



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101820929 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200880111837. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 10. 10

A61L 27/20(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61L 27/56(2006. 01)

07301451. 6 2007. 10. 11 EP

A61L 27/52(2006. 01)

A61L 27/38(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 5/00(2006. 01)

2010. 04. 12

A61L 27/50(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/EP2008/063672 2008. 10. 10

CN 1268057 A , 2000. 09. 27, 说明书第2-6页.

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 1694955 A , 2005. 11. 09, 说明书第13页实施例4.

W02009/047347 EN 2009. 04. 16

(73) 专利权人 国家健康与医学研究院

地址 法国巴黎

审查员 白姝琼

专利权人 巴黎大学-丹尼斯·迪德罗特第七分校

(72) 发明人 卡特琳·勒维萨热

迪迪埃·勒图尔纳尔

弗雷德里克·肖贝 奥德·奥蒂西耶

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 郑立柱

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

制备用于组织工程的多孔支架的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于组织工程的多孔支架的制备方法。本发明的另一个目的是提供一种由上述方法获得的多孔支架,及其在组织工程、细胞培养和细胞输送中的应用。本发明的方法包括以下步骤:a) 制备碱性水溶液,其含有一定量的至少一种多糖和一种交联剂;b) 冷冻步骤a)的水溶液;c) 升华步骤b)的冷冻溶液;其特征在于,在步骤a)的溶液中发生多糖交联之前进行步骤b)。

1. 一种制备多孔支架的方法,包括以下步骤:

a) 制备碱性水溶液,其含有一定量的至少一种多糖和一种交联剂;

b) 冷冻步骤 a) 的水溶液;和

c) 升华步骤 b) 的冷冻溶液;

其特征在于,所述多糖的交联发生在升华步骤 c) 期间。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述多糖选自下组:右旋糖酐、琼脂、藻酸、透明质酸、菊粉、支链淀粉、肝素、壳聚糖和岩藻依聚糖。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中所述交联剂选自下组:三偏磷酸三钠(STMP)、三氯氧磷( $\text{POCl}_3$ )、环氧氯丙烷、甲醛、水溶性的碳二亚胺和戊二醛。

4. 根据权利要求 3 的方法,其中所述交联剂是三偏磷酸三钠(STMP)。

5. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中步骤 a) 的水溶液被冻干。

6. 根据权利要求 5 的方法,其中步骤 a) 的水溶液在 0.1mBar-6.5mBar 的压力下冻干。

7. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中步骤 a) 的水溶液在步骤 b) 之前倒入模具中。

8. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中所述支架是成型的。

9. 根据权利要求 1 或 2 的方法,进一步包括再水化步骤 c) 获得的支架的步骤。

10. 能够根据权利要求 1-9 任一项的方法获得的多孔支架。

11. 根据权利要求 10 的多孔支架,其中孔径为  $1\ \mu\text{m}$ - $500\ \mu\text{m}$ 。

12. 根据权利要求 10 或 11 的多孔支架,其中孔隙率为 4% -50%。

13. 根据权利要求 10 或 11 的多孔支架,其特征是,所述支架载有一定量的细胞。

14. 根据权利要求 13 的多孔支架,其中所述细胞选自下组:酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞和植物细胞。

15. 根据权利要求 14 的多孔支架,其中所述哺乳动物细胞选自下组:软骨细胞、纤维软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、肌肉细胞、滑膜细胞、骨髓细胞、间叶细胞、上皮细胞、肝细胞、基质细胞、干细胞、胚胎干细胞、衍生自脂肪组织的前体细胞、外周血祖细胞、分离自成人组织的干细胞和遗传转化的细胞;其中所述干细胞和胚胎干细胞不由人类胚胎获得。

16. 根据权利要求 10 或 11 的多孔支架,其用于组织工程、3D 细胞培养或治疗用途的细胞输送。

17. 血管替代物,其用权利要求 10-13 任一项所述的支架制造。

18. 软骨或骨植入物,其用权利要求 10-13 任一项所述的支架制造。

19. 活性药物的控制释放系统,其用权利要求 10-13 任一项所述的支架制造。

## 制备用于组织工程的多孔支架的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于组织工程的多孔支架的制备方法。本发明的另一个目的是提供由上述方法得到的多孔支架,以及其在组织工程、细胞培养和细胞传输中的应用。

### 背景技术

[0002] 组织工程通常定义为通过将细胞接种于适于移植的支架上或支架内而产生组织或器官等效物。所述支架必须为生物兼容的,细胞必须能够在所述支架上附着并增生扩散从而使其形成组织或器官等效物。这些支架可以认为是用于体内或体外细胞生长的基底。

[0003] 理想的生物兼容支架的性质应包括体内或体外支持细胞生长的能力,支持多种细胞类型或细胞谱系生长的能力,被赋予所需的不同程度的弹性或刚性的能力,具有不同程度的生物兼容性的能力,不引起二次伤害而引入体内理想位置的能力,作为载体或储存体用于传送药物、细胞和 / 或生物活性物质至所需作用位置的能力。

[0004] 目前已使用了不同的支架材料用于引导组织再生和 / 或作为生物兼容表面。在许多情况下,生物可降解聚合物材料是优选的,因为支架随着时间降解,最终细胞支架结构整体被细胞所取代。在可用作支持组织生长或再生的支架材料中,包括了凝胶体、泡沫材料、薄片以及不同形式和形状的许多多孔微粒结构。

[0005] 在已公开的可用于组织工程或培养的多种天然聚合物中,可以列举细胞外基质不同组成,包括纤维连接蛋白、不同类型的骨胶原和昆布氨酸,以及角蛋白、纤维蛋白和纤维蛋白原、透明质酸、硫酸肝素、硫酸软骨素等。

[0006] 其他使用的常用的聚合物包括聚(丙交酯-共聚-乙交酯)(PLG)。PLG 为水化降解聚合物,经 FDA 批准用于体内,机械性强。(Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG. Fabrication of biodegradable polymer polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1995 ;7(1) :23-38 ;Wong WH, Mooney DJ. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In :Atala A, Mooney DJ, editors ;Langer R, Vacanti JP, associate editors. *Synthetic biodegradable polymer scaffolds.* Boston :Birkhauser ; 1997. p. 51-82) 然而,它们是输水的,典型地在相对剧烈的条件下形成,使得要素结合和活细胞卡压具有潜在的挑战性。

[0007] 另外,多种水凝胶、一类高度水化的聚合物材料(水的质量含量超过 30%) 用作了支架材料。它们由亲水聚合物链构成,所述聚合物链为合成或天然来源的。所述水凝胶的结构整体性基于聚合物链间通过不同的化学键和物理作用形成的交联。这些应用中的水凝胶通常是可降解的,可以在相对温和的条件下加工,其机械和结构特性和多种组织和细胞外基质相似,并且可以最小的侵入方式传输 (Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 2001 Jul ;101(7) :1869-79.)。因此,多种聚合物已用于加工水凝胶。例如,那些聚合物包括胶原质、明胶、透明质酸(HA) 和壳聚糖。

