[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[6]
A61L 27/00
A61L 31/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97191715.9

[43]公开日 1999年3月17日

[11]公开号 CN 1211194A

[22]申请日 97.10.15 [21]申请号 97191715.9
[30]优先权
[32]96.10.16 [33]US [31]08/731,484
[86]国际申请 PCT/CA97/00766 97.10.15
[87]国际公布 WO98/16266 英 98.4.23
[85]进入国家阶段日期 98.7.15
[71]申请人 有机凝胶加拿大有限公司
地址 加拿大魁北克省
[72]发明人 S·沃尔利

[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
代理人 任宗华

权利要求书3页 说明书16页 附图页数1页

[54]发明名称 用于治疗的可移植的丙烯酰胺共聚物水凝胶

[57]摘要

本发明的水凝胶是N－取代的异丁烯酰胺或者丙烯酰胺，交联剂与复合糖或其衍生物，组织粘着肽或者具有抗体的聚合物共轭体的共聚物。该聚合物是多相的，有弹性和可变形的，并且具有含量为至少约80%的平衡水。其可以用于在例如发育的和成熟的神经系统中的组织再生和器官修复。



权 利 要 求 书

1. 一种用于治疗的聚合物水凝胶，所说的水凝胶是以下物质的共聚物，(a)N-取代的异丁烯酰胺或者丙烯酰胺，(b)交联剂，和(c)选自下组的可共聚的材料：复合糖，糖衍生物，组织粘着肽以及具有脂质衍生物抗体的聚合物共轭体，所说的聚合物水凝胶是多相的，有弹性和可变形的，并且具有含量为至少约80%的平衡水。

2. 按照权利要求1的聚合物水凝胶，其中(a)所说的N-取代的异丁烯酰胺或者丙烯酰胺选自 N-单烷基和 N,N-二烷基异丁烯酰胺和丙烯酰胺，(b)所说的交联剂包括丙烯酰胺或其前体，(c)所说的可聚合的材料是糖，该糖选自葡糖胺、N-乙酰葡糖胺和神经氨酸的N-乙酰衍生物。

3. 按照权利要求2的聚合物水凝胶，其中所说的烷基含有1-2个碳原子。

4. 按照权利要求3的聚合物水凝胶，其中所说的烷基是羟烷基或氨烷基。

5. 按照权利要求1的聚合物水凝胶，其中所说的平衡水的含量为至少96%。

6. 按照权利要求1的聚合物水凝胶，其中所说的水凝胶是共价交联的，实质上不透明的，并且构成一种多相的材料。

7. 按照权利要求6的聚合物水凝胶，其中所说的水凝胶显示出明显的相分离结构，该结构是由约1-10 μm的聚合物微粒形成的，由此，使得在所说的水凝胶用于与宿主组织接触时给出相对粗大的孔区域，在与向内生长的组织接触时给出相对细小的孔区域。

8. 按照权利要求1的聚合物水凝胶，其具有大孔结构，该结构具有至少80-90%的分孔隙率，至少100平方米/克的比表面区域，约15-35 μm的中值孔径，测定值至少10μm(等于100%的水凝胶分孔隙率)的孔的多孔体积；20-30μm范围内的超孔特征。

9. 一种制备用于治疗的聚合物水凝胶的方法，该方法包括(a)将交联剂溶解在具有自由基聚合引发剂的溶剂中，以形成溶液，(b)将N-取代的异丁

烯酰胺或丙烯酰胺加入到(a)中获得的溶液中，以形成混合物，(c)在有效给出所说的聚合物凝胶的条件下，将可聚合的材料的溶液加入到(b)中获得的混合物中，所说的可聚合的材料包括复合糖，复合糖衍生物，组织粘着肽或具有脂质衍生物抗体的聚合物共轭体。

10. 按照权利要求 9 的方法，该方法包括将偶氮二异丁腈和亚甲基双丙烯酰胺溶解到所说的溶剂中形成溶液，将所说的溶液与 N-2-(羟丙基)异丁烯酰胺混合，向其中加入葡糖胺或 N-乙酰葡糖胺或 N-乙酰神经氨酸，并且从中除去低分子量的残余产物和引发剂微量物。

11. 按照权利要求 9 的方法，其中所说的交联剂选自丙烯酰胺、其前体和二乙烯基交联剂。

12. 按照权利要求 9 的方法，其中所说的聚合引发剂选自是由偶氮二异丁腈，过氧化物，抗坏血酸，过氧硫酸盐以及取代的氮杂化合物，并且以所形成的聚合物水凝胶重量的 0.01 和 2%之间的范围的量使用。

13. 按照权利要求 12 的方法，其中所说的可聚合的材料的溶液包含复合糖。

14. 按照权利要求 13 的方法，其中所说的复合糖选自葡糖胺，N-乙酰葡糖胺，神经氨酸的 N-乙酰衍生物，聚唾液酸和 galactosene 。

15. 按照权利要求 12 的方法，其中所说的可聚合的材料的溶液包含组织粘着肽。

16. 按照权利要求 12 的方法，其中所说的可聚合的材料的溶液包含具有脂质衍生物抗体的聚合物共轭体。

17. 按照权利要求 12 的方法，其在 40 至 60 ℃之间的温度下进行约 12 小时。

18. 按照权利要求 9 的方法，该方法包括将活组织细胞或遗传修饰的细胞加入到(c)中获得的产物中，并且使所说的细胞与所说的产物聚合。

19. 一种共聚的按照权利要求 1 的聚合物水凝胶，其中活的组织细胞或遗传修饰的细胞在其中是聚合的。

20. 用于治疗损坏的脑部组织或脊髓的方法，该方法包括取走人类或动物中的所说的损坏的脑部组织或脊髓，用按照权利要求 1 的聚合物水凝胶替代所说的损坏的脑部组织或脊髓。

