



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114949368 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202210355498.8

(22) 申请日 2016.08.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114949368 A

(43) 申请公布日 2022.08.30

(30) 优先权数据
62/206,011 2015.08.17 US

(62) 分案原申请数据
201680060849.5 2016.08.17

(73) 专利权人 约翰·霍普金斯大学
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 R·马丁 S·雷迪 J·萨克斯
X·李 B·H·丘 H-Q·毛

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.
A61L 27/48 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61F 2/12 (2006.01)
A61F 2/00 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2010331980 A1, 2010.12.30
US 2012040461 A1, 2012.02.16

审查员 王墩

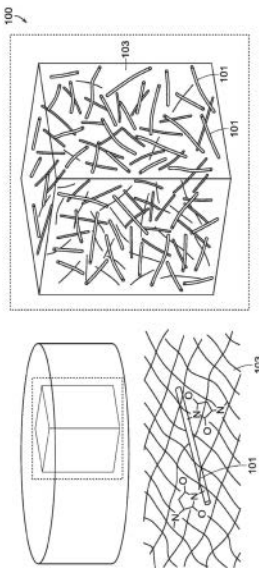
权利要求书3页 说明书43页 附图48页

(54) 发明名称

用于组织修复的纤维-水凝胶复合材料外科网片

(57) 摘要

提供一种用于组织修复的纤维-水凝胶复合材料外科网片,本公开的组合物和方法以用于与外科支架或网片整合的水凝胶或纳米纤维-水凝胶复合材料。公开一种包含层状复合材料的外科支架装置以用于减少异物反应、管理组织-材料界面、以及改善所述外科网片与受试者的周围组织的整合的目的。



1. 一种外科装置,其包含i)可操作地连接到水凝胶材料的层状支架复合物,其中所述支架复合物包含具有100nm至8000nm的平均直径的聚合物纤维;以及ii)外科网片材料,

其中,所述装置包含第一层状支架复合物和第二层状支架复合物,其中所述外科网片材料设置在所述第一层状支架复合物与所述第二层状支架复合物之间,

其中所述装置包括存在于所述装置的表面上或表面内的多个孔,其中所述孔在所述表面的至少50个孔/cm²的浓度下存在,并且其中所述孔的至少80%在所述表面上具有至少5微米的平均孔直径,以及

其中所述装置还包含交联部分,所述交联部分以在聚合物纤维与水凝胶材料之间引入结合的有效量存在。

2. 如权利要求1所述的装置,其中所述装置被构造为适于植入在选自以下的器官或组织中的几何形状:皮肤、筋膜、胸膜、硬脑膜、心包膜、腱旁组织、骨膜、神经束膜、血管壁、以及淋巴管壁。

3. 如权利要求1所述的装置,其被构造为薄片,所述薄片的第一维度和第二维度的长度独立地是第三维度的至少五倍大。

4. 如权利要求3所述的装置,其中所述第三维度小于1cm。

5. 如权利要求3所述的装置,其中所述第三维度小于9mm、8mm、7mm、6mm、5mm、4mm、3mm、2mm、1mm、或0.5mm。

6. 如权利要求3所述的装置,其中所述第一维度和所述第二维度独立地大于1cm。

7. 如权利要求1所述的装置,其被构造为可植入在有需要的人类受试者中。

8. 如权利要求1所述的装置,其被构造为皮下可植入的。

9. 如权利要求1所述的装置,其包含多种线性排序的聚合物纤维。

10. 如权利要求1所述的装置,其包含多种聚合物纤维,所述聚合物纤维被设置来在其上提供线性细胞迁移。

11. 如权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶材料与所述聚合物纤维共价缔合。

12. 如权利要求1所述的装置,其还包含将所述聚合物纤维可操作地连接到所述水凝胶材料的接头部分。

13. 如权利要求1所述的装置,其中,所述聚合物纤维与所述水凝胶材料的比率在组分-质量基础上是1:10至10:1。

14. 如权利要求1所述的装置,其中所述聚合物纤维是非织造的。

15. 如权利要求1或14所述的装置,其中所述聚合物纤维是电纺丝的。

16. 如权利要求1-14中任一项所述的装置,其中所述聚合物纤维以薄片布置。

17. 如权利要求1所述的装置,其包含无机外科网片材料。

18. 如权利要求1所述的装置,其包含有机外科网片材料。

19. 如权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶材料包括源自或可源自选自以下的哺乳动物组织的生物材料:脂肪、肌肉、膀胱、肠、肌腱或软骨。

20. 如权利要求1所述的装置,其中所述支架复合物设置在所述外科网片材料的全部或部分上。

21. 如权利要求1所述的装置,其包含第一层状支架复合物和第二层状支架复合物,其中所述外科网片材料插置在所述第一层状支架复合物与所述第二层状支架复合物之间。

22. 如权利要求1所述的装置,其还包含人类细胞或细胞提取物。
23. 如权利要求1所述的装置,其还包含人类干细胞或祖细胞干细胞。
24. 如权利要求1所述的装置,其中所述聚合物纤维包括生物相容性和生物可降解聚酯。
25. 如权利要求1所述的装置,其中所述聚合物纤维包括合成聚合物材料,其包括聚(乳酸-共-羟基乙酸)、聚(乳酸)、和/或聚己内酯、或其组合。
26. 如权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶材料存在于呈功能性网络形式的所述复合物中。
27. 如权利要求1所述的装置,其中所述聚合物纤维包括非织造聚合物纤维。
28. 如权利要求1所述的装置,其包含彼此平行取向的多种非织造聚合物纤维。
29. 如权利要求1所述的装置,其中所述聚合物纤维包括电纺丝聚己内酯纤维。
30. 如权利要求25所述的装置,其中所述聚合物纤维包括聚己内酯。
31. 如权利要求1所述的装置,其被配制成生物相容性的。
32. 如权利要求1所述的装置,其中所述聚合物材料包括选自以下组成的组的生物聚合物材料:胶原、和壳聚糖、或其组合。
33. 如权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶材料包括透明质酸。
34. 如权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶材料包括一种水凝胶材料,其包括聚(乙二醇)、胶原、葡聚糖、弹性蛋白、藻酸盐、血纤维蛋白、藻酸盐、透明质酸、聚(乙烯醇)、其衍生物、或其组合。
35. 如权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶材料包括处理的组织细胞外基质。
36. 如权利要求35所述的装置,其中所述处理的组织细胞外基质可源自脂肪组织。
37. 如权利要求1所述的装置,其包含非织造聚己内酯纤维。
38. 如权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶材料包括透明质酸,其覆盖聚己内酯纤维的外表面的至少一部分。
39. 如权利要求38所述的装置,其中所述水凝胶材料结合到所述聚合物纤维的所述外表面。
40. 如权利要求38所述的装置,其中所述交联部分以在所述聚己内酯纤维与所述透明质酸之间诱导交联的有效量存在。
41. 如权利要求1所述的装置,其中当植入到存在于人类受试者中的靶标组织中时,所述装置促进组织生长和细胞浸润。
42. 如权利要求1所述的装置,其中当植入到人类组织中时,所述装置是生物可降解的。
43. 如权利要求1所述的装置,其中当植入到人类组织中时,所述装置是非生物可降解的。
44. 如权利要求1所述的装置,其还包含治疗剂,所述治疗剂选自细胞、小分子、核酸、以及多肽。
45. 如权利要求1所述的装置,其被配制用于施加在皮肤伤口上。
46. 如权利要求1所述的装置,其被配制用于施加在皮下伤口上。
47. 一种可植入生物材料,其包括如权利要求1所述的装置。
48. 如权利要求47所述的可植入生物材料,其无细胞和/或不含多肽。

49. 如权利要求47所述的可植入生物材料,其被配制用于通过注射进行施用。

50. 如权利要求47所述的可植入生物材料,其被配制用于皮下施用。

51. 一种试剂盒,其包含如权利要求47-50中任一项所述的可植入生物材料。

52. 一种用于经历外科手术的受试者的医疗装置,其包含当施用到所述受试者时提供一种或多种组织的强化和/或再生的有效量的如权利要求1所述的装置或如权利要求47所述的可植入生物材料,所述一种或多种组织包括皮肤、筋膜、胸膜、硬脑膜、心包膜、腱旁组织、骨膜、神经束膜、血管壁、淋巴管壁。

53. 一种用于经历外科手术的受试者的医疗装置,其包含当施用到所述受试者时提供医疗植入物或组织扩张器的强化或覆盖的有效量的如权利要求1所述的装置或如权利要求47所述的可植入生物材料。

用于组织修复的纤维-水凝胶复合材料外科网片

[0001] 本申请是中国专利申请号为2016800608495,发明名称为“用于组织修复的纤维-水凝胶复合材料外科网片”,申请日为2016年8月17日的进入中国的PCT专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请是国际专利申请,其要求2015年8月17日提交的标题为“Composite Material for Tissue Restoration”的美国临时申请号62/206,011的优先权益。本申请还涉及2015年8月17日提交并且标题为“Composite Material for Tissue Restoration”的国际专利申请PCT/US15/45494。这些相关申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0004] 背景

技术领域

[0005] 1. 领域

[0006] 本公开涉及修复软组织缺损同时促进软组织再生的复合材料和方法。

背景技术

[0007] 2. 相关技术描述

[0008] 由创伤、肿瘤切除或先天畸形引起的软组织缺损难以通过常规手段治疗。当前的疗法(包括组织重排或组织转移)导致供体部位缺损。其他疗法(诸如假体植入物)造成纤维化和包裹。促进组织向内生长的现有策略也不足以治疗软组织缺损。当前的无细胞基质引起平坦纤维化组织薄片,而不是理想重建所需的软的三维组织。最后,虽然脂肪移植术可使软组织缺损恢复,但是其更广泛的用途受到变化的移植物存活和受限的恢复体积的阻碍。软组织重建的理想方法助长体内软组织(诸如脂肪组织或筋膜)再生,接着植入所述组织以促进再生。然而,脂肪组织或筋膜再生长需要合适的基质以用于细胞进行附着、迁移、增殖、分化、以及组织成新组织。许多天然细胞外基质(ECM)在修复部位处缺失。因此,在使用基于脂肪或筋膜组织的重建修复软组织缺损时,重造不仅立即使损失的组织体积恢复、还调理微环境、支持宿主细胞浸润、并且助长软组织再生的合成基质成为重要任务。

[0009] 水凝胶作为用于软组织重建的材料提供若干优点。然而,为了实现足够的机械特性,通常需要更高的交联密度。然而,在这些条件下,宿主组织细胞(例如,脂肪祖细胞和内皮祖细胞)不能够穿透并生长到支架中。在可降解水凝胶的情况下,瘢痕和纤维组织形成是典型的,因为宿主组织的向内生长发生得太慢,或至少在慢于纤维材料的吸收的速率下发生。

[0010] 最近,已开发官能化纳米纤维来充当ECM模拟物以支持各种细胞活动。符合FDA的合成生物可降解聚 α 酯(诸如聚己内酯(PCL)或聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA))可用于通过已知为电纺丝的过程生成纳米纤维。由这些聚合物制备的生物可降解缝合线和植入物由于其关于生物相容性的优异追踪记录而被广泛地临床使用。已开发用于干细胞工程应用的具有变化的直径和外形的各种纳米纤维。然而,这些纳米纤维不提供宏观结构,从而使其难以

用作3D支架。

[0011] 鉴于与此类常规方法和系统相关联的各种问题,本领域仍然存在对于使软组织缺损愈合的改善解决方案的需要。本公开提供一种针对此需要的克服本领域指出的各种问题的解决方案。

发明内容

[0012] 概述

[0013] 本发明至少地基于识别具有拥有改善的特性(例如,用于软组织重建的改善的质量,如下文进一步详述的)的聚合物纤维组分的支架复合物。

[0014] 在某些方面,本发明提供一种层状薄片支架,其由以互穿结构形成在外科网片薄片周围的纳米纤维-水凝胶复合材料构成,从而形成整合网络。

[0015] 在其他方面,本发明提供一种层状薄片支架,其由从表面官能化电纺丝纤维薄片和水凝胶制备的纳米纤维-水凝胶复合材料构成,但是在纤维与水凝胶网络之间引入界面结合,从而形成整合网络。

[0016] 在另外的方面,本发明提供一种层状薄片支架,其由外科网片薄片和水凝胶复合材料构成,但是在外科网片表面与水凝胶网络之间引入界面结合,从而形成整合网络。

[0017] 在一方面,本发明提供一种支架复合物,其包含共价连接到水凝胶材料的具有约100nm至约8000nm的平均直径的聚合物纤维,其中纤维与水凝胶材料的比率在组分-质量基础上是约1:10至约10:1,或者在浓度基础上是约1至50mg/mL。

[0018] 在一个实施方案中,所述聚合物纤维包括生物相容性生物可降解聚酯。任选地,所述聚合物纤维包括聚己内酯。

[0019] 在另一个实施方案中,所述水凝胶材料存在于呈功能性网络形式的复合物中。

[0020] 在另一个实施方案中,纤维与无水水凝胶材料的比率是约1:10至约10:1。

[0021] 在另一个实施方案中,所述聚合物纤维包括非织造聚合物纤维。

[0022] 在某些实施方案中,所述聚合物纤维包括电纺丝聚己内酯纤维。任选地,所述聚合物纤维包括合成聚合物材料,其包括聚(乳酸-共-羟基乙酸)、聚(乳酸)、和/或聚己内酯、或其组合。

[0023] 在一个实施方案中,所述复合物被配制成基本上生物相容的。任选地,所述聚合物纤维包括生物聚合物材料,其包括丝、胶原、壳聚糖、和/或其组合。

[0024] 在一个实施方案中,所述水凝胶材料包括透明质酸。任选地,所述水凝胶材料包括一种水凝胶材料,其包括聚(乙二醇)、胶原、葡聚糖、弹性蛋白、藻酸盐、血纤维蛋白、藻酸盐、透明质酸、聚(乙烯醇)、其衍生物、或其组合。

[0025] 在某些实施方案中,所述水凝胶材料包括处理的组织细胞外基质。

[0026] 在一个实施方案中,所述处理的组织细胞外基质可源自脂肪组织。

[0027] 在另一个实施方案中,所述支架复合物包含非织造聚己内酯纤维。

[0028] 在一个实施方案中,所述水凝胶材料包括透明质酸,其基本上覆盖所述聚己内酯纤维的外表面的至少一部分。

[0029] 在某些实施方案中,所述水凝胶材料结合到所述聚合物纤维的所述外表面。

[0030] 在另一个实施方案中,所述支架复合物还包含交联部分,其以在聚合物纤维与水

凝胶材料之间引入结合的有效量存在。

[0031] 在某些实施方案中,所述支架复合物包括存在于所述支架复合物的表面上或表面内的多个孔,其中所述孔在所述表面的至少约50个孔/cm²的浓度下存在,并且其中所述孔的至少80%在所述表面上具有至少约5微米的平均孔直径。

[0032] 在另外的实施方案中,所述支架复合物还包含交联部分,其以在聚己内酯纤维与透明质酸之间诱导交联的有效量存在。

[0033] 任选地,当植入到存在于人类受试者中的靶标组织中时,所述支架复合物促进组织生长和细胞浸润。

[0034] 在某些实施方案中,当植入到人类组织中时,所述支架复合物是基本上生物可降解的。

[0035] 在一个实施方案中,当植入到人类组织中时,所述支架复合物是基本上非生物可降解的。

[0036] 在另一个实施方案中,所述支架复合物还包含治疗剂,其选自细胞、小分子、核酸、以及多肽。

[0037] 本发明的另一方面提供一种可植入生物材料,其包括本发明的支架复合物。

[0038] 在某些实施方案中,所述可植入材料基本上无细胞和/或基本上不含多肽。

[0039] 在一个实施方案中,所述可植入材料被配制用于通过注射进行施用。

[0040] 在另一个实施方案中,所述可植入材料被配制用于皮下施用。

[0041] 本发明的另一方面提供一种包含本发明的可植入材料的试剂盒。

[0042] 本发明的另一方面提供一种用于保持经历外科手术的受试者中的组织形状的医疗装置,其包含当施用到所述受试者时提供组织形状的保持的有效量的本发明的支架复合物和/或可植入材料。

[0043] 本发明的另一方面提供一种用于制备用于组织或软骨修复的植入物的方法,所述方法涉及以下步骤:提供包含取向成产生多个孔的聚合物纤维的无细胞三维支架,其中所述聚合物纤维的至少一部分交联到其他聚己内酯纤维;将包含水凝胶材料的组合物设置在所述聚合物纤维上以形成复合物;以及使所述复合物反应或稳定化以形成稳定化的植入物,从而制备所述植入物。

[0044] 任选地,所述组织包括软组织。

[0045] 本发明的另一方面提供一种用于制备用于组织或软骨修复的植入物的方法,所述方法涉及以下步骤:提供包含取向成产生多个孔的聚合物纤维的无细胞三维支架;将包含水凝胶材料的组合物设置在所述聚合物纤维上以形成复合物;以及使所述复合物反应或稳定化以形成稳定化的植入物,其中所述聚合物纤维的至少一部分交联到所述水凝胶材料。

[0046] 在某些实施方案中,所述三维支架包含反应性聚己内酯纤维。

[0047] 本发明的另一方面提供一种用于制备用于组织或软骨修复的植入物的方法,所述方法涉及以下步骤:提供包含取向成产生多个孔的聚合物纤维的无细胞三维支架;将包含水凝胶材料的组合物设置在所述聚合物纤维上以形成复合物;以及使所述复合物反应或稳定化以形成稳定化的植入物,其中所述聚合物纤维的至少一部分交联到所述水凝胶材料。

[0048] 本发明的另一方面提供一种用于解决由创伤或外科干预引起的组织缺损的方法,所述方法涉及使所述组织胀大,其中使所述组织胀大包括将有效量的本发明的所述支架复

合物植入到所述组织中以便从而使其胀大。

[0049] 本发明的另一方面提供一种用于减少或逆转由衰老相关疾病、病症或病状引起的组织缺损的方法,所述方法涉及使包括所述组织的组织胀大,其中使所述组织胀大包括将有效量的本发明的支架复合物植入到所述组织中以便从而使其胀大。

[0050] 任选地,所述组织缺损包括胸膜组织、肌肉组织、皮肤、或其组合。

[0051] 在至少一方面,本发明提供一种包含凝胶和设置在所述凝胶内的至少一种纳米结构的复合材料。所述凝胶可以是水凝胶或任何其他合适的凝胶。所述纳米结构可以是纳米纤维或任何其他合适的纳米结构。所述纳米结构可共价结合到所述凝胶。所述纳米结构可由聚己内酯(PCL)或任何其他合适的材料制成。

[0052] 在至少另一方面,本发明提供一种用于使软组织缺损愈合的方法,其包括将复合材料施加到软组织缺损,其中所述复合材料包含凝胶和设置在所述凝胶内的纳米结构。

[0053] 在又一方面,本发明提供一种用于制造用于使软组织缺损愈合的复合材料的方法,其包括提供凝胶和将纳米纤维设置在所述凝胶内。

[0054] 在另一方面,提供一种外科装置,其包含:i)层状支架复合物,其包含可操作地连接到水凝胶材料的具有约100nm至约8000nm的平均纤维直径的聚合物纤维薄片(任选地非织造和/或电纺丝聚合物纤维薄片);以及ii)外科网片材料。

[0055] 在适用或没有具体地不要求保护的情况下,设想本文所述的实施方案中的任一个能够与任何其他一个或多个实施方案组合,虽然所述实施方案根据本发明的不同方面描述。

[0056] 这些和其他实施方案进行公开或从以下详细描述变得明显并且由以下详细描述涵盖。

附图说明

[0057] 结合附图可最好地理解以下详细描述,详细描述通过举例给出,但是不意图将本发明仅限于所描述的具体实施方案。

[0058] 图1A展示根据本公开的复合材料的实施方案的结构,其示出设置在凝胶中的纳米结构,并且更具体地示出纳米结构与凝胶中的官能团的共价附着。

[0059] 图1B示出如图1所示的完全溶胀的复合材料的光学显微镜图像;

[0060] 图1C是如图1所示的水化复合材料的宏观外观的图像;

[0061] 图1D示出如图1所示的脱水复合材料的扫描电子显微术(SEM)图像,其揭示与ECM的超结构相似性;

[0062] 图2A描绘针对单独的HA水凝胶绘制的图1的复合材料的实施方案的应力-应变曲线,其揭示在相同的交联密度下与水凝胶相比的改善的弹性模量;

[0063] 图2B描绘疲劳测试,其显示图2A的复合材料的实施方案保留与常规水凝胶相比的相似程度的机械完整性的稳健性;

[0064] 图3A和图3B示出在纳米纤维-HA水凝胶复合材料中培养4天的ASC的荧光和重合图像(图3A)连同相差图像(图3B);

[0065] 图3C和图3D示出在常规HA水凝胶中培养4天的ASC的荧光和重合图像(图3C)连同相差图像(图3D);

[0066] 图4A和图4B示出对比沿对齐的650-nm纳米纤维从球形体迁移的ASC的荧光图像和重合图像(图4A)连同相差图像(图4B)。

[0067] 图5A是示出大鼠腹股沟脂垫下的原位纳米纤维-水凝胶复合材料的外观的照片。

[0068] 图5B示出来自植入之后2周收获的复合材料周围的组织的切片的H&E染色图像;并且

[0069] 图5C示出在4周时从复合材料-组织界面采集的组织切片的H&E染色图像,其显示细胞浸润。

[0070] 图6A描绘聚己内酯(PCL)纤维-HA水凝胶复合材料的合成方案。

[0071] 图6B描绘具有PCL纤维与HA链网络之间的界面结合的复合材料结构的示意性图示。

[0072] 图6C描绘示出具有相同尺寸(比例尺=5mm)的新鲜制备的圆柱形纤维-HA水凝胶复合材料(左)和HA水凝胶(右)的总体外观的光学图像。

[0073] 图6D描绘冻干和再水化之后相同样品集的光学图像。

[0074] 图6E描绘HA水凝胶的横截面的SEM图像(比例尺=40 μ m)。

[0075] 图6F描绘PCL纤维-HA水凝胶复合材料的横截面的SEM图像(比例尺=100 μ m)。

[0076] 图6G描绘去细胞化的天然脂肪组织的横截面的SEM图像(比例尺=10 μ m)。

[0077] 图7A描绘纤维直径和界面结合对于强化HA水凝胶的压缩模量的影响。基于4.5mg/ml的HA来制备HA水凝胶和复合材料。应力值在50%应变下进行测量。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0078] 图7B描绘纤维直径和界面结合对于强化PEG水凝胶的压缩模量的影响。基于30mg/ml的PEGSH和20mg/ml的PEGDA来制备PEG水凝胶和复合材料,并且使用1.0- μ m PCL纤维来合成纤维-PEG水凝胶复合材料。应力值在50%应变下进行测量。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0079] 图8A描绘界面结合密度和纤维直径对于强化HA水凝胶的剪切储能模量的影响。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0080] 图8B描绘界面结合密度和纤维直径对于强化PEG水凝胶的剪切储能模量的影响。剪切储能模量的值在1-Hz频率下进行测量。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0081] 图8C描绘界面结合密度和纤维直径对于强化HA水凝胶的剪切储能模量的影响。剪切储能模量的值在1-Hz频率下进行测量。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0082] 图8D描绘界面结合密度和纤维直径对于强化HA水凝胶的剪切储能模量的影响。剪切储能模量的值在1-Hz频率下进行测量。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0083] 图9A描绘纤维负荷量对于HA水凝胶的剪切储能模量的影响。HA水凝胶和复合材料使用10-mg/ml的HA来合成。剪切储能模量在1-Hz频率下进行测量。蓝色箭头指示具有SH基团与(DA+MAL)基团的1至2的摩尔比的两种复合材料的情况。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0084] 图9B描绘纤维负荷量对于HA水凝胶的剪切储能模量的影响。HA水凝胶和复合材料使用4.5-mg/ml的HA来合成。剪切储能模量在1-Hz频率下进行测量。蓝色箭头指示具有SH基团与(DA+MAL)基团的1至2的摩尔比的两种复合材料的情况。 $*p<0.05$ (Student-t测试)。

[0085] 图10A描绘在不同频率下的纤维-HA水凝胶复合材料的机械强度。HA水凝胶和复合材料的剪切储能模量针对不同频率的剪切负荷进行测量。

[0086] 图10B描绘在不同再水化下的纤维-HA水凝胶复合材料的机械强度。再水化之前和

之后复合材料的压缩应力的比较(应变=40%)。

[0087] 图10C描绘在不同周期负荷下的纤维-HA水凝胶复合材料的机械强度。HA水凝胶和对应复合材料的压缩应力针对周期负荷进行测量(应变=25%)。

[0088] 图11A描绘第27天人类脂肪衍生干细胞(hASC)在HA水凝胶中的迁移能力。选择表现出大约1.9kPa的相似压缩模量的HA水凝胶对照和两种复合材料。使用Alexa Fluor® 568鬼笔环肽(红)和DAPI(蓝)分别对hASC的F-肌动蛋白和核进行染色。使用Alexa Fluor® 647(白)对纳米纤维进行标记。比例尺=100 μ m。

[0089] 图11B描绘第27天人类脂肪衍生干细胞(hASC)在纳米纤维-HA水凝胶复合材料中的迁移能力。选择表现出大约1.9kPa的相似压缩模量的HA水凝胶对照和两种复合材料。使用Alexa Fluor® 568鬼笔环肽(红)和DAPI(蓝)分别对hASC的F-肌动蛋白和核进行染色。使用Alexa Fluor® 647(白)对纳米纤维进行标记。比例尺=100 μ m。

[0090] 图11C描绘第27天人类脂肪衍生干细胞(hASC)在RGD-纳米纤维-HA水凝胶复合材料中的迁移能力。选择表现出大约1.9kPa的相似压缩模量的HA水凝胶对照和两种复合材料。使用Alexa Fluor® 568鬼笔环肽(红)和DAPI(蓝)分别对hASC的F-肌动蛋白和核进行染色。使用Alexa Fluor® 647(白)对纳米纤维进行标记。比例尺=100 μ m。

[0091] 图11D描绘第27天人类脂肪衍生干细胞(hASC)在RGD-纳米纤维-HA水凝胶复合材料中的迁移能力。选择表现出大约1.9kPa的相似压缩模量的HA水凝胶对照和两种复合材料。(d)和(e)中的黄色箭头指示粘附到纤维或纤维簇的细胞。使用Alexa Fluor® 568鬼笔环肽(红)和DAPI(蓝)分别对hASC的F-肌动蛋白和核进行染色。使用Alexa Fluor® 647(白)对纳米纤维进行标记。比例尺=20 μ m。

[0092] 图11E描绘第27天人类脂肪衍生干细胞(hASC)在纳米纤维-HA水凝胶复合材料中的迁移能力。选择表现出大约1.9kPa的相似压缩模量的HA水凝胶对照和两种复合材料。(d)和(e)中的黄色箭头指示粘附到纤维或纤维簇的细胞。使用Alexa Fluor® 568鬼笔环肽(红)和DAPI(蓝)分别对hASC的F-肌动蛋白和核进行染色。使用Alexa Fluor® 647(白)对纳米纤维进行标记。比例尺=20 μ m。

[0093] 图11F描绘人类脂肪衍生干细胞(hASC)的迁移能力。示出具有PCL纤维与HA链网络之间的界面结合的复合材料结构中的hASC球形体的示意性图示。

[0094] 图12A描绘在30天中由植入的纤维-HA水凝胶复合材料和HA水凝胶介导的组织再生。示出在腹股沟脂垫下植入之前(插图)和之后的复合材料的宏观图像(比例尺=2mm)。白星指示植入的基质。

[0095] 图12B描绘在30天中由植入的纤维-HA水凝胶复合材料和HA水凝胶介导的组织再生。示出在腹股沟脂垫下植入之前(插图)和之后的HA水凝胶的宏观图像(比例尺=2mm)。白星指示植入的基质。

[0096] 图12C描绘在30天中由植入的纤维-HA水凝胶复合材料和HA水凝胶介导的组织再生。示出第14天和第30天(i)天然脂肪组织、(ii)假手术之后愈合组织、(iii,v)纤维-HA水凝胶植入的组织、以及(iv,vi)HA水凝胶植入的组织的H&E和Masson氏三色染色图像。在图像中,H=HA水凝胶,C=纤维-HA水凝胶复合材料,B=褐色脂肪组织,黄色箭头=血管。比例尺=200 μ m。

[0097] 图12D描绘在30天中由植入的纤维-HA水凝胶复合材料和HA水凝胶介导的组织再

生。示出第14天和第30天 (i) 天然脂肪组织、(ii) 假手术之后愈合组织、(iii、v) 纤维-HA水凝胶植入的组织、以及 (iv、vi) HA水凝胶植入的组织的H&E和Masson氏三色染色图像。来自Masson氏三色染色的蓝色染色指示检查的组织中的总胶原。在图像中,H=HA水凝胶,C=纤维-HA水凝胶复合材料,B=褐色脂肪组织,黄色箭头=血管。比例尺=200 μ m。

[0098] 图13A描绘通过PAA移植方法制备使用MAL表面修饰的纤维的示意图。

[0099] 图13B描绘PAA移植有3%和10% (v/v) 的丙烯酸之后纤维上的羟基的平均密度(* $p < 0.05$, $n=6$)。

[0100] 图14描绘使用4.5mg/ml HA-SH制备的具有SH与DA的各种摩尔比的HA水凝胶的剪切储能模量。

[0101] 图15A描绘由各种量的纤维制备的纤维-HA水凝胶复合材料的剪切储能模量。纤维的平均直径是686nm,纤维上的MAL表面密度是100nmol/mg,并且复合材料使用4.5mg/ml的HA-SH和5mg/ml的PEGDA来制备。蓝色箭头指示SH基团与(DA+MAL)基团的1至2的摩尔比。* $p < 0.05$ ($n=3$)。

[0102] 图15B描绘具有各种量的负荷纤维的纤维-PEG水凝胶复合材料的剪切储能模量。* $p < 0.05$ ($n=3$)。

[0103] 图16描绘基于其横截面的SEM图像估计HA水凝胶和纳米纤维-HA水凝胶复合材料的平均孔大小(* $p < 0.05$)。

[0104] 图17A描绘第14天通过纤维-HA水凝胶复合材料进行的细胞浸润和组织向内生长。切片组织通过H&E针对总胶原进行染色(蓝)。标记:C=纤维-HA水凝胶复合材料,黄色箭头=血管。比例尺=50 μ m。

[0105] 图17B描绘第14天通过纤维-HA水凝胶复合材料进行的细胞浸润和组织向内生长。切片组织通过Masson氏三色针对总胶原进行染色(蓝)。标记:C=纤维-HA水凝胶复合材料,黄色箭头=血管。比例尺=50 μ m。

[0106] 图17C描绘第30天通过纤维-HA水凝胶复合材料进行的细胞浸润和组织向内生长。切片组织通过H&E针对总胶原进行染色(蓝)。标记:C=纤维-HA水凝胶复合材料,黄色箭头=血管。比例尺=50 μ m。

[0107] 图17D描绘第30天通过纤维-HA水凝胶复合材料进行的细胞浸润和组织向内生长。切片组织通过Masson氏三色针对总胶原进行染色(蓝)。标记:C=纤维-HA水凝胶复合材料,黄色箭头=血管。比例尺=50 μ m。

[0108] 图18描绘去细胞化的脂肪组织(上图)和纤维-HA水凝胶复合材料(下图)的横截面的SEM图像。

[0109] 图19A描绘第4天hASC在HA水凝胶($G' = 24.85 \mu 2.92$ Pa)中的迁移能力。所述HA水凝胶使用2.5mg/ml的HA-SH和5.0mg/ml的PEGDA来制造。比例尺=100 μ m。

[0110] 图19B描绘第4天hASC在1.0- μ m纤维-HA水凝胶复合材料($G' = 32.29 \mu 2.16$ Pa)中的迁移能力。所述复合材料使用2.5mg/ml的HA、5.0mg/ml的PEGDA和10mg/ml纤维制造。比例尺=100 μ m。

[0111] 图19C描绘第4天hASC在286-nm纤维-HA水凝胶复合材料($G' = 39.56 \mu 1.26$ Pa)中的迁移能力。所述复合材料使用2.5mg/ml的HA、5.0mg/ml的PEGDA和10mg/ml纤维制造。比例尺=100 μ m。

[0112] 图20A描绘可注射制剂。所述纤维-水凝胶复合材料可配制用于可注射应用。

[0113] 图20B描绘刚注射之后可注射复合材料是稳定的。

[0114] 图20C描绘可注射复合材料在水中保持非分散,其形状和体积保持不变。

[0115] 图20D描绘第30天通过可注射纤维-HA水凝胶复合材料进行的细胞浸润和组织向内生长,其显示充分的细胞重塑和脂肪细胞形成。切片组织通过H&E进行染色。标记:c=纤维-HA水凝胶复合材料。

[0116] 图21描绘包含纤维外科网片和纳米纤维-水凝胶复合材料的复合材料外科支架装置的结构和制备方案。在右下角处的插图示出冻干并且再水化回至最初水化状态的复合材料网片的光学图像。

[0117] 图22描绘复合材料纳米纤维-水凝胶薄片支架的结构和制备方案。使用表面官能化纳米纤维薄片而没有另外的微纤维网片。使用如在PCT/US15/45494中所述的相同方法而没有低温研磨步骤来对无规或对齐的纳米纤维薄片进行官能化。然后使用完整的薄片来形成复合材料薄片支架。

[0118] 图23描绘呈冻干形式(左)和再水化形式(右)的复合材料纳米纤维薄片的光学图像。

[0119] 图24描绘复合材料微纤维-水凝胶薄片支架的结构和制备方案。使用表面官能化微纤维薄片而没有另外的纳米纤维网片。使用如在PCT/US15/45494中所述的相同方法来对编织或织造或非织造的微纤维网片薄片进行官能化。然后使用微纤维薄片来形成复合材料薄片支架。

[0120] 图25描绘呈再水化形式的复合材料微纤维薄片的光学图像。在没有纳米纤维组分的情况下制备此支架构型。在微纤维网片周围浇铸无纤维HA水凝胶。

[0121] 图26A和图26B描绘在大鼠体内模型中沿腹壁放置外科网片。具体地呈现描绘外科手术的附图(图26A)和啮齿动物中网片植入的图像(图26B)。

[0122] 图27A和图27B描绘体内植入后第4天假手术对照(顶行)、未涂覆聚丙烯网片(中间行)和复合材料网片(底行)的组织学评价。在5×放大率(左列)和20×放大率(中间列和右列)下对代表性苏木精和曙红(H&E;图27A)和Masson氏三色染色(图27B)结缔组织横截面进行成像。当与对照组和仅网片组进行比较时,在复合材料网片组中观察到增加的细胞浸润。

具体实施方式

[0123] 详细描述

[0124] 本发明涉及用于软组织重建的方法的包含水凝胶和纳米结构的复合材料。本发明还涉及用于使用包含水凝胶和设置在其中的纳米结构的组合物修复或重建软组织损伤的方法。在其他方面,本发明还涉及一种制造用于软组织重建的组合物的方法,其中所述组合物包含水凝胶和设置在其中的纳米结构。

[0125] 本文提供的复合材料薄片支架的一个优点是这些支架减少异物反应、减少炎症和改善组织-材料界面、从而最终改善外科网片与受试者的周围组织的整合的倾向。本文所述的支架可用于各种应用,如下文所述的并且如本领域另外已知或理解的。

[0126] 本文提供短暂的复合材料薄片支架的至少三种不同的构型。在第一构型中,包含外科网片、水凝胶和纳米纤维,所述构型被设计来使支架助长来自周围组织的细胞浸润和

改善植入物和组织的整合的能力最大化,并且实现如在母专利申请PCT/US15/45494中所定义的纳米纤维-水凝胶复合材料的全部优点。在可替代的构型(其是较简单的构型)中,仅包含外科网片和水凝胶(没有纳米纤维)。此可替代的构型仍然保留微纤维外科网片的良好机械特性。最后的构型是具有连接到水凝胶的纳米纤维但是没有单独的外科网片的层状基质。此构型不具有网片-纳米纤维-水凝胶组合物的很大的拉伸强度,但是它生产起来更简单并且由于纳米纤维和水凝胶组分的再吸收性而诱导与永久性外科网片相比更少的瘢痕形成。因此,在不需要高拉伸强度但是最小的瘢痕形成是必需的情况(诸如硬脑膜或胸膜修复)下,此构型是理想的。重要的是,整合网络结构是所有例示构型的共同特征。

[0127] 以下是提供来帮助本领域的技术人员实践本发明的本发明的详细描述。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,本领域的普通技术人员可在本文所述的实施方案中做出修改和变化。除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与由本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本发明的描述中使用的术语仅用于描述特定实施方案并且不意图限制本发明。本文提到的所有公布、专利申请、专利、附图和其他参考文献均明确地以引用的方式整体并入。