[0008] 天然多糖的使用也代表了一种有前景的制造基于水凝胶的替代方式,因为它们没

有抗原性和没有免疫原性,它们中的一些呈现出抗血栓形成的效果并且和血管生长因子相互作用。而且,由于其可塑性,基于那些多糖的水凝胶可以成型为不同形式以便于设计治疗性植入物或移植生物材料。

[0009] 例如,Chaouat 等人 (Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials*. 2006 Nov ;27(32) :5546-53. Epub 2006 Jul 20.) 设计了一种新型的基于多糖的支架,其通过使用支链淀粉和右旋糖酐的混合物制备。多糖的化学交联使用交联剂三偏磷酸三钠 (STMP) 进行。然后,在体内检验了用这种支架制备的动脉材料的效果。

[0010] 然而,尽管按照 Chaouat 等人的描述 (2006) 使用多糖制备支架具有优势,应当正视,所得支架孔隙率的不足成为有效的治疗目的使用的缺点。事实上,孔隙率是支架内细胞增殖、完整度和分化的关键特征,因此材料可被用于细胞储库以在体内重新构建组织或器官。

[0011] 因此,亟需开发一种制备多孔支架基质的方法,可用于治疗目的。

## 发明内容

[0012] 因此,本发明的一个目的是提供一种制备多孔支架的方法,包括下列步骤:

[0013] a) 制备碱性水性溶液,其含有一定量的至少一种多糖和一种交联剂;

[0014] b) 冷冻步骤 a) 的水溶液;

[0015] c) 升华步骤 b) 的冷冻溶液;

[0016] 其特征在于,在步骤 a) 的溶液中发生多糖交联之前进行步骤 b)。

[0017] 根据本发明,术语“在步骤 a) 的溶液中发生多糖交联之前进行步骤 b)”的意思是多糖的交联发生在升华步骤 (步骤 c))。

[0018] 本发明的另一目的是提供一种由上述方法得到的多孔支架。

[0019] 本发明的再一目的是提供本发明所述多孔支架在组织工程中的应用。

## [0020] 定义

[0021] 此处所用的术语“多糖”是指包括两个或更多单糖单元的分子。

[0022] 此处所用的术语“碱性溶液”是指具有 pH 大于 7 的溶液。

[0023] 此处所用的术语“水溶液”是指溶剂为水的溶液。

[0024] 此处所用的术语“交联”是指通过共价键将一个聚合物链与另一个聚合物链链接。

[0025] 此处所用的术语“支架”定义为半固体体系,包括一种或多种多糖链的三维网络。基于所采用的多糖 (或多种多糖) 的性质,以及基于网络的性质和密度,这些平衡态的结构能够包括不同量的水。

[0026] 术语“交联剂”包括能够在本发明的多糖链间引起交联的任意试剂。

[0027] 术语“生物可降解”是指在体内降解为无毒化合物的材料,所述无毒化合物可以被排出或进一步新陈代谢。

[0028] 术语“升华”是指从固态直接至气态的物理相变化。更具体地,升华是一个过程,其中物质从固体转化为气体而不经液态。溶液的升华可以通过冻干过程获得。

[0029] 术语“冻干”是指在高真空下通过冷冻溶剂 (例如水) 以及然后将其从冷冻状态

蒸发以干燥深度冷冻的材料。

[0030] 多孔支架及其制备

[0031] 本发明的第一个目的涉及制备多孔支架,包括下列步骤:

[0032] a) 制备碱性水性溶液,其含有一定量的至少一种多糖和一种交联剂;

[0033] b) 冷冻步骤 a) 的水溶液;

[0034] c) 升华步骤 b) 的冷冻溶液;

[0035] 其特征在于,所述在步骤 a) 的溶液中发生多糖的交联之前进行步骤 b)。

[0036] 根据本发明,术语“在步骤 a) 的溶液中发生多糖的交联之前进行步骤 b)”的意思是多糖的交联发生在升华步骤(步骤 c))。

[0037] 在本发明中,可以使用任意类型的多糖。合成或天然的多糖可用于本发明。例如,合适的天然多糖包括但不限于右旋糖酐、琼脂、褐藻酸、透明质酸、菊粉、支链淀粉、肝素、岩藻依聚糖、壳聚糖、小核菌葡萄聚糖、凝胶多糖、淀粉、纤维素及其混合物。可以包括化学修饰的带有如酸基(羧酸、硫酸、磷酸)、氨基(乙胺、二乙胺、二乙氨基乙胺、丙胺)、疏水基团(烷基、苄基)的多糖。可用于制备理想的多糖的单糖包括但不限于核糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖、山梨糖、山梨糖醇、甘露醇、艾杜醇、己六醇及其混合物。许多这些化合物为商品,如 Sigma-Aldrich (St. Louis, Michigan, US)。

[0038] 优选的多糖的平均分子质量为约 10000 道尔顿 - 约 2000000 道尔顿,更优选为约 10000 道尔顿 - 约 500000 道尔顿,最优选的为约 10000 道尔顿 - 约 200000 道尔顿。

[0039] 在本发明的一个实施方式中,本发明使用的制备支架的多糖为中性多糖如右旋糖酐、琼脂、支链淀粉、菊粉、小核菌葡萄聚糖、凝胶多糖、淀粉、纤维素或它们的混合物。在一个优选的实施方式中,支链淀粉和右旋糖酐的混合物用于制备本发明的支架。例如,所述混合物含有 25% 的右旋糖酐和 75% 的支链淀粉。

[0040] 在本发明另一个实施方式中,本发明使用的制备支架的多糖为带正电荷的多糖,如壳聚糖、DEAE-右旋糖酐及其混合物。

[0041] 在本发明另一个实施方式中,本发明使用的制备支架的多糖为带负电荷的多糖,如褐藻酸、透明质酸、肝素、岩藻依聚糖及其混合物。

[0042] 在本发明另一个实施方式中,本发明使用的制备支架的多糖为中性和带负电荷的多糖的混合物,其中,带负电荷的多糖占混合物的 1-20%,优选为 5-10%。

[0043] 在一个特定的实施方式中,交联剂选自三偏磷酸三钠 (STMP)、三氯氧磷 ( $\text{POCl}_3$ )、环氧氯丙烷、甲醛、水溶性碳二亚胺、戊二醛或其他任意适合交联多糖的化合物。在一个优选的实施方式中,交联剂为 STMP。水溶液中交联剂的浓度 (w/v) 为约 1% - 约 6%,更优选为约 2% - 约 6%,最优选为约 2% - 约 3%。优选采用交联剂的量使得多糖相对于交联剂的比例为约 20 : 1-1 : 1,优选为约 15 : 1-1 : 1,更优选为约 10 : 1-1 : 1。许多这些化合物为商品,如 Sigma-Aldrich 的商品 (St. Louis, Michigan, US)。

[0044] 根据不同的应用,含有多糖的水溶液进一步含有不同的添加剂。优选地,添加剂与多糖兼容,且不影响有效的多糖交联。使用的添加剂的量依赖于特定的应用,本领域技术人员可以采用常用的实验方法测定。

