

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 077**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/GB2014/051646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191753**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14736001 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 3004179**

54 Título: **Proceso para producir quitosano bajo en endotoxina**

30 Prioridad:

29.05.2013 GB 201309607

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.03.2024

73 Titular/es:

**MEDTRADE PRODUCTS LIMITED (100.0%)
Electra House Crewe Business Park
Crewe, Cheshire CW1 6GL, GB**

72 Inventor/es:

**HARDY, CRAIG;
HOGGARTH, ANDREW y
GLADMAN, JUNE**

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 963 077 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para producir quitosano bajo en endotoxina

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir quitosano alcalino bajo en endotoxinas, y también a un proceso para producir quitosano neutro, sal de quitosano y derivados de quitosano bajos en endotoxinas, y a los productos de tales procesos.

10 El quitosano es particularmente útil en la preparación de materiales hemostáticos para su uso en el control de hemorragias.

15 El quitosano es un derivado de los desechos sólidos del procesamiento de mariscos y puede extraerse del cultivo de hongos. El quitosano es un material polimérico catiónico insoluble en agua. Antes de utilizar el quitosano en materiales hemostáticos, a menudo se convierte primero en una sal soluble en agua. De esta forma, la sal de quitosano se disuelve en la sangre para formar un gel que detiene el flujo sanguíneo.

20 Las sales de quitosano son ideales para las aplicaciones descritas en el presente documento ya que el quitosano se descompone fácilmente en el cuerpo. El quitosano se convierte en glucosamina mediante la enzima lisozima y, por lo tanto, se excreta del cuerpo de forma natural. No es necesario eliminar el quitosano del cuerpo. Además, las sales de quitosano presentan propiedades antibacterianas leves y, como tal, su uso reduce el riesgo de infección.

25 Para utilizar quitosano en la preparación de materiales hemostáticos que sean adecuados para su uso en el control de hemorragias, es necesario garantizar que el quitosano tenga una concentración de endotoxina lo suficientemente baja.

30 La endotoxina es un lipopolisacárido que existe en la superficie de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Las endotoxinas son altamente tóxicas para los mamíferos, particularmente para los humanos, y son muy difíciles de eliminar de los materiales. Las endotoxinas pueden volverse pirógenas cuando se liberan al torrente sanguíneo o a otros tejidos donde normalmente no se encuentran. Por tanto, las endotoxinas deben eliminarse de los productos farmacéuticamente aceptables.

35 Los tratamientos para eliminar o destruir pirógenos, particularmente endotoxinas, se denominan métodos de "despirogenación". Las técnicas para la despirogenación de materiales que contienen endotoxinas incluyen cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración, destilación y diversos procesos químicos destinados a destruir la endotoxina.

El documento WO2008063503 se refiere a un método para eliminar endotoxinas del quitosano que incluye las siguientes etapas:

- 40 a) utilizar equipos y materiales estériles libres de pirógenos en un ambiente estéril;
- b) hinchar el quitosano que contiene endotoxinas durante hasta 24 horas;
- 45 c) disolver de 1 kg/25 l a 1,5 kg/25 l de quitosano en 0,01 M a 4,0 M de una base de hidróxido;
- d) agitar continuamente la solución base de quitosano resultante;
- e) calentar la solución entre 60-100 °C durante 45 minutos hasta 4 horas con agitación;
- 50 f) enjuagar la solución con hasta 10 veces el volumen de agua ultrapura libre de endotoxinas;
- g) neutralizar la solución a un pH entre 6,8 y 7,5;
- 55 h) formar una suspensión de quitosano ultrapura baja en endotoxinas y transferirla a un sistema cerrado libre de endotoxinas;
- i) eliminar el exceso de agua de la suspensión.

60 Este es un proceso complicado y costoso, especialmente debido a la necesidad de equipos estériles y la necesidad de enjuagar la solución con 10 veces el volumen de agua libre de endotoxinas.

El documento US2006293509 se refiere a un método para preparar un quitosano soluble en agua que tiene un bajo nivel de endotoxinas por medio de:

- 65 (a) poner en contacto quitosano insoluble en agua con una solución básica durante un primer período de tiempo superior a 1 hora;

- (b) enjuagar el quitosano insoluble en agua para eliminar la solución básica residual, deseablemente con agua libre de endotoxinas;
- 5 (c) acetilar parcialmente el quitosano insoluble en agua en una solución de reacción que contiene un agente de transferencia de fase;
- (d) 10 disolver el quitosano soluble en agua parcialmente acetilado en una solución acuosa que contiene un tensioactivo y que tiene un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4;
- (e) 15 añadir un disolvente miscible en agua a la solución acuosa y ajustar adicionalmente el pH de la solución acuosa a un pH de al menos 8,0 para provocar la precipitación de quitosano soluble en agua que tiene un bajo contenido de endotoxinas a partir de la mezcla de solución acuosa/disolvente miscible en agua; y
- (f) 15 opcionalmente lavar en un no disolvente tal como isopropanol.

20 Sin embargo, este proceso es complicado y costoso y deseablemente implica el uso de grandes cantidades de agua u otros líquidos libres de endotoxinas. El proceso también requiere el uso de agentes de transferencia de fase y dura unas pocas horas.

El documento TW593342 se relaciona con un método para reducir la endotoxina en el quitosano mediante:

- 25 (a) disolver quitosano que contiene endotoxina en una solución acuosa;
- (b) poner en contacto la solución acuosa con un tensioactivo para formar un sólido insoluble y una solución acuosa con un contenido reducido de endotoxina;
- 30 (c) usar un medio de separación sólido/líquido para separar el sólido de la solución acuosa.

35 Sin embargo, este proceso requiere que un tensioactivo reaccione con el quitosano disuelto para formar un sólido insoluble. El sólido resultante será una mezcla de quitosano y tensioactivo o un producto de reacción entre el quitosano y el tensioactivo.

