

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12M 3/06 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680031295.2

[43] 公开日 2008 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 101253259A

[22] 申请日 2006.7.20

[21] 申请号 200680031295.2

[30] 优先权

[32] 2005.7.20 [33] US [31] 60/700,860

[32] 2005.9.22 [33] US [31] 60/719,351

[32] 2006.2.3 [33] US [31] 60/764,849

[86] 国际申请 PCT/US2006/028252 2006.7.20

[87] 国际公布 WO2007/012050 英 2007.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2008.2.26

[71] 申请人 苏尔莫迪克斯公司

地址 美国明尼苏达

共同申请人 唐纳森公司

[72] 发明人 M·罗迪赫 T·纳克维

G·欧皮尔曼 丁厚荣

M·S·施德勒

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 袁志明

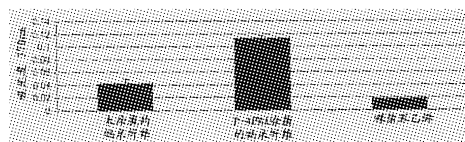
权利要求书 5 页 说明书 46 页 附图 15 页

[54] 发明名称

聚合物涂覆的纳米原纤结构和用于细胞维持和分化的方法

[57] 摘要

本发明提供用于具有纳米原纤结构的物品的细胞-粘附性聚合物涂层。该涂层包含具有至少一种悬垂的胺基团的合成的、非-生物可降解的聚合物，其中所述聚合物经由潜在的反应基团共价固定在所述物品上。本发明还提供用于使用所述聚合物涂覆的纳米原纤结构长期培养细胞的方法。已经发现本发明的聚合物涂覆的纳米原纤结构特别适用于细胞(包括神经前体)的生长和分化。



1. 细胞培养物品，它含有：

(a) 含有纳米纤维的纳米原纤结构，以及

(b) 在所述纳米纤维的至少一部分上形成的涂层，该涂层包含聚合物，该聚合物包含 (i) 至少一种悬垂的含胺基团以及 (ii) 至少一种悬垂的将该聚合物结合至所述纳米纤维上的潜在反应基团。

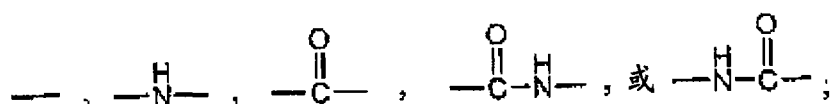
2. 权利要求 1 的细胞培养物品，其中所述的聚合物是非-生物可降解的聚合物。

3. 权利要求 1 的细胞培养物品，其中所述的聚合物是合成的聚合物。

4. 权利要求 3 的细胞培养物品，其中所述悬垂的含胺基团具有式：



其中 R_1 是：



其中 R_2 是 C_1-C_8 直链或支链烷基；并且

其中 R_3 和 R_4 都连接于氮上并且独立地是 H 或 C_1-C_6 直链或支链烷基。

5. 权利要求 4 的细胞培养物品，其中所述悬垂的含胺基团具有式：



R_1 是 $-C(=O)NH-$ ， R_2 是 C_2-C_4 直链或支链烷基；并且 R_3 和 R_4 都连接于氮上并且独立地是 H、 CH_3 或 C_2H_5 。

6. 权利要求 5 的细胞培养物品，其中所述的聚合物包含一种或多种选自 3-氨基丙基甲基丙烯酰胺、3-氨基乙基甲基丙烯酰胺和二甲氨基丙基甲基丙烯酰胺的单体。

7. 权利要求 6 的细胞培养物品，其中所述的聚合物包含 3-氨基丙基甲基丙烯酰胺 (APMA)。

8. 权利要求 4 的细胞培养物品, 其中所述悬垂的含胺基团以所述聚合物的 50% 或更大的摩尔量存在, 该摩尔量是以聚合物中的总单体单元为基础的。

9. 权利要求 1 的细胞培养物品, 其中所述悬垂的潜在反应基团包括光反应基团。

10. 权利要求 9 的细胞培养物品, 其中所述的光反应基团选自苯乙酮、二苯酮、蒽醌、蒽酮和类蒽酮杂环及其被取代的衍生物。

11. 权利要求 10 的细胞培养物品, 其中所述的光反应基团以 0.1% 至 10% 范围内的摩尔量存在, 该摩尔量是以所述聚合物中的总单体单元为基础的。

12. 权利要求 3 的细胞培养物品, 其中所述合成的聚合物具有 20 kDa 至 2000 kDa 范围内的分子量。

13. 权利要求 1 的细胞培养物品, 其中所述的纳米纤维包含非-生物可降解的聚合物。

14. 权利要求 13 的细胞培养物品, 其中所述的纳米纤维包含水溶性或短链醇溶性聚合物。

15. 权利要求 14 的细胞培养物品, 其中所述的纳米纤维包含交联剂。

16. 权利要求 15 的细胞培养物品, 其中所述的纳米纤维由包括通过 UV 处理、加热或它们的组合来活化所述交联剂的步骤的方法形成。

17. 权利要求 13 的细胞培养物品, 其中所述的纳米纤维包含聚酰胺。

18. 权利要求 17 的细胞培养物品, 其中所述的聚酰胺选自尼龙聚合物。

19. 权利要求 18 的细胞培养物品, 其中所述的纳米纤维包含两种或更多种尼龙聚合物的混合物。

20. 权利要求 1 的细胞培养物品, 其中所述纳米纤维的直径在 50 nm 至 1000 nm 的范围内。

21. 权利要求 1 的细胞培养物品, 其中所述的纳米原纤结构包含

所述纳米纤维的网络,所述网络的平均孔径在大约 $0.2\ \mu\text{m}$ 至 $10\ \mu\text{m}$ 的范围内。

22. 权利要求 1 的细胞培养物品,其中所述纳米原纤结构的厚度在 $0.1\ \mu\text{m}$ 至 $10\ \mu\text{m}$ 的范围内。

23. 权利要求 1 的细胞培养物品,其中所述纳米原纤结构的面积在 $1\ \text{mm}^2$ 至 $4\times 10^5\ \text{mm}^2$ 的范围内。

24. 权利要求 1 的细胞培养物品,它进一步包括用于所述纳米原纤结构的支持物。

25. 权利要求 24 的细胞培养物品,其中所述的支持物包含卤化热塑性树脂。

26. 权利要求 25 的细胞培养物品,其中所述的支持物包含三氟氯乙烯。

27. 权利要求 24 的细胞培养物品,其中所述的支持物包含玻璃。

28. 权利要求 24 的细胞培养物品,其中所述的支持物是透明的。

29. 权利要求 24 的细胞培养物品,其中所述的支持物是柔性的。

30. 权利要求 24 的细胞培养物品,其中所述的纳米原纤结构是通过将纳米纤维置于支持物上,然后用热、蒸汽或其组合处理所放置的纳米纤维和支持物来形成的。

31. 权利要求 24 的细胞培养物品,它适合放置在细胞培养容器的细胞培养物表面上。

32. 权利要求 31 的细胞培养物品,其中所述的细胞培养容器选自烧瓶、培养皿和多孔平板。

33. 权利要求 1 的细胞培养物品,它进一步包括与所述基材接触的细胞。

34. 制备细胞培养物品的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 获得包含纳米纤维的纳米原纤结构,其中在纳米纤维的至少一部分上形成涂层,该涂层包含聚合物,该聚合物具有 (i) 至少一种悬垂的含胺基团和 (ii) 至少一种悬垂的将该聚合物结合至纳米纤维的潜在反应基团; 并且

(b) 将该纳米原纤结构提供至细胞培养容器的细胞培养物表面上。

35. 制备细胞培养物品的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 获得包含纳米纤维的纳米原纤结构；

(b) 将涂层组合物放置在纳米纤维的至少一部分上，该涂层组合物包含聚合物，该聚合物具有 (i) 至少一种悬垂的含胺基团和 (ii) 至少一种悬垂的潜在反应基团；并且

(c) 处理所述的涂层组合物以激活该悬垂的潜在反应基团并通过该潜在反应基团使所述聚合物结合至纳米纤维上，从而在纳米纤维上形成涂层。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述的聚合物以 10 $\mu\text{g/mL}$ 至 20 mg/mL 存在于所述涂层组合物中。

37. 权利要求 36 的方法，其中所述悬垂的潜在反应基团是光反应性基团。

38. 权利要求 35 的方法，其中所述的处理步骤包括用在 190 nm 至 360 nm 范围内的 UV 光照射所述的光反应性基团。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述的处理步骤包括用 0.1 mW/cm^2 至 20 mW/cm^2 范围内的剂量的 UV 光照射所述的光反应性基团。

40. 用于培养一种或多种细胞的方法，该方法包括将一种或多种细胞与包含纳米纤维的纳米原纤结构接触，其中所述的纳米纤维包含在所述纳米纤维的至少一部分上形成的涂层，该涂层包含聚合物，该聚合物具有 (i) 至少一种悬垂的含胺基团和 (ii) 至少一种悬垂的将聚合物结合至纳米纤维的潜在反应基团。

41. 权利要求 40 的方法，其中 90 % 的所述细胞附着至涂覆的纳米纤维上。

42. 权利要求 40 的方法，其中将所述的细胞与纳米原纤结构接触 14 天或更长的时间。

43. 权利要求 40 的方法，其中所述的细胞选自哺乳动物细胞、禽类细胞、鱼类细胞、爬行动物细胞、两栖动物细胞和昆虫细胞。

44. 权利要求 40 的方法，其中所述的细胞是体细胞。

45. 权利要求 44 的方法，其中所述的体细胞是干细胞。

46. 权利要求 45 的方法，其中将所述的干细胞维持在未分化的状态持续 1 小时至 60 天的时间。

47. 权利要求 46 的方法，其中在 14 天时所述未分化的细胞的生存力减少不超过 90 %。

48. 权利要求 40 的方法，该方法进一步包括诱导干细胞分化的步骤。

49. 权利要求 40 的方法，其中所述的细胞是神经元前体细胞。

50. 权利要求 49 的方法，其中将所述的神经元前体细胞在足以使神经元前体细胞发育成神经元的条件下与纳米原纤结构接触并且持续足以使神经元前体细胞发育成神经元的时间。

51. 权利要求 49 的方法，其中将所述的神经元前体细胞在足以使神经元前体细胞发育成少突胶质细胞的条件下与纳米原纤结构接触并且持续足以使神经元前体细胞发育成少突胶质细胞的时间。

52. 权利要求 49 的方法，其中将所述的神经元前体细胞在足以使神经元前体细胞发育成星形胶质细胞的条件下与纳米原纤结构接触并且持续足以使神经元前体细胞发育成星形胶质细胞的时间。

53. 权利要求 49 的方法，其中大于 30 % 的神经元前体细胞在 10 天后分化。

54. 产生少突胶质细胞、星形胶质细胞或神经元的方法，该方法包括将选自少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元的前体的细胞与纳米原纤结构接触，该纳米原纤结构包含在纳米原纤结构的至少一部分上形成的涂层，该涂层包含聚合物，该聚合物具有 (i) 至少一种悬垂的含胺基团和 (ii) 至少一种悬垂的将聚合物结合至所述基材的潜在反应基团，其中在足以使所述前体分别发育成少突胶质细胞、星形胶质细胞或神经元的条件下将该前体放置并且持续足以使所述前体分别发育成少突胶质细胞、星形胶质细胞或神经元的时间。

聚合物涂覆的纳米原纤结构和用于细胞维持和分化的方法

相关申请的交叉参考

本非临时申请要求享有 2005 年 7 月 20 日提交的序号为 60/700,860 并且名称为 POLYMERIC COATINGS AND METHODS FOR CELL MAINTENANCE AND DIFFERENTIATION 的美国临时申请、2005 年 9 月 22 日提交的序号为 60/719,351 并且名称为 POLYMER COATED NANOFIBRILLAR STRUCTURES AND METHODS FOR CELL MAINTENANCE AND DIFFERENTIATION 的美国临时申请和 2006 年 2 月 3 日提交的序号为 60/764,849 并且标题为 POLYMER COATED NANOFIBRILLAR STRUCTURES AND METHODS FOR CELL MAINTENANCE AND DIFFERENTIATION 的美国临时申请的权益。

技术领域

本发明涉及具有涂层的纳米原纤 (nanofibrillar) 结构和用于促进细胞在包括这些涂层的表面上粘附的方法, 所述的涂层包括存在非-生物可降解的胺的聚合物。本发明也涉及分化细胞的方法以及在具有这些涂层的表面上维持细胞的方法。

背景技术

多种方法已经用于提供适合细胞附着和生长的表面。许多细胞是贴壁依赖性的, 这意味着它们必须表现对基材的一些类型的附着以便增殖或分化。在体内, 细胞可以附着至基膜中存在的蛋白因子, 基膜是支持上面的上皮或内皮的结构。基膜由称为基板的膜和下面的胶原原纤维的网络组成。由于其给细胞附着和生长提供优良的基材的能力, 已经制造了基于基膜中发现的成分的用于细胞附着的人造表面。这种

人造表面已经用于体内（例如可移植的医疗器械）和体外（例如细胞培养物品）中。

已经将带电荷的表面用于促进细胞粘附于基材上。然而，不是所有带电荷的表面适合细胞在培养过程中充分附着。例如，一些带负电荷的表面不提供合适的基材，因为许多细胞不产生足够量的带正电荷的蛋白质来介导细胞附着至该表面。

天然的基于多肽的细胞附着因子例如胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白已经用于增强细胞附着至基材上。已经将生物可降解的合成的多聚阳离子例如多聚赖氨酸和多聚鸟氨酸用于提供促进多种贴壁依赖性细胞类型的附着的涂层。使用这些类型的聚合材料的一个问题是：在一段时间后，它们可以被可能会出现在培养物的液体培养基中的或存在于体内血清中的蛋白酶降解。因此，含有这些物质的表面仅在一段有限的时期内可用于细胞附着。与细胞粘附相关的性质可能由于存在于涂层内的所述物质的降解而受到损害。

此外，用于促进细胞附着的一些涂层也可能由于这样的观点而有问题：如果涂层材料没有正确附着在物品表面，涂层材料则可能从涂层上脱落。然后这些材料可能会出现于液体培养基或体液中并影响与之发生接触的细胞。例如，从涂层脱落的聚合材料可以结合细胞的表面并影响细胞附着至基材或可以影响培养物中的细胞-细胞相互作用。一些聚合材料也可能对细胞生存力是有害的。

因此，需要提供改良的聚合物涂层给用于涉及培养细胞的过程的物品。这种改良的涂层可以提供有用的细胞培养物品，该物品将有益于涉及原代细胞、难以培养的细胞系和干细胞的维持和分化的过程。这种涂层也可以用于涂覆用于体内使用的可移植的医疗物品的表面。因此，这将有益于用于治疗各种疾病和病况的组织特异性再生的技术。

发明内容

发明概述

一方面，本发明提供用于细胞培养物品的涂层，该细胞培养物品

可用于用来培养细胞的方法，特别是用来在培养物中保持细胞一段长的时期（长期培养）的方法。培养，如在此使用的，指涉及将代谢活性细胞置于细胞培养物品中的过程，该细胞培养物品包括具有聚合物涂层的纳米原纤结构。已经显示本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构提供了用于长期细胞培养的理想表面（因为该聚合物涂层的稳定性）、用于细胞附着的优质表面和用于培养多种多样的细胞类型的广泛适用性。

纳米原纤结构指纳米纤维的网格状网络，纳米纤维是平均直径为约 1000nm 或更小，例如范围为约 1 nm 至约 1000 nm，并且更优选范围为约 50 nm 至约 1000 nm 的纤维结构。在一些方面，纳米原纤结构通过包括聚合物溶液的电纺丝（electrospinning）的方法形成。在一些方面，纳米原纤结构包括聚酰胺、聚酯、类似的合成聚合物或它们的组合。在一些方面，聚酰胺选自尼龙聚合物。然而在其它方面，纳米纤维通过包括水溶性或醇溶性尼龙聚合物的交联的方法来形成以提供水不溶的或醇不溶的纳米纤维。

在许多方面，纳米原纤结构与另一细胞培养物品一起使用。可以改变所述纳米原纤结构或使之成形用来置于细胞培养物表面，例如细胞培养容器的表面上。细胞培养容器的实例包括多孔平板、培养皿和烧瓶。因此，可以获得适合放置进培养容器内，例如细胞培养孔内的形状的纳米原纤结构，并可以在孔的表面（例如底部）具有该纳米原纤结构的细胞培养孔中进行细胞培养过程。

细胞可以在聚合物-涂覆的纳米原纤结构上、在液体培养基中培养，以提供期望的代谢活性细胞状态。该聚合物-涂覆的纳米原纤结构可以用于促进一种或多种代谢活性细胞状态，包括其中细胞是休眠的状态（非增殖和非分化状态）、细胞增殖状态和细胞分化状态。

在本发明的另一方面，在包含纳米原纤结构的可移植的医疗器械上提供所述的涂层。在某些方面，类似于体外提供的涂层的功能，可以将该涂层用于这些表面上以促进细胞附着。这可用于许多应用，包括促进组织形成、上皮形成和血管发生。

本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构包括具有悬垂的胺基团的非-生物可降解的聚合物，其中所述涂层还包括一种或多种潜在的反应基团。在该涂层中，至少一部分潜在的反应基团发生反应将该聚合物共价结合至纳米原纤结构的表面上。

在涂层中，可以在所述聚合物上提供潜在反应基团作为悬垂的潜在反应基团。备选地，悬垂的潜在反应基团可以包括于化合物（例如交联剂）上，独立于所述的聚合物，并然后用于将该聚合物连接至该纳米原纤结构的表面上。

潜在反应基团指响应特异性施加的外部刺激而经历活性物产生，随之共价结合至靶标上的基团。该潜在反应基团一旦吸收外部电磁或动（热）能则产生活性物例如自由基、氮烯、碳烯和酮的激发态。在一方面，该潜在反应基团是可以被激活至活性状态来提供所述聚合物和细胞培养物品的表面之间的键合的光反应性基团。示例性的光反应性基团包括芳基酮，例如苯乙酮、二苯酮、蒽醌、蒽酮和类蒽酮杂环（例如，蒽酮的杂环类似物例如在 10-位上具有氮、氧或硫的那些）或它们的被取代（例如环取代的）衍生物。

据信，经由所述悬垂的潜在反应基团的结合提供了其中所述聚合物在纳米原纤表面上最佳成形而促进细胞附着的涂层。

该纳米纤维上的聚合物涂层提供了促进细胞附着至该纳米原纤结构的胺基。在本发明的一些方面，本发明的聚合物包括悬垂的含胺基的基团，该基团具有以下通式：



其中 R_1 是：



其中 R_2 是 C_1 - C_8 直链或支链烷基；并且

其中 R_3 和 R_4 都连接于氮上并且独立地是 H 或 C_1 - C_6 直链或支链烷基。

在一些方面， R_1 是 $—\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}—NH—$ ， R_2 是 C_2 - C_4 直链或支链烷基；并且

R_3 和 R_4 都连接于氮上并且独立地是 H 或 CH_3 或 C_2H_5 。

示例性的含胺的基团包括发现于可聚合的单体，例如 3-氨基丙基甲基丙烯酰胺 (APMA)、3-氨基乙基甲基丙烯酰胺 (AEMA) 和二甲基氨基丙基甲基丙烯酰胺 (DMAPMA) 上的那些。在一些方面，包括悬垂的胺基团和潜在反应基团的聚合物可以通过将具有如上定义的基团- $R_1R_2NR_3R_4$ 的单体与携带潜在反应基团的共聚用单体共聚合而形成。在其它方面，聚合物可以通过聚合具有式 $R_1R_2NR_3R_4$ 的单体并然后让一种或多种悬垂的胺基与具有潜在反应基团的化合物反应而形成。

