



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101522788 B

(45) 授权公告日 2013.04.10

(21) 申请号 200780033287.6

(22) 申请日 2007.08.02

(30) 优先权数据

2006904181 2006.08.02 AU

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.03.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2007/001085 2007.08.02

(87) PCT申请的公布数据

W02008/014561 EN 2008.02.07

(73) 专利权人 宝利诺沃生物材料有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 帕蒂拉贾·阿拉奇拉格·古纳蒂莱克

罗尚·蒂勒尔·安东·马亚邓恩

拉朱·阿迪卡里 亨·吉·塔因

塔姆·蓬·西·勒

杰罗姆·安东尼·沃克迈斯特

约翰·艾伦·莫里斯·拉姆肖

雅辛塔·弗朗西丝·怀特

特拉西·安·特伯

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 韩宏星

(51) Int. Cl.

C08L 33/04 (2006.01)

A61L 27/14 (2006.01)

C08F 290/02 (2006.01)

C08F 299/00 (2006.01)

C08G 63/08 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2002/0103347 A1, 2002.08.01, 实施例 1, 图 4.

US 2006/0074208 A1, 2006.04.06, 说明书第 [0007]-[0102] 段.

CN 1774460 A, 2006.05.17, 说明书第 4 页第 10 行 - 第 17 页第 23 行、实施例部分.

US 5334681 A, 1994.08.02, 说明书第 4 栏第 11 行 - 第 12 栏第 68 行.

US 6388047 B1, 2002.05.14, 说明书第 1 栏第 45 行 - 第 8 栏第 46 行.

审查员 时钢印

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 7 页

(54) 发明名称

生物相容性聚合物组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种包含亲水性节段和疏水性节段以及水的生物相容性预聚物,其中所述疏水性节段具有至少一个烯键式不饱和官能团,并且至少 5% 的所述节段具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。本发明还提供了包含亲水性预聚物和疏水性预聚物以及水的生物相容性预聚物组合物,其中至少一种所述疏水性预聚物具有至少一个烯键式不饱和官能团,并且至少 5% 的所述预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。本发明还提供了本发明的预聚物或预聚物组合物在生物医学应用(如组织工程中作为骨替代物或支架以及在伤口处理)中的用途。

1. 一种生物相容性预聚物,其包含亲水性节段和疏水性节段以及水,其中所述疏水性节段具有至少一个烯键式不饱和官能团并且至少 5%的所述疏水性节段具有两个或更多个烯键式不饱和官能团,其中所述疏水性节段包含选自羟基、硫醇、胺或羧基的至少一个官能团,其中所述亲水性节段包含至少一个异氰酸基。

2. 权利要求 1 的生物相容性预聚物,其中至少 25%的所述疏水性节段具有两个或更多个烯键式不饱和基团。

3. 权利要求 1 的生物相容性预聚物,其中至少 40%的所述疏水性节段具有两个或更多个烯键式不饱和基团。

4. 权利要求 1~3 中任一项的生物相容性预聚物,当其与水混合时其为可溶于水的、可与水混溶的或者与水形成乳液或糊。

5. 一种生物相容性预聚物组合物,其包含亲水性预聚物和疏水性预聚物以及水,其中所述疏水性预聚物中至少一个具有至少一个烯键式不饱和官能团并且至少 5%的所述疏水性预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团,其中所述疏水性预聚物包含选自羟基、硫醇、胺或羧基的至少一个官能团,其中所述亲水性预聚物包含至少一个异氰酸基。

6. 权利要求 5 的生物相容性预聚物组合物,其中至少 25%的所述疏水性预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。

7. 权利要求 5 的生物相容性预聚物组合物,其中至少 40%的所述疏水性预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。

8. 权利要求 5~7 中任一项的生物相容性预聚物组合物,当其与水混合时其为可溶于水的、可与水混溶的或者与水形成乳液或糊。

9. 一种生物相容性聚合物组合物,其为亲水性预聚物和疏水性预聚物和水反应产物,其中至少一种疏水性预聚物具有至少一个烯键式不饱和官能团并且至少 5%的所述疏水性预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团,其中所述疏水性预聚物包含选自羟基、硫醇、胺或羧基的至少一个官能团,其中所述亲水性预聚物包含至少一个异氰酸基。

10. 权利要求 9 的生物相容性聚合物组合物,其中至少 25%的所述疏水性预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。

11. 权利要求 9 的生物相容性聚合物组合物,其中至少 40%的所述疏水性预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。

12. 权利要求 9~11 中任一项的生物相容性聚合物组合物,当其与水混合时其为可溶于水的、可与水混溶的或者与水形成乳液或糊。

13. 一种固化的生物相容性聚合物,其包含根据权利要求 1~12 中任一项的预聚物、预聚物组合物或聚合物组合物与至少一种引发剂的反应产物。

14. 一种生物相容性支架,其包含根据权利要求 1~12 中任一项的预聚物、预聚物组合物或聚合物组合物与至少一种引发剂的反应产物。

15. 根据权利要求 1~12 中任一项的预聚物、预聚物组合物或聚合物组合物与至少一种引发剂作为用于组织工程应用的生物相容性支架的用途。

生物相容性聚合物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及生物相容性预聚物组合物。所述预聚物组合物能够在生物成分（如细胞和生长因子）存在下固化（curing）而形成交联的聚合物网络，并且能用于细胞递送和生物医学应用，比如组织工程、药物递送、创伤愈合中的生物粘合剂（bioadhesive）和支架、骨替代物或用于神经修复的支架、牙用和牙周用的粘固粉（cement）以及抗粘剂或保护性屏障。

[0002] 背景技术

[0003] 开发组织工程产品和疗法的一个主要障碍是缺乏可在组织再生过程中用作细胞递送平台并形成用于细胞生长以及提供机械支持的三维支架的合适基质。这样的聚合物体系可用于关节镜下递送细胞以修复体内受损的组织。这些细胞递送体系可利用组织工程领域的全部潜能并帮助机体修复其受损的组织和器官。尽管在用于制造支架的合适聚合物的设计和开发方面已有很多新近进展，但现有的聚合物体系仍不能满足细胞递送的苛刻标准。

[0004] 如果使这种聚合物体系可用于细胞递送，则必需达到几个标准。其必须在固化之前和之后都没有细胞毒性，并且在机体内不引起炎症反应。引发聚合反应以形成聚合物网络的方法应当是细胞和其它所用成分能耐受的。所形成的聚合物网络应当具有足够的孔隙以促进细胞-聚合物相互作用，并可将营养物运输至细胞，并且还提供足够空间用于细胞外基质的生长。可根据待再生组织的类型而被调整成具有不同机械性能的聚合物体系在不同类型的生物组织再生中具有优势。例如，设置为高模量材料的体系将可用在整形外科应用中。而且，聚合物/细胞混合物的粘度应当是可利用注射器或关节镜方法将其递送的粘度。这在利用微创外科手术技术进行治疗以修复受损的机体组织（例如折骨、受损的膝软骨、或其它机体组织和器官）中提供了实质性优点。

[0005] 已经研究了将天然聚合物（例如藻酸盐、纤维蛋白、琼脂糖、胶原、甲基纤维素、透明质酸（hyaluronon）和基于肽的水凝胶）作为细胞递送体系并取得了一定成功。主要由于这些聚合物能容纳大量水并且具有良好的生物相容性，细胞能在这些体系中保持活力。因此，开发基于天然聚合物的制剂主要用作细胞包封产品。利用一些聚合物的热可逆性或在某些情形下利用离子强度转化为凝胶来实现由这些聚合物形成凝胶。已经将天然聚合物和某些合成聚合物的这些性质用在细胞包封体系中。

[0006] 还对引入可交联官能团的化学改性进行了研究。这些聚合物体系的主要缺点是交联水凝胶的机械强度非常差。虽然这些体系可用作细胞包封体系，但它们在组织工程产品和疗法中的效用仍是有限的，尤其是在需要高机械强度的凝胶时。

[0007] 同样，已经研究了将合成聚合物用来制备用于细胞包封/递送目的的水凝胶。已经研究了将亲水性聚合物（例如利用丙烯酸酯进行末端官能化的聚乙二醇）用于细胞包封。通过交联形成的凝胶的机械强度通常非常差，与基于天然聚合物的那些凝胶并没有很大的区别。虽然合成聚合物可为开发具有合适机械强度的体系提供最好的选择，但迄今所报道的合成聚合物体系并没有提供适当的机械性质，也不具备容纳细胞而不影响细胞活力

的能力。

[0008] 承载负荷的组织（如软骨和骨）的修复和再生需要细胞递送聚合物体系在组织再生得以完成的相当长一段时间内具有足够的机械强度。理想地，所述机械强度应当与待修复或待再生组织类型的机械强度具有可比性。机械强度较差的凝胶很可能在缺陷部位修复之前由于这种组织将充分承受的压缩力、扭力或拉力而破裂。一般说来，基于天然聚合物和合成聚合物的凝胶在这些情况下并不提供足够的机械支持。因此，需要根据待修复/再生组织的类型进行加工以具有足够机械强度的细胞递送聚合物体系。还需要凝胶在与聚合物交联之前和之后均保持细胞友好的环境。理想地，一旦损伤被修复，聚合物便降解并且降解产物应完全从机体释放。

[0009] 发明内容

[0010] 本发明涉及可容纳生物成分（比如细胞和生长因子）的生物相容性预聚物，并提供了使细胞在将所述预聚物递送至缺陷部位的足够长一段时间内保持活力的环境。所述预聚物适于通过注射或关节镜形式的方法进行递送并可通过辐射或其它方法进行交联而不损害存在于所述组合物中的细胞或其它组分。本发明还涉及固化的（cured）聚合物终产物，其保持生物相容性并提供足够的机械强度供细胞迁移、繁殖以及重建所述生物组织结构。

