

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61F 2/08 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780025349.9

[43] 公开日 2009 年 10 月 7 日

[11] 公开号 CN 101553189A

[22] 申请日 2007.5.9

[21] 申请号 200780025349.9

[30] 优先权

[32] 2006.5.9 [33] US [31] 60/799,102

[86] 国际申请 PCT/US2007/068607 2007.5.9

[87] 国际公布 WO2007/134134 英 2007.11.22

[85] 进入国家阶段日期 2009.1.4

[71] 申请人 生命细胞公司

地址 美国新泽西州

共同申请人 斯托特医疗集团

[72] 发明人 D·J·麦奎兰 J·R·哈珀

C·T·沃纳 E·S·格林哈尔格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋 李连涛

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 6 页

[54] 发明名称

加强的生物组织

[57] 摘要

本发明提供可植入的医疗器械，其包括混杂复合材料，该混杂复合材料包含第一种生物组分，例如无细胞组织基质，和在植入后加强所述器械的第二种非生物组分。

1. 一种可植入的医疗器械，所述医疗器械包括：
复合材料，所述复合材料包含：
具有生物基质的第一种生物组分；和
第二种非生物组分。
2. 权利要求 1 的医疗器械，其中对于复合材料的至少部分组成，
第一种组分覆盖第二种组分。
3. 权利要求 1 的医疗器械，其中对于基本上全部的复合材料，第
一种组分覆盖第二种组分。
4. 权利要求 1 的医疗器械，其中所述生物基质包括无细胞组织基
质。
5. 权利要求 4 的医疗器械，其中所述生物基质包括粒状无细胞组
织基质。
6. 权利要求 1 的医疗器械，其中第二种组分在植入时具有比第一
种组分更高的载荷能力。
7. 权利要求 1 的医疗器械，其中，在植入后且在生物基质中的天
然细胞生长后，第一种组分具有比第二种组分更高的载荷能力。
8. 权利要求 1 的医疗器械，其中第二种组分包括生物吸收性聚合
物。
9. 权利要求 1 的医疗器械，其中第二种组分包括生物相容性金
属。
10. 权利要求 1 的医疗器械，其中第二种组分包括聚羟基丁酸酯、
聚乳酸、聚乳酸羟基乙酸、聚二噁烷酮或聚己酸内酯。
11. 权利要求 1 的医疗器械，其中第二种组分是连续的材料。
12. 权利要求 1 的医疗器械，其中第二种组分为包含非生物材料
的织物，所述织物为针织、梭织、编织、非织结构，或者为针织、梭
织、编织或非织结构的组合。

13. 权利要求 12 的医疗器械,其中第二种组分包括单丝非生物材料。

14. 权利要求 12 的医疗器械,其中第二种组分还包括编织的或纺成的复丝纱。

15. 权利要求 12 的医疗器械,其中第一种组分被整合入第二种组分的织物结构中。

16. 权利要求 1 的医疗器械,其中第一种组分作为包被物、浆料、粉末或液体涂覆于第二种组分上。

17. 权利要求 1 的医疗器械,其中复合材料制成片状、圆柱、实心管、中空管或卷材。

18. 权利要求 1 的医疗器械,所述医疗器械还包括拴系部分。

19. 一种植入医疗器械的方法,包括:

向植入部位提供复合材料,所述复合材料包含:

包含生物基质的第一种生物组分;

在植入时强化复合材料的第二种非生物组分;

提供一个或多个锚钉,以将医疗器械固定在植入部位附近;和

将复合材料锚定在植入部位附近,其中锚钉从复合材料中固定住所述器械。

加强的生物组织

优先权保护

[0001] 本申请要求保护 2006 年 5 月 9 日申请的美国临时专利申请序号 60/799,102 的优先权,该临时专利申请的公开内容整体在此引入作为参考。

技术领域

[0002] 本发明总体上涉及用于组织修复的组织基质,更具体地说,涉及用于组织修复的、与合成的生物相容性材料组合的混杂无细胞组织基质。

发明背景

[0003] 长期以来一直在寻找接近天然韧带和腱结构的负荷传递和性能的材料在哺乳动物中进行韧带和腱替换。业已由钢、聚酯、聚脲烷、聚乙烯、尼龙、聚四氟乙烯、碳纤维和其它人造材料制备了合成的韧带和腱。还已经使用任一种或多种前述材料的组合制造合成韧带组织。然而,合成材料通常随时间推移而出现功能性下降,可在植入后的相对短的时间段(例如约 1、2、3 或 4 年)内用坏、磨损和/或粒子化。

[0004] 作为合成材料的替代,由供区(例如自体移植物和/或尸体组织移植物(即同种异体移植物))采集的天然韧带或腱组织,也可以用于韧带或腱替换程序。同合成材料一样,对于自体移植物和同种异体移植物这二者而言,功能参数(例如破坏荷载、线性和切向刚度、破坏应力和应变失效)的长期恢复与天然韧带、腱或其它软组织结构相比仍显著降低。

[0005] 自体移植物来自移植接受者自身的供区。例如，在 ACL (前交叉韧带)重建中，一部分患者自身的髌韧带或腿后腱可用于替换磨损(torn)的 ACL。

[0006] 尸体组织移植物可被置于磨损的 ACL 的位置，例如，没有与自体移植物采集相关的供区损伤(donor site morbidity)。尽管通常以某些方式处理尸体组织来降低任何外来物体反应，但它们可传播疾病。在大部分情况下，相比于自体移植物，同种异体移植物愈合更慢，并且失败率显著趋于更高。

[0007] 人造的和尸体的组织移植物优于自体移植物，因为它们不具有与采集自体移植物相关的供区损伤以及短期和长期的疼痛。

[0008] 因此，需要用于韧带、腱和其它软组织修复和替换的材料，该材料避免了与自体移植物相关的供区损伤，相比于传统的同种异体移植物和合成组织失败率改善，更接近于天然组织的生物力学性能。

[0009] 纳入本文的发明背景论述是为了解释本发明的背景。这不能被视为承认所提及的任何材料截至任一权利要求的优先权日被公开、已知或为普通的一般性知识的组成部分。

[0010] 在本说明书的描述和权利要求中，词语“包含”及其变体，例如“包括”和“含有”，无意排除其它添加物、组分、整体或步骤。

发明概述

[0011] 本发明涉及可植入的医疗器械，其包括混杂的合成和天然组织修复和替换材料，解决了韧带、腱和其它软组织修复和替换程序中降低供区损伤、改善失败率和/或更好地接近天然组织性能的需要。

[0012] 具体地说，本发明的实施方案包括一种复合材料，所述复合材料具有包含生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。

其它的实施方案包含的第二种非生物组分在植入时具有比第一种组分更高的载荷能力。本发明的不同实施方案尤其适用于韧带、腱和其它软组织修复和替换。

[0013] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械，所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。对于复合材料的至少部分组成，第一种组分覆盖第二种组分。

[0014] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械，所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。对于基本上全部的复合材料，第一种组分覆盖第二种组分。

[0015] 本发明的再一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械，所述复合材料包含具有无细胞组织基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。

[0016] 本发明的另一实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械，所述复合材料包含具有粒状无细胞组织基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。

[0017] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械，所述复合材料包含具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分，所述第二种非生物组分在植入时具有比第一种组分更高的载荷能力。

[0018] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械，所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。第一种组分在植入后且在天然细胞于第一种组分的生物基质中生长后具有比第二种组分更高的载荷能力。

[0019] 本发明的再一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械，所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和包含生物吸收性聚合物的第二种非生物组分。

[0020] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械,所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和包含生物相容性金属的第二种非生物组分。

[0021] 本发明的另外的实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械,所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分,所述第二种非生物组分包含聚羟基丁酸酯、聚乳酸、聚乳酸羟基乙酸(polyactideglycolide acid)、聚二噁烷酮(polydioxanome)或聚己酸内酯。

[0022] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械,所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和连续材料的第二种非生物组分。

[0023] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械,所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。而且,所述第二种组分为包括非生物材料的织物,所述织物为针织(knit)、梭织(weave)、编织(braid)或非织结构,或者为针织、梭织、编织或非织结构的组合。所述织物还可以包括单丝的非生物材料或者编织的或纺成的非生物材料细丝。

[0024] 本发明的另一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械,所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。所述第一种组分作为包被物、浆料、粉末或液体包覆于第二种组分上。

