



〔12〕发明专利申请公开说明书

〔21〕 申请号 90109120.0

〔51〕 Int.Cl⁵
C08H 1/00

〔43〕 公开日 1991年6月5日

<p>〔22〕申请日 90.10.11</p> <p>〔30〕优先权 〔32〕89.10.13 〔33〕SU 〔31〕4745668</p> <p>〔71〕申请人 眼显微外科跨部门科学技术综合所 地址 苏联莫斯科</p> <p>〔72〕发明人 恩·倪·非德喀夫 瑟·尼·巴格喀夫 阿·佛·奥丝泼夫 艾·安·里涅克 依·亚·马克拉可瓦 亚·倪· 克丝孜恩 艾·微·啦里奥诺夫</p>	<p>〔74〕专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利 代理部 代理人 林伯楠</p> <p>G02C 7/04</p> <p>说明书页数: 10 附图页数:</p>
--	---

〔54〕发明名称 生物相容高分子材料的制备方法

〔57〕摘要

本发明涉及医学领域。

制备生物相容性高分子材料的方法是,将由家畜眼睛巩膜分离出来并洗去色素,糖蛋白和蛋白聚糖的骨胶原的酸溶液,与多硅酸碱金属盐的水溶液或与多硅酸凝胶混合至 pH4.5-6.0 而形成多硅酸的吸着聚合物,洗去所得吸着聚合物的阳离子并使之与水溶性乙烯和 / 或丙烯单体在 5-15KP 剂量的辐射作用下进行接枝共聚,接着分离目的产物。所制得的聚合物材料可用于眼科学,作为隐形眼镜,异源引流,基质内透镜的生物填料以及其它制品。

21 >

权 利 要 求 书

1、制备生物相容高分子材料的方法，其特征在于由家畜眼睛的巩膜分离出来并洗去色素，糖蛋白和蛋白聚糖的骨胶原的酸溶液，与多硅酸的碱金属盐的水溶液或与多硅酸凝胶混合，至PH4.5—6.0形成多硅酸的吸着聚合物，洗去吸着聚合物的阳离子并使之与水溶性乙烯和/或丙烯单体在5—15K P剂量的辐射作用下进行接枝共聚，然后分离出目的产物。

2、根据权利要求1的方法，其中在分离目的产物以前，将所得接枝共聚产物用氢氟酸处理并用电化学方法除去阳离子和阴离子。

3、根据权利要求1—2的任一方法，其中作为水溶性单体使用2-羟基乙基甲基丙烯酸酯或丙烯酰胺或N-乙烯基吡咯烷酮或其混合物。

生物相容高分子材料的制备方法

本发明涉及医学领域，具体地说，是涉及一种新的生物相容高分子材料的制备方法，它用于眼科的接触透镜(隐形眼镜)，异源引流，基质内透镜的生物填料以及其它制品。

用于眼科的生物相容材料的制备已知有各种方法，其制备都基于骨胶原—纤维蛋白。骨胶原作为独特的骨架，实现对其它蛋白以及细胞的支持功能。它存在于全部组织体中，在皮、腱、和骨骼中。

从原料分离骨胶原的各种方法是熟知的，通过将它溶解于酸、碱、盐中或借助于酶来分离，或者通过盐在粉碎的原料上的作用而使分离出呈固态不溶纤维形式的骨胶原。分离出的骨胶原用已知方法去除色素，糖蛋白和蛋白聚糖。

由骨胶原制得用于生产隐形眼镜的生物相容材料的方法是已知的(US, A, 4268131)。

上述材料是基于原纤维骨胶原的或基于可溶态原纤维骨胶原和骨胶原混合物的凝胶。上述材料的制备方法包括由原料(毛皮、腱、皮及其它)中提取骨胶原的各种方法，例如，通过溶解于酸(醋酸或柠檬酸)中，或于碱中，接着离心，用水洗涤，脱水，干燥，再溶解，沉淀和离心。为了生产透镜，制备一种基于在PH2—4的酸性水溶液介质中的骨胶原的4—10%凝胶。也使用有水解蛋白质酶(骨蛋白酶，胰蛋白酶，直肠酶(npok a a)和其它)存在时的酶提取方法。

