(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115697428 A
(43)申请公布日 2023.02.03

(21)申请号 202180037202.1
(22)申请日 2021.04.02
(30)优先权数据
63/004,794 2020.04.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/025523 2021.04.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/202965 EN 2021.10.07
(71)申请人 生命细胞公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 辉·许 亚历山德拉·帕斯蒂诺 方弘
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 李敏春 郑霞
(51)Int.Cl.
A61L 27/36(2006.01)
A61L 27/22(2006.01)

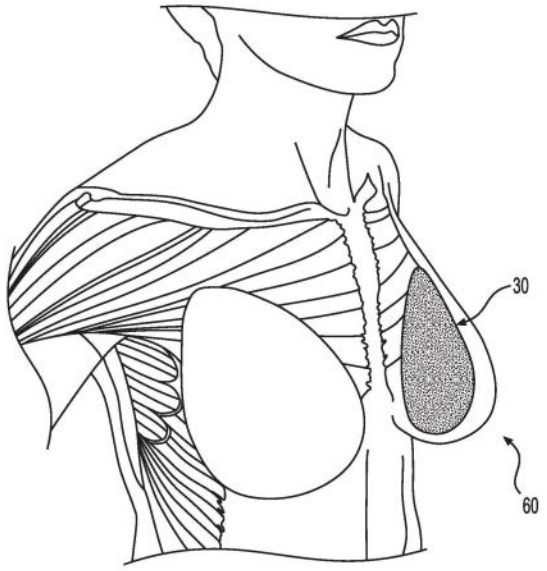
权利要求书3页 说明书14页 附图17页

(54)发明名称

含有原弹性蛋白的脂肪组织基质

(57)摘要

本公开提供了从脂肪组织产生的组织产品，以及用于产生这样的组织产品的方法。组织产品可以包括用于处理乳房的无细胞组织基质或颗粒产品。产品可以包括脂肪基质和原弹性蛋白。



CN 115697428 A

1.一种用于产生组织产品的方法,包括以下步骤:

选择脂肪组织;

处理所述组织以从所述组织中去除基本上所有的细胞材料;

将所述组织悬浮在液体中以形成具有按重量计2%-4%的固体含量的悬浮液;以及

将所述悬浮液冷冻和干燥以形成多孔海绵。

2.根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括交联所述多孔海绵。

3.根据权利要求2所述的方法,其中交联使用高温脱水工艺进行。

4.根据权利要求3所述的方法,所述方法还包括进行化学交联步骤。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述多孔海绵至少在所述海绵的最厚部分包括期望的厚度,所述厚度超过10.0cm。

6.根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括将所述悬浮液添加到模具中。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述模具为圆形或泪滴形乳房植入物的形状。

8.根据权利要求4所述的方法,其中所述化学交联步骤包括戊二醛、京尼平、碳二亚胺和二异氰酸酯中的至少一种。

9.根据权利要求4所述的方法,其中交联包括加热所述多孔海绵。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述多孔海绵在真空中被加热。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述多孔海绵被加热到70℃至120℃的范围。

12.根据权利要求4所述的方法,其中所述多孔海绵被交联,使得所述材料在与水性环境接触时保持稳定的三维结构。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述水性环境是哺乳动物身体。

14.一种组织产品,包含:

乳房植入物,所述植入物包含已经被均质化以形成悬浮液、干燥并稳定化的无细胞脂肪组织基质的构建体,所述无细胞脂肪组织基质包括颗粒无细胞脂肪组织基质,并且其中所述植入物在至少一个维度上测量为至少5cm并包含原弹性蛋白。

15.根据权利要求14所述的组织产品,其中所述植入物在至少一个维度上测量为至少8cm。

16.根据权利要求14所述的组织产品,其中所述植入物为圆形乳房植入物的形式。

17.根据权利要求14所述的组织产品,其中所述植入物为泪滴形乳房植入物的形式。

18.一种用于产生组织产品的方法,包括以下步骤:

选择脂肪组织;

处理所述组织以从所述组织中去除基本上所有的细胞材料;

将所述组织悬浮在液体中以形成悬浮液;

添加原弹性蛋白到所述悬浮液中;以及

将所述悬浮液冷冻和干燥以形成多孔海绵。

19.根据权利要求18所述的方法,所述方法还包括交联所述多孔海绵。

20.根据权利要求19所述的方法,其中交联使用高温脱水工艺进行。

21.根据权利要求20所述的方法,所述方法还包括进行化学交联步骤。

22.根据权利要求18所述的方法,其中所述多孔海绵至少在所述海绵的最厚部分包括期望的厚度,所述厚度超过10.0cm。

23.根据权利要求18所述的方法,所述方法还包括将所述悬浮液添加到模具中。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述模具为圆形或泪滴形乳房植入物的形状。

25.根据权利要求21所述的方法,其中所述化学交联步骤包括戊二醛、京尼平、碳二亚胺和二异氰酸酯中的至少一种。

26.根据权利要求19所述的方法,其中交联包括加热所述多孔海绵。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述多孔海绵在真空中被加热。

28.根据权利要求26所述的方法,其中所述多孔海绵被加热到70℃至120℃的范围。

29.根据权利要求19所述的方法,其中所述多孔海绵被交联,使得所述材料在与水性环境接触时保持稳定的三维结构。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述水性环境是哺乳动物身体。

31.根据权利要求18-30中任一项所述的方法,所述方法还包括从所述海绵形成颗粒。

32.一种组织产品,包含:

第一组分,所述第一组分包含无细胞脂肪基质(AAM);以及

第二组分,所述第二组分包含原弹性蛋白(TE)。

33.根据权利要求32所述的组织产品,其中所述产品为海绵的形式。

34.根据权利要求33所述的组织产品,其中所述海绵包含约3:1至约1:3的AAM与TE的比例。

35.根据权利要求32-34中任一项所述的组织产品,其中所述产品为颗粒。

36.根据权利要求32-35中任一项所述的组织产品,其中所述TE是人类TE。

37.根据权利要求32-36中任一项所述的组织产品,其中所述AAM来源于猪脂肪。

38.根据权利要求32-37中任一项所述的组织产品,其中所述产品已被至少部分交联。

39.根据权利要求38所述的组织产品,其中所述交联用1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)进行。

40.一种组织产品,所述组织产品通过包括以下的工艺产生:

选择脂肪组织;

处理所述组织以从所述组织中去除基本上所有的细胞材料;

将所述组织悬浮在液体中以形成悬浮液;

添加原弹性蛋白到所述悬浮液中;以及

将所述悬浮液冷冻和干燥以形成多孔海绵。

41.根据权利要求40所述的组织产品,还包括交联所述多孔海绵。

42.根据权利要求41所述的组织产品,其中交联使用高温脱水工艺进行。

43.根据权利要求42所述的组织产品,还包括进行化学交联步骤。

44.根据权利要求43所述的组织产品,其中所述化学交联步骤包括戊二醛、京尼平、碳二亚胺和二异氰酸酯中的至少一种。

45.根据权利要求41所述的组织产品,其中交联包括加热所述多孔海绵。

46.根据权利要求41所述的组织产品,其中所述多孔海绵在真空中被加热。

47.根据权利要求46所述的组织产品,其中所述多孔海绵被加热到70℃至120℃的范围。

48.根据权利要求19所述的组织产品,其中所述多孔海绵被交联,使得所述材料在与水

性环境接触时保持稳定的三维结构。

49.根据权利要求18-30中任一项所述的组织产品,还包括从所述海绵形成颗粒。

50.一种处理方法,包括:

将包含无细胞脂肪组织基质和原弹性蛋白的组织产品植入解剖部位中或解剖部位上。

51.根据权利要求50所述的方法,其中所述产品被植入乳房内或乳房周围。

52.根据权利要求50所述的方法,其中所述解剖部位是手术程序留下的空腔。

53.根据权利要求50所述的方法,其中所述解剖部位是手、髋部、臀部或面部结构中的至少一个。

含有原弹性蛋白的脂肪组织基质

[0001] 本申请根据35 USC§119要求美国临时申请第63/004,794号的优先权,该申请于2020年4月3日提交,并通过引用以其整体并入。

[0002] 本公开涉及组织产品,并且更具体地,涉及从脂肪组织制备并包含原弹性蛋白的细胞外组织基质。

[0003] 多种组织来源的产品用于再生、修复或以其他方式治疗病变(diseased)或受损的组织和器官。这样的产品可以包括组织移植物和/或加工的组织(例如来自皮肤、肠或其他组织的有或没有细胞接种的无细胞组织基质)。这样的产品一般具有由组织来源(即组织类型和其来源的动物)和用于产生组织产品的加工参数确定的特性。由于组织产品通常用于手术应用和/或组织置换或增大(augmentation),产品应支持组织生长和再生,如选择的植入部位期望的。本公开提供了脂肪组织产品,其可以允许改善的组织生长和再生用于各种应用,诸如乳房植入物。组织产品还可以包含原弹性蛋白以改善生物或机械特性。产品可以是交联的以在植入时保持期望的形状。

[0004] 根据某些实施方案,提供了用于产生组织产品的方法。该方法可以包括选择脂肪组织;对脂肪组织进行机械加工以减小组织尺寸;处理经机械加工的组织以从组织中去除基本上所有的细胞材料;将组织悬浮在液体中以形成悬浮液;以及将悬浮液在模具中干燥以形成多孔海绵。在一些实施方案中,悬浮液被干燥并经受处理,诸如高温脱水(dehydrothermal)交联。组织产品可以包含原弹性蛋白。

[0005] 在多种实施方案中,脂肪组织被加工以控制某些机械特性。例如,经加工的组织可以被交联以产生稳定的三维结构。另外,或可选地,海绵或悬浮液的固体含量百分比可被控制,如以下进一步详细讨论的。此外,在一些实施方案中,可在形成悬浮液之前将原弹性蛋白添加到组合物中。

[0006] 本文还提供了通过所公开的工艺制备的组织产品。

[0007] 在一些实施方案中,组织产品包括脱细胞脂肪细胞外组织基质(decellularized adipose extracellular tissue matrix),其中组织基质已经形成为预定的三维形状,并且其中组织基质被部分交联以保持三维形状。产品可包含期望量的原弹性蛋白。

[0008] 本文还提供了一种包含乳房植入物的组织产品。植入物可以包含脂肪组织基质,该脂肪组织基质以通过交联和/或固体百分比控制的一组期望的机械特性形成。该产品还可以包含原弹性蛋白。