[0025] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械,所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分。所述复合材料制成片材、圆柱、实心管、中空管或卷材。

[0026] 本发明的又一个实施方案包括具有复合材料的可植入医疗器械,所述复合材料含有具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分;以及拴系部分。

[0027] 另外,提供一种用于植入其中提供复合材料的医疗器械的方法。所述复合材料包括具有生物基质的第一种生物组分和第二种非生物组分,所述第一种生物组分有利于天然细胞向内生长(in-growth),所述第二种非生物组分在植入时和天然细胞通过第一种组分的生物基质显著向内生长之前加强该医疗器械。复合材料被锚定在植入部位附近。复合材料可从复合材料的内部锚定到植入部位。

附图简述

- [0028] 图1图示了本发明的实施方案的生物力学特征;
[0029] 图2图示了本发明的实施方案的生物力学特征;
[0030] 图3和3A显示了本发明的实施方案;
[0031] 图4和4A显示了本发明的实施方案;
[0032] 图5显示了本发明的实施方案;和
[0033] 图6图示了本发明的示例性实施方案的生物力学特征。

发明详述

[0034] 本发明涉及“混杂的”复合材料,其包括适于用作韧带、腱或软组织结构的组织移植植物或替代物的生物和非生物组分。混杂组织被构建为至少两种材料的复合物,例如人造的非生物组分(例如合成聚合物)和生物组分(例如生物基质)。在一个实施方案中,人造非生物组分与生物组分密切组合,产生复合的混杂修复组织,其平衡了每种组成材料的有利特性。

[0035] 诸如聚合物的非生物组分设计用于为混杂复合结构在植入后立即提供适宜的强度和刚度,并在植入混杂韧带时传递比传统生物植入体更高的载荷。另外,非生物组分将部分载荷和运动传递至生物组分。生物组分设计用于产生更长期的愈合反应。混杂材料的合成组分和生物组分之间的运动/载荷分布形成适于组织愈合的环境。生物组分凭借生物基质通过促进或允许生物组分的基质结构中的天然

细胞向内生长,有利于由基础生物组织变成或转化成类似于要替换的天然组织的组织(例如韧带样组织)的复杂过程。

[0036] 多个实施方案可以包括一层或多层生物和非生物组分,产生本文设想的混杂复合材料。在描述复合结构之前,将更详细地描述单独的组分。

[0037] 生物组分:

[0038] 本发明的实施方案的生物组分一般而言可以为具有本文描述的有利特性的任何生物材料(例如完整组织或组织来源的材料)。特别有用的生物组分为生物基质,包括无细胞组织基质。

[0039] 本文使用的“无细胞组织基质”(“ATM”)是组织来源的生物基质结构,由各种各样的含胶原组织中的任一种如下制备:除去所有的或基本上所有的存活细胞和所有可检测的亚细胞组分和/或通过杀死细胞产生的碎片。本文使用的没有“基本上所有的存活细胞”的ATM为其中存活细胞的浓度低于制备ATM的组织或器官中的存活细胞浓度的1%(例如低于:0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%或0.000001%)的ATM。

[0040] 可用于本发明的ATM优选但不是必须地没有或基本上没有上皮基底膜。上皮基底膜是与上皮细胞基底面接触的胞外材料的薄片。大片聚集的上皮细胞构成上皮。因此,例如,皮肤上皮叫做表皮,皮肤上皮基底膜位于表皮和真皮之间。上皮基底膜是特化的胞外基质,为上皮样细胞提供屏障功能和附着表面;然而,其对基础组织(例如真皮)不提供任何显著的结构或生物力学作用。上皮基底膜的独特组分包括例如层粘蛋白、胶原VII型和巢蛋白。上皮基底膜的独特时间和空间组织化将其与例如真皮胞外基质区分开来。在本发明的ATM中存在上皮基底膜可能不利,因为上皮基底膜可能含有多种物种特异性组分,其会在无细胞基质的异种移植受体中激发抗体产生和/或结合预先形成的抗体。另外,上皮基底膜可以用作细胞和/或可溶性因子(例如化学引诱物)扩散以及细胞浸润的屏障。因此,其在ATM

移植物中的存在可在受体动物中有效延迟由无细胞组织基质形成新组织。本文使用的“基本上没有”上皮基底膜的 ATM 是这样的无细胞组织基质：其含有的上皮基底膜低于得到无细胞组织基质的相应未加工组织所具有的上皮基底膜的 5% (例如低于：3%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.1%、0.01%、0.001%乃至低于 0.0001%)。

[0041] ATM 保留的生物功能包括细胞识别和细胞结合以及支持细胞扩散、细胞增殖、细胞向内生长和细胞分化的能力。这样的功能由未变性的胶原蛋白(例如 I 型胶原)和多种非胶原分子(例如用作诸如整联蛋白受体的任一种分子、具有高电荷密度的分子(如葡糖胺聚糖(例如透明质酸)或蛋白聚糖)或其它粘附素的配体的蛋白)提供。有用的无细胞基质保留的结构功能包括维持组织结构、维持组织组分的三维排列和物理特征，如强度、弹性和耐久性、限定的有孔性以及大分子的保留。例如可以通过 ATM 支持细胞增殖的能力检测 ATM 的生物功能的效力，其为制备 ATM 的天然组织或器官的该效力的至少 50% (例如至少：50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、100%或 100%以上)。

[0042] 移植的基质材料不一定由与周围的宿主组织相同的组织制备，但应当仅仅由浸润细胞(例如相关宿主组织的分化细胞)、干细胞(例如间充质干细胞)或祖细胞就可重建。重建由上述 ATM 组分和周围宿主组织的信号(例如细胞因子、胞外基质组分、生物机械刺激和生物电刺激)指导。在骨髓和外周循环中存在间充质干细胞在文献中已有记载，表明再生多种肌肉骨骼组织[Caplan (1991) J. Orthop. Res. 9:641-650; Caplan (1994) Clin. Plast. Surg. 21:429-435; 和 Caplan 等，(1997) Clin Orthop. 342:254-269]。另外，在重建过程中移植物必须提供一定程度的(大于阈值的)抗拉伸强度和生物力学强度。

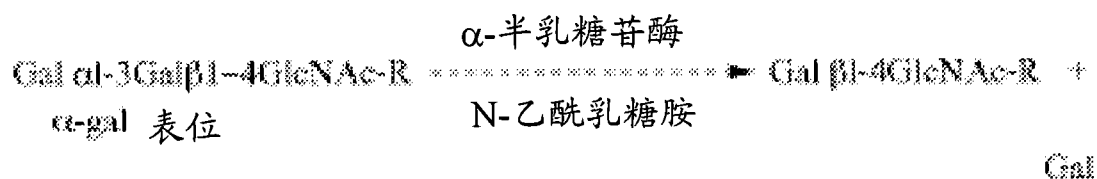
[0043] 要理解的是，ATM 可以由任何含胶原的软组织和肌肉骨骼(例如真皮、筋膜、心包膜、硬脑膜、脐带、胎盘、心瓣、韧带、腱、血管组织(动脉和静脉，如隐静脉)、神经结缔组织、膀胱组织、

输尿管组织或肠组织)产生,只要上述特性被基质保留。而且,其中放置含有 ATM 的混杂基质的组织包括基本上任何的组织,其可通过侵袭或浸润细胞重建。相关组织包括但不限于骨骼组织,例如骨、软骨、韧带、筋膜和腱。其中可以放置以上任一种同种异体移植物的其它组织包括但不限于皮肤、齿龈、硬脑膜、心肌、血管组织、神经组织、横纹肌、平滑肌、膀胱壁、输尿管组织、肠和尿道组织。

[0044] 而且,尽管 ATM 一般将由与 ATM 移植物受者相同的物种的一个或多个单体制备,但未必都是如此。因此,例如,ATM 可以由猪组织制备,并植入人类患者中。可用作 ATM 受者和用于产生 ATM 的组织或器官的供体的物种包括但不限于人、非人灵长类动物(例如猴、狒狒或黑猩猩)、猪、牛、马、山羊、绵羊、狗、猫、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠或小鼠。作为供体特别令人感兴趣的是已被遗传改造为没有末端 α -半乳糖部分的动物(例如猪)。关于适宜动物的描述,参见共同未决的美国申请序号 10/896,594 和美国专利号 6,166,288,全部文献的公开内容都整体在此引入作为参考。