[0045] 含有多糖的水溶液可选地包括至少一种抗微生物剂。合适的抗微生物防腐剂为本领域熟知的。合适的抗微生物剂的例子包括但不限于烷基对羟基苯甲酸酯,如甲基对羟

基苯甲酸酯、乙基对羟基苯甲酸酯、丙基对羟基苯甲酸酯以及丁基对羟基苯甲酸酯；甲酚；氯甲酚；对苯二酚；苯甲酸钠；苯甲酸钾；三氯生和氯己定。其他抗微生物剂的例子以及可用的抗感染剂为，但不限于，利福平、二甲胺四环素、氯己定、银离子剂以及基于银的组合物。

[0046] 含有多糖的水溶液还可选地包括至少一种着色剂，以提高溶液的可见度。合适的着色剂包括染料、色素以及天然着色剂。合适的着色剂的例子包括但不限于：阿利新蓝、异硫氰酸荧光素 (FITC) 和 FITC 右旋糖酐。

[0047] 含有多糖的水溶液还可选地包括至少一种表面活性剂。此处所用的表面活性剂是指降低水的表面张力的化合物。表面活性剂可以是离子表面活性剂，如硫酸十二烷基钠，或者中性表面活性剂，如聚氧乙烯醚、聚氧乙烯酯、以及聚氧乙烯山梨聚糖。

[0048] 本发明的关键特征是步骤 b) 在步骤 a) 的溶液中多糖的交联发生前进行（见实施例 1）。温度和时间是控制水溶液交联的主要因素。为了避免或者严重限制多糖的交联，水溶液可以在 37°C 以下制备，优选在 4°C -25°C 制备。而且，步骤 b) 可以尽可能快地进行以避免多糖的交联。

[0049] 一旦水溶液制备好，进行冷冻。水溶液的冷冻可以在不同的速度进行（例如 °C /min）。例如，冷冻可以约 1°C /min- 约 200°C /min 的速度进行，优选约 1°C /min- 约 20°C /min，最优选约 5°C /min- 约 10°C /min。溶液可以在液氮或干冰中冷冻。

[0050] 当水溶液冷冻后，可以开始升华。在一个优选的实施方式中，根据本发明制备多孔支架的方法包括冻干过程。

[0051] 因此，根据本发明，冻干过程在水溶液中的交联过程发生前进行。

[0052] 冻干可以用本领域已知的任何设备完成。主要有三种冷冻干燥机：旋转蒸发仪、多管道冷冻干燥机和盘式冷冻干燥机。这些仪器是本领域熟知的，并且可以通过商业途径获得，例如冻干机 Lyovac (GT2, STERISRotary 滑片泵, BOC EDWARDS)。

[0053] 基本上，深度冷冻的水溶液置于一腔室内。然后腔室温度升至高于液化蒸汽的沸点的水平，由此蒸汽蒸发并除去。例如，腔室的温度可以从 -70°C 至 -1°C，优选 -70°C 至 -40°C，更优选约 -50°C 至 -40°C。腔室的加热伴随着真空流以降低腔室的压力。通常，腔室的真空度为 0.1mBar- 约 6.5mBar。

[0054] 冻干的时间足够长以除去至少 98.5% 的水，优选至少 99% 的水，更优选至少 99.5%。

[0055] 水溶液的冷冻导致从水中形成冰颗粒。不希望被任何理论束缚，在上述温度和压力条件下，冷冻溶液中包括的水被升华，因此，材料中原先由冰颗粒占据的空间中留下空隙，从而生成多孔支架。意外地，交联在冻干过程中发生。

[0056] 因此，所得支架的材料密度和孔尺寸可以通过控制冷冻水溶液的冻干速度变化。冻干过程的关键参数是真空度。在实施例中，发明人已经实际上示出了不同的真空度会导致支架中孔径和密度的不同。

[0057] 支架的平均孔径为约 1 μm- 约 500 μm，优选约 150 μm- 约 350 μm，更优选约 175 μm- 约 300 μm。孔的密度为约 4% -75%，优选约 4% - 约 50%。

[0058] 在另一个实施方式中，本发明的方法还进一步包括水化根据本发明制备的支架的步骤。所述水合可以通过将支架浸没在水溶液中（例如，去离子水、反向渗透过滤的水、盐

水或者含有合适活性成分的水溶液) 足够的时间以生成具有理想含水量的支架。例如, 当需要最大含水量的支架时, 支架浸没在水溶液中足够的时间以使支架膨胀至其最大尺寸或体积。通常, 支架浸没在水溶液中至少约 1 小时, 优选至少约 2 小时, 以及更优选约 4 小时 - 约 24 小时。应当知道水化支架至理想水平所需的时间取决于多个因素, 例如所用的多糖的成分、支架的尺寸 (例如厚度), 水溶液的温度和年度, 以及其它因素。

[0059] 在一个具体的实施方式中, 水化的支架含有 80% 的水, 优选 90% 的水, 最优选 95% 的水。

[0060] 在另一个具体的实施方式中, 含水多糖溶液可以在冷冻和升华前倒入一模具, 从而根据本发明的该方法获得的多孔支架可以具有理想的形式。根据本发明, 可以使用任何几何模具。也可以展望不同的尺寸。例如, 通常, 水溶液可以倒入带有中心轴的管状模具中, 从而多孔支架可以是具有理想外径和内径的管状 (见实施例 6)。模具可以由任何材料制造, 但优选的材料包括非粘性的表面, 例如特氟隆。

[0061] 或者, 本发明的支架可以切割和成型以具有理想的尺寸和形式。

[0062] 本发明的方法还可以进一步包括用合适的方法消毒支架的步骤。支架可以在任何合适的点消毒, 但优选在支架水化后消毒。合适的非放射性消毒技术包括但不限于本领域所知的 UV 暴露、气体等离子体或环氧乙烷方法。例如, 支架可以使用从 Abtox, Inc of Mundelein, Illinois 获得的商标为 PlazLyte 的消毒系统消毒, 或者按照 US-5413760 和 US-5603895 公开的气体等离子体方法消毒。

[0063] 根据本发明的方法生成的支架可以用任何合适的包装材料包装。理想地, 包装材料保持支架的无菌性直至包装材料被破坏。

[0064] 在另一个实施方式中, 一种或多种生物分子可以结合进多孔支架。这些生物分子可以包括, 在其它实施方式中, 药物、激素、抗生素、抗微生物物质、染料、放射活性物质、荧光物质、抗菌物质、化学品和试剂, 包括任何其组合。可以使用物质以增强治疗效果、增强视觉效果、指示合适的方向、抗感染、促进愈合、增加柔软度或任何其它理想的效果。在所述实施方式中, 本发明的支架, 含有如这里前面所述的一种或多种生物分子, 可以用作活性药物的控制释放系统。

