(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102188746 A
(43)申请公布日 2011.09.21

(21)申请号 201010122277.3

(22)申请日 2010.03.11

(71)申请人 北京益而康生物工程开发中心
地址 102600 北京市大兴区大兴工业开发区金苑路 9 号

(72)发明人 宋文领 张艳花 石凌锋 赵春卉

(74)专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司 11241
代理人 卢新

(51)Int.Cl.
A61L 27/24(2006.01)
A61L 27/20(2006.01)
A61L 27/50(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54)发明名称

人工细胞外基质及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种人工细胞外基质及其制备方法。本发明的人工细胞外基质主要由壳聚糖、胶原蛋白、透明质酸钠和赖氨酸制备而成。所述壳聚糖、所述胶原蛋白、所述透明质酸钠和所述赖氨酸的质量比为(0.1～400)∶(1～400)∶(0.1～5000)∶(0.1～5000)。本发明的人工细胞外基质的制备方法是将壳聚糖胶体溶液、胶原蛋白水凝胶、透明质酸钠水溶液和赖氨酸水溶液混合,再加入交联剂反应;交联好的混合凝胶冷冻干燥,获得所述的人工细胞外基质。本发明的人工细胞外基质具有良好的可控降解性能的,良好的生物相容性能和组织修复性能,可作为临床适用的新型人工硬脑膜。

CN 102188746 A

1. 一种人工细胞外基质，主要由壳聚糖、胶原蛋白、透明质酸钠和赖氨酸制备而成。

2. 根据权利要求 1 所述的人工细胞外基质，其特征在于：所述壳聚糖、所述胶原蛋白、所述透明质酸钠和所述赖氨酸通过交联剂交联。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的人工细胞外基质，其特征在于：所述壳聚糖、所述胶原蛋白、所述透明质酸钠和所述赖氨酸的质量比为 (0.1 ～ 400) ：(1 ～ 400) ：(0.1 ～ 5000) ：(0.1 ～ 5000)。

4. 根据权利要求 3 所述的人工细胞外基质，其特征在于：所述交联剂选自如下任一种或任几种；甲醛、戊二醛、碳化二亚胺、双环氧化合物、京尼平和原花青素。

5. 人工细胞外基质的制备方法，包括如下步骤：

将壳聚糖胶体溶液、胶原蛋白水凝胶、透明质酸钠水溶液和赖氨酸水溶液混合，再加入交联剂反应；

交联好的混合凝胶冷冻干燥，获得所述的人工细胞外基质。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述壳聚糖、所述胶原蛋白、所述透明质酸钠和所述赖氨酸的质量比为 (0.1 ～ 400) ：(1 ～ 400) ：(0.1 ～ 5000) ：(0.1 ～ 5000)。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法，其特征在于：所述交联剂选自如下任一种或任几种；甲醛、戊二醛、碳化二亚胺、双环氧化合物、京尼平和原花青素。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述冷冻干燥的温度为 -80℃～ 40℃。

9. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述壳聚糖胶体溶液为 0.1 ～ 5mg/ml 壳聚糖的乙酸溶液，所述乙酸溶液中乙酸的浓度为 0.1ml/100ml ～ 0.5ml/100ml；所述胶原蛋白水凝胶中胶原蛋白的浓度为 1 ～ 50mg/ml；所述透明质酸钠水溶液中透明质酸钠的浓度为 0.1 ～ 100mg/ml；所述赖氨酸水溶液中赖氨酸的浓度为 0.1 ～ 100mg/ml。

10. 权利要求 1 至 4 中任一所述的人工细胞外基质在制备人工硬脑膜材料中的应用。

人工细胞外基质及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人工细胞外基质及其制备方法。

背景技术

[0002] 临床上神经外科医师在手术中常利用自体颅骨骨膜，颈肌筋膜、帽状腔膜，阔筋膜等自体组织修补硬脑膜缺损，但是取这些材料不仅花费时间长，有时这些组织自身受到损伤而不能被利用，有的部位自身就没有完整的可利用的组织，常导致没有足够的面积能被利用。移植其他组织不仅需要术前规划，准备第二个手术部位，增加手术和麻醉时间，还要产生新的创伤。另外，即使使用自身组织，自身组织的缺氧常会诱导下方皮质的炎症反应，导致脑膜与脑之间的粘连。

