



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101035572 B

(45) 授权公告日 2010.12.08

(21) 申请号 200580034176.8

*A61L 26/00* (2006.01)

(22) 申请日 2005.10.06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/616,899 2004.10.07 US

US 20040096507 A1, 2004.05.20, 全文.

WO 0149268 A1, 2001.07.12, 全文.

WO 03035122 A, 2003.05.01, 全文.

US 5275838 A, 1994.01.04, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.04.06

审查员 梅黎

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/036251 2005.10.06

(87) PCT申请的公布数据

W02006/042161 EN 2006.04.20

(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 G·K·科多基安 S·D·阿瑟

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 段晓玲 黄可峻

(51) Int. Cl.

*A61L 24/00* (2006.01)

*A61L 17/00* (2006.01)

*A61L 15/28* (2006.01)

*A61L 31/00* (2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 28 页

(54) 发明名称

用于医疗用途的多糖基聚合物组织粘合剂

(57) 摘要

公开了通过氧化多糖与可水分散的多臂聚醚胺反应形成的组织粘合剂,所述聚醚胺其中至少三个臂由伯胺基封端。描述了组织粘合剂对于医疗和兽医应用如局部创伤闭合;和手术操作,如肠吻合,血管吻合,组织修复,和眼科操作;给药;抗粘应用;和作为治疗尿失禁的填充剂的用途。

1. 试剂盒,包含:

a) 包含氧化多糖的第一水溶液,所述氧化多糖包含醛基,分子量为 1,000-1,000,000 道尔顿,所述氧化多糖每个醛基的当量为 90-1500 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -40wt% 氧化多糖;和

b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液,其中至少三个臂由伯胺基团封端,其中多臂聚醚胺的分子量为 450-200,000 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -70wt% 多臂聚醚胺。

2. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中氧化多糖的分子量是 3,000-250,000 道尔顿。

3. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中多臂聚醚胺的分子量是 2,000-40,000 道尔顿。

4. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中氧化多糖选自葡聚糖、甲壳质、淀粉、琼脂、纤维素、和透明质酸。

5. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中第一水溶液的氧化多糖上的醛基是化学计量过量的,相对于第二水溶液的多臂聚醚胺上的胺基而言。

6. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中第一和第二水溶液是经过消毒的。

7. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中第一或第二水溶液进一步包含选自如下的添加剂: pH 改性剂、粘度改性剂、抗菌剂、着色剂、愈合促进剂、表面活性剂、抗炎剂、血栓形成剂、和射线不透性化合物。

8. 根据权利要求 7 的试剂盒,其中所述着色剂选自 FD&C Violet No. 2、D&C Green No. 6、D&C Green No. 5、和 D&C Violet No. 2。

9. 根据权利要求 7 的试剂盒,其中所述抗菌剂是三氯生。

10. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中第一或第二水溶液进一步包含药物或治疗剂。

11. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中氧化多糖在第一水溶液中的浓度是 15wt% -30wt%。

12. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中可水分散的多臂聚醚胺选自氨基封端的星型聚环氧乙烷、氨基封端的树枝状聚环氧乙烷、氨基封端的梳型聚环氧乙烷、氨基封端的星型聚环氧丙烷、氨基封端的树枝状聚环氧丙烷、氨基封端的梳型聚环氧丙烷、氨基封端的星型聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的树枝状聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的梳型聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的树枝状聚酰胺型胺类、和聚氧化烯三胺类。

13. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中多臂聚醚胺是星型聚乙二醇,所述聚乙二醇包含由伯胺基封端的八个臂并且分子量为 10,000 道尔顿。

14. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中多臂聚醚胺在第二水溶液中的浓度是 20% -50wt%。

15. 根据权利要求 1 的试剂盒,其中第二水溶液进一步包含含有一个或多个伯胺基的至少一种其它多官能胺,所述多官能胺存在的浓度为 5% -1000wt%,相对于溶液中多臂聚醚胺的量。

16. 根据权利要求 15 的试剂盒,其中所述多官能胺选自可水分散的多臂聚醚胺、线性二胺、支化多元胺、环状二胺、氨基烷基三烷氧基硅烷、氨基烷基二烷氧基烷基硅烷、梳型多元胺、二酰肼和聚酰肼。

17. 根据权利要求 1 的试剂盒,进一步包含第三溶液,所述第三溶液包含含有一个或多

个伯胺基的至少一种其它多官能胺,所述溶液包含 5% -100wt% 多官能胺,相对于溶液的总重量。

18. 根据权利要求 17 的试剂盒,其中多官能胺选自可水分散的多臂聚醚胺、线性二胺、支化多元胺、环状二胺、氨基烷基三烷氧基硅烷、梳型多元胺、二酰肼和聚酰肼。

19. 根据权利要求 17 的试剂盒,其中第三溶液是经过消毒的。

20. 以下 a) 和 b) 在制备向活有机体的组织上解剖学部位施加涂层的药物中的用途:  
a) 包含氧化多糖的第一水溶液,所述氧化多糖包含醛基,分子量为 1,000-1,000,000 道尔顿,所述氧化多糖每个醛基的当量为 90-1500 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -40wt% 氧化多糖;和 b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液,其中至少三个臂由伯胺基团封端,其中多臂聚醚胺的分子量为 450-200,000 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -70wt% 多臂聚醚胺,

其中所述药物制备成先向部位施加 (a) 的水溶液随后施加 (b) 的水溶液,或先施加 (b) 的水溶液随后施加 (a) 的水溶液,或预混合 (a) 和 (b) 的水溶液并在获得的混合物完全固化之前将获得的混合物施加到所述部位的制剂形式。

21. 以下 a) 和 b) 在制备将至少两个解剖学部位结合在一起的药物中的用途:a) 包含氧化多糖的第一水溶液,所述氧化多糖包含醛基,分子量为 1,000-1,000,000 道尔顿,所述氧化多糖每个醛基的当量为 90-1500 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -40wt% 氧化多糖;和 b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液,其中至少三个臂由伯胺基团封端,其中多臂聚醚胺的分子量为 450-200,000 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -70wt% 多臂聚醚胺,

其中所述药物制备成先向至少一个部位施加 (a) 的水溶液随后向相同部位或另一个部位的至少一个施加 (b) 的水溶液,或预混合 (a) 和 (b) 的溶液并在获得的混合物完全固化之前施加获得的混合物到至少一个部位的制剂形式。

22. 权利要求 20 或 21 的用途,其中氧化多糖的分子量是 3,000-250,000 道尔顿。

23. 权利要求 20 或 21 的用途,其中多臂聚醚胺的分子量是 2,000-40,000 道尔顿。

24. 权利要求 20 或 21 的用途,其中氧化多糖选自葡聚糖、甲壳质、淀粉、琼脂、纤维素、和透明质酸。

25. 权利要求 20 或 21 的用途,其中第一水溶液的氧化多糖上的醛基是化学计量过量的,相对于第二水溶液的多臂聚醚胺上的胺基而言。

26. 权利要求 20 或 21 的用途,其中第一和第二水溶液是经过消毒的。

27. 权利要求 20 或 21 的用途,其中第一或第二水溶液进一步包含选自如下的添加剂:pH 改性剂、粘度改性剂、抗菌剂、着色剂、愈合促进剂、表面活性剂、抗炎剂、血栓形成剂、和射线不透性化合物。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述着色剂选自 FD&C Violet No. 2、D&C Green No. 6、D&C Green No. 5、和 D&C Violet No. 2。

29. 权利要求 27 的用途,其中所述抗菌剂是三氯生。

30. 权利要求 20 或 21 的用途,其中第一或第二水溶液进一步包含药物或治疗剂。

31. 权利要求 20 或 21 的用途,其中氧化多糖在第一水溶液中的浓度是 15wt% -30wt%。

32. 权利要求 20 或 21 的用途,其中可水分散的多臂聚醚胺选自氨基封端的星型聚环氧乙烷、氨基封端的树枝状聚环氧乙烷、氨基封端的梳型聚环氧乙烷、氨基封端的星型聚环氧

丙烷、氨基封端的树枝状聚环氧丙烷、氨基封端的梳型聚环氧丙烷、氨基封端的星型聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的树枝状聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的梳型聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的树枝状聚酰胺型胺类、和聚氧化烯三胺类。

33. 权利要求 20 或 21 的用途,其中可水分散的多臂聚醚胺是聚乙二醇,所述聚乙二醇包含由伯胺基封端的八个臂并且分子量为 10,000 道尔顿。

34. 权利要求 20 或 21 的用途,其中多臂聚醚胺在第二水溶液中的浓度是 20% -50wt%。

35. 权利要求 20 或 21 的用途,其中第二水溶液进一步包含含有一个或多个伯胺基的至少一种其它多官能胺,所述多官能胺存在的浓度为 5% -1000wt%,相对于溶液中多臂聚醚胺的量。

36. 权利要求 35 的用途,其中多官能胺选自可水分散的多臂聚醚胺、线性二胺、支化多元胺、环状二胺、氨基烷基三烷氧基硅烷、梳型多元胺、二酰肼和聚酰肼。

37. 权利要求 20 的用途,所述药物进一步包含 c) 包含多官能胺的第三溶液,所述多官能胺含有一个或多个伯胺基,所述药物配制成将溶液 (a)、(b)、和 (c) 以任何顺序施加或预混合 (a)、(b)、和 (c) 的溶液并在获得的混合物完全固化之前将所述获得的混合物施加到部位的制剂形式。

38. 权利要求 37 的用途,其中多官能胺选自可水分散的多臂聚醚胺、线性二胺、支化多元胺、环状二胺、氨基烷基三烷氧基硅烷、梳型多元胺、二酰肼和聚酰肼。

39. 权利要求 21 的用途,所述药物进一步包含 c) 包含多官能胺的第三溶液,所述多官能胺含有一个或多个伯胺基,或预混合 (a)、(b)、和 (c) 的溶液并在获得的混合物完全固化之前将所述获得的混合物施加到所述部位,和将所述至少两个解剖学部位接触到一起。

40. 权利要求 39 的用途,其中多官能胺选自可水分散的多臂聚醚胺、线性二胺、支化多元胺、环状二胺、氨基烷基三烷氧基硅烷、梳型多元胺、二酰肼和聚酰肼。

41. 权利要求 37 或 39 的用途,其中第三溶液是经过消毒的。

42. 权利要求 20 的用途,其中解剖学部位是皮肤上的伤口而且所述方法用于治疗局部伤口。

43. 权利要求 20 的用途,其中解剖学部位在肠或血管上而且所述方法用于吻合操作。

44. 权利要求 20 的用途,其中解剖学部位在眼睛上而且所述方法用于闭合角膜切口。

45. 权利要求 20 的用途,其中所述方法用于防止在相邻解剖学部位之间的粘合。

46. 权利要求 20 的用途,其中第一或第二水溶液进一步包含药物或治疗剂而且所述方法用于给药到所述解剖学部位。

47. 权利要求 20 的用途,其中解剖学部位是膀胱而且所述方法用于治疗尿失禁。

48. 包含如下物质的反应产物的组合物:

a) 包含氧化多糖的第一水溶液,所述氧化多糖包含醛基,分子量为 1,000-1,000,000 道尔顿,所述氧化多糖每个醛基的当量为 90-1500 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -40wt% 氧化多糖;和

b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液,其中至少三个臂由伯胺基团封端,其中多臂聚醚胺的分子量为 450-200,000 道尔顿,所述溶液包含 5wt% -70wt% 多臂聚醚胺。

