

[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 200780012116.5

[51] Int. Cl.

A61K 9/50 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月29日

[11] 公开号 CN 101495102A

[22] 申请日 2007.3.30

[21] 申请号 200780012116.5

[30] 优先权

[32] 2006.3.31 [33] ZA [31] 2006/02676

[86] 国际申请 PCT/IB2007/051153 2007.3.30

[87] 国际公布 WO2007/113762 英 2007.10.11

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.6

[71] 申请人 CSIR 南非科学和工业研究中心

地址 南非共和国豪登省比勒陀利亚赛斯缇亚

[72] 发明人 保罗·威廉·李斯特 柯斯齐·莱多
斯陀克·凡·德·麦威

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司
代理人 陈英

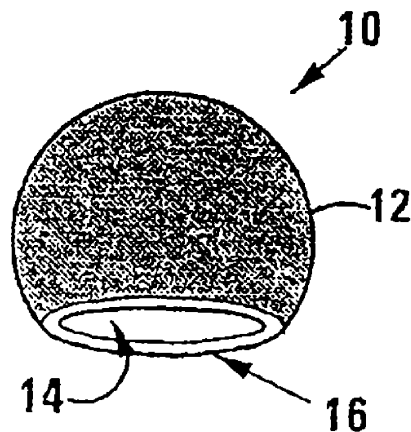
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称

软组织填充物

[57] 摘要

一种包含多种颗粒的软组织填充材料。每种颗粒有圆形的聚合壳体，界定一个内腔体，其最大尺寸在 $50\ \mu\text{m}$ - $250\ \mu\text{m}$ 之间。壳体上有开口，开口与腔体相连。开口的大小为颗粒的外部尺寸 $1/10$ 至颗粒的整个外部大小。



1. 一种含有多颗粒的软组织填充材料，每个颗粒由圆形聚合物壳组成，聚合物壳界定一内腔体，其最大外部尺寸为 $50\mu\text{m} - 250\mu\text{m}$ ，并界定壳体内的孔或开口，该孔或开口提供进入该腔体的通道，该孔或开口的大小或尺寸为颗粒外部尺寸的 $1/10$ 至整个颗粒的外部大小。
2. 根据权利要求 1 中所述的填充材料，其中，所述填充材料的颗粒壳体大体为球形，其外部直径为 $50\mu\text{m} - 250\mu\text{m}$ 。
3. 根据权利要求 2 中所述的填充材料，其中，所述颗粒的入口大体为圆形，其直径范围为颗粒外部大小的 $1/10$ 至相应颗粒的外部大小。
4. 根据权利要求 2 或 3 中所述的填充材料，其中，至少有部分所述颗粒的壳具有尺寸 $<10\mu\text{m}$ 的微孔。
5. 根据权利要求 2 到 4 中任一项所述的填充材料，其中，至少有部分所述颗粒的壳具有大孔，其尺寸在 $10\mu\text{m} - 50\mu\text{m}$ 之间。
6. 根据权利要求 5 中所述的填充材料，其中，小于 20% 的所述颗粒壳体的外表面区域被大孔所占据。
7. 根据权利要求 1 到 6 中任一项所述的填充材料，其中，所述壳体包含作为与聚合物形成复合材料或者与之吸附或附着的至少一种添加剂，其选自磷酸钙化合物、对比剂、治疗剂、生长因子、自体富血小板血浆、正常的人体细胞和自体干细胞中。
8. 根据权利要求 1 到 7 中任一项所述的填充材料，其中，至少有部分所述颗粒的壳具有羟基磷灰石和/或磷酸三钙的外表层。
9. 一种软组织填充注射混合物，包含：
 - (i) 如权利要求 1 到 8 中任一项所述的软组织填充材料，及
 - (ii) 一种能相容的载体介子，填充材料颗粒悬浮其中，其成份具有适合将其注射入软组织的浓度。
10. 根据权利要求 9 所述的成份，其中，所述载体介子包含溶于溶剂中的载体介子材料，该材料选自胶原、壳聚糖、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、硅油、明胶、脂肪、透明质酸、盐水、水、血浆、水溶液、乙二醇、中链甘油三酯、甘油酯、甘油、B-葡聚糖和琼脂糖溶液、乳酸乙酯、羟丙基甲基纤维素、泊洛沙姆或聚 N-异丙基丙烯酰胺或其衍生物。
11. 根据权利要求 10 所述的一种混合物，其中，所述载体介子在室温条件下呈液体形态，并在注射入人体软组织中时，发生相变成为胶体形态。
12. 根据权利要求 10 或 11 所述的混合物，其中，所述载体介子包含高纯戊二

