



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105363071 B

(45)授权公告日 2018.10.09

(21)申请号 201510816888.0

(22)申请日 2015.11.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105363071 A

(43)申请公布日 2016.03.02

(73)专利权人 金仕生物科技(常熟)有限公司
地址 215500 江苏省苏州市常熟市联丰路
58号

(72)发明人 钟生平 刘静

(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理
有限公司 11205
代理人 马爽 黄健

(51)Int.Cl.

A61L 27/36(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

(56)对比文件

CN 101289539 A,2008.10.22,

CN 101289539 A,2008.10.22,

CN 104990882 A,2015.10.21,

US 2006/0002852 A1,2006.01.05,

邓伶俐等.“纳米乳液与微乳液的研究进展”.《中国食品学报》.2013,第13卷(第8期),
173-180.

审查员 唐敏健

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

生物材料的抗钙化处理方法

(57)摘要

本发明提供一种生物材料的抗钙化处理方法,采用微乳液对生物材料进行处理。本发明采用的微乳液可以包括脂肪酸及其衍生物。本发明的抗钙化处理方法能够提高生物材料的抗钙化性能。

1. 一种生物材料的抗钙化处理方法,其特征在于,采用微乳液对生物材料进行处理;所述微乳液含有脂肪酸及其衍生物。

2. 根据权利要求1所述的抗钙化处理方法,其特征在于,所述脂肪酸为不饱和脂肪酸,且所述不饱和脂肪酸包括油酸、亚油酸、亚麻酸、蓖麻油酸和鱼油中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的抗钙化处理方法,其特征在于,所述微乳液还包括十二烷基硫酸钠、油酸钾、油酸钠、硬脂酸钾、聚乙二醇辛基苯基醚、聚氧乙烯基失水山梨醇酯和失水山梨醇酯中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的抗钙化处理方法,其特征在于,所述微乳液还包括乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、正戊醇和异戊醇中的一种或多种。

5. 根据权利要求1所述的抗钙化处理方法,其特征在于,所述处理为将所述生物材料与所述微乳液进行接触,并且控制所述接触的时间大于5min。

6. 根据权利要求1所述的抗钙化处理方法,其特征在于,在振荡、搅拌或超声波的条件下进行所述处理。

7. 根据权利要求1所述的抗钙化处理方法,其特征在于,在进行所述处理时,对处理体系进行光照、辐照或加热,或者向处理体系中通入臭氧。

8. 根据权利要求1至7任一所述的抗钙化处理方法,其特征在于,所述生物材料为心包、瓣膜、脑硬膜、肠粘膜、真皮、韧带、肌腱、巩膜、血管或者带瓣管道。

生物材料的抗钙化处理方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医疗技术,尤其涉及一种生物材料的抗钙化处理方法。

背景技术

[0002] 生物材料是用于人体组织和器官的诊断、修复或增进其功能的一类高技术材料,即用于取代、修复人体活组织的天然或人造材料,其作用药物不可替代。但是也存在植入人体后的生物材料钙化,而直接影响到其使用性能和预期寿命,导致存在二次手术植入的风险,因此生物材料的钙化问题一直是困扰生物医疗界的难题,如何有效的进行生物材料抗钙化一直是众多科学研究者研究的方向。

[0003] 目前,临床上主要应用的抗钙化处理方法是采用表面活性剂对生物材料进行处理,利用该抗钙化处理方法处理的生物材料的抗钙化性能具有明显的进步。然而,上述抗钙化处理方法存在局部抗钙化性能不佳、易造成生物材料破坏乃至分层等问题,从而影响生物材料的耐疲劳性能和使用寿命。

发明内容

[0004] 本发明提供一种生物材料的抗钙化处理方法,其抗钙化性能良好且均一,并且不影响生物材料的结构和机械力学性能,处理后生物材料的耐疲劳性能和使用寿命均有所提高。

[0005] 本发明提供一种生物材料的抗钙化处理方法,采用微乳液对生物材料进行处理。

[0006] 本发明所述的微乳液指的是一种分散液滴直径较小,一般分布在5nm~100nm之间的液体体系,通常由表面活性剂、助表面活性剂、油相以及水相混合乳化而成。本发明人经研究发现,当使用微乳液对生物材料进行处理时,能够克服传统抗钙化处理方法(即采用表面活性剂对生物材料进行处理)所存在局部抗钙化性能不佳、易造成生物材料破坏乃至分层等问题,从而获得良好的抗钙化效果。本发明对所采用的微乳液不作严格限制,其可以为本领域常规的微乳液,比如含硅油微乳液,含植物油微乳液,含鱼油等动物油微乳液等。同时,本发明所采用的微乳液还具有生物相容性。这里指的生物相容性是指当微乳液残留在生物材料中时,其残留成分不会对日后生物材料的使用造成任何安全性隐患,例如毒性、致敏性等,从而人体使用时不会产生毒副作用,安全性良好。