[0045] 而且,可以在脱细胞之前或之后,用由例如糖蛋白上的糖链除去末端 α -半乳糖(α -gal)部分的酶 α -半乳糖苷酶处理适宜的组织 and 器官,而不使用这些遗传改造的动物作为供体。用除去这些部分的 α -半乳糖苷酶处理组织的方法描述于例如美国专利号 6,331,319,该专利的公开内容整体在此引入作为参考。

[0046] 在一个实施方案中,在杀死 ATM 中的软组织细胞之前或之后,用一种或多种糖苷酶,尤其是半乳糖苷酶,例如 α -半乳糖苷酶,对含胶原的材料进行含胶原材料的体外消化。具体地说,如在以下反应中所示,用 α -半乳糖苷酶酶促处理消除 α -gal 表位:



[0047] N-乙酰乳糖胺残基为通常在人和哺乳动物细胞上表达

的表位,因此不是免疫原性的。通过多种方法实现用糖苷酶体外消化含胶原的材料。例如,含胶原的材料可以在含糖苷酶的缓冲溶液中浸泡或温育。或者,可以经由脉冲式冲洗法在压力下将含糖苷酶的缓冲溶液推入含胶原的材料中。

[0048] 由含胶原的材料消除 α -gal 表位减小了对含胶原的材料免疫反应。 α -gal 表位是非灵长类哺乳动物和新域猴(南美的猴子)中以 1×10^6 - 35×10^6 个表位/细胞表达,以及在诸如胞外组分的蛋白聚糖的大分子上表达。U. Galili 等, *J. Biol. Chem.* 263: 17755 (1988)。然而,该表位在狭鼻猴(亚洲和非洲的猴子以及猿)和人中不存在。出处同上。抗-gal 抗体由于对胃肠细菌上的 α -gal 表位糖结构的免疫应答而在人和灵长类动物中产生。U. Galili 等, *Infect. Immun.* 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh 等, *J. Clin. Invest.* 89: 1223 (1992)。因为非灵长类哺乳动物(例如猪)产生 α -gal 表位,所以通过将得自这些哺乳动物的含胶原的材料注射入灵长类动物中进行的异种移植产生排斥,原因在于灵长类动物抗-Gal 结合含胶原的材料上的这些表位。该结合通过补体结合和抗体依赖性细胞毒活性而对含胶原的材料产生破坏。U. Galili 等, *Immunology Today* 14: 480 (1993); M. Sandrin 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11391 (1993); H. Good 等, *Transplant. Proc.* 24: 559 (1992); B. H. Collins 等, *J. Immunol.* 154: 5500 (1995)。此外,异种移植导致免疫系统显著活化,产生增加量的高亲和力抗-gal 抗体。因此,由含胶原的材料的细胞和胞外组分基本上消除 α -gal 表位,并防止细胞 α -gal 表位再表达,可以减小针对含胶原的材料、与结合 α -gal 表位的抗-gal 抗体相关的免疫反应。

[0049] 其中提供 ATM 的形式将取决于获得 ATM 的组织或器官和受体组织或器官的性质以及在受体组织或器官中的损伤或缺陷的性质。因此,例如,来源于心瓣的基质可以作为全瓣、小片或小条、被切成任意的多种形状和/或大小的块或以粒状形式提供。相同的设想适用于由以上所列组织和器官中的任一种产生的 ATM。要理解的是,

可用于本发明的 ATM 可以由基于接受者自身胶原的组织制备。

[0050] ATM 可通过众多方法中的任一种产生。所有方法都要求在它们的生产中使用产生具有上述生物和结构特性的基质的步骤。特别有用的生产方法包括在美国专利号：4,865,871、5,366,616 和 6,933,326 以及共同未决的美国申请序号 10/165,790 (公开为美国专利申请公开号 US 2003/0035843 A1)和 10/896,594 (公开为美国专利申请公开号 US 2005/0028228 A1)中描述的那些方法,所述专利都整体在此引入作为参考。

[0051] 简而言之,涉及产生 ATM 的步骤一般包括由供体(例如人尸体或任何以上列出的哺乳动物)采集组织;化学处理,以便稳定组织,并避免生物化学性和结构性降解;连同或继之以在类似地保存生物和结构功能的条件下除去细胞。在彻底除去可能引起炎症的死亡和/或裂解的细胞组分以及任何生物不相容的除细胞剂之后,可以用冷冻保护剂处理基质,并冷冻保护,可选地,再在必须保持所描述的基质的生物和结构特性的条件下冻干。在冻干后,组织可选地在类似的保存功能的条件下被研磨成粉或微粉化,产生粒状 ATM。在冷冻保存或冻干(和可选地研磨成粉或微粉化)后,可以分别融化或再水合 ATM。所有步骤一般都在消毒(优选无菌)的条件下进行。

[0052] 初始稳定溶液阻滞和防止渗透、低氧、自溶和蛋白水解降解,对抗微生物污染,并降低可在例如含有平滑肌组分的组织(例如血管)中发生的机械损伤。稳定溶液一般包含适宜的缓冲液、一种或多种抗氧化剂、一种或多种渗透剂、一种或多种抗生素、一种或多种蛋白酶抑制剂,在某些情况下包含平滑肌松弛剂。

[0053] 然后将组织置于处理溶液中,以由结构基质除去存活细胞(例如上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞),而不损伤基底膜复合物或胶原基质的生物和结构完整性。处理溶液一般含有适宜的缓冲液、盐、抗生素、一种或多种洗涤剂(例如 Triton-x-100、脱氧胆酸钠、聚氧乙烯(20)山梨醇酐单油酸酯)、一种或多种防止交联的

物质、一种或多种蛋白酶抑制剂和/或一种或多种酶。组织处理必须(a)采用含有一定浓度的活性物质的处理溶液,并(b)持续一段时间,使基质的结构完整性得以保持。

[0054] 或者,可以在进行水替换之前冷冻保存组织。如果这样的话,则在脱细胞之后,将组织在冷冻保护溶液中温育。该溶液一般含有一种或多种冷冻保护剂,以使可在冷冻过程中发生的对结构基质的冰晶损伤最小化。如果要冻干组织,则溶液一般还包含一种或多种干燥保护组分,以使干燥过程中的结构损伤最小化,并可以包含有机溶剂和水的组合,该组合在冷冻过程中既不膨胀也不收缩。冷冻保护剂和干燥保护剂可以为相同的一种或多种物质。如果组织不进行冻干,则可通过将组织(在无菌容器中)放置于约-80°C的冰箱中或通过将组织投入无菌液氮中冷冻组织,然后储存于-160°C以下的温度,直至使用。组织样品可在使用前融化,例如通过将含有该样品的无菌的不可穿透性容器(参见下文)浸没在约37°C的水浴中,或者使组织在环境温度下恢复到室温。

[0055] 如果组织要被冷冻和冻干,则在冷冻保护溶液中温育后,将组织包装在无菌容器中,该容器可透过水汽,但不能透过细菌,例如可透过水汽的小袋或玻璃小瓶。优选的小袋的一侧由医用级的可渗透Tyvek®膜组成,该膜是Wilmington, DE的DuPont公司的一种商品。该膜对水汽是能渗透的,对细菌和灰尘不可渗透。将Tyvek膜热封至不可渗透的聚乙烯复合片,保持一侧开口,由此形成双侧小袋。开口袋在使用前通过辐射灭菌。将组织无菌操作放置(通过开口侧)入无菌小袋中。然后无菌热封开口侧,以密闭该小袋。自此以后,在整个随后的处理步骤中已包装的组织都得到保护,免遭微生物污染。

[0056] 将含有所述组织的容器以特定速率冷却至低温,该速率与特定的冷冻保护制剂相适,以使冷冻损伤最小化。参见美国专利号5,336,616中适宜的冷却方案的实例。然后在真空条件下以低温干燥组织,从而使得水汽由每个冰晶相中被序贯除去。

[0057] 在水汽可透过的容器中的样品干燥结束时,用干惰性气体如氮气、氦气或氩气反转冻干装置的真空。在被保持于相同气体环境中的同时,半透性容器被放置在例如通过热和/或压力进一步密封的不透性(即水汽以及微生物不可透过)容器(例如小袋)中。在组织样品于玻璃小瓶中被冷冻和干燥的情况下,小瓶在真空下用适宜的惰性塞子密封,干燥装置的真空在卸载前用惰性气体反转。在任一种情况下,终产物均在惰性气体氛围下被密封。

