



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102892880 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201180013996. 4

(22) 申请日 2011. 01. 14

(30) 优先权数据

61/295073 2010. 01. 14 US

61/337938 2010. 02. 12 US

61/347725 2010. 05. 24 US

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 孔青 权陆军

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2006. 01)

A61L 27/36(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 09. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/021362 2011. 01. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02011/088365 EN 2011. 07. 21

(71) 申请人 奥加诺吉尼西斯公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 V. 荣法德 D. 巴克什 X. 王

M. Q. 王 L. 曹 P. 萨瓦

T. 博伦巴赫 E. 耶西拉兰

权利要求书 4 页 说明书 41 页 附图 23 页

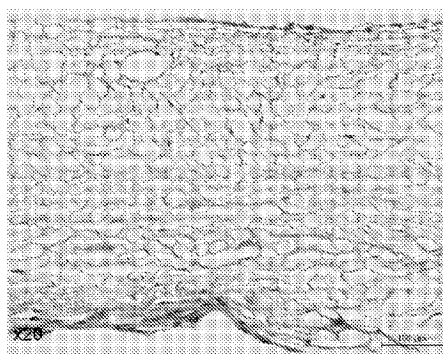
(54) 发明名称

生物工程化组织构建物及其制备和使用方法

(57) 摘要

在无需外源基质组分或网状支持体或支架组件的情况下自培养的细胞形成生物工程化构建物,诱导所述细胞以合成和分泌内源产生的胞外基质组分。本发明的生物工程化构建物可用多种细胞类型产生,所述细胞类型均可有助于产生所述胞外基质。另外地或备选地,所述多种细胞类型之一可经由内源产生的胞外基质组分递送至身体的某个部位,以达到各种治疗益处。

C



平均孔径: 约 20 μm

1. 一种生物工程化构建物,其包含在产生胞外基质层的条件下生长的间充质干细胞,所述胞外基质层通过所述间充质干细胞合成和装配。
2. 权利要求 1 的生物工程化构建物,其中所述间充质干细胞来源于骨髓、脐带、胎盘、羊膜、肌肉、脂肪、骨、腱或软骨。
3. 权利要求 1 或 2 的生物工程化构建物,其中所述间充质干细胞为脐带间充质干细胞。
4. 权利要求 3 的生物工程化构建物,其中所述脐带间充质干细胞分离自脐带血、脐静脉内皮下膜或脐带胶质。
5. 权利要求 3 的生物工程化构建物,其中所述脐带间充质干细胞为人脐带血管周细胞(HUCPVC)。
6. 权利要求 1-5 中任一项的生物工程化构建物,其中所述间充质干细胞为人间充质干细胞。
7. 权利要求 1-6 中任一项的生物工程化构建物,其中所述间充质干细胞为转染细胞、重组细胞或基因工程细胞。
8. 权利要求 1-7 中任一项的生物工程化构建物,其进一步包含并非间充质干细胞的细胞,任选其中所述非间充质干细胞为成纤维细胞。
9. 权利要求 8 的生物工程化构建物,其中所述成纤维细胞来源于选自以下的组织:新生男婴包皮、真皮、腱、肺、尿道、脐带、角膜基质、口腔黏膜和肠。
10. 权利要求 8 或 9 的生物工程化构建物,其中所述成纤维细胞为人成纤维细胞。
11. 权利要求 1-10 中任一项的生物工程化构建物,其中混合所述间充质干细胞和成纤维细胞。
12. 权利要求 1-10 中任一项的生物工程化构建物,其中所述间充质干细胞和成纤维细胞存在于至少两个独立层中。
13. 权利要求 1-12 中任一项的生物工程化构建物,其中所述胞外基质为至少 60 微米厚。
14. 权利要求 1-13 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物具有直径范围在 10 微米 -150 微米的孔,任选其中所述孔在 50 微米 -100 微米或 80 微米 -100 微米的范围。
15. 权利要求 1-14 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物具有至少 0.4 牛顿的平均 F_{max} 。
16. 权利要求 1-15 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物具有至少 0.4 兆帕的极限拉伸强度(UTS)。
17. 权利要求 1-16 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物具有至少为初始长度 0.4 倍的塑性变形公差。
18. 权利要求 1-17 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物的细胞为失活的。
19. 权利要求 1-18 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物为去细胞化的。
20. 权利要求 1-19 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物为脱

水的。

21. 权利要求 1-20 中任一项的生物工程化构建物,其中用交联剂将所述胞外基质交联。

22. 权利要求 21 的生物工程化构建物,其中所述交联剂选自:碳化二亚胺、京尼平、转谷氨酰胺酶、核糖和其他糖、去甲二氢愈创木酸(NDGA)、氧化剂和紫外(UV)线。

23. 权利要求 1-22 中任一项的生物工程化构建物,其中生物工程化构建物进一步包含以下中的一种或多种:乙酰透明质酸、CSF-3、玻连蛋白、肝素、NCAM1、CXCL1、IL-6、IL-8、VEGFA、VEGFC、PDGF β 、PECAM1、CDH5、ANGPT1、MMP2、TIMP1 和 TIMP3。

24. 权利要求 1-23 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物进一步包含抗微生物剂、药物、生长因子、细胞因子、肽或蛋白质。

25. 权利要求 1-24 中任一项的生物工程化构建物,其中通过从培养基底释放生物工程化构建物,使所述生物工程化构建物收缩至表面积至少减少 50%。

26. 权利要求 1-25 中任一项的生物工程化构建物,其进一步包含多孔丝心蛋白支架,在所述多孔丝心蛋白支架上培养在产生胞外基质层的条件下生长的间充质干细胞。

27. 权利要求 26 的生物工程化构建物,其中所述多孔丝心蛋白支架具有直径范围在 10 微米-150 微米的孔。

28. 权利要求 26 或 27 的生物工程化构建物,其中所述多孔丝心蛋白支架具有两个侧面并且至少一个侧面被硅酮包被。

29. 权利要求 26-28 中任一项的生物工程化构建物,其中所述多孔丝心蛋白支架进一步包含抗微生物剂、药物、生长因子、细胞因子、肽或蛋白质。

30. 权利要求 1-29 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物进一步包含粘附增强工具。

31. 权利要求 1-30 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物为最终灭菌的。

32. 一种多层生物工程化构建物,其中将至少两个权利要求 1-31 中任一项的生物工程化构建物结合在一起。

33. 权利要求 32 的多层生物工程化构建物,其中用交联剂将所述结合的生物工程化构建物交联。

34. 一种用于产生生物工程化构建物的方法,所述生物工程化构建物具有平均孔径增加的胞外基质,所述方法包括:

a) 在培养瓶内接种能够合成胞外基质组分的细胞;

b) 培养所述细胞以合成、分泌和组织胞外基质组分;

c) 至少冻干所得胞外基质组分,其中冻干包括冷冻所述胞外基质组分至最终冷冻温度并随后干燥所述胞外基质组分,从而产生生物工程化胞外基质构建物,其具有平均孔径增加的胞外基质。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述多孔胞外基质的平均孔径通过增加最终冷冻温度来增加。

36. 权利要求 34 或 35 的方法,其中随着最终冷冻温度从约 -40°C 增加到约 -10°C ,所述生物工程化构建物平均孔径从至少 10 微米增加到至少 50 微米。

37. 权利要求 34-36 中任一项的方法,其中所述胞外基质产生细胞来源于新生男婴包皮、真皮、腱、肺、脐带、软骨、尿道、角膜基质、口腔黏膜、肠、骨髓、胎盘、羊膜、肌肉、脂肪或骨。

38. 权利要求 34-37 中任一项的方法,其中所述胞外基质产生细胞为人真皮成纤维细胞或人脐带血管周细胞。

39. 权利要求 34-38 中任一项的方法,其中所述胞外基质产生细胞为转染细胞、重组细胞或基因工程细胞。

40. 权利要求 34-38 中任一项的方法,其中所述生物工程化构建物除包含所述胞外基质产生细胞类型之外还包含至少一种细胞类型。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述至少一种另外的细胞类型选自:成纤维细胞、基质细胞和间充质干细胞。

42. 权利要求 40 或 41 的方法,其中混合所述胞外基质产生细胞和至少一种另外的细胞类型。

43. 权利要求 40-42 中任一项的方法,其中所述胞外基质产生细胞和至少一种另外的细胞类型存在于至少两个独立层中。

44. 权利要求 34-43 中任一项的方法,其中所述各细胞类型的细胞以 1×10^5 个细胞/ cm^2 - 6.6×10^5 个细胞/ cm^2 的组合密度接种。

45. 权利要求 34-43 中任一项的方法,其中所述各细胞类型的细胞以大于 100% 汇合的组合密度接种。

46. 权利要求 34-45 中任一项的方法,其中所述胞外基质在冻干之前为至少 60 微米厚。

47. 权利要求 34-46 中任一项的方法,其中在冻干前使所述生物工程化构建物的细胞失活或去细胞化。

48. 权利要求 34-47 中任一项的方法,其中达到约 -40°C 的最终冷冻温度以产生至少 10 微米的平均孔径。

49. 权利要求 34-48 中任一项的方法,其中达到约 -10°C 的最终冷冻温度以产生至少 30 微米的平均孔径。

50. 权利要求 34-49 中任一项的方法,其中用交联剂将所述生物工程化构建物的胞外基质交联。

51. 权利要求 51 的方法,其中所述交联剂选自:碳化二亚胺、京尼平、转谷氨酰胺酶、核糖和其他糖、去甲二氢愈创木酸 (NDGA)、氧化剂、脱水加热 (DHT) 和紫外 (UV) 线。

52. 权利要求 34-51 中任一项的方法,其中在冻干前通过从培养基底释放生物工程化构建物,使所述生物工程化构建物收缩至表面积至少减少 50%。

53. 权利要求 34-52 中任一项的方法,其进一步包括在多孔丝心蛋白支架上培养所述胞外基质产生细胞。

54. 权利要求 53 的方法,其中所述多孔丝心蛋白支架具有直径范围在 10 微米-150 微米的孔。

55. 权利要求 53 或 54 的方法,其中所述多孔丝心蛋白支架具有两个侧面并且至少一侧面被硅酮包被。

56. 权利要求 53-55 中任一项的方法,其中所述多孔丝心蛋白支架进一步包含抗微生物剂、药物、生长因子、细胞因子、肽或蛋白质。

57. 权利要求 34-56 中任一项的方法,其中将至少两个生物工程化构建物结合在一起。

58. 权利要求 57 的方法,其中所述结合通过粘附增加工具进行或通过用交联剂交联来进行。

59. 权利要求 34-58 中任一项的方法,其中在冻干后将所述生物工程化构建物最终灭菌。

60. 权利要求 34-59 中任一项的方法,其中所述细胞在化学上确定的培养基中培养。

61. 权利要求 60 的方法,其中所述化学上确定的培养基不含不确定的动物器官或组织提取物。

62. 权利要求 60 或 61 的方法,其中所述化学上确定的培养基包含 TGF- α 。

63. 权利要求 34-62 中任一项的方法,其中所述细胞在多孔膜上培养。

64. 权利要求 63 的方法,其中所述多孔膜包含尺寸小于 6 微米的孔。

65. 权利要求 34-64 中任一项的方法,其中减小到达最终冷冻温度的速率以增加平均孔径的一致性。

66. 权利要求 65 的方法,其中到达最终冷冻温度的速率为 0.1°C -0.5°C / 分钟。

67. 一种生物工程化构建物,其包含:

胞外基质产生细胞;

通过所述胞外基质产生细胞产生的内源胞外基质;

其中所述胞外基质产生细胞为失活的。

68. 权利要求 67 的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物具有直径范围为 10 微米 -150 微米的孔,任选其中所述孔在 50 微米 -100 微米或 80 微米 -100 微米的范围。

69. 权利要求 67-68 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物通过在化学上确定的培养基中培养的细胞形成。

70. 权利要求 69 的生物工程化构建物,其中所述化学上确定的培养基包含 TGF- α 。

71. 权利要求 69-70 中任一项的生物工程化构建物,其中所述化学上确定的培养基进一步包含碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)。

72. 权利要求 67-71 中任一项的生物工程化构建物,其中用交联剂将所述生物工程化构建物的胞外基质交联。

73. 权利要求 72 的生物工程化构建物,其中所述交联剂选自:碳化二亚胺、京尼平、转谷氨酰胺酶、核糖和其他糖、去甲二氢愈创木酸 (NDGA)、氧化剂、脱水加热 (DHT) 和紫外线 (UV) 线。

74. 权利要求 67-73 中任一项的生物工程化构建物,其中所述生物工程化构建物呈粉状形式。

生物工程化组织构建物及其制备和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求保护 2010 年 5 月 24 日提交的美国临时申请号 61/347,725、2010 年 2 月 12 日提交的美国临时申请号 61/337,938 和 2010 年 1 月 14 日提交的美国临时申请号 61/295,073 的优先权的权益；各项申请的全部内容通过引用明确地结合到本文中。

[0002] 发明背景

骨、软骨、腱、韧带、肌肉、脂肪和髓基质为间充质组织（即分化自间充质干细胞的组织）的实例。

[0003] 间充质组织可能在外科手术期间受损，或者它们可因遗传病症或环境扰动而形成疾病。

[0004] 因此，需要用于修复患病或受损组织的新疗法。

[0005] 发明概述

本文特征在于包含以下形式胞外基质（ECM）的生物工程化构建物，所述形式针对特定治疗用途最优化。某些构建物由通过培养的间充质干细胞（MSC）产生的胞外基质组成。某些构建物亦包含产生所述基质的细胞。在某些构建物中，已使细胞失活。在其他构建物中，已去除产生所述胞外基质的细胞，以产生去细胞化（decellularized）构建物。

[0006] 某些构建物具有至少约 30 μm 的厚度。某些构建物包含平均直径在 10–100 μm 范围内的孔。某些构建物具有至少 0.4 牛顿的平均 F_{max} 。某些构建物具有至少 0.4 兆帕的极限拉伸强度（UTS）。某些构建物具有至少为初始长度 0.4 倍的塑性变形公差（plastic deformation tolerance）。

[0007] 构建物中的 ECM 可进一步加工（例如脱水、交联、收缩、微粉化、灭菌等）或与其他生物活性物质或支持材料（例如蚕丝、粘合剂等）进一步组合，以制备治疗产品。

[0008] 另外特征在于制备和修饰所述生物工程化构建物的方法，包括控制构建物厚度、孔径和组成的方法。

[0009] 可将本文所述生物工程化构建物给予受试者以增强软组织的活力、生长和 / 或修复，包括用于慢性或急性伤口的治疗。

[0010] 其他特点和优点可根据以下详述和权利要求而变为显而易见的。

[0011] 附图简述

图 1A–1B 显示在第 5–12 天（图 1A）或第 12–18 天（图 1B）通过 MSC 的胞外基质形成速率的时程分析。 $n=9$ （3 个独立构建物 / 组，3 次测定 / 构建物）。显示了趋势线和斜率方程。

[0012] 图 2 显示渐增的生物工程化构建物厚度与增加的 TGF- α 浓度之间的函数关系。无 TGF- α ：0 ng/mL；1.5x：30 ng/mL TGF- α ；5x：100 ng/mL TGF- α ；和 10x：200 ng/mL TGF- α 。 $n=9$ （3 个独立构建物 / 组，3 次测定 / 构建物），除了在 1.5x 和 10x 中， $n=6$ （2 个独立构建物 / 组，3 次测定 / 构建物）。

[0013] 图 3 显示渐减的生物工程化构建物厚度与增加的前列腺素 2（PGE₂）浓度（具有 20 ng/mL 恒定量的 TGF- α ）之间的函数关系。无 PGE₂：0 ng/mL；5x：19 ng/mL PGE₂；10x：

38 ng/mL PGE₂; 和 50x: 190 ng/mL PGE₂。n=9 (3 个独立构建物 / 组, 3 次测定 / 构建物)。

[0014] 图 4 显示渐增的生物工程化构建物厚度与增加的 TGF- α 浓度和跨越生物工程化构建物的细胞接种密度之间的函数关系, 所述生物工程化构建物来源于不同细胞类型 MSC (HDF: 新生人真皮成纤维细胞; HUCPVC: 人脐带血管周细胞; BM-MSC: 骨髓衍生的间充质干细胞; 以及 Pre-Adipo: 前脂肪细胞)。使用实施例 1 所述化学上确定的细胞培养基 (例如 200 ng/mL TGF- α) 且接种密度为 30×10^6 个细胞 / 75 mm 插入物, 其等同于 9.6×10^6 个细胞 / 24 mm 插入物。基质厚度测定值收集自培养 18 天后固定的苏木精和伊红染色切片。条 (平均值 $\pm$ S. D, n=12) 代表在 4 个独立位置处成像的 n=3 的独立构建物的平均厚度。

[0015] 图 5A-5B 显示生物工程化构建物的代表性苏木精和伊红染色切片、Masson's Trichrome/Goldner (MTG) 染色切片和 SEM 切片, 所述生物工程化构建物来源于培养 18 天后不同细胞类型的 MSC (HDF: 新生人真皮成纤维细胞; HUCPVC: 人脐带血管周细胞; BM-MSC: 骨髓衍生的间充质干细胞; 以及 Pre-Adipo: 前脂肪细胞)。使用实施例 1 所述化学上确定的细胞培养基 (例如 200 ng/mL TGF- α) 且接种密度为 30×10^6 个细胞 / 75 mm 插入物, 其等同于 9.6×10^6 个细胞 / 24 mm 插入物。在 20x 放大率下获取图片。

[0016] 图 6A-6C 显示生物工程化构建物的代表性 F_{max}、极限拉伸强度 (UTS) 和弹性模量性质, 所述生物工程化构建物来源于培养 18 天后不同细胞类型的 MSC (HDF-02: 新生人真皮成纤维细胞; HUC-02: 人脐带血管周细胞; MSC-02: 骨髓衍生的间充质干细胞; 以及 PAD-02: 前脂肪细胞)。使用实施例 1 所述化学上确定的细胞培养基 (例如 200 ng/mL TGF- α) 且接种密度为 30×10^6 个细胞 / 75 mm 插入物, 其等同于 9.6×10^6 个细胞 / 24 mm 插入物。条 (平均值 $\pm$ S. D, n=9) 代表各自测试 3 次的 3 个独立构建物的平均 F_{max}、UTS、弹性模量。

[0017] 图 7A-7B 显示 HUCPVC 衍生的生物工程化构建物和 HDF 衍生的生物工程化构建物之间在胞外基质组分和粘附组分 (图 7A; HUCPVC 衍生的生物工程化构建物中 17 个基因增量调节至 HDF 衍生的生物工程化构建物的 > 2 倍) 以及生长因子 (图 7B; HUCPVC 衍生的生物工程化构建物中 8 个基因增量调节至 HDF 衍生的生物工程化构建物的 > 2 倍) 方面的差别概述。

[0018] 图 8A-8D 显示由不同 MSC 衍生的生物工程化构建物和 HDF 衍生的生物工程化构建物产生的条件培养基内 IL-6、IL-8 和 VEGF 水平的时程比较结果, 其从 CBA 分析得到。从 n=3 个条件培养基样品的平均数计算平均值和标准差。亦显示了从 ELISA 分析得到的 HA 水平的定量。

[0019] 图 9 显示细胞迁移测定的结果。间接 2D 迁移测定比较作为收集自不同实施方案的条件培养基的函数的闭合指数。对在条件培养基中培养的角质形成细胞进行测定, 所述条件培养基在第 5 天和第 18 天从 HDF-02 和 HUCPVC VCT-02 单元收集。图片由在条件培养基中诱导 24 小时后用酸性品红 (Acid Fuchsin) 染料染色的角质形成细胞的代表性明视野图像以及闭合指数值的图示组成, 所述闭合指数值表示在第 5 天的 HUCPVC VCT-02 条件培养基样品中的最大闭合度。

[0020] 图 10A-10C 显示对 MSC 衍生 (HUC-02) 和 HDF 衍生 (HDF-02) 的生物工程化构建物以及自其分离的细胞进行的多谱系潜能测定的结果。图 10A 采用一组成骨基因显示来自生物工程化构建物内的细胞的基因表达数据, 用成骨诱导培养基对所述细胞进行诱导。图 10B

采用一组成骨基因显示来自分离自生物工程化构建物的细胞的基因表达数据,用成骨诱导培养基对所述细胞进行诱导。图 10C 显示来自生物工程化构建物内的细胞的油红 O 染色结果,所述细胞用脂肪形成诱导培养基进行诱导。

[0021] 图 11A-11E 显示来自皮下植入裸小鼠中 1 周后的 100% MSC 衍生的生物工程化构建物(图 11A)、50% HUCPVC-50% HDF 衍生的生物工程化构建物(图 11B)、10% HUCPVC-90% HDF 衍生的生物工程化构建物(图 11C)和 100% HDF 衍生的生物工程化构建物(图 11D)的 α -平滑肌肌动蛋白(α SMA)染色的代表性组织切片和定量。暗区表示 α SMA 正染色。图 11E 显示如通过 α SMA 正染色确定的植入区内的血管定量。使用总共 2 只动物/组($n=2$)用于分析。 α SMA 阳性血管的数量利用显微镜的 40x 物镜手动计数。然后将阳性血管的数量对植入面积标准化。

[0022] 图 12 显示在培养后立即进行福尔马林固定的生物工程化构建物的独立组织学图像。

[0023] 图 13 显示在福尔马林固定之前允许经受受控收缩的生物工程化构建物的独立组织学图像。

[0024] 图 14A-14G 显示控制生物工程化构建物胞外基质内的孔径的结果。图 14A 显示根据不同平均孔径性质的生物工程化构建物的不同用途。图 14B 显示来自经受控收缩、以 0.1°C/分钟的速率在 -40°C 的最终冷冻温度下冻干以及不交联、与 EDC 交联或采用 DHT 方法交联的生物工程化构建物的平均孔径和标准差的定量分析。图 14C 显示在图 14C 中定量的代表性组织切片。图 14D 显示以 0.5°C/分钟的速率跳动到 -10°C 的最终冷冻温度的生物工程化构建物的代表性组织切片。图 14E 显示经受控收缩和任选风干(上图)或在 -40°C 的最终冷冻温度下冻干(下图)的生物工程化构建物的代表性组织切片。图 14F 显示天然有孔的 MSC 衍生的生物工程化构建物,而图 14G 显示可通过冻干来增加该平均孔径。

[0025] 图 15A-15E 显示由于用 bFGF 补充化学上确定的培养基而对生物工程化构建物的生物物理学性质造成的影响。图 15A 显示 bFGF 补充减少生物工程化构建物厚度。图 15B 显示 bFGF 剂量响应分析的结果,其中胶原亚型蓄积随 bFGF 补充增加而减少。图 15C 显示酸溶性胶原和胃蛋白酶可溶胶原两者相对于总胶原的相对水平(黑色)和其他胶原的相对水平(灰色)。相对于对照,硫酸化糖胺聚糖(sGAG;图 15D)和透明质酸(HA;图 15D)在补充 bFGF 的生物工程化构建物中蓄积至更低水平。

[0026] 图 16 显示已通过多孔蚕丝支架迁移并均匀地排布在所述蚕丝支架各处的人真皮成纤维细胞。

[0027] 图 17A-17D 在体外显示带有失活的人真皮成纤维细胞及其相应胞外基质的多孔蚕丝支架上的染色人脐静脉内皮细胞。通过检测染色的 HUVEC 在蚕丝支架实施方案上的排列进行体外血管发生测定。将 HUVEC 在蚕丝支架上培养 11 天并获取荧光图像。HUVEC 排列在蚕丝支架(图 17A)或在基质培养基中预处理(pre-conditioned)的蚕丝支架(图 17B)上看不见,但在具有活的人真皮成纤维细胞(HDF)的蚕丝支架(图 17C)和具有失活 HDF 的蚕丝支架(图 17D)上却突出。

[0028] 发明详述

本文特征在于生物工程化构建物,其包含具有限定的厚度、孔径和组成的胞外基质(ECM)。已知 ECM 通过某些细胞分泌以及主要由纤维状蛋白质、多糖和其他少量成分组成。

其组分包括结构元件（例如胶原和弹性蛋白）、粘附蛋白（例如糖蛋白纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、血小板反应蛋白 I 和生腱蛋白）以及蛋白聚糖（例如饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、硫酸软骨素和硫酸肝素以及糖胺聚糖（GAG），例如透明质酸（HA））。

[0029] 不同的 ECM 可通过不同细胞产生。例如与成纤维细胞相比，已发现 MSC 产生多孔 ECM。另外，与血管形成有关的某些蛋白质（例如 VEGF α 、VEGFC、PDGF β 、PECAM1、CDH5、ANGPT1、MMP2、TIMP1、TIMP3）以及某些生长因子和粘附蛋白（例如乙酰透明质酸、肝素、IL-6、IL-8、玻连蛋白（VTN）、集落刺激因子 3（CSF-3）、NCAM1 和 CXCL1），似乎在由 MSC 产生的 ECM 中比在由成纤维细胞产生的 ECM 中以更大的量产生（参见例如，图 7）。

[0030] 由成纤维细胞产生的占优势的主要胞外基质组分为纤维状胶原，特别是 I 型胶原。然而，细胞亦产生其他纤维状和非纤维状胶原，包括 II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX 型胶原和其他胶原。

[0031] 这些 ECM 组分的分级网状系统提供了细胞可在其中生存和适当起作用的天然环境。细胞培养条件和培养后的方法，如本文所述，可应用于能够合成和分泌胞外基质的细胞类型，以产生具有确定的生物物理学性质的生物工程化构建物。

[0032] I. 控制生物工程化构建物厚度

可将 ECM 的厚度针对特定的体内用途最优化。例如，较厚的生物工程化构建物可用于身体中经历物理振荡的部位（例如膝）或用于需要所述构建物在体内长时期存留的任何应用。

[0033] ECM 的层积厚度 (bulk thickness) 赋予抵抗物理损伤（例如撕裂或破裂）的粘合组织样性质。适当的 ECM 应具有适用于试验或临床应用的厚度，所述厚度为至少约 30 μm 、40 μm 、50 μm 、60 μm 、70 μm 、80 μm 、90 μm 、100 μm 、110 μm 、120 μm 、130 μm 、140 μm 、150 μm 、160 μm 、170 μm 、180 μm 、190 μm 、200 μm 、220 μm 、240 μm 、260 μm 、280 μm 、300 μm 、320 μm 、340 μm 、360 μm 、380 μm 、400 μm 、450 μm 、500 μm 、550 μm 、600 μm 、650 μm 、700 μm 、750 μm 、800 μm 、850 μm 、900 μm 、950 μm 或更大的厚度，在所述试验或临床应用中这类厚度为有用的。

[0034] a. 间充质干细胞 (MSC) 衍生的生物工程化构建物

间充质干细胞 (MSC ;或者称为间充质祖细胞) 为能够在培养基中扩繁并分化成间充质组织细胞（包括骨、软骨、腱、韧带、肌肉、脂肪和髓基质）的细胞。在正常培养条件下，MSC 无效率地合成、分泌和 / 或组织胞外基质组分（即内源胞外基质产生）。然而，在本文另外描述的培养条件下，它们无需外源基质组分（即不是由培养的细胞产生，而是通过其他方式引入的基质组分）便可将自身包含在有效分泌的胞外基质之内。

[0035] MSC 可获自许多来源，包括但不限于骨髓、脐带、胎盘、羊膜和其他结缔组织（例如，肌肉、脂肪、骨、腱和软骨）。例如，脐带 MSC 可分离自脐带血、脐静脉内皮下膜和脐带胶质 (Wharton's Jelly)。MCS 可进一步分离自三个区：血管周区（脐带血管周细胞或 UCPVC）、血管间区、胎盘、羊膜和羊膜下 (subamion) (Troyer 和 Weiss, 2007)。或者，骨髓衍生的 MSC 可获自骨髓，包含非造血多能细胞、支持造血干细胞扩繁以及可分化成多种结缔组织。

[0036] 可使用人类细胞以及来自其他哺乳动物物种的细胞，包括但不限于马、犬、猪、牛、羊、绵羊或啮齿类动物（例如，小鼠或大鼠）。所述细胞可作为原代细胞来源于相关组织或者更优选自己建立的细胞贮库或细胞库连续传代或传代培养，所述细胞贮库或细胞库

已针对病毒和细菌污染进行筛选并测试纯度。此外,自发地、化学地或病毒地转染或重组的细胞或者基因工程细胞也可用于本发明。另外,所述细胞可为重组或基因工程改造的。例如,可将所述细胞工程改造为在连续时间内产生重组细胞产物(例如生长因子、激素、肽或蛋白质)并将其递送给受试者,或者在因存在于受试者中的条件所致而产生生物学、化学或热信号转导时根据需要产生重组细胞产物并将其递送给受试者。可工程改造长期或短期基因产物表达。当给受试者植入或施用培养的组织构建物以长时期向受试者递送治疗产物时,需要长期表达。相反,在一旦伤口愈合,所述部位便不再需要或可能不再需要来自培养组织构建物的基因产物的情况下,需要短期表达。也可将细胞基因工程改造成表达蛋白质或不同类型的胞外基质组分,其为“正常的”但是以高水平表达或者以某种方式修饰以制备包含胞外基质和活细胞的生物工程化复合物,所述复合物在治疗上有利于改善伤口愈合、促进或指导新血管形成,或者使瘢痕或瘢痕疙瘩形成最小化。

[0037] 为了有效地分泌胞外基质至所需厚度,可将 MSC 在不确定的培养基或化学上确定的培养基中培养许多天或许多周(例如 18、19、20、21、22、23、24、25 天或更多天)。可使用包含人衍生细胞但不含化学上不确定或非人生物组分或细胞的化学上确定的体系。根据众所周知的环境变量,将培养物维持在培养箱中以确保对细胞培养而言充足的环境条件(受控的温度、湿度和气体混合物)。例如,培养箱可为约 34°C – 约 38°C (例如 37 ± 1°C),具有约 5–10 ± 1% CO₂ 的大气和约 80–90% 的相对湿度(Rh)。或者,可在低氧条件下培养细胞。可在补料、接种或其他细胞操作期间将细胞暂时暴露给环境室温、空气和湿度。

