



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110201246 A

(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201910658935.1

(22)申请日 2014.05.19

(30)优先权数据

61/825,256 2013.05.20 US

(62)分案原申请数据

201480029024.8 2014.05.19

(71)申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

(72)发明人 S·蒂米卓吾思嘉 L·尼克拉森

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信

(51)Int.Cl.

A61L 33/08(2006.01)

A61L 33/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书24页 附图20页

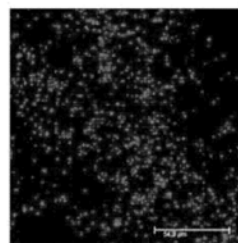
(54)发明名称

抗血栓形成移植物

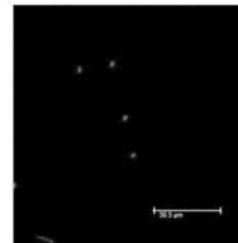
(57)摘要

本发明的名称是抗血栓形成移植物。本发明提供了抗血栓形成组合物,包括抗血栓形成血管移植物。在某些实施方式中,所述组合物包含用抗血栓形成涂层涂覆的脱细胞组织。本发明还提供了制备抗血栓形成组合物的方法和包括将所述抗血栓形成组合物植入到需要所述治疗的受试者中的治疗方法。

脱细胞对照



透明质酸-肝素涂覆的



1. 一种组合物,其包括具有至少一个涂覆有抗血栓形成涂层的表面的基底。
2. 权利要求1所述的组合物,其中所述抗血栓形成涂层包括第一层,所述第一层包含水凝胶。
3. 权利要求2所述的组合物,其中所述第一层包含透明质酸。
4. 权利要求3所述的组合物,其中所述透明质酸是硫醇改性的透明质酸。
5. 权利要求2所述的组合物,其中所述第一层与所述基底的所述至少一个表面交联。
6. 权利要求2所述的组合物,其中所述抗血栓形成涂层进一步包括第二层,所述第二层包含抗凝剂,其中所述第二层与所述第一层交联。
7. 权利要求6所述的组合物,其中所述第二层包含肝素。
8. 权利要求1所述的组合物,其中所述基底是脱细胞组织。
9. 权利要求8所述的组合物,其中所述脱细胞组织是具有腔面的脱细胞血管,并且其中所述抗血栓形成涂层涂覆在所述脱细胞血管的所述腔面上。
10. 一种制备涂覆有抗血栓形成涂层的移植物的方法,包括以下步骤:
提供具有至少一个表面的基底;以及
将所述至少一个表面涂覆以抗血栓形成涂层,其中所述涂覆步骤包括:
向所述表面施加第一交联溶液;以及
向所述表面施加水凝胶溶液,由此提供在所述基底的所述表面上的第一层。

抗血栓形成移植物

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日是2014年5月19日、申请号是201480029024.8 (PCT/US2014/038597)、发明名称为“抗血栓形成移植物”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请有权根据35 U.S.C.§119 (e) 要求于2013年5月20日提交的美国临时专利申请号61/825,256的优先权,该申请以其整体通过引用并入本文。

[0004] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0005] 本发明是在政府支持下利用由国立卫生研究所授予的HL083895完成的。政府在本发明中拥有某些权利。

背景技术

[0006] 血管移植术是利用移植的血管或合成支架来替换、修复或绕过损伤的或潜在危险的血管。血管移植物被植入到患有多种多样疾病和病症的受试者中,所述疾病和病症包括心血管疾病、动脉粥样硬化、周围性血管疾病、腹主动脉瘤等等。这些移植物可以改善或恢复至其中流动被阻塞的区域的血流。尽管现在传统地使用自体血管或由生物相容材料制成的合成血管,但在使用脱细胞结构作为血管移植物中已经有了一些进展。脱细胞血管移植物保留了天然血管的形状和结构,但不含有细胞,由此使移植物的免疫原性最小化。各种脱细胞生物学结构正在被开发为小口径血管移植物。目前它们的主要缺点是高促凝性,可以通过利用宿主细胞将植入物的腔侧再细胞化来降低高促凝性。然而,此解决方案意味着至少一个月的患者专门等待时间,其原因是需要采集和扩充自体内皮细胞以衬于移植物腔。对于刚出现的生物血管移植物(诸如组织工程的和天然脱细胞的移植物)的临床应用,在需要的时候将是可用的解决方案对于临床应用来说是必不可少的。

[0007] 因此,在本领域中存在对血管移植物的抗血栓形成涂层的需求。本发明满足了这种尚未被满足的需求。

发明内容

[0008] 如下所述,本发明包括抗血栓形成组合物,诸如抗血栓形成血管移植物,所述组合物包括涂覆有抗血栓形成涂层的脱细胞组织;制备抗血栓形成组合物的方法;和治疗方法,所述治疗方法包括将所述抗血栓形成组合物植入需要所述治疗方法的受试者中。

[0009] 本发明的一个方面包括一种组合物,所述组合物包括具有至少一个涂覆有抗血栓形成涂层的表面的基底。

[0010] 另一个方面包括制备涂覆有抗血栓形成涂层的移植物的方法,包括以下步骤:提供具有至少一个表面的基底;以及将所述至少一个表面涂覆以抗血栓形成涂层,其中所述涂覆包括:向所述表面施加第一交联溶液;以及向所述表面施加水凝胶溶液,由此在所述基底的表面上提供第一层。

[0011] 在另一个方面,本发明包括治疗受试者中的患病血管的方法,包括通过将抗血栓形成血管移植物植入所述受试者中来绕过所述患病血管,所述抗血栓形成血管移植物包括

具有涂覆有抗血栓形成涂层的腔面的基底。

[0012] 在还另一个方面,本发明包括在受试者中提供血管通路的方法,包括将抗血栓形成血管移植物植入所述受试者中,所述抗血栓形成血管移植物包括具有涂覆有抗血栓形成涂层的腔面的基底。

[0013] 在本文中描述的本发明的上述方面或任何其它方面的各种实施方式中,抗血栓形成涂层包括第一层,所述第一层包含水凝胶。在一个实施方式中,第一层包含透明质酸,诸如硫酸改性的透明质酸。在另一实施方式中,第一层与基底的至少一个表面——诸如基底的腔面——交联。在又另一实施方式中,水凝胶溶液包含透明质酸。

[0014] 在另一实施方式中,抗血栓形成涂层进一步包括第二层,所述第二层包含抗凝剂,其中第二层与第一层交联。在一些包括第二层的实施方式中,第二层包含肝素。在另一实施方式中,抗凝剂溶液包含肝素。

[0015] 在又另一实施方式中,基底是脱细胞组织,诸如脱细胞血管。在另一实施方式中,脱细胞组织是具有腔面的脱细胞血管,并且其中抗血栓形成涂层被涂覆在脱细胞血管的腔面上。

[0016] 在还另一实施方式中,涂覆进一步包括向所述第一层施加第二交联溶液并且向所述第一层施加抗凝剂溶液,由此在所述第一层上面提供第二层。

[0017] 在还又另一实施方式中,受试者具有选自以下的病症:周围性血管疾病、动脉粥样硬化、动脉瘤和静脉血栓形成。在一个实施方式中,受试者正在经历或预期要经历血液透析。

附图说明

[0018] 当结合附图阅读时将更好地理解下面对本发明的优选实施方式的详述。为了举例说明本发明的目的,在附图中显示了目前优选的实施方式。然而,应当理解的是,本发明不限于在附图中显示的实施方式的准确布置和手段。

[0019] 图1是脱细胞移植物结构的基于HA-肝素的涂层的示意性描述,所述细胞移植物结构使用巯基化-HA作为涂层的第一层和使用“端点(end-on)”胺化的肝素作为涂层的第二层。

[0020] 图2A描绘了对用于“端点”肝素改性的肝素改性和添加碘基-SMCC用于自发的肝素交联至涂覆透明质酸的脱细胞血管的示意性描述。

[0021] 图2B描绘了肝素改性的NMR表征。

[0022] 图3是一组图像,描绘了使用递增浓度的SM(PEG)₁₂交联剂(NHS-马来酰亚胺交联剂)的涂覆HA的脱细胞猪腹主动脉的横截切片。当交联剂的浓度增加时,涂层光滑度和厚度也增加,如通过表面上厚度增加的蓝色染料(甲苯胺蓝)层和橙色染料层(Alamar Blue pH 1)所证明的。由甲苯胺蓝和Alamar Blue pH 1(AB pH 1)两者中的箭头指示涂层。

[0023] 图4是一组图像,描绘了对照脱细胞大鼠腹主动脉(被脱细胞而没有进一步处理的主动脉)、透明质酸涂覆的脱细胞主动脉和透明质酸-肝素逐层涂覆的主动脉的鸟瞰视图SEM图像。

[0024] 图5是描绘了HA-肝素逐层涂覆的整个管状脱细胞大鼠腹主动脉的SEM横截切片的图像。可以在血管的腔侧上清晰地看到涂层为几微米厚的层,如由白色箭头所指示的。

[0025] 图6是一组图像,描绘了整个管状对照大鼠腹主动脉(没有进一步处理的脱细胞主动脉)和透明质酸-肝素逐层涂覆的脱细胞主动脉的组织学切片。这些切片用甲苯胺蓝、爱茜蓝pH 1和爱茜蓝PAS染色。可以在血管的腔侧上清晰地看到涂层为几微米厚的层。

[0026] 图7是在脱细胞对照大鼠腹主动脉、透明质酸涂覆的和透明质酸-肝素逐层涂覆的脱细胞主动脉上孵育的分离自大鼠血液的血小板的一组SEM图像。血小板和血栓形成在对照上清晰可见。经处理的血管显示完全没有血小板粘附。

[0027] 图8是一组图像,描绘了来自实验的结果,在所述实验中,血小板被鬼笔环肽染色(其在血小板中产生红颜色),在脱细胞对照大鼠腹主动脉和透明质酸-肝素逐层涂覆的脱细胞主动脉上孵育。在对照主动脉上血小板清晰可见。涂覆的主动脉显示没有血小板。

[0028] 图9是描绘经由X因子测定确定功能性表面肝素的图,其中以反算的肝素当量表示肝素对X因子灭活的作用。测定的样品为:脱细胞对照主动脉、新鲜切除的保留了连续层的内皮细胞的天然大鼠主动脉、培养连续单层的HUVEC和透明质酸-肝素涂覆的脱细胞大鼠主动脉。

[0029] 图10是描绘其中HUVEC被铺在HA-肝素逐层涂覆的主动脉上并培养2周的实验的结果的图像。HUVEC细胞骨架用鬼笔环肽(红色)染色且HUVEC核用DAPI(蓝色)染色,并且在10 μ m协议栈(z-stack)上成像。x和y轴显示在图像的侧面上,其中看见HUVEC长成了非平面单层。可以看到HUVEC侵入了涂层。

[0030] 图11是显示了在脱细胞猪主动脉上孵育的HA凝胶和HA-PEG交联剂的恢复模量(G' 整圆)和损失模量(G'' 开口圆)被绘制为时间的函数的一组图。组A和B显示了在没有PEG交联剂的情况下加载到脱细胞猪主动脉上的透明质酸,并且其中弹性模量(G')和损失模量(G'')以Log(组A)或Ln(组B)针对时间作图。组C和D显示在添加PEG交联剂的情况下加载在脱细胞猪主动脉上的透明质酸。弹性模量(G')和损失模量(G'')以Log(组C)或Ln(组D)针对时间作图。使用上面的复合恢复模量方程,在凝胶的80%聚合形式下,对于HA-PEG恢复模量 G 计算为37kPa,而对于不含PEG交联剂的HA凝胶计算为2kPa。对于涂层开发重要的是,HA-PEG凝胶在4小时孵育时间内达到它们的成熟交联形式,而HA凝胶在23小时的孵育时间内单独达到成熟形式。这指示在血管内HA凝胶的腔灌注至少4小时后应当具有完全聚合的涂层。

[0031] 图12是一组图像,显示了在37 $^{\circ}$ C下对在PBS(组A)和新鲜抽取的大鼠血浆(组B)下孵育2周的未涂覆的脱细胞大鼠主动脉对照(左手组图像)和涂覆了透明质酸/肝素的脱细胞大鼠主动脉(右手组图像)的稳定性评价。经PBS和大鼠血浆两者孵育后,涂层仍然存在并经AB/PAS和甲苯胺蓝染色可见。

[0032] 图13是一组图像,显示了培养三天后用DAPI(蓝色)和VE-钙粘蛋白(红色)染色的接种在三种不同的沉积涂层上的HUVEC。涂层组分是生物相容的并且支持内皮细胞在体外短时期内生长和增殖。

[0033] 图14是一组图像,显示了在大鼠腹主动脉中端-对-端植入的大鼠-脱细胞移植物在植入4周后的横截切片。上组显示了对照组的实施例,在该对照组中植入的移植物是没有进一步改性的脱细胞大鼠主动脉。下组显示了在大鼠腹主动脉中端-对-端植入的透明质酸涂覆的大鼠脱细胞移植物在植入后4周的实施例。所有切片用苏木精和伊红(H&E)染色,其显示近腔细胞在移植物内的迁移以及对照组大鼠的大血凝块内的细胞沉积。

[0034] 图15是一组图像,显示了在第4周时的外植体和在第4周时对移植物通畅性(graft

patency)的多普勒超声成像评估。上组是对照脱细胞大鼠主动脉,而下组是透明质酸涂覆的脱细胞大鼠主动脉。根据多普勒超声成像,对照植入物显示没有流动记录,在多普勒超声成像中扁平线指示没有流动。外植体的图片显示在植入物的中心形成的大纤维化血凝块阻止任何血流通过移植物。移植物也扩张到其原始尺寸的20X,这指示移植物壁可能很薄弱和大的吻合形成。另一方面,透明质酸涂覆的大鼠脱细胞主动脉(下组)多普勒记录显示了指示健康血管流量的典型大鼠脉动流和速度峰值为30cm/s的典型大鼠主动脉流量读数。外植体图片显示了没有腔阻塞、凝块和堵塞物,并且显示移植物在2mm直径的植入尺寸范围内,这指示没有扩张。

[0035] 图16是一组图像,显示了在犬颈动脉中端-对-侧植入的脱细胞TEVG在植入4周后的横截切片。上组显示了对照组的实施例,在对照组中植入的移植物是没有进一步改性的脱细胞TEVG。下组显示了透明质酸涂覆的脱细胞TEVG的实施例。所有切片用苏木精和伊红(H&E)染色。在涂覆的移植物中看到了没有血凝块和阻塞,并且在透明质酸-肝素涂覆的移植物上也可看到内皮细胞的沉积。

具体实施方式

[0036] 本发明涉及抗血栓形成涂层组合物,制备这种组合物的方法,和使用这种组合物的方法。例如,在某些实施方式中,本发明提供了涂覆有抗血栓形成涂层的血管移植物。本发明基于下面的发现:将脱细胞血管的腔面涂覆以透明质酸(HA)层或HA和肝素或其它分子的多层涂层阻止血管中的血栓形成。因此,在一个实施方式中,本发明提供了抗血栓形成血管移植物组合物,所述组合物包括脱细胞血管,其中所述血管的腔面涂覆以HA层。在另一实施方式中,本发明提供了抗血栓形成血管移植物组合物,所述组合物包括脱细胞血管,其中所述血管的腔面涂覆以多层涂层,其中至少一层包含HA并且至少一个其它层包含肝素。在一个实施方式中,HA层与血管的腔面交联。在一个实施方式中,肝素层与HA层交联。在某些实施方式中,涂层中的一层或多层包含水凝胶。在其它的实施方式中,HA层与其它血液接触表面结合,诸如在血管移植物或导管中包含的塑料、或引导血液的天然脉管系统。

[0037] 本发明进一步提供了治疗方法,所述治疗方法包括将本发明的抗血栓形成组合物植入到受体中。例如,在一个实施方式中,该方法包括将HA-涂覆的或HA-肝素-涂覆的血管移植物植入至需要所述治疗方法的受试者中。涂覆的血管移植物可以用于,例如,治疗具有患病的或阻塞的血管的受试者。在某些实施方式中,涂覆的血管移植物用于治疗动脉瘤的方法。在另一实施方式中,涂覆的血管移植物用于绕过患病的或阻塞的血管的方法。在另一实施方式中,涂覆的血管移植物用于在经历或预期要经历血液透析的受试者中提供血管通路的方法。

[0038] 定义

[0039] 除非另外定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员所普遍理解的含义相同的含义。尽管与本文所述的那些相似或等效的任何方法和材料可以用于实施或测试本发明,但描述了优选的方法和材料。

[0040] 如本文所使用,下面术语中的每一个具有在此部分中与其相关联的含义。

[0041] 冠词“一个(a)”和“一种(an)”在本文中用来指一个或多于一个(即,指至少一个)该冠词的语法对象。举例而言,“一个要素”意指一个要素或多于一个要素。

[0042] 如本文所使用,当术语“异常的”用于生物体、组织、细胞或其组分的语境中时,是指与表现出“正常的”(预期的)各自特征的那些生物体、组织、细胞或其组分在至少一个可观察到的或可检测到的特征(例如,年龄、治疗或每天的时间)方面不同的那些生物体、组织、细胞或其组分。对于一种细胞或组织类型来说是正常的或预期的特征对于不同的细胞或组织类型可能是异常的。

[0043] 如本文所使用,当“约”指可测量到的值诸如量、时间持续时间等时,意在涵盖与指定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选 $\pm 5\%$,甚至更优选 $\pm 1\%$,且还更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这些变化适合于实施公开的方法。

[0044] 如本文所使用,“减轻”疾病、缺陷、病症或病况意指降低所述疾病、缺陷、病症或病况的一种或多种症状的严重性。

[0045] 如本文所使用,“抗凝剂”指阻止血液凝结或凝固的药剂或一类药剂。

[0046] 如本文所使用,“抗血栓形成涂层”指减少血栓或血凝块形成的涂层。

[0047] 如本文所使用,“自体的”指来源于将在以后再引入其中的相同个体的生物学材料。

[0048] 如本文所使用,“同种异体的”指来源于与所述材料将引入其中的个体相同的物种的基因上不同的个体的生物学材料。

[0049] 如本文所使用,“生物相容的”指当在哺乳动物中植入时不会引起所述哺乳动物中的不良反应的任何材料。当被引入至个体中时,生物相容材料对该个体是无毒的或无害的,其也不在哺乳动物中诱发对所述材料的免疫排斥。

[0050] 如本文所使用,术语“生物相容聚合物”和“生物相容性”当与聚合物相关联使用时在本领域中是公认的。例如,生物相容聚合物包括通常对宿主无毒性,也不以在宿主中产生处于毒性浓度下的单体亚基或寡聚亚基或其它副产物的速率降解(如果该聚合物降解)的聚合物。在一个实施方式中,生物降解通常涉及聚合物在宿主中降解成例如其单体亚基,所述单体亚基可能已知为实际上是无毒性的。然而,由这种降解产生的中间寡聚产物可以具有不同的毒理学性质,或生物降解可以涉及氧化或其它生化反应,所述氧化或其它生化反应产生不同于所述聚合物的单体亚基的分子。因此,在一个实施方式中,预期用于体内使用——诸如植入或注射至患者中——的生物可降解聚合物的毒理学可以在一个或多个毒性分析后进行确定。没有必要使任何主题组合物具有100%的纯度从而被认为是生物相容的;实际上,仅有必要的是所述主题组合物是如上面所示的那样生物相容的。因此,主题组合物可以包含如此聚合物:包含99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%或甚至更少的生物相容聚合物,例如,包含本文所述的聚合物和任何其它材料以及赋形剂,并且仍然是生物相容的。