[0007] 进一步地,为了达到较好得抗钙化效果,所述微乳液含有脂肪酸及其衍生物。

[0008] 进一步地,所述微乳液含有脂肪酸及其疏水性衍生物。

[0009] 进一步地,所述微乳液含有不饱和脂肪酸及其疏水性衍生物。

[0010] 在一实施方式中,所述不饱和脂肪酸为油酸、亚油酸、亚麻酸、蓖麻油酸和鱼油的一种或多种。当不饱和脂肪酸为多种物质的混合物时,本发明对各物质之间的比例不做限制。在应用过程中,饱和脂肪酸作为也可以对生物材料进行抗钙化的处理,但是优选为不饱和脂肪酸。这里需要说明的是,本发明中涉及到的脂肪酸类物质及其疏水性衍生物可以在作为油相成分出现在微乳液中,也可以做为疏水性表面活性剂成分出现在微乳液中,也可

以同时作为油相以及表面活性剂成分出现在微乳液中,本发明对涉及到的脂肪酸类物质及其衍生物不作具体成分上的归属。

[0011] 在一实施方式中,所述微乳液还包括醇类化合物,如乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、正戊醇和异戊醇中的一种或多种。即,微乳液中的助表面活性剂可以具体为这些成分,当助表面活性剂为多种物质的混合物时,本发明对各物质之间的比例不做限制。

[0012] 在一实施方式中,所述微乳液还包括表面活性剂,如十二烷基硫酸钠、油酸钾、油酸钠、硬脂酸钾、聚乙二醇辛基苯基醚、聚氧乙烯基失水山梨醇酯和失水山梨醇酯中的一种或多种。即,微乳液中的表面活性剂可以具体为这些成分。其中,当选用聚氧乙烯基失水山梨醇酯和失水山梨醇酯时,可以选用聚氧乙烯基失水山梨醇酯和失水山梨醇酯的各种型号,例如吐温20-80,司盘20-80。在具体使用时,本发明对表面活性剂的种类不做限制,可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂,或者两种表面活性的混合物,当表面活性剂为多种物质的混合物时,本发明对各物质之间的比例不做限制。表面活性剂还可以包括反应性表面活性剂。

[0013] 同时,本发明的微乳液中的水相可以是普通水,也可以是含有电解质的水溶液,例如生理盐水(0.9%氯化钠水溶液)或者常见的模拟体液的缓冲溶液,例如磷酸盐缓冲溶液,本发明的水相可以优选为含有电解质的水溶液。

[0014] 在使用本发明的方法处理生物材料时,可以采用下述的具体微乳液对生物材料进行处理,该微乳液液包括如下重量份的成分:表面活性剂0.01~30份,助表面活性剂1~85份,油相0.01-5份和水相10~90份。进一步地,表面活性剂可优选为0.03~20份;助表面活性剂可优选为5~60份,更优选为10~40份;油相可优选为0.02~2份;水相可优选为20~90份,更优选为40~90份。上述微乳液中的各成分不仅可以为本发明之前提供的具体成分,也可以为本领域的常规成分。

[0015] 在具体使用微乳液处理生物材料时,优选的,可以采用平均粒径为5~60nm,粒径分布为0.2以下的微乳液。当控制微乳液的参数在上述范围内时,所获得生物材料的抗钙化性能良好且均一,生物材料的结构和机械力学性能不受影响,生物材料的耐疲劳性能和使用寿命均有所提高。

[0016] 在本发明中,可以采用本领域常规方法制备上述微乳液,制备时为了加速组分间的乳化互溶过程,可对温度进行控制,例如在20~40℃条件下进行组分的添加搅拌。

[0017] 在本发明中,可以采用本领域常规方法进行所述处理。

[0018] 在一实施方式中,所述处理为将所述生物材料与所述微乳液进行接触,例如通过浸渍来使材料与微乳液充分接触,并且控制所述浸渍的时间大于5min。在具体操作中,例如可以通过浸渍来使生物材料与微乳液进行充分接触,并且一般控制接触时间为5min~72h,接触时间越长,生物材料的抗钙化效果越好,优选将接触时间控制在30min~48h。

