

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61F 6/14 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02819398.9

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100434051C

[22] 申请日 2002.7.22 [21] 申请号 02819398.9

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 1 [33] US [31] 60/309,274

[86] 国际申请 PCT/IB2002/003363 2002.7.22

[87] 国际公布 WO2003/011200 英 2003.2.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.1

[73] 专利权人 阿内科瓦有限公司

地址 瑞士日内瓦

[72] 发明人 帕斯卡尔·莫克

[56] 参考文献

US5158881A 1992.10.27

US3659596A 1972.5.2

US3911911A 1975.10.14

US6054142A 2000.4.25

CN2209968Y 1995.10.18

CN2128873Y 1993.3.31

审查员 王秋岩

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

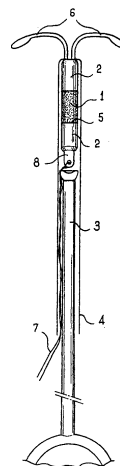
权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称

子宫内装置及其生产方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于将一或多种被包囊化于所述装置中的因子放置在子宫腔内的可取式子宫内装置及其制备方法，所述可取式子宫内装置包括具有合适孔径的选择性可通透膜，以使得可以将足够的营养素转移至所述因子。



1. 一种可取式子宫内装置，其用于将一或多种被包裹化于所述装置中的因子放置在子宫腔内，所述因子选自胚胎、雄性和/或雌性配子、受精的卵母细胞、未受精的卵、及它们的任意组合，所述装置的特征在于其包括具有合适孔径的选择性可通透膜，以使得可以将足够的营养素转移至所述因子。

2. 权利要求 1 的可取式子宫内装置，其中所述装置为管状。

3. 权利要求 1 或 2 的可取式子宫内装置，其中所述装置包括使得所述因子保持在所述装置中的工具。

4. 权利要求 3 的可取式子宫内装置，其中所述装置具有至少一种用于装填所述因子的包裹 (1)。

5. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置包括一个有义方向瓣膜。

6. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置包括使得所述装置稳定于子宫内的工具 (6)。

7. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述膜由聚醚砜制成。

8. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置的壁的厚度在 50-500  $\mu\text{m}$  的范围。

9. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其具有的分子量截止等于或大于 50000。

10. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其具有的分子量截止大于 1000000。

11. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置的长度在 0.5 cm-5 cm 的范围。

12. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置包括一可取式中空纤维。

13. 权利要求 12 的可取式子宫内装置，其中所述中空纤维的内径在 100-10000  $\mu\text{m}$  的范围。

14. 权利要求 4 的可取式子宫内装置，其中所述包囊（1）由生物聚合物材料中空纤维制成。

15. 权利要求 14 的可取式子宫内装置，其中所述生物聚合物材料为聚醚砜。

16. 权利要求 14 的可取式子宫内装置，其中所述中空纤维由聚丙烯酸酯、丙烯酸酯共聚物、聚偏二乙烯或聚氨酯制成。

17. 权利要求 4 的可取式子宫内装置，其中所述包囊（1）具有的分子量截止为 150kDa 至 280kDa。

18. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置装填了选自雄性和/或雌性配子、受精的卵母细胞、未受精的卵、及它们的任意组合中的至少一种因子。

19. 权利要求 18 的可取式子宫内装置，其中所述装置装填了雄性和/或雌性配子。

20. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置装填了胚胎。

21. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置可被放置于哺乳动物的子宫腔内，所述哺乳动物选自包含以下动物的一组：牛、绵羊、猪和马。

22. 权利要求 1 或 4 的可取式子宫内装置，其中所述装置可被放置于人的子宫腔内。

23. 一种制备用于将一或多种因子放置在子宫腔内的可取式子宫内装置的方法，所述一或多种因子选自胚胎、雄性和/或雌性配子、受精的卵母细胞、未受精的卵、及它们的任意组合，所述因子能与子宫液相互作用，所述方法包括以下步骤：

- 提供所述因子，
- 提供适于接受所述因子的如权利要求 1-22 中任一项所述的可取式

子宫内装置，

- 将所述因子装填入所述装置中。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述因子选自雄性和/或雌性配子。

## 子宫内装置及其生产方法

本发明一般性涉及子宫内装置 (intrauterine device) 且特别是出于治疗目的将因子 (element) 置于子宫腔内的方法。子宫腔是一个解剖学位置, 不容易直接进入其中, 而且至今子宫内装置仅用于避孕方法领域中。然而, 子宫腔借助于合适的子宫内装置可用于一些其它目的, 特别用于直接治疗子宫壁 (子宫内膜和/或子宫肌膜) 病变、暂时性体内胚胎/卵培育及作为合适的施用途径以到达全身血液系统。本发明提供了这方面的方法。

本发明涉及一种可取式子宫 (子宫腔或输卵管) 内装置, 特别用于将配子或胚胎移植入子宫 (或输卵管), 使得可在辅助生殖技术 (ART) 中进行体内及子宫内 (或输卵管内) 受精和/或植入前发育。