[0065] 在一个实施方式中, 生物分子可以包括趋化药物、抗生素、甾体或非甾体镇痛药、抗炎药、免疫抑制剂、抗癌药、各种蛋白质 (例如短链肽、骨形成蛋白质、糖蛋白和脂蛋白)、细胞粘附介质、生物活性配体、整合素结合序列、配体、各种生长和 / 或分化药物 (例如表皮生长因子、IGF-I、IGF-II、TGF- $\beta$ )、生长和 / 或分化因子、间质组织衍生的因子 SDF-1、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板衍生的生长因子、胰岛素衍生的生长因子和转化生长因子、甲状旁腺激素、甲状旁腺激素相关肽、bFGF、TGF $\beta$  超家族因子、BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-12、音猬蛋白、GDF5、GDF6、GDF8、PDGF)、影响特定生长因子上调节的小分子、肌糖蛋白 -C、透明质酸、硫酸软骨素、纤维连接蛋白、核心蛋白聚糖、促凝血酶原激酶、凝血酶衍生的肽、肝素结合区域、肝素、硫酸乙酰肝素、DNA 片段、DNA 质粒、Si-RNA、转染药物或任何其组合。

[0066] 在一个实施方式中, 生长因子包括肝素结合生长因子 (HBGF)、转化生长因子  $\alpha$  或  $\beta$  (TGF)、 $\alpha$  成纤维细胞生长因子 (FGF)、表皮生长因子 (TGF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 SDF-1, 其中有些也是血管生成因子。在另一个实施方式中, 因子包括激素, 例如胰岛素、高

血糖素和雌激素。在一些实施方式中,可以理想地结合因子,例如神经生长因子 (NGF) 或者肌肉形成素因子 (MMF)。在一些实施方式中, TNF  $\alpha/\beta$ , 或者基质金属蛋白酶 (MMPs) 被结合进来。

[0067] 此外,本发明的支架可以可选地包括抗炎药物,例如吲哚美辛、乙酰水杨酸、布洛芬、舒林酸、吡罗昔康和萘普生;凝血酶原药物,例如凝血酶、纤维蛋白原、高半胱氨酸和雌二醇氮芥;和放射不穿透的化合物,例如硫酸钡、金颗粒和氧化铁纳米颗粒 (USPIOs)。

[0068] 此外,本发明的支架可以可选地包括抗血栓药物,例如抗维生素 K 或阿司匹林,抗血小板药物,例如阿司匹林、噻吩并吡啶、双嘧达莫或 氯吡格雷 (其选择性和不可逆地抑制二磷酸腺苷 (ADP)- 引发的血小板聚集), 或者抗凝血药物例如肝素。肝素 (抗凝血药) 和替罗非班 (抗血小板药) 的组合已经显示出能够有效地减轻血栓和栓塞,因此可以结合进来。也可以结合金雀异黄素,一种潜在的异黄酮,其具有剂量依赖的抗血小板和抗增生性质并且抑制导致原发性血栓的胶原质引发的血小板聚集。

#### [0069] 使用本发明支架的方法

[0070] 本发明的支架特征适合于组织工程、修复或再生。孔隙率的差异可以有助于不同细胞类型迁移至支架的合适的区域。在另一个实施方式中,孔隙率的不同有助于含有支架的细胞类型间合适的细胞至细胞连接的发育,这是合适的发育 / 修复 / 再生组织合适的结构化所要求的。例如,细胞过程延伸可以通过改变支架材料的孔隙率而更合适地容纳。因此,支架可以含有任何组织细胞。

[0071] 在一个具体实施方式中,细胞接种到所述支架上。在另一个实施方式中,本发明的支架浸没到培养溶液中足够的时间以使细胞的穿透贯穿整个支架,所述培养溶液含有理想的细胞。

[0072] 在另一个实施方式中,本发明的支架能够在长时间内在培养物中支持接种细胞的活力和生长,而不导致分化。

[0073] 在另一个实施方式中,本发明的支架提供未刺激细胞生长 (未被生长刺激物活化) 的环境。

[0074] 在另一个实施方式中,本发明的支架可以用于研究生理和病理过程,例如组织生长、骨重新塑造、伤口愈合、肿瘤转移 (包括迁移和入侵) 和血管生成。支架能够产生定义的和控制的环境,其中特定的过程可以不含有内源性因子的控制方式调控和研究。

[0075] 特别地,本发明的支架可用于诊断或者毒理学药量的 3D 培养。在这个实施方式中,本发明的支架可以直接在 3D 环境中存在的细胞上评估产品的毒性。在所述实施方式中,本发明的支架用于培养细胞,所述细胞可用于评估产品的毒理和 / 或药理学,例如肝细胞、胚胎干细胞、上皮细胞、角化细胞或者被诱导的多能性干细胞 (iPS 细胞)。

[0076] 在另一个实施方式中,本发明的支架能够在体外和体内支持细胞类型的生长和分化。

[0077] 在另一个实施方式中,细胞是干细胞或者祖细胞。在另一个实施方式中,细胞可以包括但不限于软骨细胞、纤维软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、滑膜细胞、骨髓细胞、间叶细胞、上皮细胞、肝细胞、肌肉细胞、基质细胞、干细胞、胚胎干细胞、衍生于脂肪组织的前体细胞、外周血祖细胞、分离自成人组织的干细胞、被诱导的多能性干细胞 (iPS 细胞) 和遗传转化的细胞、软骨细胞和其它细胞的组合、骨细胞和其它细胞的组合、滑膜细胞和其它

细胞的组合、骨髓细胞和其它细胞的组合、间叶细胞和其它细胞的组合、基质细胞和其它细胞的组合、干细胞和其它细胞的组合、胚胎干细胞和其它细胞的组合、分离自成人组织的祖细胞和其它细胞的组合、外周血祖细胞和其它细胞的组合、分离自成人组织的干细胞和其它细胞的组合以及遗传转化的细胞和其它细胞的组合。

[0078] 在另一个实施方式中, 支架中使用的以及本发明的方法中使用的任何细胞可以被遗传工程以表达理想的分子, 例如肝素结合生长因子 (HBGF)、转化生长因子  $\alpha$  或  $\beta$  (TGF- $\beta$ .)、 $\alpha$  成纤维细胞生长因子 (FGF)、表皮生长因子 (EGF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 SDF-1, 其中有些也是血管生成因子。在另一个实施方式中, 所表达的因子包括激素, 例如胰岛素、高血糖素和雌激素。在另一个实施方式中, 表达神经生长因子 (NGF) 或者肌肉成形因子 (MMF), 或者在另一个实施方式中, 表达 TNF  $\alpha / \beta$ 。

[0079] 在一个实施方式中, 本发明的支架适合于制备血管替代物以代替受损害的动脉, 如 Chaouat 等人所述 (Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials*. 2006 Nov ;27 (32) :5546-53. Epub 2006 Jul 20.)。这些替代物可以使用如前面描述的模具根据本发明的方法制备。这些替代物可以然后含有一定量的细胞以在体外或体内重建血管。在另一个实施方式中, 细胞可以包括但不限于间充质干细胞 (MSC)、内皮祖细胞 (EPCs)、内皮细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞。

[0080] 在另一个具体实施方式中, 本发明的支架适合于制备软骨或骨植入物。用这种方式时, 本发明的支架可以加载软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、血管细胞或其混合物, 以及可以在分化药物的存在下培养。

