



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104144716 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201280060886. 8

A61L 27/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 26

A61L 27/52 (2006. 01)

A61F 2/14 (2006. 01)

(30) 优先权数据

13/284, 301 2011. 10. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/062116 2012. 10. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/063390 EN 2013. 05. 02

(71) 申请人 伊利诺伊大学理事会

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 迈克尔·卓 阿枚利亚·扎兰德尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51) Int. Cl.

A61L 27/56 (2006. 01)

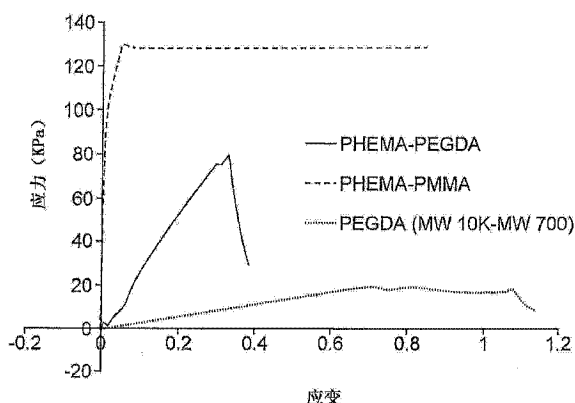
权利要求书1页 说明书18页 附图2页

(54) 发明名称

用于角膜的可缝合的混合型超多孔水凝胶角膜假体

(57) 摘要

本发明的特征在于一种用于角膜再生的混合型超多孔水凝胶支架及其生产方法。该混合型水凝胶由与胶原蛋白混合的超多孔的聚(甲基丙烯酸2-羟乙基酯)(PHEMA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)共聚物构成。该混合型支架可以用作可缝合的混合型角膜植入物或角膜假体。



1. 一种用于角膜再生的混合型支架,其包含超多孔水凝胶共聚物以及在所述超多孔水凝胶共聚物的孔中的胶原蛋白,其中所述超多孔水凝胶共聚物包含聚(甲基丙烯酸 2-羟乙基酯)(PHEMA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)。

2. 一种可缝合的混合型植入物,其包含 PHEMA-PMMA 共聚物以及在所述 PHEMA-PMMA 共聚物的孔中的胶原蛋白。

3. 权利要求 1 的可缝合的混合型植入物,其中所述植入物形成用于植入到角膜中的核心-裙边型角膜假体的裙边。

4. 一种用于生产权利要求 2 的可缝合的混合型植入物的方法,所述方法包括:在水性溶液中混合甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-羟乙基酯、去离子水、四丙烯酸季戊四醇酯和二甲基甲酰胺以形成超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液;冷却所述超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液;向冷却的超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液加入胶原蛋白以形成胶原蛋白-水凝胶溶液;以及将所述胶原蛋白-水凝胶溶液在 37°C 下温育以产生可缝合的混合型植入物。

5. 一种用于生产超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶的方法,所述方法包括在溶液中混合甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-羟乙基酯、去离子水、四丙烯酸季戊四醇酯(PETA)和二甲基甲酰胺(DMF)以形成超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶,其中 DMF 促进 MMA 和 HEMA 溶解到凝胶溶液中,并且 PETA 促进 PHEMA-PMMA 共聚物的交联。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述溶液含有浓度为 10% v/v 的甲基丙烯酸甲酯、浓度为 45% v/v 的甲基丙烯酸 2-羟乙基酯、5mg PETA、2mg 过硫酸铵、10 μ l N,N',N'-四甲基乙二胺、浓度为 6% v/v 的 DMF 和 22% 的去离子水。

用于角膜的可缝合的混合型超多孔水凝胶角膜假体

[0001] 简介

[0002] 本申请要求 2011 年 10 月 28 日提交的美国专利申请系列号 13/284,301 的优先权,所述专利申请的全部内容通过参考并入本文。

背景技术

[0003] 角膜是无血管且光学透明的组织,其在光线进入眼睛之前折射并过滤光线。透明的角膜对于清晰的视觉来说是必不可少的。角膜在受伤、变性或感染之后可能变得不透明。视觉共享联盟 (Vision Share Consortium) 估计,角膜性失明在全世界影响超过 1 千万患者 (Carlsson 等, (2003) Curr. Opin. Ophthalmol. 14(4):192-7)。金标准治疗是使用新近捐献的人类尸体角膜进行角膜的手术置换。目前,在美国,每年进行约 40,000 例角膜移植 (美国眼库联合会的 2000 年统计报告 (Eye Bank Association of America. Statistical report 2000)), 其中对于在非血管化“低风险”患者中进行的无并发症首次移植植物来说,2 年成功率高达 90% (科学事务理事会 (Council on Scientific Affairs) (1988) JAMA 259:719; 角膜移植合作研究组 (The Collaborative Corneal Transplantation Research Group) (1992) Arch. Ophthalmol. 110:1392)。然而,在低风险角膜移植中的成功与被放置在所谓的“高风险”患者中的角膜移植植物的结果形成鲜明对比,在所述“高风险”患者中,即使使用最大的局部和全身免疫抑制,排斥率也可以增加至高达 50-70% (Mader & Stulting (1991) Ophthalmol. Clin. North Am. 4:411; Foulks & Sanfilippo (1982) Am. J. Ophthalmol. 94(5):622-9)。免疫排斥仍然是角膜移植失败的主导原因 (Ing 等, (1998) Ophthalmology 105(10):1855-65)。免疫排斥的风险因素包括以前的移植植物排斥、角膜血管化和年轻。这些“高风险”患者通常经历反复的手术,导致过多的疼痛、费用和有限资源的使用。例如,对于出生时患有角膜疾病的婴儿来说,在他们到达成年时为止经历 15-20 次角膜移植,每个移植植物在屈从于排斥之前仅持续 3-6 个月,这并不是罕见的。因此,对于在这些高风险患者中克服排斥的可选治疗方法,存在着明显的需求 (Coster & Williams (2003) Eye 17(8):996-1002)。

[0004] 为了满足角膜置换这一尚未得到满足的需求,设计了人造角膜或角膜假体。人造角膜的主要优点是不存在免疫排斥。有两种人造角膜可用于移植,即 Boston 角膜假体 (KPro) 和 AlphaCor。Boston KPro 是现代的核心和裙边 (skirt) 设计的先驱,其中可生物整合的裙边围绕着光学透明的核心 (Chirila & Crawford (1996) Gesnerus 53(3-4):236-42)。AlphaCor 后来通过利用柔软的聚合物以避免与 Boston KPro 的刚性相关的并发症,对这种设计进行了改良。两种装置都具有高保留率:AlphaCor 据报道在 6 个月后为 92% (Hicks 等, (2006) Cornea 25(9):1034-42), Boston KPro 表现出在 8.5 个月后为 95% (Zerbe 等, (2006) Ophthalmology 113(10):1779.e1, 1779.e7)。然而,两者都没有被广泛接受,这是由于缺乏稳定的宿主整合,这最终导致熔化、挤出和排斥 (Chirila (2001) Biomaterials 22(24):3311-7)。此外,在前表面上缺乏上皮形成,使得眼睛不受保护并易于发生感染 (Myung 等, (2007) Biomed. Microdevices 9:911-922)。其他设计也未能解决理想

的角膜假体的一个或多个至关重要的参数,即宿主整合、物质运输、组织上皮形成或神经分布。不够完善的角膜假体设计可以引起挤出、组织坏死、眼内压升高或感染。

[0005] 为了克服这样的限制,已经研究了其他多孔聚合物,包括聚四氟乙烯、聚氨酯、聚(甲基丙烯酸 2-羟乙基酯)(Carlsson 等,(2003)同上)和聚乙二醇(Myung 等,(2007)同上)。尽管孔为细胞从宿主迁移到植入物提供了物理通路,但是它们不提供细胞粘附、存活和分泌细胞外基质的生物信号。显然,细胞对三维(3-D)和二维(2-D)背景中存在的细胞外信号的应答不同。在 2-D 中,由于由空气-基材界面产生的人工极性,细胞粘附被显著改变。3-D 细胞外环境是促成组织工程支架的成功的关键要素。然而,尽管有证据支持 3-D 组织工程支架,但它们受到扩散能力的极大限制。因此,为了促进整个构建物中营养物和废物的交换,多孔系统是必需的(Karande 等,(2004)Ann. Biomed. Eng. 32(12):1728-43; Karageorgiou&Kaplan(2005)Biomaterials26(27):5474-91)。孔在移植后也是有利的,在那时它们可以用作用于宿主细胞整合的导管。周围组织、包括血管和神经元可以通过互连的孔网络迁移到支架内,将构建物进一步粘接在组织内。

[0006] 已经使用许多方法来工程化改造 3-D 多孔支架,包括盐浸析,冷冻干燥,以及使用热、粘合剂、光或模具进行逐层光刻。尽管这些方法有许多优点,但主要的缺点包括难以获得互连的孔、有毒副产物、难以掺入细胞或长的处理时间(Tsang&Bhatia(2004)Adv. Drug Deliv. Rev. 56(11):1635-4)。

[0007] 美国专利号 6,960,617 描述了具有改进的弹性和机械强度的水凝胶的应用。所教导的水凝胶是超多孔的,并被用于形成聚合物链的网络。该专利没有教导或建议将任何其他化合物与所述水凝胶组合,以便改善聚合物的功能或生物相容性。

[0008] 角膜组织工程是具有挑战性的,因为它需要将数种细胞类型掺入到不同的层中。上皮是角膜的最外层,由鳞状上皮细胞构成。上皮的主要功能是阻断外来物质进入眼睛,并为角膜吸收氧气和营养物。Bowman 层是将上皮与间质分隔开的无细胞的胶原蛋白层。位于 Bowman 层下方的间质由水、胶原蛋白和角膜细胞构成,并且不含血管。在间质下方的是后弹力膜(Descemet's membrane),这是将间质与内皮分隔开的另一个无细胞的层。内皮是最内层,其起到泵的作用以调节角膜的水合水平。

[0009] 胶原蛋白基质支持细胞生长和分化(Sun 等,(2004)Tissue Eng. 10(9-10):1548-57;Yoneno 等,(2005)J. Biomed. Mater. Res. A75(3):733-41; Reyes&Garcia(2004)J. Biomed. Mater. Res. A69(4):591-600)。胶原蛋白是人类细胞外基质的天然组分,并且是哺乳动物组织中最丰富的蛋白质。此外,胶原蛋白是无毒性、可生物降解和廉价的。作为细胞外基质(ECM)蛋白,胶原蛋白提供大量用于细胞粘附的整合素结合位点。这允许细胞和 ECM 之间存在双向通讯流,其介导许多机械和生物学特征(Pampaloni 等,(2007)Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8(10):839-45)。不幸的是,在体外产生的胶原蛋白凝胶长期以来由于它们的弱的机械性质而受到批评。为了提高胶原蛋白的机械稳定性,已经尝试了化学交联或脱水(Drury&Mooney(2003)Biomaterials24(24):4337-51)。然而,这样的方法通常对细胞有毒并阻止细胞在基质内的 3-D 包封。

