



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101400717 B

(45) 授权公告日 2011.08.31

(21) 申请号 200780008284.7

代理人 焦丽雅

(22) 申请日 2007.03.07

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C08G 63/664 (2006.01)

PA200600337 2006.03.09 DK

C08G 81/00 (2006.01)

PA200601131 2006.09.01 DK

C08J 9/00 (2006.01)

PCT/EP2006/067837 2006.10.26 EP

C08J 9/28 (2006.01)

A61L 27/18 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61L 15/26 (2006.01)

2008.09.08

A61L 27/56 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/DK2007/000115 2007.03.07

JP 特开 2002-20523 A, 2002.01.23, 说明书第 [0016] 段 - 第 [0039] 段, 实施例 1-9.

(87) PCT申请的公布数据

W02007/101443 EN 2007.09.13

US 4716203, 1987.12.29, 说明书第 1 栏第 7 行 - 第 4 栏第 9 行, 实施例 19.

(73) 专利权人 科洛普拉斯特公司

地址 丹麦胡姆勒拜克

EP 1234587 B1, 2005.11.23, 权利要求 1-46.

(72) 发明人 J·范格 K·施瓦奇 - 阿布迪拉奥伊

H·埃弗兰德 P·S·尼尔森

B·尼尔森 L·K·杰斯珀森

L·F·尼尔森

CN 1332189 A, 2002.01.23, 说明书第 2 页第 2 段 - 第 3 页倒数第 2 段.

审查员 李蔚慰

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 3 页

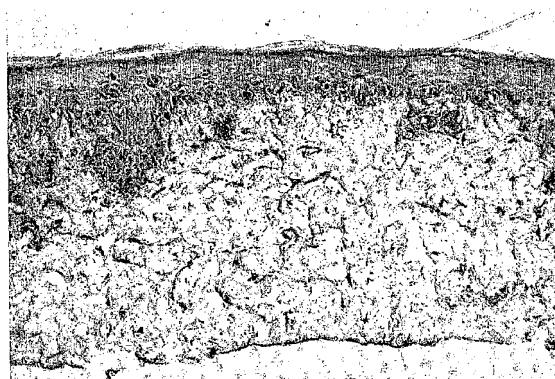
(54) 发明名称

具有用于软组织再生的改进生物相容性的可降解亲水嵌段共聚物

和 (ii) 乙交酯单元 [-CH₂-COO-] 组合数量的摩尔比最多是 14:86, 共聚物的分子量至少是 20,000g/mol.

(57) 摘要

本发明公开了可生物降解聚合物、多孔的和含有这种聚合物的其它材料以及这种材料的各种医疗用途, 包括用作支持细胞粘附或组织再生的进界生长的支架。聚合物的通式是 A-O-(CHR¹CHR²O)_n-B 其中 A 是聚(丙交酯-共-乙交酯) 残基, 聚(丙交酯-共-乙交酯) 残基中的 (i) 丙交酯单元 [-CH(CH₃)-COO-] 和 (ii) 乙交酯单元 [-CH₂-COO-] 的摩尔比的范围是 80:20 至 10:90, B 是聚(丙交酯-共-乙交酯) 残基或氢、C₁₋₆-烷基或羟基保护基团, R¹和 R²中一个是氢或甲基, 另一个是氢, n 是 10-1000, (iii) 聚亚烷基二醇单元 [- (CHR¹CHR²O)-] 与聚(丙交酯-共-乙交酯) 残基中的 (i) 丙交酯单元 [-CH(CH₃)-COO-]



CN 101400717 B

1. 一种含有如下通式的聚合物的可生物降解的多孔材料：



其中

A 是分子量至少为 4000g/mol 的聚（丙交酯-共-乙交酯）残基，聚（丙交酯-共-乙交酯）残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 80 : 20 至 10 : 90 ；

B 是如 A 所定义的聚（丙交酯-共-乙交酯）残基或是选自氢、 C_{1-6} -烷基和羟基保护基团；

每个 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中一个选自氢和甲基，同一 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中另一个是氢；

n 表示聚合物链中 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元的平均数量，是 10-1000 范围内的整数；

(iii) 聚亚烷基二醇单元 $[-(CHR^1CHR^2O)-]$ 与聚（丙交酯-共-乙交酯）残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 组合数量的摩尔比最多是 14 : 86 ；

和其中共聚物的数均分子量至少是 10,000g/mol ；

其中孔隙率至少是 50%。

2. 根据权利要求 1 的多孔材料，其中共聚物的数均分子量至少是 20,000g/mol。

3. 根据权利要求 1 的多孔材料，其中在每个单元内的 R^1 和 R^2 都是氢。

4. 根据权利要求 1 的多孔材料，其中 B 是如 A 所定义的聚（丙交酯-共-乙交酯）残基。

5. 根据权利要求 1 的多孔材料，其中 B 是 C_{1-6} 烷基。

6. 根据权利要求 1 的多孔材料，其中 B 是羟基保护基。

7. 根据权利要求 1 的多孔材料，其中 B 是氢。

8. 根据权利要求 1 的多孔材料，其中所述聚合物具有如下通式：



其中

A 是分子量至少为 8000g/mol 的聚（丙交酯-共-乙交酯）残基，聚（丙交酯-共-乙交酯）残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 80 : 20 至 10 : 90 ；

n 表示聚合物链中 $-(CH_2CH_2O)-$ 单元的平均数量，是 16-250 范围内的整数；

(iii) 聚乙二醇单元 $[-(CH_2CH_2O)-]$ 与聚（丙交酯-共-乙交酯）残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 组合数量的摩尔比在 1 : 99 至 12 : 88 的范围内，

和其中共聚物的数均分子量至少是 20,000g/mol。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项的材料，其是冷冻干燥的。

10. 根据权利要求 1-8 中任一项的材料，其中材料的孔至少部分被一种或多种来自细胞外基质的组分占据。

11. 根据权利要求 10 的材料，其中来自细胞外基质的组分选自硫酸软骨素、透明质烷、透明质酸、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素、生长因子、凝血酶、纤维蛋白、纤连蛋白、

弹性蛋白、胶原蛋白、明胶和聚集蛋白聚糖。

12. 根据权利要求 9 的材料,其中所述材料的孔至少部分被一种或多种来自细胞外基质的组分占据。

13. 根据权利要求 12 的材料,其中来自细胞外基质的组分选自硫酸软骨素、透明质烷、透明质酸、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素、生长因子、凝血酶、纤维蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白、明胶和聚集蛋白聚糖。

14. 一种如下通式的可生物降解聚合物:



其中

A 是分子量至少为 8,000g/mol 的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基,聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 80 : 20 至 10 : 90,

n 表示聚合物链中 $-(CH_2CH_2O)-$ 单元的平均数量,是 16-250 范围内的整数,

(iii) 聚乙二醇单元 $[-(CH_2CH_2O)-]$ 与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 组合数量的摩尔比在 1 : 99 至 12 : 88 的范围内,

和其中共聚物的数均分子量至少是 20,000g/mol。

15. 制备可生物降解的、多孔聚合物材料的方法,该方法包括步骤:

(a) 在非水溶剂中溶解如权利要求 1-8 任一项所定义的聚合物以获得聚合物溶液;