在另外的方面，所述具有悬垂的胺基团的聚合物选自聚乙烯亚胺 (PEI)、聚丙烯亚胺 (PPI) 和聚酰胺胺。PEI 可以通过聚合乙烯亚胺而形成；任选地，可以将具有可聚合基团和潜在反应基团的单体与乙烯亚胺共聚合而形成具有悬垂的潜在反应基团。在一个特定的方面，所述聚合物包括具有一种或多种潜在的光反应性基团的聚乙烯亚胺。

包括具有至少一种悬垂的胺和至少一个潜在反应基团的聚合物的涂层可用任何合适的方法在纳米原纤结构的表面上形成。一种用于形成所述涂层的方法包括将预先形成的聚合物配置于纳米原纤表面上，然后激活所述的潜在反应基团以使该聚合物结合至该表面。在一些方面，所述潜在反应基团可以是所述聚合物上悬垂的。在另外的方面，潜在反应基团可以独立于所述聚合物。备选地，单体材料可以在纳米原纤表面聚合以形成具有悬垂的胺和一种或多种潜在反应基团的聚合物，所述潜在反应基团使聚合物偶联至该表面。

已经显示本发明的聚合物涂层可用于制备包括纳米原纤结构的细胞培养物品。所述纳米原纤结构可以与细胞培养物品，包括多孔细胞培养板、细胞培养皿、细胞培养袋、细胞培养管、微载体和细胞培养瓶结合。

纳米原纤结构可制造成具有最适宜细胞培养过程的一个或多个方面的尺寸，如基于例如要培养的特殊细胞类型、要培养的细胞的数量、培养的时间长度，以及与经涂覆的纳米原纤结构结合使用的任意任选

的细胞培养器。在一些方面，纳米原纤结构具有适合与多孔细胞培养器结合使用的面积和深度。例如，可以使在支持物上形成的聚合物涂覆的纳米原纤结构成形来适合在多孔培养器的孔内。纳米原纤结构的深度可以改变，但已经发现范围约 $0.1\ \mu\text{m}$ - $10\ \mu\text{m}$ 的深度和范围约 $1\ \mu\text{m}$ -约 $5\ \mu\text{m}$ 的深度可以为细胞培养提供特别有效的基材。

也可以设计纳米原纤结构来提供在纳米纤维之间具有期望间隔的网状纳米纤维，该间隔类似于该结构中的孔。在许多方面，纳米纤维连接网络在纤维之间具有相对小的间隔例如约 0.01 微米至约 25 微米，并且在一些情形中约 0.2 微米至约 10 微米的间隔。

三维的基于纳米纤维的细胞培养物品的涂覆表面可以类似于细胞可附着至其上的支架。取决于在纳米原纤结构上培养的细胞的类型和纳米纤维之间的间隔，可以二维或三维地培养细胞。在二维培养过程中，细胞可附着至通常在一个平面内的经涂覆的纳米纤维，而在三维培养过程中，细胞可以附着至纳米纤维网络内的不止一个平面内的纳米纤维。

纳米原纤结构可以以适合用于细胞培养过程的形式提供。在一些方面，纳米原纤结构在支持物上提供。所述支持物可选自玻璃基材，例如玻璃显微镜载玻片、玻璃盖玻片、微球体和玻璃薄膜；聚合物基材例如聚合物膜；以及适合用于细胞培养的其他生物材料基材。支持物可以具有一些可用于制备和/或使用细胞培养装置的特性。在一些特定的方面，支持物具有一种或多种特性例如可操纵性和/或柔性、对灭菌的抗性、对通过辐射降解的抗性、化学惰性、透明性、不可燃性和光滑表面性质。在一些特定的方面，支持物包括卤化的热塑性树脂，例如卤化的氟化-氯化树脂。特别地，支持物可以包括三氟氯乙烯（CTFE）。在其他的特定方面，支持物是约 $0.25\ \text{mm}$ 或更小。

基于在此描述的发明发现，用于制备细胞培养物品和在用于培养细胞的方法中的许多优势已经变得显而易见。

首先，包含具有悬垂的胺基团和潜在反应基团的聚合物的涂层的使用提供了非常有效且有效率的提供粘附表面（即，如与细胞粘附有

关的)给纳米原纤结构的方法。在许多情形中,可将包含该聚合物的液体组合物施加至纳米原纤结构并随后处理,从而在液体组合物接触的一些或所有纳米纤维上形成聚合材料的涂层。在一些情形中,聚合材料的涂层在纳米原纤结构的一部分(例如在培养过程中细胞接触的部分)上形成。这可以提供经济优势,因为用于形成纳米纤维的物质的添加剂不是必需需要的。

在此描述的涂层组合物和方法也可以提供粘附表面而不损害由纳米纤维提供的整体结构的表面状况。据认为本发明的方法在纳米纤维的表面上提供非常薄,然而却非常有效的聚合物涂覆的层。也就是说,聚合物涂层在单独的纳米纤维周围形成,而不是在纳米原纤结构的总的表面上形成。传统的聚合物涂覆方法(例如其中将聚合物在基材上弄干的那些方法)可导致涂层丝网般密布于表面并改变纳米纤维表面的表面状况。然而,本发明的聚合物涂层非常薄并且与纳米原纤结构的纳米纤维的尺寸成比例。

包含具有含悬垂的胺基团的聚合物的涂层的纳米原纤结构能够在培养过程中促进细胞的优良粘附。这使得表现出一些程度的贴壁依赖性的细胞能附着至涂层并取决于培养的细胞的类型和细胞在其中培养的培养基的类型,显示出一种或多种代谢活性。聚合物-涂覆的纳米原纤结构因而特别可用于培养非粘附性的、弱粘附性的或中度粘附性的细胞。本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构也特别可用于提供允许细胞增殖和分化的涂层。

本发明提供了非常稳定和有效的用于细胞培养过程的聚合物-涂覆的纳米原纤结构。因而,本发明的这些结构可特别用于涉及细胞的长期培养的过程。

在这些方面,已经发现本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构是特别有利的,因为存在胺的聚合物在存在培养基时不会降解并从而可用于在相当长的时期内促进培养物中细胞的粘附。这是与主要由可降解的天然聚合物例如多肽和多糖,以及生物可降解的合成聚合物组成的涂层形成比较。这些类型的生物可降解的涂层可在更短的时期(例如,

两周)内降解并丧失它们促进培养物中细胞粘附的能力。

另外,由于本发明的聚合物是共价地结合至纳米原纤结构的纳米纤维的表面,所以存在胺的聚合物从该表面最小脱落或不脱落。这在许多方面是有利的。首先,因为在培养期间,细胞变成或保持附着至纳米原纤表面的潜能将不会改变。也就是说,附着至纳米原纤表面的存在胺的聚合物的量将不会随时间过去而显著改变。其次,存在最小的所述存在胺的聚合物脱落进入培养物中的风险。这也是有利的,因为聚合物脱落进培养物中可能以其它方式改变细胞的特性。例如,细胞可能变成非粘附性的,或者可能会丧失由细胞表面上的蛋白质传达的其他特性。此外,在一些情形中,特殊类型的聚合物从涂覆的表面脱落进入培养基中可能对细胞具有毒性效应。例如,已经报道了在细胞外加入聚乙烯亚胺时,在不同培养系统中一些分子量为 25 kDa 和更大的 PEI 的毒性效应 (Fischer 等(1998) Eur, J. Cell Biol. 48, 108; Fischer 等(1999) Pharm. Res. 16, 1723-1729)。因此,本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构克服了发现于在现有技术中传统上用于促进细胞附着和培养的涂覆的基材中的一些缺点。

虽然在聚合物-涂覆的纳米原纤结构上的本发明涂层包含存在非-生物可降解的胺的聚合物,但其他非-生物可降解的或可降解的材料,例如生物可降解的聚合物或生物活性分子也可存在于该涂层中。例如,尽管生物可降解的聚合物可以存在于涂层中并在较短的时期内为培养细胞提供有利条件,而非-生物可降解的聚合物继续存在于涂层中并在延长的培养时期内提供粘附表面。

在一些方面,本发明提供了用于在聚合物-涂覆的纳米原纤结构上培养细胞的方法。该方法包括获得纳米原纤结构的步骤,该纳米原纤结构具有包含非-生物可降解的合成聚合物的涂层,所述的合成聚合物具有至少一个悬垂的胺基和至少一个将该化合物连接至所述物品表面的潜在的反应基团。然后将细胞置于与聚合物-涂覆的纳米原纤结构接触,通常是在环境(液体培养基)中。所述细胞能够粘附至纳米原纤细胞培养物品上的涂层,这样该细胞可以维持在期望的生理状态下或

者可以经诱导而具有期望的生理状态。

在一些方面，所述方法包括将细胞培养在液体培养基中一段长的时间。该段长的时间通常指长于14天的一段时间。当指明时，所述的一段长的时间可以长于21天、长于28天、长于35天、长于42天、长于49天或长于56天。因而在一些方面，细胞也可保持在培养基中约14-约60天的时限。本发明的一个明显优势是，不必将细胞转移至新的具有能促进细胞粘附的新鲜涂层的纳米原纤培养物品。然而，在长期培养过程中，可例如通过置换或通过补充来改变液体培养基，以提供适合达到期望的生理状态的环境。

在一些方面，在一段时期的培养过程内，所述方法可用于让细胞维持在低代谢活性的状态（例如，维持休眠的细胞）下。也就是说，在一些方面，可以让细胞在合适的培养基中维持在聚合物-涂覆的纳米原纤结构上而不会促进细胞的代谢改变，例如可以改变细胞形态的代谢改变。该方法也可用于维持细胞，并且可以包括通过无增殖来扩展细胞群体。可以用本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构在细胞培养物中维持的示例性细胞类型包括未分化细胞，例如干细胞，或者部分或完全分化的细胞类型，例如肝细胞、胰岛细胞、神经元和星形胶质细胞。未分化细胞可包括多能性、全能性或多潜能性细胞类型。

在这方面，所述的聚合物-涂覆的纳米原纤结构是特别有用的，因为它们可用于长期维持细胞而在一段时间内不需要置换所述的涂覆的物品。

在其他方面，在一段时期的培养过程内，聚合物-涂覆的纳米原纤结构可用于促进细胞分化的方法中。可以使用任意适合的分化前的细胞或祖细胞类型。该方法可包括以下步骤：获得聚合物-涂覆的纳米原纤结构并随后将分化前的细胞置于该结构上，其中所述细胞粘附至该涂覆的结构上。该方法还包括在存在环境（液体培养基）时培养细胞的步骤，所述环境包含可改变细胞的代谢活性，导致一个或多个细胞方面的改变，例如细胞形态学的改变的成分。该成分可以是分化因子，其指任何类型的促进分化前的细胞成熟进入部分或完全分化状态的成

分。该方法然后包括使与该纳米原纤的涂覆表面接触的细胞分化的步骤。在一些方面，细胞在聚合物-涂覆的纳米原纤结构上分化长于 14 天、长于 21 天、长于 28 天、长于 35 天、长于 42 天、长于 49 天或长于 56 天的一段时期。在一些方面，取决于初始的细胞接种密度，细胞可以分化约 14-约 60 天范围的一段时间。在长期培养过程中，可例如通过置换或通过补充来改变液体培养基，以提供适合达到期望的生理状态的环境。

可根据本发明分化的示例性细胞类型包括原代细胞、神经前体、骨髓细胞、干细胞，如胚胎（胚泡衍生的）干细胞等。

在一些方面，该方法用于促进神经前体细胞成熟为期望的分化的神经元细胞类型。已经显示本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构促进神经前体细胞的附着，所述细胞随后可在存在一种或多种期望的分化因子时培养一段长的时间。已经显示聚合物-涂覆的纳米原纤结构促进轴突向外生长和/或延伸，而在相同的培养基条件下在传统涂覆的物品上培养的神经前体未能存活。聚合物-涂覆的纳米原纤结构也促进一亚组在涂覆的纳米纤维上生长的神经元细胞中出现成熟神经元的标记物。本发明的聚合物-涂覆的纳米原纤结构也已经显示促进神经前体形成星形胶质细胞。

附图说明

图 1 是显示在多种光-聚合物涂覆的和未涂覆的平表面上 PC12 细胞附着的结果的图。

图 2 是显示在光-聚合物涂覆的和未涂覆的纳米纤维结构上 PC12 细胞附着的结果的图。

图 3 是在光-聚（APMA）-涂覆的纳米纤维（3A）和未涂覆的纳米纤维（3B）上生长的 PC12 细胞的明视场显微图像。

图 4 是在光-聚（APMA）-涂覆的纳米纤维上生长了 24 小时的鬼笔环肽染色的 PC12 细胞的荧光显微图像。

图 5 是显示在多种光-聚合物涂覆的和未涂覆的平表面上 HFF 细

胞附着的结果的图。

图 6 分别是在光-聚 (APMA) -涂覆的纳米纤维 (A) 和未涂覆的纳米纤维 (B) 上生长的 PC12 细胞中的 BrdU 掺入的荧光显微图像, 以及这些细胞 (A') 和 (B') 的 DAPI 染色的荧光显微图像。

图 7 是在多种光-聚合物涂覆的和未涂覆的平的聚苯乙烯表面上生长的 β -III 微管蛋白-染色的 PC12 细胞的荧光显微图像。

图 8 是在多种光-聚合物涂覆的和未涂覆的平的纳米纤维表面上生长的 β -III 微管蛋白-染色的 PC12 细胞的荧光显微图像。

图 9 是在光-聚 (APMA) -涂覆的纳米纤维上相比其他可商业获得的细胞基材上生长的 β -III 微管蛋白-染色的 PC12 细胞的荧光显微图像。

图 10 是在光-聚 (APMA) -涂覆的纳米纤维上生长的巢蛋白/BrdU 染色的 ES-D3 细胞的荧光显微图像。

图 11 是证明在光聚 (APMA) -涂覆的纳米纤维和未涂覆的纳米纤维上生长的 β III 微管蛋白-染色的 ES-D3 的神经突形态学的荧光显微图像。该图像显示 ES-D3 细胞分化进入产生与在未涂覆的纳米纤维上生长的神经元比较具有更长神经突的神经元的突起, 而在未涂覆的纳米纤维上所述突起短而粗。

图 12 是在光聚 (APMA) -涂覆的纳米纤维和未涂覆的纳米纤维上生长的 GFAP-染色的 ES-D3 的荧光显微图像。

图 13 是证明在光-聚 (APMA) -涂覆的纳米纤维上生长并分化了 30 天的 β -III 微管蛋白-染色的 PC12 细胞的伸展神经轴突形态学的荧光显微图像。

图 14 是证明 β -III 微管蛋白-染色的阳性神经元 (A) 和神经丝-染色的神经元的荧光显微图像, 后者是一亚组 β -III 微管蛋白-染色的阳性神经元。

图 15 是显示 GFAP⁺-染色的 I 型和 II 型星形胶质细胞的荧光显微图像。

发明详述

下面描述的本发明实施方案无意于是穷尽的或限制本发明于下面详述中公开的确切形式。而是，选择并描述实施方案以便本领域中的其他技术人员能了解并理解本发明的原理和实践。

在这里提及的所有出版物和专利都因此通过引入作为参考。这里公开的出版物和专利仅因为它们的内容而提供。在此任何信息都不应该解释为承认本发明人没有权利将任意出版物和/或专利，包括在此引用的任何出版物和/或专利的日期提前。

在一些方面，本发明提供了用于提供涂层给纳米原纤结构的纳米纤维的表面的试剂和方法，该涂层包括具有至少一种悬垂的胺基团和至少一个潜在的反应基团的聚合材料，其中该聚合物上的至少一个潜在的反应基团用于将该聚合物连接至纳米原纤结构的纳米纤维的表面。

“细胞培养物品”指细胞培养器的任何部分。例如，细胞培养物品可以是具有纳米原纤结构的物品。细胞培养物品也可以是用于细胞培养过程的容器，例如细胞培养瓶。在一些情形中，两种或更多种细胞培养物品（例如纳米原纤结构和细胞培养容器）形成细胞培养器；在另外的情形中，单个细胞培养物品例如纳米原纤结构构成细胞培养器。

“纳米原纤结构”指纳米纤维的网格状网络。纳米原纤结构可以是细胞培养物品并且可以包含于任意类型的、在其中细胞附着是期望的，或者细胞培养过程在那里进行的细胞培养器中。在许多情形中，包括纳米纤维网络的物品包括纳米纤维网络加上一种或多种其他非-纳米纤维材料。例如，纳米原纤结构可以包括在支持物上的纳米纤维网络，其中该支持物由不同于纳米纤维的材料制造。纳米原纤结构也可以与不用于体外细胞培养过程的物品一起使用。

可以将纳米原纤结构置于另一种细胞培养物品，例如细胞培养容器的表面上。在许多方面，纳米原纤结构可以“适应于插入”另一种物品中。这意味着可以加工或制造纳米原纤结构以用于另一种物品（例如细胞培养容器）的一个或多个表面的维度中或之上。可以通过例如

将纳米原纤结构裁减至特定尺寸来设定纳米原纤结构的尺寸以用于培养容器的表面的维度中或之上，例如从相连结的片、辊或垫切下一片纳米原纤结构达到适合用于插入至培养容器的表面上的尺寸。

“细胞培养容器”是细胞培养物品的一个实例并且，如在此使用的，表示可以与纳米原纤结构结合并且可容纳用于培养细胞或组织的培养基的容器。细胞培养容器可以是玻璃或塑料的。优选地，塑料是非细胞毒性的。示例性的细胞培养容器包括，但不限于单孔平板和多孔平板（包括6孔和12孔培养板，以及更小孔的培养板如96、384和1536孔平板）、培养罐、培养皿、平皿、培养烧瓶、培养板、培养滚瓶、培养载玻片（包括分室的和多室的培养载玻片）、培养管、盖玻片、培养杯、转瓶、灌流室、生物反应器和发酵罐。

纳米原纤结构可以是“垫”的形式，如在此使用的，其表示密集交织的、缠结的或粘附的纳米纤维块。纳米纤维在垫子中的分布可以是无规则的或定向的。垫可以非编织的或网状的。垫可以或可以不安置在支持物上。垫具有约100 nm至约10,000 nm，或约1000 nm至约5000 nm的厚度。

本发明的聚合物涂层可以在纳米原纤结构的任何类型的合适纳米纤维上形成。在一些方面，期望提供具有纳米原纤结构的细胞培养物品，所述纳米原纤结构提供足以用于一种或多种细胞类型的生长和分化的表面。理想地这种物品具有支持正在分化的细胞的特殊形态学的表面。例如，在神经前体分化的情形中，纳米原纤表面使得能形成大于10 μm 或大于200 μm 的神经细胞的神经突或其他特征。

取决于制造方法和培养的细胞的类型，细胞可以在纳米原纤结构的一个平面或多于一个平面上生长。一般而言，包括纳米原纤结构的细胞培养物品的涂覆的表面类似于细胞可以附着至其上的支架。

聚合物涂层可以在纳米原纤结构的纳米纤维上形成，其中纳米纤维可以用广泛多种材料制造。用于形成纳米原纤结构的材料在这里称为“纳米纤维材料”，而用于在纳米纤维上形成聚合物涂层的材料在这里称为“涂层材料”。

示例性的纳米原纤结构在美国专利公开号 2005/0095695A1 中有描述。

纳米原纤结构提供了包含一种或多种纳米纤维的用于培养代谢活性细胞的环境，其中该结构由一种或多种纳米纤维的网络确定。在一些实施方案中，纳米原纤结构包含基材，其中该纳米原纤结构由沉积在该基材表面上的一种或多种纳米纤维的网络确定。设计该纳米原纤结构的纳米形貌、纳米纤维网络的形貌和纳米纤维网络的纳米纤维在空间中的排列，以提供组织相兼容的体外仿生基材用于促进单层或多层细胞培养物中的同型或异型的细胞生长和/或细胞分化。可以使纳米原纤结构分层以形成多层的纳米纤维集合、细胞阵列或组织结构。

