



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105358185 B

(45)授权公告日 2019.08.06

(21)申请号 201480032915.9

(22)申请日 2014.04.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105358185 A

(43)申请公布日 2016.02.24

(30)优先权数据
2013901223 2013.04.10 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2014/000391 2014.04.10

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/165917 EN 2014.10.16

(73)专利权人 墨尔本大学
地址 澳大利亚维多利亚

(72)发明人 安东·布伦科韦
贝尔卡伊·厄兹切利克 乔光华

(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 彭鲲鹏 郑斌

(51)Int.Cl.
A61L 27/18(2006.01)
A61F 2/00(2006.01)
C08G 63/668(2006.01)
C08G 65/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2005250914 A1,2005.11.10,说明书第
[0017]-[0022]、[0026]-[0037]段。
US 2005250914 A1,2005.11.10,说明书第
[0017]-[0022]、[0026]-[0037]段。
CN 1446109 A,2003.10.01,说明书第9页第
17-19行。
Berkay Ozcelik et al.Ultrathin
chitosan-poly(ethylene glycol) hydrogel
films for corneal tissue engineering.
《Acta Biomaterialia》.2013,第9卷(第5期),
6594-6605.

审查员 王田

权利要求书2页 说明书33页 附图17页

(54)发明名称

用于再生医学和组织工程的可生物降解的
网络聚合物

(57)摘要

本发明涉及通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物,包含所述可生物降解的聚醚网络聚合物的基质、植入物和支架,用于制备这类网络聚合物、植入物和支架的方法,以及使用包含所述网络聚合物的基质、植入物和支架的方法,特别是用于培养细胞和再生组织。

1. 通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其由包含以下的单体组合物形成:

包含多个羟基官能团的支链多官能聚醚单体, 其选自甘油乙氧基化物和季戊四醇乙氧基化物和

多官能交联单体, 其选自琥珀酰氯、己二酰氯、癸二酰氯、戊二酰氯、庚二酰氯、辛二酰氯和均苯三甲酰氯, 能够与所述聚醚单体的所述羟基官能团反应形成酯连接基, 和

多至20% (w/w) 的机械性能改性剂, 其为疏水的聚酯多元醇,

其中所述聚醚单体与所述交联单体的摩尔比为3:1至1:3, 并且

其中作为所述网络聚合物组分的所述疏水的聚酯多元醇通过其羟基官能团共价地结合入。

2. 根据权利要求1所述的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其含量为0.1%至15% (w/w) 的所述疏水的聚酯多元醇。

3. 根据权利要求1所述的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其含量为0.5%至10% (w/w) 的所述疏水的聚酯多元醇。

4. 根据权利要求1所述的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其中所述疏水的聚酯多元醇是二羟基聚(己内酯)。

5. 根据权利要求1所述的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其中聚醚单体与交联单体的摩尔比为1:2。

6. 根据权利要求1所述的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其中所述交联单体选自琥珀酰氯和癸二酰氯。

7. 根据权利要求1所述的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其中所述聚合物在为膜的形式时对可见光具有大于98%的透明度。

8. 根据权利要求1所述的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其中所述聚醚单体为甘油乙氧基化物, 所述交联单体为癸二酰氯, 并且所述疏水的聚酯多元醇为二羟基聚(己内酯)。

9. 用于制备通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物的方法, 所述方法包括在允许聚醚单体和交联单体之间形成酯连接基和通过其羟基官能团共价地结合入疏水的聚酯多元醇作为所述网络聚合物的组分的条件下, 使包含以下的单体组合物进行反应的步骤:

(i) 包含多个羟基官能团的支链多官能聚醚单体, 其选自甘油乙氧基化物和季戊四醇乙氧基化物,

(ii) 多官能交联单体, 其选自琥珀酰氯、己二酰氯、癸二酰氯、戊二酰氯、庚二酰氯、辛二酰氯和均苯三甲酰氯, 能够与所述聚醚单体的所述羟基官能团反应; 和

(iii) 多至20% (w/w) 的机械性能改性剂, 其为疏水的聚酯多元醇,

并且其中聚醚单体与交联单体的摩尔比为3:1至1:3。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述单体组合物含量为0.1%至15% (w/w) 的所述疏水的聚酯多元醇。

11. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述单体组合物含量为0.5%至10% (w/w) 的所述疏水的聚酯多元醇。

12. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述疏水的聚酯多元醇是二羟基聚(己内酯)。

13. 根据权利要求9所述的方法,其中聚醚单体与交联单体的摩尔比为1:2。
14. 根据权利要求9所述的方法,其中所述交联单体选自琥珀酰氯和癸二酰氯。
15. 根据权利要求9所述的方法,其中所述聚醚单体和所述交联单体之间的反应在室温下进行。
16. 根据权利要求9所述的方法,其中所述聚醚单体为甘油乙氧基化物,所述交联单体为癸二酰氯,并且所述疏水的聚酯多元醇为二羟基聚(己内酯)。
17. 眼部植入物,其包含含有根据权利要求1至8中任一项所述的可生物降解的聚醚网络聚合物的膜基质,以及接种到所述膜基质上的选自角膜上皮细胞和角膜内皮细胞的细胞。
18. 根据权利要求17所述的眼部植入物,其中当在水合状态时,所述膜基质的厚度在10 μm 至150 μm 的范围内。
19. 根据权利要求1至8中任一项所述的可生物降解的聚醚网络聚合物在制造用于植入到对象眼中以治疗角膜内皮功能障碍的眼部植入物中的用途,其中所述眼部植入物包含含有可生物降解的聚醚网络聚合物的膜基质以及接种到所述膜基质上的角膜内皮细胞。
20. 水凝胶,其包含被水性溶剂溶剂化的权利要求1至8中任一项所述的可生物降解的聚醚网络聚合物。

用于再生医学和组织工程的可生物降解的网络聚合物

技术领域

[0001] 本发明一般地涉及与生物环境兼容的可生物降解的网络聚合物。本发明特别地涉及通过酯连接基 (ester linkage) 交联的可生物降解的聚醚网络聚合物, 包含所述可生物降解的聚醚网络聚合物的基质、植入物和支架, 用于制备这类网络聚合物、植入物和支架的方法, 以及使用包含所述网络聚合物的基质、植入物和支架的方法, 特别是用于培养细胞和再生组织。

背景技术

[0002] 由于其在一系列生物医学应用 (例如组织工程) 中的潜力, 与生物环境兼容的聚合物材料特别令人感兴趣。已研究的用于这类应用中的聚合物材料通常是合成的或天然来源的。

[0003] 天然的聚合物材料例如胶原、藻酸盐、壳聚糖 (chitosan) 和羟磷灰石已用于制备靶向多种组织的组织工程应用中的支架。虽然这样的天然材料有许多优点, 但是关于其使用也存在某些问题, 例如, 批次与批次的差异、疾病传播的风险和免疫原性。此外, 获得这些天然材料所需的加工方法可影响其物理特性。例如, 虽然胶原在体内展示出高的机械强度, 但是由于天然交联的损失, 获取、分离和纯化的过程显著降低了这种性质。

[0004] 在另一方面, 合成的聚合物提供了胜过天然聚合物的某些优势。这些优势可包括批次与批次间差异的减少, 对聚合物结构的高度控制, 以及调整聚合物组成和特性以适合特定应用的能力。

[0005] 对于生物医学应用, 已经开发了基于聚醚聚合物的亲水性材料, 例如聚 (乙二醇) (PEG)。特别对 PEG 进行了广泛的研究, 原因是其水溶性、非毒性、极低免疫原性和抗蛋白质结垢性 (anti-protein fouling property), 并且 PEG 已被美国食品和药品管理局 (FDA) 批准用于药物和化妆品应用。在体外和体内的多种研究已证实 PEG 制造的材料具有期望的生物相容性。

[0006] 对于细胞培养和组织工程应用, 已经研究了基于聚醚的交联聚合物网络聚合物和水凝胶例如 PEG, 并且多个研究小组已经对使用多种反应条件来构建 PEG 水凝胶进行了报道。然而, 虽然 PEG 聚合物和水凝胶一般是生物相容的, 但是它们通常不是可生物降解的。

[0007] 已经通过将基于聚 (α 羟基酸) (例如聚 (乳酸) 和聚 (乙醇酸)) 的聚合物片段结合入 (incorporation) 水凝胶中制备了可降解的 PEG 水凝胶。然而, 将聚 (α 羟基酸) 片段结合入 PEG 水凝胶中的一个问题是, 聚 (α 羟基酸) 片段可以是非常疏水的, 这可能是刺激主要的异物反应的重要因素。聚 (α 羟基酸) 片段的另一个问题是当它们降解时, 它们能够产生高局部浓度的酸, 其可刺激炎症反应。

[0008] 期望提供可解决或改善与现有的材料相关的一个或多个缺点和不足之可生物降解的聚醚网络聚合物和/或至少提供此类材料的可用的替代物。

发明内容

[0009] 在一个方面,本发明提供了通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物,其是通过使包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的单体组合物聚合而制备的,其中所述聚醚单体和所述交联单体之一包含羟基官能团并且所述聚醚单体和所述交联单体之另一包含能够与所述羟基官能团反应形成酯连接基的互补官能团(complementary functional group),且其中选自聚醚单体和交联单体的至少一者是支链的。

[0010] 聚醚网络聚合物通过聚醚单体和交联单体之间形成的酯连接基交联。酯连接基在生理条件下和水解作用下可水解,使得网络聚合物发生降解。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了用于制备通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物的方法,所述方法包括在允许所述聚醚单体和所述交联单体之间形成酯连接基的条件下,使包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的单体组合物进行反应的步骤,其中所述聚醚单体和所述交联单体之一包含羟基官能团并且所述聚醚单体和所述交联单体之另一包含能够与所述羟基官能团反应形成酯连接基的互补官能团,且其中选自所述聚醚单体和所述交联单体的至少一者是支链的。

[0012] 根据本发明的一个或更多个方面,聚醚单体和交联单体之一包含羟基官能团,而聚醚单体和交联单体之另一包含能够与羟基官能团反应以形成酯连接基的互补官能团。在一组实施方案中,互补官能团选自羧酸、羧酸酯、羧酸酐和羧酰卤化物(carboxylic acid halide)。在一组具体的实施方案中,所述互补官能团是羧酰卤化物。

[0013] 为了能够形成聚醚网络聚合物,所述聚醚单体和所述交联单体的至少一种必须是支链的。在一个实施方案中,所述聚醚单体是支链的。

[0014] 在本发明的一个或更多个方面的实施方案中,所述聚醚单体包含多个羟基官能团。因此在这样的实施方案中,所述交联单体包含互补官能团。

[0015] 在一些实施方案中,聚醚单体是支链的并且具有式(I)的结构:

[0016] $A(BX)_n$ (I)

[0017] 其中:

[0018] A是n价核心;

[0019] B是聚醚链段;

[0020] X是羟基官能团;并且

[0021] n表示(BX)基团的数目且至少为3。

[0022] 在一些实施方案中,在聚醚网络聚合物的制备中使用的聚醚单体包含衍生自C2-C3二元醇的聚醚链段。

[0023] 在一组实施方案中,聚醚单体中的聚醚链段各自具有选自约100Da至约10,000Da、约150Da至约5000Da和约200Da至约1000Da范围内的分子量。

[0024] 在一些实施方案中,所述聚醚单体选自甘油乙氧基化物和季戊四醇乙氧基化物。

[0025] 在本发明的一个或更多个方面的实施方案中,所述交联单体包含至少两个能够与羟基官能团反应以形成酯连接基的互补官能团。在特定的一组实施方案中,所述交联单体包含至少两个羧酰卤化物官能团。

[0026] 在一种形式中,所述交联单体可具有式(II)的结构:

[0027] $R(Y)_m$ (II)

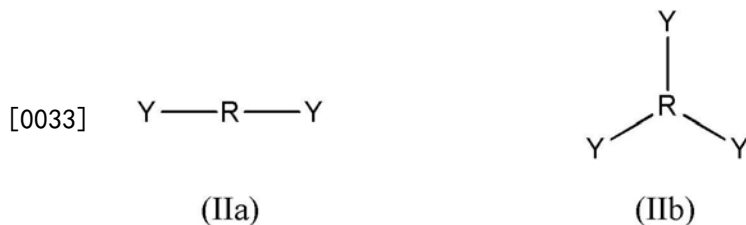
[0028] 其中：

[0029] R是烃基；

[0030] Y是选自羧酸、羧酸酯、羧酸酐和羧酰卤化物的互补官能团(优选羧酰卤化物官能团)；并且

[0031] m表示Y基团的数目且至少为2。

[0032] 在一些实施方案中,式(II)的交联单体可具有式(IIa)或(IIb)的结构：



[0047] 在另一个方面,提供了可植入装置,其包括包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物的基质以及接种到该基质上的细胞。

[0048] 在另一个方面,提供了支架,其包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物。在一些实施方案中,所述支架是多孔海绵的形式。

[0049] 在本发明的另一个方面,提供了用于制备通过酯连接基交联的多孔可生物降解的聚醚网络聚合物的方法,所述方法包括在允许形成通过酯连接基交联的聚醚网络聚合物且在原位生成在网络聚合物内产生多个孔的气态缩合物的条件下,使包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的单体组合物进行反应的步骤,其中聚醚单体和交联单体的一种包含羟基官能团且聚醚单体和交联单体的另一种包含能够与所述羟基官能团反应形成酯连接基的互补官能团,其中选自所述聚醚单体和交联单体的至少一种是支链的。

[0050] 本发明还提供了在对象中再生组织的方法,所述方法包括在对象的期望部位植入包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物的支架的步骤。在一组实施方案中,所述组织是脂肪组织且所述支架植入到对象的乳房区域中。

[0051] 本发明还提供了培养细胞的方法,其包括在细胞培养的条件下,使细胞与包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物的基质相接触的步骤。

[0052] 本发明还提供了制备可植入装置的方法,其包括提供包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物的基质和用细胞接种该基质的步骤。在一种形式中,所述装置是用于在对象的眼中植入的眼植入物且所述细胞选自角膜上皮细胞和角膜内皮细胞。

[0053] 本发明还提供了用于治疗对象的病患或病症的方法,其包括以下步骤:提供包含含有根据本文描述的一个或更多个实施方案之可生物降解的聚醚网络聚合物的基质的可植入装置并将细胞接种在基质上,以及在对象需要治疗的部位植入所述装置。在一些实施方案中,疾病或病患是角膜内皮功能障碍,且所述方法包括在对象的眼睛中植入包含接种在基质上的角膜内皮细胞的装置的步骤,所述基质包含根据本文描述的一个或更多个实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物。

附图说明

[0054] 本文将仅参考附图举例说明本发明的优选实施方案,其中:

[0055] 图1是说明根据本发明的一个实施方案的通过甘油乙氧基化物(GE)、癸二酰氯(SebCl)和二羟基PCL的反应合成可生物降解的聚醚网络聚合物的方案。

[0056] 图2示出了说明根据本发明的一些实施方案的具有不同量之机械性能改性剂(PCL)的可生物降解的聚醚网络聚合物在8周内的体外降解谱的图。

[0057] 图3示出了说明根据本发明的一些实施方案的(a)聚合物条件培养基和(b)含有不同量的PCL的可生物降解聚醚网络聚合物的降解产物之细胞毒性评估之结果的图。

[0058] 图4示出了根据本发明的一个实施方案的(a)在组织培养板上培养的绵羊角膜内皮细胞(corneal endothelial cell, CEC)的显微图像,以及(b)在具有5wt% PCL的可生物降解的聚醚网络聚合物上培养的CEC的显微图像。

[0059] 图5示出了(a)对照和(b)植入绵羊角膜的可生物降解的聚醚网络聚合物(PHF)在植入后28天H&E染色切片的显微图像。

[0060] 图6是示出了根据本发明的一个实施方案使用季戊四醇乙氧基化物(PE)和癸二酰氯(SebCl)制造可生物降解的多孔PEG海绵的方案。

[0061] 图7示出了本发明的一个实施方案的可生物降解的多孔PEG海绵的扫描电子显微镜(SEM)图像。

[0062] 图8示出了(a)说明本发明的一个实施方案在对用季戊四醇乙氧基化物(PE)、癸二酰氯(SebCl)和PCL(2wt%)制备的可生物降解的多孔PEG海绵进行30个压缩循环之压缩应力(compressive stress)相对应变的曲线图,和(b)说明了本发明的一些实施方案的多种可生物降解的多孔PEG海绵的压缩模量(compressive moduli)的图。

[0063] 图9是示出了本发明的一个实施方案的可生物降解的多孔PEG海绵在8周内(PBS, 37°C)的体外降解的图。

[0064] 图10示出了说明(a)多孔PEG海绵条件培养基和(b)多孔PEG海绵降解产物的细胞毒性评估之结果的图。

[0065] 图11示出了以下图像:(a)在植入和缝合之前,本发明的一个实施方案的用季戊四醇乙氧基化物(PE)和癸二酰氯(SebCl)以及PCL(2wt%)制备的可生物降解的多孔PEG海绵,(b)背侧皮下袋的制备,(c)插入到背侧袋的可生物降解的多孔PEG海绵,(d)在2周时可生物降解的多孔PEG海绵外植体的宏观横截面,(e)在8周时可生物降解的多孔PEG海绵外植体的宏观横截面,(f)在8周时可生物降解多孔PEG海绵外植体之放大的横截面,在2周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵外植体的(g)1.25×,(h)10×和(i)20×放大倍率的H&E染色切片和在8周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵外植体的(j)1.25×,(k)10×和(l)20×放大倍率的H&E染色切片。

[0066] 图12示出了(a)16周后,植入的本发明的一个实施方案的用季戊四醇乙氧基化物(PE)和癸二酰氯(SebCl)以及PCL(2wt%)制备的可生物降解的多孔PEG海绵的位置,(b)在16周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵的宏观横截面,(c)其中植入了可生物降解的多孔PEG海绵之组织的H&E染色切片,在2周取出的可生物降解的多孔PEG海绵的(d)1.25×,(e)10×和(f)20×放大倍率的ED1染色切片,在8周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵的(g)1.25×,(h)10×和(i)20×放大倍率的ED1染色切片,和在16周时在植入位置之组织的(j)1.25×,(k)10×和(l)20×放大倍率的ED1染色切片。

[0067] 图13示出了本发明的一个实施方案之用盐模板与(a)琥珀酰氯交联单体和2wt%的PCL(b)癸二酰氯交联单体和2wt%的PCL和(c)均苯三甲酰氯交联单体和2wt%的PCL形成的可生物降解的多孔PEG海绵的Enviro-SEM图像。

[0068] 图14示出了(a)说明根据本发明的一些实施方案的用盐模板与不同wt%的PCL制备的可生物降解的多孔PEG海绵的压缩模量的图,和(b)说明一个实施方案的用盐模板、癸二酰氯交联单体和2wt%的PCL制备的可生物降解的多孔PEG海绵在15个压缩循环过程中的压缩应力相比应变的曲线图。

[0069] 图15说明了示出根据本发明的一些实施方案的用不同的交联单体和盐模板制备的可生物降解的多孔PEG海绵在8周内(PBS, 37°C)的体外降解的图。

[0070] 图16示出了说明(a)条件培养基和(b)从用不同的交联单体制备的本发明的一些实施方案之多孔PEG海绵获得的降解产物的细胞毒性评估的结果。

[0071] 图17示出了(a)根据本发明的一些实施方案的用于植入用盐模板和癸二酰氯交联

单体制备的可生物降解的多孔PEG海绵之制备的皮下袋, (b) 植入和缝合前的可生物降解的多孔PEG海绵, (c) 插入并缝合到背侧袋的可生物降解的多孔PEG海绵。 (d) 在2周后, 在从植入位置切除之前可生物降解的多孔PEG海绵, (e) 在2周时, 可生物降解的多孔PEG海绵外植体的宏观横截面, (f) 在8周时, 可生物降解的多孔PEG海绵外植体, 在2周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵的 (g) 1.25 \times , (h) 10 \times 和 (i) 20 \times 放大倍率的H&E染色切片, 在8周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵 (j) 1.25 \times 、(k) 10 \times 和 (l) 20 \times 放大倍率的H&E染色切片。

[0072] 图18示出了 (a) 在16周取出的根据本发明的一些实施方案的用盐模板和癸二酰氯交联单体制备的可生物降解的多孔PEG海绵之宏观横截面, 植入可生物降解的多孔PEG海绵外植体之组织的 (b) 1.25 \times 、(c) 10 \times 放大倍率的H&E染色切片, 在2周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵的 (d) 1.25 \times 、(e) 10 \times 和 (f) 20 \times 放大倍率的ED1染色切片, 在8周时取出的可生物降解的多孔PEG海绵的 (g) 1.25 \times 、(h) 10 \times 和 (i) 20 \times 放大倍率的ED1染色切片, 以及在16周时在植入位置之组织的 (j) 1.25 \times 、(k) 10 \times 和 (l) 20 \times 放大倍率的ED1染色切片。

