



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103037783 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 10

(21) 申请号 201180026776. 5

代理人 章社杲 孙征

(22) 申请日 2011. 03. 25

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61B 17/08 (2006. 01)

12/750, 316 2010. 03. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 11. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/029931 2011. 03. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02011/123346 EN 2011. 10. 06

(71) 申请人 乔治·D·福卢什

地址 美国纽约

(72) 发明人 乔治·D·福卢什

(74) 专利代理机构 北京德恒律治知识产权代理

有限公司 11409

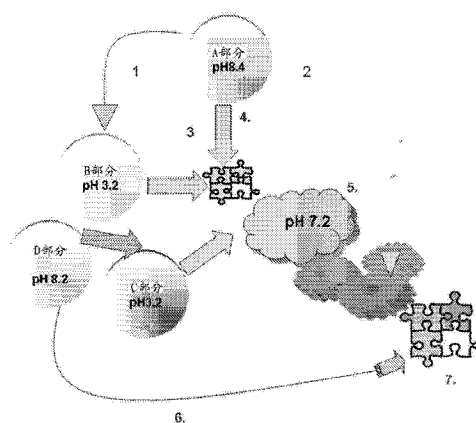
权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 7 页

### (54) 发明名称

用于非压迫性出血的组织封闭剂

### (57) 摘要

ClotFoam 是被设计成在非压迫性出血情况中用于中度至重度出血的手术封闭剂和止血剂。ClotFoam 可以在腹部、胸、四肢或其他腔内裂开创伤或手术之后作为止血的初级处理或辅助手段在手术室中通过腹腔镜端口施用,或者在剖腹手术中直接施用在撕裂组织上面,或者在手术室外通过混合针和 / 或喷雾注射方法施用。ClotFoam 的交联技术产生运载止血所必需的纤维蛋白封闭剂的粘性三维聚合网络或支架。当混合时,ClotFoam 产生扩散至整个体腔从而到达撕裂组织的泡沫以封闭组织和促进凝血级联。本发明使用通过 pH 的变化发生聚合的纤维蛋白单体作为活性封闭组分。



1. 一种用于纤维蛋白封闭剂（纤维蛋白单体）的水凝胶载体的四部分组合物，所述组合物作为非压迫性止血剂用于控制出血和预防血肿形成。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，所述组合物能够在不需要缝合线、缝合或其他压迫要素的情况下阻止严重出血情形下的出血并且封闭撕裂组织。

3. 一种包括组合使用的水凝胶载体和纤维蛋白单体的四部分止血组合物，所述组合物用于中止患者身体的损伤组织的失血而不需要额外单独地施加压迫力，所述组合物包括：第一组分（A 部分），呈液体形式，所述第一组分为在金属离子的存在下在选定的 pH 为大约 8.3 的缓冲溶液中与蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮和牛血清白蛋白混合的硬骨鱼（鱼）A 型明胶；第二组分（B 部分），所述第二组分为在 pH 3.4 的溶液中的选定的相对高分子量的丙烯酸卡波姆和二价离子；第三组分（C 部分），所述第三组分为在选定酸性溶液中当 pH 变化时发生聚合的纤维蛋白单体；以及第四组分（D 部分），所述第四组分具有用于稳定纤维蛋白聚合物的选定钙非依赖型转谷氨酰胺酶和氯化钙。

4. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，碱性缓冲溶液是浓度通常在 0.5M 至 0.75M 范围内的碳酸钠 / 碳酸氢钠。

5. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，所述 D 部分包含适合于所述纤维蛋白单体聚合的浓度为约 20mM 溶液的钙离子源。

6. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，所述二价离子包括用于大幅增加纤维蛋白聚合速率、纤维蛋白丝的长度和强度以及加强支架聚合的钙、锌和镁离子。

7. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，A 部分至 D 部分在灭菌过程中保持其理化性质。

8. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，所述纤维蛋白单体在醋酸中的浓度通常是在 12mg/ml 至 20mg/ml 的范围内。

9. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，A 部分至 D 部分以及所述组合物与施用它们的组织具有生物相容性。

10. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，所述失血是所述患者在引起失血的选定手术或事件期间出现血肿形成的结果，所述选定手术或事件包括但是不限于内伤、普通外科手术、腹腔镜手术和脂肪吸除手术。

11. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、白蛋白和明胶是高分子，这些高分子混合后产生 3D 聚合物，所述 3D 聚合物提高泡沫的寿命和质量，同时通过基质形成提高组织粘性。

12. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中，所述纤维蛋白单体是基本上不含有凝血酶和催化纤维蛋白原形成纤维蛋白的任何外源性酶的非动态纤维蛋白单体。

13. 一种利用包含组合使用的水凝胶载体和纤维蛋白单体的四部分止血组合物封闭患者身体的损伤组织的方法，所述组合物用于中止所述损伤组织的失血而不需要额外单独施加压迫力，所述方法包括以下步骤：

(i) 在选定的混合装置中混合第一组分（A 部分）和第二组分（B 部分），其中所述第一组分呈液体形式，所述第一组分为在金属离子的存在下在选定的 pH 为大约 8.3 的缓冲溶液中与蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮和牛血清白蛋白混合的硬骨鱼（鱼）A 型明胶；所述第二组分为在 pH 3.4 的溶液中的选定的相对高分子量的丙烯酸卡波姆和二价离子；

(ii) 在所述混合装置中混合步骤 (i) 的混合物和第三组分 (C 部分), 所述第三组分为在选定酸性溶液中当 pH 变化时发生聚合的纤维蛋白单体;

(iii) 在所述混合装置中混合步骤 (ii) 的混合物和第四组分 (D 部分) 从而产生泡沫, 所述第四组分具有用于稳定纤维蛋白聚合物的选定钙非依赖型转谷氨酰胺酶和氯化钙;

(iv) 通过所述混合装置的出口将所述泡沫递送和 / 或分散至体腔、器官或组织的手术部位从而使所述泡沫与所述部位接触, 使得所述泡沫的非动态、非交联的纤维蛋白单体粘着至所述部位的湿组织并在所述患者的血液中形成基质; 以及

(v) 通过中和所述非交联的纤维蛋白单体的 pH 使所述非交联的纤维蛋白单体呈现动态, 以使所述非交联的纤维蛋白转化成纤维蛋白封闭剂, 从而诱导血液凝结和切开组织的粘合性能。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 所述手术部位包括患者的皮肤、腹腔、胸、心血管系统、淋巴系统、肺部系统、耳朵、鼻子、咽喉、眼睛、肝脏、脾脏、颅、脊柱、上颌面、骨头、肌腱、胰腺、泌尿生殖道或消化道。

15. 根据权利要求 13 所述的方法, 进一步包括使四部分组合物粘合剂的水溶性组分混合, 然后通过由混合装置引起的选定的聚合 / 交联反应使所述粘合剂聚合 / 交联的步骤。

16. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 步骤 (i) 至步骤 (iii) 的所述混合装置是气动式四管注射器, 每一管包含组分 A 部分、B 部分、C 部分和 D 部分中的一种。

17. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 由硬骨鱼 (鱼) A 型明胶、牛血清白蛋白、角叉菜胶 (磺化多糖)、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、卡波姆 934 和 ACTIVA 在缓冲溶液中形成的交联基质用作纤维蛋白组分的支架, 从而与组织结合到一起而不需要额外单独压迫或加入缝线、短纤维、胶带或绷带。

18. 根据权利要求 13 所述的方法, 进一步包括当 A 部分、B 部分、C 部分和 D 部分的混合物形成粘性发泡水凝胶时将所述混合物分散至所述患者的体腔, 从而使得所述混合物在适合形成纤维蛋白凝块并因此封闭伤口的选定时间周期内将所述损伤组织的失血量减到最少的步骤。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中, 所述粘性发泡水凝胶在组分 A 部分、B 部分、C 部分和 D 部分混合后不足约 10 秒内形成。

20. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中, 在约 5Hz 的频率和约 2% 的应力应变以及大约 37°C 的条件下, 通过流变测量学监测, 形成的所述粘性发泡水凝胶达到约 6000dyn/cm<sup>2</sup> 的储能模量 (G'), 所述储能模量为时间的函数。

21. 根据权利要求 13 所述的方法, 在步骤 (ii) 中, 组分 C 部分的溶液包含溶解在醋酸中的纤维蛋白单体。

22. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 步骤 (iii) 进一步包括使纤维蛋白单体在四部分溶液中保持聚合和稳定从而形成纤维蛋白封闭剂的步骤。

23. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 当将碱性 A 部分加入所述纤维蛋白单体时, 由酸溶液引起所述纤维蛋白单体的聚合。

24. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 步骤 (iii) 进一步包括使通过 D 部分中的转谷氨酰胺酶的活性稳定化的纤维蛋白聚合物保持 90 天以上的步骤。

25. 根据权利要求 13 所述的方法, 通过卡波姆 934 和磷酸二氢钠 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 与碳酸氢

钠 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 的简单缓冲溶液混合从而在二价离子或表面活性剂的存在下释放出二氧化碳 ( $\text{CO}_2$ ) 的化学反应引起泡沫形成。

26. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 当混合组分 A 部分、B 部分、C 部分和 D 时产生的泡沫是不放热的泡沫, 所述泡沫的体积比混合步骤 (i) 之前的各组分部分的体积大了约 400%。

27. 一种用于制备和施用包括组合使用的水凝胶载体和纤维蛋白单体的四部分止血组合物的医用试剂盒, 所述组合物用于中止患者身体的损伤组织的失血而不需要额外单独地施加压迫力, 所述试剂盒包括: 第一组分 (A 部分), 呈液体形式, 所述第一组分为在金属离子的存在下在选定的 pH 为大约 8.3 的缓冲溶液中与蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮和牛血清白蛋白混合的硬骨鱼 (鱼) A 型明胶; 第二组分 (B 部分), 所述第二组分为在 pH 3.4 的溶液中的选定的相对高分子量的丙烯酸卡波姆和二价离子; 第三组分 (C 部分), 所述第三组分为在选定酸性溶液中当 pH 变化时发生聚合的纤维蛋白单体; 以及第四组分 (D 部分), 所述第四组分具有用于稳定纤维蛋白聚合物的选定钙非依赖型转谷氨酰胺酶和氯化钙; 以及用于混合、混合后通过混合装置的出口将所述组合物递送和 / 或分散至所述患者的身体部位的装置。

## 用于非压迫性出血的组织封闭剂

### 技术领域

[0001] 注册商标为ClotFoam®的本发明大体上涉及可以在无压迫、缝线或短纤维的情况下用于在体内结合或封闭组织的粘性封闭剂组合物和止血剂。具体而言,本发明涉及呈液态的四个组分,在施用到组织上时将这四个组分混合起来,然后在体内固化以结合组织和封闭组织从而预防或控制腔内出血或内出血。更具体而言,本发明是发明名称为“Tissue Sealant for Use in Non-Compressible Hemorrhage (用于非压迫性出血的组织封闭剂)”(日期:2009年4月7日)的第12419734号专利申请的改进。

### 背景技术

[0002] 外伤性损伤是全球发病率和死亡率最常见的原因。在美国,医院接纳的40%以上的创伤病例都是由道路交通事故造成的。

[0003] 出血是常规战争的战场上死亡的主要原因(1)。这些死亡中的大部分发生在伤员能够被转移至治疗机构之前的场所(2)。几乎50%的伊拉克和阿富汗的战斗死亡率以及高达80%的美国国内平民外伤死亡率都归因于不受控制的出血(3)。

[0004] 这种类型的死亡的主要原因是出血(50%)和神经创伤(36%),而其他原因是破坏性的多发性损伤。即使伤员存活的时间足以转移至治疗机构,出血仍然是后来死亡和并发症的主要原因(2)。腹部损伤带来棘手的问题,尤其是对于年轻人(4-8)。由于肝脏和脾脏是腹内最大的实体器官,因此它们是最常受伤的器官(9-10)。

[0005] 目前通过肝门血流阻断(Pringle's maneuver)或包扎伤口来控制肝脏的大量出血,但是这两种方法都需要手术干预并且不能在战场上或事故现场使用(11,12)。极小的损伤引起的脾脏创伤可能会大出血(10-12)。尽早和有效地控制出血可能会比任何其他措施挽救更多的生命。但是由于目前用于腔内出血的所有止血剂都被设计成用于手术室且在腔被充分打开的情况下,而不能用于事故现场或战场上的突发情况,因此出血通常是致命的。同样,目前需要压迫止血的某些类型的手术(诸如腹腔镜手术或脑手术)以及内出血可以以更低侵入性的方式处理。

[0006] 目前的解决方案和局限性。可以附着至组织的生物胶是已知的。通常,合成粘合剂用于紧密地封闭血管或肺以及用于“胶粘”皮肤切口的边缘。通常在伤口愈合后,这些胶通过生物降解、吸收或通过以痂的形式简单分离而去除。已经开发了各种技术来配制组织粘合剂。某些组织粘合剂来源于合成,诸如基于氰基丙烯酸盐(2-丁基氰基丙烯酸盐,2-辛基氰基丙烯酸盐)或合成聚合物的胶粘物,其他组织粘合剂包含诸如胶原蛋白或纤维蛋白的生物材料,这些生物材料除具有止血性能外也通过控制出血来发挥作用。

[0007] 由于具有止血和粘合性能,封闭剂(尤其是纤维蛋白封闭剂)在大部分外科专业中已经广泛使用二十多年,用于减少失血量和手术后出血,这是因为封闭剂(尤其是纤维蛋白封闭剂)具有在聚合时附着至人体组织的能力(14,15,16)。这些化合物用于封闭或加固已经缝合或吻合(stapled)的伤口;这些化合物也可以与在受伤区域上方施加的压力一起使用。纤维蛋白封闭剂是模仿凝血级联的最后步骤的生物粘合剂(13)。