[0081] 植入的位点取决于需要治疗的患病 / 损伤组织。例如, 为治疗关节软骨、半月板和骨的结构缺陷, 接种细胞的复合支架将置于缺陷位点以促进损伤组织的修复。

[0082] 在中枢神经系统 (CNS) 损伤时, 复合支架可以接种成人神经干细胞、胚胎干细胞、神经胶质细胞和唯支持细胞的组合。在优选的实施方式中, 复合支架可以接种衍生自转化细胞系、异种或异基因来源的唯支持细胞和神经干细胞的组合。在加入干细胞以及随后的植入受伤位点之前, 唯支持细胞可以和复合支架共同培养一段时间。这种方法能够防止 CNS 应用的细胞治疗的主要障碍之一, 即干细胞在移植后的存活。捕获大量唯支持细胞的复合支架可以提供干细胞存活更顺应的环境。

[0083] 相应地, 根据本发明制备的多孔聚合物支架, 可以有效地用作制造人工组织或器官的原材料, 例如人工血管、人工食道、人工膀胱、人工心脏、人工心脏瓣膜、人工皮肤、整形植入物、人工肌肉、人工韧带、人工呼吸器官等。而且, 本发明的多孔聚合物支架可以杂交组织的形式制备, 这是通过混合或者结合在其它类型生物材料上或者内部以及带有衍生自组织或器官的功能性细胞。它也可以有多种生物医学应用, 例如维持细胞功能、组织再生等。

[0084] 或者, 本发明的支架可用于治疗使用的细胞输送。实际上, 本发明的支架可用作制备细胞输送系统的原材料, 所述细胞输送系统可以为治疗或者诊断目的给予主体。在一个具体实施方式中, 本发明的支架可以用于制备能够加载细胞的补丁、生物膜或者敷料, 优选自体同源细胞。人和动物细胞可以在细胞培养后以及直接从冷冻的细胞库获得。例如, 本发明的支架可用于制备含有细胞的敷料, 所述敷料可以应用到皮肤, 以重建或者愈合皮肤。或者, 所述敷料可以用在主体的心脏上以治疗局部缺血 (心肌梗塞)。在这些实施方式中,

支架捕获的细胞可以因此迁移至目标组织或器官。

[0085] 在另一个实施方式中,本发明的支架可用于培养细胞。细胞可以然后通过后加入合适的生长因子刺激以进行分化生长或其它生理过程。含有一种或多种细胞因子、生长因子、激素或其组合的培养介质,可用于使细胞维持在非分化状态,或者用于分化细胞进入特定的方向。

[0086] 更特别地,本发明的支架可用于生成有用的分子。实际上,本发明的支架可以用于提供生物环境,用于在生物反应器内固定细胞,从而细胞能够生产理想的分子。本发明的支架提供培养细胞的机械和生化保护。

[0087] 支架因此可用作细胞储库以生成理想的分子,例如蛋白质、有机分子和核酸。例如,有用的蛋白质包括但不限于生长因子、激素、信号分子、细胞生长抑制剂和抗体。本发明的支架特别有利于制造单克隆抗体。本发明的支架也可用于生产有机分子,例如香料、治疗性分子.....

[0088] 为了这种目的,本发明的支架可以加载任何类型的细胞,包括原核或真核细胞。例如,本发明的支架可以加载细菌、酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等。具体的例子包括 *E. coli*, *Kluyveromyces* 或 *Saccharomyces* 酵母、哺乳动物细胞系(例如 Vero 细胞、CHO 细胞、3T3 细胞、COS 细胞等)以及原代或者建立的哺乳动物细胞培养物(例如由成淋巴细胞、成纤维细胞、胚胎细胞、上皮细胞、神经细胞脂肪细胞等生产)。更特别地,本发明包括已建立的细胞系的使用,例如杂交瘤细胞。或者,细胞可以遗传工程化以表达如上所述的理想的分子。

[0089] 本发明的支架可以加载细胞,所述细胞培养一段时间然后细胞可以从支架回收/提取/分离以进一步使用,例如治疗或诊断性应用或者细胞分析。从支架分离细胞可以包括能够降解支架的酶的使用,例如支链淀粉酶,和/或能够脱附细胞的酶的使用,例如胶原酶、弹性酶或者胰蛋白酶或者细胞脱附溶液的使用,例如 EDTA。

[0090] 本发明将通过下面的附图和实施例进一步说明。

## 附图说明

[0091] 图 1:圆形多孔支架再水化后的显微外观。

[0092] 图 2:多孔水化支架作为冻干过程条件(真空度单位为 mbar)函数的 ESEM 显微观察。比例条:200 微米,高放大率除外(50 微米)。

[0093] 图 3:在 0.1mbar(左)或 6.5mbar(右)制备的多孔干燥支架的 SEM 观察。

[0094] 图 4:在 0.1mbar 或 6.5mbar 制备的多孔支架切片的 H&E 染色的观察。

[0095] 图 5:膨胀比率作为冻干压力的函数。

[0096] 图 6:诺氟沙星从多孔支架中的释放和诺氟沙星从非多孔支架中的释放的比较,所述非多孔支架不使用造孔剂制备。

## 具体实施方式

[0097] 实施例 1:基于多糖的支架的制备:制备支链淀粉/右旋糖酐 75:25 的混合物,其水中总浓度为 24.5% (w/v)(支链淀粉, MW 200,000, Hayashibara Inc., Okayama, Japan; 右旋糖酐 MW 500,000, Pharmacia)。多糖的化学交联使用交联剂三偏磷酸钠 (STMP) (11%

(w/v), Sigma) 在碱性条件下进行。简言之, 9mL 多糖溶液和 1mL NaOH 10M 混合, 然后向该混合物中加入 1mL 水中的 300mg STMP。溶液立即倾入 60mm 的 Peri 盘中, 然后在  $-80^{\circ}\text{C}$  储存。交联在冷冻的混合物上于 Lyovac 冻干机 (GT2, STERIS 旋叶真空泵, BOC EDWARDS) 中在冻干过程中进行。支架冻干 24h 以完全除去水。在冻干过程中交联的支架是不透明的并且稍微有点脆。它们能够容易地切割成理想的尺寸和形状以及能够再水化 (图 1)。

[0098] 对照试验通过冻干在  $50^{\circ}\text{C}$  进行化学交联后获得的支架进行。然而, 这些干燥的支架不能合适地再水化, 因为它们的整体结构在冻干过程后被破坏了。另一个试验通过在过程中省略化学交联剂进行。在这种条件下, 冻干方法只会形成溶液而不是支架。

[0099] 实施例 2: 冻干条件的影响: 根据实施例 1 进行多糖支架段制备。在冻干步骤, 使用控制的泄漏调节不同的真空 (0.1mbar, 0.75mbar, 3mbar, 1.5mbar 和 6.5mbar)。