21. 一种用于治疗的共聚物水凝胶，所说的水凝胶是下列物质的共聚物：(a)N-取代的异丁烯酰胺或者丙烯酰胺，(b)交联剂，和(c)可聚合的组织-粘着材料。

22. 用于治疗哺乳动物疤痕、损坏的或功能缺陷的组织的方法，该方法包括取走所说的疤痕、损坏的或功能缺陷的组织，用按照权利要求 1 的聚合物水凝胶替代它们。

23. 根据权利要求 22 的方法，用于重建与中枢神经系统中轴索路径相联系的神经元回路。

24. 按照权利要求 22 的方法，用于治疗视神经和外周神经的创伤性损伤。

说　　明　　书

用于治疗的可移植的丙烯酰胺共聚物水凝胶

技术领域

本发明涉及聚合物水凝胶。更具体地说，本发明涉及用于治疗的多孔的可移植的聚合物水凝胶，例如，其可以用于软器官任何部分的内部组织置换，用于创伤治愈，用于组织再生，和用于全身(尤其是发育的和成熟的神经系统中)的器官修复等类似的治疗中。本发明尤其针对一种聚合物水凝胶，移植后，该水凝胶变成一种多孔基质(其中填充有生物体液和分子，形成所谓的器官样水凝胶)，并且通过尔后的组织和血管向内生长，逐渐整合进宿主。本发明也涉及将活组织细胞，前体细胞或遗传修饰的细胞引入这样的聚合物水凝胶内，产生生物杂种材料的方法，所说的杂种材料对三维细胞培养或对组织重构有用。本发明也涉及产生按照本发明的聚合物水凝胶的方法，并涉及由以上提及的方法产生的生物杂种材料。最后，本发明涉及通过移植进按照本发明的聚合物水凝胶或生物杂种材料，治疗中枢神经系统，尤其是脊髓和视神经，或外周神经，或其它组织的损坏部分的方法。

背景技术

器官移植目前是缓和器官衰竭、恢复或改善器官功能和功效的唯一的选择。然而，器官移植疗法的一些弊端是潜在的供体对受体的疾病传播、供体器官的短缺和有限的可获得性以及可能的免疫交叉反应。

这样，例如，脊髓移植既不是临床上也不是生物学上可行的，因此对SCI患者没有可供使用的治疗方法，而仅在美国就有250,000个慢性瘫痪的患者，并且每年增加10,000个新的SCI患者。

另一方面，细胞移植、转移或注射到体内替换或恢复损失的细胞或组织器官的一部分不能适当地形成新的组织，这是由于缺乏支持性胞外基质(对扩展和组织进入与宿主器官接触的整体结构所必需的组织框架)。此外，

细胞需要置于生理学上等同的环境(其有利于营养物，氧，体液以及细胞组分的扩散)中，以便在移植后保持高的细胞存活性和生长潜力。

本发明的多孔水凝胶是以间质液体或水饱和的可变性的多孔聚合物基质，因此提供了必需的组织构架和水化空间，由此细胞可以以一种正确的组织学结构增殖和装配成超细胞组织体系结构中，获得一种功能性新组织(neotissue)。

在文献中已经公开了采用各种移植材料尝试在脊髓(动物模型)中恢复损伤时，脊柱内移植的不同的实验策略，所说的移植材料可以分成两个大类：(1)生物组织和(2)修复材料。

在第(1)类中包括使用向脊髓的桥损伤(如胎儿神经组织)的供体组织移植物，同质的自体移植物或同种移植物，异源移植物或异种移植物，如(a) 固体移植物(例如. Bregman, 脑研究进展, 34, 265, 1987; Houle 和 Reier, 化合物神经学杂志（J. Comp. Neurol.）, 269, 535, 1988)或如(b)包括混合的神经组织细胞的悬液移植物(例如 Goldberg 和 Bernstein, 神经科学研究杂志, 19, 34, 1988; Hoovler 和 Wrathall, 神经病理学学报, 81, 303, 1991); 以培养的敏感神经元重组的 Schwann 细胞(Kuhlengel 等, 化合物神经学杂志（J. Comp. Neurol.）, 293, 74, 1990): 未成熟的星形细胞(例如, Bernstein 和 Goldberg, 神经学神经科学研究, 2, 261, 1991); 神经组织细胞前体(Monteros 等, 神经科学进展, 14, 98, 1982)和永久移植生长的细胞系(Zompa 等, 国际神经科学进展杂志（Int. J. Dev. Neurosci.）, 11, 535, 1993); 包括培养的非神经细胞的外周神经区段 (Wrathall 等, 神经病理学学报, 57, 59. 1982)或者用胚神经组织(Horvat 等, 神经学神经科学研究, 2, 289, 1991)。对第(2)类修复材料，已经公开的包括纯的胶原基质(de la Torre 和 Goldsmith, 脑研究通讯, 35, 418, 1994; Marchand 和 Woerly, 神经科学. 36, 45, 1990; Gelderg, 脑研究, 511, 80, 1990), 包含神经活性剂的(Goldsmith 和 de la Torre, 脑研究, 589, 217, 1992)或包括培养的神经移植物的(Bernstein 和 Goldberg, 脑研究 377, 403, 1986); 处理过的硝基纤维素移植物（treated nitrocellulose implants） (Schreyer 和 Jones, 脑研究进展, 35, 291, 1987; Houle 和 Johnson, 神经科学通讯. 103, 17, 1989); 胶原移植物(Paino 等, J. Nemocytol., 23, 433, 1991)和包含 Schwann 细胞的聚

(丙烯腈-氯乙烯)的聚合物引导管)(Xu 等，化合物神经学杂志（ J. Comp. Neurol.），351, 145, 1995)。

这些方法十分专注于促进轴索再生，其采用各种组织基质作为新轴突的来源，或者采用复合修复基质支持和指导生长的轴突，而不涉及由大批宿主组织的再生和创伤愈合的改型修复的临床相关脊髓组织或人脑组织，例如在损伤后移去坏死的或伤疤组织后。

