

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910052695.7

[51] Int. Cl.

A61K 31/722 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 11 月 18 日

[11] 公开号 CN 101579353A

[22] 申请日 2009.6.9

[21] 申请号 200910052695.7

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学  
地址 200433 上海市翔殷路 800 号

[72] 发明人 侯春林 顾其胜 魏长征

[74] 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司  
代理人 丁振英

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称

温敏性几丁糖制剂及其制备与应用

[57] 摘要

本发明涉及医用生物材料技术领域，目前广泛应用的预防术后组织粘连剂存在体内降解时间较快、操作步骤繁琐、不适应于微创手术等不足。本发明的目的是提供一种具有良好的温度响应性、生物相容性和生物可降解性的防粘连材料—温敏性几丁糖制剂，及其制备方法与应用。本发明是通过对几丁糖进行羟丁基化反应，控制反应条件，赋予几丁糖独特的温度响应性，同时还保留几丁糖固有的其他生物学特性。本发明的温敏性几丁糖制剂具有良好的温敏性同时具有良好的凝胶回复性，在手术应用中操作简便；良好的生物相容性保证了温敏性几丁糖应用的安全性；可调控的凝胶化时间、体内残留时间使其适合不同的应用要求；术后组织粘连和脑脊液漏动物实验证明本发明有较好的临床应用前景。

1、一种温敏性几丁糖制剂，其特征在于该制剂是通过以下方法制得的：

在几丁糖的羟烷基化反应中，充  $N_2$  进行保护；反应体系的压力为 0.1-0.5mPa；反应温度为 15-40℃。

2、一种如权利要求 1 所述的温敏性几丁糖制剂的制备方法，其特征在于该制备方法是在几丁糖的羟烷基化反应中，采取了以下反应条件：充  $N_2$  进行保护；反应体系的压力为 0.1-0.5mPa；反应温度为 15-40℃。

3、根据权利要求 2 所述的温敏性几丁糖制剂的制备方法，其特征在于具体步骤为：几丁糖，加入 10 倍体积的 50% (wt/wt) KOH 溶液中，充  $N_2$  进行保护，15℃碱化 24 小时；放入高压反应釜中，加入 10 倍于几丁糖体积的异丙醇，然后加入 5-20 倍于几丁糖体积的 1, 2-环氧丁烷，同时充入  $N_2$  保持釜内压力 0.1-0.5mPa，15-40℃，500-3000rpm 搅拌下反应 24-120 小时。

4、根据权利要求 3 所述的温敏性几丁糖制剂的制备方法，其特征在于该方法是由以下步骤组成的：

#### A. 几丁糖的制备

取新鲜虾壳，去除头、脚和尾，用清水洗净，分别用 5%HCl 和 10%的 NaOH 浸泡去除钙和蛋白，洗至中性、烘干、磨粉得到粉末几丁质，取粉末几丁质在 50%的 NaOH 溶液中 100℃以上脱乙酰反应 24h 以上，然后中和，用注射用水洗涤至中性，酒精脱水，最后真空干燥得脱乙酰度为 85-95%的几丁糖；

#### B. 几丁糖的碱化

取制备的几丁糖，加入 10 倍体积的 50% (wt/wt) KOH 溶液中，充  $N_2$  进行保护，15℃碱化 24h；

#### C. 温敏性几丁糖的制备

将碱化后的几丁糖用 100 目绢丝过滤，去除 10 倍体积的碱液，放入高压反应釜中，加入 10 倍体积的异丙醇，然后加入 5-20 倍体积的 1, 2-环氧丁烷，同时充入  $N_2$  保持釜内压力 0.1-0.5mPa，15-40℃，高速搅拌下反应 24-120h；反应结束后，100 目绢丝过滤去除未反应的 1, 2-环氧丁烷和异丙醇，然后旋转蒸发进一步去去除残留的有机溶剂，加入去离子水溶解，10%

