



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103038269 B

(45) 授权公告日 2015.08.26

(21) 申请号 201080068305.6

C12N 5/00(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.26

C12N 11/08(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61L 27/18(2006.01)

2013.01.28

A61L 27/58(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C08G 63/91(2006.01)

PCT/EP2010/057269 2010.05.26

C08G 64/02(2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C08G 64/14(2006.01)

W02011/147452 EN 2011.12.01

C08G 64/40(2006.01)

(73) 专利权人 麦迪斯有限公司

C08F 299/04(2006.01)

地址 荷兰埃德

C08G 65/332(2006.01)

(72) 发明人 迪尔克·怀伯·格里普玛 扬·费延

C08L 71/02(2006.01)

埃尔汉·巴特

(56) 对比文件

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

EP 2075279 A1, 2009.07.01, 第10页第0059
段, 第9页第0047段, 第6页第0028段, 第12页
第0084段等等.

责任公司 11240

审查员 贺峥

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

权利要求书2页 说明书40页 附图28页

C08F 299/02(2006.01)

B32B 27/08(2006.01)

C08J 3/24(2006.01)

C08J 5/18(2006.01)

(54) 发明名称

用于制备可降解聚合物网络的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于制备可降解聚合物网络的方法。用于制备可降解聚合物网络的方法包括 :a) 在 20° C 至 200° C 之间的温度下制备聚合物组合物, 其包含环状碳酸酯的单体和 / 或环状酯的单体和 / 或直链碳酸酯的单体和 / 或直链酯的单体和 / 或环醚的单体和 / 或直链羟基羧酸的单体 ; b) 添加交联剂, 其包含至少一个 C-C 双键或 C-C 三键, 和 / 或交联自由基引发剂 ;c) 将聚合物组合物 (其包含交联剂) 加工成所期望的形状 ;d) 通过照射混合物进行交联。另外, 本发明涉及可降解聚合物网络。此外, 本发明涉及可降解聚合物网络的应用。

1. 一种用于制备可降解聚合物网络的方法,包括 :

a) 通过在 20°C 至 200°C 之间的温度下聚合获自环状碳酸酯的单体来制备聚合物组合物;

b) 添加包含至少一个 C-C 双键或 C-C 三键的交联剂和 / 或交联自由基引发剂;

c) 将所述聚合物组合物加工成所期望的形状;

d) 通过照射所述混合物进行交联,

其中在步骤 a) 中的所述单体获自选自下组的环状碳酸酯 : 碳酸三亚甲基酯、碳酸亚乙酯、二乙二醇双烯丙基碳酸酯、和它们的衍生物,

其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计,所述交联剂包含 0.01 至 15wt% 的交联剂。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,所述交联剂选自由丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、多丙烯酸酯、多甲基丙烯酸酯、延胡索酸酯、多延胡索酸酯、马来酸酯、多马来酸酯、马来酸酐、衣康酸酯、多衣康酸酯、或它们的衍生物组成的组。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述交联剂选自下组 : 二丙烯酸亚乙酯、二丙烯酸乙二醇酯、二丙烯酸四乙二醇酯、二丙烯酸聚乙二醇酯、三丙烯酸三羟甲基丙烷酯、三丙烯酸季戊四醇酯、四丙烯酸季戊四醇酯、二甲基丙烯酸乙二醇酯、二甲基丙烯酸四乙二醇酯、二甲基丙烯酸聚乙二醇酯、丙烯酸酯官能化的聚 (碳酸三亚甲基酯) 类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚 (碳酸三亚甲基酯) 类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚 (碳酸三亚甲基酯) 类低聚物、丙烯酸酯 官能化的聚 (D, L- 丙交酯) 类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚 (D, L- 丙交酯) 类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚 (D, L- 丙交酯) 类低聚物、丙烯酸酯官能化的聚 (L- 丙交酯) 类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚 (L- 丙交酯) 类低聚物、丙烯酸酯官能化的聚 (ε - 己内酯) 类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚 (ε - 己内酯) 类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚 (ε - 己内酯) 类低聚物、丙烯酸酯官能化的聚 (乙二醇) 类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚 (乙二醇) 类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚 (乙二醇) 类低聚物、或它们的衍生物。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中按总共聚物的摩尔百分比计,在步骤 a) 中的所述聚合物组合物包含 40% 摩尔至 85% 摩尔的环状碳酸酯含量。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述交联自由基引发剂选自下组 : 光引发剂、热引发剂、氧化还原引发剂。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计,步骤 b) 进一步包含 0.001% wt 至 0.1% wt 的所述交联自由基引发剂。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中步骤 b) 包含溶剂,所述溶剂是丙酮、二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、碳酸亚乙酯、碳酸亚丙酯、二甲基亚砜、甲苯、苯、四氢呋喃或 1,4- 二噁烷。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中在步骤 d) 中的所述照射是紫外线、可见光、红外、微波、或 γ 照射。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述 γ 照射包括 10 至 150kGy 的辐射。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中在 20°C 至 200°C 的温度下,通过压缩模制、挤出模制、注射模制或铸造,来获得在步骤 d) 中的所述聚合物组合物的所述期望的形状。

11. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中在步骤 c) 中的所述期望的形状是薄膜, 所述薄膜具有 $1 \mu\text{m}$ 至 $1000 \mu\text{m}$ 的厚度。
12. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述聚合物组合物的制备包括开环聚合和 / 或缩聚。
13. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中在 100°C 至 160°C 之间的温度下, 制备所述聚合物组合物。
14. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计, 所述交联剂包含 0.1% wt 至 10% wt 的交联剂。
15. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计, 所述交联剂包含 0.5% wt 至 8% wt 的交联剂。
16. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计, 所述交联剂包含 1% wt 至 5% wt 的交联剂。
17. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按总共聚物的摩尔百分比计, 在步骤 a) 中的所述聚合物组合物包含 50% 摩尔至 70% 摩尔的环状碳酸酯含量。
18. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按总共聚物的摩尔百分比计, 在步骤 a) 中的所述聚合物组合物包含 60% 摩尔至 70% 摩尔的环状碳酸酯含量。
19. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计, 步骤 b) 进一步包含 0.005% wt 至 0.075% wt 的所述交联自由基引发剂。
20. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计, 步骤 b) 进一步包含 0.01% wt 至 0.05% wt 的所述交联自由基引发剂。
21. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中按所述聚合物组合物的总重量的重量百分比计, 步骤 b) 进一步包含 0.025% wt 的所述交联自由基引发剂。
22. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中所述 γ 照射包括 20 至 120kGy 的辐射。
23. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中所述 γ 照射包括 25 至 100kGy 的辐射。
24. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中在步骤 c) 中的所述期望的形状是薄膜, 所述薄膜具有 $10 \mu\text{m}$ 至 $750 \mu\text{m}$ 的厚度。
25. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中在步骤 c) 中的所述期望的形状是薄膜, 所述薄膜具有 $50 \mu\text{m}$ 至 $600 \mu\text{m}$ 的厚度。
26. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中在 120°C 至 150°C 的温度下, 制备所述聚合物组合物。
27. 一种可降解聚合物网络, 可以通过根据权利要求 1 至 26 中任一项所述的方法来获得。
28. 一种根据权利要求 27 所述的可降解聚合物网络的应用, 用于涂覆表面, 作为用于热绝缘和 / 或用于抗氧化绝缘的保护层, 用于包装材料的制造。
29. 一种根据权利要求 27 所述的可降解聚合物网络的应用, 用于制备组织工程、细胞培养、或药物递送中的植入物。

用于制备可降解聚合物网络的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于制备可降解聚合物网络的方法。另外，本发明涉及可降解聚合物网络。此外，本发明涉及可降解聚合物网络的应用。

背景技术

[0002] 组织工程的多学科领域的发展已产生一组新的组织替代部件和实施策略。在生物材料、干细胞、生长和分化因子、以及仿生环境方面的科学进步已产生在实验室中通过工程化细胞外基质（“支架”）、细胞、和生物活性分子的组合用于制造组织的独特机会。因此，在组织工程中，这些支架材料的物理、化学和生物性能是非常重要的。其上培养细胞的基质的刚性会影响细胞行为。在软组织工程中，支架将机械刺激传递给细胞和组织，并经受体内重复的动态负载。而且在体外，这可能是需要的，因为在细胞培养期间细胞接种的工程支架的机械刺激会增强工程化组织的发育以及它们的功能。在此方面，允许细胞粘附和增殖的柔性的和非柔性的、形状稳定的和可再吸收弹性的或非弹性的聚合物网络是特别令人感兴趣的，包括无定形和半晶体聚合物材料。具有这些性能的交联聚合物材料是本发明的目的。

[0003] 聚（碳酸三甲基酯）(PTMC) 是生物相容的和可生物降解的聚合物，其具有大约 -17°C 的玻璃化转变温度 (T_g)。可以通过在惰性气氛中照射来交联这种无定形和柔性聚合物以形成抗蠕变的和形状稳定的网络。这类弹性聚合物尤其用作软组织工程的支架材料或用作控制释放系统的长效制剂、或用于设计植入物，如抗黏附膜或血管修复术。抗蠕变性和形状稳定性是所期望的性能。在体内，通过表面侵蚀，PTMC 较快地降解，而没有释放酸性降解产物。为了扩大这种聚合物的适用性，需要开发具有可调节的较低侵蚀速率的基于碳酸三甲基酯 (TMC) 的材料。

[0004] 聚(D,L-丙交酯) (PDLLA) 是生物相容的和可生物降解的聚合物，其用于可吸收缝线、受控药物释放系统、和组织工程支架的制备。PDLLA 是玻璃状的、非晶体脂肪族聚酯，其通过体内本体水解而降解。当照射时，观测到 PDLLA 分子量降低。(D,L)-丙交酯是可以用来制备 PDLLA 的单体。

[0005] TMC 和 DLLA 的共聚物呈现介于 PTMC 和 PDLLA 之间的中间物理性能：取决于共聚物的组成，可以调节玻璃化转变温度、弹性模量值、拉伸强度和降解速率。这使得这些聚合物适用于许多生物医学应用。然而，在体温下，玻璃化转变温度低于生理温度的无定形未交联共聚物具有较差的形状稳定性。因此，在交联以后，高压灭菌可以用作由这些共聚物制备的医疗器械的灭菌方法。

[0006] 聚己内酯 (PCL) 是具有约 60°C 的低熔点和约 -60°C 的玻璃化转变温度的可生物降解聚酯。这种聚合物经常用作树脂添加剂用来改善它们的加工特性和它们的最终使用性能（例如，耐冲击性）。

[0007] 聚(L-丙交酯) (PLLA) 是源自可再生资源（如玉米淀粉或甘蔗）的可生物降解的、热塑性的、脂肪族聚酯。PLLA 是源于 L, L-丙交酯（也称为 L-丙交酯）聚合反应的产

物。PLLA 具有 50–80°C 的玻璃化转变温度和 170–200°C 的熔化温度。PLLA 目前用于多种生物医学应用,如缝线、支架,透析介质和药物递送装置。它还被评价为组织工程的材料。PLLA 和 PDLLA 已被用作用于形成聚合物囊泡的小泡膜的两亲性合成嵌段共聚物的疏水性嵌段。PLLA 和 PDLLA 是石化衍生产物的可持续的替代物,因为由其最终产生它们的丙交酯可以源自农业副产物(如玉米淀粉)或其他富含碳水化合物的物质(如玉米、糖或小麦)的发酵。

[0008] 聚乙二醇(PEG)是具有从工业制造到医药的许多应用的聚醚化合物。它也称为聚环氧乙烷(PEO)或聚氧乙烯(POE)。PEG、PEO 或 POE 是指环氧乙烷的低聚物或聚合物。通过环氧乙烷与水、乙二醇或乙二醇低聚物的相互作用来产生聚乙二醇。上述反应是通过酸性或碱性催化剂来催化的。它是多种轻泻药(例如,包含聚乙二醇的产品)和许多护肤霜的基础。

[0009] 可以对 PTMC、无定形和半晶体聚(丙交酯)、PCL 和 PEO 聚合物(当它们交联时)进行高压灭菌的灭菌。对于基于它们各自单体的共聚物情况也是如此。

[0010] 已知高能辐射通过形成自由基、离子、或可以使聚合物交联的激发态引起聚合物结构的化学变化。当照射时,对于一些聚合物,交联占优势,而对于其他聚合物,则断链是主要的。对于生物医学应用而言,γ 照射和电子束照射已广泛用于改变聚合物生物材料的表面或本体性能以及用来以低成本方式对它们进行灭菌。

[0011] γ 照射是用于对(聚合物)生物材料灭菌的广泛使用的低成本方法。高能 γ 射线可以引发自由基反应或离子反应,导致所灭菌材料的表面性能和本体性能的改变。对于一些聚合物,在 γ 照射期间观测到交联,而对于其他聚合物,照射则导致断链或解链反应和分子量的降低。这些降低的分子量可以限制可吸收的聚合物植入物(如组织工程支架、骨折固定装置或缝合线)的使用寿命(由于机械强度的迅速降低和装置的解体)。而且当植入由可生物降解聚合物制备的药物释放基质时,分子量的降低可以导致早期发生质量损失并影响药物释放特性。γ 照射显著改善 PTMC 的抗蠕变性和形状稳定性。通过 γ 照射通过增加 PTMC 的交联效率,可以防止照射对网络拉伸性能的不利影响。获得的较高的凝胶含量和网络密度将进一步改善抗蠕变性并且还减慢降解和侵蚀。降解是通过聚合物骨架中的键断裂导致的聚合物断链过程。这导致聚合物链长度减小。侵蚀是聚合物基体的质量损失,这可能是由于单体、低聚物、聚合物链或其部分的丧失。侵蚀可以是生物、化学或物理作用的结果。因此,应当清楚的是聚合物降解是聚合物侵蚀过程的一部分。

[0012] 另一种类型的聚合和交联是令人感兴趣的:由可降解低聚物制备的大分子单体的游离基聚合和交联。两种过程均已用来在环境温度下有效地制备可吸收性聚合物网络。

[0013] 在现有技术中不断地需要进一步开发用于制备生物相容的和可降解的聚合物网络的方法。

发明内容

[0014] 本发明的一个目标是(除其他以外)提供具有无定形结构和低玻璃化转变温度的柔性的、生物相容的和可降解的聚合物网络,具体地,具有低玻璃化转变温度和可调节降解性能的形状稳定的和抗蠕变材料的可降解聚合物网络。本发明的目的还在于制备具有不同柔韧性、不同弹性模量值以及增加的形状稳定性的聚合物网络,并且允许制备适合通过高压灭菌或热处理来灭菌的材料。

[0015] 按照本发明，通过包括以下各项的用于制备可降解聚合物网络的方法来实现此目标（除其他以外）：a) 在20°C至200°C的温度下制备包括以下单体的聚合物组合物：环状碳酸酯和/或环状酯和/或直链碳酸酯和/或直链酯和/或环醚和/或直链羟基羧酸；b) 添加交联剂，其包含至少一个C-C双键或C-C三键和/或交联自由基引发剂；c) 将聚合物组合物（其包含交联剂）加工成所期望的形状；d) 通过照射混合物进行交联。

[0016] 聚合物网络是具有将一个聚合物链连接到另一个聚合物链上的键的聚合物。它们可以是共价键或离子键。术语“交联聚合物”还可以用于聚合物网络。聚合物是由通常通过共价化学键连接的重复结构单元组成的大分子（也称为高分子）。由其制备聚合物的化合物称为单体。

[0017] 单体是一种或多种、两种或更多种、三种或更多种环状碳酸酯和/或环状酯和/或环醚和/或直链碳酸酯和/或直链酯和/或直链羟基羧酸。

[0018] 碳酸酯是在碳氢化合物中具有至少一个碳酸酯基 $-O-C(=O)-O-$ （如一个碳酸酯基、两个碳酸酯基、三个碳酸酯基）的碳氢化合物。

[0019] 酯是在碳氢化合物中具有至少一个酯基 $-COO-$ （如一个酯基、两个酯基、或三个酯基）的碳氢化合物。

[0020] 羟基羧酸是具有包含第二有机基团羟基（-OH）的羧酸（有机官能团-COOH）的碳氢化合物。

[0021] 环状分子具有环结构，如芳基、或芳环。直链分子是烃链，如烷烃。

[0022] 可以在步骤a) 中在惰性气氛下通过单体或单体混合物的反应来制备本发明的聚合物组合物。它可以是氮气、氩气或真空。在机械搅拌下进行反应直至均质化。搅拌直至均质化是搅拌直到形成对于肉眼观察而言均匀的混合物。可以通过任何其他类型的搅拌或混合来进行搅拌。

[0023] 按照本发明的可降解聚合物是可吸收的聚合物和/或可生物降解的聚合物。本发明的聚合物网络可以是无定形、半晶体或晶体。

[0024] 交联剂可以是交联剂或交联助剂。当它仅有助于形成更好的聚合物网络（在没有该试剂的情况下也形成网络）时，该试剂是交联助剂。仅当试剂存在时才形成网络，该试剂是交联剂。更好的网络可以是具有更高凝胶含量的网络、更加抗蠕变的网络、或更有弹性的网络。

[0025] 交联剂包含至少一个C-C双键或C-C三键，如一个以上、两个以上、三个以上、四个以上C-C双键或C-C三键。C-C双键或C-C三键还分别称为 sp^2-sp^2 碳-碳键或 $sp-sp$ 碳-碳键。C-C键应当理解为碳-碳键。

[0026] 本发明的材料的交联可以在高温下（如通过高压灭菌或热处理）对由可降解聚合物网络制造或用其涂覆的装置进行灭菌。

[0027] 自由基引发剂是在一些条件下（如暴露于照射、光、温度变动、或电化学反应）可以产生自由基物质的化学物质。具体类型的自由基引发剂可以是光引发剂、热引发剂或氧化还原引发剂。它们分别是当暴露于光、温度变化或暴露于电化学反应时产生自由基物质的化学物质。

[0028] 照射是将物品暴露于辐射的过程。辐射通常可以是电离辐射，如电子束处理、X射线或 γ 射线，但此术语也应用于非电离辐射如在可见光、紫外线或红外光谱区中的光辐

射,或微波。如果在适当水平下给予,则所有这些形式的辐射可以用来对物体灭菌,即它是用于生产医疗器械和一次性用品(如注射器),以及用于对食物消毒和灭菌的技术。

[0029] 在步骤a)中的温度范围是20℃至200℃之间,如20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、100℃、105℃、110℃、115℃、120℃、125℃、130℃、135℃、140℃、145℃、150℃、155℃、160℃、165℃、170℃、175℃、180℃、185℃、190℃、195℃、200℃,优选100℃至200℃。

[0030] 交联剂是帮助形成聚合物网络的化合物。它们产生将一个聚合物链连接到另一个聚合物链上的键。它们可以是共价键。当通常是指使用交联来促进聚合物的物理性能的差异时,使用术语“交联”。

[0031] 按照本发明,交联剂选自由以下组成的组:丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、多丙烯酸酯、多甲基丙烯酸酯、延胡索酸酯、多延胡索酸酯、马来酸酯、多马来酸酯、马来酸酐、衣康酸酯或多衣康酸酯。丙烯酸酯和多丙烯酸酯分别包含一个、和数个丙烯酸酯单元。丙烯酸酯单元包含一个乙烯基和一个酯基。它也称为丙烯酸酯(propenoate)并具有化学式 $C_3H_3O_2$ 。甲基丙烯酸盐/酯($CH_2=CMeCOO-$)是甲基丙烯酸的盐或酯。甲基丙烯酸酯包含甲基-乙烯基,即,彼此双键键合的两个碳原子直接连接于羰基碳上,并且其中用非末端甲基取代乙烯基。多甲基丙烯酸酯化合物包含数个甲基丙烯酸酯基。延胡索酸酯具有通式($O_2CCH=CHCO_2$)并且可以用烷基或酰基来取代。多延胡索酸酯包含数个延胡索酸酯基。马来酸酯是相应延胡索酸酯的顺式异构体。多马来酸酯包含数个马来酸酯基。马来酸酐(也称为顺式丁烯二酸酐或马来酸酐(toxilic anhydride)或二氢-2,5-二氧呋喃)是化学式为 $C_2H_2(CO)_2O$ 的有机化合物。衣康酸酯是衣康酸的酯。衣康酸或亚甲基丁二酸是无毒的,并且易于生物降解。衣康酸酯还称作2-亚甲基丁二酸酯并且包含两个酯(-COO-)和 sp^2 (C-C双键)甲基取代(在位置2处)。多衣康酸酯包含数个衣康酸酯基。

[0032] 按照本发明,交联剂选自由以下组成的组:丙烯酸酯官能化的聚(碳酸三甲基酯)类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚(碳酸三甲基酯)类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚(碳酸三甲基酯)类低聚物、丙烯酸酯官能化的聚(D,L-丙交酯)类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚(D,L-丙交酯)类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚(D,L-丙交酯)类低聚物、丙烯酸酯官能化的聚(L-丙交酯)类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚(L-丙交酯)类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚(L-丙交酯)类低聚物、丙烯酸酯官能化的聚(ϵ -己内酯)类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚(ϵ -己内酯)类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚(ϵ -己内酯)类低聚物、丙烯酸酯官能化的聚(乙二醇)类低聚物、甲基丙烯酸酯官能化的聚(乙二醇)类低聚物、延胡索酸酯官能化的聚(乙二醇)类低聚物、二丙烯酸亚乙酯、二丙烯酸乙二醇酯、二丙烯酸四乙二醇酯、二丙烯酸聚乙二醇酯、三丙烯酸三羟甲基丙烷酯、三甲基丙烯酸三羟甲基丙烷酯、三丙烯酸季戊四醇酯、四丙烯酸季戊四醇酯、二甲基丙烯酸乙二醇酯、二甲基丙烯酸四乙二醇酯、二甲基丙烯酸聚乙二醇酯以及它们的衍生物。

[0033] 甲基丙烯酸甲酯(MMA)是2-甲基丙-2-烯酸甲酯并具有线型化学式 $C_5H_8O_2$ 。二丙烯酸亚乙酯具有化学式 $C_8H_{10}O_4$ 。三丙烯酸季戊四醇酯(PETA)也称为2-丙烯酸2-(羟甲基)-2-[(1-氧化-2-丙烯基)氨基]甲基]-1,3-丙二基酯并具有线型化学式($H_2C=CHCO_2CH_2)_3CCH_2OH$ 。照射包含作为交联剂的三丙烯酸季戊四醇酯的PTMC薄膜使得以这种方式形成的PTMC网络不仅具有非常高的凝胶含量,而且具有极好的弹性体性能:在拉伸试验

中,试样显示低模量值、和高断裂强度和断裂伸长。当循环加载时,永久变形非常低。另外,以这种方式进行的交联还导致网络的酶侵蚀速率降低。三丙烯酸三羟甲基丙烷酯(TMPTA)具有线型化学式($\text{H}_2\text{C} = \text{CHCO}_2\text{CH}_2)_3\text{CC}_2\text{H}_5$)。三甲基丙烯酸三羟甲基丙烷酯具有线型化学式 $[\text{H}_2\text{C} = \text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{CH}_2]_3\text{CC}_2\text{H}_5$ 。四丙烯酸季戊四醇酯具有化学式 $(\text{H}_2\text{C} = \text{CHCO}_2\text{CH}_2)_4\text{C}$ 。二甲基丙烯酸乙二醇酯具有化学式 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$,也命名为 $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3) = \text{CH}_2$,而二甲基丙烯酸四乙二醇酯具有化学式 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_6$ 。聚乙二醇是环氧乙烷和水的缩聚物,通式为 $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$,其中n是重复的氧化乙烯基的平均数。

[0034] 它们的衍生物是指由任何有机基团和 / 或烷基、链烯基、炔基、芳基取代的上述交联剂。

[0035] 在一种最优先的实施方式中,步骤 b) 包含按聚合物组合物的总重量的重量百分比计,0.01 至 15wt%,优选 0.1% wt 至 10% wt,更优选 0.5% wt 至 8% wt,最优先 1% wt 至 5% wt 的交联剂。

[0036] 按照本发明的方法,在步骤 a) 中的单体获自选自下组的环状碳酸酯:碳酸三甲基酯、碳酸亚乙酯、二乙二醇双烯丙基碳酸酯、和它们的衍生物。碳酸三甲基酯称为 1,3-二氧杂环己烷-2-酮(1,3-二噁烷-2-酮,1,3-dioxan-2-one)并具有化学式 $C_4H_6O_3$ 。化学式为 $C_3H_4O_3$ 的碳酸亚乙酯称为 1,3-二氧杂环戊烷-2-酮(1,3-dioxolan-2-one)。二乙二醇双烯丙基碳酸酯具有化学式 $C_{12}H_{18}O_7$ 。

[0037] 按照本发明的方法，在步骤 a) 中的单体获自选自下组的环状酯：L-丙交酯、D-丙交酯、D, L-丙交酯、 ϵ -己内酯、二噁烷酮、聚乙二醇、乙交酯、和它们的衍生物。L-丙交酯是左旋丙交酯对映体，D-丙交酯是右旋对映体并且 D, L-丙交酯是外消旋混合物。 ϵ -己内酯或简称己内酯是环状酯（内酯家族的一个成员），具有七元环，具有化学式 $(CH_2)_5CO_2$ 。二噁烷酮是二噁烷衍生物（羰基代替亚甲基）并具有化学式 $C_4H_6O_3$ 。乙交酯，1,4-二噁烷-2,5-二酮，具有化学式 $C_4H_4O_4$ 。

[0038] 按照本发明的方法，在步骤 a) 中的单体获自选自下组的直链碳酸酯：碳酸二乙酯或碳酸二苯酯。碳酸二乙酯具有化学式 $C_5H_{10}O_3$ 并且碳酸二苯酯具有化学式 $C_{13}H_{10}O_3$ 。

[0039] 按照本发明的方法，在步骤 a) 中的单体获自选自下组的直链酯：富马酸单乙酯、富马酸二乙酯、对苯二甲酸二甲酯、对苯二甲酸二乙酯。富马酸单乙酯还称作 (E)-丁烯二酸二甲酯并具有化学式 $C_6H_8O_4$ 。富马酸二乙酯还称作 (E)-2-丁烯二酸二乙酯并具有化学式 $C_8H_{12}O_4$ 。对苯二甲酸二甲酯和对苯二甲酸二乙酯分别具有化学式 $C_{12}H_{14}O_4$ 。

[0040] 按照本发明的方法，在步骤 a) 中的单体获自选自下组的直链醚：聚乙二醇和它的衍生物。聚乙二醇 (PEG) 还被称为聚环氧乙烷 (PEO) 或聚氧乙烯 (POE)，是指环氧乙烷的低聚物或聚合物。

[0041] 它们的衍生物是指在任何位置由烷基、链烯基、炔基、酰基、环烷基、环炔基取代的单体。取代基可以携带有机基团。

[0042] 具有低玻璃化转变温 (T_g) 的可吸收聚合物网络和无定形低聚物可以基于碳酸三亚甲基酯 (TMC)、D,L-丙交酯 (DLLA)、和 ϵ -己内酯 (CL) 单体以及聚 (癸二酸甘油酯)，并已由数个组发展并且显示弹性体性能。在存在光引发剂下当 UV 照射时，或通过游离基聚合的热或氧化还原引发，具有 (甲基)丙烯酸酯基或延胡索酸酯基的这些相对低分子量聚合物的末端官能化可以形成网络。以这种方式获得的柔性网络的最终拉伸强度和断裂伸长值

随着大分子单体分子量和交联之间的分子量的增加而显著增加。

[0043] 按照本发明的方法,在步骤 a) 中的聚合物组合物包含按总共聚物的摩尔百分比计,40% 摩尔至 85% 摩尔,优选 50% 摩尔至 70% 摩尔,更优选 60% 摩尔至 70% 摩尔的环状或直链碳酸酯单体含量。碳酸酯可以是碳酸三甲基酯。

[0044] 按照本发明的方法,交联自由基引发剂选自下组:光引发剂、热引发剂、氧化还原引发剂。自由基引发剂可以是任何可商购引发剂。

[0045] 在本发明的一种更优选的实施方式中,这些方法包括在步骤 b) 中,按聚合物组合物的总重量的重量百分比计,0.001% wt 至 0.1% wt,优选 0.005% wt 至 0.075% wt,更优选 0.01% wt 至 0.05% wt,最优选 0.025% wt 的自由基引发剂。

[0046] 在本发明的又另一种优选的实施方式中,步骤 b) 包含溶剂,该溶剂是丙酮、二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、碳酸亚乙酯、碳酸亚丙酯、二甲基亚砜、甲苯、苯、四氢呋喃或 1,4- 二噁烷。丙酮具有化学式 CH_3COCH_3 , 二氯甲烷具有化学式 CH_2Cl_2 , 氯仿具有化学式 CHCl_3 , 四氯化碳具有化学式 CCl_4 。碳酸亚乙酯和碳酸亚丙酯分别是乙二醇或丙二醇和碳酸的酯。它们具有化学式 $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$ 和 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ 。二甲基亚砜 (DMSO) 是化学式为 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ 的有机硫化合物。苯和甲苯是化学式分别为 C_6H_6 和 C_7H_8 的芳烃。四氢呋喃 (THF) 具有化学式 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ 。1,4- 二噁烷具有化学式 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 。

[0047] 按照本发明的方法,在步骤 d) 中的照射是紫外线、可见光、红外、微波、或 γ 照射。紫外线照射具有 1 至 400nm 的波长,可见光照射具有 400 至 800nm 的波长,并且红外照射具有 0.8 μm 至 300 μm 的波长。微波照射具有 300MHz (0.3GHz) 至 300GHz 的频率。

[0048] 在本发明的一种优选实施方式中, γ 照射包括 10 至 150kGy, 优选 20 至 120kGy, 更优选 25 至 100kGy 的辐射。KGy 是指千戈瑞 (辐射的测量单位)。辐射源可以是钴⁶⁰、或任何其他 γ 源。

[0049] 按照本发明的方法,在步骤 c) 中的聚合物组合物的所期望的形状是在 20 °C 至 200 °C, 优选 100 °C 至 180 °C, 更优选 130 °C 至 150 °C, 最优选 140 °C 的温度下,通过压缩模制、挤出、注射模制或铸造 (铸膜, casting) 来获得。可以通过压缩模制来获得聚合物薄膜, 上述压缩模制是一种模塑方法, 其中首先将通常预热的模制材料放入开放的、加热的模腔中。通过顶柱塞或塞构件来闭合模具, 施加压力以迫使材料接触所有模具区, 同时保持加热和加压直到模制材料固化。挤出是一种方法, 其用来产生具有固定横截面形状的物体。将材料推动或拉动通过具有所期望的横截面的模具。相对于其他制造过程, 这种过程的两个主要优点是它能够产生非常复杂的横截面和加工脆性材料, 这是因为材料仅受到压缩和剪切应力。它还形成具有极好表面光洁度的成品部件。注射模制是用于生产聚合物材料部件的制造过程。将材料送入加热机筒中, 混合, 并迫使进入模腔, 在此它冷却并且硬化成模腔的形状。在设计产品以后, 通常用钢或铝来制造模具并加以精密机械加工以形成所期望部件的特点。注射模制广泛用于制造各种各样的部件。铸造 (铸膜) 可以是通过溶剂浇注。溶剂浇注是通过以下步骤用于形成热塑性物品的过程: 将阳模浸渍到树脂的溶液或分散液中并抽走溶剂以留下附着于模具上的一层塑料薄膜。

[0050] 按照本发明的方法,在步骤 c) 中聚合物组合物的所期望的形状是薄膜, 该薄膜具有 1 μm 至 1000 μm 的厚度, 优选 10 μm 至 750 μm , 更优选 50 μm 至 600 μm 。

[0051] 在一种优选实施方式中,聚合物组合物的制备包括开环聚合和 / 或缩聚。

[0052] 开环聚合是加成聚合的一种形式，其中聚合物的末端作为反应中心，其中通过增长，另外的环状单体进行连接以形成更大的聚合物链。用引发剂和催化剂对一些环状化合物的处理造成环的裂解，接着聚合，以产生低聚物或聚合物。通常在惰性条件下（氩气、氮气或真空）以及在加热条件下进行反应。

[0053] 缩聚是一种化学缩合，通过连接单体分子并释放小分子（如水）导致聚合物的形成。

[0054] 在一种更优选的实施方式中，在本发明的方法中聚合物组合物的制备是在100°C至160°C的温度下进行，更优选120°C至150°C。

[0055] 按照另一个方面，可以通过本发明的方法来获得可降解聚合物网络。

[0056] 按照本发明的另一个方面，可降解聚合物网络用于涂覆表面，作为用于热绝缘和/或用于抗氧化绝缘的保护层，用于包装材料的制造。

[0057] 按照本发明的另一个方面，可降解聚合物网络用于制备组织工程、细胞培养、或药物递送中的植入物。

[0058] 通过附图和实施例来进一步描述本发明。附图和实施例用来说明本发明而并不旨在限制它的范围。

附图说明

[0059] 附图

[0060] 在实施例中，参照附图，其中：

[0061] 图1. 初始聚合物分子量和照射剂量对在真空中通过 γ 照射交联的PTMC薄膜的凝胶含量(A)以及在氯仿中的溶胀比(B)的影响。

[0062] 图2. 用于通过 γ -照射不同初始分子量的PTMC薄膜所制备的网络的Charlesby-Pinner图(A)，以及初始聚合物分子量对断链的辐射化学产率相对于交联的比率($(G(s)/G(x))$)以及对可以获得的最大凝胶百分比($(1-s)_{max}$)的影响(B)。

[0063] 图3. 加入PETA对在25kGy下当照射不同初始分子量的PTMC聚合物时形成的PTMC网络的凝胶含量(A)以及在氯仿中的平衡溶胀比(B)的影响。

[0064] 图4. 初始分子量、照射剂量、和PETA含量对PTMC薄膜的弹性模量(A)、屈服强度(B)、断裂应力(C)、和永久变形(D)值的影响。

[0065] 图5. γ 照射、PETA含量、和乙醇提取对PTMC₈₈(A)和PTMC₄₄₃(B)的应力-应变行为的影响(为了清楚起见，将曲线偏移)。

[0066] 图6. 在直接或间接接触PTMC网络下培养的成纤维细胞的存活率。在存在5wt% PETA下通过照射不同分子量的PTMC薄膜来制备网络。开始的两个条棒分别表示空白(仅培养基)和阳性对照的细胞存活率。

[0067] 图7. 在存在(5wt%)和不存在PETA下 γ 照射的PTMC₄₄₃薄膜在胆固醇酯酶(CE)水溶液中的侵蚀。该图显示随时间推移的相对厚度(A)和相对质量(B)以及相对厚度和相对质量之间的关系(C)。

[0068] 图8. 共聚物组成和加入PETA对通过 γ 照射(25kGy)P(TMC-DLLA)共聚物薄膜所形成的网络的凝胶含量(A)和溶胀比(B)的影响。

[0069] 图9. 在直接或间接接触未提取的共聚物网络下培养的成纤维细胞的存活率。在

25kGy 下存在 5wt% PETA 下通过照射共聚物薄膜来制备网络。开始的两个条棒分别表示空白（仅培养基，阴性对照）和阳性对照的细胞存活率。

[0070] 图 10. SEM 显微照片,显示了在培养 15 天以后,未照射的 P(TMC-DLLA) 共聚物薄膜 (A、C、E、G、I) 和通过 γ 照射包含 5% PETA 的共聚物薄膜所制备的未提取网络薄膜 (B、D、F、H、J) 的巨噬细胞介导的侵蚀。