[0058] 在 ATM 再水合后(参见下文),可以将组织相容的存活细胞放回 ATM,以产生透过性可接受的移植物,该移植物可由宿主重建。此重建一般在与非生物组分形成复合物之后并且就在将 ATM 放置于哺乳动物受试者中之前进行。在基质已被冷冻干燥的情况下,此重建在再水合后进行。在优选的实施方案中,可以在移植前通过标准体外细胞共培养技术或通过移植后的体内再定居将组织相容性存活细胞加入基质。体内再定居可通过受体自身细胞迁移入 ATM 中进行,或通过得自受体的细胞或得自另一个供体的组织相容性细胞原位灌输或注射到 ATM 中进行。

[0059] 用于重建的细胞类型取决于要重建 ATM 的组织或器官的性质。例如,用 ATM 重建全层皮肤的主要要求是恢复表皮细胞或角化细胞。例如,直接由预期受体获得的细胞可用于重建 ATM,产生的组合物以网状皮片移植物的形式移植至受体。或者,可以将培养的(自体的或同种异体的)细胞添加至 ATM。这样的细胞例如可以在标准组织培养条件下培养,然后加入 ATM。在另一个实施方案中,细胞可以在组织培养物中的 ATM 当中和/或之上生长。在组织培养物中的 ATM 当中和/或之上生长的细胞可以直接由适宜的供体(例如预期的受体或同种异体供体)获得,或者它们可以在没有 ATM 的情况下先在组织培养物中生长。

[0060] 用于心瓣和血管重建的最重要的细胞是内皮细胞,该内皮细胞衬在组织的内表面。内皮细胞也可以在培养物中扩增,并可以

由预期受体患者或者脐动脉或静脉直接获得。

[0061] 可以再定居基质的其它细胞包括但不限于成纤维细胞、胚胎干细胞(ESC)、成人或胚胎间充质干细胞(MSC)、前成软骨细胞、成软骨细胞、软骨细胞、前成骨细胞、骨细胞、破骨细胞、单核细胞、前成心肌细胞(pro-cardiomyoblasts)、周细胞、成心肌细胞、心肌样细胞、齿龈上皮细胞或牙周韧带干细胞。自然地, ATM 可以再定居这些细胞类型中的 2 种以上(例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 种)的组合。

[0062] 实施所有以上步骤的试剂和方法都是本领域已知的。适宜的试剂和方法描述于例如美国专利号 5,336,616。

[0063] 粒状 ATM 可以由上述的任一种非粒状 ATM 通过任何方法制备, 所述方法使上述生物性和结构性功能得以保留, 尤其是应使对胶原纤维(包括剪切的纤维末端)的损伤最小。用于制备粒状 ATM 的许多已知的润湿和干燥方法不能如此保留胶原纤维的结构完整性。

[0064] 一种制备粒状 ATM 的适宜方法描述于美国专利号 6,933,326。在下文针对冻干的真皮 ATM 简单描述了该方法, 但本领域技术人员可易于使该方法适于使用得自本文列出的任一种其它组织的冻干 ATM。

[0065] 可将无细胞真皮基质切成条(使用例如配有不间断的“连续”切割轮的 Zimmer 拉网机(mesher))。然后将产生的长条切成约 1 cm 至约 2 cm 的长度。组装匀浆器和灭菌的匀浆器探头(例如得自 OMNI International, Warrenton, VA 的 LabTeck Macro 匀浆器), 并使用注入匀浆器罐中的无菌液氮将其冷却至低温温度(即约-196°C 至约-160°C)。一旦匀浆器已达到低温温度, 就将 ATM 切片加至含有液氮的匀浆罐。然后开动匀浆器, 以便冷冻破碎 ATM 片。冷冻破碎步骤的次数和持续时间取决于使用的匀浆器、匀浆室的大小和操作匀浆器的速度和次数, 并易于由本领域技术人员确定。作为替代, 冷冻破碎法可在冷却至低温温度的 cryomill 中进行。

[0066] 可选地,通过用无菌液氮经由一系列也已冷却至低温温度的金属筛洗涤匀浆产物,根据颗粒大小分拣冷冻破碎的粒状无细胞组织基质。一般可用具有相对大孔径的筛除去大的不需要的颗粒,之后用具有较小孔径的一个(或多个)筛继续进行。颗粒一旦被分离出来就可以冻干,以确保除去在该过程中可能吸收的任何残余水分。终产物是粉末(通常为白色或灰白色),其粒径一般为约 1 μm 至约 900 μm 、约 30 μm 至约 750 μm 或者约 150 μm 至约 300 μm 。所述材料易于通过悬浮在生理盐水或本领域已知的任何其它适宜的再水合物质中再水合。其还可以悬浮在本领域已知的任何适宜载体中(参见例如美国专利号 5,284,655,该专利整体在此引入作为参考)。如果以高浓度(例如以约 600 mg/ml)悬浮,则粒状 ATM 可以形成“灰泥”,如果以稍微低的浓度(例如约 330 mg/ml)悬浮,则其可形成“浆料”。这些灰泥和浆料可以便利地装填入例如组织和器官中任何形状的孔、间隙或空间中,以便基本填满这些孔、间隙或空间。

[0067] 一种高度适宜的冻干 ATM 由 Lifecell Corporation (Branchburg, NJ)从人真皮产生,成小片形式以 AlloDerm®上市。这些片状物由 Lifecell Corporation 以矩形片材上市,尺寸例如为 1 cm $\times$ 2 cm、3 cm $\times$ 7 cm、4 cm $\times$ 8 cm、5 cm $\times$ 10 cm、4 cm $\times$ 12 cm 和 6 cm $\times$ 12 cm。用于冷冻和干燥 AlloDerm 的冷冻保护剂为 35%麦芽糖糊精和 10 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)的溶液。因此,最终的干燥产物含有约 60%重量的 ATM 和约 40%重量的麦芽糖糊精。Lifecell Corporation 还制备了由猪真皮制备的类似产品(称为 XenoDerm),其与 AlloDerm 具有相同的 ATM 和麦芽糖糊精比例。另外, Lifecell Corporation 以名称 Cymetra®上市了通过冷冻破碎 AlloDerm 制备的粒状无细胞真皮基质(如上所述)。据质谱分析测定, Cymetra 的粒径在约 60 μm 至约 150 μm 的范围内。

[0068] 本发明的粒状或研磨成粉(粉末化)的 ATM 颗粒的最长尺度小于 1.0 mm。尺度大于此的 ATM 块为非粒状无细胞基质。

[0069] 非生物组分:

[0070] 本发明实施方案的非生物组分一般可以包含生物相容性合成材料,包括生物吸收性聚合物、非生物吸收性聚合物和金属合金或组合物。多个实施方案可以包括为生物相容性和生物吸收性的非生物组分,使得完成的靶组织再生不包含显著的和/或载荷量的非生物组分。使用生物吸收性聚合物使得可以在天然组织于生物组分的整个基质结构中再生时,将载荷能力由非生物组分(例如聚合物)转移至生物组分。

[0071] 本文使用的“生物相容性”组合物是能够支持完整或部分组织再生必需的细胞活性但不刺激宿主中显著的局部或系统炎症或免疫反应的组合物。本文使用的“宿主中显著的局部或系统炎症或免疫反应”是部分或完全阻止组织再生的局部或系统炎症或免疫反应。

[0072] 本文使用的术语“生物吸收性”一般意在表示哺乳动物体向内生长期介导的材料降解过程,例如酶和细胞过程,以及化学介导的材料降解过程,包括但不限于其中降解产物一般通过其中一个机体器官系统被排出或降解产物被掺入正常代谢途径中的降解过程。

[0073] 一种这样的生物吸收性聚合物为聚羟基丁酸酯(聚羟基链烷酸酯),例如由 Tephra, Inc., Cambridge, Massachusetts 生产的 TephraFlex 聚合物。其它有用的生物吸收性材料包括聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸羟基乙酸(polyactideglycolide acid)(PLGA)、聚二噁烷酮或聚己酸内酯(PCL)。