[0008] 有几种商品 (Floseal, Gelfoam, Evicel) 可用 (16-18)。然而, 这些产品具有阻碍它们在急诊医学 (创伤) 和腹腔镜手术中广泛使用的显著的局限性。目前所有用于腔内出血的止血剂都被设计成用于手术室而不用于突发情况 (例如事故现场或战场上) 并且都需要压迫。用于非压迫性出血的组织粘合剂和封闭剂组合物的开发和 / 或使用所面临的主要局限性之一是它们不能够与组织形成足够强的结合且不能发展成一种施用方法。因此, 组织粘合剂和封闭剂必须与压迫方法、缝合线和 / 或短纤维 (staples) 组合使用以至于使达到可接受性能所需的组织结合强度降低。然而, 在很多情况下, 缝合线和 / 或短纤维的使用是不理想、不适当或不可能的。粘性基质与组织难以形成强的界面或结合很可能归因于若干因素: 腔内释放的血液或流动的血液不允许促进凝结的化合物到达出血源, 而且在施用组织粘合剂或封闭剂组分时和 / 或固化期间以及固化之后, 组织中的各种蛋白质不易于与组织粘合剂或封闭剂组分发生非共价和 / 或共价相互作用。因此, 可以料想到, 对于大部分组织粘合剂以及封闭剂体系, 通常在交联的粘性基质和一种或多种与组织相关的蛋白质 (诸如胶原蛋白、肌动蛋白和肌凝蛋白) 之间的界面处不起作用 (19, 20)。

[0009] 目前可选择的方法: ClotFoam。需要在无压迫和 / 或无缝合的情况下就可以实现止血从而在手术室外阻止严重腔内损伤出血的试剂。在不能使用压迫的手术室中 (例如腹腔镜手术, 神经外科等), 非压迫性技术也是有用的。为了抵抗血液流动, 粘性基质必须在几秒内在流动的血液中与组织形成强界面和结合并保留在撕裂部位从而形成凝块。如第 12419734 号专利申请中描述的, 本发明的试剂附着至人体组织的能力与运载纤维蛋白封闭剂的支架 (scaffold) 的内部结构有关, 当纤维蛋白封闭剂聚合时其转化并具有必要的粘弹性和粘附性能。水凝胶的快速形成, 在最短的聚合时间内产生包含必要组分的粘性胶从而在撕裂的出血组织上方形成功能性纤维蛋白凝块, 这在临床上是重要的。组织封闭剂瞬时粘合是理想的从而确保该封闭剂在接触施用部位时发挥作用并停留在施用部位而不被血液冲走或因目标组织的移动而移位。(21)

[0010] 在我们的方法中, 这些功能通过以下内容实现 a) 在原位形成通过非共价键与组织结合的三维聚合交联化学网络; b) 泡沫的粘弹性特性产生附着至撕裂组织和湿表面的非常粘的基质; c) 快速形成强纤维蛋白凝块, 该纤维蛋白凝块通过钙非依赖型转谷氨酰胺酶 ACTIVA 来稳定。粘性和其他粘弹性性能对于纤维蛋白聚合物刺激凝血级联、形成血凝块和实现止血的能力具有实质性贡献。

[0011] 组合物。ClotFoam 包含纤维蛋白单体溶液, 该纤维蛋白单体在通过渗析方法引起 pH 变化时易于聚合, 该纤维蛋白单体溶液被嵌入水凝胶支架中。支架在活化的转谷氨酰胺酶 (钙依赖性和钙非依赖性) 的存在下交联。当纤维蛋白和支架这两种聚合物在原位交联时实现三个目标或功能: a) 允许试剂在腹膜腔或其他体腔中无创施用和扩散; b) 附着并压迫撕裂或受伤组织以阻止血液流动; 以及 c) 在伤口上方保留必需的组分从而产生纤维蛋白凝块并刺激凝血级联。

[0012] 支架使用明胶作为与生物聚合物交联的“结构”蛋白质以获得特定的粘弹性特性 (profile), 该粘弹性特性对于运载纤维蛋白单体和中和其 pH 以使纤维蛋白单体聚合是理想的 (21, 22)。当通过各个部分的混合发生聚合时, 纤维蛋白在受伤部位提供了关键的临时基质 (23)。

[0013] 无创施用和扩散是基于混合各个组分之后产生的泡沫, 一旦被注射, 泡沫会扩散

至整个腔从而到达撕裂组织以刺激凝血级联。与现有凝胶的其他重要区别是所提出的粘合剂用作交联的结构蛋白质,硬骨鱼凝胶 A 型明胶、牛血清白蛋白 (BSA, 蛋白质)、卡波姆 934 (与烯丙基蔗糖 (perallylsucrose) 交联的聚丙烯酸)、钙非依赖性交联催化剂 (ACTIVA) 和诸如多糖和聚乙烯吡咯烷酮的可选材料、角叉菜胶 (磺化多糖) 蔗糖、 $MgCl_2$ 、具有或不具有海藻酸、羧甲基纤维素,提供更好和更“智能的”交联化学作用,根据需要改进液体-凝胶状态和粘性。

[0014] 基质实现止血的能力不仅取决于纤维蛋白本身的形成,还取决于纤维蛋白、酶原、凝结因子、酶抑制剂、细胞受体的特异结合位点之间的相互作用以及同样重要的泡沫的分布动力学和粘弹性附着性能 (24, 25)。可以增强或提高这些因素的活性以产生能够阻止脾脏、肝脏和腹腔、颅腔和软组织中的其他实体器官的薄壁组织出血的强凝块。配制每一部分从而使纤维蛋白凝块组分的活性最大化。

[0015] 支架的瞬时凝胶化以及其快速产生纤维蛋白凝块的能力对于确保封闭剂停留在施用部位而不被血液冲走或因目标组织的移动而移位是必要的 (19)。在凝结条件下, ACTIVA 以及  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{++}$  和  $Zn^{++}$  通过共价键使纤维蛋白凝块稳定而对这一过程作出贡献 (24)。

[0016] 关键属性。聚合/粘合。在蔗糖、金属离子和钙非依赖性转谷氨酰胺酶的存在下,明胶链、血清白蛋白和卡波姆 934 共价交联的结果是形成凝胶泡沫 [24]。该凝胶运载和支持纤维蛋白单体溶液的聚合,在施用 1 分钟内纤维蛋白单体通过  $Ca^{++}$  和 ACTIVA 稳定形成纤维蛋白凝块。该凝块是物理稳定的,并且与支架很好地融为一体 [25],而且与非交联的凝块 [26] 或其他纤维蛋白封闭剂相比更能抵抗由血纤维蛋白溶酶引起的细胞溶解。支架的组分与 ACTIVA 一起促进纤维蛋白的 aC- 域的转谷氨酰胺酶介导的低聚反应以促使整合蛋白聚集,从而增强细胞粘附和扩散,这促进纤维蛋白与 EC 上的 avb3-, avb5- 和 a5b1- 整合蛋白结合 (27)。该低聚反应还促进经由粘着斑激酶 (FAK) 和细胞外信号调节激酶 (ERK) 的整合蛋白依赖型细胞信号转导,随着时间的推移,这导致通过鱼明胶对成纤维细胞分化的作用操纵的细胞粘附和细胞迁移增加 [28]。额外存在的  $Ca^{+}$  和锌加快炎症反应和凝血级联之间 (第一阶段) 的进展。

[0017] 通过流变测量法测量的胶凝时间、胶凝强度,在湿表面保持接触粘附性的能力以及纤维蛋白单体的快速聚合和稳定化 (在 ACTIVA 的存在下形成共价键) 以获得功能性纤维蛋白凝块在临床上是重要的。高抗张强度和粘合强度是表征由试剂产生的明胶-纤维蛋白聚合网络的机械性能,明胶-纤维蛋白聚合网络是成功封闭所必需的 (29)。

[0018] 在体内和体外测试所提出的试剂粘附至人体重要组织的特性和聚合动力学。在啮齿动物和猪模型中获得的数据充分证明了 ClotFoam 在继发于 IV 级外伤性肝损伤的诱导性腹膜内非压迫性出血中停止流血和在无压迫的情况下实现止血的能力。取决于蛋白质浓度、稀释和催化剂,胶凝过程在液体溶液混合的 6 秒钟内开始,在 20 秒内达到  $7000\text{dyn/cm}^2 \pm 1000\text{dyn/cm}^2$  的胶凝强度。取决于表面活性剂 (吐温 80) 的浓度和 pH,凝胶状态在 10 至 20 分钟之间保持稳定,最终恢复液体状态。这种最终状态的转换有助于试剂从腔中吸收和去除。粘性水凝胶的张力静态和动态体积载荷的研究表明杨氏模量在 45 至 120KPa 的范围内,而且与报道过的由基于纤维蛋白的封闭剂获得的水溶胶的体积性能 (28) 相比,这些体积性能更高。即使是在被冲走之后,数缕 ClotFoam 仍然附着至两个相对的撕裂组织。

[0019] 蛋白质凝胶化。确保三维聚合网络与伤口周围的组织结合的另一个重要组分是结构蛋白质。ClotFoam 包含液态的硬骨鱼 A 型明胶。制造该明胶的原料是诸如鳕鱼、黑线鳕鱼和青鳕等的深水鱼的皮。其是由胶原蛋白在相对低的温度下通过温和的部分水解衍生得到的。

[0020] 鱼明胶的独特性在于明胶的氨基酸含量。虽然所有的明胶都由相同的 20 种氨基酸组成,但是可以在亚氨基酸、脯氨酸和羟脯氨酸的量方面有所变化。在这些亚氨基酸的量较少的情况下,明胶在水溶液中的氢键结合较少,从而降低了胶凝温度。来自于鳕鱼皮的明胶在 10℃ 胶凝,而来自于鲤鱼皮的明胶更类似于动物明胶,其在高于室温的温度下胶凝。该明胶的最有用的两种性能是凝胶强度和粘性 (30)。

[0021] 类似明胶的生物大分子已经成为用于组织工程学的高度通用的仿生涂料 (31)。3T3 成纤维细胞在明胶膜上的稳态粘附能比在壳聚糖膜上的稳态粘附能高三倍。假设在明胶上存在粘合域导致 3T3 成纤维细胞对明胶具有更好的附着性。因此,可生物吸收的明胶和多糖可以用于制备更安全且更强的止血凝胶 (32)。

[0022] 在我们的实验室中研究明胶-纤维蛋白-BSA 水凝胶胶粘物的快速可固化 3D 网络对撕裂组织的封闭效果。当在水溶液中混合聚合物组分时,在改性明胶中的氨基基团和改性多糖中的醛基基团之间形成希夫碱 (Schiffbase),这导致分子间交联和凝胶形成。凝胶形成可以在 5 秒内发生,而且当 20wt% 的氨基-明胶 (55% 氨基) 和 10wt% 的醛-HES (> 84% 二醛) 水溶液混合时,结合强度是约 225gm cm<sup>-2</sup>。水凝胶胶粘物导致极好的封闭效果。

[0023] 明胶广泛用于医学应用中。明胶与水一起形成半固体胶态凝胶。明胶已经用在多种生命支持应用中,诸如血浆扩容剂和血液代用品 (31)。当在失血性休克中通过静脉注射一定量血液代用品时,明胶被认为是止血变量中的低效应分子 (33)。该分子被认为是细胞极好的天然附着位点和具有高度生物相容性并且易于吸收以将与伤口愈合过程和凝血相关的试剂引入其中的材料。

[0024] 粘弹性性能。在不同的明胶、角叉菜胶、卡波姆和活性物质浓度下,胶凝点处的粘度和弹性模量不同。这些参数为某一时间点 (胶凝点) 的流动性能和胶凝强度提供量度,这些参数还指示泡沫在腔中的最佳分布和泡沫扩散到整个腔中以粘着至撕裂组织并触发凝血级联的能力。如下描述的组分的最佳浓度使得该粘合剂流入并机械地“互锁”或粘着至组织从而封闭伤口。然而低粘性粘合剂可能缺乏足够的粘合强度以保留在其施用的位置而且可能被冲走,高粘性配方可能不能产生足够的泡沫来覆盖腔或不能充分流动以到达组织。如果该粘合剂必须被施用到湿组织,这种问题可能尤为重要。另外,较强的凝胶或聚合较快的凝胶具有更大的粘合强度,但可能不能有效地渗入组织并与组织互锁。因此,粘合剂的流动性能和胶凝强度是特别重要的,而且在器官或组织被穿孔的腔内非压迫性出血情形中,这种重要性更明确 (19-21)。

[0025] 尽管血液流动,但是试剂的粘性和胶粘稠度使得泡沫原位维持在撕裂组织上方,而 PVP 和其他大分子增强泡沫与湿组织的物理粘附。与均质液体形式实现的附着相比,这种泡沫性质实现了更广泛的附着,并且还提供支架用于生长结合切开组织并对血流形成屏障的纤维蛋白网络。可商购的基于细菌或植物衍生的碳水化合物的凝胶组分的加入可以用于进一步提高 ClotFoam 的性能。已知用于形成稳健的水凝胶的具有钙离子、藻酸 (pKa =