La presente invención pretende paliar las dificultades antes mencionadas.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir quitosano alcalino bajo en endotoxinas, quitina o un derivado del mismo, comprendiendo el proceso las etapas de:

- 40 (a) poner en contacto quitosano, quitina, un derivado de quitosano o un derivado de quitina con una solución alcalina que tiene una concentración de 0,01 M a 0,2 M para formar una mezcla; y
- (b) 45 dejar la mezcla por un período inferior a 11 horas; y luego
- (c) secar la mezcla.

50 El proceso de la presente invención proporciona una forma eficaz de obtener un quitosano alcalino, quitina, derivado de quitosano o derivado de quitina que tiene una baja concentración de endotoxina. Ventajosamente, el proceso no requiere una etapa de lavado, una etapa de enjuague, el uso de un tensioactivo o agentes de transferencia de fase, equipo estéril y/o el uso de agua libre de endotoxinas. Además, tampoco se requiere filtración de aire especializada ni condiciones estériles. El proceso de la presente invención preferiblemente no comprende una etapa de acetilación del quitosano. Además, el proceso de la presente invención no utiliza equipo libre de endotoxinas. Esto es particularmente beneficioso ya que reduce el coste del proceso en comparación con procesos que requieren dicho equipo.

55 Por el término "derivado de quitosano" se entiende en el presente documento una quitina parcialmente desacetilada, que puede tener diferentes porcentajes de desacetilación, según se desee. Normalmente, la quitina parcialmente desacetilada adecuada para su uso en la presente invención tiene un grado de desacetilación superior a aproximadamente el 50 %, más habitualmente superior a aproximadamente el 75 % y lo más habitualmente superior a aproximadamente el 85 %.

60 También se incluyen en el presente documento dentro del término "derivados" productos de reacción de quitosano o quitina con otros compuestos. Dichos productos de reacción incluyen, entre otros, carboximetilquitosano, hidroxibutilquitina, N-acilquitosano, O-acilquitosano, N-alquilquitosano, O-alquilquitosano, N-alquilidenoquitosano, O-sulfonilquitosano, quitosano sulfatado, quitosano fosforilado, quitosano nitrado, alcalichitina, alcaliquitosano o quelatos metálicos con quitosano, etc.

Si bien el primer aspecto de la presente invención proporciona un proceso para producir quitosano bajo endotoxinas, quitina o un derivado del mismo, se describe a continuación en relación con el quitosano por conveniencia y con fines ilustrativos únicamente.

5 El quitosano puede ser quitosano disponible comercialmente, tal como quitosano de calidad alimentaria, de calidad médica o de calidad farmacéutica. Por lo tanto, el proceso de la presente invención puede funcionar para proporcionar quitosano alcalino bajo en endotoxinas a partir de quitosano disponible comercialmente. Esto es diferente a ciertos procesos en los que las endotoxinas pueden eliminarse o reducirse como parte del proceso de producción de quitosano. Ventajosamente, el proceso de la presente invención se puede utilizar para proporcionar quitosano alcalino bajo en endotoxinas a partir de quitosano preparado que de otro modo habría sido inadecuado para el campo médico debido a su concentración de endotoxinas.

10 El término quitosano alcalino se utiliza en el presente documento para referirse a una composición de quitosano que tiene un valor de pH superior a 7,5.

El término solución alcalina se utiliza en el presente documento para referirse a una solución que tiene un valor de pH superior a 7,5.

20 Dado que el peso molecular de las endotoxinas puede variar significativamente, la concentración de endotoxinas se mide en unidades de endotoxinas (UE) por gramo de material. La medición de la concentración de endotoxina es una cuantificación de los niveles de endotoxina en relación con una cantidad específica de endotoxina de referencia.

25 Por ejemplo, en la presente invención, la concentración de endotoxina se mide en unidades de endotoxina (UE) por gramo de quitosano. El término "bajo endotoxina" se utiliza en el presente documento para referirse a una concentración de endotoxina inferior a 50 unidades de endotoxina (UE) por gramo de quitosano.

Por tanto, el proceso de la presente invención es adecuado para preparar un quitosano alcalino que tiene una concentración de endotoxina inferior a 50 UE/g.

30 Preferiblemente, el quitosano alcalino resultante tiene una concentración de endotoxina de menos de 30 UE/g, más preferiblemente menos de 20 UE/g, más preferiblemente menos de 15 UE/g, incluso más preferiblemente menos de 10 UE/g y lo más preferiblemente menos de 5 UE/g.

35 Se ha descubierto que bajas concentraciones de solución alcalina producen un producto con propiedades deseables. La concentración de solución alcalina es de 0,01 M a 0,2 M. Más preferiblemente, la concentración de solución alcalina es de aproximadamente 0,02 M a 0,1 M. La concentración de solución alcalina puede ser de aproximadamente 0,04 M a 0,06 M, normalmente 0,05 M. Se han observado buenos resultados con una concentración de solución alcalina 0,1 M.

40 En algunas realizaciones, la cantidad de solución alcalina a quitosano puede estar en el rango de aproximadamente 1 parte de quitosano a aproximadamente 10 partes de solución alcalina hasta aproximadamente 10 partes de quitosano a aproximadamente 1 parte de solución alcalina. Preferiblemente, la cantidad de solución alcalina con respecto a quitosano es aproximadamente 1 parte de solución alcalina por aproximadamente 2 partes de quitosano, más preferiblemente aproximadamente 1 parte de solución alcalina por aproximadamente 1 parte de quitosano.

45 La solución alcalina puede comprender un componente alcalino o alcalinotérreo seleccionado entre los siguientes, solos o en combinación: hidróxidos metálicos, carbonatos metálicos, bisulfitos metálicos, persilicatos metálicos, bases conjugadas e hidróxido de amonio.

50 Los metales adecuados incluyen sodio, potasio, calcio o magnesio.

Preferiblemente, el componente alcalino es hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o carbonato de sodio. Normalmente se utiliza hidróxido de sodio.

55 La solución alcalina se puede poner en contacto con el quitosano mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la solución alcalina se puede pulverizar sobre el quitosano o el quitosano se puede mezclar con la solución alcalina. Preferiblemente, hay una distribución uniforme del quitosano en contacto con álcali.

