



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102743792 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201210246619. 1

(22) 申请日 2006. 06. 05

(30) 优先权数据

60/692, 708 2005. 06. 21 US

PCT/US2005/043967 2005. 12. 06 US

(62) 分案原申请数据

200680027977. 6 2006. 06. 05

(73) 专利权人 夏尔再生医学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 海伦·玛丽·纽金特

埃拉扎尔·埃德尔曼

阿努帕姆·达拉尔 史蒂夫·博林杰

斯科特·埃珀利

(74) 专利代理机构 北京明和龙知识产权代理有

限公司 11281

代理人 郁玉成

(51) Int. Cl.

A61L 27/38(2006. 01)

C12N 5/071(2010. 01)

C12N 5/12(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 02/062335 A2, 2002. 08. 15, 全文.

US 6328762 B1, 2001. 12. 11, 全文.

WO 2004/002549 A1, 2004. 01. 08, 全文.

US 2002/077694 A1, 2002. 06. 20, 全文.

US 5766584 A, 1998. 06. 16, 全文.

审查员 赵莉

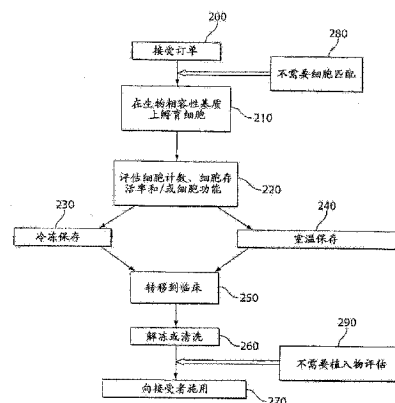
权利要求书3页 说明书41页 附图4页

(54) 发明名称

用于增强血管通路的方法和组合物

(57) 摘要

公开的是一种包含生物相容性基质和细胞的可植入材料,当向血管通路结构提供时,其可以一般地提高功能。例如,本发明的可植入材料可以增强动静脉的天然瘘的熟化以及延长所述瘘处于适合于透渗析的成熟的、功能性状态。另外,本发明可以促进适合于透渗析的功能性动静脉移植物的形成,以及促进功能性外周旁路移植物的形成。可植入材料可以被配置为柔性平面形式或具有形状保持性质的可流动组合物,适合于在接合点或动静脉移植植物处、邻近或附近植入。根据在此公开的方法,向血管的外表面提供所述可植入材料。柔性平面形式的某些实施方式限定了槽隙。本发明的材料和方法包含细胞,优选内皮细胞或具有内皮样表型的细胞。



1. 一种可植入材料,包含:

(a) 细胞群体,所述细胞群体具有抑制性表型,使得它们能够抑制或干扰血管平滑肌细胞增殖,其中,所述细胞群体通过细胞-基质相互作用连接到柔性平面的或可流动的生物相容性基质,并且其中所述细胞群体是近融合的、融合的或融合后的细胞的群体;和

(b) 一定体积的低温保存介质,所述低温保存介质包含低温保存剂、多糖和血清,其中所述体积的低温保存介质足以维持细胞活力、所述抑制性表型和基质完整性,同时所述可植入材料处于冷冻状态。

2. 权利要求 1 的可植入材料,其中所述材料处于冷冻状态至少 2 个月。

3. 权利要求 1 的可植入材料,其中所述材料处于冷冻状态至少 6 个月。

4. 权利要求 1 的可植入材料,其中所述材料处于冷冻状态至少 1 年。

5. 权利要求 1-4 任一项的可植入材料,其中所述细胞群体的细胞活力是至少 80%。

6. 权利要求 1-4 任一项的可植入材料,其中所述细胞群体表达选自硫酸乙酰肝素、TGF- $\beta$  1、b-FGF 和 NO 的产物。

7. 权利要求 6 的可植入材料,其中由所述细胞群体表达的产物包括:至少 1.0 微克/ $10^6$  个细胞/天的硫酸乙酰肝素。

8. 权利要求 7 的可植入材料,其中由所述细胞群体表达的产物包括:至少 300pg/mL/天的 TGF- $\beta$  1。

9. 权利要求 8 的可植入材料,其中由所述细胞群体表达的产物包括:不大于 400pg/mL/天的 b-FGF。

10. 权利要求 1 的可植入材料,其中所述材料转变至非冷冻状态。

11. 权利要求 10 的可植入材料,其中所述材料处于室温至少 7 天。

12. 权利要求 10 的可植入材料,其中所述材料处于室温至少 21 天。

13. 权利要求 10 的可植入材料,其中所述材料处于室温至少 28 天。

14. 权利要求 11-13 任一项的可植入材料,其中所述细胞群体表达选自硫酸乙酰肝素、TGF- $\beta$  1、b-FGF 和 NO 的产物。

15. 权利要求 14 的可植入材料,其中由所述细胞群体表达的产物包括:至少 1.0 微克/ $10^6$  个细胞/天的硫酸乙酰肝素。

16. 权利要求 15 的可植入材料,其中由所述细胞群体表达的产物包括:至少 300pg/mL/天的 TGF- $\beta$  1。

17. 权利要求 16 的可植入材料,其中由所述细胞群体表达的产物包括:不大于 400pg/mL/天的 b-FGF。

18. 权利要求 11-14 任一项的可植入材料,其中所述细胞群体的活力是至少 80%。

19. 权利要求 11-14 任一项的可植入材料,其中所述材料在低于 37°C 的温度下保存。

20. 权利要求 11-14 任一项的可植入材料,其中所述材料在 15-25°C 的温度下保存。

21. 权利要求 1 的可植入材料,其中所述生物相容性基质呈固体、半固体或可流动形式。

22. 权利要求 10 的可植入材料,其中所述材料保持在冷冻状态下放置时的形式和抑制性表型。

23. 权利要求 1 的可植入材料,其中所述细胞群体选自:内皮细胞、内皮样细胞、非内皮

细胞、干细胞和前述任一种的功能等同物。

24. 一种可植入材料,包含细胞群体,所述细胞群体通过细胞-基质相互作用连接到柔性平面的或可流动的生物相容性基质,其中所述细胞群体表现抑制性表型,其中所述抑制性表型选自:至少 1.0 微克/10<sup>6</sup> 个细胞/天的硫酸乙酰肝素的表达,至少 300pg/mL/天的 TGF-β 1 的表达,以及不大于 400pg/mL/天的 b-FGF 的表达,且其中所述可植入材料处于冷冻状态。

25. 权利要求 1 的可植入材料在制备用于治疗血管通路失效的材料中的用途。

26. 低温保存的可植入材料,包括:

移接有近融合、融合或融合后细胞群体的生物相容性基质;以及一定体积的包含低温保存剂、多糖和血清的低温保存介质,足以维持基质完整性,

至少 80% 的细胞活力,和

抑制性表型,包含至少 1.0 微克/10<sup>6</sup> 个细胞/天的硫酸乙酰肝素产量、至少 300pg/mL/天的 TGF-β 1 产量,以及不大于 400pg/mL/天的 b-FGF 产量,同时低温保存在不高于-4℃ 的温度下达 1 个月至 1 年的长时间。

27. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述材料在-20℃至-160℃ 的温度下低温保存。

28. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述材料在-80℃至-160℃ 的温度下低温保存。

29. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述材料在-140℃至-160℃ 的温度下低温保存。

30. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述材料低温保存至少 2 个月的长时间。

31. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述材料低温保存至少 6 个月的长时间。

32. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述材料低温保存至少 1 年的长时间。

33. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述细胞包括内皮细胞或内皮样细胞。

34. 权利要求 26 的低温保存的可植入材料,其中所述细胞包括干细胞。

35. 一种生产包含细胞和生物相容性基质的可植入材料的方法,所述方法包括步骤:

使所述细胞接触所述生物相容性基质;其中所述细胞具有抑制性表型,使得它们能够抑制或干扰血管平滑肌细胞增殖,并具有足以增殖所述基质的数量,并生长成为融合、近融合或融合后群体,以及进一步地,其中所述基质用与细胞类型无关的、未经兼容性测试的、未匹配的细胞增殖。

36. 根据权利要求 35 的方法生产的可植入材料在制备用于治疗血管通路失效的材料中的用途。

37. 一种根据权利要求 35 的方法生产的、包含细胞和生物相容性基质的可植入材料。

38. 一种低温保存组合物,包含移接有融合的、近融合的或融合后的内皮细胞群体的生物相容性基质和一定体积的包含低温保存剂、多糖和血清的低温保存介质,足以维持

基质完整性,

至少 80% 的细胞活力, 和

抑制性表型, 包含至少 1.0 微克 /  $10^6$  个细胞 / 天的硫酸乙酰肝素产量、至少 300pg/mL / 天的 TGF- $\beta$  1 产量, 以及不大于 400pg/mL / 天的 b-FGF 产量, 同时低温保存在不高于 - 4°C 的温度下达 1 个月至 1 年的长时间。

39. 权利要求 38 的组合物, 其中所述低温保存介质是 CryoStor™ CS-10 溶液。

40. 权利要求 38 的组合物, 其中所述多糖是葡聚糖。

41. 权利要求 38 的组合物, 其中所述血清是胎儿牛血清。

42. 权利要求 38 的组合物, 其中所述生物相容性基质是凝胶、泡沫、悬浮液、颗粒、微载体、微囊或纤维结构。

43. 权利要求 38 的组合物, 其是包含颗粒状生物相容性基质的可流动组合物。

44. 权利要求 38 的组合物, 其中所述生物相容性基质呈柔性平面形式。

45. 权利要求 44 的组合物, 其中所述柔性平面形式的尺寸是 1cm × 4cm × 0.3cm。

46. 权利要求 38 的组合物, 其中所述生物相容性基质包括血纤蛋白凝胶、藻酸盐、聚苯乙烯磺酸钠微载体、胶原包被的葡聚糖微载体、PLA/PGA 和 pHEMA/MMA 共聚物、胶原或明胶。

47. 权利要求 46 的组合物, 其中所述明胶具有 Gelfoam® 颗粒、Gelfoam® 粉末或粉碎的 Gelfoam® 的形式。

48. 权利要求 38 的组合物, 其中所述细胞选自: 近融合的、融合的或融合后的细胞群体。

49. 权利要求 38 的组合物, 其中所述细胞是血管内皮细胞。

50. 权利要求 38 的组合物, 其中所述细胞是人细胞。

51. 权利要求 38 的组合物, 其中使用盐水冲洗掉低温保存溶液。

52. 权利要求 38 的组合物, 其容纳在冷冻小瓶中。

53. 权利要求 38 的组合物, 其保持在 - 4°C 至 - 160°C 的温度下。

54. 权利要求 38 的组合物, 其保持在 - 20°C 至 - 80°C 的温度下。

## 用于增强血管通路的方法和组合物

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 6 月 5 日、国家申请号为 200680027977.6 (相应的国际申请号为 PCT/US2006/021755)、发明名称为“用于增强血管通路的方法和组合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关的申请数据

[0003] 这个非临时专利申请于 2006 年 6 月 5 日提交,根据 35U. S. C. Section119(e) 要求 2005 年 6 月 21 日提交的临时专利申请 U. S. S. N. 60/692, 708 的权益;并根据 35U. S. C. Sections120、363 和 / 或 365 要求 2005 年 12 月 6 日提交的共同待决国际申请 PCT/US05/43967 的优先权;其要求了 2004 年 12 月 8 日提交的临时专利申请 U. S. S. N. 60/634, 155 ;2005 年 3 月 21 日提交的临时专利申请 U. S. S. N. 60/663, 859 ;和 2005 年 5 月 19 日提交的临时专利申请 U. S. S. N. 60/682, 054 的优先权;每一个上述申请的完整内容通过引用并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] 血管通路失效是在血液透析时为患者提供照料来治疗终末期肾病 (ESRD) 中的主要并发症。自 1980 年以来在美国现存 ESRD 病例的比率逐年提高。在 2001 年,普遍率几乎达到每百万群体 1, 400 位患者,与前一年相比增加百分之 2. 4。根据在年龄、人种、种族划分和糖尿病状态方面的人口变化,在美国普遍 ESRD 群体预计到 2030 年达到 130 万。当前,大约 65% 的普遍 ESRD 群体使用血液透析治疗 (大约 264, 710 位患者)。在 1997 年到 2001 年间,普遍血液透析群体每年增长 4. 5%。使用医疗保险数据,已经确定了到 2001 年,总的 ESRD 费用达到 155 亿美元,整个 2420 亿医疗保险预算的 6. 4% (从所有的来源,总成本达到 228 亿美元)。实际上,血管通路相关发病的年度费用在美国当前超过每年 10 亿美元。

[0006] 血管通路失效是血液透析群体中发病的单一最重要原因。分析美国肾脏数据系统 (USRDS) 数据的新近报告发现,总体的初级未协助的通路开通率 1 年仅 53%。1 年初级未协助的通路开通率,对于血管通路结构例如涉及 ePTFE® 修复性桥 (prosthetic bridge) 的动静脉移植物是 49%,对于动静脉 (AV) 瘘是 62%。在 1、3 和 5 年对于首次通路的累积的开通率分别地对于下臂瘘是 54%、46% 和 36%,对于 AV 移植物是 54%、28% 和 0%。当前,在美国涉及 ePTFE 修复性桥的移植物的使用占据了所有血液透析通路的 70%,国家肾脏基金会当前建议 AV 瘘是血管通路的优选的方法。预期的是,将来在美国在新的 AV 瘘比例方面将有提高。