本发明还涉及一种相似的子宫内装置以将通过基因转染而遗传学修饰的细胞系植入子宫内, 以将分子输送于子宫内膜附近而无全身作用并允许在 ART 或自然受精后在胚胎移植之前更特异性改变及预处理子宫内膜, 或者相反地作为标准宫内节育器 (IUD) 以避免任何妊娠 (避孕)。

本发明还涉及一种相似的子宫内装置, 使得可以将各种活性因子输送于子宫腔内。

特别地, 所述活性因子可以是配子/胚胎及用于分泌生物活性因子的通过基因转染而遗传学修饰的细胞系, 后者的目的是为改善体内培育配子/胚胎 (胚胎可得自克隆或任何其它技术) 的子宫内环境。

本发明可应用于任何哺乳动物物种。

根据第一方面, 本发明涉及生殖医学, 特别是在辅助生殖技术中体外受精 (IVF) 及使用与细胞包囊技术 (cell encapsulation technology) 相关的子宫内装置经由子宫输送药物。

自 1978 年开始，IVF 已经成为处理大多数不孕症患者致病原因的优选方法。作为 IVF 方法的一部分，生殖细胞（卵母细胞和精子）及所得受精的卵母细胞（受精卵，胚胎）根据特异方法使用适于该方法中每个特异步骤的体外培养基处理。

标准体外受精（IVF）包括以下步骤：

-成熟（卵母细胞募集）

为保证一个以上的卵母细胞成熟，将妇女在实际受精之前用激素处理。通常地，将妇女用破坏脑（下丘脑和垂体）与卵巢之间正常激素控制信号的一种因子（GnRH 激动剂）处理 14-21 天。之后根据卵巢应答情况施用 10-20 天相对大剂量的卵泡刺激素（FSH）。FSH 刺激许多卵泡成熟，每个卵泡均含有一个卵母细胞。

当卵母细胞准备排卵时，施用人绒毛膜促性腺激素（hCG）以完成卵母细胞成熟。

-抽吸卵母细胞

在体内成熟后，使用超声导向卵泡穿刺（ultrasound guided follicular puncture）从妇女卵巢中收集卵母细胞。

-受精及胚胎培养

体外受精通过向卵母细胞中加入精子（体外受精 IVF）或者通过微注射在每个成熟的卵母细胞中注入一个精子（胞质内精子注射，ICSI）而获得。受精的卵母细胞在生殖道外的 IVF 培养基中培养 2-5 天。

-胚胎移植

在体外培养胚胎 2-5 天后，选择几个胚胎并用一个细管将其移植至妇女的子宫内。

体外受精和胚胎培养的最终目标是提供高质量的胚胎，其能持续正常发育并分娩存活。

-针对植入前胚胎发育进行体外培养

近 20 年来尽管用 IVF 及最近用胞质内精子注射（ICSI）治疗患者，

但移植的每个胚胎的植入率还较低，平均为大约 20%。

世界上大多数 IVF 中心在第 2 或第 3 天进行胚胎移植，即在生理学植入期之前 3 或 2 天进行移植。胚胎生理学和新陈代谢领域的新近进展导致新的贯序无血清培养基形成，其设计为模拟胚胎沿着生殖道行进的动态环境（Gardner 等，1996）。贯序培养系统（G1.2/G2.2）具有最高比率的胚泡形成，但仍低达 50%（Gardner 等，1998）。

将胚胎培养至胚泡阶段的基本原理是这使得可以进行选择以移植具有经证实的发育能力的胚胎。另外，将胚泡转移至子宫内与转移一个早期分裂的胚胎相比在生理学上更接近体内情况，其正常存在于输卵管中且没有从子宫内逐出的危险，因为在胚胎植入之前的时间减少。

最近的论文揭示将受精卵与人子宫内膜上皮（Simon 等，1999）和/或基质细胞（Barmat 等，1998）在体外共同培养对每个前胚胎的卵裂球数，发育为桑椹胚-卵裂球期的比率，自然培育的比率及胞质片段的百分率，及植入比率具有有益作用，如近来 Spandorfer 等，2002 所述。

在 1994 年美国和加拿大的辅助生殖技术活动的报道中，配子输卵管内转移（GIFT）及合子输卵管内转移（ZIFT）与体外受精相比具有较高的临床妊娠率。最近 Levran 等在 2002 年表明合子输卵管内转移与在标准 IVF 之后转移胚泡相比改良了重复植入失败的结果。

这些发现提示合子存在于上段生殖道中对得益于子宫液中存在的所有已知和未知的生长因子的胚胎发育及其在植入过程期间浸润子宫内膜的潜力是重要的。

另外，在牛体内进行的研究近来表明在体内产生的胚胎与具有更多的细胞内通讯手段（Boni 等，1999）及特别是成熟的线粒体（Crosier 等，2000）的体外产生的胚胎相比很少变化。

所有上述研究证实，尽管已经努力通过模拟子宫液特性而使培养基最佳化，但体外的胚胎植入前发育还远未达到优化。

本发明提供了 ART 中的一种新方法，使用细胞包囊技术以特别使

IVF 程序（或者克隆所有其它哺乳动物物种）中的配子和/或植入前合子/胚胎从在子宫中暂时自然培育受益。

另外，控制子宫内培育的时间可产生更好质量的胚胎发育及因此具有较高的植入率，而且如果胚胎转移在 ART 单位中很普遍，则与标准 IVF 相比具有较低花费的经济学优势。