醛交联牛皮肤胶原。

13. 根据权利要求 10 所述的混合物，其中，所述载体介子为一种假塑性液体，在注射过程中相对高剪力环境下能具有降低的粘度，而在注射后具有能稳定和悬浮所注射材料的较高粘度。

14. 根据权利要求 13 所述的混合物，其中，所述载体介子含有溶于水的透明质酸。

15. 根据权利要求9到14中任一项所述的混合物，其中，所述载体介子包括作为添加剂的对比剂、自体富血小板血浆、正常人体细胞和/或自体干细胞。

软组织填充物

本发明涉及一种软组织填充，特别涉及一种软组织填充材料物质以及一种可注射的软组织填充材料混合物。

本发明的第一个方面：一种含有多颗粒的软组织填充材料，每个颗粒由圆形聚合物壳组成，聚合物壳界定一内腔体，其最大外部尺寸为 $50\mu\text{m} - 250\mu\text{m}$ ，并界定壳体内部的孔或开口，该孔或开口提供进入该腔体的通道，该孔或开口的大小或尺寸为颗粒外部尺寸的 $1/10$ 至整个颗粒的外部大小。

本发明的填充材料适于作为软组织填充材料用于胃食管反流疾病(GERD)、泌尿回流疾病、应力性尿失禁(SUI)、大便失禁、皮肤异常增大、声带麻痹症中的声带隆乳等等疾病的治愈。该材料在如下文所述的载体介子中悬浮时，可通过注射方式注入需要填充或扩大的软组织中。

该内腔体被壳包围，通过孔或开口提供进入腔体的通道。

该颗粒的壳大体为球体状，其外径在 $50\mu\text{m}$ 至 $250\mu\text{m}$ 之间。换句话说，该微粒优选为空洞形微球体，每个颗粒的壳上有单个主要的大孔或开口。典型的微球体的直径大约为 $100\mu\text{m}$ 。

该颗粒的孔的直径从颗粒直径的 $1/10$ 到整个颗粒大小，呈圆形。开口的直径约在 $20\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 之间。举例说，开口直径可以为 $60\mu\text{m}$ 。

至少有部分颗粒的壳具有微孔，该微孔为的尺寸 $<10\mu\text{m}$ ，例如直径 $<10\mu\text{m}$ 。

至少有部分颗粒的壳具有大孔，该大孔具有 $10\mu\text{m} - 50\mu\text{m}$ 的尺寸，例如直径。

在本发明的一个实施方式中，颗粒壳体的小于 20% 的外表面区域，即不包括有任何微孔或大孔存在的内表面积，被大孔所占据，即微球体可具有有限的宏观孔隙。

该壳可含有作为与聚合物形成复合材料或者与之吸附或附着的至少一种添加剂，其选自磷酸钙化合物、对比剂、治疗剂、生长因子、自体富血小板血浆、正常人体细胞或自体干细胞。

本发明的第二方面提供一种可注射的软组织填充材料混合物，其包含如下：

(i) 一种如前描述的软组织填充材料及

(ii) 一种能相容的载体介子，填充材料颗粒悬浮其中，其成份具有适合将其注射入软组织的浓度。

该载体介子可含有从溶解于溶剂中的载体介子材料，该材料选自胶原、壳聚糖、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、硅油、明胶、脂肪、透明质酸、盐水、水、血浆、水溶液、乙二醇、中链甘油三酯、甘油酯、甘油、B-葡聚糖和琼脂糖溶液、乳酸乙酯、羟丙基甲基纤维素、泊洛沙姆或聚 N-异丙基丙烯酰胺或其衍生物。

载体介子材料与溶剂的比例约为 1: 1 到 200: 1(载体介子材料(mg)与溶剂(ml)的比)。

任何适合的溶剂皆可选用，如水、酸或碱，具体根据所使用的载体介子材料而定。当使用胶原作为载体介子时，溶剂可以用乙酸。当使用藻酸盐作为载体介子时，可以选择碱例如氢氧化钠作为溶剂。