乙酸调整 PH 至 6.5-7.0, 砂芯漏斗过滤去除不溶物, 然后将滤液加入透析袋中透析, 最后透析液冷冻干燥得到粗品;

D. 温敏性几丁糖的纯化

将粗品悬浮于无水乙醇中, 然后加入等体积含抗生素的无菌 PBS, 4℃ 冰箱静置 48h, 然后离心去除小分子量的样品, 同样的步骤重复 3 次, 将沉淀 50℃ 真空干燥得到成品;

E. 温敏性几丁糖制剂的配制

将制备纯化后的温敏性几丁糖加入无菌 PBS 中, 4℃ 下溶解, 配制成 1-5% 的温敏性几丁糖制剂。

5、一种如权利要求 1 所述的温敏性几丁糖制剂在防术后组织粘连制剂和预防脑脊液漏制剂中的应用。

6、如权利要求 2-4 所述的制备方法制得的温敏性几丁糖制剂在防术后组织粘连制剂和预防脑脊液漏制剂中的应用。

## 温敏性几丁糖制剂及其制备与应用

### 技术领域

本发明涉及医用生物材料技术领域，具体涉及一种温敏性几丁糖制剂及其制备方法与应用，该制剂具有良好的温度响应性并可以用作预防术后组织粘连制剂和预防脑脊液漏制剂来使用。

### 背景技术

在施行腹腔、脊柱等部位的外科手术后，普遍存在手术性粘连问题。术后粘连不仅会影响手术效果，还可导致严重的术后并发症，甚至会使手术失败。国外相关报道术后粘连的发生率高达 80%，严重者可导致患者腹痛、神经压迫甚至死亡，因此防止术后粘连是一个亟待解决的问题。

生物化学和材料学的飞速发展预防组织粘连提供了多种生物材料，有效地缓解了患者的痛苦。常见的防粘连制剂主要分为三类：高分子溶液；高分子凝胶；各种膜和海绵。高分子溶液主要包括羧甲基纤维素钠、透明质酸钠、水溶性几丁糖等，该类材料具有良好的流动性和生物相容性能有效的预防术后组织粘连，但良好的流动性不能完全将创面覆盖，较快的降解时间是该类制剂的主要缺陷；高分子凝胶主要分为预交联型和原位交联型，主要包括交联透明质酸钠和交联几丁糖凝胶，该类材料在溶液的基础上通过化学或物理方法进行交联提高了材料的分子量和体内残留时间，但交联剂的使用影响了材料的生物相容性和安全性，同时胶体类材料制约了其在微创手术中的应用；膜类材料主要分为可降解型和不可降解型，包括聚四氟乙烯（PTFE）、Oxiplex®（Johnson 公司产品，由相对高分子量的聚氧乙烯 PEO 和羧甲基纤维素 CMC 通过分子组装得到）和 Seprafilm®（Genzyme 公司产品，透明质酸和羧甲基纤维素共混制得），该类材料可有效的起到物理隔离作用，但在使用过程中难以固定需要手术缝合，操作不便，这也较大限制了该类材料的推广和应用。

因此理想的防粘连材料必须具备以下特点：①操作简单，在开放手术和显微操作时都简便易行；②良好的生物相容性和生物降解性；③对创面具有

良好的封闭能力；④材料的残存时间一直维持到整个创面愈合修复完毕。⑤具有良好的温度响应性，在低温下（小于 15℃）具有流动性，在体内 37℃ 生理温度下变成可逆的固体凝胶。

几丁糖是自然界唯一的碱性多糖，其资源丰富，储量仅次于纤维素，多年的研究表明几丁糖具有多种特异的生物学功能，如抑菌、防粘连、创面愈合等，由于几丁糖分子上含有性质相对比较活泼的 2-NH<sub>2</sub> 和 6-OH，因此可进行多种化学修饰赋予其更多的化学性质和生物学功能，如几丁糖羧甲基化赋予其良好的水溶性（陶希芹，王明力，壳聚糖糖的改性及其在农业上的应用，贵州农业科学，2007，35（5）：157—159）；几丁糖羟烷基化可赋予其良好的水溶性、起泡性或温敏性等（韩蕴华，壳聚糖的羟丙基化研究，天津师范大学学报，2001，21（2）：3—5）。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种具有良好的温度响应性、生物相容性和生物可降解性的防粘连材料—温敏性几丁糖制剂，及其制备方法与应用。

