



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101678152 B

(45) 授权公告日 2013.06.26

(21) 申请号 200880019892.2

(22) 申请日 2008.06.10

(30) 优先权数据

60/943,118 2007.06.11 US

12/135,507 2008.06.09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/066411 2008.06.10

(87) PCT申请的公布数据

W02008/154534 EN 2008.12.18

(73) 专利权人 爱德华兹生命科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·戴维森 J·达夫 D·多布勒

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民

(51) Int. Cl.

A61L 27/36(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2006/099334 A2, 2006.09.21, 参见说明书第44-46页.

US 2006/0217805 A1, 2006.09.28, 参见说明书第15-18、20、29-30、49-50、54-59、61、63、66-67段、附图1-2.

US 2006/0217805 A1, 2006.09.28, 参见说明书第15-18、20、29-30、49-50、54-59、61、63、66-67段、附图1-2.

审查员 强婧

权利要求书3页 说明书12页 附图6页

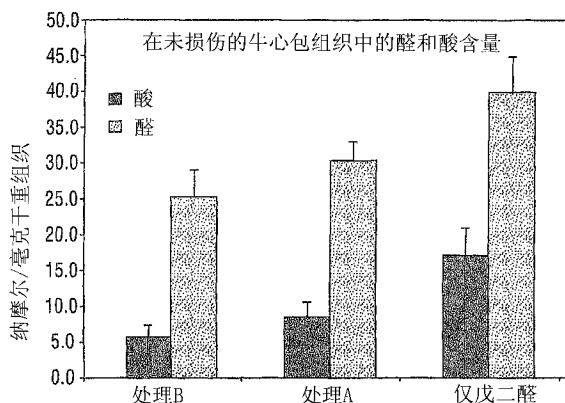
(54) 发明名称

用于给生物假体组织预加应力和加帽的方法

(57) 摘要

本发明公开了对植入物中使用的生物假体组织的处理或对装配的生物假体心瓣膜的处理,以减少体内钙化。该方法包括预处理、预加应力、或预损伤固定的生物假体组织,其方式为模拟与植入后使用相关的损伤,同时,和/或随后应用钙化缓和剂例如加帽剂或连接剂到损伤的组织。加帽剂抑制组织中结合位点的形成,结合位点是由于损伤过程(使用应力)被暴露或生成的,并且另外在植入后将吸引钙、磷酸酯、免疫原性因子、或其它钙化前体。连接剂在组织结构中的预应力损害位点处将作为弹性加强或吸震弹簧成分。在一种方法中,在装配生物假体心瓣膜中的组织小叶通过模拟预先确定数量循环的实际流动情况被预处理,在此期间或之后将瓣膜暴露于加帽剂。

CN 101678152 B



1. 处理生物假体植入组织以减少体内钙化的方法,其包括:
至少部分交联生物假体植入组织;然后
通过重复地弯曲该交联的组织加应力到该交联的组织;和
应用钙化缓和剂到该受应力的交联的组织。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括具有至少一种可以结合钙、磷酸酯、或免疫原性因子结合位点的成分的加帽剂溶液。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括包含长弹性分子的连接剂溶液。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括选自下述的加帽剂:
胺,
氨基酸,
氨基磺酸盐,
亲水性多官能聚合物,
疏水性多官能聚合物,
 α -二羧基,
酰肼类,
N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯,
碳二亚胺,
2-氯-1-甲基碘代吡啶(CMPI),
抗生素,
细胞募集剂,
血液相容剂,
抗炎剂,
抗增殖剂,
免疫原性抑制剂,
还原剂,和
单环氧烷烃、二环氧烷烃或聚环氧烷烃。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述钙化缓和剂在下述选择溶液的一种或组合中被递送:
水溶液,
有机溶剂,和
有机缓冲溶液。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组织在加应力之前被完全交联。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组织包括安装和弯曲在适当的流动产生装置中的预切割的心瓣膜小叶。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组织包括弯曲在适当装置中的组织大片。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物假体植入组织包括生物假体心瓣膜,并且所述加应力的步骤包括使心瓣膜经受通过它的脉冲流体流动。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述心瓣膜经受至少100个循环的脉冲流体流

动。

11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述加应力的步骤包括使所述生物假体植入组织经受模拟的植入后生理环境。

12. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述加应力的步骤包括使所述生物假体植入组织经受至少一种应力促进环境参数。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述应力促进环境参数包括 4-1500Hz 范围中的快速脉冲流体流动。

14. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述应力促进环境参数是 26-65°C 的升高温度范围。

15. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述应力促进环境参数是 pH 4-7 的酸性溶液。

16. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述应力促进环境参数是 pH 8-10 的碱性溶液。

17. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述应力促进环境参数是氧化溶液。

18. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述应力促进环境参数包括选自以下的至少两种参数:

4-1500Hz 范围中的快速脉冲流体流动;

26-65°C 的升高温度范围;

pH 4-7 的酸性溶液;

pH 8-10 的碱性溶液;和

氧化溶液。

19. 根据权利要求 1 所述的方法,其中进行所述加应力的步骤直到在所述生物假体组织上待被加帽的新暴露位点增加至少 10%。

20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中进行所述加应力的步骤直到在所述生物假体植入组织中的损伤水平增加大约 10%。

21. 根据权利要求 1 所述的方法,其中进行所述加应力的步骤至少直到在所述生物假体植入组织中的酸生产率减少大约 10%。

22. 根据权利要求 1 所述的方法,其中首先加应力到所述组织和随后向其应用钙化缓和剂的步骤进行多次。

23. 根据权利要求 1 所述的方法,其中首先加应力到所述组织和随后向其应用钙化缓和剂的步骤用不同的钙化缓和剂进行至少两次。

24. 处理生物假体植入组织以减少体内钙化的方法,其包括:

通过重复地弯曲所述生物假体植入组织,周期性地加应力到所述生物假体植入组织直到在所述生物假体植入组织中酸生产率减少大约 10%;然后

应用钙化缓和剂到该受应力的组织。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述生物假体植入组织包括生物假体心瓣膜,并且所述加应力的步骤包括使所述心瓣膜经受通过它的脉冲流体流动。

26. 根据权利要求 24 所述的方法,其中进行所述加应力的步骤直到所述生物假体植入组织的酸水平的增加速度稳定。

27. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括具有至少一种可以结合钙或磷酸酯和 / 或免疫原性结合位点的成分的加帽剂溶液。

28. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括选自下述的加帽剂:
胺,
氨基酸,
氨基磺酸盐,
亲水性多官能聚合物,
疏水性多官能聚合物,
 α -二羰基,
酰肼类,
N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯,
碳二亚胺,
2-氯-1-甲基碘代吡啶(CMPI),
抗生素,
细胞募集剂,
血液相容剂,
抗炎剂,
抗增殖剂,
免疫原性抑制剂,
还原剂,和
单环氧烷烃、二环氧烷烃或聚环氧烷烃。
29. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括包含长弹性分子的连接剂溶液。
30. 处理生物假体心瓣膜以减少体内钙化的方法,其包括:
在模拟的流体流动系统中安装生物假体心瓣膜;
使所述生物假体心瓣膜经受至少 100 个弯曲循环的脉冲流体流动;和
应用钙化缓和剂到所述生物假体心瓣膜。
31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中使所述生物假体心瓣膜经受至少 100,000 个弯曲循环的脉冲流体流动。
32. 根据权利要求 30 所述的方法,其中首先使所述生物假体心瓣膜经受脉冲流体流动和随后向其应用钙化缓和剂的步骤进行多次。
33. 根据权利要求 30 所述的方法,其中首先使所述生物假体心瓣膜经受脉冲流体流动和随后向其应用钙化缓和剂的步骤用不同的钙化缓和剂进行至少两次。
34. 根据权利要求 30 所述的方法,其中进行所述经受步骤直到所述生物假体植入组织的酸水平的增加速度稳定。
35. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括具有至少一种可以结合钙、磷酸酯和 / 或免疫原性结合位点的成分的加帽剂溶液。
36. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述钙化缓和剂包括包含长弹性分子的连接剂溶液。
37. 根据权利要求 30 所述的方法,其中使所述生物假体心瓣膜经受脉冲流体流动和应用钙化缓和剂到所述生物假体心瓣膜的步骤是同时进行的。

用于给生物假体组织预加应力和加帽的方法

技术领域

[0001] 本专利申请要求在 2007 年 6 月 11 日提交的、名称为“用于生物假体组织预加应力和加帽的方法 (Methods for Prestressing and Capping Bioprosthetic Tissue)”并且被转让给本文的受让人的美国临时申请号 60/943, 118 的优先权, 其因此通过引用明确并入本文。

发明背景

[0002] 当出现天然的心瓣膜变窄时——通常被称为狭窄, 或当天然的瓣膜渗漏或回流时——例如当小叶钙化时, 表明可以进行心瓣膜置换。在一个治疗方案中, 天然的瓣膜可以被切除并用生物或机械瓣膜替换。