[0128] 虽然在实践或测试本发明中也可使用与本文所述的方法和材料相似或等效的任何方法和材料,但是现在描述优选的方法和材料。为了公开和描述公布在引用时所涉及的方法和/或材料,本文中提到的所有公布均以引用的方式并入本文。

[0129] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有由本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。以下参考文献、以引用的方式并入本文的所有公开为技术人员提供本发明中所使用的许多术语的一般定义(除非本文另外定义):Singleton等人, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第2版,1994年);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编,1988);The Glossary of Genetics, 第5版,R.Rieger等人(编),Springer Verlag(1991);以及Hale&Marham,the Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。通常,本文所述或固有的分子生物方法的程序等是本领域所用的普通方法。此类标准技术可见于参考手册,例如像Sambrook等人,(2000, Molecular Cloning--A Laboratory Manual,第三版,Cold Spring Harbor Laboratories);以及Ausubel等人,(1994,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons,New-York)。

[0130] 除非另外说明,否则以下术语可具有以下归属于其的含义。然而,应理解,由本领域的普通技术人员已知或理解的其他含义也是可能的,并且在本发明的范围内。本文提到的所有公布、专利申请、专利和其他参考文献以引用的方式整体并入。如有矛盾,以包括定义在内的本说明书为准。另外,材料、方法和实例仅是说明性的而非意图具有限制性。

[0131] 定义

[0132] 如本文所用,“支架复合物”包括两种组分的任何共价缔合:聚合物纤维和水凝胶材料。所述支架复合物包含呈“功能性网络”形式的聚合物纤维和水凝胶材料,这意味着组分之间的相互作用引起化学、生物化学、生物物理、物理、或生理有益效果。另外,功能性网络可包含另外的组分,包括细胞、生物材料(例如,多肽、核酸、脂质、碳水化合物)、治疗性化合物、合成分子等。在某些实施方案中,当植入到存在于人类受试者中的靶标组织中时,所述支架复合物促进组织生长和细胞浸润。

[0133] 如本文所用,术语“水凝胶”是“凝胶”的一种类型,并且指代水溶胀性聚合物基质,其由通过共价或非共价交联保持在一起的大分子(例如,亲水性聚合物、疏水性聚合物、其共混物)的三维网络组成,所述大分子可吸收大量水(例如,50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%/单位的非水分子)以形成弹性凝胶。聚合物基质可由任何合适的合成或天然存在的聚合物材料形成。如本文所用,术语“凝胶”指代使液体介质的体积扩展并且通过表面张力效应对其进行捕获的固体三维网络。此内部网络结构可由物理键(物理凝胶)或化学键(化学凝胶)、以及微晶或在延伸的流体内保持完整的其他联结引起。事实上,任何流体可用作延伸物,包括水(水凝胶)、油和空气(气凝胶)。在重量和体积两者的组成中,凝胶主要是流体并且因此表现出与其组成液体的密度相似的密度。水凝胶是将水用作液体介质的一类凝胶。

[0134] “疏水性”和“亲水性”聚合物的定义基于在100%相对湿度下由聚合物吸收的水蒸气的量。根据此分类,疏水性聚合物在100%相对湿度(“rh”)下吸收仅多至1%水,而中等亲水性聚合物吸收1%-10%水,亲水性聚合物能够吸收多于10%的水,并且吸湿性聚合物吸收多于20%的水。“水溶胀性”聚合物是在含水介质中浸没之后吸收大于其本身重量的至少50%的水量的聚合物。

[0135] 本文的术语“交联的”指代包含分子内和/或分子间交联的组合物,无论是通过共价或非共价结合发生,并且可以是直接交联剂或包括交联剂。“非共价”结合包括氢结合和静电(离子)结合两者。

[0136] 术语“聚合物”包括直链和支链聚合物结构,并且还涵盖交联聚合物以及共聚物(其可以是或可以不是交联的),因此包括嵌段共聚物、交替共聚物、无规共聚物等。本文中称为“低聚物”的那些化合物是具有低于约1000Da、优选地低于约800Da的分子量的聚合物。聚合物和低聚物可以是天然存在的或从合成来源获得。

[0137] 在某些实施方案中,采用外科网片。在一些实施方案中,“外科网片”指代在手术期间用作器官和其他组织的永久性 or 临时性支撑物的松散织造网片。外科网片可由无机和/或生物材料产生,并且可用于各种手术中。

[0138] 软组织重建

[0139] 来自肿瘤摘除术、创伤、衰老、或先天畸形的毁灭性软组织损失每年影响数百万人。包括皮肤、脂肪和肌肉的组织损失造成主要功能和美观障碍,其难以通过常规手段治疗。例如,美国每年进行超过300,000例部分乳房切除术,从而由于乳房软组织损失而造成毁灭性乳房瘢痕。软组织恢复的现有选择具有显著的缺点。在长时间的外科手术中,自体组织皮瓣需要从身体的另一部分调用软组织,这引起供体部位不足LoTempio 2010.*Plastic and Reconstructive Surgery*,126(2),393-401;Patel 2012.*Annals of Plastic Surgery*,69(2),139-144}。假体植入物易于引起异物反应,从而造成纤维化和包囊{Calobrace 2014*Plastic and Reconstructive Surgery*,134(1增刊),6S-11;Tsoi 2014.*Plastic and Reconstructive Surgery*,133(2),234-249}。涉及在吸脂期间收获的脂肪细胞的放置的脂肪移植限于小体积并且受到较差的移植存活的阻碍{Kakagia 2014*Surgical Innovation*,21(3),327-336;Largo 2014*British Journal of Plastic Surgery*,67(4),437-448}。最后,可使用可注射水凝胶软组织填料,但是这些仅适于较小的缺损并且它们提供的体积恢复是暂时的{Young 2011.*Acta Biomaterialia*,7(3),1040-

1049;Varma2014Acta Biomaterialia,10(12),4996-5004}。已提出新一代的组织工程解决方案来关注于使用水凝胶支架作为在重建部位处使软组织(诸如脂肪组织)再生的模板。

[0140] 软组织重建的当前组织工程方法

[0141] 脂肪衍生干细胞(ASC)是在软组织缺损周围的伤口基底中识别到的一类间充质干细胞(MSC){Salibian 2013Archives of plastic surgery 40.6:666-675}。当使用合适的基质微环境支持时,它们可分化为软组织,诸如脂肪。其他MSC可迁移到合适的微环境中以重构软组织,诸如筋膜、硬脑膜和胸膜。因此,使用功能性材料填充修复部位的策略具有潜力来使用内源性MSC实现新组织的再生。由于其三维(3D)性质和弹性特性(其与软组织的特性相似),水凝胶已作为用于组织缺损再生的支架基质被广泛研究。各种方法已用于生成具有与天然脂肪组织的模量相似的模量($\sim 2\text{kPa}$) {Alkhouli 2013American Journal of Physiology.Endocrinology and Metabolism,305(12),E1427-35;Sommer 2013Acta biomaterialia 9.11(2013):9036-9048}、同时抵抗来自周围组织的物理应力维持其体积和形状的水凝胶支架。这需要较高的交联密度和较小的平均孔大小 {Ryu 2011Biomacromolecules12.7(2011):2653-2659;Khetan 2013Nature Materials,12(5),458-465;Li 2014Journal of Neurotrauma,31(16),1431-1438},从而造成低细胞浸润和较差的再生。水凝胶支架促进细胞浸润的能力是软组织恢复成功的关键。缺少血管浸润是大体积脂肪移植和其他组织工程尝试失败的原因。当前没有可用的材料可填充软组织缺损的体积损失,同时促进较早血管形成和ASC分化以使软组织再生。

[0142] 水凝胶基质

[0143] 在过去的几年中,Li和Wen已开发缀合有层粘连蛋白衍生的环肽(CCRRIKVAVWLC, $10\mu\text{M}$)的透明质酸(HA)水凝胶,其具有优化的孔大小和模量(10-100Pa)以用于干细胞移植。他们表示此水凝胶支持稳健的神经干细胞(NSC)迁移和神经突从分化细胞萌发 {Li 2014Journal of Neurotrauma,31(16),1431-1438}。在创伤性脑损伤的大鼠受控皮层损伤(CCI)模型中,当在CCI损伤之后第3天注射时,此水凝胶在植入后4周至6个月促进填充病灶部位的显著血管系统网络形成($>10\text{mm}$)。此改善的血管生成归因于此水凝胶保留并呈递组织分泌生长因子、具体地是血管内皮生长因子(VEGF)的能力。文献报告还揭示3-10个二糖单元的小HA降解片段是内皮细胞增殖、迁移、微管形成、以及血管生成的强力调节剂 {Slevin 2002Journal of Biological Chemistry,277(43),41046-41059}。在最近的研究中,测试了此HA水凝胶在CCI损伤之后的脑病灶部位中递送人类胎儿组织衍生的NSC球形体的有效性。此HA水凝胶在移植之后在支架基质内递送稳健的血管形成。再生的血管生长到病灶中并且透过植入的基质,并且支持神经元祖细胞的存活和生长。虽然这些研究并不针对脂肪组织再生,但是这些结果确认了此优化的HA水凝胶组合物在促进宿主血管向内生长方面的独特能力。更重要的是,所述水凝胶基质是多孔的,足以实现水凝胶基质内的稳健细胞迁移。然而,将此HA水凝胶直接用于软组织重建是不可行的,因为其机械特性对于维持植入部位的完整性不够高-周围脂肪组织具有多于10倍高的模量。增加交联密度以改善其模量将使其对于细胞浸润和迁移的可透性较差。需要新策略来增加机械特性而不显著降低整体水凝胶的平均孔大小。提供包括处理的组织细胞外基质(诸如源自和/或可源自脂肪组织的细胞外基质)和/或从其分离的水凝胶材料。

[0144] 支架复合物。

[0145] 本文提供支架复合物,其适用于并入到例如通过注射或植入施用所述复合物的人类受试者的组织中的医疗装置。所述支架复合物包含聚合物纤维,其通常具有以下平均直径:约10nm至约10,000nm,诸如约100nm至约8000nm、或约150nm至约5,000nm、或约100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm、3,000nm、3,500nm、4,000nm、4,500nm、5,000nm、5,500nm、6,000nm、6,500nm、7,000nm、7,500nm、或8,000nm。如本文所提供的,聚合物纤维与水凝胶材料的比率可通过本领域已知的任何手段确定。例如,聚合物纤维与水凝胶材料的比率在组分-质量基础上是约1:100至约100:1,诸如约1:50至约50:1、或1:10至约10:1,诸如1:5至约5:1,诸如约1:3至约3:1。聚合物纤维与水凝胶材料的比率还作为浓度基础,例如聚合物纤维的给定重量/水凝胶材料的体积提供。例如,所述浓度是约1至50mg/mL。水凝胶材料通常设置在聚合物纤维上,诸如结合到聚合物纤维的外表面(或根据组合物和形状,结合到一个外表面)。支架复合物通常不是均匀的固体材料。相反,支架复合物包括存在于支架复合物的表面上或表面内的多个孔。所述孔的存在、大小、分布、频率和其他参数可在支架复合物的产生期间进行调控。孔大小可低于约1微米至高至100微米,包括1微米、2微米、3微米、4微米5微米、10微米、15微米、20微米、30微米、40微米、50微米、60微米、70微米、80微米、90微米或100微米,并且其大小可精密地定制,例如使得所述孔的至少40%,诸如50%、60%、70%、80%、90%、95%或大于95%处于所需大小中或处于所需大小范围内。

[0146] 本发明的支架复合物适于并入到人类受试者的组织中,并且因此它们通常是“生物相容的”,这意味着它们能够与生物系统(诸如存在于人类受试者中)相互作用而不在其中和/或通过其诱导病理生理反应。在一些实施方案中,提供所述支架复合物以便耐久性地保留在组织中。可替代地,所述支架复合物暂时地保留在人类受试者中,并且被提供为基本上生物可降解的。优选地,聚合物纤维包括生物相容性生物可降解聚酯。在一个优选实施方案中,所述聚合物纤维包括聚己内酯。

[0147] 如本文所提供的,包含聚合物纤维和水凝胶的复合物的相互作用的一个优选形式包括交联部分,其通常以在聚合物纤维与水凝胶材料之间引入结合,例如在聚己内酯纤维与透明质酸之间诱导交联的有效量存在。

[0148] 用于软组织恢复的支架设计

[0149] 复合材料概念已被广泛用作材料强化机制。例如,将羟基磷灰石颗粒添加到水凝胶中可增加其刚度{Wu 2008Materials Chemistry and Physics 107.2(2008):364-369},并且对于拉长颗粒,复合材料拉伸模量甚至增加更多{Yusong 2007Journal of Materials Science,42(13),5129-5134}。由于其与天然ECM的外形相似性,电纺丝纳米纤维网片已被广泛用作组织工程基材。特别感兴趣的是,脂肪组织的去细胞化ECM在自然界中是高度纤维和多孔的(图6G){Young 2011.Acta Biomaterialia,7(3),1040-1049}。若干最近的研究已尝试通过将片段化的聚(丙交酯)(PLA)或壳聚糖纤维引入到聚乙二醇(PEG)、聚丙烯酰胺或藻酸盐水凝胶来重演纤维组分{Coburn 2011Smart Structures and Systems,7(3),213;#37;Zhou2011Colloids and Surfaces B:Biointerfaces,84(1),155-162;Shin 2015Journal of Materials Chemistry}。片段化的纤维与水凝胶前体溶液混合并且在凝胶化过程期间并入到水凝胶中来产生3D构造。这些纤维嵌入的水凝胶已显示优于对应水凝胶的改善的机械特性。然而,并没有关于测试体内宿主细胞浸润的报告。另外,这些水凝胶

是不可降解的并且对于脂肪细胞粘附和分化需要粘附剂配体。

[0150] 纳米纤维-水凝胶复合材料设计

[0151] 为了实现纤维强化作用、同时维持水凝胶相的高多孔性,提供一种提供与其他支架相比的优良特性的电纺丝纤维-水凝胶复合材料。除了将纳米纤维和水凝胶基质共混(其先前已进行报告{Coburn 2011Smart Structures and Systems,7(3),213}),在此引入在纤维表面与水凝胶交联网络之间的界面结合(图6)。此复合材料设计不仅允许来自固体纤维组分的更强的机械强化,还允许水凝胶相的整体机械特性和平均孔大小/多孔性的独立调整,从而实现最佳细胞浸润特性和结构完整性两者。还设想,纤维可用作ASC和内皮祖细胞的优选细胞粘附基材,从而充当支持细胞迁移和ASC分化的导向物。

[0152] 创新

[0153] 在某些方面,关键创新是具有纳米纤维表面与水凝胶网络之间的界面结合的纳米纤维-水凝胶复合材料设计(图6A)。此工程复合材料具有潜力来极大地改善水凝胶的机械特性而不显著降低水凝胶相的平均孔大小。与两种组分的仅物理共混相比,引入界面结合可提供优良的机械加强作用。此研究制定出相比于共混物、使用电纺丝聚己内酯(PCL)纤维-HA水凝胶复合材料可达到的机械特性(压缩和剪切模量)的范围。第二创新是证明此纳米纤维-水凝胶复合材料使软组织缺损恢复。初步表征证明所述复合材料与脂肪组织共享结构特征(图6){Christman,2012US20120264190A1;Young 2011.Acta Biomaterialia,7(3),1040-1049}。假设,此复合材料提供对于软组织再生而言重要的结构完整性和机械特性。此研究还证明与水凝胶相比的复合材料的通用性和效率。

[0154] 在某些方面,关键创新是纳米纤维-水凝胶复合材料作为适于重建层状软组织缺损(诸如由缺失的筋膜、硬脑膜或胸膜所带来的那些缺损)的平坦薄片的构型(图23)。

[0155] 在某些方面,关键创新是与外科网片整合的水凝胶或纳米纤维-水凝胶复合材料的组合物。所得的组合物保留水凝胶的低炎性特征和优良的组织向内生长,同时得益于外科网片的强拉伸强度。

[0156] 在某些方面,关键创新是具有线性取向的纳米纤维的纳米纤维-水凝胶复合材料的可促进优先细胞迁移的构型(图4)。此组合物对于引导沿单一轴线的组织再生是理想的,如在诸如筋膜和硬脑膜的组织中明显的。

[0157] 此计划的成功完成将递送用于恢复缺失的软组织结构的现用解决方案,具体地用于层状种类的较大缺损,其中实现强的柔性材料薄片、建立血管网络、维持组织修复部位完整性、促进细胞迁移和组织、以及募集宿主细胞均对于可持续的组织恢复是重要的。对于在复合材料设计中所使用的材料组分(即,HA水凝胶和生物可降解聚酯纤维)的充分临床追踪记录连同关于组织相容性的这些初步数据表明优良的组织相容性和临床转化的快速管理批准通道。

[0158] 特征:

[0159] 在一些实施方案中,本发明提供纳米纤维与水凝胶组分中的聚合物网络之间的界面结合。这对于形成“真实的”复合材料是重要的。证明了将此类纤维和水凝胶共混不提供相同程度的机械增强。还存在关于纳米纤维-水凝胶共混物的使用的先前报告。换言之,界面结合重要地将此新工件与本领域区分开。此外,界面结合可包括如此原稿所示的共价键和第二结合,诸如氢键和静电荷相互作用。

[0160] 在一些实施方案中,本发明提供呈适于重建层状组织诸如硬脑膜、胸膜和筋膜的形式的结合到水凝胶的纳米纤维的层状薄片。任选地,纳米纤维进行对齐以促进沿优选方向的细胞向内生长。

[0161] 在其他实施方案中,本发明提供通过并入强外科网片来强化的层状水凝胶或层状纳米纤维-水凝胶复合材料。所得的材料可得益于外科网片的拉伸强度(其在诸如腹壁修复的应用中可以是一个优点),同时保留由水凝胶提供的改善的炎性特征和优良的组织相容性和向内生长。

[0162] 这也是本领域的证明了各向同性强化的第一件工件-所述复合材料在所有取向上均更强,如替换任意几何形状的面积缺损所需要的。使用纳米纤维毡或小数量的对齐细丝的设计是固有地各向异性的。此设计能够形成各向同性和各向异性材料两者。

[0163] 对于至少某些方面,本文呈现的工件将用于形成复合材料的组分限定为:水凝胶网络,其具有用于细胞迁移和宿主组织向内生长的足够的孔大小和多孔性;和纳米纤维,其不受限制地包括具有范围是50nm至100 μ m的直径的聚合物纤维。

[0164] 凝胶/水凝胶组分

[0165] 本发明的水凝胶复合材料可包含任何类型的合适的水凝胶组分。本发明设想包含任何合适的凝胶组分(包括本领域已知的任何合适的水凝胶组分)的纳米结构/凝胶复合材料。所述凝胶和/或水凝胶可由任何合适的合成或天然存在的材料形成。

[0166] 例如,所述凝胶和/或水凝胶的聚合物组分可包括纤维素酯,例如乙酸纤维素酯、乙酸丙酸纤维素酯(CAP)、乙酸丁酸纤维素酯(CAB)、丙酸纤维素(CP)、丁酸纤维素酯(CB)、丙酸丁酸纤维素酯(CPB)、二乙酸纤维素酯(CDA)、三乙酸纤维素酯(CTA)等。这些纤维素酯在美国专利号1,698,049、1,683,347、1,880,808、1,880,560、1,984,147、2,129,052、以及3,617,201中进行描述并且可使用本领域已知的技术制备或商购获得。本文中合适的可商购获得的纤维素酯包括CA 320、CA 398、CAB 381、CAB 551、CAB 553、CAP 482、CAP 504,均可从Eastman Chemical公司,Kingsport,Tenn获得。此类纤维素酯通常具有约10,000与约75,000之间的数均分子量。

[0167] 所述纤维素酯包括纤维素和纤维素酯单体单元的混合物;例如,可商购获得的乙酸丁酸纤维素酯包含乙酸纤维素酯单体单元以及丁酸纤维素酯单体单元和未酯化纤维素单元。

[0168] 本发明的凝胶/水凝胶还可包含其他水溶胀性聚合物,诸如丙烯酸酯聚合物,其通常由丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、和/或其他乙烯基单体形成。合适的丙烯酸酯聚合物是可以商品名“Eudragit”从Rohm Pharma (Germany)获得的那些共聚物,如上所指示的。Eudragit系列E、L、S、RL、RS和NE共聚物可如溶解在有机溶剂中、含水分散体中或作为干粉获得。优选的丙烯酸酯聚合物是甲基丙烯酸和甲基丙烯酸甲酯的共聚物,诸如Eudragit L和Eudragit S系列共聚物。特别优选的此类共聚物是Eudragit L-30D-55和Eudragit L-100-55(后一共聚物是Eudragit L-30D-55的可使用水重构的喷雾干燥形式)。Eudragit L-30D-55和Eudragit L-100-55共聚物的分子量是大约135,000Da,其中游离羧基与酯基的比率是大约1:1。所述共聚物在具有低于5.5的pH的含水流体中通常是不可溶的。另一种特别合适的甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物是Eudragit S-100,其与Eudragit L-30D-55不同,因为自由羧基与酯基的比率是大约1:2。

Eudragit S-100在低于5.5的pH下是不可溶的,但是与Eudragit L-30D-55不同,其在具有5.5至7.0范围内的pH的含水流体中溶解性较差。此共聚物在pH 7.0和更高pH下是可溶的。也可使用Eudragit L-100,就其在低于6.0的pH下不可溶而言,它具有在Eudragit L-30D-55与Eudragit S-100的溶解性特征之间的pH依赖性溶解性特征。本领域的技术人员应理解,Eudragit L-30D-55、L-100-55、L-100和S-100可使用具有相似的pH依赖性溶解性特征的其他可接受的聚合物替换。

[0169] 本文所述的凝胶/水凝胶组合物中的任一种可进行修改以便包含活性剂,并且因此当施加到身体表面(例如,组织修复的部位)时以对其的活性剂传递关系充当活性剂递送系统。“加载”到本发明的水凝胶组合物中的活性剂的释放通常涉及通过溶胀受控扩散机制进行的水的吸收和药剂的解吸两者。可在以下中采用包含活性剂的水凝胶组合物:通过举例,在经皮药物递送系统中、在伤口敷料中、在局部药物制剂中、在植入药物递送系统中、在口服剂型中等。

[0170] 可并入到本发明的水凝胶组合物中并且进行全身性递送(例如,在适于全身性施用药物的经皮、口服或其他剂型的情况下)的合适的活性剂包括但不限于:苏醒剂;止痛剂;麻醉剂;抗关节炎剂;呼吸系统药物,包括抗哮喘剂;抗癌剂,包括抗肿瘤药物;抗胆碱能药;抗惊厥药;抗抑郁药;抗糖尿病剂;止泻药;驱肠虫剂;抗组胺药;抗高血脂剂;抗高血压剂;抗感染剂诸如抗生素和抗病毒剂;抗炎剂;抗偏头痛剂;抗恶心剂;抗帕金森病药物;止痒剂;抗精神病药;退烧药;解痉药;抗结核剂;抗溃疡剂;抗病毒剂;抗焦虑药;食欲抑制剂;注意力缺乏病症(ADD)和注意力缺乏多动症(ADHD)药物;心血管制剂包括钙通道阻断剂、抗心绞痛剂、中枢神经系统(CNS)药剂、 β -阻断剂以及抗心律失常药剂;中枢神经系统兴奋剂;咳嗽和感冒制剂,包括减充血剂;利尿剂;遗传物质;草药;激素离解剂(hormonolytics);安眠药;降血糖剂;免疫抑制剂;白细胞三烯抑制剂;有丝分裂抑制剂;肌肉松弛药;麻醉药拮抗剂;尼古丁;营养剂,诸如维生素、必需氨基酸和脂肪酸;眼用药物诸如抗青光眼剂;副交感神经抑制剂;肽药物;精神兴奋剂;镇静剂;类固醇,包括孕激素、雌激素、皮质类固醇、雄激素以及合成代谢剂;戒烟剂;拟交感神经药;镇定剂;以及血管扩张剂包括一般的冠状动脉、外周和大脑。具有其本发明的粘附剂组合物可用的特定活性剂包括但不限于新烟碱、辣椒碱、硝酸异山梨酯、氨基柱头素(aminostigmine)、硝化甘油、维拉帕米、普萘洛尔、silabolin、foridone、可乐定、金雀花碱、溴氯苯基二氢苯并二氮杂、尼非地平、fluacizin、以及沙丁胺醇。

[0171] 对于局部药物施用和/或药用衬垫(例如,药用足垫),合适的活性剂通过举例包括以下:

[0172] 抑菌和杀菌剂:合适的抑菌和杀菌剂通过举例包括:卤素化合物,诸如一氯化碘、聚维酮碘复合物(即,PVP和一氯化碘的复合物,还称为“povidine”并且可以商品名Betadine从Purdue Frederick获得)、碘化物盐、氯胺、氯己定、次氯酸钠;银和含银化合物,诸如磺胺嘧啶、银蛋白乙酰单宁酸酯(silver protein acetyltannate)、硝酸银、乙酸银、乳酸银、硫酸银以及氯化银;有机锡化合物,诸如苯甲酸三-n-丁基锡;锌和锌盐;氧化剂,诸如过氧化氢和高锰酸钾;芳基汞化合物,诸如硼酸苯汞或汞溴红;烷基汞化合物,诸如硫柳汞;苯酚,诸如百里酚、邻-苯基苯酚、2-苄基-4-氯苯酚、六氯苯酚以及己基间苯二酚;以及有机氮化合物诸如8-羟基喹啉、氯喹那多、氯碘羟喹、乳酸依沙吖啶、合克替啶、洗必泰、以

及安巴脲。

[0173] 抗生素药剂:合适的抗生素药剂包括但不限于林肯霉素家族的抗生素(指代最初从林肯链霉菌回收的一类抗生素药剂)、四环素家族的抗生素(指代最初从金霉素链霉菌(*streptomyces aureofaciens*)回收的一类抗生素药剂)、以及硫磺基抗生素,即磺酰胺。林肯霉素家族的示例性抗生素包括林肯霉素、克林霉素、如例如在美国专利号3,475,407、3,509,127、3,544,551和3,513,155中描述的相关化合物、以及其药学上可接受的盐和酯。四环素家族的示例性抗生素包括四环素本身、氯四环素、氧四环素、四环素、地美环素、吡甲四环素、甲烯土霉素和强力霉素以及其药学上可接受的盐和酯,尤其是酸加成盐诸如盐酸盐。示例性硫磺基抗生素包括但不限于磺酰胺、磺胺醋酰、磺胺苯酰、磺胺嘧啶、磺胺多辛、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺甲唑、以及其药学上可接受的盐和酯,例如磺胺醋酰钠。

[0174] 疼痛缓解剂:合适的疼痛缓解剂是局部麻醉剂,包括但不限于醋胺丁香酚、醋酸阿法沙龙、阿法沙龙、amucaine、阿莫拉酮、阿米洛卡因、丁氧普鲁卡因、贝托卡因、苯柳胺酯、布比卡因、burethamine、布他卡因、butaben、布坦卡因、丁硫妥、丁氧卡因、卡替卡因、2-氯普鲁卡因、辛可卡因、可卡乙碱、可卡因、环美卡因、二丁卡因、盐酸奎尼卡因、二甲卡因、diperadon、达克罗宁、芽子定、芽子碱、氨基苯甲酸乙酯、乙基氯、依替卡因、乙苯二恶哌啶、 β -优卡因、尤普罗辛、非那可明、福莫卡因、环己烯巴比妥、海克卡因、羟孕二酮、羟普鲁卡因、羟基丁卡因、对氨基苯甲酸异丁酯、氯胺酮、甲磺酸亮氨卡因、左沙屈尔、利多卡因、马比佛卡因、美普卡因、美布卡因、美索比妥、甲基氯、咪达唑仑、桃金娘卡因、纳依卡因、辛卡因、奥索卡因、奥昔卡因、对乙氧卡因、芬那卡因、苯环己哌啶、苯酚、皮珀罗卡因、哌啶卡因、聚多卡醇、普莫卡因、丙胺卡因、普鲁卡因、丙泮尼地、丙泮卡因、丙美卡因、丙哌卡因、异丙酚、丙氧卡因、假可卡因、吡咯卡因、利索卡因、水杨醇、丁卡因、硫烯比妥、硫戊巴比妥、仲丁硫巴比妥钠、硫喷妥钠、托利卡因、美索卡因、佐拉敏、以及其组合。丁卡因、利多卡因和丙胺卡因在本文中称为疼痛缓解剂。

[0175] 可使用作为药物递送系统的本发明的水凝胶组合物递送的其他局部用药剂包括以下:抗真菌剂,诸如十一碳烯酸、托萘酯、咪康唑、灰黄霉素、酮康唑、环吡酮、克霉唑和氯二甲苯酚;角质层分离剂,诸如水杨酸、乳酸和脲;发泡剂,诸如斑蝥素;抗痤疮剂,诸如有机过氧化物(例如,过氧化苯甲酰)、类视色素(例如,视黄酸、阿达帕林和他佐罗汀)、磺酰胺(例如,磺胺醋酰钠)、间苯二酚、皮质类固醇(例如,曲安西龙)、 α -羟基酸(例如,乳酸和乙醇酸)、 α -酮酸(例如,乙醛酸)、以及抗菌剂,其具体地指示用于治疗痤疮,包括壬二酸、克林霉素、红霉素、甲氯环素、米诺环素、那氟沙星、头孢氨苄、强力霉素、以及氧氟沙星;皮肤增亮和漂白剂,诸如对苯二酚、曲酸、乙醇酸和其他 α -羟基酸、桂木黄酮、以及某些有机过氧化物;用于治疗疣的药剂,包括水杨酸、咪喹莫特、二硝基氯苯、二丁基方酸、鬼臼树脂、鬼臼毒素、斑蝥素、三氯乙酸、博来霉素、西多福韦、阿德福韦、以及其类似物;以及抗炎剂,诸如皮质类固醇和非类固醇抗炎药物(NSAID),其中NSAID包括酮洛芬、氟比洛芬、布洛芬、萘普生、非诺洛芬、苯恶洛芬、吲哚洛芬、吡咯洛、卡洛芬、奥沙普嗪、普拉洛芬、舒洛芬、阿明洛芬、布替巴芬、芬布芬、以及噻洛芬酸。

[0176] 对于伤口敷料,合适的活性剂是可用于治疗伤口的那些活性剂,并且包括但不限于抑菌和杀菌化合物、抗生素药剂、疼痛缓解剂、血管扩张剂、组织愈合增强剂、氨基酸、蛋

白质、蛋白水解酶、细胞因子、以及多肽生长因子。

[0177] 对于一些活性剂的局部和经皮施用并且在伤口敷料中,可能需要或希望将渗透增强剂并入到水凝胶组合物中以便增强所述药剂到皮肤中或通过皮肤的渗透速率。合适的增强剂包括例如以下:亚砷诸如二甲基亚砷(DMSO)和癸基甲基亚砷;酯诸如二甘醇单乙基醚(作为乙二醇单乙基醚可商购获得)和二甘醇一甲基醚;表面活性剂,诸如月桂酸钠、月桂基硫酸钠、十六烷基三甲基溴化铵、苯扎氯铵、泊洛沙姆(231、182、184)、吐温(20、40、60、80)以及卵磷脂(美国专利号4,783,450);1-取代氮杂环庚烷-2-酮,具体地是1-正-十二烷基氮杂环庚-2-酮(可以商品名Azone从Nelson Research&Development公司,Irvine,Calif.获得;参见美国专利号3,989,816、4,316,893、4,405,616、以及4,557,934);醇类,诸如乙醇、丙醇、辛醇、癸醇、苄醇等;脂肪酸,诸如月桂酸、油酸和戊酸;脂肪酸酯,诸如肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、甲基丙酸酯、以及油酸乙酯;其多元醇和酯,诸如丙二醇、乙二醇、甘油、丁二醇、聚乙二醇、以及聚乙二醇单月桂酸酯(PEGML;参见例如,美国专利号4,568,343);酰胺和其他含氮化合物,诸如脲、二甲基乙酰胺(DMA)、二甲基甲酰胺(DMF)、2-吡咯烷酮、1-甲基-2-吡咯烷酮、乙醇胺、二乙醇胺以及三乙醇胺;萜烯;烷酮;以及有机酸,具体地是水杨酸和水杨酸酯、柠檬酸和琥珀酸。也可使用两种或更多种增强剂的混合物。

[0178] 在某些其他实施方案中,包含凝胶(例如,水凝胶组分)和纳米结构的本发明的复合材料组合物还可包含另外任选的添加剂组分。此类组分是本领域已知的并且可包括例如填料、防腐剂、pH调节剂、软化剂、增稠剂、颜料、染料、折射颗粒、稳定剂、增韧剂、防粘剂、药剂(例如,抗生素、血管生成促进剂、抗真菌剂、免疫抑制剂、抗体等)、以及渗透增强剂。这些添加剂及其量被选择成使得它们不显著干扰水凝胶组合物的所需化学和物理特性。

[0179] 当粘附剂在皮肤或其他身体表面上时,可有利地并入吸收填料来控制水化程度。此类填料可包括微晶纤维素、滑石、乳糖、高岭土、甘露糖醇、胶态二氧化硅、氧化铝、氧化锌、氧化钛、硅酸镁、硅酸镁铝、疏水淀粉、硫酸钙、硬脂酸钙、磷酸钙、磷酸钙二水合物、织造或非织造纸以及棉材料。其他合适的填料是惰性的,即基本上不吸收的,并且包括例如聚乙烯、聚丙烯、聚氨酯聚醚酰胺共聚物、聚酯以及聚酯共聚物、尼龙和人造丝。

[0180] 所述组合物还可包含一种或多种防腐剂。防腐剂通过举例包括对-氯-间-甲酚、苯乙醇、苯氧基乙醇、氯代丁醇、4-羟基苯甲酸甲酯、4-羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵、十六烷基氯化吡啶鎓、氯己定二乙酸酯或葡萄糖酸盐、乙醇、以及丙二醇。

[0181] 所述组合物还可包含pH调节化合物。可用作pH调节剂的化合物包括但不限于甘油缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液,或者还可包含柠檬酸-磷酸盐缓冲液以便确保水凝胶组合物的pH与个体身体表面的pH相容。

[0182] 所述组合物还可包含合适的软化剂。合适的软化剂包括柠檬酸酯诸如柠檬酸三乙酯或乙酰基柠檬酸三乙酯、酒石酸酯诸如酒石酸二丁酯、甘油酯诸如二乙酸甘油酯和三乙酸甘油酯;邻苯二甲酸酯,诸如邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二乙酯;和/或亲水性表面活性剂,优选地亲水性非离子表面活性剂,例如像糖的偏脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸醚、以及聚乙二醇脱水山梨糖醇-脂肪酸酯。

[0183] 所述组合物还可包含增稠剂。本文的优选增稠剂是天然存在的化合物或其衍生物,并且通过举例包括:胶原;半乳甘露聚糖;淀粉;淀粉衍生物和水解产物;纤维素衍生物诸如甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、以及羟丙基甲基纤维素;胶体硅酸;以及糖

诸如乳糖、蔗糖、果糖以及葡萄糖。也可使用合成增稠剂,诸如聚乙烯醇、乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物、聚乙二醇、以及聚丙二醇。

[0184] 在某些实施方案中,包含水凝胶和纳米结构的本发明的水凝胶复合材料还包含促进血管生成的组分。在本发明之前实现临床上相关的软组织再生的挑战是再生的组织优选地应再血管化。因此,促进软组织再生的任何材料优选地也应助长血管生成。实现此血管生成的一种方式是通过使用包含肝素的水凝胶组分,其可充当生长因子结合位点以富集并保留促进血管生成和组织形成的生长因子。

[0185] 在各种其他实施方案中,本发明的复合材料可基于透明质酸(HA)作为其水凝胶材料。HA是具有形成水凝胶组分的重复二糖单元的非硫酸化直链多糖。HA也是人类组织中的细胞外基质的非免疫原性天然组分,并且在美容和重建手术中广泛用作表皮填料。

[0186] HA的分解由天然透明质酸酶促进,所述天然透明质酸酶的表达在组织损害和炎症的区域中增加。重要的是,研究显示3-10个二糖单元的小HA降解片段是内皮细胞增殖、迁移、微管形成、以及血管生成的强力调节剂。HA的这些生物功能被认为由涉及Ras和PKC的通路中的CD44介导。使用抗CD44抗体阻断CD44/HA相互作用减少体内人类微血管内皮细胞的增殖和迁移。已研究HA水凝胶作为在细胞和组织损伤的各种模型中用于细胞递送的潜在基质。这些水凝胶可充当细胞的保护和支持支架并且还可减少瘢痕。因此,认为HA通过促进细胞浸润和促进血管生成在增强组织再生方面具有重要作用。