[0100] 所得支架采用环境扫描电子显微 (ESEM) 和扫描电子显微 (SEM) 表征。水合状态的支架表面直接使用 ESEM-FEG (Philips XL 30, Netherlands, 4torr 压力下的加速电压为 15kV) 观察, 因为 ESEM 技术不要求样品的任何脱水。膨胀状态的支架段 ESEM 图表示这些支架是多孔的 (图 2)。在 0.1mbar (高真空) 下冻干的支架呈现的孔比在 6.5mbar (低真空) 下制备的那些具有更大的直径。对于低真空条件, 支架段网络组织得更好、更均匀, 相互连接的孔贯穿支架。干燥支架段 SEM 图证实了在冻干过程中交联的支架是多孔的 (图 3)。对于组织学染色, 支架固定于 4% 多聚甲醛 / PBS 中, 然后 OCT-包埋 (Tissue Teck-OCT (EMS, Washington, PA), 并且在液氮冷却的异戊烷中冷冻。冷冻的样品使用低温恒温器 (Leica CM 1900) 低温切割 ( $10\ \mu\text{m}$  切片)。苏木素 - 伊红染色在支架切片上进行以使支架的结构呈现。

[0101] 组织学切片上支架段外观和电子显微图像 (图 4) 一致。支架的内孔结构可以通过改变冻干的真空度调节。和高真空 (0.1mbar) 下交联的支架呈现的松散网络相比, 低真空下 (6.5mbar) 交联的支架呈现出具有小孔的结构。

[0102] 实施例 3: 膨胀比率: 根据实施例 2 进行多糖支架的制备。冻干的支架用刀片切割以获得矩形的支架 ( $2.5\text{cm} \times 2\text{cm}$ , 厚: 3mm)。支架用去离子水洗涤以除去所有缓冲液, 然后在  $50^{\circ}\text{C}$  脱水 36 小时。干燥 (W 干燥) 和用去离子水再水合 24 小时后膨胀状态 (W 膨胀) 状态的样品的重量用电子天平 (AG 204 Deltarange® mettler Toledo; max 81g/210g; d = 0.1mg/1mg) 检测。称重前, 支架小心地放在软纸上以除去过量的水。每个试验重复进行三次。膨胀比率根据公式计算:  $\text{膨胀比率} = ((W \text{ 膨胀} - W \text{ 干燥}) / W \text{ 干燥}) \times 100$ 。

[0103] 多孔支架的膨胀比率随着冻干真空的增加而增加 (图 5)。发现在最低真空 (6.5mbar) 下制备的支架的膨胀比率最低。

[0104] 实施例 4: 细胞浸润: 在实施例 1 制备的支架上培养 Wistar 大鼠的股骨髓基质干细胞 (MSC)。使用圆形冲头以切出 6mm 直径和 1mm 厚度圆形多孔支架。接种细胞之前, 支架在 24 孔板中于  $37^{\circ}\text{C}$  下在培养介质中平衡 24 小时。培养介质由低葡萄糖 DMEM (Gibco, Life Technology, New York) 和 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素 (Sigma) 组成。细胞接种在支架的顶部 (细胞密度 106 细胞 / 支架)。补加抗坏血酸 ( $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的细胞介质每 2-3 天换一次。样品维持培养长达 1 周。对照为在介质中孵育的未接种的多孔支架。使用其他细胞类型成功进行了类似的试验, 例如动物和人类来源的原代血管平滑肌细胞和内皮细胞。

[0105] - 初始附着: 使用 MSC 浸润支架, 细胞在少于 2 小时内附着在多孔支架表面。

[0106] - 细胞示踪: 细胞示踪通过在接种步骤前用荧光染料 PKH26 (Sigma) 根据生产商的

说明标记细胞进行。细胞接种在未标记和 FITC- 支架上。接种的支架在通过共聚焦显微镜 (Zeiss LSM 510) 分析前固定于 4% 多聚甲醛 /PBS 中。

[0107] 示踪显示 PKH26 标记的 -MSC 贯穿支架的孔。代表性的凝胶内地细胞分布图像于第 1 天和第 7 天在 70 和 90 微米深度获取。共聚焦图像 z- 轴的投影证实了凝胶内地细胞浸润。我们注意到从第 1 天至第 7 天支架内细胞密度的增加。

[0108] -细胞活力 :细胞活力用 Calcein AM (Calbiochem, San Diego CA) 检测, 其作为一种活细胞脱水的聚阴离子染料, 因此能够产生一种强的均一的绿色荧光 ( 波长 485-535nm)。这种染料在第 1、第 5 和第 7 天根据生产商的说明加入到多孔的未标记和 FITC- 支架中。接种的支架在通过共聚焦显微镜 (Zeiss LSM 510) 分析前固定于 4% 多聚甲醛 /PBS 中, 以呈现支架和 FITC- 支架中的细胞分布。

[0109] 通过这种检测, 我们证实了大部分细胞在第 1 天和第 7 天在多孔支架的表面和内部是活的。

[0110] 实施例 5 :蛋白质结合进支架 :根据实施例 1 制备多糖支架, 但有以下改变以结合粘附蛋白, 例如明胶和 I 型胶原质。对于明胶, 9mL 多糖溶液和 1mL NaOH 10M 混合, 然后向该混合物中加入 1mL 水中的 300mg STMP, 所述水含有 500  $\mu$ g 明胶 (500  $\mu$ L 0.1% 明胶溶液)。I 型胶原质的结合通过在加入交联试剂 (300mg 于 500  $\mu$ L) 前向多糖溶液中加入 500  $\mu$ L 0.4% 的胶原质溶液中进行。支架厚切片的考马斯亮蓝和天狼猩红染色证实了支架中的蛋白质分布。平均蛋白质含量估计为每 6mm 直径支架约 1  $\mu$ g 明胶, 以及每 6mm 直径支架约 4  $\mu$ g 胶原质。

[0111] 实施例 6 :管状支架用作血管替代物 :按照实施例 1 描述制备的基于多糖的管状支架可用作血管替代物。

[0112] 按照实施例 1 描述制备的水性溶液倒入家庭制作的管式模具中, 其由 20G 针和针帽组成。针 (20G  $\times$  1<sup>1/2</sup>" 或 0.9  $\times$  40mm) 用作中心轴以生成一个光滑的腔管 (2mm 腔管直径) 表面。多糖 /STMP 溶液使用 1ml 注射器通过针帽注入 针中。所得管状支架的内径和外径都取决于针及其帽的尺寸 ( 也使用了 18G 或 21G 针制备了样品)。

[0113] 根据实施例 1, 模具立即在 -80 $^{\circ}$ C 冷冻。然后, 根据前面的描述冻干混合物。冻干后, 支架容易地从模具取出。在 PBS 中再水化后, 获得管状的支架。细胞, 例如平滑肌细胞或间充质干细胞, 可以在再水化过程期间接种到管状支架, 然后其他细胞, 例如内皮细胞或内皮祖细胞, 可以加载到管状支架的腔管内。

