



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112292099 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 201980041598.X

(22) 申请日 2019.07.02

(30) 优先权数据

62/693,192 2018.07.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/000779 2019.07.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/008258 EN 2020.01.09

(71) 申请人 盖鲍厄-克洛波泰克佩坦特弗瓦尔

屯格斯-尤格公司

地址 德国诺伊豪森

(72) 发明人 彼得·J·克洛波泰克

(74) 专利代理机构 北京国昊天诚知识产权代理有限公司 11315

代理人 南霆 李有财

(51) Int.Cl.

A61F 2/14 (2006.01)

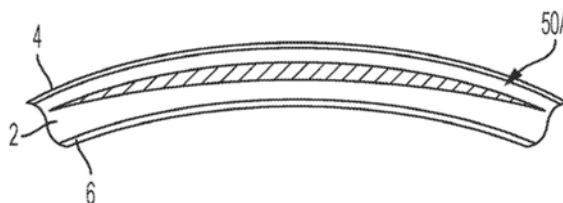
权利要求书4页 说明书19页 附图11页

(54) 发明名称

胶原蛋白支架的稳定

(57) 摘要

公开了形状稳定的胶原蛋白支架和获得这种稳定支架的方法。可以例如从人或猪角膜基质收获基质。所述基质可以在切除期间或在切除之后的单独步骤中成形。在成形(并且优选地脱细胞)之后,使所切除的基质部分经受压力、力或真空以减少流体含量,然后进行照射或以其它方式处理以诱导胶原蛋白链或原纤维的交联。可以采用各种能量源来诱导胶原蛋白的肽键交联,包含例如紫外(UV)辐射。也可以选择性地使所述支架致密化或图案化。本发明在形成用于加成眼科手术中的角膜内植入的稳定微透镜方面特别有用。



1. 一种由从供体角膜来源的中心区域切除的供体角膜基质形成支架的方法,其包括:
使供体角膜基质脱细胞以获得支架;
去除所述支架中存在的流体;以及
使所述支架的至少一部分交联以抑制随后的膨胀。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括:用角膜刀、激光或水射流对角膜进行微透镜取出,以获得供体角膜基质。
3. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括以下步骤:使所述支架成形,并且其中成形与所述供体角膜基质的切除同时地或顺序地进行。
4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述去除流体的步骤进一步包括:向所述支架施加压力、加速度(例如,离心力)或真空。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述脱细胞步骤进一步包括:用化学脱细胞剂处理所述支架,并且可选地,其中所述脱细胞步骤发生在去除水之前或之后,或者交联之前或之后。
6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述脱细胞步骤进一步包括:用洗涤剂或表面活性剂从所述支架去除细胞碎片。
7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括:酶促去除或在构象上改变所述支架的至少一个免疫原性表位。
8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述从所述支架去除流体并使所述支架交联的步骤导致所述支架的至少一部分的胶原蛋白密度大于原始切除基质。
9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述从所述支架去除流体的步骤进一步包括:压缩所述支架,由此被压缩和交联支架的至少一部分具有至少15%胶原蛋白、或至少30%胶原蛋白、或至少25%胶原蛋白或至少60%胶原蛋白的成分。
10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:将被压缩的支架的至少一部分暴露于交联促进剂或光化辐射。
11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:将被压缩的支架的至少一部分暴露于辐射,以便在或不在交联促进剂或其它能量介导剂的辅助下通过胶原蛋白原纤维之间的肽键形成诱导交联,并且可选地,其中,使所述支架交联的步骤进一步包括:用紫外辐射、X射线、 γ 辐射或电子束照射所述支架。
12. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:通过直接暴露或通过以掠入射角或经由耦合到所述支架的表面的隐逝波导暴露而将被压缩的支架的至少一部分暴露于紫外辐射。
13. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:将被压缩的支架的表面部分选择性地暴露于辐射,使得所述表面部分相较于所述支架的主体区域表现出更大的交联和更高的胶原蛋白密度。
14. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:施加足够的辐射以使任何微生物剂失活和/或对所述支架进行灭菌。
15. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述支架被配置成用作可植入的微透镜,其具有微透镜主体、使所述微透镜具有最终期望形状的前表面和后表面。
16. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:用交联剂或通

过选择性地施加图案化辐射来处理所述微透镜的所述后表面的至少一部分,以在植入患者的基质床中时促进所述微透镜与基质床的粘附。

17. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:增强所述支架的光学透明度。

18. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述支架表现出小于4弧分的散射角 θ 。

19. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述微透镜表现出小于3弧分或小于2弧分的散射角 θ 。

20. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述微透镜表现出小于1弧分的散射角 θ 。

21. 一种在减少辐射施加的情况下形成交联胶原支架的方法,所述方法包括:去除所述支架中存在的流体;以及使被压缩的支架经受辐射以使所述支架的至少一部分交联,以便限定最终期望形状并抑制随后的所述支架暴露于水性环境时的膨胀。

22. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括以下步骤:通过向所述支架的至少一个表面施加压力来压缩所述支架。

23. 根据权利要求22所述的方法,其特征在于,压缩所述支架的步骤进一步包括:将所述支架跨流体腔室中的开口固定,并向所述支架的一个表面施加流体压力以提供第一期望形状的支架。

24. 根据权利要求22所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括:在压缩之前使所述支架脱细胞,或者反之亦然。

25. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,使所述支架交联的步骤进一步包括:用紫外辐射、x射线、 γ 辐射或电子束照射所述支架。

26. 根据权利要求25所述的方法,其特征在于,照射所述支架的步骤进一步包括:用注量范围为约15焦耳/cm²到约2500焦耳/cm²的UV辐射,可选地用注量范围为约15焦耳/cm²到约600焦耳/cm²的UV-C辐射(约100nm到约280nm),并且优选地在一些情况下用约240nm到约280nm的UV-C辐射照射所述支架以诱导交联。

27. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,所述交联步骤进一步包括:增强所述支架的光学透明度。

28. 根据权利要求27所述的方法,其特征在于,所述支架表现出小于4弧分、或小于3弧分、或小于2弧分或小于1弧分的散射角 θ 。

29. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括:压缩所述支架,使得其表现出大于15%、或大于30%、或大于45%或大于60%的胶原蛋白浓度。

30. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,所述支架表现出的细胞物质的残留量,如以残留DNA或RNA含量测量,小于原始DNA或RNA含量的重量的1%,或小于0.1%或小于0.01%。

31. 一种胶原微透镜,其包括:

源于角膜供体来源的微透镜主体,其具有使所述微透镜具有期望形状的前表面和后表面;

所述微透镜主体进一步包括已至少部分交联以抑制轴向膨胀的胶原蛋白。

32. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,多层胶原蛋白通过施加辐射而交联,

并且所述微透镜由胶原蛋白原纤维之间的诱导化学键进一步表征。

33. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,使所述微透镜脱细胞,使得所述微透镜中残留的细胞物质的量,如以残留DNA或RNA含量测量,小于原始DNA或RNA含量的重量的1%,或小于0.1%或小于0.01%。

34. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜以期望形状形成,使得其可以被植入患者眼睛的基质区域中以改变角膜的屈光力。

35. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜具有盘状形状并且直径为约0.5毫米到约10毫米,并且可选地具有通过向所述微透镜的至少一侧施加压力而获得的曲率。

36. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜的最大厚度小于约600微米,小于约400微米,或小于约200微米,或小于约100微米或小于50微米。

37. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜由于免疫原性表位的去除或降解而表现出低免疫反应性。

38. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜的所述后表面进一步包括交联剂或可变交联的图案,以在植入患者的基质床中时促进所述微透镜粘附到基质床。

39. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述前表面进一步包括前表面区域,所述前表面区域相较于所述微透镜主体的主体区域具有更大的胶原蛋白密度。

40. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜具有曲率,所述曲率可选地通过向所述支架的一个表面施加压力而形成。

41. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,微透镜具有足够的光学透明度以用作角膜内植入物。

42. 根据权利要求41所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出小于3弧分、或小于2弧分或小于1弧分的散射角 θ 。

43. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜已耗尽流体,并且可选地被压缩,使得其表现出大于15%、或大于30%、或大于45%、或大于60%的胶原蛋白浓度。

44. 根据权利要求41所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜已通过辐射进行灭菌,例如,UV辐射或电子束。

45. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜进一步包括包围所述微透镜以用于储存和/或装运的容器。

46. 根据权利要求45所述的微透镜,其特征在于,所述容器还用作用于成形、压缩或从所述支架去除流体的模具。

47. 根据权利要求45所述的微透镜,其特征在于,所述容器进一步包括至少一个辐射可透射的或半透明的表面,以便于所述支架的交联或灭菌。

48. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出比天然角膜基质组织更大的屈光率。

49. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出大于1.377的屈光率。

50. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出大于1.378的屈光率。

51. 根据权利要求31所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出屈光率的梯度。

52. 一种脱细胞胶原微透镜,其包括源于角膜供体来源的微透镜主体,所述微透镜主体具有前表面和后表面,使所述微透镜具有期望形状以及足够的光学透明度以用作角膜内植入物。

53. 根据权利要求52所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出小于4弧分的散射角 θ 。

54. 根据权利要求52所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出小于2弧分的散射角 θ 。

55. 根据权利要求52所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜表现出小于1弧分的散射角 θ 。

56. 根据权利要求52所述的微透镜,其特征在于,所述微透镜进一步包括胶原蛋白,所述胶原蛋白已至少部分地耗尽流体,可选地被压缩,并且至少部分地交联以抑制轴向膨胀。

57. 一种微透镜的储存容器,其包括在其间限定密封腔的上主体和下主体,其中,所述上主体或下主体或两者的至少一部分是辐射可透射的,以允许微透镜的原位灭菌。

58. 根据权利要求57所述的微透镜储存容器,其特征在于,至少一个密封件设置在所述上主体和所述下主体之间,并且可选地,其中,所述密封件是O形环或扁平垫圈密封件。

59. 根据权利要求58所述的微透镜储存容器,其特征在于,所述密封件是辐射可透射的。

60. 根据权利要求58所述的微透镜储存容器,其特征在于,所述密封件是UV可透射的,并且可选地包括氟聚合物组合物。

61. 根据权利要求58所述的微透镜储存容器,其特征在于,所述密封件包括聚四氟乙烯 (PTFE)、氟化乙烯丙烯 (FEP)、乙烯四氟乙烯 (ETFE) 或全氟烷氧基 (PFA) 组合物。

胶原蛋白支架的稳定

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2018年7月2日提交的美国专利临时申请第62/693,192号的优先权,其通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 由异常屈光病状(例如,屈光不正)引起的视力障碍对于所有年龄段的患者来说可能都是一个严重的问题,并且可以(但并非总是)用消减激光手术治疗。最近,已经开发了加成技术,其涉及在将皮瓣切开并折回以暴露角膜的基质内区域之后将微透镜移植到患者的角膜中。微透镜的形状通过改变其曲率来改变患者角膜的光学能力。然后,可以将皮瓣重新放到微透镜的顶部。在其它情况下(例如,圆锥角膜),植入的微透镜可以机械地稳定或调节异常基质并减慢疾病进展。在圆锥角膜的情况下,更经常形成基质袋而不是皮瓣。

[0004] 然而,若干问题限制了加成(微透镜)技术的更广泛的接受。首先,供体人角膜形成微透镜的可用性非常有限。另外,当从非人来源获得微透镜时,必须使微透镜脱细胞以使免疫反应最小化。此外,由于微透镜的性质(多个结构化层的胶原蛋白),它们是易碎的并且需要特殊处理。通常,脱细胞进一步削弱结构和/或改变渗透性质,使得脱细胞微透镜易于在术后膨胀,从而可能无法保持手术时适当的屈光矫正。因此,需要更好的方法来稳定可植入微透镜和其它基于胶原蛋白的支架。

[0005] 胶原蛋白广泛存在于人体中。例如,胶原蛋白存在于肠、静脉、关节、皮肤、内膜、心室瓣以及角膜中。

[0006] 然而,角膜中的基质胶原蛋白在许多方面都是独特的。除了水以外,胶原蛋白是角膜基质的主要组分。基质的其它组分包含糖胺聚糖(GAG)和蛋白聚糖。活细胞仅占角膜基质的约1到4%。人基质由大约100-150个板层组成,每个板层含有平行的胶原蛋白原纤维。为了透明,多层胶原蛋白原纤维表现出平面内排列,并且层或板层之间的间隔是几乎理想的分布。没有其它器官含有以这种方式布置的胶原蛋白原纤维。

[0007] 基质胶原蛋白在平面内方向上表现出高拉伸强度,但在垂直于平面方向上显著变弱。脱细胞基质会表现出进一步的弱化。如果将这种脱细胞基质胶原蛋白用作支架,则需要更好的增强其机械强度的方法。

发明内容

[0008] 公开了稳定胶原蛋白支架的方法,由此可以采用水取出和/或压缩以及交联来使支架成形,机械地增强它并抑制其在水性环境中膨胀的趋势。所述方法可能在将胶原蛋白支架制备成用于作为加成屈光手术的一部分的基质内或角膜内植入的微透镜方面特别有用。

[0009] 由胶原组织形成的支架可以为角膜提供机械优势。然而,由于通常通过脱细胞过程将支架机械地削弱,因此在将其置于基质中之前需要对其进行增强和定向。在本发明的一个方面中,公开了由供体胶原组织形成和增强支架的方法,其包含以下步骤:从供体胶原

组织来源(例如,供体角膜基质)的中心区域切除一部分组织;使所述组织部分成形以提供第一期望形状的支架;使所述支架脱细胞;紧压所述支架(例如,在大体上垂直于所述支架的板层结构的方向上)以去除所述支架中存在的多余流体并增强胶原蛋白密度;和使所述支架的至少一部分交联以机械地增强并抑制随后的膨胀。因此,本发明的方法可以增强支架的机械强度和化学稳定性。当旨在将其用作角膜内可植入的微透镜时,也可以采用交联来恢复和/或保持所述支架的光学透明度(例如,透明性)。

[0010] 在某些实施例中,所述切除和成形步骤可以同时地进行。所述使所述支架脱细胞的步骤可以进一步包含裂解细胞,并用洗涤剂或表面活性剂从所述微透镜去除细胞碎片;并且可选地可以进一步包含从所述微透镜酶促去除至少一个免疫原性表位。用于使所述支架脱细胞的一种溶液可以包括水、乙醇和甘油。所述支架的定向也可以被操纵。只要可行,本文中叙述的方法步骤可以以任何顺序进行。

[0011] 不受任何特定操作理论的束缚,胶原蛋白支架的机械增强不仅是交联的结果,而且是胶原蛋白原纤维紧压成更紧的束的结果。致密化原纤维束的交联可以导致材料强度超出仅通过交联所能实现的改善。

[0012] 在本发明的方法中,所述交联步骤可以进一步包含将压缩支架的至少一部分暴露于交联剂或能量介导剂,或将被压缩的支架的至少一部分暴露于辐射以在或不在能量介导剂的辅助下通过胶原蛋白原纤维之间的肽键形成诱导交联。还公开了化学和光交联的组合,由此所述化学剂可以诱导不同的化学键并在胶原蛋白原纤维之间物理地形成机械桥。