本发明是通过对几丁糖进行羟丁基化反应，控制反应条件，赋予几丁糖独特的温度响应性，同时还保留几丁糖固有的其他生物学特性，如生物相容性、生物可降解性等。

本发明提供一种温敏性几丁糖制剂，该制剂是在几丁糖的羟烷基化反应中，采取了 N<sub>2</sub> 保护；增加反应体系的压力（0.1-0.5mPa），控制温度（15-40℃）制备得到的。

本发明还提供上述温敏性几丁糖制剂的制备方法，该制备方法是在几丁糖的羟烷基化反应中，采取了以下反应条件：N<sub>2</sub> 保护；增加反应体系的压力（0.1-0.5mPa）；较低温度下（15-40℃）。

上述温敏性几丁糖制剂的制备方法，具体步骤为：几丁糖，加入 10 倍几丁糖体积的 50%（wt/wt）KOH 溶液中，充 N<sub>2</sub> 进行保护，15℃ 碱化 24 小时；放入高压反应釜中，加入 10 倍原料体积的异丙醇，然后加入 5-20 倍原料体积的 1, 2-环氧丁烷，同时充入 N<sub>2</sub> 保持釜内压力 0.1-0.5mPa，15-40℃，高速（500-3000rpm）搅拌下反应 24-120 小时。

本发明还提供了上述温敏性几丁糖制剂在防术后组织粘连制剂和预防脑脊液漏制剂中的应用。

本发明制备纯化后的温敏性几丁糖加入无菌 PBS 中，4℃下溶解，可配制成 1-5%的临床使用的温敏性几丁糖制剂。本发明的温敏性几丁糖在进行流变学性质研究、生物相容性、生物降解性以及应用研究对不同浓度的材料的测试，用了 2%浓度的温敏性几丁糖制剂的研究结果。

本发明通过高浓度 KOH 溶液进行低温、N<sub>2</sub>保护来保证制备产品的较高的分子量进而保证了制备的温敏性几丁糖具有较长的体内残留时间。本发明制备的羟丁基几丁糖在 4℃时具有流动性，在体内 37℃生理温度下变成可逆的固体凝胶，在预防术后组织粘连过程中操作方便，可以完全覆盖住创面，随着温度的升高可在创面表面形成一层柔软的保护层，起到良好的物理隔离作用，达到理想的预防组织粘连和预防脑脊液漏的效果，同时材料的性能可通过调整取代度、制剂的浓度来调整材料的凝胶化时间、凝胶化温度以及凝胶的强度来达到不同的应用要求。

因此本发明的温敏性几丁糖制剂是一种新型的生物材料，在预防组织粘连和预防脑脊液漏中具有良好的应用前景。

## 附图说明

图 1 是温敏性几丁糖的流变学图

其中 a:凝胶形成过程；b:凝胶回复过程；c: 不同温度下时间扫描

图 2 是温敏性几丁糖生物安全性结果图

其中 a: 1 周末，材料的植入引入大量炎性细胞；b:2 周末，炎性细胞减少；c: 3 周末，已无明显炎性细胞产生；d: 4 周末，无明显炎性细胞产生

图 3 是温敏性几丁糖生物降解性结果图

其中 a: 1 周末；b:2 周末；c: 3 周末；d: 4 周末

图 4 是温敏性几丁糖预防术后腹腔粘连实验结果图

其中 a: 对照组 2 周末盲肠和周围软组织产生粘连；b:温敏性几丁糖组 2 周末，无明显粘连，创面表面形成一层保护膜；c: 对照组 4 周末，盲肠和腹壁产生严重粘连；d: 温敏性几丁糖组 4 周末，材料基本降解完毕，没有粘连。