如在此使用的，术语“网络”表示纳米纤维在空间中的无规则或定向分布，控制该分布以形成在选择用以促进生长和培养稳定性的纤维之间具有间隔的交互连接的网络。该网络在纤维之间具有小的间隔，其包括网络中的形成网络的孔隙或通道。孔隙或通道具有约 0.01 微米至约 25 微米，并且更典型地约 0.2 微米至约 10 微米，穿过厚度的直径。有利地是，在纳米纤维上形成的聚合物涂层不会显著减少孔隙或通道的直径。

网络可以包含纳米纤维的单层（由连续的纳米纤维形成的单层）、纳米纤维的多层（由连续的纳米纤维形成的多层）或垫。网络可以是非编织的或网状的。网络可具有大约单个纳米纤维的直径至约 10 μm 的厚度。包括，但不限于纹理、糙度、粘着性、孔隙度、坚硬度、弹性、几何形状、互连性（interconnectivity）、表面与体积比、纤维直径、纤维溶解性/不溶解性、亲水性/疏水性、纤维密度和纤维定向的网络的物理性质可以设计成期望的参数。有利地是，本发明的聚合物涂层可以在纳米纤维上形成而不会显著改变由纳米纤维网络提供的有利特性。例如，聚合物涂层不会以如其减少它作为仿生基材的作用的方式来改变纳米原纤结构的结构特征。

如在此使用的，术语“纳米纤维”意指直径约 1000 纳米或更小的聚合物细纤维。

在制备纳米原纤结构中许多聚合物材料可以用作纳米纤维材料。纳米纤维材料可包括加聚物和缩聚物材料两者例如聚烯烃、聚缩醛、聚酰胺、聚酯、纤维素醚和酯、聚硫化亚烃、聚芳撑氧、聚砜、修饰的聚砜聚合物及其混合物。在这些通用类型范围内的示例性材料包括聚乙烯、聚(ϵ -己内酯)、聚(乳酸酯)、聚(甘醇酸酯)、聚丙烯、聚(氯乙炔)、聚甲基丙烯酸甲酯(和其他丙烯酸树脂)、聚苯乙烯及其共聚物(包括 ABA 型嵌段共聚物)、聚(偏二氟乙炔)、聚(偏二氯乙炔)、交联和非交联形式的不同水解程度(87 %至 99.5 %)的聚乙烯醇。示例性的加聚物倾向于是玻璃状的(T_g 大于室温)。聚氯乙炔和聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯聚合物组合物或合金是这样的情况,或聚偏二氟乙炔和聚乙烯醇材料的结晶度低。

在本发明的一些实施方案中,纳米纤维材料是聚酰胺缩聚物。在更特别的实施方案中,聚酰胺缩聚物是尼龙聚合物。术语“尼龙”是所有长链的合成聚酰胺的通用名。典型地,尼龙命名法包含一系列数字例如在尼龙-6,6 中,其表示原料为 C_6 二胺和 C_6 二酸(第一个数字表示 C_6 二胺而第二个数字表示 C_6 二羧酸化合物)。另一种尼龙可通过在存在少量水时使 ϵ 己内酰胺缩聚制得。该反应生成尼龙-6(由环内酰胺-也称为 ϵ -氨基己酸制成),其为线性聚酰胺。此外,也可考虑尼龙共聚物。共聚物可通过这样制得:将多种二胺化合物、多种二酸化合物和多种环内酰胺结构合并于反应混合物中,并然后形成在聚酰胺结构中具有随机定位的单体材料的尼龙。例如,尼龙 6,6-6,10 材料是由六亚甲基二胺和 C_6 及 C_{10} 二酸掺合物制成的尼龙。尼龙 6-6,6-6,10 是通过使 ϵ -氨基己酸、六亚甲基二胺和 C_6 及 C_{10} 二酸材料的掺合物共聚而制成的尼龙。

嵌段共聚物也可用作纳米纤维材料。在制备用于制备纳米纤维的组合物中,可选择溶剂系统,这样两种单元在溶剂中都是可溶解的。一个实例是二氯甲烷溶剂中的 ABA(苯乙烯-EP-苯乙烯)或 AB(苯乙烯-EP)聚合物。这种嵌段共聚物的实例是 KratonTM 型的 AB 和 ABA 嵌段聚合物,包括苯乙烯/丁二烯和苯乙烯/氢化丁二烯(乙烯丙烯)、

Pebax™ 型的 ϵ 己内酰胺/环氧乙烷、Sympatex™ 聚酯/环氧乙烷以及环氧乙烷和异氰酸酯的聚氨酯。

加聚物例如聚偏二氟乙烯、间规聚苯乙烯、偏二氟乙烯和六氟丙烯的共聚物、聚乙烯醇、聚乙烯乙酸酯、非晶型加聚物例如聚(丙烯腈)和它与丙烯酸和甲基丙烯酸酯的共聚物、聚苯乙烯、聚(氯乙烯)及其各种共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)以及其各种共聚物可以相对容易地成为溶液纺丝, 因为它们在低的压力和温度下是可溶解的。如果它们要为溶液纺丝, 高度结晶的聚合物像聚乙烯和聚丙烯通常需要较高的温度和高压溶剂。静电溶液纺丝是一种产生纳米纤维和微纤维的方法。

纳米纤维也可以由含有聚合物混合物、合金形式或在交联的化学键合结构中的两种或更多种聚合材料的聚合组合物形成。这种聚合物组合物可通过改变聚合物的特性, 例如改良聚合物链柔性或链移动性、增加总的分子量和通过形成聚合材料的网络提供加固来改变物理特性。

可以将两种相关的聚合物材料掺合以提供具有有利特性的纳米纤维。例如, 可以将高分子量的聚氯乙烯与低分子量的聚氯乙烯掺合。类似地, 可以将高分子量的尼龙材料与低分子量的尼龙材料混合。此外, 可以将普通的聚合物属的不同种类掺合。例如, 可以将高分子量的苯乙烯材料与低分子量的、高抗冲聚苯乙烯掺合。尼龙-6 材料可以与尼龙共聚物例如尼龙-6; 6,6; 6,10 共聚物掺合。此外, 具有低水解程度的聚乙烯醇例如 87 % 水解的聚乙烯醇可以与水解程度在 98-99.9 % 之间和更高的完全或过水解的聚乙烯醇掺合。混合物中的所有这些材料可以用合适的交联机制交联。尼龙可以用与酰胺键中的氮原子反应的交联剂交联。聚乙烯醇材料可以用羟基反应性物质例如单醛, 如甲醛、脲、密胺甲醛树脂及其类似物、硼酸和其他的无机化合物、二醛、二酸、尿烷、环氧类(epoxies)以及其他已知的交联剂交联。交联试剂反应并在聚合物链之间形成共价键以相当地提高分子量、耐化学性、总强度和对机械降解的抗性。

电纺丝产生直径可以不同(通常约 5 nm 至约 1000 nm)的纳米纤

维群体。

纳米纤维可以通过用电场控制聚合物的形成和沉积的电纺丝方法产生。注入具有电势的聚合物溶液。电势引起电荷不平衡，导致聚合物溶液流从发射器（例如针）的尖端处喷出。电场内的聚合体喷射流集中到接地的基材上，在这段时间过程中溶剂蒸发并形成纤维。产生的单一的连续细丝作为无纺织物聚集在支持物上。用于产生纳米纤维的电纺丝方法已经在美国专利 No.4,650,506 (Barris)和 6,743,273 (Chung 等) 中描述。

可以产生具有随机或指定方向的电纺制纳米纤维网络。可以将无规则的纤维装配成分层的表面。在一些实施方案中，本发明的纳米纤维包含随机分布的细纤维，其可以键合形成连结网络。纳米纤维连结网络在纤维之间具有相对小的间隔。纤维之间的这种间隔通常约 0.01-约 25 微米，优选约 2-约 10 微米的范围。这种间隔在纳米纤维网络中形成孔隙或通道，使得离子、代谢物、蛋白质和/或生物活性分子能扩散和/或使得细胞能穿透和渗透网络并在促进细胞和纳米纤维之间多点附着的环境中生长。

纳米纤维网络也可以以定向方式被电纺制。这种定向的电纺丝使得能制造包含纳米纤维单层或由连续的纳米纤维形成的单层的纳米纤维网络，其中该网络具有单个纳米纤维的直径的高度。单层网络的物理性质包括孔隙度、坚硬度、纤维密度、纹理、糙度和纤维取向可以通过在电纺丝过程中控制纳米纤维在支持物上的方向和/或取向来选择。优选地，孔的大小使得细胞能穿透和/或迁移通过单层纳米纤维网络。在一个实施方案中，纤维之间的间隔是约 0.01-约 25 微米。在另一个实施方案中，纤维之间的间隔是约 2-约 10 微米。

纳米纤维可任选包括其他材料。

在一些方面，纳米纤维可通过将聚合材料与添加剂组合物组合形成。添加剂组合物可以影响聚合物的堆积，这样聚合物的电纺丝导致产生与由不含添加剂的聚合物溶液电纺制的纳米纤维群比较具有更大数量或百分比的细纤维的纳米纤维群。在一个实施方案中，聚合物溶

液含有约 0.25 %至约 15 % w/w 的添加剂组合物。在另一实施方案中, 聚合物溶液含有约 1 %至约 10 % w/w 的添加剂组合物。在一些实施方案中, 影响聚合物堆积的添加剂组合物包括生物活性分子例如脂质。在一些实施方案中, 脂质可选自溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱、鞘磷脂、胆固醇及其混合物。

尽管纳米纤维上的聚合物涂层促进细胞附着, 细胞附着可以通过设计纳米原纤结构的纹理和糙度来进一步提高。例如, 纳米原纤结构可以由具有不同直径的多种纳米纤维和/或用不同聚合物制造的多种纳米纤维组成。也可以设计纳米原纤结构的坚硬度来影响细胞生长和/或分化。在一个实施方案中, 纳米原纤结构具有约百分之 3 至约百分之 70 的坚硬度。在另一实施方案中, 纳米原纤结构具有约百分之 3 至约百分之 50 的坚硬度。在另一实施方案中, 纳米原纤结构具有约百分之 3 至约百分之 30 的坚硬度。在另一实施方案中, 纳米原纤结构具有约百分之 3 至约百分之 10 的坚硬度。在另一实施方案中, 纳米原纤结构具有约百分之 3 至约百分之 5 的坚硬度。在另一实施方案中, 纳米原纤结构具有约百分之 10 至约百分之 30 的坚硬度。

在一些方面, 纳米纤维包括荧光标记物。荧光标记物使得能例如显影纳米纤维、鉴定纳米纤维混合物中的特殊纳米纤维、鉴定纳米纤维的化学或物理性质, 以及评价纳米纤维和/或包含纳米纤维的结构(包括可用于设计组织的多层部件)的降解和/或再分布。荧光标记物可以是可光可漂白的或非-光可漂白的。荧光标记物可以是 pH 敏感的或 pH 不敏感的。优选荧光标记物是非细胞毒性的。

用于形成纳米纤维的聚合物也可以具有粘附特性, 这样在与纤维素、聚乙烯、聚酯、聚苯乙烯或聚酰胺支持物接触时, 该纳米纤维以足够的强度粘附至支持物, 这样它牢固地结合至支持物并且可以抵抗与机械应力相关的脱层效应。纳米纤维粘着至支持物可以在纤维与支持物接触时由纤维形成的溶剂效应产生或者由后面用热或压力处理支持物上的纤维产生。在粘附时用溶剂或蒸汽增塑的聚合物可具有增加的附着力。

如在此使用的，术语“纳米原纤支持物”意指纳米纤维或纳米纤维网络沉积在其上的任何表面。纳米原纤支持物可以是沉积的纳米纤维网络提供结构支撑的任何表面。纳米原纤支持物可包含玻璃或塑料。优选塑料是非-细胞毒性的。在一些方面，纳米原纤支持物可以是薄膜或培养容器。

纳米原纤支持物可以是水溶性的或水不溶性的。水溶性的纳米原纤支持物优选为聚乙烯醇薄膜。在许多方面，并且对于大多数方法，纳米原纤结构中的孔的平均尺寸太小以至于不容许细胞进入纳米原纤结构中。然而，细胞的运动可取决于细胞的大小和纳米原纤结构中的孔隙大小。

优选地，多孔纳米原纤结构中的孔隙具有约 0.2 μm 至约 10 μm 的直径。纳米原纤结构可以是生物可降解的和/或生物可溶解的。优选纳米原纤结构是生物相容的。

在一些方面，纳米原纤支持物选自玻璃基材，例如玻璃显微镜载玻片、玻璃盖玻片和玻璃薄膜；聚合物基材例如聚合物膜；以及适合用于细胞培养的其他生物材料基材。纳米原纤支持物可以具有某些可用于制备和/或使用细胞培养器械的特性。在一些特定的方面，纳米原纤支持物具有一种或多种特性例如可操纵性和/或柔性、对灭菌的抗性、对通过辐射降解的抗性、化学惰性、透明性、不可燃性和光滑表面性质。在一些特定的方面，纳米原纤支持物包括卤化的热塑性树脂，例如卤化的氟化-氯化树脂。特别地，支持物可以包括三氟氯乙烯（CTFE）。在其他的特定方面，支持物是约 0.25 mm 或更小。

如在此使用的，术语“间隔物”意指将纳米纤维或纳米纤维网络与支持物表面或另一纳米原纤结构的表面分开的层，这样所述的结构分开了间隔物的直径或厚度。间隔物可以包含聚合物细纤维或薄膜。优选薄膜具有约 10 微米至约 50 微米的厚度。间隔物可以包含聚合物，该聚合物包括纤维素、淀粉、聚酰胺、聚酯或聚四氟乙烯。细纤维可包含微纤维。微纤维是包含直径约 1 μm 至约 30 μm 的聚合物细纤维。微纤维可以非编织的或网状的。

在本发明的其他方面，具有包含至少一种悬垂的胺基团和至少一种潜在反应基团的聚合物的涂层在其他类型的纳米结构的物品上形成。其他示例性的纳米-结构的细胞培养物品包括多壁碳纳米管（MWCN；见 Chen 等(1998) Science 282: 95）、羟基磷灰石颗粒状表面（Rosa 等(2003) Dental Mater. 19: 768-772）。聚合物涂层也可以在天然材料的表面上形成，例如自组装的肽纳米纤维支架（Genove 等(2005) Biomaterials. 26: 3341-3351）和胶原/透明质酸聚合电解质多层（Zheng 等(2005) Biomaterials, 26: 3353-61）。在其他情形中，三维表面可用稳定的纳米颗粒的层产生。

纳米原纤结构可以与物品例如支持物、细胞培养物品和医疗器械结合或者在其上形成。这类物品可以与纳米原纤结构结合或用其制成以便形成多种物品或部件，包括细胞培养器和医疗器械。物品例如支持物、细胞培养物品和医疗器械可以用与纳米原纤结构相同的材料制备，或者可以用不同的材料制备。

可用于形成与所述纳米原纤结构结合的物品（例如支持物、细胞培养物品或医疗器械）的材料的实例包括合成聚合物，包括寡聚物、均聚物和由加聚或缩聚作用产生的共聚物。合适的加聚物的实例包括，但不限于丙烯酸类（acrylics）例如由丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸甘油酯、甲基丙烯酸甘油酯、甲基丙烯酰胺和丙烯酰胺聚合的那些；乙烯类（vinyls）例如乙烯、丙烯、氯乙烯和苯乙烯。

在细胞培养物品中普遍使用的示例性的聚合材料包括聚苯乙烯和聚丙烯。

缩聚物的实例包括（但不限于）尼龙例如聚己内酰胺、聚十二碳内酰胺、聚亚己基己二酰胺和聚亚己基十二烷二酰胺，以及还包括聚氨酯、聚碳酸酯、聚酰胺、聚砜、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、聚乳酸、聚乙醇酸、聚二甲基硅氧烷和聚醚酮。

生物可降解的聚合物也可用于制备与纳米原纤结构结合的物品。已经研究作为生物可降解的材料的合成聚合物类型的实例包括聚酯、

聚酰胺、聚氨酯、聚原酸酯类、聚己酸内酯(PCL)、聚亚胺碳酸酯、脂肪族碳酸酯、聚磷腈、聚酞及其共聚物。可以与例如可植入的医疗器械结合使用的生物可降解的材料的具体实例包括聚交酯、聚乙交酯、聚二噁烷酮、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚(乙交酯-共-聚二噁烷酮)、聚酞、聚(乙交酯-共-三亚甲基碳酸酯)和聚(乙交酯-共-己内酯)。也可以使用这些聚合物与其他生物可降解的聚合物的混合物。

在一些方面,纳米原纤结构可以在物品的表面上形成或与其结合,所述的物品预先用不同于所述具有悬垂的胺基团的聚合物的聚合材料涂覆。例如,物品可以用聚对亚苯基二甲基或有机硅烷材料预先涂覆,以提供所述纳米原纤结构可以结合或形成于其上的基底涂层。

纳米原纤结构可以在用金属、金属合金和陶瓷制造的物品上形成或与其结合,并且在许多情形中,这些物品可具有聚对亚苯基二甲基或有机硅烷材料的预涂层。金属和金属合金包括,但不限于钛、镍钛合金、不锈钢、钽和钴铬。第二种类型的金属包括贵金属例如金、银、铜和铂。陶瓷包括但不限于氮化硅、碳化硅、氧化锆和氧化铝,以及玻璃、硅石和蓝宝石。陶瓷和金属的组合是另一种类型的生物材料。

在本发明的其他方面,聚合物涂层是在纳米原纤结构的纳米纤维的表面上形成的,所述的纳米原纤结构与可植入的医疗用品的至少一部分结合或在其上形成。这指的是包括纳米纤维网络的可植入的医疗器械,所述的纳米纤维网络在可植入的医疗用品上形成或在某些方面与其结合。这类器械可通过多种方法形成。一种形成这类器械的方法可以包括在可植入医疗器械的全部或部分上电纺纳米纤维。另一种方法可以包括形成纳米原纤结构并随后将该纳米原纤结构连接至可植入的医疗器械的一部分。

示例性的医疗用品包括血管植入物和移植物、移植物、外科器械;合成假体;血管假体包括内假体、支架-移植物和血管内支架组合;小直径移植物、腹主动脉瘤移植物;创伤敷料和伤口护理器械;止血屏障;网塞和疝气塞;补片包括子宫出血补片、心房间隔缺损(ASD)补

片、卵圆孔未闭(PFO)补片、室间隔缺损(VSD)补片,和其他通用的心脏补片; ASD、PFO 和 VSD 关闭物; 经皮闭合器械、二尖瓣修复器械、左心耳过滤器; 瓣膜成形术器械、导管; 中心静脉进入导管、血管进入导管、脓肿引流导管、药物输注导管、亲代给食导管、静脉内导管(例如, 用抗凝血剂处理的)、中风治疗导管、血压和支架植入导管; 吻合术器械和吻合关闭物; 脉瘤旷置术器械; 生物传感器包括葡萄糖传感器; 节育器械; 乳房植入物; 心脏传感器; 感染控制器械; 膜; 组织支架; 组织相关材料; 分流器, 包括脑脊髓液(CSF)分流器、青光眼引流分流器; 牙科器械和牙植入物; 耳用器械例如耳引流管、鼓膜造孔术通风管; 眼科器械; 器械的套和套部分包括引流管套、植入式药物输注管套、导管套、缝合套; 脊柱和神经科用器械; 神经再生导管; 神经科用导管; 神经贴片; 矫形外科器械例如矫形关节植入物、骨修复/加强器械、软骨修复器械; 泌尿科用器械和尿道用器械例如泌尿科用植入物、膀胱用器械、肾脏用器械和血液透析器械、结肠造瘘袋附着器械; 胆汁引流产品。

在一些方面, 纳米原纤结构的纳米纤维具有包含非-生物可降解的聚合物的涂层, 所述聚合物具有一种或多种并且优选多种悬垂的胺基团以及一个或优选多于一个悬垂的潜在反应基团。“非-生物可降解的”指一般不能非-酶促降解、用水解方法降解或酶促降解的聚合物。例如, 非-生物可降解的聚合物对可由蛋白酶引起的降解有抗性。然而, 注意到虽然所述涂层包含存在非-生物可降解的胺的聚合物, 但该涂层不限于非-生物可降解的材料, 并因而也可以包含可生物降解的材料, 例如天然的或合成的生物可降解的聚合物。

