

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910306024.9

[51] Int. Cl.

A61L 27/40 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月20日

[11] 公开号 CN 101628131A

[22] 申请日 2009.8.25

[21] 申请号 200910306024.9

[71] 申请人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞瑜路
1037号

[72] 发明人 张胜民 仇志焯 黄浩 周磊
王深琪

[74] 专利代理机构 北京市德权律师事务所
代理人 周发军

权利要求书3页 说明书6页

[54] 发明名称

一种超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的
制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，属于生物医学材料领域。该制备方法包括以下步骤：1) 根据修复缺损情况，确定待制备支架的材料和结构；2) 制备各层支架，等待溶剂挥发，浆料逐渐变干成型；3) 将成型物置于通风处，等待残留溶剂完全挥发后脱模；4) 取出成型物，进行干燥，即得超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架。使用该方法可制备厚度适合于关节骨软骨修复的超薄多孔叠层复合支架，制备的支架力学性能良好，生物相容性好，降解速率可控，能适应成骨细胞和软骨细胞共同培养及特异性生长因子的复合，可同时进行关节软骨组织和软骨/骨组织综合缺损的修复。

【权利要求1】一种超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，该制备方法包括以下步骤：

- 1) 根据修复缺损情况，确定待制备支架的材料和结构；
- 2) 将制备第一层支架的有机材料溶于溶剂中，所用溶剂为易挥发溶剂，待有机材料完全溶解后，再加入无机材料，搅拌形成均匀的混合浆料，再将此混合浆料倒在一个平底模具中，使浆料均匀平铺于模具底部，然后置于有利于溶剂挥发的环境中，等待溶剂挥发，挥发时间为0.5~12小时，混合浆料逐渐变干成型；
- 3) 按照步骤2)的操作，制备第二层支架的混合浆料，将混合浆料直接倒在已制备成型的第一层支架上，并使浆料平铺均匀，然后置于有利于溶剂挥发的环境中，等待溶剂挥发，浆料逐渐变干成型；
- 4) 按照步骤3)的操作，逐层制备第三至第N层支架 ($N \geq 2$)；
- 5) 将成型物置于通风处，等待残留溶剂完全挥发后脱模；
- 6) 取出成型物，进行干燥，即得超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架。

【权利要求2】根据权利要求1所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述步骤2)至步骤4)中可加入致孔剂，其具体步骤为：将致孔剂与无机材料混合均匀，再加入有机材料的溶液中，搅拌形成均匀的混合浆料。

【权利要求3】根据权利要求2所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述加入致孔剂的具体步骤为：将无机材料加入有机材料的溶液并搅拌均匀之后，再加入致孔剂，搅拌形成均匀的混合浆料。

【权利要求4】根据权利要求1所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述步骤2)至步骤4)中加入致孔剂后，步骤5)中的成型物需要用纯

水进行浸泡，除去致孔剂。

【权利要求5】根据权利要求1所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述某一层的制备过程中，所用溶剂的量能够完全溶解制备该层所用的有机材料，且制备该层所用的无机材料不溶于该溶剂，但无机材料必须均匀分散于混合流动相中。

【权利要求6】根据权利要求1所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述无机材料占各层支架的质量百分比为0%~60%。

【权利要求7】根据权利要求1、2、3或5任意一项所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述有机材料为人工合成聚合物材料或天然聚合物材料，或者是工合成聚合物材料和天然聚合物材料的混合。

【权利要求8】根据权利要求7所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述人工合成聚合物材料为聚乳酸（聚丙交酯，polylactic acid, PLA）、聚羟基乙酸（聚乙交酯、聚乙醇酸，polyglycolic acid, PGA）、聚乳酸-羟基乙酸共聚物（poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA）、聚己内酯（polycaprolactone, PCL）、聚酰胺（polyamide, PA）、聚乙烯醇（polyvinyl alcohol, PVA）。

【权利要求9】根据权利要求7所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述天然聚合物材料为丝素蛋白（fibroin）、胶原（collagen）、壳聚糖（chitosan）、透明质酸（haluronic acid, HA）。