具体实施方式

[0073] 本发明涉及通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物和用于制备这些网络聚合物的方法。包含在聚醚网络聚合物中的酯连接基是可生物降解的且在生物环境中是可水解和/或酶促裂解的, 使得交联的网络聚合物分解。从网络聚合物的分解产生的降解产物对于身体基本上是无毒的。

[0074] 本文相对于物质、连接基或基团所使用的术语“可降解的”和“可生物降解的”意味着该物质、连接基或基团在生理条件下或在生物环境中随着时间的推移易于降解、裂解或破碎。在选定的生理或生物条件下, 此类降解、裂解或碎片可通过合适的不稳定部分的化学分解 (例如, 通过水解或还原) 而发生。当相对于聚合物物质使用时, 术语“可降解的”和“可生物降解”表明该聚合物包含合适的不稳定或可降解的部分作为该聚合物分子结构的一部分。聚合物中一种或更多种可降解部分的裂解或分解通常导致聚合物碎裂为单体和/或低分子量的聚合物片段。

[0075] 在一个方面, 本发明提供了通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物, 其是通过使包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的单体组合物聚合而制备的, 其中聚醚单体和交联单体之一包含羟基官能团并且聚醚单体和交联单体之另一包含能够与所述羟基官能团反应形成酯连接基的互补官能团, 且其中选自聚醚单体和交联单体中的至少一者是支链的。

[0076] 为了形成可生物降解的聚醚网络聚合物, 使用包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的单体组合物。存在于所述单体组合物中的聚醚单体和交联单体各自包含能够共价反应的官能团以便聚合并形成可生物降解的聚醚网络聚合物。由聚合反应形成的聚醚网络聚合物是固体且不溶的聚合物基质。

[0077] 包含在单体组合物中的聚醚单体和交联单体中的至少一种是支链的。在一些实施方案中, 聚醚单体是支链的。在另一些实施方案中, 交联单体是支链的。当一种单体是支链的时, 另一种单体可以是直链的或支链的。

[0078] 在一些实施方案中, 聚醚单体是支链的, 其中支化度至少为3。在这样的实施方案中, 交联单体可以是直链的或支链的。在一组实施方案中, 其中聚醚单体是支链的, 交联单

体是直链的。

[0079] 包含在单体组合物中的聚醚单体和交联单体是多官能的,每个单体包含多个官能团。多官能的单体包含两个或更多个官能团。然而,当单体是支链的时,该单体通常将包含至少3个官能团。

[0080] 根据本发明,聚醚单体和交联单体的一种包含羟基官能团,而聚醚单体和交联单体的另一种包含能够与羟基官能团反应以形成酯连接基的互补官能团。

[0081] 如本文所使用的术语“连接基”指的是作为两个互补官能团之间的共价化学反应的结果而形成的基团。

[0082] 与羟基反应的互补官能团可选自羧酸、羧酸酯、羧酸酐和羧酰卤化物官能团。在一组实施方案中,互补官能团是羧酰卤化物基团。

[0083] 如将在下面进一步解释的,在制备可生物降解的聚醚网络聚合物中使用包含羟基官能团和羧酰卤化物官能团的单体可以是有利的,原因是从这样单体的共价反应产生的缩合物可帮助生成多孔网络聚合物结构。

[0084] 在一组实施方案中,所述单体组合物包含含有多个羟基官能团的聚醚单体。存在于聚醚单体中的官能团的数目可取决于聚醚单体是直链的或是支链的。在一组实施方案中,聚醚单体是直链的聚醚多元醇、支链的聚醚多元醇或其混合物。

[0085] 在一组实施方案中,单体组合物包含含有两个羟基官能团的直链聚醚单体。这样的直链聚醚单体在本文中可指直链聚醚二醇。直链聚醚单体可包含衍生自C2-C3二元醇的聚醚链段。合适的直链聚醚单体包括聚(乙二醇)和聚(丙二醇),如由以下通式所示:

[0086] $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p\text{H} \quad \text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_q\text{H}$

[0087] 其中p和q分别表示重复的氧化乙烯基或氧化丙烯基单元的数目。

[0088] 存在于单体组合物中的直链聚醚二醇的分子量可在选自约100Da至10,000Da、约150Da至5000Da和约200Da至1000Da的范围内。

[0089] 在一组实施方案中,单体组合物可包含含有至少三个羟基官能团的支链聚醚单体。在这样的实施方案中,所述聚醚单体可具有式(I)的结构:

[0090] $\text{A}(\text{BX})_n \quad (\text{I})$

[0091] 其中:

[0092] A是n价核心;

[0093] B是聚醚链段;

[0094] X是羟基官能团;并且

[0095] n表示(BX)基团的数目且至少为3。

[0096] 在式(I)中,A表示中心的n价核心部分,其适用于形成支链聚醚单体。在一些实施方案中,聚醚单体可以是星形的,其中多个臂从中央核心辐射。在这样的实施方案中,A表示星的核心,星的臂由基团(BX)表示。

[0097] 可通过改变核心部分A的性质而改变聚醚单体的支化度(由n表示),不同的支化度可用于控制聚醚网络聚合物的机械性能和物理特性。在式(I)的一些实施方案中,n为选自3、4、6和8的整数。

[0098] 在式(I)的一些实施方案中,A可衍生自多价化合物,所述多价化合物选自甘油、甘油低聚物、季戊四醇、季戊四醇低聚物、山梨糖醇、三羟甲基丙烷和二(三羟甲基丙烷)。

[0099] 在式(I)中,B表示聚醚单体的聚醚链段。聚醚链段可衍生自C2-C3二元醇。在特定的实施方案中,聚醚链段各自包含聚(乙二醇)(PEG)。

[0100] 当式(I)的单体是星形时,星的每个臂可包含分子量在约100Da至10,000Da、约150Da至5000Da和约200Da至1000Da范围内的聚醚链段。在一些实施方案中,聚醚链段各自包含具有选自上述范围内的分子量的聚(乙二醇)。聚醚链段的分子量将决定臂的长度并可能影响所得聚醚网络聚合物的某些物理特性,例如,水相容性或亲水性。

[0101] 在一些实施方案中,包含聚(乙二醇)(PEG)链段的聚醚单体可以是有利的,原因是聚(乙二醇)是生物相容的、亲水的、非毒性和非免疫原性的。由其中包含PEG的网络聚合物之分解中产生的聚合物片段也可通过正常的排泄途径很容易地从体内清除。

[0102] 在一组实施方案中,所述单体组合物可包含选自甘油乙氧基化物和季戊四醇乙氧基化的支链聚醚单体。

[0103] 用包含PEG的聚醚单体制备的可生物降解的聚醚网络聚合物可被认为是可生物降解的聚(乙二醇)网络聚合物。

[0104] 当单体组合物包含含有多个羟基官能团的聚醚单体时,也存在于单体组合物中的交联单体包含与聚醚单体中的羟基官能团互补的多个官能团。互补官能团能够与羟基官能团反应形成酯连接基。

[0105] 在一些实施方案中,所述交联单体可包含选自羧酸、羧酸酯、羧酸酐和羧酰卤化物官能团的多个互补官能团。在一组实施方案,所述交联单体包含至少两个羧酰卤化物官能团。

[0106] 当聚醚单体是支链的时,交联单体可以是直链的或支链的。

[0107] 当聚醚单体是直链的(例如直链聚醚二醇)时,交联单体一定是支链的。

[0108] 在一组实施方案中,交联单体具有式(II)的结构:

[0109] $R(Y)_m$ (II)

[0110] 其中:

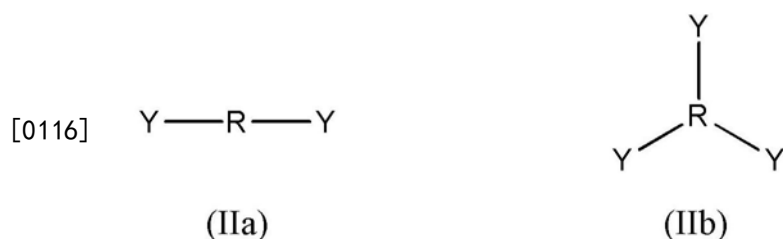
[0111] R是烃基;

[0112] Y是选自羧酸、羧酸酯、羧酸酐和羧酰卤化物(优选羧酰卤化物)的互补官能团;并且

[0113] m表示Y基团的数目且至少为2。

[0114] 交联单体包含至少两个互补的官能团,在式(II)中,互补官能团的数目由集合m表示。在式(II)中,m至少为2,且在一些实施方案中,m可以是3或更大。

[0115] 在一些实施方案中,式(II)的交联单体可具有式(IIa)或(IIb)的结构,其中在式(II)中m是2或3:



[0117] 在式(IIa)和(IIb)的单体中,R和Y可选自本文对式(II)所限定的基团。

[0118] 在一种形式中,在式(II)、(IIa)或(IIb)的交联单体中由Y表示的互补官能团在每

次出现时可以是羧酰卤化物官能团。当Y是羧酰卤化物官能团时,官能团的卤化物部分可选自通常所使用的那些卤化物中的任一种。在一些实施方案中,羧酰卤化物官能团的卤化物部分可选自氟化物、氯化物、溴化物和碘化物,优选氯化物和溴化物。在一种形式中,羧酰卤化物官能团可以是羧酰氯化物(carboxylic acid chloride)官能团或羧酰溴化物(carboxylic acid bromide)官能团。

[0119] 在式(II)、(IIa)的和(IIb)的交联单体中存在的烃基R可选自直链烃基、支链烃基、环烃基或芳香烃基。在一些实施方案中,R是包含2至12个碳原子的直链烃基、支链烃基、环烃基或芳香烃基。在一些实施方案中,R是包含8至12个碳原子的直链烃基、支链烃基、环烃基或芳香烃基。在一些实施方案中,这样的基团可认为是疏水性烃基。

[0120] 在本发明的一些实施方案中,用于制备可生物降解的聚醚网络聚合物的单体组合可包含选自琥珀酰氯、己二酰氯、癸二酰氯、戊二酰氯、庚二酰氯、辛二酰氯、均苯三甲酰氯及其组合的交联单体。交联单体的选择可用于控制聚醚网络聚合物的溶胀程度、降解速率和机械性能。例如,可采用包含疏水性烃基的交联单体通过平衡由聚醚单体提供的亲水性来降低水溶胀性和改善聚合物网络的拉伸特性。

[0121] 在一些实施方案中,单体组合物包含选自琥珀酰氯和癸二酰氯的交联单体可以是有利的。使用例如琥珀酰氯和癸二酰氯的单体可以是有利的,原因是在生物环境中一旦网络聚合物分解,这样的单体能够被转换成琥珀酸和癸二酸。琥珀酸和癸二酸是生物相容的且毒性极低。例如,癸二酸是天然存在于细胞中的二羧酸且是脂肪酸氧化的中间物,而琥珀酸是三羧酸循环/柠檬酸循环的中间物。

[0122] 在制备可生物降解的聚醚网络聚合物中所使用的单体组合物可包含任何合适量的聚醚单体和交联单体。在一些实施方案中,所述单体组合物可包含摩尔比在约5:1至1:5或约3:1至1:3范围内的聚醚单体与交联单体。在一个实施方案中,在单体组合物中聚醚单体与交联单体的摩尔比为约1:2。可期望具有过量的交联单体以确保形成足够数目的交联,尤其是如果使用直链交联单体时。

[0123] 在一组实施方案中,用于制备可生物降解的聚醚网络聚合物的单体组合物可还包含机械性能改性剂。机械性能改性剂用于帮助控制聚醚网络聚合物的机械性能,例如拉伸特性。旨在在于用于再生医学和组织工程应用中的材料的机械性能对于促进期望的细胞和组织相互作用以及确保植入物的机械完整性是重要的。

[0124] 机械性能改性剂可以选自多至20% (w/w)、多至15% (w/w) 和多至约10% (w/w) 的量存在于单体组合物中。

[0125] 在一些实施方案中,所述机械性能改性剂可以是疏水性大分子,例如疏水性聚合物或疏水性低聚物。与疏水聚合物相比,疏水性低聚物通常包括较少的单体重复单元。例如,疏水性低聚物可包含不超过10个单体重复单元。优选地,所述疏水性大分子是生物相容的且对生物环境的毒性极低。

[0126] 疏水性大分子可以比聚醚网络聚合物(其通常可以是亲水的)更硬。因此包含疏水性大分子可以改变网络聚合物的机械性能。

[0127] 在水性环境中疏水性大分子通常也可改善该亲水性聚醚网络聚合物的溶胀性。可按照平衡溶胀率(equilibrium swelling ratio, ESR%) 测量网络聚合物的水溶胀性,其是根据等式(1)计算的:

[0128] $ESR\% = (W_s - W_d) / W_d \times 100\%$ (1)

[0129] 其中 W_s 和 W_d 分别指网络聚合物的溶胀重量和干重。

[0130] 包含疏水性大分子可限制对于聚醚网络聚合物而获得的ESR%。在一些实施方案中,聚醚网络聚合物展现出极低溶胀(低ESR%)可以是有利的,原因是这能够保证使用聚醚网络聚合物制备的任何植入物一旦暴露于含水生物环境中,将呈现出物理尺寸的最小变化。

[0131] 在一组实施方案中,用作机械性能改性剂的疏水性分子是可生物降解的并且包含在生物环境中能够降解的官能团。通过此意味着疏水性大分子在生物环境中可能易于水解和/或酶促裂解等,导致在生物环境中大分子能够分解成低分子量的降解产物。在一组实施方案中,机械性能改性剂是含有选自酯、酰胺、尿烷(氨基甲酸酯)和二硫化物官能团及其混合物的至少一种官能团的疏水性分子。

[0132] 在一组实施方案中,疏水性大分子可以是疏水性聚酯多元醇。示例性的疏水性聚酯多元醇是二羟基聚(己内酯)。因为聚酯多元醇包含羟基官能团,所以聚酯多元醇能够与包含互补官能团的单体进行共价反应,从而导致共价地结合入聚酯多元醇作为聚醚网络聚合物的组分。另外,在聚酯多元醇中的酯基可以易于水解或酶促裂解,从而使得随着网络聚合物降解通过产生低分子量的碎片而除去疏水性大分子。在一组实施方案中,聚酯多元醇也可包含二硫化物基团。在生物环境中二硫化物基团可能易于还原或酶促裂解并且可促进聚酯多元醇的降解。

[0133] 在一组实施方案中,可生物降解的聚醚网络聚合物可包含选自0%至20% (w/w)、0.1%至15% (w/w) 和约0.5%至10% (w/w) 的量的聚酯多元醇。在一个实施方案中,聚酯多元醇是二羟基聚(己内酯)。

[0134] 可以以一步反应制备可生物降解的聚醚网络聚合物,其中形成包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的混合物,然后使单体的混合物共价反应足够长的时间以形成聚醚网络聚合物。

[0135] 在另一个方面,本发明提供了用于制备通过酯连接基交联的可生物降解的聚醚网络聚合物的方法,该方法包括在允许聚醚单体和交联单体之间形成酯连接基的条件下,使包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的单体组合物进行反应的步骤,其中聚醚单体和交联单体之一包含羟基官能团并且聚醚单体和交联单体之另一包含能够与羟基官能团反应形成酯连接基的互补官能团,且其中选自聚醚单体和交联单体的至少一者是支链的。

[0136] 单体组合物可包含选自本文所述的那些中任一项的聚醚单体和交联单体。

[0137] 单体组合物还可包含如本文所述的机械性能改性剂。

[0138] 在一些实施方案中,所述单体组合物包含溶剂。该溶剂可以是有机溶剂。该溶剂可帮助溶解聚醚单体和交联单体,从而能够获得均匀的单体组合物。这可能是有用的,因为这样的单体组合物(例如甘油乙氧基化物和季戊四醇乙氧基化物)是水溶性的,而交联单体例如二羧酰卤化物是水不溶性的。因此,在不存在添加的溶剂的情况下,将单体混合在一起可能会遇到困难。在另一些实施方案中,单体组合物不含添加的溶剂。

[0139] 本领域技术人员将理解,羟基官能团和互补官能团之间的共价反应通常产生缩合物。缩合物通常是小分子,其作为官能团之间共价反应的副产物被除去。

[0140] 在一个实施方案中,互补官能团为酰氯化物,且酰氯化物与羟基官能团之间的反

应产生盐酸(HCl)作为缩合物。使用酰氯化物-羟基化学反应来形成聚醚网络聚合物的一个优点是,反应不仅产生可生物降解的酯连接基,该反应还相对迅速和高效率地进行,减少了使用偶联剂或其他添加剂(如可在现有技术方法中使用的)以促进聚合物形成的需求。此外,酰氯化物-羟基反应不需要特别的反应条件(例如无氧环境),而通过自由基聚合形成的网络聚合物可能需要特殊的反应条件。

[0141] 用于制备可生物降解的聚醚网络聚合物的方法可在室温或在升高的温度下进行。聚醚单体和交联单体之间的反应可以是放热的,从而导致温度随着单体之间反应的进行而升高并形成聚醚网络聚合物。单体之间的反应可促进生成气态形式的缩合物。例如,包含酰氯化物官能团和羟基官能团的单体之间的反应可生成气体形式的盐酸。气态缩合物在聚醚网络聚合物中产生孔。

[0142] 在一组实施方案中,可生物降解的聚醚网络聚合物可以是多孔的,孔具有在约1nm至3mm范围内的平均孔直径。在一些实施方案中,可生物降解的聚醚网络聚合物可具有包括互连的孔的结构。

[0143] 孔是由于在气态缩合物的气泡周围形成网络聚合物而形成的,而气态缩合物是在单体组合物的聚合过程中在原位生成的。在原位生成气体的优点是不再需要使用试剂例如表面活性剂以产生包含孔的多孔结构,所述孔足够大以允许养分迁移以及支持细胞生长、组织渗透和血管形成。

[0144] 还可通过使用成孔剂在聚醚网络聚合物中产生孔。因此,在其中期望多孔的可生物降解的聚醚网络聚合物的一些实施方案中,用于制备聚合物的单体组合物还可包含固体成孔剂。因此,在存在成孔剂的情况下,聚醚单体与交联单体发生共价反应以形成多孔的聚醚网络聚合物。在除去成孔剂之后,得到多孔的网络聚合物。使用成孔剂形成多孔网络聚合物可以是有利的,原因是成孔剂将对在网络聚合物中产生的孔径提供更好的控制。

[0145] 在一个实施方案中,所述单体组合物还包含成孔剂颗粒。所述颗粒可具有选自约50 μm 至1000 μm 、约100 μm 至700 μm ,或约300 μm 至600 μm 范围内的颗粒直径。在一些实施方案中,成孔剂颗粒是水溶性的。在一个实施方案中,成孔剂颗粒是盐颗粒。盐颗粒通常包含合适的盐,例如氯化钠。盐颗粒可以是融合的盐颗粒,其可在潮湿的气氛中形成。使用融合的盐颗粒的一个优点是,它们可形成大粒径的水溶性成孔剂颗粒(例如,约100 μm 至700 μm)。融合的盐颗粒也可有助于在聚醚网络聚合物中形成互连的孔。

[0146] 可在聚合物形成后,随后除去成孔剂颗粒以得到多孔的交联的聚醚网络聚合物。可通过以下除去成孔剂颗粒:向网络聚合物引入适当的溶剂,然后使成孔剂溶解在溶剂中并因此从聚合物中浸出。其中成孔剂颗粒是水溶性的,水可用作用于除去颗粒的溶剂。因为聚醚网络聚合物是三维交联的大分子结构,所以其不溶于该溶剂。

[0147] 可生物降解的聚醚网络聚合物是三维交联的大分子结构,其通常不溶于一系列溶剂。在一些实施方案中,可生物降解的聚醚网络聚合物能够在所选择的溶剂中溶胀。在一些实施方案中,可生物降解的聚醚网络聚合物能够在含水溶剂中溶胀。这可由于在网络聚合物的制备中所用的聚醚单体的亲水性和/或网络聚合物的多孔性而发生。一经在含水溶剂中溶胀,网络聚合物可类似于凝胶。因此,在这样的实施方案中,可认为可生物降解的聚醚网络聚合物是水凝胶。

[0148] 多孔网络聚合物的孔径可对机械性能产生影响。不同的工艺条件可产生具有不同

模量的多孔可生物降解的聚醚网络聚合物。能够通过改变孔隙率来调整多孔网络聚合物的压缩模量将允许把网络聚合物的机械性能、用网络聚合物制备的可植入装置和支架的性能调整到适合一系列组织类型,例如脂肪、肾脏、前列腺组织和心肌。