[0013] 所述交联步骤可以通过以下进行:将压缩(或脱水)支架的至少一部分通过直接暴露而暴露于辐射或通过以掠射角或经由耦合到所述支架的表面的隐逝波导而暴露于这种辐射。所述交联可以进一步包含将被压缩的支架的表面部分暴露于辐射,使得表面部分相较于所述支架的主体区域表现出更大的交联和更高的胶原蛋白密度。

[0014] 优选地,被压缩和交联步骤导致所述支架的至少一部分的胶原蛋白密度大于所述初始脱细胞支架片段。例如,被压缩和交联支架的至少一部分可以具有至少20%胶原蛋白,优选大于35%胶原蛋白的成分。

[0015] 可以实践本发明的方法,使得所述支架被配置成用作可植入的角膜内微透镜,其具有微透镜主体、定向的前表面和后表面,并且所述方法进一步包括:用交联剂或通过选择性地施加图案化辐射来处理所述微透镜的所述后表面的至少一部分,以促进所述微透镜与基质床的粘附。在某些实施例中,所述方法可以包含以下步骤:由供体基质形成微透镜;通过微透镜取出从供体基质的中心区域去除一部分组织;将所去除的组织部分成形为第一期望形状的微透镜,所述微透镜具有微透镜主体、前表面和后表面,从所述微透镜去除细胞物质;去除所述微透镜中存在的多余流体(例如,最初存在于基质中的水以及在脱细胞期间可能已引入所述微透镜中的任何其它流体);和使所述微透镜的至少一部分交联以限定最终期望形状并抑制随后的所述微透镜暴露于水性环境时的膨胀。可以通过用角膜刀或飞秒激光或准分子激光或水射流进行的微透镜切除或取出来进行微透镜形成。

[0016] 所述微透镜的交联可以通过以下进行:将被压缩的支架的至少一部分暴露于交联剂或能量介导剂,或将被压缩的支架的至少一部分暴露于辐射以在或不在能量介导剂的辅助下通过胶原蛋白原纤维之间的肽键形成诱导交联。例如,微透镜的交联可以包含:通过直接暴露或通过以掠射角或经由耦合到所述支架的表面的隐逝波导暴露而将被压缩的支架

的至少一部分暴露于辐射。在某些应用中,紫外辐射是优选的能量源。

[0017] 已经报道了胶原蛋白交联的化学方法。这些方法可以包含使用化学剂(例如,京尼平)或光化学剂。例如,美国专利申请公开第2017/0119928号公开了通过使心包组织脱细胞以获得胶原基质材料(其可以与含戊二醛的溶液交联并形成用于植入的期望结构)来形成心脏瓣膜假体的方法。

[0018] 辐射交联可能比化学交联更具优势,因为所得的微透镜通常更透明——在植入受体角膜之后产生更好的视敏度。

[0019] 相较于非压缩(含流体)支架所必需,被压缩的支架的辐射交联可以用显著更低的能量来实现。例如,对于压缩之后的典型的微透镜,可以通过注量小于约15焦耳/cm²或在一些情况下小于约2500焦耳/cm²的紫外辐射来实现交联。更一般地,期望的注量将在约15焦耳/cm²到约600焦耳/cm²的范围内。用于交联胶原支架的一个特定波长范围通常对应于“UV-C”波长带的一部分,例如,约185nm到约280nm。在一些情况下,还可以采用其它UV波长带(在约280nm到约315nm(或320nm)的范围内的UV-B带或在约315nm(或320nm)到约400nm的范围内的UV-A带)以及X射线、 γ 辐射或电子束来诱导所述支架的至少部分交联和/或灭菌。

[0020] 因为脱细胞胶原蛋白支架表现出一定量的“形状记忆”或“压缩滞后”,所以可以将其分开压缩,并在随后使其交联,而不再受压缩模具的约束。这种分离(顺序地)是可替代的制造过程。然而,在大多数情况下,优选的方法是在使所述支架在模具中保持压缩的同时诱导交联。在任一种情况下,紧压胶原蛋白束的交联都比分散胶原蛋白原纤维布置的交联产生更大的强度。

[0021] 在本发明方法的另一方面中,所述交联步骤可以进一步包含以下步骤:将被压缩的支架的表面部分暴露于辐射,使得表面部分相较于所述支架的主体区域表现出更大的交联和更高的胶原蛋白密度。此外,所述交联步骤还可以包含:施加足够的辐射以使任何微生物剂失活并对所述微透镜进行灭菌。在某些实施例中,所述使所述支架脱细胞的步骤可以涵盖:用洗涤剂或表面活性剂从所述微透镜去除细胞碎片;并且可选地进一步包括:从所述微透镜酶促去除至少一个免疫原性表位。

[0022] 另外,压缩和交联步骤可以导致所述支架的至少一部分的胶原蛋白密度大于所述初始胶原组织片段。所述交联步骤可以进一步包含:向所述前表面选择性地施加辐射,使得前表面区域相较于所述微透镜主体的主体区域表现出更大程度的交联或更大的胶原蛋白密度。

[0023] 在本发明的又一方面中,公开了脱细胞胶原蛋白微透镜,其具有源于供体组织的微透镜主体,所述微透镜主体的前表面和后表面被形成为使所述微透镜具有期望形状和定向。例如,微透镜可以具有凸侧和凹侧,其经常但并非总是与所述微透镜的前表面和后表面重合。所述微透镜主体可以包含多层胶原蛋白,所述胶原蛋白已脱细胞并压缩以实现大于15%或25%胶原蛋白的组成,并且可以进一步至少部分地交联以抑制轴向膨胀。对于大部分交联的微透镜,所述组成可以大于30%胶原蛋白。此外,如果需要局部致密化的层(例如,以近似角膜结构,例如鲍曼氏膜),则局部胶原蛋白浓度可能甚至更高(例如,大于35%或大于40%或甚至大于60%胶原蛋白)。

[0024] 在某些实施例中,所述微透镜可以由通过施加辐射而交联的多层胶原蛋白来表征,并且所述微透镜还可以由胶原蛋白原纤维之间的诱导肽键进一步表征。所述微透镜可

以90%到100%或优选95%到99.99%不含细胞物质,并且以期望形状形成,使得在脱细胞、压缩和交联之后,所述微透镜可以被植入患者的眼睛中以改变角膜的屈光力,或替代或增强基质的受损或患病区域。

[0025] 根据本发明的微透镜通常具有弯曲的盘状形状,并且直径为约0.5mm到约10mm。而且,它们的最大厚度通常可以在约600到约50微米的范围内,更优选地在约400到约100微米的范围内。所述微透镜通常不具有均匀的厚度,并且最小厚度可以小于约50微米,更优选地小于约30微米或小于约15微米。

[0026] 由于免疫原性表位的降解,所述微透镜应表现出低免疫反应性。在某些实施例中,所述微透镜的至少一个表面进一步包含可变交联的图案,以在基质内植入患者的基质床中时促进所述微透镜与基质床的粘附。所述微透镜还可以具有前表面,所述前表面的前表面区域相较于所述微透镜主体的主体区域具有更大的胶原蛋白密度。例如,所述前表面区域的胶原蛋白密度可以是至少约35%或40%或60%胶原蛋白。

[0027] 因此,本发明公开了稳定胶原蛋白微透镜和支架的形状的方法。可以从人或动物源的任何胶原来源收获胶原组织。在某些优选实施例中,可以从人或猪基质收获组织。所述源组织可以在切除期间或在切除之后的单独步骤中成形。可以通过各种技术使所述组织成形、脱细胞和稳定,以下将更详细地描述所述各种技术中的几种。在成形和脱细胞之后,使所切除的基质部分经受压缩以减少流体含量,并进行照射以诱导胶原蛋白链或原纤维的交联。可以在有或没有化学中间体(例如,交联剂)的情况下诱导交联。在某些优选实施例中,通过暴露于足够高能的辐射而在胶原蛋白原纤维之间形成肽键来实现交联。这种高能辐射是期望的,因为胶原蛋白链之间肽键的建立通常是吸热反应。可以采用各种诱导肽键交联的能量源。在某些优选实施例中,所述能量通过紫外(UV)辐射传递。

[0028] 本发明特别适用于通常从分层胶原组织,特别从角膜基质收获的胶原蛋白支架的空间稳定。所述源组织的分层胶原蛋白布置可能已自然地演化为具有光学透明性,但是在暴露于水性环境时可能会导致机械弱化和/或渗透性膨胀趋势。因此,本发明的一个目的是抑制这种膨胀和/或为最终的支架提供更大的轴向机械强度。本发明还可以应用于非分层的(或混沌的)切除胶原组织片段。

[0029] 在本发明的另一方面中,公开了用于在支架是旨在用于角膜植入的微透镜的情况下改变所述支架的至少一个表面(例如,前表面)上的胶原蛋白密度或光滑度的方法。这种表面改变可以使所述支架在植入之后更易于操纵(例如,在必须重新打开覆盖的皮瓣以触及植入物的情况下)。所述表面改变可以通过照射和/或化学剂的施加来实现。

[0030] 公开了来自同种异体移植物和/或异种移植物来源的脱细胞和成形角膜组织微透镜以及获得这种微透镜的方法。所述微透镜可特别地用作角膜移植手术中的基质内或角膜内的微透镜植入物,在角膜移植手术中,在患者的角膜中形成较合皮瓣并沿其较合部折回以暴露角膜的基质层。然后,将所成形的微透镜施加到基质床上,并使皮瓣返回其原始位置,从而为角膜赋予新的曲率,并实现期望的屈光矫正。新的屈光力的微调可以在植入的同时或在发生回退或紧张性改变的稍后时间通过激光消融来实现。

[0031] 在本发明的一个方面中,公开了脱细胞角膜微透镜和使角膜组织脱细胞的方法,以减少患者的所述部位对所植入的微透镜的潜在免疫原性反应。典型角膜的仅约1-4%由细胞构成。其余96-99%大部分是细胞外基质(ECM)——主要是胶原蛋白、糖胺聚糖(GAG)和

蛋白聚糖以及水。在一个优选实施例中,通过用表面活性剂(诸如例如十四烷基硫酸钠(STS)处理或通过酶促增溶来去除所述微透镜的细胞组分,如果需要,可以采取另外的步骤以进一步降低所述微透镜的免疫原性,尤其是在所述来源是非人(异种)供体时。例如,异种组织中可能存在的两个非人表位是neu5GC和 α -Gal。这些不期望的表位不仅可以存在于基质细胞的内部,还可以存在其表面上;一部分表位可能嵌入包裹在ECM胶原蛋白原纤维周围的GAG(也被称为粘多糖)中。在这种情况下,可以通过激酶处理和另外的清洗来选择性地至少部分地去除这些表位。

[0032] 本发明的脱细胞微透镜通常去除95%-100%细胞物质。优选地,所述微透镜95%-99.99%不含细胞。在不列举95%和100%之间的每个可能的子范围的情况下,应当清楚的是,所有这些子范围都被考虑并且被认为是本发明的一部分。例如,所述微透镜可以95%到97%、97%到99%或98%到99.9%不含细胞物质。

[0033] 在本发明的另一方面中,通过从供体角膜切割盘形组织片段来获得根据本发明的盘形微透镜。可以将所述组织片段切片和/或进一步以某一方式成形或切割,使得在切片手术期间获得期望形状。切割可以机械地(例如,用微型角膜刀等),通过激光加工,例如或通过用飞秒激光进行光切割,或通过准分子激光或通过水射流来进行。为了降低不对称的可能性,优选地从所述供体角膜的中心部分取所述组织片段,例如将所述供体角膜的光轴或几何轴保留在所述微透镜的中心。所述组织片段的形状将由矫正患者屈光不正所需的屈光度变化指定。例如,为了矫正远视(hyperopia/hypermotropia)和/或老花眼,目标通常是增加角膜的曲率,并且期望的微透镜形状将在至少一侧上略微凸出。通常,微透镜的最大厚度将小于400微米,或者在许多情况下小于200微米,或者小于100微米或小于50微米。几乎所有应用的最大厚度都小于600微米。在一些情况下,如果所述盘状微透镜被形成为将光重新定向到视网膜的不同部分的棱镜,则可以实现患有黄斑变性的患者的视觉改善。

[0034] 圆锥角膜的处理不仅可以包含减少视觉像差,还可以包含机械地增强所述患病基质。为此目的,可能优选的是,厚度在50和300微米之间的具有有限的屈光影响的共面盘,其在所述盘的外周上具有过渡的倾斜(楔状)区域。可替代地,用于圆锥角膜的处理的微透镜可以利用从供体角膜继承的天然曲率,或者可以在压缩和/或交联期间通过使用弯曲的模具引入另一程度的曲率。在一些情况下,在处理圆锥角膜中可能是有利的是,“倒置”植入微透镜,例如使得所述微透镜的曲率是所述受体角膜的相反数。

[0035] 尽管在一些情况下可能需要弯曲的模具,但是压缩和交联步骤也可以用扁平的模具执行。(扁平模制对于储存和运输或制造效率可能是有利的。)在本发明的另一方面中,可以采用可气密密封的模具进行压缩和储存。

[0036] 也可以使用施加到所述支架的一个表面上的压力来改变其曲率和/或重新排列胶原蛋白原纤维(或维持其排列)。例如,可以将支架固定到腔室中的开口,然后向所述腔室填充加压流体以在所述支架的一侧施加压力,从而向所述支架施加水平/切向力。流体压力将导致所述支架膨胀(像气球一样)。可以可选地将压缩板施加到相对的表面。例如,可以使用弯曲(拟凹)的压缩板来限制支架可以被拉伸或重新成形的程度。当获得期望曲率时,可以采用交联来维持期望形状和/或抑制如此操纵的支架在基质内或角膜内植入时膨胀的趋势。

[0037] 在一些实施例中,可能是有利的是,保留顶部基质表面(即,所谓的“鲍曼氏膜”),

使得所述微透镜的前表面将与另一(后)表面表现出不同的质地,因为角膜的这种天然前段由于最外层基质组织的自然凝结而更致密且更光滑。可替代地,所切除的片段可以取自基质的中心区域,并且可以在成形和切除之后通过选择性交联使前表面致密化,如下面更详细所描述。后表面(与前表面或鲍曼氏膜相对)将变得更粗糙,这是由于基质组织密度较低以及它是通过组织的机械或激光切割而形成的事实。当将所述微透镜用于基质内或角膜内植入时,这种粗糙度的差异可能是尤其有利的,因为非常期望所述微透镜牢固地粘附到基质床上。如果在手术后观察到的屈光结果未达到最佳,则可能需要再次折回皮瓣,以允许通过激光消融等进行另外的角膜移植(微透镜的重塑)。微透镜从其在基质床中的原始位置的任何移动都可能损害这种角膜移植的有效性。而且,微透镜的前表面的光滑度也使得重新打开皮瓣将导致微透镜移位的可能性降低。