根据第二方面，本发明涉及通过植入可能经过遗传学修饰的组织、细胞或细胞系而子宫内输送活性因子，特别是进行细胞治疗。

在所有哺乳动物物种中，植入的成功与良好质量的胚胎和接受子宫内膜之间的完美通讯相关。

在辅助生殖技术（ART）领域中，临床医生对子宫内膜接受性的复杂情况的控制限于通过施用  $17\beta$ 雌二醇和孕酮以模拟生理学的贯序的卵泡和黄体期进行内分泌处理。

在基础科学文献中，大多数研究目前集中在使用体外和体内模型如缺乏目的分子的基因敲除小鼠来研究胚胎和子宫内膜之间的围植入期（periimplantation）的旁分泌学。例如，已经揭示了在整联蛋白 $\beta 1$ 缺陷小鼠（Fassler 和 Meyer, 1995）及具有白细胞介素 II 受体 $\alpha$ 链无效突变的雌性小鼠（Robb 等, 1998）中，胚胎不能植入。

然而，在啮齿动物中发现不一定需要在胚胎和子宫内膜之间直接接触（Shiotani 等, 1993）。但二十年来胚胎植入率仍保持稳定及低下，我们可以说用阴道孕酮和 hCG 全身性施用及最后的  $17\beta$ 雌二醇进行的内分泌处理远未到达最佳而且完全未掌握胚胎植入过程的复杂的旁分泌学。

本发明提供了 ART 的一种新观念，使用细胞包裹技术以植入细胞系，所述细胞系经遗传学修饰而暂时在 IVF 程序中转移胚胎之前在子宫内膜附近分泌目的分子。

这种比较接近靶组织的子宫内分子或“药物”输送，使得更好及更选择性预处理子宫内膜及使用短半衰期的小分子或者使用具有不良反应而严禁在全身施用的分子。



根据第三方面，本发明涉及一种可植入/可插入型装置，以将在植入之前在接受胚胎之前能预处理子宫的因子输送至子宫壁或者治疗子宫。关于这个实施方案，能刺激子宫特异性针对胚胎植入而准备的某些或大多数药物，营养素，维生素，氨基酸，脂肪酸，肽，蛋白质等物质，或者任何其它治疗剂，也可以通过本发明的含有释放这些因子的聚合物或细胞的装置而易于输送。事实上，本发明的可取式子宫内装置就药物输送而言对不能通过正常的注射或其它输送途径接受药物的妇女具有特别的优势。另外，通过子宫壁输送因子可以是治疗生殖系统癌症和/或其它生殖疾病以及任何子宫疾病的最佳治疗形式。

本发明特别提供了细胞包囊子宫内装置以进行控制时间的体内和子宫内配子受精和/或胚胎植入前发育（从几分钟至 48、72 小时），在此子宫在 IVF 程序中转移指定胚胎之前发挥“天然培育器”的作用。

因此，本发明的细胞包囊子宫内装置是一种新的及经改良的子宫内装置，与 Jerome Schwarz 于 1969 年的美国专利 No.3628530 及 Rene Cournut 于 1967 年的美国专利 No.3516403 所述避孕 IUD 相似，其根据本发明可以使得将与其它体细胞相关或不相关的配子或胚胎（在体内共同培养）暂时导入子宫腔内，及在限定时间之后通过使用细胞包囊技术回收，如 Thomas Mandel 等于 1989 年的 WO91/00119, Newman 和 Kram 于 2000 年的 WO01/64185 A2 及 Aebischer 等于 1990 年的美国专利 No.5158881 和 Li 等于 1996 年的美国专利 No.6054142 所述。

事实上，本发明涉及一种可取式子宫内装置以将一或多种能与子宫液相互作用的被包囊化（encapsulated）的因子放置在子宫腔内，其包括一种装填包囊化的因子的子宫内装置。

根据本发明，术语“因子”是指任何有机或无机的、细胞或分子、天然或合成的化合物或物质。

术语“装填”不仅涵盖了其中本发明子宫内装置是所述被包囊化的因子的支持物，例如所述因子可附着于所述装置的表面上，而且还包括

其中所述因子包含在本发明的装置内。根据优选的实施方案，提供的本发明可取式子宫内装置具有至少一个腔（housing），其中装填了所述被包裹化的因子。不同的因子可以混合在相同的腔中或者置于单独的腔中。

短语“能与子宫液相互作用”不仅涵盖了其中所述因子通过本发明的装置输送至子宫液中以对子宫腔的壁（子宫内膜和/或子宫肌膜）产生作用（第一种情况），还包括其中所述因子保持在所述装置中并与子宫液和/或与子宫壁（子宫内膜和/或子宫肌膜）具有已知或未知的交换或相互作用（第二种情况）。

根据“第一种情况”的第一个方面，所述因子不仅是能治疗子宫的制剂，而且还是能治疗任何病变的制剂。事实上，能治疗子宫的因子从本发明的装置中输送至子宫液中并对子宫腔壁具有直接作用。这种因子选自以下一组：能预处理子宫壁以达到最佳植入胚胎的因子，能预处理子宫壁以达到最佳卵培养的因子，治疗性处理子宫的因子及避孕制剂。

