



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101849850 B

(45) 授权公告日 2013.03.06

(21) 申请号 201010144611.5

A61K 47/42(2006.01)

(22) 申请日 2010.04.12

A61M 31/00(2006.01)

A61M 37/00(2006.01)

(73) 专利权人 苏州博创同康生物工程有限公司  
地址 200062 上海市普陀区金沙江路 895 弄  
55 号 101 室

(56) 对比文件

CN 1709515 A, 2005.12.21,

CN 101422630 A, 2009.05.06,

CN 101301494 A, 2008.11.12,

CN 101323670 A, 2008.12.17,

(72) 发明人 吴昌琳

(74) 专利代理机构 上海申蒙商标专利代理有限  
公司 31214

审查员 刘静

代理人 徐小蓉

(51) Int. Cl.

A61L 31/12(2006.01)

A61L 31/16(2006.01)

A61L 27/44(2006.01)

A61L 27/54(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种仿生原位再生修复纳米补片、制备方法  
及用途

(57) 摘要

本发明仿生原位再生修复纳米补片为由带阳离子基团材料的 A 层及带阴离子基团材料的 B 层依次叠加形成,其中带阳离子基团材料的 A 层占补片的质量百分比为 20%-80%,其余为带阴离子基团材料的 B 层。带阳离子基团材料的 A 包括带阳离子基团多糖、带阳离子基团蛋白或带阳离子基团多肽(聚肽)中的至少一种;带阴离子基团材料的 B 包括带阴离子基团多糖、带阴离子基团蛋白或带阴离子基团多肽(聚肽)中的至少一种,功能因子和/或功能多肽的添加占补片的质量百分比为不超过 10%。本发明所用原料为可体内降解的具有生物相容性材料,补片柔软,组织黏附性好,适应脏器表面的凹凸,抗拉伸及抗气压性能强,适合缺损组织的黏贴、封闭、堵漏、止血、隔离、修复、防止粘连及人工脑膜方面的用途,也可用于作为药物的缓释载体及纳米级组织工程支架材料。

1. 一种仿生原位再生修复纳米补片,其特征在于所述补片的构成方式是由带阳离子基团材料的 A 层及带阴离子基团材料的 B 层依次叠加形成,其中所述的依次叠加指的是,由  $[(A+B)n+A]$  或  $[(B+A)n+B]$  的构成方式,其中叠加次数  $n$  为正整数,所述 B 层为带阴离子基团材料,所述的带阴离子基团材料包括带阴离子基团多糖、带阴离子基团蛋白或带阴离子基团多肽中的至少一种,所述 A 层为带阳离子基团材料,所述的带阳离子基团材料包括带阳离子基团多糖、带阳离子基团蛋白或带阳离子基团多肽中的至少一种,所述 B 层的带阴离子基团材料和所述 A 层的带阳离子基团材料为可体内降解的具有生物相容性材料。

2. 根据权利要求 1 所述的一种仿生原位再生修复纳米补片,其特征在于所述 A 层或 B 层的厚度为纳米级。

3. 根据权利要求 1 所述的一种仿生原位再生修复纳米补片,其特征在于所述的带阳离子基团材料的 A 层占所述补片的质量百分比为 20%-80%,其余为带阴离子基团材料的 B 层。

4. 根据权利要求 1 所述的一种仿生原位再生修复纳米补片,其特征在于所述的带阴离子基团多肽为带阴离子基团聚肽,所述的带阳离子基团多肽为带阳离子基团聚肽。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种仿生原位再生修复纳米补片,其特征在于所述的纳米补片用于缺损组织的黏贴、封闭、堵漏、止血、隔离、修复、防止粘连及人工脑膜方面的用途,或用于作为药物的缓释载体及纳米级组织工程支架材料。

6. 一种仿生原位再生修复纳米补片的制备方法,其特征在于所述方法采用如下步骤:

(1) 分别配制带阳离子基团材料的 A 溶液和带阴离子基团材料的 B 溶液;