5) 的 Lo- 酰基结冷胶和具有槐豆胶和钾离子的角叉菜胶也可以加入到汇集的血液 (pooled blood) 中以更好地实现止血。

[0026] 纤维蛋白单体的聚合 :Belitser 等 (1968, BBA) 最先描述和发表了生产纤维蛋白单体的实验方法 (34)。这种方法的局限性在于单体的产量为每天几毫克。从 1968 年开始许多作者研究了纤维蛋白单体的制备、性质、聚合、纤维蛋白原 - 纤维蛋白转化的平衡、溶解性、活化作用和交联 (35-43)。虽然 Edwardson 等的第 5750657 号美国专利描述了利用纤维蛋白单体组合物制备纤维蛋白封闭剂的方法,但是 ClotFoam 封闭剂组合物、通过中和纤维蛋白单体生产聚合物、以及利用通过渗析方法生产的纤维蛋白单体是完全新颖的。以专利申请号 12487057 提交的非临时专利申请“A Method to Produce Fibrin Monomer in Acid Media for Use as Tissue Sealant (生产用作组织封闭剂的酸性介质中的纤维蛋白单体的方法)” (日期:2009 年 6 月 18 日) 描述了一种商业上可行的生产工业规模数量的纤维蛋白单体溶液的方法。各部分的组合物和生产纤维蛋白单体的方法对于非压迫性技术的实现是关键。在一滩血中粘着至撕裂组织的能力取决于细胞与基质的相互作用。纤维蛋白本身的特性,诸如纤维蛋白的厚度、分枝点的数量、多孔性和渗透性以及其它聚合特性限定纤维蛋白、酶原、凝结因子、酶抑制剂和细胞受体上的特异结合位点之间的相互作用 [24]。氯化物和 Zn 离子已被识别为纤维蛋白聚合的调节剂,因为这些离子通过抑制更厚、更硬和更直的纤维的生长来控制纤维尺寸。

[0027] 其他研究者进行的 pH 研究 (34) 和我们的研究表明 pH 和离子强度对支架和纤维蛋白单体的聚合和交联以及凝块形成存在依赖性。pH 决定包含支架的溶液的粘度以及该溶液中和单体溶液的酸性 pH 的能力,从而产生将通过 ACTIVA 稳定的聚合物。配制 ClotFoam 的 A 部分, B 部分, C 部分以及 D 部分以保持最佳的 pH 从而支持纤维蛋白封闭剂组分、纤维蛋白单体和 Activa 的结合、保存和活性。

[0028] 泡沫的作用通过产生粘性泡沫的有机无毒不放热反应触发使化合物到达出血源或停留在撕裂部位以形成凝块的补充过程,该粘性泡沫以与密封泡沫用于修理轮胎相同的方式扩散至整个腔。磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 用于缓冲溶液 B 的 pH,从而当与 A 部分混合时通过  $\text{NaHCO}_3$  和海藻酸或卡波姆 934 的酸碱中和促进发泡。在溶液混合的 10 秒钟内,泡沫触发组分产生的体积膨胀为原始体积的 300% 至 400%。就其使 ClotFoam 溶液产生一种以附着 (粘着) 至撕裂组织的强凝胶形式分布在腔中的泡沫的意义而言,这些时间范围、强度和体积是合适的。我们的研究已经确定调节胶凝时间和凝胶相持续时间所必需的组分浓度 (25)。

[0029] 二价金属离子的作用。目前形式的 ClotFoam 试剂盒包含钙、锌和镁离子。已经证实这些离子可以显著地增加纤维蛋白聚合速率以及纤维蛋白丝的长度和强度。额外存在的  $\text{Ca}^{2+}$  和锌加快炎症反应和凝血级联之间的进展。 $\text{Zn}^{2+}$  调节纤维蛋白集合而且在活化凝血酶激活的纤维蛋白溶解抑制剂方面发挥作用。

[0030] Activa 的作用 :这种 Ga 非依赖性转谷氨酰胺酶具有使基于明胶的聚合物和纤维蛋白聚合物交联的双重作用。

## 发明内容

[0031] 本发明属于生物粘合剂和组织封闭剂领域,所述生物粘合剂和组织封闭剂是可生

物降解和无毒的并旨在用于治疗用途,例如作为腔内止血剂用于治疗非压迫性出血。

[0032] 一方面,本发明涉及用于手术或治疗用途的具有生物相容性的流体粘性蛋白质泡沫以及具有生物相容性的可生物再吸收且无毒的流体/泡沫粘合剂。本发明还涉及这种包含可以在给定位点释放的生物活性物质的泡沫。

[0033] 另一方面,本发明涉及生产这种粘性泡沫的方法以及递送这种制剂的装置。

[0034] 大量的体内研究表明 ClotFoam 是用于紧急情况和战斗损伤以及非侵入性外科手术的一种优良的止血剂候选物。如果需要,可以由护理人员施用 ClotFoam, ClotFoam 疗效持久,具有极小的风险,几乎不需培训就可使用,它有效地针对可以导致大量失血的严重出血并能够维持止血至少几小时以允许安全地疏散至最终的护理中心。专门为无创用途设计的经由“混合针”的施用方法是安全的并且可以在战场或医疗机构中应用。因此,ClotFoam 是一种新颖的构思,因为没有其他化合物可以在微创手术中通过针递送,从而通过混合的或流动的血液到达腹腔或其他腔内的损伤组织。

## 附图说明

[0035] 图 1 ClotFoam 四部分敷药器和混合针

[0036] 1- 混合针

[0037] 2- 包含各个部分的注射器夹具

[0038] 3- 气动活塞

[0039] 图 2 作用方式

[0040] 1- $\text{Ca}^{++}$  用于激活凝血因子 XIII (Factor XIII)

[0041] 2- 转谷氨酰胺酶用于强化纤维蛋白聚合物的交联

[0042] 3- $\text{CO}_2$

[0043] 4- 交联明胶形成强凝胶泡沫

[0044] 5- 泡沫扩散至组织上方的整个腔

[0045] 6- 来自血液的激活凝血因子 XIII 稳定化(交联)纤维蛋白聚合物

[0046] 7- 嵌入支架中的交联纤维蛋白聚合物附着至撕裂组织

[0047] 图 3 四部分组分相互作用示意图

[0048] 图 4 以  $\text{gr.}/\text{cm}^2$  测量的组织内粘着的图表,比较 ClotFoam 纤维蛋白单体技术和目前可用的由原位混合的纤维蛋白原和凝血酶制成的封闭剂。

[0049] 图 5 将卡波姆用作明胶交联剂的本制剂的流变测量学示出  $G'$  或储存能超过  $6000\text{dyne}/\text{cm}^2$ 。

[0050] 图 6 当 ClotFoam 的四种组分在 ACTIVA 或凝血因子 XIII 的存在下混合时纤维蛋白的聚合、交联和稳定化。蛋白质印迹试验 (Western Blot)

[0051] 1-Blue Plus2 蛋白质标准液 (Invitrogen)

[0052] 2-CF+FXIIIa, 0 分钟

[0053] 3-CF+FXIIIa, 10 分钟

[0054] 4-CF+FXIIIa, 30 分钟

[0055] 5-CF+activa, 0 分钟

[0056] 6-CF+activa, 10 分钟

- [0057] 7-CF+activa,30 分钟
- [0058] 8-CF+FXIIIa+active,0 分钟
- [0059] 9-CF+FXIIIa+active,10 分钟
- [0060] 10-CF+FXIIIa+active,30 分钟 (Activa 与 A 部分、B 部分和 C 部分分开加入)
- [0061] 图 7 在 60 天储存期内纤维蛋白单体聚合能力的蛋白质印迹
- [0062] 图 8 在 50 天周期内纤维蛋白单体在不同温度下的凝结能力
- [0063] 图 9 成纤维细胞在包含 ClotFoam 的培养基中生长第 0 天的显微照片 (生物相容性)
- [0064] 图 10 成纤维细胞在包含 ClotFoam 的培养基中生长第 3 天的显微照片 (生物相容性)
- [0065] 图 11 成纤维细胞在包含 ClotFoam 的培养基中生长第 7 天的显微照片 (生物相容性)
- [0066] 图 12 取出肝脏用于观察对照组 (NaCl) 中的损伤和凝块形成效应
- [0067] 1- 凝块
- [0068] 2- 损伤区域紧紧闭合
- [0069] 图 13 用 ClotFoam 处理过的肝脏显示在损伤区域形成很强的凝块
- [0070] 图 14 通过腹腔镜手术经由钻头造成的 IV 级肝损伤和闭腔 ClotFoam 施用 (猪模型)
- [0071] 图 15 四部分 ClotFoam 通过端口的盲法施用
- [0072] 图 16 60 分钟之后打开腔示出凝块形成和出血控制
- [0073] 图 17 血液凝块和凝结强度的测量
- [0074] 图 18 用 ClotFoam 处理过的 IV 级肝损伤的平均动脉压 (MAP) 的趋势 (猪模型)
- [0075] 图 19 未处理过的 IV 级肝损伤的平均动脉压 (MAP) 的趋势 (猪模型)

## 具体实施方式

[0076] 我们开发了一种液体形式的腔内止血剂**CLOTFOAM®**,以及用于手术室外的非压迫性出血或非侵入性手术方法的应用方法。

[0077] ClotFoam 是一种新颖的运载纤维蛋白封闭剂的脂质体凝胶, ClotFoam 被设计成在严重出血的情况下促进止血,以及被设计成在无压迫的情况下停止由器官切除、创伤和 / 或 IV/V 级腔内创伤、实体器官创伤、软组织和大脑导致的出血,否则可能导致临床并发症或大量失血 (exanginations)。**CLOTFOAM®**作为止血剂旨在专门但不仅用于紧急情况 and 战斗创伤,并且用于微创手术,诸如腹腔镜手术和整容手术。这种封闭剂促进凝血并且提供止血以及受损组织表面之间的粘合性。ClotFoam 是一种新颖的构思,因为没有其他化合物可以 1) 通过腹腔镜端口或伤口入口递送, 2) 在微创手术中在无压迫的情况下施用 10 分钟内实现止血以及在很严重的腔内创伤的情况下维持止血 1 小时, 3) 用于缝合线和 / 或短纤维是不理想、不适当或不可能之时,阻止出血和促进受损组织的早期粘合,以及 4) 通过混合的或流动的血液到达腹腔内的损伤组织。CLOTFOAM 可以 :a) 在战场受伤之后或在事故现场立即使用 ;b) 由医务人员使用 ;c) 在宽温度范围内保持其粘性。

[0078] CLOTFOAM 是由溶解在水介质中的四个部分组成的试剂盒 (kit) (图 1), 当通过气

动操作装置混合和递送时形成运载纤维蛋白单体的粘性化合物的 3D- 复合水凝胶（支架，scaffold），纤维蛋白单体通过与支架反应发生聚合 / 交联并通过 ACTIVA 稳定。

[0079] 允许试剂到达出血源或者保持在撕裂部位以形成凝块的方法是由形成凝胶的液体组分 A, B, C 和 D 的混合物引发的。一旦溶液被混合，它们将产生一种导致粘性泡沫（水凝胶）的无毒低放热反应。这种泡沫以与使用密封泡沫来修理轮胎相同的方式扩散至整个腔。尽管血液流动，但是该试剂的粘性和胶粘稠度使得泡沫原位维持在撕裂组织上方，从而在受损组织上方快速形成粘性基质，该粘性基质 1) 用固体覆盖物封闭伤口，2) 通过沿着伤口引入屏障以触发凝血级联从而形成血凝块，以及 3) 通过非共价作用附着至撕裂组织。（图 2）

[0080] CloFoam 制剂的止血性能是基于与纤维蛋白单体酸溶液（C 部分）和稳定纤维蛋白聚合物的 ACTIVA（D 部分）混合的支架（A 部分 +B 部分）的物理和凝结性能。水凝胶支架由混有水溶性泡沫诱导剂（碳酸氢钠和磷酸二氢盐）并在钙非依赖型转谷氨酰胺酶（Activa）、2 型角叉菜胶和蔗糖的存在下通过（但不是唯一的）卡波姆（Carbomer）934（聚丙烯酸）交联的液态硬骨鱼 A 型明胶（Teleostan Gelatin type A），牛血清白蛋白（BSA，蛋白质），聚乙烯吡咯烷酮（PVP）的混合物组成。其他交联剂是海藻酸（多聚糖）和羧甲基纤维素白蛋白。一旦 C 部分与 A 部分（pH 8.4）混合，C 部分（纤维蛋白单体醋酸溶液）通过 pH 中和而聚合，然后被 D 部分（ACTIVA）稳定。

[0081] 可以加入诸如月桂基磺酸钠、月桂酰肌氨酸钠、牛磺酸盐和甜菜碱表面活性剂的发泡增强剂。Ca、Mg 和 Zn 离子增强聚合反应。可以用凝血因子 XIII（Factor XIII）代替 ACTIVA。

[0082] 图 3 示出的作用机制显示出与 B 部分混合的 A 部分如何与明胶和 BSA 交联从而形成初始体积膨胀 400% 的强发泡（脂质体）水凝胶。在形成凝胶的同时，通过 pH 的变化（7.2）或由 A 部分（pH 8.4）触发的中和使纤维蛋白单体（C 部分）聚合。D 部分递送钙离子和稳定单体所必需的 ACTIVA。尽管血液流动仍然保留在原处、特定地在撕裂组织的上方形成基质并封闭伤口的能力通过以下实现：a) 泡沫组分的表面粘附和粘弹性特性，从而产生一种运载纤维蛋白聚合物的非常粘的基质，该基质附着至撕裂组织和湿表面并对试剂实现止血的能力作出实质性贡献，以及 b) 在 ACTIVA 和钙离子的存在下原位产生的三维聚合交联化学网络，其形成与组织结合的纤维蛋白凝块。