【权利要求10】根据权利要求1、2、3、5或6任意一项所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述无机材料为钙磷系列活性生物材料。

【权利要求11】根据权利要求10所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述钙磷系列活性生物材料为羟基磷灰石（hydroxyapatite, HA）、 α 磷酸三钙（ α -tricalcium phosphate, α -TCP）、 β 磷酸三钙（ β -tricalcium

phosphate, β -TCP)、磷酸四钙以及元素掺杂改性钙磷生物材料。

【权利要求12】根据权利要求2至4任意一项所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述致孔剂为固体颗粒，粒径为30~500微米，所使用的致孔剂不溶于制备该层时使用的溶剂，但溶于水。

【权利要求13】根据权利要求4所述的超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，其特征在于，所述纯水为蒸馏水、去离子水或反渗透水。

一种超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法

技术领域

本发明属于生物医学材料领域，具体涉及用于关节骨软骨缺损修复的多孔叠层组织工程复合支架的制备方法。

背景技术

关节软骨缺损是很常见的疾病，由于关节软骨特殊的组织结构及生物学特性，虽然已知有许多治疗关节软骨缺损的方法，但是所有这些方法都不能达到满意的修复效果。组织工程技术的出现使软骨组织缺损的修复成为可能。其基本原理是，将体外分离培养的软骨组织细胞接种到具有一定空间结构和良好生物相容性的三维支架上，同时辅以特殊的生长因子，然后将细胞-支架的复合体在体外培养一定时间后再植入体内，随着细胞的增殖，支架材料不断降解，被细胞外基质代替，逐渐形成具有正常功能的组织。其中，支架是组织工程的关键要素之一。由于骨软骨具有多层结构，由外向里包含软骨层、钙化软骨层、软骨下骨层以及骨组织，软骨损伤可能涉及钙化软骨、软骨下骨甚至骨组织，因此要根据需要选择降解速率可控且能同时修复多层组织的多孔叠层支架，该支架具有多层结构，且各层的性能能适应对应层组织的修复。该支架还应具有较高的孔隙率，以适合细胞的生长和增殖，以及营养物质和代谢废物的输送。

据相关文献报导，人体膝关节内外侧关节面软骨的厚度为1.5~3毫米 (D. E. T. Shepherd, B. B. Seedhom. Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. Ann. Rheum. Dis. 1999, 58: 27-34)，由于骨软骨缺损可能涉及软骨下骨甚至骨组织，因此用于修复关节骨软骨损伤的支架材料的厚度应为2~4毫米。目前，由于技术所限，国内外研制的多孔叠层复合软骨组织工程支架的厚度均远大于修复骨软骨缺损所需要的厚度，通常超过6毫米，甚至达到9毫米 (S. Ghosh等, Bi-layered constructs based on poly(L-lactic acid) and starch for tissue engineering of osteochondral defects, Materials Science and Engineering C, 2008, 28: 80-86)，用于缺损修复会导致较大创伤。在常规的多孔叠层复合支架制备工艺中，支架的各层被分别制备，再被叠加起来并进行一定的粘合，形成叠层支架。在这样的制备工艺中，层与层之间结合强度较差、孔隙连通性

差，且多孔的各层必须具备一定的厚度以维持其结构、形貌和一定的强度。据相关文献报导，多孔单层复合支架的厚度无法做到小于1.5毫米（Anna Tampieri等，Design of graded biomimetic osteochondral composite scaffolds, Biomaterials, 2008, 29: 3539-3546），因此，按照上述的常规制备工艺，多孔双层复合支架的厚度无法做到小于3毫米，具有三层或三层以上结构的多孔叠层支架的整体厚度更无法达到修复关节骨软骨损伤所需的2~4毫米。

发明内容

本发明的目的是为解决上述问题而提供一种超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法。使用该方法可制备厚度适合于关节骨软骨修复的超薄多孔叠层复合支架。