[0019] 进一步地,在振荡、搅拌或超声波的条件下进行所述处理。在处理过程中,还可以采用振荡、搅拌或超声波等适当的物理方式进行辅助,这些辅助有利于微乳液与生物材料接触充分,以达到抗钙化效果的良好和均一。具体的,当采用振荡方式时,可以将盛有样品的容器置于振荡床上,控制振荡频率为30~70rpm/min,震荡时间可以与接触时间相同,也可以短于接触时间,例如先振荡后静置;当采用搅拌方式处理时,可以根据需要设定搅拌频次和时间;当采用超声波方式时,可以将盛有样品的容器置于超声清洗器中,控制超声频率

为25~80HZ,优选为30~60HZ,超声时间为5~90min。除了上述3种方式外,还可以在微乳液与材料接触时对生物材料施加外力挤压以助于微乳液的渗入。为了加强微乳液处理效果,在处理过程中可以按照一定的顺序依次采用这几种方式对生物材料进行处理。

[0020] 进一步地,在进行所述处理时,对处理体系进行光照、辐照或加热,或者向处理体系中通入臭氧。除了机械外力的辅助作用,还可以在处理时,对处理体系进行光照、辐照或加热,或者向处理体系中通入臭氧,从而提高抗钙化效果,当进行加热处理时,可以将温度控制在20~60℃,优选为25~50℃。通入臭氧时,可以控制臭氧浓度为10~80mg/L,流量为5~20L/h,一般臭氧注入时间为2~90min。

[0021] 本发明提供的使用微乳液处理生物材料的方法,在具体实施过程中,并不只限定于上述处理方式。例如,在处理过程中不限于只使用一种微乳液对生物材料进行处理,还可以采用成分不同或者比例不同的多种微乳液对生物材料进行分步处理。而且,本发明的处理方法不仅可以作为抗钙化方法单独使用,还可以与其他已知的抗钙化技术联用,包括组织脱细胞技术、Linx™AC抗钙化处理技术、ThermaFix™抗钙化技术、AOA™抗钙化技术、羟基铬抗钙化处理技术、醇处理技术、还原法抗钙化技术等,其他抗钙化技术还包括但不限于以其他交联剂取代常规的醛来固定胶原组织的抗钙化方法和其他能减轻组织植入后钙化的方法,以达到最佳抗钙化效果。在具体实施方法中,本发明的微乳液抗钙化技术可以在其他方法之前使用,也可以在其他抗钙化方法之后使用。

[0022] 由于微乳液的生物相容性良好,因此经过微乳液处理的生物材料从微乳液中取出后可以直接保存在常规的戊二醛保存液中,也可以经过磷酸盐缓冲溶液或者其它模拟体液的液体漂洗后进行保存,例如干法保存等。

[0023] 进一步地,所述生物材料为包括心包、瓣膜、脑硬膜、肠粘膜、真皮、韧带、肌腱、巩膜、血管或者带瓣管道的材料。更广范围的,生物材料可以是以胶原组织为主要组成的材料,或者一切具有抗钙化需要的待植入人体的材料,这些生物材料一般来自于动物源,以及同种异体或者自体。本发明对生物材料没有限定要求,可以使经过脱细胞预处理后的生物材料,例如脱细胞胶原组织,也可以是未经过脱细胞预处理的生物材料。临床上使用的生物瓣膜、带瓣管道、生物补片以及人工血管等医疗器械产品均有不同程度的抗钙化要求,本发明对提高这些产品的抗钙化性能具有重要意义。经过微乳液处理的生物材料,由于其抗钙化效果好,使用寿命长,因此被用作生物瓣膜等人体器官组织植入人体后,降低了二次换瓣手术的风险。

[0024] 本发明提供的生物材料的抗钙化处理方法,至少具有以下优势:

[0025] 1、本处理方法能最小程度的避免对生物材料的组织损伤,有效增强生物材料的抗钙化效果,尤其在抗钙化性的均一性上,相较于常规的表面活性剂抗钙化处理方法的提高,能够有效延长生物材料的使用寿命,避免生物材料二次更换的风险,减轻病患痛苦。

[0026] 2、本处理方法简单可行,对生物材料无需进行过多预处理,可实施度高,可实施范围广。

具体实施方式

[0027] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明的实施例,对本

发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0028] 实施例1

[0029] 本实施例的微乳液1,按照重量份包括如下组分:乙醇25份,正戊醇10份,Tween-80 3份,脂肪醇聚氧乙烯醚(AEO-9) 5.5份,油酸1.0份,氨基硅油0.5份,水55份。