49. 权利要求 48 的组合物,其中氧化多糖的分子量是 3,000-250,000 道尔顿。
50. 权利要求 48 的组合物,其中多臂聚醚胺的分子量是 2,000-40,000 道尔顿。
51. 权利要求 48 的组合物,其中氧化多糖选自葡聚糖、甲壳质、淀粉、琼脂、纤维素、和透明质酸。
52. 权利要求 48 的组合物,其中第一水溶液的氧化多糖上的醛基是化学计量过量的,相对于第二水溶液的胺上的胺基而言。
53. 权利要求 48 的组合物,其中第一和第二水溶液是经过消毒的。
54. 权利要求 48 的组合物,其中第一或第二水溶液进一步包含选自如下的添加剂:pH 改性剂、粘度改性剂、抗菌剂、着色剂、愈合促进剂、表面活性剂、抗炎剂、血栓形成剂、和射线不透性化合物。
55. 权利要求 54 的组合物,其中所述着色剂选自 FD&C Violet No. 2、D&C Green No. 6、D&C Green No. 5、和 D&C Violet No. 2。
56. 权利要求 54 的组合物,其中所述抗菌剂是三氯生。
57. 权利要求 48 的组合物,其中第一或第二水溶液进一步包含药物或治疗剂。
58. 权利要求 48 的组合物,其中氧化多糖在第一水溶液中的浓度是 15wt% -30wt%。
59. 权利要求 48 的组合物,其中可水分散的多臂聚醚胺选自氨基封端的星型聚环氧乙烷、氨基封端的树枝状聚环氧乙烷、氨基封端的梳型聚环氧乙烷、氨基封端的星型聚环氧丙烷、氨基封端的树枝状聚环氧丙烷、氨基封端的梳型聚环氧丙烷、氨基封端的星型聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的树枝状聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的梳型聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物、氨基封端的树枝状聚酰胺型胺类、和聚氧化烯三胺类。
60. 权利要求 48 的组合物,其中可水分散的多臂聚醚胺是星型聚乙二醇,所述聚乙二醇包含由伯胺基封端的八个臂并且分子量为 10,000 道尔顿。
61. 权利要求 48 的组合物,其中多臂聚醚胺在第二水溶液中的浓度是 20% -50wt%。
62. 权利要求 48 的组合物,其中第二水溶液进一步包含含有一个或多个伯胺基的至少一种其它多官能胺,所述多官能胺存在的浓度为 5% -1000wt%,相对于溶液中多臂聚醚胺的量而言。
63. 权利要求 62 的组合物,其中多官能胺选自可水分散的多臂聚醚胺、线性二胺、支化多元胺、环状二胺、氨基烷基三烷氧基硅烷、梳型多元胺、二酰肼和聚酰肼。
64. 权利要求 48 的组合物,进一步包含 c) 包含多官能胺的第三溶液,所述多官能胺含有一个或多个伯胺基,所述溶液包含 5% -100wt%多官能胺,相对于溶液的总重量。
65. 权利要求 64 的组合物,其中多官能胺选自可水分散的多臂聚醚胺、线性二胺、支化多元胺、环状二胺、氨基烷基三烷氧基硅烷、梳型多元胺、二酰肼和聚酰肼。

## 用于医疗用途的多糖基聚合物组织粘合剂

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请按照 35 U.S.C. § 119 要求 2004 年 10 月 7 日提交的 U.S. 临时申请系列 No. 60/616, 899 的优先权。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及医疗粘合剂领域。更具体地,本发明涉及通过氧化多糖与可水分散的多臂聚醚胺的反应而形成的聚合物组织粘合剂。

[0004] 发明背景

[0005] 组织粘合剂具有许多潜在的医疗应用,包含局部创伤闭合、补充或替代内部手术操作中的缝线或 U 形钉、将合成高嵌体或嵌体粘合到角膜、给药器械,和作为防粘合阻挡物以防止手术后粘合。常规组织粘合剂通常不适于宽范围的粘合剂应用。例如,氰基丙烯酸酯基粘合剂用于局部创伤闭合,但毒性降解产物的释放限制它们对于内部应用的用途。纤维蛋白基粘合剂是缓慢固化的,具有差的机械强度,和造成病毒感染的危险。另外,纤维蛋白基粘合剂并不共价结合到下面的组织。

[0006] 开发了几种类型的水凝胶组织粘合剂,它们具有改进的粘合和内聚性能和是非毒性的。这些水凝胶通常通过使含有亲核基团的组分与含有亲电基团的组分反应而形成,该亲电基团能够与第一组分的亲核基团反应以通过共价键合形成交联的网络。然而,这些水凝胶典型地太快溶胀或溶解掉,或缺乏足够的粘合或机械强度,因此降低它们作为外科手术粘合剂的效力。

[0007] 水凝胶组织粘合剂的例子由 Sehl 等人在 U.S. 专利申请公开 No. 2003/0119985 中描述。通过亲水性聚合物,如胶原,与含有亲核基团的可交联组分和含有亲电基团的可交联组分反应形成粘合剂。可交联组分包含各种活化形式的聚乙二醇。Goldmann 等人在 WO 03/035122 中描述了通过反应如下物质形成的水凝胶组织粘合剂:脱乙酰壳聚糖或带有氨基的改性聚乙烯醇与氧化多糖,如氧化葡聚糖。这些公开文献没有一个描述了通过氧化多糖与可水分散的多臂聚醚胺反应形成的聚合物粘合剂。

[0008] 因此,要解决的问题是提供组织粘合剂材料,该材料具有对用于外科手术操作以及其它医疗应用而言的改进特性。

[0009] 申请人通过发现如下聚合物组织粘合剂解决了所述问题,即通过氧化多糖与可水分散的多臂聚醚胺反应形成该组织粘合剂,其中至少三个臂由伯胺基封端。获得的粘合剂具有改进的粘合和内聚性能、在体温下容易交联、初始保持尺寸稳定性、不快速降解、对细胞是非毒性的和对组织是非炎性的。

### 发明内容

[0010] 本发明提供试剂盒,该试剂盒包含:

[0011] a) 包含氧化多糖的第一水溶液,该氧化多糖包含醛基,分子量为约 1,000-约 1,000,000 道尔顿,该氧化多糖每个醛基的当量为约 90-约 1500 道尔顿,该溶液包含约

5wt% - 约 40wt% 氧化多糖 ; 和

[0012] b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液, 其中至少三个臂由伯胺基团封端, 其中多臂聚醚胺的分子量为约 450- 约 200, 000 道尔顿, 该溶液包含约 5wt% - 约 70wt% 多臂聚醚胺。

[0013] 在另一个实施方案中, 本发明提供向活的有机体的组织上的解剖学部位施加涂层的方法, 该方法包含: 向该部位施加 a) 包含氧化多糖的第一水溶液, 该氧化多糖包含醛基, 分子量为约 1, 000- 约 1, 000, 000 道尔顿, 该氧化多糖每个醛基的当量为约 90- 约 1500 道尔顿, 该溶液包含约 5wt% - 约 40wt% 氧化多糖, 随后施加 b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液, 其中至少三个臂由伯胺基团封端, 其中多臂聚醚胺的分子量为约 450- 约 200, 000 道尔顿, 该溶液包含约 5wt% - 约 70wt% 多臂聚醚胺, 或先施加 (b) 的水溶液随后施加 (a) 的水溶液, 或预混合 (a) 和 (b) 的水溶液并在获得的混合物完全固化之前施加获得的混合物到所述部位。

[0014] 在另一个实施方案中, 本发明提供将至少两个解剖学部位结合在一起的方法, 该方法包含: 向至少一个部位施加 a) 包含氧化多糖的第一水溶液, 该氧化多糖包含醛基, 分子量为约 1, 000- 约 1, 000, 000 道尔顿, 该氧化多糖每个醛基的当量为约 90- 约 1500 道尔顿, 该溶液包含约 5wt% - 约 40wt% 氧化多糖; 向相同部位或另一个部位的至少一个部位施加 b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液, 其中至少三个臂由伯胺基团封端, 其中多臂聚醚胺的分子量为约 450- 约 200, 000 道尔顿, 该溶液包含约 5wt% - 约 70wt% 多臂聚醚胺; 或预混合 (a) 和 (b) 的溶液并在获得的混合物完全固化之前施加获得的混合物到至少一个部位; 和将所述至少两个解剖学部位接触在一起。

[0015] 在另一个实施方案中, 本发明提供包含如下物质的反应产物的组合物: a) 包含氧化多糖的第一水溶液, 该氧化多糖包含醛基, 分子量为约 1, 000- 约 1, 000, 000 道尔顿, 该氧化多糖每个醛基的当量为约 90- 约 1500 道尔顿, 该溶液包含约 5wt% - 约 40wt% 氧化多糖; 和

[0016] b) 包含可水分散的多臂聚醚胺的第二水溶液, 其中至少三个臂由伯胺基团封端, 其中多臂聚醚胺的分子量为约 450- 约 200, 000 道尔顿, 该溶液包含约 5wt% - 约 70wt% 多臂聚醚胺。

[0017] 也提供将本发明的聚合物组织粘合剂用于局部创伤闭合、肠和血管吻合、闭合角膜切口、防止粘合、给药、和治疗尿失禁的方法。

[0018] 发明详述

[0019] 本发明涉及通过氧化多糖与可水分散的多臂聚醚胺反应形成的聚合物粘合剂, 其中所述多臂聚醚胺的至少三个臂由伯胺基封端。本发明的聚合物粘合剂用作医疗和兽医应用的粘合剂, 该应用包含, 但不限于局部创伤闭合, 和外科手术操作, 如肠吻合, 血管吻合, 组织修复, 和眼科操作。另外, 聚合物粘合剂可在给药、抗粘应用中具有功用, 和作为填充剂以治疗尿失禁。