[0009] 本文还提供了一种包含可注射脂肪基质或颗粒脂肪基质的组织产品。植入物可以是至少部分交联的固体。该产品还可以包含原弹性蛋白。

[0010] 本文还提供了处理方法(methods of treatment),该处理方法包括选择组织部位和将本文公开的组织产品植入组织部位的步骤。

[0011] 附图简述

[0012] 图1是概述根据某些实施方案的用于产生脂肪组织基质海绵的工艺的流程图。

[0013] 图2是根据某些实施方案的生物乳房植入物的侧视图。

[0014] 图3A是根据某些实施方案的乳房植入物的配置的透视图。

[0015] 图3B是根据某些实施方案的乳房植入物的另一配置的透视图。

[0016] 图3C是根据某些实施方案的乳房植入物的另一配置的透视图。

[0017] 图4说明了根据某些实施方案的用于乳房手术程序的系统的植入。

[0018] 图5A-图5G是示出EDC交联对脂肪生成的作用的组织学图像。

[0019] 图6A是示出脂肪基质固体含量对抗压强度的作用的条形图。

[0020] 图6B是示出脂肪基质固体含量对恢复百分比的作用的条形图。

[0021] 图6C是示出脂肪基质固体含量对弹性的作用的条形图。

[0022] 图6D是示出脂肪基质固体含量对模量的作用的条形图。

[0023] 图7A是示出不同交联物含量或原弹性蛋白含量对脂肪基质产品的抗压强度的作用的条形图。

[0024] 图7B是示出不同交联物含量或原弹性蛋白含量对脂肪基质的恢复百分比的作用的条形图。

[0025] 图7C是示出不同交联物含量或原弹性蛋白含量对脂肪基质产品的模量的作用的条形图。

[0026] 图8A-图8D是代表性组织学图像,示出了在大鼠模型中在植入后8周,在有或没有EDC交联脂肪基质产品的情况下添加原弹性蛋白对脂肪生成的作用。

[0027] 图9是植入后8周脂肪基质在有或没有EDC交联和有或没有添加原弹性蛋白的情况下的脂肪生长图。

[0028] 图10A-图10D是代表性组织学图像,示出了在大鼠模型中在植入后16周,在有或没有EDC交联脂肪基质产品的情况下添加原弹性蛋白对脂肪生成的作用。

[0029] 图11是植入后16周脂肪基质在有或没有EDC交联和有或没有添加原弹性蛋白的情况下的脂肪生长图。

[0030] 图12A-图12B是16周时外植体的马松三色染色切片,示出了TE的持续存在。

[0031] 某些示例性实施方案的描述

[0032] 现在将详细参考根据本公开的某些示例性实施方案,其某些实例在附图中示出。在可能的情况下,将在整个附图中使用相同的附图标记来指代相同或相似的部分。

[0033] 在本申请中,除非另外特别说明,否则单数的使用包括复数。在本申请中,除非另外说明,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及诸如“包括(includes)”和“包括(included)”的其他形式的使用不是限制性的。本文描述的任何范围将被理解为包括端点,以及端点之间的所有值。

[0034] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。在本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文,出于任何目的特此通过引用明确地以其整体并入。

[0035] 如本文使用的,“组织产品”指的是包含细胞外基质蛋白的任何人类或动物组织。“组织产品”可包括无细胞或部分脱细胞的组织基质,以及已用外源细胞重新填充的脱细胞组织基质。

[0036] 如本文使用的,术语“无细胞组织基质”是指来源于人类或动物组织的细胞外基质,其中基质保留了大量用作支持组织再生的支架所需的天然胶原、其他蛋白质、蛋白聚糖和/或糖蛋白。“无细胞组织基质”不同于纯化的胶原材料,诸如酸提取的纯化胶原,纯化的

胶原材料基本上没有其他基质蛋白，并且由于纯化工艺，没有保留组织基质的天然微结构特征。尽管称为“无细胞组织基质”，但应理解的是，这样的组织基质可与外源细胞，包括例如干细胞或来自可以植入“无细胞组织基质”的患者的细胞组合。“脱细胞脂肪组织基质”将被理解为指基于脂肪的组织，其中所有细胞已被去除以产生脂肪细胞外基质。“脱细胞脂肪组织基质”可以包括完整的基质(intact matrix)或已经如本文所讨论的进一步加工的基质，包括机械加工、海绵的形成和/或进一步加工以产生颗粒基质。如本文使用的，AAM是指来自任何来源的“无细胞脂肪基质”，并且pAAM是指“猪来源的无细胞脂肪基质”。

[0037] “无细胞”或“脱细胞”组织基质将被理解为是指使用光学显微镜看不到细胞的组织基质。

[0038] 各种人类和动物组织可以用来产生用于治疗患者的产品。例如，已经产生了用于再生、修复、增大、强化和/或治疗由于各种疾病和/或结构损伤(例如，来自创伤、手术、萎缩和/或长期磨损和退化)而受损或丢失的人类组织的各种组织产品。这样的产品可以包括，例如，无细胞组织基质、组织同种异体移植物或异种移植物和/或重构组织(即，至少部分脱细胞的组织，其已接种了细胞以产生活体材料(viable material))。

[0039] 已产生了多种组织产品用于治疗软组织和硬组织。例如，ALLODERM® 和STRATTICE™(LIFECELL CORPORATION,BRANCHBURG,NJ)是分别从人和猪真皮制备的两种真皮无细胞组织基质。尽管这样的材料对于治疗某些类型的状况非常有用，但对于某些应用来说，具有不同生物学和机械特性的材料可能是期望的。例如，ALLODERM® 和STRATTICE™已被用于帮助治疗结构缺损和/或为组织提供支持(例如用于腹壁或乳房重建)，并且它们的强度和生物学特性使它们非常适合这样的用途。然而，当期望的结果是产生具有活体脂肪细胞的脂肪组织时，这样的材料可能对含脂肪组织的再生、修复、置换和/或增大不是理想的。因此，本公开提供了可用于治疗涉及含脂肪组织的组织缺损/缺陷的组织产品。本公开还提供了用于产生这样的组织产品的方法。

[0040] 组织产品可以包括已经被加工以去除至少一些细胞组分的脂肪组织。在一些情况下，所有或基本上所有的细胞材料被去除，从而留下脂肪细胞外基质蛋白。此外，产品可被加工以去除一些或全部细胞外脂质和/或细胞内脂质。然而，在一些情况下，完全去除细胞外脂质和/或细胞内脂质可能损害脂肪基质的结构和功能。例如，经过长时间化学或酶处理的脂肪组织可能具有变性或以其他方式损坏的胶原，或者可能耗尽脂肪再生所需的蛋白质。因此，在一些情况下，产品包含一定水平的残余脂质。剩余的脂质含量可以是，例如，按产品的重量计约5％、6％、7％、8％、9％或10％。如以下进一步描述的，可以进一步处理细胞外基质蛋白质以产生三维多孔或海绵样材料，并且可以进一步加工该多孔或海绵样材料以产生可注射产品。

[0041] 如所述的，本公开的组织产品至少部分地从脂肪组织形成。脂肪组织可来源于人类或动物来源。例如，人类脂肪组织可以从尸体获得。此外，人类脂肪组织可以从活体供体获得(例如，自体组织)。脂肪组织也可以从动物诸如猪、猴或其他来源获得。如果使用非灵长类动物来源，可以进一步处理组织以去除抗原性组分，诸如1,3-α-半乳糖部分，它存在于猪和其他哺乳动物，但不存在于人类或灵长类中。参见Xu,Hui,等人，“A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold that Supports Soft Tissue Regeneration:Removal of Terminal Galactose-α-(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure,”

Tissue Engineering,Vol.15,1-13(2009)，其特此通过引用以其整体并入。此外，脂肪组织可以从已经经过遗传修饰以去除抗原性部分的动物中获得。

[0042] 用于产生本公开的组织产品的示例性工艺在图1中说明。图1提供了说明可用于产生合适的脂肪组织海绵的基本步骤的流程图。如示出的，该工艺可包括许多步骤，但应理解，可以基于所使用的特定组织、期望的应用或其他因素添加或替换另外的或替代的步骤。

[0043] 如示出的，工艺100一般可以在步骤110开始，在该步骤中接收组织。该组织可包括多种脂肪组织类型，包括例如人类或动物脂肪组织。合适的组织来源可以包括同种异体移植物组织、自体移植物组织或异种移植物组织。当使用异种移植物时，该组织可以包括来自动物(包括猪、牛、狗、猫、家养或野生来源和/或任何其他合适的哺乳动物或非哺乳动物脂肪来源)的脂肪。

[0044] 组织可以使用任何期望的技术从动物来源收获，但如果可能的话，一般可以使用无菌(aseptic)或消毒(sterile)技术获得。组织可以在冷藏或冷冻条件下储存，或者可以立即加工以防止由于长时间储存而引起的任何不期望的变化。

[0045] 在接收组织后，组织最初可以在步骤120经受机械尺寸减小和/或在步骤130经受机械脱脂。机械尺寸减小可以包括使用手动刀片或任何其他合适的研磨工艺对组织进行粗切割或大切割。

[0046] 步骤130的机械脱脂在组织的产生中可以是重要的。具体地，为了帮助脂质去除，脂肪可以经受各种机械加工条件。例如，机械加工可以包括研磨(grinding)、混合、切碎、磨碎(grating)或以其他方式加工组织。机械加工可以在允许一定程度加热的条件下进行，这可以帮助释放或去除脂质。例如，机械加工可以在允许脂肪组织被加热到122℉(50℃)的条件下进行，或者对于猪脂肪，在42℃-45℃之间，或者对于人类脂肪，在稍低的温度。应用外部热可能不足以释放脂质；因此，在机械破坏期间产生的热可以是优选的，以帮助脂质去除。在一些实例中，机械加工期间的加热可以是温度上升的脉冲，并且持续时间可以很短。这种热脉冲可以导致通过机械破坏从破碎的脂肪细胞中释放的脂质液化，然后可以导致高效的相分离以去除大量脂质。在一个实例中，当加工猪脂肪组织时，在此工艺期间达到的温度高于100℉，并且不得超过122℉(50℃)。所达到的温度范围可以根据脂肪组织的来源调整。例如，当加工具有较少饱和脂肪的组织，例如灵长类组织时，温度可以进一步降低到约80℉、90℉、100℉、110℉或120℉。可选地，该工艺可以选择为确保脂肪达到最低温度，诸如80℉、90℉、100℉、110℉或120℉。

[0047] 在一些情况下，机械脱脂可以通过在添加很少或不添加洗涤液的情况下机械加工组织来进行。例如，组织可以通过在不使用溶剂的情况下研磨或混合进行机械加工。可选地，当研磨组织需要水分时，例如为了增加流动性或降低粘度，可以使用水，包括纯水或盐水或者其他缓冲液(包括盐水或磷酸盐缓冲盐水)。在一些实例中，可以通过添加一定量的生物相容性溶剂，诸如盐水(例如生理盐水、磷酸盐缓冲盐水或包含盐和/或去污剂的溶液)来加工组织。其他促进细胞裂解的溶液也可以是适当的，包含盐和/或去污剂。

[0048] 在机械加工和脂质去除之后，可以在步骤140洗涤脂肪。例如，可以用各种生物相容性缓冲液进行一次或更多次冲洗来洗涤组织。例如，合适的洗涤溶液可以包括盐水、磷酸盐缓冲盐水或其他合适的生物相容性材料或生理溶液。在一个实例中，水可用作冲洗剂以进一步破坏细胞，之后可引入磷酸盐缓冲盐水或任何其他合适的盐水溶液以允许基质蛋白

