



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104603155 B

(45) 授权公告日 2021.08.17

(21) 申请号 201380026792.3

(73) 专利权人 医疗行业产品有限公司

(22) 申请日 2013.03.25

地址 英国柴郡

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 J.格拉德曼 C.哈迪 A.霍格思

申请公布号 CN 104603155 A

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(43) 申请公布日 2015.05.06

代理人 张慧 彭昶

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

1205174.4 2012.03.23 GB

C08B 37/08 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C08L 5/08 (2006.01)

2014.11.21

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2005034865 A2, 2005.04.21

PCT/GB2013/050775 2013.03.25

WO 2006134614 A1, 2006.12.21

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 封志强

W02013/140190 EN 2013.09.26

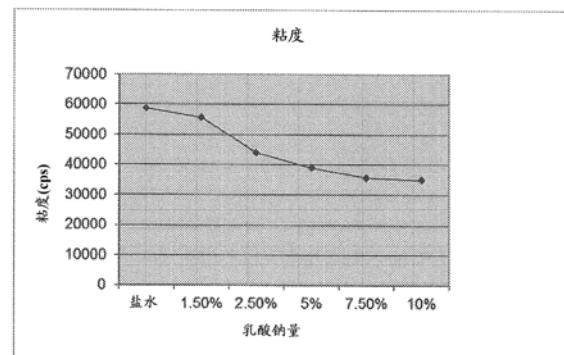
权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

制备低内毒素壳聚糖的方法

(57) 摘要

本发明涉及制备低内毒素碱性壳聚糖的方法,还涉及制备低内毒素中性壳聚糖、壳聚糖盐和壳聚糖衍生物的方法,并涉及这些方法的产物。所述方法包括使壳聚糖与碱性溶液接触,以形成混合物,并让混合物保持至少约12小时。可用低内毒素碱性壳聚糖制备其它有用的基于壳聚糖的产物。



1. 一种制备具有小于100EU/g的内毒素浓度的低内毒素碱性壳聚糖的方法,所述方法包括以下步骤:

- (a) 使壳聚糖与具有0.01M至0.2M的浓度的碱性溶液接触,以形成混合物;和
- (b) 让所述混合物在室温下保持至少12小时。

2. 如权利要求1所要求保护的方法,其中所述方法还包括干燥所述混合物的步骤(c),其中所述干燥步骤任选在烘箱中进行。

3. 如权利要求1所要求保护的方法,其中所述碱性溶液包含碱或碱土组分,所述碱或碱土组分选自单独或组合的以下组分:金属氢氧化物、金属碳酸盐、金属亚硫酸氢盐、金属过硅酸盐、共轭碱和氢氧化铵,其中所述金属任选自钠、钾、钙或镁。

4. 如权利要求3所要求保护的方法,其中所述碱组分选自氢氧化钠、氢氧化钾或碳酸钠。

5. 如权利要求1所要求保护的方法,其中将所述碱性溶液喷到所述壳聚糖上,或者使所述壳聚糖与所述碱性溶液混合。

6. 如权利要求1所要求保护的方法,其中在步骤(b)中使所述混合物保持至少48小时,和/或其中让所述混合物保留在洁净容器中和/或保持在惰性气氛下。

7. 如权利要求6所要求保护的方法,其中在步骤(b)中使所述混合物保持2至4星期。

8. 如权利要求1所要求保护的方法,其中所述混合物还包含任选自银离子、锌离子、氯己定或其组合的防腐剂。

9. 一种制备低内毒素中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物的方法,所述方法包括以下步骤:

- (a) 使壳聚糖与具有0.01M至0.2M的浓度的碱性溶液接触,以形成混合物;
- (b) 让所述混合物在室温下保持至少12小时;和
- (c') 使在步骤(b)中获得的碱性壳聚糖与酸接触。

10. 如权利要求9所要求保护的方法,其中步骤(c')在权利要求2至8中任一项所述的干燥步骤(c)之前进行,并且其中将所述酸任选喷到所述碱性壳聚糖上,或者使所述碱性壳聚糖与所述酸混合。

11. 如权利要求9至10中任一项所要求保护的方法,其中所述酸选自路易斯酸;单质子酸;双质子酸;多质子酸和核酸。

12. 如权利要求9至10中任一项所要求保护的方法,其中所述酸选自单独或组合的以下酸:任选自单独或组合的以下有机酸:乙酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、乙酰基水杨酸、葡萄糖酸和乳酸;羧酸;任选自单独或组合的以下脂肪酸:肉豆蔻脑酸、棕榈油酸、顺-6-十六碳烯酸、油酸、反油酸、11-十八碳烯酸、亚油酸、反亚油酸、 α -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、木蜡酸、蜡酸;任选自单独或组合的以下氨基酸:组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、牛磺酸;和任选自单独或组合的以下无机酸:盐酸、硫酸和硝酸。

13. 如权利要求9所要求保护的方法,其中所述酸具有1M的浓度。

14. 如权利要求9所要求保护的方法,其中所述酸作为包含所述酸和非溶剂的酸液存在,所述非溶剂任选自乳酸乙酯、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇、丙酮、乙醇:水的80:20混合

物或其混合物。

15. 如权利要求14所要求保护的方法,其中壳聚糖与酸液之比为5:1至1:5,和/或其中使所述碱性壳聚糖与所述酸混合5分钟。

16. 如权利要求9所要求保护的方法,所述方法还包括干燥反应产物的步骤,其中任选在烘箱中或使所述产物通过空气干燥器过滤进行所述干燥步骤。

制备低内毒素壳聚糖的方法

[0001] 本发明涉及制备低内毒素碱性壳聚糖的方法,还涉及制备低内毒素中性壳聚糖、壳聚糖盐和壳聚糖衍生物的方法,并涉及这些方法的产物。

[0002] 壳聚糖特别用于制备控制出血使用的止血材料。

[0003] 壳聚糖是来自甲壳类动物处理的固体废物衍生物,并且可从真菌培养物提取。壳聚糖是水不溶性阳离子聚合物质。在壳聚糖用于止血材料之前,通常首先转化成水溶性盐。以这种方式,壳聚糖盐在血液中可溶形成阻止血流的凝胶。

[0004] 由于壳聚糖在身体中容易分解,壳聚糖盐理想适用于本文所述应用。壳聚糖通过溶菌酶转化成葡糖胺,并因此自然从身体排泄。不必从身体去除壳聚糖。另外,壳聚糖盐显示温和的抗菌性质,因此,它们的使用减小感染风险。

[0005] 为了在适用于控制出血的止血材料制备中利用壳聚糖,有必要保证壳聚糖具有足够低的内毒素浓度。

[0006] 内毒素是格兰氏阴性菌的外膜表面上存在的脂多糖。内毒素对哺乳动物为高度毒性,特别是对人,且众所周知难以从材料去除。在释放进入血流或通常未发现它们的其它组织时,内毒素可变成热原性。因此,内毒素必须从药学上可接受的产物去除。