[0051] 术语“生物学相容的载体”或“生物学相容的介质”指适合用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、变态反应或其它并发症的具有合理的收益/风险比的试剂、细胞、化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0052] 如本文所使用,“涂层”指施加于物体——通常是基底——的表面的覆盖物。涂层在基底的表面上方可以是连续的或不连续的。涂层可以具有一层或多层。

[0053] “交联”意指形成将一个聚合物链与另一链连接的键。交联可以通过交联剂、交联溶液或交联源诱发或可以通过自组装诱发。

[0054] “交联剂”或“交联源”意指能够在分子之间形成化学或离子键的试剂。交联剂或交联源的非限制性实例包括氯化钙；过硫酸铵 (APS) 和四甲基乙二胺 (TEMED)、戊二醛、环氧化物、氧化葡聚糖、对叠氮苯甲酰肼、N-[α -马来酰亚胺基乙酰氧基]琥珀酰亚胺酯、对叠氮苯基乙二醛一水合物、双-[β -(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物、双[磺基琥珀酰亚胺基]辛二酸酯、二硫代双[丙酸琥珀酰]亚胺酯、辛二酸二琥珀酰亚胺酯、1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、核黄素、热、可见光辐射、紫外线辐射、蓝光辐射、及其组合。

[0055] “交联溶液”意指处于溶液或溶剂中的交联剂。

[0056] 如本文所使用，术语“脱细胞的”或“脱细胞化”指生物结构（例如，器官、或部分器官、或组织），从所述生物结构中已经去除了细胞成分，留下了完整的无细胞基础结构。一些器官由多种特化组织构成。器官或实质的特化组织结构提供了与所述器官相关的特定功能。器官的支持性纤维状网络是间质。大多数器官具有由未特化结缔组织构成的间质框架，其支持特化组织。脱细胞化的过程去除特化的组织细胞，留下细胞外基质的复杂三维网络。结缔组织基础结构主要由胶原蛋白构成。脱细胞结构提供了生物相容基底，不同的细胞群可以注入到所述基底上。脱细胞生物结构可以是刚性的，或半刚性的，其具有改变它们的形状的能力。

[0057] 术语“来源于”在本文中用来意指源自特定的来源。

[0058] 如本文所使用，“细胞外基质组合物”包括可溶的和不可溶的级分两者或其任何部分。不可溶级分包括那些分泌的ECM蛋白和沉积在支撑体或支架上的生物学组分。可溶级分包括其中已经培养了细胞并且细胞已经向其中分泌了活性剂（一种或多种）的培养基，并且包括没有在支架上沉积的那些蛋白和生物学组分。两种级分都可以收集，和任选地进一步加工，并且在如本文所述的多种应用中单独地使用或组合使用。

[0059] 如本文所使用，术语“凝胶”指三维聚合物结构，所述三维聚合物结构本身在特定的液体中是不溶的，但其能够吸收和保留大量的液体以形成稳定的、经常是柔软的和柔韧的、但常常具有不同程度的保形 (shape-retentive) 结构。当液体主要是水时，凝胶被称作水凝胶。

[0060] 如本文所使用，“移植物”指如此组合物：其被植入到个体中以通常替换、纠正或以另外的方式克服细胞、组织或器官缺陷。移植物可以包括支架。在某些实施方式中，移植物包括脱细胞组织。在一些实施方式中，移植物可以包括细胞、组织或器官。移植物可以由来源于同一个体的细胞或组织组成；此移植物在本文中被称作以下可互换术语：“自体移植物”、“自体的移植体”、“自体的植入物”和“自体的移植物”。包含来自相同物种的基因上不同的个体的细胞或组织的移植物在本文中可称为以下可互换术语：“同种异体移植物”、“同种异体的移植体”、“同种异体的植入物”和“同种异体的移植物”。从个体至其同卵双生的移植物在本文中被称作“同系移植物”、“同系的移植体”、“同系的植入物”或“同系的移植物”。“异种移植物”、“异种的移植体”或“异种的植入物”指从不同物种的一个个体至另一个个体的移植物。

[0061] 如本文所使用，术语“完整的”指存在状态，凭借此存在状态要素能够在很大程度上执行其原始功能。

[0062] “光致交联”指在暴露于适宜波长的光后连接一个聚合物链与另一个聚合物链的

键形成。例如，与光敏基团缀合的两个聚合物可以通过光敏基团之间的共价键形成而被共价地光致交联。

[0063] 如本文所使用，术语“聚合”或“交联”指至少一个消耗单体分子(或单体)、低聚分子(或低聚体)或聚合分子(或聚合物)中的至少一种官能团以形成至少两个不同的分子之间的至少一个化学键(例如，分子间键)、同一分子内的至少一个化学键(例如，分子内键)、或其任意组合的反应。聚合或交联反应可以消耗约0%和约100%之间的系统中可用的至少一种官能团。在一个实施方式中，至少一种官能团的聚合或交联导致所述至少一种官能团的约100%的消耗。在另一实施方式中，至少一种官能团的聚合或交联导致所述至少一种官能团的小于约100%的消耗。

[0064] 如本文所使用，“支架”指结构，其包含提供适合于细胞粘附和增殖的表面的生物相容材料。支架可以进一步提供机械稳定性和支撑。支架可以处于特定的形状或形式以便影响或定界由增殖细胞的群体所呈现的三维形状或形式。这种形状或形式包括，但不限于，膜(例如二维基本上大于第三维的形式)、带、索、片、平碟、圆柱体、球体、三维无定形形状等。

[0065] 如本文所使用，“基底”指支撑材料。

[0066] 如本文所使用，“表面”指基底的最外层或基底的最外侧部分。

[0067] 如本文所使用，“硫醇改性的”指对基底的一种或多种改性。

[0068] 如本文所使用，“治疗”意指降低患者经历疾病、缺陷、病症或不良状况等的症状的频率。

[0069] 如本文所使用，术语“组织”，包括，但不限于，骨、神经组织、包含肌腱和韧带的纤维结缔组织、软骨、硬脑膜、心包、肌肉、肺、心脏瓣膜、静脉和动脉以及其它脉管系统、真皮、脂肪组织或腺体组织。

[0070] 如本文所使用，“支架”指结构，包含提供适合于物质粘附的表面的生物相容材料。支架可以进一步提供机械稳定性和支撑。支架可以处于特定的形状或形式以便影响或定界三维形状或形式。这些形状或形式包括，但不限于，膜(例如，二维基本上大于第三维的形式)、带、索、片、平碟、圆柱体、球体、三维无定形形状等。

[0071] 如本文所使用，术语“受试者”和“患者”可互换使用。如本文所使用，受试者优选是哺乳动物诸如非灵长类动物(例如，牛、猪、马、猫、犬、大鼠等)和灵长类动物(例如，猴和人)，最优选是人。

[0072] 如本文所使用，术语“治疗疾病或病症”意指降低患者经历疾病或病症的症状的频率。疾病和病症在本文中可互换使用。

[0073] 如本文所使用，术语“治疗有效量”指足以或有效阻止或治疗(延缓或阻止其发作，阻止其进展，抑制、减少或逆转)本文所述或考虑的疾病或病况的量，包括减轻这样的疾病或病况的症状。

[0074] 如本文所使用，术语化合物的“有效量”或“治疗有效量”是足以对施用所述化合物的受试者提供有益效果的化合物量。

[0075] 范围：在整个本公开内容中，本发明的多个方面可以以范围形式呈现。应当理解的是，以范围形式的描述仅为了方便和简明，并且不应当被解释为对本发明的范围的不容变更的限制。因此，对范围的描述应当被认为是已经具体地公开了所有可能的子范围以及该

范围内的单个数值。例如,对范围诸如从1到6的描述应当被认为是已经具体地公开了子范围诸如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等,以及该范围内的单个数字,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度为多少,这均适用。

[0076] 描述

[0077] 本发明涉及涂覆以抗血栓形成涂层的组合物,制备这样的组合物的方法,以及使用这样的组合物的方法。特别地,本发明涉及涂覆以抗血栓形成涂层的生物材料、组织工程构建体等。

[0078] 例如,在某些实施方式中,本发明提供了涂覆以抗血栓形成涂层的血管移植物。然而,本发明不限于任何具体类型的材料或构建体。而是,本发明涵盖涂覆以本发明的抗血栓形成涂层的任何材料或构建体。

[0079] 本发明基于以下的发现:将脱细胞血管的腔面涂覆以透明质酸(HA)层或HA和肝素或其它分子的多层涂层阻止血管中的血栓形成。已经研究了脱细胞组织用作血管移植物。然而,未处理的脱细胞移植物是血栓形成的,除非它们用内皮细胞再细胞化以抑制凝块形成,这是时间密集型过程,其可限制它们的临床应用性。在一个实施方式中,本发明涉及化学涂层,代替细胞接种,以提供抗血栓形成、抗凝的移植物。在某些实施方式中,涂层在标准冷藏条件下是稳定的,由此允许根据需要使用现成(off the shelf)组合物。

[0080] 在一个实施方式中,本发明提供了抗血栓形成血管移植物组合物,所述组合物包括脱细胞血管,其中所述血管的腔面涂覆以第一层。在某些实施方式中,所述第一层包含HA。在另一实施方式中,本发明提供了抗血栓形成血管移植物组合物,所述组合物包括脱细胞血管,其中所述血管的腔面涂覆以多层涂层。在某些实施方式中,所述多层涂层包括包含HA的第一层和包含肝素的第二层。在一个实施方式中,HA层与血管的腔面交联。在一个实施方式中,肝素层与HA层交联。在某些实施方式中,涂层中的一层或多层包含水凝胶。

[0081] 在一个实施方式中,本发明提供了制备涂覆以抗血栓形成涂层的组合物的方法。在某些实施方式中,该方法包括将基底的表面涂覆以第一层。在一个实施方式中,基底是脱细胞组织。然而,本发明不限于任何具体类型的基底。而是,所述方法涵盖本领域中已知的任何合适的基底,包括,但不限于,天然血管、工程化血管、由聚合物制成的合成血管移植物和由聚合物制成的接触血液的导管。在一个实施方式中,第一层包含HA。在某些实施方式中,HA是硫醇改性的HA。在某些实施方式中,所述方法包括使用交联剂以将基底的胺基与HA的巯基交联,所述交联剂包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和马来酰亚胺。在某些实施方式中,所述方法包括逐层涂覆程序。在一个实施方式中,所述方法包括将基底涂覆以第二层。在某些实施方式中,将第二层涂覆在第一层的上面。例如,在一个实施方式中,第二层包含胺化肝素,胺化肝素与第一层的HA交联。

[0082] 本发明进一步提供了治疗方法,所述治疗方法包括植入本发明的抗血栓形成组合物。这样的方法包括植入生物材料、组织工程基底、人造器官、人造组织、人造移植物等中的一种或多种用于治疗有需要的受试者中的疾病、病症或组织缺陷。例如,在一个实施方式中,所述方法包括将HA-涂覆的或HA-肝素-涂覆的血管移植物植入到有需要的受试者中。例如,涂覆的血管移植物可以用于治疗具有患病的或被阻断的血管的受试者。在某些实施方式中,涂覆的血管移植物用于治疗动脉瘤的方法。在另一实施方式中,涂覆的血管移植物用于绕过患病的或被阻断的血管的方法。在另一实施方式中,涂覆的血管移植物用于在经历

或预期经历血液透析的受试者中提供血管通路的方法。

[0083] 组合物

[0084] 本发明提供了包含涂覆以抗血栓形成涂层的表面的组合物。在某些实施方式中，所述组合物包括具有至少一个涂覆以抗血栓形成涂层的表面的生物材料、组织工程基底、人造器官或人造组织。

[0085] 在一个实施方式中，本发明的组合物包括具有至少一个涂覆以抗血栓形成涂层的表面的血管移植物。在一个实施方式中，血管移植物是具有外表面、内表面或腔面和中空的通道的管状血管移植物。本发明的管状血管移植物是生物相容的、与合适的尺寸诸如直径、长度和壁厚度适当地成比例、容易附着到期望的活组织诸如通过缝合，并且提供适宜的操作特性诸如良好的挠性、弯曲度和在弯曲过程中对扭结的抗力。在某些实施方式中，本发明的管状血管移植物是体液（例如，血液）可以流动通过的管道。因此管状血管移植物的腔面是移植物的内表面，当被植入时，其与流体接触。因此，这些管状血管移植物可以用来替换天然血管节段，或另外地可以用作人造血管，作用是绕过天然血管。在另一实施方式中，管状血管移植物用作血管通路点。在某些实施方式中，本发明的管状血管移植物具有基本上类似于天然血管的机械性能。即，血管移植物具有经受血管内压力的壁强度。在一个实施方式中，管状血管移植物的腔面被涂覆以无血栓形成 (thromobogenic) 涂层。涂层阻止血小板粘附和血栓形成。

[0086] 在某些实施方式中，本发明的管状血管移植物具有根据需以模拟被修复、替换或绕过的天然血管的内径、外径、长度和壁厚度。例如，在一个实施方式中，本发明的管状血管移植物是小口径血管移植物，具有小于5cm的内径。

[0087] 在一个实施方式中，本发明的管状血管移植物具有约[1]mm-约[25]mm的内径。

[0088] 在一个实施方式中，本发明的管状血管移植物具有约[1]mm-约[25]mm的外径。

[0089] 在一个实施方式中，本发明的管状血管移植物具有约[100]μm-约[2]mm的壁厚度。

[0090] 在一个实施方式中，本发明的管状血管移植物具有约[4]cm-约[100]cm的长度。

[0091] 在另一实施方式中，本发明的血管移植物是片状移植物。例如，本发明的片状移植物可以用来修补部分天然血管。因此，片状移植物包括腔面，当施用于天然血管时所述腔面与流过血管的流体接触。在一个实施方式中，片状移植物的腔面被涂覆以无血栓形成涂层。

[0092] 在某些实施方式中，本发明的组合物包括基底，其中表面包括至少一个涂覆以无血栓形成涂层的表面。所述基底可以是本领域中已知的任何材料或生物材料。例如，在某些实施方式中，所述基底是细胞外基质蛋白组合物、基于胶原蛋白的组合物、基于弹性蛋白的组合物、水凝胶、静电纺丝支架、注塑成型的聚合物支架、编织的和非编织的聚合物支架、基于金属的植入物、陶瓷复合生物材料或其它组织工程基底。

[0093] 在一个实施方式中，基底是脱细胞组织。脱细胞组织基底是由从供体来源采集组织并从采集的组织去除细胞和细胞碎片而获得的基底。脱细胞组织基底保留了采集的组织结构并且随后可以用作被植入到有需要的受试者中的组织工程基底。制备脱细胞组织基底的方法在本领域中是公知的。本发明不限于任何具体类型的脱细胞组织或制备脱细胞组织的方式。

[0094] 在某些实施方式中，脱细胞化依赖于化学方法。在一些例子中，脱细胞化包括化学方法与机械方式组合以便从组织去除细胞。在一个方面，用于脱细胞化的化学溶液或另外

称作脱细胞化溶液通常至少包括高渗溶液、洗涤剂 and 螯合剂。在某些实施方式中，高渗溶液是高渗氯化钠溶液。在某些实施方式中，洗涤剂是两性离子洗涤剂诸如CHAPS。在某些实施方式中，螯合剂是EDTA。

[0095] 在一个实施方式中，脱细胞化溶液可以包括用于与细胞的渗透相容性的缓冲液（例如，PBS）。在一些情况下，脱细胞化溶液还可以包含酶，诸如，但不限于，一种或多种胶原酶、一种或多种中性蛋白酶、一种或多种脱氧核糖核酸酶、或蛋白酶诸如胰蛋白酶。在一些情况下，脱细胞化溶液还可以或可选地可以包含一种或多种酶的抑制剂（例如，蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、和/或胶原酶抑制剂）。

[0096] 在某些情况下，制备脱细胞组织基底的方法包括利用脱细胞化溶液灌注组织。使脱细胞化溶液灌注通过组织的压力可被调节至所需的压力。在一个实施方式中，脱细胞溶液在低于约30mmHg的灌注压力下灌注通过组织。在一个实施方式中，脱细胞溶液在小于约20mmHg的压力下灌注通过组织。

[0097] 在某些实施方式中，脱细胞组织基底是脱细胞血管。例如，脱细胞血管可以充当本文其它地方所述的管状血管移植物的基底。在一个实施方式中，脱细胞化溶液可以被引入至血管中以实现细胞去除。在某些实施方式中，对血管的脱细胞化去除了血管的天然内皮细胞衬里。

[0098] 在一个实施方式中，本发明的脱细胞组织基本上由组织的所有或大多数区域的细胞外基质（ECM）组分组成。ECM组分可以包括以下任一种或全部：纤连蛋白、原纤蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白家族成员（例如，胶原蛋白I、III和IV）、葡糖氨基葡聚糖、基质（ground substance）、网状纤维和血小板反应蛋白，它们可以保持组织为界限明确的结构诸如基底层。成功的脱细胞化被定义为使用标准的组织学染色程序在组织学切片中没有可检测到的肌丝、内皮细胞、平滑肌细胞、上皮细胞和核。优选地，但不是必要地，残留的细胞碎片也已经从脱细胞组织中去除。

[0099] 在一个实施方式中，天然组织的脱细胞化过程保留了组织的天然三维结构。即，在脱细胞化过程期间和之后保持了组织——其包括ECM组分——的形态学和构架。ECM的形态学和构架可以通过视觉和/或组织学检查。例如，实体器官的外表面上的基底层、或器官或组织的脉管系统内的基底层不应当因脱细胞化而被去除或被明显损害。另外，ECM的原纤维应当与未被脱细胞的器官或组织的原纤维类似或显著无变化。

[0100] 在一个实施方式中，一种或多种化合物可以被应用于脱细胞组织中或其上，例如，从而保存脱细胞组织，或制备所述脱细胞组织用于再细胞化和/或在再细胞化过程期间辅助或刺激细胞。这样的化合物包括，但不限于，一种或多种生长因子（例如，VEGF、DKK-1、FGF、BMP-1、BMP-4、SDF-1、IGF和HGF）、免疫调节剂（例如，细胞因子、糖皮质激素、IL2R拮抗剂、白三烯拮抗剂）、和/或改变凝血级联的因子（例如，阿司匹林、肝素-结合蛋白和肝素）。另外，脱细胞的器官或组织可以进一步用例如辐照（例如，UV、 γ 射线）处理以减少或消除脱细胞组织上或之中残留的任何类型的微生物的存在。

[0101] 用来生成脱细胞组织的示例性的脱细胞化方法提供了破坏组织细胞的可控的、精确的方式，同时保留了潜在的ECM，其包括血管化，并使得原始组织的其它总体形态学特征完整。在某些实施方式中，脱细胞基底然后适合于接种合适的细胞。在一个实施方式中，脱细胞基底不接种细胞。在某些实施方式中，脱细胞基底涂覆以本文其它地方所述的无血栓