(b) 冷冻步骤 (a) 中获得的溶液以获得冷冻的聚合物溶液;和

(c) 冷冻干燥步骤 (b) 中获得的冷冻聚合物溶液以获得可生物降解的多孔材料。

16. 根据权利要求 15 的方法,其中聚合物溶液在步骤 (a) 之后被倒出或浇铸入合适的模具。

17. 含有如权利要求 14 中所定义的聚合物的材料的医疗设备元素。

18. 根据权利要求 17 的医疗设备元素,其中所述元素是医疗设备的外部涂层。

19. 含有如权利要求 14 中所定义的聚合物的材料的医疗设备。

20. 根据权利要求 19 的医疗设备,其是网眼或网状的形式。

21. 根据权利要求 19 的医疗设备,其是纤维的形式。

22. 用于治疗、牙科或外科的如权利要求 1-13 中任一项所定义的可生物降解的多孔材料。

23. 如权利要求 1-13 中任一项所定义的可生物降解的多孔材料在制备支持细胞粘附或组织再生的进界生长的支架中的用途。

24. 如权利要求 1-13 中任一项所定义的可生物降解的多孔材料在制备创伤敷料中的用途。

具有用于软组织再生的改进生物相容性的可降解亲水嵌段 共聚物

发明领域

[0001] 本发明涉及新的可生物降解的聚合物、多孔的和含有这种聚合物的其它材料以及这种材料的各种医疗用途。

[0002] 发明背景

[0003] 支架是可以加入细胞的多孔结构。它们通常由生物相容的并可降解的材料构成，加入到组织中以在形成功能组织过程中指导细胞的组织、生长和分化。所用的材料可以是天然的或合成的来源。

[0004] 知道聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D/L-丙交酯)(PDLLA)和聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)作为可降解的植入材料已有相当长的时间，它们都是经食品及药物管理局(FDA)批准用于此目的的。它们被用作骨骼、软骨、肝脏、皮肤、尿道、肠、腱和心血管组织的支架。

[0005] 这些应用中一个的典型例子是聚合物常常通过溶剂浇注/颗粒浸析制成多孔结构。然后此结构用乙醇预湿，接着用水冲洗。此步骤是必须的，因为这些聚合物是疏水的并且直接用水弄湿这些聚合物的尝试失败了。湿的结构再用细胞播种并在移植之前在生物反应器中培育。

[0006] 聚醚和聚酯的共聚物也是已知的。它们通常不用做支架，因为已知含PEG(聚乙二醇)聚合物阻碍细胞和蛋白的粘附。这种类型的聚合物用作药物递送的载体，其中聚醚部分的高亲水性和抗污力是有用的。

[0007] 已知PLGA和PEG与PLGA的共聚物具有良好的生物相容性，由于其对细胞无毒并不会引起组织炎症反应。在Zange等人，*Journal of Controlled Release*, 56, 1998, 249-258中，用体外模型检验了不同PEG-PLGA共聚物的生物相容性，未显示聚合物对小鼠成纤维细胞有反作用。对构成支架的聚合物而言，良好的生物相容性是不够的。细胞必须有效地粘附到材料上。已知含PEG聚合物和涂有PEG的表面阻碍细胞和蛋白的粘附。

[0008] US 6,201,072B1 讲授了一组具有低分子量和药物递送应用上不同水溶解性特征的PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物。

[0009] WO 03000778 A1 使用(尤其)具有羟基功能末端的接头的MPEG-PLGA(MPEG = 甲氧基聚乙二醇)来达到药物释放的目的。

[0010] US 20040076673 公开了 $M_w < 5000$ 的MPEG-PLGA用于口服药物递送。

[0011] CN1446841 公开了聚(丙交酯)-聚醚嵌段共聚物的三维多孔结构材料和制备这种嵌段共聚物的方法。

[0012] 用于组织工程的聚合物可以是天然的或合成的。最广泛使用的合成聚合物来自聚酯类。此类中最常见的是PLLA、PDLLA、PLGA、PCL(聚-ε-己内酯)和其各种共聚物。它们都是疏水材料，细胞与这些聚酯支架的最初粘附是最好也不过是缓慢的。

[0013] 本发明者已发现通过加入亲水的嵌段(即聚亚烷基二醇嵌段)到聚合物中，聚酯的生物相容性得到改进。此归因于材料更好的润湿特征，最初细胞粘附在非极性材料上减

弱了。此外,已发现通过保持相对于丙交酯/乙交酯单元摩尔量低的聚亚烷单元摩尔量,即最多 14 摩尔 %,获得高级的聚合物和衍生材料。

[0014] 发明简述

[0015] 本发明的一个方面涉及如下通式的可生物降解聚合物:

[0016] $A-O-(CHR^1CHR^2O)_n-B$

[0017] 其中

[0018] A 是分子量至少 4000g/mol 的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基,聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 80:20 至 10:90,特别是 70:30 至 10:90;

[0019] B 是如 A 所定义的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基或是选自氢、 C_{1-6} -烷基和羟基保护基团;

[0020] 每个 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中一个选自氢和甲基,同一 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中另一个是氢;

[0021] n 表示聚合物链中 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元的平均数量,是 10-1000 范围内的整数,特别是 16-250;

[0022] (iii) 聚亚烷基二醇单元 $[-(CHR^1CHR^2O)-]$ 与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 组合数量的摩尔比最多是 14:86;

[0023] 和其中共聚物的分子量至少是 20,000g/mol。

[0024] 本发明的另一个方面涉及一个通式的可生物降解的多孔材料 $A-O-(CHR^1CHR^2O)_n-B$

[0025] 其中

[0026] A 是分子量至少为 4000g/mol 的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基,聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 80:20 至 10:90;

[0027] B 是如 A 所定义的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基或是选自氢、 C_{1-6} -烷基和羟基保护基团;

[0028] 每个 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中一个选自氢和甲基,同一 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中另一个是氢;

[0029] n 表示聚合物链中 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元的平均数量,是 10-1000 范围内的整数;

[0030] (iii) 聚亚烷基二醇单元 $[-(CHR^1CHR^2O)-]$ 与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 组合数量的摩尔比最多是 14:86;

[0031] 和其中共聚物的分子量至少是 10,000g/mol。

[0032] 其中孔隙率至少是 50%,例如在 50-99.5% 的范围。

[0033] 本发明的第三方面涉及制备可生物降解的多孔的聚合物材料的方法,该方法包括的步骤有:

[0034] (a) 在非水溶剂中溶解如本文定义的聚合物以获得聚合物溶液;

[0035] (b) 冷冻步骤 (a) 中获得的溶液以获得冷冻的聚合物溶液;和

[0036] (c) 冷冻干燥步骤 (b) 中获得的冷冻聚合物溶液以获得可生物降解的多孔材料。

[0037] 本发明的进一步方面涉及含有如本文定义的聚合物材料的医疗设备元素；含有如本文定义的聚合物材料的医疗设备；如本文定义的可生物降解的多孔材料用于治疗、牙科或外科的用途；如本文定义的可生物降解的多孔材料在制备用来支持细胞粘附或组织再生的进界生长的支架中的用途；如本文定义的可生物降解的多孔材料在制备创伤敷料中的用途；和支持细胞粘附和 / 或组织再生的进界生长的方法，该方法包括将如本文定义的可生物降解的多孔材料与所述组织接触的步骤。

[0038] 附图说明

[0039] 图 1 说明了支持再生表皮发育的 MPEG-PLGA 2-30kDa 支架。

[0040] 图 2：二氧杂环己烷中 2-30 50% 丙交酯聚合物 (6% (w/w)MPEG) 的 1.5% (w/w) 溶液，在 -5℃ 冷冻，再在 -20℃ 冷冻干燥。

[0041] 图 3：二氧杂环己烷中 2-30 50% 丙交酯聚合物 (6% (w/w)MPEG) 的 1.5% (w/w) 溶液，在 +5℃ 冷冻，再在 -20℃ 冷冻干燥。

[0042] 图 4：冷冻干燥的含有 40% ECM 颗粒的 1.5% MPEG-PLGA 的 SEM 图 (放大率 250x)。

[0043] 图 5：示出了 GAG 的释放。观察到 GAG 从包含 GAG 的所有支架中立即释放，而从纯的 MPEG-PLGA 的支架中没有释放。与 1% 和 2% 的相比，在 8% 的支架中观察到了略高的释放。

[0044] 发明详述

[0045] 本发明者已发现特殊设计的可生物降解的聚合物具有非常有趣的可用于支持细胞粘附和 / 或组织再生的进界生长的支架的特性。

[0046] 聚合物

[0047] 新的可生物降解聚合物由聚亚烷基二醇残基和一种或两种聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯) 残基组成。

