



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101018513 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200580026902. 1

(22) 申请日 2005. 08. 12

(30) 优先权数据

60/601, 270 2004. 08. 13 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 02. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/028723 2005. 08. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02006/020859 EN 2006. 02. 23

(73) 专利权人 渥太华健康研究所

地址 加拿大安大略省

专利权人 加拿大国家研究委员会

库柏维景公司

(72) 发明人 梅·格里菲思 戴维·J·卡尔森

李丰福 刘宇文

J·克里斯托弗·马尔莫

迈赫达德·阿斯曼拉法特

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 王允方 刘国伟

(51) Int. Cl.

A61F 2/16(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2002/0007217 A1, 2002. 01. 17, 全文.

US 5112350 A, 1992. 05. 12, 全文.

US 5836313 A, 1998. 11. 17, 全文.

US 4581030, 1986. 04. 08, 说明书第 2 栏 45 行 - 第 5 栏 20 行.

审查员 彭燕

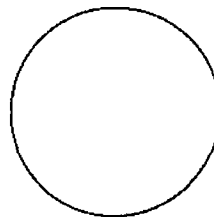
权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 6 页

(54) 发明名称

视力增强眼科器件及相关方法和组合物

(57) 摘要

本发明阐述用于改善视力或治疗眼睛疾病、病症或损伤的器件、方法和组合物。眼科器件（例如角膜覆盖体、角膜嵌体及全层角膜植入体）均由有效促使神经穿过所述器件或在所述器件上生长的材料制成。所述材料可包含数量大于 1% (w/w) 的胶原，例如介于约 10% (w/w) 与约 30% (w/w) 之间。所述材料可包括使用 EDC/NHS 化学品交联的胶原聚合物及 / 或第二生物聚合物或水溶性合成聚合物。所述材料可另外包含合成聚合物。所述器件是放置于眼睛中以校正或改善个体的视力或治疗个体眼睛的疾病、病症或损伤。



1. 一种视力增强眼科器件,其包括本体,所述本体包括一定量当将所述器件放置于个体的眼睛中时有效促使神经穿过所述本体生长或在所述本体上生长的材料,

其中所述本体构造为角膜覆盖体,所述角膜覆盖体为一种眼科植入体,其经构造位于一个体眼睛的上皮或上皮细胞层与鲍曼氏膜之间;

所述本体形成后具有屈光力,并且当将所述覆盖体放置于上皮下的鲍曼氏膜时有效促使神经穿过所述覆盖体生长。

2. 如权利要求 1 所述的器件,其中所述材料包含数量介于 1% (w/w) 与 50% (w/w) 之间的胶原。

3. 如权利要求 2 所述的器件,其中所述材料包含数量介于 10% (w/w) 与 30% (w/w) 之间的胶原。

4. 如权利要求 1 所述的器件,其中所述材料包含经交联的胶原聚合物。

5. 如权利要求 1 所述的器件,其中所述材料包含重组胶原。

6. 如权利要求 1 所述的器件,其中所述材料进一步包含细胞生长增强剂。

7. 如权利要求 6 所述的器件,其中所述细胞生长增强剂是肽。

视力增强眼科器件及相关方法和组合物

[0001] 相关申请案的交叉参考

[0002] 本申请案主张于 2004 年 8 月 13 日提出申请的美国临时申请案第 60/601,270 号的权利,该案的全部内容以引用方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明关于用于增强一个体的视力或用于治疗眼睛创伤性损伤或一个体的眼睛疾病或病症的器件、方法和组合物。具体而言,本发明是关于由能为所述个体提供一或多个益处的材料构成的角膜覆盖体、角膜嵌体和角膜植入体。

背景技术

[0004] 美国专利第 5,713,957 号揭示角膜覆盖体,其包含一种非生物可降解非水凝胶眼睛生物相容的材料,且具有一足以使分子流体重量大于 10,000 道尔顿的组织液组份穿过所述覆盖体的孔。

[0005] 美国专利第 5,716,633 号揭示一种用于促进上皮细胞生长及间质再生的胶原 / PHEMA-水凝胶。所述胶原-水凝胶可经提供作为一附着于鲍曼氏膜 (Bowman's membrane) 的光学透镜,此有效促进并支持上皮细胞生长或使所述角膜上皮附着于所述透镜的前表面上。所述胶原-水凝胶是一种水凝胶聚合物,其是在胶原的水性原液存在下通过一经凝胶化且经交联的亲水单体溶液的自由基聚合以形成一用于固定胶原的三维聚合物网络来形成。胶原在所述覆盖体中的最终浓度为约 0.3% 至约 0.5% (wt/wt)。

[0006] 美国专利第 5,836,313 号揭示用于形成可植入复合人工角膜的方法。所述方法提供经设计以为角膜上皮细胞生长提供适宜基质的人工角膜。所述人工角膜是通过以下形成:将一角膜组织放置于一具有角膜植入体形状的模具中并使一聚合物溶液交联以将一厚度介于约 50 微米与 100 微米之间的生物相容水凝胶化学键结至所述角膜组织以形成所述人工角膜。或者,将一聚合物溶液置于所述角膜组织与一预形成水凝胶之间并然后聚合以便使所述聚合物溶液连接至所述水凝胶与所述角膜组织二者。

[0007] 美国专利第 6,454,800 号揭示一种角膜覆盖体或角膜植入体,其包含具有复数个表面压痕的表面,所述表面可支持组织细胞的粘附和生长。

[0008] 美国专利第 6,689,165 号揭示一种用于角膜增大及替换的合成器件,其使用栓系的角膜增强剂增加角膜上皮细胞粘附及迁移。

[0009] 一些与现有以胶原为主的材料相关的问题是所述以胶原为主的材料不是光学透明的,此可能是由于形成或转化成一导致不期望光散射的以纤维为主的材料之故。

[0010] 因此,业内仍需要生物相容、眼科上可接受且适于放置于眼睛中以增强一个体视力的材料。

发明内容

[0011] 一种眼科器件包括一本体,所述本体包括一当将所述器件放置于一个体的眼睛中

时有效促使神经穿过所述本体或在所述本体之上生长的组合物。在某些实施例中,所述器件是一种视力增强眼科器件。在替代实施例中,所述器件是一种治疗眼科器件。本发明视力增强器件可理解为经结构化以校正一或多种屈光不正的器件。换言之,本发明器件可理解成屈光不正校正器件。本发明器件的本体形成后可具有一屈光力。

[0012] 本发明组合物是光学透明的且可包含数量介于约 1% (w/v 或 w/w) 与约 50% (w/v 或 w/w) 之间的胶原。在某些实施例中,胶原数量大于 2.5% (w/w 或 w/v)。本文所用胶原及 / 或所述组合物及器件的其他组份的数量应理解为 w/w 或 w/v 百分数,此并不背离本发明的精神。在附加实施例中,胶原数量大于约 5.0%。例如,所述材料可包含数量介于约 10% 与约 30% 之间的胶原。在某些实施例中,所述材料包含数量介于约 1% 与约 50% 之间的交联胶原,其中所述胶原是使用 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC ;CAS 编号 1892-57-5) 及 N- 羟基琥珀酰亚胺进行交联。在其他实施例中,经交联胶原数量介于 2.5% 与约 50% 之间。所述材料可包含一交联至一第二胶原聚合物的第一胶原聚合物。在某些实施例中,本文所揭示的眼科器件不使用戊二醛制造。例如,所述眼科器件在其制造中不利用戊二醛作为一交联剂。由于戊二醛及 / 或本发明组合物及器件的处理及安全要求,不期望或不会首选戊二醛作为一交联剂。在某些实施例中,所述眼科器件是在没有细胞毒性组份的情况下制造,或换言之,是使用具有降低细胞毒性的组份制造。

[0013] 上述器件可为一角膜覆盖体、角膜嵌体或全层角膜植入体,例如一经构造以代替一个体天生角膜的器件。本发明器件是透明的,且可自在组合物形成所述器件之前透明的组合物制得。

[0014] 上述器件的材料亦可包含一或多种细胞生长增强剂或一或多种额外的生物聚合物。

[0015] 根据本文揭示内容,一种制造眼科器件(例如屈光不正校正器件)的方法包括使用 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (EDC 和 NHS) 使胶原聚合物交联。所述交联在一酸性 pH(例如约 5.0 至约 5.5 的 pH) 下出现。所述方法还可包括一或多个将一细胞生长增强剂添加于所述经交联组合物的步骤。所述方法包括将所述组合物放置于一模具中,并使所述组合物固化以形成一眼科器件。

[0016] 本文所阐述的任何特性或特性组合皆包括在本发明范围内,只要任何所述组合中所包括的特性不与上下文、此说明书及熟习该项技术者的知识明显相互矛盾即可。此外,任何特性或特性组合可明确排除在本发明任何实施例之外。

[0017] 自以下详细阐述、图示、实例及权利要求可清楚地了解本发明的额外优点及方面。

附图说明

[0018] 图 1 绘示一用于制造本发明组合物及器件的系统的 T 形连接器的剖视图。

[0019] 图 2 绘示一用于制造本发明组合物及器件的系统的凹形 Luer 连接器的剖视图。

[0020] 图 3 是图 1 所述 T 形连接器的平面图,其中一隔膜和两个注射器连接至其以制造本发明组合物及器件。

[0021] 图 4 是人类重组水凝胶材料(称为 F1)细胞计数随时间变化的图表。

[0022] 图 5 是人类重组水凝胶材料(称为 F3)细胞计数随时间变化的图表。

[0023] 图 6 是人类重组水凝胶材料(称为 F6)细胞计数随时间变化的图表。

- [0024] 图 7 是位于一大鼠中的人类重组水凝胶材料（称为 F3）的照片。
- [0025] 图 8 绘示本发明屈光不正校正眼科器件的一实施例。
- [0026] 图 8A 绘示本发明覆盖体一实施例的透镜边缘构造。
- [0027] 图 9 是膨胀比随 EDC 与 NH_2 摩尔比变化的图表。
- [0028] 图 10 是抗拉强度随 EDC 与 NH_2 摩尔比变化化的图表。
- [0029] 图 11 提供抗拉强度随胶原浓度变化（左图）及膨胀比随胶原浓度变化（右图）的图表。
- [0030] 图 12 提供对于具有不同 EDC 与 NH_2 摩尔比的组合物热流随温度变化（左图）及对于具有不同 CSC 浓度的组合物热流随温度变化（右图）的图表。
- [0031] 图 13 是神经突长度随硫酸软骨素与胶原干重比而变的图表。

具体实施方式

[0032] 一典型的人类眼睛具有一个晶状体和一虹膜。后房是位于所述虹膜的后面且前房是位于所述虹膜的前面。所述眼睛具有一由五层构成的角膜，如下文所讨论。所述层中的一层角膜上皮覆盖角膜的前外表面。所述角膜上皮是横向延伸至缘的复层扁平上皮。

[0033] 所述角膜的五层包括角膜上皮、鲍曼氏膜、间质、Descemet 氏膜和内皮。所述角膜上皮通常约 5-6 个细胞层厚（约 50 微米厚），且当所述角膜损伤时通常可再生。所述角膜上皮提供一相对平滑的折射表面且有助于防止眼睛感染。所述角膜基质是层状结构的胶原，其包含分散于其中的细胞（例如成纤维细胞和角膜细胞）。所述间质构成所述角膜厚度的约 90%。所述间质的前部分（其位于所述上皮之下）无细胞且通称为鲍曼氏膜。鲍曼氏膜是位于所述上皮与所述间质之间且认为其保护所述角膜不受伤害。所述角膜内皮通常是一通过自所述角膜去除水使所述角膜脱水的单层低立方或扁平细胞。一成年人角膜通常约 $500\text{ }\mu\text{m}$ (0.5mm) 厚且通常没有血管。

[0034] 已发明眼科器件，其为一期望增强或改善其视力或需要治疗眼睛疾病、病症或创伤性损伤的个体（例如，人）提供一或多个益处。本文所述的器件可经构造作为角膜覆盖体、角膜嵌体或全层角膜植入体。本发明器件可增强视力下降个体的视力或为没有视力的个体提供视力。特定而言，本文所述的器件不包括眼内透镜。

[0035] 如本文所用，“光学透明”是指白色光至少 85% 透射。在某些实施例中，“光学透明”是指与具有（例如）白色光大于 90% 透射及小于 3% 散射健康角膜等效的光学透明度。

