



(10) 授权公告号 CN 115297903 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202180021887.0

(22) 申请日 2021.03.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115297903 A

(43) 申请公布日 2022.11.04

(30) 优先权数据
FR2002619 2020.03.17 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/056753 2021.03.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/185881 FR 2021.09.23

(73) 专利权人 神经生物材料公司
地址 法国阿尔尚

(72) 发明人 S.沃利

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
专利代理师 郭晓东

(51) Int.Cl.
A61L 27/16 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)

(56) 对比文件
AU 6100700 A, 2001.02.05
CN 101437467 A, 2009.05.20
CN 105412935 A, 2016.03.23
CN 1703175 A, 2005.11.30
US 5863551 A, 1999.01.26
WO 2010097524 A1, 2010.09.02

审查员 赵哲晗

权利要求书2页 说明书15页 附图1页

(54) 发明名称

杂化多相水凝胶、其制造方法及其作为不可降解原位填充植入物的用途

(57) 摘要

一种填充植入物,包括由共聚物形成的杂化多相水凝胶制成的支架,所述共聚物包括:被乙烯基团官能化的树枝状聚合物单体、选自N-取代的甲基丙烯酸酰胺和N-取代的丙烯酰胺的丙烯酰胺化合物、交联剂和生物活性可共聚材料。支架由直径在1.5微米和10微米之间的微珠形成,并且主要包含按重量计的丙烯酰胺化合物。微珠被组装形成包含5至50个微珠的聚集体。聚集体通过交联点连接以限定限定三维渗滤路径的贯穿多孔阵列。贯穿多孔阵列由孔形成,其大部分孔体积的直径在10至30微米之间。该支架具有粘弹性,弹性模量在1至200kPa之间。

1. 一种通过衍生自至少三种下列单体的共聚物形成的杂化多相水凝胶：

- 由设置有不饱和乙烯基团的单个支链官能化的树枝状聚合物单体，
- 选自N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺的丙烯酰胺化合物，以及
- 交联剂，

其中，杂化多相水凝胶主要由直径大于1.5微米且小于10微米的大量微珠形成，并且主要包含按重量计的N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺，

其中，微珠被组装以限定贯穿多孔阵列，所述贯穿多孔阵列限定三维渗滤路径，

其中，贯穿多孔阵列限定孔，所述孔的多孔比例的大部分由直径为10至30微米的孔形成，

杂化多相水凝胶的特征在于，微珠限定尺寸小于20nm的封闭的非连通微孔，微珠彼此组装以形成含有5至50个微珠的聚集体，聚集体呈现大于弱交联区域的交联密度，允许聚集体相对于彼此移动，

并且其中，直径为30至300微米的孔比例大于20%，并且其中杂化多相水凝胶具有粘弹性，并且具有1至200kPa的弹性模量。

2. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，所述贯穿多孔阵列具有大于20%的直径在30至300微米的孔比例和大于60%的直径在10至30微米的孔比例。

3. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，所述微珠包含至少90重量%的丙烯酰胺化合物。

4. 根据权利要求3所述的杂化多相水凝胶，其中，所述微珠由交联的丙烯酰胺化合物构成。

5. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，所述聚集体包含10至30个微珠。

6. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，所述聚集体呈现“葡萄串”构型，每个聚集体沿着所述聚集体的长度从一端到另一端具有增加的横截面，在垂直于聚集体长度的截面图中横截面基本为圆形。

7. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，所述官能化树枝状聚合物单体包含一个聚氧乙烯大分子树枝状分支，所述聚氧乙烯大分子树枝状分支被一种生物活性可共聚材料官能化，所述生物活性可共聚材料选自自由复合糖衍生物、组织粘附肽衍生物和与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物衍生物构成的组，所述一种或多种生物活性可共聚材料覆盖三维渗滤阵列的壁。

8. 根据权利要求7所述的杂化多相水凝胶，其中，所述三维渗滤阵列的壁通过多种不同的生物活性可共聚材料进行功能化。

9. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，一种或多种活性分子选自自由复合糖的衍生物、组织粘附肽或具有血管生成活性的肽的衍生物、刺激神经再生的肽的衍生物、刺激细胞增殖和分化的肽的衍生物、与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的衍生物以及基质衍生因子-1类趋化因子构成的组。

10. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，所述官能化树枝状聚合物单体包含中心核A和聚氧乙烯的大分子树枝状分支，其中一个树枝状分支被可聚合的丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯基团官能化。

11. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶，其中，所述丙烯酰胺化合物为N-(2-羟丙

基) 甲基丙烯酰胺, 且所述官能化树枝状聚合物单体包含在其外围用生物活性剂官能化的聚氧乙烯树枝状分支, 所述生物活性剂赋予组织再生的生物活性性质。

12. 根据权利要求1所述的杂化多相水凝胶作为永久性填充植入物的用途。

13. 一种制造杂化多相水凝胶的方法, 包括:

- 在45℃和55℃之间的温度下, 由包含至少三种下列单体的反应混合物通过共聚和自由基共聚诱导的相分离形成微珠:

- 由包含不饱和乙烯基团的单个分支官能化的树枝状聚合物单体, 其他分支没有乙烯基团,

- 选自N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺的丙烯酰胺化合物, 以及

- 至少一种包含两个反应性乙烯基键的双官能不饱和乙烯交联剂, 以及

自由基引发剂,

所述微珠限定尺寸小于20nm的封闭的非连通微孔,

所述微珠的直径大于1.5微米且小于10微米, 并且主要包含按重量计的N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺,

所述微珠彼此组装以形成含有5至50个微珠的聚集体, 所述聚集体通过交联点彼此连接以限定杂化多相水凝胶, 所述杂化多相水凝胶描绘限定三维渗滤路径的贯通多孔阵列, 所述贯通多孔阵列限定孔, 所述孔的多孔比例的大部分由直径为10至30微米的孔形成, 并且直径为30至300微米的孔比例大于20%, 并且

其中, 杂化多相水凝胶具有粘弹性, 并且具有1至200kPa的弹性模量;

其中, 在第一温度平稳段进行聚合, 然后是第二平稳段或温度梯度以形成微珠, 第一平稳段的温度在45℃和55℃之间, 第二平稳段或温度梯度的温度比第一平稳段的温度高至少5℃, 并且

其中, 将反应混合物注射到紧密的圆柱形导热模具中。

14. 根据权利要求13所述的制造杂化多相水凝胶的方法, 其中, 所述官能化树枝状聚合物单体和交联剂之间的摩尔比在0.1和0.8之间。

15. 根据权利要求14所述的制造杂化多相水凝胶的方法, 其中, 所述官能化树枝状聚合物单体的分子量为6.220g/mol至23.280g/mol。

16. 根据权利要求13所述的制造杂化多相水凝胶的方法, 其中, 生物活性可共聚材料存在于形成微珠的反应混合物中, 所述生物活性可共聚材料选自自由复合糖的衍生物、组织粘附肽的衍生物和与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的衍生物构成的组。

17. 根据权利要求13所述的制造杂化多相水凝胶的方法, 其中, 将所述反应混合物注射到由被聚四氟乙烯覆盖的内壁制成的模具中, 并且其中, 所述模具通过水浴加热。

18. 根据权利要求13所述的制造杂化多相水凝胶的方法, 包括在第一温度下聚合所述反应混合物至少80分钟以形成微珠, 随后将所述模具和反应混合物的温度升高至少5℃。

19. 一种用于制造填充植入物的方法, 包括形成根据权利要求13所述的杂化多相水凝胶的微珠聚集体, 以及通过三维印刷方法将聚集体彼此组装以形成填充植入物。

杂化多相水凝胶、其制造方法及其作为不可降解原位填充植入物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及杂化多相水凝胶,更具体地涉及其作为填充植入物的用途。

背景技术

[0002] 脊髓神经实质的损伤,无论是与局部创伤、局部缺血、肿瘤的手术切除或者血管畸形或其他原因有关,都会导致神经纤维连接的切断,这中断了大脑传递的控制运动功能的神经冲动的传递,并反过来阻碍了感觉功能的治疗。这导致完全或部分瘫痪。