[0011] 根据本发明，提供了一种生物相容性预聚物，其包含亲水性节段和疏水性节段以及水，其中所述疏水性节段具有至少一个烯键式（ethylenically）不饱和官能团，并且至少 5% 的所述节段具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。

[0012] 还提供了一种生物相容性预聚物组合物，其包含：

[0013] 亲水性预聚物和疏水性预聚物以及水，其中至少一种所述疏水性预聚物具有至少一个烯键式不饱和官能团，并且至少 5% 的所述预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。

[0014] 根据本发明，还提供了一种生物相容性聚合物组合物，其为亲水性预聚物和疏水性预聚物以及水的反应产物，其中至少一种疏水性预聚物具有至少一个烯键式的不饱和官能团，并且至少 5% 的所述预聚物具有两个或更多个烯键式不饱和官能团。

[0015] 术语“烯键式不饱和官能团”指含有通过两个碳原子连接的双键或叁键的官能团，比如能够经受自由基聚合反应的丙烯酸基（acrylate）、甲基丙烯酸基（methacrylate）和烯丙基。

[0016] 一些所述疏水性预聚物是新的并构成了本发明的另一个方面。因此，本发明还提供了疏水性（共聚）多元醇，其包含含有来自 α -羟基酸的重复单元的多个取代基，所述 α -羟基酸连接在核心分子上并与其化学键合。

[0017] 在一个优选的实施方案中，所述疏水性（共聚）多元醇是通过核心分子与羟基酸的聚合反应而制备的。

[0018] 当与水混合时，所述预聚物是可溶于水的、可与水混溶的或者与水形成乳液或糊（paste）。因为该预聚物是生物相容性的，所以它们与细胞、生长因子和其它生物或非生物成分以及合适的细胞培养基组合，以给细胞提供营养物从而使其保持活力和增殖以便使组织和相关的细胞外基质生长。细胞在预聚物中保持其活力，并且不受与所述固化过程（用于将预聚物转化为交联的聚合物网络）相关的化学和物理变化的损伤。可向所述预聚物组

合物中加入至少一种引发剂以引发聚合反应并将所述预聚物转化为交联网络。

[0019] 本发明还提供了一种固化的生物相容性聚合物,其包含上述预聚物组合物与至少一种引发剂的反应产物。

[0020] 本发明还提供了一种生物相容性支架,其包含上述预聚物组合物与至少一种引发剂的反应产物。

[0021] 还提供了上述预聚物组合物与至少一种引发剂用作组织工程应用的生物相容性支架的用途,如创伤处理以及骨、软骨和神经的修复。

[0022] 还提供了一种处理有此需要的对象中的伤口和受损伤的骨、软骨或神经的方法,所述方法包括:植入由上述固化的生物相容性聚合物离体制备的支架;或者

[0023] 注射未固化形式的上述预聚物组合物以及至少一种引发剂用于在体内固化并制得支架。

[0024] 详细描述

[0025] 本发明涉及具有亲水性节段和疏水性节段以及烯键式不饱和官能团的生物相容性预聚物以及含有至少一种亲水性预聚物和至少一种疏水性预聚物的生物相容性预聚物组合物。所述预聚物组合物当与水混合时是可与水混溶的、可溶的或者形成乳液。

[0026] 本发明还涉及可用作组织工程应用之支架的固化的生物相容性聚合物,其可通过使所述预聚物组合物与至少一种引发剂反应而形成交联网络而制得。

[0027] 术语“生物相容性”包括组织相容性并指当与活的动物或人的细胞和/或体液接触时的相容性。

[0028] 疏水性/亲水性预聚物

[0029] 术语“预聚物”指尚在固化阶段有待固化的聚合物。

[0030] 术语“疏水性预聚物”指具有使其不溶于水或与水不相混溶并且本身不能与水形成乳液的节段/官能团的预聚物。

[0031] 术语“亲水性预聚物”指具有使其可溶于水、与水可混溶或者当与水混合时能够形成乳液或糊的节段/官能团的预聚物。

[0032] 所述疏水性预聚物优选包含源自疏水性多元醇的节段并且可以是有规支化的(比如星形聚合物)或树枝状的或无规支化的,如超支化的。所述疏水性预聚物优选具有至少两个烯键式不饱和官能团以及至少一个其它官能团(如羟基、硫醇、胺或羧基)以与所述亲水性预聚物的异氰酸基(isocyanate)进行反应。

[0033] 所述亲水性预聚物优选由亲水性线形多元醇和二异氰酸酯(diisocyanate)制得,使得所述预聚物具有至少一个异氰酸基官能团用于与所述疏水性预聚物反应。选择所述预聚物中亲水性节段和疏水性节段的相对比例,使得所述预聚物当与水混合时是可溶于水的、可与水混溶的或者与水形成乳液或糊。

[0034] 如果希望的话,可以通过颠倒亲水性和疏水性顺序而制备所述亲水性预聚物和疏水性预聚物。例如,可利用亲水性多元醇制备所述星形/树枝状/超支化预聚物,可利用疏水性多元醇制备所述基于氨基甲酸酯的线形预聚物。

[0035] 术语“多元醇”指具有至少两个或更多个羟基官能团的分子,其与异氰酸基反应而形成氨基甲酸酯基。多元醇的实例包括但不限于二醇、三醇和大单体(macromer)如大二醇(macrodial)。优选地,所述多元醇的分子量为300~10000,更优选为300~5000,甚至更

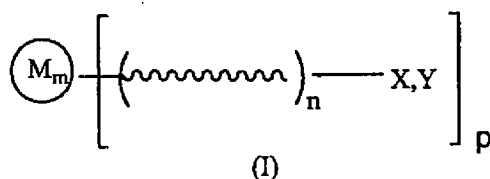
优选为 300 ~ 2000。应当理解,所述分子量值在本文中指“数均分子量”。可使用具有两个或更多个羟基、硫醇基、胺基和羧基的低聚物或它们的任意组合来制备根据本发明的预聚物。

[0036] 合适的疏水性多元醇包括基于聚酯、聚醚、聚碳酸酯、聚硅氧烷、聚酸酐、聚原酸酯、聚内酯、聚酰亚胺和聚磷腈的三元或多元羟基或胺基官能化的低聚物。

[0037] 合适的亲水性多元醇包括聚乙二醇,聚丙二醇,聚乙烯醇,以及基于丁二硫醇、己二硫醇或四(3-巯基丙酸)季戊四醇酯(pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionate))的聚硫醇或者它们的共聚物。

[0038] 本发明预聚物的优选结构由以下的通式(I)和(II)表示:

[0039]



[0040] 其中

[0041] ~~~~~代表源自 α -羟基酸、二羟基化合物、二羧基化合物、二醇或它们的混合物的重复单元;

[0042] M 是核心分子;

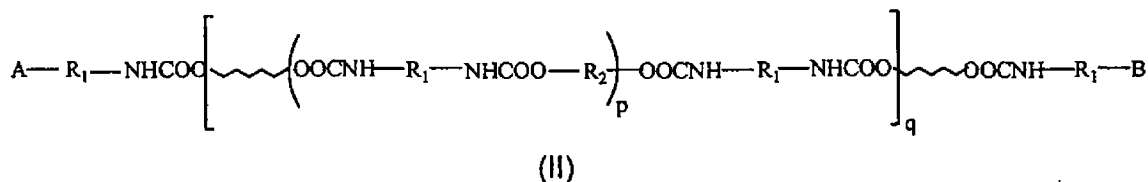
[0043] m 是核心分子中羟基的数目;

[0044] n 是 1 ~ 50 的整数;

[0045] p 是含有与所述核心分子相键连之重复单元的臂的数目;以及

[0046] X 和 Y 独立地是官能团如丙烯酸酯基(acrylate)或羟基。

[0047]



[0048] 其中

[0049] A 和 B 独立地是官能团如 NCO、羟基、胺 C_{1-10} 烷基或芳基;

[0050] R_1 和 R_2 独立地选自 C_{1-18} 亚烷基或亚芳基;

[0051] p 是 0 ~ 10; 以及

[0052] q 是 1 ~ 50。

[0053] α -羟基酸的实例包括羟基乙酸、乳酸、DL-乳酸、L-乳酸、D-乳酸、羟基丙酸、羟基丁酸、苦杏仁酸和己酸。所述羟基化合物可包括 1,2-乙二醇、1,3-丙二醇、1,4-丁二醇和 1,6-己二醇。

[0054] 术语“核心分子”指具有至少两个优选三个或更多个官能团的分子,所述官能团能与异氰酸基反应而形成氨基甲酸酯或脲基。优选地,所述核心分子的分子量为 400 或更小。核心分子的实例包括但不限于二醇、三醇、和多元醇如糖分子。

[0055] 核心分子的实例如下:

- [0056] 1. 季戊四醇
- [0057] 2. 甘油
- [0058] 3. 二季戊四醇
- [0059] 4. 三季戊四醇
- [0060] 5. 1,2,4- 丁三醇
- [0061] 6. 三羟甲基丙烷
- [0062] 7. 1,2,3- 三羟基己烷
- [0063] 8. 肌醇
- [0064] 9. 抗坏血酸
- [0065] 10. 葡萄糖和异构体如 D- 半乳糖和 D- 甘露糖、D- 果糖
- [0066] 11. 麦芽糖
- [0067] 12. 蔗糖
- [0068] 13. 甘露醇
- [0069] 14. N- 乙酰基 -D- 葡糖胺
- [0070] 15. 丁三硫醇
- [0071] 16. 四季戊四醇酯例如四巯基丙酸季戊四醇酯
- [0072] 17. 二乙醇胺
- [0073] 18. 二异丙醇胺
- [0074] 19. 三(羟甲基)氨基甲烷