这种系统的优势是使得可以使用对靶器官具有直接作用的因子，避免全身性途径使用。

另外，根据“第一种情况”的第二个方面，本发明的装置可以使得可以通过子宫内施用途径输送能治疗任何病变的因子。换言之，这种因子可以在子宫液内输送，然后进入与子宫壁接触并通过子宫内膜的静脉系统之后进入全身血液系统。换言之，该子宫内输送是施用可能治疗与任何器官有关的任何病变的任何药物的一种可能途径。

在可能装填于本发明可取式子宫内装置中的因子中，必须提及的有分泌一或多种因子的组织，细胞或细胞系（用于细胞治疗），体细胞，干细胞（全能细胞），作为基因转移载体的重组病毒（用于基因治疗），有义或反义 mRNA 序列，雄性和/或雌性配子，受精的卵母细胞（两个前核细胞），未受精的卵及任何上述因子的组合。

上述“第二种情况”涉及受精的卵母细胞（两个前核细胞）和未受精的卵，其中子宫发挥天然培育器的作用，使得所述胚胎或卵在代替体

外培养基的天然培养基中培养。在这种情况下，本发明的装置中未装填因子输送至子宫液中，短语“与子宫液相互作用”涵盖了胚胎或卵与由子宫液和子宫壁组成的环境培养基交换或相互作用。

根据本发明优选的实施方案，由组织，细胞或细胞系分泌的至少一种因子选自药物，激素，营养素，肽，蛋白质，抗体，营养因子，生长因子，淋巴因子，细胞因子，酶，凝血因子，血管生成因子，神经递质，神经调节因子。关于这一点，本发明涵盖了其中分泌可装填于本发明装置中的因子的组织，细胞或细胞系可遗传学修饰以获得分泌希望的产物的情况。

根据本发明的另一个优选的实施方案，能治疗性处理子宫的因子选自抗炎制剂，氨基酸，脂肪酸，抗体，营养因子，生长因子，淋巴因子，细胞因子，酶，蛋白质，肽，凝血因子，血管生成因子，止痛剂，神经递质，神经调节因子，抗焦虑药，抗抑郁药，抗生素，有义或反义 mRNA 序列，作为基因转移载体的重组病毒。

根据本发明的另一个实施方案，装填于本发明可取式子宫内装置中的因子能治疗癌症，各种生殖系统癌症，生殖疾病及子宫疾病如子宫内膜炎，子宫内膜异位，子宫出血及各种感染（非限于所列出的疾病）。

事实上，本发明的装置存在许多优势：所述装置对子宫不可能造成任何问题，因为其不是植入子宫壁内，其不需要外科或麻醉以插入而且其可以以完全非固定的方式插入。另外，因子可以在自然月经周期阶段及与控制药物从所述装置中输送的激素依赖性基因表达系统结合而输送。同样非常重要是应注意与经皮肤途径施用同样，子宫内施用使得可以避免施用的因子首先经过肝脏。这产生低毒性及所述因子存在较好的生物可利用度。最后，所述装置可以使用外科介入而快速回收。

图 1 例证了本发明装置（1：包囊，2：支持带 A-远端部分，支持带 B-近端部分，3：活塞，4：保护管，5：开启薄膜或瓣膜，6：侧翼，7：移除装置，8：硅酮绳）。

例如，本发明的装置包括：

1: 包囊

- 非生物可降解的
- 半通透的
- 聚合物材料（即聚醚砜或 PES。来源于 Akzo Nobel Faser AG, Wuppertal, 德国）中空纤维如聚丙烯酸酯（包括共聚物），聚偏二乙烯（polyvinylidienes），聚氨酯。

- 孔：适应于最佳环境性质，通透性从子宫液中存在的小至大分子。
- 孔径：从  $0.005\mu\text{m}$ （等于截止分子量 150kDa 至 280kDa）。
- 孔结构：微孔或任何适当的结构。
- 外径：适应于通过宫颈进入子宫的导管的最佳规格（即  $700\mu\text{m}$ ）。
- 内径：适应于卵或胚胎的大小（即  $500\mu\text{m}$ ），卵或胚胎大小的大约 5 倍（人体具有放射冠的卵大小 =  $200\mu\text{m}$ ），或者适应于输送的分子的大小

- 长度适应于子宫腔，避免子宫内膜损伤及由于子宫扩伸及最后其取出所致任何有害因素（即大约 1.5cm）

- 根据上述要点采取圆柱形状或适于子宫腔的任何适当形状

2: 两个支持物，A 带（远端）和 B 带（近端），如 Schwarz 的美国专利 3628530 针对 IUD 所述加以如下修改：

- 远端部分（A）由基于丙烯酸酯的胶，Luxtrack LCM 23（Ablestik, 美国）或者任何其它系统如套帽密闭，近端部分（B）是中空及能打开的，具有一个有义方向（在内壁上）瓣膜

- A 带支持物包括两个侧翼或者相似材料的任何其它装置（其可以包括相似材料的不对称侧翼，与用薄亲水性材料覆盖支持物相比液面接触更厚一些）或者使所述装置稳定位于稳定子宫内其它支持物