[0010] 其他人描述了许多不同类型的生物合成基质。例如,US2004/0048796 教导了将胶原蛋白生物织物用于医学和外科应用。胶原蛋白生物织物从胎盘膜、优选为人类的胎盘膜,通过羊膜的脱细胞而制备得到。US2006/0083773 公开了被设计用于替换或增强角膜的人

造角膜植入物。所公开的植入物由双重网络水凝胶制成,所述双重网络水凝胶由生物相容性聚合物构成,其中至少一种网络聚合物是基于亲水性聚合物,其中所述植入物具有促进上皮形成的生物分子,所述生物分子共价连接到双重网络水凝胶的表面。所述植入物还具有生理扩散系数,以允许营养物通向被粘附的细胞。US2006/0246113 教导了由水凝胶构成的生物合成基质的应用,所述水凝胶通过将合成聚合物与生物聚合物化学交联来形成。EP 1 741 457 公开了包含水凝胶的生物合成基质,所述水凝胶也通过将合成聚合物与生物聚合物交联来形成。然而,现有技术中描述的基质都不能成功地用于生产具有足够的强度和生物相容性以用于角膜置换手术的角膜植入物材料。对于可以在角膜置换手术中使用的材料,仍存在需求。

发明内容

[0011] 本发明是用于角膜再生的混合型支架,所述混合型支架包含超多孔水凝胶共聚物以及在所述超多孔水凝胶共聚物的孔中的胶原蛋白,其中所述超多孔水凝胶共聚物包含聚(甲基丙烯酸 2-羟乙基酯)(HEMA)和聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)。

[0012] 本发明的另一个目的是一种可缝合的混合型植入物,其包含 PHEMA-PMMA 共聚物以及在所述 PHEMA-PMMA 共聚物的孔中的胶原蛋白。在一种实施方式中,所述可缝合的混合型植入物形成用于植入到角膜中的核心-裙边型(core-skirt)角膜假体的裙边。

[0013] 本发明的另一个目的是生产可缝合的混合型植入物的方法,所述方法包括:在水性溶液中混合甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-羟乙基酯、去离子水、四丙烯酸季戊四醇酯和二甲基甲酰胺以形成超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液;冷却所述超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液;向冷却的超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液加入胶原蛋白以形成胶原蛋白-水凝胶溶液;以及将所述胶原蛋白-水凝胶溶液在 37℃ 下温育以产生可缝合的混合型植入物。

[0014] 本发明的另一个目的是生产超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶的方法,所述方法包括在溶液中混合甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-羟乙基酯、去离子水、四丙烯酸季戊四醇酯(PETA)和二甲基甲酰胺(DMF)以形成超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶,其中 DMF 促进 MMA 和 HEMA 溶解到凝胶溶液中,并且 PETA 促进 PHEMA-PMMA 共聚物的交联。在优选实施方式中,所述溶液含有浓度为 10% v/v 的甲基丙烯酸甲酯、浓度为 45% v/v 的甲基丙烯酸 2-羟乙基酯、5mg PETA、2mg 过硫酸铵、10 μ l N,N,N',N'-四甲基乙二胺、浓度为 6% v/v 的 DMF 和 22% 的去离子水。

附图说明

[0015] 图 1 示出了本发明的聚合物的拉伸强度试验的结果。在试验中比较了多孔 PHEMA-PMMA 共聚物、多孔 PHEMA-PEGDA 共聚物和多孔 PEGDA 聚合物。所有材料在其水合状态下进行测试。与 PEGDA 聚合物以及 PHEMA-PEGDA 共聚物相比,PHEMA-PMMA 共聚物显示出显著更高的拉伸强度。

[0016] 图 2 示出了本发明的聚合物的拉伸强度试验的结果。在试验中比较了盐致孔的多孔 PHEMA-PMMA 共聚物、气体发泡的多孔 PHEMA-PMMA 共聚物、多孔 PHEMA-PMMA 共聚物和多孔 PEGDA 聚合物。所有材料在其水合状态下进行测试。

[0017] 图 3 示出了本发明的聚合物的最佳透明度。分析了具有不同量的 PMMA(3.5%、

7%、14%或21%)的多孔 PHEMA-PMMA 共聚物。标出了使用气体或碳酸氢钠(盐构建物)生产的构建物。

具体实施方式

[0018] 本发明是一种混合型支架,其由交织在基于聚(甲基丙烯酸2-羟乙基酯)或 PHEMA 或者基于聚(甲基丙烯酸甲酯)或 PMMA 的超多孔水凝胶(SPH)中的胶原蛋白构成,以提供一种用于完全3-D细胞粘附的方法,所述方法在维持 SPH 的总体机械强度的同时也鼓励细胞向内生长。使用这种支架时,本发明还包括可缝合的混合型植入物。可缝合的混合型植入物由 PHEMA-PMMA 共聚物和胶原蛋白构成。混合型植入物在体内促进宿主整合和物质运输,并且可以用作用于角膜植入物的核心-裙边型角膜假体中的裙边。用于角膜植入物的裙边-核心型角膜假体模型是其中核心允许形成视觉而裙边促进稳定的宿主整合的角膜假体模型。本发明还提供了用于生产可缝合的混合型植入物的方法,所述方法包括:在水性溶液中混合甲基丙烯酸甲酯(MMA)、甲基丙烯酸2-羟乙基酯(HEMA)、去离子水、四丙烯酸季戊四醇酯和二甲基甲酰胺以形成超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液;冷却所述超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液;向冷却的超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液加入胶原蛋白以形成胶原蛋白-水凝胶溶液;以及将所述胶原蛋白-水凝胶溶液在37℃下温育以产生可缝合的混合型植入物。

[0019] 目前可用的角膜假体裙边不能提供充分的宿主整合以实现植入物长期使用和维持全视野两者。例如,在一种假体即骨齿角膜假体(OOKP)中,被由自体牙齿制成的晶片包围的 PMMA 中央核心显示出62%的10年总体平均解剖学存活率,但是仅提供有限的视野(Griffith等,(2005)《眼科学要点:角膜和外部眼睛疾病》(Essentials in Ophthalmology:Cornea and External Eye Disease),第3章,T.Rheinhard 主编, Springer;Jun等,(2010)《角膜和外部眼睛疾病:眼科学要点》(Cornea and External Eye Disease:Essentials in Ophthalmology),第10章,Weinreb 和 Krieglstein 主编, pp.137-144)。不能提供充分的宿主整合和全视野两者的装置的另一个实例是 Seoul 型角膜假体,其由 PMMA 镜片和由聚氨酯或聚丙烯制成的裙边构成。使用这种装置在68个月时得到66.7%的解剖学保留率。所有这些装置都发展出角膜熔化,引起裙边的完全暴露。缺少所有所需品质的装置的另一个实例是 Stanford 角膜假体,它的中央光学部件由聚乙二醇和聚丙烯酸(PEG/PAA)的混合型网络构成。这种假体在动物模型中在长达6周的时间内耐受良好(Griffith等,(2005)《眼科学要点:角膜和外部眼睛疾病》(Essentials in Ophthalmology:Cornea and External Eye Disease),第3章,T.Rheinhard 主编, Springer);然而,没有宿主整合的证据。基于 PHEMA 的角膜假体 Alphacor 目前被批准用于临床使用(Griffith等,(2005)同上;Jun等,(2010)同上)。在2年的随访时,Alphacor 的保留率据报道高达62%,并且发现手术后局部使用甲羟孕酮(MPG)与更少的角膜间质熔化相关,角膜间质熔化是最常见的并发症(Gomaa(2010)Clin. Exp. Ophthalmol. 38:211-224)。此外,其他 Alphacor 并发症还包括假体后膜(retroprosthetic membrane)形成、视觉损伤和生物整合不良(Sheardown(2008)《角膜再生医学》(Regenerative Medicine in the Cornea), pp.1060-1071)。此外,由 Alphacor 不能保持缝合线造成的伤口开裂,是临床前试验期间常见的失败模式(Hicks,(1997)Austral. NZ J. Ophthalmol. 25:S50-S52)。最后,

对于使用各种交联剂、包括二甲基丙烯酸乙二醇酯 (EDMA) 产生的 PHEMA 海绵来说, 观察到 3 - 14KPa 范围内的拉伸模量, 所述 EDMA 被用在角膜假体设计的优选形成中 (美国专利号 5, 458, 819 ; Lou (2000) J. Mater. Sci. 11:319-325)。鉴于现有的角膜假体设计和体内使用时的问题, 需要新的设计。为解决这些问题, 本发明提供了被设计成保持缝合线并促进细胞迁移的混合型构建物 (输注有 I 型胶原蛋白的多孔 PHEMA-PMMA), 其引起组织发育和裙边整合到宿主的眼组织中。

[0020] 本发明的开发是通过首先研究由交织在基于聚乙二醇二丙烯酸酯 (PEGDA) 的超多孔水凝胶 (SPH) 中的胶原蛋白构成的混合型支架的使用而实现的。本发明包括使用其他 SPH 聚合物来提供用于完全 3-D 细胞粘附的方法, 所述方法在维持 SPH 的总体机械强度的同时也鼓励细胞向内生长。混合型支架通过以下方式来生产: 将 SPH 脱水, 然后在胶原蛋白 - 细胞溶液中重新溶胀以产生在材料之间没有共价键合或紧密相互作用的混合型支架。与利用胶原蛋白和 PEGDA 聚合物链的紧密缠结产生的支架相比, 这种方法产生更好的 3-D 细胞粘附。由于细胞被完全包埋在胶原蛋白部分内并且不暴露于 SPH 的壁, 因此不需要孔尺寸的精确控制或均匀性。此外, 由于可以在摄取并凝胶化之前将细胞包埋在基于 PEGDA 的支架中的胶原蛋白内, 因此这种方法产生 3-D 环境并避免了非天然的细胞极性。