[0038] 不论细胞类型,培养基均由营养物基料组成,所述营养物基料通常用其他组分进一步补充。通常提供诸如葡萄糖、无机盐、能源、氨基酸和维生素等营养物的营养物基料为动物细胞培养领域所熟知的。实例包括但不限于 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM);最小必需培养基(MEM);M199;RPMI 1640;Iscove 改进的 Dulbecco 培养基(EDMEM)。最小必需培养基(MEM)和 M199 需要用磷脂前体和非必需氨基酸另外补充。可市购的富含维生素的混合物包括 Ham's F-12、Ham's F-10、NCTC 109 和 NCTC 135,所述混合物提供另外的氨基酸、核酸、酶辅因子、磷脂前体和无机盐。也可使用这类培养基的混合物,例如各自在 3:1 比率至 1:3 比率之间的 DMEM 和 Ham's F-12。

[0039] 可根据本领域众所周知的细胞培养方法(参见例如 Parenteau 的美国专利号 5,712,163、PCT 公布号 WO 95/31473、PCT 公布号 WO 00/29553、PCT 公布号 WO 2009/070720、Ham 和 McKeehan, *Methods in Enzymology*, 58:44–93 (1979), Bottenstein 等, *Meth. Enzym.*, 58:94–109 (1979);其各自通过此引用以其整体结合到本文中),选择用于 MSC 和其他细胞类型(例如成纤维细胞或上皮细胞)的培养基配方和用培养基补充剂进行的另外给料。例如,MSC 衍生的生物工程化构建物可在用试剂补充的培养基中培养,所述试剂促进通过细胞的基质合成和沉积。可使用化学上确定的培养基,其不含不确定的动物器官或组织提取物,例如血清、垂体提取物、下丘脑提取物、胎盘提取物或胚胎提取物或者饲养细胞分泌的蛋白质和因子。这类培养基可不含来自非人动物来源的不确定组分和生物组分,以降低外来动物病毒或交叉物种病毒污染和感染的风险。合成或重组的功能性等同物可代替这类动物器官或组织提取物的使用。

[0040] 本文已发现,在巨噬细胞、脑细胞和角质形成细胞中产生并诱导上皮形成的转化生长因子 α (TGF- α) 刺激 MSC 合成、分泌和组织胞外基质组分至可察觉的程度。TGF- α

为小蛋白质（约 50 个残基），其与 EGF 共享 30% 结构同源性并竞争相同的表面结合的受体位点。其涉及伤口愈合并且在某些细胞中促进表型改变。可以约 0.0005 $\mu\text{g/mL}$ –约 0.30 $\mu\text{g/mL}$ 、约 0.0050 $\mu\text{g/mL}$ –约 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 或约 0.01 $\mu\text{g/mL}$ –约 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 的范围给培养基补充 TGF- α 或长链 TGF- α 。在一些实施方案中，补充 TGF- α 的量为 10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、120 ng/mL、130 ng/mL、140 ng/mL、150 ng/mL、160 ng/mL、170 ng/mL、180 ng/mL、190 ng/mL、200 ng/mL 或更多。

[0041] 相比之下，前列腺素 E_2 (PGE₂) 产生自前列腺素合酶对前列腺素 (PGH₂) 的作用，且本文已发现其在以相对高剂量存在时抑制 MSC 合成、分泌和组织胞外基质。因此，PGE₂（例如 16, 16 PGE₂ 形式）补充可用来调节胞外基质厚度以及范围可为约 0.000038 $\mu\text{g/mL}$ –约 0.760 $\mu\text{g/mL}$ 、约 0.00038 $\mu\text{g/mL}$ –约 0.076 $\mu\text{g/mL}$ 、或约 0.038 $\mu\text{g/mL}$ 。在一些实施方案中，补充 PGE₂ 的量为 10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL、120 ng/mL、130 ng/mL、140 ng/mL、150 ng/mL、160 ng/mL、170 ng/mL、180 ng/mL、190 ng/mL、200 ng/mL 或更多。

[0042] 类似地，本文已发现碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 抑制细胞（例如成纤维细胞）合成、分泌和组织胞外基质组分。具体而言，胃蛋白酶可溶胶原、硫酸化糖胺聚糖 (sGAG) 和透明质酸 (A) 随 bFGF 水平增加而减少，且各个组分相对于对照可减少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 或更多。胞外基质组分组成上的这类差别进一步导致风干后得到粉状形式以及在冻干时得到容易研磨的粉末。这类粉状形式具有降低的粘度，使得它们可以通过具有 23、24、25、26、27、28、29、30 或更细规格的注射器针头。因此，从约 10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、25 ng/mL、30 ng/mL、35 ng/mL、40 ng/mL、45 ng/mL、50 ng/mL、55 ng/mL、60 ng/mL、65 ng/mL、70 ng/mL、75 ng/mL、80 ng/mL、85 ng/mL、90 ng/mL、95 ng/mL、100 ng/mL 或更多起，bFGF 补充可用于调节胞外基质厚度和组成。

[0043] 抗坏血酸盐或衍生物（例如抗坏血酸钠、抗坏血酸或其化学上更稳定的衍生物之一，例如 L-抗坏血酸磷酸镁盐 n-水合物）可用作补充剂以促进脯氨酸羟化和前胶原（沉积的胶原分子的可溶性前体）分泌。抗坏血酸盐亦增量调节 I 型和 III 型胶原合成。

[0044] 胰岛素可用作补充剂以促进葡萄糖和氨基酸的摄取，从而提供在多次传代期间的长期益处。胰岛素或胰岛素样生长因子 (IGF) 的补充对长期培养而言为必需的，因为将存在细胞摄取葡萄糖和氨基酸能力的最终耗尽以及细胞表型的可能退化。胰岛素可来源于动物（例如牛族动物、人类来源）或通过重组方法作为人重组胰岛素得到。因此，人胰岛素视为不是来自非人类生物来源的化学上确定的组分。胰岛素补充适于连续培养并且以宽范围的浓度提供给培养基。优选的浓度范围为约 0.1 $\mu\text{g/mL}$ –约 500 $\mu\text{g/mL}$ 、约 5 $\mu\text{g/mL}$ –约 400 $\mu\text{g/mL}$ 和约 375 $\mu\text{g/mL}$ 。对于选择用于培养的细胞类型，本领域技术人员可容易地确定胰岛素样生长因子（例如 IGF-1、IGF-2 等）补充的适当浓度。

[0045] 转铁蛋白可用作补充剂以调节铁运输。铁为血清中发现的必需微量元素，但是如果未被转铁蛋白整合，在大量时可为有毒的。转铁蛋白可以约 0.05–约 50 $\mu\text{g/mL}$ 或约 5 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围补充。

[0046] 三碘甲腺原氨酸 (T3) 可用作补充剂以调节细胞代谢并且可以约 0–约 400 pM、约 2–约 200 pM 或约 20 pM 的浓度范围补充。

[0047] 乙醇胺和 o- 磷酰乙醇胺（其为磷脂）的任一者或二者可用作补充剂以利于脂肪酸产生，特别是在无血清培养基中培养时。乙醇胺和 o- 磷酰乙醇胺可以约 10^{-6} –约 10^{-2} M 或约 1×10^{-4} M 的浓度范围补充。

[0048] 亚硒酸可用作补充剂以在无血清培养基中提供痕量元素。亚硒酸可以约 10^{-9} M–约 10^{-7} M 或约 5.3×10^{-8} M 的浓度范围提供。

[0049] 用氨基酸补充可通过绕过细胞对合成蛋白质的这些结构单元的需要来保存细胞能量。例如，添加的脯氨酸和甘氨酸以及羟化形式的脯氨酸（羟脯氨酸）为组成胶原结构的基础氨基酸。另外，氨基酸 L- 谷氨酰胺存在于一些营养物基料中并且可在不存在 L- 谷氨酰胺或存在不足量的 L- 谷氨酰胺时添加。L- 谷氨酰胺也可以稳定形式提供，例如以商标 GlutaMAX-1™ (Gibco BRL, Grand Island, NY) 出售的稳定形式。GlutaMAX-1™ 为 L- 丙氨酰基-L- 谷氨酰胺的稳定二肽形式，可与 L- 谷氨酰胺交换使用并且作为 L- 谷氨酰胺的代用品以等摩尔浓度提供。所述二肽给 L- 谷氨酰胺提供稳定性，避免其在储存中和孵育期间随时间降解，所述降解可导致培养基中 L- 谷氨酰胺在有效浓度上的不确定性。通常，用优选约 1 mM–约 6 mM、更优选约 2 mM–约 5 mM 和最优选 4 mM L- 谷氨酰胺或 GlutaMAX-1™ 补充基础培养基。

[0050] 也可添加另外的补充剂用于特定的培养结果，例如一种或多种前列腺素、转化生长因子（包括转化生长因子 α 或 β ）、角质形成细胞生长因子 (KGF)、结缔组织生长因子 (CTGF) 或甘露糖-6- 磷酸 (M6P) 或其组合。例如已知 TGF- β 1 和 TPA 各自增量调节胶原合成 (Raghow 等, J. Clin. Invest., 79:1285–1288 (1987) 和 Pardes 等, J. Invest. Derm., 100:549 (1993))。

[0051] 此外，表皮生长因子 (EGF) 可用作补充剂以通过细胞放大和接种来帮助建立培养物。可使用呈天然形式或重组形式的 EGF。当制备不含非人生物组分的皮肤等同物时，优选将天然或重组的人形式 EGF 用于培养基。EGF 为任选组分并且可以约 1–15 ng/mL 或约 5–10 ng/mL 的浓度提供。

[0052] 皮质醇可用作补充剂以促进角质形成细胞表型并因此增强分化特征，例如内披蛋白和角质形成细胞转谷氨酰胺酶含量 (Rubin 等, J. Cell Physiol., 138:208–214 (1986))。因此，在这些特征有益于例如角质形成细胞层移植或皮肤构建物形成的情况下，皮质醇为合乎需要的添加剂。皮质醇可以约 0.01 μ g/mL–约 4.0 μ g/mL 或约 0.4 μ g/mL–16 μ g/mL 的浓度范围提供。

[0053] 角质形成细胞生长因子 (KGF) 可以约 0.001 μ g/mL–约 0.150 μ g/mL、约 0.0025 μ g/mL–约 0.100 μ g/mL、约 0.005 μ g/mL–约 0.015 μ g/mL 或 5 μ g/mL 的范围用作补充剂以支持表皮化 (epidermalization)。

[0054] 甘露糖-6- 磷酸盐 (M6P) 可以约 0.0005 mg/mL–约 0.0500 mg/mL 用作补充剂以支持表皮形成。

[0055] 中性聚合物可用作补充剂以增强在样品之间的胶原加工和沉积的一致性。例如，已知聚乙二醇 (PEG) 促进将由培养的细胞产生的可溶性前体前胶原体外加工成基质沉积的胶原形式。在约 1000–约 4000 MW（分子量）、约 3400–约 3700 MW 范围内的组织培养级 PEG，处于约 5% w/v 或更少、约 0.01% w/v–约 0.5% w/v、约 0.025% w/v–约 0.2% w/v 或约 0.05% w/v。其他培养级中性聚合物例如葡聚糖、优选葡聚糖 T-40 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)

(优选在 30,000–40,000 MW 范围内),亦可以约 5% w/v 或更少、约 0.01% w/v–约 0.5% w/v、约 0.025% w/v–约 0.2% w/v 或约 0.05% w/v 的浓度使用。增强胶原加工和沉积的其他细胞培养级和细胞相容性试剂为技术人员所熟知。

[0056] b. 培养基底和 / 或灌注

在限定直径的多孔膜(即培养插入物(culture insert))上接种细胞可通过增加胞外基质产生速率来增加生物工程化构建物厚度,因为其使暴露给培养基营养物的表面积最大化。孔连通膜的上表面和下表面以允许培养基与发育中的组织构建物双向接触,或者允许仅从培养物下面接触。培养基也可仅与形成中的培养组织构建物的底部接触,以使上表面可暴露给空气,如在培养的皮肤构建物的发育中。通常,将膜固定在插入基底内并与基底形成界面的管状组件或构架的一端,所述基底例如可用盖盖上的皮式培养皿或培养皿。采用这些类型的培养容器时,组织构建物在膜的一个表面(例如顶部面朝上的表面)上产生且细胞培养基在上表面和下表面两者上均接触培养物。孔径小到足以不允许细胞穿过膜生长,但大到足以允许培养基中所含营养物例如通过毛细管作用自由通行至生物工程化构建物的下表面。例如,孔径的直径可为约小于 7 μm 、约 0.1 μm –约 7 μm 、约 0.2 μm –约 6 μm 、或约 0.4 μm –约 5 μm 。最大孔径不仅取决于细胞的大小,而且还取决于细胞改变其形状并穿过膜的能力。重要的是,组织样构建物粘附于表面但没有掺入或包封基底,所以例如通过用极微的力度剥离便可将其从基底移出。形成的组织构建物的大小和形状由它生长于其上的容器表面大小或膜大小决定。基底可为圆形、正方形、矩形或角形的或者形成圆形棱角的形状或不规则形状。基底也可平的或按照模具成形以产生以与伤口对接或模拟天然组织的物理结构的成形构建物。为了考虑较大的生长基底表面积,向表面接种相应较多的细胞且需要较大量的培养基以充分浸泡和滋养细胞。当基于生物工程的组织构建物最终形成时,通过从膜基底剥离来将其移出。在细胞接种前可对基底进行预处理,以提高表面能来改善基底的结合特性。预处理可包括但不限于 COOH 和长 NH_2 处理。

[0057] 灌注培养基底以施加对形成中的生物工程化层的机械力,从而模拟体内力,这可进一步增加生物工程化构建物厚度和强度。灌注方法为本领域众所周知,包括但不限于:使用磁力搅拌棒或机动叶轮(位于包含培养膜的基底载体下方或与其邻接)搅拌培养基;在培养皿或培养室内泵送培养基或使之穿过培养皿或培养室;在振荡平台或旋转平台上轻轻摇动培养皿;或者如果使用滚瓶培养瓶,则,转动。通过在培养期间脉冲、弯曲、波动或拉伸多孔膜可施加其他机械力。

[0058] 在培养期间,细胞分泌内源基质分子并组织分泌的基质分子形成三维组织样结构,但未显示出显著的收缩力使形成中的生物工程化构建物收缩并将其自身从培养基底剥离。细胞可在其上生长的合适细胞生长表面可以是细胞可粘附并为生物工程化构建物形成提供锚定工具的任何生物相容性材料。可将以下材料用作细胞生长表面,例如:玻璃;不锈钢;聚合物,包括聚碳酸酯、聚醚砜(PES)、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚偏乙烯、聚二甲基硅氧烷、含氟聚合物和氟化乙烯丙烯;以及硅基底,包括熔融石英、多晶硅或硅晶体。细胞生长表面材料可经化学处理或修饰、带静电或用生物制品(例如聚-L-赖氨酸或肽)包被。化学处理的一个实例产生带静电的表面 COOH 和长 NH_2 。肽包被的一个实例为 RGD 肽。细胞生长表面可用合成形式或人形式的胞外基质处理以使细胞与细胞生长表面具有天然界面用于附着、定向和生化提示,所述胞外基质帮助基质产生细胞的粘附。当合成形式或人形式的

胞外基质用于此方面时,其为暂时的,因为它在培养中随时间被细胞替换。当合成形式或人类形式的胞外基质沉积在细胞生长表面时,其范围为从跨越表面分散的基质分子到分子厚度,或到纳米至微米厚度的连续薄膜。

[0059] 呈天然形式和合成形式的纤连蛋白可用于给培养基底提供包被物。可使用的纤连蛋白形式包括但不限于:人纤连蛋白、人血浆衍生的纤连蛋白、重组纤连蛋白或合成形式例如 ProNectin,其为从天然人纤连蛋白的一部分衍生和合成的重复肽序列。可给基底提供天然胶原、细胞培养产生的胶原或重组胶原的包被物。

[0060] 培养的生物工程化构建物的形成和完整性不依赖合成的或生物可吸收的组件例如网状组件;然而,可使用这类组件。网状组件为机织物、手工编织物、或毛毡样材料。在使用网状组件的系统中,细胞在网状组件上培养且在网状物的任一侧上和间隙内生长,以将网状物包封和掺入到培养的组织构建物内。通过掺入这类网状物的方法形成的最终构建物就物理支持和体积而言依赖所述网状物。

[0061] 蚕丝支架可提供结构支持,同时引起轻微的宿主免疫应答或不引起宿主免疫应答。多孔丝心蛋白支架的孔隙率的直径范围可在约 10 微米-约 150 微米、30 微米-约 45 微米、50 微米-100 微米或 80 微米-150 微米。

[0062] 蚕丝支架的平均孔径可通过改变溶剂百分比来控制。可将丝纤维与有机溶剂例如乙醇或 DMSO 混合。通过增加有机溶剂的量,可基于所需的孔隙率水平选择性地减小蚕丝支架的孔径。例如,将 4% 蚕丝溶于 1% 乙醇得到具有 50-100 微米平均孔径的蚕丝支架。对于增强的成纤维细胞渗透以及使构建物在体内更快地进行血管形成,需要 50-100 微米的孔径。通过将 3% 蚕丝溶于 0.5% 乙醇可获得更大的蚕丝支架平均孔径(例如约 80-150 微米)。对于较严重的烧伤,需要具有约 80-150 微米平均孔径的蚕丝支架,因为较大的孔允许从伤口床清除伤口渗出物。

[0063] 丝心蛋白可来自天然来源或重组来源。丝心蛋白的优选天然来源来自 Bombyx Mori 蚕茧的脱胶丝纤维。将丝心蛋白的溶液与水混溶性有机溶剂混合,所述有机溶剂例如醇,选自乙醇、甲醇、异丙醇、丙醇、丁醇;或二甲基亚砷(DMSO)或丙酮。然后将丝心蛋白溶液投入或倒入模具中或者直接投入或倒入掺入多孔/渗透性培养膜的培养插入物中,所述培养膜提供在膜和多孔丝心蛋白支架的平表面上下两者上的培养基的双向接触。然后将溶液冷冻一段时间,之后解冻并漂洗以去除溶剂残留。然后对多孔丝心蛋白支架进行高压灭菌、 γ 辐照或电子束灭菌以产生无菌多孔丝心蛋白支架。灭菌之后,可采用本文所用方法将所述多孔丝心蛋白支架用作培养的细胞的培养基底。在多孔丝心蛋白支架上培养细胞之后,亦可采用本文所用方法使细胞失活。可向所述多孔丝心蛋白支架构建物加入其它特征,例如硅酮层。

[0064] 可使用用于增进伤口愈合的物质调适蚕丝支架。例如,可将湿的蚕丝支架或干的蚕丝支架与含有一种或多种蛋白质的溶液一起孵育 5-10 分钟,使得被吸附蛋白质的最终量在 1 微克-1 毫克的范围。在与蛋白质溶液一起孵育之前部分冻干(例如在 0°C 冷冻干燥 3 小时)并于 -20°C 冷冻的蚕丝支架和包含蚕丝支架的生物工程化构建物,似乎使被吸附的蛋白质的量达到最大。在用于细胞培养之前对蚕丝支架进行高压灭菌,亦似乎增加体内降解并因此减少存留。

[0065] c. 细胞接种

以超汇合 (superconfluency) (即大于 100% 汇合) 接种通过绕过细胞生长期而增加胞外基质形成的速率。因此,可直接以从 100% 汇合直至约 900% 汇合 (包括在约 300%- 约 600% 汇合的范围) 的超汇合接种细胞以立即产生胞外基质。亦可根据细胞接种密度 / 培养表面积来达到超汇合,其可为例如 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 或更多个细胞 / cm^2 。例如,可使用 75 mm 直径插入物,其具有约 44 cm^2 的培养表面积。在所述插入物上接种超汇合数量的细胞 (例如 3×10^6 个细胞) 产生约 6.8×10^5 个细胞 / cm^2 的最初接种密度。可将约 7.5×10^6 个细胞接种至 $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 矩形插入物上以产生约 7.5×10^5 个细胞 / cm^2 的最初接种密度。

[0066] 或者,可以亚汇合接种细胞以在刺激它们产生和组织胞外基质之前进行增殖。可通过以约 1×10^5 个细胞 / cm^2 – 约 6.8×10^5 个细胞 / cm^2 、约 3×10^5 个细胞 / cm^2 – 约 6.8×10^5 个细胞 / cm^2 或约 6.8×10^5 个细胞 / cm^2 (细胞 / 平方厘米表面积) 接种来达到亚汇合细胞密度。

[0067] d. 受控收缩

可通过将生物工程化构建物自培养基底释放来增加其厚度,以便允许其无拘束地收缩。可实时监测这类“受控收缩”或“无拘束收缩”,并在出现所需收缩量和厚度之后可将其停止。生物工程化构建物中的活细胞对内源胞外基质施加收缩力,所述收缩力因生物工程化构建物与培养基底的粘附而被缓和。在无拘束收缩步骤中,细胞给予的这些收缩力用于 (leveraged to) 与培养之后未经无拘束收缩的同样制备的构建物相比,增加构建物的总体物理强度和厚度。受控收缩可通过从培养基底释放所述生物工程化构建物来诱导,所述释放例如通过使用物理方法,例如通过将其从基底剥离或提起,从基底振离,或通过弯曲基底来进行。生物工程化构建物的释放亦可通过改变培养温度来实现 (特别是在采用温敏性基底时),或者通过使用化学方法实现。

[0068] 受控收缩通过时间、构建物的厚度增加和构建物的表面积减少 (如通过构建物的直径减少或宽度和长度减少而测定) 来测定。通过细胞的基质收缩似乎组织内源基质的纤维以使它们增加基质的总强度 (例如缝合保持强度),但未增加过多而使基质变得畸形、扭曲、褶皱、或失去其构型上的近似平面性。换言之,基质的平整平面外观被保留,但总表面积减小且厚度增加。如果通过生物工程化厚度的总体增加来测定无拘束收缩,则使用厚度增加百分比或实际厚度增加测定值。如果通过表面积的减少来测定无拘束收缩,则使用表面积减少百分比或者一个或多个尺寸的实际减少测定值。收缩可通过测定组织基质的表面积减少百分比来测定,例如 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或更多或其间的任何范围。在适当时可可通过使细胞失活来停止收缩,例如本文另外所述的。

[0069] e. 杂合的生物工程化构建物

MSC 衍生的生物工程化构建物可进一步包含另外的细胞类型,所述细胞类型能够合成、分泌和组织胞外基质以增加胞外基质厚度。这类细胞类型可为成纤维细胞、基质细胞、平滑肌细胞、软骨细胞和其他间质起源的结缔组织细胞。成纤维细胞可来自许多来源,包括但不限于新生男婴包皮、真皮、腱、肺、脐带、软骨、尿道、角膜基质、口腔黏膜和肠。可使用来自两种或更多种来源的正常细胞的嵌合混合物,例如自体同源和同种异体细胞的嵌合混合物;正常细胞与遗传修饰细胞或转染细胞的混合物;来自不同组织或器官类型的细胞的混合物;或两个或更多个物种或组织来源的细胞的混合物。

[0070] 可以分层形式或混合形式加入所述至少一种另外的细胞类型。对于分层的生物工程化构建物,将第一细胞类型接种在细胞培养基底上,随后将第二细胞类型接种在第一层细胞之上。混合的构建物可通过至少部分地基于疗效所需的构建物属性改变所述至少两种细胞类型的最初接种比率来产生。例如, MSC 可为第一细胞类型并构成 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或更多的最初细胞接种混合物。成纤维细胞,例如新生成纤维细胞、真皮成纤维细胞、乳头状成纤维细胞、网状成纤维细胞或其组合,可为第二细胞类型并构成剩余的最初细胞接种混合物。最初接种的总细胞群可为 $1.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ – $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ 。

[0071] 对于通过混合产生的生物工程化构建物,也可基于接种时的细胞数量来确定最初接种密度,其中接种时所需的细胞总量根据下式得知: $aX + bY = Z$; 其中 $X = Y = Z$ 且 $a + b = 1$, 但是 $b > 0$ 且 $a < 1$ 。例如,所需细胞接种密度为 Z 且 $Z = 2.1 \times 10^5$ 个细胞/ cm^2 (近似), aX 和 bY 分别代表每平方厘米面积待接种的细胞总数(用 Z 表示)中成纤维细胞和间充质祖细胞的数量。因此,在成纤维细胞和 MSC 各自构成接种总细胞的 50% 时,方程表达为: $aX + bY = Z$ 个细胞/ cm^2 , 其中 $(0.5)(2.1 \times 10^5 \text{ 个细胞}) + (0.5)(2.1 \times 10^5 \text{ 个细胞}) = 2.1 \times 10^5$ 个总细胞/ cm^2 。解这个方程导致确定所述至少两种细胞类型二者的最初接种密度: 1.05×10^5 个成纤维细胞 + 1.05×10^5 个间充质祖细胞 = 2.1×10^5 个总细胞/ cm^2 。当采用这个接种方程时,可使用: $a = 0, b = 1$; $a = 0.1, b = 0.9$; $a = 0.2, b = 0.8$; $a = 0.3, b = 0.7$; $a = 0.5, b = 0.5$; $a = 0.8, b = 0.2$ 。

[0072] 或者,杂合的生物工程化构建物可通过成纤维细胞和 MSC 产生,其中 X 为常量(即保持成纤维细胞的数量恒定),其中接种时细胞总量中成纤维细胞的总数根据下式得知: $aX + bY = Z$; 其中 $X = Y, a = 1, b > 0$ 且 $b < 1, Z =$ 计算的细胞总量接种密度。例如,如果 $X = 2.1 \times 10^5$ 个成纤维细胞且接种需要 50% MSC,则方程表达为: $aX + bY = Z$, 其中 $(1)(2.1 \times 10^5 \text{ 个细胞}) + (0.5)(2.1 \times 10^5 \text{ 个细胞}) = Z$ 个总细胞/ cm^2 。解这个方程导致确定所述至少两种细胞类型二者的最初接种密度: 2.1×10^5 个成纤维细胞 + 1.05×10^5 个间充质祖细胞 = 3.15×10^5 个总细胞/ cm^2 。当采用这个接种方程时,可使用: $a = 1, b = 2$; $a = 1, b = 1$; $a = 1, b = 0.9$; $a = 1, b = 0.8$; $a = 1, b = 0.7$; $a = 1, b = 0.5$; $a = 1, b = 0.2$ 。

[0073] II. 控制生物工程化构建物孔径

某些构建物可为多孔结构的。孔隙率可通过组织学图像中属于孔的表面积相对于图像的总表面积来测定。某些构建物可具有至少 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 或更大的孔隙率。

[0074] 可工程改造生物工程化构建物的胞外基质内的平均孔径,以形成多孔胞外基质和/或调节孔径。与某一类型和/或一定程度的交联组合,可选择和控制限定的平均孔径以产生具有不同体内存留比率和/或细胞渗透比率的构建物,其范围从“可迅速生物重建的”到“可适度生物重建的”到“可长期生物重建的”生物工程化构建物,用于针对治疗用途的定制适用性。此外,可在阻止或抑制细胞渗透为有用的情况下(例如不合乎需要的宿主细胞类型时)工程改造较小的孔径以增强屏障功能。

[0075] 可通过改变进行冻干(也称为冷冻干燥)的最终温度来工程改造平均孔径(直径)。在此过程中,将生物工程化构建物冷冻以使生物工程化构建物的水分达到冻结状态,

之后,使生物工程化构建物经受真空以从构建物中去除冻结的水(冰)。冻干通过去除基质中形成的冰晶来产生和打开孔结构,冷冻温度决定所得的平均孔径。因此,在较低的冷冻温度下进行冻干产生较小的孔径,而在较高的冷冻温度下进行冻干产生较大的孔径。因此,在一个实施方案中,温度范围可为 -100°C – 0°C ,平均孔径随冷冻温度升高而在尺寸上小于5至10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100微米(μm)或更大。在一个实施方案中,在 -40°C 的冷冻温度下可产生尺寸小于5、10、15、20、25或30 μm 或之间的任何范围的平均孔径。在另一个实施方案中,在 -10°C 的冷冻温度下可产生尺寸为至少30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 μm 或更大或之间的任何范围的平均孔径。减小达到冷冻温度的速率可增加孔径的一致性。因此,使冻结速率减少10、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.3、0.1 $^{\circ}\text{C}$ /分钟或更少或之间的任何范围,可增加构建物中孔的一致性。

[0076] III. 控制生物工程化构建物组成

本发明生物工程化构建物的胞外基质包含用于治疗 and 治愈伤口的组分。

[0077] a. 失活的生物工程化构建物

根据其在治疗受试者中的最终用途,可使本发明的生物工程化构建物失活以无需去除便终止细胞,和/或进行去细胞化以去除细胞。失活或去细胞化可在培养插入物的膜上进行或在将所述生物工程化构建物移出培养插入物之后进行。

[0078] 可用许多方式使生物工程化构建物失活。用于使生物工程化构建物中细胞失活的一个方法为利用物理方法去除构建物中的所有或基本上所有水分。去除水分的方法包括通过冷冻或通过冷冻干燥在空气中脱水。将培养基移出制备生物工程化构建物的容器器以通过风干使构建物脱水,只需使生物工程化构建物脱水足够时间便可使细胞死亡。脱水条件根据温度和相对湿度改变。脱水温度范围可从冷冻温度以上直至生物工程化构建物中胶原的变性温度(如通过示差扫描量热法或“DSC”所测定),例如约 0°C –约 60°C 或环境室温(例如约 18°C –约 22°C)。优选较低的相对湿度值,如在约0%–约60%的范围;然而,亦优选与室内湿度相当的相对湿度(约10%Rh–约40%Rh)。如果在环境室温和湿度下通过风干进行脱水,则生物工程化构建物将具有约10%–约40% w/w水分或更少水分。或者,可将生物工程化构建物冷冻干燥(即冻干),其中将构建物冷冻,然后置于真空环境以去除水分。例如,可直接从培养中取出生物工程化构建物并冷冻(例如在 -80°C – 0°C 或之间的任何范围的温度),并且冻干过夜,例如约1–约15小时或更长时间。或者,可将生物工程化构建物首先风干约8小时,随后冷冻和冻干。在环境条件下干燥或通过冷冻干燥而干燥之后,生物工程化构建物已失活但仍保留失活的细胞和细胞残留物。冻干还可赋予与在环境条件下脱水时可产生的性质不同的性质。在一个实施方案中,这类性质显示更多孔和打开的纤维基质结构。