已公开了聚合物水凝胶作为神经系统的移植物(Woerly 等，生物材料，11, 97, 1990; Woerly 等，生物材料，12, 197, 1991; Woerly 等，神经移植塑料杂志 3, 21, 1992; Woerly 等，细胞移植，2, 229, 1993; Woerly 等，神经移植塑料杂志 5, 245, 1995)。这些水凝胶由在水中的自由基聚合制备，采用过硫酸铵和偏亚硫酸氢钠（ metabisulfite ）或过硫酸钠和抗坏血酸作为氧化还原引发剂，用羟乙基甲基丙烯酸酯(pHEMA)，甲基丙烯酸缩水甘油酯(pGMA)或 N-羟丙基甲基丙烯酰胺(pHPMA)或者包含上述单体的组合物以及交联剂进行，所述交联剂是乙二醇和四亚乙基二醇二甲基丙烯酸酯或亚甲基双丙烯酰胺。这些凝胶典型地是均相的和不透光的，具有双重孔隙率，包括开的(可进入的孔体积)和闭的孔，如汞孔隙计数据和扫描电子显微术所显示的；这些凝胶的典型的多孔结构是由如图 1 所示的环状交叉片段的平行圆柱形毛细管形成的，具有 7-13μm 的平均孔径。分孔隙率(fractional porosity)对 pHEMA 水凝胶而言在 50%-85%的范围内，对 pGMA 水凝胶而言在 60%-65%的范围内，对 pHPMA 水凝胶而言在 70%-94%的范围内。水凝胶的至少 50%的孔体积被 1.2-4μm 的孔(pHPMA 水凝胶)，pGMA 的 6-13μm 的孔(pGMA)和 10-14μm 的孔(pHPMA)占据。人们发现它们的生物活性取决于胶原向交联网络中的引入和共聚合。申请人的在脑中的实验性移植(显示某种程度的组织修复)可以按照组织向内生长至均相凝胶基质的程度而达到。按照单体的组成和添加的官能团，这一反应是可变的。然而，均相水凝胶常引起纤维状囊的形成，所述的囊易于使宿主与移植物分离。这是由于这些凝胶的不足以与活的神经组织的性质相匹配的机械性质，和由于较少比例体积的大孔。在脊髓中，这些均相水凝胶不整合进宿主，并迅速被结缔组织与神经胶质伤疤轴突包裹，而不穿入轴突或组织组分，如图 2 所示。此外，有一种限制可以产生的表面区域的物理因素，由

在这些均相凝胶中的圆柱形孔产生的成功的组织相互作用的一个重要参数。对凝胶的固定体积而言，所说的表面区域达到占据凝胶总体积的单一孔的最大半径的限度。另一方面，通过减小孔尺寸增加的表面区域会导致与组织向内生长和生物量积累不相容的总空隙体积。

Harvey 等，在脑研究，671，119，1995 中公开了聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)的聚合物海绵体，其用作组织再生和轴突生长的脑移植物。这一产物最好在添加胶原到聚合物网络中作为组织生物粘着剂和包含 Schwann 细胞后使用。

美国专利 4,902,295 描述了一种从胰腺组织细胞制备人工组织的方法。该方法涉及将基质前体，凝胶前体和促进剂与在水相中的存活的细胞聚合。所有聚合物前体以及促进剂生物化合物，易于快速生物降解到体内，并且在移植后不具有长期稳定性。

Bellamkonda，R.；Ranieri，J，P.；Bouche，N.；Aebischer，P.("神经细胞的水凝胶三维基质"，生物医学材料研究杂志（J. Biomed. Mat. Res.）1995，29，663-671)描述了一种将神经组织细胞固定到琼脂糖和胞外等同物(Matrigel®)凝胶中的方法。这些材料是生物学的和可被生物降解的。

Krewson，C.E.；Chung，S.W.；Dai, W.；Saltzman，W.M.("在胞外基质分子凝胶中的细胞聚集作用和轴突成长"，生物技术生物工程，1994，43，555-562)描述了一种技术，其中，将 PC12 细胞悬浮在单独的或与纤连蛋白或层粘连蛋白组合的胶原凝胶中，和悬浮在琼脂糖和胶原凝胶中。这些凝胶是可被生物降解的。

Cascone，M.G.；Laus，M.；Ricci，D.；Sbarbati del Guerra, R.("聚(乙烯醇)水凝胶作为杂种人工组织组分的评价"，材料科学材料医学杂志（J. Mat. Sci. Mat. Med.）1995，6，71-75)描述了一种利用聚(乙烯醇)水凝胶(物理交联的)的技术，成纤维细胞通过一个冷干循环引入到所说的水凝胶中。

Wald H.L.；Sarakinos，G.；Lyman，M.D.；Mikos，A.G.；Vacanti J.P.；Langer，R.("在多孔移植中的细胞接种"，生物材料（Biomat.）1993，14，270-278)描述了一种用微注射技术将肝细胞包封

进聚(L-乳酸)的可降解聚合物泡沫中的方法。这一技术不能提供不可降解的基质和不能使均匀的细胞分布到整个聚合物基质中。

Mikos，A.G.; Bao，Y.; Cima，L.G，; Ingber，D.E.; Vacanti，J.P.; Langer，R.("用于细胞附着和移植的聚(乙醇酸)结合的纤维结构的制备"，生物医学材料（Biomed. Mat.）1993，27 183-189)描述了一种制造具有结合到肝细胞上的纤维的聚(乙醇酸)网络的方法。这一聚合物是可被生物降解的，并且将细胞引入基质的方法不同于包埋。

Puerlacher，W，C.; Mooney，D.; Langer，R.; Upton，J.; Vacanti，J.P.，Vacanti，C.A("从可被生物降解的聚合物和软骨细胞合成的鼻隔软骨替代物的设计"，生物材料（Biomat.）1994，15，774-778)，并且 Freed，L.E.，Marquis，J.C.; Nohria，A. Emmanual; Mikos，A.G.; Langer，R.("利用在合成可被生物降解的聚合物上的培养的细胞体外和体内的 Neocartilage 形成"，生物医学材料研究杂志（J，Biomed. Mat. Res.）1993 27，11-23)。这些参考文献描述了通过毛细管作用将软骨细胞引入聚乙醇酸(PGA)或聚乳酸(PLLA)或 PGA-PLLA 基质的方法。这一方法产生可被生物降解的聚合物材料，而细胞不均一地分布到聚合物中，并且使得不能控制细胞密度。