[0187] 第一,所述材料的三维完整性和稠度与天然脂肪组织的相似。这使得其适于缺失的软组织体积的现用恢复。第二,所述材料可优选地沉积有多种柔性纳米纤维,其可充当用于脂肪细胞和内皮祖细胞的迁移的基材。第三,所述材料具有足够的多孔性以允许这些前体细胞快速浸润并整合到支架中而不是在其周围形成纤维囊。第四,HA水凝胶组分提供压缩性和体积膨胀,同时还提供重要的血管生成提示。第五,纳米纤维和水凝胶组分是可生物降解的,从而允许其被再生的软组织替换。第六,所有的组分材料在多种FDA批准的装置中具有较强的安全追踪记录,从而潜在地减少临床转化的管理障碍。

[0188] 本发明的凝胶/水凝胶/纳米结构复合材料还可包含组织修复剂,诸如多种生长因子,包括表皮生长因子(EDF)、PDGF和神经生长因子(NGF)。例如,所述组合物可包含EGF。当使小鼠舔吃表皮生长因子(EGF)时,观察到实验小鼠的皮肤伤口似乎更快速地愈合,之后发现了表皮生长因子。这不仅是由于唾液中的某一防腐剂(诸如溶菌酶)而发生。显示特定生长因子(现已知为EGF)是其原因。EGF与抗溃疡素相同,并且具有血管生成特性。转化生长因子- α (TGF- α)是非常相似的,其结合到相同的受体,并且在刺激上皮细胞再生(上皮形成)方面是甚至更有效的。

[0189] 因此,包含EGF/TGF的本发明的水凝胶可有利地用于加速伤口愈合和烧伤、减少瘢痕疙瘩形成(尤其对于烧伤而言)、皮肤移植敷料以及治疗慢性腿溃疡。

[0190] 可用于本发明的组织修复剂包括多种生长因子,包括表皮生长因子(EDF)、PDGF和神经生长因子(NGF)。通常,生长促进激素影响一种与四种之间的组织。由此类蛋白质开发的产品中的许多种靶向一种或另一种伤口修复,虽然存在其他适应症。一些最重要的组织生长因子以下进行进一步描述。

[0191] 本发明的凝胶/纳米结构组合物还可包含可用于组织修复方法和本发明的其他应用的一种或多种生长因子。

[0192] 例如,本发明设想在本发明的组合物中包含PDGF。血小板衍生生长因子(PDGF)是用于几乎所有的间充质衍生细胞(即,血液、肌肉、骨、软骨以及结缔组织细胞)的促分裂素。它是作为AA或BB同源二聚体或作为AB异源二聚体存在的二聚体糖蛋白。如同许多生长因子,PDGF现在被认为是较大因子家族的一员。除PDGF之外,此家族包括同源二聚体因子血管内皮生长因子(VEGF)和胎盘生长因子(PIGF)、VEGF/PIGF异源二聚体、以及结缔组织生长因子(CTGF),它是由人类血管内皮细胞和成纤维细胞分泌的PDGF样因子。连同NGF、TGF- β 和糖蛋白激素诸如人类绒毛膜促性腺激素(hCG),PDGF现在被分类为半胱氨酸结生长因子超家族的一员。所有这些因子可结合本发明的水凝胶使用。

[0193] PDGF由血小板产生并且在血液凝固的过程中释放。它仅是源自这些细胞的生长因子中的一种。PDGF将成纤维细胞和白细胞吸引到损伤部位,并且刺激替换结缔组织(主要是成纤维细胞和平滑肌细胞)的生长。它刺激各种细胞(包括产生胶原的那些细胞)的细胞分裂,从而助长血管生成。它还刺激有丝分裂发生、血管收缩、趋化性、酶活性以及钙动员。

[0194] 血小板衍生生长因子可用于在使用本发明的组合物的某些治疗期间恢复骨和软组织再生长,并且加速慢性和急性伤口的愈合过程。因此,本发明的水凝胶/纳米结构组合物可有利地包含血小板衍生生长因子混合物。

[0195] 本发明的水凝胶/纳米结构组合物可在用于例如局部递送PDGF基因的基因疗法中使用。编码PDGF的质粒DNA并入到水凝胶基质和肉芽组织成纤维细胞中,所述肉芽组织成纤维细胞起源于伤口周围的活组织,增殖并且迁移到所述基质中,从而充当质粒基因转移和表达的靶标。

[0196] 本发明的水凝胶/纳米结构组合物还可包含VEGF以促进血管生成。血管内皮生长因子(VEGF--还已知为血管渗透性因子)是另一种血管生长因子,并且是多功能血管生成细胞因子。它直接地并且通过在微血管水平下刺激内皮细胞的增殖、从而致使其迁移并改变其基因表达来间接地有助于血管生成(血管生长)。VEGF还使这些内皮细胞具有高渗透性,从而致使其在血管空间外释放血浆蛋白,其导致所述区域中的变化,从而有助于血管生成。

[0197] 本发明的组合物还可包含FGF。成纤维细胞生长因子(FGF)实际上是属于肝素结合生长因子家族的至少19 14 18kD肽的家族,并且对于培养的成纤维细胞和血管内皮细胞是促有丝分裂的。它们在体内也是促血管生成的,并且此促血管生成性通过TNF增强。FGF可以与EGF相似的方式使用。bFGF还已知为FGF-2,其涉及控制人类巨核细胞生成,并且显示FGF在刺激内皮细胞形成和在帮助结缔组织修复方面是有效的。

[0198] 水凝胶/纳米结构组合物还可包含角质细胞生长因子(KGF),其还已知为FGF-7,用于伤口愈合和涉及上皮细胞破坏的其他病症。

[0199] 转化生长因子(TGF)具有转化各种细胞系的能力,并且可赋予例如在培养物中生长多于有限数量的世代、以多层而非单层生长以及获取异常核型的能力。TGF家族存在至少五个成员,最广泛地研究的两个是TGF- α 和TGF- β 。前者对于成纤维细胞和内皮细胞是促有丝分裂的、促血管生成的并且促进骨再吸收。组合物还可包含TGF。TGF- β 是细胞调节的一般介导体、细胞生长的强效抑制剂,并且抑制许多细胞类型的增殖。TGF- β 可抵消其他肽生长因子的促有丝分裂作用,并且还可抑制许多肿瘤细胞系的生长。TGF- β 还具有促血管生成作用,并且促进成纤维细胞中的胶原形成。本发明的水凝胶的适应症包括慢性皮肤溃疡,诸如糖尿病患者中的神经营养足溃疡。其他方面包括伤口愈合、骨修复和免疫抑制疾病。

[0200] 本发明的水凝胶/纳米结构组合物可用于承载例如合适的细胞。这些细胞可在即将施加到伤口或其他合适的区域之前并入到凝胶中以使效力最大化。合适的细胞包括自体成纤维细胞和角质细胞,其主要负责真皮和表皮形成。每种包含一种细胞类型的单独的凝胶可连续或一起施加,或者一种凝胶可包含两种细胞类型,但是这通常较不优选。

[0201] 本发明的水凝胶/纳米结构组合物可有用地包含例如胶原。虽然呈此形式的胶原不太可能提供有用的结构功能,但是它主要在蛋白水解活性不合需要地高的情况下充当牺牲蛋白,从而帮助防止例如健康组织的浸渍。

[0202] 水凝胶/纳米结构组合物还可包含某些酶。酶用于急性和慢性伤口两者的清创术。清创术是从伤口去除非活组织和异物,并且在伤口修复过程中是天然发生事件。在炎症阶段期间,嗜中性粒细胞和巨噬细胞消化并从受伤区域去除“使用的”血小板、细胞碎片和无血管损伤组织。然而,在积累显著量的受损组织的情况下,此自然过程变得不足且不堪重负。然后坏死组织的堆积产生针对伤口的大量吞噬需求并且延迟伤口愈合。因此,坏死组织的清创术是局部用疗法的具体目标和最佳伤口管理的重要组成。

[0203] 例如,酶可并入到本发明的水凝胶中以用于局部施加来提供清创术的选择性方法。合适的酶可源自各种来源,诸如磷虾、螃蟹、番木瓜果、牛提取物和细菌。可商购获得的合适的酶包括胶原酶、木瓜蛋白/脲、以及纤溶酶和脱氧核糖核酸酶组合。

[0204] 用于本发明的酶通常以两种方式中的一种起作用:通过直接地消化腐肉的组分(例如,血纤维蛋白、细菌、白细胞、细胞碎片、浆液性渗出物、DNA);或者通过溶解将无血管组织固定到下面的伤口基底的胶原“锚”。

[0205] 本发明的水凝胶可包含达金溶液(若需要),通常用于发挥抗微生物作用和气味控制。作为清创剂,达金溶液由于其细胞毒性特性是非选择性的。达金溶液使蛋白质变性,从而使得其更容易地从伤口去除。疏松腐肉也促进通过其他方法进行的清创术。如果目的是进行清创,则包含达金溶液的水凝胶可每天改变两次。伤口周边皮肤保护通常应提供有例如膏剂、液态皮肤屏障膜敷料或固态皮肤屏障片。

[0206] 本发明的凝胶可通过任何合适的方法递送,诸如通过注射器或波纹管包(单剂量递送系统)或多剂量系统,诸如加压递送系统或通过罐类型系统中的袋递送(诸如在W098/32675中所公布的)。波纹管包的实例在公布的UK设计号2082665中示出。

[0207] 由此,本发明还延伸至用于治疗伤口的包含根据本发明的凝胶的单剂量递送系统。本发明还延伸至包含根据本发明的凝胶和根据本发明的加压水凝胶的加压递送系统,其呈能够在从其释放压力之后形成喷雾的气溶胶容器的形式。使用此类递送装置允许凝胶递送到患者上的难以另外通过直接施加到达的区域,诸如当患者躺下时患者的背部上的区域。

[0208] 在某些实施方案中,可能有利的是,使本发明的水凝胶组合物导电以在生物电极和其他电疗法环境中使用,即将电极或其他导电构件附着到身体表面。例如,所述水凝胶组合物可用于将经皮神经刺激电极、电外科返回电极或EKG电极附着到患者的皮肤或粘膜组织。这些应用涉及水凝胶组合物的修改以便包含导电物质。合适的导电物质是离子导电电解质,具体地是通常在制造用于施加到皮肤或其他身体表面的导电粘附剂中使用的那些电解质,并且包括可电离的无机盐、有机化合物或两者的组合。离子导电电解质的实例包括但不限于硫酸铵、乙酸胺、单乙醇胺、二乙醇胺、乳酸钠、柠檬酸钠、乙酸镁、硫酸镁、乙酸钠、氯

化钙、氯化镁、硫酸钙、氯化锂、高氯酸锂、柠檬酸钠和氯化钾、以及氧化还原对诸如铁和亚铁盐(诸如硫酸盐和葡萄糖酸盐)的混合物。优选的盐是氯化钾、氯化钠、硫酸镁、以及乙酸镁,并且氯化钾对于EKG应用是最优选的。虽然事实上任何量的电解质可存在于本发明的粘附剂组合物中,但是优选的是,所存在的任何电解质在水凝胶组合物的约0.1重量%至约15重量%的范围内的浓度下。授予Nielsen等人的美国专利号5,846,558所述的用于制造生物医学电极的程序可适用于与本发明的水凝胶组合物一起使用,并且此专利的关于制造细节的公开内容以引用的方式并入。如本领域的技术人员所理解的,也可使用其他合适的制造程序。

[0209] 交联

[0210] 对于某些应用,具体地当需要高内聚强度时,本发明的凝胶/水凝胶的聚合物可共价交联。本公开设想交联可能在凝胶/水凝胶组分的聚合物之间需要,但是交联也可能在本发明的复合材料的凝胶/水凝胶的聚合物与纳米结构组分之间需要。本发明设想用于将聚合物与彼此交联以及将本发明的凝胶/水凝胶聚合物与纳米结构组分交联的任何合适的手段。所述凝胶/水凝胶聚合物可在分子内或分子间或通过共价键与其他聚合物或与纳米结构共价交联。在前一种情况下,没有将聚合物与彼此或与纳米结构连接的共价键,而在后一种情况下,存在将聚合物与彼此或与纳米结构结合的共价交联。交联可使用任何合适的手段来形成,包括使用热、辐射或化学固化(交联)剂。交联度应足以使压缩下的冷流消除或至少最小化。交联还包括使用第三分子,在交联过程中利用的一种“交联剂”。

[0211] 对于热交联,使用自由基聚合引发剂,并且其可以是在乙烯基聚合中常规使用的任何已知的自由基生成引发剂。优选的引发剂是有机过氧化物和偶氮化合物,通常以可聚合材料的约0.01重量%至15重量%、优选地0.05重量%至10重量%、更优选地约0.1重量%至约5重量%并且最优选地约0.5重量%至约4重量%的量使用。合适的有机过氧化物包括二烷基过氧化物诸如叔丁基过氧化物和2,2-(叔丁基过氧基)丙烷、二酰基过氧化物诸如苯甲酰基过氧化物和乙酰基过氧化物、过酸酯诸如叔丁基过苯甲酸酯和叔丁基过-2-乙基己酸酯、过二碳酸酯诸如双十六烷基过氧二碳酸酯和二环己基过氧二碳酸酯、酮过氧化物诸如环己酮过氧化物和甲基乙基甲酮过氧化物、以及氢过氧化物诸如异丙基苯氢过氧化物和叔丁基氢过氧化物。合适的偶氮化合物包括偶氮二(异丁腈)和偶氮二(2,4-二甲基戊腈)。用于热交联的温度取决于实际组分并且可易于由本领域的普通技术人员推导,但是通常在约80C至约200C的范围内。

[0212] 交联也可使用辐射、通常在光引发剂的存在下实现。辐射可以是紫外线、 α 、 β 、 γ 、电子束、以及x射线辐射,虽然优选紫外线辐射。可用的光敏剂是“夺氢”型的三重态敏化剂,并且包括二苯甲酮和取代的二苯甲酮以及苯乙酮诸如安息香双甲醚、4-丙烯酰氧基二苯甲酮(ABP)、1-羟基-环己基苯基酮、2,2-二乙氧基苯乙酮和2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮、取代的 α -酮醇诸如2-甲基-2-羟基苯丙酮、安息香醚诸如安息香甲醚和安息香异丙醚、取代的安息香醚诸如茴香偶姻甲醚、芳香磺酰氯诸如2-萘磺酰氯、光敏剂诸如1-苯基-1,2-丙二酮-2-(0-乙氧基-羰基)-肟、噻吨酮包括烷基和卤素取代的噻吨酮诸如2-异丙基噻吨酮、2-氯代噻吨酮、2,4-二甲基噻吨酮、2,4-二氯代噻吨酮、和2,4-二乙基噻吨酮、以及酰基膦氧化物。优选具有200nm至800nm、优选地200nm至500nm的波长的辐射用于本文使用,并且低强度紫外线光在大部分情况下足以诱导交联。然而,在夺氢型的光敏剂的情况下,可能需要较高

强度的UV暴露来实现足够的交联。此暴露可由汞灯处理器(诸如可从PPG、Fusion、Xenon和其他公司获得的那些)提供。交联也可通过使用 γ 辐射或电子束进行辐照来诱导。适当的辐照参数(即,用于实现交联的辐射的类型和剂量)对于本领域的技术人员将是显而易见的。

[0213] 合适的化学固化剂(还称为化学交联“促进剂”)包括但不限于多硫醇诸如2,2-二巯基二乙醚、二季戊四醇六(3-巯基丙酸酯)、乙烯二(3-巯基乙酸酯)、季戊四醇四(3-巯基丙酸酯)、季戊四醇四巯基乙酸酯、聚乙二醇二巯基乙酸酯、聚乙二醇二(3-巯基丙酸酯)、三羟甲基乙烷三(3-巯基丙酸酯)、三羟甲基乙烷三硫代羟乙酸酯、三羟甲基丙烷三(3-巯基丙酸酯)、三羟甲基丙烷三硫代羟乙酸酯、二硫代乙烷、二或三硫代丙烷以及1,6-己烷二硫醇。交联促进剂添加到非交联亲水性聚合物来促进其共价交联,或添加到非交联亲水性聚合物和互补低聚物的共混物来提供两种组分之间的交联。

[0214] 所述聚合物和/或纳米结构也可在与互补低聚物掺和之前进行交联。在此情况下,可优选通过将聚合物的单体前体与多官能共聚单体掺和在一起并且进行共聚来以交联形式合成聚合物。单体前体和对应的聚合产物的实例如下:N-乙烯基酰胺前体用于产生聚(N-乙烯基酰胺)产物;N-烷基丙烯酰胺用于产生聚(N-烷基丙烯酰胺)产物;丙烯酸用于产生聚丙烯酸产物;甲基丙烯酸用于产生聚甲基丙烯酸产物;丙烯腈用于产生聚(丙烯腈)产物;以及N-乙烯基吡咯烷酮(NVP)用于产生聚(乙烯基吡咯烷酮)(PVP)产物。聚合可在本体中、在悬浮液中、在溶液中、或在乳液中进行。优选溶液聚合,并且特别优选极性有机溶剂诸如乙酸乙酯和低级烷醇(例如,乙醇、异丙醇等)。对于亲水性乙烯基聚合物的制备,合成通常在如上所述的自由基引发剂的存在下通过自由基聚合过程发生。多官能共聚单体包括例如双丙烯酰胺、二醇诸如丁二醇和己二醇的丙烯酸或甲基丙烯酸酯(优选1,6-己二醇二丙烯酸酯)、其他丙烯酸酯诸如季戊四醇四丙烯酸酯、和1,2-乙二醇二丙烯酸酯、以及1,12-十二烷二醇二丙烯酸酯。其他可用的多官能交联单体包括低聚和聚合多官能(甲基)丙烯酸酯,例如聚(环氧乙烷)二丙烯酸酯或聚(环氧乙烷)二甲基丙烯酸酯;聚乙烯交联剂诸如取代的和非取代的二乙烯基苯;以及双官能聚氨酯丙烯酸酯诸如EBECRYL 270和EBECRYL 230(分别是1500重均分子量和5000重均分子量的丙烯酸酯化聚氨酯--均可从Smyrna, Ga.的UCB获得)、以及其组合。如果采用化学交联剂,则所使用的量优选地是使得交联剂与亲水性聚合物的重量比在约1:100至1:5的范围内的量。为了实现较高的交联密度(若需要),将化学交联与辐射固化组合。

[0215] 纳米结构

[0216] 本发明的纳米结构组分可呈任何合适的形式,包括纤维、细丝、网片部分、分支的细丝或网络、薄片、或成型颗粒。所述纳米结构还可包含任何合适的化学官能团,以促进本发明的纳米结构与水凝胶的聚合物之间的共价或非共价交联。用于制备纳米结构和使纳米结构官能化的方法、技术和材料是本领域熟知的。

[0217] 在某些实施方案中,微制造方法用于制备本发明的纳米纤维。在各种实施方案中,所公开的装置可使用任何合适的微制造技术来装配和/或制造。此类方法和技术是本领域众所周知的。

[0218] 可用于制备本文所公开的纳米结构的微制造方法包括平版印刷;蚀刻技术,诸如激光、等离子体蚀刻、光刻、或化学蚀刻诸如湿化学、干燥、以及光刻胶去除;或通过固体自由成形技术,包括三维印刷(3DP)、立体光刻成型(SLA)、选择性激光烧结(SLS)、弹道颗粒制

造(BPM)以及融合沉积成型(FDM);通过微机械加工;硅的热氧化;电镀和无电电镀;扩散过程,诸如硼、磷、砷和锑扩散;离子植入;膜沉积,诸如蒸发(细丝蒸发、电子束蒸发、闪蒸发、以及阴影和阶梯覆盖蒸发)、溅射、化学气相沉积(CVD)、外延(气相、液相和分子束)、电镀、丝网印刷、层合、或通过其组合。参见Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing公司, Reading Mass. 1988); Runyan等人, Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing公司, Reading Mass. 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998; Rai-Choudhury编, Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997) 用作模具的材料的选择决定表面如何被构造来形成分支结构。

[0219] 例如,可使用用于利用源自半导体工业的光刻工艺和方法来制造微机电系统(MEMS)的现有技术工艺。最近开发的方法包括“软平板印刷”(Whitesides等人, Angew chem. Int编, 37:550-575, (1998))和微流体技术(美国专利号6,488,872, Beebe等人, Nature; 404:588-59 (2000))。聚合物微装置制造的综述和其他讨论包括Madou, M.J. Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization; 第2版; CRC Press: Boca Raton, 1997; Becker, H. 和 Locascio, L.E. “Polymer microfluidic devices.” Talanta, 56 (2): 267-287, 2002; Quake, S.R. 和 Scherer, A. “From micro- to nanofabrication with soft materials.” Science, 290 (5496): 1536-1540, 2000; 以及 Whitesides, G.M. 和 Stroock, A.D. “Flexible methods for microfluidics.” Physics Today, 54 (6): 42-48, 2001, 其各自以引用的方式并入本文。

[0220] 本发明的纳米结构还可通过静电纺丝(还称为电纺丝)来制造。能够形成纤维的液体和/或溶液的电纺丝的技术是熟知的,并且已在多个专利例如像美国专利号4,043,331和5,522,879中进行描述。电纺丝的过程通常涉及将液体引入到电场中,使得致使液体产生纤维。这些纤维通常在用于收集的吸引电势下被引向导体。在液体转换成纤维期间,纤维变硬和/或干燥。此变硬和/或干燥可通过液体冷却来导致,即,其中所述液体在室温下通常是固体;通过溶剂蒸发来导致,例如通过脱水(物理诱导的固化);或通过固化机制(化学诱导的固化)来导致。

[0221] 静电纺丝的过程通常涉及使用纤维来产生毡或其他非织造材料,如例如在美国专利号4,043,331中所公开的。直径范围是50nm至5微米的纳米纤维可电纺丝成非织造或对齐的纳米纤维网片。由于较小的纤维直径,电纺丝织品固有地具有非常高的表面积和较小的孔大小。这些特性使电纺丝织物成为多种应用的潜在候选,所述多种应用包括:膜、组织支架和其他生物应用。

[0222] 静电纺丝纤维可生成具有非常薄的直径。影响电纺丝纤维的直径、稠度和均匀度的参数包括纤维形成组合中的聚合物材料和交联剂浓度(负荷)、施加的电压和针收集器距离。根据本发明的一个实施方案,所述纳米纤维具有范围是约1nm至约100.μm的直径。在其他实施方案中,所述纳米纤维具有在约1nm至约1000nm范围内的直径。此外,所述纳米纤维可具有在至少约10至约至少100范围内的纵横比。应理解,因为纤维的非常小的直径,所述纤维具有非常高的表面积/单位质量。此高表面积与质量比率允许纤维形成溶液或液体

在几分之一秒内从液态或溶剂化的纤维形成材料转化为固态纳米纤维。

[0223] 用于形成本发明的纳米纤维/纳米结构的聚合物材料可选自与交联剂相容的任何纤维形成材料。根据预期应用,所述纤维形成聚合物材料可以是亲水性的、疏水性的或两亲性的。另外,所述纤维形成聚合物材料可以是热响应聚合物材料。

[0224] 合成的或天然的、生物可降解的或非生物可降解的聚合物可形成本发明的纳米纤维/纳米结构。“合成聚合物”指代合成制备的并且包含非天然存在的单体单元的聚合物。例如,合成聚合物可包含非天然的单体单元,诸如丙烯酸酯或丙烯酰胺单元。合成聚合物通常通过传统聚合反应来形成,诸如加成、缩合或自由基聚合。合成聚合物还可包括具有与非天然单体单元(例如,合成肽、核苷酸和糖衍生物)组合的天然单体单元的那些聚合物,所述天然单体单元诸如天然存在的肽、核苷酸和糖单体单元。这些类型的合成聚合物可通过标准合成技术(诸如通过固相合成)或重组地(在允许的情况下)产生。

[0225] “天然聚合物”指代天然地、重组地或合成地制备的并且由聚合物主链中的天然存在的单体单元组成的聚合物。在一些情况下,天然聚合物可进行修饰、加工、衍生化、或以其他方式处理来改变天然聚合物的化学和/或物理特性。在这些情况下,术语“天然聚合物”被修改以反映天然聚合物的变化(例如,“衍生化的天然聚合物”或“去糖基化的天然聚合物”)。

[0226] 纳米纤维材料例如可包括加聚物和缩聚物材料两者,诸如聚烯烃、聚缩醛、聚酰胺、聚酯、纤维素醚和酯、聚硫化亚烃、聚亚芳基氧化物、聚砜、修饰的聚砜聚合物以及其混合物。在这些总类内的示例性材料包括聚乙烯、聚(ϵ -己内酯)、聚(乳酸酯)、聚(羟乙酸酯)、聚丙烯、聚(氯乙烯)、聚甲基丙烯酸甲酯(和其他丙烯酸类树脂)、聚苯乙烯、以及其共聚物(包括ABA型嵌段共聚物)、聚(偏二氟乙烯)、聚(偏二氯乙烯)、聚乙烯醇,其具有各种水解度(87%至99.5%),呈交联和非交联形式。示例性加聚物往往呈玻璃态(T_g 大于室温)。对于聚氯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯聚合物组合物或合金而言,是这种情况,或者对于聚偏二氟乙烯和聚乙烯醇材料而言,其结晶度较低。

[0227] 在本发明的一些实施方案中,纳米纤维/纳米结构材料是聚酰胺缩聚物。在更具体的实施方案中,所述聚酰胺缩聚物是尼龙聚合物。术语“尼龙”是所有长链合成聚酰胺的通用名称。另一种尼龙可在少量水的存在下通过 ϵ -己内酰胺的缩聚来制备。此反应形成尼龙-6(由环状内酰胺--还已知为 ϵ -氨基己酸制成),它是直链聚酰胺。此外,还设想尼龙共聚物。共聚物可通过以下来制备:将各种二胺化合物、各种二酸化合物和各种环状内酰胺结构在反应混合物中组合,并且然后形成呈聚酰胺结构的具有无规定位单体材料的尼龙。例如,尼龙6,6-6,10材料是由六亚甲基二胺和二酸的C6和C10共混物制造的尼龙。尼龙6-6,6-6,10是通过 ϵ -氨基己酸、六亚甲基二胺以及C6和C10二酸材料的共混物的共聚制造的尼龙。

[0228] 嵌段共聚物还可用作纳米纤维材料。在制备用于制备纳米纤维的组合物时,溶剂体系可选择成使得两个嵌段在溶剂中均可溶。一个实例是在二氯甲烷溶剂中的ABA(苯乙烯-EP-苯乙烯)或AB(苯乙烯-EP)聚合物。此类嵌段共聚物的实例是Kraton类型的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类型的 ϵ -己内酰胺/环氧乙烷以及Sympatex类型的聚酯/环氧乙烷和环氧乙烷的聚氨酯和异氰酸酯。

[0229] 加聚物可相对容易进行溶液纺丝,因为它们较低压力和温度下是可溶的,所述加聚物诸如聚偏二氟乙烯、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

乙酸乙烯酯、无定型加聚物诸如聚(丙烯腈)以及其与丙烯酸和甲基丙烯酸酯的共聚物、聚苯乙烯、聚(氯乙烯)以及其各种共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)以及其各种聚合物。如果高度结晶的聚合物像聚乙烯和聚丙烯要进行溶液纺丝,则其通常需要较高的温度和高压溶剂。

[0230] 纳米纤维还可由聚合物组合物形成,所述聚合物组合物包含呈聚合物掺和物、合金形式、或呈交联化学结合结构形式的两种或更多种聚合物材料。两种相关的聚合物材料可共混以提供具有有益特性的纳米纤维。例如,高分子量聚氯乙烯可与低分子量聚氯乙烯进行共混。相似地,高分子量尼龙材料可与低分子量尼龙材料进行共混。此外,聚合物总类的不同物质可进行共混。例如,高分子量苯乙烯材料可与低分子量高抗冲聚苯乙烯进行共混。尼龙-6材料可与尼龙共聚物诸如尼龙-6;6,6;6,10共聚物进行共混。此外,具有低水解度的聚乙烯醇诸如87%水解的聚乙烯醇可与具有98%与99.9%之间和更高水解度的完全或超水解聚乙烯醇进行共混。呈掺和物形式的所有这些材料可使用适当的交联机制进行交联。尼龙可使用与酰胺键中的氮原子反应的交联剂进行交联。聚乙烯醇材料可使用以下各项进行交联:羟基反应性材料诸如单醛诸如甲醛、脲、蜜胺甲醛树脂及其类似物、硼酸、和其他无机化合物、二醛、二酸、聚氨酯、环氧树脂、以及其他已知的交联剂。交联试剂进行反应并且在聚合物链之间形成共价键以基本上改善分子量、化学抗性、总体强度以及机械降解抗性。

[0231] 生物可降解聚合物也可用于制备本发明的纳米结构。作为生物可降解材料进行研究的合成聚合物的种类的实例包括聚酯、聚酰胺、聚氨酯、聚原酸酯、聚己内酯(PCL)、聚亚氨基碳酸酯、脂肪族碳酸酯、聚磷腈、聚酞、以及其共聚物。可结合例如可植入医疗装置使用的生物可降解材料的具体实例包括聚交酯、聚乙交酯、聚二氧六环酮、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚(乙交酯-共-聚二氧六环酮)、聚酞、聚(乙交酯-共-三亚甲基碳酸酯)、以及聚(乙交酯-共-己内酯)。还可使用这些聚合物与其他生物可降解聚合物的共混物。

[0232] 在一些实施方案中,所述纳米纤维是非生物可降解聚合物。非生物可降解指代通常不能够以非酶促、水解或酶促方法降解的聚合物。例如,非生物可降解聚合物对可由蛋白酶导致的降解具有抗性。非生物可降解聚合物可包括天然或合成聚合物。

[0233] 形成纳米纤维的组合物内包含交联剂允许纳米纤维与宽范围的支持表面相容。交联剂可单独使用或与其他材料组合以提供所需的表面特征。

[0234] 合适的交联剂包括具有至少两个潜在反应活化基团的单体(小分子材料)或聚合物材料,当经受能量源(诸如辐射、电能量或热能量)时,所述材料能够与其他材料形成共价键。通常,潜在反应活化基团是化学实体,其响应于特定施加的外部能量或刺激来生成与相邻的化学结构具有所得的共价结合的活性物质。潜在反应基团是在保存条件下保留其共价键但是在通过外部能量源进行的活化之后与其他分子形成共价键的那些基团。在一些实施方案中,潜在反应基团形成活性物质,诸如自由基。这些自由基可包括氮宾、卡宾或在吸收外部施加的电、电化学或热能量之后的激发态的酮。已知的或可商购获得的潜在的反应基团的各种实例在美国专利号4,973,493;5,258,041;5,563,056;5,637,460;或6,278,018中进行报告。

[0235] 例如,可使用可商购获得的基于三氯甲基三嗪的多官能光交联剂,其可从Aldrich Chemicals、Produits Chimiques Auxiliaires et de Syntheses(Longjumeau,France)、Shin-Nakamura Chemical, Midori Chemicals有限责任公司或Panchim S.A.(France)获

得。八种化合物包括2,4,6-三(三氯甲基)-1,3,5-三嗪、2-(甲基)-4,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪、2-(4-甲氧基萘基)-4,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪、2-(4-乙氧基萘基)-4,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪、4-(4-羧基苯基)-2,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪、2-(4-甲氧基苯基)-4,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪、2-(1-乙烯-2-2'-呋喃基)-4,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪以及2-(4-甲氧基苯乙烯基)-4,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪。

[0236] 使用方法和示例性实施方案

[0237] 本发明的凝胶/水凝胶/纳米结构组合物可有利地在各种组织修复情况中以及在其他应用中使用,诸如在导管和其他外科装置和植入物上提供涂层。本发明的凝胶/水凝胶/纳米结构组合物还可用于递送本文所述的活性剂,诸如抗生素、生长因子和免疫抑制剂。

[0238] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于使软组织缺损愈合的方法,其包括将复合材料施加到软组织缺损,其中所述复合材料包含凝胶和设置在所述凝胶内的纳米结构。

[0239] 应理解,本文所述的水凝胶/纳米结构组合物的有利特性包括以下能力:1)提供容易的表征和质量控制;2)与现有的组织基质整合;3)直接并入到新形成的基质中;4)直接包含细胞和生物活性因子;5)维持生物相容性;6)控制生物再吸收;7)由于归因于纳米结构的较大结构刚性而容易地铸成复杂的解剖学形状;以及8)表现出天然组织诸如关节软骨的机械特性。

[0240] 在一种应用中,本发明的水凝胶/纳米结构复合材料组合物可用于修复软骨组织。用于软骨修复的当前基于生物的外科手术包括自体软骨细胞植入、钻孔、磨蚀软骨成形术、微骨折、以及镶嵌关节成形术。所有这些手术仅治疗局灶性关节软骨损伤,但是不治疗软骨脱落关节表面,诸如在严重的骨关节炎和类风湿性关节炎中所看到的。另外,它们使用从患者收获的软骨组织栓或扩张的软骨细胞来填充软骨缺损。期待这些组织或软骨细胞通过完全从头合成与现有软骨基质整合并且具有正常软骨的生物机械特性的材料(诸如新合成的透明软骨)来填充缺损。然而,此类手术均促进形成修复性组织(纤维软骨)而不是真正的透明软骨,这具有认为使关节易受骨关节炎的对于纤维软骨的另外的机械损害。此外,作为修复材料的内源性软骨的可用性极大地受限,其获取对于患者造成风险和发病。如根据前述讨论而明显的,本文所公开的所得的水凝胶/纳米结构组合物呈现用于患有软骨变性疾病的患者的具有前景的新疗法的实用材料。

[0241] 如本文所述,本发明的水凝胶/纳米结构组合物可制备成具有适于任何数量的合成组织植入或扩增以及其他临床应用的广泛变化的特性。如已所述的,本发明的材料可用于修复由于损伤或疾病产生的软骨缺损。可如此修复的由于损伤引起的缺损可以是运动或意外相关的,并且可仅涉及表面软骨层,或可包括下面的软骨下骨。可使用本文所述的组合物修复的由于疾病引起的缺损包括由骨关节炎和类风湿性关节炎引起的那些缺损。无论是由于损伤或是疾病引起,此类缺损均可在成熟或生长板软骨中。用于合成生长板软骨的水凝胶的配制可需要包含非取代支架材料以允许在生长期间控制生物材料的生物再吸收。

[0242] 本文所述的水凝胶/纳米结构组合物可用的另一个领域是修复、重建或扩增头部和颈部的软骨以及软组织。用于软组织扩增以及头部和颈部重建的生物材料的可用性在整形和重建手术领域中一直是根本性挑战。已进行大量的研究和调查以用于开发具有适当的生物相容性和使用寿命的材料。此研究的结果并不理想。当置于免疫活性动物中时,显示当

前提出的材料的结构完整性因为框架被吸收而失效。此外,虽然常规的合成材料提供优异的使用寿命,但是它们产生某些不可避免的缺陷。例如,硅酮存在安全和长期免疫相关作用的问题。合成聚合物PTFE (gortex) 和硅橡胶提供较少的组织反应性,但是不提供组织整合并且可产生异物感染和排出的长期风险。此应用所述的材料可用于制备用于扩增或修复头部和颈部的软组织缺损的合成软组织支架材料。具体地,非炎性、非免疫原性并且可制备成具有适当的粘弹性程度的水凝胶/纳米结构(参见本文的描述)可用作有效的可植入支架材料。

[0243] 另外,本发明的水凝胶/纳米结构组合物可例如用作新型生物相容性和生物顺从性材料来制备软骨植入物,其频繁用于头部和颈部的重建手术以修复创伤或先天异常之后的软骨或骨缺损。特定用于耳朵的应用包括耳成形术和耳廓重建,其常常进行来修复由于创伤、肿瘤(即,鳞状上皮细胞癌、基底细胞癌和黑素瘤)以及先天缺损诸如小耳症引起的软骨缺损。特定用于鼻部的应用包括鼻部和鼻中隔的美容和重建手术。背隆起扩增、鼻尖、盾形和扩展移植频繁用于美容鼻成形术。创伤、肿瘤、自身免疫疾病诸如韦格纳氏肉芽肿病或先天缺损之后进行鼻重建需要用于修复的软骨。中隔穿孔难以操纵并且常常使治疗失败。软骨移植对于这些应用是理想的,因为自体或供体软骨常常不可获得。特定用于喉部的应用包括喉气管重建,其在儿童中通常需要收获肋软骨,这并非不产生发病。耳廓和中隔软骨常常不足以进行此应用。由本文所公开的水凝胶制备的合成软骨材料可基于调整水凝胶合成的参数(诸如试剂浓度、取代和交联速率)来合成以适应于前述应用中的每一个。喉气管重建通常针对由于声门下或气管狭窄引起的气道变窄来进行。病因可能是创伤性的(即,插管创伤或气管切开)或自发性的。除多种颅面应用之外,其他可能性包括脸颊和下巴扩增以及在下眼睑的外翻修复中的用途。应指出,这些应用可不需要具有关节软骨的严苛机械特性的软骨。包含细胞群或生物活性剂也可以是合乎需要的。