[0048] 因此，本发明特别涉及一个通式的可生物降解聚合物：

[0049] $A-O-(CHR^1CHR^2O)_n-B$

[0050] 其中

[0051] A 是分子量至少为 4000g/mol 的聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯) 残基，聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯) 残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 80:20 至 10:90，特别是 70:30 至 10:90；

[0052] B 是如 A 所定义的聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯) 残基或是选自氢、 C_{1-6} -烷基和羟基保护基团；

[0053] 每个 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中一个选自氢和甲基，同一 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中另一个是氢；

[0054] n 表示聚合物链中 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元的平均数量，是 10-1000，特别是 16-250 范围内的整数；

[0055] (iii) 聚亚烷基二醇单元 $[-(CHR^1CHR^2O)-]$ 与聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯) 残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 组合数量的摩尔比最多是 14:86；

[0056] 和其中共聚物的分子量至少是 20,000g/mol。

[0057] 因此,聚合物可以是两嵌段型或三嵌段型。

[0058] 可以理解为聚合物含有一个或两个残基 A,即聚(丙交酯-共-乙交酯)残基。发现这种残基的分子量应至少为 4000g/mol,更特别地至少 5000g/mol,或甚至至少 8000g/mol。

[0059] 聚合物的聚(丙交酯-共-乙交酯)可以在生理状况下,举例来说,在身体的液体和组织中降解。然而,由于这些残基的分子量(和本文所述的其它要求),我们相信降解将十分缓慢以至于材料和聚合物制成的物体可以在聚合物完全降解前完成它们的使命。

[0060] “聚(丙交酯-共-乙交酯)”表达包括许多聚合物变体,比如聚(无规-丙交酯-共-乙交酯)、聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)、聚(内消旋丙交酯-共-乙交酯)、聚(L-丙交酯-共-乙交酯),PLGA 中丙交酯/乙交酯的顺序也可以是无规的、递变的或是嵌段,丙交酯可以是 L-丙交酯、DL-丙交酯、D-丙交酯或内消旋丙交酯。

[0061] 优选地,聚(丙交酯-共-乙交酯)是聚(无规-丙交酯-共-乙交酯)或聚(渐缩-丙交酯-共-乙交酯)。

[0062] 另一个重要特征是如下事实,聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的(i)丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和(ii)乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 80:20 至 10:90,特别是 70:30 至 10:90。

[0063] 一般观察得知,对聚合物而言得到的最好结果是聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的(i)丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和(ii)乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 的摩尔比的范围是 70:20 或更少,或 70:30 或更少,然而对聚合物而言各自摩尔比直至 80:20 时也观察到相当好的结果,只要(iii)聚亚烷基二醇单元 $[-(CHR^1CHR^2O)-]$ 与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的(i)丙交酯单元 $[-CH(CH_3)-COO-]$ 和(ii)乙交酯单元 $[-CH_2-COO-]$ 组合数量的摩尔比最多是 10:90。

[0064] 如上所述,B 是如 A 所定义的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基或是选自氢、 C_{1-6} -烷基和羟基保护基团。

[0065] 在一个实施方案中,B 是如 A 所定义的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基,即聚合物是三嵌段型。

[0066] 在另一个实施方案中,B 是选自氢、 C_{1-6} -烷基和羟基保护基团,即聚合物是两嵌段型。

[0067] 最典型地(在此实施方案中),B 是 C_{1-6} -烷基,例如甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、叔-丁基、1-戊基等等,最优选甲基。如果在 B 是氢的情况下,即与末端羟基基团相对应,聚合物典型地用如 B 的羟基保护基团来制备。“羟基保护基团”是能够在聚合物合成后通过如氢解作用、水解或其它合适的破坏聚合物的手段除去的基团,从而在 PEG 部分留下自由的羟基基团,参见例如描述现有技术方法的教科书如 Greene, T. W. 和 Wuts, P. G. M. 所述的(Protecting Groups in Organic Synthesis, 第三版或更新版)。其中特别有用的例子是苄基、四氢吡喃基、甲氧基甲基和苄氧基羰基。这种羟基保护基团可以被除去以获得聚合物,其中 B 是氢。

[0068] 每个 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中一个选自氢和甲基,同一 $-(CHR^1CHR^2O)-$ 单元中 R^1 和 R^2 中另一个是氢。因此, $-(CHR^1CHR^2O)_n$ 残基可以是聚乙二醇、聚丙二醇或聚(乙二醇-共-丙二醇)。优选地, $-(CHR^1CHR^2O)_n$ 残基是聚乙二醇,即每个单元中 R^1 和 R^2 均是

氢。

[0069] n 表示聚合物链中 $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-$ 单元的平均数量, 是 10-1000, 特别是 16-250 范围内的整数。应理解为 n 表示在一群聚合物分子中的 $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-$ 单元的平均数量。这对本领域技术人员而言是显而易见的。聚亚烷基二醇残基 $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})_n-$ 的分子量典型在 750-10,000g/mol 的范围内, 例如 750-5,000g/mol。

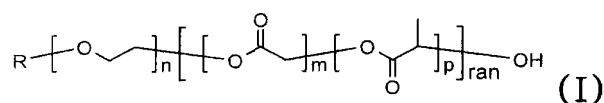
[0070] $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})_n-$ 残基典型地在生理状况下是不降解的, 也许通过 - 另一方面 - 从人体未改变地分泌出。

[0071] (iii) 聚亚烷基二醇单元 $[-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-]$ 与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中的 (i) 丙交酯单元 $[-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}-]$ 和 (ii) 乙交酯单元 $[-\text{CH}_2-\text{COO}-]$ 组合数量的摩尔比也起到一定作用, 并应最多是 14:86。更典型地, 比值最多是 12:88, 特别是最多 10:90, 或甚至最多 8:92。通常比值在 0.5:99.5 至 14:86 的范围内, 如在 1:99 至 14:86 的范围内, 或在 1:99 至 12:88 的范围内, 特别是在 2:98 至 10:90 的范围内, 或甚至在 2:98 至 8:92 的范围内。

[0072] 我们认为用于多孔材料的共聚物的分子量不是特别有关的, 只要它是至少 10,000g/mol。然而优选地, 分子量是至少 15,000g/mol。“分子量”解释为聚合物数均分子量, 因为本领域技术人员可理解, 一群聚合物分子中聚合物分子的分子量将由分布在平均值周围的值来表示, 例如用高斯分布来表示。更典型地, 分子量在 10,000-1,000,000g/mol 的范围内, 如 15,000-250,000g/mol, 或 20,000-200,000g/mol。发现特别有趣的聚合物是分子量至少为 20,000g/mol 的那些, 如至少是 30,000g/mol。

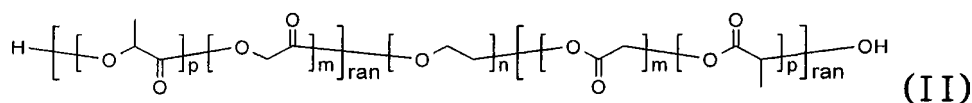
[0073] 聚合物的结构可以如下所示(其中 R 选自氢、 C_{1-6} -烷基和羟基保护基团; n 如上定义, 选择 m 、 p 和 ran 以便完成上述聚(丙交酯-共-乙交酯)残基的规定):

[0074]



[0075] 两嵌段型聚合物

[0076]



[0077] 三嵌段型聚合物

[0078] 对每个上述的聚合物结构 (I) 和 (II) 而言, 理解为 p 和 m 表示的丙交酯和乙交酯单元 $[-\text{CH}_2-\text{COO}-]$ 可以根据原料和反应情况随机分布。

[0079] 也理解为丙交酯单元 $[-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}-]$ 可以是 D/L 或 L 或 D, 典型地 D/L 或 L, 或内消旋丙交酯。

