



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102844053 B

(45) 授权公告日 2015.08.05

(21) 申请号 201080061895.X

(22) 申请日 2010.11.24

(30) 优先权数据

61/264,570 2009.11.25 US

61/350,224 2010.06.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.07.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/058118 2010.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/066471 EN 2011.06.03

(73) 专利权人 洛马林达大学医学中心

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 沃尔夫·M·基尔希 朱咏华

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 安佳宁

(51) Int. Cl.

A61L 15/28(2006.01)

(56) 对比文件

US 2005/0038369 A1, 2005.02.17, 说明书
第 [0029]、[0034]-[0035]、[0052]、[0074] 段、
TABLE 1.

CN 1833732 A, 2006.09.20, 说明书第 2 页第
4 段、第 3 页第 3,5 段.

CN 1833732 A, 2006.09.20, 说明书第 2 页第
4 段、第 3 页第 3,5 段.

US 2005/0038369 A1, 2005.02.17, 说明书
第 [0029]、[0034]-[0035]、[0052]、[0074] 段、
TABLE 1.

审查员 张凌

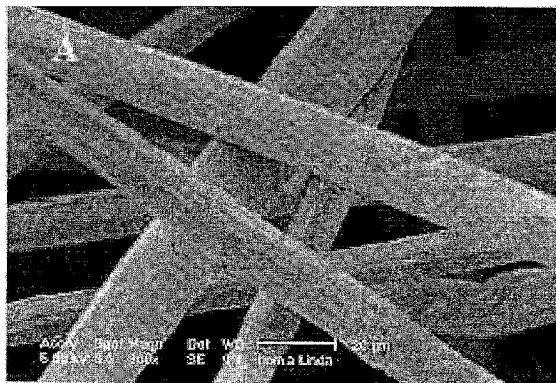
权利要求书4页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

基于壳聚糖的止血织物

(57) 摘要

基于微纤维状高分子量壳聚糖的织物能用作止血物。通过施加能量以电离在该壳聚糖织物中及其周围的氮，从而在氮场中处理壳聚糖。可以采用单独或多个这种处理。例如，可以使用 γ -辐射在氮气下辐射该壳聚糖织物，或在氮等离子体下处理该壳聚糖织物或用这两种方法处理该壳聚糖织物。



1. 制备止血织物材料的方法,其包括加工蟹壳以获得具有 600kDa 至 800kDa 的分子量和 75%至 88%的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工成包含壳聚糖纤维网络的织物,以及首先在氮场下 γ -辐射所述高分子量壳聚糖织物,然后在氮等离子体下等离子体处理所述高分子量壳聚糖织物。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括在使用 γ -辐射和等离子体处理之前将所述壳聚糖纤维浸入醇中。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括在氮场中包装所述纤维状高分子量壳聚糖织物并密封所述包装,以便在 γ -辐射之前在氮气环境内密封所述壳聚糖织物,并且其中使所述壳聚糖织物在辐射和氮等离子体处理期间保持密封在所述包装内。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其包括在干燥条件下包装所述壳聚糖织物。

5. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述包装包括金属化的包装。

6. 如权利要求 3 所述的方法,其还包括在包装所述壳聚糖之前,使所述止血的壳聚糖织物形成成为纺织织物或无纺布。

7. 如权利要求 3 所述的方法,其还包括使用乙酸溶液处理所述壳聚糖纤维。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述乙酸为冰醋酸以便形成壳聚糖的铵盐。

9. 制备织物形式的止血材料的方法,其包括提供具有 600kDa 至 800kDa 的分子量和所选定的有利于形成干燥纤维的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工为纤维状织物,并且在氮等离子体和 γ -辐射下处理所述高分子量壳聚糖织物。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中在氮气下使所述纤维状壳聚糖灭菌的步骤被设定为增加在所述壳聚糖纤维上的氨基浓度。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其包括在室温下,在氮等离子体中处理所述壳聚糖织物。

12. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述壳聚糖具有 75%至 88%的脱乙酰度。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述壳聚糖具有 80%至 85%的脱乙酰度。

14. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述壳聚糖具有 85%的脱乙酰度。

15. 制备止血材料的方法,其包括提供壳聚糖,使所述壳聚糖为干燥形式,并且在电离的氮场中浸洗所述壳聚糖,其中所述处理增加所述壳聚糖中及其周围的氨基数量,并且产生基于氮的自由基,从而灭活内毒素,而不损害壳聚糖的结构或在促进止血方面的效能并同时增加可湿润性、亲水性和黏膜粘附性中的一种或多种。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其中提供壳聚糖包括加工蟹壳。

17. 如权利要求 15 所述的方法,其中提供壳聚糖包括提供形成为纤维形式的高分子量壳聚糖。

18. 如权利要求 15 所述的方法,其中提供壳聚糖包括提供形成为蓬松物或毛绒的纤维状高分子量壳聚糖。

19. 制备止血材料的方法,其包括提供干燥形式的纤维状壳聚糖,将所述纤维状壳聚糖放置在氮场中,并对所述纤维状壳聚糖进行处理以电离在所述纤维状壳聚糖中及其周围的氮,其中所述处理增加所述纤维状壳聚糖中及其周围的氨基数量,并且产生基于氮的自由基,从而灭活内毒素,而不损害纤维状壳聚糖的结构或在促进止血方面的效能并同时增加可湿润性、亲水性和黏膜粘附性中的一种或多种。

20. 制备包含高分子量壳聚糖织物的止血装置的方法,其包括加工蟹壳以获得具有 600kDa 至 800kDa 的分子量和 75%至 88%的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工成包含壳聚糖纤维网络的高分子量壳聚糖织物,以及首先在氮场下 γ -辐射所述高分子量壳聚糖织物,然后在氮等离子体下等离子处理所述高分子量壳聚糖织物至足以灭活内毒素,并且由所述高分子量壳聚糖织物制造止血装置。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中通过鲎变形细胞溶解物 (LAL) 测试来在 10 倍或 20 倍稀释下测量所述内毒素的浓度。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的方法,包括使用 γ -辐射在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物至足以灭活内毒素,使得所述内毒素的浓度为稀释 10 倍时等于 9.77EU/装置。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其中在用 γ -辐射处理后,所述高分子量壳聚糖织物基本上不降低分子量。

24. 如权利要求 20-23 中任一权利要求所述的方法,包括以 25kGy 用 γ -辐射 (CO^{60}) 在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物 15 小时。

25. 制备包含高分子量壳聚糖织物的止血装置的方法,其包括加工蟹壳以获得具有 700kDa 的分子量和 85%的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工成包含壳聚糖纤维网络的高分子量壳聚糖织物,在氮场中在包装中密封所述高分子量壳聚糖织物,首先以 25Gy γ -辐射所述包装的高分子量壳聚糖织物,然后在氮等离子体下等离子处理所述包装的高分子量壳聚糖织物 5 分钟,使得所述内毒素的浓度为 9.6EU/装置。

26. 如权利要求 20-25 中任一权利要求所述的方法,其还包括在氮场中包装所述纤维状高分子量壳聚糖织物并密封所述包装,以便在 γ -辐射之前在氮气环境内密封所述壳聚糖织物,并且其中使所述壳聚糖织物在辐射期间保持密封在所述包装内。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其还包括在氮等离子体下处理所述壳聚糖织物,其中所述壳聚糖织物在氮等离子体处理期间保持密封在所述包装内。

28. 如权利要求 26 或 27 所述的方法,其包括在干燥条件下包装所述壳聚糖织物。

29. 如权利要求 26-28 中任一权利要求所述的方法,其还包括在包装所述壳聚糖之前,使所述止血的壳聚糖织物形成为纺织织物或无纺布。

30. 制备包含高分子量壳聚糖织物的止血装置的方法,其包括提供具有 600kDa 至 800kDa 的分子量和所选定的有利于形成干燥纤维的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工为纤维状织物,首先在氮场下 γ -辐射所述高分子量壳聚糖织物,然后在氮等离子体下处理所述高分子量壳聚糖织物至足以增加所述纤维状壳聚糖上及其周围的氨基数量并产生基于氮的自由基,使得灭活内毒素,并同时增加可湿润性、亲水性和粘膜粘附性中的一种或多种,并且由所述高分子量壳聚糖织物制造止血装置。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其中通过鲎变形细胞溶解物 (LAL) 测试来在 10 倍或 20 倍稀释下测量所述内毒素的浓度。