[0071] 图 11. 在培养 14 天以后,在不同的未照射的 P(TMC-DLLA) 共聚物薄膜上 (A),以及在通过 γ 照射包含 5% PETA 的共聚物薄膜所制备的未提取网络薄膜上 (B),巨噬细胞的密度。

[0072] 图 12. UV 照射时间和初始聚合物分子量对 PTMC 均聚物薄膜的凝胶含量 (A) 和在氯仿中的溶胀比 (B) 的影响,所述 PTMC 均聚物薄膜包含 5wt% PETA 和 0.025wt% 光引发剂并且暴露于 254nm UV 光。值表示为平均值 \pm 标准偏差, ($n = 3$)。

[0073] 图 13. 在循环拉伸试验中光致交联对 PTMC 聚合物和网络的滞后行为的影响。曲线显示在 (PTMC_x) 以前以及在光致交联以后 (在存在 PETA 和光引发剂下 UV 曝光 (A、B、C) 300 分钟),重复 (20 个循环) 施加 50% 应变于不同分子量的 PTMC 均聚物上。图 D 显示在动态负载下光致交联掺合物的行为。

[0074] 图 14. 光致交联以及与嵌段共聚物掺合对基于 PTMC₃₇₃的网络的体外酶侵蚀作用的影响:随时间推移相对质量降低 (A),以及随时间推移相对厚度减小 (B)。

[0075] 图 15. 由 PTMC₃₇₃制备的光致交联多孔支架的 SEM 显微照片。A 和 B 显示支架的顶视图。纤维的微孔性示于 C 中。支架的横截面示于 D 中。

[0076] 图 16. 显微照片,显示了在细胞接种以后 (A、D、G)、以及在 hMSC 培养 5 天 (B、E、H) 和 10 天 (C、F、I) 以后,在由 PTMC₃₇₃(A、B、C)、PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC(D、E、F)、PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC(G、H、I) 制备的 3D 制造的和光致交联的支架之上 / 之中的活细胞。每个支架的横截面示于插图中。

[0077] 图 17. SEM 显微照片,显示了在 hMSC 培养 5 天 (A、D、G) 和 10 天 (顶视图 B、E、H, 横截面 C、F、I) 以后,在由 PTMC₃₇₃(A、B、C)、PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC(D、E、F)、PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC(G、H、I) 制备的 3D 制造的和光致交联的支架之上 / 之中的 hMSC。

[0078] 图 18. 在 3D 制造的和光致交联的 PTMC 类支架中培养的 hMSC 的葡萄糖消耗和乳酸生产。

[0079] 图 19. 合成的双臂 PTMC 大分子单体 (DMAC) (A)、三臂 PTMC 大分子单体 (TMAC) (B)、和直链 PTMC 聚合物 (C) 的化学结构。

[0080] 图 20. Irgacure® 2959 光引发剂浓度对通过 UV 照射 PTMC 薄膜 120 分钟所获得的网络的凝胶含量和溶胀比的影响。

[0081] 图 21. 所使用的照射时间和交联剂对光致交联的 PTMC 网络的凝胶含量 (A)、和溶胀比 (B) 的影响。在所有 PTMC 薄膜中, PI/(聚合物中 TMC 重复单元) 比率是 1/1000。PTMC-PI 薄膜仅包含光引发剂而不包含 PTMC 大分子单体。对于包含 DMAC 和 TMAC 的 PTMC 薄膜而言, 甲基丙烯酸酯 /(聚合物中 TMC 重复单元) 比率是 1/50。

[0082] 图 22. 代表性曲线,显示了直链和光致交联的提取的 PTMC 网络薄膜的应力 - 应变行为。在所有 PTMC 薄膜中, PI/(聚合物中 TMC 重复单元) 比率是 1/1000。PTMC-PI 薄膜仅包含光引发剂而不包含 PTMC 大分子单体。对于包含 DMAC 或 TMAC 的 PTMC 薄膜而言, 甲

基丙烯酸酯 / (聚合物中 TMC 重复单元) 比率是 1/50。为了清楚起见, 将曲线偏移。

[0083] 图 23. 直链 PTMC 和 UV 交联的 (120 分钟) 提取的 PTMC 网络薄膜 (仅包含光引发剂或光引发剂和 PTMC 大分子单体) 的滞后行为。在所有 PTMC 网络薄膜中, PI / (聚合物中 TMC 重复单元) 比率是 1/1000。PTMC-PI 网络薄膜仅包含光引发剂而不包含 PTMC 大分子单体。对于包含 DMAC 或 TMAC 的 PTMC 网络薄膜而言, 甲基丙烯酸酯 / (聚合物中 TMC 重复单元) 比率是 1/50。为了清楚起见, 将曲线偏移。

[0084] 图 24. SEM(左) 和 CLSM(右) 显微照片, 显示了在通过 UV 照射 120 分钟交联的 PTMC-PI-TMAC(1/50 甲基丙烯酸酯 / 聚合物中 TMC 重复单元) 薄膜上培养 28 天以后的 hMSC。PI 相对于聚合物中 TMC 重复单元的比率是 1/1000。在此图中, 细胞核染成蓝色并且肌动蛋白细胞骨架染成绿色。

[0085] 图 25. SEM 显微照片, 显示了由直链 PTMC 制备的薄膜 (A、B)、以及由光致交联 (120 分钟) 的提取的薄膜的巨噬细胞介导的侵蚀, 所述光致交联 (120 分钟) 的提取的薄膜具有不同比率的甲基丙烯酸酯 / (聚合物中 TMC 重复单元) :PTMC-PI(C、D)、PTMC-PI-TMAC(1/200)(E、F)、PTMC-PI-TMAC(1/100)(G、H)、PTMC-PI-TMAC(1/50)(I、J) 网络薄膜。在所有 PTMC 网络薄膜中, PI / (聚合物中 TMC 重复单元) 比率是 1/1000。PTMC-PI 网络薄膜仅包含光引发剂而不包含 PTMC 大分子单体。

[0086] 图 26. 在由直链 PTMC 制备的薄膜、以及光致交联 (120 分钟) 的提取的网络薄膜上培养 14 天以后巨噬细胞的密度, 所述光致交联 (120 分钟) 的提取的网络薄膜具有不同比率的甲基丙烯酸酯 / (聚合物中 TMC 重复单元)。在所有 PTMC 网络薄膜中, PI / (聚合物中 TMC 重复单元) 的比率是 1/1000。PTMC-PI 薄膜仅包含光引发剂而不包含 PTMC 大分子单体。

具体实施方式

[0087] 实施例

[0088] 实施例 1

[0089] 材料

[0090] 按原接收状态使用聚合物级碳酸 1,3- 三亚甲基酯 (TMC, Boehringer Ingelheim, 德国)、和辛酸亚锡 (Sigma, 美国)。按原接收状态使用三丙烯酸季戊四醇酯 (PETA, Aldrich, 美国)。溶剂 (Merck, 德国, 或 Biosolve, 荷兰) 具有分析级。

[0091] 聚合物合成

[0092] 在真空下在 130°C 下, 利用辛酸亚锡作为催化剂, 通过 TMC 单体的开环聚合持续 3 天来合成聚 (碳酸 1,3- 三亚甲基酯) (PTMC) 均聚物。为了控制分子量, 不同量的己二醇用作引发剂。通过溶解于氯仿并沉淀到乙醇中, 用新鲜乙醇洗涤并在室温下在真空下干燥, 来纯化聚合物。

[0093] 聚合物表征

[0094] 使用 CDCl₃ (Merck, 德国), 通过质子核磁共振 (¹H-NMR) 光谱仪 (300MHz, Varian Innova, 美国) 来确定单体转化率。

[0095] 通过凝胶渗透色谱法 (GPC, Viscotek 美国) 来确定纯化的聚合物的数均和重均分子量 (分别为 \overline{M}_n 和 \overline{M}_w)、多分散指数 (PDI) 和特性粘度 ([η])。设备配备有串联放置

的 ViscoGEL I-guard-0478、ViscoGELI-MBHMW-3078、和 ViscoGEL I-MBLMW-3078 柱, 以及带有折光检测器、粘度检测器、和光散射检测器的 TDA302 三检测器阵列 (TripleDetector Array), 从而可以测定绝对分子量。在 30℃下利用氯仿作为洗脱剂, 在 1.0ml/分钟的流速下进行所有测定。

[0096] PTMC 薄膜的制备

[0097] 在 140℃下利用厚度为 500 μm 的不锈钢模具, 使用实验室压制机 (Fonteijne THB008, 荷兰) 来压缩模制纯化的聚合物。在大约 25kg/cm²下模制薄膜, 然后利用冷水骤冷至室温。为了在存在 PETA 下交联 PTMC 薄膜, 将纯化的聚合物和 PETA(1 或 5wt% 的聚合物) 溶解于二氯甲烷以实现良好的混合。在蒸发溶剂以后, 以与纯化聚合物相同方式来制备压缩模制的薄膜。这些包含 PETA 的 PTMC 薄膜完全溶于氯仿, 从而证实了在这些条件下没有发生交联。

[0098] γ 照射、网络形成和网络表征

[0099] 在真空下将压缩模制的薄膜密封于层压的聚乙烯 / 聚酰胺袋 (Hevel Vacuum B.V., 荷兰) 中并暴露于来自 ⁶⁰Co 源 (Isotron B.V., Ede, 荷兰) 的 25、50 或 100kGy γ 照射。

[0100] 为了确定平衡溶胀比和凝胶含量, 从照射的薄膜中冲切出盘状试样 (厚度为 500 μm, 直径为 10mm) 并放入 30mL CHCl₃中持续 1 周, 在 3 天以后更换溶剂一次。这个过程确保溶胶部分的完全去除。然后称重溶胀的凝胶, 在室温下在真空下干燥至恒重并再次称重。分别按照方程 (1) 和 (2), 计算凝胶和溶胶部分:

[0101]

$$\text{凝胶部分}(\%) = \frac{m_d}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

[0102]

$$\text{溶胶部分}(\%) = \left(1 - \frac{m_d}{m_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

[0103] 其中, m_d是干燥的 (提取的) 样品的质量并且 m₀是溶胀以前试样的质量。

[0104] 按照方程 (3) 来计算溶胀比 (q)。

$$q = 1 + \rho_p \times \left(\frac{m_s}{m_d \times \rho_s} - \frac{1}{\rho_s} \right) \quad (3)$$

[0106] 其中, m_s是提取的和溶胀的样品的质量, 并且 ρ_s和 ρ_p分别是氯仿 (1.48g/cm³) 和 PTMC(1.31g/cm³) 的密度。

[0107] 热性能和机械性能

[0108] 通过差示扫描量热法 (DSC) 来确定不同 PTMC 薄膜的玻璃化转变温度 (T_g)。在 0 或 25kGy 下照射包含 0 或 5wt% PETA 的薄膜。在利用乙醇来提取溶胶部分以后, 还确定包含 PETA 的照射的薄膜的 T_g。利用 PerkinElmer Pyris1DSC, 在 -50 至 200℃的温度范围内, 以 10℃/分钟的加热速率, 来分析样品 (5-10mg)。在第一次扫描后, 以 300℃/分钟将样品骤冷至 -50℃并在 5 分钟以后记录第二次扫描。由第二次扫描确定报告值。铟、铅、和环己烷用作仪器温度校准的标准品。

[0109] 按照 ASTM-D882-91, 确定熔化压制的和照射的 PTMC 薄膜的机械性能, 重复三次。

以 50mm/ 分钟的十字头速度,操作配备有 500N 测压元件 (load cell) 的 Zwick Z020 拉伸测试仪 (Ulm, 德国)。初始夹头间距离是 50mm 并施加 0.01N 的预加载。试样变形源自夹头间距离;因此,提供的杨氏模量 (由应力 - 应变曲线的初始斜率计算) 值仅给出聚合物刚度的指示。

[0110] 为了评估它们在动态负载条件下的行为,在循环试验中,以 50mm/ 分钟,将试样 ($n = 1$) 重复 (20x) 伸长至 50% 应变。在 2h 恢复期以后,由第 21 个循环的应力 - 应变图估计永久变形。在这些实验中,施加 0.01N 的预加载,形变源自夹头间距离。数值的误差大约为 0.5% 应变。

[0111] 按照 ASTM1938, 使用裤形试样 ($n = 3$) 来确定薄膜的撕裂强度。试样的尺寸是 $75 \times 25 \times 0.5\text{ mm}$, 具有一半通过试样宽度的 50mm 长度切口。以 250mm/ 分钟的速度进行测量, 重复三次。将报告的最大撕裂强度针对试样的厚度进行归一化处理并以 N/mm 为单位来表示。

[0112] 为了比较,如上所述,还确定了硅氧烷弹性体 (Sylgard[®] 184, DowCorning, 美国) 薄膜的机械性能。按照制造商的说明,将厚度为大约 $500 \mu\text{m}$ 的硅氧烷弹性体薄膜浇注,然后热固化。

[0113] 细胞存活率测定

[0114] 利用直接和间接 MTS [3-(4,5-二甲基噻唑-2 基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑] 测定法来评估 γ 照射的和未提取的 PTMC 薄膜 (包含 5wt% PETA) 的可能的细胞毒性。简言之,使用 96 孔板 (5000 个细胞 / 孔) 和 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 来培养小鼠皮肤成纤维细胞 (NIH3T3 细胞系)。在 37°C 和 5% CO_2 下温育细胞三天。

[0115] 对于间接细胞毒性评估而言,在 37°C 和 5% CO_2 下将每种薄膜的未提取圆盘 ($n = 3$, 直径 8mm, 厚度 $500 \mu\text{m}$) 与 $500 \mu\text{l}$ DMEM2 一起温育 24 小时以提取任何可浸出成分。在细胞培养 3 天以后,用包含可浸出物的 DMEM 培养基更换培养基。在直接细胞毒性测定中,将未提取的圆盘 ($n = 3$) 直接放置在培养中的细胞上。在两种测定中,在培养另外两天以后,测量可溶于培养基的甲臜 (formazan) 的吸光度。仅用 DMEM 培养基 (阴性对照) 温育的细胞培养物获得的平均值被标准化为 100% 细胞存活率。乳胶橡胶 (Hilversum Rubber Factory, Hilversum, 荷兰) 用作阳性对照。

[0116] 体外酶侵蚀研究

[0117] 使用来自猪胰腺的胆固醇酯酶 (CE) 来研究 γ 照射的 PTMC 薄膜的酶水解。使用包含作为杀菌剂的 0.02wt% NaN_3 (Sigma, 美国) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH = 7.4), 以 $20 \mu\text{g/mL}$ 的浓度, 制备 CE 酶水溶液。将未提取的盘状薄膜 (10mm 直径, 大约 $500 \mu\text{m}$ 厚度, $n = 3$ /时间点) 放入包含 1ml 的酶溶液的小瓶中并在 37°C 下调节。每两天更换培养基一次。利用 PBS (pH7.4, $n = 1$ /时间点) 进行没有酶的对照实验。在冲洗和吸干它们的表面以后,在预定时间点,确定湿试样的质量和厚度。在真空下在室温下干燥试样至恒重以后再次进行测量。

[0118] 结果

[0119] 评估了初始聚合物分子量和三丙烯酸季戊四醇酯含量对 γ 照射交联行为以及对产生的 PTMC 网络的物理性能的影响。通过改变引发剂浓度 (从 0 至 0.1 摩尔%), 合成了

分子量为 80–450 kg/mol 的 PTMC 聚合物（参见表 1，针对每种聚合物在索引中给出分子量）。在所有情况下，单体转化率均高于 99%。获得的聚合物的分子量低于由单体相对于引发剂比例可以预期的（假设每个羟基引发一个增长的聚合物链）。这可能是由于由包含杂质（如水）的羟基引发聚合反应。在压缩模制以后，获得略有降低的 \overline{M}_n^a 值和较高的多分散指数。

[0120] 表 1 在压缩模制之前和之后，合成的 PTMC 均聚物的特性。在括号中给出压缩模制的聚合物的数值。

[0121]

聚合物	引发剂含量 (mol %)	\overline{M}_n^a (kg/mol)	\overline{M}_w^a (kg/mol)	PDI ^a	$[\eta]^a$ (dL/g)
PTMC ₈₈	0.1	88 (79)	139 (143)	1.58 (1.81)	1.7 (1.8)
PTMC ₁₅₇	0.05	157 (144)	228 (217)	1.45 (1.51)	2.6 (2.6)
PTMC ₂₇₇	0.025	277 (230)	407 (382)	1.47 (1.66)	4.4 (4.3)
PTMC ₄₄₃	0	443 (436)	620 (698)	1.48 (1.60)	6.6 (7.1)

[0122] ^a在 30°C 下使用氯仿作为洗脱剂通过 GPC 确定的

[0123] 通过 γ 照射交联 PTMC

[0124] 在真空下在 25、50 或 100 kGy 的剂量下， γ 照射具有不同分子量的压缩模制的 PTMC 薄膜。图 1A 和 1B 给出凝胶含量和在氯仿中的平衡溶胀比。这些图显示，在给定照射剂量下，随着初始 PTMC 分子量增加，获得具有较高凝胶含量和较低溶胀比的网络。在 25 kGy 下，PTMC₈₈ 和 PTMC₁₅₇ 根本不交联，而 PTMC₂₇₇ 和 PTMC₄₄₃ 则分别具有 22 ± 1 和 60 ± 1% 的相对较低凝胶含量。对于所研究的聚合物分子量的范围，在 100 kGy 的照射剂量下，凝胶含量为 15 ± 4% 至 73 ± 1%，并且溶胀比为 327 ± 32 至 22 ± 1。

[0125] 在图 1A 和 1B 中，还可以看到，对于给定分子量，随着照射剂量增加，凝胶含量会增加而溶胀比则降低。增加照射剂量对较低分子量的 PTMC 具有更大影响。例如，在照射 PTMC₄₄₃ 期间，将剂量从 25 增加至 100 kGy 会将凝胶含量从 60 ± 1g 增加至 73 ± 1%，而对于 PTMC₁₅₇，则将凝胶含量从 0 增加至 42 ± 2%。同时，对于 PTMC₄₄₃，溶胀比从 45 ± 1 降低至 22 ± 1，并且对于 PTMC₁₅₇，则从 537 ± 9 (50 kGy) 降低至 92 ± 4。可以得出结论：可以通过增加聚合物的初始分子量或通过增加 γ 照射剂量来增加 PTMC 网络的凝胶含量和密度。

[0126] 按照方程 4 来评估不同初始分子量的 PTMC 聚合物的交联行为，上述方程使照射剂量 (r) 与所形成的网络的溶胶部分 (s) 相关联（假设断链和交联事件均是随机发生以及它们的数目是正比于照射剂量）：

$$[0127] s + \sqrt{s} = \frac{G(s)}{2G(x)} + \frac{1}{2.08 \times 10^{-6} \times G(x) \times \overline{M}_n \times r} \quad (4)$$

[0128] 其中，G(s) 和 G(x) 分别是剪断和交联的辐射化学产率，并被定义为剪断和交联事件数目 / 100 eV。因为每个交联涉及两个链，所以断链密度相对于交联密度的比率是 G(s) / 2G(x)。对于具有随机的、单峰分子量分布的聚合物而言，获得在 $s + \sqrt{s}$ 和照射剂量的倒数之间的线性关系。在图 2A 中，针对在此研究中所使用的 PTMC 聚合物给予这样的曲线。 $s + \sqrt{s}$ 外推至无限的照射剂量可以确定在方程 4 中给出的剪断相对于交联的辐射化学产率的比率。针对 PTMC₄₄₃、PTMC₂₇₇、和 PTMC₁₅₇ 确定的比率 G(s) / G(x) 分别是 2.1、2.0、和 1.4。

[0129] 将曲线外推至零凝胶含量 ($s + \sqrt{s} = 2$)，可以估计最小凝胶剂量。PTMC₄₄₃、PTMC₂₇₇

和 PTMC₁₈₇ 的最小凝胶剂量被确定分别为 6.3、16.7 和 36.3kGy。

[0130] 可以利用以下表达式来确定可以获得的最大凝胶部分 ((1-s)_{max}) :

$$[0131] (1-s)_{\max} = \frac{1}{2} \times \left[1 - \frac{G(s)}{G(x)} + \left(1 + \frac{2G(s)}{G(x)} \right)^{1/2} \right] \quad (5)$$

[0132] 在图 2B 中, 可以清楚地看到, 随着 PTMC 聚合物的初始分子量增加, G(s)/G(x) 比率降低, 而 (1-s)_{max} 则增加。具有最高分子量的聚合物, PTMC₄₄₃, 具有断链相对于交联的最低比率 (1.4) 以及最高的可获得的凝胶含量 (77%)。

[0133] 已通过电子自旋共振 (ESR) 研究了通过照射聚乙烯和线性脂族聚酯所形成的自由基的特性。对于聚乙烯而言, 夺氢反应时形成的烷基可以结合以形成交联, 虽然还可以发生主链断裂。因此, 照射可以同时导致形成较低分子量的聚合物网络、分支结构和聚合物链。当照射聚 (ε-己内酯) 和聚 (乙交酯) 时也形成烷基。然而, 观测到形成气体产物 (一氧化碳、二氧化碳和氢气) 表明当照射时也发生 C-O 键断裂。

[0134] 当在 25kGy 下照射 PTMC₈₈ 和 PTMC₁₅₇, 各自的 \overline{M}_n 值降低到 45 和 127kg/mol, 而 \overline{M}_w 值则增加到 173 和 394kg/mol。各自的多分散指数 (PDI) 从 1.81 和 1.51 增加至 3.84 和 3.10, 这表明分支 PTMC 结构的形成。当在 50kGy 下照射时, PTMC₈₈ 的 PDI 值甚至进一步增加至 6.99。

[0135] 在存在三丙烯酸季戊四醇酯 (PETA) 下, 通过 γ 照射交联 PTMC

[0136] 当 γ 照射时 PTMC 发生交联, 但为了达到高凝胶含量, 则需要非常高分子量的聚合物。在我们合成的最高分子量 PTMC 聚合物 (443kg/mol) 的情况下, 在 100kGy 下的 γ 照射导致凝胶含量为 73% 的网络。从理论上讲, 估计表明, 可以预期 77% 的最大凝胶百分比 (图 1A、2B 和方程 5)。

[0137] 一般而言, 在存在交联剂 (其降低断链相对于交联事件的比率) 下, 通过照射, 可以增加所形成网络的凝胶百分比。为了增强当 γ 照射时 PTMC 的网络形成, PETA 用作交联剂。就其本身而言, 当在 25kGy 下进行 γ 照射时, PETA 产生 99.8 ± 0.1% 的凝胶百分比。

[0138] 图 3A 和 3B 显示, 通过在 25kGy 下 γ 照射不同初始分子量的 PTMC (包含不同量的 PETA (0、1、5wt%)), 所制备的网络的凝胶含量和平衡溶胀比。可以清楚地看到加入 PETA 的作用: 产生的 PTMC 网络具有大大增加的凝胶含量和降低的溶胀比。当将 PETA 加入具有相对较低分子量的 PTMC 时, 上述作用是最明显的。对于包含 0、1、和 5wt% PETA 的 PTMC₈₈, 在 25kGy 下照射以后网络的凝胶含量分别从 0% 增加至 31 ± 1% 和 73 ± 1%。对于 PTMC₄₄₃, 各自的值为 60 ± 1%、76 ± 1%、和 96 ± 1%。PETA 的加入还导致更密集交联的 PTMC 网络。在 25kGy 下照射 PTMC₄₄₃ 以后, 对于包含 0、1、和 5wt% PETA 的薄膜而言, 网络的溶胀比分别为 45 ± 1、22 ± 1、和 4.6 ± 0.2。

[0139] 对于所研究的 PTMC 聚合物分子量的范围而言, 对于包含 1 和 5% PETA 的薄膜, 当在 25kGy 下照射时形成的网络的凝胶含量分别为 31 ± 1 至 76 ± 1% 以及 73 ± 1 至 96 ± 1%。在氯仿中的相应溶胀比为 75 ± 1 至 22 ± 1 以及 7.1 ± 0.1 至 4.6 ± 0.2。这表明, 通过加入 PETA, 大大增强了通过 γ 照射获得的 PTMC 交联的程度。通过调节 PETA 含量, 可以容易地改变网络的凝胶含量和网络密度。

[0140] 在 50 或 100kGy 的较高照射剂量下, 照射包含 5wt% PETA 的 PTMC 薄膜, 导致所形

成网络较低的凝胶含量。当照射剂量从 25kGy 增加到 100kGy 时, 使用 PTMC₄₄₃ 形成的网络的凝胶含量从 96% 降低到 87%。很可能的是, 在 25kGy 下, 所有 PETA 已被耗尽, 并且不能期望交联效率的进一步增强。实际上, 包含 PETA 的 γ 照射的 PTMC 薄膜的提取物的 NMR 谱并未揭示存在包含未反应的丙烯酸酯基的化合物。

[0141] 在存在 5wt% PETA 下, 通过 γ 照射制备的不同 PTMC 网络的溶胀比为 4.6 至 7.1。这些数值可以与前面提到的由分子量为 1500 和 17200g/mol 的三臂 PTMC 大分子单体制备的光致交联的网络 (它们分别具有 3.3±0.4 和 9.8±0.4 的溶胀比) 相比。作为粗糙近似, 在存在 5wt% PETA 下, 通过照射 PTMC 制备的网络的交联之间的分子量可以预期为大约 1500 至 3600g/mol。

[0142] γ 照射的 PTMC 网络的热性能和机械性能

[0143] 所有 PTMC 聚合物均是无定形的, 具有低于室温的玻璃化转变温度 (T_g)。压缩模制的、未照射的 PTMC 薄膜的 T_g 不依赖于聚合物分子量并且为 -17.7 至 -18.5°C。当未将 PETA 加入聚合物时, 在 25kGy 下的 γ 照射对薄膜的 T_g 并没有显著影响。5wt% PETA 的加入的确会增加 γ 照射的 PTMC 薄膜的玻璃化转变温度。这可能是由于更密集网络的形成。在提取以前, 这些薄膜的 T_g 值为 -16.2 至 -16.7°C, 而在用乙醇提取以后数值略高 (-14.7 至 15.1°C)。在所研究的温度范围 (-50 至 200°C) 内, 薄膜的热分析仅显示单一 T_g , 表明 PETA 被均匀地结合到 PTMC 网络中。

[0144] 初始分子量和网络形成对 PTMC 薄膜的弹性模量 (E- 模量)、屈服强度和断裂应力值的影响示于图 4A、4B 和 8C, 而 PTMC₈₈ 和 PTMC₄₄₃ 的代表性的应力 - 应变曲线则分别示于图 5A 和 5B。

[0145] 在未交联状态下, 弹性模量、屈服强度和断裂应力值随聚合物分子量的增加而增加。所有 PTMC 薄膜是柔性的; PTMC₈₈ 的弹性模量和屈服强度值分别是 6.3±0.2 和 1.2±0.1MPa, 而对于 PTMC₄₄₃, 这些数值则分别为 7.2±0.1 和 2.8MPa (图 4A 和 4B)。断裂应力从 PTMC₈₈ 的 0.7±0.1MPa 增加至 PTMC₄₄₃ 的 25.2±3.7MPa。以前已观测到机械性能对 PTMC 分子量的这种依赖性。当在 25kGy 下 γ - 交联不同 PTMC 薄膜时, 弹性模量和屈服强度值分别降低为 5.5±0.1 至 6.7±0.2MPa 以及 0.9±0.1 至 2.0±0.1MPa (图 4A 和 4B)。类似地, 这些未提取网络的断裂应力 (0.7±0.1 至 14±0.4MPa) 低于未交联薄膜的断裂应力 (图 4C 以及图 5A、5B)。这些数值接近硅氧烷弹性体薄膜的数值, 其中上述硅氧烷弹性体薄膜具有 2.6±0.2MPa 的弹性模量和 7.3±0.5MPa 的断裂应力拉伸强度。

[0146] 增加照射剂量会进一步降低 PTMC 薄膜的弹性模量和屈服强度。在 100kGy 下, 薄膜的弹性模量和屈服强度分别为 2.9±0.2 至 4.6±0.2MPa 和 0.5 至 1.2MPa。断裂应力值也较低, 为 0.5±0.1 至 2.7±0.2MPa。虽然增加照射剂量会产生较高凝胶含量和网络密度, 但它还导致较低强度和刚度。这可能是由于在 γ - 照射期间与交联同时发生的断链。

[0147] 通过将 PETA 加入网络结构, 可以防止弹性模量和断裂应力的降低。在图 4 和 5 中, 还可以看到, 所有 γ 照射的 (未提取的) 包含 5wt% PETA 的 PTMC 网络仍然是非常柔性的和类似橡胶的。弹性模量和屈服强度值分别为 9.5±0.6 至 10.7±0.2MPa (图 4A) 和 3.1±0.1 至 4.9±0.1 (图 4B)。在存在 PETA 下, 当照射时, 观测到 PTMC 网络的断裂应力大量增加。在存在 5wt% PETA 下在 25kGy 下当照射时, PTMC₁₅₇ 的断裂应力非常从 1.4±0.1MPa 显著地增加至 25.0±1.8MPa (图 4C)。在存在 5wt% PETA 下 γ 照射的 PTMC₄₄₃ 的薄膜具有非常高

的最大拉伸强度,为 35.3 ± 0.3 MPa。这使得它可以应用于需要高强度的用途,如韧带的组织工程中。在存在 5wt% PETA 下用乙醇提取制备的 PTMC 网络的溶胶部分会进一步改善最大拉伸强度。PTMC₈₈的断裂应力从 5.5 ± 0.9 增加至 12.4 ± 2.9 MPa(图 4C 和 5A),并且 PTMC₄₄₃的断裂应力增加至 37.7 ± 1.3 MPa(图 4C 和 5B)。提取网络的弹性模量和屈服强度值可与未提取网络的弹性模量和屈服强度值相比。如在实验部分中描述的,在循环变形实验中评估了 PTMC 薄膜的抗蠕变性。图 4D 表明,未交联 PTMC 薄膜的永久变形主要取决于聚合物分子量并且为 11.2% 至 1.2%。最高分子量聚合物是最抗蠕变的。在 25kGy 下的 γ 照射会降低所有聚合物的永久变形。PTMC₄₄₃和 PTMC₂₇₇的照射的未提取薄膜具有与硅橡胶相同的永久变形值(1.0% 应变),表明这些可生物降解弹性体的极好的抗蠕变性。当在 25kGy 下照射 PTMC₈₈时,即使没有观测到凝胶形成,未提取薄膜也具有比未照射的薄膜(11.2%)低得多的永久变形(3.2%)。在存在 5wt% PETA 下,当在 25kGy 下 γ 照射时,未提取 PTMC₈₈ 和 PTMC₁₅₇ 的永久变形值分别进一步下降到 1.4 和 1.6% 应变。这意味着,甚至在相对较低初始分子量的 PTMC 聚合物的情况下,通过 γ 照射,可以获得具有极好抗蠕变性的网络。当用乙醇提取时,所有包含 PETA 的网络的永久变形甚至更低(0.9–1.2%)。

[0148] 评估了 γ 照射对 PTMC₄₄₃ 的抗撕裂扩展性(tear propagation resistance)的影响。未照射的 PTMC₄₄₃ 薄膜具有 1.9 ± 0.2 N/mm 的最大撕裂强度,这个值已经远高于硅氧烷弹性体薄膜的最大撕裂强度(0.21 ± 0.01 N/mm)。当存在 5wt% PETA 下当 γ 照射时,PTMC 网络的抗撕裂性显著增加到 4.2 ± 0.2 N/mm。在用乙醇提取以后,撕裂强度甚至进一步增加到 9.3 ± 2.0 N/mm。

[0149] 与 γ 照射的 PTMC 网络接触的细胞的存活率

[0150] 在存在 5wt% PETA 下,通过直接和间接细胞存活率测定法,评估了在 25kGy 下 γ 照射的(未提取的)PTMC 薄膜的可能的细胞毒性(图 6)。在两种测定中,并没有观测到对细胞形态的不利影响。当成纤维细胞直接接触薄膜时,细胞存活率值非常高,为 87 ± 16 至 117 ± 26 %。另外,在间接测定中,细胞存活率非常高,为 91 ± 8 至 100 ± 7 %。因此确认了,在存在 5wt% PETA 下交联对细胞存活率并不具有不利影响。

[0151] γ 照射的 PTMC 网络的体外酶侵蚀

[0152] 使用胆固醇酯酶(CE)研究了在 25kGy 下照射的未提取的 PTMC₄₄₃ 薄膜的体外酶侵蚀,因为上述酶在 PTMC 的侵蚀方面可能起重要作用。图 7A、7B 和 7C 显示在 CE 水溶液中温育的薄膜的质量和厚度的变化,为时间的函数。包含 5wt% PETA 的照射的 PTMC 薄膜的侵蚀远慢于不包含 PETA 的情况。在三周以后,并不包含 PETA 的薄膜的质量损失为大约 64%,而包含 5% PETA 的薄膜已失去大约 13% 的它们的质量。包含 5wt% PETA 的薄膜的厚度减小也远低于并不包含 PETA 的薄膜的厚度减小(图 7B)。在此酶溶液中的相应侵蚀速率分别为 12.0 ± 2.9 $\mu\text{m}/\text{天}$ 和 3.0 ± 1.6 $\mu\text{m}/\text{天}$ 。对于两种聚合物薄膜,质量的减少和厚度的减小同时发生(图 7C),这意味着表面侵蚀过程。在图 7C 中,厚度的减小似乎是稍低于质量的减少,特别是在稍后的时间点。这可以是在确定薄膜的厚度中的误差的结果(起因于在降解过程中表面的粗糙化)。

[0153] 这些结果显示,在存在 PETA 下,PTMC 的交联是降低 PTMC 网络侵蚀速率的有效方式。这可能是由于包含 PETA 的 PTMC₄₄₃ 薄膜的较高凝胶含量和网络密度。另外,包含 PETA 的 PTMC 网络的较高的水吸收(由于存在于 PETA 中的羟基),可以发挥作用。在 CE 水溶液

中温育 21 天以后,包含 PETA 的薄膜的水吸收是 $3.4 \pm 0.6\%$,而并不包含 PETA 的 PTMC₄₄₃ 网络则吸收 $1.7 \pm 0.4\%$ 的水。已知的是,当吸附于疏水性基质上时这种酶被最大程度地激活。

[0154] 结论

[0155] 在存在三丙烯酸季戊四醇酯 (PETA) 下,通过 γ 照射压缩模制的 PTMC 薄膜,可以获得具有高凝胶含量和高网络密度的柔性 PTMC 网络。加入这种交联剂还导致具有高拉伸强度以及极好的抗撕裂性和抗蠕变性的网络。此外,能够以这种方式来降低 PTMC 网络的酶侵蚀速率。基于直接和间接测定,这些网络对成纤维细胞的存活率并不具有任何不利影响。因此可以得出结论,在存在 PETA 下, γ 照射是用来获得具有弹性体性能的可生物降解 PTMC 网络的非常有效的方法。这些类似橡胶的可生物降解 PTMC 网络非常适合于医疗应用如软组织和心血管组织的工程化,以及控制释放。