[0003] 在脊髓损伤的情况下,由压迫或任何其他脊椎-延髓冲击引起的损伤通过神经退行性现象而发展,所述神经退行性现象以离心的方式从损伤的中心发展,并逐渐导致初始损伤的慢性阶段。在慢性阶段,损伤表现为囊腔,被由神经胶质细胞、成纤维细胞、周细胞和脑膜细胞、细胞外基质分子特别是蛋白聚糖和胶原构成的异质瘢痕组织隔离和包围。与髓腔一样,这种形式的愈合是进入和离开轴突路径的神经纤维修复失败的原因。

[0004] 再生疗法寻求在髓损伤的慢性阶段进行囊腔的细胞修复和受损区域的血管再生,这可能代表体积的大量损失,其大小在高度上从2到6个椎体变化。再生疗法还试图使神经纤维生长通过这个囊腔,以促进脊髓神经元回路的重新连接,并重建运动和感觉功能。这种策略考虑了神经系统的损伤后可塑性,该可塑性能够在损伤水平下重新形成正在再生的神经纤维和完整神经元之间的中继回路。组织工程中使用的策略是在损伤水平(在急性期或在慢性期)引入多孔的许可基质,作为内源性细胞、血管和神经修复过程的物理、化学和机械支架,导致神经组织的组织学重建。

[0005] 通常在实验水平和临床试验中使用的支架由特殊类的生物材料水凝胶代表。这些是聚合物基质,形成水饱和的交联大分子阵列。它们用于组织工程,特别是涉及神经系统的组织工程。它们由可降解或可生物吸收的聚合物制备,以构成暂时不稳定的多孔结构。这些聚合物是天然来源的一藻酸盐、琼脂糖、壳聚糖、胶原、透明质酸、纤维蛋白或肽,或者它们是合成的,比如聚己内酯、聚(羟基丁酸酯)、聚(原酸酯)、聚(α -羟基酯)或聚酞。因此,可降解和/或可生物吸收的水凝胶已被提议在实验模型或人类临床试验中促进脊髓损伤的神经再生。

[0006] 可生物降解的水凝胶是那些一旦注射到活的有机体中,通过自发的化学水解降解为聚酞、聚(原酸酯)和聚(α -羟基酯)的水凝胶。硫醚-酯在有水的情况下降解,生物聚合物(寡肽、蛋白质或多糖)由于酶或细胞产生的其他蛋白质的作用而降解。

[0007] 例如,美国专利7163545公开了一种聚(乳酸-共-乙醇酸)基质,包括用于轴突再生的导向通道以及治疗剂。美国专利8377463报道了一种由聚(乳酸-共-乙醇酸)形成的用于治疗脊髓损伤急性期的装置,该装置在30至60天内原位降解,能够与治疗剂和/或干细胞组合。文献US2018/0037865描述了一种复合水凝胶,其包含与干细胞和治疗分子结合的透明质酸、胶原、纤维蛋白、壳聚糖、甲基纤维素、聚氧乙烯或其组合的可降解基质,其根据聚合物的性质以可变速率原位降解。文献US20060002978公开了一种包含多孔聚合物材料的管

状基质,该多孔聚合物材料由乳酸和/或乙醇酸和/或聚(己内酯)的均聚物或共聚物形成。聚合物基质可以包括脂肪族聚酯、聚酐、聚磷腈、聚乙烯醇、多肽或藻酸盐。美国专利8877498报道了一种基质,其包含具有高度对齐的通道和沿壁的脊的分级结构,能够引导神经纤维的再生,并提供了包含脱乙酰壳多糖、甲壳质、纤维素、藻酸盐、明胶、透明质酸、胶原、弹性蛋白或其组合的组合物。文献W02014013188公开了用于治疗脊髓损伤的微凝胶悬浮液形式或2-3mm³凝胶形式的乙酰化壳聚糖生物材料。文献US2015/0166786A1和W02013010087A1揭示了一种由聚(乳酸-共-乙醇酸)构成或包含聚(ϵ -己内酯)与聚(L-赖氨酸)组合的水凝胶,用于治疗人类脊髓的急性损伤。文献US2015/0044259A1描述了由聚-D赖氨酸和肽聚糖构成的基质,以促进神经纤维的生长。文献EP2347763A1和文献US2011/0177170A1描述了由包含在由肽、糖醛酸和氨基己糖构成的均匀凝胶中的胶原微粒构成的基质,用于在治疗中枢神经系统损伤中与细胞移植物一起植入,基质的降解发生在几周和几个月之间。文献W02013/084137公开了使用硫酸钙半水合物的可降解植入物,其包括与生长因子结合的平行几何通道,用于治疗人类完全脊髓损伤。

[0008] 还提出了可生物降解的水凝胶,例如在文献US8815277或文献W02011/002249中提出的那些。据指出,这些系统具有非侵入性的优点,即它们不需要为了植入而进行脊髓的开放性手术。一般来说,这些系统在两周内原位降解,这与再生过程相比是非常快的。

[0009] 还提出了由聚(乳酸-共-乙醇酸)基制成的水凝胶来修复脊髓的神经通道。这种水凝胶在大鼠体内30至60天内降解,如果将这些结果移植到人类身上,这对于成功的组织再生来说是非常不够的。一项对比研究表明,与大鼠相比,人的孤立轴突生长时间更长,再生速度慢三倍(Gordon 2007,电刺激促进外周神经损伤后功能恢复的潜力—大鼠和人类的比较;神经病学学报增刊2007;100:3-11)。就脊髓而言,时间甚至更长,因为大量神经纤维必须重新生长才能实现功能性运动恢复。穿过外科修复部位的轴突生长缓慢且不同步,直到达到损伤水平下脊髓节段的适当目标。

[0010] 这些试图修复脊髓损伤的方法在应用于人的中枢神经组织再生中具有非常有限和不完善的效率,因为它们不能在实现神经功能的功能恢复的同时修复受损髓质段的解剖结构。

[0011] 一旦它们被植入到器官中,可降解水凝胶基质通过切断聚合物链而降解,同时在组织重塑过程中发生细胞、血管和再生神经纤维的迁移和定植。以这种方式,当进行脊髓的组织重建时,为了促进神经新组织的形成,可降解水凝胶基质呈现高降解速率,导致初始机械支撑性能的快速损失。为了使组织再生最佳,即及时完成,水凝胶支架在整个组织重塑过程中在空间和时间上保持一定的结构完整性是至关重要的。

[0012] 同样明显的是,聚(α -羟基酸)的酯键的水解释放出酸性化合物,当这些酸性化合物在接枝部位积累时,会降低pH值。如Bostman OM和Pihlajamaki HK(2000)在临床整形外科相关研究371:216-227中的对生物可吸收固定装置的不良组织反应中所述,pH值的降低导致植入物中心与表面相比水解速率加快,导致植入物初始机械性能的快速丧失和对异物的局部反应。

[0013] 文献W02010/097524公开了一种杂化多相水凝胶,其是衍生自以下单体的共聚物:

[0014] -树枝状聚合物单体,其包含中心核A、聚氧乙烯的大分子树枝状分支,其中至少一个树枝状分支被丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯基团官能化,

[0015] -N-取代的甲基丙烯酰胺或N-取代的丙烯酰胺,以及

[0016] -生物活性可共聚材料,其选自复合糖的衍生物、组织粘附肽的衍生物和与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的衍生物构成的组。

发明内容

[0017] 本发明的一个目的在于弥补这些缺点,更具体地说,在于提供一种由水凝胶制成的植入物,该植入物与现有技术的水凝胶相比具有较低的降解速率,并且更适合于与细胞定植相关的机械应力。

[0018] 根据本发明的一个特征,提出了一种通过衍生自至少三种以下单体的共聚物形成的杂化多相水凝胶:

[0019] -由设置有不饱和乙烯基团的单个支链官能化的树枝状聚合物单体,

[0020] -选自N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺的丙烯酰胺化合物,以及

[0021] -交联剂。

[0022] 杂化多相水凝胶的特征在于,杂化多相水凝胶主要由直径大于1.5微米且小于10微米的大量微珠形成,并且主要包含按重量计的N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺,微珠彼此组装以形成含有5至50个微珠的聚集体,所述聚集体通过交联点彼此连接以限定限定三维渗滤路径的贯通多孔阵列,所述贯通多孔阵列限定孔,所述孔的多孔比例的大部分由直径为10至30微米的孔形成,并且其中杂化多相水凝胶具有粘弹性,并且具有1至200kPa的弹性模量。