[0149] 本发明的可生物降解的聚醚网络聚合物可用于一系列应用。

[0150] 在一个方面,提供了体外细胞培养基质,其包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物。在一种形式中,细胞培养基质为膜的形式。所述膜可以是纳米多孔膜,具有孔直径在纳米范围内的孔。纳米多孔膜将允许支持细胞生长所需的营养物质和液体进行转移。

[0151] 在另一个方面,提供了可植入装置,其包括基质以及接种到该基质上的细胞,所述基质包含根据本文所述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物。

[0152] 如果需要的话,可植入装置还可包括生长因子和/或促进特定类型的细胞生长或增殖的其他生物和化学实体。

[0153] 在一种形式中,可植入装置是用于在对象的眼中植入的眼科装置,且细胞选自角膜上皮细胞和角膜内皮细胞。

[0154] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了眼部植入物,其包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物之基质和接种到该基质上的选自角膜上皮细胞和角膜内皮细胞的细胞。

[0155] 优选地,眼部植入物的基质对可见光具有大于98%透明度且可以是膜的形式。在一种形式中,所述基质可以是纳米多孔膜的形式。基底可具有便于在对象的眼的所需位置操纵装置和植入装置的合适厚度。可通过改变存在于用于制备可生物降解的聚醚网络聚合物的单体组合物中单体的量来调节基质的厚度。在一组实施方案中,当在水合状态时,基质的厚度在约10 μ m至150 μ m的范围内。本发明的可生物降解的聚醚网络聚合物的优点是网络聚合物的机械性能使得其能够用网络聚合物制备相对较薄的膜。当膜在植入装置中用作基质时这可以是有利的,因为它可以便于使用微创外科手术。

[0156] 在另一个方面,提供了包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物之支架。在一些实施方案中,该支架是如本文所述的多孔海绵的形式。如下面进一步所讨论的,该支架可用于组织工程应用,特别是软组织工程。

[0157] 在本发明的另一个方面,提供了用于制备通过酯连接基交联的多孔可生物降解的聚醚网络聚合物的方法,所述方法包括在允许形成通过酯连接基交联的聚醚网络聚合物和产生在网络聚合物中在原位生成多个孔的气态缩合物的条件下,使包含多官能聚醚单体和多官能交联单体的单体组合物进行反应的步骤,其中聚醚单体和交联单体之一包含羟基官能团且聚醚单体和交联单体之另一包含能够与所述羟基官能团反应形成酯连接基的互补官能团,并且其中选自聚醚单体和交联单体中的至少一者是支链的。

[0158] 在上述方法的一种形式中,原位生成的气态缩合物随着其形成而导致聚醚网络聚合物膨胀,由此导致网络聚合物发泡。在一种形式中,膨胀的多孔聚醚网络聚合物可以类似于或者是多孔海绵。由于聚醚单体和交联单体之间形成的酯连接基,聚合物海绵是可生物降解的和交联的。

[0159] 在一组用于制备多孔可生物降解的聚醚网络聚合物的实施方案中,含有聚醚单体和交联单体的单体组合物在有限空隙体积(finite void volume)的容器中进行反应。有限

空隙体积的容器可以是封闭的反应容器。在有限空隙体积的容器中的单体反应可能会影响孔径或结构。例如,与当相同的单体组合物在更小的有限空隙体积的容器中的反应相比,单体组合物在具有较大的有限空隙体积的容器中的反应将在多孔聚醚网络聚合物中生成较大的孔。认为孔径的差异与容器中原位生成气态缩合物而造成的压力有关。也可通过改变单体组合物中单体的量来获得孔径的类似改变。

[0160] 在用于制备多孔可生物降解的聚醚网络聚合物的另一些实施方案中,单体组合物在无限空隙体积的容器中进行反应。例如,可以允许单体组合物在开放的容器中进行反应。在这种情况下,所得到的多孔聚醚网络聚合物将具有大的孔径。

[0161] 单体组合物中聚醚单体和交联单体的反应可在室温下或升高的温度下进行。

[0162] 在多孔可生物降解的聚醚网络聚合物的制备中使用的单体组合物可包含本文所述的任一实施方案的聚醚单体和交联单体。

[0163] 在一种形式中,聚醚单体包含多个羟基官能团且交联单体包含多个羧酰卤化物官能团。

[0164] 在一种具体的形式中,聚醚单体包含多个羟基官能团且交联单体包含多个酰氯化物官能团。在这样的实施方案中,当羟基和酰氯化物官能团反应以形成酯连接基时,原位生成的气态缩合物将是气态盐酸(HCl)。

[0165] 在一些实施方案中,在多孔可生物降解的聚醚网络聚合物的制备中使用的单体组合物还可包含如本文所述的机械性能改性剂。在一组实施方案中,所述单体组合物可包含选自多至20% (w/w)、多至15% (w/w) 和多至10% (w/w) 的量的机械性能改性剂。

[0166] 机械性能改性剂可以是疏水性大分子。示例性的疏水性大分子是聚酯多元醇,例如二羟基聚(己内酯)。在一组实施方案中,单体组合物可包含选自0%至20% (w/w)、0.1%至15% (w/w) 和约0.5%至10% (w/w) 的量的聚酯多元醇。

[0167] 在一些实施方案中,在多孔可生物降解的聚醚网络聚合物的制备中使用的单体组合物还可包含如本文所述的成孔剂,例如成孔剂颗粒。在一个实施方案中,成孔剂颗粒是盐颗粒,例如融合的盐颗粒。成孔剂可具有选自约50 μm 至1000 μm ,约100 μm 至700 μm ,或约300 μm 至600 μm 范围内的粒径。成孔剂可有助于产生较大的孔和/或有助于控制在聚醚网络聚合物中产生的孔的大小和结构。

[0168] 可生物降解的多孔聚醚网络聚合物可具有互连的多孔结构,多孔结构是由于聚醚单体和交联单之间的反应以及从该反应中产生的气态缩合物在原位形成的。如果用于制备多孔网络聚合物的单体组合物包含成孔剂,则可产生具有大孔的互连多孔结构。

[0169] 包含大孔和互连通道的互连多孔结构对于组织工程应用可以是有利的。大孔将允许组织和血管穿透并促进组织的增殖和发育。此外,互连的通道可提供多孔结构中细胞迁移、组织扩张和血管系统形成的途径。多孔结构的互连性质也将允许输送养分和流体以及清除细胞废物。

[0170] 本文所述的聚醚网络聚合物适合用于其中期望生物相容的和可生物降解的聚合物的应用范围。

[0171] 可生物降解的聚醚网络聚合物在体外和体内展示了优异的机械性能和降解特性以及无毒性 and 极低免疫原性。这些特征最终使得网络聚合物成为用作组织工程应用之支架和用作细胞培养和可植入装置之基质的优异的候选物。聚醚网络聚合物的可生物降解性意

味着任何外来材料都不会在植入部位积累,从而使周围的组织恢复其天然结构。

[0172] 本发明还提供了在对象中再生组织的方法,该方法包括在对象的期望部位植入包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物之支架的步骤。在一组实施方案中,组织是脂肪组织且支架被植入到对象的乳房区域。该支架可用于需要组织再生的重建或美容过程。

[0173] 本发明还提供了培养细胞的方法,所述方法包括在细胞培养的条件下,使细胞与包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物之基质相接触的步骤。该方法可用于在细胞培养中能够增殖的任何增殖性细胞。在该方法的一组实施方案中,细胞选自内皮细胞和上皮细胞,特别是角膜内皮细胞和角膜上皮细胞。

[0174] 本发明还提供了用于制备可植入装置的方法,其包括提供包含根据本文描述的任一实施方案的可生物降解的聚醚网络聚合物之基质以及将所述基质接种到细胞上的步骤。在一种形式中,所述装置是用于植入对象的眼部的可植入眼部装置,所述细胞选自角膜上皮细胞和角膜内皮细胞。

[0175] 本发明还提供了用于治疗对象的疾病或病症的方法,其包括提供包含基质的可植入装置和将细胞接种到该基质上以及在对象需要治疗的位置植入该装置的步骤,所述基质包含根据本文所述的一个或多个实施方案中的可生物降解的聚醚网络聚合物。在一些实施方案中,疾病或病症是角膜内皮功能障碍,且该方法包括在对象的眼中植入眼植入物的步骤,其中眼植入物包括基质和接种到该基质上的角膜内皮细胞,所述基质包含根据本文所述的一个或多个实施方案中的可生物降解的聚醚网络聚合物。本发明人观察到用眼植入物能够在数周内有利地维持角膜透明度。

[0176] 本发明的聚醚网络聚合物在生物环境中能够降解并产生无毒的降解副产物。生物降解的速率可以从几天到几周不等,并且可通过改变在聚醚网络聚合物中的不稳定的酯连接基的量来调整。在一些实施方案中,聚醚网络聚合物的降解可发生在约2周至约20周的时间内。

[0177] 在一些实施方案中,可通过调整网络聚合物的形态来改变聚醚网络聚合物的可生物降解性。例如,多孔海绵形式的聚醚网络聚合物可展现出更快的降解速率,原因是聚合物的多孔结构提供更大的可暴露于生物环境的表面积。

[0178] 本发明的可生物降解的聚醚网络聚合物是已发现为生物相容的、无毒的和极低免疫原性的合成聚合物。能够控制网络聚合物的降解性、机械性能和渗透性使得这些聚合物可被制成用于再生医学和组织工程应用的通用基质和支架。

[0179] 以下的实施例旨在说明本发明的范围以及使得能够再现和进行比较。它们并非旨在以任何方式限制本公开的范围。

[0180] 实施例

[0181] 可生物降解的聚(乙二醇)(PEG)膜

[0182] 材料

[0183] 甘油乙氧基化物($M_n \sim 1\text{kDa}$)、癸二酰氯($\geq 95\%$)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)片剂、 ϵ -己内酯(97%)、2,2'-二硫二乙醇(90%)、辛酸亚锡($\sim 95\%$)、甲苯(无水,99.8%)、Costar超低附着板、胰岛素、转铁蛋白、碘、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)的荧光染色、Triton X-100和葡聚糖 $M_r \sim 500000$ 、葡萄糖测定试剂盒(Sigma GAGO-20:葡萄糖氧化酶/过氧化物

酶试剂和邻联茴香胺二盐酸盐)和来自牛的白蛋白-异硫氰酸荧光素缀合物(白蛋白-FITC)是从Sigma Aldrich获得并按原样使用。Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶-EDTA(0.05%)、台盼蓝(0.4%)和青霉素-链霉素是从GIBCO获得。在用于细胞存活力测定之前,给DMEM补充10%v/v的FBS,1%v/v的L-谷氨酰胺和1%v/v的青霉素-链霉素。NUNC T225、斜颈瓶(canted neck flask)是从Thermo Fisher Scientific获得。Thermanox组织培养塑料(TCP)玻片是从UNC获得。Dulbecco改良的Eagle培养基:养分混合物F12(DMEM:F12)、抗生素-抗真菌剂、表皮生长因子(EGF)、胎牛血清(fetal calf serum,FCS)、Alexa Fluor 488山羊抗小鼠IgG、胰蛋白酶和EDTA从Invitrogen获得。在小鼠克隆M17-P5-F11产生的抗Na⁺/K⁺ATP酶(β 2-亚基)单克隆抗体从Santa Cruz Biotechnology获得。基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法(MALDI ToF MS)的基质反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈(DCTB)(≥ 99.0)和阳离子化剂(NaTFA(99.999%))购自Aldrich并按原样使用。四氢呋喃(THF)(Honeywell, 99.99%)、D-葡萄糖($\geq 99.5\%$)、二氯甲烷(99.5%)由Chem-Supply提供并按原样使用。用于细胞存活力测定的CelltiterAqueousOne溶液是从Promega获得并按原样使用。

[0184] α , ω -二羟基聚己内酯(机械性能改性剂)的合成

[0185] 通过 ϵ -己内酯的开环聚合(ring-opening polymerisation,ROP)制备 α , ω 二羟基聚己内酯(二羟基PCL)。将 ϵ -己内酯(20.0g,175mmol)、2,2'-二硫二乙醇(1.08g,7.00mmol)和辛酸亚锡(0.95g,2.34mmol)溶解于无水甲苯(45mL)中,并在110℃于氩气下加热24小时。将混合物冷却至室温,用THF(50mL)稀释,并沉淀到冷甲醇(-18℃,1L)中。通过过滤收集沉淀物并在真空下(0.1mbar)下干燥以得到18.8g(94%)为白色粉末的 α , ω 二羟基PCL; M_n (NMR)=3.2k Da, M_n (MALDI ToF)=3.3kDa(PDI=1.07)。

[0186] 可生物降解的PEG膜的制备

[0187] 将所需量的二羟基PCL(PCL含量分别为5wt%或10wt%)溶解于二氯甲烷(DCM)(15mL)中。将甘油乙氧基化物(0.70mmol)和癸二酰氯(1.42mmol)添加到二羟基PCL溶液中,将其充分混合并使其在室温下静置1小时,偶尔进行搅拌。还制备了不含PCL的样品。用于制备PEG膜的单体溶液详述于表1。

[0188] 表1

| 实施例编号 | 甘油 乙氧基化物 (mL) | 癸二酰氯 (mL) | 二羟基 PCL (g) | PCL 含量 (wt %) |
|----------|---------------------|--------------|----------------|---------------------|
| [0189] 1 | 0.62 | 0.30 | 0.0 | 0 |
| 2 | 0.62 | 0.30 | 0.052 | 5 |
| 3 | 0.62 | 0.30 | 0.104 | 10 |

[0190] 将一定体积(7.5mL)的每一种上述单体溶液移液到玻璃培养皿(直径10cm)上。然后将每个培养皿放置在真空烘箱中于60℃持续20分钟,之后施加真空(20mbar)。再过30分钟后,将皿取出并使其冷却至室温。用解剖刀对该膜的周边进行划痕并将培养皿中装满去离子水(20mL)。15分钟后,除去水并添加1:1的THF:去离子水(40mL)。将膜从培养皿表面剥离并放置于水(250mL)中。每15分钟用新鲜水(3×250mL)替换该水,并将膜在真空下干燥24

小时 (20mbar, 30℃)。将干燥的膜储存在干燥器中直到进一步使用。

[0191] 使用环境扫描电子显微镜 (Enviro-SEM) 和光谱反射率分析来测定交联的PEG膜的厚度。测定了水化的膜的平均厚度为约50μm。

[0192] 由于膜的厚度小以及流延 (casting) 条件 (20mbar, 60℃), 在流延过程中挥发性溶剂二氯甲烷和形成的HCl气体很容易被除去。随后用水对水凝胶膜进行洗涤和使其溶胀以确保完全除去HCl。用四氢呋喃 (THF) 替代水使得在膜内进行水和THF之间的溶剂交换, 产生的溶胀使得膜易于从培养皿表面剥离, 在干燥状态下若不损坏流延膜, 则无法实现剥离。

[0193] 平衡溶胀率和接触角测量

[0194] 为了观察溶胀特性, 允许以上制备的PEG膜在1×PBS中溶胀24小时。使用等式 $ESR\% = ((W_s - W_d) / W_d) \times 100\%$ 计算各种膜的平衡溶胀率 (ESR%), 其中 W_s 和 W_d 分别指的是溶胀重量和干重。对于每种类型的膜以一式三份进行分析并且结果取平均值。

[0195] 用Data Physics OCA 20张力计进行水接触角测量。对具有0wt%、5wt%和10wt% PCL含量的完全溶胀的膜使用座滴法 (sessile drop technique) (10μL液滴), 用OCA软件记录测量值。在将水滴置于膜的表面上60秒后进行测量。

[0196] 以上实验的结果示于表2中。

[0197] 表2

[0198]

| 样品 | PCL 含量 (%) | ESR% | 接触角 (度) |
|------|------------|---------|------------|
| 实施例1 | 0 | 118 ± 4 | 44 ± 0.4 |
| 实施例2 | 5 | 109 ± 5 | 58 ± 0.7 |
| 实施例3 | 10 | 100 ± 4 | 67 ± 0.4 |

[0199] 如在表2中所示, 发现随着PCL含量的增加 (0wt%、5wt%和10wt%), 膜的ESR%略有下降 (分别为118%、109%、100%)。这是由于疏水PCL成分的斥水作用降低了PEG膜的溶胀能力的结果。增加的PCL含量也导致接触角从44°分别增加至58°和67°, 表明PEG膜的疏水性略有增加。

[0200] 光透射率评估

[0201] 将水化的PEG膜置于1×PBS溶液中1小时, 然后进行UV-Vis评估。在25℃下记录膜对UV和可见光谱 (290nm至750nm) 的透射率。结果揭示, 在所有波长 (400nm至700nm) 下, 含0%、5%和10%PCL的PEG膜均能透过>98%的可见光。

[0202] 拉伸评估

[0203] 进行拉伸测试以测定用不同量的PCL (0wt%、5wt%和10wt%) 制备的PEG膜的拉伸能力并使其与人角膜进行比较 (表3)。使脱水的膜在1×PBS中溶胀并切割成具有2×2cm测量区 (gage area) 和2cm突起物 (tab) 的狗骨头形状以用于评估其拉伸性能。将该膜夹在Instron Microtester金属夹内的木突起物之间以防止膜的滑移和钳口撕裂 (jaw tearing)。在拉伸试验前, 这些膜未进行应力预适应 (precondition)。在1×PBS溶液中温度控制的microtester的水浴中于35℃进行膜的拉伸评估。每种类型的膜 (具有0wt%、5wt%和10wt%的PCL) 测试最少三个重复。用50N负荷传感器 (load cell) 将夹紧的样品以0.1mm/

秒的速率进行拉伸,直到在测量区发生膜的破裂。在原始数据的汇编中忽略在测量区未破损的任何膜。将从Bluehill软件获得的数据导出到OriginPro 7.5软件中进行绘图并确定关键参数,例如极限拉伸应力/极限拉伸应变(ultimate tensile stress/strain)以及拉伸模量。结果总结于表3中。

[0204] 表3

| 样品 | PCL 含量 (wt%) | 极限 应力 (MPa) | 极限 应变 % | 拉伸 模量 (MPa) |
|-------------------|-----------------|----------------|---------------|-------------------|
| 实施例1 (0% PCL) | 0 | 1.5 ± 0.2 | 33 ± 5.0 | 3.3 ± 0.6 |
| 实施例2 (5% PCL) | 5 | 3.7 ± 0.7 | 71 ± 17 | 3.8 ± 0.8 |
| 实施例3 (10% PCL) | 10 | 5.2 ± 0.2 | 61 ± 3.0 | 6.3 ± 0.8 |
| 人角膜 | -- | 3.3 ± 0.2 | 60 ± 15 | 15.9 ± 2.0 |
| 德斯密膜 | -- | 0.3 ± 0.01 | 1.7 ± 0.2 | 2.6 ± 0.4 |

[0206] 从上述结果已显示添加疏水性PCL可改善所得的PEG膜的机械性能。此外,具有0wt%和5wt%PCL含量的PEG膜展示出与德斯密膜(Descemet's Membrane)可媲美的拉伸模量,当开发用于再生角膜内皮细胞的可植入装置时,这可以有所帮助。

[0207] 体外降解研究

[0208] 将具有0%、5%和10%PCL含量的水化膜切成 2×2 cm的正方形。用水(20mL)以5分钟的间隔洗涤三次后,将膜在真空下(20mbar)于40℃干燥24小时。将干燥的膜称重,转移至小瓶(28mL)中并添加 $1 \times$ PBS(20mL)。随后,将容器置于温度受控的定轨摇床中,维持在35℃(角膜前房的自然温度)。在1、2、4和8周的时间点从定轨摇床中取出具有膜的三个容器。用水(3×20 mL)将取出的膜洗涤15分钟,偶尔轻轻搅拌,并在真空下(20mbar)于40℃干燥24小时。将干燥的膜称重并将质量对时间进行作图以获得膜的降解谱。对具有0%、5%和10%PCL含量的膜的降解程度的计算显示,在8周内的质量损失分别为~24%、15%和10%。结果示于图2中。

[0209] PEG膜的体外渗透性评估

[0210] 在具有5mL池体积的并排式扩散池(PermeGear, Bethlehem, PA)中进行葡萄糖和白蛋白的扩散率测量。将膜(5wt%PCL)置于扩散池之间并紧紧地夹住以防止泄漏。对于葡萄糖测量,一个池(来源池)中填充含葡萄糖的PBS(0.05g/mL, 4mL)且另一个池(目标池)仅填充PBS缓冲液(4mL)。对于白蛋白的测量,将含白蛋白-异硫氰酸荧光素缀合物(白蛋白-FITC)的PBS(50μM, 4mL)放置于来源池中并将PBS缓冲液放置于目标池中。对于葡萄糖和白蛋白测量两者,在磁力搅拌下将每个池中的室保持在35℃。在设定的时间(30、45、60、80和