[0007] 自生的动静脉瘘历史上被认为是血液透析患者中血管通路的最好选择。当在手术建成之后 AV 瘘成功地熟化之时,它可以以低并发症风险和低校正几率起作用数年。然而,报道的 AV 瘘非熟化比率很广泛地变动,但保持在约 20 — 50%。非熟化一般被定义为不能允许用于透析的瘘的重复性插管,或在手术建成之后 12 周内不能获得充足的透析血流。AV 瘘非熟化的发生可能部分地取决于用于形成 AV 瘘的血管的质量和大小。血管特征的手术前评定已经显示了在鉴定用于 AV 瘘建成的适合的血管中具有有益的效果。

[0008] 血管通路结构的失效可归因于各种不同的急性和慢性现象的累积效应,特别是在接合点和它的下游周围物的所谓“趾部”处。例如,AV 移植可能在静脉接合侧的接合点处发

展出移植相关的狭窄和移植相关的闭塞。在一份公开的报告中,从患有移植相关的接合性狭窄的患者取下的片段的组织学检查揭示了由平滑肌细胞和细胞外基质构成的内膜增生。移植血栓形成也可能在 ePTFE 透渗析移植中引起血管通路功能障碍。此外,在静脉和动脉的一般分离之后使静脉段暴露于动脉血流和压力可能引起不可避免的缺血和重灌注损伤。外科操作,例如缝合,也可以引起对静脉和动脉中血管中层的内皮和平滑肌细胞的直接伤害。在天然或移植接合的建成期间对动脉和静脉内皮的损伤可能影响开放和闭塞率。除了在血管通路结构的形成期间与切割和缝合静脉和动脉相关的物理伤害之外,提高的壁压力和剪切力也可能引起对内皮的物理和 / 或生物化学的损伤。已经暗示,动脉血压可能改变内皮生长调节化合物的正常产生,以及在静脉的血管中层产生形态学的和生物化学的改变。

[0009] 血管通路失效的当前治疗是外科校正或有或没有展伸的血管成形术。在这些一般为多病的患者中外科治疗可能是危险的,血管成形术的和展伸的长期结果由于它们自身的失败率一般是令人失望的。为了血液透析目的以及为了外周循环而改善血管通路的目标是维持原始移植位置的解剖学完整性,以允许血液流速来支持透析治疗或外周旁路位点具有充足血流。

[0010] 促进新建成的血管通路结构的成功熟化或已存在血管通路结构的延长的熟化的其他因素仍然是不清楚的。然而,相对少的随机化临床试验已经在血管通路失效预防领域实施了。评估血管通路失效的原因的研究得到了不一致的结论。实际上,在目前,尽管面临这个难题,临床医师没有对功能性透渗析通路瘻的延长存活有效的外科、治疗或药理学措施。明显地,在病人护理这个重要领域终存在着需求。

## 发明内容

[0011] 本发明利用了以下发现,包含细胞和生物相容性基质的可植入材料,当向血管通路结构局部地提供时,可以促进结构的形成和 / 或增强结构的熟化,以及延长结构的熟化的、功能性状态。根据本发明,所述可植入材料位于处在或邻近于或接近于血管通路结构的血管的外表面上。本发明可以有效地促进新建的血管通路结构的整合和 / 或增强其熟化;提高和维持现有的功能性结构的功能寿命;以及,可以有助于抢救失效的或失效中的结构。

[0012] 在一个方面,本发明是处理患者中血管通路结构的方法,包括步骤:在所述血管通路结构处、邻近或附近放置包含细胞和生物相容性基质的可植入材料,其中所述可植入材料有效提高所述结构的功能。根据如下所述的某些实施方式,所述血管通路结构用于透渗析。

[0013] 根据各种实施方式,所述血管通路结构是动静脉的天然瘻、动静脉的移植物、外周移植物、静脉导管或内驻的端口。在一个实施方式中,所述动静脉移植物包含修复性桥。在其他实施方式中,所述导管是内驻的双管腔导管,处理所述内驻的双管腔导管提高了临床稳定性来足以允许血液透析。

[0014] 在一个实施方式中,处理所述血管通路结构提高了流过所述结构和流向所述结构下游的正常的或近正常的血流。例如,正常的或近正常的血流是处在足以防止血液透析期间的再循环的速度的血流。根据其他的实施方式,处理所述血管通路结构提高了正常的或近正常的血管直径,并降低了血液透析的流动再循环。

[0015] 对动静脉的天然瘻来说,处理所述动静脉的天然瘻增强了临床熟化足以允许血液透析,降低了动静脉的天然瘻的熟化中的延迟,改进重复插管。对于动静脉移植物来说,处理所述动静脉移植物提高了临床稳定性足以恢复正常的或近正常的循环。在各种实施方式中,所述可植入材料降低了具有通路结构的患者中校正的发生。

[0016] 在一个实施方式中,增强熟化的特征在于重复地将导管插入所述瘻用于透渗析的能力。根据另一个实施方式,增强熟化的特征在于在透渗析期间获得充足血流的能力。优选的,充足的血流包含约 350mL/ 分钟的速度。根据各种实施方式,生物相容性材料在动静脉瘻上的应用在使用治疗试剂、物理扩张或展伸之后或同时进行。动静脉瘻是桡头的、头臂的或臂贵要的 (brachio basilic)。

[0017] 在一个优选的实施方式中,本发明是在人体中防止动静脉瘻熟化失败的方法,包括步骤:将包含生物相容性基质和血管内皮细胞的可植入材料放置在位于、邻近或接近所述瘻的位置,从而防止瘻熟化失败。在一个实施方式中,熟化失败的特征在于不能重复地将导管插入所述瘻用于透渗析,或在透渗析期间不能获得充足的血流,其中所述充足的血流包括约 350mL/ 分钟的速度。在其他实施方式中,成熟失败的特征在于在建成之后至少 2 个月、至少 3 个月、或至少 4 个月不能向动静脉瘻中插入导管。

[0018] 在另一个实施方式中,本发明是维持动静脉移植物的血流速度足以允许透渗析的方法,包括提供包含细胞和生物相容性基质的可植入材料的步骤,其中以有效维持移植物的血流速度足以允许透渗析的数量,在所述动静脉移植物的静脉流出区域的修复性桥处、其邻近或附近,将所述可植入材料放置在所述动静脉移植物的外表面上。在一个实施方式中,所述动静脉移植物的静脉流出区域处的血流速度基本上相似于所述流出区域上游的血流速度。

[0019] 在另一个实施方式中,本发明是维持外周旁路移植物的正常血流足以维持外周循环的方法,包括提供包含细胞和生物相容性基质的可植入材料的步骤,其中以有效维持所述旁路移植物的血流速度足以允许维持外周循环的数量,在修复性桥处、其邻近或附近,将所述可植入材料放置在所述旁路移植物的外表面上。在一个实施方式中,流入血液速度和流出血液速度是基本上相似的。

[0020] 在另一个实施方式中,本发明是维持动静脉移植物的血压足以允许透渗析的方法,包括提供包含细胞和生物相容性基质的可植入材料的步骤,其中以有效维持血压足以允许透渗析的数量,在所述动静脉移植物的静脉流出区域的修复性桥处、其邻近或附近,将所述可植入材料放置在所述动静脉移植物的外表面上。在一个实施方式中,所述动静脉移植物的静脉流出区域处的血压基本上相似于所述流出区域上游的血压。所述修复性桥选自:隐静脉;牛异种移植物;脐静脉;涤纶;PTFE;ePTFE,聚氨基甲酸酯;牛肠系膜静脉;和低温保存的股静脉同种异体移植物。根据优选的实施方式,所述修复性桥是 ePTFE。

[0021] 在另一个实施方式中,本发明是促进动静脉移植物或外周旁路移植物的修复性桥的组织整合的方法,包括提供包含细胞和生物相容性基质的可植入材料的步骤,其中以有效促进所述桥的组织整合的数量,在修复性桥处、其邻近或附近,将所述可植入材料放置在所述动静脉移植物或所述外周旁路移植物的外表面上。在某些实施方式中,所述可植入材料促进所述修复性桥的内管腔表面之内或附近的平滑肌细胞增殖或迁移,或促进所述修复性桥的内管腔表面之内或附近的内皮细胞增殖或迁移。在某些其他实施方式中,所述可植

入材料促进所述移植物处、其邻近或附近的平滑肌细胞和 / 或内皮细胞增殖。

[0022] 在另一个实施方式中,本发明是预防或降低动静脉瘘或动静脉移植物发生开裂的方法,包括提供包含细胞和生物相容性基质的可植入材料的步骤,其中以有效预防或降低开裂发生率的数量,在所述动静脉移植物的静脉流出区域的修复性桥处、其邻近或附近,将所述可植入材料放置在所述瘘或动静脉移植物的外表面上。

[0023] 根据其他实施方式,所述提供步骤在天然动静脉瘘失效之后或在天然或隐静脉血管外周旁路失效之后作为介入性治疗来进行。

[0024] 在另一个方面,本发明是适合于处理血管通路结构的包含细胞和生物相容性基质的可植入材料。所述细胞是内皮细胞或具有内皮样表型的细胞。所述生物相容性基质是柔性平面形式或可流动组合物。在特别优选的实施方式中,所述细胞是血管内皮细胞。所述柔性平面形式被配置用于在血管通路结构处、其邻近或附近植入。在某些实施方式中,这种形式限定了槽隙。根据可流动组合物一个实施方式,所述可流动组合物是保持形状的组合物。

[0025] 在其他实施方式中,本发明是包含细胞和生物相容性基质的可植入材料,适用于通过防止动静脉瘘熟化失败来增强动静脉瘘熟化的方法。所述细胞是内皮细胞或具有内皮样表型的细胞,所述生物相容性基质是柔性平面形式或可流动组合物。在一个实施方式中,所述柔性平面形式被配置用于在天然瘘处、其邻近或附近植入。在某些实施方式中,这种形式被配置,从而它限定了槽隙或一系列槽隙。对于所述可流动组合物,它是保持形状的组合物。

[0026] 在另一个实施方式中,本发明是包含细胞和生物相容性基质的可植入材料,其中所述可植入材料被放置在修复性桥处、其邻近或附近的血管的外表面。所述修复性桥位于或接近动静脉移植物的静脉流出区域,或位于或接近流出口。

[0027] 在另一个方面,本发明是用于保存包含生物相容性基质和移接的细胞的可植入材料的转移介质组合物。所述转移介质组合物包含一定量的 VEGF,当细胞在低于所述细胞的标准细胞培养温度的温度下保存在所述转移介质组合物中时,VEGF 的量足以维持细胞存活力或抑制性表型、以及使细胞维持存活延长的时间。

[0028] 在另一个方面,本发明是在低于细胞的标准细胞培养温度的温度下长期保存包含生物相容性基质和移接的细胞的可植入材料的方法。所述方法包括将所述可植入材料浸浴在转移介质组合物中的步骤,所述转移介质组合物包含在保存期间足以维持细胞活力或抑制性表型的量的 VEGF。当在低于所述细胞的标准细胞培养温度的温度下在所述转移介质组合物中保存时,所述细胞长时间保持存活。

[0029] 根据一个实施方式,所述转移介质组合物含有一定量的 VEGF, VEGF 的量足以在低于所述细胞的标准细胞培养温度的温度下维持细胞活力或抑制性表型,并且高于在所述细胞的标准细胞培养温度下所需的 VEGF 数量。根据一个实施方式,所述 VEGF 数量是约 4ng/mL。

[0030] 根据其他实施方式,所述可植入材料在低于 37°C 的温度下或在环境温度下在所述转移介质组合物中保存约 1 周、约 2 周、或约 3 周的长时间。所述细胞是保存时是近融合的 (near-confluent)、融合的 (confluent) 或融合后的 (post-confluent) 并且至少 80% 存活的内皮细胞或内皮样细胞。

[0031] 在另一个方面,本发明是用于低温保存包含生物相容性基质和移接的细胞的可植入材料的低温保存介质组合物。所述低温保存介质组合物包含低温保存剂、多糖和血清。当保存在至少约-4℃时,细胞活力或抑制性表型以及基质完整性被保持长时间。

[0032] 在一个实施方式中,所述低温保存介质组合物中血清的数量超过用于细胞的常规培养的血清数量,例如,20%血清或50%血清。在一个实施方式中,所述血清是胎儿牛血清。在一个实施方式中,所述低温保存介质组合物中的多糖超过用于细胞的常规培养的多糖数量,例如,至少约4%多糖或至少约4.5%多糖。在一个实施方式中,所述多糖是葡聚糖。在另一个实施方式中,所述低温保存介质组合物进一步包含约10% DMSO。

[0033] 根据一个实施方式,所述低温保存介质组合物用于在至少约-80℃、至少约-140℃或至少约-160℃下保存。根据各种实施方式,所述长时间是约1个月、约6个月或约1年。在一个实施方式中,细胞活力是至少约80%。

[0034] 在另一个方面,本发明是低温保存的可植入材料,包含用细胞移接的生物相容性基质和足以在低温保存时维持细胞活力或抑制性表型以及基质完整性的体积的低温保存介质组合物,其中所述低温保存介质组合物包含低温保存剂、多糖和血清。