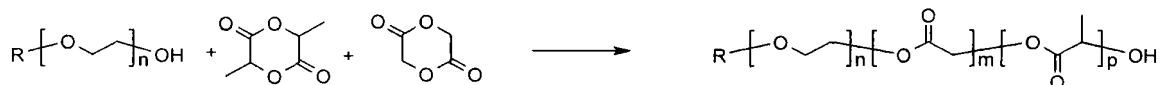
[0080] 如上所述, 聚(丙交酯-共-乙交酯)残基, 即聚酯残基, 是在生理环境中水解降解, 聚亚烷基二醇残基自例如哺乳动物身体分泌。可以如实验部分所述的评定可生物降解能力。

[0081] 聚合物的制备

[0082] 原则上聚合物可以根据本领域技术人员所知的原理来制备。

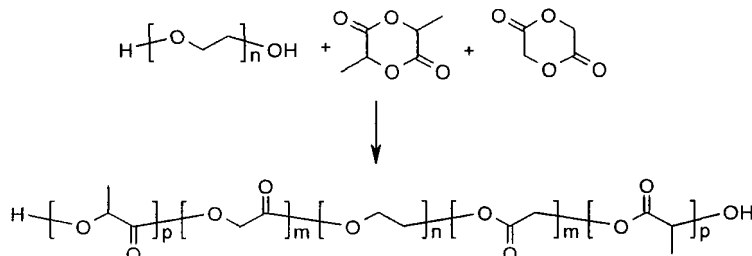
[0083] 原则上, B 不是残基 A (两嵌段型聚合物) 的聚合物可以如下制备:

[0084]



[0085] 原则上, B 是残基 A (三嵌段型聚合物) 的聚合物可以如下制备:

[0086]

[0087] 除非应用特殊情况, 丙交酯单元 $[-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}-]$ 和乙交酯单元 $[-\text{CH}_2-\text{COO}-]$ 的分布在每个聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中会是随机分布或渐缩的。

[0088] 根据本发明的聚合物合成在实验部分进一步阐述。

[0089] 材料

[0090] 聚合物在内科、牙科和外科使用的材料上用途很广。

[0091] 材料可以例如是含有如本文定义的聚合物的可生物降解的、多孔的材料, 其中孔隙率至少是 50%, 例如在 50-99.5% 的范围。

[0092] 高程度的孔隙率可以 - 在下面将进一步叙述 - 通过冷冻干燥获得, 即材料优选被冷冻干燥。

[0093] 聚合物材料的空隙空间可以空着以允许或甚至促进细胞粘附和 / 或组织再生的进界生长。然而在一个实施方案中, 材料的孔至少部分被一种或多种来自细胞外基质的组分占据。这种组分可以促进细胞粘附和 / 或组织再生的进界生长。来自细胞外基质的组分的例子是硫酸软骨素、透明质烷、透明质酸、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素、生长因子、凝血酶、纤维蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白、明胶和聚集蛋白聚糖。

[0094] 来自细胞外基质的组分也可以作为多相分散的颗粒或作为表面涂层加入。来自细胞外基质的组分相对于合成聚合物的浓度典型是在 0.5-15% (w/w) 的范围, 优选低于 10% (w/w)。此外, 相对于材料的体积, 来自细胞外基质的组分的浓度优选最多 0.3% (w/v), 例如最多 0.2 (w/v)。然而在某些实施方案中, 来自细胞外基质的组分相对于合成聚合物的浓度可以高达 80%, 例如 40-70%。在这些实施方案中, 来自细胞外基质的组分的浓度优选是 0.1-5% (w/v), 例如 0.5-4% (w/v)。

[0095] 至于可生物降解能力, 在某些实施方案中, 优选在实验部分所述的生物降解能力测试的 28 天测试内材料的降解度在 0.9-0.1, 如 0.8-0.2 的范围内。

[0096] 可以根据已知技术制备多孔材料, 如在 Antonios G. Mikos, Amy J. Thorsen, Lisa A. Cherwonka, Yuan Bao 和 Robert Langer. Preparation and characterization of poly(L-lactide) foams. Polymer 35, 1068-1077 (1994) 中公开的。然而, 一个制备多孔材料非常有用的技术是冷冻干燥。

[0097] 因此, 本发明也提供了制备可生物降解的、多孔聚合物材料的方法, 此方法包括的步骤有:

[0098] (a) 在非水溶剂中溶解如本文定义的聚合物以获得聚合物溶液；

[0099] (b) 冷冻步骤 (a) 中获得的溶液以获得冷冻的聚合物溶液；和

[0100] (c) 冷冻干燥步骤 (b) 中获得的冷冻聚合物溶液以获得可生物降解的多孔材料。

[0101] 应关于熔点选择方法中使用的非水溶剂以便它可以被适当冷冻。其说明性例子是二氧杂环己烷（熔点 12°C）和碳酸二甲酯（熔点 4°C）。

[0102] 在一个变型中，聚合物溶液在步骤 (a) 之后被倒出或浇铸入合适的模具。这样，可能获得为特殊用途而特定设计的材料的三维形状。

[0103] 此外，本发明也包括一个变型，其中在步骤 (b) 所定义的溶液（分散体）被冷冻前，来自细胞外基质的组分颗粒被分散到步骤 (a) 获得的溶液中。

[0104] 本发明也包括更特殊的变型，其中来自细胞外基质的组分溶解在合适的溶剂中，然后添加到步骤 (a) 获得的溶液中。通过与步骤 (a) 溶剂，即本文定义的聚合物的溶剂的混合，来自细胞外基质的组分很可能沉淀以形成分散体。

[0105] 此外，本发明包括一个变型，其中步骤 (c) 中获得的可生物降解的、多孔材料，在随后的步骤中，浸入到葡糖胺聚糖溶液（例如透明质烷）中，随后再次冷冻干燥。

[0106] 本发明也提供了一种含有如本文定义的聚合物的材料的医疗设备元素。

[0107] 在当前上下文中使用时，“医疗设备”表达意思是包括创伤敷料、缝合线、移植体等等。术语“元素”意思是所述医疗设备的某个部分、部件或层面。

[0108] 因此，在一个实施方案中，元素是医疗设备的外部涂层。

[0109] 在另一个实施方案中，材料形成创伤敷料的外部层面。

[0110] 在一个特别的变型中，本发明提供了一种含有如本文定义的聚合物的材料的医疗设备，即该医疗设备完全由该材料制得。在一个变型中，医疗设备是网眼或网状的形式，特别是网眼，比如疝补片。在另一个变型中，医疗设备是纤维的形式，特别是缝合线。

[0111] 在某些可选的实施方案中，材料以本文定义的聚合物制备的纤维或含纤维的结构的形式存在，材料可能与来自细胞外基质的组分结合。纤维或含纤维的材料可以通过本领域技术人员所知的技术来制备，比如通过熔化纺丝、静电纺丝、挤压等。这种纤维或含纤维的材料可以例如用作缝合线、疝 - 补片、支架等等。

[0112] 各种用途

[0113] 正如上面所述显而易见的，聚合物和材料在医药、保健、外科和牙科等领域有许多用途，特别是在需要可生物降解聚合物中的用途，比如创伤敷料、细胞附着和组织再生的进界生长支架、缝合线、疝 - 补片、软骨、韧带、移植体等等。

[0114] 因此，本发明也涉及如本文定义的用于治疗、牙科或外科的可生物降解的多孔的材料。

[0115] 更特别地，本发明也涉及使用如本文定义的可生物降解的多孔的材料来制备支持细胞粘附或组织再生的进界生长的支架，及使用如本文定义的可生物降解的多孔的材料来制备创伤敷料。

[0116] 本发明进一步涉及支持细胞粘附和 / 或组织再生的进界生长的方法，该方法包含将如本文定义的可生物降解的多孔材料与所述组织接触的步骤，例如，其中组织是至少一种选自皮肤、韧带、腱、软骨、骨、肌肉、心血管组织和牙齿组织。

