

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01)

A61L 33/12 (2006.01)

专利号 ZL 200410071932.1

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1319604C

[22] 申请日 2004.9.13

[21] 申请号 200410071932.1

[73] 专利权人 中国医学科学院生物医学工程研究所

地址 300192 天津市南开区科研东路 7 号

[72] 发明人 张其清 李学敏 刘玲蓉 亢 凯

[56] 参考文献

JP61041452A 1986.2.27

EP1262200A2 2002.12.4

FR2657352A 1991.7.26

CN1158573A 1997.9.3

CN1337270A 2002.2.27

审查员 周文娟

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理
事务所
代理人 赵尊生

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

双层复合胶原基引导组织再生膜及其制备方法

[57] 摘要

本发明是涉及双层复合胶原基引导组织再生材料及其制备方法，它是以胶原和透明质酸或其钠盐为主要原材料制备成具有致密层和疏松层结构的双层复合材料，质量组成为：所述的致密层是丙二酸胶原溶胀液 0.6 - 0.8%。所述的疏松层是丙二酸胶原溶胀液 0.2 - 0.4% 与胶原干重含量 5 - 20% 的透明质酸或其钠盐。本发明生物相容性优良，一侧为疏松结构，另一侧为致密结构，使制品具有能阻止成纤维细胞等向缺损处的长入，同时促进缺损处组织的再生修复，具有相应生物学功能，可降解吸收，不必二次手术取出植入材料的显著特点。适用于由于创伤、肿瘤术后等造成的组织缺损，用于缺损组织的引导再生修复，实现缺损组织的再生性愈合。

1、一种双层复合胶原基引导组织再生材料，它是由致密结构的胶原层和疏松层组成，其特征在于所述的致密结构的胶原层是由 0.6-0.8%丙二酸胶原溶胀液冻干压制而成；所述的疏松层是丙二酸胶原溶胀液与透明质酸或其钠盐的丙二酸或水溶液混合冻干而成，其中透明质酸或其钠盐用量为胶原干重量的 5-20%，胶原在最终混合溶液中的浓度为 0.2-0.4%；胶原致密层紧密地覆于疏松层上继续冷冻干燥后再经压制成型。

2、权利要求 1 所说的双层复合胶原基引导组织再生材料的制备方法，其特征在于它包括下述步骤：

(1) 按中国专利 ZL94118836.1 中所述方法提取制备胶原溶胀液，按计量用 0.3%的丙二酸配制成丙二酸胶原溶胀液 0.6-0.8%；

(2) 将丙二酸胶原溶胀液倒入容器中置于-35℃的冰箱中 2 小时，然后在真空冷冻干燥机中，冷冻干燥；

(3) 将胶原膜置于两个适合大小的平板之间，压平整，使成相对致密层；

(4) 4℃下，将透明质酸及其钠盐用氧化剂高碘酸钠溶液进行氧化处理 18 小时，然后用亚硫酸氢钠还原未反应残余氧化剂，至无色为止；

(5) 4℃下，大量对水透析 72 小时，然后-30℃预冻，真空冷冻干燥机中冻干待用；

(6) 按计量取均匀分散的丙二酸胶原溶胀液和经上述处理的透明质酸或其钠盐，将该种透明质酸或其钠盐用 0.3%丙二酸或水溶解成溶液，胶原溶胀液中加入透明质酸或其钠盐溶液，搅拌混匀，-30℃预冻 30 分钟，然后将上述已制备好的胶原致密层紧密地覆于其上，-30℃继续冷冻并进行冻干处理；

(8) 将上述成型的复合材料用常用交联剂溶液交联，交联后用蒸馏水充分洗涤 10-15 次并浸泡过夜至中性；然后再将其置于容器中，冷冻干燥方法冻干；

(9) 从冻干机中取出后，将膜置于两个平板间，机械加压平整，成为最终制品；

(10) 切割成不同的规格，包装，然后用 γ -射线照灭菌，即得到复合胶原基引导组织再生材料。

3、根据权利要求 2 所说的双层复合胶原基引导组织再生材料的制备方法，其特征在于所述的疏松层制备步骤中透明质酸或其钠盐溶液加入胶原溶胀液中，是用 0.1M 的 Tris 碱或 0.1M 的碳酸氢钠溶液调节 pH 值至 7-9，置 20℃恒温空气浴箱内低速搅拌，<60 转/每分钟，24 小时，使发生交联反应，反应结束后，弃去过多的液体，余下的固体悬浮液-30℃预冻，至形成疏松层。