返回生物相容性缓冲液。

[0049] 洗涤可以与离心或其他工艺一起进行以从组织中分离脂质。例如,在一些实施方案中,用水或另一溶剂稀释材料。然后将稀释的材料离心,并且游离脂质将流向顶部,而细胞外基质蛋白则以沉淀的形式沉积。然后可以重新悬浮蛋白质沉淀,并且可以重复洗涤和离心,直到足够量的脂质被去除。

[0050] 在任何洗涤之后,可以处理脂肪以从脂肪组织中去除一些或所有细胞,如步骤150指示的。细胞去除工艺可以包括许多合适的工艺。例如,用于从脂肪组织中去除细胞的合适方法可以包括用去污剂诸如脱氧胆酸、聚乙二醇或其他去污剂在足以破坏细胞和/或去除细胞组分的浓度和时间进行处理。

[0051] 在细胞去除之后,基于所使用的组织或期望的最终结构,可掺入另外的加工和/或洗涤步骤,如在步骤160指示的。例如,可以进行另外的洗涤或处理以去除抗原性物质,诸如α-1,3-半乳糖部分,其可以存在于非灵长类动物组织上。此外,在洗涤步骤期间、之前和/或之后,可以使用另外的溶液或试剂来加工材料。例如,酶、去污剂和/或其他剂可以在一个或更多个步骤中使用,以进一步去除细胞材料或脂质,去除抗原性物质,和/或减少材料的细菌或其他生物负荷。例如,可以包括使用去污剂(诸如十二烷基硫酸钠或Triton)的一个或更多个洗涤步骤,以帮助细胞和脂质去除。此外,酶诸如脂肪酶、DNA酶、RNA酶、α-半乳糖苷酶或其他酶可用于确保核物质、来自异种来源的抗原、残余细胞组分和/或病毒的破坏。此外,酸性溶液和/或过氧化物可用于帮助进一步去除细胞材料和破坏细菌和/或病毒,或其他潜在的感染性病原体。

[0052] 在去除脂质和细胞组分后,然后材料可以形成多孔或海绵样材料。一般,如在步骤170指示的,首先将细胞外基质重悬在水性溶剂中以形成AAM(无细胞脂肪基质)的浆样材料。使用足够量的溶剂以允许材料形成液体团(liquid mass),该液体团可以倒入具有期望的组织产品的尺寸和形状的模具中。添加的水或溶剂的量可以基于最终材料的期望孔隙率而变化。在一些情况下,浆样材料可以具有按重量计约2%至约10%的固体浓度,优选地约2%至约5%的固体浓度。重量应理解为AAM或TE(如果添加)的干重。因此,作为一个实例,3%的AAM浆包括100mL液体中的3g AAM。冷冻干燥后,最终的材料将重3g。或者,如果浆具有1% TE和3% AAM,则每100ml浆包含1g TE和3g AAM。在一些情况下,重悬的细胞外基质可以通过研磨、切割、混合或其他工艺机械处理一次或另外更多次,并且可以将经处理的材料离心和重悬一次或更多次以进一步去除细胞材料或脂质(如果需要)和/或控制细胞外基质的粘度。

[0053] 在一些情况下,如在步骤180指示的,可在海绵形成之前将原弹性蛋白添加到材料中。可选择多种合适的原弹性蛋白。例如,原弹性蛋白可以以适合混合到AAM浆中的形式提供。例如,通过用化学工艺和/或热处理,可将原弹性蛋白从原弹性蛋白溶液形成为弹性材料、粘弹性材料或水凝胶。在处理形成弹性体(elastic)、粘弹性体(viscoelastic)或水凝胶后,原弹性蛋白可以被切割或以其他方式加工以允许与先前制备的无细胞脂肪基质混合。

[0054] 以下在单独的标题下进一步讨论制备原弹性蛋白的示例性工艺。

[0055] 原弹性蛋白可以在合适的浓度范围内添加到AAM浆中。例如,原弹性蛋白的量可选择为赋予期望的机械和/或生物特性。例如,原弹性蛋白可以以0.1%-50%、或0.5%-3%、

1%-5%、0.5%-2%、10%-75%或其他合适的值的重量百分比与AAM混合。

[0056] 可以以许多形式产生原弹性蛋白并与步骤170中的AAM海绵浆混合，包括，例如，在原弹性蛋白是干粉、溶液、浆或水凝胶的形式的情况下将原弹性蛋白混合到AAM浆中。例如，可以将TE水凝胶掺入AAM浆中至期望的重量。示例性TE水凝胶可以通过使用EDC、BS3或其他交联物交联人类TE来制备。可选地，TE可以通过冷冻干燥来干燥并碾磨以产生干粉，并且该粉末可以掺入AAM浆中。

[0057] TE的量可以基于许多因素而变化，包括期望的机械或生物学特性。例如，可以将TE掺入浆中，以形成浆重量的0.1%-10%，AAM占浆的0.1%-10%。在一些情况下，TE和AAM以期望的比例(诸如TE:AAM在浆中为1:3、1:4、1:5(按重量计)，或其他合适的范围的比例)被包括。

[0058] 在将原弹性蛋白与AAM混合并悬浮材料之后，将材料放置在容器或模具中以形成多孔的海绵样产品，如在步骤190指示的。一般，多孔或海绵样材料是通过干燥材料以留下具有多孔结构的三维基质来形成的。在一些实施方案中，材料被冷冻干燥。冷冻干燥可以允许产生一般符合模具的形状的三维结构，如图3示出的。具体的冷冻干燥方案可以基于所使用的溶剂、样品尺寸和/或为了优化加工时间而变化。一种合适的冷冻干燥工艺可以包括冷却材料；将样品保持在冷却的温度，并进一步冷却样品以确保完全冷冻；施加真空；并以一个或几个步骤升高温度。然后可以将冷冻干燥的样品从冷冻干燥器中取出，并在氮气下包装在箔袋中。

[0059] 在形成固体或海绵之后，材料可以任选地被稳定化，如在步骤195指示的。在一些情况下，稳定化可以包括另外的工艺，诸如交联、用高温脱水(DHT)工艺处理或其他合适的稳定化方法。例如，一般，在机械加工的组织形成多孔基质的情况下，当它被植入体内、变湿或置于溶液中时，可以形成更加油灰样(putty-like)或糊样的材料。因此，可能会失去期望的形状和尺寸。此外，可能会失去可能对支持细胞附着、组织生长、血管形成和组织再生重要的多孔结构。因此，可以进一步加工该材料以使该材料的尺寸、形状和结构稳定化。

[0060] 在一些实施方案中，TE-AAM材料被交联以用于稳定化。示例性交联工艺可包括将如以上讨论产生的冷冻干燥材料与戊二醛或EDC接触。

[0061] 在一些实施方案中，材料在冷冻干燥后交联。然而，材料也可以在冷冻干燥之前或期间交联。交联可以以多种方式进行。在一种实施方案中，交联是通过将材料与交联剂诸如戊二醛、京尼平、碳二亚胺(例如，1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC))和二异氰酸酯接触来实现的。

[0062] 此外，交联可以通过在真空中加热材料(DHT)来进行。例如，在一些实施方案中，材料可以在减压或真空中加热到70℃至120℃之间、或80℃与110℃之间，或约100℃，或指定范围内的任何值。DHT处理后还可以进行化学交联以产生期望的机械特性(例如，DHT后进行EDC或其他化学交联)。此外，其它交联工艺或工艺组合可用于产生任何所公开的产品，包括紫外照射、γ照射和/或电子束照射。此外，真空不是必需的但可以减少交联时间。此外，只要不发生基质蛋白的熔化和/或为交联提供足够的时间，就可以使用更低或更高的温度。

[0063] 在多种实施方案中，可控制交联工艺以产生具有期望的机械、生物学和/或结构特征的组织产品。例如，交联可以影响材料的整体强度，并且可以控制该工艺以产生期望的强度。此外，交联量可以影响产品在植入时保持期望形状和结构(例如，孔隙率)的能力。因此，

可以选择交联量以在植入体内时、与水性环境接触时和/或压缩时(例如被周围组织或材料压缩)产生稳定的三维形状。

[0064] 过度交联可以改变细胞外基质材料。例如,过度交联可以损伤胶原或其他细胞外基质蛋白。当组织产品被放置在脂肪组织部位或其他解剖学位置时,受损的蛋白质可能不支持组织再生。此外,过度的交联可能会导致材料变脆或变弱。因此,可以控制交联量以产生期望的稳定性水平,同时保持期望的生物学、机械和/或结构特征。

[0065] 在一些情况下,不是将所公开的组织产品作为海绵提供,而是将产品形成为颗粒或可流动和可注射的材料。这样的组合物可以用于诸如填充的应用(诸如,平滑皱纹,增加嘴唇或其他结构的组织尺寸,或改善其他解剖结构的形状或特征)。

[0066] 可注射组合物可以以许多合适的方式形成。特别地,可将原弹性蛋白组分与脂肪组织基质产品以许多方式混合,以产生可注射组合物。例如,在一些情况下,如图1中直到步骤195所说明的产生具有原弹性蛋白的脂肪基质海绵。稳定化后,可通过机械手段诸如切割或研磨将海绵颗粒化,并且如果需要,可对颗粒进行分选或尺寸选择,以产生期望的尺寸分布范围。

[0067] 可选地,在一些情况下,可以形成AAM海绵并颗粒化。随后,颗粒AAM可以与颗粒原弹性蛋白混合,并且该组合物可以用作注射剂。原弹性蛋白可以以合适的百分比的范围(例如,10%-75%)添加。

[0068] 使用以上讨论的方法产生的设备可以具有多种配置。例如,图2是由原弹性蛋白和脂肪组织基质形成的生物乳房植入物30的侧视图。该植入物可以包括多种合适的乳房植入物形状、轮廓或投影(projection)。此外,应该理解,可以使用多种形状,包括圆形、不规则、同心球体或同心不规则3-D形状,或定制成形的植入物。例如,图3A-图3C说明了使用所公开的方法产生的植入物的示例性形状,包括泪滴形植入物36(图3A)、不规则植入物37(图3B)和/或球形植入物38(图3C)。

[0069] 设备30、36-38可以具有多种尺寸。但是如以上所述,本文提供的方法可以通过允许产生具有与常规乳房植入物或组织扩张器相匹配的大尺寸的脂肪植入物来提供优势。例如,使用本文讨论的方法,可以产生具有至少一个尺寸为5cm或更大的植入物。在其他情况下,设备具有至少6cm、至少7cm、至少8cm、至少10cm或更大的尺寸。

[0070] 本文还公开了通过植入组织产品来处理(treating)乳房的方法。因此,图4说明了用于乳房手术程序的系统的植入。该方法可首先包括识别乳房60内的解剖部位。(如本文使用的,“乳房内”将被理解为在乳腺组织内,或者在乳房周围的组织内或附近,诸如乳房的正下方、外侧或内侧的组织,或者周围组织下方的组织,包括例如胸部(胸肌)肌肉下方,并且还将包括植入到部分或全部乳房已通过手术程序去除的部位)。该部位可以包括,例如,需要重建、修复、增大或治疗的任何合适的部位。这样的部位可以包括进行过肿瘤手术程序(乳房切除术、肿块切除术)的部位,进行过美容程序(增大或修正增大)的部位,或因疾病或创伤需要治疗的部位。

