白。

[0070] 在一些实施方式中,所提供的丝质耳管可以包含一种或多种蛋白酶。在一些实施方式中,蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶(例如蛋白酶K、蛋白酶XIV或 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶)、胶原酶或基质金属蛋白酶(MMP)(例如MMP\_1、MMP-2等)中的一种或多种。在一些实施方式中,在植入受试者中后,一种或多种蛋白酶嵌入丝质耳管中或与丝质耳管相结合。在一些实施方式中,可以使用一种或多种蛋白酶,其需要一个或多个激活事件以引起蛋白酶活化。在一些实施方式中,激活事件可以是例如水合作用、pH变化(即升高或降低)、辅因子的添加和/或任何其他适用的激活事件。附加信息可以在Brown等人的Impact of silk biomaterial structure on proteolysis,Acta Biomaterialia,11:212-224,(2014)中找到,其公开内容在此整体并入。

[0071] 使用方法

[0072] 本领域技术人员将能够设想所提供的丝质耳管的若干用途。在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗中耳炎的方法,其包括将丝质耳管引入受试者的耳道中的步骤,其

中丝质耳管的长度小于2mm并且具有小于1.5mm的外径,并且其中丝质耳管被受试者再吸收。在一些实施方式中,中耳炎是急性中耳炎、渗出性和传导性听力丧失中耳炎或慢性化脓性中耳炎。

[0073] 所提供的丝质耳管与先前的鼓膜造口术管相比具有若干优点,包括预防先前的鼓膜造口术管和插入方法的许多常见并发症。鼓膜造口术管的常见并发症包括管的延迟挤出,需要随后的第二次手术来移除管,以及可在非挤压管周围发展的鼓膜硬化和肉芽组织。一个更为可怕的并发症是与鼓膜造口术管相邻的鼓膜的萎缩区域的发展,并且可能反过来导致胆脂瘤形成。本发明的各种实施方式能够减少或消除至少部分地源自使用先前已知的鼓膜造口术管的这些示例性并发症中的一种或多种。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管的插入或植入不会导致受试者中的炎症反应。

[0074] 根据各种实施方式,所提供的丝质耳管可被设计成在体内或货架上持续较长时间。例如,在一些实施方式中,可以生产所提供的丝质耳管,其在6个月和5年之间的时段内在体内保持基本的完整性,换言之,这些示例性丝质耳管具有6个月和5年之间的再吸收率。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管可具有一天和一周之间、八天和两年之间、一年和四年之间、一年和三年之间、或一年和两年之间的再吸收率。在一些实施方式中,可以生产货架稳定一年、两年、三年、四年、五年或更久的所提供的丝质耳管。

[0075] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料可用于本发明的实践或测试,但下面描述了优选的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用并入。另外,材料、方法和实例仅是说明性的而无意于进行限制。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

## 实施例

### [0076] 实施例1-示例性浸涂和凝胶纺丝方法

[0077] 丝溶液的制备-可以根据先前研究中描述的程序从家蚕的蚕茧产生丝溶液。家蚕蚕茧的丝可以由Tajima Shoji Co(日本横滨)提供。简言之,将茧在煮沸的0.02M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)溶液中脱胶20分钟。然后在Milli-Q水中漂洗丝素蛋白提取物三次,将其溶解在9.3-M LiBr溶液中以产生20%(w/v)溶液,随后在蒸馏水中透析(MWCO 3,500)2天以获得丝素蛋白水溶液(约8重量/体积%)。

[0078] 丝管的制备-在本实施例中,使用示例性的多重浸涂或凝胶纺丝方法形成丝管。对于多重浸涂工艺,制备丝素蛋白(10ml 8重量/体积%)和PEO(MW=900,000;Sigma-Aldrich)(4ml 5重量/体积%)溶液的混合物(丝:PEO 4:1w/w)(如果需要在丝管基质内形成孔隙,不需要孔隙,则在该过程中无需包含PEO)。通过以下生成丝管:将镍钛诺、特氟龙(Teflon)或其他线或销(直径0.76mm)浸涂入溶液中,在MeOH中处理线或销上的经涂覆混合物溶液30秒以稳固线表面上的丝,然后在空气中干燥涂层1小时。重复该浸渍过程以在线上产生约1.36mm外径的管状基质。浸涂后,在MeOH中处理管2小时,然后将其置于水浴中2天以提取出PEO(如果使用的话)。将管自线上移出并在空气中干燥。图1显示了根据该浸涂方法生产的丝质耳管的示例性图像。对于凝胶纺丝工艺,通过使用CentriVap真空浓缩器(Labconco, Kansas City, MO)进一步浓缩丝溶液(25-30w/v%)。通过使用如前所述[10]的

定制凝胶纺丝平台和程序,将浓缩的丝溶液[25-30% (w/v), 0.1ml/5cm支架]纺丝到轴向转速(ASR)为2mm/秒的旋转(200rpm)和轴向往复线上来生产管状支架。将管冷冻干燥,用甲醇处理2小时并从线上取下。图2示出了根据该凝胶纺丝法生产的丝质耳管以及此类丝质耳管的一些机械特性(参见图2的C栏)的示例性图像和示意图。