[0021] 通过本发明的方法生产的支架是具有强的堆积性能以及天然的 3-D 粘附性能的支架。不论使用何种具体凝胶, 本发明的混合型支架的天然和合成凝胶都以非共价、非粘附性的方式交织。就此而言, 混合型支架的胶原蛋白不附着于超多孔水凝胶的壁, 从而允许胶原蛋白凝胶收缩。因此, 包埋在胶原蛋白内的细胞被浸没在胶原蛋白凝胶的 3-D 中, 并且不暴露于超多孔水凝胶的壁。尽管胶原蛋白提高细胞粘附、保留和向内生长, 但混合型支架的总体机械学不依赖于胶原蛋白, 而是极大地类似于超多孔水凝胶。因此, 混合型超多孔水凝胶提供了机械稳定性和互连的孔, 而 3-D 胶原蛋白基质提供了 3-D 粘附性结合位点。尽管初始的混合型支架由胶原蛋白和 PEGDA 构成, 但设想了, 这种通用方法可以被改造成根据特定组织类型的需要掺入许多不同的天然和合成材料。事实上, 据预期, 本发明的混合型支架能够根据所需应用在具有或不具有预先接种的细胞的情况下有效地使用。

[0022] 使用基于 PEGDA 的混合型支架进行实验, 以证实本发明的混合型支架可以成功地在体内使用。在这些实验中, 向两只大鼠植入包含混合型支架 (SPH 和胶原蛋白) 或没有胶原蛋白的水凝胶 (非混合型) 支架的人造角膜。使用混合型支架生产的人造角膜的新的性质与植入物的混合型裙边 (外部) 部分相关。因此, 在维持植入物的中央部分透明的同时, 将外周的裙边设计成鼓励与眼睛组织整合。为了测试这种类型的角膜植入物的体内整合程度, 将外周裙边植入到大鼠角膜中, 并在 2 周后进行观察。植入物的检查显示, 取决于植入物的性质, 存在着差异。在 2 周后, 带有含有混合型材料 (SPH 和胶原蛋白) 的外周裙边的植入物在眼中更不明显。混合型裙边植入物耐受良好并且生物相容。此外, 结果表明, 与不含胶原蛋白的植入物相比, 混合型裙边植入物更好地与周围的眼组织整合。

[0023] 在可选制剂中, 本发明是由 PHEMA-PMMA 共聚物构成的超多孔水凝胶。现在已显示, 与基于 PEGDA 的超多孔水凝胶相比, 这种共聚物在掺入到角膜假体中时具有出人意料的改进的性质。本发明还提供了用于形成用作角膜假体的超多孔水凝胶的新方法。在本发明的方法中, 超多孔水凝胶被配制成 PHEMA-PMMA 混合型共聚物。本发明的方法包括对甲基丙烯酸甲酯 (MMA)、甲基丙烯酸 2-羟乙基酯 (HEMA)、四丙烯酸季戊四醇酯 (PETA)、过硫

酸铵、N,N,N',N' - 四甲基乙二胺 (TEMED)、二甲基甲酰胺 (DMF) 和去离子水进行混合, 以形成凝胶溶液。凝胶溶液中 PETA 的使用提供了 PHEMA-PMMA 共聚物的交联以产生具有所需强度和机械性质的凝胶, 并且是本发明的形成超多孔水凝胶的方法的新特点。使用 DMF 溶解凝胶溶液中的 PHEMA-PMMA, 是本发明的形成超多孔水凝胶的方法的另一个新特点, 因为它提供了 PHEMA 和 PMMA 的溶解, 同时不破坏大孔, 大孔是 PHEMA-PMMA 共聚物的一个重要特点。在聚合期间进行搅拌是引起大孔形成的关键步骤。通过搅拌混合物直至阈值温度, 可以使孔变得更大。一旦达到阈值温度后, 从本发明的方法得到的凝胶溶液产生粘度, 其柔性足以使其被放置在模拟角膜曲率的隐形眼镜形状的模具中。一旦产生凝胶后, 由于 PHEMA-PMMA 在水性溶液中的缓慢膨胀, 在多孔 PHEMA-PMMA 共聚物中互相贯穿的胶原蛋白网络的形成可能需要长达 36 小时。一旦 PHEMA-PMMA 共聚物已在胶原蛋白溶液中完全膨胀之后, 得到的构建物是用于植入的可缝合的混合型角膜假体。与其他材料相比, 本发明的共聚物的可缝合性是一个重要的改进。已经进行了实验, 实验显示, PHEMA-PMMA 共聚物在溶液例如去离子水和磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中是机械稳定的, 同时所述共聚物具有足够的弹性以允许以适度的力牵拉该材料。此外, 本发明的混合型可缝合角膜假体的胶原蛋白网络促进细胞从宿主迁移到构建物中。当通过用抗 I 型胶原蛋白单克隆抗体染色进行检查时, 显示出已在 PHEMA-PMMA 植入物的孔内形成胶原蛋白纤维。当进行染色以鉴定活细胞 (钙黄绿素 -AM 染色) 与死细胞 (乙啶均二聚体 -1) 时, 明显看出细胞迁移到可缝合的混合型角膜假体中。

[0024] 进行了实验以检查 PHEMA-PMMA 共聚物与其他聚合物相比的拉伸强度。所有材料在其水合状态下进行测试。如图 1 中所示, 本发明的 PHEMA-PMMA 共聚物的拉伸强度具有比 PEGDA 聚合物高 1 至 2 个数量级的拉伸强度。根据这些关于材料强度的结果, PEGDA 聚合物 (MW10K - MW700) 是可以被制造成有孔以容纳细胞向内生长但是不能被成功地缝合的柔软材料。PHEMA - PEGDA 共聚物比 PEGDA 在机械上更稳定, 但是也缺乏可缝合性强度; 这种材料可以被弯曲和拉伸而不破裂。相反, PHEMA-PMMA 共聚物在中等至轻微力量的拉力下维持其完整性, 并且在插入针和随后施加力后也能抵抗破裂。因此, 本发明的 PHEMA-PMMA 共聚物提供了可缝合的角膜假体, 所述角膜假体还能够进行稳定的宿主整合。

[0025] 因此, 带有包埋在本发明的构建物中的 I 型胶原蛋白网络的多孔 PHEMA-PMMA 共聚物, 代表了极大改进的人造角膜 (角膜假体)。本发明满足了现有的人造角膜所未满足的两个主要标准, 即细胞迁移 / 宿主整合和允许假体缝合的结构 / 机械稳定性。数据显示, 本发明的混合型角膜假体促进细胞向内生长, 并且还表现出缝合和植入所需的拉伸强度。结果, 本发明提供了能够支持全厚度角膜置换手术的新的角膜假体。因此, 本发明提供了由掺入到超多孔水凝胶的孔中的胶原蛋白和细胞构成的混合型支架及其生产方法。

[0026] 当在本文中使用时, 超多孔水凝胶基质是指一种半固体三维结构, 其由于存在大量互连的平均直径尺寸在约 100nm 至约 300 μ m 之间的大孔而能够吸收显著量的水。超多孔水凝胶可以按照本文中所公开的方法, 即, 被优化用于同时聚合的发泡反应, 或按照本领域中使用的任何其他适合的方法来生产。正如本领域技术人员认识到的, 大孔的尺寸可以取决于多种因素, 包括例如在其中形成凝胶的溶剂的性质, 和 / 或聚合引发剂或催化剂的量。

[0027] “超多孔”意欲指基质在溶液中溶胀。由于材料的摄取是基于毛细管作用而不是扩散 (Gemeinhart 等, (2000) J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 11(12):1371-80; Gemeinhart 等,

(2001) J. Biomed. Mater. Res. 55(1):54-62), 因此本发明的超多孔水凝胶能够将多种可溶性材料例如细胞和蛋白质快速掺入到支架基质的孔中。超多孔水凝胶由当置于水或其他生物流体中时溶胀而不溶解的聚合物构成。水凝胶一般能够吸收大量流体, 并且在达到平衡时, 通常由 60 - 90% 的流体和仅仅 10 - 30% 的聚合物构成。由于交联的聚合物网络的固有的生物相容性, 水凝胶是特别有用的 (Hill-West 等, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5967-5971)。水凝胶的生物相容性可以归因于亲水性和吸收大量生物流体的能力 (Brannon-Peppas. 《吸收性聚合物技术中交联的亲水性网络的制备和表征》(Preparation and Characterization of Cross-linked Hydrophilic Networks in Absorbent Polymer Technology), Brannon-Peppas 和 Harland 主编, 1990, Elsevier: Amsterdam, pp45-66; Peppas 和 Mikos, 《医学和药理学中的水凝胶》中的“水凝胶的制备方法和结构”(Preparation Methods and Structure of Hydrogels in Hydrogels in Medicine and Pharmacy), Peppas 主编, 1986, CRC Press: Boca Raton, FL, pp1-27)。此外, 水凝胶非常类似于天然的活的细胞外基质 (Ratner 和 Hoffman, 《用于医学和相关应用的水凝胶》中的“用于生物医学应用的合成水凝胶”(Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications in Hydrogels for Medical and Related Applications), Andrade 主编, 1976, American Chemical Society: Washington, DC, pp1-36)。

[0028] 本发明的水凝胶基质由合成的亲水性聚合物构成, 所述聚合物被合成地生产并且是亲水性的, 但是不一定是水溶性的。可以在本发明的实践中使用的合成的亲水性聚合物的实例是聚乙二醇 (PEG)、聚氧乙烯、聚甲二醇、聚丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸、聚衣康酸、聚甲基丙烯酸、聚羟丙基丙烯酸酰胺 (HPMA)、聚肽例如聚谷氨酸、聚赖氨酸、聚天冬氨酸、聚丝氨酸、聚苏氨酸、聚半胱氨酸和聚氧乙烯 - 聚氧丙烯嵌段聚合物, 以及它们的共聚物、衍生物和混合物。尽管天然的海洋生物聚合物例如琼脂糖、壳聚糖和藻酸盐也被本发明所涵盖, 但在某些实施方式中, 亲水性基质不是天然存在的聚合物例如蛋白质、淀粉、纤维素、肝素或透明质酸。在优选的实施方式中, 水凝胶基质是聚甲基丙烯酸聚合物。在更优选的实施方式中, 聚甲基丙烯酸聚合物是 PHEMA-PMMA 共聚物。

[0029] 尽管不同的合成亲水性聚合物和所选的生物聚合物可以相组合使用以形成本发明的亲水性基质, 但是聚合物必须是生物相容和亲水的, 而且被物理或化学交联以防止溶解。特别适合的聚合物包括由于不存在毒性、抗原性和免疫原性, 具有广范围的溶解性, 通常不可生物降解并且易于从大多数活的生物体、包括人类中排泄出去而被广泛用在生物活性分子的改性中的那些聚合物。