[0003] 组织型或“生物假体”瓣膜具有由基底结构支持的柔韧小叶, 小叶通过彼此对着合紧以确保单向的血流, 伸出进入流动流中并起到很像天然心瓣膜的那些小叶的作用。在组织型瓣膜中, 整个的异种移植瓣膜 (例如, 猪) 或多个异种移植小叶 (例如, 牛心包) 典型地提供流体闭合表面 (fluid occluding surfaces)。也提出合成的小叶。两个或多个柔韧小叶安装在外周支持结构里面, 例如, 如在可以从加利福尼亚州 Irvine 的 Edwards Lifesciences 获得的 CARPENTIER-EDWARDS 猪心瓣膜和 PERIMOUNT 心包心瓣膜中所看见的。

[0004] 可植入的生物组织可以由人体组织形成, 所述人体组织通过冷冻 (即, 低温保存) 同种移植组织进行保存; 或者由动物组织形成, 所述动物组织通过化学固定 (即, 鞣制) 异种移植组织进行保存。用作生物假体的生物组织类型包括心脏瓣膜、血管、皮肤、硬脑膜、心包、小肠粘膜下层 (“SIS 组织”)、韧带和腱。这些生物组织典型地包含充当所述组织的支持构架的结缔组织蛋白 (即, 胶原和弹性蛋白)。每种生物组织的柔韧性或刚性很大程度上由该组织中存在的胶原和弹性蛋白的相对量和 / 或其结缔组织构架的物理结构和构造来决定。胶原是大多数组织中存在的最丰富的结缔组织蛋白。每个胶原分子由以卷曲螺旋构造缠绕在一起的三 (3) 个多肽链形成。

[0005] 用于化学固定生物组织的技术典型地包括将该生物组织暴露于一种或多种化学固定剂 (即, 鞣剂), 所述化学固定剂在给定的胶原分子内的多肽链之间形成交联 (即, 分子内交联), 或者在相邻胶原分子之间形成交联 (即, 分子间交联)。已经用于交联胶原生物组织的化学固定剂的例子包括: 甲醛、戊二醛、二醛淀粉、1,6-己二异氰酸酯和某些聚环氧化合物。

[0006] 与许多生物假体材料植入相关的一个问题是这些材料中的结缔组织蛋白 (即, 胶原和弹性蛋白) 在植入到体内后可以变成钙化的。这种钙化可导致该生物假体发生不期望的硬化或降解。

[0007] 在可用的各种化学固定剂中, 戊二醛 (也简单地称为“戊二醛 (glut)”) 自从在 1968 年由 Dr. Alain Carpentier 发现它具有抗免疫和抗降解效果以来已经得到了最广泛的应用。参见 Carpentier, A., J. Thorac. Cardiovascular Surgery, 58:467-69 (1969)。另外, 戊二醛是最有效的灭菌剂之一。戊二醛因此被用作许多商业可得的生物假体产品的固

定剂和杀菌剂,例如在可从加利福尼亚州 Irvine 的 Edwards Lifesciences 获得的生物假体心瓣膜中。

[0008] 已经提出减轻戊二醛固定的生物假体的体内钙化或用其它方法改进戊二醛固定方法的各种技术。包括其中的是在美国专利 4,729,139(Nashef);美国专利 4,885,005(Nashef 等);美国专利 4,648,881(Carpentier 等);美国专利 5,002,566(Carpentier);EP103947(Pollock 等)和美国专利 5,215,541(Nashef 等)中所描述的方法。美国专利 5,862,806(Cheung)中提出的方法包括在应用化学还原剂例如氰基硼氢化钠或硼氢化钠之前,对戊二醛处理的组织进行脱水。在美国专利 6,471,723 中发现的钙化减轻技术包括加入各种胺官能,努力使戊二醛固定组织中的醛基团解毒。这些化学品不是永久地连接到组织并且随着时间将扩散出组织。在 Connolly, J., J. Heart Valve Disease, 13:487-493(2004)中显示结合乙醇处理应用还原剂有利于减轻钙化。该出版物指出使用还原剂没有不利地影响该组织的形态学或组织收缩温度。

[0009] 最近,已经开发了通过在戊二醛中高温固定组织的钙减轻的新技术并且在美国专利 6,561,970(Carpentier 等)中描述,其与在美国专利 5,931,969(Carpentier 等)中描述的相对组织/流体运动结合。包括调整戊二醛固定溶液的 pH 的另一种技术在美国专利 6,878,168(Carpentier 等)中公开。一种商用的实施方式,Edwards LifesciencesXenoLogiX™ 组织处理,消除多至 98%的磷脂,力图减少钙结合位点。在也来自于 Edwards Lifesciences 的 Carpentier-Edwards ThermaFix™ 高级心瓣膜组织方法中,使用热和化学处理以除去不稳定戊二醛分子,这减少了钙结合位点,相对于只有戊二醛的对照,其导致钙摄入显著减少。

[0010] 虽然这些已知技术中的一些已证明是稍微有效的,但是对进一步改进以减轻植入物中使用的固定生物假体组织特别是心瓣膜的长期植入后钙化的倾向仍存在需要。现有技术没有解决由于使用(植入)环境可能发生的组织内变化。

发明概述

[0011] 本发明解决由于使用(植入)环境可能发生的组织内的某些有害变化。即,当在正常使用期间组织被周期性地加应力时,产生某些潜在的钙化、免疫系统攻击等的结合位点。本发明包括预加应力到组织以暴露这些结合位点,并且随后给这些位点加帽或以其它方法中和这些位点。

[0012] 本发明的处理生物假体植入组织以减少体内钙化的方法包括至少部分地交联生物假体植入组织,然后加应力到交联的组织;和对受应力的、交联的组织应用钙化缓和剂。钙化缓和剂可以为具有至少一种可以结合钙、磷酸酯或免疫原性因子结合位点的成分的加帽剂溶液。可选地,钙化缓和剂为包括长弹性分子的连接剂溶液。

[0013] 如果钙化缓和剂包括加帽剂,加帽剂期望地选自:胺、氨基酸、氨基磺酸盐、亲水性多官能聚合物、疏水性多官能聚合物、 α -二羰基、酰肼类、N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、碳二亚胺、2-氯-1-甲基碘代吡啶(CMPI)、抗生素、细胞募集剂(cell recruiting agent)、血液相容剂(hemocompatibility agent)、抗炎剂、抗增殖剂、免疫抑制剂、还原剂、单环氧烷烃、二环氧烷烃或聚环氧烷烃。

[0014] 理想地以一种以下溶液或以下溶液的组合来递送钙化缓和剂:水溶液例如水缓冲

溶液、水、醇、甘油或增塑剂,有机溶剂,及有机缓冲溶液。

[0015] 组织在加应力之前优选地被完全交联。在一种实施方式中,组织包括安装和弯曲在适当的流量装置(flow apparatus)中的预切割的心瓣膜小叶。可选地,组织可以为弯曲在适当装置中的组织大片(bulksheets)。仍更进一步地,生物假体植入组织可以是生物假体心瓣膜,而加应力的步骤包括使心瓣膜受到通过它的脉冲流体流动。期望地,心瓣膜受到至少 100 个循环的脉冲流体流动。

[0016] 在优选的实施方式中,加应力的步骤包括使生物假体植入组织经受模拟的植入后生理环境。另外,加应力的步骤包括使生物假体植入组织经受至少一种应力促进环境参数。例如,应力促进环境参数可以包括 4-1500Hz 范围中的快速脉冲流体流动、26-65°C 的升高温度范围、pH 4-7 酸性溶液、pH 8-10 的碱性溶液、氧化溶液、或前述的至少两种。

[0017] 优选地,进行加应力的步骤直到在生物假体组织上待被加帽的新暴露位点增加至少 10%。另一种测量是加应力到组织直到在生物假体植入组织中的损伤水平增加大约 10%。可选地,进行加应力至少直到在生物假体植入组织中的酸生产率减少大约 10%。

[0018] 首先加应力到组织和随后应用钙化缓和剂到那里的步骤可以进行多次。另外,首先加应力到组织和随后应用钙化缓和剂到那里的步骤可以用不同钙化缓和剂进行至少两次。

[0019] 本发明的另一方面是处理生物假体植入组织以减少体内钙化的方法,其包括周期性加应力到生物假体植入组织直到在生物假体植入组织中酸生产率减少大约 10%,和随后应用钙化缓和剂到受应力组织。期望地,生物假体植入组织包括生物假体心瓣膜,并且加应力的步骤包括使心瓣膜经受通过它的脉冲流体流动。可以进行加应力的步骤直到生物假体植入组织的酸水平的增加速度稳定。钙化缓和剂可以是具有至少一种可以结合钙或磷酸酯和 / 或免疫原性结合位点的成分的连接剂溶液。可选地,钙化缓和剂包含包括长弹性分子的连接剂溶液。