[0036] 如本文所用，“角膜覆盖体”是一种眼科植入体或器件，其经构造（例如具有一定大小和形状）位于一个体眼睛（例如人类或动物的眼睛）的上皮或上皮细胞层与鲍曼氏膜之间。与此相比，一接触透镜是经构造位于一眼睛的上皮上。因此，一角膜覆盖体可完全搁置于所述鲍曼氏膜上，或其可包括一或多个延伸至鲍曼氏膜的部分。所述部分构成所述器件的较小部分，例如小于所述器件面积或体积的 50%。

[0037] 如本文所用，“角膜嵌体”是一种经构造位于眼睛间质中的器件或植入体。角膜嵌体可通过在所述间质中形成一皮片或囊而放置于所述间质中。角膜嵌体是放置于一眼睛的鲍曼氏膜之下。

[0038] 如本文所用，“全层角膜植入体”是指一经构造代替一眼睛位于所述眼睛眼房水前面所有或部分不健康角膜的器件。

[0039] 本发明眼科器件具有降低的细胞毒性或无细胞毒性且为其中放置所述器件的个体提供一或多个益处。例如,所述器件提供以下中的一或多个:

[0040] (i) 一合意的折射率,

[0041] (ii) 一合意的光学透明度(对于可见光而言,光透射和光散射等于或比相当厚度的健康人角膜材料为好)

[0042] (iii) 一合意的屈光力,例如一视力增强屈光力,

[0043] (iv) 增强的舒适性,

[0044] (v) 增强角膜和上皮的健康,及

[0045] (vi) 在(例如)治疗一眼睛疾病、病症或创伤性损伤中的治疗益处。本发明眼科器件是透明的或是透明材料形成。所述器件的某些实例包括为光学透明的器件。

[0046] 以上益处以及其他益处可通过形成一种材料的器件来获得,所述材料是一种(i)可成形(例如可模制)以形成一具有可接受屈光力的基质、(ii)光学透明或视觉上透明的、且(iii)有效促使神经穿过及/或在所述器件上生长的材料。当所述器件是一种角膜覆盖体时,所述器件有效促使在所述器件的前表面重新形成外皮。

[0047] 所述器件是由具有足够机械或结构性质以经受处理、植入(其可包括缝合、及安装后磨损和撕裂)的材料形成。所述器件提供或允许足够的营养物和气体交换以促进一健康眼睛。在模具中制造的器件(例如角膜覆盖体)是由可模制成适当尺寸及形状(包括边缘梯度和视力校正曲率)的材料形成,如本文所讨论。

[0048] 在本发明一实施例中,一视力增强眼科器件包括一本体,其包括一当将所述器件放置于一个体的眼睛中时有效促使神经穿过所述本体生长的材料。通过促使神经穿过所述本体生长,接受所述器件个体的角膜可维持其触觉敏感性。所述本体形成后具有一屈光力。因此,所述本体可理解为一透镜本体。如本文所讨论,所述器件可经构造(例如具有一定大小和形状)成角膜覆盖体、角膜嵌体或全层角膜植入体。在某些实施例中,本发明屈光不正校正器件可不具有一屈光力。例如,根据本发明揭示内容,屈光不正校正器件可理解成一放置于患者的角膜上皮与鲍曼氏膜之间或所述患者角膜基质中的间隔。

[0049] 对于角膜覆盖体而言,制造所述覆盖体的材料提供或允许所述鲍曼氏膜与上皮间的气体 and 营养物(例如葡萄糖)交换以维持一有生命力的全功能上皮。其他营养物包括促进或增强细胞(例如上皮细胞)的存活、生长和分化的因子或试剂。所述交换可与一健康人角膜的交换相当或比其好。所述材料对营养物及/或药物的渗透性可使用传统技术监控。此外,营养物及/或药物穿过所述材料的运动不应造成所述材料的光学性质改变。所述覆盖体或微透镜是完全生物相容的,使上皮迅速粘附至所述覆盖体,且允许神经支配和敏感性(例如触觉敏感性)的修复。

[0050] 本发明眼科器件可包括一细胞外基质(ECM)组份。在某些器件中,所述本体的材料包括胶原、实质上或完全由胶原构成。在所述器件的制造中,所述胶原可通过(例如)使用EDC/NHS进行交联。本发明水凝胶器件中所提供胶原数量大于其他眼科器件中目前所用的量。例如,本发明器件中所提供胶原数量通常大于1%(w/w)或(w/v),如本文所讨论。在某些实施例中,胶原数量大于2.5%。例如,胶原数量可为约5.0%或以上。在本发明器件的某些实施例中,胶原数量介于约1%(w/w)与约50%(w/w)之间,例如介于2.5%与约50%之间。例如,胶原数量大于约6%(w/w)。或者,所述材料可包含数量介于约10%(w/

w) 与约 30% (w/w) 之间的胶原。如熟悉该项技术者所了解,水合人角膜的约 15wt% 是胶原 (Maurice D M: The Cornea and Sclera, 第 489-600 页。The Eye, 第 I 卷, 第二版, 编者 H Davson. Academic Press, New York, 1969)。因此,本发明器件包括大于现有眼科器件的胶原数量且更类似于人角膜中所存在的胶原数量。此外,本发明器件中所提供的胶原数量和类型有效提供一合意折射率、合意光学透明度、成形性、允许处理、植入、并将所述器件缝合于眼睛中、及安装后磨损及撕裂。

[0051] 所述眼科器件的剩余部分(例如所述以非胶原为主的部分)可为一液体(例如水或盐水),或也可包括一或多种附加聚合物,例如生物聚合物及诸如此类。例如,一如本文所揭示包含约 24% (w/w) 胶原的眼科器件可包括约 76% (w/w) 的液体,例如水或盐水。换言之,在一水合状态下,所述眼科器件可具有一占所述水合眼科器件重量 24% 的胶原组件。另一实例,一眼科器件可包含一占所述水合器件重量 24% 的胶原组份、及占所述水合器件重量 6% 的第一聚合物组份,且所述重量的 70% 是一种液体。

[0052] 如熟悉该项技术者所了解,在所述非水合状态下,所述器件中胶原数量可为一比所述水合状态大的百分数。

[0053] 胶原包括三个多肽链且结构为螺旋状。如本文所用,术语“胶原聚合物”意欲指三螺旋胶原分子。胶原是一种长度和直径分别为约 300nm 与约 1.5nm 的棒状分子。胶原分子在其 N- 和 C- 两个末端均具有一称为“端肽”的氨基酸序列,其包括大部分胶原抗原性。端胶原是通过胃蛋白酶消化获得的 [DeLustro 等人, J Biomed Mater Res. 1986 Jan; 20(1):109-20] 且没有端肽,此意味着其具有低免疫原性 [Stenzel 等人, Annu Rev Biophys Bioeng. 1974; 3(0):231-53]。

[0054] 用于以上经确定器件中的胶原可自任何适宜胶原来源(其包括动物、酵母及细菌来源)获得或由其衍生出。例如,所述胶原尤其可为人胶原、牛胶原、猪胶原、鸟类胶原、鼠类胶原、马胶原,或所述胶原可为重组胶原。本发明器件中的重组胶原可包括一或多个自正常动物源中所获得的胶原中不存在的结构或物理特性,这是因为重组胶原是从细菌、酵母、植物或转基因动物中获得。例如,重组人胶原可包括动物源性 & 经处理的胶原中可能不存在的不同糖基化组份。此外,重组胶原相对于动物源性胶原可具有不同的交联度,其可为可变成份。动物源性胶原中交联度的变化可导致所述胶原不期望的不一致性 & 可变的化学和物理性质。而且是密切控制纯度,重组人胶原与病毒及 / 或朊病毒污染无关,而所述污染可与动物源性胶原有关。本发明器件中使用的胶原是市售品或可使用常用技术合成。例如,重组胶原可自 Fibrogen(来自多基因酵母生物反应器培养物)或 Pharming(Netherlands)(来自转基因奶牛或兔子的奶液)获得,或重组胶原可使用 PCT 公开案第 WO 93/07889 号或第 WO 94/16570 号中所揭示的方法制造并获得。在某些器件中,所述胶原可为 I 型胶原。所述器件也可由端胶原(例如,无端肽的胶原)构成。在某些实施例中,所述胶原是一种未经变性型胶原。端胶原可自诸如 Koken Japan(供应商 A, 如本文所用)等公司获得,其中牛胶原是以在中性组合物中 3.5% (w/v)、在酸性组合物中 3.0% (w/v)、在酸性组合物中 10% (w/v) 获得,且其中猪胶原是以在酸性组合物中 3.0% (w/v)、或作为酸性、冻干猪胶原粉末获得。酸性、冻干猪胶原粉末也可自 Nippon Ham(Japan)(供应商 B, 如本文所用)获得。Becton Dickinson(供应商 C, 如本文所用)提供 0.3% 酸性和 10% 酸性胶原组合物。

[0055] 在许多胶原类型中,出于易于溶解、处理和最终器件清晰度的目的,提供 I 端胶

原。此胶原（在中性或酸性溶液中的牛、猪或重组胶原，或作为酸性冻干粉末）是自上述若干公司购得。冻干酸性猪胶原通过在 4℃ 下搅拌可容易地溶解以高达 33% (w/v) 浓度获得存于冷水中的均匀（非乳色）水溶液。所述透明胶原组合物（例如溶液）的 pH 是约 3（供应商 B）或约 5（供应商 A）。低至 0.3% (w/v) 的市售酸性胶原组合物可通过真空蒸发同时在 0° -4℃ 下搅拌来浓缩以获得高达约 10% (w/v) 最终胶原浓度的透明溶液，其然后可用于制造本发明器件。

[0056] 相对硬或坚固的眼科器件可使用分离和提纯期间不变性（即，丧失其所有或实质部分的三螺旋构型变成凝胶）的 I 型胶原获得。

[0057] 差示扫描量热法 (DSC) 是一种基于其三螺旋含量确定供应商胶原溶液质量的有用工具（表 1）。对于近乎完美的三螺旋含量，DSC 变性焓 ($\Delta H_{\text{变性}}$) 在 65-70 J/g 范围内（以干胶原重量计）。根据 DSC 数据， $\Delta H_{\text{变性}}$ 结果表示市售酸性冻干猪胶原的溶液及某些市售牛胶原溶液是完全的三螺旋形式。

[0058] 与相同浓度来自具有接近 100% 三螺旋含量的胶原的组合物或溶液相比，具有低三螺旋含量 ($\Delta H_{\text{变性}} < 5 \text{ J/g}$, 供应商 C, 表 1) 的胶原溶液具有相对低粘度且获得弱凝胶。人们发现 $\Delta H_{\text{变性}} > \text{约 } 60 \text{ J/g}$ 的胶原组合物（溶液）能制造可接受的眼科器件。

[0059] 表 1. 胶原溶液的变性焓

[0060]

市售胶原试样	组合物	$\Delta H_{\text{变性}}$ (J/g 干胶原)
Koken(Japan), 供应商 A	10% 牛溶液	65.3
Koken(Japan), 供应商 A	10% 牛胶原溶液, 自 3% (酸性) 浓缩	67.5
Koken(Japan), 供应商 A	5% 牛胶原溶液, 自 3.0% (酸性) 浓缩	66.4
Koken(Japan), 供应商 A	3.5% 牛中性溶液	68.1
Koken(Japan), 供应商 A	3.5% 牛中性溶液 (加热变性后)	24.4
Koken(Japan), 供应商 A	3.0% 猪胶原溶液	72.0
Koken(Japan), 供应商 A	来自冻干猪胶原的 5% 溶液 (酸性)	68.1
Nippon Ham, 供应商 B	来自冻干猪胶原的 10% 溶液 (极酸性)	63.4
Becton Dickinson, 供应商 C	自 0.3% 浓缩的 5% 牛溶液	59.4
Becton Dickinson, 供应商 C	" 10% " 牛溶液	4.8

FibroGen 重组人胶原	自 0.3wt/wt%浓缩的 10%溶液	67.7
----------------	----------------------	------

[0061] 在某些实施例中,包括上文所阐述的在内,所述本体的材料可包含经交联的胶原聚合物。或者,在不同表述中,所述本体的材料可包含两种或更多经交联的胶原聚合物。例如,所述本体的材料可包括一第一胶原聚合物、第二胶原聚合物和第三胶原聚合物。其他材料可包括三种以上的胶原聚合物。所述经交联聚合物可理解为所述眼科器件的胶原组份。