32. 如权利要求 30-31 中任一权利要求所述的方法,包括在室温下,在氮等离子体中处理所述壳聚糖织物,从而有效地灭活在高分子量壳聚糖上的内毒素,而不负面影响所述壳聚糖的效能或分子量。

33. 如权利要求 30-32 中任一权利要求所述的方法,其中所述壳聚糖具有 75%至 88%的脱乙酰度。

34. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述高分子量壳聚糖织物是医用等级的止血织物材料。

35. 如权利要求 34 所述的方法,其中通过鲎变形细胞溶解物(LAL)测试来在 10 倍或 20 倍稀释下测量所述内毒素的浓度。

36. 如权利要求 34 或 35 所述的方法,包括使用 γ -辐射在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物至足以灭活内毒素,使得所述内毒素的浓度为稀释 10 倍时等于 9.77EU/装置。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中在用 γ -辐射处理后,所述高分子量壳聚糖织物基本上不降低分子量。

38. 如权利要求 34-37 中任一权利要求所述的方法,包括以 25kGy 用 γ -辐射(CO^{60})在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物 15 小时。

39. 如权利要求 34-38 中任一权利要求所述的方法,其还包括在氮场中包装所述纤维状高分子量壳聚糖织物并密封所述包装,以便在 γ -辐射之前在氮气环境内密封所述壳聚糖织物,并且其中使所述壳聚糖织物在辐射期间保持密封在所述包装内。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其还包括在氮等离子体下处理所述壳聚糖织物,其中所述壳聚糖织物在氮等离子体处理期间保持密封在所述包装内。

41. 如权利要求 39 或 40 所述的方法,其包括在干燥条件下包装所述壳聚糖织物。

42. 如权利要求 39-41 中任一权利要求所述的方法,其还包括在包装所述壳聚糖之前,使所述止血的壳聚糖织物形成为纺织织物或无纺布。

43. 如权利要求 30 所述的方法,其中,所述高分子量壳聚糖织物是医用等级的织物形式的止血材料。

44. 如权利要求 43 所述的方法,其中通过鲎变形细胞溶解物(LAL)测试来在 10 倍或 20 倍稀释下测量所述内毒素的浓度。

45. 如权利要求 43-44 中任一权利要求所述的方法,包括在室温下,在氮等离子体中处理所述壳聚糖织物。

46. 如权利要求 43-45 中任一权利要求所述的方法,其中所述壳聚糖具有 75%至 88%的脱乙酰度。

47. 制备包含高分子量壳聚糖织物的止血装置的方法,其包括加工蟹壳以获得具有 700kDa 的分子量和 85%的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工成包含壳聚糖纤维网络的高分子量壳聚糖织物,在氮场中在包装中密封所述高分子量壳聚糖织物,首先以 25Gy γ -辐射所述包装的高分子量壳聚糖织物,然后在氮等离子体下等离子处理所述包装的高分子量壳聚糖织物 10 分钟以使得所述内毒素的浓度为 2.3EU/装置。

48. 如权利要求 30-33 中任一权利要求所述的方法,其中所述壳聚糖具有 80%至 85%的脱乙酰度。

49. 如权利要求 43-45 中任一权利要求所述的方法,其中所述壳聚糖具有 80%至 85%的脱乙酰度。

50. 如权利要求 20 或 30 所述的方法,包括使用 γ -辐射在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物至足以灭活内毒素,使得所述内毒素的浓度为未稀释时等于 20.7EU/装置。

51. 如权利要求 20 或 30 所述的方法,包括使用 γ -辐射在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物至足以灭活内毒素,使得所述内毒素的浓度为稀释 2 倍时等于 18.40EU/装置。

52. 如权利要求 20、21、30 或 31 所述的方法,包括使用 γ -辐射在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物至足以灭活内毒素,使得所述内毒素的浓度为稀释 20 倍时等于 8.60EU/装置。

基于壳聚糖的止血织物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请基于 2009 年 11 月 25 日提交的第 61/264,570 号以及 2010 年 6 月 1 日提交的第 61/350224 号美国临时申请,并且要求其的优先权。

[0003] 背景

发明领域

[0004] 本发明涉及由壳聚糖纤维制成的止血织物,并且更特别地涉及具有降低的致热原性的基于壳聚糖纤维的止血物。

[0005] 相关领域描述

[0006] 手术操作和外伤的特征通常为大量失血。常规方法,例如手动压迫、烧灼或缝合可能比较耗时,且并不总是有效地控制出血。

[0007] 多年来,已经开发了大量的局部止血剂以在手术操作期间控制出血以及控制由外伤导致的出血。一些试剂,例如基于胶原的粉末、海绵或织物都具有微粒性质。微粒型的止血剂为自然的血栓形成提供了网格,但不能在凝血病患者中增强这一过程。微纤维状的胶原,即微粒型止血剂,为粉末形式,并刺激患者内在的止血级联反应。然而,据报道这种产品会形成栓塞,并且如果在心肺分流术中使用时会诱导局部炎性反应。此外,诸如粉末以及甚至诸如凝胶的微粒难以控制活跃的出血位点,并且易于从活跃的出血位点移除。

[0008] 诸如凝血酶的药理学活性试剂可以和微粒载体联合使用,例如用凝血酶浸泡的明胶海绵或粉末。凝血酶已经被用于控制弥漫性出血表面上的出血,但由于缺乏可供凝血块附着的框架而限制了其用途。同源和异源的纤维蛋白胶可引起凝血块的形成,但不能良好地附着在湿润的组织上,以及对活跃出血的伤口的作用很小。

[0009] 壳聚糖,即甲壳质的 N-脱乙酰化衍生物,已经表现出止血有效性以及生物相容性、生物可降解性和抗菌活性。壳聚糖已表现为获得黏膜粘附和止血,尽管其有脱纤维作用和抗凝作用。FDA 认可的局部壳聚糖止血物包括 Celox™(粒状粉末)和 HemCon(冻干的壳聚糖膜)。此外,对于外部应用,FDA 认可的为海绵、蓬松物(puff)或无纺织物形式的微纤维状的高分子量壳聚糖。

[0010] 尽管壳聚糖已表现为有效的止血物,但制备商品级的壳聚糖的常规、廉价的方法产生负载有致热原、特别是内毒素的产品,这限制了其在生物和医疗领域的适用性,因为微量的内毒素在与哺乳动物组织接触时可能诱发脓毒性反应。

[0011] 概述

[0012] 因此,在本领域中亟需基于壳聚糖的止血材料,其具有降低的致热原水平和/或其中内毒素已被除去和/或已被灭活至足以避免在与哺乳动物组织接触时诱发脓毒性反应。

[0013] 在本领域中还亟需能以廉价方式制备的这种具有降低的内毒素的基于壳聚糖的止血物。

[0014] 此外,在本领域中亟需除去和/或灭活高分子量纤维状壳聚糖中的内毒素而基本

不降低壳聚糖分子量的方法。

[0015] 根据一个实施方案,提供了制备止血织物材料的方法。所述方法包括加工蟹壳以获得具有约 600kDa 至 800kDa 的分子量和约 75% 至 88% 的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工成包含壳聚糖纤维网络的织物,以及使用 γ -辐射在氮气下辐射所述高分子量壳聚糖织物。

