



(51) МПК

A61L 15/22 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/64 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61L 15/22 (2024.01); A61L 15/42 (2024.01); A61L 15/64 (2024.01); A61K 9/14 (2024.01); A61P 7/04 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2022103276, 09.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.07.2020

Дата регистрации:
12.08.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
12.07.2019 EP 19186036.0;
14.01.2020 EP 20151779.4

(43) Дата публикации заявки: 14.08.2023 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 12.08.2024 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 14.02.2022(86) Заявка РСТ:
EP 2020/069441 (09.07.2020)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2021/009013 (21.01.2021)

Адрес для переписки:
105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр.
1, секция 1, этаж 3, "Евромаркпат"

(72) Автор(ы):

КЕРЕВЕР, Абрахам Рейнир (NL),
ФЕЛИКС ЛАНАО, Роза Пилар (NL),
ОПСТЕН, Йост (NL),
БЕНДЕР, Йоханнес Каспар Матиас
Элизабет (NL)

(73) Патентообладатель(и):

ГАТТ ТЕКНОЛОДЖИЗ Б. В. (NL)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2010059280 A2, 27.05.2010. WO
2016056901 A1, 14.04.2016. RU 2593755 C2,
10.08.2016.

(54) БИОСОВМЕСТИМЫЙ ГИБКИЙ ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ ЛИСТ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биосовместимому гибкому гемостатическому листу, содержащему: водостойкую структуру когезивного волокнистого носителя, содержащую трехмерное взаимосвязанное внутреннее пространство, указанная структура волокнистого носителя содержит волокна, содержащие нуклеофильный полимер, несущий химически активные нуклеофильные группы, которым является сополимер поли(2-этил/аминоэтиламиноэтил-2-оксазолина) (NU-POx); и

распределенное во внутреннем пространстве множество реакционно-способных полимерных частиц, содержащих водорастворимый электрофильный полимер - терполимер поли[2-(этил/гидрокси-этил-амид-этил/NHS-сложный эфир-этил-сложный эфир-этил-амид-этил)-2-оксазолина] с активированной NHS-боковой цепью, содержащей 20% NHS-сложноэфирных групп, несущий, по меньшей мере, три химически активных электрофильных группы, которые могут взаимодействовать с аминными группами

в ткани и крови, а также с реакционно-способными нуклеофильными группами нуклеофильного полимера, с образованием ковалентной связи, указанные реакционно-способные полимерные частицы имеют диаметр в пределах 0,5-100 мкм и присутствуют в количестве, по меньшей мере, 3% мас. структуры волокнистого носителя, также относится к пакету из алюминиевой фольги для хранения гемостатического листа, содержащему один или несколько гемостатических листов и 1 г диоксида кремния, и который герметизирован в вакууме, и относится к способу получения

гемостатического листа, включающему: получение листа водостойкой структуры когезивного волокнистого носителя; получение реакционно-способных полимерных частиц; и распределение реакционно-способных полимерных частиц во внутреннем пространстве структуры волокнистого носителя. Группа изобретений обеспечивает разработку биосовместимого гибкого гемостатического листа, который является особенно пригодным для предотвращения кровотечения в ходе лапароскопических хирургических процедур. 3 н. и 13 з.п. ф-лы, 10 табл., 9 пр.

R U 2 8 2 4 5 8 0 C 2

R U 2 8 2 4 5 8 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61L 15/22 (2006.01)
A61L 15/42 (2006.01)
A61L 15/64 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61L 15/22 (2024.01); A61L 15/42 (2024.01); A61L 15/64 (2024.01); A61K 9/14 (2024.01); A61P 7/04 (2024.01)

(21)(22) Application: **2022103276, 09.07.2020**(24) Effective date for property rights:
09.07.2020Registration date:
12.08.2024

Priority:

(30) Convention priority:
12.07.2019 EP 19186036.0;
14.01.2020 EP 20151779.4(43) Application published: **14.08.2023 Bull. № 23**(45) Date of publication: **12.08.2024 Bull. № 23**(85) Commencement of national phase: **14.02.2022**(86) PCT application:
EP 2020/069441 (09.07.2020)(87) PCT publication:
WO 2021/009013 (21.01.2021)Mail address:
105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
sektiya 1, etazh 3, "Evromarkpat"

(72) Inventor(s):

KEREVER, Abrakham Rejnir (NL),
FELIKS LANAO, Roza Pilar (NL),
OPSTEN, Jost (NL),
BENDER, Jokhannes Kaspar Matias Elizabet
(NL)

(73) Proprietor(s):

GATT TEKNOLODZHIZ B. V. (NL)(54) **BIOCOMPATIBLE FLEXIBLE HAEMOSTATIC SHEET**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to a biocompatible flexible haemostatic sheet comprising: a water-resistant structure of a cohesive fibrous carrier comprising a three-dimensional interconnected inner space, said structure of the fibrous carrier contains fibres containing a nucleophilic polymer carrying chemically active nucleophilic groups, which is poly(2-ethyl/aminoethylamidoethyl-2-oxazoline) (NU-POx) copolymer; and distributed in the inner space a plurality of reactive polymer particles containing a water-soluble electrophilic polymer, that is terpolymer poly[2-(ethyl/

hydroxy-ethyl-amide-ethyl/NHS-ester-ethyl-ester-ethyl-amide-ethyl)-2-oxazoline] with an activated NHS-side chain containing 20% NHS-ester groups, bearing at least three chemically active electrophilic groups which can react with amine groups in tissue and blood, as well as with reactive nucleophilic groups of the nucleophilic polymer, to form a covalent bond, said reactive polymer particles having a diameter in range of 0.5–100 μm and are present in an amount of at least 3 wt.% of fibrous carrier structure, also relates to an aluminium foil package for storing a haemostatic sheet, comprising one or more haemostatic sheets and 1 g of silicon

dioxide, and which is sealed in a vacuum, and relates to a method of producing a haemostatic sheet, comprising: obtaining a sheet of a water-resistant structure of a cohesive fibrous carrier; obtaining reactive polymer particles; and distribution of reactive polymer particles in inner space of fibrous carrier structure.

EFFECT: group of inventions provides the development of a biocompatible flexible haemostatic sheet, which is especially suitable for preventing bleeding during laparoscopic surgical procedures.

16 cl, 10 tbl, 9 ex

R U 2 8 2 4 5 8 0 C 2

R U 2 8 2 4 5 8 0 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к биосовместимому гибкому гемостатическому листу, который можно использовать соответствующим образом для сведения к минимуму кровотечения в ходе хирургических процедур. Этот гемостатический лист

5 содержит:

водостойкую структуру когезивного волокнистого носителя, содержащего трехмерное взаимосвязанное внутреннее пространство, указанная структура волокнистого носителя содержит волокна, содержащий нуклеофильный полимер, несущий реакционно-

10

распределенное во внутреннем пространстве множество реакционно-способных полимерных частиц, содержащих водорастворимый электрофильный полимер, несущий, по меньшей мере, три реакционно-способные электрофильные группы, указанные реакционно-способные электрофильные группы могут взаимодействовать с аминными группами в ткани и крови, а также с химически активными нуклеофильными группами

15

нуклеофильного полимера, с образованием ковалентной связи.

Уровень техники

Одна из главных проблем в ходе хирургических процедур на паренхиматозной ткани заключается в достижении контроля кровотечения. Контроль с помощью зашивания, электрокоагуляции и ультразвукового заживления часто недостаточен в ходе операций,

20

например, на печени или почках. В результате, процедуры подобные резекции печени или частичной резекции почки требуют альтернативного подхода к контролю кровотечения. Для этой цели разработан и является клинически доступным широкий набор гемостатических продуктов местного применения.

25

Lewis et al. (Control of bleeding in surgical procedures: critical appraisal of HEMOPATCH (Sealing Hemostat), Dove Press Journal: Medical Devices Evidence and Research, 22 Dec. 2015, 1-9) описывают гемостатическую мягкую накладку (HEMOPATCH), которая состоит из синтетического мономера, взаимодействующего с белками, и коллагеновой подкладки. Активная сторона покрыта мономером, взаимодействующим с белками: N-

30

гидроксисукцинимид-функционализированным полиэтиленгликолем (NHS-PEG). NHS-PEG быстро фиксирует коллагеновую мягкую накладку на ткани, чтобы ускорять и поддерживать гемостаз.

Schuhmacher et al. (Safety and effectiveness of a synthetic hemostatic patch for intraoperative soft tissue bleeding, Med Devices (Auckl). 2015; 8: 167-174) описывают гемостатический пластырь (Veriset™), который состоит из поглощаемого материала подкладки,

35

окисленной целлюлозы и полиэтиленгликолевого гидрогеля. Гемостатический пластырь Veriset™ поставляется как готовый к употреблению пластырь, который накладывается стороной с полиэтиленгликолем вниз на область кровотечения.

40

Voerman et al. (Next Generation Hemostatic Materials Based on NHS-Ester Functionalized Poly(2-oxazoline)s, Biomacromolecules (2017), 18, 2529-2538) описывают синтетический биологически неактивный гемостатический продукт, который получают посредством нанесения покрытия из сложного N-гидроксисукцинимидного эфира (NHS)-функциональных поли(2-оксазолинов) (NHS-POx) на желатиновые пластыри, которые действуют посредством образования ковалентных поперечных сшивок между

45

полимером, белками крови хозяина, желатином и тканями для закрытия раневой области и предотвращения кровотечения в ходе хирургической операции.

US 2010/0233246 описывает биосовместимое полимерное устройство, содержащее коллагеновую губку или лист, пропитанный двухчастным порошком химически активного полиэтиленгликоля, где указанный химически активный порошок содержит

первый полиэтиленгликоль, содержащий нуклеофильные группы, и второй полиэтиленгликоль, содержащий электрофильные группы, где порошок полиэтиленгликоля остается химически неактивным в сухом состоянии.

5 WO 2010/059280 описывает безводный волокнистый лист, содержащий первый компонент волокнистого полимера, указанный полимер содержит электрофильные группы или нуклеофильные группы, и второй компонент, который может поперечно сшиваться с первым компонентом, когда указанный лист экспонируется для водной среды в контакте с биологической тканью, с формированием поперечно сшитого гидрогеля, который является адгезивным для биологических тканей; где:

10 а) где второй компонент представляет собой волокнистый полимер, имеющий структуру основной цепи такую же или отличную от волокнистого полимера первого компонента и содержащий электрофильные группы, если первый компонент содержит нуклеофильные группы, или содержащий нуклеофильные группы, если первый компонент содержит электрофильные группы;

15 б) второй компонент представляет собой покрытие на волокнистом полимере первого компонента и при этом указанное покрытие содержит электрофильные группы, если первый компонент содержит нуклеофильные группы, или нуклеофильные группы, если первый компонент содержит электрофильные группы; или

20 в) второй компонент представляет собой сухой порошок, диспергированный и удерживаемый во внутреннем пространстве волокнистого полимера первого компонента, где указанный порошок содержит электрофильные группы, если первый компонент содержит нуклеофильные группы, или нуклеофильные группы, если первый компонент содержит электрофильные группы.

25 US 2011/0250257 описывает безводный волокнистый лист, содержащий первый компонент волокнистого полимера, указанный полимер содержит электрофильные группы или нуклеофильные группы, и второй компонент может поперечно сшиваться с первым компонентом, когда указанный лист экспонируется для водной среды в контакте с биологической тканью с формированием поперечно сшитого гидрогеля, который является адгезивным для биологической ткани; при этом второй компонент

30 представляет собой волокнистый полимер и содержит электрофильные группы, если первый компонент содержит нуклеофильные группы, или содержит нуклеофильные группы, если первый компонент содержит электрофильные группы; или

второй компонент представляет собой покрытие на волокнистом полимере первого компонента, при этом указанное покрытие содержит электрофильные группы, если

35 первый компонент содержит нуклеофильные группы, или нуклеофильные группы, если первый компонент содержит электрофильные группы; или

второй компонент представляет собой сухой порошок, диспергированный и удерживаемый во внутреннем пространстве волокнистого полимера первого компонента, при этом указанный порошок содержит электрофильные группы, если

40 первый компонент содержит нуклеофильные группы, или нуклеофильные группы, если первый компонент содержит электрофильные группы.

WO 2011/124640 описывает способ изготовления гемостатической губки, включающий:

а) получение губки, содержащей матрицу биоматериала в высушенной форме,

б) получение одного химически активного полимерного материала в форме сухого

45 порошка,

с) приведение в контакт а) и б) таким образом, что материал б) присутствует, по меньшей мере, на одной поверхности указанной губки, и

д) фиксирование материала б) на губке а).

Фиксирования можно достичь посредством плавления в течение достаточно долгого периода времени.

WO 2012/057628 описывает адгезивный для тканей медицинский продукт, содержащий, по меньшей мере, 1% масс. сухого вещества электрофильно активированного полиоксазолина (EL-POx), указанный EL-POx содержит, по меньшей мере, 2 химически активных электрофильных группы, включая, по меньшей мере, одну боковую электрофильную группу. Кроме EL-POx, медицинский продукт может содержать нуклеофильно активированный полиоксазолин (NU-POx). Примеры адгезивных для тканей продуктов включают адгезивную ленту для ткани, герметик для ткани, гемостатический пористый материал и импланты.

WO 2016/056901 описывает адгезивный гемостатический продукт, выбранный из сетки с покрытием, пены с покрытием или порошка с покрытием, указанный гемостатический продукт содержит:

пористую твердую подложку, имеющую пористость, по меньшей мере, 5% объем и содержащую наружную поверхность, которая содержит нуклеофильный полимер, содержащий химически активные нуклеофильные группы;

адгезивное покрытие, которое покрывает, по меньшей мере, часть твердой подложки, указанное покрытие содержит электрофильно активированный полиоксазолин (EL-POx), указанный EL-POx содержит в среднем, по меньшей мере, 1 химически активную электрофильную группу.

Адгезивный гемостатический продукт изготавливают с помощью способа, включающего стадии получения пористой твердой подложки; нанесения на подложку покрытия из текучей среды, которое содержит EL-POx и растворитель; и удаления растворителя.

Сущность изобретения

Авторы разработали биосовместимый гибкий гемостатический лист, который является особенно пригодным для предотвращения кровотечения в ходе лапароскопических хирургических процедур.