[0030] 聚乙二醇二丙烯酸酯 (PEGDA) 和聚甲基丙烯酸水凝胶在许多生物医学应用中已被广泛接受 (Peppas 等, (1999) J. Controlled Release 62:81-87)。这样的水凝胶是亲水、生物相容、无毒性的, 并且取决于大分子单体的长度而表现出可变的筛孔尺寸。正如本文中所示例的, 从 PEGDA 和聚甲基丙烯酸生产得到的超多孔水凝胶对细胞无毒, 并且可以使用气体发泡法容易地生产得到。此外, 本发明的水凝胶是光学透明的, 使得它们在体内具有理想的透明度。因此, 本发明的特定实施方式包含使用 PEGDA 或聚甲基丙烯酸聚合物例如 PHEMA 和 PMMA 生产得到的超多孔水凝胶。

[0031] 通过掺入可以在基质形成后交联的交联亲水剂例如藻酸钠、果胶、壳聚糖或聚乙烯醇, 可以对本发明的超多孔水凝胶进行进一步修饰以具有高机械强度 (Omidian 等,

(2006)Macromol.Biosci.6:703-10)。通过掺入 PLA、PLGA 或 PGA 聚合物,也可以使水凝胶在体内可降解。此外,超多孔水凝胶可以用纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白或例如用于表面修饰的 RGD 进行修饰,其可以促进细胞粘附和增殖 (Heungsoo Shin(2003)Biomaterials24:4353-4364 ;Hwang 等, (2006)Tissue Eng.12:2695-706)。事实上,改变分子量、嵌段结构、可降解的连接键和交联方式,可以影响本发明的水凝胶的强度、弹性和降解性能 (Nguyen&West(2002)Biomaterials23(22):4307-14 ;Ifkovits&Burkic(2007)Tissue Eng.13(10):2369-85)。

[0032] 超多孔水凝胶还可以用官能团进行修饰,以共价连接多种蛋白质(例如胶原蛋白)或化合物例如治疗剂。可以被连接到基质的治疗剂包括但不限于镇痛剂、麻醉剂、抗真菌剂、抗生素、抗炎剂、驱蠕虫剂、解毒剂、止吐剂、抗组胺剂、抗高血压剂、抗疟剂、抗微生物剂、抗精神病剂、退热剂、防腐剂、抗关节炎剂、抗结核剂、止咳剂、抗病毒剂、心脏活性药物、泻药、化疗剂、着色或荧光成像剂、皮质激素类(例如甾醇类)、抗抑郁剂、镇静剂、诊断助剂、利尿剂、酶、祛痰剂、激素、安眠剂、矿物质、营养增补剂、拟副交感神经药、钾增补剂、辐射敏化剂、放射性同位素、镇静剂、磺胺类药物、兴奋剂、拟交感神经药、安神剂、尿路抗感染剂、血管收缩剂、血管扩张剂、维生素、黄嘌呤衍生物等。治疗剂也可以是其他有机小分子、天然分离的实体或其类似物、有机金属剂、螯合的金属或金属盐、基于肽的药物或者肽类或非肽类受体靶向剂或结合剂。设想了治疗剂与基质的连接可以通过蛋白酶敏感性连接物或其他可生物降解的连接键。

[0033] 除了官能团之外,本发明的水凝胶的聚合物还可以包含用于受控的生物降解的手段,以促进从治疗的对象移除基质聚合物。例如,可以通过修饰将水凝胶制造成以更快的速率生物降解 (Sawhney 等, (1994)J.Biomed.Mater.Res.28:831-838)。通过掺入可生物降解的交联剂或通过利用可生物降解的共聚物,可以将水凝胶制造成可生物降解的 (Sawhney 等, (1993)Macromolecules26:581-587 ;Park 等,《用于药物递送的可生物降解的水凝胶》(Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery).1993,Lancaster,PA:Technomic Pub.ix,252 ;Watanabe 等, (2002)Biomaterials23:4041-4048 ;Yamini 等, (1997)J.Macromol.Sci.A34:2461-2470)。例如,被纤溶酶或粗胶原酶特异性降解的远螯可生物降解的嵌段共聚物已被用于交联的水凝胶中 (West 等, (1999)Macromolecules,32:241-244)。降解的程度和速率由所使用的具体降解机制控制,由此限制了基质在植入位点处的积累。

[0034] 正如所指出的,本发明的水凝胶可以通过气体发泡法来生产,其中制备水凝胶前体溶液并向其加入发泡剂以产生泡沫,所述泡沫胶凝或聚合以形成其中分散有大量大孔的基质。前体溶液被定义为用于组合产生超多孔水凝胶结构的组分的混合物,但是不存在促进泡沫形成和水凝胶胶凝或聚合的发泡剂。本发明的前体溶液可以包括但不限于亲水性聚合物、引发剂和泡沫稳定剂。本文中公开了适合的亲水性聚合物。适合的引发剂包括例如 APS/TEMED,适合的泡沫稳定剂可以是嵌段共聚物例如 PLURONIC F-127。发泡剂可以是化学或物理发泡剂。在某些实施方式中,发泡剂是盐例如碳酸氢钠。在其他实施方式中,发泡剂是气体例如压缩空气或氮气。在气体发泡法中使用的其他发泡剂对于本领域技术人员来说是已知的。

[0035] 根据本发明的用于生产超多孔水凝胶的方法,将超多孔水凝胶基质脱水。水凝胶基质可以通过任何适合的化学和 / 或物理手段来脱水。例如,可以使用醇(例如乙醇)和

脱水剂的组合来实现脱水。

[0036] 在优选的实施方式中,本发明是用于生产超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶的方法,所述方法包括在溶液中混合甲基丙烯酸甲酯 (MMA)、甲基丙烯酸 2-羟乙基酯 (HEMA)、去离子水、四丙烯酸季戊四醇酯 (PETA) 和二甲基甲酰胺 (DMF) 以形成超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶,其中 DMF 促进 MMA 和 HEMA 溶解到凝胶溶液中,并且 PETA 促进 PHEMA-PMMA 共聚物的交联。在更优选的实施方式中,本发明的方法包括混合 10% v/v MMA、45% v/v HEMA、5mg PETA、2mg 过硫酸铵、10 μ l N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、6% v/v DMF 和 22% 去离子水。

[0037] 为了掺入目标分子 (例如胶原蛋白) 并在其中包埋或不包埋细胞,将水凝胶基质在含有目标分子并且含有或不含细胞的溶液中重新溶胀或重新水合。可以被掺入到超多孔水凝胶基质的孔中的分子包括但不限于维生素和其他营养增补剂、糖蛋白 (例如胶原蛋白)、纤连蛋白、肽和蛋白质、糖类 (简单糖和 / 或复合糖)、蛋白聚糖、抗原、寡核苷酸 (正义和 / 或反义 DNA 和 / 或 RNA)、抗体 (例如针对感染因子、肿瘤、药物或激素的抗体) 和基因治疗试剂。在某些实施方式中,目标分子是胶原蛋白。在特定实施方式中,胶原蛋白是 I 型胶原蛋白。理想地,目标分子在生物相容的溶液、即在体内无毒的溶液中。适合的溶液包括但不限于水、盐水、缓冲液等。

[0038] I 型胶原蛋白是人体最丰富的胶原蛋白。它存在于瘢痕组织、肌腱和骨骼的有机部分中。II 型胶原蛋白是关节软骨的组分,并且与 IX 型胶原蛋白相伴存在,而 III 型胶原蛋白是肉芽组织的胶原蛋白,并且在更坚韧的 I 型胶原蛋白合成之前由年轻的成纤维细胞快速产生。XII 型胶原蛋白被发现与 I 型和 III 型胶原蛋白相互作用。IV 型胶原蛋白是基底层的一部分。V 型和 VI 型胶原蛋白是大多数间质组织的组分,并且与 I 型胶原蛋白相伴。VII 型胶原蛋白是上皮的组分,VIII 型胶原蛋白也是如此。X 型胶原蛋白是肥大性的并且是矿化软骨的一部分,而 XI 型胶原蛋白是软骨的组分。因此,取决于植入位点和目标治疗结果,可以将一种或多种胶原蛋白掺入到超多孔水凝胶基质的孔中。胶原蛋白可以在溶液中作为溶解在酸中的胃蛋白酶增溶的胶原蛋白获得 (例如 Vitrogen; ANGIOTECH® Biomaterials, Palo Alto, CA)。胶原蛋白可以被中和 (例如用 NaOH 中和到 pH7.0 至 pH7.4),并直接掺入到超多孔水凝胶基质中或与目标细胞组合并掺入到超多孔水凝胶基质中。然后通过原纤维形成 (例如在存在或不存在 CO₂ 的情况下,在 24°C 至 37°C 下) 将胶原蛋白固化,并且使细胞悬浮在其中。在优选实施方式中,将 I 型胶原蛋白掺入到本发明的超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶的孔中。这通过向冷却的 PHEMA-PMMA 水凝胶溶液 (约 2-8°C) 加入胶原蛋白来实现,其中所述溶液在整个胶原蛋白吸收过程中保持冷却。一旦胶原蛋白被掺入到 PHEMA-PMMA 溶液之后,将胶原蛋白溶液在细胞温育器中在 37°C 下温育 1 小时。得到的产物是可缝合的混合型植入物或可缝合的混合型角膜假体。

[0039] 当希望将细胞掺入到本发明的超多孔水凝胶中时,可以在将含有目标分子的溶液用于使水凝胶重新溶胀或重新水合之前或之后,将细胞与所述溶液组合。在特定实施方式中,在使水凝胶重新溶胀之前向溶液加入细胞。在本发明中有具体用途的细胞的类型包括但不限于干细胞、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、间充质细胞、产胰岛素的胰岛细胞、肝细胞、肌细胞、神经元、软骨细胞、皮肤细胞、骨髓细胞等。对于接受本发明的混合型超多孔水凝胶的对象来说,细胞可以是自体的、同种异体的或异种的。可以使用常规方法从活检样品分离细胞或通过干细胞的分化和扩增来产生细胞。除了被掺入到水凝胶基质的孔中之

外,某些实施方式包括例如通过在聚合之前向水凝胶前体溶液加入细胞,将细胞包封在水凝胶自身内。被包封在水凝胶基质和水凝胶的孔内的细胞可以是相同或不同的。例如,人们可以将干细胞包封在水凝胶基质中,并将能够产生生长或分化因子的细胞包封在孔中,反之亦然。