[0079] 在本实施例中描述的是用于生产丝素蛋白溶液和形成根据本发明的丝质耳管的示例性、非限制性方法。

[0080] 实施例2-通过喷射模塑法示例性生产丝质耳管

[0081] 在本实施例中,使用喷射模塑工艺生产丝质耳管。

[0082] 根据先前描述的方法,由MachinableWax.com (USA) 制备的蜡制成模具。该模具的高度为3.30cm,直径为0.76cm。模具具有两个部件,即放置在1mm底部晶片顶部上的2mm厚的顶部部件,其提供直径为0.76mm的支撑孔,对应于顶部中PTFE的所需布置。该模具还有一个薄晶片连接到一个高度为0.25厘米的6孔顶部。在注射丝之前,将两个部件互相叠放并与石蜡膜一起密封,并通过放入底部孔座中将PTFE固定在孔的中部。然后,将使用CentriVap台式真空浓缩至25-33w/v%的30分钟煮沸丝加载到模具的每个孔中。将丝添加到孔中后,将模具置于-20℃下4小时,然后放入-30℃真空冻干机中直至完全干燥。

[0083] 然后将模具置于甲醇浴中12小时(图3,A栏),在去离子(DI)水中洗涤,并在机械加工之前使其空气干燥。重要的是,需要注意到,在一些实施方式中,经注射样品可以直接进入甲醇而不需要介入的冻干步骤。使用扫描电子显微镜图像(SEM)的ImageJ软件测量机械加工管的内径为0.8mm,外径为2mm且长度为1.7mm(图3,E栏)。在一些实施方式中,可以调整尺寸,例如将内径调整至0.79mm,将外径调整至1.36mm。然而,在一些实施方式中,诸如高压灭菌的灭菌技术可能导致管收缩,因此在加工到不同尺寸之前应当考虑到尺寸的减小。在一些实施方式中,在60℃烘箱中干燥可以用于减少收缩,和/或可以在设计丝质耳管时考虑收缩。在本实施例中,使用领口纽扣法兰,但是在其他实施方式中,可以使用其他设计,例如,流行的斜面索环。对两个丝质耳管进行Instron机械测试以测量用该方法生产的管的机械学。如图4,A栏和B栏中所示,管的压缩模量在624和717MPa之间,这与商业化的PTFE管机械学一致,并且比使用类似方法生产的螺丝低得多(图4,C栏)。

[0084] 另外,使用a)在真空下不同时冷冻样品的台式冻干机,b)定时甲醇处理,和c)大批量丝浓缩法来干燥如上所述生产的丝质耳管样品。

[0085] 不希望受限于特定理论,似乎本实施例中使用的模具需要可以在真空中干燥样品,同时保持温度在-20和-30℃之间以确保样品在干燥过程中保持冷冻的冻干机。将样品放置在台式冻干机中导致在干燥过程中管部分解冻(图5,A栏)。此外,进行6小时的甲醇处理,并且该甲醇处理时间产生更多类似于聚苯乙烯泡沫材料的管(参见图5,B栏和C栏),而不是自实现图3中所示的管的步骤所显示的机械性能优异的材料。在甲醇时间较短的管上没有进行机械学测试,因为它们缺乏被加工能力。因此,在一些实施方式中,施用甲醇处理至少12小时以促进附加的β片层形成可能是有利的。此外,采用大批量丝浓缩法进行了实验,其中5-7w/v%丝被添加到透析管,并放置在橱中1天以预浓缩丝,然后在CentriVap机器中的2mL管中放置并浓缩。根据一些实施方式,向较大批量浓缩法的转变可在CentriVap纺丝后回收更大量的丝,帮助确保自2mL管挤出足够的丝以减少随后注射步骤中的气泡积聚。

[0086] 本实施例中生产的示例性耳管的扫描电子显微镜(SEM)成像显示非常低的孔隙

度。不希望受限于特定理论,对于一些实施方式,例如对于生物可降解的药物洗脱丝质耳管,对于一些实施方式可能需要较高程度的孔隙度。尽管孔隙度很小,但本实施例的示例性技术提供了可再现、可扩展、可加工、且比先前观察到的更可靠的载药方法。

[0087] 本实施例尤其表明,具有类似于当前销售的PTFE耳管的机械特性的丝质耳管可以以快速和经济的方式生产。它还表明这些管可经进一步定制以适应特定的应用甚至特定的受试者。

#### [0088] 实施例3-通过含水方法生产多孔丝质耳管的示例

[0089] 丝溶液的制备-可以根据先前研究中描述的程序从家蚕的蚕茧产生丝溶液。家蚕蚕茧蚕丝可以由Tajima Shoji Co (日本横滨) 提供。简言之,将茧在煮沸的0.02M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 溶液中脱胶30分钟以提供5-7%w/v丝溶液。然后浓缩溶液1天至约8-9%w/v丝的溶液。随后,使用CentriVAP真空浓缩器将丝溶液进一步浓缩以达到丝浓度在20-25%w/v之间的丝溶液。

[0090] 丝管的制备-然后将上述浓缩丝溶液注入1mL蜡模中,然后将模具置于甲醇浴中48小时。48小时后,将丝筒从模具中移出并置于去离子水(DI)的烧杯中并搅拌24小时。然后,将经洗涤的丝筒从模具中移出并置于1mL蜡模中以在橱中干燥。不希望受限于特定理论,预期在模具中干燥丝筒可能有助于避免在干燥过程中材料的翘曲。干燥后,将丝筒加工成所需的耳管尺寸。

#### [0091] 用丝和聚环氧乙烷(PEO)涂布管

[0092] PEO溶液制备-通过向50mL去离子(DI)水中加入60mg/mL的聚(乙烯)氧化物(PEO)制备6%wt的PEO溶液(总共300mg PEO)。在加入PEO之前,在具有搅拌棒的热板上在约80°C下加热DI水10分钟。一旦将PEO加入去离子水中,搅拌混合物1小时,且其变成粘性、均匀溶液。同时,制备20%w/v丝溶液。