涂层包含潜在的反应基团, 其中至少一部分基团在涂覆过程中激活以使该聚合物结合至纳米原纤结构的纳米纤维的表面。为了描述本发明的形成的涂层, 共价结合至纳米纤维表面的(在形成的涂层中的)聚合物可称为是具有“潜在的反应基团”或“反应基团”, 指的是在该聚合物上的一种或多种这些潜在的反应基团已经激活并反应而在聚合物和纳米纤维的表面之间形成共价键。

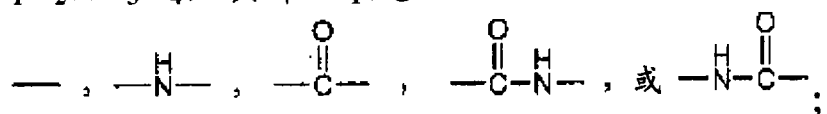
通过经由所述潜在的反应基团结合至表面，固定的聚合物给所述纳米原纤结构的纳米纤维的表面提供了带正电荷的胺基团。据认为这种结合排列使得能形成非常持久和有效的用于细胞附着的表面。已经显示这种表面对于包括在纳米原纤结构上维持和分化细胞的方法来说是非常有效的。

在所述非-生物可降解的聚合物上的多个悬垂的胺基团可以在适于细胞培养的 pH 条件下给涂层提供正电荷。例如，非-生物可降解的聚合物在约 pH 5.0 至约 pH 10.0 范围的条件将会给纳米原纤结构的纳米纤维提供正电荷。

非-生物可降解的聚合物可具有伯胺、仲胺、叔胺或这些胺基团的组合，其悬垂在所述聚合物上。

在本发明的一方面，示例性的含胺基团具有下式：

$R_1R_2NR_3R_4$ ，其中 R_1 是：



其中 R_2 是 C_1 - C_8 直链或支链烷基；并且其中 R_3 和 R_4 都连接于氮上并且独立地是 H 或 C_1 - C_6 直链或支链烷基。作为聚合物上悬垂的，含胺基团可以用式 $P\text{—}[R_1R_2NR_3R_4]$ 表示，P 是聚合主链的一部分。

在一些更特别的方面， R_1 是 $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}\text{—}\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{N}}}\text{—}$ ， R_2 是 C_2 - C_4 直链或支链烷基；并且 R_3 和 R_4 都连接于氮上并且独立地是 H 或 CH_3 或 C_2H_5 。

示例性的含胺基团包括发现于可聚合物单体，例如 3-氨基丙基甲基丙烯酸酰胺（APMA）、3-氨基乙基甲基丙烯酸酰胺（AEMA）和二甲基氨基丙基甲基丙烯酸酰胺（DMAPMA）等上的那些。因而，在一些方面，包括悬垂的胺基团和潜在反应基团的聚合物可以通过将具有如上定义的基团 $\text{—}R_1R_2NR_3R_4$ 的单体与携带潜在反应基团的共聚用单体共聚而形成。任选地，其他含非胺或含非潜在反应基团的单体可包含在聚合物中。

在一方面，基于聚合物的单体含量，聚合物包含约 10 % 或更大摩尔量的含胺基团。这可以例如通过制备具有 10 % 或更多的含胺基团单

体的聚合物实现。在一些方面，含胺基团以 50 %或更大、60 %或更大、70 %或更大、80 %或更大、90 %或更大或者 95 %或更大摩尔量存在。在一些方面，聚合物包含范围为约 90 %-99.95 %摩尔量的含胺基团。一个示例性的共聚物制剂包含约 98.4 %的含胺单体，例如 APMA、AEMA 或 DMAPMA 和约 1.6 %的包含潜在反应基团的单体。

控制胺基团的量和潜在反应基团的量可以通过将含胺单体与含潜在反应基团的单体（以及任选含非-胺或含非-光反应性基团的单体）共聚合来实现。其他的示例性含胺聚合物可以通过这样形成：使例如含胺单体如 N-(2-氨基-2-甲基丙基)甲基丙烯酰胺、对氨基苯乙烯、烯丙胺或其组合与具有悬垂的潜在反应基团的单体共聚合，来提供具有悬垂的胺基团和潜在反应基团的聚合物。这些含胺单体也可以与其他的含非-伯胺的单体例如丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、乙烯基吡咯烷酮或其衍生物共聚合，以提供具有期望特性，例如具有期望密度的胺基团和光反应性基团的聚合物。其他合适的具有胺基团的聚合物包括由单体例如 2-氨基甲基丙烯酸甲酯、3-(氨基丙基)-甲基丙烯酰胺和二烯丙胺形成的聚合物。也可以使用包含光基团和悬垂的胺基团的树状高分子。

在一些方面，可以制备具有悬垂的胺基团和疏水性质的聚合物。这可以通过一种或多种用于合成该聚合物的方案来实现。例如，聚合物可以用期望量的疏水性单体例如(烷基)丙烯酸酯单体形成，或者所述存在胺的单体可包括更长的烷基链长度。例如，基团 R_2 、 R_3 和/或 R_4 任意一个或多个可包括 3 个或更多个碳原子的烷基基团。

另一种用于制备非-生物可降解的聚合物的方法包括用包含潜在反应基团的化合物衍生预成型的聚合物的步骤。例如，具有悬垂的胺基团的均聚物或杂聚物可以容易地通过让一部分悬垂的胺基团与具有光反应性基团和与胺基团反应的基团的化合物，例如 4-苯甲酰基苯甲酰氯反应而用光反应性基团衍生。

在一些方面，具有悬垂的胺基团和至少一种潜在反应基团的聚合物选自聚乙烯亚胺、聚丙烯亚胺和聚酰胺胺。在一个特定的方面，聚

合物材料包括具有一种或多种潜在的反应基团的聚乙烯亚胺。

在广义上定义的潜在的反应基团是响应特异性施加的外部刺激而经历活性物种产生，随之共价结合至靶标上的基团。潜在的反应基团是在存储条件下保持它们的共价键不变，但它一旦被激活则与其他分子形成共价键的分子中的那些原子基团。该潜在反应基团一旦吸收外部电磁或动（热）能则产生活性物种例如自由基、氮烯、碳烯和酮的激发态。可以选择对电磁光谱多个部分有响应的潜在反应基团，并且对光谱的紫外线部分、可见光部分或红外部分有响应的潜在反应基团是优选的。潜在的反应基团（包括在此描述的那些）是本领域熟知的。参见，例如美国专利 No. 5,002,582（Guire 等，“Preparation of Polymeric Surfaces Via Covalently Attaching Polymers”）。本发明考虑使用任意合适的潜在反应基团用于形成如在此描述的本发明的涂层。

光反应性基团一旦吸收电磁能则可以产生活性物种例如自由基并且特别是氮烯、碳烯和酮的激发态。可以选择对电磁光谱多个部分有响应的光反应性基团，并且对光谱的紫外线部分和可见光部分有响应的光反应性基团是优选的。

光反应性芳基酮是优选的，例如苯乙酮、二苯酮、蒽醌、蒽酮和类蒽酮杂环（例如，蒽酮的杂环类似物例如在 10-位上具有氮、氧或硫的那些）或它们被取代（例如环取代的）衍生物。优选的芳基酮的实例包括蒽酮的杂环衍生物，包括吡啶酮、氧杂蒽酮和噻吨酮，以及它们的环取代的衍生物。一些优选的光反应性基团是具有大于约 360 nm 的激发能的噻吨酮及其衍生物。

这类酮的官能团是优选的，因为它们容易能够经历在此描述的激活/失活/重激活循环。二苯酮是特别优选的潜在反应部分，因为它能够光化激活最初形成激发的单重态，所述的激发的单重态经历系间跨越至三重态。激发的三重态可以通过夺取氢原子（例如从支持物表面）插入碳-氢键中，因而产生自由基对。随后自由基对裂解导致新的碳-碳键的形成。如果没有反应键（例如，碳-氢）可用于结合，那么紫外

光-诱导的二苯酮基团的激活是可逆的并且一旦移除能源则该分子会恢复到基态能级。可光激活的芳基酮例如二苯酮和苯乙酮是特别重要的，因为这些基团在水中受到多次重激活并因此提供了增加的涂覆效率。

叠氮化物构成了另一类光反应性基团并且包括芳基叠氮化物($C_6R_5N_3$)例如叠氮苯和叠氮 4-氟-3-硝基苯；酰基叠氮化物($-CO-N_3$)例如苯甲酰基叠氮化物和对甲基苯甲酰基叠氮化物；叠氮甲酸酯($-O-CO-N_3$)例如叠氮甲酸乙酯和叠氮甲酸苯酯；磺酰基叠氮化物($-SO_2-N_3$)例如苯磺酰基叠氮化物；以及磷酰基叠氮化物 $[(RO)_2PON_3]$ 例如二苯基磷酰基叠氮化物和二乙基磷酰基叠氮化物。

重氮化合物构成了另一类光反应性基团并且包括重氮烷($-CHN_2$)例如重氮甲烷和二苯基重氮甲烷；重氮酮($-CO-CHN_2$)例如重氮苯乙酮和 1-三氟甲基-1-重氮基-2-戊酮；重氮醋酸酯($-O-CO-CHN_2$)例如叔丁基重氮醋酸酯和苯基重氮醋酸酯；以及 β -酮- α -重氮乙酰乙酸酯($-CO-CN_2CO-O-$)例如叔丁基 α 重氮乙酰乙酸酯。

其他的光反应性基团包括重氮甲烷(diazirines) ($-CHN_2$) 例如 3-三氟甲基-3-苯基重氮甲烷；和烯酮类($CH=C=O$)例如乙烯酮和二苯烯酮。

过氧基化合物认为是另一种类型的潜在的反应基团，并且包括二烷基过氧化物例如二叔丁基过氧化物和二环己基过氧化物以及二酰基过氧化物例如过氧化二苯甲酰和过氧化二乙酰及过氧酯如过氧化苯甲酸乙酯。

在一些方面，潜在的反应基团以至多约 10 % 的摩尔量（相对于聚合物的单体），或至多约 5 % 的量存在。在一些方面，聚合物包含范围为约 0.05%-10% 的摩尔量的潜在反应基团。一个示例性的共聚物制备物包含约 98.4 % 的含胺单体，例如 APMA、AEMA 或 DMAPMA 和约 1.6% 的包含潜在反应基团的单体。

用任意合适的方法在纳米原纤结构的纳米纤维的表面上形成本发明的涂层。如上面描述的，可以将具有悬垂的胺基团和悬垂的潜在反

应基团的聚合物置于纳米纤维的表面上，并且可以处理该表面以激活潜在的反应基团从而使该聚合物结合至纳米纤维的表面，并在该纳米纤维表面上形成薄的聚合物涂层。

在另一种方法中，聚合物通过接枝聚合方法在纳米原纤结构的纳米纤维表面上形成。例如，可以处置包含潜在反应基团和可聚合的基团的单体并让其结合至纳米纤维的表面。随后可将包含胺基团的单体组合物处置于该表面上，并且可起始聚合反应以引起聚合物链从纳米原纤结构表面上形成并结合至其上。

在又一个方法中，所述的涂层可以用具有两个或更多个潜在反应基团的交联剂形成，其中交联剂用于使聚合物结合至纳米原纤结构的纳米纤维的表面。所述交联剂可以具有任意两个或更多个如在此描述的潜在反应基团。在形成聚合物涂层中，可将交联剂处置于纳米原纤结构的表面上之后处置具有悬垂的胺基团的聚合物，或者可以将交联剂与聚合物组合处置，或者这两者方法。

如果光反应性基团存在于交联剂上，则优选它们适应于经历可逆的光解均裂，因而使得未在附着至聚合材料中消耗的光反应性基团能恢复到无活性或“潜在的”状态。这些光反应性基团可随后被激活，以便连接至具有用于共价键形成的可夺取的氢的聚合物。因此，光反应性基团的激发是可逆的并且一旦移除能量源该基团可以恢复至基态能级。在一些实施方案中，优选的交联剂是可以受到多次激活并因而提供增加的涂覆效率的那些基团。示例性的交联剂在申请人的美国专利 No. 5,414,075 (Swan 等) 和美国公开文本 No. 2003/0165613 A1 (Chappa 等) 中描述。还可以参见美国专利 No. 5,714,360 (Swan 等) 和 5,637,460 (Swan 等)。

具有悬垂的胺基团的非-生物可降解的聚合物可以单独地或与其他任选成分一同结合至纳米原纤结构的纳米纤维。以它的最简单形式，涂层组合物由例如 (i) 具有至少一种或者优选多种悬垂的胺基团和至少一种潜在反应基团的非-生物可降解的聚合物和/或 (ii) 具有至少一种或者优选多种悬垂的胺基团的非-生物可降解的聚合物和具有两个

或更多个潜在反应基团的交联剂组成。其他成分可以加入涂层组合物以改变或改善涂层的方面。所述成分可以是聚合物成分或非-聚合物成分。

其他合成的或天然的、生物可降解的或者非-生物可降解的聚合物可加入至组合物以形成涂层。“合成聚合物”指合成制备的和包含非-天然存在的单体单元的聚合物。例如，合成聚合物可以包括非-天然的单体单元例如丙烯酸酯、丙烯酰胺等。合成聚合物通常通过传统的聚合反应，例如加聚、缩聚或自由基聚合形成。合成聚合物也可以包括具有与非天然的单体单元（例如合成肽、核苷酸和糖衍生物）结合的天然的单体单元，例如天然存在的肽、核苷酸和糖单体单元的那些。这些类型的合成聚合物可以通过标准的合成技术，例如通过固相合成或者在允许时通过重组产生。

“天然聚合物”指天然、重组或合成制备的并且由聚合物主链中天然存在的单体单元组成的聚合物。在一些情形中，可以修饰、加工、衍生或以其它方式处理天然的聚合物以改变该天然聚合物的化学和/或物理性质。在这些情形中，将修改术语“天然聚合物”以反映天然聚合物的改变（例如，“衍生的天然聚合物”或“去糖基化的天然聚合物”）。

生物可降解的材料例如生物可降解的聚合物也可以存在于涂层中。如果生物可降解的材料包含于涂层中，则它可以任选存在于与存在非-生物可降解的胺的聚合物相同的涂覆层中，可以存在于另一涂覆层中，或者两者中。例如，包括生物可降解的聚合物的涂覆层可以形成于包括存在非-生物可降解的胺的聚合物的涂覆层和物品表面之间，或者可以形成于包括存在非-生物可降解的胺的聚合物的涂覆层的上面。在培养过程中，生物可降解的聚合物可以降解，而非-生物可降解的聚合物保持存在于涂层中并在长的培养时期内提供粘附表面。

在本发明的一些方面，“生物活性分子”可以与聚合物-涂覆的纳米原纤结构结合。例如，一种或多种生物活性分子可以存在于纳米纤维和/或纳米纤维上的涂层中，所述涂层含有具有悬垂的胺基团和潜在反应基团的非-生物可降解的聚合物。在一些情形中，生物活性分子可以

是如在此描述的生物可降解的材料。虽然一种或多种生物活性分子可以与所述聚合物-涂覆的纳米原纤结构结合,但在细胞培养方法与聚合物-涂覆的纳米原纤结构一同进行时可也将生物活性分子包含于液体培养基中。因此,生物活性分子的列举无意于限制分子出现在涂层或任何培养基中,除非在此特别描述。

如在此使用的,术语“生物活性分子”意指对细胞或组织有影响的分子。该术语包括人或兽用治疗剂、营养药、维生素、盐、电解质、氨基酸、肽、多肽、蛋白、碳水化合物、脂质、多糖、核酸、核苷酸、多核苷酸、糖蛋白、脂蛋白、糖脂、糖胺聚糖、蛋白聚糖、生长因子、分化因子、激素、神经递质、信息素、抑素、前列腺素、免疫球蛋白、单核因子和其他细胞因子、湿润剂、矿物质、电和磁反应物质、光敏材料、抗氧化剂、可以代谢作为细胞能量源的分子、抗原,以及可引起细胞或生理反应的任何分子。可以使用分子的任意组合,以及这些分子的激动剂或拮抗剂。糖胺聚糖包括糖蛋白、蛋白聚糖和乙酰透明质酸。多糖包括纤维素、淀粉、褐藻酸、脱乙酰壳多糖或乙酰透明质酸。细胞因子包括,但不限于心肌营养蛋白、基质细胞衍生因子、巨噬细胞衍生的趋化因子(MDC)、黑素瘤生长刺激活性因子(MGSA)、巨噬细胞炎性蛋白 1 α (MIP-1 α)、2、3 α 、3 β 、4 和 5、白细胞介素(IL)1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、TNF- α 和 TNF- β 。可用于本发明的免疫球蛋白包括,但不限于 IgG、IgA、IgM、IgD、IgE 及其混合物。氨基酸、肽、多肽和蛋白质可以包括任何类型的任何大小和复杂性的这类分子以及这类分子的组合。实例包括但不限于结构蛋白、酶和肽激素。

术语生物活性分子也包括纤维状蛋白质、粘附蛋白、粘附性化合物、去粘附性 (deadhesive) 化合物和靶向化合物。纤维状蛋白质包括胶原蛋白和弹性蛋白。粘附/去粘附化合物包括纤连蛋白、层粘连蛋白、血小板反应蛋白和生腱蛋白-C。粘附蛋白包括肌动蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白、钙粘着蛋白、选择蛋白、细胞内黏着分子 1、2 和 3,以及细胞基质黏着受体,包括

但不限于整联蛋白例如 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta_3$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 。

在一些方面，传统上已经用于形成用于细胞附着的涂层的聚合物可以包含于涂层组合物中。例如，基于多肽的聚合物如多聚赖氨酸、胶原蛋白、纤连蛋白、整联蛋白和层粘连蛋白可包含于涂层中。这些多肽的肽部分也可以包含于涂层组合物中。示例性的基质蛋白的结合结构域序列在表 1 中显示。

表 1

纤连蛋白:	RGDS	LDV	REDV
玻连蛋白	RGDV		
层粘连蛋白 A	LRGDN	IKVAV	
层粘连蛋白 B1	YIGSR	PDSGR	
层粘连蛋白 B2	RNIAEIIKDA		
胶原蛋白 I	RGDT	DGEA	GTPGPQGLAGQRGVV
血小板反应蛋白	RGD	VTXG	FYVVMWK

根据涂层组合物中存在的试剂，这些基于多肽的聚合物可以是未经衍生的形式或衍生形式。例如，可以用潜在的反应基团衍生该基于多肽的聚合物，并然后可与非-生物可降解的聚合物上悬垂的潜在反应基团一起激活而形成涂层。示例性的组合可以包括光-聚(氨丙基甲基丙烯酰胺)或光-聚(乙烯亚胺)与光-多聚赖氨酸、光-胶原蛋白、光-纤连蛋白和光-层粘连蛋白或多肽的光-衍生部分的一种或多种，包括在这里描述的那些。

光衍生的多肽，例如胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白可以如美国专利 No. 5,744,515 (Clapper, Method and Implantable Article for Promoting Endothelialization) 中描述的制备。如在本专利中描述的，异双功能试剂可用于光衍生蛋白质。该试剂包含在一端的二苯酮可光激活基团(苯甲酰苯甲酸, BBA)，在中间的间隔物(ϵ -氨基己酸，

EAC),和在另一末端的胺反应性热化学偶联基团(N-羧琥珀酰亚胺, NOS)。BBA-EAC由4-苯甲酰基苯甲酰氯和6-氨基己酸合成。然后通过用N-羧基琥珀酰亚胺通过碳二亚胺活化酯化BBA-EAC的羧基来产生BBA-EAC-NOS而合成BBA-EAC的NOS酯。蛋白质例如胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白等可从商业来源获得。通过以每摩尔蛋白质10-15摩尔BBA-EAC-NOS的比加入BBA-EAC-NOS交联剂来光衍生该蛋白质。