100分钟)将等分试样(2mL)从目标池中取出并用新鲜的PBS(2mL)替换。对于葡萄糖测量,制备用于使用葡萄糖测定试剂盒(Sigma GAGO-20:葡萄糖氧化酶/过氧化物酶试剂和邻联茴香胺二盐酸盐试剂)之分光光度分析的样品并使用Shimadzu UV-1800分光光度计在540nm处进行分析。对于白蛋白测量,使用Shimadzu UV-1800分光光度计测量白蛋白-FITC在495nm处的吸光度。

[0211] 体外渗透性研究显示具有5%PCL的膜对于葡萄糖和白蛋白分别具有 $2.3(\pm 0.3) \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{秒}$ 和 $1.0(\pm 0.2) \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{秒}$ 的扩散率。相比之下,文献报道显示人角膜对葡萄糖和白蛋白分别具有 $2.6(\pm 0.3) \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ 和 $1.0 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ 的扩散率(参见Rafat M, Li F, Fagerholm P, Lagali NS, Watsky MA, Munger R, Matsuura T, Griffith M. PEG-stabilised carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29:3960-3972)。体外扩散性研究表明PEG膜对大分子和小分子两者都是可渗透的。所述大分子和小分子对于组织(例如人角膜)的生存和功能是重要的。

[0212] PEG膜的体外细胞毒性评估

[0213] 为了评估膜的细胞毒性,将脱水的膜(5wt%的PCL, 100mg)置于80%v/v的乙醇溶液中,持续30分钟。然后洗涤该膜并用无菌PBS(3×20mL)以10分钟的间隔进行再水化。随后将再水化的膜置于无菌的补充的DMEM(2mL)中,随后在37℃下孵育72小时。从溶液中取出膜并在细胞生存力测定中使用条件培养基。为了研究膜降解产物对细胞生存力的影响,将脱水的膜(500mg)在1M HCl(5mL)中降解30分钟。将溶液在真空下浓缩并将残余物与水(5×20mL)共沸,然后在真空下(0.1mbar)干燥。将降解产物(100mg)溶解于无菌DMEM(2mL)中。然后使溶液在UV下灭菌30分钟,并通过0.22μm的尼龙过滤器过滤,之后用于毒性研究。在37℃下,具有95%-100%的湿度的5%CO₂气氛中,使NIH 3T3-L1细胞在T225瓶中于补充的DMEM中生长至汇合。用0.05%胰蛋白酶-EDTA(GIBCO)将细胞胰蛋白酶消化,使用台盼蓝手动计数活细胞/死细胞染色,用新鲜培养基进行稀释以得到 1.25×10^5 个细胞/mL的接种密度并接种在96孔板(80μL/孔)上。留下一些空白孔作为细胞空白对照。将板放回培养箱中,持续4小时,之后添加膜条件培养基和膜降解产物溶液。将制备的储备溶液(50mg/mL)用新鲜的完全培养基按因数10稀释两次。将20μL的储备溶液及其两种稀释物以一式三份添加到96孔板中(以获得100ppm、1000ppm和10000ppm的浓度),通过板的定轨运动轻轻地混合,然后将板放回培养箱中再孵育72小时。然后,将CelltiterAqueousOne溶液添加到板(20μL/孔)中,将板轻轻摇晃以帮助混合,然后放回到培养箱中孵育30分钟至4小时。在定期的间隔中,使用配备有微板读数器(micro plate reader)的Cary 50 Bio UV-可见分光光度计在490nm和700nm处读取板的UV-Vis吸光度。在约2小时孵育后溶液的颜色达到平衡。用背景吸光度(700nm)和培养基单独的吸光度(细胞空白对照)校正在490nm处的吸光度值,然后归一化至生长对照。

[0214] 在多种浓度(100、1000和10000ppm)的PEG膜的条件培养基和降解产物的存在下,在将细胞孵育72小时后,观察到了极低的毒性,如在图3(a)和(b)中所示。

[0215] 在(通过加速的酸催化水解获得的)降解产物的存在下,相对于对照(无降解产物),细胞仍然能生存且具有代谢活性,甚至在极高的浓度10000ppm下也是如此(如图3(b))。通过酯连接基之水解的PEG膜的降解产生低毒性的化合物,例如PEG、癸二酸和6-羟基

己酸(来自PCL的降解)。

[0216] 至于PEG膜条件培养基,在100ppm和1000ppm的浓度时没有观察到对细胞生存力和代谢活性的副作用。虽然在非常高的浓度10000ppm时,观察到细胞的代谢活性略有下降(图3(a)),但是这个数据的标准差恰好落在对照数据的范围内,并且认为在统计上可忽略不计。细胞毒性研究的结果表明PEG膜及其降解产物不会损害细胞的生长并且是对健康无害的(benign),这使得他们成为用于组织再生和作为可植入基质之合适的平台。

[0217] 角膜内皮细胞(CEC)获取和PEG膜基质的体外细胞接种

[0218] 将脱水的膜(5wt%的PCL)在PBS(20mL)中再水化并使用圆形打孔器切成圆盘(直径16mm)。随后,将膜置于80%v/v的乙醇(20mL)中,持续1小时。然后用无菌PBS溶液(3×20mL)以15分钟的间隔洗涤膜。然后将膜放入24孔板中,将无菌玻璃环(外部直径15mm)置于膜的顶部上。向含有膜的孔中添加PBS(2mL),然后将孔板在冰箱中于8℃下储存,之后进行细胞培养研究。在细胞培养研究之前在膜上不进行表面改性也不进行蛋白质缀合。

[0219] 选择羊角膜内皮细胞(CEC)用于体外细胞接种研究。用聚乙烯吡咯酮碘(1:50,8分钟)、甲醇(20%v/v,60秒)、过乙酸(0.1%体积/体积,5分钟)以及具有抗生素-抗真菌剂的PBS洗涤来自麦兰奴绵羊(merino sheep)之新鲜取出的实验尸体的眼球。然后切割角膜并转移至稀释培养基(1:1的DMEM:F12、胰岛素(0.5μg/mL)、转铁蛋白(0.275μg/mL)、硒(0.25ng/mL)、表皮生长因子、2%FCS、抗生素-抗真菌剂和葡聚糖)中,持续16个小时。从角膜组织剥离德斯密膜,用胶原酶(2mg/mL)处理60分钟并用胰蛋白酶(0.05%)-EDTA(0.02%)处理5分钟。然后将样品中的德斯密膜切成小片并研磨以产生单细胞悬液,随后取出脱细胞化的德斯密碎片。将50000个细胞接种到角膜培养基(1:1的DMEM:F12、胰岛素0.5μg/mL、转铁蛋白0.275μg/mL、硒0.25ng/mL、EGF、10%FCS和抗生素-抗真菌剂)中的膜上或Thermanox组织培养塑料(TCP)盖玻片上。在标准条件(37℃,5%CO₂)下进行细胞培养。

[0220] 对于免疫荧光研究,将从绵羊角膜剥离的德斯密膜用作阳性对照。测试样品是在膜上培养的绵羊CEC。所有样品均用4%多聚甲醛(PFA)固定10分钟,之后在PBS中洗涤,并储存于4℃直至使用。如下进行免疫荧光。将样品用0.3%的Triton X-100透化处理15分钟,之后用PBS洗涤。用3%常规的山羊血清封闭30分钟。在加湿的室中,将样品与一抗(抗Na⁺/K⁺ATP酶IgG抗体)在PBS中孵育2小时。阴性对照未用一抗孵育。PBS洗涤后,将样品与二抗孵育1小时(Alexa Fluor 488)。PBS洗涤后,样品与4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)孵育5分钟。在最终的PBS洗涤后,将样品用含水介质封片。使用Olympus BX61获得图像。

[0221] 使用计算机辅助立体断层摄影术(Computer Assisted Stereographic Tomography,CAST,Olympus)从苏木精标记的细胞核来确定细胞密度。为了进行比较,用相差显微镜(Lions Eye Donation Service,CERA)测定新鲜解剖的羊角膜的细胞密度。

[0222] 在体外,CEC在具有PEG膜的基质上的附着和增殖

[0223] 使培养的CEC维持其天然的体内多边形的形态,如图4(a)和(b)所示。在PEG膜基质上培养的细胞的CAST计数得到3150个细胞/mm²的细胞密度(标准误差=459,n=4)。此细胞密度与由窥视显微镜(specular microscopy)测定的绵羊体内CEC的细胞密度3150个细胞/mm²(标准误差=88,n=3)相同。免疫荧光显示,培养的细胞对Na⁺K⁺ATP酶是阳性的。Na⁺K⁺ATP酶是泵功能的调节器并且已用作CEC的标志物。在CEC的外侧边缘观察到Na⁺K⁺ATP酶指示了完好的泵功能。绵羊CEC易于在PEG膜基质上增殖。PEG膜能够支持CEC附着和增殖,而不结合

任何粘附配体例如胶原或RGD。与来自14个月龄的麦兰奴绵眼角膜中3150个细胞/ mm^2 (SEM 88, $n=3$) 的密度相比,在膜上培养的细胞提供3150个细胞/ mm^2 的细胞密度 (SEM 459, $n=4$)。这些细胞密度相当于健康的人角膜的那些密度并足够用于眼捐赠的服务质量控制标准 (一般 >2500 个细胞/ mm^2)。

[0224] 体内毒性和免疫反应评估

[0225] 使用打孔器将水化的膜 (5wt%的PCL) 切成圆盘 (直径10mm), 在40℃下干燥24小时, 然后密封在双层样品袋中。将该膜在Steritech (Dandenong, Victoria, Australia) 中以最小剂量25kGy进行灭菌。灭菌的膜用于评估膜的体内毒性和免疫反应。

[0226] 所有的步骤都是根据澳大利亚的国家健康与医学研究委员会 (National Health and Medical Research Council, NHMRC) 的指导方针进行的, 并经墨尔本大学的兽医学院动物伦理委员会批准。在外科手术前, 使麦兰奴羊 ($n=4$) 禁食24小时。手术前1小时, 用一滴外用的1%的硫酸阿托品和一滴10%的粘性盐酸去氧肾上腺素使待进行手术的眼睛的瞳孔扩大。用25mg/kg的硫喷妥钠 (sodium thiopentone) 静脉注射到颈外静脉血管以诱导麻醉并在气道插管后保持具有1.5%的氟烷的2:1空气/氧气。通过眼科狭缝刀 (slit knife) 在角膜内形成3mm的狭缝并使用细镊子插入膜。在前房内形成切口, 之后将膜插入物缝合并使绵羊进行恢复。

[0227] 手术后, 使用手持式狭缝灯每2至3天检查角膜形态并且使用经过验证的预期表 (proforma) 对清晰度、水肿和炎症的指标进行评分。具体地, 清晰度和水肿分别在0-4的范围内进行评分, 其中0是完全透明的 (对于清晰度) 或薄的 (对于水肿), 4表示完全不透明的 (对于清晰度) 或极厚的 (对于水肿)。

[0228] 植入后28天, 通过颈静脉内注射lethobarb使绵羊安乐死并获取眼球。对于终点 (end-point) 组织学, 将组织固定在缓冲的福尔马林中, 包埋进石蜡中, 以5 μm 切割并用苏木精和伊红 (H&E) 染色。检查切片以确定膜的免疫反应、降解, CEC单层的维持和小梁网的任何堵塞。

[0229] 结果:

[0230] 用于体内植入研究的具有5wt%的PEG膜在手术过程中维持了其完整性并且其弹性性能使得整个手术中容易进行处理。

[0231] 在28天的狭缝灯观察中, 与对照角膜 (无PEG膜) 相比, 测试 (PEG膜-表示为PHF) 角膜维持了其光学透明性并且在视觉上没有注意到有显著差异。没有观察到水肿或不透明的任何证据。宏观上通过狭缝灯观察未看出任何副作用的端倪。为了确定在微观水平是否引起了任何副作用, 进行了组织学分析。

[0232] 植入后28天获取羊眼球 (obr) 并为组织学评估做好制备。在进行切片和用苏木精和伊红 (H&E) 染色后, 对照以及测试角膜的组织学分析显示基质 (stroma)、德斯密膜与角膜内皮的自然形态 (图5)。也观察到在某些区域内PEG膜已粘附到角膜的内表面上, 没有毒性。PEG膜粘附到CEC顶部的角膜内表面上没有影响天然的CEC功能, 原因是角膜在整个研究中保持了其光学透明度。这是有利的, 因为膜的粘附对于CEC能够跨膜和角膜泵送对维持角膜透明度是必要的。这对于外科手术目的也是有用的, 因为其粘附将使外科医生更容易将植入物保持在合适的位置 (in place)。

[0233] 羊模型中组织工程化的角膜内皮 (TECE) 的体内安全性测试

[0234] 作为建立手术方法的一系列先导实验的一部分,单个动物植入具有组织工程化的角膜内皮(TECE)(具有培养的同种异体羊角膜内皮细胞(ovine corneal endothelial cell,OCEC)单层的PEG载体膜),而不首先除去内源性OCEC并持续51天(51d)。角膜保持透明且无水肿。在51天没有证据表明有毒性和免疫排斥反应。组织学未能找到眼球内的聚合物膜,表明经过51天聚合物膜已完全被生物降解。

[0235] 建立CEC缺失的羊模型并通过TECE植入进行治疗

[0236] 通过手动剥离角膜内皮建立了角膜内皮细胞缺失的羊模型。使用DSEAK类方法能够植入TECE。TECE具有足够的拉伸强度,便于植入和易于光滑地展开和平贴在角膜的后表面。DMEK供体紧紧地卷起来且难以展开并放置成平贴在角膜的后表面。实验性角膜内皮缺失的动物没有放置在伤口上的TECE,具有未愈合的角膜水肿。在TECE放置的伤口区域,水肿消退。由于基质瘢痕,对试验动物的角膜的小区域有轻微的不透明度(在一个案例中通过组织学观察和确认)。在手术后维持了62天的动物中,组织学在眼球内没有发现任何PEG膜的痕迹,这证实了膜在前房内已完全降解。

[0237] 多孔可生物降解的聚(乙二醇)(PEG)海绵

[0238] 材料

[0239] 季戊四醇乙氧基化物($M_n \sim 797\text{Da}$)、癸二酰氯($\geq 95\%$)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)片剂是从Sigma-Aldrich获得并按原样使用。Dulbecco氏改良的Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶-EDTA(0.05%)、台盼蓝(0.4%)和青霉素-链霉素是从GIBCO获得。在用于细胞生存力测定之前,给DMEM补充10%v/v的FBS、1%v/v的L-谷氨酰胺和1%v/v的青霉素-链霉素。NUNC T225、斜颈瓶是从Thermo Fisher Scientific获得。二氯甲烷($\geq 99.5\%$)、乙醇(未变性100%)、碳酸钠($\geq 99.2\%$,无水)是从Chem-Supply获得并按原样使用。Selleys Quick Fix Supa Glue(氰基丙烯酸乙酯/聚(甲基丙烯酸甲酯))从Woolworths,Australia获得。用于细胞生存力测定的CelltiterAqueousOne溶液是从Promega获得并按原样使用。

[0240] 多孔的可生物降解PEG海绵的制备

[0241] 将季戊四醇乙氧基化物(PE)和癸二酰氯(SebCl)以1:2的摩尔比(量在表4中示出)移液到聚乙烯小瓶(28mL总体积)中。

[0242] 对于实施例4至7,改变PE和SebCl的体积(单体体积)以获得不同的前体占有体积(precursor occupied volume,P0V%);表示为总容器体积的百分比。对于实施例8至11,单体体积保持恒定,但是添加不同量的二氯甲烷(DCM)以改变P0V%。然后拧紧盖子并将小瓶立即涡旋15秒,之后放置在通风橱内。再过60秒,移去盖子,将小瓶留在通风橱中,持续15分钟。实施例12与实施例6相同,但是在涡旋后移去盖子。

[0243] 将所得的海绵从小瓶中取出并用手术刀将底部的不均匀的部分去除。随后,将海绵放入30mM的碳酸钠溶液(100mL/海绵)中持续1小时以中和所有HCl,随后浸泡在去离子水中持续30分钟($3 \times 200\text{mL}$)。通过将海绵浸泡在乙醇中20分钟($2 \times 100\text{mL}$)、在真空下(30°C , 20mbar)干燥24小时使其脱水,然后在干燥器中储存直至进一步使用。

[0244] 表4

[0245]

| 实施例 编号 | PE | | SebCl | | DCM (v/v %) | 空隙 体积 (%) | 前体 体积 (mL) |
|-----------|------------|--------------|------------|--------------|----------------|-----------------|---------------|
| | 体积 (mL) | 摩尔 (mmol) | 体积 (mL) | 摩尔 (mmol) | | | |
| 4 | 4.87 | 7.33 | 3.13 | 14.7 | - | 71.5 | 8 |
| 5 | 3.65 | 5.50 | 2.35 | 11.0 | - | 78.6 | 6 |
| 6 | 2.44 | 3.67 | 1.57 | 7.33 | - | 85.7 | 4 |
| 7 | 1.22 | 1.83 | 0.78 | 3.67 | - | 92.9 | 2 |
| 8 | 2.31 | 3.48 | 1.49 | 6.97 | 5 | 85.7 | 4 |
| 9 | 2.19 | 3.30 | 1.41 | 6.60 | 10 | 85.7 | 4 |
| 10 | 1.95 | 2.93 | 1.25 | 5.87 | 20 | 85.7 | 4 |
| 11 | 1.22 | 1.83 | 0.78 | 3.67 | 50 | 85.7 | 4 |
| 12* | 2.44 | 3.67 | 1.57 | 7.33 | - | - | 4 |

[0246] *在涡旋后立即移去盖子。

[0247] 在密封容器中在限制体积的条件下,季戊四醇乙氧基化物(PE)和癸二酰氯(SebCl)之间的反应导致形成多孔的聚(乙二醇)海绵。SebCl交联剂的酰基氯基团和PE的羟基端基团之间的反应导致形成酯连接基且同时释放氯化氢(HCl)气体。该反应是放热的且非常迅速地释放作为气体的HCl。由于PE和SebCl之间的快速交联反应造成HCl气体产生和溶液粘度增加联合导致混合物发泡,涡旋后20秒内发生胶凝(图6)。交联和凝胶形成将气泡捕集到合适位置,产生互连的多孔网络。

[0248] 多孔结构的SEM评估

[0249] 将多孔的PEG海绵切成两半,并固定在碳突起物上。在低真空条件下,使用FEI Quanta FEG 200 E-SEM分析暴露的内表面以观察海绵的多孔结构。利用ImageJ (National Health Institute,USA) 软件确定平均孔径。结果示于表5。

[0250] 表5:多孔PEG海绵的平均孔径和通道尺寸

[0251]

| 实施例编号 | 孔径 (μm) | 通道尺寸 (μm) |
|-------|----------------------|------------------------|
| 4 | 571 ± 205 | 222 ± 81 |
| 5 | 908 ± 209 | 302 ± 90 |
| 6 | 1000 ± 433 | 445 ± 182 |
| 7 | 1387 ± 337 | 647 ± 226 |
| 8 | 965 ± 166 | 367 ± 91 |
| 9 | 940 ± 220 | 361 ± 143 |
| 10 | - | - |
| 11 | - | - |
| 12 | 1539 ± 297 | 632 ± 233 |

[0252] SEM评估的结果表明发现空隙体积、溶剂含量和压力释放 (pressure release) 对孔属性具有影响。一般而言,观察到伴随HCl气体形成的酰基氯/醇反应导致如由较小的圆

形通道内部连通的大的圆形孔(如通过SEM图像揭示的)(图7)。较大的孔可能是由于HC1气泡在放热反应期间成核和扩大而形成的。在交联中正在扩大和连接在一起的相邻HC1气泡之间的接触导致孔之间的通道互连。随后这些通道导致可通过SEM图像观察到的多孔PEG海绵的互连性。

[0253] 在交联反应过程中HC1释放导致容器内的压力增加。在着眼于不同前体(单体)体积的研究中,可观察到在发泡期间较大的前体体积导致随后的空隙体积减小以及HC1气体生成增加。此外,由于增加的前体量,在放热反应中产生的热也增加。接着发生的由于热量和气体造成的压力增加抵抗了溶液内HC1气泡的膨胀,从而导致较小的孔径。相反地,具有较小的体积,形成较少的HC1且压力增加较少。这导致对气泡膨胀的抵抗较低且随后导致观察到的形成较大的孔和通道。