(2) 在一平板上喷涂 A 或 B 溶液,干燥成膜,其中平板材料须无毒,不溶于水或酸、碱性溶液,经除菌除热源处理;再在其上喷涂或浸泡 B 或 A 溶液,用注射用水洗涤,如此分别交替喷涂或浸泡 A 液或 B 液,用注射用水洗涤,重复操作  $n-1$  次,最后再在其上喷涂或浸泡 A 或 B 溶液,用注射用水洗涤,干燥成膜;控制每层 A 或 B 的膜厚为纳米级,制得如权利要求 1-2 所述的纳米补片;

(3) 在(1)所述的 A 或 B 溶液中添加功能因子及多肽,质量百分比浓度为 0%-10%;或单独配制功能因子及多肽质量百分比浓度为 0%-10% 的溶液 C 喷涂或浸泡在(2)制得的纳米补片表面。

## 一种仿生原位再生修复纳米补片、制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属生物医药技术领域,具体涉及一种带阴离子基团材料、功能因子和 / 或功能多肽、带阳离子基团材料复合物组成的纳米补片。并提供该纳米补片的制备方法以及在外科手术中缺损组织的黏贴、封闭、堵漏、止血、隔离、修复、防止粘连、抗感染及人工脑膜方面的用途,也可作为药物的缓释载体及纳米级组织工程支架材料。

### 背景技术

[0002] 在外科手术中经常需要对缺损及损伤组织的封闭、修复及防止粘连,现有的产品有羧甲基纤维素、壳聚糖、聚乳酸、胶原及纤维蛋白胶的膜及凝胶产品,这些产品在一定程度上对损伤组织的封闭、修复及防止粘连起到了积极的作用。但由于其产品存在诸多缺陷影响了功能的发挥,如胶原蛋白海绵或膜产品厚度从 0.5mm 至 5mm,导致产品不柔软,与组织贴附性能差,产品遇组织液容易形成粘糊状,产品失去拉伸强度,使得临床外科医生操作不便,为获得一定的力学性能,得添加交联剂如戊二醛等,交联剂除有一定的组织毒性外,还容易导致钙化形成;动物源性蛋白类产品存在较大安全风险(如病毒、病原微生物等)以及蛋白大分子造成的人体过敏等不良反应;羧甲基纤维素、壳聚糖类产品力学强度不够,体内降解时间或太短或太长;而聚乳酸产品降解产生酸性产物等等;因此,研制一种克服现有膜产品缺陷的创新产品具有非常重大的临床应用价值。

[0003] 在本发明中巧妙地把生物材料的仿生、促进组织修复功能与生物材料的纳米复合制备技术结合起来,使产品的理化性能得到了改善,柔软,组织黏附性好,适应脏器表面的凹凸,抗拉伸及抗气压性能强,可作为缺损组织的黏贴、封闭、堵漏、止血、隔离、修复、防止粘连、抗感染及人工脑膜方面的用途。也可作为药物的缓释载体及纳米级组织工程支架材料。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是根据上述现有产品的不足之处,提供一种仿生原位再生修复纳米补片、制备方法及应用,本发明首先是提供一种对组织缺损具有原位再生修复效果的仿生复合纳米补片;其次提供了一种该仿生复合纳米补片的制备方法;再者提供了该仿生复合纳米补片作为缺损组织的黏贴、封闭、堵漏、止血、隔离、修复、防止粘连及人工脑膜方面的用途。也可作为药物的缓释载体及纳米级组织工程支架材料。

[0005] 本发明目的实现由以下技术方案完成:

[0006] 一种仿生原位再生修复纳米补片,其特征在于所述补片的构成方式是由带阳离子基团材料的 A 层及带阴离子基团材料的 B 层依次叠加形成,其中所述的依次叠加指的是,由  $[(A+B)_n+A]$  或  $[(B+A)_n+B]$  的构成方式,其中叠加次数  $n$  可为正整数。