图 5 是温敏性几丁糖预防椎板切除后组织粘连实验结果图

其中 a: 对照组 2 周末硬脊膜与周围组织粘连无法完整剥离；b:温敏性几丁糖组 2 周末硬脊膜表面形成保护层，可完整剥离；c: 对照组 2 周末 HE

染色；d：温敏性几丁糖组 2 周末 HE 染色。

图 6 是温敏性几丁糖预防脑脊液漏实验结果图

其中 a：对照组蓝色美蓝溶液从硬脊膜裂口处溢出；b：温敏性几丁糖组硬脊膜裂口处无蓝色美蓝溶液溢出；c：对照组 X-射线图，硬脊膜裂口有明显的显影剂；d：温敏性几丁糖组 X-射线图，硬脊膜裂口处无显影剂溢出。

## 具体实施方式

现结合实施例，对本发明作详细描述，但本发明的实施不仅限于此。

### 实施例 1：温敏性几丁糖的制备

#### 第一步，几丁糖的制备

取新鲜虾壳，去除头、脚和尾，用清水洗净，分别用 5% HCl 和 10% 的 NaOH 浸泡去除钙和蛋白，洗至中性、烘干、磨粉得到粉末几丁质。取粉末几丁质在 50% 的 NaOH 溶液中 100℃ 以上脱乙酰反应 24h 以上，然后中和，用注射用水洗涤至中性，酒精脱水，最后真空干燥得脱乙酰度为 85-95% 的几丁糖。

#### 第二步，几丁糖的碱化

取制备的几丁糖，加入 10 倍体积的 50% (wt/wt) KOH 溶液中，充 N<sub>2</sub> 进行保护，15℃ 碱化 24h。

#### 第三步，温敏性几丁糖的制备

将碱化后的几丁糖用 100 目绢丝过滤，去除 10 倍几丁糖体积的碱液，放入高压反应釜（额定压力 10MPa）中，加入 10 倍几丁糖体积的异丙醇，然后加入 20 倍体积的 1, 2-环氧丁烷，同时充入 N<sub>2</sub> 保持釜内压力 0.3MPa，30℃，1000rpm 高速搅拌下反应 96h；反应结束后，100 目绢丝过滤去除未反应的 1, 2-环氧丁烷和异丙醇，然后旋转蒸发进一步去去除残留的有机溶剂，加入去离子水溶解，10% 乙酸调整 PH 至 6.5-7.0，砂芯漏斗过滤去除不溶物，然后将滤液加入透析袋中透析，最后透析液冷冻干燥得到粗品。

#### 第四步，温敏性几丁糖的纯化

将粗品悬浮于无水乙醇中，然后加入等体积含抗生素的无菌 PBS，4℃ 冰箱静置 48h，然后离心去除小分子量的样品，同样的步骤重复 3 次，将沉淀 50℃ 真空干燥得到成品。

### 第五步，温敏性几丁糖制剂的配制

将制备纯化后的温敏性几丁糖加入无菌 PBS 中，4℃下溶解，配制成 1-5% 的温敏性几丁糖制剂。

### 实施例 2：温敏性几丁糖流变学性质研究

将 2%的温敏性几丁糖溶液用流变仪进行温度扫描和时间扫描，温度变化频率为 1℃/min，震动频率为 1rads，考察温敏性几丁糖的温敏性性质和凝胶化时间。

2%温敏性几丁糖在凝胶形成过程中储能模量随着温度的升高而急剧升高，表现出典型的凝胶特征，而耗能模量的变化则不大，在凝胶回复过程中，储能模量急剧下降，耗能模量变化也不大，因此本发明制备的温敏性几丁糖具有良好的温敏性和凝胶回复性，通过凝胶的时间扫描显示该材料可在<60s 形成凝胶（见附图 1）。