[0023] 根据一种发展,微珠的直径在2至5微米之间。

[0024] 优选地,微珠包含至少90重量%的丙烯酰胺化合物。甚至更优选地,微珠由交联的丙烯酰胺化合物构成。

[0025] 在特定实施例中,聚集体包含10至30个微珠。有利的是提供压缩时可变形的聚集体。

[0026] 有利地,官能化树枝状聚合物单体包含一个或多个聚氧乙烯大分子树枝状分支,所述至少一个聚氧乙烯大分子树枝状分支被一种或多种生物活性可共聚材料官能化,所述生物活性可共聚材料选自复合糖衍生物、组织粘附肽衍生物和与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物衍生物,所述一种或多种生物活性可共聚材料覆盖三维渗滤阵列的壁。

[0027] 优选地,三维渗滤阵列的壁通过多种不同的生物活性可共聚材料进行功能化。

[0028] 在有利的构型中,所述一种或多种活性分子选自复合糖的衍生物、组织粘附肽或具有血管生成活性的肽的衍生物、刺激神经再生的肽的衍生物、刺激细胞增殖和分化的肽的衍生物、与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的衍生物以及基质衍生因子-1(SDF-1)类趋化因子。

[0029] 进一步有利的是,提供包含中心核A、聚氧乙烯大分子树枝状分支的官能化树枝状聚合物单体,其中至少一个树枝状分支被可聚合的丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯基团官能化。

[0030] 根据另一构型,丙烯酰胺化合物是N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA),并且官能化的树枝状聚合物单体包括在其外围用生物活性剂官能化的聚氧乙烯树枝状分支,所述生物活性剂赋予组织再生的生物活性性质。

[0031] 本发明的另一目的在于根据前述构型之一的杂化多相水凝胶作为填充植入物的

用途,其被设计成用于插入器官或组织的解剖缺损的边缘之间。

[0032] 优选地,杂化多相水凝胶用作填充植入物来填充中枢神经系统的实质内腔。

[0033] 以有利的方式,杂化多相水凝胶用作填充植入物,以矫正中枢神经系统的先天性畸形或脊柱裂。

[0034] 根据本发明的一个特征,提出了一种制造杂化多相水凝胶的方法,该方法易于实现工业化生产,由此可以生产更适于形成填充植入物的杂化多相水凝胶,特别是就物理化学规格而言。

[0035] 制造杂化多相水凝胶的方法的显著之处在于它包括:

[0036] -在45℃和55℃之间的温度下,由包含至少三种下列单体的反应混合物通过共聚和自由基共聚诱导的相分离形成微珠:

[0037] -由包含不饱和乙烯基团的单个分支官能化的树枝状聚合物单体,其他分支没有乙烯基团,

[0038] -选自N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺的丙烯酰胺化合物,

[0039] -至少一种包含两个反应性乙烯基键的双官能不饱和乙烯交联剂,以及

[0040] -自由基引发剂,

[0041] 所述微珠的直径大于1.5微米且小于10微米,并且主要包含按重量计的N-取代的甲基丙烯酰胺和N-取代的丙烯酰胺,

[0042] 所述微珠彼此组装以形成含有5至50个微珠的聚集体,所述聚集体通过交联点彼此连接以限定杂化多相水凝胶,所述杂化多相水凝胶描绘限定三维渗滤路径的贯通多孔阵列,所述贯通多孔阵列限定孔,所述孔的多孔比例的大部分由直径为10至30微米的孔形成,并且

[0043] 其中,杂化多相水凝胶具有粘弹性,并且具有1至200kPa的弹性模量;

[0044] 其中,将反应混合物注射到紧密的圆柱形导热模具中。

[0045] 在一发展中,官能化树枝状聚合物单体和交联剂之间的摩尔比在0.1和0.8之间。优选地,官能化树枝状聚合物单体的分子量为6.220g/mol至23.280g/mol。

[0046] 优选地,生物活性可共聚材料存在于反应混合物中以形成微珠,生物活性可共聚材料选自复合糖的衍生物、组织粘附肽的衍生物和与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的衍生物。

[0047] 在有利构型中,将反应混合物注射到金属模具中,模具的内壁覆盖有聚四氟乙烯。模具优选通过水浴加热。优选地,反应混合物的聚合在第一温度下进行至少80分钟以形成微珠,然后模具和反应混合物的温度升高至少5℃。

[0048] 以有利的方式,根据前述构型之一的用于形成杂化多相水凝胶微珠的聚集体的方法在制造填充植入物的方法中实施。制造填充植入物的方法包括形成杂化多相水凝胶微珠的聚集体,并通过三维印刷方法将聚集体彼此组装以形成填充植入物。

附图说明

[0049] 从下面对本发明的特定实施例和实施方式的描述中,其他优点和特征将变得更加清楚,描述仅用于非限制性的示例目的,并在附图中示出,其中:

[0050] -图1示意性地说明了提供有限定三维贯穿通道的杂化多相水凝胶的植入物;

[0051] -图2示出了限定四个圆柱形井的金属体,井的壁被由PTFE制成的表面覆盖。

具体实施方式

[0052] 由水凝胶基质制成的植入物被设计成植入代表体积组织损失的腔中,例如骨髓腔。如果水凝胶的降解速率(V_d)比细胞再生速率(V_r)快,则很快不再有任何对组织重建的支持。组织重建将被限制在植入区域的外围,并且细胞再生过程将是不完全的。此外,植入髓损伤中的聚合物支架的生物降解导致植入物主体和脊髓组织之间的物理分离。将植入物与组织分开的空间填充有脑脊液,并防止水凝胶整合到神经组织中。这也阻止了再生过程中的轴突到达由植入物形成的支架的主体。

[0053] 酸降解产物的产生可能导致急性炎症反应。其他降解产物可能在细胞水平上具有毒性作用,并干扰器官的体内平衡。这些降解产物随着时间的推移而产生,直到聚合物载体被完全破坏。降解产物可以通过体循环运输,以连续的方式在靶器官中累积,其长期后果可能对器官造成损害。

[0054] 为了使再生过程最佳和完全,植入物的聚合物阵列的降解速率必须与组织修复速率相匹配,以便凝胶总体积的减少与细胞生物负荷体积的逐渐增加保持恒定,从而不会在与宿主器官的界面上施加机械压缩应力。这种应力会因局部缺血性压迫而导致损伤。尽管可以在严格控制的实验条件下控制聚合物水凝胶的体外降解速率,但不可能控制水凝胶基质的体内降解速率,也不可能监测聚合物基质相对于体内细胞生物负荷率的降解速率。因此,不可能在再生过程中有效地使用可生物降解的植入物。

[0055] 通常,细胞再生过程和植入物的降解过程从与脊髓接触的界面开始,并向腔内部延伸。此外,水凝胶基质的中心没有完全降解,并保持低聚物链的形式,低聚物链已经失去了它们的结构和它们作为生长基质的功能。植入物不再可用,因为它不能提供任何机械支撑,并且它会阻碍重建。

[0056] 基质的降解可以进一步导致迁移到水凝胶结构中的细胞之间存在的连接的解离。这些连接对于功能性组织的形成和凝聚至关重要。

[0057] 因此,在组织工程中使用可降解聚合物水凝胶作为植入物以最佳修复组织(特别是神经系统)的体积损失时,必须考虑水凝胶基质在使用过程中的机械行为的演变,以便后者在新的生物组织形成之前保持其结构完整性,还必须考虑其实际的体内降解速率。这是不可能的,因为随着降解,基质逐渐失去其架构形貌,并因此失去由其初始架构限定的机械性能。植入物的结构完整性不能长时间保持。然而,植入物的结构完整性是在整个组织重建过程中维持组织重建形成的基本特征。

[0058] 损伤后,神经纤维具有通过伸长或侧枝发芽再生的天然能力。如果再生纤维的末端即生长锥找不到任何可以附着和伸长的底物,这种能力就会大大降低。

[0059] 然而,如果基质被降解,生长锥在轴突再生过程中可以通过其进行的底物就不能是连续的。因此,使用由降解速率 V_d 低于或等于组织再生速率 V_r 的水凝胶制成的植入物是有利的。