[0079] 也可采用化学方法使生物工程化构建物中的细胞失活。可利用水以渗透压法终止细胞。可将生物工程化构建物浸没在无菌纯水中达足以允许导致细胞裂解的低渗溶胀的时间。细胞裂解后,所述生物工程化构建物可失活但仍保留失活的细胞和细胞残留物。当使用水时,也可将其与其他物质混合,例如过乙酸或过氧化氢、或盐、或其组合。例如,可使用约0.05%–约3% v/v 过乙酸/水的失活溶液。此失活剂也可进行缓冲或含有高盐浓度以防止在终止细胞时生物工程化构建物的过度溶胀。或者,可将有机溶剂和有机溶剂溶液用作

本发明中的失活剂。有机溶剂能够替换生物工程化构建物中的水而使生物工程化构建物中的细胞终止并因此失活。用于去除水的有机溶剂可以是在从构建物中去除时不会留下残留物的有机溶剂,包括但不限于醇(例如乙醇、甲醇和异丙醇)和丙酮。例如,可将生物工程化构建物浸没在无菌乙醇中达足以替换生物工程化构建物中的水并使细胞失活的时间。可去除乙醇,然后暴露给空气达足以蒸发生物工程化构建物中吸收的乙醇的时间。溶剂蒸发后,构建物保留失活的细胞和细胞残留物并且为脱水的。

[0080] 使细胞失活的其他方法包括使生物工程化构建物经受紫外线或 γ 辐照。这些方法可与用水低渗溶胀或其他化学失活方法联合进行,或与风干和冷冻联合进行。

[0081] b. 去细胞化生物工程化构建物

去细胞化使得从完成的构建物中去除胞外基质产生细胞,所述细胞产生所述生物工程化构建物的内源胞外基质组分。用于去细胞的一个方法采用在一系列化学处理液(treatment)内浸泡或轻轻摇动来去除细胞、细胞残留物以及残留的细胞 DNA 和 RNA。其他非胶原和非弹性蛋白的胞外基质组分(例如糖蛋白、糖胺聚糖、蛋白聚糖、脂质和存在于 ECM 中的其他非胶原蛋白)也可使用用于去细胞的试剂和方法来去除或减少。例如,可通过使其与有效量的螯合剂(优选生理学上碱性)接触来首先处理所述生物工程化构建物,以可控地限制细胞-基质的溶胀。螯合剂通过降低二价阳离子浓度来增强从基质中去除细胞、细胞碎片和基膜结构。碱处理可从胶原组织解离糖蛋白和糖胺聚糖并皂化脂质。可使用的本领域已知的螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)和亚乙基双(氧亚乙基次氨基(oxyethylenitrilo))四乙酸(EGTA)。可通过加入氢氧化钠(NaOH)、氢氧化钙 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、碳酸钠或过氧化钠使 EDTA 碱性更强。EDTA 或 EGTA 浓度可为约 1-约 200 mM、约 50-约 150 mM 或约 100 mM。NaOH 浓度可为约 0.001-约 1 M、约 0.001-约 0.10 M 或约 0.01 M(例如水中 100 mM EDTA/10 mM NaOH)。本领域技术人员可确定使螯合溶液的 pH 在有效碱性 pH 范围内的其他碱或碱性试剂。碱性螯合溶液的最终 pH 应为约 8-约 12 或约 11.1-约 11.8。

[0082] 然后可使生物工程化构建物与有效量的酸性溶液(任选含盐)接触。酸处理可增强糖蛋白、糖胺聚糖、非胶原蛋白和核酸的去除。盐处理可在酸处理期间控制胶原基质的溶胀并增强从胶原基质中去除某些糖蛋白和蛋白聚糖。可使用本领域已知的酸溶液,其可包括但不限于盐酸(HCl)、醋酸(CH_3COOH)和硫酸(H_2SO_4)。例如,可在约 0.5-约 2 M、约 0.75-约 1.25 M 或约 1 M 的浓度下使用盐酸(HCl)。酸/盐溶液的最终 pH 应在约 0-约 1、约 0-0.75 或约 0.1-约 0.5。盐酸和其他强酸对裂解核酸分子最有效,而较弱的酸效果较差。可使用的盐优选为无机盐,包括但不限于盐酸盐,例如氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl_2)和氯化钾(KCl)。例如,可在约 0.1-约 2 M、约 0.75-约 1.25 M 和约 1M 的浓度下使用盐酸盐(例如在水中的 2 M HCl/1 M NaCl)。

[0083] 然后可使生物工程化构建物与有效量的盐溶液接触,优选所述盐溶液已缓冲至约生理 pH。缓冲的盐溶液中和物质,同时减少溶胀。可使用的盐优选为无机盐,包括但不限于盐酸盐,例如氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl_2)和氯化钾(KCl);以及含氮的盐,例如硫酸铵(NH_4SO_4)。例如,可在约 0.1-约 2 M、约 0.75-约 1.25 M 或约 1M 的浓度下使用盐酸盐。缓冲剂为本领域已知的,包括但不限于磷酸盐和硼酸盐溶液。例如,可使用磷酸缓冲盐溶液(PBS),其中盐溶液中磷酸盐浓度为约 0.001-约 0.02 M,盐浓度为约 0.07-约 0.3 M(例如 1 M 氯化钠(NaCl)/10 mM 磷酸缓冲盐溶液(PBS))。pH 应为约 5-约 9、约 7-约 8 或约

7.4- 约 7.6。

[0084] 化学清洗处理之后,可通过使其与有效量的漂洗剂接触,在无化学清洗剂下漂洗所述生物工程化构建物。可使试剂(例如水、等渗盐水(例如 PBS)和生理 pH 缓冲的溶液)与生物工程化构建物接触达足以去除清洗剂的时间。可以任意顺序进行以下清洗步骤而达到基本上相同的清洗效果:使生物工程化构建物与碱性螯合剂接触和使生物工程化构建物与酸溶液接触。

[0085] c. 多层和 / 或交联的生物工程化构建物

可利用交联剂使 ECM 交联,以在被植入或移入活体时控制其生物重建速率和增加其存留。可使其交联并用作单层构建物,或可对其组合或操作以产生不同类型的构建物。交联可将生物工程化片层或其部分结合在一起。

[0086] 一些生物工程化构建物具有两个或更多个叠加的 ECM 片层,所述片层结合在一起形成平层构建物。本文所用“结合的胶原层”意指由相同或者不同起源或特征的两种或更多种生物工程化片层组成,所述片层以某种方式处理使得所述层相互叠加并通过自身层压和 / 或化学键合充分地结合在一起。例如,所述生物工程化构建物可包含许多层,例如 2-20 层或 2-10 层,层数取决于构建物的最终预期用途所需的强度和体积。或者,由于基质片层的大小可限制叠加排列的最终大小,可将所述层交错在胶原排列中,形成具有大于任何独立基质片层尺寸的表面积但没有跨越排列区的连续层的构建物。

[0087] 可铺设第一无菌刚性支持组件(例如聚碳酸酯的刚性片层)以形成基质片层的多层生物工程化构建物。如果基质片层仍未处于水合状态,例如在进行失活或去细胞过程之后,则使它们在水溶液(例如水或磷酸缓冲盐溶液)中水合。可用无菌吸水布吸干基质片层以从材料中吸收过量的水。可在聚碳酸酯片层上铺设第一基质片层并手动使其与聚碳酸酯片层相平以去除任何气泡、褶皱和折痕。可在第一片层上铺设第二基质片层,再次手动去除任何气泡、褶皱和折痕。可重复这种分层直至获得特定应用所需的层数。

[0088] 铺设所需数量的基质片层后,可将它们一起脱水。脱水可在将水从邻接基质片层的纤维之间去除时,使层中胞外基质组分(例如胶原纤维)聚集在一起。可在第一支持组件上或第一支持组件和第二支持组件之间将所述层开放地脱水,所述第二支持组件例如聚碳酸酯的第二片层,在干燥前置于顶层上并固定在第一支持组件上以在存在或不存在压缩的情况下使得以平整平面排列将所有层保持在一起。为了利于脱水,所述支持组件可为多孔的以允许空气和水分穿过到达脱水层。可在空气、真空中或通过化学方法(例如通过丙酮或醇,例如乙醇或异丙醇)干燥所述层。风干脱水可在室内湿度进行,在约 0% Rh- 约 60% Rh 或更小;或者约 10%- 约 40% w/w 水分或更小。可通过在环境室温(约 20℃)和室内湿度下斜置所述叠加的基质层,使之面向层流柜的无菌气流至少约 1 小时直至 24 小时来容易地进行脱水。通过真空或化学方法进行的脱水将使所述层脱水至比通过风干达到的水分水平更低的水分水平。

[0089] 在任选步骤中,将脱水层再水化或者再水化并再次脱水。如上所述,脱水使邻接基质层的胞外基质组分聚集在一起以及将那些层交联在一起在组分间形成化学键以结合所述层。为了再水化所述层,将其一起从多孔支持组件剥离并如下在水性再水化剂(优选水)中再水化:通过在约 4℃ - 约 20℃ 的温度下将其转移到含有水性再水化剂的容器中达至少约 10- 约 15 分钟,无需将其分离或分层便可再水化所述层。然后通过使分层的基质片层与

交联剂接触来使所述基质层交联在一起,所述交联剂优选保留基质层的可生物重建性的化学交联剂。

[0090] 交联给所述构建物提供强度和耐久性并改善其处理性能。可使用本领域已知的多种类型的交联剂,例如碳化二亚胺、京尼平、转谷氨酰胺酶、核糖和其他糖、去甲二氢愈创木酸(NDGA)、氧化剂、紫外(UV)线和脱水加热(dehydrothermal, DHT)法。除了化学交联剂,所述层还可使用生物相容性的基于纤维蛋白的胶或医用级粘合剂(例如聚氨酯、醋酸乙烯酯或环氧树脂(polyepoxy))结合在一起。一种生物相容性粘合剂为丝心蛋白,即置于组织基质的邻接层之间的结合区的4-8%丝心蛋白溶液,使用甲醇将其激活。生物相容性胶或粘合剂可用于将交联的或未交联的层或二者结合在一起。

[0091] 一种适当的交联剂为1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)。如Staros, J. V., Biochem. 21, 3950-3955, 1982所述,可向EDC交联剂中加入磺基-N-羧基琥珀酰亚胺。在最优选的方法中,将EDC以约0.1 mM-约100 mM、约1.0 mM-约10 mM或约1.0 mM的浓度溶于水中。除水之外,还可用磷酸缓冲盐溶液或(2-[N-吗啉代]乙磺酸)(MES)缓冲液溶解EDC。可向溶液中加入其他试剂(例如丙酮或醇)直至在水中含99% v/v以及通常50% v/v,使得交联更加一致和有效。这些试剂将水从层中去除以使基质纤维聚集在一起来促进所述纤维之间的交联。可利用交联剂中这些试剂与水的比率来调节交联。在临用前制备EDC交联溶液,因为EDC将随时间损失其活性。为了使交联剂与基质层接触,将经水化经结合的基质层转移到诸如浅盘等容器并且将交联剂轻轻倒入盘中,确保基质层被覆盖并且自由漂浮以及在基质层下面或之间不存在气泡。盖上容器,使基质层在约4℃-约20℃的温度下交联约4-约24小时或8-约16小时。交联可用温度调节,如在较低的温度下,因为反应变慢而使交联更有效。相比之下,在较高的温度下,因为EDC更不稳定而使交联不那么有效。

[0092] 交联之后,将交联剂轻轻倒出并去除,交联的多层基质构建物通过使其与漂洗剂(例如水)接触来漂洗以去除残留的交联剂,例如通过使交联的多层基质构建物与等体积无菌水接触三次,每次漂洗持续在1分钟-45分钟间的任何时间。

[0093] 或者,可利用脱水加热(DHT)交联法使生物工程化构建物交联,所述方法通过在真空下将植入物暴露给受控加热时(通常120℃干热直至24小时)的缩合反应,在蛋白质纤维上的邻接羧基和氨基之间形成共价键。在此处理中,水分子被从各个纤维中移走,常常导致氨基酸在胶原链中分子定位的复杂变化以及可能的氧化损伤。DHT对于某些再生医学应用而言相对于化学交联可为有利的,因为此过程不会把潜在的细胞毒性或炎性化学品引入用于治疗用途的植入物中,所述化学品将刺激患者的免疫应答。

[0094] DHT具有给胶原基质提供高强度的潜能(约50 MPa),但已知其由于胶原纤维内氨基酸的分子再定位而使胶原纤维部分变性。在材料暴露给消化酶时,所述材料中制成的交联数越多通常将提供越大的耐久性。然而,亦已知某些蛋白酶仅在特定的靶位点切割,除非蛋白质变性且在蛋白质变性以前,在胶原纤维的三螺旋域内所述位点不能暴露。可使在胶原可植入物的交联期间发生的变性水平降至最低,以避免基质在植入患者时可能被非特异性蛋白酶快速降解。胶原基质中的DHT交联水平通常通过胶原纤维在收缩温度、机械负荷或对酶消化(例如胶原酶、胰蛋白酶等)的敏感性方面的变化来测定。利用X射线衍射观察随着脱水进行而在纤维中胶原分子的轴向包装上的变化,亦可观察胶原的干燥和热处理

效果。基于众所周知的技术（参见例如 Parenteau 的美国专利号 5,712,163、PCT 公布号 WO 95/31473、PCT 公布号 WO 00/29553 和 PCT 公布号 WO 2009/070720），可使分层的和 / 或交联的生物工程化构建物形成许多形状因素（form factor），例如管状构建物。

[0095] d. 组合产物

可向 ECM 中加入其它物质以进一步增强体内给予时的生物活性或功能。

[0096] 例如，可在生物工程化构建物、其中的层和 / 或支架之中或之上掺入抗微生物剂、药物、生长因子、细胞因子、遗传物质和培养的细胞。

[0097] 生物工程化构建物在其使用中与血液接触的地方，如在循环系统中，可通过给所述构建物施涂肝素（施涂至构建物的所有表面或平层构建物的仅一侧或管状构建物的内腔或外腔）使其变为非血栓形成的。可通过各种众所周知的技术给构建物施涂肝素。例如，可用以下三种方式给构建物施涂肝素。第一种，通过垂直填充内腔或使假体浸在溶液中然后使其风干来给假体施涂苯甲羟胺肝素（BA-Hep）异丙醇溶液。此程序用离子结合的 BA-Hep 复合物处理胶原。第二种，EDC 可用于激活肝素然后使肝素与胶原纤维共价键合。第三种，EDC 可用于激活胶原，然后使鱼精蛋白与胶原共价键合并随后使肝素与鱼精蛋白离子键合。

[0098] 可将合成材料置于所述生物工程化构建物的至少一个表面上。合成材料可呈片状形式，叠加或交错于生物工程化构建物之上形成生物工程化层上的合成层。一类合成材料，优选生物相容性合成材料，包括聚合物。这类聚合物包括但不限于：聚氨脂、聚硅氧烷或硅酮、聚乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚 2- 羟乙基甲基丙烯酸酯、聚 N- 乙烯吡咯烷酮、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚丙烯酰胺、乙烯 - 醋酸乙烯酯共聚物、聚乙二醇、聚甲基丙烯酸、聚丙交酯（PLA）、聚乙交酯（PGA）、丙交酯 - 乙交酯共聚物（PLGA）、聚酐和聚原酸酯或者生物学相容性的可开发的任何其他类似合成聚合物。术语“生物相容性合成聚合物”通常也包括共聚物和掺合物，以及前述聚合物一起的任何其他组合或前述聚合物与其他聚合物的任何其他组合。这些聚合物的使用依赖于所需的给定应用和规格。例如，生物相容性合成材料亦可为可生物降解的，使得在植入受试者身体时随时间进行生物降解。当置于生物工程化构建物上时，所述组合构建物包含可生物降解层和可生物重建层。这些聚合物和聚合物类型的更详细讨论在 Brannon-Peppas, Lisa, "Polymers in Controlled Drug Delivery," Medical Plastics and Biomaterials, 1997 年 11 月中陈述，其通过如同在本文中完整陈述的引用而结合。

[0099] 可用作背衬层的另一种合成材料的实例为硅酮。将多孔或微孔膜或者无孔薄膜形式的硅酮层施用并粘附至基质构建物。当用于伤口愈合时，硅酮层可用来操纵和操控基质构建物至皮肤伤口并封住伤口外围以围封基质构建物来治疗伤口。硅酮亦形成防潮层以保持伤口不会干燥。愈合的伤口组织成功形成之后（通常约 21 天），用镊子小心地从已愈合的或愈合中的伤口边缘剥落硅酮。

[0100] 亦可向生物工程化构建物中加入蛋白质。有用的胞外基质蛋白质的实例包括但不限于：胶原、纤维蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白和纤连蛋白、蛋白聚糖。纤维蛋白原与凝血酶组合时，形成纤维蛋白。乙酰透明质酸（也称为透明质酸或透明质酸盐）为广泛分布在结缔组织、上皮组织和神经组织各处的非硫酸化糖胺聚糖。其为胞外基质的主要成分之一，显著促进细胞增殖和迁移，并用于减少手术后粘附。有天然存在的这些蛋白质的每一种的

多种类型,以及可合成制备或通过基因工程产生或者已合成制备或通过基因工程产生的类型。胶原以许多形式和类型存在。术语“蛋白质”进一步包括但不限于片段、类似物、保守氨基酸取代物以及用非天然存在氨基酸对各个已命名蛋白质的取代物。术语“残基”是指通过酰胺键掺入蛋白质中的氨基酸(D或L)或氨基酸模拟物。因此,氨基酸可为天然存在的氨基酸,或者除非另有限制,否则可包括以类似于天然存在氨基酸的方式起作用的天然氨基酸的已知类似物(即氨基酸模拟物)。此外,酰胺键模拟物包含本领域技术人员众所周知的肽主链修饰。例如,肽可用于增强细胞效应(例如,人真皮成纤维细胞渗入蚕丝支架并改善募集宿主细胞(例如上皮细胞)的能力)。这类肽可为RGD、Gofoger、层粘连蛋白1-10和pronectin。更具体地说,层粘连蛋白5和层粘连蛋白10特别好地对增强上皮细胞渗透/迁移起作用。肽亦可用于增强内皮细胞迁移。更具体地说,肽(例如凝血酶和纤维蛋白原)可增强内皮细胞迁移,特别是用于从新生血管形成获益的适应症。

[0101] 亦可在聚合物基质之内或之上掺入细胞粘附分子,使支架组合物与局部组织部位连接并防止所述生物工程化构建物扩散。在基质聚合之前或基质聚合之后将这类分子掺入聚合物基质中。细胞粘附分子的实例包括但不限于肽、蛋白质和多糖,例如纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原、血小板反应蛋白1、玻连蛋白、弹性蛋白、生腱蛋白、聚集蛋白聚糖、聚集蛋白、骨唾液蛋白、软骨基质蛋白、纤维蛋白原、纤维蛋白、纤蛋白、粘蛋白、巢蛋白、骨桥蛋白、纤维蛋白溶酶原、限制蛋白、丝甘蛋白聚糖、SPARC/骨粘连蛋白、多功能蛋白聚糖、von Willebrand 因子、多糖硫酸肝素、连接蛋白、胶原、RGD (Arg-Gly-Asp) 和 YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) 肽和环肽、糖胺聚糖(GAG)、透明质酸(HA)、6-硫酸软骨素、整联蛋白配体、选择蛋白、钙黏着蛋白和免疫球蛋白超家族成员。其他实例包括神经细胞粘附分子(NCAM)、胞间粘附分子(ICAM)、血管细胞粘附分子(VCAM-1)、血小板-内皮细胞粘附分子(PECAM-1)、L1 和 CHL1。

[0102] ECM 蛋白和肽以及在细胞功能中的作用

蛋白质	序列	SEQ.ID No:	作用
纤连蛋白	RGDS		粘附
	LDV		粘附
	REDV		粘附
玻连蛋白	REDV		粘附
层粘连蛋白 A	LRGDN		粘附
	IKVAV		神经突延伸
层粘连蛋白 B1	YIGSR		细胞粘附,通过 67 kD 层粘连蛋白受体
	PDSGR		粘附
层粘连蛋白 B2	RNIAEIIKDA		神经突延伸
胶原 I	RGDT		大部分细胞粘附
	DGEA		血小板和其他细胞粘附
血小板反应蛋白	RGD		大部分细胞粘附
	VTXG		血小板粘附

以下显示了合适的细胞粘附分子的其他实例。

[0103] 来自胞外基质蛋白质的对蛋白聚糖结合特异的氨基酸序列

序列	SEQ.ID.NO.	蛋白质
XBBXB*		共有序列
PRRARV		纤连蛋白
YEKPGSPPREVVPRPRPGV		纤连蛋白
RPSLAKKQRFRRNRKGYRSQRGHSRGR		玻连蛋白
RIQNLLKITNLRIKFVK		层粘连蛋白

特别优选的细胞粘附分子为包含氨基酸序列精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 的肽或环肽, 已知所述序列作为细胞连接配体并且在多种天然胞外基质分子中被发现。带有这类修饰的聚合物基质提供对支架的细胞粘附性质, 并且维持哺乳动物细胞系统的长期生存以及支持细胞生长。

[0104] 亦可将生长因子引入生物工程化构建物中或引至支架结构上。这类物质包括 BMP, 骨形态发生蛋白; ECM, 胞外基质蛋白或其片段; EGF, 表皮生长因子; FGF-2, 成纤维细胞生长因子 2; NGF, 神经生长因子; PDGF, 血小板衍生的生长因子; PIGF, 胎盘生长因子; TGF, 转化生长因子; VEGF, 血管内皮生长因子; MCP1 和 IL4。任选向支架组合物中加入细胞-细胞粘附分子 (钙黏着蛋白、整联蛋白、ALCAM、NCAM、蛋白酶、Notch 配体)。在下表中提供了示例性生长因子和配体。

[0105] 用于血管发生的生长因子

生长因子	缩写	相关活性
血管内皮生长因子	VEGF	EC 的迁移、增殖和生存
碱性成纤维细胞生长因子	bFGF-2	EC 和许多其他细胞类型的迁移、增殖和生存
血小板衍生的生长因子	PDGF	通过募集平滑肌细胞来促进血管成熟
血管生成素-1	Ang-1	增强 EC-平滑肌细胞相互作用
血管生成素-2	Ang-2	减弱 EC-平滑肌细胞相互作用
胎盘生长因子	PIGF	刺激血管发生
转化生长因子	TGF	通过促进基质沉积来稳定新血管

用于伤口愈合的生长因子

用于组织工程的生长因子

生长因子	缩写	相关活性
血小板衍生的生长因子	PDGF	在愈合过程的所有阶段有活性
表皮生长因子	EGF	角质形成细胞的促有丝分裂
转化生长因子 β	TGF- β	促进角质形成细胞迁移、ECM 合成和重建以及上皮细胞分化
成纤维细胞生长因子	FGF	用于伤口愈合的一般刺激物

生长因子	缩写	分子量 (kDa)	相关活性	rH 生长因子的代表性 供应商
表皮生长因子	EGF	6.2	上皮细胞、间充质细胞和成纤维细胞的增殖	PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA)
血小板衍生的生长因子	PDGF-AA PDGF-AB PDGF-BB	28.5 25.5 24.3	平滑肌细胞的增殖和化学引诱剂；胞外基质合成和沉积	PeproTech Inc.
转化生长因子- α	TGF- α	5.5	角质形成细胞的迁移和增殖；胞外基质合成和沉积	PeproTech Inc.
转化生长因子- β	TGF- β	25.0	骨形成细胞的增殖和分化；成纤维细胞的化学引诱物	PeproTech Inc.
骨形态发生蛋白	BMP-2 BMP-7	26.0 31.5	骨形成细胞的分化和迁移	Cell Sciences Inc. (Norwood, MA, USA)
碱性成纤维细胞生长因子	bFGF/FGF-2	17.2	成纤维细胞的增殖和血管发生的引发	PeproTech Inc.
血管内皮生长因子	VEGF ₁₆₅	38.2	内皮细胞的迁移、增殖和生存	PeproTech Inc.

rH, 重组人的

用于组织工程的固定化配体

固定化配体*	ECM 分子来源	应用
RGD	多种 ECM 分子, 包括纤连蛋白、玻璃蛋白、层粘连蛋白、胶原和血小板反应蛋白	体外和体内增强骨和软骨组织形成 体外和体内调节神经突生长 促进成肌细胞粘附、增殖和分化 增强内皮细胞粘附和增殖
IKVAV YIGSR RNIAEIIKDI	层粘连蛋白	体外和体内调节神经突生长
重组纤连蛋白片段(FNIII ₇₋₁₀)	纤连蛋白	促进前成骨细胞中焦点接触的形成
Ac-GCRDGPQ-GIWGQDRCG	通用 MMP 底物(例如胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白)	在体内促进细胞介导的蛋白水解降解、重建和骨再生(在 RGD 和 BMP-2 存在下)

* 以单字母氨基酸密码给出序列。MMP, 基质金属蛋白酶。

[0106] 为了增强体内血管形成, 可将失活的生物工程化构建物浸泡在蛋白质中, 所述蛋白质例如血小板衍生的生长因子 (PDGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、肝细胞生长因子 / 分散因子 (HGF/SF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和其他种类的促血管生成因子。在一方面, 将 50 微克重组人 PDGF-BB 粉在 0.5 ml 4mM HCl 中复溶, 然后加入另外的 0.5 ml 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)。在植入裸小鼠和正常小鼠的全厚度伤口之前, 使用所得 1 mL 溶液浸泡失活的生物工程化构建物。此外, 将 50 微克重组人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 在 1 mL PBS 中复溶。在植入裸小鼠和正常小鼠的全厚度伤口之前, 将生物工程化构建物在 1 mL bFGF 溶液中浸泡 5 分钟。在另一个实施方案中, 将 50 微克重组人 PDGF-BB 在 0.5 ml 4mM HCL 中复溶并随后与 0.5 mL PBS 复溶的重组人 bFGF 混合。在植入裸小鼠和正常小鼠上的全厚度伤口之前, 将生物工程化构建物浸泡在所得 1 mL 溶液中 5 分

钟。在另一个实施方案中,如实施例 12 产生生物工程化构建物。可收集来自培养时间过程中任一次多次补料的条件培养基。具体而言,在 11 天后收集条件培养基并浓缩(例如 100 倍)。接着在临植入前,将本发明的失活生物工程化构建物浸泡在浓缩的条件培养基中。

[0107] 也可将补充剂引入化学上确定的培养基中,以选择性地增强所需的胞外基质属性和/或获得所需的体内结果。化学上确定的培养基包含以下组分:

组分	浓度 (1L 体积)
DMEM	96.0%(960mL/1L)
L- 谷氨酰胺	1060mg/L
皮质醇	0.4mg/L
亚硒酸	6.78 μ g/L
ITT (2.5mg/mL 胰岛素 +2.5mg/mL 转铁蛋白 +6.74ng/mL 三碘甲腺原氨酸)	2mL
EOP ((3.103g/L 单乙醇胺 +7.06g/L α - 磷酸乙醇胺)	2mL
EGF	10.0 μ g/L
抗坏血酸镁	50mg/L
L- 脯氨酸	213.6mg/L
甘氨酸	101.4mg/L
长 TGF α	20ng/mL
前列腺素 2	0.038 μ g/mL

为了增加生物工程化构建物中透明质酸 (HA) 的量并增强体内新血管形成,可用 2x 长 TGF α (40 ng/mL) 补充所述化学上确定的培养基。此外,可在第 5 天用 25 ng/mL PDGF、在第 10 天用 25 ng/mL bFGF 和在第 15 天用 25 ng/mL 肝细胞生长因子 (HGF) 进一步补充所述化学上确定的培养基。或者,所述化学上确定的培养基包含用 2x 长 TGF α (40 ng/mL) 的补充、在第 5 天用 25 ng/mL bFGF 的补充、在第 10 天用 25 ng/mL PDGF 的补充和在第 15 天用 25 ng/mL bFGF 的补充。额外的备选的化学上确定的培养基配方为 2x 长 TGF α (40 ng/mL)、第 5 天的 25 ng/mL pDGF、第 10 天的 25 ng/mL bFGF 和第 15 天的 25 ng/mL HGF。

[0108] 或者,通过补充所述化学上确定的培养基以包含 10x 长 TGF α (200 ng/mL),可产生包含提高量的硫酸化糖胺聚糖 (sGAG) 的本发明生物工程化构建物。更具体地说,当比较通过用 10x 长 TGF α (200 ng/mL) 和 1X TGF α (20 ng/mL) 补充所述化学上确定的培养基产生的生物工程化构建物时,在通过用 10x 长 TGF α (200 ng/mL) 补充的培养基产生的生物工程化构建物中观察到大约 1100 μ g sGAG/ 构建物,与之相比在用 1X TGF α (20 ng/mL) 补充的培养基中产生的生物工程化构建物中观察到 600 μ g sGAG/ 构建物。要理解的是,本文所公开的在培养基补充上的变化可用于处理其上已接种 HDF 或未接种 HDF 的蚕丝支架,而不会偏离本发明的范围。