[0007] 处理去除或破坏热原,特别是内毒素,被称为“去热原”法。包含内毒素的材料去热原的技术包括离子交换色谱、超滤、蒸馏和针对破坏内毒素的各种化学方法。

[0008] WO2008063503涉及从壳聚糖去除内毒素的方法,所述方法包括以下步骤:

[0009] a) 在无菌环境中使用无菌无热原设备和材料;

[0010] b) 使包含内毒素的壳聚糖溶胀最多24小时;

[0011] c) 使1kg/25L至1.5kg/25L壳聚糖溶于0.01M至4.0M氢氧化物碱;

[0012] d) 连续搅拌所得壳聚糖碱溶液;

[0013] e) 在搅拌下,将溶液在60-100°C之间加热45分钟至4小时;

[0014] f) 用最多10x体积超纯无内毒素水冲洗溶液;

[0015] g) 将溶液中和到6.8和7.5之间的pH;

[0016] h) 形成超纯低内毒素壳聚糖浆料,并转移到无内毒素封闭系统;

[0017] i) 从浆料去除过量水。

[0018] 这是一个复杂且费用大的过程,尤其需要无菌设备,且需要用10x体积无内毒素的水冲洗溶液。

[0019] US2006293509涉及通过以下步骤制备具有低内毒素的水溶性壳聚糖的方法:

[0020] (a) 使水不溶性壳聚糖与碱性溶液接触大于1小时的第一时间段;

[0021] (b) 理想用无内毒素水冲洗水不溶性壳聚糖,以去除残余碱性溶液;

[0022] (c) 使水不溶性壳聚糖在包含相转移剂的反应溶液中部分乙酰化;

[0023] (d) 使部分乙酰化的水溶性壳聚糖溶于包含表面活性剂且具有约7.0至约7.4的pH的水溶液;

[0024] (e) 将水混溶性溶剂加入到水溶液,并进一步将水溶液的pH调节到至少8.0的pH,以使具有低内毒素含量的水溶性壳聚糖从水溶液/水混溶性溶剂混合物沉淀;和

[0025] (f) 任选在非溶剂中洗涤,例如,异丙醇。

[0026] 然而,这一过程复杂且花费大,并且合乎需要包括使用大量无内毒素的水或其它液体。此过程也需要使用相转移剂,并且经数小时进行。

[0027] TW593342涉及通过以下步骤减少壳聚糖中内毒素的方法:

[0028] (a) 使包含内毒素的壳聚糖溶于水溶液;

[0029] (b) 使水溶液与表面活性剂接触,以形成不溶性固体和内毒素含量减小的水溶液;

[0030] (c) 使用固体/液体分离装置从水溶液分离固体。

[0031] 然而,这一过程需要表面活性剂与溶解的壳聚糖反应产生不溶性固体。得到的固体为壳聚糖和表面活性剂的混合物或壳聚糖和表面活性剂之间的反应产物。

[0032] 本发明目的在于减轻前述困难。

[0033] 根据本发明的第一个方面,提供一种制备低内毒素碱性壳聚糖的方法,所述方法包括以下步骤:

[0034] (a) 使壳聚糖与碱性溶液接触,以形成混合物;和

[0035] (b) 让混合物保持至少约12小时。

[0036] 根据本发明的另一个方面,提供一种制备低内毒素碱性壳聚糖的方法,所述方法包括以下步骤:

[0037] (a) 使壳聚糖与碱性溶液接触,以形成混合物;

[0038] (b) 让混合物保持至少约12小时;和

[0039] (c) 干燥混合物。

[0040] 本发明的方法提供得到具有低内毒素浓度的碱性壳聚糖的有效方式。所述方法有利的是不需要洗涤步骤、冲洗步骤、使用表面活性剂或相转移剂、无菌设备和/或使用无内毒素的水。另外,也不需要专用空气过滤或无菌条件。本发明的方法优选不包括使壳聚糖乙酰化的步骤。

[0041] 本文所用术语“碱性溶液”是指具有大于pH 7.5的pH值的溶液。

[0042] 由于内毒素的分子量可显著不同,因此,内毒素浓度以内毒素单位(EU)/克材料测定。内毒素浓度的测定是内毒素水平相对于具体量参比内毒素的定量。

[0043] 例如,在本发明中,内毒素浓度以内毒素单位(EU)/克壳聚糖测定。本文所用术语“低内毒素”是指具有小于100内毒素单位(EU)/克壳聚糖的内毒素浓度。

[0044] 因此,本发明的方法适用于制备具有小于100EU/g内毒素浓度的碱性壳聚糖。

[0045] 优选所得碱性壳聚糖具有小于50EU/g的内毒素浓度,更优选小于20EU/g,甚至更优选小于15EU/g,最优选小于10EU/g。

[0046] 已发现,低浓度碱性溶液在本发明方法中优选。在所述方法中使用的碱性溶液的浓度可以为约0.01M至约1M。优选碱性溶液的浓度小于1M。优选碱性溶液的浓度为约0.02M至0.2M,甚至更优选碱性溶液的浓度为约0.04M至0.06M,一般0.05M。碱性溶液的浓度可以为约0.01M、0.05M、0.10M、0.15M、0.20M、0.25M、0.30M、0.35M、0.40M、0.45M、0.50M、0.55M、0.60M、0.65M、0.70M、0.75M、0.80M、0.85M、0.90M或0.95M。已利用0.1M碱性溶液的浓度观察到良好结果。

[0047] 在一些实施方案中,碱性溶液与壳聚糖的量可以为约1份壳聚糖比约10份碱性溶液至约10份壳聚糖比约1份碱性溶液。优选碱性溶液与壳聚糖的量为约1份碱性溶液比约2

份壳聚糖,更优选约1份碱性溶液比约1份壳聚糖。

[0048] 碱性溶液可包含碱或碱土金属(alkaline earth)组分,所述碱或碱土金属组分选自单独或组合的以下组分:金属氢氧化物、金属碳酸盐、金属亚硫酸氢盐、金属过硅酸盐(persilicate)、共轭碱和氢氧化铵。

[0049] 适合的金属包括钠、钾、钙或镁。

[0050] 优选碱组分为氢氧化钠、氢氧化钾或碳酸钠。一般使用氢氧化钠。

[0051] 可通过在本领域已知的任何适合方法使碱性溶液与壳聚糖接触。例如,可使碱性溶液喷到壳聚糖上,或者可使壳聚糖与碱性溶液混合。优选碱接触的壳聚糖均匀分布。

[0052] 优选使壳聚糖与碱性溶液混合。在低分子量,壳聚糖可完全或部分溶于碱性溶液。可使壳聚糖与碱性溶液混合最多约30分钟,更优选约10分钟。在一些实施方案中,可使壳聚糖与碱性溶液混合大于30分钟。在一些实施方案中,可将壳聚糖和碱性溶液的混合物间歇搅拌步骤(b)的持续时间。