所得材料不可能用作持久的植入物和用作具有指定多孔性因而

有透气性的材料的植入物，因为，为制成这种材料使用了具有平均统计分子量12—13万的蛋白质（材料的多孔性是由分子的几何大小以及构成材料的骨胶原的物理—化学性质所决定）。

此外，上述材料对酶的作用是不稳定的，因为完全由可以溶解的蛋白质所构成。材料的低孔隙度以及对酶作用的低稳定性导致与眼睛组织的生物相容性的减少。

已知的还有一种方法制备用于生产隐形眼镜的生物材料，它基于骨胶原和乙烯不饱和的化合物(US, A, 4388428)。

上述材料是高分子的，亲水的，在水成分中能够膨胀，它由可溶性骨胶原和乙烯—不饱和单体所组成，其特征是具有碳—碳双键聚合能力。这种材料的制备方法包括通过用胃蛋白酶作用的酶提取方法，由皮提取原纤维骨胶原。将所提取的和清洗过的骨胶原与乙烯—不饱和单体的水溶液混合。在所得混合物中，骨胶原用1.0HCl酸化到PH3时溶解。过滤所得溶液，注入注射器，将注射器中的溶液去气，离心并借助注射器注入透镜模具。

上述材料是水凝胶，其特征是没有足够高的透气性和孔隙度，限于骨胶原分子的几何大小和所使用的单体，蛋白含量低，在储存和使用中有不稳定性。

本发明制备的生物相容高分子材料是新的，在文献中尚未有描述。

本发明的主要任务是研制一种制备新型生物相容高分子材料的方法，该材料具有高度的透气性和孔隙度，生物相容性，机械强度高，高的光折射指数。

任务是这样解决的，发现了本发明制备生物相容高分子材料的

方法，其中，根据本发明，由家畜眼睛巩膜分离出来并去除了色素、糖蛋白和蛋白聚糖的骨胶原的酸溶液与多硅酸的碱金属盐的溶液或与PH4.5—6.0的多硅酸凝胶相混合而形成吸着的多硅酸聚合物，将所得的吸着聚合物除去阳离子并与乙烯和/或丙烯单体的水溶液在剂量为5—15K P的辐照下进行接枝共聚，接着分离出目的产物。

在分离目的产物之前，所得的接枝共聚产物可以用氢氟酸处理并用电化学方法清除阳离子和阴离子。作为水溶性乙烯的和/或丙烯的单体最好使用2-羟基乙基甲基丙烯酸酯或丙烯酰胺或N-乙烯基吡咯烷酮或其混合物。

本发明方法可以制得新型生物相容高分子材料，它是高空隙度材料，含有的多硅酸，按二氧化硅计算达25%(重量)，蛋白质达12%(重量)，氟硅酸阴离子和氢氟酸含量不大于 $1 \cdot 10^{-6}$ 摩尔/克。

所得材料具有高的透气性和孔隙度。本发明材料的透气性超出已知材料的3—6倍。

材料的高孔隙度导致弹性增加，这就增加了它的生物相容性。由本发明材料制得的制品的生物相容性较已知材料(US, A, 4268131)增加到3倍，也由于其巨噬细胞系细胞的弱的粘着作用。因而，例如在本发明材料中细胞粘着作用为 10^2 个/cm²，可是在现有材料(US, A, 4268131)中，细胞的粘着作用为 10^6 个/cm²。

所制得材料也具有高的光折射指数和机械强度，对水解蛋白质酶的作用有高稳定性。

按照所培养的成纤维细胞和巨噬细胞系的粘着作用来测试所得高分子材料的生物相容性(在角膜细胞(Кератинocytes)和腹膜巨噬细胞的培养物上)。

为此，将20×20mm的小块材料放在培养基中，然后移入细胞悬浮液。实验结果表明，角膜的成纤维细胞很好地粘着(总量的80—90%)并在本发明材料上展开，而炎症性系列的细胞实际上不固定在材料表面上。进行了一系列实验，其中将由本发明材料制成的隐形眼镜放在眼睛的角膜上。在试验中共使用了30支家兔。生物相容性的情况是按眼睛结膜水肿的程度来评价的。在全部情况下，在家兔眼睛上自放置透镜之时起没有发现任何水肿。本发明材料的临床试验表明有良好的氧渗透性以及生物相容性。