60 Preferiblemente, el quitosano se mezcla con la solución alcalina. A pesos moleculares bajos, el quitosano puede disolverse total o parcialmente en la solución alcalina. El quitosano se puede mezclar con la solución alcalina en la etapa (a) durante hasta aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente durante aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, el quitosano se puede mezclar con la solución alcalina durante más de 30 minutos.

65 En algunas realizaciones, el quitosano no se disuelve en la solución alcalina.

En algunas realizaciones, el quitosano no se hincha en la solución alcalina.

En algunas realizaciones, la solución alcalina humedece el quitosano sin disolver ni hinchar el quitosano.

- 5 En algunas realizaciones, la mezcla de quitosano y solución alcalina se puede agitar de forma intermitente durante la etapa (b).

La mezcla de quitosano y solución alcalina se deja durante un período de tiempo en el que se destruye suficiente endotoxina. La mezcla de quitosano y solución alcalina se deja por un periodo menor a 11 horas. Se ha descubierto que dejar la solución de quitosano y álcali que tiene una concentración de 0,01 M a 0,2 M durante un periodo de tiempo inferior a 11 horas antes del procesamiento posterior da como resultado una concentración de endotoxina deseablemente baja en el quitosano alcalino resultante.

- 10 Una ventaja del proceso de la presente invención es que la mezcla se puede dejar sin necesidad de seguir mezclando el quitosano con la solución alcalina.

- 15 En algunas realizaciones, la mezcla se puede dejar en la etapa (b) durante un período de menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 horas. La mezcla se puede dejar en la etapa (b) durante un período de menos de 10 horas, preferiblemente menos de 8 horas, más preferiblemente menos de 6 horas, incluso más preferiblemente menos de 4 horas y lo más preferiblemente menos de 2 horas.

- 20 En algunas realizaciones, la mezcla se puede dejar en la etapa (b) durante un período de entre 1 a 11 horas, 1 a 10 horas, 1 a 9 horas, 1 a 8 horas, 1 a 7 horas, 1 a 6 horas, 1 a 5 horas, 1 a 4 horas, 1 a 3 horas o 1 a 2 horas. Así, en algunas realizaciones, la mezcla se puede dejar durante un periodo de entre 2 a 10 horas, 4 a 8 horas o 5 a 7 horas.

- 25 En algunas realizaciones, la mezcla se puede dejar en la etapa (b) durante un período de menos de 1 hora, incluyendo menos de 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 minutos. La mezcla se puede dejar durante un periodo inferior a tres minutos, menos de dos minutos o menos de un minuto.

- 30 En algunas realizaciones, la mezcla se puede dejar en la etapa (b) solo durante el período de tiempo necesario para preparar la mezcla para una etapa posterior de procesamiento, por ejemplo, la etapa de secado (c). Se han observado buenos resultados cuando la mezcla se secó inmediatamente después de poner en contacto el quitosano con la solución alcalina en la etapa (a). En este contexto, inmediatamente significa que la mezcla sólo se deja en la etapa (b) durante el período de tiempo que lleva preparar la mezcla para la etapa de secado (c). Normalmente, esto es menos de aproximadamente 30 segundos, preferiblemente menos de 20 segundos y lo más preferiblemente menos de 10 segundos.

- 35 Así, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir quitosano alcalino bajo en endotoxinas, quitina o un derivado del mismo, comprendiendo el proceso las etapas de:

- 40 (a) poner en contacto quitosano, quitina, un derivado de quitosano o un derivado de quitina con una solución alcalina que tiene una concentración de 0,01 M a 0,2 M para formar una mezcla; y

- 45 (b) secar inmediatamente la mezcla.

En tal proceso, la mezcla se deja en la etapa (b) sólo durante el tiempo necesario para prepararla para la siguiente etapa de procesamiento. Por ejemplo, la mezcla se puede dejar en la etapa (b) durante el tiempo que lleva prepararla para el secado. Luego la mezcla se seca en una etapa de secado (c).

- 50 La mezcla se puede dejar reposar en la etapa (b) a temperatura y presión ambiente. Por temperatura y presión ambiente se entiende una temperatura de aproximadamente 20-25°C y una presión de aproximadamente 1 atmósfera (atm). Beneficiosamente, no es necesario dejar la mezcla en un ambiente estéril.

- 55 Preferiblemente la mezcla se almacena en un recipiente limpio. La mezcla se puede almacenar bajo atmósfera inerte.

- La mezcla puede comprender además un conservante. De manera beneficiosa, el conservante puede eliminar el riesgo de crecimiento microbiano que puede desarrollarse, por ejemplo, cuando la mezcla se deja durante un período prolongado. El conservante puede ser cualquier conservante que sea biocompatible y adecuado para su uso en un entorno alcalino. Los conservantes adecuados incluyen iones de plata, iones de zinc, clorohexadina o combinaciones de los mismos.

- 60 El proceso de la presente invención comprende una etapa de secado. La etapa de secado puede realizarse mediante cualquier medio de secado convencional conocido en la técnica. Preferiblemente, la etapa de secado se realiza en un horno o mediante filtración a través de un secador de aire. Nuevamente, no se requiere equipo estéril especializado para la etapa de secado.

Se ha descubierto que, una vez que la mezcla se ha secado en la etapa de secado, el nivel de endotoxinas de la mezcla seca no aumenta notablemente con el tiempo. Esto es beneficioso porque la mezcla se puede almacenar durante un período de tiempo antes de su posterior procesamiento.

5 Se proporciona así un quitosano alcalino bajo en endotoxinas que tiene una concentración de endotoxina inferior a 50 EU/g. El quitosano alcalino bajo en endotoxinas puede ser insoluble en agua. A pesos moleculares bajos, el quitosano alcalino de baja endotoxina puede mostrar cierta solubilidad en agua.

10 También se describe un quitosano alcalino bajo en endotoxinas, quitina o un derivado del mismo que se puede obtener mediante el proceso como se describe en el presente documento.

También se describe un quitosano alcalino, quitina o un derivado de los mismos que comprende una concentración de endotoxina inferior a 50 UE/g.