[0117] 实验

[0118] 生物降解测试

[0119] 多孔材料的生物降解能力可根据以下来测定。

[0120] 大约 1 克的多孔材料完全浸入到介质中（含 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco' s 改进的 Eagle' s 介质)）在 37°C 保存达 28 天。介质一周换两次, 即在第 3、7、10、14、17、21 和 24 天。在第 28 天, 通过 GPC 分析多孔材料。相对于初始值的数均分子量 / 重均分子量来衡量生物降解。

[0121] 测试了多孔的 MPEG-PLGA (2-30kDa, L:G 50:50), 其生物降解测定为约 0.5 (相对于初始值的最终 $M_{n/w}$ 值)

[0122] 概述

[0123] 作为使 PLGA 更亲水的尝试, MPEG 或 PEG 与 PLGA 共聚以使共聚物具有低的 MPEG/PEG- 含量 (<20% (w/w) MPEG/PEG)。当测试这些聚合物并与普通 PLGA 比较时, 最初的细胞粘附于 MPEG-PLGA 和 PLGA-PEG-PLGA 优于粘附于普通 PLGA, 细胞的形态学和附着更好。

[0124] 这是出人意料的, 因为文献已知的含 PEG 的聚合物阻碍蛋白和细胞的粘附。改进我们的聚合物性能的关键似乎是聚合物中 PEG 含量保持低含量 (最多 14mol%), 因为具有高 PEG 含量的聚合物在生物学测试中引起差的粘附和形态学。

[0125] 相比 PLGA, PLA 的降解时间长, 我们的试验显示聚醚-PLGA 中 PLGA 部分的较高丙交酯含量引起较慢的细胞粘附。

[0126] 已知合成的可生物降解的聚合物是典型地在生物环境中具有缓慢的最初细胞粘附的疏水材料。我们尝试通过合成 MPEG-PLGA 嵌段共聚物来改进 PLGA 的亲水性。我们的第一聚合物是 G:L- 比率为 50:50 (mol) 的 1.9-30kDa MPEG-PLGA。这些通过冷冻干燥制成薄的多孔板。在一个生物分析中, 最初的和长期的细胞粘附都极好, 并且性能优于未改进的 PLGA。这是出人意料的, 因为文献描述了 PEG 加到聚合物中使得它们阻碍细胞和蛋白的粘附。我们成功的关键似乎是我们具有低的 PEG 含量 (6% (w/w)) (参见下表 2)。当 PEG 含量更高 (MPEG-PLGA 5-30kDa, 14% (w/w) PEG), 我们观察到与低-PEG 材料及普通 PLGA 相比, 最初的和长期的细胞粘附降低。

[0127] 试剂的纯化

[0128] DL- 丙交酯和乙交酯在氮气中在干燥的乙酸乙酯内再结晶并在真空中干燥。PEG/MPEG 溶解于合适的溶剂中, 在冷己烷中沉淀, 过滤并干燥过夜。亚锡 2- 己酸乙酯真空蒸馏并在氮中储存。乙酸乙酯在氮中从氯化钙中蒸馏出。二氧杂环己烷在氮气氛中从钠 / 苯甲酮中蒸馏出。甲苯在氮气氛中从钠 / 苯甲酮中蒸馏出。

[0129] 聚合物的合成

[0130] 于甲苯中的 PEG/MPEG、DL- 丙交酯、乙交酯和含 4% (w/v) 辛酸亚锡在充满氮气的手套式操作箱中加到一个小瓶内。小瓶被封闭、加热和摇晃直至内含物清澈和均一, 然后放到 120-200°C 的烤箱内 1 分钟至 48 小时, 例如直至 6 小时。

[0131] 合成也可以在合适溶剂 (如二氧杂环己烷) 的溶液中进行以便随后的纯化。然后 MPEG、DL- 丙交酯、乙交酯、4% 亚锡 2- 己酸乙酯和 100% (w/w) 二氧杂环己烷在充满氮气的手套式操作箱中加到一个小瓶内, 并如上处理。

[0132] 聚合物的纯化

[0133] 聚合物 (参见表 1) 溶解在合适的溶剂中 (如二氧杂环己烷、四氢呋喃、三氯甲烷、

丙酮), 在 -40 至 40℃ 的温度下通过非溶剂 (如水、甲醇、乙醇、1-丙醇或 2-丙醇) 中搅拌沉淀。聚合物静置, 弃去溶剂, 聚合物在真空烤箱中 40-120℃ / 过夜干燥。

[0134] 聚合物用 NMR- 光谱学和 GPC 分析来确定结构、分子量和纯度。

[0135] 表 1 不同 MPEG-PLGA 聚合物合成的例子

[0136]

聚合物	G/L- 比率	乙交酯 (g)	DL- 丙交酯 (g)	引发剂	引发剂 (g)	4% Sn(Oct) ₂ (μL)	二氧杂环己烷 (g)
750-1500050L	50:50	2.12	2.64	MPEG750Da	0.238	129	5
1100-2000050L	50:50	2.11	2.63	MPEG1100Da	0.261	98	5
1900-3000050L	50:50	2.10	2.60	MPEG1900Da	0.298	65	5
1900-3000080L	20:80	0.79	3.91	MPEG1900Da	0.298	65	5
5000-3000050L	50:50	1.86	2.31	MPEG5000Da	0.833	68	5
15000-1900-1500050L	50:50	2.10	2.60	PEG1900Da	0.298	65	5
30000-5000-3000050L	50:50	2.06	2.56	PEG5000Da	0.385	31	5

[0137] 制作支架的方法

[0138] 聚合物 (如 1.9-30kDa) 溶解在合适的溶剂 (如二氧杂环己烷) 中使得浓度为 0.5-10% (w/v)。溶液注入模具, 冷冻和冷冻干燥至多孔板。来自细胞外基质的组分可以通过在溶剂中分散这种组分或通过随后用来自细胞外基质的组分的分散体 / 溶液处理多孔板来被加入。

[0139] 支架试验

[0140] MPEG-PLGA 和 PLGA 的不同支架的生物相容性研究 (参见表 2) 通过在支架表面以 2.5×10^4 细胞 / cm² 浓度接种原代成纤维细胞来执行。在第 1、3 和 7 天通过用中性红着色细胞随后通过使用配备 Evolution MP 冷色相机 (Media Cybernetics) 的 Leica DMIRE2 倒置显微镜评估来执行细胞附着、成活力和生长的评价, 并使用 Image Pro Plus5.1 软件 (Media Cybernetics) 拍摄数码相片。

[0141] 比较冷冻干燥的 PLGA 支架的生物相容性研究总体上显示细胞粘附的形态学很好, 但是初始细胞数量非常低。相比这些与 MPEG-PLGA2-30kDa 的支架, 我们观察到 MPEG-PLGA 支架的生物相容性更好, 原因是由于较好的润湿能力导致更高数量的细胞粘附于支架上。

[0142] 从试验开始, 细胞以很好的形态学及对 MPEG-PLGA1.9-30kDa 良好的粘附来生长, 从第 1 天到第 7 天观察到细胞数量增加。MPEG-PLGA 中 MPEG 部分尺寸到 5-30kDa 的增长单独地引起圆形细胞, 很少或不粘附于支架表面, 引起显著的生物相容性下降, 从第 1 天到第 7 天此现象进一步恶化。

[0143] 如果 MPEG-PLGA2-15kDa 被测试并同 MPEG-PLGA2-20kDa 及 MPEG-PLGA2-30kDa 比较, 我们观察到当 PLGA 部分尺寸增长时成纤维细胞的附着和成活力增强。这意味着 2-30kDa 的生物相容性最好。与从 2-20kDa 到 2-30kDa 的步骤相比, 尺寸从 2-15kDa 到 2-20kDa 的增长引起对生物相容性最积极的影响。

[0144] MPEG-PLGA2-20kDa 中 L:G 比率从 50:50 至 80:20 的增加引起成纤维细胞的附着和成活力下降。

[0145] 表 2 生物相容性测试概述

[0146]