[0093] 涂布溶液的制备和涂布/诱导形成丝管上涂层的孔-接下来,通过如下计算待混合的丝和PEO的体积来制备丝/PEO的80/20w/w混合物:

[0094] 使用1mL的20%丝:

[0095] a.  $(x_{\text{总}} \text{mg}) * 0.8 = 200 \text{mg 丝}$

[0096] b.  $x_{\text{总}} = 250 \text{mg}$ , 因此PEO的mg数 =  $250 \text{mg 总} - 200 \text{mg 丝} = 50 \text{mg PEO}$

[0097] c.  $50 \text{mg PEO} / (60 \text{mg/mL PEO}) = 0.83 \text{mL PEO}$

[0098] 在将丝和PEO体积加入到2mL eppendorf管后,用针搅拌混合物,然后涡旋直至溶液完全混合。接下来,在涂布丝管之前:将管放置在直径为0.79mm的聚四氟乙烯(PTFE)涂布棒上,丝管间隔均匀。为了在PEO/丝溶液被涂上的同时确保管的最小移动,将胶带放置在每个管的任一侧上,这也防止了涂布管的彼此滑动(见图6)。接下来,将该棒放置在称重舟上,并使用修补漆刷将均匀的丝/PEO溶液层施涂到每个管上(参见图1, B栏)。然后,在涂布之后立即将100%甲醇倒入皿中,使管在其中水平放置1小时,其中在丝中发生β片层形成且PEO是高度可溶的,在耳管的外部形成多孔涂层。放入甲醇浴后约1小时,将管置于Falcon管中的去离子水中并振荡48小时。振荡后,将管自水中移出并在通风橱中干燥24小时。

[0099] 干燥后,将丝管高压灭菌并使用扫描电子显微镜(SEM)检查。如图7-8中所示,所提供的方法能够提供多孔丝质耳管。具体而言,图7显示了在本实施例中生产的管中存在的多个孔。不希望受限于特定理论,预期这些孔的存在和性质可促进鼓膜附着和/或一段时间后

的体内管降解。图8显示了本实施例中提供的管的示例性SEM照片,包括通过所提供的方法可获得的显著的孔隙度的视图。

[0100] 实施例4-具有丝和环丙沙星的涂布管

[0101] 用Ciprodex (示例性活性剂) 涂布多孔管-将9mg/mL环丙沙星HCL和3mg/mL地塞米松加入浓缩至20-25%丝w/v之间的丝溶液中。接下来将如以上实施例3中所述制备的没有PEO涂层的丝管放置在Teflon棒上。然后将丝管和Teflon棒浸入丝-环丙沙星-地塞米松溶液中,然后水平放置在充满100%甲醇的称重舟中1小时。重要的是,甲醇浴用环丙沙星和地塞米松二者饱和,以防止药物从丝-药物浸渍涂层释放到甲醇溶液中。甲醇处理后,在通风橱中干燥丝管。干燥后,使用环氧乙烷灭菌对丝管进行灭菌。

[0102] 为了测试所提供的涂布有至少一种活性剂(在此是环丙沙星和地塞米松)的丝质耳管的有效性,将这些药物涂布的丝管与不具有此种涂层的丝质耳管进行比较,并且还含有溶原培养液的阳性对照比较预防和/或减缓细菌生长的能力。为了测试此,在多孔板中将每个药物涂布的丝质耳管、非药物涂布的丝质耳管和阳性对照耳管与约 $5.21 \times 10^7$ CFU/mL的革兰氏阴性菌卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) 孵育24小时(参见图9顶行)。大约24小时后,将培养基自多孔板中取出并在37°C下在培养板上再培养24小时。图9显示药物涂层有效减少和/或防止细菌生长至少24小时。

[0103] 如这些实施例中所示,所提供的方法可用于创建多种丝质耳管中的任一种。在一些实施方式中,所提供的丝质耳管可以包括与先前已知的非丝质耳管的物理和/或机械特性类似的物理和/或机械特性,同时是可生物降解并适于包括一种或多种活性剂(例如在所提供的实施方式的涂层或孔中)。

[0104] 等同物和范围

[0105] 本领域技术人员将认识到,或仅仅使用常规实验就能够确定本文所述的本发明的具体实施方式的许多等同物。本发明的范围不是旨在限于以上描述,而是如在以下权利要求中阐述的那样。