[0038] 在本发明的又一方面中,可以在切除、成形和脱细胞之后处理后表面,以使所述表面更粘附于基质床。例如,可以在灭菌和包装之前施加交联剂。可替代地,可以在植入之前由临床医生在手术期间施加增粘剂。可以对所述前表面进行处理,以减少其对皮瓣的粘附。

附图说明

[0039] 图1A是所切除的基质组织片段的示意性截面图;

[0040] 图1B是所切除的基质组织片段在脱细胞之后的示意性截面图,其示出了组织的膨胀和随之而来的胶原蛋白原纤维的分离;

[0041] 图1C是根据本发明的所切除的基质组织片段在脱细胞、压缩和交联之后的示意性截面图;

[0042] 图2是所切除的基质组织片段在脱细胞、压缩和前表面区域的选择性交联之后的示意性截面图;

[0043] 图3是所切除的基质组织片段在脱细胞、压缩和后表面区域的选择性图案化之后的示意性截面图;

[0044] 图4A示出了扁平形状的根据本公开的微透镜,所述扁平形状是制造和/或运输期间的典型形状;

[0045] 图4B示出了在准备用于角膜内植入时处于最终弯曲状态的微透镜;

[0046] 图5A示出了被设计用于角膜内植入以矫正远视病状的微透镜;

[0047] 图5B示出了被设计用于角膜内植入以矫正近视病状的微透镜;

[0048] 图5C示出了被设计用于角膜内植入以矫正老花眼病状的微透镜;

[0049] 图5D示出了被设计用于角膜内植入以矫正被称为圆锥角膜的病状的微透镜;

[0050] 图6A示出了用局部强交联点制造的微透镜的另一个实施例;

[0051] 图6B示出了包含具有适度交联的中心光学活性区域和具有强交联的外部或外周区域的微透镜的又一个实施例;

[0052] 图7A示出了微透镜在深前板层角膜移植(DALK)中的使用;

[0053] 图7B示出了被配置用于放置在患者的完整鲍曼氏膜的顶部上的微透镜的使用;

[0054] 图7C示出了用于穿透性角膜移植(PK)手术的微透镜的又一个实施例;

[0055] 图8A和8B示出了用于厚微透镜的外周的两替代设计;

[0056] 图8A示出了具有简单的(例如,圆柱形或圆锥形)外周边缘的微透镜;

- [0057] 图8B示出了在其外周处具有锯齿形或阶梯形边缘的微透镜；
- [0058] 图8C示出了在其外周处具有“锁和钥匙”边缘的微透镜；
- [0059] 图9是根据本发明的用于压缩胶原蛋白支架并使其交联的压合设备的示意性透视图；
- [0060] 图10A和10B示出了根据本发明的两部分可气密密封的压缩和储存模具；
- [0061] 图10A示出了在压缩支架之前示出了模具；
- [0062] 图10B示出了在压缩之后的模具；
- [0063] 图11示出了用于拉伸支架的根据本发明的另一设备；
- [0064] 图12示出了与图11的设备相似的又一替代设备，但是增加了压缩施加板元件，用于同时拉伸支架并对其进行压缩，以及促进暴露于交联辐射；并且
- [0065] 图13示出了用于测量根据本公开产生的微透镜的透明性的设备130；
- [0066] 图14是为了量化光学透明度可用图13的设备等获得的亮度分布曲线的图。

具体实施方式

[0067] 本发明不限于所描述的特定过程、组合物或方法，因为这些可以有所不同。说明书中使用的术语仅出于描述特定版本或实施例的目的，而不旨在限制本发明的范围。除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同含义。本文提及的所有出版物通过引用整体并入。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明由于先前发明而无权先于此公开内容。

[0068] 术语“切割”涵盖例如通过机械刀片、紫外(UV)激光、飞秒激光或水射流的作用剖开、消融或去除生物材料的任何已知方法。

[0069] 术语“压缩”涵盖通过施加压力或通过其它技术(例如，真空或离心力驱动的水取出)的紧压。

[0070] 术语“辐射”涵盖红外辐射、可见辐射和紫外辐射(例如，从约400nm向下到大约193nm或以下)、X射线、 γ 射线和电子束。

[0071] 术语“生物样品”是指组织、细胞、细胞提取物、均质组织提取物或一种或多种细胞产物的混合物。可以在合适的生理上可接受的载体中使用或提供生物样品。

[0072] 如本文和所附权利要求书中使用，单数形式“一个/一种”和“所述”包含复数指代，除非上下文另外明确指出。因此，例如，对一个“细胞”的指代是对一个或多个细胞以及本领域技术人员已知的其等同物等的指代。

[0073] 如本文使用，术语“约”是指与其一起使用的数字的数值的 $\pm 10\%$ 。因此，约100 μm 是指在90 μm -110 μm 的范围内。

[0074] 本文使用的术语“动物”、“患者”或“受试者”包含但不限于人和非人脊椎动物，例如野生、家养和农场动物。术语“动物”、“患者”或“受试者”也指角膜微透镜移植的受体。术语“异种移植物”是指从动物(包含猪(pig/porcine)、牛、猿、猴子、狒狒、其它灵长类动物以及任何其它非人动物)收集的用于提供的组织。“同种异体移植物”是指取自与受体物种相同的供体的组织。

[0075] 一般而言，术语“组织”是指在特定功能的执行中联合在一起的相似特殊细胞的任何集合。角膜基质是“组织”的一个实例，但其大部分是非细胞构成的(约1到5%由细胞构

成)。

[0076] 术语“微透镜”是指准备植入受体的角膜之中或之上的脱细胞加工供体角膜组织。除非另有指示,否则术语“微透镜”和“支架”在本文中可互换使用。术语“胶原蛋白浓度”和“胶原蛋白百分比”在本文中可互换使用,并且是指微透镜或支架中存在的胶原蛋白的量。本浓度或百分数可以作为完全干燥的微透镜(例如,真空干燥的微透镜)相对于干燥之前(与水完全平衡)的微透镜的重的重量分数来测量。在一些情况下,可以使用乙醇来改善干燥。

[0077] 在微透镜植入的上下文中,术语“角膜内”是指将微透镜放置在角膜之中或之上的任何手术。一种类型的角膜内植入是“基质内”植入,即在不切除前鲍曼氏膜或上皮的情况下,例如通过折回前组织的皮瓣或通过经由侧面入路直接插入将微透镜放置在眼睛的基质内的手术。其它类型的微透镜的角膜内使用包含深前板层角膜移植(DALK)和穿透性角膜移植(PK)(其中微透镜完全替代了眼睛的前段,如下面更详细地讨论)。又一个适用的“角膜内”手术是所谓的“表层角膜移植”,其也在下面更详细地讨论。

[0078] 术语“轴向”是指相对于微透镜或支架的定向的方向。通常,所成形的微透镜将以球形或椭圆柱形盘状弯曲,并且轴向方向或“轴”将大体上垂直于盘的中心。除非另有指示,否则“轴向”也大体上与从其切除组织片段的眼睛或被设计为植入微透镜的受体眼睛的视轴或光轴几乎平行或同轴。(在天然的眼睛中,光轴通常几乎但不完全通过角膜的中心。)

[0079] 行星物理学(球面几何学)可以提供便利的命名法来描述基质中的胶原蛋白原纤维的空间分布。大多数胶原蛋白原纤维都位于中高纬度轨道上,只有一小部分位于极轨道中。出于此原因,基质通常在中心(中间)区域/位置是最薄的。压缩的轴向方向可以被称为极帽压缩或径向压缩。供体基质的中心区域在原纤维排列中表现出强旋转对称性。在指定植入物不仅在压缩状态下而且在拉伸应力下工作的情况下,从中心基质位置取出的微透镜最好为植入物赋予旋转对称性拉伸性质。

[0080] 本公开还涉及一种来自同种异体移植物和/或异种移植物来源的脱细胞角膜微透镜以及由供体基质形成微透镜的方法。可以使用所公开的脱细胞角膜微透镜来矫正异常屈光病状,例如近视、远视、老花眼和散光以及其它眼科病理。

[0081] 一般认为角膜从前到后包含5层:角膜上皮、薄却致密的顶部基质层(在人眼中通常被称为鲍曼氏膜)、角膜基质、德斯密氏膜和角膜内皮。角膜上皮由约6层快速生长且易于再生的非角质化复层鳞状上皮细胞构成。前基质层(例如,鲍曼氏膜)是坚韧的层,其主要由随机组织的紧密编织的I型胶原蛋白原纤维构成。角膜基质是一个较厚的透明层,其由在平行层中布置的I型胶原蛋白纤维组成。德斯密氏膜是一个较薄的非细胞构成层,其作为角膜内皮的基底膜并且由硬度较低的IV型胶原蛋白原纤维构成。最后,角膜内皮由单层鳞状或低立方单层线粒体富集细胞构成。

[0082] 如本文使用,术语“鲍曼氏膜”用于描述来自人或供体动物角膜的任何角膜的前基质区域。尽管人角膜的致密层可能更明显(并且因此在人角膜中被称为鲍曼氏膜),但所有角膜在某种程度上都表现出较高的前致密性和光滑度(相对于基质床组织),这取决于动物物种和年龄。因此,“鲍曼氏膜”是整个本申请中用来描述本前段的术语。

[0083] 因此,供体角膜的收获和加工以及微透镜的产生是矫正视力屈光不正的关键元素。微透镜特别可用作角膜移植手术中的微透镜植入物,在角膜移植手术中,在患者的角膜

中形成较合皮瓣并沿其较合部折回以暴露角膜的基质层。然后,将所成形的微透镜施加到基质床上,并使皮瓣返回其原始位置,从而为角膜带来新的曲率,并实现期望的屈光矫正。新的屈光力的微调可以在植入的同时或在发生回退或紧张性改变的稍后时间通过激光消融来实现。

[0084] 在本发明的某些实施例中,脱细胞角膜微透镜可以包含源于供体基质的微透镜主体,其前表面包含来自供体基质的顶层的至少一部分,并且后表面被形成为使微透镜具有期望形状;并且其中供体基质被脱细胞。在其它实施例中,不考虑鲍曼氏膜和供体基质的任何顶部的保存来使微透镜成形。例如,微透镜可以通过基质组织片段的基质内切除(例如,通过用飞秒激光脉冲切除)而形成。

[0085] 在某些实施例中,收获供体基质,并使其脱细胞,从而产生减少了患者的所述部位上的任何潜在免疫原性反应的微透镜。典型角膜的仅约1%到约4%由细胞构成。其余96%到99%大部分是细胞外基质(ECM),主要是胶原蛋白以及水、糖胺聚糖和蛋白聚糖。如上所述,本发明的脱细胞微透镜通常去除95%-100%细胞物质。优选地,所述微透镜95%-99.99%不含细胞。在不列举95%和100%之间的每个可能的子范围的情况下,应当清楚的是,所有这些子范围都被考虑并且被认为是本发明的一部分。例如,所述微透镜可以95%到97%、97%到99%或98%到99.9%不含细胞物质。微透镜中残留的细胞物质的量可以例如以残留的DNA或RNA含量测量。优选地,DNA或RNA含量小于原始DNA或RNA含量的重量的1%,或小于0.1%或小于0.01%。

[0086] 脱细胞(即从供体基质去除细胞物质)可以使用多种技术来完成。在一个优选实施例中,通过化学处理去除角膜的细胞物质。用于溶解和去除来自角膜的细胞的化学物质包含表面活性剂(例如,十四烷基硫酸钠(STS))、酸、碱处理剂、离子洗涤剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))、非离子洗涤剂(例如,Triton X-100)和两性离子洗涤剂。在一些实施例中,使用酶处理剂去除角膜的细胞物质。使用脂酶、嗜热菌蛋白酶、半乳糖苷酶、核酸酶、胰蛋白酶、核酸内切酶和核酸外切酶来从角膜去除细胞物质。在一些实施例中,使用物理技术去除角膜的细胞物质。这些物理技术包含用于通过使用温度、力和压力以及电干扰来溶解、杀死和去除来自组织的基质的细胞的方法。温度方法通常用于快速冻融机制中。温度方法保护了ECM支架的物理结构。压力脱细胞涉及在高温下静水压力的受控使用,以避免可能损坏支架的不受监控的冰晶形成。质膜的电干扰是溶解角膜中细胞物质的另一种选择。

[0087] 在本文所述的实施例中,由于免疫原性表位的降解,微透镜可以表现出甚至更低的免疫反应性。在使用异种提供时,这可能是一个重要的步骤。例如,异种组织中可能存在的两个非人表位是N-羟乙酰神经氨酸(Neu5GC)和半乳糖- α -1,3-半乳糖(α -Gal)。这些不期望的表位不仅可以存在于基质细胞的内部,还可以存在于其表面上;一小部分表位可能嵌入包裹在ECM胶原蛋白原纤维周围的糖胺聚糖(GAG,也被称为粘多糖)中。在某些实施例中,可以通过酶促处理(例如,通过半乳糖苷酶处理)和另外的清洗来选择性地去除表位。可替代地,可以从缺少任何免疫原性表位的基因敲除转基因动物(例如,转基因猪)收获角膜组织,从而产生非免疫原性微透镜而不需要表位降解步骤。

[0088] 在本文所述的实施例中,可以结合包装和密封对脱细胞微透镜进一步灭菌。可以使用湿润剂、辐射或电子束完成灭菌。在一个优选实施例中,由于不太可能发生对胶原蛋白支架的损伤,所以使用UV辐射进行脱细胞微透镜的灭菌。使用UV辐射可以有利于改善微透

镜的光学透明性。

[0089] 在本发明的另一方面中,微透镜的形状和定向被设计用于获得最佳结果。在一些实施例中,微透镜的直径为约0.5毫米(mm)到约10mm,或约3mm到约9mm,或约4mm到约8mm或约5mm到约7mm。同样,在不列举0.5mm和10mm之间的每个可能子范围的情况下,应当清楚的是,所有这些子范围都被考虑并且被认为是本发明的一部分。

[0090] 可以将供体角膜基质切片和/或进一步成形以获得期望形状。切割可以机械地(例如,用微型角膜刀等),或通过激光加工(例如,通过用准分子激光进行光消融或用飞秒激光进行光切割)来进行。为了降低不对称的可能性,优选地从所述供体角膜的中心部分取所述角膜组织片段,例如将所述供体角膜的光轴或几何轴保留在所述微透镜的中心。所述角膜组织片段的形状将由矫正患者屈光不正所需的屈光度变化指定。例如,为了矫正远视(hyperopia/hypermopia)和/或老花眼,目标通常是增加角膜的曲率,并且期望的微透镜形状将在至少一侧上略微凸出。在一些实施例中,微透镜的最大厚度将小于600微米,小于400微米,小于200微米,小于100微米或小于50微米。直径越小,微透镜越薄,将其整合到患者的基质床中的速度就越快。