形成涂层。在体外执行所述方法的地方,脱细胞组织适合于植入到受体内作为替代组织。本发明包括由这样的基底制造工程化组织构建体的方法。

[0102] 尽管组织的来源不受限制,但在示例性的实施方式中,组织来自相对大的动物或被公认具有与人相似(关于感兴趣的组织)的解剖学的动物,诸如猪、牛、马、猴、或猿。在一些实施方式中,组织的来源是人,其使用可以降低对基于支架的工程化组织的排斥的可能性。在某些实施方式中,组织在体外由细胞改造而成,并且然后经受脱细胞化。在某些实施方式中,组织是获自动物的血管。可以使用任何合适的血管来制备脱细胞血管基底。例如,在一个实施方式中,由获自供体动物的主动脉或其部分,或由冠状动脉、大隐静脉、胫后动脉、肺动脉、髂外动脉、右下乳动脉、桡动脉制备脱细胞基底。

[0103] 本发明的组合物包括至少一个涂覆以无血栓形成涂层的表面。在某些实施方式中,无血栓形成涂层阻止血小板粘附和活化,由此减少血栓形成。例如,在某些实施方式中,涂层阻止胶原蛋白或可以存在于基底中的其它血栓形成组分进入到血流中。在一个实施方式中,本发明的涂层是单层涂层。在另一实施方式中,本发明的涂层是多层涂层。在一个实施方式中,涂层包含水凝胶层。例如,在某些实施方式中,所述组合物包括与基底交联的包含水凝胶的第一层。第一层在本文中有时称作水凝胶层。在一个实施方式中,水凝胶层包含硫醇改性的透明质酸(HA)或二酰肼改性的HA或未改性的HA。

[0104] 水凝胶可以包括本领域中已知的任何生物聚合物或合成聚合物。例如,水凝胶可以包括透明质酸、壳聚糖、海藻酸盐、胶原蛋白、葡聚糖、果胶、角叉菜胶、聚赖氨酸、明胶或琼脂糖。(参见:W.E.Hennink和C.F.van Nostrum,2002,Adv.Drug Del.Rev.54,13-36和A.S.Hoffman,2002,Adv.Drug Del.Rev.43,3-12)。这些材料由高分子量主链构成,所述高分子量主链由直链的或支链的多糖或多肽制成。基于合成聚合物的水凝胶的实例包括但不限于(甲基)丙烯酸酯-寡丙交酯(oligolactide)-PEO-寡丙交酯-(甲基)丙烯酸酯、聚(乙二醇)(PEO)、聚(丙二醇)(PPG)、PEO-PPG-PEO共聚物(普朗尼克类(Pluronic))、聚(磷腈)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(N-乙基吡咯烷酮)、PL(G)A-PEO-PL(G)A共聚物、聚(乙烯亚胺)等(参见A.S.Hoffman,2002Adv.Drug Del.Rev.43,3-12)。

[0105] 水凝胶通常可以吸收大量的流体,并且,处于平衡下,典型地由60-90%流体和仅10-30%聚合物构成。在优选的实施方式中,水凝胶的含水量为约70-80%。由于交联的聚合物网络的固有生物相容性,水凝胶是特别有用的(Hill-West等,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5967-5971)。水凝胶生物相容性可以归因于亲水性和吸收大量生物学流体的能力(Brannon-Peppas.Preparation and Characterization of Cross-linked Hydrophilic Networks in Absorbent Polymer Technology,Brannon-Peppas和Harland,Eds.1990,Elsevier:Amsterdam,pp 45-66;Peppas和Mikos.Preparation Methods and Structure of Hydrogels in Hydrogels in Medicine and Pharmacy,Peppas,Ed.1986,CRC Press:Boca Raton,Fla.,pp 1-27)。水凝胶可以通过交联亲水性生物聚合物或合成聚合物来制备。由亲水性生物聚合物的物理或化学交联形成的水凝胶的实例包括但不限于,透明质酸、壳聚糖、藻酸盐、胶原蛋白、葡聚糖、果胶、角叉菜胶、聚赖氨酸、明胶或琼脂糖。(参见:W.E.Hennink和C.F.van Nostrum,2002,Adv.Drug Del.Rev.54,13-36以及A.S.Hoffman,2002,Adv.Drug Del.Rev.43,3-12)。这些材料由高分子量主链构成,所述高分子量主链由直链的或支链的多糖或多肽制成。基于化学或物理交联合成聚合物的

水凝胶的实例包括但不限于(甲基)丙烯酸酯-寡丙交酯-PEO-寡丙交酯-(甲基)丙烯酸酯、聚(乙二醇)(PEO)、聚(丙二醇)(PPO)、PEO-PPO-PEO共聚物(普郎尼克类)、聚(磷腈)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(N-乙基吡咯烷酮)、PL(G)A-PEO-PL(G)A共聚物、聚(乙烯亚胺)等(参见A.S Hoffman, 2002 Adv. Drug Del. Rev, 43, 3-12)。在一些实施方式中,透明的水凝胶支架包含聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)。

[0106] 水凝胶非常类似于天然现存的细胞外基质(Ratner和Hoffman. Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications in Hydrogels for Medical and Related Applications, Andrade, Ed. 1976, American Chemical Society: Washington, D.C., pp 1-36)。水凝胶也可以通过掺入PLA、PLGA或PGA聚合物而制成体内可降解的。此外,水凝胶可以用纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白改性,或,例如,用RGD进行表面改性,其可以促进细胞粘附和增殖(Heungsoo Shin, 2003, Biomaterials 24:4353-4364; Hwang等, 2006 Tissue Eng. 12:2695-706)。事实上,改变分子量、嵌段结构、可降解连接和交联模式可以影响瞬时水凝胶(instant hydrogel)的强度、弹性和降解性质(Nguyen和West, 2002, Biomaterials 23(22):4307-14; Ifkovits和Burkirk, 2007, Tissue Eng. 13(10):2369-85)。

[0107] 在某些实施方式中,本发明的水凝胶是交联的。水凝胶的交联可以使用本领域中已知的任何合适的方法进行。在某些实施方式中,可以利用一种或多种多功能交联剂作为共价地连接生物聚合物或合成聚合物的反应性部分。这样的双功能交联剂可以包括戊二醛、环氧化物(例如,双-环氧乙烷)、氧化葡聚糖、对叠氮苯甲酰肼、N-[α -马来酰亚胺基乙酰氧基]琥珀酰亚胺酯、对叠氮苯基乙二醛一水合物、双-[β -(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物、双[磺基琥珀酰亚胺基]辛二酸酯、二硫代双[丙酸琥珀酰]亚胺酯、辛二酸二琥珀酰亚胺酯、1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和本领域技术人员已知的其它双功能交联试剂。在某些实施方式中,水凝胶包含光活化的交联剂。在一个实施方式中,水凝胶的一种或多种组分在暴露于UV光后发生交联。

[0108] 在某些实施方式中,使用包含NHS和马来酰亚胺的异型双功能交联剂交联水凝胶。在具体的实施方式中,交联剂将水凝胶层直接连接到基底。例如,在一个实施方式中,NHS与脱细胞血管基底上的胺基反应,同时马来酰亚胺与硫醇改性的HA上的巯基反应(图1)。

[0109] 在某些实施方式中,使用包含亚氨酸酯反应基团的同型双功能交联剂诸如DMA(二甲基己二酰亚胺酯 $\cdot 2\text{HCl}$)交联剂交联水凝胶,所述同型双功能交联剂对胺基有反应性。在具体的实施方式中,交联剂将水凝胶层直接连接至基底。例如,在一个实施方式中,亚氨酸酯与脱细胞血管基底上的胺基以及二酰肼改性的HA上的胺基反应。

[0110] 在某些实施方式中,使用交联羧基和胺基的EDC/NHS交联剂交联水凝胶。在具体的实施方式中,交联剂将水凝胶层直接连接至基底。例如,在一个实施方式中,EDC/NHS与未修饰的HA的羧基和脱细胞血管基底上的胺基反应。

[0111] 在某些实施方式中,可以利用一种或多种多功能交联剂作为共价地连接生物聚合物或合成聚合物的反应性部分。这样的双功能交联剂可以包括戊二醛、环氧化物(例如,双-环氧乙烷)、氧化葡聚糖、对叠氮苯甲酰肼、N-[α -马来酰亚胺基乙酰氧基]琥珀酰亚胺酯、对叠氮苯基乙二醛一水合物、双-[β -(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物、双[磺基琥珀酰亚胺基]辛二酸酯、二硫代双[丙酸琥珀酰]亚胺酯、辛二酸二琥珀酰亚胺酯、1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和本领域技术人员已知

的其它双功能交联试剂。

[0112] 在利用交联剂的另一实施方式中,聚丙烯酸酯材料诸如乙氧基化(20)三甲基丙烷三丙烯酸酯可以用作非特异性光活化交联剂。示例性反应混合物的组分将包括保持在39℃下的热可逆的水凝胶、聚丙烯酸酯单体诸如乙氧基化(20)三甲基丙烷三丙烯酸酯、光引发剂诸如伊红Y、催化剂诸如1-乙烯基-2-吡咯烷酮、和三乙醇胺。此反应性混合物持续暴露于长波长光(>498nm)将产生交联的水凝胶网络。

[0113] 本发明的稳定化的交联水凝胶基质可以通过添加一种或多种增强剂进一步稳定和增强。“增强剂”或“稳定剂”意指除了高分子量组分以外添加至水凝胶基质的任何化合物,其通过提供进一步的稳定性或功能优点来增强水凝胶基质。与高分子量组分混合并分散在水凝胶基质内的合适的增强剂包括先前结合上面讨论的热可逆的基质描述的许多添加剂。增强剂可以包括当掺入至交联的水凝胶基质中时通过提供进一步的稳定性或功能优点来增强水凝胶基质的任何化合物,特别是极性化合物。

[0114] 用于与稳定化的交联水凝胶基质一起使用的优选增强剂包括极性氨基酸、氨基酸类似物、氨基酸衍生物、完整的胶原蛋白和二价阳离子螯合剂,诸如乙二胺四乙酸(EDTA)或其盐。极性氨基酸意在包括酪氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸和组氨酸。优选的极性氨基酸是L-半胱氨酸、L-谷氨酸、L-赖氨酸和L-精氨酸。每种特定的优选增强剂的合适浓度与上面结合热可逆的水凝胶基质所述的相同。极性氨基酸、EDTA及其混合物是优选的增强剂。另外,凝胶可以充填有生长因子:碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和/或血管内皮生长因子(VEGF)。在添加交联剂之前将VEGF或bFGF掺入至透明质酸凝胶中。然后继续进行交联,不做其它的改性,将生长因子截留在透明质酸凝胶内。这通过植入部位的邻近内皮细胞促进凝胶的再内皮化。生长因子可以以50ng/cm²待交联的血管面积的浓度加入。增强剂也可以在高分子量组分的交联过程中加入至基质组合物中。

[0115] 由于它们在基质内促进的固有性质,增强剂在稳定化的交联生物活性水凝胶中特别重要。水凝胶基质表现出内在生物活性,这种内在生物活性通过下文所述的附加实施方式将变得更加明显。据信,在增强和强化的极性氨基酸以及其它增强剂的存在下,所述内在生物活性是交联大分子的独特立体化学的功能。

[0116] 在一个实施方式中,水凝胶层可以包含一种或多种治疗剂。例如,一种或多种治疗剂可以被包埋在水凝胶层内。在另一实施方式中,水凝胶层可以用官能团修饰,用于共价地附接多种蛋白质(例如,胶原蛋白)或化合物诸如治疗剂。治疗剂包括,但不限于,镇痛药、麻醉药、抗真菌剂、抗生素、抗炎药、驱虫药、解毒剂、止吐药、抗组胺药、降压药、抗疟药、抗微生物剂、抗精神病药、退热剂、防腐剂、抗关节炎药、抗结核药、镇咳药、抗病毒剂、作用于心脏的药物、泻药、化疗剂、彩色或荧光显像剂、肾上腺皮质激素(诸如类固醇)、抗抑郁药、镇静剂、诊断辅助物、利尿剂、酶、祛痰剂、激素、安眠药、矿物质、营养补充剂、拟副交感神经的药、钾补充剂、辐射敏化剂、放射性同位素、镇静药、磺胺类药、兴奋剂、拟交感神经剂、安神药、尿道抗感染药、血管收缩剂、血管舒张剂、维生素、黄嘌呤衍生物等。治疗剂也可以是其它小的有机分子、天然分离的实体或它们的类似物、有机金属试剂、螯合金属或金属盐、基于肽的药物、或肽类或非肽类受体靶向或结合剂、或肽/蛋白生长因子或细胞因子。考虑治疗剂与基质的连接可以经由蛋白酶敏感性接头或其它可生物降解的连接。可以被掺入至水

凝胶基质中的分子包括,但不限于,维生素和其它营养补充剂;糖蛋白(例如,胶原蛋白);纤连蛋白;肽和蛋白质;糖类(简单糖和/或复合糖两者);蛋白聚糖;抗原;寡核苷酸(有义和/或反义DNA和/或RNA);抗体(例如,针对传染原、肿瘤、药物或激素);和基因治疗试剂。

[0117] 在某些实施方式中,沿基底的腔面涂覆的水凝胶层的厚度为约[100]nm至约[3]mm。在某些实施方式中,水凝胶层被涂覆以第二层。例如,在一个实施方式中,水凝胶层被涂覆以包含抗凝剂的第二层。例如,在一个实施方式中,第二层包含肝素或其衍生物。然而,本发明不限于使用肝素作为抗凝剂。而是,可以使用任何已知的抗凝剂。示例性的抗凝剂包括,但不限于,维生素K拮抗剂、香豆素、姜黄素(Curcumin)(二阿魏酰甲烷(diferuloyl methane))、水蛭素、肝素、Xa因子抑制剂、直接Xa抑制剂、直接凝血酶抑制剂、天然多糖和基于 β -(1-4)连接的脱水葡萄糖单元的合成多糖、硫酸软骨素、黏多糖等。

[0118] 在一个实施方式中,第二层与第一层交联。例如,在一个实施方式中,第二层的抗凝剂与第一层(例如,水凝胶层)的透明质酸交联。在一个实施方式中,第二层的抗凝剂被改性,这在某些情况下允许更容易地与第一层交联。例如,在某些实施方式中,第二层包含胺化的肝素,其中肝素包含伯胺基。在一个实施方式中,肝素在端链亲电子碳原子处被胺化(“端点胺化”)(图2)。

[0119] 在某些实施方式中,胺化肝素与透明质酸经由EDC/NHS交联。然而,本发明的组合物不限于任何具体的交联剂。而是可以使用本领域中已知的任何类型或适于将第一层的一种或多种组分与第二层的一种或多种组分交联的交联剂。在一个实施方式中,第二层的胺化肝素与第一层的HA的羧基交联。在另一实施方式中,胺化肝素与第一层的HA的硫醇基交联。例如,在某些实施方式中,胺化肝素进一步被改性以包含NHS和巯基-反应性马来酰亚胺基。此改性的肝素然后可以自发地与剩余的第一层的硫醇改性的HA的硫醇基反应(图2)。

[0120] 在一个实施方式中,第二层的肝素沿腔延伸,由此当植入所述组合物时将肝素的活性五糖序列暴露于血流。因此,此构型阻止凝血的立即激活。

[0121] 本发明的抗血栓形成组合物的涂层是生物相容的和无毒的。例如,在本文其它地方证明了与涂层接触的细胞可以存活并增殖。因此,虽然在某些实施方式中,本发明的组合物在植入受试者之前不被再细胞化,但是组合物有益于天然细胞的体内再细胞化。在某些实施方式中,体内再细胞化使涂层随时间而降解。

[0122] 在某些实施方式中,本发明的抗血栓形成组合物的涂层是无免疫原性的。即,涂层不在受试者中诱发免疫应答。

[0123] 制备方法

[0124] 本发明提供了制备组合物的方法,所述组合物具有至少一个涂覆有无血栓形成涂层的表面。如本文其它地方所讨论的,本发明的组合物包括基底,例如,生物材料、组织工程基底、或类似物,其中基底的至少一个表面涂覆以无血栓形成涂层。在某些实施方式中,基底包括脱细胞组织。如本文其它地方所讨论的,本发明不限于任何具体的脱细胞组织,也不限于任何具体的生成脱细胞组织的方法。在本文其它地方讨论了制备脱细胞组织的示例性方法,并且这些示例性方法在本领域中是公知的,参见例如US2012/0064050和W02007/025233,它们中的每一个以其全部通过引用并入本文中。

[0125] 所述方法包括将基底的表面涂覆以无血栓形成涂层。如本文其它地方所讨论的,在某些实施方式中,涂层包括单层或多层涂层。在一个实施方式中,所述方法包括用一种或

多种溶液灌注基底。在某些实施方式中,在施加无血栓形成涂层之前,脱细胞组织基底用水、盐水等类似物灌注。

[0126] 如本文其它地方所讨论的,在某些实施方式中,本发明的组合物包括与脱细胞组织基底交联的水凝胶层。在一个实施方式中,脱细胞组织基底用含有交联剂的溶液灌注。本发明不限于任何具体类型的交联剂。而是,可以采用本领域中已知的任何合适的交联剂。在一个实施方式中,交联剂是SM (PEG) n NHS-PEG-马来酰亚胺交联剂(Thermo)。在一个实施方式中,交联剂溶解在DMSO和PBS中以形成交联溶液。交联剂在交联溶液中的相对量可以适当地变化。在某些实施方式中,交联剂在交联溶液中的浓度为约0.1mM至约500mM。在另一实施方式中,交联剂在交联溶液中的浓度为约1mM至约100mM。在另一实施方式中,交联剂在交联溶液中的浓度为约40mM。交联剂溶液然后可以被灌注到脱细胞组织基底上。如本文其它地方所讨论,在某些实施方式中,基底是脱细胞血管。在一个实施方式中,通过血管的腔连续地用溶液灌注管状脱细胞血管。在一个实施方式中,溶液以闭合回路方式灌注。在一个实施方式中,基底用交联溶液灌注约5秒至约2小时。在另一实施方式中,基底用交联溶液灌注约30秒至约24小时。在另一实施方式中,基底用交联溶液灌注约30分钟。

[0127] 在某些实施方式中,在施加交联溶液后,基底用水凝胶溶液灌注。如本文其它地方所讨论,水凝胶溶液可以包含任何合适的生物聚合物、合成聚合物或其组合。在一个实施方式中,水凝胶溶液包含HA。在一个实施方式中,水凝胶溶液包含硫醇改性的HA。水凝胶溶液可以通过将硫醇改性的HA溶解在水中或其它合适的溶剂中来制备。在某些实施方式中,将溶剂脱气,因为在某些情况下,HA将在氧的存在下交联。在一个实施方式中,管状脱细胞血管连续地用所述水凝胶溶液灌注通过所述血管的腔。在一个实施方式中,溶液以闭合回路方式灌注。在一个实施方式中,基底用水凝胶溶液灌注约5秒至约8小时。在另一实施方式中,基底用水凝胶溶液灌注约30秒至约4小时。在另一实施方式中,基底用交联溶液灌注约2小时。在灌注水凝胶溶液后,在某些实施方式中,基底用水、盐水或类似物冲洗。在某些实施方式中,为了产生粗糙形态学的腔面,基底用包含透明质酸酶(hyaluronidase)和胶原酶的溶液灌注。

