



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1938036 B

(45) 授权公告日 2011.05.11

(21) 申请号 200580005708.5

(22) 申请日 2005.02.18

(30) 优先权数据

60/547,166 2004.02.23 US

60/547,257 2004.02.23 US

60/638,865 2004.12.22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.08.23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/005239 2005.02.18

(87) PCT申请的公布数据

W02005/081866 EN 2005.09.09

(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 朱咏华 杨昌正

沃尔夫·M·基尔希

(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 韩克飞

(51) Int. Cl.

A61K 31/722 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

(56) 对比文件

US 20030129730 A, 2003.07.10, 说明书摘要以及说明书第5页左栏79段至89段。

EP 1152013 A, 2001.11.07, 说明书摘要, 说明书第3页9—14行, 第4页1、2段以及实施例6。

蒋挺大. 壳聚糖 第1版. 化学工业出版社, 2001, 103-104, 164.

杨健等. 壳聚糖的止血机理和应用. 国外医学生物医学工程分册 第24卷 第2期. 2001, 第24卷(第2期), 77-80.

审查员 林冠

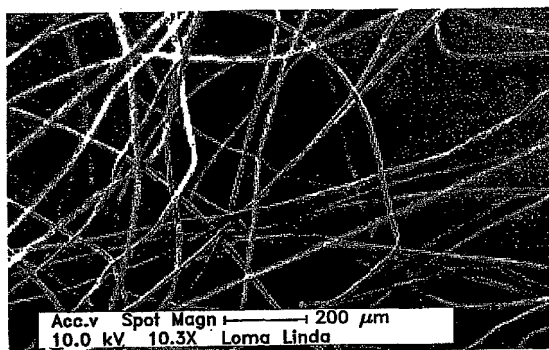
权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 10 页

(54) 发明名称

局部和内部使用的止血剂

(57) 摘要

本发明涉及包括壳聚糖纤维的可展开的止血材料。该止血材料适用于封闭或控制动脉和静脉破口和穿刺的活跃出血以及控制组织渗血。



1. 止血材料,其中所述止血材料是包含壳聚糖纤维和辅助止血剂的无纺布物或纺织物,其中所述壳聚糖具有 800kDa 至 1500kDa 的分子量以及 90%或更高的脱乙酰度,以及其中所述壳聚糖纤维已用弱酸进行了处理,使所述壳聚糖纤维彼此紧固,形成网状结构;

其中所述弱酸选自冰醋酸、乙酸溶液、乳酸、柠檬酸和羟乙酸;

其中所述辅助止血剂选自凝固因子浓缩物、重组因子 VIIa、alphanate FVIII 浓缩物、bioclote FVIII 浓缩物、monoclote-P FVIII 浓缩物、haemate P FVIII、von Willebrand 因子浓缩物、helixate FVIII 浓缩物、hemophil-M FVIII 浓缩物、humate-P FVIII 浓缩物、porcine FVIII 浓缩物、koate HP FVIII 浓缩物、kogenate FVIII 浓缩物、recombinant FVIII 浓缩物、mononine FIX 浓缩物和 fibrogammin P FXIII 浓缩物。

2. 如权利要求 1 所述的止血材料,其中所述弱酸的 pH 值为 3.0 至 4.5。

3. 如权利要求 1 所述的止血材料,其中所述止血材料包括具有粗糙面和平滑面的无纺布物。

4. 如权利要求 1 所述的止血材料,其中所述止血材料包括两面均为粗糙面的无纺布物。

5. 如权利要求 1 所述的止血材料,其中所述止血材料包括多个壳聚糖纤维层。

6. 如权利要求 1 所述的止血材料,其中所述壳聚糖纤维经过乙酸溶液处理。

7. 如权利要求 1 所述的止血材料,其中所述壳聚糖纤维经过冰醋酸处理。

8. 止血材料在制备用于处理伤口的伤口敷料中的用途,其中所述止血材料是包含壳聚糖纤维和辅助止血剂的无纺布物或纺织物,其中所述壳聚糖具有 800kDa 至 1500kDa 的分子量以及 90%或更高的脱乙酰度,以及其中所述壳聚糖纤维已用弱酸进行了处理,使所述壳聚糖纤维彼此紧固,形成网状结构;

其中所述弱酸选自冰醋酸、乙酸溶液、乳酸、柠檬酸和羟乙酸;

其中所述辅助止血剂选自凝固因子浓缩物、重组因子 VIIa、alphanate FVIII 浓缩物、bioclote FVIII 浓缩物、monoclote-P FVIII 浓缩物、haemate P FVIII、von Willebrand 因子浓缩物、helixate FVIII 浓缩物、hemophil-M FVIII 浓缩物、humate-P FVIII 浓缩物、porcine FVIII 浓缩物、koate HP FVIII 浓缩物、kogenate FVIII 浓缩物、recombinant FVIII 浓缩物、mononine FIX 浓缩物和 fibrogammin P FXIII 浓缩物。

9. 如权利要求 8 所述的用途,其中所述伤口选自瘤床、肝脏伤口和脑部伤口。

10. 如权利要求 8 所述的用途,其中所述伤口选自动脉穿刺伤口、静脉穿刺伤口、动脉破口伤口和静脉破口伤口。

11. 如权利要求 8 所述的用途,其中所述壳聚糖纤维经过冰醋酸处理。

局部和内部使用的止血剂

发明领域

[0001] 本发明涉及包括壳聚糖纤维的可展开的止血材料。该止血材料适用于封闭或控制动脉和静脉破口和穿刺的活跃出血以及控制组织渗血。

[0002] 发明背景

[0003] 手术操作和外伤通常有大量血液流失的现象。处理血液流失的常规方法如手动按压、烧灼或缝合比较耗时,且并不总是能有效地控制出血。

[0004] 多年来,已经开发了众多局部止血剂来控制手术过程中和来自外伤伤口处的出血。某些止血剂,如胶原质为基础的粉末、海绵和织物都具有微粒特性。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(微粒型止血剂)为粉末形式,并刺激患者内源的止血级联反应。然而,据报道这种试剂会形成栓塞,并且如果在心肺分流术中使用时会诱导局部炎性反应。如凝血酶的药理学活性试剂可以和微粒载体结合使用,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,因此对活跃出血的伤口的作用很小。

[0005] 发明概述

[0006] 需要一种可生物吸收的止血材料,其具有出众的止血作用,并可制成多种适用于控制各种伤口出血的形式。同时,还需要同时适用于手术应用和野外外伤治疗的止血材料。例如,在血管手术中,出血是个很大的问题。在心脏手术中,由体外分流术诱导的凝血病复杂化的多重血管吻合和套管插入位点可导致出血,且这种出血只能通过局部止血钳来控制。在脊椎手术过程中快速和有效的止血,即对骨、硬膜上和/或硬膜下出血,或不适于进行缝合或烧灼的脊髓的出血进行控制,可以使伤害神经根的可能性最小化,并缩短操作时间。在肝脏手术中,例如在活供体肝移植过程中或恶性肿瘤摘除过程中,有较高的大量出现的风险。有效的止血材料可以显著改善提高这类过程中患者的结果。甚至在那些没有大量出血的情况下,也需要有效的止血材料,例如在如拔牙的牙科操作中,以及处理擦伤、烧伤等等。在神经外科中,渗血的伤口是常见的,并且难以处理。

[0007] 因此,在第一方面提供了止血材料,该材料包括包壳聚糖纤维,其中所述壳聚糖具有约 1100kDa 或更高的分子量以及约 90% 或更高的脱乙酰度。

[0008] 在该第一方面的优选实施方案中,所述止血材料包括蓬松物(puff)或毛绒(fleece)。

[0009] 在该第一方面的优选实施方案中,所述止血材料包括无纺布物或纺织物。

[0010] 在该第一方面的优选实施方案中,所述止血材料包括具有粗糙面和平滑面的无纺布物。

[0011] 在该第一方面的优选实施方案中,所述止血材料包括无纺布物,其中两面是粗糙的。

[0012] 在该第一方面的优选实施方案中,所述止血材料包括多个壳聚糖纤维层。

- [0013] 在该第一方面的优选实施方案中,所述壳聚糖纤维经乙酸溶液处理。
- [0014] 在该第一方面的优选实施方案中,所述壳聚糖纤维经冰醋酸处理。
- [0015] 第二方面提供了制备包括壳聚糖纤维的止血材料的方法,其中所述壳聚糖具有约 1100kDa 或更高的分子量以及约 90%或更高的脱乙酰度,该方法包括提供第一壳聚糖纤维层;对第一壳聚糖纤维层使用弱酸;并且将第二壳聚糖纤维层置于第一壳聚糖纤维层之上,由此得到止血材料。
- [0016] 在该第二方面的优选实施方案中,至少重复一次所述步骤。
- [0017] 在该第二方面的优选实施方案中,所述方法还包括加热止血材料的步骤,由此液体从止血材料中蒸发。
- [0018] 在该第二方面的优选实施方案中,所述方法还包括在第一表面和第二表面之间压缩止血材料;并加热止血材料,由此得到干燥的止血材料。
- [0019] 在该第二方面的优选实施方案中,所述弱酸包括乙酸溶液。
- [0020] 在该第二方面的优选实施方案中,所述弱酸包括冰醋酸。
- [0021] 在该第二方面的优选实施方案中,所述弱酸包括 pH 值约 3.0 至约 4.5 的乙酸溶液。
- [0022] 第三方面提供了处理伤口的的方法,所述方法包括对伤口使用止血材料的步骤,由此控制出血或渗血,所述止血材料包括壳聚糖纤维,其中所述壳聚糖具有约 1100kDa 或更高的分子量以及约 90%或更高的脱乙酰度。
- [0023] 在该第三方面的优选实施方案中,所述止血材料以选自蓬松物、海绵和织物的形式存在。
- [0024] 在该第三方面的优选实施方案中,所述伤口选自瘤床、肝脏伤口和脑部伤口。
- [0025] 在该第三方面的优选实施方案中,所述伤口选自动脉穿刺伤口、静脉穿刺伤口、动脉破口伤口和静脉破口伤口。
- [0026] 在该第三方面的优选实施方案中,所述壳聚糖纤维经冰醋酸处理。
- [0027] 附图简述
- [0028] 图 1 提供壳聚糖毛绒的扫描电子显微照片 (SEM) 图像。
- [0029] 图 2 显示用止血蓬松物封闭股动脉穿刺口。将可膨胀、可吸收、生物相容的壳聚糖蓬松物经皮肤切口放置在所述穿刺伤口上。所述止血蓬松物膨胀,并保持其自身位置抵靠所述动脉血管壁,从而封闭所述穿刺。
- [0030] 图 3 显示用止血毛绒封闭动脉穿刺的设备。
- [0031] 图 4 显示从虾废物中提取壳聚糖的过程示意图
- [0032] 图 5 显示制备壳聚糖纤维的设备的示意图。
- [0033] 图 6 提供包括加料器、松散机、梳理机、输送带和卷切机的壳聚糖毛绒生产装配线示意图。
- [0034] 图 7 提供负载有 15%微孔多糖微球的壳聚糖毛绒的扫描电子显微照片。
- [0035] 图 8 提供负载有 60%微孔多糖微球的壳聚糖毛绒的扫描电子显微照片。
- [0036] 图 9A 和 9B 提供融合或结合在壳聚糖纤维上的微孔多糖微球的扫描电子显微照片。
- [0037] 图 10A、10B 和 10C 提供物理地负载在壳聚糖毛绒上的微孔多糖微球的 SEM 图像。

[0038] 优选实施方案的详细说明

[0039] 以下描述和实施例示例性地对本发明的优选实施方案进行了详细说明。本领域所属技术人员可以理解,本发明范围应包括本发明的众多变体和修改。因此,这些对优选实施方案的说明不应视为对本发明范围的限制。

[0040] 止血

[0041] 止血是指阻止出血,其可以通过正常血管收缩、非正常的阻塞、凝结或手术方式来实现。通过凝结来止血依赖于血浆凝结和溶解纤维蛋白的蛋白、血小板及血管系统的复杂相互作用。止血有三类:初级止血;二级止血和三级止血。

[0042] 初级止血定义为初级血小板栓塞的形成。其涉及血小板、血管壁和 von Willebrand 因子。血管壁受伤后首先发生血管收缩。血管收缩不仅延缓了向血管外的血液流失,并且降低了局部血流量,促进了血小板对暴露的内皮下表面的粘附和凝结过程的活化。初级血小板栓塞的形成包括血小板粘附、血小板活化、然后聚集形成血小板栓塞。

[0043] 在血小板粘附中,血小板粘附到暴露的内皮下膜。在诸如微血管系统的高剪切速率的区域中,这由 von Willebrand 因子(vWf)来介导,其与血小板膜中的糖蛋白 Ib-IX 结合。在诸如动脉的低剪切速率的区域中,纤维蛋白原通过结合到血小板受体介导了血小板对内皮下膜的结合。血小板到血管壁的粘附将其活化,引起血小板变形,从而活化其表面的胶原受体,以释放出 α 和致密颗粒组分。所述活化的血小板还合成并释放血栓烷 A2 和血小板活化因子,它们为强力的血小板聚集激动剂和血管收缩剂。

[0044] 血小板聚集包括活化、募集以及另外的血小板与粘附的血小板的结合。诸如血栓烷 2、PAF、ADP 和血清素的血小板激动剂促进这一过程。通过凝血级联作用产生的另一种血小板激动剂凝血酶加强这种活化。血小板聚集主要由纤维蛋白原介导,该纤维蛋白原结合到相邻血小板上的糖蛋白 IIb/IIIa 上。这种聚集导致初级血小板栓塞的形成,而纤维蛋白的形成则稳定了这种聚集。

[0045] 在二级止血中,通过凝血级联形成了纤维蛋白,该凝血级联涉及循环凝血因子、钙和血小板。所述凝血级联包括三种途径:内源、外源和共同途径。

[0046] 所述外源途径涉及组织因子和因子 VII 复合物,其活化因子 X。所述内源途径涉及高分子量的激肽原、激肽释放酶原和因子 XII、XI、IX 和 VIII。因子 VIII 充当因子 X 的因子 IX 介导的活化的辅助因子(与钙和血小板磷脂)。所述外源途径和内源途径在因子 X 的活化上汇合。所述共同途径包括因子 X 介导的从凝血酶原产生凝血酶(因子 V、钙和血小板磷脂对其有促进作用),以及从纤维蛋白原产生纤维蛋白。

[0047] 引发凝血的主要途径是外源途径(因子 VII 和组织因子),而内源途径使凝血级联放大。通过外源途径借助组织因子的产生/暴露来引发凝血级联。组织因子由内皮细胞、内皮下组织和单核细胞表达,且表达由细胞因子上调。然后组织因子结合到因子 VII,该复合物活化因子 X。其后,在因子 V、钙和血小板磷脂存在下,因子 X 将前凝血酶活化为凝血酶。该途径被称为组织因子途径抑制剂的脂蛋白相关分子迅速抑制。然而,由这一途径产生的少量凝血酶使所述内源途径的因子 XI 活化,其使凝血级联扩大。

[0048] 通过所述外在途径产生的少量凝血酶放大凝血级联。这种凝血酶通过活化因子 XI 和 VIII 将所述内源途径激活。活化的因子 IX 与活化的因子 VIII、钙和磷脂一起被称为 tenase 复合物,其放大因子 X 的活化,产生大量凝血酶。进而,凝血酶切割纤维蛋白原形成

可溶的纤维蛋白单体,随后这些单体自发聚合形成可溶性纤维蛋白聚合物。凝血酶还活化因子 XIII,其与钙一同起交联并稳定所述可溶性纤维蛋白聚合物的作用,形成交联的纤维蛋白。

[0049] 三级止血定义为纤溶酶的形成,该酶是引起纤维蛋白溶解的主要的酶。在凝血级联活化的同时,从内皮细胞释放出组织纤溶酶原活化剂。组织纤溶酶原活化剂与凝血块内的纤溶酶原结合,将其转化为纤溶酶。纤溶酶可分解凝血块内的纤维蛋白原和纤维蛋白,释放出纤维蛋白和纤维蛋白原的降解产物。