[0062] 因此,根据本发明,一视力增强眼科器件可包含胶原数量介于约 1% (w/w) 与约 50% (w/w) 之间且形成后具有一屈光力的胶原组件。如本文所讨论,在某些实施例中,胶原数量大于 2.5%,例如至少约 5.0%。例如,在某些实施例中,所述胶原大于约 6% (w/w)。例如,胶原数量是介于约 10% (w/w) 与约 30% (w/w) 之间。例如,胶原数量可介于约 10% (w/w) 与约 24% (w/w) 之间。在某些器件中,所述胶原是所述器件的唯一水膨胀性(例如,水凝胶)聚合物。在其他器件中,所述胶原可为唯一器件或透镜形成聚合物。例如,所述器件可包含 100%呈干状态的胶原。如上文所讨论,在某些器件中,所述胶原可使用(例如)EDC/NHS 交联或至少部分交联。

[0063] 用于制造本发明组合物和器件的胶原聚合物可来自相同胶原源或来自不同胶原源。或者,在不同的表述中,一种单一类型的胶原(例如 I 型端胶原(其包含许多胶原聚合物链))是以一种有效使所述胶原聚合物彼此交联的方式处理。在一实施例中,所述胶原聚合物是重组胶原。在其他实施例中,两种胶原聚合物均衍生自相同的动物源。单一组合物中的各胶原聚合物可具有不同的分子量。

[0064] 应了解,本发明屈光不正校正器件包括经交联的重组胶原。在所述器件中所存在的胶原数量大于在其他先前所揭示以胶原为主的屈光不正校正器件中所发现的数量。所述器件形成后可具有一屈光力。

[0065] 本文所揭示器件是透明的。例如,所述器件可为光学透明的。例如,当将所述器件放置于一个体的眼睛中时所述器件应提供最小光散射(与健康人角膜组织相当或比其好)。此外,本文所揭示器件具有一折射率。在某些实施例中,所述折射率介于约 1.34 与约 1.37 之间。例如,折射率可介于 1.341 与 1.349 之间。当将所述器件构造为一角膜覆盖体或角膜嵌体时,所述器件可构造为放置于一与其中角膜被损坏或患病可需要一全层角膜植入体的眼睛相比健康的个体眼睛中。在本发明器件的某些实施例中,所述器件不具有浅黄色或黄色。例如,所述器件可经设计以减少或消除可能伴随某些含胶原组合物的浅黄色或黄色。

[0066] 本发明器件具有一前表面和后表面。因此,所述器件的本体或胶原组件可具有一前表面和后表面。所述前和后表面通常是对置表面。所述器件的前表面是指当将所述器件放置于一眼睛中时定向远离视网膜的表面,且后表面是当将所述器件放置于一眼睛中时定向朝向视网膜。当所述器件为角膜覆盖体时,后表面应毗邻且可接触鲍曼氏膜,且前表面应毗邻且可接触角膜上皮。当所述所述器件为角膜嵌体时,前表面应毗邻或定向朝向鲍曼氏膜,且后表面应位于间质中定向朝向眼睛的视网膜。当所述器件为全层角膜植入体时,前表面是定向朝向角膜上皮,且后表面毗邻且可接触角膜内皮。

[0067] 本发明器件可不包括额外的表面修饰,或所述器件可包括一影响在所述前和后表面中之一或二者上的细胞生长及/或分化的表面修饰。例如,一角膜覆盖体可不包括影响

在前或后表面上的细胞生长的表面修饰。如本文所用,“细胞生长”是指一细胞或细胞种群的扩展。因此,细胞生长是指一个体细胞的物理生长(例如表面积、体积及诸如此类的增加)、一细胞或若干细胞种群的物理生长(例如细胞分裂和细胞迁移),在某些情况下以形成一分层多层,如在健康人角膜上所发现的。细胞生长是指神经细胞的生长,例如一或多个神经突起在所述器件之上、之下或穿过其延伸,且是指上皮细胞或内皮细胞在所述器件一表面上的生长或迁移或增殖。如本文所用,“细胞分化”是指一单一或全能性、多能性或未熟性前驱细胞(包括干细胞)的种群经受形态、生物化学和生理变化以达成其最终表现型。在本发明器件某些实施例中,上皮细胞在所述角膜覆盖体上生长且紧紧地连接至其,例如直接附着于所述覆盖体、具体而言所述覆盖体的前表面。

[0068] 在某些角膜覆盖体中,所述本体或胶原组件包括一当将所述覆盖体放置于一个体的眼睛中时有效降低所述覆盖体之下上皮细胞生长的后表面修饰。此外,或另外,角膜覆盖体可包括一本体或胶原组件,其包括一当将所述覆盖体放置于一个体的眼睛中时有效促进在所述覆盖体前表面上的上皮细胞生长(包括迁移)的前表面修饰。相关地,全层角膜植入体可包括一本体或胶原组件,其包括一当将所述植入体放置于一眼睛中时有效降低在所述全层角膜植入体后表面上的内皮细胞生长的后表面修饰。全层角膜植入体可不包括前表面修饰。

[0069] 可降低细胞生长的表面修饰实例包括在前和后表面中之一或二者上提供一等离子聚合的氟化单体薄膜(例如 CF_4 或 C_3F_8)、在所述表面之一或二者上提供一低自由表面能、及/或通过使一或两个表面亲水。所述表面可通过在所述表面上提供一藻酸盐涂层使其亲水。

[0070] 所述器件可包括一或多种促进细胞在所述器件之上或穿过其生长的细胞生长增强剂。在某些实施例中,所述细胞生长增强剂包括肽。例如,所述细胞生长增强剂可为一氨基酸序列包括 RGD、YIGSR 或 IKVAV 的肽。I 胶原自身是一种富 RGD 序列源。在某些实施例中,所述细胞生长增强剂是一种神经营养因子或所述分子的其生物活性或神经营养部分。例如,神经营养因子可为神经生长因子(NGF)、表皮生长因子(EGF 或 HB-EGF)或碱性成纤维细胞生长因子(bFGF 或 FGF-2)。所述细胞生长增强剂可整体上与所述器件的胶原组件或本体一起形成,或换言之,所述细胞生长增强剂可实质上提供于整个器件。相比较而言,一些眼科器件仅包括提供于所述器件表面上的肽。

[0071] 在某些实施例中,所述以胶原为主的眼科器件包括一胶原组份,所述胶原组份在制造所述器件时具有酸性 pH。当所述胶原组件包括一交联至一第二胶原聚合物的第一胶原聚合物时,一酸性 pH 尤其有用。在所述器件制造中所用的酸性 pH 通常小于约 6.0,例如,所述 pH 可介于约 5.0 与约 5.5 之间。通过维持一酸性 pH 且通过防止或减少 pH 调节期间的 pH 波动,降低所述胶原的原纤维形成。此外,通过维持 pH 高于约 5.0,所述胶原不会如同 pH 小于 5.0 一样快速降解。

[0072] 胶原聚合物可使用任何小或聚合、胶原-反应性试剂或分子进行交联。交联化学可使用对于熟悉该项技术者是例行公事的传统方法或新颖试剂。通过使所述胶原聚合物交联,所述器件维持其光学透明度且能够经受生物降解。

[0073] 在某些实施例中,所述胶原聚合物是使用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC;CAS 编号 1892-57-5)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行交联。换言之,在制造

所述器件中所用的交联剂是 EDC/NHS。所述胶原聚合物和 EDC/NHS 交联剂是在酸性 pH 下同时防止 pH 波动下混合在一起。充分混合后,将一部分混合组合物放置于一模具中,并使其在所述模具中固化以形成一眼科器件。利用水溶性 EDC/NHS 化学品交联胶原与 CSC 的一个优点在于其获得一零长度(酰胺)键。此降低了接枝有毒物质浸出至组织的可能性。此外,未反应的试剂和来自 EDC/NHS 反应的副产物是水溶性的且因此凝胶形成后可容易地去除。

[0074] 在某些实施例中,所述胶原聚合物是使用一具有降低的细胞毒性的交联剂或交联试剂进行交联。当将所述眼科器件放置于一个体的眼睛中时,所述交联剂较佳不会刺激或造成一负反应。在一些实施例中,所述交联剂是一种除戊二醛以外的交联剂。尽管在某些实施例中戊二醛可是一种有用交联剂,但由于处理及安全要求,戊二醛并非首选。

[0075] 在附加实施例中,所述处理可进一步包括使用以下组份中的至少一种:聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、硫酸软骨素、硫酸角质素、硫酸皮肤素、弹性蛋白、壳聚糖、N-0-羧甲基壳聚糖、透明质酸、透明质酸醛和藻酸盐,这些可与胶原组合物混合。因此,所述眼科器件可包括一胶原组份(例如经交联胶原聚合物的基质)及一或多种非胶原聚合物(包括生物聚合物在内)。所述非胶原聚合物可交联在一起及/或可交联至所述胶原聚合物以形成一经交联聚合物的网络或基质。

[0076] 在某些实施例中,所述组合物是混合在一起穿过相对窄的通道或通路以在不同组合物之间诱导一高剪切力。在一实施例中,所述组合物是使用基于注射器的系统进行混合。所述混合依赖于注射器通过狭窄通道抽吸以在粘性胶原溶液与试剂间引发高剪切力。所述通道直径是经选择以便适应粘度和所述注射器或其他类似器件的胀破强度。对于高粘度(例如,20-30% (w/v) 胶原溶液)而言,可使用具有小直径注射器柱塞的小体积注射器,这是因为用手可获得较高压力。所述混合是在酸性 pH(例如介于约 5.0 与约 5.5 之间)和降低温度(例如介于约 0°C 与约 5°C 之间)下进行。

[0077] 与其他眼科器件相比,本发明器件可不使用活细胞制造。因此,本发明发明者已发明利用相对高且接近生理浓度的胶原而不使用活角膜细胞制造组合物和眼科器件的新方法。此外,本发明器件实质上或完全不含合成树枝状聚合物组份,所述组份在其他器件中用于增加胶原的交叉反应性。

[0078] 在本发明器件制造中可使用额外的神经友好材料。所述材料可使用本文所揭示的方法制造并使用对熟悉该项技术者是例行公事的常用方法(例如细胞培养系统及诸如此类)测试神经友好性(例如神经生长)。例如,所述材料可使用于 2003 年 8 月 11 日提出申请的 WO 2004/015090 中所揭示的方法进行测试和鉴别。

[0079] 本文所揭示器件是经构造(例如具有一定大小和形状)以放置于一眼睛中环绕所述眼睛的角膜区。当所述器件是一角膜覆盖体时,所述覆盖体可具有约 4mm 至约 12mm(例如约 6mm)的直径。所述覆盖体还可具有小于约 30 μm (例如介于约 10 μm 与约 30 μm 之间)的边缘厚度。所述覆盖体亦可具有一约 70 μm 的中心厚度。

[0080] 覆盖体成型模具可由聚丙烯制成且可具有 4mm、6mm、8mm 或 12mm 的直径。所述模具可相对坚硬(例如,封闭期间未弯曲),且是透明的以便可看得见装料。所述模具是经构造以提供一细锥形(例如,约 10 μm)覆盖体边缘、或一稍微陡(例如,约 30 μm)覆盖体边缘。

[0081] 角膜植入体模具（全厚度或部分厚度）可具有约 12mm 的直径。移植体模具是利用一具有合意曲率和厚度的角膜成型的。若需要，眼科器件（例如，水凝胶）可视移植程序需要进行环锯。

[0082] 本发明屈光不正校正器件的一个实例绘示于图 8 和图 8A 中。

[0083] 本文所揭示的角膜覆盖体也可经构造以校正一个体眼睛的一或多个波前像差。关于波前技术和波前像差测量的阐述提供于美国专利第 6,086,204 号 (Magnate) 和 W02004/028356 (Altmann) 中。所述角膜覆盖体可经成型以通过使所述模具成型为一允许所述覆盖体呈现校正形状的合意构型来校正波前像差。在角膜覆盖体中使用波前像差测量的方法揭示于 2004 年 5 月 20 日提出申请的美国申请案第 60/573,657 号中。也可切除所述覆盖体以校正波前像差。例如，所述覆盖体可使用一激光器或类似激光器的器件及其他适宜透镜成型器件切除。