[0109] 可用表面修饰处理生物工程化构建物以增强粘合性或组织附着性质。可在顶表面、基底面或两个相对的表面上包含提供粘附“工具”的表面修饰,当密切地体内施用于患者组织和器官时,这起到增加构建物结合的作用。粘附增强“工具”可为任何以下中的一种或多种:(a) 掺入的多个自组装的显微结构和/或纳米结构,其在生物工程化表面上成型或从生物工程化表面突出;(b) 加入的生物相容性和生物可降解的粘附材料,例如薄膜、凝胶、水凝胶、液体或胶,其直接结合、包被或施涂在生物工程化表面;或(c) 电纺的粘性纤维基质,将其覆盖或纺在生物工程化表面。

[0110] 可将粘附增强工具局限在一个外表面(任选基底面或顶表面,取决于优选的制备设计)。此粘性构建物可用于器官修复、膨胀、增强或重建。所述粘性构建物不意图粘附至

邻接伤口的外围组织,而是仅意图直接粘附至需要愈合的器官表面。然而,基底面和顶表面二者均可含有粘附增强工具(在各表面上相同或不同的工具),这取决于组合物的预期治疗用途(例如,用于特意保持内部组织或器官彼此紧密接近,或者,用于使患者组织紧紧粘附于外源可植入治疗装置或传感器的表面)。

[0111] 某些制备方法可用于产生不同的实施方案,不论是将它们制备成含有自组装的显微结构和/或纳米结构,还是将它们制备成包含生物相容性和生物可降解的粘合材料。例如,植入物的形状可为圆形、卵形、椭圆形、三角形或不同大小的矩形和正方形的补片(patch),这取决于其预期的治疗用途(例如,用于某些应用的长而窄的矩形类似于胶带形式,其中所述组合物具有基本上大于其宽度的长度,例如用于骨或其他器官包扎,而其他用途可需要更正方形样的补片,例如用于疝修复)。外科医生可根据需要进一步修整所述植入物,以匹配患者缺损的具体大小和形状。此外,所述胶带或补片可包含一种或多种药物以阻止细菌感染(例如胶体银或微生物毒素)和阻止手术后出血(例如纤维蛋白原或凝血酶)。在另一个实施方案中,在装运之前可通过 γ 辐照、用丝裂霉素C处理或本领域已知的任何其他方法在有丝分裂上灭活所述构建物,这将允许供体细胞继续分泌其生物愈合因子,但可防止其在患者宿主中的长期植入。当依据ASTM标准D4501、D4541或D6862-04测定时,所述粘性制品的至少一部分可具有等于或大于约0.05牛顿/平方厘米投影面积的粘合强度。

[0112] 粘附工具包括在用成纤维细胞和/或间充质祖细胞单元产生的生物工程化构建物的基底面上成型的多个自组装显微结构,所述基底面由细胞及其分泌的胞外基质形成,模拟生物反应器系统的培养插入膜的修饰孔表面。本质上平板接种系统表面充当含有许多工程改造的腔或空隙结构的显微模型(micromold),其中在培养时细胞可沉入这些空隙中并随后分泌蛋白质、脂质、GAG和其他基质因子以填充这些空隙,从而产生覆盖生物工程化构建物的全部或一部分基底面的突出物或组织“夹具(gripper)”,其在从生物反应器中移出所述生物工程化构建物时,以针对平板接种表面的纳米级形貌的镜像形成。可利用本领域已知的多种技术形成平板接种表面的显微构建形貌,包括但不限于平板印刷、纳米冲压成形(nanodrawing)、显微蚀刻以及光刻接着蚀刻或纳米成型(nanomolding)。突出物可以多种形状和尺寸形成,包括锥体、刺突、圆柱体、三棱形、锥体、多边形图案化的凹槽、吸盘或模拟在壁虎足垫上发现的纳米级刚毛和匙形(spatulae)形貌的形状。突出物可包含延伸自生物工程化构建物基底面或顶表面主要突出物的第二组、第三组或其他组突出物。所述突出物可为生物工程化构建物的固有特征并且在表面上其形状和尺寸可为一致的或者可以形状和尺寸的组合排列,这取决于预期的用途和所需粘合性水平。所述突出物可以多种图案和以多种密度排列于表面。突出物密度或突出物数量/单位面积的范围为约10个突出物/ cm^2 -约 1×10^{10} 个突出物/ cm^2 。所述突出物可以图案排列,或者规则、不规则或随机排列,这取决于所述胶带或补片的预期应用。在一些实施方案中,所述突出物具有小于约1,000微米的平均高度。所述突出物可具有约0.2 μm -约150 μm 的平均高度。所述突出物可具有约0.05 μm -约150 μm 的平均尖端宽度。所述突出物可具有约0.05 μm -约150 μm 的平均基底宽度。所述突出物可具有约0.2 μm -约500 μm 的平均中心间节距。所述突出物可具有约0.1:1-约500:1的平均高度与基底宽度比率。所述突出物可具有约1000:1-约0.1:1的平均基底宽度与尖端宽度比率。在一些实施方案中,在外科医生施用,所述自组

装突出物能够刺穿患者的组织。

[0113] 或者,所述粘附增强工具为粘性材料,在开始平板接种细胞之前将其施涂至生物反应器表面,或者在培养完成之后但最终包装之前(即在液体生长培养基去除之后但单元装运之前),将其直接施涂至自组装生物工程化构建物表面。用于本发明的粘合剂的重要特征包括生物可降解的、生物相容的、柔性的、弹性的、能够与组织表面形成强键(甚至在湿润或潮湿环境中)的粘合剂。粘性材料应当能够与细胞基质构建物的表面形成化学键,例如共价键或通过范德华相互作用、静电相互作用或氢相互作用的非共价键。可通过喷雾、滚动或浸渍来将粘性材料加至构建物表面。本领域已知的多种粘性材料可用于形成粘性表面,包括但不限于纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或其组合。用于粘性表面的其他材料可包括但不限于聚甘油癸二酸酯(PGS)、聚甘油癸二酸丙烯酸酯(PGSA)、乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚己酸内酯(PCL)、聚乙交酯(PGA)、聚乳酸(PLA)、聚3-羟基丁酸酯(PHB)、磷酸酯聚胺、聚氨酯、聚对二甲苯C、角蛋白、碳纳米管、聚酐、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙二醇、透明质酸、葡聚糖、胶原、壳多糖、壳聚糖、丝心蛋白、糖胺聚糖、纤维蛋白、纤维蛋白原等。

[0114] 所述粘附增强工具亦可从具有固有粘附性质的纳米纤维或微纤维制备,在培养完成之后但最终包装之前(即在液体生长培养基去除之后但单元装运之前),将所述纳米纤维或微纤维直接电纺至自组装构建物表面。所述电纺的纳米纤维或微纤维可为但不限于胶原、乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚己酸内酯(PCL)、聚乙醇酸交酯(PGA)、聚乳酸(PLA)及其组合。

[0115] e. 网状生物工程化构建物

亦可在给需要伤口护理的受试者移植之前,将生物工程化构建物网格化。当用于伤口愈合时,网格化改善对伤口床的适应并提供从移植物下方引流伤口渗出物的工具。术语“网格化”定义为一种机械方法,通过所述机械方法用裂缝使组织穿孔以形成网状排列。通过拉伸皮肤可展开网状构建物以使裂缝打开,然后施用于伤口床。展开的网状构建物给伤口区提供最大的覆盖度。或者,网状构建物可不经展开,仅作为排列有未展开裂缝的片层来施用。所述网状构建物可单独施用或与来自受试者身体另一区域的自身皮肤一起施用。构建物亦可具有穿孔或开窗和通过其他方式提供的孔。开窗可使用激光、打孔器、解剖刀、针或别针来手动实施。亦可提供带洞的生物工程化构建物,所述洞连通构建物的两个平面。洞为以规则或不规则模式引入的穿孔。亦可用解剖刀或针手动地对组织进行刻划或穿孔。

[0116] f. 最终灭菌的生物工程化构建物

可利用本领域已知的方法对构建物进行最终灭菌。根据美国专利号 5,460,962(其公开内容结合到本文中),用于灭菌的优选方法通过使所述构建物与用足量 10 N 氢氧化钠(NaOH)中和的无菌 0.1% 过乙酸(PA)处理液接触来进行。在振荡器平台上于容器(例如 1 L Nalge 容器)中进行 16-20 小时(例如 18 小时)净化。然后可通过使其与 3 体积无菌水接触来漂洗构建物,每次漂洗 10 分钟。

[0117] 可通过 γ 辐照对构建物进行灭菌。可将构建物包装在由适于 γ 辐照的材料制成的容器中并使用真空密封器密封,将所述容器依次置于密封袋中进行 15.0-40.0 kGy 的 γ 辐照。 γ 辐照显著但不会不利地降低对构建物降解的易感性、杨氏模量和收缩温度。 γ 辐照之后的机械性质仍足以用于一系列应用,并且 γ 辐照为灭菌的优选方法,因为其广泛用

于可植入医疗装置领域。

[0118] V. 治疗方法和医学用途

可将存在或不存在细胞的生物工程化构建物递送给受试者,例如治疗损伤的或患病的器官或组织、修复器官或组织和 / 或恢复其预期的功能性。本发明的生物工程化构建物具有以下性质,当以治疗上有效量植入受试者时,其诱导部位适当的组织修复和再生。治疗上有效量的构建物可以一次或多次给予或施用提供给受试者。由于间充质祖细胞的分化潜能,包含这些多能细胞群将改善骨、软骨、腱、韧带、肌肉和皮肤的愈合速率和愈合质量。当在对植入部位而言适当的情况下邻接待治疗的组织或器官植入或者与待治疗的组织或器官接触植入时,所述生物工程化构建物为血管发生的、抗炎的、成骨的、脂肪形成的或纤维发生的或其组合。

[0119] 本发明的生物工程化构建物具有血管发生性质,意味着其诱导新血管生长,这对于伤口愈合和皮肤伤口肉芽组织形成以及所述生物工程化构建物的其他外科应用而言为重要的。通过例如标准组织学技术(例如通过 α SMA 染色)或本文公开的其他测定法来检测血管发生。

[0120] 本发明的生物工程化构建物在植入时具有抗炎性质,意味着宿主炎性细胞浸润被降到最低,相反地使得宿主细胞迁移进入植入的生物工程化构建物以生物重建所述构建物并修复宿主组织。宿主细胞自宿主组织迁移进入植入的生物工程化构建物将作为再生愈合反应的部分。组织学技术可用来确定炎性细胞浸润和宿主细胞迁移的程度。本发明的生物工程化构建物还具有成骨性质,意味着在治疗部位将发生新骨形成。骨发生通过新结缔组织和骨化组织检测、更高细胞活性检测和新形成组织的更新来测定。标准组织学技术和其他技术可用于测定治疗部位的细胞效应以及骨密度和骨表面积。所述生物工程化构建物可为脂肪形成的,其在植入治疗部位时形成新脂肪组织。在植入治疗部位时可实现生物工程化构建物的纤维发生性质。本发明的生物工程化构建物可用于多种人和非人(即兽医)的治疗应用。

[0121] 本发明包含用于治疗需要伤口愈合的受试者的医学用途和方法,其利用本发明的生物工程化构建物治疗外科伤口;烧伤伤口;慢性伤口;糖尿病性下肢溃疡;静脉溃疡;压迫性溃疡(使用或不使用负压伤口疗法);动脉溃疡;隧道伤,例如从慢性伤口腔穿出的隧道伤;窦(例如藏毛的手术后裂开)和瘘(例如肛门的、肠皮肤的、膀胱阴道的、口窦的、支气管胸膜的瘘)。

[0122] 用于治疗需要治疗的受试者的其他医学用途和方法包括心脏应用、针对口腔的硬组织和软组织的应用(例如,治疗退缩的牙龈组织、引导骨再生以修复骨缺损或衰退的骨、引导组织再生和修复口腔结缔组织)。

[0123] 使用所述生物工程化构建物的另外的医学用途和治疗方法包括美容应用,包括真皮软组织填充物(例如美容术的外形修整)、乳房再造应用(例如增大、提升和 / 或乳房固定术)和神经学应用,例如硬膜修复片或用于周围神经修复的移植物、用于神经束的包裹物或用于引导的神经再生的管。

[0124] 生物工程化构建物的另外用途包括但不限于施用至缝合线或开放性伤口以改善密封并增强某些手术操作的性能,在所述手术操作中,空气或液体的渗漏将有害于受试者健康且需要额外的矫正手术操作来防止并发症,例如感染、脓肿形成或内衄(例如胃旁路

术 ; 结肠造口术 ; 胃切除术以及大肠和小肠切除术 ; 血管移植术 ; 血管植入术 ; 冠状动脉旁路移植术 ; 腹壁成形术 ; 腹部外科手术 (例如剖腹术) ; 剖腹生产术 ; 气管造口术部位 ; 导管植入术部位 ; 心包、胸膜和硬膜创伤的封闭) ; 作为预防治疗施用以治愈或防止器官破裂 (例如易损的斑块稳定 ; 腹主动脉 / 动脉瘤破裂 ; 胃或小肠溃疡穿孔 ; 克罗恩病 ; 炎性肠病) ; 为于细胞生长修复而需要填充的“洞” (例如尿失禁 ; 鼻或隔膜修复 ; 肛瘘 ; 造口术 ; 肌肉撕裂 ; 软骨撕裂 ; 关节涂覆材料 ; 软组织和肌壁疝修复) 。

[0125] 生物工程化构建物的再另外的用途包括但不限于骨移植和修复 (例如哆开骨折 ; 骨切开术 ; 人造骨膜 ; 肢体的残肢覆盖和附肢截肢技术 ; 足和踝关节融合术) ; 心血管组织修复和再生 (心肌梗死后 ; 充血性心力衰竭) ; 心肌缺血 ; 中风 ; 外周动脉疾病 ; 神经病 ; 冠状动脉疾病) ; 神经修复应用 ; 肝再生应用 (纤维化 ; 急性、亚急性和慢性肝炎 ; 肝硬化 ; 爆发性肝功能衰竭 ; 叶移植后外表面的覆盖) ; 急性肾衰竭期间的肾再生应用 ; 外科伤口闭合 ; 腹部手术粘连预防 ; 心血管、涎腺导管或胆管支架覆盖。

[0126] 所述生物工程化构建物可通过使之与损伤的或患病的组织接触、通过填充组织间隙中的空隙或通过置于受试者组织不会或不再存在的地方来施用或植入治疗部位。生物工程化构建物的施用或植入可通过直接接触压至器官表面、经由沿器官圆周地环绕或使用外科粘合剂、缝线或 U 形钉附着于治疗部位来完成。所述生物工程化构建物亦可作为平整片层递送, 将其卷拢、揉紧或注入治疗部位。所述生物工程化构建物可在开放性手术操作期间在手术中递送至缺损、经皮递送至缺损或通过使构建物穿过插管来腹腔镜式递送至缺损。不论递送模式, 所述装置通过以相关生理浓度局部递送修复结构单元和细胞信号转导化合物来起到刺激再生性愈合过程的作用, 所述结构单元和化合物包括细胞连同其复杂配置的分泌的细胞因子、ECM 蛋白、糖胺聚糖、脂质、基质重组酶和胶原材料, 可将其重组以满足受伤器官的需要或起到局部募集宿主的内源再生细胞的作用。或者, 所述生物工程化构建物可并入遗传修饰的细胞, 所述细胞用于到将局部基于细胞的基因治疗递送至需要所述基因治疗的受试者的特定器官。所述构建物还可并入药物以充当用于小分子治疗药、生物治疗药或药物制剂的药物递送载体, 用于内部、局部、持续、缓释递送治疗药至需要所述治疗药的受试者。

[0127] 提供以下实施例以更好地说明本发明的实践, 并且不应以任何限制本发明范围的方式解释所述实施例。本领域技术人员应认识的是, 可对本文所述的方法进行各种修改, 而不背离本发明的精神和范围。

实施例

[0128] 实施例 1 : 通过间充质干细胞 (MSC) 产生的生物工程化构建物

使用人脐带血管周细胞 (HUCPVC) 举例说明生物工程化构建物的产生, 所述生物工程化构建物包含在产生胞外基质层的条件下生长的间充质干细胞, 所述胞外基质层通过间充质干细胞合成和装配。特别地, 技术人员此前未能确定允许 MSC 合成和装配胞外基质组分至任何可察觉厚度的预备条件。在接种 HUCPVC 之前, 用约 5 ug/cm^2 人血浆衍生的纤连蛋白包被培养插入物。通过最初接种 3×10^6 个 HUCPVC/24 mm 插入物来产生所述生物工程化构建物。在插入物中带有多孔膜的培养插入物上接种细胞后, 在下列化学上确定的培养基中将所述细胞维持培养 18 天, 在第 5、8、12 和 15 天更换新鲜培养基 :

组分	浓度 (1L 体积)
DMEM	96.0%(960mL/1L)
L- 谷氨酰胺	1060mg/L
皮质醇	0.4mg/L
亚硒酸	6.78 μ g/L
ITT (2.5mg/mL 胰岛素 +2.5mg/mL 转铁蛋白 +6.74ng/mL 三碘甲腺原氨酸)	2mL
EOP ((3.103g/L 单乙醇胺 +7.06g/L α - 磷酸乙醇胺)	2mL
EGF	10.0 μ g/L
抗坏血酸镁	50mg/L
L- 脯氨酸	213.6mg/L
甘氨酸	101.4mg/L
长 TGF α (NovozymesA/S)	200ng/mL
前列腺素 2	0.038 μ g/mL

所得生物工程化构建物产生至少 30 微米厚的胞外基质。进行胞外基质形成的时程分析,使 MSC 衍生的生物工程化构建物厚度与培养时长相关联。图 1A 和 1B 证实,通过 12 天培养可获得生物工程化构建物厚度的最大增加。

[0129] 为了进一步确定促进通过间充质干细胞的有效胞外基质合成和装配的因子,对 TGF- α 和前列腺素 2 的作用进行评价。图 2 显示在培养 3×10^6 个 HUCPVC/24 mm 插入物 18 天后,渐增的生物工程化构建物厚度与培养基中增加的 TGF- α 浓度之间的函数关系。图 3 显示在培养 3×10^6 个 HUCPVC/24 mm 插入物 18 天后,渐减的生物工程化构建物厚度与培养基中增加的前列腺素 2 浓度之间的函数关系。因此,可基于培养基组分来调节通过间充质干细胞合成和装配的胞外基质的量,具体而言,可获得所得生物工程化构建物的可察觉厚度。此外,培养基补充可与增加的接种密度(例如包含 3×10^6 个- 10×10^6 个或更多细胞/24 mm 插入物的超汇合密度)协同,以在 MSC 衍生的生物工程化构建物(包括来源于 HUCPVC、骨髓衍生的 MSC 和前脂肪细胞的生物工程化构建物)中产生甚至更厚的胞外基质(图 4)。在具体的实施方案中,使用 30×10^6 个细胞/75 mm 插入物(其等同于 9.6×10^6 个细胞/24 mm 插入物)进行超汇合细胞接种。

[0130] 实施例 2:通过间充质干细胞(MSC)产生的生物工程化构建物的生物物理学性质

除生成可察觉量的通过间充质干细胞合成和装配的胞外基质以产生具有显著厚度的生物工程化构建物之外,这类生物工程化构建物还具有另外的生物物理学性质,其将它们与通过其他细胞类型形成的胞外基质区分。

[0131] 依照实施例 1 限定的方法和培养基以超汇合接种并培养 18 天的 MSC 衍生的生物工程化构建物,在胶原排列和总体基质形态上显示出与类似培养的 HDF 衍生生物工程化构建物(除使用 20 ng/mL TGF- α 之外)的显著差别。具体而言,胞外基质含有较不密集的孔且含有胶原束的聚集物(图 5A-5B)。因此,MSC 衍生的生物工程化构建物具有可表示为面积百分比的孔隙率,其通过组织切片中的孔相对于组织切片的总面积来表示。这类多孔胞外基质对于许多伤口愈合适应症而言为合乎需要的,因为一旦其被移植进入伤口,便允许宿主细胞和血管发生相关的分子更多地迁移和渗透。然而,这类多孔胞外基质还应维持机械完整性以允许医师以最小难度施用所述生物工程化构建物。因此,进行 MSC 衍生的生物工程化构建物和 HDF 衍生的生物工程化构建物的机械测试以评估数个机械性质。具体地, F_{max} (也称为最大载荷/最大力,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 N)为其在破裂之前可施加在材料上的最大载荷。极限拉伸强度(也称为 UTS,例如 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50

N/cm²) 为样品在破裂之前承受的最大压力载荷。弹性模量 (也称为伸长率, 例如 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 位移/初始长度) 为线性区内材料的刚度衡量, 其中如果去除载荷, 所述材料将恢复到起始状态。图 6A-6C 显示, 尽管具有更多孔的胞外基质, MSC 衍生的生物工程化构建物具有与 HDF 衍生的生物工程化构建物类似的机械完整性, HUCPVC 衍生的生物工程化构建物具有最类似的机械完整性和厚度概况。

[0132] 具有强机械性质的多孔胞外基质的生物工程化构建物, 可通过允许促进伤口愈合的生长因子在递送部位扩散来进一步用于治疗伤口。为了表征在存在于 MSC 衍生的生物工程化构建物和使用其他细胞类型产生的生物工程化构建物之间的胞外基质组分、粘附组分和/或生长因子方面的差别, 使用从超汇合接种并培养 18 天 (依照实施例 1 中限定的方法和培养基) 的 MSC 衍生生物工程化构建物中或超汇合接种并培养 18 天 (依照实施例 1 中限定的方法和培养基, 除了用 20 ng/mL 长 TGF- α 补充培养基) 的人真皮成纤维细胞 (HDF) 衍生生物工程化构建物中分离的 cDNA, 进行定量 PCR (qPCR) 测定。依照制造商方案, 实时 PCR 引物来自人 ECM 和粘附分子阵列 (SuperArray PAHS-013A) 以及人生长因子阵列 (SuperArray PAHS-041A)。图 7 显示 MSC 衍生的生物工程化构建物和 HDF 衍生的生物工程化构建物之间在生长因子方面的差别概述。例如, HUCPVC 衍生的生物工程化构建物中增加的胶原表达符合图 5 中观察到的胶原成束特征。在 HUCPVC 衍生的生物工程化构建物中亦观察到下列的表达增加: CXCL6, 趋化分子; KDR, VEGF 诱导的增殖、迁移、管状形态发生和内皮萌发的指示物; 和层粘连蛋白 $\alpha 5$ (LAMA5), 胚胎细胞组构的指示物。这些结果证实, 除利用 MSC 衍生的生物工程化构建物达到的胞外基质的可察觉厚度之外, 这类构建物亦表现出增量调节可用于治疗伤口环境例如增进愈合速率和血管发生的基因 (图 7)。

[0133] 此外, 依照制造商方案进行利用来自 Becton Dickinson 的流式细胞珠粒阵列系统 (CBA) 检测 IL-6、IL-8 和 VEGF 水平的基于蛋白质的测定, 其使用超汇合接种并培养 18 天 (依照实施例 1 中确定的方法和培养基) 的 MSC 衍生生物工程化构建物或超汇合接种并培养 18 天 (依照实施例 1 中确定的方法和培养基, 除了用 20 ng/mL 长 TGF- α 补充培养基) 的人真皮成纤维细胞 (HDF) 衍生生物工程化构建物进行。图 8A-8C 显示通过 MSC 衍生的生物工程化构建物和 HDF 衍生的生物工程化构建物产生的条件培养基内 IL-6、IL-8 和 VEGF 水平的时程比较。MSC 衍生的生物工程化构建物中的 IL-6 表达在培养时程的早期达到峰值, 并且在培养 HUCPVC 衍生的生物工程化构建物第 5 天, IL-6 表达超过 HDF 衍生的生物工程化构建物 IL-6 表达的 9 倍 (图 8A)。除了其在免疫应答中的作用之外, IL-6 亦由成骨细胞分泌以促进破骨细胞形成。在整个培养期间, 相对于 HDF-衍生的生物工程化构建物, MSC 衍生的生物工程化构建物中的 IL-8 表达亦为显著过表达的 (图 8B)。除了其在免疫应答中的作用之外, IL-8 亦由上皮细胞分泌, 通过结合诸如 CXCR1 和 CXCR2 等受体而作为有效的血管发生因子。同样, VEGF 为另一种有效的血管发生因子, 并且在培养早期, 相对于 HDF 衍生的生物工程化构建物, 其在 MSC 衍生的生物工程化构建物中显著过表达 (图 8C)。认为培养基中可察觉 VEGF 水平的下降归因于通过 HUCPVC 和其他 MSC 的高水平 KDR 表达, 所述 KDR 为 VEGF 的受体且螯合所述生物工程化构建物内的分子, 由此妨碍培养基中的检测。此外, 相对于 HDF 衍生的生物工程化构建物, CSF-3 和玻连蛋白在 HUCPVC 衍生的生物工程化构建物中增量调节。对依照实施例 1 的方法 (即两种条件均 10x TGF- α) 培养 HDF 衍生生物工程化构建物和 MSC 衍生生物工程化构建物的条件培养基样品, 进一步进行 ELISA 测定, 以定

量 5 天和 18 天后乙酰透明质酸 (HA) 产生量。图 8D 显示, HDF 衍生生物工程化构建物的培养基中 HA 水平从第 5 天的 4,664 ng/mL 减少至第 18 天的 4,085 ng/mL, 而 HUCPVC 衍生生物工程化构建物的培养基中 HA 水平从第 5 天的 4,333 ng/mL 增加至第 18 天的 5,615 ng/mL。此外, MSC 衍生的生物工程化构建物显示出相对于 HDF 衍生的生物工程化构建物 38 倍的玻连蛋白、21 倍的 CSF-3、15 倍的 NCAM1 以及 4 倍的 CXCL1。

[0134] 最后, 依照实施例 1 中限定的方法和培养基以超汇合接种并培养 18 天的 MSC 衍生的生物工程化构建物, 相对于在同一条件下 (除了用 20 ng/mL 长 TGF α 补充培养基之外) 培养的 HDF 衍生的生物工程化构建物, 产生具有增加细胞迁移能力的组分的条件培养基 (图 9)。

[0135] 实施例 3: 通过间充质干细胞 (MSC) 产生的生物工程化构建物的多谱系潜能性质进行测定以确定分离自通过 MSC 产生的生物工程化构建物的细胞以及天然生物工程化构建物环境内的 MSC 的多谱系潜能性质。依照实施例 1 中限定的方法和培养基, 以超汇合接种 MSC 衍生的生物工程化构建物并培养 18 天。在第 18 天, 用胶原酶消化所述生物工程化构建物以确定细胞产率和细胞消化物用于多谱系潜能测定, 或者直接将其在诱导培养基中培养。对于各个诱导的细胞和生物工程化构建物组, 维持细胞和生物工程化构建物的无诱导 MSC 对照组, 其中使用以 10% 胎牛血清 (FBS) 补充的 α MEM 培养基替代诱导培养基。每 2-3 天进行培养基更换。此外, 对于各个诱导的细胞和生物工程化构建物组, 维持细胞和生物工程化构建物的 HDF 衍生对照组。

[0136] 对于成骨诱导测定, 直接在成骨诱导培养基中培养生物工程化构建物并且以 20,000 个细胞/cm² 将得自胶原酶消化的细胞接种到 12 孔板用于成骨诱导。在培养第 18 天将实施例 1 所示确定的培养基更换为以下成骨诱导培养基: 用 10⁻⁸ M 地塞米松 (DEX)、1M β -甘油磷酸酯 (BGP) 和 50 mg/mL 抗坏血酸 (AA) 补充的完全 DMEM 基础培养基。在使用分离自所述生物工程化构建物或培养细胞的 RNA 分析 Runx2 (在成骨细胞分化后期表达的转录因子)、ALP 和骨钙素 (osteocalcin, OC) 的基因表达之前, 进行数天成骨诱导培养。相对于无诱导的 MSC 衍生生物工程化构建物, 在诱导的 MSC 衍生生物工程化构建物中观察到 ALP 表达的 8 倍增加 (图 10A)。此外, 相对于未在成骨诱导培养基中诱导的分离的 MSC 衍生生物工程化构建物细胞, 在成骨诱导培养基中诱导的这类细胞中观察到 Runx2 表达的 11 倍增加 (图 10B)。因此, 可基于环境信号转导提示, 向成骨谱系诱导完整生物工程化构建物内的 MSC 或分离自这类构建物的 MSC。

[0137] 对于脂肪形成诱导测定, 直接在脂肪形成诱导培养基中培养生物工程化构建物并且以 20,000 个细胞/cm² 将得自胶原酶消化的细胞接种到 12 孔板用于脂肪形成诱导。在培养第 18 天将实施例 1 所示确定的培养基更换为以下脂肪形成诱导培养基: 用 10⁻⁸ M 地塞米松 (DEX)、10 mg/mL 胰岛素和 0.5 mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 补充的完全 DMEM 基础培养基。在使用标准油红-O 染色分析来自所述生物工程化构建物或培养细胞的中性甘油三酯和脂质之前, 进行数天成骨诱导培养。相对于未在脂肪形成诱导培养基中诱导的分离的 MSC 衍生生物工程化构建物细胞, 观察到仅在脂肪形成诱导培养基中诱导的这类细胞具有相当多的阳性染色细胞 (图 10C)。因此, 可基于环境信号转导提示, 向脂肪形成谱系诱导完整生物工程化构建物内的 MSC 或分离自这类构建物的 MSC。

[0138] 因此, 当以干细胞样潜能维持亚群时, 可基于环境信号转导提示, 向数种细胞谱系

诱导完整生物工程化构建物内的 MSC 和自其分离的 MSC。

[0139] 实施例 4 :通过间充质干细胞 (MSC) 产生的生物工程化构建物的体内血管形成性质

本研究的目的在于将通过实施例 1 的方法产生的生物工程化构建物移植到裸小鼠上,并分析在皮下植入时它们的体内应答。更具体地说,使用 α -平滑肌肌动蛋白 (α SMA) 染色来定性和定量分析小鼠中所述构建物内的血管形成。在 8 周大的雌性瑞士裸小鼠中以皮下植入模式移植单元。