[0035] 在另一个方面,本发明是制备包含生物相容性基质和移接的细胞的可植入材料的方法。所述方法包括步骤:提供包含细胞的工作细胞库、提供水化的生物相容性基质材料、用来自所述工作细胞库的细胞播种所述水化的生物相容性基质材料、将所述细胞播种的生物相容性基质材料放置在孵育器中直到所述细胞近融合、融合或融合后,以及评定所述细胞播种的生物相容性基质材料的细胞计数、细胞活力和细胞功能。

[0036] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括步骤:将所述细胞播种的生物相容性基质材料放置在适合于低温保存的小瓶中,向近融合的、融合的、或融合后的细胞播种的生物相容性基质材料中引入一定体积的低温保存介质组合物,所述低温保存介质组合物包含低温保存剂、多糖和血清,在所述材料被低温保存时,所述体积的组合物足以保持细胞活力或抑制性表型以及基质完整性,将所述含有细胞播种的生物相容性基质材料和低温保存介质组合物的小瓶放置在冷冻容器中,向所述冷冻容器中引入控制冷冻速度的试剂、将含有所述试剂的所述冷冻容器放置在至少-4℃的冷冻器中,从所述至少约-4℃冷冻器中移出所述冷冻容器,将所述冷冻容器放置在至少约-80℃的冷冻器中。

[0037] 在另一个实施方式中,所述方法进一步包括步骤:从至少-80℃冷冻器中移出所述冷冻容器,以及将所述冷冻容器置于至少-160℃的冷冻器中。

[0038] 在另一个实施方式中,所述方法进一步包括步骤:从所述冷冻器中移出所述小瓶,将所述小瓶放置在环境温度空气中约15分钟,随后将所述小瓶放置在环境温度水浴中约15分钟,从所述小瓶中移出所述可植入材料,在清洗介质组合物中清洗所述可植入材料约5分钟,以及将所述可植入材料放置在细胞培养介质中约48小时。

[0039] 在另一个实施方式中,所述方法进一步包括步骤:从所述冷冻器中移出所述小瓶,将所述小瓶放置在环境温度空气中约15分钟,随后将所述小瓶放置在环境温度水浴中约15分钟,从所述小瓶中移出所述可植入材料,以及在清洗溶液组合物中清洗所述可植入材料约30分钟。

[0040] 在另一个实施方式中,所述方法进一步包括步骤:将所述细胞播种的生物相容性基质材料放置在适合于保存的小瓶中,向近融合、融合或融合后的细胞播种的生物相容性

基质材料中引入一定体积的转移介质组合物,所述转移介质组合物包含一定量的 VEGF,足以在所述材料保存在所述组合物中时维持细胞活力或抑制性表型。

[0041] 在另一个实施方式中,所述方法进一步包括步骤:制备细胞播种的生物相容性基质材料,用于根据公开的方法低温保存或用于根据公开的方法保存,制备小瓶,用于转移,和转运所述外盒到临床位置用于向患者施用。

[0042] 在另一个实施方式中,所述方法进一步包括步骤:将含有细胞播种的生物相容性基质材料的小瓶放置到内盒中,将所述内盒放置到隔离的外盒中,以及提供产品文件。

[0043] 在所述方法的一个实施方式中,所述细胞播种的生物相容性基质材料是临床试验材料,所述患者是临床试验中的参与者。在所述方法的另一个实施方式中,所述可植入材料以工业规模制备。在另一个方面,本发明是实施任何在此公开的方法的机器人系统。

[0044] 在另一个方面,本发明是制造包含细胞和生物相容性基质的可植入材料的方法,所述方法包括步骤:使用适合的试剂和条件使细胞与生物相容性基质接触,其中所述细胞的数量足以增殖 (populate) 所述基质并生长到融合、近融合或融合后的群体,以及进一步的,其中所述基质用与细胞类型无关的、未经兼容性测试的、未匹配的细胞增殖。在另一个方面,本发明是提供根据这种方法制造的可植入材料的方法。在进一步的方面,本发明是根据这种方法制造的包含细胞和生物相容性基质的可植入材料。

#### 附图说明

[0045] 在附图中,相同的附图标记一般在不同的视图中指代相同的部分。并且,所述附图没有按比例或成比例绘制,而重点一般是说明本发明的原理。

[0046] 图 1 是根据本发明的示例性实施方式,用于向管形解剖结构的外表面施用的可植入材料的柔性平面形式的示意性立体图。

[0047] 图 2A 是根据本发明的示例性实施方式,用于向管形解剖结构的外表面施用的可植入材料的轮廓化柔性平面形式的示意性立体图。

[0048] 图 2B、图 2C、图 2D、图 2E、图 2F 和图 2G 是根据本发明的各种示例性实施方式包含槽隙的可植入材料的轮廓化柔性平面形式的示意立体图。

[0049] 图 3A 和图 3B 是根据本发明的示例性实施方式的代表性细胞生长曲线。

[0050] 图 4A、图 4B 和图 4C 说明了根据本发明的示例性实施方式从顶部透视的、施用具有多个柔性平面形式的可植入材料到血管接合点的外表面的一系列步骤。

[0051] 图 5 是根据本发明的示例性实施方式,向血管接合点的外表面施用的轮廓化形式的可植入材料的俯视图。

[0052] 图 6 是根据本发明的示例性实施方式,向管形解剖结构施用的柔性平面形式可植入材料的俯视图。

[0053] 图 7 是根据本发明的示例性实施方式,制备、保存和转移用于向接受者施用的可植入材料的方法的流程图。

#### 具体实施方式

[0054] 如在此解释的,本发明基于这样的发现,基于细胞的治疗可以用于处理血管通路结构。以下呈现的教导提供了制造和使用本发明的材料和方法的足够指导,进一步为鉴定

适合的指标和受试者提供了足够的指导,用于测试、测量和监视本发明的材料和方法的性能。

[0055] 因而,已经开发了基于细胞的治疗,用于临床上管理血管通路并发症和 / 或失效。本发明的示范性的实施方式包含适用于在此描述的处理范例的生物相容性基质和细胞。特别地,在一个优选的实施方式中,所述可植入材料包含生物相容性基质和内皮细胞或内皮样细胞。在一个实施方式中,所述可植入材料具有柔性平面形式,并且包含内皮细胞或内皮样细胞,优选人大动脉内皮细胞,以及生物相容性基质 **Gelfoam**<sup>®</sup> 明胶海绵 (Pfizer, New York, NY, 以下称“Gelfoam 基质”)。根据另一个优选的实施方式,所述可植入材料具有可流动形式,并且包含内皮细胞或内皮样细胞,优选人大动脉内皮细胞,以及生物相容性基质 **Gelfoam**<sup>®</sup> 明胶颗粒或粉末 (Pfizer, New York, NY, 以下称“Gelfoam 颗粒”)。

[0056] 本发明的可植入材料包含在生物相容性基质之上、之中和 / 或之内移接的细胞。移接是指经由细胞与细胞和 / 或细胞与基质相互作用可靠地连接,从而细胞经得起在此公开的准备性操作的苛刻条件。如在此其他地方说明的,可植入材料的操作性实施方式包括具有优选表型的近融合、融合或融合后的细胞群体。要理解的是,可植入材料的实施方式可能在准备性操作期间脱落细胞,和 / 或某些细胞不是与其他细胞一样可靠地连接的。全部需要的是,可植入材料包含满足在此阐述的功能或表型指标的细胞。

[0057] 本发明的可植入材料是基于组织工程原理开发的,代表了解决上述临床需求的新方法。本发明的可植入材料是独特的,原因在于在所述生物相容性基质之上、之中和 / 或之内移接的活细胞能够在生理学反馈控制之下以生理学比例供给血管通路结构和相关的基于脉管系统多细胞的产物。如在此其他地方描述的,适合与可植入材料使用的细胞是内皮细胞或内皮样细胞。通过这些细胞的多化合物本地递送以及生理学上动态的给药提供了对过程的更有效调节,所述过程负责维持功能性血管通路结构和减少血管通路并发症和 / 或失效。重要地,由于被放置在血管的非腔体表面,例如,在外膜或接触血管的外表面处,本发明的可植入材料的例如内皮细胞被保护免于受到血管管腔内的侵蚀性血流的影响。本发明的可植入材料,当缠绕在、沉积在或以其他方式与这种外部目标位点即接合点和 / 或其周围接触时,用来重建稳态。也就是说,本发明的可植入材料可以提供一种环境,其模拟了支持性的生理,并有助于血管通路结构形成、熟化、整合和 / 或稳定。

[0058] 对于本发明来说,接触是指直接或间接地与在此其他地方定义的腔外或非腔表面相互作用。对于某些优选的实施方式来说,实际的物理接触不是有效性所需的。在其他实施方式中,实际的物理接触是优选的。实践本发明所需的全部是,以有效治疗受损或患病位置的数量、可植入材料在受损或患病位置处、邻近或附近发生腔外或非腔沉积。对于某些疾病或损伤来说,患病或损伤位置可以临床地显现在内管腔表面上。对于其他疾病或损伤来说,患病或损伤位置可以临床地显现在腔外或非腔表面上。在某些疾病或损伤中,患病或损伤的位置可以临床地显现在内管腔表面以及腔外或非腔表面上。本发明对于治疗任何上述临床表现是有效的。

[0059] 例如,内皮细胞可以释放各种各样的试剂,其组合起来可以抑制或缓解与血管通路结构建成之后的急性并发症相关的有害生理学事件。如在此例示的,概括了正常的生理和给药的组合物和使用方法对于增强血管通路结构形成、熟化、整合和 / 或位点,以及促进这种血管通路结构的长期开放是有用的。一般地,处理包括在血管通路结构位置处、其邻近

或附近,例如,在操作中涉及的动脉和静脉管腔外侧的血管周围间隙中放置本发明的可植入材料,。当缠绕、环绕、沉积或以其他方式接触损伤的、外伤的或患病血管时,所述可植入材料的细胞可以为血管系统提供生长调节化合物,例如,对血管内的底层平滑肌细胞提供。预期的是,当位于腔外位置时,所述可植入材料的细胞提供了多种调节化合物的连续供应,所述化合物可以渗透血管组织并到达管腔,而所述细胞被保护免于受到血管中血流的有害机械作用。如在此描述的,一个优选的腔外位置是血管的外表面。

[0060] 使用本发明的优选实施方式处理可以促进正常的或近正常的痊愈和正常的生理。相反地,在缺少本发明的优选实施方式的处理时,正常的生理痊愈被损害,例如,天然内皮细胞和平滑肌细胞可能在血管通路结构建成之后以过度地或不受控制的速度异常生长,引起有害的临床结果,包括血管通路结构失效。因而,如在此预期的,使用本发明的可植入材料处理将改善接合位置处天然组织的痊愈以维持血管通路结构开放。

[0061] 对于本发明来说,血管通路结构可以形成为各种构型。血管通路结构可以包括天然发生的或手术创建的动静脉瘘、动静脉移植物、外周旁路移植物、内驻静脉导管、内驻血管端口、或其他被创建以改善患者中的血管通路的血管接合结构。另外,血管通路结构的各种实施方式形成为各种构型,包括面对面、端对面、端对端和面对端接合点。血管通路结构也可以放置在各种解剖学位置中。

[0062] 本发明的可植入材料可以以各种构型放置在要处理的血管通路结构处。根据某些实施方式,本发明的可植入材料可以置于接合接点以及置于远离接合点的近端静脉段。在其他实施方式中,本发明的可植入材料可以置于动脉段、近端静脉段、远端静脉段,和 / 或桥接血管通路结构。在另一个实施方式中,所述可植入材料也可以置于接合接点处的移植材料上或移植材料的一部分上。血管可以完全或部分地接触,例如,本发明的可植入材料可以周向地或以弧形构型应用于血管。血管和 / 或血管通路结构仅需要与足够改善、形成、熟化、整合和 / 或稳定血管通路结构的数量的可植入材料接触。

[0063] 动静脉瘘。根据某些实施方式,为血管通路创建的动静脉瘘 (“AV 瘘”) 可以用本发明的可植入材料处理。AV 瘘可以置于患者体内的各种位置,包括,例如,放置在颈部、腕、上臂或小臂。临床的 AV 瘘结构包括桡头的 (在桡动脉和头静脉之间)、Brescia-Cimino (在腕内桡动脉和头静脉的面对面接合)、头臂的 (在肱动脉和头静脉之间)、臂 - 肘前的 (肱动脉和肘前静脉之间)、臂贵要的 (移位的贵要静脉)、尺头的 (ulnarcephalic) (尺动脉和头静脉之间) 和隐静脉回路 (隐静脉和股动脉的右侧) 瘘。

[0064] AV 瘘手术的并发症一般在三个阶段出现。这些阶段是通常以血栓形成为特征的人为急性阶段、临床标志是瘘不能熟化的中间阶段,和最后的,例如可能由于渐进性静脉狭窄造成的已经建成的功能性瘘的更慢性的失效。

[0065] AV 瘘熟化的特征包括,例如重复地将导管插入所述瘘用于进行透渗析的能力。AV 瘘熟化的另一特征是获得对血液透析有用的充足透渗析血流的能力。充足的血流至少是使用透渗析机器足够支持透渗析的流速,从而不出现再循环。对本发明来说,充足的透渗析血流是在瘘的建成之后不超过 24 周,优选超过 20 周,更优选 16 周、最优选十二周的时间点至少约 350mL/ 分钟的血流。AV 瘘不能熟化的机理当前理解为包括,例如,瘘血管的早期血栓形成、在结合位点处或附近的狭窄、附属静脉的存在,包括侧突或静脉侧枝、不足够的静脉大小,包括不足够的静脉内径,和由于渐进性狭窄造成的晚期瘘失效。通过转移血流和通过