[0016] 另一实施方案还包括在氮等离子体下处理壳聚糖织物。一个这种实施方案还包括在使用 γ -辐射或等离子体处理之前将壳聚糖纤维浸入醇中。

[0017] 其它的实施方案还包括在氮场中包装所述纤维状高分子量壳聚糖织物并密封该包装,以便在 γ -辐射之前在氮气环境内密封该壳聚糖织物,并且其中使该壳聚糖织物在辐射期间保持密封在该包装内。一个这种实施方案还包括在氮等离子体下处理所述壳聚糖织物,并且使该壳聚糖织物在氮等离子体处理期间保持密封在包装内。另一个实施方案包括在干燥条件下包装所述壳聚糖织物。

[0018] 在一个实施方案中,所述包装包括金属化的包装。另一实施方案还包括在包装壳聚糖之前将止血的壳聚糖织物形成为纺织物或无纺布物。另一实施方案还包括使用乙酸溶液处理壳聚糖纤维。在一个这种实施方案中,所述乙酸为冰醋酸以便形成壳聚糖的铵盐。

[0019] 根据另一实施方案,本发明提供了制备织物形式的止血材料的方法。所述方法包括提供具有约 600kDa 至 800kDa 分子量和所选定的有利于形成干燥纤维的脱乙酰度的高分子量壳聚糖,将所述高分子量壳聚糖加工为纤维状织物,并且在氮等离子体下处理所述高分子量壳聚糖织物。

[0020] 在另一实施方案中,在氮气下使纤维状壳聚糖灭菌的步骤被设定为增加壳聚糖纤维上的氨基浓度。

[0021] 另一实施方案包括在室温下,在氮等离子体中处理壳聚糖织物。

[0022] 在其它实施方案中,壳聚糖具有的脱乙酰度为约 75% 至 88%,或约 80% 至 85%,或约 85%。

[0023] 根据另一实施方案,本发明提供了制备止血材料的方法,其包括提供壳聚糖,使壳聚糖为干燥形式,以及在电离的氮场中浸洗壳聚糖。

[0024] 在一个这种实施方案中,提供壳聚糖包括加工蟹壳。

[0025] 在另一实施方案中,提供壳聚糖包括提供形成为纤维形式的高分子量壳聚糖。

[0026] 在其它实施方案中,提供壳聚糖包括提供形成为蓬松物或毛绒(fleece)的纤维状高分子量壳聚糖。

[0027] 根据另一实施方案中,本发明提供了制备止血材料的方法,其包括提供干燥形式的纤维状壳聚糖,将所述壳聚糖放置在氮场中,并且对壳聚糖进行处理,从而电离在壳聚糖中及其周围的氮。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 示例地描述了根据一个实施方案从甲壳纲动物的壳废物中获得壳聚糖的方法。

[0030] 图 2 示例地描述了制备壳聚糖纤维的设备的实施方案。

[0031] 图 3 提供了根据一个实施方案用于制备壳聚糖毛绒的装配线的示意图。

[0032] 图 4A 为根据一个实施方案制备的微纤维状壳聚糖的扫描电子显微镜图像。

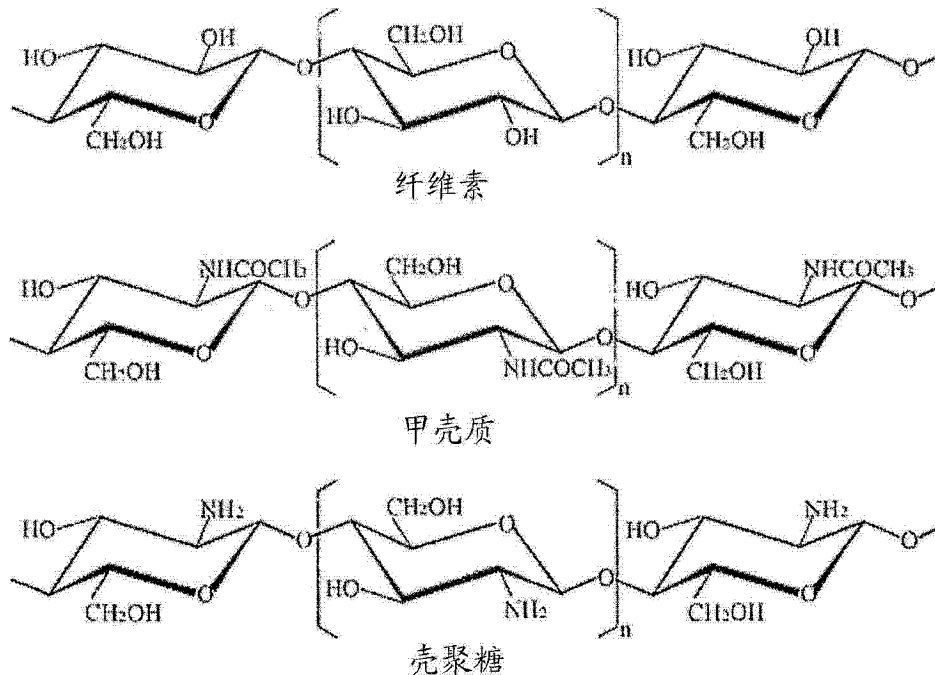
[0033] 图 4B 为图 4A 的边缘放大图像。

[0034] 图 5 为一个实施方案的等离子体处理组件的示例性描述。

[0035] 优选实施方案的详述

[0036] 壳聚糖得自甲壳质，而甲壳质为主要得自虾壳废弃物和蟹壳废弃物的可广泛获得的生物聚合物。壳聚糖是甲壳质的主要衍生物，并且是脱乙酰化和解聚过程中各阶段的脱乙酰化甲壳质的集合术语。甲壳质和壳聚糖的化学结构类似于纤维素。区别在于，作为键接在纤维素中每个 D-葡萄糖单元的 C-2 上键合的是羟基，而甲壳质中每个 D-葡萄糖单元的 C-2 上为乙酰化的氨基 ($-\text{NHCOCH}_3$)，在壳聚糖中每个 D-葡萄糖单元的 C-2 上为氨基。

[0037]



[0038] 甲壳质和壳聚糖都是无毒的，但与甲壳质相比，由于壳聚糖在酸溶液中具有良好的溶解性，因此在医疗和制药领域中壳聚糖的应用更为广泛。壳聚糖具有良好的生物相容性，并且可被脱乙酰壳多糖酶、木瓜蛋白酶、纤维素酶和酸性蛋白酶生物降解。壳聚糖显示出抗炎和镇痛作用，并促进止血和伤口愈合。壳聚糖还已表现为有效的止血剂。壳聚糖止血被认为由下述过程介导，即带正电的氨基与带负电的红细胞以及血小板表面结合，形成黏膜粘附的凝块而未激活传统的凝结途径。

[0039] 在优选的实施方案中，由微纤维状高分子量壳聚糖制成的止血装置能被构造为海绵、蓬松物或无纺织物形式。所述微纤维状高分子量壳聚糖已在申请人于 2004 年 6 月 14 日提交的发明名称为“可展开的多功能止血剂”的共同未决的第 10/868, 201 号申请中以及在 2005 年 2 月 18 日提交的发明名称为“局部和内部使用的止血剂”的共同未决的第 11/061, 243 号申请中讨论。

[0040] 如上所述，由甲壳质形成壳聚糖，甲壳质以与蛋白和钙盐的复合物的形式存在于甲壳类动物的壳中。通过从这些壳中去除碳酸钙和蛋白即可获得甲壳质，而通过在强碱溶液中对甲壳质进行脱乙酰化即可产生壳聚糖。

[0041] 用于从蟹、虾或其它甲壳类动物的壳中获得壳聚糖的一种方法示例性描绘于图 1 中并描述如下。通过将所述壳在室温下在稀盐酸中浸泡 24 小时来除去碳酸钙（脱矿物

质)。随后通过将脱钙的壳用稀氢氧化钠水溶液煮沸 6 小时来从脱钙的壳中提取蛋白(脱蛋白质)。所述脱矿物质和脱蛋白质步骤优选重复至少两次,以从甲壳类动物的壳中基本去除所有的无机物质和蛋白。洗涤由此获得的粗甲壳质,随后干燥。将甲壳质在强碱溶液中(50wt.%)在 140° C 下加热 3 小时。在所述碱处理过程中,通过间歇地用水对中间产物进行洗涤,优选两次或更多次,可获得表现出分子链无明显降解的高度脱乙酰化的壳聚糖。