[0050] 优选实施方案提供了与止血系统反应来治疗或预防出血的组合物和材料。特别地,该优选实施方案的组合物和材料引起血液的凝结。

[0051] 在以动脉或静脉出血为特征的损伤治疗中,以及控制出血有困难的手术过程中,例如大表面积、重度静脉或动脉出血、渗血伤口及器官破裂 / 切除,特别需要将止血剂有效地输送到伤口处。优选实施方案的组合物和材料在将止血剂输送到伤口方面拥有诸多优点,包括但不限于容易应用和移除、生物吸收的可能性、缝合性、抗原性和组织反应活性。

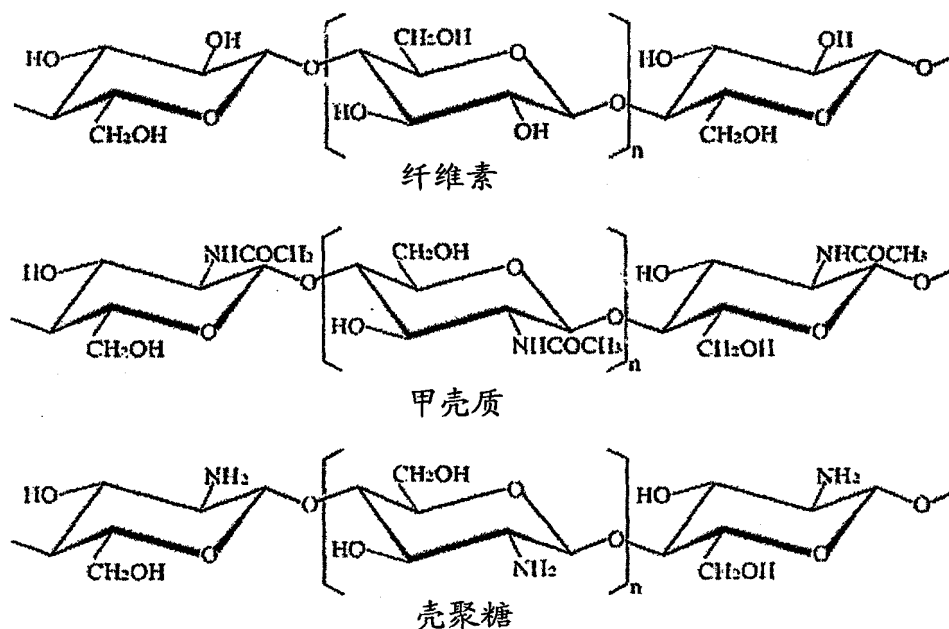
[0052] 根据伤口的特性和所采用的治疗方法,优选实施方案的装置可以使用不同的形式。例如,优选蓬松物、毛绒或海绵形式来控制动脉或静脉的活跃出血,或控制腹腔镜操作过程中的内出血。在经常遇到渗血性脑部伤口的神经外科手术中,优选片状形式的止血材料。同样地,在肿瘤手术中,特别是肝脏手术中,优选采用片状形式或海绵形式的止血材料,将其放置在瘤床内或瘤床上来控制渗血。在皮肤病应用中,优选片状形式。在血管闭合穿刺时,通常优选蓬松物形式。在某些应用中优选诸如微缝合或大缝合的缝合线形式。虽然所述不同形式在递送和操作特性上各有不同,这些装置可以有效地将止血剂施加在作用位点,并通过血小板粘附、血小板活化和血液凝结迅速引发止血栓塞的形成。

[0053] 在优选实施方案中,使用包括壳聚糖纤维的止血剂。诸如可生物吸收的微孔多糖微球的辅助止血剂可沉积在壳聚糖纤维上。然而,可以使用任何其他适合的辅助止血剂。

[0054] 止血基质

[0055] 任何适合的止血基质都可用作优选实施方案的止血剂的支持物。然而,在特别优选的实施方案中,所述止血基质包括壳聚糖。壳聚糖得自甲壳质,而甲壳质为主要得自虾壳和蟹壳废弃物的生物聚合物。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 上的羟基的替代,甲壳质的每个 D- 葡萄糖单元的 C-2 上为乙酰化的氨基 ($-NHCOCH_3$),而在壳聚糖的每个 D- 葡萄糖单元的 C-2 上为氨基。

[0056]



[0057] 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更好的溶解性,因此在医疗和制药领域中应用更为广泛。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。壳聚糖还在手术治疗和伤口保护中用作止血剂。美国专利第 4,394,373 号公开了壳聚糖的止血作用。

[0058] 可采用单一的止血基质或止血基质的组合。优选不同的基质形式,例如蓬松物、毛绒、织物、片、海绵、缝合线或粉末。在本说明书中,术语“毛绒”根据其通常的意思被用作广义的术语并且包括任何处理为柔软的、有延展性的或类似的纤维材料。提供的毛绒不限于无纺或纺织织物形式或蓬松物、球或片的形式。可以理解,使用任何合适的方法处理或涂布纤维毛绒以加强其亲水性和/或其止血性质。术语“蓬松物”根据其通常的意思被用作广义的术语并且包括任何设置为软球或衬垫的纤维材料。可以使用毛绒构成蓬松物。术语“海绵”根据其通常的意思被用作广义的术语并且包括配置为吸收诸如血液的液体的材料。可以单独使用但不限于毛绒、蓬松物、纤维、织物等或与另一材料组合使用构成海绵。可采用不同基质形成材料的均匀混合物,或者可从两种或更多种不同组成的基质制备复合基质。优选的复合物包括壳聚糖和胶原。

[0059] 用于制备壳聚糖毛绒的甲壳质的特别优选的来源是蟹壳。从蟹壳制备的甲壳质通常显示比从虾壳制备的甲壳质更高的分子量。蟹壳甲壳质通常还显示比虾壳甲壳质更高的脱乙酰度。蟹壳甲壳质通常显示约 600,000 至 130 万道尔顿的平均分子量。脱乙酰度通常高于 90%,其可以促成观察到更高的分子量。

[0060] 用于制备壳聚糖纤维的优选壳聚糖具有高于约 600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400 或 1500kDa 或更高的分子量;更优选从约 600、650、700、750、800、925、850、875、900、925、950、975、1000、1025、1050 或 1075kDa 至约 1500kDa;最优选从约 1100、1125、1150、1175、1200、1225、1250 或 1275kDa 至约 1300、1325、1350、1375、1400、1425、1450 或 1475kDa。壳聚糖优选具有约 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 或更高的脱乙酰度,更优选从约 90.0、90.5、91.0、91.5 或 92.0% 至约 92.5、93.0、93.5、94.0、

94.5 或 95.0%。

[0061] 虽然通常优选采用壳聚糖作为基质,但也可应用其它适合的基质。这些基质优选为可制成所需形式(例如,纤维、海绵、基体、粉末、片、缝合线和/或蓬松物)的可生物吸收的亲水性材料。

[0062] 其它适合的基质包括合成的乙交酯和丙交酯的可吸收的共聚物。这种共聚物以 VICRYL™(Johnson&Johnson in Somerset, NJ 的 Ethicon 分公司生产的 Polyglactin 910)的商品名销售。其通过酶水解降解而被吸收。

[0063] 明胶海绵是用于静脉或渗血性出血的手术过程中的可吸收的止血海绵。该海绵粘附在出血位点,并可以吸收约 45 倍于其本身重量的流体。由于该明胶海绵的均匀的多孔性,血小板被捕获在其孔中,激活了凝血级联。可溶性纤维蛋白原转化为不溶性纤维蛋白的网络,其使出血停止。当植入组织内时,该明胶海绵在 3-5 周内被吸收。

[0064] 聚乙醇酸也是适合用作基质的合成可吸收聚合物。由于其较强的水解敏感性,聚乙醇酸在植入后几个月内被吸收。

[0065] 聚交酯由乳酸的环二酯(丙交酯)通过开环聚合反应制备。乳酸以两种光学异构体或对映异构体的形式存在。天然存在的是 L- 对应异构体,而 D, L 消旋混合物来自乳酸的合成制备过程。拉伸时,由衍生自 L- 对映异构体的聚合物纺成的纤维具有较高的结晶度,而衍生自消旋混合物的纤维是无定形的。结晶性的聚-L- 丙交酯与无定形的 DL 形式相比,通常更耐水解降解,可用柠檬酸三乙酯增塑化而增加,然而所得产物的结晶性较低而柔韧性较高。与其它可生物吸收的材料相比,聚-L- 丙交酯被肌体吸收所需的时间相对较长。可以制备高分子量的聚-L- 丙交酯聚合物并得到具有高抗拉强度的纤维。

[0066] 聚(丙交酯-共-乙交酯)聚合物也是适合的基质。包含约 25 到约 70 摩尔百分比的乙交酯的共聚物通常是无定形的。纯聚乙交酯约为 50% 结晶性,而纯聚-L- 丙交酯约为 37% 结晶性。

[0067] 可将聚二噁烷酮制成纤维来形成合适的基质。由 ε- 己内酯合成的聚己酸内酯是半结晶性聚合物,其体内吸收非常缓慢。由 25% ε- 己内酯和 75% L- 丙交酯制备的 ε- 己内酯和 L- 丙交酯共聚物是弹性的,而由 10% ε- 己内酯和 90% L- 丙交酯制备的是刚性的。聚-β- 羟丁酸酯是天然存在的可生物降解的聚合物,并易于在体外合成,并可熔化加工。与纯的聚-β- 羟丁酸酯相比,羟丁酸酯和羟戊酸酯的共聚物表现出更快的降解。

[0068] 含羧乙酯链的可吸收的合成聚酯是合适的基质。也可使用用二噁烷酮替代乙交酯制备的类似共聚物,聚氨基酸也可使用。

[0069] 肠线、硅化处理的肠线及含铬的肠线在某些实施方案中适合用作为基质。然而,由于合成材料通常具有可预测的性能及较低的炎性反应,因此与天然材料相比,更为优选。

[0070] 止血剂

[0071] 在某些实施方案中,需要向优选实施方案的壳聚糖纤维止血剂中加入辅助的止血剂。可将任何适合的止血剂沉积在优选实施方案的基质上。然而,在特别优选的实施方案中,所述止血剂包含生物可吸收的微孔多糖微球(例如由 Waukesha, WI 的 Emergency Medical Products, Inc. 销售的 TRAUMADEX™)。所述微球具有微重复多孔通道。该微球的孔大小能使水吸收和血液中的白蛋白、凝血因子和其它蛋白和细胞组分的超浓缩。该微球还影响了血小板的功能,并促进纤维蛋白的形成。此外,该微球似乎加速了凝血作用的酶反

应速率。当通过直接、加压应用到活跃出血伤口时,颗粒充当分子筛来从血液中提取液体。该颗粒控制的多孔性可排除血小板、血红细胞和大于 25,000 道尔顿的血清蛋白,随后这些物质在所述颗粒的表面浓缩。这种分子排阻特性在颗粒表面产生了高浓度的血小板、凝血酶、纤维蛋白原和其它蛋白,产生了成凝胶作用。所述凝胶化的聚集的细胞和组分加速了正常的凝固级联反应。该密集的蛋白-细胞基质内产生的纤维蛋白网络紧密地粘连到周围的组织。所述成凝胶过程在几秒内开始,而所得凝块异常坚韧,通常与所述微粒一起破碎。

[0072] 优选实施方案中可采用的其它适合的止血剂包括但不限于凝固因子浓缩物、重组因子 VIIa(NOVASEVEN®);alphanate FVIII 浓缩物;bioclote FVIII 浓缩物;monoclote-P FVIII 浓缩物;haemate P FVIII;vonWillebrand 因子浓缩物;helixate FVIII 浓缩物;hemophil-M FVIII 浓缩物;humate-P FVIII 浓缩物;hyate-C® Porcine FVIII 浓缩物;koate HPFVIII 浓缩物;kogenate FVIII 浓缩物;recombine FVIII 浓缩物;mononine FIX 浓缩物和 fibrogammin P FXIII 浓缩物。这类止血剂可以任何适合的形式(粉末、液体、纯化形式、位于适合赋形剂中、位于适合支持物上等等)应用到所述基质。

[0073] 可采用单一的止血剂或止血剂的组合。根据基质和止血剂的性质、基质的形式和待处理的伤口的性质,所述基质上止血剂的优选承载水平可以不同。然而,通常希望相对基质最大化止血剂的量。例如,在止血蓬松物的情况下,虽然对某些实施方案可能优选采用更高或更低的比例,通常优选止血剂与基质的重量比为从约 0.001 : 1 或更低,0.01 : 1、0.05 : 1、0.1 : 1、0.2 : 1、0.3 : 1、0.4 : 1、0.5 : 1、0.6 : 1、0.7 : 1、0.8 : 1、或 0.9 : 1 至约 1 : 1、1.1 : 1、1.2 : 1、1.3 : 1、1.4 : 1、1.5 : 1、1.6 : 1、1.7 : 1、1.8 : 1、1.9 : 1、2 : 1 或更高。

[0074] 包含壳聚糖支持物的止血材料

[0075] 通常优选在止血支持物上(例如壳聚糖纤维)沉积辅助止血剂(例如微孔多糖微球)以生产用于出血或渗血伤口的止血材料。然而,在某些实施方案中,可以将壳聚糖纤维作为有效的止血材料使用而不添加另一止血剂。例如,如下所述但没有加入微孔多糖微球的壳聚糖蓬松物用于出血或渗血伤口时为特别有效的止血材料。在某些实施方案中,此处描述的各种壳聚糖形式(织物、海绵、缝合线、纤维等)当不使用辅助剂时也是有效的止血材料。止血支持物的优选形式依赖于其应用。

[0076] 止血蓬松物

[0077] 止血蓬松物或毛绒是特别优选的形式,其中所述基质包括纤维、棉花样材料的蓬松物,其可处理为适合的形状或大小以适应具体的伤口结构。图 1 提供壳聚糖毛绒的扫描电子显微照片图像。在优选的实施方案中,以如下方式由壳聚糖纤维制备蓬松物。将根据常规方法制备的壳聚糖纤维撕或切(手动或用机械装置)成片,将所述片平整并层叠在一起。将乙酸溶液、冰醋酸或其它酸性溶液(pH 值优选 3.0 至 4.5)喷在第一层上使壳聚糖纤维彼此紧固,借此形成网状结构。用冰醋酸喷洒壳聚糖毛绒或纤维形成水溶性壳聚糖铵盐。铵盐形式的壳聚糖与未处理的壳聚糖毛绒或纤维相比,对潮湿组织具有增强的生物粘附性和增强的止血效果。喷洒在壳聚糖毛绒或纤维上的希望浓度的乙酸可以作为“胶水”将纤维粘附在一起,将微孔多糖微球粘附在纤维上,或者更好地将壳聚糖毛绒粘附在诸如血液或体液的潮湿组织上。

[0078] 任选地,如微孔多糖微球的粉末形式的辅助剂,可以喷雾在第一壳聚糖纤维层上,

然后将另一壳聚糖纤维层置于其上。随后重复所述沉积过程（酸溶液之后沉积微孔多糖微球），建立所需水平的层。可将适量的粉末形式剂加入到纤维层以产生包含直到约 50、60、70、80 或 90% 重量比或更高的辅助剂的蓬松物。如果辅助剂以粉末形式加入，最适负载水平依赖于采用的辅助剂的应用和类型。通常优选不向上层加入辅助剂或其他粉末物质，但是在某些实施方案中希望添加。通过选择总层数可得到纤维的优选厚度。