[0075] 术语“ C_{1-18} 亚烷基”和“亚芳基”分别是“ C_{1-18} 烷基”和“芳基”的二价基团等同物。将所述亚烷基或芳基连接至相邻基团的两个键可来自所述二价基团中的同一个碳原子或不同的碳原子。

[0076] 术语“ C_{1-10} 烷基”或“ C_{1-18} 烷基”指具有 1 ~ 10 个或 1 ~ 18 个碳原子的直链、支链或环状的烃基。这些烷基的示例是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、新戊基、己基、环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

[0077] 术语“芳基”指含有一个、两个或三个环的碳环芳香体系，其中这些环可以以侧链(pendent)方式连接在一起或者可以是稠合的。术语“芳基”包括芳香基团如苯基、萘基、四氢萘基、茚满基和联苯基。

[0078] 优选的本发明预聚物是 (I) 和 (II) 的反应产物，(I) 和 (II) 的组合比如混合物，或多元醇 (I)，其中亲水性节段和疏水性节段均作为嵌段共聚物、无规共聚物或交替共聚物而存在，并且至少两个羟基反应而形成烯键式不饱和基团。

[0079] 例如，为制备作为两种预聚物反应产物的预聚物，选择每个预聚物分子中含有具有疏水性质的重复单元、丙烯酸基末端官能团以及至少一个羟基的预聚物 (I)。然后使该预聚物与具有亲水性节段和异氰酸末端基团的 (II) 反应。所得反应产物具有亲水性和疏水性节段。

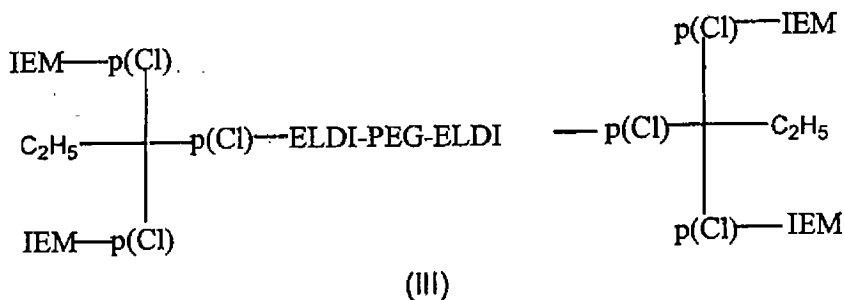
[0080] 同样，可使该两种预聚物 (I) 和 (II) 官能化而具有丙烯酸基官能团并且没有彼此间能反应的官能团，从而当组合形成乳液时两者间没有化学反应。

[0081] 此外，可选择所述多元醇 (I) 以同时具有疏水性节段和亲水性节段。这样的多元醇的实例包括基于乙二醇与乳酸、羟基乙酸、己酸或其混合物的共聚物星形多元醇 (star

polyol)。具有位于内部核心内的聚乙二醇嵌段和聚乳酸外部结构的星形多元醇是可商购的 (Polymer Source™)。也可根据文献报道的方法,利用环氧乙烷的阴离子活性聚合反应并且然后进行丙交酯的缩合或阳离子聚合反应而制备这些多元醇。¹

[0082] 可使用可商购的多元醇来制备本发明的预聚物。例如,可使聚己内酯三元醇 (PCLT) 与甲基丙烯酸异氰酸根合乙酯 (IEM) 反应而将 PCLT 的平均两个羟基末端基团转换为甲基丙烯酸基末端基团。剩余的羟基可用来与 (II) 反应。可通过使亲水性多元醇 (如聚乙二醇) 与二异氰酸酯 (如二异氰酸乙基赖氨酸酯) 反应而制得预聚物 (II), 以获得具有异氰酸基末端官能团的预聚物。使两摩尔当量的 (II) 与一摩尔当量的 (I) 反应将制得生物相容性的预聚物, 当其与细胞和营养液混合时可吸收高比例的水并形成活细胞的稳定混悬液。这种类型的预聚物的代表性实例如下:

[0083]



[0084] 本发明还提供了一种新的疏水性 (共聚) 多元醇, 其通过核心分子 (如季戊四醇、甘油或葡萄糖) 与羧基酸 (如乳酸、羟基乙酸、苦杏仁酸或芳族羧基酸例如水杨酸或对苯二甲酸 (terephthalic acid)) 的聚合反应 (优选通过缩聚反应) 制得。

[0085] 所述缩聚反应可任选地在催化剂 (如 2-乙基己酸亚锡) 的存在下进行。此方法提供了分子量为 120 ~ 30,000K 的低酸值、窄多分散性和定量产率的无色多元醇。可获得具有末端基团 (如伯羟基和仲羟基) 的多元醇以及硫醇。聚合反应需要相对短的反应时间。也可使用其它的方法 (如相应的羧基酸环状单体的开环聚合反应) 来制备所述疏水性多元醇。

[0086] 亲水性预聚物也可利用已知的亲水性预聚物来制备, 比如聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮和甲基丙烯酸聚羟乙酯或它们的嵌段共聚物、接枝共聚物或无规共聚物。例如, 可利用甲基丙烯酸异氰酸根合乙酯将聚乙烯醇的羟基官能化来提供烯键式不饱和基团, 使得当将所述丙烯酸酯官能化的聚乙烯醇与疏水性预聚物混合并固化时形成交联的聚合物网络。

[0087] 用于制备预聚物 (II) 的优选的二异氰酸酯包括脂肪族的二异氰酸酯如 1,4-二异氰酸六亚甲酯、1,4-二异氰酸丁酯、二异氰酸乙基赖氨酸酯 (ELDI)、二异氰酸甲基赖氨酸酯、异佛尔酮二异氰酸酯和二异氰酸 2,2,4-三甲基六亚甲酯。还可以使用异硫氰酸酯, 如二异硫氰酸丁酯、二异硫氰酸六亚甲酯、二异硫氰酸二甲苯酯 (xylene diisothiocyanate) 和二异硫氰酸二环己基甲酯。

[0088] 在制备预聚物 (II) 中任选使用常规的扩链剂 (式 (II) 中的 R₂)。优选的扩链剂包括 C₂₋₁₀ 烷二醇比如乙二醇和丙二醇; C₂₋₁₀ 烷二醇比如丁二醇和丙二醇; 胺比如乙醇胺、乙二胺、丙二胺和丁二胺; 以及主链上具有一个或多个可水解 (可降解) 官能团的扩链剂, 比如在澳大利亚专利申请 No. 2005905792 中所描述的那些。

[0089] 预聚物 (I) 的优选分子量是 300 ~ 10000, 更优选为 300 ~ 5000, 最优选为 300 ~ 2000。预聚物 (II) 的优选分子量是 500 ~ 50000, 更优选为 500 ~ 5000, 最优选为 500 ~ 2000。

[0090] 应当理解, 这两种预聚物 (I) 和 (II) 的分子量及相对比例影响交联聚合物网络的机械性质。可容纳的水的量主要由所述组合物中亲水性预聚物的比例决定。

[0091] 分散剂或致孔剂 (Porogen)

[0092] 本发明的组合物还可包含: 分散剂 (包括生物成分, 比如细胞例如成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、黑素细胞以及内皮细胞和生长因子)、生物活性分子 (比如生物药物, 天然聚合物例如藻酸盐、纤维蛋白、琼脂糖、胶原、甲基纤维素和基于肽的水凝胶和药物)、其它用于支持细胞生长的成分 (比如纳米颗粒羟基磷灰石、磷酸钙和羟基磷灰石)、粘合剂 (比如纤维蛋白、胶原和谷氨酰胺转移酶体系)、表面活性剂 (比如硅氧烷表面活性剂)、二氧化硅颗粒、粉末二氧化硅、可用于接种细胞的中空纤维、或者致孔剂比如水和明胶珠。

[0093] 所述预聚物和预聚物组合物尤其可用于与细胞、含营养成分或生长因子的培养基以及其它细胞友好性添加剂 (比如羟基磷灰石和磷酸三钙) 相组合。这些组合物在注射或递送至缺陷部位后可在体内固化 (交联) 或者可在体外固化而形成组织层、整个器官或器官的一部分。可采用众所周知的方法将细胞包封并与所述预聚物合并。可将珠 (比如明胶珠) 和脱矿物质骨上培养的细胞与所述预聚物合并。

[0094] 本发明还能制备能够容纳不同量的水的预聚物。可制得含水量相对大 (比如至少 60wt%、优选 70wt%、更优选 85wt%) 的组合物用于递送细胞。在这些组合物中, 水形成通道, 这些通道使得营养成分流向细胞并且还有助于任何废产物的去除。

[0095] 通过配制容纳不同量水的预聚物组合物, 可制得其机械性质能与不同机体组织的机械性质相匹配的聚合物。例如, 可配制与软骨的机械性质相匹配的聚合物。这样的组合物尤其适于递送软骨细胞以帮助修复受损的关节软骨。同样, 可通过选择合适的疏水性成分以及亲水性成分的量以及通过调整吸水量而制备刚性更大的聚合物, 这样的聚合物尤其适于递送用于骨折固定或固定其它骨缺陷的成骨细胞。同样, 与人皮肤性质相匹配的聚合物适于递送细胞 (如成纤维细胞、黑素细胞和内皮细胞) 以修复伤口。

[0096] 引发剂

[0097] 术语“引发剂”指在固化步骤中通过能源进行活化时将导致预聚物的自由基聚合反应的至少一种分子。引发所述聚合反应的能源可以是热源、光解源或基于成分的氧化还原体系的能源, 结果是发生自由基聚合反应而使所述预聚物组合物固化。