载体介子也可以是溶于水的假塑性液体，如溶于水的玻璃酸(最好使用非动物源材料)，在相对高剪力下，如注射时，能具有降低的粘度，而在注射后具有能稳定和悬浮所注射材料的较高粘度。作为替代的，载体介子可在室温条件下为液体，当被注射入软组织中，即在人体环境下，可适合发生相变，例如从液体变为胶体。特别是，该载体介子可以有温度和/或 PH 响应，以在人体温度和/或人体 PH 下，即注射入人体软组织后，发生从液体变为胶体的相变。优选地，使用高纯化戊二醛交联牛胶原蛋白作为载体介子。典型的如美国加利福尼亚加州圣巴巴拉的 INAMED Aesthetics 制造的胶原蛋白，并由美国新泽西州 C.R.Bard Murray Hill 出品。

该混合物是由填充材料和载体介子组成的。在向载体介子加入填充材料之前优选将填充材料进行消毒处理。可以用伽马灭菌以 25kGy 剂量进行。也可以在填充材料加入前对载体介子进行消毒。水基胶原溶液也可使用管线灭菌过滤器过滤(0.22 微米)，并通过严格的消毒制备程序。

载体介子可包含如前所述的添加剂，如对比剂、自体富血小板血浆、正常人体细胞或自体干细胞。

软组织填充材料的制备：

(i) 将孔形成剂分散在溶有聚合物的溶剂中，形成一个油相(O)。

(ii) 将油相加入到水相(W)中，水相中包含溶于水的乳化剂/表面活性剂，以形成一种水包油乳剂(O/W)，或者，

(iii) 将含有溶于水的乳化剂/表面活性剂的水相(W)加入到油相中，形成乳剂，然后再将该乳状液加入到含有乳化剂/表面活性剂的第二油相中，形成油包油包水乳剂((W/O)/O)。

(iv) 在适宜的情况下，在步骤(ii)或步骤(iii)的乳化过程中加入酸，酸同孔形成剂反应，形成圆形高分子壳，每个壳界定一内腔，同时具有 50 μ m--250 μ m 的

最大外部尺寸，壳上有孔或开口，孔或开口与腔体连通，腔的开口的最大尺寸是 $100\mu\text{m}$ ，最小尺寸为 $20\mu\text{m}$ 。

作为替代的，该软组织填充材料的制备可以以如下的方式进行：

(v)将包含溶于水的乳化剂/表面活性剂的水相(W)加入到溶有聚合物的溶液组成的油相(O)中，形成乳剂(W/O)，再向该乳剂中加入孔形成剂；其后

(vi)将该乳剂再加回到包含溶于水的乳化剂/表面活性剂的水相(W)中，并形成水包油包水乳剂((W/O)/W)，随后

(vii)如果条件适宜，在((W/O)/W)乳剂中加入酸，酸和孔形成剂反应，形成圆形状高分子壳体，每个壳体界定一个内腔体，并具有 $50\mu\text{m}$ --- $250\mu\text{m}$ 的最大的外形尺寸，壳体上有孔或开口，孔或开口与内腔体相通。腔体的孔或开口的最大尺寸是 $100\mu\text{m}$ ，最小尺寸是 $20\mu\text{m}$ 。

可以选择孔形成剂和酸，以便在向乳剂中添加酸时，其与孔形成剂发生反应产生泡腾或泡沫，并颗粒中孔的形成。

孔形成剂可以为一种固体孔形成剂或致孔剂，其可选自碳酸钙、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸铵、碳酸氢铵、可体内使用的硝酸盐、氯化钠、柠檬酸钠、蔗糖和葡萄糖。尤其是使用碳酸氢钠。同时，作为替代方案，惰性液体孔形成剂如全氟化碳也可以利用。但是致孔剂的使用不受到前述物质的限制。

只有在适当的情况下，向乳剂中添加酸才是重要的，也就是说，当使用化学惰性液体孔形成剂时，固体或挥发性有机溶剂孔形成剂或致孔剂自身没有产生足够的气体，将没有酸的增加。此外，酸的添加也可与某些固体孔形成剂的使用同时进行。例如，当重碳酸铵被当成孔形成剂使用时，是不需要添加酸的，因为重碳酸铵能满足成孔反应需求的足够量。在这种情况下，酸是不需要的。