[0140] 皮下植入各种生物工程化构建物 1 周后,将来自列于下表各组的 5 只动物处死:

组	时间点	总单元数/读数	单元数/组
A:100% MSC 衍生的生物工程化构建物	- 1 周	3 x 24 mm 用于组织学	5 片/组(30 单元)
B:50%混合的生物工程化构建物	- 4 周	3 x 24 mm 用于 qPCR (干细胞组)	
C:10%混合的生物工程化构建物		6 x 24 mm 用于 CFU-F 和 FC (消化后)	
D: (对照) 100% HDF 衍生的生物工程化构建物		10 x 14 mm 孔片用于移植(但是向上舍入为 3 片/组)	

移出植入区并加工用于组织学检测。具体而言,将来自各组 n=2 只动物的组织切片用 α SMA 染色。图 11A-11D 分别显示取自 100% HUCPVC 衍生的生物工程化构建物、50% HUCPVC-50% HDF 衍生的生物工程化构建物、10% HUCPVC-90% HDF 衍生的生物工程化构建物和 100% HDF 衍生的生物工程化构建物的 α SMA 染色切片的代表性切片。除 100% HDF 衍生的构建物以 20 ng/mL TGF- α 培养之外,所有生物工程化构建物如实施例 1 所述产生。与图 11B-11D 的构建物相比,图 11A 中的生物工程化构建物似乎在植入区内具有更显著数量的 α SMA 阳性染色。 α SMA 染色尤其与新形成的血管相关,其在图 11A 中 40x 放大率下清晰可见。 α SMA 的定量显示,100% HUCPVC 产生的生物工程化构建物相对于其他组在植入区内具有更多数量的血管(图 11D)。尽管不希望被理论所约束,但 HUCPVC 可分泌细胞因子/生长因子,例如上面实施例 2 和 3 中所述的细胞因子/生长因子,其以旁分泌模式起作用来募集随后形成新血管的小鼠内皮细胞。此外,通过 HUCPVC 产生的基质及其相关组织可提供更适于细胞募集和渗透进入植入区的临时基质,导致在 1 周见到相对于其他组更多的血管形成。此外,可进行标准血管发生测定以进一步证实 HUCPVC 衍生的生物工程化构建物促进血管发生的能力增加,例如测定构建物从内皮细胞形成和/或维持管状的能力(例如来自 Millipore 的血管发生管形成测定)以及血管发生生物标记的基因表达分析(例如来自 Q-Plex 的血管发生 ELISA 测定和来自 R&D Systems 的血管发生蛋白质组分析器阵列测定)。

[0141] 实施例 5 :控制生物工程化构建物的收缩

通过将人新生包皮成纤维细胞接种至带有血浆处理 (COOH) PES 膜 (包含 5 微米孔) 的 75 mm 膜插入物来产生生物工程化构建物。最初细胞接种密度为 3 千万个细胞/膜插入物。在化学上确定的培养基 (不含不确定的非人组分) 中悬浮细胞,将 20 ml 混悬液直接接种至插入物,并在培养容器中接入 110 ml 培养基以允许双向滋养细胞。培养基包含: DMEM 的基础 3:1 混合物、2mM L-谷氨酰胺 (Invitrogen Inc.)、4 mM GlutaMAX (Gibco BRL, grand Island, NY) 以及添加剂: 5 ng/ml 人重组表皮生长因子 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、 1×10^{-4} M 乙醇胺 (Fluka, Ronkonkoma, NY 目录号 02400 ACS 级)、1

$\times 10^{-4}$ M o-磷酰乙醇胺 (Sigma, St. Louis, MO)、5 ug/ml 转铁蛋白 (Sigma, St. Louis, MO)、20 pM 三碘甲腺原氨酸 (Sigma, St. Louis, MO) 和 6.78 ng/ml 硒 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、50 ng/ml L-抗坏血酸 (WAKO Chemicals USA, Inc.)、0.2 ug/ml L-脯氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、0.1 ug/ml 甘氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、20 ng/ml TGF- α (即 1x TGF- α) 和 10 nM PGE₂。在收获生物工程化构建物之前,以此方式培养细胞 18 天。在一些实施方案中,可优选 2x TGF- α 或更多。将若干生物工程化构建物立即进行福尔马林固定用于组织学分析,以防止自然收缩 (图 12),而使剩下的生物工程化构建物进行受控收缩,如下文另外描述。

[0142] 特别地,使用无菌镊子从 Transwell 膜分离所述生物工程化构建物,以使其漂浮在培养皿中。为了产生同时仍保留强机械性质的多孔生物工程化构建物,通过将漂浮的构建物返回培养箱并允许所述生物工程化构建物自然收缩两小时,来以受控的方式收缩所述生物工程化构建物。两小时后,去除培养基,在 RODI 水中漂洗并进行福尔马林固定用于组织学分析 (图 13)。相对于未经历受控收缩的生物工程化构建物 (图 13),经历受控收缩的生物工程化构建物 (图 12) 显示在平均生物工程化构建物厚度上增加至约 2 倍 (例如 400-800 μ m 平均厚度对比 200-300 μ m 平均厚度)。

[0143] 在另一个实施方案中,漂浮培养两小时后,将所述生物工程化构建物随后浸入 1 mM EDC 溶液于 4°C 过夜,然而可备选地在培养皿中将所述构建物浸入 0.2 mM EDC、0.5 mM EDC、5mM EDC 或 10 mM EDC,亦不会偏离本发明的范围。EDC 交联之后,将所述构建物用反渗透去离子 (RODI) 水漂洗三次、排干并平放。用 RODI 水漂洗之后,以 0.5°C / 分钟的速率从室温 (约 20°C) 冷却所述生物工程化构建物 2 小时,直至达到 -40°C 的最终冷冻温度。在生物工程化构建物达到 -40°C 的温度之后,将所述生物工程化构建物在 -40°C 退火至少 2 小时。然后使所有生物工程化构建物在冻干设备中经受低于 200 毫托的真空环境并于 0°C 处理 24 小时。要理解的是,冷冻循环可在能够适当地进行冻干的设备或在任何冰箱 (例如控速冰箱) 中进行。还要理解的是,可使所述生物工程化构建物经受 0 毫托 -350 毫托的真空环境,而不会偏离本发明的范围。在一个备选的实施方案中,允许所述构建物在 EDC 交联后风干 8 小时,而不经历冻干 (即冷冻干燥)。

[0144] 在另一个实施方案中,漂浮培养两小时后去除培养基,并且将所述生物工程化构建物在 MES 缓冲液中漂洗直至构建物不再带有粉红色。然后将所述构建物浸入反渗透去离子 (RODI) 水中约一小时,之后排干并平放。用 RODI 水漂洗之后,以 0.5°C / 分钟的速率从室温 (约 20°C) 冷却所述生物工程化构建物 2 小时,直至达到 -40°C 的最终冷冻温度。在生物工程化构建物达到 -40°C 的温度之后,将所述生物工程化构建物在 -40°C 退火 2 小时。然后使所有构建物于 0°C 在冻干设备中经受低于 200 毫托的真空环境达 24 小时。随后将所述生物工程化构建物置于 100°C 真空干燥箱中 24 小时以在生物工程化构建物中形成脱水加热交联 (DHT)。在一些实施方案中,在不存在交联步骤时可优选冻干法。

[0145] 实施例 6:生物工程化构建物具有体内成骨功能和屏障功能

将生物工程化构建物如利用实施例 5 的方法产生的生物工程化构建物 (即 EDC 交联的、DHT 交联的和未交联的生物工程化构建物,在本实施例中统称为“试验构建物”) 加上阴性对照 (无构建物) 和阳性对照 (Bioguide 的 25x25 mm 标准生物可吸收屏障膜,其包含来自 Osteohealth, One Luitpold Drive, P.O. Box 9001, Shirley, NY 11967 的猪 I 型和

III 型胶原膜), 植入 Gottingen 小型猪颌的四个分区 (右上颌、左上颌、右下颌和左下颌) 的每一个。

[0146] 具体地, 研究全程在单独的房间中于 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的温度共同圈养四只雄性成年小型猪。使每只猪麻醉 8 小时, 所有骨缺损均在所述 8 小时期间准备和治疗。用于施用各个构建物的手术操作花费约 2 小时。第二和第四前臼齿在以下操作后取出: 1) 翻开全厚度龈瓣, 2) 使用多刃牙钻分离根部, 和 3) 用 Orban 解剖刀切开牙周膜。在取出之前, 用球钻在多个点穿透围绕牙齿的牙槽骨口板并使用碳化合金裂钻通过连通球钻洞来将其切下。使用骨凿和骨剪以外科手术法去除口板, 以产生骨缺损 (每个 1.2 cm^2)。所有构建物均为 $25 \times 25 \text{ mm}$ 切片并置于随机选择的 4 个上颌部位和 4 个下颌部位, 以使缺损的近中、远端边和顶端边缘延伸 2-3 mm。使用结扎线将构建物边缘系在围绕的宿主齿龈软组织上。所有手术操作在无菌条件下进行并使用 LASC 兽医服务提供的全身麻醉和气管内插管。

[0147] 4、8 和 12 周后, 处死指定的动物, 连同块状切片中邻接的骨回收试验 / 对照部位并固定在 10% 福尔马林溶液中。使用脱钙剂对各组的一半块状切片进行脱钙。脱钙和脱水之后, 将所述块浸没在石蜡中, 随后切下 5 微米切片并用苏木精-伊红染色以用于光学显微镜检测和鉴定炎性浸润的细胞组成以及用于组织病理学和组织形态学检测。亦用马松三色 (masson's trichrome) 对切片进行染色以检测新胶原沉积和新骨形成。另一半块状切片在刮去覆盖的软组织之后固定在 4% 福尔马林溶液中, 在递升级别的乙醇中脱水, 并且包埋在甲基丙烯酸甲酯中以使用甲苯胺蓝进一步染色来评价新骨和胶原沉积。通过缺损治疗后的定量显微计算机断层扫描术 (显微 CT) 来检测牙槽骨结构和新形成组织组成。使用位于波士顿大学机械工程系整形外科和发育生物力学实验室的 Scanco 显微 CT 80 系统 (Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland) 进行显微 CT 扫描。临扫描前, 从储藏库中取出 4 只小型猪的颌并使其校准至室温。

[0148] 用试验构建物治疗的试验部位显示更高的细胞活性和新形成组织 (即结缔组织和骨样组织) 的更新。在第 8 周, 健康的结缔组织和高度组织的新形成的骨样组织填满缺损区, 且颊骨轮廓几乎完全重新形成。在第 12 周, 用试验构建物治疗的试验部位显示几乎完全愈合, 具有与旧骨良好连接的新骨形成, 同时一些切片显示持续的愈合, 在骨表面的一些破骨细胞表明骨更新。

[0149] 实施例 7: 控制生物工程化构建物的孔径

可工程改造本发明生物工程化构建物的胞外基质内的平均孔径, 以形成密集或多孔的胞外基质。与某种类型和 / 或某种程度的交联组合, 可选择和控制限定的平均孔径, 产生具有不同的体内存留比率和 / 或细胞渗透比率的构建物, 其范围从“可迅速生物重建的”到“可适度生物重建的”到“可长期生物重建的”生物工程化构建物, 用于针对治疗用途的定制适用性 (图 14A)。将依照实施例 5 的方法产生的 HDF 衍生的生物工程化构建物在培养 18 天后进行分析, 以确定孔径和分布特征。图 13 证实, 未经冻干的这类生物工程化构建物基本上不具有孔。然而, 依照实施例 5 的方法使生物工程化构建物进一步经历受控收缩、冻干以及不交联、与 EDC 交联或采用 DHT 方法交联。使用 Scandium® 图像分析程序 (Olympus) 的魔棒工具统计地分析代表性组织切片上的孔长度和面积。由于孔不是精确的圆, 所以假设测定的给定孔面积来自圆以反算孔径。使用每组两个组织学图像来产生测定结果。图 14B 显示, 以 $0.5^{\circ}\text{C} / \text{分钟}$ 的速率跳动到 -40°C 的最终冷冻温度, 得到 $15\text{--}20 \mu\text{m}$ 的平均孔径。此

外,图 14C 进一步证实,不论交联状态,平均孔径由最终冷冻温度决定。相比之下,图 14D 显示以 0.5℃/分钟的速率使所述生物工程化构建物跳动到 -10℃ 的最终冷冻温度(比 -40℃ 更高的冷冻温度),得到至少 50 μm (例如范围在 30 μm-100 μm) 的平均孔径。图 14E 进一步证实,平均孔径与受控收缩无关。特别地,依照实施例 5 的方法产生并且在受控收缩后仅经风干的 HDF 衍生的生物工程化构建物,产生具有非常小孔(如果有的话)的密集基质。相比之下,如图 14B 所示加工的生物工程化构建物产生 15-20 μm 的平均孔径。同样,依照实施例 1 的方法产生的 MSC 衍生的生物工程化构建物的平均孔径(图 14F)可在受控收缩、漂洗、从室温冻结至 -20℃ 并冻干后增加(图 14G)。

[0150] 实施例 8:控制生物工程化构建物厚度和 ECM 组成

除使用 20 ng/mL TGF-α 之外,依照实施例 1 的方法以超汇合(即 30 × 10⁶ 个细胞/75 mm 插入物)接种 HDF 并培养 18 天。亦在培养基中以 5 μg/mL 补充肝素。为了测试碱性成纤维细胞因子(bFGF;Peprotech Inc.)对所得生物工程化构建物的作用,在最初接种后或培养 5 天后在培养基中补充并维持 bFGF。图 15A 显示,用 20 ng/mL bFGF 补充所述化学上确定的培养基显著减少生物工程化构建物厚度,相对于对照,其在用镊子操作时更容易被撕裂。肝素补充对生物工程化构建物厚度无影响。使用 2 ng/mL bFGF 产生的生物工程化构建物具有类似于未处理对照的厚度。

[0151] 越薄的 bFGF 补充的生物工程化构建物表明胞外基质包含越少的基质蛋白、越少的糖胺聚糖或二者。图 15B 显示 bFGF 剂量响应分析的结果,其中胶原蓄积随 bFGF 补充的增加而减少。鉴于胶原群体在胞外基质产生期间序贯地形成(即可逆交联的酸溶性胶原,然后不可逆交联且必须通过用胃蛋白酶切断交联来分离的胃蛋白酶可溶胶原,然后高度交联且既非酸溶性也非胃蛋白酶可溶的 SDS 可溶胶原),使用标准技术从对照和 bFGF 补充的生物工程化构建物中提取这些胶原群体的每一个。bFGF 补充的生物工程化构建物中的总胶原蓄积低于对照,且在胃蛋白酶可溶胶原的蓄积上有特别显著的缺乏(图 15B)。单独的肝素不影响胶原蓄积。

[0152] 在图 15B 中分析的生物工程化构建物上,使用 Sircol 胶原测定法对酸溶性胶原量和胃蛋白可溶胶原量进行独立测定和定量。鉴于 SDS 可溶胶原不是三螺旋的,所述 Sircol 测定法不测定该类胶原。图 15C 显示酸溶性胶原和胃蛋白酶可溶胶原相对于总胶原的相对水平(黑色)和其他胶原的相对水平(灰色)。用 20 ng/mL 或 100 ng/mL bFGF 补充的生物工程化构建物中,酸溶性胶原和胃蛋白酶可溶胶原的组合量分别为对照量的 20% 和 35%。

[0153] 随后进行示差扫描量热法(DSC)以确定相对于对照在 bFGF 补充的生物工程化构建物中蛋白质交联的总数。相对于仅用肝素补充的对照,在接种时或培养 5 天后用 bFGF 补充的生物工程化构建物中的峰面积减少或为零,表明在 bFGF 补充的生物工程化构建物中交联更少。

[0154] 除了在胶原量上的变化,负责结合生长因子并帮助调节 ECM 水化的硫酸化糖胺聚糖(sGAG)以及透明质酸(HA),相对于对照在 bFGF 补充的生物工程化构建物中以更低水平蓄积(图 15D 和 15E)。组织学染色测定独立地证实,bFGF 补充的生物工程化构建物密度更小、含有更少 sGAG(Alcian 蓝染色)并含有更少弹性纤维(通过 Gieson 染色)。

[0155] 在胞外基质组成上的改变导致 bFGF 补充的生物工程化构建物在脱水时变成粉末,表明这类构建物可通过研磨容易地微粉化。使用 20 ng/mL 产生的生物工程化构建物在

控温冷冻干燥机中冻干时,在冻干期间破裂,但是片段仍保持与对照单元一样柔韧。然而,所述片段亦比对照单元更薄且明显更多孔。临冻干前,将 bFGF 补充的生物工程化构建物置于 -80°C 冰箱中 2 小时。要理解的是,可将所述 bFGF 补充的生物工程化构建物保持在温度范围从 -10°C 到 -80°C 的冰箱中达在 1 小时-3 天的任何时间,而不会偏离本发明的范围。或者,可将 bFGF 补充的生物工程化构建物从培养中取出并直接置于冻干机中。然后使所有 bFGF 补充的生物工程化构建物在冻干设备中经受低于 200 毫托的真空环境并于 0°C 处理 24 小时。要理解的是,可使所述生物工程化构建物经受 0 毫托-350 毫托的真空环境,而不会偏离本发明的范围。在另一个实施方案中,可使所述 bFGF 补充的生物工程化构建物在室温风干过夜来代替冻干机处理。

[0156] 所述风干的粉末或冻干的 bFGF 补充生物工程化构建物以及对照,通过在室温使用研钵和研杵研磨或使用组织研磨机(其中将所述构建物在液氮中保持冻结)研磨来微粉化。在观察流体稠度之前,将同样量的磨碎构建物在微量离心管中用磷酸缓冲盐溶液(PBS)再水化 10 分钟。再水化的 bFGF 补充构建物与对照样品相比明显粘度更小且更自由地漂浮。这意味着再水化的 bFGF 补充构建物穿过注射器针头的能力增强(即它们可穿过规格 23 和规格 27 针头,但不能穿过规格 30 针头,而对照不能穿过任何所述规格的注射器针头)。鉴于在 1000x 放大率下的扫描电子显微镜检查已确定磨碎的 bFGF 补充构建物中的微粒相对于对照在大小上相似,认为对照微粒的粘度阻碍它们穿过注射器针头。进一步认为,使用更精细的组织研磨机可获得更精细或更一致的粒径,使得再水化的 bFGF 补充构建物可穿过甚至更细规格的注射器针头。

[0157] 实施例 9:与生物工程化构建物一起使用的多孔蚕丝支架

基于多孔蚕丝的支架从家蚕(*Bombyx mori*)蚕茧的脱胶丝纤维制备。将丝纤维以 6-10% 重量的浓度溶于 9 M LiBr 溶液 6-10 小时,同时在室内条件下搅拌。使用纤维素透析膜将所述溶液对水透析 3 天,每 10 小时更换水。通过在纤维素透析膜中静置所述溶液来浓缩丝心蛋白水溶液。通过 20,000 rpm 离心 30 分钟去除不溶部分。蚕丝溶液的终浓度约为 7.5-8%。

[0158] 然后用蚕丝储藏液制备 6%-8% 浓度的蚕丝工作液。所述工作液用于制备多孔蚕丝支架。将所述工作液与具有不同体积比的 1-6% 乙醇溶液最初混合,以使最终蚕丝浓度范围在 3%-5%,乙醇最终浓度范围在 0.5%-2%。随后将混合物倒入皮氏培养皿并置于 -20°C 冰箱中至少 10 小时。10 小时过后,将所述蚕丝溶液置于室温并使其解冻,得到多孔蚕丝支架。随后将解冻的蚕丝支架在 RODI 水中漂洗 3 天以去除溶剂残留。漂洗之后,可从所述支架的表面去除顶端薄层。可通过高压灭菌最终支架、或使用与无菌过滤的乙醇溶液混合的高压灭菌的蚕丝溶液、或使用与无菌过滤的乙醇溶液混合的无菌过滤的蚕丝溶液,对蚕丝支架灭菌。

[0159] 为了增强体内血管形成,可将多孔蚕丝支架浸泡在蛋白质中,所述蛋白质例如血小板衍生的生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子/分散因子(HGF/SF)、胰岛素样生长因子(IGF)、血管内皮生长因子(VEGF)和其他种类的促血管生成因子。在一方面,将 50 微克重组人 PDGF-BB 粉在 0.5 ml 4mM HCl 中复溶,然后加入另外的 0.5 ml 磷酸缓冲盐溶液(PBS)。在植入裸小鼠和正常小鼠的全厚度伤口之前,使用所得 1 mL 溶液浸泡 6x6 mm 蚕丝支架。此外,将 50 微克重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在

1 mL PBS 中复溶。在植入裸小鼠和正常小鼠的全厚度伤口之前,将 6x6 mm 多孔蚕丝支架在 1 mL bFGF 溶液中浸泡 5 分钟。同样,将 50 微克重组人 PDGF-BB 在 0.5 mL 4mM HCL 中复溶并随后与 0.5 mL PBS 复溶的重组人 bFGF 混合。在植入裸小鼠和正常小鼠上的全厚度伤口之前,将多孔蚕丝支架浸泡在所得 1 mL 溶液中 5 分钟。此外,可在化学上确定的培养基中将蚕丝支架与细胞一起培养,所述培养基包含第 5 天用 25 ng/ml PDGF、第 10 天用 25 ng/ml bFGF 和第 15 天用 25 ng/ml 肝细胞生长因子 (HGF) 的补充。或者,所述化学上确定的培养基包含第 5 天用 25 ng/ml bFGF、第 10 天用 25 ng/ml PDGF 和第 15 天用 25 ng/ml bFGF 或第 5 天用 25 ng/ml pDGF、第 10 天用 25 ng/ml bFGF 和第 15 天用 25 ng/ml HGF 的补充。同样,也可将实施例 10 的第 11 天施用给生物工程化构建物的条件培养基浓缩(例如 100 倍),以及可将蚕丝支架浸泡在所述条件培养基中。

[0160] 在一个实施方案中,将人真皮成纤维细胞接种至多孔蚕丝支架。具体地,以约 30×10^6 最初接种人真皮成纤维细胞并在化学上确定的培养基中培养 11 天。或者,要理解的是,可以约 5×10^6 的最初接种密度将 HDF 接种到蚕丝支架上。所述化学上确定的培养基包含: DMEM 与 Hams F-12 培养基的基础 3:1 混合物 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD)、4 mM GlutaMAX (Gibco BRL, grand Island, NY) 以及添加剂: 5 ng/ml 人重组表皮生长因子 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、 1×10^{-4} M 乙醇胺 (Fluka, Ronkonkoma, NY 目录号 02400 ACS 级)、 1×10^{-4} M o-磷酸乙醇胺 (Sigma, St. Louis, MO)、5 ug/ml 转铁蛋白 (Sigma, St. Louis, MO)、13.5 pg/mL 三碘甲腺原氨酸 (Sigma, St. Louis, MO) 和 6.78 ng/ml 硒 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、50 ng/ml L-抗坏血酸 (WAKO Chemicals USA, Inc.)、0.2 ug/ml L-脯氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、0.1 ug/ml 甘氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、20 ng/ml TGF- α 和 10 nM PGE₂。如在图 16 中可见,人真皮成纤维细胞能够穿过蚕丝支架迁移并均匀地排布在蚕丝片层各处。

[0161] 可进行若干修改以将所需特征工程改造至所得的多孔蚕丝支架上培养的生物工程化构建物中。

[0162] 在另一个实施方案中,通过用 WFI 水漂洗所述包含培养的 HDF 的蚕丝支架,使具有培养的 HDF 的蚕丝支架失活。对于需要增加的血管发生反应的适应症,已显示具有 50-100 微米平均孔径、HDF 接种并产生 WFI 水失活的生物工程化构建物的蚕丝支架为有效的治疗。更具体地说,图 17(d) 在体外显示带有失活成纤维细胞的蚕丝支架上的染色人脐静脉内皮细胞。所述染色的内皮细胞在蚕丝支架上形成对齐的管,表明带有失活成纤维细胞的蚕丝支架允许有效的内皮细胞粘附和存留。

[0163] 在另一个实施方案中,将含有多孔蚕丝支架和失活 HDF 的生物工程化构建物随后与 EDC 交联,以制备具有增强的体内存留(例如在烧伤伤口床中)的生物工程化构建物。

[0164] 亦可用有用的分子浸透蚕丝支架。将蚕丝支架浸没在经预处理的化学上确定的培养基中以强化蚕丝支架,所述培养基(培养后)预先收集自内源产生的生物工程化组织构建物。更具体地说,在 0.4 微米多孔膜上培养约 3 千万个人真皮成纤维细胞并在化学上确定的培养基中培养 11 天。所述化学上确定的培养基包含: DMEM 与 Hams F-12 培养基的基础 3:1 混合物 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD)、4 mM GlutaMAX (Gibco BRL, grand Island, NY) 以及添加剂: 5 ng/ml 人重组表皮生长因子 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、 1×10^{-4} M 乙醇胺 (Fluka, Ronkonkoma, NY 目录号 02400 ACS 级)、1

$\times 10^{-4}$ M o- 磷酰乙醇胺 (Sigma, St. Louis, MO)、5 ug/ml 转铁蛋白 (Sigma, St. Louis, MO)、13.5 pM 三碘甲腺原氨酸 (Sigma, St. Louis, MO) 和 6.78 ng/ml 硒 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、50 ng/ml L- 抗坏血酸 (WAKO Chemicals USA, Inc.)、0.2 ug/ml L- 脯氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、0.1 ug/ml 甘氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、20 ng/ml TGF- α 和 10 nM PGE₂。培养 11 天后,收集条件培养基并将蚕丝支架浸泡在所述条件培养基中 12 小时。

[0165] 亦可将硅酮背衬施涂至蚕丝支架的一侧或两侧,在允许运输气体分子(例如氧气)时充当防止感染的屏障。例如,用硅酮涂层处理带有失活人真皮成纤维细胞的蚕丝支架。通过在硅酮聚合期间改变单体浓度与交联剂浓度的比率来使所述硅酮涂层最佳化。单体与交联剂的比率范围可在约 5:1- 约 20:1。对于湿蚕丝海绵,最佳的单体与交联剂比率约为 5:1。此外,随后产生的生物工程化构建物本身可被硅酮背衬包被。

[0166] 上皮细胞迁移的增强可通过将所述蚕丝支架浸浴在磷酸缓冲盐溶液和层粘连蛋白 5 的溶液中约 1 小时来实现。根据蚕丝支架的孔隙率概况,可将所述支架浸没在层粘连蛋白 5 溶液中直至 4 小时。带有缀合的层粘连蛋白 5 的蚕丝支架可在体内用于增强上皮细胞迁移。

[0167] 实施例 10 :HDF 和 MSC 的分层构建物

将人新生包皮成纤维细胞(来自 Organogenesis, Inc. Canton, MA)以 5×10^5 个细胞/162cm² 接种于组织培养处理瓶(Costar Corp., Cambridge, MA, 目录号 3150)并在培养基中生长。生长培养基由以下组成:用 10% 新生小牛血清(NBCS)(HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah)和 4 mM L- 谷氨酰胺(BioWhittaker, Walkersville, MD)补充的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM)(高糖配方,无 L- 谷氨酰胺, BioWhittaker, Walkersville, MD)。在培养箱中于 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、10 $\pm$ 1% CO₂ 的气氛下维持所述细胞。每 2-3 天将培养基更换成新鲜培养基。培养 8 天后,细胞已生长至汇合,即细胞沿组织培养瓶的底部形成紧密的单细胞层,从培养瓶中吸出培养基。将无菌过滤的磷酸缓冲盐溶液加入到各个培养瓶的底部以漂洗所述单细胞层,然后从烧瓶中吸出。通过向各个烧瓶中加入 5ml 胰蛋白酶- 乙二胺四乙酸谷氨酰胺(BioWhittaker, Walkersville, MD)并轻轻摇动以确保完全覆盖所述单细胞层,使细胞从烧瓶释放。将培养物放回培养箱。一旦细胞释放,立即向各个烧瓶中加入 5ml SBTI(大豆胰蛋白酶抑制剂)并与混悬液混合以终止胰蛋白酶- 乙二胺四乙酸的作用。将细胞混悬液从烧瓶中移出并均分入无菌圆锥形离心管中。通过以大约 800-1000 x g 离心 5 分钟收集细胞。

[0168] 用新鲜培养基将细胞重悬至浓度为 3.0×10^6 个细胞/ml,并以 1.0×10^6 个细胞/ 插入物的密度接种于在六孔板中的 0.4 微米孔径、24 mm 直径的组织培养处理插入物(TRANSWELL[®], Corning Costar)上。要理解的是,如果要使用 75 mm 插入物,则应采用 10×10^6 个细胞的细胞接种密度。如果使用 24 mm 直径插入物,则应采用约 1×10^6 个细胞/24 mm 插入物。要理解的是,加入混悬液中 HUCPVC 的量为成纤维细胞量的百分数。例如,要制备包含 50% HUCPVC 的分层 24 mm 构建物,在预先接种于多孔膜上的 1.0×10^6 个人新生包皮成纤维细胞上,接种 5×10^5 HUCPVC。将成纤维细胞和 HUCPVC 二者浸没于 3 ml 基质产生培养基中,所述培养基包含:

组分	浓度
----	----

DMEM	96.0%
L-谷氨酰胺	1060mg/L
皮质醇	0.4mg/L
亚硒酸	6.78 μ g/L
乙醇胺	0.1mM
o-磷酸乙醇胺	14.0Mg/L
EGF	10.0 μ g/L
抗坏血酸镁	50mg/L
L-脯氨酸	213.6mg/L
甘氨酸	101.4mg/L
长 TGF α	10.0 μ g/L

将所述细胞在培养箱中维持在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $10 \pm 1\%$ CO_2 的气氛下,并在基质产生培养基中培养 11 天,定期进行培养基更换(每 3-4 天)。