[0244] 本文所述的水凝胶/纳米结构组合物还可用于通常在过于侵略性的手术切除之后修复并缩小鼻腔,以防止造成感染和结垢的臂通道中的流体的慢性聚集。另一种具有前景的应用是在儿童和成年人两者中由于例如在外科手术(诸如心血管手术)期间插管引起的喉气管损伤而进行的喉气管重建。如本文所述的水凝胶/纳米结构组合物还可用于提供环状软骨环替换以在针对癌症进行的颈部切除之后保护颈动脉--本发明的组合物可放置在颈动脉与皮肤之间,作为针对皮肤屏障损失的用于颈动脉的保护性屏障。作为切除神经的神经元再种植期间的保护性涂层--纤维组织常常比神经元再种植形成更快,从而防止其最终形成。在本发明的水凝胶/纳米结构组合物预铸管内放置神经末端可从再种植部位排除纤维组织形成。

[0245] 本发明的水凝胶/纳米结构组合物还可用于修复任何内部或外部器官的软组织缺损。例如,除多种颅面应用之外,本发明的材料可用于脸颊和下巴扩增以及在下眼睑的外翻修复中使用。用于除头部和颈部以外的部位中的美容和重建目的,例如用作用于乳房扩增的乳房植入物,作为伤口密封剂例如以填充淋巴结去除(即,由于癌症)之后在乳房或颈部中留下的空处,密封淋巴管以及减少可造成感染和其他并发症的流体非受控地排入到切除部位中。

[0246] 除以上用途之外,本文所述的水凝胶/纳米结构组合物可用于其他组织工程应用以使用如上所述的用于合成人造形式的软骨的相似策略和方法来产生合成矫形组织,包括

但不限于骨、肌腱、韧带、半月板以及椎间盘。所述水凝胶/纳米结构还可用于使用如上所述的用于合成人造形式的软骨的相似策略和方法来制备合成的非矫形组织,包括但不限于声带、玻璃体、心脏瓣膜、肝脏、胰腺以及肾。

[0247] 本文所公开的水凝胶/纳米结构组合物可使用的另一个领域是肠胃应用,其中需要治疗或预防腹部或肠胃器官中瘢痕组织或狭窄形成。已存在处于临床和FDA批准的各种阶段处的多种产品,所述产品通常称为“水凝胶”,其被设计来或意图用于治疗 and 预防瘢痕和/或狭窄形成。本发明的材料优于其他已知的水凝胶,因为在此所公开的材料可包含纳米结构,其可向水凝胶材料提供支撑、形状和强度。本文所公开的水凝胶/纳米结构组合物可用于与已知的水凝胶所用于或意图用于的相似应用,包括以下:用于治疗胃肠道的狭窄或瘢痕。所述治疗涉及在预期的狭窄部位处注射水凝胶材料以预防瘢痕,或在疗法之后在现有狭窄部位处注射水凝胶材料以扩大变窄的胃肠道来预防狭窄再发生。

[0248] 本发明的材料还可用于治疗食道狭窄。食道狭窄是胃食管反流性疾病(GERD)的常见并发症。GERD由回流到食道中并且损伤食道内层细胞的酸、胆汁或其他损伤性胃内容物导致。GERD患者中大约7%-23%发展食道狭窄或食道的纤维瘢痕。食道瘢痕还可由用于治疗Barrett食道(Barrett's esophagus)的消融疗法导致。此类消融疗法的主要并发症是消融损伤过深延伸到食道壁中并且引起食道瘢痕或狭窄。食道狭窄阻止正常吞咽并且是患者发病的主要原因。本文所述的材料可用于治疗或预防由GERD、Barrett食道和食道消融疗法引起的食道狭窄。

[0249] 本发明的复合材料还可用于治疗克罗恩氏病(Crohn's disease)。克罗恩氏病导致阻塞肠腔或使肠腔变窄、从而阻止正常肠功能的狭窄或瘢痕。本发明的材料可用于治疗或预防此类狭窄。

[0250] 所述复合材料还可在用于治疗原发性硬化性胆管炎(PSC)的方法中使用。PSC是肝脏的胆管的罕见疾病。胆管在肝脏内形成分支网络并且通过两个主要分支离开肝脏,所述两个主要分支组合成将肝脏和胆囊的胆汁排入到十二指肠中的总胆管。胆管的直径非常窄,通常在其最大最远的部分处测量仅多至2mm,但是它们每天通常必须将几升胆汁从肝脏排入到十二指肠中。这些管道的任何阻塞可引起已知为黄疸的严重病状,其使得许多毒素并且尤其是血红蛋白分解产物在身体中积累。PSC是肝脏内的胆管和在以上所述的将肝脏连接到小肠的肝外胆管中的瘢痕和结构疾病。PSC的胆管狭窄可使用本发明的水凝胶/纳米结构组合物治疗或预防。

[0251] 本发明的复合材料也可用于治疗慢性胰腺炎。慢性胰腺炎是胰腺的可通过胰腺导管的瘢痕或狭窄恶化的慢性炎性疾病。这些狭窄阻塞胰液的排出,所述胰液通常必须通过导管或排出管道的系统离开胰腺到小肠中。胰液包含许多种消化酶和对于正常消化和营养物质吸收而言重要的其他元素。由慢性胰腺炎造成的胰腺导管的阻塞或变窄可引发严重的并发症,其中胰腺自动消化并且形成威胁生命的腹部感染和或脓肿。慢性胰腺炎的胰腺狭窄可使用本发明的水凝胶治疗或预防。

[0252] 本发明所述的组合物还可用于治疗胆石诱导的胆管和胰腺导管狭窄。胆石是非常常见的病症,所述病症的主要并发症是形成胆管和胰腺导管狭窄,其使用用于治疗缺血性肠病的水凝胶治疗或预防。当肠的血液供应受损害时,肠易于形成瘢痕或狭窄。受损害的血液流动称为局部缺血,并且可由许多病理导致,所述病理包括心血管疾病、动脉粥样硬化、

低血压、血容量不足、肾或肝疾病诱导的低清蛋白血、血管炎、药物诱导的疾病、以及许多其他病理。所有这些病理的最后阶段结果可引起阻塞肠并且阻止其正常功能的肠道狭窄。本发明的水凝胶/纳米结构复合材料可用于治疗或预防缺血性肠狭窄。

[0253] 本发明的组合物还可用于治疗辐射诱导的肠道狭窄。癌症的辐射疗法与多种发病相关联,在所述发病中重要的一个是肠道狭窄形成。本发明的水凝胶复合材料可用于治疗或预防辐射诱导的肠道狭窄。

[0254] 除制备合成组织或修复天然组织之外,在此所公开的水凝胶/纳米结构复合材料还可用于提供针对用于手术或其他用于体内植入的非生物结构或装置(诸如外科仪器或陶瓷或金属假体)的涂层。此涂层在非生物装置材料与活组织之间提供屏障。作为非生物装置的屏障的水凝胶的作用包括但不限于:1)防止非生物装置的表面上的大分子和/或细胞的吸收,所述吸收可造成装置表面处的蛋白质污垢或血栓形成;2)呈现由其他非生物相容材料制成的装置的非毒性、非炎性、非免疫原性、生物相容表面;3)与装置功能相容,诸如用于葡萄糖传感器的葡萄糖的扩散、用于压力传感器的机械力的传递或血管移植或支架的内皮化;4)增强装置功能,诸如向基于MEMS的人造肾中的现有大小屏障提供电荷屏障;5)将捕获在含水的生理相容环境内的活细胞群并入到非生物装置中;以及6)包含被设计来助长装置的血管形成、上皮化或内皮化的药物或生物活性因子,诸如生长因子、抗病毒剂、抗生素、或粘附分子。

[0255] 基于前文所述,本发明的水凝胶/纳米结构复合材料可用于提供用于各种可植入装置(包括用于管理糖尿病的可植入葡萄糖传感器)的非过敏原性涂层。另外,所述水凝胶/纳米结构复合材料可用于提供:用于开发基于MEMS的人造肾的电荷屏障;含水的生理相容环境,其中嵌入的肾细胞(诸如足细胞)可并入到基于MEMS的人造肾设计中;以及用于被设计用于各种目的的可植入MEMS装置的涂层,所述目的包括但不限于药物递送、机械感测以及作为生物检测系统。

[0256] 所公开的水凝胶/纳米结构复合材料,并且具体地是基于透明质酸的水凝胶还可共价附着到基于硅的装置,例如通过酪胺的伯胺与硅表面的第一共价附着进行,以提供羟基苯基涂覆的表面化学。这可使用用于将使用游离胺修饰的DNA结合到硅表面的相同化学。基于HA的水凝胶然后通过在其以上所述的优选交联模式中使用的相同过氧化物酶驱动的化学来共价偶联到羟基苯基涂覆的表面。

[0257] 所述水凝胶/纳米结构复合材料还可用于涂覆非生物心血管装置,诸如导管、支架和血管移植。这些装置包括由因为其生物不相容性而常规地不使用、但是其对于当前使用的那些装置具有优良的设计特征的材料制成的装置。生物活性因子可并入到水凝胶中来促进水凝胶、并且因此植入装置的内皮化或上皮化。

[0258] 虽然本发明的水凝胶/纳米结构复合材料的具体实例和用途已在本文中进行描述,但是此类特定用途并不意味着是限制性的。本发明的水凝胶/纳米结构复合材料可用于已知的水凝胶通常所用于的任何应用,并且具体地可用于修复和/或再生身体中的任何地方的软组织。

[0259] 现在将对附图进行参考,其中相同附图标号标识本公开的相似结构特征或方面。出于解释和说明而非限制的目的,根据本公开的生物可降解复合材料的一个实施方案的示意图在图1A中示出,并且总体上由参考字符100标示。本文所述的系统和方法可用于增强软

组织缺损的愈合。

[0260] 总体上参考图1A-图1D,生物可降解复合材料100可包含纳米纤维101强化凝胶103,其组合凝胶103和纳米纤维101两者的优点。凝胶103可包括任何合适的材料,诸如但不限于水凝胶。纳米纤维101可由任何合适的纳米材料例如聚己内酯(PCL)或任何其他合适的材料制成,并且可采取任何合适的形状和/或大小。复合材料100具有高多孔性(例如,以介导细胞粘附和迁移),同时维持足够的机械特性(例如,以维持完整性和组织支撑)。

[0261] 在至少一些实施方案中,纳米纤维101共价缀合到水凝胶103,从而形成一个或多个聚合物链。水凝胶103共价附着到纳米纤维101可引起具有优于单独使用或作为简单共混物的组成材料的组合集的理想特性的材料。

[0262] 图2A描绘针对单独的HA水凝胶绘制的图1的复合材料的实施方案的应力-应变曲线,其揭示在相同的交联密度下与水凝胶相比的改善的弹性模量。如图所示,测试复合材料100(4.5mg/ml HA,10mg/ml PEG-DA,6.75mg/ml PCL纤维)的弹性模量是750Pa,并且在相同密度下的单独的水凝胶是320Pa。图2B描绘疲劳测试,其显示如图1所示的复合材料保留与常规水凝胶相比的相似程度的机械完整性的稳健性

[0263] 参考图3A-图3B,显示复合材料100支持脂肪组织衍生干细胞(ASC)迁移。来自吸脂吸出物的GFP标记的ASC生长成球形体并且然后接种到复合材料或水凝胶中。

[0264] 图3A和图3B示出在纳米纤维-HA水凝胶复合材料中培养4天的ASC的荧光和重合图像(图3A)连同相差图像(图3B)。细胞在延长的长过程和轨迹的情况下向外迁移。相比之下,图3C和图3D所示的在单独的HA水凝胶中培养的ASC没有显示显著的细胞迁移。

[0265] 图4A和图4B示出对比沿对齐的650-nm纳米纤维101从球形体迁移的ASC的荧光图像和重合图像(图4A)连同相差图像(图4B),其显示ASC对于纳米纤维101的存在的强迁移反应。

[0266] 实施例1:复合材料外科支架装置的制备。

[0267] 通过对PCL(聚己内酯,80k,来自Sigma Aldrich)进行电纺丝来产生纳米纤维。将纳米纤维纺成无规网片。纺丝参数是在90%/1%w/w DCM-DMF中的10%重量PCL溶液,在0.6ml/h的流动速率下,通过27号钝针进行,距离靶标金属板15cm。针电压是+10kV,其中靶标板以-3kV的电压被负偏压。对于每个纳米纤维薄片,每轮纺丝1mL的溶液。

[0268] 然后使用多步骤工艺对纤维进行官能化。简而言之,对纤维进行等离子体处理以使纤维表面上具有反应基团,丙烯酸通过UV光引发缀合到所述反应基团。然后丙烯酸酯基与EDC和重氮胺(diazimine)反应以形成伯胺。这些胺然后可与SMCC反应以附着马来酰亚胺基,所述马来酰亚胺基可易于与水凝胶中的巯基反应。

[0269] 使用复合材料凝胶制剂与10mg/mL的官能化的分散纳米纤维来制备复合材料外科网片,所述制剂具有5.4mg/mL的巯基化透明质酸(220KDa,25%的巯基化程度)和5.4mg/mL的PEG-二丙烯酸酯(PEG-DA)。所使用的聚丙烯外科网片是Ethicon Prolene Soft(产品代码SPMH)。所述网片使用连续乙醇浸泡液进行清洁并且在使用之前使其在生物安全通风橱中进行干燥。将1×2cm的矩形网片放置到2.5×4.5cm特氟隆模具的底部中,每个模具两个网片。

[0270] 将500μL等分式样的复合材料移取到每个模具中(针对两个网片),然后将塑料片放置在网片上,并且向下按压来使复合材料扩展开。使网片在37°C的培养箱中过夜凝胶化。

将凝胶化网片取出并且冻干为最终产品(参见图21)。然后将网片在使用之前进行再水化。

[0271] 在某些实施方案中,将官能化的纤维网片切成60mg或更少的部分。将60mg样品在乙醇中浸泡,并且然后添加到部分填充有液氮的陶瓷研钵中。纤维样品将变得非常具有刚性。将样品保持足够冷却以维持刚性,使用剪刀将纤维薄片切成 $\sim 5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 部分。在切割完全薄片之后,使用研钵和研杵对纤维进行研磨 $\sim 20\text{min}$,保持研钵部分填充有液氮。然后将纤维浆液倾注入乙醇中。将约1mg的表面活性剂添加到浆液以帮助防止纤维缠结。将悬浮液在300G下离心数分钟,并且弃去上清液。使纤维过夜干燥。然后称取纤维到第二离心管中,使得可悬浮精确浓度的纤维。然后将纤维在乙醇中浸泡以进行灭菌、离心、弃去上清液、并且使其在生物安全通风橱中过夜干燥。然后将纤维在去离子水中重悬浮至所需浓度,通常15mg/mL。

[0272] 为了形成水凝胶复合材料,使用1mL的纤维-悬浮液对1小瓶的HA-SH进行再水化,从而引起15mg/mL纤维和10mg/mL透明质酸的溶液。向900 μL 的此溶液添加100 μL 的10%PEG-DA储备溶液,以得到13.6mg/mL纤维、9mg/mL HA-SH和10mg/mL PEG-DA的最终浓度。这是初始体内实例的配制,但是通过改变组成浓度来进行其他配制。

[0273] 所得的复合材料的颜色是乳白色(图1C),而不是没有纤维的透明水凝胶。所述复合材料凝胶维持其形状并且具有良好的可操作性,而单独的水凝胶的组更易于撕裂。水凝胶中的纤维是分散的,并且长度范围是数十至数百微米(图1B)。断裂的冻干样品复合材料的横截面的SEM图像显示纤维与水凝胶组分之间的密切缔合以及高密度的分散纤维(图1D)。

[0274] 材料和方法

[0275] 巯基化透明质酸(HA)购自ESI BIO(Alameda,CA)。聚(乙二醇)二丙烯酸酯购自Laysan Bio公司(Arab,AL)。以下从Sigma获得;聚(ϵ -己内酯)、乙基氨基-马来酰亚胺、丙烯酸、甲苯胺蓝O、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、半胱氨酸、牛血清白蛋白(BSA)、乙酸以及TritonTMX-100。Dulbecco改进的eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素、Alexa Fluor[®] 568鬼笔环肽以及4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)购自Invitrogen Life Technologies。乙基(二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)从AnaSpec公司(Fremont,CA)获得。所有其他化学品和试剂均为分析级。

[0276] 用于流变实验的PCL纳米纤维的电纺丝:

[0277] 为了制造两种不同直径的PCL纤维,在二氯甲烷和二甲基甲酰胺的混合物(9:1,v/v)以及氯仿和甲醇的混合物(3:1,v/v)中分别制备11.0%和8.5%(w/v)PCL溶液。使用具有27G的金属针的注射器加载每种均质PCL溶液。然后,使用以下参数进行电纺丝;1.0ml/h的进料速率、对于金属针的15kV的正施加电压、以及12cm的针端部与接地装置之间的距离。使用场发射扫描电子显微镜(FESEM,JEOL 6700F)观察纤维的形态,并且使用ImageJ软件(US National Institutes of Health,Bethesda,MD)使用FESEM图像测量纤维的直径。

[0278] 体内复合材料的电纺丝:

[0279] 纺丝条件:在二氯甲烷和二甲基甲酰胺的溶剂混合物(9:1,w/w)中的16%w/vPCL(95%45,000Mn PCL,5%80,000Mn PCL,均来自Sigma)。通过27号钝针在5.25ml/h的速率下对纤维进行纺丝,所述27号钝针与在1000rpm下进行纺丝的接地轮的表面分开10cm。施加的电压是15kV,并且电纺丝泵横穿85mm行进距离来回运动,在2mm/sec下进行140个行程(约

4h)。然后将纤维薄片切成用于官能化的14cm直径单一薄片。

[0280] 使用MAL表面官能化的纤维的制备:

[0281] 为了使用MAL对纤维进行表面官能化,通过根据具有微少改变的文献[Interface Focus 2011,1,725-733]移植聚(丙烯酸)(PAA)来对纤维的表面诱导羧基。简而言之,在室温下使用氧气气氛在280mmHg下对纤维进行等离子体处理10min以在纤维的表面上诱导自由基。然后将在0.5mM NaIO₃中的10ml的3%或10%(v/v)丙烯酸溶液中的70mg的纤维暴露于UV(36mW/cm²,DYMAX Light Curing Systems 5000Flood,Torrington,CT)90s以用于PAA在纤维表面上的光聚合(PAA-纤维)。在室温下对PAA-纤维进行孵育20min之后,使用20ml的去离子水洗涤PAA-纤维三次以去除未反应的丙烯酸。在对PAA-纤维进行完全空气干燥之后,在假定甲苯胺蓝0(TBO)与纤维上的羧基在1:1的摩尔比下反应的情况下通过TBO测定确定PAA-纤维上的羧基的密度[J Biomed Mater Res2003,67,1093-1104]。简而言之,在20μl的50%(v/v)乙醇中浸泡之后将PAA-纤维(1×1cm²)完全浸没在0.1mM的NaOH(pH 10)中的1ml的0.5mM TBO溶液中并且在室温下在轻微摇动下反应5h。在使用0.1mM NaOH(pH 10)对其进行洗涤之后,在室温下在剧烈摇动下使用1ml的50%(v/v)乙酸解吸在PAA-纤维的表面上吸收的TBO 1h。然后使用微板读取器(BioTeck Synergy2,Winooski,VT)在633nm下测量上清液的光密度。使用50%(v/v)乙酸中的TBO作为标准。

[0282] 在以下参数的情况下使用低温研磨机(Freezer/Mill 6770,SPEX SamplePrep, Metuchen,NJ)对PAA-纤维进行研磨以制备纤维片段;碾磨1min并且在液氮中冷却3min,进行10个循环。在将PAA-纤维片段采集到50-ml锥形管中之后,将PAA-纤维片段完全分散在异丙醇和蒸馏水的10ml的混合物(1:1,v/v)中以在纤维的表面上使用氨乙基-MAL进行修饰。简而言之,向PAA-纤维添加NHS和EDC以活化纤维上的PAA的羧基。羧基与NHS和EDC的摩尔比分别是1比4和4。在室温下在轻微摇动下进行活化。在1h之后,在羧基与氨乙基-MAL的1比2的摩尔比下将氨乙基-MAL添加到羧基活化纤维中。然后在室温下在轻微摇动下将反应进行12h。在使用蒸馏水洗涤三次之后,将使用MAL表面官能化的纤维冻干。在此,纤维上的MAL的密度根据以下假定:纤维表面上的所有羧基均被MAL完全取代。

[0283] 纤维-HA水凝胶复合材料的制备:

[0284] 为了制备纤维-HA水凝胶复合材料,将巯基化HA和PEGDA在PBS(pH 7.4)中分别完全溶解至12.5mg/mL和100mg/mL的浓度。将具有25mg/mL所需浓度的MAL-纤维完全分散在PBS(pH 7.4)中。然后连续添加纳米纤维、HA、PEG-DA和PBS的悬浮液以达到制剂的所需最终浓度。在均质混合复合材料前体溶液之后,对于流变研究,将100μL的复合材料前体溶液倾注到模具(直径=8mm)中并且在37°C下孵育2h以用于凝胶化。对于压缩研究,将200μL的前体溶液添加到圆柱形特氟隆模具(直径=6.35mm,h=6.35mm)并且如上孵育。为了使用FESEM观察纤维-HA水凝胶复合材料和HA水凝胶的横截面的形态,通过连续乙醇洗涤(每个在50%、70%、80%、90%、100%和100%乙醇下进行10min)、之后进行临界点干燥(Samdri-795,Tousimis,Rockvillle,MD)或化学干燥(HDMS)来对复合材料和HA水凝胶进行脱水。在液氮中对样品进行冷冻断裂以展示内部孔结构。将所述结构溅射涂覆有10-nm的铂层(Hummer 6.2Sputter System,Anatech UDA,Hayward,CA),然后使用场发射SEM(JEOL 6700F,Tokyo Japan)进行成像。

[0285] 对于用于体内动物研究的复合材料的制备,将巯基化HA在PBS中重构至12.5mg/

mL。将PEG-DA在PBS中溶解至100mg/mL。将MAL-纤维在无菌PBS中重悬浮至25mg/mL。首先将所述纤维与HA溶液组合并且使其反应10min,之后与PEG-DA组合以获得所需最终浓度。然后将悬浮液立即移取到圆柱形特氟隆模具 (McMaster-Carr,Robbinsville,NJ) 中,其中将300 μ L移取到用于体内样品的直径为11.125mm且高度为3mm的圆柱形模具中。然后将凝胶放置到37°C孵育箱中以过夜凝胶化。

[0286] 为了确认HA的巯基与纤维上的MAL之间的界面结合的作用,使用半胱氨酸淬灭纤维上的MAL以用于制备淬灭纤维-HA水凝胶复合材料。简而言之,将1mg的纤维分散在PBS (pH 8.0) 中的1ml的半胱氨酸溶液中,然后MAL与半胱氨酸的摩尔比是1比2。在室温下在轻微摇动下对MAL进行淬灭12h之后,使用1ml的蒸馏水洗涤MAL淬灭的纤维五次,以去除未反应的半胱氨酸并进行冻干。

[0287] 纤维-HA水凝胶复合材料的机械特性:

[0288] 压缩测试。将水凝胶前体悬浮液移取到圆柱形特氟隆模具 (McMaster-Carr, Robbinsville,NJ) 中,其中将200 μ L移取到用于压缩测试的直径为6.35mm且高度为6.35mm的圆柱形模具中。然后将凝胶放置到37°C孵育箱中以过夜凝胶化。将凝胶从其模具取出并且立即使用Endura TEC机械测试仪ELF 3200系列,BOSE ElectroForce,Eden Prairie,MN) 通过在两个平行板之间的无侧限单轴压缩进行测试。将样品压缩至50%应变,其中弹性模量根据应力-应变曲线的10%至20%应变的线性部分的斜率确定。样品各自测试三次,并且每组测试三个样品以用于确定平均压缩模量。为了测量再水化纤维-HA水凝胶复合材料的压缩模量,将复合材料冻干并且在37°C下使用1ml的PBS (pH 7.4) 进行再水化24h。对于疲劳测试,将压缩样品在0.1Hz下重复0%至25%应变的循环。

[0289] 流变测试。使用具有平行板 ($\phi = 8\text{mm}$) 的振荡流变计 (ARES-G2流变计,TA Instruments,New Castle,DE) 测量各种纤维-HA复合材料的剪切储能模量 (G')。采用振荡扫频来监测在10%的恒定应变的情况下1Hz至10Hz的 G' 的变化。

[0290] hASC在纤维-HA水凝胶复合材料中的迁移:

[0291] 在含有10%的FBS、1%的青霉素/链霉素、和1ng/ml的bFGF的高葡萄糖DMEM中培养人类脂肪衍生干细胞 (hASC)。培养基每周更换三次以用于最佳生长。为了制备hASC球形体,将50 μ L的hASC溶液 (5.6×10^5 个细胞/ml) 倾注到浇铸的微模制琼脂糖凝胶 (MicroTissues® 3D PetriDish®微模制球形体,96孔) 中,以制备hASC球形体并且在37°C下在轻微摇动下孵育24h。

[0292] 将HA和PEGDA完全溶解在PBS (pH 7.4) 中,其中HA的最终浓度为4.5和2.5mg/ml并且PEGDA的最终浓度为5.0mg/ml。将使用20 μ L的50% (v/v) 乙醇预润湿的纤维完全溶解在具有10.0mg/ml最终浓度的PEGDA中,然后将HA添加到纤维和PEGADA的混合物中。将30 μ L的复合材料前体溶液倾注到96孔组织培养板的每个孔中并且进行孵育以在37°C下交联1h,以避免到达组织培养板的表面上的hASC球形体。然后,将具有3~5个hASC球形体的50 μ L的复合材料前体溶液倾注到每个孔中。在37°C下交联1h之后,将200 μ L的新鲜培养基添加到每个孔中,并且培养基每几天更换一次。为了观察来自复合材料内的hASC球形体的迁移细胞,使用Alexa Flour®568鬼笔环肽和DAPI分别对hASC的F-肌动蛋白和核进行染色。简而言之,在培养4天之后,在室温下使用100 μ L的4% (v/v) 对甲酰胺固定具有hASC球形体的复合材料过夜。然后,在使用PBS (pH7.4) 洗涤三次之后,将复合材料与100 μ L的1% (w/v) BSA在PBS中孵

育以在4°C下抑制非特异性染色过夜并且使用PBS洗涤三次。随后,将复合材料与在PBS中的100 μ l的0.1% (v/v) Triton-X 100在室温下孵育1h。在使用PBS洗涤三次之后,将100 μ l的160nM AlexaFluor® 568鬼笔环肽添加到每个复合材料中并且在室温下孵育4h。然后,在去除上清液之后,将复合材料与100 μ l的0.5 μ g/ml DAPI在室温下孵育1h。在使用PBS洗涤三次之后,使用共焦激光扫描显微镜 (CLSM, Carl Zeiss LSM780, Germany) 观察迁移的hASC, 针对AlexaFluor® 568鬼笔环肽在ex. 561nm和em. 570-600nm下, 并且针对DAPI在ex. 405nm和em. 385-420nm下。

[0293] 体内纤维-水凝胶复合材料的性能:

[0294] 巯基化HA在PBS中重构至12.5mg/mL。将PEG-DA在PBS中溶解至100mg/mL。将MAL-纤维在无菌PBS中重悬浮至25mg/mL。首先将所述纤维与HA溶液组合并且使其反应10min, 之后与PEG-DA组合以获得所需最终浓度。然后将悬浮液立即移取到圆柱形特氟隆模具 (McMaster-Carr, Robbinsville, NJ) 中, 其中将300 μ L移取到直径为11.125mm且高度为3mm的圆柱形模具中。然后将凝胶放置到37°C孵育箱中以过夜凝胶化。选择两个制剂以便匹配脂肪组织的2kPa刚度。单独的HA制剂是10mg/mL PEG-DA和9mg/mL HA-SH, 并且HA-纤维复合材料制剂是5mg/mL PEG-DA、5mg/mL HA-SH和12.5mg/mL分散纳米纤维。

[0295] 为了研究复合材料纳米材料支架的生物相容性, 将其植入在Sprague-Dawley大鼠的腹股沟脂垫下并且观察变化长度的时间。在短暂麻醉下, 在邻近腹股沟摺两侧制作1cm切口。在对皮下组织进行钝器解剖之后, 使腹股沟脂垫暴露。在使用电烙术进行的细致止血的情况下并且在小心保护进料管的情况下使其提高。将支架植入在动物右侧上的脂垫下。左侧不接受植入物并且充当假手术对照。以标准分层方式封闭两侧。对动物观察7天、14天、30天和90天。在采集时, 对动物进行处死, 并且使具有和没有支架的腹股沟脂垫暴露并且固定在4% PFA中。埋入样本并且进行切片以用于标准苏木精和曙红染色。

[0296] 统计分析

[0297] 所有结果以平均值和标准偏差表达。通过实施使用SigmaPlot 12.0软件 (SPSS) 的单相ANOVA确定一对组之间的统计显著性; $p < 0.05$ 的值被认为是统计上显著的。

[0298] 本文设想用于制备如本文所公开的复合材料100的实施方案的任何其他合适的方法。

[0299] 实施例2: 纳米纤维-水凝胶复合材料的压缩测试。

[0300] 对于压缩测试, 将纤维-水凝胶样品形成为直径为8.5mm且高度为~4mm的圆柱形, 使其在37°C下在模具中过夜固化。通过使用Bose EnduraTEC ELF 3200 (Eden Prairie, MN) 进行的压缩测试确定弹性模量。样品在两个平行板之间经历单轴压缩, 压缩至50%应变。通过测量初始线性区域的斜率来确定弹性模量。在相同的水凝胶制剂的情况下测试具有和没有纤维的两个样品组。使用4.5mg/mL的巯基化透明质酸 (Glycosan Glycosil) 和10mg/mL PEG-DA (聚乙基乙二醇二丙烯酸酯, 分子量3350) 形成仅水凝胶样品。所述纤维-水凝胶复合材料组具有相同的水凝胶浓度, 但是另外具有6.75mg/mL PCL纳米纤维, 所述纳米纤维具有使用可易于与巯基化透明质酸反应的马来酰亚胺基官能化的表面。

[0301] 代表性应力-应变迹线可见于图2A。所述仅水凝胶组具有320Pa的弹性模量, 而所述纤维-水凝胶复合材料具有750Pa的较高模量。纤维-水凝胶复合材料的增加的刚度可见于在每个应变值处的较高应力值。官能化纳米纤维的存在极大地增加所述材料的强度和刚

度。因此,所述复合材料的总体结构可具有与靶标组织匹配的刚度,而水凝胶组分的交联密度可低于在没有纳米纤维的有益效果的情况下实现相同刚度所需要的密度。这应引起针对给定植入物刚度的较好的细胞反应。

[0302] 然后通过0.1Hz下的25%应变的重复压缩(20个循环)测试相同的组。代表性迹线可见于图2B。这显示水凝胶和复合材料可承受重复压缩,并且所述复合材料一直比无纤维组硬度更高。

[0303] 实施例3:细胞-材料相互作用。

[0304] 为了测试对于复合材料水凝胶的细胞反应,在具有和没有纤维的水凝胶的变化制剂中测试脂肪衍生干细胞(ASC)的迁移潜力。

[0305] 对ASC进行转染以表达GFP,然后将细胞过夜接种在由微组织模具制成的藻酸盐模具中来形成球形体簇。将细胞作为球形体接种以更好地评价细胞运动性,因为球形体是迁移细胞可容易地从其测量的不同点源。将球形体混合到水凝胶中,之后移取到96孔板中并且使其固化。然后在接下来的若干天中对细胞进行成像以观察其迁移。细胞能够逐渐地迁移更远,这是因为由于相应增加的孔大小,透明质酸和PEG-DA的浓度降低。在相同的水凝胶密度(4.5mg/mL透明质酸和2.5mg/mL PEG-DA)下,细胞在具有分散的纳米纤维的样品(12mg/mL,图3A和图3B)中比在没有分散的纳米纤维的样品(如图3C和图3D所示)中能够更好地迁移。这指示官能化纳米纤维的存在不仅改善纳米纤维的机械特性,还可有助于改善细胞迁移。

[0306] 为了清楚地证明ASC强烈地被纳米纤维的存在影响,将ASC球形体在没有水凝胶的情况下在对齐的纳米纤维薄片上进行培养。在96小时之后,细胞(图3C和图3D中的绿色)沿对齐纤维的同一轴线清楚地迁移出球形体(在图3D中示出)。

[0307] 实施例4:纳米纤维-水凝胶复合材料的组织相容性。

[0308] 为了研究复合材料纳米材料支架的生物相容性,将其植入在Sprague-Dawley大鼠的腹股沟脂垫下并且观察变化长度的时间。在短暂麻醉下,在邻近腹股沟摺两侧制作1cm切口。

[0309] 图5A是示出大鼠腹股沟脂垫下的原位纳米纤维-水凝胶复合材料的外观的照片。图5B示出来自植入之后2周收获的复合材料周围的组织的切片的H&E染色图像。嗜酸性、深粉红色染色的间充质细胞的叶状体显示迁移到纳米材料(以浅粉红色染色)中。

[0310] 图5C示出在4周时从复合材料-组织界面采集的组织切片的H&E染色图像,其显示细胞浸润。植入部位周围的间充质细胞使用曙红染成深粉红色。纳米材料呈浅粉红色。浸润性粉红色间充质细胞以及具有清楚的圆形液泡的推定的脂肪细胞可在界面处看到。

[0311] 在对皮下组织进行钝器解剖之后,使腹股沟脂垫暴露。在使用电烙术进行的细致止血的情况下并且在小心保护进料管的情况下使其提高。将支架植入在动物右侧上的脂垫下。左侧不接受植入物并且充当假手术对照。以标准分层方式封闭两侧。对动物观察2周、4周和6周。在采集时,对动物进行处死,并且使具有和没有支架的腹股沟脂垫暴露并且固定在4% PFA中。埋入样本并且进行切片以用于标准苏木精和曙红染色。在较早时间点(2周),发现来自伤口基底的间充质细胞浸润所述材料,从而表明所述材料具有足够的多孔性以实现天然细胞向内生长(图5B中的深粉红色染色)。

[0312] 重要的是,甚至在外源性生长因子不存在的情况下,也实现细胞向内生长。浸润材

料而非仅围绕所述材料的细胞的存在将此复合材料纳米材料与当前使用的其他异质材料区分开。后一材料被纤维囊用壁隔开,并且因此对于软组织重建是较不合乎需要的。在较晚时间点(4周),在可表示新生脂肪细胞分化的液泡区出现的情况下,细胞向内生长是甚至更明显的(图5C中的深粉红色染色和清楚的圆圈)。

[0313] 实施例5:纤维-HA水凝胶复合材料的设计

[0314] 纤维可形成常常可在天然细胞外基质中看到的纤维构造,从而有助于细胞迁移并且强化水凝胶的初始低的机械特性。通过在水凝胶与纤维之间引入界面结合(图6A,图6B),复合材料被加强而没有显著阻碍细胞迁移的平均孔大小和多孔性的降低(图6)。还期待机械特性可通过控制水凝胶与纤维表面之间的界面结合的密度来调整。在此,表面官能化的纤维使用马来酰亚胺(MAL)来制备以引入与巯基化透明质酸(HA-SH)的界面结合(图6)。电纺丝聚(ϵ -己内酯)(PCL)纤维的表面使用 O_2 等离子体进行处理以在移植聚(丙烯酸)(PAA)之前将自由基诱导到其表面上。羧基通过偶联剂NHS和EDC活化,然后N-(2-氨乙基)马来酰亚胺与活化的羧基反应(图13)。随后,MAL-官能化的纤维引入到由HA-SH和PEGDA构成的水凝胶前体溶液以用于制造纤维-水凝胶复合材料。采用HA的巯基来通过与纤维上的MAL基团和PEG接头的DA基团两者反应来形成凝胶。有趣的是,与具有相似交联密度的HA水凝胶的横截面相比,纤维-水凝胶复合材料的横截面显示具有高多孔性的纤维3D结构(图6)。所得的复合材料显示横跨复合材料的宽度和高度两者的纳米纤维的平均分布,从而实现各向同性强化。另外,再水化纤维-HA水凝胶复合材料在冻干之后显示99.34%的体积恢复,而HA水凝胶显示70.17%的体积恢复(图6D)。