聚合物与孔形成剂的质量比为1：5到2：1。特别是约2：1。

当使用固体孔形成剂或致孔剂时，颗粒的尺寸范围为 $0.01\mu\text{m}$ - $250\mu\text{m}$ ，特别是约 $150\mu\text{m}$ 。

当孔形成剂添加到溶液中后，优选将致孔剂溶液混合物搅拌或作均质化处理直至获得均匀的分散体。

在溶液中，聚合物与溶剂的比可以为1：20---1：5(聚合物(g)与溶剂(ml)的比)，特别是约1：6，根据聚合物的可溶性限制而定。

该聚合物可以是合成聚合物选自聚(ϵ -己内酯)、聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙交酯-联-乙交酯、聚(ϵ -己内酯)-联-乙交酯、聚羟基丁酸酯、聚羟基戊酸酯、聚丁内酯、聚戊内酯、聚碳酸乙二酯、聚对苯二甲酸亚乙酯、聚对二氧环己酮(polydioxanone)、聚氨酯、聚乙二醇、聚甲基丙烯酸甲酯、聚醋酸乙烯酯和聚(2

-羟乙基甲基丙烯酸甲酯)或天然聚合物选自胶原蛋白、透明质酸、壳聚糖、纤维和藻酸盐。

该溶液是由通过在溶剂中溶解聚合物形成的，例如，使用搅拌和均质化。该溶剂可使用步骤(ii)(iii)或(v)中使用的水相进行预饱和。

该溶剂可以是可溶于水的有机溶剂，如芳香烃、含氯溶剂(二氯甲烷、氯仿、CCl₄等)、酒精(苯甲醇，聚丙二醇，正丁醇等)、酯(乙酸甲酯，醋酸丁酯，苯甲酸甲酯，醋酸甲酯等)、或有机酸如醋酸或丙酸等等。

该水相可包括乳化剂/表面活性剂，与去离子水的比例为1:10至1:1000(乳化剂/表面活性剂(g)与水(ml)的比)，特别是约1:50。

在上述步骤(v)和(vi)中，使用的水相的组成可以相同。

该乳化剂/表面活性剂可选自聚乙烯醇、明胶、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、聚山梨醇酯、聚乙烯吡咯烷酮、泊洛沙姆、一油酸丙三酯、一硬脂酸丙三酯、聚氧乙烯烷基醚、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素及其混合物。

该水相的制备：在向去离子水中加入乳化剂/表面活性剂后，搅拌或均质化至乳化剂/表面活性剂完全溶解。该去离子水可使用如前所述步骤(v)中的溶液中使用的溶剂预饱和。

该第二油相含有油和该乳化剂/表面活性剂。第二油相中的油不同于在其它或第一油相中使用的油，即溶剂。第二油相中的油可以是植物油、矿物油、荷荷芭油、鳄梨油或棕榈仁油。在第二油相中，油与乳化剂/表面活性剂的体积比为20:1至2000:1的范围内，特别是大约200:1。

添加了酸的乳剂于是成为一种O/W乳剂，或(W/O)/W乳剂或(W/O)/O乳剂。

该O/W乳剂的形成：向水相(W)添加油相(O)并连续搅拌均匀或对W相进行均质化处理而得到的。W相与O相的比例可以是5:1至200:1(W相ml与O相ml的比)。特别是大约20:1。

该(W/O)/W乳剂的形成：向O相中添加W相(最初W相)，形成乳剂，然后将该乳剂加回到W相中，于是(W/O)/W乳剂形成。

该(W/O)/O的形成：向O相中加入W相，形成乳剂，然后再向第二油相中加入该乳剂，于是，(W/O)/O乳剂形成。

在以上的所有情况下，乳化过程可通过磁力搅动、膜乳化、转定子均质处理、高压均质化处理或超声乳化处理来实现。搅拌/均质化要连续进行，直到完全乳化。本领域所公知的其他类型的乳化方法也可以使用，如，用于生产颗粒的干喷乳化法等。

乳化搅拌或均质化处理时可加入酸。足够量的酸用以化学计量地平衡所使用的致孔剂。该酸可选自冰醋酸、抗坏血酸、水杨酸、磷酸、盐酸、丙酸及其混合物。

乳剂添加了酸之后得到的混合物可在 50 - 1000 mbar 下蒸发溶剂，以促进其中形成壳和孔。特别是，在约 500 mbar 的真空条件下蒸发溶剂，直到酸/致孔剂反应完成为止。