[0254] 通过向单体组合物添加溶剂研究了在恒定空隙体积(85.7%)时,前体(单体)浓度对孔径分布的影响。因此,使用不同量的二氯甲烷(DCM)(5%、10%、20%和50%v/v)作为溶剂制备实施例8至11,并与其无水对应物(neat counterpart)实施例6进行比较。

[0255] 相对于在无溶剂时制备的实施例6,在实施例8和9观察到孔径和通道尺寸两者均略有下降。对于实施例10和11,没有观察到发泡且没有获得多孔的交联凝胶。在较低的前体浓度(较高稀释度)时,反应速率降低(如通过降低的温度变化率所证明的)。同时HC1形成速率也降低。因为HC1气体产生较慢,气泡也将以较慢的速率成核及扩大;与实施例6相比,产生较小的孔。当DCM含量增加至20%和50%v/v时,没有海绵形成。在这些低浓度下,反应速率和随后的HC1形成速率进一步降低。结果,所产生的热和气体更容易消散而没有发泡。在较高浓度时,由于增加的反应速率,更迅速地积累了温度。然后,温度的这种升高导致迅速的气泡形成和膨胀。

[0256] 通过使反应在非密封容器中进行研究了开放环境对孔径的影响。发现所得的海棉(实施例12)具有膨胀的孔之更大的开孔结构和具有较少球形形态的通道。这导致形成分支网络的更薄的壁,与当盖子密封时得到的由较小的通道连通的大孔的区室化的结构(实施例6)相反。孔径和通道尺寸也显著增加。除去盖子使得HC1气体自由漏出而不增加容器中的压力。因此,气泡可容易地膨胀,从而导致所观察到的较大的孔径。

[0257] 总之,对于所有的多孔PEG海绵(实施例9和10除外)的孔径评估显示大的孔径具有高的互连性。这适用于组织工程应用,其中大尺寸的孔将使得组织和血管易于渗透进支架中。大的孔将提供组织增殖和发育所需的空間,而互连的通道提供了用于支架内细胞迁移、组织扩张和血管系统形成的途径。多孔PEG海绵的高度互连性也使得易于输送营养和流体以及清除细胞废物。

[0258] 机械评估

[0259] 因此,通过压缩测试研究了多孔PEG海绵作为可植入组织工程支架的机械完整性。在测试前,将多孔PEG海绵切成圆柱体(直径=15mm,高=10mm)。在压缩评估前,未使海绵进行应力预适应。将圆柱形样品放置在Instron Microtester 5848(50N负荷传感器)的金属板之间,并使其经受多至80%应变的压缩。使用产生的应力比应变曲线来确定压缩模量。结果示于表6。

[0260] 表6:多孔PEG海绵的压缩模量

[0261]

| 实施例编号 | 压缩模量 (MPa) |
|-------|------------------|
| 4 | 0.381 ± 0.05 |
| 5 | 0.212 ± 0.03 |
| 6 | 0.055 ± 0.01 |
| 7 | 0.044 ± 0.02 |
| 8 | 0.054 ± 0.01 |
| 9 | 0.022 ± 0.01 |
| 12 | 0.011 ± 0.01 |

[0262] 实施例4至9和实施例12的机械测试表明所有经测试的多孔PEG海绵显示出多至80%压缩应变的弹性形变,并且在完全恢复到其原始尺寸之前可进行反复压缩。例如,实施例5多至80%的重复压缩显示出相同的应力比应变曲线而不存在压缩断裂(图8(a))。

[0263] 除了其弹性性能,研究了制造条件对多孔PEG海绵的压缩性能的影响。然而,观察到实施例4具有约380kPa的最高压缩模量,实施例5、6和7的压缩模量分别降低(图8(b)和表6)。这种趋势可归因于随着前体体积的减小,获得的孔径增加。与具有较小孔的相同体积的支架相比,较大的孔导致单位体积具有较少的支架材料。在溶剂存在下制备的实施例8和9也显示出压缩模量比其无水对应物(实施例6)略微减小。在固化过程中添加溶剂降低了反应的速率,从而减低了交联密度,这导致减小的压缩模量。实施例12的压缩评估显示在所有经测试的多孔PEG海绵中其具有最低的压缩模量(0.011MPa)。这与其他的多孔PEG海绵一致,证实了孔径和压缩模量之间的相关性,因而较大的孔导致较低的模量,反之亦然。没有对实施例10和11进行机械测试,因为它们没有形成如通过SEM所确定的均匀的多孔海绵。

[0264] 对于多孔PEG海绵获得的模量在对组织(例如脂肪、肾脏、前列腺组织和心肌)获得的模量的范围内。

[0265] 体外降解研究

[0266] 为了提供多孔PEG的海绵的水解降解速率的指示,将脱水的实施例5样品切成立方体($5 \times 5 \times 5\text{mm}$),称重并置于 $1 \times \text{PBS}$ (20mL, 0.01%w/v的叠氮化钠)中。将小瓶封盖并放入温度可控的定轨摇床中(37°C , 100rpm)。在各个时间点(1、2、4和8周)从定轨摇床中取出3个样品,并浸泡于去离子水中30分钟($3 \times 20\text{mL}$)。随后,通过将海绵浸泡在乙醇中1小时($2 \times 20\text{mL}$),接着在真空中干燥(60°C , 24小时)使其脱水。然后将海绵称重并将得到的质量值对时间进行作图以得到降解谱。

[0267] 体外降解研究揭示了在8周内约20%的质量损失的线性降解谱(图9)。

[0268] 多孔的PEG海绵及降解产物的体外细胞毒性评估

[0269] 为了评估多孔PEG海绵的细胞毒性,将脱水海绵(100mg)置于80%v/v的乙醇溶液中30分钟。然后用无菌PBS($3 \times 20\text{mL}$)洗涤海绵30分钟,将其置于无菌DMEM(2mL)中并在 37°C 下孵育72小时。然后将多孔PEG海绵取出并在细胞生存力测定中使用条件培养基。为了研究降解产物对细胞生存力的影响,使脱水海绵(500mg)在1M HCl(5mL)中降解。在真空下除去HCl,并使残余物与水($5 \times 20\text{mL}$)共沸,接着在真空中干燥(0.1mbar, 50°C , 3小时)。在用

于毒性研究前,将降解产物(100mg)溶解/重悬于无菌DMEM(2mL)中并将溶液在UV辐照下灭菌30分钟,然后通过0.22 μ m的过滤器过滤。在37 $^{\circ}$ C,在具有95%-100%湿度的5%CO₂气氛下,使NIH 3T3-L1细胞在T225瓶中于DMEM中生长至汇合。用胰蛋白酶-EDTA对细胞进行胰蛋白酶消化,用台盼蓝人工计数活细胞/死细胞染色,用DMEM稀释至达到 1.25×10^5 个细胞/mL的接种密度并接种在96孔板上(80 μ L/孔),留下一些空白孔作为细胞空白对照。然后将板放置于培养箱中4小时,之后添加多孔PEG海绵条件培养基或降解产物。将制备的储备溶液(50mg/mL)用新鲜的培养基按因数10稀释两次。将其20 μ L的两种稀释物以一式三份添加到96孔板(以获得100ppm、1000ppm的浓度),通过板的定轨运动轻轻混合,然后将板放回培养箱中再持续72小时。在孵育3天后,将CelltiterAqueousOne (CAO) 溶液添加到该板中(20 μ L/孔)。将板轻轻摇晃以帮助混合,然后放回到培养箱中保持30分钟至4小时。在定期的间隔中,使用配备有微板读数器的Cary 50 Bio UV-可见分光光度计在490nm和700nm处读取板的UV/Vis吸光度(一经添加CAO试剂,由代谢活性细胞产生的产物的吸光度)。通常在约2小时孵育后颜色达到平衡。用背景吸光度(700nm)和培养基单独的吸光度(细胞空白对照)校正490nm处的吸光度值,然后归一化至生长对照。

[0270] 在不同浓度(100ppm、1000ppm)的实施例5条件培养基的存在下孵育72小时后,观察到了对细胞生存力有极低影响(图10(a))。在实施例5的100ppm(通过加速酸催化水解获得的)降解产物的存在下,没有观察到对细胞代谢活性有影响。然而,在1000ppm时,观察到细胞的代谢活性降低,并且认为是由于降解产物中高浓度的癸二酸造成的,其将降低培养基的pH(图10(b))。预期不会在体内能观察到这样的高浓度,因为在一个实例中使用的降解产物浓度是基于海绵的完全降解。

[0271] 多孔PEG海绵的体内评估

[0272] 使用皮下袋模型在大鼠中对实施例5进行体内测定。选择实施例5进行研究是因为其高度互连的孔结构、压缩模量和高刚度,这使得其能够在植入时抵抗由于外部力造成的压缩破坏。

[0273] 将实施例5样品切成圆盘(10 \times 4mm,直径 \times 高度)并置于自封袋(zip-lock bag)内部的塑料小瓶中双重密封,之后进行 γ 灭菌。在Steritech,Victoria,Australia进行 γ 灭菌(25kGy最小值)。灭菌之后,植入前将海绵置于无菌1 \times PBS中,持续3小时,将海绵在3个时间点植入12只大鼠中。所有的步骤都是根据澳大利亚国家健康与医学研究委员会(NHMRC)的指导方针进行的,并经墨尔本大学,圣文森特(St Vincent's)医院,动物伦理委员会批准。将雄性Sprague Dawley大鼠(动物资源中心(Murdoch,Western Australia),350 \pm 50g体重)关在批准的设备中并喂食标准的大鼠饲料并随意饮水。手术前2天和手术后2天,以饮水的形式以25.5mg/kg/天的剂量施用抗生素-恩诺沙星(enrofloxacin)(Baytril 50, Bayer)以避免伤口感染。为了手术,麻醉动物并使用异氟烷维持麻醉状态。对背表面上的皮肤进行剃毛、消毒并沿中线制成四个独立的纵向切口,约1.5cm长,相距1.5cm。通过在主切口的任意一边小心地进行钝器解剖来制备每个支架的单独的皮下袋,将海绵插入到每个袋中,并使用通过中心孔且进入周围筋膜的3-0聚丙烯缝线(prolene suture)将其锚定到合适的位置。使用伤口夹使伤口闭合并使动物在加热垫上恢复30分钟。在植入2、8和16周后,如先前所描述的使大鼠麻醉,重新打开原始伤口,取出支架和周围组织,然后通过心内注射lethabarb使大鼠安乐死。将取出的海绵垂直于圆形表面切成两半,并用4%的多聚甲醛溶

液于4℃固定48小时,并进行石蜡处理。处理之后,将外植体包埋以便可以观察和分析完整的横截面和周围组织。通过样品的中点切割5μm厚的切片并安放在多聚赖氨酸包被的载玻片上。使用苏木精和伊红(H&E)对切片进行染色并使用抗ED1的抗体对巨噬细胞和巨细胞进行免疫组织化学分析。

[0274] 切离的2周的样品显示在植入的多孔PEG海绵周围形成薄纤维囊,海绵明显并入组织中(图11(d))。宏观观察二等分的海绵显示,在2周后海绵在尺寸方面变化很小,海绵保持完整并清晰可见,但是观察到黄色着色,这可能是降解过程的指示(图11(e))。在加工到石蜡中后,将海绵进行切片并随后用苏木精和伊红(H&E)染色以观察渗透进多孔PEG海绵的细胞和组织(图11(g)-(i))。染色的切片显示致密细胞组织和高血管化的组织从周围组织浸润到海绵中。从指示血管位置的染色的红细胞可清楚地看到血管形成(图11(h)和(i))。在2周时,虽然有大量的组织渗透,但是多孔PEG海绵并未完全填满组织(如从切片的中心空隙可明显看出)(图11(g))。在染色的组织之间也可观察到指示海绵之孔壁位置的多孔PEG海绵的碎片(图11(h))。

[0275] 在8周时的获取也显示并入周围组织的多孔PEG海绵周围形成的薄纤维囊。与在2周时获取的多孔PEG海绵相比,二等分外植体的宏观分析展示了均匀组织的完全渗透(图11(f))。也观察到植入物的尺寸变化极小,表明多孔PEG海绵保持其完整性而没有收缩。与2周的切片相比,8周切片的H&E染色显示多孔PEG海绵由恰好通过中心的血管化组织完全充满(图11(j))。也注意到,8周后存在的组织是疏松结缔组织,而不是在2周时存在的致密细胞组织(图11(k),(l))。在整合到组织的海绵内观察到的血管是很可能是由于从周围组织诱导的新生血管(neovasculature),因为多孔PEG海绵没有接种细胞或装载生物因子。支架的多孔结构内这样的血管形成对于再生组织的生长和存活是关键的。

[0276] 完全的组织浸润说明多孔PEG海绵的孔之高度互连性质。因为没有接种细胞且没有引入生物因子到多孔PEG海绵中,多孔PEG海绵孔内形成的组织必须从周围组织中浸润,因此,2周时有细胞和血管组织的渗透和8周时则完全浸润,表明多孔PEG海绵对细胞组织和血管的渗透性。因此,多孔PEG海绵能够提供适合细胞和血管结合的3D环境,并保证浸润组织的存活。

[0277] 在16周时,植入物的获取在宏观上揭示非常难以定位植入物。与2周和8周相比,没有植入物突起的证据。相反,通过原本用于使其固定在合适位置的缝线的存在辨别了多孔PEG海绵的位置。没有宏观的证据表明在邻近缝线处有任何副作用。观察到存在少量固体组织粘附至缝线(图12(a))。切割缝线粘附的组织及周围组织并进行组织学处理。

[0278] 进行H&E染色来辨别组织形态并看是否可以观察到多孔PEG海绵的存在。H&E染色切片的分析表明,到16周时,没有任何证据表明在任何植入部位剩余多孔PEG海绵(图12(C))。周围组织是平常的致密细胞组织和血管组织。这表明,在16周内多孔PEG海绵完全降解,证明了其在体内的可生物降解性。

[0279] 可通过观察巨噬细胞和异物巨细胞(FBGC)的出现来识别对植入物的先天免疫应答。作为确定巨噬细胞和FBGC浸润的一种手段,对来自三个时间点的所有切片进行ED1免疫染色(图12(d)-(l))。2周样品的分析显示如所预测的存在巨噬细胞。在2周通过ED1染色观察到的巨噬细胞主要是存在支架/组织界面,而中央组织主要以非炎性细胞(图12(d)-(f))为主。ED1染色的8周切片的分析显示巨噬细胞反应已显著降低并且尺寸小的多(图12(g)-(l))。

(i))。染色的组织以非炎性细胞为主,甚至是在支架/组织界面,这表明对海绵材料的反应降低。到16周,多孔PEG海绵已经完全降解,因此ED1染色将显示对多孔PEG海绵及其最终的降解产物是否有主要应答。ED1染色的16周切片显示几乎不存在巨噬细胞(图12(j)-(1))。这表明,总体而言,多孔PEG海绵和其降解产物最初导致轻微的炎症反应,并且这种反应随时间减弱。

[0280] 体内研究表明,组织对多孔PEG海绵的反应和相互作用是非常积极的,结果非常有前景。通过允许在其多孔3D结构内进行浸润、血管形成和组织的生存,多孔PEG海绵成为用于组织再生的优良的候选物。加上他们极低的免疫原性、组织浸润以及在16周内完全可生物降解而无毒性,多孔PEG海绵具有非常理想的性质作为用于组织工程的支架。

[0281] 具有可控物理性质的多孔可生物降解的聚(乙二醇)(PEG)海绵

[0282] 在此,我们描述了通过盐浸出技术生产的具有可控孔径的多孔PEG水凝胶的制造与表征。此外,三种交联剂:癸二酰氯、琥珀酰氯、均苯三甲酰氯用于控制所得网络聚合物的机械特性和降解特性。

[0283] 材料

[0284] 季戊四醇乙氧基化物($M_n \sim 797\text{Da}$)、聚(乙二醇)($M_n \sim 600\text{Da}$)、癸二酰氯($\geq 95\%$)、琥珀酰氯(95%)、1,3,5-苯三酰三氯(均苯三甲酰氯)(98%)、 ϵ -己内酯(97%)、2,2'-二硫二乙醇(90%)、辛酸亚锡($\sim 95\%$)、甲苯(无水,99.8%)和磷酸盐缓冲盐水(PBS)片剂是从Sigma-Aldrich获得并按原样使用。Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶-EDTA(0.05%),台盼蓝(0.4%)和青霉素-链霉素是从GIBCO获得。在用于细胞生存力测定之前,给DMEM补充10%v/v的FBS,1%v/v的L-谷氨酰胺和1%v/v的青霉素-链霉素。NUNC T225、斜颈瓶是从Thermo Fisher Scientific获得。二氯甲烷($\geq 99.5\%$)、四氢呋喃(THF)(Honeywell,99.99%)、乙醇(未变性100%)、碳酸钠($\geq 99.2\%$,无水)是从Chem-Supply获得并按原样使用。用于细胞生存力测定的CelltiterAqueousOne溶液是从Promega获得并按原样使用。基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法(MALDI TOF MS)的基质反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈(DCTB)(≥ 99.0)和阳离子化剂(NaTFA(99.999%))购自Aldrich并按原样使用。

[0285] 融合的盐模板制备

[0286] 将结晶氯化钠(NaCl)在研钵中用杵初步研磨,然后过筛(Endecotts Ltd.(London,England)一套标准实验室试验筛)以得到300 μm 至600 μm 大小的盐颗粒。称重4g的盐颗粒并放置在聚乙烯小瓶(28mL)中,并用圆柱形金属压缩机轻轻压缩。然后将小瓶转移到加湿器中并于室温(80%湿度)下在加湿器中保持24小时以产生融合的盐模板。然后将融合的模板在室内真空下干燥18小时(100 $^{\circ}\text{C}$,20mbar),加盖并置于干燥器中直到进一步使用。

[0287] α , ω 二羟基PCL(机械性能改性剂)的合成

[0288] 通过开环聚合(ROP)制备 α , ω 二羟基聚己内酯,将 ϵ -己内酯(20.0g,175mmol)、2,2'-二硫二乙醇(1.08g,7.00mmol)和辛酸亚锡(0.95g,2.34mmol)溶解于无水甲苯(45mL)中,并在110 $^{\circ}\text{C}$ 于氩气下保持24小时。将混合物冷却至室温,用THF(50mL)稀释,并沉淀到冷甲醇(-18 $^{\circ}\text{C}$,1L)中。通过过滤收集沉淀物并在真空下(0.1mbar)下干燥以得到18.8g(94%)为白色粉末的 α , ω 二羟基PCL; M_n (NMR)=3.2k Da, M_n (MALDI ToF)=3.3kDa(PDI=1.07)。

[0289] 用盐做模板的 (Salt-templated) 可生物降解的多孔聚(乙二醇) (PEG) 海绵的制备

[0290] 将聚(乙二醇) (PEG600) (0.75g, 1.255mmol)、季戊四醇乙氧基化物 (PE) (0.50g, 0.63mmol) 和 0mg、33mg 或 82mg 的二羟基 PCL (分别对应于 0wt%、2wt% 或 5wt% PCL) 溶解于二氯甲烷 (DCM, 10% v/v) 中 (表7)。随后添加癸二酰氯 (SebCl) (0.60g, 2.51mmol)、琥珀酰氯 (SucCl) (0.39g, 2.51mmol) 或均苯三甲酰氯 (TmsCl) (1.27g, 4.77mmol)。将单体组合物涡旋 10 秒, 并立即将 1.2mL 的该溶液移液到含有融合的盐模板的小瓶中并离心 30 秒。然后将小瓶放入烘箱, 在 60℃ 持续 1 小时, 在真空烘箱中抽真空 24 小时 (20mbar, 60℃)。从小瓶中取出交联的凝胶, 并放置于去离子水 (100mL) 中, 轻微搅拌下。每 30 分钟更换一次水, 持续 2 小时, 然后每小时更换一次水持续 3 小时, 之后最后一次更换保持 24 小时。然后将溶胀聚合物置于碳酸钠溶液中持续 2 小时, 轻微搅拌, 并用去离子水 (3×100mL) 洗涤 30 分钟以中和所有的 HCl。然后将所产生的多孔 PEG 海绵储存在 PBS 中, 之后进行表征。