[0079] 在烘箱中真空干燥所得止血材料生产止血蓬松物。虽然通常优选使用冰醋酸或乙酸溶液，但同样也可使用具有类似 pH 值或类似性质的其它酸溶液。例如，适于使用的可为乳酸、柠檬酸、羟乙酸和弱酸的混合物。同样，也可使用任何生物相容的壳聚糖溶剂液体，例如纯水、乙醇溶液等。这样的溶液可以是酸性的、碱性的或中性的。在某些实施方案中，优选使用非酸性的溶液。在这类实施方案中，可采用在壳聚糖纤维间提供粘合的适合形式的另一材料，例如明胶、淀粉、角叉菜胶、古尔胶、胶原、果胶等等。虽然壳聚糖是制备止血蓬松物的优选基质，其它纤维基质，特别是纤维多糖基质也适合使用。

[0080] 通过调节壳聚糖纤维的水分水平，可优化纤维间的粘附性和任选辅助剂负载容量。纤维中该液体辅助所述纤维将相互并粘附到相容的辅助剂。还可通过采用较薄的纤维增加负载容量。所述纤维可具有均一的厚度，也可具有多种厚度。更薄的纤维可更牢固地粘附到动脉、静脉或其它伤口。

[0081] 在制备包含负载了微孔多糖微球的壳聚糖纤维的止血蓬松物时，通常优选所得蓬松物含有从约 0.1% 至约 95% 重量比的微孔多糖微球，更优选从约 1 至约 60、65、70、75、80、85、90 或 95% 重量比的微孔多糖微球，最优选从约 5、10、15、20 或 25% 重量比至约 30、35、40、45、50 或 55% 重量比的微孔多糖微球。然而，在某些实施方案中，可优选更高或更低水平的微孔多糖微球。如果使用不同的止血剂，或需 将其它组分加入所述壳聚糖纤维或其它纤维基质中时，可优选不同的负载水平。

[0082] 为了制备具有改善伸延性的止血壳聚糖蓬松物，可将聚乙烯醇（PVA）加入酸性溶液中。含有 2% 重量比 PVA 的乙酸溶液产生弹性加强的止血蓬松物，但是蓬松物亲水性减弱。通常优选高亲水性以确保止血蓬松物牢固地粘附伤口。然而，在某些实施方案中，也可相对少量地降低亲水性，这并不严重影响蓬松物粘附伤口的能力。

[0083] 止血织物

[0084] 借助以下修改，可根据上述用于制备止血蓬松物的方法由壳聚糖纤维和微孔多糖微球制备止血织物。将任选负载有辅助剂的一层或更多层壳聚糖纤维压平并真空干燥。通常优选使用 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 层或更多层的壳聚糖纤维制备织物。通常优选所述织物的一侧具有平滑的表面，而织物的另一侧具有粗糙表面（例如，对于壳聚糖，在加热期间向纤维层表面上施用 TEFLON™ 表面得到平滑表面，而向纤维层表面应用隔离纸得到粗糙表面）。然而，在某些实施方案中，优选具有两侧粗糙侧的织物，例如，用于连接不规则伤口，或者诸如致命的腹股沟损伤的较深的伤口。在优选的实施方案中，将所述粗糙表面暴露于伤口，以使壳聚糖纤维与伤口的接触最大化，以对伤口产生改进的止血效果和对伤口更好的粘附。在制备包含负载有微孔多糖微球的壳聚糖织物的止血织物时，通常优选所得织物含有从约 0.01 至约 75% 重量比微孔多糖微球，更优选从约 1 至 60% 重量比微孔多糖微球，最优选从约 5、10、15、20 或 25% 重量比至约 30、35、40、45、50 或 55% 重量比微孔多糖微球。然而，在某些实施方案中，可优选更高或更低水平的微孔多糖微球，或甚至根本没有微球。如

果使用不同的止血剂,或将其它组分加入所述壳聚糖纤维或其它基质中,可优选不同的负载水平。

[0085] 所述止血织物可以预定尺寸的片形式提供。任选地,可对大片的止血织物进行切割、修剪或折叠,以提供适合所述伤口的尺寸和形状。虽然所述止血织物是生物可吸收的,但是在皮肤或局部应用中,优选在获得满意的止血程度后将其从所述伤口移除,或将其留在原位直到伤口痊愈。止血织物可用作人造皮肤,和/或提供抗菌性质。当将所述止血剂用于体内应用时,优选将其留在原位,由身体随时间吸收。这类止血织物特别适合应用于处理诸如癌床中或脑组织的渗血性伤口。

[0086] 止血海绵

[0087] 可根据本领域公知的方法由生物相容或可生物吸收的聚合材料如壳聚糖制备多孔海绵来制备止血海绵。这类方法通常涉及制备聚合材料、交联剂和发泡剂的溶液。所述海绵可在所述制备过程中的任何适当时刻或多个时刻负载止血剂,例如在所述海绵的形成过程中,或在海绵制备后。

[0088] 止血缝合线

[0089] 可将优选实施方案的止血基质制成缝合线。在优选实施方案中,将壳聚糖纤维制成微缝合线。用于缝合线制作的方法包括挤出、熔化纺制、编织及许多其它类似方法。缝合线原材料的合成可通过纺织工业中的许多方法来实现。缝合线尺寸以代表其直径的数字表示,所述直径以降序排列为从 10 至 1,随后是 1-0 至 12-0,其中 10 为最大而 12-0 为最小。缝合线可包括单丝或许多丝捻合在一起、纺在一起或编织在一起。优选实施方案的缝合线表现出令人满意的特性,包括压迫-牵拉关系、拉伸强度、保持率、柔韧性、固有粘度、可湿性、表面形态、降解性、热性质、结的接触角以及弹性。止血缝合线可用于任何适合的应用。然而,通常不优选用于血管吻合,因为它的止血性质会造成血管中不希望的血栓的形成。

[0090] 止血粉

[0091] 优选实施方案的止血基质可成形为粉末,并以此形式直接应用于伤口。例如,任选与其它材料组合的壳聚糖颗粒可用作拔牙后的孔隙填充物。

[0092] 止血基体

[0093] 可由烧结的如壳聚糖颗粒的聚合物颗粒制备三维多孔基体,且药物或治疗剂渗入所述孔中。可选择地,可将包括包裹有药物或治疗剂壳聚糖壳的微囊烧结形成基体。

[0094] 伤口敷料

[0095] 虽然通常优选将止血材料(例如上述制备的止血织物、海绵、蓬松物或粉末)直接应用到伤口,并且虽然止血材料对许多类型的伤口具有令人满意的粘附性,然而在某些实施方案中,优选将所述止血材料结合入包括其它组分的伤口敷料中。

[0096] 为了确保所述止血材料保持粘附于伤口,可例如沿着所述止血织物、海绵或蓬松物的一侧的边缘使用适合的粘合剂。虽然可使用任何适用于与皮肤形成结合的粘合剂,通常优选使用压敏粘合剂。压敏粘合剂通常定义为当施加轻压时能粘附到基质,但去除后不留下残余物的粘合剂。压敏粘合剂包括但不限于含溶剂的溶液粘合剂、热熔粘合剂、水性乳液粘合剂、可压延的粘合剂以及可辐射熟化的粘合剂。由于溶液粘合剂易于应用以及其多功能性,多数应用都优选溶液粘合剂。热熔粘合剂通常基于树脂-增粘的嵌段共聚物。水性乳液粘合剂包括那些由丙烯酸共聚物、丁二烯苯乙烯共聚物和天然橡胶乳胶制备的粘合

剂。可辐射熟化的粘合剂通常由丙烯酸低聚物和单体构成,其通过暴露于紫外光熟化后形成压敏粘合剂。

[0097] 压敏粘合剂中最常用的弹性体包括天然橡胶、苯乙烯-丁二烯乳胶、聚异丁烯、丁基橡胶、丙烯酸树脂和硅酮。在优选实施方案中,使用以丙烯酸聚合物或硅树脂为基础的压敏粘合剂。丙烯酸聚合物通常具有低水平的致过敏性,可从皮肤干净地清除,具有较低的气味,并且表现出较低等级的机械和化学刺激。医疗级的硅酮压敏粘合剂因其生物相容性而优选。

[0098] 影响在优选实施方案的伤口敷料中应用的压敏粘合剂适用性的因素,包括不含皮肤刺激性组分、足够的粘着强度以使所述粘合剂可干净地从皮肤移除、能适应皮肤的运动而无过度的机械性皮肤刺激以及对体液的良好耐受性。

[0099] 在优选的实施方案中,所述压敏粘合剂包含丙烯酸丁酯。虽然,通常对许多应用优选丙烯酸丁酯压敏粘合剂,但是可使用任何适用于结合皮肤的压敏粘合剂。这类压敏粘合剂是本领域公知的。

[0100] 如上所述,优选实施方案的止血材料通常对伤口显示出良好的粘附性,因而通常不必使用例如压敏粘合剂的粘合剂。然而,为了便于使用以及确保应用于伤口后所述止血材料保持在固定的位置,优选使用压敏粘合剂。

[0101] 虽然优选实施方案的止血织物和其它止血材料通常显示出良好的机械强度和伤口保护性,但是在某些实施方案中,优选在所述止血材料的一侧使用支持材料或其它材料。例如,可制备包括两层或更多层的组合物,其中这些层中之一为止血材料,而另一层例如为弹性体层、薄纱、蒸汽透过性膜、防水膜、纺织或无纺布、网等等。然后所述层可用任何适合的方法结合,例如诸如压敏粘合剂、热熔粘合剂、可熟化粘合剂的粘合剂,在例如迭片结构中加热或加压,通过使用缝合、纽扣或其它紧固装置进行物理附着等等。

[0102] 壳聚糖纤维与伤口之间的相互作用

[0103] 当将优选实施方案的壳聚糖纤维置于出血或渗血伤口时,其具有止血效果。检测了壳聚糖纤维的物理和化学性质以决定其止血作用的机理并最大化其止血效果。当不希望被任何特别的理论束缚,虽然壳聚糖止血功能至今还没有被彻底阐明,但是人们认为在止血中钙含量起重要作用。钙可以刺激血小板释放 b-TG、PF-4 因子或止血过程中涉及的其它物质。

[0104] 测得 0.2g 壳聚糖样品中(通过脱乙酰作用制备,纯度 91.8% 重量比,1000kD 分子量)钙含量为 0.238% 重量比。通过电感耦合等离子体(ICP)光谱分析仪以及 Jarrell-Ash-1100 ICP- 俄歇电子光谱仪(AES),在 1.6-105Pa 的压力下,氩气气氛中测定钙含量。样品制备包括,第一步将壳聚糖纤维溶于浓硝酸。溶液保持 2 小时,然后煮沸将溶液中全部水分蒸发。剩余残余物溶于 100ml 1M 硝酸中,然后测定钙含量。

[0105] 文献提示壳聚糖的止血作用可能不遵循上述的凝血级联途径,由于壳聚糖仍可引起去除了所有的血小板、白细胞和血浆的血液的凝聚。壳聚糖的止血作用最可能源于其引起红细胞彼此凝结从而形成血块的能力。当壳聚糖纤维与血液接触时,血液渗入壳聚糖纤维形成的网络中。壳聚糖是亲水性的,并且可润湿形成水凝胶。多孔水凝胶能吸附血细胞或为血细胞提供足够的空间以扩散进入其中。这些因素通过红细胞凝结并形成血栓诱导止血。另一种假说是壳聚糖作为天然带正电的多糖,可与血蛋白表面的负电荷相互作用,

以引起血红细胞彼此凝结。

[0106] 壳聚糖是亲水性的和生物可降解的,并具有生物相容性止血性质。它与其他诸如微孔多糖微球材料容易并有效地组合,并在纤维中具有强物理吸附能力和粘附性。壳聚糖还能与微孔多糖微球牢固地链接,这可能是由于它们均基于葡萄糖单元的骨架化学结构的相似性。壳聚糖对细胞具有强亲和力,借此成为有效的止血材料。

[0107] 测定了包含壳聚糖纤维的蓬松物中微孔多糖微球的负载效率。在保持蓬松物的柔韧性时,可实现多至 90% 的负载效率。当负载效率高于 90% 时,导致蓬松物变硬,但在某些实施方案中是可接受的。

[0108] 当壳聚糖纤维负载或结合有其它诸如微孔多糖微球的多糖材料时,可能涉及多种粘附或成键机制。在一种机制中,在纤维之间、在微孔多糖微球之间、或在微孔多糖微球和壳聚糖纤维之间,静电力维持接触。在另一机理中,物理力使颗粒保持在适当的位置,壳聚糖纤维形成支持微孔多糖微球的网格或基质。在另一机制中,加入壳聚糖纤维和微孔多糖微球的酸性溶液使组分溶解并键合在一起。

[0109] 虽然通过上述三种方法中的任一种(静电力、物理或化学)壳聚糖纤维能相互(或与微孔多糖微球)键合或粘附,通常优选使用两种或更多机制的组合,以产生毛绒的最适负载,例如静电的和物理的、静电的和化学的、物理的和化学的、或静电的和物理的和化学的。

[0110] 检测了微孔多糖微球和壳聚糖与水接触后的膨胀。据观测,纯微孔多糖微球吸收水,并膨胀产生对抗周围结构的压力。然而,与水接触时,沉积在壳聚糖纤维蓬松物上的微孔多糖微球在临床上未观测到明显的膨胀。所述检测按如下进行:将 19g TRAUMADDEX™ 微孔多糖微球置于直径为 1.55cm 的装置中,以检测膨胀。向所述 TRAUMADDEX™ 中加水,导致水吸附。向所述装置顶部加重量以防止 TRAUMADDEX™ 膨胀。添加的重量对应接触水后 TRAUMADDEX™ 产生的压力。在该试验中,TRAUMADDEX™ 与水接触前应用的重量与 TRAUMADDEX™ 接触水后应用的重量之差值为 270g。因此,TRAUMADDEX™ 接触水后产生的压力为 107mmHg。采用相同的方法来检测沉积到壳聚糖蓬松物上的 TRAUMADDEX™ 的膨胀,但所观测到的体积变化太小而无法检测。相信,所述多孔壳聚糖蓬松物为所述膨胀的 TRAUMADDEX™ 提供了足够的空间,从而与水接触后,无法检测到沉积到壳聚糖蓬松物上的 TRAUMADDEX™ 的明显体积变化。

[0111] 股动脉穿刺伤口的封闭

[0112] 开发了止血蓬松物,用于与 2003 年 6 月 16 日提交的标题为“血管伤口封闭装置和方法”的同时待审的美国专利申请第 10/463,754 号中所描述的股动脉穿刺伤口封闭装置结合使用,本发明将该申请内容全文引入作为参考。图 2 表示用止血蓬松物封闭股动脉穿刺口。如图 3 所示,止血蓬松物包裹在伤口封闭装置的血液指示导管周围,以便被有效和有作用地输送至所述穿刺伤口的上部。图 3 描述的血管伤口封闭装置 300 包括具有在它们之间定义管腔的近端和远端的导管 310,可用于将止血蓬松物 270 放置于穿刺伤口之上。偶合部件 320 可移动地围绕导管 310 设置并被配置与停止部件 316 机械地偶联。所述装置具有手柄 340 和手柄 362 以及输送管 350。在特别优选的实施方案中,止血蓬松物任选地与粘附性的或对伤口提供加强的粘附性的其它物质一同通过伤口封闭装置被输送至伤口。

[0113] 在静脉破口中,修复所述破口的常规方法包括暂时阻止出血,闭塞该静脉、抽出血液,随后缝合或夹住所述破口以进行修复。在常规方法中还需要血管贴片。优选实施方案

的止血织物只需将织物按压在破口处,使其保持原位,并最终被身体吸收,即可用于治疗静脉或动脉破口。

[0114] 使用内窥镜装置伤口的封闭

[0115] 优选实施方案的壳聚糖毛绒特别适合用于与内窥镜或内腔装置、特别是与胃肠应用的内窥镜装置一起使用,以控制出血。壳聚糖毛绒可以被制成小的蓬松物,其可插入内窥镜腔以置于伤口之上或处理出血。例如,直径 2mm 的壳聚糖毛绒蓬松物,或适合装置腔内径的另一尺寸的蓬松物可通过内窥镜插入并用于控制胃肠或其它出血,例如溃疡、肿瘤或损伤出血,或诸如摘除肿瘤手术过程中的出血。