[0083] 为了保持组分的活性，防止组分之间发生化学反应以及维持 pH，需要四个部分。

[0084] 对泡沫的形成作出贡献的组分是：碳酸氢钠、磷酸二氢盐、卡波姆 934 和诸如月桂基磺酸钠、月桂酰肌氨酸钠、牛磺酸盐和甜菜碱表面活性剂的发泡增强剂。

[0085] 以下组分提供物理粘弹性性能：液态硬骨鱼 A 型明胶，牛血清白蛋白（BSA，蛋白质），2 型角叉菜胶，聚乙烯吡咯烷酮，蔗糖和卡波姆 934。补充出现的额外的 Ca、Mg 和锌离子促进聚合工艺的进行。

[0086] ClotFoam 制剂。

[0087] ClotFoam 由 A, B, C 和 D 这 4 种溶液的组合制得：

[0088] 溶液 A：

[0089] 步骤 1. 中性 A 的制备：

[0090] >>>> 微摩尔范围的 ZnCl

- [0091] >>>> 毫摩尔范围的  $\text{MgSO}_4$
- [0092] >>>> 硬骨鱼冷水鱼凝胶
- [0093] >>>> 蔗糖
- [0094] >>>> 聚乙烯吡咯烷酮
- [0095] >>>>  $\text{H}_2\text{O}$
- [0096] >>>> 将所有成分搅拌均匀,然后将溶液用 NaOH 中和至 pH 7.1
- [0097] 步骤 2. 最终溶液 A 的制备
- [0098] >>>> 中性 A'' (上述)
- [0099] >>>> 角叉菜胶, 2 型或槐豆型
- [0100] >>>>  $\text{NaHCO}_3$
- [0101] >>>> 牛血清白蛋白
- [0102] 搅拌所有组分得到一悬浮液,然后用杜恩斯匀浆器 (ounce homogenizer) 使该悬浮液均质三次 (three strokes)。
- [0103] 搅拌所有组分得到一悬浮液,然后用杜恩斯匀浆器使该悬浮液均质三次。
- [0104] 步骤 3) 溶液 B 的制备
- [0105] >>>>  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- [0106] >>>> Tris 碱 (Tris-Base)
- [0107] >>>> 卡波姆 934
- [0108] 步骤 4) 溶液 C 的制备
- [0109] 通过渗析方法制备 90-120mg/ml 纤维蛋白单体的 0.125% 冰 AcOH (pH 3.4) 溶液。
- [0110] 溶液 D
- [0111] 溶解在 HEPES 缓冲液中的 ACTIVA
- [0112] 根据下文进一步描述的方法对所有部分进行灭菌。通过对多粘菌素树脂进行过滤来去除内毒素。当在水溶液中混合组分 A 和 B 时,在 CLOTFOAM 组合物中使用的改性 (鱼) 明胶中的氨基基团和改性多糖中的醛基基团之间形成希夫碱 (Schiff base),这导致分子间交联和凝胶形成。可以在 5 秒内发生凝胶形成。
- [0113] ClotFoam 明胶由鱼皮制成,而且该明胶通常被称为 'A' 型明胶。生产该明胶的原料是来自于诸如鳕鱼、黑线鳕鱼和青鳕的深水鱼的皮。该明胶是由胶原蛋白在相对低的温度下温和地部分水解衍生而来的蛋白质。该明胶的最有用的两种性能是凝胶强度和粘度,主要对这两种性能进行评价。
- [0114] 表 1. ClotFoam 明胶的规格
- [0115]

pH	3.8-5.5
等电点	7.0-9.0
凝胶强度 (bloom)	50-300
粘度 (mps)	15-75
灰 (%)	0.3-2.0

- [0116] 在 CLOTFOAM 的组合物中使用的明胶类型是可以获得的最纯和最适合的蛋白质中的一种。一旦经过灭菌,该明胶类型则完全无毒。该明胶类型很活泼并且易于快速地被身

体接受。该明胶类型广泛用于医学应用中。该明胶类型与水一起形成半固体胶态凝胶。该明胶类型已经用在多种生命支持应用中,诸如血浆扩容剂和血液代用品。(29)

[0117] 鱼明胶的独特性在于明胶的氨基酸含量。虽然所有的明胶都由相同的 20 种氨基酸组成,但是可以在亚氨基酸、脯氨酸和羟脯氨酸的量方面有所变化。在这些亚氨基酸的量较少的情况下,明胶在水溶液中的氢键结合较少,从而降低了胶凝温度。来自于鳕鱼皮的明胶在 10℃ 胶凝,而来自于鲤鱼皮的明胶更类似于动物明胶,其在高于室温的温度下胶凝。鱼明胶可以在碱性条件下与酸酐反应,从而降低或消除了醛作为硬化剂对明胶的作用。

[0118] 胶原蛋白通过煮沸水解并转化成明胶。酸处理产生 A 型明胶,其可以被动地与其他阴离子聚合物相互作用,这一化学特征赋予 ClotFoam 粘附至撕裂组织的性能。

[0119] 在鱼新陈代谢的温度和皮的性能与提取所得到的明胶之间也存在重要的关系。从深层冷水鱼的皮得到的明胶具有较低量的脯氨酸和羟脯氨酸,因而,水溶液在室温下不会胶凝而将保持液体至 8 ~ 10℃,而大部分的动物凝胶在 32℃ 胶凝。这一性能对于制造能够在室温下以其液体物理状态储存的产品是有用的。而且,为了易于在任何战场环境(无论是寒冷的还是温暖的气候)中活化,能够在宽温度范围内保持产品的溶解性也是重要的。

[0120] 递送方法:

[0121] ClotFoam 通过液压敷药器经由混合针递送至腔内。(图 1) 可以调整混合针以用于其他微创手术所需的不同的腹腔镜手术。

[0122] 实施例

[0123] 1. 粘附和粘弹性性能:在体外对凝胶粘附至人体重要组织的特性以及凝胶聚合动力学进行离体研究测试。

[0124] 1.1. 粘附性能

[0125] 在 Sprague-Dawley 大鼠肝脏组织中进行粘附和张力的测量(组织内附着和凝块强度)。选择肝脏是因为肝脏是腹腔内创伤中最常受损的器官,其次是脾脏。

[0126] 实验模型:麻醉 Sprague-Dawley 大鼠(250 至 300g)。从中间接近腹腔然后完全解剖出并且切除肝脏。选择肝脏是因为肝脏是腹腔内非压迫性出血中最常受损的器官,其次是脾脏。用等长传感器进行粘附和张力的研究。

[0127] 1.1.1 张力测量:分离两个最大的肝叶。将一个肝叶附着至固定件,该固定件随后被固定至等长传感器。将另一个肝叶放置在容器中的纱布平层中,可以逐渐升高和降低该容器从而与传感器的固定件中的肝脏块产生接触。在这两块肝脏中产生 1cm<sup>2</sup> 的损伤区域。将用于测试组织粘着的制剂放置在这两块肝脏之间。在 0gr 的基线压力下使样品接触。在各个时间点(暴露和接触 1,5 和 10 分钟),记录使其完全分离所需的压力。我们测试了本制剂,并将这些结果与作为对照样品的 NaCl 溶液对比,以及与所有可用的在原位混合凝血酶和纤维蛋白原的纤维蛋白封闭剂所使用的标准技术对比。图 4 示出了组织内粘着的结果。在继发于受损组织暴露于泡沫后的组织内附着中,ClotFoam 在 10 分钟之后诱导的粘附力比对照强 200% 以上。以 gr/cm<sup>2</sup> 计测量粘附性。所有的测试在 37℃ 下实施。

[0128] 1.1.2 凝块强度的定量:为了研究在 CLOTFOAM 的影响下形成的凝块的强度,我们使用以下实验模型:将血液收集在试管中,事先准备该试管使其包含一股棉缝线,该股棉缝线的一端具有作为重物的一片纱布以保持该端位于试管的底部,而在该股棉缝线伸出试管的另一端具有环以将该股棉缝线悬挂至等长传感器。将该股棉缝线包含在血液中并使其凝

结 2 分钟。将该股棉缝线的另一端固定到等长传感器,然后下拉从而测量将该股棉缝线从凝块和试管拉上来所需的力(以克计)。

[0129] 在包括血液加生理盐水溶液(B+S)、只有血液(BA)和血液加 CLOTFOAM(B+ 凝胶)的三个实验组中观察的凝块强度表明:与只有血液或血液加生理盐水相比,当用 CLOTFOAM 处理血液时具有统计学显著( $P = 0.001$ )差异。

[0130] 1.2. 凝胶化过程中的粘弹性性能

[0131] 形成凝胶的交联聚合物对的粘弹性性能对于试剂抵抗血液流动和附着至撕裂组织的能力至关重要。优化该性能的工作包括 a) 使明胶与可以形成强凝胶并牢固地结合至软组织的多糖(例如海藻酸,聚-(左旋谷氨酸),透明质酸,卡波姆 934)交联;B) 使用可选的材料(例如白蛋白,聚(环氧乙烷),白蛋白,PVP);c) 更好的交联化学物质(例如戊二醛,碳二亚胺,钙非依赖型转谷氨酰胺酶)以及 d) 更可控的聚合反应。

[0132] 进行流变学研究对 ClotFoam 制剂与目前用于制造外科封闭剂的材料的各种组合在凝胶化过程中的粘弹性特性进行比较。用平行板几何学进行凝胶化研究;在混合之后立即(时间  $t = 0$ )转移所有样品,并在  $t = 6s$  时开始测量。对于时间和应力扫描试验,在  $37^{\circ}\text{C}$  下在 5Hz 频率和 2% 应力应变条件下监测作为时间函数的储能模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )。ClotFoam 组合物的流变学测量结果与以下比较:

[0133] 结构聚合物对

[0134] a) 明胶,海藻酸

[0135] b) 明胶,透明质酸

[0136] c) 明胶,聚(左旋谷氨酸)

[0137] d) 壳聚糖,海藻酸

[0138] e) 明胶,卡波姆 934

[0139] 以下交联催化剂

[0140] a) 钙非依赖型转谷氨酰胺酶 mTg

[0141] b) EDC

[0142] 可选的材料:

[0143] a) 羧甲基纤维素

[0144] 丙烯酸盐

[0145] 通过以下内容从流变学方面描述被认为是对该应用最优的胶凝动力学和形态演变:a) 组分混合之后的 10 秒钟内  $G'$  和  $G''$  的相交(交联以及从液体到凝胶的状态变化);b)  $G'$  值骤增超过  $5000\text{dyn}/\text{cm}^2$ ,从而表明是强凝胶;c) 保持高  $G'$  值 10 分钟以上并且在 10 分钟之后  $G''$  下降使得试剂恢复至液体状态从而有助于该试剂被腔液吸收,而且正切值从 0.1 增加至 0.4 表明增加的储存能超过释放能。

[0146] 图 5 示出当使用卡波姆替换常规制剂中作为明胶和 BSA 的交联剂的海藻酸时的凝胶强度。本发明的制剂的流变学测量结果表明 CLOTFOAM 促进明胶溶液转化成水凝胶,胶凝时间是大约 6 秒。 $G'$  在不到 20 秒内达到  $6000\text{dyn}/\text{cm}^2$ ,而  $G''$  保持低于  $1000\text{dyn}/\text{cm}^2$ 。

[0147] 1.3. 对二价金属离子的作用的研究

[0148] 研究了  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对凝胶的作用。已确定这些离子可以促进泡沫膨胀,加速明胶交联、纤维蛋白聚合,并且同时增加纤维蛋白丝的长度和强度以及凝胶强度。

[0149] 由于动力学特征可以表明虽然加入的给定金属离子可以提高凝胶强度,但是却极大地降低 3\_D 结构中包含的各种聚合物的交联时间,因此动力学特征是有用的。

[0150] 使用氯化镁和氯化锌的离子试验 – 使用原基线制剂制备溶液。按以下方式加入离子: 20  $\mu$  M  $\text{ZnCl}_2$  溶液, 20  $\mu$  M  $\text{MgCl}_2$  溶液, 40  $\mu$  M  $\text{ZnCl}_2$  溶液, 40  $\mu$  M  $\text{MgCl}_2$  溶液, 60  $\mu$  M  $\text{ZnCl}_2$  溶液, 以及最后是加入了 0.002M  $\text{ZnCl}_2$  和 0.002M  $\text{MgCl}_2$  溶液的 60  $\mu$  M  $\text{MgCl}_2$  溶液。

[0151] 在没有二价金属离子的情况下,通过流变测定法测试作为时间的函数的凝胶强度的变化从而建立基线;之后加入对凝块强度产生最大作用的各种浓度的金属离子。

[0152] 20 $\mu$ M 及小于 20 $\mu$ M 的  $\text{Zn}^{2+}$  浓度估计使凝胶强度增强了 15%–20%,而且降低了凝胶时间(正如通过  $G'$  和  $G''$  的斜率所观察到的),以及增强支架的粘附性(使用乳胶手套通过触觉观察来估算粘附性)。使用 50mL 的量筒进行排量(displacement)试验。

[0153] 结论:在体积排量和粘附强度方面 20  $\mu$  M 的  $\text{MgCl}_2$  溶液表现出最好的改进。

[0154] 2. 泡沫体积膨胀

[0155] 方法:设计和验证用于测定泡沫体积膨胀的分析方法。在加入金属离子和丙烯酸的情况下通过改变这两种成分的初始 pH 值来实现泡沫的最优体积膨胀。体积从 400%变化至 500%膨胀。

[0156] 制剂与生物相容剂结合,它们都通过化学反应产生泡沫。该泡沫产生方法是无害的并且避免组织在微环境中与破坏生理 pH 极限的溶液接触,这种接触引起不良的刺激和粘附。

[0157] 方法:通过测量已知重量的反应物在聚合之后的总体积来量化发泡能力,如以诸如己烷或  $\text{CCl}_4$  的惰性溶剂的体积计算的通过凝胶产生的排量。