[0091] 基质胶原蛋白原纤维是较长的聚合(多肽)串。它们是三重缠绕的蛋白质。单个胶原蛋白原纤维的长度几乎是肉眼可见的,因此每个原纤维可以单独地是较强的光散射体。基质在轴向方向上是透明的事实是所有这些强散射贡献的负叠加的结果。也就是说,尽管胶原蛋白原纤维单独都是散射性的,但它们共同贡献了总计接近零的散射。如果原纤维在一个平面内平行布置,则可实现这种集体透明性。在角膜基质中,布置平面垂直于光轴。这种独特的布置存在于角膜中,但在其它器官中未观察到。在例如肠或心肌膜、心室瓣的其它器官中,原纤维未精细排列,因此光被散射。眼睛的角膜缘胶原蛋白也可以这样说。

[0092] 除了透明性之外,自然选择还针对强度优化了角膜的结构。胶原蛋白原纤维的长度和排列对基质的平面内(切向)拉伸(拉引)强度有很大贡献。通过在基质上施加切向拉伸(拉引)应力的静水眼内压力来保持天然的眼睛的形状。胶原蛋白原纤维的平面内定向有助于角膜透明性并提供了显著的机械拉伸(拉引)强度。然而,这种强度在很大程度上受限于力的平面内施加。角膜基质在光轴方向上的强度明显较弱。这种轴向强度不足的一种表现是,在将支架浸入水中(例如,浸入缓冲盐水溶液(BSS)中)时的膨胀。所述膨胀在光轴的方向上几乎完全单向的。在平面内方向上的膨胀可忽略不计。

[0093] 支架的这种弱化令人关切,因为光学活性微透镜的形状保真度对于成功的加成屈光手术至关重要。支架在轴向方向上的膨胀可能会诱导屈光不正。

[0094] 膨胀量通常随浸入流体而不同。当将表面活性剂和/或洗涤剂加入到水中时,观察到最高的膨胀度,即膨胀其标称厚度的大约250-400%。BSS通常会诱导标称厚度的大约150-250%的膨胀。在酒精(轻度和重度)中的膨胀通常较小(标称厚度可以被定义为在脱细胞步骤之前,例如在组织样本非常新鲜时,例如在切除之后少于60秒左右或更长时间(在样本保留上皮和/或内皮细胞时),原始的切除基质片段(板层)的轴向厚度。)

[0095] 如果微透镜较厚,则膨胀可能会使微透镜过厚,使得难以将皮瓣放回基质床上。皮瓣也可能太短而不能覆盖所加入的材料(增加了上皮发育不全的危险),并且可能需要另外的机械拉伸和/或将皮瓣缝合到基质床的手术。

[0096] 胶原蛋白支架的单向机械弱化以及渗透性质和/或支架的亲水性的变化(与脱细

胞之前的基质相比)可以导致支架的厚度方向(即,轴向方向)上的明显的单向膨胀。

[0097] 自由水留在胶原组织内。在完整的天然角膜中,基质的水含量由角膜的整体结构(例如,提供角膜边界的上皮和内皮膜)控制。然而,当在加成屈光手术中植入外源性基质组织时,这种平衡通常会受到干扰,并且所植入的微透镜的水含量有增加的趋势,并导致术后膨胀超过标称厚度。

[0098] 根据本发明,如果将扁平的(圆柱形)胶原组织样本放置在施加稳定压力的两个板之间,则可以减少流体含量(或等效地,可以增加胶原蛋白浓度)。对于进行了脱细胞的成形微透镜也是如此。压合器应提供引流功能,使得多余的自由流体将从组织侧面流出。(在成形微透镜的情况下,压合器的至少一个板应弯曲以适应微透镜厚度的径向变化。优选地,轻轻地施加压力,持续期望的时间。取决于期望的压缩程度,可以在胶原蛋白支架上施加压力,持续几秒到几小时的预定持续时间,例如30秒到一小时,或在一些情况下5分钟到半小时。

[0099] 通过压合器的板的移动距离可以计算近似的胶原蛋白浓度。例如,如果扁平的切除组织片段的标称厚度为100微米,并且其在脱细胞过程之后膨胀到200微米,则组合物的胶原蛋白含量为约15%。如果将其重新压缩到100微米厚度,则标称胶原蛋白浓度将恢复到大约30%水平。如果将支架进一步压缩到50微米厚度,则胶原蛋白浓度将为大约60%。如果将支架进一步压缩到40微米的厚度,则胶原蛋白浓度将为大约75%。(胶原蛋白含量百分比可以作为真空干燥的微透镜相对于干燥之前(其与水完全平衡时)的其重量的重量分数来测量。)本值只有在长时间压合之后才能达到,并且接近可合理达到的胶原蛋白浓度的高端。此时剩余的水例如通过范德华力牢固地结合到蛋白质上,并且进一步的压力可能会损害胶原蛋白原纤维的完整性。

[0100] 如果将支架从压合器中取出并重新浸入流体中,则压缩胶原组织的过程在很大程度上是可逆的。支架重新膨胀以接近其压缩前的厚度。然而,在本发明的另一方面中,公开了用于通过在压合过程期间经由胶原蛋白支架的交联而增强胶原蛋白支架(最明显的是,在轴向应力方向上)来防止重新膨胀的方法。支架的压缩和/或多余流体的去除也可以通过将支架暴露于加速下(例如,在离心机中)来实现。例如,可以采用10G直到100G(981米/秒²)或以上的加速度。也可以通过将支架暴露于真空或减压下来实现或帮助去除多余流体。

[0101] 在某些实施例中,交联可以通过化学剂实现。可以以足够的浓度、持续时间和温度加入外部化学分子(通常在水溶液或一些其它流体中)。所述分子可被构造成在一端与一个胶原蛋白原纤维键合而在另一端与另一个胶原蛋白原纤维键合。键的类型可以特定于所述试剂,或不必要是肽型键。化学分子以化学键(共价键)为强附接物建立物理桥。这种桥的足够致密的集合在轴向方向上为胶原蛋白支架赋予了新的强度和/或刚度。胶原蛋白分子不需要彼此接触,但需要相距大约试剂分子大小的距离。这种宽松的驱动要求使交联过程变得简单。化学交联剂的例子是戊二醛、京尼平和单糖。

[0102] 胶原蛋白原纤维本身是较强的光散射体,但是它们的定向和统计布置共同消除了散射。交联剂和能量介导分子的潜在缺点是,它们将外源性物质引入胶原蛋白支架中,当胶原蛋白支架在屈光矫正手术中用作可植入微透镜时,它们会充当光散射体并不利地影响支架的光学透明性。

[0103] 在其它实施例中,胶原蛋白原纤维也可以通过直接在原纤维之间建立的稳定化学

键来增强。当原纤维彼此接触但不是自发接触时,就会发生这种情况。所谓的肽键是吸热的,并且需要外部能量局部地且及时地传递到原纤维所接触的位置。在一些实施例中,可以采用专门的介导分子,其从光子接收能量。然后,所述介导分子可以提供键合能量,或成为交联过程的催化剂,而其本身不会参与连接结构。因此,光是用于建立稳定键的间接能量源。当暴露于例如来自发光二极管(LED)等的光时,介导分子的一个实例是核黄素。

[0104] 在又一种变型方法中,支架的胶原蛋白原纤维可以通过在原纤维彼此接触的位置局部地吸收的辐射彼此直接键合。不需要外源性介导分子来捕捉能量的量子(但是胶原组织中存在的内源性分子(例如,糖胺聚糖(GAG))可以提供类似的功能)。量子在接触事件的临界点(abutment)被直接且及时地吸收。本方法可以利用各种形式的直接辐射,例如可见、蓝色或UV辐射、 γ 射线或甚至电子束。一种优选的能量源是UV光,其能量密度为至少100焦耳/平方厘米,或至少200焦耳/平方厘米,或至少300焦耳/平方厘米。例如,光化辐射的期望能量密度可以在约100到约5000焦耳/平方厘米的范围内,或在约200和约1000焦耳/平方厘米之间,或在约300和约600焦耳/平方厘米之间。

[0105] 胶原蛋白支架的密度(压缩)可以在交联速度中起作用。如果胶原蛋白浓度较高(即,胶原蛋白支架被更多地压缩),则可以交联过程可以进行得更快。

[0106] 仅纯辐射诱导的交联(没有任何介导剂,例如核黄素)所需的临界(阈值)剂量可以随脱细胞过程而不同。非脱细胞基质的阈值剂量可以比脱细胞胶原蛋白支架的阈值剂量大3到300倍。(本比率也可以随所施加的辐射的波长而不同。)在本发明的另一方面中,已经发现,如果脱细胞去除了基质中存在的更多细胞外物质(例如,GAG),则胶原蛋白交联的阈值降低。阈值的差异可能会变化一个数量级,这取决于所应用的脱细胞方案和辐射的波长。这种交联阈值的降低似乎与脱细胞方案的强度有关。

[0107] 交联可以与压缩同时执行,也可以在随后的步骤中经由专用的UV辐射源(或可替代地,通过环境UV辐射,例如阳光)执行。

[0108] 如果使用光能来诱导交联,则光的吸收可能受到比尔定律的控制,也就是说,更多的光将在光所入射的材料表面层中被吸收,而较少量将在材料的较深层中被吸收。可用于诱导交联的光的量基本上呈指数衰减。如果支架中的光散射分子的量存在差异,则这也会影响能量的分布,因为散射剂将减少可以直通到被照射材料的下面区域的光的量。在本发明中,可以有利地使用这些作用来为暴露于光化辐射的支架的表面区域建立分级的交联程度和/或赋予不同的性质。

[0109] 因此,仅光能的自然吸收曲线单独或者与光散射剂的引入(例如,作为表面涂层)一起提供了选择性表面交联和/或胶原蛋白支架的表面以下较小程度的交联的选择。微透镜的表面的选择性交联可以有利于为表面赋予不同的粘附性、渗透性或光滑度,或便于植入后受体细胞的更多或更少的穿透。例如,如果将支架压缩到约60%胶原蛋白密度并使其在表面上选择性交联到约5到10微米的深度,则表面将保持高密度,而支架的其余部分将在脱细胞过程之后保持其膨胀状态不变。这种致密化表面可以提供伪鲍曼氏膜。

[0110] 而且,通过用光散射体选择性地处理表面的一部分或经由图案化掩模暴露支架,可以采用表面交联来为前表面、后表面或两者赋予图案化效果。表面图案化可以选择性地改变表面的部分的摩擦或粘附性。

[0111] 有三种使支架的表面选择性地交联的方法。首先,通过在支架中使用吸收性强的

短波长UV辐射,可以限制穿透深度。在这种方法中,优选的波长将在约230到约150纳米的范围内,并且更优选地,在约215到约193纳米(例如,193nm)的范围内。辐射的入射角通常垂直于表面,但是相对于表面法线可以在0和60度之间变化。

[0112] 可替代地,可以使用更长波长的UV辐射(例如,延伸到约400纳米),并且以大于60度、优选大于75度或以上(例如,在约80到约89.9度的范围内)的掠入射角进入支架。本方法的一个优点是,由于其商业用途,波长约为或超过280纳米的可靠且密集的UV辐射源随时可用。也可以优选使用激光辐射作为光源,因为激光的空间相干性实现了良好的入射角限定。

[0113] 在又一个替代方案中,可以使用隐逝波板波导。这实现了非常浅的交联深度(约为入射光的波长)。例如,当使用380纳米UV辐射时,交联可被限制为微米或更小的表面层。

[0114] 重要的是,因为鲍曼氏膜由于紧密编织的I型胶原蛋白原纤维而变得更致密且更光滑,所以通过致密化微透镜的前表面(或使其更剧烈地进行选择性交联),其将表现出与后表面不同的质地。后表面(与前表面相对)将变得更粗糙,这是由于本部分微透镜的组成密度较低(以及它是通过组织的机械或激光切割而形成的事实)。当将所述微透镜用于基质内或角膜内植入时,这种粗糙度的差异可能是尤其有利的,因为非常期望所述微透镜牢固地粘附到基质床上。如果在手术后观察到的屈光结果未达到最佳,则可能需要再次折回皮瓣,以允许通过激光消融等进行另外的角膜移植(微透镜的重塑)。微透镜从其在基质床中的原始位置的任何移动都可能损害这种角膜移植的有效性。而且,微透镜的前表面的光滑度也使得重新打开皮瓣将导致微透镜移位的可能性降低。

[0115] 在本发明的又一方面中,可以在切除、成形和脱细胞之后处理后表面,以使所述表面更粘附于基质床。例如,可以在灭菌和包装之前施加交联或增粘剂。可替代地,可以在植入之前由临床医生在手术期间施加交联或增粘剂。

[0116] 在一些实施例中,将以某一方式标记所收获、成形和脱细胞的微透镜,使得临床医生可以在重新打开皮瓣和激光重塑调整期间保持微透镜的适当定向。所述标记可以以多种方式来完成,但是在所有情况下,一旦微透镜置于基质床上时,标记便对患者不可见。在一些实施例中,所述标记可以是微透镜的顶部前部或底部前部中的微观凹口。在一些实施例中,所述标记可以是由置于微透镜的顶部前部或底部前部的染料制成的线或点。

[0117] 本文还公开了由供体基质形成微透镜的方法。在一些实施例中,一种由供体基质形成微透镜的方法包括:从供体角膜的中心区域去除基质的一部分,并使所述供体基质的后表面成形以提供期望形状的微透镜主体。为了降低不对称的可能性,优选地从所述供体角膜的中心部分取所述组织片段,例如将所述供体角膜的光轴或几何轴保留在所述微透镜的中心。所述组织片段的形状将由矫正患者屈光不正所需的屈光度变化指定。例如,为了矫正远视(hyperopia/hypermopia)和/或老花眼,目标通常是增加角膜的曲率,并且期望的微透镜形状将在至少一侧上略微凸出。微透镜还可以在微透镜的外周包含一个或多个不对称标志物(例如,字母“L”),以标识微透镜的前表面和后表面。

[0118] 本发明的支架可以进一步提供作为屈光(例如,加成)微透镜的优点,因为它们可以被设计为具有比天然基质组织更高的屈光率。目前,在发生上皮不稳定或不可接受的上皮糜烂之前,使用植入的微透镜来改变角膜的曲率通常限于小于约50D(如可在顶点附近测量)的总屈光度(例如,天然角膜和加成微透镜的屈光值之和)。具有更高屈光率的可植入支架提供了更高远视矫正的可能性。基质组织的标准屈光率通常为约1.376。本发明的压缩技

术可以提供屈光率大于1.377,大于1.378,大于1.379,大于1.38或更高的支架。微透镜的屈光率的梯度也可以通过受控交联来实现(这种梯度还可以用来矫正高阶屈光不正,其各项可以用人眼的高阶泽尼克多项式来描述)。

[0119] 在本文所述的实施例中,所述方法产生具有被设计用于获得最佳结果的形状和密度的微透镜。通过首先以保留鲍曼氏膜作为前表面的方式从供体基质切割盘形组织片段来获得微透镜。在一些实施例中,微透镜的直径为约0.5mm到约10mm,约3mm到约9mm,约4mm到约8mm和约5mm到约7mm。可以将所述组织片段切片和/或进一步以某一方式成形或切割,使得在切片手术期间获得期望形状。切割可以机械地(例如,用微型角膜刀等),通过激光加工(例如,通过用飞秒激光进行光切割)来进行。切割可以例如用仪器来进行,例如题为“用于对来自生物组织的板层片段进行切片的手术设备和刀片元件(Surgical Apparatus and Blade Elements for slicing Lamellar Segments From Biological Tissue)”的国际专利申请号PCT/IB2016/054793中公开的那些,其通过引用整体并入。