不允许与瘻相连的静脉变为足够大小以允许插管, 附属的静脉可以阻止瘻的发育。当前认为, 附属静脉可以响应于例如瘻中狭窄的存在而发育。AV 瘻熟化的机理是多模式的, 一般需要对多种临床征候的评定。单独的缺少狭窄一般是成熟的 AV 瘻的不充分指标。

[0066] 此外, 认为足够用于透渗析目的的 AV 瘻需要瘻的熟化以及足以支持透渗析的血流, 所述瘻的熟化就是在瘻的静脉段发生的、容许瘻被重复地插入导管的那些变化。即使在存在很少血流时, AV 瘻可以保持开放, 但是开发的 AV 瘻可能临床上足以进行透渗析。对于本发明来说, 用于透渗析的临床上充足的血流是约 150 — 500mL/ 分钟、优选约 300 — 500mL/ 分钟、最优选约 350 — 400mL/ 分钟; 适合的血压是约 50 — 180mmHg, 优选约 50 — 120mmHg。

[0067] 对于本发明来说, 相信的是, 使用本发明的可植入材料处理提供了有益的自我平衡性环境, 从而无论在瘻建成时或更晚的阶段被放置在瘻邻近或附近时, 在 AV 瘻熟化中常见的并发症, 例如血栓形成、狭窄、凝结和 / 或附属静脉的生长被减少。这种类型的有益环境允许 AV 瘻继续熟化和 / 或保持在成熟阶段。例如, AV 瘻静脉增厚并能够引导高流动、高压血液时, 功能上地实现熟化。用在此提供的可植入材料处理 AV 瘻增强了瘻的熟化和 / 或防止瘻不能熟化。对于本发明来说理解的是, AV 瘻熟化的增强包括在瘻功能中的任何改善, 包括它的形成、达到功能状态所需的时间以及维持瘻处于成熟形态形式。

[0068] 手术后即时的血栓形成可能阻止开放的 AV 瘻的形成并引起瘻的早期失效。如在此解释的, 在手术时使用本发明的可植入材料处理可以防止 AV 瘻由于手术后血栓形成即时失效。例如, 所述可植入材料释放降低血栓形成的抗血栓性介体, 可以在整个瘻形成或熟化阶段维持瘻的开放。

[0069] 在手术时在 AV 瘻位置处或附近放置可植入材料也可以通过以下措施来增强熟化: 在接合点处或附近降低狭窄、容许瘻变为足够大小以提供充足的血流来支持透渗析、促进静脉和动脉的扩张、降低寄生性附属静脉的形成、维持天然的附属静脉来增强瘻的熟化、以及改善静脉的大小。

[0070] 另外, AV 瘻比 AV 瘻移植需要更长的时间段来达到熟化。在瘻熟化期间, 一般使用透皮导管或内驻导管来进行血液透析, 导致感染风险提高和损害中央静脉的开放性。在瘻建成时在 AV 瘻位点防止可植入材料可以降低瘻熟化所需的时间, 从而降低相关的感染风险和损害中央静脉的开放性。在内驻导管的位置处放置可植入材料可以降低与内驻导管相关的血栓形成、内膜增生和再狭窄的风险, 从而降低相关的感染风险和损害中央静脉的开放性。

[0071] 最后, 在此描述的可植入材料的使用可以降低成熟 AV 瘻的晚期失效。由于晚期的渐进性狭窄, 成熟的瘻可能经历减少的血流和增加的静脉狭窄。瘻狭窄或闭塞到足以使血流降低到低于透渗析所需水平的程度, 可能需要介入性血管成形术或瘻的展伸来恢复足够的血流水平。这种介入性治疗增大了静脉狭窄和闭塞的风险, 进一步阻止了成熟瘻的形成。此外, 展伸可能引起在展伸的血管远端和近端的一部分中被处理的血管形成闭塞性血栓形成或再狭窄, 通常称为边缘效应。

[0072] 可植入材料的应用可以产生主动的改变 ( 血管扩张与同时抑制静脉新内膜增生的组合 ), 从而防止晚期的渐进性狭窄, 增大成熟瘻的血流, 降低对复原性血管成形术或阻塞瘻的展伸的需求, 防止展伸相关的边缘效应, 以及延长成熟瘻的使用期和可用性。

[0073] 本发明的可植入材料可以在许多不同阶段的任何时候向瘻提供。例如,在手术时的处理可以防止 AV 瘻不能成熟和 / 或可以增强瘻的熟化。可植入材料通常也可以在开始手术之后提供来促进愈合,以及在形成了成熟 AV 瘻之后提供来维持它处于临床上稳定的状态。另外,所述可植入材料也可以援救随后将失效的成熟的 AV 瘻,和 / 或可以延长成熟瘻的使用期。这些情况是 AV 瘻熟化增强的非限制性实例。因而,预期的是,可植入材料不仅可以在创建 AV 瘻的手术开始时使用,还可以在随后的时间点使用(例如,用于维持成熟 AV 瘻或援救成熟的瘻以免失效)。随后的施用可以手术地或非侵入性地实现。

[0074] 动静脉移植。根据其他的实施方式,为血管通路创建的动静脉移植(“AV 移植”)可以用本发明的可植入材料处理。AV 移植可以是前臂直移植、前臂回路移植或上臂移植的形式。动脉流入位置包括,但不限于,颈总动脉、腕处的桡动脉、肘窝处的肱动脉、臂的低位部分的肱动脉、腋下的肱动脉、腋动脉和股动脉。静脉流出位置包括,但不限于,中部的肘前静脉、近端头静脉、远端头静脉、手肘水平的贵要静脉、上臂水平的贵要静脉、腋静脉、颈静脉和股静脉。其他适合于 AV 移植形成的动脉和静脉位置包括胸壁(腋动脉到锁骨下静脉)、低位末端(股动脉 / 静脉、隐静脉、或胫骨(前)动脉、主动脉到大静脉、腋动脉到股静脉或股动脉到腋静脉)。

[0075] 对于本发明来说,涉及适合于透渗析的修复性桥的功能性 AV 移植能够引导高流动、高压的血液通过该修复性桥。在这种 AV 移植中,所述移植的静脉流出区域处的血流速度基本上相似于所述移植流出区域上游的血流速度。适合于透渗析的血流速度是约 150 — 500mL/ 分钟、优选约 300 — 500mL/ 分钟、最优选约 350 — 400mL/ 分钟;适合的血压是约 50 — 180mmHg, 优选约 50 — 120mmHg。

[0076] 由于移植相关的内膜增生,随后是在静脉 - 移植接合点处或在近端静脉段处移植相关的血栓形成,造成 AV 移植通常失效。由于天然血管和修复性桥材料之间不良的组织整合和桥材料与血管的最后开裂,AV 移植也是容易失效的。

[0077] 对于本发明来说,使用本发明的可植入材料处理提供了有益的自我平衡性环境,从而无论在移植创建时或更晚的阶段,与 AV 移植整合和熟化相关的并发症,例如血栓形成、狭窄、凝结和 / 或开裂被减小。这种类型的有益环境容许与 AV 移植相关的血管完全地与修复性桥材料整合。例如,AV 移植整合并能够引导高流动、高压血液时,功能上地实现熟化。如在此展现的,使用可植入材料处理 AV 移植增强了移植的整合和熟化。对于本发明来说,理解的是,AV 移植整合和 / 或熟化的增强包括在移植的功能方面的任何改善,包括它的形成、达到功能状态所需的时间、以及移植保持其功能形式。

[0078] 手术后即时的与移植相关的血栓形成能够阻止组织整合和开放 AV 移植的最后形成,并可以引起移植的早期失效。如在此解释的,在手术时的处理可以防止 AV 移植由于手术后血栓形成而即时失效。例如,所述可植入材料释放降低血栓形成的抗血栓性介体,并在整个移植整合和熟化阶段维持开放的移植。

[0079] 在手术时,在 AV 移植接合点处、邻近或附近;在移植的静脉流出区域处、邻近或附近;和 / 或在移植处、邻近或附近放置可植入材料也可以通过在移植接合点处或附近减少即时血栓形成和渐进性狭窄来增强整合和熟化。这种治疗效果容许移植有足够的时间来变得与修复性桥材料充分整合、最小化血管血栓形成和闭塞、并维持足够的血管内径来支持足够透渗析的血流。

[0080] 可植入材料的施用也可以最小化成熟 AV 移植物的晚期失效。由于晚期的渐进性狭窄,成熟的移植物能够经历减小的血流和增大的静脉狭窄。可植入材料的应用可以产生主动的改变(血管扩张与同时抑制静脉新内膜增生的组合),从而防止晚期的渐进性狭窄,增大成熟移植物的血流,以及延长成熟移植物的使用期和可用性。

[0081] 如在此展现的,使用本发明的可植入材料处理 AV 移植物接合点促进了适合于透渗析的功能性 AV 移植物的形成。进一步理解的是,对于本发明来说,功能性 AV 移植物的形成包括移植物的临床功能的任何改善、或移植物接合点的形成过程或修复性桥的整合过程、和 / 或移植物接合点保持成熟形式,包括开裂发生率的降低。

[0082] 如临床医师公认的,AV 移植物的足够性需要移植物支持和维持足够的血流。对于用于血液透析的 AV 移植物来说,充足的血流至少是足够支持使用透渗析机器进行透渗析的流速,从而不出现再循环。临床上失效的 AV 移植物是不能支持足够支持透渗析的血流的移植物。预期的是,通过促进能够支持透渗析的充足血流的功能性移植物的形成,本发明的优选的实施方式将延迟 AV 移植物失效的发作或降低 AV 移植物失效。

[0083] 外周旁路移植物。根据其他的实施方式,被创建来绕过失效的外周血管的外周移植物可以使用本发明的可植入材料处理。外周旁路移植物可以置于各种解剖学位置,包括末端,例如低于或高于膝盖的腿的区域。外周旁路移植物可以用于绕过阻塞的外周血管,包括在外周动脉或静脉中的堵塞。外周旁路移植物可以用于修复和 / 或维持通向末端的正常血流,例如,足以维持正常或近正常外周循环的血流速度。根据某些实施方式,外周旁路移植物在高于堵塞区域或低于堵塞区域处形成。在某些实施方式中,本发明可以用于改善具有包含天然材料的桥的外周旁路的功能、整合、熟化和 / 或稳定;在某些其它实施方式中,所述移植物具有修复性桥。

[0084] 对于外周旁路移植物来说,可植入材料可以置于移植物一端或两端的血管的外表面上和 / 或移植物材料的外表面上。在某些实施方式中,所述可植入材料可以在一端或两端接触外周旁路移植物接点。在某些其他实施方式中,所述植入物可以置于外周旁路移植物上游的血管外部。

[0085] 在手术时在外周旁路移植物的流入或流出区域处或附近放置可植入材料的优选实施方式也可以增强功能性移植物的形成、促进整合和 / 或防止开裂。对于本发明来说,功能性外周旁路移植物能够在正常压力下引导正常的血流。膝盖以下的旁路移植物的正常流速是约 50 — 150mL/ 分钟、优选约 80 — 100mL/ 分钟;膝盖以上的旁路移植物的正常流速是约 50 — 150mL/ 分钟,优选约 80 — 100mL 分钟;脚移植物的正常流速是约 25 — 30mL/ 分钟。适合的血压是约 50 — 180mmHg, 优选约 50 — 120mmHg。

[0086] 对于如在此描述的经处理的外周旁路移植物来说,流出速率基本上相似于流入速率。本发明恢复了通向低位肢端的充足血流,并减少了与通向低位肢端的血流不足相关的症状。本发明的优选实施方式通过促进形成具有足够维持外周循环的血流的功能性外周旁路移植物延迟了外周旁路移植物失效的发作或降低了外周旁路移植物失效。

[0087] 对于本发明来说,任何修复性桥材料适合于创建血管通路结构,只要它支持在 AV 移植物的情况下血液透析所需的血流速度和压力,并且支持在外周旁路移植物的情况下外周循环所需的血流速度和压力。一般地,修复性桥优选地是柔性的,与细胞整合相容的,并且具有合适的大小来支持所需的血流速度。一个优选的实施方式利用了 PTFE、或 ePTFE、聚

四氟乙烯桥；另一个实施方式利用 **Dacron**<sup>®</sup> (E. I. duPont de Nemours and Co.)。修复性桥也可以由修饰的 PTFE 材料、聚氨酯甲酸酯、碳包被的 PTFE 和复合移植物形成。PTFE 移植物可以制作成各种物理构型，包括锥形、延伸的、棱纹状的、平滑的，可以含有多种水平的 PTFE。修复性移植物也可以包括末梢修饰，包括静脉贴片、轴环、和插入在动脉和瘘之间的套管。其他实施方式包括天然材料，例如隐静脉移植物、脐静脉移植物、股静脉同种异体移植物和生物学异种移植，包括牛颈动脉和牛肠系膜静脉移植物。包含上述任一种的复合移植物也是此处预期的。熟练医师将认可适合的等价物。

[0088] 另外地和重要地，对于 AV 移植物或外周旁路移植物来说，正常或近正常的痊愈速度促使内皮细胞在修复性桥的腔表面增殖，从而促进移植物和相连血管系统的整合。为了促进整合，可植入材料的细胞提供的治疗因子扩散到管壁。对于合成的移植物材料来说，合成材料的孔隙也可以影响治疗因子到达在合成移植物的腔表面上增殖的细胞的能力。