对比剂可以是水溶性的也可以是非水溶性的，可以添加在 O 相中，以便结合进入聚合体的壳体和/或加入载体介子。水溶性对比剂的例子包括甲泛葡胺、碘帕醇、异泛影钠、iodomide sodium 及甲葡胺。非水溶性对比剂包括钽、氧化二钽、金、钨、铂、全氟化碳和钡。通过荧光镜、X 光照相、超声波光学相干断层扫描和/或其它视觉成像设备，这些添加剂可使注射该成分的人体可见注射中软组织范围的增加，提供更可控程序。

治疗物剂如抗生素或消炎药可以添加到 W 相中，使其结合入聚合物的壳中和/或加入到载体介子中。

刺激初期血管形成和新组织形成的生长因子可结合到聚合物壳和/或载体介子中。

可使用的生长因子包括肝素、表皮生长因子、转化生长因子- α 、转化生长因子- β 、血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子、结缔组织激活肽、 β -血小板球蛋白、胰岛素类生长因子、肿瘤坏死因素、白细胞介素、集落刺激因子、促红细胞生成素、神经生长因子、干扰素、成骨素和骨形态发生蛋白。

如有必要，自体富血小板血浆(PRP)也能结合到聚合物的壳以及载体介子体中。这样一种添加剂如同丰富资源的各种相关生长因子的鸡尾酒，能刺激新组织和血管在初期阶段的形成。

有关的正常人体细胞和/或自体干细胞将进一步刺激新生组织和血管的形成，它们也可结合到聚合物的壳体和/或载体介子中。这些可包括成人的或预分化的脂肪源性干细胞、成肌细胞、成骨细胞、成纤维细胞、上皮细胞和血管内皮细胞、平滑肌细胞，优选成人脂肪源性干细胞和正常人血管平滑肌和上皮细胞。干细胞可预先在体外进行分化。

由此，本发明的填充混合物可以用于软组织的填充，通过对要求填充的软组织进行软组织注射达到此一目的。混合物的注射可以通过 cytoscopically、胃镜或腹腔镜有效完成。

如上文所述，软组织施用可包括治疗胃食管反流病(GERD)、尿液反流疾病、压力性尿失禁(SUI)、大便失禁、真皮不规则的扩大、和治疗声带麻痹症中的声带扩大。

以下将结合附图进一步描述本发明的细节，其中：

图 1 显示根据本发明第一实施方式的软组织填充材料颗粒的三维视图；

图 2 显示根据本发明第二实施方式的软组织填充材料的类似三维视图；

图 3 显示根据本发明第三实施方式的软组织填充材料的类似三维视图；

图 4 显示根据本发明第四实施方式的软组织填充材料的类似三维视图；

图 5 为实施例 1 获得的软组织填充材料颗粒扫描电子显微照片；

图 6 为实施例 2 获得的软组织填充材料颗粒扫描电子显微照片；

图 7 显示为实施例 1 获得的微粒上培养的细胞的扫描电子显微照片。

在本附图中，类似的特征标记为相同的参照数字。

参见图 1，参照数字 10 普遍表示根据本发明第一实施方式的软组织填充材料颗粒。

该颗粒 10 包含固体的球型壳 12，即是非多孔聚合物。该壳 12 典型地具有约 100 μm 的外直径。该聚合物典型地为 (ϵ -己内酯)。

该球型壳 12 界定一中心闭合的圆形腔体 14。

壳 12 是典型有 1 μm 至 10 μm 厚度的墙体。

在壳 12 中提供一单一主孔，由参照数字 16 表示。该孔的典型直径约 60 μm 。该孔 16 为腔体 14 提供外部通道。

参见图 2，参照数字 20 普遍表示根据本发明的第二实施方式的软组织填充材料颗粒。

在颗粒 20 的情况下，壳 12 提供微孔，其直径 \leq 10 μm 。

参见图 3，参照数字 30 普遍表示根据本发明的第三实施方式的软组织填充材料颗粒。

颗粒 30 的壳 12 提供大孔 32，其直径在 10 μm 至 50 μm 之间。

参见图 4，参照数字 40 普遍表示根据本发明的第四实施方式的软组织填充材料颗粒。

颗粒 40 具有有限的大孔结构，即大孔 32 所占的总开放面积小于总微壳外表面积的 20%。

颗粒 10、20、30 和 40 制备和合成如下文所述。

软组织填充混合物及软组织填充材料的可注射量约为 0.5-20ml，根据软组织填充需求量的不同而定。聚合物的微壳典型地占据总注射体积的 10-20%。因此，每次内窥镜治疗注射的高分子微壳量大约为 0.5-4ml。如下所述，合成步骤产生的高分子微壳的量约为 1ml。