### 实施例 3：温敏性几丁糖生物相容性研究

选用 48 只昆明小鼠作为实验动物，将 2%的温敏性几丁糖注入小鼠的腿部肌肉，分别在第 1，2，3，4 周将动物处死，分别将注射部位的肌肉 10% 福尔马林中固定，进行 HE 染色观察其生物相容性。

在注射 1 周后，材料周围有大量的炎性细胞，这是由于异物的进入造成的机体正常反应，而 2 周后炎性细胞则明显减少，至第 3，4 周时已无明显的炎性细胞，因此结果表明本发明制备的温敏性几丁糖就有良好的生物相容性（见附图 2）。

### 实施例 4：温敏性几丁糖生物降解性研究

选用 48 只昆明种小鼠作为实验动物，分别将 2%的温敏性几丁糖进行皮下注射，在第 1，2，3，4 周处死动物后，观察其残留量（见附图 3）。

结果显示 2%温敏性几丁糖在体内可维持在 4 周以内，结果同时表明浓度越高，其体内残留时间越长。

### 实施例 5：预防腹腔术后组织粘连的研究

Wistar 大白鼠 30 只，体重 250~300g，随机分为 3 组。通过盲肠-腹壁损伤复制粘连模型。然后将温敏性几丁糖溶液涂在创面表面，关闭腹腔后，分别在第 2，4 周进行大体观察和 HE 组织学观察。

结果显示：温敏性几丁糖可在实验 2 周末在盲肠创面和腹壁损伤面之间形成一层物理隔层，而对照组盲肠和周围软组织发生了严重的粘连；4 周末



对照组盲肠和腹壁产生了组织粘连，而温敏性几丁糖组则无明显组织粘连，腹壁手术部位清晰可见（见附图 4）。

#### **实施例 6：预防椎板切除后组织粘连的研究**

Wistar 大白鼠 30 只，体重 250~300g，随机分为 3 组。通过椎板切除来复制硬脊膜粘连动物模型，然后将温敏性几丁糖溶液涂在创面表面，分别在第 2，4 周进行大体观察和 HE 组织学观察。

结果显示：温敏性几丁糖 2 周后可以在硬脊膜表面和背部肌肉之间形成有效的物理隔层，有效预防因椎板切除后硬脊膜和周围组织间的粘连，使得硬脊膜可以清晰暴露，而对照组的硬脊膜和周围组织相互粘连在一起，不能清晰暴露。HE 检测结果显示 6 周后硬脊膜和外周组织之间形成一层空白（见附图 5）。

#### **实施例 7：温敏性几丁糖预防术后脑脊液漏的研究**

16 只犬作为实验动物，随机分为两组，每组 8 只，每只犬 L3-L5 行椎板切除后暴露硬脊膜，用锋利刀片将硬脊膜做 0.5-1.0cm 切口，然后通过下方埋入的 PE 管缓慢注射美蓝溶液，对照组不做任何处理，温敏性几丁糖组迅速注射 3ml 温敏性几丁糖溶液，同时用烤灯烘烤数分钟后关闭创口后通过下方埋入的 PE 管注射葡安显影剂，然后 X 射线扫描拍片观察。

结果显示：注射温敏性几丁糖溶液后，创面上方迅速形成一层凝胶，硬脊膜切口周围无蓝色美蓝溶液漏出，而对照组周围则涌出蓝色溶液，X 射线扫描后对照组硬脊膜裂口处溢出大量显影剂，而温敏性几丁糖组未发现显影剂溢出。（见附图 6）。