[0116] 壳聚糖的制备

[0117] 甲壳质以与蛋白和钙盐的组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。美国专利第 3,533,940 号描述了制备壳聚糖的方法,本发明将其全文引入作为参考。

[0118] 用于从蟹或其它甲壳类动物的壳中获得壳聚糖的优选方法如下。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 小时来从其中提取蛋白(脱蛋白)。所述脱矿物质和脱蛋白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(50%重量比)在 140℃ 加热至少 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,可获得分子链无明显降解的高度脱乙酰化的壳聚糖。

[0119] 图 4 所示为从虾废物中提取壳聚糖的过程示意图。

[0120] 壳聚糖纤维的制备

[0121] 在优选实施方案中,采用湿纺方法来制备壳聚糖纤维。首先,将壳聚糖溶解在适合的溶剂中得到第一纺丝溶液。优选的溶剂包括酸性溶液,例如含有三氯乙酸、乙酸、乳酸等等的溶液。然而可采用任何适合的溶剂。对所述第一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入固化池中。从该固化池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。图 5 所示为制备壳聚糖纤维的设备的示意图。装置包括溶解罐 1、过滤器 2、中间罐 3、贮罐 4、计量泵 5、过滤器 6、纺丝喷嘴 7、固化池 8、传感辊 9、牵拉池 10、牵拉辊 11、洗涤池 12,以及卷曲辊 13。

[0122] 制备适用于制成优选实施方案的止血材料的壳聚糖纤维的优选方法如下。通过在混合溶剂温度为 5℃ 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第一壳聚糖纺丝溶液。将所得第一壳聚糖纺丝溶液过滤,并随后在真空下脱气。使用包含 14℃ 的丙酮的第一固化池。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。通过用再循环热水加热,使所述纺丝溶液维持在 20℃。从丙酮池中回收壳聚糖纤维,并通过传送带传送到包含 15℃ 的甲醇的第二固化池中。将纤维在第二固化浴中保持 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。

[0123] 在特别优选实施方案中,实施方案中使用冰醋酸或无水醋酸作为试剂将壳聚糖纤

维相互粘附,其中壳聚糖纤维单独或与添加的药剂、治疗剂或其它剂一起用于形成止血剂。除在壳聚糖纤维之间提供好的粘附性外,用冰醋酸处理过的纤维对包括动脉或静脉伤口等的伤口还具有优良的粘附性。

[0124] 根据应用,可调节溶液中乙酸浓度以提供期望的粘附程度。例如,如果采用壳聚糖纤维处理较深的伤口或其它不需要强粘附性的伤口,或者止血剂要从伤口移除的应用中,最好采用较低浓度的乙酸。在这样的实施方案中,通常使用浓度从约 1% 体积比或更低至约 20% 体积比,更优选使用浓度从约 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10% 体积比至约 11、12、13、14、15、16、17、18 或 19% 体积比。当需要纤维之间强粘附性,或对伤口强粘附性时,优选浓度大于或等于约 20% 体积比,更优选从约 50、55、60、65 或 70% 体积比至约 75、80、85、90、95 或 100% 体积比,最优选从约 95、96、97、98 或 99% 体积比至 100% 体积比。

[0125] 实验

[0126] 壳聚糖毛毡的制备

[0127] 可使用纺织工业中生产纤维通常使用的装置制备壳聚糖毛毡。如图 6 所示,生产壳聚糖毛毡的典型组装线可以使用加料器、松散机、梳理机、输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毡,然后通过小滚筒(duffer)将毛毡作为网的分离薄层剥离。来自小滚筒的壳聚糖毛毡网薄层在输送带上移动。将调节的乙酸溶液喷雾在壳聚糖毛毡上,然后将特定量的微孔多糖微球平均分配,而壳聚糖毛毡网在输送带上移动。然后通过卷轴收集负载有微孔多糖微球的壳聚糖毛毡,再送入真空烘箱干燥。

[0128] 壳聚糖纤维的表征

[0129] 水含量的确定

[0130] 在干净干燥的烧杯中准确称取 1.0g 壳聚糖织物蓬松物(W1),然后将烧杯移至 100℃烘箱 12 小时。再次称量干燥壳聚糖样品(W2),然后用下式计算水含量:

$$[0131] \quad \alpha = (W_1 - W_2) / W_2$$

[0132] 平均分子量的确定

[0133] 准确称量 0.3g 干燥壳聚糖并溶于 0.1mol L⁻¹ CH₃COONa-0.2mol L⁻¹ CH₃COOH 溶液。制备五种不同浓度的壳聚糖溶液。在 25±0.5℃的恒温水浴中使用乌氏粘度计测量相对粘度。固有粘度定义如下:

$$[0134] \quad [\eta] = C(\eta_{red}) \rightarrow 0$$

[0135] 通过外推减小粘度对浓度值直至浓度为零得到固有粘度。参见,例如 Qurashi T, Blair HS, Allen SJ, J. Appl. Polym. Sci., 46:255(1992)。纵轴截距为固有粘度。使用基于如下的 Mark-Houwink 等式计算粘度平均分子量:

$$[0136] \quad [\eta] = KM^\alpha$$

$$[0137] \quad \text{其中 } K = 1.81 \times 10^{-3} \text{ L/g}, \alpha = 0.93。$$

[0138] 脱乙酰度的确定

[0139] 使用 Broussignac, Chem. Ind. Genie. Chim. 99:1241(1969) 报道的改进方法测量。准确称量 0.3g 干燥壳聚糖并溶于 0.1mol L⁻¹ HCl 中。使用溴甲酚绿作为指示剂用 0.1mol L⁻¹ NaOH 滴定所述溶液。脱乙酰度计算如下:

$$[0140] \quad NH_2\% = \frac{(C_1V_1 - C_2V_2) \times 0.016}{G(100 - W)} \times 100$$

[0141] 其中 C_1 是 HCl 的浓度 (mol L^{-1}) ; C_2 是 NaOH 的浓度 (mol L^{-1}) ; V_1 是 HCl 的体积 (ml) ; V_2 是 NaOH 的体积 (ml) ; G 是样品重量 ; W 是样品中水的百分比 (%) ; 以及 0.016 是相当于 1ml $0.1\text{mol L}^{-1}\text{HCl(g)}$ 的 NH_2 的重量。

[0142] 脱乙酰度 (%) = $\text{NH}_2\% / 9.94\% \times 100\%$

[0143] 其中 9.94% 是当 CH_3CONH 基团 100% 脱乙酰时, 理论 NH_2 百分比。

[0144] 重金属含量 (Cr、Cu、Zn、Pb、Hg) 的确定

[0145] 使用电感耦合等离子体原子发射光谱 (ICP-AES) 法测定 Cr、Cu、Zn 和 Pb 的含量。测量前如下处理壳聚糖样品 : 准确称量 0.1g 壳聚糖样品, 然后浸入含有 2mL 90% 硝酸和 0.6mL 50% HClO_4 的坩埚中。壳聚糖样品逐渐溶解在混酸中, 并同时经历氧化降解。反应 2 小时后, 缓慢加热溶解的样品慢慢蒸发所有液体, 然后使用喷灯燃烧至所有有机组分分解消失。用 2% 硝酸溶液稀释含有无机盐的残余物至 10mL, 然后使用 ICP-AES (Jarrell-Ash 1100+2000 ICP-AES) 测定重金属含量。

[0146] 使用原子吸收光谱 (AAS) 测定壳聚糖中的汞含量。将准确称量的 0.1g 壳聚糖样品溶于 10mL 2% 硝酸。然后使用 AAS 测定样品中的汞含量。

[0147] 壳聚糖样品 1 的分析产生如下结果 : 水含量 : 11.75% ; 分子量 : 1326kDa ; 脱乙酰度 : 91.2% ; 金属含量 ($\mu\text{g/g}$) : Al 59.1、Ba 2.95、Ca 187、Cr 8.86、Cu 3.76、Fe 34.9、Mg 59.1、Na 169、Si 185、Pb 16.3、Zn 25.5、Hg 0.16。

[0148] 壳聚糖样品 2 的分析产生如下结果 : 水含量 : 12.38% ; 分子量 :

[0149] 1407 kDa ; 脱乙酰度 : 93.6% ; 金属含量 ($\mu\text{g/g}$) : Al 106、Ba 4.36、Ca 751、Cr 12.6、Cu 40.7、Fe 116、Mg 319、Na 193、Si 973、Pb 8.76、Zn 8.47×10^3 、Hg 0.16。

[0150] 基于壳聚糖样品 1 和 2 的分析结果, 测试的壳聚糖纤维的质量是可以接受的, 每一个样品均具有平均分子量 > 1000kDa (1 百万), 脱乙酰度 > 90%, 并且有害重金属 (Cr、Cu、Pb、Hg) 含量非常低 (除了壳聚糖样品 2 中的 Zn 含量)。

[0151] 微孔多糖微球的负载百分比和壳聚糖毛绒的质量

[0152] 可以通过使用两步制造法实现微孔多糖微球增加的负载百分比。第一步是松散壳聚糖纤维, 第二步是梳理松散的壳聚糖纤维使之成为壳聚糖毛绒薄层。壳聚糖毛绒的质量可以直接影响诸如微孔多糖微球的止血剂的负载百分比, 其从而影响毛绒的止血功能。当使用上述的两步法时, 样品的微孔多糖微球负载百分比能够从小于或等于 25% 重量比增加至 30-40%。

[0153] 壳聚糖蓬松物的实验制备

[0154] 通过构建采用乙酸溶液“粘结”在一起的壳聚糖纤维和微孔多糖微球层, 从壳聚糖纤维制备止血蓬松物, 然后真空干燥。制备 pH 值 3.0-4.5 的包括乙酸溶液的“粘结”溶液。将壳聚糖纤维撕成片。在放置第一层壳聚糖片后, 将所述乙酸溶液喷到所述壳聚糖片上, 随后加入微孔多糖微球。通过相同的方法在第一层上形成第二层。除了没有将微孔多糖微球加入至最上层外, 以这种方式构建各层, 直至得到 7 层。所述乙酸溶液不仅作为壳聚糖纤维层之间的胶合剂, 也增加了止血粉粘附壳聚糖纤维的能力。可选择地, 可以根据上述方法省略向壳聚糖层中加入微孔多糖微球的步骤而制备仅仅包含壳聚糖纤维的止血蓬松物。表 1

提供了上述止血蓬松物中微孔多糖微球的负载效率。

[0155] 表 1

[0156] 壳聚糖 (CS) 蓬松物的药物负载效率

[0157]

CS 重量 (g) 干燥后 / 干燥前	药物 (g)	CS+ 药物 (干燥后) (g)	负载效率	纤维状况
1.96/(2.19)	0	1.96	---	疏松 / 柔韧
1.92/(2.15)	0.25	2.15	92.0%	疏松 / 柔韧
1.82/(2.03)	0.51	2.28	90.1%	疏松 / 柔韧
1.98/(2.21)*	1.01	2.96	97.0%	硬

[0158] * 与其它实施例中所用的相比,将两倍的水喷到所述纤维上。

[0159] 由此制备的止血壳聚糖蓬松物显示出良好的止血功能和溶胀能力。当置于伤口上或伤口内时,所述蓬松物迅速吸收血液。血液通过前几层壳聚糖层,然后迅速固化防止了进一步的出血。如果所述蓬松物置于体内,则一段时间后,该止血壳聚糖蓬松物在体内生物降解为无毒的物质,因此不需要手术来去除该蓬松物。

[0160] 为了提高止血蓬松物的弹性,使用 CELVOL™205PVA(由 Celanese Ltd., Dallas, Texas 制造,用乙烯醇部分水解乙酸乙烯酯聚合物)修饰壳聚糖纤维以降低其亲水性。制备 PVA 修饰的止血蓬松物的步骤与制备未修饰的蓬松物的步骤相似,主要不同点是向用于壳聚糖层的乙酸溶液中加入 PVA。PVA 在乙酸溶液中的浓度为 2% 重量比。与未修饰的蓬松物相比,PVA 修饰的蓬松物具有稍微改善的弹性。

[0161] 壳聚糖海绵的制备

[0162] 根据下面的步骤制备止血海绵。将壳聚糖和 PVA 溶于稀释的乙酸溶液。加入二氯化钼作为催化剂并加入二异氰酸甲苯酯作为发泡剂和交联剂。用氨水洗涤粗产品并在烘箱中干燥。通过在所述海绵制备前向乙酸溶液中加入止血剂,或制备后向海绵中加载,向所述海绵任选地加载药物或治疗剂。

[0163] 壳聚糖织物的制备

[0164] 根据下面的步骤制备止血织物。首先,制备 pH3.0 的 1% 重量比的乙酸水溶液。将壳聚糖纤维分离为片状,并均匀地铺在覆盖有隔离纸的玻璃板上形成薄层。将乙酸水溶液喷到所述壳聚糖纤维表面,并将特定量的止血粉分布到该壳聚糖纤维上。通过相同的方法制备其它层。将少量的乙酸水溶液喷到最顶层的壳聚糖纤维层上后,将聚四氟乙烯 (TEFLON™) 平板置于最顶层的壳聚糖纤维层上。由此制备了包括五层的样品。

[0165] 将整个体系置于真空烘箱中,并在 50°C 真空干燥 3 小时。去除 TEFLON™ 板和隔离纸,得到无纺织止血织物。与所述 TEFLON™ 板接触的上层用壳聚糖薄膜覆盖,而与所述隔离纸接触的底层由无纺纤维状壳聚糖构成,具有粗糙表面。

[0166] 负载微孔多糖微球的壳聚糖毛绒的显微镜检查

[0167] 使用扫描电子显微镜检查负载不同量的微孔多糖微球的壳聚糖毛绒。在 15% 负载时,观察到在壳聚糖毛绒上微孔多糖微球的非平均分布(图 7)。在 60% 负载时,几乎观察不到微孔多糖微球(图 8)。相信在得到 SEM 图像以前或该过程中,微孔多糖微球从负载的壳聚糖毛绒上移去。在 60% 负载样品中,观察到样品容器表面上有颗粒微孔多糖微球。也可能在制备样品的 SEM 溅涂过程中使用的真空将微孔多糖微球移去。相信当松散微孔多糖微球沉积在壳聚糖毛绒间隙中,存在中性或弱酸性微孔多糖微球与阳离子壳聚糖的弱静电

键。图 10A、10B 和 10C 提供物理负载在壳聚糖毛绒上的微孔多糖微球的 SEM 图像。所述负载毛绒被压成碳粘性带。如图像所示,在转移有负载的毛绒至粘性带上的过程中,许多圆球被移去,但是保持其孔形态。

[0168] 还观察到微孔多糖微球附着在壳聚糖毛绒丝条上。在制造过程中可发生壳聚糖和微孔多糖微球的一定程度的溶解或熔化,形成扫描电子显微镜可见的键。观察到微孔多糖微球成簇附着的丝条上,一个或更多微球融合在丝条上。这些融合的圆球通常具有平滑的表面,并且在不具有不直接附着在丝条上的簇中圆球的复杂的孔结构。图 9A 和 9B 提供丧失孔结构的融合在壳聚糖纤维上或与其键合的微孔多糖微球簇的扫描电子显微照片。一旦微孔多糖微球丧失其孔(这可能发生在熔化或溶解过程中),其作为促凝剂的效果会严重受损。

[0169] 使用优选实施方案的方法通过在壳聚糖毛绒上负载微球,微孔多糖微球能与壳聚糖毛绒组合,而基本不改变各自组分的形态外表。通过对旋转圆筒中、传送带上或类似装置上的壳聚糖纤维更均匀地使用弱酸,例如通过雾化器或喷雾器以更小微滴尺寸的使用弱酸,任选对壳聚糖纤维使用真空源将微滴送入纤维块中、并且/或者使用鼓风机将微滴送入纤维块中,可以实现微孔多糖微球在壳聚糖毛绒上更加平均的分布。在涂渍过程中水分水平的较严格控制也可以实现微球更好的分布、更高的负载水平或降低对毛绒和微球形态的影响。