[0040] 除了将细胞掺入到混合型超多孔水凝胶的孔中之外,本发明还包括用本文中公开的一种或多种细胞类型涂覆混合型超多孔水凝胶基质的一个或多个表面。具体来说,本发明包括通过胶原蛋白层将上皮细胞附着到混合型水凝胶基质的表面。此外,本发明包括将中央核心包含在填充有一种或多种光学透明的大分子单体的混合型水凝胶中。出于本发明的目的,当大分子单体能够透过 200nm 至 1000nm 范围内的波长的光,并且具有大于 1 或更理想地大于 1.3 的反射率时,大分子单体是光学透明的。适合的大分子单体包括例如本文中公开的亲水性聚合物。在特定实施方式中,光学透明的大分子单体是 PEGDA。

[0041] 正如本文中证实的,本发明的组分和制造方法对细胞无毒,并且能够将细胞掺入到超多孔水凝胶的孔中。这样的水凝胶能够作为生物支架用于维持和生长细胞,以及用于身体的受伤或受损器官的功能性置换。在某些实施方式中,本发明的混合型超多孔水凝胶被用于制备多种成型植入物,以用于医学应用。有利的是,超多孔水凝胶被设计成将细胞提供给受损或受伤的位点以促进再生。因此,本发明的组合物可用于将细胞局部递送到对象。这样的递送可用于例如促进伤口愈合以及用在组织再生或置换中。在特定实施方式中,本发明的水凝胶被用于组织工程或再生医学,用于药物试验的模型器官系统,或用于细胞扩增。

[0042] 在本发明的特定实施方式中,本发明的混合型超多孔水凝胶被用于制备人造角膜。就此而言,特定实施方式包括将胶原蛋白和角膜成纤维细胞掺入到超多孔水凝胶的孔中。

[0043] 取决于应用,本发明的超多孔水凝胶可以单独使用或以与药学可接受的载体的混合物形式用在药物组合物中。用于本发明的适合的制剂可参见《雷明顿药理学科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro 主编,第 20 版, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000)。示例性载体包括例如水、盐水、缓冲液等。根据需要,组合物还可以含有药学可接受的辅助物质以接近生理条件,例如 pH 调节剂和缓冲剂、渗透压调节剂、润湿剂、去污剂等。

[0044] 取决于细胞将要被递送到的位点和待治疗的疾病或病症,可以将本发明的组合物配制成用于任何适合的施用方式,包括例如局部、皮下植入或肌肉植入。

[0045] 本发明的生产混合型超多孔支架的方法是简单、廉价且多用途的。因此,它可以应用于许多组织工程应用,包括骨骼和软组织应用。例如,除了角膜再生之外,混合型超多孔水凝胶可用于骨骼组织工程。事实上,可以对所公开的水凝胶做出许多修改,以便为特定组织定制水凝胶。可以在 SPH 内掺入水解连接键,以使产物可随时间降解并且无毒性。对于受控释放情形来说,可以将药物或分子装载到 SPH 内。可以改变天然和合成材料两者以产生明确需要的性能。例如,基于 PEGDA 的聚合物不能承受拉伸力,包括缝合。然而,本发明的 PHEMA-PMMA 共聚物具有足以用于缝合的拉伸强度。因此,技术人员会根据所需性能选择本发明的超多孔水凝胶。

[0046] 通过下面的非限制性实施例对本发明进行更详细描述。

[0047] 实施例 1 :材料和方法

[0048] 细胞培养。分析了两种细胞类型,即干细胞和定型细胞。将人类间充质干细胞(MSC)维持在含有 15%胎牛血清(FBS)、1% L-谷氨酰胺和 1%抗生素的 Gibco 的 α -最低必需培养基(含有 L-谷氨酰胺,不含核糖核苷,不含脱氧核糖核苷)中。HT-1080 人类纤维肉瘤细胞系购自 ATCC(Manassas, VA)。将成纤维细胞培养在增补有 10%胎牛血清(FBS)和 1%抗生素/抗真菌剂的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)中。每 2 至 3 天更换培养基以去除废物并提供新鲜营养物。细胞在 5% CO₂ 和 95%空气存在下被维持在 37℃。将细胞以 3×10^3 个细胞/cm² 的密度铺于组织培养瓶中,直至形成 75-80%汇合的单层。通过将细胞与 0.25mg/mL 胰蛋白酶温育 5 分钟并以上述密度重新铺制,进行细胞传代。本文的实验中使用的所有细胞都在第 3 至 6 次传代之间。本文提出的方法可以被扩展到其他细胞类型。可以将细胞装载到植入前的支架中,或者可以鼓励细胞迁移到植入后的支架中。

[0049] 胶原蛋白凝胶的制备。将大鼠尾部 I 型胶原蛋白(BD Biosciences, San Diego, CA)与 0.1N NaOH、10X Hank's 平衡盐溶液(HBSS)和 0.1N 乙酸以 3:2:1:1 的体积比混合。这产生浓度为 1mg/mL 的中性 pH 的胶原蛋白溶液。如果需要细胞接种,将细胞以 1 百万个细胞/mL 的浓度悬浮在胶原蛋白溶液中,以便将它们包封在 3-D 网络中。将脱水的 SPH 浸泡在该溶液中,这允许将细胞和胶原蛋白摄取到孔内。通过加温至 37℃ 30 分钟来引发胶原蛋白胶凝。如果不希望用细胞预先接种,将 SPH 浸泡在不含细胞的胶原蛋白溶液中。同样地通过加温至 37℃ 30 分钟进行胶凝。

[0050] 超多孔 PEGDA 水凝胶的制造。将 20% (w/v) 的 PEGDA 溶液(500 μ L)与下列试剂组合:60 μ L 10% PLURONIC PF-127, 30 μ L 20% TEMED(四甲基乙二胺), 20 μ L 丙烯酸和 23 μ L APS(过硫酸铵)。通过加入去离子水将终体积调整到 1mL。将溶液在 37℃ 下加热 2 分钟。随后,将 200mg 碳酸氢钠混合在溶液中,其引起发泡反应,产生多孔结构。碳酸氢钠的量在 100 至 300mg 之间变化,以产生孔结构体系的差异。将 SPH 在水中漂洗以去除未反应的碳酸氢钠晶体。为了防止孔塌陷,将支架在乙醇中脱水过夜。然后将支架在食品脱水剂中进一步脱水 45 分钟。将切下的区段置于 UV 光下 20 分钟进行灭菌。

[0051] 超多孔 PHEMA-PMMA 水凝胶共聚物的制造。用于产生多孔 PHEMA-PMMA 共聚物的凝胶溶液包含:10% v/v 甲基丙烯酸甲酯(MMA)(Aldrich M55909), 45% v/v 甲基丙烯酸 2-羟乙基酯(HEMA)(Aldrich 525464), 5mg 四丙烯酸季戊四醇酯(PETA), 2mg APS, 10 μ L TEMED, 6% v/v 二甲基甲酰胺和 22% 去离子水。将凝胶混合,直至获得与软口香糖相当的粘度。接下来,将凝胶插入到模具中。将产物在干热中在 37℃ 下聚合 24 小时。在聚合后,将凝胶在去离子水中漂洗长达一周。对于长期储存来说,将水漂洗过的凝胶在干热中在 37℃ 下干燥 1 天。

[0052] 孔的形成。PHEMA 海绵(US5, 458, 819)已被开发用于产生多孔 PHEMA 支架。当溶解的单体变成聚合物并从溶液中析出时,多孔 PHEMA 海绵因相分离而产生。对于 PHEMA-PMMA 构建物来说,向 MMA 和 HEMA 单体的混合物加入二甲基甲酰胺(DMF)和四丙烯酸季戊四醇酯。已发现 DMF 是促进 PHEMA-PMMA 聚合物溶解的重要方法。DMF 的不正确使用引起孔的破坏。使用四丙烯酸季戊四醇酯作为交联剂是独特的,因为它允许获得具有所需机械性能的 PHEMA-PMMA 交联。在发生聚合的同时进行搅拌是导致大孔形成的另一个关键步骤。凝胶状溶液产生与糖蜜相当的粘度并具有足以被放置在模拟角膜曲率的隐形眼镜形状的模

具中的柔性。

[0053] 产生混合型可缝合植入物。由于 PHEMA-PMMA 在水性溶液中膨胀缓慢,用于在多孔 PHEMA-PMMA 中形成互相贯穿的胶原蛋白网络的过程可能需要长达 36 个小时。首先,将聚合物构建物在紫外光下灭菌 30 分钟。使用大鼠尾部 I 型胶原蛋白 (BD Bioscience),按照 BDBioscience 的流程制造胶原蛋白凝胶 (1-5mg/ml)。人类胶原蛋白容易被掺入,并且 1-5mg/ml 的胶原蛋白浓度看起来能够支持细胞接种和附着。向冷却并脱水的 PHEMA-PMMA 加入胶原蛋白凝胶溶液。将样品和冰袋盖上,以维持冷却温度。在整个胶原蛋白吸收过程中,PHEMA-PMMA 样品必须保持冷却,约为 2-8℃。在 PHEMA-PMMA 在胶原蛋白溶液中完全膨胀后,将构建物、现在被称为可缝合的混合型植入物,在细胞温育器中在 37℃ 下温育 1 小时,以产生胶原蛋白凝胶。

[0054] 孔结构体系和溶胀测量。使用扫描电子显微镜来对 SPH 的孔结构体系进行拍照。对使用不同量的碳酸氢钠制造的 SPH 进行成像。快速溶胀至大体积是本申请的重要特点。通过将溶胀的 SPH 的质量与脱水的 SPH 的质量进行比较,来确定溶胀比 Q。将具有不同的孔尺寸的脱水结构浸泡在水中至少 20 分钟。将所有 SPH 以 1000rpm 离心 3 分钟以去除空气泡。将 SPH 用筛网拉紧以去除过量的水,并称重。该质量表示被积累在孔中以及水凝胶结构本身中的水。随后,将 SPH 轻柔挤压并吸干,以去除孔中的水但是维持水凝胶结构中的水。通过用溶胀的重量除以初始重量,获得两个溶胀比 $Q_{\text{全部水}}$ 和 $Q_{\text{水凝胶的水}}$ 。

[0055] $Q_{\text{全部水}} = \text{重量}_{\text{全部水}} / \text{重量}_{\text{脱水后}}$

[0056] $Q_{\text{水凝胶的水}} = \text{重量}_{\text{水凝胶的水}} / \text{重量}_{\text{脱水后}}$

[0057] 细胞染色。将含有和不含胶原蛋白的 SPH 构建物用作 3-D 成纤维细胞支架。将细胞如上所述进行装载并温育 24 和 48 小时。使用粘着斑试剂盒 (Chemicon, Temecula, CA) 来观察细胞粘附和保留。罗丹明鬼笔环肽将微丝染为红色, DAPI 将核染为蓝色。使用活/死存活性试剂盒 (Molecular Probes, Eugene, OR) 来显示活的 (绿色) 和死的 (红色) 细胞。使用 BIO-RAD 共聚焦显微镜对这些结构中的每一个进行成像。