- B 带支持物包括一个系于取出线上的硅酮绳以回收所述装置

3. 一个活塞

- 4.与活塞相连的一个操纵手柄
- 5.一种取出纤维以取出子宫内包囊装置
- 6.一个附着装置以附着取出纤维保证子宫内包囊装置与活塞的固定位置
- 7.一个环绕活塞的保护套管,如 Lehtinen Matti 等于 1994 年所述(专利号 CZ 286 820),但具有活塞使得 IVF 生物学家可以装填配子,胚胎,药物或具有标准移液管任何其它因子

本发明的细胞包囊子宫内装置可以采取任何形状,其适应于使用合适微移液管装填被包囊化的配子和/或胚胎或任何其它上述因子。优选的可植入胚胎培养装置是具有合适孔径的管状选择性可通透膜,以使得可以将足够的营养素如 O<sub>2</sub>,蛋白质,生长因子及子宫内膜释放的其它已知和未知的因子移至胚胎中,具有一个末端,通过该末端可将配子或胚胎装填于细胞区室中。然后控制侧面末端然后用套帽永久闭塞,或者用环氧胶或生物适合的及不可再吸收材料如聚丙烯材料缝合线闭塞。

关于本发明可取式子宫内装置的结构,内径尺寸为 100-10000 微米的及具有将所述装置附着于子宫腔(壁)的合适设施的一种可取式中空纤维装置是子宫内培育卵/胚胎的理想场所。本发明应用的现行装置是一种聚醚砜膜, MW 截止为大约 240000 道尔顿,壁厚度为 100 微米,内径为 472 微米。壁厚度根据成分,多孔性,水压通透性,孔径及包囊材料的强度可在 50-500 微米范围内。分子量截止可在 50000 至 >1 百万分子量之间变化。另外,包囊材料可以由任何生物适合材料组成,包括聚醚砜, Pan-PVC 或者扩展的 PTFE 及用层积或单一薄膜结构。包囊装置可以含有或不含有一种基质或内衬材料。长度为 0.5cm-5cm 或者与子宫相适应。如上所述,针对这种装置最重要的是其能在子宫内直接培育维持胚胎而不受损害,是完全可取式。另外,该装置已经设计为很少或无组织反应,具有光滑表面,由此其可以植入或插入及回收而不诱导炎症或纤维化反应或者不适当的子宫壁组织损害或者瘢痕。最后,该装置设计为其具有

一种保留在子宫内的设施（即小缝合线胶粘于所述装置的顶端以附着于子宫内或外）而且在植入子宫后任何时间均可易于回收（附着于缝合线）。与 Modex 治疗（PES 5, PES 1, PES 10/10）现行使用的那些中空纤维装置及细胞治疗（Pan-PVC）过去使用的装置成分相似的装置，针对这种应用是理想的，尽管符合这种一般描述的任何装置均适于使用。

本发明的装置可以经外科操作作为避孕的标准 IUD 通过子宫颈植入子宫内及在指定培育时间之后取出。

然而，通过修改本发明细胞包囊子宫内装置，使得本发明还可在输卵管部位植入，例如修改为没有具有两翼的远端部分。这种植入更难以达到而且需要使用外科方法，如在全身麻醉下使用腹腔镜或者在局部麻醉下使用陷凹镜。这种体内输卵管内胚胎培育与 GIFT 或 ZIFT 相似，除了使用本发明细胞包囊装置可以控制培育时间及装填的胚胎可以不受限制数目，可以对其加以回收并在一个简便的冲洗程序之后选择移植。

因此，在使用或不使用 ICSI 的标准 IVF 之后，可以用标准微移液管将不同阶段的（2-5 天）合子或胚胎装填入本发明的细胞包囊子宫内装置中。

本发明还涉及一种制备可取式子宫内装置以放置一或多个因子的方法，所述因子能与子宫液相互作用，所述方法包括以下步骤：

- 提供被包囊化的合适形式的所述因子，
- 提供适于接受被包囊化的因子的一种可取式子宫内装置
- 用所述因子装填所述装置。

本发明还涉及一种放置一或多个放置因子的方法，所述因子能与子宫液相互作用，所述方法包括以下步骤：

- 提供一种可取式子宫内装置，
- 将所述装置植入子宫腔内一定时期。

根据本发明优选的实施方案，在哺乳动物子宫腔内进行上述方法，所述动物优选选自牛，绵羊，猪和人。

更特别地，本发明可以根据以下方法进行：

#### A. 体内受精

在包囊装置中注入准备的精子和可重新获得的卵母细胞以植入子宫内。在体内及子宫内培养的指定及控制的培育时间后（2 小时），回收被包囊化的精子和卵母细胞，在简单的冲洗程序之后收集体子和/或未受精的卵母细胞。在第 3 天选择合子低温贮藏或者移植剩余的胚胎的体外培养物。

#### B. 体内植入前胚胎发育

将准备的精子和可重新获得的卵母细胞在体外受精。在控制的时期内（即 48 小时），将不同发育阶段的一些胚胎（即 6-8 个细胞）注入可以植入子宫腔内的细胞。在从子宫中取出包囊系统装置后，将卵泡阶段的胚胎从该装置中取出冲洗，使用常规转移管移至子宫腔内或者在冷冻之后延期在下一个周期中。