[0042] 尽管能够使用任何合适的方法,但能够通过湿纺方法来制备壳聚糖纤维。在一实施方案中,首先将壳聚糖溶解在适合的溶剂中得到初级纺丝溶液。优选的溶剂包括酸性溶液,例如含有三氯乙酸、乙酸、乳酸等酸的溶液。然而可采用任何适合的溶剂。对所述初级纺丝溶液进行过滤和脱气,随后将其在压力下通过纺丝喷嘴的孔喷射入凝固浴中。从该凝固浴中回收固体壳聚糖纤维。可对该纤维进行进一步处理,包括但不限于牵拉、洗涤、干燥、后处理、官能化等等。

[0043] 图 2 示例性描述了根据一个实施方案的制备壳聚糖纤维的设备。该示例性设备包括溶解釜 1、过滤器 2、中间槽 3、储存槽 4、计量泵 5、过滤器 6、纺丝喷嘴 7、凝固浴 8、蘸料辊 9、拉伸浴 10、拉伸辊 11、洗涤浴 12,以及卷曲辊 13。

[0044] 在一实施方案中,通过在混合溶剂的温度为 5° C 的条件下,将 3 份壳聚糖粉末溶解在含有 50 份三氯乙酸(TDA)和 50 份二氯甲烷的混合溶剂中制备了初级壳聚糖纺丝溶液。将所得初级纺丝溶液过滤,并随后在真空下脱气。使用包含 14° C 的丙酮的第一凝固浴。所述纺丝喷嘴的孔径为 0.08mm,孔计数为 48,且纺丝速度为 10m/min。通过用再循环的热水加热,使所述纺丝溶液保持在 20° C。回收来自丙酮浴中的壳聚糖纤维,并通过传送带传送到包含 15° C 的甲醇的第二凝固浴中。将纤维在第二凝固浴中保持 10 分钟。回收所述纤维,并随后以 9m/min 的速度卷绕。将卷绕的纤维在 0.3g/l 的 KOH 溶液中中和 1 小时,随后用去离子水洗涤。随后将所得壳聚糖纤维干燥,其后该纤维即可制成优选实施方案的止血材料。

[0045] 在一个优选实施方案中,实施方案中使用冰醋酸、无水醋酸或乙酸作为试剂将壳聚糖纤维相互粘附,其中壳聚糖纤维单独地或与添加的药物、治疗剂或其它试剂一起用于形成止血剂。除在壳聚糖纤维之间提供良好的粘附性外,用冰醋酸处理过的纤维对包括动脉伤口或股骨伤口在内的伤口也表现出优异的粘附能力。

[0046] 根据应用,可调节溶液中乙酸浓度以提供所期望的粘附程度。例如,如果待采用壳聚糖纤维处理渗透伤口或其它不需要强粘附性的伤口,或者止血剂要从伤口处移除的应用中,最好采用降低浓度的乙酸。在这样的实施方案中,通常使用的乙酸浓度为约 1vol.% 或更低至约 20vol.%,更优选使用的浓度为约 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10vol.% 至约 11、12、13、14、15、16、17、18 或 19vol.%。当需要纤维之间的强粘附性,或对伤口的强粘附性时,优选浓度大于或等于约 20vol.%,更优选约 50、55、60、65 或 70vol.% 至约 75、80、85、90、95 或 100vol.%,最优选约 95、96、97、98 或 99vol.% 至约 100vol.%。

[0047] 可使用纺织工业中生产纤维通常使用的装置由壳聚糖纤维制备壳聚糖织物。参考图 3,生产壳聚糖毛绒的装配线可以使用加料器、松散机、梳理机、传送带和最后的卷切机。在加料器中,通过加料器加入壳聚糖短纤维,并进入松散机,其中用若干搅拌器松散壳聚糖短纤维。在梳理机中,通过圆筒和滚轮销的高速旋压,壳聚糖纤维被撕裂并转变为壳聚糖毛绒,然后通过落纱机将毛绒作为网的分离薄层剥离。

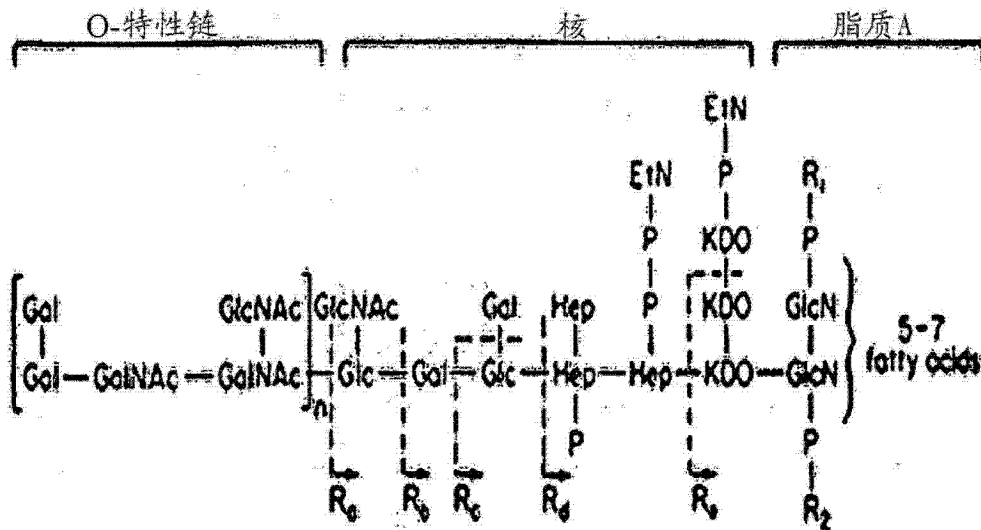
[0048] 当使用相对高分子量的壳聚糖时,上述的纤维制备和相关的加工是最有效的。这种高分子量壳聚糖特别易于形成诸如毛绒的纤维形式,该纤维形式能形成为强且持久耐用的织物,该织物柔韧且可延展,但保持连续性,以便其能作为单元而移动并在使用期间操作时不破裂。在一些实施方案中,壳聚糖纤维能形成纱线,其进而能被纺织。在其它实施方案中,将壳聚糖纤维片的连续层弄平,并用上述的诸如冰醋酸的酸性溶液(优选 pH 为约 3.0 至 4.5 的溶液)对其进行喷雾以形成无纺布。

[0049] 根据优选的实施方案,纤维状止血装置由高分子量壳聚糖(<600kDA)构成。高分子量壳聚糖有助于构成干燥的纤维状止血材料,该材料能构成蓬松物、毛绒、织物或片状形式。根据伤口的性质和所采用的处理方法,能以多种形式提供基于壳聚糖的止血织物的多个实施方案。例如,优选蓬松物、毛绒或海绵形式来控制来自动脉或静脉的活跃出血,或控制腹腔镜操作过程中的内出血。在经常遇到渗血性脑部伤口的神经外科手术中,优选软片形式的止血材料。同样地,在肿瘤手术中,特别是肝脏手术中,优选采用片状形式或海绵形式的止血材料,将其放置在瘤床内或瘤床上来控制渗血。在皮肤病应用中,优选片状形式。在血管闭合穿刺时,通常优选蓬松物形式。在某些应用中优选诸如显微缝合或大缝合等缝合线形式。

[0050] 优选的,微纤维状高分子量壳聚糖的实施方案适用于所有这些应用和结构,并且能够预期形成由这种壳聚糖制成的装置并由此而具有的形状的实施方案。然而,通常地,壳聚糖负载有致热原,特别是内毒素,这能限制壳聚糖在生物和医疗领域的应用,因为微量的内毒素在与哺乳动物组织接触时可以诱发脓毒性反应。因此,根据一些实施方案,外部使用微纤维状高分子量壳聚糖止血物以使脓毒性反应的可能性最小化。在其它实施方案中,这种壳聚糖止血物能在手术期间使用,但仅为了临时目的,并且未植入或留在患者体内。