[0060] 使用不可降解的杂化多相水凝胶是特别有利的,即其降解速率低于再生速率。优选地,不可降解的杂化多相水凝胶是指在代表人体的生理条件下,不会因化学或酶水解反应或光解裂解而原位降解的聚合物组合物。例如,在至少相当于一年或两年的参考期内,化

学降解较低或为零。

[0061] 杂化多相水凝胶可降解性研究有利地在40℃下在pH等于1的酸性溶液中和pH等于14的碱性溶液中进行。将一片水凝胶放入这些溶液的每个中,并将每个溶液保持在40℃,例如通过热板。搅拌溶液。定期观察杂化多相水凝胶样品和溶液。例如,观察到一周后,不可降解的杂化多相水凝胶没有改变外观,并且溶液保持透明。在溶液中没有观察到样品的漂浮残留物。也没有观察到水凝胶质量的任何损失。

[0062] 酸性溶液有利地是0.1mol/L的盐酸溶液。碱性溶液有利地是1mol/L的苏打溶液。

[0063] 杂化多相水凝胶也通过高效液相色谱进行分析。优选使用含有25%体积甲醇和75%水的混合物作为洗脱剂。洗脱剂的流量有利地为1mL/min。所用的色谱柱可以是Nova-Pack C18 150mm 3.9mm反相型。色谱图的分析能够通过搜索水凝胶的成分来检测其降解。

[0064] 对于不可降解的杂化多相水凝胶,色谱分析显示随着时间的推移很少有新的峰。例如,分析色谱图以监测根据本发明的水凝胶的主要成分,例如含有HPMA(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酯)的水凝胶。高效液相色谱分析没有显示HPMA基水凝胶的任何降解。这些观察被“体内”试验所证实,其中HPMA基凝胶被植入脊髓。通过电泳对脑脊液的分析没有显示脑脊液中有任何寡聚体类型的降解产物。降解产物的这种不存在表明水凝胶没有降解。

[0065] 具有不可生物再吸收且可压缩的水凝胶也是有利的。这种水凝胶可用作填充植入物,并可插入到器官(例如神经系统,特别是创伤后髓内囊性腔)的解剖缺损的边缘之间。

[0066] 然而,由于植入物降解很少或根本不降解,植入物的体积必须不妨碍细胞重建。特别有利的是形成填充植入物,其包括由多孔杂化多相水凝胶制成的支架,该支架具有允许植入物内细胞再生的通孔。如图1所示,杂化多相水凝胶1具有多孔结构是特别有利的,该多孔结构的孔彼此连通,从而在凝胶体积的三维空间中形成渗滤阵列2。由孔形成的贯穿阵列使得细胞能够迁移和增殖到水凝胶的核心,由于细胞代谢所需的营养物的运输和扩散而结合和存活。

[0067] 由于水凝胶是不可降解的,孔阵列不会引起水凝胶降解的增加,因为有毒或刺激性分子滞留在孔中。

[0068] 植入物是多孔结构,具有穿过植入物的开孔,以在水凝胶的三维空间中限定渗滤路径。开孔增强了从组织到植入物核心的细胞和血管集群,以及生物流体、细胞生长因子、细胞修复因子和生理营养物通过植入物的循环。不同流体通过植入物的流动促进植入物中产生的组织的血管化。植入物形成三维支撑基质,通过该基质的孔引导细胞、神经纤维和血管的生长。与没有植入物相比,与植入物接触的细胞生长质量更好。植入物必须仅由水凝胶形成。

[0069] 以优选的方式,形成植入物的水凝胶的多孔比例在体积上大于85%,更优选至少等于90%,甚至更优选至少等于92%。多孔比例可以用水银孔隙度测定技术计算。

[0070] 优选具有杂化多相水凝胶,其多孔比例的大部分由直径为10至30微米的孔形成。优选地,多孔比例的至少60%由直径为10至30微米的孔形成。换句话说,多孔体积的至少60%由直径为10至30微米的孔构成。

[0071] 具有直径为30至300微米的孔比直径小于10微米的孔占更大比例的杂化多相水凝胶也是有利的。以优选的方式,直径在30至300微米之间的孔比例大于20%,甚至更优选大于30%。直径在30至300微米的孔比例对于容纳大尺寸的生物物体比如多细胞组织特别有

利。有利地,直径小于10微米的孔的比例小于15%,甚至更优选小于10%。进一步有利的是,杂化多相水凝胶在贯穿多孔阵列中包含尺寸小于1微米的小于2%体积的孔。

[0072] 孔尺寸的这种分布确保生物化合物穿过植入物,覆盖活组织生物化合物的整个维度谱。这使得将植入物用作待修复组织的组织等同物更容易实现。

[0073] 植入物的孔与炎性细胞分泌的趋化因子的流通相容。植入物的构型能够渗透神经胶质细胞、间充质细胞、与分泌SDF-1因子的软脑膜相关的干/祖细胞以及具有神经元分化潜能的中央通道上皮相关的干/祖细胞,渗透血管并生长再生神经纤维。

[0074] 还有利的是,由具有随细胞定植或细胞生物负荷量逐渐改变其多孔阵列构型的性质的材料形成杂化多相水凝胶。杂化多相水凝胶可在细胞定植和/或细胞生物负荷施加的应力下变形。当再生发生时,植入物在细胞组织施加的压力下逐渐变形。水凝胶必须能够随着细胞生物负荷的机械应力而变形,从而能够保持具有渗滤通道的结构。

[0075] 特别有利的是形成包括由多孔杂化多相水凝胶制成的支架的填充植入物,多孔杂化多相水凝胶可以粘弹性方式变形,并且具有足够低的降解速率,使得该水凝胶被认为是不可降解的杂化多相水凝胶。多孔植入物占据的体积将随着再生的发生而改变,以部分适应水凝胶周围和内部的再生速率。

[0076] 当细胞和神经再生发生时,杂化多相水凝胶的大分子骨架以恒定或基本恒定的体积变形。在植入物中细胞积聚的过程中和正在形成的新组织扩张的过程中,聚合物阵列在细胞积聚所施加的机械压力下变形。植入物的结构由弹性模量在1至200KPa之间的材料制成,以适应细胞生物负荷施加的应力。弹性模量的值可以在切断前其变形的50%处测量。

[0077] 随着细胞生物负荷逐渐增加,植入物根据植入物中细胞生物负荷引入的机械应力而变形。植入物弹性变形,然后粘弹性变形,以便不阻碍细胞生长,特别是在贯穿通道中。尽管发生变形,植入物仍保持三维渗滤阵列,其可伸展以确保完全的组织再生。一旦组织被重建,植入物的残余聚合物阵列充当细胞间支持基质,从而稳定通过施加机械应变形成的新组织。

[0078] 植入物的表面具有大的粗糙度,这通过增加植入物和接触的组织细胞之间的接触表面而有助于与宿主组织的良好粘附,这将促进两种环境之间的粘附。在生物流体、细胞生长因子和细胞必需的生理营养物流通的同时,连接到渗滤阵列的植入物表面的开孔促进细胞和血管从接触的组织定植到植入物的核心。

[0079] 从文献FR2942408中已知能够形成具有弹性和多孔结构的基质的杂化多相水凝胶的用途,该基质适用于器官和/或组织再生的治疗和修复,特别是其作为可植入生物材料的用途。据观察,这种材料的降解速率低于细胞组织的再生速率。

[0080] 特别有利的是,改进文献FR2942408中已知的杂化多相水凝胶,以形成具有多孔结构的不可降解支架,该多孔结构在三维空间中特别限定了渗滤通道,并具有弹性模量为1至200kpa的粘弹性行为。

[0081] 使用杂化多相水凝胶是有利的,该水凝胶是衍生自至少三种单体的共聚物—被乙烯基团官能化的树枝状聚合物单体、丙烯酰胺单体和交联剂。在特定构型中,杂化多相水凝胶包含生物活性可共聚材料。在另一特定构型中,杂化多相水凝胶不含任何生物活性可共聚材料。随后可以在形成的水凝胶上进行生物活化。