[0020] 如下定义在此使用并对权利要求和说明书的解释都应参考。

[0021] 术语“氧化多糖”表示已经与氧化剂反应以向分子中引入醛基的多糖。

[0022] 术语“每个醛基的当量”表示氧化多糖的分子量除以分子中引入的醛基数目。

[0023] 术语“可水分散的多臂聚醚胺”表示支化聚醚, 其中至少三个支链 (“臂”) 由

伯胺基封端,它是水溶性的或能够在水中分散以形成胶体悬浮液,该悬浮液能够与水溶液中的第二反应物反应。

[0024] 术语“树枝状聚醚”表示具有树状结构的高度支化聚醚。

[0025] 术语“梳型聚醚”表示含有主链的聚醚,所述主链具有多个三官能支化点从每个支化点伸出线性臂。

[0026] 术语“星型聚醚”表示含有单一支化点的聚醚,从该支化点伸出线性臂。

[0027] 在此使用的术语“分子量”表示重均分子量。

[0028] 除非另外说明,在此使用的术语“wt%”表示相对于溶液总重量的重量百分比。

[0029] 术语“解剖学部位”表示人或动物身体的任何外部或内部部分。

[0030] 术语“组织”表示人或动物中的任何活和死的组织。

[0031] 术语“水凝胶”表示可水溶胀的聚合物基质,由共价或非共价交联保持在一起的三维大分子网络组成,可吸收大量的水以形成弹性凝胶。

[0032] 本发明提供通过氧化多糖与多臂聚醚胺反应形成的组织粘合剂,其中至少三个臂由伯胺基封端。反应形成水凝胶,它具有作为组织粘合剂的许多所需特性,包括但不限于改进的粘合和内聚性能、在体温下容易交联、初始保持尺寸稳定性、不快速降解、对细胞是非毒性的和对组织是非炎性的。

[0033] 氧化多糖

[0034] 用于本发明的多糖包含,但不限于葡聚糖、甲壳质、淀粉、琼脂、纤维素、和透明质酸。这些多糖从来源如Sigma Chemical Co. (StLouis,MO) 购得。在一个实施方案中,多糖是葡聚糖。合适多糖的分子量为约 1,000- 约 1,000,000 道尔顿,和此外约 3,000- 约 250,000 道尔顿。

[0035] 使用任何合适的氧化剂将多糖氧化以引入醛基,该氧化剂包含但不限于高碘酸盐、次氯酸盐、臭氧、过氧化物、氢过氧化物、过(二)硫酸盐、和过碳酸盐。在一个实施方案中,多糖由与高碘酸钠的反应而氧化,例如由 Mo 等人所述(J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 11 :341-351,2000)。将多糖与不同数量的高碘酸盐反应以得到不同氧化程度和因此具有不同醛基数量的多糖,如在下文实施例的通用方法部分中详细所述。氧化多糖的醛含量可以使用本领域已知的方法测定。例如,氧化多糖的二醛含量可以使用由 Hofreiter 等人描述的方法测定(Anal Chem. 27 :1930-1931,1955),如在下文实施例的通用方法部分中详细所述。在那个方法中,由 pH 滴定测定在具体反应条件下,氧化多糖中每摩二醛消耗的碱数量。在一个实施方案中,氧化多糖每个醛基的当量是约 90- 约 1500 道尔顿。

[0036] 在本发明中,氧化多糖以水溶液的形式使用。将氧化多糖加入水中以得到约 5wt% - 约 40wt%,此外约 15wt% - 约 30wt%的浓度,相对于溶液的总重量。要使用的最优浓度依赖于应用和依赖于使用的多臂聚醚胺浓度,如下文所述,并可以由本领域技术人员使用常规试验容易地确定。

[0037] 为在活组织上使用,优选将包含氧化多糖的水溶液消毒以防止感染。可以使用不降解多糖的本领域已知的任何合适消毒方法,包含,但不限于电子束辐射、 $\gamma$  辐射、环氧乙烷消毒、或通过 0.2  $\mu$ m 孔膜的超滤。

[0038] 依赖于希望的应用,包含氧化多糖的水溶液可进一步包含各种添加剂。优选,添加剂与氧化多糖相容。具体地,添加剂不包含会干扰水凝胶有效胶凝化的伯或仲胺基。使用



的添加剂数量依赖于特定的应用并可以由本领域技术人员使用常规试验容易地确定。例如,溶液可任选地包含至少一种 pH 改性剂以调节溶液的 pH。合适的 pH 改性剂是本领域公知的。pH 改性剂可以是酸性或碱性化合物。酸性 pH 改性剂的例子包含,但不限于羧酸、无机酸、和磺酸。碱性 pH 改性剂的例子包含,但不限于氢氧化物、醇盐、除了伯和仲胺以外的含氮化合物、和碱性碳酸盐和磷酸盐。

[0039] 包含氧化多糖的水溶液可任选地包含至少一种增稠剂。增稠剂可以选自己知的粘度改性剂,包含,但不限于多糖和其衍生物,如淀粉或羟乙基纤维素。

[0040] 包含氧化多糖的水溶液可任选地包含至少一种抗菌剂。合适的抗菌防腐剂是本领域公知的。合适抗菌剂的例子包含但不限于对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、和对羟基苯甲酸丁酯;三氯生;氯己定;甲酚;氯甲酚;氢醌;苯甲酸钠;和苯甲酸钾。在一个实施方案中,抗菌剂是三氯生。

[0041] 包含氧化多糖的水溶液也可任选地包含至少一种着色剂以提高溶液的可见性。合适的着色剂包含染料、颜料、和天然着色剂。合适着色剂的例子包含但不限于 FD&C 和 D&C 着色剂,如 FD&C Violet. No. 2, D&C Green No. 6, D&C Green No. 5, D&C Violet No. 2, FD&C Yellow No. 6, FD&C Red No. 3;和天然着色剂,如甜菜根红,角黄素,叶绿素,曙红,藏红花,和胭脂红。在一个实施方案中,着色剂是 FD&C Violet No. 2, D&C Green No. 6, D&C Green No. 5, 或 D&C Violet No. 2。

[0042] 包含氧化多糖的水溶液也可任选地包含至少一种表面活性剂。在此使用的表面活性剂表示降低水的表面张力的化合物。表面活性剂可以是离子表面活性剂,如十二烷基硫酸钠,或中性表面活性剂,如聚氧乙烯醚、聚氧乙烯酯,和聚氧乙烯脱水山梨醇。

[0043] 另外,包含氧化多糖的水溶液可任选地包含抗炎剂,如吲哚美辛,水杨酸乙酸酯,布洛芬,舒林酸,吡罗昔康,和萘普生;血栓形成剂,如凝血酶,纤维蛋白原,高半胱氨酸,和雌莫司汀;和射线不透性化合物,如硫酸钡和金粒子。

#### [0044] 多臂聚醚胺

[0045] 多臂聚醚胺是含有重复单元  $[-O-R]-$  的可水分散的聚醚,其中 R 是含有 2-5 个碳原子的亚烃基。术语“亚烃基”表示从烃脱除两个氢原子形成的二价基团,其中是从两个不同碳原子中的每个脱除一个氢原子。本发明的多臂聚醚胺包含但不限于树枝状、梳型、和星型聚醚,其中至少三个臂由伯胺基团封端。多臂聚醚胺的分子量为约 450-约 200,000 道尔顿,此外约 2,000-约 40,000 道尔顿。可水分散的多臂聚醚胺的合适例子包含但不限于氨基封端的星型、树枝状、或梳型聚环氧乙烷;氨基封端的星型、树枝状、或梳型聚环氧丙烷;氨基封端的星型、树枝状、或梳型聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物;氨基封端的树枝状聚酰胺型胺类,以商品名 Starburst® Dendrimers 销售(购自 Sigma-Aldrich, St Louis, MO);和聚氧化烯三胺,以商品名 Jeffamine® 三胺由 Huntsman LLC. (Houston, TX) 销售。星型聚环氧乙烷胺的例子包含但不限于各种多臂聚乙二醇胺,购自 Nektar Transforming Therapeutics (Huntsville, AL),和含有由伯胺封端的 3、4 或 8 个臂的星型聚乙二醇(在此分别称为 3、4 或 8-臂星型 PEG 胺)。8-臂星型 PEG 胺购自 Nektar Transforming Therapeutics。合适 Jeffamine® 三胺的例子包含但不限于 Jeffamine® T-403 (CAS No. 39423-51-3)、Jeffamine® T-3000 (CAS No. 64852-22-8) 和 Jeffamine® T-5000 (CAS No. 64852-22-8)。在一个实施方案中,可水分散的多臂聚醚胺是含有由伯胺基封端的八个臂并且分子量为 10,000

道尔顿的八臂聚乙二醇（购自 Nektar Transforming Therapeutics）。

[0046] 这些多臂聚醚胺是市售的，如上所述，或可以使用本领域已知的方法制备。例如，多臂聚乙二醇，其中至少三个臂由伯胺基封端，可以使用由 Buckmann 等人 (Makromol. Chem. 182 :1379-1384, 1981) 描述的方法通过多臂聚乙二醇（如，3, 4 和 8-臂星型聚乙二醇，购自 Nektar Transforming Therapeutics）上布置胺端制备。在那个方法中，将多臂聚乙二醇与亚硫酸溴反应以将羟基转化成溴，它可然后由与氨在 100°C 下的反应转化成胺。该方法广泛适用于其它多臂聚醚胺的制备。可用于制备多臂聚醚胺的其它方法由 Merrill 等人描述于 U. S. 专利 No. 5, 830, 986, 和由 Chang 等人描述于 WO 97/30103 中。

[0047] 应当认识到多臂聚醚胺通常是具有不同臂数目的物种分布的非均匀混合物。然而，存在具有特定臂数目的占优势的物种。例如，8-臂星型 PEG 胺包含多臂星型 PEG 胺的混合物，一些含有小于 8 个臂和一些含有多于 8 个臂，但占优势的物种是 8-臂星型 PEG 胺。

[0048] 当选择最优多臂聚醚胺以用于给定应用时考虑的一个因素是最终水凝胶所需的降解速率。发现水凝胶的降解速率依赖于用于制备水凝胶的多臂聚醚胺上臂的数目。具体地，当多臂聚醚胺上臂的数目增加时，水凝胶的降解速率降低。因此，对于其中需要快速降解速率的应用，应当选择含有 3 或 4 个臂的多臂聚醚胺，而在要求缓慢降解速率的应用中，应当选择含有 6, 8 或更多个臂的多臂聚醚胺。

[0049] 在本发明中，多臂聚醚胺以水溶液的形式使用。将多臂聚醚胺加入水中以得到约 5wt% - 约 70wt%，此外约 20% - 约 50wt% 的浓度，相对于溶液的总重量。要使用的最优浓度依赖于应用和依赖于使用的氧化多糖浓度。在一个实施方案中，调节氧化多糖和多臂聚醚胺的浓度使得氧化多糖上的醛基是化学计量过量的，相对于多臂聚醚胺上的胺基。在一个实施方案中，其中 8-臂星型 PEG 胺用作多臂聚醚胺，醛基的数量是约 1.1 倍 - 约 50 倍胺基的数量，此外约 3 倍 - 约 15 倍胺基的数量。在另一个实施方案中，其中 Jeffamine® 三胺用作多臂聚醚胺，醛基的数量是约 0.5 倍 - 约 3 倍胺基的数量。