#### C. 体内胚胎辅助孵化

近来已经表明在体外程序中充分研究和描述的卵泡孵化方法已经在啮齿动物中错误接受，表示一种自然情况（Gonzales 等，2001）。确实，在仓鼠物种中子宫在体内有助于卵泡脱掉由子宫分泌的蛋白质组成的透明带，这似乎是在子宫内透明带脱失的主要机制，而在体外溶胞活性对滋养外胚层的侵袭行为是次要的。

考虑到这种令人惊奇的经过，使用本发明的子宫内细胞包囊装置暂时培育胚胎的本发明方法可以用于进行一种新的辅助孵化方法：体内胚胎辅助孵化。

在这个基础上，使用本发明的细胞包囊装置在体内和子宫内控制时间地培养配子和/或植入前胚胎，使得在胚胎-母体界面的真实对话具有来自子宫内膜的（或者在输卵管内植入的情况中来自输卵管）的一些已知但也未知的因子旁分泌作用及最佳发育的胚胎可以使 ART 程序中的植入过程更成功。

其它科学家已经描述了配子或胚胎包囊化 (Loi 等, 1992; Nebel 等, 1993)。然而, 他们均使用生物可降解的材料 (藻酸钠) 并具有消除与胚胎移植程序相关的一些问题 (创伤) 和在植入之前改善胚胎保护及保护胚胎的游离透明带 (Cosby 等, 1990; Adaniya 等, 1993)。

本发明人的最佳见解是本发明中描述的通过使用本发明的包囊装置自然培育配子和/或胚胎的新观点从未由科学家公布或提议。

本发明还提供了一种使用通过基因转染而遗传学修饰的细胞系的细胞包囊装置以植入子宫腔内的方法, 这种方法在本发明之前从未由科学家公布, 所述基因转染如 Kopchick 等于 1984 年的美国专利 No.4686098 及 Aebischer 等于 1987 年的美国专利 No.4892538 所述。

上述这种新装置使得可以将分子从子宫腔输送至子宫内膜而无全身作用, 及可以在 ART 中体外受精或自然受精之后在胚胎移植之前改变和准备更特异性的子宫内膜, 或者可以相反地作为 IUD 避免任何方式妊娠 (抗植入, 抗受精)。

将生物活性因子输送入子宫腔内的这种新观念可以更好地理解对子宫内膜组织的特异性旁分泌作用, 及可以在不远的将来揭示一种新的及加以补充的细胞治疗方法以调节和准备在 ART 中胚胎植入所需的子宫内膜。

#### 实施例 1: 在小鼠模型中的体内和子宫内胚胎培养

这个实验的目的是评价使用改良的半通透的中空纤维作为包装进行体内和子宫内植入前胚胎发育的能力。

对在 4-6 周龄的青春前期雌性小鼠使用卵巢刺激方案获得合子, 所述方案是相应于在程序第一天经腹膜内注射使用 5U PMSG (Folligon, Veterinaria) 及在第三天在 17:00 腹膜内注射使用 5 IU 人绒毛膜促性腺激素 (Choluron, Veterinaria), 间隔 48 小时以诱导超排卵。

将雌性小鼠与 CBAxC57B1 雄性小鼠在注射 HCG (第三天) 套笼交



配。

在雄性与雌性小鼠套笼交配后第 5 天收集 6-8 个细胞阶段的胚胎，在体内培养（1 组）或者在体外用贯序培养基培养（2 组）。只对两个具有交配孔栓（plug）的雌性小鼠进行操纵并用于这个实验中。

将雌性小鼠通过颈部脱位处死并进行剖腹手术以取出子宫角和输卵管以收集胚胎。

在第 3 天将 6-8 个细胞阶段的胚胎移至两个假妊娠雌性小鼠（受体）的左角或右角。

将 1 组胚胎（体内培养）装填于本发明经修改的中空纤维装置中（半通透的聚醚砜（PES）中空纤维，得自 Akzo Nobel Faser AG, Wuppertal, 德国），所述中空纤维外径=680 $\mu$ m，内径=480 $\mu$ m，长度=0.5cm，附于一个 6.0 号无菌不可再吸收手术线上，使用细玻璃移液管在显微镜观察下进行装填。

根据标准程序在乙醚麻醉下进行背部剖腹手术，以取出右侧或左侧子宫角并将具有被包裹化的合子的子宫内装置植入右角或左角的内腔中。

在经手术固定具有被包裹化的合子的子宫内装置后，将所述子宫角再放置入其解剖部位，使用钩子以闭合皮肤。

在 48 小时后，将移植的雌性小鼠通过颈部脱位处死，进行剖腹手术以取出含有子宫内装置的左角和右角并回收所述装置。

在切下所述装置的两个远端部分后收集胚胎，用培养基冲洗包裹化腔。表 1 示出两个实验的结果，对比了在 48 小时培养后 6-8 个细胞阶段的胚胎在体内和体外（对照）的发育。