[0071] 本文还提供了处理方法,包括选择组织部位和将本文公开的组织产品植入组织部位的步骤。该方法可以包括将处理设备(treatment device)植入伤口或手术部位中或附近,以及将处理设备的至少一部分固定到处理部位中或附近的组织。可以将组织产品植入组织部位后面以支撑、重新定位或向外突出天然组织。

[0072] 本文还提供了处理方法，包括选择乳房内的组织部位；在组织部位内植入设备；并允许组织在无细胞脂肪组织基质内生长。在一种实施方案中，该设备包括合成的乳房植入物或组织扩张器和围绕该乳房植入物或组织扩张器的无细胞脂肪组织基质。该方法还可以包括去除乳房植入物或组织扩张器，并在通过去除乳房植入物或组织扩张器而形成的空腔内植入另外的无细胞脂肪组织基质。

[0073] 本文描述的组织产品可用于处理多种不同的解剖部位。例如，如通篇所讨论的，本公开的组织产品由脂肪组织基质产生，并可用于处理乳房。在一些情况下，组织产品可以植入到其他部位，包括例如主要或显著为脂肪组织的组织部位。在一些情况下，组织部位可以包括乳房(例如，用于增大，置换切除的组织，或放置在植入物周围)。此外，可选择任何其他包含脂肪组织的部位。例如，组织产品可用于乳房、面部、臀部、腹部、髋部、大腿或任何其他可能需要具有接近天然脂肪的结构和感觉的额外脂肪组织的部位的重建或美容用途。在任何这些部位，组织可以用来减少或消除皱纹、下垂或不期望的形状。

[0074] 本发明的工艺和由此形成的弹性材料在组织填充应用中特别有用，例如，需要在美容上增强或改善外表的应用(例如，使嘴唇丰满、鼻唇皱褶填充、减少皱纹或其他组织增强)，或者需要支持先天性缺损或由疾病或手术切除导致的缺损的医疗应用。

[0075] 在一些情况下，产品包括可注射组合物，该组合物包括包含在运载体溶液中的颗粒AAM和TE。如果呈特定形式，该材料可以被配置成允许期望的流动性或可注射性。例如，可以以一定百分比添加各种运载体以允许流动性。合适的运载体可以包括溶液(例如，PBS)、水凝胶、透明质酸或透明质酸的衍生物、明胶或其他生物相容性可流动材料。

[0076] 产生原弹性蛋白的示例性方法：

[0077] 如以上所述，原弹性蛋白可以许多形式提供，诸如弹性体、粘弹性体、水凝胶或其他材料。一般来说，“弹性材料”不是自由流动的液体。它可以是凝胶、糊状物、固体或其他明显缺乏流动特性的相。“弹性材料”一般在施加于它的力(诸如压缩或伸展)被撤回后，恢复到特定的形状或构象。“弹性材料”也被称为弹性可压缩和可伸缩、机械耐用或相对低滞后的柔韧材料。这种材料可以被称为可拉伸的、拉伸的、有弹性的或能够反冲的。

[0078] 应理解，“原弹性蛋白”一般意指包括与原弹性蛋白的亲水性结构域相同或相似的序列或由该序列组成的肽。亲水性结构域具有通常富含赖氨酸和丙氨酸残基的序列。这些结构域经常由被2或3个丙氨酸残基分隔的赖氨酸的链段诸如AAAKAAKM(SEQ ID NO:1)组成。其他亲水性结构域不包含聚丙氨酸束，而是替代地在脯氨酸附近具有赖氨酸。相比之下，原弹性蛋白疏水性结构域富含非极性氨基酸，特别是甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸和丙氨酸，并且经常以3至6个肽的重复诸如GVGVP(SEQ ID NO:2)、GGVP(SEQ ID NO:3)和GVGVAP(SEQ ID NO:4)出现。

[0079] 可与现有AAM一起使用的原弹性蛋白的实例是由亲水性结构域或其同源物组成的那些，以及包含亲水性结构域或同源物和部分或全部疏水性结构域的那些。以下列举了一些实例：

[0080] GGVPGAIPGGVPGGVFYP,(SEQ ID NO:5)

[0081] GVGLPGVYP,(SEQ ID NO:6)

[0082] GVPLGYP,(SEQ ID NO:7)

[0083] PYTTGKLPYGYGP,(SEQ ID NO:8)

[0084] GGVAGAAGKAGYP,(SEQ ID NO:9)

[0085] TYGVGAGGFP;(SEQ ID NO:10)

[0086] KPLKP,(SEQ ID NO:11)

[0087] ADAAAAYKAAKA,(SEQ ID NO:12)

[0088] GAGVKPGKV,(SEQ ID NO:13)

[0089] GAGVKPGKV,(SEQ ID NO:14)

[0090] TGAGVKPKA,(SEQ ID NO:15)

[0091] QIKAPKL,(SEQ ID NO:16)

[0092] AAAAAAAKAAAK,(SEQ ID NO:17)

[0093] AAAAAAAAAAKAAKYGAAAGLV,(SEQ ID NO:18)

[0094] EAAAKAAAKAAKYGAR,(SEQ ID NO:19)

[0095] EAQAAAAAKAAKYGVGT,(SEQ ID NO:20)

[0096] AAAAAKAAAKAAQFGLV,(SEQ ID NO:21)

[0097] GGVAAAAKSAAKVAAKAQLRAAAGLGAGI,(SEQ ID NO:22)

[0098] GALAAAKAAKYGAAV,(SEQ ID NO:23)

[0099] AAAAAAAKAAAKAA,(SEQ ID NO:24)

[0100] AAAAKAAKYGAA,(SEQ ID NO:25)

[0101] CLGKACGRKRK(SEQ ID NO:26)。

[0102] “原弹性蛋白”可以具有与GenBank条目AAC98394中示出的条目相同的序列。包含亲水性结构域的其它原弹性蛋白序列是本领域中已知的,包括但不限于:CAA33627(智人(Homo sapiens))、P15502(智人)、AM42271(褐家鼠(Rattus norvegicus))、AAA42272(褐家鼠)、AAA42268(褐家鼠)、AAA42269(褐家鼠)、AAA80155(小家鼠(Mus musculus))、AAA49082(原鸡(Gallus gallus))、P04985(牛(Bos taurus))、ABF82224(斑马鱼(Danio rerio))、ABF82222(热带爪蟾(Xenopus tropicalis))、P11547(绵羊(Ovis aries))。

[0103] “原弹性蛋白”也可以是这些序列的片段,前提是该片段包含以上讨论的亲水性结构域的至少一部分。一个实例是AAC98394的氨基酸27至724。本公开中使用的原弹性蛋白可以包括人类原弹性蛋白或人类原弹性蛋白的选择的结构域。

[0104] 原弹性蛋白还可以包括具有诸如以上描述的序列的肽(特别是AAC98394)的同源物,或者是具有诸如以上描述的序列的肽的同源物,或者是具有诸如以上描述的序列的肽的同源物的片段。在本文中,“同源物”是指具有与参考序列不相同但相似的序列的蛋白质。它还具有与参考序列相同的功能,例如,当操纵同源物的溶液以调节碱度、温度或盐浓度时形成弹性材料的能力,如本文讨论的。

[0105] 在某些实施方案中,同源物与诸如以上描述的肽(特别是AAC98394)或诸如以上描述的肽的包含至少一部分亲水性结构域的片段具有至少60%的同源性。

[0106] 可以理解,“原弹性蛋白”可以是天然的或重组的。

[0107] 存在温度、碱度和盐浓度条件的子集,在这些条件下,可以制备原弹性蛋白的溶液以形成弹性材料。在一种实施方案中,提供了一种从原弹性蛋白产生弹性材料的工艺,包括加热具有碱性pH的原弹性蛋白溶液,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0108] 在其他实施方案中,提供了一种由原弹性蛋白产生弹性材料的工艺,包括向具有

约37℃温度的原弹性蛋白的溶液提供碱性pH,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0109] 在其他实施方案中,提供了一种由原弹性蛋白产生弹性材料的工艺,包括向原弹性蛋白溶液提供碱性pH,并允许溶液的温度增加到约37℃,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0110] 在其他实施方案中,提供了一种由原弹性蛋白产生弹性材料的工艺,包括将原弹性蛋白添加到具有碱性pH且温度为约37℃的溶液中,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0111] 在其他实施方案中,提供了一种由原弹性蛋白产生弹性材料的工艺,包括将原弹性蛋白添加到具有碱性pH的溶液中,并允许溶液的温度增加到约37℃,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0112] 在其他实施方案中,提供了一种由原弹性蛋白产生弹性材料的工艺,包括调节具有碱性pH和约37℃的温度的原弹性蛋白溶液的盐浓度,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0113] 一般而言,具有大于约1.5mg/mL的原弹性蛋白浓度的溶液能够形成期望的完整性的弹性材料,尽管较低的浓度也是有用的。在大多数应用中,溶液浓度小于约300mg/mL。因此,具有约1.5mg/mL至约300mg/mL的浓度的原弹性蛋白溶液是优选的。更优选地,使用具有约10mg/mL至约300mg/mL之间的浓度的原弹性蛋白溶液。最优选地,使用具有约10mg/mL至约200mg/mL之间的浓度的原弹性蛋白溶液。

[0114] 已经确定,约pH7.5或更高的pH足够导致从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。pH值一般保持不超过约pH13,因为在此之上,弹性材料形成得较差。更优选地,在约pH9和pH13之间的pH是期望的。然而,最优选地,使用在约pH10和pH11之间的pH。可以使用的其他pH测量值包括8.0、8.5、9.5、10、10.5和11.5。

[0115] 碱度可以通过许多方法来调节,包括:1)直接向原弹性蛋白溶液中添加增加pH的物质,2)通过将包含足够量的增加pH的物质以使其呈碱性的溶液与原弹性蛋白溶液混合。增加pH的物质可以是碱、缓冲液、质子吸附材料。已发现包括Tris碱、NH_4OH和NaOH的实例可以用作增加或控制pH的物质。

[0116] 在pH为碱性且小于约9.5的情况下,可能需要盐来形成用于形成本发明的海绵的弹性原弹性蛋白材料。在使用盐的情况下,浓度一般大于25mM,并且可以高达200mM。优选地,盐浓度在约100mM和150mM之间。更优选地,盐浓度为约150mM。特别地,发明人已经发现,随着pH降低(但仍保持碱性)到pH 10以下时,需要盐来导致弹性材料的形成,并且所需的盐量随着pH降低而增加。因此,例如,在约pH9至10,盐是需要的,例如,应该向溶液提供等同于约60mM的盐浓度。在一些实施方案中,溶液应具有等同于哺乳动物等渗盐水的渗透压(150mM)或更小的渗透压。在其他实施方案中,溶液应具有大于150mM的渗透压。盐浓度也可以是0mM。