[0084] 本文所揭示的角膜覆盖体也可包括许多不同区。例如，所述角膜覆盖体可包括一视区和周围区。通常，视区由周围区环绕，或换言之，视区通常绕覆盖体的视轴（例如中心视轴）以中心方式定位且周围区是布置于所述视区边缘与所述角膜覆盖体周围边缘之间。所述覆盖体也可提供额外的区和覆盖体构型，此取决于患者所经受的特定视力缺陷。

[0085] 此外，本发明角膜覆盖体可具有非连接区，例如两个或多个不具有一视觉或光学上可侦测连接的区。所述覆盖体的这些区域可平滑且连续，且所述覆盖体可经光学优化以不仅校正屈光不正，而且可独立地或与校正屈光不正结合校正眼睛及 / 或光学器件的其他光学像差。如熟悉该项技术者所了解，一角膜覆盖体可经结构化以校正视力缺陷，其包括且不限于近视、远视、散光 and 老视。所述覆盖体可通过施加于眼睛间质上的光学构件或物理构件或其组合来增强或改善视力缺陷。因此，所述角膜覆盖体可为一单焦距透镜或多焦距透镜（包括但不限于双焦距透镜）。

[0086] 此外，或另外，所述角膜覆盖体可为一复曲面透镜。例如，所述覆盖体可包括一当放置于一散光的眼睛上时有效的复曲面区域以校正或降低散光效应。所述覆盖体可包括一个定位于所述覆盖体后表面上的复曲面区域，或所述覆盖体可包括一个定位于前表面上的复曲面区域。有利的是，可使用复曲面覆盖体而不需要一压载物来维持覆盖体在眼睛上的正确定向，这是因为覆盖体可通过适当的上皮保持在一相对固定位置。然而，视需要可提供一压载物。在某些实施例中，所述覆盖体可包括一压载物（例如棱镜），或其可包括一或多个薄化区域（例如一或多个下部及 / 或上部薄区）。在经构造以校正老视的覆盖体中，所述覆盖体可包括一或多种设计，例如同心、非球面（具有正及 / 或负球面像差）衍射、及 / 或多区折射。

[0087] 本发明还涵盖组合物，例如合成或非天然存在的组合物。所述组合物可完全或部分经合成。例如，本发明是关于光学透明的组合物。所述组合物可用于制造一或多种本文所揭示的眼科器件。或者，所述组合物可作为非眼科组合物用于非眼科设备中，或可用于眼科设备中且不提供一屈光不正校正。在另一实施例中，根据本发明揭示内容，一组合物质包括数量大于约 1% (w/w) 呈水合状态的胶原且是光学透明的。如本文所讨论，胶原数量可大于 2.5%，例如至少约 5.0%。例如，所述组合物可包含数量介于约 1% (w/w)、或 2.5%、或约 5.0% 与约 30% (w/w) 之间呈水合状态的胶原。在某些实施例中，所述组合物可包含约 6% (w/w) 的胶原。在其他实施例中，所述组合物可包含数量介于约 10% (w/w) 与约 24% (w/

w) 之间的胶原。所述组合物可包含数量大于约 1% (w/w) 呈水合状态的交联胶原, 其中所述胶原是使用 EDC/NHS 交联。

[0088] 本发明组合物可包含两种或以上胶原聚合物。在某些实施例中, 所述组合物包含一交联至一第二胶原聚合物的第一胶原聚合物, 如上文所述。所述组合物可实质上或完全不含细胞毒性剂, 例如戊二醛。

[0089] 本文所揭示的眼科器件可使用任何适宜方法或技术放置于一眼睛中。

[0090] 例如, 角膜覆盖体可通过自所述鲍曼氏膜去除或分离一部分上皮放置于一眼睛的鲍曼氏膜上。在某些情况下, 可将一定量醇 (例如乙醇) 施加于所述角膜上皮以自眼睛剥离上皮。醇的浓度可为约 10% 至约 60%, 例如约 20% 或约 50%。将乙醇加热至约 37°C (例如, 体温) 可有效增强上皮的去除。此去上皮技术类似于目前已成熟的 LASEK 技术。

[0091] 在其他情况下, 一角膜覆盖体可通过将所述覆盖体放置于一上皮皮片之下或一上皮囊中来放置于鲍曼氏膜上。所述皮片或囊可使用一切割器具、钝器解剖工具、及诸如此类制得。将一角膜覆盖体放置于一眼睛中的方法实例揭示于 2003 年 9 月 12 日提出申请的美国申请案第 10/661,400 号和于 2004 年 5 月 20 日提出申请的美国申请案第 60/573,657 号中。

[0092] 角膜嵌体可通过形成一基质内囊或角膜皮片、并将所述嵌体放置于所述囊中或皮片之下来放置于一眼睛中。

[0093] 全层角膜植入体可通过去除角膜的损坏或患病部分并将所述角膜植入体放置于所述角膜去除部分的区域中或靠近所述区域来放置于一眼睛中。

[0094] 本文所揭示的眼科器件可使用镊子、或任何其他适宜插入器放置于一眼睛中, 例如那些阐述于 2003 年 9 月 12 日提出申请的美国申请案第 10/661,400 号和于 2004 年 5 月 20 日提出申请的美国申请案第 60/573,657 号中者。

[0095] 为使所述眼科器件更容易地放置于眼睛中, 所述器件可包括一观察组件。所述观察组件可为任何当将所述器件插入或放置于一眼睛中时使其易于看见的适宜部件。例如, 所述观察组件可包含一或多个对所述器件旋转位置也可能会有用的标记, 或所述观察组件可包含一种染料 (例如生物相容或非细胞毒性染料) 或一着色剂。

[0096] 关于本发明眼科器件的其他细节和制造及使用所述器件的相关方法皆提供于以下实施例种, 其仅为了阐述而提供, 且并非限制本发明。

[0097] 实例

[0098] 实例 1

[0099] 以胶原为主的角膜覆盖体的制备

[0100] 通常, 于约 0°C 下在无气泡捕获的情况下将 0.5mL-2.0mL 存于水性缓冲液中的胶原溶液与 0.01mL-0.50mL 存于所述水性缓冲液中的交联试剂混合。在一些组合物中, 将一第二生物聚合物而非胶原添加于所述组合物中。

[0101] 为混合所述组合物, 将包含所述组合物的注射器连接至一 Tefzel T 形件 (Uptight Fittings), 形成一允许粘性胶原溶液充分混合及 / 或控制中和 pH 无波动的微歧管。一 pH 波动通常导致所述胶原不可逆的微纤维形成获得不透明基质。

[0102] 更特定而言, 一第一 Luer 连接器是用于保持一切割成一定大小以紧密配合至 Tee 螺纹孔底部的隔膜。将来自 Restek 公司的 "Ice Blue" 17mm 通用 22397 隔膜切割成一定大

小的隔膜。将一带有缓冲溶液（例如 MES (2-[N- 吗啉基] 乙烷磺酸) 缓冲液) 的注射器锁定于第二 Luer 连接器中并利用所述缓冲溶液将任何气泡挤出。将一胶原溶液放置于一第二注射器中,然后将所述第二注射器连接至 Tefzel T 形件的第三 Luer 连接器（如图 1 中所示）,所述 Tefzel T 形件配备有三个 Luer 连接器（图 2）。整个装配展示于图 3 中。

[0103] 所述胶原溶液与 MES 缓冲溶液是通过在所述第一和第二注射器间通过 T 形件反复抽吸以使通过 T 形件中狭窄孔通道（例如介于约 0.5mm 至约 0.25mm 之间）的流动能强烈剪切所述液体而完全混合。将 pH 调节至 5.0-5.5。然后,于 0℃ -4℃ 下通过使用另一注射器引导所述组合物穿过所述歧管使胶原 / 缓冲液混合物与 EDC 和 NHS 溶液（EDC : NHS 为 1 : 1 摩尔当量比）混合。

[0104] 将各实质上均匀溶液的等份试样立即分配于覆盖体模具中并首先在室温下固化 5-24 小时（例如 15 小时）,并随后于 37℃ 下固化 15-24 小时,在两个温度下皆处于 100% 湿度环境中。

[0105] 在磷酸盐缓冲盐水（PBS）中浸泡 2 小时后,将各最终覆盖体试样小心与其模具分开。

[0106] 在某些情况下,将这些凝胶浸泡于一第二反应性生物聚合物的水溶液中以获得进一步交联并添加新的生物因子。

[0107] 最后,于 20℃ 下将经交联的覆盖体水凝胶浸泡于 PBS 溶液中（0.5% 存于 PBS 中,包含 1% 氯仿）以终止任何反应性残余物并提取出反应副产物。在所有测试之前将这些无菌平衡水合覆盖体在 PBS 中充分洗涤。

[0108] 对于自一些胶原 /EDC-NHS 化学品以较高胶原浓度（10% 和以上）制造的凝胶,首先将凝胶浸于 pH 9.1 的缓冲液中以终止任何残余反应性并获得充分提取的反应产物,之后将其存储于氯仿饱和的 PBS 中。此碱性提取可消除这些试样的上皮毒性问题。对于许多理想配比而言,在氯仿饱和的 PBS 中浸泡随后去除氯仿残余物获得无菌非细胞毒性凝胶。

[0109] 实例 2

[0110] 具有细胞生长增强剂的眼科器件

[0111] 细胞生长增强剂（例如五肽（YIGSR,层粘连蛋白大分子中的活性单元）可单独或与协同肽（例如一包含 IKVAV、协同 IGF 及促进上皮健康的物质 P 肽、EGF、NGF、FGF 或这些分子的一部分者）组合纳入胶原 /EDC-NHS、经交联器件任一者中,其包括那些具有一第二 EDC-NHS 反应性生物聚合物者。对于 YIGSR 而言,此细胞生长增强剂的结合可经由所述试剂上酪氨酸残基的游离胺端基的反应性来达成。凝胶化后的粗提取可去除任何未键结的细胞生长增强剂。

[0112] 眼科器件的特定调配物细节提供于以下实例 3-13 和表 2 中。

[0113] 实例 3

[0114] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述,使用 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC) 与 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS)+ 胶原于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中,于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下 15 小时,然后于 37℃ 下 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0115] 实例 4

[0116] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用 COP+EDC-NHS+ 胶原于 pH 5.5 下

在 MES 缓冲液中,于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下 15 小时,然后于 37℃ 下 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。[COP,共聚物,聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)是通过在 1,4-二氧杂环乙烷中利用 2,2'-偶氮双-异丁腈引发剂在氮下于 70℃ 下 NiPAAm 与 AAc 的自由基聚合来制备]。

[0117] 实例 5

[0118] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用 EDC-NHS+ 硫酸软骨素 C(ChS)+ 胶原于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中,于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下 15 小时,然后于 37℃ 下 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0119] 实例 6

[0120] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用胶原 +EDC-NHS+N,0-羧甲基壳聚糖(CMC)于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中,于 0° -4℃ 下,升温至 21℃ 下 15 小时,然后于 37℃ 下 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0121] 实例 7

[0122] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用胶原 +EDC-NHS+N,0-羧甲基壳聚糖(CMC)于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中,于 0° -4℃ 下,升温至 21℃ 下保持 2 小时,然后当凝胶浸泡于存于 PBS 中的壳聚糖(1%水溶液,5000Da)中达 4 小时时进行第二次交联。最后于 37℃ 下保持 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0123] 实例 8

[0124] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用胶原 +EDC-NHS+ 透明质酸(HA)并于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下保持 15 小时,然后于 37℃ 下保持 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0125] 实例 9

[0126] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用胶原 +EDC-NHS+ 硫酸软骨素(ChS)+ 透明质酸(HA)于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下保持 15 小时,然后升温至 37℃ 下保持 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0127] 实例 10

[0128] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用胶原 + 透明质酸醛(HA-CHO)+ 氰基硼氢化钠于 pH 7-8 下在 PBS 中于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下保持 15 小时,然后于 37℃ 下保持 15 小时。HA-CHO 是自 HA(0.1g)通过利用过氧化钠(0.05g)于 21℃ 下氧化分解 2 小时制得。将所述水溶液对水渗析 2 天。

[0129] 实例 11

[0130] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用胶原 +EDC-NHS+ 藻酸盐于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中,于 0° -4℃ 下,升温至 21℃ 下 15 小时,然后于 37℃ 下 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0131] 实例 12

[0132] 通过以下制造一眼科器件:如实例 1 中所述使用戊二醛(“Glut”,在水中稀释至 1%)+胶原于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下保持 2 小时,然后当凝胶浸渍于存于 PBS 中的壳聚糖(1%水溶液,5000Da)中达 4 小时时进行第二次交联。将其模具中的凝胶升温至 37℃ 保持 15 小时,然后在 PBS 下取出。