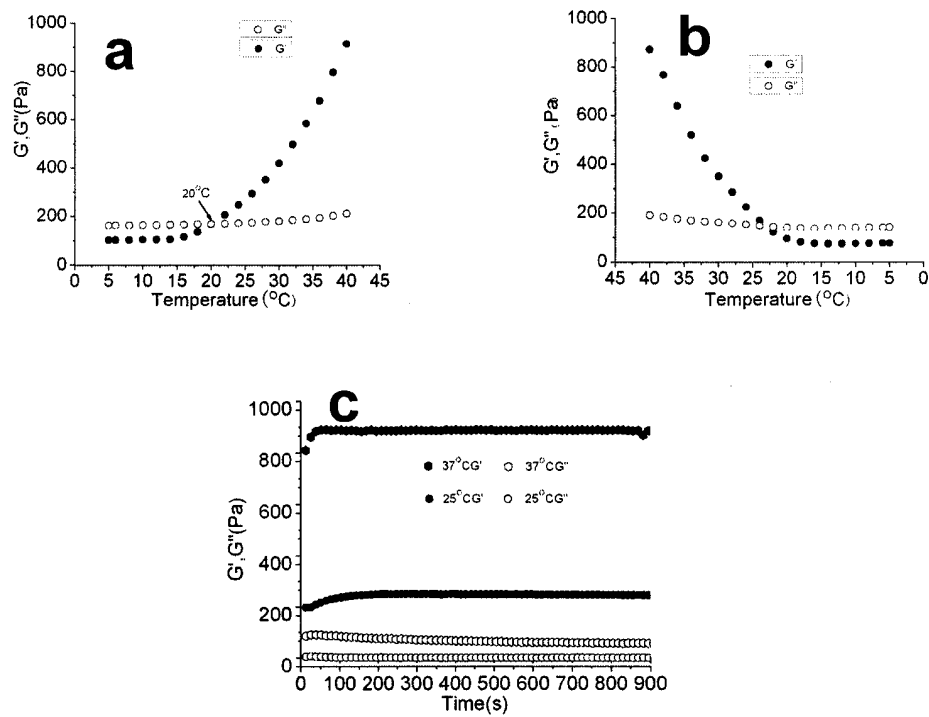


图1

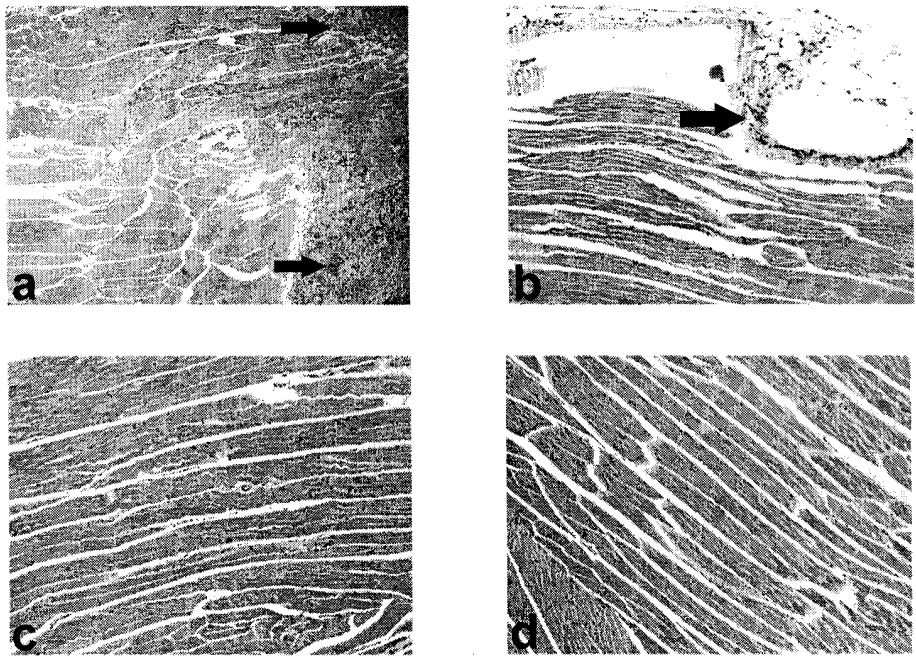


图2