制备生物相容高分子材料的本发明方法是按下面方法实施的。

按照任何已知的方法，由原料中提取骨胶原并洗去其色素，糖蛋白和蛋白聚糖。

例如，也可以按以下方式实施。将家畜眼睛巩膜仔细地清洗掉眼睛的内皮及结膜残余物，肌肉残余物并切开基质。完全清除色素。清除色素可以用机械或酶处理共同进行。酶处理巩膜可以完全除去色素层。处理包括以下步骤：将小块没有处理的巩膜放在稍酸化的氯化钠的等渗溶液或醋酸溶液中，溶液的PH值为4.5—6，在溶液中加入胰蛋白酶，加入量为每克干巩膜加入0.01克，处理是在37℃，不断搅拌下进行2小时。此后，由溶液中取出巩膜，按1克干巩膜10—15升水的比例用蒸馏水洗涤。洗涤是在不断搅拌下进行的。残留的色素以机械法除去。将基质切成小块，物块小心地在蒸馏水中洗涤，直到完全除去机械性杂质，血液，然后转入烧瓶并注入10%苛性钠溶液(按10公斤组织中加入500毫升溶液计算)在18—36℃保持48小时。倒出溶液并中和组织到PH=6.8—7.0，在2%硼酸溶液中搅拌反复更换溶液。组织用蒸馏水洗涤直到洗涤液中完全没有硫酸根离

子为止，注入1M醋酸溶液使得在溶液中的最终骨胶原浓度大于1%。搅拌物质并在4°C温度下的冷藏器中放置1—2昼夜。然后均质化，在3000转/分的转速下离心30分钟，并在4°C下放置一昼夜。所得溶液通过玻璃漏斗过滤，之后在溶液—1M醋酸溶液中用胰蛋白酶进行补充处理骨胶原，而且胰蛋白酶的用量与第一次相同(每1克干巩膜使用0.01克胰蛋白酶)，在37°C处理时间为1小时。所得溶液要按使得全部胰蛋白酶析出而骨胶原留在溶液中这样来计算进行透析过滤(gua u pa u)，使用醋酸洗去胰蛋白酶。骨胶原溶液通过透析过滤而浓缩，直到浓度为1—10%(重量)之间为止。为了制备骨胶原溶液，可以使用其它稀酸溶液，如甲酸，盐酸。

骨胶原的酸溶液在不断搅拌下与多硅酸碱金属盐的水溶液相混合。在PH值为4.5—6.0时停止搅拌直到形成多硅酸的吸着聚合物。骨胶原的酸溶液也可以与预先制备的多硅酸凝胶相混合。混合物也搅拌至PH4.5—6.0时为止(到形成多硅酸吸着聚合物)。

所制得的吸着聚合物在4°C温度，不断搅拌的条件下保持一昼夜。用离心方法收集并除去阳离子。

所制得的吸着聚合物用水溶性单体，如丙烯酰胺，N-乙烯基吡咯烷酮等或其混合物饱和。饱和是按如下方式进行。将吸着聚合物在单体中研磨并在其中保持一昼夜，此后过滤除去过量单体。将所得混合物冷却到0°C，并用5—15K P剂量照射。要在5—15KTP剂量下进行辐射接枝共聚作用，因为当剂量低于5K P则所得材料具有较低强度。15K P剂量是上限，因为15K P以上不会再增加材料的强度。产品按照需要进行干燥，机械加工以制得光学制品，例如隐形眼镜。辐照作用以后，所得的接枝共聚产物可以用氢氟酸处理。为此，将