Гемостатический лист по настоящему изобретению содержит водостойкую структуру когезивного волокнистого носителя, которая удерживает малые частицы, содержащие реакционно-способный (химически активный) электрофильный полимер, который может ковалентно связываться с белками крови и тканями хозяина, а также с реакционно-способными (химически активными) нуклеофильными группами в структуре волокнистого носителя, и который тем самым вызывает гемостаз и/или адгезию на тканях. Таким образом, один из аспектов настоящего изобретения относится к биосовместимому гибкому гемостатическому листу, содержащему:

водостойкую структуру когезивного волокнистого носителя, содержащего трехмерное взаимосвязанное внутреннее пространство, указанная структура волокнистого носителя содержит волокна, содержащие нуклеофильный полимер, несущий реакционно-способные (химически активные) нуклеофильные группы; и

распределенное во внутреннем пространстве множество реакционно-способных (химически активных) полимерных частиц, содержащих водорастворимый электрофильный полимер, несущий, по меньшей мере, три химически активные электрофильные группы, которые могут взаимодействовать с аминными группами в ткани и крови, а также с реакционно-способными (химически активными) нуклеофильными группами нуклеофильного полимера, с образованием ковалентной связи, указанные химически активные полимерные частицы имеют диаметр в пределах 0,5-100 мкм и присутствуют в количестве, по меньшей мере, 3% масс. структуры

волокнистого носителя.

Гемостатический лист по настоящему изобретению содержит водостойкую структуру когезивного волокнистого носителя, которая легко поглощает кровь, когда кровь может проникать во внутреннее пространство. Эта структура волокнистого носителя может легко пропитываться реакционно-способными (химически активными) полимерными частицами. В отличие от пропитки жидкостями, такая сухая пропитка не влияет на структурную целостность или на механические свойства структуры носителя. Когда кровь поглощается гемостатическим листом по настоящему изобретению, реакционно-способные (химически активные) полимерные частицы внутри листа начинают растворяться после того как они 'смачиваются' кровью, давая при этом возможность электрофильному полимеру для взаимодействия как с химически активными нуклеофильными группами в крови и ткани, так и с химически активными нуклеофильными группами в структуре волокнистого носителя, тем самым вызывая коагуляцию крови и закрытие ткани, и то и другое вносит вклад в гемостаз.

Хотя авторы не имеют желания ограничиваться теорией, считается, что преимущественные свойства гемостатического листа по настоящему изобретению могут быть приписаны тому факту, что химически активные полимерные частицы распределяются в структуре волокнистого носителя, создавая минимум изгибного трения а также благодаря тому факту, что из-за малого размера частиц, эти химически активные полимерные частицы быстро растворяются, когда они вступают в контакт с кровью или с другими водными телесными жидкостями. Таким образом, при наложении листа на область ранения, происходит быстрая ковалентная поперечная сшивка между химически активным электрофильным полимером, с одной стороны, и белками крови, тканями и структурой волокнистого носителя, с другой стороны, приводя к образованию геля, который перекрывает поверхность раны и прекращает кровотечение и который может обеспечить прочную адгезию волокнистого листа на ткани. Водостойкая структура волокнистого носителя обеспечивает механическую прочность в ходе нанесения и после него и предотвращает избыточное набухание.

Благодаря своей гибкости, гемостатический лист по настоящему изобретению можно удобным образом наносить на области кровотечения нерегулярной формы. Гемостатический лист может наноситься несколькими слоями, если уже нанесенный лист не останавливает кровотечение полностью.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу приготовления гемостатического листа, указанный способ включает:

- 35 получение листа водостойкой структуры когезивного волокнистого носителя, как определено выше;
- получение реакционно-способных (химически активных) полимерных частиц, как определено выше; и
- распределение реакционно-способных (химически активных) полимерных частиц во внутреннем пространстве структуры волокнистого носителя.

Подробное описание изобретения

Соответственно, один из аспектов настоящего изобретения относится к биосовместимому гибкому гемостатическому листу, содержащему:

- водостойкую структуру когезивного волокнистого носителя, содержащего трехмерное взаимосвязанное внутреннее пространство, указанная структура волокнистого носителя содержит волокна, содержащий нуклеофильный полимер, несущий химически активные нуклеофильные группы; и
- распределенное во внутреннем пространстве множество химически активных

полимерных частиц, содержащих водорастворимый электрофильный полимер, несущий по меньшей мере, три химически активных электрофильных группы, которые могут взаимодействовать с аминными группами в ткани и крови, а также с химически активными нуклеофильными группами нуклеофильного полимера, с образованием ковалентной связи, указанные химически активные полимерные частицы имеют диаметр в пределах 0,5-100 мкм и присутствуют в количестве, по меньшей мере, 3% масс. структуры волокнистого носителя.

Термин "гемостатический лист", как используется в настоящем документе, если не указано иного, относится к листу, который может остановить кровотечение из поврежденной ткани. Гемостатический лист по настоящему изобретению может достичь гемостаза посредством превращения крови в гель и/или посредством формирования герметизации, которая закрывает область ранения.

Термин "адгезивный для ткани", как используется в настоящем документе, относится к способности гемостатического листа приклеиваться к ткани благодаря формированию ковалентных связей между листом и тканью. Образование этих ковалентных связей, как правило, требует присутствия воды.

Термин "водостойкий", как используется в настоящем документе, по отношению к структуре волокнистого носителя, означает, что эта структура не является водонерастворимой и не разрушается в воде с образованием коллоидной дисперсии при условиях нейтрального pH (pH 7) и при температуре 37°C.

Термин "внутреннее пространство", как используется в настоящем документе, относится к полному ("пустому") пространству в структуре волокнистого носителя. Внутреннее пространство в структуре волокнистого носителя дает возможность для введения химически активных полимерных частиц в структуру. Кровь и другие телесные жидкости также могут проникать во внутреннее пространство, давая возможность для растворения водорастворимого электрофильного полимера в химически активных полимерных частицах.

Концентрация химически активных полимерных частиц, имеющих диаметр в пределах 0,5-100 мкм, выражается как % масс. от структуры волокнистого носителя самой по себе, то есть, без химически активных полимерных частиц.

"Водорастворимый электрофильный полимер, несущий химически активные электрофильные группы", который используется по настоящему изобретению, несет, по меньшей мере, три химически активных группы, которые могут взаимодействовать с аминными группами в тканях и крови с образованием ковалентной связи. Этот водорастворимый электрофильный полимер имеет молекулярную массу, по меньшей мере, 1 кДа и растворимость в дистиллированной воде при 20°C, по меньшей мере, 50 г/л.

Термин "емкость поглощения воды" как используется в настоящем документе, представляет собой меру способности гемостатического листа поглощать воду. Емкость поглощения воды определяется посредством взвешивания образца сухого листа (W_d) с последующим погружением образца в дистиллированную воду (37°C) на 45 минут. Затем образец удаляют из воды и вода, прилипшая снаружи к подложке, удаляется, после чего образец снова взвешивают (W_w). Емкость поглощения воды = $100\% \times (W_w - W_d) / W_d$. Емкость поглощения воды является показателем пористости подложки, а также ее способности к набуханию в присутствии воды.

Термин "коллаген", как используется в настоящем документе, относится к главному структурному белку во внеклеточном пространстве различных соединительных тканей

организмов животных. Коллаген образует характерную тройную спираль из трех полипептидных цепей. В зависимости от степени минерализации, коллагеновые ткани могут быть либо жесткими (кости) либо податливыми (сухожилия) или иметь градиент от жесткости к податливости (хрящи). Если не указано иного, термин "коллаген" также охватывает модифицированные коллагены, иные чем желатин.

Термин "желатин", как используется в настоящем документе, относится к смеси пептидов и белков, получаемой посредством частичного гидролиза коллагена, экстрагируемого из кожи, костей и соединительных тканей животных, таких как домашний крупный рогатый скот, куры, свиньи и рыба. В ходе гидролиза, природные молекулярные связи между отдельными нитями коллагена разрушаются до формы, которая перегруппируется легче.

Термин "полиоксазолин", как используется в настоящем документе, относится к поли(N-ацилалкиленимину) или поли(ароилалкиленимину) и далее упоминается как РОх. Пример РОх представляет собой поли(2-этил-2-оксазолин). Термин "полиоксазолин" также охватывает сополимеры РОх.

Химически активные полимерные частицы могут однородно распределяться во внутреннем пространстве структуры волокнистого носителя в том смысле, что плотность частиц в основном одинакова по всей структуре носителя. Химически активные полимерные частицы могут также неоднородно распределяться по структуре носителя. Например, если гемостатический лист приготавливают в форме ламината тонких слоев структуры волокнистого носителя и слоев химически активных полимерных частиц, плотность химически активных полимерных частиц в листе может флуктуировать. Для определенных применений может быть преимущественным, если плотность химически активных полимерных частиц показывает градиент, например, когда плотность химически активных частиц ниже всего вблизи стороны листа, которая, как предполагается, наносится на кровоточащую рану, и самой высокой вблизи другой стороны листа.

Распределение диаметров химически активных полимерных частиц можно определять соответствующим образом посредством лазерной дифракции с использованием Malvern Mastersizer 2000 в сочетании с Stainless Steel Sample Dispersion Unit. Установку для диспергирования образцов заполняют приблизительно 120 мл циклогексана, который стабилизируют в течение 5-10 минут при скорости перемешивания 1800 об/мин, с последующим фоновым измерением (пустое измерение). Пробирку с образцом встряхивают и поворачивают горизонтально 20 раз, затем, примерно 50 мг диспергируют в установке для диспергирования образцов, содержащей циклогексан. После введения образца в установку для диспергирования, образец перемешивают в течение полутора минут при 1800 об/мин для обеспечения соответствующего диспергирования всех частиц перед осуществлением измерения. Ультразвуковой обработки диспергированных частиц не производят. Средний размер частиц выражается как $D[4.3]$, взвешенный по объему средний диаметр $(\sum n_i D_i^4) / (\sum n_i D_i^3)$.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, в отличие от волокнистого герметика для тканей, описанного в US 2011/0250257, гемостатический лист по настоящему изобретению не образует гидрогеля, то есть, набухающей в воде полимерной матрицы, которая может поглощать значительное количество воды для формирования эластичного геля.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, гемостатический лист по настоящему изобретению является биопоглощаемым, это означает, что структура носителя, химически активные полимерные частицы и любые другие

компоненты гемостатического листа в конечном счете поглощаются в организме. Поглощение структуры носителя и химически активных полимерных частиц, как правило, требует химического разложения (например, гидролиза) полимеров, содержащихся в нем.

5 Полное биопоглощение гемостатического листа организмом человека, как правило, достигается через 1-10 недель, предпочтительно, через 2-8 недель.

Гемостатический лист по настоящему изобретению, как правило, имеет среднюю толщину без сжатия 0,5-25 мм. Более предпочтительно, средняя толщина без сжатия находится в пределах 1-10 мм, наиболее предпочтительно, в пределах 1,5-5 мм.

10 Размеры гемостатического листа предпочтительно являются такими, что верх и низ листа, каждый, имеет площадь поверхности, по меньшей мере, 2 см^2 , более предпочтительно, по меньшей мере, 10 см, а наиболее предпочтительно, $25-50 \text{ см}^2$. Как правило, лист имеет прямоугольную форму и имеет длину 25-200 мм, ширину 25-200

15 мм. Гемостатический лист предпочтительно имеет плотность без сжатия меньше 200 мг/см^3 , более предпочтительно, меньше 150 мг/см^3 , а наиболее предпочтительно $10-100 \text{ мг/см}^3$.

20 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения химически активные полимерные частицы однородно распределяются во внутреннем пространстве структуры волокнистого носителя. В другом варианте осуществления настоящего изобретения гемостатический лист представляет собой ламинат, содержащий чередующиеся слои структуры волокнистого носителя и слои химически активных полимерных частиц. В

25 предпочтительно должны вводиться в слои структуры волокнистого носителя, которые разделяют слои химически активных полимерных частиц.

Гемостатический лист по настоящему изобретению предпочтительно является по существу безводным. Как правило, гемостатический лист имеет содержание воды не более 5% масс., более предпочтительно, не более 2% масс., а наиболее предпочтительно,

30 не более 1% масс.

Емкость поглощения воды гемостатического листа предпочтительно составляет, по меньшей мере, 50%, более предпочтительно, находится в пределах от 100% до 800%, наиболее предпочтительно, в пределах от 200% до 500%.

35 Гемостатический лист по настоящему изобретению является предпочтительно стерильным.

Химически активные полимерные частицы в гемостатическом листе предпочтительно содержат водорастворимый электрофильный полимер, который несет химически активные электрофильные группы, выбранные из сложных эфиров карбоновых кислот, сложных сульфонатных эфиров, сложных фосфонатных эфиров, сложных

40 пентафторфениловых эфиров, сложных п-нитрофениловых эфиров, сложных п-нитротииофениловых эфиров, групп галогенангидридов, ангидридов, кетонов, альдегидов, изоцианато, тиоизоцианато, изоциано, эпоксидов, активированных гидроксильных групп, олефинов, простых глицидиловых эфиров, карбоксила, сложных

45 сукцинимидиловых эфиров, сложных сульфосукцинимидиловых эфиров, малеимида (малеимидил), этенсульфонила, сложных имида эфиров, ацетоацетата, галогенацетата, ортопиридилдисульфида, дигидроксифениловых производных, винила, акрилата, акриламида, йодацетамида и их сочетаний. Более предпочтительно, химически активные электрофильные группы выбирают из сложных эфиров карбоновых кислот, сложных

сульфонатных эфиров, сложных фосфонатных эфиров, сложных пентафторфениловых эфиров, сложных п-нитрофениловых эфиров, сложных п-нитротиофениловых эфиров, групп галогенангидридов, ангидридов, кетонов, альдегидов, изоцианато, тиоизоцианато, изоциано, эпоксидов, активированных гидроксильных групп, простых глицидиловых эфиров, карбоксила, сложных сукцинимидиловых эфиров, сложных сульфосукцинимидиловых эфиров, сложных имидо эфиров, дигидроксифениловых производных и их сочетаний. Еще более предпочтительно, химически активные электрофильные группы выбирают из галогенацеталей, ортопиримидилдисульфида, малеимидов, винилсульфона, дигидроксифениловых производных, винила, акрилата, акриламида, йодацетамида, сложных сукцинимидиловых эфиров и их сочетаний. Наиболее предпочтительно, химически активные электрофильные группы выбирают из малеимидов, винила, акрилата, акриламида, сложных сукцинимидиловых эфиров, сложных сульфосукцинимидиловых эфиров и их сочетаний.