[0315] 实施例6:纤维-HA水凝胶复合材料的压缩模量

[0316] 首先,当反应基团在摩尔基础上相等时,所述复合材料被验证拥有其最大刚度(在剪切下)。HA上的巯基可与纳米纤维上的MAL基团或PEG-DA上的丙烯酸酯基反应,所以当SH与(DA+MAL)的摩尔比是大约1比1时,所述凝胶显示最佳的剪切储能模量。因此,对于所有随后的研究均维持此比率。所述凝胶经历无侧限压缩测试以评价HA水凝胶和纤维-HA水凝胶复合材料的弹性模量(图7)。官能化纳米纤维的强化作用可在应变至50%时的压缩应力中看到(图7A)。1.0- μ m纤维组中的压缩应力是仅水凝胶组的3.1倍大,从而显示机械强化的作用。286-nm纤维组显示甚至更明显的强化作用,其中压缩应力是在50%应变下的4.2倍大。有趣的是,当马来酰亚胺基在凝胶化之前被淬灭时,286-nm纤维的加强刚度作用被极大减小至高于水凝胶的仅1.3倍,从而确认纤维与水凝胶的界面结合对于官能化纤维的强化作用是关键的。此外,当286-nm纤维在形成复合材料之前不被官能化时,强化作用消失,从而使得复合材料几乎不比单独的水凝胶更具刚度。当通过配制具有更高浓度的HA和PEG-DA的复合材料来配制更具刚度的凝胶时,可看到相同的强化作用(图7)。所述界面结合还显示其在使复合材料凝胶加强刚度方面的剂量反应,因为向纳米纤维表面添加逐渐更多的马来酰亚胺基引起逐渐更具刚度的材料,从而提供界面结合的重要性的更多证据。还在脱水和再水化之前和之后测试复合材料的机械特性的变化。在压缩下在机械上测试具有和没有两种不同马来酰亚胺密度的官能化纳米纤维的凝胶。然后冻干凝胶,然后使其完全再水化并且再次针对压缩进行测试。所有样品在再水化之后维持其刚度,从而指示所述复合材料可适于在临床上作为冻干产品使用。虽然单独的HA凝胶似乎维持其刚度,但是与包含纤维的组不同,所述凝胶本身在脱水-再水化过程期间显著变紧密。复合材料凝胶也经受循环负荷以

测试疲劳效应,其中代表性迹线在图10中示出。在25%应变的重复负荷的情况下,复合材料凝胶随时间维持其刚度,并且始终比单独的水凝胶更具刚度。

[0317] 实施例7:纤维-HA水凝胶复合材料的剪切储能模量

[0318] 除更高的压缩模量之外,纤维-HA水凝胶复合材料显示比单独的HA水凝胶显著更高的剪切储能模量(图8A)。具有286-nm纤维的复合材料的剪切储能模量高于具有686-nm纤维的复合材料的剪切储能模量(图8C)。还确认,与在压缩测试下的模量相似,复合材料的剪切储能模量通过增加286-nm纤维上的马来酰亚胺表面密度来增加(图8D)。通过在其表面上引入具有62nmol/mg MAL的纤维,复合材料显示与单独的HA水凝胶的剪切储能模量相比,其剪切储能模量的1.3倍增加。此外,在其纤维上具有147nmol/mg MAL的复合材料的剪切储能模量与62nmol/mg MAL基团的模量相比增加1.8倍,从而显示对于纤维上的MAL表面密度的对应2.4倍增加的明显剂量反应。当纤维上的MAL基团在凝胶化之前被淬灭时,与在压缩测试中所看到的相似,与未淬灭纤维的剪切储能模量相比,所述剪切储能模量对应地降低。另外,当频率增加至10Hz时,复合材料的剪切储能模量维持不变,而单独的HA水凝胶和具有淬灭纤维的复合材料两者显示在10Hz下的剪切储能模量比在1Hz下的剪切储能模量减小。复合材料的剪切储能模量在纤维上的MAL表面密度增加的情况下增加,无论纤维的表面积(直径)如何,从而指示纤维直径对于刚度的先前观察的作用可能随马来酰亚胺密度变化(图8D)。从MAL表面密度与剪切储能模量之间的关系获得线性回归,其中 $R^2=0.93$ 。此外,复合材料显示对于纤维负荷的剂量反应,因为复合材料的剪切储能模量在官能化纤维与水凝胶组分的重量比增加的情况下增加(图9)。

[0319] 实施例8:体内纤维-HA水凝胶复合材料中的细胞迁移

[0320] 假设,纤维-HA水凝胶复合材料与HA水凝胶相比增强细胞迁移,这是因为(i)具有较大孔大小的复合材料的较高多孔性,当它们具有相同的机械特性时,这提供细胞迁移的空间性,和(ii)复合材料中的模拟ECM的纤维构造,从而允许固有地引导细胞迁移。因此,为了证明当前假设,将人类脂肪衍生干细胞(hASC)的球形体作为模型细胞和模拟组织块接种在HA水凝胶和复合材料内,然后培养hASC球形体27天(图11)。选择ASC是由于它们存在于脂肪组织中并且对于血管生成和脂肪细胞形成是重要的。虽然复合材料具有与HA水凝胶相似的1.9kPa的杨氏模量,但是复合材料的孔大小是HA水凝胶的2.08倍大(图16)。因此,清楚地观察到,hASC在复合材料内3维地迁移(图11B-图11E),因为较大的孔可适于使细胞迁移,而hASC在HA水凝胶中维持其球形体形状而没有任何细胞迁移(图11A)。具体地,当针对复合材料使用细胞粘附肽RGD修饰纤维时,细胞迁移被极大地增强(图11C)。然而,在体内设定中,因子从局部环境扩散到复合材料中应提供另外的粘附信号,从而弱化此差异。在一些情况下,部分纤维由于PCL纤维之间的疏水性相互作用而在凝胶化期间轻微地形成簇,并且观察到细胞体在复合材料内优先地抓取纤维簇(图11D和图11E)。此外,在相同的HA和PEG-DA浓度下(图19),复合材料显示与无纤维组相比增强的细胞迁移,从而显示纳米纤维本身可固有地帮助引导细胞迁移,无论多孔性如何。

[0321] 实施例9:组织反应和宿主组织浸润

[0322] 为了确定这些复合材料植入物的治疗性潜力,在大鼠脂肪垫模型中体内测试复合材料植入物。植入物组的制剂配制实现与复合材料凝胶和靶标脂肪组织相同的初始2kPa刚度。因此,单独的HA-凝胶植入物的制剂具有巯基化HA和PEG-DA两者的更高浓度以匹配纤

维-复合材料组的刚度。虽然浓度更高,但是单独的HA植入物不能够随研究的过程维持其形状和体积。4周之后在总体观察下,单独的HA植入物伸展开并且体积显著变小。考虑到其总体外观和其浸润的组织学缺少,单独的HA系统不可被优化以能够助长细胞浸润并维持预先确定的形状。然而,90天之后在总体观察下,纤维-凝胶复合材料植入物在体内良好地维持其最初形状。然而,引人注目的是,在组织学观察下,复合材料被彻底地浸润,使得植入物与天然组织之间的边界变得难以确定。

[0323] 开发了Lewis大鼠中的软组织缺损模型,其中使用微外科技术使腹股沟脂垫暴露并提高,并且将预成型复合材料放置在下面。此良好限定的模型对于解决目标3假设和顺从于R21研究的比例的所有元素是理想的。虽然这不直接证明此复合材料使大缺损恢复的能力,但是它将建立原理证据并且确认复合材料设计的所有重要功能性,并且为较大动物模型奠定基础以测试更临床相关的模型中的大缺损恢复。

[0324] 在试验研究中,将PCL纳米纤维-HA水凝胶复合材料和HA水凝胶在相似模量的情况下植入在8-12周大的雄性Lewis大鼠的腹股沟脂垫下($n=3$ /时间点)。HA水凝胶组和复合材料组两者在植入之后14天和30天均显示良好的组织相容性(图12,POD 14,在POD 30处具有相似的观察。POD=术后日期)。在POD 30处的组织学没有显示比假手术组更高的炎性反应水平。H&E和Masson氏三色染色显示由天然脂肪通过复合材料进行的分隔和细胞浸润、在周边周围的毛细管形成、以及天然脂肪的腺部分和脂肪细胞部分的再生(图12)。另一方面,HA水凝胶对照缺少细胞浸润并且形成纤维化组织薄片和异物反应。此HA水凝胶制备成具有2kPa以确保足够的机械特性。此结果突显支架的多孔性对于细胞浸润的重要性。

[0325] 在较早时间点(2周),发现来自伤口基底的间充质细胞浸润所述材料,从而表明所述材料具有足够的多孔性以实现天然细胞向内生长(图12中的深粉红色染色)。重要的是,甚至在外源性生长因子不存在的情况下,也实现细胞向内生长。浸润材料而非仅围绕所述材料的细胞的存在将此复合材料纳米材料与当前使用的其他异质材料区分开。后一材料被纤维囊用壁隔开,并且因此对于软组织重建是较不合乎需要的。在较晚时间点(4周),在可表示新生脂肪细胞分化的液泡区出现的情况下,细胞向内生长是甚至更明显的。

[0326] 实施例10:肝素化制剂

[0327] 复合材料制剂还制备成具有缀合到透明质酸的肝素。在体内与以上执行的支架相同地测试此制剂。在7天、14天、30天和90天收获组织($n=3$)。许多相关的生长因子具有肝素结合结构域,诸如bFGF、PDGF和VEGF。缀合的肝素可用于两个目的;第一,它可结合存在于注射部位处的许多内源性生长因子并且充当对于再生组织的局部储器和吸引信号。第二,肝素化复合材料可用于使支架预加载有生长因子以更好地加强再生。肝素化支架在7天和14天处显示与未肝素化复合材料支架相比增强的血管再生,但是在30天和90天处显示相似的结果。

[0328] 实施例11:可注射制剂

[0329] 水凝胶-纳米纤维复合材料还配制成可注射变体。将与用于体内使用的预形成复合材料所使用的相同的200 μ L组合物(5mg/mL巯基化HA、5mg/mL PEG-DA、12.5mg/mL纤维)混合并且使其在注射器中部分地固化8-10min。此时,复合材料是可通过外科针注射的粘性、可流动液体(图20)。一旦注射,复合材料在反向时维持其形状,并且在浸入水中时是非分散的、维持形状的和非/低溶胀的。为了测试可注射复合材料的生物相容性,然后将悬浮液通

过21号针注射到大鼠的腹股沟脂垫中。然后在7天、14天、30天和90天收获组织 (n=3), 并且与先前实施例相同地进行分析。复合材料在30天处展示充分的细胞重塑, 同时维持体积并且没有导致纤维化包裹。早期脂肪细胞可清楚地看到在复合材料内发展。

[0330] 实施例12: 去除所有现有外科网片的现有织造聚丙烯组分的纳米纤维薄片的用途

[0331] 在某些以上实施例中, 纳米纤维复合材料技术用于扩增并改善现有外科网片材料。可替代地, 在所述过程期间制备的纳米纤维薄片还可用于去除所有现有外科网片的现有织造聚丙烯组分。与织造聚丙烯细丝相反, 据推断, 非织造纳米纤维网片可在一些应用中提供外科网片的薄片结构和完整性。这些网片可包括对齐纳米纤维薄片或无规纤维薄片。

[0332] 例如, 使用复合材料凝胶制剂与10mg/mL的官能化的分散纳米纤维来制备复合材料纳米纤维外科网片, 所述制剂具有5.4mg/mL的巯基化透明质酸 (220KDa, 25%的巯基化程度) 和5.4mg/mL的PEG-二丙烯酸酯 (PEG-DA)。复合材料凝胶形成为浸透电纺丝PCL纳米纤维的非织造网片 (取代聚丙烯细丝) 的互穿水凝胶网络。纳米纤维网片先前已进行官能化来在纳米纤维表面上包含马来酰亚胺基, 从而使纤维与周围的水凝胶直接结合, 在纤维-水凝胶界面处实现对分层具有抗性的强制剂。将1×2cm的矩形纳米纤维网片放置到2.5×4.5cm特氟隆模具的底部中, 每个模具两个网片。将500μL等分式样的复合材料移取到每个模具中 (针对两个网片), 然后将塑料片放置在网片上, 并且向下按压来使复合材料扩展开。使网片在37°C的培养箱中过夜凝胶化。然后将凝胶化网片冻干为最终产品。然后将网片在使用之前进行再水化。

[0333] 此复合材料制剂可用于与聚丙烯网片组合, 或者纳米纤维网片可替代地单个地使用。所述网片比以上实施例的那些网片具有较小刚性, 但是拥有适于其他应用 (诸如伤口敷料或硬脑膜修复) 的可操作性和强度特征 (参见图22)。

[0334] 实施例13: 移植有聚 (丙烯酸) 链的织造聚丙烯或非织造微纤维网片的直接表面等离子体处理

[0335] 在可替代构型中, 织造聚丙烯或非织造微纤维网片可使用PCT/US15/45494所述的方法直接进行表面等离子体处理并且移植有聚 (丙烯酸) 链。所述微纤维网片可用于替换以上实施例12中所用的纳米纤维网片。此微纤维网片可用于形成整合的交联网络结构, 如图24所示。

[0336] 例如, 使用复合材料凝胶制剂与适当量的官能化的微纤维网片 (Ethicon Prolene Soft, 产品代码SPMH) 来制备复合材料外科微纤维网片, 所述制剂具有5.4mg/mL的巯基化透明质酸 (220KDa, 25%的巯基化程度) 和5.4mg/mL的PEG-二丙烯酸酯 (PEG-DA)。微纤维网片先前已进行官能化来在纤维表面上包含马来酰亚胺基, 从而使纤维与周围的水凝胶直接结合。复合材料凝胶形成并且与微纤维上的官能团交联。将1×4cm的矩形Prolene Soft纤维网片放置到2.5×4.5cm特氟隆模具的底部中, 每个模具两个网片。在它们混合之后, 立即将500μL等分式样的巯基化HA和PEG-DA混合物 (以上所述的) 移取到每个模具中。使网片在37°C的培养箱中过夜凝胶化。然后将凝胶化网片冻干为最终产品。然后将网片在使用之前进行再水化 (参见图25)。

[0337] 实施例14: 复合材料外科网片的体内生物相容性和组织整合

[0338] 对六至八周大的Sprague-Dawley大鼠进行随机分组。标记3-cm的纵向腹部中线切口, 并且通过皮肤制作切口, 低至腹壁肌肉系统的水平。表面解剖在两侧上进行~2cm。将1

×2cm外科网片(聚丙烯、聚丙烯和复合材料凝胶、或纳米纤维和复合材料凝胶)植入在大鼠的右腹腔上的皮下平面中。使用4-0Vicryl缝合线以铺层方式将网片缝合在适当位置中。使用间断4-0vicryl缝合线封闭皮肤。同一大鼠的左腹腔经历假手术。三只大鼠每只植入有未修改的Prolene外科网片和具有纳米纤维-水凝胶网络的复合材料外科网片。在第3天和第14天对大鼠进行安乐死;并且通过整块切除腹壁和植入的网片移出组织样品。图26-图27B示出此类外科放置的设计和结果。

[0339] 实施例15:实施例5-14的讨论

[0340] 由于其促进细胞迁移的3D水化环境和高多孔性,水凝胶已作为用于组织缺损的再生的填料材料被广泛研究。然而,已证明水凝胶是体积缺损的较差取代物,因为水凝胶的相对弱的机械特性不足以在组织再生的整个时间段维持其体积,这是因为水凝胶可通过体液以及内部和外部应力而容易地降解和塌缩。为了改善水凝胶的机械特性,本领域的主要策略是(i)增加水凝胶前体的浓度,(ii)增加水凝胶内的交联网络的密度,以及(iii)诸如通过嵌入羟基磷灰石颗粒或与纤维薄片层合来引入强化材料。[Mater Chem Physics,2008,107,364-369,Biomaterials 2006,27,505-518,Acta Biomaterialia 2010,6,1992-2002]。遗憾的是,这些加强策略固有地减小所得的水凝胶的平均孔大小和多孔性,从而阻止细胞能够迁移到这些水凝胶中。因此,寻求通过仍然保留允许快速细胞浸润的高多孔性的新机制来加强水凝胶。复合材料通过引入可加强总体水凝胶复合材料、同时使水凝胶相大体上完整(包括多孔性)的官能化纳米纤维来设计。因为两个关键因素,所得的纤维-水凝胶复合材料在先前的软组织复合材料上进行改善。第一,纳米纤维需要在水凝胶内在高负荷水平下均匀分散以实现各向同性加强。组织工程领域通常利用电纺丝纳米纤维作为平坦纤维薄片或毡。这些纳米纤维然后通常通过使用水凝胶前体溶液浸透毡来制成复合材料。

[0341] 这极大地约束纳米纤维在整个水凝胶内的分散并且将复合材料的几何形状限制为2D薄片或管。虽然这些几何形状可用于某些应用诸如神经修复或伤口敷料,但是它们对于修复体积缺损是较差选择。通过低温研磨纤维薄片,可能将平均纤维长度减小至允许其在水性溶液中保持悬浮的足够短的长度。因此,然后样品容易地移取到水凝胶前体溶液中,从而在凝胶化之前产生纳米纤维片段在整个水凝胶体积内的均匀分散。然后溶液可直接用作可注射制剂,或添加到模具以形成任何任意几何形状的支架凝胶,而不是大多数电纺丝纳米纤维网片的受限平面几何形状。水凝胶内的分散纤维的复合结构还重演细胞外基质的纤维构造(图6G),从而提供可有助于复合材料内的细胞迁移的粘附位点。

[0342] 第二,仅将纳米纤维分散在水凝胶内不足以形成强复合材料。这些数据指示仅包含纳米纤维本身提供复合材料的弹性模量的非常少的改善,其中改善仅在引入界面结合时才发生。界面结合是必需的,因为在水凝胶与纤维组分之间不形成强连接的情况下,水和水凝胶组分可滑动经过纤维组分而不将负荷转移到更具刚度的材料。此外,此类相异材料之间的界面可造成分层和复合材料失效。此外,PCL的初始疏水性使其难以在水性溶液中分散,因为纤维优先地聚集在一起并且形成不再悬浮的凝块。等离子体处理和使用羧酸基团和胺基的随后的官能化极大地增加纤维的疏水性并且实现分散。机械特性的明显增加仅在纤维表面上的马来酰亚胺基与透明质酸分子上的巯基之间发生界面结合时发生。此共价-强度结合在压缩或拉伸期间将负荷更有效地转移到纤维,从而造成更具刚度、更强的材料。此外,复合材料显示在马来酰亚胺密度增加的情况下增加弹性模量的强趋势,从而突出其

在加强机制方面的卓越性以及强化的可调整性质。

[0343] 在此研究中,经鉴定,可能通过各种因素来调整纤维-水凝胶复合材料的机械特性,所述各种因素包括纤维的总表面积、纤维表面上的官能马来酰亚胺基的密度、以及加载到水凝胶的纤维的量。第一,具有更小纤维直径的复合材料显示比具有更大纤维直径的复合材料的更大压缩模量和剪切储能模量(图7A和图8C)。相似地,在文献中,使用戊二醛进行等离子体活化的单一超高分子量聚乙烯(UHMWPE)纤维($\sim 25\mu\text{m}$)显示与60的UHMWPE纤维束的相比聚(乙烯醇)水凝胶的界面剪切强度的2.36倍增加[Acta Biomaterialia 2014,10,3581-3589]。因此,可能的是,降低纤维直径并且因此增加纤维比表面积可在改善复合材料的机械特性方面是有效的。然而,每个纤维组的纤维上的MAL表面密度稍微不同(大约10-15nmol/mg),所以纤维的表面积的单独的作用不能确切地确定。因此,第二,复合材料在相同的直径纤维的情况下、但是在纤维上的各种MAL表面密度的情况下制造(图8)。复合材料的压缩模量和剪切储能模量在纤维上的MAL表面密度增加的情况下增加。确认了没有界面结合的复合材料通过使用通过PAA步骤(纤维上的羧基)、但是不通过另外的MAL缀合步骤修饰的纤维仅显示其压缩模量的稍微增强(图7)。界面结合的重要性另外通过在凝胶化之前使用半胱氨酸使MAL基团淬灭来确认。半胱氨酸缀合到马来酰亚胺基并且阻止纤维与水凝胶之间的界面结合,这允许仅隔离界面结合的作用,因为纤维以其他方式与界面结合组相同地进行处理。有趣的是,具有MAL淬灭的纤维的复合材料的机械特性明显地减弱(图7A和图8B),其中当HA的浓度是10mg/ml时,MAL淬灭的纤维组显示比单独的HA水凝胶的更低的压缩模量(图7)。可能的是,MAL淬灭的纤维通过在纤维和水凝胶的界面处容易地分层而弱化总体复合材料,如在先前研究中所看到的[Acta Biomaterialia 2014,10,3581-3589]。另外,与由一种组分构成或在凝胶化期间没有任何外来物质的纯水凝胶相比,没有官能团的纤维可充当抑制凝胶化的外来物质[JMC B 2015,DOI:10.1039/C3TB21830A,Journal of Biomedical Materials Research Part A 2010,95(2),564-573]。此外,验证了具有各种MAL表面密度的复合材料的剪切储能模量与界面结合的密度之间的显著相关性(图8C)。这些研究提供水凝胶的机械特性可通过界面结合来强化和调整的有力证据。第三,复合材料的剪切储能模量在纤维与水凝胶的重量比增加的情况下增强(图9)。因此,确认了,重量比是可用于调整纤维-水凝胶复合材料的机械特性的另一个变量。然而,在此确认了,在纤维负荷增加的情况下,剪切储能模量增加开始趋于平衡并且在高于0.6的重量比的情况下甚至稍微降低。此饱和效应的一种可能性可能是,复合材料的界面结合的密度通过具有MAL的过量纤维如何与大部分的HA的巯基反应、从而阻止其与用于凝胶化的PEGDA反应来减小。考虑到HA水凝胶的最高剪切储能模量在HA-SH和PEGDA的每种官能团等摩尔量的情况下获得并且降低的剪切储能模量在HA-SH或DA过量的情况下获得(图14),在纤维的量增加的情况下,纤维上过量的MAL可破坏复合材料内的SH与DA结合。

[0344] 通常,植入的生物材料在组织缺损再生期间必须耐受多种内部和外部应力。虽然应力并不严重且连续,但是在模拟此类应力的重复条件和高频率(10Hz)下进行抗应力测试(图10和图8)。HA水凝胶和纤维-HA水凝胶复合材料两者在重复压缩应变期间均耐受而没有任何损害或其机械强度的减少。值得注意的是,具有界面结合的复合材料在10Hz的频率下保留其剪切储能模量,而HA水凝胶和没有界面结合的复合材料的剪切储能模量在10Hz下均减小。此趋势指示与分散纤维的界面结合对于复合材料的机械特性的强化是关键的。另外,

纤维-HA复合材料在经受冻干和随后的再水化之后维持其维度和其杨氏模量,而单独的HA凝胶在相同的处理下基本上收缩(图6C和图10)。脱水和再水化之后的此形状、体积和刚度维持是此技术的临床转化的重要特征,因为具有冻干形式的复合材料使对商业产品进行灭菌和储存更容易。

[0345] 对于软组织重建,理想的植入支架将立即填充缺损空处,但是还充当基材以用于身体自身的细胞生长到支架中、进行增殖并且分化成适当的组织表型,从而最终使用正常的健康组织替换人造支架。因此,非常重要的一点是,相关细胞将能够在水凝胶或复合材料支架内迁移。为了确定相关细胞类型在支架内迁移的潜力,将hASC球形体接种在HA水凝胶和纤维-HA水凝胶复合材料内并且评价其细胞迁移。hASC不能在单独的HA水凝胶内迁移,因为HA水凝胶过于软而不能满足细胞迁移的牵引力(图11A) [Biomaterials 2015,42,134-143]。有趣的是,虽然复合材料的剪切储能模量与HA水凝胶的剪切储能模量相似,但是hASC能够在复合材料内显著地远离球形体迁移(图11)。一种假设是,复合材料内的纤维可提供粘附位点以引导细胞迁移,这与脂肪组织的天然ECM的原纤维组分相似。先前证明,对齐的和无规的纤维可以是各种细胞类型中的细胞粘附、增殖、分化、和迁移的关键因素 [Biomaterials 2005,26,2537-2547/2006,27,6043-6051/2009,30,556-564/2010,31,9031-9039,Acta Biomaterialia 2013,9,7727-7736]。尤其是观察到,细胞将纤维识别为引导基质,因为其细胞骨架与下面的纤维对齐并且沿循所述纤维 [Biomaterials 2006,30,6043-6051/2009,30,556-564]。然而,复合材料内的纤维的直径不影响迁移的细胞,因为它们具有1000-nm或286-nm纳米纤维的复合材料中稳健地迁移(图19)。

[0346] 在台式测试和在体内细胞培养中看到的多孔性和细胞迁移效应在复合材料的体内测试期间转化为明显差异。配制成模拟脂肪的2kPa刚度而没有纤维的水凝胶的多孔性对于细胞浸润而言过低。细胞反应是使用厚层胶原将水凝胶用壁隔开,典型的异物反应是缺少浸润或重塑。然而,纳米纤维-水凝胶复合材料具有足够的多孔性来促进细胞向内生长、血管生成和细胞重塑而没有异物反应。这提供以下展望:使用最终将成为身体自身的组织的物质永久性地填充身体中的体积缺损。所述结果在可注射制剂中甚至更明显,所述可注射制剂可与宿主组织形成更紧的界面并且显示稳健的脂肪生成的现象。

[0347] 结论:

[0348] 水凝胶内官能化纳米纤维的分散形成具有两种组分的组合强度的复合材料结构。纳米纤维与水凝胶组分之间的界面结合对于制备强复合材料、同时维持高多孔性和孔大小以促进组织和细胞向内生长是关键的。所得的复合材料特性可容易地通过改变纤维直径、纤维负荷水平、马来酰亚胺密度水平、以及水凝胶组分的负荷水平来调整。这在靶向的总体刚度下实现较低交联和较高的多孔性,从而增加细胞浸润和随后的组织重塑。纤维本身还可通过提供与在天然ECM中所看到的相似的粘附位点来直接改善细胞迁移。可调整所得的复合材料植入物以匹配天然脂肪组织的刚度,但是仍然保持渗透性以用于细胞浸润和重塑。此新型复合材料足够强以立即填充任何任意形状的体积缺损。复合材料植入物然后充当容许身体自身的细胞浸润到复合材料中、形成血管、并且分化成脂肪细胞的细胞的支架。支架在组织重塑期间将缓慢降解,直至初始缺损空处被正常的健康组织完全替换为止。复合材料结构具有重建和美容手术潜力的巨大潜力。

[0349] 实施例16.医疗装置的产生和用途

[0350] 合成和生物网片在普通手术、重建手术、神经外科、泌尿学、妇科手术、矫形手术、以及美容手术中具有广泛适用性。这些网片用于强化或替换整个身体中的组织。这些网片的主要限制是它们与身体的较差整合,这造成异物反应、血清肿形成、和感染等其他并发症。提供一种与现有合成网片相比与身体组织具有极大改善的整合的纳米纤维-水凝胶复合材料。此材料产生并用作平坦薄片以充当用于组织强化和替换的网片。它还可用作常规网片的助剂以改善其生物相容性和整合潜力。

[0351] 本发明的支架复合物通过与外科网片材料缔合来并入到外科装置中。例如,外科装置包含:i)“层状”支架复合物,其包含可操作地连接到水凝胶材料的具有约100nm至约8000nm的平均直径的聚合物纤维;以及ii)外科网片材料。如本文所用,“层状”支架复合物通常是平面的且柔性的,并且具有足够的表面,具有所述表面的所述复合物可与外科网片缔合。示例性外科网片包括polyglactin 910、聚丙烯、聚乙醇酸、聚四氟乙烯(ePTFE)、具有可吸收的polyglactin的聚丙烯、具有聚卡普隆25的聚丙烯、具有纤维素的聚丙烯、具有ePTFE的大孔聚丙烯。此类医疗装置的大小和形状使得它们可易于在组织缺损处或邻近组织缺损(例如,在外科处理的部位处)植入(即,插入)到人类受试者中。支架复合物与外科网片共价或非共价缔合。

[0352] 等效物

[0353] 应理解,本文所述的详细实施例和实施方案仅出于说明性目的通过举例给出,并且决不应认为限于本发明。本领域的技术人员鉴于此可想出各种修改或改变,这些修改或改变包括在本申请的精神和范围内并且被认为在所附权利要求书的范围内。例如,成分的相对量可变化以使所需作用优化,可添加另外的成分,并且/或者相似的成分可取代所述成分中的一种或多种。与本发明的系统、方法和过程相关联的另外的有利特征和功能性将从所附权利要求书变得显而易见。此外,本领域的技术人员仅仅使用常规实验将认识到或能够确定本文所述的发明的具体实施方案的许多等效物。此类等效物意图涵盖于以下权利要求书中。