[0007] 所述 A 层或 B 层的厚度为纳米级。

[0008] 所述的带阳离子基团材料的 A 层占所述补片的质量百分比为 20%–80%,其余为带阴离子基团材料的 B 层。

[0009] 所述 B 层为带阴离子基团材料,该基团材料为可体内降解的具有生物相容性材料,所述的带阴离子基团材料包括带阴离子基团多糖、带阴离子基团蛋白或带阴离子基团多肽(聚肽)中的至少一种。

[0010] 所述的带阴离子基团多糖包括但不限于羧甲基纤维素、羧甲基壳聚糖、透明质酸、海藻酸、硫酸软骨素及肝素多糖及其衍生物中的一种或一种以上,以及聚乳酸、聚羧基乙酸等一些高分子材料及衍生物。

[0011] 所述 A 层为带阳离子基团材料,该基团材料为可体内降解的具有生物相容性材料,所述的带阳离子基团材料包括带阳离子基团多糖、带阳离子基团蛋白或带阳离子基团多肽(聚肽)中的至少一种。

[0012] 所述的带阳离子基团多糖包括但不限于壳聚糖及其衍生物。

[0013] 所述的带阳离子基团多肽(聚肽)包括但不限于聚赖氨酸及其衍生物。

[0014] 所述的基团蛋白及多肽(聚肽)包括但不限于两性聚电解质胶原、弹性蛋白及其水解产物。

[0015] 所述补片中含有不超过 10% 质量百分比的功能因子和 / 或功能多肽。

[0016] 所述功能多肽包括但不限于含 - 精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸 - 的多肽、含 - 缬氨酸 - 甘氨酸 - 缬氨酸 - 丙氨酸 - 脯氨酸 - 甘氨酸 - 的多肽或含 - 异亮氨酸 - 赖氨酸 - 缬氨酸 - 丙氨酸 - 缬氨酸 - 的多肽中的一种或一种以上的混合物。

[0017] 所述功能因子包括但不限于纤连蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)、血管内皮生长因子(VEGF)、纤维蛋白原(fg)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子(TGFs)、骨形态发生蛋白(BMPs)、类胰岛素生长因子(IGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、凝血酶及分子量小于 10000 的壳寡糖中的一种或一种以上的混合物。

[0018] 一种仿生原位再生修复纳米补片的制备方法,其特征在于所述方法采用如下步骤:

[0019] 1) 分别配制带阳离子基团材料的 A 溶液和带阴离子基团材料的 B 溶液;

[0020] 2) 在一平板(平板材料须无毒,不溶于水或酸、碱性溶液,经除菌除热源处理)上喷涂 A 或 B 溶液,干燥成膜;再在其上喷涂或浸泡 B 或 A 溶液,用注射用水洗涤,如此分别交替喷涂或浸泡 A 液或 B 液,用注射用水洗涤,重复操作 n-1 次,最后再在其上喷涂或浸泡 A 或 B 溶液,用注射用水洗涤,干燥成膜;控制每层 A 或 B 的膜厚为纳米级,制得如权利要求 1-2 所述的纳米补片;

[0021] 3) 功能因子及多肽的添加可添加在 1) 所述的 A 或 B 溶液中,质量比浓度为 0%~10%;也可单独配制质量比浓度为 0%~10% 的溶液 C 喷涂或浸泡在 2) 制得的纳米补片表面;

[0022] 4) 作为显色剂,在 1) 配制的 A 和 / 或 B 溶液中可加入适量的核黄素;

[0023] 所述的纳米补片用于缺损组织的黏贴、封闭、堵漏、止血、隔离、修复、防止粘连及人工脑膜方面的用途,也可用于作为药物的缓释载体。

[0024] 本发明的优点是,本发明通过生物高分子材料的复合,模拟细胞外基质,为细胞的停泊、生长、繁殖提供生存空间及获取营养、进行新陈代谢,且通过材料的优化组合调控材料的体内降解速率;功能因子及功能结构多肽的添加有助于细胞的黏附、伸展,可调控细胞-基质之间和细胞-细胞间的相互作用,从而实现材料在损伤组织的修复、再生等方面的