15 El quitosano alcalino, la quitina o un derivado de los mismos tiene preferiblemente una concentración de endotoxina de menos de 30 UE/g, preferiblemente menos de 20 UE/g, más preferiblemente menos de 15 UE/g, incluso más preferiblemente menos de 10 UE/g y lo más preferiblemente menos de 5 UE. /gramo.

20 El quitosano, quitina o un derivado alcalino de bajo contenido de endotoxinas comprende un álcali que tiene una concentración de 0,01 M a 0,2 M.

25 El quitosano alcalino de bajo endotoxina se puede utilizar como intermediario en la fabricación de otros productos de quitosano, tales como, por ejemplo, derivados o copolímeros o en la fabricación de quitosano de bajo peso molecular u oligosacáridos de quitosano. El quitosano alcalino bajo en endotoxinas también puede ser útil como materia prima para la fabricación de otras formas de quitosano o derivados o copolímeros, tales como fibras, tejidos, revestimientos, películas, geles, soluciones, láminas o espumas a base de quitosano.

30 En particular, el quitosano alcalino bajo en endotoxinas se puede usar en la preparación de otros productos de quitosano útiles que tienen bajas concentraciones de endotoxina, incluyendo quitosano neutro y sales de quitosano y otros derivados de quitosano, por ejemplo, carboximetilquitosano, hidroxietilquitosano, acilquitosano, alquilquitosano, sulfonil quitosano, quitosano fosforilado, alquilideno quitosano, quelatos metálicos, cloruro de quitosano, lactato de quitosano, acetato de quitosano, malato de quitosano, gluconato de quitosano.

35 Por tanto, según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un proceso para producir quitosano, sal de quitosano o derivado de quitosano neutro con bajo contenido de endotoxinas que comprende la etapa de poner en contacto un quitosano alcalino preparado mediante el proceso descrito anteriormente en el presente documento con un ácido.

40 El proceso puede proporcionar quitosano neutro, sal de quitosano u otro derivado de quitosano médicamente útil que tenga bajas concentraciones de endotoxina.

45 La etapa de poner en contacto el quitosano alcalino con un ácido se puede realizar después de la etapa de secado (c) descrita anteriormente en el proceso para producir un quitosano alcalino bajo en endotoxinas. En tales realizaciones, el proceso para producir un quitosano neutro con bajo contenido de endotoxinas, una sal de quitosano o un derivado de quitosano puede comprender una etapa de secado adicional después de la etapa de poner en contacto el quitosano alcalino con un ácido. La etapa de secado puede realizarse mediante cualquier medio de secado convencional conocido en la técnica. Preferiblemente, la etapa de secado se realiza en un horno o mediante filtración del producto a través de un secador de aire.

50 El ácido puede ponerse en contacto con el quitosano alcalino mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el ácido se puede pulverizar sobre el quitosano alcalino o el quitosano alcalino se puede mezclar con el ácido.

55 Preferiblemente, el quitosano alcalino se mezcla con el ácido.

En el presente documento se hace referencia a quitosano neutro como una composición de quitosano que tiene un valor de pH entre aproximadamente pH 6,5 y aproximadamente pH 7,5, y preferiblemente aproximadamente pH 7.

60 Por tanto, para preparar un quitosano neutro, el quitosano alcalino se puede mezclar con un volumen y/o concentración apropiados de ácido para formar una solución neutra que tenga un pH entre 6,5 y 7,5. El volumen y/o concentración de ácido requerido para neutralizar el quitosano alcalino dependerá del pH del quitosano alcalino.

65 Alternativamente, para preparar una sal de quitosano o un derivado de quitosano, el quitosano alcalino se puede mezclar con un volumen y/o concentración de ácido superior al requerido para proporcionar un quitosano neutro.

Un ácido adecuado para su uso en la presente invención se puede seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: ácidos orgánicos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, aminoácidos, ácidos de Lewis, ácidos monopróticos, ácidos dipróticos, ácidos polipróticos, ácidos nucleicos y ácidos minerales.

5 Los ácidos orgánicos adecuados se pueden seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: ácido acético, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, ácido glucónico y ácido láctico.

10 Los ácidos grasos adecuados se pueden seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapienico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoelaídico, ácido α -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico, ácido docosahexaenoico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico.

15 Los aminoácidos adecuados pueden seleccionarse entre los siguientes, solos o en combinación: histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, taurina.

20 Los ácidos minerales adecuados pueden seleccionarse entre los siguientes, solos o en combinación: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico. Preferiblemente, el ácido seleccionado para la neutralización es ácido clorhídrico.

25 El ácido puede tener una concentración desde aproximadamente 0,001 M hasta la concentración máxima posible de ácido. Por ejemplo, la concentración máxima típica de ácido sulfúrico es de alrededor del 98% de ácido sulfúrico. El ácido puede tener una concentración de aproximadamente 0,01 M a 5 M, 0,01 M a 3 M ó 0,1 M a 2 M. Preferiblemente, el ácido tiene una concentración de aproximadamente 1 M. La concentración de ácido puede ser de hasta aproximadamente 0,01 M, 0,05 M, 0,10 M, 0,15 M, 0,20 M, 0,25 M, 0,30 M, 0,35 M, 0,40 M, 0,45 M, 0,50 M, 0,55 M, 0,60 M, 0,65 M, 0,70 M, 0,75 M, 0,80 M, 0,85 M, 0,90 M, 0,95 M ó 1,0 M.

30 El ácido puede estar presente como un licor ácido que comprende el ácido y un no disolvente. El no disolvente puede ser cualquier disolvente en el que el quitosano sea insoluble. Los no disolventes típicos incluyen lactato de etilo, acetato de etilo, acetato de metilo, etanol, acetona o mezclas de los mismos. Preferiblemente, el no disolvente comprende acetato de etilo o etanol. Más preferiblemente, el no disolvente comprende etanol en agua 80:20. De manera beneficiosa, se ha observado que la reacción avanza a una velocidad más rápida utilizando un no disolvente que comprende una mezcla 80:20 de etanol y agua.