[0082] 生物活性可共聚材料选自复合糖的衍生物、组织粘附肽的衍生物和与针对脂质衍

生物的抗体偶联的聚合物偶联物的衍生物。优选地,生物活性可共聚材料是复合糖的、组织粘附肽的以及针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的甲基丙烯酸酯或甲基丙烯酰胺衍生物。

[0083] 生物活性可共聚材料可以优选为复合糖的甲基丙烯酸酯基或甲基丙烯酰胺衍生物,所述复合糖选自例如葡萄糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺、N-二缩水甘油基-葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰神经氨酸(唾液酸)和聚唾液酸。

[0084] 生物活性可共聚材料可以优选为组织粘附肽的甲基丙烯酸酯或甲基丙烯酰胺衍生物,所述组织粘附肽选自含有氨基酸序列的组织粘附寡肽,比如Arg-Gly-Asp、Ile-Lys-Val-Ala-Val、Ala-His-Ala-Val-Ser-Glu、Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg,组织分化分子的寡肽衍生物,例如骨形态发生蛋白或SDF-1(基质细胞衍生因子-1)家族的蛋白,具有动员和吸引表达CXCR4受体的内源性干细胞的能力并具有在组织再生发生时刺激轴突生长的能力的趋化因子。

[0085] 生物活性可共聚材料可以优选是与抗髓磷脂及其与轴突相关的脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的甲基丙烯酸酯基或甲基丙烯酰胺衍生物。

[0086] 丙烯酰胺单体有利地是N-取代的甲基丙烯酰胺或N-取代的丙烯酰胺。弹性模量的值部分由水凝胶的交联密度决定,即由丙烯酰胺单体形成的大分子链之间的共价键数决定,优选通过监测大分子HPMA链之间的共价键数决定。

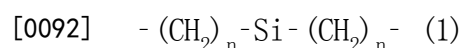
[0087] N-取代的甲基丙烯酰胺优选选自N-单烷基甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基甲基丙烯酰胺、N-羟烷基甲基丙烯酰胺、优选N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)、N-烷基、N-羟烷基甲基丙烯酰胺和N,N-二羟基烷基甲基丙烯酰胺。

[0088] N-取代的丙烯酰胺优选选自N-单烷基丙烯酰胺、N-羟烷基丙烯酰胺、N,N-二烷基丙烯酰胺、N-烷基、N-羟烷基丙烯酰胺和N,N-二羟基烷基丙烯酰胺。

[0089] 树枝状聚合物单体优选包含中心核A和聚氧化乙烯(PEO)的大分子树枝状分支。只有一个树枝状分支被乙烯基官能化,有利地在末端位置。乙烯基团是不饱和的,以便与包含至少一个反应性乙烯基双键的单体反应。其他树枝状分支优选由羟基官能团终止,并且没有乙烯基团。它们也可以在共聚前通过其他官能团比如酯或酰胺官能团进行官能化。乙烯基团有利地是丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯基团。树枝状聚合物的星形架构使得多功能可变几何形状能够被引入水凝胶中,从而以特定的方式响应与其他材料的多重相互作用。只有一个分支被官能化的指示对应于统计结果,表明就平均而言,树枝状聚合物单体被具有不饱和和乙烯基团的单个分支官能化。

[0090] 杂化多相水凝胶中的功能性羟基可以通过附粘实体来修饰,例如生物活性剂比如多肽、活性成分、配体、可聚合基团或寡糖。

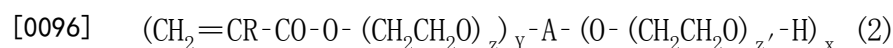
[0091] 根据特定实施例,中心核A是选自碳硅烷、聚碳硅烷、星形架构聚碳硅烷的基团,或根据下式(1)的基团:



[0093] 其中,n是介于1和20之间的整数,优选等于6。

[0094] 根据变型,中心核A是聚(二乙烯基苯)。

[0095] 根据优选实施例,树枝状聚合物单体符合下式(2):



[0097] 其中:

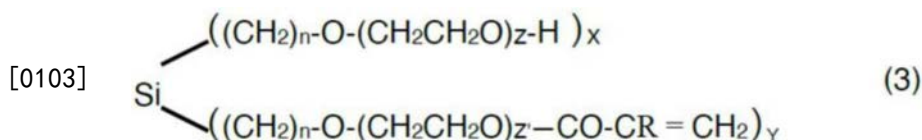
[0098] R是H或CH₃,

[0099] X和Y是介于1和100之间的整数,X+Y之和是4的倍数,

[0100] Z和Z' 是相同或不同的,并且在1和100之间,并且

[0101] A优选为碳硅烷、聚碳硅烷、星形架构聚碳硅烷或根据式(1)的基团。

[0102] 根据另一优选实施例,树枝状聚合物单体符合下式(3):



[0104] 其中:

[0105] R是H或CH₃,

[0106] n是介于1和20之间的整数,优选等于6,

[0107] Z和Z' 是相同或不同的,并且在1和100之间,

[0108] X等于1、2或3,并且

[0109] Y符合式Y=4-X。

[0110] 有利地,树枝状聚合物单体被甲基丙烯酸甲酯基团官能化,并且具有四个PEO的树枝状分支和具有己醇桥的硅烷中心核A,即具有式(3)的结构,其中R=CH₃,n=6,X=3,Y=1和Z=Z'。为了清楚起见,这种树枝状聚合物单体将用符号Si-PEO4-MMA来标识。

[0111] 水凝胶的机械和化学性质也可以通过在树枝状分支的游离羟基末端上接枝具有特定性质比如亲水、疏水和/或表面活性性质的功能来调节。由于其氧原子的亲核性质,羟基官能团可以容易地被官能化。已知该功能容易被激活,例如通过基本治疗。杂化多相水凝胶的固有性质也可以通过改变掺入水凝胶骨架的树枝状聚合物单体的数量和中心核A的性质来改变。树枝状分支的数量决定了大分子在水和有机溶剂中的溶解度。

[0112] 杂化多相水凝胶主要由多个微珠形成或构成,这些微珠相互组装以限定贯穿多孔阵列。微珠呈现球形或基本球形形状,并且主要具有大于1.5微米且小于10微米的直径。以优选的方式,微珠主要具有2至5微米的直径,以根据细胞生物负载施加的应力更好地调节通道的变形。

[0113] 为了更好地控制三维渗滤阵列的构象,优选以包含至少5个微珠和少于50个微珠且优选为至少10个微珠的聚集体的形式聚集水凝胶微珠。以有利的方式,微珠彼此聚集以形成10至30个微珠的聚集体。同样特别有利的是,水凝胶微珠以被称为“葡萄串”的构型彼此聚集,这有利于形成有效的多孔阵列,同时确保支架的良好可变形性。优选聚集体由直径在5至10微米之间的微珠形成。聚集体优先形成水凝胶基质的初级阵列。聚集体通过附粘点彼此固定,允许一个聚集体相对于另一个聚集体移动。在葡萄串构象中,横截面从一端到另一端增加,并且横截面基本是垂直于聚集体长度的圆形。葡萄串构象比线性构型更有利于促进细胞和植入物之间的相互作用,从而促进多细胞组织结构的形成和/或神经纤维的生长。葡萄串构象也提高了粘附力。

[0114] 在聚集体中,微珠通过可变形的交联点彼此固定,以允许微珠相对于彼此移动,并根据所施加的机械应力调整杂化多相水凝胶支架的构象。聚集体可被压缩。聚合物链通过拉伸在交联点之间变形。交联点彼此远离,导致水凝胶的多孔比例增加。当细胞和神经再生

发生时,植入物的总多孔体积在恒定体积下以各向异性构型增加。

[0115] 微珠聚集体以相对于彼此可移动的方式构建,从而允许微珠聚集体响应于与微珠表面接触的迁移细胞所施加的毛细压力而收缩。微珠聚集体构造使得后者的收缩具有扩张多孔阵列和增加可用于形成组织扩张的多孔体积的效果。