[0003] 目前临床应用的人工硬脑膜材料主要分为同种异体材料、异种材料、合成材料和天然材料四个类型。

[0004] 同种异体脑膜是最早用于临床的非自体的修复材料。这种材料是从死亡的人体脑取得，经过冷冻干燥加工后作为商品出售。优点为：制备简单、能直接使用、植入方便，可以长期保存，保留了新鲜脑膜的生理特性即早期成纤维细胞的渗入和血管再生，它能融合到周围的正常组织内而消除排斥反应。但是异体硬脑膜有 3 个显著的弱点：一是材料来源受到限制，捐献者缺乏，而且还存在伦理方面的问题；二是传染性蛋白质因子 (Prion) 的存在，根据日本厚生省 1997 年 3 月发布的调查报告，766 名克罗伊茨费尔特 - 雅各布 (Creutzfeldt-JakobSyndrome(disease),CJD) 患者中，28 例经历过人体干燥硬脑膜修补术，与 JCD 百万分之一的自然发生率相比，作过硬脑膜修补术的人 JCD 发病率明显高于自然发病率，为此，厚生省发布使用异体干燥脑膜的禁令，同时世界卫生组织亦发布手术中禁止使用人异体硬脑膜的紧急公告，所以目前有些国家已取消使用冷冻人体硬脑膜作为修补材料；三是价格昂贵超过了病员的承受能力。

[0005] 国内外，异种硬脑膜修复材料是在临床应用较多的品种，主要是用牛心包膜和羊心包膜制备。异种硬脑膜修补材料的优点是便于获取，制备简单，防漏性能较好。但是由于近年来动物源性材料的安全问题，有的国家已经限制该类材料的使用。

[0006] 合成材料容易成型加工，易于消毒，无传递病毒的风险。常用于硬脑（脊）膜修补的材料有硅橡胶、聚丙烯、聚四氟乙烯等。但是这些材料仅具有机械充填的功能，而无促组织再生的能力，特别在材料处理不好情况下，日长容易产生渗漏，甚至会引起毛细血管出血，产生慢性炎症。

[0007] 天然材料是经过加工提纯的天然生物大分子物质，可用于硬脑脊膜修补的材料有胶原、壳聚糖、硫酸软骨素等。它们被称为人工细胞外基质，是良好的组织工程支架材料。它们除了具有机械屏障作用外，还可作为细胞生长的良好基质，有传递细胞化学信号的功能，因此能促进组织再生。在此过程中，材料本身发生降解，最终被愈合的自身组织替代。这一点正是现代再生医学要求和提倡的。但是这些材料也有缺点，比如降解速率过快，以致自身新脑膜还未完全形成而材料已经降解。

发明内容

[0008]　本发明的目的是提供一种有良好的可控降解性能的人工细胞外基质及其制备方法。

[0009]　本发明所提供的人工细胞外基质，主要由壳聚糖、胶原蛋白、透明质酸钠和赖氨酸制备而成。

[0010]　本发明的人工细胞外基质，其中，所述壳聚糖、所述胶原蛋白、所述透明质酸钠和所述赖氨酸通过交联剂交联。

[0011]　本发明的人工细胞外基质，其中，所述壳聚糖、所述胶原蛋白、所述透明质酸钠和所述赖氨酸的质量比为 (0.1 ～ 400) ：(1 ～ 400) ：(0.1 ～ 5000) ：(0.1 ～ 5000)。

[0012]　本发明的人工细胞外基质，其中，所述交联剂选自如下任一种或任几种 ：甲醛、戊二醛、碳化二亚胺、双环氧化合物、京尼平和原花青素。

[0013]　本发明所提供的人工细胞外基质的制备方法，包括如下步骤 ：

[0014]　将壳聚糖胶体溶液、胶原蛋白水凝胶、透明质酸钠水溶液和赖氨酸水溶液混合，再加入交联剂反应 ；

[0015]　交联好的混合凝胶冷冻干燥，获得所述的人工细胞外基质。

[0016]　本发明的人工细胞外基质的制备方法，其中，所述壳聚糖、所述胶原蛋白、所述透明质酸钠和所述赖氨酸的质量比为 (0.1 ～ 400) ：(1 ～ 400) ：(0.1 ～ 5000) ：(0.1 ～ 5000)。