双层复合胶原基引导组织再生膜及其制备方法

技术领域

本发明属于生物医用材料领域，特别是涉及一种双层复合胶原基引导组织再生材料及其制备方法。本发明适用于由于创伤、肿瘤术后等造成的组织缺损，用于缺损组织的引导再生修复，实现缺损组织的再生性愈合。作为一种有功能的生物材料，本发明所制备的材料也可以作为组织工程支架用于组织工程化人工器官的研究和开发。

技术背景

医用引导组织再生材料是医用生物材料的重要组成部分，是近几年来发展的一类全生物材料。引导组织再生（guided tissue regeneration, GTR）的概念 80 年代首先由 Nyman 等提出，它是指依靠机械屏障等作用，选择性地引导细胞向受损的部位附着、增生，达到组织修复的目的。实现组织病（缺）损的修复和组织引导再生的关键是功能性修复材料的开发和应用。

作为一种促进组织再生性愈合的全新治疗手段，引导组织再生巧妙的利用膜材料的保护、阻隔作用实现形态和功能上的组织再生或重建，该技术的兴起打破了传统手术疗法的局限性。该技术关键是引导组织再生膜的应用。已有的引导再生材料大多数是由单一材料制备，分为可降解和不可降解两大类。七十年代后期至八十年代初期，Nyman、Gottlow、Becker 等人相继对不可降解材料聚缩醛、聚四氟乙烯 (PTFE)、硅酮膜等进行了研究，这类材料虽然与组织有较好的生物相容性，但因不能被组织吸收，需要二次手术取出材料，增加了创伤的机会。

传统的引导组织再生主要是利用某些生物材料形成的隔膜作用，使得受损组织局部免受周围纤维结缔组织等的影响，从而有利于组织再生修复，但对于需要修复再生的组织并没有很好的促进作用。为更有利于组织修复再生，需要开发新型的材料，所开发的新型 GTR 材料其应该能阻止成纤维细胞等向缺损处长入，还应该促进缺损处组织的再生修复，具有生物学功能。通过制备有多层结构的引导组织再生材料可以实现这一目的，已有一些研究工作取得进展。在这些研究工作中，由于主材料的限制（如选用 II 型胶原制备的材料使其更主要的适用于软骨组织）或者制备工艺的不稳定性（如通过机械压制制备多层膜材料可能出现分层结构的分离）使这些研制成的制品实用性受到影响。选用广泛使用的 I 型胶原为主材料，同时利用透明质酸或其钠盐具有的促进细胞黏附、增殖和分化的生物学功能，采用更为稳定和简便的制备工艺，可以更好的实现引导组织再生修复的临床需要。

发明内容

本发明的目的是提供一种双层复合胶原基引导组织再生材料及其制备方法，它是从牛腱中提取的胶原蛋白为主要原料制备的医用引导组织再生材料。本发明制成的新型医用引导组织再生膜，同时具有胶原材料和透明质酸或其钠盐材料的特点，生物相容性优良，所制备材料为双侧结构不同，一侧为疏松结构，另一侧为致密结构，使制品具有能阻止成纤维细胞等向缺损处的长入，同时促进缺损处组织的再生修复，具有相应生物学功能，可降解吸收，不必二次手术取出植入材料的显著特点。

本发明包括从动物的结缔组织中用蛋白酶消化法提取的胶原蛋白，用0.3%的丙二酸溶液处理使胶原蛋白溶胀，混匀后再用浓度为0.3%的丙二酸溶液调节固体含量，即得到胶原蛋白溶液。分别配制不同含量比例的胶原蛋白溶液，其中低含量比例的胶原蛋白溶液中混合透明质酸或其钠盐，透明质酸或其钠盐的用量为相应低含量比例的胶原蛋白溶液中胶原干重的5-20%，采用通常冷冻干燥和加压成型的方法成型，以常规交联方法使成膜后的胶原蛋白及透明质酸或其钠盐分子间交联，最后再次干燥或冻干已交联的复合胶原蛋白膜材料。

为实现本发明的目的，首先应用哺乳动物的结缔组织如牛腱、牛皮、猪腱、猪皮等进行酶处理，制备得到胶原蛋白溶液见中国专利ZL94118836.1。具体内容包括采用酶消化法从牛腱组织中提取I型胶原，并将胶原纤维中具有抗原性的端肽去除，使其具有良好的生物相容性。选用医用级透明质酸或其钠盐并经过氧化等处理，使其具有良好的复合性能。通过共混、多次、多级冻干技术和化学交联，制备双层结构的复合材料，材料中一侧为含有胶原和适度比例的透明质酸或其钠盐的疏松层，另一侧为含有高浓度比例胶原材料的致密层。具体为按比例称取适量的胶原溶胀液适度稀释后预冷冻、合适的条件下冻干处理，冻干材料后处理成为致密结构；按合适的比例分别称取胶原溶胀液和透明质酸或其钠盐分别稀释和溶解，于均匀分散的胶原稀释液中缓慢加入透明质酸或其钠盐溶液，边加边低速搅拌使二者混匀，预冻适当时间形成有一定粘性的冰水结构，后将已制备好的胶原致密层紧密地覆于其上，继续冷冻并进行冻干处理，成为相对疏松/致密的结构；冻干的复合材料经化学交联，清洗冻干处理制备成成品。化学交联所用交联剂可选用醛类、二亚胺类等常用交联剂。得到的产品切割为所需形状，用铝箔或其他软包装材料进行包装，然后用 γ -射线照射灭菌。制备过程中可以根据需要，调整致密层和疏松层厚度来调整最终成品的厚度。