[0117] 溶液的盐浓度可以通过添加盐来控制,盐包括任何离子化合物、单价或二价离子或能够影响溶液渗透压的低分子量物类。例如,可以使用NaCl、KCl、MgSO4、Na2CO3或葡萄糖。优选的盐是NaCl。

[0118] 从原弹性蛋白的溶液形成弹性材料的方法可以包括:

[0119] (1)提供原弹性蛋白的溶液;

[0120] (2)调节溶液的pH以形成具有碱性pH的溶液,以导致溶液中的原弹性蛋白沉淀;

[0121] (3)去除沉淀;

[0122] (4)将去除的沉淀添加到具有基本上非碱性pH和/或基本上较低温度的溶液中,导致沉淀分散到溶液中;和

[0123] (5)允许溶液的温度增加到约37℃,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0124] 在一种实施方案中,溶液的温度优选在步骤(2)在约4℃至约37℃之间,而在步骤(4)小于约4℃。此外,在一种实施方案中,溶液的pH优选在步骤(2)为至少约pH9,并且在步骤(4)小于约pH9。在步骤(4),pH可低至约pH7.5。此外,在一种实施方案中,溶液的盐浓度优选在约0mM和200mM之间。

[0125] 在其它实施方案中,用于从原弹性蛋白产生弹性材料的工艺包括加热具有小于10的碱性pH和150mM或更低的盐浓度的原弹性蛋白溶液,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。这些实施方案对于体内应用是特别优选的,因为原弹性蛋白的溶液和弹性材料的pH更接近哺乳动物的pH。

[0126] 在另外的实施方案中,用于从原弹性蛋白产生弹性材料的工艺包括调节具有碱性pH的原弹性蛋白溶液的盐浓度,并允许该溶液的温度增加到约37℃,以从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。

[0127] 已经确定,优选37℃左右的温度以导致从溶液中的原弹性蛋白形成弹性材料。然而,在某些实施方案中,可以使用小于37℃的温度。温度一般大于4℃。温度一般小于42℃。

[0128] 可以通过在哺乳动物组织中或在组织上提供溶液并允许热从组织传递以增加溶液的温度,或者通过照射组织来加热溶液。

[0129] 可选地,可以通过将溶液与无生命表面接触并加热该表面来加热该溶液。无生命表面可以提供在具有预定的形状或构象的模具或铸件上,用于提供通过所述方法形成的弹性材料。

[0130] 在提供溶液加热以触发弹性材料形成的情况下(例如,在已经提供适当的pH和/或盐条件的情况下),溶液一般储存在低于30℃,优选地约4℃的温度,直到需要它来形成在形成本发明海绵的方法中使用的弹性材料。

[0131] 在某些实施方案中,通过以上描述的工艺从原弹性蛋白溶液形成的弹性材料可以与能够交联原弹性蛋白残基(例如赖氨酸残基)侧链的剂交联。在以下描述的某些应用中,当弹性材料已经形成时交联侧链是有用的,因为这为弹性材料提供了另外的特性。具体地说,与不存在交联物的情况下形成的弹性材料相比,使用交联物诸如戊二醛给出了更硬、更致密、更坚韧并且因此在体内可能更生物稳定的弹性材料。对于要求更高的组织修复应用或当与周围自然组织的顺应性是非必需时,交联材料可能是相对于非交联弹性材料更优选的。

[0132] 设想可以使用任何可用于形成弹性蛋白的交联剂,无论是天然的还是人工交联剂。实例包括赖氨酰氧化酶、转谷氨酰胺酶、碳二亚胺(例如1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、戊二醛、京尼平和胺反应性交联物,诸如双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)。在一种实施方案中,交联剂是戊二醛,并以约0.001w/v%溶液至约0.5w/v%溶液的浓度使用或交联剂是1mM至100mM的BS3。

[0133] 在一些情况下,原弹性蛋白(本文有时称为TE)可以通过加热来交联,例如,加热到

120℃-180℃持续10-24小时可以允许合适的交联。

[0134] 实施例:交联对脂肪生成的作用

[0135] 3D无细胞脂肪基质(AAM)海绵减少血清肿、血肿和疤痕形成,以及促进脂肪生成。海绵的机械特性必须能够正确承受体内的压缩力。为了改善3D AAM海绵的机械强度和复原力,通过化学交联(例如,1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺;EDC)改变海绵。然而,在生物学应答和通过交联实现的机械强度之间经常存在折衷。因此,使用皮下裸大鼠模型评估对交联海绵的生物学应答。

[0136] 制备猪无细胞脂肪基质(pAAM)浆,冷冻干燥,并用DHT在80℃交联24小时。一些样品还在0.016%或0.125%的EDC中交联。N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)也以5:3的EDC:NHS比例添加。然后用电子束对海绵进行最终消毒。用10mm活检穿孔器切割厚度为大约5mm的海绵,并且然后将其皮下植入裸大鼠(n=5)。4周时,将外植体切割成两半,一半在10%福尔马林中固定用于马松三色染色,并且另一半在蔗糖中固定。

[0137] 到4周,未交联的海绵表现出细胞向内生长、血管化和脂肪生成(图5A和图5B)。相比之下,0.125% EDC交联的海绵在油红O染色中没有表现出任何脂肪细胞(图5E和图5F)。具有中等交联量(0.016%)的海绵示出了介于0.125%和未交联海绵中发现的水平中间的脂肪细胞水平(图5C和图5D)。然而,三色染色揭示所有海绵类型的广泛的细胞向内生长和血管化(图5A、图5C、图5E和图5G)。这表明,脂肪生成可能仅仅被EDC交联延迟,而不是完全阻止。

[0138] 总的来说,随着EDC交联增加,脂肪生成也随之减少,如通过三色染色和油红O染色证明的。无论交联条件如何,所有三种海绵类型都促进了细胞的向内生长和血管化。

[0139] 实施例:加工对机械特性的作用

[0140] AAM海绵一般应具有机械特性,以正确承受身体内的压缩力。为了改善3D AAM海绵的机械强度和复原力,通过(1)改变AAM固体含量,或(2)化学交联(例如,1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺;EDC)改变海绵。

[0141] 在20% PBS中制备了具有3%或4%固体含量的AAM浆。然后将浆冷冻干燥以形成海绵,然后用DHT在80℃交联24小时。海绵由具有3%或4%固体含量的浆形成,并且如果用EDC交联,则在MES缓冲液中的0.03%或0.1%的EDC中在室温孵育4小时。N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)也以5:3的EDC:NHS比例添加到缓冲液中。交联后,用PBS洗涤海绵两次。样品固体含量和EDC量如下:

[0142]

样品#	样品名称
1	3%AAM
2	4%AAM
3	3%AAM 0.03%EDC
4	4%AAM 0.03%EDC
5	3%AAM 0.1%EDC
6	4%AAM 0.1%EDC

[0143] 对用PBS水化的海绵进行压缩测试,以评估50%应变的压缩强度、压缩后的形状恢复百分比和模量。这里,模量定义为力-位移曲线线性区域的斜率。使用以PBS水化并然后轻轻挤压以去除多余的液体的海绵条进行拉伸测试以评估弹性。

[0144] 随着EDC百分比的增加，抗压强度、弹性和模量总体呈线性趋势(图6A、图6C、图6D)。对于每种EDC交联条件，4% AAM海绵比其3%对应物强。

[0145] 通过这些参数，具有0.1% EDC的4% AAM海绵(样品6)表现出最高的强度。图6B示出了，0.03%和0.1% EDC交联条件二者平均而言都相似地使形状恢复相对于未交联的版本改善了7.2%。

[0146] 固体含量从3%增加到4%增加了海绵的机械强度。

[0147] EDC交联海绵进一步增加了机械强度，其中较高的EDC浓度(0.1%)比较低的EDC浓度(0.03%)产生更强的海绵。

[0148] 实施例:加工对脂肪生成及机械特性的作用

[0149] 在另一种海绵组合物中，PBS中的10mg/ml原弹性蛋白与10mM双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸(BS3)在37℃交联18小时以形成水凝胶。然后将原弹性蛋白水凝胶在PBS中洗涤，切割，并掺入AAM浆中至最终浓度为1%w/v(1%的浆具有3%的AAM含量)。可选地，将原弹性蛋白水凝胶冷冻干燥，切割，冷冻研磨(cryomill)以形成粉末并掺入AAM浆中至最终浓度为1%。然后将原弹性蛋白:AAM海绵冷冻干燥，并如以上描述的交联(DHT或EDC)。

[0150] 对用PBS水化的海绵进行压缩测试，以评估50%应变时的抗压强度、压缩后的形状恢复百分比和模量。还在体内测试了原弹性蛋白/AAM海绵的生物学应答。海绵最终通过15kGy-25kGy的电子束灭菌。用10mm活检穿孔器切割厚度为大约5mm的海绵，用盐水洗涤，并且然后将其皮下植入裸大鼠(n＝5)。在第8周和第16周，将外植体在10%福尔马林中固定以进行马松三色染色。

[0151] 随着EDC百分比的增加，抗压强度和模量总体呈线性趋势(图7A、图7C)。与AAM对照相比，添加原弹性蛋白水凝胶导致抗压强度增加大约2倍，并且原弹性蛋白粉末处于中等水平。通过这些参数，具有0.1% EDC的3% AAM海绵和原弹性蛋白水凝胶表现出最高的强度。图7B示出了0.03%和0.1% EDC交联条件二者平均而言都相似地使形状恢复相对于未交联版本改善了大约10%。

[0152] 对马松三色染色外植体的评估揭示了裸大鼠在第8周和第16周的两个时间点的广泛细胞再群体化(repopulation)和血管化的证据(图8A-图8D(8周)和图10A-图10D(16周))。与未交联的对照组相比，交联组的炎性细胞浸润在两个时间点都更高。与未交联的对照相比，0.03%的EDC交联显著降低了两个时间点的平均脂肪组织百分比(ANOVA;Tukey事后;$p<0.05$)。图9展示了与所有组相比，添加原弹性蛋白水凝胶后，第8周时脂肪组织的平均百分比显著增加(74±8.9;ANOVA;Tukey事后;$p<0.05$)。同样，与交联组相比，向0.03% EDC交联的AAM海绵添加原弹性蛋白显著增加了脂肪组织的平均百分比，但仍低于其未交联的对应物(ANOVA;Tukey事后;$p<0.05$)。

[0153] 到第16周时，所有组的脂肪组织的总百分比都增加了。然而，3%pAAM的交联组的脂肪细胞覆盖率仍低于10%，指示pAAM的脂肪生成潜力受在至少0.03%的EDC浓度进行交联的影响。当与其相应的未交联的3%pAAM样品相比，添加原弹性蛋白显著提高了第16周时的脂肪百分比(ANOVA;Tukey事后;$p<0.05$)(图11)。原弹性蛋白水凝胶在海绵中持续存在，并且有些保持了16周(图12A-图12B)。第16周时，具有原弹性蛋白的交联的pAAM与其他交联组无显著差异(ANOVA;Tukey事后;$p<0.05$)。