生物活性分子也包括瘦蛋白、白血病抑制因子(LIF)、RGD肽、肿瘤坏死因子 α 和 β 、内皮抑制素、制管张素、血小板反应蛋白、成骨蛋白-1、骨形态发生蛋白2和7、骨粘连蛋白、生长调节素样肽、骨钙蛋白、干扰素 α 、干扰素 αA 、干扰素 β 、干扰素 γ 、干扰素 1α 和白细胞介素2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17和18。

如在此使用的,术语“生长因子”意指促进细胞或组织增殖的生物活性分子。可用于本发明的生长因子包括,但不限于转化生长因子- α (TGF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生的生长因子包括AA、AB和BB同工型(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF),包括FGF酸性同工型1和2、FGF碱性型2和FGF4、8、9和10、神经生长因子(NGF)包括NGF2.5s、NGF7.0s和 β NGF及神经营养蛋白、脑衍生的神经营养因子、软骨衍生的因子、骨生长因子(BGF)、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子(IGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、EG-VEGF、VEGF-相关蛋白、Bv8、VEGF-E、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、胰岛素样生长因子(IGF) I和II、肝细胞生长因子、神经胶质的神经营养生长因子(GDNF)、干细胞因子(SCF)、角质形成细胞生长因子(KGF)、转化生长因子(TGF),包括TGF α 、 β 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 、骨骼生长因子、骨基质衍生的生长因子和骨衍生的生长因子及其混合物。一些生长因子也可以促进细胞或组织的分化。例如,TGF可以促进细胞或组织的生长和/或分化。一些优选的生长因子包括VEGF、NGF、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、FGFb、FGFa和BGF。

如在此使用的，术语“分化因子”意指促进细胞分化的生物活性分子。该术语包括，但不限于神经营养蛋白、集落刺激因子(CSF)或转化生长因子。CSF 包括粒细胞-CSF、巨噬细胞-CSF、粒细胞-巨噬细胞-CSF、促红细胞生成素和 IL-3。一些分化因子也可以促进细胞或组织的生长。例如，TGF 和 IL-3 可以促进细胞的分化和/或生长。

在一些方面，如果将其他任选成分加入至涂层组合物中，通常理想的是非-生物可降解的聚合物是该组合物中的主要成分。如果涂层包含一些生物可降解的成分，这些成分可以在一段时期内降解，然而剩下非生物可降解的聚合物作为该涂层的主要成分。

涂层组合物的试剂例如聚合材料可以在合适的液体，例如基于水或醇的液体中制备。例如，聚合材料可以以约 0.1 mg/mL 至约 50 mg/mL 范围的浓度溶解。然而，更通常使用的浓度是在约 1 mg/mL 至约 10 mg/mL 的范围。

涂层可以通过任何合适的方法形成，所述的方法包括浸涂法、溶液中 (in-solution) 涂覆和喷涂法。

在其中涂层包含光反应性基团的情形中，通常，照射步骤可通过让光反应性基团受到促进该光反应性基团激活的量的光化辐射并连接至纳米原纤结构的纳米纤维而完成。

光化辐射可由促进光反应性基团激活的任何合适的光源提供。优选的光源（例如可从 Dymax 公司获得的那些）提供 190 nm-360 nm 范围的 UV 照射。合适的辐射剂量是在约 0.1 mW/cm² 至约 20 mW/cm² 的范围，该辐射剂量是用安装有带宽约 10 nm 的 335 nm 通带滤光片的辐射计测量的。

在一些方面，与激活光反应性基团的步骤结合使用滤光片可能是理想的。滤光片的使用从这样的观点来看是有利的：它们可以选择性地最小化在激活步骤过程中提供给涂层的特定波长的辐射量。如果涂层的一种或多种成分对特定波长的辐射敏感，并且曝露时可降解或分解，则这可以是有利的。

通常，滤光片通过允许通过该滤光片的光的波长来鉴定。可以与

本发明结合使用的两种说明性类型的滤光片是截止滤光片和通带滤光片。一般而言，截止滤光片是通过截止透射率分类，在截止透射率时透光率是约最大透射率的 25 %。对于通带滤光片，鉴定滤光片的波长范围，并且中心波长是允许通过滤光片的波长的中点。

在制备涂覆的纳米原纤结构之后，可实施洗涤步骤用以去除可能未共价结合至纳米纤维表面的任何过剩材料。涂覆的纳米原纤结构也可以通过例如进一步的 UV 照射处理来使纳米原纤结构灭菌。

本发明的一些有利方面与形成可特别用于为多种细胞类型提供粘着涂层的涂层有关。由于该涂层的稳定性，可实施涂覆过程以提供涂覆的纳米原纤结构，然后将该涂覆的纳米原纤结构递送给使用者或在使用前存储一段时间。在其他情形中，可将涂层试剂（至少包括非-生物可降解的聚合物）在试剂盒内提供给使用者，该使用者随后可在纳米原纤结构上实施涂覆过程。因此，本发明也提供了用于制备包括非生物可降解的聚合物的涂层的试剂盒。该试剂盒可以包括用于形成涂层的说明书，并且任选可包括用于用纳米原纤结构培养细胞的方法，所述的纳米原纤结构用试剂盒的试剂涂覆。

在一些方面，本发明提供了涂层和用于用涂覆的纳米原纤结构培养细胞的方法，其中所述涂覆的纳米原纤结构为细胞附着提供优良的基材，并且它可用于其中细胞可以保持与涂覆的纳米原纤结构接触相当长的一段时间，例如长于 14 天，长于 21 天，长于 28 天，长于 35 天，长于 42 天，长于 49 天或长于 56 天的方法中。在一些方面，细胞也可在培养基中保持约 14-约 60 天范围的时间周期。例如，可以将细胞处置于涂覆的纳米原纤结构上，其中细胞粘附至涂覆的结构的上并在存在合适的培养基时保持活力。在一些情形中，细胞可以通过增殖扩展，但一般而言，细胞的表型不改变。

结合本发明的涂层，细胞通常在适合用于维持细胞或促进期望的细胞类型形成的液体培养基中培养。可以使用多种基础液体培养基，例如 RPMI，其可补充血清、氨基酸、微量元素、激素、抗生素、盐、缓冲液、生长因子（例如在这里描述的那些）和/或分化因子（例如在

这里描述的那些)。

可以影响细胞的功能多个方面,包括生长和分化的因子也可以加入液体培养基中。这些因子可包括神经营养蛋白、细胞因子(例如白细胞介素)、胰岛素样生长因子、转化生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、肝素结合生长因子、酪氨酸激酶受体配体、血小板衍生的和血管内皮生长因子,以及脑信号蛋白。

示例性的神经营养蛋白包括神经生长因子(NGF)、神经营养蛋白和脑衍生的神经营养因子;示例性的表皮生长因子包括神经调节蛋白、转化生长因子 α 和 netrin;示例性的细胞因子包括白细胞介素(IL)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15和 G-CSF、白血病抑制因子、睫状神经营养因子(CNTF)、心肌营养蛋白-1和制瘤素-M;示例性的转化生长因子包括神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)、artemin、neurturin和 persephin。

在本发明的一些方面,所述方法包括将干细胞在存在合适的培养基时在如在此描述的涂层上培养。干细胞是多能性和可塑性的,这使得它们能被诱导分化成多种细胞类型。干细胞包括胚胎干细胞,例如从胚泡获得的那些,以及成体干细胞,其可从成体内的多种组织(例如骨髓,其提供造血干细胞源)获得。胚胎干细胞在体外具有基本上不受限制的增殖能力并因而可以极大地扩展用于应用,例如涉及组织再生的那些应用。本发明的涂覆的纳米原纤结构为培养这些细胞提供了理想的基材,因为所述细胞可以在该涂覆的纳米原纤结构上维持和扩展比在其他基材上相当更长的时间。因此,该涂覆的纳米原纤结构可以大大地有助于获得大量干细胞用于期望的应用,例如细胞移植或组织工程。

根据本发明方法培养的细胞也可以用于药物发现、基因鉴定和用于抗体产生。

本发明的涂覆的纳米原纤结构也使得克隆细胞或少量细胞能接种于涂覆的物品容器中,并且还使得细胞在达到培养中的汇合状态之前必须收获、分盘或稀释之前的时期更长。

在一些情形中，在处置于涂覆的纳米原纤表面之前，可以将细胞保持在细胞的滋养层上。在滋养层上培养一段时间后，可以将细胞转移至如在此描述的具有本发明涂层的纳米原纤细胞培养物品上。根据本发明，已经发现细胞可以在涂覆的纳米原纤结构上培养约 30 天的时间而不需要提供新鲜涂覆的表面。

在本发明的其他方面，本发明涉及用于神经前体和干细胞的分化的方法。根据本发明，神经前体可以在存在本发明的涂层和一种或多种因子例如神经营养生长因子时培养，所述的神经营养生长因子诱导部分或完全成熟的神经元表现型特征性的形态学或生物化学变化。

更特别地，在一些方面，涂覆的纳米原纤结构可用于培养多能的神经上皮干细胞和谱系限制的中间前体细胞，其可以被诱导分化成少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元。在多个发育阶段这类前体细胞存在于 CNS 中。

在本发明的一方面，所述方法用于促进神经突伸长。

较弱粘附于塑料的 PC12 细胞（嗜铬细胞瘤细胞）能表现出对在此描述的涂覆的纳米原纤结构的极好的粘附。一般而言，PC12 细胞缓慢生长并且可以用起协同作用的 NGF 和 cAMP 分化。一旦分化，PC12 细胞可以维持约 14 天。地塞米松诱导非神经谱系的分化。在这里描述的结果还显示，神经前体 PC12 细胞在存在具有非生物可降解的聚合的胺涂层和神经生长因子（NGF）时表现出神经突伸展和交感神经元表现型的生物化学标记物的表达。

具体实施方式

实施例 1

光聚合试剂

1. 光-多聚(APMA) 光-聚(氨丙基甲基-丙烯酸酰胺)(光-聚(APMA)/APO2)的制备通过盐酸 N-(3-氨丙基)甲基丙烯酸酰胺(APMA-HCl)和 N-[3-(4-苯甲酰基苯甲酰氨基)丙基]甲基丙烯酸酰胺(BBA-APMA)的

共聚作用进行,这两种物质的制备分别在美国专利 No. 5,858,653 的实施例 2 和实施例 3 中描述。

通过加入 2.378 g BBA-APMA (6.7877 mmol)、0.849 g 2,2'-偶氮双(2-甲基-丙腈)(AIBN)(5.1748 mmol)和 0.849 g N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED) (6.77 mmol)至 2L 的烧瓶,并然后加入 786 g 二甲基亚砷(DMSO)来溶解所述的成分而进行共聚化作用。然后搅拌这些物质并用氮气喷射脱氧至少 5 分钟。将 306 g DI 水中的 72.4 g APMA-HCl (405.215 mmol)溶解于独立的烧瓶中,同时用氮气喷射。将溶解的 APMA-HCl 转移至含有 BBA-APMA 的混合物,随后用氮气喷射至少 10 分钟。然后将密封的容器在 55°C 下加热过夜完成聚合作用。

然后将 180 mL 的量的该聚合物溶液用 180 mL 的 DI 水稀释,并用 1.25-0.35 加仑/分钟的恒定流速在 55 加仑的罐中用分子量截断值为 12,000-14,000 的管对去离子水进行透析至少 96 小时。

用光-聚(APMA)聚合物制备了在水中范围为 10 µg/mL-20 mg/mL 的多种涂层溶液。

II-IV.光-胶原蛋白、光-纤连蛋白和光-层粘连蛋白 光-胶原蛋白、光-纤连蛋白和光-层粘连蛋白是如美国专利 No. 5,744,515 的实施例 1 中描述的制备。

制备在水中范围为 25 µg/mL-300 µg/mL 的多种光-层粘连蛋白涂层溶液。

在水中制备 25 µg/mL 的光-层粘连蛋白涂层溶液。

在 0.012 N HCl 中制备 25 µg/mL 的光-胶原蛋白涂层溶液。

V. 光-PEI 光-PEI 通过如下制备:首先在真空下干燥聚乙烯亚胺(PEI; 24.2 重量%固体; 2000 kg/mol Mw; BASF 公司),并然后溶解 1.09 g PEI 于 19 mL 90:10 (v/v)的氯仿:甲醇溶液中。然后将该 PEI 溶液在冰浴中冷却至 0°C。将 62 mg BBA-Cl (4-苯甲酰基苯甲酰氯; 它的制备在美国专利 No. 5,858,653 中描述)加入 2.8 mL 氯仿中,让其溶解。将该 BBA-Cl 溶液加至冷的、搅拌的 PEI 溶液中。搅拌该反应溶液过夜同时升温至室温(TLC 分析该反应溶液显示,在 2.5 小时

后没有未反应的 BBA-Cl 存在)。第二天将该反应溶液转移至一个大烧瓶中并将一当量的浓盐酸与 77.5 mL 去离子水一起加入。于 40℃ 在真空下除去有机溶剂直至含水 PEI 溶液看上去澄清。然后将该含水 PEI 溶液稀释至 5 mg/mL 的终浓度以用作涂层溶液。

V. *Photo-RGD* 光-RGD 是如美国专利 No. 6,121,027 的实施例 1 中描述的制备。制备在水中为 25 µg/mL 的光-RGD 涂层溶液。

实施例 2

基材涂覆

将上面实施 1 中制备的光-聚合试剂涂在平的基材(多孔板)和三维基材(聚合纳米纤维)上。

为了涂覆平的表面,将 1.0 mL 的量的如实施例 1 中描述的涂层溶液加至 12 孔板(聚苯乙烯; Corning)的孔中。对于基材涂覆,涂层溶液的深度(从溶液的表面至基材(聚苯乙烯或纳米纤维)的表面的距离)通常是 5 mm 或更小,并且通常是在约 1 或 2 mm 的范围。将 Dymax™ 灯用于传递 200-300 mJ 的能量,能量用具有 10 nm 带宽的 335 nm 带通滤光器测量(平均,用灯保持离孔 20 cm 的距离对孔照射约 3-4 分钟)。然后用缓冲盐水 pH 7.2 洗涤孔以除去任何未结合的试剂。然后用与上面描述相同的照明条件再次用 UV 照明孔以对孔灭菌。

然后将未涂覆的 12 孔板用作对照。

为了涂覆三维表面,将 0.5 mL 的量的如实施例 1 中描述的涂层溶液加至圆盘纳米纤维基材(Synthetic-ECM™, Donaldson 公司, MN; 参见,例如美国专利公开号 2005/0095695)。将该基材用 Dymax™ 灯离大约 20 cm 的距离照射 1 分钟。然后将所述的圆盘用水洗涤 4 次。然后将该纳米纤维基材再次 UV 照明以对该纳米纤维基材灭菌。

然后将未涂覆的纳米纤维基材用作对照。

实施例 3

PC12 细胞在光-聚合物涂覆的基材上的附着测定

进行了附着测定来测定平铺附着性差的细胞(PC12 细胞)于多种光聚合物基材上的效果。将从 ATCC 获得的大鼠 PC12 (嗜铬细胞瘤)细胞(登记号 CRL 1721)在胶原-涂覆的聚苯乙烯烧瓶(15 $\mu\text{g/mL}$, Sigma)于 RPMI 培养基(Invitrogen)中预培养,该培养基含有 10%马血清、5%胎牛血清、2 mM Glutamax (Invitrogen)、1 mM 丙酮酸钠(Invitrogen)和 10mM HEPES (Invitrogen)。将细胞在 37°C 5% CO_2 /95%空气湿润的室内培养。每隔一天更换培养基。当细胞达到 80%汇合时将细胞进行胰蛋白酶处理并进行传代。在将细胞接种于已经根据如实施例 2 中描述的方法涂覆的 12 孔基材中之前,进行这些培养条件。

第 2 代和第 10 代之间的 PC12 细胞用于进行的所有试验。将细胞进行胰蛋白酶处理并以 500,000 个细胞/孔的密度在 12 孔板中于 RPMI 培养基中以 500,000 个细胞/mL 的浓度接种。将细胞在 37°C 下在具有 5% CO_2 的湿润室内培养 48 小时。在接种前,细胞至少 99%的有活力,具有多边形形态。

为了将细胞接种于纳米纤维上,将 PC12 细胞进行胰蛋白酶处理并再悬浮于 200 μL 的 RPMI 培养基中。将密度为 500,000 个细胞/18 mm 的细胞悬浮液小心加至涂覆的和未涂覆的纳米纤维(Synthetic-ECMTM, 产品号 P609192, Donaldson 公司, MN)并让细胞在层流通风橱下于室温下附着至纳米纤维 10 分钟。10 分钟后将 800 μL 生长培养基轻轻加在纳米纤维周围并将细胞置于 37°C 下潮湿的、5% CO_2 /95%空气的室内。每隔一天更换培养基。

MTT 附着测定法 48 小时后,除去生长培养基并用无 Ca^{++} 和无 Mg^{++} 的 PBS 洗涤在涂覆的和未涂覆的聚苯乙烯、涂覆的和未涂覆的纳米纤维上生长的细胞 4 次。这些多次洗涤从孔中除去了松散结合和未结合的细胞。在涂覆的基材上通过洗涤除去了 5%的细胞,而在未涂覆的基材上通过洗涤除去了 70%的细胞。然后将细胞与 MTT (用生长培养基 1: 1 稀释, Sigma)在潮湿的室内于 37°C 孵育 2 小时。除去含有 MTT 的培养基并用 PBS 再次洗涤以除去酚红。加入 500 μL 的染料增溶剂(0.5 ml 0.04N HCl/异丙醇和 0.12 ml 3% SDS/水的混合物)

并在室温下以 30 转/分钟轻轻摇晃孔 30 分钟(或直到染料完全溶解)。将该样品转移至 96 孔盘并在分光计(Spectramax, Molecular Devices)中于 570 nm 下读取吸光度。

涂覆的和未涂覆的平面(12 孔板)上细胞附着的结果在图 1 中显示。在用光-多聚(APMA)涂覆的孔中显示了 PC12 细胞的最好附着,随后是光-层粘连蛋白和光-PEI 试剂。将未涂覆的孔和光-纤连蛋白涂覆的基材用作对照。相对于很好粘附至纤连蛋白的其它细胞类型,PC12 细胞表达低水平的纤连蛋白受体。(参见 Tomaselli and Reichardt (1987) *J. Cell Biol.*, 105: 2347-2358)。结果显示,光-RGD 和光-胶原不提供表现与光-聚(AMPA)一样好的涂层,与光-胶原蛋白和光-层粘连蛋白比较,光-聚(AMPA)的附着能力有大约 2 倍的差别。

三维表面(纳米纤维)上细胞附着的结果在图 2 中显示。与平面上的结果类似,较于未涂覆的基材,光-聚(APMA)-涂覆的纳米纤维显示了弱贴壁细胞的牢固附着。

图 3 显示了在光-聚(APMA)-涂覆的纳米纤维(3B)和未涂覆的纳米纤维(3A)上生长的 PC12 细胞的明视野显微镜图像。在 24 小时后拍摄图片。PC12 细胞在光-聚(APMA)-涂覆的纳米纤维上显示了好的扩散,但是在未涂覆的表面上细胞相互附着形成簇,但十分弱地附着在未涂覆的基材上。

图 4 显示了已经在光-聚(APMA)-涂覆的纳米纤维上生长了 24 小时并接受鬼笔环肽(1:500, Molecular Probes)染色的 PC12 细胞的荧光显微镜图像。鬼笔环肽结合至纤维状肌动蛋白(F-肌动蛋白)并使所述细胞的细胞支架组织显影。染色结果显示,在光-聚(APMA)-涂覆的纳米纤维上培养的 PC12 细胞保持它们正常的多面体形态,表明该基材的强结合能力没有影响细胞的形态学。对于鬼笔环肽染色,将 PC12 细胞用 4%多聚甲醛固定 20 分钟,用 0.1 M PBS 洗涤三次并在室温下与鬼笔环肽孵育 1 小时,其中所述的鬼笔环肽与在含有 0.5% Triton-X-100TM和 5%山羊血清的 PBS 中稀释的 TRITC 缀合。用 0.1 M