[0133] 实例 13

[0134] 通过以下制造一眼科器件：如实例 1 中所述使用胶原 +EDC-NHS+ 壳聚糖于 pH 5.5 下在 MES 缓冲液中于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下保持 15 小时，然后于 37℃ 下保持 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0135] 实例 14

[0136] 通过以下制造一眼科器件：如实例 1 中所述使用 EDC-NHS+ 硫酸软骨素 C (ChS) + 胶原于 pH 7-8 下在 PBS 缓冲液中于 0° -4℃ 下升温至 21℃ 下保持 15 小时，然后于 37℃ 下保持 15 小时。EDC : NHS = 1 : 1 摩尔当量比。

[0137] 利用下表 2 中表明的所有市售胶原与反应物比，实例 3-14 的所有器件皆获得强壮、透明且挠性凝胶。

[0138] 用于覆盖体应用的一些水凝胶是通过 DSC、光学透明度和折射率、测量、拉伸性质（刚性、最大抗拉强度、断裂伸长率，表 2）和活体内性能来表征。对于所有实例而言，根据反应后对凝胶进行的 DSC 测量，发现变性温度增加且 $\Delta H_{\text{变性}}$ 降低，与所述胶原的交联一致。表 2 中所有调配物的折射率均在 1.341 至 1.349 范围中。

[0139] 实例 15

[0140] 活体外覆盖体性能（表 2）

[0141] 使用 Li 等人于 PNAS 100 :15346-15351(2003) 中揭示的方法来评价上皮细胞（人类永久角膜上皮细胞，HCEC）如何生长至在水凝胶上铺满（铺满天数）、评价 HCEC 细胞如何在水凝胶上分层、并评价鸡背根神经节神经在水凝胶上和其中的生长（后者在可获得数据的情况下以微米 / 生长天数报告）。

[0142] 人角膜完全去除后在 3-5 天内修复其上皮。

[0143] 活体外测试持续时间通常为约 6-8 天，但较佳调配物在 3-5 天或更少时间内使上皮重新形成至铺满。对于稠凝胶（> 5% 胶原）而言，在许多调配物的活体外测试中发现大量神经生长过度（延伸 300 微米）。当凝胶刚性增加时，神经向内生长迅速减缓，但只能通过深入的显微镜方法才能看到。

[0144] 表 2 组合物和水凝胶的性能

[0145]

实例编号	胶原供应商，（表 1）（初始浓度 wt/vol%）	胶原 /XL 当量比或 (wt/wt)	凝胶中的最终胶原浓度 (w/v%)	最大应力，g 力*	断裂应变，mm*	刚性，g/mm*	活体外上皮细胞，铺满天数	在 6 天中活体外神经生长**
2	BAFDP： （以 10% 溶解）	Col-NH ₂ : EDC = 5 : 1 Col : YIGSR = 5 : 0.0001	7.2				3-5	Over :快速 In :27 μm/d
3	A, (10% 牛)	Col-NH ₂ : EDC = 5 : 1	7.3	8.0	2.6	4.0		
3	B, AFDP： （以 10% 溶解）	Col-NH ₂ : EDC = 5 : 1	7.3	9.7	4.0	4.4	2-3	Over :快速 In :40 μm/d

3	B, AFDP ; (以 15%溶解)	Col-NH ₂ : EDC = 5 : 1	10.8	13.08	4.6	3.0	2-3	
3	B, AFDP (以 20%溶解) 350 μm 厚度凝胶	Col-NH ₂ : EDC = 10 : 1	14.3	11.95	4.3	3.0	2-3	
3	B, (AFDP, 以 32%溶解)	Col-NH ₂ : EDC = 1 : 1	18.0	14			2-3	Over :快速 In : = 30 μm/d
3	A, (3.5% 中性 牛	Col-NH ₂ : EDC = 1 : 1	2.7	3.1	2.0	1.7	3-5	Over :快速
5	A, (3.5%中性 牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : ChS = (9 : 1)	2.7	2.5	1.8	1.4	3	Over :快速 In : = 41 μm/d
5	A, (3.5%中性 牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : ChS = (4 : 1)	2.7	2.7	1.8	1.5	3	Over :快速 In : = 73 μm/d
5	A, (3.5% 中性 牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : ChS = (3 : 1)	2.7	3.1	1.5	1.5	3	Over In : = 70 μm/d

[0146] ⁺ 缩写 : Col 胶原 ; Glut 戊二醛 ; HA 透明质酸 ; ChS 硫酸软骨素 C ; Col-NH₂ 胶原的游离胺含量 ; AFDP 酸性冻干猪 ; epi. 上皮 ; ND 未测定。

[0147] ^{*} 除非另有说明, 否则为 500 μm 厚 12mm 直径植入体。应力、应变和刚性数据来自 Li 等人于 PNAS 100 : 15346-15351 (2003) 中揭示的缝线抽出方法。

[0148] ^{**} Over : 来自 DRG 生长过度水凝胶的神经突。In : 在 6 天内生长至所述水凝胶中至所示长度的神经突。

[0149] 表 2 (续)

[0150]

实例编号	胶原供应商, (表 1) (初始浓度 wt/vol %)	胶原 /XL 当量比或 (wt/wt)	凝胶中的 最终胶原 浓度 (w/v %)	最大应 力, g 力 *	断裂应 变 (mm) *	刚性, g/mm *	活体外 上皮细 胞, 铺满 天数	在 6 天中活 体外神经生 长 **
6	A, (3.5%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 1 : 1 Col : CMC = (1 : 0.5)		3.6	1.6	2.0		
6	B, (AFDP, 以 32% 溶解)	Col-NH ₂ : EDC = 1 : 13 Col : CMC = (15 : 1)	14.5	6.0			3	

7	A, (3.5%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 1 : 1 Col : CMC = (2 : 1)+可溶壳聚糖		2.9	1.6	1.9		
8	A, (3.5%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : HA = (9 : 1)	2.2	2.5	2.2	1.08	3-5	
8	A, (5%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : HA = (4 : 1)	2.2	2.4	2.2	2.07	3-5	
8	A, (10%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : HA = (3 : 1)	2.2	2.0	1.8	1.13	3-5	
9	A, (3.5%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 0.5 : 1.0 Col : HA : ChS = 9 : 1 : 1	2.3	3.0	1.7	1.7	3-5	Over 且向内生长
10	A, (3.5%中性牛) 350 μm 厚凝胶	Col-NH ₂ : HA- CHO = 1 : 1	32	1.0		0.7		
11	A, (3.5%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : Alg = 4 : 1	2.7	3.0	2.0	1.6	3-5	Over :快速 In : = 41 μm/d
11	A, (3.5%中性牛)	Col-NH ₂ : EDC = 2 : 1 Col : Alg = 2 : 1	2.7	3.4	2.5	1.5	3-5	Over :快速 In : = 13 μm/d
12	A, (3.5%中性牛)	Col : Glut = (130 : 1) ?? ± 可溶壳聚糖		3.1	2.1	1.5		
13	B, (11% AFDP), 900 μm 厚凝胶	Col-NH ₂ : EDC = 0.33 : 1.0 Col : 壳聚糖 = (15 : 1)	5.8	8.32	3.29	2.57	4	
13	B, (11% AFDP) 500 μm 厚凝胶	Col-NH ₂ : EDC = 0.66 : 1.0 Col : 壳聚糖 = (15 : 1)	5.8	4.25	4.02	1.32		
13	B, (11% AFDP), 900 μm 厚凝胶	Col-NH ₂ : EDC = 0.66 : 1.0 Col : 壳聚糖 = (15 : 1)	5.8	8.46	5.23	2.17		

[0151] ⁺ 缩写 : Col 胶原 ; Glut 戊二醛 ; HA 透明质酸 ; ChS 硫酸软骨素 C ; Col-NH₂ 胶原的游离胺含量 ; AFDP 酸性冻干猪 ; epi. 上皮 ; ND 未测定。

[0152] ^{*} 除非另有说明, 否则为 500 μm 厚 12mm 直径植入体。应力、应变和刚性数据来自 Li 等人于 PNAS 100 : 15346-15351 (2003) 中揭示的缝线抽出方法。

[0153] ^{**} Over : 根据 DRG 生长过度水凝胶的神经突。In : 在 6 天内生长至所述水凝胶中至所示长度的神经突。

[0154] 实例 16

[0155] 活体内覆盖体性能

[0156] 如实例 1 中所述制备覆盖体。自 10% (w/v) 猪胶原利用 EDC/NHS 制备第一组覆盖体。自 3.5% (w/v) 牛胶原利用硫酸软骨素 (CSC) 和 EDC/NHS 制备第二组覆盖体。所述覆盖体具有约 6mm 的直径、约 70 μm 的中心厚度及 30 μm 的倾斜边缘。

[0157] 为植入所述覆盖体, 将一猪的上皮用 45% 乙醇处理 30-45 秒钟。制造一蝴蝶切口

并在所述上皮中形成一囊。将所述覆盖体用蓝色非细胞毒性染料 (Gel-Code™) 染色用于观察。将预染色的覆盖体插入所述囊中。在眼睛上缝合一保护性接触透镜。

[0158] 进行目视检查以评价所述角膜的炎症、发红及 / 或血管侵犯。裂隙灯检查用于估计角膜透明度。tonopen 笔式眼压计用于测量眼内压。Cochet-Bonnet 触觉计用于测定角膜的触觉敏感性。触觉敏感性可用于评价功能神经的存在, 其由活体内共焦图像和经收获具有植入体的角膜的免疫组织化学来证实。角膜形貌是利用 PAR 角膜形貌系统 (CTS) 在植入之前及手术后三周检查。

[0159] 角膜形貌是通过使经麻醉猪的眼睛与 CTS 对准来实施。将荧光素与人工泪液的稀释溶液施加于眼睛以涂布角膜表面并能观察目标网格。调整仪器焦平面以使所述目标网格在前角膜表面上聚焦。捕获所述网格的数字图像。分析所述数字图像以提供一前角膜表面形状的测量。比较植入所述覆盖体之前和之后的数字图像可用于评价所述角膜形状因放置覆盖体而发生的变化。

[0160] 活体内共焦显微术可捕获活猪中角膜不同深度的图像, 且因此允许监控眼睛对所述眼科器件的响应。例如, 所述共焦显微术可用于监控所述器件中神经的存在。活体内共焦显微术是通过利用 Nidek Confoscan 3 活体内共焦显微镜在植入所述眼科器件之前及术后 3 周检查被麻醉的猪来实施。将人工泪液放置于欲检查的眼睛上。将两滴局部麻醉剂施加于所述眼睛以减少眼球运动。使共焦透镜 (凝胶浸渍) 接触所述角膜, 其中所述透镜前表面上的一层凝胶用于折射率匹配。调整仪器焦平面以使角膜内皮聚焦, 并然后当透镜的焦平面扫描通过一等于所述角膜厚度的深度时获得所述角膜的图像。

[0161] 除了使用经苏木精和曙红 (H&E) 染色的组织切片的组织病理学检查外, 还使用了免疫组织化学来确定所述覆盖体上的角膜上皮是否修复以及对下伏覆盖体的附着与相互作用的早期指示。免疫组织化学也可用于确定神经的存在或不存在及任何免疫和炎症细胞的渗入。利用清洁剂渗透后有和没有植入覆盖体的一半角膜上使用常用技术实施抗神经纤维丝染色。荧光免疫检验法是用以使所结合抗体显影。

[0162] 接受一角膜覆盖体的角膜 (如上文所讨论) 痊愈良好且保持光学透明伴随最少或无发红或炎症。没有血管渗入的迹象。观察到正常眼内压。手术后角膜展示触觉敏感性。形貌测量表明, 植入的覆盖体能够有效改变角膜形貌。所述覆盖体导致在中心角膜隆起中约 50 μ m 的厚度改变。上皮很好的粘附于所述覆盖体。活体内角膜显微术显示良好的整体角膜结构, 其自上皮直至内皮具有上皮和间质神经、及细胞。H&E 染色冰冻切片展示所述覆盖体结合于宿主角膜中。免疫组织化学表明, 使用一用于 E- 钙粘着蛋白的着色剂, 与未处理的角膜相比, 在覆盖体植入股膜中细胞粘着性有少许 (若有) 改变。角蛋白 3 和 E- 钙粘着蛋白的染色相当于对照。固定纤维连同基底膜复合体的 VII 型胶原染色展示比对照低的着色清晰度。α 6 整联蛋白的染色显示在操作后和未经处理对照二者中的基底上皮细胞中的定位。抗神经纤维丝 200 抗体染色展示在具有覆盖体的角膜中在植入位置存在神经。抗 CD 45 抗体染色显示没有炎症或免疫反应。