多功能用途 ;通过材料交替叠加聚电解质的制备方法所得纳米级材料使产品的理化性质利于细胞的粘附与基因表达,特别是强化了材料的力学性能,避免了交联剂的毒副作用。

### 具体实施方式

[0025] 以下通过实施例对本发明特征及其它相关特征作进一步详细说明,以便于同行业技术人员的理解:

[0026] 实施例 1. 准备一 12 厘米直径培养皿,内置一张同样直径高分子材料膜(经洗涤、灭菌及除热原处理),干燥;分别配制带阳离子基团材料的 A 溶液(1mg/ml 壳聚糖,0.1mol/L 乙酸,0.2mol/L NaCl, pH=4)和带阴离子基团材料的 B 液(1mg/ml 羧甲基壳聚糖,0.15mol/L NaCl, pH=6);取部分 B 液加入功能多肽( $1 \times 10^{-4}$ mg/ml)配制成 C 液,功能多肽氨基酸顺序为:赖氨酸-赖氨酸-半胱氨酸-丝氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸-半胱氨酸-赖氨酸-赖氨酸;把上述溶液分别灌装到高压瞬时喷涂设备中,首先往培养皿内高压瞬时喷涂 C 液,干燥成膜;接着高压瞬时喷涂 A 液,用注射用水冲洗;接着高压瞬时喷涂 B 液,用注射用水冲洗,如此交替喷涂 A 液、B 液、冲洗,重复操作 800 次;接着再高压瞬时喷涂 A 液,用注射用水冲洗;最后高压瞬时喷涂 C 液,用注射用水冲洗,干燥,揭膜,贴面用注射用水冲洗,干燥处理得成品。

[0027] 实施例 2. 准备一 12 厘米直径培养皿,内置一张同样直径高分子材料膜(经洗涤、灭菌及除热原处理),干燥;分别配制带阳离子基团材料的 A 溶液(2mg/ml 壳聚糖,0.1mol/L 乙酸,0.2mol/L NaCl, pH=4)和带阴离子基团材料的 B 液(2mg/ml 的海藻酸,0.15mol/L NaCl, pH=6)简称 B 液;取部分 B 液加入表皮生长因子(EGF)(0.01mg/ml)配制成 C 液;把上述溶液分别灌装到高压瞬时喷涂设备中,首先往培养皿内高压瞬时喷涂 C 液,干燥成膜;接着高压瞬时喷涂 A 液,用注射用水冲洗;接着高压瞬时喷涂 B 液,用注射用水冲洗,如此交替喷涂 A 液、B 液、冲洗,重复操作 200 次;接着再高压瞬时喷涂 A 液,用注射用水冲洗;最后高压瞬时喷涂 C 液,用注射用水冲洗,干燥,揭膜,贴面用注射用水冲洗,干燥处理得成品。

[0028] 实施例 3. 准备一 12 厘米直径培养皿,内置一张同样直径高分子材料膜(经洗涤及灭菌除热原处理),注射用水冲洗干燥;分别配制带阳离子基团材料(1mg/ml 胶原,0.1mol/L 乙酸,0.2mol/L NaCl, pH=3.5)和带阴离子基团材料的 B 液(1mg/ml 透明质酸,0.15mol/L NaCl, pH=6);把上述溶液分别灌装到高压瞬时喷涂设备中,首先往培养皿内高压瞬时喷涂 A 液,干燥,接着高压瞬时喷涂 B 液,用注射用水冲洗,如此交替喷涂 A 液、B 液、冲洗,重复操作 500 次;最后再高压瞬时喷涂 A 液,用注射用水冲洗,干燥,揭膜,贴面用注射用水冲洗,干燥处理得成品。