[0128] 在一个实施方式中,基底涂覆以包含抗凝剂的第二层。例如,在一个实施方式中,第二层包含肝素或其衍生物。然而,本发明不限于使用肝素作为抗凝剂。而是,可以使用任何已知的抗凝剂。示例性的抗凝剂包括,但不限于,维生素K拮抗剂、香豆素、姜黄素(curcumin)(二阿魏酰甲烷(diferuloyl methane))、水蛭素、肝素、Xa因子抑制剂、直接Xa抑制剂、直接凝血酶抑制剂、天然多糖和基于 β -(1-4)连接的脱水葡萄糖单元的合成多糖等。如本文其它地方所讨论的,在某些实施方式中,肝素被改性。在一个实施方式中,ADH-氨基改性的肝素通过将肝素溶解在合适的溶剂——例如,甲酰胺——中并加入己二酸二酰肼(ADH)来制备。在一个实施方式中,将氰基硼氢化钠水溶液加入至混合物中。在一些实施方式中,然后将混合物透析。然后将滞留物冻干并纯化,例如,通过乙醇沉淀。

[0129] 在某些实施方式中,用第二层涂覆基底包括首先用第二交联溶液灌注所述基底。例如,在一个实施方式中,方法包括灌注包含EDC和NHS的第二交联溶液。在一个实施方式中,第二交联溶液包含水、盐水或其它合适的缓冲液。例如,在某些实施方式中,第二交联溶液包含NaCl/MES缓冲液。在某些实施方式中,第二交联溶液的EDC/NHS允许第二层与第一层的HA的羧基交联。在一个实施方式中,基底用第二交联溶液灌注约5秒至约2小时。在另一实

施方式中,基底用第二交联溶液灌注约30秒至约1小时。在另一实施方式中,基底用第二交联溶液灌注约15分钟。

[0130] 在某些实施方式中,用第二层涂覆基底包括在基底上灌注之前,首先用交联溶液活化肝素(或任何已知的抗凝剂)。例如,在一个实施方式中,方法包括加入异型双功能交联剂诸如磺基-SMCC,活化胺化肝素。这使得肝素的预活化的胺基在第一层上的可及的硫醇基上自发地交联。在第二个实施方式中,肝素(或任何已知的抗凝剂)羧基经由包含EDC和NHS的交联溶液活化。基底用第二交联溶液灌注约5秒至约2小时。在另一实施方式中,基底用第二交联溶液灌注约30秒至约1小时。在另一实施方式中,基底用第二交联溶液灌注约15分钟。

[0131] 在某些实施方式中,用第二层涂覆基底包括用抗凝剂溶液灌注所述基底。例如,在某些实施方式中,抗凝剂溶液包含肝素溶液。肝素溶液包含溶解在合适溶剂——包括,但不限于,水、盐水或其它缓冲液——中的肝素。例如,在一个实施方式中,肝素溶解在NaCl/MES缓冲液中。如本文其它地方所述,在某些实施方式中,肝素溶液的肝素被改性。肝素溶液中肝素的量可以根据需要而变化。例如,在某些情况下,肝素的量可以取决于组合物的最终用途。在某些实施方式中,肝素溶液中肝素的浓度为[5 μ M]。在一个实施方式中,基底用肝素溶液灌注约5秒至约3小时。在另一实施方式中,基底用肝素溶液灌注约30秒至约2小时。在另一实施方式中,基底用第二交联溶液灌注约1小时。在某些实施方式中,基底用水、盐水或其它合适的缓冲液冲洗,然后灌注肝素溶液。

[0132] 尽管本发明的优点是不需要再细胞化,但了解本说明书的技术人员将认识到,如果需要,脱细胞组织可以被再细胞化。因此,在某些实施方式中,方法包括离体或体外培养基底的表面上或基底的涂层上的细胞。培养的细胞可以被诱导以增殖遍布组合物的至少一部分。例如,在某些实施方式中,细胞培养使得它们在本文所述的血管移植物组合物的腔面上产生汇合的细胞层。还可以通过培养处于分化中的细胞在体外使细胞分化。可选地,当细胞与哺乳动物内的组织建立接触时或当细胞与组织充分接近从而被从组织释放的物质(例如,生长因子、酶或激素)影响时细胞可以在体内分化。

[0133] 如本文其它地方所述,在某些实施方式中,组合物的基底是脱细胞组织。因此,在某些实施方式中,方法包括基底的再细胞化。

[0134] 被引入至脱细胞器官中和之上以便生成器官或组织的细胞数目取决于器官(例如,哪个器官,器官的尺寸和重量)或组织两者以及再生细胞的类型和发育阶段。关于那些细胞将达到的群体密度,不同类型的细胞可具有不同的趋势。类似地,不同的器官或组织可以以不同的密度被细胞化。举例而言,脱细胞器官或组织可以用至少约1,000(例如,至少10,000、100,000、1,000,000、10,000,000或100,000,000)个再生细胞接种;或可以具有与其附着的约1,000个细胞/mg组织(湿重,即,在脱细胞之前)至约10,000,000个细胞/mg组织(湿重)。

[0135] 可以通过将细胞注射至一个或多个位置中将细胞引入至脱细胞器官或组织。另外,一种以上类型的细胞(即,多种细胞的混合物)可以被引入至脱细胞器官或组织。例如,多种细胞的混合物可以在脱细胞器官或组织中的多个位置处注射,或不同的细胞类型可以被注射至脱细胞器官或组织的不同部分中。可选地,或除了注射以外,再生细胞或多种细胞的混合物可以通过灌注到被插管的脱细胞器官或组织中而引入。例如,可以使用灌注介质

将细胞灌注到脱细胞器官中,然后可以将灌注介质改变成扩张(expansion)和/或分化介质以诱导再生细胞的生长和/或分化。在肺组织的情况下,细胞可以经由气管被引入至气道腔隙(compartment)中的任一个或两个中,或经由肺动脉或肺静脉引入至血管腔隙中。

[0136] 在再细胞化期间,将器官或组织维持在其中至少一些再生细胞可以在脱细胞器官或组织内和之上倍增和/或分化的条件下。这些条件包括,但不限于,适宜的温度和/或压力、电活动和/或机械活动、力、适宜量的O₂和/或CO₂、适宜量的湿度、和无菌或接近无菌的条件。在再细胞化期间,脱细胞器官或组织和附着于其的细胞被维持在合适的环境中。例如,细胞可能需要营养补充物(例如,营养物和/或碳源诸如葡萄糖)、外源性激素或生长因子和/或特定的pH。

[0137] 细胞可以是对脱细胞器官或组织(例如,接种了人细胞的人脱细胞器官或组织)同种异体的,或再生细胞可以是对脱细胞器官或组织(例如,接种了人细胞的猪脱细胞器官或组织)异种的。

[0138] 在一些情况下,通过本文所述的方法产生的器官或组织要移植到患者中。在那些情况下,用来使脱细胞器官或组织再细胞化的细胞可以自患者获得使得再生细胞对于患者是自体的。来自患者的细胞可以使用本领域中已知的方法自,例如,处于不同生命阶段(例如,产前地、新生地或围产期地、青春期期间或作为成年人)的血液、骨髓、组织、或器官获得。可选地,用来使脱细胞器官或组织再细胞化的细胞可以是与患者同系的(即,来自同卵双生),细胞可以是来自,例如,患者的亲属或与患者不相关的HLA-匹配的个体的人淋巴细胞抗原(HLA)-匹配的细胞,或细胞可以与来自例如非HLA-匹配的供体的患者是同种异体的。

[0139] 不管细胞的来源如何(例如,自体的或不是自体的),脱细胞实体器官可以对于患者是自体的、同种异体的或异种的。

[0140] 在某些情况下,脱细胞组织可以用细胞在体内再细胞化(例如,在组织已经被移植到个体内后)。可以如上面所述(例如,注射和/或灌注)利用,例如,本文所述的任一种细胞在体内进行再细胞化。可选地或另外地,利用内源性细胞对脱细胞器官或组织进行体内接种可以天然地发生或通过递送至再细胞化组织的因子介导。

[0141] 使用方法

[0142] 本发明提供了治疗方法,包括施用或植入本文所述的抗血栓形成组合物(例如,抗血栓形成血管移植物)。例如,在某些实施方式中,本发明的抗血栓形成血管移植物用于替代或绕过受试者中损伤的或患病的血管的方法。在某些实施方式中,方法用来治疗受试者中的动脉瘤。在另一实施方式中,方法用来替代或绕过提供不充足血流的血管。

[0143] 在某些实施方式中,方法包括治疗具有患病血管的受试者。例如,借助于本发明的方法治疗的示例性疾病或病症包括,但不限于,周围性血管疾病、动脉粥样硬化、动脉瘤或静脉血栓形成。在一个实施方式中,受试者是哺乳动物。在一个实施方式中,受试者是人。

[0144] 将本发明的基底和组合物移植到待增强的器官或组织可以根据本文中所描述的方法或根据本领域公认的方法执行。组合物可以通过将移植物材料缝合到靶器官而被移植到受试者的器官或组织。植入用于全器官替代的新器官构建体可以根据本文所述的方法或根据本领域公认的外科方法执行。

[0145] 在某些实施方式中,本发明的血管移植物被缝合到受试者的现有血管。例如,本文

所述的抗血栓形成血管移植物可以适宜地定尺寸和成形以模拟或替代受试者的特定的受损或异常的血管。在某些实施方式中,天然血管的待替代区域由受试者经手术切除。本发明的血管移植物的端部然后可以缝合到剩余的血管。

[0146] 本发明的血管移植物可以在任何应用中用于替换任何现有的天然或人造的旁路或分流移植物。因此,它们可以非限制地用于,动脉旁路、心脏多样性 (variety) 和用于治疗周围性血管疾病 (PVD) 两者。本发明的移植物还可以用于在血液透析中使用而形成的瘘的替代物或代用品。本发明的血管移植物还可以用于替代受损的血管诸如创伤损伤的肢体动脉。

[0147] 在某些实施方式中,本发明的方法包括植入本发明的移植物以提供人造动静脉分流或移植物用于透析患者。在血液透析中,通过使患者的血液通过透析仪而“清洗”血液,所述透析仪由被薄膜分隔的两个室组成。血液在膜的一侧通过室,并且透析液在另一侧循环。血液中的废料穿过膜进入透析液中,透析液被废弃,而“清洁的”血液再循环到血流中。到血流的通路可以在外部或内部。外部通路涉及两个导管,一个置于动脉且一个置于静脉中。更常见地和优选地,提供了内部通路。这通过动静脉瘘或AV移植物中的任一个来实现。AV瘘涉及在皮肤下面手术连接动脉和静脉。增加的血量拉伸弹性静脉从而允许更大体积的血流。将针置于瘘中使得可以取出血液用于透析,然后血液通过扩张的静脉返回。

[0148] AV移植物可以用于其静脉出于某种原因而不适合于AV瘘的人。AV移植物涉及手术移植来自患者自己的隐静脉的供体静脉、来自牛的颈动脉或来自患者的动脉至静脉的合成移植物。利用合成AV移植物的主要并发症之一是导致移植物闭塞的血栓形成和新生内膜 (neointimal) 细胞增殖。

[0149] 如本文其它地方所述,本发明的血管移植物的益处在于它们是无血栓形成的,不需要用受试者或供体细胞接种移植物。因此,移植物可以在需要的时刻植入。即,不存在为了制备移植物所需的等待时间。本发明的移植物在标准冷藏期间是稳定的,因此可以充当现成的组合物。

[0150] 实验实施例

[0151] 通过参照下面的实验实施例进一步详细地描述本发明。提供这些实施例仅为了举例说明的目的,不意在是限制性的,除非另外指明。因此,本发明绝不应当被解释为限于下面的实施例,而是,应当被解释为涵盖由于本文提供的教导的结果而显而易见的任何和所有变化。

[0152] 不需要进一步描述,据信,本领域普通技术人员使用前面的描述和下面的说明性实施例就可以做出和利用本发明并且实施要求保护的方法。因此,下面的工作实施例具体地指出了本发明的优选实施方式,并且不应被解释为以任何方式限制本公开的其余内容。

[0153] 实施例1:用于生物学基底的基于透明质酸-肝素的涂层

[0154] 本文描述了用于脱细胞生物学结构 (天然的和组织工程化的) 的涂层的开发,所述涂层由硫醇改性的透明质酸 (HA; 也称为乙酰透明质酸) 的第一层和改性肝素的第二层构建而成。

[0155] HA涂层

[0156] 使用HA上的巯基 (SH) 基团将硫醇改性的HA (Glycosan, San Francisco, USA) 交联到脱细胞生物学结构胺基 (NH₂) 上。这通过由N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和马来酰亚胺组成的

异型双功能交联剂实现,其中NHS与脱细胞血管上的胺基反应,而马来酰亚胺与透明质酸上的巯基反应。交联的透明质酸在管状血管的长度上形成几微米厚的连续层,“隐藏”了脱细胞血管的暴露的胶原蛋白。

[0157] 肝素改性和改性的肝素涂层

[0158] 涂覆的第二步是将经由还原胺化产生的“端点”胺化的肝素经由EDC/NHS交联到透明质酸的羧基(COOH)基团上。“端点”肝素胺化在肝素端链亲电子碳原子上完成,使用氰基硼氢化钠(NaCNBH_3)使所述亲电子碳原子在加热条件下攻击己二酸二酰肼(ADH)伯胺的亲核氮从而产生稳定化的弱键。这在肝素上产生了端点的伯胺基团(图2A顶部)。通过透析清洗端点胺化的肝素,并且将其经由EDC/NHS交联在HA涂层的剩余羧基(COOH)基团上。以此方式附接的肝素沿着腔延伸(由于水合作用),暴露肝素的活性五糖序列,阻止凝血的即刻激活。此反应示意性地描述于图1中。

[0159] 在某些情况下,肝素改性包括附加的步骤。可以通过用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)改性ADH伯胺来进一步进行肝素改性(图2A底部)。此路线使用ADH-胺来连接NHS,留下巯基-反应性马来酰亚胺基。改性的肝素与透明质酸涂层上的剩余硫醇基自发地反应。

[0160] 大鼠主动脉分离

[0161] 在全身麻醉(异氟烷)下采集Sprague Dawley大鼠升主动脉。简言之,通过中线剖腹手术剖开大鼠,并剥离(dissect)升主动脉使其游离。然后用冷PBS冲洗主动脉,并在半小时分离时间内经受脱细胞化。

[0162] 血管的组织工程化

[0163] 通过将500万个猪颈动脉平滑肌细胞接种到围绕硅酮管的管状聚乙醇酸网状物(直径3mm,长度8mm;Concordia Medical,Coventry,RI)上并在与蠕动泵连接的生物反应器中在5% CO_2 和37°C培养形成组织工程化的猪动脉。在培养8周后从生物反应器收获工程化血管并用PBS冲洗2-3次以去除痕量的培养基。在半小时分离时间内,使组织经受脱细胞化。

[0164] 大鼠主动脉和组织工程化血管两者的脱细胞化程序

[0165] 使用基于洗涤剂的方法完成脱细胞化,所述基于洗涤剂的方法包括在CHAPS/SDS缓冲液(8mM CHAPS,1M NaCl,和25mM乙二胺四乙酸(EDTA),1.8mM SDS,1M NaCl,在PBS中)中孵育24小时,然后用PBS洗涤2天以完全去除洗涤剂。最后,将主动脉和/或组织工程化移植物在含有10%(v/v)FBS(Hyclone,Logan,UT)和1%青霉素/链霉素(Pen/Strep)的PBS中孵育。所有脱细胞化步骤在37°C无菌条件下进行并搅动。脱细胞血管在含有1%Pen/Strep的PBS中在4°C贮藏多达2周。

[0166] 涂覆方案

[0167] 通过将血管端部连接到带帽的针上将脱细胞血管安装在内部构建的闭合回路灌注室上。在涂覆血管前,使用含有5%Pen/Strep的PBS溶液灌注。平衡至室温的SM(PEG)n NHS-PEG-马来酰亚胺交联剂(Thermo)(100mg)通过涡旋溶解在187 μl DMSO中,接着进行2min超声处理步骤。当交联剂-DMSO溶液澄清时,加入3ml PBS,并将全部溶液通过三通旋塞立即灌注至血管中。通过第二回路将交联剂溶液灌注回血管内部,以回路方式建立连续灌注持续30min。通过用100ml PBS开放式灌注血管将过多的交联剂冲洗出血管。冲洗不超过15min,因为附接的交联剂的硫醇-反应基团与PBS中的水反应。然后在不打开瓶子的盖的情

况下,将硫醇改性的透明质酸(Glycosan, San Francisco, USA)溶解在1ml脱气水中。将瓶子放置在旋转板上持续30分钟以充分溶解。在2小时的过程中将2毫升重构的硫醇改性的透明质酸以闭合回路的方式灌注到血管中。2小时后,通过插入到三通旋塞中的注射器抽吸去除过多的硫醇改性的透明质酸。然后用500ml PBS以一个回路方式冲洗血管2小时,去除未反应但结合的透明质酸。

[0168] 如果需要较粗糙的形态学,用5ml透明质酸酶(300 μ g/ml)/胶原酶(0.5mg/ml)混合物在37 $^{\circ}$ C下灌注经清洗的血管2小时。在透明质酸酶/胶原酶混合物的灌注后,用200ml PBS通过开放式灌注冲洗血管。

[0169] 通过将肝素(100mg, 8.3 μ mol)添加到10mL甲酰胺并在50 $^{\circ}$ C下加热制备ADH-氨基改性的肝素。在肝素全部溶解(约30分钟)后,加入己二酸二酰肼(ADH)(10mg, 92 μ mol)。反应在50 $^{\circ}$ C下维持6h。然后加入氰基硼氢化钠水溶液(9.5mg, 150 μ mol)并将混合物在65 $^{\circ}$ C下孵育另外24h。用50mL水稀释反应混合物并使用3500截留分子量(MWCO)透析膜针对2L水透析48h。回收滞留物,冻干并通过乙醇沉淀纯化。氨基改性的肝素(120mg)溶解在处于pH 7的16%w/v NaCl/MES缓冲液中。EDC(110mg)和NHS(78mg)溶解在10ml处于pH 5的16%w/v NaCl/MES缓冲液中并灌注通过血管持续15分钟。(胶原蛋白的预活化羧基)。通过灌注50ml处于pH 7的MES缓冲液冲洗过多的EDC/NHS。溶解的肝素然后灌注通过血管持续1小时。通过灌注500ml PBS洗涤过多的未反应的肝素。

[0170] HA和HA-肝素涂层的特征

[0171] 使用主动脉氨基和HA硫醇基经由NHS-马来酰亚胺SM(PEG)₁₂交联剂将HA交联到脱细胞主动脉上,所述交联剂被优化为40mM SM(PEG)₁₂交联剂浓度用于全部覆盖脱细胞结构。通过纳米粒子(NP)标记物评估用于肝素添加步骤的HA层上可用的表面可及的羧基。如在40mM SM(PEG)₁₂浓度下由NP所指示的那样,在HA涂层的表面上保留了游离羧基的丰度。