[0116] 聚集体彼此固定以形成包含中孔和大孔区域的多孔阵列。由聚集体限定的多个孔相互连接以形成渗滤阵列,该阵列呈现一定的弯曲度并穿过处于初始构型的水凝胶。在微观水平上,当组织生物重建过程发生时,渗滤阵列允许细胞、血管和神经纤维在三维空间中渗透穿过水凝胶。平行地,微珠限定尺寸小于20nm的微孔,优选尺寸在1.5至11纳米范围内变化,平均直径为6纳米。这些微孔是封闭的和不通连的。微孔在微珠表面形成凹坑,这使得水凝胶微珠具有蜂窝状表面。这些微孔产生表面并有助于增加由这些水凝胶微珠形成的大分子水凝胶阵列的内部比表面。这种大分子阵列表面和微珠表面形貌的增加促进了与细胞膜的相互作用,特别是迁移细胞的局部粘附。

[0117] 优选地,渗滤阵列限定了大的内部比表面积,至少等于 $25\text{m}^2/\text{g}$,有利地至少 $50\text{m}^2/\text{g}$ 。

[0118] 在现有技术中,由于水凝胶基质的降解,观察到细胞生物负荷量随时间增加,并部分填充水凝胶基质损失的体积。同样明显的是,水凝胶的降解速率高于细胞定植速率,这使得生物负荷在植入物最初占据的体积中的分布变得复杂。相反,对于多孔和粘弹性可变形的不可降解的杂化水凝胶,利用水凝胶的压缩和变形,每单位体积组织缺损的生物负荷增加。细胞定植被更好地掌握。可变形的大分子阵列随着细胞的生长而改变,所述细胞以自主方式组织、迁移和分化以形成功能性新组织。

[0119] 形成交联密度不均匀的植入物是特别有利的。交联度的差异可以通过所使用的制造方法来定义。优选通过实施反应混合物相分离的方法来使用水凝胶的共聚,并且实施其中相分离源自通过热手段诱导的聚合的共聚方法也是有利的。通过在限定的温度范围内进行交联来控制相分离是特别有利的。例如,在 40°C 和 60°C 之间的相分离获得了良好的结果。在 45°C 和 55°C 之间的交联获得了具有更好性能的支架。在 49°C 和 51°C 之间的交联获得了具有甚至更好性能的支架。使用这样的温度范围能够更好地限定微珠的尺寸。

[0120] 限制聚合速率以确保形成具有良好机械性能和贯穿通道的水凝胶也是有利的。以优选的方式,交联时间大于6小时或甚至大于12小时以形成植入物。

[0121] 特别有利的是制造一种植入物,其中聚集体是水凝胶阵列中交联密度高的区域。水凝胶由通过弱交联区域彼此强交联的聚集体形成。强交联的聚集体形成机械支撑区域,其可以通过弱交联区域相对于彼此移动。

[0122] 聚集体之间的交联点由共价键形成,即可被认为是不可降解的化学键,这使得聚集体之间具有良好的机械强度。有利的是提供以统计方式分布在水凝胶体积中的聚集体,限定具有高聚合链浓度的区域和具有低聚合链浓度的区域,并形成包含游离水的腔。

[0123] 强交联区域中两个交联点之间的平均距离小于弱交联区域中两个交联点之间的平均距离的20%,优选小于弱交联区域中两个交联点之间的平均距离的10%。

[0124] 强交联区域的比例代表水凝胶侵入体总体积的至少60%是优选的。强交联区域的比例小于水凝胶侵入体总体积的80%也是有利的。

[0125] 植入物的表面不平坦。它存在缺陷,例如源于微珠组装的突起。

[0126] 特别有利的是制造杂化多相水凝胶,其中微珠包含至少90重量%或甚至至少95重

量%或由丙烯酸胺化合物例如N-取代的甲基丙烯酸胺或N-取代的丙烯酸胺构成,以赋予微珠弹性,确保植入物随着细胞负荷而变形。以特定的方式,主要或专门由丙烯酸胺化合物制成的微珠具有1.5至10微米,优选2至5微米的直径。

[0127] 以优选的方式,微珠主要含有重量比的HPMA,优选强交联的HPMA。以有利的方式,强交联微珠的交联率大于交联剂的1摩尔%。这种交联速率的使用确保了每单位体积水凝胶的线性聚合物链之间存在足够数量的横向化学键。这种构型使水凝胶具有足够的聚合物阵列内聚力,例如HPMA,平衡时的溶胀比为最终质量(g水/g干物质)的96%。在这种情况下,该比例优选为0.95摩尔%。可以使用更弱交联的材料(例如HPMA)来形成微珠之间的结合并限定微珠聚集体。

[0128] 特别有利的是,植入物的贯穿通道由微珠描绘,微珠的官能化树枝状聚合物单体包含聚氧乙烯的一个或多个大分子树枝状分支。聚氧乙烯的大分子树枝状分支被一种或多种活性分子官能化,例如上述的生物活性可共聚材料之一。然后可以使渗滤阵列的表面功能化,以促进植入物内的细胞重建。

[0129] 活性分子选自复合糖的衍生物、组织粘附肽或具有血管生成活性的肽的衍生物、刺激神经再生的肽的衍生物、刺激细胞增殖和分化的肽的衍生物、与针对脂质衍生物的抗体偶联的聚合物缀合物的衍生物以及基质衍生因子-1(SDF-1)类趋化因子。

[0130] 提供微珠的用途也是有利的,其中丙烯酸胺化合物是N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸胺(HPMA),并且由乙烯基团官能化的树枝状聚合物单体包括在其外围用生物活性剂官能化的聚氧乙烯树枝状聚合物,为组织再生提供生物活性特性。

[0131] 以与文献FR2942408相同的方式,可以通过自由基共聚来制造杂化多相水凝胶。优选的聚合方法在极性有机介质中进行,有利的是在双有机极性介质中进行,例如丙酮/DMSO混合物。

[0132] 以有利的方式,除了自由基共聚之外,共聚还与聚合诱导的相分离(PIPS)相关。这样,单体和极性溶剂的初始均匀溶液在共聚过程中分离以形成微珠。有利地,官能化树枝状聚合物单体和交联剂之间的摩尔比在0.1和0.8之间,例如PEO-MMA/MbisAA比在0.1和0.8之间。使用该比值,相分离定义了形成微珠的缠绕球,称为线圈。在45-55℃的温度范围内,更容易获得主要由直径在1.5和10微米之间的丙烯酸胺化合物制成的线圈。该比值还允许形成三维渗滤阵列。通过选择分子量在6220g/mol和23280g/mol之间的官能化树枝状聚合物单体,甚至更容易控制产生的线圈的数量和线圈的尺寸分布。在该特定范围内,当官能化树枝状聚合物单体的摩尔质量增加时,线圈数量增加,尺寸分布减小。

[0133] 形成杂化多相水凝胶的方法包括反应混合物形成由线圈状聚合物链构成的不溶性核的第一阶段反应。如图2所示,将反应混合物注射到紧密的圆柱形导热模具3中,模具3具有与反应混合物接触的由PTFE制成的壁4。反应混合物可以用氩气脱气。

[0134] 微珠缔合形成聚集体,并且聚集体彼此连接形成设计用于形成填充植入物的杂化多相水凝胶。

[0135] 还可以通过三维印刷方法提供微珠聚集体的供应和聚集体的相互组装,以形成填充植入物。植入物的形式由三维打印设备直接定义。

[0136] 共聚是通过交联剂进行的。交联剂可以是丙烯酸胺,比如亚甲基双丙烯酸胺(MbisAA),后者的前体或二乙烯基化合物,比如二乙烯基苯(DVB)。自由基聚合引发剂选自

已知的引发剂,比如偶氮二异丁腈(AIBN)或过氧化苯甲酰。

[0137] 交联剂优选为具有两个乙烯基的亚甲基双丙烯酰胺(MbisAA)。与只有一个乙烯基的N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)相比,亚甲基双丙烯酰胺具有更高的反应活性。这使得亚甲基双丙烯酰胺能够在形成微珠之前更快地结合到形成核的生长链中。

[0138] 使用聚氧乙烯水凝胶是特别有利的,因为聚氧乙烯已经显示出对神经元膜的神经保护作用,并降低损伤后的氧化应激(Luo等人的聚乙二醇在脊髓损伤后立即修复神经元膜并抑制自由基产生,神经化学期刊,83,471,2002)。优选使用由一种或多种具有聚氧乙烯分支的分支星形结构的聚合物形成的水凝胶,特别是通过防止血液蛋白的非特异性吸收来增强水凝胶的生物相容性,从而通过将C3蛋白切割成负责吞噬细胞募集的肽来减少补体的活化,从而调节局部炎症反应(Nilsson,B.等人的补体在生物材料诱导的炎症中的作用,分子免疫学,44,82,2007)。