Примеры сложных сукцинимидиловых эфиров, которые можно использовать, включают сукцинимидилглутарат, сукцинимидилпропионат, сукцинимидилсукцинамид, сукцинимидилкарбонат, дисукцинимидилсуберат, бис(сульфосукцинимидил)суберат, дитиобис(сукцинимидилпропионат), бис(2-сукцинимидооксикарбонилокси)этилсульфон, 3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат), сукцинимидилкарбамаат, сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат, бис(сульфосукцинимидил)суберат, сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, дитиобис-сульфосукцинимидилпропионат, дисульфо-сукцинимидилтартрат; бис[2-(сульфосукцинимидилоксикарбонилоксиэтилсульфон)], этиленгликоль бис(сульфосукцинимидилсукцинат), дитиобис-(сукцинимидилпропионат).

Примеры дигидроксифениловых производных, которые можно использовать, включают дигидроксифенилаланин, 3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA), допамин, 3,4-дигидрокси-3-гидрокси-коричную кислоту (ДОНА), норэпинефрин, эпинефрин и катехол.

Использование структуры волокнистого носителя в гемостатическом листе по настоящему изобретению дает то преимущество, что химически активные полимерные частицы можно однородно распределить по этой структуре носителя без сложностей. Такого однородного распределения гораздо сложнее достичь, например, в структурах вспененных носителей.

Волокна в структуре волокнистого носителя предпочтительно имеют средний диаметр 1-500 мкм, более предпочтительно, 2-300 мкм, а наиболее предпочтительно, 5-200 мкм. Средний диаметр волокон можно соответствующим образом определить с использованием микроскопа.

Как правило, по меньшей мере, 50% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 80% масс. волокон в структуре волокнистого носителя имеют диаметр 1-300 мкм и длину, по меньшей мере, 1 мм.

Предпочтительно, по меньшей мере, 50% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 80% масс. волокон в структуре волокнистого носителя имеет аспектное отношение (отношение длины к диаметру), по меньшей мере, 1000.

Структура волокнистого носителя, которая используется по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой структуру войлока, тканую структуру или вязаную структуру. Наиболее предпочтительно, структура волокнистого носителя представляет собой структуру войлока. В настоящем документе термин "структура войлока" относится к структуре, которую получают посредством валяния и прессования волокон вместе с формированием когезивных материалов.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, структура

волокнистого носителя является биodeградируемой.

Нуклеофильный полимер, который содержится в структуре волокнистого носителя, может однородно распределяться среди волокон, которые содержатся в структурах носителей, или его можно наносить как наружный слой покрытия. Присутствие нуклеофильного полимера в структуре носителя улучшает как адгезию, так и гемостатические свойства гемостатического листа.

Предпочтительно, волокна структуры волокнистого носителя содержат, по меньшей мере, 5% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 10% масс., а более предпочтительно, по меньшей мере, 50% масс. нуклеофильного полимера. Наиболее предпочтительно, волокна состоят из указанного нуклеофильного полимера.

Нуклеофильный полимер, который содержится в волокнах структуры носителя, как правило, содержит, по меньшей мере, 2 химически активных нуклеофильных групп, более предпочтительно, по меньшей мере, 5 химически активных нуклеофильных групп, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 10 химически активных нуклеофильных групп, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 20 химически активных нуклеофильных групп.

Эти химически активные нуклеофильные группы предпочтительно выбирают из аминных групп, тиольных групп, фосфиновых групп и их сочетаний. Более предпочтительно, эти химически активные нуклеофильные группы выбирают из аминных групп, тиольных групп и их сочетаний. Наиболее предпочтительно, химически активные нуклеофильные группы представляют собой аминные группы. Эти аминные группы предпочтительно выбираются из первичных аминных групп, вторичных аминных групп и их сочетаний.

Нуклеофильный полимер в волокнах структуры волокнистого носителя предпочтительно имеет содержание азота, по меньшей мере, 1% масс., более предпочтительно, 5-10% масс., а наиболее предпочтительно, 15-25% масс.

Нуклеофильный полимер предпочтительно выбирают из белка, хитозана, синтетического полимера, несущего химически активные нуклеофильные группы, из углеводных полимеров, несущих химически активные нуклеофильные группы и их сочетаний. Более предпочтительно, нуклеофильный полимер выбирается из желатина, коллагена, хитозана и их сочетаний. Еще более предпочтительно, нуклеофильный полимер представляет собой желатин, наиболее предпочтительно, поперечно сшитый желатин.

Хитозан представляет собой биodeградируемый нетоксичный сложный углевод, производное хитина (поли-N-ацетил-D-глюкозамин), встречающееся в природе вещество. Хитозан представляет собой деацетилированную форму хитина. Хитозан, применяемый по настоящему изобретению, предпочтительно имеет степень деацетилирования более 70%.

Структура волокнистого носителя предпочтительно содержит, по меньшей мере, 50% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 80% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 90% масс. волокон, содержащих нуклеофильный полимер, несущий химически активные нуклеофильные группы.

В предпочтительном варианте осуществления, структура волокнистого носителя содержит, по меньшей мере, 50% масс., более предпочтительно по меньшей мере, 80% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 90% масс. волокон, содержащих, по меньшей мере, 50% масс. нуклеофильного полимера, несущего химически активные нуклеофильные группы.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, структура

волокнистого носителя содержит, по меньшей мере, на 50% масс., более предпочтительно по меньшей мере, 80% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 90% масс. волокон, полученных из желатина, коллагена или хитозана.

Предпочтительные коллагены не содержат телопептидных областей ("ателопептидный коллаген"). Коллаген, используемый по настоящему изобретению, предпочтительно выбирается из группы из микрофибриллярного коллагена, синтетического коллагена человека, такого как коллаген типа I, коллаген типа III, или из сочетания коллагена типа I и коллагена типа III. Коллаген, поперечно сшитый с использованием тепла, радиации или химических агентов, таких как глутаральдегид также можно использовать.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, волокна в структуре волокнистого носителя содержат, по меньшей мере, 50% масс, более предпочтительно, по меньшей мере, 80% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 90% масс. желатина. Желатин в волокнах предпочтительно имеет прочность по Блуму 200 или больше.

В особенно преимущественном варианте осуществления, структура волокнистого носителя содержит, по меньшей мере, 50% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 80% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 90% масс. частично поперечно сшитого желатина. Использование частично поперечно сшитого желатина дает то преимущество, что структура волокнистого носителя является как достаточно стабильной, так и гибкой при температуре тела и что набухание структуры волокнистого носителя не дает в результате образования структуры волокнистого геля с закрытыми порами.

При приготовлении гемостатического листа по настоящему изобретению, может быть преимущественным взаимодействие части химически активных электрофильных групп в электрофильном полимере химически активных полимерных частиц с химически активными нуклеофильными группами нуклеофильного полимера. Таким образом, химически активные полимерные частицы могут эффективно фиксироваться в структуре волокнистого носителя.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, химически активные нуклеофильные группы нуклеофильного полимера в волокнах структуры волокнистого носителя, включают аминовые группы и химически активные электрофильные группы электрофильного полимера в химически активных полимерных частицах выбираются из сложных эфиров карбоновых кислот, сложных сульфонатных эфиров, сложных фосфонатных эфиров, сложных пентафторфениловых эфиров, сложных п-нитрофениловых эфиров, сложных п-нитротииофениловых эфиров, групп галогенангидридов, ангидридов, кетонов, альдегидов, изоцианато, тиоизоцианато, изоциано, эпоксидов, активированных гидроксильных групп, простых глицидиловых эфиров, карбоксила, сложных сукцинимидиловых эфиров, сложных сульфосукцинимидиловых эфиров, сложных имидо эфиров, дигидроксифениловых производных и их сочетаний.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, химически активные нуклеофильные группы нуклеофильного полимера включают тиольные группы и химически активные электрофильные группы электрофильного полимера в химически активных полимерных частицах выбирают из галогенацеталей, ортопиридилдисульфида, малеимидов, винилсульфона, дигидроксифенильных производных, винила, акрилата, акриламида, йодацетамида, сложных сукцинимидиловых эфиров, сложных сульфосукцинимидиловых эфиров и их сочетаний. Более

предпочтительно, химически активные электрофильные группы выбирают из сложных сукцинимидиловых эфиров, сложных сульфосукцинимидиловых эфиров, галогенацеталей, малеимидов или дигидроксифениловых производных и их сочетаний. Наиболее предпочтительно, химически активные электрофильные группы выбирают из

5 малеимидов или дигидроксифениловых производных и их сочетаний.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, структура волокнистого носителя не содержит окисленной регенерированной целлюлозы.

Предпочтительные структуры волокнистого носителя имеют структуру открытых пор с проницаемостью для воздуха, по меньшей мере, $0,1 \text{ л/мин} \times \text{см}^2$, более

10 предпочтительно, по меньшей мере, $0,5 \text{ л/мин} \times \text{см}^2$.

Проницаемость для воздуха определяется согласно EN ISO 9237:1995 (Textiles - Determination of permeability of fabrics to air).

Волокна в структуре волокнистого носителя можно получить с помощью способов, известных в данной области, таких как электропрядение, электроаэродинамическое прядение и прядение с помощью высокоскоростного роторного распылителя. Получение структуры волокнистого носителя посредством прядения с помощью

15 высокоскоростного роторного распылителя описано в US 2015/0010612. Можно также использовать в качестве структуры волокнистого носителя коммерчески доступные

гемостатические волокнистые листы. Пример пригодного для использования коммерческого продукта представляет собой GELITA TUFT-IT® (в прошлом Gelita Medical).

Химически активные полимерные частицы предпочтительно присутствуют в гемостатическом листе по настоящему изобретению в количестве 5-90%, более

25 предпочтительно, 10-80%, еще более предпочтительно, 20-75%, а наиболее предпочтительно, 50-70% масс. структуры волокнистого носителя.

Химически активные полимерные частицы предпочтительно содержат, по меньшей мере, 10% масс. водорастворимого электрофильного полимера. Более предпочтительно, химически активные полимерные частицы содержат, по меньшей мере, 50% масс., более

30 предпочтительно, по меньшей мере, 90% масс. водорастворимого электрофильного полимера.

Химически активные полимерные частицы, которые распределены во внутреннем пространстве структур волокнистого носителя, предпочтительно имеют взвешенный по объему средний размер частиц в пределах 2-75 мкм, более предпочтительно, в

35 пределах 1-50 мкм, а наиболее предпочтительно, в пределах 1-25 мкм.

Химически активные полимерные частицы по настоящему изобретению можно приготовить различными способами, например, посредством помола, посредством сушки распылением полимерного раствора, посредством сушки вымораживанием, посредством охлаждения распылением полимерного расплава, посредством

40 гранулирования порошкообразной смеси или посредством нанесения покрытия в псевдооживленном слое.

Водорастворимый электрофильный полимер, как правило, имеет молекулярную массу, по меньшей мере, 2 кДа, более предпочтительно, по меньшей мере, 5 кДа, и наиболее предпочтительно, 10-100 кДа.

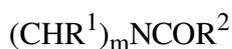
Водорастворимый электрофильный полимер предпочтительно имеет растворимость в дистиллированной воде при 20°C, по меньшей мере, 100 г/л, более предпочтительно, по меньшей мере, 200 г/л.

Водорастворимый электрофильный полимер, который используется по настоящему изобретению, предпочтительно содержит, по меньшей мере, 4 химически активных

электрофильных группы, более предпочтительно, по меньшей мере, 8 химически активных электрофильных групп, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 16 химически активных электрофильных групп, а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 32 химически активных электрофильных групп.

5 Водорастворимый электрофильный полимер, который присутствует в химически активных полимерных частицах, предпочтительно выбирается из полиоксазолинов, полиэтиленгликолей, поливинилпирролидонов, полиуретанов (например, как описано в WO 2017/171551) и их сочетаний. Еще более предпочтительно, электрофильный полимер выбирается из полиоксазолинов, полиэтиленгликолей и их сочетаний. Наиболее
10 предпочтительно, электрофильный полимер представляет собой полиоксазолин.

Полиоксазолин, содержащий химически активные электрофильные группы, предпочтительно получают из полиоксазолина, у которого повторяющиеся единицы представлены следующей формулой (I):



15 где R^2 и каждый из R^1 независимо выбираются из H, необязательно замещенного C_{1-22} алкила, необязательно замещенного циклоалкила, необязательно замещенного аралкила, необязательно замещенного арила; и m равно 2 или 3.

20 Предпочтительно, R^1 и R^2 в формуле (I) выбирают из H и C_{1-8} алкила, еще более предпочтительно, из H и C_{1-4} алкила. R^1 , наиболее предпочтительно, представляет собой H. Целое число m в формуле (I) предпочтительно равно 2.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, полиоксазолин представляет собой полимер, еще более предпочтительно, гомополимер 2-алкил-2-оксазолина,
25 указанный 2-алкил-2-оксазолин выбирают из 2-метил-2-оксазолина, 2-этил-2-оксазолина, 2-пропил-2-оксазолина, 2-бутил-2-оксазолина и их сочетаний. Предпочтительно, полиоксазолин представляет собой гомополимер 2-пропил-2-оксазолина или 2-этил-оксазолина. Наиболее предпочтительно, полиоксазолин представляет собой гомополимер 2-этил-оксазолина.

30 Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, водорастворимый электрофильный полимер содержит, по меньшей мере, 20 оксазолиновых единиц, более предпочтительно по меньшей мере, 30 оксазолиновых единиц, а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 80 оксазолиновых единиц. Электрофильный полимер предпочтительно содержит в среднем, по меньшей мере, 0,05 химически активной
35 электрофильной группы на оксазолиновый остаток. Еще более предпочтительно, электрофильный полимер содержит в среднем, по меньшей мере, 0,1 химически активной электрофильной группы на оксазолиновый остаток. Наиболее предпочтительно, электрофильный полимер содержит в среднем 0,12-0,5 химически активной электрофильной группы на оксазолиновый остаток.

40 Водорастворимый электрофильный полимер, как правило, несет в среднем, по меньшей мере, 10, более предпочтительно, по меньшей мере, 20 химически активных электрофильных групп.

Полиоксазолин может нести химически активные электрофильные группы в своих боковых цепях (боковые химически активные электрофильные группы), на своих
45 окончаниях, или там и там.

Полиоксазолин, который используют по настоящему изобретению, преимущественно содержит одну или несколько боковых химически активных электрофильных групп. Как правило, полиоксазолин содержит 0,03-0,5 боковой химически активной

электрофильной группы на мономер, более предпочтительно, 0,04-0,35 боковой химически активной электрофильной группы на мономер, еще более предпочтительно, 0,05-0,25 боковой химически активной электрофильной группы на мономер.