[0089] PTFE 移植物。在某些优选的实施方式中，15 — 25cm 长度的 6 — mm 内径 PTFE 管被用于形成移植物 (Atrium Advanta VS Standard Wall PTFE graft, 0.6mm, Atrium Medical Corp, Hudson, NH)。特别优选的移植物材料 PTFE 是柔性的聚合物，其已经显示了用于外科操作时是非血栓性的。预期的是，替代的聚合物材料，例如 **Dacron**<sup>®</sup>，具有与 PTFE 类似的性质，也可以用作移植物材料。

[0090] 移植物可以被切割成期望的长度来便于在特定患者中精确放置。移植物可以是前臂回路移植物或直移植物。移植物的末端可以被切割成角、具有凸缘，或具有其他的构型，足以提高移植物末端的表面积用于缝合或足以改善移植物在特定患者中的适应即可。移植物的末端也可以粗糙化或以其他方式修饰来促进细胞粘附。另外，移植物材料可以包被有明胶、白蛋白或另一种治疗试剂。

[0091] 最后，为失效中或失效的 AV 移植物或外周旁路移植物提供可植入材料可以引起原始移植物的复原，从而恢复移植物的功能。在相关的环境中，失效的天然 AV 瘘可以用与本发明的可植入材料组合的 AV 移植物替换，作为介入性治疗。

[0092] 血管通路导管。根据某些实施方式，为血管通路创建的内驻静脉导管可以用本发明的可植入材料处理。导管可以置于患者体内的各种位置，包括，例如，放置在颈部、胸部和腹股沟。对于血液透析来说，当瘘在熟化时或移植物在手术后整合时，双管腔导管可以被植入作为临时血管通路。

[0093] 由于与导管相关的内膜增生，随后是在静脉 - 导管的通路接合点处或在近端静脉段处与导管相关的血栓形成，造成血管通路导管通常过早地失效。

[0094] 对于本发明来说，使用本发明的可植入材料处理提供了有益的自我平衡性环境，从而无论在导管放置时或更晚的阶段与血管通路导管功能相关的并发症，例如血栓形成、狭窄和 / 或凝结被减少。对于本发明来说，理解的是，血管通路导管功能的增强包括导管功能方面的任何改善，或导管维持功能形式方面的任何改善。

[0095] 血管通路端口。根据某些实施方式，为血管通路创建的内驻端口可以用本发明的可植入材料处理。端口可以置于患者体内的各种位置，包括，例如，放置在臂、胸部和腹股沟中的静脉或动脉位置。

[0096] 由于与端口相关的内膜增生，随后是在静脉 - 端口接合点处或在近端静脉节处与端口相关的血栓形成，导致血管通路端口一般过早地失效。

[0097] 对于本发明来说,使用本发明的可植入材料处理提供了有益的自我平衡性环境,从而无论在端口放置时或更晚的阶段与血管通路端口功能相关的并发症,例如血栓形成、狭窄和/或凝结在端口处被减少。对于本发明来说,理解的是,血管通路端口功能的增强包括端口功能方面的任何改善,或端口维持功能形式方面的任何改善。

[0098] 一般问题。在本发明的某些实施方式中,在所述可植入材料的施用之前、同时或之后施用其他治疗试剂。例如,可以施用防止或减少血凝块形成、血小板凝聚或其他类似堵塞的试剂。示范性的试剂包括,例如,硫酸乙酰肝素和 TGF- $\beta$ 。取决于植入物需要的临床指标,其他细胞因子或生长因子也可以掺入到可植入材料中,包括 VEGF,来促进内皮细胞重生,以及包括 b-FGF 来促进移植整合。其他治疗试剂种类包括,但不限于,抗增殖试剂和抗肿瘤试剂。实例包括雷帕霉素、紫杉醇 (paclitaxel) 和 E2F 诱物 (Decoy) 试剂。任何上述试剂可以局部地或全身地施用;如果局部地施用,某些试剂可以被包被在可植入材料内或由所述细胞提供。

[0099] 另外,介导积极的组织重塑的试剂也可以与在此描述的可植入材料实施方式组合施用。例如,某些试剂可以促进在血管损伤的部位,包括外科位置处正常的或正常样的管腔再生或腔组织重塑。再一次,这些试剂可以包含在所述可植入材料内或由所述细胞提供。

[0100] 如临床医师所公认的,足够血液透析的血管通路需要血管通路结构成熟和具有充足的血流。如在此其他地方说明的,熟化涉及在静脉中发生的解剖变化,其允许透渗析期间重复的插管。允许重复性插管的某些改变涉及血管大小和/或血管壁增厚和/或管腔直径。并且,如在此解释的,某一些上述变化允许足够支持透渗析的血流速度。此外,如在此其他地方说明的,临床上失效的血管通路结构是不能重复地将导管插入用于透渗析的结构,和不能支持足以支持透渗析的血流的结构。这些临床失效可以直接与如上所述的解剖参数中的功能障碍直接相关。

[0101] 因而,本发明还提供了实现血管通路相关的临床终点的方法,包括提高插管频率、改善血管通路结构血流、提高血管壁厚度、维持管腔直径、和/或上述的组合,其中所述方法包括以有效实现一种或多种上述终点的数量在所述血管通路结构处、邻近或附近放置所述可植入材料的步骤。

[0102] 此外,本发明还提供了鉴定成功地熟化的血管通路结构的方法,其中所述方法包括监视以下临床参数的任一项的步骤:重复的插管;足够在透渗析期间防止再循环的血流;血管壁增厚;足以在透渗析期间允许血液流动的管腔直径,其中所述成功地熟化的血管通路结构展现至少一种上述参数。

[0103] 本发明的可植入材料可以应用于需要介入性治疗以维持稳态的任何管形解剖结构。管形的解剖结构包括血管系统、生殖系统、生殖泌尿系统、胃肠系统、肺系统、呼吸系统以及脑和脊髓的室系统的结构。如在此预期的,管形解剖结构是具有内部腔表面和腔外表面的那些结构。对于本发明来说,腔外表面可以是但不限于管形结构的外表面。在某些结构中,所述内部腔表面是内皮细胞层;在某些其他结构中,内部腔表面是非内皮细胞层。

[0104] 细胞来源。如在此描述的,本发明的可植入材料包括细胞。细胞可以是同种异体的、异种的或自体的。在某些实施方式中,活细胞的来源可以来自适合的供体。在某些其他实施方式中,细胞的来源可以来自尸体或来自细胞库。

[0105] 在一个当前优选的实施方式中,所述细胞是内皮细胞。在特别优选的实施方式中,

这种内皮细胞从血管组织获得,优选但不限于动脉组织。如以下例示的,适合使用的一种血管内皮细胞是主动脉内皮细胞。适合使用的另一种血管内皮细胞是脐带静脉内皮细胞。以及,适合使用的另一种血管内皮细胞是冠状动脉内皮细胞。适合本发明使用的其他种类的血管内皮细胞包括肺动脉内皮细胞和髂动脉内皮细胞。

[0106] 在另一种当前的优选实施方式中,适合的内皮细胞可以从非血管组织获得。非血管组织可以来自此处的其他地方描述的任何管形解剖结构,或可以来自任何非血管组织或器官。

[0107] 在又一个实施方式中,内皮细胞可以来自内皮祖细胞或干细胞;在又一个实施方式中,内皮细胞可以一般地来自祖细胞或干细胞。在其他优选的实施方式中,细胞可以是来自血管、非血管组织或器官的同种异体的、异种的或自体的非内皮细胞。本发明还预期遗传改变的、修饰的或工程化的任何上述细胞。

[0108] 在进一步的实施方式中,两种或多种细胞被共培养来制备当前的组合物。例如,第一细胞可以导入到生物相容的可植入材料中并培养直到融合。第一细胞类型可以包括,例如,平滑肌细胞、成纤维细胞、干细胞、内皮祖细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞的组合、任何其他期望的细胞类型或适合于创建有助于内皮细胞生长的环境的期望细胞类型的组合。一旦第一细胞类型达到融合,第二细胞类型被播种到生物相容性基质之中、之上或之内的第一融合细胞类型的顶部,并培养直到第一细胞类型和第二细胞类型达到融合。第二细胞类型可以包括,例如,内皮细胞或任何其他期望的细胞类型或细胞类型的组合。预期的是,第一和第二细胞类型可以逐步地、或作为单一混合物来引入。还预期的是,可以改变细胞密度来改变平滑肌细胞与内皮细胞的比例。

[0109] 为了防止平滑肌细胞或其他倾向于过度增殖的细胞类型的过度增殖,可以修改培养过程。例如,在第一细胞类型融合之后,可以在引入第二细胞类型之前用适合于第二细胞类型的附着因子包被培养物。示范性的附着因子包括用明胶包被培养物来改善内皮细胞的附着。根据另一个实施方式,肝素可以在培养第二细胞类型期间添加到培养基中来降低第一细胞类型的增殖并优化期望的第一细胞类型与第二细胞类型的比例。例如,在平滑肌细胞的初步生长之后,可以施用肝素来控制平滑肌细胞生长以实现更大的内皮细胞与平滑肌细胞的比例。

[0110] 在优选的实施方式中,通过首先用平滑肌细胞种植生物相容性可植入材料创建共培养物,来创建血管结构。一旦平滑肌细胞达到融合,将内皮细胞播种到可植入材料上培养的平滑肌细胞表面顶部来创建模拟的血管。这种实施方式可以根据在此描述的方法应用到,例如,AV 移植物或外周旁路移植物,来促进修复性移植物材料的整合。

[0111] 所有需要的是,当前组合物的细胞展现一种或多种优选的表型或功能性质。如在此较早描述的,本发明基于以下发现:当与优选的基质(在此其他地方描述)相连时具有可易于鉴定的表型的细胞可以促进、修复和/或以其他方式调节与血管通路结构例如动静脉瘘或动静脉移植物的处理相关的血管内皮细胞生理机能和/或腔稳态。

[0112] 对于本发明来说,本发明的细胞的一种这样优选的、可易于鉴定的典型表型是抑制或以其他方式干扰血管平滑肌细胞增殖的能力,如以下描述的体外分析所测定的。这在此称为抑制性表型。

[0113] 由当前组合物的细胞展现的另一种可容易鉴定的表型是,它们是抗血栓性的或能

够抑制血小板粘附和聚集。抗血栓活性可以使用如下所述的体外硫酸乙酰肝素分析和 / 或体外血小板凝聚分析来测定。

[0114] 在本发明的典型操作性实施方式中,细胞不必展现超过一种上述表型。在某些实施方式中,细胞可以展现超过一种上述表型。

[0115] 虽然上述表型各自代表了功能性的内皮细胞,例如但不限于血管内皮细胞,但是展现了这种表型的非内皮细胞对于本发明来说被考虑为内皮样的,并因而适用于本发明。内皮样的细胞在此也称为内皮细胞的功能类似物;或内皮细胞的功能模拟物。因而,仅仅举例来说,适用于在此公开的材料和方法的细胞还包括产生内皮样细胞的干细胞或祖细胞;非内皮细胞来源的但功能上表现像使用在此列出的参数的内皮细胞的细胞;任何来源的、被工程化或以其他方式被修饰以具有使用在此列出的参数的内皮样功能的细胞。

[0116] 一般地,当以融合、近融合或融合后群体存在并与例如在此其他地方描述的优选的生物相容性基质相连时,本发明的细胞展现一种或多种上述表型。本领域普通技术人员理解的是,细胞的融合、近融合或融合后群体可以通过各种技术容易地鉴定,最常见和广泛接受的技术是直接显微镜检查。其他的技术包括使用标准细胞计数技术评估单位表面积 of 细胞数量,所述标准细胞计数技术例如但不限于血球计数器或库尔特计数器。

[0117] 另外,对于本发明来说,内皮样细胞包括但不限于功能上和表型上模仿或模拟融合的、近融合的或融合后内皮细胞的细胞,如通过在此所列的参数所测量的。

[0118] 因而,使用以下阐述的详细说明和指导,本领域普通技术的医师将理解如何生产、使用、测试和鉴定在此公开的可植入材料的操作性实施方式。也就是说,在此提供的教导公开了制备和使用本发明的可植入材料所必需的所有内容。进一步的,在此提供的教导公开了鉴定、制备和使用含有操作上等效的细胞的组合物所必需的所有内容。实际上,所有需要的是含等效细胞的组合物对于根据在此公开的方法处理血管通路结构是有效的。熟练医师将理解的是,当前组合物的等效实施方式可以仅使用常规实验和在此提供的教导来鉴定。

[0119] 在某些优选的实施方式中,本发明的可植入材料中使用的内皮细胞从人类尸体供体的主动脉分离。每一批细胞来自单个或多个供体,广泛地测试内皮细胞纯度,生物学功能,以及细菌、真菌、已知的人类病原体和其他外来试剂的存在。使用公知的技术低温保存细胞并入库,用于稍后在培养中扩增,从而随后配制在生物相容性可植入材料中。