Cao，Y.; Vacanti，J.P.; Ma, X.; Paige; K.T.; Upton，J.; Chowanski Z.; Schloo，B.; Langer，R.; Vacanti，C.A.("采用由 Tenocytes 接种的合成聚合物产生 Neo-Tendon"，移植进展 1994，26，3390-3391)描述了一种将 tenocyte 细胞接种到聚乙醇酸的修饰的非编织物中的方法。

Mooney，D.J.; Park，S.; Kaufman P. M.; Sano, K.; McNamara. K; Vacanti J.P.; Langer, R("用于肝细胞移植的可被生物降解的海绵"，生物医学材料研究杂志（J. Biomed. Mat. Res.）1995，29，959-965)和 Takeda，T., Kim，T.H.; Lee，S.K.; Langer, R.; Vacanti，J.O.("利用 Hyperuricosuria 的 Baltimatian 狗模型以可被生物降解的聚合物骨架进行的肝细胞移植"，移植进展. 1995，27，635-636)描述了一种通过吸附和毛细管作用将肝细胞吸附进聚乙醇酸聚合物毡片中或吸附到由聚乳酸和聚乙烯醇和从聚乳酸乙醇酸制造的聚合物海绵内的方

法。这一方法产生可被生物降解的聚合物材料，而细胞不均一地分布到聚合物中，并且使得不能控制细胞密度。

Woerly， S.; Plant， G， W.; Harvey， A.R.("培养包含在水凝胶聚合物基质内的大鼠神经和神经胶质细胞： 一种神经组织置换的潜在的手段"，神经科学通讯（ Neurosci. Lett. ） 1996， 205， 197-201)公开了一种将神经组织细胞包含进聚[N-(2-羟丙基)-异丁烯酰胺]的均匀透明聚合物凝胶(可以含有胶原作为粘着基质)中的方法。这一方法包括把细胞悬浮加入到聚合物混合物中，制备在室温下或在保持在37 ℃的温箱中使细胞-聚合物混合物聚合。所形成的凝胶是不透光的，细胞随机分散在交联的凝胶内。免疫细胞化学研究表明，体外6天后，细胞的存活率在0和6%之间。

发明的公开

本发明的目的是通过利用非生物修复装置(如不可降解的聚合物水凝胶)克服现有技术的弊端，所说的修复装置充当空间填充材料和作为刺激组织再生，形态发生以及改造成完整的结构至器官的骨架组分。

本发明的另一个目的是改善向组织形成的组织愈合，其可以通过控制稳定的聚合物基质内的细胞增殖、细胞渗透和细胞组构达到。

本发明的另一个目的是借助聚合物基质提供组织再生方法，其对患有脊髓(SCI)和脑损伤或发育性脊髓缺损(脊柱 bifida)的患者具有很大的益处和重要的临床和经济影响。

本发明的另一个目的是为视神经与外周神经的再生提供聚合物基质。

本发明的另一个目的是提供一种不可降解的合成聚合物水凝胶基质，其具有各向异性的多孔结构，有效的表面区域和良好的组织粘着性和相容性，其设计来用于软组织结构(特别是神经系统)中的移植，并且逐渐成为器官的一部分。

本发明的另一个目的是提供具有控制的孔结构和携带表面活性剂的合成聚合物基质的治疗用途。

本发明的一个基本目的是提供一种聚合物基质，其是由一种新的水不溶性聚合物水凝胶制造的，作为柔器官修复的组织再生修复装置以膨胀态使用。

本发明的另一个目的是提供一种用具有最后的修复装置形状的模型产生水凝胶产物的方法。

本发明的还一个目的是克服现有技术的一种或多种缺陷，并提供一种可以用标准的外科方法植入脑或脊髓中的聚合物神经修复物。

本发明的再一个目的是提供一种可以将细胞或遗传修饰的细胞引入到聚合物网络中的方法。

本发明的另一个目的是提供提供一种聚合物基质，该基质能够与活细胞混合，从而将具有水凝胶-型行为的聚合物基质的物理特征(多孔性、稳定性、指导表面、通透性)与细胞生物因子(例如，生长因子)相组合。

本发明的另一个目的是提供可以用于替换部分组织软器官的生物杂种装置。

本发明的另一个目的是提供可以用于在体外延长时间期限的培养各种细胞的三维培养系统。

本发明的另一个目的是将生物活性分子附着到组织或器官上的支持基质。

本发明的另一个目的是提供多孔水凝胶，其是用间质液体或水饱和的可变形的多孔聚合物基质，从而提供必需的组织构架和水化空间，由此细胞可以以一种正确的组织学结构增殖和装配成超细胞组织体系结构中，获得一种功能性组织。

本发明的另一个目的是提供一种控制药物和大分子释放的系统组分，所说的药物和大分子特别是抗炎症物质，如 indomethacin；细胞因子刺激物，如，细菌脂多糖；类固醇，如甲基 prenisolone 以及神经活性因子，如成纤维细胞生长因子。

本发明的另一个目的是提供一种具有强的生物附着和止血性质的材料，所说的性质适用于内部软组织置换，迅速附着并同时止血。

本发明的一个基本目的是提供一种聚合物基质，其具有对持续长期植入体内的机械的和化学的稳定性，而不进行能够损坏已生长进基质替代部分器官的新的组织网络的降解。

本发明的另一个目的是提供一种基质，其具有机械柔顺性，使得操作者可以切割、确定尺寸和操作聚合物基质，而不改变基质的内部结构和机

械性质。

本发明的另一个目的是提供一种可膨胀的材料，其在含水介质中的具有高膨胀的容量，为了本发明的目的，其可以吸收大量的生物兴趣物，例如粘着分子，如 CAM 和 L1 分子；或指导分子，如在合适的溶液中溶解的 semaphorins 或 netrins，以便所说的分子其后被吸附在聚合物基质网络的表面上。