[0074] 其它适用于非生物组分的生物吸收性材料包括聚酐、聚原酸酯、聚(氨基酸)、多肽、聚缩酚酸肽(polydepsipeptides)、尼龙-2/尼龙-6 共聚酰胺(copolyamides)、聚(亚烷基琥珀酸酯)、聚(羟基丁酸酯)(PHB)、聚(葡萄糖酸丁烯酯)(butylene diglucolate)、聚(ϵ -己内酯)和共聚物、聚二氢吡喃、聚磷腈、聚(原酸酯)、聚(氰基丙烯酸酯)、改性多糖、纤维素、淀粉、几丁质、改性蛋白、胶原和纤维蛋白。非生物

吸收性材料的实例包括贵金属，例如金。

[0075] 其它有用的合成聚合物列于美国专利号 5,885,829, 该专利描述了可用于组织再生的合成以及天然物质, 该专利的公开内容整体在此引入作为参考。

[0076] 非生物组分的形式可涵盖模制形状(1 块连续的聚合物)至含有复合丝的织物装置, 复合丝为单丝或复丝结构(例如编织物)的细丝。然后, 织物制造方法可以产生针织、梭织、编织、非织或其组合的最终结构。

[0077] 复合混杂材料:

[0078] 在植入后的第一个月当中, 所有的组织移植物均出现一定的机械特性下降。机械性能特征可以包括但不限于载荷性能、弹性和刚度。某些或全部的机械性能特征的恢复通常在植入后发展 1-2 年。

[0079] 用于组织替换的典型合成材料在植入时赋予的初始载荷能力可以等于或高于天然组织移植物。但是, 在植入后的前 2 年当中, 合成组织移植物通常出现持续但有时显著的载荷能力丧失。

[0080] 天然纤维组织移植物, 例如自体移植物和同种异体移植物, 在植入后的约第一个月当中出现显著的载荷能力下降, 载荷能力和其它机械性能特征最终恢复至天然移植组织的起始强度的 50-60%。

[0081] 本发明的混杂复合组织的多个实施方案将典型的合成聚合组织移植物的利益—具有相对较高的初始机械性能特征, 连同天然组织移植物的促愈合和更好的长期机械特性组合在一起。混杂组织可呈现为单独组分的总和。混杂组织还可以比单独组分的总和表现得更好。例如, 典型的合成移植物随时间推移出现降解和物理性能下降。本文开发的混杂复合组织在合成组分周围或之上提供生物基质层, 由此使降解比典型的未包被合成移植物出现的降解减慢。

[0082] 业已发现, 可以构建第一种生物组分和第二种非生物组分, 以优化更换特定组织所需要的机械性能参数。例如, 在构建用于韧带替换的混杂组织时, 可能需要具有约 1800 N 的最终破坏载荷。

如果构建的第一种组分生物基质材料提供仅 400 N 的最终破坏载荷, 则合成的第二种组分可被配置为提供余下的 1400 N, 以产生具有所需的性能特征的混杂复合组织移植物。同样, 如果 ACL 替换移植物所需要的刚度为 200 N/mm, 而第一种组分的生物基质仅提供 50 N/mm, 则可以配置聚合的第二种组分, 以提供余下的 150 N/mm 刚度。

[0083] 图 1 图示了多种组织移植物的示例性应力-应变曲线。线 2 图解了理想移植物的预期曲线。线 4 图解了合成或天然组织移植物的示例性实际应力应变曲线。由图可见, 对于在所需移植物中考察的相同应变量, 实际移植物不能达到需要的应力水平。

[0084] 还已经发现, 制备生物和非生物材料的混杂移植物(例如制备梭织或编织或卷曲或某些其它构型, 例如层状或卷状构型)沿着 y 轴产生改性混杂材料的应力-应变曲线。因此, 线 6 图解了相对于实际的合成或生物移植物具有改善的载荷性能的改性混杂移植物。

[0085] 图 2 图解了构建的混杂移植物的功能性目标载荷的原理图, 是载荷能力对复合混杂移植物植入后时间的图谱。由图可见, 单独的生物组织在植入时的载荷能力相对较低。由于机体随后痊愈, 承载能力随时间推移增加。相反, 聚合移植物的承载能力在植入时初始相对较高, 但随后下降。业已发现, 混杂复合移植物与含有具有生物基质的生物组分和人造非生物组分(例如聚合物)这二者的本文开发产品(标示为“混杂”)相一致, 保持承载能力随着时间推移相对稳定(即, 承载能力由“目标范围”起始, 并保持在“目标范围”内)。

[0086] 要认识到的是, 非生物组分可以多种方式与生物组分结合, 例如组织在非生物组分周围(如图 3 中示例)、非生物组分在组织周围或者组织嵌入或包被针织、梭织、编织或其它织物的非生物组分。另外, 为确保例如非生物组分和组织组分之间的载荷分担, 可使两种组分共混合, 或者单独的组分彼此分层或紧密缠绕。紧密缔合的分层构建体平衡了非生物组分和生物组分之间的微结构和纳结构的分界面, 产生摩擦力保持。可通过包含与带和箍设计类似的紧固带, 对分

层构建体施加压力。

[0087] 图 3 图示了混杂复合组织移植物的 1 个示例性实施方案。提供管状非生物组分 40, 其具有上方部分 42、上方锥形区 43、下方部分 44、下方锥形区 45 和颈部部分 46。还提供生物组分 50, 如图具有上边缘 51 和下边缘 52 的薄片所示。在代表性的构建中, 生物组分 50 缠绕在非生物组分 40 的颈部部分 46 周围, 使得上边缘 51 与上方锥形区 43 紧邻或接触, 下边缘 52 与下方锥形区 45 紧邻或接触。生物组分 50 可以一次或多次缠绕或环绕颈部部分 46, 以形成多层缠绕。例如, 生物组分 50 可以 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次以上缠绕非生物组分 40 的颈部部分 46。生物组分 50 可以类似地一次或多次缠绕非生物组分 40 的上方部分 42 和下方部分 43。

[0088] 在将生物组分 50 绕非生物组分 40 缠绕之后, 将非生物组分 40 的上方部分 42 在缠绕的生物组分 50 之上并向下方部分 44 卷起或折叠, 使得上方部分 42 的至少某一些延伸到上方锥形区 43 之下, 并与颈部部分 46 重叠。同样, 下方部分 44 在生物组分 50 之上并向上方部分 42 卷起或折叠, 使得下方部分 44 的至少某一些延伸到下方锥形区 45 之上, 并与颈部部分 46 重叠, 如在图 3A 中所示。

[0089] 进一步的实施方案包括一个或多个紧固带 58 和拴系 60。紧固带 58 向卷起的混杂复合移植物提供压力, 更好地平衡生物组分对非生物组分的微和纳表面结构的摩擦接触和结合。紧固带 58 可由与非生物组分 40 相同的材料制造。

[0090] 拴系 60 在装置植入过程中起辅助作用。拴系 60 可用于将组织/非生物组分组合装置牵引入骨隧道中。拴系 60 可由与移植物的织物部分相同的材料制作, 或者由诸如不锈钢或非生物吸收性聚合物的其它材料制作。拴系 60 可在混杂装置的构建期中起辅助作用。例如, 拴系 60 可用于锚定非生物组分 40, 而生物组分 50 被缠绕在非生物组分 40 周围。拴系 60 可被梭织、针织或编织入非生物组分 40 或完整组装的混杂移植物中。拴系 60 可以与非生物组分 40 为整体性

的, 或者可以被配置为一旦拴系 60 已起到其作用就与非生物组分 40 分开。拴系 60 还可以用作射线透不过的标记。

[0091] 替代的植入构建用平板非生物组分替换以上论述的非生物组分 40 的中空管, 如在图 4 中所示。非生物组分 80 包括上方部分 82、下方部分 84、颈部部分 85 和颈侧边缘 86。上方部分 82 和下方部分 84 可以与颈部部分 85 为相同或不同的非生物组分。例如, 在一个实施方案中, 颈部部分 85 可以含有高抗张强度的生物吸收性聚合物织物, 而上方部分 82 和下方部分 84 可以包含抗张强度相对较低的生物吸收性聚合物织物。非生物组分 80 还可以包含如前所述的非-织物聚合物。

[0092] 再参看图 4, 提供为平板生物材料的生物组分 50, 其含有无细胞组织基质, 所述基质具有上边缘 51、下边缘 52 和侧边缘 53。非生物组分 80 置于生物组分 50 的顶部, 使得非生物组分 80 的颈侧边缘 86 与生物组分 50 的侧边缘 53 对齐。然后, 卷起两层组分, 使得颈侧边缘 86 和侧边缘 53 保持对齐, 并形成卷材的最内侧部分。