本发明所采用的技术方案是：

一种超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架的制备方法，该制备方法包括以下步骤：

1) 根据修复缺损情况，确定待制备支架的材料和结构；

2) 将制备第一层支架的有机材料溶于溶剂中，所用溶剂为易挥发溶剂，待有机材料完全溶解后，再加入无机材料，搅拌形成均匀的混合浆料，再将此混合浆料倒在一个平底模具中，使浆料均匀平铺于模具底部，然后置于有利于溶剂挥发的环境中，等待溶剂挥发，挥发时间为0.5~12小时，混合浆料逐渐变干成型；

3) 按照步骤2)的操作，制备第二层支架的混合浆料，将混合浆料直接倒在已制备成型的第一层支架上，并使浆料平铺均匀，然后置于有利于溶剂挥发的环境中，等待溶剂挥发，浆料逐渐变干成型；

4) 按照步骤3)的操作，逐层制备第三至第N层支架（ $N \geq 2$ ）；

5) 将成型物置于通风处，等待残留溶剂完全挥发后脱模；

6) 取出成型物，进行干燥，即得超薄多孔叠层梯度组织工程复合支架。

优选地，所述步骤2)至步骤4)中可加入致孔剂，其具体步骤为：将致孔剂与无机材料混合均匀，再加入有机材料的溶液中，搅拌形成均匀的混合浆料。

优选地，所述加入致孔剂的具体步骤为：将无机材料加入有机材料的溶液并搅拌均匀之后，再加入致孔剂，搅拌形成均匀的混合浆料。

进一步地，所述步骤2)至步骤4)中加入致孔剂后，步骤5)中的成型物需要用纯水进行浸泡，除去致孔剂。

进一步地，所述某一层的制备过程中，所用溶剂的量能够完全溶解制备该层所用的有机

材料，且制备该层所用的无机材料不溶于该溶剂，但无机材料必须均匀分散于混合流动相中。

进一步地，所述无机材料占各层支架的质量百分比为0%~60%。

优选地，所述有机材料为人工合成聚合物材料或天然聚合物材料，或者是人工合成聚合物材料和天然聚合物材料的混合。

更优选地，所述人工合成聚合物材料为聚乳酸（聚丙交酯，polylactic acid, PLA）、聚羟基乙酸（聚乙交酯、聚乙醇酸，polyglycolic acid, PGA）、聚乳酸-羟基乙酸共聚物（poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA）、聚己内酯（polycaprolactone, PCL）、聚酰胺（polyamide, PA）、聚乙烯醇（polyvinyl alcohol, PVA）。

更优选地，所述天然聚合物材料为丝素蛋白（fibroin）、胶原（collagen）、壳聚糖（chitosan）、透明质酸（hyaluronic acid, HA）。

优选地，所述无机材料为钙磷系列活性生物材料。

更优选地，所述钙磷系列活性生物材料为羟基磷灰石（hydroxyapatite, HA）、 α 磷酸三钙（ α -tricalcium phosphate, α -TCP）、 β 磷酸三钙（ β -tricalcium phosphate, β -TCP）、磷酸四钙以及元素掺杂改性钙磷生物材料。

进一步地，所述致孔剂为固体颗粒，粒径为30~500微米，所使用的致孔剂不溶于制备该层时使用的溶剂，但溶于水。

优选地，所述纯水为蒸馏水、去离子水或反渗透水。

本发明具有以下优点：

利用本发明可制备出厚度适合于关节骨软骨修复的超薄多孔叠层复合支架，制备的支架力学性能良好，生物相容性好，降解速率可控，能适应成骨细胞和软骨细胞共同培养及特异性生长因子的复合，可同时进行关节软骨组织和软骨/骨组织综合缺损的修复。

具体实施方式

实施例1

制备厚度为1.5毫米的锌羟基磷灰石/聚乳酸双层复合支架。所用模具为一内径为60mm的圆柱形平底玻璃容器。所用有机材料为左旋聚乳酸（PLLA，分子量50000）；所用无机材料为含锌纳米羟基磷灰石（nano-Zn-HA，针状颗粒，长80~120nm，宽20~50nm）；所用溶剂为丙酮（C₃H₆O）；所用致孔剂为氯化钠（NaCl，分为粒径50~200 μ m和粒径200~300 μ m两种）。欲制备的叠层支架厚度为1.5mm，其中支架的第一层（下层）厚度为0.5mm，第二层（