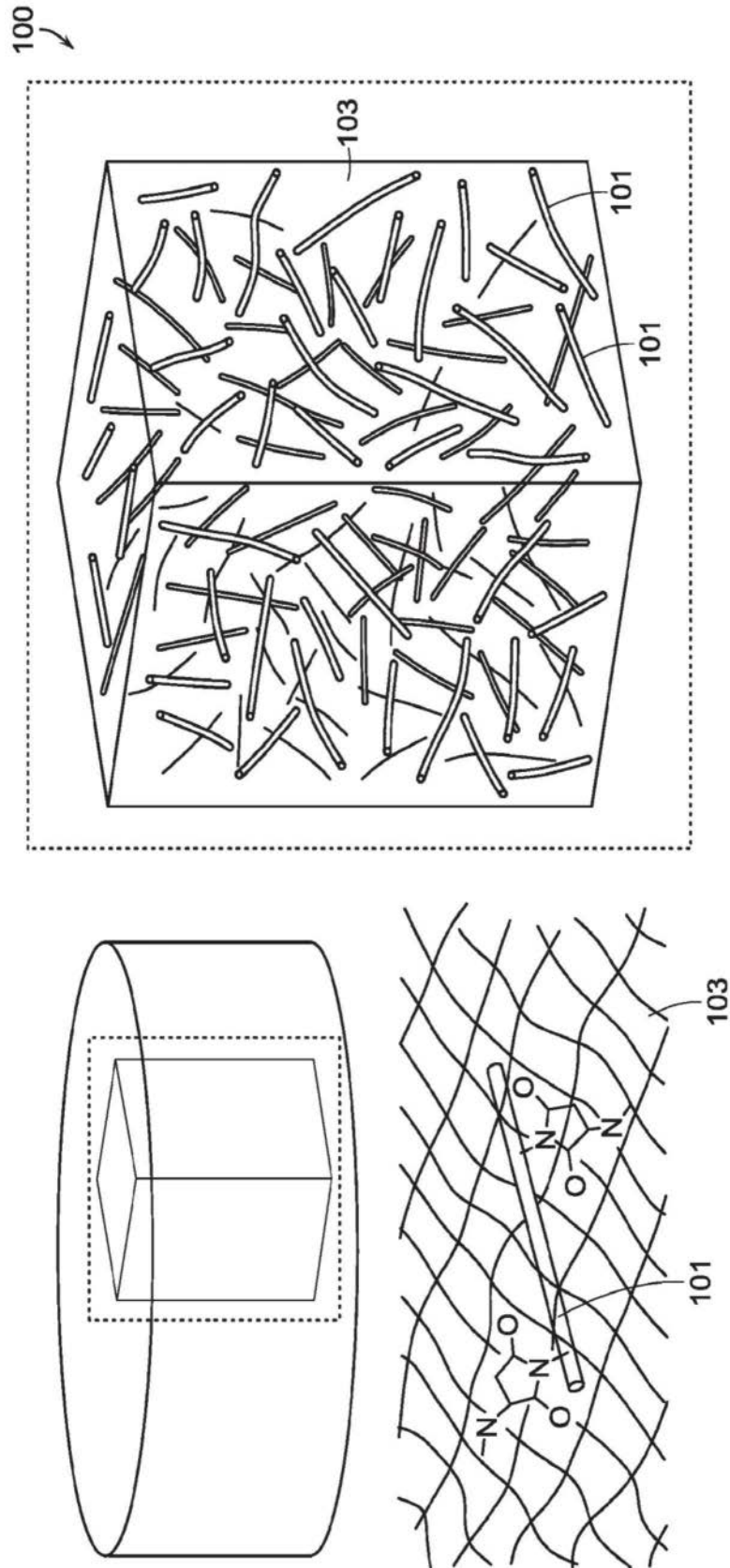


图1A

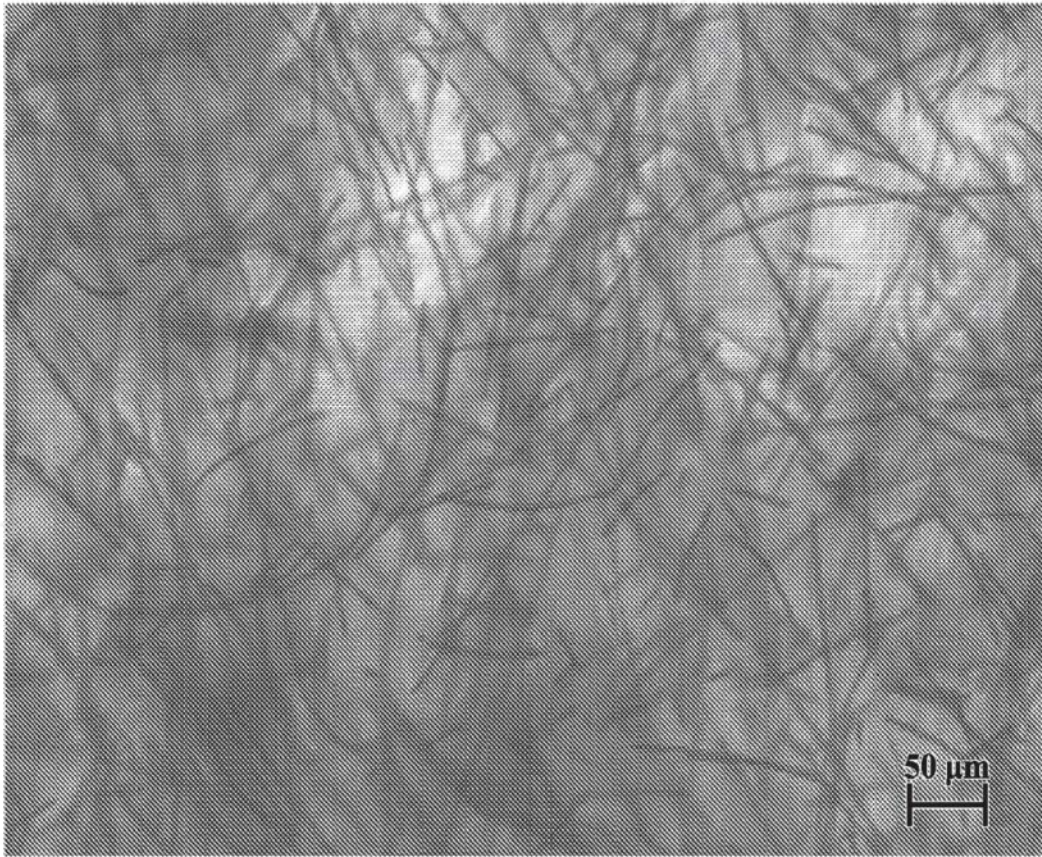


图1B

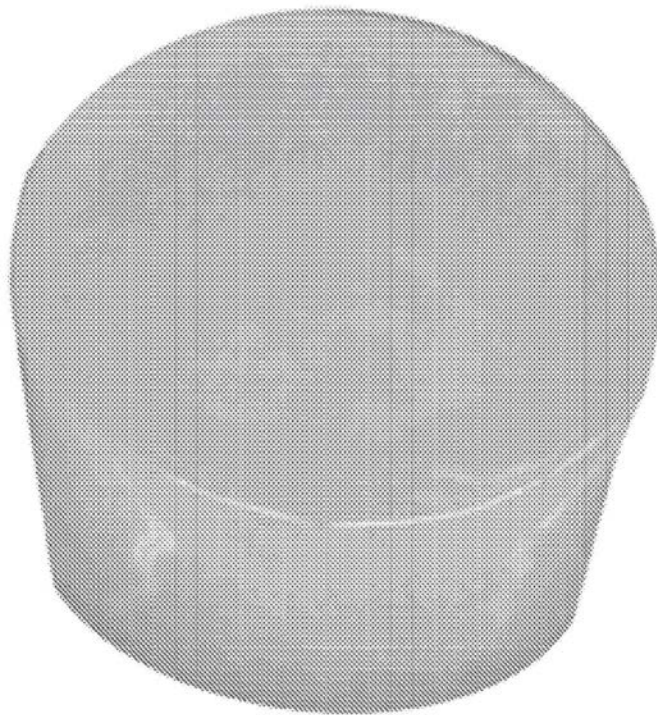


图1C

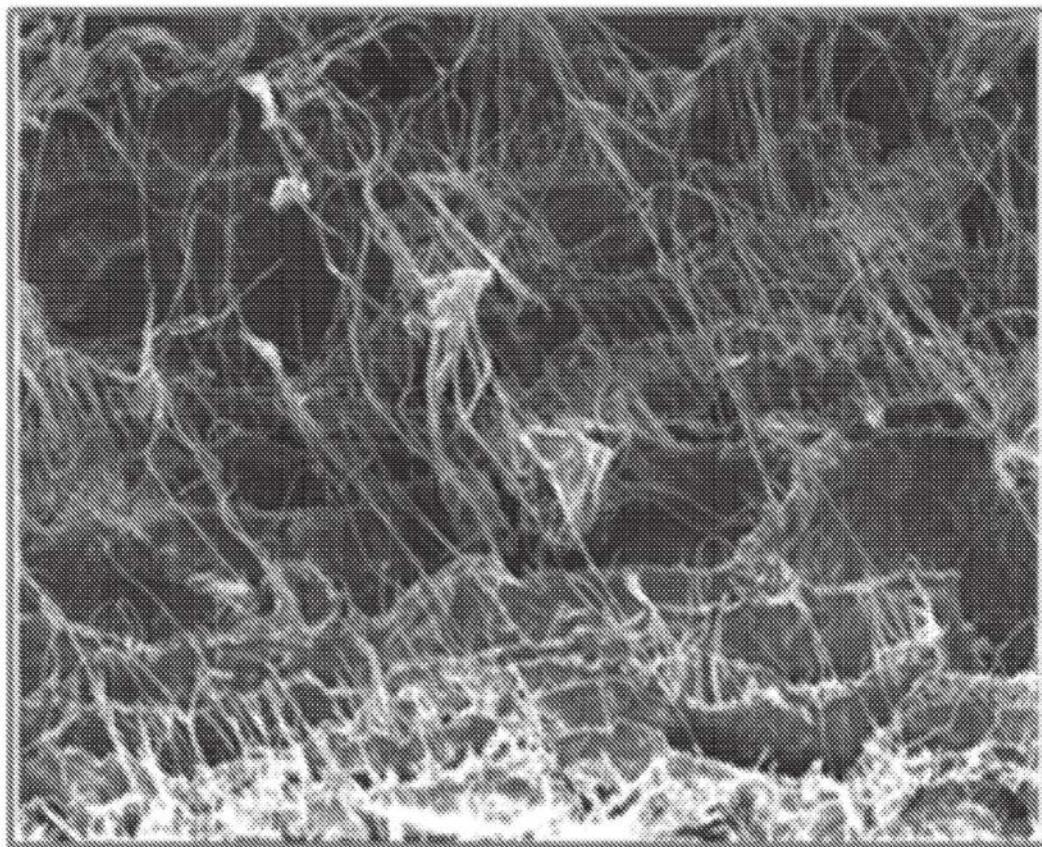


图1D

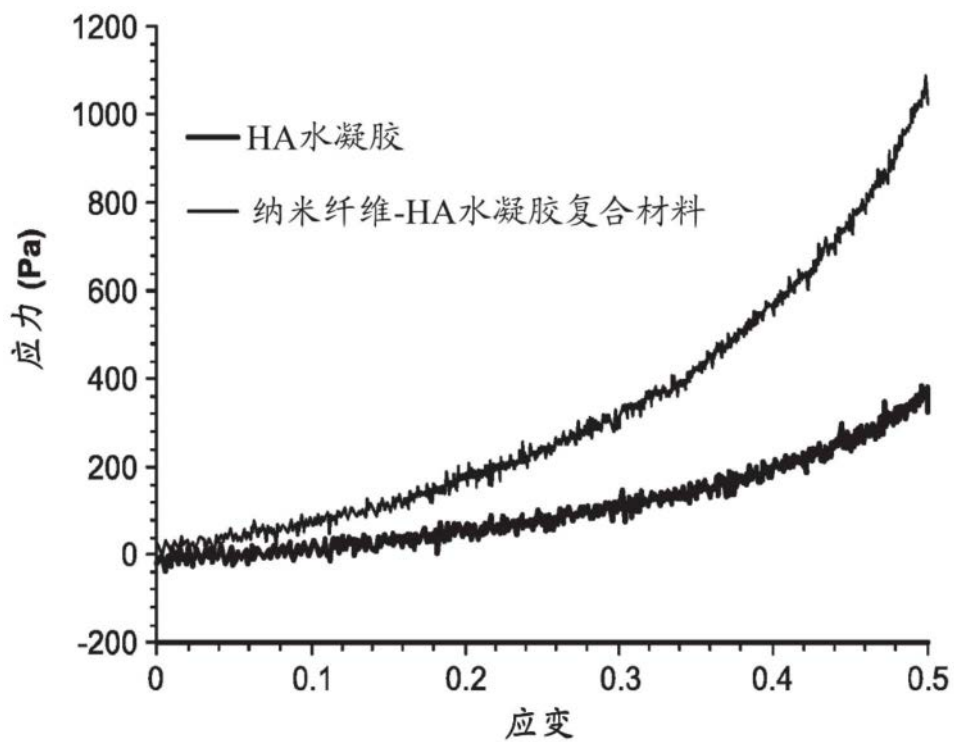


图2A

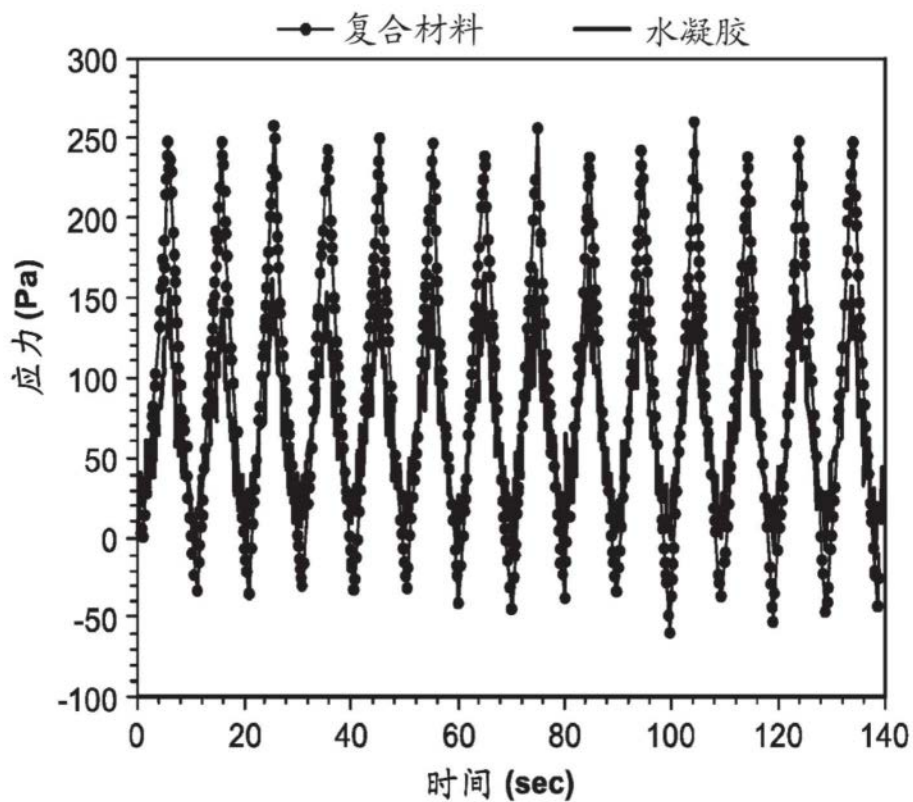


图2B

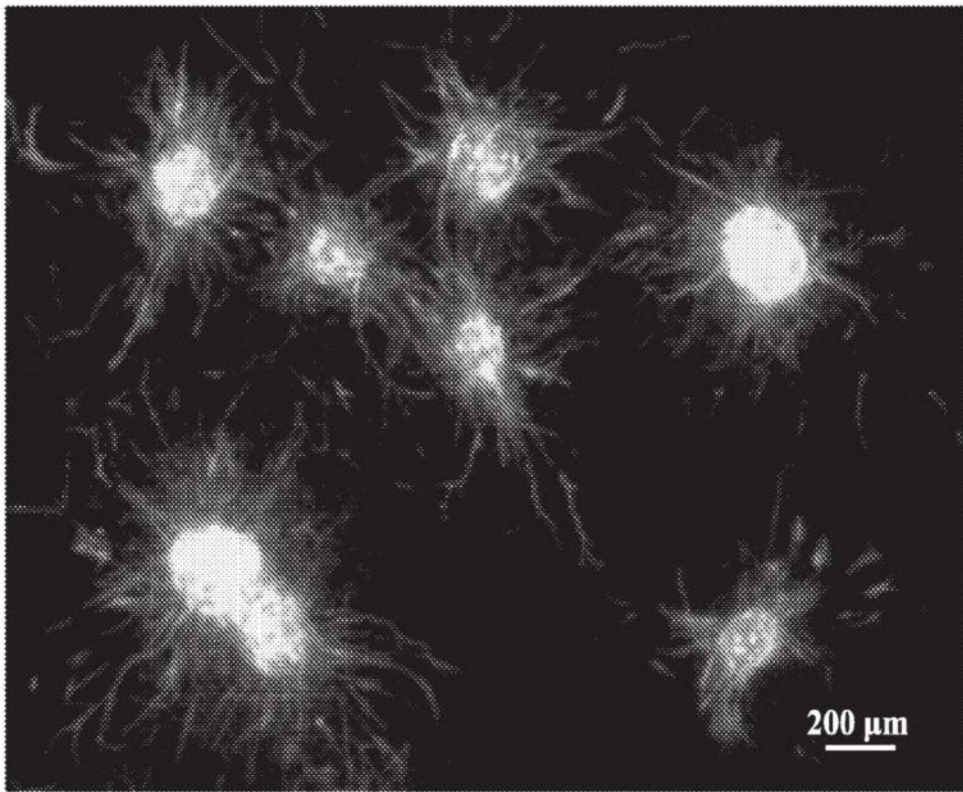


图3A

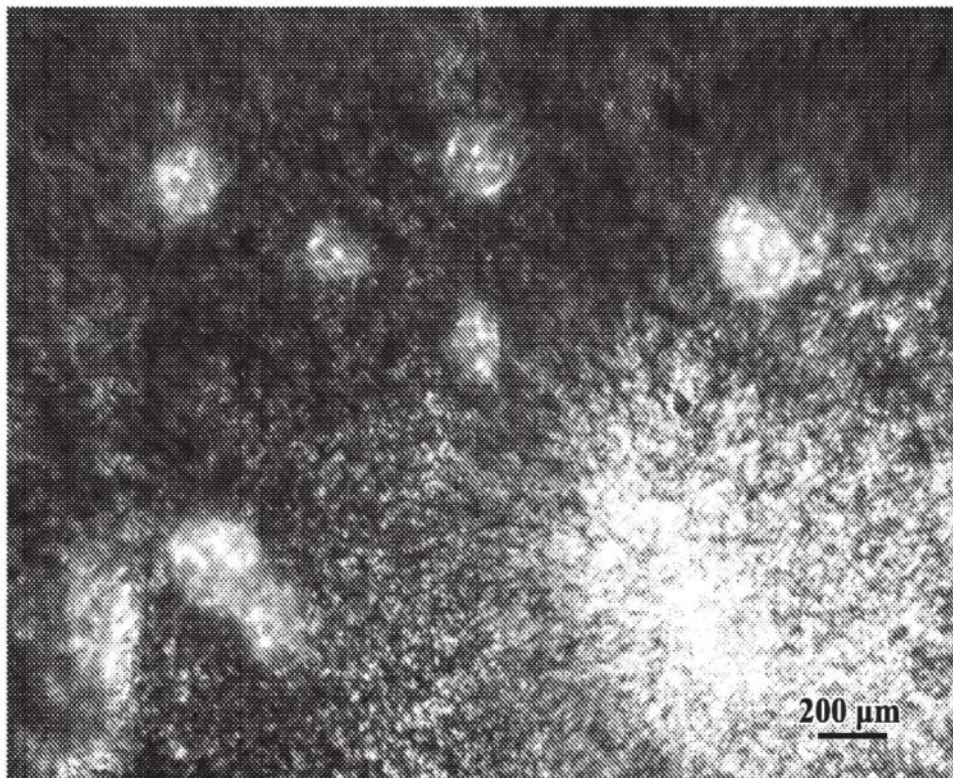


图3B

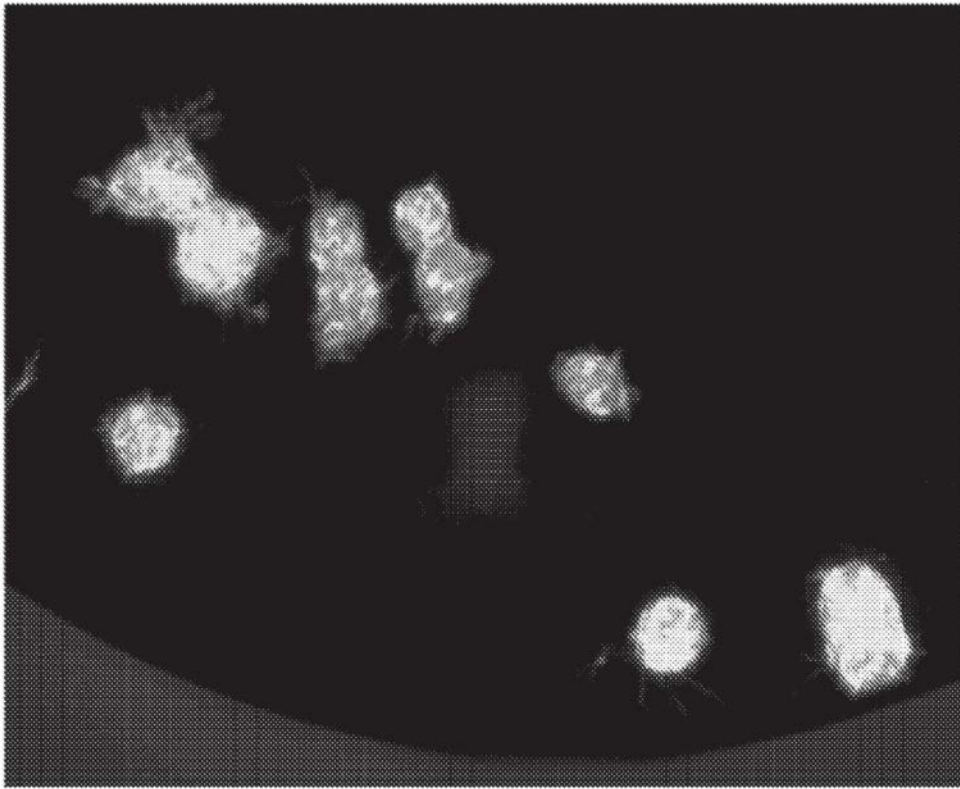


图3C

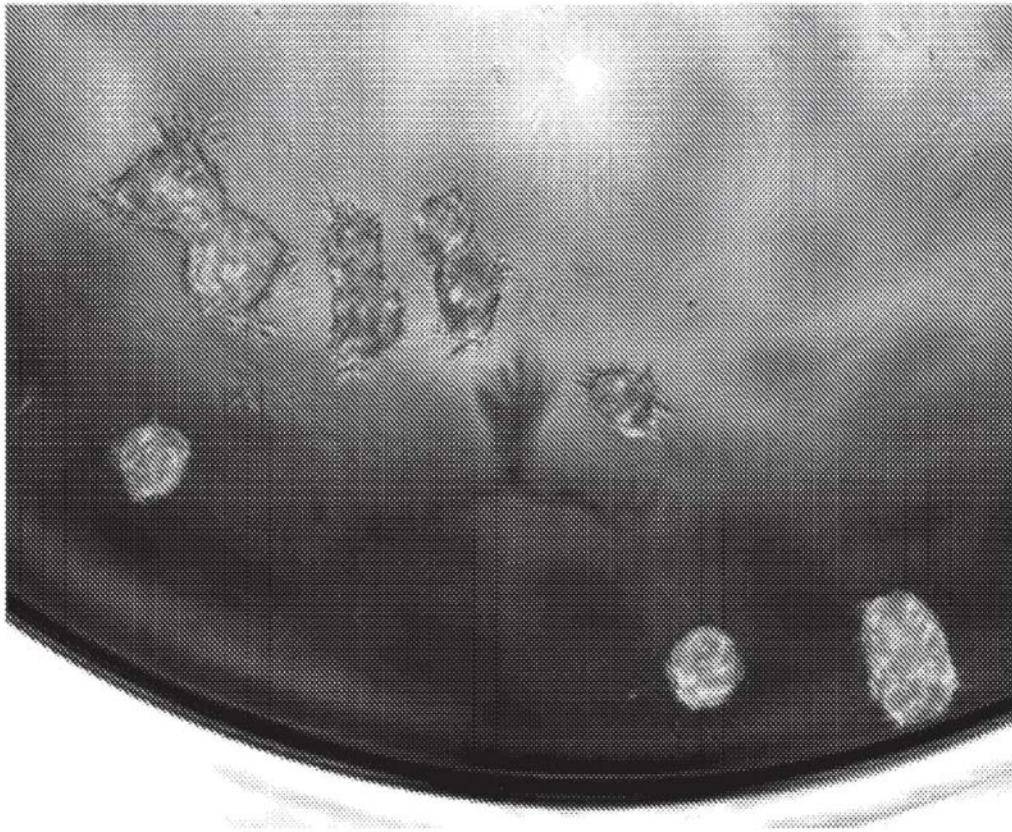


图3D

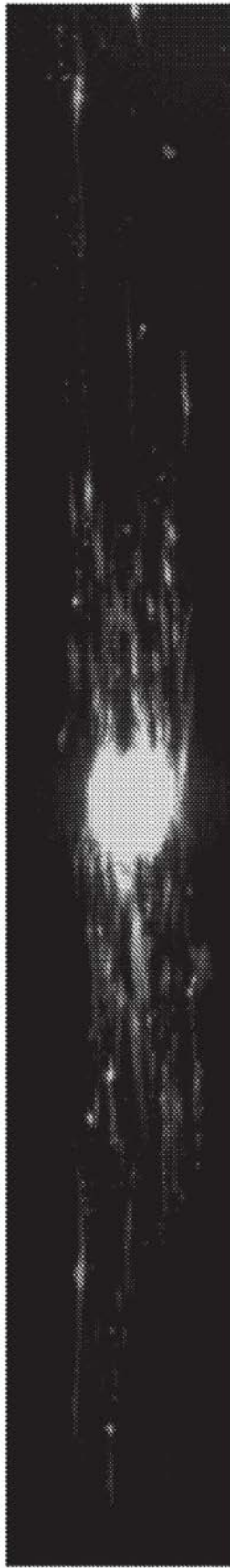


图4A

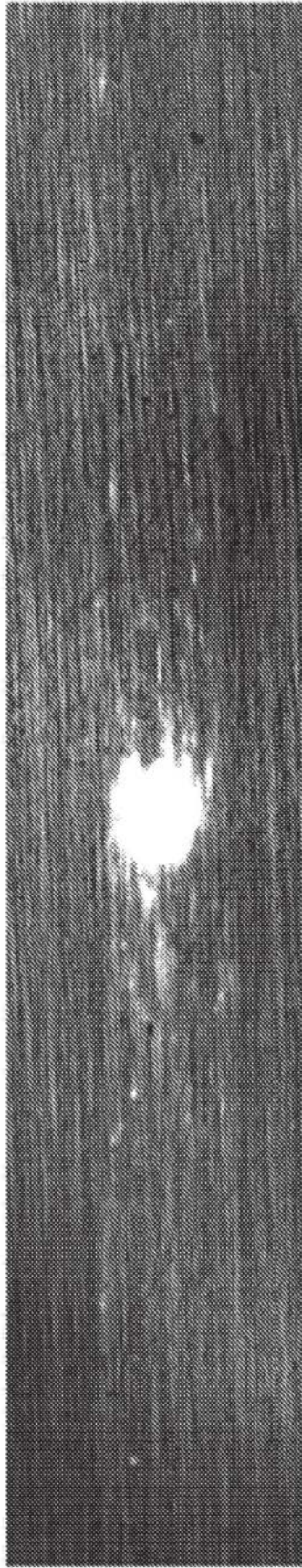


图4B

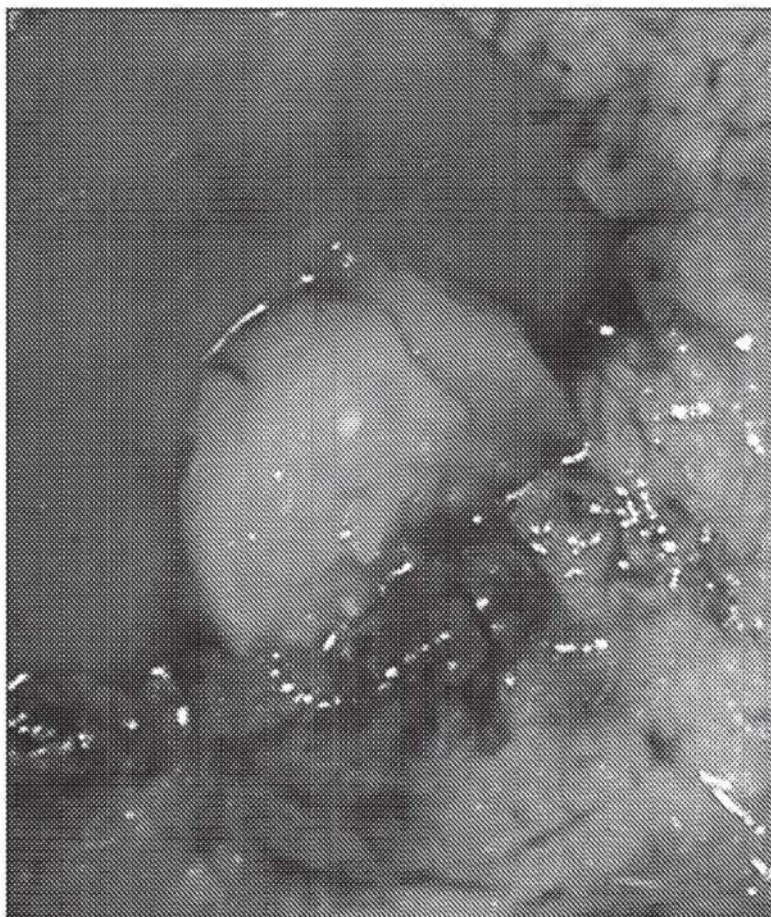


图5A

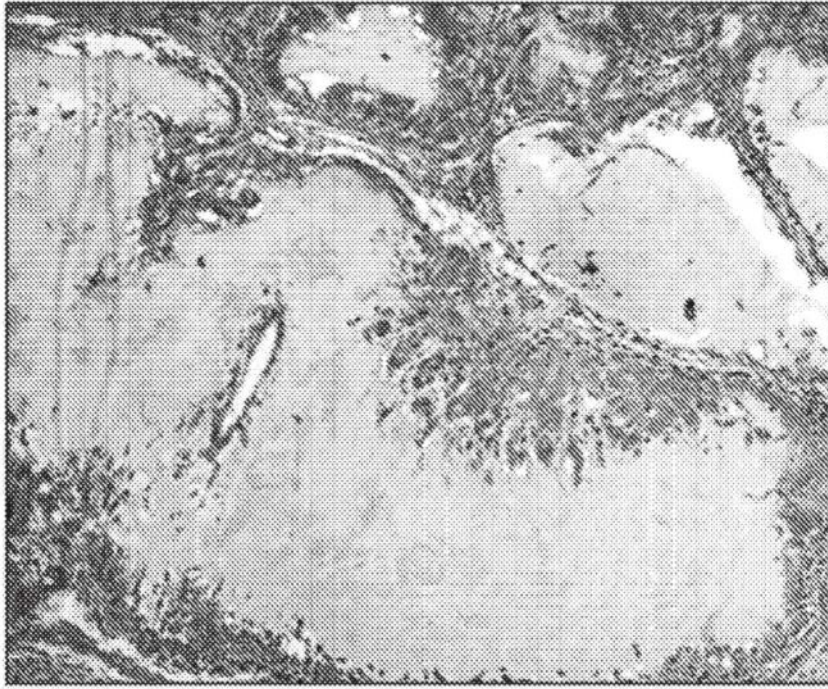


图5B

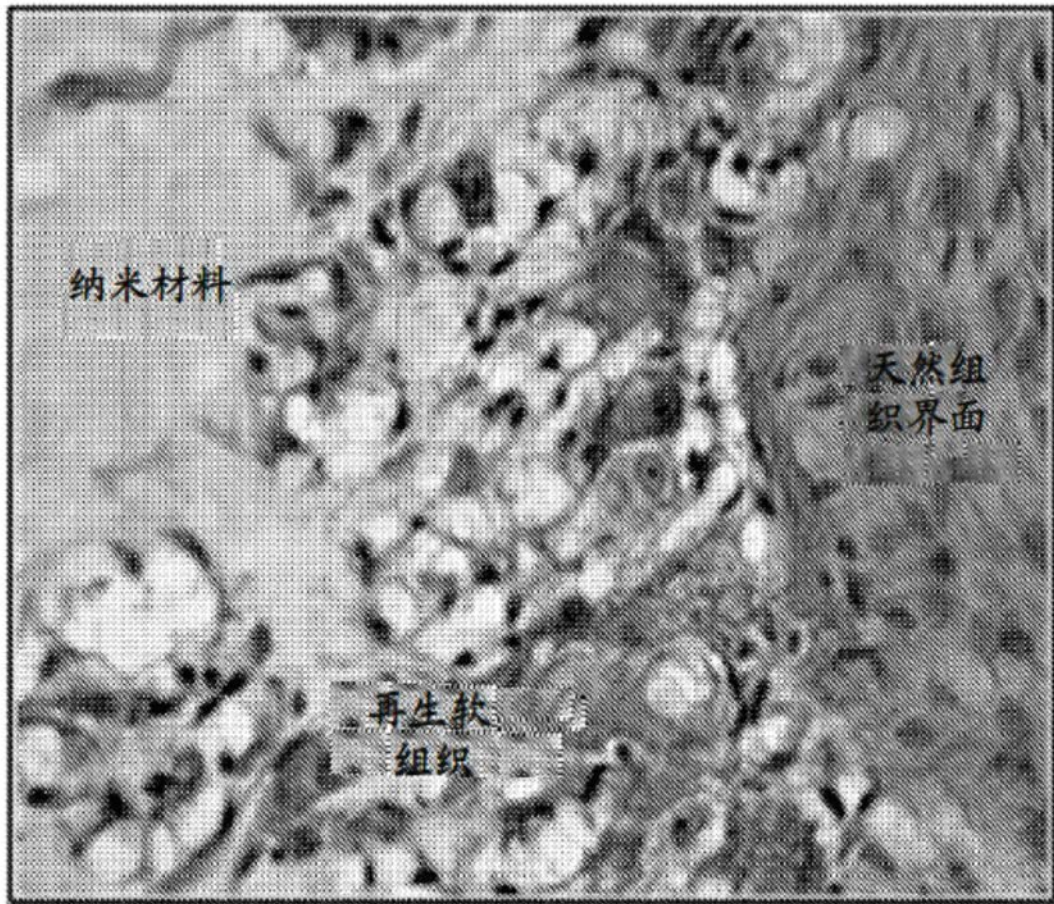


图5C

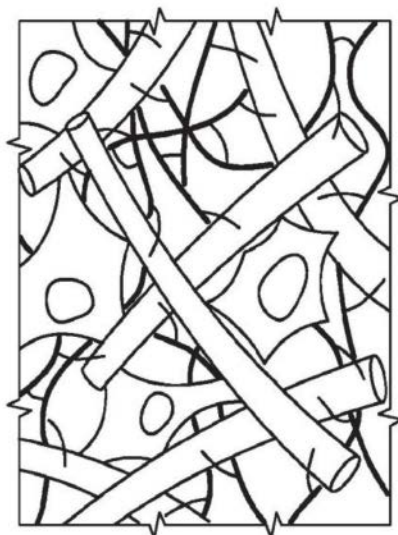


图6B

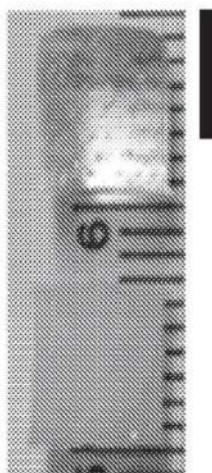


图6C



图6D

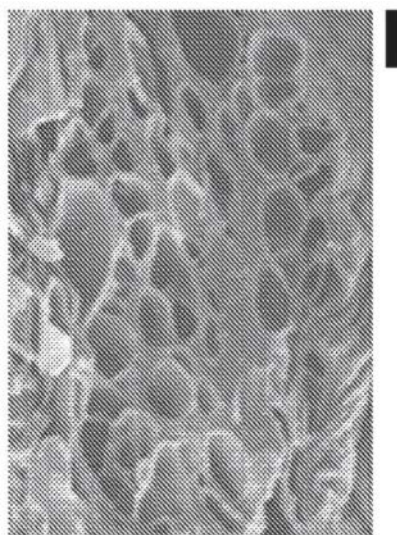


图6E

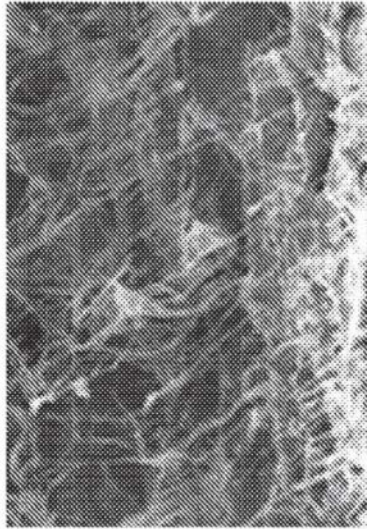


图6F

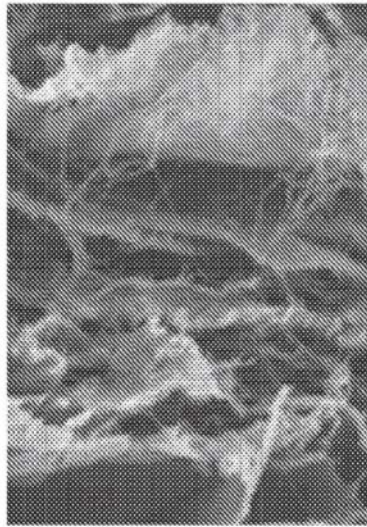


图6G

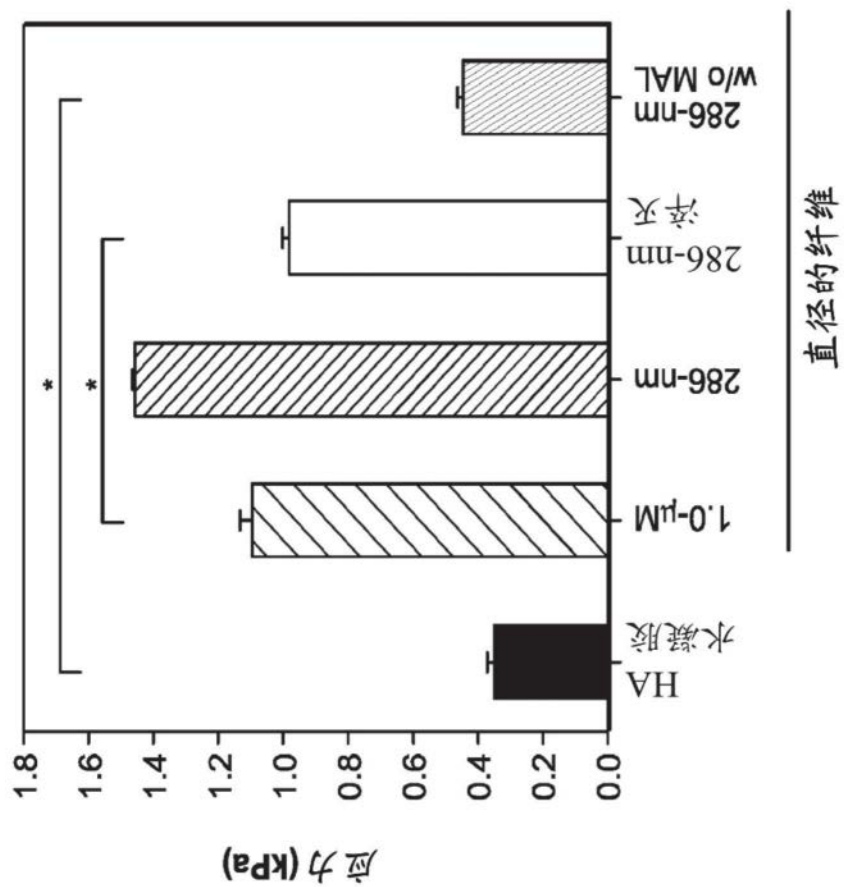


图7A

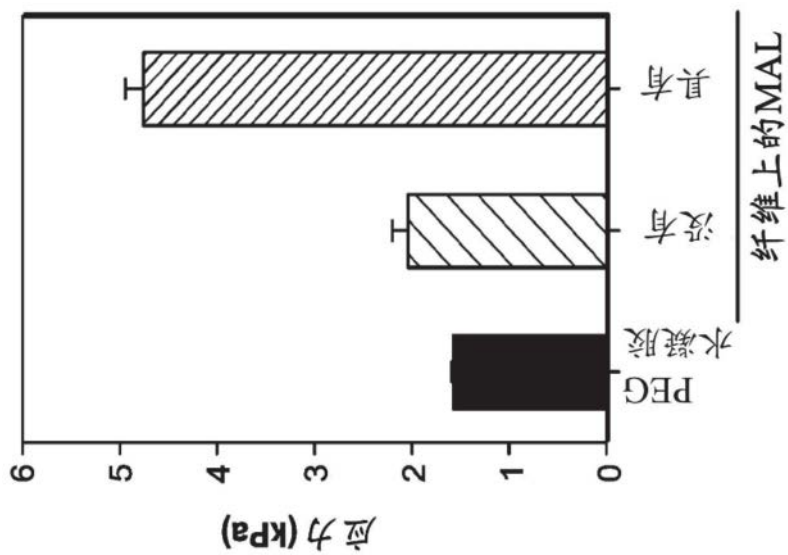


图7B