[0051] 内毒素主要为骨骼或细胞残留物以及死亡细菌的副产物分泌物,其为普遍存在的,并在空气中、表面上以及食物和水中找到。更准确地,内毒素是具有多糖和亲脂性组分的复合的两亲脂多糖(LPS)。它们由革兰氏阴性菌的脂多糖壁组分的片段组成。在下面示出 LPS 的实例。

[0052]



[0053] 术语内毒素和致热原通常互换使用。内毒素是多种致热原的一种,其为在哺乳动

物体的血流中引起发热反应的物质。血管或淋巴暴露于内毒素时能导致严重的败血症、败血性休克以及潜在致死。因此,内毒素对于制备医疗装置而言是特别受关注的,因为它们是能污染产品的最有效的致热原之一。

[0054] 因此,接触人的组织、血液、骨骼的或能被人体吸收的或植入体内的药物、医疗装置和产品必须满足严格的内毒素控制水平。美国药典已制定了用于医疗装置的内毒素单位(EU)的规格。目前的标准(USP27)规定每个装置 $<20\text{EU}$ (例如,在水中 $<0.5\text{EU/mL}$)。期望用于内部应用的基于壳聚糖的止血物的优选实施方案已显著降低了内毒素水平以满足这种标准。

[0055] 众所周知,内毒素难以从材料中除去。它们有极强的复原力;它们强壮、顽强且易恢复,在蒸汽灭菌和正常干燥之后仍保持存活,并能通过过滤器。研究表明需要在超过 200°C 的温度下且高达1小时才能去除内毒素污染。

[0056] 因为内毒素在生物材料中是普遍存在的,因此许多努力和研究已经致力于去除和/或灭活内毒素,从而使生物材料可用于医疗目的。已研究和采用的一些治疗方法包括加热、酸碱水解、氧化、诸如 γ -辐射的电离辐射以及超滤。这些方法具有不同范围的效能、费用以及对特定产品的适用性。

[0057] 然而,已证实难以开发适于壳聚糖、特别是适于高分子量壳聚糖的内毒素去除或灭活方法(去除热原法),因为已知的方法,例如将壳聚糖与强碱接触或 γ -辐射壳聚糖水溶液趋于使壳聚糖解聚,由此降低平均分子量。

[0058] 如上所述,基于壳聚糖的止血织物的优选实施方案采用了具有非常高的分子量的壳聚糖。获得这种壳聚糖涉及至关重要的选择和过程。在壳聚糖织物的制备实施方案中使用的特别优选的甲壳质源为蟹壳。由蟹壳、特别是北极蟹壳制备的甲壳质通常具有比由虾壳制备的甲壳质更高的分子量。蟹壳甲壳质还通常表现出比虾壳甲壳质更高的脱乙酰度。蟹壳甲壳质通常表现出约 600kDa 至 1300kDa 的平均分子量。这种高分子量壳聚糖能更易于加工以形成坚固的纤维。

[0059] 根据一些实施方案,用于制备壳聚糖纤维的优选的甲壳质材料具有的分子量大于约 600kDa 、 650kDa 、 700kDa 、 750kDa 、 800kDa 、 850kDa 、 900kDa 、 950kDa 、 1000kDa 、 1100kDa 、 1200kDa 、 1300kDa 、 1400kDa 或 1500kDa 或更高;更优选地,分子量为约 600kDa 至 800kDa ;并且最优选为约 700kDa 。优选地,所生成的壳聚糖纤维具有相似的分子量。优选地,壳聚糖优选具有的脱乙酰度为约75%至90%,更优选约80%至88%,并且最优选约80%至85%。

[0060] 根据实施方案,例如阿拉斯加雪蟹壳的北极蟹壳用作制备微纤维状壳聚糖的原料。优选地将这些壳洗涤、粉碎、干燥,然后浸渍12小时在3%至5%的 HCl 中浸渍1至2小时以使该材料脱矿物质和脱蛋白质。将浆料转移至在 90°C 的5% NaOH 反应器中,以用于另外的蛋白质去除。脱蛋白质的粉碎的壳用水洗涤两次直至为中性,干燥并通过暴露于紫外光下再次脱色。另外的脱钙和脱蛋白质在3% HCl 中持续12小时,然后在 90°C 的3%至5%的 NaOH 中持续另外的1至2小时。用水将脱蛋白质、脱矿物质的材料洗涤至中性,干燥并UV脱色。在该阶段,壳材料已被加工成甲壳质形式,并且具有的残留蛋白水平 $\leq 0.1\%$,这显著低于商品级的壳聚糖。

[0061] 根据一个实施方案,为了将甲壳质加工为高分子量壳聚糖,使该材料在 90°C 的48% NaOH 溶液中受控地脱乙酰化4小时。优选地,通过滴定法监测脱乙酰度(DA)直至为如

上所述的 80% 至 88%，并且更优选约 85%，从而制备高分子量 (M. W.) 壳聚糖 (M. W. >600kDa)。此外，如上所述，蟹壳甲壳质在提供高分子量壳聚糖方面是独特的。申请人已经确定，高分子量壳聚糖对内毒素 / 致热原的减少和微纤维的制备提供了显著的优势，从而有利于构建基于壳聚糖的止血织物。

[0062] 根据优选实施方案，为了加工高分子量壳聚糖（在优选实施方案中，认为高分子量 $\geq 600\text{kDa}$ ），将壳聚糖溶于 1% 三氯乙酸中，过滤，脱气并在压力下迫使其通过纺丝喷嘴（纺丝组件）的孔进入凝固浴。将从凝固浴中回收的壳聚糖纤维洗涤、干燥并在丙酮凝固浴（14° C）中以纤维形式进行收集。纺丝喷嘴的孔径优选为 0.8mm（800 微米），孔数为 48 个，并且纺丝速率为 10m/min，20° C。来自丙酮浴的壳聚糖纤维通过传送带被移动至第二凝固浴（15° C 的甲醇）。将纤维在第二凝固浴中保持 10 分钟，回收，并以 9m/min 的速率卷绕。卷绕的纤维在 0.3gm/L KOH 溶液中中和 1 小时，然后用去离子水洗涤，然后干燥、包装并隔离直至由分析认为已清除。

[0063] 已经分析了如上加工的壳聚糖，产生下表描述的说明，该说明符合下列指南：“ASTM F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Material Intended for Use in Biomedical and Tissue Engineered Medical Product Applications（用于表征和测试作为旨在用于生物医学和组织设计的医疗产品应用的起始原料的壳聚糖盐的 ASTM F2103-01 标准指南）”。

项目	说明
生物负载, 菌落数	总菌落数小于 500 cfu/gram。总的需氧菌、真菌、孢子和专性厌氧菌小于 1000 cfu/gram
脱乙酰度	85%
平均分子量	700,000 道尔顿
H ₂ O-C ₂ H ₅ OH 水溶液的 pH	5 ± 0.5
重金属: Pb、Cr、Hg、Cd、As	≤ 20 ppm 总共 < 20 ppm
干燥时的重量损失	< 15%
颜色	白色至浅黄色
可提取的材料	< 0.1% 蛋白
在酸中的溶解度	< 0.5%, 不溶于 1% 乙酸
鉴定	FTIR
用于运输的成批包装	在氮气下, 在金属化的箔袋中密封
残留的蛋白	< 1%
在微纤维状、无纺织物制备后的内在说明	
项目	说明
纤维, 旦	范围 9.1 微米至 26.9 微米, O.D.
体外粘附	粘附强度(kPa ~ 70 至 80)
壳聚糖结构	在 UV 之后, 在 IR 谱中没有变化

[0065] 优选地, 在内毒素减少、UV 辐射的环境中进行所制备的壳聚糖产品的处理和贮存。优选所有袋、容器和贮存材料不含致热原, 并且在氮气环境中将产品存贮和转移。