[0158] 对每个样品测试三次。使用两个 1mL 的一次性 BD 注射器向 16 $\times$ 100mm 试管中的 1mL 溶液 B 中同时加入 1mL 溶液 A。在混合之后立即将每种混合物涡旋 5 秒钟。在涡旋之后 20 分钟进行排量试验,使用通过记号笔在试管上标记的发泡最高点进行测试。将试管在包含 40mL 丙酮的 50mL 量筒中降低至丙酮的弯液面的底部与记号笔标记对齐,从而记下以 mL 计的排量。在涡旋之后 40 分钟通过剪切试验进行粘性测试以确保溶液已经实现其升高的粘附性。

[0159] 3. 纤维蛋白聚合

[0160] 我们进行分子化学试验对凝胶组合物的 A 部分和 B 部分引起的纤维蛋白单体(C 部分)聚合(pH 中和)与由凝血酶引起的纤维蛋白原聚合的有效性进行比较。我们还比较使用 ACTIVA(D 部分)和凝血因子 XIII 对纤维蛋白聚合物的稳定化作用。

[0161] 3.1. ClotFoam 凝胶内纤维蛋白的聚合

[0162] 为了测验使用支架组分(A 部分和 B 部分)中和时 ClotFoam 中的纤维蛋白单体的聚合速率,以及确定由转谷氨酰胺酶(凝血因子 XIII 和 ACTIVA)产生的稳定化的效果,我们使用抗纤维蛋白原抗体进行蛋白质印迹试验。通过与多克隆羊抗人纤维蛋白原(Fg)亲和纯化的过氧化物酶标记抗体(商品目录号:SAFG-APHRP, Enzyme Research Laboratory, IN)反应 1 小时(1 份在 50K 5%牛奶的 TBST 中)检测纤维蛋白聚合物链。

[0163] 当在 FXIII 或 ACTIVA 以及  $\text{Ca}^{2+}$  的存在下混合 ClotFoam 的所有四种组分时,图 6 所示的蛋白质印迹试验证实纤维蛋白的聚合。这两种酶都催化纤维蛋白单体转化成稳定的不溶性纤维蛋白凝块。



[0164] 4. 保存期限

[0165] 4.1 单体 C 部分的保存期限

[0166] 这些实验的目的是证实单体在标准条件 (4℃ 和 22℃) 下随着时间不发生降解。

[0167] 通过纤维蛋白聚合物对 1 升 0.125% 的醋酸渗析 20h 来制备纤维蛋白单体, 其中更换两次渗析溶液 (1h 内一次)。将纤维蛋白单体浓缩至 17.6mg/ml。最终产率是 80%。然后将纤维蛋白单体分成 3 份, 一份在 4℃ 下保存, 其他两份在室温 (22℃) 下保存 (其中一份含有叠氮化钠); 在指示时间将用于分析的样品取出。

[0168] 通过 SDS-PAGE 分析纤维蛋白单体的保存期限并用 Imperial 蛋白染色剂 (ThermoScientific) 进行染色。在 1, 4 和 15 天之后对这些样品进行分析并与通过独立方法 (Medved&Oglov, 未公开的数据) 得到的并在 4℃ 下储存 30 天以上的纤维蛋白单体样品比较。图 7。

[0169] 4.2. 凝结能力

[0170] SDS-Page 数据表明无论是在 4℃ 还是 22℃ 下, 随着时间的变化都没有明显的纤维蛋白降解。通过吸收方法进行的凝结能力研究表明该单体保持稳定性超过 6 个星期, 而在 22℃ 下保持稳定性超过一个星期。结论是通过本专利中描述的任一方法生产的纤维蛋白单体都可以在 4℃ 下保存 60 天以上。(图 8)

[0171] 5. 灭菌

[0172] 研究凝块泡沫的无菌制剂。使用 Nalg-Nunc 500mL 装置 (Cat#450-0045, 硝酸纤维膜, 0.45m 过滤器) 在生物学安全工作橱中无菌过滤 A 部分的半中性部分 (Neutral Half)。

[0173] 碱性 A 部分: 将 BSA,  $MgCl_2$  和  $CaCl_2$  溶解在无菌水中组成 0.15g 溶液。使用 0.22  $\mu m$  Millipore Syringe 过滤器将溶液无菌过滤至大于 8mL 的半中性部分中。然后向该混合物中加入预称重和高温蒸汽灭菌的固体  $NaHCO_3$  1.2g 和角叉菜胶 0.4g。

[0174] B 部分: 将次亚磷酸钠, 三 (羟基甲基) 氨基甲烷 (TRIS-Base) 和 Activa 溶解在无菌水中。使用 0.22  $\mu m$  Millipore Syringe 过滤器无菌过滤该溶液。向该无菌混合物中加入 0.5g 紫外线 (UV) 灭菌的卡波姆。

[0175] C 部分: 使用 Nalg-Nunc 500mL 装置 (Cat#450-0045, 硝酸纤维膜, 0.45m 过滤器) 在生物学安全工作橱中无菌过滤酸性纤维蛋白单体。

[0176] D 部分: 使用 Nalg-Nunc 500mL 装置 (Cat#450-0045, 硝酸纤维膜, 0.45m 过滤器) 在生物学安全工作橱中无菌过滤溶解在缓冲溶液中的 ACTIVA。

[0177] 生长研究: 总体实验方案包括样品溶液的制备, 然后为了生长将样品溶液铺在皮氏 (Petri) 培养皿中的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA, Sigma-Aldrich, Cat#P2182) 和胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA, Sigma-Aldrich, Cat#T4536) 凝胶上。培育 PDA 和 TSA 凝胶并在指定的时间周期观察 PDA 和 TSA 凝胶在 37℃ 下的菌落生长 (霉菌和 / 或细菌), 然后使用肉眼在已设定的时间周期评价菌落生长。在数据表中用 1, 2 和 3 命名法显示多个样品。

[0178] 菌落计数略语表

[0179]

符号	计数
-	无可见生长

+	1-199 个可见菌落
++	200-399 个可见菌落
+++	> 400 个可见菌落

[0180] 表 2. 对 FIBRIN\_ClotFoam 的无菌组分在 PDA 和 TSA 上的微生物生长分析的研究结果

[0181]

表 2. 通过在 37℃ 下在 PDA/TSA 上的细菌生长进行的无菌研究																	
消耗的时间 (天)		马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)								胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA)							
		1	2	3	4	5	6	7	11	1	2	3	4	5	6	7	11
样品	#S <sup>\$</sup>																
半中性部分*	1				-			-	-				-			-	-
A**^	1				-			-	-				-			-	-
	2				-			-	-				-			-	-
	3				+			-	-				-			-	-
B**^	1				-			!	-				-			-	-
	2				-			-	-				-			-	-
	3				-			-	-				-			-	-
C**^ (纤维蛋白 /AcOH, pH 3.5)	1				-			-	-				-			-	-
	2				-			-	-				-			-	-
	3				\!			-	-				-			-	-
高温蒸汽灭菌 的 NaHCO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	1				-			-	-				-			-	-
	2				-			-	-				-			-	-
	3				-			-	-				-			-	-
高温蒸汽灭菌 的角叉菜胶 <sup>++</sup>	1				-			-	-				-			-	-
	2				-			-	-				-			-	-
	3				-			-	-				-			-	-
D 部分	3				-			-	-				-			-	-

[0182] \* 半中性部分使用 0.45 μm 过滤器进行无菌过滤, 在 4℃ 下储存 1 星期

[0183] \*\* “无菌” A, B, C 用于 SUNY 的动物实验, 在 4℃ 下储存 1 星期

[0184] ^ 只在 A&B 中加入 1000 μL 无菌水以制成“液体”

[0185] + 在 121℃ 下高温蒸汽灭菌 20 分钟之后 NaHCO<sub>3</sub> (在 A 中使用) 的无菌检查, 制成饱和无菌水溶液

[0186] ++ 在 121℃ 下高温蒸汽灭菌 20 分钟之后角叉菜胶 (在 A&B 中使用) 的无菌检查, 制成无菌水溶液

[0187] \$ 除了半中性部分之外, 以一式三份的方式进行实验

[0188] ! 实验误差

[0189] 生长数据表明即使是在 11 天之后,半中性部分和其他无菌组分也没有产生显著生长。在不同的浓度下测试使用防腐剂的其它灭菌方法来抑制生长。生长数据也表明在 3 天之后,4-羟基苯甲酸甲酯和 Germaben II 提供灭菌 / 抑制生长。

[0190] 结论

[0191] 采用无菌制备方法抑制污染物(霉菌和细菌)的生长并且可以为商品提供可接受的保存期限。防腐剂的加入表现出对微生物生长的抑制。

[0192] 6. 生物相容性

[0193] 对无菌条件下制备的包含苯甲酸钠和不包含苯甲酸钠的两种 ClotFoam 制剂进行试验。测试这些制剂与人成纤维细胞(HF)和人上皮细胞(A549 细胞系,ATCC)的生物相容性。

[0194] 从商业途径获得正常人成纤维细胞(HF),并在补充了 10%胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)中的 60mm 组织培养板中建立培养物,并在 5% CO<sub>2</sub> 的加湿气氛(CO<sub>2</sub> 培养箱)中保持在 37℃ 下。将人上皮细胞系 A549 保持在补充了 10%胎牛血清和 2mM 谷氨酸盐的最小必需培养基中。当成纤维细胞和上皮细胞培养物达到亚融合状态,混合对照物和苯甲酸钠 ClotFoam 制剂并立即递送至单独的培养皿。将培养物重新放回 CO<sub>2</sub> 培养箱并在第 0 天(图 9),第 3 天(图 10)和第 7 天(图 11)时检查。从所有的培养物中取出 ClotFoam 材料和培养基,用结晶紫(0.1%的 2%乙醇溶液)对粘着细胞染色。

[0195] 观察的主要结果是对细胞完全不存在损伤或毒性,而且不存在任何细菌或真菌污染。在暴露于 ClotFoam 制剂的人成纤维细胞培养物中,与未处理的对照培养物相比,细胞显得稍大和更分散。结论:ClotFoam 和 ClotFoam+ 防腐剂苯甲酸盐是生物可相容的,而且不影响细胞的生长和分化,反而会刺激细胞的生长和分化,这是伤口愈合剂的重要属性。

[0196] 7. 动物模型实验

[0197] 我们对大鼠和猪(猪)模型的几种腔内创伤模型进行研究。

[0198] 7.1. ClotFoam 对 IV 级肝损伤之后的失血的影响(大鼠模型)

[0199] 方法:使用 10 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠(225-250g)(得到 UMB 的机构动物饲养和使用委员会的批准)。

[0200] 实验步骤:实施剖腹手术;在较大的左右肝叶中诱导 III 级肝损伤。通过用止血夹夹住这两个肝小叶并通过两个中间肝叶的肝薄壁组织(parenchyma)造成损伤来诱导损伤。

[0201] 第一次刺入肝脏之后,打开夹子并将夹子重新放置到动物的左侧以诱导第二次损伤,第二次损伤包括从边缘到肝上腔静脉的距离的 40%以上。这次重新放置之后,第二次刺入肝脏。在实验的最后,通过切除和检查肝脏获得肝损伤的更多证据。损伤是完全的。没有观察到对总胆管、尾腔静脉或肝动脉的伴随损伤。在该研究中 10 只动物受到损伤,对这些动物进行随机分配以接受 4ml 的生理盐水溶液(对照)或 4ml 的 ClotFoam 试剂。在诱导损伤之后,立即通过针将 ClotFoam 或生理盐水给药至腹腔内。

[0202] 观察和记录出血时间。然后用 4-0 尼龙闭合腹腔以观察动物 90 分钟。在这段时间之后重新麻醉动物,用预称重过的纱布收集腹腔中的所有流体然后重新称重以测量腹膜

内体积并计算失血量。

[0203] 结果 :对照组的出血时间是平均 37 秒钟 ( $\pm$ SD 7.5)。在 CLOTFOAM 处理组中,受伤区域的出血在 4 秒钟内 ( $\pm$ 1.0) 停止。这一差异表现出统计学显著性,  $p < 0.008$ 。

[0204] 在对照组中,未处理对照组中的失血测量值是 2.45mL (从 1.86–3.61),SD 为 0.67,相比之下,处理组的平均值为 0.95mL (0.72–1.78),SD 为 0.55,T-检验表明该差异具有统计学显著性,  $p$  值为 0.028。

[0205] 7.2. ClotFoam 在肝损伤中的封闭有效性的验证 (大鼠模型)

[0206] 取出肝脏用于观察损伤和凝块形成行为。发现在对照组 (图 12) 中,损伤区域上出现了一些凝块但是它们总是保持分离。相比之下,当给药 ClotFoam 时,肝脏显示在受伤区域形成很大的凝块 (图 13),且无凝块附着至未受损的组织。

[0207] 7.3. 剖腹手术实验中的主动脉模型

[0208] 方法 :在该模型中,进行中线剖腹手术。刚好在肾动脉下方和刚好在髂动脉的分叉上方夹住主动脉,从而有效地获得对肾下近侧和远侧的主动脉控制。然后在血管的左右两侧用 25 号针对肾下主动脉进行一次穿孔。在不控制出血 6 秒之后,施用 500 微升 ClotFoam 扩散至整个腹膜内腔。泡沫施用完成之后,测量止血时间。然后闭合腹部。

[0209] 在受伤之后,立即给予大鼠林格氏溶液从而保持平均动脉压约为初始 MAP 的 70–80% (如果可能的话),这是用于创伤患者的现行标准复苏技术。观察大鼠 20 分钟。20 分钟之后,通过相同的中线切口再探索该动物。用预称重过的纱布垫收集所有的血液并且计算总失血量。