[0098] 对于为了引发自由基固化的目的而存在于所述预聚物组合物中的引发剂的选择取决于所选的引发方法。引发可以是光解引发、热引发或基于成分的氧化还原体系的引发, 优选通过外源进行引发。例如, 樟脑醌、基于氧化膦的引发剂 (比如 2,4,6-三甲苯甲酰基二苯基氧化膦) 是适合的, 氧化还原引发剂 (比如过硫酸铵和偏亚硫酸氢钠)、 γ 辐射或激光也是适合的。对于体内应用而言, 光解引发剂或基于氧化还原的体系是优选的。利用电磁辐射的 UV 或可见区的波长使所述聚合物组合物固化的体系是更优选的。在这两类中, 在生物医学应用中可见光引发更理想。在本发明的一个实施方案中, 使用最大波长为 $450 \pm 30\text{nm}$ 的可见光源。光引发剂的实例包括但不限于 2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮 (Irgacure 651)、羟烷基苯酮 (1-羟基环己基苯基甲酮) (Irgacure 184)、2-甲

基-1-[4-(甲硫基)苯基]-2-(4-吗啉基)-1-丙酮(Irgacure 907)、2-羟基-1-[4-(羟基乙氧基)苯基]-2-甲基-1-丙酮(Darocur 2959)、Darocur 4265、Darocur TPO、Darocur 1173、Irgacure 500、784、907、2959、819、2020、1000、369、651、1300、819/819W、Irgacure 2005 和 Irgacure 2010W 以及 Irgacure 2020、聚硅烷、Esacure KP150(羟烷基苯基甲酮)、樟脑醌、玫瑰红、4-N,N-二甲基氨基苯甲酸乙酯(4EDMAB)/三乙醇胺、 α -烷氧基去氧基-苯偶姻、 α , α -二烷氧基苯乙酮(DEAP)、(1-羟基环己基-苯基甲酮)、二苯甲酰基二硫化物、硫代苯甲酸-S-苯酯、酰基氧化膦、二苯甲酰基甲烷、O-酰基 α -肟基酮、苯偶氮基-4-二苯基砷、二苯甲酮、芴酮、咕吨酮、噻吨酮、偶苯酰、缩酮(2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮 DMP)、 α -酮香豆素、葱醌、乙基曙红和对二苯甲酰苯酮(terephthalophenone)。

[0099] 添加剂

[0100] 应当理解,本发明的预聚物、预聚物组合物或聚合物中可包含高分子化学领域中已知的一种或多种添加剂,其量可多达 20%。

[0101] 合适的添加剂包括有助于防止预聚物或预聚物组合物在贮存过程中发生过早聚合的自由基抑制剂、有助于通过加快引发速率和/或在所希望的温度引发聚合而活化交联过程的增敏剂或促进剂、其它有机添加剂(比如改变发生聚合反应的波长的叔胺)、催化剂、或表面活性剂。

[0102] 3,5-二叔丁基-4-羟基甲苯(或 2,6-二叔丁基对甲酚)、对苯醌、氯醌、1,2,3-三羟基苯和 2,4,6-三甲基苯酚是自由基抑制剂的实例。

[0103] 增敏剂的实例包括双(N,N'-四乙基)乙二胺、甲基丙烯酸 N,N'-二甲基氨基乙酯、4-二甲基氨基苯甲酸乙酯、异丙基噻吨酮(quantacure ITX)、对-二氨基苯甲酸乙酯、三乙醇胺、叔胺(N,N'-二乙基氨基甲基丙烯酸酯)和 Michler's 酮。

[0104] 所述催化剂可选自但不限于锡催化剂(如乙基己酸亚锡(II)、油酸亚锡、氯化亚锡、二月桂酸二丁基锡(DBTDL)、二丁基二氧化锡、二丁基双(2-乙基己酸)锡)、叔胺催化剂(如三乙二胺、四甲基丁二胺(TMBDA)、二甲基乙醇胺、1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯、1,4-二氮杂[2,2,2]二环-辛烷(DABCO)、羟基胍、四甲基胍、N-乙基吗啉、核黄素)、钛催化剂(如乙醇胺钛、Tyzor-钛酸盐(Tyzor 131)、Tyzor 有机钛酸盐、丁氧基钛)、在水中稳定的水性钛螯合物(如 Tyzor-LA(水性乳酸钛螯合物)、Tyzor 131(水性钛螯合物)、Tyzor 217(水性乳酸锆)、Tyzor 218(水性羟乙酸锆))、以及其它催化剂(如磷酸钙、卵清蛋白、乙酸钠和三丁基膦)。

[0105] 固化

[0106] 所述固化/交联反应可在温和温度条件下进行。通常,所述反应优选在 20°C~40°C 的温度下进行。

[0107] 引发剂浓度的改变可控制聚合物被固化成软或硬材料的时间范围并且还还对固化机制产生影响。

[0108] 组合物中每种组分的改变均可用来指示最终固化聚合物的化学和物理性质。例如,降低丙烯酸基团的百分率可具有使终产品变得较软的益处,而增加其百分率则具有相反作用。这可通过在制备所述预聚物中添加引入丙烯酸基的化合物而得以实现。因此,可调整材料的所期望机械性质使之与即将进行的应用相适应。

[0109] 生物医学用途

[0110] 本发明的预聚物组合物以及至少一种引发剂的反应产物可作用于组织工程应用（例如伤口愈合，骨、软骨或神经修复，牙用和牙周用的粘固粉，药物递送和抗粘附屏障或防护性屏障，脊椎应用如脊椎盘髓核置换）的生物可降解支架。在组织工程应用中，所述预聚物组合物还将包含适于所述目标生物应用的生物成分。

[0111] 应当理解，所述支架可以离体制备并固化然后植入，也可以以未固化形式注射其组成成分以便在体内固化并制得支架。

[0112] 附图说明

[0113] 在实施例中，参考附图，其中：

[0114] 图 1 是显示如实施例 4 所述与未固化聚合物混合并在室温下与其接触 1 小时的在 Cultispher-S 珠上的软骨细胞的照片。白色区域为活细胞。

[0115] 图 2 是显示如实施例 5 所述在 1 小时后固化的聚合物栓 (plug) 内的 Cultispher-S 珠上的软骨细胞的照片。白色区域为活细胞。

[0116] 图 3 是显示在 Cultispher-S 珠之内和周围生长并包埋在固化的聚合物栓中的软骨细胞的照片，所述软骨细胞如实施例 5 所述在细胞培养基 (H&E) 中增殖 8 周。

[0117] 图 4 是显示如实施例 5 所述在细胞培养基中 8 周后产生大量 II 型胶原物质（通过黑-灰染色显示）的软骨细胞的照片。

[0118] 图 5 是显示如实施例 5 所述在细胞培养基中 8 周后产生大量硫酸角质素物质（通过黑-灰染色显示）的软骨细胞的照片。

[0119] 图 6 是显示如实施例 5 所述在细胞培养基中 8 周后产生大量 VI 型胶原物质（通过黑-灰染色显示）的软骨细胞的照片。

[0120] 图 7 是显示如实施例 6 所述与未固化聚合物混合并在室温下与其接触 1 小时的在 Cultispher-S 珠上的软骨细胞的照片。

[0121] 图 8 是显示如实施例 6 所述固化并于 1 小时后检查的在聚合物支架内珠上的软骨细胞培养物的照片。

[0122] 图 9 是显示在 Cultispher-S 珠之内和周围生长并包埋在固化的聚合物栓中的软骨细胞的照片，所述软骨细胞如实施例 6 所述在细胞培养基 (H&E) 中增殖 8 周。

[0123] 图 10 是显示如实施例 6 所述在细胞培养基中 8 周后产生大量 II 型胶原物质（通过黑-灰染色显示）的软骨细胞的照片。

[0124] 图 11 是显示如实施例 6 所述在细胞培养基中 8 周后产生大量硫酸角质素物质（通过黑-灰染色显示）的软骨细胞的照片。

[0125] 图 12 是显示如实施例 6 所述在细胞培养基中 8 周后产生大量 VI 型胶原物质（通过黑-灰染色显示）的软骨细胞的照片。

[0126] 图 13 是显示如实施例 7 所述与利用 ESP 水合方法制得的未固化聚合物混合并在室温下与其接触 1 小时的在 Cultispher-S 珠上的软骨细胞的照片。白色区域为活细胞。

[0127] 实施例

[0128] 现将参考以下非限定性的实施例来说明本发明。

[0129] 实施例 1

[0130] 材料

[0131] 聚乙二醇 (PEG) Mn ~ 1500、聚己内酯三元醇 Mn 900、2-乙基己酸亚锡和 3,5-二叔

丁基-4-羟基甲苯 (BHT) 购自 Aldrich 并且不经处理直接使用。甲基丙烯酸 2-异氰酸根合乙酯 (IEM) 购自 Showa Denko 并通过减压蒸馏纯化。二异氰基乙基赖氨酸酯 (ELDI) 购自 Kyowa HakkoKogyo 并通过减压蒸馏纯化。

[0132] 方法

[0133] 由聚(己内酯)三元醇制备丙烯酸酯官能化的疏水性多元醇:

[0134] 将聚己内酯三元醇 (Aldrich) (59.17g, 63.3mmol) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80°C 干燥 1 小时。向所述多元醇中加入自由基抑制剂 BHT (总重量的 0.1wt%, 78.8mg) 和甲基丙烯酸 2-异氰酸根合乙酯 (19.65g, 126.6mmol) 并在 80°C 下搅拌。然后向混合物中加入 2-乙基己酸亚锡催化剂 (所述多元醇的 0.1wt%, 59.2mg) 并继续搅拌反应物过夜。通过 IR 分光光度法监测, 以在 2272cm⁻¹ 处异氰酸酯峰的消失作为反应的完成。通过 GPC 表征所述多元醇。根据文献报道的方法测定羟基酸和酸值 (2)。羟基数为 47.86, 酸值为 1.23。数均分子量为 1767, 多分散性为 1.32 (相对于聚苯乙烯标准物)。