35 La proporción de quitosano a licor ácido puede ser de aproximadamente 5 a 1 a aproximadamente 1 a 5. Preferiblemente, la proporción de quitosano a licor ácido es de aproximadamente 2 a 1.

40 En algunas realizaciones, el quitosano alcalino bajo en endotoxinas se puede mezclar con el ácido durante hasta aproximadamente 30 minutos o menos, más preferiblemente durante aproximadamente 10 minutos o menos y lo más preferiblemente durante aproximadamente cinco minutos o menos. Luego se puede dejar que se produzca la reacción mientras se seca la mezcla.

45 El producto resultante de la mezcla de quitosano alcalino con ácido puede contener una sal ácida. Preferiblemente, la solución alcalina y el ácido se seleccionan para asegurar que la sal ácida formada sea biocompatible. Por ejemplo, la solución alcalina puede comprender hidróxido de sodio y el ácido puede comprender ácido clorhídrico. En tal ejemplo, la sal ácida sería la sal biocompatible cloruro de sodio.

La sal ácida se forma como subproducto de la reacción entre el quitosano alcalino y el ácido.

50 Se ha descubierto que la presencia de una sal ácida en el producto puede afectar la utilidad del producto de quitosano resultante. Por ejemplo, se ha observado que el quitosano gelifica en menor medida en solución salina que en agua, y en menor medida aún en solución salina al doble de concentración. Se contempla que la solución salina doblemente concentrada a la que se hace referencia en el presente documento tiene una cantidad de cloruro de sodio del 1,8%. En consecuencia, es deseable tener una cantidad tan baja como sea posible de sal ácida en el producto de quitosano resultante e, idealmente, un nivel de sal ácida que haga poca o sustancialmente ninguna diferencia en la eficacia del producto de quitosano.

60 Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de una solución alcalina que tiene una concentración baja de 0,01 M a 0,2 M produce la concentración baja de endotoxina deseada y al mismo tiempo produce menos subproductos de sal ácida en el proceso posterior para producir un quitosano neutro, la sal de quitosano o derivado de quitosano. De manera beneficiosa, se ha descubierto que un subproducto de sal menos ácida da como resultado un producto de quitosano que tiene una gelificación mejorada en su uso en comparación con productos que contienen una mayor cantidad de sal ácida. El proceso de la presente invención puede proporcionar un producto de quitosano con una cantidad adecuadamente baja de sal ácida sin necesidad de lavar o enjuagar el producto de quitosano. Esto también
65 tiene la ventaja adicional de no requerir el uso de agua libre de endotoxinas en una etapa de lavado o enjuague.

También se ha descubierto que el uso de concentraciones bajas de solución alcalina como se describe en el presente documento provoca una menor reducción en la viscosidad del quitosano cuando se produce un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano.

- 5 Por bajas concentraciones de álcali se entiende de 0,01 M a 0,2 M. En algunas realizaciones, la concentración de álcali puede ser de 0,02 M a 0,1 M, preferiblemente de 0,05 M a 0,1 M. Se han observado buenos resultados utilizando una concentración de álcali de alrededor de 0,1 M. En algunas realizaciones, la concentración de álcali puede ser como se mencionó anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, es beneficioso utilizar bajas concentraciones de solución alcalina en el proceso, lo que resulta menos perjudicial para el quitosano. Por lo tanto, es posible eliminar la endotoxina del quitosano provocando sólo un cambio mínimo en la viscosidad. Es deseable que la viscosidad del quitosano se reduzca en menos de aproximadamente un 25 % en el proceso, preferiblemente en menos de aproximadamente un 15 % y más preferiblemente en menos de aproximadamente un 10 %.

- 15 Cuando el proceso proporciona un quitosano neutro con bajo contenido de endotoxinas, el producto es adecuado para su uso como intermediario en la producción de otros productos a base de quitosano. Un uso particular es la producción de sales de quitosano, cuyas propiedades absorbentes las hacen deseables para su uso en preparaciones hemostáticas para controlar la hemorragia. Es preferible que las sales de quitosano sean solubles en agua.

- 20 Por tanto, en otra realización de la presente invención, se puede preparar una sal de quitosano baja en endotoxinas poniendo en contacto un quitosano neutro bajo endotoxinas producido mediante el proceso descrito en el presente documento con un ácido.

- 25 El ácido puede ser cualquier ácido apropiado para proporcionar la sal de quitosano deseada. Por ejemplo, si se desea acetato de quitosano, se puede utilizar ácido acético; si se desea succinato de quitosano, se puede usar ácido succínico, etc. Cualquiera de los ácidos descritos en el presente documento se puede usar en el presente proceso para producir una sal de quitosano baja en endotoxinas.

- 30 El proceso para producir una sal de quitosano con bajo contenido de endotoxinas o un derivado de quitosano puede comprender además la etapa de secar la mezcla de quitosano neutro con bajo contenido de endotoxinas y ácido. La etapa de secado puede realizarse mediante cualquier medio de secado convencional conocido en la técnica. Preferiblemente, la etapa de secado se realiza en un horno o mediante filtración del producto a través de un secador de aire.

- 35 De este modo se proporciona un quitosano, una sal de quitosano o un derivado de quitosano neutro con bajo contenido de endotoxinas que tiene una concentración de endotoxina inferior a 50 EU/g.

El quitosano neutro, bajo en endotoxinas, puede ser insoluble en agua.

- 40 La sal de quitosano baja en endotoxinas puede ser soluble en agua.

También se describe un quitosano neutro con bajo contenido de endotoxinas, una sal de quitosano o un derivado de quitosano que se puede obtener mediante cualquiera de los procesos descritos en el presente documento.

- 45 También se describe un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano que comprende una concentración de endotoxina inferior a 50 UE/g.

- 50 El quitosano neutro, la sal de quitosano o el derivado de quitosano pueden tener una concentración de endotoxina de menos de 30 UE/g, preferiblemente menos de 20 UE/g, más preferiblemente menos de 15 UE/g, incluso más preferiblemente menos de 10 UE/g, y lo más preferiblemente menos de 5UE/g.