[0163] 实例 17

[0164] 角膜覆盖体的切除

[0165] 胶原 / EDC 和胶原 / 壳聚糖覆盖体是使用一 VISX Star S4 准分子激光器 (表 3) 切除。所述覆盖体的表面形貌测量是在处理之前及之后利用 PAR 角膜形貌系统 (CTS) 获得。

对于该处理而言,将所述覆盖体自存储溶液中取出并敷设于一由 PMMA 制成的球面上。

[0166] 准分子激光治疗性角膜切除 (PTK) 术将均匀数量的激光脉冲 (或能量) 输送至整个切除区。光学屈光性角膜切除 (PRK) 术改变整个切除区上的脉冲密度以达成曲率的合意变化。AZD 是指切除区直径。深度是针对人角膜进行处理的预定深度,如由激光器制造商所报告的。

[0167] 表 3:

[0168]

手术	类型	AZD(mm)	球体 (d)			Cyl (D)	深度 (μm)
1	PTK	5		----			10
2	PTK	5		----			20
					—		
3	PTK	6	2 +2			0	26
4	PTK	6				0	19
					—		
5	PTK	6	4 +4			0	51
6	PTK	6				0	38
					—+2		
7	PTK	6	4				30

[0169] 自胶原 /EDC 覆盖体的手术前和手术后形貌获得差值图以展示切除的效果。

[0170] 预计 PTK 切除产生一直径约 5mm 的相当固定的中心蓝色区域 (对于差值图而言)。预计所去除组织数量中存在一小梯度,这是因为覆盖体是一个弯曲表面。预计近视球 PRK 切除在中心去除最大组织深度。预计所去除组织的深度在所述去除的边缘逐渐降低至零。预计远视球校正将留下 1mm 中心直径未接触并最大限度地去除所述处理区边缘处的组织,亦预计自所述中心向外 9mm 的外周产生一过渡区。预计远视校正后的差值图展示一环绕一中心绿色区的蓝色环。预计来自近视散光校正的差值图似乎类似于来自近视球面校正的图,只是预计其蓝色图案为椭圆形。

[0171] 来自切除覆盖体的差值图证明上述所有差值图中的预计组织去除图案。所去除组织的最大深度似乎大于针对人角膜所预计的深度。例如,去除角膜覆盖体材料的速率介于角膜去除速率的约 1.7 倍与约 2 倍之间。所述覆盖体材料与角膜的切除速率间的差异在整个试样上并不均匀。所述速率差异尤其由于处理测量的深度、材料密度和表面粗糙度及材料的水含量。

[0172] 观察到,胶原 /壳聚糖覆盖体是以比胶原 /EDC 覆盖体快的速率被切除。此差异可能是由于水合问题。例如,手术后胶原 /壳聚糖覆盖体可具有比胶原 /EDC 覆盖体低的水含量。

[0173] 所述眼科器件也可包括一种强度增加组份,例如氨基甲酸酯。

[0174] 实例 18

[0175] 人类重组胶原眼科器件

[0176] 交联胶原水凝胶是通过使用一基于注射器的系统将 0.3ml 13.7wt % 自 FibroGen(San Francisco,CA) 获得的人类重组 I 型胶原与 0.3ml 0.625M 吗啉基乙烷磺酸 (MES) 混合来制备,如本文所述。所述混合是通过在冰-水浴中实施所述混合而在降低温度下发生。

[0177] 获得一均匀溶液后,将 57 μ l EDC/NHS 以与胶原游离胺 (CO11-NH₂) 基团 3 : 3 : 1 的摩尔当量比注射至所述混合物中。为调节溶液的 pH 至约 5,将 NaOH(2N) 添加于所述混合物中。

[0178] 将混合物浇注于玻璃或塑料模具中并在室温下 100%湿度下放置 16 小时。随后将所述模具转移至一恒温箱于 37°C 下后固化 5 小时。

[0179] 使用此方法亦可制造其他具有人类重组 I 型胶原 EDC/NHS 与胶原 CO11-NH₂ 基团的比例为 1 : 1 : 1 和 6 : 6 : 1 的水凝胶。

[0180] 折射率 (RI) 是在一个 VEE GEE 折射计上测定。光透射是在白色光、450nm、500nm、550nm、600nm 和 650nm 的波长下测量。直接拉伸性质测量 (例如应力、断裂应变和模量) 是在 Instron 电动机械测试机 (3340 型) 上测定。试样的尺寸为 5mm×5mm×0.5mm。水凝胶的水含量是根据以下等式计算:

[0181] $(W-W_0)/W\%$

[0182] 其中 W₀ 和 W 分别表示干和溶胀试样的重量。

[0183] 一种 EDC/NHS/CO11-NH₂ 的比例为 1/1/1 (摩尔当量) 的人类重组胶原水凝胶 (称为 F1) 具有 1.3457±0.0013 的折射率。一种 EDC/NHS/CO11-NH₂ 的比例为 3/3/1 (摩尔当量) 的人类重组胶原水凝胶 (称为 F3) 具有 1.3451±0.0002 的折射率。一种 EDC/NHS/CO11-NH₂ 的比例为 6/6/1 (摩尔当量) 的人类重组胶原水凝胶 (称为 F6) 具有 1.3465±0.0001 的折射率。

[0184] 表 4 汇总了不同水凝胶的光透射。

[0185] 表 4. 光透射

[0186]

波长(nm)	白色光	450	500	550	600	650
平均透射率 (%)						
F1	86.7±0.9	69.7±1.2	76.0±1.3	79.2±1.4	82.4±1.3	84.9±1.4
F3	90.7±2.5	85.8±3.5	86.4±2.9	86.7±2.6	88.0±2.4	89.6±2.6
F6	75.5±1.5	48.7±0.4	57.7±1.1	62.7±1.1	67.6±1.4	71.6±1.7

[0187] 水凝胶材料 (称为 F3) 似乎展示最可接受的光学性质。在视觉上或目视上, F3 与其他人类重组水凝胶相比似乎具有最大透明度。

[0188] 表 5 提供本发明人类重组水凝胶的机械性质。

[0189] 表 5. 机械性质

[0190]

试样	F1	F3	F6
平均最大应力 (KPa)	62.6±9.9	117.2±36.9	149.9±57.7
平均断裂应力 (KPa)	67.1±21.0	110.5±49.7	99.5±60.8
平均断裂应变 (%)	62.60±6.82	50.20±7.55	23.51±9.03
平均模量 (MPa)	0.281±0.032	0.525±0.124	1.949±0.939

[0191] 水凝胶 F3 似乎具有较低模量,但其他机械性质是可接受的。

[0192] 表 6 提供所述水凝胶材料的水含量值。

[0193] 表 6. 经平衡的水含量

[0194]

试样	F1	F3	F6
水含量 (%)	92.82±0.68	92.63±0.61	91.40±0.38

[0195] 很明显,所述水凝胶高度水合。

[0196] 在本发明实例中,将一 pH 指示剂添加于 MES 缓冲液中以帮助监控 pH 变化。用于此实例的特定指示剂是 Alizarin Red S(Sigma Aldrich)。

[0197] 图 4 是在 7 天时期内在人类重组胶原试样 F1 上人角膜上皮细胞生长的图表。图 5 是在 7 天时期内在人类重组胶原试样 F3 上人角膜上皮细胞生长的图表。图 6 是在 7 天时期内在人类重组胶原试样 F6 上人角膜上皮细胞生长的图表。

[0198] 在重组水凝胶材料上观察到的细胞生长比在对照试验上观察到的多。

[0199] 图 7 是一个证明所述水凝胶材料 F3 在活体内存留至少 30 天的照片。

[0200] 实例 19

[0201] 胶原-聚(NIPAAm-共-AAC)组合物

[0202] 使用本文所述的 EDC/NHS 交联方法(实例 4)制备一种组合物。起始胶原浓度为 15%。最终胶原浓度为 11%。最终聚(NIPAAm-共-Aac)浓度为 3%。所述凝胶中的总固体浓度为 14%。

[0203] 根据 Li 等人在 PNAS 100:15346-15351(2003)中揭示的缝线抽出法,此材料具有 1.3542 的折射率、11g-力的抗拉强度、3.3mm 的伸长和 3.8 克-力/毫米的模量。

[0204] 变性温度自交联前的 40℃增加至交联后的 50℃。所述材料具有比人角膜或兔角膜高的光透射和比其低的反散射。例如,对于白色光,所述水凝胶材料的透射百分数为约 102%,且人角膜为约 93%,且兔角膜为 78%。所述水凝胶对于 450nm、500nm、550nm、600nm 和 650nm 的光波长分别具有约 90%、96%、100%、101%和 103%的透射百分数。人角膜和兔角膜在所有测试波长下展示小于 100%的透射百分数,且在各波长下展示始终比所述水凝胶材料低的透射百分数。

[0205] 所述水凝胶材料证明,播种后 7 天铺满角膜上皮细胞。

[0206] 实例 20

[0207] 胶原/硫酸软骨素组合物

[0208] 使用 I 胶原利用硫酸软骨素 (CSC) 作为一蛋白多糖等效物来研发具有高光学透明度及抗拉强度的生物合成基质。在控制条件下制造具有高达 30% (wt/wt) CSC 与胶原干重量的水凝胶, 而没有导致光学透明度损失的凝固或胶原原纤维形成。所述水凝胶是以物理和生物化学方式进行表征。活体外测试展示人角膜上皮细胞 (HCEC) 在凝胶表面上生长良好且成功分层。所述基质支持良好的神经生长。在活体内亦获得类似结果。

[0209] 以类似于本文所述的实例 14 制备组合物。CSC 是使用 EDC 和 NHS 化学品共价键结至胶原。

[0210] 具有不同 CSC 与胶原干重比和不同 EDC 与胶原 $-NH_2$ 摩尔当量比的胶原 (3.5w/v%) 和 CSC 凝胶是通过使用 EDC/NHS (1 : 1 摩尔当量) 交联技术来制备, 如本文所讨论。所有凝胶均是视觉上透明的。所述组合物与人角膜 (约 87% 透射和 3% 反散射) 相比具有较高光透射和较低光散射, 如下表 7 中所示。

[0211] 表 7- 透射和光散射

[0212]

CSC 与胶原重量比 (%)	0	5	10	20	30
透射 (%)	89.9	95.5	93.0	90.5	97.3
反散射 (%)	0.30	0.19	0.19	0.17	0.19
EDC 与 NH_2 比例 (%)	0.25	0.5	1.0	2.0	
透射 (%)	96.7	100	99.9	88.2	
反散射 (%)	0.24	0.28	0.16	0.20	

[0213] 折射率介于 1.34-1.35 之间, 其接近于人角膜的折射率 (1.376)。

[0214] 测量通过使用不同 EDC 与胶原 $-NH_2$ 摩尔比所制成凝胶的溶胀比并通过以下等式计算:

[0215] 溶胀比 = $(W_w - W_d) / W_d$

[0216] 其中 W_w 是经水合凝胶的重量且 W_d 是干凝胶的重量。

[0217] 使用 EDC/NHS 的胶原-CSC 交联导致在羧酸与胺基团之间形成交联。结果 (图 9) 表明, 增加 EDC 与胶原 $-NH_2$ 比降低胶原-CSC 凝胶的溶胀比, 这是因为其引入更多的耦合网络。

[0218] 所述植入体的机械性质测量是通过缝线抽出方法实施, 如由 Li 等人在 PNAS 100 : 15346-15351 (2003) 中所揭示者。将植入体在 PBS 中完全水合并以 10mm/min 的速度拉伸。监测植入体 (厚度 500 μm 且直径 12mm) 断裂时的抗拉强度。所述凝胶的抗拉强度是通过增加 EDC 与 NH_2 摩尔比来增强 (图 10)。然而, 当 EDC 的量实质上增加时, 所述材料变得易碎, 因此当 EDC 与胶原 $-NH_2$ 摩尔比为 2 或更高时抗拉强度略微下降。