Полиэтиленгликоль (PEG), содержащий химически активные электрофильные группы, который применяется по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой многолучевой PEG или звездообразный PEG, содержащий, по меньшей мере, 3 луча, более предпочтительно, по меньшей мере, 4 луча, заканчивающихся химически активной электрофильной группой.

Кроме водорастворимого электрофильного полимера, химически активные полимерные частицы могут соответствующим образом содержать полисахарид, выбранный из декстрана, альгината, окисленной целлюлозы (включая окисленную регенерированную целлюлозу (ORC)), гидроксипропилцеллюлозы, гидроксиметилцеллюлозы, гиалуроновой кислоты; и из их сочетаний. Предпочтительно, такой полисахарид содержится в химически активных полимерных частицах при концентрации, по меньшей мере, 15% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 25% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 50% масс. В особенно предпочтительном варианте осуществления химически активные полимерные частицы содержат, по меньшей мере, 25% масс., наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 50% масс. ORC.

В преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения, кроме водорастворимого электрофильного полимера, химически активные полимерные частицы дополнительно содержат нуклеофильный агент для поперечной сшивки, который содержит, по меньшей мере, две химически активных нуклеофильных группы, которые могут взаимодействовать с химически активными электрофильными группами другого водорастворимого полимера с образованием ковалентной связи, и необязательно, один или несколько полисахаридов. Введение нуклеофильного агента для поперечной сшивки дает то преимущество, что гемостатические и адгезивные свойства листа могут улучшаться, когда водорастворимый электрофильный полимер будет взаимодействовать с нуклеофильным агентом для поперечной сшивки, когда кровь или, что важнее, когда телесные жидкости, содержащие относительно малое количество нуклеофильного белка (например, печеночная желчь), поступают в лист. Эта реакция поперечной сшивки будет приводить к формированию гидрогеля, который иммобилизует поток крови или телесной жидкости, и этот гидрогель будет прилипать к тканям из-за образования ковалентных связей между химически активными электрофильными группами в гидрогеле и аминными/тиольными группами в тканях. Посредством объединения водорастворимого электрофильного полимера и нуклеофильного агента для поперечной сшивки в одной частице, обеспечивается то, что эти два химически активных компонента могут однородно распределяться по гемостатическому листу, что не происходит сегрегации в ходе транспортировки и манипуляций и что эти компоненты могут взаимодействовать непосредственно друг с другом, когда частицы вступают в контакт с кровью или водными телесными жидкостями.

Химически активные полимерные частицы, содержащие сочетание водорастворимого полимера, несущего химически активные электрофильные группы, и нуклеофильного агента для поперечной сшивки, то есть химически активные гибридные частицы можно получать посредством влажного гранулирования и последующей сушки, предпочтительно, при пониженном давлении. Гранулирующая жидкость должна выбираться так, чтобы в ходе гранулирования происходило мало реакций между

водорастворимым электрофильным полимером и нуклеофильным агентом для поперечной сшивки, или чтобы они вообще не происходили. Этого можно достичь, например, посредством использования гранулирующей жидкости, в которой, по меньшей мере, один из этих двух компонентов является нерастворимым. Наиболее
5 предпочтительно, водорастворимый полимер, несущий химически активные электрофильные группы, является нерастворимым в гранулирующей жидкости.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, химически активные полимерные частицы представляют собой агломераты частиц, содержащие: (i) электрофильные частицы, содержащие водорастворимый электрофильный полимер; и
10 (ii) нуклеофильные частицы, содержащие нуклеофильный агент для поперечной сшивки.

Электрофильные частицы предпочтительно содержат, по меньшей мере, 30% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 50% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 80% масс. водорастворимого электрофильного полимера.

Нуклеофильные частицы предпочтительно содержат, по меньшей мере, 30% масс.,
15 более предпочтительно, по меньшей мере, 50% масс., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 80% масс. нуклеофильного агента для поперечной сшивки.

Как правило, химически активные гибридные частицы согласно настоящему варианту осуществления имеют следующую композицию:

(a) 50-95% масс. водорастворимого электрофильного полимера, несущего, по меньшей
20 мере, три химически активных электрофильных группы;

(b) 5-50% масс. нуклеофильного агента для поперечной сшивки;

(c) 0-50% масс. полисахарида;

где сочетание компонентов (a) - (c) вместе составляет, по меньшей мере, 80% масс., более предпочтительно, по меньшей мере, 90% масс. химически активных полимерных
25 частиц. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, водорастворимый электрофильный полимер, несущий химически активные электрофильные группы, которые используются в этом варианте осуществления, представляет собой полиоксазолин (EL-POx).

Химически активные полимерные частицы предпочтительно содержат
30 водорастворимый электрофильный полимер и нуклеофильный агент для поперечной сшивки в таких количествах, что отношение общего количества химически активных электрофильных групп, обеспечиваемых водорастворимым электрофильным полимером, и общего количества химически активных нуклеофильных групп, обеспечиваемых нуклеофильным агентом для поперечной сшивки, находится в пределах от 25:1 до 1:1,
35 более предпочтительно, в пределах от 18:1 до 2:1, а наиболее предпочтительно, в пределах от 12:1 до 2,5:1.

Нуклеофильный агент для поперечной сшивки предпочтительно содержит, по меньшей мере, 3 химически активных нуклеофильных группы, более предпочтительно, по меньшей мере, 5 химически активных нуклеофильных групп, еще более
40 предпочтительно, по меньшей мере, 10 химически активных нуклеофильных групп, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 20 химически активных нуклеофильных групп.

Химически активные нуклеофильные группы нуклеофильного агента для поперечной сшивки предпочтительно выбирают из аминовых групп, тиольных групп, фосфиновых
45 групп и их сочетаний, более предпочтительно, их выбирают из аминовых групп, тиольных групп и их сочетаний. Наиболее предпочтительно, эти химически активные нуклеофильные группы представляют собой аминовые группы. Согласно предпочтительному варианту осуществления, химически активные нуклеофильные

группы, присутствующие в нуклеофильном агенте для поперечной сшивки, представляют собой первичные аминовые группы.

Нуклеофильный агент для поперечной сшивки предпочтительно имеет содержание азота, по меньшей мере, 1% масс., более предпочтительно, 5-10% масс., а наиболее предпочтительно, 15-25% масс.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения нуклеофильный агент для поперечной сшивки представляет собой низкомолекулярный полиамин, имеющий молекулярную массу меньше 1000 г/моль, более предпочтительно, меньше 700 г/моль, а наиболее предпочтительно, меньше 400 г/моль. Примеры пригодных для использования низкомолекулярных полиаминов, включают дилизин; трилизин; тетрализин; пентализин; дицистеин; трицистеин; тетрацистеин; пентацистеин; олигопептиды, содержащие два или более аминокислотных остатка, выбранных из лизина, орнитина, цистеина, аргинина и их сочетаний, и другие аминокислотные остатки; спермин; трис(аминометил)амин; аргинин и их сочетания.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, нуклеофильный агент для поперечной сшивки представляет собой высокомолекулярный (>1000 г/моль) полиамин, выбранный из группы нуклеофильно активированных POx (NU-POx); амин-функционализированный полиэтиленгликоль, хитозан; производные хитозана (например, дикарбокси-derivатизированные хитозановые полимеры, как описано в WO 2009/028965), полиэтиленимины; поливиниламин; полиаллиламин; амин-функционализированные поли(мет)акрилаты; сахараиды, содержащие амин-функциональные остатки, такие как аминокликозиды; полипептиды, содержащие два или более аминокислотных остатков, выбранных из лизина, орнитина, цистеина, аргинина, и их сочетания; и их сочетаний. Альбумин, из природного источника или рекомбинантный, представляет собой пример полипептида, который можно соответствующим образом использовать как полипептид. 4,6-Дизамещенный деоксистрептамин (Kanamycin A, Amikacin, Tobramycin, Dibekacin, Gentamicin, Sisomicin, Netilmicin), 4,5-дизамещенный деоксистрептамин (Neomycins B, C и Neomycin E (паромомицин)) и не- деоксистрептаминовые аминокликозиды, например, стрептомицин, являются примерами аминокликозидов, которые можно использовать. Наиболее предпочтительно, высокомолекулярный полиамин представляет собой NU-POx.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеофильный агент для поперечной сшивки, используемый в химически активных полимерных частицах, представляет собой низкомолекулярный политиол, содержащий 2 или более тиольных групп, имеющий молекулярную массу меньше 1000 г/моль, более предпочтительно, меньше 700 г/моль, а наиболее предпочтительно, меньше 400 г/моль. Еще более предпочтительно, нуклеофильный агент для поперечной сшивки выбирается из группы тримеркаптопропана, этандитиола, пропандитиола, простого 2-меркаптоэтилового эфира, 2,2'-(этилендиокси)диэтанттиола, тетра(этиленгликоль)дитиола, пента(этиленгликоль)дитиол, гексаэтиленгликольдитиола; тиол-модифицированного пентаэритриттола, дипентаэритриттола, триметилпропана или дитриметилпропана; олигопептидов, содержащих, по меньшей мере, две цистеиновых единицы.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, нуклеофильный агент для поперечной сшивки, используемый в химически активных полимерных частицах, представляет собой высокомолекулярный (>1000 г/моль) политиол, выбранный из группы: NU-POx, содержащих, по меньшей мере, две тиольных группы; тиол-функционализированных поли(мет)акрилатов; полисахаридов, содержащих тиол-функциональные остатки, полипептидов, содержащих две или более тиольных

групп.

Предпочтительно, нуклеофильный агент для поперечной сшивки представляет собой высокомолекулярный полиамин, выбранный из группы нуклеофильно активированных РОх (NU-РОх); амин-функционализованного полиэтиленгликоля, хитозана; производных хитозана, полиэтилениминов; поливиниламина; полиаллиламина; амин-функционализованных поли(мет)акрилатов; сахаридов, содержащих амин-функциональные остатки; полипептидов, содержащих два или более аминокислотных остатков, выбранных из лизина, орнитина, цистеина, аргинина и их сочетаний; и их сочетаний. Более предпочтительно, нуклеофильный агент для поперечной сшивки выбирается из NU-РОх; амин-функционализованного полиэтиленгликоля; желатина, коллагена и их сочетаний. Наиболее предпочтительно, высокомолекулярный полиамин представляет собой NU-РОх.

Высокомолекулярный полиамин предпочтительно содержит три или более аминовых группы, более предпочтительно, 10 или более аминовых групп, а наиболее предпочтительно 20 или более аминовых групп.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения химически активные полимерные частицы содержат 50-95% масс. EL-РОх и 5-50% масс. NU-РОх, более предпочтительно, 60-90% масс. EL-РОх и 10-40% масс. NU-РОх, а наиболее предпочтительно, 70-85% масс. EL-РОх и 15-30% масс. NU-РОх.

Согласно другому преимущественному варианту осуществления химически активные полимерные частицы содержат сухую буферную систему. Предпочтительно, буферная система имеет буферный рН в пределах от 7 до 11, более предпочтительно, в пределах от 8 до 10.

Предпочтительно, буферная система имеет буферную емкость, по меньшей мере, 10 ммоль.л⁻¹.рН⁻¹. Более предпочтительно, буфер емкость составляет, по меньшей мере, 25 ммоль.л⁻¹.рН⁻¹, наиболее предпочтительно, буфер емкость составляет, по меньшей мере, 50 ммоль.л⁻¹.рН⁻¹

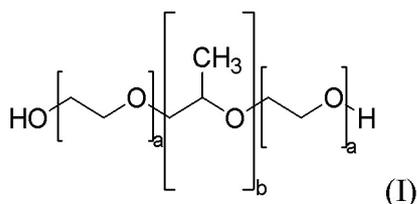
Авторы неожиданно обнаружили, что гемостатический лист, имеющий особенно желательные адгезивные свойства, можно получить посредством использования химически активных полимерных частиц, содержащих 1-20% масс., более предпочтительно, 2,5-15% масс., а наиболее предпочтительно, 5-10% масс. химически неактивного неионного полимера. Этот химически неактивный неионный полимер не содержит химически активных электрофильных групп или химически активных нуклеофильных групп.

В очень предпочтительном варианте осуществления, химически активные полимерные частицы покрыты химически неактивным неионным полимером.

Химически неактивный неионный полимер предпочтительно имеет температуру плавления в пределах 40-70°C, более предпочтительно, в пределах 45-65°C, а наиболее предпочтительно, в пределах 50-60°C. Здесь, температура плавления относится к температуре, при которой полимер полностью расплавляется.

Примеры химически неактивных неионных полимеров, которые можно соответствующим образом применять в химически активных полимерных частицах по настоящему изобретению, включают полоксамеры, полиэтиленгликоли и их сочетания. Полоксамер представляет собой неионный трехблочный сополимер, состоящий из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)) с двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)) на концах, и он представлен формулой (I)

5



10

где a представляет собой целое число от 10 до 110 и b представляет собой целое число от 20 до 60. Когда a равно 80 и b равно 27, этот полимер известен как полуксамер 188. Другие известные полуксамеры пригодные для использования в настоящем изобретении представляют собой полуксамер 237 ($a=64$; и $b=37$), полуксамер 338 ($a=141$; и $b=44$) и полуксамер 407 ($a=101$; и $b=56$). Другие полуксамеры, которые известны и могут быть пригодными для использования по настоящему изобретению, включают полуксамер 108, полуксамер 182, полуксамер 183, полуксамер 212, полуксамер 217, полуксамер 238, полуксамер 288, полуксамер 331, полуксамер 338 и полуксамер 335.

15

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления, химически неактивный неионный полимер представляет собой полуксамер, еще более предпочтительно, полуксамер, имеющий среднюю молекулярную массу 2000-18000, наиболее предпочтительно, полуксамер, имеющий среднюю молекулярную массу 7000-10000.

20

Полуксамер, наносимый на агломераты частиц, предпочтительно является твердым при комнатной температуре.

Другой аспект настоящего изобретения относится к герметичной упаковке, содержащей один или несколько гемостатических листов по настоящему изобретению.

25

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу приготовления гемостатического листа, указанный способ включает

получение листа водостойкой структуры когезивного волокнистого носителя, как определено выше;

получение химически активных полимерных частиц, как определено выше; и

распределение химически активных полимерных частиц во внутреннем пространстве структуры волокнистого носителя.