[0139] 这些分支的分子可以通过聚氧乙烯分支末端位置的生物偶联用肽、生物活性糖和趋化因子类的官能团修饰。特别有利的是形成具有在支架中形成的多孔结构的水凝胶材料,所述支架包含由N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺构成的结构和由官能团的支链聚氧乙烯聚合物载体形成的支链结构。官能团优选为短肽,比如与细胞的整联蛋白受体相互作用的寡肽,例如但不限于以下序列,Arg-Gly-Asp(RGD),Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS),Ile-Lys-Val-Ala-Val(IKVAV)。其他官能团可以是与一种或多种唾液酸共轭的寡聚体,例如唾液酸乳糖(Neu5Ac- α 2,3-Gal- β 1,4-Glc),以及硫酸化寡糖比如HNK1(SO_4 -3-Glc β 1-4Gal β 1-4GlcNac-R)或岩藻糖基化寡糖,例如Fuc α (1-2)Gal。生物活性剂也可以选自刺激轴突再生的生长因子,包括但不限于BDNF(“脑源性神经营养因子”)、IGF-1(“胰岛素样生长因子”)、NT-3(“神经营养蛋白”)、GDNF(“神经胶质源性神经营养因子”);或刺激神经元前体细胞增殖,比如FGF(“成纤维细胞生长因子”)和EGF(“表皮生长因子”)、PDGF(“血小板衍生生长因子”)、VEGF(“血管内皮生长因子”)、PlGF(“胎盘生长因子”)、NGF(“神经生长因子”)以及TGF(“转化生长因子”)可与POE缀合。

[0140] 刺激前体干细胞动员的生物活性剂比如SDF-1(基质衍生因子-1)趋化因子,其具有吸引表达受体CXCR4的内源性干细胞并在组织再生发生时刺激轴突生长的能力,G-CSF(粒细胞集落刺激因子),GM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)或SCF(干细胞因子)细胞因子和白介素(IT-8)。

[0141] 水凝胶的一个实施例有利地在惰性气氛中制造,并且包含将N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺与交联剂N,N'-亚甲基双丙烯酰胺或N,N'-亚甲基双甲基丙烯酰胺结合的水凝胶,其包含两个乙烯基,摩尔比为100:1,占反应混合物总重量的30.4重量%;双有机极性溶剂丙酮/DMSO(93/7v/v)。

[0142] 将反应混合物用氩气脱气,并注射到紧密的圆柱形导热模具中,模具壁由PTFE制成,与反应混合物接触。以有利的方式,将初始反应混合物置于优选由不锈钢制成的金属模具中,其内壁覆盖有聚四氟乙烯(PTFE)。直接在模具内部用惰性气体吹扫反应混合物。优选地,模具具有圆形横截面,其高度至少是直径的两倍。金属模具的使用使得后者更容易与水浴一起使用,水浴在聚合过程中固定模具和反应混合物的温度。这种构型能够更好地控制微珠和孔的尺寸。

[0143] 自由基聚合反应优选在50℃下在偶氮二异丁腈引发剂的存在下进行。据观察,在

聚合过程中,将模具和反应混合物的温度提高至少5℃,优选提高10℃或更高是特别有利的。温度升高低于20℃是有利的。聚合的最高温度低于70℃也是有利的,甚至更优选低于65℃以便不降解干凝胶,即水凝胶在被水饱和之前。这种温度升高使得聚合物链在水凝胶中更均匀地分布,并获得更好的效率。以优选的方式,在形成微珠或大多数微珠之后进行温度升高。温度升高可以至少在聚合80分钟后发生,甚至更优选在聚合90分钟后发生。聚合可以在用于形成微珠的第一温度平稳段下进行,例如包括在45℃和55℃之间,优选等于50℃的温度平稳段。温度平稳段之后是第二平稳段,或者可能是温度梯度或另一种形式的退火,以达到比平稳段温度高至少5℃的温度。使用两个不同的温度范围能够实现对微珠尺寸的更好控制和对聚集体尺寸的更好控制。优选地,在第一温度平稳段期间,进行聚合,直到低聚物浓度达到能够通过低聚物缩合形成更长链的阈值。低聚物的缩合导致出现至少两种具有不同密度的相。通过改变聚合温度进行相分离是有利的。

[0144] 为了检测低聚物浓度已经达到阈值,监测反应的吸光度信号是有利的。例如,通过紫外-可见范围内的吸收光谱(光密度)监测吸光度信号。通过寡聚体的缩合获得的足够量的长链的检测可以对应于阈值吸光度值或达到阈值的吸光度的进展速率。一旦检测到阈值,就知道长链的数量是足够的。第二聚合步骤在较高的温度下进行,优选具有比先前平稳段高至少5℃的第二平稳段。第二平稳段通过加速成核和允许聚合继续来实现共聚。形成交联的低聚物线圈,从而形成微珠。微珠随机聚集并形成交联点。在较高温度下的第二聚合阶段,吸光度值降低。作为替代,第二平稳段由温度梯度或更复杂的温度级数代替,其具有比第一平稳段的温度高至少5℃的最低温度。

[0145] 在聚合过程中,优选紧密地封闭模具3,例如通过有利地与密封件5相关的聚四氟乙烯盖。盖的使用限制了溶剂从反应混合物中的蒸发,并且能够实现更好的再现性。

[0146] 以优选的方式,选择模具的尺寸,使得由模具形成的水凝胶对于水合凝胶呈现等于175mm的直径和等于400mm的高度。使用一个相同的金属部件限定多个井6形式的多个模具也是有利的。模具3可以包括孔7,孔7设计成与螺钉配合来封闭井6。

[0147] 在聚合结束时,干凝胶呈干燥或无水形式,并从模具中取出。用聚四氟乙烯覆盖模具的内壁是特别有利的,因为这使得干燥形式的水凝胶更容易取出,从而避免损坏后者。模具中存在的干凝胶是易碎的,这使其成为易碎材料,当其从现有技术方法中使用的小瓶中取出时容易损坏。

[0148] 在乙醇/无热原水中洗涤干凝胶,使其达到96%的平衡溶胀比。作为替代方案,乙醇被甲醇代替。以有利的方式,干凝胶被转移到多孔篮形式的第一接收器中,该篮有利地由聚四氟乙烯制成。在优选的方式中,第一篮安装在包含液体的第二篮中。液体可以是水、乙醇或甲醇或者水与乙醇或甲醇的混合物。第二接收器的液体穿过第一接收器的孔以清洁干凝胶。

[0149] 特别有利的是,第二接收器对于可见辐射是不透明的。第二接收器可以由聚碳酸酯制成。

[0150] 安装在第一接收器中的干凝胶经受洗涤循环,其有利地包括应用多个连续的洗涤浴。在不同的浴中,水含量增加,以清洁干凝胶并用水使其饱和以形成水凝胶。

[0151] 水凝胶有利地与亚甲基双丙烯酰胺以等于或基本等于1摩尔%的比率交联,这赋予水凝胶作为填充植入物的有利物理特性。

[0152] 为了在外科手术中使用后者作为在无菌条件下操作的填充植入物,必须确保产品的无菌性。凝胶有利地放置在由高级PTFE制成的圆柱形容器中,该材料不与凝胶的化学性质相互作用,并填充有无热原的可注射级水。装有凝胶的PTFE容器通过在121℃下高压灭菌30分钟进行灭菌,然后用螺纹紧固的盖将容器重新盖紧,以使凝胶保持水饱和和无菌。该容器放置在由聚苯乙烯制成的第二容器中,该容器带有向无菌手术区敞开的“安全盖”。因此,PTFE容器可以无菌方式处理。聚苯乙烯第二容器可以具有等于54mm的高度、等于34mm的内径和等于1.5mm的厚度。

[0153] 杂化多相水凝胶有利地用于填充策略中,以便通过在粘弹性基质存在下由再生现象进行填充来改变自然愈合现象,所述粘弹性基质具有改变其多孔几何空间的构型和其聚合物阵列的构型的性质。水凝胶的弹性效应提供了能够改变底物的机械弹性性质并重建接近体内细胞的机械环境的优点。这种水凝胶能够接收和引导细胞、神经纤维和血管的流动。