按照本发明，本发明提供了一种新的亲水聚合物水凝胶，其能够形成多孔的，柔软的，高吸收的聚合物基质，该基质有弹性并可变形，并且至少具有含量为约 80%，优选地至少 96%的平衡水。

按照本发明，本发明也提供了可以与活细胞混合的聚合物混合物。

本发明涉及一种用于治疗的聚合物水凝胶，所说的水凝胶是以下物质的共聚物(a)N-取代的异丁烯酰胺或者丙烯酰胺，(b)交联剂，和(c)选自下组的可共聚的材料：糖，糖衍生物，组织粘着肽，组织分化分子蛋白质(如骨形态形成蛋白质)以及具有脂质衍生物之抗体的聚合物共轭体，所说的聚合物水凝胶是有弹性和可变形的，并且具有含量为至少约 80%，优选地至少 96%的平衡水。

优选地，所说的 N-取代异丁烯酰胺或丙烯酰胺(a)选自 N-单烷基和 N,N-二烷基异丁烯酰胺和丙烯酰胺， 所说的交联剂(b)包括丙烯酰胺或其前体，所说的可聚合的材料(c)是糖，该糖选自葡糖胺、N-乙酰葡糖胺和神经氨酸的 N-乙酰衍生物和它们的聚合形式，例如聚唾液酸。

本发明也涉及一种制备用于治疗的聚合物水凝胶的方法，该方法包括(a)将交联剂溶解在具有自由基聚合引发剂的孔-形成溶剂中，以形成溶液，(b)将 N-取代的异丁烯酰胺或丙烯酰胺加入到(a)中获得的溶液中，以形成混合物，(c)将糖，糖衍生物，组织粘着肽，组织分化分子蛋白质或衍生的生物活性肽，或具有脂质衍生物之抗体的聚合物共轭体溶液加入到(b)中获得的混合物中。

按照一个优选的实施方案，该方法包括将偶氮二异丁腈和亚甲基双丙烯酰胺溶解到所说的溶剂中形成溶液，将所说的溶液与 N-2-(羟丙基)异丁烯酰胺混合，向其中加入葡糖胺或 N-乙酰葡糖胺或 N-乙酰神经氨酸，并且从中除去低分子量的残余产物和引发剂微量物。

按照另一个实施方案，该方法包括将活组织细胞或遗传修饰的细胞加入到(c)中获得的产物中，并且使所说的细胞在所说的产物中聚合。

按照另一个实施方案，按照本发明的聚合物水凝胶包含聚合于其中的细胞或遗传修饰的细胞。

按照另一个实施方案，本发明涉及用于治疗损坏的脑部组织或脊髓的方法，该方法包括取走人类和动物中的所说的损坏的脑部组织或脊髓，用按照本发明的聚合物水凝胶替代所说的损坏的脑部组织或脊髓。

按照本发明的水凝胶是共价交联的，不透明的，多相的材料。其优选地显示出明显的相分离结构，该结构是由约 1-10 μm，优选地约 3-5μm 的聚合物微粒形成的，由此，使得在所说的水凝胶用于与宿主组织接触时给出相对粗大的孔(大孔)区域，在与向内生长的组织接触时给出相对细小的孔(中孔)区域。

这导致优选的具有大孔结构的海绵状结构；例如至少 80-90%的分孔隙率(汞侵入的体积对凝胶的总体积比)；优选地几百平方米/克凝胶范围内的比表面区域.；例如约 15-35 μm 的中值孔径(体积)；等于或大于 10μm(等于 100%的水凝胶分孔隙率)的孔的多孔体积；20-30μm 的超孔特征(凝胶的分孔隙率至少为凝胶体积的 50%)。

水凝胶的大结构和多孔结构可以提供控制颗粒大小和多孔结构来操作，后者取决于所使用的孔形成溶剂的组成和性质，聚合物的体积份数，聚合物-溶剂相互作用，聚合温度和所使用的交联单体的性质。成功的生物量积累和细胞相互作用导致产生这种最佳表面/体积相互作用(如汞孔隙学数据所显示的)，其导致形成聚合物颗粒的小和中孔隙率。

材料的一个重要的最后方面是它的开放性质和适合于生物量细胞积累和细胞/分子与活组织相互作用的互相连接性(interconnectedness)。如图 3 所示，在扫描电子显微镜下，这些多相凝胶通常显示出胶状的三维结构，具有非环状的孔 和由聚合物聚集体的表面的接触代表的孔系统壁，如图中所显示的。有效的表面区是粒子表面孔隙率的函数。与均相凝胶相反，这样的多相凝胶的一个主要优点是由微粒所产生的表面区域实际上是无限的，因为聚集体(1)的大小降低，以便表面区域倒转为 1 的比例。另外，与均相水凝胶比较，本发明的多相水凝胶显示出大得多的多孔体积，因此对

细胞渗透和生物量积累来说更有效。此外，与均相水凝胶比较，按照本发明的水凝胶具有与成熟的和发育的神经组织匹配的机械柔顺性质。

这些水凝胶基质具有真正的组织特异性结构，因为细胞相互作用通过凝胶 结构导致产生有组织的组织网络，所谓的器官样水凝胶。

所说的聚合物基质可以由同时沉淀或沉淀聚合和交联有效量的以下各种组分的共聚合来形成：(i) N-取代的异丁烯酰胺(如 N-单烷基异丁烯酰胺)或 N-取代的丙烯酰胺(如 N-单烷基丙烯酰胺，或者 N, N-二取代的丙烯酰胺，如 N,N-二烷基丙烯酰胺；(ii)交联剂，如丙烯酰胺或其前体或二乙烯基化合物等；(iii)自由基聚合引发剂，如偶氮二异丁腈，各种过氧化物，抗坏血酸，过氧硫酸盐以及取代的氮杂化合物等，它们是本领域技术人员已知的，其用量在共聚物或三元共聚物重量的 0.01 和 2%之间变化。(iv)复合糖，如葡糖胺或 N-乙酰葡糖胺或 N-乙酰葡糖胺或 N-乙酰神经氨酸或聚唾液酸或其它糖衍生物或组织粘着寡肽(包含序列，如 Arg-Gly-Asp ， Ile-Lys-Val-Ala-Val ， Ala-His-Ala-Val-Ser-Glu Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg)，组织分化分子来源的寡肽(例如，骨形态发生蛋白)或具有抗髓鞘质和轴突-相关脂质的抗体的聚合物共轭体，以及它们的衍生物，这些物质在溶剂中，优选地在丙酮/二甲基亚砜，丙酮或丙酮/乙醇中。