[0053] 将壳聚糖和碱性溶液的混合物保持一段其中内毒素被碱破坏的时间。将壳聚糖和碱性溶液的混合物保持至少约12小时。已发现,壳聚糖和碱性溶液的混合物保持的时间越长,得到的碱性壳聚糖的内毒素浓度越低。在混合物已保持约12小时时,已观察到适合的低内毒素浓度。本发明方法的另一个优势是,可保持混合物,而不需要不断混合壳聚糖与碱性溶液。

[0054] 在一些实施方案中,混合物可保持至少约13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72小时。

[0055] 优选保持混合物至少48小时。

[0056] 在一些实施方案中,混合物可保持至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70天或更长时间。

[0057] 在一些实施方案中,混合物保持约2至4星期(或14至30天)或更长时间。优选混合物保持24小时和70天之间,更优选7天和35天之间,最优选14天和21天之间。

[0058] 通过使壳聚糖与0.1M氢氧化钠溶液接触,并保持混合物约12至16天,优选约14天,已观察到良好结果。

[0059] 可在室温和室内压力保持混合物。室温和室内压力是指约20-25°C温度和约1大气压(atm)压力。有利的是,所述混合物不需要保持在无菌环境。

[0060] 优选混合物在洁净容器中储存。混合物可在惰性气氛下储存。

[0061] 混合物可进一步包含防腐剂。有利的是,防腐剂可消除例如混合物长期保持时可能发生的微生物生长的风险。防腐剂可以为任何生物相容性且适用于碱性环境的防腐剂。适合的防腐剂包括银离子、锌离子、氯己定(chlorohexidine)或其组合。

[0062] 本发明的方法可包括或可不包括干燥步骤。可通过在本领域已知的任何常规干燥方法进行干燥步骤。优选在烘箱中或通过空气干燥器过滤进行干燥步骤。同样,干燥步骤不需要专用无菌设备。

[0063] 已发现,一旦混合物已在干燥步骤干燥,混合物的内毒素水平就不再显著增加。这

对进一步处理混合物是有利的。

[0064] 因此,本发明提供具有小于100EU/g内毒素浓度的低内毒素碱性壳聚糖。低内毒素碱性壳聚糖可以为水不溶性。在低分子量,低内毒素碱性壳聚糖可显示一些水溶性。

[0065] 根据本发明的另一个方面,提供一种可由本文所述方法得到的低内毒素碱性壳聚糖。

[0066] 根据本发明的另一个方面,提供一种具有小于100EU/g内毒素浓度的碱性壳聚糖。

[0067] 碱性壳聚糖优选具有小于50EU/g的内毒素浓度,更优选小于20EU/g,甚至更优选小于15EU/g,最优选小于10EU/g。

[0068] 可用低内毒素碱性壳聚糖制备其它壳聚糖产物,例如衍生物或共聚物,或制备低分子量壳聚糖或壳聚糖低聚糖。低内毒素碱性壳聚糖也可作为原料用于制备其它形式的壳聚糖或衍生物或共聚物,例如基于壳聚糖的纤维、织物、涂料、薄膜、凝胶、溶液、片或泡沫。

[0069] 具体地讲,低内毒素碱性壳聚糖可用于制备具有低内毒素浓度的其它有用的壳聚糖产物,包括中性壳聚糖和壳聚糖盐和其它壳聚糖衍生物,例如羧甲基壳聚糖、羟乙基壳聚糖、酰基壳聚糖、烷基壳聚糖、磺酰基壳聚糖、磷酸化壳聚糖、烷叉基壳聚糖、金属螯合物、氯化壳聚糖、乳酸壳聚糖、乙酸壳聚糖、苹果酸壳聚糖、葡萄糖酸壳聚糖。

[0070] 因此,根据本发明的另一个方面,提供一种制备低内毒素中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物的方法,所述方法包括使通过本文所述方法制备的碱性壳聚糖与酸接触的步骤。

[0071] 这种方法可提供具有低浓度内毒素的医用中性壳聚糖、壳聚糖盐或其它壳聚糖衍生物。

[0072] 在本发明第一方面的方法中,使碱性壳聚糖与酸接触的步骤可在干燥步骤之前进行。

[0073] 可通过在本领域已知的任何适合方法使酸与碱性壳聚糖接触。例如,可使酸喷到碱性壳聚糖上,或者可使碱性壳聚糖与酸混合。

[0074] 优选使碱性壳聚糖与酸混合。

[0075] 在本文中,中性壳聚糖是指具有约6.5和约7.5之间pH值的壳聚糖,优选约7。

[0076] 因此,为了制备中性壳聚糖,可使碱性壳聚糖与适合体积和浓度的酸混合,以生成具有6.5和7.5之间pH的中性溶液。中和碱性壳聚糖所需酸的体积和/或浓度将取决于碱性壳聚糖的pH。

[0077] 或者,为了制备壳聚糖盐或壳聚糖衍生物,可使碱性壳聚糖与超过提供中性壳聚糖所需的体积和浓度的酸混合。

[0078] 用于本发明的适合的酸可选自单独或组合的以下酸:有机酸、羧酸、脂肪酸、氨基酸、路易斯酸、单质子酸、双质子酸、多质子酸、核酸和无机酸。

[0079] 适合的有机酸可选自单独或组合的以下有机酸:乙酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、乙酰基水杨酸、葡萄糖酸和乳酸。

[0080] 适合的脂肪酸可选自单独或组合的以下脂肪酸:肉豆蔻脑酸、棕榈油酸(palmitoleic acid)、顺-6-十六碳烯酸(sapienic acid)、油酸、反油酸、11-十八碳烯酸、亚油酸、反亚油酸(linoelaidic acid)、 α -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、木蜡酸、蜡酸。

[0081] 适合的氨基酸可选自单独或组合的以下氨基酸：组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、牛磺酸。

[0082] 适合的无机酸可选自单独或组合的以下无机酸：盐酸、硫酸和硝酸。优选选择用于中和的酸为盐酸。

[0083] 酸可具有约0.001M酸至最高可能酸浓度的浓度。例如，用于硫酸的一般最高浓度为约98%硫酸。酸可具有约0.01M至5M、0.01M至3M或0.1M至2M的浓度。优选酸具有约1M浓度。酸的浓度可以为约0.01M、0.05M、0.10M、0.15M、0.20M、0.25M、0.30M、0.35M、0.40M、0.45M、0.50M、0.55M、0.60M、0.65M、0.70M、0.75M、0.80M、0.85M、0.90M、0.95M或1.0M。