[0169] 将福尔马林固定的样品包埋在石蜡中并钻取 5 微米切片,然后依照本领域已知的程序用苏木精-伊红(H&E)染色。使用 H&E 染色的载玻片,利用装有 10mm/100 测微计分度线的 10X 目镜对 10 个随机挑选的显微镜视野进行厚度测定。

[0170] 实施例 11:通过混合 HDF 和 MSC 产生生物工程化构建物

具有成纤维细胞和 HUCPVC 产生的胞外基质层的构建物在完全化学上确定的培养基体系中形成。在 24 mm 培养插入物上带有 9×10^5 个间充质祖细胞的混合细胞群中,接种 1×10^5 个人新生真皮成纤维细胞。要理解的是,在本发明的范围内,成纤维细胞的最初接种密度范围可在约 1×10^5 -约 9×10^5 ,间充质祖细胞的最初接种密度范围亦可在约 1×10^5 -约 9×10^5 。在第 2 代获得 HUCPVC,并且在最初接种至培养插入物之前将其扩繁到第 7 代。要理解的是,只要保持了所述细胞的多能性,便可在任何其他传代数使用 HUCPVC。

[0171] 所述化学上确定的基质产生培养基包含:

组分	浓度
DMEM	96.0%
L-谷氨酰胺	1060mg/L
皮质醇	0.4mg/L
亚硒酸	6.78 μ g/L
乙醇胺	0.1mM
o-磷酸乙醇胺	14.0Mg/L
EGF	10.0 μ g/L
抗坏血酸镁	50mg/L
L-脯氨酸	213.6mg/L
甘氨酸	101.4mg/L
长 TGF α	10.0 μ g/L

将成纤维细胞和间充质祖细胞在所述基质产生培养基中培养 11 天,定期进行培养基更换(每 3-4 天),得到内源产生的胞外基质。

[0172] 实施例 12:在生物工程化构建物上产生表皮层

在实施例 1-8 的任一个中描述的生物工程化构建物上接种人表皮祖细胞(HEP;角质形成细胞)。在所述生物工程化构建物已培养约 11 天后接种 HEP。优选约 3.5×10^5 - 1.2×10^6 个细胞/构建物的接种密度,然而依照本发明亦考虑其他最初接种密度。在第 11 天,用培养基处理带有 HEP 的皮肤构建物,所述培养基大约包含:

组分	浓度	
DMEM:HAM's F-12 3:1	96.10%	
L-谷氨酰胺	1060 mg/L	
皮质醇	0.4 mg/L	
胰岛素	5.0mg/L	
转铁蛋白	5.0 mg/L	
三碘甲状腺原氨酸	13.5 ng/L	
乙醇胺	0.1 mM	
α-磷酸乙醇胺	14.0 Mg/L	
亚硒酸	6.78 μg/L	
腺嘌呤	24.4 mg/L	
抗坏血酸镁	50.0 mg/L	
黄体酮	0.63 μg/L	
EGF	10.0 μg/L	
长 TGFα	10.0 μg/L	
脂质浓缩液	花生四烯酸	0.004 mg/L
	胆固醇	0.220 mg/L
	DL-α-生育酚乙酸酯	0.140 mg/L
	亚油酸	0.020 mg/L
	亚麻酸	0.020 mg/L
	肉豆蔻酸	0.020 mg/L
	油酸	0.020 mg/L
	棕榈油酸	0.020 mg/L
	棕榈酸	0.020 mg/L
	Pluronic® F-68	200.0 mg/L
	硬脂酸	0.020 mg/L
	Tween® 80	4.4 mg/L

在第 13 天,通过使用分化培养基来诱导 HEP 的分化,所述培养基包含以下组分:

组分	浓度	
DMEM:HAM's F-12 3:1	96.3%	
L-谷氨酰胺	1060 mg/L	
皮质醇	0.40 mg/L	
胰岛素	5.0 mg/L	
转铁蛋白	5.0 mg/L	
三碘甲状腺原氨酸	13.5 ng/L	
亚硒酸	0.00678 mg/L	
乙醇胺	0.1 mM	
o-磷酸乙醇胺	14.0 Mg/L	
腺嘌呤	24.4 mg/L	
抗坏血酸镁	50.0 mg/L	
黄体酮	0.63 μg/L	
CaCl2	265 mg/L	
脂质浓缩液	花生四烯酸	0.004 mg/L
	胆固醇	0.220 mg/L
	DL-α-生育酚乙酸酯	0.140 mg/L
	亚油酸	0.020 mg/L
	亚麻酸	0.020 mg/L
	肉豆蔻酸	0.020 mg/L
	油酸	0.020 mg/L
	棕榈油酸	0.020 mg/L
	棕榈酸	0.020 mg/L
	Pluronic® F-68	200.0 mg/L
	硬脂酸	0.020 mg/L
	Tween® 80	4.4 mg/L

在第 15 天,改变培养基配方以诱导形成中的表皮层在培养基中角化,所述培养基大约包含:

组分	浓度																								
DMEM	48.0%																								
HAM's F-12	48.0%																								
L-谷氨酰胺	658 mg/L																								
皮质醇	0.4 mg/L																								
胰岛素	5.0 mg/L																								
转铁蛋白	5.0 mg/L																								
三碘甲状腺原氨酸	13.5 ng/L																								
乙醇胺	0.1 mM																								
o-磷酸乙醇胺	14.0 Mg/L																								
亚硒酸	6.78 µg/L																								
腺嘌呤	24.4 mg/L																								
抗坏血酸镁	50.0 mg/L																								
长 TGFα	10.0 µg/L																								
MEM 非必须氨基酸溶液	<table> <tr><td>L-丙氨酸</td><td>1.78 mg/L</td></tr> <tr><td>L-天冬酰胺</td><td>2.64 mg/L</td></tr> <tr><td>L-天冬氨酸</td><td>2.66 mg/L</td></tr> <tr><td>L-谷氨酸</td><td>2.94 mg/L</td></tr> <tr><td>甘氨酸</td><td>1.5 mg/L</td></tr> <tr><td>L-脯氨酸</td><td>2.3 mg/L</td></tr> <tr><td>L-丝氨酸</td><td>2.1 mg/L</td></tr> </table>	L-丙氨酸	1.78 mg/L	L-天冬酰胺	2.64 mg/L	L-天冬氨酸	2.66 mg/L	L-谷氨酸	2.94 mg/L	甘氨酸	1.5 mg/L	L-脯氨酸	2.3 mg/L	L-丝氨酸	2.1 mg/L										
L-丙氨酸	1.78 mg/L																								
L-天冬酰胺	2.64 mg/L																								
L-天冬氨酸	2.66 mg/L																								
L-谷氨酸	2.94 mg/L																								
甘氨酸	1.5 mg/L																								
L-脯氨酸	2.3 mg/L																								
L-丝氨酸	2.1 mg/L																								
MEM 维生素溶液	<table> <tr><td>NaCl</td><td>17 mg/L</td></tr> <tr><td>D-泛酸钙</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>氯化胆碱</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>叶酸</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>i-肌醇</td><td>0.4 mg/L</td></tr> <tr><td>烟酰胺</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>盐酸吡哆醛</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>核黄素</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>盐酸硫胺素</td><td>0.2 mg/L</td></tr> </table>	NaCl	17 mg/L	D-泛酸钙	0.2 mg/L	氯化胆碱	0.2 mg/L	叶酸	0.2 mg/L	i-肌醇	0.4 mg/L	烟酰胺	0.2 mg/L	盐酸吡哆醛	0.2 mg/L	核黄素	0.020 mg/L	盐酸硫胺素	0.2 mg/L						
NaCl	17 mg/L																								
D-泛酸钙	0.2 mg/L																								
氯化胆碱	0.2 mg/L																								
叶酸	0.2 mg/L																								
i-肌醇	0.4 mg/L																								
烟酰胺	0.2 mg/L																								
盐酸吡哆醛	0.2 mg/L																								
核黄素	0.020 mg/L																								
盐酸硫胺素	0.2 mg/L																								
脂质浓缩液	<table> <tr><td>花生四烯酸</td><td>0.004 mg/L</td></tr> <tr><td>胆固醇</td><td>0.220 mg/L</td></tr> <tr><td>DL-α-生育酚乙酸酯</td><td>0.140 mg/L</td></tr> <tr><td>亚油酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>亚麻酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>肉豆蔻酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>油酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>棕榈油酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>棕榈酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>Pluronic® F-68</td><td>200.0 mg/L</td></tr> <tr><td>硬脂酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>Tween® 80</td><td>4.4 mg/L</td></tr> </table>	花生四烯酸	0.004 mg/L	胆固醇	0.220 mg/L	DL-α-生育酚乙酸酯	0.140 mg/L	亚油酸	0.020 mg/L	亚麻酸	0.020 mg/L	肉豆蔻酸	0.020 mg/L	油酸	0.020 mg/L	棕榈油酸	0.020 mg/L	棕榈酸	0.020 mg/L	Pluronic® F-68	200.0 mg/L	硬脂酸	0.020 mg/L	Tween® 80	4.4 mg/L
花生四烯酸	0.004 mg/L																								
胆固醇	0.220 mg/L																								
DL-α-生育酚乙酸酯	0.140 mg/L																								
亚油酸	0.020 mg/L																								
亚麻酸	0.020 mg/L																								
肉豆蔻酸	0.020 mg/L																								
油酸	0.020 mg/L																								
棕榈油酸	0.020 mg/L																								
棕榈酸	0.020 mg/L																								
Pluronic® F-68	200.0 mg/L																								
硬脂酸	0.020 mg/L																								
Tween® 80	4.4 mg/L																								

每 2-3 天更换角化培养基。使生物工程化构建物在 22 天 -35 天内成熟并维持,并且供以维持培养基,每 2-3 天更换为包含以下的新鲜维持培养基:

组分	浓度																								
DMEM	48.0%																								
HAM's F-12	48.0%																								
L-谷氨酰胺	658 mg/L																								
皮质醇	0.4 mg/L																								
胰岛素	5.0 mg/L																								
转铁蛋白	5.0 mg/L																								
三碘甲状腺原氨酸	13.5 ng/L																								
乙醇胺	0.1 mM																								
α-磷酸乙醇胺	14.0 Mg/L																								
亚硒酸	6.78 μg/L																								
腺嘌呤	24.4 mg/L																								
长 TGFα	10.0 μg/L																								
MEM 非必须氨基酸溶液	<table> <tr><td>L-丙氨酸</td><td>1.78 mg/L</td></tr> <tr><td>L-天冬酰胺</td><td>2.64 mg/L</td></tr> <tr><td>L-天冬氨酸</td><td>2.66 mg/L</td></tr> <tr><td>L-谷氨酸</td><td>2.94 mg/L</td></tr> <tr><td>甘氨酸</td><td>1.5 mg/L</td></tr> <tr><td>L-脯氨酸</td><td>2.3 mg/L</td></tr> <tr><td>L-丝氨酸</td><td>2.1 mg/L</td></tr> </table>	L-丙氨酸	1.78 mg/L	L-天冬酰胺	2.64 mg/L	L-天冬氨酸	2.66 mg/L	L-谷氨酸	2.94 mg/L	甘氨酸	1.5 mg/L	L-脯氨酸	2.3 mg/L	L-丝氨酸	2.1 mg/L										
L-丙氨酸	1.78 mg/L																								
L-天冬酰胺	2.64 mg/L																								
L-天冬氨酸	2.66 mg/L																								
L-谷氨酸	2.94 mg/L																								
甘氨酸	1.5 mg/L																								
L-脯氨酸	2.3 mg/L																								
L-丝氨酸	2.1 mg/L																								
MEM 维生素溶液	<table> <tr><td>NaCl</td><td>17 mg/L</td></tr> <tr><td>D-泛酸钙</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>氯化胆碱</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>叶酸</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>i-肌醇</td><td>0.4 mg/L</td></tr> <tr><td>烟酰胺</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>盐酸吡哆醛</td><td>0.2 mg/L</td></tr> <tr><td>核黄素</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>盐酸硫胺素</td><td>0.2 mg/L</td></tr> </table>	NaCl	17 mg/L	D-泛酸钙	0.2 mg/L	氯化胆碱	0.2 mg/L	叶酸	0.2 mg/L	i-肌醇	0.4 mg/L	烟酰胺	0.2 mg/L	盐酸吡哆醛	0.2 mg/L	核黄素	0.020 mg/L	盐酸硫胺素	0.2 mg/L						
NaCl	17 mg/L																								
D-泛酸钙	0.2 mg/L																								
氯化胆碱	0.2 mg/L																								
叶酸	0.2 mg/L																								
i-肌醇	0.4 mg/L																								
烟酰胺	0.2 mg/L																								
盐酸吡哆醛	0.2 mg/L																								
核黄素	0.020 mg/L																								
盐酸硫胺素	0.2 mg/L																								
脂质浓缩液	<table> <tr><td>花生四烯酸</td><td>0.004 mg/L</td></tr> <tr><td>胆固醇</td><td>0.220 mg/L</td></tr> <tr><td>DL-α-生育酚乙酸酯</td><td>0.140 mg/L</td></tr> <tr><td>亚油酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>亚麻酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>肉豆蔻酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>油酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>棕榈油酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>棕榈酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>Pluronic® F-68</td><td>200.0 mg/L</td></tr> <tr><td>硬脂酸</td><td>0.020 mg/L</td></tr> <tr><td>Tween® 80</td><td>4.4 mg/L</td></tr> </table>	花生四烯酸	0.004 mg/L	胆固醇	0.220 mg/L	DL-α-生育酚乙酸酯	0.140 mg/L	亚油酸	0.020 mg/L	亚麻酸	0.020 mg/L	肉豆蔻酸	0.020 mg/L	油酸	0.020 mg/L	棕榈油酸	0.020 mg/L	棕榈酸	0.020 mg/L	Pluronic® F-68	200.0 mg/L	硬脂酸	0.020 mg/L	Tween® 80	4.4 mg/L
花生四烯酸	0.004 mg/L																								
胆固醇	0.220 mg/L																								
DL-α-生育酚乙酸酯	0.140 mg/L																								
亚油酸	0.020 mg/L																								
亚麻酸	0.020 mg/L																								
肉豆蔻酸	0.020 mg/L																								
油酸	0.020 mg/L																								
棕榈油酸	0.020 mg/L																								
棕榈酸	0.020 mg/L																								
Pluronic® F-68	200.0 mg/L																								
硬脂酸	0.020 mg/L																								
Tween® 80	4.4 mg/L																								

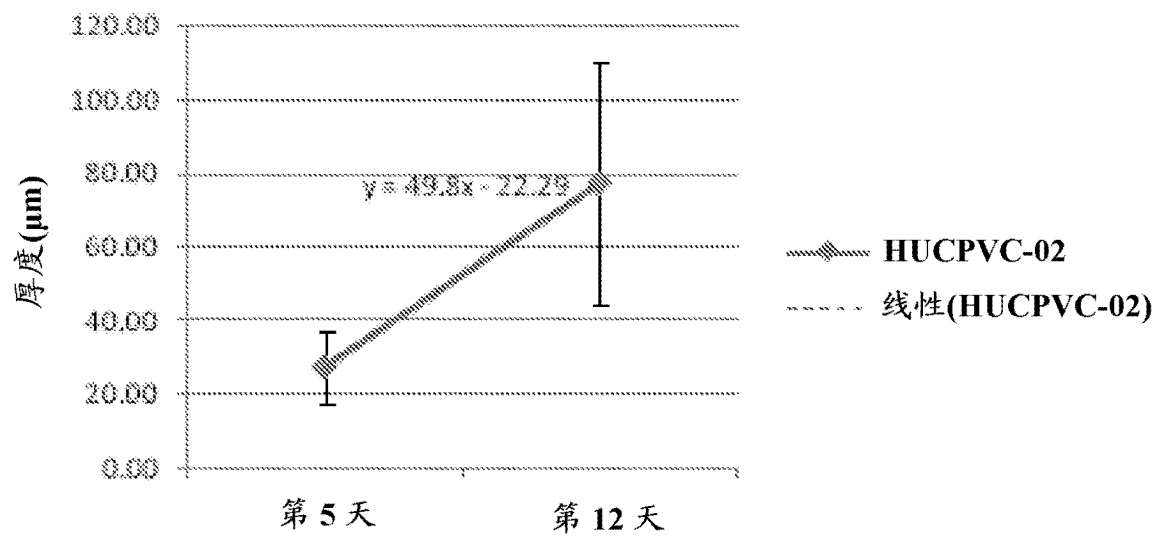
当生物工程化构建物完全形成时,培养的生物工程化构建物显示内源产生的胞外基质蛋白、成纤维细胞和 / 或间充质细胞的混合生物工程化层,带有排布在所述生物工程化构建物上的分化上皮层。

[0173] 实施例 13 :蚀刻生物工程化组织构建物以改善细胞渗透

可修饰生物工程化组织构建物,以增强内源产生的组织构建物上空的深层网络内的细胞粘附和细胞渗透。可通过在 0.4 微米多孔膜上最初接种约 3 千万个人真皮成纤维细胞并在化学上确定的培养基中培养 11 天,来产生这类内源产生的构建物。所述化学上确定的培养基包含 :DMEM 与 Hams F-12 培养基的基础 3:1 混合物 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD)、4 mM GlutaMAX (Gibco BRL, grand Island, NY) 以及添加剂 :5 ng/ml 人重组表皮生长因子 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、 1×10^{-4} M 乙醇胺

(Fluka, Ronkonkoma, NY 目录号 02400 ACS 级)、 1×10^{-4} M o- 磷酰乙醇胺 (Sigma, St. Louis, MO)、5 ug/ml 转铁蛋白 (Sigma, St. Louis, MO)、20 pM 三碘甲腺原氨酸 (Sigma, St. Louis, MO) 和 6.78 ng/ml 硒 (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI)、50 ng/ml L- 抗坏血酸 (WAKO Chemicals USA, Inc.)、0.2 ug/ml L- 脯氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、0.1 ug/ml 甘氨酸 (Sigma, St. Louis, MO)、20 ng/ml TGF- α 和 10 nM PGE₂。培养 11 天后,可对所述生物工程化组织构建物的表面进行蚀刻以去除细胞碎片。这可通过施涂 1% 醋酸溶液以从所述生物工程化构建物的上表面去除薄层胶原来完成。蚀刻可供改善的细胞渗透,其可有利于烧伤适应症。