[0120] 微透镜也可以通过飞秒激光消融、准分子激光消融或通过用水射流切割来获得。如果不需要保留前段,微透镜也可以通过小切口微透镜取出(SMILE)技术来获得,所述技术在例如题为“用于角膜激光手术的方法(Method For Corneal Laser Surgery)”的美国专利6,110,166中公开,其也通过引用整体并入本文。

[0121] 在本文所述的实施例中,微透镜的最大厚度将小于600微米,小于400微米,小于200微米,或小于100微米或小于50微米。直径越小,微透镜越薄,可以将其整合到患者的基质床中的速度就越快。

[0122] 在某些实施例中,使供体基质脱细胞以产生微透镜,其降低了患者的所述部位对细胞来源的免疫原的不良反应的可能性。使用本发明的方法产生的脱细胞微透镜90%到100%,或优选95%到99.99%或98%到99.9%不含细胞和/或细胞残余物。(仅约2%典型角膜由细胞构成。其余98%大部分是细胞外基质(ECM),主要是胶原蛋白、水、GAG和蛋白聚糖。表征脱细胞过程之后的细胞残余物的量的优选和大多数实践方法基于DNA或替代性RNA残留的检测。这些方法非常灵敏且特异性高。通常将这些测量值标准化为脱细胞步骤之前的微透镜中存在的DNA/RNA的量。在不列举90%和99.99%之间的每个可能的子范围的情况下,应当清楚的是,所有这些子范围都被考虑并且被认为是本发明的一部分。例如,所产生的微透镜可以90%,95%,99%到99.7%,99.7%到99.9%或更好地不含天然细胞物质(如以DNA/RNA残留含量测量)。换句话说,微透镜中残留的细胞物质的量(如以残留DNA或RNA含量测量)可以小于原始DNA或RNA含量的重量的1%,或小于0.1%或小于0.01%。(通过微透镜取出本身便可以进行大量的脱细胞。多达95%的总角膜细胞内容物位于上皮和内皮中,其可以被机械地丢弃,从而仅留下角膜基质以进行进一步的脱细胞。)

[0123] 可以使用多种技术来完成细胞物质从供体基质的去除(脱细胞)。在一个优选实施例中,通过化学处理去除角膜的细胞物质。用于溶解和去除来自角膜的细胞的化学物质可以包含酸、碱、表面活性剂(例如,十四烷基硫酸钠(STS))、离子洗涤剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))、非离子洗涤剂(例如,Triton X-100)和两性离子洗涤剂。

[0124] 可替代地或另外地,可以使用酶处理剂去除角膜的细胞物质。可以使用脂酶、嗜热菌蛋白酶、半乳糖苷酶、核酸酶、胰蛋白酶、核酸内切酶和核酸外切酶来从角膜去除细胞物质。在一些实施例中,使用物理技术去除角膜的细胞物质。这些物理技术包含用于通过使用

温度、压力和/或电干扰来溶解、杀死和去除来自组织的基质的细胞的方法。基于温度的脱细胞方法可以包含快速冻融方案。这种基于温度的方法保护了ECM支架的物理结构。压力脱细胞涉及在高温下静水压力的受控使用,以避免可能损坏支架的不受监控的冰晶形成。质膜的电干扰是溶解角膜中细胞物质的另一种选择。

[0125] 在一些实施例中,由于免疫原性表位的降解,微透镜可以被进一步处理以表现出甚至更低的免疫反应性。在使用异种提供时,这是一个重要的步骤。例如,异种移植物组织中可能存在的两个非人表位是N-羟乙酰神经氨酸(Neu5GC)和半乳糖- α -1,3-半乳糖(α -Gal)。这些不期望的表位不仅可以存在于基质细胞的内部,还可以存在其表面上;一小部分表位可能嵌入包裹在ECM胶原蛋白原纤维周围的糖胺聚糖(GAG,也被称为粘多糖)中。在某些实施例中,可以通过酶促处理(例如,激酶或半乳糖苷酶处理)和另外的清洗来去除或在构象上改变这些表位(以中和免疫原)。可替代地,可以从缺少表位的基因敲除转基因猪收获角膜组织,从而产生非免疫原性微透镜而不需要降解步骤。在一些情况下,还可以优选的是,在表位中和之前从微透镜去除上皮和/或内皮细胞层或残留。这可以通过例如用手术刀刮擦或通过例如用适当粗糙度的磨料摩擦来完成。

[0126] 在本文所述的实施例中,产生脱细胞微透镜的方法可以进一步包含灭菌步骤,其可以与包装和密封相结合。可以使用湿润剂、 γ 辐射或电子束来完成灭菌。在一个实施例中,由于不太可能发生对胶原蛋白支架的损伤,所以使用电子束进行脱细胞微透镜的灭菌。可替代地,用于诱导交联的辐射也可以提供足够的能量来对微透镜进行灭菌。

[0127] 在一些实施例中,所收获、成形的和脱细胞的微透镜的制备将包含以下步骤:以某一方式标记微透镜,使得临床医生可以在重新打开皮瓣和激光调整期间保持微透镜的适当定向。所述标记可以以多种方式进行,但是在所有情况下,一旦微透镜放置到位时,标记便对患者不可见。在一些实施例中,所述标记可以是微透镜的顶部前部或底部前部中的微观凹口。在一些实施例中,所述标记可以由置于微透镜的顶部前部或底部前部的染料制成的线或点。这些方法还可以包含:在微透镜的外周雕刻一个或多个不对称标志物(例如,字母“L”),以标识微透镜的前表面和后表面。

[0128] 通过参考以下示例性方案,可以进一步理解本发明以及示出所使用的方法和材料的实施例。可以从猪供体收获角膜组织。微透镜可以取自供体基质内的某一区域,以保持微透镜的前表面处的高密度I型胶原蛋白原纤维或鲍曼氏膜以及较不致密的后表面。可替代地,角膜组织可以取自天然致密化表面下方的基质区域。

[0129] 如图1A中所示,可以将供体角膜的目标区域切成盘形微透镜10A,其具有前表面12、后表面14和组织化的多层胶原蛋白原纤维16。在本阶段,微透镜将通常具有约0.5到10毫米的直径和小于250微米的厚度。

[0130] 图1B示出了脱细胞之后的微透镜,例如通过化学处理、酶促处理或物理技术以产生95-99.99%不含细胞物质的微透镜。如果需要,可以进一步处理脱细胞成形微透镜以降解免疫原性表位。可以进一步对微透镜进行清洗和灭菌,并且如果需要,可以将交联剂施加到微透镜的前表面和/或后表面。脱细胞微透镜(通常由于施加洗涤剂、表面活性剂和/或清洗溶液而膨胀)表现出更大的原纤维层16的分离。在一些实施例中,还可以用凹口标记微透镜的顶部前表面以帮助微透镜在患者的基质床中的定向。

[0131] 在图1C中,然后对脱细胞(且可能膨胀的)微透镜进行压缩,以便从微透镜主体驱

出多余的流体并增加胶原蛋白密度。将胶原蛋白原纤维层压缩在一起,然后使其至少部分地交联以抑制随后的膨胀。

[0132] 在图2中,示出了具有前表面区域22的微透镜20,其中胶原原纤维层已被压缩和交联。还可以使微透镜20的主体区域24交联以抑制膨胀,但其程度与前表面区域22不相同。

[0133] 在图3中,示出了微透镜30,其中一个表面(例如,后表面14)已形成有图案32,以促进术后整合。图案32可以通过选择性施加试剂、选择性照射或这些技术的组合来形成。(应当清楚的是,可以将所述图案施加到前表面12、后表面14或两个表面。)

[0134] 图4A示出了扁平形状的根据本公开的微透镜40A,所述扁平形状通常是在制造和/或运输期间的典型形状。

[0135] 图4B示出了用于角膜内植入的处于示例性最终弯曲状态的微透镜40B。微透镜可以采取各种形状,以矫正不同的屈光不正或眼部病状(在下面进一步讨论)。尽管微透镜通常被示出为形状为球形或球体形,但是应当清楚的是,它们同样可以是椭圆体形或任何期望形状(例如,部分环形)。这种形状在矫正患者视力中的散光或高阶像差方面可能有用。这种非球形形状在匹配患者的角质或角膜缘的形状方面也可能有用。

[0136] 图5A示出了被设计用于角膜内植入以矫正远视病状的微透镜50A。图5B示出了被设计用于角膜内植入以矫正近视病状的微透镜50B。图5C示出了被设计用于角膜内植入以矫正老花眼病状的微透镜50C。图5D示出了被设计用于角膜内植入以矫正被称为圆锥角膜的病状的微透镜50D,其中角膜的天然胶原结构由于损伤、遗传或其它眼部病状(例如,角膜内的酶或信号传导活性的不平衡)而弱化。微透镜50A、50B、50C和50D通常被设计用于角膜内的基质内(多层天然基质之间)的植入。通过将微透镜置于基质组织2内,保留了上皮区域4和内皮区域6。

[0137] 图6A示出了微透镜的另一个实施例,其中微透镜60A用局部强交联点61制造,以提供具有另外的机械强度的区域,例如用于在穿透性角膜移植(PK)或深前板层角膜移植(DALK)期间附接手术缝线),如下面更详细地讨论。

[0138] 图6B示出了微透镜的另一个实施例。在本实施例中,微透镜60B包含具有适度交联的中心光学活性区域65(例如,具有约3到6.5毫米的大直径尺寸)和具有强交联的外部或外周区域63,以再次提供具有另外的机械强度的区域,例如用于附接手术缝线或支持视觉区域外的圆锥角膜弱化的基质。应当注意,区域63和65不必是同心的,并且在例如处理圆锥角膜的情况下,可能期望使光学活性区域与微透镜的中心偏移。

[0139] 图7A示出了根据本公开的微透镜70A在不同类型的角膜内植入(即,深前板层角膜移植(DALK))中的使用。在本手术中,首先去除眼睛的前段,并将微透镜70放入眼睛中,以替代天然鲍曼氏膜3和基质2的一部分。微透镜70A最初可以通过缝线7固定在适当位置。可选地,微透镜70A可以由具有完整鲍曼氏膜的天然供体组织形成,所述鲍曼氏膜在微透镜形成的脱细胞和压缩步骤中被保存。可替代地,可以例如通过浅辐射交联选择性地处理微透镜的前表面,以形成鲍曼氏膜状结构。无论哪种情况,在角膜内植入之后,患者的外周上皮都可以在所植入的微透镜的前表面上生长。

[0140] 图7B示出了微透镜70B的使用,其类似于图7A中示出的DALK微透镜,但是通常更薄(例如,小于200微米)并且被配置成放置在患者的完整鲍曼氏膜3的顶部但是在上皮4下方。在本手术(有时被称为“表层角膜移植”)中,微透镜70B可以再次通过缝线7固定在适当位

置。

[0141] 图7C示出了根据本公开的微透镜70C的又一个实施例,在这种情况下,其被设计用于穿透性角膜移植(PK)手术。微透镜70C类似于图7A中示出的DALK微透镜,但被配置成完全替代全深度的中心角膜组织,即角膜后部的内皮6、基质2和鲍曼氏膜3。微透镜70C可以再次通过缝线7固定在适当位置。在微透镜70C的角膜内植入之后,患者的外周上皮可以在所植入的微透镜的前表面上生长。

[0142] 图8A、8B和8C示出了用于厚微透镜的外周的两种替代设计,例如诸如在DALK和PK手术中可用的那些。在图8A中,示出了具有简单的(例如,圆柱形或圆锥形)外周边缘的微透镜80A。在图8B中,示出了在其外周处具有锯齿形或阶梯形边缘的微透镜80B。可以将成形的边缘设计成与在天然角膜中形成的互补结构配合,以进一步帮助将微透镜80B连接到其余的天然角膜组织。也可以采用阶梯形状的变型(例如,反向锯齿形)。如图8C中所示,可以采用甚至更高级的外周边缘形状,以允许机械闩定或锁定到天然角膜中。在一些情况下,锁定功能可以减少或消除对沿闩定边缘的手术缝线的需要。这种微透镜的外周可以比中心部分更强地交联。

[0143] 在一些情况下,这些较厚的微透镜的厚度从中心到边缘可能有所变化。例如,微透镜的厚度可以从中心的约400微米变化为外周边缘的550微米。这与在大多数角膜中发现的天然厚度变化一致,在大多数角膜中,典型的完整角膜可以表现出约500微米的中心角膜厚度,而角膜的外周片段可以表现出约550到约650微米级别的厚度。

[0144] 图9示意性地示出了用于压缩根据本发明的胶原蛋白支架的压合器90。压合器90可以包含框架92和可移动平台94。所述框架装有顶部压合元件96,并且所述平台装有底部压合元件98。这些元件中的至少一个是非平面的并且被成形为符合支架的期望最终形状。元件96和98可以通过施加动力(由蜗杆91示意性示出)而被压缩。在某些实施例中,压合元件96、98中的至少一个可以是透明的,使得可以在其模制的同时例如通过UV辐射源93照射在其间保持压缩状态的支架。

[0145] 图10A和10B示出了根据本发明的两部分可气密封的压缩和储存容器或模具101。容器/模具101可以包括模具基部102和模具顶部104,二者在其间限定了腔室105。模具101的目的是压缩支架100A(例如,脱细胞基质胶原(细胞外基质)支架),并同时从支架中去除流体。图10A示出了处于其预压缩状态的模具101。密封件106(例如,0形环或扁平垫圈密封件)最初将模具顶部104和模具底部102分开。在一些情况下,还可能需要将未被支架100A占据的腔室105的其余部分用流体107填充,以避免在压缩期间气体滞留在支架中。密封件106适于容纳从支架驱出的流体以及腔室101中最初围绕支架的任何流体。在图5A中,示出了在压缩之前的模具,但其处于密封件106与周围环境隔离的第一时刻。

[0146] 模具的顶部104可以是至少部分地透明或半透明的,以允许光化辐射直通到支架,以便使支架交联。可替代地或另外地,模具底部102可以对光化辐射透明。模具的透明部分可以由塑料、玻璃、陶瓷或金属或这些材料的任何组合制成,只要它足够透明或半透明以允许辐射透射即可。

[0147] 图10B示出了在压缩支架100B之后的模具101。密封件106(例如,0形环)可以在凹槽103中移动,使得所述凹槽容纳排出的流体。(还可以采用各种其它引流机构。)在这种情况下,可以使用模具101来进行交联和灭菌。如果选择了合适的辐射波长和注量,则这种灭

菌可以与交联同时进行。(在许多情况下,使病毒灭活所需的辐射剂量将大大少于交联所需的辐射剂量)。可以进一步使用压缩灭菌模具进行装运或长期储存。为了使光化交联辐射(例如,UV辐射)也可有效地用于灭菌目的,辐射应在本过程期间到达微透镜的所有表面。因此,可能希望采用对所选的光化辐射具有透射性的密封件(例如,Q形环或扁平垫圈。例如,如果在模制期间使用UV辐射对微透镜同时进行交联和灭菌,则密封件可以由UV可透射或半透明材料(例如,氟聚合物,例如聚四氟乙烯(FIFE)、氟化乙烯丙烯(FEP)、乙烯四氟乙烯(ETFE)或全氟烷氧基(PFA)组合物)制成。