[0030] 在25℃下,将上述组分按照微乳液的常规制备方法制得微乳液1。采用Malvern Nano ZS90粒径分析仪对制备得到微乳液进行粒径分析,本实施例的制备的微乳液的平均粒径为95.4nm,粒径分布为0.586。

[0031] 将经过脱细胞处理的牛心包1片(5cm×5cm)完全浸入200g微乳液1中,每隔10min用搅拌棒手动搅拌一次,每次搅拌时间为1min,4小时后,停止搅拌,静置20小时。然后将牛心包材料取出,制成样品1。将样品1用生理盐水清洗,放入戊二醛溶液中进行保存。

[0032] 实施例2

[0033] 本实施例的微乳液2,按照重量份包括如下成分:吐温80 0.9份,聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)0.2份,乙醇8.4份,油酸0.3份,角鲨烷0.2份,0.9%生理盐水90份。

[0034] 在25℃下,将上述组分按照微乳液的常规制备方法制得微乳液2。采用Malvern Nano ZS90粒径分析仪对制备得到微乳液2进行粒径分析,本实施例的制备的微乳液2的平均粒径为31.84nm,粒径分布为0.098。

[0035] 将经过脱细胞处理的牛心包1片(5cm×5cm)完全浸入盛有300g微乳液2的容器中,将容器置于振荡摇床上,控制频率为30~70rpm/min进行振荡。24小时后,将牛心包材料取出,制成样品2。

[0036] 实施例3

[0037] 本实施例的微乳液3,按照重量份包括如下成分:吐温20 1.7份,Triton X-100 1.6份,油酸钾0.3份,乙醇17份,异丙醇5.1份,亚油酸0.1份,水74.2份。

[0038] 在35℃下,将上述组分按照微乳液的常规制备方法制得微乳液3。采用Malvern Nano ZS90粒径分析仪对制备得到微乳液3进行粒径分析,本实施例的制备的微乳液3的平均粒径为12.2nm,粒径分布为0.091。

[0039] 将未经过脱细胞处理的牛颈静脉带瓣管道15cm,完全浸入盛有500g微乳液3的容器中,将该容器放于超声清洗器中,超声频率设置为40KHZ,每30min超声一次,每次超声5min,持续5h。浸泡15小时后,将材料取出制成样品3。

[0040] 实施例4

[0041] 本实施例的微乳液4,按照重量份包括如下成分:司盘20 3.2份,十二烷基硫酸钠(SDS)0.3份,正丙醇27份,甘油5份,鱼油0.8份,月桂酸0.2份,0.9%生理盐水63.5份。

[0042] 在35℃下,将上述组分按照微乳液的常规制备方法制得微乳液4。采用Malvern Nano ZS90粒径分析仪对制备得到微乳液4进行粒径分析,本实施例的制备的微乳液4的平均粒径为47.81nm,粒径分布为0.097。

[0043] 将经过脱细胞处理的牛心包1片(5cm×5cm)完全浸入盛有500g微乳液4的底部平坦的容器中,将牛心包平铺于容器底部,对整块心包均匀施加垂直于表面的压力,压力大小为2N,每次压力作用时间为2秒,频率为每分钟15次。反复作用持续时间为5分钟。每间隔30

分钟,再重复上述操作共3次,将牛心包取出后制成样品4。

[0044] 实施例5

[0045] 本实施例的微乳液5,按照重量份包括如下成分:硬脂酸钾8份,油酸钾0.2份,异丁醇22份,异戊醇6份,亚麻酸1.8份,磷酸盐缓冲溶液68份。

[0046] 在25℃下,将上述组分按照微乳液的常规制备方法制得微乳液5。采用Malvern Nano ZS90粒径分析仪对制备得到微乳液5进行粒径分析,本实施例的制备的微乳液5的平均粒径为32.7nm,粒径分布为0.078。

[0047] 将经过脱细胞处理的牛心包1片(5cm×5cm)完全浸入盛有500g微乳液5的底部平坦的容器中,将牛心包平铺于容器底部,对整块心包均匀施加垂直于表面的压力,压力大小为2N,每次压力作用时间为2秒,频率为每分钟15次。反复作用持续时间为5分钟。每间隔30分钟,再重复上述操作共3次。

[0048] 将上述生物材料取出,平铺在用离心装置的转筒内表面,快速离心甩干7秒,将材料中所含的微乳液5部分甩出。再放入500g微乳液4中按照上述施加外力的方法进行处理。然后将容器置于恒温振荡床上,控制温度为40℃,振荡频率为20rpm/min,振荡8h,将牛心包取出后制成样品5。