支架			附着					成活力			
类型	尺寸	LA % 2)	EO 比 率 3)	%PEG (w/w)	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 7 天	
PLGA ¹⁾	-	50	0:100	0	+	++	++++	+++	+++	++++	
MPEG- PLGA	2-15	50	16:84	12 (ref)	+	+	+	++	++	++	
	2-15	60	17:83	12 (ref)	+	+	+	++	++	+	
	2-15	80	17:83	12 (ref)	+	+	+	+	+	+	
	2-20	50	13:87	9	++	+++	+++	++	+++	+++	
	2-20	60	13:87	9	++	++	++	++	++	++	
	2-20	80	14:86	9	+	+	+	+	+	+	
	2-30	50	9:91	6	+++	+++++	+++++	++++	+++++	+++++	
	2-30	60	9:91	6	+++	++++	+++++	++++	+++++	+++++	
	2-30	80	9:91	6	+++	++++	++++	+++	++++	++++	
		5-25	50	23:77	17 (ref)	+	+	+	+	+	+
		5-30	50	20:80	14 (ref)	++	+	+	++	+	+
	5-79	50	9:91	6	+++	++++	+++++	++++	+++++	+++++	
PLGA- PEG- PLGA	13-6- 13	50	25:75	19 (ref)	+	+	+	+	+	+	
	23-3- 23	50	9:91	6	+++	+++++	+++++	++++	+++++	+++++	
	47-6- 47	50	9:91	6	++	+++	++++	+++	+++	+++++	

[0147] 1) Alkermes MEDISORB PLGA5050DL 高 I. V.

[0148] 2) LA 是聚合物中 PLGA 部分的 mol%

[0149] 3) EO- 单元与丙交酯 / 乙交酯单元的比率。

[0150] 结果主观分等级从 + 到 +++++, + 指低附着和低成活力, +++++ 指极好的附着和成活力。

[0151] 人体角化细胞可以在成纤维细胞定殖的 MPEG-PLGA 支架上体外培养以形成多层的和分化的再生表皮 (参见图 1)。再生表皮显示了类似体内正常表皮的形态学特征。

[0152] 在组织学标本上,我们发现清楚的证据:基础层细胞(基底层)和最上面覆盖的皮肤角质层以及类似棘层及颗粒层(但是不成熟和轻微过度增殖)的中间层。最终未能成熟

应该归咎于选择的体外模型而不是支架材料。

[0153] 含有 ECM 颗粒的 MPEG-PLGA 支架的制备

[0154] MPEG-PLGA 和 ECM 复合支架的制备：甲氧基-聚乙二醇-聚（丙交酯-共-乙交酯）（Mn₂, 000-30, 000, L:G1:1；如上文所述制备）溶解到 1,4- 二氧杂环己烷中得到 1.5% 的溶液。对于含 UBM (Ace11 公司, 美国) 的样本而言, 搅动的同时将 UBM 加到溶液中；0, 0.017, 0.038, 0.064, 0.1, 0.15, 0.225g/ 支架 (0, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% w/w), 高速混合并将 10mL 注入 7.3x7.3cm 的模具中。溶液在 -5°C 冷冻, 在 -20°C 冻干 5 小时, 在 20°C 约 15 小时。样本放置在真空干燥器中过夜以去除残留的二氧杂环己烷。

[0155] SEM 照片证明了 ECM 颗粒同质地分布在支架基体中图 4。

[0156] MPEG-PLGA 和有 4 种不同 GAG 浓度的 GAG 的复合支架的制备、细胞形态学和三维生长。

[0157] MPEG-PLGA 和粘多糖 (GAG) 的复合支架的制备：甲氧基-聚乙二醇-聚（丙交酯-共-乙交酯）（Mn₂, 000-30, 000, L:G1:1；如上文所述制备）溶解到 1,4- 二氧杂环己烷中得到 1.5% 的溶液。对于含 GAG 的样本而言, 搅动的同时将 GAG 加到溶液中；0, 0.0015, 0.0031, 0.00625, 0.013g/ 支架 (0, 1%, 2%, 4%, 8% w/w), 高速混合并将 10mL 注入 7.3x7.3cm 的模具中。溶液在 -5°C 冷冻, 在 -20°C 冻干 5 小时, 在 20°C 约 15 小时。样本放置在真空干燥器中过夜以去除残留的二氧杂环己烷。

[0158] 为了评价复合支架的细胞形态学和 3 维生长, 从支架的每种类型中打孔进行活组织检查, 在支架表面上在小体积的含抗生素（青霉素、链霉素和两性霉素 B）培养基（含 10% FCS 的 DMEM）中以 2.5×10^4 个细胞/cm² 的密度播种原代人体成纤维细胞（通道 3）。在添加另外的培养基前, 支架在 37°C 和 5% 的 CO₂ 中培育。在第 1、3 和 7 天通过用中性红着色细胞随后通过使用配备 Evolution MP 冷色相机 (MediaCybernetics) 的 Leica DMIRE2 倒置显微镜评估来执行对支架细胞附着、形态学、生长和定殖的评价, 并使用 Image Pro Plus 5.1 软件 (MediaCybernetics) 拍摄数码相片。

[0159] 无 GAG 的 MPEG-PLGA 支架中细胞形态学和三维生长在研究的第一天显示了粘附细胞生长, 如圆形细胞和纺锤形细胞的结合。细胞在支架表面上生长。在研究剩下的时间里, 所有的细胞变成纺锤形并从第 3 天起观察到生长到支架中去。与无 GAG 的 MPEG-PLGA 支架相比, 加入 1% (w/w) GAG 到支架中在此研究中不改变细胞的生长方式。增加 GAG 浓度到 2% (w/w) 导致第 1 天在细胞靠近生长的小范围内细胞生长更多。增加 GAG 浓度到 4% 和 8% (w/w) 增大了范围的大小, 使得难以辨别单独的细胞。

[0160] 在第 3 天细胞开始在支架表面更广扩展。此效果在 2% 和 4% (w/w) 中比含 8% (w/w) 的支架中更显著。

[0161] 在第 7 天, 与更进入含有更高浓度 GAG 的支架的进界生长相比, 细胞在纯 MPEG-PLGA 支架和低浓度 GAG 中在支架表面生长更多；结果, 随着 GAG 浓度增加, 细胞生长更广泛。

[0162] 从 MPEG-PLGA 和有不同 GAG 浓度含 GAG 的复合支架中释放出 GAG。

[0163] MPEG-PLGA 和 GAG 复合支架的制备：甲氧基-聚乙二醇-聚（丙交酯-共-乙交酯）（Mn₂, 000-30, 000, L:G1:1；如上文所述制备）溶解到 1,4- 二氧杂环己烷中得到 1.5% 的溶液。对于含 GAG 的样本而言, 搅动的同时将 GAG 加到溶液中；0, 0.0015, 0.0031, 0.013g/

支架 (0, 1%, 2%, 8% w/w), 高速混合并将 10mL 注入 7.3x7.3cm 的模具中。溶液在 -5°C 冷冻, 在 -20°C 冻干 5 小时, 在 20°C 约 15 小时。样本放置在真空干燥器中过夜以去除残留的二氧化杂环己烷。

[0164] 在二甲基亚甲蓝 (DMMB) 分析中, 硫酸盐化的 GAG 含量通过 OD525nm 的增加来测量。DMMB 着色溶液根据 Farndale 等 (RW Farndale 等 *Biochimica et Biophysica Acta* 883: 173-177, 1986) 来制备。简单说, 16mg 的 1,9-二甲基亚甲蓝溶解在 1 升含有 3.04g 甘氨酸、2.37g NaCl 和 95mL 0.1M HCl 的水中, pH 3.0。为了测量含有 0, 1%, 2% 和 8% (w/w) GAG 的 MPEG-PLGA 支架中 GAG 的释放, 从支架的每种类型中打孔进行活组织检查。这些活组织检查一式两份被放在 48 孔板中, 相应覆盖支架需要的量, 将 200 μ l 的 DMMB 溶液注在支架上。5 分钟后, 100 μ l 来自孔的着色溶液转移到 96 孔板中, 在 525nm 上测量。使用了 Bio-Tek 的 SynergyTMHT 多检测的全自动定量绘图酶标仪。