在 1 组中，所有被包裹化的 6-8 个细胞的胚胎在子宫内与在对照组中相似持续发育。然而，与体外胚胎培养相比注意到发育延迟。

这个实施例首次揭示了具有被包裹化的胚胎的子宫内装置可以使得其在子宫内自然培育，至少与常规在体外培养的发育相似。

从可获得的文献中，曾经认为 IUD 与生殖是相对立的及总是与避孕相关的。在子宫腔内存在外源体已知在所有物种中均干扰生殖。然而，受影响的生殖过程的步骤在文献中还未清楚。似乎其可以根据物种的变化而改变。一般认可的是 IUD 诱导子宫内膜局部炎症反应。而在小鼠和大鼠中，这种多形核细胞的慢性浸润似乎与细菌感染相关及将子宫内膜转化为具有胚胎毒性分泌因子的对立环境(Parr 等, 1967), 20 年, Alvarez 等 (1988) 揭示了在妇女中在胚泡进入子宫腔之前 IUD 可影响受精。

上述结果表明小鼠胚胎无退化发育与一般认可的学术观点相对立，所认可的观点是在动物模型中子宫自身通过释放一些毒性因子而杀死胚胎。

在体内被包囊化的胚胎中示出的发育延迟可以解释为孔或内腔直径的大小不合适，导致其周围营养素浓度较低。另外，在体内培养之前在室温将具有被包囊化的胚胎的 IUD 植入子宫内的时间，有时是几分钟，可以解释对植入前胚胎的热和 gaseous 休克的有害作用。

## 实施例 2: 子宫内促红细胞生成素输送

使用经修改和发明的包囊化的分泌小鼠 Epo 的小鼠 C2C12 细胞在子宫内输送促红细胞生成素 (Epo)，降低子宫内膜中细胞程序死亡及提高血液血细胞比容，这提示 EPO 对邻近的子宫内膜组织的直接作用及从子宫中输送 Epo 的全身作用。

促红细胞生成素在成人由肾产生，在胎儿由肝产生。其是调节红细胞生成的重要因子，通过刺激晚幼红细胞增殖和分化而起作用。近来已经示出脑具有一种旁分泌 Epo/EpoR，Epo 可以在脑缺血后防止神经细胞程序死亡 (Siren 等, 2001)。令人感兴趣地地，Epo 似乎与子宫血管生成相关。

考虑到 Epo 的上述生理学作用，通过测定血液血细胞比容评价使用本发明的细胞包囊装置从子宫输送 Epo 对子宫内膜的作用，及评价子宫

腔内该装置的新植入部位的细胞存活性。

将小鼠 C2C12 成肌细胞用含有小鼠 Epo cDNA 和突变的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因的质粒转染, 在施用增加剂量的氨甲蝶呤的基础上进行基因扩增。

将分泌 Epo 的细胞系装填于聚醚砜小孔中空纤维中, 以植入子宫腔内。这种新发明的细胞包囊装置的特点与实施例 1 所述相似。

在本实验中使用共 14 个装置以盲试形式植入, 1 组: 具有 Epo 分泌作用 mEpo-C2C12 (n=7), 2 组: 无 Epo 分泌作用 mEpo-C2C12 对照细胞 (n=7)。

在第 14 天, 根据处死动物的标准认可方案, 取出子宫和回收包囊装置以进行 mEpo 输出脉冲。将子宫固定于 10% 甲醛中, 进行免疫组织化学和 TUNEL 分析测试细胞程序死亡。

与无 Epo 输送的 2 组 ( $45.7 \pm 2.9$ ) 相比, 具有子宫内 Epo 输送的 1 组的血液血细胞比容明显提高 ( $59.4 \pm 6.8$ )。注意到在 14 只雌性小鼠中在子宫内输送 Epo 14 天后  $p \leq 0.005$  (数据未示出)。

注意到 Epo 与最近描述的其在神经细胞中的作用相似, 降低子宫内膜组织中细胞程序死亡。

子宫内膜因此是 Epo 一种新靶位, 具有细胞程序死亡的调节作用。

被包囊化入微孔中空纤维内的转染的细胞系在子宫内培育 14 天后是可存活的, 其在之前从未作为细胞包囊装置的植入部位进行实验。

由转染的细胞系分泌的 Epo 穿过该装置的微孔壁并通过子宫内吸膜吸收及通过全身循环, 明显提高处理动物血液血细胞比容。

这些结果证实: i) 通过实施例 1 的结果证实子宫可以是胚胎附于的良好天然培育器, ii) 可以使用妇女或雌性动物的子宫腔作为细胞包囊系统的植入部位进行药物输送。

表 1

实验	48 小时					
	体内			体外		
	6-8 个细胞	桑椹胚	胚泡	6-8 个细胞	桑椹胚	胚泡
No1 6-8 个细胞 N=30	n=20			n=10		
	0	16	2*	0	0	9 <sup>×</sup>
No2 6-8 个细胞 N=22	n=12			n=10		
	0	6	1	0	2	8

\* 早期胚泡，在包囊冲洗两个胚胎后不可回收

<sup>×</sup> 1 早期胚泡，1 胚胎丧失

## 参考文献:

Adaniya GK, Rawlins RG, Quigg JM, Roblero L, Miller IF, Zaneveld First pregnancies and live births from transfer of sodium alginate encapsulated embryos in a rodent model. *L J Fertil Steril* 1993 59: 652-6.