[0020] 本发明的另一方面是处理生物假体心瓣膜以减少体内钙化的方法,其包括在模拟的流体流动系统中安装生物假体心瓣膜,使生物假体心瓣膜经受至少 100 个循环的脉冲流体流动,然后应用钙化缓和剂到生物假体心瓣膜。期望地,使生物假体心瓣膜经受至少 100,000 个循环的脉冲流体流动。首先使生物假体心瓣膜经受脉冲流体流动和随后应用钙化缓和剂到那里的步骤可以进行多次。首先使生物假体心瓣膜经受脉冲流体流动和随后应用钙化缓和剂到那里的步骤可以用不同钙化缓和剂进行至少两次。优选地,进行该经受步骤直到生物假体植入组织的酸水平的增加速度稳定。钙化缓和剂可以是具有至少一种可以结合钙或磷酸酯和 / 或免疫原性结合位点的成分的连接剂溶液。可选地,钙化缓和剂包含包括长弹性分子的连接剂溶液。

[0021] 在以下说明书和权利要求中,特别是当结合附图考虑时,阐明本发明的性质和优势的进一步理解,在该附图中相同部分具有相同的参考数字。

附图简述

[0022] 图 1 为显示在数种不同的化学处理后,牛心包组织中的醛和酸含量的图;

[0023] 图 2 为将体内组织钙含量与三种不同方式处理的组织的相应酸和醛含量关联起来的图;

[0024] 图 3 为图解在被损伤（被切碎）之前和之后的戊二醛处理组织的酸含量图；

[0025] 图 4 为显示以一种特定方式处理并且受到增加量弯曲循环的组织的酸含量图；

[0026] 图 5 为一图，其显示以与图 4 中图的组织相同方式处理并且受到增加量弯曲循环，和随后用钙化缓和剂——在该情况中为加帽剂——处理之后的组织的酸含量；

[0027] 图 6 为显示在加速磨损试验装置 (AWT) 中随着增加的循环来自于整个假体心瓣膜的酸产生水平的图；和

[0028] 图 7 为显示存在的钙化缓和过程如何大大地降低在经受弯曲循环的组织带 (tissue strip) 中的酸水平的图。

优选实施方式的描述

[0029] 与仅关注“处理组织 (as-processed tissue)”而没有任何考虑组织钙化倾向如何由于施加的使用应力而改变的现有技术不同，本发明提供了相信大大地降低植入后钙化可能性的改进的生物假体组织处理方法。在这个意义上“生物假体组织”至少表示在生物假体心瓣膜中通常使用的牛心包和完整猪瓣膜，生物假体心瓣膜必须耐受数年和甚至数十年而没有钙化。可以通过处理而改进的其它组织包括血管、皮肤、硬脑膜、心包、小肠粘膜下层 (“SIS 组织”)、韧带和腱。本申请中“植入物”不仅指心瓣膜，而且指血管假体和移植物、组织移植物、骨移植物和眼眶植入物覆盖物 (orbital implant wraps) 以及其它。

[0030] 本申请中的“生物假体心瓣膜”指至少部分地由生物假体组织制成的全装配假体瓣膜。在所谓的“无支架 (stentless)”生物假体瓣膜中使用一些完整猪瓣膜，在所谓的“无支架 (stentless)”生物假体瓣膜中如果任何合成材料被加入用于支持或固定的目的，其存在是非常少的。“支架式 (stented)”生物假体瓣膜典型地具有用于小叶的一些合成（例如，聚合物或金属）支持形式，如所说明，其可以是完整的猪异种移植小叶或分开的牛心包小叶。

[0031] 现有的组织处理方法针对交联、微生物和在“静态”装置中组织的其它方面，并且典型地包括使组织在戊二醛、吐温（聚氧乙烯 20 山梨糖醇单油酸酯）、乙醇、甲醛和其它物质中浸渍，以缓和植入后的钙化。一些现有技术方法包括在静态或动态（搅动）装置中加入各种化学品，以便通过使用金属离子（也就是 Al^{3+} 或 Fe^{3+} ，参见美国专利 5, 746, 775, Levy）或整体封闭剂 (bulk blocking agents)（也就是 2-氨基油酸，参见美国专利 4, 976, 733, Giradot）以降低交联组织的毒性或减轻钙化。但是每一个这些现有技术过程方法仅应用于最初处理的组织而不应用于“使用装置 (service setting)”中的组织或组织装置。现有技术方法局限于加入化学或生物制剂到临时附着于组织的交联组织，或者它们局限于在没有加入任何“加帽剂”的情况下仅还原或氧化组织（参见美国专利 5, 862, 806, Cheung）。

[0032] 与各种现有技术组织处理不同——在现有技术中目标是固定（也就是交联等）组织，本发明描述了另外的方法，通过该方法，由固定过程形成的酸和其它可能的结合位点，以及从固定组织的弯曲和其它体内使用相关的应力 - 诱导的损伤产生的“结合位点”和“可能的结合位点”被“加帽”。通常用戊二醛、吐温（聚氧乙烯 20 山梨糖醇单油酸酯）、乙醇、甲醛和其它物质处理的组织可以提供有用的组织固定。然而，组织的固定将也产生能够与钙、磷酸酯、免疫原性因子、其它钙化前体相互作用或吸引钙、磷酸酯、免疫原性因子、其它钙化前体的“结合位点”。例如，在戊二醛固定组织后，有许多带负电荷的羧酸基团形成，并且这

些基团能够吸引钙离子（由于它们的负电荷并且与带正电荷离子的静电相互作用），导致组织钙化或不利的细胞相互作用。

[0033] 如同在谷氨酸或 γ 羧基谷氨酸中发现的，已知羧酸基团结合钙原子 (Hauschka 等 PNAS 1975 72 :3925)。钙结合蛋白质例如骨涎蛋白含有目的是吸引和结合钙的富羧酸结构域，导致羟基磷灰石形成（钙化）。在这些蛋白质中酸基团的总体水平和位置决定蛋白质有效结合钙和形成羟基磷灰石（钙化）的能力。术语组织的“酸化潜力 (acid potential)”是指在固定组织内通过任何方法例如氧化、脱水、水合、或类似的方法能够或可以最终形成酸基团或“结合位点”的这些化学官能团的水平。

[0034] 本发明利用使已经处理的组织经受应力或弯曲（固定组织的微纤丝损伤）将产生另外的酸结合位点的事实。这通过故意地损伤这种组织来说明，在这种组织中这种损伤如图 3 中显示显著地增加结合位点。与静态或未弯曲的组织比较，戊二醛交联组织的周期性弯曲也将增加组织中的酸水平（图 4）。弯曲或受应力的组织现在具有较高的“酸化潜力”和增加的钙化或免疫原性应答刺激的倾向。静态形成和应力诱导的位点的“加帽”将减少组织的整体“酸化潜力”和降低钙化与免疫原性应答的风险，并且其是本发明的基本前提。

[0035] 本发明人已经发现，生物假体材料，特别是用于心瓣膜小叶的组织，经历显著的植入后损伤，这往往破坏任意组织固定处理方法的一些有利效果。具体地，在植入后，在它的体内“使用”型环境中，组织小叶的重复应力弯曲可对胶原纤丝和小叶的其它区域产生微损伤，这取决于弯曲的严重性。这种渐进的小叶损伤过程可以产生为钙化和免疫原性相关通路的前体的新结合位点或潜在结合位点。本发明描述在植入体内之前给这种应力诱导的结合位点加帽的方法。

[0036] 本发明的一个目的是酸基团的永久“加帽”，这将显著降低它们吸引钙、磷酸酯、免疫原性因子或其它基团的能力。一旦酸基团形成或当酸基团通过重复的弯曲或应力而形成时，这可以通过例如给它们加帽来完成。术语“加帽”指封闭、去除或改变先前已对生物假体功能有不良作用的一些基团。例如，加入 1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺（琥珀酰-NHS）和乙醇胺将有效地用非反应性醇基团给酸基团加帽。

[0037] 除了酸结合位点，用戊二醛或其它含醛物质处理的组织也产生具有许多游离醛基团的组织，其引起增加的毒性、较高的钙化和免疫原性应答的产生。这些醛基团通过空气氧化、体内血液氧化、巨噬细胞氧化和其它类似氧化路径可以容易地氧化成为羧酸基团（上述）。另外，如酸结合位点的情况，通过固定组织的增加和重复的弯曲或应力可以产生生成更多结合位点或酸基团的另外的醛。例如，用戊二醛处理和随后加应力或弯曲的组织也将促进从醛产生酸。因此，本发明另外的目的包括永久使为潜在结合位点的醛基团加帽，其方式为将阻止它们转化为酸或其它基团的能力并且因此进一步减轻身体内（体内）的钙化潜力。除了酸和醛，还有其它可能的结合位点例如免疫原性和抗原因子，它们被包括在本发明的范围内。