实施例 1：O/W 步骤

1% (w/v) 的聚乙烯醇 (PVA) 溶液溶于 150ml 的蒸馏水中 (W)。在 10ml 的二氯甲烷中溶解 15 克聚(ϵ -己内酯)(PCL) 形成 O 相。将 3 克碳酸氢钠(粒径: 25 - 40 μ m) 作为致孔剂加入到 O 相中。轻轻对油-致孔剂进行磁搅拌一分钟。将油相加入 PVA 溶液(W 相)中, 在 300rpm 下均质 2 分钟。然后在 800rpm 及 20 $^{\circ}$ C 的温度下磁搅拌 2 小时, 至溶剂蒸发完成。在搅拌一小时候后加入 2.4ml 的乙酸。使发泡反应发生。使用适当网目尺寸的过滤器过滤溶液, 除去多余的水, 得到理想尺寸范围内的颗粒, 得到体积推导 80% 的颗粒满足理想尺寸。同样的过滤程序也适用于如下的例 2 至例 4 中。真空干燥颗粒以及分离使用典型的凝固步骤, 以得到根据本发明的软组织填充材料。颗粒的平均体积, 根据激光光散射的测定为 185 μ m, 具体可参见图 5, 图 5 显示的是根据本发明颗粒的扫描电子显微照片。

实施例 2: W/O/W 步骤

将 1.5 克 PCL 溶解于 10ml 的二氯甲烷(DCM)中形成油相 (O)。将 0.5ml 的 1% (w/v) 聚乙烯醇(PVA)溶液(W)加入油相中。磁搅拌形成第一乳剂(W/O)。在第一乳剂中加入 3 克碳酸钙 CaCO_3 (颗粒大小为 100-150 μ m) 作为致孔剂。将第一乳剂加入 150ml 的 1% PVA (w/v) (W/O/W)。在 800rpm 的条件下磁搅拌该混合物形成第二乳剂, 并继续搅拌至溶剂蒸发完为止。搅拌一小时候后再加入 2.4 ml 的乙酸。使泡沫形成反应发生。用蒸馏水冲洗球体三次。过滤溶液, 真空烘干颗粒, 并用典型的凝固程序分离颗粒, 得到微壳, 即本发明中的软组织填充材料。在激光散射测定下, 颗粒的体积为 196 μ m, 参见图 6, 图 6 是根据本发明颗粒的扫描电子显微照片。

实施例 3: W/O/O 步骤

在 5ml 的蒸馏水中混合 0.33% (w/v) 的聚乙烯醇(PVA) (W), 将 1 克聚(ϵ -己内酯)加入到 10ml 的二氯甲烷中形成第一油相(O₁), 在第一油相中加入 3 克碳酸氢钠(颗粒直接为 150-212 μ m) 作为致孔剂, 并轻轻磁搅拌添加有孔形成剂的第一乳剂 (W/O₁) 1 分钟。第二油相(O₂)由 200 ml 的植物油和 1% 失水山梨醇单硬脂酸酯(Span 60)(V/V)形成。Span 60 (商标) 是商业可获得的山梨醇酐单硬脂酸酯, 即一种表面活性剂/乳化剂。将第一乳剂加入第二油相(W/O₁/O₂)中, 并在 2000rpm 的条件下搅拌 2 小时形成乳化, 并继续搅拌至溶剂完全蒸发。过滤最后的乳剂, 用去离子水冲洗三遍。用适合的溶剂清除微粒上的油迹。真空烘干颗粒, 用典型的凝固程序进行分离处理后得到本发明的软组织填充材料。

实施例 4: 液体致孔剂的步骤(O/W)

在 150ml 的蒸馏水(W)中加入 1% [w/v] 的聚乙烯醇 (PVA) 溶液。将 1.5 克的聚合物聚己内酯, PCL) 溶解在 10ml 的二氯甲烷中形成一个 O 相, 形成一个 O 相。