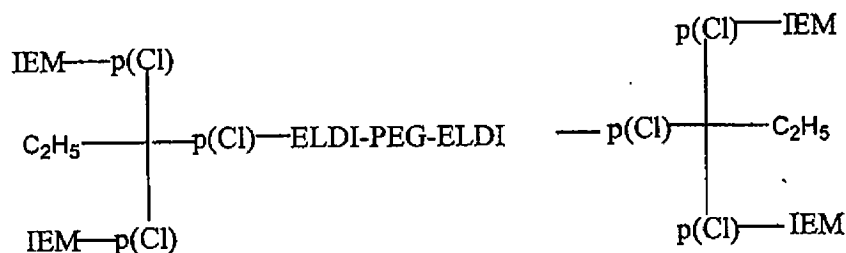
[0135] 亲水性预聚物的制备:

[0136] 将聚乙二醇 (102.87g, 61.2mmol) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80°C 干燥 1 小时。然后向所述多元醇中加入 ELDI (27.69g, 122.5mmol) 并在 80°C 下搅拌反应。根据 ASTM D 5155-01 测得异氰酸酯的含量为 3.70% (3)。

[0137] 组合了疏水性和亲水性多元醇 (PCL-PEG)-丙烯酸酯 (III) 的预聚物的合成:

[0138] 将丙烯酸酯官能化的 3 臂聚己内酯 (28.60g, 26.3mmol) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80°C 干燥 1 小时。给反应配备带有特氟隆 (Teflon) 搅拌桨的上悬式机械搅拌器并在 80°C 下搅拌。按顺序加入自由基抑制剂 BHT (总重量的 0.1wt%, 33.65mg) 和亲水性预聚物 (33.65g, 13.2mmol)。将反应物在 80°C 下搅拌过夜。通过 IR 分光光度法监测, 以在 2272cm⁻¹ 处异氰酸酯峰的消失作为反应的完成。通过 GPC 表征最终的多元醇, 数均分子量为 5807。

[0139]



[0140] 实施例 2

[0141] 材料

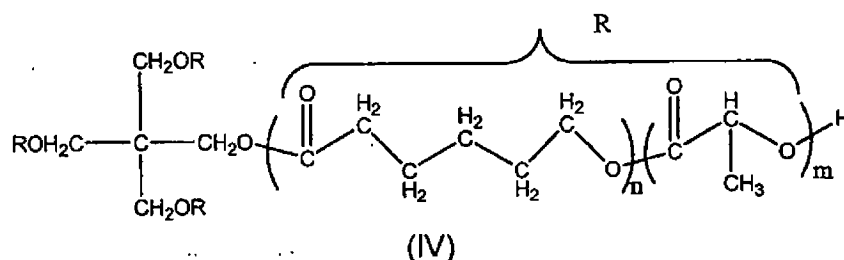
[0142] 聚乙二醇 (PEG) (Mn1500)、2-乙基己酸亚锡、85%对甲苯磺酸一水合物和 3,5-二叔丁基-4-羟基甲苯 (BHT) 购自 Aldrich 并且不经处理直接使用。L-乳酸 (88%溶液) 购自 DuPont 并且不经处理直接使用。用前将 98%的季戊四醇 (Aldrich) 研磨, 然后在 80°C 下干燥过夜。通过减压蒸馏将 99%的 ε-己内酯 (Aldrich) 纯化并贮存在 4 Å 分子筛上。甲基丙烯酸 2-异氰酸根合乙酯 (IEM) 购自 Showa Denko 并通过减压蒸馏纯化。二异氰基乙基赖氨酸酯 (ELDI) 购自 Kyowa Hakko Kogyo 并通过减压蒸馏纯化。

[0143] L-乳酸共聚己内酯多元醇共聚物 (L-lactic acid-co caprolactone polyol) 的

合成：

[0144] P(L-LaCl) (IV) :将季戊四醇 (16.32g, 120mmol) 置于 500mL 配有磁力搅拌棒和回流冷凝器的烧瓶中。加入水 (163mL) 并使烧瓶在 50℃ 下回流直到季戊四醇完全溶解。将 L-乳酸 (20.18g, 197mmol) 和 ϵ -己内酯 (89.4g, 784mmol) 直接称重到烧瓶中。然后将对甲苯磺酸 (0.84g) 和 200mL 甲苯加入到混合物中。将 Dean-Stark 装置、回流冷凝器和干燥管连接到所述烧瓶上。将另外 150mL 甲苯置于所述 Dean-Stark 装置中并将化合物在 160℃ 下回流。随着反应进行,除去在底部收集到的水;除去 63mL 水并向烧瓶中加入 63mL 甲苯以保持相同水平的反应混合物。使反应物回流大约 72 小时。通过 GPC 和 NMR 表征所述多元醇。根据文献确定羟基数和酸值¹。测定羟基数为 177, 酸值为 0.96。产品的 GPC 分析表明数均分子量为 1677, 多分散性为 1.56 (相对于聚苯乙烯标准物)。

[0145]



[0146] L-乳酸共聚己内酯多元醇共聚物的丙烯酸酯官能化：

[0147] 将 P(L-LaCl) 多元醇 (70.04g, 55.6mmol) 置于烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80℃ 干燥 1 小时。向所述多元醇中加入自由基抑制剂 BHT (总重量的 0.1wt%, 96mg) 和甲基丙烯酸 2-异氰酸根合乙酯 (25.87g, 166.8mmol)。然后向混合物中加入 2-乙基己酸亚锡催化剂 (所述多元醇的 0.1wt%, 70mg) 并将反应物在 80℃ 下搅拌过夜。通过 IR 分光光度法监测,以在 2272cm⁻¹ 处异氰酸酯峰的消失作为反应的完成。根据文献中报道的方法确定羟基数和酸值³。所述多元醇的羟基数是 43.55, 酸值是 0.90。

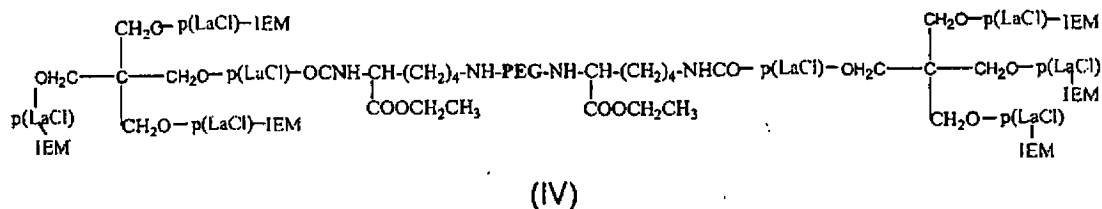
[0148] 亲水性预聚物的合成：

[0149] 将聚乙二醇 (102.87g, 61.2mmol, MW(1500)) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80℃ 干燥 1 小时。向所述多元醇中加入 ELDI (27.69g, 122.5mmol) 并将反应混合物在 80℃ 下搅拌过夜。根据 ASTM D 5155-01 测得预聚物的异氰酸酯含量为 3.04%³。

[0150] 组合了疏水性和亲水性组分 P(L-LaClPeg)-丙烯酸酯] (IV) 的预聚物的合成：

[0151] 将丙烯酸酯官能化的 4 臂 P(L-LaCl) (15.50g, 12.4mmol) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80℃ 干燥 1 小时。给反应配备带有特氟隆 (Teflon) 搅拌桨的上悬式机械搅拌器并在 80℃ 下搅拌。按顺序加入自由基抑制剂 BHT (总重量的 0.1wt%, 31mg) 和亲水性预聚物 (15.55g, 6.2mmol)。将反应物在 80℃ 下搅拌过夜。通过 IR 分光光度法监测,以在 2272cm⁻¹ 处异氰酸酯峰的消失作为反应的完成。通过 GPC 表征最终的多元醇,数均分子量为 5996。

[0152]



[0153] 实施例 3

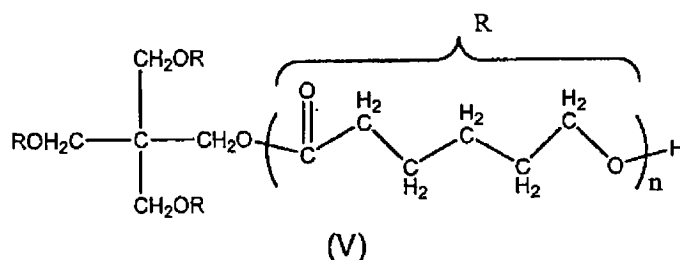
[0154] 材料

[0155] 聚乙二醇 (PEG) ($M_n \sim 1500$)、2-乙基己酸亚锡、85%的对甲苯磺酸一水合物和 3,5-二叔丁基-4-羟基甲苯 (BHT) 购自 Aldrich 并且不经处理直接使用。L-乳酸 (88%溶液) 购自 DuPont 并且不经处理直接使用。用前将 98%的季戊四醇 (Aldrich) 研磨,然后在 80°C 下干燥过夜。通过减压蒸馏将 99%的 ϵ -己内酯 (Aldrich) 纯化并贮存在 4A 分子筛上。甲基丙烯酸 2-异氰酸根合乙酯 (IEM) 购自 Showa Denko 并通过减压蒸馏纯化。二异氰酸乙基赖氨酸酯 (ELDI) 购自 Kyowa Hakko Kogyo 并通过减压蒸馏纯化。

[0156] 4-臂 P(Cl) (V) (MW 900) 的制备:

[0157] 将季戊四醇 (15.1g, 111mmol)、 ϵ -己内酯 (84.82g, 744mmol) 和 2-乙基己酸亚锡 (所述多元醇的 0.1wt%, 75mg) 置于配有磁力搅拌棒的干燥的 500mL 烧瓶中;将体系保持在惰性气体下。将反应烧瓶在 140°C 下加热 24 小时。通过 GPC 和 NMR 表征所述多元醇。根据文献³报道的方法确定羟基和酸的数目。羟基数目为 204.4, 酸值为 2.06。数均分子量为 1257, 多分散性为 1.25 (相对于聚苯乙烯标准物)。

[0158]



[0159] 丙烯酸酯官能化的 4-臂聚(己内酯)的制备:

[0160] 将聚己内酯四元醇 (41.20g, 37.6mmol) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80°C 干燥 1 小时。向所述多元醇中加入自由基抑制剂 BHT (总重量的 0.1wt%, 59mg) 和甲基丙烯酸 2-异氰酸根合乙酯 (17.48g, 115.7mmol)。然后向混合物中加入 2-乙基己酸亚锡催化剂 (所述多元醇的 0.1wt%, 10mg) 并将反应物在 80°C 下搅拌过夜。通过 IR 分光光度法监测,以在 2272 cm^{-1} 处异氰酸酯峰的消失作为反应的完成。通过 GPC 表征所得的聚合物。根据文献中报道的方法确定羟基数和酸值³。所述羟基数是 60.94, 酸值是 1.58。数均分子量为 1775。

[0161] 亲水性预聚物的制备:

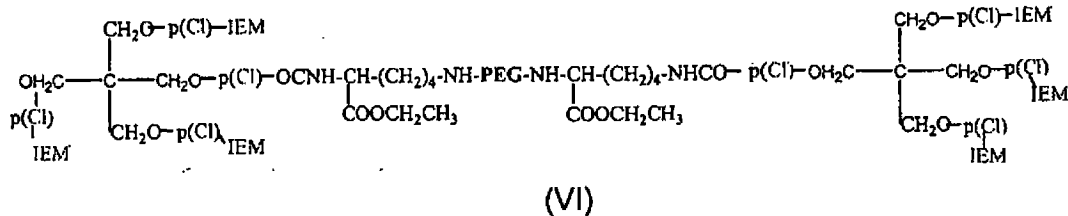
[0162] 将聚乙二醇 (102.87g, 61.2mmol) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg) 于 80°C 干燥 1 小时。向所述多元醇中加入 ELDI (27.69g, 122.5mmol) 并将反应混合物在 80°C 下搅拌过夜。根据 ASTM D 5155-01 测得异氰酸酯含量为 3.43%³。

[0163] 组合了疏水性和亲水性多元醇 (PCL-PEG)-丙烯酸酯的预聚物的合成:

[0164] 将官能化的 4 臂聚己内酯 (8.27, 9mmol) 置于圆底烧瓶中并在真空下 (0.1mmHg)

于 80°C 干燥 1 小时。给反应配备带有特氟隆搅拌桨的上顶置机械搅拌器并在 80°C 下搅拌。按顺序加入自由基抑制剂 BHT (总重量的 0.1wt%, 11mg) 和亲水性预聚物 (11.03g, 4.5mmol)。将反应物在 80°C 下搅拌过夜。通过 IR 分光光度法监测, 以在 2272cm⁻¹ 处异氰酸酯峰的消失作为反应的完成。通过 GPC 表征最终的多元醇, 数均分子量为 7508。

[0165]



[0166] 实施例 4

[0167] 本实施例举例说明了可将人软骨细胞纳入到本发明的生物可降解的生物相容性组合物中并使之与未固化状态的聚合物相接触而不损失细胞活力。

[0168] 聚合物水化

[0169] 将根据实施例 1 制备的 0.67g 预聚物 (III) 置于 25ml 包裹于铝箔 (foil) 中的 Schott 瓶 (no. 2) 中, 并通过在 Atherton 高压釜 (S/No. 850451117004) 中于 121°C 下高压灭菌 15 分钟而进行灭菌, 然后在黑暗处于室温下利用 20ml 无菌 PBS (磷酸盐缓冲液) 水解过夜。

[0170] 然后在第 1、2、5、6 和 7 天将 20ml 无菌 PBS 进行更换。然后将聚合物于室温下置于黑暗处, 在第 30 天 (86.9% 水合) 时取样并使用。在第 70 天 (88.8% 水合) 时在用前利用 20ml 无菌 PBS 清洗样品。

[0171] 软骨细胞制备

[0172] 将从冻存样品中分离的软骨细胞以 0.75×10^6 的接种密度接种在完全软骨细胞培养基 (10% FBS 在 F12 : DMEM 1 : 1 中) 中的 Cultispher-S 珠 (Sigma M9043-10G) 上。根据制造商说明制备珠。简而言之, 将 Cultispher-S 珠以 20mg/ml 在 PBS 中水合, 在 121°C 下高压灭菌 15 分钟, 冷却并贮存在 4°C。这些细胞在 Cultispher-S 珠之内或之上生长, 利用 50ml 温热的培养基 (DMEM/10% FBS 或自体血清, 含有 100 μg/ml 青霉素和链霉素) 在 37°C 下将所述珠预先清洗, 然后置于 125ml 旋转瓶中。每 0.75×10^6 个软骨细胞使用 1.8ml 重悬的 20mg/ml 的珠溶液。然后将瓶在 37°C 培养箱 (含有 5% CO₂) 中搅拌, 在 25rpm 下搅拌 3 小时, 每 30 分钟间歇 2 分钟; 然后在 45rpm 下再搅拌 3 小时, 每 30 分钟间歇 2 分钟; 然后在 45rpm 下连续搅拌。使用在该接种步骤后第 7 至 21 天中的软骨细胞。将等份的珠上软骨细胞的试样从旋转瓶中移至 10ml 管中。将溶液吸入 Nichiryo 注射器中并以垂直方式保持 5 分钟使珠上软骨细胞沉降到待推注的注射器的底部。将 0.4g 如上制得的水合聚合物称重到无菌 4 孔细胞培养皿 (In-vitro Technologies 176740) 中。由 Nichiryo 注射器加入 0.10ml 充分沉降的珠上细胞并利用无菌刮刀将其混入聚合物中。

[0173] 未固化混合物的检查

[0174] 在室温下于 15 分钟和 1 小时时检查样品 (如图 1 所示)。在 1 小时时取样并置于 10ml 管中。然后利用 8ml 温热的 PBS 将此样品清洗 3 次, 所述清洗相当有力以将珠上细胞从周围的聚合物混合物中分离出来。然后按照制造商的说明书以 Molecular Probes

Live-Dead 测定试剂盒 L3224 对此混合物染色。简而言之,向 5ml 37°C 的 PBS 中加入 10 μ l 溶液 B (Ethidium Homodimer, 将死细胞核染成红色, 将活细胞核排除在外), 振荡混合, 再加入 2.5 μ l 溶液 A (Calcein, 通过与细胞内酯酶相互作用的活性将活细胞的细胞质染成绿色), 再振荡混合。将 1ml 染色溶液加入到清洗的细胞 / 珠中, 在 37°C 下培育 20 分钟然后观察。还平行制备了对照样品。

[0175] 通过取等份的活细胞试样并在室温下向所述细胞加入过量的 80% 乙醇并保持 10 分钟而制备对照死细胞。然后以 PBS 清洗所述细胞 3 次并如上进行染色。从同一旋转瓶中取活细胞作为用于聚合物栓混合物的细胞, 如上述进行清洗和染色。利用配有 Olympus BX61 型显微镜的 Optiscan F900e 共聚焦 KrAr 激光器观察结果。

[0176] 实施例 5

[0177] 本实施例举例说明了可将人软骨细胞纳入到本发明的生物可降解的生物相容性组合物中并使之固化而形成固体多孔性支架而不损失细胞活力。此外这些栓的细胞培养物还表明经过 8 周软骨细胞形成新的组织基质。

[0178] 软骨细胞的制备

[0179] 将人关节软骨细胞 (0.75×10^6 个细胞, 分离后第 0 天, 购自 EdwardKeller, EK 23-7-02, KN8823) 解冻并如实施例 4 在 Cultispher-S 珠上培养。再过 18 天后收获细胞, 计数并将所获的 10×10^6 个细胞接种到 0.36ml 20mg/ml 的 Cultispher-S 珠上, 得到 0.14ml 的最终接种 (珠上细胞) 体积。然后将这些细胞与 0.6ml 聚合物 (制备详见后面) 混合而得到最终的构建物 (construct)。得到的最终细胞密度为 14.1×10^6 个细胞 / ml 合成聚合物混合物制剂。

[0180] 如实施例 1 制备聚合物并按照实施例 4 中的方法进行水化。将 0.833g 此水化聚合物与 0.933 μ l 1 : 5 (w/w) 的 CQ : DMAEMA (樟脑醌和甲基丙烯酸 N, N-二甲基氨基乙酯) 通过无菌刮刀进行混合。将 0.6g 此混合物称重到无菌组织培养孔中。通过 Nichiryo 注射器加入 0.14ml 珠上细胞混合物并轻轻混入所述水化聚合物中, 所述细胞 / 珠 / 聚合物的最终体积为 0.75ml。

[0181] 在无菌硅模中形成了三种栓, 每种 140 μ l ($17.5 \times 5 \times 1.5$ mm), 各自利用 Elipar™ Free Light 2 (3M ESPE) 将其以蓝光 (5 \times 20 秒) 进行固化。