[0291] 表7

| 实施例 编号 | PE (g) | PEG ₆₀₀ (g) | 二羟基 PCL (mg) | 10% (v/v) DCM (μl) | SucCl (g) | SebCl (g) | TmsCl (g) |
|-----------|-----------|---------------------------|-----------------|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 13 | 0.50 | 0.75 | 0 | 151 | 0.39 | - | - |
| 14 | 0.50 | 0.75 | 33 | 151 | 0.39 | - | - |
| 15 | 0.50 | 0.75 | 82 | 151 | 0.39 | - | - |
| 16 | 0.50 | 0.75 | 0 | 180 | - | 0.60 | - |
| 17 | 0.50 | 0.75 | 37 | 180 | - | 0.60 | - |
| 18 | 0.50 | 0.75 | 93 | 180 | - | 0.60 | - |
| 19 | 0.50 | 0.75 | 0 | 170 | - | - | 0.67 |
| 20 | 0.50 | 0.75 | 38 | 170 | - | - | 0.67 |
| 21 | 0.50 | 0.75 | 96 | 170 | - | - | 0.67 |

[0293] 为了产生用于组织渗透和血管形成的互连多孔结构, 使用牺牲的 (sacrificial) 融合氯化钠模板。交联后, 将多孔 PEG 海绵在 60℃ 下抽真空, 持续 24 小时, 并放置于去离子水中以使多孔 PEG 海绵溶胀并除去盐模板。

[0294] 用琥珀酰氯 (SucCl)、癸二酰氯 (SebCl) 和均苯三甲酰氯 (TmsCl) 产生的多孔 PEG 海绵分别命名 Suc-SPH、Seb-SPH 和 Tms-SPH。

[0295] 溶胀研究

[0296] 进行了溶胀研究以确定多孔 PEG 海绵的水分吸收。将脱水的多孔 PEG 海绵 (1×1×1cm³) 称重, 然后浸入 Milli-Q 水中, 持续 48 小时。使用等式 $ESR\% = ((W_s - W_d) / W_d) \times 100\%$ 计算水凝胶的百分比平衡溶剂率 (equilibrium solvent ratio, ESR%), 其中 W_s 和 W_d 分别指的是溶胀重量和干重。对各种类型的聚合物以一式三份进行分析, 结果取平均值。结果示于表 8。

[0297] 表8

[0298]

| 实施例编号 | PCL 含量 (wt%) | ESR% | 平均孔径 (μm) |
|-------|--------------------|---------------|---------------------------|
| 13 | 0 | 1209 ± 65 | - |
| 14 | 2 | 1184 ± 56 | 456 ± 114 |
| 15 | 5 | 1139 ± 52 | - |
| 16 | 0 | 327 ± 4.5 | - |
| 17 | 2 | 310 ± 2.1 | 467 ± 118 |
| 18 | 5 | 301 ± 2.3 | - |
| 19 | 0 | 370 ± 6.3 | - |
| 20 | 2 | 340 ± 0.9 | 477 ± 102 |
| 21 | 5 | 321 ± 5.5 | - |

[0299] 在测得的平衡溶胀率 (ESR%) 方面,用不同的交联单体SebCl、SucCl和TmsCl制备的聚合物的不同是明显的。用SucCl制备的实施例13至16都比其SebCl和的TmsCl对应物显示出更高的ESR。这可证明SebCl和TmsCl的疏水性。与在交联的聚合物网络内的SucCl相比,SebCl的较长的烷基主链和TmsCl的苯环造成更加疏水的环境,因此降低了多孔PEG海绵的吸水能力。SucCl具有较短的烷基主链,因此生成的多孔PEG海绵的疏水性较低并吸收更多的水。

[0300] 多孔PEG海绵的PCL含量也为0wt%、2wt%和5wt%不等,并且可观察到,对于由所有交联剂制备的水凝胶,随着PCL含量的增加,ESR%降低。这与用SebCl和TmsCl观察到的疏水性影响是一致的。PCL是疏水聚合物,因此增加PCL的量也导致较低的ESR%。

[0301] 孔径分析

[0302] 使具有2wt%PCL的多孔PEG海绵在1×PBS中溶胀,然后切成两半,并固定在碳突起物上。在低真空条件下,使用FEI Quanta FEG 200E-SEM分析暴露的内表面以观察水凝胶的多孔结构。利用ImageJ (National Health Institute, USA) 软件来确定平均孔径。

[0303] SEM显示,在用不同的交联单体制备的多孔PEG海绵内观察到的孔径与所制备的融合盐模板具有良好的相关性,且观察到其互连(图13)。获得的平均孔径示于表8中。所制备的盐颗粒的大小为300 μm 至600 μm ,因此多孔PEG海绵获得的平均孔径与所制备的盐颗粒具有很好的相关性。

[0304] 此外,没有观察到用不同的交联剂制备的多孔PEG海绵的之间孔径有显著差异,虽然在溶胀方面聚合物之间有差异。这证明了不管溶胀性如何,孔径不受影响。对于所有的多孔PEG海绵,这些大尺寸的孔将使组织和血管形成易于渗透进支架。大的互连孔将提供支架内组织增殖和发育以及血管系统形成所需的空間。多孔PEG海绵的互连性也将使得可输送养分和流体以及清除细胞废物。

[0305] 考虑到盐模板技术,可以控制水凝胶的孔径,因为成孔剂(盐)粒径可针对特定的范围直接进行调整。这对于特定的组织类型可以是有利的,其中发现某些孔径更适合于特

定组织和细胞类型。

[0306] 多孔PEG海绵的机械评估

[0307] 在压缩测试前将溶胀的多孔PEG海绵切成立方体 ($1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$)。在压缩评估前,多孔PEG海绵未进行应力预适应。将立方样品置于Instron Microtester 5848 (具有50N负荷传感器)的金属板之间,并进行多至80%应变的压缩。所得的应力比应变曲线用于确定多孔PEG海绵的压缩模量。还对一些多孔PEG海绵进行多至80%应变的循环压缩以确定其弹性性能。结果示于表9

[0308] 表9

| 实施例 编号 | PCL 含量 (wt%) | 极限 应力 (MPa) | 极限 伸长 (%) | 压缩模量 (kPa) |
|-----------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------|
| 13 | 0 | 33 ± 3.4 | 46 ± 2.0 | 81.0 ± 11 |
| 14 | 2 | 51 ± 5.3 | 58 ± 2.1 | 89.0 ± 0.1 |
| 15 | 5 | 63 ± 4.2 | 75 ± 4.1 | 81.0 ± 10 |
| [0309] 16 | 0 | - | - | 183 ± 28 |
| 17 | 2 | - | - | 250 ± 20 |
| 18 | 5 | - | - | 330 ± 5.7 |
| 19 | 0 | 124 ± 18 | 60 ± 9.2 | 192 ± 6.0 |
| 20 | 2 | - | - | 148 ± 3.0 |
| 21 | 5 | - | - | 193 ± 6.0 |

[0310] 对于使用的不同交联剂,观察到了不同的压缩行为。对于所有用SebC1和TmsC1制备的含有PCL的聚合物网络,观察到了弹性“J”形压缩应力比应变曲线。SebC1聚合物和含有PCL的TmsC1聚合物保持了其弹性结构。Sebc1聚合物保持弹性而没有断裂,甚至在多至80%的反复压缩后也是如此(图14(a))。随着二羟基PCL含量从0wt%分别增加至2wt%和5wt%,SebC1聚合物的压缩模量从约180kPa增加至约250kPa和330kPa。

[0311] 另一方面,用SucC1制备的多PEG孔海绵显示“牛顿”线性应力比应变行为,并随着PCL含量的增加在约45%至70%压缩应变之间断裂(表9)。随着PCL含量增加,这些聚合物显示出改善的断裂应力和应变。但压缩模量没有受到显著影响(图14(b))。

[0312] 用TmsC1制备的多孔PEG海绵最初不拥有用SebC1制备的多孔PEG海绵的高弹性,直到结合入PCL。在结合入PCL后,TmsC1海绵也具有了已证明的抵抗多至80%压缩的弹性结构(图14(b),表9)。

[0313] 多孔PEG海绵的体外降解研究

[0314] 将多孔PEG海绵切成立方体 ($5 \times 5 \times 5 \text{ mm}$),在乙醇中脱水并在真空烘箱 (60°C) 中干燥过夜。将干燥的样品称重并置于 $1 \times \text{PBS}$ (20 mL , $0.01\% \text{ w/v}$ 的叠氮化钠) 中。将小瓶密封并放入温度可控的定轨摇床中 (37°C , 100 rpm)。在各个时间点 (1、2、4和8周) 从定轨摇床取出3个样品并在去离子水 ($3 \times 20 \text{ mL}$) 中洗涤30分钟。随后,通过将聚合物浸泡在乙醇 ($2 \times 20 \text{ mL}$) 中1小时,接着在真空中 (60°C , 24小时) 干燥进行脱水。然后将干燥的样品称重并将获得的

质量值对时间进行作图以得到降解谱。

[0315] 降解研究揭示用TmsC1制备的多孔PEG海绵在8周内约有40%的质量损失,而用SebC1制备的那些多孔PEG海绵在8周内约有35%的质量。到4周时,用SucC1制备的多孔PEG海绵已经完全降解(图15)。

[0316] 多孔PEG海绵的体外细胞毒性评估

[0317] 为了多孔PEG海绵的细胞毒性的评估,制备了两种类型的样品。为了评估多孔水凝胶的细胞毒性,将干燥的多孔PEG海绵称重,将100mg置于80%v/v的乙醇溶液,持续30分钟。然后洗涤多孔PEG海绵并用无菌PBS (3×20分钟)再水化并放在2mL的无菌DMEM中,随后在37℃孵育72小时。然后取出多孔PEG海绵并在细胞生存力测定中使用条件培养基。为了研究水凝胶降解产物对细胞生存力的影响,将干燥的水凝胶(500mg)在1M HCl溶液(5mL)中降解。在真空下与水(5×20mL)共沸除去HCl,最后在高真空下干燥。称重100mg的降解产物并使其溶解/重悬浮于2mL的无菌DMEM中。然后将溶液在UV下灭菌30分钟,并通过0.22μm的过滤器过滤,之后用于毒性研究。在37℃下,具有95%–100%的湿度的5%CO₂气氛中,使NIH 3T3-L1细胞在T225瓶中于DMEM中生长至汇合。用0.05%胰蛋白酶-EDTA将细胞胰蛋白酶消化,使用台盼蓝手动计数活细胞/死细胞染色,用新鲜的培养基稀释以达到 1.25×10^5 个细胞/mL的接种密度并接种在96孔板上(80μL/孔)。留下一些空白孔作为细胞空白对照。将板放回培养箱中,持续4小时,之后添加多孔PEG海绵条件培养基和降解产物。将制备的储备溶液(50mg/mL)用新鲜的完全培养基按因数10稀释两次。将其20μL的两种稀释物以一式三份添加到96孔板中(以获得100ppm和1000ppm的浓度),通过板的轨道运动轻轻地混合,然后将板放回培养箱中再孵育72小时。孵育后,将CelltiterAqueousOne溶液添加到板(20μL/孔)中。轻轻摇晃板以帮助混合,然后放回到培养箱中,持续30分钟至4小时。以定期的间隔,使用配备有微板读数器的Cary 50 Bio UV-可见分光光度计在490nm和700nm处读取板的UV-Vsi吸光度。在约2小时孵育后溶液的颜色达到平衡。用背景吸光度(700nm)和培养基单独的吸光度(细胞空白对照)校正490nm处的吸光度值,然后归一化至生长对照。

[0318] 在不同浓度(100ppm和1000ppm)的多孔PEG海绵条件培养基存在下,孵育72小时后,观察到所有交联剂对细胞生存力的影响极小(图16(a))。在通过快速的酸介导之降解获得的降解产物的存在下,在100ppm没有观察到对细胞的代谢活性有显著的影响(如图16(b))。另一方面,在1000ppm观察到代谢活性稍有降低,但是相对于对照,此差异是极小的。

[0319] 多孔PEG海绵的体内评估

[0320] 将用癸二酰氯(2wt%的PCL)制备的溶胀多孔PEG海绵(实施例17)切成圆盘10×4mm(直径×高度),在真空中干燥(20mbar,60℃)并置于塑料小瓶中,双重密封在自封袋内,之后进行γ辐照灭菌。在Steritech,Victoria,Australia中进行γ灭菌(25kGy最小值)。灭菌后,在植入前将水凝胶置于1×无菌PBS中持续3个小时。将多孔PEG海绵在3个时间点植入12只大鼠中。所有的步骤都是根据澳大利亚国家健康与医学研究委员会(NHMRC)的指导方针进行的,并经墨尔本大学,圣文森特医院动物伦理委员会批准。雄性Sprague Dawley大鼠(动物资源中心(Murdoch,Western Australia),350±50g体重)关在批准的设备中并喂食标准的大鼠饲料并随意饮水。手术前2天和手术后2天,以饮水的形式以25.5mg/kg/天的剂量施用抗生素-恩诺沙星(Baytril 50,Bayer)以避免伤口感染。对于手术,麻醉动物并使用异氟烷维持麻醉状态。对背表面上的皮肤进行剃毛、消毒并沿中线制成四个独立的纵向切

口,约1.5cm长,相距1.5cm。通过在主切口的任意一边小心地用钝器解剖来制备每个支架的单独的皮下袋,并将海绵插入到每个袋中,并使用通过中心孔且进入周围筋膜的3-0聚丙烯缝线将其锚定到合适的位置。使用伤口夹闭合伤口并使动物在加热垫上恢复30分钟。在植入后2、8和16周,如先前所描述的使大鼠麻醉,重新打开原始伤口,取出水凝胶支架和周围组织,然后通过心内注射lethobarb使大鼠安乐死。将取出的海绵垂直于圆形表面切成两半,并用4%的多聚甲醛溶液于4℃固定48小时,并通过石蜡处理。处理之后,将外植体包埋以便可以观察和分析完整的横截面和周围组织。通过样品的中点切割5μm厚的切片并封片在多聚赖氨酸包被的载玻片上。使用苏木精和伊红(H&E)对切片进行染色并使用抗ED1的抗体对巨噬细胞和巨细胞进行免疫组织化学分析。

[0321] 植入2周后,多孔PEG海绵很好地并入组织中,只形成薄的囊(图17d)。在2周后观察到关于水凝胶的尺寸的微小改变;聚合物海绵保持完整并清晰可见(图17e)。在加工到石蜡中后,将聚合物海绵切片,随后用H&E染色以观察渗透进聚合物海绵的细胞和组织(图17g-i)。H&E染色的切片显示致密细胞组织和高度血管化组织从周围组织渗入水凝胶中。从指示血管位置的染色的红细胞可清楚地看到血管(图17h-i)。可以看到血管化组织能够从周围组织渗透到聚合物海绵的中心(如通过H&E染色的切片所证明的)。在染色的切片中观察到的大间隙可能是由于加工进石蜡造成的脱水而导致的多孔PEG海绵孔壁和穿透的组织收缩引起的。

[0322] 8周获取也显示在并入周围组织之多孔PEG海绵周围的薄纤维囊。获取的组织的二等分显示外植体尺寸的厚度减小并且观察到聚合物海绵材料变黄。通过H&E染色证实组织浸润至支架的中心,但是没有观察到渗透组织的量有显著差异(图17j)。然而,注意到8周后存在的组织是疏松结缔组织,而不是在2周时存在的致密细胞组织(图17k,l)。多孔PEG海绵的血管形成很可能是由于来自周围组织的血管形成,因为没有进行细胞或生物因子装载。

[0323] 血管化组织渗透到聚合物海绵的中心证明了多孔PEG海绵的孔的互连性。到2周时细胞和血管组织的渗透表明多孔PEG海绵对细胞组织和血管是可渗透的。因此,多孔PEG海绵具有适合于细胞和血管结合的3D环境,并保证渗透组织的存活。

[0324] 与在2周和8周时相比,在16周更加难以定位植入物,原因是在切除时所观察到的植入物突起缩小。按照2周和8周,在周围组织中没有副作用的宏观证据。存在少量固体组织并粘附至缝线。切割粘附至缝线的组织和缝线周围的组织并进行组织学处理。获取之组织的二等分揭示,植入物的尺寸小得多且仅剩余非常少量的多孔PEG海绵(图18a)。

[0325] 进行H&E染色以辨别组织形态并观察多孔PEG海绵的存在。H&E染色的切片的分析揭示,到16周,剩余极少量的多孔PEG海绵(图18b和c)。其中存在多孔PEG海绵残余物的地方,周围组织是平常的致密细胞组织和血管组织。这表明,在16周内聚合物海绵发生严重的降解,表明其在体内的可生物降解性。

[0326] 巨噬细胞和异物巨细胞(FBGC)的存在是对植入物的先天免疫应答的指示。作为确定巨噬细胞和FBGC反应的一种手段,对所有切片进行ED1免疫染色(图18d-1)。2周样品的ED1染色揭示如所预测的存在巨噬细胞。在第2周通过ED1染色观察到巨噬细胞主要是存在于渗透组织的中心,一些位于组织/聚合物界面处(图18d-f)。8周切片的分析显示巨噬细胞反应已显著降低,且巨噬细胞的尺寸小的多(图18g-i)。染色的组织主要以非炎性细胞为主,在支架/组织界面存在的量极少,表明对水凝胶材料的反应极小。到16周聚合物海绵已

经发生了严重降解(如剩余极少量的支架所证明的)。ED1染色的16周切片显示极少量的巨噬细胞(图20j-1)。通过ED1染色对切片进行分析,多孔PEG海绵及其降解产物最初导致轻微的炎症反应,这种反应超过16周就显著降低。

[0327] 体内研究揭示在植入16周后,对于多孔PEG海绵及其降解产物没有观察到副作用。通过使血管组织以极低免疫原性渗透和到16周时严重降解,多孔PEG海绵表现出作为支架的理想性能。

[0328] 应当理解,在不背离如本文所概述的本发明的精神的情况下,可作出多种其他修改和/或改变。

[0329] 除非上下文另有说明,否则在整个本说明书和所附的权利要求书中,术语“包括”及其变形例如“包含”和“含有”将理解为指包含陈述的整数或步骤或者整数组或步骤组,但不排除任何其他的整数或步骤或者整数组或步骤组。

[0330] 在本说明书中提到的任何现有出版物(或从其中推出的信息)或任何已知事项,不是并且不应认为是承认或认可或以任何形式暗示现有出版物(或从其中推出的信息)或已知事项构成本说明书所努力涉及的领域的公知常识的一部分。