30

Химически активные полимерные частицы могут распределяться во внутреннем пространстве с использованием сухого способа или влажного способа, сухой способ является предпочтительным. В сухом способе, химически активные полимерные частицы применяются в форме порошка и этот порошок диспергируется в сухой форме во внутреннем пространстве.

35

Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления этого сухого способа, химически активные полимерные частицы распределяются во внутреннем пространстве структуры волокнистого носителя посредством встряхивания или вибраций листа структуры волокнистого носителя.

40

Согласно другому варианту осуществления сухого способа, гемостатический лист приготавливают посредством способа ламинирования, включающего:

а) получение листа структуры волокнистого носителя,

б) осаждение слоя химически активных полимерных частиц на листе структуры волокнистого носителя;

45

с) наложение другого листа структуры волокнистого носителя на слой химически активных полимерных частиц; и

необязательное повторение стадий б) и с) один или несколько раз.

Распределение химически активных полимерных частиц в ламинате, полученном

таким образом, можно облегчить посредством встряхивания или вибраций ламината.

Во влажном способе распределения химически активных полимерных частиц, дисперсия химически активных полимерных частиц в органической жидкости с низкой температурой кипения используется для пропитки структуры волокнистого носителя, с последующим выпариванием органической жидкости с низкой температурой кипения, предпочтительно, при пониженном давлении. Как правило, органическая жидкость с низкой температурой кипения имеет температуру кипения при атмосферном давлении меньше 150°C, более предпочтительно, меньше 98°C, а наиболее предпочтительно, меньше 80°C.

Предпочтительно, в настоящем способе структура носителя, содержащая распределенные химически активные полимерные частицы, нагревается до температуры выше температуры стеклования водорастворимого электрофильного полимера в течение, по меньшей мере, 5 минут. Посредством нагрева полимерных частиц таким образом, частицы становятся липкими и прилипают к структуре волокнистого носителя. Как правило, полимерные частицы нагревают до температуры, по меньшей мере, 40°C, более предпочтительно, до 50-80°C в течение, по меньшей мере, 15 минут.

Альтернативно, химически активные полимерные частицы могут приклеиваться к структуре волокнистого носителя просто посредством экспонирования структуры волокнистого носителя, содержащего распределенные химически активные полимерные частицы, для влажной атмосферы, чтобы позволить части химически активных электрофильных групп в химически активных полимерных частицах взаимодействовать с химически активными нуклеофильными группами в рассмотренных выше волокнах.

Настоящий способ предпочтительно включает стерилизацию гемостатического листа. Гемостатический лист может стерилизоваться до асептического упаковывания.

Альтернативно лист может стерилизоваться в герметичной упаковке.

Затем настоящее изобретение иллюстрируется с помощью следующих неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Как правило: когда не рассматривается в явном виде содержание остаточной влажности после сушки (в высушенном порошке, грануляте и/или в структурах когезивных волокнистых носителей), ее уровни ниже 2,0% масс/масс.

Приготовление NHS-Рох

Терполимер поли[2-(этил/гидрокси-этил-амид-этил/NHS-сложный эфир-этил-сложный эфир-этил-амид-этил)-2-оксазолина] с активированной NHS-боковой цепью, содержащей 20% NHS-сложноэфирных групп (= EL-POx, 20% NHS) синтезируют следующим образом:

Сополимер поли[2-(этил/метокси-карбонил-этил)-2-оксазолина] (DP=+/-100) синтезируют посредством CROP, используя 60% 2-этил-2-оксазолина (EtOx) и 40% 2-метоксикарбонил-этил-2-оксазолина (MestOx). Получают статистический сополимер, содержащий 40% 2-метоксикарбонил-этильных групп (¹H-ЯМР).

Во-вторых, полимер, содержащий 40% 2-метоксикарбонил-этильных групп, взаимодействует с этаноламином, с получением сополимера с 40% 2-гидрокси-этил-амид-этильных групп (¹H-ЯМР). После этого, половина 2-гидрокси-этил-амид-этил-групп взаимодействует с янтарным ангидридом, с получением терполимера с 60% 2-этильных групп, 20% 2-гидрокси-этил-амид-этильных групп и 20% 2-карбокси-этил-сложный эфир-этил-амид-этильных групп согласно ¹H-ЯМР. Наконец, 2-карбокси-этил-сложный эфир-этил-амид-этильные группы активируются с помощью N-

гидроксисукцинимид (NHS) и диизопропилкарбодиимида (DIC), с получением EL-POx, 20% NHS. NHS-POx содержит 20% NHS-сложноэфирных групп согласно ^1H -ЯМР. NHS-POx растворяют в пределах 2-8°C в воде (60 г в 300 мл), охлаждают при минус 80°C в течение получаса и сушат вымораживанием. Высушенный вымораживанием порошок, полученный таким образом, сушат в Rotavap при 40°C до получения содержания воды ниже 0,8% масс/масс, как определено с помощью титрования Карла Фишера. Этот сухой (белый) порошок перемалывают с использованием шаровой мельницы (Retch MM400) до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 40 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Сушка порошка NHS-POx

20 г порошка NHS-POx растворяют в воде и смешивают с 50 мг Brilliant Blue FCF (Sigma Aldrich) с использованием высокопроизводительного диспергирующего инструмента (Ultra-Turrah, IKA). Сразу после перемешивания (2 минуты) раствор замораживают при -78°C и впоследствии сушат вымораживанием в течение ночи.

Высушенный вымораживанием порошок, полученный таким образом, сушат в Rotavap при 40°C до тех пор, пока остаточное содержание воды не станет ниже 0,8% масс/масс, как определено с помощью титрования Карла Фишера. Затем высушенный (голубой) порошок перемалывают с использованием шаровой мельницы (Retch MM400) до тех пор, пока не будет получен окрашенный голубым порошок NHS-POx, имеющий средний размер частиц не больше 40 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Приготовление NU-POx

Полиоксазолин, содержащий этильные и аминовые группы в алкильной боковой цепи, синтезируют с помощью CROP из EtOx и MestOx и последующего амидирования боковых цепей сложного метилового эфира с помощью этилендиамина с получением сополимера поли(2-этил/аминоэтиламидоэтил-2-оксазолина) (NU-POx). NU-POx содержит 10% NH_2 согласно ^1H -ЯМР. NU-POx растворяют в пределах 2-8°C в воде (60 г в 300 мл), охлаждают при минус 80°C в течение получаса и сушат вымораживанием.

Высушенный вымораживанием порошок, полученный таким образом, сушат в Rotavap при 40°C до получения содержания воды ниже 0,8% масс/масс, как определено с помощью титрования Карла Фишера. Этот сухой порошок измельчают в настольном устройстве для измельчения до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 100 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/P188

Химически активные грануляты NHS-POx с покрытием из P188, содержащие 1,5, 2,5 или 3,5% масс. Pluronic P188, приготавливают посредством нагрева NHS-POx вместе с порошком P188 в высокосдвиговом смесителе при 65°C в течение 10 минут с последующим охлаждением до условий окружающей среды. Гранулят с покрытием перемалывают с использованием шаровой мельницы (Retch MM400) до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 40 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Распределение размеров частиц гранулятов, полученных таким образом, представляет собой приблизительно: 90% объем <80 мкм, 50% объем <40 мкм и 10% объем <10 мкм.

Гранулят NHS-POx/P188 (2,5%) анализируют с использованием спектроскопии ^1H -ЯМР. 15 мг гранулята растворяют в 1 мл диметилсульфоксида (DMSO- d_6). Раствор переносят в пробирку для ЯМР и регистрируют спектр ^1H -ЯМР. Из полученного спектра

можно вычислить количество NHS связанного с NHS-POx. Согласно вычислениям, количество NHS связанного с NHS-POx в грануляте составляет 101 процент по сравнению с исходным материалом NHS-POx, указывая на отсутствие разложения или поперечной сшивки в ходе грануляции.

5 Гранулят NHS-POx/P188 дополнительно анализируют посредством эксклюзионной хроматографии. 5 мг гранулята растворяют в N, N-диметилацетамиде, содержащем 50 мМ хлорида лития (2,50 мл), который является элюентом для анализа SEC. SEC измеряют в сравнении с поли(метилметакрилатными) стандартами и из полученной эксклюзионной хроматограммы, определяют M_n , M_w и PDI. PDI составляет не больше 1,5, что указывает
10 на то, что в ходе грануляции не происходит поперечной сшивки.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/карбонат

Смесь 1:1 моль/моль карбоната натрия и гидрокарбоната натрия приготавливают посредством растворения 25,31 грамм карбоната натрия и 20,06 грамм гидрокарбоната натрия в 350 мл ультрачистой воды, с последующим быстрым замораживанием в жидком
15 азоте, и сушат вымораживанием. Полученный в результате порошок сушат при пониженном давлении и герметизируют в вакууме в мешке из алюминиевой фольги.

25,28 грамм NHS-POx смешивают с 1,75 грамм смеси карбоната натрия/ гидрокарбоната натрия и 0,80 мл изопропилового спирта (IPA) с использованием высокосдвигового смесителя пока не будет получен однородного порошка.

20 После перемешивания, влажные грануляты сушат при пониженном давлении до тех пор, пока содержание IPA не станет меньше 0,1% масс/масс. Высушенный гранулят перемалывают в кофемолке до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 25 мкм, и герметизируют в вакууме в мешке из алюминиевой фольги.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/P188/карбонат

25 Химически активные грануляты NHS-POx/карбонат с покрытием из P188, содержащие 1,5, 2,5 или 3,5% масс. Pluronic P188, приготавливают посредством нагрева гранулята NHS-POx/карбонат вместе с порошком P188 в высокосдвиговом смесителе при 65°C в течение 10 минут с последующим охлаждением до условий окружающей среды. Гранулят с покрытием перемалывают с использованием шаровой мельницы (Retch MM400) до
30 тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 40 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Распределение размеров частиц гранулятов, полученных таким образом, представляет собой приблизительно: 90% объем <20 мкм, 70% объем <10 мкм и 40% объем <5 мкм.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/NU-POx (гранулирование с помощью IPA)

35 Голубой или белый (неокрашенный) порошок NHS-POx смачивают изопропиловым спиртом (IPA) в высокосдвиговом смесителе, пока не будет получен однородный похожий на снег порошок, содержащий примерно 1-2% масс/масс IPA. После этого, добавляют порошок NU-POx и перемешивают. Смоченный голубой порошок NHS-POx
40 смешивают с порошком NU-POx при молярном отношении 1:0,6, указанное молярное отношение относится к отношению количества групп NHS, обеспечиваемых NHS-POx, к количеству аминовых групп, обеспечиваемых NU-POx. Смоченный неокрашенный порошок NHS-POx также перемешивают с порошком NU-POx при других молярных отношениях (1:0,8; 1:1 и 1:1,2).

45 После перемешивания, влажные грануляты сушат при пониженном давлении до тех пор, пока содержание IPA не станет меньше 0,1% масс/масс, как определено с помощью ^1H -ЯМР. Высушенные грануляты перемалывают с использованием шаровой мельницы (Retch MM400) до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 50 мкм (D

[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Распределение размеров частиц гранулятов, полученных таким образом, представляет собой приблизительно: 90% объем <90 мкм, 50% объем <45 мкм и 10% объем <15 мкм.

5 Гранулят NHS-POx/NU-POx (1:1) анализируют с использованием спектроскопии ¹H-ЯМР. 25 мг гранулята растворяют в трифторуксусной кислоте (0,20 мл) посредством обработки ультразвуком в течение 20 минут. После полного растворения гранулята, образец разбавляют дейтерированным диметилсульфоксидом (DMSO-d₆), содержащим малеиновую кислоту (2,5 мг/мл), в качестве внутреннего стандарта (0,80 мл), переносят
10 в пробирку для ЯМР и регистрируют спектр ¹H-ЯМР.

Из полученного спектра можно вычислить количество NHS, связанного с NHS-POx, вместе с молярным отношением NHS и аминовых групп, присутствующих в грануляте. Количество NHS, связанного с NHS-POx, в грануляте равно количеству NHS, связанного с исходным материалом NHS-POx, что указывает на отсутствие разложения или
15 поперечной сшивки в ходе грануляции.

Общий выход полимера, то есть сочетания NHS-POx и NU-POx, в образце для ЯМР определяют с использованием известного количества внутреннего стандарта (малеиновой кислоты) и калибровочной кривой, построенной по спектрам ¹H-ЯМР, зарегистрированным для NHS-POx и NU-POx при различных концентрациях. Общий
20 выход полимера как измерено, составляет 99 процентов, что указывает на то, что нерастворимый поперечно сшитый материал не образуется.

Гранулят NHS-POx/NU-POx (1:1) дополнительно анализируют посредством эксклюзионной хроматографии. 20 мг гранулята обрабатывают уксусным ангидридом (1,00 мл) в течение 1 час при 50°C. Затем добавляют метанол (2,00 мл) и смесь
25 перемешивают в течение дополнительного часа при 50°C. Отбирают аликвоту (0,75 мл) и удаляют все летучие продукты при пониженном давлении. Образец отбирают в N, N-диметилацетамиде, содержащем 50 мМ хлорида лития (2,50 мл), который является элюентом для анализа SEC. SEC измеряют в сравнении с поли(метилметакрилатными) стандартами и из полученной эксклюзионной хроматограммы, определяют M_n, M_w и
30 PDI. PDI составляет не больше 1,5, что указывает на то, что в ходе грануляции не происходит поперечной сшивки. Аналитическая проверка этого эксклюзионного хроматографического метода показывает, что намеренная поперечная сшивка NHS-POx с NU-POx на уровне 0,05% моль вызывает увеличение PDI до более 2,5.

35 **Приготовление химически активных гранул NHS-POx/NU-POx (грануляция с помощью ацетона)**

Голубой или белый (неокрашенный) порошок NHS-POx смачивают ацетоном в высокосдвиговом смесителе, пока не будет получен однородный похожий на снег порошок, содержащий примерно 1-2% масс/масс ацетона. После этого, добавляют порошок NU-POx и перемешивают. Смоченный голубой порошок NHS-POx смешивают
40 с порошком NU-POx при молярном отношении 1:0,20, указанное молярное отношение относится к отношению количества групп NHS, обеспечиваемых NHS-POx, к количеству аминовых групп, обеспечиваемых NU-POx. Смоченный неокрашенный порошок NHS-POx также смешивают с порошком NU-POx при других молярных отношениях (1:0,10 и 1:0,40).