[0017]　本发明的人工细胞外基质的制备方法，其中，所述交联剂选自如下任一种或任几种 ：甲醛、戊二醛、碳化二亚胺、双环氧化合物、京尼平和原花青素。

[0018]　本发明的人工细胞外基质的制备方法，其中，所述壳聚糖胶体溶液为 0.1 ～ 5mg/ml 壳聚糖的乙酸溶液，所述乙酸溶液中乙酸的浓度为 0.1ml/100ml ～ 0.5ml/100ml ；所述胶原蛋白水凝胶中胶原蛋白的浓度为 1 ～ 50mg/ml ；所述透明质酸钠水溶液中透明质酸钠的浓度为 0.1 ～ 100mg/ml ；所述赖氨酸水溶液中赖氨酸的浓度为 0.1 ～ 100mg/ml。

[0019]　本发明的人工细胞外基质的制备方法，其中，所述冷冻干燥的温度为 -80℃～ 40℃。

[0020]　本发明的人工细胞外基质具有良好的可控降解性能，良好的生物相容性能和组织修复性能，可作为临床适用的新型人工硬脑膜。

具体实施方式

[0021]　实施例 1、人工细胞外基质

[0022]　0.01ml/100ml 的乙酸溶液中加入脱乙酰度 60％的经过纯化的壳聚糖，搅拌 2 小时，配制成 0.1mg/ml 的壳聚糖胶体溶液。

[0023]　将 0.1mg/ml 壳聚糖胶体溶液、1mg/ml 胶原蛋白水凝胶、0.1mg/ml 透明质酸钠水溶液和 0.1mg/ml 赖氨酸水溶液放入交联罐中混合，0.1mg/ml 壳聚糖胶体溶液、1mg/ml 胶原蛋白水凝胶、0.1mg/ml 透明质酸钠水溶液和 0.1mg/ml 赖氨酸水溶液的体积比为 1 ：1 ：1 ：1，再加入碳化二亚胺混均，碳化二亚胺与壳聚糖的质量比为 0.001 ：1，50℃反应 2 小时，降温至室温，将交联好的混合凝胶装入冻干盘于 -80℃～ 40℃条件下真空冷冻

干燥 48 小时得到人工细胞外基质。

[0024] 人工细胞外基质的外观为白色的片状矩形，表面有晶体光泽，肉眼或放大镜下可见材料呈无规则短纤维网络状结构，用手感知有一定的韧性，外表洁净无污点。

[0025] 人工细胞外基质的长为 4.32 ～ 4.56cm，宽为 4.24 ～ 4.54cm，厚为 0.5 ～ 0.9cm。

[0026] 人工细胞外基质的化学性能 ：人工细胞外基质的炽灼残渣 0.3％，pH 值 7.1，人工细胞外基质的重金属含量（以铅计）小于 10ug/g。

[0027] 人工细胞外基质的生物学性能 ：无菌检验（GB/T 19973.2-2005）人工细胞外基质符合无菌规定。细胞毒性试验（GB/T 16886.5-2003）检测人工细胞外基质的细胞毒性为 0 ～ 1 级。细菌内毒素试验（EN455-3-2000）检测人工细胞外基质的细菌内毒素小于 0.5EU/ml。Ames 试验（GB/T 16886.3-2008）检测为阴性。染色体畸变试验（GB/T 16886.3-2008）检测为阴性。微核试验（GB/T 16886.3-2008）检测为阴性。致敏试验（GB/T 16886.10-2005）检测无致敏反应。急性供毒试验（ISO 10993-11 ：2006）检测无急性生身毒性反应。植入后局部反应试验（ISO 10993-6 ：2007），人工细胞外基质植入 1 周后，在试样材料周围有较多的淋巴细胞、嗜中性粒细胞及少量多核巨细胞，材料周围有肉芽组织包绕。植入 4 周后，在试样材料周围有较多的淋巴细胞、嗜中性粒细胞。植入 12 周后，植入部位有极少的淋巴细胞、嗜中性粒细胞，试样材料被降解吸收，无肉眼可辨别异物。

[0028] 上述结果说明本实施例中的人工细胞外基质具有良好的可控降解性能的，良好的生物相容性能和组织修复性能。

[0029] 实施例 2、人工细胞外基质

[0030] 0.5ml/100ml 的乙酸溶液中加入脱乙酰度 70％的经过纯化的壳聚糖，搅拌 10 小时，配制成 5mg/ml 的壳聚糖胶体溶液。

[0031] 将 5mg/ml 壳聚糖胶体溶液、50mg/ml 胶原蛋白水凝胶、100mg/ml 透明质酸钠水溶液和 100mg/ml 赖氨酸水溶液放入交联罐中混合，5mg/ml 壳聚糖胶体溶液、50mg/ml 胶原蛋白水凝胶、100mg/ml 透明质酸钠水溶液和 100mg/ml 赖氨酸水溶液的体积比为 80 ∶ 80 ∶ 50 ∶ 50，再加入戊二醛，戊二醛与壳聚糖胶体溶液的体积比为 1 ∶ 400 混均，50℃反应 2 小时，降温至室温，将交联好的混合凝胶装入冻干盘于 -60℃～ 30℃条件下真空冷冻干燥 48 小时得到人工细胞外基质。