[0156] 实施例 2

[0157] 材料

[0158] 按原接收状态使用聚合物级碳酸 1,3- 三亚甲基酯 (TMC, Boehringer Ingelheim, 德国)、聚合物级 D,L- 丙交酯 (DLLA, Purac Biochem, 荷兰)、辛酸亚锡 (Sigma, 美国)、和三丙烯酸季戊四醇酯 (PETA, Aldrich, 美国)。溶剂 (Merck, 德国, 或 Biosolve, 荷兰) 具有分析级。J774A 巨噬细胞 (ATCC-TIB-67) 获自美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection)。培养基, 胎牛血清, Glutamax™ 和青霉素 - 链霉素获自 Invitrogen (Gibco, 美国)。培养一次性用品来自 Nunc (美国) 和 Greiner (德国)。

[0159] 聚合物合成

[0160] 在真空在 130°C 下,利用辛酸亚锡作为催化剂,通过相应单体 (50、60、和 70 摩尔% TMC) 的开环聚合持续三天,来合成聚 (碳酸 1,3- 三亚甲基酯)、聚 (D, L- 丙交酯) 均聚物和 TMC 与 DLLA 的共聚物。通过溶解于氯仿并且沉淀到乙醇或异丙醇中,用新鲜醇洗涤并在室温下在真空下干燥,来纯化聚合物。在 80°C 下在氮气下进一步干燥含有 DLLA 的共聚物直至恒重。

[0161] 聚合物表征

[0162] 使用 CDCl₃ (Merck, 德国), 通过质子核磁共振 (¹H-NMR) 光谱仪 (300MHz, Varian Innova, 美国) 并来确定单体转化率和共聚物组成。

[0163] 通过凝胶渗透色谱法 (GPC, Viscotek 美国) 来确定共聚物的数均和重均分子量 (分别为 M_n 和 M_w)、多分散指数 (PDI) 和特性粘度 ([η])。设置配备有串联放置的 ViscoGEL I-guard-0478、ViscoGELI-MBHMW-3078、和 ViscoGEL I-MBLMW-3078 柱以及具有折光检测器、粘度检测器、和光散射检测器的 TDA302 三检测器阵列 (Triple DetectorArray), 从而可以测定绝对分子量。在 30°C 下使用氯仿作为洗脱剂,在 1.0ml/ 分钟流速下进行所有测定。

[0164] 聚合物薄膜的制备

[0165] 在 140°C 下,在厚度为 500 微米的不锈钢模具中,利用实验室压制机 (Fonteijne THB008, 荷兰), 来压缩模制纯化的聚合物。在大约 25kg/cm² 下模制薄膜,然后利用冷水骤冷至室温。对于包含 PETA 的聚合物薄膜的交联实验 (见下文), 将纯化的聚合物和 PETA (5wt% 聚合物) 溶解于二氯甲烷以实现均匀混合。在蒸发溶剂以后,以与纯化的聚合物相同方式,制备压缩模制的薄膜。

[0166] γ 照射、网络形成和网络表征

[0167] 在真空下将压缩模制的薄膜密封在层压的聚乙烯 / 聚酰胺袋 (Hevel Vacuum B.V., 荷兰) 中并暴露于来自 ^{60}Co 源 (Isotron B.V., Ede, 荷兰) 的 25kGy γ 照射。

[0168] 为了确定平衡溶胀比和凝胶含量, 从照射的薄膜中冲切出盘状试样 (500 μm 厚度, 10mm 直径) 并放入 30mL CHCl_3 中持续 1 周, 在 3 天以后更换溶剂一次。这个过程可以确保溶胶部分的完全去除。然后称重溶胀的凝胶, 在室温下在真空下干燥至恒重并再次称重。分别按照方程 (1) 和 (2) 来计算凝胶部分和溶胶部分:

[0169]

$$\text{凝胶部分 (\%)} = \frac{m_d}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

[0170]

$$\text{溶胶部分 (\%)} = \left(1 - \frac{m_d}{m_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

[0171] 其中 m_d 是干燥的 (提取的) 样品的质量并且 m_0 是溶胀以前试样的质量。按照方程 (3) 来计算溶胀的体积程度 (q) :

$$[0172] q = 1 + \rho_p \times \left(\frac{\frac{m_s}{m_d} - 1}{\rho_s - \rho_p} \right) \quad (3)$$

[0173] 其中 m_s 是提取的和溶胀的样品的质量并且 ρ_s 和 ρ_p 分别是氯仿 (1.4832g/cm³) 和共聚物的密度。通过测量压缩模制薄膜的质量和尺寸来确定共聚物的密度。包含 100%、72%、60%、48%、和 0% TMC 的 TMC 和 DLLA 共聚物的密度分别为 1.31、1.29、1.27、1.26、和 1.25g/cm³。

[0174] 热性能和机械性能

[0175] 按照 ASTM-D882-91, 确定包含 PETA (0wt%、5wt%) 的熔化压缩的和照射的 (0kGy、25kGy) 共聚物的机械性能, 并重复三次。在提取的以及未提取的试样 ($0.5 \times 10 \times 0.05\text{cm}^3$) 上进行测量。用乙醇进行可浸出成分的提取。在 500mm/分钟的十字头速度下操作配备有 500N 测压元件 (load cell) 的 Zwick Z2020 拉伸测试仪 (Ulm, 德国)。初始夹头间距离为 50mm 并施加 0.01N 的预加载。试样变形源自夹头间距离; 因此, 提供的弹性模量值 (由应力 - 应变曲线的初始斜率计算) 给出聚合物刚度的指示。

[0176] 按照 ASTM1938, 使用裤形试样 ($n = 3$) 来确定薄膜的撕裂强度。试样尺寸为 $75 \times 25 \times 0.5\text{mm}$, 并具有一半通过试样宽度的 50mm 长切口。以 250mm/分钟的速度进行测量, 并重复三次。将报告的最大撕裂强度化针对试样厚度进行归一化处理并以 N/mm 为单位来表示。

[0177] 通过差示扫描量热法 (DSC) 来确定纯化的聚合物和照射的聚合物薄膜的玻璃化转变温度 (T_g) 和熔化温度。在 -100 至 200°C 的温度范围内利用 PerkinElmer Pyris1DSC, 在 10°C / 分钟的加热速率下, 来分析样品 (5-10mg)。在第一次扫描后, 以 300°C / 分钟, 将样品骤冷至 -100°C, 并在 5 分钟以后记录第二次扫描。由第二次加热扫描来确定报告值。铟、铅、和环己烷用作温度校准的标准品。

[0178] 细胞存活率测定

[0179] 使用直接和间接 MTS [3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-磺

苯基)-2H-四唑]测定法来评估包含 5wt% PETA 的 γ 照射的、未提取的共聚物薄膜的可能的细胞毒性。简言之,使用 96 孔板(5000 个细胞 / 孔)和 Dulbecco 改良型 Eagle 培养基(DMEM) 来培养小鼠皮肤成纤维细胞(NIH3T3 细胞系)。在 37°C 和 5% CO₂ 下温育细胞持续三天。

[0180] 对于间接细胞毒性评估而言,在 37°C 和 5% CO₂ 下用 500 μ l DMEM 来温育每种薄膜的未提取的圆盘($n = 3$, 直径 8mm, 厚度 500 μ m) 持续 24 小时,以提取任何可浸出成分。在细胞培养三天以后,用包含可浸出物的 DMEM 培养基来更换培养基。在直接细胞毒性测定中,将未提取的圆盘($n = 3$) 直接放置在培养中的细胞上。在两种测定中,在培养另外两天以后,测量可溶于培养基的甲臜的吸光度。将仅用 DMEM 培养基(阴性对照)温育的细胞培养物获得的平均值标准化为 100% 细胞存活率。乳胶橡胶(Hilversum Rubber Factory, Hilversum, 荷兰)用作阳性细胞毒性对照。

[0181] 巨噬细胞介导的侵蚀研究

[0182] 将 J774A 巨噬细胞保持在包含 4.5g/L D-葡萄糖、丙酮酸酯(盐)、10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 100 μ g/mL L2mGlutamaxTM 的 DMEM 中。通过刮取,每 4 至 7 天,将细胞传代。

[0183] 通过在薄膜表面上直接培养 J774A 巨噬细胞,研究了并不包含 PETA 的未照射的共聚物薄膜以及包含 5wt% PETA 的 γ 照射的、未提取的共聚物薄膜的巨噬细胞介导的侵蚀。测试样品为 15mm 直径和大约 500 μ m 厚度。接种密度为大约 8×10^4 个细胞 / cm²。在第 7 和第 10 天,将新鲜等分部分的细胞加入每个孔。每周更换培养基三次。在每种材料的 6 个圆盘上培养细胞。

[0184] 在培养 14 天以后,首先将每种材料的三个试样放入 Milli-Q 水中以溶解细胞,然后彻底冲洗并称重。在真空下在室温下干燥薄膜至恒重以后,再次称重样品。用金溅射涂覆试样表面,然后在 5kV 的操作电压下通过扫描电子显微镜(SEM, Philips XL30ESEM-FEG, 荷兰)进行分析。

[0185] 用处于细胞骨架稳定(CS)缓冲液(0.1M 喹嗪-1,4-二(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂、1mM 乙二醇四乙酸(EGTA)、pH = 6.9)中的 3.7% 多聚甲醛固定每种材料的剩余圆盘($n = 3$)持续 15 分钟,然后转移到 PBS。试样用于使用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)进行细胞核的荧光染色,以及使用四甲基罗丹明异硫氰化物-鬼笔环肽(TRITC-鬼笔环肽)进行肌动蛋白细胞骨架的荧光染色。然后通过共聚焦激光扫描显微镜(LEICATCS SP2, 具有完全水浸式 40x 物镜(NA0.80))来分析这些试样。

[0186] 结果

[0187] 通过开环聚合来合成碳酸三甲酯(TMC)和 D,L-丙交酯(DLLA)的高分子量共聚物、以及 PTMC 和 PDLLA 均聚物。单体的转化率高于 95%,并在通过沉淀加以纯化以后,获得具有接近进料组成的单体组成的共聚物 / 聚合物(表 2)。在压缩模制以后,共聚物的分子量仍然很高,虽然,当压缩模制时,具有高 DLLA 含量的共聚物的分子量已经有所下降。具有高分子量的聚合物是所期望的,因为已表明,通过 γ 照射的交联效率随聚合物分子量的增加而增加。合成的包含 TMC 的共聚物在生理温度下是橡胶状的,因为它们的玻璃化转变温度为 -17.9 至 16.5 °C。

[0188] 表 2 在压缩模制之前和之后,合成的和纯化的 P(TMC-DLLA) 共聚物的特性。在括

号中的数值是压缩模制试样的。

[0189]

TMC含量 ^a (mol %)	DLLA含量 ^a (%)	\bar{M}_n ^b (kg/mol)	\bar{M}_w ^b (kg/mol)	PDI ^b	$[\eta]$ ^b (dl/g)	T_g ^c (°C)
100	0	443 (436)	620 (698)	1.5 (1.6)	6.6 (7.1)	-17.9
72	28	399 (385)	624 (586)	1.6 (1.5)	5.0 (4.6)	0.1
60	40	404 (384)	633 (593)	1.6 (1.5)	4.7 (4.4)	10.4
48	52	285 (232)	429 (361)	1.5 (1.6)	2.8 (2.8)	16.5

[0190]

0	100	283 (208)	375 (336)	1.3 (1.6)	3.2 (2.8)	52.1
---	-----	-----------	-----------	-----------	-----------	------

[0191] ^a在通过沉淀纯化的试样上通过 ¹H-NMR 确定的

[0192] ^b在 30°C 下使用氯仿作为洗脱剂通过 GPC 确定的。

[0193] ^c使用压缩模制薄膜通过 DSC (第二次加热扫描) 确定的。

[0194] 通过 γ 照射交联的 P(TMC-DLLA) 共聚物

[0195] 在不存在 PETA 下,首先研究了在真空下被 γ 照射的,压缩模制的共聚物薄膜的交联行为。产生的共聚物网络的凝胶含量和溶胀比示于图 8。当在 25kGy 下照射时,48% 的包含 TMC 的共聚物和 PDLLA 并没有交联。这与先前的研究是一致的。在 PDLLA 的情况下, \bar{M}_n 、 \bar{M}_w 值已分别下降到 78kg/mol、117kg/mol,而对于共聚物,各自的值为 60kg/mol、111kg/mol。可以通过 γ 照射来交联具有较高 TMC 含量 (60% 和 72%) 的共聚物,从而产生具有 12±2%、和 30±1% 凝胶含量的网络。在氯仿中非常高的溶胀比表明这些共聚物网络的低交联密度。 γ 照射的 PTMC 薄膜具有 60±1% 的最高凝胶含量。

[0196] 图 8 还清楚地表明,将少量 PETA 加入共聚物薄膜有可能通过增加在 γ 照射过程中发生的交联事件相对于断链事件的比率而显著增加所形成网络的凝胶百分比。在 25kGy 下,获得具有 86±5 至 96±1% 的高凝胶含量的透明的和形状稳定的共聚物网络。有趣的是,在 γ 照射期间,通过使用 PETA 作为交联剂,甚至可以有效地交联 PDLLA。所形成的网络被稠密地交联,其中在氯仿中的溶胀比为 4.6±0.2 至 11.0±2.5vol/vol。这表明以下可能性:通过 γ 照射来消毒这些共聚物,而没有显著断链和机械性能的损失。

[0197] 在这些实验中,PETA 被均匀混合并且使共聚物溶于溶液中。这使我们能够获得具有多丙烯酸酯交联剂的非常高的凝胶含量。

[0198] 利用 TMC 和 ϵ -己内酯的共聚物 (具有 41 至 100 摩尔 % 的 ϵ -己内酯含量的五种共聚物,均具有高于 200kg/mol 的 \bar{M}_n 值) 还研究了在网络形成中 PETA 作为交联剂的潜力。在交联这些共聚物方面,PETA 也是非常有效的:在 25kGy 下,使用 5wt% 的 PETA 含量,获得凝胶含量为 88 至 93% 和溶胀比为 5.4 至 7.0vol/vol 的网络。这表明,这种增强的交联方法也可以适用于其他可吸收聚合物。

[0199] γ 照射的 P(TMC-DLLA) 共聚物网络的热性能和机械性能

[0200] 在未交联状态下,所有 P(TMC-DLLA) 共聚物均是玻璃化转变温度 (T_g) 为 -17.9 至 52.1°C 的无定形材料 (表 3)。 T_g 值随着 TMC 含量的增加而降低并且通过调节共聚物组成来容易地调节。在不存在 PETA 下, γ 照射似乎稍微降低 T_g 值,这可能是由于通过断链事件形成相对短的链。当在存在 PETA 下照射时,由于形成密集网络, T_g 值增加 (与图 8B 相比较)。

当使用乙醇从网络中除去低分子量可浸出物时,玻璃化转变温度进一步增加,并且为 14.9 至 53.7°C。包含 PETA 的网络显示单一 T_g ,这表明共聚物被均匀地结合到 PETA 网络中。

[0201] 表 3 还给出 P(TMC-DLLA) 共聚物和网络的拉伸性能的综述。可以看出,通过调节共聚物组成,可以获得弹性模量值为 5.1 ± 0.1 至 2780 ± 112 MPa 的未照射薄膜。当在不存在 PETA 下进行 γ 照射时,共聚物薄膜的弹性模量和断裂应力值略有下降(由于断链)。通过在存在 PETA 下进行照射,可以防止在 γ 照射期间共聚物的机械性能的恶化。获得具有较高弹性模量、屈服强度、和断裂应力值的网络薄膜,这可能是由于防止了断链和密集网络形成。出于同样的理由,与并不包含 PETA 的照射的薄膜相比较,包含 PETA 的网络具有较低的断裂伸长值和屈服应变值。在拉伸试验中,交联试样基本上返回到它们的原始尺寸。考虑到它们的玻璃化转变温度低于生理温度,包含 TMC 的网络可以用于微创手术,其中具有形状记忆的材料的使用是有利的。

[0202] 通过用乙醇提取,除去在 γ 照射期间可能已形成的低分子量化合物,可以进一步增加网络薄膜的弹性模量和断裂应力值。虽然保留它们较高的拉伸强度,还发现,包含 PETA 的 γ 照射的薄膜的弹性模量值取决于共聚物组成。这表明,这些共聚物网络的机械性能可以被改变以适合任何预期的应用。

[0203] 网络薄膜的一个重要特征是它们的抗撕裂性,因为缝合的聚合物生物材料通常经受体内动态环境。线性 PTMC 薄膜的确定的最大撕裂强度是 1.9 ± 0.2 N/mm。通过在存在 PETA 下进行 γ 照射以及通过增加共聚物的 DLLA 含量,可以显著改善所形成的网络的抗撕裂扩展性。由 100、72、60、和 48% 包含 TMC 的共聚物制备的包含 PETA 的网络的撕裂强度分别为 4.2 ± 0.2 、 10.6 ± 1.0 、 13.7 ± 1.2 和 38.9 ± 6.4 N/mm。

[0204] 表 3. 在不存在或存在 PETA 下,在 γ 照射之前和之后, P(TMC-DLLA) 共聚物的热性能和机械性能。值表示为平均值 \pm 标准偏差 ($n = 3$)。

[0205]

TMC含量 (mol %)	照射剂量 (kGy)	PETA含 量 (wt %)	T _g (°C)	E (MPa)	σ屈服 (MPa)	ε屈服 (%)	σ断裂 (MPa)	ε断裂 (%)
100	0	0.0	-17.9	7.2±0.1	2.8±0.1	180±20	25.2±3.7	974±45
100	25	0.0	-18.1	6.7±0.2	2.0±0.1	190±15	14.0±0.4	1330±40
100	25	5.0	-16.4	10.7±0.2	4.9±0.1 ^a	110±10 ^a	35.3±0.3	580±30
100 ^b	25	5.0	-14.9	10.8±0.3	4.9±0.1 ^a	120±15 ^a	37.7±1.3	570±15
72	0	0.0	0.1	5.1±0.1	1.9±0.1	120±15	5.5±1.4	1323±108
72	25	0.0	-1.9	4.8±0.4	1.5±0.1	250±25	1.5±0.1	1330±174
72	25	5.0	1.8	32.4±0.5	2.1±0.1 ^a	25±10 ^a	12.5±1.2	523±18
72 ^b	25	5.0	3.2	35.6±0.2	2.2±0.1 ^a	25±10 ^a	15.4±0.8	588±36
60	0	0.0	10.4	14.5±1.1	2.0±0.1	130±15	21.8±2.0	1047±25
60	25	0.0	9.4	10.6±1.0	1.8±0.1 ^a	150±10 ^a	19.7±4.7	1384±28
60	25	5.0	11.7	34.8±2.8	2.5±0.1 ^a	40±10 ^a	20.2±2.0	593±36
60 ^b	25	5.0	13.1	40.2±2.8	2.4±0.1 ^a	40±10 ^a	18.5±1.3	535±24
48	0	0.0	16.5	195±17	2.0±0.1	55±15	13.4±1.7	804±100
48	25	0.0	13.8	61±11	1.6±0.3 ^a	100±25 ^a	6.2±1.6	733±111
48	25	5.0	20.0	630±120	5.8±1.1	4.2±2.7	18.8±3.6	378±111
48 ^b	25	5.0	21.9	936±88	10.3±1.2	3.6±2.1	23.8±2.6	419±26
0	0	0.0	52.1	2780±112	55.5±1.1	2.6±0.1	48.8±1.6	5.5±0.8
0	25	0.0	51.1	2610±101	49.9±1.4	2.4±0.1	42.2±1.3	5.9±1.6
0	25	5.0	52.6	2860±84	59.1±1.5	2.6±0.1	58.1±2.2	2.7±0.2
0 ^b	25	5.0	53.7	2970±117	59.9±2.7	2.5±0.1	59.3±2.2	2.6±0.2

[0206] ^a由针对应力 - 应变图切线的交叉估计的,因为无法观察到明显的屈服点。

[0207] ^b在用乙醇提取可浸出成分以后,在 γ 照射的试样上进行测量。

[0208] γ 照射的共聚物网络薄膜与成纤维细胞的相容性

[0209] 使用直接和间接测定法,研究了包含 PETA 的 γ 照射的未提取网络与成纤维细胞的相容性。图 9 显示,当与不同共聚物网络薄膜温育时,活的成纤维细胞的百分比。对于所有共聚物网络而言,活的成纤维细胞的百分比可以与针对阴性对照所获得的百分比相比 (100±13.5%)。在直接测定中,细胞存活率为 88±18 至 108±1%,而在间接测定中这些值为 90±5 至 102±10。两种测定的结果证实了,这些包含 PETA 的网络是无细胞毒性的。另外,这些结果显示,可以从聚合物基质中有效地去除用于纯化和用于混合 PETA 的溶剂。

[0210] 在巨噬细胞培养物中共聚物薄膜和网络的体外侵蚀

[0211] 在体内,在对生物材料的组织反应方面以及在它们被分泌的许多物质降解方面,巨噬细胞发挥重要作用。可以由巨噬细胞分泌的超氧化物阴离子自由基可以降解线性 PDLLA 和 PTMC 网络。胆固醇酯酶(也由巨噬细胞分泌的一种水解酶),已表明也会侵蚀 PTMC 网络以及 P(TMC-DLLA) 共聚物。

[0212] 作为巨噬细胞对它们的体内侵蚀行为和它们的生物相容性的影响的初步评估,在

γ 照射的和在未照射的共聚物薄膜上直接培养巨噬细胞。P(TMC-DLLA) 共聚物是生物相容性材料并当皮下植入大鼠体内时诱导温和的炎症反应。在 14 天培养期间, 没有观测到 P(TMC-DLLA) 共聚物网络或它们的降解产物对巨噬细胞存活率的不利影响。另外, 当在这些表面上培养时并没有激活巨噬细胞。这表明, 包含 PETA 的 P(TMC-DLLA) 网络是生物相容的材料。

[0213] 研究了在存在 PETA 下, 共聚物组成和交联对巨噬细胞介导的薄膜侵蚀的影响。图 10 显示在巨噬细胞培养 14 天以后共聚物薄膜的表面, 相应的侵蚀速率则列于表 4。从图 10 中可以看出, 在巨噬细胞培养期间, 所有未照射的共聚物薄膜已发生侵蚀。随着 TMC 含量降低, 表面侵蚀的程度似乎减小, 这种观测结果可以被表 4 所列质量损失和侵蚀速率值证实。质量损失值 (在 14 天内) 和侵蚀速率分别为 5.35 ± 0.49 至 0% 以及 276 ± 23 至 $0 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$ 。这表明, 包含较高量的 TMC 的共聚物易于被源自巨噬细胞的化合物表面侵蚀。这可能是由于化学结构的差异或由于它们较低的玻璃化转变温度。有趣的是, 甚至在 PDLLA 薄膜上也看到侵蚀迹象。很显然, 源自巨噬细胞的化合物能够在一定程度上降解 PDLLA。虽然不能检测到质量损失, 但在并不接触细胞的薄膜的侧面上检测不到侵蚀迹象。

[0214] 表 4. 在巨噬细胞培养 14 天以后, 共聚物组成对未照射的 P(TMC-DLLA) 共聚物薄膜以及在 25kGy 下 γ 照射的包含 5% PETA 的 P(TMC-DLLA) 共聚物薄膜的表面侵蚀速率和质量损失的影响。值表示为平均值 \pm 标准偏差 ($n = 3$)。

[0215]

TMC含量 (mol%)	DLLA含量 (mol%)	0 kGy, 0% PETA		25 kGy, 5% PETA	
		侵蚀速率 ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$)	质量损失 (wt%)	侵蚀速率 ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$)	质量损失 (wt%)
100	0	276 ± 23	5.35 ± 0.49	31 ± 12	0.60 ± 0.20
72	28	74 ± 2	1.46 ± 0.04	13 ± 2	0.26 ± 0.04
60	40	14 ± 2	0.28 ± 0.05	12 ± 1	0.25 ± 0.01
48	52	18 ± 12	0.40 ± 0.26	- ^a	- ^a
0	100	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a

[0216] ^a不能检测到质量损失。

[0217] 通过照射包含 5wt % PETA 的共聚物薄膜, 可以在很大程度上减小它们的侵蚀速率。对于由 PTMC 均聚物制备的薄膜, 侵蚀速率从 276 ± 23 降低到 $31 \pm 12 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$ (比较图 10A 和 10B)。这可能是由于形成密集网络。 γ 照射的并不包含 PETA 的 PTMC 的侵蚀速率具有相对较低的交联密度 (图 10B) 并显示 $265 \pm 32 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$ 的腐蚀速率, 这可以与表 4 所示的未照射的 PTMC 的侵蚀速率相比。另外, 当皮下植入大鼠体内时, γ 照射的 PTMC 网络薄膜的体内侵蚀速率可以与未照射的线性 PTMC 的侵蚀速率相比。这表明, 巨噬细胞培养测定是用于初步评估结构变量对生物材料体内侵蚀的影响的适当的模型。对于包含 72% 和 60% TMC 的共聚物网络薄膜也观测到侵蚀 (图 10D 和 10F), 而对于包含 48% 和 0% TMC 的共聚物网络检测不到质量损失。在这些网络薄膜上, 仅观测到很少的侵蚀斑点 (图 10H 和 10J)。

[0218] 不同材料侵蚀方面的差异还可能涉及在薄膜表面上存在的巨噬细胞的数目。在图 11 中, 可以看到在未照射的和 γ 照射的 P(TMC-DLLA) 薄膜上的巨噬细胞密度。对于未照射的共聚物薄膜而言, 细胞数目是可比较的, 为 3537 ± 137 至 4770 ± 612 个细胞/ mm^2 , 除了

包含 72% TMC 的共聚物薄膜, 其具有较高的细胞数目 (6010 ± 405 个细胞 / mm^2)。这是合理的, 因为这些共聚物是疏水性材料, 其中相对于组成, 接触角无显着性差异。在 γ 照射的网络的情况下, 数值是非常接近的, 为 3317 ± 815 至 42 ± 215 个细胞 / mm^2 。细胞数目也没有受到交联的太大影响 (再一次, 除包含 72% TMC 的共聚物以外)。这些结果表明, 在这些材料的巨噬细胞介导的侵蚀中结构效应 (组成、玻璃化转变温度、交联) 可能更有影响力。还通过非酶本体水解来降解 TMC 和 DLLA 的共聚物、和 PDLLA 均聚物, 并且先前已研究了共聚物组成对它们降解行为的影响。在通过照射 TMC 和 DLLA 共聚物薄膜 (包含 5wt% PETA) 所制备的网络上并没有进行非酶水解降解实验, 然而, 其他降解实验已表明, 与线性高分子量 PDLLA 相比较, 在光致交联的丙烯酸酯官能化的 DLLA 低聚物的情况下, 质量损失的开始被推迟。

[0219] 结论

[0220] 三丙烯酸季戊四醇酯可以用作交联剂 / 交联试剂, 用来通过 γ 照射有效地交联 P(TMC-DLLA) 共聚物。通过调节共聚物组成, 可以容易地调节网络的热性能和机械性能。体外测定表明, 这些包含 PETA 的共聚物网络和它们的降解产物与细胞相容。通过增加共聚物的 DLLA 含量, 可以显著减少共聚物薄膜的巨噬细胞介导的侵蚀。还可以通过交联过程来大大减少侵蚀。这种交联方法可以用来在通过 γ 照射使 TMC 和 DLLA 类的材料灭菌期间将损害降至最低并且它允许制备具有广泛可调节性能的聚合物材料。

[0221] 实施例 3

[0222] 材料

[0223] 按原接收状态使用聚合物级碳酸 1,3- 三亚甲基酯 (TMC) (Boehringer Ingelheim, 德国) 和催化剂, 辛酸亚锡 (Sigma, 美国)。在 PTMC 合成中, 1,6- 己二醇 (Aldrich, 德国) 用作引发剂。另外, 数均分子量 (M_n) 分别为 10000g/mol 和 5800g/mol 的商购 α , ω - 二羟基聚 (ϵ - 己内酯) (PCL) (Aldrich, 德国) 和聚 (乙二醇) 单甲氧基醚 (mPEG) (Fluka, 德国) 用作引发剂来合成 TMC 嵌段共聚物。分子量为 46000g/mol 的 PCL 聚合物 (Aldrich, 德国) 用于交联研究。三丙烯酸季戊四醇酯 (PETA) (Aldrich, 德国) 和 Irgacure[®] -369 (2- 苄基 -2- 二甲基氨基 -1-(4- 吡啶代苯基) - 丁酮 -1) (Ciba[®], 瑞士) 用作交联剂和光引发剂。

[0224] 将来自猪胰腺的胆固醇酯酶 (CE) (Sigma, 英国, 56.2U/mg) 溶解于磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH = 7.4, B. Braun Melsungen A.G., 德国), 用于酶侵蚀研究。溶剂 (Merck, 德国, 或 Biosolve, 荷兰) 具有分析级。对于细胞培养, 使用了 α - 最低程度基本增殖培养基 (α -MEM, Gibco 美国)。此培养基包含胎牛血清 (10%, Biowhitaker, 比利时)、抗坏血酸 -2- 磷酸盐 (酯) (0.2mM, Sigma, 美国)、青霉素 G (100 单位 /ml, Invitrogen 美国) 和链霉素 (100 μ g/ml, Invitrogen 美国)、L- 谷氨酰胺 (2mM, Sigma, 美国)、和碱性成纤维细胞生长因子 (1ng/mL, InstruChemie, 荷兰)。

[0225] 聚合物合成

[0226] 在真空下在 130°C 下, 使用辛酸亚锡作为催化剂, 通过 TMC 单体的开环聚合持续三天来合成聚 (碳酸 1,3- 三亚甲基酯) (PTMC) 均聚物。为了控制分子量, 不同量的己二醇用作引发剂。

[0227] 通过在 130°C 下 TMC 的开环聚合持续三天还制备了单甲氧基聚 (乙二醇) - 嵌

段 - 聚 (碳酸三亚甲酯) (mPEG-PTMC) 二嵌段共聚物和聚 (碳酸三亚甲酯) - 嵌段 - 聚 (ϵ - 己内酯) - 嵌段 - 聚 (碳酸三亚甲酯) (PTMC-PCL-PTMC) 三嵌段共聚物。在真空下在 130°C 下干燥 mPEG 和 PCL 引发剂持续 90 分钟。在两种情况下, 进料的 TMC 含量均为 60 摩尔%。

[0228] 通过溶解于氯仿并沉淀到乙醇或己烷中, 用新鲜非溶剂洗涤并在室温下在真空下干燥, 来纯化全部聚合物。

[0229] 聚合物表征

[0230] 使用 CDCl₃ (Merck, 德国), 通过质子核磁共振 (¹H-NMR) 光谱仪 (300MHz, Varian Innova, 美国), 来确定残余单体含量和共聚物的组成。

[0231] 使用氯仿作为洗脱剂, 在 1.0ml/分钟的流速下, 通过凝胶渗透色谱法 (GPC, Viscotek 美国) 来确定 PTMC 均聚物的数均和重均分子量 (分别为 M_n 和 M_w)、多分散指数 (PDI) 和特性粘度 ([η])。设置配备有串联放置的 ViscoGEL I-guard-0478、ViscoGEL I-MBHMW-3078、和 ViscoGEL I-MBLMW-3078 柱, 以及具有折光检测器、粘度检测器、和光散射检测器的 TDA302 三检测器阵列 (Triple Detector Array), 从而可以测定绝对分子量。GPC 和 NMR 两者均用于 PTMC-PCL-PTMC 嵌段共聚物的分子量测定, 而仅利用 NMR 来测定 mPEG-PTMC 的分子量。

[0232] 聚合物薄膜的制备

[0233] 在 140°C 下利用厚度为 500 μm 的不锈钢模具 (Fonteijne THB008 实验室压制机, 荷兰) 来压缩模制纯化的 PTMC 聚合物。在大约 25kg/cm² 下模塑薄膜, 然后利用冷水骤冷至室温。

[0234] 通过将成分溶解于 DCM, 在培养皿中浇注溶液并干燥, 来制备 PTMC 和 PTMC 掺合物以及包含 PETA (5wt%) 和 Irgacure[®] 369 (0.025wt%) 的嵌段共聚物 (以 9 : 1 重量比) 的薄膜。在黑暗中进行这些步骤, 然后进行压缩模制 (如上所述)。

[0235] 光致交联和网络表征

[0236] 将包含 PETA 和光引发剂的压缩模制薄膜真空密封于层压的聚乙烯 / 聚酰胺袋中 (Hevel Vacuum B. V., 荷兰) 并在 7cm 的距离处暴露于短波 UV 光 (UltraLum 交联室, 美国, 波长 254nm)。在室温下照射试样的两侧持续不同的时间。在此距离处的光强度为 10–14mW/cm², 如使用光功率计 (Newport1916-C, 美国) 测量的, 聚乙烯 / 聚酰胺袋将强度降低至 5–7mW/cm²。

[0237] 利用氯仿来确定光致交联薄膜的平衡溶胀比和凝胶含量。

[0238] 机械性能

[0239] 按照 ASTM-D882-91, 在用乙醇进行提取之前和之后, 确定熔化压缩的和光致交联的基于 PTMC 的网络薄膜的拉伸性能, 重复三次。在 50mm/分钟的十字头速度下, 操作配备有 500N 测压元件 (load cell) 的 ZwickZ020 拉伸测试仪 (德国)。初始夹头间距离为 50mm 并施加 0.01N 的预加载。试样变形源自夹头间距离; 因此, 提供的杨氏模量 (由应力 – 应变曲线的初始斜率计算) 值仅给出聚合物刚度的指示。

[0240] 为了评估它们在动态负载条件下的行为, 在循环试验中, 以 50mm/分钟, 将试样 (n = 1) 重复 (20x) 伸长至 50% 应变。在 2h 恢复期以后, 由第 21 个循环的应力 – 应变图估计永久变形。在这些实验中, 施加 0.01N 的预加载, 形变源自夹头间距离。数值的误差大约为

0.5%应变。

[0241] 润湿性和水吸收

[0242] 在通过在玻璃圆盘 ($n = 8$ / 材料) 上浇注处于二氯甲烷中的聚合物溶液 (大约 1wt %), 在真空下干燥, 以及在惰性气氛下光致交联而制备的薄膜上进行接触角测量。在用乙醇提取光致交联薄膜以后进行测量。在室温下, 利用配备有电子注射器模块的基于视频的系统 (OCA20DataPhysics Instruments GmbH, 德国) 来确定超纯水 (MilliQPlus-Millipore, 法国) 在不同表面上的静态接触角、前进接触角和后退接触角。

[0243] 在用乙醇提取以后, 确定压缩模制的和光致交联的薄膜的平衡水吸收。在 37°C 的 PBS (pH = 7.4) 中调节试样 ($n = 4$) 持续一周。水吸收被定义为试样的质量增加。