[0058] 细胞迁移。在不希望用细胞预先接种的情况下,确定混合型支架对于细胞向支架内迁移是否是优选的。将含有和不含胶原蛋白的无细胞 SPH 支架置于细胞单层的顶上。在 3 周内监测细胞向支架内的迁移。将细胞用活/死存活性进行染色,并用共聚焦显微镜可视化。

[0059] 压缩测量。通过压缩试验测定 SPH 支架的压缩模量。将水溶胀的 SPH 夹在两片衬有 VELCRO (以防止滑动) 的玻璃之间,并与胶原蛋白溶胀的 SPH 进行比较。将增加的重物置于顶上,并记录每个 SPH 承受的应变的量。绘制应力-应变曲线,以确定压缩模量的估算值。

[0060] 中央光学水凝胶的合成。通过将 5% (w/v) PEGDA 在无菌 PBS 中混合来制备水凝胶溶液。向 PEGDA 溶液加入光引发剂 IGRACURE2959 (CIBA, Tarrytown, NY), 获得 0.025% w/v 的终浓度。评估对光引发剂、UV 光暴露和 PEGDA 浓度做出响应的细胞存活率。IGRACURE2959 是对于哺乳动物细胞来说毒性极小的光引发剂。0.03% (w/v) 或更低的浓度被认为是最佳的 (Williams 等, (2005) Biomaterials 26(11):1211-8)。将该溶液在 UV 光 (365nm, 4mW) 下放置 10 分钟产生透明的聚合凝胶。将凝胶浸泡在新鲜 PBS 中,以去除未反应的单体和引发剂。

[0061] 实施例 2 :溶胀比

[0062] 由于胶原蛋白在 pH 中和后开始快速胶凝,因此必需立即装载到 SPH 中以促进均匀分布在 SPH 中。由于 SPH 制造方法产生互连的大尺寸孔,因此溶胀在小于 1 分钟内发生。将 SPH 浸泡在胶原蛋白溶液中允许天然材料通过毛细管作用容易且快速地进入孔。因此,在希望用细胞预先接种的情况下,可以在即将摄取之前将细胞悬浮在胶原蛋白溶液中。溶胀由互连孔的程度和尺寸决定。使用 100、200 和 300mg 碳酸氢钠产生的三种 SPH 中的孔结构的 SEM 分析揭示了两种类型的孔:在每种 SPH 中在尺寸和形状方面看起来相似的较大孔,以及形成互连通路的较小孔。显然,提高碳酸氢钠的量引起互连孔的数量增加。这表明孔结构体系的差异引起溶胀比的差异。确定具有不同的孔尺寸的 SPH(即使用 100、200 或 300mg 碳酸氢钠)的溶胀比 Q 。这一分析表明,当使用更多碳酸氢钠时, $Q_{全部水}$ 增加。然而,对于不同的孔尺寸来说, $Q_{水凝胶的水}$ 没有明显差异。这表明,不同量的碳酸氢钠改变孔的结构,但是每种 SPH 中水凝胶的量保持相同。这一现象对于可能希望将分子装载在水凝胶结构本身内的应用来说是重要且值得注意的。此外, $Q_{全部水}$ 在 100 左右,表明 SPH 能够掺入其干重的约 100 倍的水。因此,由于细胞增殖或细胞外基质 (ECM) 产生造成的任何长期的重量增加,都不会成为长期稳定性的障碍。

[0063] 快速摄取到 SPH 中不会引起细胞损伤。事实上,在细胞装载后一天进行的活/死存活性染色显示,MSC 细胞是活的并且正在铺展。钙黄绿素 AM 穿过活细胞的细胞膜并产生绿色荧光,而乙锭均二聚体只进入死细胞并产生红色荧光。检测到极少的死细胞。这些结果证实了这种方法是有效且高效的细胞装载方法,其不需要使用外力或损害细胞存活性。

[0064] 尽管已经建议狭窄范围内的小孔尺寸对于支架内的 3-D 细胞行为来说是必需的,但本文中的结果表明,SPH 混合技术消除了对孔尺寸或形状的精确控制的需求。本发明方法的独特之处在于,支架材料之间的非共价结合和缺乏紧密接触将细胞微环境与支持性 SPH 分隔开。当细胞与 PEGDA 相接触时,尽管存在胶原蛋白,细胞也不能够铺展开。因此,对于最佳细胞行为来说,两种材料的空间和时间分离是必需的。

[0065] 正如在孔结构的 SEM 图像中显然看出的,形状和尺寸不是均匀的。然而,SPH-胶原蛋白凝胶中细胞形态和粘附的观察结果显示与纯粹 3-D 胶原蛋白图像的相似性。因此,SPH 孔结构不是细胞行为的影响因素,因为细胞不接触 SPH。混合型基质中的细胞看起来仅仅被包埋在胶原蛋白部分中。只要孔是互连的以确保均匀分布以及有效的营养物和废物扩散,则本发明的混合型超多孔水凝胶不需要其他系统的严格要求来产生天然 3-D 细胞微环境。因此,本发明的混合型水凝胶更加方便,并且更好地模拟通常不存在由工程化改造的构建物所强加的均匀性的天然的活系统。

[0066] 实施例 3 :粘附染色

[0067] 在预先接种的支架中,观察到胶原蛋白鼓励成纤维细胞在 3-D 中铺展并形成应力纤维。不含胶原蛋白的支架容纳成团的圆形细胞,所述细胞不能附着于支架。PEGDA 固有地对粘附有抗性。因此,据推测,在无胶原蛋白支架中缺少 ECM 细胞结合位点,造成了圆形形态。48 小时后,不含胶原蛋白的支架是完全无细胞的。由于没有任何物质可以附着,细胞倾向于迁移出支架并附着于下面的组织培养板。

[0068] 相反,装载有胶原蛋白的支架显示出细胞保留在支架内,并且如果有的话也是很少的细胞附着于下面的板上。水凝胶孔内的胶原蛋白以 3-D 方式极大地增强细胞铺展和保

留。清楚地观察到微丝应力纤维,表明细胞粘附由胶原蛋白中可用的整合素结合位点介导,引起粘着斑的形成。已显示,角膜成纤维细胞表达多种 $\beta 1$ 家族的整合素,其可以结合于胶原蛋白。在不含胶原蛋白的支架中, $\beta 1$ -整合素均匀地分布在细胞外周周围。然而,在填充有胶原蛋白的支架中, $\beta 1$ -整合素穿插并簇集在粘着斑的位点处。加入针对 $\beta 1$ -整合素的抗体阻止细胞附着并铺展在胶原蛋白上。

[0069] 除了当被包埋在孔的胶原蛋白中时增强细胞铺展和保留之外,证实了这一混合型支架还利用开孔结构和胶原蛋白结合而增强周围的细胞迁移到支架中。将含有或不含胶原蛋白的无细胞 SPH 支架放置在成纤维细胞单层的顶上。3 周后,在含有胶原蛋白的支架内观察到大量细胞向内生长。不含胶原蛋白的支架保持无细胞。这证实了单独的孔不足以使细胞向内生长,并且胶原蛋白的掺入极大地增强这种支架作为理想的组织工程支架。良好的细胞向内生长对于体内植入来说是必需的,以便宿主细胞能够迁移到支架中并与周围组织形成强烈整合。这也是对于植入物长期存活来说可能必需的神经和血管向内生长的导管。

[0070] 实施例 4:机械测量

[0071] 测定压缩模量的压缩试验表明 SPH 与单独的无孔 PEGDA 相比显著更加可压缩。不含胶原蛋白的 SPH 的平均压缩模量为 1kPa。当与无孔 PEGDA 相比时,观察到 SPH 能够承受高得多的压缩力。这在植入物经历高压缩力的情况下可能是重要的。在 SPH 中加入胶原蛋白对体积模量没有显著影响。因此,本发明的混合型水凝胶可以维持高的总体压缩模量而不使包埋的细胞经历这些条件,因为它们仅仅暴露于软得多的胶原蛋白微环境。

[0072] 还进行了机械测量以测试多孔 PHEMA-PMMA 混合型支架的强度。使用定制设计的试验装置 (Test Resources, Shakopee, MN) 来测试水合的多孔 PHEMA-PMMA 构建物的张力。使用对 75g 力 (0.735N) 的张力进行疲劳评级的压力传感器 (load cell) 来测试样品。使用校准重物 (Rice Lake Weighing System, Fisher Scientific) 对施加的力进行校准。通过制造商的 100LM 软件来观察并记录力测量值。在 0.3 至 0.735N 的范围内观察到低于 1% 的误差。以 0.1Hz 的应变率对每个样品测试 30 个循环。使用 5% 的应变对样品进行预调制。使用 20% 应变来计算弹性模量。使用最高 150% 的应变将样品测量至破裂。通过用试验机的载荷输出量除以其上施加有力的样品的横截面积来计算应力 (应力 = 力 / 面积)。通过确定应力 - 应变曲线的线性部分的斜率来估算弹性模量。使用标准偏差来确定弹性模量的误差。

[0073] 进行了 PHEMA-PMMA 构建物的进一步分析,所述分析将气体发泡的 PHEMA-PMMA 与盐致孔的 PHEMA-PMMA、即使用碳酸氢钠作为气体发泡剂生产的 PHEMA-PMMA 的机械性能进行比较。该分析的结果显示在表 1 中。

[0074] 表 1

[0075]	性能	盐致孔的 PHEMA-PMMA	气体发泡的 PHEMA-PMMA
	弹性模量 (E, kPa)	398±68	3557±536*
	最终拉伸强度 (UTS, kPa)	143±9	273±31*
	断裂时的应变 (%)	84±15	113±29

[0076] 应变率 = 0.2mm/s

[0077] * 经 T- 检验确定为统计学显著的 ($\alpha = 0.5$)。

[0078] 对由气体发泡的 PHEMA-PMMA、盐致孔的 PHEMA-PMMA 或 PHEMA-PMMA 构成的裙边的机械性能进行类似的分析。该分析的结果显示在表 2 和图 2 中。

[0079] 表 2

[0080]	性能	盐致孔的 PHEMA-PMMA	气体发泡的 PHEMA-PMMA	PHEMA-PMMA
	E (kPa)	678±72	4081±808*	299±10
	UTS (kPa)	125±25	263±66	147±7
[0081]	断裂时的应变 (%)	44±3	64±9	94±4