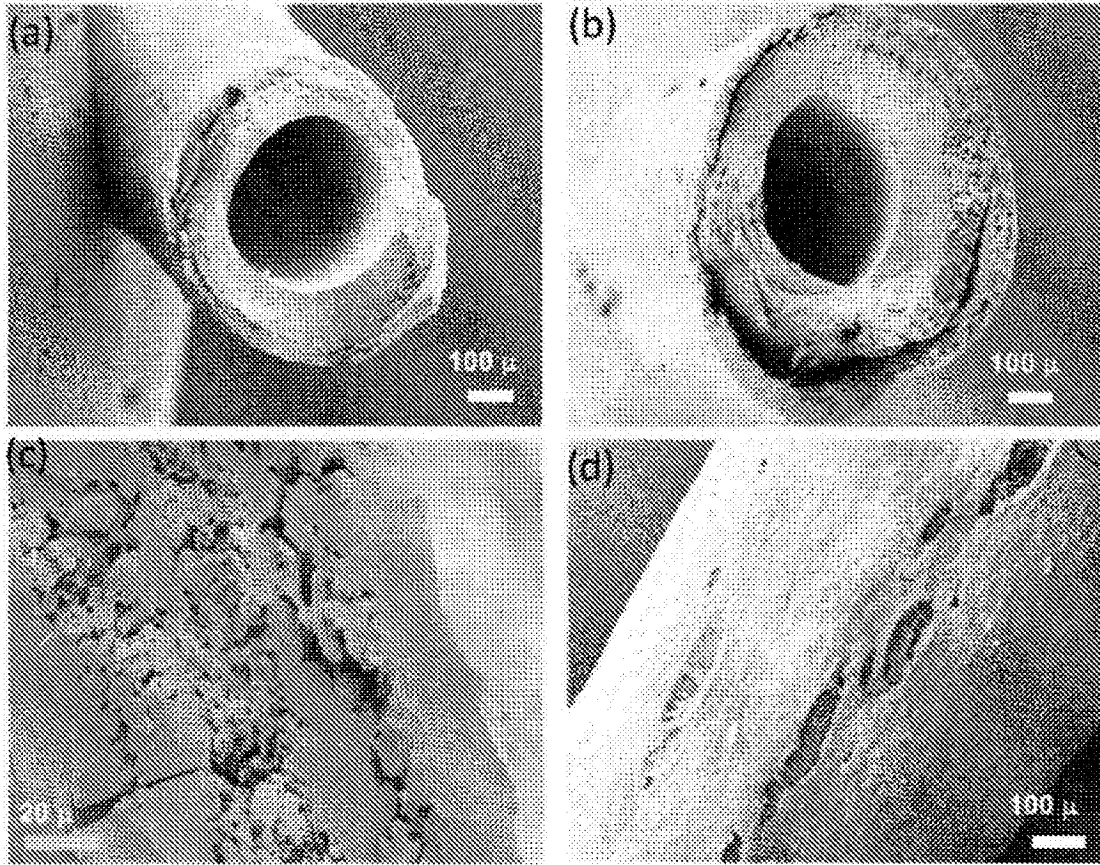


图1

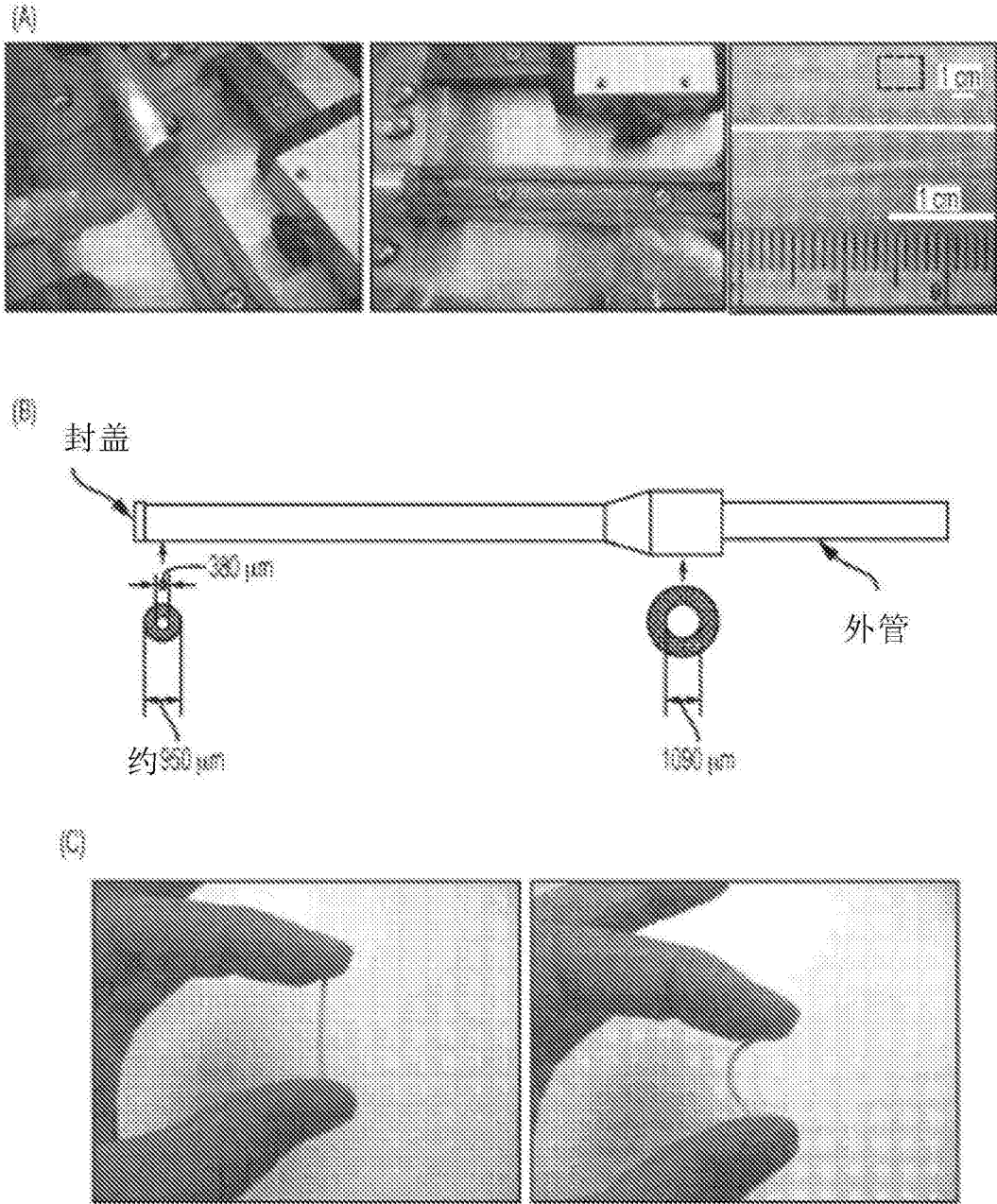


图2

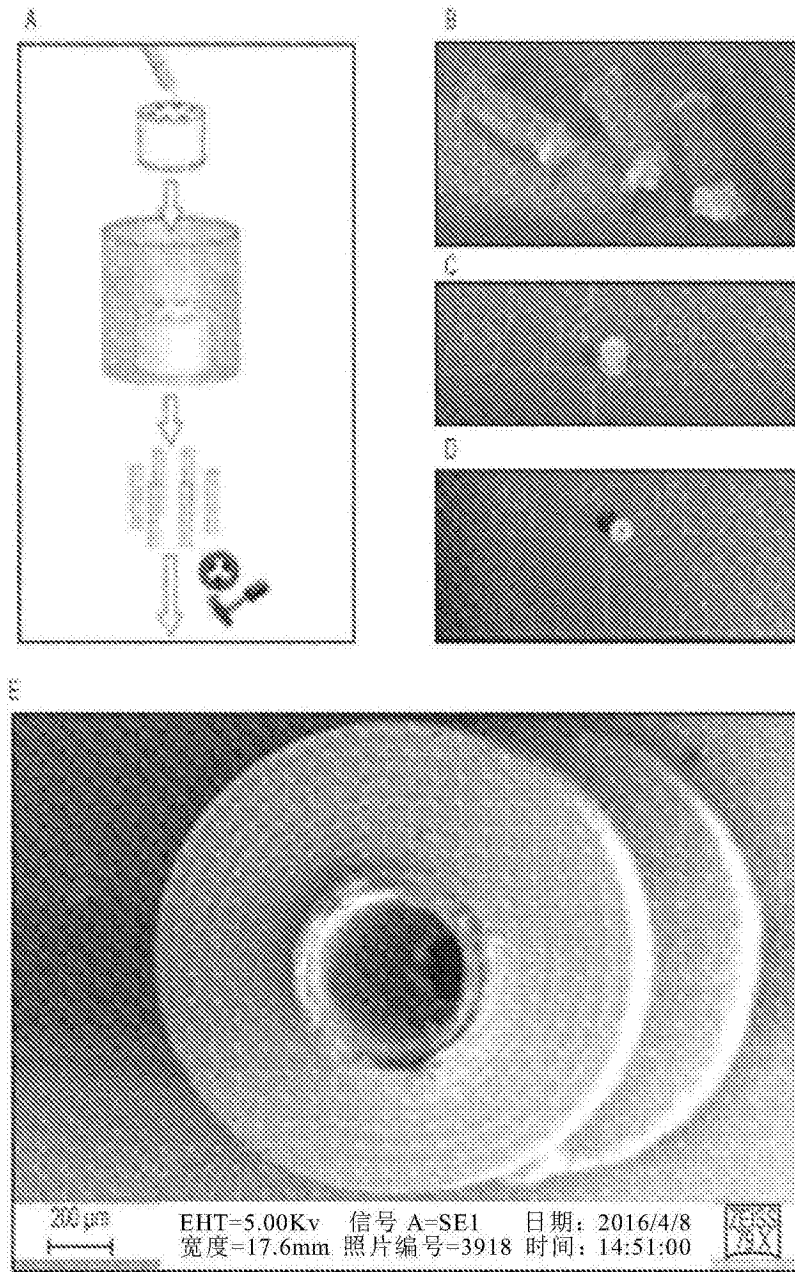