上层)厚度为1mm。支架的第一层成分为nano-Zn-HA与PLLA混合物, nano-Zn-HA与PLLA的质量比为30:70; 支架的第二层成分为纯PLLA。制备支架时, 从支架的第一层开始制备, 再于第一层上制备第二层, 即在制备过程中模具底部为支架的下层, 其上为支架的上层。

称取0.16g PLLA, 溶解于1.4ml C₃H₆O中, 待PLLA完全溶解后加入0.07g nano-Zn-HA, 搅拌形成均匀浆料, 再加入1.8g粒径200~300 μm的NaCl, 搅拌形成均匀浆料, 将浆料倒入模具中, 并使浆料均匀铺于模具底部, 静置4小时, 待溶剂挥发, 形成支架的第一层。

称取0.45g PLLA, 溶解于2.8ml C₃H₆O中, 待PLLA完全溶解后加入3.4g粒径50~200 μm的NaCl, 搅拌形成均匀浆料, 将浆料倒入模具中, 并使浆料均匀铺于成形的支架第一层上, 静置4小时, 待溶剂挥发, 形成支架的第二层。

将成型物置于通风橱中, 在30℃下挥发48小时后脱模。将成型物浸入去离子水中, 每6小时更换一次去离子水, 直至浸泡用的水中检测不出氯离子(Cl⁻)。再将成型物冷冻干燥36小时, 制得多孔叠层复合支架。

经检测, 该支架平均厚度为1.53毫米, 孔隙率为86.6%, 符合设计要求。经体外和体内降解实验证明, 该支架降解产物无毒, 不会引发无菌炎症, 支架在体内的降解时间为20天, 符合临床骨软骨修复的要求。经动物修复实验证明, 该支架能够很好地修复深及钙化软骨层的关节骨软骨缺损。

实施例2:

制备厚度为3毫米的羟基磷灰石/聚乳酸-羟基乙酸三层复合支架。所用模具为一内径为40mm的圆柱形平底玻璃容器。所用有机材料为聚乳酸-羟基乙酸(PLGA, 分子量100000, LA:GA=50:50); 所用无机材料为纳米羟基磷灰石(nano-HA, 针状颗粒, 长100~150nm, 宽20~50nm); 所用溶剂为二氯甲烷(CH₂Cl₂); 所用致孔剂为氯化钠(NaCl, 粒径200~300 μm)。欲制备的叠层支架厚度为3mm, 各层厚度均为1mm。支架的第一层(底层)成分为nano-HA与PLGA混合物, nano-HA与PLGA的质量比为40:60; 支架的第二层(中间层)成分为nano-HA与PLGA混合物, nano-HA与PLGA的质量比为20:80; 支架的第三层(顶层)成分为纯PLGA。制备支架时, 从支架的第三层开始制备, 直至第一层, 即在制备过程中模具底部为支架的顶层, 其上为中间层, 最上为支架的底层。

称取0.2g PLGA, 溶解于1.2ml CH₂Cl₂中, 待PLGA完全溶解后加入1.8g NaCl, 搅拌形成均匀浆料, 将浆料倒入模具中, 并使浆料均匀铺于模具底部, 静置2小时, 待溶剂挥发, 形成支架的第三层。

称取0.16g PLGA, 溶解于1.2ml CH₂Cl₂中, 待PLGA完全溶解后加入0.04g nano-HA, 搅

拌形成均匀浆料，再加入1.8g NaCl，搅拌形成均匀浆料，将浆料倒入模具中，并使浆料均匀铺于成形的支架第三层上，静置2小时，待溶剂挥发，形成支架的第二层。

称取0.12g PLGA，溶解于1.2ml CH₂Cl₂中，待PLGA完全溶解后加入0.08g nano-HA，搅拌形成均匀浆料，再加入1.8g NaCl，搅拌形成均匀浆料，将浆料倒入模具中，并使浆料均匀铺于成形的支架第二层上，静置2小时，待溶剂挥发，形成支架的第一层。