[0182] 固化混合物的检查

[0183] 利用 LIVE/DEAD 活力 / 细胞毒性试剂盒, 通过如实施例 4 所述从 1 个栓的中央区取一系列非常薄 (1mm) 的薄片来评价细胞活力。

[0184] 固化后, 将构建物保持完整或切成两半。将余下的栓在 6 孔混悬物板 (静态) 中培养或者保持动态运动 (旋转器)。使培养物在抗坏血酸的长期存在下生长, 最终浓度为 28.9 μ g/ml。以 1 : 100 的稀释度使用贮存于 4°C 下的 10mM 储备液 (Wako L-抗坏血酸磷酸镁盐, Novachemcat No. 013-12061)。每周更换培养基两次, 培养 8 周。

[0185] 然后将所述栓块切成两半或者以 10% 中性缓冲福尔马林进行固定 并进行标准组织学处理以及采用苏木精和曙红进行染色, 或者在液氮冷却的异戊烷中迅速冷冻。然后利用抗 II 型胶原、硫酸角质素和 VI 型胶原的抗体将这些冷冻栓染色。结果示于图 2 ~ 6 中。

[0186] 实施例 6

[0187] 本实施例表明, 可通过不同于实施例 4 中所用的方法将聚合物水化。

[0188] 利用每日清洗方法将根据实施例 1 的方法制备的聚合物水化,表明所述聚合物与 1 小时未固化试验和固化的 8 周细胞培养物中的软骨细胞均是生物相容的。

[0189] 聚合物水化

[0190] 将 0.5 克等份的实施例 1 聚合物称重到瓶中并如实施例 4 进行高压灭菌。加入 20ml 无菌 PBS 溶液,然后每日移除并更换,共 12 天。移除 PBS 并将 0.4 克此水化聚合物称重到无菌 4 孔细胞培养皿 (InvitroTechnologies 176740) 中,由 Nichiryo 注射器加入 0.10ml 如实施例 4 制备的充分沉降的珠上细胞,并利用如实施例 4 中的无菌刮刀将其轻轻混入聚合物中。

[0191] 以 3 种方式检验此材料。

[0192] 1. 使珠上软骨细胞在室温下与未固化聚合物接触 1 小时 (参见图 7)。

[0193] 2. 使珠上软骨细胞在固化的聚合物支架中培养并在 1 小时后检查 (参见图 8)。

[0194] 3. 使珠上软骨细胞在固化的聚合物支架中培养并在细胞培养基中生长 8 周 (参见图 9 ~ 12)。

[0195] 实施例 7

[0196] 利用增强饱和和处理法 (ESP) 将根据实施例 1 中所述方法制备的聚合物水合,表明在 1 小时未固化试验中与软骨细胞是生物相容的。

[0197] 聚合物水合

[0198] 向 1.5 克等份的在直边玻璃瓶 (容量约 20ml) 中的聚合物中加入 15.0g PBS。在进行高速混合之前将其利用刮刀手动混合 3 分钟。在室温下在转速 4 时使用混合器 (Ika-Werke Ultra Turrax T8) 5 分钟,得到了泡沫状的分散体。然后在 Beckman Coulter Allegra X-12R 离心机中在 2000rpm 下将瓶离心 5 分钟,然后除去过量的 PBS,计算水化% 为 83.4%。

[0199] 如实施例 4 制备软骨细胞并添加到此混合物中,并且分析样品的实验过程也如实施例 4 所示。简而言之,将 0.4 克增强饱和和处理法 (enhenced saturation process) 的材料与 0.1ml 实施例 4 中的软骨细胞混合,结果如图 13 所示。

[0200] 参考文献

[0201] 1. [Volgaris D, Tsitsilianis C, Grayer V, Esselink FJ, Hadzioannou G. Polymer 1999 ;405879-89)

[0202] 2. Strategy for Cell Therapy :Polymers for Live Cell Encapsulation and Delivery, Satya Prakash and Hahn Soe-Lin in Trends Biomater. Artif. Organs Vol 18(1), pp 24-35 (2004)

[0203] 3. N-Methylimidazole as a Catalyst for Acetylation of Hydroxyl Terminated Polymers by Louis A. Dee and others. Analytical Chemistry, 1980, 52, 572-573.

[0204] 4. ASTM D 2849-69. (Sections 31 to 39) Standard Methods of Testing URETHANE FOAM POLYOL RAW MATERIALS. Method A-Acetic Anhydride Pressure Bottle section.

[0205] 在以下的权利要求中以及在本发明前面的说明书中,除了在上下文中由于语言表达或必需的隐含的情况下以外,词语“包含”或其变体如“包括”或“含有”用于开放式含义,即用于指定所述特征的存在但不排除存在或增加本发明中各种实施方案的其它特征。