[0093] 图 4A 显示了如上所述构建的卷曲的混杂复合组织移植物, 生物组分 50 形成卷曲结构的外表面, 颈侧边缘 86 形成卷曲结构的最内部部分。上方部分 82 和下方部分 84 在卷曲结构中形成多层非生物材料, 并例如通过界面螺钉可以提供增加的强度和材料, 以将混杂复合组织移植物固定至周围的天然组织。

[0094] 在混杂组织的实施方案中, 移植物密切匹配其要替换的天然结构的韧带尺寸(长度、宽度、厚度)。例如, 就 ACL 而言, 对于单片装置, 混杂装置的直径可以为约 6-12 mm, 或者如果分为两束, 则直径为 3-6 mm。将组织移植物的大小与要除去的天然组织匹配降低了复杂性。在体内, 特定的韧带尺寸在骨质结构之间滑动和配合。太小的韧带可能不能均匀地分配应力, 太大的韧带可能干扰或摩擦一个或两个骨质结构。

[0095] 要认识到的是, 本发明的混杂复合移植物的实际尺寸可

以针对患者和要替换的组织定制。例如，可以通过改变单个组分的尺寸或长度，添加或删减生物和非生物组分的一个或多个卷绕。例如，卷绕前的复合构建体越长，卷绕可能越多，由此产生更大直径的最终混杂复合组织移植物。或者，可以改变单独组分的层数，以调整混杂移植物的最终大小。例如，含有组织层、聚合物层和另一组织层的复合构建体应比仅2层的复合构建体提供更大直径的混杂移植物。

[0096] 另外，在本发明的多个实施方案中包括将人工混杂复合组织移植物锚定或固定至植入部位的技术。例如，在 ACL 替换中，通常使用简单的界面螺钉锚定尸体或自体移植物材料。在一个实施方案中，提供由移植物结构的内部锚定混杂复合组织移植物的界面螺钉。这示于图 5，其中界面螺钉 90 被插入混杂移植物 94 的中心，使得随着界面螺钉 90 前进，螺钉 90 将混杂移植物 94 的直径扩展，以靠着坚固的骨隧道向外施加径向压力。或者，可使用标准界面螺钉固定混杂移植物。可以使用其它常见的固定装置，包括十字销、内扣(endobutton)、缝线或钉。

[0097] 界面螺钉可由钛、不锈钢、生物可降解金属、生物降解性或生物吸收性聚合物(例如 PGA、PLA、PLGA 或 PCL)制成。典型的界面螺钉应为 Smith and Nephew, Andover MA, 01810, 螺钉类型 RCI Screw。

[0098] 实施例:

[0099] 制备适于 ACL 替换的混杂复合组织移植物，其具有含有生物基质的第一种生物组分。生物基质包含符合本文所述的无细胞组织基质的无细胞组织基质。所述生物基质作为单层材料提供。

[00100] 混杂复合组织移植物还含有由聚羟基丁酸酯(聚羟基链烷酸酯)制成的第二种非生物组分，例如由 Tephra, Incorporated of Cambridge, Mass 生产的 TephraFlex 聚合物。第二种组分也作为与第一种生物组分类似尺寸的单层材料提供。

[00101] 如下构建复合移植物：将第二种组分覆盖在第一种组分

的上部,将分层的薄片卷成一卷复合材料,从卷材中心朝外向卷材外层产生多层的第一种组分和第二种组分。卷绕的复合材料的直径约为8 mm。

[00102] 天然 ACL 通常具有处于以下范围的生物力学性能特征:破坏载荷(1200-2400 N);刚度(150-300 N/mm);破坏应力(18-28 MPa);破坏应变(20-35%);和弹性系数(75-180 Mpa)。为了匹配天然 ACL 组织的天然力学和生物特性,对混杂装置中的每种组分进行选择并构建,以满足特殊设计要求。混杂组织的非生物组分的弹性系数为约 140 MPa,最大破坏荷载或最终破坏载荷为约 1200 N,在构建混杂复合组织移植物之前具有 9-16 个月的耐降解性。

[00103] 生物组分在植入时的弹性系数为约 55 MPa,在构建复合混杂组织移植物之前的最大破坏载荷为约 600 N。

[00104] 在组装复合移植物之后,完成的移植物在植入前的最大破坏载荷为约 1400 N。最终破坏载荷在植入后下降,但在天然细胞通过生物基质增殖时随着时间推移稳定地增加。植入物的最终破坏载荷在植入后的 4 个月内为约 600 N,在植入的 8 个月内为约 400 N,在植入的 12 个月内为约 1000 N。用于 ACL 替换的混杂材料在植入前的刚度为约 85 N/mm,在植入的 4 个月内为约 106 N/mm,在固定的 8 个月内为约 78 N/mm,在固定的 12 个月内为约 176 N/mm。

[00105] 在 5 个测试病例中的 5 个当中,在移植的 4 个月、8 个月和 12 个月之后,用混杂组织进行的 ACL 替换产生连续组织,该连续组织由经由生物基质的骨连接至对侧的骨连接。仅组织的移植物在植入的 4 和 8 个月内通常 5 次中有 2 次不能产生连续组织生长。仅合成材料的移植物在植入的 4、8 和 12 个月内通常 5 次中有 1 次不能产生组织生长。

[00106] 图 6 图示了示例性实施方案的第一种组分、第二种组分和混杂移植物随时间变化的载荷能力。如图所示,第一种组分(线 8)显示出在植入后载荷能力立即下降,此后随着天然细胞在整个生物基

质中增殖而载荷能力增加。线 10 图示了第二种组分在植入后的初始高载荷能力，随着第二种组分随时间推移降解，载荷能力稳步下降。线 12 显示了含第一种组分和第二种组分这二者的混杂移植物的载荷能力。

[00107] 尽管参考某些实施方案相当详细地描述了本发明，但其它实施方案是可能的。例如，混杂组织结构的实施方案可用于其中需要替换软组织的许多用途，还提供特定的承载或生物力学特征，包括有关膝盖、踝、肩膀、颈和脊骨的韧带、腱或软组织替换。可如上所述使用相同的基本思路开发其它混杂系统。实例包括：人工半月板替换或修复；腹壁(例如疝)修复；例如膝盖、肩膀和髋中的软骨修复；关节表面置换(可使用适宜设计的锚钉或缝线以织物加固的混杂组织简单地覆盖关节面，而不用取出关节)；和起搏器小袋(一种用于容纳起搏器或疼痛管理系统的简单的包/小袋，使其定期替换更简单，建立更稳定的锚定起搏器移植物)。因此，随附权利要求的精神和范围不应限于本文包含的具体实施方案。