[0029] 实施例 4. 准备一 12 厘米直径培养皿,内置一张同样直径高分子材料膜(经洗涤、灭菌及除热原处理),干燥;分别配制带阳离子基团材料的 A 溶液(5mg/ml 壳聚糖,0.1mol/L 乙酸,0.2mol/L NaCl, pH=4)和带阴离子基团材料的 B 液(1mg/ml 透明质酸,0.15mol/L NaCl, pH=6);取部分 B 液加入凝血酶(浓度:2000IU/ml)配制成 C 液;把上述溶液分别灌装到高压瞬时喷涂设备中,首先往培养皿内高压瞬时喷涂 C 液,干燥成膜;接着高压瞬时喷涂 A 液,用注射用水冲洗;接着高压瞬时喷涂 B 液,用注射用水冲洗,如此交替喷涂 A 液、B 液、冲洗,重复操作 300 次;接着再高压瞬时喷涂 A 液,用注射用水冲洗;最后高压瞬时喷涂 C 液,用注射用水冲洗,干燥,揭膜,贴面用注射用水冲洗,干燥处理得成品。

[0030] 实施例 5. 准备一 12 厘米直径培养皿, 内置一张同样直径高分子材料膜(经洗涤、灭菌及除热原处理), 干燥; 分别配制带阳离子基团材料的 A 溶液(1mg/ml 聚赖氨酸, 0.1mol/L 乙酸, 0.2mol/L NaCl, pH=4) 和带阴离子基团材料的 B 液(1mg/ml 的胶原, 10ug/ml 的血管内皮生长因子, 0.15mol/L NaCl, pH=8) 简称 B 液; 首先往培养皿内浸涂 B 液, 干燥成膜, 接着浸涂 A 液, 用注射用水冲洗, 如此交替浸涂 B 液、A 液、冲洗, 重复操作 100 次, 最后再浸涂 B 液, 冲洗, 干燥, 揭膜, 贴面用注射用水冲洗, 干燥处理得成品。

[0031] 按实施例所制备样品(以下称供试品), 对其安全性及有效性进行了生物学及力学性能评价试验:

[0032] 1. 细胞毒性试验:

[0033] 参照 / 技术标准: GB/T 16886.5-2003

[0034] 细胞株: L-929 细胞(小鼠成纤维细胞)

[0035] 培养液: 含 10% (V/V) 小牛血清的 MEM

[0036] 空白对照: 同批细胞培养液

[0037] 阴性对照: 高密度聚乙烯

[0038] 阳性对照: 5g/L 苯酚溶液

[0039] 浸提介质: 同批不含小牛血清的 MEM

[0040] 浸提时间: 24 小时

[0041] 供试品浸提比例: 1g/5ml

[0042] 试验方法: 浸提液试验(MTT 法)

[0043] 在 27°C、5%CO<sub>2</sub> 的空白对照、阴性对照、阳性对照和供试品浸提液接触贴壁生长的细胞, 培养 72h 后, 加入 MTT 液, 孵育 4h。吸除后, 加入 DMSO, 通过分光光度计在波长 630nm 下对各组进行吸光度测定, 并计算细胞的相对增殖率。