所得的接枝共聚产物在化学纯氢氟酸中放置一昼夜，接着用电化学方法将所得产物清除阳离子和阴离子。

进行电化学清洗以完全除掉所得产物中的过量离子 F^- ， SiF_6^{2-} ，因为在一定量的浓度下，后者在使用本发明材料开始后几天会引起发炎反应。

为了更好地理解本发明，列出以下制备生物相容高分子材料方法的实例。

实施例1

将40克去净和洗净的巩膜基质放在1升0.1M的醋酸中，在溶液中加入0.1克胰蛋白酶，将溶液在37°C下培养1小时，然后在10升蒸馏水中洗涤此巩膜。用机械法去除余下的色素。切开基质并注入2升10%氢氧化钠并在18—20°C下放置48小时，倾析溶液。用少量蒸馏水洗涤组织，注入2升2%硼酸水溶液并在磁搅拌器上搅拌2小时，硼酸溶液更换二次。在不断搅拌下用蒸馏水(5升)仔细地清洗组织，直到由洗涤组织中完全除去硫酸根离子为止，加入700ml 0.5M醋酸，溶液在4°C放置一昼夜。然后用机械组织研磨机均化物质，在3000转/分的转速下离心30分钟，并在4°C放置三天。通过玻璃漏斗过滤所得溶液。在所得的骨胶原溶液中加入胰蛋白酶，其量按每1200ml溶液加入0.1克，混合物在37°C温度下培养1小时。然后将所得溶液用10升0.1M醋酸进行透析过滤，直到在溶液中骨胶原浓度为4%(重量)为止。在不断搅拌下将所制得的骨胶原的酸溶液滴加到20%通过0.22微米的滤器过滤的硅酸钠(Na_2SiO_3)溶液中。混合溶液直到PH6.0，制得凝胶状多硅酸的吸着聚合物。制得的聚合物在4°C下放置一昼夜，然后离心分离过量的水，离心是在3000转/分速率下进行30分钟。

所得聚合物在1升去离子水中研磨，在3000转/分转速下离心，重复该步骤6次。在100克所得吸着聚合物中加入700克2-羟基乙基甲基丙烯酸酯，在单体溶液中研磨吸着聚合物，在3000转/分转速下离心。将所制得的混合物转入模具中，冷却至4℃并以15K P的辐照剂量照射和干燥。制得的材料是2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和多硅酸以及骨胶原的接枝共聚物，多硅酸含量为15.6%(重量)(按二氧化硅计算)，蛋白含量为11.4%(重量)。

由本发明材料制成的隐形眼镜，固定在患者角膜表面上，在2-3天中角膜水肿0.1%，也就说明了本发明材料有良好的氧渗透性以及良好的生物相容性。

实施例2

按照实施例1制备2-羟基乙基甲基丙烯酸酯以及多硅酸和骨胶原的吸着复合物的接枝共聚物，该共聚物用0.4%氢氟酸溶液在25℃温度下处理1昼夜，然后按10克1升水的比例放在去离子水中，重复操作6-7次，然后将材料转入电化学槽中，并在 $10^{-3}M$ 的盐酸水溶液中进行电化学清洗材料，在300伏功率8瓦下除去 F^{-} ， SiF_6^{-2} 离子。按1克材料10升水的比例将材料在去离子水中洗涤以除去盐酸，然后用磷酸盐缓冲液洗涤。制得的材料是2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和多硅酸和骨胶原吸着络合物的接枝共聚物用氢氟酸化学降解的产物，它具有的孔径为0.025-0.35微米，没有多硅酸，蛋白含量为12.0%(重量)，氟硅酸阴离子和氢氟酸的含量为 $1 \cdot 10^{-6}$ 摩尔/克。

由本材料制备的隐形眼镜的试验结果表明与实施例1的相似。

实施例3

方法按实施例1进行，除了将所得的骨胶原溶液用10升0.5M醋

酸透析过滤直到骨胶原浓度为35%(重量)。在不断搅拌下将所得骨胶原的酸溶液按滴加入35%的通过0.22微米滤器过滤的硅酸钠(Na_2SiO_3)溶液中。混合溶液直到PH为5.5, 得到凝胶状的多硅酸吸着聚合物。所得聚合物在0°C放置一昼夜, 然后在3000转/分的转速下离心30分钟, 离心分离过量的水。将吸着聚合物在微研磨机中在1升PH6.5的去离子水中研磨, 重复操作6—8次直到完全除去金属阳离子, 在火焰发射分析仪上进行监测。在100克制得的聚合物中加入800克由600克丙烯酰胺, 0.1克N—亚甲基二丙烯酰胺和水组成的混合物, 在微研磨机中将聚合物在单体溶液中研磨, 在3000转/分的转速下离心浆料30分钟。将所得混合物移入模具中, 冷却至0°C 并用5K P的 γ -射线剂量照射。所制得材料是丙烯酰胺以及多硅酸和骨胶原的吸着络合物的接枝共聚物, 多硅酸含量的24.0%(重量)(以二氧化硅计算), 蛋白含量10.2%(重量)。