[0170] 在制备负载了微孔多糖微球的壳聚糖毛绒的特别优选实施方案的过程中,为了避免水溶液中微球的溶解以及避免微球结构的瓦解,只将少量酸性溶液或冰醋酸喷雾在壳聚糖毛绒表面以维持适当的水分水平。因此,微孔多糖微球主要被粘在壳聚糖毛绒上。

[0171] 当不希望被任何特别理论束缚时,相信当在伤口上使用时,壳聚糖,任选地负载有微孔多糖微球,可具有两种重要作用机制。一种是 非常快速地阻止出血,因为微孔多糖微球能够快速吸收血液中的水分。另一种是修复伤口和任何遭受损坏的血管。该第一作用能使伤口立即停止出血,而该第二作用能保护伤口并避免从遭受损坏或被切开的血管第二次出血。相信由湿润的壳聚糖毛绒支持的壳聚糖水溶胶的形成促成所述作用。

[0172] 负载壳聚糖毛绒的制造方法

[0173] 如上述讨论,通过梳理或类似方法处理壳聚糖可以产生毛绒层,其可被放置在传送带上用于进一步加工。这种进一步的加工包括使壳聚糖毛绒负载诸如微孔多糖微球或其它多糖剂和/或止血剂。在一个实施方案中,使毛绒负载微孔多糖微球的方法包含使用诸如冰醋酸的酸涂渍毛绒,任选地然后是使用多糖粉末或其它辅助剂的过程。

[0174] 在酸涂渍过程中,雾化弱酸然后应用于壳聚糖毛绒。可通过包括例如超声雾化的任何适合的方法完成该过程。所述的雾化的酸包含酸薄雾或酸雾,其经过位于传送带上的壳聚糖毛绒。优选地,使用风机将雾化的酸薄雾同时吹到毛绒上,并使用抽出泵将薄雾通过毛绒和传送带吸入。照这样,经过并涂渍毛绒的酸薄雾的体积可以严密地控制,并且所述酸薄雾可以被包含在酸涂渍处理区域。

[0175] 在毛绒被酸涂渍后,其可进入粉末应用处理区域,如果需要,粉末化的微孔多糖微球或其它粉末化试剂被负载在毛绒上。优选地,将粉末化的微孔多糖微球放置在振动滤网中,使用风机和抽出泵同时将其吹至所述毛绒并穿过毛绒和传送带将其吸入。照这样,用于毛绒的多糖粉末的体积可以严格地控制,并且所述多糖粉末可以被基本包含在粉末应用处

理区域内。

[0176] 优选地,酸涂渍处理区域和粉末应用处理区域基本相互隔离。在应用多糖后,优选将毛绒送至干燥装置。

[0177] 上述方法提供负载了微孔多糖微球的毛绒层。可以理解,进一步的处理可以用于将这种层掺入无纺布物中,其中若干经负载的毛绒层相互附着以制成负载多糖的壳聚糖毛绒无纺布物。

[0178] 根据一个实施方案,无纺布物制造方法使用缠绕衬纸的滚筒。优选使用诸如冰醋酸或弱酸溶液涂渍衬纸,以便使负载壳聚糖毛绒的底层与其粘附。使用另一酸涂渍喷雾底部毛绒层,将负载毛绒的另一层放置在酸涂渍毛绒上。由于在底层上的酸涂渍,所述毛绒层与另一层融合。该酸涂渍和毛绒包裹方法,如果需要能够继续形成许多毛绒层以生产无纺布物。一旦形成合适数量的层,就将毛绒从圆筒中移去,并输送至压力机,其对毛绒施加压力以进一步成键并压实无纺布物。在一个实施方案中,所述毛绒在压力机中干燥。

[0179] 沉积淀粉的壳聚糖

[0180] 当不希望被任何特别的理论束缚时,相信当与淀粉混合时,由于新的壳聚糖夹入淀粉的聚合物的形成,壳聚糖的止血效率比单独的壳聚糖或淀粉要好得多。壳聚糖和淀粉具有类似的结构和好的相容性。当酸溶液存在时,聚合物在熔融态或成形态 (plasticized state) 互相混合时,被认为发生了壳聚糖和淀粉的互相渗透和大分子链的纠缠。然而,两种聚合物链的互相渗透和纠缠通常归因于物理现象,该现象可以改变原始聚合物的某些物理性质,而不改变其化学结构。因此,互相渗透和纠缠的聚合物被认为是聚合物混合物或聚合物组合物,但是不是新的聚合物。在壳聚糖中,有大量能与酰基 ($-C(=O)-$)、酯基 ($-COOR$) 或醚基 ($-O-$) 中的氧原子形成氢键的氨基 ($-NH_2$)。相信在壳聚糖和淀粉聚合物链之间存在氢键。然而,氢键通常被划分为不改变化学结构的物理相互作用。在某些条件下(诸如加热、催化剂的存在等等),氨基可与活性醛或酮基反应以产生 Schiff 键,其被认为是化学反应。通常在多糖中没有足够的活性醛或酮基以促进该键的形成,所以 Schiff 键的产生通常在壳聚糖和多糖的组合中观察不到。

[0181] Everaers 等人, Science, Vol. 303, 2004 年 2 月 6 日, 第 823-826 页报道了纠缠的聚合物液体的流变学和微观拓扑学。人们发现高分子量聚合物液体的粘弹性性质由分子尺度上的拓扑学约束所支配。以与纠缠的绳子的类似方式,聚合物链可以滑动,但是不能互相通过。聚合物动力学的管道模型和流变学是基于这样的想法,即纠缠将链限制在围绕原始路径的小波动,该路径跟随纹理粗糙的链轮廓。Everaers 等人提供了这些现象模型的微观基础,他们以原始路径方式分析了聚合物液体拓扑学态,以得到对平台模量 (plateau modulus) 的无参数的、定量的预测,该预测与所有主要类型的合成聚合物的实验数据一致。

[0182] 如 Viyoch 等人在 International Journal of Cosmetic Science, 25(3), 113(2003) 中讨论的,分子量 100,000 道尔顿的壳聚糖和诸如玉米、马铃薯或木薯淀粉的淀粉能够用于制备含有罗望子果实提取物的化妆品贴片 (patch)。研究了不含罗望子的贴片的物理化学性质,例如弹性、颜色、透明度、完整性、光泽、吸水性、生物粘附性和稳定性。在 4℃、室温和 45℃ 下将制备的贴片保持两周以进行稳定性的测试。结果表明由壳聚糖:玉米淀粉为 4.5 : 0.5 ($CC_{4.5:0.5}$)、壳聚糖:木薯淀粉为 4.5 : 0.5 ($CT_{4.5:0.5}$) 和 4.0 : 1.0 ($CT_{4.5:1.0}$) 组成的制剂提供具有良好物理性质、高吸水性、良好生物粘附性和良

好稳定性的贴片。将冻干的罗望子提取物以相应于 5% 酒石酸的量引入 $CC_{4.5:0.5}$ 、 $CT_{4.5:0.5}$ 和 $CT_{4.5:1.0}$ 的制剂中后,贴片粘附皮肤的能力有所改善。然而,在室温或 45℃ 下保持贴片 6 周,其颜色加深,而其弹性和皮肤粘附性性质降低。通过观察渗透 Silastic® 膜 (Dow-Corning, Midland, MI) 的酒石酸的累积量进行体外 12 小时渗透测试。 $CC_{4.5:0.5}$ 贴片具有最高酒石酸释放量。所有混合聚合物基质的释放模式展现了两个不同的阶段:快速阶段,其中流量平均为 $3.61 \mu g \min^{-1} mm^{-2}$;慢速阶段,其中流量平均为 $1.89 \mu g \min^{-1} mm^{-2}$ 。Viyoch 等人描述制备壳聚糖和淀粉混合物的方法可以适用于制备优选实施方案的材料的壳聚糖基质或止血剂的制备。

[0183] 沉积了右旋糖酐的壳聚糖

[0184] 通过提供用具有微孔表面的右旋糖酐涂渍的壳聚糖纤维可实现高级涂渍,而不是通过沉积微孔多糖微球。能够使用任意一种方法制备右旋糖酐涂层。例如,右旋糖酐可溶于水或弱酸溶液以通过温和氧化赋予该分子电负性,借此产生羧基。在控制条件下,右旋糖酐也可经反应以纠缠聚合物。壳聚糖右旋糖酐混合物可被冻干以产生在壳聚糖纤维上具有微孔的表面。通过直链或支链淀粉的各种组成,可以控制右旋糖酐涂层的程度,可控制涂层的厚度以及可控制孔尺寸。带负电的右旋糖酐和阳离子壳聚糖反应可以形成化学键。可通过光学和电子显微镜以及材料切片的组织化学监视所有这些过程以确定是否成功成键。

[0185] 该技术的变化涉及制备右旋糖酐涂覆的微孔壳聚糖和非涂覆的壳聚糖的交互层,以制备无纺毛绒和织物的梯度。本领域已知的将右旋糖酐涂层应用于各种基质的方法能够加以变化以产生将右旋糖酐涂覆应用于壳聚糖纤维的方法。微孔多糖微球对右旋糖酐涂覆的壳聚糖纤维也具有优秀的粘附性。因此,在某些实施方案中,希望在微孔多糖微球沉积前用右旋糖酐预处理壳聚糖纤维。

[0186] 壳聚糖-微孔多糖微球生产方法

[0187] 术语“壳聚糖”对应于一组不同脱乙酰度 (DA) 的聚合物族。壳聚糖通常在约 50 至 70% DA 变化,并具有不同粘度、溶解性和止血性质。因为壳聚糖聚合物的特性,即其反应性、溶解性和结合 MPH 的能力,依赖于甲壳质和壳聚糖的 DA,所以希望进行分析以确定 DA。FTIR 光谱和 $C13$ 质量 NMR 光谱与壳聚糖分析有关。用于确定甲壳质和壳聚糖的乙酰化度的技术优选 FTIR 光谱。FTIR 光谱具有无损、快速、极其灵敏、使用者友好、低价和适用于可溶和不溶样品的优点。

[0188] 分析前,如同为临床应用而生产,从甲壳质中除去所有蛋白质和内毒素。测定壳聚糖纤维以确定其横截面、抗拉强度、断裂强度、负载强度及其外观。在制造壳聚糖毛绒和壳聚糖海绵以及制造壳聚糖织物时使用该工业工程方法。在模型系统中测定微孔多糖微球的饱和量以确定用于三种主要类型出血的适当的物理性质。

[0189] 表征壳聚糖纤维的结构和性质

[0190] 使用建立的和在线的方法测量晶体结构、尺寸、甲壳质 DA、平均分子量、重金属含量以及壳聚糖纤维的毒性。表征测试包括测定纤维长度、牵拉率、平均纤维溶胀即吸收蒸馏水前后纤维直径的比率、以及 pH。对比具有 50 至 80% 重量比或更高的 DA 的壳聚糖。分析的材料包括微孔多糖微球、不同 DA 的壳聚糖以及壳聚糖-微孔多糖微球材料。还进行了水和血液吸收、水和血液释放比率、局部滞留 (使用凝胶强度) 以及用于止血的筛选试验。因为红细胞聚合作用 (凝集反应) 被认为是壳聚糖诱导血液凝结的主要因素,简单的血细胞

凝集试验可以用于产品的快速筛选。

[0191] 本领域已知简单的血细胞凝集试验。在储液中配制壳聚糖、壳聚糖-微孔多糖微球以及微孔多糖微球组合物,含有 2000 $\mu\text{g/ml}$ 材料。使用 10 倍稀释得到 0.9% NaCl (生理盐水) 中的最终浓度为 1000、100、10 或 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.2ml 容积。使用 Alsever's 溶液冲洗人红细胞 (从血库中得到) 两次,并用 0.9% 氯化钠冲洗两次。氯化钠用于防止脱乙酰甲壳质和其它离子之间的不相容性。在生理盐水 (0.9% NaCl) 中混悬洗涤过的红细胞,并使用比色计 (Klett-Summerson, No. 64 过滤器) 调节至 70% 透光率。向壳聚糖-微孔多糖微球、壳聚糖和微孔多糖微球组合物的各种稀释液中加入等体积的红细胞悬液 (0.2ml)。读数前试管在室温下孵育两小时。脱乙酰甲壳质 (壳聚糖) 正常地在 1 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下产生人血红细胞的血细胞凝集。

[0192] 使用利用反射干涉光谱 (RIFS) 的生物医学传感器确定蛋白质结合能力,该光谱能够确定蛋白质吸收于单独的壳聚糖、壳聚糖-微孔多糖微球和微孔多糖微球表面上的动力学。一旦得到用于止血的最佳壳聚糖-微孔多糖微球,可迅速评估各批次蛋白质的结合能力,该参数与上述大鼠模型中的止血效果相关。

[0193] 可使用不同于乙酸处理的体系来溶解和加载微孔多糖微球至壳聚糖,实现壳聚糖负载微孔多糖微球的最优化。乳酸比乙酸可以降低更多的毒性。能想象的是,通过选择性的淀粉氧化和阴离子态的产生可加强作为非极性多糖的微孔多糖微球 (淀粉) 与作为强阳离子多糖的壳聚糖的结合。

[0194] 进行了带有和不带有微孔多糖微球的壳聚糖纤维、壳聚糖毛绒和织物的降解动力学的研究。使用多光子成像和光谱评价了壳聚糖、壳聚糖-微孔多糖微球和微孔多糖微球与人和猪全血和血小板的相互作用,以进行壳聚糖-微孔多糖微球毛绒和织物的止血机制的研究。将这些结果与应用 NAG 提供的测定进行了比较。研究了体外凝血快的形成、RBC 聚集以及血小板激活。

[0195] 已经进行了大规模生产混有微孔多糖微球的壳聚糖毛绒和无纺织物的生产线的设计和制造。开发了用以完成以下功能的机器:松散壳聚糖纤维;梳理松散的纤维成为薄毛绒网;使用稀乙酸 (或乳酸) 溶液润湿纤维毛绒;在该湿润的壳聚糖纤维薄片上均匀地负载微孔多糖微球;将负载微孔多糖微球的壳聚糖纤维薄片卷在卷轴上;以及真空干燥纤维。设计并组装了全自动或半自动生产线以生产标准化的大批量的壳聚糖-微孔多糖微球毛绒和无纺织物。进行了不同毛绒制备的密度试验以优化空隙尺寸和止血的最佳毛绒密度。在胶原毛绒上进行了类似的试验。

[0196] 最优化壳聚糖-微孔多糖微球制剂以满足特定出血素质的需要

[0197] 使用军队为测试和对比评价壳聚糖-微孔多糖微球材料定义的模型最优化制剂。这些模型包括肝损伤模型 (猪) 中的致命的主动脉穿孔损伤和大静脉和弥散毛细血管出血。从文献中得到的动脉导管插入损伤的遥控封闭模型能迅速适于使用壳聚糖-微孔多糖微球封闭损伤。兔口腔出血模型使得能在凝结状态易于改变 (血小板、肝素化) 的动物的血管器官系统中进行试验。该模型已用液体壳聚糖作为止血剂进行过试验。

[0198] 壳聚糖-微孔多糖微球毛绒和织物的动物止血试验

[0199] 对肝素化下损伤的大血管 (例如,插入导管的犬股动脉),以及对致命的猪横切面模型 (股动脉、股静脉) 和对穿刺的大鼠股动脉和股静脉进行了止血测试。

[0200] 插入导管的犬股动脉

[0201] 用于动脉穿刺和导管插入术后的活跃出血控制的模型是肝素化动物中犬股动脉穿孔。对股动脉中放置了 11.5 French 导管 4-6 小时的三只动物进行肝素化,使活化凝血时间 (ACT) 为正常的 2-3 倍,并通过 IV 液体替换保持在正常张力水平。移除留置的动脉导管,立刻将壳聚糖-微孔多糖微球贴片 (2×2cm) 以最小的压力应用到出血血管 10 分钟。录像带记录这些研究。