[0114] 实施例 7 :药物结合进支架 :根据实施例 1 制备多糖支架, 但有以下改变以结合药物, 例如诺氟沙星。诺氟沙星, 一种氟喹诺酮羧酸, 是一种使用广泛的抗微生物药物。现在它被认为是一种低生物利用度的模型化合物, 主要是由于其低水溶性。诺氟沙星 (Sigma) 以固态 (60mg) 加入到多糖溶液 (10g) 中, 混合物搅拌直至达到均匀。所得混合物然后和 1mL NaOH 10M 混合, 然后往混合物中加入 1mL 中的 300mg STMP。然后按照实施例 1 进行交联过程。

[0115] 通过将多孔支架在 PBS 中于 37 $^{\circ}$ C 孵育长达 24 小时获得释放曲线。上清液中的诺氟沙星含量在 274nm 用分光光度法检测。图 6 示出了诺氟沙星从多孔支架中的释放和诺氟沙星从非多孔支架中的释放的比较, 所述非多孔支架不使用造孔剂制备。

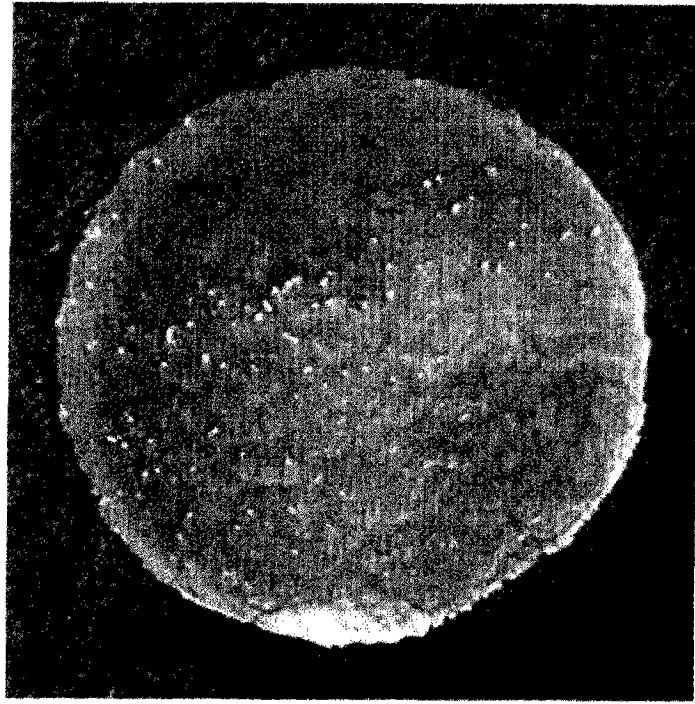


图 1

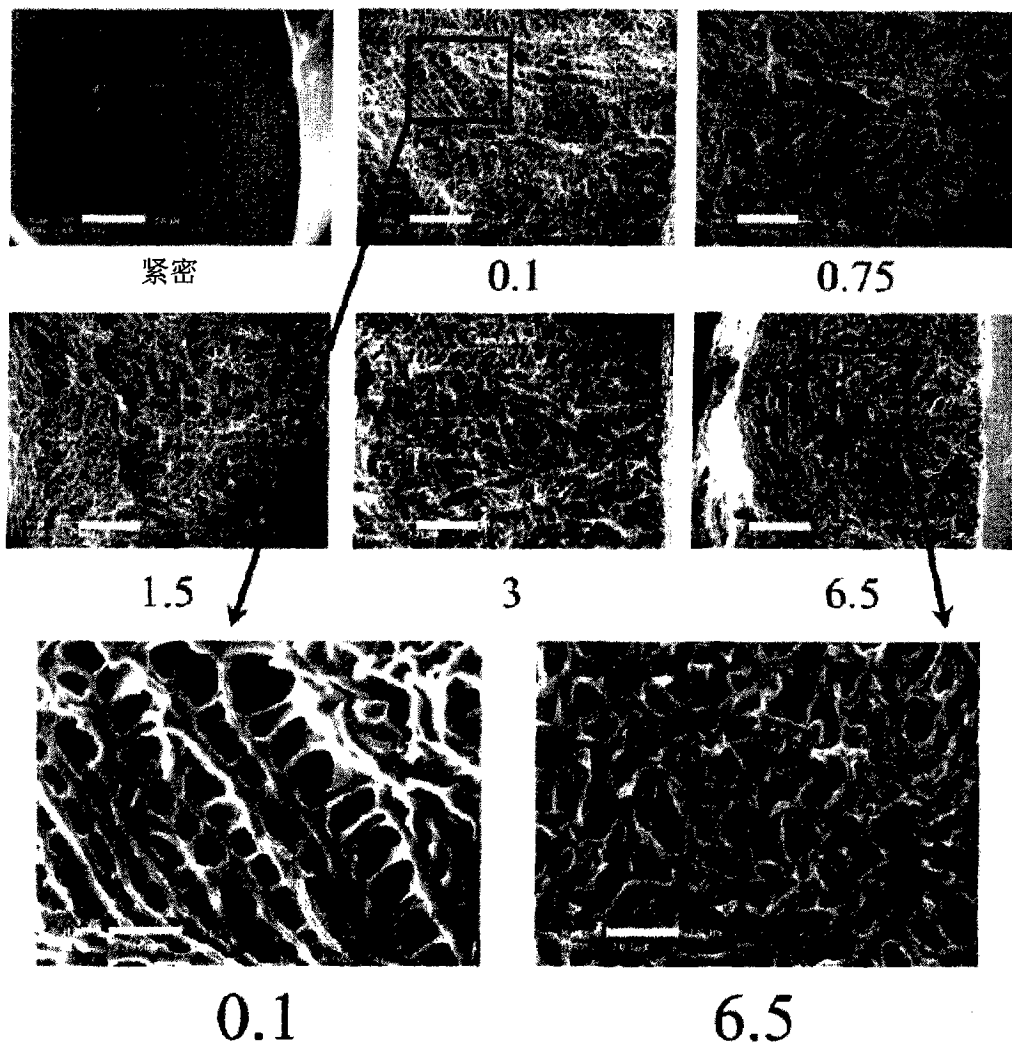


图 2

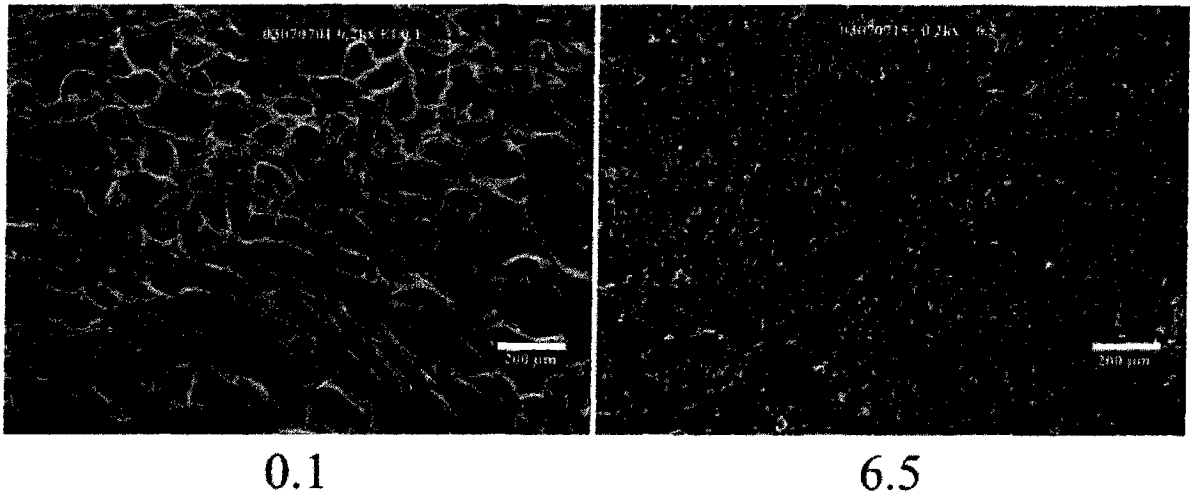


图 3

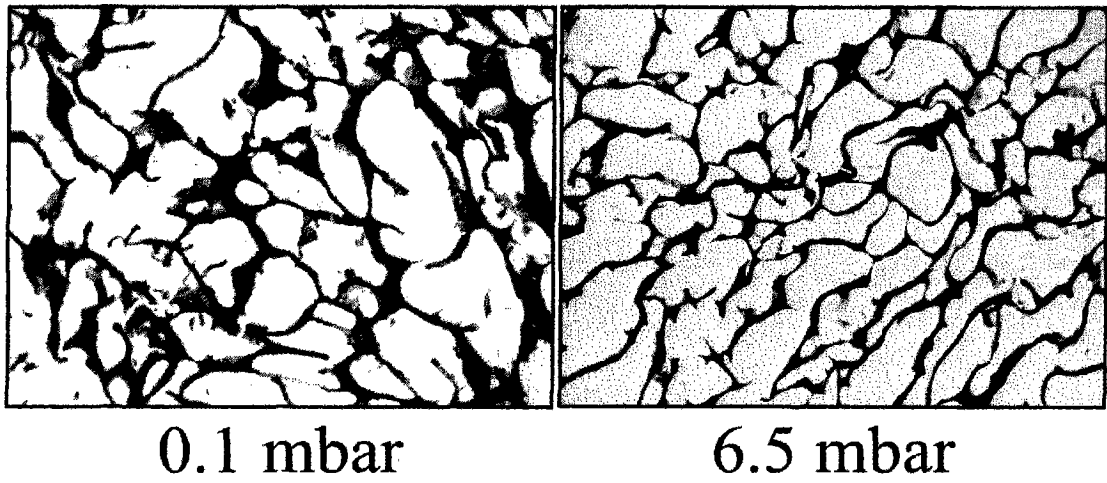


图 4

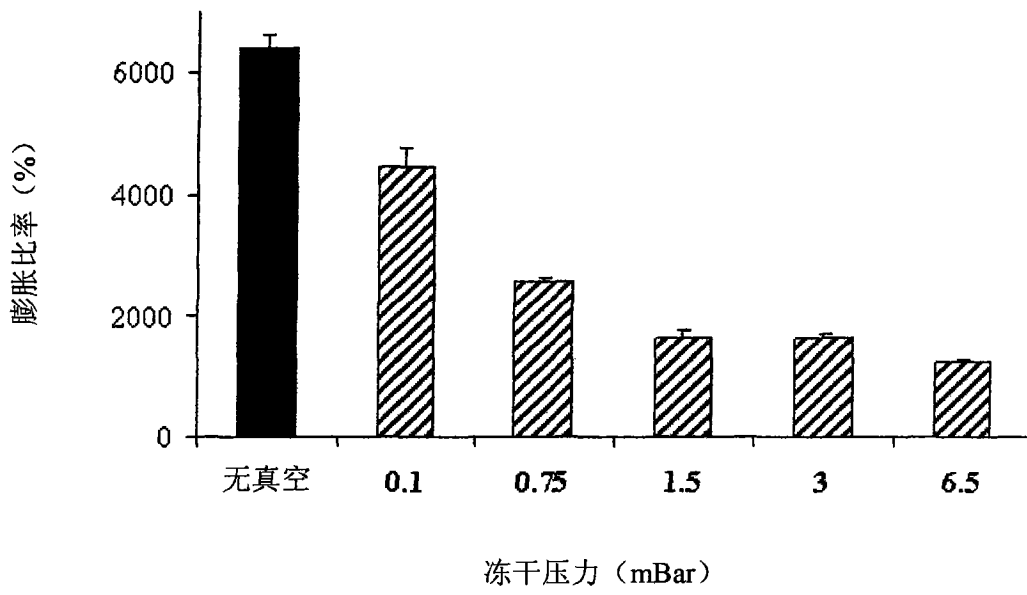


图 5

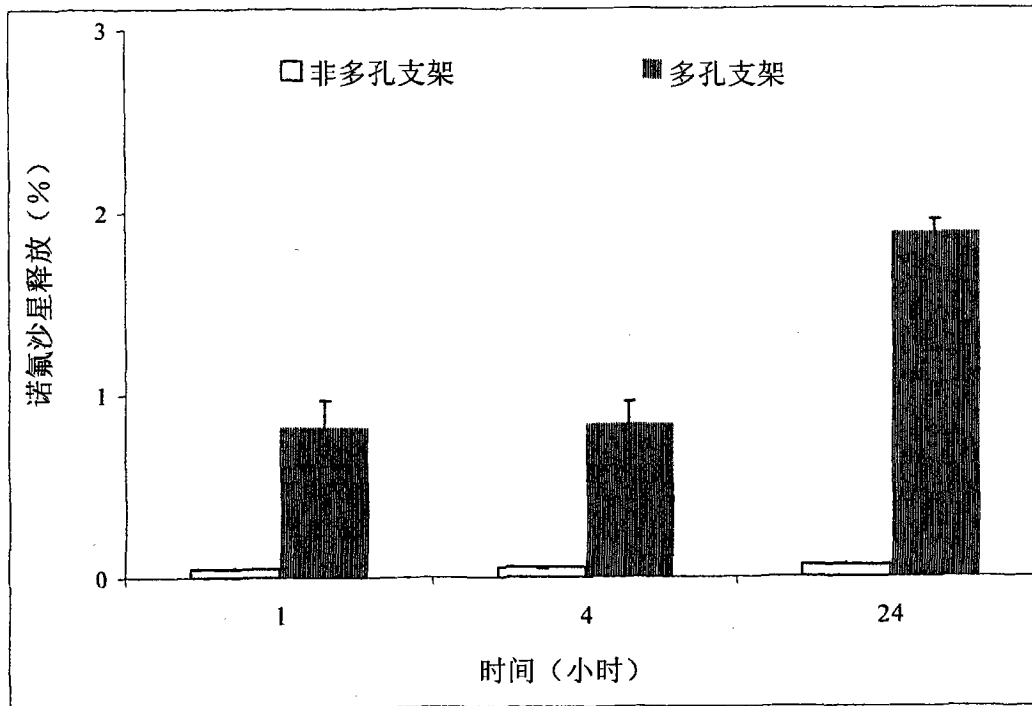


图 6