[0148] 压缩之前的支架或微透镜的形状和模具的匹配形状通常将确保微透镜的密度在压缩之后保持均匀。例如,压缩可以将垂直尺寸减小一半,并且均匀地将密度增加两倍。

[0149] 图11示出了用于拉伸支架161的根据本发明的另一设备110,所述支架161可以是已脱细胞并经过初始压缩处理的天然脱细胞基质切除物或支架。在本实施例中,支架161已通过密封机构167(例如,通过将支架161的外周边缘压接在两个扁平凸缘之间)附接到腔室163的开口。(代替压接或除了压接以外,可以采用各种其它密封机构以在支架和腔室口之间提供不透流体的连接。)然后,将流体166经由受控压力导管165引入腔室163中,以填充腔室的内部并在支架161上施加压力。例如,通过在腔室中保持足够的静水压力(例如,约30到约500毫巴,优选约50到约200毫巴(或约22.5到约375托,优选约37.5到约150托)的压力),可以获得水平和/或切向拉伸。

[0150] 即使对支架施加机械应力的流体是纯水或平衡盐溶液(BSS),施加此流体压力也可能导致支架退胀(释放自由水)。流体可以以任何方向从支架流出(例如,移动到加压流体腔室中,或从支架的外表面渗出或两者兼有)。还可以在腔室163中采用高渗或低渗溶液以增强或限制这种效果。

[0151] 通过将ECM支架暴露于这种类型的拉伸中,可以对胶原蛋白原纤维进行排列以形成弯曲形状。如图所示,当获得期望曲率时,可以通过交联(例如,通过光化辐射168)来保持(或固定)形状。

[0152] 在图12中,示出了又一替代设备120,其与图6的设备相似,但是增加了压缩施加板元件171,用于同时拉伸支架并对其进行压缩,以及促进暴露于交联辐射。通过在腔室中保持足够的静水压力(约30到约500毫巴,优选约50到约200毫巴),再次提供水平和/或切向拉伸。可以通过顶板171同时施加垂直/径向压缩。优选地,顶板171至少部分地透明(例如,透明或半透明),以允许光化辐射通过其到达支架,以便使支架交联。

[0153] 尽管顶板171被示出为扁平板,但是本压缩元件的形貌可以采取任何期望形状和/或曲率,以确保胶原蛋白原纤维的布置被适当地固定以构建期望形状的微透镜,这可以再次通过辐射诱导的交联来保存或固定。

[0154] 图13示出了用于测量根据本公开产生的微透镜的透明性的设备130。设备130包含光源132、透明小容器(cuvette)134(可以在其中放置微透镜135)、透镜136和检测器138。光源(例如,具有波导/光纤和光束准直器(未示出)的发光二极管(LED))优选地产生准直光束133。光束应与跨其光束宽度D(例如,约5-7mm)的平坦(非高斯)强度曲线空间相干。例如,光源132可以产生中心波长为约500纳米且带宽为约5-10纳米的绿光。

[0155] 来自光源132的光被引导到透明小容器134,在所述透明小容器134中,微透镜135悬浮在屈光率匹配流体137(例如,硅油或具有约为1.376的屈光率n的与水不混溶且具有化

学惰性的其它流体)中。(n的值=1.376表示天然角膜组织的标称或平均屈光率。在一些情况下,可能是有利的是,使微透镜具有不同的屈光率。在这种情况下,透明小容器中的流体将被选择成匹配进行测试的微透镜的具体n值。然后,将通过透明小容器134(和微透镜135)的光引导到透镜136,所述透镜136是高质量透镜,在所选的光束波长下没有球面像差。透镜136具有焦距f,并且用于将聚焦的光引导到位于透镜136的焦平面内的检测器138上。如果微透镜的透明性是完美的(并且假定来自光源132的光到达检测器138所通过的光学元件具有理想的光学透明性),入射在检测器(位于焦平面)之间的光束的大小将是具有均匀强度的衍射限制点。实际上,微透镜将并非完全透明,并且由于支架中的光的前向散射,检测器处的光束强度图像将表现出一定程度的模糊。(应选择透镜的焦距以及光束直径,以施加期望的衍射限制角分辨率。)

[0156] 因此,可以通过测量所检测光束的强度曲线来测量微透镜的透明性。用于测量强度或亮度曲线的合适的光检测器可以包含例如照相板、CCD阵列或扫描针孔检测器。

[0157] 图14是这种通过测量微透镜的散射角(在本文中被称为“ θ (theta)”)来量化透明性的方法的图示。图14示出了如在透镜的焦平面中测量的亮度分布曲线。这种类高斯分布表示散射波前的所有贡献之和。在微透镜中越散射,所检测的光束的宽度越大。散射的一种度量(光学透明度的降低)是半垂直最大值全宽度(FWHV),如图14中所示。(应当理解,图14的类高斯曲线是理想化的,并且实际亮度曲线可能会由于噪声或其它杂散信号而失真。可以使用多个测量值和求平均(或其它已知的降噪信号处理技术)获得微透镜散射的最佳数据表示。FWHV值除以焦距f提供了光束的角展度的测量值(弧度):

[0158] $\theta = \text{FWHV}/f$ [弧度]

[0159] θ 仅取决于散射量,也可以使用转换公式以弧分表示:1弧分=291微弧度。如果角度 θ 小于4弧分,优选小于3或2弧分,更优选在一些情况下小于1弧分,则通过本文公开的方法制造的微透镜表现出令人满意的透明性(例如,用于角膜内植入)。

[0160] 本文引用的所有专利文献或出版物通过引用整体并入。尽管结合各个实施例描述了申请人的教导,但是并不旨在将申请人的教导限于这些实施例。相反,如本领域技术人员将理解,申请人的教导涵盖各种替代方案、修改和等同内容。结合一个实施例示出的任何元件或特征可以与在任何其它实施例中示出的任何元件或特征可互换地、组合地或附加地使用,并且应当理解,元件和特征的所有这种排列涵盖在本公开内。因此,将理解,本发明不限于本文公开的实施例,而是将根据以下权利要求来理解,所述权利要求应在法律允许的范围内广泛地解释。