[0038] 本发明的加帽方法包括组织的化学还原，当在弯曲之前、期间或之后加帽剂存在时应用于组织时，组织的化学还原将永久地将加帽剂与目标基团连接。例如，在弯曲期间，当醛基团形成时，添加牛磺酸到组织将使牛磺酸基团加帽于（或覆盖）醛基团，并且还原剂氰基硼氢化钠将减少醛和牛磺酸基团之间的临时希夫碱键。醛基团最终替换为可有利于组

织水合、柔韧性和细胞相互作用的磷酸盐基团。另一优选的策略是给酸基团加帽并且包括加入 EDC、硫代-NHS 和乙醇胺。当然,可以使用其它加帽剂替换乙醇胺,并且本领域技术人员知道除了氰基硼氢化钠之外的其它还原剂,而且它们被包括在本专利的范围内。这种新的“被加帽”基团将显著地减少钙、磷酸酯、免疫原性因子或其它类似物质的吸引。

[0039] 示例性加帽剂可以选自以下清单:胺,包括烷基胺、氨基醇、乙醇胺;氨基酸,包括赖氨酸、羟基赖氨酸;氨基磺酸盐,包括牛磺酸、氨基硫酸盐、葡聚糖硫酸盐、软骨素硫酸盐;亲水性多官能聚合物,包括聚乙烯醇、聚乙烯亚胺;疏水性多官能聚合物, α -二羰基,包括甲基乙二醛、3-脱氧葡萄糖醛酮;乙二醛;酰肼类,包括脂肪;酰肼,N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯;碳二亚胺类,包括1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-环己基-N'-(2-吗啉乙基)碳二亚胺(CMC)、1,3-二环己基碳二亚胺(DCC);2-氯-1-甲基碘代吡啶(CMPI);抗生素;细胞募集剂;血液相容剂,例如肝素;抗炎剂;抗增殖剂;免疫抑制剂;还原剂,包括氰基硼氢化钠、硼氢化钠、亚硫酸氢钠+乙酰丙酮、甲酸+甲醛;和单环氧烷烃、二环氧烷烃或聚环氧烷烃。

[0040] 通过“连接”结合位点和含有至少两个或多个互补反应性官能团——其特定于由应力损伤产生的新形成的官能团或其它可获得的附近官能团——的长弹性分子(加帽功能),在组织结构中的损伤位点处产生将作为弹性加强或吸震弹簧成分的长分子交联。这将随后阻止上述的级联故障(cascade failure)。在邻近的附着位点情况下,潜在钙化的最初损伤(官能团,也就是酸)位点可以受益于被加帽,其受益方式如关于给酸基团“加帽”所述,并且在同时发生或随后的处理中可以被“连接”。术语“加帽”剂或“连接”剂都指用于处理预加应力组织以减轻将来可能的钙化的物质(即,钙化缓和剂)。

[0041] 下表提供各种示例性连接剂;以及它们可能的目标和共反应剂;和可能的二级处理和它们的共反应剂:

聚合物/低聚物 (oligamer)	例子	官能团 X-连接目标	共反应剂 (一种或多种)	可能的二级处理 (一种或多种)	共反应剂
合成物					
胺		醛 酸 醇	EDC/S- NHS DSC	还原	NaCNBH ₃
- 双官能的	氨丙基-封端的聚				
聚合物/低聚物 (oligamer)	例子	官能团 X-连接目标	共反应剂 (一种或多种)	可能的二级处理 (一种或多种)	共反应剂
	四氢呋喃				

- 多官能的	聚乙烯亚胺			肝素 / 还原	NaCNBH ₃
酸		胺醇	EDC/S-N HS CMPI		
- 双官能的	聚乙二醇二酸 - 封端的				
- 多官能的	异丁烯 - 马来酸共聚物			加帽 磺化	乙醇胺 牛磺酸
醇		酸胺	CMPI DSC		
- 双官能的	聚氨酯 - 二醇封端的				
- 多官能的	聚乙烯醇			磺化	三乙胺 + 三氧化硫
环氧乙烷		胺 酸 醛	pH 8 NaBF ₄		
- 双官能的	聚乙二醇二缩水甘油醚				
- 多官能的	(邻 - 甲苯基) 缩水甘油醚 - 甲醛共聚物				
硅氧烷	羟基 - 封端的聚二甲基硅氧烷	酸 胺	CMPI DSC		
聚合物 / 低聚物 (oligamer)	例子	官能团 X- 连接目标	共反应剂 (一种或多种)	可能的二级处理 (一种或多种)	共反应剂
天然物					

葡萄糖胺聚糖					
	肝素				
	透明质酸				
	软骨素硫酸盐				
多糖					
	羟乙基淀粉				

聚合物 / 低聚物 (oligamer)	例子	官能团 X- 连 接目标	共反应剂 (一种或多 种)	可能的二级 处理 (一种 或多种)	共反应剂
	纤维素				
	葡聚糖				
	壳聚糖				
蛋白质					
	胶原				
	弹性蛋白				
	凝血酶				
	层粘连蛋白				
	肌联蛋白				

[0042] 其中 :EDC :1- 乙基 -3-[3- 二甲基氨丙基] 碳二亚胺盐酸盐 SNHS :N- 羟基琥珀酰亚胺 DSC :N,N- 二琥珀酰亚胺基碳酸酯 CMPI :2- 氯 -1- 甲基碘代吡啶 NaBF_4 :四氟硼酸钠 NaCNH_3 :氰基硼氢化钠

[0043] 优选的加帽剂的作用不仅封闭将吸引钙、磷酸酯、免疫原性因子、或其它类似物质的官能团,而且用优良的“生物功能性 (Biological functionality)”替换那些基团。生物功能性定义为组织成分对植入材料的局部生物学的作用。组织处理的改进的生物功能性可以包括组织总电荷 (overall charge) 的减少、更好的血液相容性、增加的组织水合、更好的细胞相互作用、更好的柔韧性等。例如,用牛磺酸加帽于醛官能将阻止醛基团氧化成为酸并且将其替换为可有益于组织水合、柔韧性和细胞相互作用的磺酸盐基团。被加帽的组织的

期望生物功能性将决定使用的成帽化合物的类型。

[0044] 加帽策略也旨在阻止可有助于不良细胞反应的组织成分的生物功能性。这些目标中的一些包括但不限于 α -gal、MHC-1 相关蛋白质、HLA 抗原等。因此,本发明也涉及加帽于或封闭蛋白质、糖类、脂类和可有助于细胞反应的其它组织成分。例如, α -gal 糖可以通过用 2-氯-1-甲基碘代吡啶 (CMPI) 和本领域技术人员所知的中和羟基的其它物质处理进行封闭。另外一个例子包括可以通过用 EDC 和牛磺酸处理而被加帽或有效中和的 MHC-1 相关蛋白质。本发明加帽方法中也包括与细胞和血管残留物 (remnants) 相关的蛋白质、糖类或脂类的目标。例如,纤连蛋白可以通过加入甲基乙二醛到组织而被加帽或封闭。已知这种二巯基结合蛋白质内关键的精氨酸官能并且损害这些蛋白质的生物功能性。

[0045] 另一方面,本发明在灭菌后提供自动加帽。例如,在 γ 照射灭菌之前,用特定的加帽剂 (例如葡萄糖和牛磺酸) 处理组织,在照射后将产生加帽剂的活化。加入到组织的加帽剂将立刻有效地加帽于组织内的目标,但是灭菌 (也就是,用环氧乙烷或 γ 照射) 将产生新的结合位点,其随后将被组织内残留的加帽剂加帽。已知胶原的 γ 照射裂解主链内的肽键并产生可能对组织有不良作用的新官能团。这些新官能团是本发明中所述的目标或结合位点,并可以通过本文列举的加帽剂加帽或封闭。

[0046] 除了在固定期间一些搅拌或加压外,在现有技术的瓣膜和装配瓣膜中使用的组织不经受在植入后出现的应力或损伤量。实际上,在固定和瓣膜组装后,组织典型地被静止地浸没在处理溶液中。在本发明的情况下,如前面提到的“完全固定的生物假体组织”指已经受到至少一些交联和 / 或其它处理以使其稳定和耐用的组织,其基本上准备就绪进行植入。不同组织和不同交联处理要求不同的时间段以完全固定生物假体组织,并且固定过程的持续时间因此是相对的。生物假体组织的固定预期期望包括用通常为戊二醛的交联剂处理;或在 EDC/SNHS 化学的情况下,用己二胺和 / 或辛二酸处理;或对于代那考尔 (Denacol) (环氧) 化学,用丁二醇二缩水甘油醚处理。

[0047] 本发明的一方面是其中固定的生物假体组织或装配的瓣膜被预处理、预加应力、或预损伤 (其中“预”指在植入前) 并随后经受加帽剂的方法。这种植入前加应力是除了由固定所需的任意搅动或加压引起的应力之外。