在该 O 相中加入 3 克碳酸氢钠(粒径为 25 - 40 μm)作为固体孔形成剂及 1ml 全氟化碳全氟化碳(PFC) 作为液体孔形成剂。搅拌油-PFC 孔形成剂的混合物一分种。在 PVA 溶剂(O/W)加入油相, 在 300rpm 的条件下均质化处理 2 分钟。然后在 800rpm 及 20°C 的温度条件下磁搅拌 2 小时, 直到溶剂蒸发完为止。过滤溶液, 真空烘干, 用典型的凝固程序作分离处理后便得到根据本发明的软组织填充材料。

值得重视的是, 在完成以上步骤后, 每一种情况的软组织填充材料将包含数字编号 1, 2, 3 和 4 对应的颗粒 12, 20, 30 和 40 的混合物。

实施例 5: 离体平滑肌肉细胞的生长

为研究实施例 1 中平滑肌肉细胞附着在软组织填充材料上的能力, 新生长的平滑肌肉细胞已在如上所述的微粒中得以培养。培养方法为经典微载体细胞培养法。在 120 小时候后, 大多数的移植细胞已移植入微粒腔体, 并显示优先附着在聚合物内体---参见图 7, 其显示在根据本发明的软组织填充材料上培养细胞的扫描电子显微照片。

本发明的实施方式仅为例子, 本领域技术人员应能找到该具体步骤的各种等同替换。所有等同步骤应在本发明的范围内。

优选使用的载体介子材料是高纯戊二醛交联牛胶原, 最典型的例子是美国胶原公司(Inamed Corporation)所生产的胶原 C.R.Bard。对牛胶原敏感的病人, 还可以采用 Restylane™(Q-Med)制造的透明质酸。

尽管本发明中的混合物, 尤其是其填充材料可以从根本上治愈各种失禁症或基于逆流的疾病, 但相信其对治愈 GERD 有特别作用, 其因短暂放松对下食管括约肌肉组织(LES)造成的胃酸返流到食道。在其他情况下, GERD 是括约肌肌肉的伸缩性休息减少而导致的。软组织填充材料通过内镜或腹腔镜注射到食管下括约肌中, 起到增强作用。填充物从填充材料颗粒的微球体或壳的特殊结构中冒出, 从而使组织向颗粒腔体内生长得以实现组织再生。特别是, 人们相信颗粒单一主要的大孔对快速促进的新组织内生长提供支持, 无需颗粒的机械性整合。希望没有受到理论的约束, 颗粒中的腔体和主孔向新组织的形成提供一种无压力的环境, 因此, 形成一个“组织港”并给与细胞一个真正的三维相互作用环境。

普遍的观点认为, 对新组织的形成提供无压力环境或“组织港”能将纤维化(疤痕)减少到最小, 同时最大化组织形成的体积, 因而, 肌肉的功能得到改善。这将导致高效率的组织形成。如果颗粒在发挥功能前与合适的细胞一起预培养, 这一无压力的环境是十分有利的, 因为细胞位于颗粒的内部, 它将得到避免高剪力的保护, 同时, 通过单一大型孔与周围的组织连通, 如果孔、微孔和大孔存在, 也通过其提供养分和氧。

人们相信利用本发明所称的填充材料治疗胃食管反流病具有良好的效果，同时，可避免使用其它方法造成的问题。例如，一名胃食管反流病患者可避免每天服用药物以及主要外科手术。

同时，随着时间的推移，颗粒会生物降解因而促进组织的再生。

两种填充机制起到良好的效果，即，源自注射混合物初始体积的早期填充物及由新组织形成及可能的功能修复产生的后期填充物。

当颗粒如前所述含有添加剂时，显出更进一步的优势。因此，当颗粒含有人体细胞或自体造血干细胞(可预分化进入平滑肌肉细胞中)会将进一步刺激新组织的形成和血管的形成，并可能引导肌肉功能恢复正常。当颗粒含有相关的生长因子时，这些能加速这些早期阶段的新组织的形成。此外，当颗粒降解时这些生长因子释放很长一段时间。当颗粒含有磷酸三钙，会增强机械强度并作为钙的存储器在一段时间内向人体供钙。磷酸三钙是一种行之有效的生物活性物质，将其纳入填充材料的颗粒中能增强颗粒的生物活性，从而改善组织内生长进入颗粒。此外，钙参与凝血叶栅，有助于血小板的肉芽组织。