将成型物置于通风橱中，在30℃下挥发48小时后脱模。将成型物浸入去离子水中，每4小时更换一次去离子水，直至浸泡用的水中检测不出氯离子(Cl⁻)。再将成型物冷冻干燥36小时，制得多孔叠层复合支架。

经检测，该支架平均厚度为3.05毫米，孔隙率为91.4%，符合设计要求。经体外和体内降解实验证明，该支架降解产物无毒，不会引发无菌炎症，支架在体内的降解时间为28天，符合临床关节骨软骨修复的要求。经动物修复实验证明，该支架能够很好地修复深及软骨下骨的关节骨软骨缺损。

实施例3

制备厚度为4.5毫米的羟基磷灰石/聚乳酸-羟基乙酸/聚己内酯四层复合支架。所用模具为一内径为40mm的圆柱形平底玻璃容器。所用有机材料为聚乳酸-羟基乙酸(PLGA，分子量100000，LA:GA=50:50)和聚己内酯(PCL，分子量70000)；所用无机材料为纳米羟基磷灰石(nano-HA，针状颗粒，长100~150nm，宽20~50nm)；所用溶剂为三氯甲烷(氯仿，CHCl₃)和四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)；所用致孔剂为氯化钠(NaCl，分为粒径为50~200 μm和200~300 μm两种)。欲制备的叠层支架厚度为4.5mm，其中支架的第一层(底层)厚度为1mm，成分为nano-HA与PCL的混合物，nano-HA与PCL的质量比为40:60；第二层厚度为1mm，成分为nano-HA与PCL的混合物，nano-HA与PCL的质量比为30:70；第三层厚度为0.5mm，成分为nano-HA与PLGA的混合物，nano-HA与PLGA的质量比为20:80；第四层(顶层)厚度为2mm，成分为纯PLGA。制备支架时，从支架的第一层开始制备，直至第四层，即在制备过程中模具底部为支架的底层，最上为支架的顶层。

称取0.12g PCL，溶解于1.2ml THF中，待PCL完全溶解后加入0.08g nano-HA，搅拌形成均匀浆料，再加入1.8g NaCl，搅拌形成均匀浆料，将浆料倒入模具中，并使浆料均匀铺于模具底部，放入90℃烘箱中静置6小时，待溶剂挥发，形成支架的第一层。

称取0.14g PCL，溶解于1.2ml THF中，待PCL完全溶解后加入0.06g nano-HA，搅拌形成均匀浆料，再加入1.8g NaCl，搅拌形成均匀浆料，将浆料倒入模具中，并使浆料均匀铺于成形的支架第三层上，放入90℃烘箱中静置6小时，待溶剂挥发，形成支架的第二层。

称取0.08g PLGA，溶解于0.6ml CHCl_3 中，待PLGA完全溶解后加入0.02g nano-HA，搅拌均匀形成均匀浆料，再加入0.9g NaCl，搅拌形成均匀浆料，将浆料倒入模具中，并使浆料均匀铺于成形的支架第四层上，静置2小时，待溶剂挥发，形成支架的第三层。

称取0.4g PLGA，溶解于2.5ml CHCl_3 中，待PLGA完全溶解后加入1.5g NaCl，搅拌形成均匀浆料，将浆料倒入模具中，并使浆料均匀铺于成形的支架第三层上，静置6小时，待溶剂挥发，形成支架的第四层。

将成型物置于通风橱中，在30℃下挥发48小时后脱模。将成型物浸入去离子水中，每6小时更换一次去离子水，直至浸泡用的水中检测不出氯离子 (Cl^-)。再将成型物冷冻干燥48小时，制得多孔叠层复合支架。

经检测，该支架平均厚度为4.50毫米，孔隙率为88.6%，符合设计要求。经体外和体内降解实验证明，该支架降解产物无毒，不会引发无菌炎症，支架在体内的降解时间为40天，符合临床骨软骨修复的要求。经动物修复实验证明，该支架能够很好地修复深及骨组织的关节骨软骨缺损。

最后所应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。