[0050] 为在活组织上使用，优选将包含多臂聚醚胺的水溶液消毒以防止感染。可以使用以上为消毒氧化多糖溶液所述的任何方法。

[0051] 包含多臂聚醚胺的水溶液可进一步包含各种添加剂。可以使用以上对于氧化多糖溶液所述的任何添加剂。另外，溶液可包含愈合促进剂，如脱乙酰壳聚糖。

[0052] 另外，包含多臂聚醚胺的水溶液可任选地包含具有一个或多个伯胺基的至少一种其它多官能胺以提供其它有益性能，如疏水性。多官能胺可以是第二可水分散的多臂聚醚胺，如以上所述的那些，或另一类型多官能胺，包含，但不限于线性和支化二胺，如二氨基烷烃、多氨基烷烃和精胺；支化多元胺，如聚氮丙啶；环状二胺，如 N, N' - 双 (3-氨基丙基) 哌嗪、5-氨基 -1, 3, 3- 三甲基环己烷甲基胺、1, 3- 双 (氨基甲基) 环己烷、1, 4- 二氨基环己烷，和对苯二甲胺；氨基烷基三烷氧基硅烷，如 3-氨基丙基三甲氧基硅烷和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷；氨基烷基二烷氧基烷基硅烷，如 3-氨基丙基二乙氧基甲基硅烷，二酰肼，如己二酸二酰肼；线性聚合物二胺，如线性聚氮丙啶、 $\alpha, \omega$ -氨基封端的聚醚、 $\alpha, \omega$ -双 (3-氨基丙基) 聚丁二醇、 $\beta, \omega$ -1-氨基-封端的聚醚（线性 Jeffamines®）；梳型多元胺，如脱乙酰壳聚糖、聚烯丙基胺，和聚赖氨酸，和二-和聚酰肼，如双（羧基酰肼并）聚醚和聚（羧基酰肼并）星型聚醚。许多这些化合物从公司如 Sigma-Aldrich 和 Huntsman LLC 购得。典型地，如果存在的话，多官能胺的使用浓度为约 5wt% - 约 1000wt%，相对于水溶液中多臂

聚醚胺的重量。

[0053] 在另一个实施方案中,将多官能胺在单独的溶液在约 5wt% - 约 100wt% 的浓度下提供,相对于溶液的总重量。如果不使用纯多官能胺(即 100wt%),它以水溶液的形式使用。为在活组织上使用,优选将包含多官能胺的溶液消毒。可以使用以上为消毒氧化多糖溶液所述的任何方法。包含多官能胺的水溶液可进一步包含各种添加剂。可以使用以上对于氧化多糖溶液或多臂聚醚胺溶液所述的任何添加剂。

[0054] 在一个实施方案中,本发明提供包含如下物质的试剂盒:包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液。每种水溶液可以容纳在任何合适的容器中,如小瓶或注射器筒中。

[0055] 在另一个实施方案中,本发明提供包含如下物质的试剂盒:包含氧化多糖的水溶液、包含多臂聚醚胺的水溶液、和包含多官能胺的第三溶液,如上所述。每种水溶液可以容纳在任何合适的容器中,如小瓶或注射器筒中。

[0056] 施加的方法:

[0057] 可以采用任何数目的方式将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到活有机体组织上的解剖学部位。一旦将两种溶液施加到部位,它们交联以形成水凝胶,即在此称为固化的过程,典型地在约 2 秒 - 约 2 分钟中进行。由于氧化多糖上的醛基也可共价结合到组织上的胺基上,本发明的组织粘合剂能够共价结合到组织,因此增加它的粘合强度。

[0058] 在一个实施方案中,使用任何合适的措施将两种水溶液按顺序施加到部位,所述措施包含,但不限于喷淋、采用棉签或刷子的刷涂,或使用吸移管的挤出,或注射器。可以采用任何顺序施加溶液。然后,使用任何合适的设备,如棉签、刮刀,或吸移管或注射器的尖端在所述部位上混合溶液。

[0059] 在另一个实施方案中,在施加到部位之前手动混合两种水溶液。然后使用合适的施加器将获得的混合物在它完全固化之前施加到部位,如上所述。

[0060] 在另一个实施方案中,两种水溶液容纳在双筒注射器中。采用此方式将两种水溶液采用注射器同时施加到部位。合适的双筒注射器施加器是本领域已知的。例如,Red1 在 U. S. 专利 No. 6, 620, 125, (特别地图 1, 5, 和 6, 它们描述于第 4 栏, 10 行到第 6 栏, 47 行) 中描述了用于本发明的几种合适施加器,该文献在此引入作为参考。另外,双筒注射器可在尖端包含如购自 ConProtec, Inc. (Salem, NH) 的不动混合器以在施加之前进行两种水溶液的混合。

[0061] 在另一个实施方案中,其中使用包含多官能胺的任选第三溶液,采用任何顺序使用上述的任何方法将三种溶液施加到解剖学部位。在此实施方案中,可以改进双筒注射器以具有三个筒,一个用于每种溶液。

[0062] 在另一个实施方案中,本发明的组织粘合剂用于结合至少两个解剖学部位在一起。在此实施方案中,将包含氧化多糖的水溶液施加到至少一个解剖学部位,和将包含多臂聚醚胺的水溶液施加到相同部位或另一个部位的至少一个上。手动或使用一些其它措施,如手术夹将两个或多个部位接触并保持在一起足够的时间以让混合物固化,典型地约 2 秒 - 约 2 分钟。或者,将手动或使用双筒注射器施加器预混合的两种水溶液的混合物施加到至少一个要结合的解剖学部位。手动或使用一些其它措施,如手术夹将两个或多个部位

接触并保持在一起足够的时间以让混合物固化。

[0063] 在另一个实施方案中,其中包含多官能胺的任选第三溶液与包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液一起用于结合至少两个解剖学部位在一起,采用任何顺序将三种溶液中的每一种施加到至少一个解剖学部位。可以将溶液施加到相同的部位或施加到不同的部位。或者,使用以上所述的任何方法将三种溶液预混合,并在所得混合物完全固化之前将获得的混合物施加到至少一个要结合的解剖学部位。然后,手动或使用一些其它措施,如手术夹将两个或多个部位接触并保持在一起足够的时间以让混合物固化。

[0064] 医疗和兽医应用:

[0065] 本发明的组织粘合剂具有许多潜在的医疗和兽医应用,包含但不限于局部创伤闭合,手术操作,如肠吻合,血管吻合,和眼科操作;给药,抗粘应用,和作为填充剂以治疗尿失禁。对于这些用途,以下描述涉及两种水溶液的施加的操作,一种水溶液包含氧化多糖而另一种水溶液包含多臂聚醚胺。三种溶液的施加也可用于使用上述操作的这些目的,其中第三溶液包含另外的多官能胺。

[0066] 本发明的组织粘合剂可用于治疗局部创伤,该局部创伤包含但不限于小切口,擦痕,发炎,磨损,破口,烧伤,痛处,和手术创伤。对于局部创伤闭合,使用以上所述的方法将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到创伤上,并允许混合物固化。

[0067] 本发明的组织粘合剂也可用于外科手术操作,包含但不限于肠吻合,血管吻合,和眼科操作,如闭合角膜白内障切口。

[0068] 肠吻合是熟练外科医生公知的外科手术操作。涉及在切除术之后将肠的两个区段结合在一起的操作由 Sweeney 等人描述 (Surgery131 :185-189,2002)。使用缝线或 U 形钉将肠的两个区段结合在一起。采用此操作遇到的问题是在缝线或 U 形钉周围的泄漏。报导 5-8% 的泄漏率 (Bruce 等人 Br. J. Surg. 88 :1157-1168,2001)。本发明的组织粘合剂可用于补充用于肠吻合的缝线或 U 形钉,提供降低泄漏的更好闭合。在此应用中,使用以上所述的方法将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到缝线或 U 形钉周围的肠处,并允许混合物固化。

[0069] 另外,本发明的组织粘合剂可用于血管吻合操作。此操作相似于上述的肠吻合,并用于血管移植。使用缝线或 U 形钉将血管的两个区段结合在一起。本发明的组织粘合剂可用于补充缝线或 U 形钉,提供降低泄漏的更好闭合。在此应用中,使用以上所述的方法将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到缝线或 U 形钉周围的血管,并允许混合物固化。

[0070] 暂时透明角膜切口和巩膜隧道切口在白内障手术期间使用。这些操作是熟练白内障外科医生公知的。尽管这些切口可以采用缝线闭合,许多外科医生偏好无缝线的自闭合切口。然而,由通过无缝线切口的泄漏产生问题,引起眼内炎 (Sarayba 等人 Amer. J. Opthamol. 138 :206-210,2004, 和 Kim 等人 J. Cataract Refract. Surg. 21 :320-325, 1995)。本发明的组织粘合剂可用于闭合透明角膜切口和巩膜隧道切口两者以防止泄漏。在此应用中,使用以上所述的方法将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到眼睛中切口部位,并允许混合物固化。另外,可以将两种水溶液涂覆在有助于产生切口的解剖刀片的侧面上,一种溶液在刀片的每侧上,以当部位准备闭合时施加它们到所述部位。

[0071] 本发明的组织粘合剂也可用于防止在手术之后在相邻解剖学部位之间的粘合或

对内部器官的损伤。使用以上所述的方法将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到一个解剖学部位。手动或使用一些其它措施,如手术夹,防止第一部位接触任何相邻的部位直到混合物固化,典型地约 2 秒 - 约 2 分钟。在固化之后,水凝胶不再是带粘性的,用作防止相邻部位粘合的阻挡。

[0072] 本发明的组织粘合剂也可用于给药到选择的解剖学部位。在此应用中,至少一种水溶液进一步包含药物或治疗剂。合适的药物和治疗剂是本领域公知的。广泛的列举由 Kabonov 等人在 U. S. 专利 No. 6, 696, 089 中给出,该文献在此引入作为参考(特别地,16-18 栏)。例子包含,但不限于抗菌剂,抗病毒剂,抗真菌剂,抗癌剂,疫苗,放射标记物,抗炎剂,抗青光眼剂(anti-glaucomic agents),局部麻醉剂,抗肿瘤剂,抗体,激素等。在此应用中,使用以上所述的方法将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到所需的解剖学部位,至少一个该溶液进一步包含感兴趣的药物或治疗剂。在水凝胶固化之后,将药物或治疗剂释放到所需的解剖学部位。释放速率依赖于水凝胶的交联密度,它可以由交联程度控制,交联程度进而由使用的氧化多糖和多官能聚醚的浓度,以及这些各自反应物上存在的官能团的相对水平确定。对于任何特定应用而言,为获得合适的药物释放速率需要的试剂浓度可以由本领域技术人员使用常规试验容易地确定。