[0048] 这里,在一种实施方式中,本文公开的方法通过预加应力于生物假体组织并随后“加帽”于任意的新的钙化位点,预先制止植入后损伤和随后的钙化倾向。例如,本发明的一个实施方式包括在植入之前,损伤 (“预处理”) 或加应力到部分固定的生物假体组织心瓣膜小叶和其它组织成分 (类似于在植入后的施加到瓣膜上的应力), 并且随后阻止或加帽于任何新暴露的可能以其它方式引发钙化的结合位点。例如,在被浸没在加帽剂溶液的同时,心瓣膜小叶可以被重复地加应力 (例如,弯曲), 加帽剂可以加帽于新的、刚暴露的钙或磷酸酯结合位点 (酸、醛等)、或可以吸引抗原和可以引发免疫原性应答的各种不利细胞和蛋白质成分 (即细胞残留物、血管细胞等) 的位点。可选地,心瓣膜小叶可以被预加应力,例如通过重复的弯曲和随后浸没在加帽剂溶液中,或这些中的一些组合。

[0049] 免疫原性因子定义为引起或参与免疫原性应答的任何物质。这包括能够诱导免疫型应答的任何化学或生物制剂。例如,组织中留下的血管和细胞膜成分可以引起来自于体内的天然免疫系统的一些类型的免疫原性或抗原应答。本发明包括能够静态或动态地掩蔽、代替、或封闭组织中这些免疫原性元件的加帽剂。例如,完整的瓣膜在固定后可以被弯

曲并且随后用非免疫原性或更加血相容的加帽剂例如肝素进行加帽。这不同于将肝素添加到固定的组织而没有任何的瓣膜弯曲或没有考虑处理后使用条件的现有技术方法。本发明方法可以用去细胞化 (decellularization) 方法来补充,以减少免疫或抗原结合位点和潜在的结合位点,并且其也在本发明的范围内。

[0050] 为了更好地理解为本发明处理方法基础的原理,基于实际试验,提供了在图 1-5 中的多个图表。如上提到的,本发明一般包括处理受应力或损伤的(弯曲的)组织,使得钙或磷酸酯结合位点、或可能引发钙化的其它这类位点被封闭。酸结合位点和组织钙化之间的相关性是引人注目的(图 2 和 Hauschka 等 PNAS 1975 72 :3925),并且众所周知的事实是酸模板化 (acid templating) 指引多种种类的矿化。因此,在植入时组织中增加量的游离酸和 / 或醛与这些结合位点的数目相关,并且因此增加了钙化的可能性。组织中存在的游离酸和醛的量可以通过已知的方法测量,特别是标准的分光光度检测。

[0051] 图 1 为显示牛心包组织中的游离醛和游离酸含量——通过前述技术测量——的图。应该理解的是,所有在本文提到的实验包括戊二醛固定的牛心包组织。研究的组织都被化学处理,一种只用戊二醛,而其它两种利用已经被 Edwards Lifesciences 用来制备商业植入用生物假体组织的组织处理。然而,其它交联和组织处理方法可以被使用并且在本发明的范围内。

[0052] 化学处理后,测量组织的醛和酸含量,并且没有给与组织任何损伤或应力。在图 1 的图右侧,组织样品只在戊二醛中处理,具体地在 0.625% 戊二醛溶液中处理 14 天的时间。总计 10 个样品被处理并随后被测试。测量显示每毫克干重组织有大约 40 纳摩尔醛和大约 17 纳摩尔酸的平均水平。

[0053] 图 1 的图中间显示来自于经受处理 A 的总计 10 个组织样品测试的结果,处理 A 商业上被称为 XenoLogiX™ 组织处理方法,来自于加利福尼亚州 Irvine 的 Edwards Lifesciences。处理 A 包括首先用戊二醛固定,随后用包括交联剂例如甲醛、表面活性剂例如吐温-80(聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)和变性剂例如乙醇在内的杀菌剂处理两次。受到处理 A 的组织的醛和酸的含量都小于单独用戊二醛处理的,其中醛含量减少了大约 25% 而酸含量减少大约 50%。这种减少归因于磷脂的进一步还原,磷脂是酸结合位点的来源。

[0054] 图 1 的左边显示来自于经受处理 B 的总计 10 个样品测试的结果,处理 B 商业上被称为 Carpentier-Edwards ThermaFix™ 组织处理方法,来自于 Edwards Lifesciences。处理 B 与处理 A 基本相同,除了在固定后和灭菌前增加热处理步骤之外。受到处理 B 的组织的醛和酸的含量都小于单独用戊二醛处理的,其中醛含量减少了大约 33% 而酸含量减少大约 50%。另外,相对于处理 A,处理 B 减少了 10-20% 之间的醛和酸含量。

[0055] 图 2 为对图 1 中显示的三种组织处理重复醛 / 酸含量测量结果的图,并且从单独研究,也添加了来自于皮下植入兔中的相似组织样品的钙摄入的测量。在植入之前,测量组织中的这些酸水平,并且其在体内可能增加。图 2 显示在植入组织中发现的钙量与来自于三种组织处理的醛 / 酸的水平基本相关。即,当在各种组织样品中游离醛和游离酸的水平降低时,植入后吸收的钙量也减少。再次,应当理解的是许多因素有助于钙摄入,但是某些钙和磷酸酯结合位点的可用性以及其它因素是将来钙化的主要指标。图 2 的图因此表明降低组织中醛 / 酸的水平将减少组织钙化的倾向。

[0056] 如以上提到的,现在应当理解的是,生物假体组织的植入后损伤或受应力产生酸

和醛钙化结合位点的显著增加。这种现象的证据在图 3 的图中提供。具体地,如以上所解释,组织中的酸水平与植入后的钙化倾向直接相关。图 3 表明在对其损伤之前和之后各种组织样品中的酸水平。四种类型的组织样品是新鲜未处理的组织、戊二醛-固定的组织和用处理 A 或 B 处理的组织。关于损伤的条件,组织被切碎成为小片。注意,切碎组织样品中的酸水平大大超过非损伤组织中的酸水平。在体内使用期间周期性损伤也可产生损伤和产生另外的结合位点。

[0057] 当然,用于植入的生物假体组织不经受切碎的极端损伤,尽管如此,来自于增加的应力或损伤的增加酸水平出现于在使用环境中的重复(周期性)的小叶运动。这通过图 4 显示,图 4 显示在已经经受增加量的弯曲循环后,经受处理 A 的很多组织样品中测量的酸含量。每个组织样品首先依照处理 A 进行制备。如果一个人假定每分钟 72 次跳动的正常平均心率,则每天循环的数量等于 $72 \times 60 \times 24 = 103,680$ 。以这个速率, 7×10^7 的最终测量对应于 675 天、或少于两年。如所预期的,图 4 显示增加量的弯曲(微胶原纤维损伤)增加酸结合位点的水平。酸水平开始增加得相当迅速,并且随后逐渐地平稳。因此在开始的“磨合”期后,微损伤的速率和酸结合位点的相关产生得到减少。这种作用类似于汽车引擎的初始“磨合”期。

[0058] 图 5 是图,其显示当组织被周期性地损伤时,组织中带电荷酸生产水平的另一个图示。图 5 中也显示在特定量的弯曲循环后(这个情况中是一百万)后,“加帽”预弯曲(“预处理”)组织的一个例子。重要的是,当这种预处理和加帽的组织随后以类似方式被进一步弯曲时,甚至在另外一百万次弯曲循环后,进一步的酸结合位点的产生被显著地减轻。在这个实验中使用的酸帽化处理包括被弯曲组织在 90mMEDC、5mM 硫代-NHS 和 50mM 乙醇胺中进行 60 分钟培育。在组织已经经历酸成帽过程后,组织被放回弯曲试验装置中,并且弯曲另外一百万次循环。组织带 ($n = 8$) 随后被移走并测量酸。

[0059] 基于前面的以试验为依据的结果,本发明人相信给予生物假体组织的植入后损伤极大促进组织钙化的倾向。具体地,心瓣膜小叶每年受到成百万次应力循环,即在心脏收缩-心脏舒张循环期间的小叶弯曲。这种重复的组织小叶弯曲对胶原纤维和组织小叶的其它结构产生局部化微损伤,这依赖于局部弯曲和其它应力的严重性。这种渐进的小叶损伤过程可以产生先前没有检测或识别到的新的结合位点,作为钙和磷离子的潜在附着位点,由此引起钙化。

[0060] 为了在完整的假体心瓣膜上说明前面提到的原理,图 6 为显示在加速磨损试验装置(AWT)中,在心瓣膜中随着增加的循环酸产生水平的图。测试的具体瓣膜是 Carpentier-Edwards® Perimount Magna™ 主动脉心瓣膜,并且 AWT 是用于验证当前产品的耐久性的标准加速磨损试验装置。在优选的实施方式中,修改的磨损试验装置将被用于模拟植入环境的循环弯曲,植入环境比目前用于验证的 AWT 的环境简单。结果表明增加量的弯曲(微胶原纤维损伤)增加酸结合位点的水平。