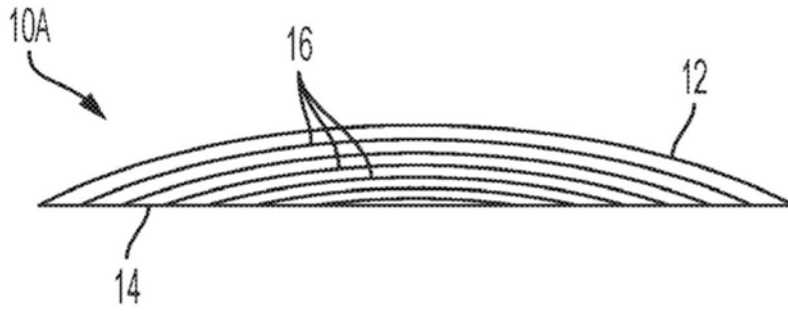


图1A

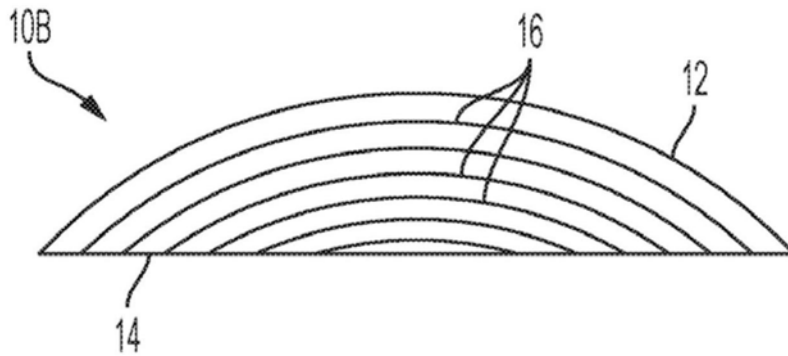


图1B

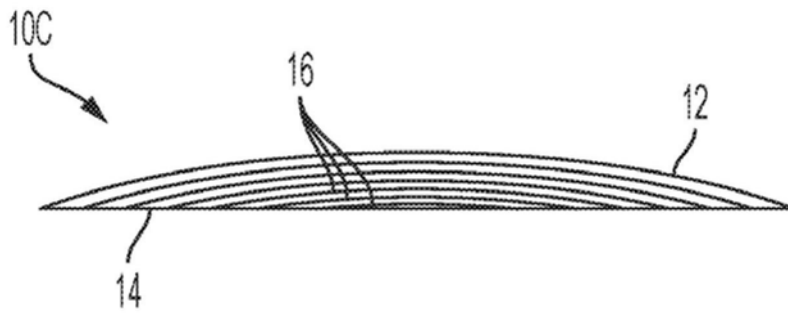


图1C

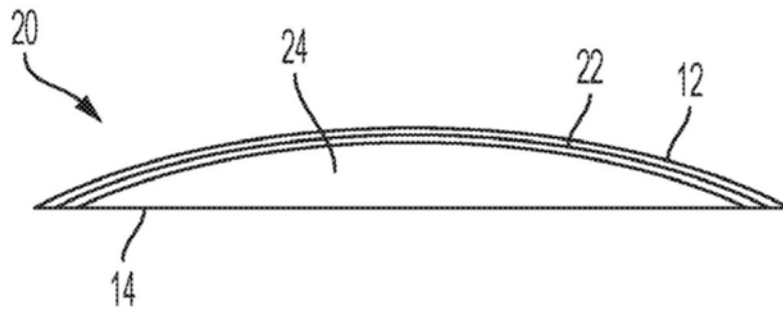


图2

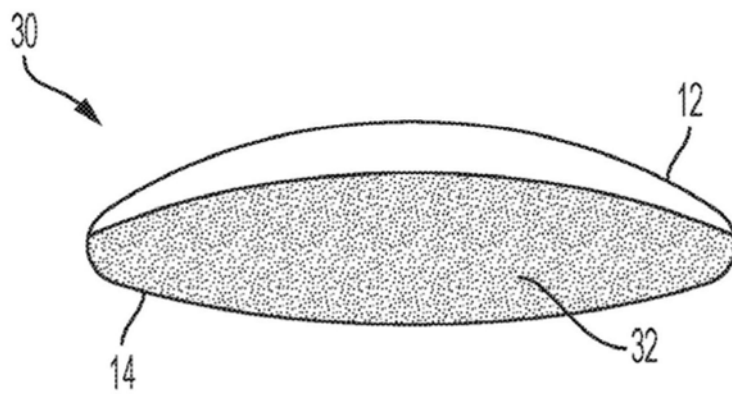


图3



图4A

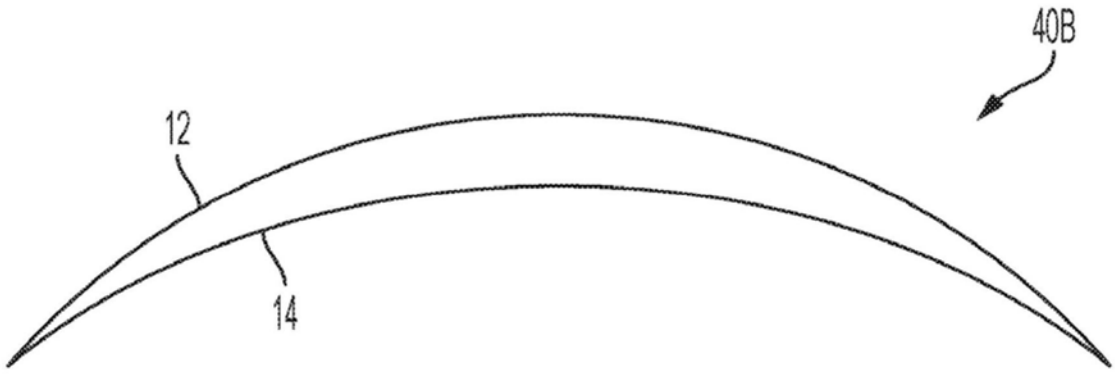


图4B

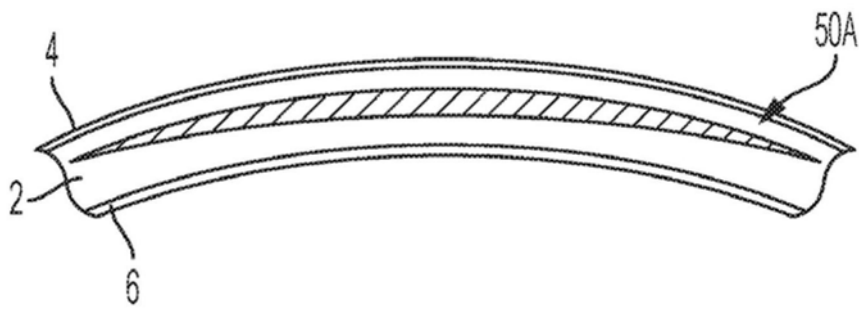


图5A

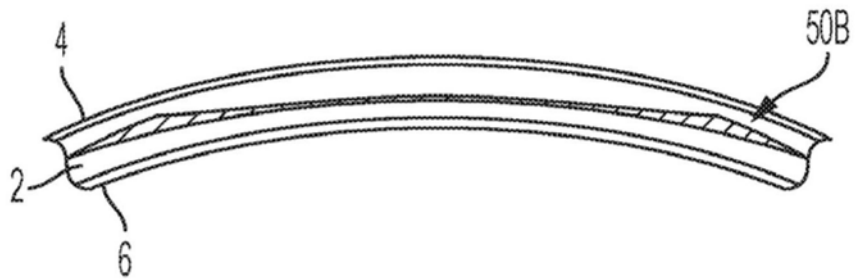


图5B

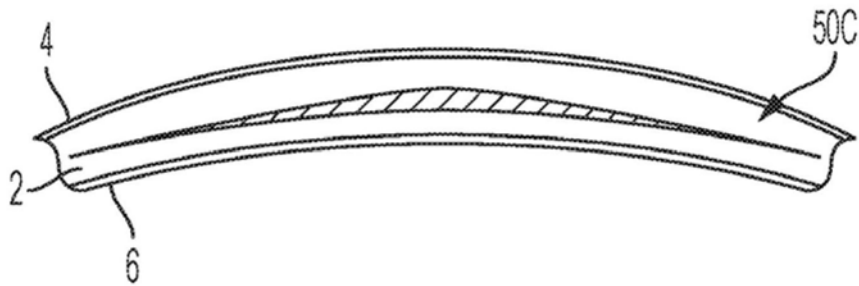


图5C

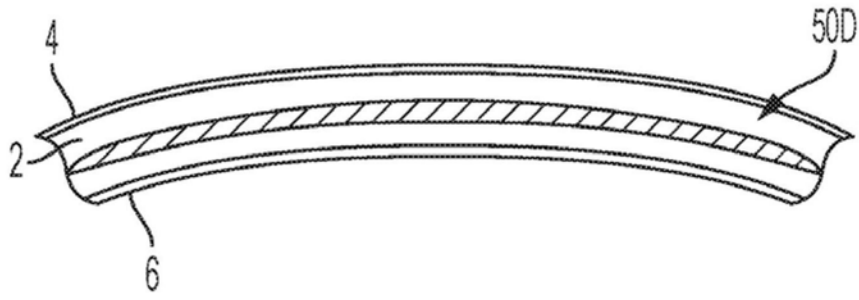


图5D

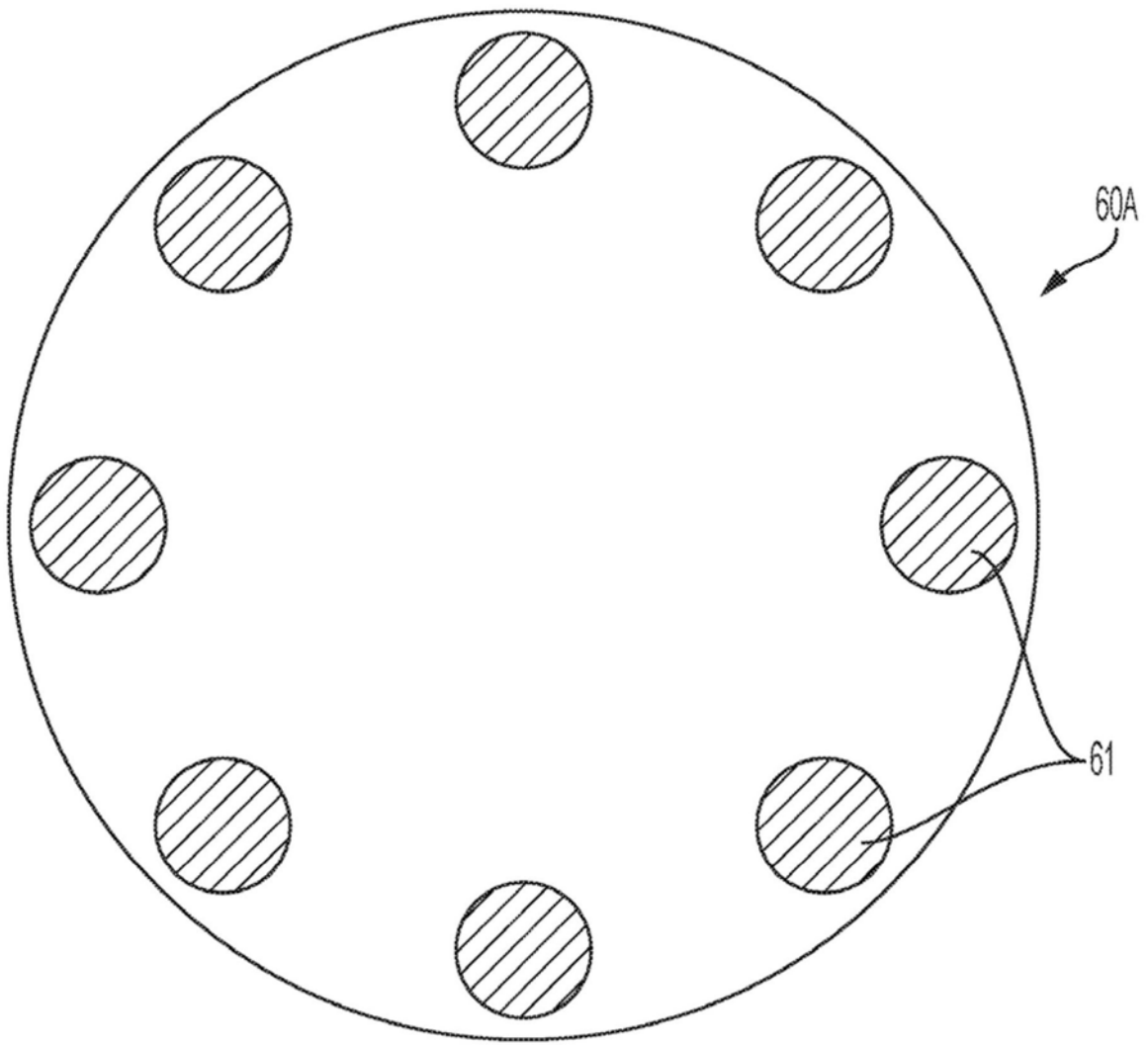


图6A

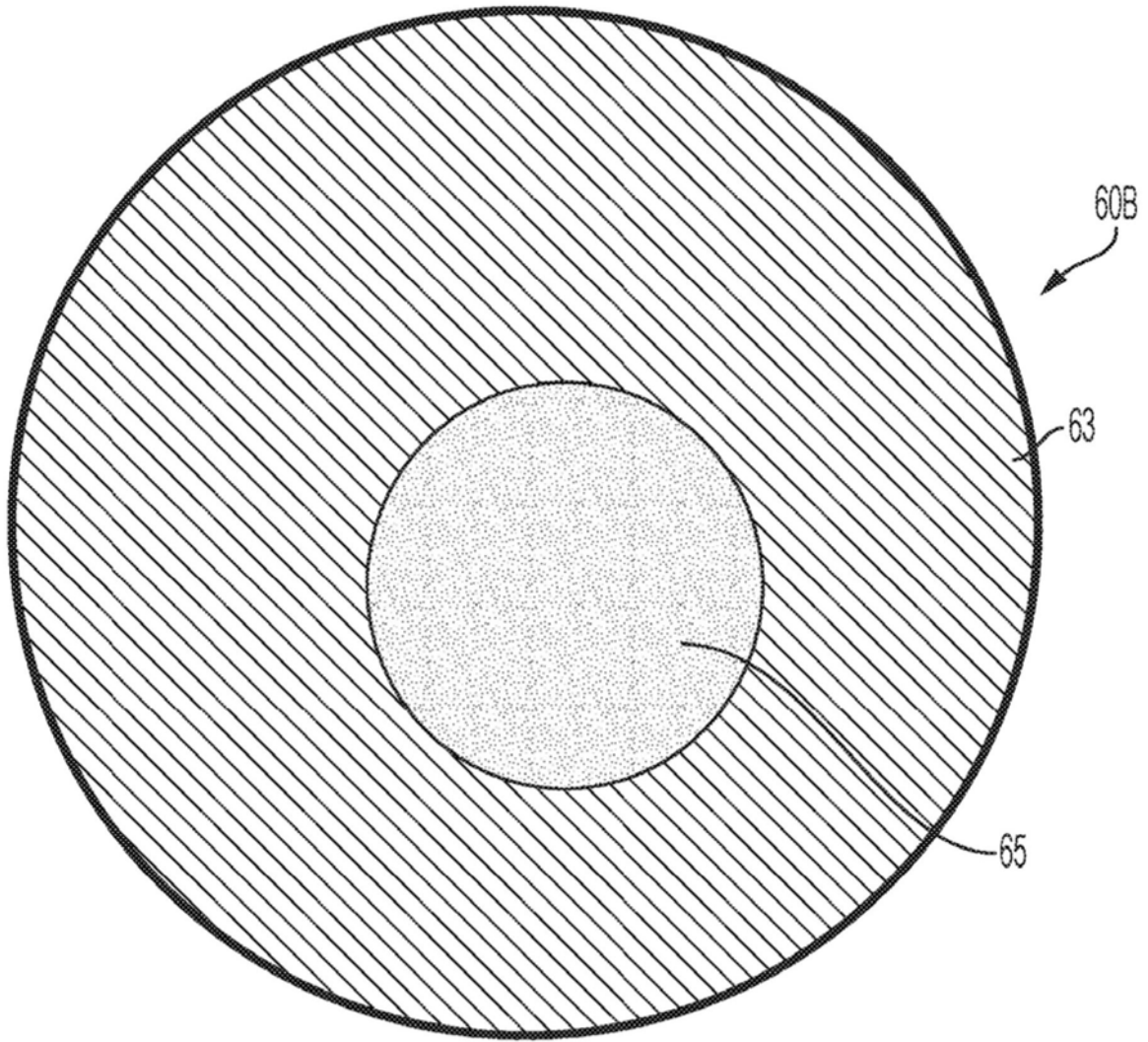


图6B