La sal de quitosano baja en endotoxinas de la presente invención es adecuada para su uso como hemostático para detener el flujo sanguíneo.

- 55 Por tanto, también se describe una sal de quitosano baja en endotoxinas como se describe en el presente documento para su uso como hemostático para detener el flujo sanguíneo. La sal de quitosano baja en endotoxinas se puede utilizar como hemostático para hemorragias internas o externas. Para las sales de quitosano utilizadas en cirugía de hemorragia interna, se desea una concentración de endotoxina inferior a 5 UE/g.

- 60 La sal de quitosano baja en endotoxinas de la presente invención se puede incorporar en un apósito para heridas para hemorragias superficiales que no ponen en peligro la vida o hemorragias que ponen en peligro la vida.

- 65 Por tanto, también se describe una sal de quitosano baja en endotoxinas como se describe en el presente documento para su uso en un apósito para heridas para hemorragias superficiales que no ponen en peligro la vida o hemorragias que ponen en peligro la vida.

La sal de quitosano baja en endotoxinas de la presente invención es adecuada para su uso en la preparación de un apósito hemostático para heridas para detener el flujo sanguíneo.

5 También se describe un apósito hemostático para heridas que comprende una sal de quitosano baja en endotoxinas como se describe en el presente documento.

También se proporciona un material hemostático que comprende una sal de quitosano baja en endotoxinas como se describe en el presente documento.

10 El material hemostático y/o la sal de quitosano pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como forma particulada, en polvo, granular, en escamas, fibrosa, en gel, en espuma, en láminas, en película o líquida.

15 También se describe un método para detener el flujo sanguíneo que comprende las etapas de: opcionalmente limpiar un área de la herida cuando sea posible; aplicar a dicha zona de la herida un apósito hemostático para heridas que comprende una sal de quitosano baja en endotoxinas como se describe en el presente documento; y aplicando presión constante en el área de la herida hasta que se forme un coágulo de gel.

Preferiblemente se aplica presión constante al área de la herida durante aproximadamente tres minutos o más.

20 Beneficiosamente, cuanto menor sea la concentración de solución alcalina utilizada en la preparación del material hemostático de la presente invención, mejor se comportará el material en cuanto a penetrabilidad, coagulación sanguínea y hemostasia.

25 A continuación se describirán con mayor detalle realizaciones de la presente invención en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de diferentes concentraciones de subproducto de sal ácida sobre la viscosidad de un producto de quitosano en los diferentes medios.

30 Ensayos con endotoxinas

- 35 1. Se prepara la solución de extracción USP (Farmacopia de Estados Unidos) como se detalla en la USP para la prueba de endotoxinas de quitosano (4,6 ml de HCl 1 M y 45,4 ml de agua libre de endotoxinas);
2. Se extrae añadiendo 0,1 g del producto de quitosano de prueba a 9,9 ml de solución de extracción USP y se deja actuar durante 48 horas a 37 °C;
- 40 3. Después de 48 horas, se diluye 100 µl del extracto en 0,9 ml de agua libre de endotoxinas; y
4. Se mezclan 100 µl de lo anterior en 100 µl de tampón específico de endotoxina (ES) proporcionado por Charles River.

45 El extracto resultante se prueba utilizando un espectrofotómetro de mano Endosafe®-PTS™ que utiliza cartuchos desechables autorizados por la FDA. El proceso de extracción utiliza una dilución de 2000x y un límite mínimo de detección de prueba de 10EU/g.

Ejemplos

50 Ejemplo 1:

Se mezclaron 50 g de quitosano con 50 g de NaOH 0,1 M durante 10 minutos. La partícula de quitosano alcalino húmedo resultante se secó inmediatamente en un secador de lecho fluido a 40°C.

55 Endotoxina inicial de quitosano crudo: 64,8 UE/g
Chitosán alcalino tratado en seco: 16,3 UE/g

Ejemplo 2:

60 Se mezclaron 50 g de quitosano con 50 g de NaOH 0,05 M durante 10 minutos. La partícula de quitosano alcalino húmedo resultante se secó inmediatamente en un secador de lecho fluido a 40°C.

65 Endotoxina inicial de quitosano crudo: 64,8 UE/g
Chitosán alcalino tratado en seco: 20,0 UE/g

Ejemplo 3:

Se mezclaron 50 g de quitosano con 50 g de NaOH 0,01 M durante 10 minutos. La partícula de quitosano alcalino húmedo resultante se secó inmediatamente en un secador de lecho fluido a 40°C.

5 Endotoxina inicial de quitosano crudo: 64,8 UE/g
Chitosán alcalino tratado en seco: <30 UE/g

Ejemplo 4:

10 Se mezclaron 50 g de quitosano con 50 g de NaOH 0,1 M durante 8 horas. La partícula de quitosano alcalino húmedo resultante se secó inmediatamente en un secador de lecho fluido a 40°C.

Endotoxina inicial de quitosano crudo: 64,8 UE/g
Chitosán alcalino tratado en seco: 23,4 UE/g

15 El proceso se puede ampliar y utilizar para producir lotes de mayor tamaño.

El proceso se puede utilizar con quitosano en diferentes formas físicas, como fibra de quitosano o tejido de quitosano.

20 El proceso también puede utilizar una base diferente al hidróxido de sodio, como por ejemplo hidróxido de potasio.

Los ejemplos 1 a 4 se refieren a la producción de quitosano alcalino bajo en endotoxinas. Este quitosano alcalino bajo en endotoxinas se puede utilizar posteriormente como materia prima para fabricar otros productos a base de quitosano. Por ejemplo, el quitosano alcalino se puede neutralizar a pH 7 para formar un quitosano neutro añadiendo un nivel bajo de un ácido apropiado que reaccionaría con la base para formar una sal biocompatible. Por ejemplo, si se utiliza hidróxido de sodio en la solución básica, se puede neutralizar añadiendo ácido clorhídrico. El producto contendría una pequeña cantidad de cloruro de sodio residual.