[0244] 体外酶侵蚀

[0245] 使用来自猪胰腺的胆固醇酯酶 (CE) 来研究基于 PTMC 的光致交联薄膜的酶水解。利用包含作为杀菌剂的 0.02wt % NaN₃ (Sigma, 美国) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH = 7.4), 以 20 μg/mL 的浓度制备 CE 酶水溶液。将乙醇提取的、盘状薄膜 (8mm 直径, 大约 500 μm 厚度, $n = 3$ / 时间点) 放入包含 1ml 酶溶液的小瓶并在 37°C 下加以调节。每两天更换培养基一次。利用 PBS (pH7.4, $n = 1$ / 时间点) 进行没有酶的对照实验。在预定时间点, 在冲洗和吸干它们的表面以后, 确定湿试样的质量和厚度。在真空下在室温下干燥试样至恒重以后再次进行测量。

[0246] 组织工程支架的制造

[0247] 熔融沉积成型用来制造具有互连孔的三维 (3D) 支架。通过在黑暗中将 PTMC 均聚物或 PTMC 掺合物连同 PETA 和光引发剂一起溶解于二氯甲烷, 并添加 80wt % (基于总聚合物质量) 的碳酸亚乙酯 (熔化温度 35–38°C), 来制备溶液。在蒸发二氯甲烷以后, 利用 Bioplotter 装置 (Envisiontec GmbH, 德国), 在 100–120°C 和 4 巴氮气压力下, 挤出碳酸亚乙酯溶液 (包含一种或多种聚合物、PETA、和光引发剂)。

[0248] 通过沉积多达 20 层 (每层为 12×12mm) 的通过内径为 260 μm 的不锈钢针挤出的纤维来打印 (plot) 三维支架。打印参数是 : 在相邻纤维的中心之间的距离 : 500 μm, 层厚度 : 130 μm。在每个连续层以后, 将绘制方向改变 90°。纤维沉积速度为 100–200mm/ 分钟。使冷空气吹过建筑结构以使碳酸亚乙酯结晶。在打印以后, 将支架保持于 4°C 下直到进一步使用。

[0249] 通过 UV 照射 300 分钟来交联支架。在照射期间, 通过使冷氮气流过交联室来将温度保持在大约 20°C。这可以防止碳酸亚乙酯熔化并提供惰性气氛。随后, 将支架放入 4°C 的轻柔搅拌的 Milli-Q 水中持续 5 天以沥滤出碳酸亚乙酯 (每天更换水两次)。然后将支架放入乙醇中以除去其他可能的可浸出物并在真空下干燥至恒重。利用聚合物的已知密度 (对于 PTMC 均聚物和掺合物, 密度分别为 1.31g/cm³ 和 1.29cm³) 并通过测量制造的支架的密度, 来确定支架的孔隙率。

[0250] 在用金溅射涂覆表面以后, 在 5kV 的操作电压下, 通过扫描电子显微镜 (SEM, Philips XL30ESEM-FEG, 荷兰), 来分析支架的表面和横截面。

[0251] 在 3D 制造的组织工程支架中人间充质干细胞 (hMSC) 的接种和培养

[0252] 通过浸泡在 70% 乙醇中持续 15 分钟来消毒由 PTMC 和掺合物制备的光致交联的和乙醇提取的支架 (大约 1mm 厚度)。然后, 在室温下, 用无菌 PBS 洗涤和温育支架三次, 持续

两小时。在细胞培养以前，在37℃下使支架在 α MEM 增殖培养基中温育过夜。

[0253] hMSC 获自接受全髋关节置换手术的供体，其给予知情同意书。得到当地医疗伦理委员会的批准。

[0254] 以1,000个细胞/ cm^2 ，将融化的细胞（第2代）铺板于300 cm^2 T-烧瓶（T-300烧瓶）中在 α MEM 增殖培养基中。使hMSC扩展一周，其中更新 α MEM 增殖培养基一次。使用颗粒计数和粒度分析仪（Z2, Beckman Coulter, Fullerton, CA）来确定细胞数目。使用移液器，将来自细胞悬液相当于 5×10^5 个hMSC（第3代）的体积放置在每个支架上；然后将它们放置在培养箱中的25孔非组织培养处理板（Nunc）的孔中持续4小时。在这段时间以后，用2ml新鲜 α MEM 增殖培养基更换孔中的培养基。将细胞接种的支架培养5或10天。在10天培养期中，在第5天更换培养基。直接在接种以后，以及在第5和10天，用PBS洗涤包含细胞的构建物并用1.5%戊二醛/0.14M二甲肿酸盐缓冲液固定细胞持续15分钟。使用亚甲蓝来染色活细胞，利用立体显微镜对其进行观测。

[0255] 从不同孔（n=3）取出培养基的样品以获得细胞的代谢图。利用VitrosDT60II系统（Ortho-Clinical Diagnostics, Tilburg, 荷兰）来确定葡萄糖和乳酸盐浓度。

0256 结果

[0257] 为了制备弹性体的光致交联的基于PTMC的网络薄膜和支架，合成了PTMC均聚物以及PTMC与mPEG和PCL的嵌段共聚物。

0258 基于PTMC的聚合物的特性

[0259] 在纯化和压缩模制以后，合成的高分子量PTMC均聚物的特性列于表5。通过改变在聚合反应中用作引发剂的己二醇的量，可以调节聚合物分子量。在压缩模制以后，PTMC聚合物的分子量与纯化的聚合物并没有太大的差别。

[0260] 表5还显示在纯化以后PTMC-PCL-PTMC和mPEG-PTMC嵌段共聚物的特性。在嵌段共聚物合成中单体转化率高于99%。在嵌段共聚物中的TMC含量非常接近进料量。

0261 表5. 用于制备光致交联网络的基于纯化TMC的聚合物的特性

0262

聚合物	己二醇含量 (mol%) ^a	TMC含量 (mol%) ^a	M_n ^a (kg/mol)	M_w ^b (kg/mol)	M_w ^b (kg/mol)	PDI ^b	$[\eta]$ ^b (dl/g)
PTMC ₄₅	0.2	100	-	45 (47)	75 (80)	1.7 (1.7)	1.3 (1.2)
PTMC ₁₈₃	0.03	100	-	183 (159)	227 (196)	1.2 (1.2)	2.6 (2.4)
PTMC ₃₇₃	0	100	-	373 (366)	474 (471)	1.3 (1.3)	5.7 (5.2)
PTMC ₄₄₃ ^c				443 (436)	620 (698)	1.5 (1.6)	6.6 (7.1)
PTMC-PC L-PTMC	0	60.4	24	15	26	1.7	0.5
mPEG-P TMC	0	60.7	27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[0263] ^a在纯化以后使用CDCl₃作为溶剂通过¹H NMR确定的。

[0264] ^b在纯化以后在30℃下使用氯仿作为洗脱剂通过GPC确定的。在括号内给出压缩模制聚合物的值。

[0265] n. d. :未确定的

0266 UV交联基于PTMC的薄膜

[0267] 为了光致交联高分子量PTMC，用短波UV光(254nm)来照射包含PETA和光引发剂

的压缩模制薄膜。当用 UV 光照射时,可以相对容易地有效地交联 PTMC,从而产生透明薄膜。图 12A 和 12B 显示了使用氯仿确定的光致交联的 PTMC 网络的凝胶含量和溶胀比,为照射时间的函数。凝胶含量最初随着照射时间增加迅速地增加,然后缓慢增加。与增加的凝胶含量一致,所形成的网络在氯仿中的溶胀比随照射时间增加而降低,这表明在更长的照射时间下形成了更密的网络。

[0268] 在 300 分钟 UV 曝光下,取决于聚合物的初始分子量,网络的凝胶含量为 57±1% 至 98±1%,并且溶胀比为 11.3±0.8 至 3.7±0.1。

[0269] 调节 PTMC 薄膜中的 PETA 含量还可以制备具有不同凝胶含量和溶胀比的光致交联网络。例如,照射包含 1、3、5% PETA 的 PTMC₁₈₃ 聚合物持续 180 分钟分别产生具有 41、71、和 91% 的凝胶含量,以及 65、14、7 vol/vol 溶胀比的网络。这些结果表明,可以改变 PETA 含量、UV 照射时间、和初始聚合物分子量,以调节网络的凝胶含量和网络密度。光致交联 PTMC 网络可以由分子量为 0.7 至 40.7 kg/mol 的三臂 PTMC- 甲基丙烯酸酯大分子单体来制备。这些网络在氯仿中的溶胀比为 3.1 至 16.9。通过将这些结果与这些基于 PTMC(大分子单体)网络的溶胀比相比较,可以估计,在 PTMC 网络(包含 PETA 和光引发剂并用 UV 光照射 300 分钟)的交联之间的分子量为 1100 至 7600 kg/mol 的第一近似值,这取决于聚合物的初始分子量。

[0270] 与通过使用不同臂长的末端官能化大分子单体相比较,仅使用交联剂和光引发剂的光致交联 PTMC 是更加实用的,并且用于制备不同交联密度的网络。此外,已观察到,甚至在存在自由基清除剂下在处理以前,可以提前交联(甲基)丙烯酸酯末端官能化的 PTMC 低聚物(未公开的数据)。在本研究中使用的包含 PETA 的聚合物薄膜仍然可溶于氯仿(甚至在压缩模制以后),这意味着在 UV 曝光以前没有发生交联。

[0271] 有趣的是,当并不包含 PETA 和 Irgacure® 369 的 PTMC 均聚物薄膜暴露于 UV 光时,聚合物的数均和重均分子量会增加。在照射 300 分钟以后,PTMC₄₅、PTMC₁₈₃ 和 PTMC₃₇₃ 的 \overline{M}_n 值分别为 49、244、和 435 kg/mol。相应的 PDI 值为 2.2、1.9、和 1.3。我们观察到,用短波 UV 光对非常高分子量 PTMC 的延长照射会导致聚合物的交联。当 48 小时照射 PTMC₄₄₃ 的压缩模制的薄膜时,形成了凝胶含量为 53±13% 以及在氯仿中的溶胀比为 84±10 vol/vol 的网络。

[0272] 照射仅包含 Irgacure® -369 而不包含 PETA 的 PTMC 薄膜导致网络形成,但凝胶含量远低于包含 PETA 和 Irgacure® -369 两者薄膜的凝胶含量,当 UV 照射 300 分钟时,包含 0.025 wt% 光引发剂的 PTMC₁₈₃ 和 PTMC₃₇₃ 薄膜分别仅具有 25±3 和 50±2% 的凝胶含量以及 253±6 和 72±4 vol/vol 的溶胀比。

[0273] 在包含仅光引发剂或光引发剂和 PETA 两者的薄膜的凝胶含量之间的这种差异可能是由于丙烯酸酯网络有效掺入 PTMC 链。光致交联 PTMC 薄膜的溶胶部分的 ¹H-NMR 分析并未揭示任何丙烯酸酯相关峰。这意味着所有 PETA 已结合到所形成的网络中。

[0274] 除 PTMC 聚合物和掺合物以外, PCL 薄膜的光致交联还研究了包含与 PTMC 薄膜相同量的 PETA 和光引发剂的薄膜。初步结果表明,也能够以这种方式来光致交联 PCL。相对低分子量($\overline{M}_n=46$ kg/mol)的 PCL 均聚物薄膜具有 41±1 的凝胶百分比以及在氯仿中的 11.3±0.7 vol/vol 的溶胀比。

[0275] 另外,可以有效地光致交联 PTMC₃₇₃与 PTMC-PCL-PTMC 或与包含 5wt% PETA 和光引发剂的 mPEG-PTMC 嵌段共聚物的掺合物。当 UV 照射 300 分钟时,PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 掺合物以及 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 掺合物的凝胶含量分别为 96±1 和 93±1。在氯仿中的相应溶胀比为 6.3±0.1 和 6.1±0.6vol/vol。在 UV 曝光以前,掺合物包含 90wt% PTMC₃₇₃。网络的溶胶部分的 ¹H-NMR 分析揭示了,嵌段共聚物含量高于在初始薄膜中的嵌段共聚物含量。可以表明,当将薄膜暴露于 UV 照射时,大约 75–80% 的嵌段共聚物已结合到网络中。

[0276] 光致交联的基于 PTMC 的网络的机械性能

[0277] 为了评估光致交联对 PTMC 聚合物的拉伸机械性能的影响,在未照射的压缩模制的 PTMC 薄膜和包含 5wt% PETA 和 0.025wt% 光引发剂的 PTMC 薄膜上进行测量,并用 UV 光照射 300 分钟(由 UV 光照射 300 分钟的薄膜简称为 PTMC_x-300)。表 6 给出未交联的和光致交联的 PTMC 均聚物、以及光致交联的 PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 和 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 掺合物的拉伸机械性能的综述。

[0278] 所有 PTMC 均聚物都是弹性模量为 3.7±0.1 至 7.7±0.3MPa 的柔性材料。它们的屈服强度、断裂应力、和断裂应变值随聚合物分子量增加而增加。光致交联的 PTMC 网络薄膜也是柔性材料,虽然它们的弹性模量高于未交联的 PTMC 薄膜的弹性模量。数值为 7.2±0.2 至 9.6±0.3MPa。当光致交联时,PTMC 均聚物的屈服强度和最终拉伸强度显著增加。取决于初始聚合物分子量,未交联薄膜的断裂应力值为 0.2±0.1MPa 至 6.7±2.8MPa。当交联时,薄膜的断裂应力值会增加并且为 2.7±0.1 至 30±9MPa。另外,断裂光致交联的 PTMC 网络薄膜所需要的能量比未交联的 PTMC 薄膜高 3 至 9 倍,这意味着,在存在 PETA 下,通过光致交联,可以显著改善 PTMC 薄膜的韧性。表 6 清楚地说明,取决于初始 PTMC 分子量,可以获得具有一定范围的屈服强度、最终拉伸强度和韧性的 PTMC 网络。

[0279] 在用乙醇(对于 PTMC 相对差的溶剂)提取 PTMC 网络薄膜的溶胶部分以后,还进行拉伸测量。对于由 PTMC₄₅制备的网络而言,性能的增强是最明显的,因为提取的薄膜具有较高的弹性模量、屈服强度、断裂应力、和断裂能量值。在由 PTMC₁₈₃和 PTMC₃₇₃制备的网络的情况下,这些数值还似乎略有增加。

[0280] 与由 PTMC₃₇₃制备的未提取网络相比较,由 PTMC₃₇₃和相对低分子量 mPEG-PTMC 嵌段共聚物的掺合物制备的光致交联薄膜仅具有稍微降低的弹性模量和屈服强度值,而它们的断裂应力和断裂能量值是可比较的。这表明,在干燥状态下,使 PTMC₃₇₃与高达 10% mPEG-PTMC 掺合并未显著恶化拉伸性能。然而,与仅由 PTMC₃₇₃制备的网络相比较,由与 PTMC-PCL-PTMC 嵌段共聚物的掺合物获得的网络具有更低的屈服强度、最终拉伸强度和韧性。由掺合物制备的网络的拉伸性能并不受到用乙醇提取溶胶部分的太大影响。

[0281] 表 6. 在存在 PETA 下,光致交联对基于 PTMC 的聚合物的机械性能的影响。值表示为平均值 ± 标准偏差 (n = 3)。

[0282]

聚合物-照射时间(分钟)	PETA含量(wt %)	乙醇提取	E(MPa)	$\sigma_{屈服}$ (MPa)	$\epsilon_{屈服}$ (%)	$\sigma_{断裂}$ (MPa)	$\epsilon_{断裂}$ (%)	断裂能(焦耳)	永久变形 ^a (%)
PTMC ₄₅ -0	0.0	否	3.7±0.1	0.5±0.1	71±3	0.2±0.1	479±165	0.2±0.05	22.0
PTMC ₄₅ -300	5.0	否	7.2±0.2	2.1±0.1 ^b	107±3 ^b	2.7±0.1	530±79	1.4±0.3	3.0
PTMC ₄₅ -300	5.0	是	9.8±0.3	2.7±0.1 ^b	93±3 ^b	4.4±0.5	515±29	2.1±0.2	2.0
PTMC ₁₈₃ -0	0.0	否	6.9±0.5	1.4±0.1	116±5	1.1±0.1	532±44	0.7±0.1	8.0
PTMC ₁₈₃ -300	5.0	否	9.2±0.1	3.6±0.2 ^b	98±3 ^b	19±5	706±61	6.6±1.6	1.5
PTMC ₁₈₃ -300	5.0	是	9.5±0.2	3.9±0.1 ^b	97±3 ^b	21±3	610±47	6.7±0.3	1.3
PTMC ₃₇₃ -0	0.0	否	7.7±0.3	2.2±0.1	126±10	6.7±2.8	847±73	2.5±0.6	2.2
PTMC ₃₇₃ -300	5.0	否	9.6±0.3	4.4±0.3 ^b	93±6 ^b	30±9	560±79	7.7±2.7	1.5
PTMC ₃₇₃ -300	5.0	是	10.5±0.2	4.6±0.2 ^b	102±10 ^b	35±4	622±26	9.5±1.4	1.0
PTMC ₃₇₃ /PTMC-PCL-PTMC-300	5.0	否	9.9±0.3	3.9±0.1 ^b	87±6 ^b	19±2	513±3	4.1±0.4	1.1
PTMC ₃₇₃ /PTMC-PCL-PTMC-300	5.0	是	10.3±0.1	3.9±0.1 ^b	95±8 ^b	17±3	608±65	4.1±0.9	1.1
PTMC ₃₇₃ /mPEG-PTMC-300	5.0	否	8.8±0.5	4.0±0.1 ^b	103±3 ^b	30±6	630±39	8.4±1.9	1.2
PTMC ₃₇₃ /mPEG-PTMC-300	5.0	是	10.0±0.3	4.1±0.2 ^b	96±1 ^b	34±1	645±22	9.4±0.3	1.3

[0283] ^a单次测量。永久变形是由在两小时恢复期以后进行的第 21 个循环估计的。误差为大约 0.5% 应变。

[0284] ^b由针对应力 - 应变图切线的交叉估计, 因为无法观察到明显的屈服点。

[0285] 因为这些 PTMC 网络旨在经受体外以及体内的重复的动态负载, 所以进行循环试验以评估光致交联对它们在动态条件下的蠕变行为的影响。图 2A、2B、和 2C 显示在光致交联之前和之后 PTMC 聚合物的滞后行为。这些图清楚地表明, 在所有情况下, 在存在 PETA 和光引发剂下, PTMC 的光致交联会显著降低滞后并在每个连续的循环中观测到减小的蠕变程度。在未交联状态下, 在第 20 个循环的结束时, PTMC₄₅、PTMC₁₈₃ 和 PTMC₃₇₃ 分别具有 45、29、15% 的蠕变值。当在存在 PETA 和光引发剂下进行光致交联时, 这些值显著下降: PTMC₄₅-300、PTMC₁₈₃-300 和 PTMC₃₇₃-300 分别具有 29、12、和 8% 的蠕变值。此外, 当光致交联时, PTMC 薄膜的应力松弛 (在每个循环中达到的最大应力的减小) 也非常大地减小。表 6 显示在施加 50% 应变的 20 次循环和 2h 恢复期以后这些薄膜的永久变形。可以看出, 当光致交联时, PTMC 均聚物的永久变形显著下降: 在循环试验中, 乙醇提取的 PTMC 网络显示可以与未提取网络比较的蠕变行为, 虽然对于提取的网络薄膜而言, 永久变形似乎略有降低。在 PTMC₃₇₃ 的光致交联和提取以后, 永久变形值低至 1.0% 应变。图 13A、13B、13C 和表 6 中的永久变形值的比较表明, 在循环试验中, 由 PTMC₃₇₃ 制备的光致交联网络显示最小的滞后、最小的应力松弛和最小的永久变形。这意味着, 与由相对较低初始分子量的聚合物制备的那些网络相比较, 高初始 PTMC 分子量可以制备具有更好弹性体性能的网络。

[0286] 图 13D 和在表 6 中的永久变形值表明, 光致交联掺合物还具有极好的弹性体性能。可以看出, PTMC₃₇₃与 PTMC-PCL-PTMC 或 mPEG-PTMC 掺合对于网络的循环蠕变行为并不具有不利影响。

[0287] 光致交联的基于 PTMC 的网络的体外酶侵蚀和润湿性

[0288] 利用胆固醇酯酶水溶液, 研究了基于 PTMC₃₇₃的光致交联网络的酶侵蚀。上述酶是巨噬细胞的分泌产物之一, 并且已知可有效地降解 γ 照射的和光致交联的 PTMC 网络。温育的聚合物薄膜随时间推移的相对质量和厚度的变化示于图 14。在胆固醇酯酶水溶液中线性 PTMC₃₇₃均聚物的侵蚀是相对快速的。当温育 11 天时, PTMC₃₇₃试样的质量损失是 $84 \pm 2.5\%$, 对应于 $2.48 \pm 0.45 \text{ mg}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$ 的质量损失速率。

[0289] 在酶水溶液中温育 28 天以后, PTMC₃₇₃-300、PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC-300、和 PTMC373/mPEG-PTMC-300 的光致交联薄膜的质量损失分别为 24 ± 2.7 、 16 ± 1.8 、和 $1.5 \pm 0.4\%$ (图 14A)。质量损失的相应速率为 0.41 ± 0.11 、 0.27 ± 0.07 、和 $0.017 \pm 0.01 \text{ mg}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$ 。光致交联 PTMC₃₇₃薄膜导致具有大大减小的侵蚀速率的网络, 从而允许它们用于长期生物医学应用中。侵蚀速率的降低可能是由于密集网络形成造成的链的受阻移动, 因为链需要针对酶攻击采取正确构象。这些结果还表明, 通过与嵌段共聚物掺合并且与其光致交联, 可以调节 PTMC 网络的酶侵蚀速率。尤其, 当与 mPEG-PTMC 嵌段共聚物掺合时, 会显著降低酶侵蚀。很可能的是, 包含 mPEG-PTMC 的掺合物的表面特性并不允许酶结合于聚合物的表面, 如已表明的, 上述酶在亲水性 - 疏水性界面处是最具活性的。实际上, 在表 7 中可以看出, 与由 PTMC₃₇₃均聚物或由它与 PTMC-PCL-PTMC 嵌段共聚物的掺合物制备的光致交联的网络相比较, 包含 mPEG-PTMC 嵌段共聚物的光致交联网络具有显著更低的接触角和略高的水吸收值。显然, 通过与亲水性 - 疏水性嵌段共聚物掺合, 可以容易地改变光致交联的 PTMC 网络的表面特性。

[0290] 表 7. 与嵌段共聚物光致交联以及与其掺合对基于 PTMC₃₇₃的薄膜的水接触角和水吸收值的影响。值表示为平均值 \pm 标准偏差。

[0291]

聚合物	水接触角 ($^\circ$) ^a			水吸收 (%) ^a
	静态	前进	后退	
PTMC ₃₇₃	77.4 ± 0.8	80.4 ± 0.4	48.6 ± 3.5	1.4 ± 0.3
PTMC ₃₇₃ -300	98.9 ± 3.4	101.5 ± 2.6	65.1 ± 1.8	1.2 ± 0.2
PTMC ₃₇₃ /PTMC-PCL-PTMC-300	94.6 ± 2.8	95.9 ± 2.8	63.6 ± 2.3	1.3 ± 0.2
PTMC ₃₇₃ /PTMC-mPEG-300	60.6 ± 1.0	63.1 ± 1.0	30.4 ± 1.2	1.8 ± 0.2

[0292] ^a在浇注在玻璃圆盘 ($n = 8$) 上的聚合物薄膜上进行的。

[0293] ^b在 37°C 的 PBS 中调节压缩模制的、光致交联的、和提取的薄膜持续 1 周 ($n = 4$)。

[0294] 未照射的 PTMC₃₇₃薄膜具有 77.4 ± 0.8 的平均静态接触角。有趣的是, 与未照射薄膜的接触角相比较, 包含 PETA 和光引发剂 (PTMC₃₇₃-300) 的 UV 照射的 PTMC₃₇₃薄膜的接触角显著地更大 (98.9 ± 3.4)。为了评估 UV 照射的单独作用, 我们照射并不包含 PETA 或光引发剂的 PTMC₃₇₃薄膜。在照射 300 分钟以后, PTMC₃₇₃的静态接触角、前进接触角、和后退接触角分别为 $85.3 \pm 1.1^\circ$ 、 $87.5 \pm 0.9^\circ$ 、和 $52.0 \pm 1.4^\circ$, 它们同样高于未照射的 PTMC。这

证实了，在惰性条件下进行交联，因为在空气中短波长紫外线照射将导致聚合物表面氧化并增加亲水性（更小的接触角）。据报道，在 2×10^{-4} Pa 的减压下，当真空 UV 照射 (126nm) 时，PMMA 的接触角也增加大约 20°。这与在聚合物表面上碳的百分比增加相关。

[0295] 图 7B 显示，在酶降解期间，随时间推移，未交联的 PTMC₃₇₃ 薄膜以及光致交联的 PTMC₃₇₃-300 和 TMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC-300 薄膜的厚度也减小。这表明，通过表面侵蚀过程来侵蚀这些聚合物和网络薄膜。可以确定 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC-300 试样的厚度没有显著减少，但 SEM 分析揭示了这些薄膜一定程度的表面点蚀，这证实了它们的缓慢的表面侵蚀（数据未显示）。

[0296] 光致交联的基于 PTMC 的组织工程支架

[0297] 为了制造 TE 支架，制备了聚合物 (PTMC₃₇₃ 均聚物、PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 或 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 混合物)、PETA、光引发剂、和碳酸亚乙酯的溶液。使用生物打印机 (bioplotter)、光致交联、以及提取处于水和乙醇中的碳酸亚乙酯和其他可能的可浸出物，通过计算机控制挤出聚合物溶液来制备光致交联的基于 PTMC 的三维支架。

[0298] 由基于 PTMC 的柔性聚合物制备的支架具有 70±6% 的高孔隙率以及互连孔。图 4 显示由 PTMC₃₇₃ 聚合物制备的光致交联支架的 SEM 显微照片。当使用 PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 或 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 混合物时，也获得类似的结构。从图 15A 和 15B 中可以看出，在设计在 x 或 y 方向上打印的纤维之间的距离为大约 200–250 μm 并且纤维的直径为 100–150 μm。孔的高度为 50 至 100 μm (图 15D)。

[0299] 使用碳酸亚乙酯 (EC) 作为溶剂允许在 100–120 °C 的相对较低的温度下挤出高分子量 PTMC 聚合物。在不使用 EC 的情况下，甚至对于挤出相对低分子量 PTMC₄₅ 聚合物也需要高于 220 °C 的温度。此外，用冷氮气冷却挤出的纤维会诱导碳酸亚乙酯结晶。EC 的结晶不仅为无定形 PTMC 聚合物的挤出纤维提供所需要的形状稳定性，而且还导致形成具有微孔性的纤维。在图 15C 中可以特别清楚地看出在纤维中的这些微孔（几微米至几十微米）和纤维表面的粗糙度。在组织工程中这些 PTMC 支架的微孔性可以是有利的，因为已经显示通过表面粗糙度，可以改善细胞与基质的附着以及它们的存活率。这种微孔性还可以导致营养物运输到细胞中以及从细胞中去除废物的增强。

[0300] 将人间充质干细胞 (hMSC) 接种于光致交联的 (300 分钟) 基于 PTMC 的支架并培养 10 天。图 16 显示用亚甲蓝染色的活细胞。可以看出，在由 PTMC₃₇₃ 和 PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 制备的支架之上和之中存在的细胞数目从接种当天 (图 16A、16D) 至第 5 天 (图 16B、16E) 会增加。在培养 10 天以后，这些支架包含很高数目的活细胞，如从图 16C 和 16F 中的广泛的 (蓝色) 染色可以看到的。在由 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 混合物制备的支架之上和之中的细胞量远小于其他两种材料。这种材料的亲水特性可能不容许吸附存在于细胞培养基中的细胞结合蛋白，这会阻碍 hMSC 粘附于这些表面。

[0301] 通过 SEM，证实了这些观测结果 (图 17)。在培养 5 天以后，在纤维上观测到具有拉伸的成纤维细胞样形态的 hMSC (图 17A、17D、17G)。图 17B 和 17E 显示，hMSC 增殖并且由 PTMC₃₇₃ 和 PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 制备的光致交联支架的表面几乎完全覆盖着细胞。从图 17C、和 17F 的横截面可以看出，细胞也存在于支架内并已产生细胞外基质。这表明，这些材料与 hMSC 相容。并且使用 SEM，在由 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 混合物制备的支架上看到少量的细胞。

[0302] 在 hMSC 培养期间,通过确定培养基中葡萄糖和乳酸盐浓度来监测细胞的代谢图。图 18A 和 18B 显示在第 5、8 和 10 天的葡萄糖和乳酸盐浓度(请注意,在第 5 天更换培养基)。在所有培养物中,随着时间的推移,葡萄糖浓度降低而乳酸盐浓度则增加。因为较高数目的细胞存在于由 PTMC₃₇₃ 和 PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 制备的光致交联支架中,所以在包含这些细胞接种支架的孔中葡萄糖消耗和乳酸盐生产均较高。在包含由 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 摹合物制备的细胞接种支架的孔中,葡萄糖消耗和乳酸盐生产均较低,因为在这些支架中存在显着较少的细胞。对于使用 PTMC₃₇₃-300、PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC-300、和 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC-300 的支架的培养物而言,葡萄糖消耗的速率分别为 23.3±1.7、25.0±2.4、和 9.8±1.5 μM/h。相应的乳酸生产速率为 60.8±6.5、63.2±8.1、和 34.1±3.9。这些结果表明,与由 PTMC₃₇₃/mPEG-PTMC 制备的那些支架相比较,PTMC₃₇₃-300 和 PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC-300 的支架更适合于组织工程的应用。(然而,包含 mPEG-PTMC 嵌段共聚物的网络可以用来改善生物材料(如血管移植植物)的血液相容性。)

[0303] 结论

[0304] 这项研究表明,通过包含 PETA 和光引发剂的 PTMC 薄膜的有效的光致交联,可以获得具有极好的弹性体性能和降低的酶侵蚀速率的、柔性的和韧性的 PTMC 网络。通过与包含嵌段共聚物的 PCL 或 PEG 摳合,可以很容易地改变这些 PTMC 网络的性能(如润湿性和酶侵蚀)。可以通过热塑性 PTMC 聚合物的熔融沉积成型以及随后 UV 光致交联支架,来获得具有互连孔和广泛的微孔性的组织工程支架。由 PTMC₃₇₃ 聚合物和 PTMC₃₇₃/PTMC-PCL-PTMC 摳合物制备的光致交联支架适用于组织工程的应用,因为它们允许人间充质干细胞的黏着和增殖。这种通用的交联方法为高分子量聚合物的简便交联和以这种方式来改进它们的性能提供了令人感兴趣的机会。

[0305] 实施例 4

[0306] 材料

[0307] 按原接收状态使用聚合物级碳酸 1,3- 三亚甲基酯(TMC, Boehringer Ingelheim, 德国)、1,3-丙二醇、三羟甲基丙烷、和辛酸亚锡(均来自 Sigma, 美国或德国)。甲基丙烯酸酐和氢醌购自 Aldrich(德国)。(±)-□-生育酚获自 Fluka(瑞士)。溶剂(Merck, 德国, 或 Biosolve, 荷兰)具有分析级。按原接收状态使用光引发剂 Irgacure® 2959(1-[4[(2-羟基乙氧基)-苯基]-2-羟基-2-甲基-1-丙烷-1-酮)、Irgacure® 369(2-苄基-2-二甲基氨基-1-(4-吗啉代苯基)-丁酮-1)、Irgacure® 500(50% 1-羟基-环己基-苯基-酮、50% 二苯甲酮)(Ciba®, 瑞士)、二苯甲酮(Aldrich, 德国)、和 DMPA(2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮)(Aldrich, 德国)。

[0308] J774A 巨噬细胞(ATCC-TIB-67)获自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)。培养基、胎牛血清、Glutamax™ 和青霉素-链霉素获自 Invitrogen(Gibco, 美国)。培养一次性用品来自 Nunc(美国)和 Greiner(德国)。对于人间充质干细胞培养,使用了 α-最低限度的基本培养基(α-MEM, Gibco 美国)。这种培养基还包含胎牛血清(10%, Biowhitaker, 比利时)、青霉素 G(100 单位/ml, Invitrogen 美国)和链霉素(100 μg/ml, Invitrogen 美国)、L-谷氨酰胺(2mM, Sigma, 美国)。在使用前,将来自猪胰腺的胆固醇酯酶(CE)(Sigma, 英国, 56.2U/mg)和二氧化钾(KO₂, Sigma, 美国)分别溶解于磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH = 7.4, B. Braun Melsungen A.G., 德国)和 NaOH/NaCl

缓冲液 (pH = 13, Scharlau Chemie, 西班牙) 中。

[0309] PTMC 聚合物和 PTMC 大分子单体交联剂的合成

[0310] 在真空下在 130°C 下, 使用辛酸亚锡作为催化剂, 通过 TMC 单体的开环聚合反应持续三天来合成线性高分子量聚 (碳酸三甲酯) (PTMC)。通过溶解于氯仿并沉淀到乙醇中, 用新鲜乙醇洗涤并在室温下在真空下干燥, 来纯化聚合物。

[0311] 通过使用 1,3-丙二醇 (20 摩尔%) 或三羟甲基丙烷 (14.3 摩尔%) 作为引发剂, 通过开环聚合反应 (低聚反应), 来合成双臂和三臂的羟基封端的 PTMC 低聚物 (参见图 19)。在氩气下在 130°C 下, 使用辛酸亚锡作为催化剂, 进行合成持续 48h。为了获得甲基丙烯酸酯官能化的 PTMC 低聚物 (大分子单体), 在 120°C 下使羟基封端的低聚物和 30 摩尔% 过量的甲基丙烯酸酐反应 8h。为了防止在此步骤期间的过早交联, 将氢醌和 (\pm - α -生育酚 (0.06wt%) 用作抑制剂。通过在减压下蒸馏来除去过量的甲基丙烯酸酐和形成的甲基丙烯酸。通过溶解于丙酮, 沉淀到水中并冷冻干燥, 来进一步纯化 PTMC 大分子单体。

[0312] 表征

[0313] 使用 CDCl_3 通过质子核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$) 光谱仪 (300MHz, Varian Innova, 美国) 来确定 TMC 单体的转化。

[0314] 通过凝胶渗透色谱法 (GPC, Viscotek, 美国) 来确定 PTMC 的数均和重均分子量 (分别为 M_n 和 M_w)、多分散指数 (PDI) 和特性粘度 ([η])。设置配备有串联放置的 ViscoGEL I-guard-0478、ViscoGEL I-MBHMW-3078、和 ViscoGEL I-MBLMW-3078 柱, 以及具有折光检测器、粘度检测器、和光散射检测器的 TDA302 三检测器阵列 (Triple Detector Array), 从而可以测定绝对分子量。在 30°C 下, 使用氯仿作为洗脱剂, 在 1.0ml/分钟的流速下, 进行所有测定。