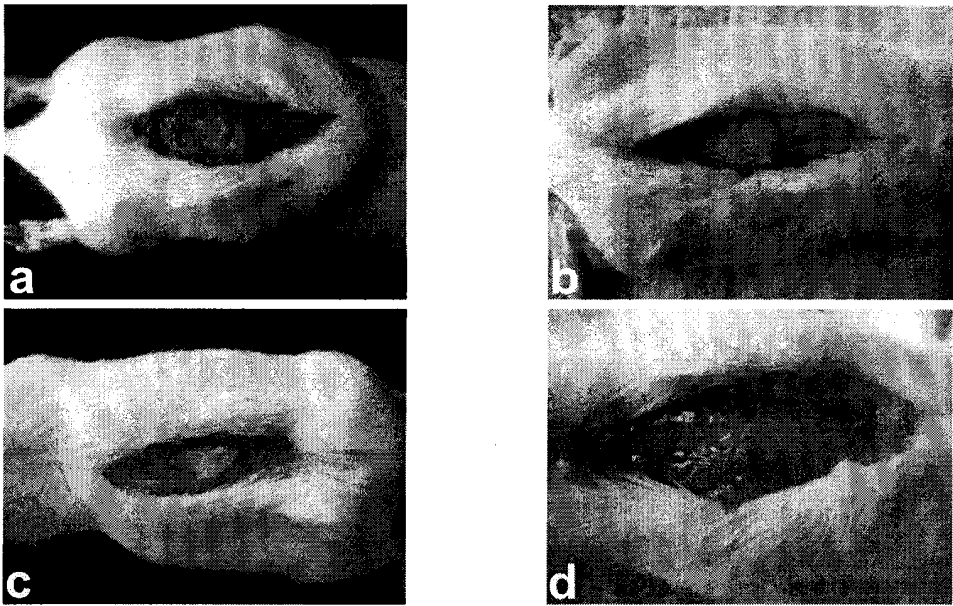


图3

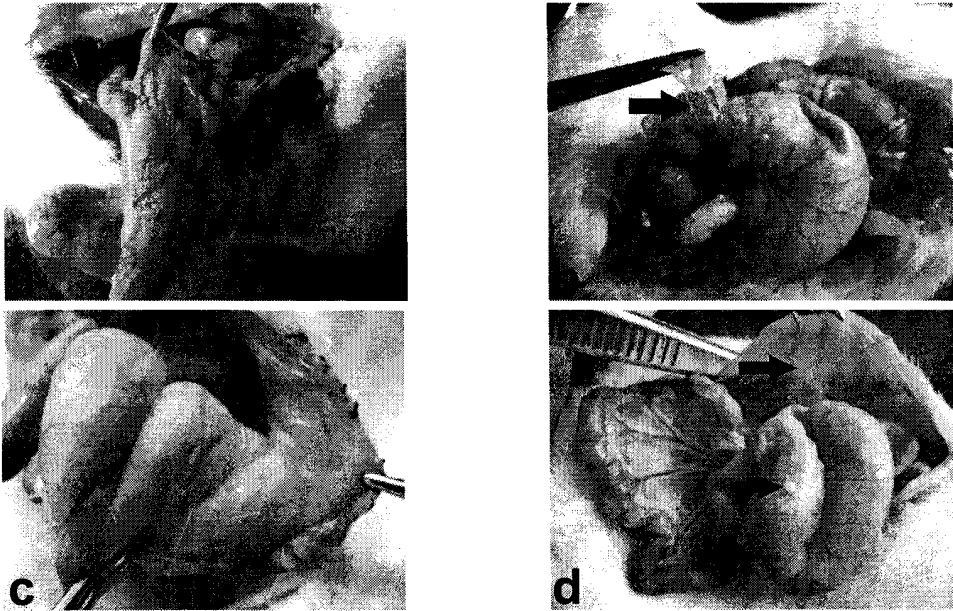


图4