[0210] 结果 :17 只动物受到主动脉损伤。将动物随机地分成 2 个不同的组 :ClotFoam 处理组和未用 ClotFoam 处理组。所有用 ClotFoam 处理过的动物在 60 分钟时的存活率是 100%。在未处理组中,没有动物在损伤后存活。所有动物受伤前的 MAP 是相似的。下面的表 1 总结了每组测量的结果。

[0211] 表 3. 用 ClotFoam 处理与未用 ClotFoam 处理的主动脉受伤的动物的结果的比较。复苏指数定义为复苏 MAP 占受伤前 MAP 的百分比。与未用试剂相比,所有结果和所有制剂的  $P$  值都  $< 0.001$ 。

[0212]

结果	Form#10 (N=10)	未用试剂 (N=7)
止血时间 (s)	12.2 $\pm$ 2.9	N/A
总失血量 (ml)	5.2 $\pm$ 0.5	16.3 $\pm$ 0.3
复苏指数 (%)	68.8 $\pm$ 14.0	26.8 $\pm$ 2.4
复苏体积 (ml)	12 $\pm$ 4.5	20.3 $\pm$ 2.5
存活时间 (min)	60 $\pm$ 0	18.3 $\pm$ 2.9

[0213] 7.4. 腔静脉模型

[0214] 第二种模型是肝脏 / 静脉腔静脉损伤模型。在该模型中,进行小的上中线剖腹手术。暴露和隔离肝脏的左叶和腔静脉。在右下腹做出小切口并通过该切口放置 ClotFoam 敷药器尖端从而使得开口位于腹膜内且远离将要发生损伤的位置。接着通过快速横切左肝叶造成损伤,然后形成刺入腔静脉中的损伤。用短纤维快速闭合该小的剖腹手术切口。然后将 ClotFoam 注入闭合的腹腔中。如上所述收集复苏、观察和失血测量数据。

[0215] 12 只动物受到肝脏 / 腔静脉损伤。将动物随机地分成 2 个不同的组 :ClotFoam 处理组和未用 ClotFoam 处理组。所有用 ClotFoam 处理过的动物在 60 分钟时的存活率是 100%。

[0216] 将敷药器置入腹膜内腔。在肝脏 / 腔静脉受伤之后的第 20 分钟,对动物进行完全开腹以暴露受伤区域。

[0217] 未处理组的动物在受伤之后 > 18 分钟死亡。所有动物的受伤前 MAP 是类似的。表 4 总结了各组测量的结果。

[0218]

表 4. 结果	Form 10 (N=7)	未用试剂 (N=5)
总失血量 (ml)	3.6	14.7
复苏指数 (%)	88.6	54.3
复苏体积 (ml)	10	16
存活时间 (min)	30	18

[0219]

表 5. 模型	基线	10 秒	NS (ml)	10 分钟	2 小时	TTH	存活
主动脉	151/110 (120)	38/31 (34)	4.0	133/124 (110)	131/117 (124)	3 m	全部
腔静脉	140/105 (115)	63/34 (41)	3.5	109/69 (83)	130/72 (97)	2 m	全部
肝损伤	162/102 (128)	66/41 (50)	4.2	131/69 (87)	135/87 (102)	2 m	全部
对照腔静脉	150/112 (128)	50/37 (41)	9.7	75/38 (48)	NA	NA	无
对照主动脉	153/108 (119)	42/34 (33)	10.5	N/A	N?A	N/A	无

[0220] 7. 5ClotFoam 在三种不同的出血模型中的效应的总结 :表 5 中的数据比较了由不同的模型得到的结果。对照表示只用 NS 处理的刺穿模型。数字表示在基线、受伤后 10 秒、受伤后 10 分钟和受伤后 2 小时的血压和平均动脉压力 (MAP- 在括号中)。NS 指以 ml 计的生理盐水给药。NA 表示不适用 (对照动物在 2 小时终点前死亡)。TTH 表示止血总时间,作为血压和 MAP 持续保持上升为 70 的函数测量的。

[0221] 7. 6. 以猪为模型进行的非 GLP 研究

[0222] 在猪模型中评价 ClotFoam。

[0223] 方法 :使用 18 只雌性的年龄为 2.5 个月的重 37±2kg 的约克夏 (Yorkshire) 杂交猪。该方案得到机构动物饲养和使用委员会的批准。然后通过开腹手术或腹腔镜手术使动物受到 4 级肝损伤。为了该模型的目的,IV 级损伤是 10cm 深的薄壁组织损伤,该损伤是用专门设计的具有切割钻头的高速钻机造成的与枪弹贯穿 (GSW) 类似的损伤。这些损伤与

美国创伤外科协会的器官损伤分级系统一致。暴露出肝脏之后,选择肝脏中间的位置造成肝损伤。通过与肝上血管和门静脉的一些分支的接近程度计算该位置。用标记物标记该位置。诱导损伤之后,外科医生闭合腔,在施用 ClotFoam 之前使得通过小贯穿孔大量出血 30 秒钟。

[0224] 目前为止将动物随机分成 4 组。组 1 ( $n = 5$ ) 中的动物受到了通过中线开腹手术造成的 IV 级肝损伤并开腔施用 ClotFoam。在该组,试剂被可视地导向肝损伤。组 2 ( $n = 6$ ) 的动物受到了通过腹腔镜手术由钻头造成的 IV 级肝损伤并闭腔施用 ClotFoam。在该组中,在不能直接目测或导向损伤的情况下,以盲法将试剂给药至腹膜腔中。组 3 ( $n = 4$ ) 的动物受到了通过中线开腹手术造成的 4 级肝损伤但没有经过 ClotFoam 处理(开腹对照)。组 4 ( $n = 3$ ) 的动物受到了通过腹腔镜手术造成的 4 级肝损伤但没有经过 ClotFoam 处理(腹腔镜对照)。

[0225] 在所有的组中,使用 150cc 的 ClotFoam 进行处理。通过混合装置将 ClotFoam 递送至腹腔中(图 15)。在受伤之后,立即使用乳酸林格氏液(LR)开始液体复苏。如果可能的话,为了将 MAP 恢复至受伤前 MAP 的至少 80% 以内,注入 LR 是必须的。在整个观察期间继续复苏。在 60 分钟研究结束时,记录每个动物的 MAP 和注入的总复苏体积。

[0226] 研究阶段完成后,检查腹部(图 16)。吸出液体血液。移出血凝块并称重。在纱布填充组,通过湿纱布重量减去干纱布重量计算额外的液体失血量(图 17)。通过液体失血量和凝块失血量之和确定总失血量。

[0227] 动物的存活定义为在研究阶段结束时存在心率。在 60 分钟时用 10ml 的 Euthasol 对存活动物实行安乐死。

[0228] 结果:组 1 和组 2(IV 级损伤)动物的终点值在表 6 中示出。平均动脉压力(MAP)的趋势(处理过的)见图 18。

[0229] 表 6. 用 ClotFoam 处理过的 IV 级肝损伤的测量结果。组 1 = 开腔,组 2 = 闭腔。所有的值按平均值  $\pm$  SEM 记录

[0230]	组	存活时间 (min)	总失血量 (ml)	液体需求量 (ml)
[0231]	1 ( $n = 5$ )	$60 \pm 0$	$300 \pm 283$	$1500 \pm 283$
[0232]	2 ( $n = 5$ )	$60 \pm 0$	$600 \pm 212$	$2175 \pm 742$

[0233] 对照:受到 IV 级肝损伤的动物(3 只腹腔镜和 4 只开腹)用于证实腹腔镜模型相对于已建立的开腹模型的结果。这些动物未经过 ClotFoam 处理。终点值见表 7。

[0234] 表 7:未经处理的 IV 级肝损伤的测量结果(对照)。组 3 = 开腹,组 4 = 腹腔镜。所有的值按平均值  $\pm$  SEM 记录

[0235]	组	存活时间 (min)	总失血量 (ml)	液体需求量 (ml)
[0236]	3 ( $n = 4$ )	$26 \pm 3$	$1900 \pm 424$	$3050 \pm 70$
[0237]	4 ( $n = 3$ )	$22 \pm 11$	$1700 \pm 200$	$2467 \pm 569$

[0238] 未用 ClotFoam 处理过的对照组的 4 级肝损伤的 MAP 的趋势在图 19 中示出。

[0239] 凝块组织学

[0240] 尸检时从所有动物收集肝切片样品。将包含受伤位置的肝样品保存在 5% 福尔马林中并用标准组织学技术处理。将固定的组织样品埋入石蜡(熔点  $56^{\circ}\text{C}$ )中并在  $2-3\ \mu\text{m}$  处切片。然后用苏木精和曙红(H&E)对安装在载玻片上的切片染色。对每个动物的与切除

位置垂直的两个肝切片进行评价。

[0241] 8. 以猪为模型进行的 GLP 研究

[0242] 有效性 : 我们比较了 ClotFoam 对年龄为 2.5 个月, 重  $37 \pm 2\text{kg}$  的约克夏杂种猪止血处理 ( 在无压迫的情况下 ) 的有效性。我们以三个手术方案测试 ClotFoam : 肝切除术, 部分通过中线开腹手术, 为该方案安排 20 只动物。这些方案得到机构动物饲养和使用委员会的批准。将动物随机地分成 2 组。组 1 ( $n = 14$ ) 的动物在受伤之后接受 ClotFoam 施用。组 2 ( $n = 6$ ) 的动物在受伤之后接受 GELFOAM (Pfizer) 以阻止中度至重度出血 ( 与 GelFoam (Pfizer) 比较 )。设计这些研究是为了确定止血剂是否可以在施用 10 分钟内控制术中出血。

[0243] 手术步骤 : 我们在三个手术方案中测试 ClotFoam : 通过中线开腹手术的肝切除术、部分肾切除术和脾撕裂, 为每个方案分配 20 只动物或总共 60 只动物。这些方案得到机构动物饲养和使用委员会的批准。将动物随机地分成 2 组。组 1 ( $n = 14$ ) 的动物在受伤之后接受 ClotFoam 施用。组 2 ( $n = 6$ ) 的动物在受伤之后接受 GELFOAM (Pfizer) 以阻止中度至重度出血。通过使用设定标准值为 0.8 的功效分析决定动物数量。设计这些研究是为了确定止血剂是否可以在无压迫的情况下在施用 5 分钟内控制术中出血。在无压迫的情况下在施用 5 分钟内达到止血的能力以及在 10 分钟内不再出血表明止血封闭剂的治疗效果。一旦对止血法进行了评估, 则闭合腹部切口。对未在 10 分钟内止血的动物实施安乐死。在第 14 天或第 15 天终止实验时, 对存活动物实施安乐死, 检查手术区域, 并回收组织进行肉眼和显微镜检查。

[0244] 肝切除术模型 : 进行部分右肝切除术, 其中肝的右叶远端 4cm 被快速地切下和取出。放任出血 10 秒钟。施用 40cc 的 ClotFoam 并在 5 分钟时评估止血。

[0245] 部分肾切除术 : 从腹膜后腔完全地固定肾脏。肾脏尖端的远端 3cm 被快速地切下和取出, 并放任出血 10 秒钟。施用 ClotFoam 并在 5 分钟时评估止血。

[0246] 脾撕裂 : 造成  $3 \times 3\text{cm}$  方形裂伤并从脾的前面取出, 放任出血 10 秒钟。施用 ClotFoam 并在 5 分钟时评估止血。

[0247] 结果 :

[0248] 每个手术达到止血的动物的数量

[0249]

组	N	手术	在 5 分钟 内 达 到 止 血 的 动 物 数 量	在 15 天 时 结 束	尸 检	组 织 学	IgE

[0250]

1 (GF)	6	肝切除术	无	无	无	无	6 (对照)
2 (CF)	14	肝切除术	14	14	14	14	14
3 (GF)	6	肾切除术	无	无	无	无	无
4 (CF)	14	肾切除术	12	11	无	11	11
5 (GF)	6	脾脏	13	8	8	8	8
6 (GF)	14	脾脏	无	无	无	无	无

[0251] 首字母缩略词 :GF = GelFoam ;CF = ClotFoam

[0252] 免疫应答 :当针对明胶或 BSA 测试时,在第 0 天,第 7 天或第 14 天,采用从对照和 ClotFoam 处理过的猪收集的血清未观察到 OD 读数的显著差异。我们得出的结论是在测试时间时,实验猪未对明胶或 BSA 产生可检测的抗体。

[0253] 生物相容性和生物降解 (组织学)

[0254] 与取自假样本的样品相比, ClotFoam 处理过的动物的大部分器官具有正常的外观。在所有动物的肺中发现异常 (淋巴细胞浸润)。在肠组织和腹壁中观察到炎性变化和淋巴细胞性浸润。炎性变化是由于内部创伤和对外来物体 (ClotFoam) 的正常炎性反应。

[0255] 结论 :本次研究的数据表明 ClotFoam 在用于造成严重出血的肝创伤时实现术中止血是 100%成功的。由于在 5 分钟内实现止血,我们得出的结论是与腹腔镜手术中使用的常规缝合方法相比,使用 ClotFoam 在更短的时间内实现止血。