[0061] 图 7 是显示本钙化缓和如何大大地降低在经历数百万次弯曲循环的组织带中的酸水平的图。牛心包组织带经历简单的弯曲。在一百万次弯曲时,一些样品依照本发明处理以缓和应力损伤(“加帽”于酸结合位点)。具体地,用含有 50mM 牛磺酸和 50mM 硼氢化物的醛加帽剂处理组织。随后在加帽样品和在 100 万次循环时未处理的样品之间测量的酸含量的差异是大约 $20 \text{ nmol} / \mu \text{g}$ 组织。本发明人相信这种酸水平上的差异将大大地降

低加帽样品中的植入后钙化的水平和速度。同样地,经历本文描述的预应力和钙化缓和过程的完整心瓣膜将也显示钙化上的降低,并且因此在耐用性和寿命上显示改进。

[0062] 为了帮助预防这种植入后损伤-钙化过程,本发明包括预处理、预损伤、或预加应力于组织并通过连接或加帽于生成的增加的钙化引发位点来缓和。

[0063] 优选的实施方式包括但不限于放置在加速心瓣膜模拟使用试验装置或其它模拟重复小叶运动的装置中的完整瓣膜,特征是由植入到患者中(使用条件)后的瓣膜可见的,例如在以下的方法中:1. 固定的组织瓣膜在模拟的使用环境中循环,直到酸结合位点的比率开始减小(也就是大约0.5到2百万次循环),和随后被加帽。2. 固定的组织瓣膜在模拟的使用环境中循环,直到酸结合位点的比率开始减小,并且其在含有加帽剂的溶液中。3. 实施方式1和2,但是其中灭菌步骤在弯曲/加帽过程期间或之后加入。4. 实施方式1和2,但是其中处理被加速以减少整体处理时间。5. 实施方式1、2、3、4和5,但是其中加帽剂用于其它新形成的结合位点例如醛或生物免疫相关的位点。6. 醛成帽溶液可以含有在pH 7.4的100mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)缓冲液中的胺(50mM 牛磺酸)和还原剂(50mM 硼氢化钠)。7. 酸成帽溶液可以含有大约50-200mM EDC、大约1-10mM 硫代-NHS和10-100mM 乙醇胺。

[0064] 虽然发明已经以其优选方式描述,但是应该理解的是已经使用的语言是描述性的言语而不是限制性的。因此,在所附权利要求内可以进行改变,而不偏离发明的真正范围。