30 El quitosano alcalino de bajo endotoxina formado en los Ejemplos 1-4 también se puede usar para preparar una sal de quitosano soluble en agua de bajo endotoxina u otros derivados de quitosano. De manera beneficiosa, esto se puede lograr sin la necesidad de un ambiente estéril, sin el uso de grandes cantidades de costosa agua libre de endotoxinas y sin necesidad de enjuague o lavado. Por ejemplo, un quitosano alcalino bajo en endotoxinas puede hacerse reaccionar con un nivel mayor de un ácido apropiado. Una pequeña porción del ácido reaccionará con la base para formar una sal biocompatible.

35 En otro ejemplo, el quitosano alcalino bajo en endotoxinas también se puede utilizar como materia prima para la fabricación de derivados de quitosano bajos en endotoxinas, tales como carboximetilquitosano.

40 Efecto de la sal ácida sobre la viscosidad.

La reacción del quitosano alcalino bajo en endotoxinas con ácido, para producir un quitosano de pH neutro o una sal de quitosano, produce un subproducto de sal ácida. La presencia de este subproducto puede afectar el rendimiento del producto de quitosano. Por ejemplo, el nivel de subproducto puede afectar la viscosidad de un producto de quitosano en solución salina.

50 Con referencia a la figura 1, se muestran los resultados de agregar lactato de sodio a solución salina en diferentes concentraciones y el efecto resultante de ello sobre la viscosidad de una muestra de 2 g del producto de quitosano actualmente disponible en el mercado, CELOX®, en una solución de 20 g de los diferentes medios después de tres minutos.

El medio base era solución salina procedente de fluidos corporales, a la que se añadieron diferentes niveles de lactato de sodio. El lactato de sodio representaba el subproducto de la reacción entre hidróxido de sodio y ácido láctico.

55 Los resultados se exponen en la tabla 1 y la figura 1.

Tabla 1

Concentración	Viscosidad			
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
1,5 %	54000	52000	61000	55667

2,5 %	50000	43000	39000	44000
5,0 %	35000	51000	31000	39000
7,5 %	35000	34000	38000	35667
10,0 %	37000	32000	36000	35000

De la figura 1 se desprende claramente que a medida que aumenta el nivel de sal añadida, la viscosidad del CELOX® en los medios cae. Por lo tanto, es beneficioso que haya sólo un nivel bajo de subproducto salino residual resultante en los productos de quitosano de la presente invención.

5

Efecto de la solución alcalina de baja concentración sobre la viscosidad.

El quitosano alcalino bajo en endotoxinas de la presente invención se puede probar para demostrar el efecto del tratamiento con ácido sobre la viscosidad del polímero de quitosano, considerado como una medida del peso molecular. El ensayo comprende las siguientes etapas del método:

10

- a) pesar 5 g de gránulos de quitosano alcalino bajo en endotoxinas;
- b) pesar 4,95 g de ácido acético en un vaso de precipitados de 600 ml;
- c) añadir 490,05 g de agua desionizada al vaso de precipitados para preparar 495 g de una solución de ácido acético al 1 %;
- d) colocar el vaso en la placa agitadora y encender la agitación (aumentar a medida que aumenta la viscosidad de la solución);
- e) agregar los gránulos de quitosano a la solución de ácido acético;
- f) comprobar la solución periódicamente hasta que todos los gránulos se hayan disuelto y aumentar el nivel de agitación a medida que aumenta la viscosidad de la solución, si es necesario;
- g) dejar la solución durante un total de 24 horas, medidas desde el momento en que se introdujeron los gránulos de quitosano en la solución de ácido acético;
- h) conectar un husillo 64 a un viscosímetro Brookfield;
- i) configurar el husillo a 10 rpm;
- j) insertar el husillo en la solución hasta la marca en el husillo y encender el viscosímetro y dejar que se estabilice;
- k) registrar la viscosidad (cPs) en intervalos de tiempo seleccionados.

15

20

25

30

35

Efecto de reducir la concentración de la solución alcalina.

40

El efecto de usar una concentración más baja de solución alcalina en el proceso de la presente invención se puede probar en tres experimentos, centrándose en (1) el porcentaje de penetrabilidad de la solución salina en una muestra de prueba; (2) el período de tiempo hasta la coagulación de la sangre; y (3) el porcentaje de hemostasia en modelos in vivo de gravedad epigástrica.

45

El método de ensayo general para (1) el porcentaje de penetrabilidad en solución salina es el siguiente: se añaden pequeños ml de agua destilada a un tubo de ensayo. Se añade al agua una gota de colorante alimentario rojo. Se vierten suavemente 3 g de muestra de polvo hemostático sobre el agua de manera que se forme una capa. Después de 1 minuto, se mide la distancia recorrida por el agua hacia el polvo hemostático y se registra como porcentaje de penetración.

50

El método de ensayo general para (2) el período de tiempo hasta la coagulación de la sangre es el siguiente: se añaden 0,75 g de muestra de polvo hemostático a un tubo de ensayo, al que se añaden pequeños ml de sangre de conejo heparinizada. Luego se invierte el tubo de ensayo y se registra el tiempo necesario para coagular completamente la sangre en una masa de gel.

55

El método de ensayo general para (3) el porcentaje de hemostasia en modelos in vivo de corte epigástrico es el siguiente: se realiza un corte de 3 a 5 cm en la arteria epigástrica de un modelo porcino (no heparinizado). Se aplica

el material hemostático en forma granular y se aplica una compresión de 1 minuto. Si se produce un nuevo sangrado, se realiza una compresión adicional de 1 minuto.