[0154] 原弹性蛋白水凝胶改善了AAM海绵的机械和生物学特性。原弹性蛋白粉末在改善

抗压强度和模量方面处于中等水平。EDC交联海绵改善了机械强度，较高的EDC浓度(0.1％)比较低的EDC浓度(0.03％)产生更强的海绵。0.03％的EDC交联显著降低了脂肪组织的向内生长。在未交联和0.03％EDC交联的3％ AAM海绵中，掺入TE水凝胶使第8周的外植体中脂肪组织的百分比分别显著增加了1.6倍和4倍($p<0.05$)。

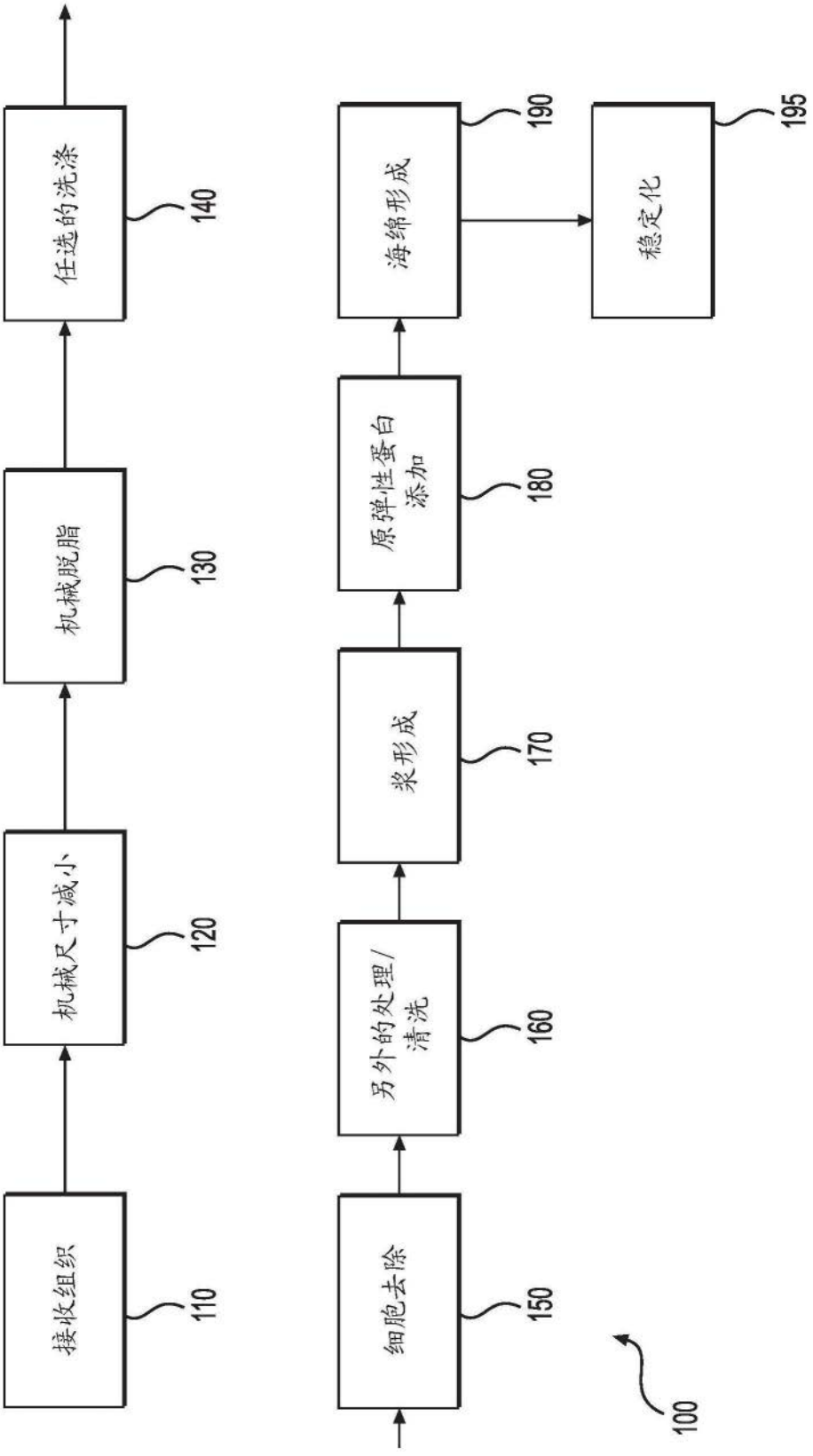

接收组织
110
机械尺寸减小
120
机械脱脂
130
任选的洗涤
140
细胞去除
150
另外的处理/清洗
160
浆形成
170
原弹性蛋白添加
180
海绵形成
190
稳定化
195
100