[0154] 杂化多相水凝胶限定可弹性变形且连续的多孔介质,该多孔介质是不可降解且不可生物吸收的,其几何形状适应细胞、血管和神经再生动力学。一旦它被植入切口区域,水凝胶基质锚定在脊髓上,使得水凝胶基质能够跟随由脊柱运动和灌注该器官的动脉搏动引起的脊髓运动,并因此保持锚定在移植部位。植入物由于其开放的多孔结构而形成支撑结构,使得细胞流能够沿着多孔阵列的渗滤路径迁移到聚合物基质中。

[0155] 在特定实施例中,杂化多相水凝胶在移植物腔中形成植入物,例如髓腔。腔可以通过从损伤的内边缘解剖和去除无生命的疤痕组织来形成。腔的边缘由健康的神经组织形成。在有利实施例中,提供腔之后是脑脊液的引流。这使得能够产生相当于急性损伤的“从头”损伤,该损伤重新激活内源性细胞修复的炎症过程(干细胞的动员、神经末端的萌发、血管生成)。植入方法还包括通过将水凝胶注射到髓腔中来填充创伤后腔的步骤。水凝胶可被切割以适应腔的形状和几何。

[0156] 在将水凝胶插入腔之前,将水凝胶部分脱水是特别有利的。在水凝胶安装到腔中后,水凝胶在与腔中流通的流体接触后膨胀,直到水凝胶植入物与腔的整个表面接触,从而与完整的损伤周围神经组织的白质形成完整的(100%)界面。水凝胶能够吸收大量的水,并在水和含水的生物液体存在下膨胀。水凝胶在平衡时含有至少80%体积的水是有利的。提供含水量低于或等于75%体积的水凝胶是有利的。优选地,植入物被脱水以使其体积减少10%至30%。对腔表面例如实质表面进行脱水也是有利的。优选用眼用海绵使壁脱水。然后将植入物插入腔,优选实质内腔,然后再水合达到其初始体积的至少95%,优选其初始体积的100%。植入物达到其初始体积的水合可以在不到一分钟内完成。以优选的方式,膨胀比等于100%的植入物的体积占待填充的腔的体积的80%至100%。一旦植入物被再水合,植入物的多孔表面与腔的表面接触,从而增强粘附力。有利的是,具有中心部分的脱水速率比周边部分的脱水速率更高的梯度。在表面处更大程度的脱水提高了随后与腔的壁接触的质量。

[0157] 为了增强植入物与腔壁的粘附力,优选将设计成接触的壁脱水,然后水合。还优选具有由微珠形成的多个葡萄串形式的植入物。具有上述微珠的植入物的构象限定了具有长钉和突起的表面粗糙度。有利的是粗糙度小于或等于30微米,优选小于或等于15微米,甚至更有利的是小于或等于5微米。粗糙度大于或等于0.1微米也是有利的。这样的粗糙度范围促进了水凝胶表面和软组织之间的间质液的流通。这种表面纹理源于水凝胶微珠的簇状结

构。纳米尺度的突起上的表面孔也增强了粘附力。

[0158] 特别有利的是用包含进入、离开和联合神经纤维的活体周围白质覆盖水凝胶的表面。植入物被特别设计成紧密遵循腔表面的几何形状。这些步骤导致脊髓在创伤区域的解剖重建。特别有利的是用包括进入、离开和联合神经纤维的活体周围白质覆盖植入物,以利用植入物与生物组织的生物粘附特性。

[0159] 为了改善重建的质量,具有生物粘附性或改善的生物粘附性的植入物是有利的。通过调整植入物的表面性质,植入物和生物组织之间的粘附力因此得到改善。

[0160] 当植入物具有改善的生物粘附特性时,它能够被插入到腔中,并且在不使用与生物组织的外科缝合的情况下获得高质量的细胞重建。

[0161] 特别有利的是,植入物主动刺激止血,尤其是止血的初级阶段。植入物主动刺激血小板聚集也是有利的。以这种方式,植入物诱导血液凝固,这使得良好的组织重建更容易实现。这种特殊的植入物构型使得微出血能够被控制在尽可能靠近植入物和腔之间的界面,从而防止在植入物和组织之间形成退化的界面。体外凝血和血小板聚集试验以及体内试验突出表明,该植入物对止血的控制令人满意。

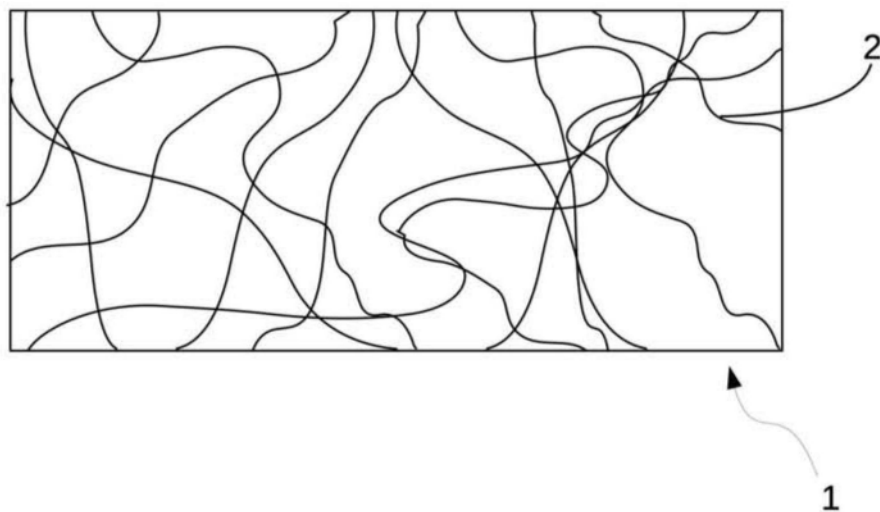


图1

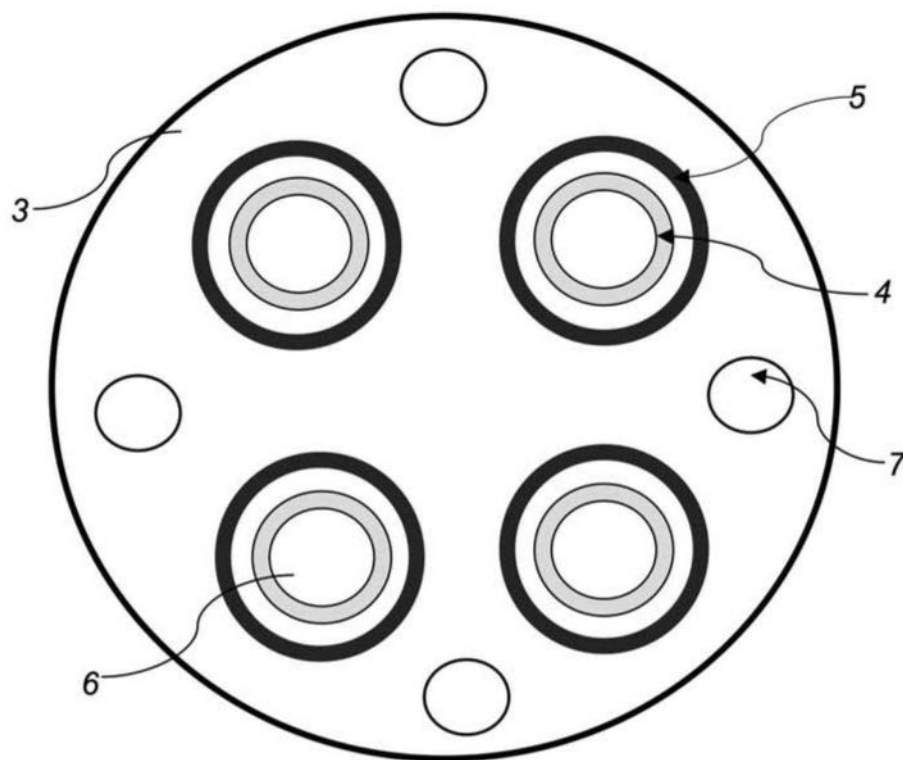


图2