A



B

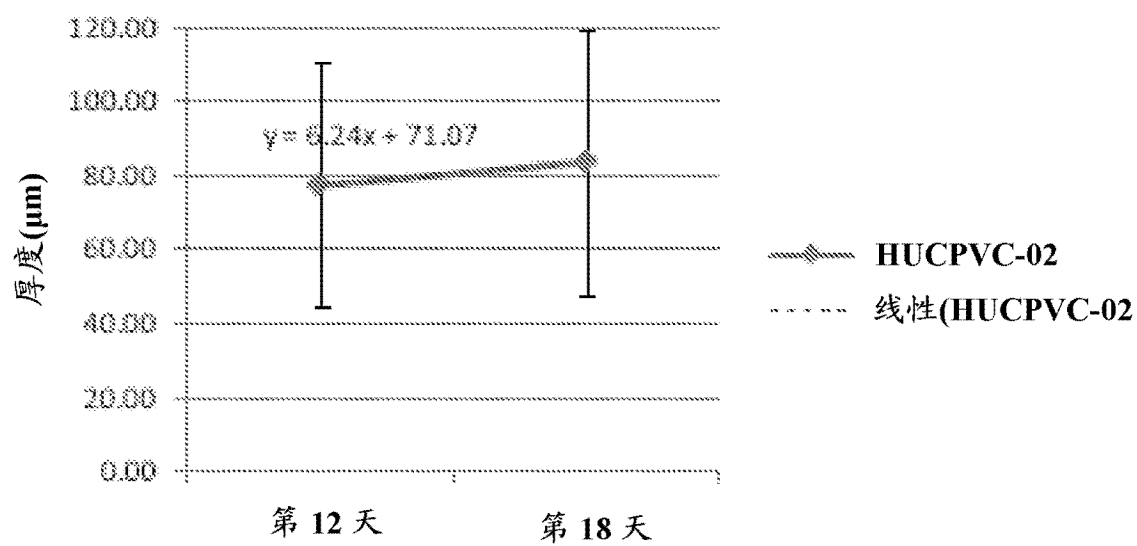


图 1

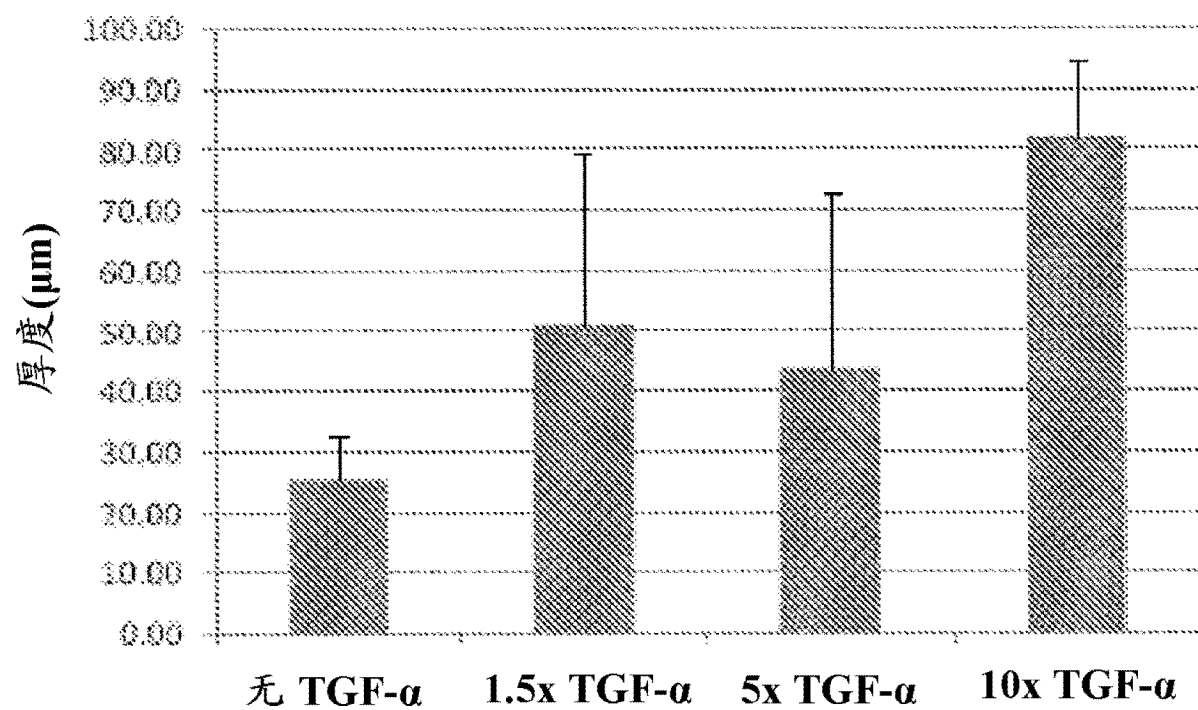


图 2

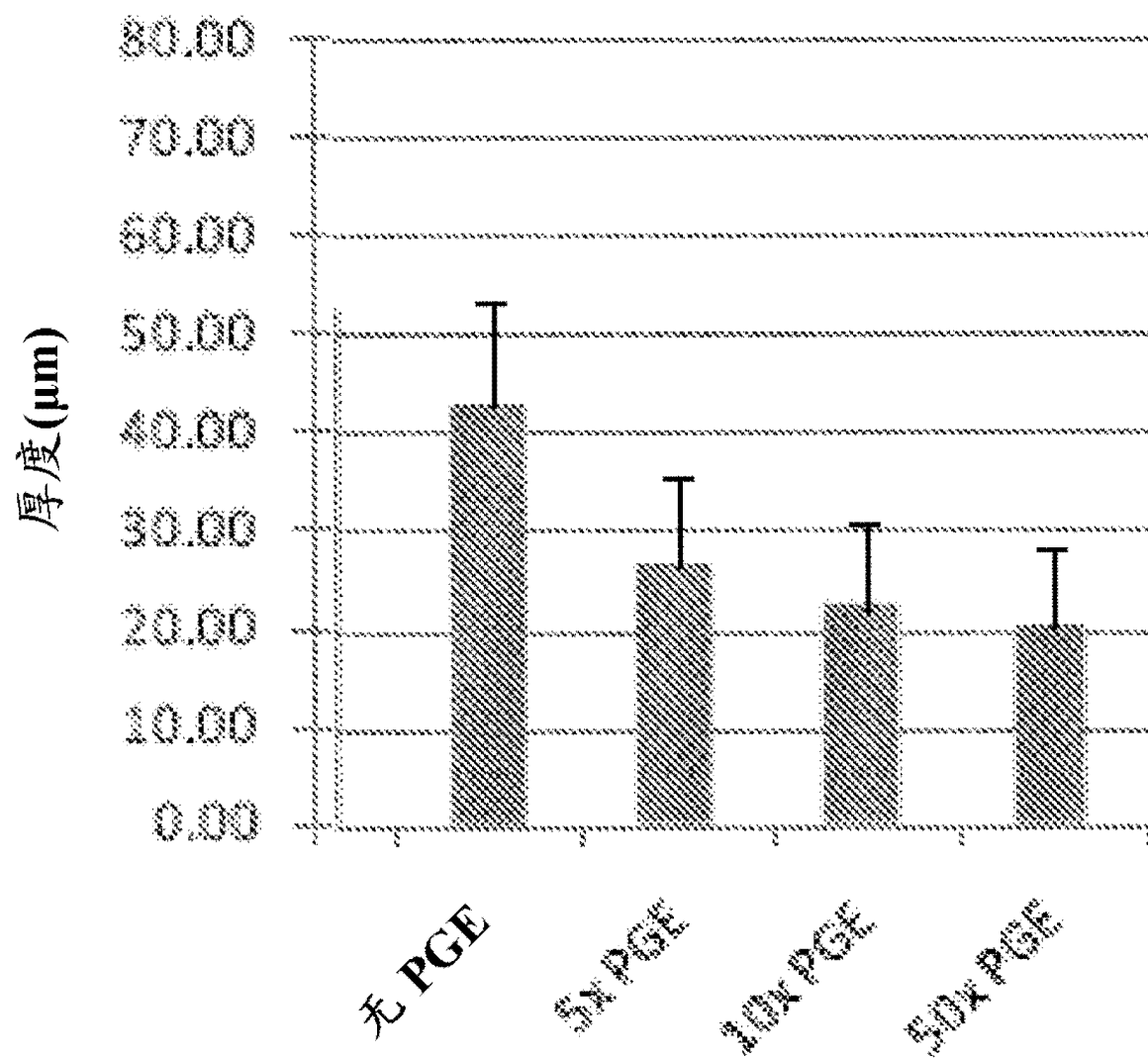


图 3

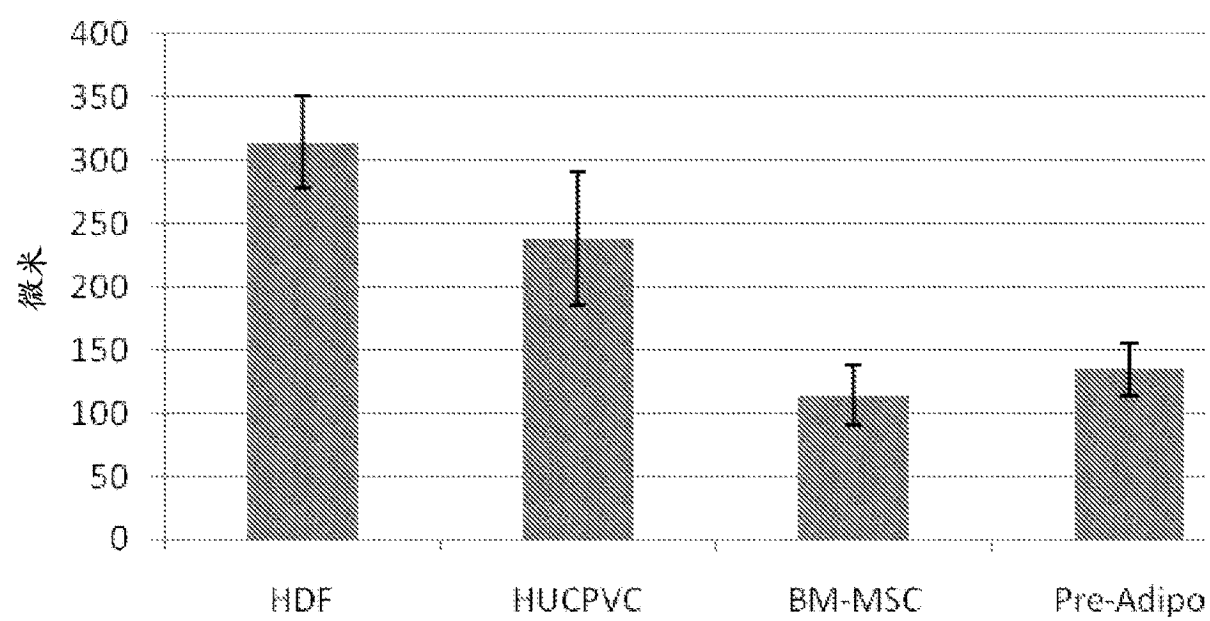


图 4

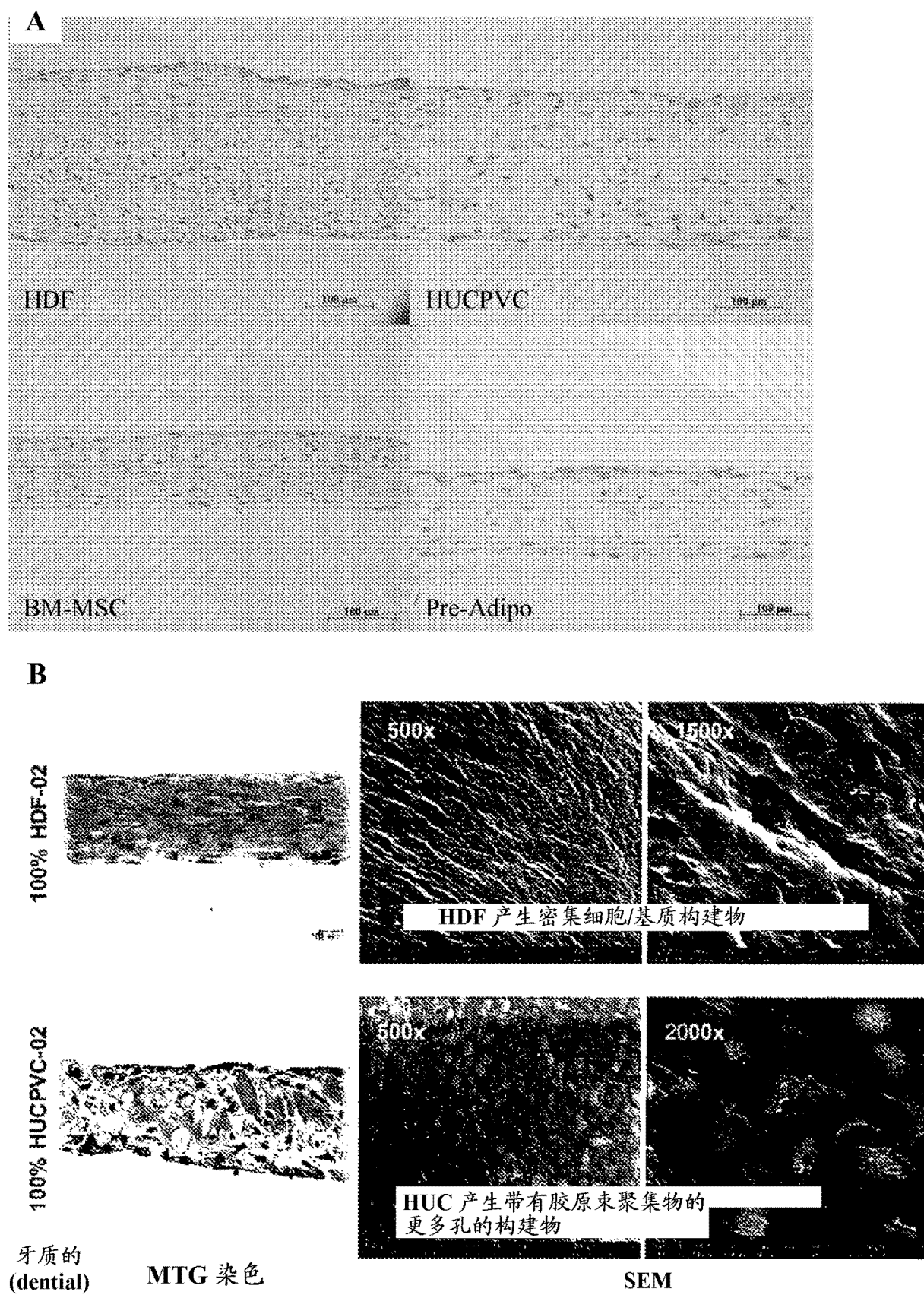
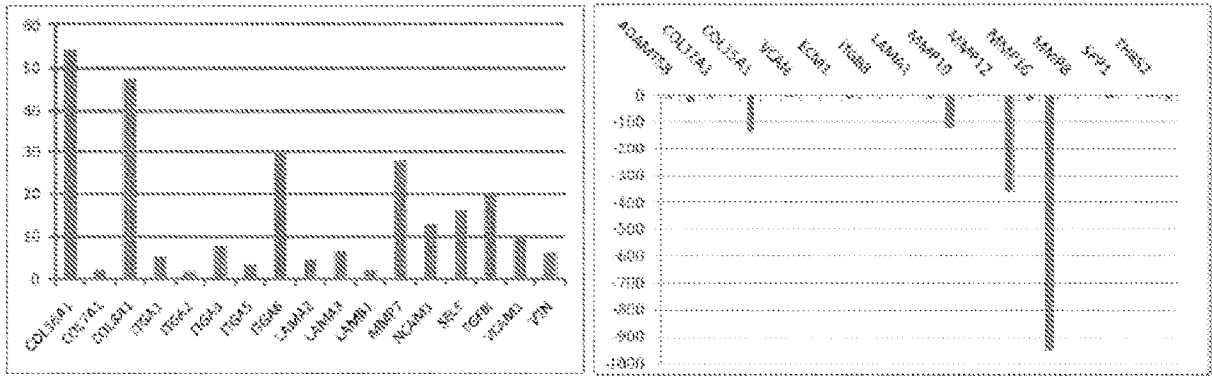


图 5

A



B

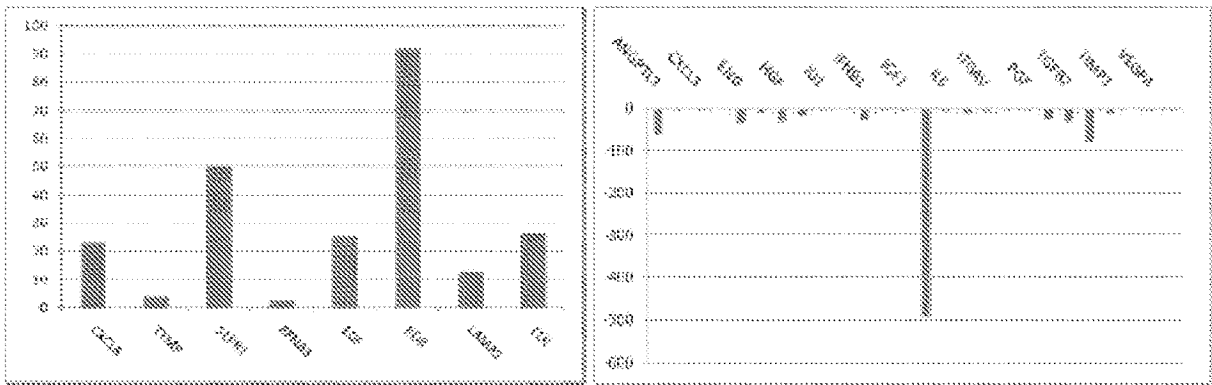
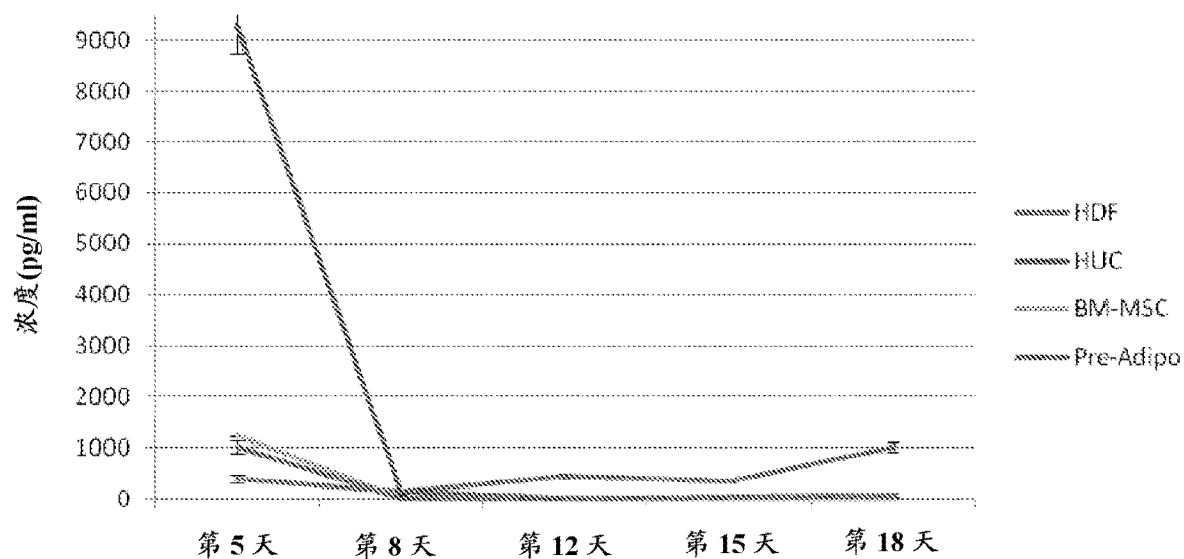


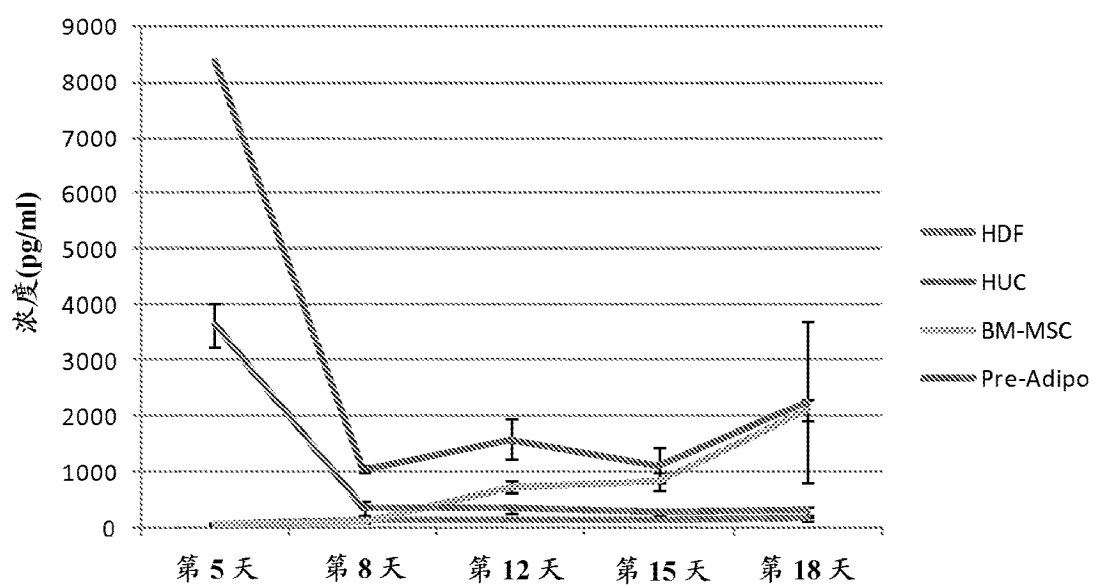
图 7

A

IL-6



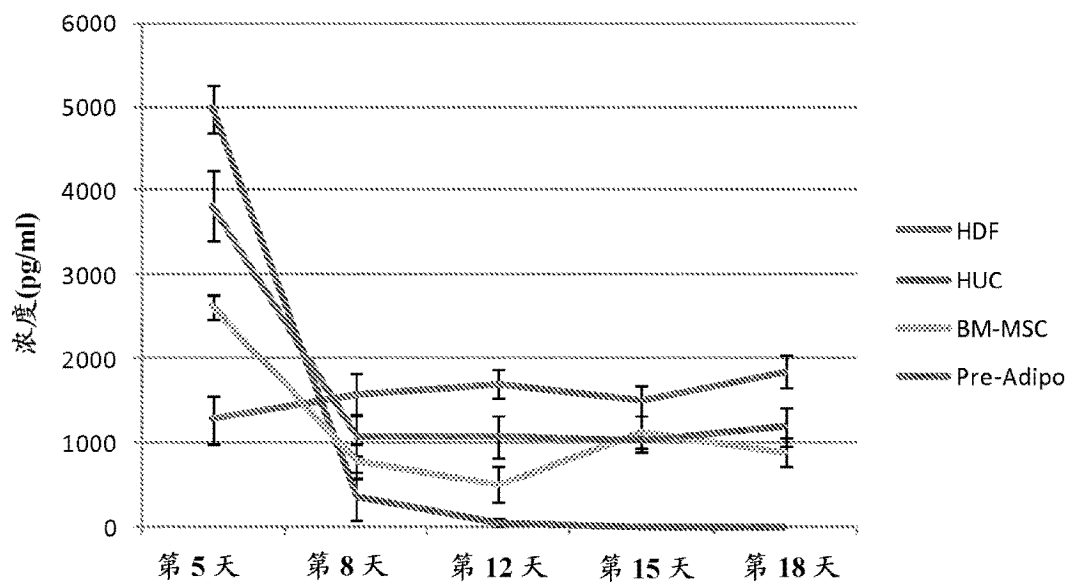
	第 5 天		第 8 天		第 12 天		第 15 天		第 18 天	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
HDF	394.69	74.94	134.88	49.71	437.94	55.66	353.41	46.26	1020.66	108.56
HUC	9288.76	553.83	152.19	22.60	28.61	7.49	9.57	4.07	12.60	8.82
BM-MSC	1237.30	16.69	13.11	1.49	6.30	1.82	6.73	0.90	6.05	0.38
PAD	1018.62	122.30	12.32	46.36	12.32	2.71	38.29	13.12	71.85	39.23

B**IL-8**

	第 5 天		第 8 天		第 12 天		第 15 天		第 18 天	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
HDF	85.83	24.03	167.11	32.95	165.10	38.47	154.34	14.84	181.16	33.92
HUC	8386.27	0.00	1059.77	72.15	1589.65	357.67	1130.56	311.80	2247.12	1449.47
BM- MSC	81.73	13.16	115.97	28.91	736.53	96.94	840.62	155.40	2123.91	193.11
Pre- Adipo	3643.28	397.89	359.34	128.21	359.34	74.60	276.39	51.02	311.37	71.15

C

VEGF



	第5天		第8天		第12天		第15天		第18天	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
HDF	1280.51	285.55	1588.32	234.22	1701.42	165.45	1507.86	184.49	1846.74	191.80
HUC	4978.54	278.26	367.37	283.38	47.33	54.40	9.26	13.10	2.45	1.80
BM-MSC	2616.98	135.61	784.14	201.44	508.44	214.53	1118.02	213.38	890.62	169.78
Pre-Adipo	3815.19	416.97	1211.30	243.71	1083.62	253.49	1040.02	101.40	1196.41	233.68

D

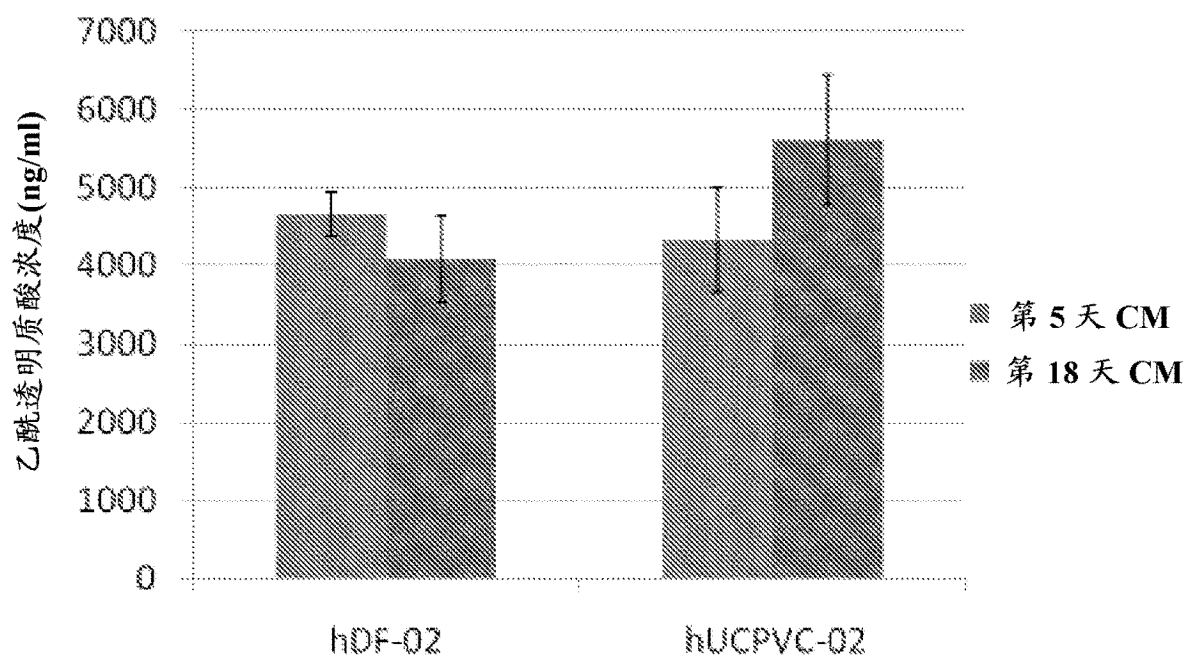


图 8

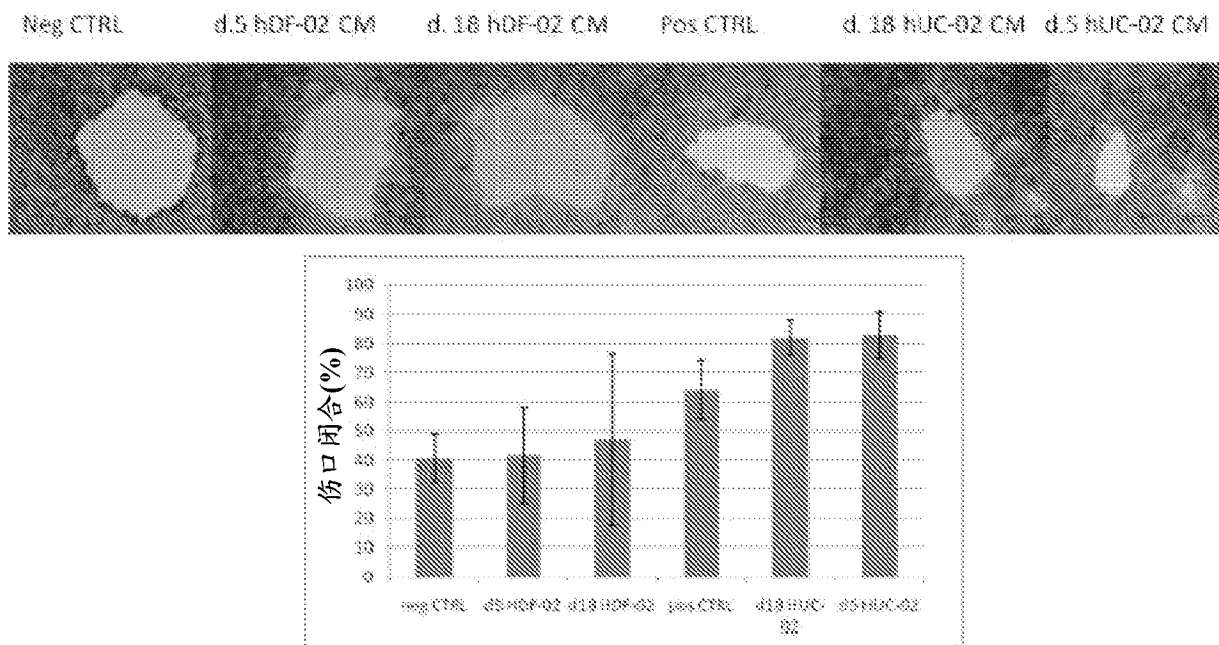
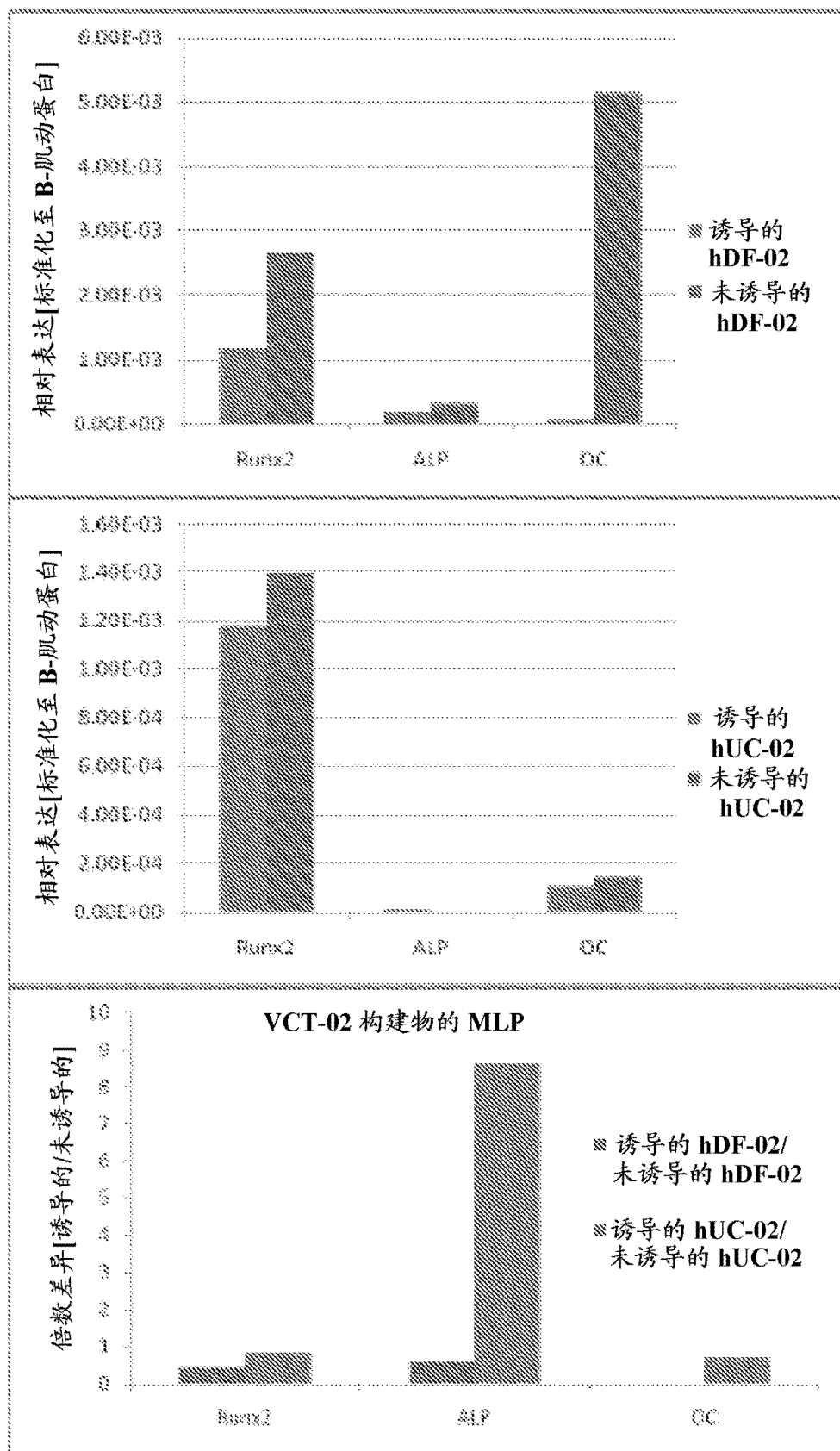
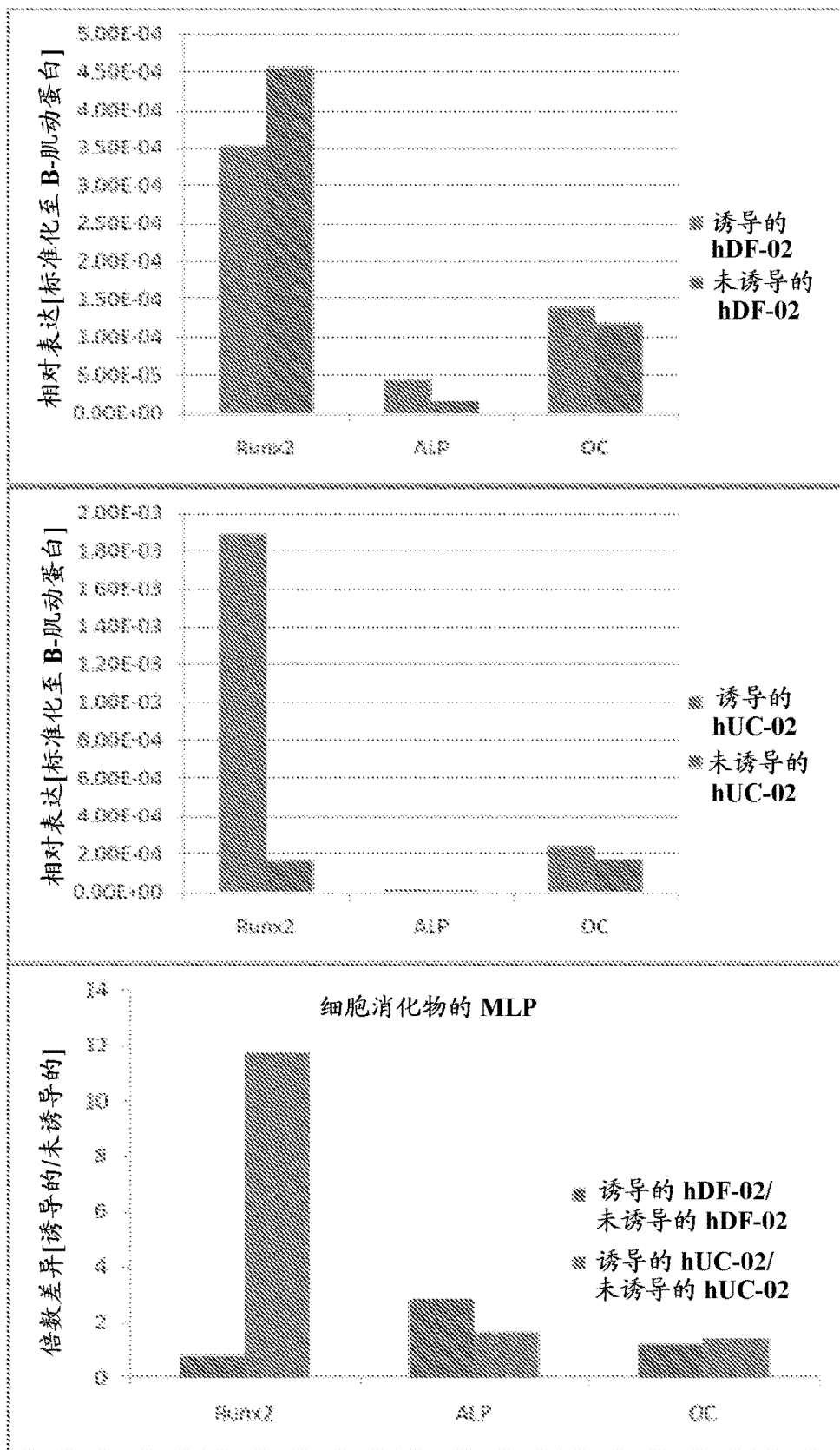


图 9

A



B

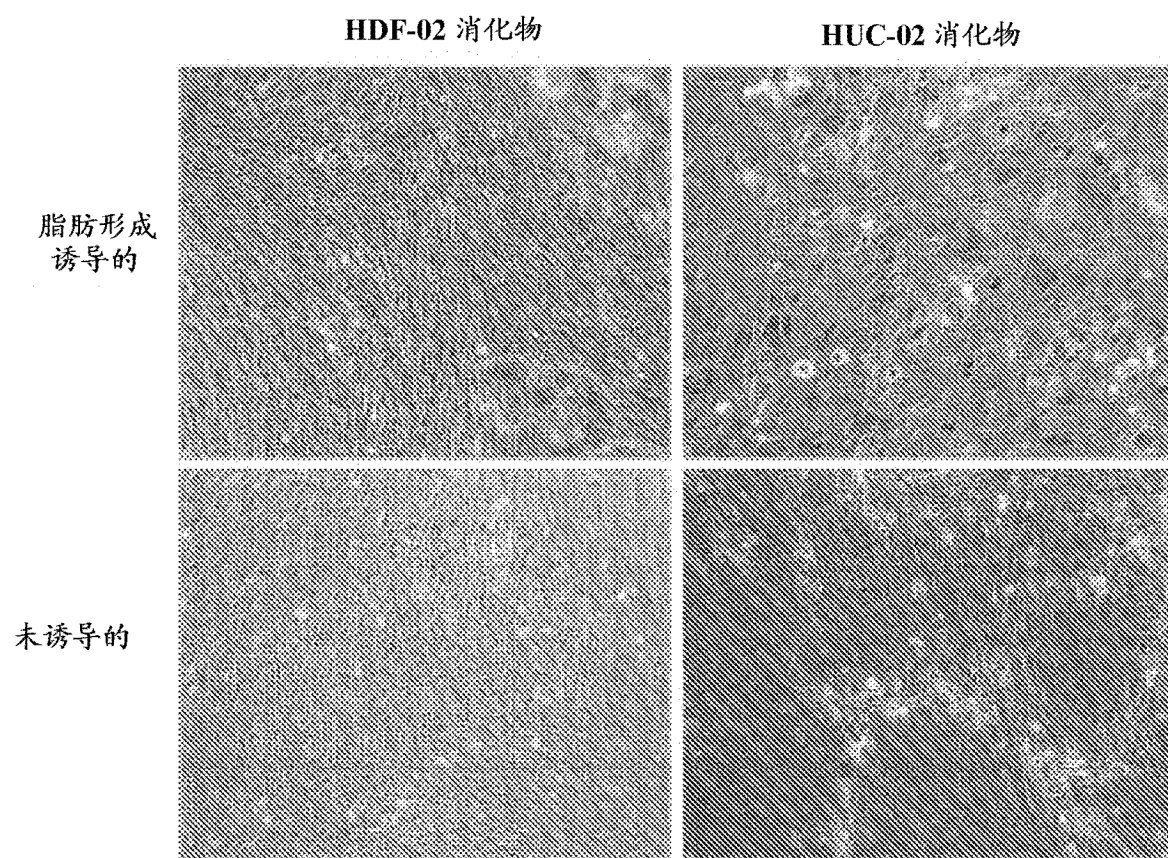
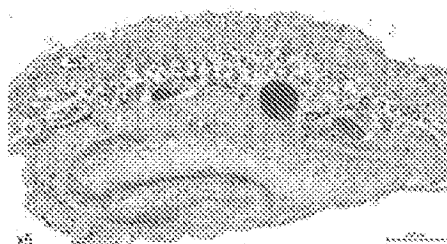
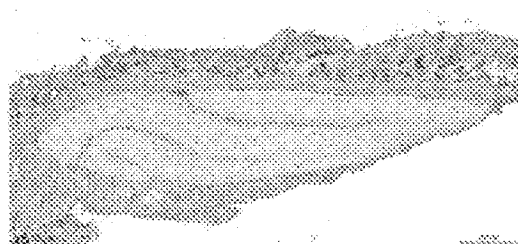
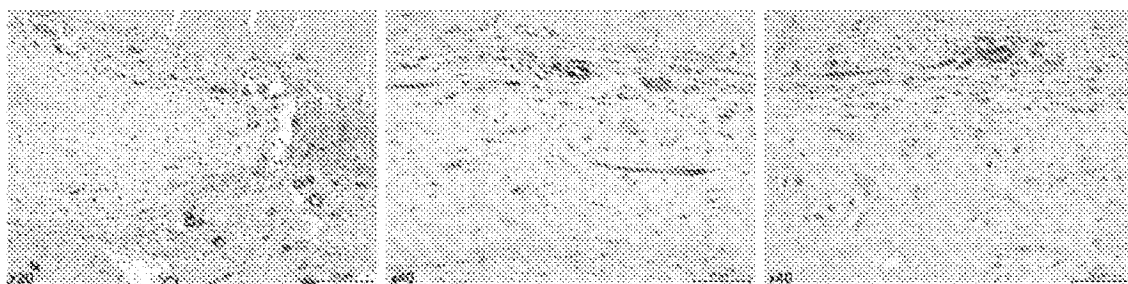
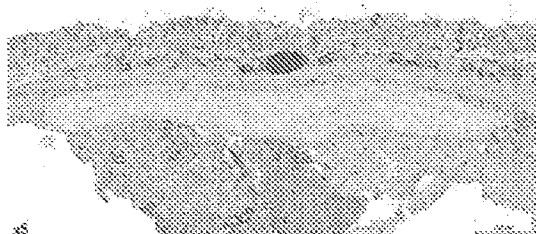
C