[0219] 所述凝胶的抗拉强度也可通过增加胶原浓度来增强, 如图 11 中所述 (比较, 使用 10% 胶原而非 3.5%)。抗拉强度自 2.65 增加至 10.02 克-力且溶胀比自 21.5 降低至 12.1。

[0220] 通过差示扫描量热法 (DSC) 评价交联效率。加热胶原或经交联胶原水凝胶在一温度下依赖于交联程度和性质将引发天然三螺旋结构的结构转变。胶原溶液和经交联完全水合胶原水凝胶是在一气密密封锅中进行表征并以 2°C/min 的恒定速率升高试样的温

度。将最高峰处的温度记录为变性温度。当 EDC 与 NH_2 比增加时,变性温度自 42.4℃ 增加至 56.6℃ (图 12A),此表明共价交联的引入使所述三螺旋的稳定性增加且因此使变性温度增加。胶原-CSC 凝胶的变性温度比仅胶原的凝胶为高(图 12B)。然而,改变胶原-CSC 凝胶中的 CSC 与胶原摩尔比并不影响变性温度。

[0221] 观察到来自一确立细胞株的人角膜上皮细胞活体外生长。神经生长是在活体外使用植入所述凝胶的背根神经节来实施。使神经突生长 7 天,对于神经纤维丝将凝胶染色并测量神经突延伸。神经突在所有胶原-CSC 凝胶中生长良好(图 13)。

[0222] 将 CSC 浓度自 5% 增加至 20% 可极大地增强神经突延伸在所述凝胶内的长度。在包含 30% CSC 的凝胶中没有明显的额外优点(图 13)。观察到优良的上皮覆盖与植入体整合。

[0223] 实例 21

[0224] III 型胶原组合物

[0225] 材料人类重组 III 型胶原(5.1% w/w FibroGen 有限公司)、0.625M 吗啉基乙烷磺酸[MES,包含 Aalizarin Red S pH 指示剂(6.5mg/100ml 水)],1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺 HCl(EDC)、N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)。

[0226] 水凝胶是自 18.3% (w/w) III 型胶原溶液制得。将 0.3ml 18.2wt% 人类重组 III 型胶原(自 FibroGen 公司的 5.1% w/w 人类重组 III 型胶原浓缩获得)与 0.3ml MES(0.625M)在两个无气泡注射器中混合,所述注射器与一在冰-水浴中的塑料 Tee 连接在一起。形成一均匀溶液后,将 33.5mg EDC 和 20.1mg NHS 溶于 0.125ml MES 中,取其 57 μl 并以 EDC : NHS : 胶原- NH_2 3 : 3 : 1 的摩尔比注射至上述注射器中。未添加 NaOH 溶液,这是因为混合物呈现粉红色,此表明 pH 约 5。将混合物充分混合并浇注于玻璃模具(厚度 434 μm)中且在室温下在 100% 湿度下放置 16 小时。然后将模具转移至一恒温箱中于 37℃ 下后固化 5 小时。将所得平水凝胶取出并浸泡于 10mM PBS 中,其中以 8 小时时间间隔更换新鲜缓冲液。将所得水凝胶浸泡于含 1% 氯仿的 10mMPBS 中并存储在 4℃ 冰箱中。

[0227] EDC : NHS : 胶原- NH_2 的比例为 2 : 2 : 1 和 1 : 1 : 1 的额外 III 型胶原水凝胶亦是使用上述方法制得。所有获得凝胶均透明。

[0228] 水凝胶也可自 5.1% (w/w) III 型胶原溶液制得。将 0.3ml 5.1wt% 人类重组 III 型胶原与 50 μl MES(0.625M)在两个无气泡注射器中混合,所述注射器与一在冰-水浴中的塑料 T 形件连接在一起。形成一均匀溶液后,将 9.3mg EDC 和 5.6mg NHS 溶于 0.125ml MES 中,取其 57 μl 并以 EDC : NHS : 胶原- NH_2 3 : 3 : 1 的摩尔比注射至上述注射器中。未添加 NaOH 溶液,这是因为混合物呈现粉红色,表明 pH 约 5。将混合物充分混合并浇注于玻璃模具(厚度 434 μm)中且在室温下在 100% 湿度下放置 16 小时。然后将模具转移至一恒温箱中于 37℃ 下后固化 5 小时。将所得平水凝胶取出并浸泡于 10mM PBS 中,其中以 8 小时时间间隔更换新鲜缓冲液。最后,将所得水凝胶浸泡于含 1% 氯仿的 10mM PBS 中并存储在 4℃ 冰箱中。所得物凝胶是光学透明的。

[0229] 对于 18.3% w/w 胶原起始浓度,最终胶原含量为 8.36% (w/v) (根据添加各个组份后的稀释因数计算)或约 10% (w/v) (测量值)。

[0230] 对于 5.1% w/w 胶原起始浓度,最终胶原含量为 3.76% (w/v) (根据添加各个组份后的稀释因数计算)或约 4% (w/v) (测量值)。