[0202] 试验在狗 3 上进行,狗重 25.7kg;性别:雌性;凝结时间 ACT277 秒。犬股动脉中的所述导管为 11.5F 的导管。在去除 11.5F 的导管后,立即将 1-2cm³ 的壳聚糖-微孔多糖微球置于股动脉穿刺孔上。对所述毛绒进行手动加压 10 分钟,出血完全停止,实现绝对止血。将壳聚糖-微孔多糖微球应用于股静脉穿刺孔,去除另一 11.5F 导管,并保持手动加压 7 分钟。实现了完全止血。通过在近端进行结扎使静脉血压上升,所述壳聚糖-微孔多糖微球依然粘附而无出血。

[0203] 试验在狗 4 上进行,狗重 25.4kg;性别:雌性;凝结时间 ACT280 秒。去除 11.5F 的导管后,立即将 1-2cm³ 的壳聚糖-微孔多糖微球置于所述股动脉穿刺孔上,并手动按压 10 分钟。观察到完全止血及所述毛绒明显粘附。

[0204] 试验在狗 5 上进行,狗重 23.1kg;性别:雄性;凝结时间 ACT340 秒。去除 11.5F 的导管后,立即将 PVA 处理的壳聚糖-微孔多糖微球毛绒 (1cm³) 置于所述股动脉穿刺孔上,并手动按压 10 分钟。出血停止,但 30 秒后观察到所述穿刺伤口的中度出血。用相同 PVA 处理的壳聚糖-微孔多糖微球毛绒 (10 分钟手动按压) 进行的二次尝试失败。随后用不含 PVA 的壳聚糖-微孔多糖微球无纺布物替代该相对无粘附性的 PVA 处理的壳聚糖-微孔多糖微球毛绒。手动按压 15 分钟后实现完全的止血。对伤口观察 20 分钟,未观察到出血。所述无 PVA 处理的壳聚糖-微孔多糖微球织物与所述动脉和周围的组织紧密粘合。切除带织物的动脉进行病理学研究。

[0205] 狗试验证明壳聚糖-微孔多糖微球毛绒 (无 PVA 处理的) 在肝素化的犬动脉导管插入模型中是极为有效的止血剂。将大孔导管 (11.5F) 留存 4-6 小时导致明显塑形的血管 (vascular breach),且考虑到明显延长的凝结时间这对止血的确是一个挑战。壳聚糖-MPH 毛绒也顺应所述动脉的轮廓,并不会干涉远端血流,并形成明显的粘附。壳聚糖-微孔多糖微球毛绒在导管插入的股静脉中可同样有效地实现止血,并同样产生明显地粘附而不影响血流。壳聚糖-微孔多糖微球毛绒 (PVA 处理的) 在一次实验中仅获得中等至极小的止血效果,并且相对不粘附。用无 PVA 处理的壳聚糖-MPH 织物贴片可以确保完全止血。

[0206] 大鼠穿刺的股动脉和静脉

[0207] 巴比妥麻醉后,将三只大鼠的股动脉和静脉 (OD 1.5-2mm) 双侧暴露。在每一动脉上用 30 规格的针形成穿刺伤口,将壳聚糖-微孔多糖微球织物的纱布 (3mm³) 置于穿刺位点 10 秒钟,并监测出血。未使用 PVA 处理的材料。

[0208] 控制从受伤的薄壁大鼠股血管的出血 100 分钟是止血上的挑战。通过暴露两侧股动脉,用 30 规格的针来穿刺动脉,形成动脉破口和活跃出血。

[0209] 试验在大鼠 1 号上进行,雄性,520g。用壳聚糖-微孔多糖微球织物的纱布处理右侧的股动脉穿刺伤口。对该纱布轻轻按压 30 秒,释放后该织物下有非常微量的出血。再次进行轻微的手动按压 10 秒,出血完全停止。观察到完全止血后 20 分钟,在所述股动脉的近

端和远端进行结扎,进行爆裂强度测试。所述织物修复的伤口在 120mmHg 下仍保持完好。

[0210] 试验在大鼠 2 号上进行,雄性,525g。用 3mm² 的壳聚糖-微孔多糖微球织物的纱布处理左侧的股动脉穿刺伤口。对该纱布手动按压 10 秒,手动按压释放后该织物贴片下有非常微量的出血。再次进行手动按压 2 秒,但仍有逐渐降低速率的微量出血。未进行继续按压,56 秒后出血完全停止。观察到完全止血后 20 分钟,在所述股动脉的近端和远端进行结扎,进行爆裂强度测试。所述织物修复的伤口耐受了高至 300mmHg 的动脉压强。

[0211] 通过将脂肪垫放置在伤口上对右侧股动脉穿刺伤口进行处理。对该脂肪组织进行手动按压 10 秒钟。手动按压释放后,该脂肪组织下有大量出血。未进行继续按压。1 分 27 秒后出血停止,20 分钟后在所述股动脉的近端和远端进行结扎,进行爆裂强度测试。所述脂肪组织修复的伤口在约 60mmHg 时失效。

[0212] 试验在大鼠 3 号上进行,雄性,555g。用壳聚糖-微孔多糖微球处理右侧的股动脉穿刺伤口,3mm² 混合壳聚糖无纺布织物的纱布用于覆盖伤口。手动按压 20 秒,释放后实现完全止血。观察 20 分钟后,在所述股动脉的近端和远端进行结扎,进行爆裂强度测试。壳聚糖-微孔多糖微球贴片耐受了高至 200mmHg 的动脉压强。用脂肪组织覆盖右侧股动脉穿刺伤口。对该脂肪组织手动按压 20 秒,手动按压释放后有大量出血。连续手动按压 1 分 21 秒后出血停止。随后,在所述股动脉的近端和远端进行结扎,进行爆裂强度测试,该脂肪组织贴片在低于 120mmHg (约 60) 时失效。

[0213] 大鼠测试证明壳聚糖-微孔多糖微球纱布在面对脆性血管的穿刺伤口的活跃出血时,可非常有效地实现完全止血。壳聚糖-微孔多糖微球织物止血所需的时间为 20 秒到 56 秒。这可能是由于微孔多糖微球在壳聚糖无纺布贴片上的不均匀分布所致。壳聚糖-微孔多糖微球贴片非常牢固地粘附到血管,并在失效前可有效地耐受较高的动脉压力。大鼠股动脉穿刺模型是研究止血和组织粘附机制的优良的筛选系统,并可筛选各种壳聚糖-微孔多糖微球制剂。

[0214] 猪股动脉和股静脉

[0215] 在致命的大动脉损伤横切股动脉和股静脉的情况下进行测试。与采用的其它方法相比,所述壳聚糖-MPH 蓬松物提供了显著的止血作用。

[0216] 猪的致命主动脉损伤模型

[0217] 在得克萨斯圣安东尼奥的美国军事外科研究所开发了这一用于进行止血剂测试的模型,目的是确定用于高压动脉出血的最优止血敷料。该损伤是在血压正常猪的远端主动脉上的标准穿刺孔。对这一 100%致命的损伤评估了 9 种不同的止血敷料。只有接受了美国红十字会纤维蛋白敷料(纤维蛋白和凝血酶)或伤口接受了缝合修复的动物存活了 60 分钟。包括 NAG 在内的其它止血剂,未能控制动脉出血,且没有动物存活超过 60 分钟。这些实验中不包括壳聚糖和微孔多糖微球。

[0218] 研究了 5 组,每组 5 只猪(40kg,未成年的约克郡杂交猪,雄性)。一组用美国红十字会纤维蛋白敷料处理,另四组用含或不含微孔多糖微球壳聚糖织物和含或不含微孔多糖微球的壳聚糖毛绒处理。单独的微孔多糖微球通常不能控制活跃的动脉出血,不包括在内。在先的实验证明了未处理损伤的致死性,以及可通过缝合修复来拯救该动物。该研究的目的是比较美国红十字会敷料和壳聚糖为基础的敷料。测定了存活率、血液损失和维持正常血压所需的 IV 复苏液体的量。

[0219] 预先对动物用药 (Telazol 4-6mg/kg IM (肌肉内), Robinul 0.01mg/kg IM), 用 1-3% 的异氟烷和氧气维持气管内麻醉, 且中心温度维持在 37° -39℃。放置留置式动脉插管, 用于近端 (颈动脉) 和远端 (股动脉) MAP (平均动脉 BP 测定), 插入股 IV 插管用于复苏液体给药。对猪进行脾切除, 对脾称重, 并用替代液体溶液 (3x 脾重量的温的乳酸盐林格氏液) 给药, 以矫正去除的血 (脾)。

[0220] 脾切除后 10 分钟内, 达到了血液动力学稳定, 在动脉穿刺之前获得动脉血样品 (12ml)。主动脉闭塞后立即造成动脉损伤, 且损伤后 30 分钟和 60 分钟抽取动脉血。测定凝血酶原时间、活化的局部促凝血酶原激酶时间、纤维蛋白原浓度、凝血弹性描记图、全血计数、乳酸和动脉血气。

[0221] 在脾切除和 10 分钟的稳定期后, 在两侧侧腹隐窝放置连续抽吸的引流管。通过称量随时间的血损失来确定出血速率, 并表示为每 10 秒的累计克数。在伤口位置的上游和下游横断夹住动脉后, (远端主动脉分叉处以上 3cm, 进行 4.4mm 的主动脉孔穿刺的主动脉切开) 移除横断夹。最初, 在未进行血管加压的情况下通过将手指放在孔上堵塞出血。在时刻 0, 手指放松堵塞, 使得活跃出血 6 秒。收集血液, 通过将血液引入用于引流的腹膜腔中来监测血液损失速率。

[0222] 将聚乙烯弹性片置于敷料和带手套的手之间, 并在活跃出血 6 秒后将测试的止血敷料应用 4 分钟。进行主动脉完全闭塞的手动按压, 表现为无脉搏的股动脉 BP (MAP 为 15mmHg)。4 分钟后, 松开手动按压, 将所述织物和塑料片留在受伤位点上。观察 2 分钟受伤位点的出血情况。关键的终点是观察两分钟后完全没有出血。如果出血仍在持续, 再按压 4 分钟。在活动出血或无止血的事件中, 不再进行复苏而让动物死亡。为了在没有出血迹象的条件下测试所述测试敷料的粘附性, 用 37℃ 的乳酸林格氏液以 300ml/分钟 IV 的速率进行复苏。在动脉切开术前基线 MAP 加或减 5mmHg 处再保持 60 分钟。死亡 (关键终点) 是 MAP < 10mmHg, 且呼气末的 PCO₂ 低于 15mmHg。在实验期的末尾 (对存活动物在 1 小时时实行安乐死) 移除主动脉, 切开并评估。在对损伤进行观测和拍照后, 检测孔的大小以确保损伤大小均一, 且固定样本用于组织学实验, 以评估止血过程 (纤维蛋白、血小板、延伸至内腔)。

[0223] 虽然, 在该模型中, ARC 止血敷料具有一定的存活率, 但其仍有缺点。除了前述的参数外, “理想” 的止血敷料控制了大血管的动脉、静脉和软组织的出血, 粘附到血管伤口而非手套或手上, 柔韧、持久且廉价, 在极端环境下稳定, 并具有长的储存期, 无需混合、没有传播疾病的危险, 无需新的训练, 并且由容易获得的材料制成。在当前设置中测试或评估的敷料中没有一种满足所有这些性质。纤维蛋白-凝血酶美国红十字会战场敷料 (ARC) 的缺点是其目前的形式太脆。该战场敷料干燥时又硬又厚, 并且当握紧该战场敷料时, 某些冻干材料会剥落。当湿润时, 该纤维蛋白-凝血酶会粘附到乳胶手套和皮肤上。含有 MPH 的壳聚糖毛绒的操作特性优于这些现有技术的材料。

[0224] 犬股动脉导管插入模型

[0225] 该模型有大量用于评估新型血管密封装置的背景文献。借助用 Seldinger 技术通过含插入的导管的经皮放置的标准血管鞘 (7 French) 对股动脉进行了研究。总共采用了 20 只动物, 10 只用 IV 肝素 (150 单位 / 千克) 抗凝至活化凝血时间 (A. C. T.) 为正常的 3 倍。在所述密封装置插入前检测 ACT。未肝素化的动物的对侧股动脉用作对照, 仅用手动按

压来实现止血。将动脉鞘和导管遗留在原位 1 小时以模拟插入时间。在一股动脉中使用含壳聚糖-MPH 的血管密封装置,而在另一股动脉上采用手动按压。释放应用到穿刺位点的手动压力,并每 5 分钟检查以下关键终点:外部出血或血肿形成、大腿周长测量、远端足脉搏的完整性及实现止血所需的手动按压时间。对动物继续观察 90 分钟,然后用过剂量的 IV 戊巴比妥钠和饱和的氯化钾安乐死。安乐死前,对每组的动物进行股动脉血管造影。

[0226] 一小组动物存活,随后在 2 周时进行检查。这些检查包括物理检查动脉入口、评估末梢脉搏、股动脉血管造影及对切开的股动脉穿刺位点和周围组织进行组织病理学检查。统计学分析表示为平均标准偏差。用未配对 student's t- 检验来比较不同处理组的平均止血时间。在进行人体临床试验之前进行了初步动物研究。含微孔多糖微球的壳聚糖毛绒和含微孔多糖微球的壳聚糖织物在控制血液损失及其它测试的参数方面均显示出较好的性能。

[0227] 严重的大静脉出血和肝损伤模型(猪)

[0228] 该模型被美国军队战斗伤亡管理研究项目广泛测试。有大量的关于伤害程度和对各种止血剂的反应的数据基线。该数据包括大直径静脉的伤害程度,将止血敷料应用于大面积出血面的能力,血液损失的量,设备操作,致命性,以及实验性肝损伤的再生性的资料。所述美国红十字会止血敷料(ARC)和实验的壳聚糖乙酸酯海绵在该模型中都是有效的止血剂。军队研究者决定准许壳聚糖和美国红十字会止血敷料(ARC)的进一步研究和开发。在猪严重大静脉出血模型中检验了壳聚糖(毛绒、织物,含有或不含有微孔多糖微球)和 ARC 敷料的止血效力。推荐的用于治疗 V 级肝损伤(广泛的薄壁组织损伤并发主血管破口)的常规治疗方法是用纱布海绵填塞,及随后再次手术。从未借助这些止血剂解决生物降解性和伤口愈合的问题。因此,损伤后一个月将存活的动物处死,以检查愈合的伤口和止血剂降解。在一个月时间内通过每周肝 CT 扫描来监测止血控制。再出血的迹象需要剖腹手术和处死动物来介入。监测了动物的损伤后和止血修复过程。

[0229] 将杂交的商业化猪(雄性,40-45kg)分为 6 组,每组 5 只。实验组由纱布包扎、ARC 敷料、含有或不含微孔多糖微球的壳聚糖毛绒,和含有或不含微孔多糖微球的壳聚糖织物构成。手术准备和麻醉如对所述主动脉穿刺损伤模型一样。放置颈动脉和颈静脉导管,并完成脾切除和膀胱导管放置。同时达到了血液动力学(MAP 稳定 15 分钟)和代谢(直肠温度 38-40°C,动脉血 pH7.39-7.41)稳定。获得动脉血液样品。每一实验动物必须具有正常的血细胞比容、血色素浓度、血小板计数、凝血酶原时间、活化的局部促凝血酶原激酶时间,和血浆纤维蛋白原浓度,这些都将包括在本研究中。在两侧放置引流管(如在主动脉切口中一样)以计算血损失速率和量。如在先出版物中所述诱导肝损伤。基本上,使用专门设计的“×”形的钳子来造成两个穿破的肝破口,该钳子包括 4.5cm 的尖锐的尖端和基板。标准化的肝损伤是贯穿的星状伤口,涉及左内叶静脉、右内叶静脉、肝门静脉和肝软组织。损伤后 30 秒,开始以 260ml/分钟的速率供应温的(39°C)乳酸盐林格氏液以恢复基线 MAP。在开始供给 IV 液体的同时,应用实验的止血辅料,通过在背腹方向标准化地应用压力来进行手动按压。1 分钟后,检查伤口的出血情况。如果未完全止血,则在内侧旁方向再次施压。将该序列重复 4 次,按压 60 秒。止血的关键终点定义为伤口不存在任何可观测到的出血。应用止血处理后,将动物的腹部暂时关闭,并对该动物观察 60 分钟。死亡的终点是脉搏为 0。处理应用前的定量收集的血液定义为“处理前血液损失”,在研究阶段结束时的定量收集