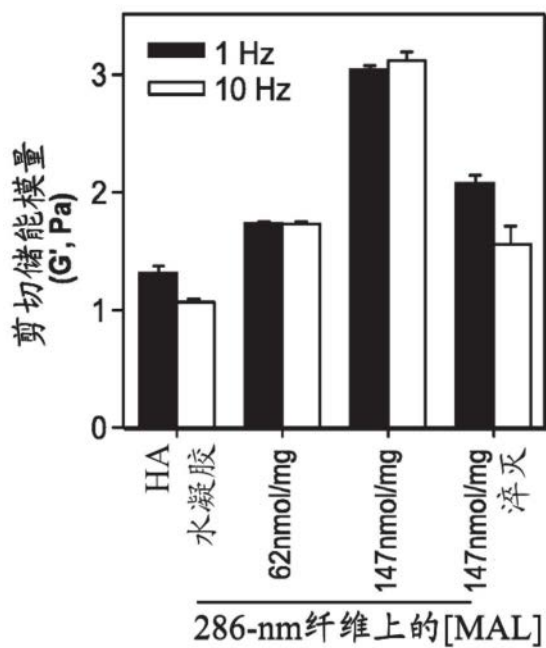


图8A

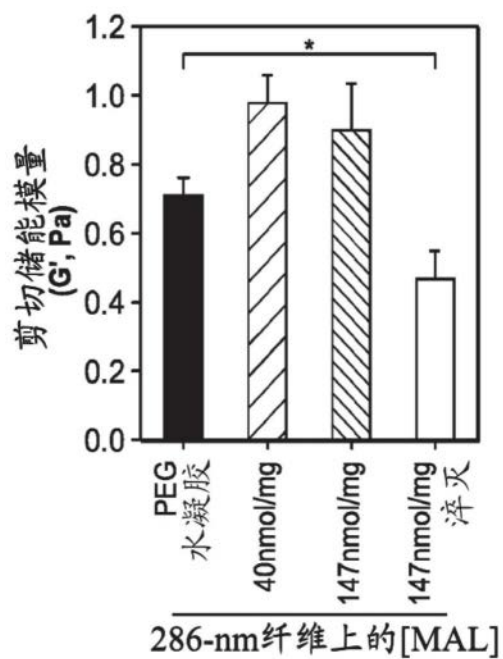


图8B

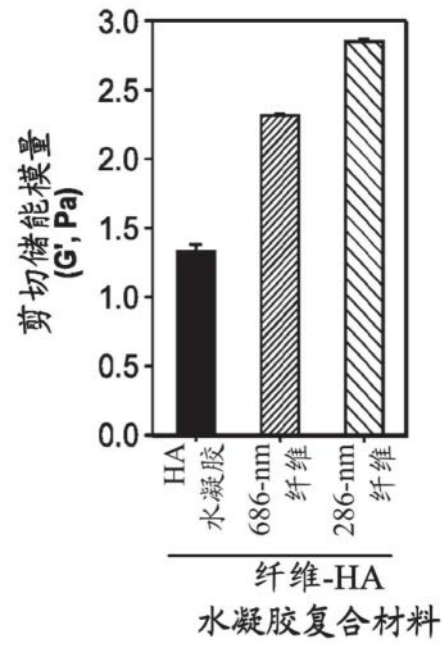


图8C

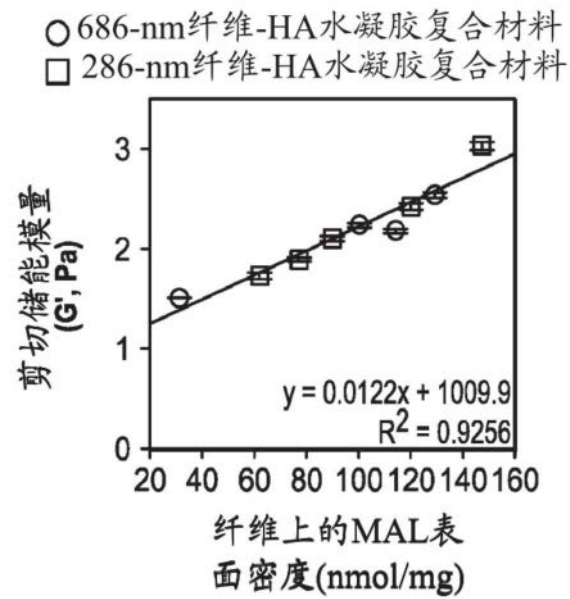


图8D

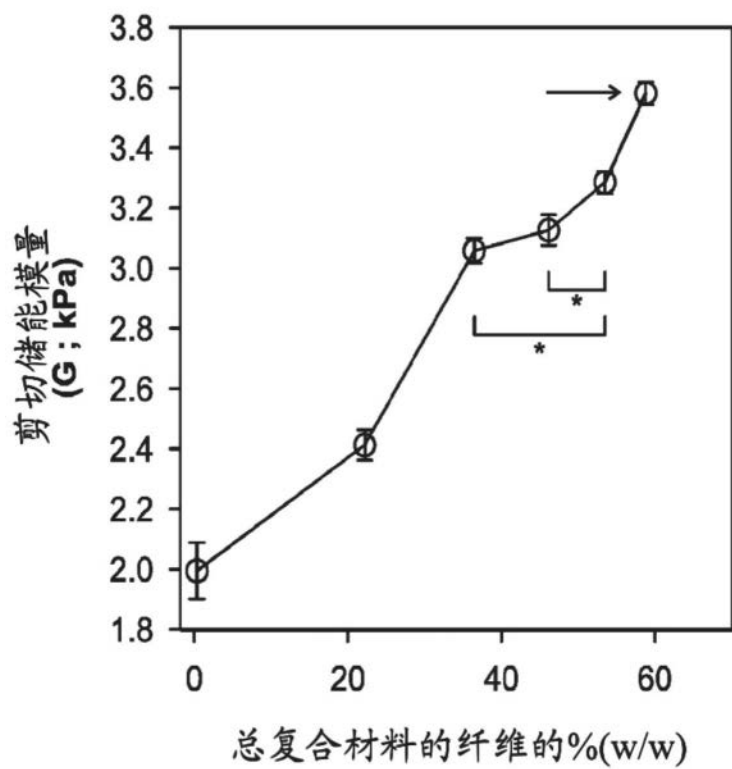


图9A

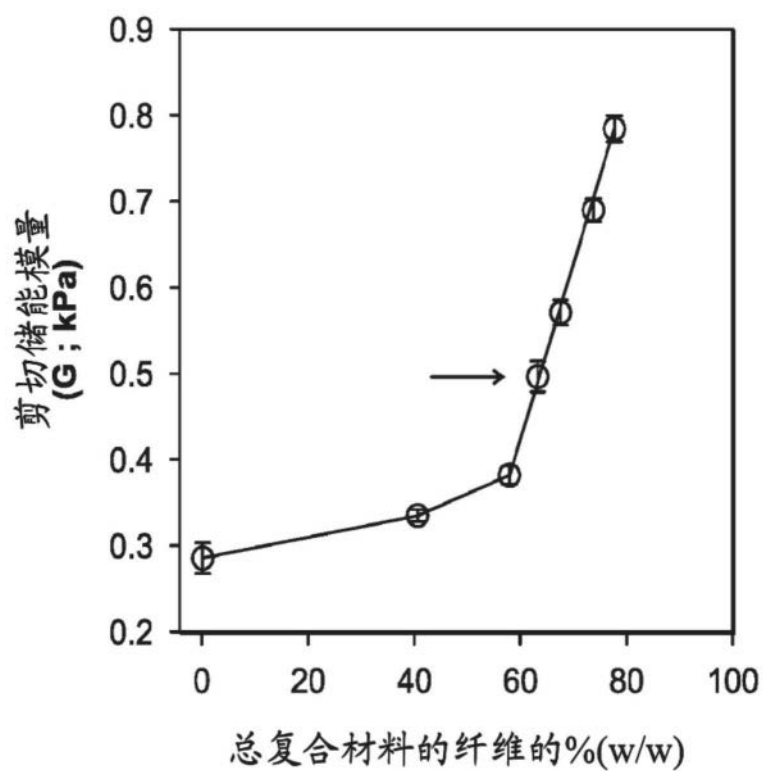


图9B

- HA水凝胶
▽ 686-nm纤维-HA水凝胶复合材料
□ 286-nm纤维-HA水凝胶复合材料

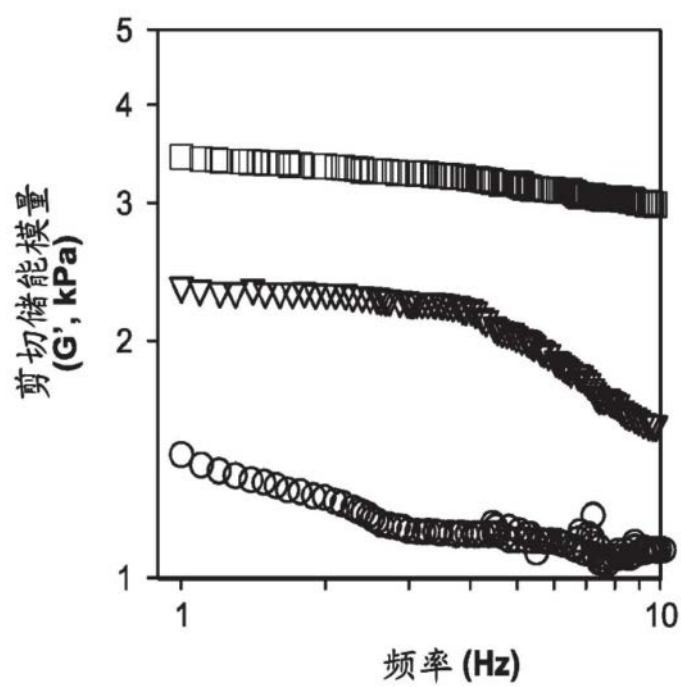


图10A

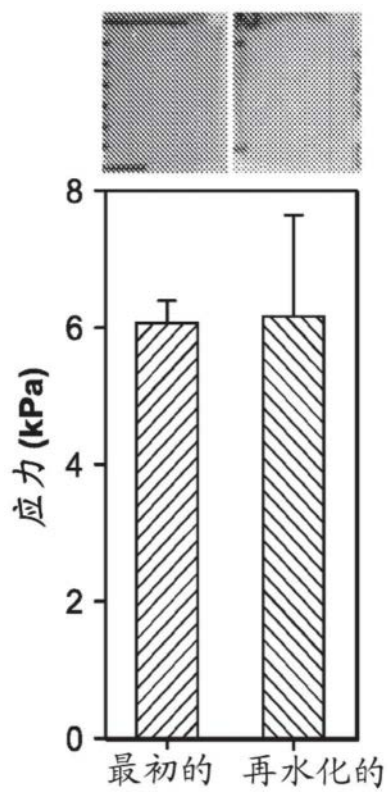


图10B

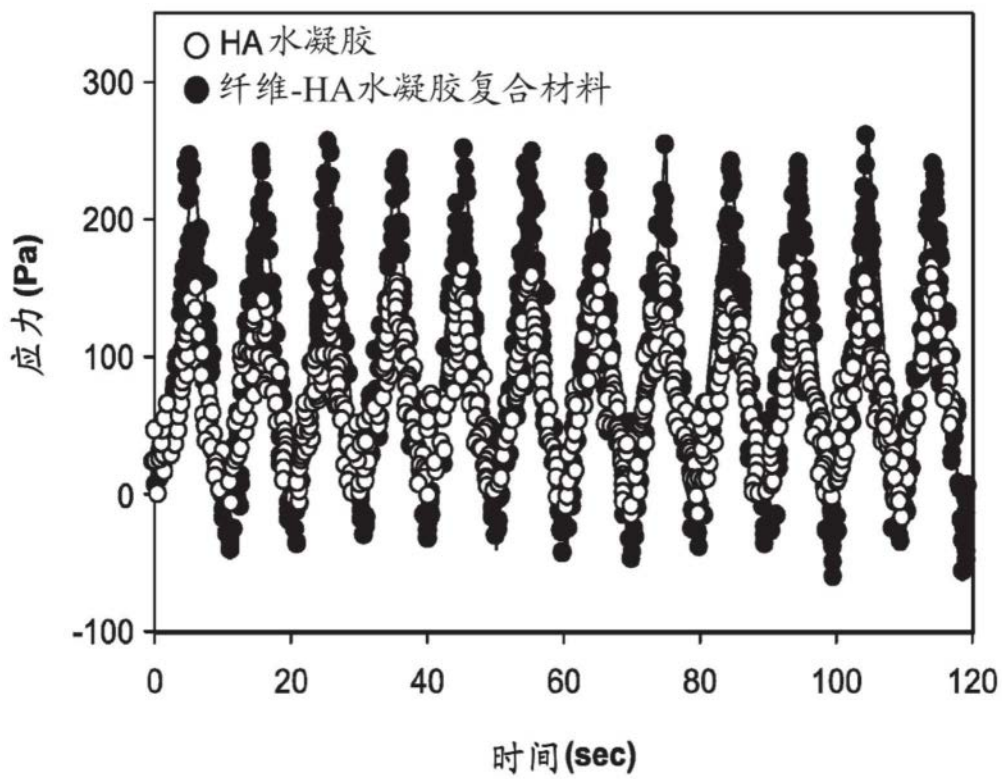


图10C

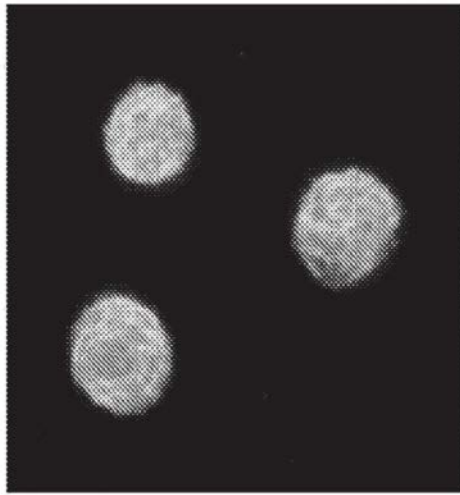


图11A



图11B

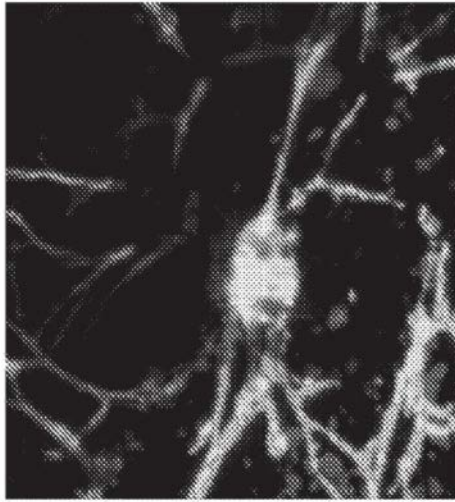


图11C

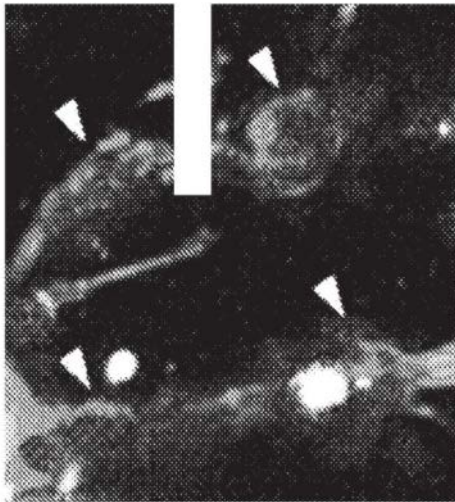


图11D

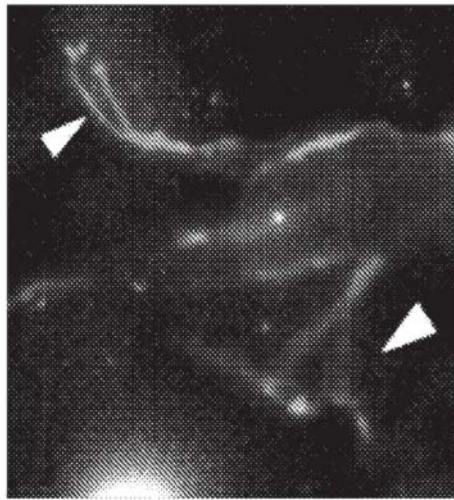


图11E

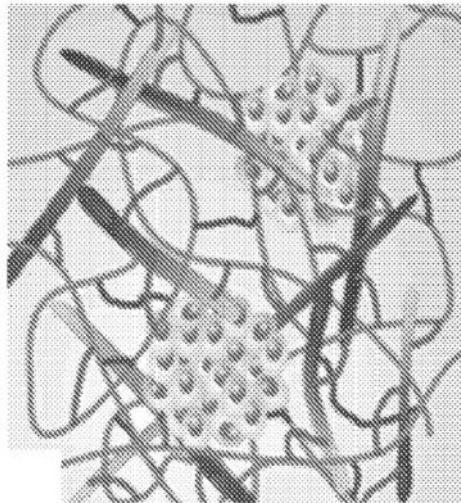


图11F

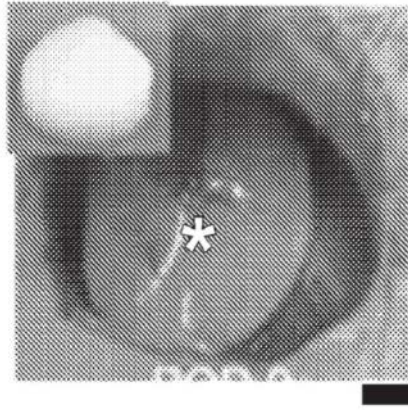


图12A

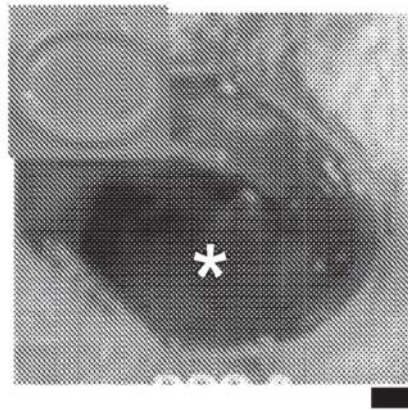


图12B

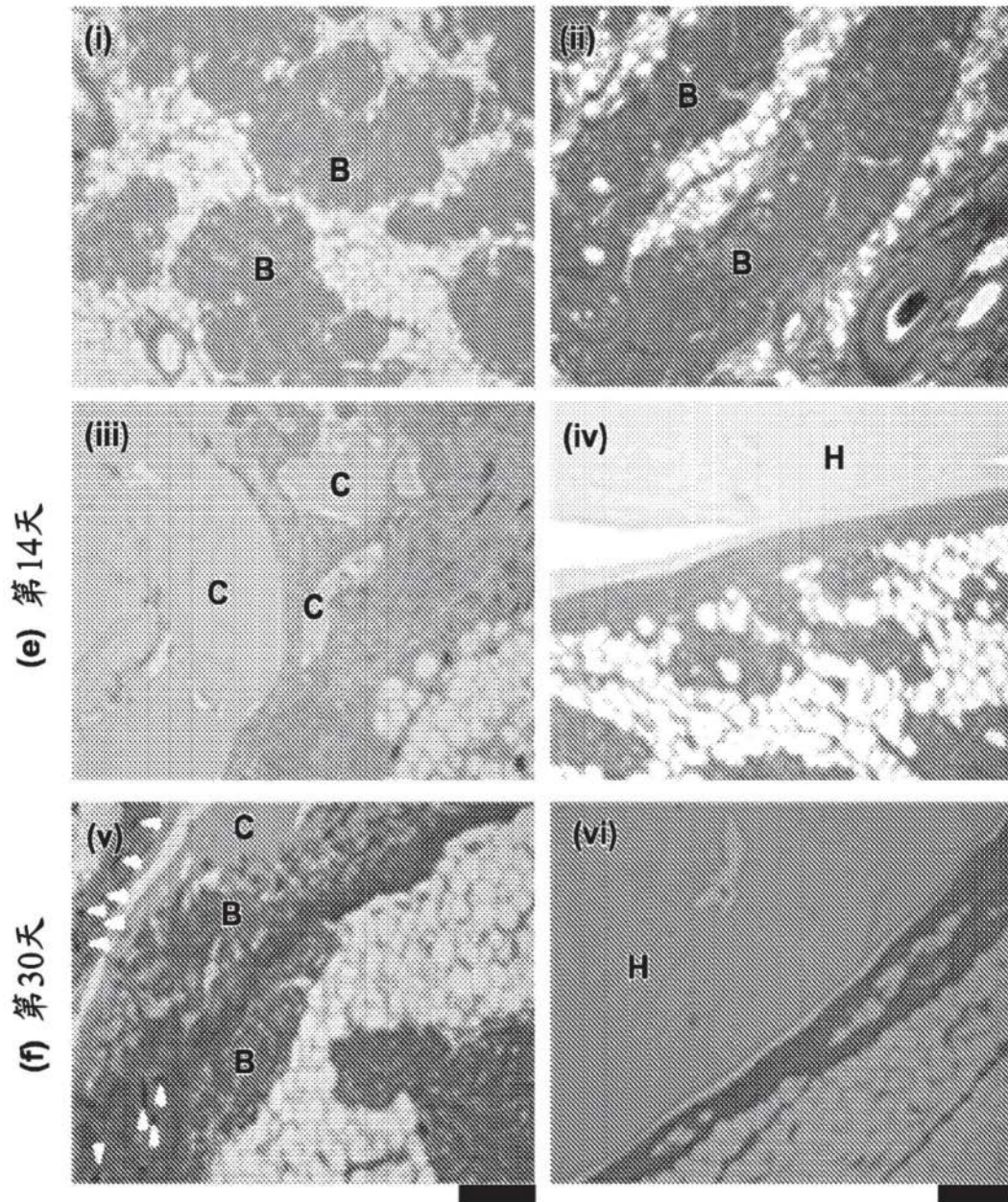


图12C

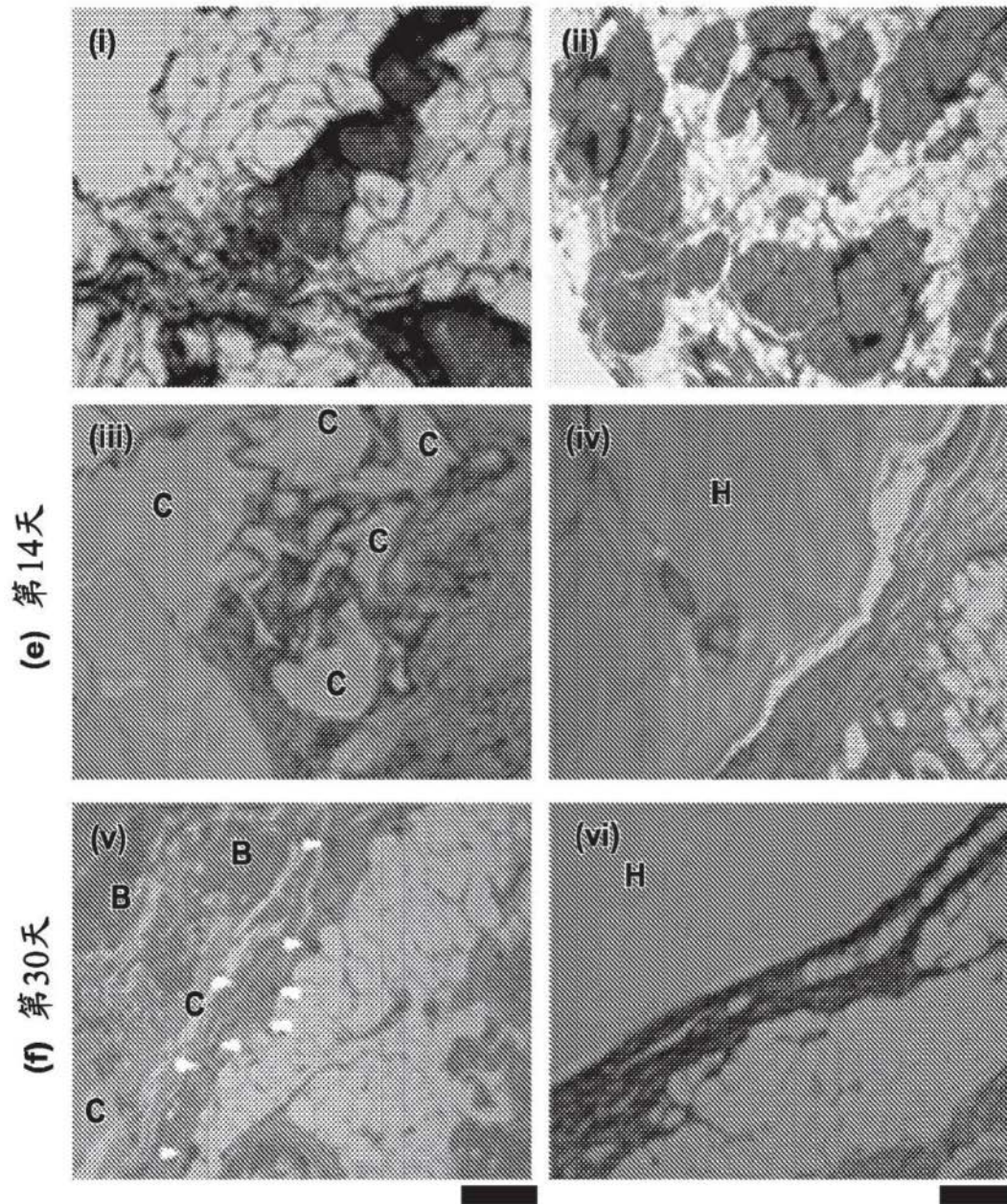


图12D

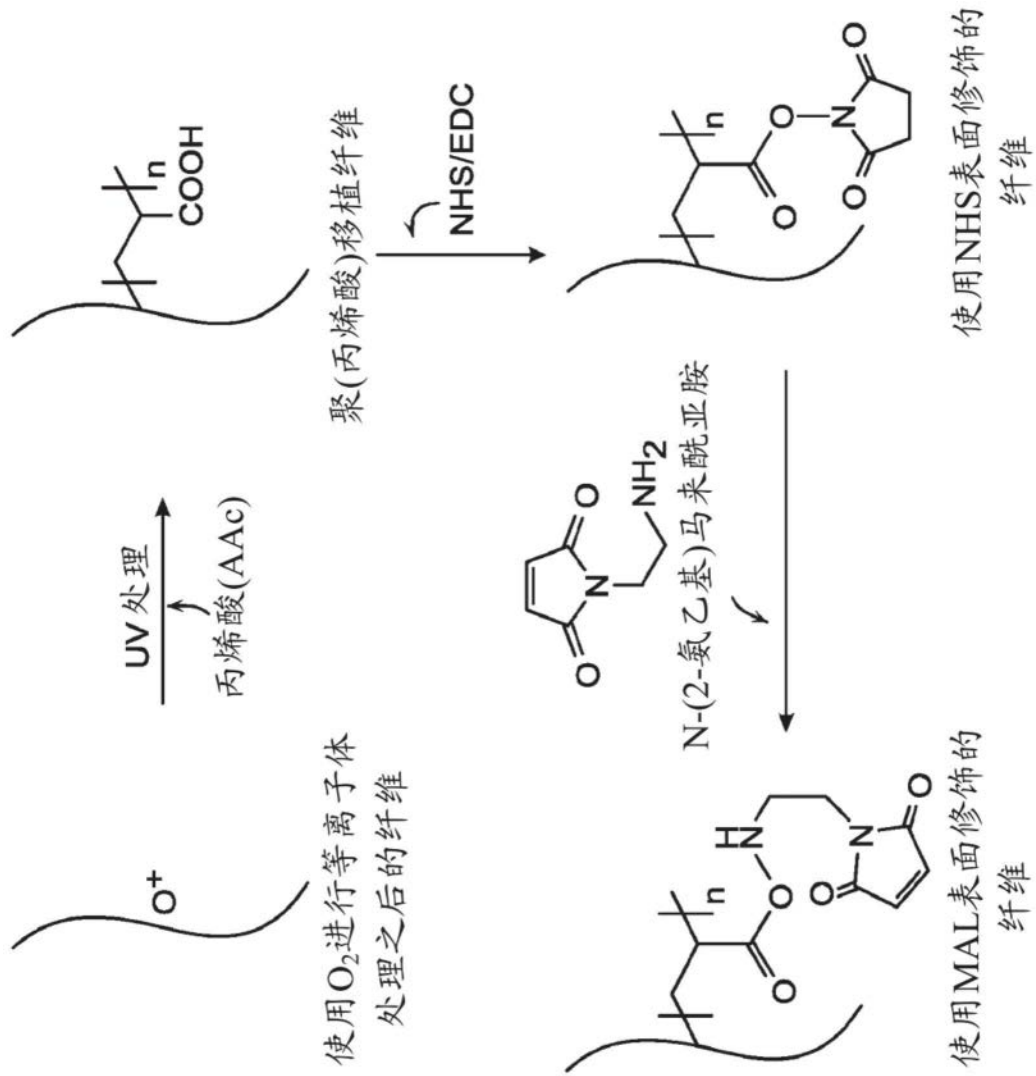


图13A

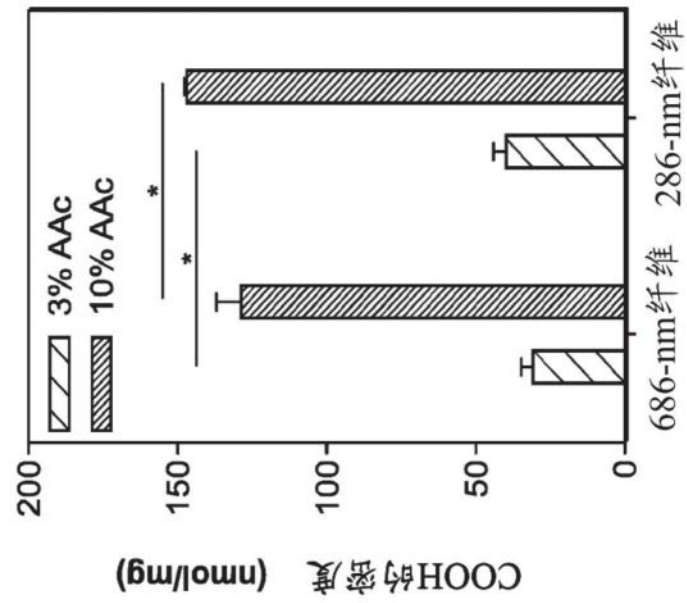


图13B

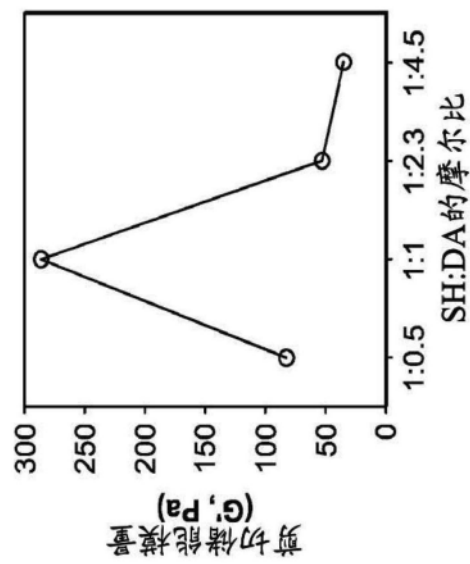


图14