[0066] 申请人已发现相比于低分子量壳聚糖, 上述的高分子量壳聚糖对于内毒素具有更低的亲和性。因此, 尽管灭活内毒素的需要可能仍然存在, 但高分子量壳聚糖更易于进行成功的灭活处理。

[0067] 在一个实施方案中, 在氮气下包装最终产品, 即高分子量纤维状壳聚糖毛绒。在一些这种实施方案中, 将所述毛绒包装在由诸如 Tyvek™ 的烯烃纤维制成的容器中。在一些实施方案中, 所述包装包括具有或不具有薄的金属化层的塑料材料。期望可以采用其它类型的包装。然而, 优选地, 该包装是密封的, 使所述毛绒保持在氮气环境中, 并防止氧气进入。

[0068] 在另一实施方案中, 能以 25kGy 用 γ -辐射 (Co⁶⁰源) 辐射具有上述制备的高分子量纤维状壳聚糖毛绒并在上述氮场中密封的包装 15 小时。预测并理解能采用 γ -辐射的

其它剂量和强度。然而，申请人测试了如此制备的壳聚糖毛绒，通过将其植入兔子体内以监测毒性反应，并由此评价 γ -辐射在灭活高分子量壳聚糖中的内毒素污染方面的效能。申请人注意到 γ -辐射的壳聚糖的脓毒性反应显著低于植入相同兔子体内的未辐射的壳聚糖。更具体地，未辐射的壳聚糖表现出大量的脓形成和局部坏死以及炎症，而 γ -辐射的样品表现出少量影响甚至没有表现出这些影响。

[0069] 通过“纯度”来分级壳聚糖，从不纯的“食品”或“商品等级”到高纯化的“医用等级”。为了定性为“医用等级”壳聚糖，内毒素/致热原水平必须降低至如 FDA 和美国药典所指定的水平。FDA 认证的可植入医疗装置（壳聚糖止血物）的内毒素标准（USP27）为每个装置 $<20\text{EU}$ （内毒素单位）或在水中 $<0.5\text{EU/ml}$ 。因为内毒素分子量是变化的（ $10,000\text{Da}$ 至 10^6Da ），以 EU 形式测量定量，其中 1EU 等于 100pg 的大肠杆菌脂多糖（LPS）。通常通过鲎（Limulus）变形细胞溶解物（LAL）测试来测量这些水平。

[0070] 申请人送出如上制备并在氮气下 γ -辐射的高分子量壳聚糖样品的六个样品以及六个未经辐射的样品用于 LAL 测试。如下所概述制备样品。

样品制备:	将样品切割并浸渍:			
	提取方法:	X	浸渍	流体途径
[0071]	样品数量	6		
	总提取体积	60.0 mL		
	静态浸泡时间:	60 分钟		
[0072]	提取温度:	20-25°		

[0073] 然后测试所述样品以检测每个装置的 EU 浓度。因为内毒素的某些性质通常干扰未稀释的样品的结果，所以在阶梯式稀释水平下测量内毒素，同时期望的结果随着连续稀释而变得更可靠。测试结果如下：

[0074]

每个装置的内毒素单位 (EU)	未稀释	20.70EU/ 装置
	2 倍	18.40EU/ 装置
	10 倍	9.77EU/ 装置
	20 倍	8.60EU/ 装置

[0075] 如在测试结果中所示，可靠的 10 倍和 20 倍稀释的试样产生的 EU/ 装置水平完全在医用等级的、可植入的壳聚糖的可接受界限内。

[0076] 相反，以相似方式制备未辐射的六个样品产生如下测试结果：

[0077]

每个装置的内毒素单位 (EU)	未稀释	$>50.00\text{EU/ 装置}$
-----------------	-----	-----------------------

	2 倍	70.00EU/ 装置
	10 倍	68.80EU/ 装置
	20 倍	73.00EU/ 装置

[0078] 10 倍和 20 倍稀释的样品测试表现出的 EU 水平完全超过用于医用等级的壳聚糖的可接受的 EU 水平。因为样品中的唯一区别是在氮气环境中,在密封包装中进行 γ -辐射,申请人已经断定在这些条件下高分子量壳聚糖的 γ -辐射有效灭活内毒素。此外,对于止血效能, γ -辐射的壳聚糖与未辐射的壳聚糖的测试未产生可察觉的差异。

[0079] 进一步研究样品以确定 γ -辐射是否导致解聚和 / 或以其它方式损害壳聚糖纤维。图 4A 和 4B 的图像描述了如上所加工且如上所辐射的微纤维状壳聚糖的扫描电子显微镜 (SEM) 表面区域。图 4A 为微纤维状壳聚糖的 SEM,纤维的平均直径为 $16.7 \pm 3.6 \mu\text{m}$ ($10 \mu\text{m}$ 至 $26 \mu\text{m}$)。图 4B 为使用 ImageJ 软件 (ImageJ, NIH) 创建并分析的图 4A 的边缘放大图像。使用来自图像的纤维长度和宽度的估计值,将在 $150 \times 100 \mu\text{m}$ 视场 (FOV) 中的 11 个纤维模拟为圆柱体。使用 FOV 尺寸且假定深度为平均纤维直径 ($16.7 \mu\text{m}$) 的六倍,则微纤维状壳聚糖的表面积与体积比 (S/V_p) 为 4.7nm^{-1} 。因此,敷料厚度和血液渗透深度为 5mm , $1 \times 1 \times 5 \text{mm}$ 体积的微纤维状壳聚糖对血液产品估计具有 $23.5 \mu\text{m}^2$ 的表面积。

[0080] 总之,辐射的壳聚糖纤维结构完整,并且保持可用于与血液相互作用的高表面积。申请人已断定在所列举的条件下的辐射导致少量甚至不导致解聚和 / 或壳聚糖纤维的分子量的降低。

[0081] 如上所制备的高分子量壳聚糖纤维具有相对高的氮含量。申请人已经确定在有助于氮电离的条件中处理这种纤维特别有益于灭活内毒素,而基本不损害壳聚糖纤维的结构或纤维在促进止血方面的效能。更具体地,在一些实施方案中,优选地对壳聚糖进行能增加纤维状壳聚糖中及其周围的氨基数量的处理,甚至更优选地进行能产生基于氮的自由基的处理,从而灭活内毒素并同时增加可湿润性、亲水性和黏膜粘附性中的一种或多种。

[0082] 在另一实施方案中,用电离的氮气、更具体地用基于氮的等离子体处理高分子量壳聚糖,优选在室温下进行,从而有效地灭活在高分子量壳聚糖上的内毒素,而不负面影响壳聚糖的效能或分子量。

[0083] 在一个实施方案中,能使用例如购自 APJ eT Inc. 的 e⁻Rio™ 大气压等离子体系统 APPR-300-13 来进行等离子体处理。该机器使用 RF 电场, $1300 \text{W} @ 27 \text{MHz}$ RF/1mm 间隙,以制备独特的、非热能的、辉光放电等离子体,其在大气压下操作,具有最大 $1 \text{gpm} @ 20 \text{psi}$ 的冷却需求。

[0084] 参考下述图 5 中的示例性示意图,在一些实施方案中,等离子体组件包括蒸发器和敷抹器。蒸发器为加热组件,其蒸发待应用至纤维状壳聚糖样品的单体。通过与附着于该蒸发器的热电偶连接的逻辑控制器来调节热。敷抹器起到加热的喷嘴的作用,从而将蒸发的单体应用于纤维状壳聚糖样品。热保持单体的蒸发性质。优选地通过与附着于敷抹器的热电偶连接的逻辑控制器来调节热。

[0085] 应理解,能采用用于高分子量壳聚糖的等离子体处理的多种方法和组件。例如,能在氮等离子体下处理纤维状壳聚糖,然后在氮气下包装。在一些实施方案中,在氮等离子体

下处理相对大量的纤维状壳聚糖,然后分为单独的剂量并分别包装。在其它实施方案中,能将壳聚糖部分包装,例如封装在具有未密封的开口的包装内,在部分包装的条件中等离子体处理壳聚糖,并且所述包装可以在等离子体处理区中或在氮场附近全部密封。