[0172] 管状脱细胞大鼠腹主动脉以闭合回路方式涂覆。血管腔侧的形态学改变在扫描式电子显微镜(SEM)图像中是明显的,如图4中所示。由于脱细胞洗涤剂洗涤对于细胞去除是必须的,则对照-脱细胞主动脉(腔直径约3mm)具有粗糙的外观。通过SM(PEG)₁₂将HA交联到血管表面上导致平滑的血管表面。在HA层的顶部上的“端点”交联的肝素层恢复了血管的较粗糙外观。

[0173] 脱细胞大鼠腹主动脉逐层HA-肝素涂层的SEM横截切片显示涂层在主动脉中沿腔延伸。如图5中所示,涂层被观察到是涂覆多孔血管的平滑结构。

[0174] 利用甲苯胺蓝、爱茜蓝和爱茜蓝/PAS对逐层涂覆的血管横截切片进行组织学分析。甲苯胺蓝是被吸引到带负电荷的结构诸如肝素的碱性染料。在碱性条件下,爱茜蓝和爱茜蓝/PAS阳离子染料也被吸引到带负电荷的结构。如图6中所示,所有三种染料均强烈地染色HA-肝素涂层。

[0175] 为了评估涂层的血栓形成效果,在持续搅动下在脱细胞血管、HA-涂覆的血管和HA-肝素涂覆的血管的表面上孵育分离的血小板。如图7和8中的SEM图像所示,血小板强烈地粘附于未涂覆的脱细胞血管,并且未涂覆的脱细胞血管的表面被血小板和红细胞致密地覆盖。脱细胞血管的表面上含有丰富的胶原蛋白,胶原蛋白是血小板的强力激活剂,因此未涂覆的脱细胞血管是血栓形成的。相比较,HA和HA-肝素涂覆的血管两者强烈地抵制血小板粘附。事实上,在涂覆的血管的表面上难以找到任何血小板。

[0176] 为了评估HA层上的固定化的功能性肝素的量,利用X因子测定。其是基于通过生物活性肝素构象改变抗凝血酶III,导致Xa因子抑制的方法。然后通过S-2732发色底物(Suc-Ile-Glu(g-Pip)-Gly-Arg • pNA)测量X因子抑制,并通过与以与支架相同的方式反应的肝素标准品(0-100ng)比较评估功能性肝素。表面灭活X因子的能力与延缓血液凝固级联的表面能力强烈相关联。与新鲜切除的被功能性内皮细胞衬里以延迟凝固的天然主动脉相比,HA-肝素涂覆的脱细胞主动脉显示至少同样多活性的肝素,所述活性的肝素抑制X因子活性(图9)。脱细胞对照主动脉是高度血栓形成的,并且没有证明任何肝素活性,如由非常低的X因子灭活作用所证明(参见图9)。生长5天的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的连续单层——其已知能证明抗凝活性——证明抗X因子活性比HA-肝素涂层低。

[0177] 为了评估这些涂层的潜在毒性,将从人脐带分离的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)接种在HA-肝素逐层涂覆的主动脉上并培养2周。HUVEC在涂层表面上增殖,但在2周的时间内通过降解涂层也侵入了涂层。HUVEC向下侵入涂层中可以从共聚焦显微镜图像看到(图10),其中向内迁移的HUVEC显示在10 μ m协议栈上。

[0178] 还进行试验以检验涂层是否产生炎症反应,刺激单核细胞和巨噬细胞的补充,或刺激白细胞的粘附和侵袭。此外,完成试验以确定用这些涂层涂覆的移植物在植入到脉管系统中后是否在腔内涂覆以宿主内皮细胞。此外,进行试验以确定HA层或肝素层是否与有助于移植物的细胞种群的生长因子结合。最后,进行试验以确定涂层是否对内皮增生——对于动脉移植物常见的中期至晚期失功模式——有抗力。

[0179] 本文所述的数据证明HA和HA-肝素涂层起生物学支架——其包括脱细胞血管移植物——的抗血栓形成涂层的作用。本文所述的涂层利用HA与脱细胞组织的蛋白基底的交联。此外,肝素在HA上的逐层涂覆增强了即刻抗凝剂特性。HA层为血栓形成胶原蛋白、其它细胞外基质蛋白或刺激外源性或内源性凝血级联的合成材料提供了物理屏障,同时活性肝素层以其活性构象与暴露的五糖序列附接从而自由地与血液成分相互作用。

[0180] 证明单独具有HA的涂层抑制凝血,如通过弱化血小板粘附/激活和使X因子和凝血酶活性失活所证明。因此,HA涂层可以有效用于小口径移植物(即,直径小于或等于6mm)。此外,HA-涂覆的移植物显示出更高的机械性能,如通过由涂层的机械特性所赋予的增加的缝合强度所测量。数据还证明HA-涂层和HA-肝素逐层涂层高度有益于细胞向内生长。因此,如本文所提出的,HA涂层和逐层HA-肝素涂层起血管移植物的功能性抗血栓形成涂层的作用。

[0181] 为了更充分地在含有胶原蛋白的移植物的表面上表征凝胶形成的过程,在25 $^{\circ}$ C下通过应力控制的流变仪(ARES LS1,TA Instruments,New Castle,DE)评价PEG交联剂和透明质酸(HA)的凝胶化时间。将猪脱细胞主动脉安装在装置的钛锥上,接着孵育400 μ l PEG交联剂45分钟。此后,吸出PEG交联剂,并将1000 μ l HA加样到脱细胞猪主动脉的顶部(这些步骤模拟3D灌注涂覆)。最后,脱细胞猪主动脉-HA凝胶复合物用装置的不锈钢板(25-mm直径,0.04-弧度角,45- μ m间隙)闭合。作为对照,将HA凝胶沉积在脱细胞猪主动脉上,无需加入PEG交联剂步骤,并且以同样的方式用不锈钢板使系统闭合。每9s记录弹性模量(G')和损失模量(G'')(1%应变,1Hz)持续24h。HA-PEG凝胶和单独HA凝胶的复数剪切模量(恢复模量)由下式计算:

[0182]
$$G = \frac{Td}{2I_p\gamma}$$

[0183] 其中T是转矩响应,d是样品直径, γ 是正弦曲线的剪切应变, I_p 是圆柱体的极惯性距($I_p = \pi d^4/32$)。

[0184] 如在图11中可以看到的那样,在没有交联剂的情况下对脱细胞主动脉上的HA凝胶的强加振荡剪切应力的流变学响应是流体样的初始响应,所述初始响应在23小时后聚合成增加的体积的80%。这显示在组A中,并且23小时由在 5×10^4 秒时与log时间的x-轴相交的红色虚线指示。当将时间框架从Log标度转换成Ln标度(在组B中绘制的Ln标度)时,在脱细胞移植物上的单独HA组分的聚合产生了23小时的相同时间框架以获得80%聚合。

[0185] 在添加HA组分前在脱细胞主动脉上添加PEG交联剂激活胺基,其在4小时的孵育时间内引起HA层的80%聚合。这在组C和D中是明显的,其中在Log时间和Ln时间两者中恢复模量(G'')相对于时间的(分别)作图在组C 10^4 秒时变成恒定的(log标度)。在添加HA组分前在脱细胞主动脉上添加PEG交联剂激活胺基,其在4小时的孵育时间内引起HA层的80%聚合。4小时后粘性(G'')和弹性(G')没有大幅度变化是HA凝胶组分没有进一步显微结构变化的指示,这表明在HA之前PEG在4小时内达到了其“成熟(mature)”形式。在所有情况下80%聚合被大致估计为没有进一步显微结构变化从恢复模量相对于时间的恒定性显而易见的位置。在所有组中这利用红色虚线标识。

[0186] 由此所描述的流变学表征将HA组分在脱细胞血管上灌注以形成涂层的灌注时间设定为4小时的最小灌注时间至18小时的最大灌注时间。

[0187] 为了评估涂层的稳定性,将猪和大鼠主动脉以及组织工程化血管移植物脱细胞并涂覆以单独透明质酸(HA)和透明质酸/肝素(HA/HP)两者。在此显示的实施例来自大鼠脱细胞腹主动脉,但各种研究的脉管结构表现相似。

[0188] 通过将涂覆的脱细胞血管在下面的条件下在37℃孵育2周而评价HA和HA/HP涂层的稳定性:1) PBS;2) M199细胞培养基;和3) 通过将新鲜抽取的大鼠血液通过0.2μm注射器式过滤器过滤获得的新鲜分离的大鼠血浆。在上述的孵育后,通过在第1、3、7和14天时使用咔唑测定定量溶液中多糖的总量来评价洗脱的涂层。咔唑测定利用2μg/ml的检测限基于比色变化定量溶液中的多糖。

[0189] 从各种涂覆的脱细胞表面释放的HA和HA/HP的量与从未涂覆的脱细胞血管(稳定的阴性对照样品)释放的多糖量是相当的。例如,检测到的从涂覆的表面释放的多糖的最大量是0.2μg/ml,该量是由用作阴性对照的未涂覆的脱细胞血管释放的多糖量且该量也低于咔唑测定检测限。随时间变化释放到溶液中的低量多糖指示在体外生理条件下涂层的高稳定性。

[0190] 在两周孵育时间后,使用甲苯胺蓝和爱茜蓝/PAS染料对脱细胞血管上的残留涂层的涂覆的脱细胞移植物进行组织学评价。如图12中所示,在37℃下PBS孵育2周后,透明质酸/肝素涂覆的脱细胞大鼠主动脉降涂层的连续层保持原位。与未涂覆的(对照)脱细胞大鼠主动脉——在该主动脉中仅存在脱细胞主动脉的背景染色——相比较,这是特别明显的。另外,在用新鲜抽取的大鼠血浆孵育2周(每3天更换一次)后,如通过甲苯胺蓝和爱茜蓝/PAS染色所见,在脱细胞大鼠主动脉上透明质酸/肝素涂层还保持可见。此观察结果提示在2周时间内血液酶没有降解涂层的整体。

[0191] 评价单个涂层上的内皮细胞生长反应。涂覆单独的PEG交联剂层、PEG交联剂与透明质酸层、和最后涂覆组合的PEG交联剂-透明质酸与肝素组分。胶凝化后,用新鲜分离的人

脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 接种这些系统中的每一个并培养3天。图13显示了培养第3天的 HUVEC, 其用DAPI对核进行染色(图13), 用VE-钙黏着蛋白对内皮细胞膜表面标志物进行染色(图13)。看见涂层的各层支持内皮体外的细胞粘附和增殖。涂层的某些区域的细胞覆盖不如其它区域密集, 因为遍及涂层细胞覆盖是不均匀的。

[0192] 采集胸部分和腹部分的大鼠主动脉并脱细胞。将脱细胞大鼠主动脉植入到三只大鼠中, 不进一步改性(对照组), 并且三个脱细胞大鼠主动脉在植入前使用施加PEG交联剂, 接着施加硫酸化HA以在脱细胞主动脉的腔面上形成凝胶的步骤来涂覆透明质酸。通过下述步骤完成大鼠植入: 首先夹住肾下主动脉的近端部分和远端部分, 并去除17-mm节段的主动脉, 该段主动脉被未处理的脱细胞大鼠主动脉(对照组) 或透明质酸-涂覆的脱细胞大鼠主动脉替换。使用间断的9-0单丝尼龙缝线通过端对端吻合术插入植入物。在将移植物缝合就位后, 缓慢地去除远端血管夹, 然后去除近端血管夹, 并使血流恢复通过移植物。通过彩色多普勒成像监测移植物通畅性, 并利用12-MHz扇形探头和回波成像装置在2周和4周时记录脉搏波。测量移植物直径和血流速度。小心地检查血栓形成和动脉瘤形成的征象。4周后处死大鼠, 并通过使用苏木精和伊红 (H&E) 染色移植物的节段来组织学评价移植物, 以便总体评价。

[0193] 在图14上组中显示的未涂覆的脱细胞移植物(对照组) 形成具有大量的纤维蛋白沉积物的大的血凝块, 这些纤维蛋白沉积物几乎完全阻塞了腹主动脉的血流。H&E染色显示了大的纤维蛋白化的血凝块, 所述血凝块覆盖植入的移植物的几乎整个腔开口。在植入后4周时对血流的多普勒超声记录显示没有血流的记录。在一些大鼠中, 血流全部缺失, 在其它大鼠中存在约3cm/s的一些最小血流。另一方面, 透明质酸涂覆的脱细胞大鼠主动脉证明在大多数大鼠中没有血凝块, 如在图13中下组的H&E染色的横截切片中所示。一些大鼠显示小至中等尺寸的凝块沉积物和植入的主动脉的一些阻塞。在腔的一些区域(显示在图14下组中) 上的外植体中可见到透明质酸涂层但涂层的厚度大幅减小。透明质酸涂覆的脱细胞大鼠主动脉证明在4周外植时间时具有正常血流, 如图15下组中所示。外植体不扩张, 但外观与植入前相似。在大多数区域上, 植入物离开管腔结合在周围组织内。对T-细胞和巨噬细胞标志物的染色揭示了在植入物中没有炎症反应的确证性征象。

[0194] 在大鼠动物模型中植入的透明质酸涂覆的脱细胞血管大鼠主动脉表明了透明质酸涂覆的血管移植物的临床可行性。

[0195] 组织工程化血管移植物 (TEVG) 根据已建立的实验方案生长, 以从犬采集的平滑肌细胞开始。移植物的直径为4mm, 长度为大约5cm。如以前在专利中所述的那样将TEVG脱细胞。在对照组中, 将脱细胞TEVG植入, 不做进一步改性; 并且第二个动物组接受透明质酸和肝素-涂覆的脱细胞TEVG。犬研究使用的移植物比大鼠动物研究使用的移植物长(植入的移植物长度为约5cm), 并且选择颈动脉的植入部位作为比大鼠腹主动脉更有侵入性的动物模型。

[0196] 通过首先识别犬颈动脉并剥离犬颈动脉使其游离于周围组织来执行植入手术。去除1厘米颈动脉, 并使用端对侧吻合术将透明质酸-肝素-涂覆的脱细胞TEVG (4-mm内径) 植入到右颈动脉中。通过相同的程序将未涂覆的脱细胞TEVG (4-mm内径) 植入在左颈动脉中。血管移植物的内径与受体颈动脉密切匹配。所有血管移植物的通畅性通过多普勒超声在植入后立即检查。植入物在犬中保留4周, 在4周时将它们取出并进行组织学检查。

[0197] 类似于大鼠动物模型,在图16上组中显示的未涂覆的脱细胞TEVG(对照组)形成了大的血凝块,其具有大量的纤维蛋白沉积物并变得几乎完全堵塞。图15中的H&E染色显示了大的纤维蛋白化血凝块,所述血凝块覆盖了植入的移植物的几乎整个腔开口。透明质酸-肝素-涂覆的脱细胞TEVG证明了可变的結果,其中一些区域显示完全没有血凝块,其它区域显示一些血凝块形成,但显著少于对照移植物。在透明质酸涂覆的TEVG的腔面上发现了内皮细胞,如图16中所标识的。

[0198] 在犬颈动脉动物模型中植入的透明质酸涂覆的脱细胞TEVG是挑战性的模型,其进一步表明了透明质酸涂覆的血管移植物的临床可行性。

[0199] 本文中引用的每一件和任一件专利、专利申请和出版物的公开内容都以其整体通过引用并入本文。尽管本发明已经参照具体的实施方式进行了公开,但很显而易见的是在不背离本发明的真实精神和范围的前提下,本发明的其它实施方式和变化形式可以由本领域技术人员进行设计。所附的权利要求意在被解释为包括所有这样的实施方式和等效的变化形式。