[0084] 酸可作为包含酸和非溶剂的酸液存在。非溶剂可以为任何其中壳聚糖不溶的溶剂。一般非溶剂包括乳酸乙酯、乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙醇、丙酮或其混合物。优选非溶剂包括乙酸乙酯或乙醇。更优选非溶剂包括80:20乙醇/水。已有利地观察到，使用包含80:20乙醇与水的混合物的非溶剂，反应以较快的速率进行。

[0085] 壳聚糖与酸液之比可以为约5:1至约1:5。壳聚糖与酸液之比优选为约2:1。

[0086] 在一些实施方案中，可使低内毒素碱性壳聚糖与酸混合约5分钟。然后使反应在混合物干燥时发生。

[0087] 从碱性壳聚糖与酸的混合物得到的溶液可包含酸式盐。优选选择碱性溶液和酸，以保证生成的酸式盐为生物相容性的。例如，碱性溶液可包含氢氧化钠，酸可包括盐酸。在此实例中，酸式盐为生物相容的盐氯化钠。

[0088] 酸式盐作为碱性壳聚糖和酸之间反应的副产物生成。

[0089] 产物中存在酸式盐可影响所得壳聚糖产物的有效性。例如，壳聚糖在盐水溶液中比在水中更小程度的胶凝，在双倍浓度盐水溶液中胶凝的程度甚至更小。本文提到的双倍浓度的盐水溶液考虑为具有1.8%氯化钠量。因此，合乎需要在所得壳聚糖产物中具有尽可能低的酸式盐量，理想的是，对壳聚糖产物的有效性产生很小或基本上不产生差异的酸式盐的水平。

[0090] 已意外地发现，使用约0.01M至约0.1M浓度的碱性溶液产生所需低内毒素浓度，同时也在随后过程产生较少酸式盐副产物，以得到中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物。有利的是，较少酸式盐副产物意味着相对于包含较高量酸式盐的产物，所得壳聚糖产物在使用中将具有改善的胶凝。本发明的方法可提供具有适合低量酸式盐的壳聚糖产物，而不需要洗涤或冲洗壳聚糖产物。这也有不需要在洗涤或冲洗步骤中使用无内毒素水的额外优势。

[0091] 也已发现，在制备中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物时，使用本文所述低浓度碱性溶液使壳聚糖粘度减小很少。低浓度碱是指约0.01M至约1M，优选小于1M，更优选约0.02M至约0.2M。在一些实施方案中，碱浓度可以为0.05M。在一些实施方案中，碱浓度可如上所述。因此，有利的是，在所述方法中使用低浓度碱性溶液很少破坏壳聚糖。因此，可从壳聚糖去除内毒素，同时只产生最小粘度变化。合乎需要在过程中壳聚糖粘度减小约25%，优选小于约15%，更优选小于约10%。

[0092] 在所述方法提供低内毒素中性壳聚糖时，产物适合作为原料制备其它基于壳聚糖的产物。一种具体用途是制备壳聚糖盐，其吸收性质使它们理想的用于控制出血使用的止血制剂。优选壳聚糖盐为水溶性的。

[0093] 因此,在本发明的另一个实施方案中,通过使由本文所述方法制备的低内毒素中性壳聚糖与酸接触,可制备低内毒素壳聚糖盐。

[0094] 酸可以为适用于提供所需壳聚糖盐的任何酸。例如,如果需要乙酸壳聚糖,可使用乙酸,如果需要琥珀酸壳聚糖,可使用琥珀酸等。可在本发明方法中用本文所述的任何酸制备低内毒素壳聚糖盐。

[0095] 用于制备低内毒素壳聚糖盐或壳聚糖衍生物的方法可还包括干燥低内毒素中性壳聚糖和酸的混合物的步骤。可通过在本领域已知的任何常规干燥方法进行干燥步骤。优选在烘箱中或使产物通过空气干燥器过滤进行干燥步骤。

[0096] 因此,本发明提供具有小于100EU/g内毒素浓度的低内毒素中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物。

[0097] 低内毒素中性壳聚糖可以为水不溶性的。

[0098] 低内毒素壳聚糖盐可以为水溶性的。

[0099] 根据本发明的另一个方面,提供可由本文所述任何方法得到的低内毒素中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物。

[0100] 根据本发明的另一个方面,提供具有小于100EU/g内毒素浓度的中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物。

[0101] 中性壳聚糖、壳聚糖盐或壳聚糖衍生物优选具有小于50EU/g的内毒素浓度,更优选小于20EU/g,甚至更优选小于15EU/g,最优选小于10EU/g。

[0102] 本发明的低内毒素壳聚糖盐适合用作止血剂,用于阻止血流。

[0103] 因此,根据本发明的另一个方面,提供用作止血剂阻止血流的本文所述低内毒素壳聚糖盐。

[0104] 本发明的低内毒素壳聚糖盐可加入到创伤敷料中,用于表面无危急生命的出血或危急生命的出血。

[0105] 因此,根据本发明的另一个方面,提供用于表面无危急生命的出血或危急生命的出血所用创伤敷料的本文所述低内毒素壳聚糖盐。

[0106] 本发明的低内毒素壳聚糖盐适用于制备阻止血流所用的止血创伤敷料。根据本发明的另一个方面,提供包含本文所述低内毒素壳聚糖盐的止血创伤敷料。

[0107] 根据本发明的另一个方面,提供包含本文所述低内毒素壳聚糖盐的止血材料。

[0108] 止血材料和/或壳聚糖盐可以为任何适合形式,例如微粒、粉末、粒状、薄片、纤维、凝胶、泡沫、片、薄膜或液体形式。

[0109] 根据本发明的另一个方面,提供一种阻止血流的方法,所述方法包括以下步骤:任选在可能的情况下,清洁创伤区域;向所述创伤区域施用包含本文所述低内毒素壳聚糖盐的止血创伤敷料;并对创伤区域施加恒压,直至形成凝胶块凝物。

[0110] 优选对创伤区域施加恒压约3分钟或更长。

[0111] 现在,在以下非限制性实施例中,参考附图,进一步描述本发明的实施方案,其中:

[0112] 图1为显示在不同介质中,不同浓度酸式盐副产物对壳聚糖产物粘度的影响的图;

[0113] 图2为显示用酸处理对壳聚糖聚合物粘度的影响的图;

[0114] 图3为显示在本发明的两种不同止血材料中,盐水渗透的图;

[0115] 图4为显示本发明的两种不同止血材料的血液凝固的时间的图;

[0116] 图5为显示本发明的两种不同止血材料的腹上部切割试验的止血百分数的图。

[0117] 内毒素试验

[0118] 1. 如USP关于壳聚糖内毒素试验所述,配制USP(美国药典)提取溶液(4.6ml 1M HCl和45.4ml无内毒素水);

[0119] 2. 通过0.1g试验壳聚糖产物加到9.9ml USP提取溶液提取,并在37℃保持48小时;