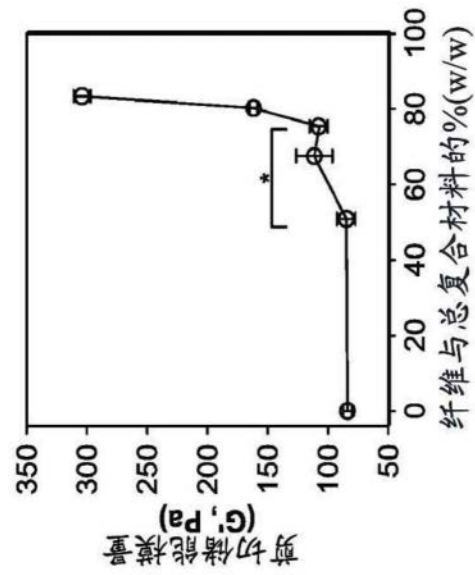


图15A

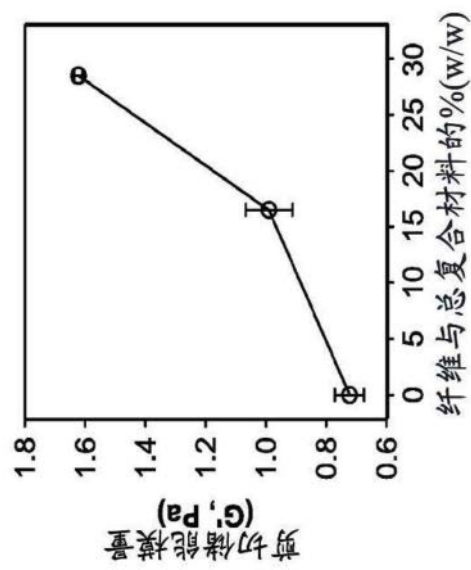


图15B

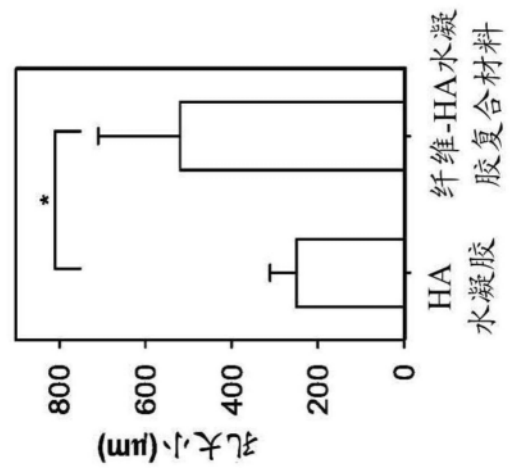


图16

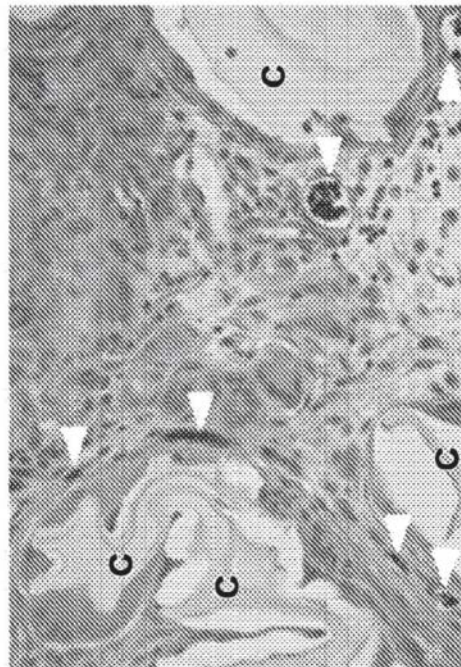


图17A

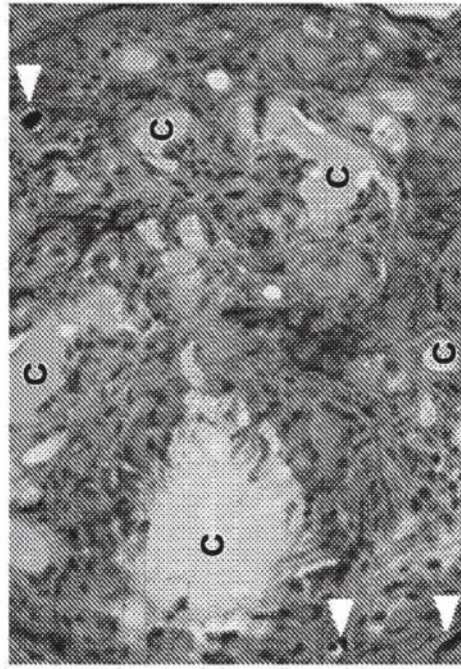


图17B

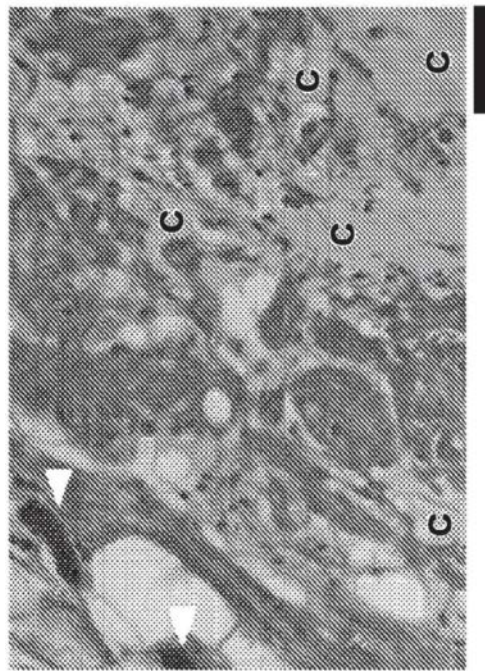


图17C

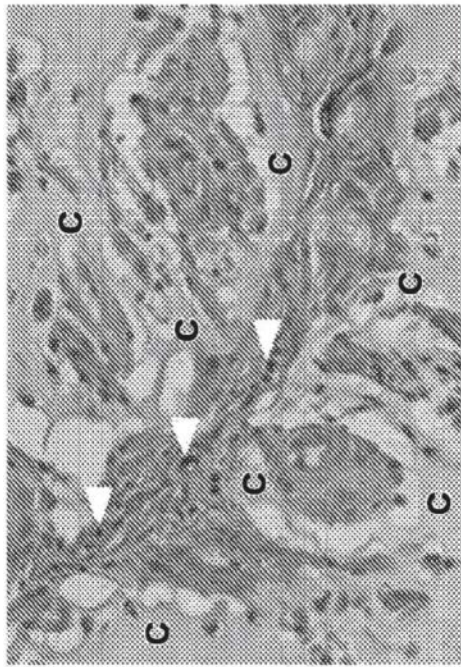


图17D

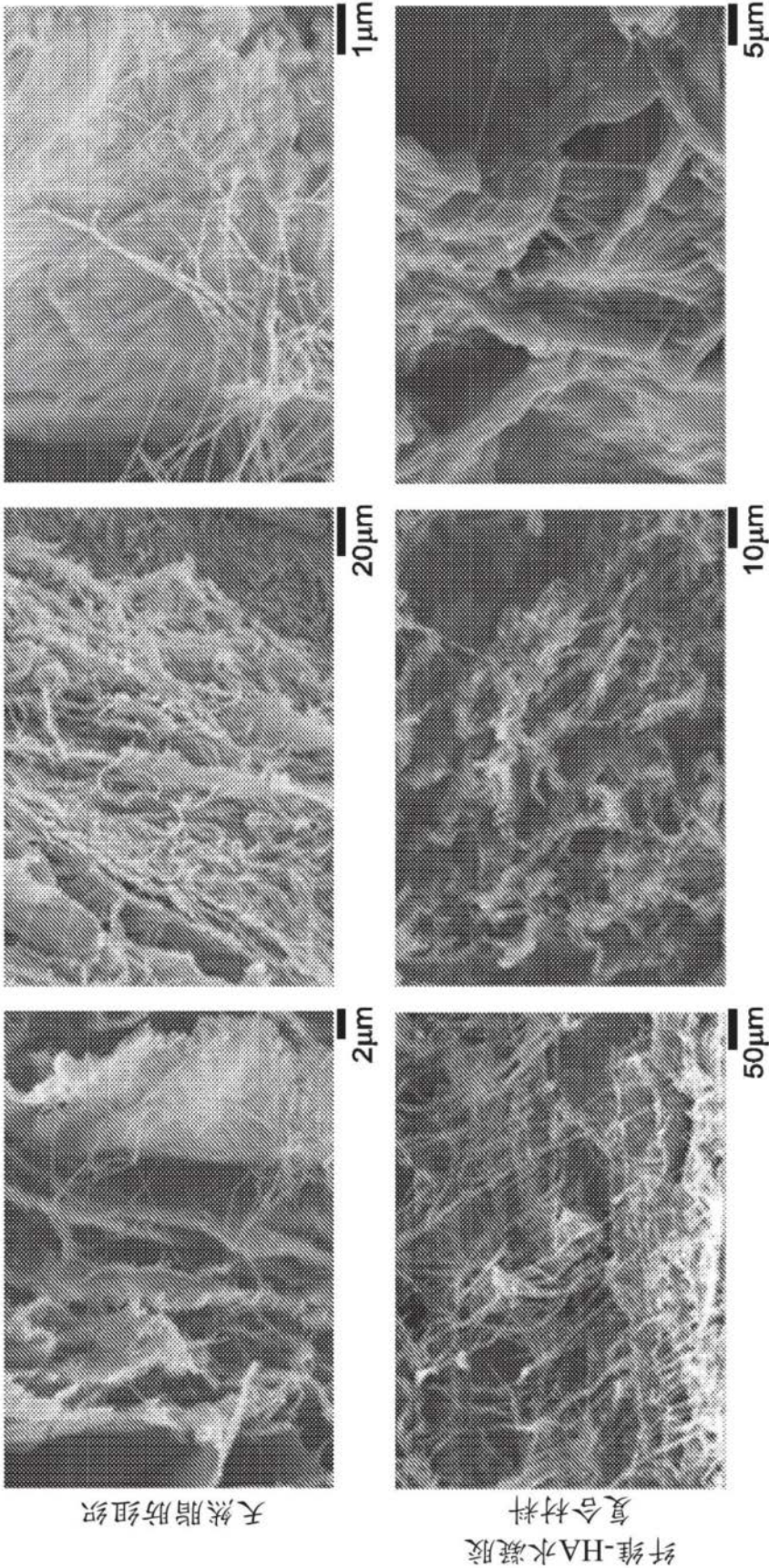


图18



图19A

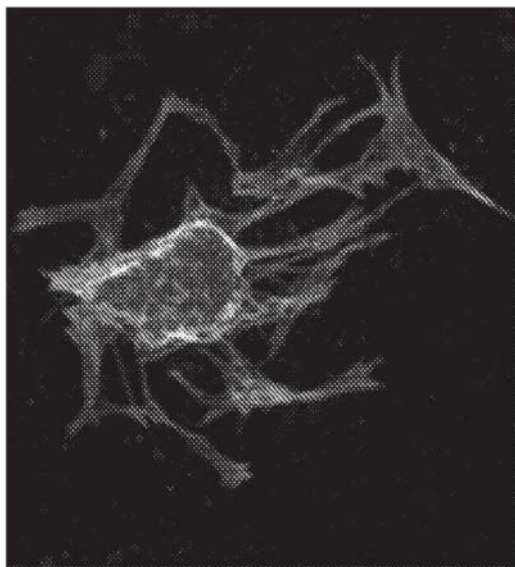


图19B

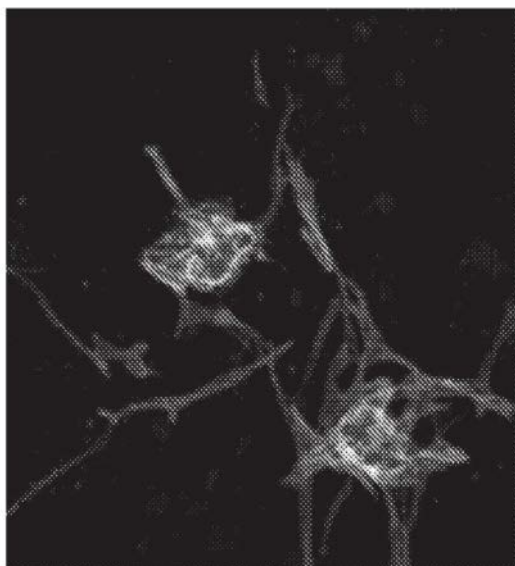


图19C

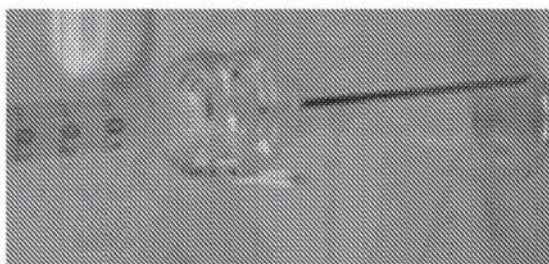


图20A

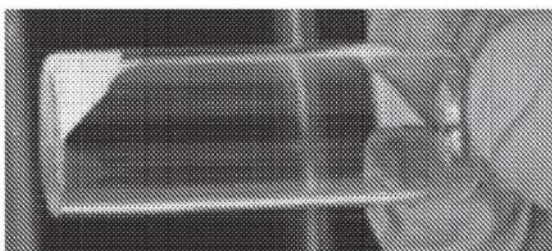


图20B

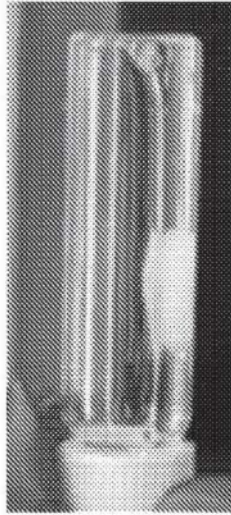


图20C

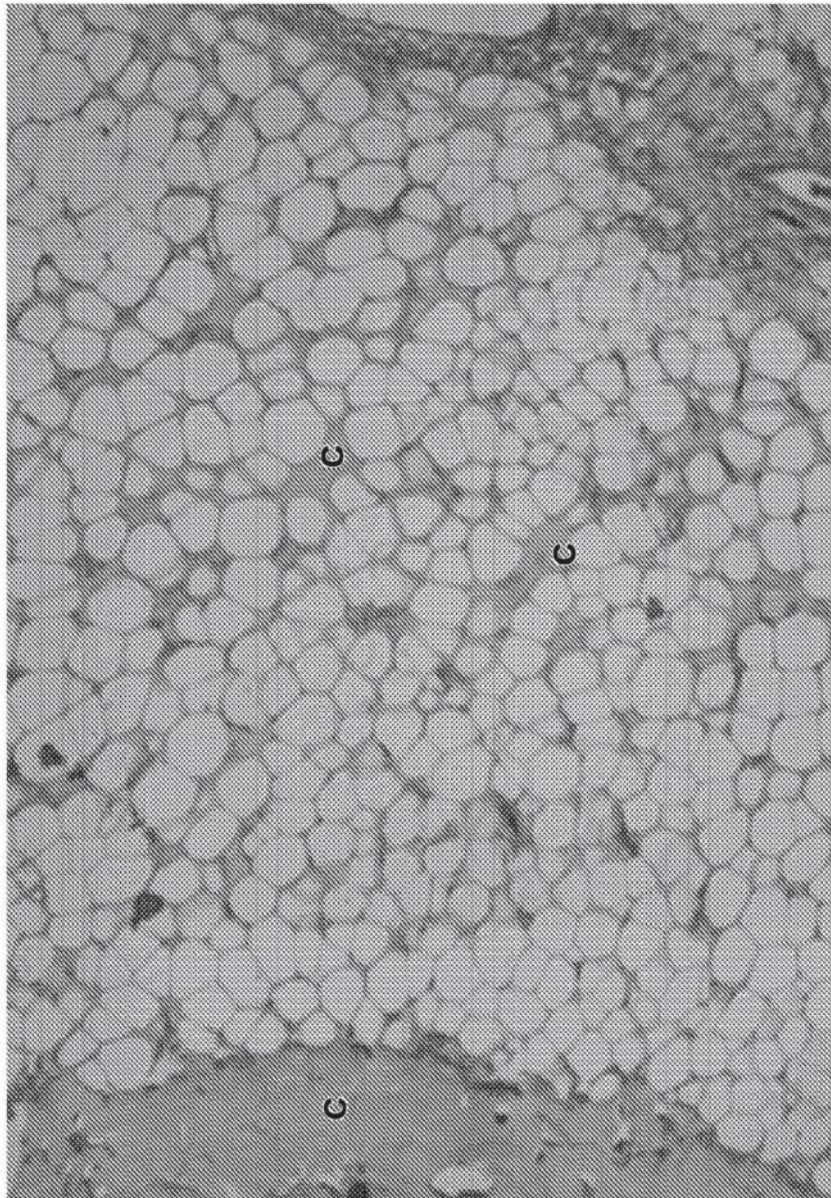


图20D

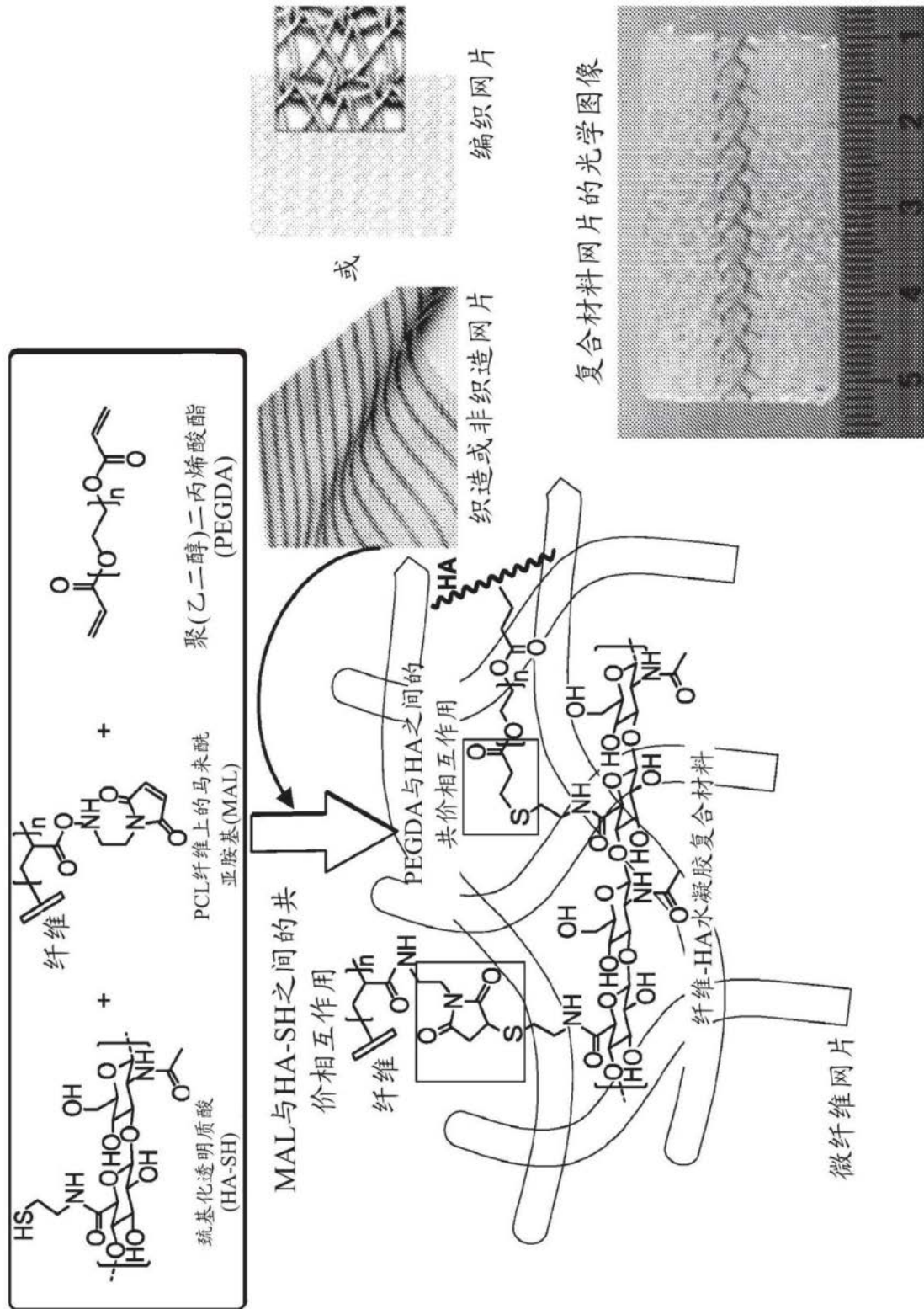


图21

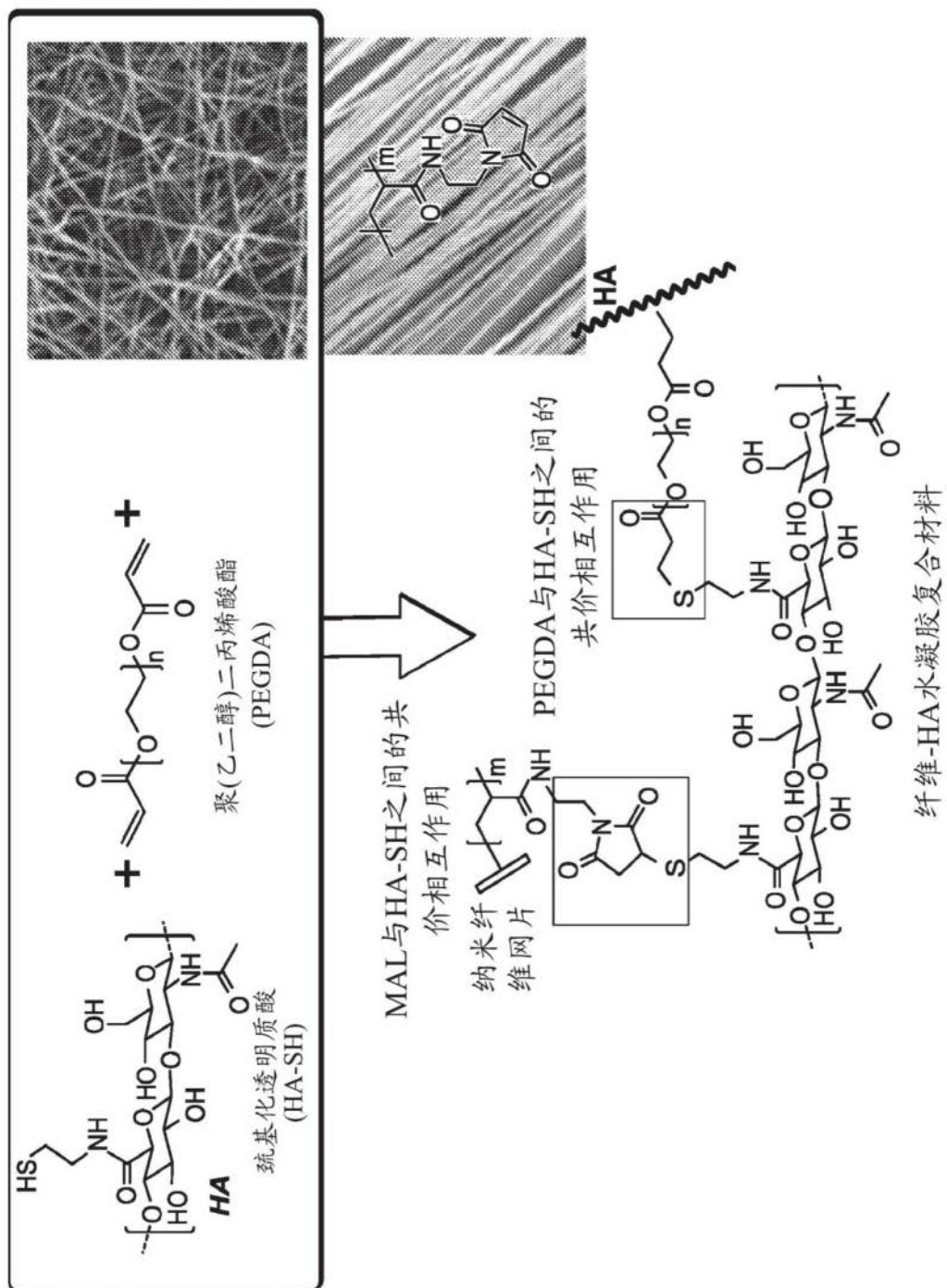


图22

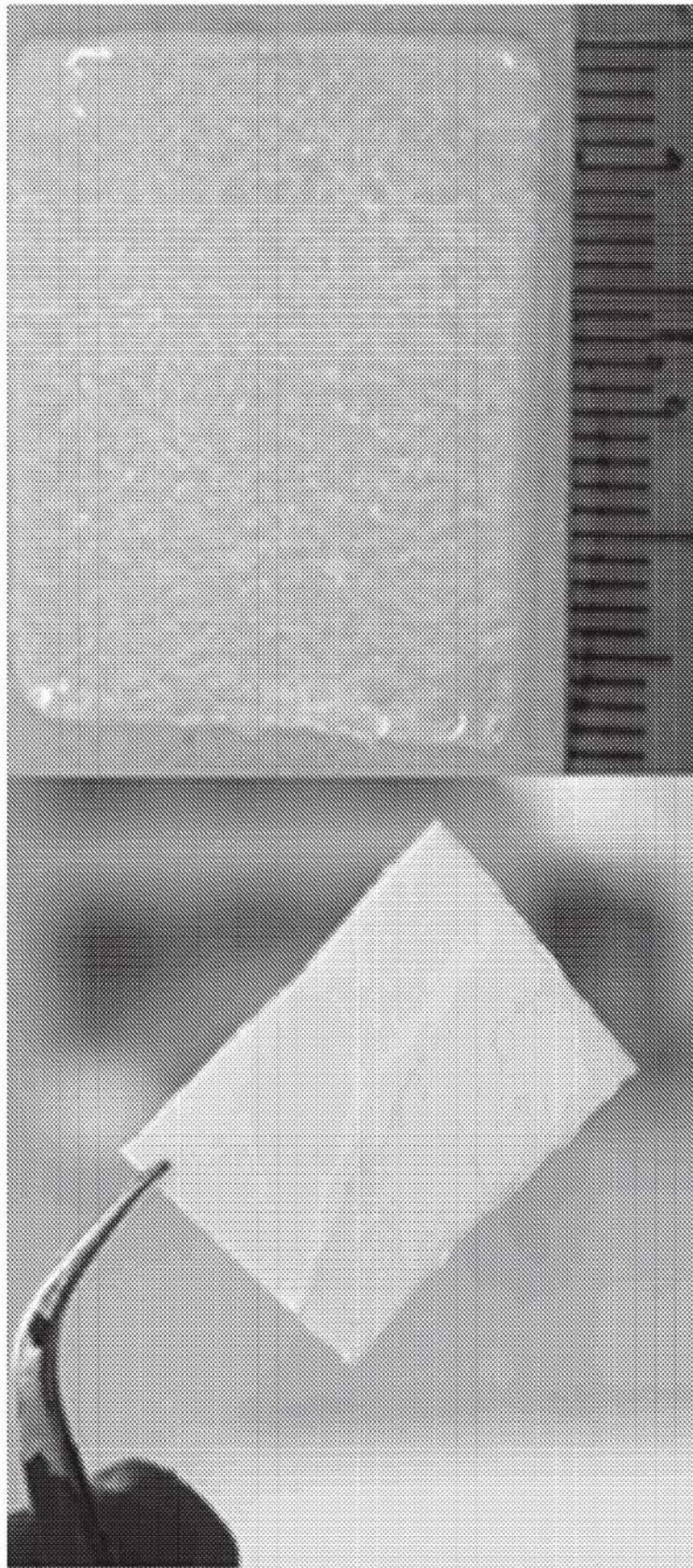


图23

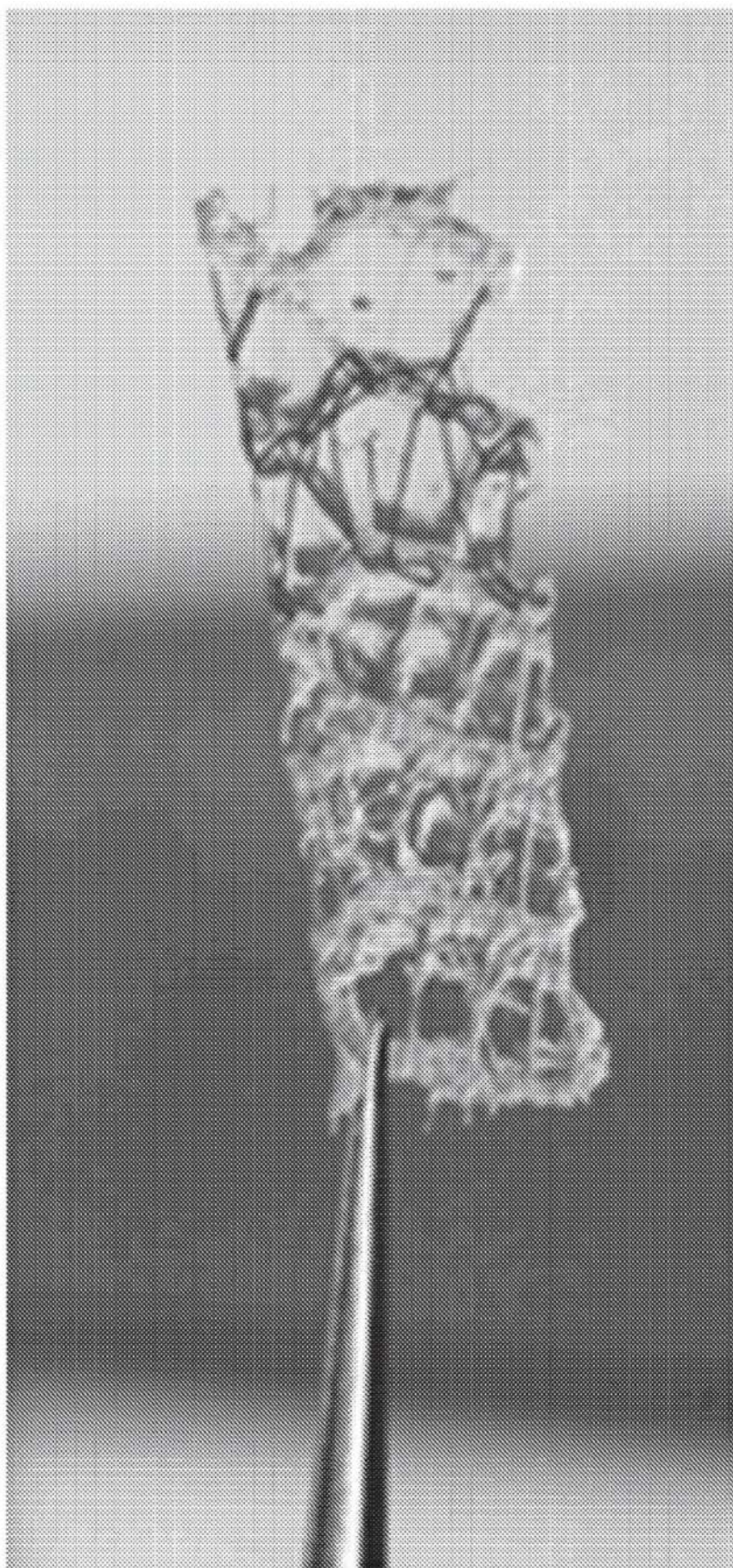


图25

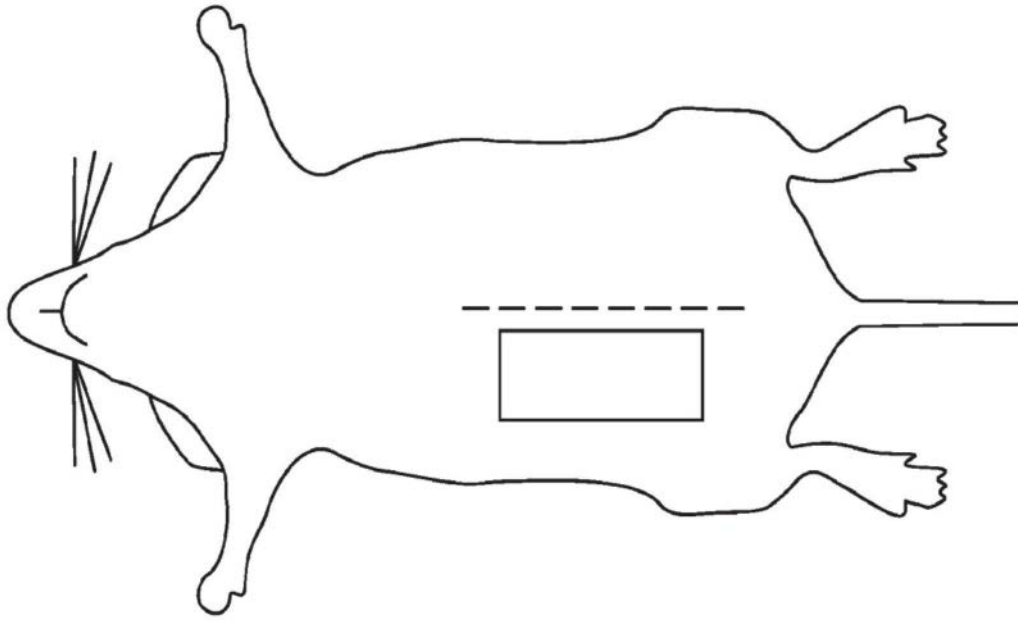


图26A

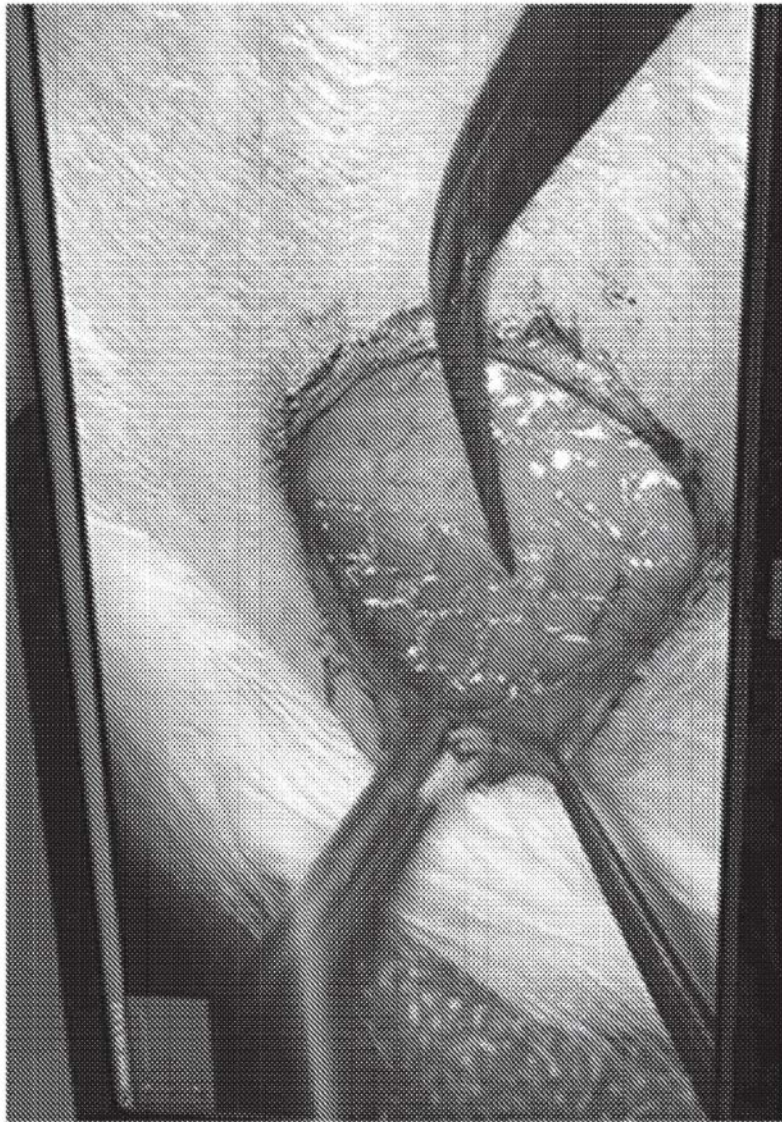


图26B

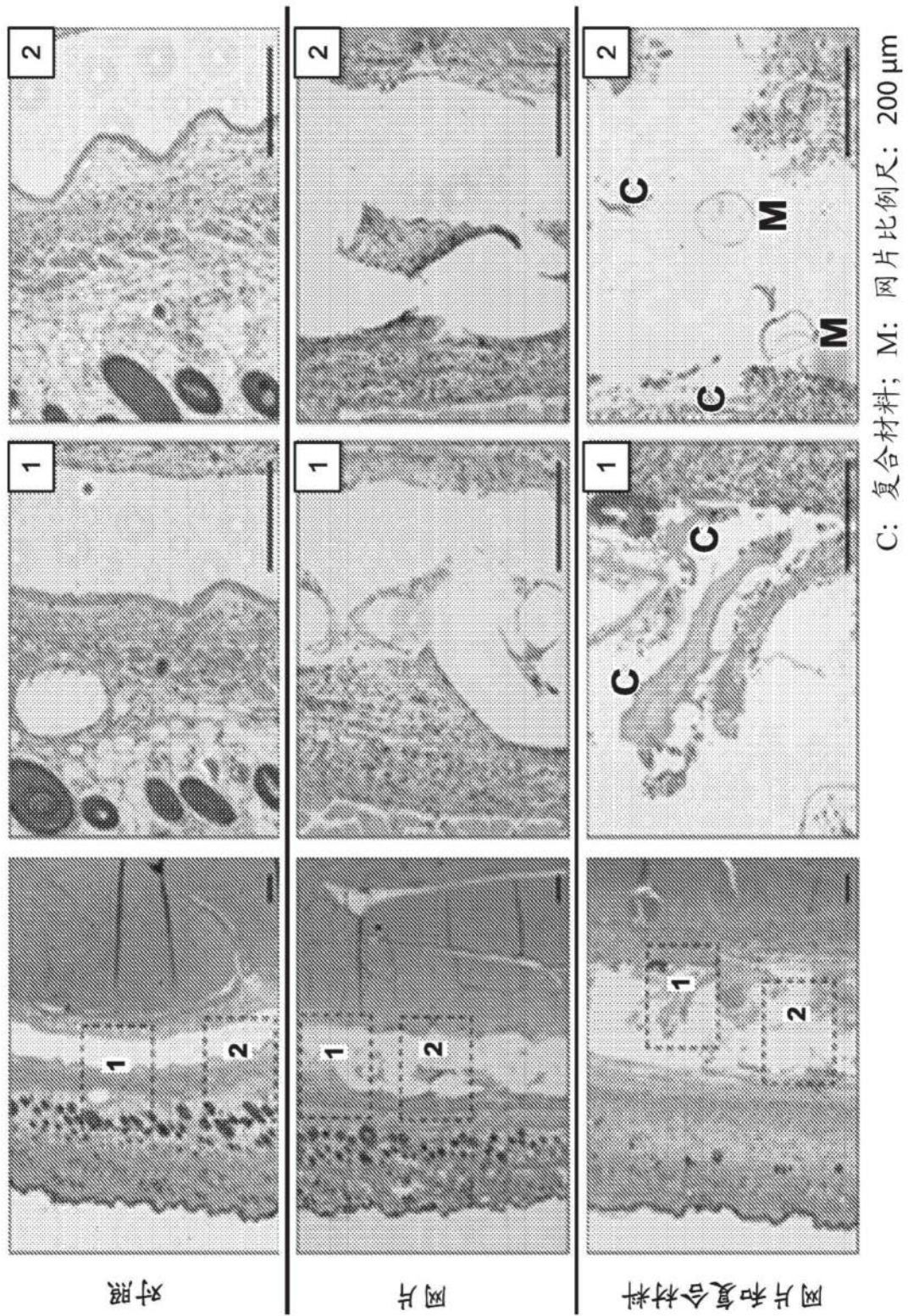


图27A

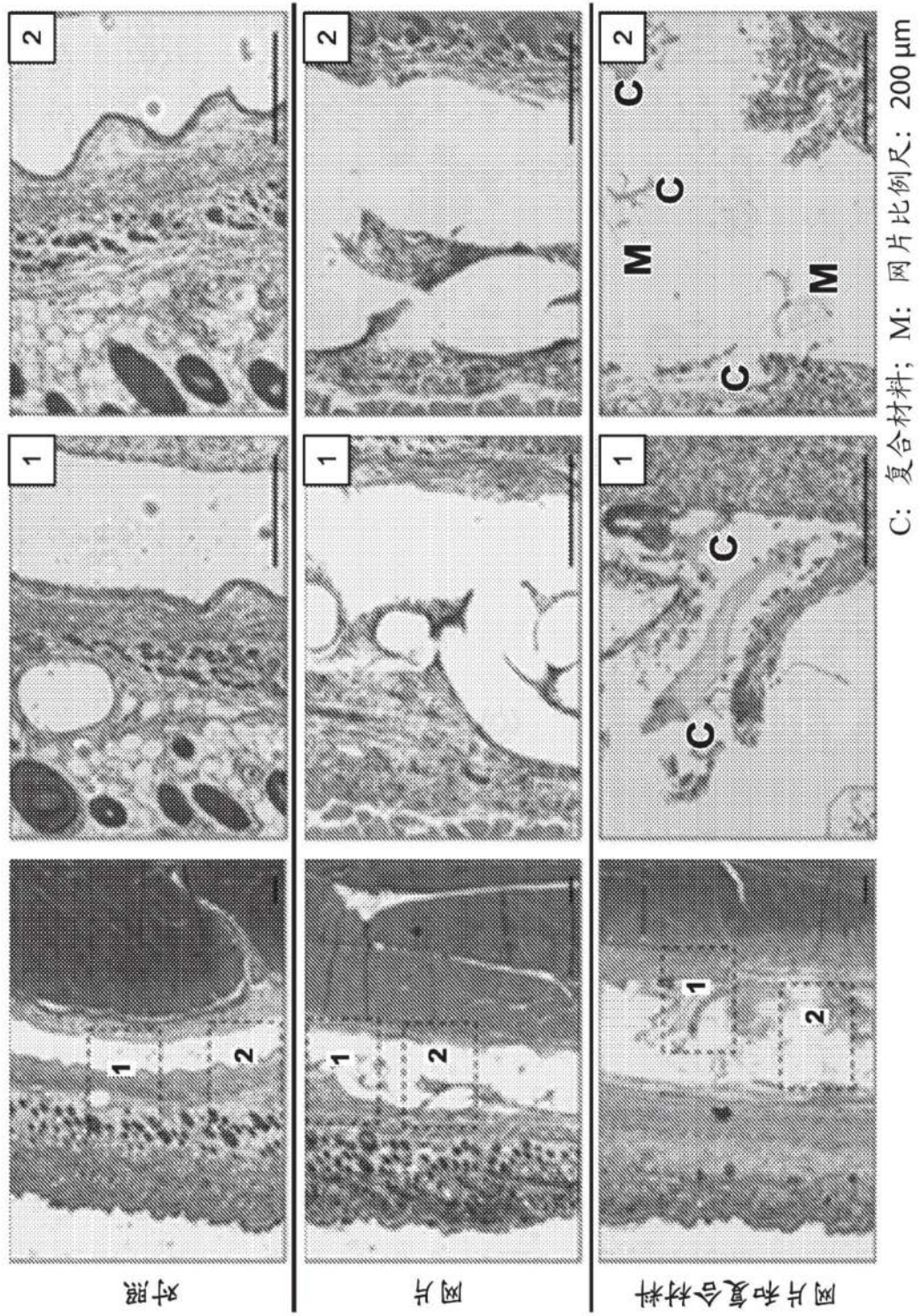


图27B