5 Por supuesto, debe entenderse que la presente invención no pretende limitarse a los ejemplos anteriores que se describen únicamente a modo de ejemplo.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir un quitosano alcalino bajo en endotoxinas, quitina o un derivado del mismo que tiene una concentración de endotoxina inferior a 50 EU/g, comprendiendo el proceso las etapas de:
- 5
- (a) poner en contacto quitosano, quitina, un derivado de quitosano o un derivado de quitina con una solución alcalina que tiene una concentración de 0,01 M a 0,2 M para formar una mezcla; y
 - (b) dejar la mezcla durante un período inferior a 11 horas; y luego
 - 10 (c) secar la mezcla.
2. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución alcalina comprende un componente alcalino o alcalinotérreo seleccionado entre los siguientes, solos o en combinación: hidróxidos metálicos, carbonatos metálicos, bisulfitos metálicos, persulfatos metálicos, bases conjugadas e hidróxido de amonio, en el que el metal se selecciona opcionalmente entre sodio, potasio, calcio o magnesio y en el que el componente alcalino se selecciona entre hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o carbonato de sodio.
- 15
3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución alcalina se pulveriza sobre el quitosano, quitina, derivado de quitosano o derivado de quitina o el quitosano, quitina, derivado de quitosano o derivado de quitina se mezcla con la solución alcalina; y/o en el que la mezcla comprende además un conservante opcionalmente seleccionado entre iones de plata, iones de zinc, clorhexadina o combinaciones de los mismos.
- 20
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla se deja durante un período inferior a diez horas.
- 25
5. Proceso para producir un quitosano neutro con bajo contenido de endotoxinas, una sal de quitosano o un derivado de quitosano que tiene una concentración de endotoxina inferior a 50 UE/g, que comprende las etapas de:
- 30 a) poner en contacto quitosano, quitina, un derivado de quitosano o un derivado de quitina con una solución alcalina que tiene una concentración de 0,01 M a 0,2 M para formar una mezcla; y
 - b) dejar la mezcla durante un periodo inferior a 11 horas; y
 - 35 (c) secar la mezcla; y luego
 - d) poner en contacto el producto de la etapa (c) con un ácido; y opcionalmente comprende además la etapa de secar el producto de reacción de la etapa (d).
- 40
6. Proceso según la reivindicación 5, en el que el ácido se pulveriza sobre el producto de la etapa (c) o el producto de la etapa (c) se mezcla con el ácido.
7. Proceso según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el ácido se selecciona entre los siguientes, solos o en combinación: ácidos orgánicos opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: ácido acético, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, ácido glucónico y ácido láctico; ácidos carboxílicos; ácidos grasos opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapienico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoelaídico, ácido α -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúxico, ácido docosahexaenoico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico; aminoácidos opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, taurina; ácidos de Lewis; ácidos monopróticos; ácidos dipróticos; ácidos polipróticos; ácidos nucleicos; y ácidos minerales opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico.
- 45
- 50
- 55
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el ácido tiene una concentración de aproximadamente 1 M; y/o en el que el ácido está presente como un licor ácido que comprende el ácido y un no disolvente seleccionado opcionalmente entre lactato de etilo, acetato de etilo, acetato de metilo, etanol, acetona, una mezcla 80:20 de etanol:agua o mezclas de los mismos; y/o en el que el producto de la etapa (c) se mezcla con el ácido durante aproximadamente 5 minutos.
- 60
9. Proceso según la reivindicación 8, en el que la proporción de quitosano a licor ácido es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5.

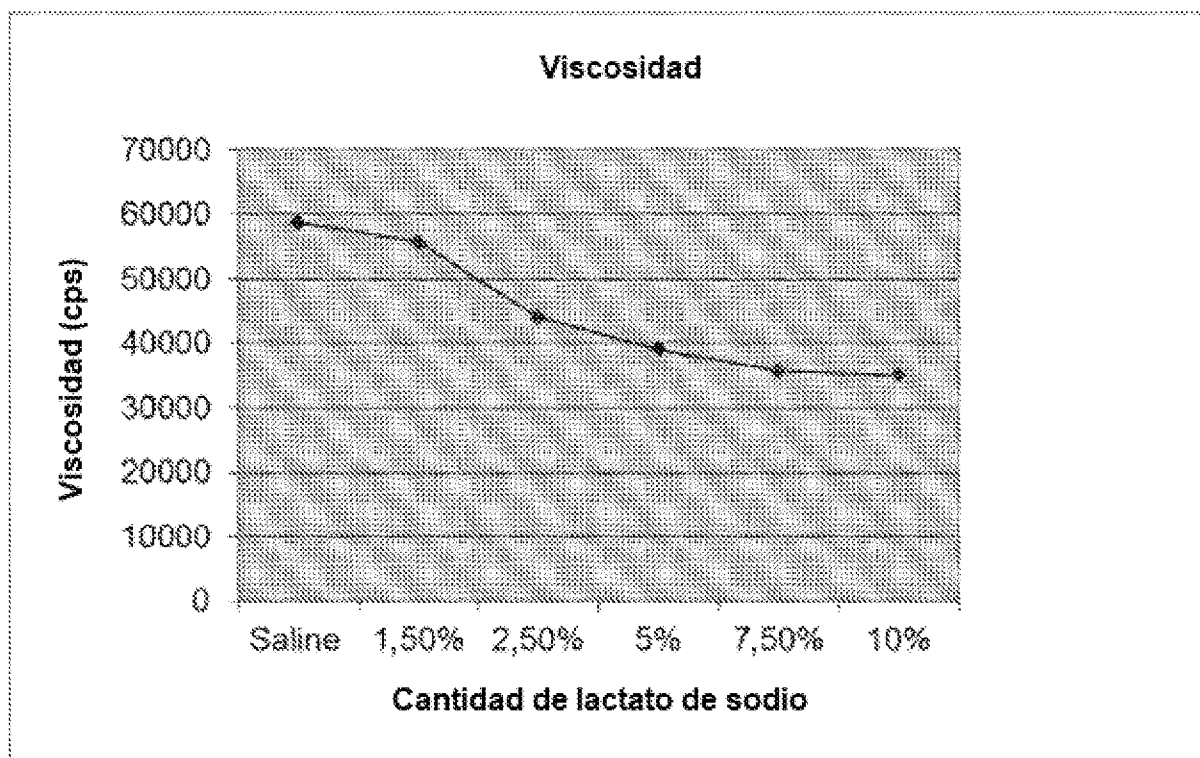


FIGURA 1