[0231] 尽管已根据各种特定实例及实施例阐述本发明,但应理解,本发明并非仅限于此且其他实施例在本发明范围内。

[0232] 在上文引用了大量出版物、专利和专利申请案。所引用的各出版物、专利和专利申请案均以其整体内容引用的方式并入本文中。

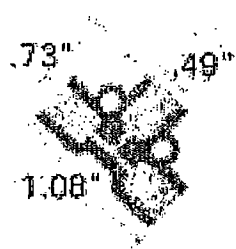


图 1

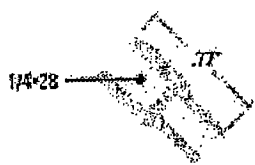


图 2



图 3

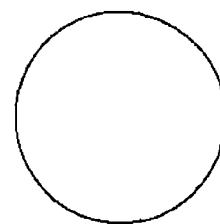


图 8

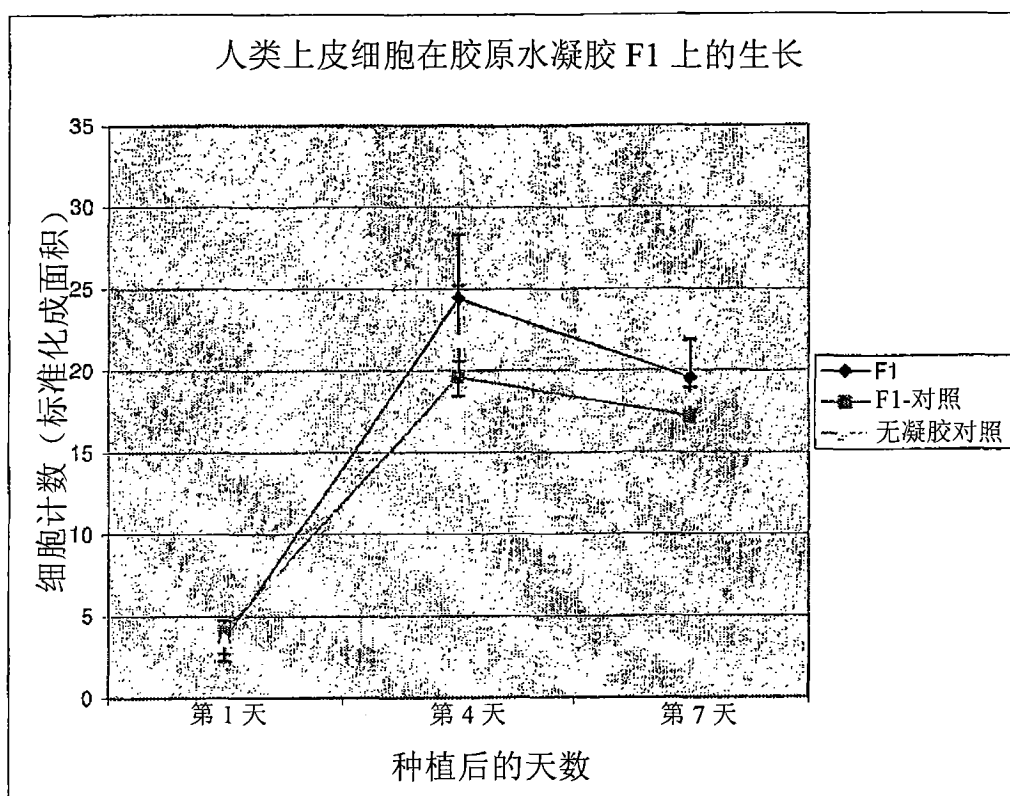


图 4



图 7

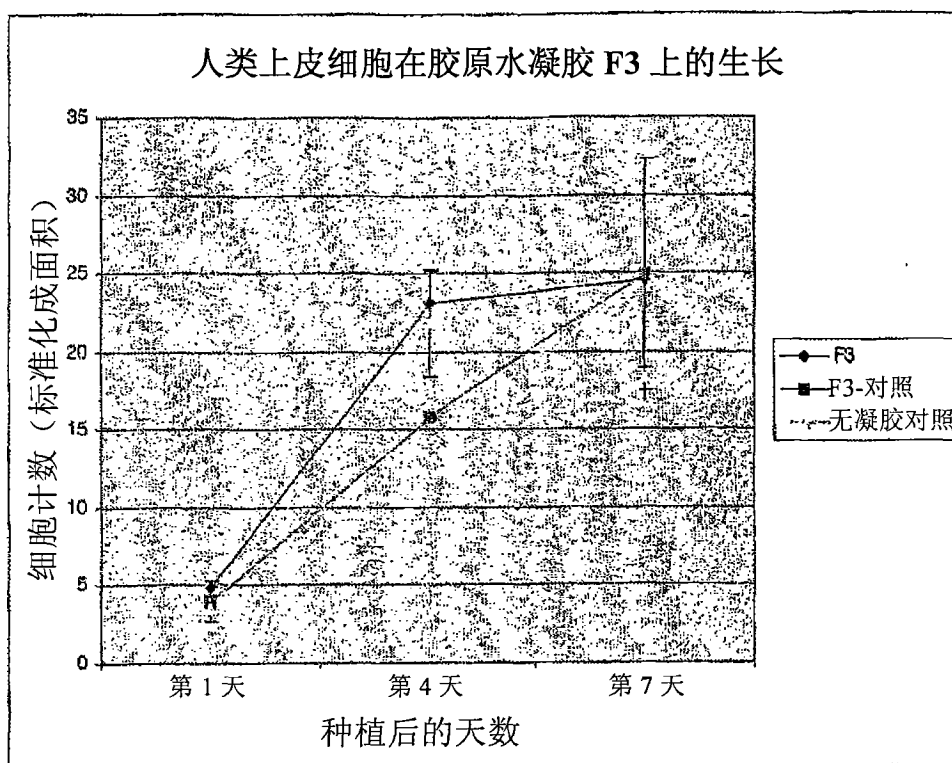


图 5

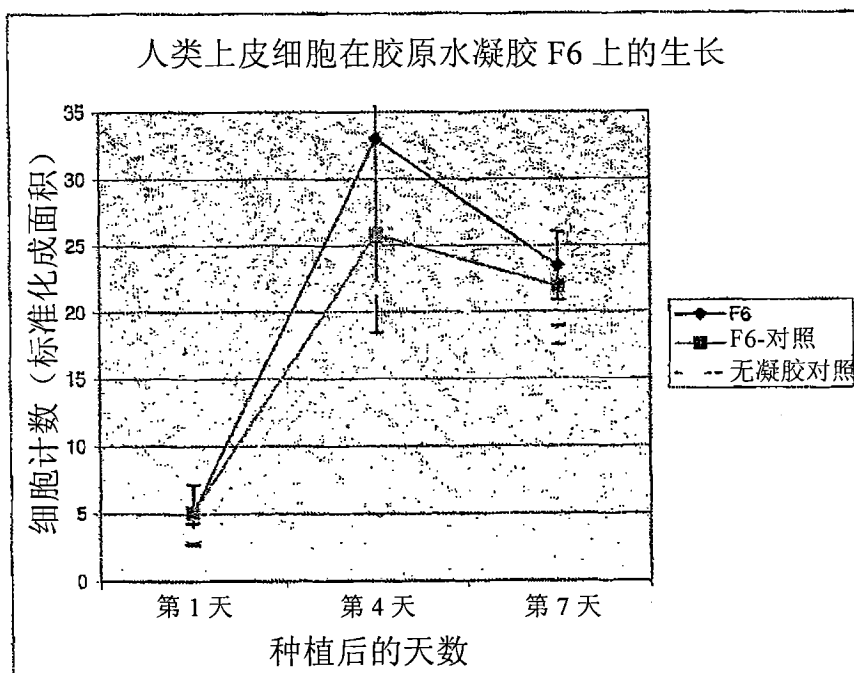


图 6

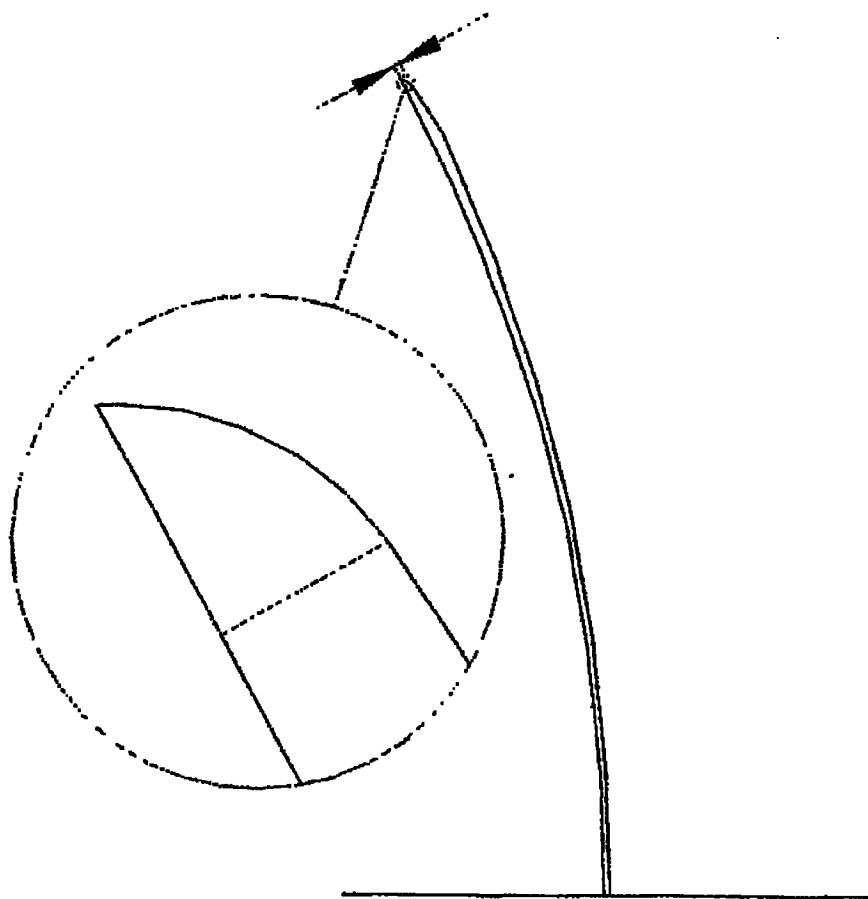


图 8A

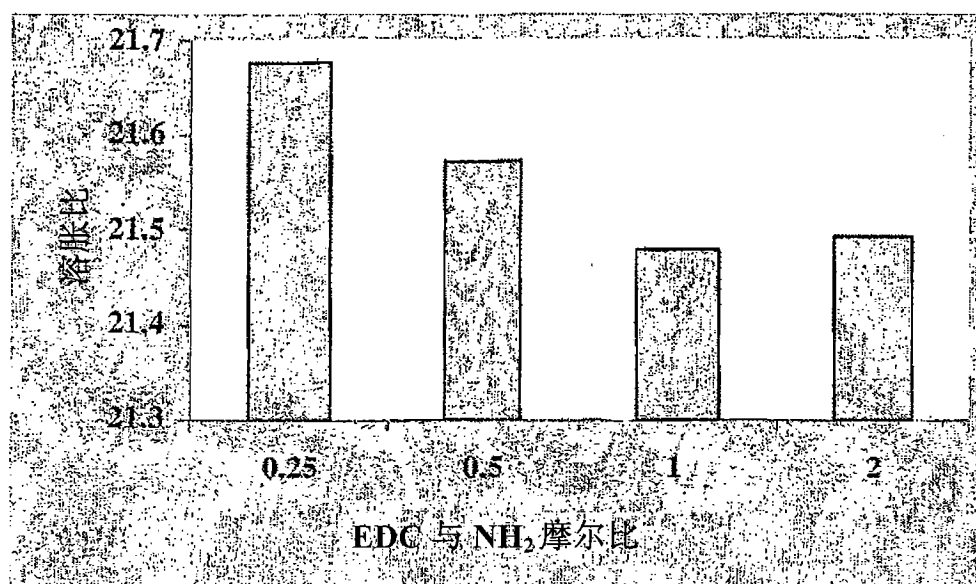


图 9

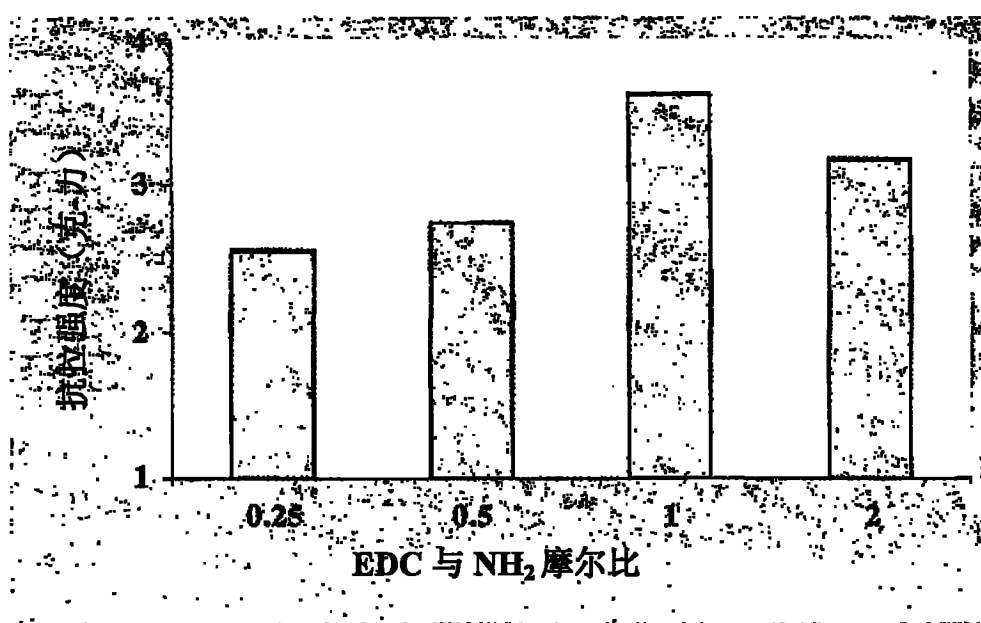


图 10

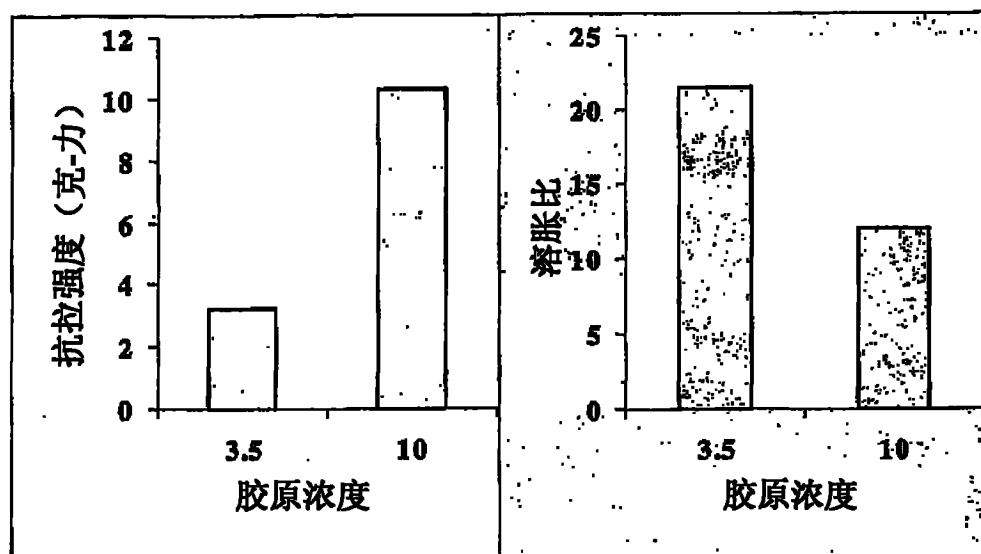


图 11

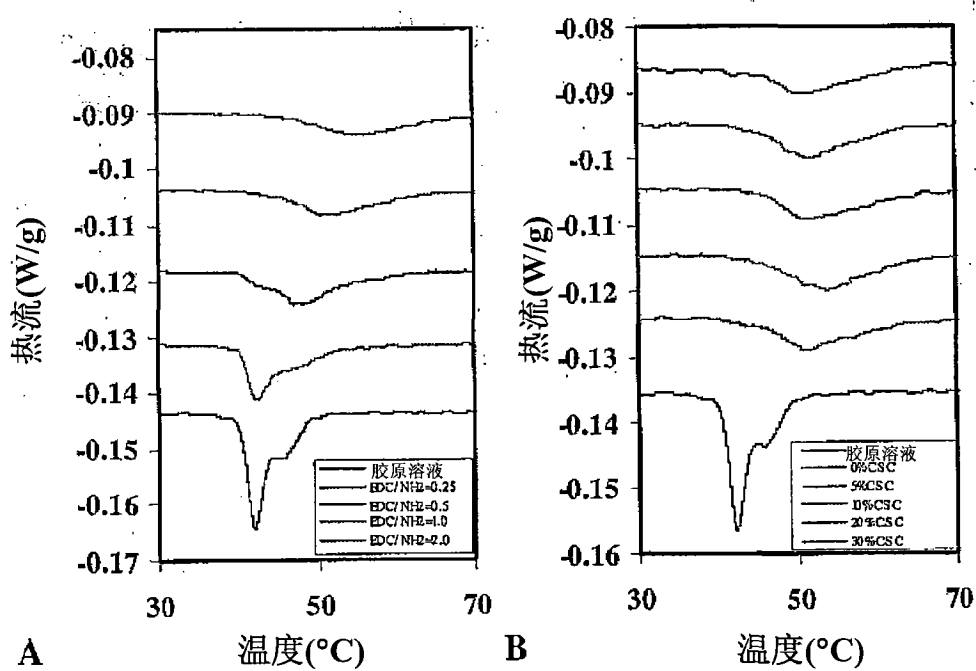


图 12

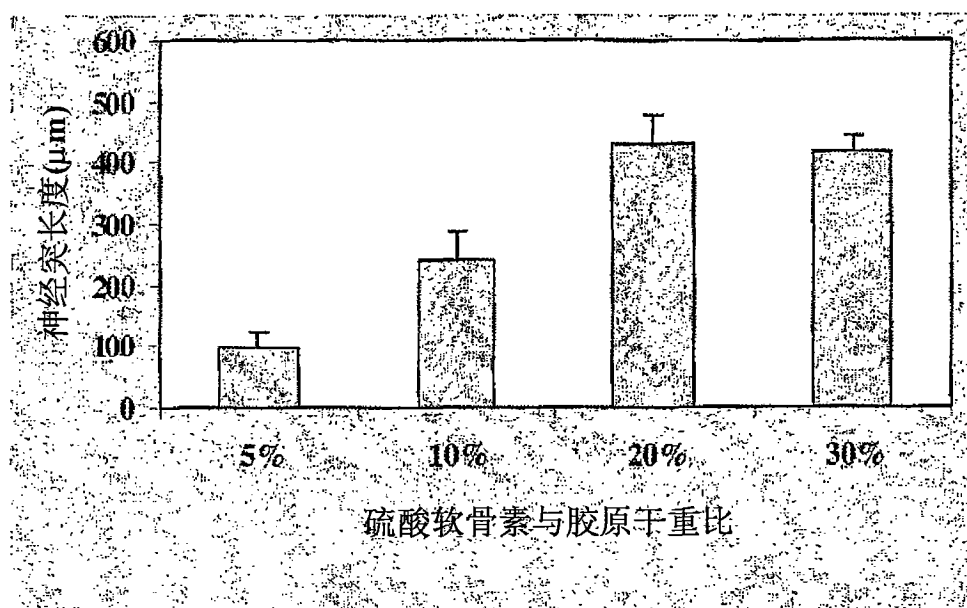


图 13