[0032] 人工细胞外基质的外观为白色的片状矩形，表面有晶体光泽，肉眼或放大镜下可见材料呈无规则短纤维网络状结构，用手感知有一定的韧性，外表洁净无污点。

[0033] 人工细胞外基质的长为 4.32 ～ 4.56cm，宽为 4.24 ～ 4.54cm，厚为 0.5 ～ 0.9cm。

[0034] 人工细胞外基质的化学性能 ：人工细胞外基质的炽灼残渣 0.5％，pH 值 7.1，人工细胞外基质的重金属含量（以铅计）小于 10ug/g。

[0035] 人工细胞外基质的生物学性能 ：无菌检验（GB/T 19973.2-2005）人工细胞外基质符合无菌规定。细胞毒性试验（GB/T 16886.5-2003）检测人工细胞外基质的细胞毒性为 0 ～ 1 级。细菌内毒素试验（EN455-3-2000）检测人工细胞外基质的细菌内毒素小于 0.5EU/ml。Ames 试验（GB/T 16886.3-2008）检测为阴性。染色体畸变试验（GB/T 16886.3-2008）检测为阴性。微核试验（GB/T 16886.3-2008）检测为阴性。致敏试验（GB/T 16886.10-2005）检测无致敏反应。急性供毒试验（ISO 10993-11 ：2006）检测无急性生身毒性反应。植入后局部反应试验（ISO 10993-6 ：2007），人工细胞外基质植入 1 周后，在试样材料周围有较多

的淋巴细胞、嗜中性粒细胞及少量多核巨细胞，材料周围有肉芽组织包绕。植入 4 周后，在试样材料周围有较多的淋巴细胞、嗜中性粒细胞。植入 12 周后，植入部位有极少的淋巴细胞、嗜中性粒细胞，试样材料被降解吸收，无肉眼可辨别异物。

[0036]　上述结果说明本实施例中的人工细胞外基质具有良好的可控降解性能的，良好的生物相容性能和组织修复性能。

[0037]　实施例 3、人工细胞外基质

[0038]　0.3ml/100ml 的乙酸溶液中加入脱乙酰度 85％的经过纯化的壳聚糖，搅拌 30 小时，配制成 2mg/ml 的壳聚糖胶体溶液。

[0039]　将 2mg/ml 壳聚糖胶体溶液、10mg/ml 胶原蛋白水凝胶、10mg/ml 透明质酸钠水溶液和 20mg/ml 赖氨酸水溶液放入交联罐中混合，2mg/ml 壳聚糖胶体溶液、10mg/ml 胶原蛋白水凝胶、10mg/ml 透明质酸钠水溶液和 20mg/ml 赖氨酸水溶液的体积比为 80 ∶ 20 ∶ 30 ∶ 30，再加入双环氧化合物混均，双环氧化合物与壳聚糖胶体溶液的体积比为 1 ∶ 500，50℃反应 2 小时，降温至室温，将交联好的混合凝胶装入冻干盘于 -40℃～ 40℃条件下真空冷冻干燥 48 小时得到人工细胞外基质。