[0049] 实施例6

[0050] 本实施例的微乳液6,按照重量份包括如下成分:吐温80 8份,油酸钾0.2份,乙醇20份,异戊醇6份,氨基油酸1.0份,亚油酸0.8份磷酸盐缓冲溶液68份。

[0051] 在30℃下,将上述组分按照微乳液的常规制备方法制得微乳液6。采用Malvern Nano ZS90粒径分析仪对制备得到微乳液6进行粒径分析,本实施例的制备的微乳液6的平均粒径为51.1nm,粒径分布为0.085。

[0052] 将经过脱细胞处理的长15cm猪主动脉瓣,完全浸入盛有300g微乳液6的容器中,将容器放入恒温振荡摇床中,设置温度为25℃,频率为50rpm/min,振荡摇床2h后,将恒温振荡摇床温度升至45℃,频率不变,继续处理2h。之后,将猪主动脉瓣从微乳液6中取出,放入盛有300g微乳液3的容器中,将容器放入振荡摇床,设定温度为40℃,频率为50rpm/min,振荡2h。振荡结束后,用塑料管向容器内注入臭氧,臭氧浓度为20mg/L,流量为10L/h,注入时间为30min。臭氧通入结束后,将容器继续在放置在振荡恒温摇床振荡4h,温度为40℃,频率为50rpm/min,将猪主动脉瓣取出后制成样品6。

[0053] 实施例7

[0054] 将猪心包1片(5cm×5cm)完全浸入100g微乳液3中,每10min搅拌1min。8h后,将浸有猪心包的微乳液暴露于γ射线辐照中,计量为10kGy。

[0055] 然后将浸有牛心包的微乳液5的容器放置于恒温摇床上,(设置温度为25-50℃,例如40℃,频率为0-100rpm/分钟,例如20rpm/分钟),恒温时间为8小时,将猪心包取出后制成样品7。

[0056] 对照例1

[0057] 本对照例采用含有吐温-80 5份,SDS 2份,水93份的溶液,对戊二醛固定后的牛心包1片(5cm×5cm)进行抗钙化处理,其中,处理方法同实施例2一致,制成样品8。

[0058] 对照例2

[0059] 将未经过任何抗钙化处理的戊二醛固定后的牛心包1片(5cm×5cm)作为空白对照

样品9。

[0060] 试验例1

[0061] 采用戊二醛分别对上述样品1-9进行灭菌,并在无菌环境中选取各样品的不同部位进行裁剪,各个样品制成1cm×1cm的四块正方形块,随后将上述制备的样品分别用100ml无菌生理盐水进行漂洗,每次10秒钟,重复3次,得到九组试验样品组1-9,每组试验样品组中包括四个试验样品。

[0062] 随机选取大鼠36只(4周龄,SD鼠),平均分为9组,每组4只。采用上述试验样品组1-9分别对9组大鼠进行试验,每组试验样品组对应一组大鼠。其中,将各试验样品组中的每一试验样品对应皮下植入至各组大鼠中每只大鼠的相同部位。

[0063] 21天后,将各试验样品从各大鼠体内取出,在X光下评价钙化水平,结果见表1。钙化部分在X光下显示为白色,未钙化部分为黑色。完全钙化样品评分为10分,完全未钙化样品评分为0分,按照白色部分和黑色部分所占比例进行样品钙化水平评价。

[0064] 表1各试验样品的钙化水平

[0065]

试验样品组	钙化水平评价			
	1	2	3	4
试验样品组 1	5	4	5	5
试验样品组 2	3	4	3	3
试验样品组 3	2	2	3	2
试验样品组 4	6	4	6	5
试验样品组 5	1	3	3	2
试验样品组 6	2	3	1	2
试验样品组 7	1	3	2	2
试验样品组 8	9	10	6	10
试验样品组 9	10	10	10	10

[0066] 由上述表1可知:

[0067] 1、本发明各实施例的经过微乳液处理过的生物材料均表现出较好的抗钙化性能,其钙含量明显低于现有的以表面活性剂处理的生物材料的钙含量(对照例1)以及未经过任何处理的生物材料的钙含量(对照例2),因此本发明能够增强生物材料的抗钙化性能,有效延长生物材料的使用寿命。

[0068] 2、本发明各实施例的经过微乳液处理过的生物材料组内各个样品的钙含量相近,因此本发明抗钙化效果均一。

[0069] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进

行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。