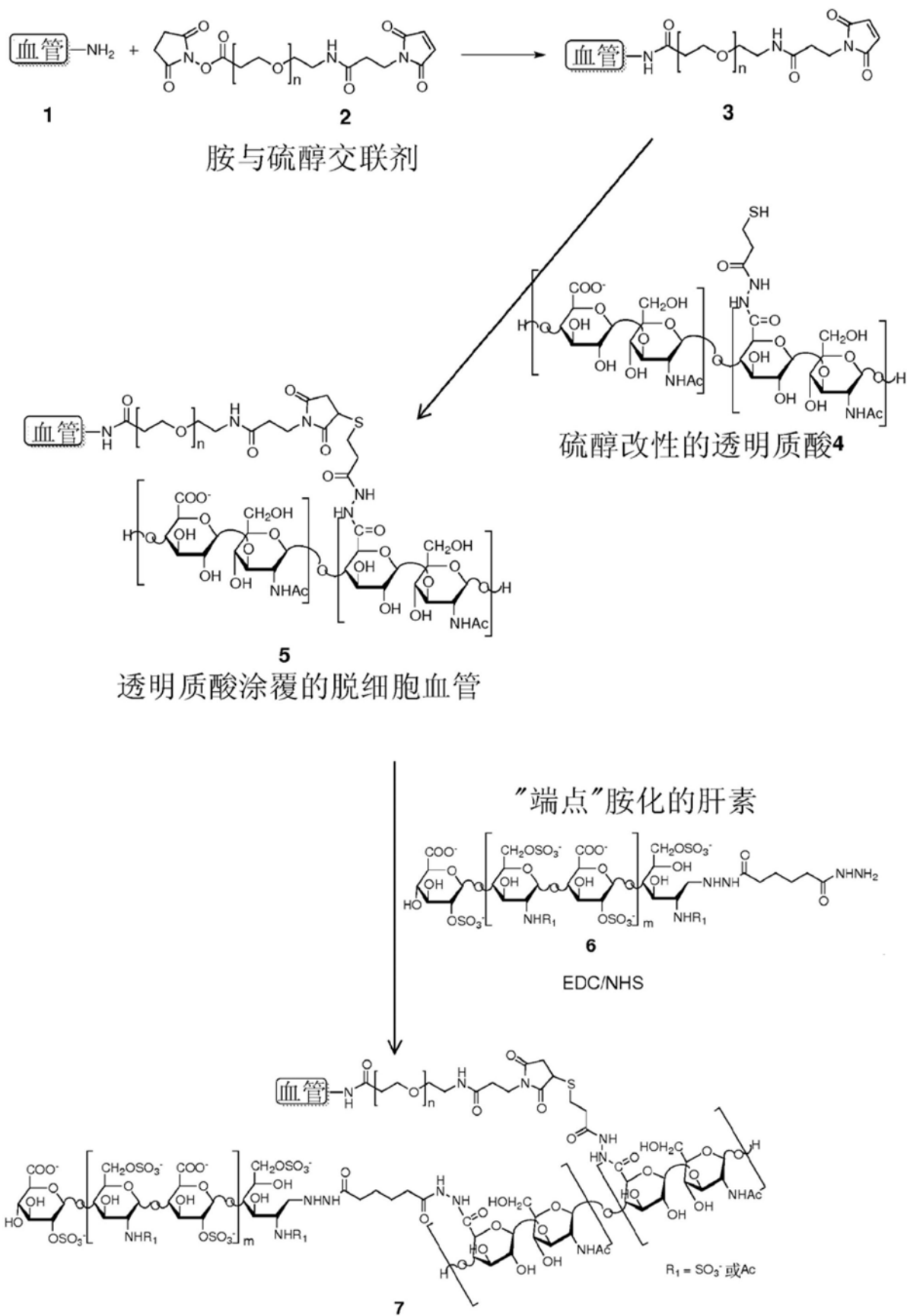


图1

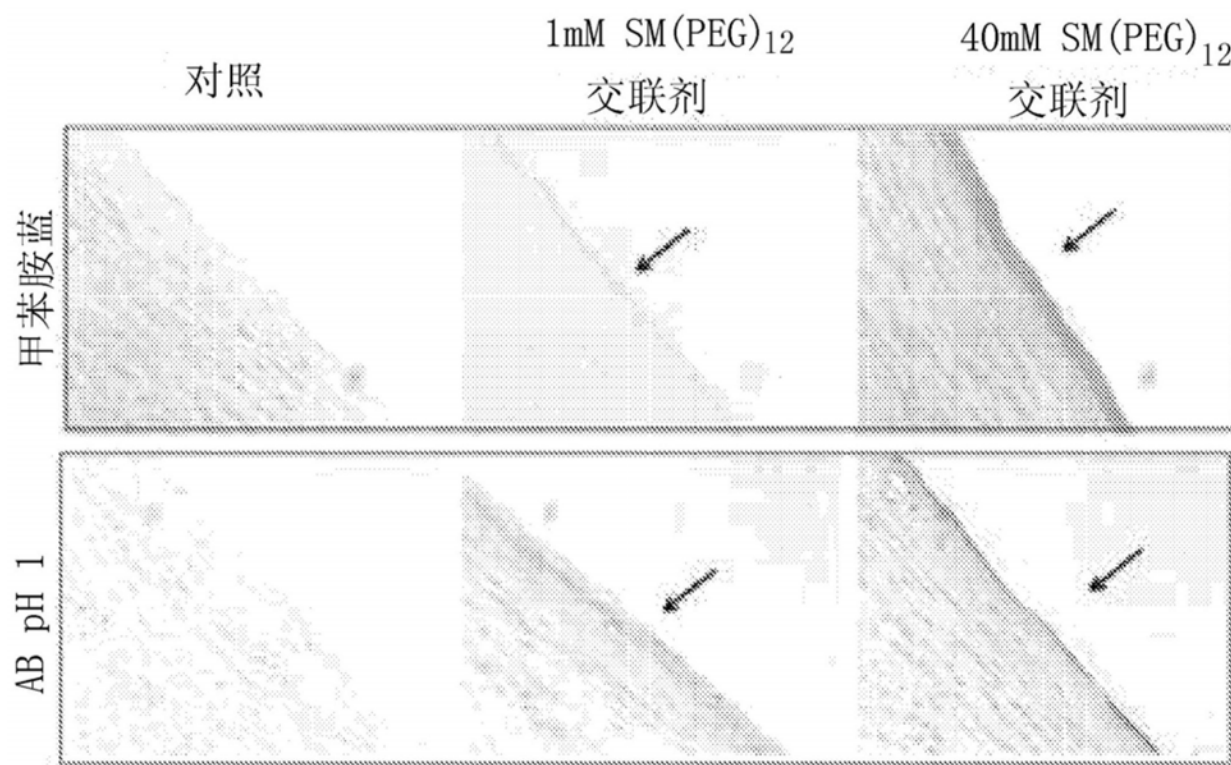
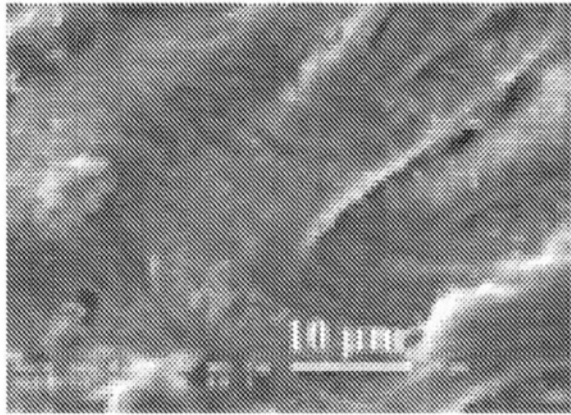
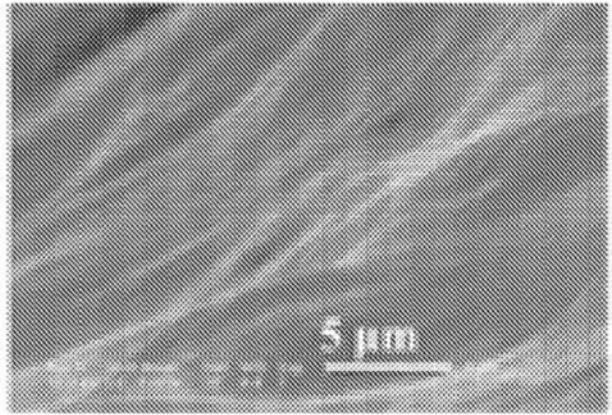


图3

对照



透明质酸



透明质酸/肝素

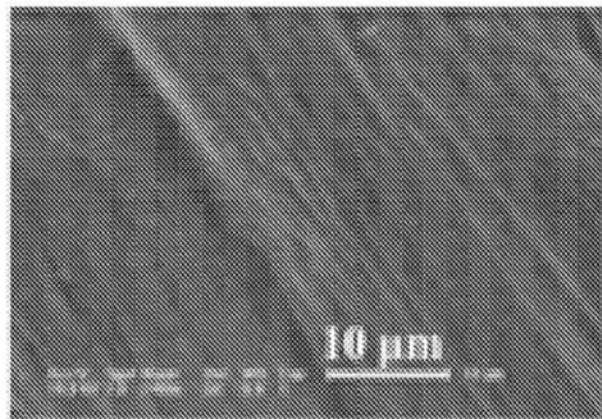


图4

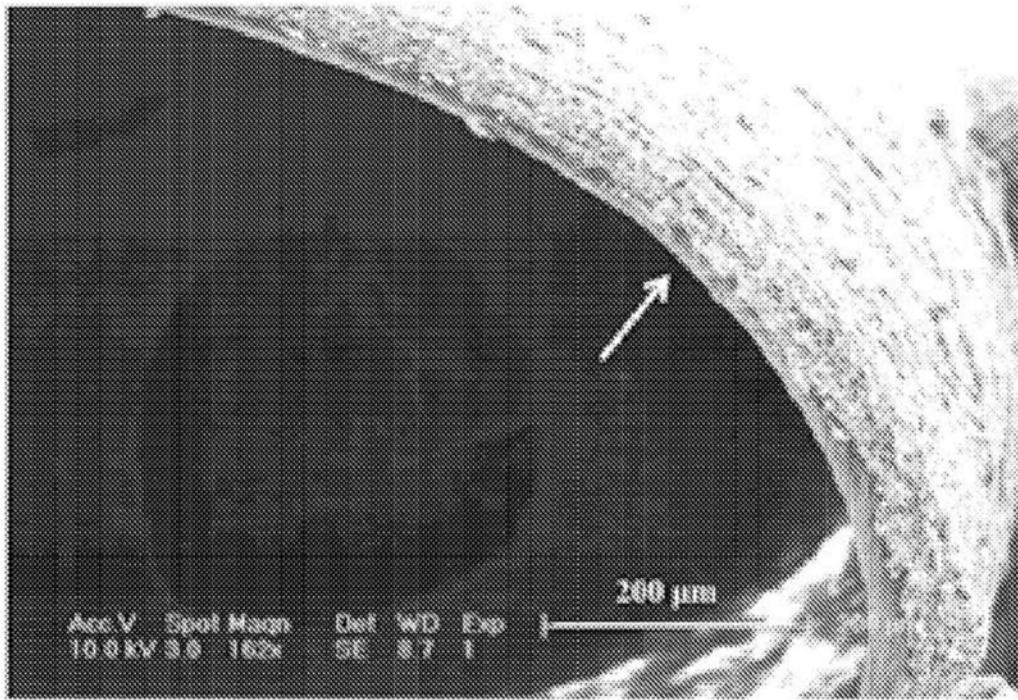


图5

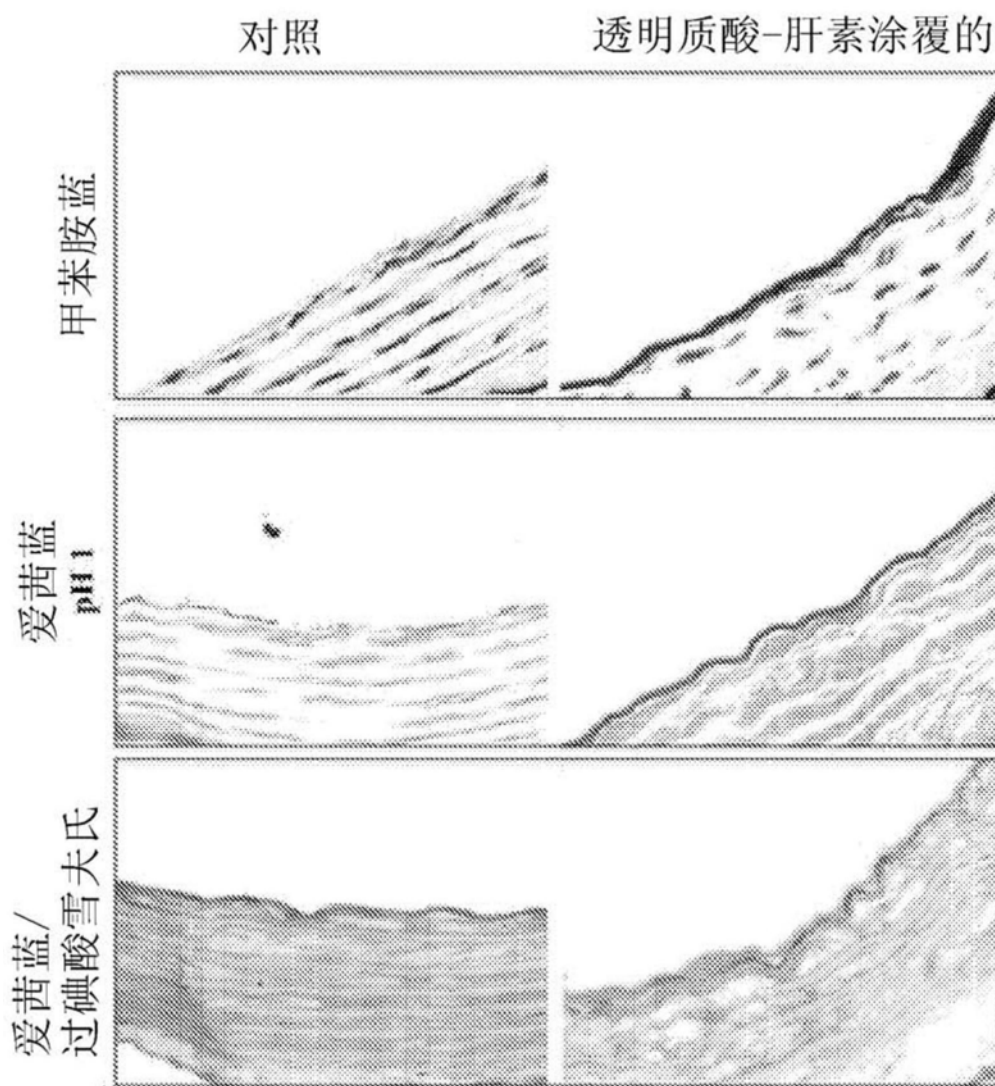
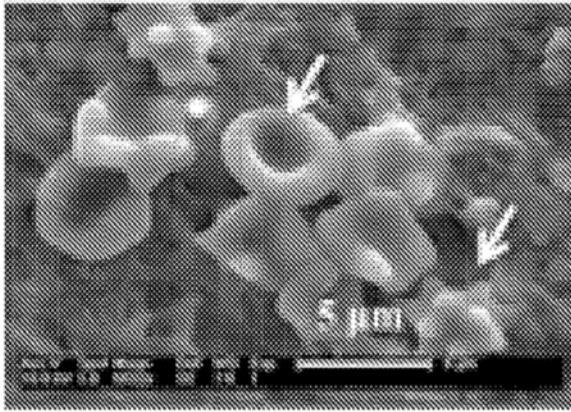
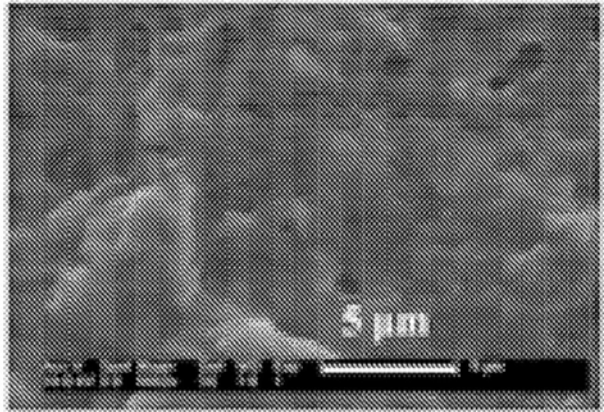


图6

对照



透明质酸



透明质酸/肝素

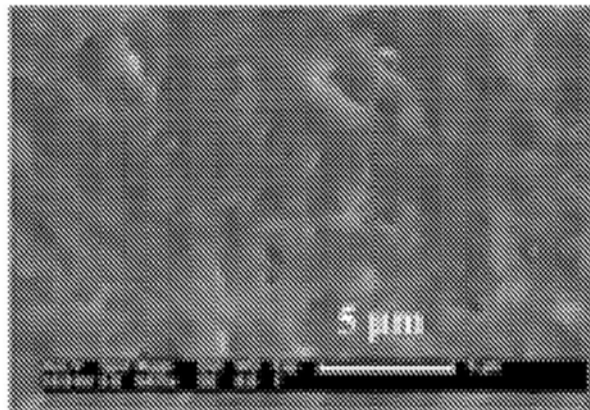
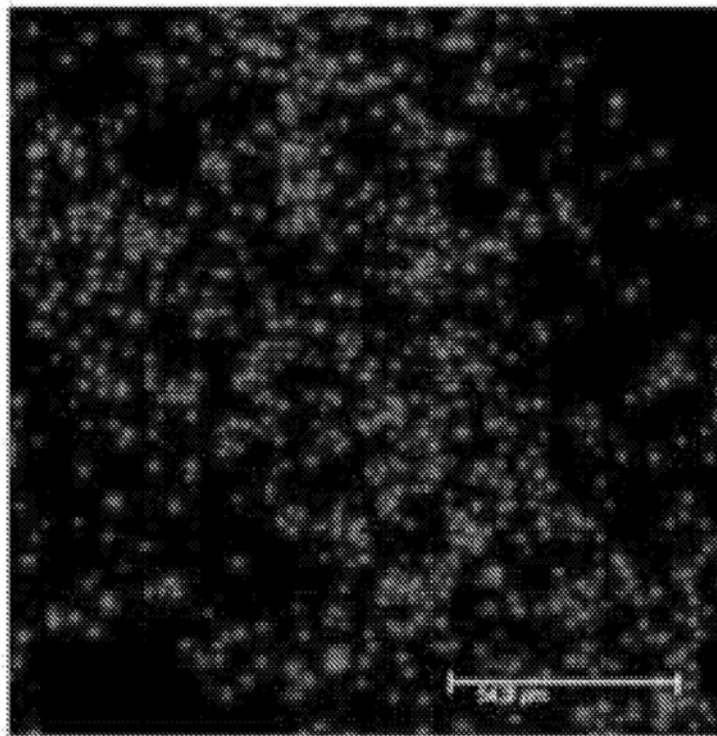