[0086] 在其它优选实施方案中,在等离子体处理之前包装高分子量壳聚糖。优选地,在氮场中密封壳聚糖织物,并能基本上如上所述来制备。在一些这种实施方案中,RF 粉末活化包装内的氮,这被认为产生有助于灭活内毒素的基于氮的自由基。当然,应理解,可以将各种类型和结构的组件和设备用于等离子体处理。

[0087] 上述实施方案已描述了在氮场中对高分子量壳聚糖的处理包括等离子体、 γ -辐射等。在其它实施方案中,能采用增加在壳聚糖上或其周围的氨基浓度的其它方法和设备。优选地,这种方法另外提供了基于氮的自由基。与本文具体讨论的实例相比,这种方法可以包括其它类型的辐射,以及功率、持续时间等方面的变化。

[0088] 根据其它实施方案,使用等离子体以及氮场和 γ -辐射处理高分子量壳聚糖。在一些实施方案中,首先使用 γ -辐射处理壳聚糖,然后在等离子体下处理。在其它实施方案中,将该顺序颠倒。

[0089] 申请人处理了具有约 700kDa 的分子量和约 85% 的脱乙酰度的纤维状高分子量壳聚糖样品,该样品已在包装和氮场中密封,首先通过以 25Gy 水平 γ -辐射所包装的样品,然后等离子体处理仍被包装的样品。然后,将处理的样品经过 LAL 测试。在等离子体下如此处理约 5 分钟的样品经测试,其具有 9.6EU/装置以及基于 20 倍稀释的 52.8EU/gm。在等离子体下如此处理约 10 分钟的样品经测试,其具有 2.3EU/装置,以及基于 20 倍稀释的 12.7EU/gm。

[0090] 在上述的一些实施方案中,用乙酸溶液处理纤维状壳聚糖以促进粘附。在其它实施方案中,未使用乙酸处理纤维状壳聚糖,而是进行在氮场中的 γ -辐射、基于氮气的等离子体处理和 / 或增加在壳聚糖上及其周围的氨基浓度的其它处理方法,从而增加可湿润性、亲水性和粘膜粘附性,而在形成纤维毛绒之后未暴露于乙酸。

[0091] 应理解,其它处理可以提高止血的、基于壳聚糖的织物。例如,在一个实施方案中,将壳聚糖纤维浸入醇中,优选持续约 1 小时。在实验中,这种处理导致壳聚糖纤维更白,但没有改变壳聚糖纤维的结构。还降低了壳聚糖纤维的细菌总数。然后,使用 γ -辐射、等离子体或二者来进一步处理这种处理的织物。

[0092] 尽管在某些优选的实施方案和实例中公开了本发明,但本领域技术人员应理解本发明不限于具体公开的实施方案而应延伸至其它可替代的实施方案和 / 或本发明的用途及其各种修改和等同。此外,尽管已经示出和详细描述了本发明的多个变体,但基于本公开,在本发明范围内的其它修改对于本领域技术人员而言是非常显而易见的。还可以进行实施方案的具体特征和方面的各种组合或亚组合,并其仍在本发明的范围内。因此,应理解,所公开的实施方案的各种特征和方面能互相结合或替代,从而形成所公开的发明的不同方式。因此,旨在本文公开的本发明的范围不应受限于上述的具体公开的实施方案,而应仅由所附的权利要求的来确定。