的血液为“处理后血液损失”。止血剂中的血液不包括在内,但包括总的 IV 液体替换,并确定估计的损伤前血液体积。

[0230] 用发明该方法的军队报导的个体评分系统来估计所述止血辅料的粘附强度。分数为从 1 到 5;1 = 无粘附,2 = 轻微,3 = 粘附导致与止血剂接触的组织伸长,但不能将肝提离肝床 (table),4 = 粘附足以将肝部分提离肝床,及 5 = 粘附足以将肝提离肝床。来自每只动物的三种辅料的平均分数视为粘附强度的单一值。

[0231] 关键终点是存活,死亡,处理前血液损失,处理后血液损失,存活时间,在 1、2、3 和 4 分钟时止血,和 % 复苏液体体积。损伤的关键参数是破损的血管数目相关的处理前血液损失,表示为 ml 和 ml/kg 体重。

[0232] 含有微孔多糖微球的壳聚糖毛绒和含有微孔多糖微球的壳聚糖织物在控制血液损失及其它测试参数方面均表现出更好的性能。

[0233] 口腔出血模型:兔的舌止血

[0234] 该模型提供了在具有增强的毛细血管血流(舌头)和高纤维蛋白溶解活性(口腔粘膜)的系统中的方便的止血测试。该模型中可很容易地使血小板的功能被抑制以及被肝素化。已使用该模型来评估在稀乙酸中的液态壳聚糖的止血作用,关键终点为标准切开后出血时间减少。该模型的描述已经公开出版了,并为待比较的结果提供了基线数据。

[0235] 将被认为对毛细管出血具有高度止血作用的 NAG 的止血效力与含有或不含微孔多糖微球的壳聚糖毛绒和含有或不含微孔多糖微球的壳聚糖织物进行比较。关键终点是舌的出血时间,即以分钟表示的从应用止血剂到完全止血的时间。手术后 1-14 天对兔实施安乐死,并对损伤进行组织学评估。研究了具有正常血液凝结状态、抑制了血小板活性、及肝素抗凝血化的兔。使用 Klokkevold 等开发的模型后,对 5-61bs 的新泽西白(NZW)兔进行舌止血研究,所述模型包括将特殊的金属支架缝合到舌头上,以稳定软组织并确保伤害一致。用有防护的 15 刃刀(guarded 15 blade knife)在侧边上对舌进行切开。用 Coles 的滤纸方法来检测从切割时的出血时间。每 15 秒钟提取斑渍,直到不发生血液着色。还测定系统出血和凝结时间。总共研究了 6 组每组 5 只共 30 只兔。这 6 组由对照(未处理)、NAG、含有或不含微孔多糖微球的壳聚糖毛绒和含有或不含微孔多糖微球的壳聚糖织物构成。对动物进行麻醉(IM Ketamine HCl 35mg/kg 和 Xylazine 5mg/kg)后,将可视窥镜插入口中使其张开,将不锈钢支架缝合到舌头上以稳定组织。用有防护的 15 刃在舌头的侧边上形成深 2mm 长 15mm 的舌切口。切口立即用止血剂处理,并检测出血时间。采用切割前进行舌标记的方法来方便标记后的组织学切片。在 5 组每组 5 只用血小板功能拮抗剂依前列醇(环前列腺素或 PGI_2)处理的动物中进行与上述 30 只兔中相同的研究。明确地遵循 Klokkevold 的方案。再次,在活性凝血时间延长 3 倍且平均收缩性出血时间增加 40%之后,对 30 只兔进行研究。组织学检查包括 SEM。含有微孔多糖微球的壳聚糖毛绒和含有微孔多糖微球的壳聚糖织物在控制口腔出血时均显示出更好的性能。

[0236] 猪试验-致命的腹股沟损伤模型

[0237] 在一只猪(94kg)身上使用 Hasan Alam 博士开发的致命的腹股沟损伤模型进行 1.5g 的负载有微孔多糖微球的壳聚糖毛绒的试验,Hasan Alam 博士是战地伤亡领域的创伤外科医生和研究专家,他是华盛顿(DC)医院中心的医务人员并服务于国防医科大学(USUHS)。在割断股血管后,使出血持续进行直至所述动物失去大约相当于体重 20 至 25ml/

kg 的血液。通过基于体重而不是出血时间的血液损失固定量,建立了更加一致的病理学。失去固定量血液后,将 1.5g 壳聚糖毛绒片置于所述伤口上。所述壳聚糖毛绒成功控制了从所述割断的血管中的出血。然后用 500ml 羟乙基淀粉复苏,观察所述动物直至平均动脉压稳定在约 45mmHg。在观察期间没有观察到出血。在那时,给予额外的复苏以及钙和多巴胺以增加平均动脉压至 95mmHg 而无出血征候。所述动物被处死并检测所述毛绒。

[0238] 在另一只猪(87kg)身上试验改变的壳聚糖毛绒。通过向毛绒中加入额外的微孔多糖微球改变所述壳聚糖毛绒以补偿在改变期间微孔多糖微球的任何损失。应用成功并且在约一小时后使用羟乙基淀粉和多巴胺升高平均动脉压以给所述应用加压。没有观察到出血,直至平均动脉压升高至约 95mmHg,此时出血重新开始。移去所述毛绒。观察到所述材料变得僵硬和坚固。在所述伤口上放置另一毛绒。之后,出血被控制。该毛绒为含有微孔多糖微球的未改变的壳聚糖毛绒。

[0239] 这两个应用均证明了必须在受伤血管上放置毛绒以实现控制严重的出血。少量出血发生在股部伤口的底部。如果将所述材料置于所述伤口的底部,出血不会得到控制。因此,优选将所述材料放置在伤口内以与股动脉接触。总之,所述应用非常成功,并且提示当正确应用时,制剂有优良的功效。

[0240] 以上描述公开了本发明的几种方法和材料。很容易对本发明的方法和材料进行修改,及对制造方法和设备进行替换。基于本公开或本文所述发明的实施,这类修改对本领域所属技术人员是显而易见的。因此,本发明不应限制为本文公开的具体实施方案,而应涵盖所有属于所附权利要求中发明的实际范围和精神内的修改和替换。本文引用的全部专利、申请和其它文献的全部内容并入本文作为参考。