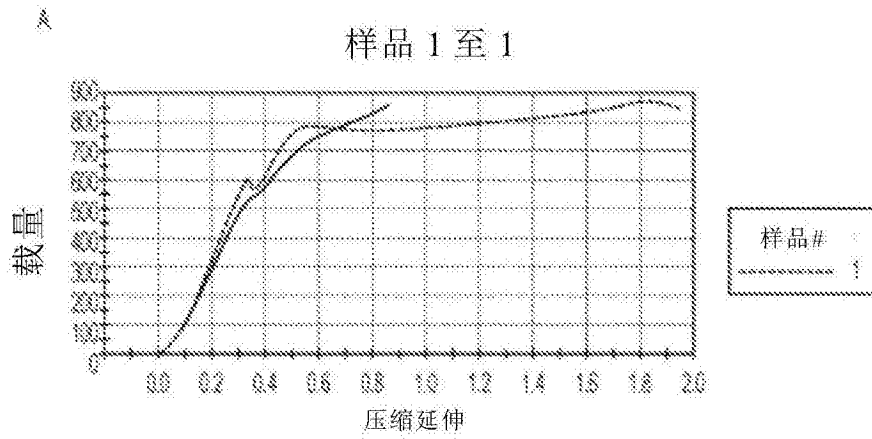


图3



B.

	模量 (部分 0%-5%) [MPa]
1	217.58816
2	624.58864

C.