本发明的具体实施方案是：双层复合胶原基引导组织再生材料是以胶原和透明质酸或其钠盐为主要原材料制备成具有致密层和疏松层结构的双层复合材料，质量组成为：

所述的致密层是丙二酸胶原溶胀液 0.6-0.8%。

所述的疏松层是丙二酸胶原溶胀液 0.2-0.4%与胶原干重含量 5-20%的透明质酸或其钠盐。

所述的双层复合胶原基引导组织再生材料的制备方法包括下述步骤：

(1) 按专利94118836.1中所述方法提取制备胶原溶胀液，按计量用0.3%的丙二酸

配制成丙二酸胶原溶胀液 0.6-0.8%；

(2)将丙二酸胶原溶胀液倒入合适的容器中置于-35℃的冰箱中2小时，厚度1-3cm，然后在真空冷冻干燥机中，冷冻干燥；

(3)将胶原膜置于两个合适大小的平板之间，机械加压使成相对致密层；

(4)4℃下，将医用级透明质酸或其钠盐用氧化剂高碘酸钠溶液进行氧化处理18小时，然后用亚硫酸氢钠还原未反应残余氧化剂，至无色为止；

(5)4℃下，大量对水透析72小时，然后-30℃预冻，真空冷冻干燥机中冻干待用。

(6)按计量取均匀分散的丙二酸胶原溶胀液0.4-0.8%和经上述处理的透明质酸或其钠盐用0.3%丙二酸或水溶解成溶液，透明质酸或其钠盐用量为胶原干重的5-20%，胶原溶胀液中加入透明质酸或其钠盐溶液，使胶原溶胀液终浓度为0.2-0.4%，搅拌均匀，转移至合适容器中，厚度1-3cm，-30℃预冻30分钟；然后将上述已制备好的胶原致密层紧密地覆于其上，-30℃继续冷冻并进行冻干处理；

(7)将上述成型的复合材料用常用交联溶液交联，交联后用蒸馏水充分洗涤并浸泡过夜至中性；然后再将其置于合适容器中，并冷冻干燥方法冻干；

(8)从冻干机中取出后，将其置于两个合适大小的平板，压平整，成为最终制品；

(9)切割成不同的规格，包装，然后用 γ -射线照灭菌，即得到复合胶原基引导组织再生材料。

所述的疏松层是0.2-0.4%胶原溶胀液与胶原干重含量5-20%的透明质酸或其钠盐组成。

所述的疏松层制备步骤中透明质酸或其钠盐溶液加入胶原溶胀液中，还可以用0.1M的Tris碱或0.1M的碳酸氢钠溶液调节pH值至7-9，置20℃恒温空气浴箱内低速搅拌，<60转/每分钟，24小时，使二者发生交联反应，反应结束后，小心弃去过多的液体，余下的固体悬浮液-30℃预冻，至形成疏松层。

本发明制成的新型医用引导组织再生膜，同时具有胶原材料和透明质酸或其钠盐材料的特点，生物相容性优良，所制备材料为双侧结构不同，一侧为疏松结构，另一侧为致密结构，使制品具有能阻止成纤维细胞等向缺损处长入，同时促进缺损处组织的再生修复，具有相应生物学功能，可降解吸收，不必二次手术取出植入材料的显著特点。本发明适用于由于创伤、肿瘤术后等造成的组织缺损，用于缺损组织的引导再生修复，实现缺损组织的再生性愈合。作为一种生物材料，本发明所制备的材料也可以作为组织工程支架用于组织工程化人工器官的研究和开发。

附图说明

图1 双层膜致密侧表面扫描电镜图像(×50)。

图2 双层膜致密侧表面扫描电镜图像(×50)。

具体实施方式

实施例 1

采用中国专利 ZL94118836.1 (CN 1086145 C)中所述方法提取制备胶原溶胀液, 溶胀液用 0.3%的丙二酸稀释至 0.6%, 胶原蛋白稀释的溶胀液 100 克倒入直径为 100mm, 高度为 2.5cm 的玻璃平皿中。将平皿先置于-35℃的冰箱中 2 小时, 取出后迅速将该冻结的平皿置于真空冷冻干燥机的搁板上于真空度为 10-100 u 下冷冻干燥 50 小时。从冻干机中取出冻干的胶原材料置于两个聚四氟乙烯平板之间, 用辊子等平滑物体压平整, 使成相对致密层。