[0315] 通过 $^1\text{H-NMR}$ 光谱术来确定两臂大分子单体和三臂大分子单体 (分别为二甲基丙烯酸酯低聚碳酸酯, DMAC, 和三甲基丙烯酸酯低聚碳酸酯, TMAC) 的分子量。

[0316] PTMC 薄膜的制备

[0317] 通过在黑暗中将化合物溶解和混合于二氯甲烷, 将 PTMC 均聚物与不同量的光引发剂和大分子单体交联剂混合。在蒸发溶剂以后, 利用厚度为 500 μm 的不锈钢模具和实验室压制机 (Fonteijne THB008, 荷兰) 来制备压缩模制的薄膜。在大约 25kg/cm² 下, 在 140°C 下, 模塑薄膜, 并使用冷水骤冷至室温。

[0318] 光致交联和网络表征

[0319] 将包含大分子单体 (DMAC 或 TMAC) 和光引发剂的压缩模制的薄膜真空密封于层压的聚乙烯 / 聚酰胺袋 (Hevel Vacuum B.V., 荷兰) 中并在 7cm 的距离处暴露于短波 UV 光 (UltraLum 交联室, 美国, 波长 254nm)。在室温下照射试样的两侧持续不同时间。在此距离处的光强度为 10–14mW/cm², 如使用光功率计 (Newport1916-C, 美国) 测量的, 聚乙烯 / 聚酰胺袋将强度降低至 5–7mW/cm²。

[0320] 为了确定平衡溶胀比和凝胶含量, 从照射的薄膜冲切出盘状试样 (500 μm 厚度, 10mm 直径) 并放置在 30mL CHCl_3 中持续 1 周, 在 3 天以后更换溶剂一次。此程度可以确保完全去除溶胶部分。然后称重溶胀的凝胶, 在室温下在真空下干燥至恒重并再次称重。按照方程 (1) 和 (2) 来分别计算凝胶部分和溶胶部分:

[0321]

$$\text{凝胶部分} (\%) = \frac{m_d}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

[0322]

$$\text{溶胶部分} (\%) = \left(1 - \frac{m_d}{m_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

[0323] 其中 m_d 是干燥 (提取) 样品的质量并且 m_0 是溶胀以前试样的质量。

[0324] 按照方程 (3) 来计算体积溶胀比 (q)。

$$q = 1 + \rho_p \times \left(\frac{\frac{m_s}{m_d} - 1}{\rho_s - \rho_p} \right) \quad (3)$$

[0326] 其中 m_s 是提取和溶胀样品的质量, 并且 ρ_s 和 ρ_p 分别是氯仿 (1.48 g/cm^3) 和 PTMC (1.31 g/cm^3) 的密度。

机械性能

[0328] 按照 ASTM-D882-91, 在乙醇中提取以后, 重复三次确定光致交联 PTMC 薄膜的拉伸性能, 测得为大约 $100 \times 5 \times 0.5 \text{ mm}^3$ 。在 50 mm/分钟 的十字头速度下, 操作配备有 500 N 测压元件 (load cell) 的 Zwick Z2020 拉伸测试仪 (Ulm, 德国)。初始夹头间距离为 50 mm 并施加 0.01 N 的预加载。试样变形源自夹头间距离; 因此提供的杨氏模量 (由应力 - 应变曲线的起始斜率计算) 仅给出聚合物刚度的指示。

[0329] 为了评估它们在动态负载条件下的行为, 在循环试验中, 在 50 mm/分钟 下, 将试样 ($n = 1$) 重复 ($20x$) 伸长至 50% 应变。在 2 h 恢复期以后, 由第 21 个循环的应力 - 应变图估计永久变形。在这些实验中, 施加 0.01 N 的预加载, 形变源自夹头间距离。数值的误差大约为 0.5% 应变。

人间充质干细胞培养

[0331] 在盘状光致交联和乙醇提取的 PTMC 薄膜 (15 mm 直径和大约 $200 \mu \text{m}$ 厚度) 上培养人间充质干细胞 (hMSC)。在细胞培养以前, 通过在 70% 乙醇中浸泡 15 分钟来消毒薄膜, 然后用无菌 PBS 洗涤。hMSC 获自接受全髋关节置换手术的供体, 其给予知情同意书。得到当地医疗伦理委员会的批准。使用 α MEM 以 5×10^4 个细胞/ cm^2 的初始接种密度来培养细胞 (第 2 代)。每周更换培养基两次。

[0332] 在培养 4 周以后, 用 3.7% 多聚甲醛来固定在薄膜上的细胞。一半试样用金溅射涂覆, 然后在 5 kV 的操作电压下通过扫描电子显微镜 (SEM, Philips XL30ESEM-FEG, 荷兰) 来分析它们的表面。剩余一半用于使用 $4', 6'$ -二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 进行细胞核荧光染色。使用小鼠单克隆 α - 肌节肌动蛋白作为一抗以及异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的同型特异性山羊抗小鼠二抗来染色细胞的肌动蛋白细胞骨架。然后通过共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 来分析这些试样。

体外侵蚀研究

[0334] 将用于巨噬细胞介导的侵蚀研究的 J774A 巨噬细胞保持在包含 4.5 g/L D-葡萄糖 、丙酮酸盐 (酯)、 10% 胎牛血清、 100 U/mL 青霉素 、 $100 \mu \text{g/mL 链霉素}$ 和 $100 \mu \text{g/mL L2mM Glutamax}^\text{TM}$ 的 DMEM 中。通过刮取, 每 4 至 7 天, 将细胞传代。

[0335] 通过在薄膜表面上直接培养 J774A 巨噬细胞, 研究了在巨噬细胞培养物中光致交联和乙醇提取的聚合物薄膜的侵蚀。测试样品的直径为 15 mm 并且厚度为大约 $500 \mu \text{m}$ 。接

种密度为大约 8×10^4 个细胞 / cm^2 。在不同表面上培养细胞 8 天以后, 将新鲜等分部分的细胞加入培养物。在每种材料的 6 个圆盘上培养细胞。一周一次更换培养基。

[0336] 在培养 14 天以后, 首先将每种材料的 3 个试样放入 Milli-Q 水中以溶解细胞, 然后彻底冲洗并称重。在真空下在室温下干燥薄膜至恒重以后, 再次称重试样。如上文所述, 通过 SEM 来评估试样的表面。

[0337] 用处于细胞骨架稳定 (CS) 缓冲液 (0.1M 呲嗪 -1,4- 二 (2- 乙磺酸) (PIPES) 缓冲剂、1mM 乙二醇四乙酸 (EGTA), pH = 6.9) 中的 3.7% 多聚甲醛来固定每种材料的剩余圆盘 ($n = 3$) 持续 15 分钟, 然后转移到 PBS。试样用于使用 DAPI 进行细胞核的荧光染色, 以及使用四甲基罗丹明异硫氰化物 - 鬼笔环肽 (TRITC- 鬼笔环肽) 进行肌动蛋白细胞骨架的荧光染色。利用 CLSM (配备有 40X NA0.80 全浸水透镜的 Leica TCS SP2) 来分析样品以允许粘附的细胞深度可视化。

[0338] 来自猪胰腺的胆固醇酯酶 (CE) 用来研究未交联和光致交联的 PTMC 薄膜的酶水解。使用包含作为杀菌剂的 0.02wt% NaN₃ (Sigma, 美国) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH = 7.4) 以 20 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度来制备 CE 酶水溶液。将乙醇提取的、盘状薄膜 (8mm 直径, 大约 500 μm 厚度, $n = 8$) 放入包含 1mL 新鲜制备的酶溶液的小瓶中并在 37°C 下加以调节。每两天更换培养基一次。在温育 14 天以后, 在冲洗和吸干它们的表面以后, 确定湿试样的质量。在真空下在室温下干燥试样至恒重以后再次进行测量。

[0339] 通过在使用 NaOH/NaCl 缓冲液 (pH = 13) 制备的 KO₂ 水溶液 [5M] 中温育, 还研究了具有相同尺寸的 PTMC (网络) 薄膜的体外侵蚀。将试样 ($n = 4$) 放入包含 1mL 新鲜制备的超氧化物溶液的小瓶中。每日更换溶液。在 37°C 下温育 1 周以后, 如上文所述确定质量损失。

润湿性和水吸收

[0341] 在通过在玻璃圆盘 ($n = 6$ / 材料) 上浇注处于二氯甲烷中的聚合物溶液 (大约 1wt%) , 在真空下干燥, 并在惰性气氛下光致交联而制备的薄膜上进行接触角测量。在室温下, 利用配备有电子注射器模块的基于视频的系统 (OCA20DataPhysics Instruments GmbH, 德国) 来确定超纯水 (MilliQ Plus-Millipore, 法国) 在不同表面上的静态接触角、前进接触角和后退接触角。

[0342] 在用乙醇提取以后, 确定压缩模制的和光致交联的薄膜的平衡水吸收。在 37°C 下在 PBS (pH = 7.4) 中调节试样 ($n = 4$) 持续 1 周。水吸收被定义为试样的质量增加。

结果

[0344] 通过 TMC 的开环聚合来合成 $M_n=291\text{ kg/mol}$ 的线性高分子量 PTMC。通过用少量的 1,3-丙二醇或三羟甲基丙烷来引发 TMC 的开环聚合, 并且随后使双臂和三臂低聚物与甲基丙烯酸酐反应, 来制备 PTMC 大分子单体。在用 UV 光照射高分子量 PTMC 期间, 将甲基丙烯酸酯官能化的 DMAC 大分子单体和 TMAC 大分子单体用作交联剂。

[0345] ¹H NMR 分析表明, 在开环聚合 (低聚反应) 反应中 TMC 的转化率高于 95%, 并且在大分子单体中 99% 以上的羟基端基已被转化成甲基丙烯酸酯。通过 NMR 还确定了纯化的 DMAC 和 TMAC 大分子单体的数均分子量, 各自的值为 810g/mol 和 1100g/mol (或 2.9 和 2.5TMC 单位 / 臂)。

利用光引发剂光致交联 PTMC 薄膜

[0347] 在初步实验中,制备包含不同光引发剂(PI)的线性高分子量PTMC的薄膜并用短波UV光照射30至120分钟。(PI与聚合物中TMC重复单元的摩尔比率为1:1000)。令人惊讶地发现,当Irgacure®2959、Irgacure®500、或二苯甲酮用作PI时,则获得具有高凝胶含量的PTMC网络。使用这些PI,在120分钟照射以后,获得具有84-87%凝胶的网络。当照射包含DMPA、或Irgacure®369的PTMC薄膜持续120分钟时,凝胶含量低得多:分别为62%和0%。

[0348] 还已表明,在存在经历Norrish II型光解的光引发剂(如二苯甲酮)下,当UV照射时聚乙烯和聚(环氧乙烷)发生交联,并作为氢夺取剂(hydrogen abstracting agent)。据提议,通过两个大分子基团结合形成H型交键,两种聚合物发生交联。另外,在存在经历Norrish I型光解(α -裂解)的光引发剂下,聚(环氧乙烷)也可以较低效地交联。在使用PTMC的实验中情况也是这样,其中经历Norrish I型光解的光引发剂(DMPA和Irgacure®369)产生最低的网络凝胶含量。

[0349] Irgacure®2959和二苯甲酮同样有效,并且认为它与范围广泛的哺乳动物细胞类型具有良好相容性,在进一步的实验中它用作PI。

[0350] 通过照射包含不同量的Irgacure®2959的PTMC薄膜持续范围从30分钟直至300分钟的时间,评估了PI浓度对凝胶含量和网络密度的影响。对于所有照射时间(30、60、120、180、240、和300分钟),增加PTMC薄膜的PI含量会最初增加所形成的PTMC网络的凝胶含量并降低其溶胀比。图20显示照射时间为120分钟的情况。对于所有照射时间,发现最佳PI/TMC比(其中获得最高凝胶含量和最低溶胀比)为1/1000。在高于1/1000的PI浓度下,凝胶含量的降低可能是由于量子产率的降低。这可能是由于竞争反应:光引发自由基可以和PTMC链反应或光引发自由基可以彼此反应或与PTMC大分子基团反应。

[0351] 对于所有PI浓度,照射薄膜持续少于120分钟会导致较低的网络凝胶含量和较高溶胀比。增加照射时间超过120分钟并不产生具有较高凝胶含量或较高网络密度的网络。

[0352] 利用Irgacure®2959光引发剂和PTMC大分子单体作为交联剂光致交联PTMC薄膜

[0353] 为了研究它们的交联性能,将包含不同量的Irgacure®2959光引发剂和不同量的PTMC大分子单体的高分子量PTMC薄膜暴露于UV光。在所有情况下,当UV照射时,形成透明的PTMC网络。

[0354] 在PTMC大分子单体的恒定浓度(1/50甲基丙烯酸酯/聚合物中TMC重复单元)下,随着PI浓度增加(1/8000、1/4000、1/2000、1/1000PI/聚合物中TMC重复单元),所形成网络的凝胶含量增加而溶胀比则降低。当DMAC和TMAC两者用作交联剂时观测到这种情况。例如,当照射包含DMAC的薄膜持续30分钟时,当PI/TMC比从1/8000增加到1/1000时,所形成的网络的凝胶含量从53±2%增加到89±1%。在氯仿中的相应溶胀比为23.2±0.6和13.9±0.2vol/vol。因此,在进一步的实验中,使用1/1000的最高PI/TMC比。当照射PTMC薄膜持续60分钟或120分钟时,观察到同样的趋势:增加照射时间也产生具有较高凝胶含量和较低溶胀比的网络。

[0355] 所使用的照射时间和交联剂对PTMC网络薄膜的凝胶含量和溶胀比的影响示于图21。PTMC薄膜具有1/1000的PI/TMC比,并且对于包含DMAC或TMAC的薄膜,则具有

1/50 的甲基丙烯酸酯 /TMC 比。取决于 UV 照射时间,由并不包含 PTMC 大分子单体的 PTMC 薄膜制备的网络 (PTMC-PI) 的凝胶含量和溶胀比分别为 64±3 至 87±2% 以及 48±1 至 14.6±1.2 vol/vol。对于由包含 PTMC 大分子单体的薄膜制备的网络,凝胶含量为 89±1 至 95±1% (对于 PTMC-PI-DMAC) 以及 91±1 至 94±1% (对于 PTMC-PI-TMAC)。重要的是,通过调节照射时间,可以调节这些网络的密度,同时维持高凝胶含量。在氯仿中的溶胀比为 13.9±0.2 至 8.5±0.1 vol/vol。

[0356] 在图 2 中也可以看到,在薄膜中使用 PTMC 大分子单体作为交联剂会显著增加交联速率,从而比仅包含光引发剂的 PTMC 薄膜快得多地产生高凝胶含量和低溶胀比。在 30 分钟 UV 照射以后,PTMC-PI、PTMC-PI-DMAC、和 PTMC-PI-TMAC 分别具有 64±3、89±1、91±1% 的凝胶含量。相应的溶胀比为 48±1、13.9±0.2、12.2±0.3 vol/vol。由包含二甲基丙烯酸酯交联剂或三甲基丙烯酸酯交联剂的 PTMC 薄膜制备的网络的特性差异是最小的,虽然 TMAC 网络薄膜似乎稍微更密集地交联。

[0357] 我们还研究了薄膜中大分子单体含量对 PTMC 网络形成的影响。在恒定 PI/TMC 比 (1/1000) 下,我们变化薄膜的 TMAC 含量。以此方式,我们也可容易地调节这些薄膜的网络密度:对于 0、1/200、1/100、1/50 的甲基丙烯酸酯 /TMC 比而言,网络的溶胀比分别为 14.6±1.2、12.4±0.3、11.4±0.3、8.5±0.1 vol/vol。所有上述网络具有 87±2 至 94±1% 的高凝胶含量。

[0358] 观测到的高凝胶含量和网络密度表明,大分子单体被并入 PTMC 网络。

[0359] 光致交联的 PTMC 网络的机械性能

[0360] 由线性 PTMC 制备的以及由光致交联和提取 PTMC 网络薄膜制备的压缩模制薄膜的拉伸性能示于表 7,同时代表性的应力 - 应变曲线则示于图 22。PTMC 光致交联已导致显著较高的断裂应力值,而断裂应变值仍然很高。光致交联导致具有高得多的韧性的薄膜。由包含作为交联剂的 TMAC 的高分子量 PTMC 薄膜制备的 PTMC 网络具有高达 24±3 MPa 的断裂应力值。此外,PTMC 的柔性特性没有受到交联的很大影响。由线性 PTMC 制备的薄膜的弹性模量值为 6.6±0.5 MPa,而对于光致交联的 PTMC 薄膜而言,弹性模量值则为 7.1±0.1 至 7.5±0.2。这是最重要的,因为这些网络旨在用于涉及软组织的医疗应用。

[0361] 当在组织工程支架中培养细胞时,经常使用生物反应器,因为这可以紧密地配合体内动态条件。因此,在有待这样的应用中使用的材料应能够经受施加的重复循环应力并从中恢复。通过施加伸长至 50% 应变的 20 次循环,我们评估了网络薄膜的抗蠕变性。图 23 示出应力 - 应变曲线,显示了不同材料的这些 20 次循环。在 20 次循环以后,未照射的 PTMC 薄膜具有最大蠕变 (15.3%)。在 2h 恢复期以后,它们的永久变形为 1.6% 应变 (表 7)。在循环试验中,光致交联网络薄膜显示显著改善的弹性行为以及小得多的蠕变。在第 20 个循环以后,PTMC-PI、PTMC-PI-DMAC、和 PTMC-PI-TMAC 分别具有 9.9、7.5、和 7.6% 应变的蠕变值。这些网络的永久变形值低至 0.6% 应变。

[0362] 在循环测试中观察到的另一种现象是最大应力值的降低,由于应力松弛在加载循环结束时达到所述最大应力值是。应力松弛是不希望的,因为,当施加循环应力时,它会导致构建物 (如血管组织工程支架和移植物) 的扩张和故障。通过光致交联,还可以降低 PTMC 的应力松弛。对于未交联的 PTMC 而言,最大应力从 3.2 降低至 2.4 MPa,而在光致交联薄膜的情况下,这种降低仅为 0.3–0.4 MPa。

[0363] 表 7. 通过 UV 光致交联仅包含光引发剂或光引发剂和 PTMC 大分子单体的 PTMC 薄膜所制备的 PTMC 和 PTMC 网络的机械性能。值表示为平均值 ± 标准偏差 (n = 3)。

[0364]

网络	照射时间 (分钟)	PI/TMC ^a (mol/mol)	甲基丙烯酸酯/TMC ^a (mol/mol)	E (MPa)	$\sigma_{屈服}$ (MPa)	$\epsilon_{屈服}$ (%)	$\sigma_{断裂}$ (MPa)	$\epsilon_{断裂}$ (%)	断裂能 (焦耳)	永久变形 ^b (%)
PTMC ^c	未照射	0	0	6.6±0.5	2.1±0.1	143±5	4.6±0.7	892±47	2.2±0.2	1.6
PTMC-PI ^d	120	1/1000	0	7.1±0.1	2.2±0.1 ^e	95±7 ^e	16±1	878±7	4.0±0.1	0.8
PTMC-PI-DMAC ^d	120	1/1000	1/50	7.1±0.6	2.3±0.1 ^e	90±5 ^e	22±2	749±28	4.7±0.6	1.0

[0365]

PTMC-PI-TMAC ^d	120	1/1000	1/50	7.5±0.2	2.3±0.1 ^e	90±8 ^e	24±3	731±28	5.2±0.7	0.6
---------------------------	-----	--------	------	---------	----------------------	-------------------	------	--------	---------	-----

[0366] ^a基于聚合物中的 TMC 重复单元

[0367] ^b单次测量。在两小时恢复期以后,由第 21 个循环估计永久变形。误差为大约 0.5% 应变。

[0368] ^c线性 PTMC 聚合物,通过沉淀纯化并且在真空中干燥,然后压缩模制

[0369] ^d用乙醇提取网络并在真空中干燥。

[0370] ^e由针对应力 - 应变图切线的交叉来估计,因为无法观察到明显的屈服点。

人间充质干细胞培养

[0372] 为了评估光致交联和提取的 PTMC 网络与细胞的相容性,在 PTMC-PI-TMAC (1/50 甲基丙烯酸酯 / 聚合物中 TMC 重复单元) 表面上培养人间充质干细胞 (hMSC)。在培养期间, hMSC 保持存活;图 24 显示在 4 周以后在薄膜表面上的 hMSC。在此时,在网络薄膜上存在具有伸长形态的 hMSC 的密集群体。这种初步测定表明,这些光致交联的 PTMC 网络是用于制备组织工程支架的合适材料,因为 hMSC 在这些表面上会很长时间保持存活并处于健康状态。在这些基于 PTMC 的网络薄膜上 hMSC 的分化是进一步研究的课题。

光致交联的 PTMC 网络的体外侵蚀和润湿性

[0374] 在植入可吸收性聚合物以后,在组织 - 生物材料界面处巨噬细胞变成主要细胞。巨噬细胞可以参与异体反应事件以及参与生物材料降解和侵蚀事件。巨噬细胞培养已用作用于可降解聚合物的生物相容性和生物降解的初步体外测定。通过这样的测定,表明短链聚(3-羟基丁酸)的小晶体颗粒可能以剂量依赖方式损害巨噬细胞,这表明降解产物和降解速率对于可生物降解聚合物的生物相容性的重要性。为了评估光致交联 PTMC 网络的侵蚀行为,我们在提取的网络薄膜上培养巨噬细胞并将它们的侵蚀作用与线性 PTMC 薄膜进行比较。所有网络薄膜包含 1/1000 的 PI/TMC 重复单元、不同量的 TMAC (甲基丙烯酸酯 / TMC 重复单元为 0、1/200、1/100、1/50) 并通过 120 分钟 UV 照射进行光致交联。

[0375] 在巨噬细胞培养 14 天以后,发现所有 PTMC 薄膜已受到侵蚀。它们的质量已减少并且在薄膜表面上观测到形成凹点,这表明在巨噬细胞培养期间表面的侵蚀(图 25)。表 8 给出在巨噬细胞培养物中薄膜的侵蚀速率的综述。值得注意的是,在培养期间,没有观测到所使用的基于 PTMC 的材料或它们的降解产物对巨噬细胞的细胞毒性作用。此外,上述材料和它们的降解产物均没有诱导巨噬细胞的活化。这表明这些材料的生物相容性并证实用间

充质干细胞进行的观察。

[0376] 表 8. 在巨噬细胞培养物中, 或在胆固醇酯酶或二氧化钾水溶液中温育的, 未交联的和光致交联的 PTMC 薄膜的表面侵蚀速率。

[0377]

网络	PI/TMC ^a (mol/mol)	MA/TMC ^a (mol/mol)	在 MQ 培养物中 的侵蚀速率 ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$)	在 CE 溶液中的侵 蚀速率 ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$)	在 KO ₂ 溶液中的 侵蚀速率 ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天})$)
PTMC ^b		未照射	159±8	2160±610	2040±360
PTMC-PI	1/1000	0	28±4	137±38	1280±130
PTMC-PI-TMAC ^c	1/1000	1/200	16±4	20±5	670±50
PTMC-PI-TMAC ^c	1/1000	1/100	12±3	13±4	670±15
PTMC-PI-TMAC ^c	1/1000	1/50	11±3	15±3	740±50

[0378] ^a基于聚合物中的 TMC 重复单元

[0379] ^b线性 PTMC 聚合物, 通过沉淀纯化并在真空中干燥。

[0380] ^c用乙醇提取网络并在真空中干燥。

[0381] 在由线性 PTMC 制备的薄膜上, 巨噬细胞是最有效的。这些薄膜的侵蚀速率为 $159 \pm 8 (\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{天}))$, 这相当于 $3.8 \pm 0.2\%$ 的质量损失。SEM 揭示了, 表面已被广泛侵蚀 (图 25A 和 25B)。通过光致交联可以减少 PTMC 薄膜的侵蚀, 因为 PTMC-PI 网络薄膜的侵蚀远小于未交联的 PTMC 薄膜。这是非常重要的, 因为线性或轻度交联的 PTMC 薄膜在体内相对快速地侵蚀, 从而阻碍它们用于长期生物医学应用。通过使用 PTMC 大分子单体作为交联剂, 可以进一步减小侵蚀速率。具有甲基丙烯酸酯相对于 TMC 的比率为 0、1/200、1/100、和 1/50 的薄膜的侵蚀速率分别为 28 ± 4 、 16 ± 4 、 12 ± 1 、 $11 \pm 3 (\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{天})$ (相当于 0.7% 至 0.3% 的质量损失)。在图 25C 至 25J 中, 随着交联剂的量增加, 薄膜侵蚀程度的减小是非常明显的; 在薄膜表面上的凹点已变得浅得多。

[0382] 所观测到的光致交联薄膜的巨噬细胞介导的侵蚀的减小可能是由于 (更密集的) 网络形成, 这使得键更加不易 (酶) 水解。在氯仿中这些网络的溶胀比为 14.6 ± 1.2 至 $8.5 \pm 0.1 \text{vol/vol}$ 。另一个原因可能是在不同表面上巨噬细胞的黏着和增殖的差异。在培养 14 天以后, 我们确定了在不同网络薄膜上的细胞数目。图 26 中显示与在未交联的 PTMC 薄膜 (5657 ± 755 个细胞/ mm^2) 或 PTMC-PI 网络薄膜 (6574 ± 1433 个细胞/ mm^2) 上的情况相比较, 包含作为交联剂的 TMAC 的网络薄膜具有较低数目的巨噬细胞 (2607 ± 1033 至 4082 ± 681)。然而, 在不同表面上细胞数目的减少远小于不同薄膜侵蚀的减少。因此, 甚至在将侵蚀速率归一化到细胞数目以后, 当交联时 PTMC 薄膜的侵蚀速率降低也是显而易见的。

[0383] 细胞在生物材料上的附着在很大程度上取决于蛋白质吸附, 这取决于生物材料的表面性能。针对未交联的和光致交联的 PTMC 薄膜的水在空气中的接触角和水吸收量列于表 9。数值表明, PTMC 和它的网络是疏水性的。当在 PBS 中温育 1 周以后, 所有薄膜获得大约 1% 重量。当交联时, 并随着 TMAC 的量增加, 接触角从 80° 增加至 97° 。与线性 PTMC 相比较, 包含 TMAC 的网络薄膜的非常高的疏水性可能导致巨噬细胞在较小程度上附着于这些表面, 因为非常疏水的或非常亲水的表面并不促进细胞附着。

[0384] 表 9. 光致交联和大分子单体含量对 PTMC 薄膜的水接触角和水吸收值的影响。值表示为平均值 ± 标准偏差。

[0385]

网络	PI/TMC (mol/mol)	MA/TMC (mol/mol)	水吸收 (%) ^a	水接触角 (°) ^b		
				静态	前进	后退
PTMC	0	0	1.2±0.3	80.1±2.7	83.3±1.4	48.6±1.7
PTMC-PI	1/1000	0	0.9±0.2	87.9±2.0	89.7±2.3	51.8±1.3
PTMC-PI-TMAC	1/1000	1/200	1.3±0.3	91.1±0.7	93.1±0.6	53.8±0.4
PTMC-PI-TMAC	1/1000	1/100	0.9±0.2	97.3±1.6	99.9±1.6	60.9±0.7
PTMC-PI-TMAC	1/1000	1/50	0.8±0.2	97.2±2.1	99.4±1.32	60.5±1.2

[0386] ^a在 37°C 的 PBS 中调节压缩模制的薄膜持续 1 周 (n = 4)。

[0387] ^b在玻璃圆盘上浇注的聚合物薄膜上进行 (n = 6)。

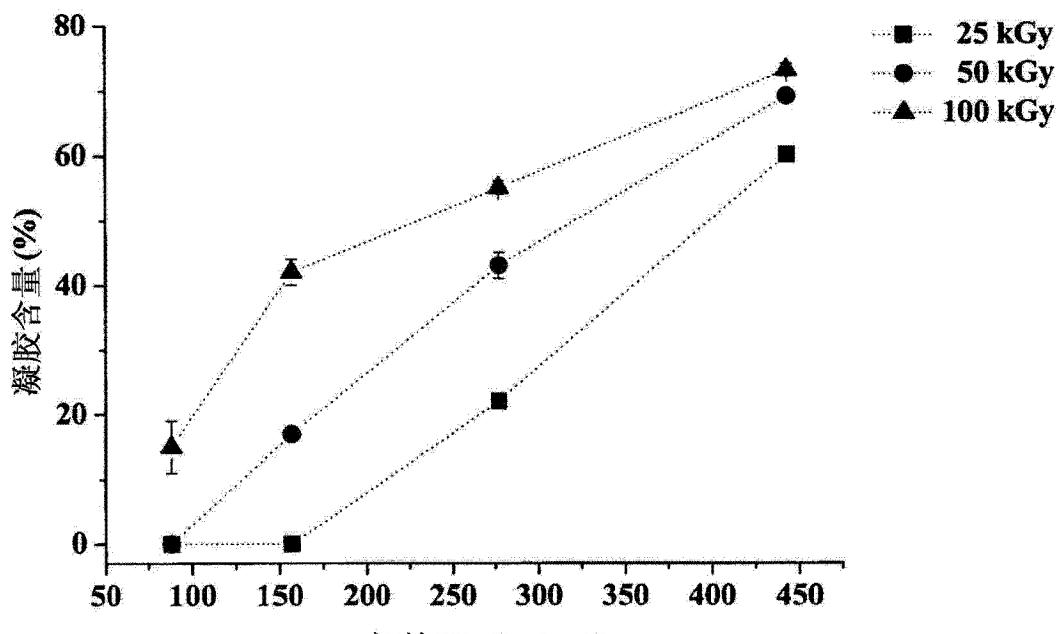
[0388] 另外,根据本发明,使用胆固醇酯酶(CE)水溶液和 K₂O₂水溶液,研究了光致交联的 PTMC 网络的侵蚀。表 8 显示当在这些溶液中温育时确定的未交联的和光致交联的 PTMC 薄膜的侵蚀速率。

[0389] 当在胆固醇酯酶水溶液中温育时,未交联的 PTMC 薄膜随时间推移线性地侵蚀。未交联的 PTMC 试样的表面侵蚀以 2160±600 (μg/cm² × 天) 的速率进行,从而导致在 14 天内 87.9±1.6% 的质量损失。在这种情况下,与在巨噬细胞介导的侵蚀中观测到的相比较,光致交联对 PTMC 的酶侵蚀具有更显著的影响。当在 CE 溶液中温育 15 天时,具有 0 至 1/50 的甲基丙烯酸酯相对于 TMC 比率的网络薄膜的质量损失为 6.6±1.8% 至 0.6±0.2% (相应于 137±38 至 15±3 (μg/cm² × 天) 的速率)。

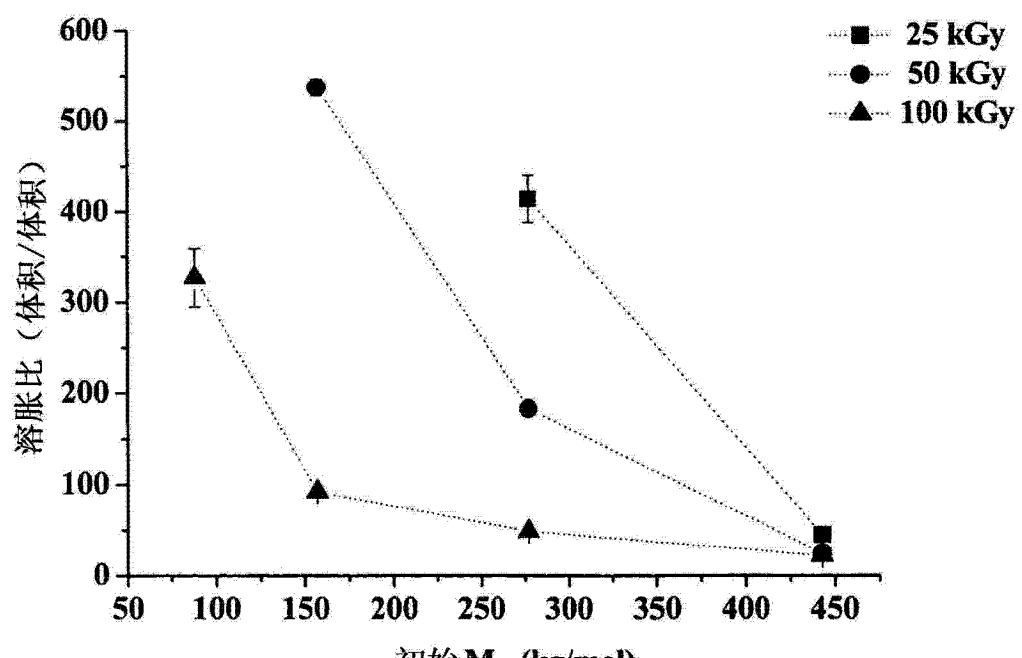
[0390] 当在包含超氧化物阴离子自由基的缓冲液中温育时,未交联的和交联的 PTMC 薄膜的质量以恒定速率减少,这意味着在这些介质它们的表面侵蚀。未交联 PTMC 的侵蚀速率为 2040±360 (μg/cm² × 天),这可以与当在 CE 溶液中温育这些薄膜时所观测到的侵蚀速率 (2160±610 (μg/cm² × 天)) 相比较。当在 K₂O₂水溶液中温育 1 周时,未交联薄膜的质量损失为 48.7±8.5%。在仅存在光引发剂下,通过光致交联也可以减小通过氧化性物质的 PTMC 降解。当温育 1 周时,PTMC-PI 网络的质量损失为 30.8±3.7,而 PTMC-PI-TMAC 网络则具有大约 16±0.5% 的质量损失。

[0391] 结论

[0392] 使用低分子量 PTMC 大分子单体和 Irgacure® 2959 光引发剂作为交联剂,可以光致交联高分子量 PTMC。通过调节加入的交联剂的量,可以调节所获得的网络的特性(网络性能、机械性能、体外侵蚀行为、水接触角和润湿性)。这些表面侵蚀弹性体 PTMC 网络具有极好的机械性能。此外,初步体外测定表明,这些材料和它们的降解产物是生物相容的。这些材料最适合于生物医学应用如(软)组织工程和生物活性化合物的控制释放。