[0120] 细胞制备。如上所述,适合的细胞可以从各种组织类型和细胞类型获得。在某些优选的实施方式中,可植入材料中使用的人类主动脉内皮细胞分离自尸体供体的主动脉。在其他实施方式中,猪的主动脉内皮细胞 (Cell Applications, San Diego, CA) 通过用于分离人类主动脉内皮细胞的相似操作分离自正常的猪主动脉。每一批细胞来自单个或多个供体,广泛地测试内皮细胞活力,纯度,生物学功能,以及支原体、细菌、真菌、酵母、已知的人类病原体和其他外来试剂的存在。使用公知的技术进一步扩增、表征和低温保存细胞,形成处于第三到第六次传代的工作细胞库,用于稍后在培养中扩增,从而随后配制到生物相容性可植入材料中。

[0121] 在通过在每个烧瓶中添加约 15ml 内皮细胞生长培养基预处理的 T-75 烧瓶中制备人或猪主动脉内皮细胞。人类主动脉内皮细胞在内皮生长培养基 (EGM-2, Cambrex Biosciences, East Rutherford, NJ) 中制备。EGM-2 由补充有含 2% FBS 的 EGM-2 单等分量 (singlequot) 的内皮细胞基础培养基 (EBM-2, Cambrex Biosciences) 构成。猪细胞在

补充有 5% FBS 和 50  $\mu$ g/ml 庆大霉素的 EBM-2 中制备。将烧瓶置于维持在约 37°C 和 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气、90% 湿度的孵化器中至少 30 分钟。从 -160°C 到 -140°C 冷冻器中移出一个或两个细胞的小瓶, 在约 37°C 解冻。每个解冻细胞的小瓶以大约  $3 \times 10^3$  个细胞每 cm<sup>3</sup> 的密度、优选不低于  $1.0 \times 10^3$  和不超过  $7.0 \times 10^3$  的密度播种到两个 T-75 烧瓶中; 将含有上述细胞的烧瓶放回孵化器中。在约 8 - 24 小时之后, 除去消耗了的培养基, 用新鲜培养基替换。每两到三天更换培养基, 此后, 直到细胞达到约 85 - 100% 的融合, 但优选不低于 60% 和不超过 100%。当所述可植入材料预计用于临床应用时, 在人类主动脉内皮细胞的解冻后培养中和本发明的可植入材料的制备中仅使用无抗生素的培养基。

[0122] 然后除去内皮细胞生长培养基, 用 10ml HEPES 缓冲盐水 (HEPES) 冲洗单细胞层。除去 HEPES, 添加 2ml 胰蛋白酶来从 T-75 烧瓶表面剥离细胞。一旦发生分离, 添加 3ml 胰蛋白酶中和溶液 (TNS) 来终止酶反应。添加另外 5ml HEPES, 使用血球计对细胞计数。离心细胞悬浮液, 对于人类细胞, 使用无抗生素的 EGM-2 调节到密度大约  $1.75 \times 10^6$  个细胞 /ml, 或对于猪细胞, 使用补充有 5% FBS 和 50  $\mu$ g/ml 庆大霉素的 EBM-2 调节到密度大约  $1.50 \times 10^6$  个细胞 /ml。

[0123] 生物相容性基质。根据本发明, 所述可植入材料包含生物相容性基质。所述基质对于细胞生长和附着到基质之上或之内是容许的。所述基质是柔性的和贴附的 (conformable)。所述基质可以是固体、半固体或可流动的多孔组合物。对于本发明来说, 可流动组合物是指可以利用注射或注射型递送装置, 例如但不限于, 针、注射器或导管施用的组合物。采用挤压、喷出或排出的其他递送装置在此也是预期的。多孔基质是优选的。优选的可流动组合物是保持形状的。所述基质也可以是具有柔性平面形式。所述基质也可以是凝胶、泡沫、悬浮液、颗粒、微载体、微囊或纤维结构的形式。当前优选的基质具有颗粒形式。

[0124] 所述基质, 例如当植入到血管的外表面上时, 在其生物侵蚀之前可以存留在植入位置至少约 56 - 84 天, 优选约至少 7 天, 更优选约至少 14 天, 最优选约至少 28 天。

[0125] 一种优选的基质是 Gelfoam® (Pfizer, New York, NY), 一种可被吸收的明胶海绵 (以下称“Gelfoam 基质”)。Gelfoam 基质是从特别处理的、纯化的猪皮明胶溶液制备的多孔的和柔性的外科海绵。

[0126] 根据另一个实施方式, 所述生物相容性基质材料可以是经修饰的基质材料。当细胞与基质相连时, 可以选择对基质材料的修饰, 来优化和 / 或控制细胞的功能, 包括如上所述的细胞的表型 (例如, 抑制性表型)。根据一个实施方式, 对基质材料的修饰包括用附着因子或增强细胞抑制平滑肌细胞增殖能力的粘附肽来包被所述基质, 以降低炎症、提高硫酸乙酰肝素产量、提高前列环素产量, 和 / 或提高 TGF- $\beta_1$  产量。示范性的附着因子包括, 例如, 纤连蛋白、血纤蛋白凝胶、和利用标准的水成碳二亚胺化学作用 (aqueous carbodiimide) 共价连接的细胞粘附配体 (包括例如 RGD)。其他细胞粘附配体包括具有细胞粘附识别序列的肽, 所述细胞粘附识别序列包括但不限于: RGDY、REDVY、GRGDF、GPDSGR、GRGDY 和 REDV。

[0127] 根据另一个实施方式, 所述基质是 Gelfoam 以外的基质。其他示范性的基质材料包括, 例如, 血纤蛋白凝胶、藻酸盐、聚苯乙烯磺酸钠微载体、胶原包被的葡聚糖微载体、PLA/PGA 和 pHEMA/MMA 共聚物 (每种共聚物的聚合比例从 1 - 100%)。根据优选的实施方

式,这些其他的基质被修饰以包括附着因子或粘附肽,如以上叙述和描述的。示范性的附着因子包括,例如,明胶、胶原、纤连蛋白、血纤蛋白凝胶、和利用标准的水成碳二亚胺化学作用共价连接的细胞粘附配体(包括RGD)。其他细胞粘附配体包括具有细胞粘附识别序列的肽,所述细胞粘附识别序列包括但不限于:RGDY、REDVY、GRGDF、GPDSGR、GRGDY和REDV。

[0128] 根据另一个实施方式,所述生物相容性基质材料被物理地修饰来改善对基质的细胞附着。根据一个实施方式,所述基质被交联来增强它的机械性能,和改善它的细胞附着和生长性质。根据优选的实施方式,首先使用硫酸钙交联藻酸盐基质,随后是使用氯化钙和常规方案实施第二交联步骤。

[0129] 根据又一个实施方式,改变所述生物相容性基质的孔径大小。优选的基质孔径大小是约25 $\mu\text{m}$ 到约100 $\mu\text{m}$ ;优选约25 $\mu\text{m}$ 到50 $\mu\text{m}$ ;更优选约50 $\mu\text{m}$ 到75 $\mu\text{m}$ ;进一步优选约75 $\mu\text{m}$ 到100 $\mu\text{m}$ 。其他优选的孔径大小包括低于约25 $\mu\text{m}$ 和高于约100 $\mu\text{m}$ 的孔径大小。根据一个实施方式,所述孔径大小使用盐浸出技术来改变。氯化钠被混合到基质材料和溶剂的溶液中,将溶液注入模具中,容许溶剂蒸发。然后将基质/盐块浸入水中,盐浸出并留下多孔结构。选择溶剂使得基质溶于溶液中而盐不溶。一种示范性的溶液包括PLA和二氯甲烷。

[0130] 根据可选择的实施方式,将二氧化碳气泡引入到非固态形式的基质中,然后用合适的表面活性剂稳定。随后利用真空除去气泡,留下多孔结构。

[0131] 根据另一个实施方式,采用冻干技术来控制基质的孔径大小,利用冰微粒的冷冻速度来形成不同大小的孔径。例如,约0.1—2%猪或牛明胶的明胶溶液可以注入到模具或平皿中,并在各种不同温度预先冷冻,然后冻干一段时间。然后可以利用,优选的,紫外光(254nm)或通过添加戊二醛(甲醛)来交联材料。预冷冻温度(例如,—20 $^{\circ}\text{C}$ 、—80 $^{\circ}\text{C}$ 或—180 $^{\circ}\text{C}$ )、冻干温度(在约—50 $^{\circ}\text{C}$ 冻干)和明胶浓度(0.1%到2.0%;孔径大小一般与溶液中明胶的浓度成反比)的变化都可能影响产生的基质材料的孔径大小,并且可以被修改来产生优选的材料。熟练技术人员将理解,适合的孔径大小是促进和维持具有在此其他地方描述的表型的最佳的细胞群体的孔径大小。

[0132] 柔性平面形式。如在此教导的,平面形式的生物相容性基质可以配置成各种形状和大小,优选适合于植入在瘻、移植物、外周移植物或其他血管通路结构和其周围之处、邻近或附近的形状和大小,所述形状和大小能够贴附通路结构和其相连血管的轮廓化表面。根据优选的实施方式,调整单片基质的大小并配置单片基质,以应用于要处理的特定血管通路结构。

[0133] 根据一个实施方式,所述生物相容性基质被配置为柔性平面形式。为向管状结构例如但不限于血管施用,或为向血管通路结构例如但不限于血管接合点施用而配置的示范性的实施方式在图1中说明。长度、宽度、厚度和表面积的特征没有按比例或以成比例方式在图1中描绘;图1是非限制性的示例性实施方式。

[0134] 参考图1,柔性平面形式20由一片合适的生物相容性基质形成。所有需要的是,柔性平面形式20是柔性的、贴附的和/或适合于管状结构例如血管的轮廓化的外表面。柔性平面形式20可以接触血管的外表面,可以包裹外表面,或可以卷绕外表面。

[0135] 根据图2A中说明的一个示范性实施方式,轮廓化的柔性平面形式20'可以被配置以含有可分界的区域,例如体30,连接到桥50,连接到片40。片40是可过桥50从体30

分离的,而这几个区域形成连续的整体。根据一个示范性实施方式,这几个区域的内部边缘被设置来限定轮廓化的柔性平面形式 20' 中的内部槽隙 60。根据优选的实施方式,限定内部槽隙 60 的这几个区域进一步限定了位于轮廓化的柔性平面形式 20' 内部的第一端点 62,位于轮廓化的柔性平面形式 20' 的外部边缘上的第二端点 64,以及宽度 66。在这个特定的示范性实施方式中,第一端点 62 处在片 40 和桥 50 之间的边界上;第二端点 64 处在片 40 和体 30 之间的边界上。

[0136] 在某些实施方式中,预期的是由以上描述的片 40、体 30 和桥 50 限定槽隙 60 的宽度 66,优选是约 0.01 到约 0.04,更优选约 0.05 到约 0.08,最优选约 0.06 英寸。优选的,柔性平面形式 20' 的槽隙 60 的宽度 66 具有足够的尺寸,以阻止移接的细胞形成跨越槽隙 60 的宽度 66 的不间断的融合层或细胞桥。然而预期的是,限定槽隙 60 和槽隙宽度 66 的实施方式可以如在此描述的使用,即使仅仅通过切割或以其他方式阻断这种细胞层或细胞桥而使细胞跨越宽度 66。

[0137] 本发明进一步预期图 1 的柔性平面形式 20' 可以适合于在即将使用之前限定槽隙 60,仅通过指导熟练医师使用解剖刀或其他刀具来部分地切割所述平面形式,从而限定槽隙。

[0138] 部分地,在此公开的发明基于以下发现,轮廓化的或贴附的柔性平面形式容许可植入材料最佳地应用到管状结构而不损害植入物或移接其上的细胞的完整性。一种优选的实施方式优化了与手术处理的血管的解剖结构的接触和相符,并控制可植入材料叠盖的程度。可植入材料在外膜间隙内的过度叠盖可以在处理的血管上引起压力点,潜在地限制血流通过血管或产生其他可能延迟和/或抑制稳态和正常痊愈的破坏。熟练医师将认识到植入时的过度叠盖,并将认识到重新放置或改变例如修整可植入材料的需要。另外,在其他实施方式中,可植入材料的叠盖能够引起散布在可植入材料内的治疗试剂的过量给药。如在此其他地方描述的,化学物质或其他外源提供的治疗试剂可以任选地添加到植入物中。在某些其他实施方式中,这种试剂可以添加到生物相容性基质并在不存在细胞的情况下施用;在这种方式下使用的生物相容性基质任选的限定槽隙。

[0139] 相比之下,不充分接触目标管状结构的可植入材料能够引起对该移接的细胞所提供的临床益处的不充分暴露,或添加到所述可植入材料中的治疗试剂的不足给药。熟练的医师将认识到在植入时次最优接触对于重新放置和/或其他可植入材料的需要。

[0140] 可流动组合物。在此处预期的某些实施方式中,本发明的可植入材料是包含颗粒状生物相容性基质的可流动组合物。用于能够通过进入血管内部长度来管腔内(血管内)施用、或通过透皮局部施用的可注射型递送装置的、任何非固体可流动组合物是此处预期的。可流动组合物优选的是保持形状的组合。因而,在此处预期的、在可流动型颗粒状基质之中、之上或之内包含细胞的可植入材料,可以被配制用于任何可注射递送装置,所述递送装置内径范围从约 22 规格(gauge)到约 26 规格,并能够递送约 50mg 包含颗粒材料、在约 1 到约 3ml 中含有约 1 百万个细胞的可流动组合物。