Alvarez F, Brache V, Fernandez E, Guerrero B, Guiloff E, Hess R New insights on the mode of action of intrauterine contraceptive devices in women *Fertil Steril* 1988 49: 768-773.

Barnat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Xu K, Veeck L, Damario MA, Rosenwaks Z Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. *Fertil Steril* 1998 70: 1109-13.

Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos *Biol Reprod* 1999 61: 1050-1055.

Cosby NC, Dukelow WR Microencapsulation of single, multiple, and zona pellucida-free mouse preimplantation embryos in sodium alginate and their development in vitro. *J Reprod Fertil* 1990 90: 19-24.

Crosier A, Farin P, Dykstra M, Alexander J, Farin C. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro *Biol Reprod* 2000 62: 1459-1465.

Fassler R and Meyer M Consequences of lack of *alpha 5 beta 1* integrin gene expression in mice. *Genes and Development* 1995 9: 1876-1908.

Fazleabas A, Donnelly KM, Srinivasan S, Fortman JD, Miller JB. Modulation of the baboon (*papio anubis*) uterine endometrium by chorionic gonadotrophin during the period of uterine receptivity. *Proc Natl Acad Sci* 1999 96: 2543-8.

Gardner DK, Lane M, Calderone I and Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells *Fertil Steril* 1996 65: 349-353.

Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J and Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization *Hum Reprod* 1998 13: 3434-3440.

Gonzales D, Bavister B, Mese S. In utero and in vitro proteinase activity during the *Mesocricetus auratus* embryo zona escape time window *Biol Reprod* 2001 64: 222-230.

Levrán D, Farhi J, Nahum H, Royburt M, Glezerman M, Weissman A. Prospective evaluation of blastocyst stage transfer vs. zygote intrafallopian tube transfer in patients with repeated implantation failure *Fertil Steril* 2002 77: 971-977.

Loi P, Ledda S, Gallus M, Filia F, Cappai P, Naitana S. Microencapsulation in Na-alginate and in vitro development of sheep blastomeres. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1992 68: 311-4.

Nebel RL, Vishwanath R, McMillan WH, Saacke RG. Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: a review. *Reprod Fertil Dev* 1993: 701-12.

Parr E, Schlaedler R, Hirsch J. The relationship of polymorphonuclear leukocytes to infertility in uteri containing foreign bodies *J Exp Med* 1967 126: 523-535.

Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen K, Begley CG. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nature Medicine* 1998 4: 303-308.

Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 84: 2638-46.

Siren A-L, Fratelli M, Brines M et al. Erythropoietin prevents neuronal

---

apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress Proc Natl Acad Sci 2001 98 : 4044-4049.

Shiotani M, Noda Y, Mori T. Embryo-dependent induction of uterine receptivity assessed by an in vitro model of implantation in mice. Biol Reprod 1993 49: 794-801.

Spandorfer SD, Barmat LI, Navarro J, Liu HC, Veeck L, Rosenwaks Z. Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures Fertil Steril 2002 77: 1209-1213

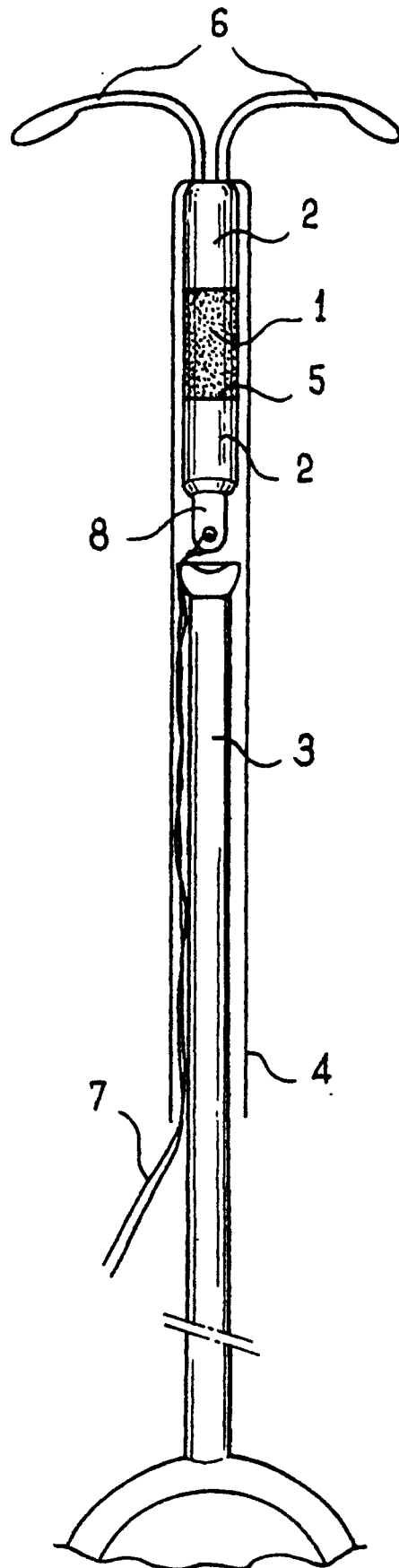


图1