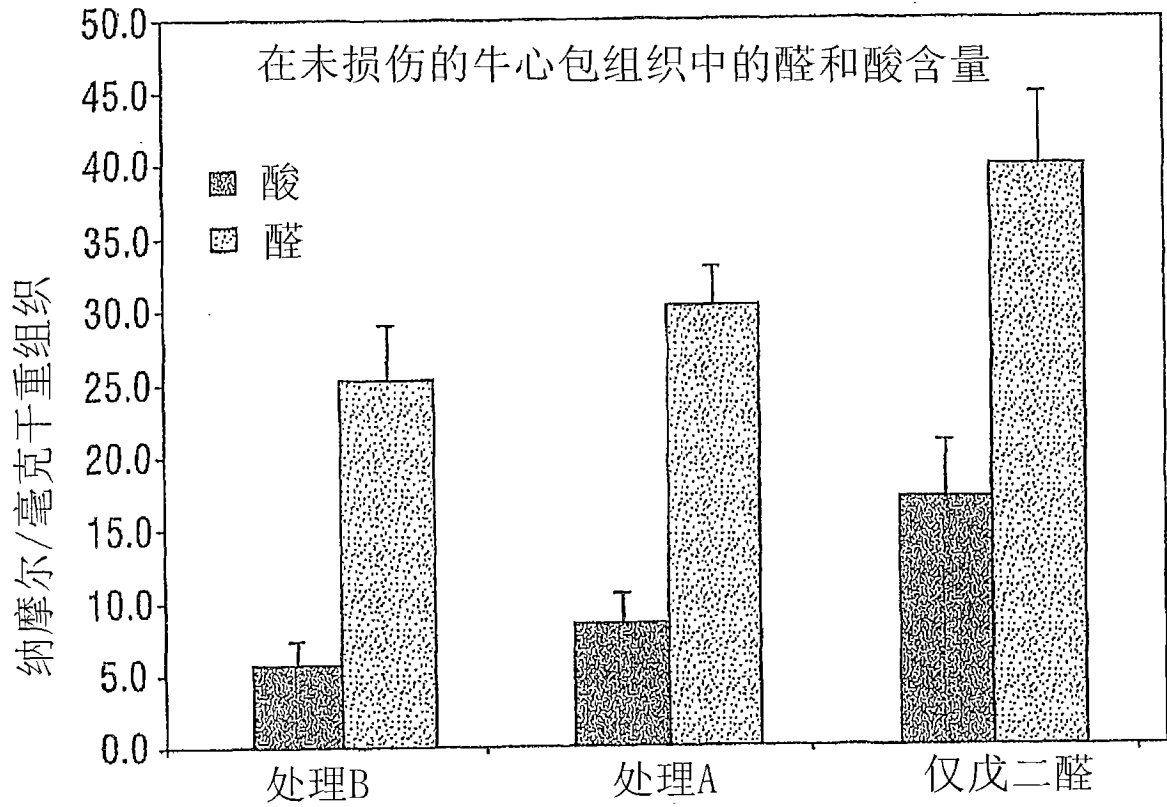


图 1

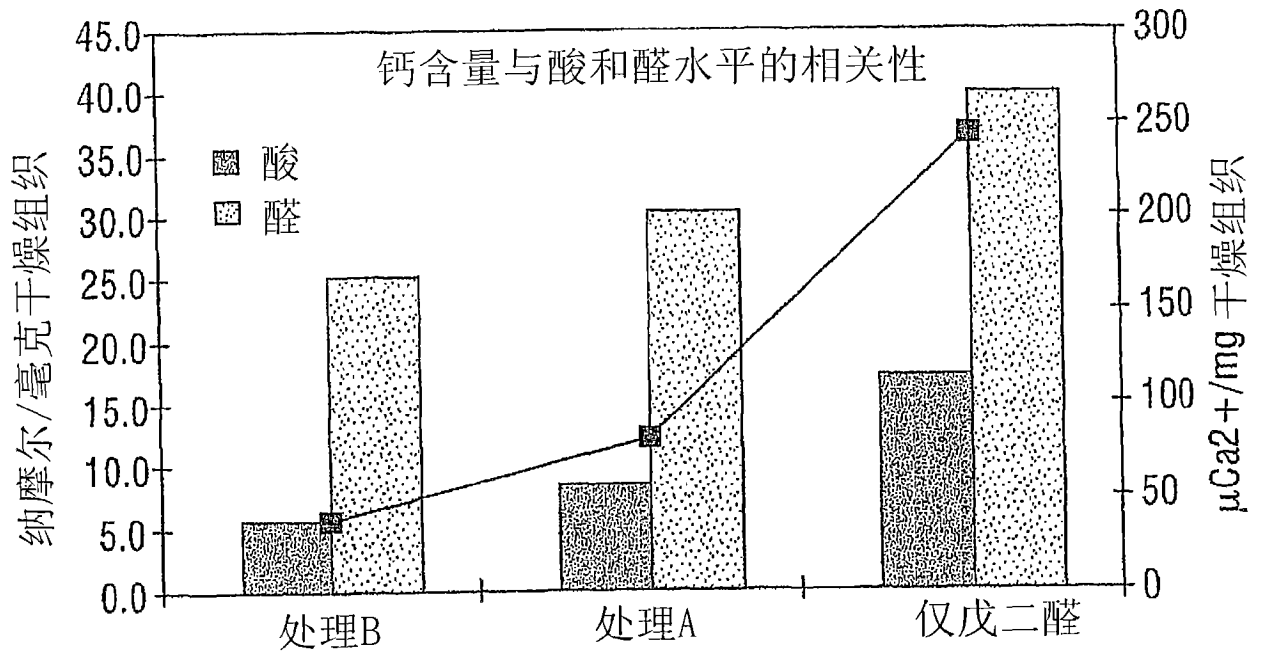


图 2

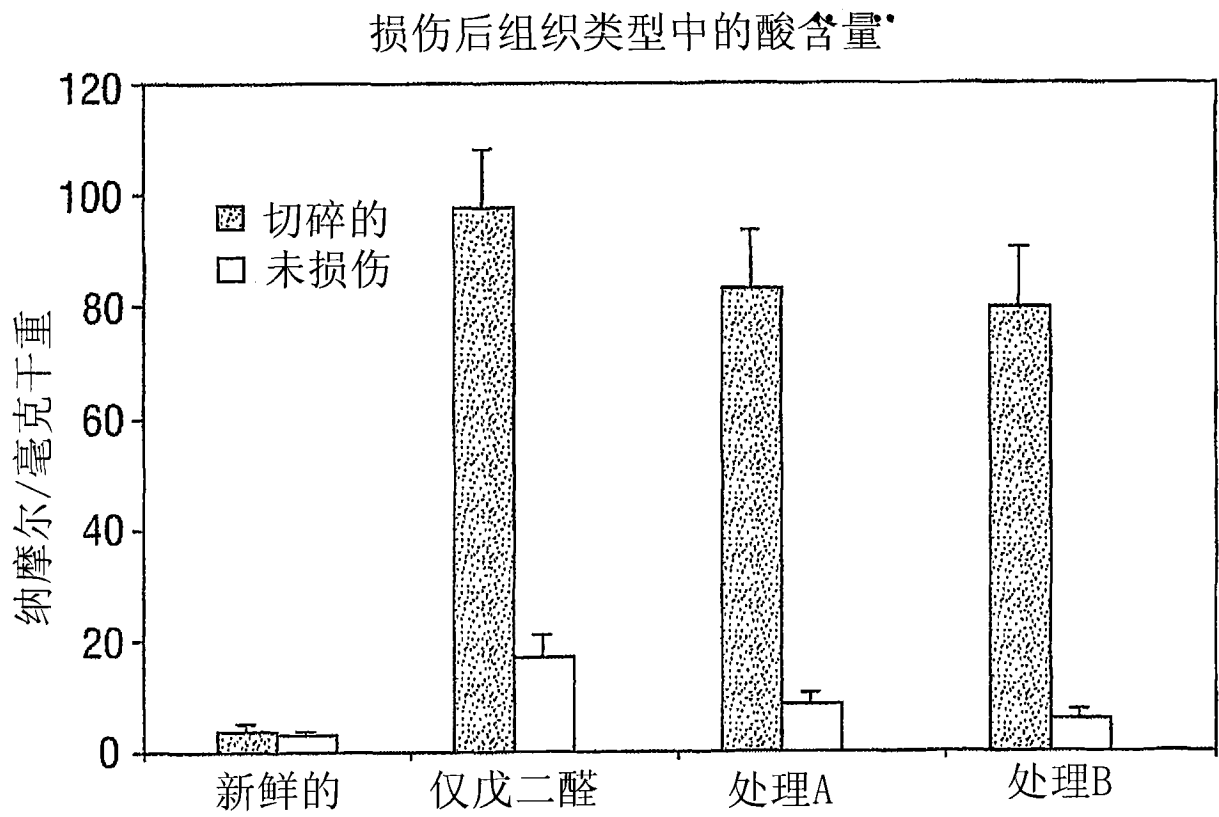


图 3

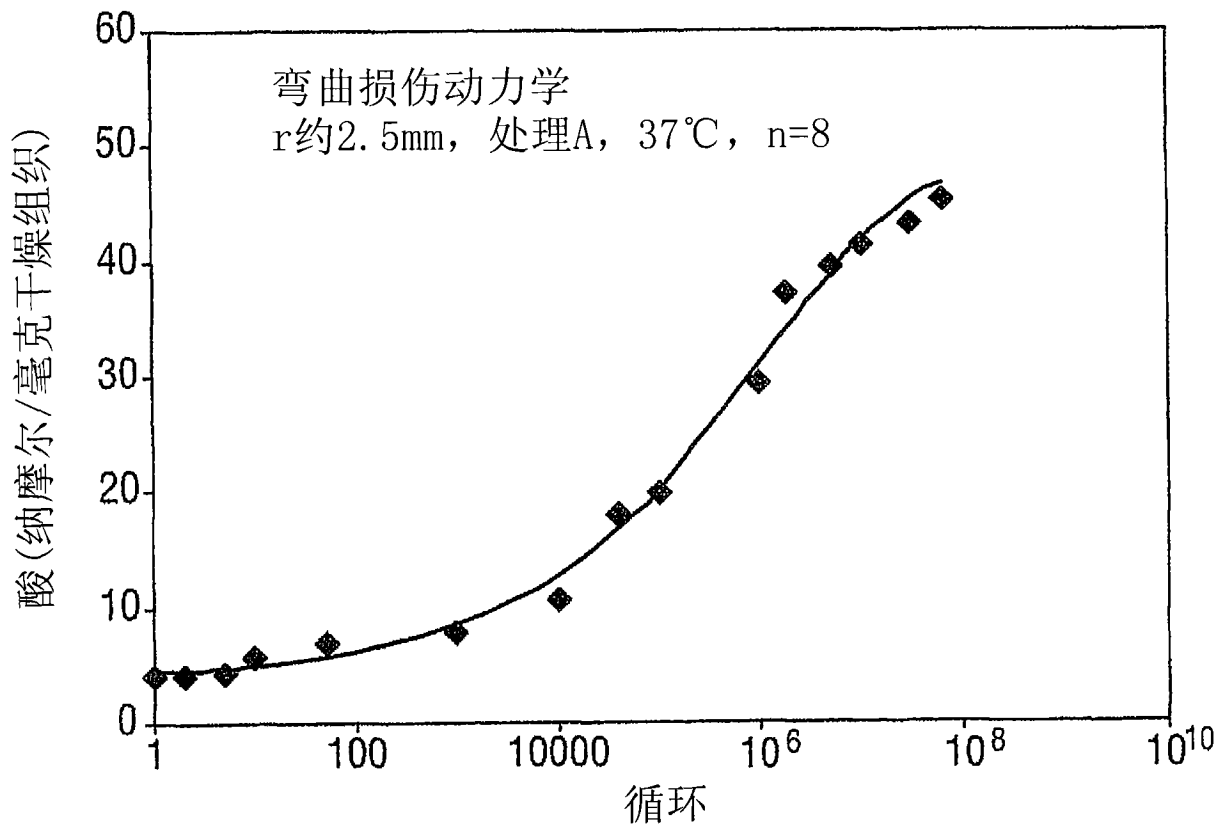