[0073] 本发明的组织粘合剂也可用作填充剂以治疗尿失禁,特别地女性压力尿失禁。压力尿失禁是由在训练,咳嗽,喷嚏等期间出现的压力引起的尿从膀胱的损失。此问题的一个原因是尿道括约肌的弱化,尿道括约肌是在膀胱底部控制尿流动的环形肌肉。对于此状况的一个补救是使用填充剂以提供对尿道括约肌的物理支持。在此应用中,使用以上所述的方法将包含氧化多糖的水溶液和包含多臂聚醚胺的水溶液施加到括约肌周围的组织,优选使用标准细胞检查镜将两种水溶液的混合物注入。混合物固化成坚固,但柔韧的水凝胶。在注射部位的增加的填充为括约肌提供控制尿流动的另外能力。

[0074] 另外,本发明的组织粘合剂可用于其它医疗应用。这些应用包含,但不限于保持植入物就位的粘合剂,在组织上使用以阻挡空气、水分、流体或微生物迁移的粘合剂,和在其它外科手术操作,如胆囊切除术,造口术,阑尾切除术,肥胖病学,视网膜再连接,剖腹产闭合,腹式子宫切除术,和外伤穿孔,和破裂膜的闭合中,代替或补充缝线或 U 形钉的粘合剂。

[0075] 实施例

[0076] 本发明进一步在如下实施例中限定。应当理解这些实施例,尽管指示本发明的优选实施方案,仅通过举例说明给出。从以上讨论和这些实施例,本领域技术人员可确定本发明的必要特性,而且在不背离其精神和范围的情况下可产生本发明的各种变化和改进以使它适于各种用途和条件。

[0077] 使用的缩写的意义如下: " min " 表示分钟, " h " 表示小时, " sec " 表示秒, " d " 表示天, " ml. " 表示毫升, " L " 表示升, "  $\mu$  L " 表示微升, " cm " 表示厘米, " mm " 表示毫米, "  $\mu$  m " 表示微米, " mol " 表示摩尔, " mmol " 表示毫摩尔, " g " 表示克, " mg " 表示毫克, " meq " 表示毫当量, " eq wt " 表示当量, " MW " 表示分子量, " M " 表示摩尔浓度, " wt% " 表示重量百分比, " PEG " 表示聚乙二醇, " Dex " 表示氧化葡聚糖, " Vol " 表示体积, " na " 表示不适用, " nd " 表示未确定, " Ox " 表示氧化, " rpm " 表示每分钟转数,和 " kGy " 表示千格瑞。

[0078] 通用方法:

[0079] 试剂：

[0080] 葡聚糖 (MW = 10,000) 购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO)。含有由伯胺基封端的八个臂的 8-臂 PEG 胺 (MW = 10,000) 购自 Nektar Transforming Therapeutic (Huntsville, AL)。Jeffamine T3000 和 Jeffamine T403 购自 Huntsman LLC. (Houston, TX)。高碘酸钠 (99% 纯度, CAS No. 7790-28-5) 购自 Acros Organics (Morris Plains, NJ)。除非另外说明, 所有其它试剂购自 Sigma-Aldrich。

[0081] 制备氧化葡聚糖：

[0082] 如下过程用于从分子量为 10,000 道尔顿的葡聚糖制备具有约 48% 醛含量转化率的氧化葡聚糖。相似的过程用于分子量为 40,000、60,000, 和 250,000 道尔顿的葡聚糖。如下所示, 通过改变使用的高碘酸盐溶液的浓度获得其它醛转化率, 如下所述。

[0083] 将葡聚糖 (18.9g) 加入 500mL 圆底烧瓶中的 170.1g 蒸馏水中 (以得到 10wt% 水溶液)。将溶液搅拌 15-30min。然后, 将在 158.4g 蒸馏水中的 17.6g  $\text{NaIO}_4$  (10-wt% 水溶液) 加入葡聚糖溶液中。高碘酸盐溶液的浓度可以依赖于所需的醛转化率而改变。将混合物在室温下搅拌 5h。在此时间之后, 将溶液从圆底烧瓶取除, 分成四个相等体积并分配入 4 个渗析膜管 (MEMBRA-CEL™) Dialysis Tubing, 截止分子量为 3500 道尔顿, 购自 Viskase Companies, Inc., Willowbrook, IL)。对于分子量为 40,000、60,000, 和 250,000 道尔顿的葡聚糖, 使用 14,000 道尔顿截止分子量的渗析膜管 (Viskase Companies, Inc.)。将渗析管插入包含 4.5L 蒸馏水的 5L 烧瓶并渗析至多 4 天。在此渗析期间, 在 2 天之后更换蒸馏水。将样品从渗析膜管取出并放入冷冻干燥器容器。将样品使用液氮冷冻并放入冷冻干燥器 24-48h 或直到蒸发所有的水为止。

[0084] 使用如下过程测定获得的氧化葡聚糖中的二醛含量。将氧化葡聚糖 (0.1250g) 加入 250mL 锥形瓶中的 10mL 的 0.25M NaOH 中。将混合物轻微回荡, 然后放入 40°C 的温度受控超声浴 5min 直到所有的材料溶解, 得到暗黄色溶液。将样品从浴取出并立即在冷自来水冷却 5min。然后, 将 15.00mL 的 0.25M HCl 加入溶液中, 随后加入 50mL 去离子水和 1mL 的 0.2% 酚酞溶液。将此溶液采用 0.25M NaOH 使用 50mL 滴定管滴定, 由从黄色到紫色的颜色变化确定端点。

[0085] 使用如下公式计算氧化葡聚糖样品中的二醛含量, 在此也称为氧化转化率：

[0086]

$$\text{二醛含量} = \frac{(V_b - V_a)_s}{W_s/M} - \frac{(V_b - V_a)_p}{W_p/M} \times 100(\%)$$

[0087]  $V_b$  = 碱的总 meq

[0088]  $V_a$  = 酸的总 meq

[0089]  $W$  = 干燥样品重量 (mg)

[0090]  $M$  = 重复单元的分子量 = 162

[0091]  $S$  = 氧化样品

[0092]  $P$  = 初始样品

[0093] 实施例 1-16

[0094] 闭合的解剖刀切口的体外爆裂测试

[0095] 这些实施例的目的是证实在猪小肠中产生的切口采用各种组织粘合剂产生的闭合的爆裂强度

[0096] 在这些实施例中,注射器泵系统用于测量在猪小肠区段中产生的切口的闭合的爆裂强度。改进注射器泵 (Model No. 22, Harvard Apparatus, Holliston, MA) 以装配两个 30mL 注射器,它们通过“Y”接头连接在一起。将水通过单片 Tygon® R-36 管路 (0.6cm 直径) 和通过压力计 (Model PDG 5000L, Omega Engineering, Stamford, CT) 泵送。

[0097] 将从当地屠宰场获得的清洁猪肠的大约 12.5cm 区段在一端装上金属栓塞并配有用于从注射器泵输送水的进料管线,在另一端装上带螺纹孔的金属栓塞,它可以由机器螺钉密封。在肠外部周围采用尼龙线将栓塞保持位置。通过采用装配 #15 手术刀片的 Bard Parker™ 手术刀片手柄 5 (购自 BD Surgical Products, Franklin Lakes, NJ) 刺破产生通过肠壁进入内部的切口。肠外部上的切口比解剖刀片宽 (典型地 4-5mm) 而通过内壁的孔是约 3mm (约等于刀片)。此尺寸切口模拟如果将肠切断并以后缝合时在间断的缝线之间的距离。通过注射器泵采用包含紫色染料的水填充肠子直到水开始从端栓塞的开孔泄漏并也从肠壁中的解剖刀刺穿处泄漏。然后关闭泵并采用机器螺钉密封端栓塞。使用纸巾将解剖刀切口部位吸干。

[0098] 氧化葡聚糖溶液和多臂聚醚胺溶液在水中制备。使用两种方法的任一种将两种溶液施加到切口。在一种方法中,将溶液使用微吸管 (Eppendorf®, Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) 施加到部位和使用刮刀在表面上混合溶液。在施加之后,允许粘合剂在室温下固化不长于 2min 的时间。在第二种施加方法中,将两个 1mL 注射器装配“Y”连接器 (购自 Micromedics, Inc., St. -Paul, MN)。将 Kenics 类型静止混合器 (购自 ConProTec, Inc., Salem, NH) 在“Y”连接器的端部处插入。混合器的内径是约 3mm 和长度是 48mm 并具有 17 个混合步骤。通过轭板将两个注射器柱塞的端扣保持对齐,允许它们同时被压下,因此采用精确比例的两种溶液沉积所需数量的粘合剂到切口的部位上。

[0099] 在这些实施例中,使用具有不同分子量、不同氧化转化率和不同浓度的葡聚糖,如表 1 所示。使用的多臂聚醚胺是 8-臂 PEG 胺, Jeffamine T3000, 和 Jeffamine T403。8-臂 PEG 胺在不同的浓度下使用而且葡聚糖溶液对胺溶液的体积比变化,如表 1 所示。

[0100] 为比较,商业血纤维蛋白粘合剂 (购自 Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) 用于闭合猪肠中的切口并测量爆裂压力。根据制造商的指示制造和使用血纤维蛋白粘合剂。

[0101] 在此也称为泄漏压力测试的爆裂压力测试由如下方式进行:从注射器泵在 11mL/min 的流速下采用水对闭合的肠加压直到生物粘合剂闭合开始泄漏,在该点记录压力。当在水凝胶和组织表面之间的闭合处泄漏水时,规定为粘合失效。当水通过水凝胶自身渗透和泄漏时,规定为内聚失效。爆裂压力测试也对未闭合的肠进行,泄漏压力 < 10mm 汞 (Hg)。爆裂测试的结果见表 1。

[0102] 这些实施例的结果指示当多糖的氧化转化率增加时,泄漏压力增加,因此提供 stronger 的闭合。然而,采用相对高氧化转化率 (即大于约 60%) 时,粘合剂非常快速地交联并没有足够的时间铺展和与组织反应。通常,泄漏压力随在 10% 和 30wt% 之间的氧化葡聚糖浓度增加而增加。另外,使用 10-70wt% 的 8-臂 PEG 胺浓度获得高泄漏压力。在几乎所有的这些实施例中,采用本发明的组织粘合剂获得的泄漏压力显著高于采用纤维蛋白粘合剂获

得的泄漏压力。对于低于 100mm 汞的泄漏压力,失效是内聚性的,而对于大于 100mm 汞的泄漏压力,失效是界面性的(即粘合失效)。

[0103] 表 1

[0104] 猪肠中闭合切口的体外爆裂测试结果

[0105]



实施例	葡聚糖 MW	葡聚糖 Ox (%)	葡聚糖 Eq Wt	葡聚糖 wt%	胺 8-臂 PEG	胺 wt%	葡聚糖 Vol ( $\mu$ L)	胺 Vol ( $\mu$ L)	泄漏 mm Hg
1	10,000	20	389	30	8-臂 PEG	50	30	30	135
2	10,000	46	160	30	8-臂 PEG	50	30	30	150
3	10,000	46	160	30	8-臂 PEG	50	64	8	150
4	10,000	46	160	30	8-臂 PEG	50	40	20	135
5	10,000	46	160	30	8-臂 PEG	50	20	40	85
6	10,000	46	160	10	8-臂 PEG	50	30	30	85
7	10,000	46	160	20	8-臂 PEG	50	30	30	100
8	40,000	15	525	30	8-臂 PEG	50	30	30	15