PBS 洗涤细胞并在倒置显微镜下观察。

图像显示在细胞于三维基材上培养时肌动蛋白在皮层环中组织而不是高度展开。肌动蛋白的这种构造在组织或类似组织的基质中观察到 (Walpita 和 Hay (2002) *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3: 137-141; 美国专利公开 No. 2005/0095695A1)。

为了证明所述的光-试剂特异性地提高差粘着的细胞系的附着, 将强粘着细胞系接种于光-聚合物涂覆的基材上。根据用于 PC12 细胞的方法将人包皮成纤维细胞 (HFF) 接种于光-聚合物涂覆的基材上并在培养后进行 MTT 附着测定法。图 5 显示, 与裸露的聚苯乙烯比较, 所述光-试剂的存在一般不提高 HFF 细胞的粘着。没有观察到在多种涂覆的试验基材上强附着细胞系的附着中的好处。

实施例 4

PC12 细胞在光-聚合物涂覆的表面上的增殖

如实施例 3 中描述的培养 PC12 细胞。检测在涂覆的和未涂覆的纳米纤维 (合成-ECMTM, 产品号 P609186, Donaldson Co., MN) 以及在涂覆的和未涂覆的聚苯乙烯上生长的细胞的 BrdU 掺入。在第 2 天, 将 5-溴脱氧尿苷 (BrdU, 1 μ M 浓度, Sigma) 加至培养物, 这使得能测定分裂细胞的数目。用 BrdU 脉冲细胞 48 小时并然后用抗-BrdU 抗体染色以便进行免疫细胞化学。通过 S.P. Memberg & A.K. Hall ((1995) *Neurobiol.* 27:26-43) 的方法对 PC12 细胞进行渗透化处理。将细胞培养物与封闭缓冲液 (PBS, 0.5% Triton-X-100TM 和 5% 山羊血清) 中的抗-BrdU 抗体 (1:100, Sigma) 孵育 1 小时, 用 PBS 冲洗并与封闭缓冲液中的抗-小鼠 IgG1 二抗 (1:200, Southern Biotech) 孵育另外 1 小时。将培养物用 PBS 冲洗三次并用倒置显微镜 (Leica DMLA) 观察标记的细胞。

图 6 显示了 PC12 细胞中 BrdU 掺入的荧光显微图像。该图像表明, 与未涂覆的纳米纤维比较, 光-聚 (APMA)-涂覆的纳米纤维上有更多的 BrdU 掺入。较于未涂覆表面, 光-聚 (APMA)-涂覆的表面

上更多的 BrdU 掺入与更多数目的分裂细胞相关,并且认为是由于光-聚(APMA)-涂覆的表面上改善的细胞附着引起。视野中存在的总细胞数目由 DAPI 染色指示。与光-多聚赖氨酸-涂覆的基材比较,在光-聚(APMA)-涂覆的基材上生长的细胞显示了多 60%的 BrdU 掺入。

实施例 5

多种涂覆的和未涂覆的表面上 PC12 细胞的分化

评估了在存在 NGF (神经生长因子) 时在光-聚合物-涂覆的和未涂覆的聚苯乙烯 12 孔板、光-聚合物-涂覆的和未经涂覆的纳米纤维(合成的-ECMTM,产品号 P609186, Donaldson Co., MN)、PuraMatrixTM (BD Biosciences)和 MatrigelTM (BD, Biosciences) 上生长的 PC12 细胞的分化。

也试验了的其它光试剂包括光-纤连蛋白、光-层粘连蛋白、光-胶原蛋白、光-PEI 和光-RGD。

对细胞进行胰蛋白酶处理并以 30,000 细胞/35 mm 孔的密度接种于实施例 3 中描述的它们正常的生长培养基中。24 小时后,用分化培养基(RPMI 培养基(Invitrogen),其含有 1%马血清、0.5% 胎牛血清、2 mM Glutamax (Invitrogen)、1 mM 丙酮酸钠(Invitrogen)和 10mM HEPES (Invitrogen)) 置换该生长培养基。将细胞在 5% CO₂/95%空气的潮湿室内于 37℃下孵育并分化 10 天,同时每隔一天加入 NGF (100 ng/mL, Invitrogen)。为了评估成为神经元的分化,在培养 10 天后对 β -III 微管蛋白染色。为了进行免疫染色,将细胞用 4%的多聚甲醛固定 20 分钟,用 0.1 M PBS 洗涤三次,并然后在室温下与 β -III 微管蛋白一抗 (1:200, Sigma), 在含有 0.5% Triton-X-100TM 和 5% 山羊血清的 PBS 中孵育 1 小时。洗涤细胞并与抗小鼠二抗 (IgG2b, Southern Biotech) 另外再孵育 1 小时。洗涤细胞并在倒置显微镜下观察 β -III 微管蛋白染色。

通常,用光-聚合物涂覆的平面或三维表面产生了富集了具有神经元的突起分化培养物。与未涂覆的表面比较,在这些表面上的平均

神经突长度加倍。其它光试剂（光-层粘连蛋白、光-PEI 和光-胶原）也发现好于未涂覆的聚苯乙烯或纳米纤维，即使不好于光-聚(APMA)

因此，与未涂覆的聚苯乙烯、未涂覆的纳米纤维、胶原、PEI 和可商业获得的 PuraMatrix™ 和 Matrigel™ 制备物比较，光-聚(APMA) 涂覆的表面产生了更好的 PC12 细胞成为神经元的分化。

图 7 显示，与未涂覆的聚苯乙烯比较，在光-聚(APMA) 和光-层粘连蛋白涂覆的聚苯乙烯上 PC12 细胞分化更好。

图 8 显示，与未涂覆的纳米纤维比较，在光-聚(APMA) 和光-层粘连蛋白涂覆的纳米纤维上 PC12 细胞分化更好。

图 9 显示，与 PuraMatrix™ 和 Matrigel™ 比较，在光-聚(APMA) 涂覆的纳米纤维上 PC12 细胞分化更好。光 APMA 定量促进了更好的细胞分化和在纳米纤维上更长的神经突延伸。

在表 2 中概括了 β -III 微管蛋白染色、神经突形态学和细胞分化的评估。

表 2

		B-III 微管蛋白染色	神经突形态学	% 分化
聚苯乙烯板	P-APMA	+++	++++	60%
	P-PEI	++	++	20%
	P-FN	+	+	小于 5%
	P-胶原蛋白	+++	+++	30%
	P-层粘连蛋白	++++	++++	80%
	P-RGD	++	++	10%
未涂覆的聚苯乙烯 12-孔板		+	+	1%
涂覆的纳米纤维	P-APMA	++++	++++	50%
	P-PEI	++	++	20%
	P-FN	+	+	小于 5%
	P-胶原蛋白	+++	+++	30%
	P-层粘连蛋白	+++	+++	30%
	P-RGD	++	++	10%
未涂覆的纳米纤维		+	+	1%
PuraMatrix™		+++	+++	10%
Matrigel™		+++	++	5%

++++ 十分好；+++ 好；++ 一般；+ 差

实施例 6

在光-聚合物涂覆的表面上 ES-D3 细胞的增殖

将来自 ATCC (登记号 CRL-1934)的 ES-D3 细胞作为在悬浮培养皿 (Nunc) 中具有 10%胎牛血清 (FCS, Cambrex) 和白血病抑制因子 (LIF, 10 ng/ml, Gibco-BRL) 的 DMEM-F12 (Invitrogen)中的聚集物生长 4 天。然后将该培养基换成在化学上确定的称为 NEP 基础培养基 (补充有 100 µg/ml 转铁蛋白、5 µg/ml 胰岛素、16 µg/ml 腐胺、20 nM 黄体酮、30 nM 亚硒酸、1 mg/ml 牛血清白蛋白、20 ng/ml bFGF 加 B27 和 N2 添加剂的 DMEM-F-12) 的培养基, 并将该细胞接种于纤连蛋白 (15 µg/ml, Sigma) 涂覆的聚苯乙烯皿、光聚 (APMA) -涂覆的和未涂覆的纳米纤维 (合成的-ECMTM, 产品号 P610304, Donaldson Co., MN) 上。每 2 天更换培养基并将细胞在 37℃下维持在 5% CO₂/95%空气的潮湿室 (Mujtaba 和 Rao (1999) *Developmental Biology* 214:113-127) 内。

光-聚 (APMA) -涂覆的表面与 ES-D3 细胞一起使用。

增殖的 ES-D3 细胞的巢蛋白染色

在 24 小时和 48 小时时测定 ES-D3 细胞。如下对 ES-D3 细胞进行巢蛋白存在时染色, 巢蛋白是未分化的干细胞的标记物 (U. Lendahl 等, (1990) *Cell* 60:585-95)。用 4%的多聚甲醛在室温下固定细胞 20 分钟。用 0.1 M PBS, pH 7.4 将他们洗涤三次并与 1: 1 稀释于含有 0.5% Triton-X-100TM 和 5%山羊血清的 PBS 中的抗大鼠巢蛋白一抗 (大鼠 401, DSHB) 在室温下孵育两小时。然后用 0.1 M PBS 洗涤细胞 5 分钟并与稀释于含有 0.5% Triton-X-100TM 和 5%山羊血清的 PBS 中的抗大鼠二抗 (1:200, Southern Biotech) 另外孵育 1 小时, 之后用 0.1 M PBS 将它们洗涤三次并在倒置显微镜 (Leica, DMLA) 下观察。巢蛋白用 BrdU 进行双标记并通过同时孵育细胞于一抗的合适组合中, 随后同时孵育细胞于非交叉反应的二抗的合适组合中, 进行该双标记试验。

图 10 显示在涂覆的纳米纤维上存在巢蛋白/BrdU 阳性 ES-D3 细胞。大部分所述细胞是巢蛋白阳性并且对于检测的所有其它谱系标记物 (GFAP、 β -III 微管蛋白和 O4) 是阴性的, 这表明未分化的干细胞的培养物可以保持在这些用光-聚 (APMA) 涂覆完全合成的表面上。

实施例 7

在涂覆的表面上 ES-D3 细胞的分化

巢蛋白阳性 ES-D3 细胞在基础培养基 (补充了 100 μ g/ml 转铁蛋白、5 μ g/ml 胰岛素、16 μ g/ml 腐胺、20 nM 黄体酮、30 nM 亚硒酸、1 mg/ml 牛血清白蛋白、20 ng/ml bFGF 加 B27 和 N2 添加剂的 DMEM-F-12) 中光-聚 (APMA) 涂覆的纳米纤维 (合成的-ECMTM, 产品号 P609192, Donaldson Co., MN) 上生长。通过从生长培养基除去 bFGF 并加入视黄酸 (1 μ M, Sigma)、PDGF BB (10 ng/ml, Sigma)、CNTF (10 ng/ml, Sigma)、10%血清(FBS, Invitrogen) (Mujtaba 和 Rao, 同上)任一种诱导细胞分化。6 天后, 随着每天加入诱导剂, 培养物中干细胞分化成神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞。不用改变细胞的基材而完成分化。

β -III 微管蛋白染色

用 4%的多聚甲醛固定细胞 20 分钟, 用 0.1 M PBS 洗涤三次并在含有 0.5% Triton-X-100TM和 5%山羊血清的 PBS 中与神经元的标记物 β -III 微管蛋白 (1:200, Sigma) 在室温下孵育 1 小时。洗涤细胞并与抗小鼠二抗 (IgG2b, Southern Biotech) 另外再孵育 1 小时。洗涤细胞并在倒置显微镜下观察。

在一些情况中我们也如下用 DAPI 染色。如上准备的细胞用 DAPI 溶液 (在 100% MeOH 中 1:1000 稀释, Boehringer Mannheim) 洗涤。固定的细胞与 DAPI 溶液在室温下孵育 15 分钟。

少突胶质细胞的 O4 染色

用 4%的多聚甲醛在室温下固定细胞 10 分钟。用 0.1 M PBS, pH 7.4 洗涤细胞三次 5 分钟。将细胞与 O4 的一抗 (6 μ g/ml, Chemicon)

在室温下在含有 5% BSA 的培养基中孵育 2 小时。然后用 0.1 M PBS, pH 7.4 洗涤制备物三次 5 分钟。将细胞与二抗孵育, 并如上面关于 β -III 微管蛋白的描述进一步处理。

星形胶质细胞的 GFAP 染色

用 4% 的多聚甲醛在室温下固定细胞 20 分钟。用 0.1 M PBS, pH 7.4 洗涤细胞三次。将细胞与对抗 GFAP 的一抗 (1:500, Chemicon) 在室温下在含有 0.5% Triton-X-100TM 和 5% 山羊血清的 PBS 中孵育 2 小时。洗涤细胞并将其与抗小鼠二抗孵育, 并且如上面关于 β -III 微管蛋白的描述进一步处理。

未涂覆的纳米纤维和用多聚-赖氨酸 (15 μ g/ml, Sigma) 和层粘连蛋白 (15 μ g/ml, Gibco BRL) 双涂覆的聚苯乙烯用作对照。

与未涂覆的纳米纤维和用多聚赖氨酸/层粘连蛋白双涂覆的组织培养塑料比较, 在涂覆的纳米纤维上获得了更好的分化成合适的细胞类型, 并且通过仅加入合适的诱导剂至相同的基材实现了这种分化。

图 11 显示, ES-D3 细胞分化为具有比在未涂覆的纳米纤维上生长的神经元有更长的神经突的神经元的突起, 而在未涂覆的纳米纤维上所述突起短而粗。

图 12 显示在光-聚 (APMA) 涂覆的纳米纤维上 ES-D3 细胞分化为 I 型和 II 型 GFAP 阳性星形胶质细胞。注意在涂覆的纳米纤维上所述的细胞更明亮。

实施例 8

克隆密度的 PC12 细胞的生长

将 PC12 细胞以 300 个细胞/32 mm 的密度接种在置于 35mm 孔的纳米纤维盘 (合成的-ECMTM, 产品号 P609186, Donaldson 公司, MN) 中并分化 30 天, 同时每 2 天加入 NGF (如实施例 5 中描述的)。30 天后, 将细胞用 4% 的多聚甲醛固定 20 分钟, 用 0.1 M PBS 洗涤三次, 并在室温下与 β -III 微管蛋白 (1:200, Sigma), 在含有 0.5% Triton-X-100TM 和 5% 山羊血清的 PBS 中孵育 1 小时。洗涤细胞并与

抗小鼠二抗 (IgG2b, Southern Biotech) 另外再孵育 1 小时。洗涤细胞并在倒置显微镜下观察。在 4 天后在培养物中单个细胞开始形成克隆。克隆快速生长并且保持牢固地附着在涂覆的表面上。

实施例 9

PC12 细胞在光-聚合物涂层上的长期培养

将如实施例 8 中描述培养的 PC12 细胞维持 45 天并针对 β -III 微管蛋白进行处理。图 13 显示分化的 PC12 细胞在光-聚 (APMA) -涂覆的表面生长。30 天后在培养物中, 所述的细胞粗壮并表现出伸展的神经突。

实施例 10

ES-D3 细胞在光-聚合物涂层上的长期培养

将如实施例 7 中所述进行培养和分化的 ES-D3 细胞保持 22 天并针对 β -III 微管蛋白和神经丝和 GFAP 进行处理。图 14 显示干细胞成熟为 β -III 微管蛋白阳性神经元。一子集这些神经元也是神经丝⁺。在该时间点培养物中, 在裸露的纳米纤维和多聚-赖氨酸/层粘连蛋白上生长的细胞开始从基材分离, 而在 APMA 涂覆的纳米纤维上生长的细胞保持牢固地附着于基材上并分化为具有成熟神经元的突起。图 15 显示星形胶质细胞成熟为 GFAP 阳性的 I 型和 II 型星形胶质细胞。该细胞保持牢固附着于表面, 而在裸露的纳米纤维和多聚赖氨酸/层粘连蛋白上生长的细胞开始脱离基材。