图1

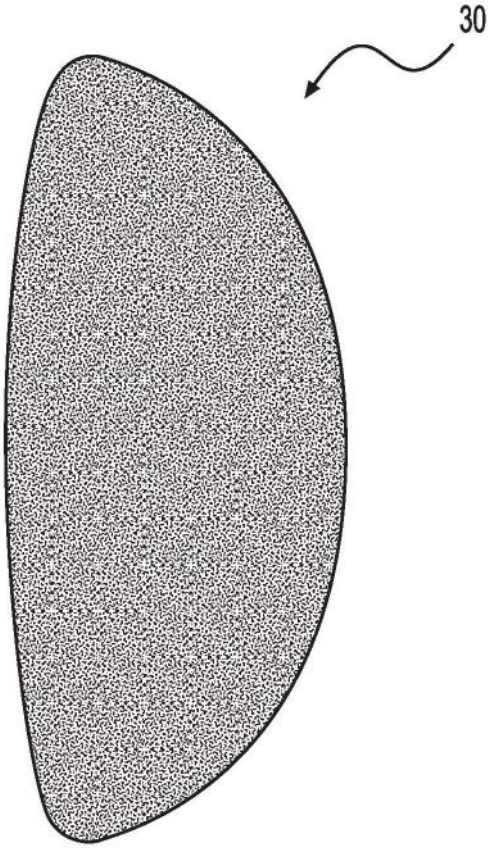


图2

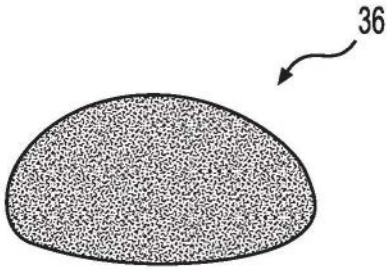


图3A

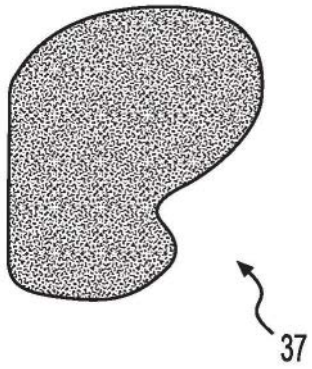


图3B

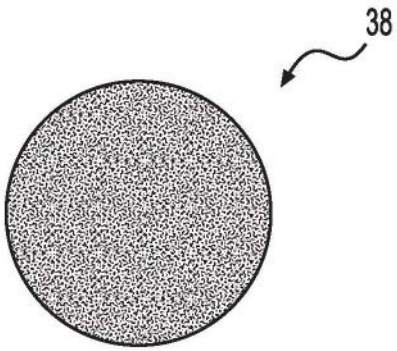


图3C

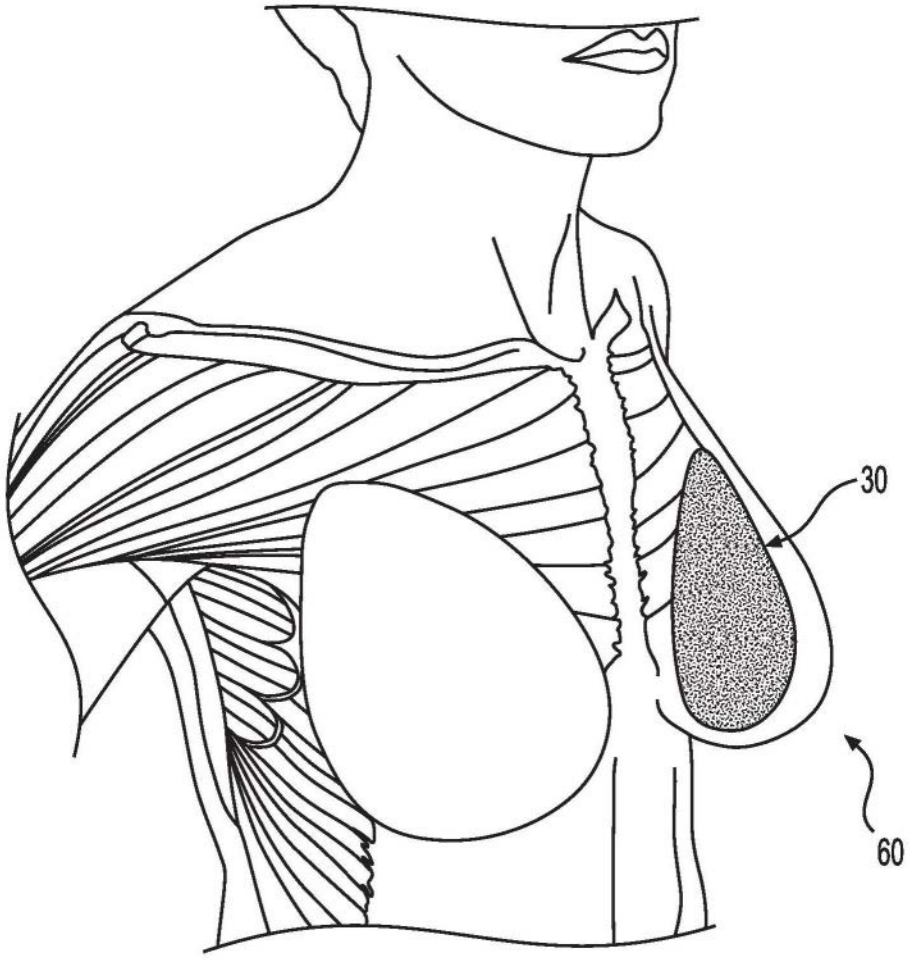


图4

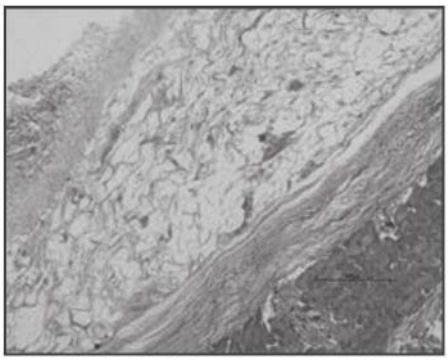


图5A

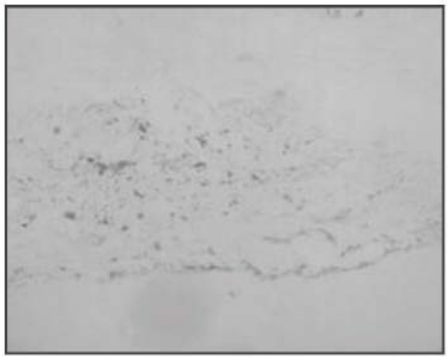


图5B

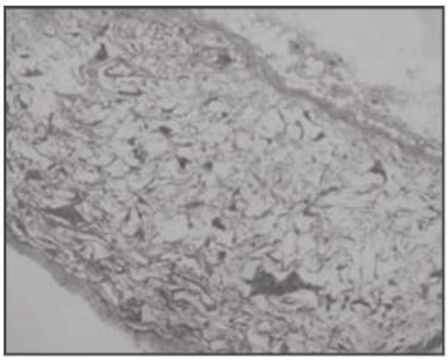


图5C



图5D

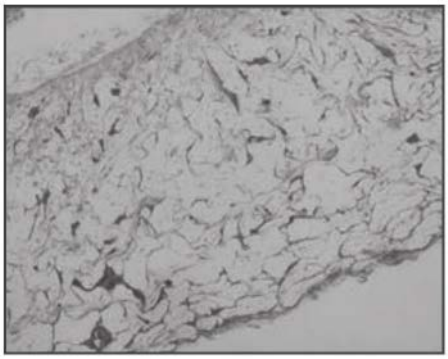


图5E



图5F

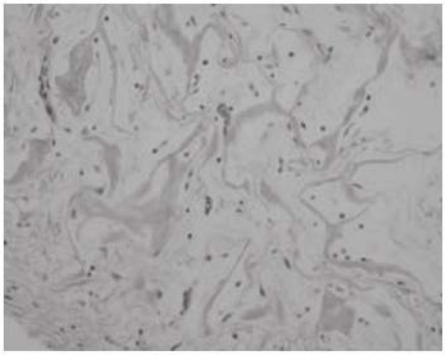


图5G

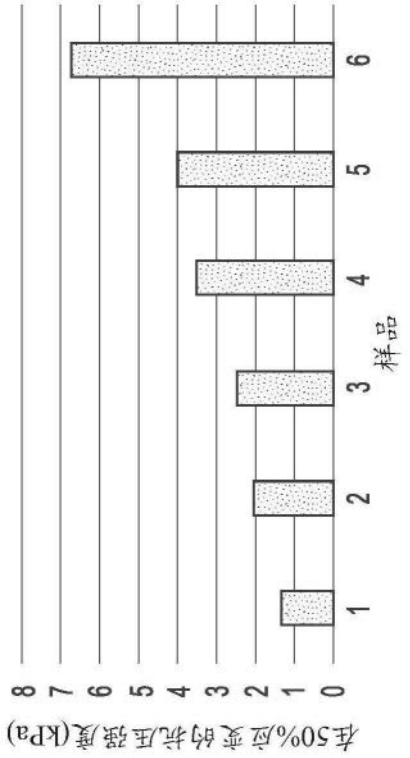

在50%应变的抗压强度(kPa)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
样品
1
2
3
4
5
6

图6A

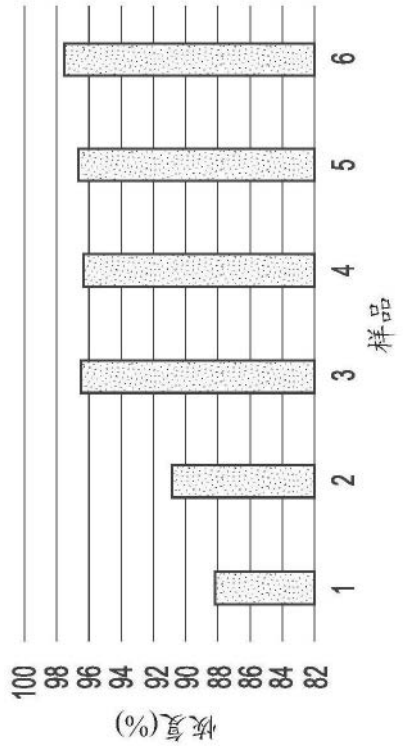

恢复(%)
82
84
86
88
90
92
94
96
98
100
样品
1
2
3
4
5
6

图6B

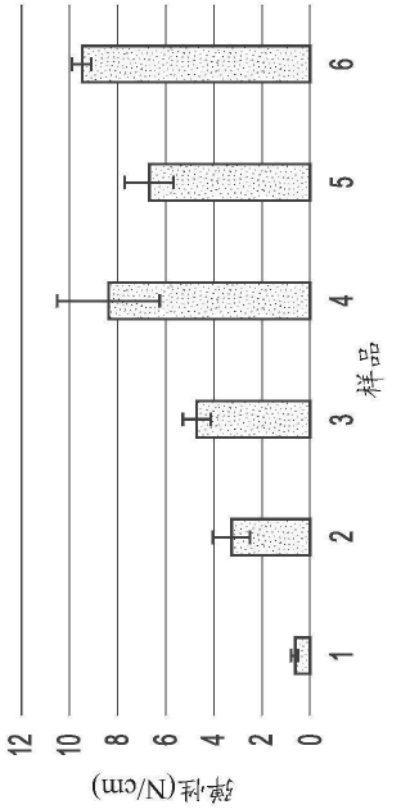


图6C

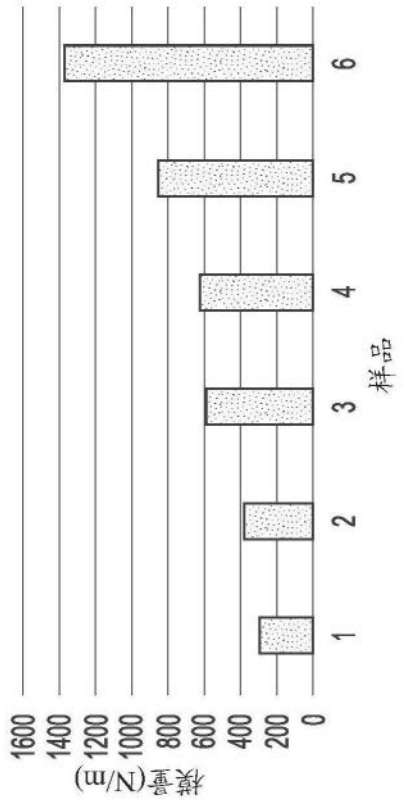

模量(N/m)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
样品
1
2
3
4
5
6

图6D

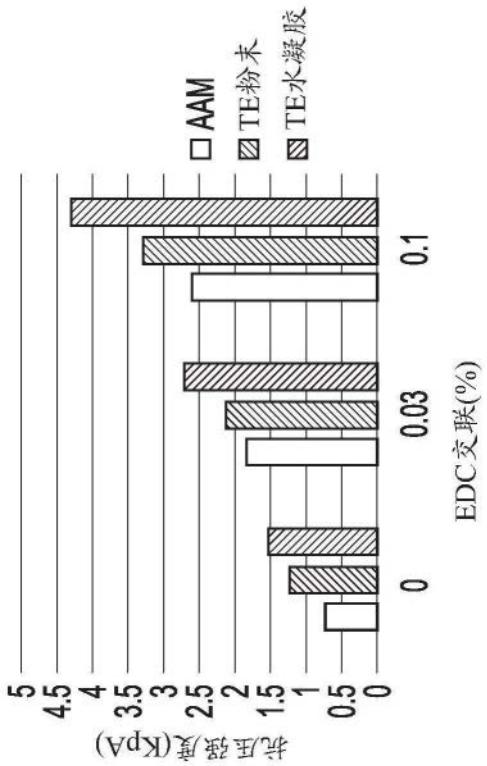

AAM
TE粉末
TE水凝胶
抗压强度(KPa)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
0.03
0.1
EDC交联(%)

图7A

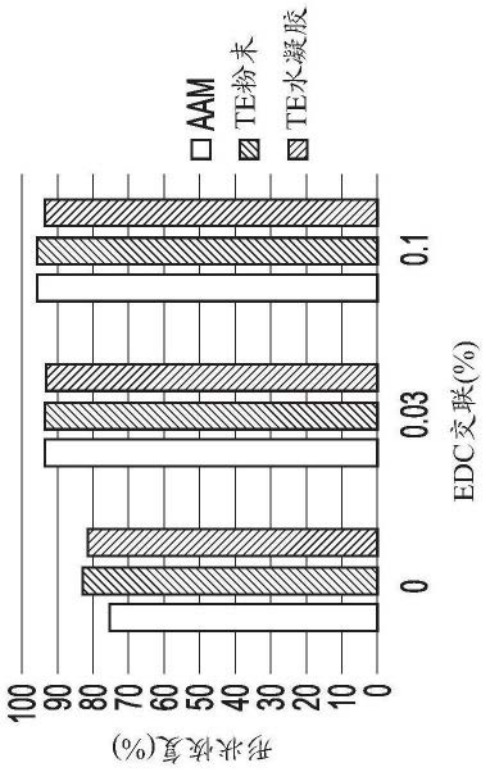

AAM
TE粉末
TE水凝胶
EDC交联(%)
0
0.03
0.1
形状恢复(%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