[0082] 应变率 = 0.2mm/s

[0083] * 经 ANOVA 确定为统计学显著的 ($\alpha = 0.5$)。

[0084] 实施例 5 : 光学性质

[0085] 人造角膜的中央光学部件应该是透明的, 并且具有适合的折射率。为了证实 PEGDA 在人造角膜的中央核心中的用途, 进行了 5% PEGDA 的定性和定量分析。对于定性分析来说, 在带有和不带有上覆的水凝胶的情况下观察书写的文本。分别使用 UV-Vis 分光光度计和折射仪测定中央核心的光学性质例如透光率和折射率。在 200nm 至 1000nm 范围内的波长下参比于 PBS 测量透光率的百分数。所有测量进行三份平行试验。使用折射仪测量中央光学部件的折射率。

[0086] 这些分析的结果表明, 5% 水凝胶产生对于用作中央光学部件来说出色的光学性质。例如, 据观察, 在带有和不带有上覆的水凝胶的情况下观察到的书写文本的清晰度是相近的。使用 UV-Vis 分光光度计进行的定量研究揭示出在广范围波长内的高透光率。例如, 550nm 处的平均透光度为 90%。此外, 折射率为约 1.34 (~ 5brix), 其仅仅略低于天然角膜的 1.37。

[0087] 对具有不同量 PMMA 的 PHEMA-PMMA 构建物进行了类似分析。测定构建物的透光度, 结果显示在图 3 中。

[0088] 实施例 6 : 人造角膜的制造

[0089] 基于天然角膜的结构体系, 将混合型水凝胶基质的前表面用上皮细胞涂覆以鼓励宿主上皮形成, 从而重新产生上皮的保护和营养物吸收特性。在上皮的下方, 使用类似于 Bowman 层的无孔 PEGDA 薄层将上皮与位于下方的间质分隔开。PEGDA 阻碍细胞结合并保持细胞类型局部化。在间质的裙边内, 胶原蛋白和细胞被 PEGDA 包围, PEGDA 是一种能够保留大量水以维持适合的形状和水合水平的水凝胶。混合型超多孔裙边被设计成允许通过孔的最大宿主细胞整合以及附着于细胞粘附位点。中央核心保持不含胶原蛋白以维持光学透明性。

[0090] 现在, 已完成可生物降解、多孔、基于细胞的组织工程改造的角膜的生产。作为生

产这样的人造角膜的第一步,将 SPH 盘浸泡在成纤维细胞-胶原蛋白溶液中。作为对照,还将 SPH 浸泡在不含胶原蛋白的细胞溶液中。浸没在液体中引起 SPH 的快速溶胀以及将胶原蛋白和细胞摄取在孔网络中。然后使胶原蛋白纤维热胶凝。结果是分散在整个机械稳定的水凝胶内的胶原蛋白微环境。使用 5mm 环钻钻出中央孔。在中央孔中填充无孔的、光学透明的 PEGDA 大分子单体溶液。无孔的 PEGDA 溶液扩散到紧邻的外周中,沿着 SPH 的底表面铺展,并在前表面上沉积成无孔 PEGDA 的薄层。无孔 PEGDA 被光聚合成这种不规则形状。然后可以将前表面用胶原蛋白进行修饰,以便上皮细胞可以附着,在上表面上进行增殖。

[0091] 为了在混合型水凝胶表面上形成上皮,可以使用水溶性异双功能交联剂例如磺基-SANPAH(PierceNet)将 I 型胶原蛋白附着于 PEGDA 表面。N-羟基琥珀酰亚胺基团连接于胶原蛋白,而苯基叠氮化物基团通过光反应插入到 PEGDA 中。共价结合的胶原蛋白的存在可以使用多光子显微镜,使用二次谐波发生来成像。与间质相比,表面上的胶原蛋白是薄层(1/10 的浓度)。据预期,该胶原蛋白的薄层支持角膜上皮细胞的生长,正如通过例如中间丝角蛋白-3 和角蛋白-12 的表达所确定的。设想了这个层可以被优化以用于足够的细胞附着并在同时维持透明度。胶原蛋白层的透明度可以通过 UV-Vis 分光光度计来评估。

[0092] 角膜上皮细胞培养物可以在手术时从约 3x2mm 的兔角膜缘组织获得。将组织在 4℃ 下用分散酶(10mg/ml)处理过夜,以破坏基底膜。揭下上皮细胞片层,并在 0.25%胰蛋白酶-EDTA 中在 37℃ 下消化 5-10 分钟。将细胞洗涤并重悬浮在角化细胞无血清培养基(KSFM, Invitrogen)中,并在涂覆有胶原蛋白的组织培养板上进行铺板。当细胞达到 80% 汇合时,将上皮细胞进行胰蛋白酶处理并在混合型支架上进行铺板。

[0093] 已显示,5 种主要的力作用于隐形眼镜上(即大气压力,镜片后泪膜的静水压力,镜片前泪膜的表面张力,镜片重量和眼睑力)(Leonardi 等, (2004) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45(9):3113-7)。因此可以假设,人造角膜在植入后暴露于类似的力。基于这一基本原理,可以确定超多孔混合型支架的机械性能的评估,例如,可以使用原子力显微镜(AFM)和 Hertz 模型来测量杨氏模量。

[0094] 使用 Hertz 的模型来计算杨氏模量:

[0095]

$$F_{\text{球}} = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \delta^{3/2} \cdot \sqrt{R} = k \cdot d$$

[0096] 其中 F 是缩进力;R 是附着的珠子的半径;δ 是缩进量,假设 δ << R;E 是杨氏模量,ν 是泊松比(对于不可压缩的样品来说为 0.5);k 是悬臂的弹簧常数,d 是悬臂的偏移。这种模型假设了均质、各向同性、半无限的弹性材料。此外,表面应该是平坦的,应该使用圆锥形或球形尖端,并且刻痕器材料应该比样品坚韧得多。

[0097] 人类供体角膜的杨氏模量据报道为 1.3MPa(Wollensak 等, (2003) J. Cataract. Refract. Surg. 29(9):1780-5)。测量人造角膜的单个组分的杨氏模量,并发现对于 5% PEGDA 凝胶来说为 2MPa,对于 1mg/mL 胶原蛋白凝胶来说为 ~1kPa。然而,预计胶原蛋白对整体机械性能的贡献是最小的。

[0098] 此外,可以使用弹性成像来确定混合型支架的剪切模量。弹性成像是一种基于磁共振的技术,其通过使电磁波传播通过材料来测量机械性能(Zerbe 等, (2006), 同上)。所述系统对于软组织的机械测量来说是理想的,并补充 AFM 测量。这种非破坏性 3D 成像技术

还可以测量水的扩散,水的扩散是组织结构和存活性的直接指示。例如,当细胞溶胀或细胞膜破裂时,水的扩散由于较少的物理屏障而更快。

[0099] 实施例 7:细胞迁移到多孔 PHEMA-PMMA 混合型支架中

[0100] 使用可商购的活/死细胞测定法来测试多孔 PHEMA-PMMA 混合型支架的细胞迁移和细胞存活性。对于细胞迁移研究来说,将含有和不含胶原蛋白的无细胞的多孔 PHEMA-PMMA 支架置于成纤维细胞单层的顶上。在预定的温育时间段后,取出支架并对支架中的细胞进行测定。在没有互相贯穿的胶原蛋白网络被工程化到支架中的对照实验中,没有发现细胞。这表明没有细胞迁移到支架中。相反,当将互相贯穿的胶原蛋白网络工程化到支架中时,容易地获得了细胞迁移的有力证据。不仅细胞已迁移到支架中,而且细胞还被染色为活的,这清楚地证实了多孔 PHEMA-PMMA 混合型支架诱导细胞上移到支架中并附着于胶原蛋白网络以便存活的生物活性。应该预见到,迁移到支架中的细胞分泌构建它们自身的细胞外基质所必需的蛋白质和其他分子,所述细胞外基质起到用于组织整合的决定性标志物的作用。

[0101] 为了证实体内细胞迁移,将 PHEMA-PMMA 构建物皮下植入到小鼠中。在脱水的 PHEMA-PMMA 的 SEM 图像中,互连的孔并不明显;然而,在植入到小鼠的皮肤下后 8 天,观察到少量的细胞向内生长到结构主体内。这表明,附加的孔引起大量的细胞向内生长。

[0102] 实施例 8:动物模型中人造角膜的生物相容性

[0103] 使用在兔模型中的体内生物相容性来评估人造角膜的宿主-假体整合程度、上皮形成、稳定性和透明度。据预期,用胶原蛋白和成纤维细胞预先接种多孔裙边会显著提高整合速率和程度并产生植入物的长期稳定性。

[0104] 在植入人造角膜之前的第一步是从兔获得自体角膜成纤维细胞。这通过来自于外周角膜的小的角膜活检来实现。然后将角膜活检组织在 1mg/ml 的胶原蛋白酶中在 37℃ 下消化过夜。将细胞洗涤,然后铺在增补有 10% FCS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、4mM L-谷氨酰胺和 1% 抗生素溶液 (Invitrogen-GIBCO) 的 DMEM 中。在培养 10-14 天的时间段后,将成纤维细胞用胰蛋白酶处理,分散在胶原蛋白溶液中,并掺入到人造角膜的超多孔裙边中。

[0105] 将接种有成纤维细胞或未接种(对照)的人造角膜,在双阶段手术程序中外科植入到兔角膜中。在第一阶段中,将人造角膜作为部分厚度置换物植入,保持兔的前端角膜作为保护性皮瓣(flaps)。具体来说,使用 Moria 角膜微切器(被设计用于制造 LASIK 皮瓣)产生直径为约 10mm 的 130 μ m 皮瓣。这事实上将角膜水平切片。将现在暴露的角膜的后端部分用 8mm 环钻进行环钻,并使用间断的 10-0 尼龙缝合线将由 4mm 核心和 2mm 裙边构成的角膜植入物缝合在位。对照兔接受相同的植入物,但是在裙边中没有包埋入任何细胞。将前部皮瓣放回到植入物的顶上,并使用间断的可溶解的 10-0vicryl 缝合线将其缝合到外周角膜。

[0106] 在第二阶段中,将覆盖植入物的透明区的前部皮瓣的一部分去除,并使人造角膜起到全厚度置换物的作用。这种分阶段手术程序的基本原理是维持角膜的整体性,同时提供时间以使整合发生。具体来说,在初始植入后 2 个月,将动物送回到手术室。将兔置于全身麻醉下,并对覆盖植入物的透明区的前部皮瓣的中央 4mm 进行环钻并移除。