自体富血小板血浆(PRP)，提供了丰富的生长因子“鸡尾酒”，是另一种可能的添加剂。PRP 通常会结合进入载体介子，而不是进、结合入颗粒壳，因此，能快速地释放于人体中，因为载体介子是能被人体快速吸收的。PRP 释放生长因子和钙，有助于血小板的肉芽生长。

结合入载体介子中的自体富血小板血浆(PRP)刺激新组织形成，作为 PRP 的颗粒能根据自然确定的比率释放出相关的生长因子，即依照人体需要。

在有本地钙供应的情况下，相关生长因子的释放率可以加快，这是由于磷酸三钙纳与壳结合或者碳酸钙作为孔形成剂使用带来的利益。

因此，填充材料的颗粒应有一定的规格是至关重要的，此处所言规格即最大的外部尺寸为 $50\mu\text{m}$ - $250\mu\text{m}$ ，只有这样，它们才能有效地被注射入需要填充的部位。在使用内窥镜注射时，大尺寸的颗粒是不能被迅速地注入的。典型的内窥镜针的最小标准尺寸是 23，腹腔镜针为 16。因此，本发明所称的颗粒不要求有潜在的造血管功能(但在心脏移植手术中，要求颗粒有造血管功能)，也即是说，本发明中的颗粒不要求有形成血管的颗粒的尺寸(0.5mm)。同样，本发明中的 $20\mu\text{m}$ - $100\mu\text{m}$ 的孔允许组织向内生长入颗粒的内部，同时血管在颗粒内形成需要较大的空的开口。本发明所称的填充材料颗粒可依照如前描述的方法进行生产。另一方面，制造能形成血管的大颗粒的方法，特别是 0.5mm - 3mm 并有大于 $100\mu\text{m}$ 的孔，特别是 $200\mu\text{m}$ 或更大，通常情况下是不适合制造根据本发明的具有较小尺寸孔的较小的颗粒。

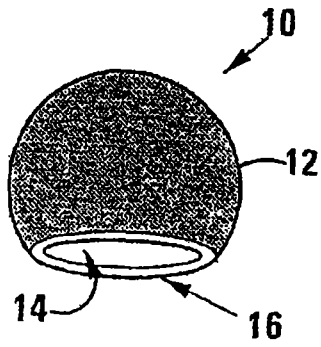


图 1

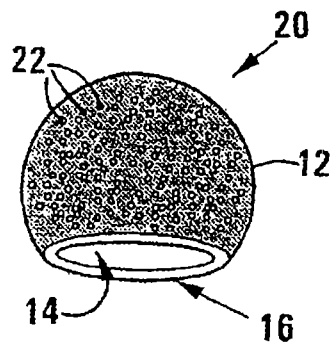


图 2

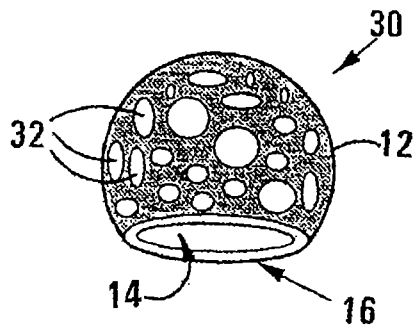


图 3

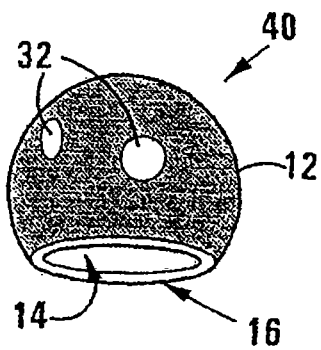


图 4

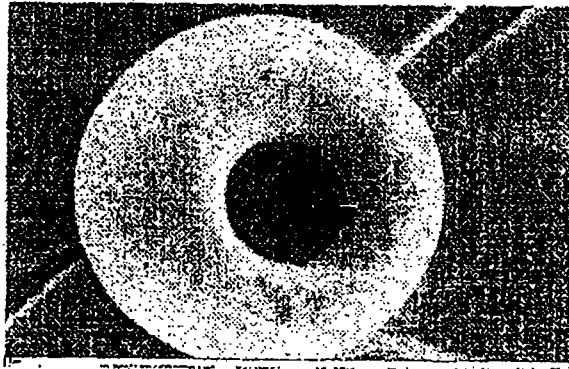


图 6



图 5



图 7