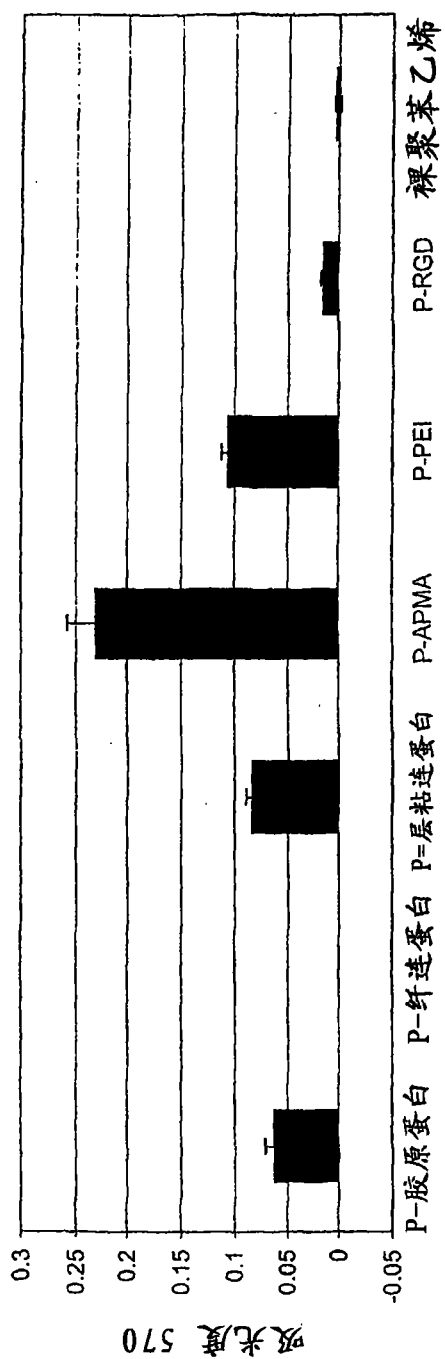


图1

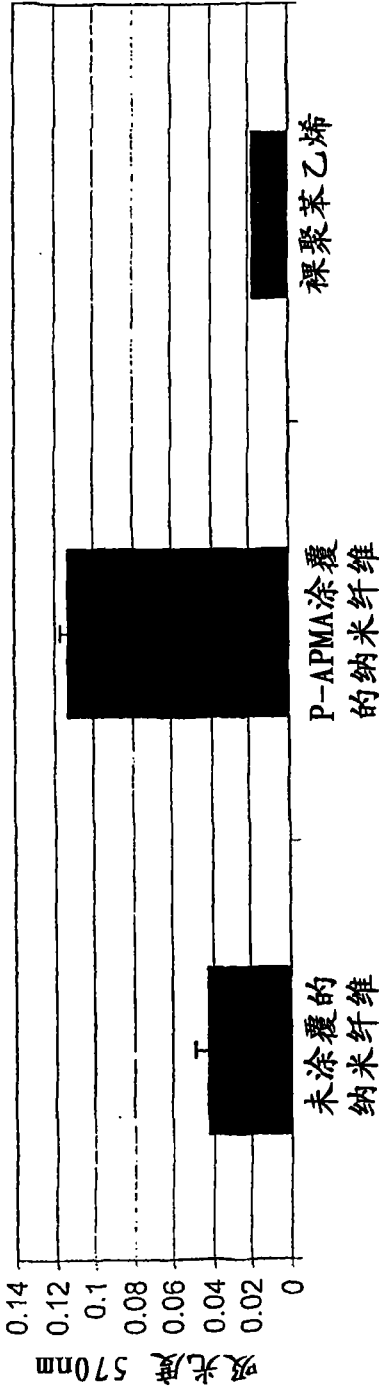


图2

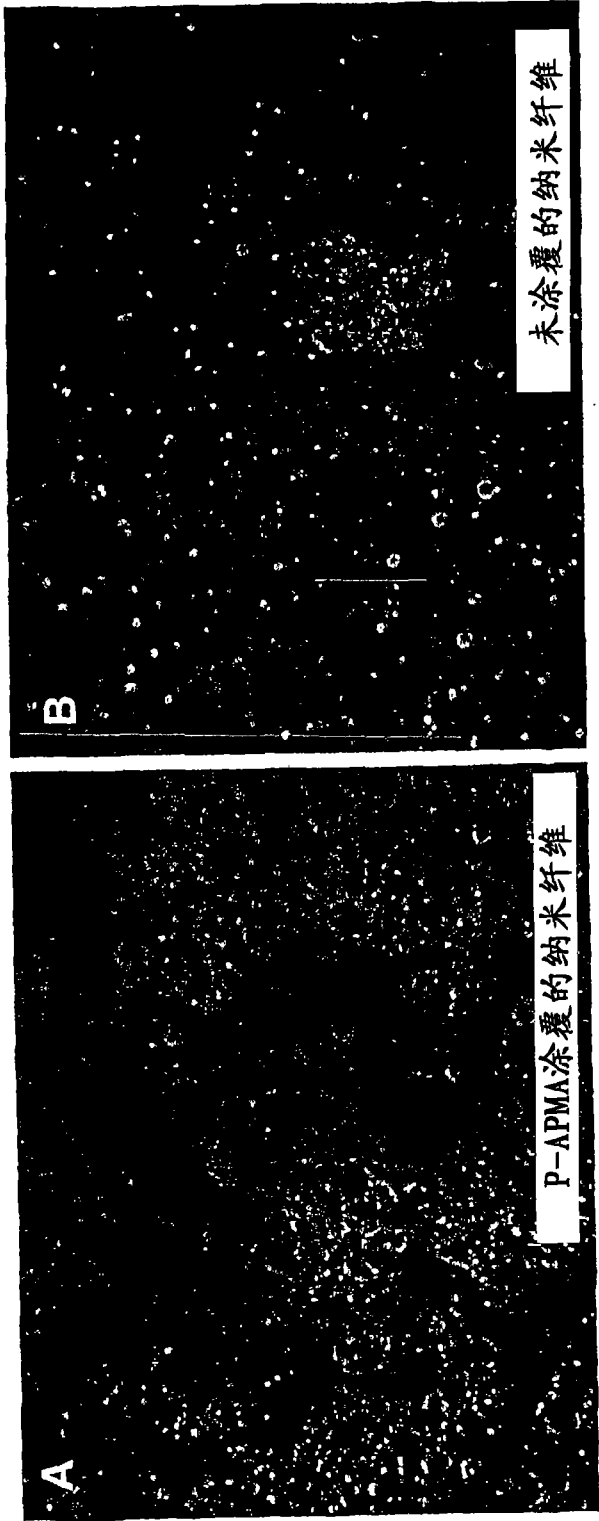


图 3

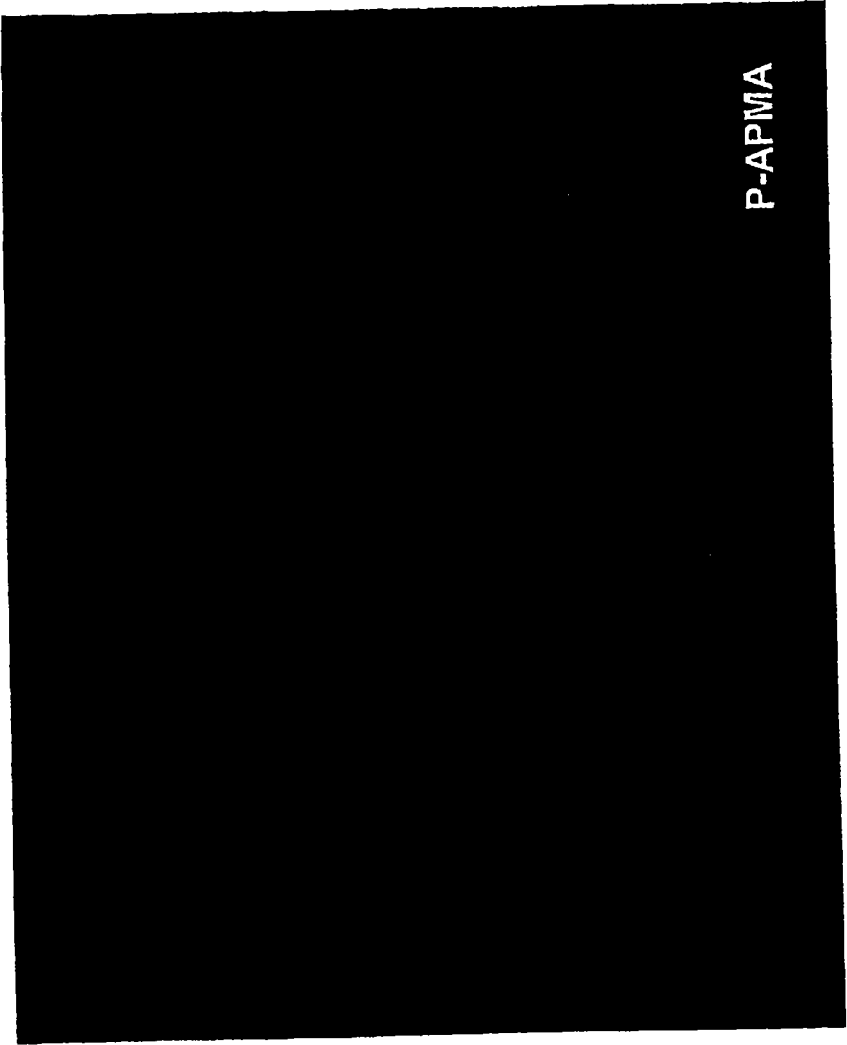


图4

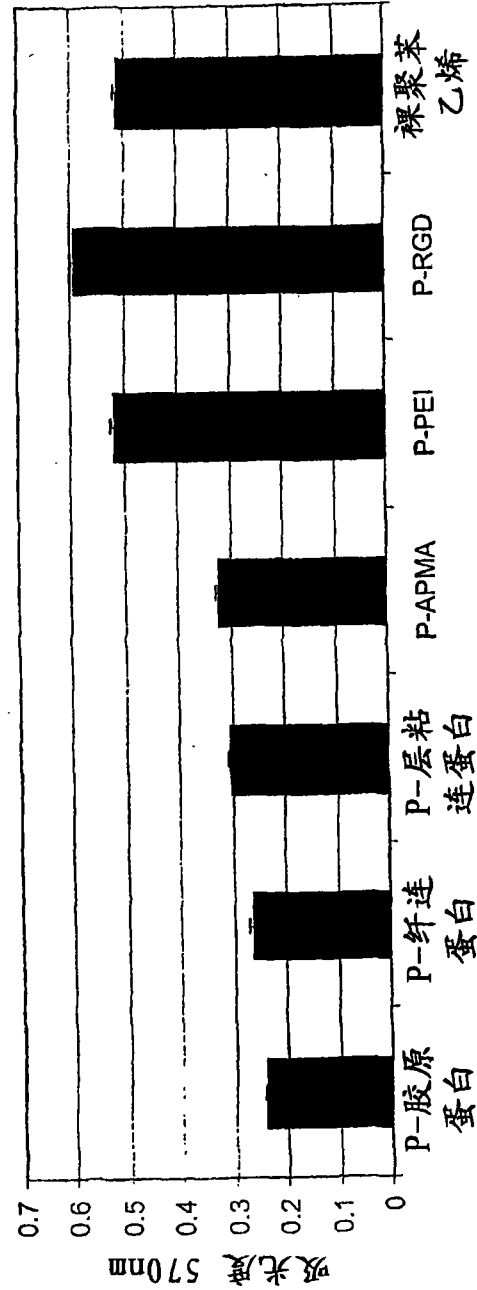


图5

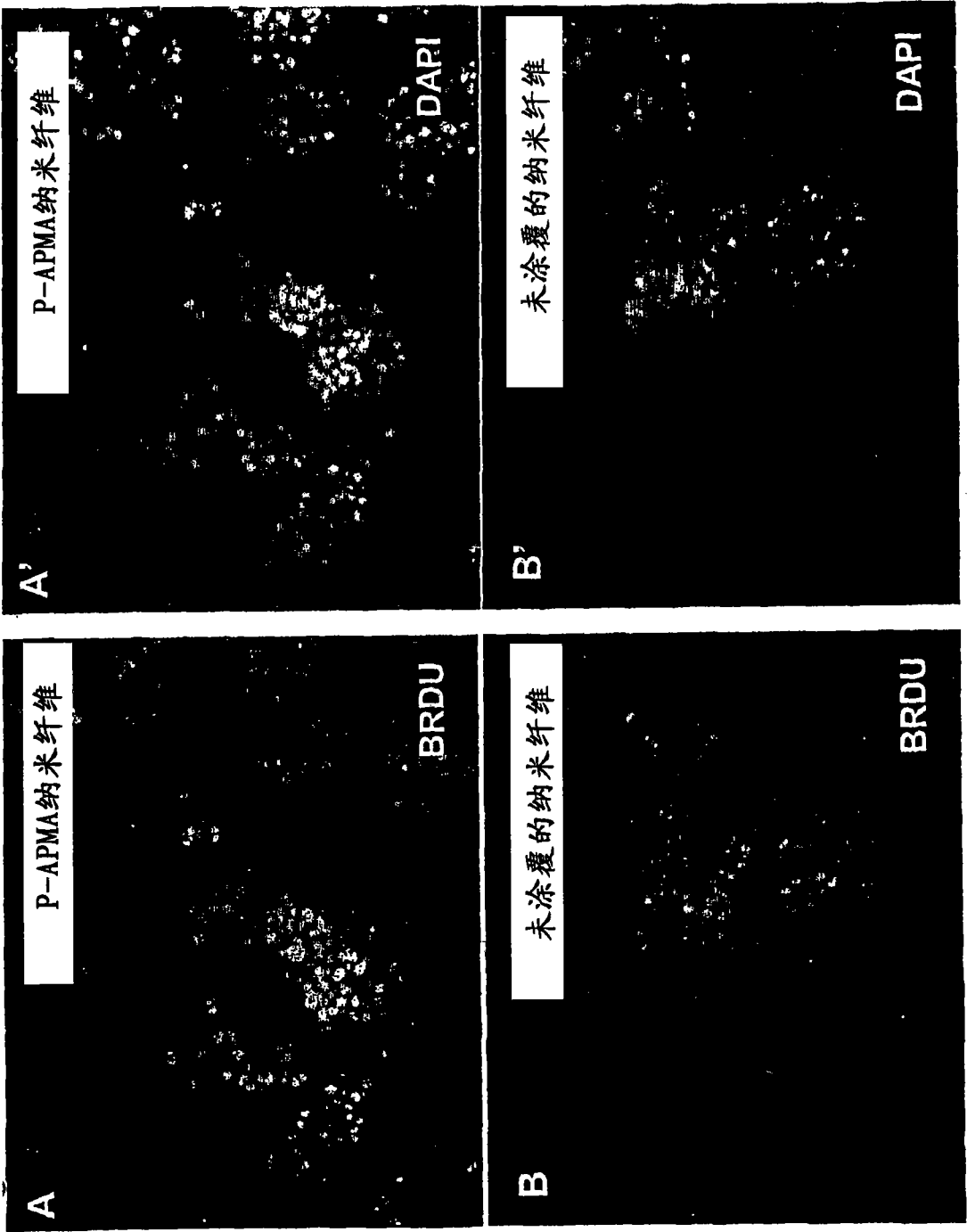


图6

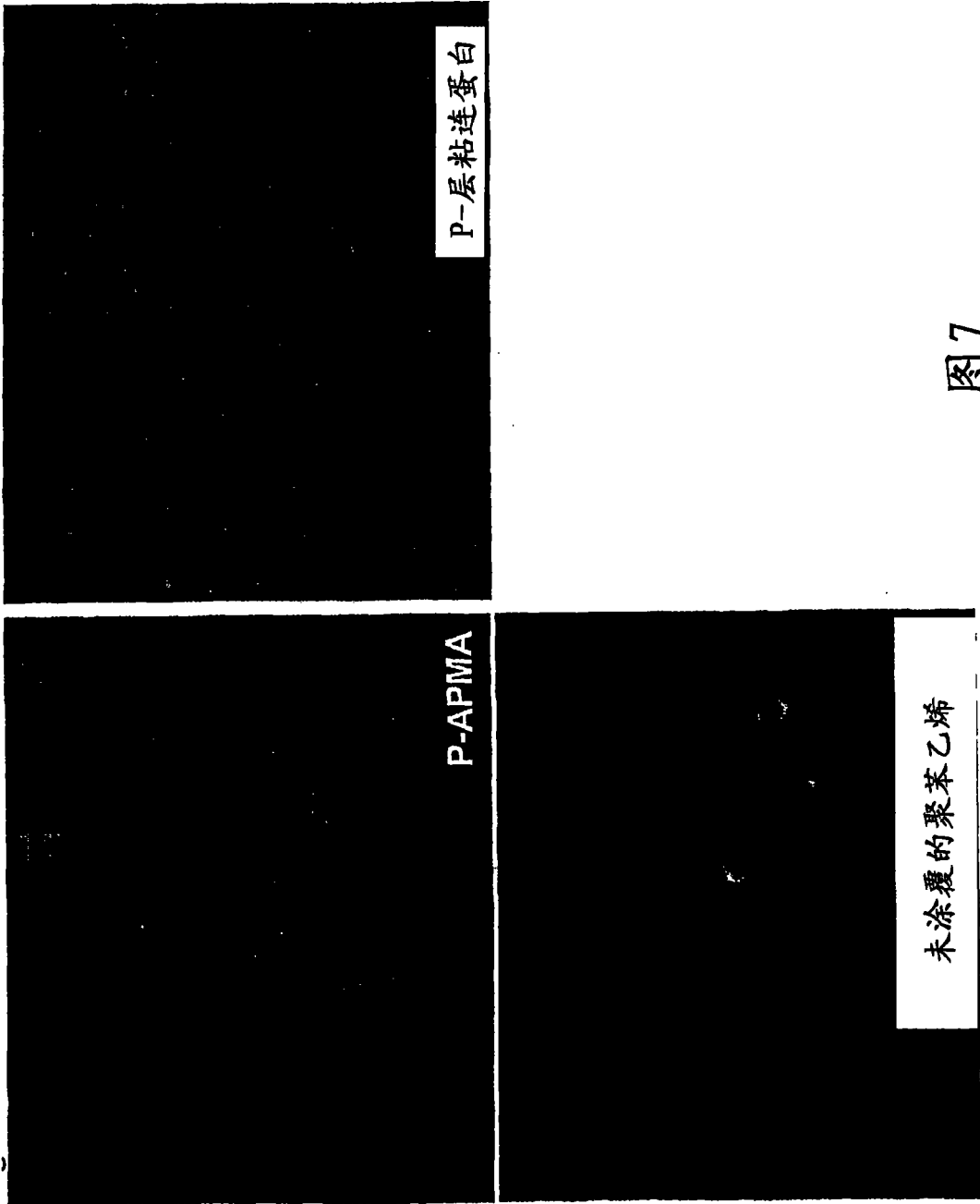


图7

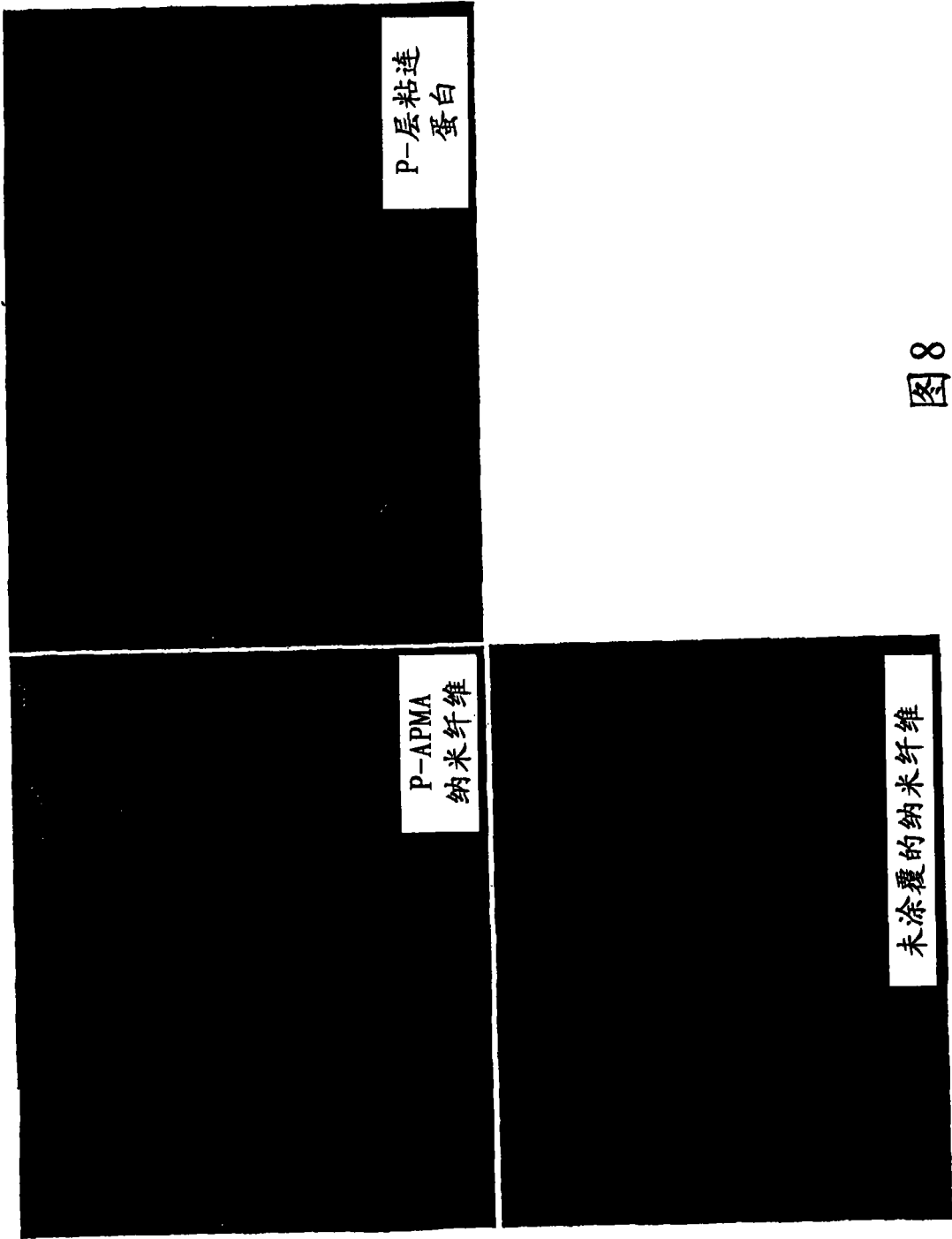