[0044] 结果: 供试品的细胞毒性: 0 级

[0045] 结论: 参照 GB/T 16886.5-2003, 该供试品无细胞毒性。

[0046] 2. 皮内刺激试验

[0047] 参照 / 技术标准: GB/T 16886.10-2005

[0048] 试验动物: 健康新西兰兔

[0049] 浸提介质: 0.9% 氯化钠注射液

[0050] 供试品: 材料浸提液

[0051] 阴性对照: 同批浸提介质

[0052] 接触途径: 皮内注射

[0053] 评判指标: 观察 24h、48h、72h 红斑、水肿反应程度

[0054] 结果: 注射后 24h、48h、72h 注射局部及周围皮肤组织均无红斑、水肿反应, 试验侧皮肤反应不大于对照侧皮肤反应。

[0055] 结论: 参照 GB/T 16886.10-2005, 该供试品无皮内刺激反应。

[0056] 3. 急性全身毒性试验

[0057] 参照 / 技术标准: GB/T 16886.11-1997/ASTM F 750

[0058] 试验动物: 健康小白鼠

[0059] 浸提介质: 0.9% 氯化钠注射液

- [0060] 供试品:材料浸提液  
[0061] 阴性对照:同批浸提介质  
[0062] 接触途径:尾静脉注射  
[0063] 评判指标:观察 4h、24h、48h、72h 动物一般状态、毒性表现和死亡动物数。  
[0064] 结果:72h 观察期内供试品组动物反应不大于阴性对照组动物。  
[0065] 结论:参照 GB/T 16886.11-1997/ASTM F 750,该供试品急性全身毒性试验结果符合要求。

#### [0066] 4. 溶血试验

- [0067] 参照/技术标准:GB/T 16886.4-2003/GB/T 16175-1996  
[0068] 试验动物:健康新西兰兔  
[0069] 稀释抗凝兔血制备:新鲜抗凝兔血+0.9%氯化钠注射液  
[0070] 阴性对照:0.9%氯化钠注射液  
[0071] 阳性对照:蒸馏水  
[0072] 接触途径:尾静脉注射  
[0073] 试验方法:将供试品按一定比例浸入 0.9%氯化钠注射液中,37℃水浴保温 30min 后,加入 0.2ml 稀释新鲜抗凝兔血,37℃水浴保温 60min。2500rpm 离心 5min 后取上清液,用紫外分光光度计在 545nm 处测定其吸光度,计算溶血率。  
[0074] 结果:该供试品的溶血率为 0.2%。  
[0075] 结论:参照 GB/T 16886.4-2003,该供试品的溶血试验结果符合医用材料的要求。

#### [0076] 5. 力学性能试验

- [0077] 参照/技术标准:M. J. Smith, M. J. McClure, S. A. Sell, et al. Suture-reinforced electrospun polydioxanone-elastin small-diameter tubes for use in vascular tissue engineering: A feasibility study. Acta Biomaterialia, 2008, 4(1): 58~66  
[0078] 试验方法:在 M350-20KN 万能力学试验机上测定样品的拉伸性能:传感器 250 kgf,拉伸速度 10 mm/min,样品数量为 3。  
[0079] 结果:该供试品的拉伸强度为 589~612KPa,断裂伸长率维持在 140-160% 范围内。  
[0080] 结论:参照文献,该供试品的的力学性能完全满足人体内力学环境的需求。  
[0081] 通过以上评价试验及数据说明本发明产品可用于人体组织缺损方面,且安全有效。

[0082] 以下可通过动物试验可进一步证明本发明的使用效果:

[0083] 新西兰兔 30 只,体重(2500±40)克,雌雄不拘,随机分成两组:A 组 15 只(用于解剖观察伤口血管生成),B 组 15 只(用于解剖观察伤口修复情况);准备好规格为 1.5X1.5 厘米的本发明产品;全部动物采用注射乌拉坦麻醉,麻醉稳妥后仰卧位,固定于手术台上;在每个新西兰兔肺部的大致相同位置制造直径 3 毫米的伤口;把本发明产品贴到实验新西兰兔肺部直径 3 毫米的伤口上,缝合解剖切口,术后分笼饲养,择日解剖观察。

[0084] 试验结果:本发明产品的强度可经受住呼吸时的空气压力。平均 8 天,A 组实验新

西兰兔的肺部伤口开始生成血管, B 组平均 27.5 天后伤口愈合。伤口愈合后, 本发明产品可在体内自然降解。本发明产品能适应脏器表面的凹凸, 能贴住伤口, 而且不会与其他组织粘连。本发明产品可用于胃、肝脏等柔软且难以缝合的脏器或是易出血的脏器, 有助于缩短外科手术时间, 及缩短康复时间。