烷基基团优选地具有一至两个碳原子，例如， C_1 到 C_2 羟烷基和氨烷基基团。本文使用的术语 N-取代的包括 C_{1-8} 取代基，其可以含有羟基，氨基或它们的组合。

反应通常在由密封的安瓿组成的聚合容器中于 40-60 ℃下进行约 12 小时。

附图简要描述

图 1 是均相凝胶的显微镜视图；

图 2 是在脊柱的 cirdl 中移植的均相凝胶的显微镜视图；

图 3 是 HPMA 多相凝胶的显微镜视图；

图 4 是在神经组织中移植的图 3 的凝胶的显微镜视图。

实施发明的最好方式

借助下列实施例说明本发明。

实施例 1

将 AIBN(偶氮二异丁腈)(1.2%W/W)和亚甲基双丙烯酰胺(1 mol%)溶解在干燥的丙酮中。将溶液与 N-2-(羟丙基)异丁烯酰胺混合，达到 30%的 HPMA 与丙酮/二甲亚砜(93:7v/v)混合物的体积比，将 N-异丁烯酰葡糖胺(5%wt)，或 l-甲基-2-异丁烯酰氨基乙基-2-乙酰氨基-2-deoxdy-β-D-葡糖苷(6.5%wt)，或 2-[l-甲基-2-异丁烯酰氨基乙基)5-乙酰胺基-3,5-二脱氧-D-甘油-α-半乳糖-2-nonulopyranosidonic 酸(5.2%wt)，或异丁烯酰甘氨酰基甘氨酰基精氨酰基甘氨酰基天冬氨酸(1.4%wt)溶解到二甲亚砜中，并添加至聚合混合物中。使混合物充分匀化，装入注射器中和注射到安瓿中。然后用氮净化反应混合物，经加温密封安瓿。为了避免溶剂蒸发，可以在加温安瓿前首先用干冰和乙醇混合物冻结混合物，接着于 50 ℃将密封的安瓿浸没在水浴中 24 小时。

优选地，按照本发明，在水凝胶产物使用之前，从其中除去没有包括在网络中的低分子量剩余产物(例如未反应的单体和、寡聚物)和引发剂微量物。这一过程可以通过以下方法达到：将干凝胶浸没在乙醇中 20 小时，然后在乙醇/水混合物(1:1 V/V)中 20 小时，在蒸馏水中一周(进行频繁的水交换，直到达到膨胀平衡，并且交换率低，优选地为 0 时)。另一个本发明的重要的方面是避免污染。聚合物凝胶的制备优选地是在具有过滤的空气流的防生物危害室中进行。洗涤步骤优选地利用无菌物质完成，并且凝胶在 4 ℃下在无菌的蒸馏水中贮存。

为了形成杂合细胞装置(它包括聚合物装置和供体组织细胞两者)，采用含有所说细胞悬液的 Hamilton seringue 通过聚合物网络的微刺法可以将细胞接种到聚合物水凝胶多孔结构中。在水凝胶移植到靶器官区域后，接着足够的二聚(dime)，可以在体外或体内进行细胞向所说的聚合物水凝胶中的引入。可以从人脑或肌肉组织或尸体解剖材料分离细胞。

实施例 2： 体外将细胞引入到 PHPMA 水凝胶中

用 DMEM 从大鼠胚的脑部半球分离无脑膜和 blod 脉管的神经元，并切成组织小碎片。在包含 DMEM 的离心机管中以巴斯德移液管机械分离组织。保存上清液，用已经用火磨光成窄小的尖端的巴斯德移液管进一步破

碎沉淀的组织碎片。在几个循环的细胞悬浮/分离后离心收集的上清液，将细胞浓缩至每100μl介质10^6个细胞。将组分保持在冰上，直到用于细胞包埋。为了有效的和可靠的将细胞穿入聚合物水凝胶中，将细胞引入到连接有微调装置的Hamilton seringue中，并用所需浓度以最低的压力损害在双目显微镜下和无菌条件下接种到膨胀的PHPMA水凝胶中。将包含细胞的水凝胶保持在小体积的培养基中，并在37℃下在潮湿氛围的5%的CO_2中培养。一旦细胞达到生长的适当程度，就可以将杂合装置移植进人脑中，以促进组织重构和修复。

聚合物混合物可以与活细胞混合，由此使聚合物基质的物理的特征与水凝胶型行为(孔隙率，稳定性，指导表面，通透性)和细胞生物因子(例如，生长因子)相结合。

通过在0℃以下的温度下达到细胞向聚合物基质的引入，即冷聚合，其产生多孔基质，在该基质内，细胞被固定化并且能够达到重构、生长和/或分化，供后续移植。溶剂应当是具有合适的冷保护剂(甘油/二甲亚砜或甘油或DMSO或聚乙烯基吡咯烷酮或羟乙基淀粉，羧甲基纤维素)等渗溶液或者是通常用于细胞和组织培养类型的组织培养基。该方法使得可以控制最后的从几个细胞的细胞密度到接近组织细胞密度的细胞密度，约10^9-10^{10}个细胞/cm^3。该方法也使得可以通过变化冷却的速率包含细胞的聚合混合物的温度(液氮或冷的异戊烷)来改变和控制基质孔隙率。该方法产生一种典型的冷凝胶大孔海绵状结构，其具有允许营养物和大分子(例如生长因子)扩散到包埋在聚合物凝胶基质内的细胞内和从这些细胞扩散的孔大小，孔体积适合于在组织发育和成熟期间有效的生物量积累，扩展(细胞分裂)和组构(细胞与细胞接触)。