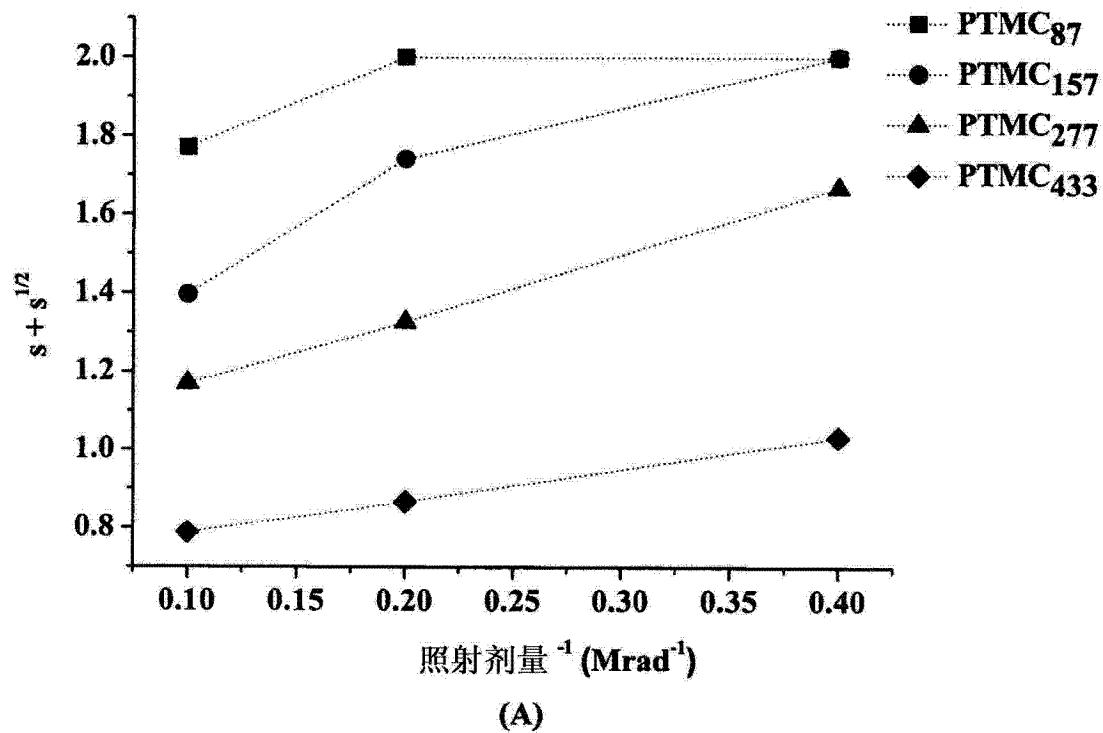


(A)



(B)

图 1



(A)

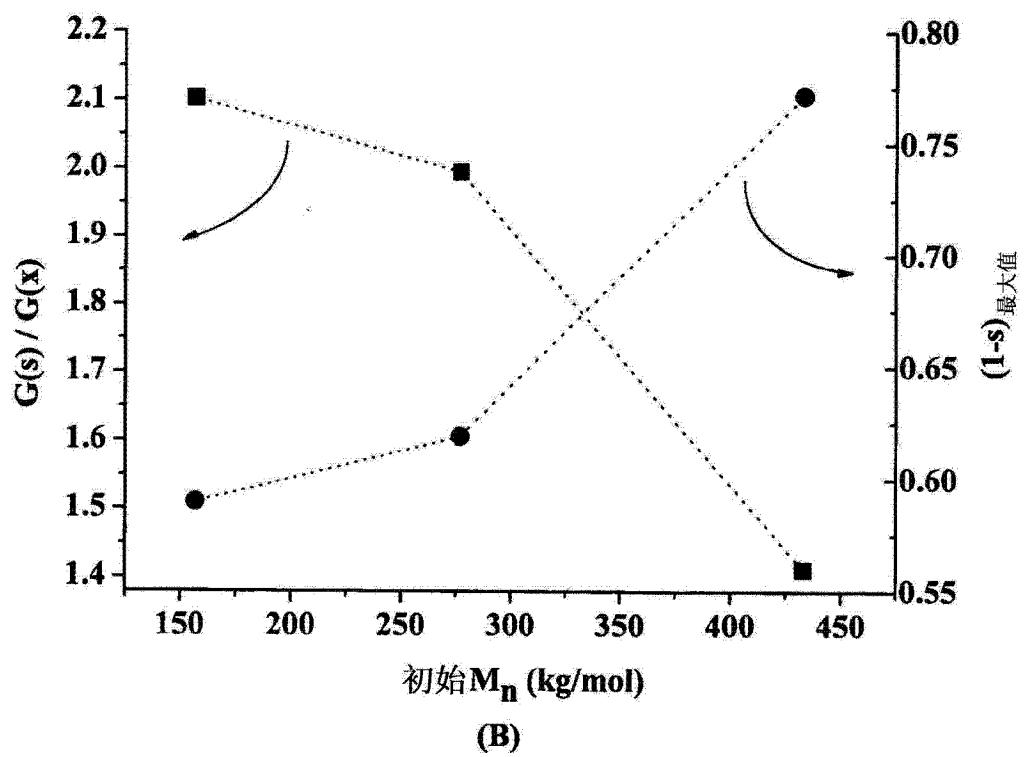


图 2

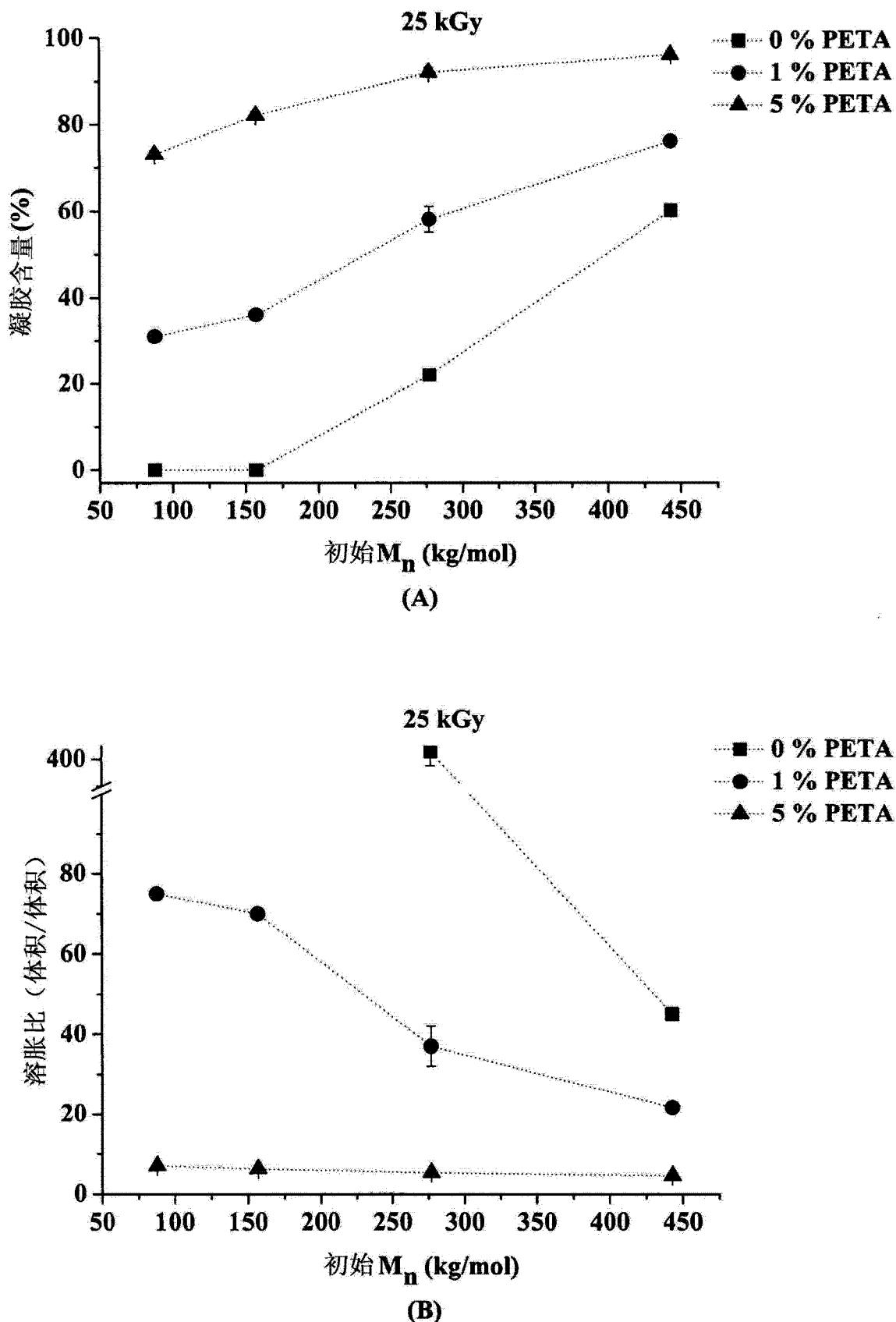
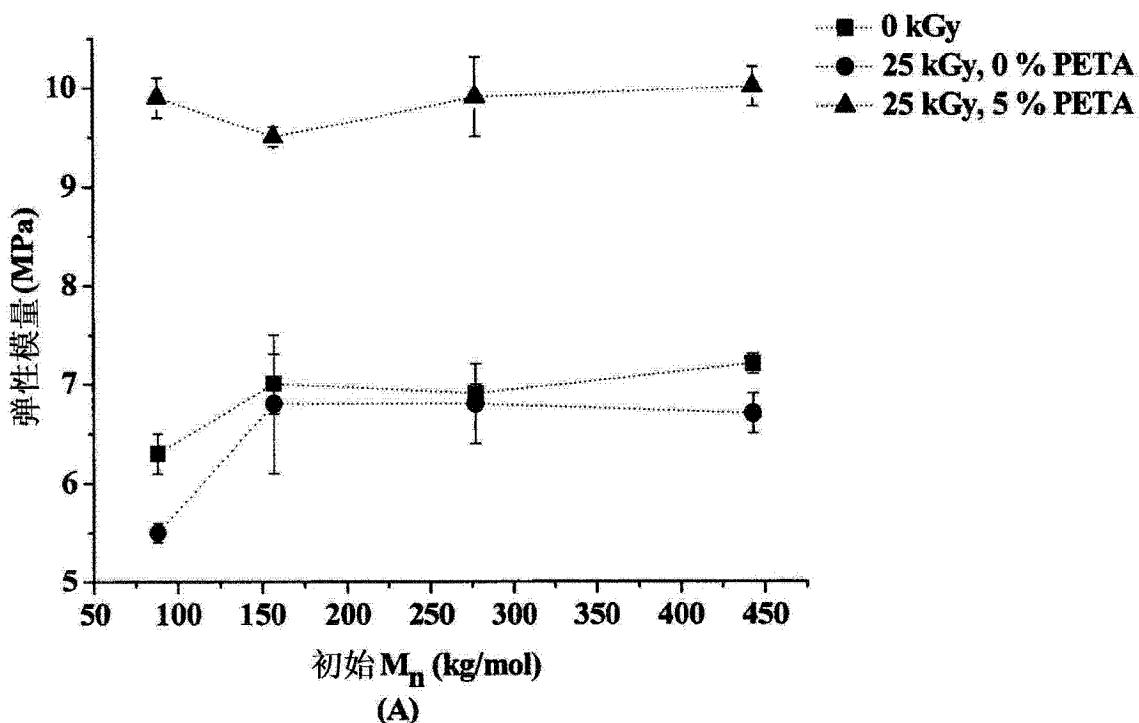
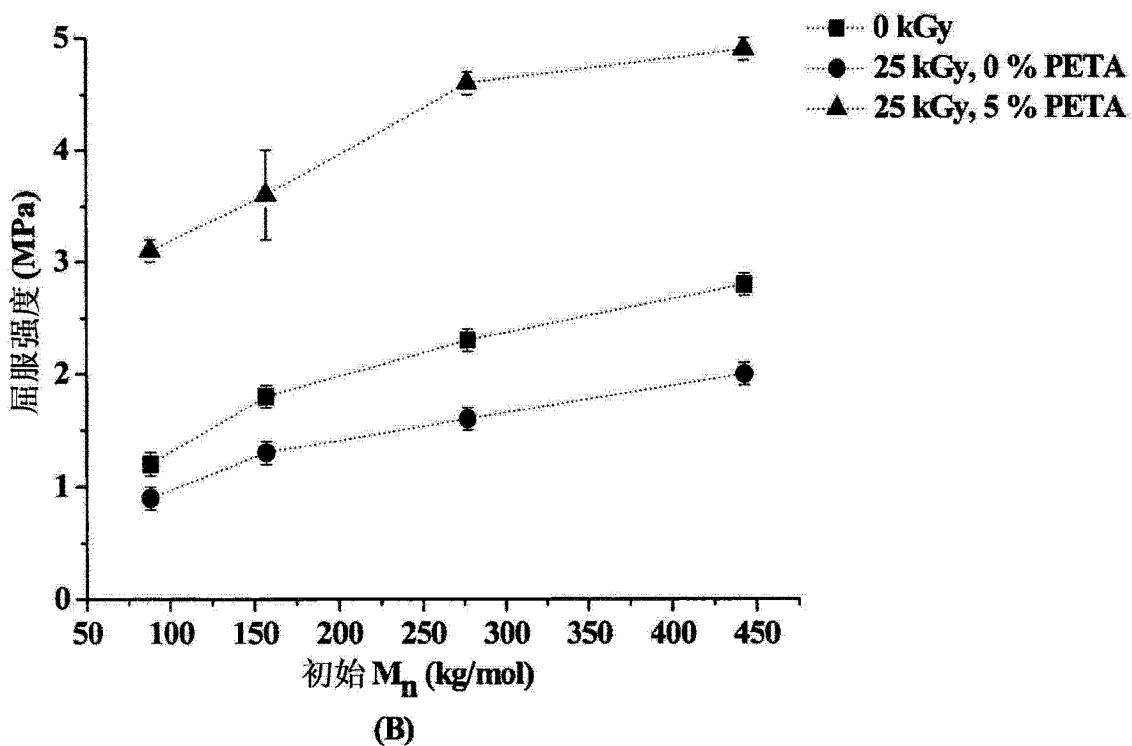


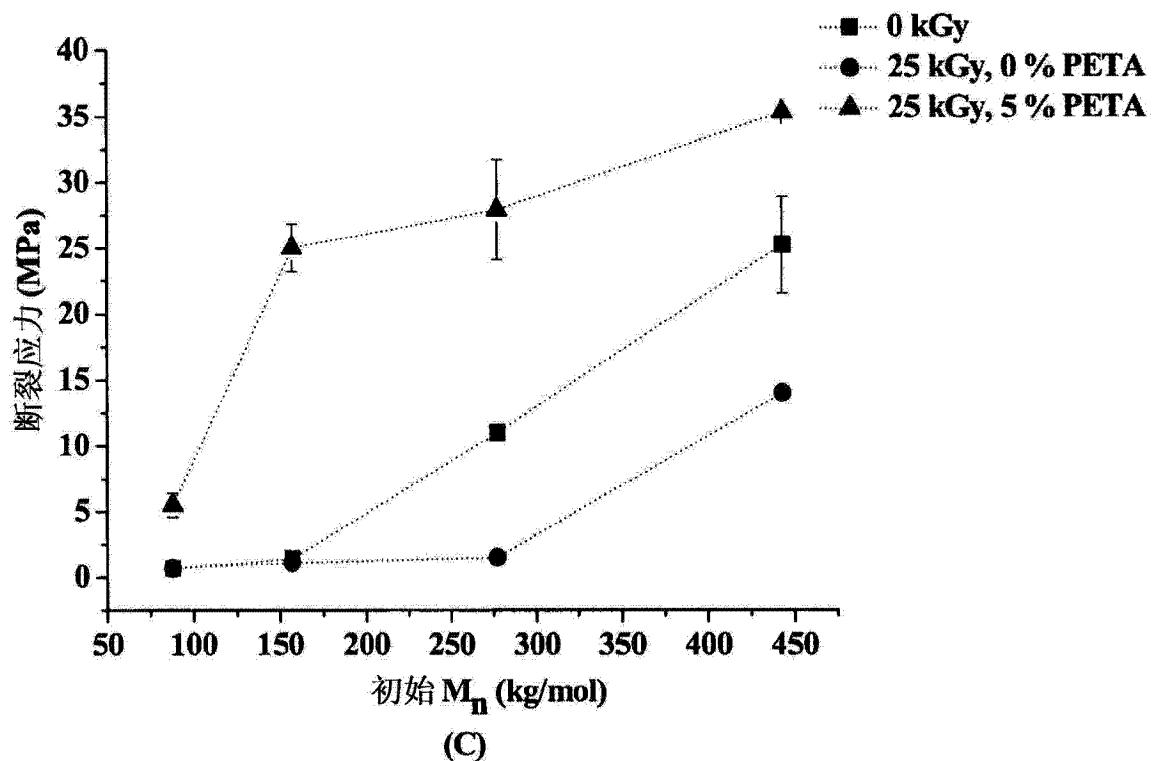
图 3



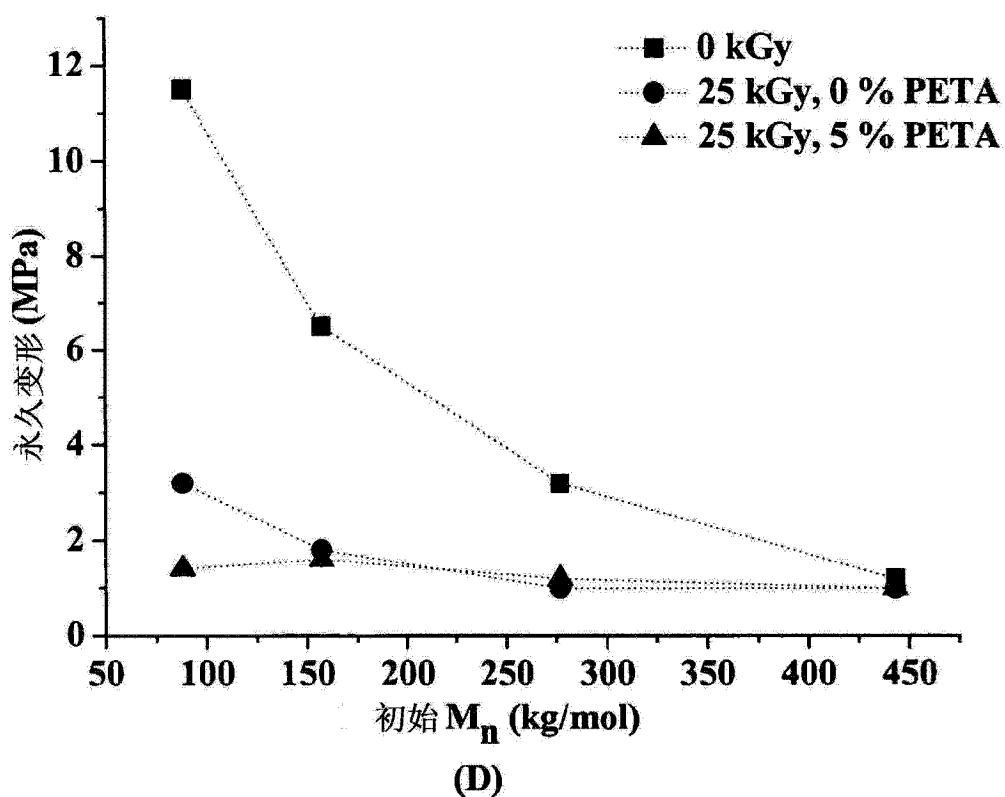
(A)



(B)

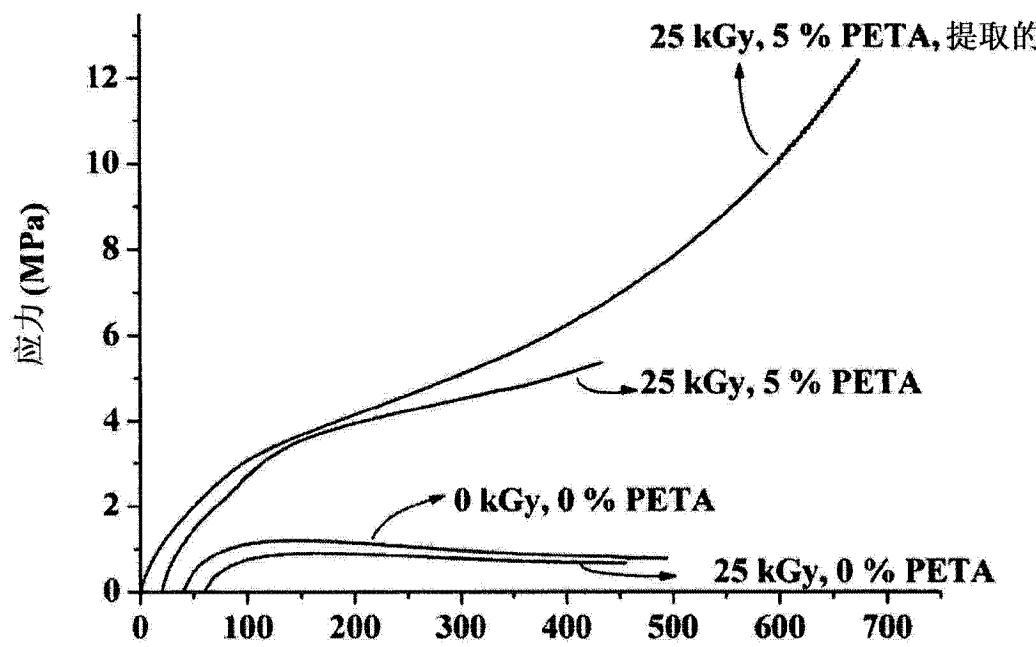


(C)

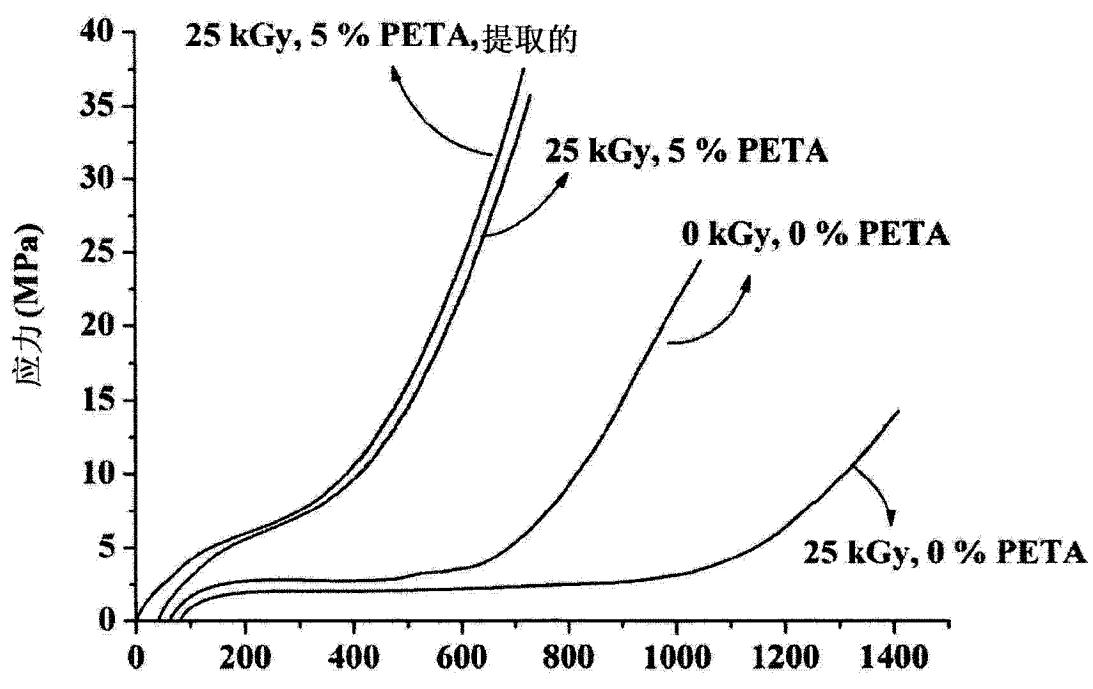


(D)

图 4



(A)



(B)

图 5

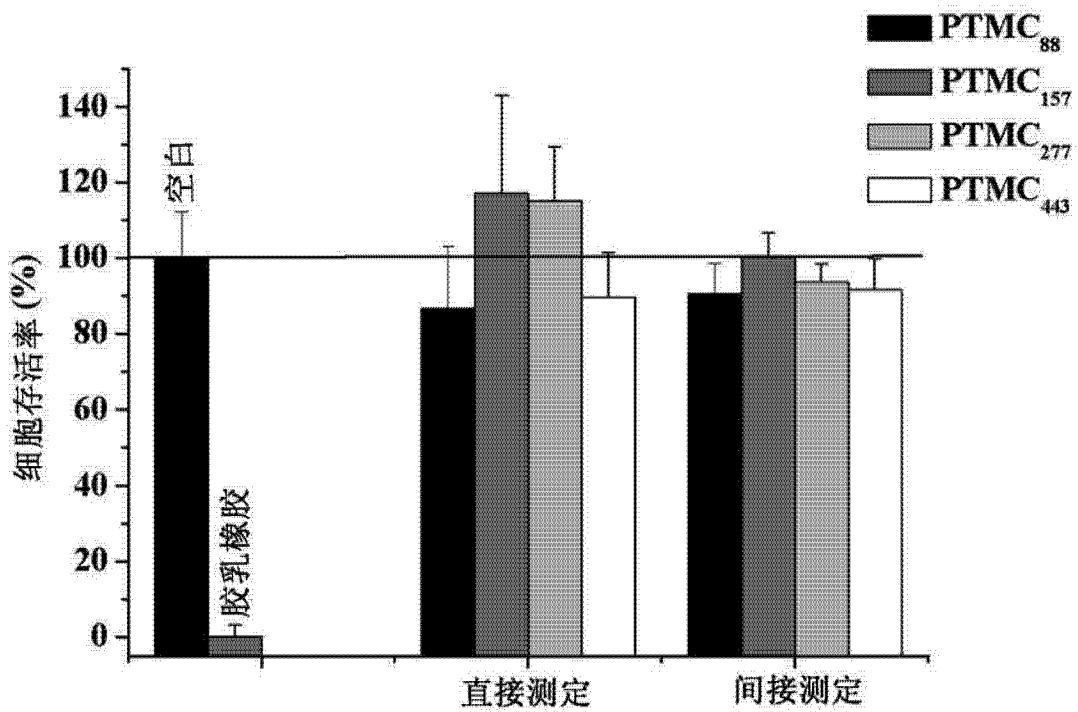
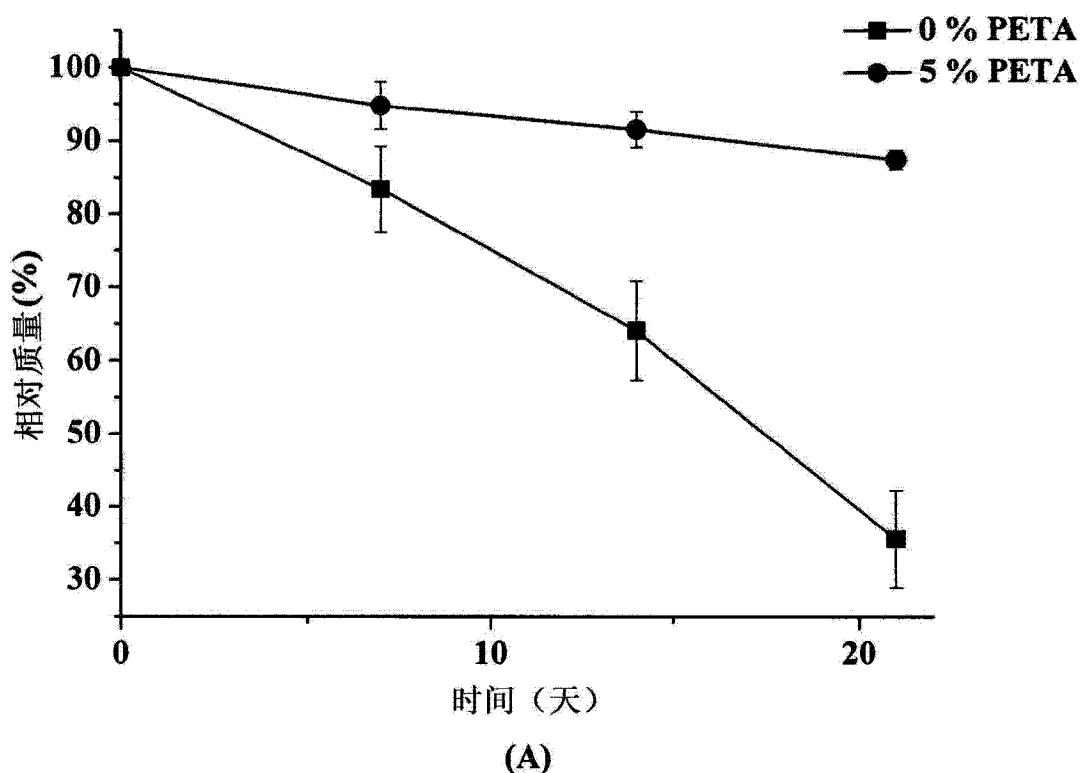
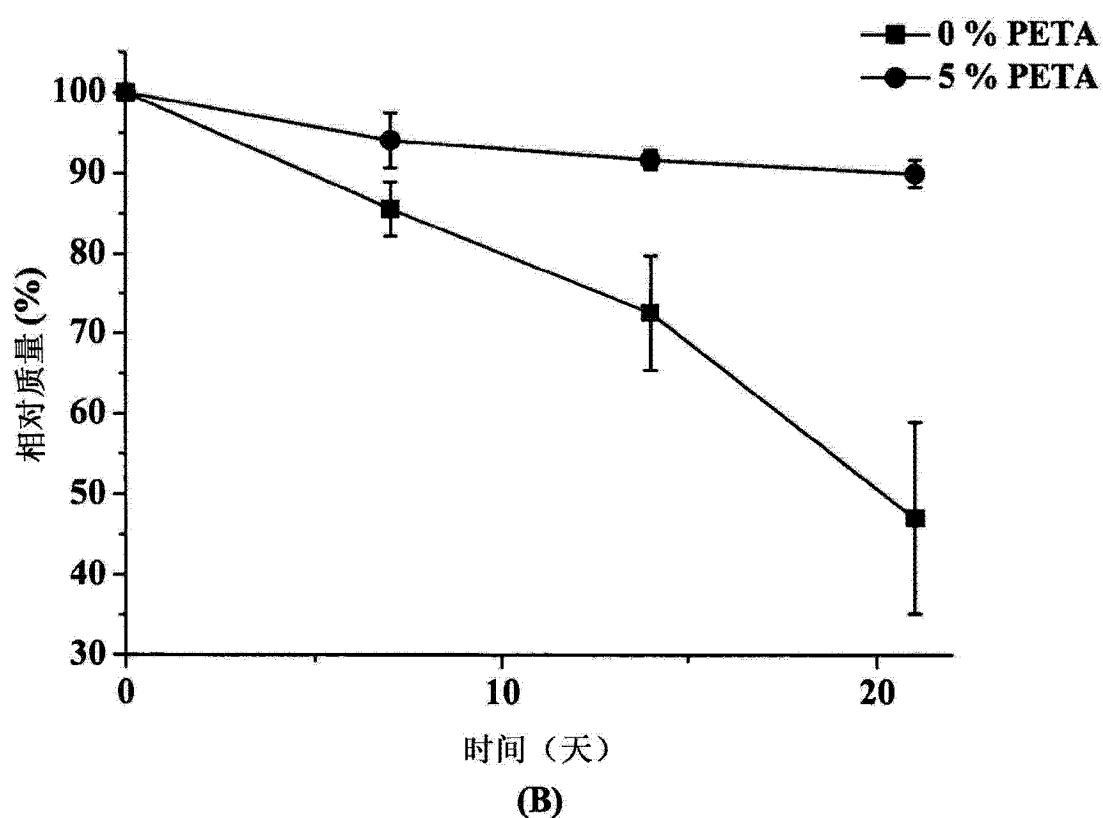


图 6



(A)



(B)