9	40,000	74	95	30	8-臂 PEG	50	30	30	60
10	60,000	19	410	30	8-臂 PEG	50	30	30	110
11	250,000	6	1335	-30	8-臂 PEG	50	30	30	175
12	10,000	46	160	25	8-臂 PEG	10	30	30	50
13	10,000	46	160	25	8-臂 PEG	70	30	30	140
14	10,000	46	160	30	Jeff- 胺 T3000	纯	30	30	60
15	10,000	46	160	30	Jeff- 胺 T403	纯	40	20	30

[0106]

15 mm
不适用
不适用
不适用
不适用
不适用
不适用
不适用
不适用
不适用
16 对比, 纤维 蛋白

[0107]

实施例 17

[0108]

使用双胺体系的闭合解剖刀切口的体外爆裂测试

[0109]

此实施例的目的是验证采用双胺基组织粘合剂产生的对猪小肠中产生的切口的闭合的爆裂强度。

[0110] 用于此实施例的操作与在实施例 1-16 中描述的那些相同,区别在于两种不同的胺用于与氧化葡聚糖反应。葡聚糖的分子量为 10,000,和氧化转化率为 46% (eq wt 为 160)。葡聚糖溶液的浓度为 30wt%。第一胺溶液包含浓度为 50wt% 的 8-臂 PEG 胺和第二胺溶液是纯的液体 Jeffamine T403 (即 100wt%)。将溶液使用微吸管 (Eppendorf®) 施加到所述部位以输送 40  $\mu$ L 氧化葡聚糖溶液、20  $\mu$ L 的 8-臂 PEG 胺溶液和 12  $\mu$ L 的 Jeffamine。使用刮刀在部位上混合溶液。爆裂强度如在实施例 1-16 中所述测定。获得 125mm 汞的泄漏压力。结果证实通过氧化葡聚糖与两种不同的多臂聚醚胺反应形成有效的组织粘合剂。

[0111]

#### 实施例 18-23

[0112]

#### 猪肠中闭合的缝合肠切开术切口的体外爆裂测试

[0113] 这些实施例的目的是验证采用各种组织粘合剂闭合的猪小肠中缝合的肠切开术切口的爆裂强度。

[0114] 解剖刀切口在清洁新鲜猪小肠的大约 12.5cm 区段的一半圆周附近产生。然后将此切口使用 5-0Vicryl 缝线通过 2-3 处间断的缝合进行 (Ethicon Inc., Summerville, NJ) 闭合。使用外翻缝合技术,其中仅将组织的外层拉到一起。将缝合的肠在一端装配金属喷嘴并配有针对来自注射器泵的水的进料管线,在另一端由止血钳夹紧。采用尼龙结将喷嘴保持位置。将缝线采用纸巾吸干,然后在缝合处上使用实施例 1-16 中描述的方法施加粘合剂。

[0115] 用于这些实施例的组织粘合剂的组分是 46% -48% 氧化转化率、浓度为 25 或 30wt% 的氧化葡聚糖 (MW 为 10,000) 的水溶液和浓度为 20-50wt% 的 8-臂 PEG 胺水溶液。变化使用的两种溶液的体积比,如表 2 所示。在实施例 1-16 中描述的纤维蛋白粘合剂用于比较。

[0116] 爆裂压力测试如在实施例 1-16 中所述进行。也测试在闭合之前的缝合肠,泄漏压力是 10mm 汞。爆裂压力测试的结果见表 2。

[0117]

#### 表 2

[0118]

#### 猪肠中缝合肠切开术切口的体外爆裂测试结果

[0119]

实施例	葡聚糖 MW	葡聚糖 Ox (%)	葡聚糖 Eq Wt	葡聚糖 wt%	8-臂 PEG 胺 wt%	葡聚糖 Vol ( $\mu$ L)	胺 Vol ( $\mu$ L)	泄漏 mm Hg
18	10,000	46	160	30	50	40	10	120
19	10,000	46	160	30	50	30	30	110
20	10,000	46	160	30	50	20	40	85
21	10,000	48	167	25	20	50	50	275
22	10,000	48	167	25	25	50	50	200
23, 对比, 纤维 蛋白	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	25

[0120] 这些结果证实使用本发明的组织粘合剂在猪肠中获得缝合肠切开术切口的有效闭合。通常,当8-臂PEG胺对葡聚糖的比例增加时,获得的粘合剂变软并具有较差的机械强度。在几乎所有的这些实施例中,采用本发明的组织粘合剂获得的泄漏压力显著高于采用纤维蛋白粘合剂获得的泄漏压力。对于低于100mm汞的泄漏压力,失效是内聚性的,而对于大于100mm汞的泄漏压力,失效是界面性的(即粘合失效)。

[0121] 实施例 24-27

[0122] 猪肠中闭合的缝合切口的体外爆裂测试

[0123] 这些实施例的目的是验证采用各种组织粘合剂闭合的猪小肠中缝合切口的爆裂强度。

[0124] 解剖刀切口在清洁猪小肠的大约 12.5cm 区段的全部圆周附近产生。然后将此切口使用 5-0 Vicryl 缝线通过间断的缝合进行闭合。使用翻转的缝合技术,其中仅将肌肉的内层拉到一起。这是用于人肠吻合操作的优选技术。将缝合的肠在一端装配金属喷嘴并配有针对来自注射器泵的水的进料管线,在另一端由止血钳夹紧。采用尼龙结将喷嘴保持就位。将缝线采用纸巾吸干,然后在缝合处上施加粘合剂,如实施例 1-16 中所述。

[0125] 用于这些实施例的组织粘合剂的组分是具有变化浓度的 46% 氧化转化率的氧化葡聚糖 (MW 为 10,000) 的水溶液和具有变化浓度的 8-臂 PEG 胺水溶液,如表 3 所示。在实施例 1-16 中所述的纤维蛋白粘合剂用于比较。

[0126] 爆裂压力测试如在实施例 1-16 中所述进行。也测试在闭合之前的缝合肠,泄漏压力是 10mm 汞。爆裂压力测试的结果见表 3。

[0127] 表 3

[0128] 猪肠中缝合切口的体外爆裂测试结果

[0129]

实施例	葡聚糖 MW	葡聚糖 Ox (%)	葡聚糖 Eq Wt	葡聚糖 wt%	8-臂 PEG 胺 wt%	葡聚糖 Vol ( $\mu$ L)	胺 Vol ( $\mu$ L)	泄漏 mm Hg
24	10,000	46	160	20	20	250	250	105
25	10,000	46	160	10	50	250	250	105
26	10,000	46	160	30	50	250	250	125
27, 对比, 纤维 蛋白	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	25

[0130] 这些结果证实使用本发明的组织粘合剂在猪肠中获得缝合切口的有效闭合。在所有的这些实施例中,采用本发明的组织粘合剂获得的泄漏压力显著高于采用纤维蛋白粘合剂获得的泄漏压力。对于低于 100mm 汞的泄漏压力,失效是内聚性的,而对于大于 100mm 汞的泄漏压力,失效是界面性的(即粘合失效)。

[0131] 实施例 28-29

[0132] 眼睛中闭合切口的体外爆裂测试

[0133] 这些实施例的目的是验证新西兰兔的眼睛中闭合切口的爆裂强度。

[0134] 在新西兰兔(购自 Covance Research Products, Denver, PA) 的眼睛中产生 2-3mm 暂时透明角膜切口,以模拟白内障手术产生的切口。装配 #15 手术刀片的 Bard Parker™ 手术刀片手柄 5(购自 BDSurgical Products, Franklin Lakes, NJ) 用于产生切口。通过施加组织粘合剂的组分到所述部位来闭合切口,如实施例 1-16 中所述。

[0135] 用于这些实施例的组织粘合剂的组分是具有变化浓度的 46% 氧化转化率的氧化葡聚糖 (MW 为 10,000) 的水溶液和具有变化浓度的 8-臂 PEG 胺水溶液,如表 4 所示。

[0136] 将眼睛采用来自注射器泵的水在流速 11mL/min 下加压,直到检测到泄漏时为止,在该点记录压力。当在水凝胶和组织表面之间的闭合处发生水泄漏时,归定为粘合失效。当水通过水凝胶自身渗透和泄漏时,归定为内聚失效。在闭合切口之前测试眼睛,泄漏压力 < 15mm 汞。爆裂测试的结果见表 4。

[0137] 表 4

[0138] 眼睛中闭合切口的体外爆裂测试结果

[0139]



实施例	葡聚糖 MW	葡聚糖 Ox (%)	葡聚糖 Eq Wt	葡聚糖 wt%	8-臂 PEG 胺 wt%	葡聚糖 Vol ( $\mu$ L)	胺 Vol ( $\mu$ L)	泄漏 mm Hg
28	10,000	46	160	25	50	10	10	235
29	10,000	46	160	27	50	5	5	250

[0140] 这些结果证实使用本发明的组织粘合剂获得眼睛中暂时透明角膜切口的有效闭合。在两个实施例中，泄漏是通过粘合剂（即内聚失效）的。

[0141]

#### 实施例 30-37

[0142]

#### 组织粘合剂的体外降解

[0143] 这些实施例的目的是验证本发明的组织粘合剂的体外机械稳定性。

[0144] 通过混和氧化葡聚糖和多臂聚醚胺的水溶液制备组织粘合剂样品。分子量为 10,000 的葡聚糖用于这些实施例。使用的两种水溶液的浓度和体积见表 5。

[0145] 在粘合剂固化之后,将样品放入含有 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液的广口瓶内部。将广口瓶放置在设定在 80rpm 和 37℃ 的温度受控摇晃器内部。样品的降解(即材料的消失)由如下方式监测:视觉观察、机械性能,如使用 45-度弯曲测试测量、和重量增量(在 24h 之后测量)。45-度弯曲测试包含将粘合剂弯曲到约 45 度的角度并观察断裂。如果没有观察到断裂,认为材料通过测试。结果见表 5。

[0146] 表 5

[0147] 组织粘合剂的体外降解结果

[0148]

实施例	葡聚糖 Ox (%)	葡聚糖 Eq Wt	葡聚糖 wt %	胺	胺 wt%	葡聚糖 Vol (μL)	胺 Vol (μL)	降解	45-度弯曲	重量增量 (%)
30	20	390	40	8-臂 PEG	50	30	30	24h	是	未检测
31	46	160	20	8-臂 PEG	50	10	50	3h	是	未检测
32	46	160	20	8-臂 PEG	50	30	30	15d	是	250
33	46	160	30	8-臂 PEG	50	30	30	15d	是	250
34	46	160	30	8-臂 PEG	50	40	20	30d	是	175
35	46	167	25	8-臂 PEG	20	50	50	> 10d	是	115
36	46	167	25	8-臂 PEG	25	50	50	> 10d	是	115
37	46	160	30	Jeff-胺 T3000	纯	30	30	> 30d	是	2