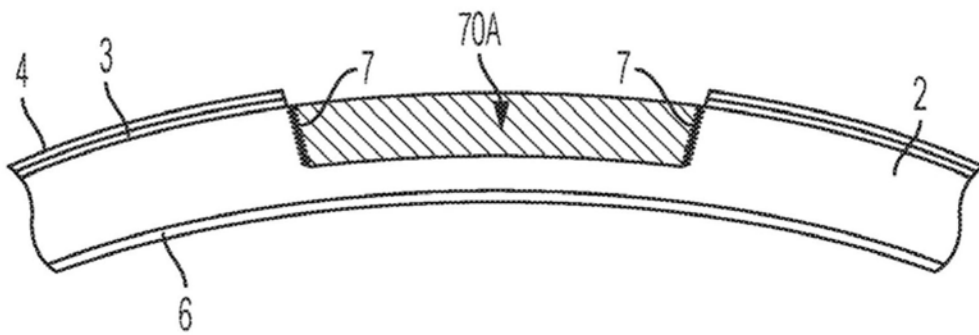


图7A

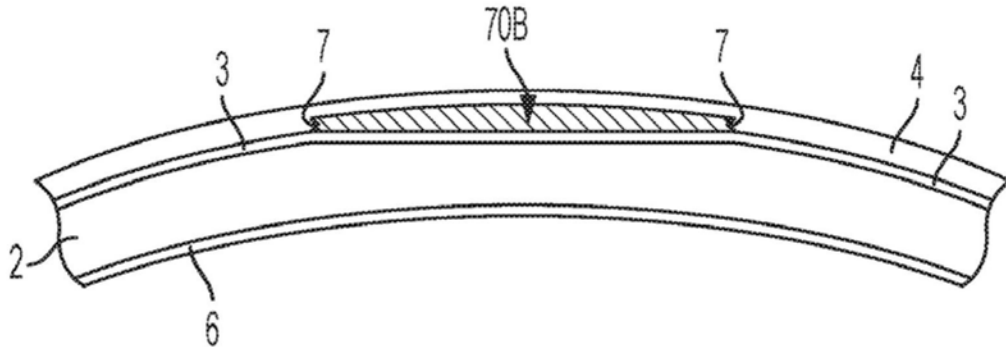


图7B

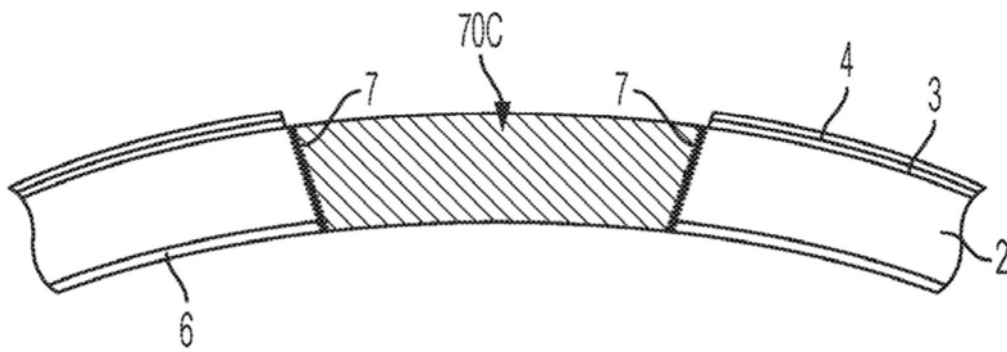


图7C

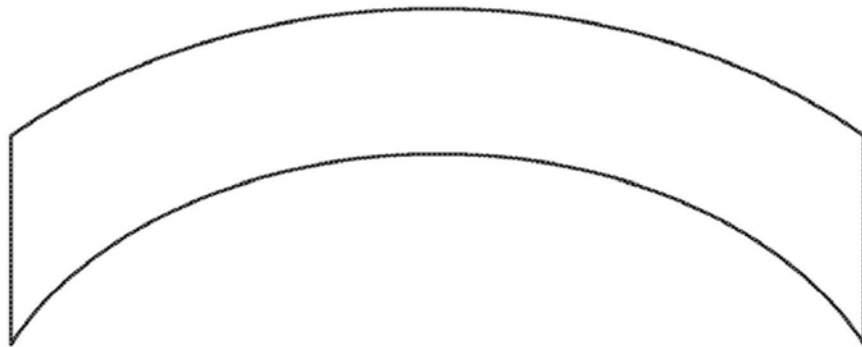


图8A

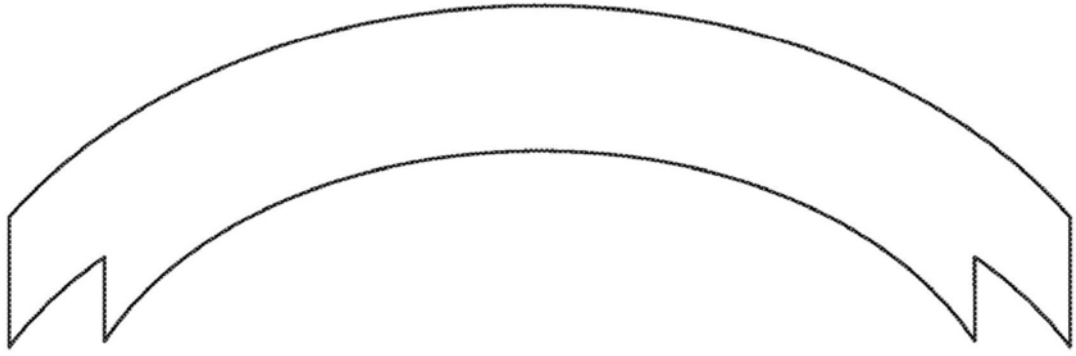


图8B

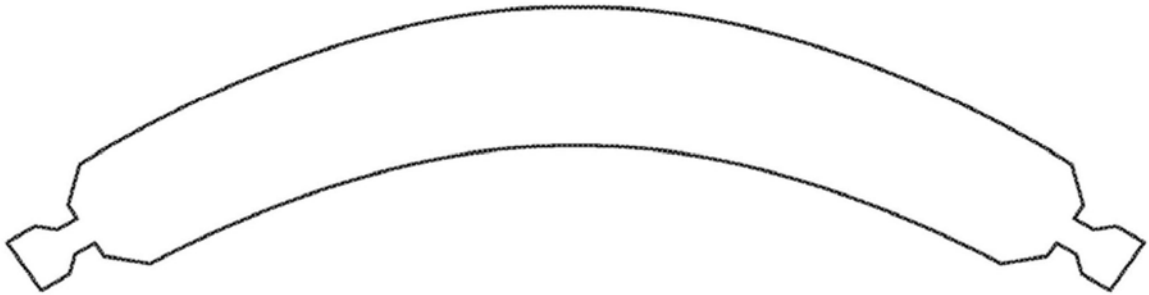


图8C

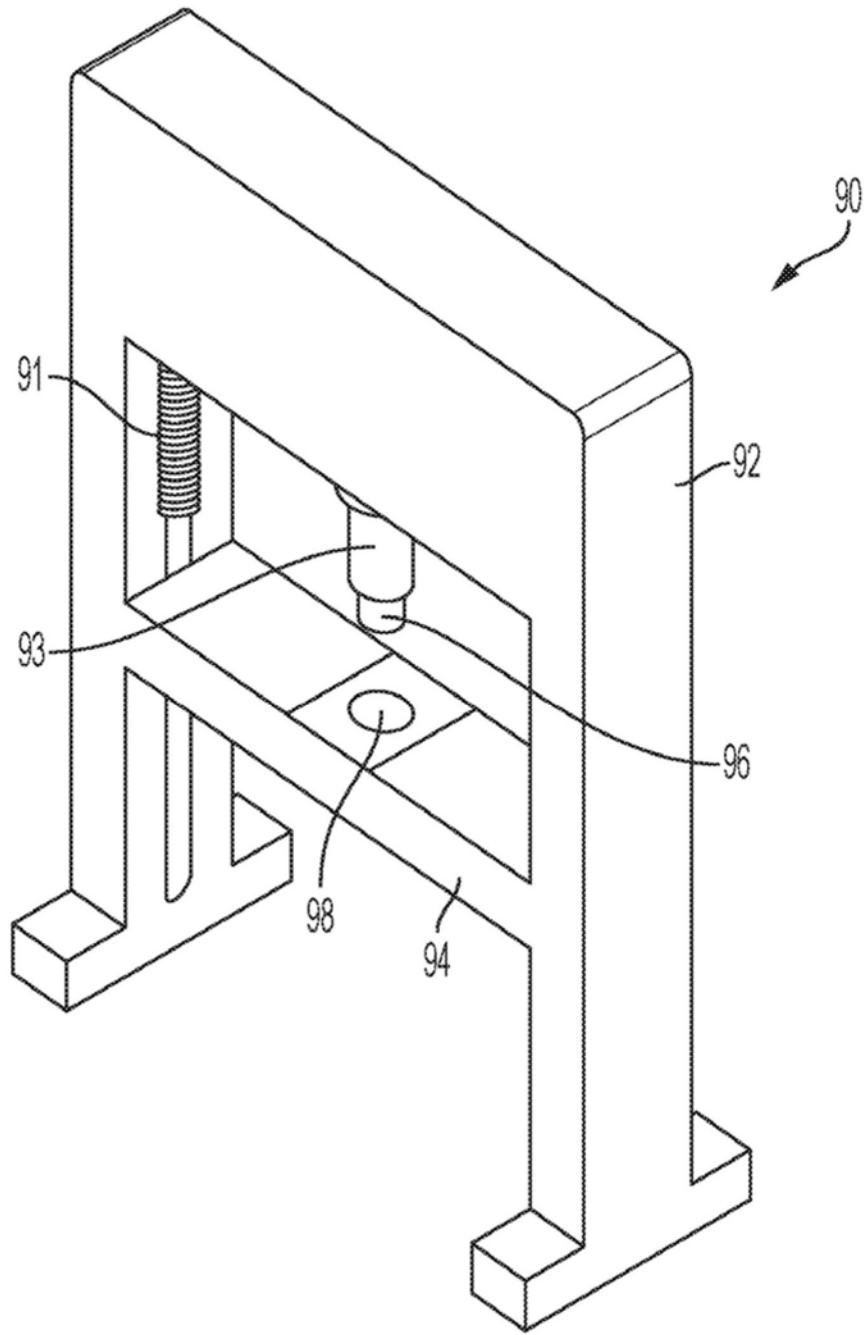


图9

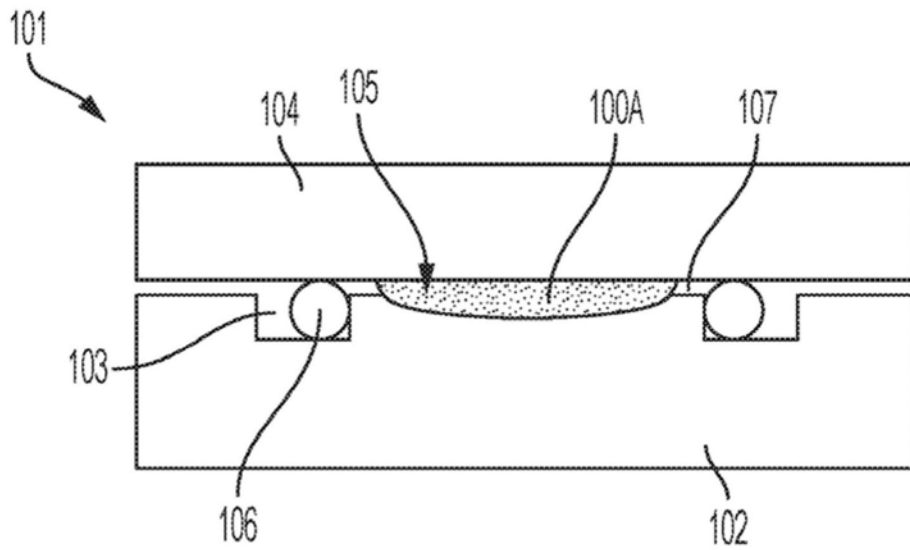


图10A

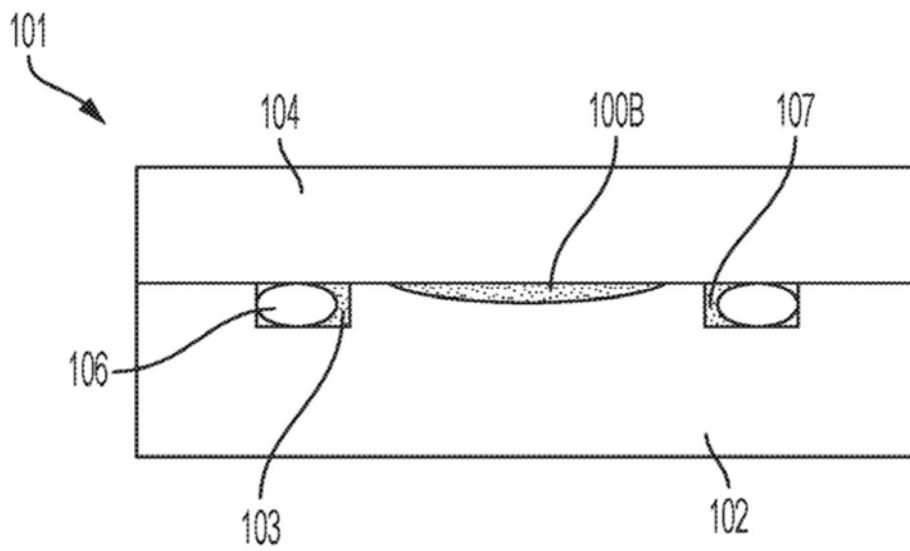


图10B

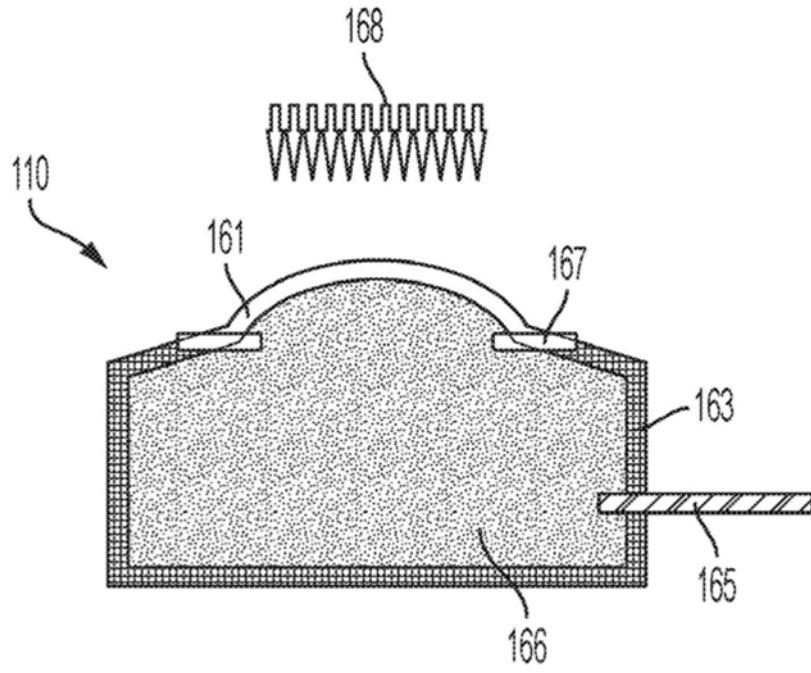


图11

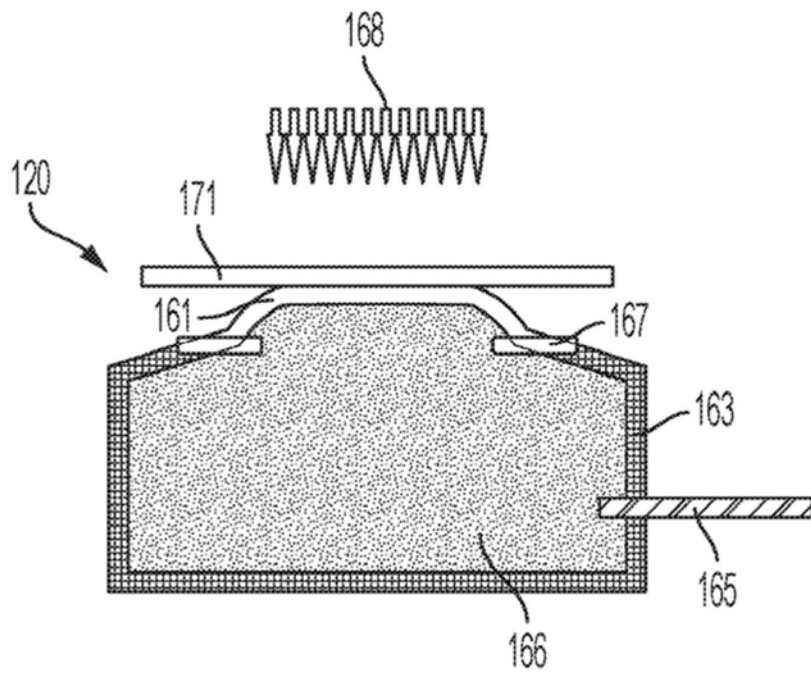


图12

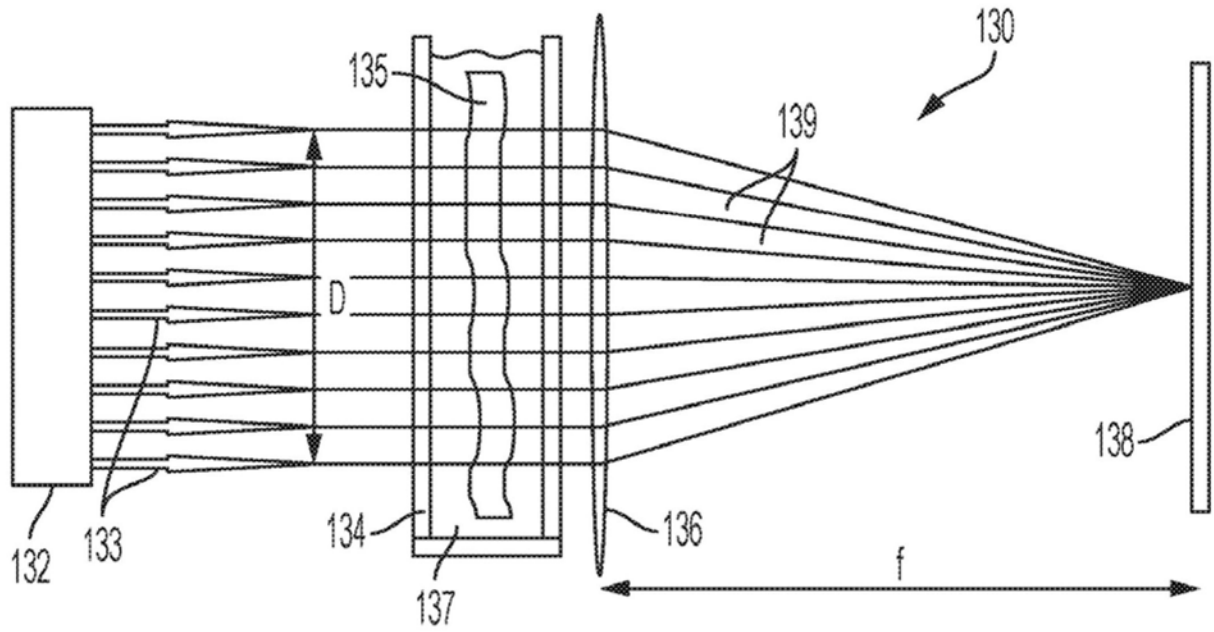


图13

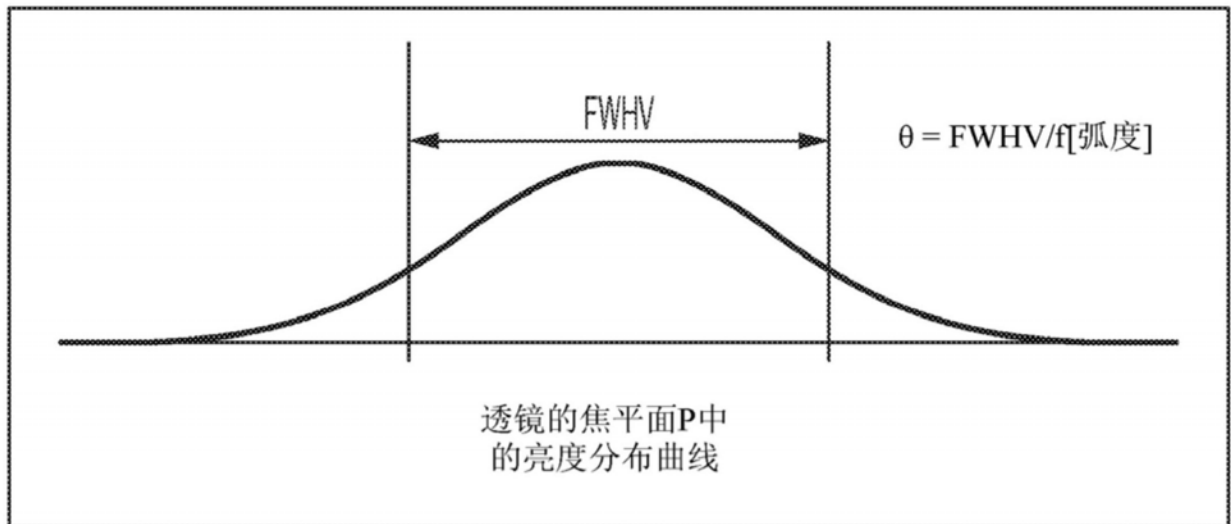


图14