由本材料制备的基质内薄片植入角膜层中。在材料上的反应是零, 植入后2—4个月角膜层透明, 这说明了材料有良好的渗透性和生物相容性。在有植入材料的角膜的组织学切片上没有发现成纤维细胞反应。

实施例4

按照实施例3制得丙烯酰胺以及多硅酸和骨胶原的吸着复合物的接枝共聚物, 将共聚物在25°C温度下用0.4% 氢氟酸溶液处理1昼夜, 然后按10克1升水的比例放在去离子水中, 操作重复几次, 之后将材料放入电化学槽中并在 10^{-3}M 盐酸溶液中以电化学清洗掉 F^- , SiF_6^{2-} 离子, 在功率8瓦300伏下进行3小时。然后在去离子水中将材料洗去盐酸, 再用磷酸盐缓冲液清洗。制得的材料是丙烯酰胺和

多硅酸及骨胶原的吸着络合物的接枝共聚物用氢氟酸化学降解的产物，具有0.025—2.0微米的孔径，没有多硅酸，蛋白含量为10.6%(重量)，氟硅酸阴离子和氢氟酸的含量为 5.10^{-7} 摩尔/克。

由本材料制备的隐形眼镜，其实验结果表明类似于实施例3。

实施例5

方法按实施例1进行，除了将所制得的骨胶原的酸溶液用10升0.5M盐酸透析过滤直到骨胶原浓度达11%(重量)。在不断搅拌下将所制得的骨胶原溶液滴加到10%通过0.22微米滤器过滤的硅酸钠(Na_2SiO_3)溶液中。混合溶液直到PH4.5，制得凝胶状多硅酸的吸着聚合物，所得聚合物在4℃放置一昼夜。然后在3000转/分转速下离心30分钟以离心分离过量的水。在微研磨机中，将吸着聚合物在1升PH6.5的去离子水中研磨，操作重复6—8次，直到完全除去金属阳离子，在火焰发射分析仪上检测。在100克所得聚合物中加入由300克2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和100克N-乙基吡咯烷酮所组成的混合物，将聚合物在单体溶液中研磨，在3000转/分的转速下离心30分钟。得到的混合物移入模具，冷却至0℃并用10K P剂量的射线照射，将所得材料干燥。得到的材料是2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和N-乙基吡咯烷酮以及多硅酸和骨胶原的吸着复合物的接枝共聚物，多硅酸含量为8.0%(重量)(按二氧化硅计算)，蛋白含量为6.2%(重量)。

由本材料制备的植人物以6mm直径和0.2mm厚的圆盘形式植入角膜层。在材料上没有反应，植入后2—3个月角膜层是透明的，这说明了材料对氧和葡萄糖有良好的渗透性，以及良好的生物相容性。

实施例6

与实施例5一样制备2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和N-乙基吡

咯烷酮以及多硅酸和骨胶原的吸着复合物的接枝共聚物，该共聚物在25—30℃的温度下用1%氢氟酸溶液处理1昼夜，然后按10克1升水的比例放入去离子水中，操作重复6—7次，之后将材料转入电化学槽中，在功率9瓦和300伏的条件下进行电化学清洗材料3小时，以除去 F^- ， SiF_6^{2-} 离子。按1克材料10升水的比例在去离子水中将材料洗去盐酸，然后用磷酸盐缓冲液洗涤，包装并消毒。

所得材料是2-羟基乙基甲基丙烯酸酯和多硅酸与骨胶原的吸着复合物的接枝共聚物用氢氟酸化学降解的产物，具有孔径0.025—0.13微米，没有多硅酸，蛋白的含量为6.5%(重量)，氟硅酸阴离子和氢氟酸的含量是 8.10^{-7} 摩尔/克。

由本材料制备的基质内透镜植入家兔眼睛的角膜层，在材料上没有反应，植入后2—3个月角膜层是透明的，这说明了材料有良好的渗透性和生物相容性。

实施例7

方法按实施例5进行，除了将所得骨胶原的酸溶液用10升0.5M盐酸透析过滤到骨胶原浓度为11%(重量)外，在不断搅拌下将所得骨胶原溶液滴加到多硅酸凝胶中，该凝胶是通过用盐酸沉淀20%硅酸钠水溶液而制得的。制得的材料相类似于实施例5。