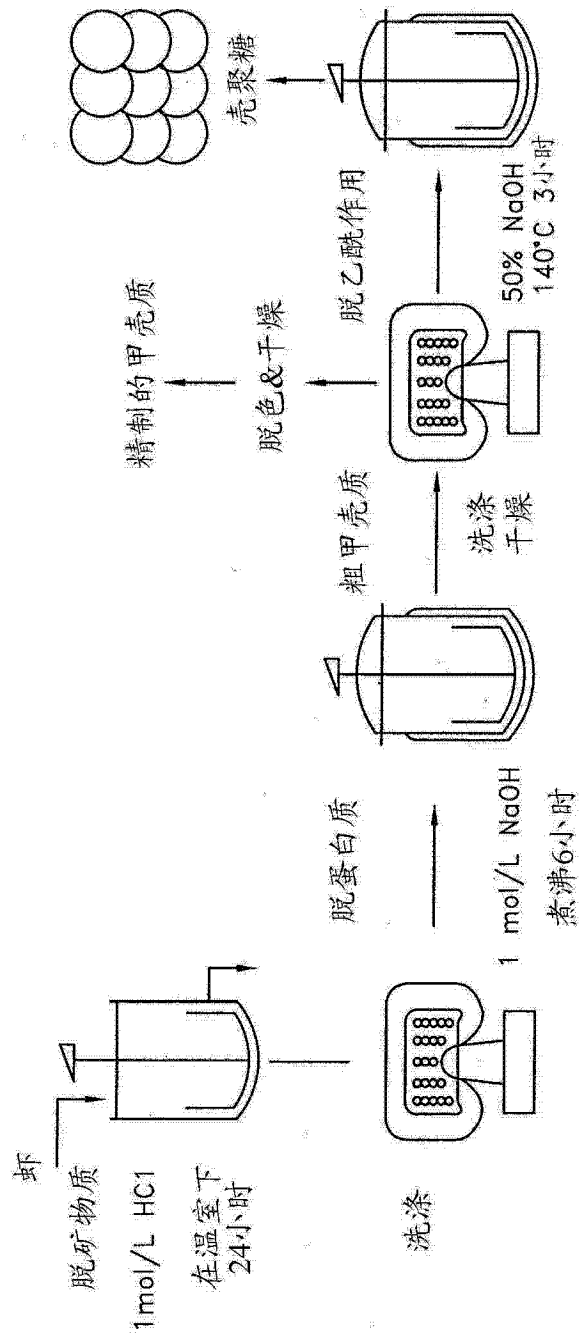


图 1

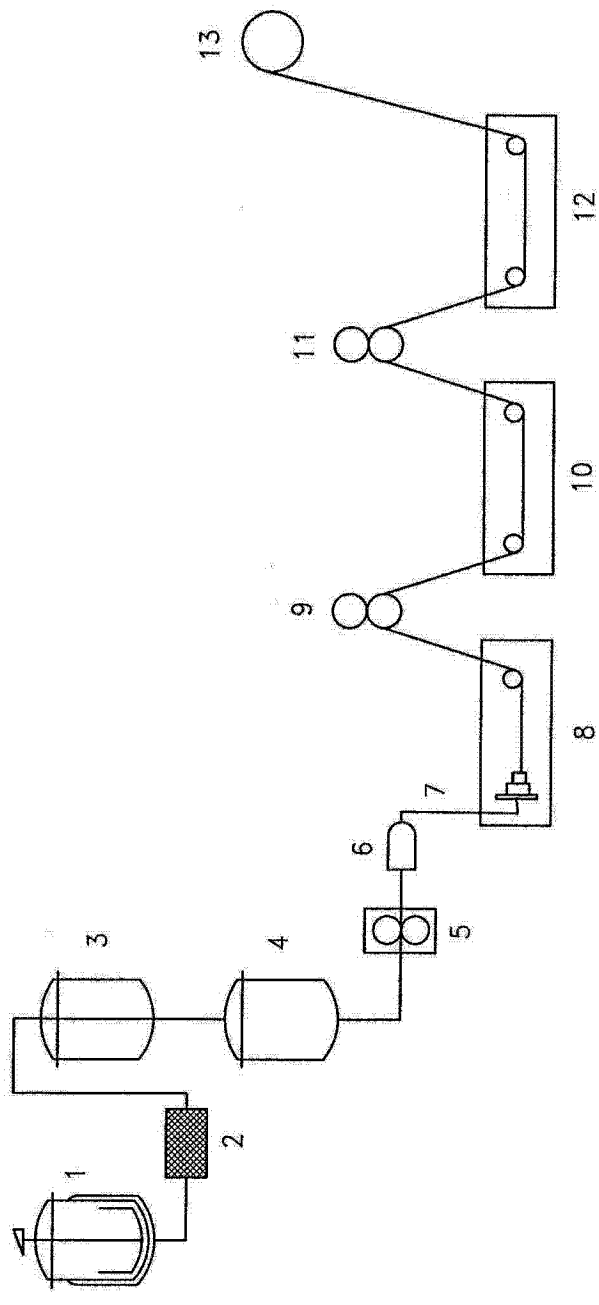


图 2

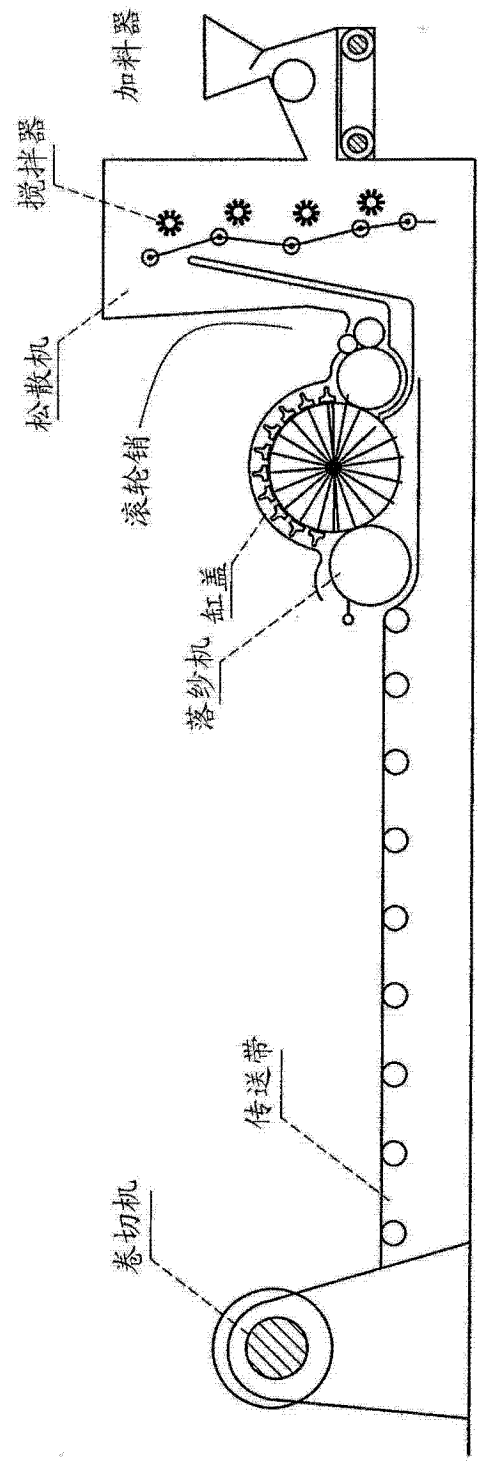


图 3

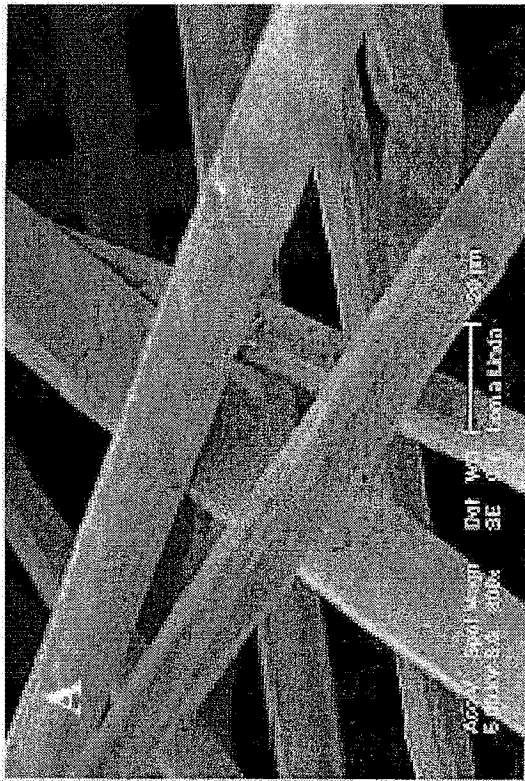


图 4A

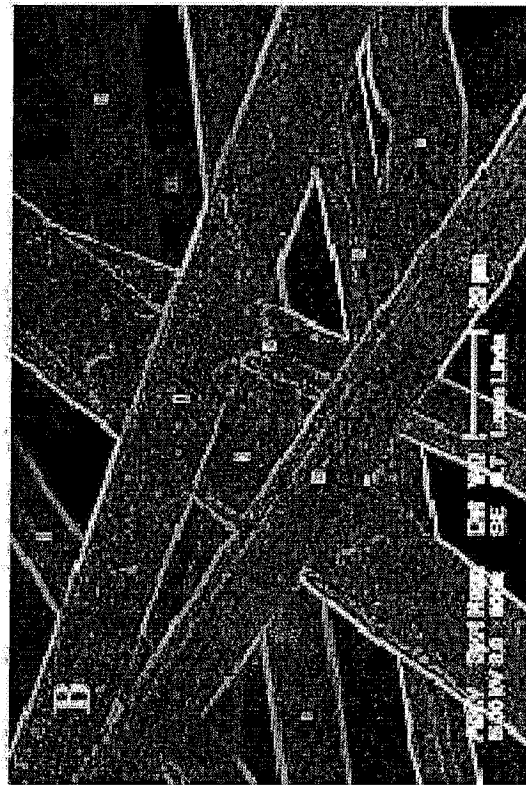


图 4B

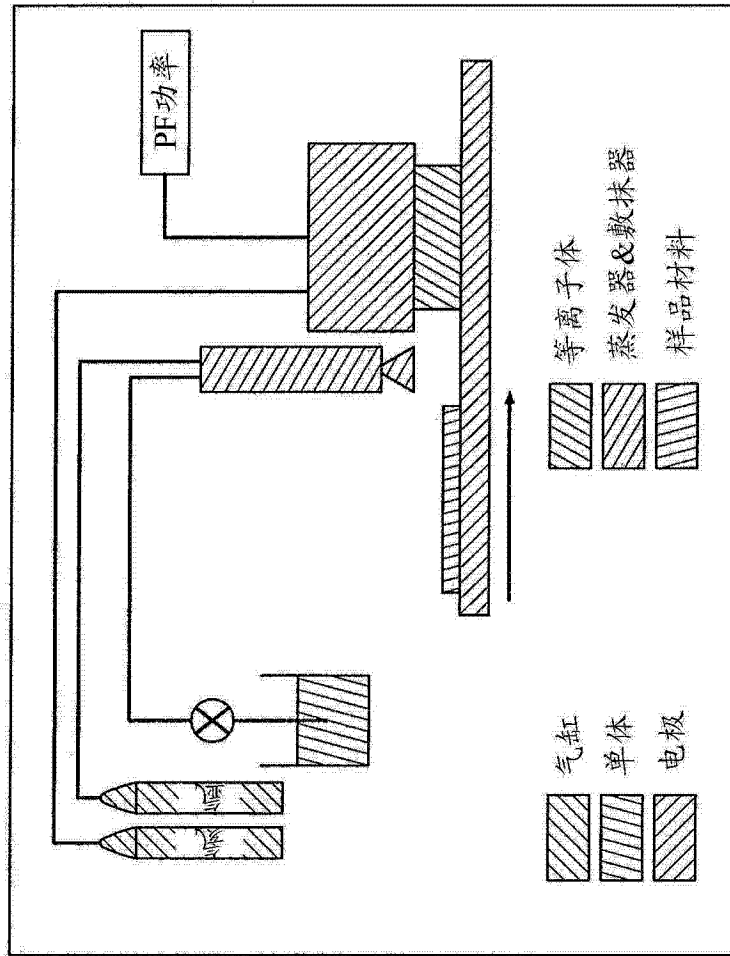


图 5