图7

脱细胞对照



透明质酸-肝素涂覆的

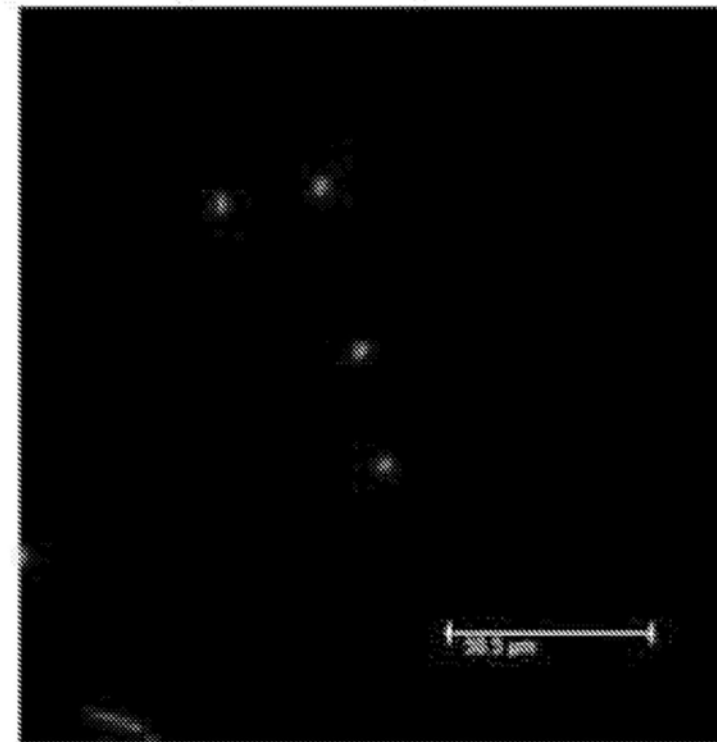


图8

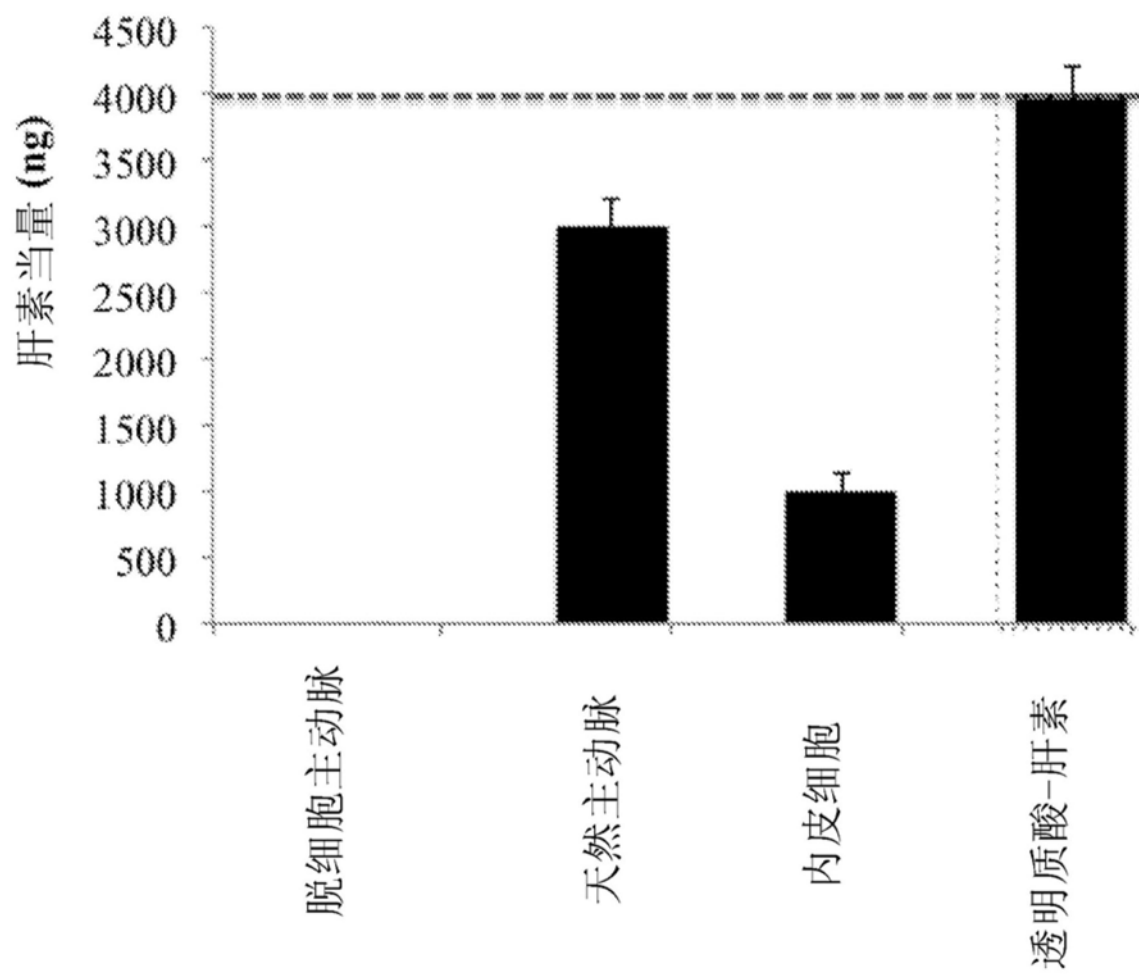


图9

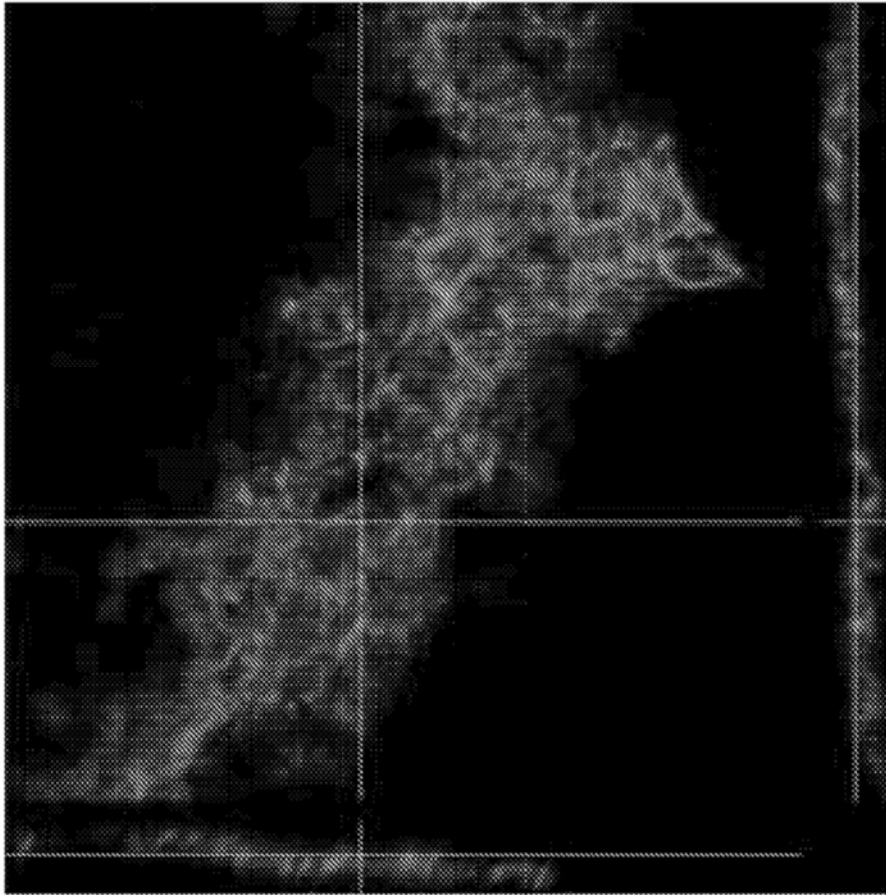


图10

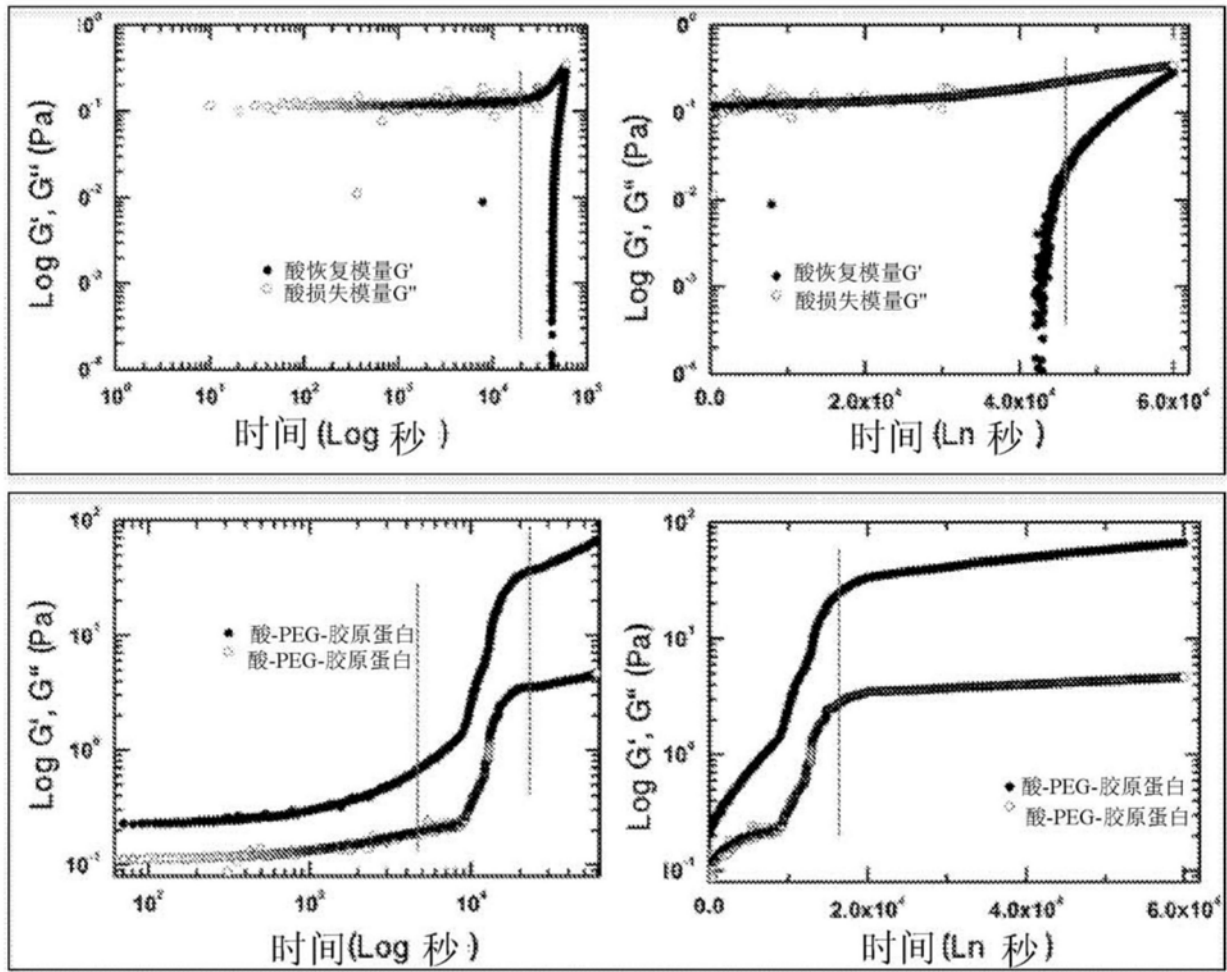


图11

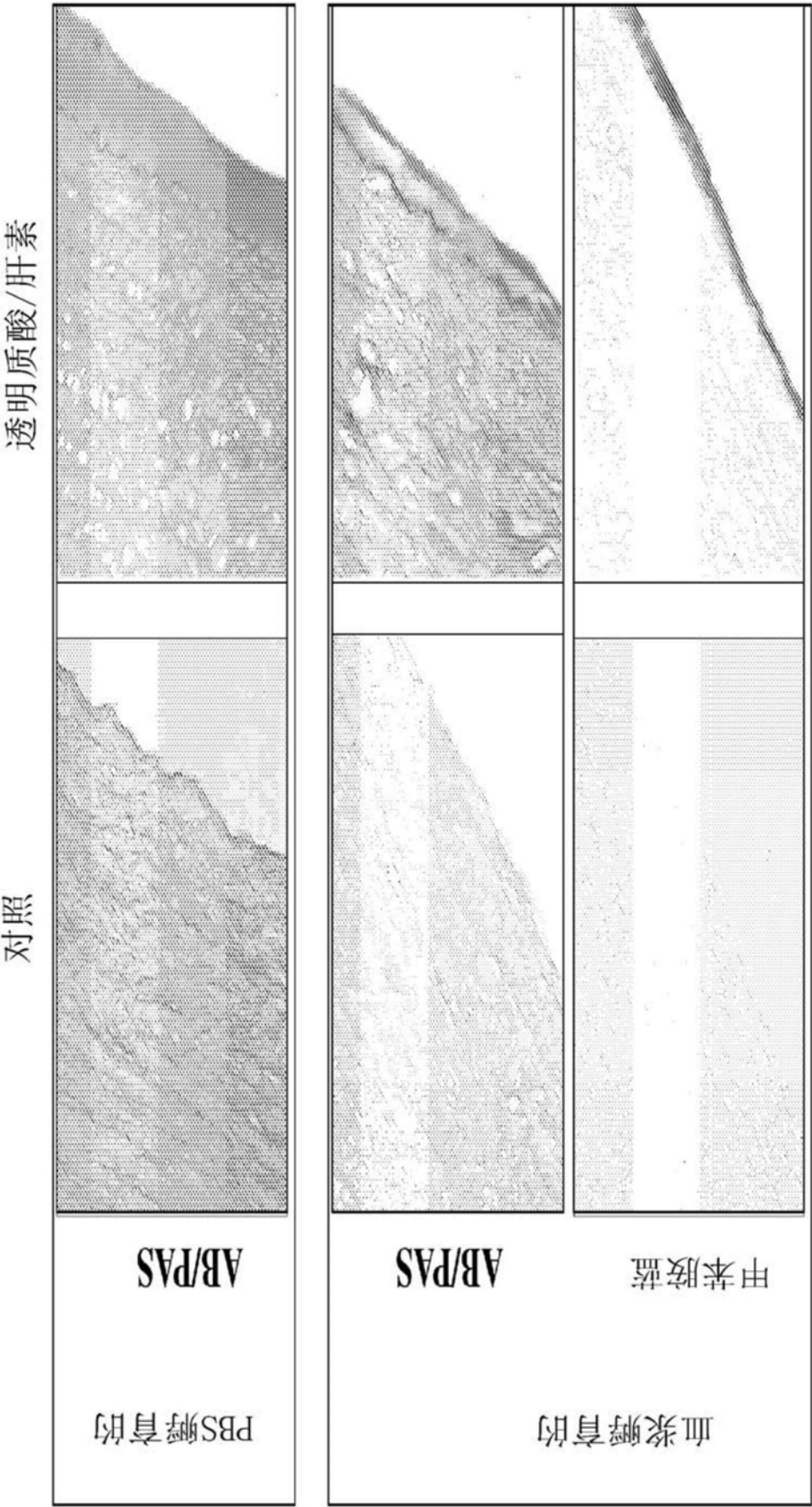


图12

表面活化-PEG交联剂

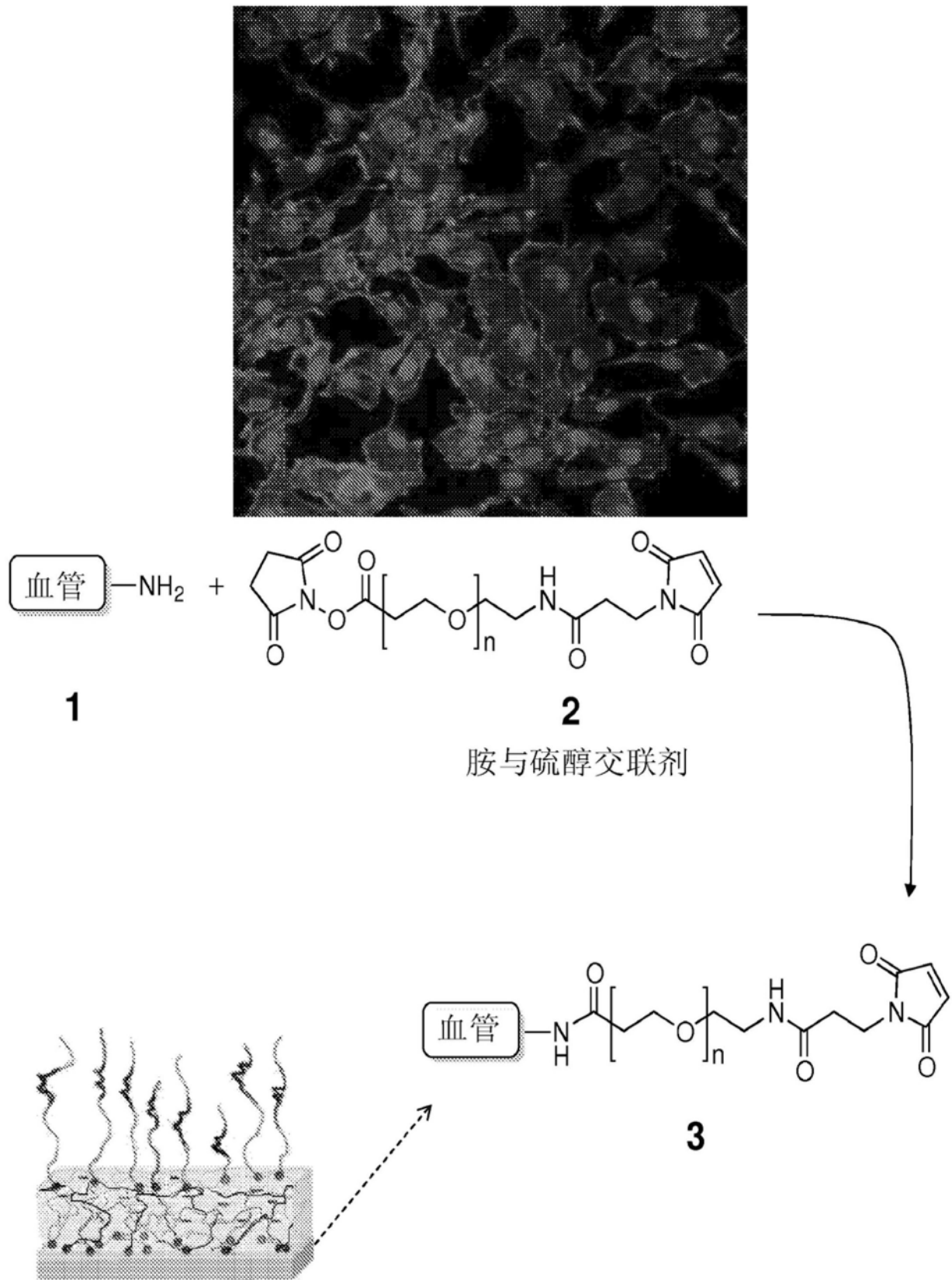
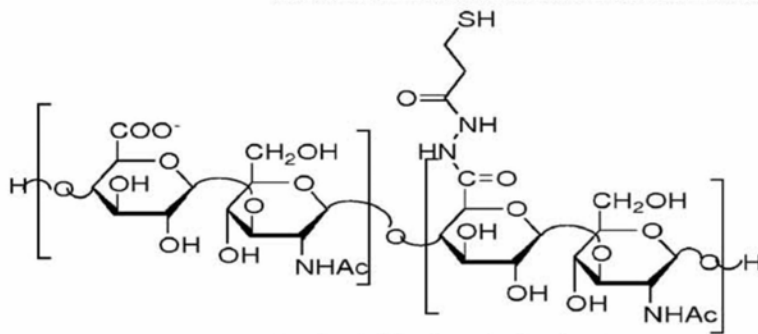
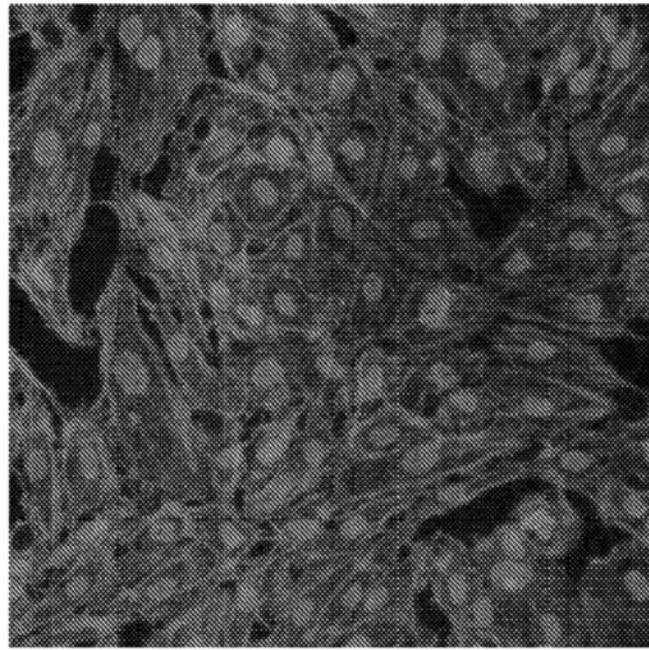
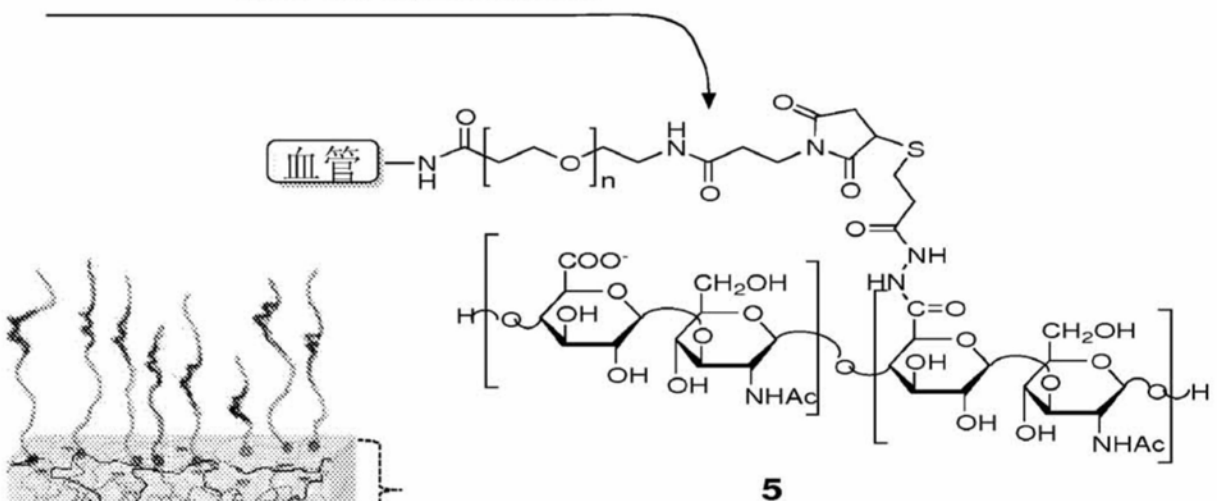