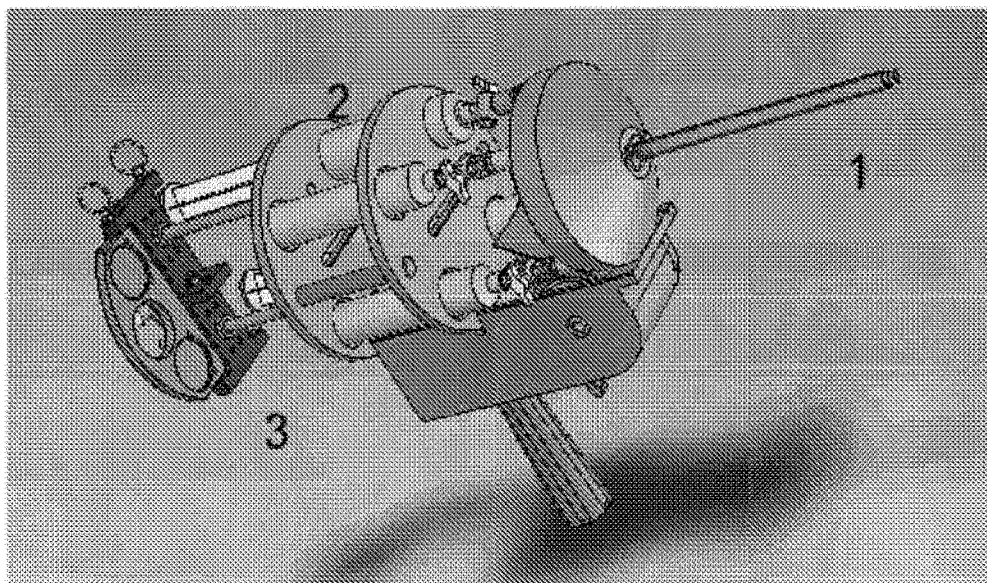


图 1

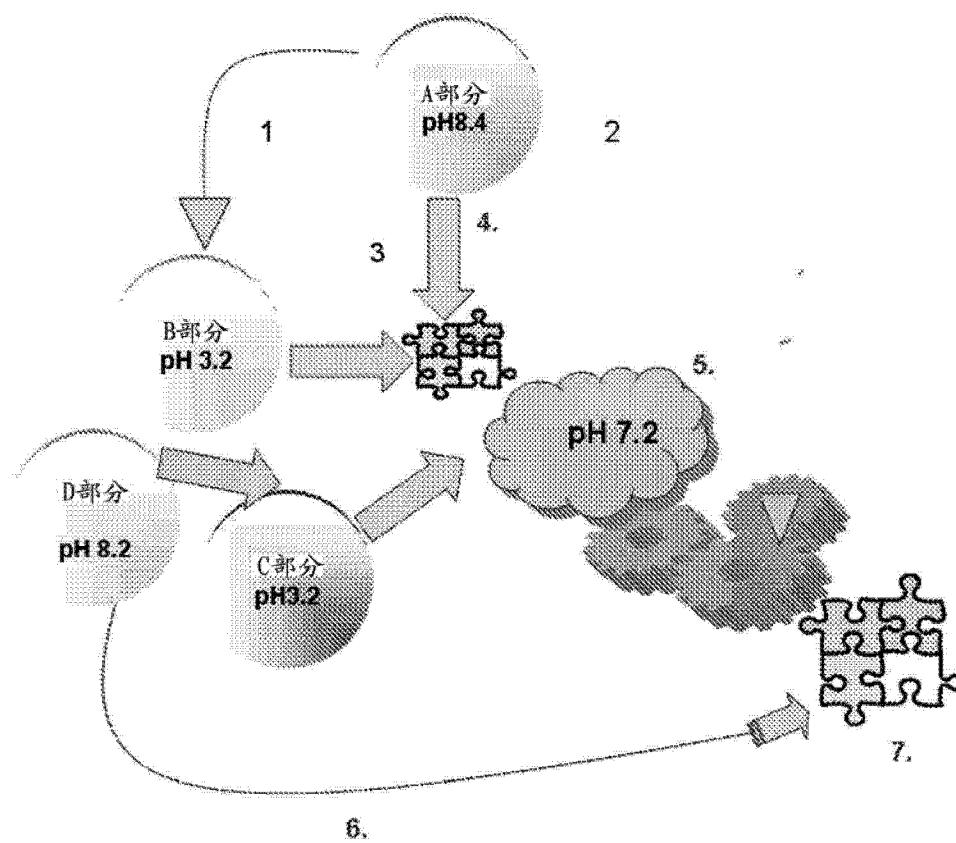


图 2

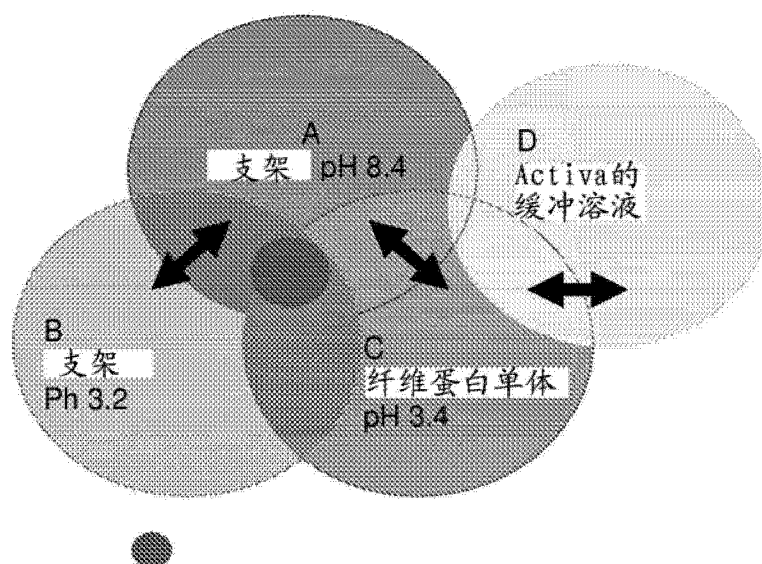


图 3

泡沫+纤维蛋白聚合物

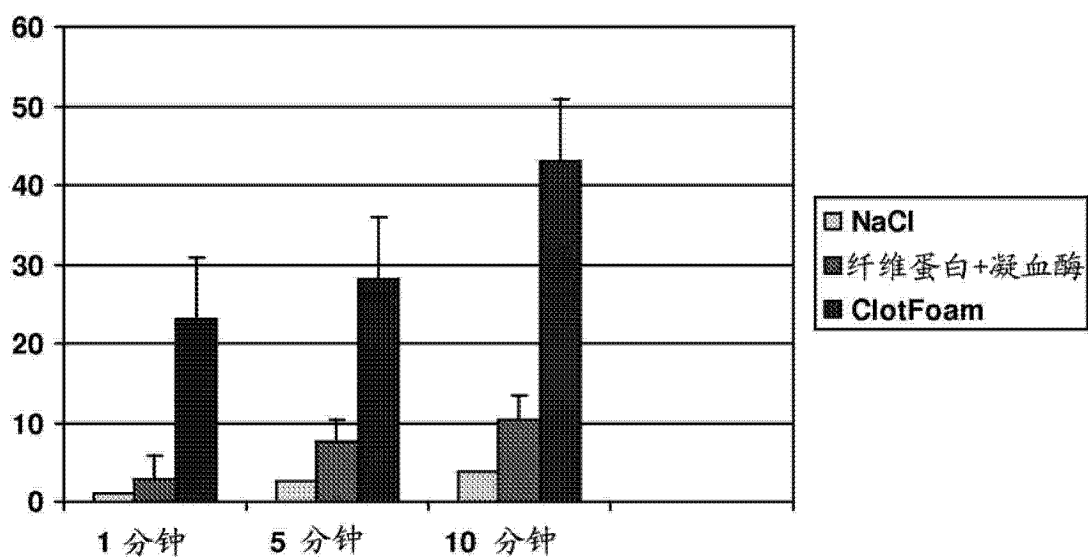
组织内粘着  
 $p=0.001$ 

图 4

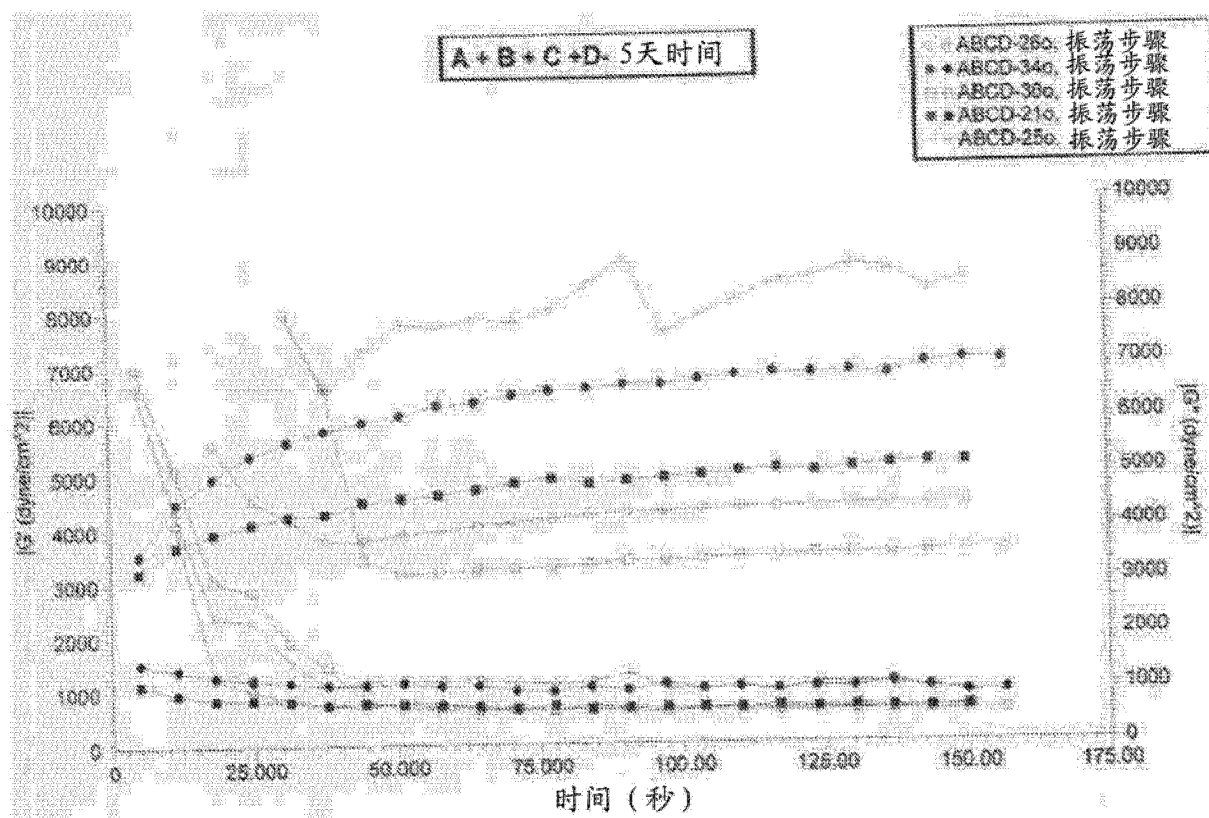


图 5

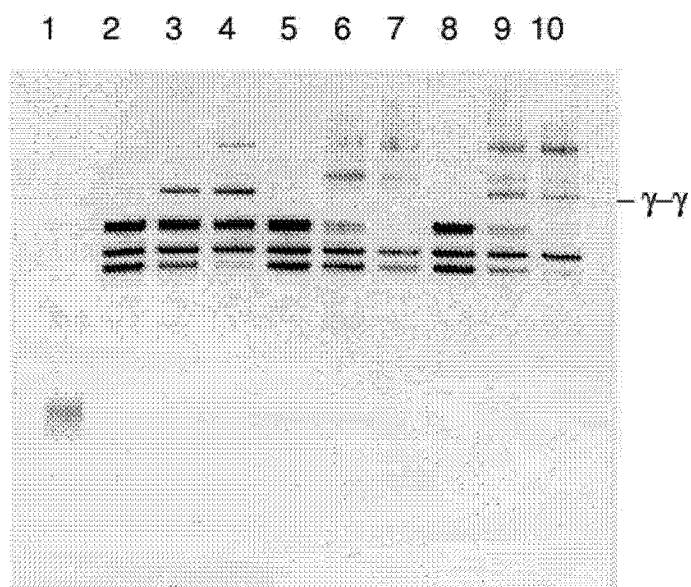


图 6

纤维蛋白单体galena 30天  
 纤维蛋白单体RT 4天W NaN<sub>3</sub>  
 纤维蛋白单体RT 4天  
 纤维蛋白单体RT 1天  
 纤维蛋白单体1 4℃ 8天  
 纤维蛋白单体4℃ 0天  
 纤维蛋白单体+B 60天  
 纤维蛋白单体+A 60天  
 纤维蛋白原样品  
 梯状条带