[0120] 3. 48小时后,在0.9ml无内毒素水中稀释100μl提取物;并且

[0121] 4. 在Charles River提供的100μl内毒素特异性(ES)缓冲液中混合100μl以上物质。

[0122] 用利用FDA许可一次性柱的Endosafe® -PTS™手持式分光光度计测试所得提取物。提取过程使用2000x稀释和10EU/g最低试验检测限。

实施例

[0123] 实施例1:

[0124] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与50g 1M NaOH混合30分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑48小时。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0125] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0126] 干燥处理的碱性壳聚糖:10.6EU/g

[0127] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0128] 实施例2:

[0129] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与50g 0.5M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑72小时。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0130] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0131] 干燥处理的碱性壳聚糖:38.3EU/g

[0132] 实施例3:

[0133] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与50g 0.2M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑7天。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0134] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0135] 干燥处理的碱性壳聚糖:27.9EU/g

[0136] 实施例4:

[0137] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与50g 0.1M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑14天。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0138] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0139] 干燥处理的碱性壳聚糖:12.7EU/g

[0140] 实施例5:

[0141] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与100g 0.2M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑2天。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0142] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0143] 干燥处理的碱性壳聚糖:35.7EU/g

[0144] 实施例6:

[0145] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与100g 0.1M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑2天。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0146] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0147] 干燥处理的碱性壳聚糖:49.3EU/g

[0148] 实施例7:

[0149] 使50g壳聚糖粉末(Cognis, 德国)与50g 0.1M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑7天。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0150] 原料壳聚糖初始内毒素:45.3EU/g

[0151] 干燥处理的碱性壳聚糖:<10EU/g

[0152] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0153] 实施例8:

[0154] 使50g壳聚糖粉末(Cognis, 德国)与50g 0.05M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑7天。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0155] 原料壳聚糖初始内毒素:45.3EU/g

[0156] 干燥处理的碱性壳聚糖:<10EU/g

[0157] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0158] 实施例9:

[0159] 使50g壳聚糖粉末(Cognis, 德国)与50g 0.025M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑7天。然后在烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0160] 原料壳聚糖初始内毒素:45.3EU/g

[0161] 干燥处理的碱性壳聚糖:<13.5EU/g

[0162] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0163] 此过程也可按比例扩大,并用于制备较大批量。实施例10和11在医疗器械制造中常用的100,000级洁净室(US FED STD 209E洁净室标准)中制备。

[0164] 实施例10:

[0165] 使3.5kg壳聚糖粉末(Primex Iceland)与3.5kg 0.1M NaOH混合30分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑14天。然后在40℃由通过空气干燥器过滤进行干燥。

[0166] 原料壳聚糖初始内毒素:288EU/g

[0167] 干燥处理的碱性壳聚糖:10.2EU/g

[0168] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0169] 实施例11:

[0170] 使3.5kg壳聚糖(Primex Iceland)粉末与3.5kg 1M NaOH混合30分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑24小时。然后在40℃由通过空气干燥器过滤进行干燥。

[0171] 原料壳聚糖初始内毒素:288EU/g

[0172] 干燥处理的碱性壳聚糖:15.3EU/g

[0173] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0174] 此过程可用于不同物理形式的壳聚糖上,例如壳聚糖纤维或壳聚糖织物。

[0175] 实施例12:

[0176] 使10g壳聚糖纤维(1.8dtex x 28mm)与10g 0.1M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖纤维2天。然后在实验室烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0177] 原料壳聚糖纤维初始内毒素:88EU/g

[0178] 干燥处理的碱性壳聚糖纤维:<10EU/g

[0179] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0180] 实施例13:

[0181] 使5g壳聚糖非织造织物(60gsm)与5g 0.1M NaOH混合10分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖织物2天。然后在实验室烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0182] 原料壳聚糖织物初始内毒素:401EU/g

[0183] 干燥处理的碱性壳聚糖织物:<78EU/g

[0184] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0185] 以下实施例14和15利用与氢氧化钠不同的碱。

[0186] 实施例14:

[0187] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与50g 0.2M KOH(氢氧化钾)混合30分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑7天。然后在实验室烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0188] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0189] 干燥处理的碱性壳聚糖:14.4EU/g

[0190] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0191] 实施例15:

[0192] 使50g壳聚糖(Primex Iceland)与50g 0.5M碳酸钠混合30分钟。在室温保持所得湿碱性壳聚糖碎屑7天。然后在实验室烘箱中在盘上在40℃干燥。

[0193] 原料壳聚糖初始内毒素:383EU/g

[0194] 干燥处理的碱性壳聚糖:25.8EU/g

[0195] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g。

[0196] 实施例1-15均涉及制备低内毒素碱性壳聚糖。这种低内毒素碱性壳聚糖随后可作为原料用于制备其它基于壳聚糖的产物。例如,通过加入与碱反应产生生物相容盐的低水平的适合酸,可将碱性壳聚糖中和到pH 7,以生成中性壳聚糖。例如,如果在碱性溶液中使用氢氧化钠,则可通过加入盐酸中和。产物将包含低量残余氯化钠。

[0197] 实施例16:

[0198] 将来自实施例4的20g湿碱性壳聚糖碎屑称入烧杯。这包含10g壳聚糖和10g 0.1M NaOH。为了中和NaOH,需要1g 1M HCl。将此在单独的烧杯中与9g乙醇混合。然后使酸液混入湿碱性壳聚糖碎屑,并搅拌5分钟。然后将所得混合物在实验室烘箱中在40℃干燥。它包含0.29%氯化钠。

[0199] 实施例17:

[0200] 将来自实施例4的20g湿碱性壳聚糖碎屑称入烧杯。这包含10g壳聚糖和10g 0.1M NaOH。为了中和NaOH,需要1g 1M乙酸。将此在单独的烧杯中与9g乙醇混合。然后使酸液混入湿碱性壳聚糖碎屑,并搅拌5分钟。然后将所得混合物在实验室烘箱中在40℃干燥。它包含0.5%乙酸钠。

[0201] 也可用在实施例1-15中生成的低内毒素碱性壳聚糖制备低内毒素水溶性壳聚糖

盐或其它壳聚糖衍生物。有利的是,这可不需要无菌环境、不使用大量花费大的无内毒素水和不需要冲洗或洗涤达到。例如,可使低内毒素碱性壳聚糖与更大水平的适合酸反应。小部分酸将与碱反应产生生物相容盐。

[0202] 实施例18:

[0203] 在100,000级洁净室中,将来自实施例10的3.1kg经干燥低内毒素碱性壳聚糖称入不锈钢混合器。使3.6kg乳酸与0.9kg无内毒素水预混。将此喷到壳聚糖上,同时运行混合器。在40℃由通过空气干燥器过滤干燥所得材料。