[0206] 本方明技术领域的技术人员应当理解,可在不背离本发明的精神和范围的情况

下进行多种改动。

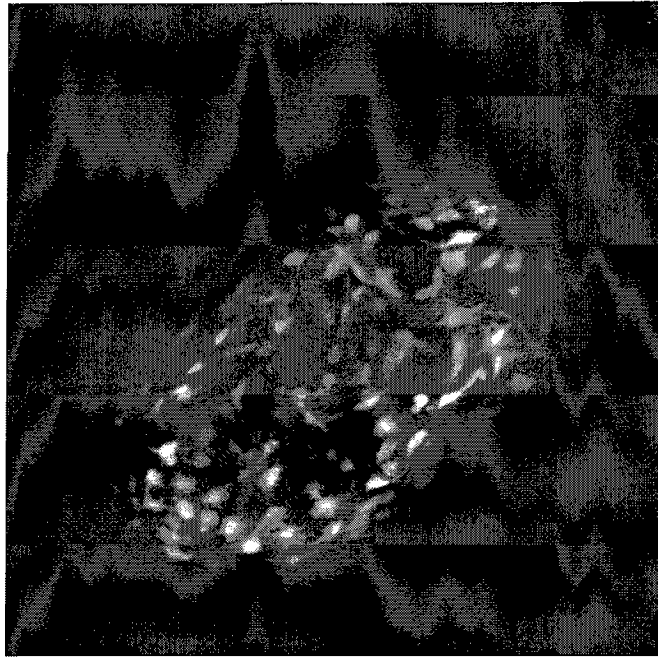


图 1

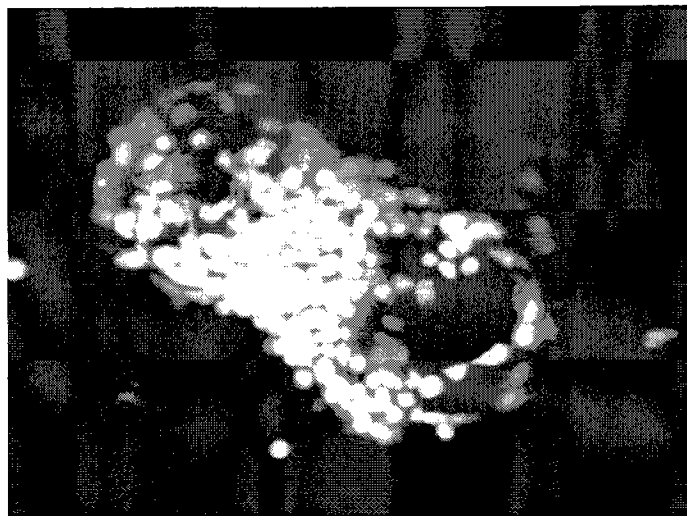


图 2

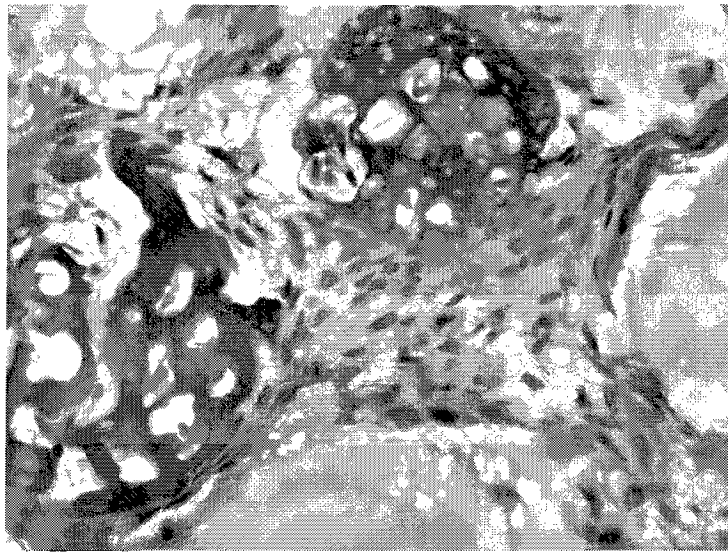


图 3

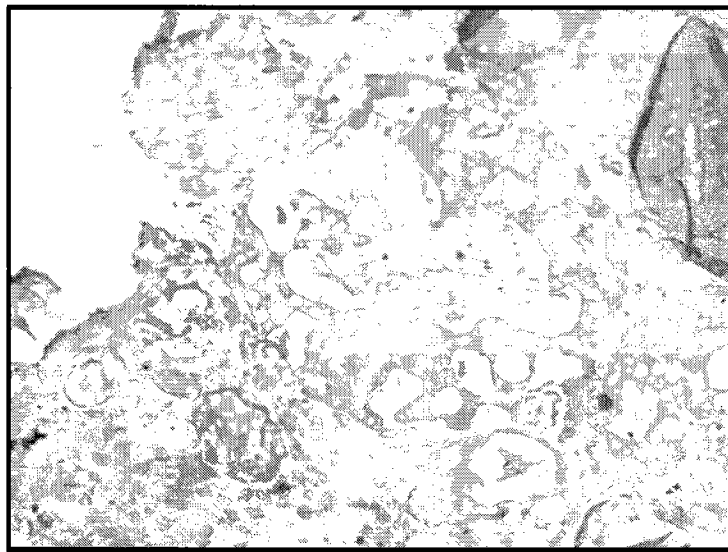


图 4

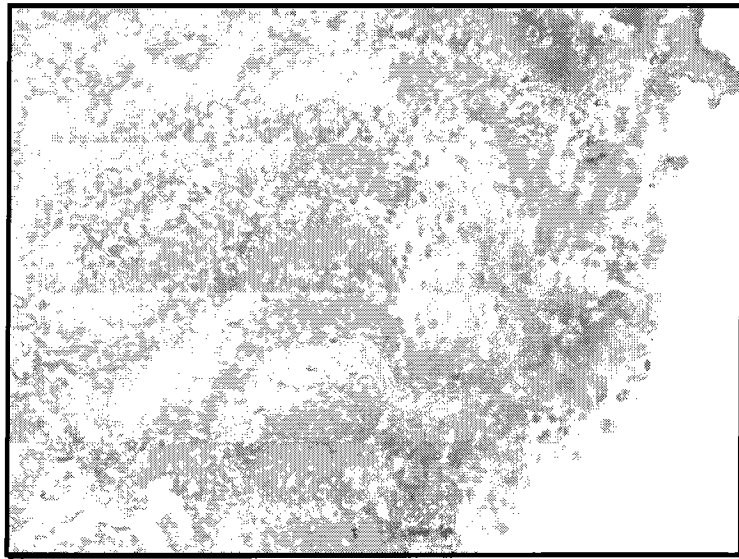


图 5

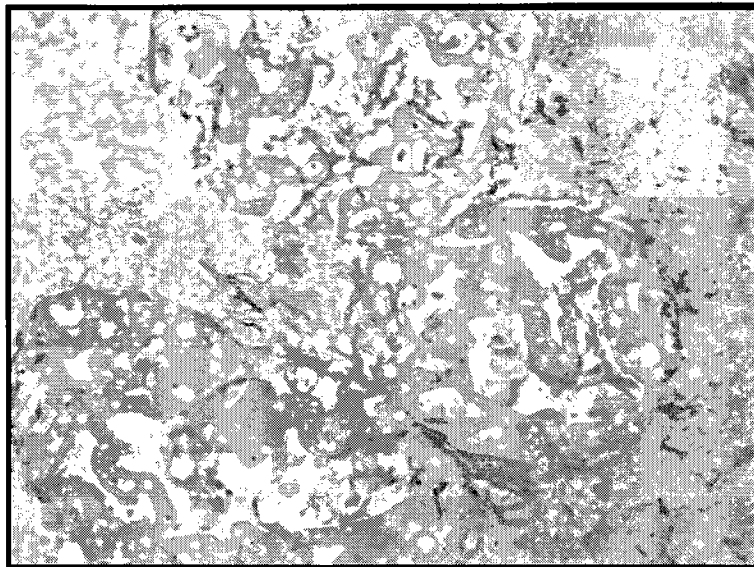


图 6

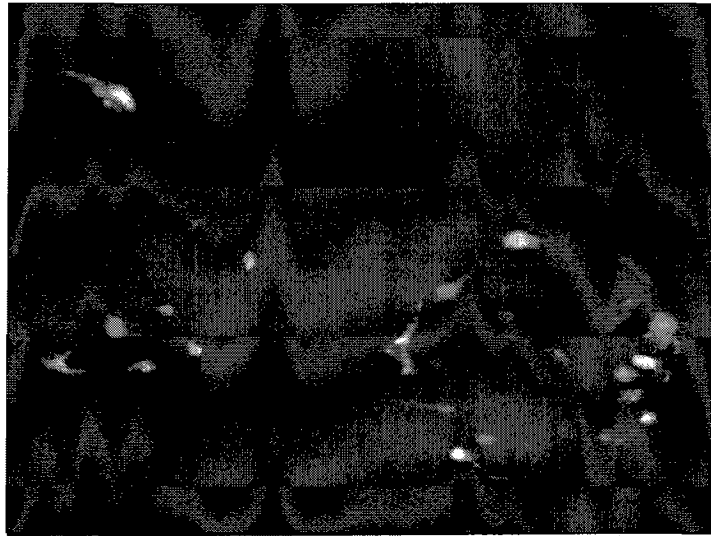


图 7

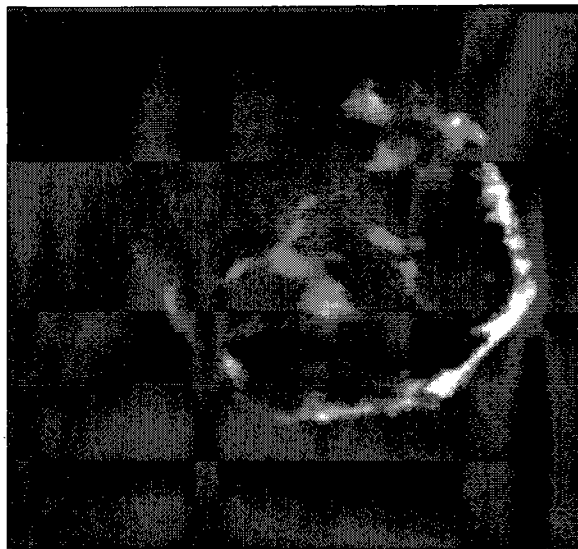


图 8

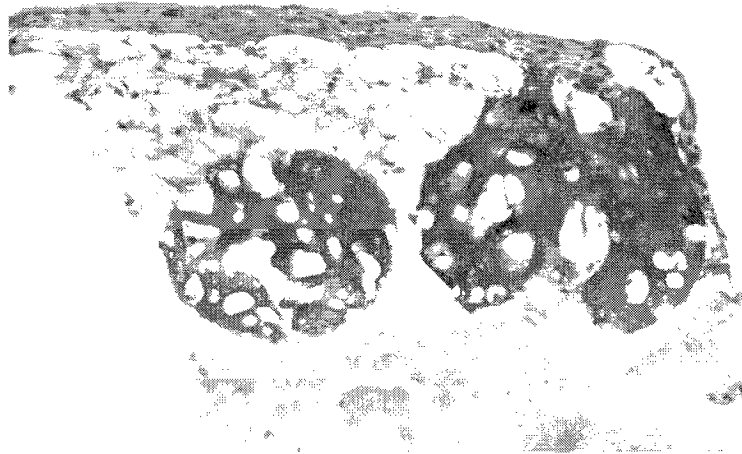


图 9



图 10

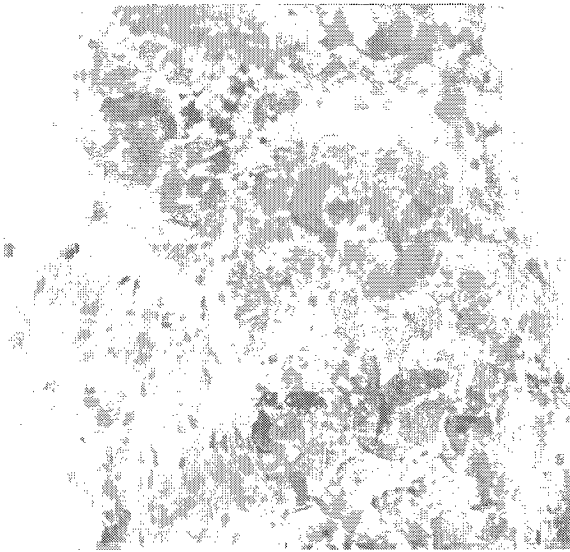


图 11

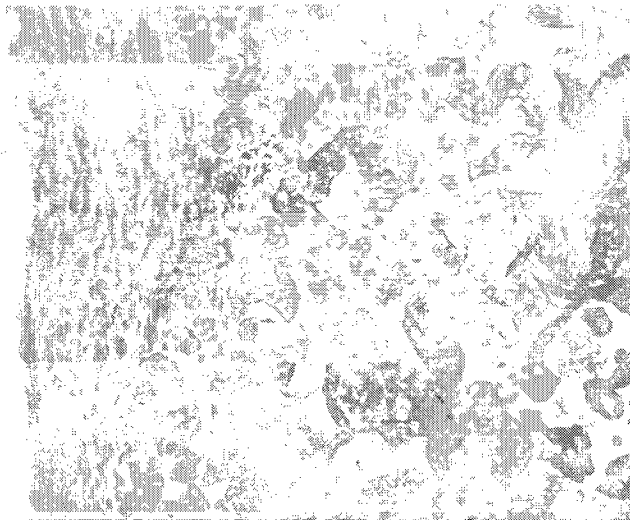


图 12

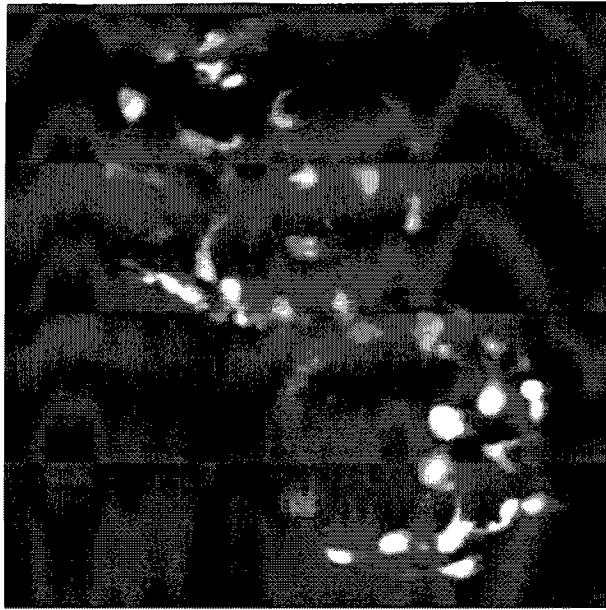


图 13