[0149] 这些结果证实本发明的组织粘合剂具有良好的机械性能。降解速率可以通过改变葡聚糖的氧化程度、多糖和多臂聚醚胺的浓度、两种水溶液的体积比和使用的多臂聚醚胺而控制。数据也表明为降低溶胀或增加组织粘合剂的长期机械性能, 较低的 8-臂 PEG 胺浓

度,特别地 20-25wt%,可能是有益的。

[0150] 实施例 38-39

[0151] 使用两种胺制备的组织粘合剂的体外降解

[0152] 这些实施例的目的是验证使用两种不同多臂聚醚胺制备的组织粘合剂的体外机械稳定性。

[0153] 用于这些实施例的操作与实施例 30-37 中所述的那些相同。分子量为 10,000、氧化转化率为 46% (eq wt 为 160) 的葡聚糖用于这些实施例。葡聚糖水溶液的浓度是 30wt%。第一胺溶液包含浓度为 50wt% 的 8-臂 PEG 胺。第二胺是 Jeffamine T3000 或 Jeffamine T403,它们以纯物质使用,如表 6 所示。三种溶液的体积和结果也见表 6。

[0154] 表 6

[0155] 使用两种胺制备的组织粘合剂的体外降解结果

[0156]

实施例	葡聚糖 Vol ( $\mu$ L)	胺 1 Vol ( $\mu$ L)	胺 2	胺 2 Vol ( $\mu$ L)	降解	45- 度弯曲	重量 增量 (%)
38	40	20	Jeffamine T3000	4	25d	是	180
39	40	12	Jeffamine T403	10	12d	否	150

[0157] 这些结果证实使用两种不同多臂胺制备的本发明的组织粘合剂具有良好的机械性能。

[0158] 实施例 40

[0159] 组织粘合剂组分和输送器械的消毒

[0160] 此实施例的目的是验证包含氧化葡聚糖的水溶液、包含 8-臂 PEG 胺的水溶液、和输送器械的组件的消毒。

[0161] 氧化葡聚糖的水溶液 (20-30wt%) 和 8-臂 PEG 胺的水溶液 (20-50wt%) 由  $\gamma$  辐射在 25kGy ( $2.5 \times 10^6$ rad) 的通量下消毒。在辐射期间溶液容纳在玻璃小瓶中。在辐射期间溶液也可容纳在密封的一次性注射器中。

[0162] 用于连接两个 1mL 注射器的输送器械的 "Y" 连接器 (实施例 1-16 中所述) 也由  $\gamma$  辐射在 25kGy ( $2.5 \times 10^6$ rad) 的通量下消毒。

[0163] 将输送器械的静止混合尖端在 25kGy ( $2.5 \times 10^6$ rad) 的通量下辐射。然而,尖端变成 "微黄色" 的颜色,并甚至在最小应力下由于脆性而断裂。混合尖端通过在 120°C 下高压蒸煮 15min 消毒而没有任何疾病效应。

[0164] 使用先前实施例中描述的方法测试消毒过的水溶液的胶凝化,和测试获得的凝胶的机械降解和泄漏压力。发现消毒后的溶液非常类似于未消毒的溶液。这些结果证实水溶液和输送器械的消毒容易。

[0165] 实施例 41

[0166] 体外生物相容性测试

[0167] 此实施例的目的是验证包含氧化葡聚糖和 8-臂 PEG 胺的水溶液、和来自它们反应的葡聚糖-PEG 水凝胶在体外测试中的安全性。

[0168] 测试使用中国仓鼠卵巢 (CHO-K1) 细胞培养物根据 ISO10993-5:1999 进行。中国仓鼠卵巢 (CHO-K1) 细胞从 American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA 获得, 在由 10% 胎牛血清补充的 F12-K 培养基中生长。

[0169] 采用氧化葡聚糖 (MW = 10,000, 46% 氧化转化率, eq wt = 160) 的水溶液 (5、10、15、20、25、27 和 30wt%) 挑战中国仓鼠卵巢 (CHO-K1) 细胞培养物。将 CHO-K1 细胞在培养板中于每坑 55000 个细胞播种, 并采用 1mL 培养基孵育 24h。然后, 加入 100  $\mu$ L 氧化葡聚糖溶液。

[0170] 相似地, 采用 8-臂 PEG 胺 (MW = 10,000, eq wt = 1250) 的水溶液 (10, 20, 30, 40, 50, 60 和 70wt%) 挑战中国仓鼠卵巢 (CHO-K1) 细胞培养物。将 CHO-K1 细胞在培养板中于每坑 55,000 个细胞播种并采用 1mL 培养基孵育 24h。然后, 加入 100  $\mu$ L 的 8-臂 PEG 胺溶液。

[0171] 另外, 采用水凝胶的含水提取物挑战中国仓鼠卵巢 (CHO-K1) 细胞培养物, 所述水凝胶的含水提取物通过结合氧化葡聚糖 (MW = 10,000, 46% 氧化转化率, eq wt = 160) 的 (10, 15, 20, 25, 27 和 30wt%) 水溶液与 8-臂 PEG 胺 (MW = 10,000, 50wt%, eq wt = 1250) 的水溶液制备。水凝胶的液体提取物由如下方式获得: 将水凝胶采用 Dulbecco 改性必要培养基 (DMEM) 在 37°C 下孵育 24h。将提取物通过超滤消毒和然后, 连续地采用 DMEM 稀释。将 CHO-K1 细胞在 96-坑培养板中于每坑 55,000 个细胞播种, 并采用培养基孵育 24h。然后, 除去 DMEM, 将 100  $\mu$ L 水凝胶提取物加入每个坑中。在提取物曝露 24h 之后, 使用基于四唑 (鎓) 的比色测定 (MTT) 测定细胞毒性, 如下所述。

[0172] 细胞毒性使用基于四唑 (鎓) 的比色测定 (MTT) 测定, 如由 Sgouras 等人 (Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1:61-68, 1990) 所述和由 ATP 生物发光测定 (Toxilight) 测定, 如由 Crouch 等人 (Journal of Immunological Methods) 所述。

[0173] 实施例 42

[0174] 体外生物相容性测试

[0175] 此实施例的目的是使用 NIH3T3 人纤维母细胞培养物验证葡聚糖-PEG 水凝胶在体外测试中的安全性。

[0176] 测试使用 NIH3T3 人纤维母细胞培养物根据 ISO10993-5:1999 进行。NIH3T3 人纤维母细胞从 ATCC 获得, 在由 10% 胎牛血清补充的 Dulbecco 改性必要培养基 (DMEM) 中生长。

[0177] 采用水凝胶挑战 NIH3T3 人纤维母细胞培养物, 所述水凝胶通过结合氧化葡聚糖 (MW = 10,000, 46% 氧化转化率, eq wt = 160) 的 (10, 15, 20, 25, 27 和 30wt%) 水溶液与 8-臂 PEG 胺 (MW = 10,000, 50wt%, eq wt = 1250) 的水溶液制备。将水凝胶在聚苯乙烯培养板中的坑的底部上涂覆, 使得覆盖约 1/4 的坑底部。然后将坑在 UV 光下消毒并采用 50,000-100,000 个 NIH3T3 细胞播种。细胞正常汇合生长并涂覆坑底部, 生长到水凝胶的边缘; 然而, 它们生长未超过水凝胶。此结果验证水凝胶没有细胞毒性, 以及细胞培养物不粘附到水凝胶上。

[0178] 实施例 43

**[0179] 体外生物相容性测试**

[0180] 此实施例的目的是使用 J774 巨噬细胞验证在体外测试中由葡聚糖-PEG 水凝胶产生的非炎性反应。

[0181] 测试使用 J774 巨噬细胞培养物根据 ISO10993-5 :1999 进行。J774 巨噬细胞从 ATCC 获得并在由 10% 胎牛血清补充的 DMEM 中生长。

[0182] 采用水凝胶挑战 J774 鼠腹膜巨噬细胞细胞培养物,所述水凝胶通过结合氧化葡聚糖 (MW = 10,000、46% 氧化转化率、eq wt = 160) 的 (10, 15, 20, 25, 27 和 30wt%) 水溶液与 8-臂 PEG 胺 (MW = 10,000、50wt%、eq wt = 1250) 的水溶液制备。将水凝胶在聚苯乙烯培养板中的坑底部上涂覆使得覆盖约 1/4 坑底部。然后将坑在 UV 光下消毒和采用 J774 细胞播种。然后使用 ELISA 测定分析细胞培养物的 TNF- $\alpha$ , 即炎症反应的指示, 如由 Lara 等人 (Journal of Dental Research 82(6) :460-A65, 2003) 所述。TNF- $\alpha$  滴定量和阴性对照物 (空白坑) 相似, 表明水凝胶具有非炎性本质。

**[0183] 实施例 44****[0184] 体内生物相容性测试**

[0185] 进一步通过“涂刷”水凝胶的贴剂到活兔的小肠上验证葡聚糖-PEG 水凝胶的安全性。将动物封闭和正常喂食, 然后在 3 天之后杀死。检查在水凝胶粘合剂贴剂以下和周围的肠和邻近组织的水肿、红斑、毒性、发炎、水凝胶的降解、对肠壁的粘合和粘合组织生长的缺乏。

[0186] 将五只白色新西兰兔 (1 岁大, 大约 4kg 重量) 禁食过夜。在手术之前, 将动物采用丁丙诺啡处理, 然后采用氯胺酮和赛拉嗪的混合物麻醉。进行标准剖腹术操作以分离小肠的十二指肠区段。将染蓝色的聚丙烯缝合材料 (Prolene<sup>®</sup>, Ethicon) 的单一“标记物”针脚在离胃约 10cm 的肠组织的外层中放入十二指肠。进行此操作以协助在尸体剖检时找到水凝胶贴剂。采用如下方式将约 1cm $\times$ 2cm 的水凝胶贴剂施加到离胃约 12cm 的十二指肠。使用微吸管 (Eppendorf<sup>®</sup>) 将约 100  $\mu$ L 氧化葡聚糖溶液 (30wt%、46% 氧化转化率、eq wt = 160) 在十二指肠上涂刷, 随后施加 100  $\mu$ L 的 8-臂 PEG 胺溶液 (50wt%、eq. wt = 1250)。将混合物在该部位上采用薄刮刀剧烈搅拌 2-5 秒或直到混合物开始得到显著的粘度为止。在 15 秒内, 贴剂是无粘性的。允许贴剂固化 2min, 然后将腹膜和腹部在层中使用标准外科手术操作闭合。将肠表面覆约 90%, 留下肠系膜未覆盖。