图 10

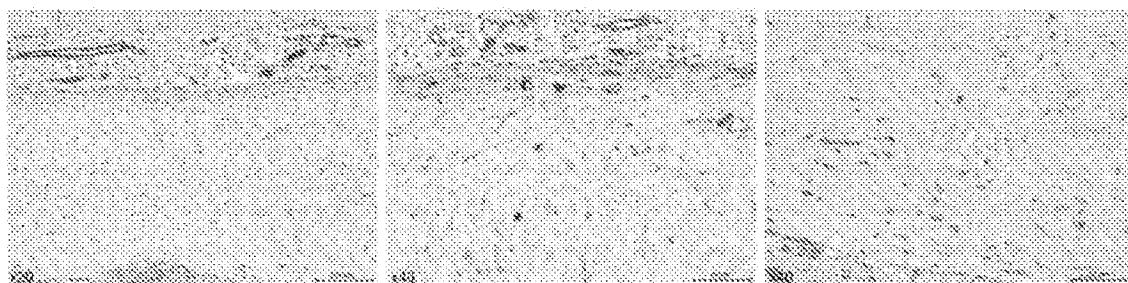
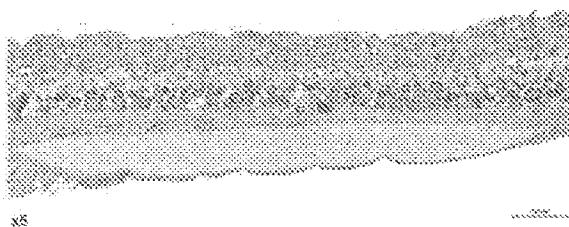
AIVV10- 1周 -SMA
A3 66028485**B**IVV10- 1周 -SMA
B13 66035453

C

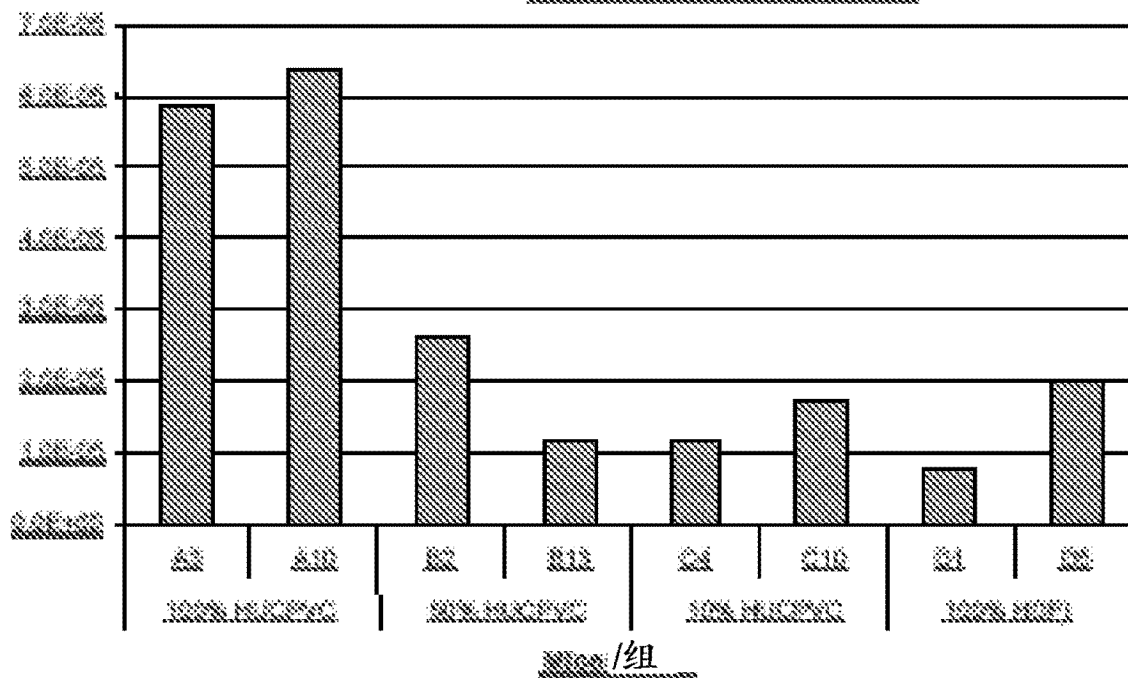
IVV10 - 1周 - SMA
C10 66034467

**D**

IVV10 - 1周 - SMA
D1 66029484



E

aSMA+血管/面积aSMA 阳性血管的定量

组	组	aSMA+/面积
100% HUCPVC	A3	3.3E-03
	A10	6.3E-03
30% HUCPVC	B2	2.6E-03
	B13	1.2E-03
10% HUCPVC	C4	1.1E-03
	C10	1.7E-03
100% HDF	D1	1.0E-03
	D2	2.0E-03

图 11

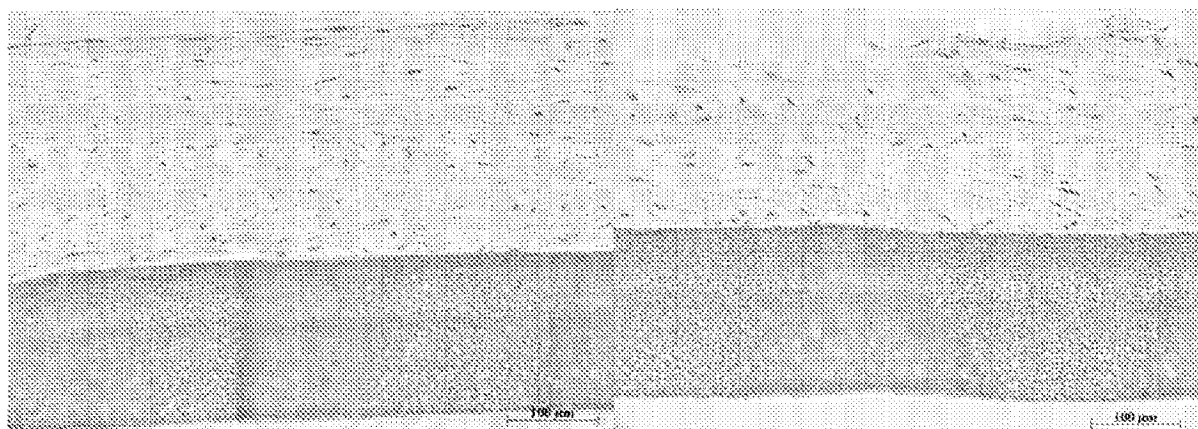


图 12

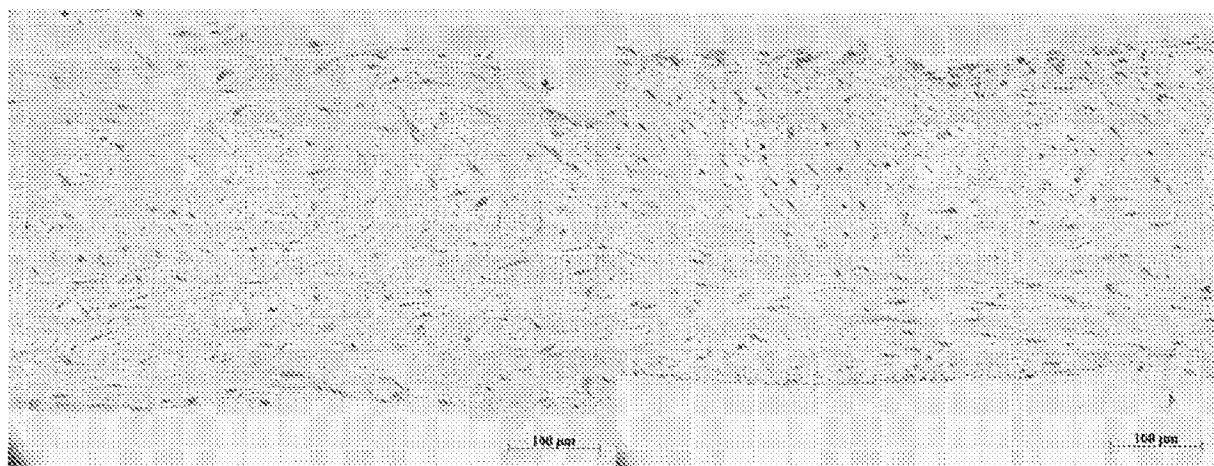
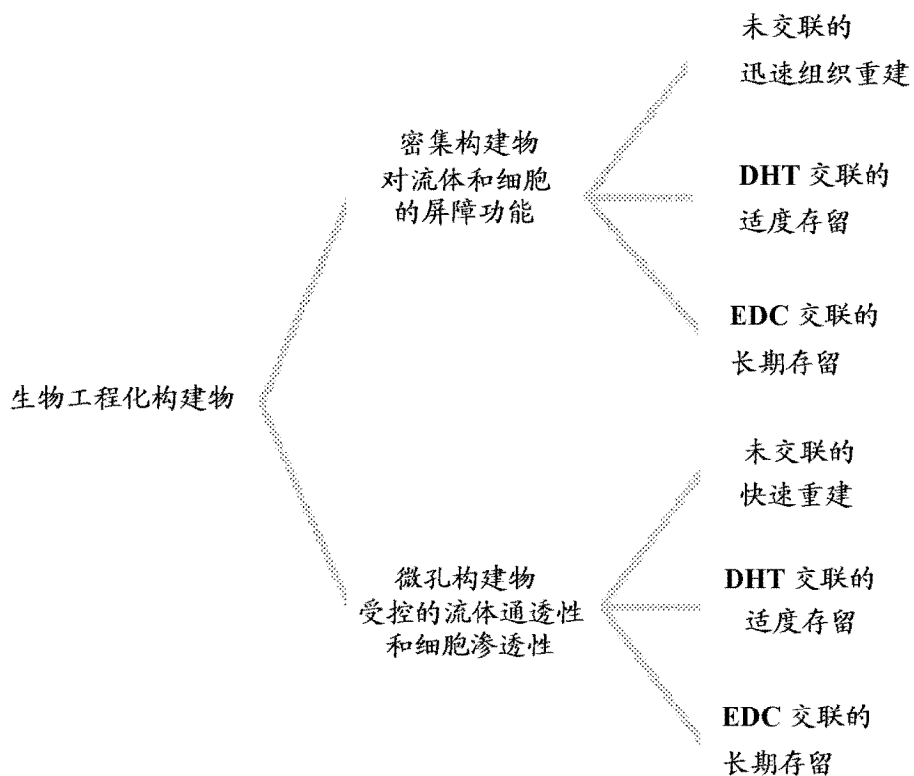
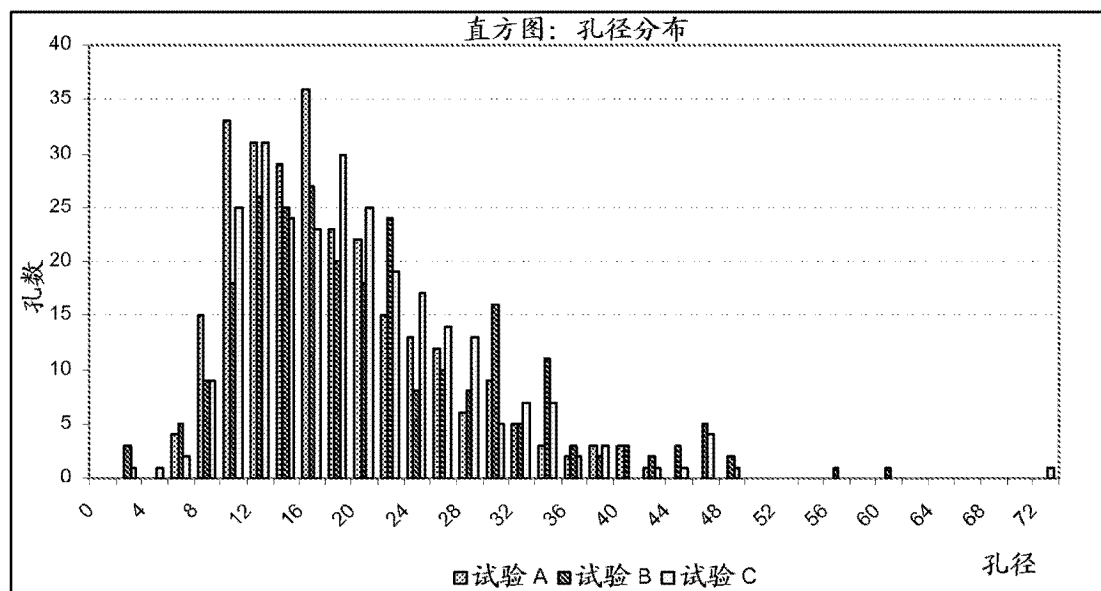


图 13

A**B**

	试验 A (EDC 交联的)	试验 B (DHT 交联的)	试验 C (未交联的)
Avg.	16.675 μm	19.706 μm	18.569 μm
St.D.	7.467 μm	10.292 μm	8.984 μm
Min	4.869 μm	1.241 μm	1.423 μm
Max	40.865 μm	59.528 μm	71.128 μm



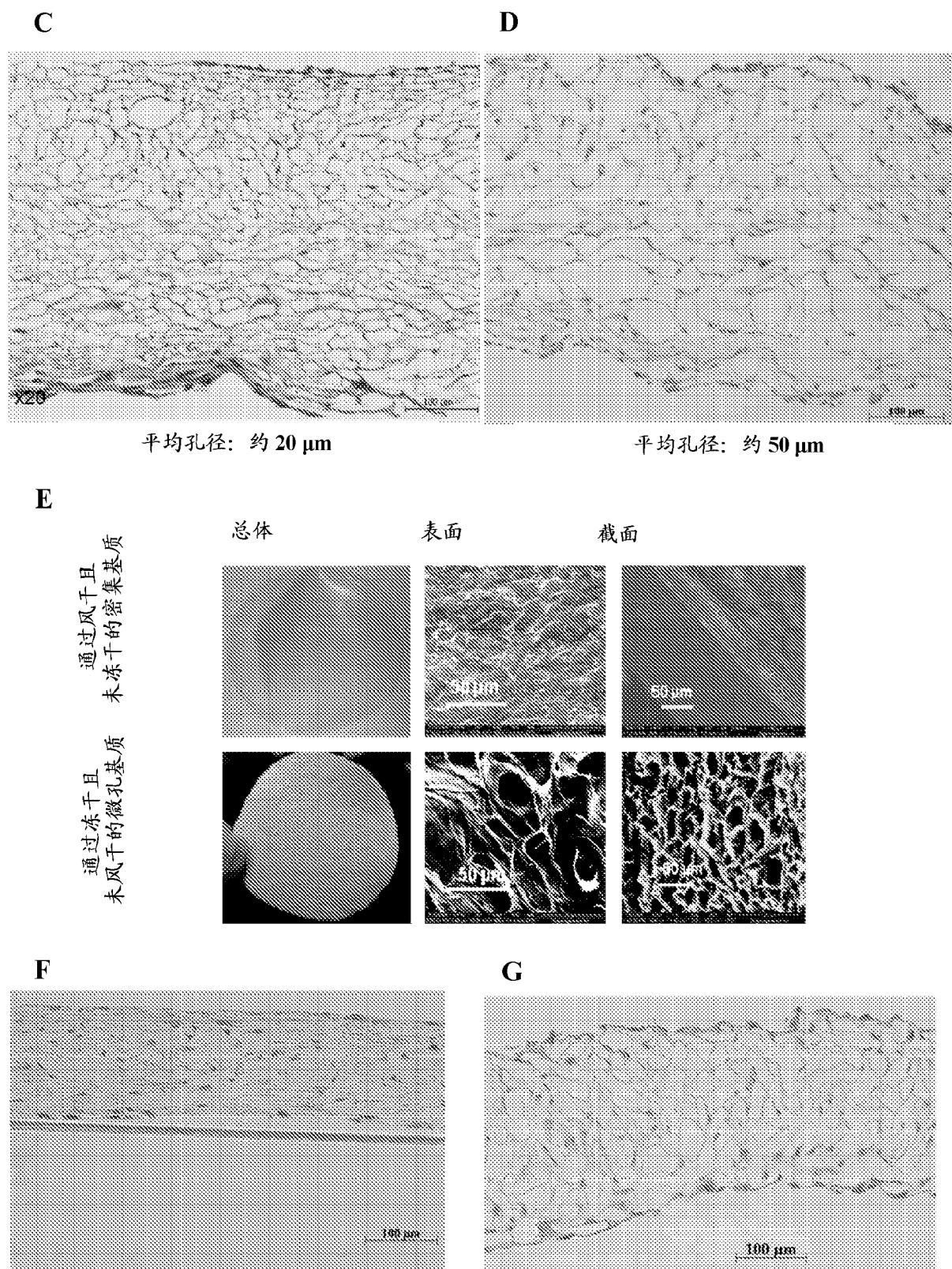
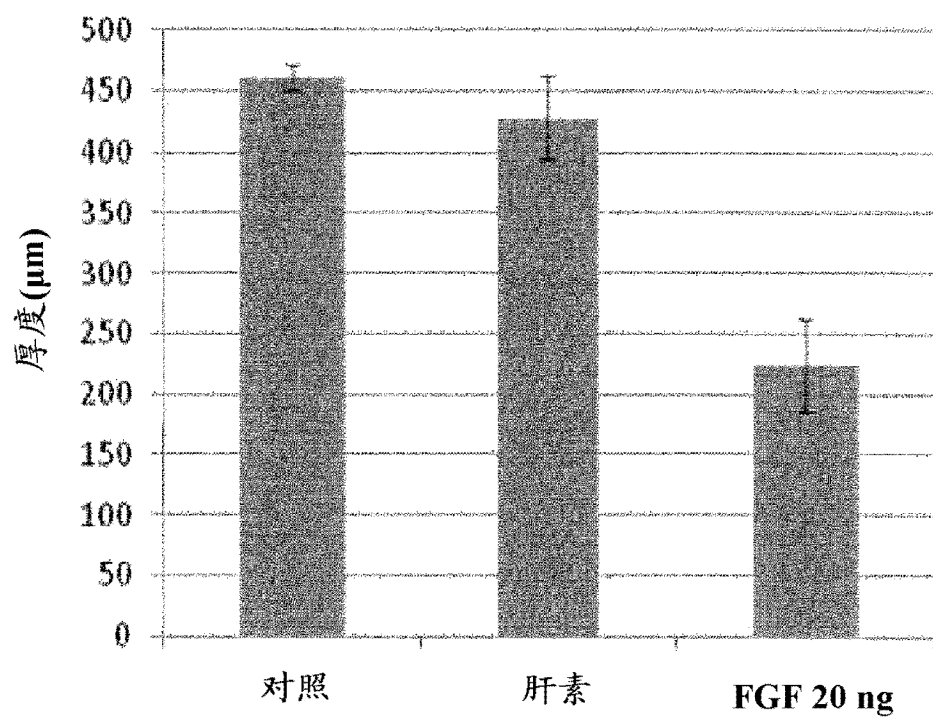
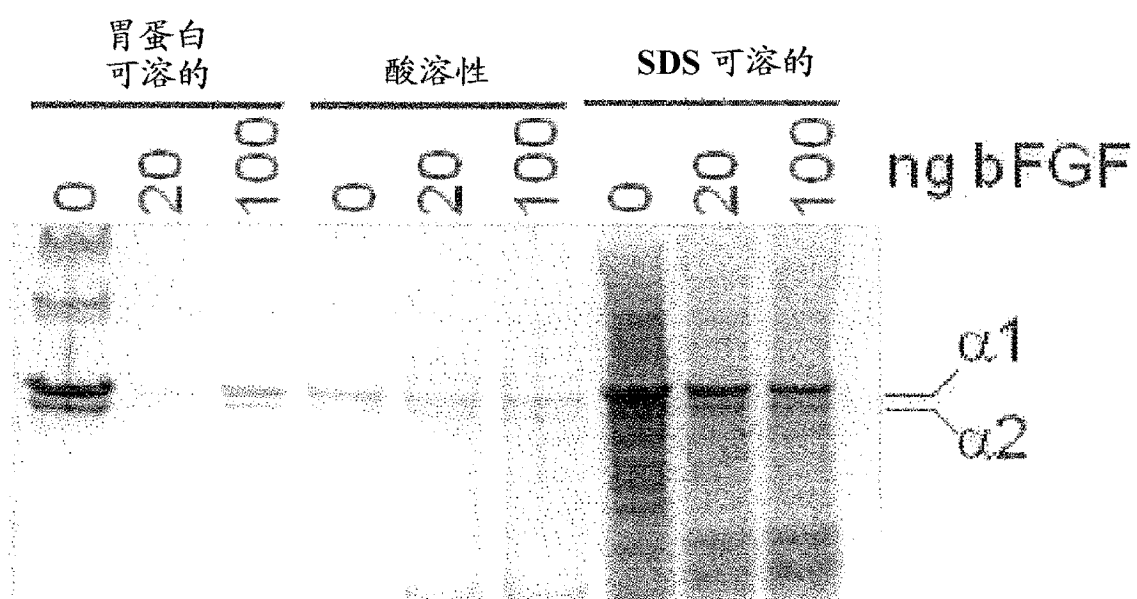


图 14

A**B**

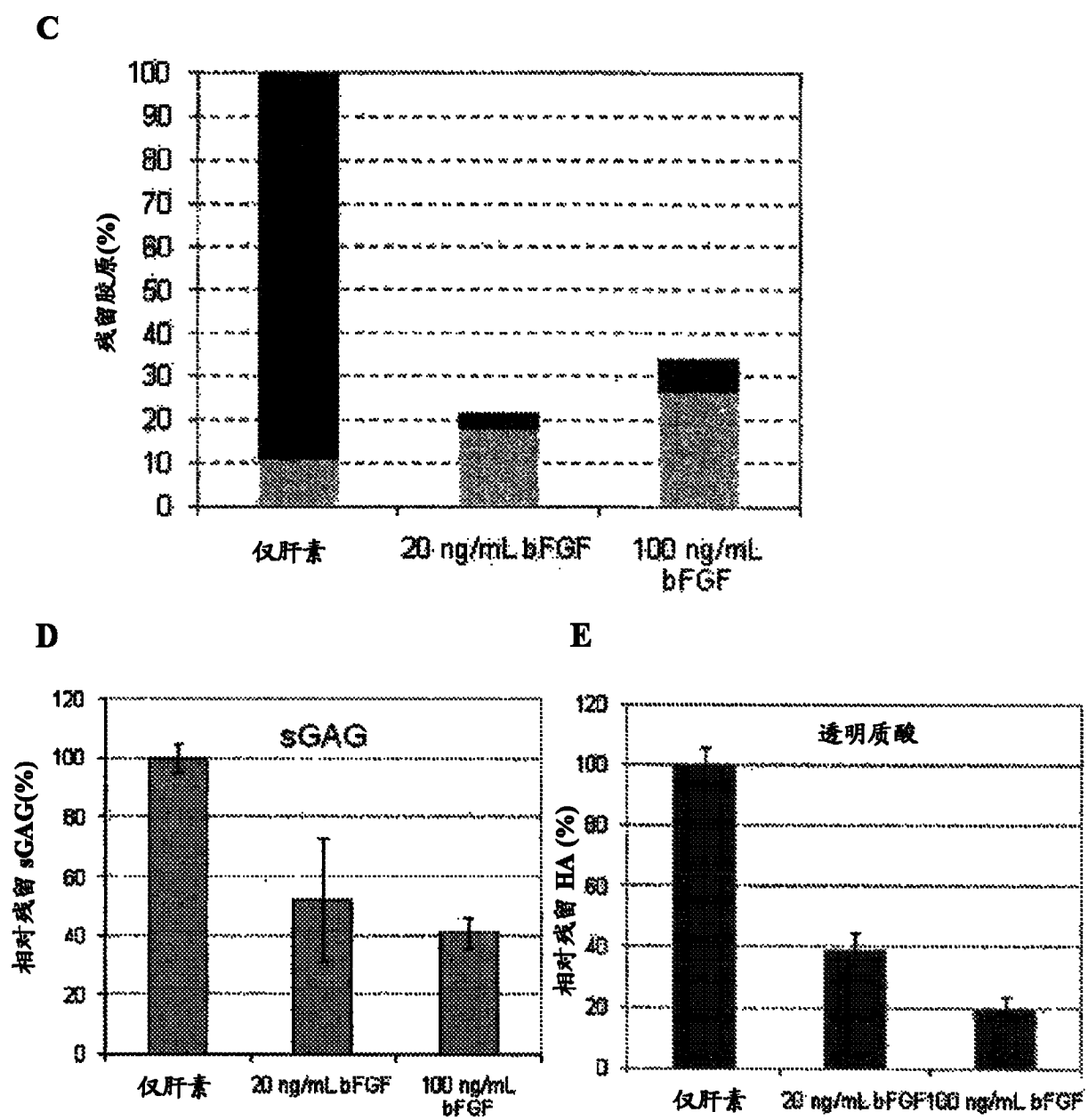


图 15

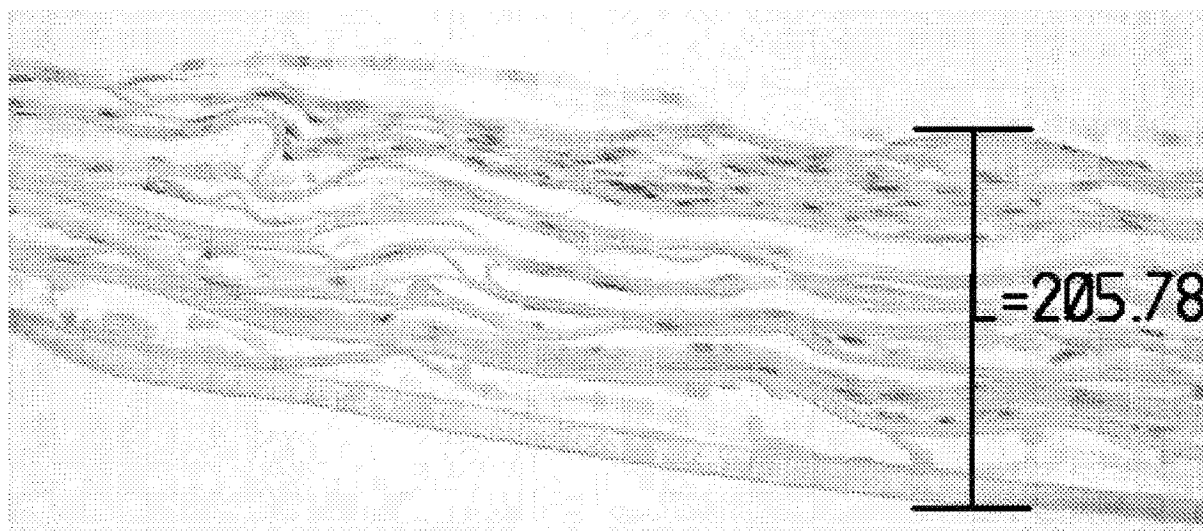


图 16



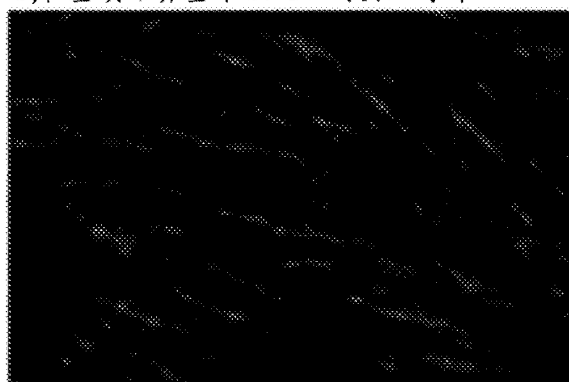
a) 蚕丝海绵



b) 在基质培养基中预处理的蚕丝海绵



c) 带有培养 18 天的活 HDF 的蚕丝海绵



d) 带有培养 18 天且在 HUVEC 培养前失活的 HDF 的蚕丝海绵

图 17