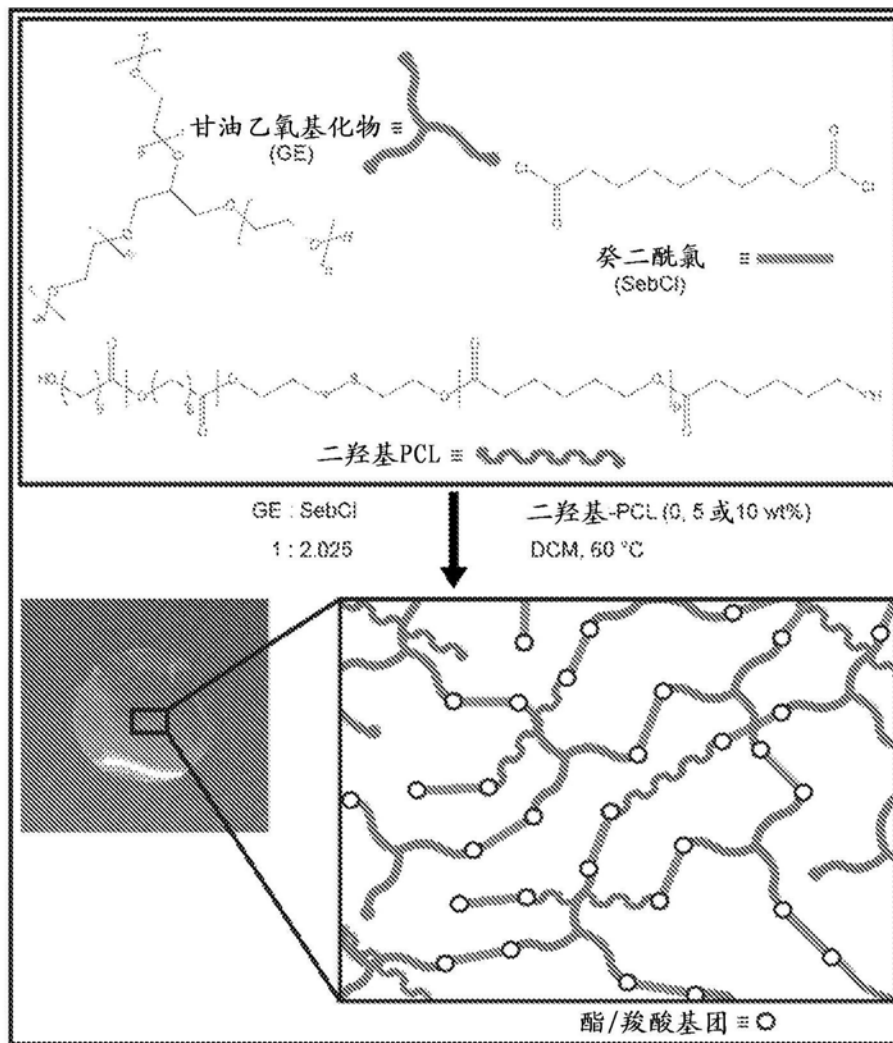


图1

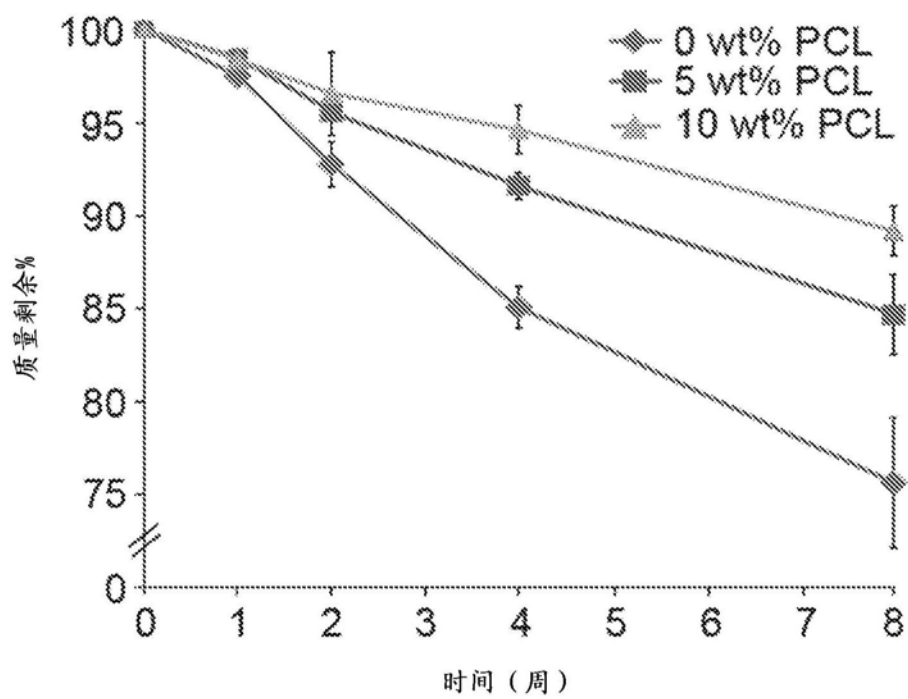
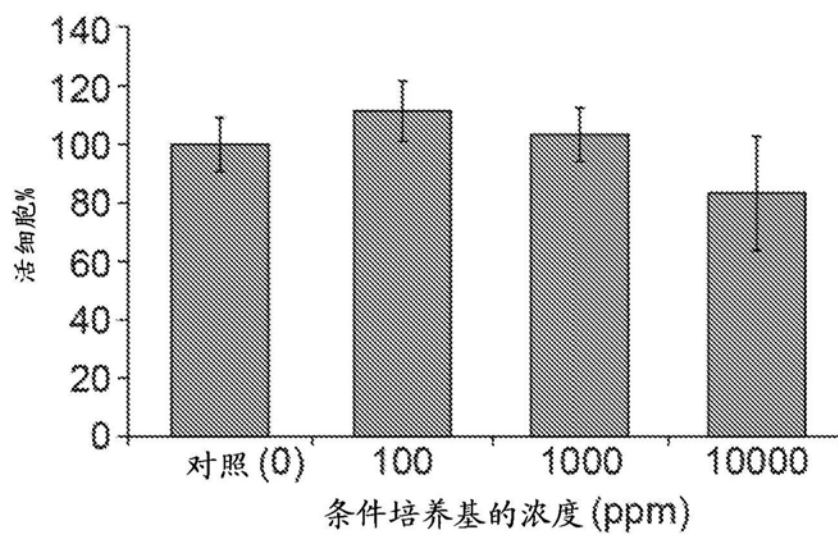


图2

(a)



(b)

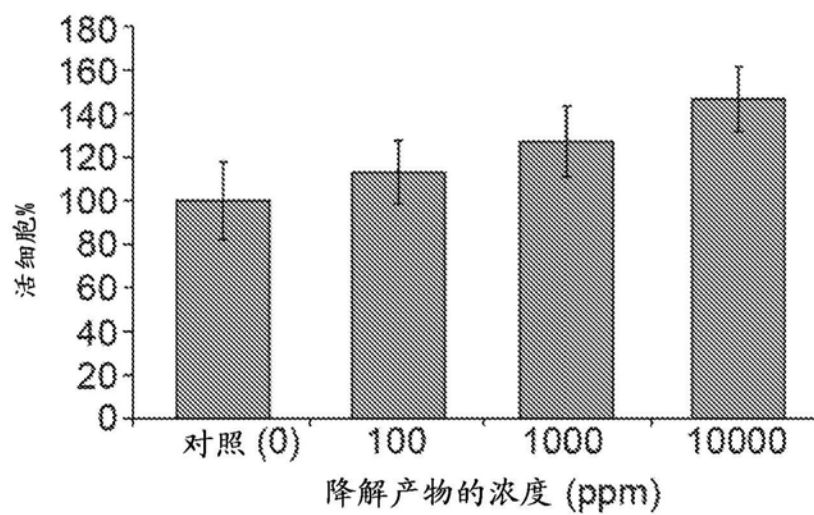


图3

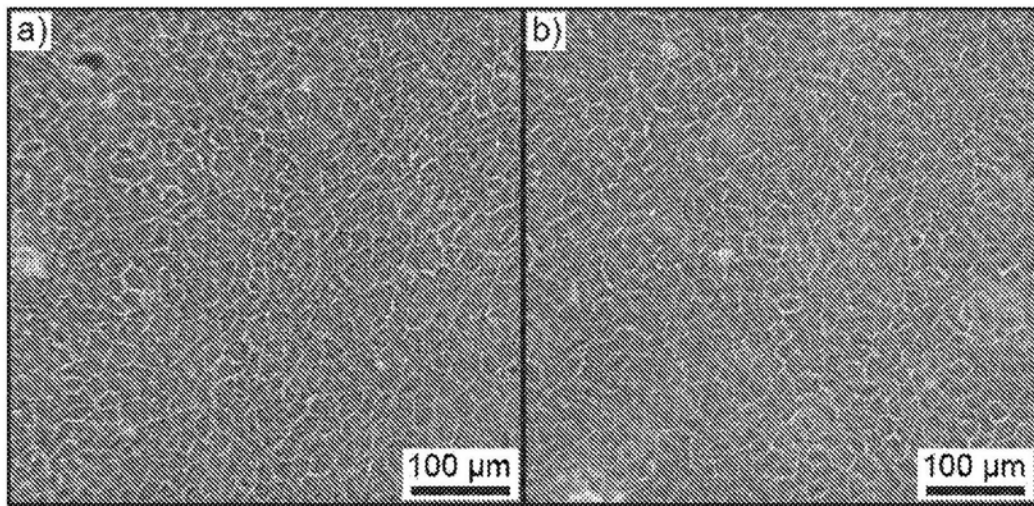


图4

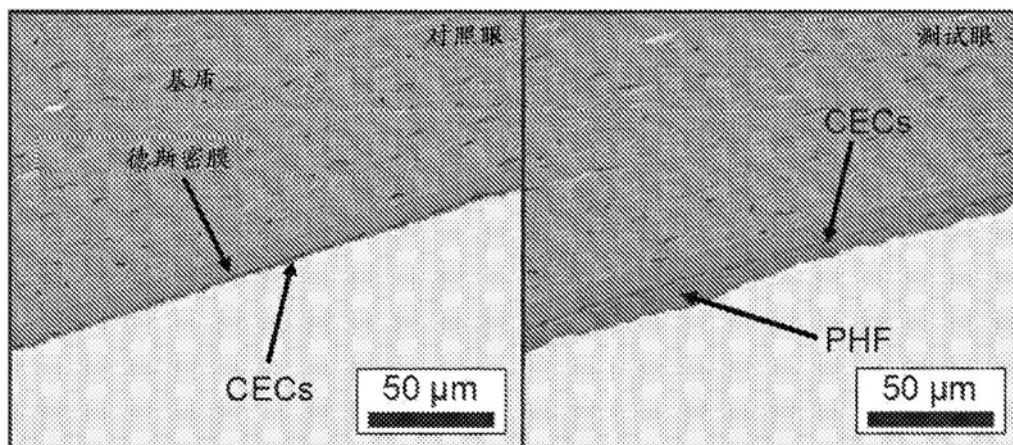


图5

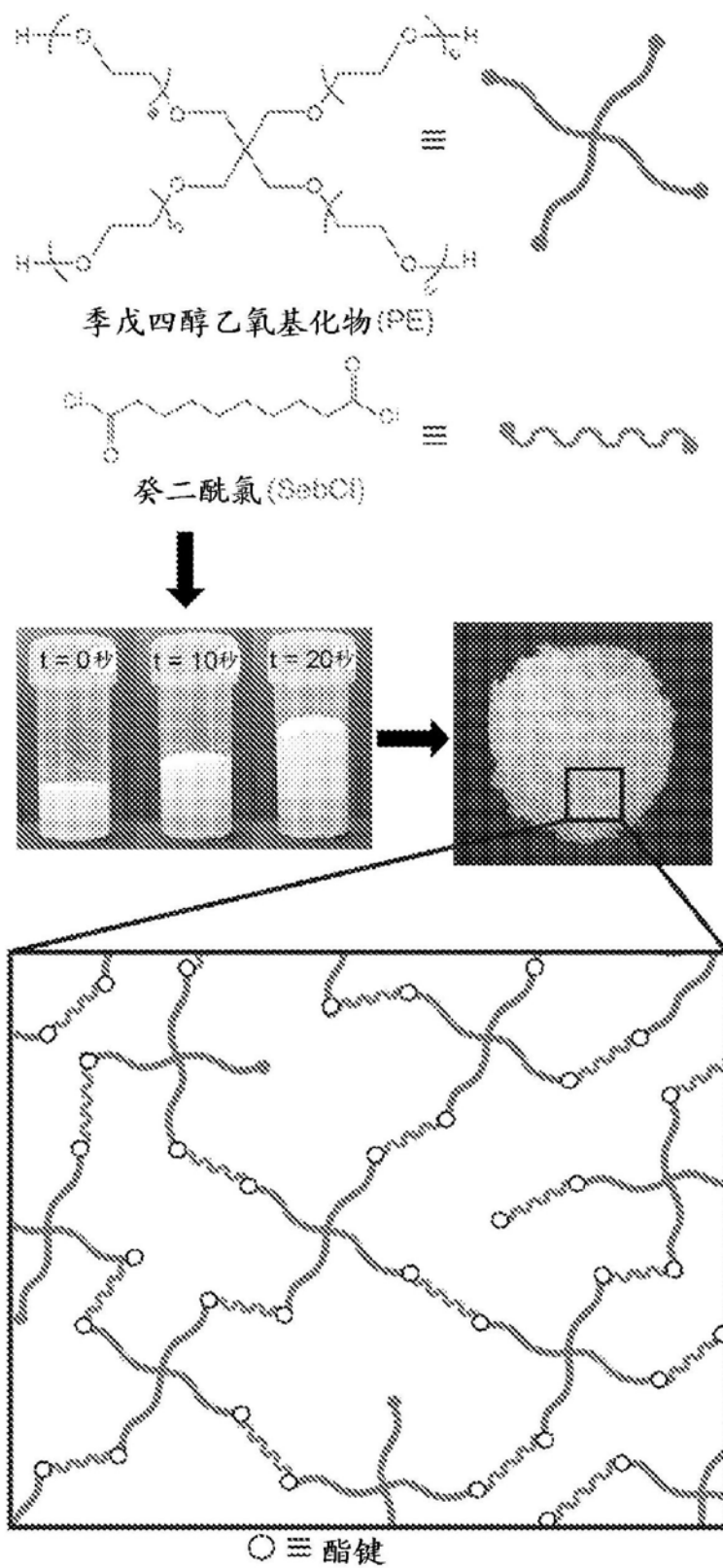


图6

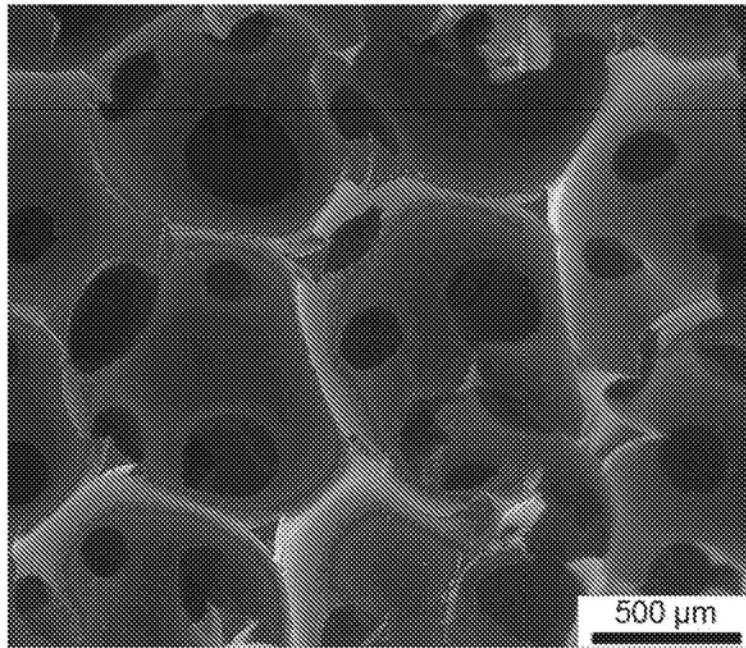
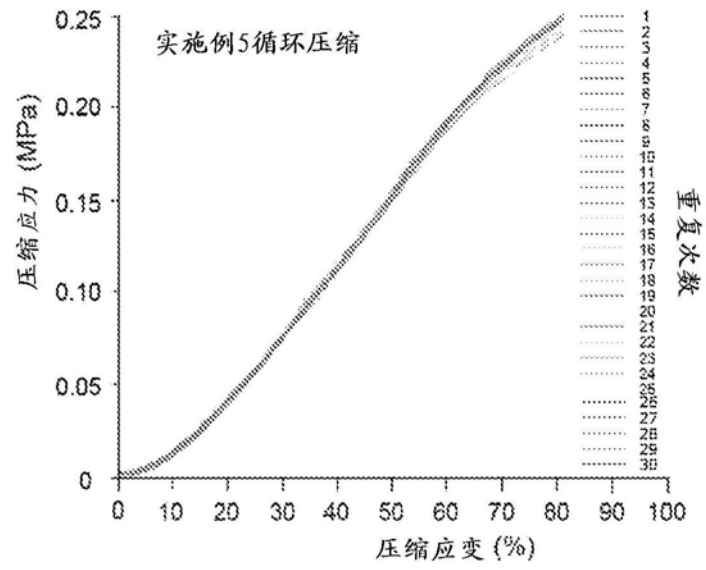


图7

(a)



(b)

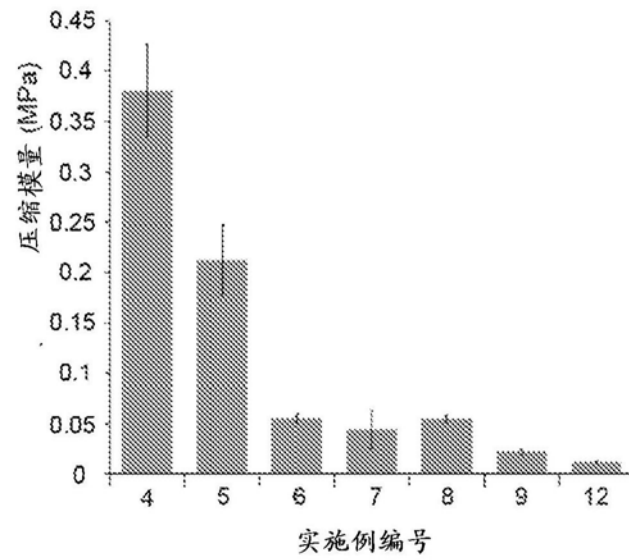


图8

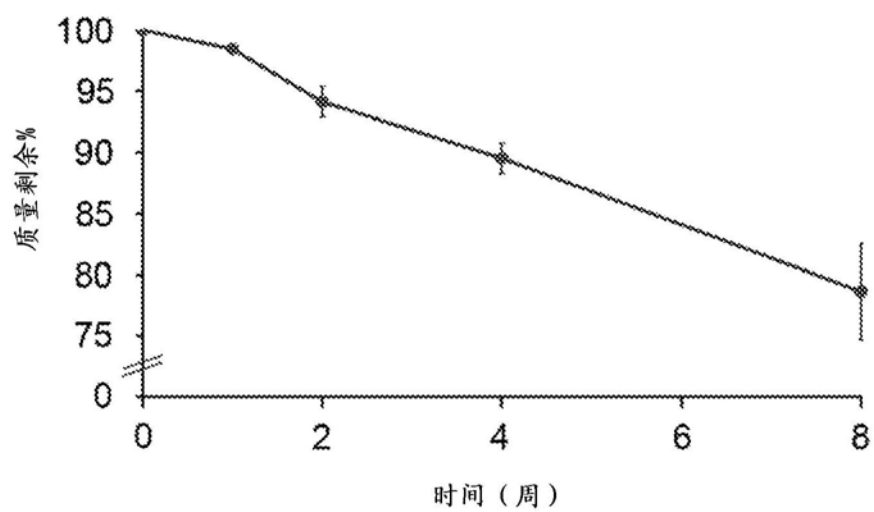
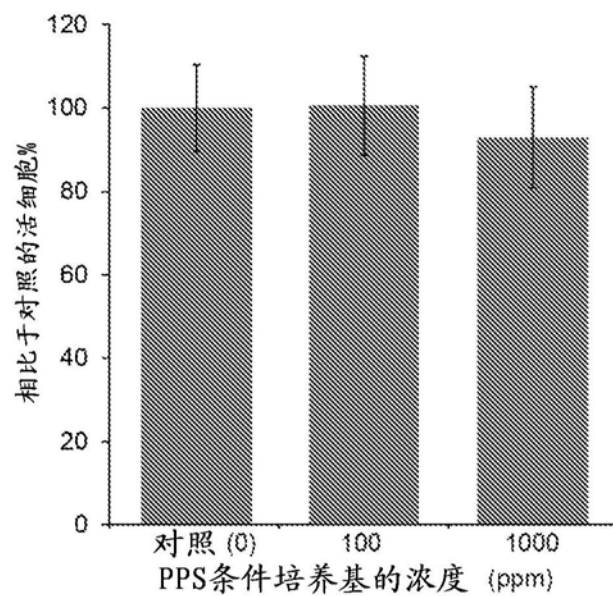


图9

(a)



(b)