图 4

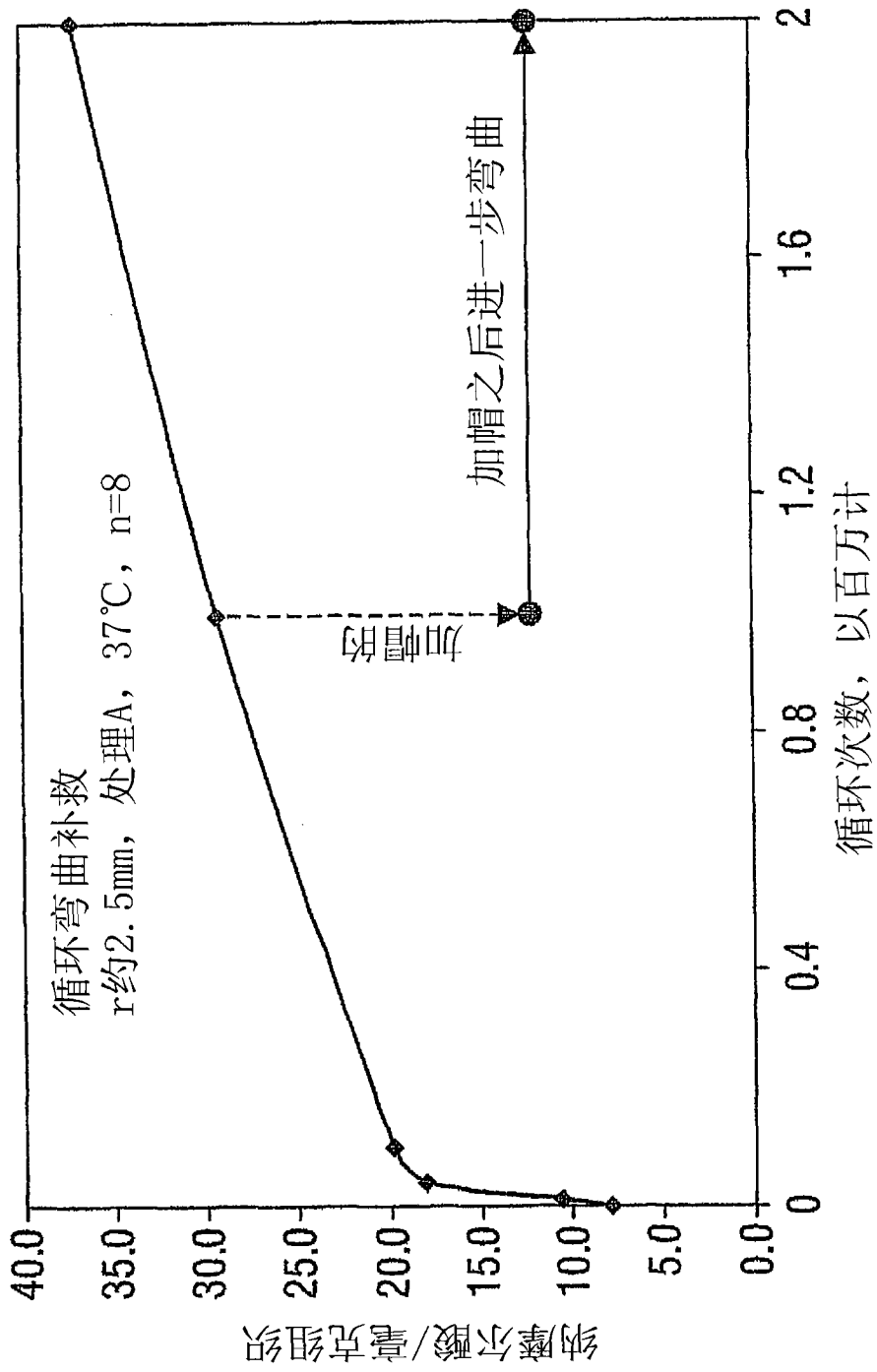


图 5

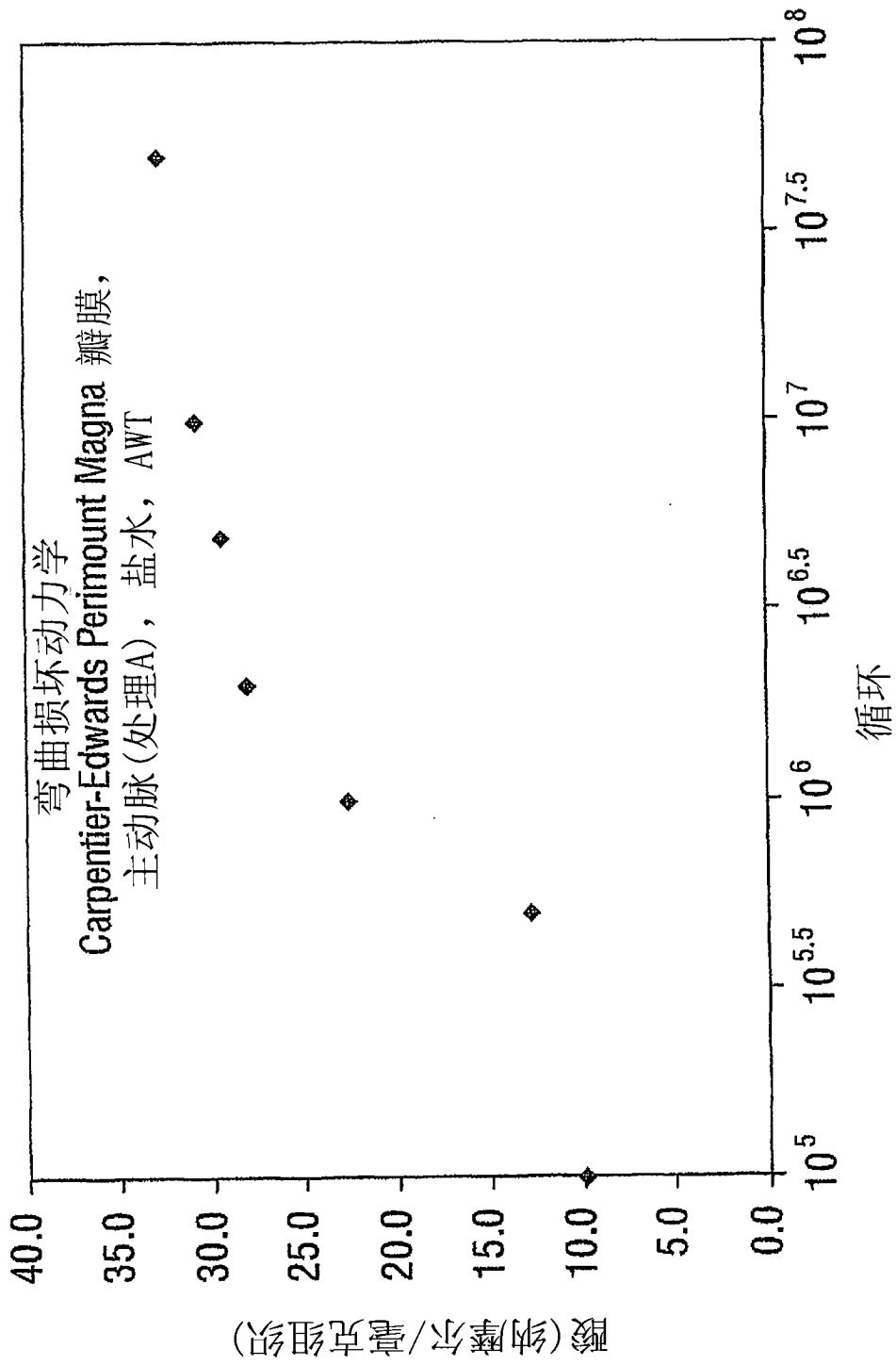


图 6

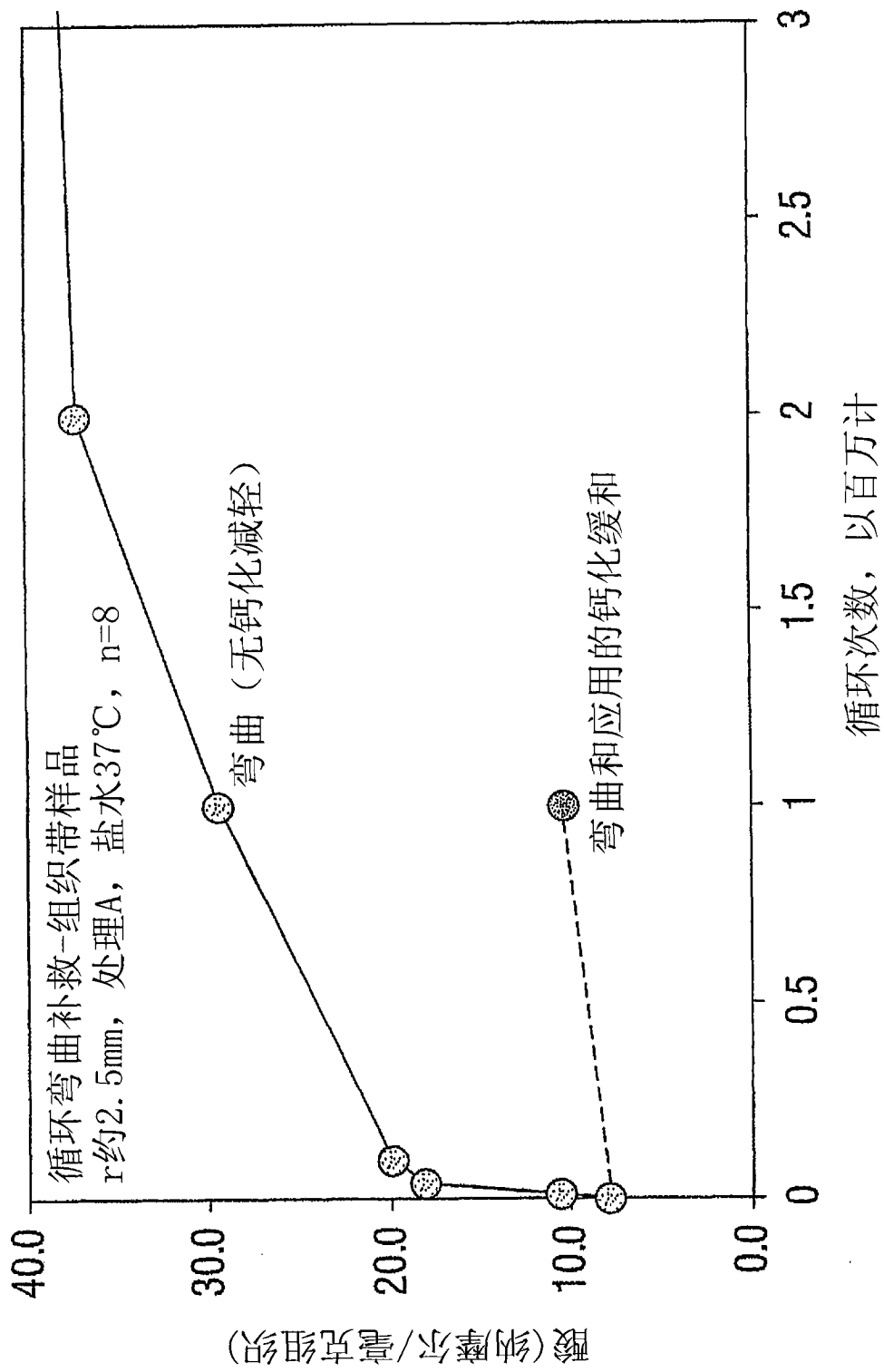


图 7