材料	压缩模量[MPa]
PTEE(未填充)	482
PTEE(25%玻璃填充)	758
PTEE(25%碳填充)	600
丝骨螺丝	2170

图4

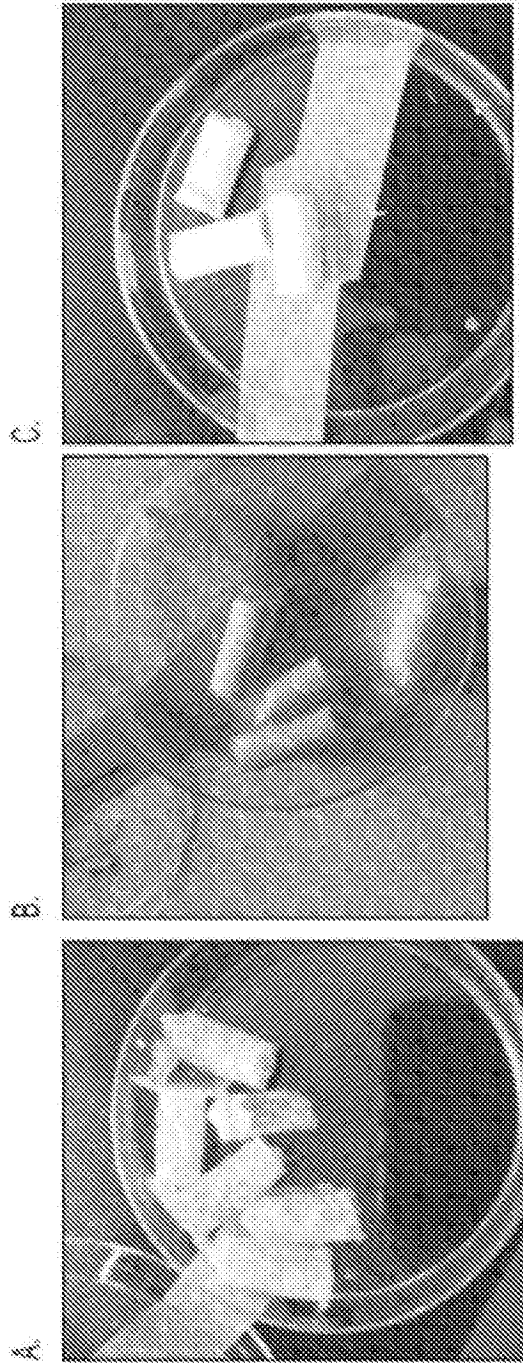


图5

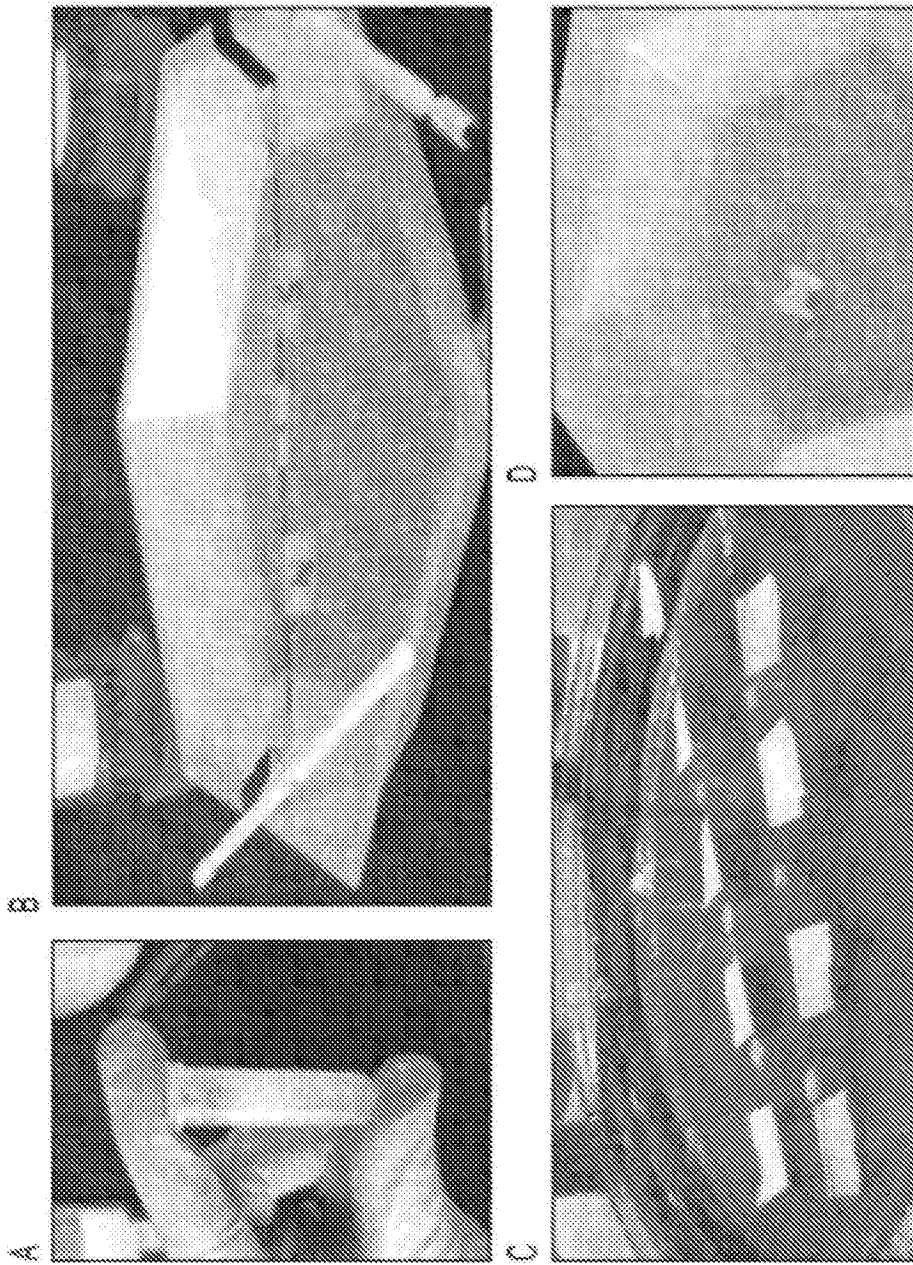