[0141] 根据当前优选的实施方式,可流动组合物包含生物相容的颗粒状基质,例如 Gelfoam® 颗粒、Gelfoam® 粉末或粉碎的 Gelfoam® (Pfizer Inc., New York, NY) (以下称“Gelfoam 颗粒”),其为来自猪皮明胶的产品。根据另一种实施方式,所述颗粒状基质是 Cytodex-3 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 微载体,包含与交联葡聚糖的基质

联结的变性胶原。

[0142] 根据可选择的实施方式,所述生物相容性可植入颗粒状基质是经修饰的生物相容性基质。修饰包括以上对于可植入基质材料描述的那些。

[0143] 适合按这种方式使用的可流动组合物的实例在同一天提交的共同待决申请 PCT/US05/44090(代理人编号 No. ELV - 008PC) 中公开,其完整内容通过引用并入本文;以及在同一天提交的共同待决申请 PCT/US05/43844(代理人编号 No. ELV - 009PC) 中公开,其完整内容通过引用并入本文。

[0144] 生物相容性基质的细胞播种。适合的生物相容性基质的预先切割的片段或适合的生物相容性可流动基质的等分量,通过添加没有抗生素的 EGM-2 在大约 37°C 和 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气中重新水化 12 到 24 小时。然后从它们的重新水化容器中移出可植入材料,放置到各个组织培养皿中。生物相容性基质以大约 1.5 - 2.0 × 10<sup>5</sup> 个细胞 (1.25 - 1.66 × 10<sup>5</sup> 个细胞 /cm<sup>3</sup> 基质) 的优选的密度播种,放置到维持在大约 37°C 和 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气、90% 湿度的孵化器中 3 - 4 小时以促进细胞附着。播种的基质然后放置到各个容器 (American Master Tech, Lodi, CA) 管中,各自装有带 0.2 μm 过滤器的帽子和 EGM-2,在大约 37°C 和 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气下孵育。每两到三天更换培养基,此后,直到细胞达到融合。在一个优选的实施方式中的细胞优选是第 6 次传代,但是可以使用更少或更多次传代的细胞。根据本发明的其他实施方式的其可植入材料制备方案在提交的共同待决申请 PCT/US05/43844(代理人编号 No. ELV - 009PC) 中公开,其完整内容通过引用并入本文。

[0145] 细胞生长曲线和融合。在或大约在第 3 或 4、6 或 7、9 或 10、和 12 或 13 天移出可植入材料的样品,计数细胞并评定活力,构建生长曲线和评估以评估生长特点,和确定是否达到融合、近融合或融合后。在图 3A 和图 3B 中呈现了来自包含猪主动脉内皮细胞植入物的可植入材料的两个制品的代表性生长曲线。在这些实例中,所述可植入材料具有柔性平面形式。一般地,普通技术人员将理解早期、中期和晚期时间点的可接受细胞生长的特征,例如在早期时间点观察到细胞数量增加(当参考图 3A 时,约 2 - 6 天之间),随后是近融合阶段(参考图 3A 时,在约 6 - 8 天之间),随后是一旦细胞达到融合时细胞数量的平台期(参考图 3A 时,在约 8 - 10 天之间),和当细胞是融合后时细胞数量的维持(参考图 3A 时,在约 10 - 14 天之间)。对于本发明来说,处于平台期至少 72 小时的细胞群体是优选的。

[0146] 通过使用 0.8mg/ml 胶原酶在胰蛋白酶-EDTA 溶液中形成的溶液完全消化可植入材料的等分量,实现细胞计数。在测量消化的可植入材料的体积之后,用 0.4% 锥虫蓝稀释已知体积的细胞悬液(细胞:锥虫蓝为 4:1),通过锥虫蓝排阻评定活力。使用血球计数器计数活细胞、非存活细胞和总细胞。通过将活细胞数目相对于培养天数作图来构建生长曲线。在达到融合之后将细胞装运和移植。

[0147] 对于本发明来说,融合被定义为当可植入材料是柔性平面形式 (1.0 × 4.0 × 0.3cm) 时存在至少约 4 × 10<sup>5</sup> 个细胞 /cm<sup>3</sup>,当是柔性组合物时优选每等分量 (50 - 70mg) 约 7 × 10<sup>5</sup> 到 1 × 10<sup>6</sup> 个总细胞。对这两者,细胞活力至少约 90%,但优选不低于 80%。如果到第 12 或 13 天细胞不融合,更换培养基,继续孵育一天。继续这个过程直到达到融合或直到播种后 14 天。在第 14 天,如果细胞没有融合,全部丢弃。如果在进行过程中检查之后确定细胞是融合的,进行最后的培养基更换。这种最后的培养基更换使用没有酚红和没有抗生素的 EGM-2 进行。在培养基更换之后立刻地给试管装上无菌栓塞密封帽用

于装运。

[0148] 功能评估。对于在此描述的发明来说,在植入之前进一步测试可植入材料的功能。例如,在培养期间收集条件培养基来确定培养的内皮细胞产生的硫酸乙酰肝素、转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、碱性成纤维细胞生长因子 (b-FGF) 和氧化氮的水平。在某些优选的实施方式中,当总细胞是至少约 2、优选至少约  $4 \times 10^5$  个细胞 /  $\text{cm}^3$  的柔性平面形式;活细胞的百分比是至少约 80 - 90%、优选  $\geq 90\%$ 、最优选至少约 90%;条件培养基中硫酸乙酰肝素是至少约 0.5 - 1.0、优选至少约 1.0 微克 /  $10^6$  个细胞 / 天时,所述可植入材料可以用于在此描述的目的。在条件培养基中 TGF- $\beta_1$  是至少约 200 - 300、优选至少约 300 皮克 / ml / 天;条件培养基中的 b-FGF 是少于约 200 皮克 / ml / 天、优选不超过约 400 皮克 / ml / 天。

[0149] 硫酸乙酰肝素水平可以使用常规的二甲基亚甲基蓝色 - 软骨素酶 ABC 消化分光光度分析来测定。总硫酸化糖胺聚糖 (GAG) 水平使用二甲基亚甲基蓝 (DMB) 染料结合分析来测定,其中未知样品与使用在集中培养基中稀释的已知数量的纯化硫酸软骨素产生的标准曲线比较。在添加 DMB 显色试剂之前将其他的条件培养基样品与软骨素酶 ABC 混合来消化软骨素和硫酸皮肤素。在与 GAG 标准物混合的 DMB 染料的最大波长吸光度下,一般约 515 - 525nm 下,测定所有的吸光度。通过从条件培养基样品中的总硫酸化糖胺聚糖浓度中减去软骨素和硫酸皮肤素的浓度,计算每  $10^6$  个细胞每天的硫酸乙酰肝素浓度。软骨素酶 ABC 活性通过消化纯化的硫酸软骨素样品来确认。如果低于 100% 的纯化的硫酸软骨素被消化,适当地校正条件培养基样品。硫酸乙酰肝素水平也可以使用采用单克隆抗体的 ELISA 分析来测定。

[0150] TGF- $\beta_1$  和 b-FGF 水平可以使用采用单克隆或多克隆抗体、优选多克隆抗体的 ELISA 分析来测定。对照集中培养基也可以使用 ELISA 分析来测定,根据对照培养基中存在的 TGF- $\beta_1$  和 b-FGF 水平适当地校正样品。

[0151] 氧化氮 (NO) 水平可以使用标准的格里斯反应分析来测定。氧化氮的短暂和挥发性特性使他不适合大多数检测方法。然而,氧化氮的两种稳定的分解产物,硝酸盐 ( $\text{NO}_3$ ) 和亚硝酸盐 ( $\text{NO}_2$ ) 可以使用常规光度方法来检测。在存在硝酸盐还原酶的情况下,格里斯反应分析酶学地转化硝酸盐成为亚硝酸盐。作为有色的偶氮染料产物以色谱方式检测亚硝酸盐,在约 540nm 的范围内吸收可见光。系统中存在的氧化氮的水平通过以下方法测定:转化所有的硝酸盐为亚硝酸盐、测定未知样品中亚硝酸盐的总浓度、然后比较产生的亚硝酸盐的浓度与使用转变成亚硝酸盐的已知数量的硝酸盐产生的标准曲线。

[0152] 使用如上所述的定量硫酸乙酰肝素、TGF- $\beta_1$ 、NO 和 / 或 b-FGF 分析,以及如下的对平滑肌细胞生长和血栓形成抑制作用的定量体外分析,来评定较早描述的优选的抑制性表型。对于本发明来说,当一种或多种这些可选择的体外分析确定了可植入材料展现优选的抑制性表型时,可植入材料准备好用于植入。

[0153] 为了评估对体外的平滑肌细胞生长的抑制作用,测定与培养的内皮细胞相关的抑制作用大小。猪或人类主动脉平滑肌细胞稀疏地播种到 24 孔组织培养平板中的平滑肌细胞生长培养基 (SmGM-2, Cambrex BioScience) 中。容许细胞附着 24 小时。然后使用含有 0.2% FBS 的平滑肌细胞基础培养基 (SmBM) 替换该培养基达 48 - 72 小时来延滞细胞生长。从融合后内皮细胞培养物制备条件培养基,用  $2 \times$  SMC 生长培养基 1 : 1 稀释,并添加到培养物中。对平滑肌细胞生长的抑制作用的阳性对照被包括在每个分析中。在三到四天之后,使

用库尔特计数器计数每个样品中的细胞数量。通过比较即将添加条件培养基之前每反应孔的平滑肌细胞数目和暴露于条件培养基之后三到四天的数目,以及对照培养基的数目(有和没有添加生长因子的标准生长培养基),测定条件培养基对平滑肌细胞增殖的影响。与条件培养基样品相关的抑制作用的大小同与阳性对照相关的抑制作用的大小相比较。根据优选的实施方式,如果条件培养基抑制了肝素对照物所能抑制的量约 20%,所述可植入材料被认为是抑制性的。

[0154] 为了评估体外的血栓形成抑制作用,测定与培养的内皮细胞相关的硫酸乙酰肝素水平。硫酸乙酰肝素具有抗增殖和抗血栓性质。使用以上详细描述常规的二甲基亚甲基蓝-软骨素酶 ABC 分光光度法分析或 ELISA 分析,计算出每  $10^6$  个细胞的硫酸乙酰肝素的浓度。当条件培养基中的硫酸乙酰肝素是至少约 0.5 - 1.0、优选至少约 1.0 微克/ $10^6$  个细胞/天时,所述可植入材料可以用于在此描述的目的。

[0155] 评估血栓形成抑制作用的另一种方法涉及测定与富血小板血浆相关的体外血小板凝聚抑制作用的大小。通过在室温下向猪血液样品添加柠檬酸钠来获得猪血浆。柠檬酸化的血浆以柔和的速度离心,来将红细胞和白细胞提取到团粒(pellet)中,留下血小板悬浮在血浆中。从融合后内皮细胞培养物制备条件培养基,并添加到富血小板血浆的等分量中。向血浆添加血小板聚集剂(激动剂)作为对照。血小板激动剂通常包括花生四烯酸(arachidonate)、ADP、胶原、肾上腺素和瑞斯托菌素(ristocetin)(可从 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO 获得)。其他的血浆等分量不添加血小板激动剂或条件培养基,来评定基线的自发血小板凝聚。用于抑制血小板凝聚的阳性对照也被包括在每个分析中。示范性的阳性对照包括阿斯匹林、肝素、阿昔单抗(abciximab)(**ReoPro®**, Eli Lilly, Indianapolis, IN)、替罗非班(tirofiban)(**Aggrastat®**, Merck&Co., Inc., Whitehouse Station, NJ)或依替巴肽(eptifibatide)(**Integrilin®**, Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA)。然后使用聚集计测量所有测试条件的产生的血小板聚集。聚集计通过监视光密度来测量血小板聚集。血小板聚集时,更多的光线可以通过样本。聚集计以“血小板聚集单位”报告结果,这是血小板聚集速度的函数。作为在添加激动剂之后 6 分钟的最大聚集来评定聚集。通过比较添加条件培养基之前的基线血小板聚集以及富血小板血浆暴露于条件培养基之后的血小板聚集,以及比较阳性对照,来测定条件培养基对血小板聚集的影响。结果表示为占基线的百分比。与条件培养基样品相关的抑制作用的大小同与阳性对照相关的抑制作用的大小相比较。根据优选的实施方式,如果条件培养基抑制了阳性对照所能抑制的约 20%,所述可植入材料被认为是抑制性的。

[0156] 当准备植入时,具有柔性平面形式的可植入材料供应至最终产物容器中,各自优选含有  $1 \times 4 \times 0.3 \text{cm}$  ( $1.2 \text{cm}^3$ ) 的无菌片,所述无菌片具有优选大约  $5 - 8 \times 10^5$ 、优选至少约  $4 \times 10^5$  个细胞/ $\text{cm}^3$ ,和至少约 90% 的活细胞,例如,来自单一尸体供体来源的人类主动脉内皮细胞,每立方厘米,在大约 45 - 60ml、优选约 50ml 内皮生长培养基中(例如,不包含酚红和抗生素的内皮生长培养基(EGM-2)。当使用猪主动脉内皮细胞时,生长培养基也是不包含酚红的 EBM-2,但补充有 5% FBS 和  $50 \mu \text{g/ml}$  庆大霉素。