图7B

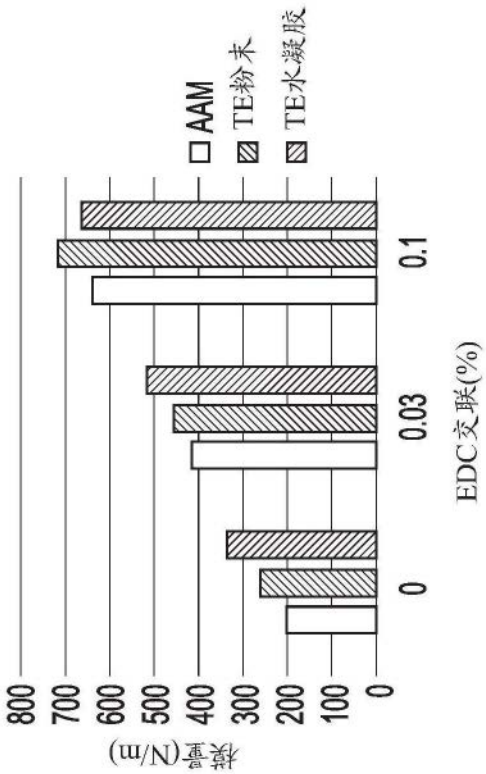

AAM
TE粉末
TE水凝胶
EDC交联(%)
0
0.03
0.1
模量(N/m)
0
100
200
300
400
500
600
700
800

图7C



图8A

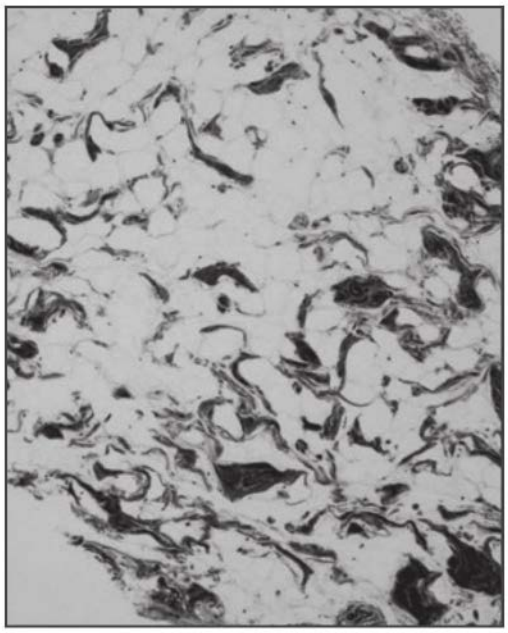


图8B



图8C



图8D

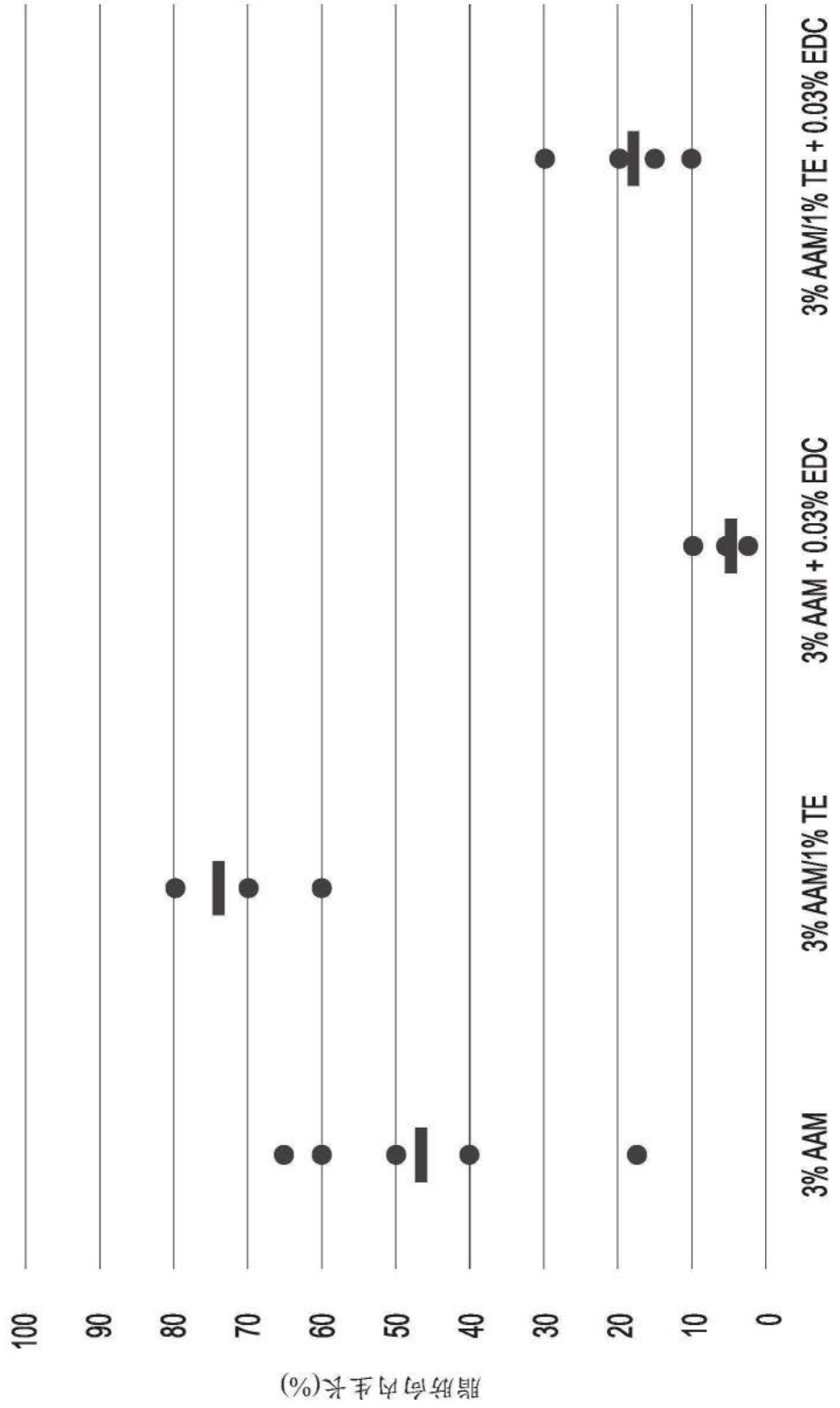

脂肪向内生长(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
3% AAM
3% AAM/1% TE
3% AAM + 0.03% EDC
3% AAM/1% TE + 0.03% EDC

图9

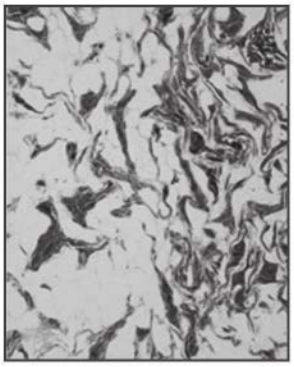


图10A



图10B

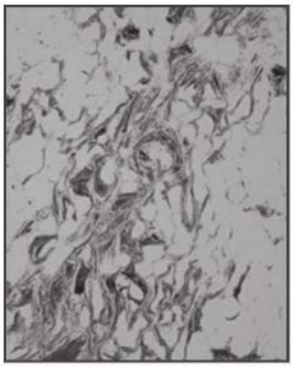


图10C



图10D

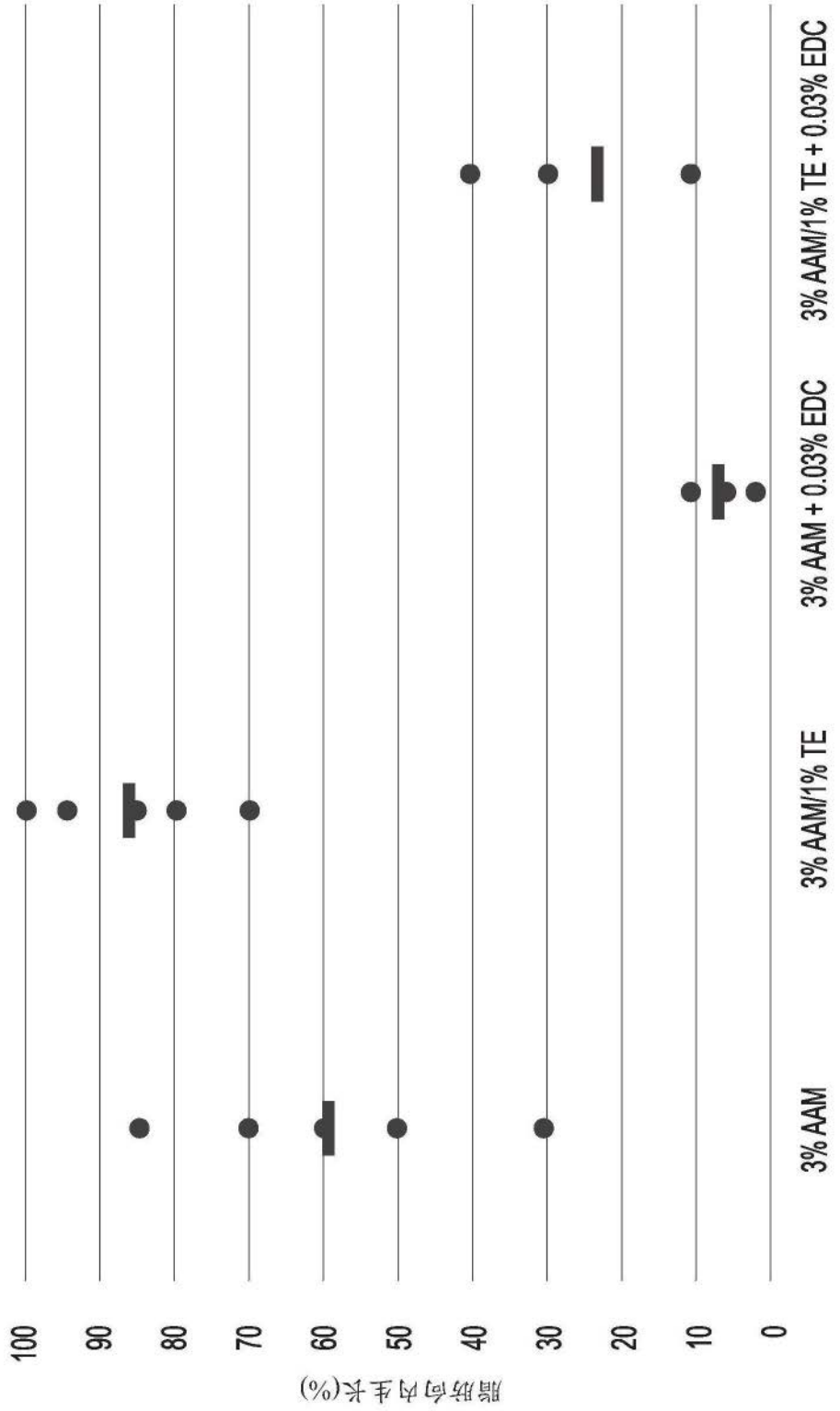

脂肪向内生长(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
3% AAM
3% AAM/1% TE
3% AAM + 0.03% EDC
3% AAM/1% TE + 0.03% EDC

图11

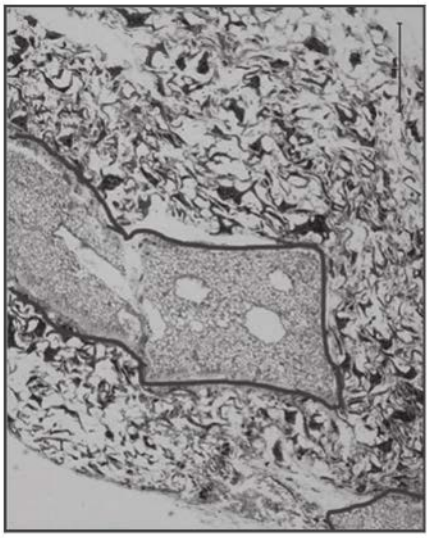


图12A

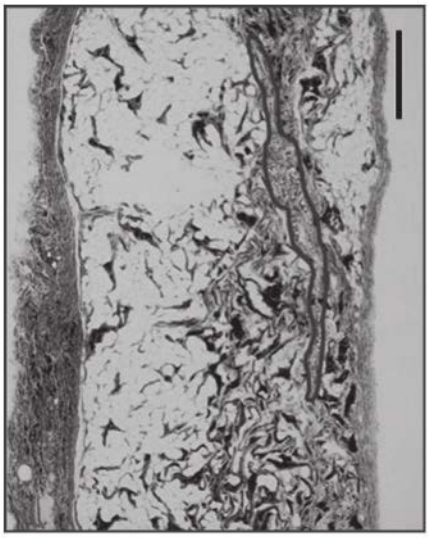


图12B