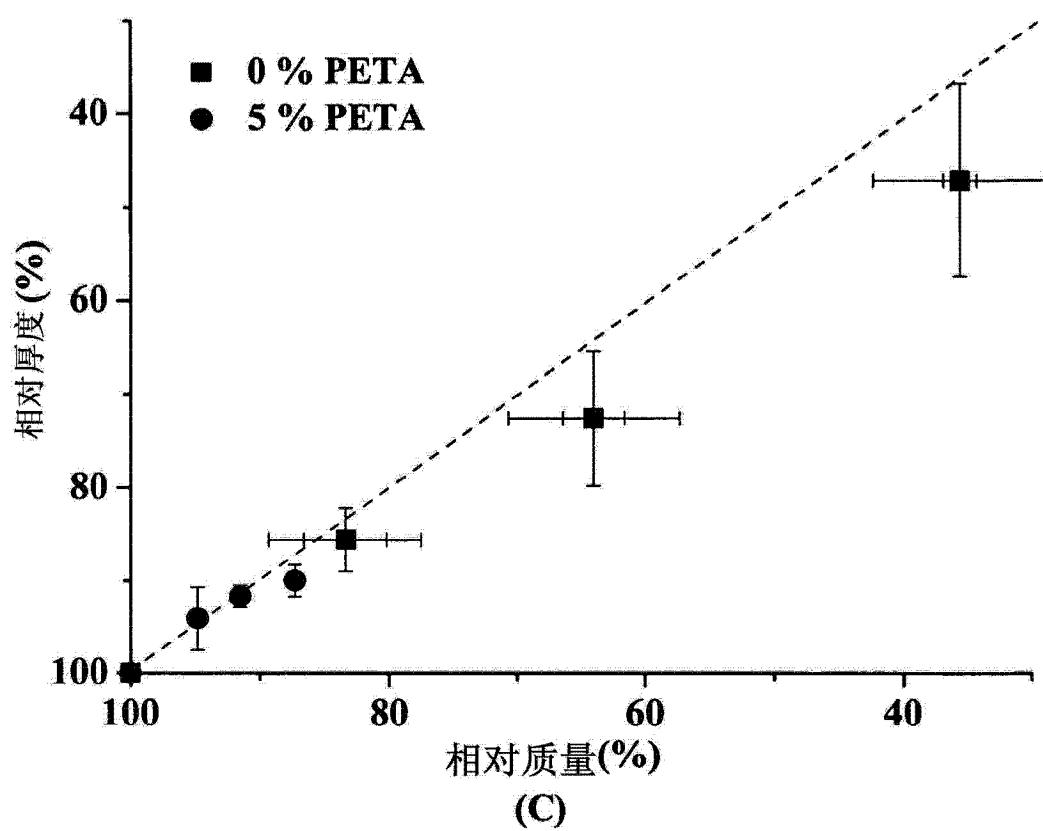


图 7

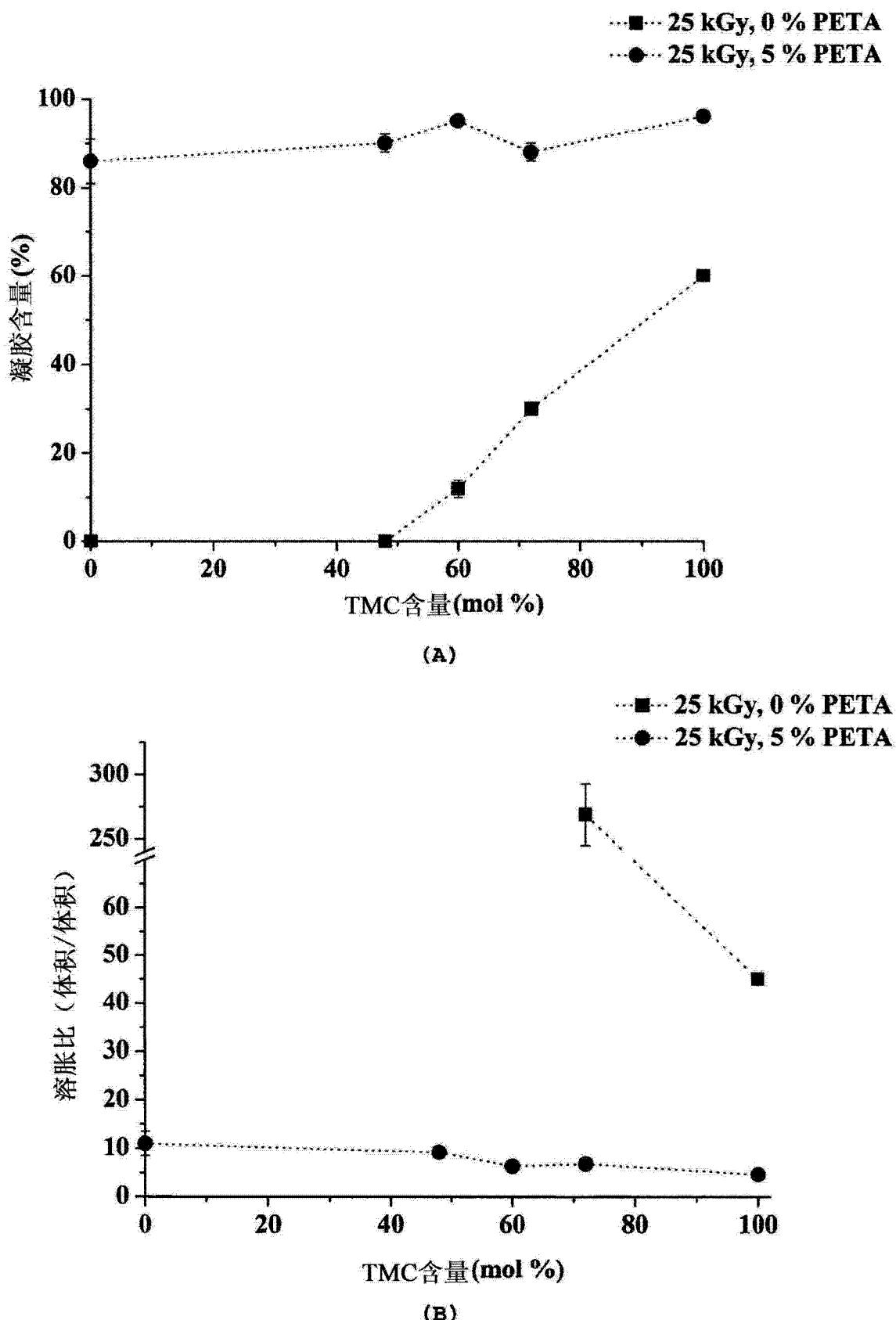


图 8

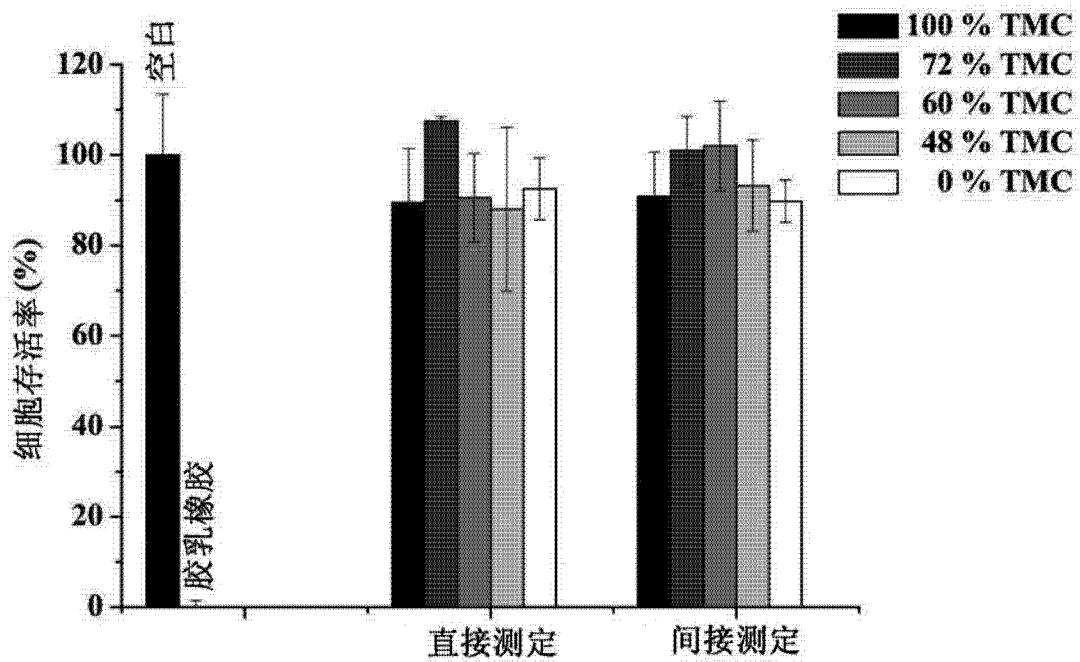


图 9

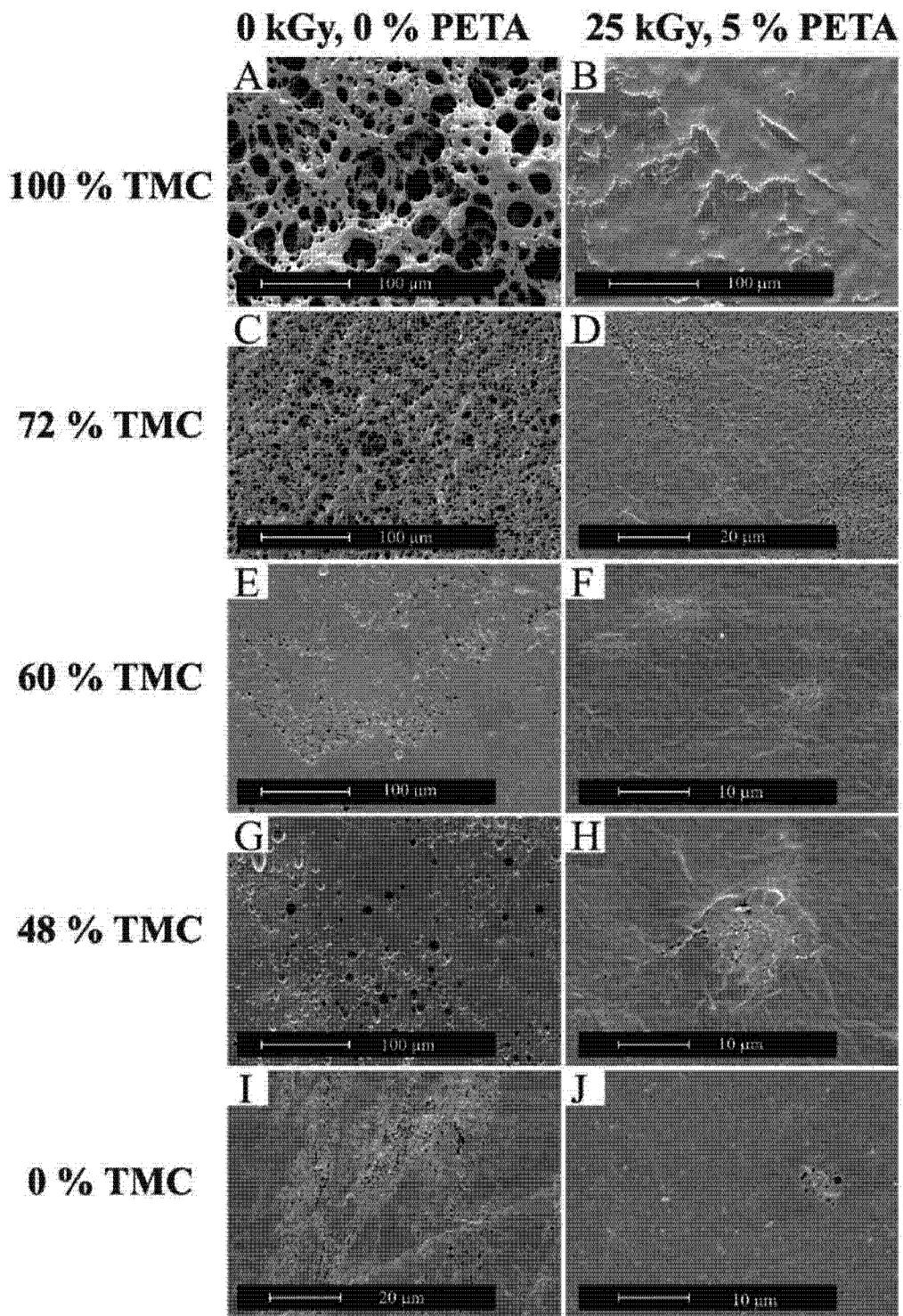
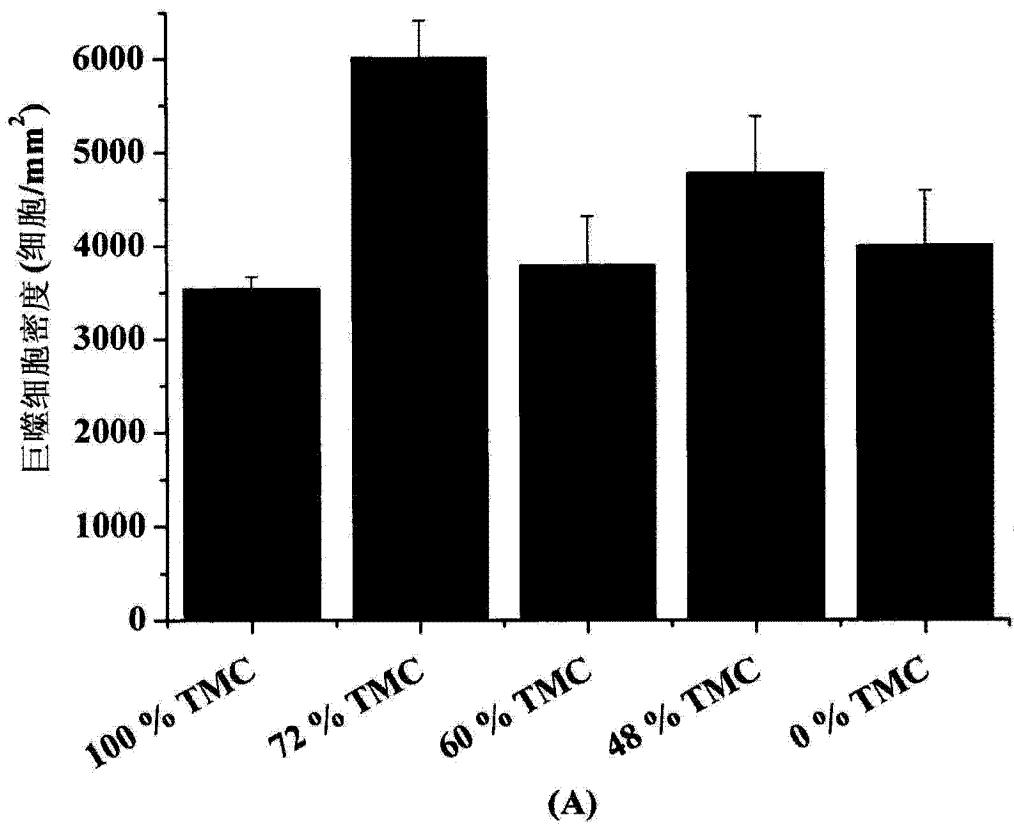


图 10



(A)

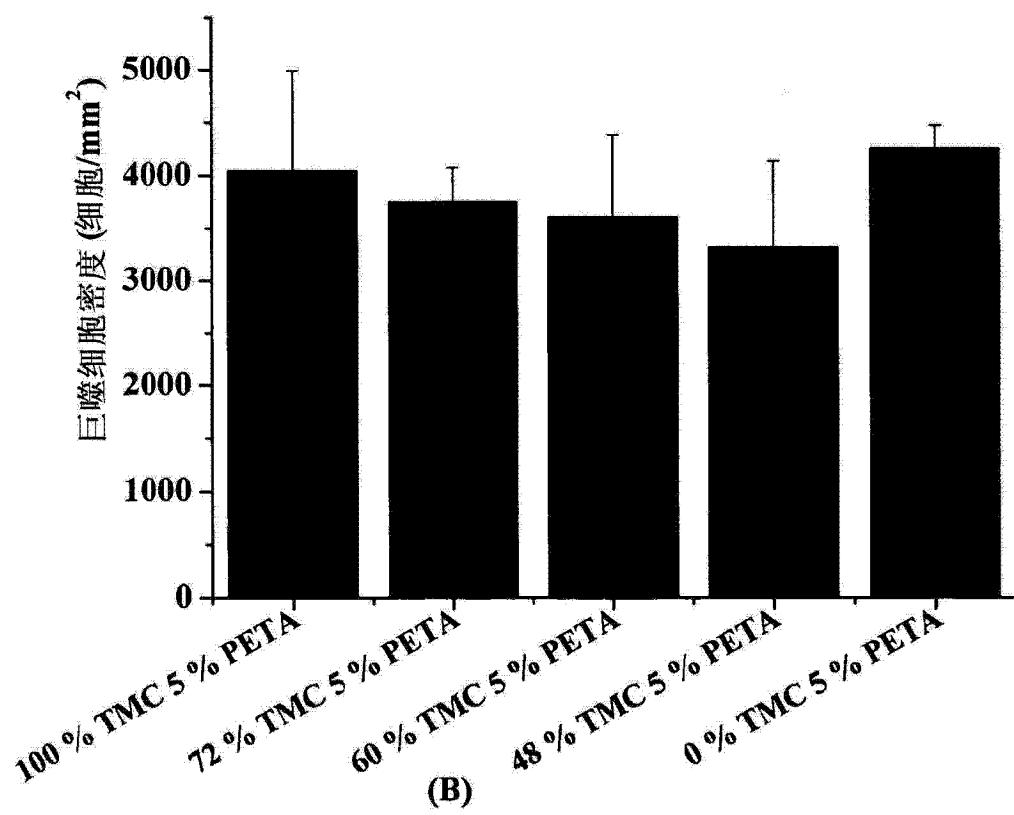
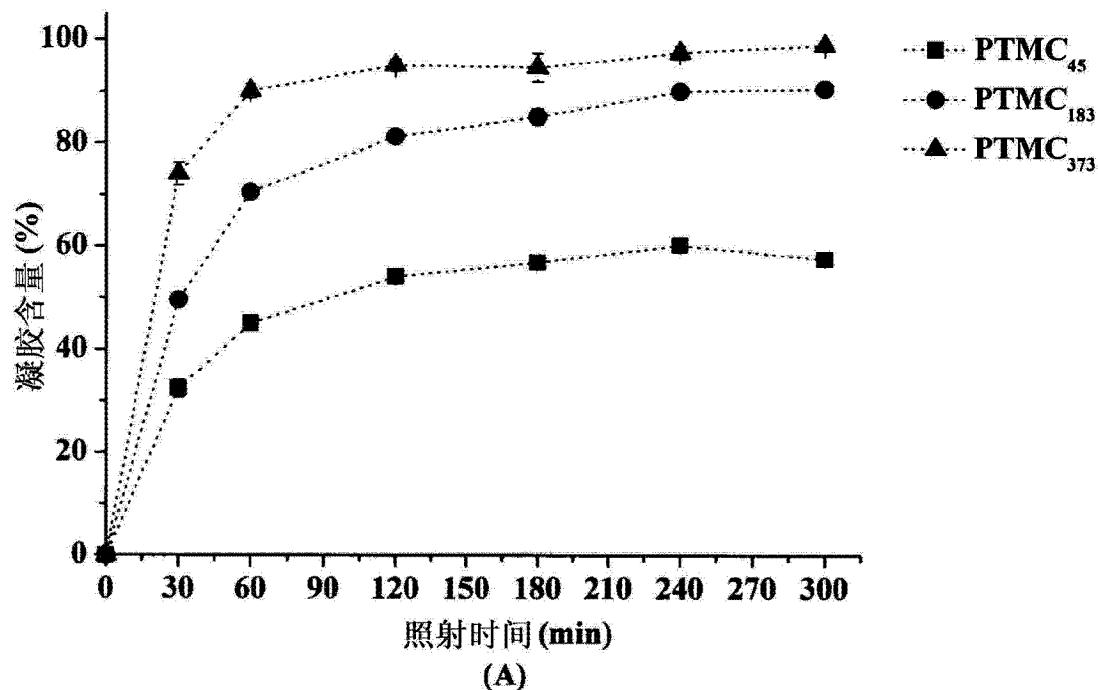
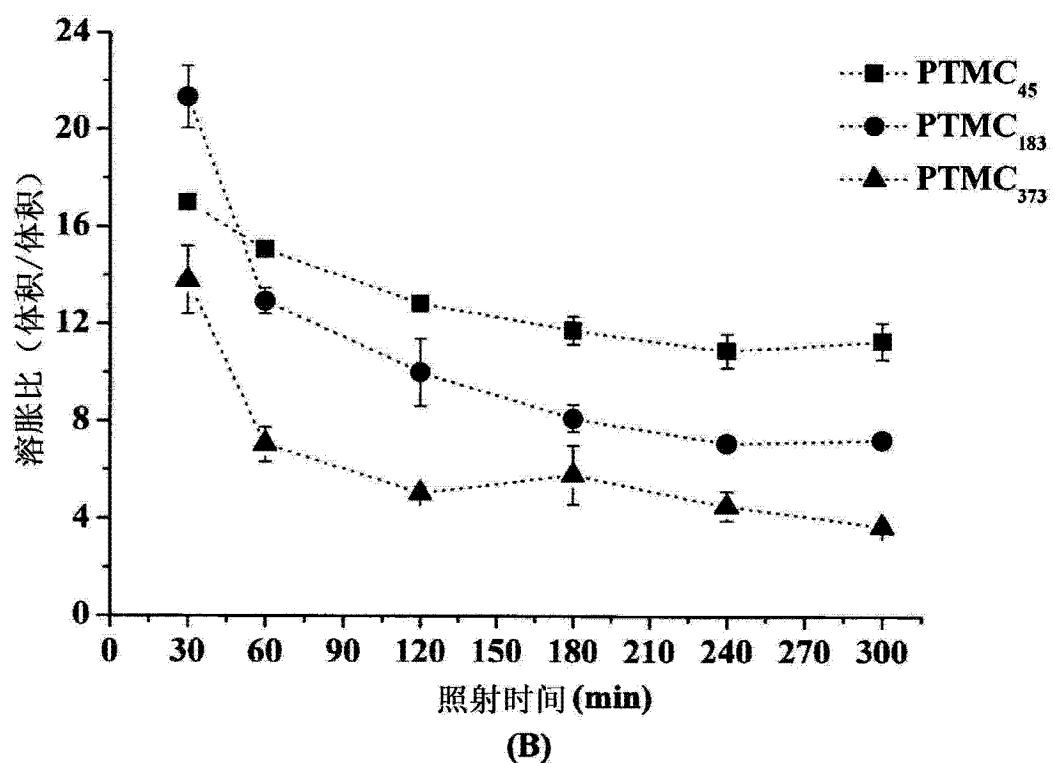


图 11

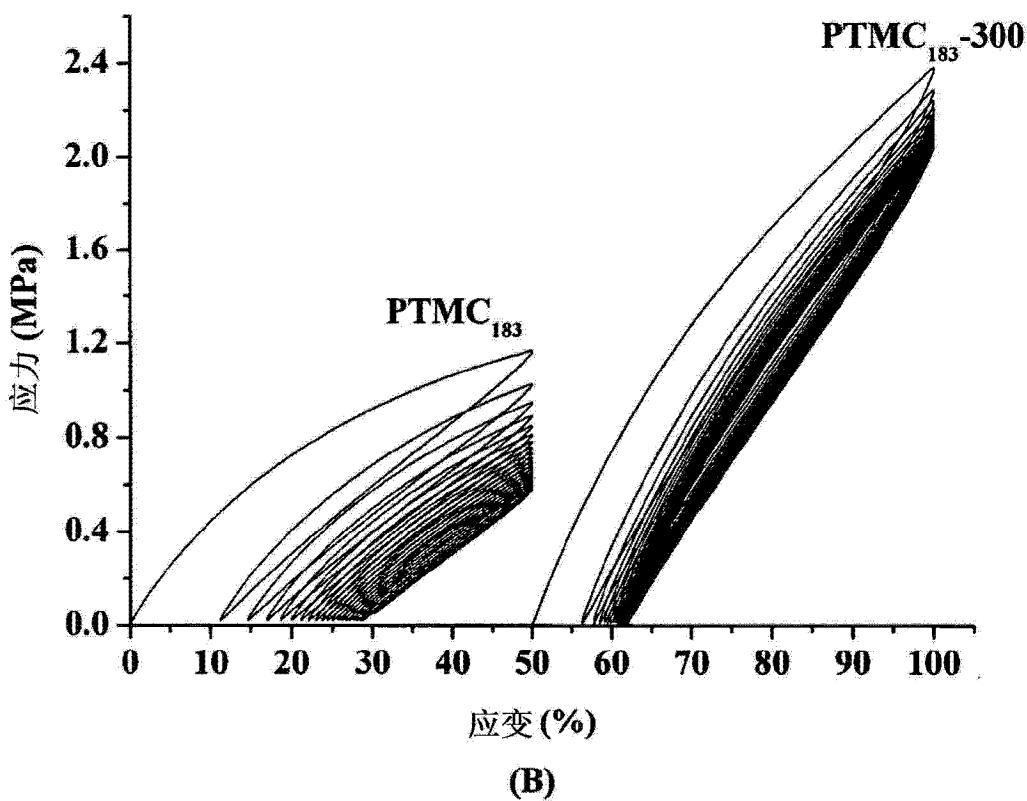
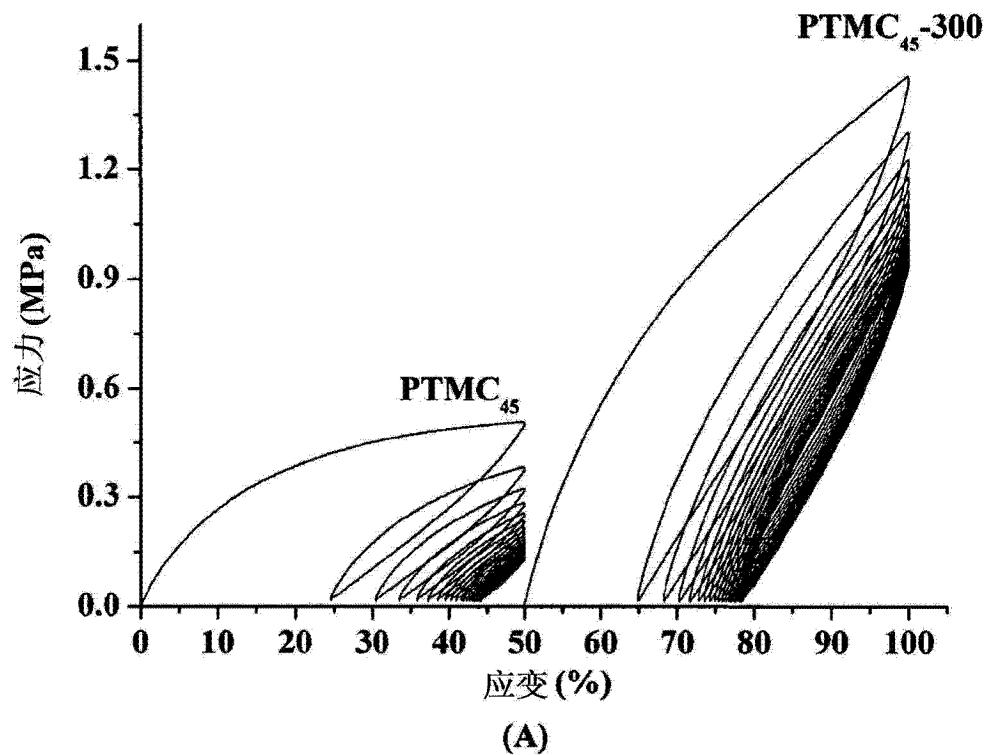


(A)



(B)

图 12



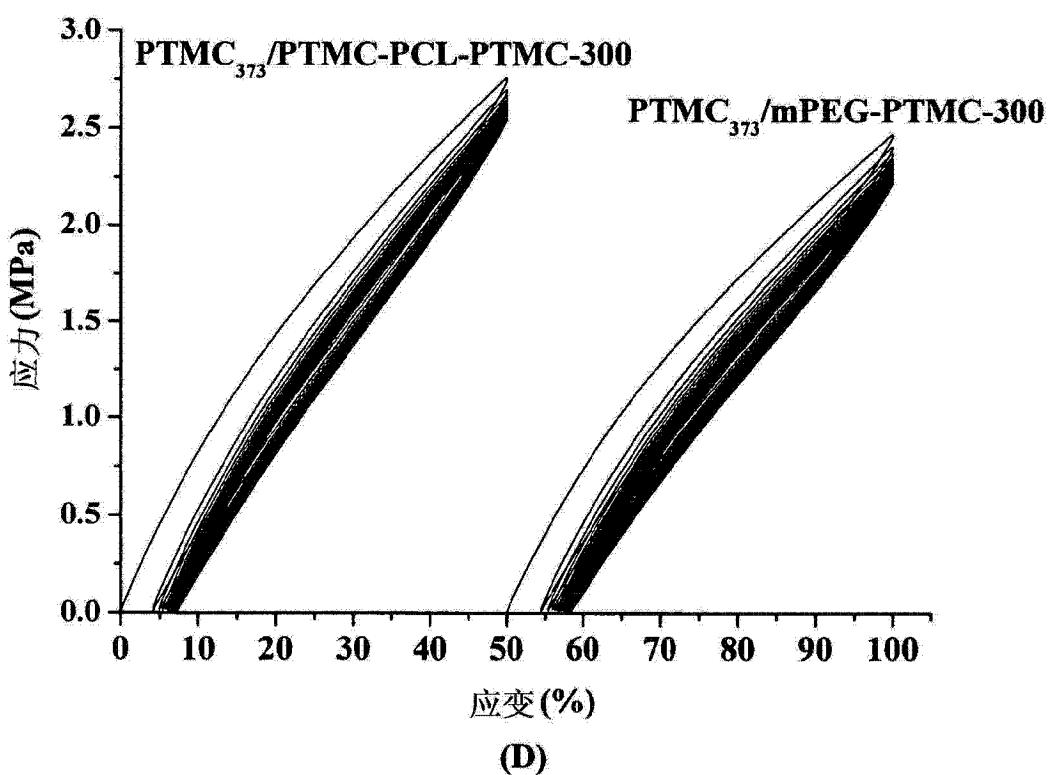
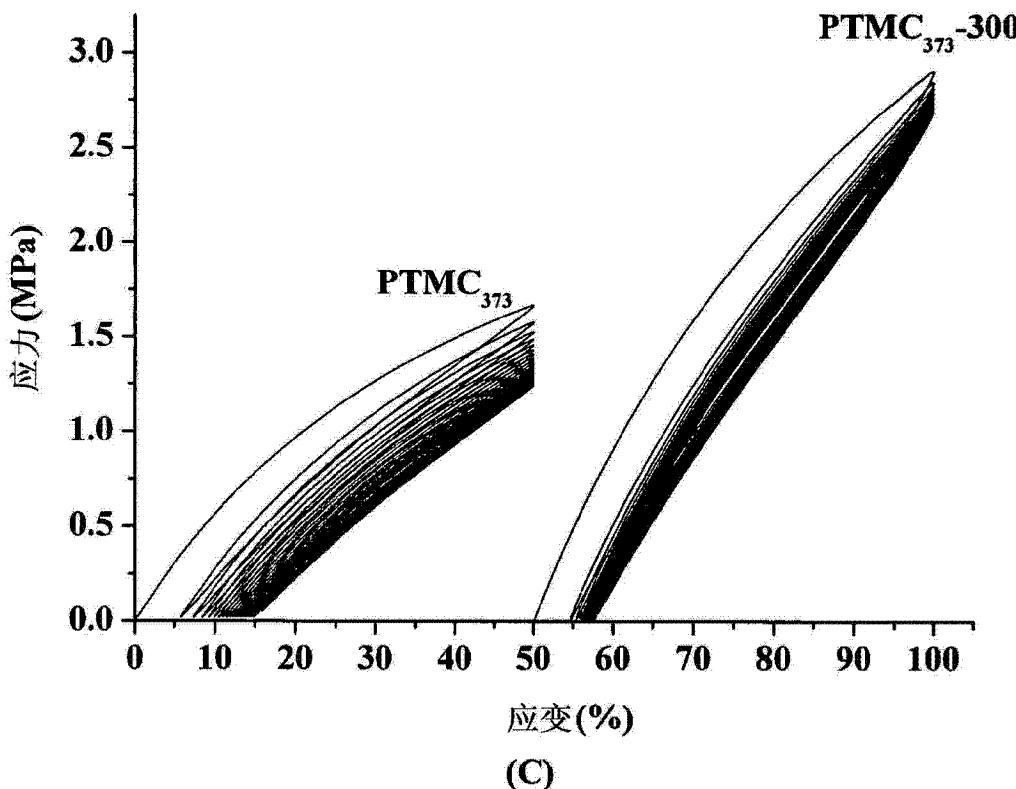
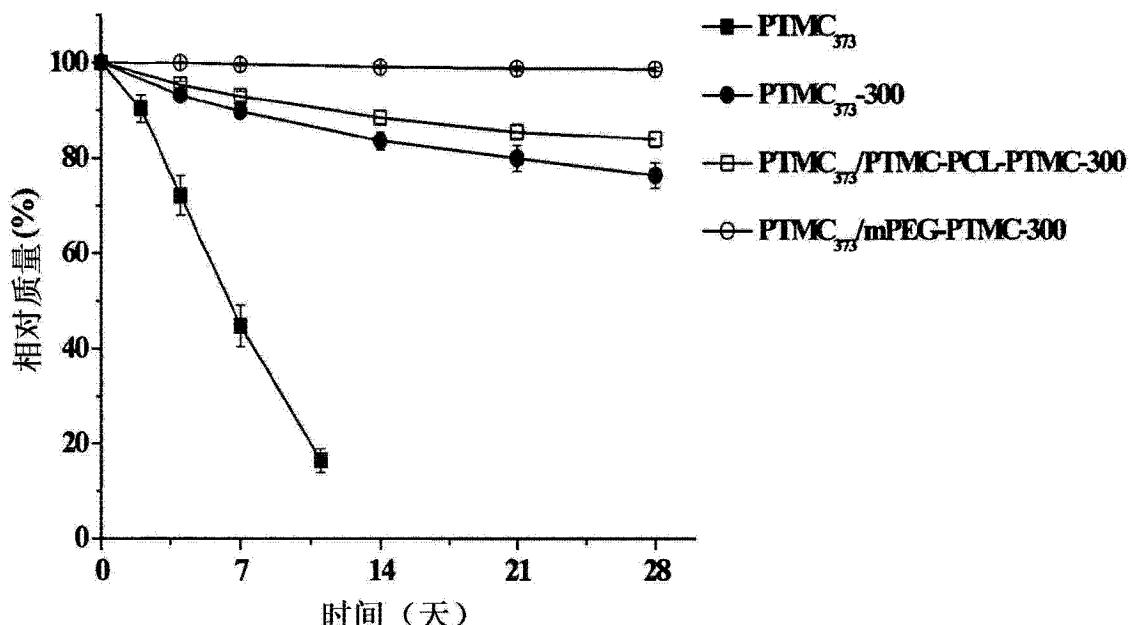
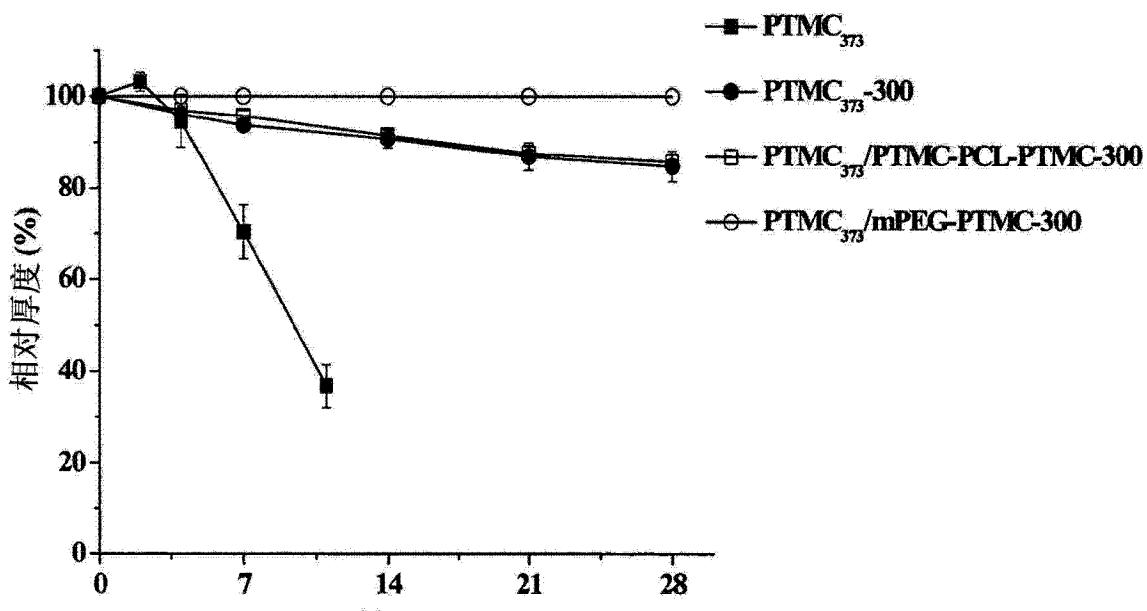


图 13



(A)



(B)