[0165] 研究结果显示所有含有 GAG 的支架立即释放 GAG, 而纯 MPEG-PLGA 支架没有释放 (参见图 5)。观察到相比 1% 和 2% (w/w), 8% (w/w) 的支架中有稍高的释放。

[0166] 28 天小鼠模型中 Integra 和 MPEG-PLGA 的植入。

[0167] 两组在 Pipeline Biotech A/S 的 4 只小鼠 (来自 M&B-Taconic 的 NMRI 小鼠) 分别有在颈部皮肤下植入的 Integra (Integra Life Sciences 公司, 美国) 或 MPEG-PLGA 支架 (1.5% 2-3050L) 的 8mm 活组织检查。皮肤开口用缝合线封闭。在第 10 和第 28 天, 来自各组的两只小鼠用 CO₂ 安乐死, 在埋入石蜡前包括周围区域的植入区域被切离并转移到 Lilly's 福尔马林缓冲液中。每个石蜡块小心地以 5 μ m 增量切片直到每个支架定位以及随后的切片用苏木精和 Eosin (H&E) 染色。使用配备 Evolution MP 冷色相机 (Media Cybernetics) 的 BX-600 Olympus 光学显微镜收集数码图像并用 Image Pro Plus 5.1 软件摄取数码图像。一个独立的病理学者执行此研究的组织病理学评估。

[0168] 在第 10 天 Integra 显示了与周围组织良好的结合和沿着支架边缘轻微的纤维化进界生长。在支架中间没有观察到成纤维细胞。支架和周围有最小限度的炎症, 但是, 在第 10 天出现一些巨细胞。28 天后支架仍然无损伤, 但是没有进一步的成纤维细胞的进界生长。

[0169] 在第 10 天 MPEG-PLGA 显示了与周围组织非常好的结合, 有轻度的炎症反应和沿着支架边缘明显的成纤维细胞进界生长, 相应理想的纤维化反应, 并且细胞移动到支架中间。与 Integra 相反, 在第 28 天继续进界生长, 形成新表皮, 并且没有炎症反应。

[0170] 总之, 动物研究显示 MPEG-PLGA 是最适合的支架材料, 支持成纤维细胞进界生长, 形成新表皮, 以及宿主耐受性良好。

[0171] 使用 MPEG-PLGA 支架中软骨细胞的软骨再生 (山羊体内研究)

[0172] 本研究意在调查在山羊股骨髁完整厚度软骨缺损的模型下结合软骨细胞悬浮液的 MPEG-PLGA 多孔支架的软骨再生反应。

[0173] 方法:

[0174] 使用 10 只成年山羊来研究, 研究在丹麦 Foulum 的研究中心实施。在两股骨髁内侧制造 6mm 的圆形缺损。为软骨细胞培养收集软骨组织。在中级开放手术中, 给以下两个处理组随机选择缺损。

[0175] 1. 空缺 (对照组)

- [0176] 2. MPEG-PLGA 冷冻干燥多孔支架 (4% 2-3050L) 中的纤维蛋白 / 软骨细胞溶液。
- [0177] 跟踪动物 4 个月。分析:ICRS 宏观评分 (0-12)。
- [0178] 实行机械测试以评定再生组织的硬度。用 O、Driscoll 和 Pinada 软骨得分及缺损填补百分比来执行组织学分析。
- [0179] 结果:
- [0180] ICRS 和组织学得分证明了两组间的显著差异。MPEG-PLGA/ 细胞组中软骨再生证明了高缺损填补和接近透明软组织的组织特征,然而在空缺损中没有再生的组织。机械测试证明两个处理组间无差异。
- [0181] 结论:
- [0182] MPEG-PLGA/ 细胞构造证明了具有良好表型特征的广泛软骨再生反应。如期望的一样,在空缺损中没有观察到再生。结合培养的软骨细胞的多孔 MPEG-PLGA 支架似乎是一种不错的体内软骨组织工程技术。