[0204] 发现材料为完全水溶性的。

[0205] 原料壳聚糖初始内毒素:288EU/g

[0206] 干燥处理的碱性壳聚糖:10.2EU/g(实施例10)

[0207] 干燥水溶性壳聚糖:13.8EU/g

[0208] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0209] 实施例19:

[0210] 在100,000级洁净室中,将来自实施例11的3.1kg经干燥低内毒素碱性壳聚糖称入不锈钢混合器。使3.9kg乳酸与0.9kg无内毒素水预混。将此喷到壳聚糖上,同时运行混合器。在40℃由通过空气干燥器过滤干燥所得材料。

[0211] 发现材料为完全水溶性的。

[0212] 原料壳聚糖初始内毒素:288EU/g

[0213] 干燥处理的碱性壳聚糖:15.3EU/g(实施例4)

[0214] 干燥水溶性壳聚糖:14.6EU/g

[0215] 对照(0.1g在提取过程中使用的无内毒素水代替壳聚糖):<10EU/g

[0216] 在另一个实施例中,也可用低内毒素碱性壳聚糖作为原料制备低内毒素壳聚糖衍生物,例如羧甲基壳聚糖。

[0217] 实施例20:

[0218] 将来自实施例1的20g湿碱性壳聚糖碎屑称入烧杯。这包含10g壳聚糖和10g 1M NaOH。在单独的烧杯中,制备5g氯乙酸钠和5g水及10g乙醇的混合物。然后将混合液体搅入湿碱性壳聚糖碎屑。然后使其温度升高到60℃,保持4小时。在实验室烘箱中在40℃干燥之前,用10g乙醇洗涤所得混合物3次,以去除任何残余氯乙酸钠。

[0219] 酸式盐对粘度的影响:

[0220] 使低内毒素碱性壳聚糖与酸反应以产生中性pH壳聚糖或壳聚糖盐,产生酸式盐副产物。存在这种副产物可影响壳聚糖产物的性能。例如,副产物的水平可影响盐水中壳聚糖产物的粘度。

[0221] 参考图1,其中显示乳酸钠以不同浓度加到盐水的结果和这对2g目前市售壳聚糖产物CELOX®样品在20g不同介质的溶液中3分钟后的粘度产生的影响。

[0222] 基础介质为来自体液的盐水,向其中加入不同水平的乳酸钠。乳酸钠代表氢氧化钠和乳酸之间反应的副产物。

[0223] 结果显示于表1和图1中。

[0224] 表1

浓度	粘度			
	试验 1	试验 2	试验 3	平均
[0225] 盐水	55000	62000	59000	58667
	1.5%	54000	52000	55667
	2.5%	50000	43000	44000
	5.0%	35000	51000	39000
	7.5%	35000	34000	38000
	10.0%	37000	32000	35000

[0226] 从图1清楚地看到,随着加入的盐水平增加,介质中CELOX®的粘度下降。因此,有利的导致本发明的壳聚糖产物只有低水平残余盐副产物。

[0227] 低浓度碱性溶液对粘度的作用:

[0228] 测试实施例10中制备的低内毒素碱性壳聚糖,以证明用酸处理对壳聚糖聚合物粘度的作用,粘度被认为是分子量的量度。试验按照以下方法步骤:

- [0229] a) 称出5g在实施例10中制备的低内毒素碱性壳聚糖颗粒;
- [0230] b) 将4.95g乙酸称入600ml烧杯;
- [0231] c) 将490.05g去离子水加到烧杯,以配制495g 1%乙酸溶液;
- [0232] d) 将烧杯放在搅拌器盘上,并开动搅拌(随溶液粘度增加而增加);
- [0233] e) 将壳聚糖颗粒加到乙酸溶液;
- [0234] f) 经常查看溶液,直至所有颗粒已溶解,并且随着溶液粘度增加提高搅拌水平,如果需要;
- [0235] g) 从壳聚糖颗粒引入乙酸溶液时测量,保持溶液总共24小时;
- [0236] h) 将转子64连接到Brookfield粘度计
- [0237] i) 将转子设定到10rpm;
- [0238] j) 将转子插入溶液到转子上的标记,开动粘度计,并使其稳定;
- [0239] k) 在选择的时间间隔记录粘度(cPs)。
- [0240] 上述粘度试验的结果显示于以下表2和图2中。对于每一批,在各时间间隔对三个读数取平均。
- [0241] 表2

	粘度(cPs)						
	批 1(经洗涤)		批 2(经洗涤)		批 3(经洗涤)		
星期	平均	STD	平均	STD	平均	STD	
[0242]	0	419.9	0.0	399.9	34.6	419.9	34.6
	1	379.9	34.6	379.9	34.6	419.9	0.0
	2	399.9	34.6	419.9	0.0	359.9	0.0
	4	239.9	0.0	239.9	0.0	239.9	0.0
	8	180.0	0.0	180.0	0.0	219.9	34.6
	12	166.7	5.8	110.0	0.0	170.0	0.0
	16	110.0	0.0	96.7	5.8	123.3	5.8
	24	120.0	0.0	100.0	34.6	190.0	34.6

[0243] 可从图2中所示的粘度测量值推断,用0.1M氢氧化钠溶液制备的低内毒素碱性壳聚糖聚合物的分子量稳定数星期。

[0244] 降低碱性溶液浓度的作用

[0245] 在三个试验中测试在本发明的方法中使用较低浓度碱性溶液的作用,集中在(1)盐水进入试验样品的渗透性百分数;(2)血液凝固的时间;和(3)上腹部切割体内模型的止血百分数。

[0246] 参考图3,其中显示渗透性测试的结果。

[0247] 一般试验方法如下:将5ml蒸馏水加到试管。将1滴红色食品染料加到水。将3g样品止血粉末轻轻地倒在水面上,以便形成层。1分钟后,测量水进入止血粉末移动的距离,作为渗透百分数记录。

[0248] 可在图3看到,与用0.1M氢氧化钠制备的止血粉末比较,用1.0M氢氧化钠制备的止血粉末随时间不太稳定,盐水溶液增加渗入到颗粒表明,血液有更多机会通过颗粒,而不形成凝胶塞。

[0249] 参考图4,其中显示血液凝固测试的结果。

[0250] 一般试验方法如下:将0.75g样品止血粉末加到试管,向其中加入5ml肝素化兔血。然后将试管倒置,记录血液完全凝固成凝胶块所用的时间。

[0251] 可在图4看到,用1.0M氢氧化钠制备的止血粉末比用0.1M氢氧化钠制备的止血粉末花更长时间使血液凝固。时间大约为3倍长,这涉及较低的止血性质(数据已显示,大于180秒的时间段在低压、中等体积体内出血模型中不导致100%止血)。