[0187] 在 3 天之后尸体剖检时, 检查粘合剂施加部位的总体组织反应和粘合剂的存在。红斑和水肿的严重性使用与 ISO 皮内反应性测试 (ISO10993-12) 一致的评分系统评定。检查揭示水凝胶粘合剂在所有情况下都良好粘合而且没有可观察到的炎症。没有到相邻组织的纤维性粘合或附着。存在水凝胶的溶胀, 但没有聚合物涂层的劣化。在所有情况下, 肠蠕动可容易地通过粘合剂部位。在总体检查之后, 将组织切离并在 4% 福尔马林中固定用于组织病理学分析。将组织样品包埋、切片并使用标准方法染色。组织病理学分析揭示水凝胶具有生物相容性。

**[0188] 实施例 45****[0189] 纤维蛋白粘合剂的体内生物相容性测试的对比实施例**

[0190] 此实施例的目的是比较纤维蛋白粘合剂在体内生物相容性测试中的性能与葡聚糖-PEG 粘合剂的相关性能, 如实施例 44 中所述。

[0191] 遵循实施例 44 中所述的操作, 区别在于将根据制造商指示制备并采用它的输送器械施加的纤维蛋白粘合剂 (200  $\mu$  L) 涂刷在十二指肠上。允许贴剂固化 2min, 然后将腹膜和腹部在层中使用标准外科手术操作闭合。将肠表面覆盖约 90%, 留下肠系膜未覆盖。

[0192] 在 3 天之后尸体剖检时, 检查粘合剂施加部位的总体组织反应和粘合剂的存在。红斑和水肿的严重性使用与 ISO 皮内反应性测试 (ISO10993-12) 一致的评分系统评定。所述检查显示出粘合性差。粘合剂贴剂由于粘合差而从部位上落下, 没有可观察到的炎症。没有到相邻组织的纤维性粘合或附着。在所有情况下, 肠蠕动可容易地通过粘合剂部位。部位的组织病理学分析表明炎症反应非常少。

[0193] 此结果证实与纤维蛋白粘合剂相比, 葡聚糖-PEG 粘合剂的体内粘合性非常好, 如在实施例 44 中所述。

[0194] 实施例 46

[0195] 兔肠切开术的体内闭合

[0196] 此实施例的目的是验证葡聚糖-PEG 粘合剂在活兔的小肠中肠切开术切口的缝线周围闭合的安全性和效力。在缝合处和切口周围施加粘合剂之后, 允许它固化。将动物封闭和正常喂食, 然后在 3 天之后杀死。检查在水凝胶粘合剂贴剂以下和周围的肠和邻近组织的水肿、红斑、毒性、发炎、水凝胶的降解、对肠壁的粘合和粘合组织生长的缺乏。

[0197] 将五只白色新西兰兔 (1 岁大, 大约 4kg 重量) 禁食过夜。在手术之前, 将动物采用丁丙诺啡处理, 然后采用氯胺酮和赛拉嗪的混合物麻醉。进行标准剖膜术操作以分离小肠的十二指肠区段。将染蓝色的聚丙烯缝合材料 (Prolene<sup>®</sup>, Ethicon) 的单一“标记物”针脚在离胃约 10cm 的肠组织的外层中放入十二指肠。进行此操作以协助在尸体剖检时找到水凝胶贴剂。离胃约 12cm 产生 5-mm 切口, 将切口采用两个 5-0 Vicryl 缝线闭合。采用如下方式将水凝胶的贴剂施加到针脚上方的小肠上。使用实施例 1-16 中所述的输送器械, 采用具有 8 个混合步骤的静止混合器, 将与 100  $\mu$  L 的 8-臂 PEG 胺溶液 (50wt%; eqwt = 1250) 混合的 100  $\mu$  L 氧化葡聚糖溶液 (30wt%, 46% 氧化转化率, eq wt = 160) 输送到肠切开术部位。粘合剂将明显的出血原位凝固、能够交联、而且在 15sec 内变得无粘性。允许贴剂固化 2min, 然后将腹膜和腹部使用标准手术操作在层中闭合。将肠表面覆盖约 90%, 留下肠系膜未覆盖。

[0198] 在 3 天之后尸体剖检时, 检查粘合剂施加部位的总体组织反应和粘合剂的存在。红斑和水肿的严重性使用与 ISO 皮内反应性测试 (ISO10993-12) 一致的评分系统评定。检查显示出水凝胶粘合剂在所有情况下具有良好的粘合性, 而且没有可观察到的炎症。没有到相邻组织的纤维性粘合或附着。存在水凝胶的溶胀, 但没有聚合物涂层的劣化。在总体检查之后, 将组织切离并在 4% 福尔马林中固定用于组织病理学分析。将组织样品包埋、切片、和使用标准方法染色。组织病理学分析显示出水凝胶具有生物相容性。

[0199] 将约 12.5cm 肠区段从兔子切离, 评价泄漏压力, 如在实施例 1-16 中所述。在所有情况下泄漏压力是至少 30mm 汞, 表明切口的良好闭合。

[0200] 为比较, 将兔子闭合但不施加粘合剂。3 天之后的尸体剖检显示出在该部位处存在由于泄漏而导致的总体粘合。组织病理学评价显示出在该部位由于泄漏而出现了炎症反应。

[0201] 实施例 47

[0202] 使用纤维蛋白粘合剂体内闭合兔子肠切开术的对比实施例

[0203] 此实施例的目的是比较纤维蛋白粘合剂与葡聚糖-PEG 粘合剂（如在实施例 46 中所述）在闭合活兔子的小肠中肠切开术切口的缝线周围方面的性能。

[0204] 使用的操作与实施例 46 中所述的相同，区别在于将纤维蛋白粘合剂（250  $\mu$  L）施加到肠切开术缝合部位。允许贴剂固化 2min。在五分之三的情况下必须再施加粘合剂，这是由于出血将粘合剂从该部位洗掉了。将腹膜和腹部在层中使用标准外科手术操作闭合。将肠表面覆约 100%，留下肠系膜未覆盖。

[0205] 在 3 天之后尸体剖检时，检查粘合剂施加部位的总体组织反应和粘合剂的存在。红斑和水肿的严重性使用与 ISO 皮内反应性测试（ISO10993-12）一致的评分系统评定。检查显示出由于预测的泄漏在该部位处出现总体粘合。此外，粘合剂从肠表面升起并机械连接到缝合处的端部。组织病理学分析揭示由于泄漏而出现炎性反应。此结果证实与纤维蛋白粘合剂相比，实施例 46 中所述的葡聚糖-PEG 粘合剂具有优异的体内粘合性和闭合能力。

[0206] 实施例 48

[0207] 兔子切除术的体内闭合

[0208] 通过在活兔的小肠中切除术的缝线周围闭合，进一步验证水凝胶的安全性和效力。在缝合处和切口周围施加粘合剂之后，允许它固化。将动物封闭和正常喂食，然后在 3 天之后杀死。检查在水凝胶粘合剂贴剂以下和周围的肠和邻近组织的水肿、红斑、毒性、发炎、水凝胶的降解、对肠壁的粘合和粘合组织生长的缺乏。

[0209] 将五只白色新西兰兔（1 岁大，大约 4kg 重量）禁食过夜。在手术之前，将动物采用丁丙诺啡处理，然后采用氯胺酮和赛拉嗪的混合物麻醉。进行标准剖膜术操作以分离小肠的十二指肠区段。将染蓝色的聚丙烯缝合材料（Prolene<sup>®</sup>, Ethicon）的单一“标记物”针脚在离胃约 10cm 的肠组织的外层中放入十二指肠。进行此操作以协助在尸体剖检时找到水凝胶贴剂。离胃约 12cm 处切出通过小肠的完全切口。采用 5-0 Vicryl 缝线通过 9 个针脚将肠的两端结合在一起。采用如下方式将水凝胶的贴剂在针脚上方施加到小肠上。使用实施例 1-16 中所述的输送器械，采用具有 8 个混合步骤的静止混合器，将与 100  $\mu$  L 的 8-臂 PEG 胺溶液（50wt%；eq wt = 1250）混合的 100  $\mu$  L 氧化葡聚糖溶液（30wt%，46%氧化转化率，eq wt = 160）输送到切除术部位。粘合剂将明显的出血原位凝固、能够交联而且在 15sec 内变得无粘性。允许贴剂固化 2min，然后将腹膜和腹部在层中使用标准外科手术操作闭合。将肠表面覆盖约 100%，留下肠系膜未覆盖。

[0210] 在 3 天之后尸体剖检时，检查粘合剂施加部位的总体组织反应和粘合剂的存在。红斑和水肿的严重性使用与 ISO 皮内反应性测试（ISO10993-12）一致的评分系统评定。检查显示出水凝胶粘合剂在所有情况下具有良好粘合性而且没有可观察到的炎症。没有到相邻组织的纤维性粘合或附着。存在水凝胶的溶胀，但没有聚合物涂层的劣化。将约 12.5cm 肠区段从兔子切离并评价泄漏压力，如在实施例 1-16 中所述。在所有情况下，泄漏压力是 25-65mm 汞。组织病理学分析显示出水凝胶具有生物相容性。

[0211] 为比较，将兔子闭合但不施加粘合剂。3 天之后的尸体剖检揭示由于预测的泄漏在该部位出现总体粘合。将约 12.5cm 肠区段从兔子切离和评价泄漏压力。在四个情况下，泄漏基本在零表压下发生。第五个样品达到约 90mm 汞的压力。然而，在吻合部位存在相当的粘合。组织病理学分析揭示由于在部位的泄漏而出现炎性反应。



[0212] 实施例 49

[0213] 使用纤维蛋白粘合剂体内闭合兔子切除术的对比实施例

[0214] 此实施例的目的是比较纤维蛋白粘合剂与葡聚糖-PEG 粘合剂（如在实施例 48 中所述）在闭合活兔子的小肠中切除术的缝线周围方面的性能。

[0215] 使用的操作与实施例 48 中所述的相同，区别在于将纤维蛋白粘合剂（300  $\mu$  L）施加到切除术部位。允许贴剂固化 2min。在五分之二的情况下必须再施加粘合剂，这是由于出血将粘合剂从该部位洗掉了。允许贴剂固化 2min，然后将腹膜和腹部在层中使用标准外科手术操作闭合。将肠表面覆盖约 100%，留下肠系膜未覆盖。

[0216] 在 3 天之后尸体剖检时，检查粘合剂施加部位的总体组织反应和粘合剂的存在。红斑和水肿的严重性使用与 ISO 皮内反应性测试（ISO10993-12）一致的评分系统评定。检查揭示由于粪便物质的预测泄漏在该部位出现总体粘合。此外，粘合剂从肠表面升起并机械连接到缝合处的端部。将约 12.5cm 肠区段从兔子切离和评价泄漏压力。在除一个以外的所有情况下，泄漏在基本零表压下出现。所述的一种情况的泄漏压力为约 25mm 汞。组织病理学分析揭示由于泄漏而出现了炎性反应。此结果证实与纤维蛋白粘合剂相比，实施例 48 中所述的葡聚糖-PEG 粘合剂具有优异的体内粘合性和闭合能力。