[0040]　人工细胞外基质的外观为白色的片状矩形，表面有晶体光泽，肉眼或放大镜下可见材料呈无规则短纤维网络状结构，用手感知有一定的韧性，外表洁净无污点。

[0041]　人工细胞外基质的长为 4.32 ～ 4.56cm，宽为 4.24 ～ 4.54cm，厚为 0.5 ～ 0.9cm。

[0042]　人工细胞外基质的化学性能 ：人工细胞外基质的炽灼残渣 0.4％，pH 值 7.2，人工细胞外基质的重金属含量（以铅计）小于 10ug/g。

[0043]　人工细胞外基质的生物学性能 ：无菌检验 (GB/T 19973.2-2005) 人工细胞外基质符合无菌规定。细胞毒性试验 (GB/T 16886.5-2003) 检测人工细胞外基质的细胞毒性为 0 ～ 1 级。细菌内毒素试验 (EN455-3-2000) 检测人工细胞外基质的细菌内毒素小于 0.5EU/ml。Ames 试验 (GB/T 16886.3-2008) 检测为阴性。染色体畸变试验 (GB/T 16886.3-2008) 检测为阴性。微核试验 (GB/T 16886.3-2008) 检测为阴性。致敏试验 (GB/T 16886.10-2005) 检测无致敏反应。急性供毒试验 (ISO 10993-11 ：2006) 检测无急性生身毒性反应。植入后局部反应试验 (ISO 10993-6 ：2007)，人工细胞外基质植入 1 周后，在试样材料周围有较多的淋巴细胞、嗜中性粒细胞及少量多核巨细胞，材料周围有肉芽组织包绕。植入 4 周后，在试样材料周围有较多的淋巴细胞、嗜中性粒细胞。植入 12 周后，植入部位有极少的淋巴细胞、嗜中性粒细胞，试样材料被降解吸收，无肉眼可辨别异物。

[0044]　上述结果说明本实施例中的人工细胞外基质具有良好的可控降解性能的，良好的生物相容性能和组织修复性能。

[0045]　实施例 4、人工细胞外基质

[0046]　0.1ml/100ml 的乙酸溶液中加入脱乙酰度 99％的经过纯化的壳聚糖，搅拌 60 小时，配制成 3mg/ml 的壳聚糖胶体溶液。

[0047]　将 3mg/ml 壳聚糖胶体溶液、30mg/ml 胶原蛋白水凝胶、30mg/ml 透明质酸钠水溶液和 30mg/ml 赖氨酸水溶液放入交联罐中混合，3mg/ml 壳聚糖胶体溶液、30mg/ml 胶原蛋白水凝胶、30mg/ml 透明质酸钠水溶液和 30mg/ml 赖氨酸水溶液的体积比为 50 ∶ 30 ∶ 10 ∶ 10，再加入甲醛混均，甲醛与壳聚糖胶体溶液的体积比为 1 ∶ 600，50℃反应 2 小时，降温至室温，将交联好的混合凝胶装入冻干盘于 -80℃～ 30℃条件下真空冷冻干燥 48 小时得到人工

细胞外基质。

[0048] 人工细胞外基质的外观为白色的片状矩形,表面有晶体光泽,肉眼或放大镜下可见材料呈无规则短纤维网络状结构,用手感知有一定的韧性,外表洁净无污点。

[0049] 人工细胞外基质的长为 4.32 ～ 4.56cm,宽为 4.24 ～ 4.54cm,厚为 0.5 ～ 0.9cm。

[0050] 人工细胞外基质的化学性能 :人工细胞外基质的炽灼残渣 0.4%,pH 值 7.1,人工细胞外基质的重金属含量(以铅计)小于 10ug/g。

[0051] 人工细胞外基质的生物学性能 :无菌检验 (GB/T 19973.2-2005) 人工细胞外基质符合无菌规定。细胞毒性试验 (GB/T 16886.5-2003) 检测人工细胞外基质的细胞毒性为 0 ～ 1 级。细菌内毒素试验 (EN455-3-2000) 检测人工细胞外基质的细菌内毒素小于 0.5EU/ml。Ames 试验 (GB/T 16886.3-2008) 检测为阴性。染色体畸变试验 (GB/T 16886.3-2008) 检测为阴性。微核试验 (GB/T 16886.3-2008) 检测为阴性。致敏试验 (GB/T 16886.10-2005) 检测无致敏反应。急性供毒试验 (ISO 10993-11 :2006) 检测无急性生身毒性反应。植入后局部反应试验 (ISO 10993-6 :2007),人工细胞外基质植入 1 周后,在试样材料周围有较多的淋巴细胞、嗜中性粒细胞及少量多核巨细胞,材料周围有肉芽组织包绕。植入 4 周后,在试样材料周围有较多的淋巴细胞、嗜中性粒细胞。植入 12 周后,植入部位有极少的淋巴细胞、嗜中性粒细胞,试样材料被降解吸收,无肉眼可辨别异物。

[0052] 上述结果说明本实施例中的人工细胞外基质具有良好的可控降解性能的,良好的生物相容性能和组织修复性能。

[0053] 以上的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通工程技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明的权利要求书确定的保护范围内。