图 14

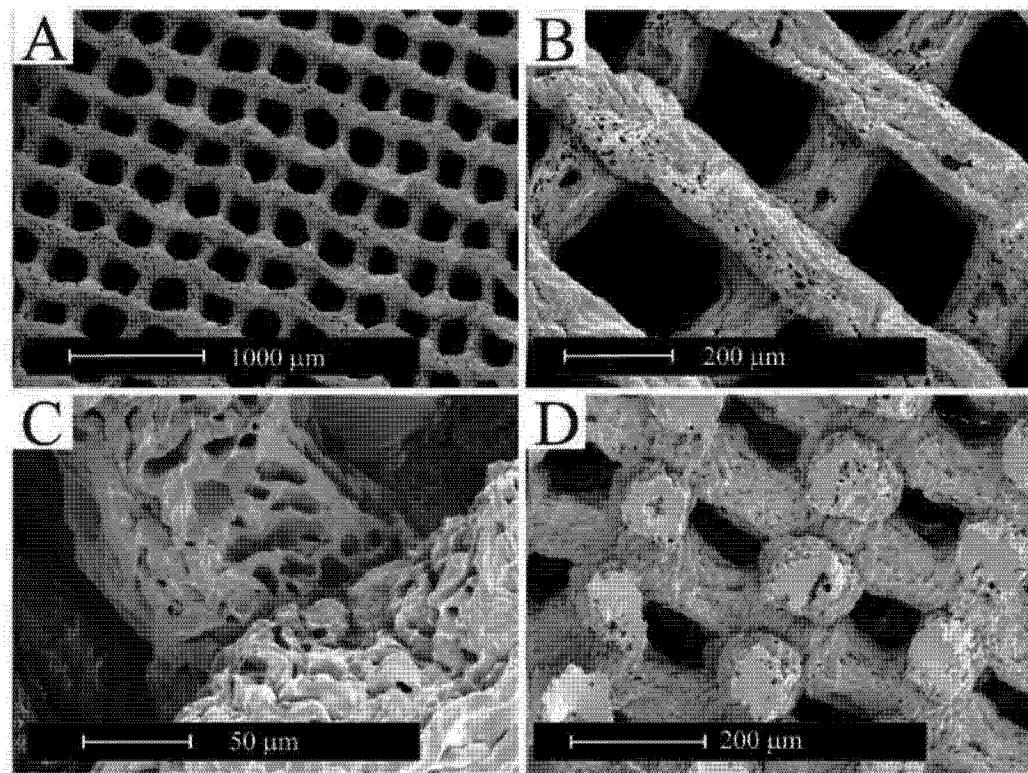


图 15

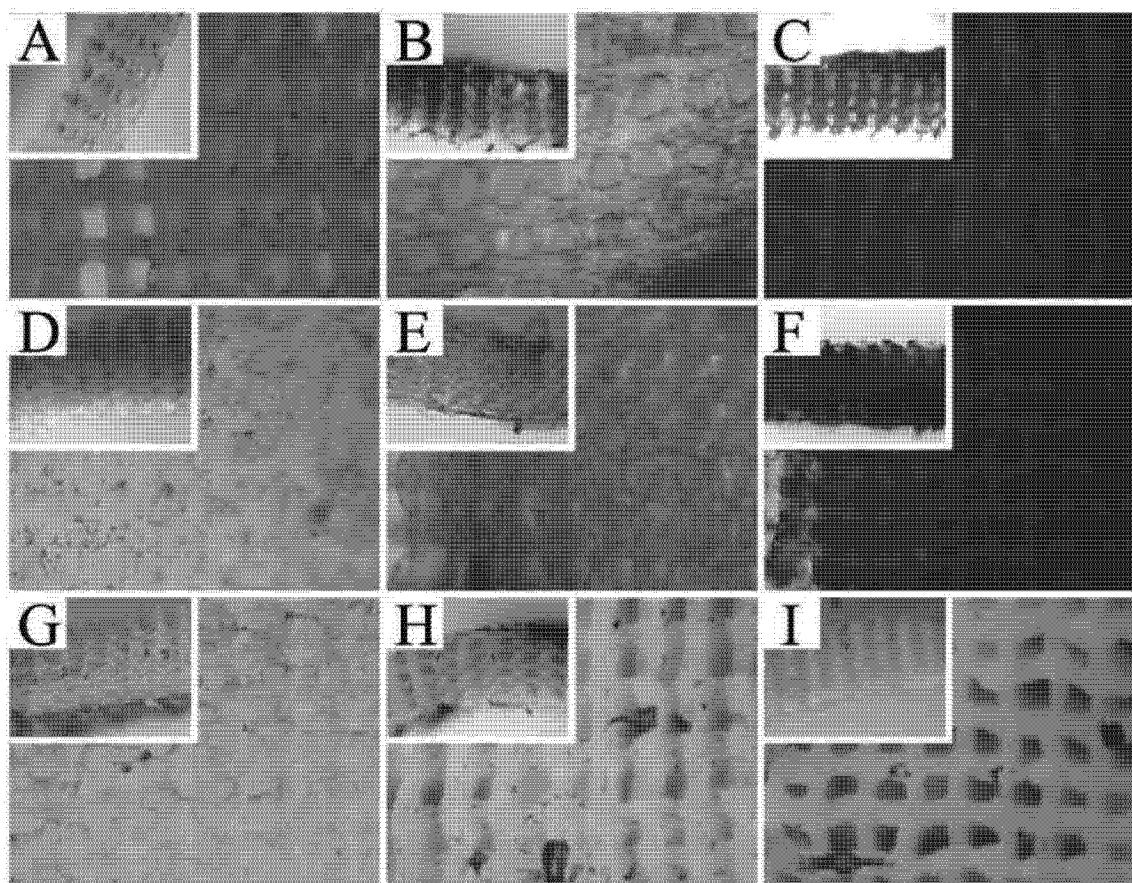


图 16

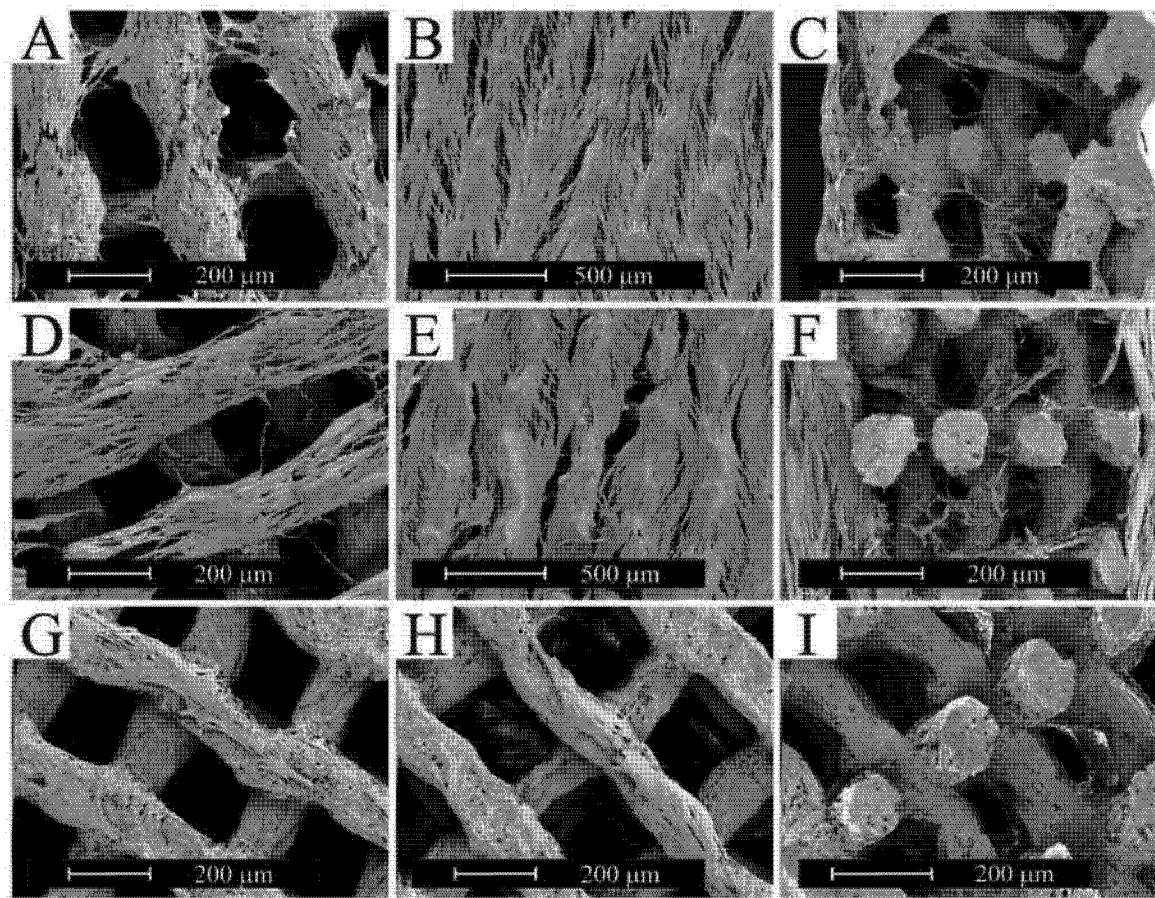


图 17

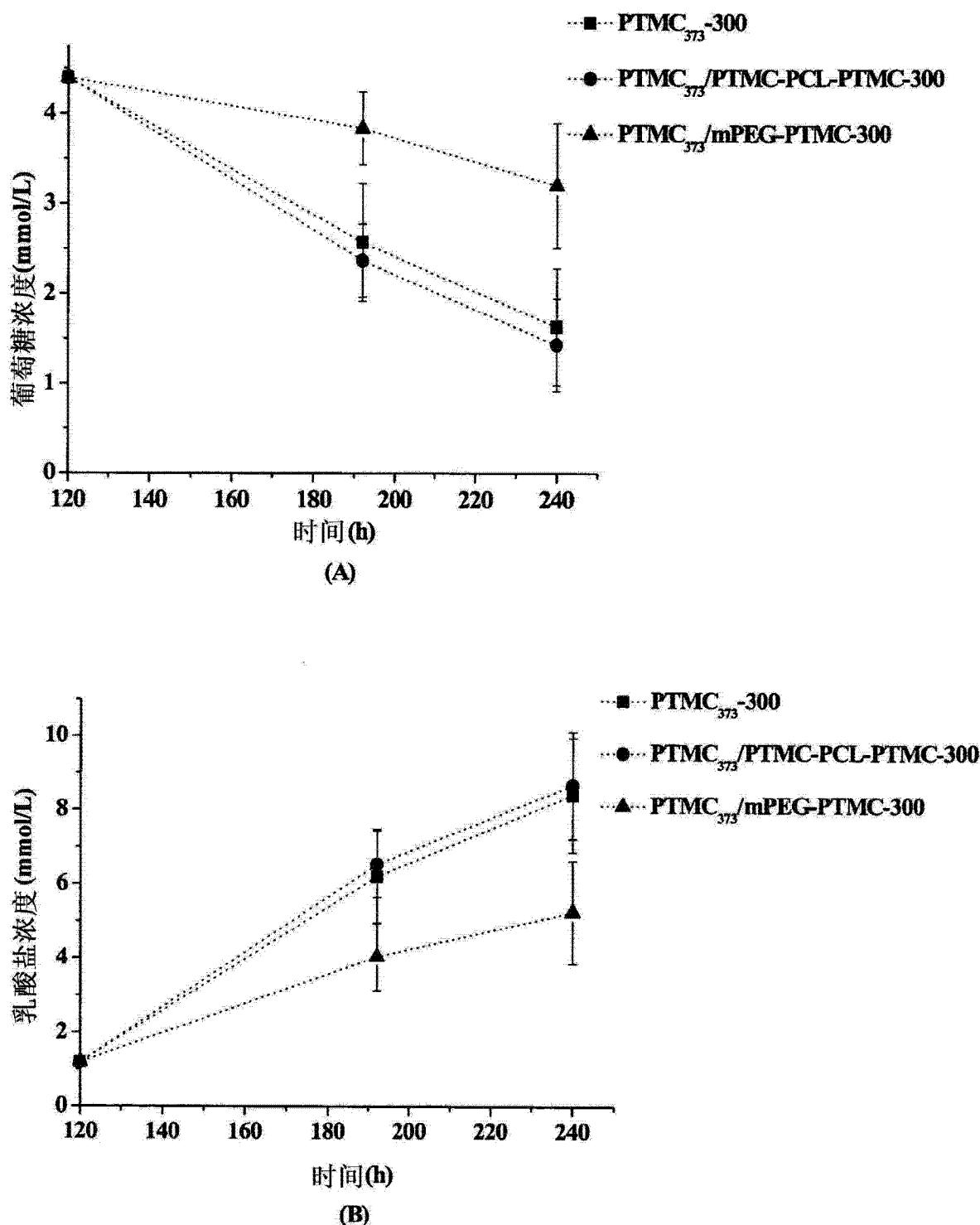


图 18

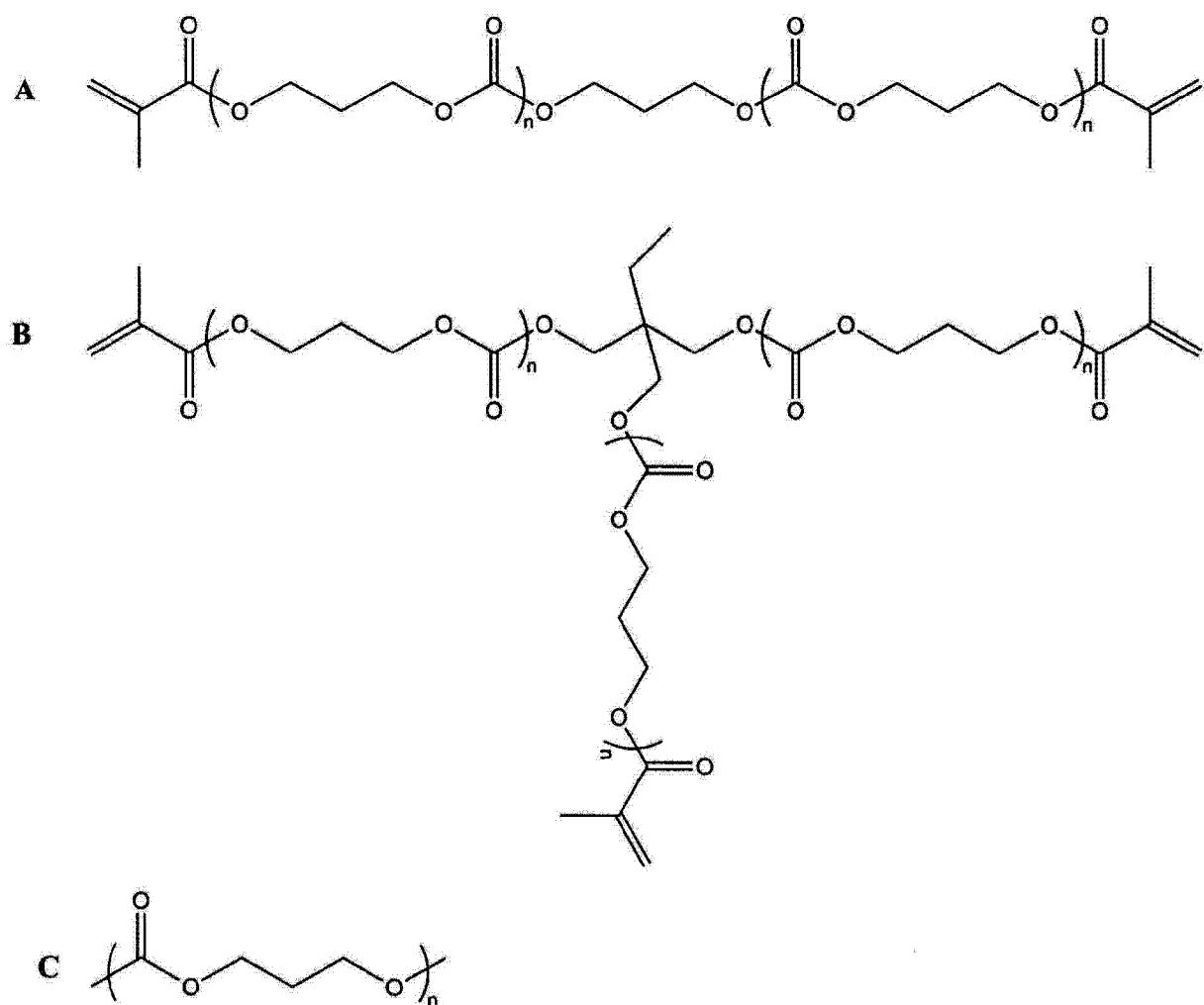


图 19

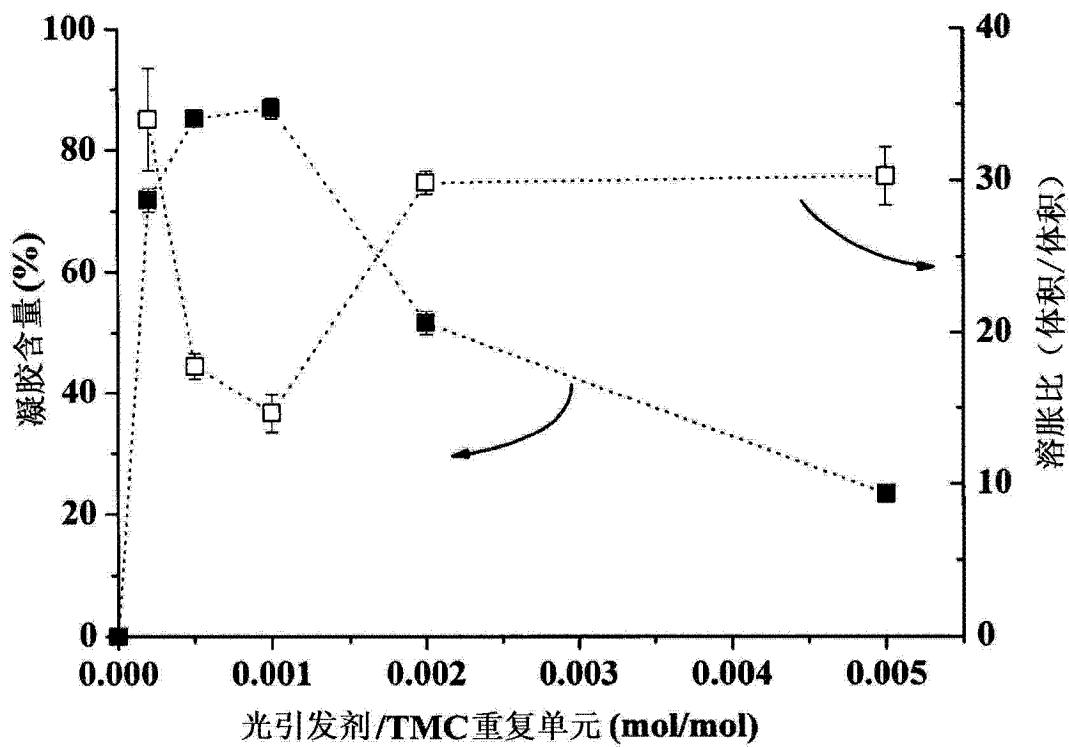


图 20

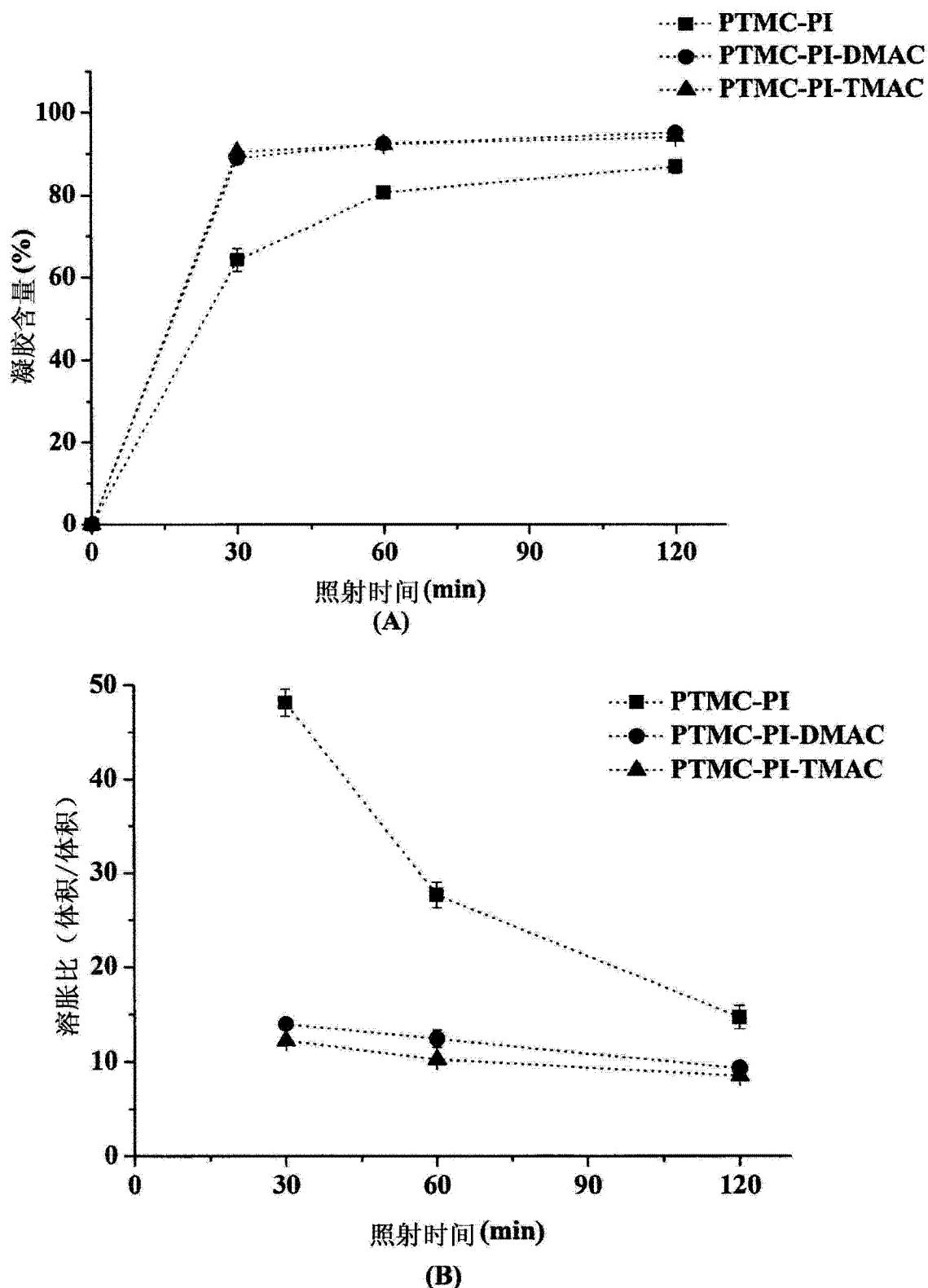


图 21

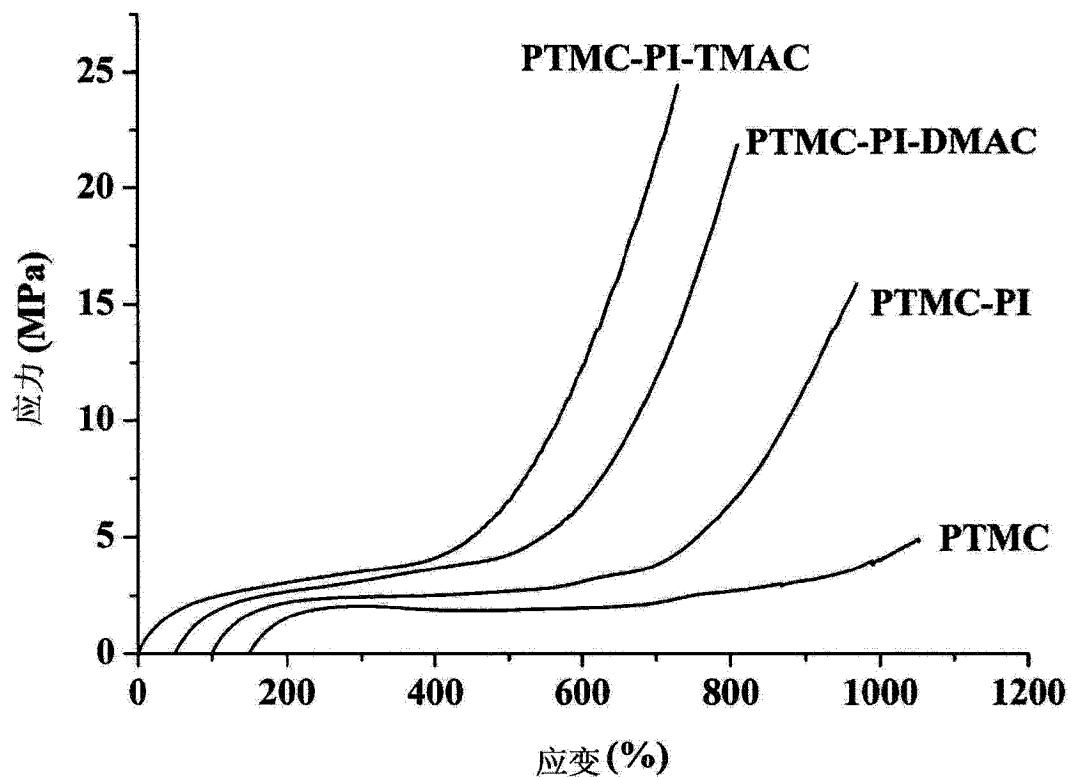


图 22

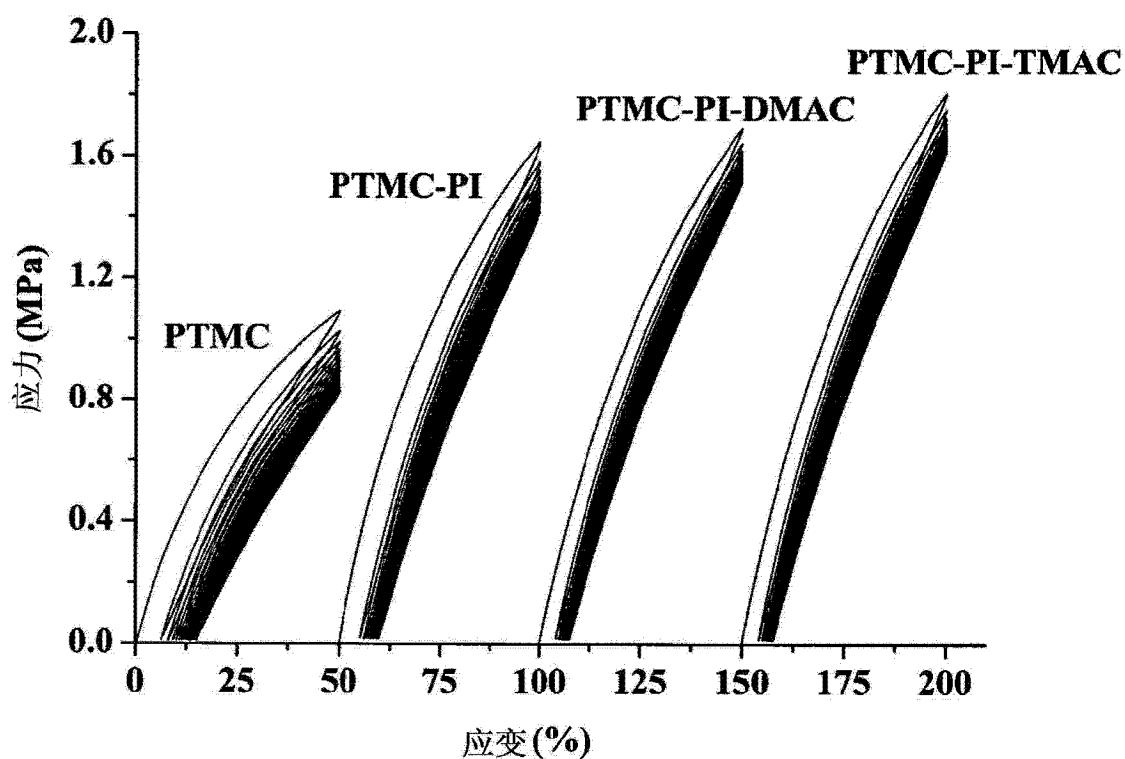


图 23

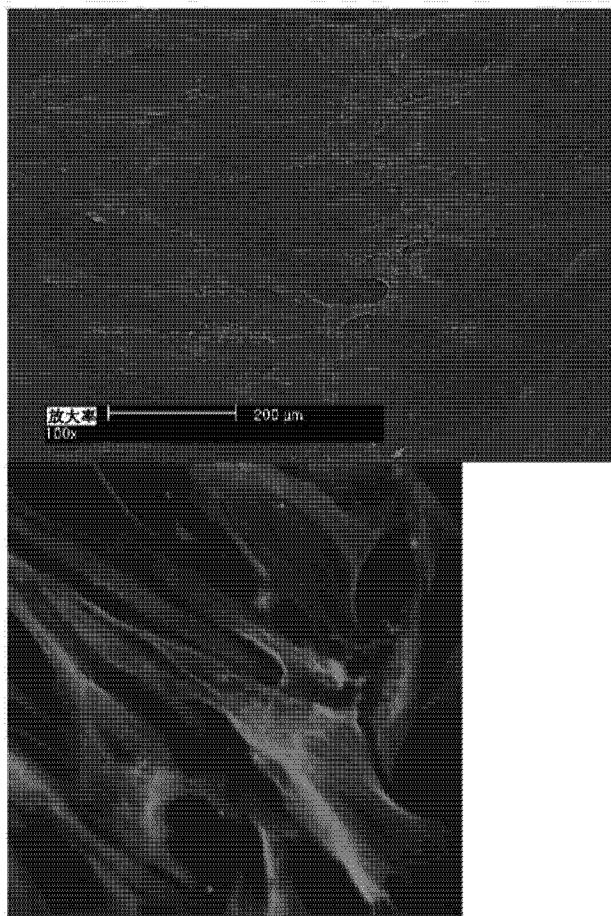


图 24

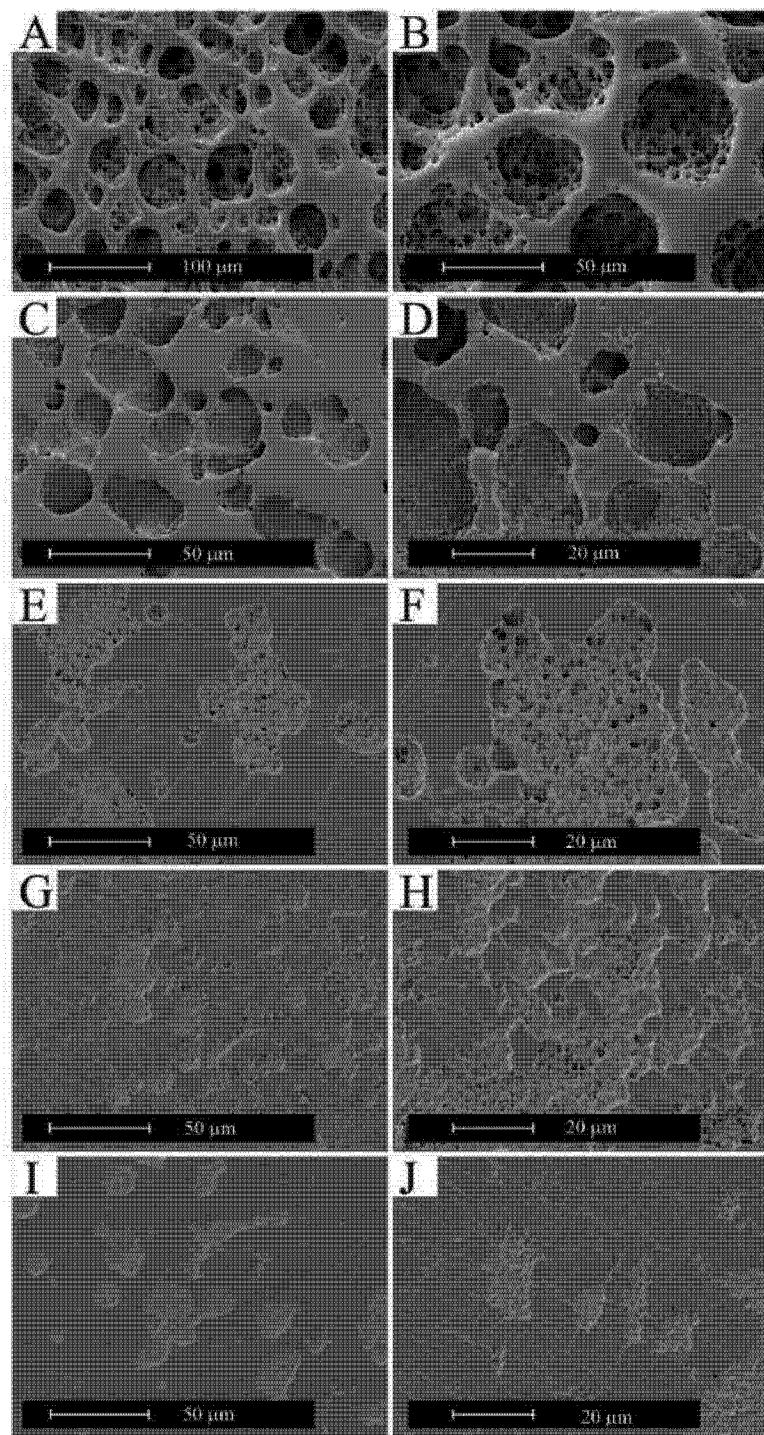


图 25

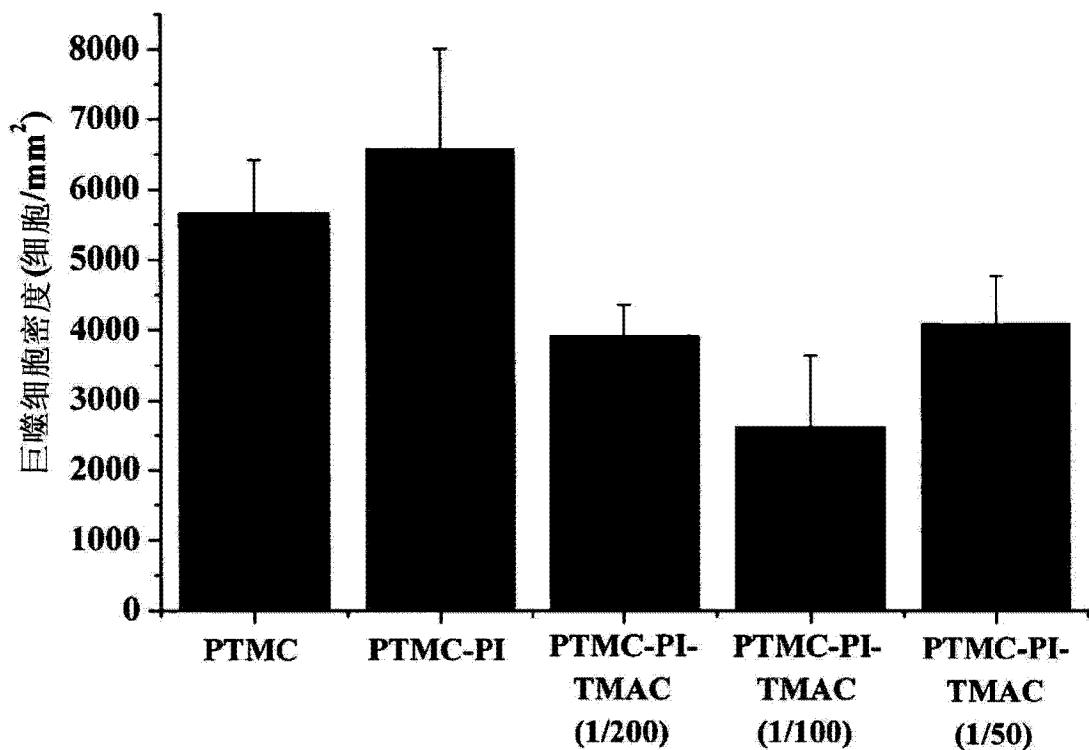


图 26