实施例3：通过HPMA的冷聚合凝胶包埋星形细胞

通过于37℃在含有0.1%胰岛素-EEDTA，0.001%DNA(在Hepes缓冲的DMEM中)的溶液中培养2日龄大鼠的脑部皮质30分钟获得星形细胞，并机械分离。将细胞以10^6个细胞/10ml平板接种到塑料烧瓶上，并于37℃保持在具有10%胎牛血清的DMEM中。体外7天之后，收获星形细胞，并重悬于含有20%甘油的Hank'平衡盐溶液(HBSS，pH7.4)中，浓缩至每100μl 10^6，并保持在6℃下。在层流柜橱中并利用无菌材料进行包埋

过程。预聚合溶液由下列物质组成： 0.69g N-(2-羟丙基)异丁烯酰胺和0.010g溶解在含有20%甘油2.3 ml的HBSS中的亚甲基双丙烯酰胺和作为引发剂的过硫酸铵(100mg/mL HBSS； 4.3 $X10^{-3}$ M)以及用HBSS(1:1 v/v HBSS； 3.3 $X10^{-5}$ M)稀释的N,N,N′,N′-四亚甲基二胺。用0.1N HC1将pH调节至7.0，用氮气使预聚合溶液脱气，在使用前预冷至4℃。以10^6个细胞/ml的密度将细胞悬浮在高密度的预聚合物混合物中，充分混合混合物，在两个预冷的玻璃平板之间(聚硅氧烷橡密封剂分开0.75 mm，以使最终体积为3ml)用Hamilton seringue注射。 通过浸没在液氮中将模子在大约在1min内冷却至-170℃，在转移到水浴中于-15℃冷却之前使其留在液氮中3分钟。在冷水浴中进行聚合反应5小时，然后将模子在37℃的冰浴中解冻。在冰破碎 之后，从模子移走凝胶，以HBSS洗涤以便除去冷保护剂与未反应的产物，并修整成具有0.8mm直径的环状盘。将凝胶盘在37℃和5% CO_2(在补充有10%FBS 和 1%抗生素(链霉素-青霉素)的DMEM 中)潮湿氛围中温育。

用于聚合物水凝胶杂合组织制造的这一方法与Woerly等公开的方法(1996)比较具有两个主要优点：在低温时阻止膜细胞被聚合损害和在细胞周围形成导致增加的孔隙率和固定的孔结构的冰晶(多相水凝胶)。结果，细胞被包埋在聚合物基质内，该基质具有用于组构的支架结构，大的内部表面区域，供细胞扩展和增加通透性的足够空间。此外，细胞聚合物混合物可以按照以上的描述为尔后的聚合冷冻保持一次。

在细胞发育的任何阶段，所形成的杂合基质由固相(其包含多孔基质，细胞和细胞胞外基质)和液相(相应于细胞培养介质和胞外液体)组成。

本领域技术人员会认识到，这一方法不同于所谓的"细胞胶囊化"方法，后者利用微或大胶囊化技术，其中的细胞只是简单地包封在具有球形和可变直径的聚合物膜内。

如本文所使用的，术语“细胞”用来包括组织片段、细胞块，胚胎、新生儿或成年人来源的单细胞，遗传修饰的细胞，原初细胞或无限增殖化细胞，肿瘤细胞系或无限增殖化前体细胞系来源的无限增殖化细胞系，茎干或祖细胞系，任何组织和器官的成长因子-选择前体细胞系。本发明的方法与产物适于制备用于移植的或三维培养系统的各种人工组织或器官。

为此，例如，将在包含10%-20%甘油(作为冷保护剂)的Hank'平衡盐溶液 (无菌HBSS， pH7.4)中的细胞悬液在4℃下温育10分钟。

将如实施例 1 所描述的由可聚合的组分组成的预聚合溶液溶解在包含10%-20%甘油的HBSS中。通过多孔玻璃滤器过滤溶液，真空脱气，并且在冰中预冷。用溶解在HBSS中的过硫酸盐抗坏血酸或过硫酸盐四亚甲基二胺引发自由基聚合反应。用1N盐酸将溶液pH值调节至中性。以可变的密度(优选地是10^6细胞/ml聚合混合物)将细胞悬浮在聚合溶液中。充分搅拌混合物，装入注射器中，注射到安瓿中或注射到由两个玻璃平板(由尺寸可变的聚硅氧烷橡胶密封剂分开的)或用安瓿制成的模子中。通过浸没在液氮中将模子或安瓿迅速冷却，并转移到水浴中在-10℃至-30℃下冷却。将冷聚合反应进行至少5个小时，优选地是12个小时。在聚合后，将模子或安瓿在37℃水浴中解冻，同时除去凝胶，以HBSS洗涤，改变其大小使其成为合适的形状。将凝胶转移到5%CO_2培养器中，所述培养器中具有优选的培养介质，其含有抗生素和抗真菌药物。在流橱中并利用无菌仪器完成该过程。

试验 1

通过移植进大鼠横切（ transected ）脊髓和脑损伤部位来研究本发明的聚合物水凝胶的生物学耐受性。移植后1周到10月采取试验样品。生物学耐受性良好。目视可见，凝胶整合进宿主组织，说明良好的稳定性，并且在某些情况下，宿主器官表现得完整。显微学研究表明，转移聚合物水凝胶配方在 半和横切（ transected ）大鼠脊髓的移植位点促进组织再构和轴索再生，由此达到100%的组织连续性恢复(图 4)。数据总结如下：(i)水凝胶的整合和器官的连续性恢复；水凝胶保持损伤的体积大小，以便新的组织可以发育和由其多孔表面粘着到伤口上替代损伤。(ii)具有总的可用聚合物表面的平滑表面；(iii)在邻近的宿主组织中最小限度的留下伤痕和没有囊腔化作用；(iv) 在加强移植物对宿主的连接的聚合物网络之内基于神经胶质的组织网络的向内生长；(v)多相来源的细胞的向内生长；(vi)毛细管向内生长；(vii)如免疫组织化学所见，在聚合物网络的表面的胞外基质分子(胶原， fibronectine 和层粘连蛋白)的沉积；和(viii)轴索成长遍及生物移植物。移植的水凝胶的红外线光谱学研究显示，天然水凝胶(非移植的)的红外