图6

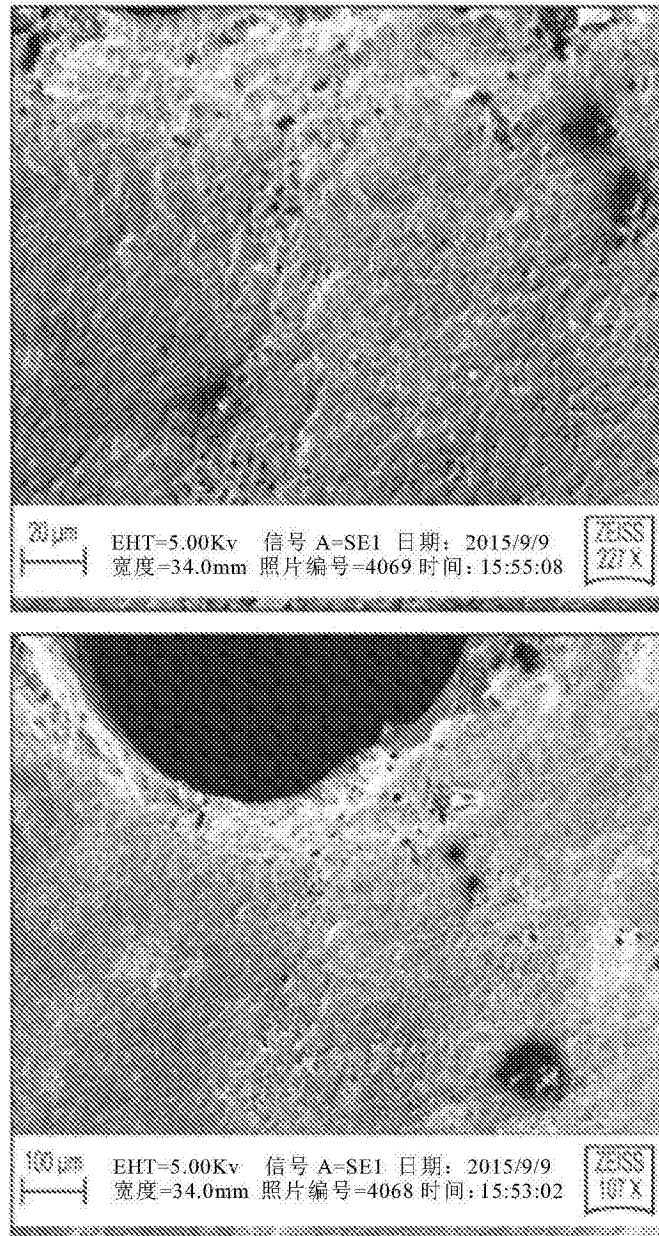


图7

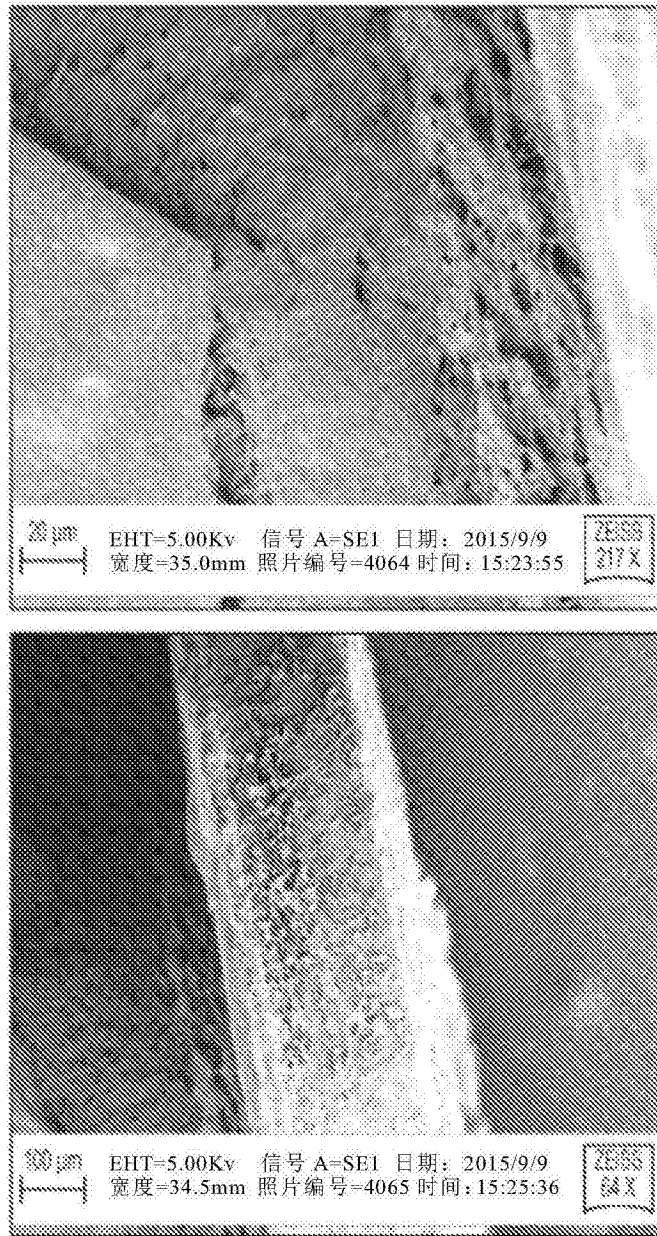
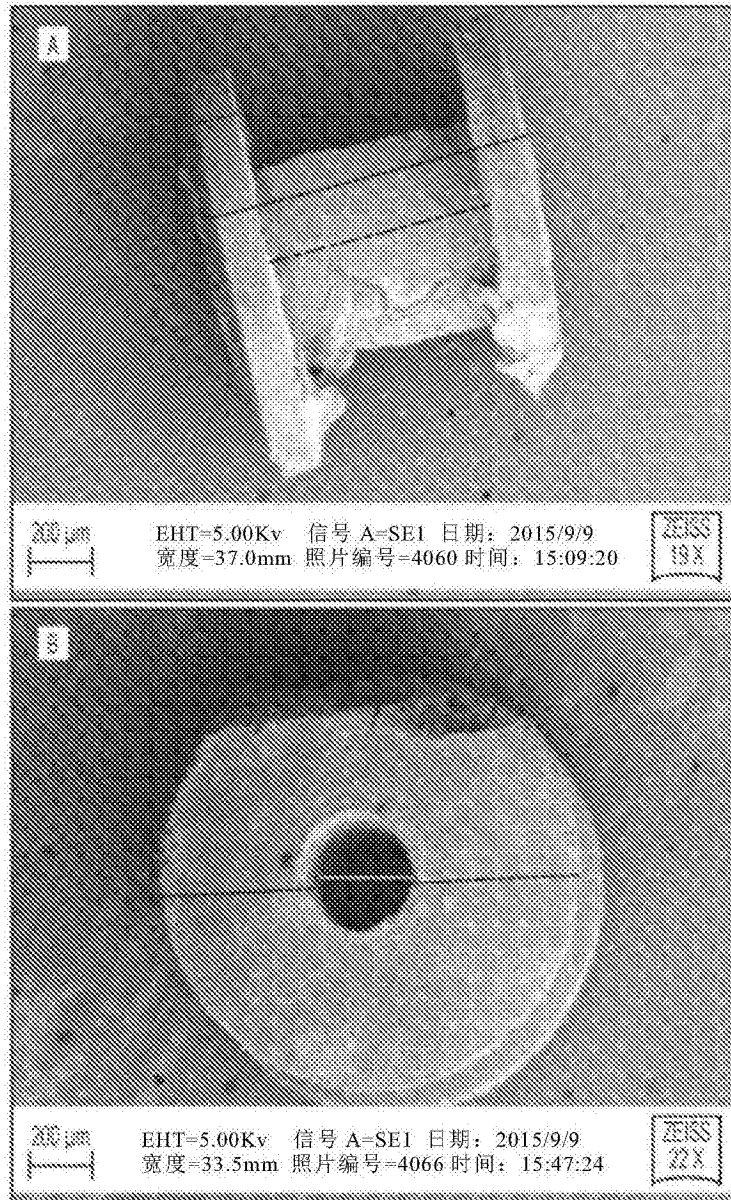


图7(续)