45 После перемешивания, влажные грануляты сушат при пониженном давлении до тех пор, пока содержание ацетон не станет меньше 0,1% масс/масс, как определено посредством ¹H-ЯМР. Высушенные грануляты перемалывают с использованием Ultra Centrifugal Mill (Retch ZM200) и просеивают через сито для исследований с размером

сетки 63 мкм. Фракцию гранулята, которая проходит через сито, собирают, и средний размер частиц составляет не больше 50 мкм (D[4.3]). Гранулят герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Распределение размеров частиц гранулятов, полученных таким образом, представляет собой приблизительно: 90% объем <90 мкм, 50% объем <45 мкм и 10% объем <15 мкм.

Гранулят NHS-POX/NU-POx (1:0,20) анализируют с использованием спектроскопии ^1H -ЯМР. 25 мг гранулята растворяют в трифторуксусной кислоте (0,20 мл) посредством обработки ультразвуком в течение 20 минут. После полного растворения гранулята, образец разбавляют дейтерированным диметилсульфоксидом (DMSO- d_6), содержащим малеиновую кислоту (2,5 мг/мл), в качестве внутреннего стандарта (0,80 мл), переносят в пробирку для ЯМР и регистрируют спектр ^1H -ЯМР. Из полученного спектра можно вычислить количество NHS, связанного с NHS-POx, вместе с молярным отношением NHS и аминных групп, присутствующих в грануляте. Количество NHS, связанного с NHS-POx, в грануляте равно количеству NHS, связанного с исходным материалом NHS-POx, указывая на отсутствие разложения или поперечной сшивки в ходе грануляции.

Общий выход полимера, то есть сочетания NHS-POx и NU-POx, в образце для ЯМР определяют с использованием известного количества внутреннего стандарта (малеиновой кислоты) и калибровочной кривой, построенной по спектрам ^1H -ЯМР, зарегистрированным для NHS-POx и NU-POx при различных концентрациях. Общий выход полимера, как измерено, составляет 99 процентов, что указывает на то, что нерастворимый поперечно сшитый материал не образуется.

Гранулят NHS-POX/NU-POx (1:0,20) дополнительно анализируют посредством эксклюзионной хроматографии. 20 мг гранулята обрабатывают уксусным ангидридом (1,00 мл) в течение 1 час при 50°C. Затем добавляют метанол (2,00 мл) и смесь перемешивают в течение дополнительного часа при 50°C. Отбирают аликвоту (0,75 мл) и удаляют все летучие продукты при пониженном давлении. Образец отбирают в N, N-диметилацетамиде, содержащем 50 мМ хлорида лития (2,50 мл), который является элюентом для анализа SEC. SEC измеряют в сравнении с поли(метилметакрилатными) стандартами и из полученной эксклюзионной хроматограммы, определяют M_n , M_w и PDI. PDI составляет не больше 1,5, что указывает на то, что в ходе грануляции не происходит поперечной сшивки.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/NU-POx/P188

Химически активные гранулы NHS-POx/NU-POx приготавливают, как описано ранее. Затем 2,5% масс/масс химически активного гранулята NHS-POx/NU-POx с покрытием из P188 приготавливают посредством нагрева гранулята NHS-POx/NU-POx вместе с порошком P188 в высокосдвиговом смесителе при 65°C в течение 10 минут с последующим охлаждением до условий окружающей среды. Гранулят с покрытием перемалывают с использованием шаровой мельницы (Retch MM400) до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 40 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Распределение размеров частиц гранулятов, полученных таким образом, представляет собой приблизительно: 90% объем <80 мкм, 50% объем <40 мкм и 10% объем <10 мкм.

Гранулят NHS-POx/NU-POx/P188 анализируют с использованием спектроскопии ^1H -ЯМР. 25 мг порошка растворяют в трифторуксусной кислоте (0,20 мл) посредством обработки ультразвуком в течение 20 минут. После полного растворения гранулята, образец разбавляют дейтерированным диметилсульфоксидом (DMSO- d_6) (0,80 мл),

переносят в пробирку для ЯМР и спектрегистрируют ¹H-ЯМР. Из полученного спектра, количество непрореагировавшего NHS, согласно вычислениям, составляет 98 процентов по сравнению с NHS-POx.

5 Гранулят NHS-POx/NU-POx/P188 дополнительно анализируют посредством
экслюзионной хроматографии. 20 мг гранулята обрабатывают уксусным ангидридом
(1,00 мл) в течение 1 часа при 50°C. Затем добавляют метанол (2,00 мл) и смесь
перемешивают в течение дополнительного часа при 50°C. Отбирают аликвоту (0,75 мл)
и удаляют все летучие продукты при пониженном давлении. Образец отбирают в N, N-
10 диметилацетамиде, содержащем 50 мМ хлорида лития (2,50 мл), который является
элюентом для анализа SEC. SEC измеряют в сравнении с поли(метилметакрилатными)
стандартами и из полученной экслюзионной хроматограммы, определяют M_n, M_w и
PDI. PDI составляет не больше 1,5, что указывает на то, что в ходе грануляции не
происходит поперечной сшивки.

15 **Приготовление восстановленного поперечно сшитого желатина (RXL)** Восстановленный
поперечно сшитый желатин (RXL) приготавливают согласно двум процедурам:

12 грамм порошка желатина (Gelita-SPON®, Gelita Medical GmbH) растворяют в 350
мл 0,1-молярного водного раствора гидроксида натрия посредством перемешивания
в течение 2 часов при 40°C. После получения прозрачного раствора, смеси дают
20 возможность для охлаждения до температуры окружающей среды и pH доводят до 7
посредством добавления 32,5 мл 0,1-молярного водного раствора хлористоводородной
кислоты. Раствор быстро замораживают с использованием жидкого азота и сушат
вымораживанием в течение ночи. Затем порошок перемалывают в кофемолке, сушат
при пониженном давлении и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.
25 Далее, этот восстановленный поперечно сшитый желатин будет упоминаться как RXL-
LS (с низким содержанием соли).

12 грамм порошка желатина (Gelita-SPON®, Gelita Medical GmbH) растворяют в 360
мл 0,1-молярного водного раствора гидроксида натрия посредством перемешивания
в течение 10 минут при 40°C. Полученный прозрачный раствор охлаждают до
30 температуры окружающей среды и pH понижают до 7 посредством добавления 30 мл
концентрированного раствора хлористоводородной кислоты (37% масс/масс). Раствор
быстро замораживают с использованием жидкого азота и сушат вымораживанием в
течение ночи. Затем порошок перемалывают в кофемолке, сушат при пониженном
давлении и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги. Далее, этот
35 восстановленный поперечно сшитый желатин будет упоминаться как RXL-HS (с высоким
содержанием соли).

**Приготовление химически активных гранул NHS-POx/RXL (с низким содержанием
соли и с высоким содержанием соли)**

40 Химически активные гранулы NHS-POx/RXL приготавливают следующим образом:
5 г голубого порошка NHS-POx смачивают IPA в высокосдвиговом смесителе, пока не
будет получен однородный похожий на снег порошок, содержащий примерно 1-2%
масс/масс IPA. После этого, добавляют 5 г порошка RXL-LS или RXL-HS и
перемешивают. После перемешивания, влажные грануляты сушат при пониженном
давлении до тех пор, пока содержание IPA не станет меньше 0,1% масс/масс, как
45 определено с помощью ¹H-ЯМР. Высушенные грануляты перемалывают в кофемолке
до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 90 мкм (D[4.3]), и
герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Распределение размеров частиц гранулятов, полученных таким образом, представляет

собой приблизительно: 90% объем <190 мкм, 50% объем <60 мкм и 10% объем <15 мкм.

Гранулят, содержащий RXL, анализируют посредством анализа с помощью спектроскопии ^1H -ЯМР. Для этого дейтерированный хлороформ (CDCl_3), содержащий 5% (объем/объем) уксусной кислоты (1,0 мл) добавляют к 25 мг гранулята. NHS-POx селективно извлекают посредством обработки ультразвуком образца в течение 20 минут. Дисперсию пропускают через 0,22-мкм фильтр, переносят в пробирку для ЯМР и регистрируют спектр ^1H -ЯМР. Из полученного спектра, количество непрореагировавшего NHS, согласно вычислениям, составляет 98 процентов по сравнению с NHS-POx.

Выход NHS-POx в образце для ЯМР определяют с использованием триметилсилана в качестве внутреннего стандарта и калибровочной кривой, построенной по спектрам ^1H -ЯМР NHS-POx при различных концентрациях. Общий выход NHS-Pox, как измерено, составляет 100 процентов, что указывает на то, что нерастворимый поперечно сшитый материал не образуется.

Гранулят NHS-POx/RXL дополнительно анализируют посредством эксклюзионной хроматографии. Для этого, отбирают аликвоту (0,15 мл) из раствора, используемого для анализа с помощью спектроскопии ^1H -ЯМР. Этот раствор разбавляют N, N-диметилацетамидом, содержащим 50 мМ хлорида лития (1,00 мл), который является элюентом для анализа SEC. SEC измеряют в сравнении с поли(метилметакрилатными) стандартами и из полученной эксклюзионной хроматограммы, определяют M_n , M_w и PDI. PDI составляет не больше 1,5, снова, что указывает на то, что в ходе грануляции не происходит поперечной сшивки.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/RXL, содержащих карбонат

Сначала, приготавливают смесь карбоната натрия и гидрокарбоната натрия 1:1 моль/моль посредством растворения 25,31 г карбоната натрия и 20,06 г гидрокарбоната натрия в 350 мл ультрачистой воды. Раствор быстро замораживают в жидком азоте и сушат вымораживанием. Полученный в результате порошок сушат при пониженном давлении и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Приготавливают грануляты NHS-POx/RXL/карбонат следующим образом: 5 г RXL-LS или RXL-HS и 0,178 г карбоната натрия/гидрокарбоната натрия смешивают с использованием высокосдвигового смесителя. Затем добавляют 5 г голубого NHS-POx, содержащего примерно 1-2% масс/масс IPA, и перемешивают пока не будет получен однородный порошок. После перемешивания, влажные грануляты сушат при пониженном давлении до тех пор, пока содержание IPA не станет меньше 0,1% масс/масс, как определено с помощью ^1H -ЯМР. Высушенные грануляты перемалывают в кофемолке до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 100 мкм ($D[4.3]$), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/NH2-PEG

NHS-POx (6,9 г) смачивают IPA в высокосдвиговом смесителе, пока не будет получен однородный похожий на снег порошок, содержащий примерно 1-2% масс/масс IPA. Затем добавляют 8,1 г амин-PEG-амин, 2-лучевого, MW 2k (от Creative PEGWorks) (молярное отношение 1:1,16, указанное молярное отношение относится к отношению количества групп NHS, обеспечиваемых NHS-POx, к количеству аминовых групп, обеспечиваемых PEG-амином). Образовавшийся гранулят сушат при пониженном давлении до тех пор, пока содержание IPA не станет меньше 0,1% масс/масс, как определено с помощью ^1H -ЯМР. Высушенный гранулят перемалывают в кофемолке

до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 100 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Гранулят NHS-POX/NH₂-PEG анализируют с использованием спектроскопии ¹H-ЯМР. 25 мг гранулята растворяют в трифторуксусной кислоте (0,20 мл) посредством обработки ультразвуком в течение 20 минут. После полного растворения гранулята, образец разбавляют дейтерированным диметилсульфоксидом (DMSO-d₆) (0,80 мл), переносят в пробирку для ЯМР и регистрируют спектр ¹H-ЯМР. Из полученного спектра, количество непрореагировавшего NHS, согласно вычислениям, составляет 97 процентов по сравнению с NHS-POx.

Гранулят NHS-POX/NH₂-PEG дополнительно анализируют посредством эксклюзионной хроматографии. 20 мг гранулята обрабатывают уксусным ангидридом (1,00 мл) в течение 1 часа при 50°C. Затем добавляют метанол (2,00 мл) и смесь перемешивают в течение дополнительного часа при 50°C. Отбирают аликвоту (0,75 мл) и удаляют все летучие продукты при пониженном давлении.

Образец отбирают в N, N-диметилацетамиде, содержащем 50 мМ хлорида лития (2,50 мл), который является элюентом для анализа SEC. SEC измеряют в сравнении с поли (метилметакрилатными) стандартами и из полученной эксклюзионной хроматограммы, определяют M_n, M_w и PDI. PDI составляет не больше 1,5, что указывает на то, что в ходе грануляции не происходит поперечной сшивки.

Приготовление химически активных гранул NHS-PEG/NU-POx

1,07 грамма NHS-PEG, 4-лучевого, MW 10k (от Creative PEGWorks) и 0,46 грамма NU-POx тщательно перемешивают с использованием пестика и ступки с 50 мкл простого диэтилового эфира. После образования однородной смеси, ее сушат при пониженном давлении и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Приготовление химически активных гранул NHS-POx/Gelitspon

7,01 г предварительно высушенного порошка желатина (Gelita-SPON®, от Gelita Medical GmbH), имеющего содержание воды меньше 0,2% масс/масс, диспергируют в дихлорметане (200 мл) с использованием высокосдвигового смесителя, работающего при 20000 об/мин, в течение 20 минут. Затем добавляют NHS-POx (7,02 г) и перемешивание продолжают в течение 5 минут. NHS-POx не растворяется. Все летучие продукты удаляют из суспензии при пониженном давлении. Полученный порошок перемалывают с использованием кофемолки до тех пор, пока средний размер частиц не станет не больше 95 мкм (D[4.3]), и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги, дополнительно сушат при пониженном давлении и герметизируют в вакууме в мешках из алюминиевой фольги.

Распределение размеров частиц гранулятов, полученных таким образом, представляет собой приблизительно: 90% объем <190 мкм, 50% объем <80 мкм и 10% объем <15 мкм.

Гранулят анализируют посредством анализа с помощью спектроскопии ¹H-ЯМР. Для этого дейтерированный хлороформ (CDCl₃), содержащий 5% (объем/объем) уксусной кислоты (1,0 мл), добавляют к 25 мг гранулята. NHS-POx селективно экстрагируют посредством обработки ультразвуком образца в течение 20 минут. Дисперсию пропускают через 0,22-мкм фильтр, переносят в пробирку для ЯМР и регистрируют спектр ¹H-ЯМР. Из полученного спектра, количество непрореагировавшего NHS, согласно вычислениям, составляет 97 процентов по сравнению с NHS-POx.