光谱被脂质和蛋白质化合物的典型的红外特征所替代，类似于邻近的脊柱组织，证实脊髓组织元件整合进水凝胶的多孔网络。

试验 2

冷聚合方法使得可以产生多相凝胶，其具有细胞固定化在其中的固定的大孔结构。使用细胞标记技术(例如细胞标记)或免疫细胞化学的研究表明，细胞在整个聚合物网络中均匀分布，在凝胶中有不同的水平，以单个分离的细胞存在或以几个细胞的小簇排列。通过用发育神经组织细胞的抗原轮廓 3 周的体外培养后，存活的细胞是免疫染色阳性的。因此，从大鼠新生脑分离的星形细胞可以由冷聚合反应以保留的高水平包藏到亲水水凝胶中，所包藏的细胞可以存活，并且通常与它们在单层培养条件下一样分化，在体外 10 天后，包藏的细胞的存活率是 90%(采用细胞标记技术)。此外，当它们在聚合物基质内合成层粘连蛋白和 fibronectine 时，与它们在单层培养物中一样是功能性的。

所说的聚合物水凝胶旨在主要用作组织膨胀物和组织形成模板，通过促进新的功能性整合的组织-到-器官，恢复组织缺陷或身体的软器官的组织缺陷(其引起损伤或外科操作或先天性畸形)。其也旨在用于经工程化使创伤愈合，组织再构，组织再生，软器官(如肝脏，胰腺，皮肤，肌肉)的组织发育。其也可以与用于骨再生和修复的其它材料结合起来。

另一种聚合物水凝胶的应用在于开发为特定的人神经学上的紊乱提供治疗法的方法，按照疾病的类型和功能性缺陷的程度，所说的聚合物水凝胶可以以两种不同的方式使用。首先，它可以用作组织再生模板或用作掺入细胞移植物后的细胞载体。按照本发明的聚合物水凝胶例如旨在用于治疗发育阶段或成熟阶段中的脑和脊髓特定区域的损坏的或先天的缺陷(例如脊髓损伤)。典型地，所说的方法包括除去损坏的组织或伤疤组织或神经组织的任何功能失常部分，并且用以上所描述的聚合物水凝胶替代的脑部组织或脊髓组织。按照本发明的聚合物水凝胶在重构神经回路(其与发育阶段或成熟阶段的中枢神经系统中的轴索途径有关)。例如，记忆功能(例如在阿耳茨海默氏疾病中其被削弱)中所牵涉的 septo-hippocampala 回路，或在帕金森病或杭廷顿氏舞蹈病中的部分纹状体中所牵涉的黑纹状体回路，或牵涉 hypophyso-hypothalamus 组织体系的垂体-下丘脑激素/再生不良作用。

这通过外科除去脑组织的缺陷部分并移植按照本发明的凝胶(优选地是用神经细胞移植物，以诱导新的功能性轴索回路的形成)完成。以相同的方式，导致脊髓回路功能失常的畸形(例如脊柱bifida)也可以通过除去异常形成形成的部分器官和用按照本发明的神经凝胶(优选地是用神经元细胞移植物)替代缺陷部分。按照本发明的水凝胶的另一个应用是通过以相同的方式经按照本发明的聚合物水凝胶诱导轴索再生长治疗视神经与外周神经。

可以理解，本发明不限于以上所描述的优选的实施方案，在不背离本发明的精神和范围的情况下进行修改是可能的。

说　明　书　附　图

图 1

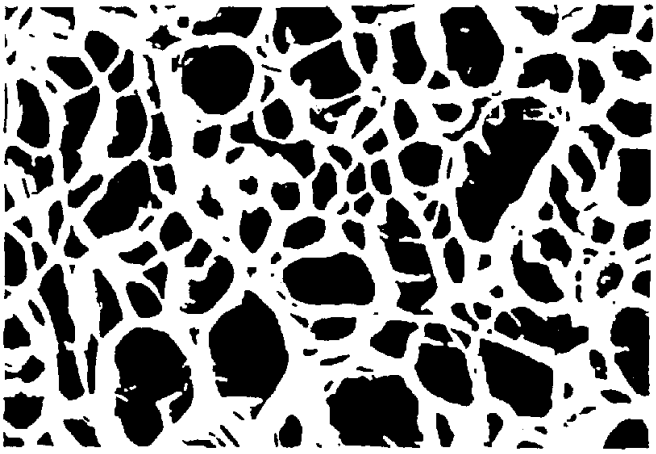


图 2



图 3

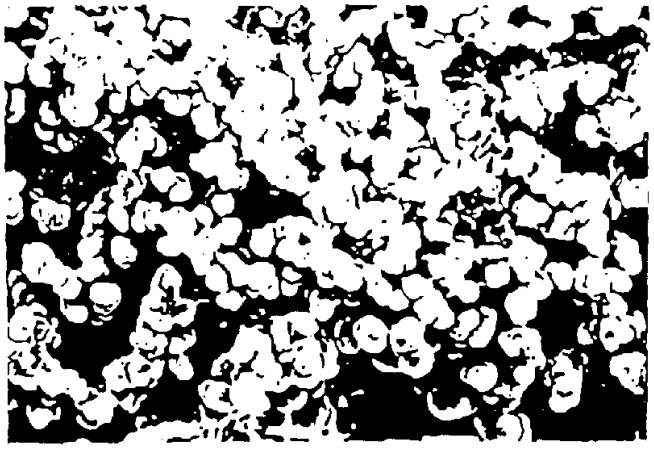


图 4