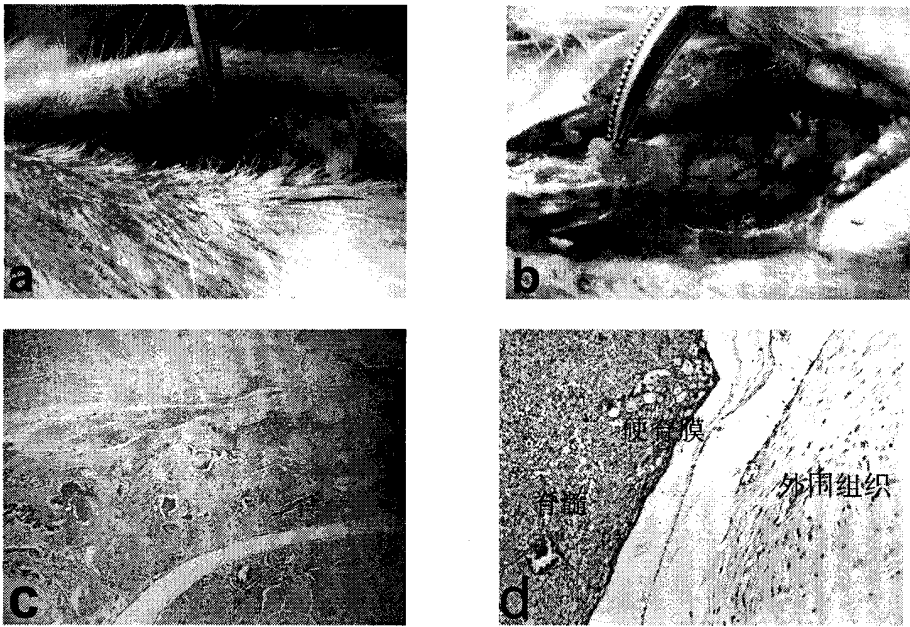


图5

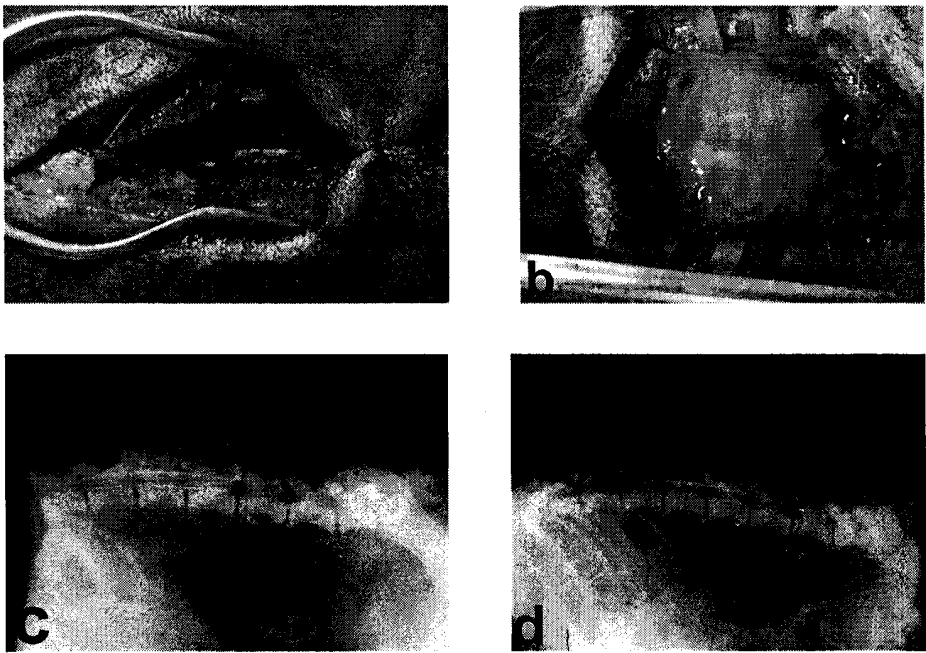


图6