Гранулят дополнительно анализируют посредством анализа с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Аликвоту (0,15 мл) отфильтрованного экстракта

NHS-POx, описанного выше, разбавляют N, N-диметилацетамидом, содержащим 50 мМ хлорида лития (1,00 мл), который является элюентом для анализа SEC.

Образец анализируют посредством SEC в сравнении с поли(метилметакрилатными) стандартами и PDI составляет 1,45, что указывает на то, что поперечной сшивки не происходит.

Структура когезивного волокнистого носителя

Следующий далее коммерчески доступный гемостатический продукт выбирают для использования в качестве структур волокнистых носителей при приготовлении адгезивных для ткани листов по настоящему изобретению:

10 **Gelita Tuft-It®**: структура когезивного волокнистого носителя, состоящая из восьми слоев из восстановленных поперечно сшитых волокон Гельфоум. Восемь слоев, каждый толщиной примерно 2 мм, имеют размеры 50 мм на 75 мм. Содержание воды Gelita Tuft-It® не больше 15%. Продукт сушат в вакуумной печи в течение нескольких часов при 40°C для уменьшения содержания воды до не более 2,0% масс/масс (определяется
15 гравиметрически) до их пропитки частицами агломератов.

Эксперименты с кровотоком

Стандартизированные модели кровотока свинообразных *ex-vivo* и *in vivo* используют для оценки гемостатической эффективности. Все модели используют гепарин для увеличения времени свертывания крови примерно в 2-3 раза по сравнению с
20 временем активированной коагуляции (ACT).

Модель *ex vivo*: живая модель свиньи *ex vivo* со свежей печенью, перфузированной гепаринизированной свежей кровью со скотобойни, для воспроизведения реальных ситуаций *in vivo* настолько близко, насколько это возможно. Печени устанавливают в перфузионном устройстве, с помощью которого оксигенация, pH крови, температура
25 и давление крови поддерживаются в границах *in vivo*. На скотобойне собирают две печени, 10 литров гепаринизированной крови (5000 единиц/л). Печени транспортируют на лед; кровь при температуре окружающей среды. В пределах двух часов после сбора, печени инспектируют относительно повреждений, которые закрывают с помощью перчаток и цианоакрилатного клея;

30 **Параметры перфузии**: поток 600 мл/мин; давление 10-12 мм.рт.ст.; температура 37°C (+/- 1°C); карбоген, 0,25 литр/минута

С помощью плоского круглого вращающегося абразивного инструмента круглая кровотокающая рана (диаметром 8 мм) создается на поверхности печени, с каучуковой накладкой, так что глубина перфорированного кровотока всегда составляет 3 мм.

35 После соответствующей перфузии печени (проверяют цвет и температуру) образцы исследуют согласно следующей процедуре: вырезают образец соответствующего размера (2,7 на 2,7 см); включают камеру; регистрируют номер области на камеру; перфорируют биопсию 8 мм; отделяют ткань от биопсии; удаляют кровь от кровотока с помощью марли (2x); собирают кровь в течение 30 сек в предварительно взвешенную марлю;
40 оценивают кровотока (2 исследователя);

помещают образец на кровотока с помощью предварительно смоченной марли (солевой раствор) и выдерживают при малом давлении в течение 1 мин; наблюдают в течение 5 мин (проверяют и оценивают адгезию и гемостаз) и повторяют через 30 минут.

45 **Модель *in vivo***: стандартную сочетанную проникающую перфорацию селезенки осуществляют на анестезированной свинье (домашняя свинья, самец, масса тела в пределах: 40 кг, взрослая особь). Осуществляют срединную лапаротомию для доступа к селезенке и другим органам. Используя скальпель, n=3 (S1...S3), осуществляют подкапсулярные стандартные повреждения (10 мм × 10 мм). Гемостатические продукты

накладывают при легком давлении с помощью предварительно смоченной марли (солевой раствор) и выдерживают в течение 1 мин. После наложения продукта оценивают время до гемостаза (ТТН). Если ТТН равно нулю, это означает, что после 1-минутного давления уже достигается гемостаз.

- 5 Система оценок для пластырей: коагуляция
 +++++ Достигается непосредственно после тампонады
 +++ Достигается через <10 секунд после тампонады
 ++ Достигается через <30 секунд после тампонады
 + Достигается в пределах 3 минут после тампонады
 10 +/- Достигается после 3 минут, применяется вторая тампонада
 - Не достигается

Система оценок для пластырей: адгезия через 10 минут после приложения

- +++++ Очень прочная адгезия (пластырь разрушается при удалении)
 +++ Прочная адгезия (пластырь разрушается при удалении)
 15 ++ Прочная адгезия (пластырь можно удалить без разрушения)
 + Умеренная адгезия (пластырь можно удалить без разрушения)
 +/- Слабая адгезия (пластырь можно удалить без разрушения)
 - Не достигается

Пример 1

- 20 Пропитка структур носителя с помощью окрашенных полимерных частиц
 Vibratory Сито Shaker AS 300 (Retsch) работает в течение двух последовательных
 периодов по 5 минут каждый для введения окрашенного порошка NHS-POx в различные
 структуры носителя. После изготовления, гемостатические пластыри упаковывают в
 пакеты из алюминиевой фольги, содержащие 1 г диоксида кремния, и герметизируют
 25 в вакууме.

Используя рассмотренное выше устройство для встряхивания, голубой порошок NHS-POx вводят в три различные структуры носителя:

- желатиновая пена (Gelita Rapid®, Gelita Medical Germany), губка;
 коллагеновая пена (Surgicoll®, MBP, Germany), губка;
 30 структура волокнистого носителя (Gelita Tuft-It®, Gelita Medical Germany)).

Обнаружено, что после обработки встряхиванием, голубой порошок NHS-POx плохо проникает в желатиновую пену или коллагеновую пену. После резки пены скальпелем видно, что глубокой пропитки нет.

- В противоположность этому, обработка встряхиванием однородно диспергирует
 35 голубой порошок NHS-POx в структуре волокнистого носителя.

Пример 2

Пропитка структуры носителей химически активными полимерными частицами и гранулятом

- Gelita Tuft-It® (примерно 0,71 грамм) пропитывается с помощью способа
 40 механического встряхивания порошком NHS-POx и гранулятом NHS-POx/NU-POx (1:
 0,6), соответственно. Устройство для встряхивания красок (VIBA PRO V, Collomix GmbH)
 используют для введения окрашенных порошков (примерно 0,75 грамм) в пластырь.
 Матрица с держателем структур носителей зажимается в устройстве. Матрица вибрирует
 вертикально.

- 45 Пропитанные образцы помещают на пластинку PMMA и помещают в печь, в которой
 образцы подвергаются различным видам термической обработки. Для оценки фиксации
 порошка, образцами постукивают дважды по белой пластинке из PMMA. Если голубой
 порошок не высвобождается, результат считается как фиксированный. Результаты

показаны в Таблице 1.

Таблица 1

	Температура (°C)	Время (мин)	Фиксация
5	70	15	фиксации нет
	70	30	фиксации нет
	70	60	фиксации нет
	70	300	фиксации нет
	75	15	фиксация наполовину
	75	30	фиксация наполовину
10	80	15	фиксация
	80	30	фиксация
	85	15	фиксация

Не наблюдается различий в результатах фиксации между образцами, пропитанными порошками NHS-POx, и образцами, пропитанными гранулятом NHS-POx/NU-POx.

15 Как химически активный порошок NHS-POx, так и гранулят NHS-POx/NU-POx являются гигроскопичными. При температуре и относительной влажности (RH) окружающей среды ниже 40% структуры волокнистых носителей могут воспроизводимо пропитываться в течение получаса экспонирования. Однако если пропитка осуществляется, например, при RH 75% и 25°C, частицы/гранулы становятся липкими в пределах минут, что приводит к невоспроизводимым неоднородным характеристикам пропитки.

Пример 3

Гемостатические пластыри (Gelita Tuft-It®; 50×75 мм, приблизительно 0,7 грамм) пропитывают 1 г голубого NHS-POx посредством встряхивания их в устройстве с пружинной подвеской, приводимом в движение с помощью пневматического встряхивающего устройства типа "грохота". Устройство представляет собой NTP 25 В+С (Netter Vibration GmbH), работает при 6 бар, 146 Гц и при центробежной силе 830 Н. Десять циклов по десять секунд каждый используют для диспергирования окрашенного порошка NHS-POx. После приготовления, гемостатические пластыри упаковывают в пакеты из алюминиевой фольги, содержащие 1 г диоксида кремния, и герметизируют в вакууме.

Пластыри разрезают на куски 2 см × 2 см и исследуют в трех экземплярах на модели перфузии печени *ex vivo*. Время до гемостаза (ТГН) составляет 0 минут (после 1-минутного давления) и повторного кровотечения не наблюдается в течение времени наблюдения 30 минут. Пластыри показывают очень хорошие адгезивные свойства. Пластыри невозможно удалить без разрушения их на кусочки. В дополнение к этому пластырь, как обнаружено, имеет хорошие свойства гибкости и изгибные свойства.

Пластыри также оценивают на модели гепаринизированных свинообразных *in vivo*. Они, как обнаружено, обеспечивают высокую гемостатическую эффективность и имеют превосходные адгезивные свойства. Активные кровотечения эффективно останавливаются при резекции различных органов: селезенки, печени и почек. Сводка результатов *ex-vivo* и *in vivo* показана в Таблице 2.

Таблица 2

45	Органы	Ex-vivo		In vivo	
		Гемостатическая емкость	Адгезивные свойства	Гемостатическая емкость	Адгезивные свойства
	Печень	+++	+++	+++	+++
	Селезенка	Нет	Нет	+++	+++
	Почки	Нет	Нет	+++	++

Пример 4

Гемостатические пластыри (Gelita Tuft-It®; 50×75 мм, приблизительно 0,71 грамм) пропитывают химически активным гранулятом NHS-POx/NU-POx (1:0,6), описанным ранее. Один грамм гранулята распределяется в пластырях, как описано в Примере 3. Затем гемостатические пластыри упаковывают в пакеты из алюминиевой фольги, содержащие 1 г диоксида кремния, и герметизируют в вакууме.

Пластыри разрезают на куски 2 см × 2 см и исследуют в трех экземплярах на модели перфузированной печени *ex vivo*. Время до гемостаза (ТГН) составляет 0 (после давления в течение 1 минуты) и повторного кровотечения не наблюдается в течение времени наблюдения 30 минут. Пластырь также, как обнаружено, имеет хорошие свойства гибкости и изгибные свойства.

Пластыри также оценивают на модели гепаринизированных свинообразных *in vivo*. Они, как обнаружено, имеют очень хорошие коагуляционные и адгезивные свойства. Активные кровотечения эффективно останавливаются при резекции различных органов: селезенки, печени и почек. Сводка результатов показана в Таблице 3.

Таблица 3

Органы	Ex-vivo		In vivo	
	Гемостатическая емкость	Адгезивные свойства	Гемостатическая емкость	Адгезивные свойства
Печень	++++	+++	++++	+++
Селезенка	Нет	Нет	++++	+++
Почки	Нет	Нет	++++	+++

Пример 5

Gelita Tuft-It® (50×75 мм, приблизительно 0,7 г) пропитывают различными химически активными полимерными порошками. Гемостатические свойства пластырей, полученных таким образом, исследуют на моделях кровотечения свинообразных *ex-vivo* и *in vivo*, описанных ранее в настоящем документе.

Структуру волокнистого носителя пропитывают 1,4 г порошка с использованием пневматического встряхивающего устройства. Лист волокнистого носителя вибрирует вертикально. Устройство типа с большой длиной хода (NTK 25 AL L, от Netter Vibration GmbH), работает при 6 бар, 11 Гц и с амплитудой 30 мм. Четыре цикла по 15 секунд используют для диспергирования порошка в листе. Грануляты распределяются по всей толщине листов. Также, распределение по поверхности листов является однородным.

Исследуют девять различных химически активных полимерных порошков. Эти порошки содержат водорастворимый полимер, несущий химически активные электрофильные группы, в форме NHS-POx или в форме простого пентаэритритолового эфира тетраэтилглютарата поли(этиленгликоля) (NHS-PEG), от NOF America corporation. Некоторые из химически активных полимерных порошков представляют собой грануляты, которые кроме NHS-POx или NHS-PEG, содержат полимер, несущий химически активные нуклеофильные группы, которые могут взаимодействовать с химически активными NHS-группами NHS-POx и NHS-PEG. Приготовление этих гранулятов описано в настоящем документе ранее.

Грануляты, которые исследуют, перечислены ниже:

NHS-POx/P188

NHS-POx/карбонат

NHS-POx/Gelitspon

NHS-POx/NH2-PEG

NHS-POx/RXL (с высоким содержанием соли)

NHS-POx/RXL (с низким содержанием соли)

NHS-PO_x/RXL-содержащий карбонат (с высоким содержанием соли),

NHS-PEG/RXL (с низким содержанием соли)

NHS-PEG/NU-PO_x

5 Различные сочетания структуры волокнистого носителя и химически активных полимерных порошков, которые исследуют, показаны в Таблице 4.

Таблица 4

Пластырь	Электрофильный полимер	Нуклеофильный полимер	Карбонат	Pluronic P188
1	NHS-PO _x			X
2	NHS-PO _x		X	
3	NHS-PO _x	Gelitspon		
4	NHS-PO _x	NH ₂ -PEG		
5	NHS-PO _x	RXL-HS		
6	NHS-PO _x	RXL-LS		
7	NHS-PO _x	RXL-HS	X	
8	NHS-PEG	RXL-LS		
9	NHS-PEG	NU-PO _x		

Результаты, полученные с помощью этих пластырей на моделях кровотока свинообразных ex-vivo и in vivo, приведены в Таблице 5.

Таблица 5

Пластырь	Ex vivo		In vivo	
	Коагуляция	Адгезия	Коагуляция	Адгезия
1	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++
3	++++	++	++++	++
4	нет	нет	+	+
5	нет	нет	+	+
6	нет	нет	+	+
7	нет	нет	+	+
8	нет	нет	+	+
9	нет	нет	++	+

Пример 6

Гемостатические пластыри (Gelita Tuft-It®; 50×75 мм, приблизительно 0,7 г) пропитывают NHS-PO_x/NU-PO_x/P188, 2,5%. Один грамм гранулята распределяют в пластырях, как описано в Примере 2. Затем гемостатические пластыри упаковывают в пакеты из алюминиевой фольги, содержащие 1 г диоксида кремния, и герметизируют в вакууме.