医用级透明质酸钠 1 克溶解于 50ml 水中, 用 20mM 高碘酸钠溶液 50ml, 0.2M 高氯酸钠 5ml 进行氧化处理, 4℃18 小时, 反应结束后缓慢滴加 0.04M 的亚硫酸氢钠还原未反应残余氧化剂, 根据颜色变化确定加入量, 至颜色为无色为止, 大量对水透析, 4℃72 小时, 每日更换透析用水 4 次, 转移至合适容器中-30℃预冻, 真空冷冻干燥机中冻干待用。

按合适的比例分别称取胶原溶胀液和经处理的透明质酸钠, 分别稀释和溶解, 使胶原稀释溶胀液浓度为 0.6% 50ml, 透明质酸钠用量相对胶原干重含量的 15% (质量比), 用 0.3%丙二酸或水溶解于成 50ml 溶液, 均匀分散的胶原稀释液中缓慢加入透明质酸钠溶液, 边加边低速搅拌使二者混匀, -30℃预冻适当时间 (30 分钟左右), 形成有一定粘性的冰水结构, 将已制备好的胶原致密层紧密地覆于其上, 继续冷冻并进行冻干处理, 成为双侧致密程度不同的复合材料。

将按上述方法制得的成型的复合材料用浓度为 pH 为 8.4 的甲醛溶液交联 120 分钟, 交联后用蒸馏水充分洗涤 10-15 次并浸泡过夜至中性。然后再将其置于玻璃平皿中, 预冻后冷冻干燥方法冻干。从冻干机中取出后, 再次将膜置于两个聚四氟乙烯板中压平整, 成为最终制品。

切割成不同的规格, 用铝箔或其他软包装材料进行包装, 然后用剂量为 25kGy 的 γ -射线照灭菌, 即得到复合胶原基引导组织再生材料。图 1 双层膜致密侧表面扫描电镜图像 ($\times 50$)。图 2 双层膜致密侧表面扫描电镜图像 ($\times 50$)。

实施例 2

致密胶原层和透明质酸钠处理同实施例 1。

疏松层制备过程为: 称取适量胶原溶胀液和经处理的透明质酸钠, 分别稀释和溶解, 浓度和比例同实施例 1, 将透明质酸钠溶液加入胶原溶胀液中, 用 0.1M 的 Tris 碱或 0.1M 的碳酸氢钠溶液调节 pH 值至 7-9, 置 20℃恒温空气浴箱内低速 (<60 转每分钟) 摇动 24 小时, 使经氧化处理的透明质酸钠分子与胶原发生交联反应。反应结束后, 小心弃去过多的液体, 余下的固体悬浮液按实施例 1 中条件预冻, 至形成一定粘性的冰水结构时紧密覆盖已制备好的致密层, 继续预冻至完全成冰样结构, 冻干处理。冻干样品于机械装置中压制成形, 切片, 包装, 用剂量为 25kGy 的 γ -射线照灭菌, 即得到复合胶原基引导组织再生材料。

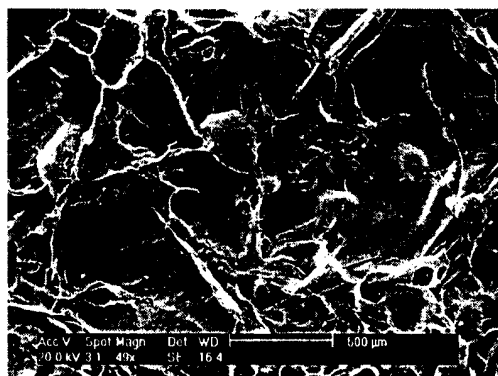


图 1

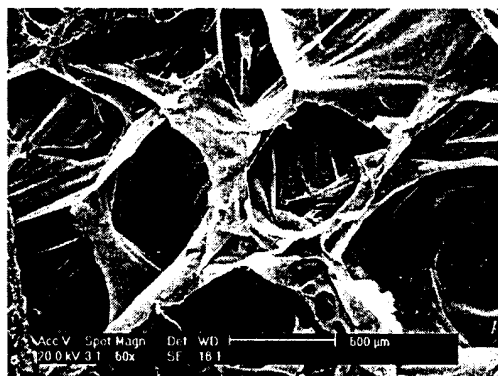


图 2