图8

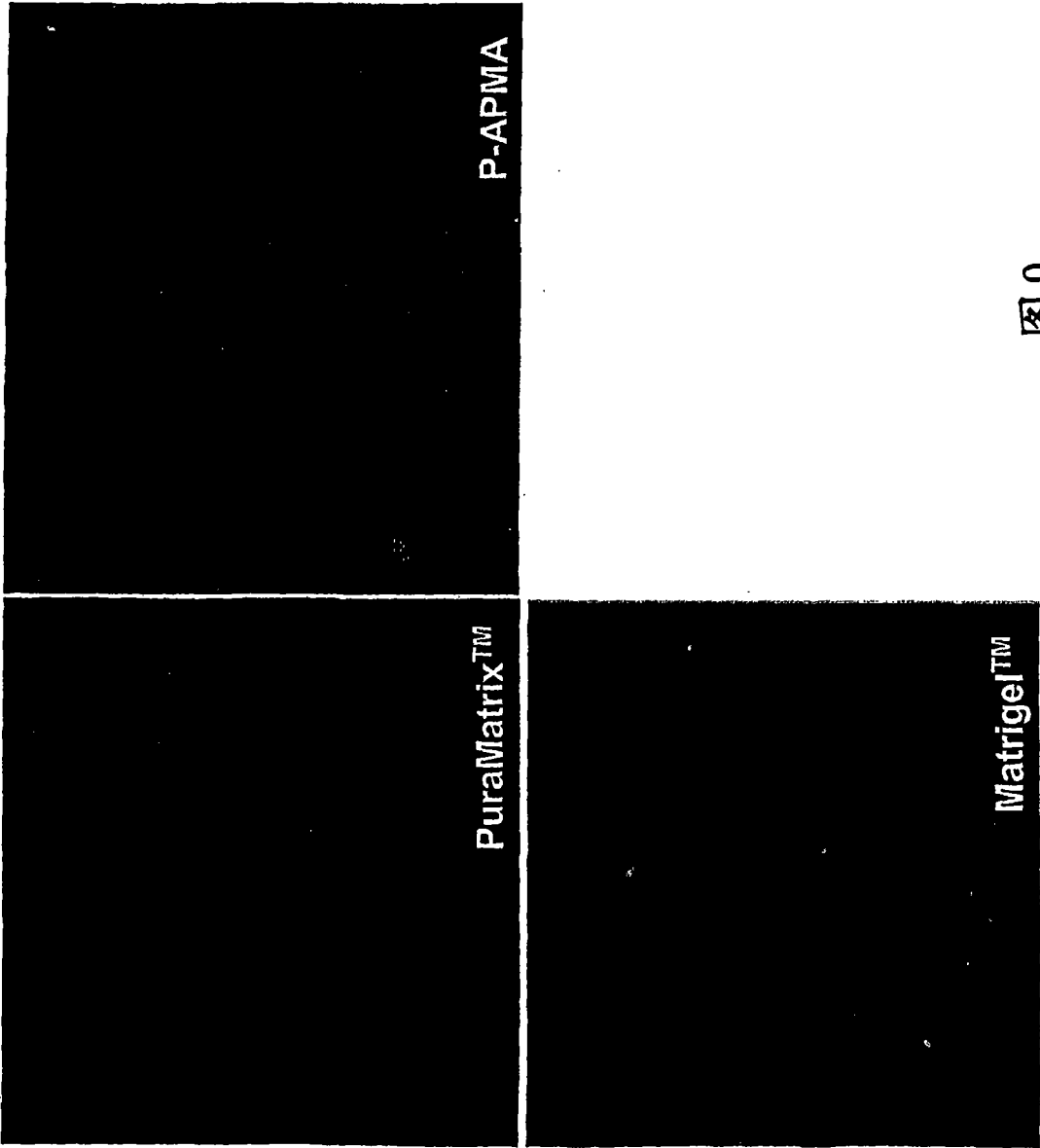


图9

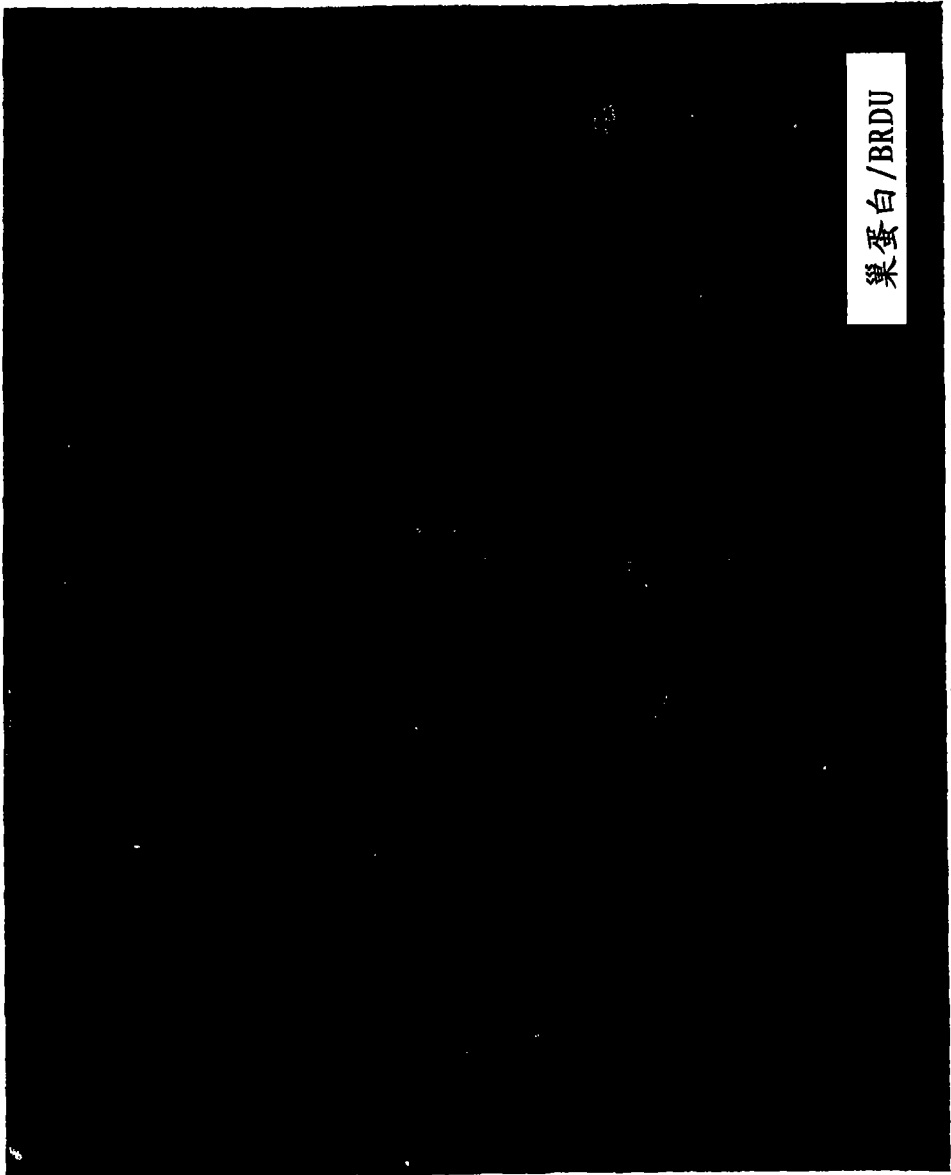


图10

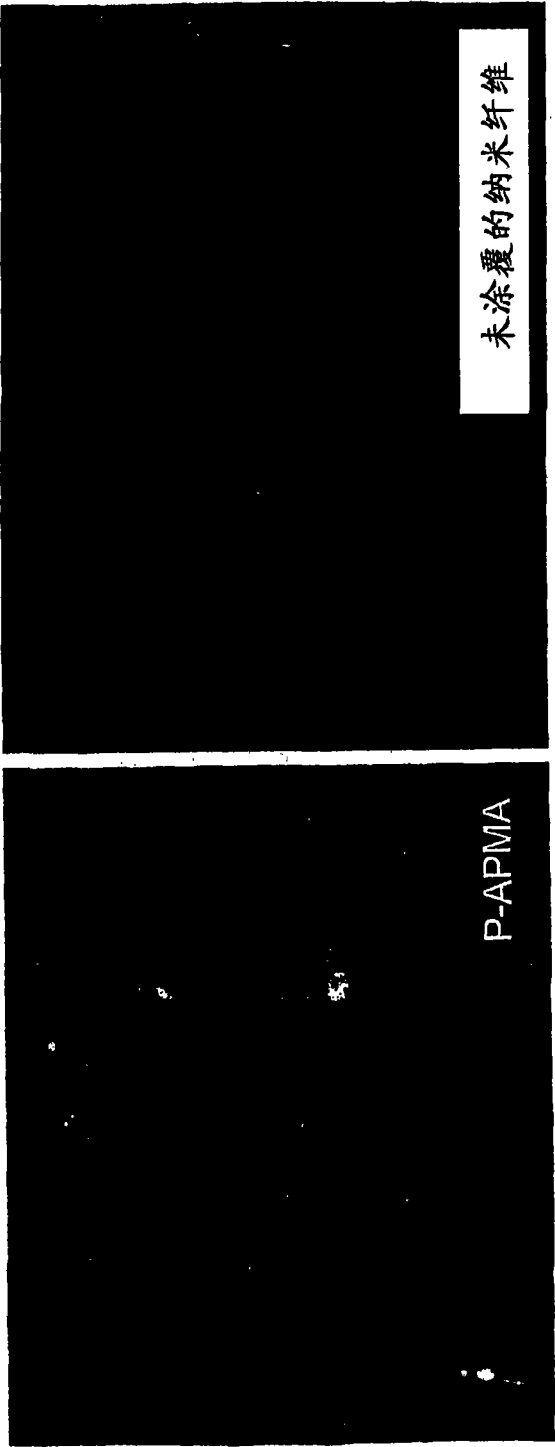


图11

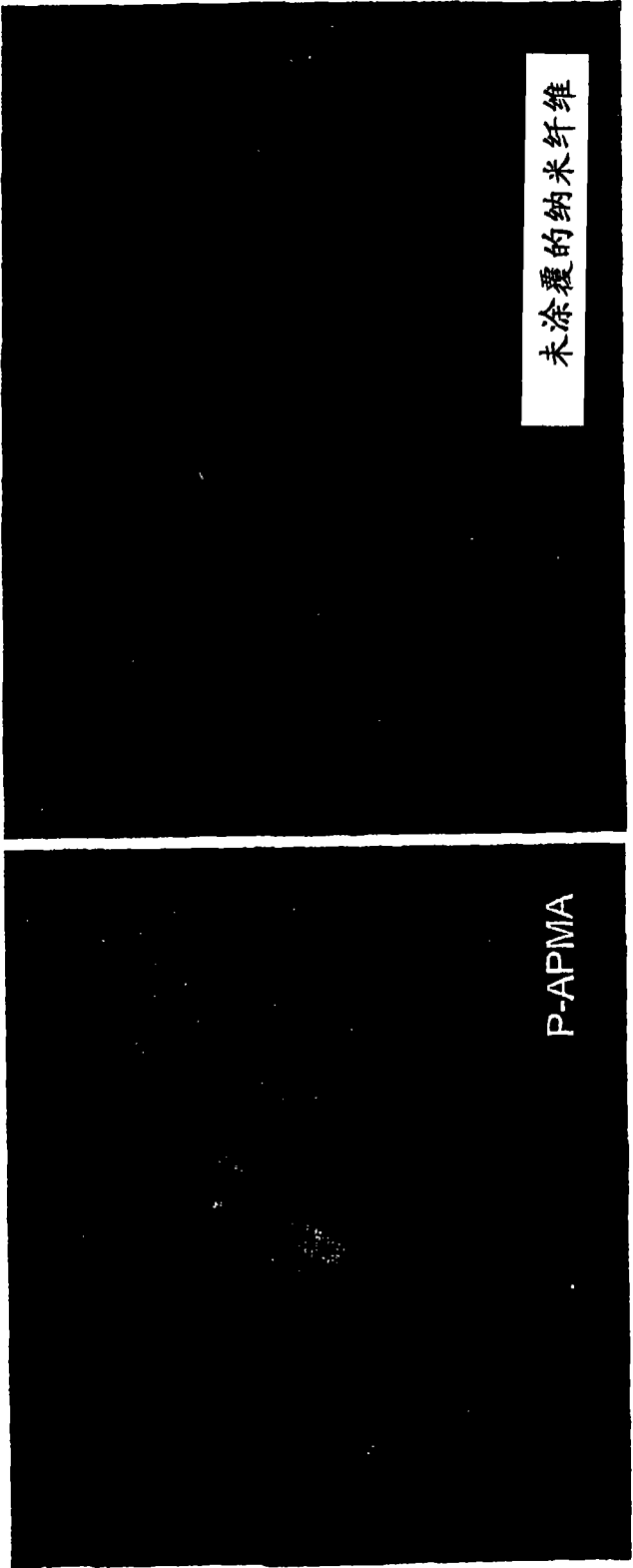


图12

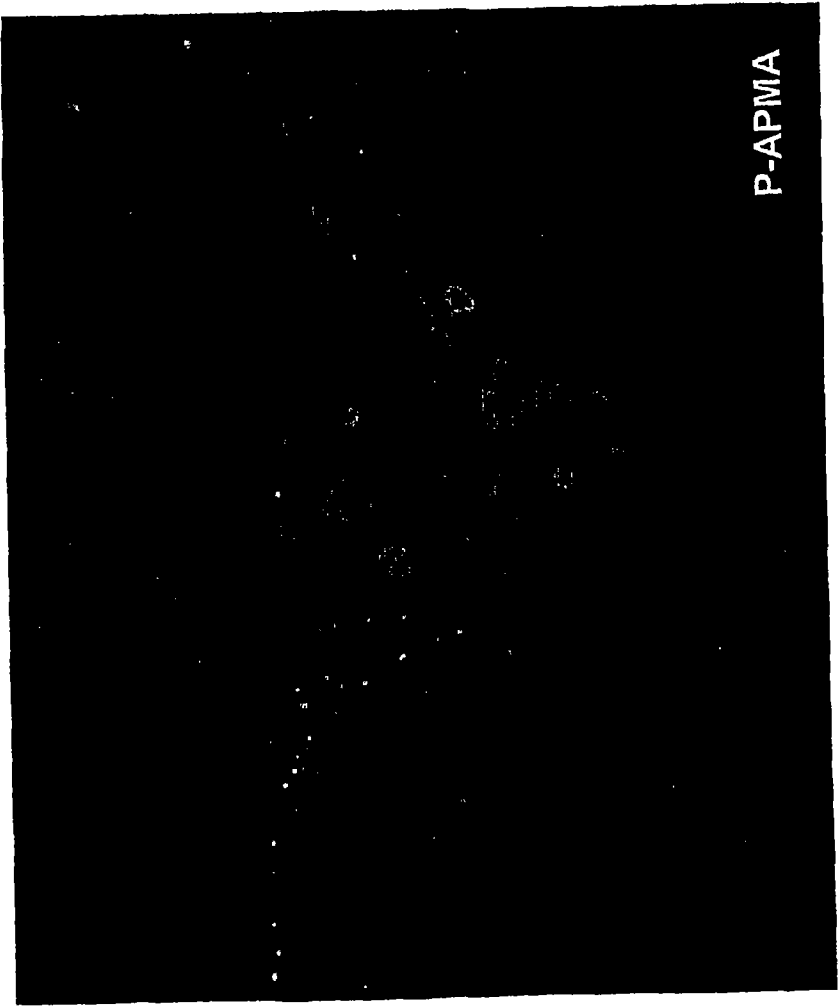


图13

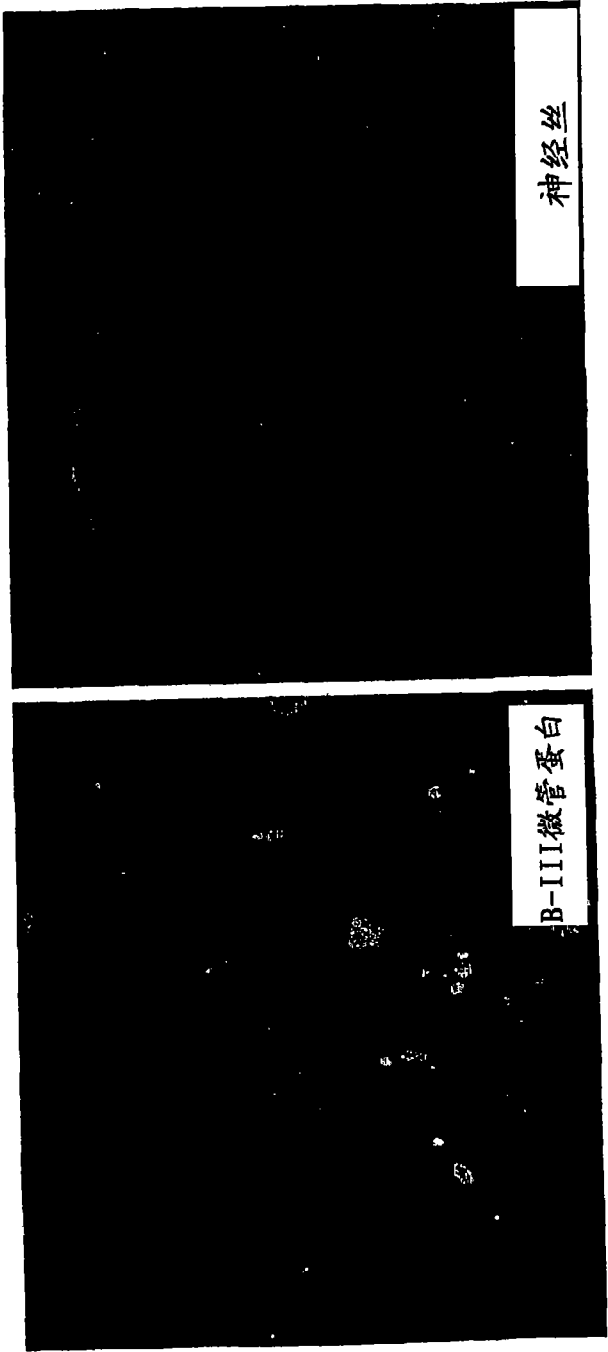


图14

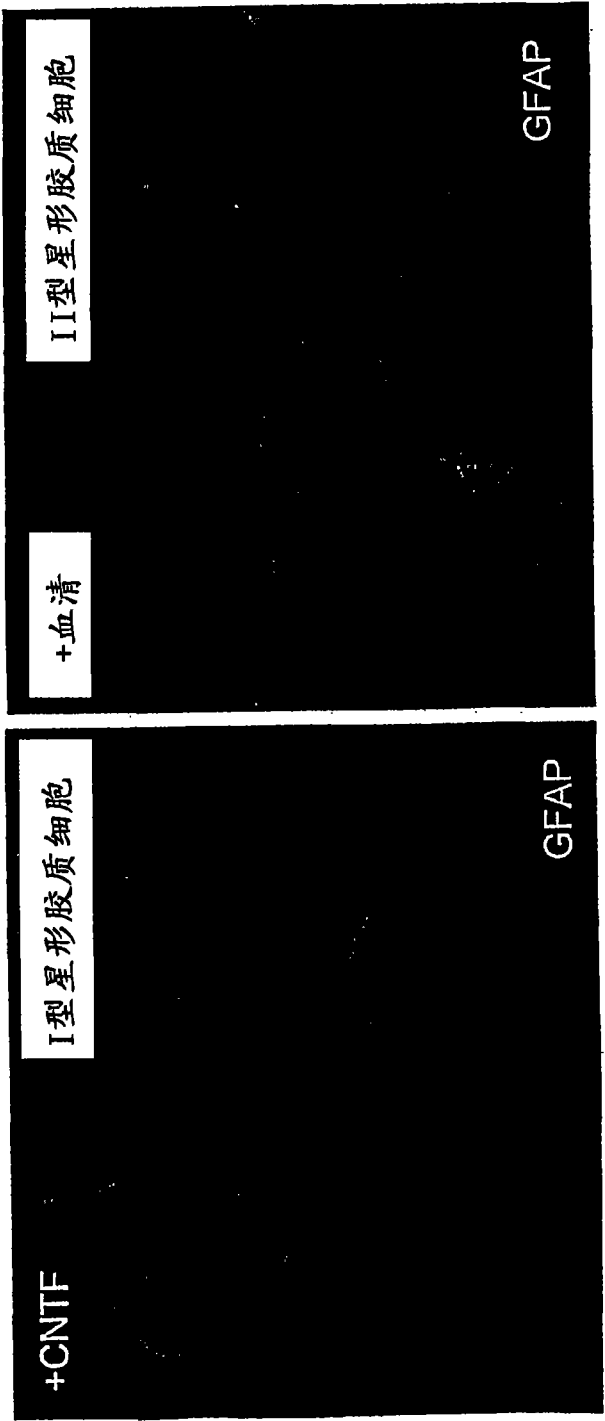


图15