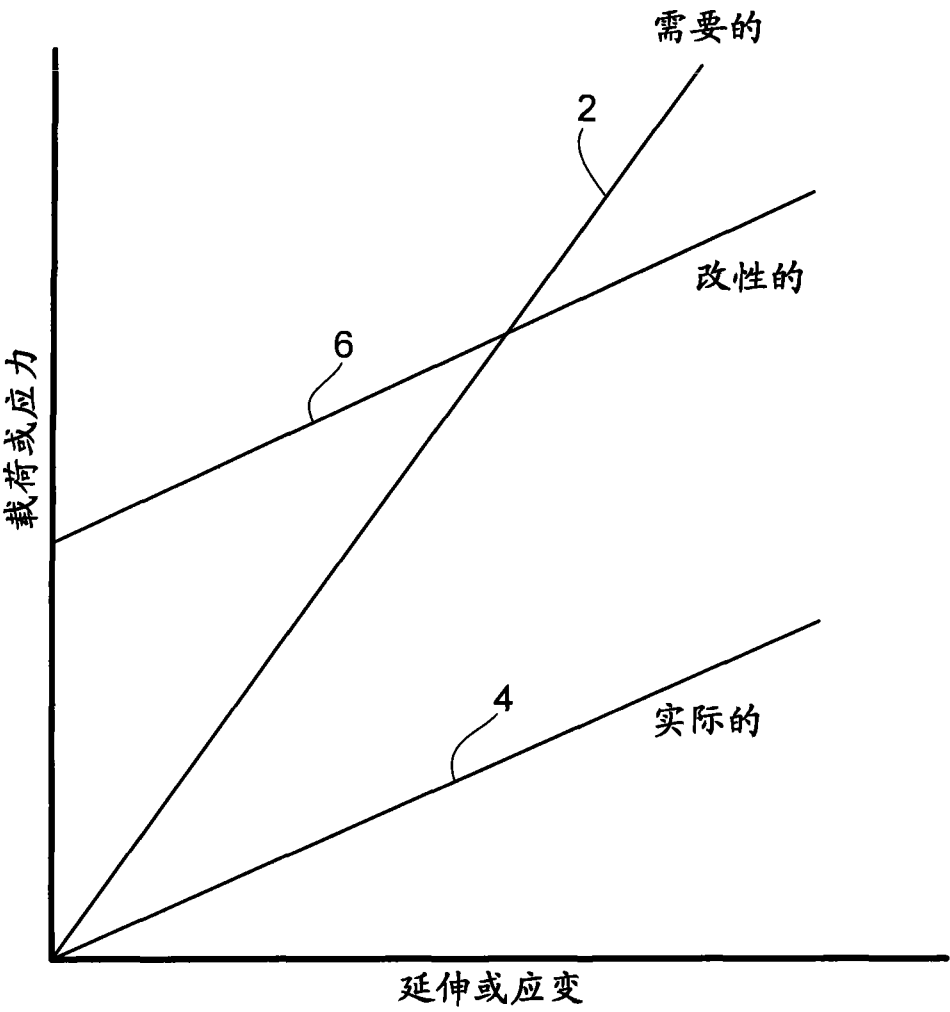


图 1

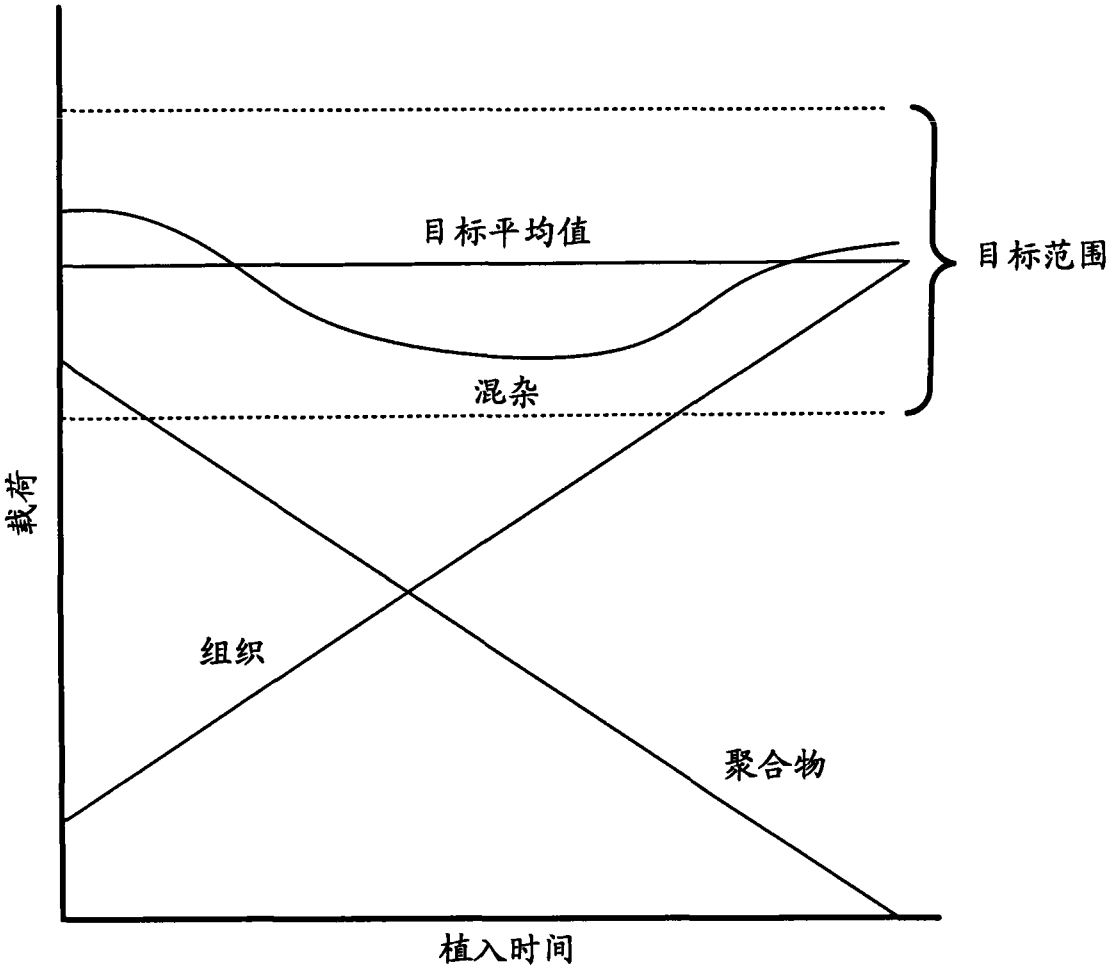


图 2

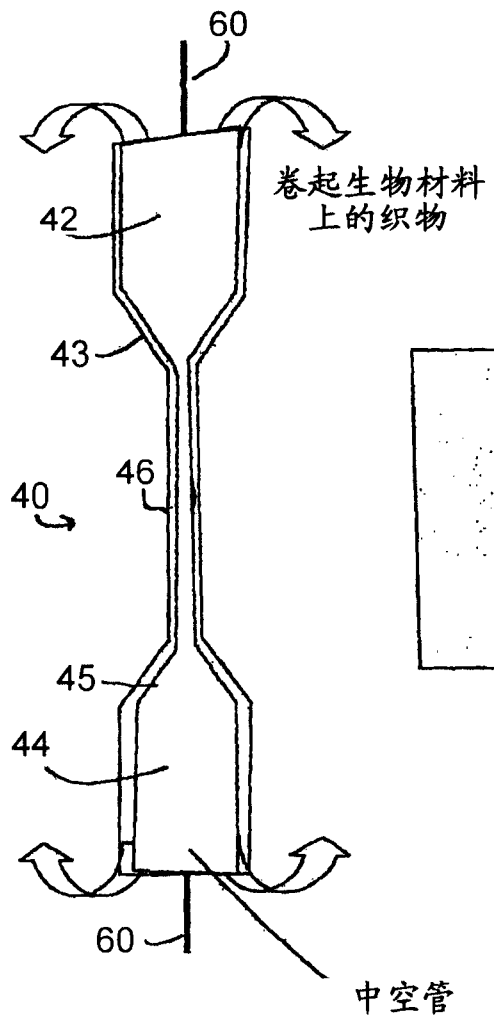


图 3

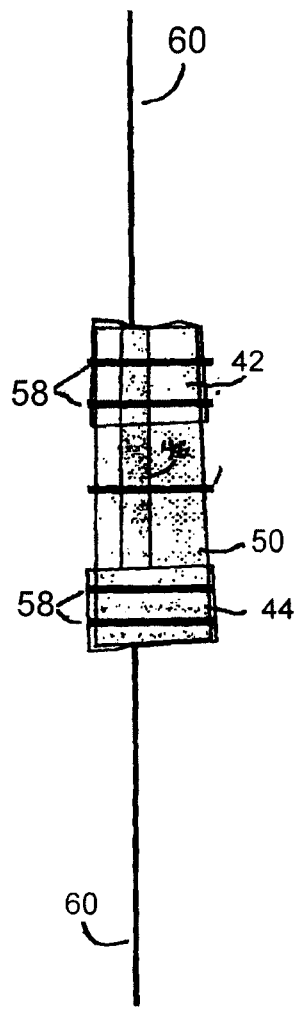