图13

层1-透明质酸



硫醇改性的透明质酸4



5

透明质酸涂覆的脱细胞血管

图13续

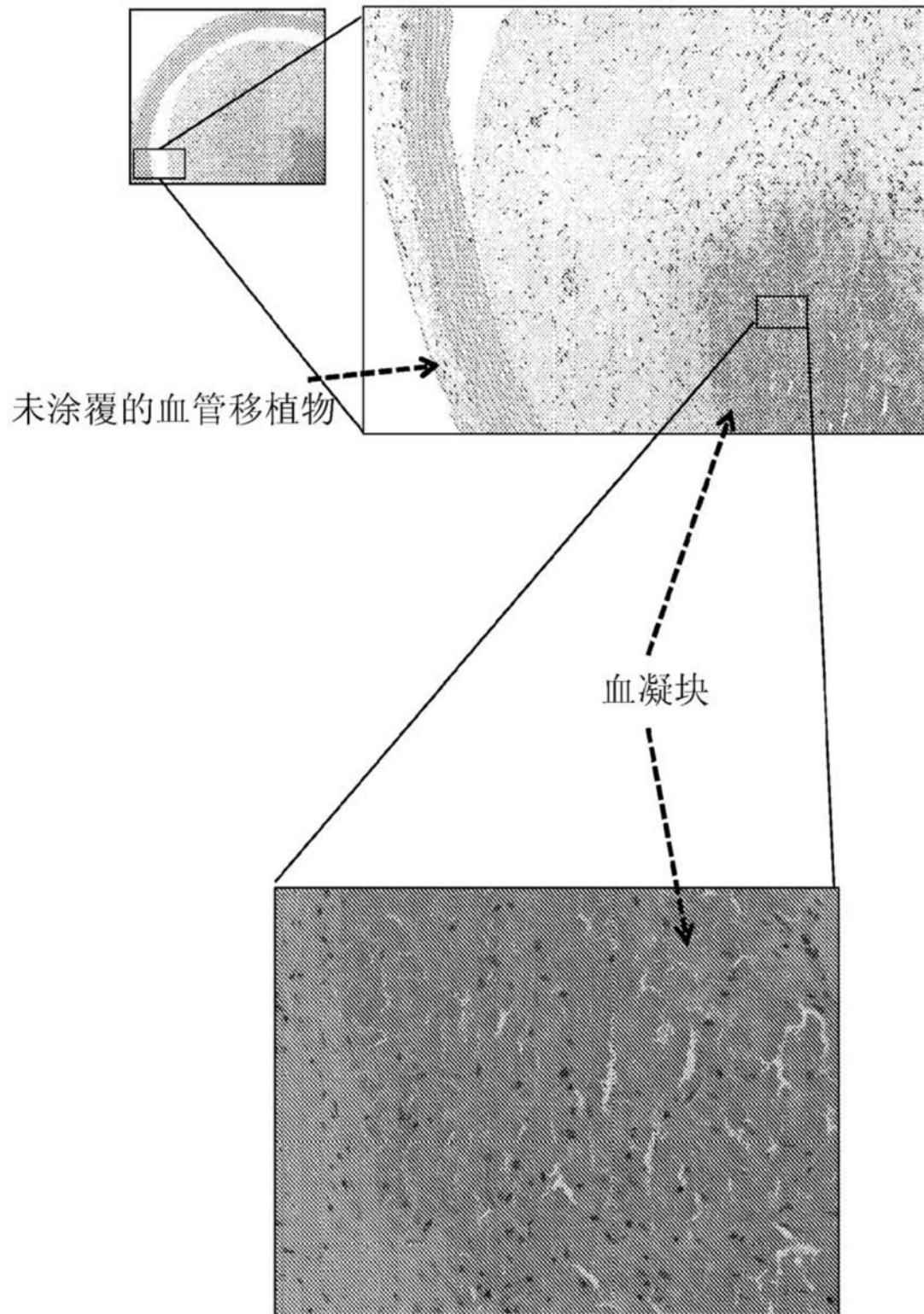


图14

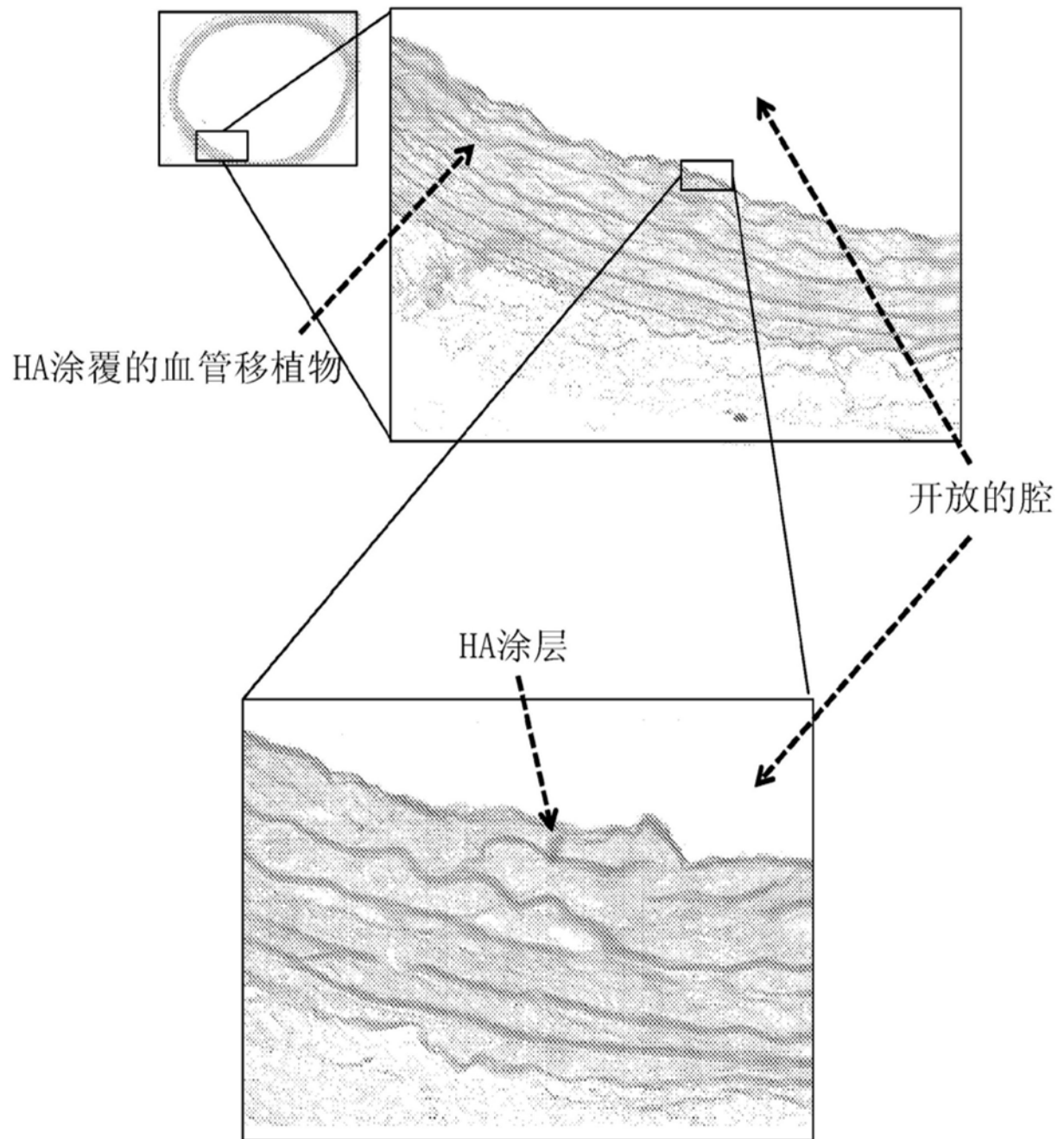


图14续

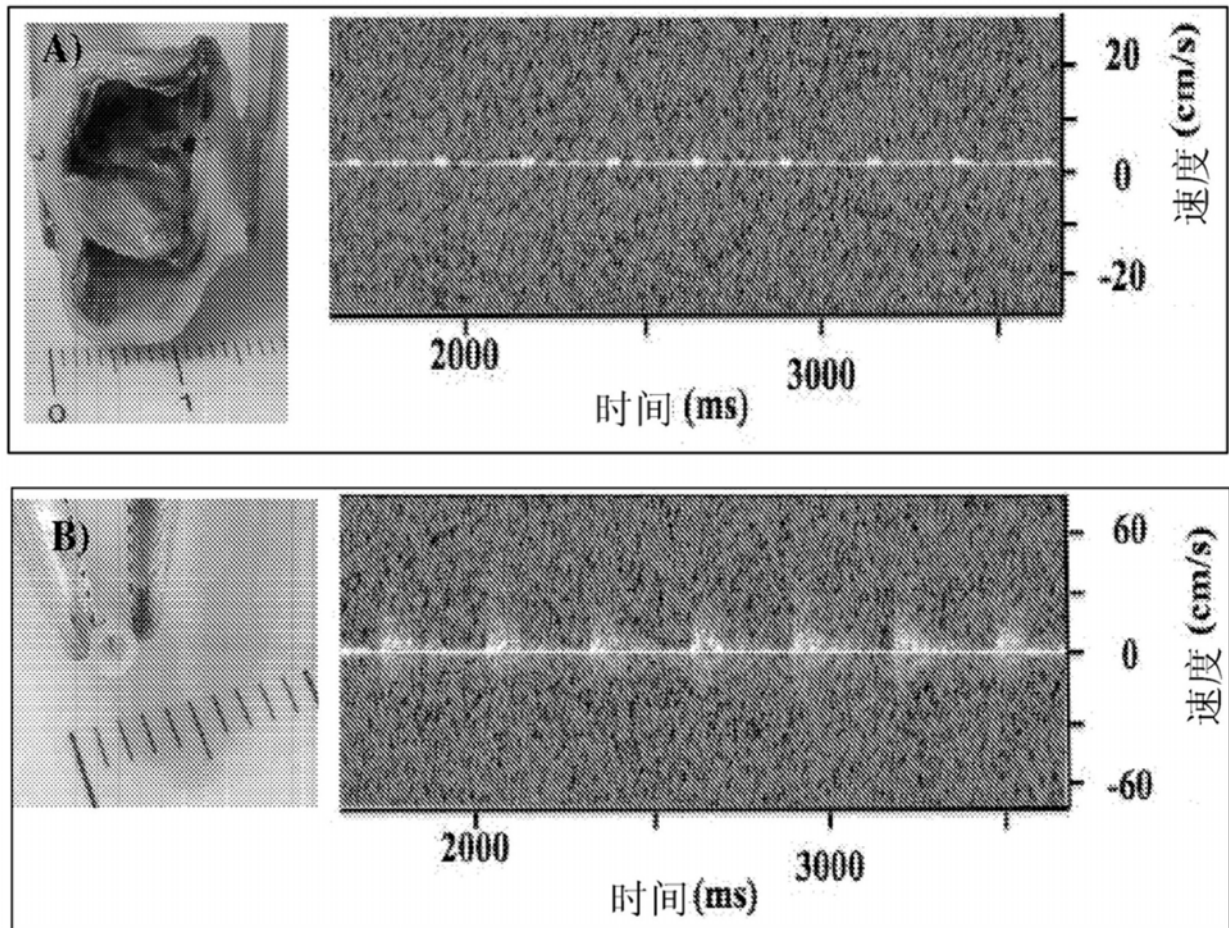


图15

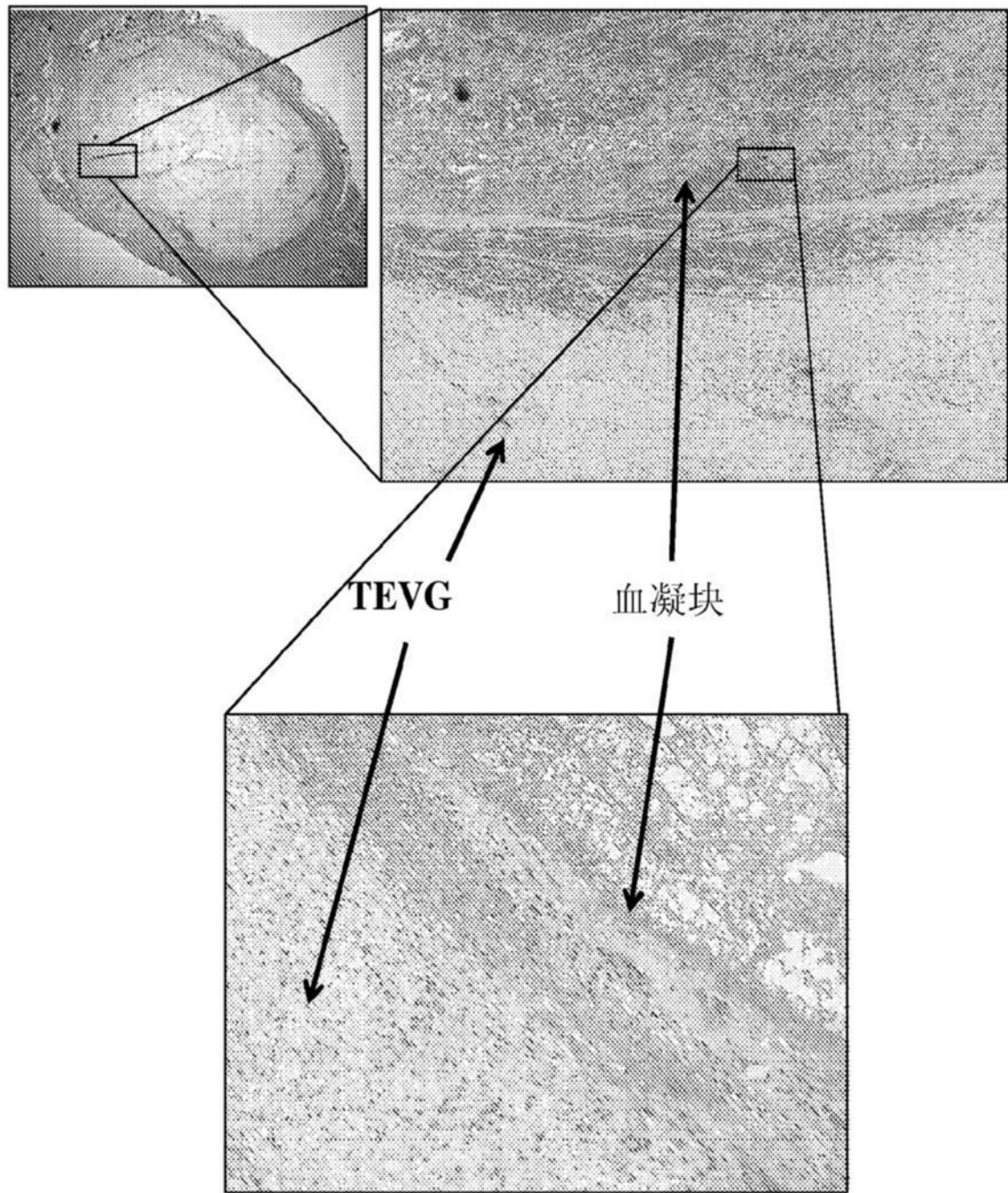


图16

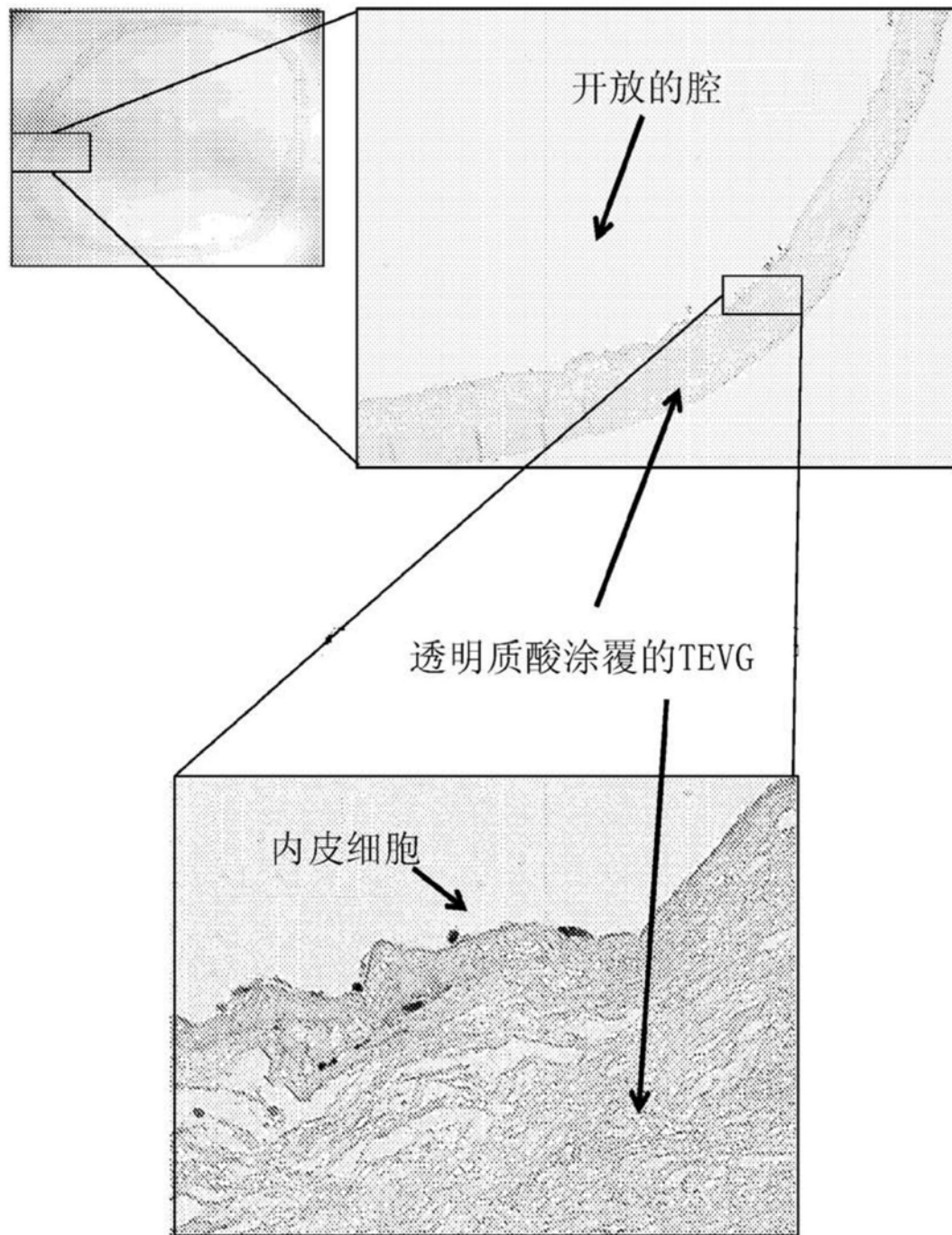


图16续