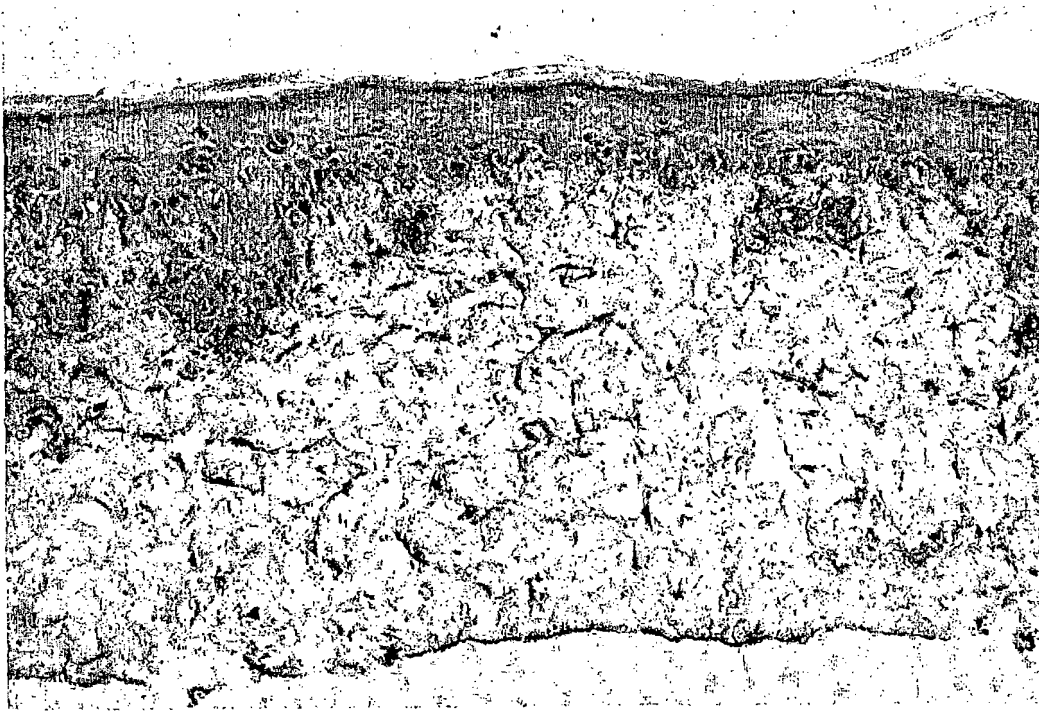


图 1

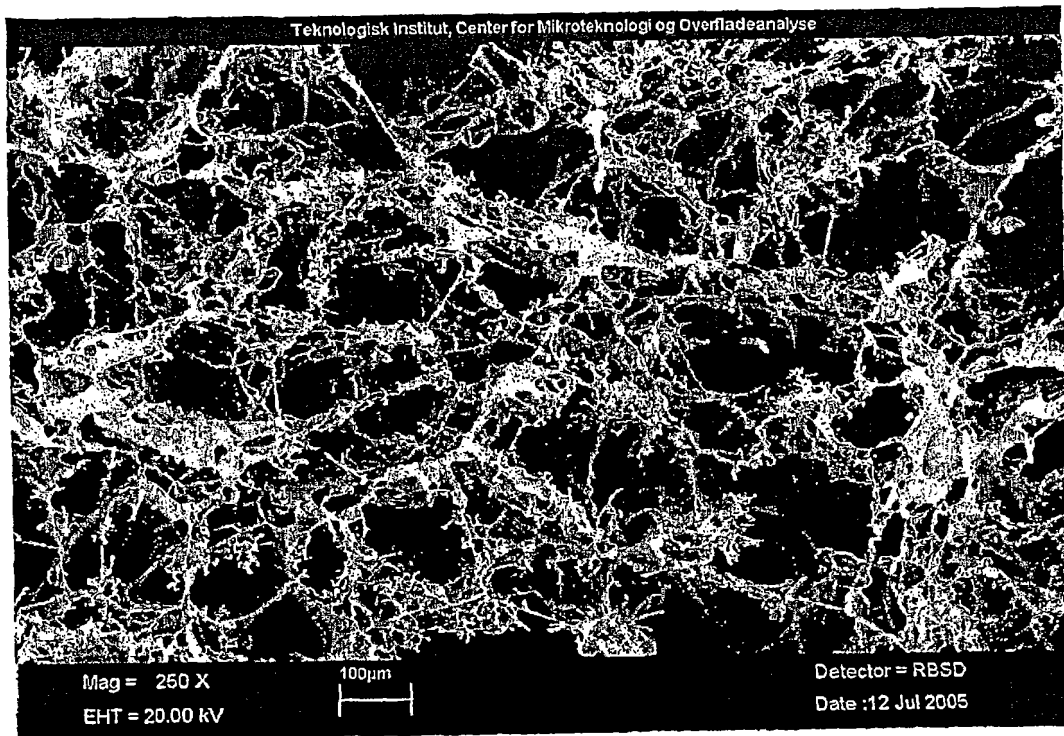


图 2

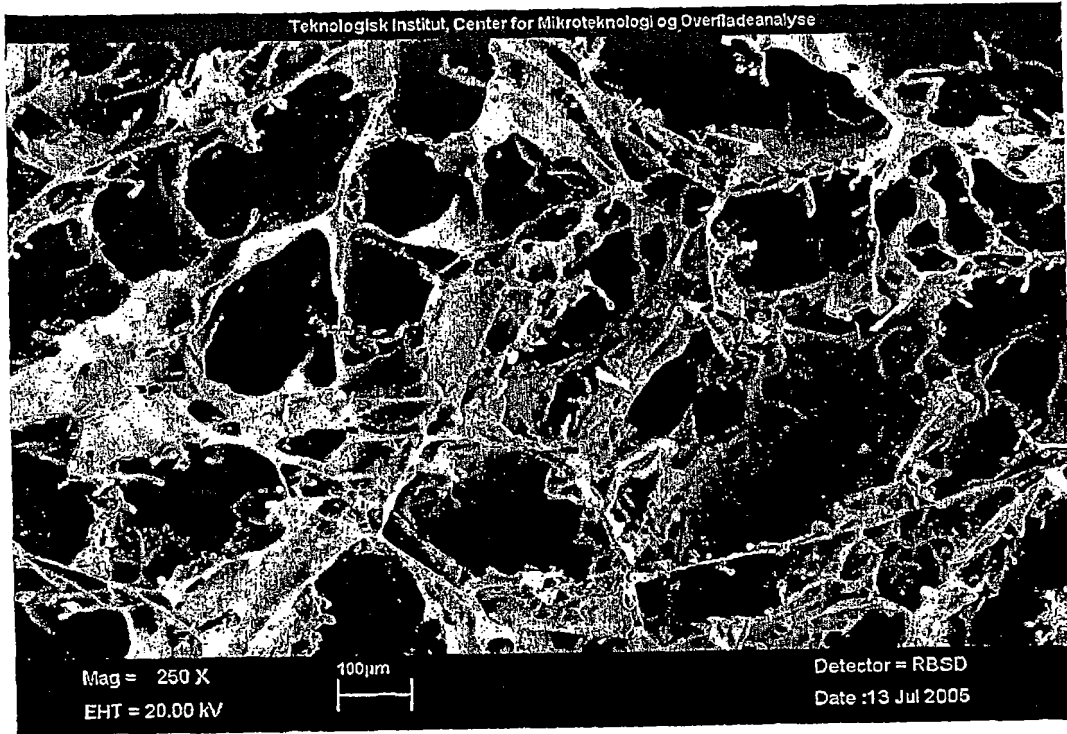


图 3

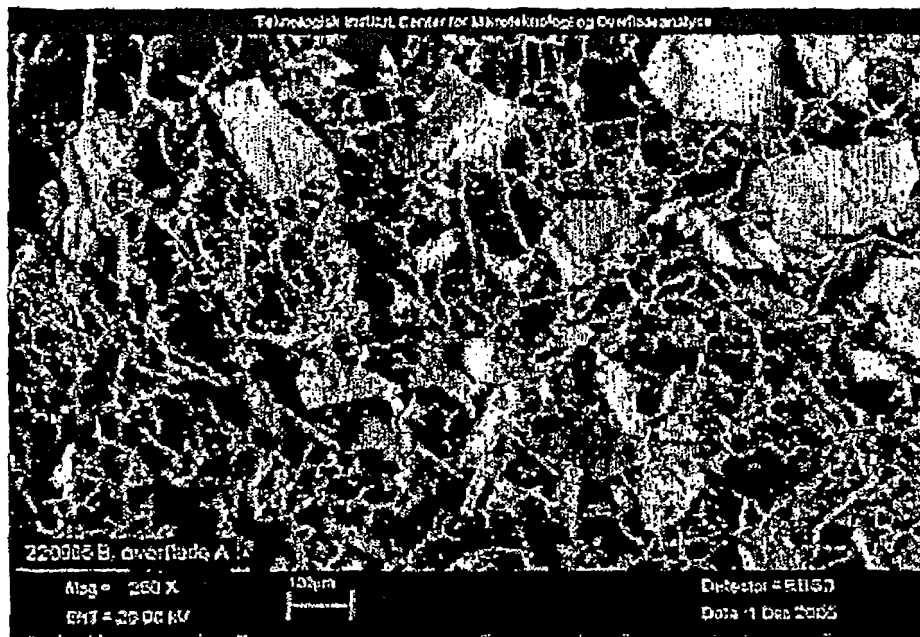


图 4

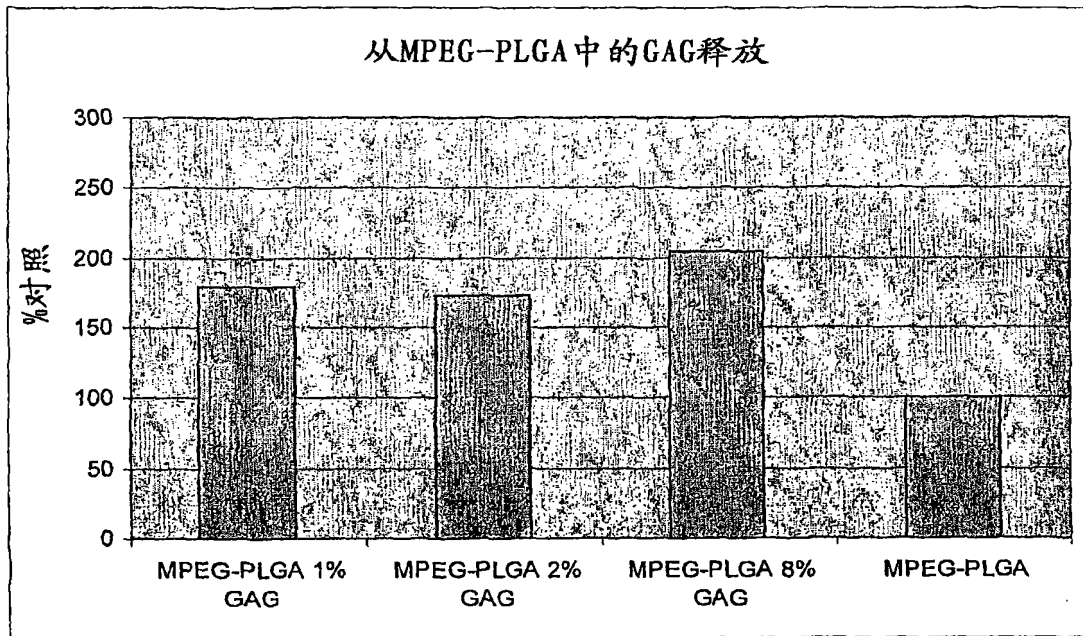


图 5