Пластыри оценивают на модели гепаринизированных свинообразных in vivo. Они, как обнаружено, имеют очень хорошие коагуляционные и достаточные адгезивные свойства - уменьшенные адгезивные свойства дают возможность для удаления пластыря одним куском в противоположность идентичным пластырям, которые не содержат P188. Активные кровотечения эффективно останавливаются при резекции различных органов: селезенки, печени и почек. Сводка результатов показана в Таблице 6.

Таблица 6

Органы	In vivo	
	Коагуляция	Адгезивные свойства
Печень	++++	++
Селезенка	++++	++
Почки	++++	++

Пример 7

Гемостатические пластыри (Gelita Tuft-It®; 50×75 мм, приблизительно 0,7 г) пропитывают NHS-POx/NU-POx или с NHS-POx/NU-POx/P188, содержащим 1,5%, 2,5% или 3,5% Pluronic P188, соответственно. Один грамм гранулята распределяют в пластырях, как описано в Примере 2. Затем гемостатические пластыри упаковывают в пакеты из алюминиевой фольги, содержащие 1 г диоксида кремния, и герметизируют в вакууме.

Пластыри оценивают на модели гепаринизированных свинообразных *in vivo* при резекции селезенки (артериальное кровотечение). Результаты показаны в Таблице 7.

Таблица 7

%P188	In vivo	
	Коагуляция	Адгезивные свойства
0	+++	++++
1,5	+++	+++
2,5	+++	++
3,5	+++	++

Пластыри, содержащие NHS-POx/NU-POx/P188, легче удалять после приложения как "один кусок", чем пластыри, содержащие NHS-POx/NU-POx.

Пример 8

Осуществляют эксперименты для определения воздействия содержания NU-POx у химически активного гранулята NHS-POx/NU-POx на характеристики *in vivo* гемостатического пластыря.

Способ пропитки

Гемостатические пластыри (Gelita Tuft-It®; 50×75 мм, приблизительно 0,7 г) пропитывают химически активными гранулами NHS-POx/NU-POx, полученными посредством грануляции в ацетонепри молярных отношениях 1:0,10, 1:0,20 и 1:0,40, указанное молярное отношение относится к отношению количества групп NHS, обеспечиваемых NHS-POx, к количеству аминовых групп, обеспечиваемых NU-POx. Такие же гемостатические пластыри пропитывают также химически активным порошком NHS-POx.

Один грамм гранулята/порошка распределяют в пластырях с использованием лабораторного устройства Fibroline SL-Preg. Затем гемостатические пластыри фиксируют, сушат и упаковывают в пакеты из алюминиевой фольги, содержащие 1 г диоксида кремния, и герметизируют в вакууме.

Устройство

Лабораторное устройство Fibroline SL-Preg перемещает частицы между электродами посредством приложения напряжения до 40 кВ при частотах до 200 Гц в течение периода до 60 секунд. Две электродных пластины имеют размер примерно 50×40 см. Верхняя пластина заземляется.

Используют следующие стандартные настройки: 40 кВ, 100 Гц, 20 секунд.

Матрицы

Порошки дозируют гравиметрически в полученную с помощью 3D печати матрицу из PMMA после чего матрица устанавливается на нижней электродной пластине.

Матрицу заполняют химически активными полимерными порошками с использованием картонного скребка или металлического шпателя. Матрица имеет размеры 50 × 75 × 4 мм и содержит 22×33=726 квадратных лунок (внутренние размеры каждой лунки: 2 × 2 × 2 мм). Объединенный объем 726 лунок составляет приблизительно 5,8 мл.

Спейсер

Спейсерную маску помещают поверх матрицы. Спейсер используют, чтобы дать возможность частицам для движения вверх и вниз, когда на них действует переменное электрическое поле. Если спейсера не использовать, проникновение и распределение сквозь носитель ограничивается. Для TUFT-IT это представляет собой маску 3 мм. Это
5 дает в результате расстояние между электродами 3+4 мм=7 мм.

Характеристики *in vivo* гемостатических пластырей, содержащих гранулят NHS-POx: NU-POx (0, 10, 20 и 40 процентов аминных групп из NU-POx, процент вычисляют по отношению к количеству групп NHS, обеспечиваемых NHS-POx) или порошок NHS-POx, оценивают на модели негепаринизированных свинообразных *in vivo*. Детали для
10 пластырей, которые исследуют, показаны в Таблице 8.

Таблица 8

Пластырь	% Молярный амина	NHS-POx : NU-POx (г/г)	Грамм гранулята в пластыре
1	10	1:0,12	1
2	20	1:0,25	1
3	40	1:0,48	1
4	0	1:0	1

Исследования *in vivo*

Исследования осуществляют на взрослых самках домашних свиней (40-50 кг).
20 Антикоагуляционного агента не применяют. Характеристики пластыря исследуют как на селезенке, так и на печени. Селезенку или печень локализуют и экстернализуют при необходимости в ходе периода исследования и их естественную влажность поддерживают, покрывая их губками, пропитанными соевым раствором.

Создают различные типы повреждений:

25 Печень: соскабливания, перфорации для биопсии и резекции

Селезенка: резекции

Секции паренхимы печени соответствующих размеров соскабливают/перфорируют, чтобы вызвать кровотечение, от умеренного до острого. Соскабливания печени создают
30 с помощью хирургического скальпеля и шаблона 1×1 см², а круговые перфорации с использованием 8 мм круглого перфоратора для биопсий. Резекцию печени и селезенки осуществляют с использованием хирургического ножа.

Пластырь накладывают непосредственно после резекции тканей или скарификации:

- куски 2 × 2 см для перфораций для биопсии и соскабливаний

- целый пластырь 7,5 × 5 см для резекций

35 Исследуемые пластыри накладывают на кровоточащую ткань и осторожно прижимают посредством нажатия с использованием марли, предварительно смоченной соевым раствором. Тампонаду применяют в течение начального периода 10 секунд с последующими 30-секундными интервалами, в целом до 5 минут.

40 Пластырь TUFT-IT, который не пропитывается, используют для сравнения (упоминается как TUFT-IT).

Результаты исследований *in vivo* приведены в Таблице 9.

Таблица 9

	Среднее время для гемостаза (в секундах)			
	Соскабливание печени	Перфорация печени	Резекция печени	Резекция селезенки
Пластырь 1	10	10	10	10
Пластырь 2	10	10	10	10
Пластырь 3	10	10	10	80
Пластырь 4	10	80	75	165

TUFT-IT	135	165	210	225
---------	-----	-----	-----	-----

Пластыри 1-4 показывают очень прочную адгезию на ткани, в то время как для пластыря TUFT-IT наблюдается только слабая адгезия.

Пластыри 1 и 2 показывают не более чем очень ограниченное набухание после наложения. Пластыри 3-4 показывают большее, но по-прежнему приемлемое набухание.

Пример 9

Гемостатические пластыри (Gelita Tuft-It®; 50×75 мм, приблизительно 0,7 г) пропитывают либо раствором NHS-POx, либо порошком NHS-POx, либо гранулятом NHS-POx/NU-POx. Используемый гранулят NHS-POx/NU-POx получают посредством грануляции в ацетоне при молярном отношении 1:0,20 (смотри Пример 8).

Распыление раствора, содержащего NHS-POx, осуществляют посредством растворения NHS-POx в смеси изопропилового спирта и дихлорметана (200 г/л) 1:1. Пластыри пропитывают 5 мл этого распыляемого раствора с использованием стеклянного лабораторного распылителя и воздуха под давлением в одном цикле распыления. Общее количество NHS-POx доставляемого таким образом, составляет 1 грамм на пластырь. После пропитки пластырям дают возможность для сушки внутри печи при 40°C в течение 2 час, после чего их хранят в десикаторе в течение 2 дней до упаковки в пакеты из алюминиевой фольги, содержащей 1 г диоксида кремния, и герметизируют в вакууме.

В дополнение к этому пластыри пропитывают 1 граммом порошка NHS-POx или 1 граммом гранулята NHS-POx/NU-POx с использованием процедуры, описанной в Примере 8.

Характеристики пластырей, приготовленных таким образом, исследуют в трех экземплярах на модели перфузированной печени *ex vivo* при условиях слабого (<20 мл/мин) и острого кровотечения (>50 мл/мин). С помощью плоского круглого вращающегося абразивного инструмента круговая кровоточащая рана (диаметр 8 мм) создается на поверхности печени, с каучуковой накладкой, так что глубина перфорированного кровотечения всегда составляет 3 мм. Результаты показаны в Таблице 10.

Таблица 10

	Ex-vivo			
	Слабое кровотечение		Острое кровотечение	
Тип пропитки	Гемостатическая емкость	Адгезивные свойства	Гемостатическая емкость	Адгезивные свойства
Гранулят NHS-POx/NU-POx	++++	++++	++++	++++
Порошок NHS-POx	+++	++++	+	++++
Раствор NHS-POx	-	+/-	не исследуют	не исследуют

(57) Формула изобретения

1. Биосовместимый гибкий гемостатический лист, содержащий:

водостойкую структуру когезивного волокнистого носителя, содержащую трехмерное взаимосвязанное внутреннее пространство, указанная структура волокнистого носителя содержит волокна, содержащие нуклеофильный полимер, несущий химически активные нуклеофильные группы, которым является сополимер поли(2-этил/аминоэтиламиноэтил-2-оксазолина) (NU-POx); и распределенное во внутреннем пространстве множество реакционно-способных полимерных частиц, содержащих водорастворимый электрофильный полимер - терполимер поли[2-(этил/гидрокси-этил-амид-этил/NHS-сложный эфир-этил-сложный эфир-этил-амид-этил)-2-оксазолина] с активированной NHS-боковой цепью, содержащей 20% NHS-сложноэфирных групп, несущий, по меньшей

мере, три химически активных электрофильных группы, которые могут взаимодействовать с аминными группами в ткани и крови, а также с реакционно-способными нуклеофильными группами нуклеофильного полимера, с образованием ковалентной связи, указанные реакционно-способные полимерные частицы имеют диаметр в пределах 0,5-100 мкм и присутствуют в количестве, по меньшей мере, 3% мас. структуры волокнистого носителя.

2. Гемостатический лист по п.1, где волокна в структуре волокнистого носителя имеют средний диаметр 1-500 мкм.

3. Гемостатический лист по п.1 или 2, где структура волокнистого носителя представляет собой структуру войлока, тканую структуру или вязаную структуру.

4. Гемостатический лист по любому из пп.1-3, где структура волокнистого носителя представляет собой структуру войлока.

5. Гемостатический лист по любому из предыдущих пунктов, где реакционно-способные электрофильные группы выбирают из сложных эфиров карбоновых кислот, сложных сульфонат эфиров, сложных фосфонатных эфиров, сложных пентафторфениловых эфиров, сложных п-нитрофениловых эфиров, сложных п-нитротифениловых эфиров, групп галогенангидридов, ангидридов, кетонов, альдегидов, изоцианато, тиоизоцианато, изоциано, эпоксидов, активированных гидроксильных групп, олефинов, простых глицидиловых эфиров, карбоксила, сложных сукцинимидиловых эфиров, сложных сульфосукцинимидиловых эфиров, малеимида (малеимидила), этенсульфонила, сложных имидо эфиров, ацетоацетата, галогенацетата, ортопиридилдисульфида, дигидроксифениловых производных, винила, акрилата, акриламида, йодацетамида и их сочетаний.

6. Гемостатический лист по любому из предыдущих пунктов, где реакционно-способные полимерные частицы содержат, по меньшей мере, 10% мас. водорастворимого электрофильного полимера.

7. Гемостатический лист по любому из предыдущих пунктов, где реакционно-способные полимерные частицы представляют собой агломераты частиц, содержащие: (i) электрофильные частицы, содержащие водорастворимый электрофильный полимер; и (ii) нуклеофильные частицы, содержащие нуклеофильный агент для поперечной сшивки.

8. Гемостатический лист по п.7, где электрофильные частицы содержат, по меньшей мере, 30% мас., более предпочтительно, по меньшей мере, 50% мас., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 80% мас. водорастворимого электрофильного полимера.

9. Гемостатический лист по п.7 или 8, где нуклеофильные частицы содержат, по меньшей мере, 30% мас., более предпочтительно, по меньшей мере, 50% мас., а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 80% мас. нуклеофильного агента для поперечной сшивки.

10. Гемостатический лист по любому из пп.7-9, где реакционно-способные полимерные частицы имеют следующую композицию:

50-95% мас. водорастворимого электрофильного полимера, несущего, по меньшей мере, три реакционно-способных электрофильных группы;

5-50% мас. нуклеофильного агента для поперечной сшивки;

0-50% мас. полисахарида;

где сочетание компонентов (a) - (c) вместе составляет, по меньшей мере, 80% мас., более предпочтительно, по меньшей мере, 90% мас. от химически активных полимерных частиц.

11. Гемостатический лист по любому из пп.7-10, где реакционно-способные полимерные частицы содержат водорастворимый электрофильный полимер и нуклеофильный агент для поперечной сшивки в таких количествах, что отношение общего количества химически активных электрофильных групп, обеспечиваемых водорастворимым электрофильным полимером, и общего количества химически активных нуклеофильных групп, обеспечиваемых нуклеофильным агентом для поперечной сшивки, находится в пределах от 25:1 до 1:1, более предпочтительно, в пределах от 18:1 до 2:1, а наиболее предпочтительно в пределах от 12:1 до 2,5:1.

12. Гемостатический лист по любому из предыдущих пунктов, где структура волокнистого носителя состоит, по меньшей мере, на 50% мас. из нуклеофильного полимера.

13. Гемостатический лист по любому из предыдущих пунктов, где лист имеет плотность без сжатия 10-100 мг/см³.

14. Пакет из алюминиевой фольги для хранения гемостатического листа, содержащий один или несколько гемостатических листов по любому из пп.1-13 и 1 г диоксида кремния, и который герметизирован в вакууме.

15. Способ получения гемостатического листа, включающий:

получение листа водостойкой структуры когезивного волокнистого носителя, как определено по любому из пп.1-3 и 12;

получение реакционно-способных полимерных частиц, как определено по любому из пп.1 и 4-11; и распределение реакционно-способных полимерных частиц во внутреннем пространстве структуры волокнистого носителя.

16. Способ по п.15, где структура волокнистого носителя, содержащая распределенные реакционно-способные полимерные частицы, подвергается воздействию во влажной атмосфере для взаимодействия реакционно-способных нуклеофильных групп в рассмотренных выше волокнах с реакционно-способными электрофильными группами в реакционно-способных полимерных частицах.