图 3A

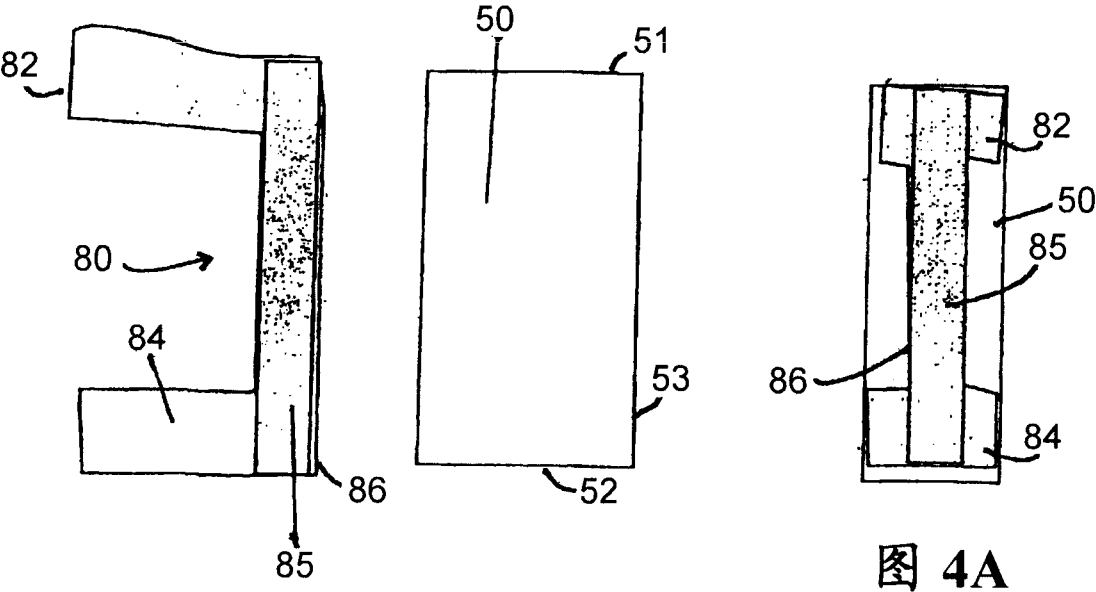


图 4

图 4A

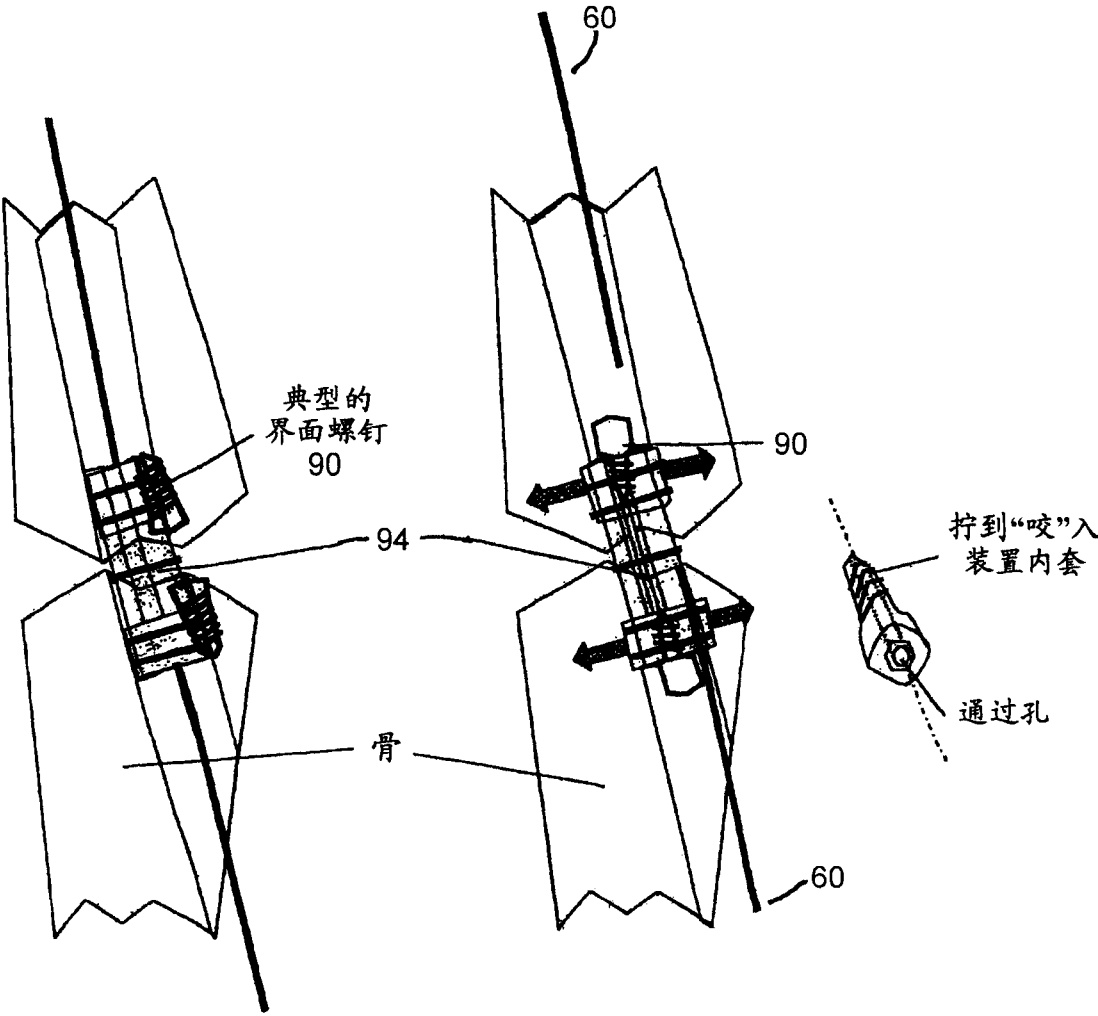


图 5

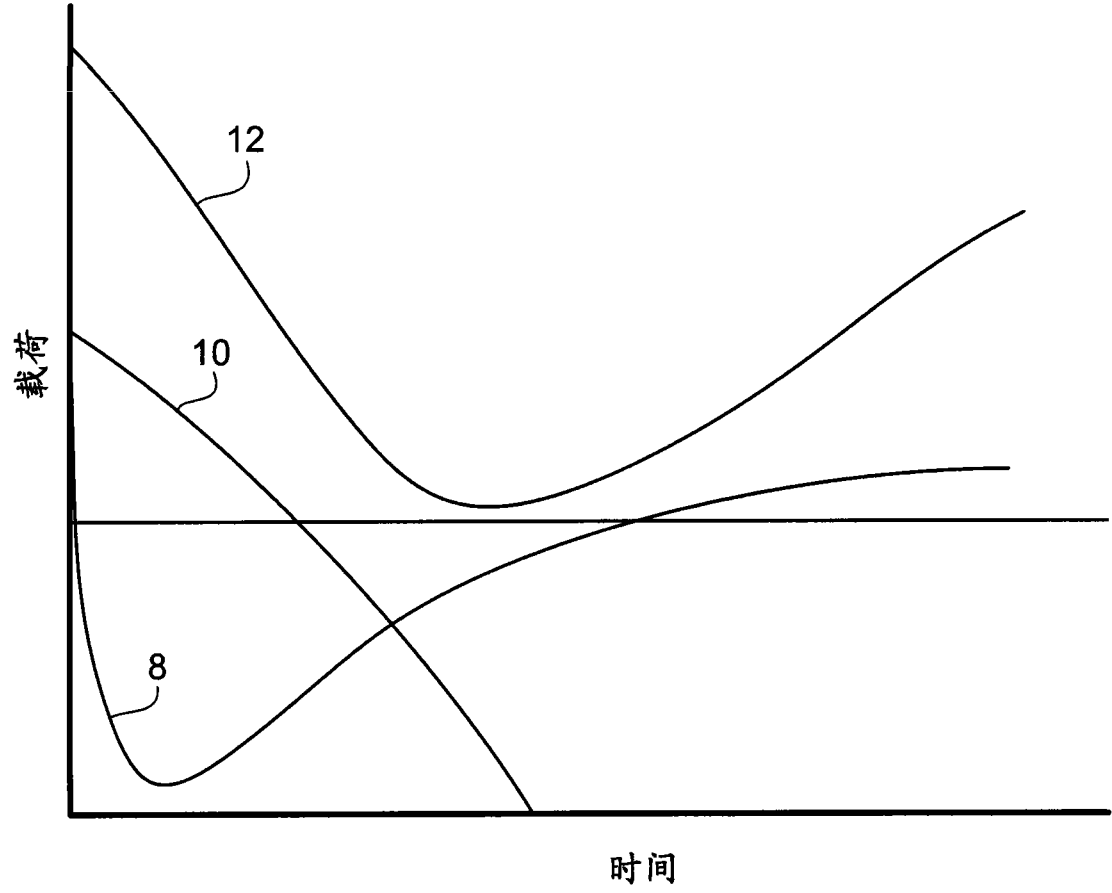


图 6