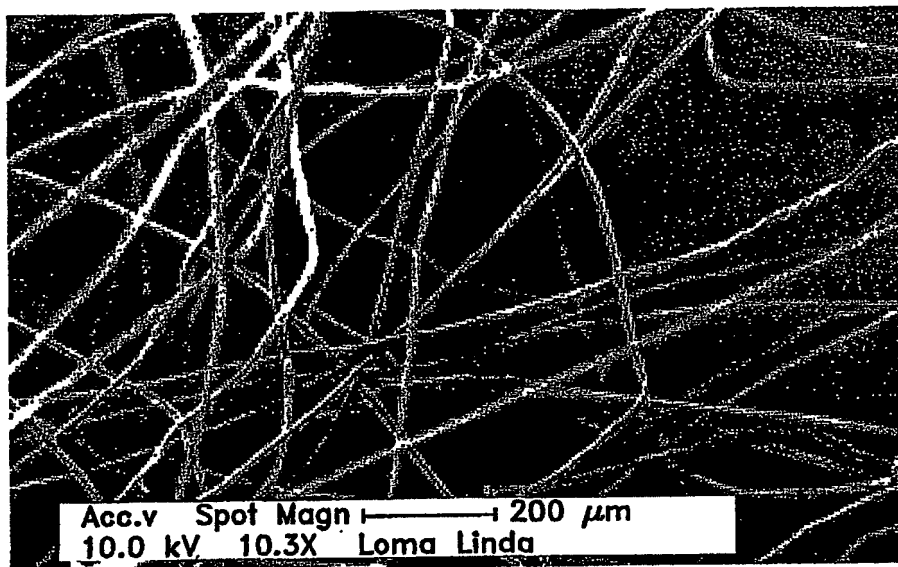


图 1

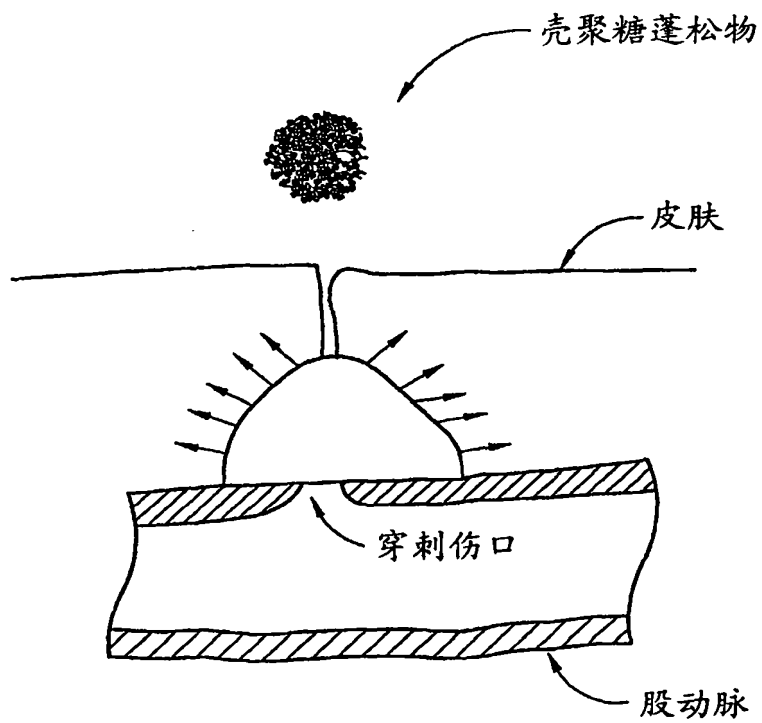


图 2

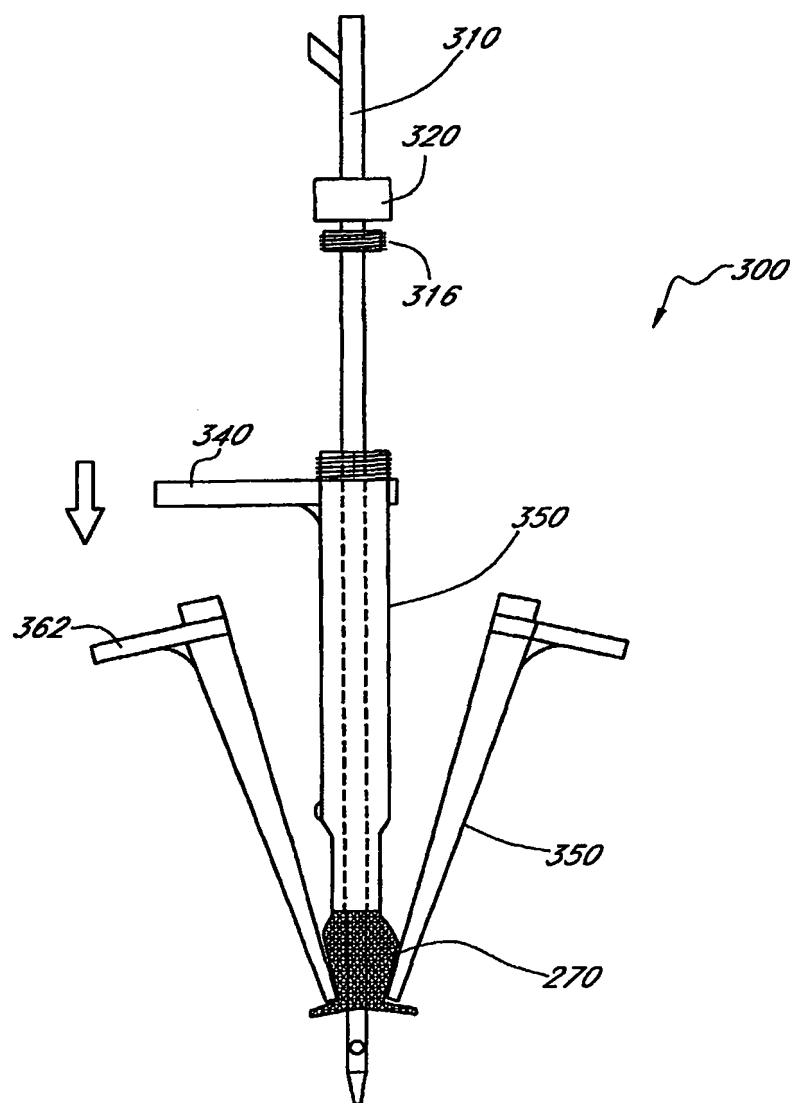


图 3

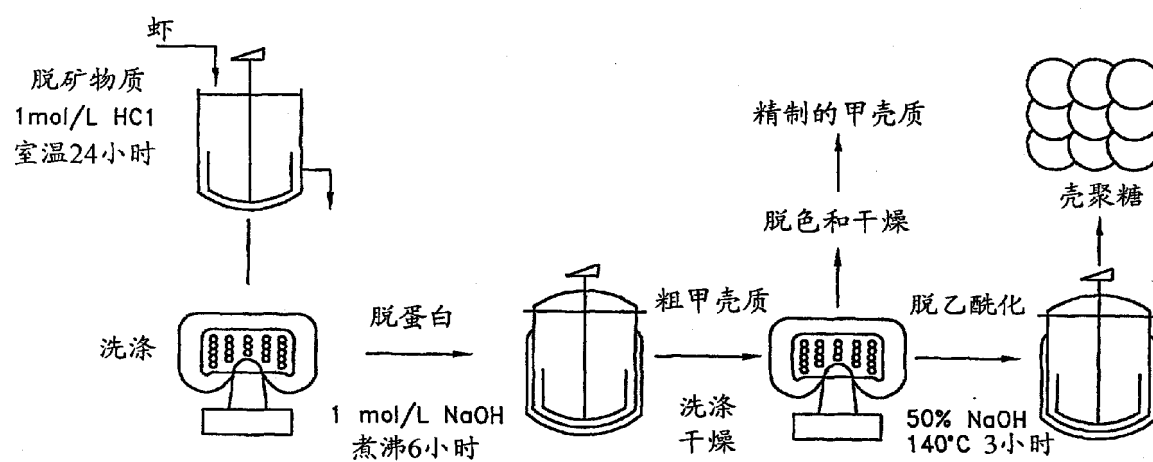


图 4

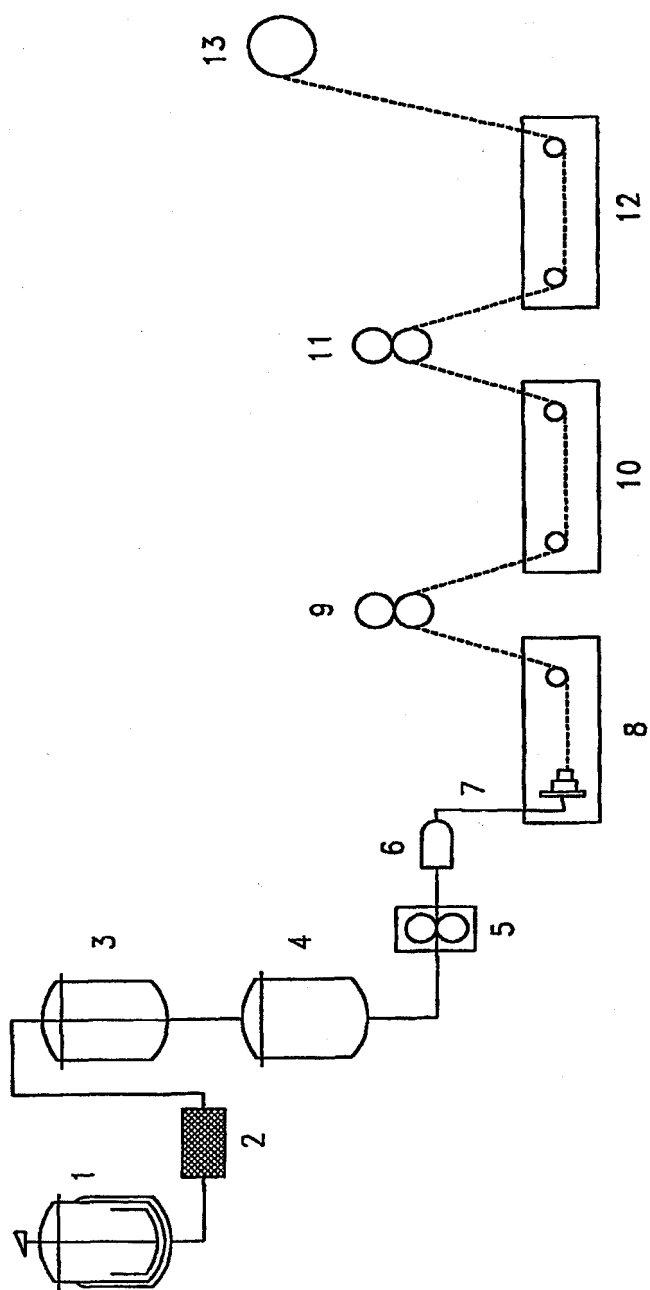


图 5

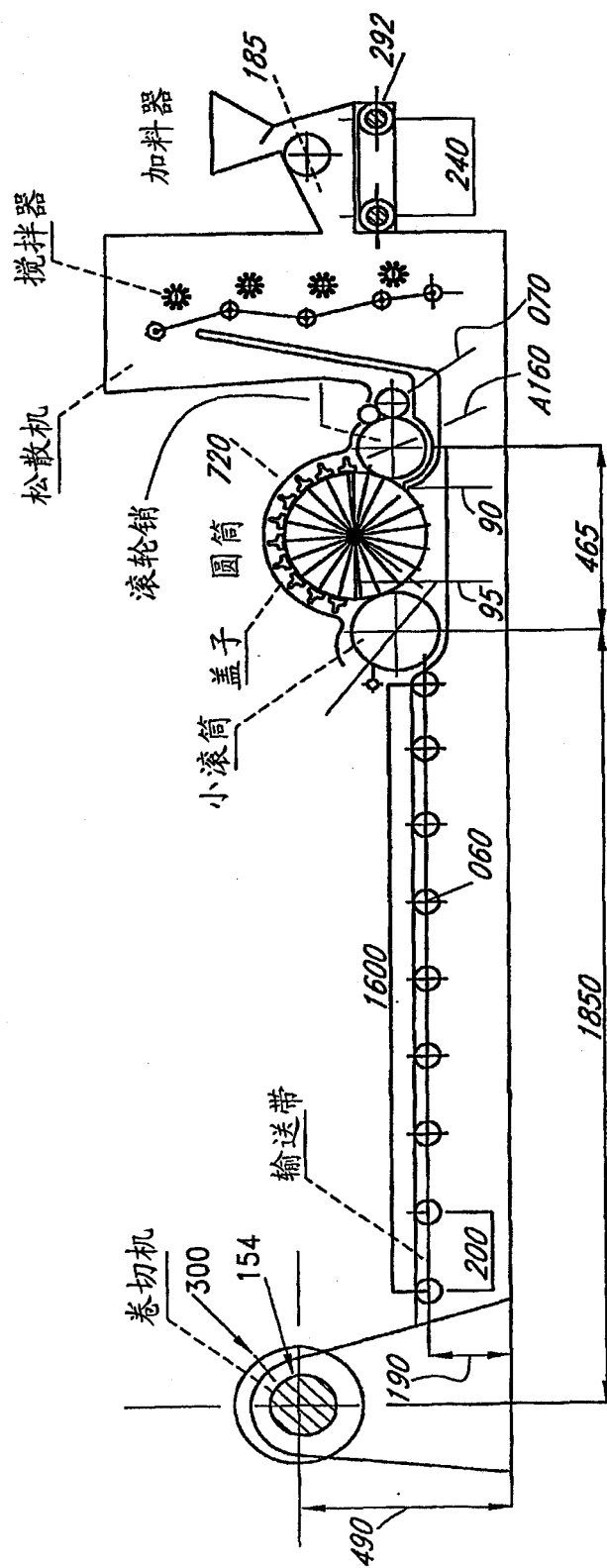


图 6

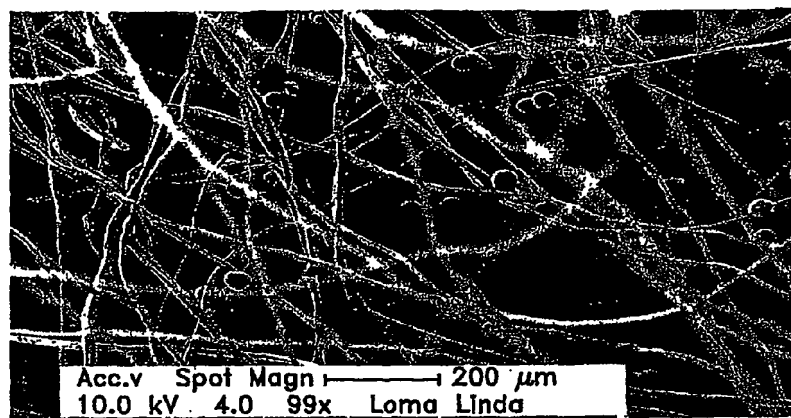


图 7

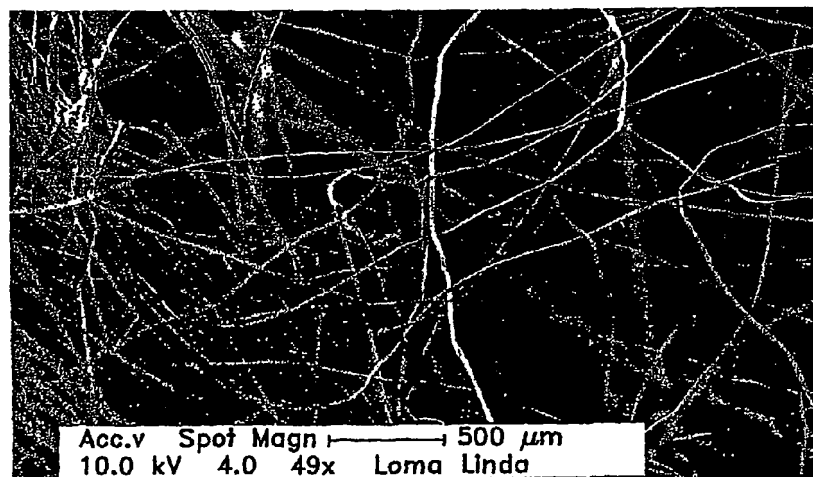


图 8

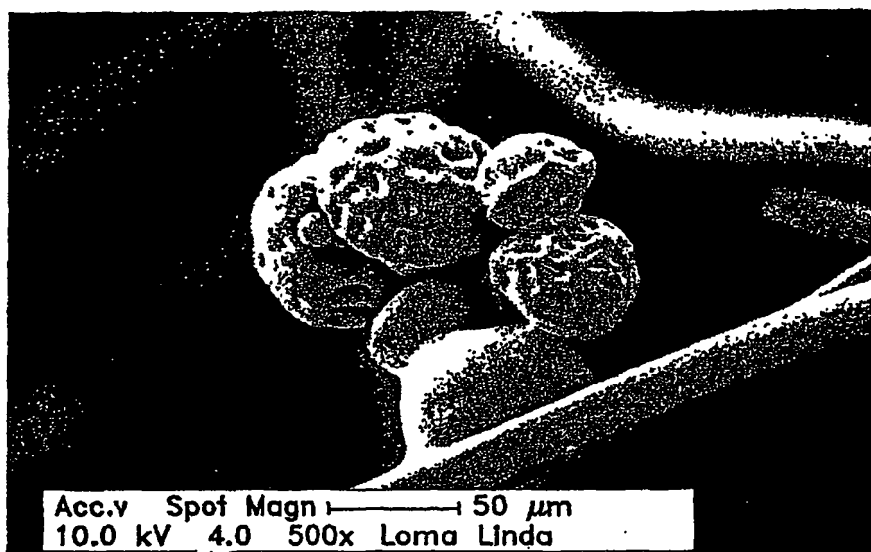


图 9A

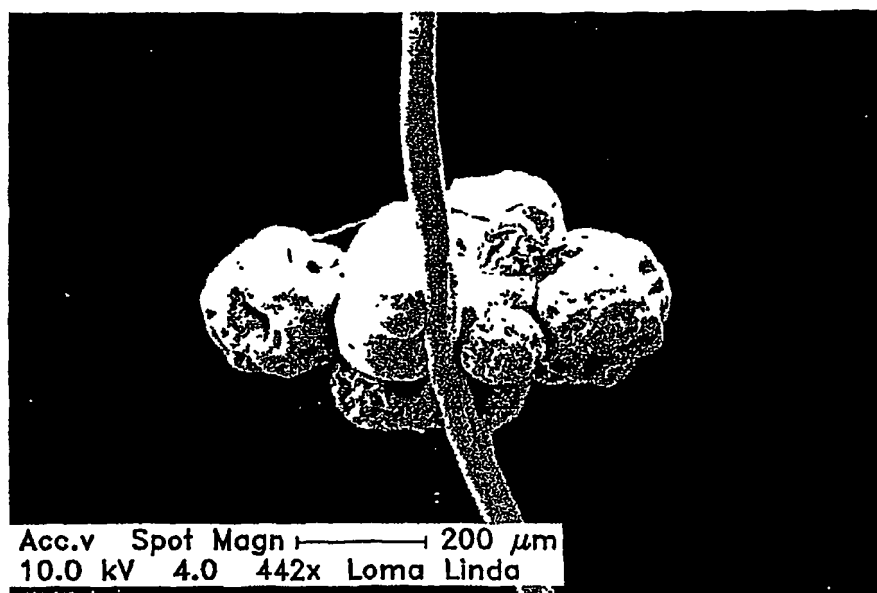


图 9B

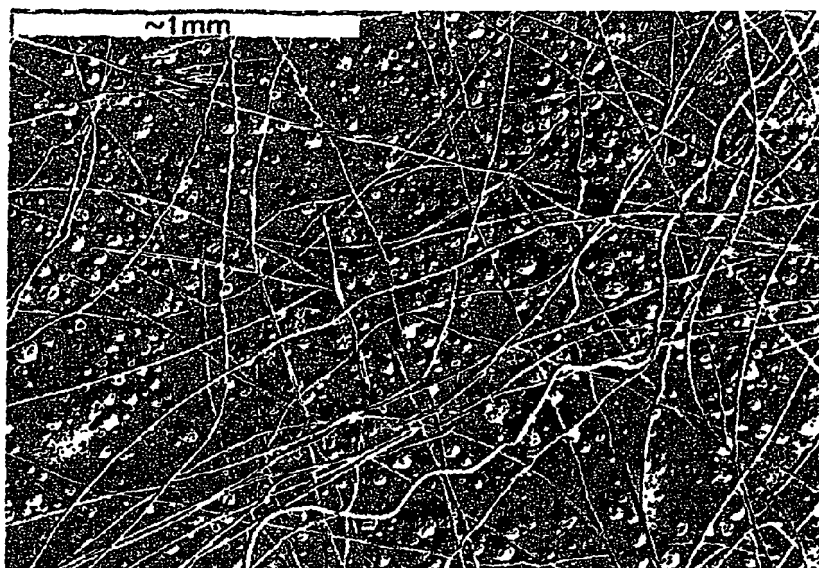


图 10A

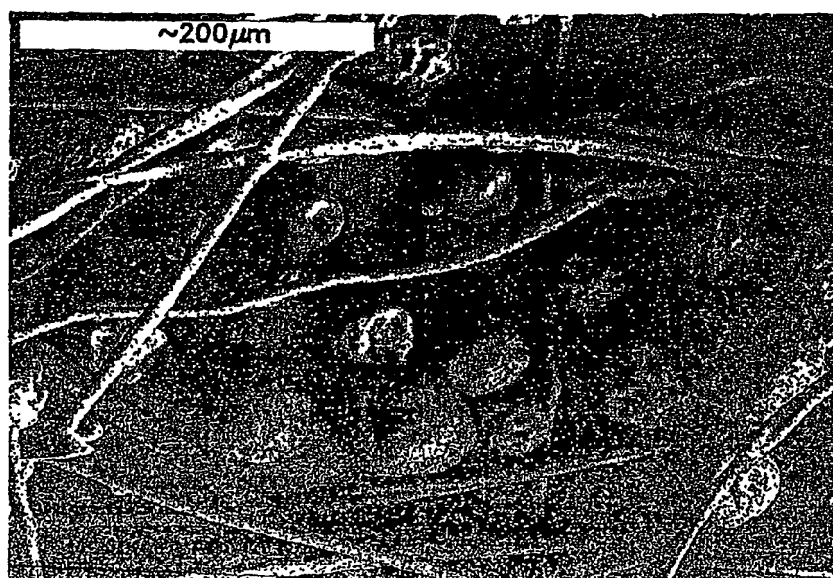


图 10B

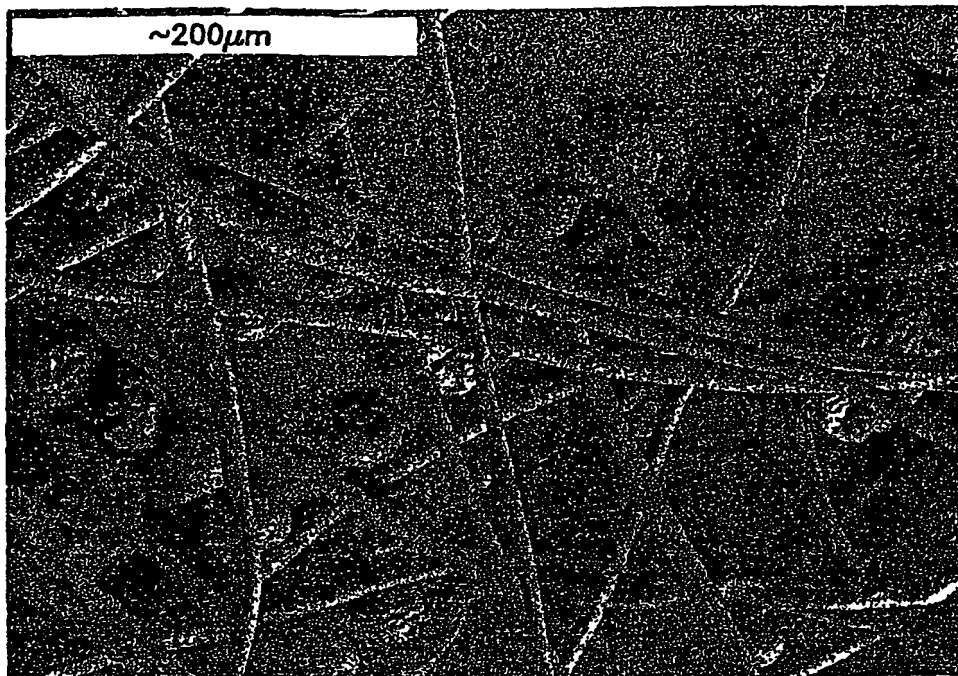


图 10C