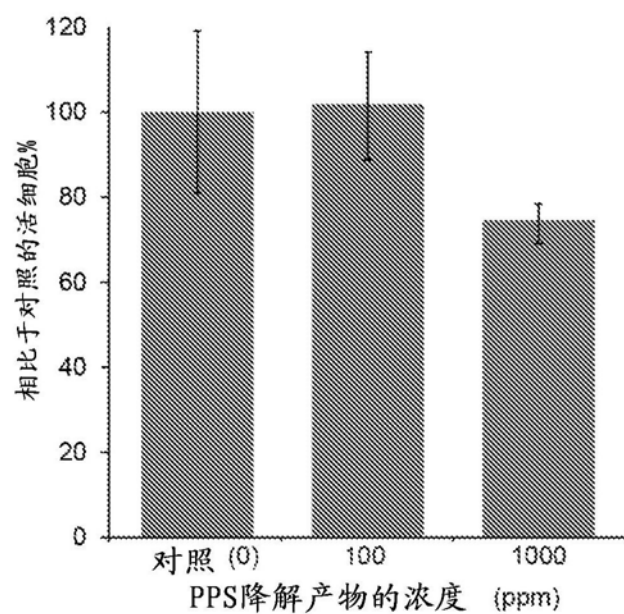


图10

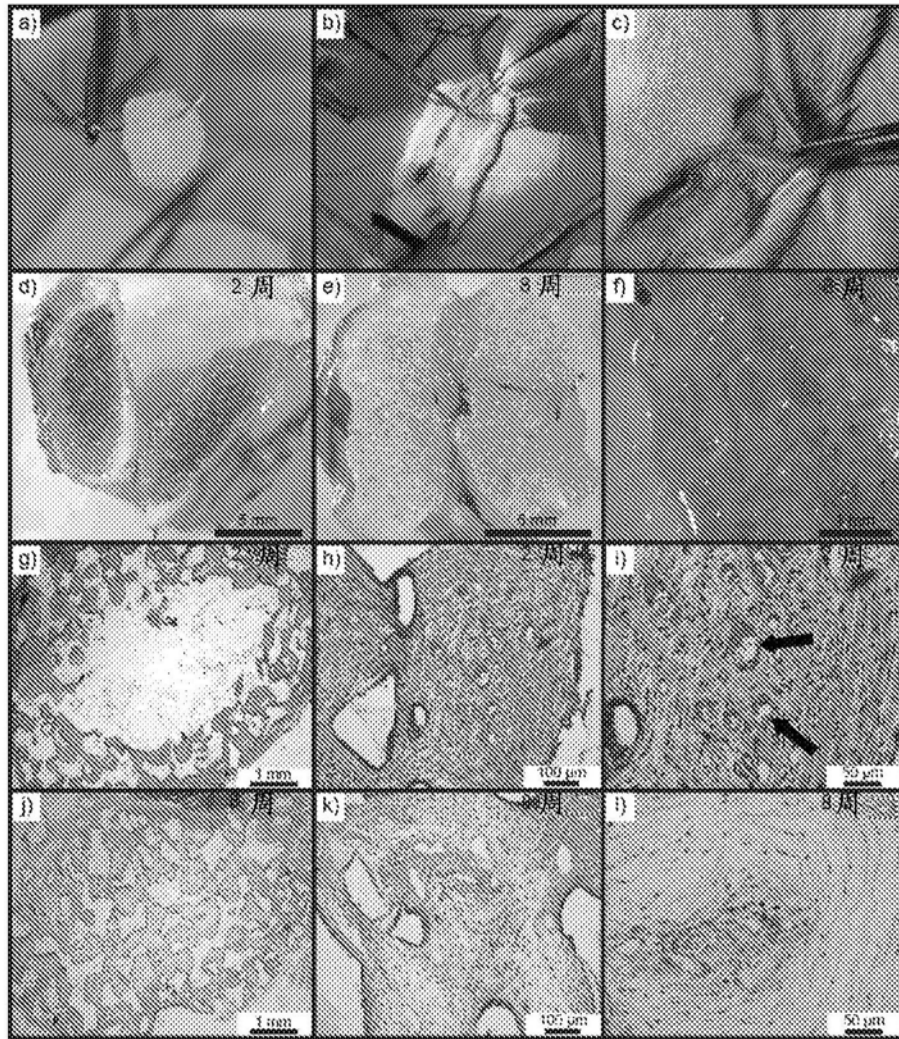


图11

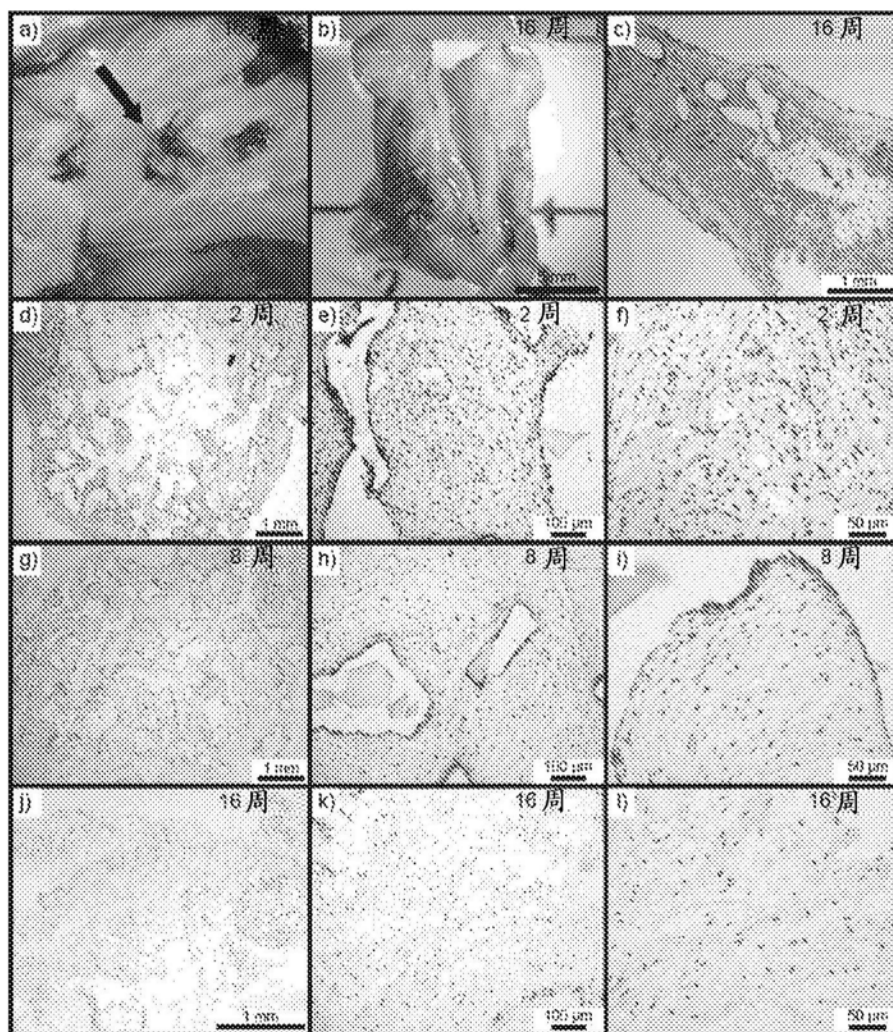
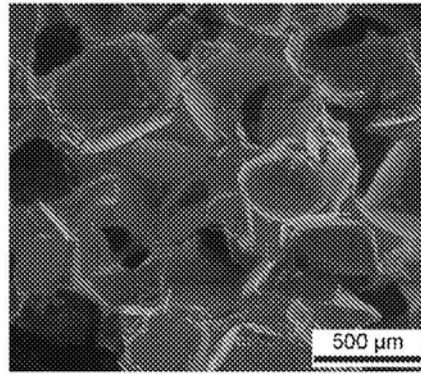
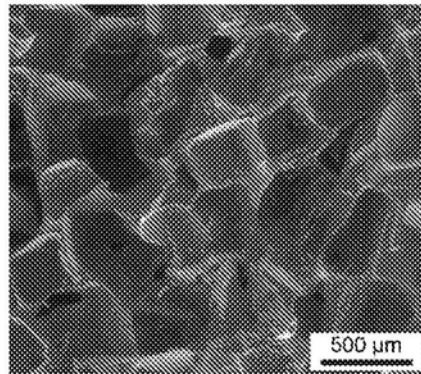


图12

(a)



(b)



(c)

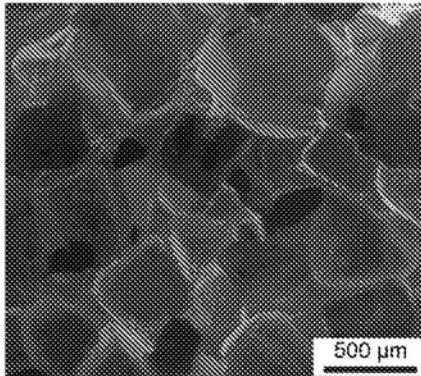


图13

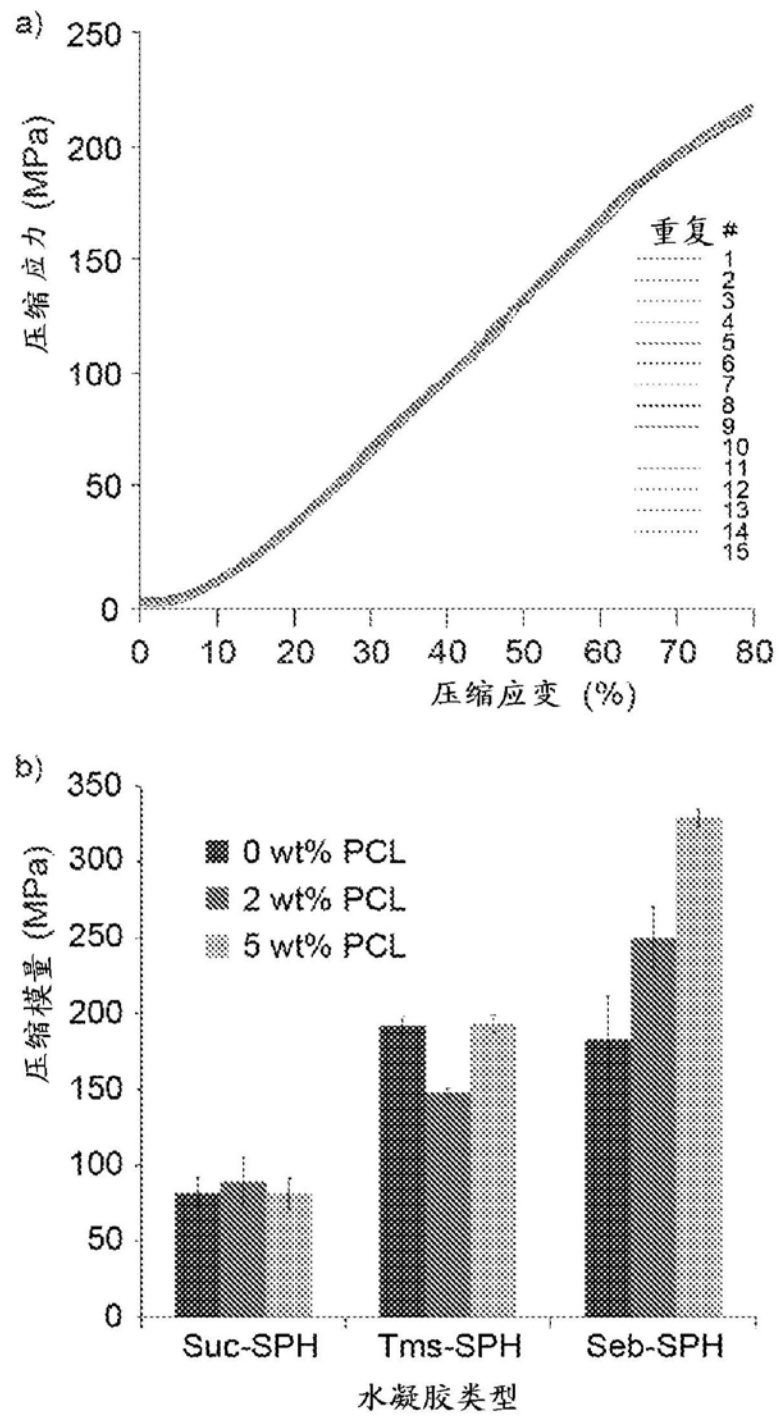


图14

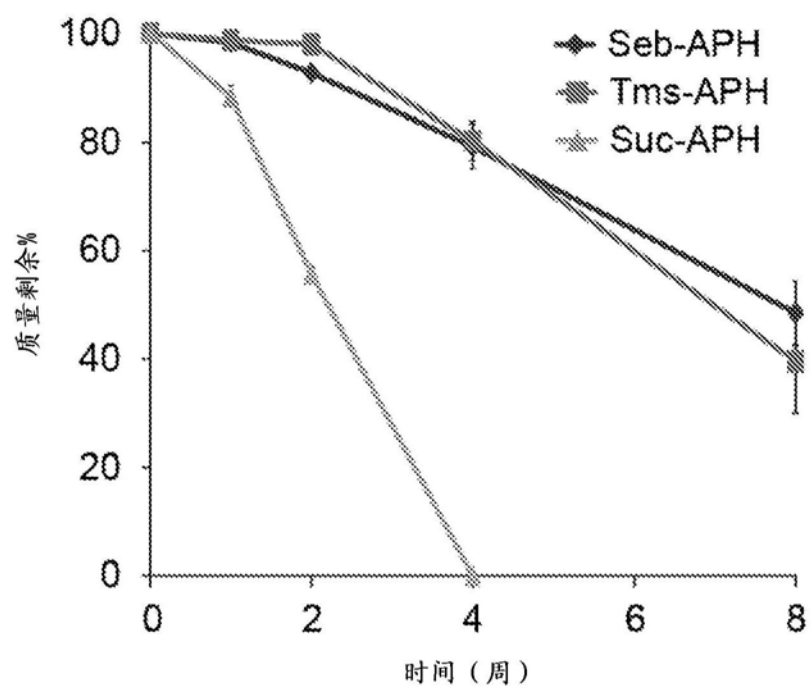
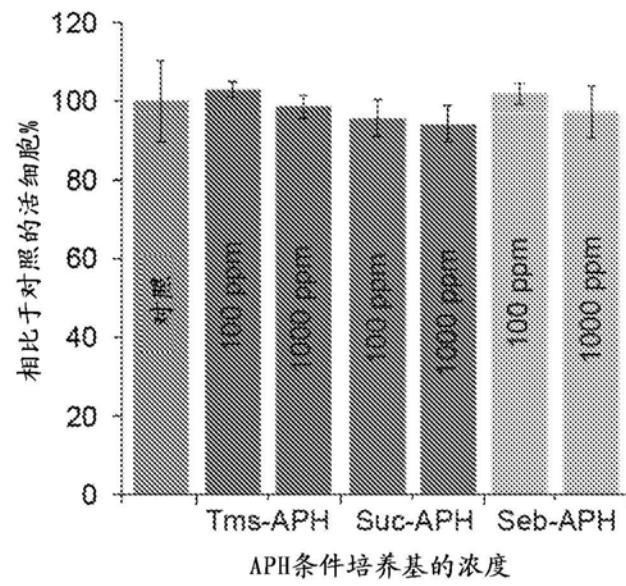


图15

(a)



(b)

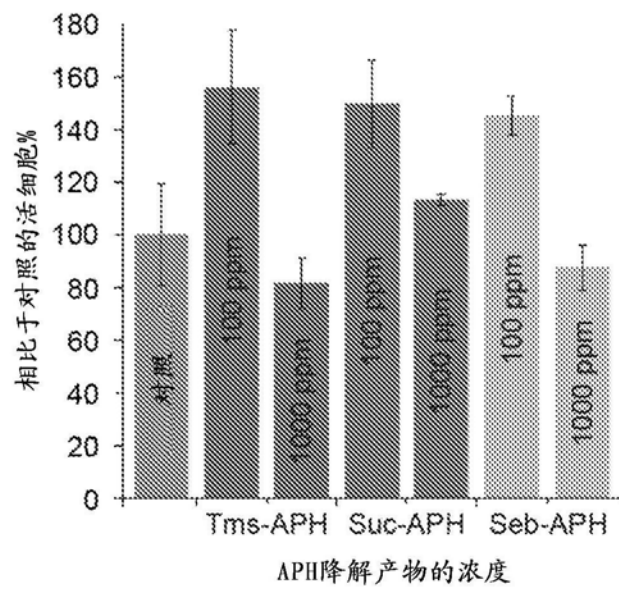


图16

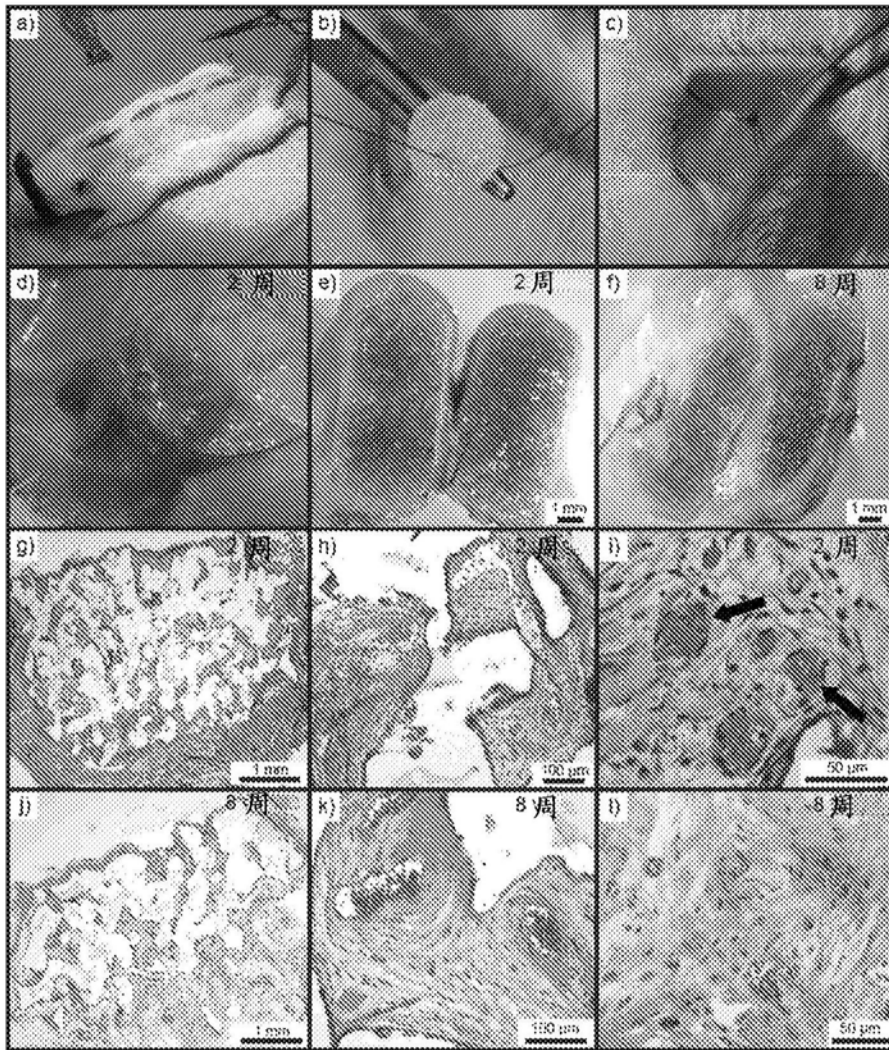


图17

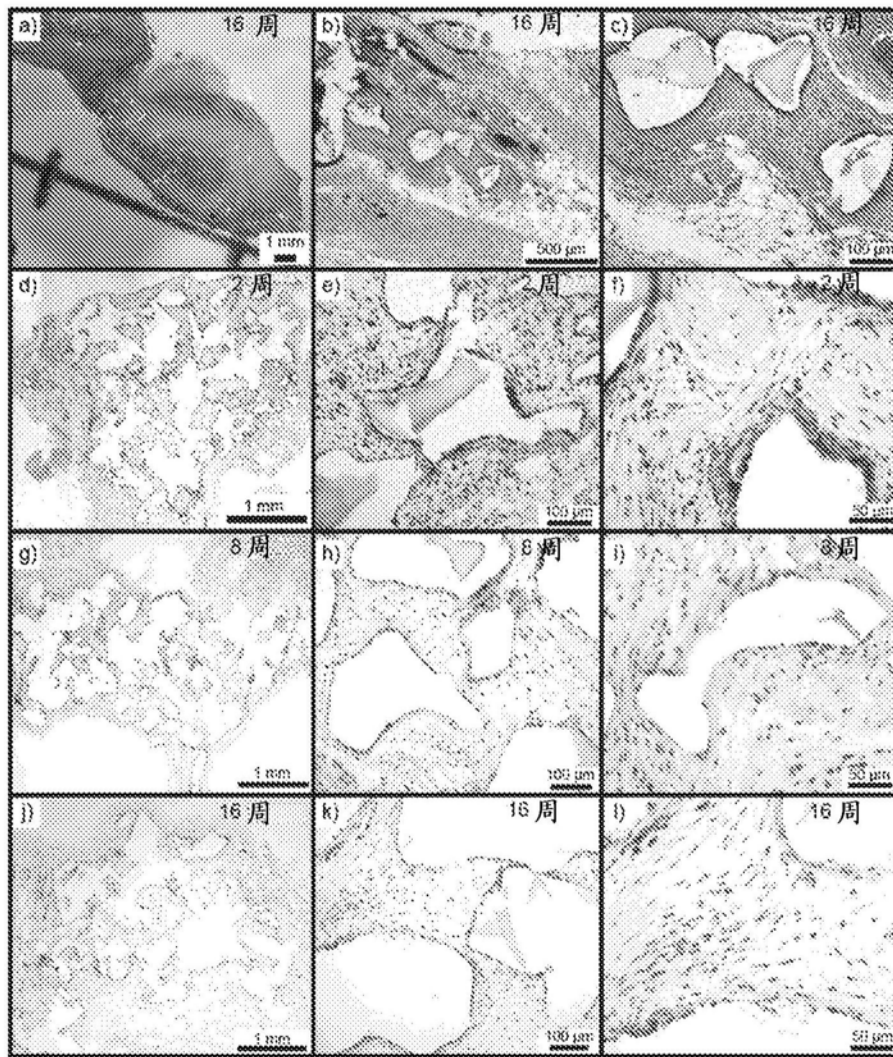


图18