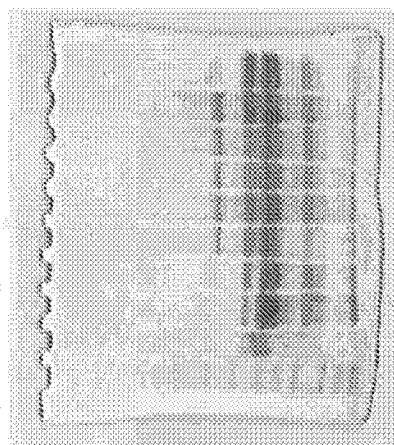


图 7

### 纤维蛋白单体的凝结能力

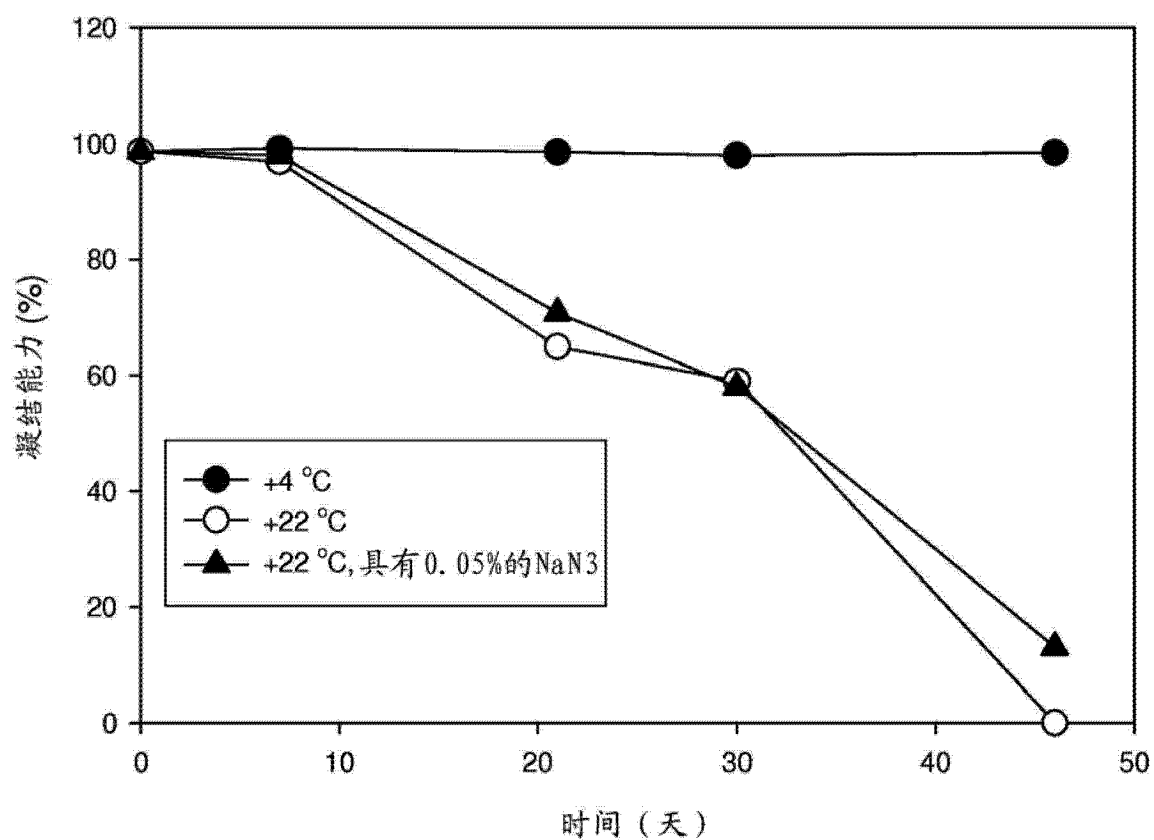


图 8

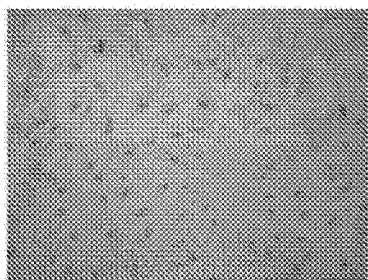


图 9

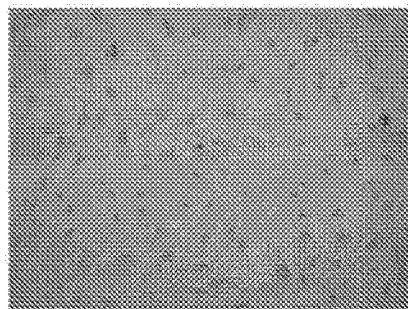


图 10

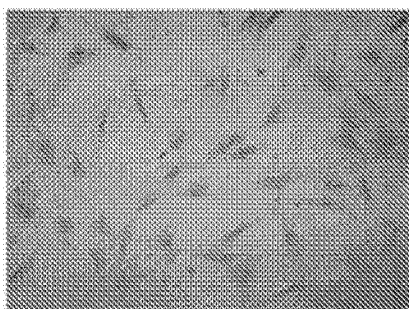


图 11

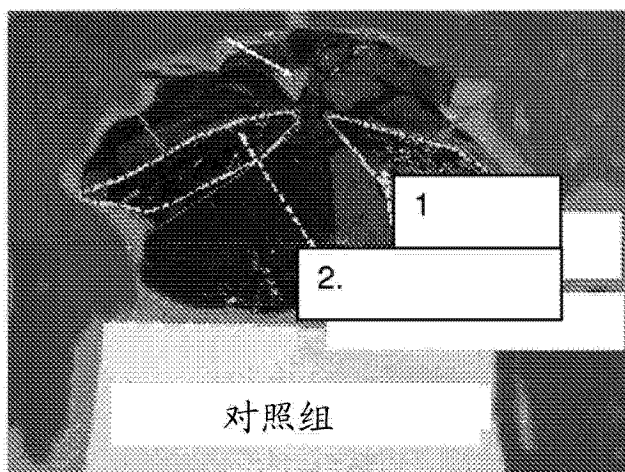


图 12

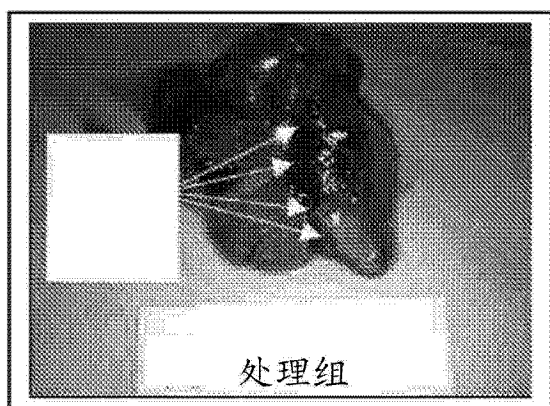


图 13

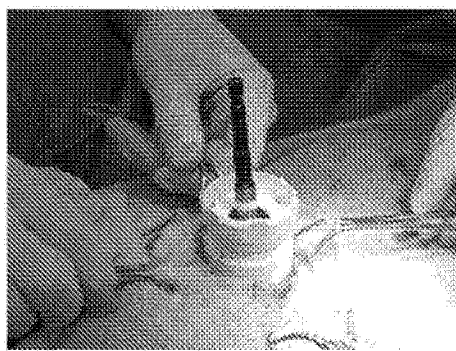


图 14

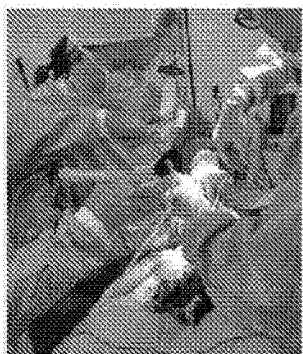


图 15

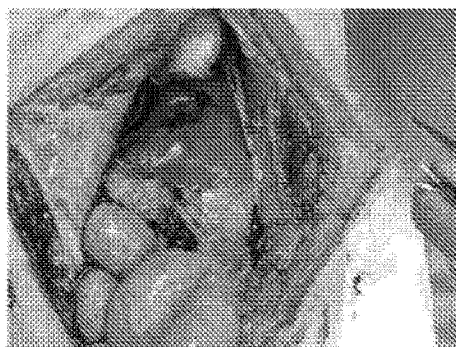


图 16

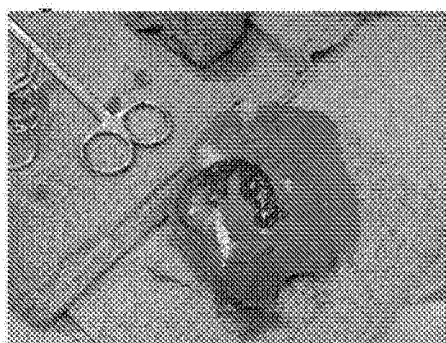


图 17

## MBP处理组

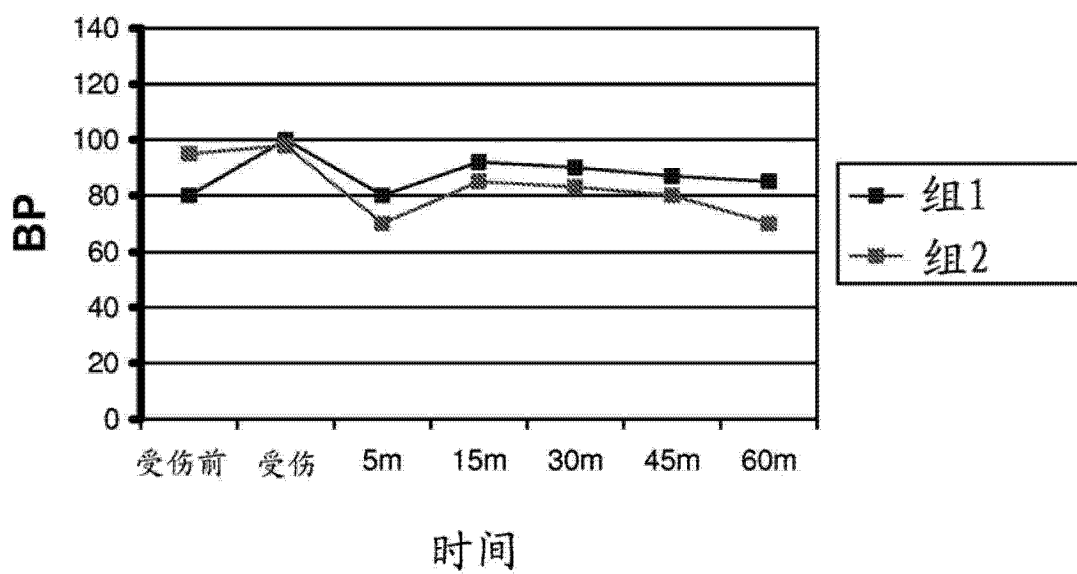


图 18

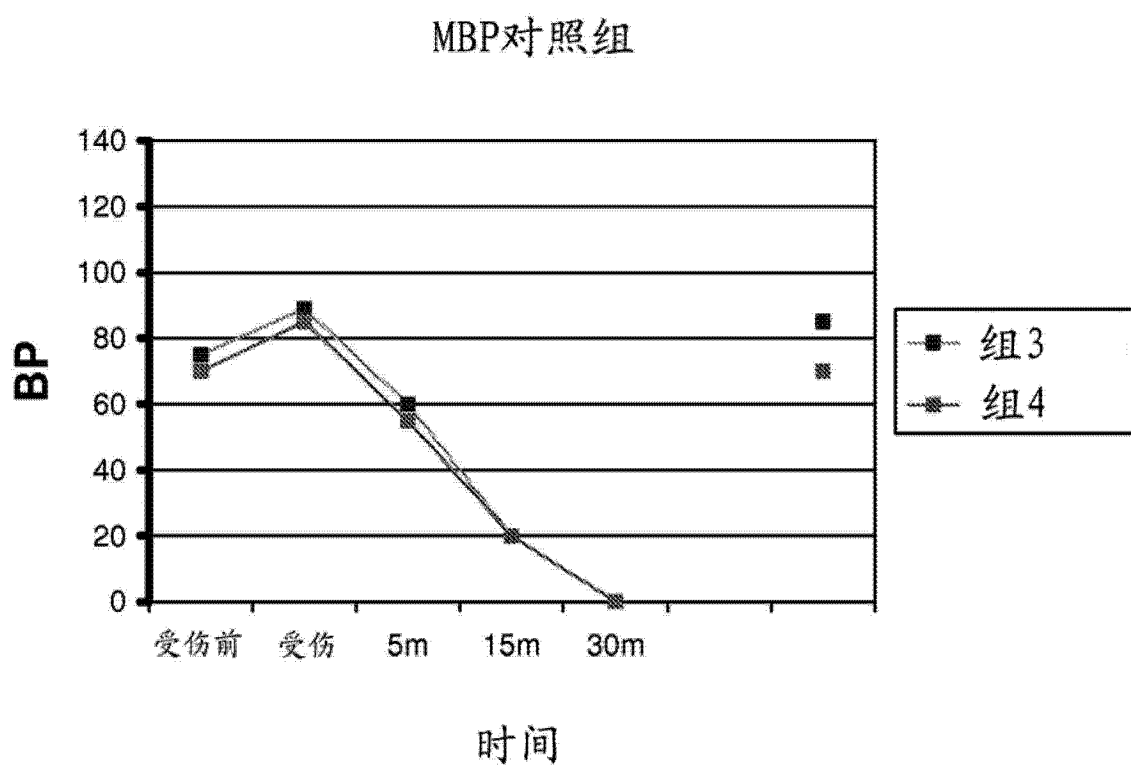


图 19

专利名称(译)	用于非压迫性出血的组织封闭剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN103037783A</a>	公开(公告)日	2013-04-10
申请号	CN201180026776.5	申请日	2011-03-25
[标]发明人	乔治D 福卢什		
发明人	乔治·D·福卢什		
IPC分类号	A61B17/08		
CPC分类号	A61B17/00491 A61L24/0031 A61L24/043 A61L24/106 A61L2400/04 A61P17/02 C08L89/06		
代理人(译)	孙征		
优先权	12/750316 2010-03-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

# 摘要(译)

ClotFoam是被设计成在非压迫性出血情况中用于中度至重度出血的手术封闭剂和止血剂。ClotFoam可以在腹部、胸、四肢或其他腔内裂开创伤或手术之后作为止血的初级处理或辅助手段在手术室中通过腹腔镜端口施用，或者在剖腹手术中直接施用在撕裂组织上面，或者在手术室外通过混合针和/或喷雾注射方法施用。ClotFoam的交联技术产生运载止血所必需的纤维蛋白封闭剂的粘性三维聚合网络或支架。当混合时，ClotFoam产生扩散至整个体腔从而到达撕裂组织的泡沫以封闭组织和促进凝血级联。本发明使用通过pH的变化发生聚合的纤维蛋白单体作为活性封闭组分。