领长 (A, 黄色虚线) : 0.41mm  
长度-领 (A, 蓝色虚线) : 1.74mm  
总长 (A, 红色虚线) : 2.6mm  
内径 (B, 红色实线) : 0.82mm  
外径 (B, 紫色虚线) : 3.13mm

图8

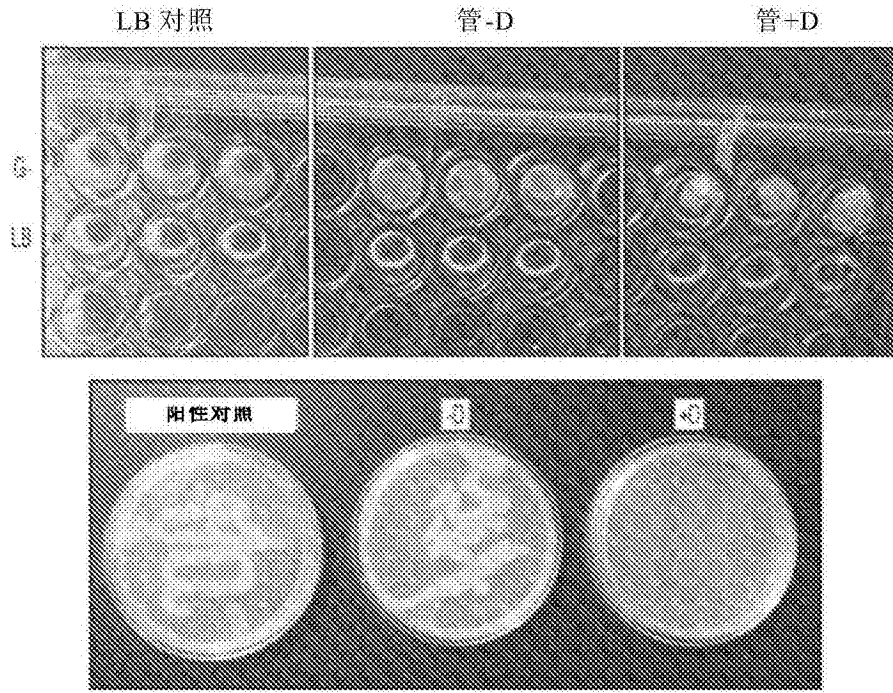


图9