[0252] 参考图5,其中显示止血测试的结果。

[0253] 一般试验方法如下:在猪模型(非肝素化)的上腹部动脉切3-5cm。施用颗粒状止血材料,并加压1分钟。如果发生再出血,则另外加压1分钟。

[0254] 可在图5看到,与用0.1M氢氧化钠制备的止血颗粒的100%比较,用1.0M氢氧化钠制备的止血颗粒得到60%试验止血。

[0255] 试验结果显示,在制备本发明的止血材料中使用的碱性溶液浓度越低,材料的渗

透性、血液凝固和止血表现得越好。

[0256] 当然，应了解，本发明无意限于上述实施例，这些实施例只作为实例进行描述。

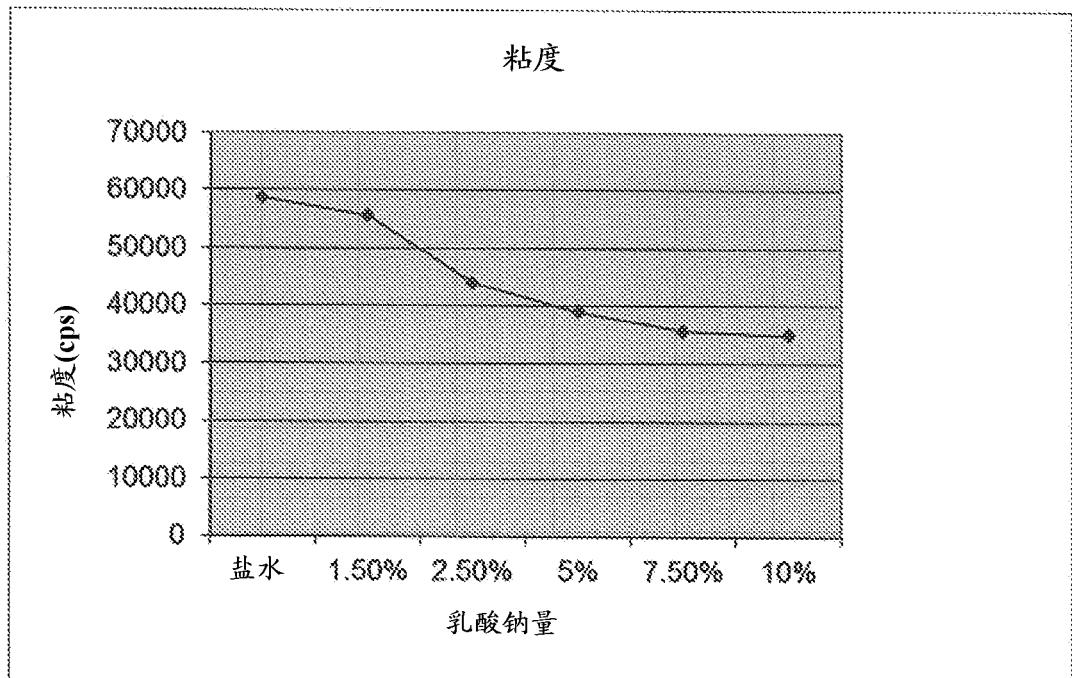


图 1

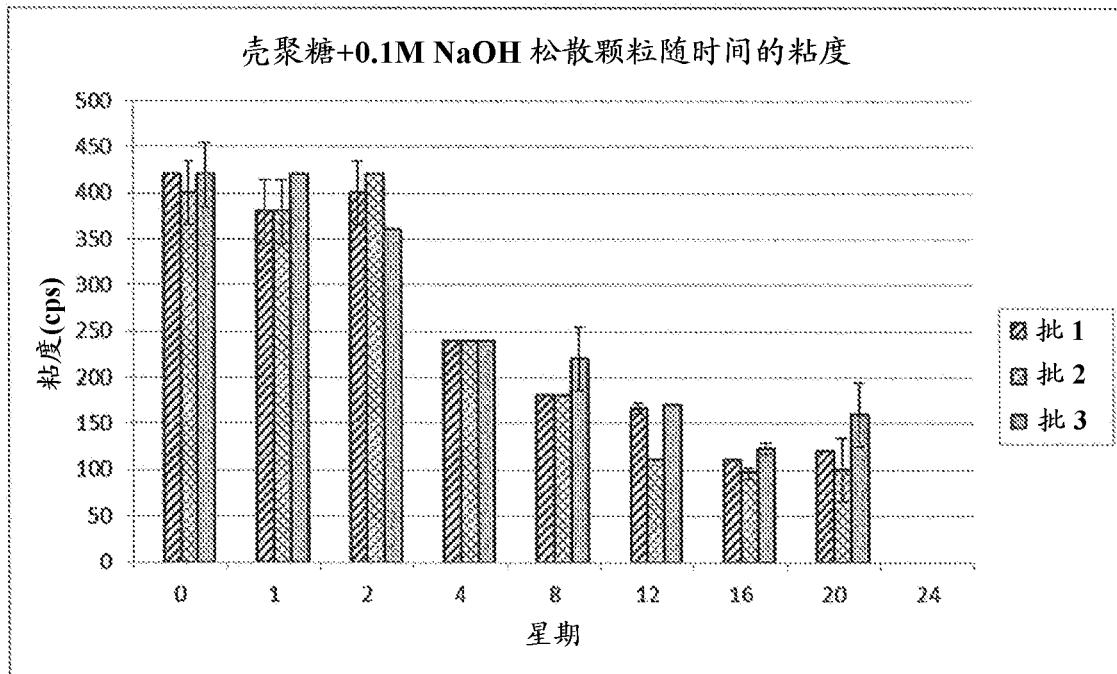


图 2

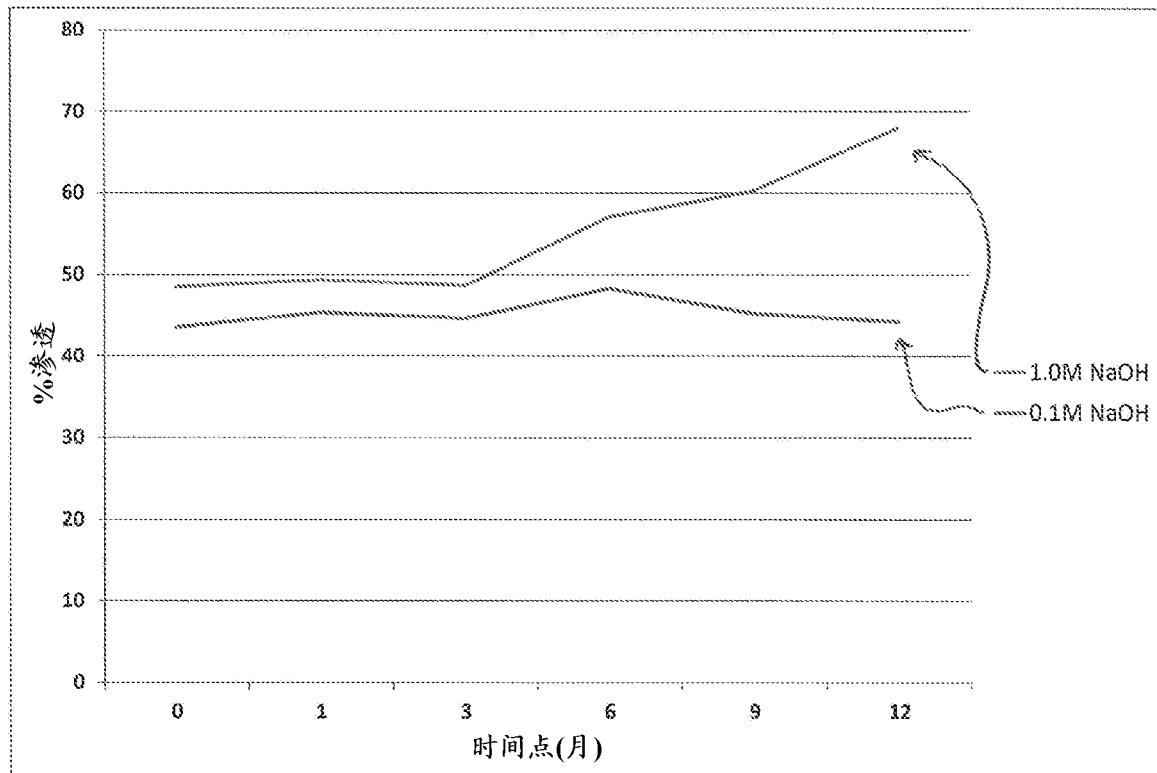


图 3

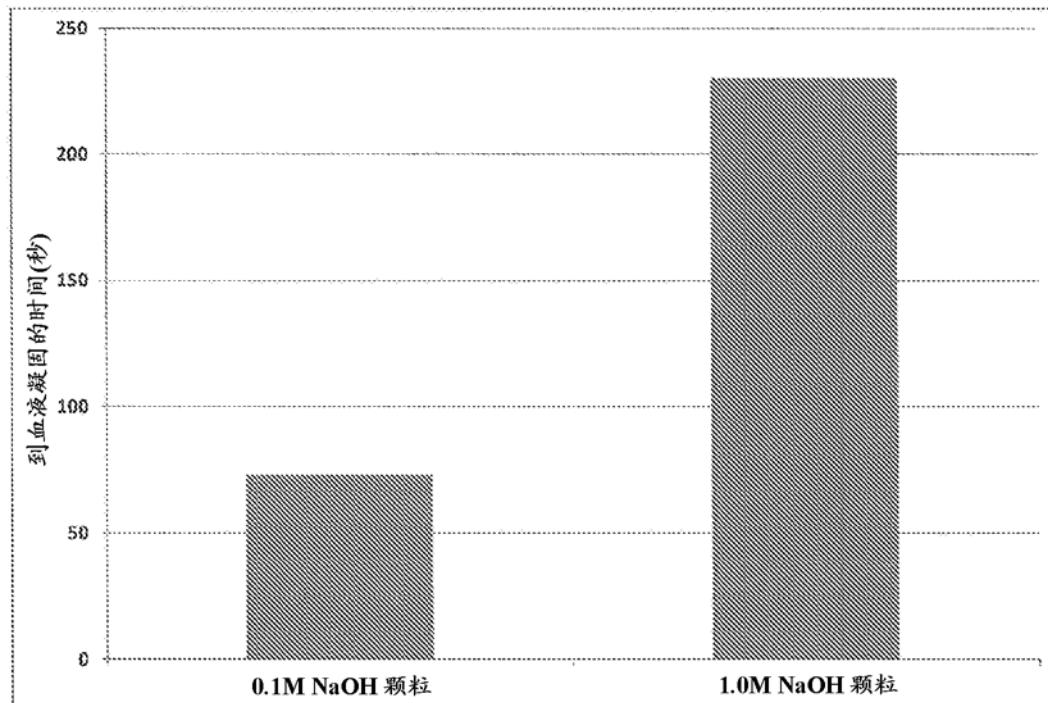


图 4

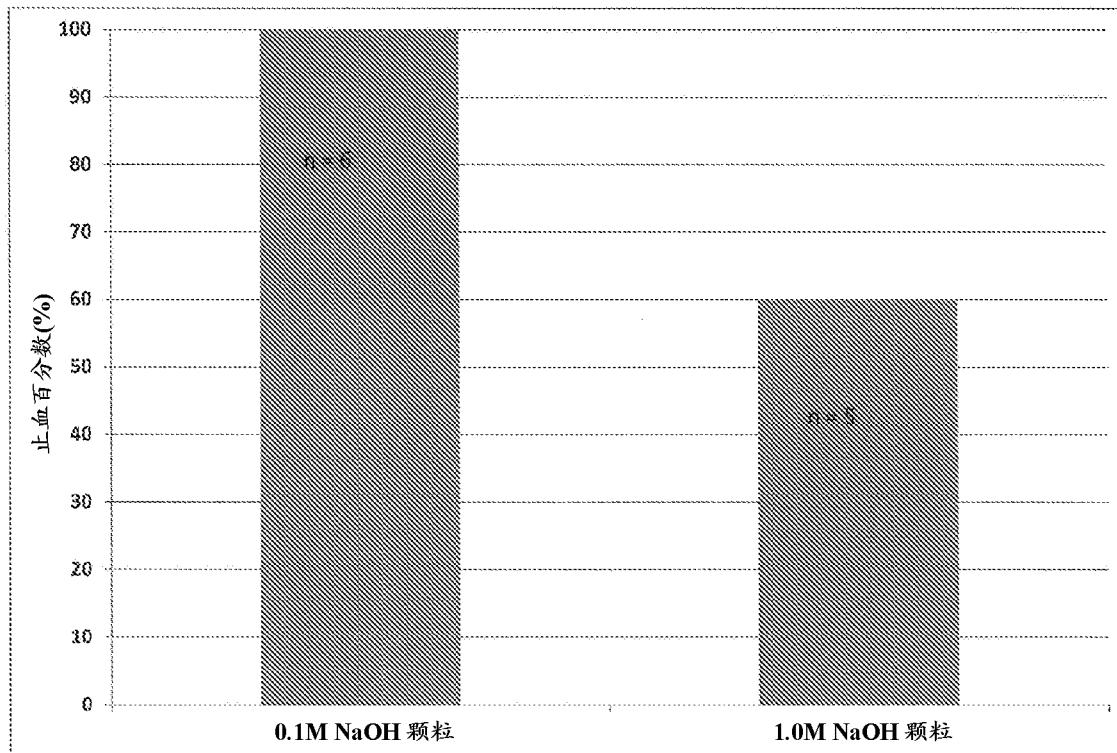


图 5