[0107] 对每只兔进行后续追踪,对于手术后第一周来说为每天 1 次,然后是每周 2-3 次,

以检查并发症例如熔化、漏水、挤出、感染、假体后膜形成、视网膜脱落或增殖性玻璃体视网膜病变的迹象。检查包括狭缝灯活组织显微镜检查以确保角膜是光学透明的,以及钠荧光素染色以评估完整性和屏障功能。还进行眼内压测量以确定植入物是否干扰房水流动。使用间接检眼镜检查法来检查后段。对所有动物进行 6 周后续追踪以确定短期结果,然后追踪直至 6 个月以进行长期研究。

[0108] 在 1 周、2 周、6 周、3 个月和 6 个月时通过组织学方法来评估人造角膜的生物整合和生物相容性。在每个时间点使用三对兔(一只实验,一只对照)进行组织病理学检查。对眼进行常规组织学检查和免疫染色,以评估核心上的上皮形成程度、裙边中的成纤维细胞向内生长和装置周围的被膜形成。使用针对平滑肌肌动蛋白的免疫染色来鉴定超多孔裙边中的成纤维细胞。由不知情的观察者使用从外周开始朝向中心的一系列切片,对穿透到植入物中的成纤维细胞的数量和范围进行评级。同样地,对 I 型胶原蛋白、 $\beta 1$ -整合素和粘着斑复合体的表达进行评估。在两个组之间进行结果比较。

[0109] 人造角膜的整合按照常规方法进行机械测试(Lee 等, (2000) Arch. Ophthalmol. 118(12):1673-8)。这些测量在安乐死后摘出的完整眼上进行。在内部逐渐增加眼内压,并记录宿主-假体开始泄漏时的压力。对于始于 6 周、然后是 3 个月和 6 个月的每个时间点来说,这些测量在三对眼(一个对照,一个实验)上进行。

[0110] 对于任何假体装置来说,存在着未整合并伴有次生组织坏死或挤出的可能性。设想了用细胞预先接种的构建物会显著提高整合。促进整合的可选策略包括在裙边中包埋入持续释放的生长因子例如 TGF- β 以促进纤维血管向内生长。另一个潜在问题是装置周围、特别是核心后方的膜形成(Hicks&Hamilton (2005) Cornea 24(6):692-8)。在临床情况下,这些膜通常可以通过 YAG 激光器移除,然而也可以使用其他用于表面修饰的策略来抑制膜形成。

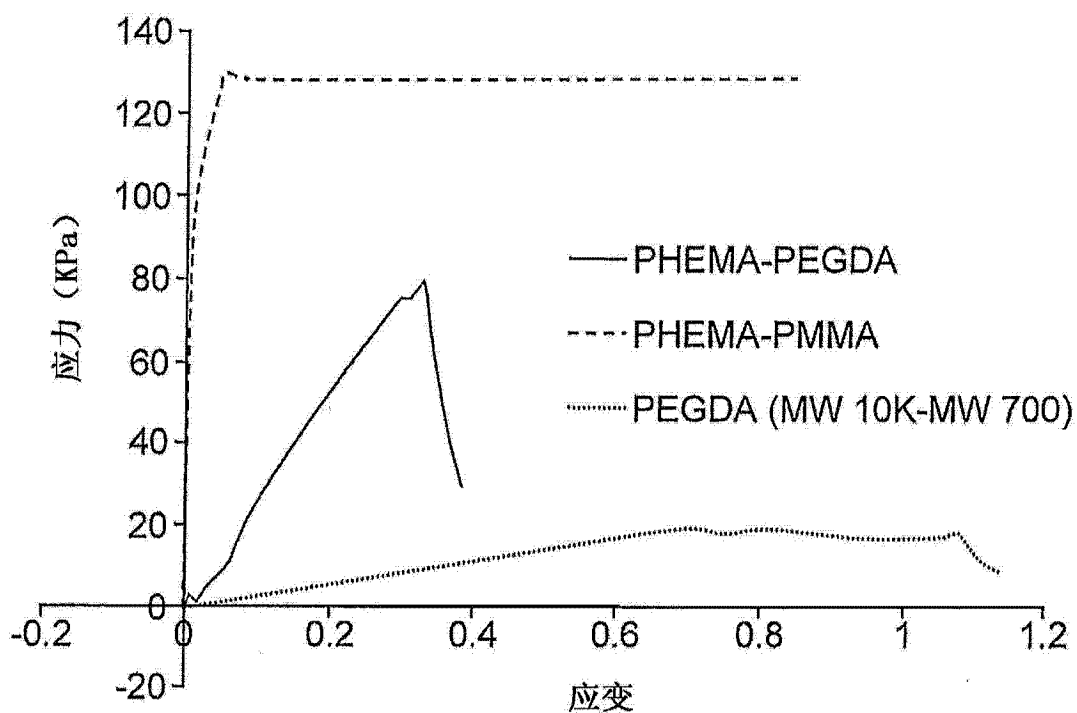


图 1

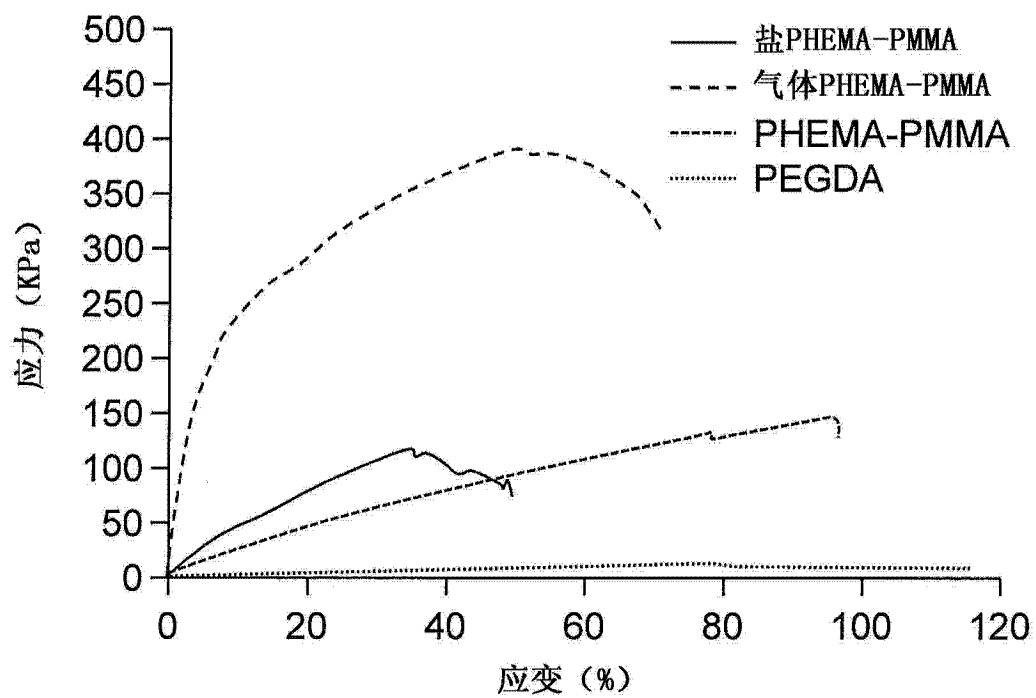


图 2

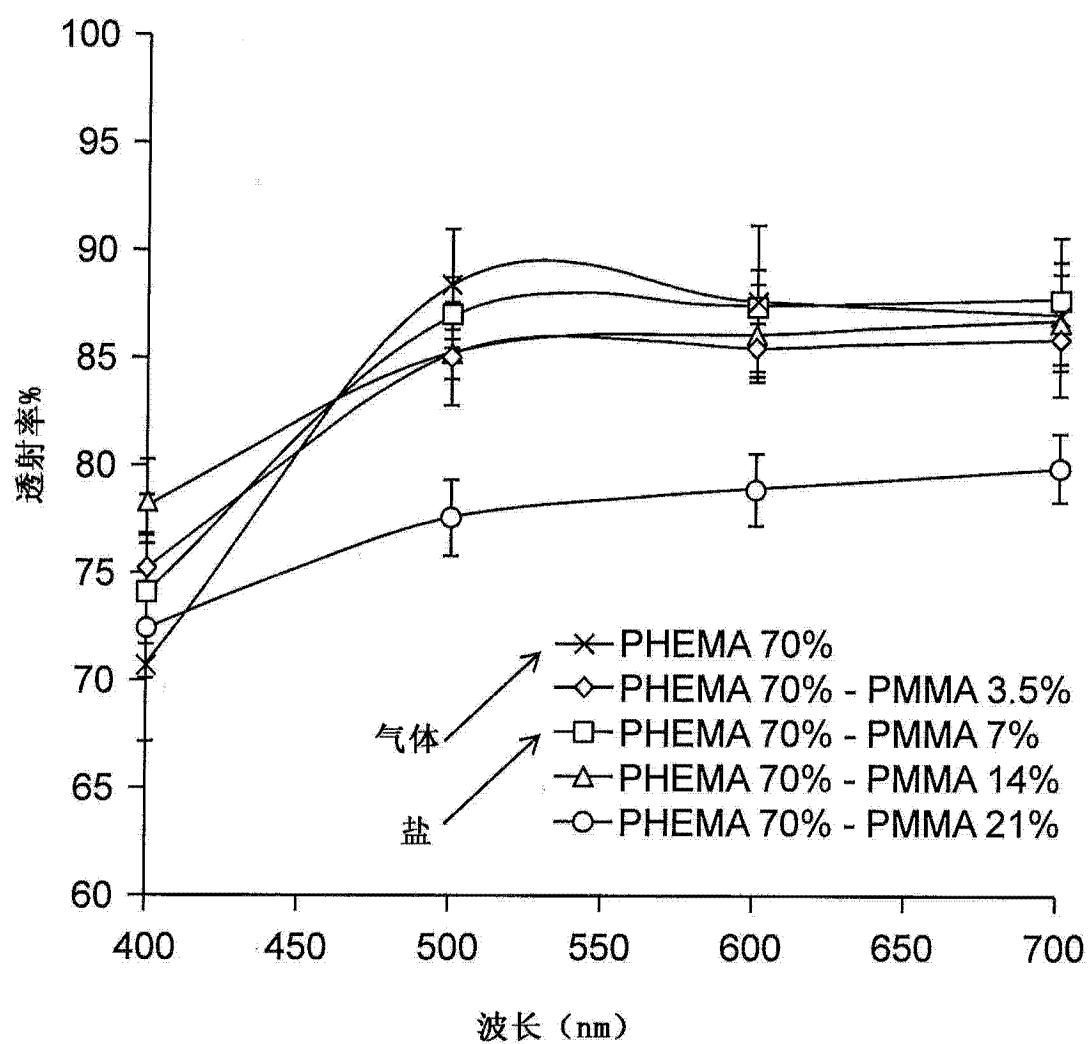


图 3