[0157] 在其他优选的实施方式中,包含可流动颗粒形式的可植入材料在最终产物容器中

提供,包括,例如,装备有过滤帽子的密封的组织培养容器或预先装载的注射器,各自优选含有约 50 — 60mg 颗粒材料,使用约  $7 \times 10^5$  到约  $1 \times 10^6$  个总内皮细胞移接,这些细胞存在于每等分量约 45 — 60ml、优选约 50ml 内皮生长培养基中。

[0158] 可植入材料的货架寿命。包含融合、近融合或融合后细胞群体的可植入材料可以在室温下以稳定和存活条件维持至少两周。优选的,这种可植入材料被保持在约 45 — 60ml、更优选 50ml 有或没有额外的 FBS 的转移培养基中。转移培养基包含没有酚红的 EGM-2 培养基。FBS 可以添加到转移培养基的体积中,直至约 10% FBS,或约 12% FBS 的总浓度。然而,由于 FBS 必需在植入之前从可植入材料中除去,优选的是限制转移培养基中使用的 FBS 的数量来降低植入前所需的清洗时长。

[0159] 可植入材料的低温保存。包含融合的细胞群体的融合可植入材料可以被低温保存,用于保存和 / 或转运到临床,而在最后解冻时不降低它的临床效力或完整性。优选的,所述可植入材料低温保存在 15ml 冷冻管 (Nalgene®, Nalge Nunc Int'l, Rochester, NY) 中、存在于含有约 5% 到 20% DMSO、约 2 — 8% 葡聚糖和约 50 — 75% FBS 的约 5ml CryoStor CS-10 溶液 (BioLife Solutions, Oswego, NY) 中。将冷冻管置于冷异丙醇 (或控制冷冻速度的任何这样的试剂中) 水浴中,转移到约  $-80^\circ\text{C}$  冷冻器约 4 小时,随后转移到液氮中 (约  $-150$  到  $-165^\circ\text{C}$ )。

[0160] 可植入材料的低温保存的等分量然后在室温下慢慢解冻约 15 分钟,随后在室温水浴中继续解冻大约 15 分钟。然后在约 15ml 洗涤培养基中洗涤材料约 3 次。洗涤培养基包含没有酚红、有  $50 \mu\text{g/ml}$  庆大霉素的 EBM。前两次清洗操作在室温下进行约 5 分钟。最终的清洗操作在  $37^\circ\text{C}$  在 5%  $\text{CO}_2$  中进行约 30 分钟。

[0161] 在解冻和清洗操作之后,容许低温保存的材料在约 10ml 再生溶液中静息约 48 小时。对于猪内皮细胞,再生溶液是补充有 5% FBS 和  $50 \mu\text{g/ml}$  庆大霉素、在  $37^\circ\text{C}$  在 5%  $\text{CO}_2$  中的 EBM-2。对于人内皮细胞,再生溶液是没有抗生素的 EGM-2。进一步的解冻后调节可以在使用和包装用于保存或转运之前另外进行至少 24 小时。

[0162] 在即将植入之前,倾倒培养基,在约 250 — 500ml 无菌盐水 (USP) 中清洗可植入材料。如有必要,最终产品中的培养基含有少量的 FBS 来在转运到临床位置期间维持细胞活力。FBS 已经根据 Title9CFR:Animal and Animal Products 广泛地测试了细菌、真菌和其他病毒剂的存在。仅在植入之前采取清洗操作,其降低转运的 FBS 的数量,优选降低到单位植入物 0 — 60ng 之间。

[0163] 每个人患者的总细胞载荷优选是大约  $1.6 - 2.6 \times 10^4$  个细胞每 kg 体重,但是不低于约  $2 \times 10^3$  以及不超过约  $2 \times 10^6$  个细胞每 kg 体重。

[0164] 如在此预期的,本发明的可植入材料包含细胞,优选血管内皮细胞,其优选是约 90% 存活的、密度优选约  $4 \times 10^5$  个细胞 /  $\text{cm}^3$  柔性平面形式,当融合时,产生含有至少约 0.5 — 1.0、优选至少约 1.0 微克 /  $10^6$  个细胞 / 天的硫酸乙酰肝素,至少约 200 — 300、优选至少约 300 皮克 / ml / 天的  $\text{TGF-}\beta_1$ , 和低于至少约 210 皮克 / ml / 天、优选不超过约 400 皮克 / ml / 天的 b-FGF 的条件培养基。

[0165] 柔性平面形式的可植入材料的递送

[0166] 一般问题。可植入材料可以以各种形式施用给血管通路结构。根据一个优选的实施方式,所述可植入材料是按形状和大小切割的柔性平面形式,使其适合于植入到瘻、移植

物、外周移植物或其他血管通路结构及其周围附近,并且其可以贴附在通路结构和它相连的血管的轮廓化表面。

[0167] 根据优选的实施方式,为向要处理的血管通路结构应用来调整单片可植入材料的大小。根据另一个实施方式,超过一片的柔性平面形式的可植入材料,例如二、三、四、五、六、七、八或更多片基质材料,可以用于单个血管通路位置。另外,沿着血管通路结构长度的超过一个位置可以用一片或多片可植入材料处理。例如,对于动静脉移植物来说,每个近端静脉接合点、远端静脉接合点和远端静脉节可以用一片或多片所述可植入基质材料处理。

[0168] 根据一个非限制性实施方式,所述可植入材料被配置以贴附血管的外表面。在图1中说明了示范性的非限制性平面形式。参考图1,示范性的柔性平面形式20具有长度12、宽度14和高度16。根据一个优选的实施方式,柔性平面形式20的长度12是约2cm到约6cm,柔性平面形式20的宽度14是约0.5cm到约2cm,柔性平面形式20的高度16是约0.1cm到约0.5cm。

[0169] 根据另一个实施方式,柔性平面形式20可以配置为解剖学上轮廓化的形式,其贴附血管或血管通路结构的外表面。在图2A中描绘了被配置用于向血管通路结构施用的示范性的解剖学轮廓化的柔性平面形式20',并在以下更详细地讨论。

[0170] 如在此的其他地方说明的,图2A的轮廓化的柔性平面形式20'可以配置为各种几何形式。例如,根据一个实施方式,轮廓化的柔性平面形式20'含有限定内部槽隙60的几个区域。根据其他实施方式,轮廓化的柔性平面形式20'的边缘和/或内部槽隙60的边缘是有角度的或曲线的。根据另一个实施方式,轮廓化的柔性平面形式20'的高度16'跨越长度12'和/或宽度14'地变化。另外,取决于轮廓化的柔性平面形式20'的构型和预期目的,可以有一个、或超过一个的片40、桥50和/或槽隙60。对于槽隙的特征,可以在轮廓化的柔性平面形式20'之中、之上或之内的任何地方限定槽隙。槽隙可以被限定为宽度均一或宽度有变化。槽隙可以被限定为线性、非线性或曲线的。

[0171] 参考图2B、图2C、图2D和图2E,其描绘了含有至少一个槽隙60的本发明的轮廓化柔性平面形式20'的多种实施方式,在某些实施方式中所述轮廓化的柔性平面形式20'可以限定一个或超过一个的槽隙,并可以根据在此公开的方法来使用。在轮廓化的柔性平面形式20'之上或之内限定的槽隙60可以沿着所述轮廓化的柔性平面形式20'的任何边缘排列,或可以穿透到轮廓化的形式20'的内部。现在参考图2E,在所述轮廓化的柔性平面形式20'之中或之内的槽隙60的宽度66或总体形状可以被限定为宽度均一或宽度有变化,可以限定为线性、非线性或曲线的。

[0172] 对于图2F和图2G,轮廓化的柔性平面形式20'可以限定分别具有不同宽度66和66'的槽隙60或60'。

[0173] 如所描绘的,图2G的槽隙60'和宽度66'代表一种实施方式,其中医师在植入之时,切割在此其他地方提出的柔性平面形式20',从而将它转变成图2G中描绘的轮廓化的柔性平面形式20'。

[0174] 根据一个实施方式,端对面血管接合点连接,例如动静脉瘘,可以使用本发明的可植入材料处理。在图4A、图4B和图4C中说明了将柔性平面形式的可植入材料递送到端对面血管接合点的示范性方法的步骤。

[0175] 参考图4A,通过将第一片可植入材料22的一个末端34或第二末端36移至接合段

110 下部,直到第一片可植入材料 22 的中段 32 处在接点 112 处,在此血管 100、110 会合,向血管通路结构提供第一片可植入材料 22。末端 34、36 然后在接点 112 卷绕缝合线 114,保持可植入材料中心在缝合线 114 上。根据一个实施方式,第一片可植入基质材料 22 的末端 34、36 可以相互叠盖仅仅足以固定第一片可植入基质材料 22 就位即可。根据另一个实施方式,第一片可植入基质材料 22 的末端 34、36 不相互叠盖。第一片可植入基质材料 22 或任何其他片可植入基质材料的末端 34、36,不必相互会合、相互叠盖、或卷绕任一血管 100、110 的整个圆周。根据一个优选的实施方式,第一片可植入材料 22 的末端 34、36 卷绕接合接点 112 尽可能远而不拉伸或撕扯。所有需要的是,实现血管的充分覆盖。熟练技术人员将理解何时恰当地实现可植入材料的施用。

[0176] 参考图 4B,根据另一个实施方式,任选的应用第二片可植入材料 24,第二片可植入材料 24 的中段 42 中心在接合接点 112 处、邻近或附近。第二片可植入材料 24 的末端 44、45 卷绕血管 100。如在图 4A 中对于第一片可植入材料 22 所描述的,第二片可植入基质材料 24 的末端 44、46 可以但不需要接触、叠盖、或卷绕任一血管 100、110 的整个圆周。

[0177] 参考图 4C,根据又一个实施方式,第三片可植入材料 26 任选的置于处理的血管 100 的近端血管段 116 处、接合接点 112 的远端。根据一个实施方式,第三片可植入材料 26 沿着血管 100 的长度纵向地放置,第三片可植入材料 26 的第一末端 54 在接合接点 112 处、其邻近或附近,第三片可植入材料 26 的第二末端 56 远离接合接点 112。如在图 4A 中对于第一片可植入材料 22 所描述的,第三片可植入基质材料 26 的末端 54、56 可以但不需要接触、叠盖、或卷绕血管 100 的整个圆周。

[0178] 根据可选择的实施方式,限定槽隙 60 的单片轮廓化柔性平面形式 20',例如图 2A 中说明的示范性轮廓化的形式,被提供给血管通路结构,例如端对面接合点。在图 5 中说明了在端对面接合点处、邻近或附近植入限定槽隙 60 的轮廓化的柔性平面形式 20' 的可植入材料。当可植入材料以缠绕方式使用时,预期的是单片的可植入基质材料足够处理接合点和邻近的脉管系统。调整每个轮廓化的柔性平面形式 20' 的大小和形状,用于应用到特定血管通路结构,并因而,被预先形成以提供足够的覆盖和充足水平的内皮细胞因子和 / 或治疗试剂,来为该特定的血管通路结构和附近的脉管系统创建自我平衡的环境。

[0179] 参考图 5,根据一个实施方式,通过从片 40 分离体 30,向接合点提供限定槽隙的单个轮廓化的柔性平面形式 20'。体 30 沿着主要血管 100 的表面放置。桥 50 置于主要血管 100 的表面上,以及二级血管 110 的分支的下方。然后将片 40 围绕分支的血管 110,将片 40 沿着分支的血管 110 的上表面放置。

[0180] 根据图 5,单片的轮廓化的柔性平面形式 20' 含有两个参照点 70、80(还参见图 2A)。当施用到端对面接合点的位置时,如图 5 中说明的,对准两个参照点 70、80。第一参照点 70 位于片 40 上,第二参照点 80 位于桥 50 上(还参见图 2A)。在轮廓化的柔性平面形式 20' 的一个实施方式中,在植入之前,参照点 70、80 分开约二分之一英寸、优选小于约 1 英寸、更优选约 1 英寸、最优选不超过 1.5 英寸的距离。当轮廓化的柔性平面形式 20' 被施用到接合点的位置时,槽隙特征所允许的轮廓化的柔性平面形式 20' 围绕分支的血管 110 的旋转使得参照点 70、80 对准。

[0181] 根据一个实施方式(再次参考图 4A、图 4B 和图 4C),例如,当处理动静脉移植时,第一片可植入材料 22 和第二片可植入材料 24 分别被应用到近端静脉接合点和远端静

脉接合点。另外,第三片可植入材料 26 可以位于远端静脉、远端静脉接合点的下游。

[0182] 根据图 6 中例示的又一个可选择的示范性实施方式,柔性平面形式 20 中的单片可植入材料 20 应用到管状结构例如血管 100 上。预期的是,可植入材料可以应用于管状结构,例如不含有血管通路结构的血管。例如,血管通路结构下游的静脉部分可能经历加重的炎症、血栓形成、再狭窄或闭塞,其由血管通路结构的形成或被处理的静脉部分上游的血管通路结构处的粘针 (needle stick) 引起。在这种情况下,本发明的可植入材料可以处理、管理和 / 或改善这些状况,这些状况在距离血管通路结构一定距离处出现。

[0183] 可流动组合物中可植入材料的递送

[0184] 一般问题。本发明的可植入材料当处于可流动组合物形式时包含颗粒状生物相容性基质和细胞,优选内皮细胞,更优选血管内皮细胞,所述细胞是约 90% 存活的,优选密度约  $0.8 \times 10^4$  个细胞 /mg,更优选约  $1.5 \times 10^4$  个细胞 /mg,最优选约  $2 \times 10^4$  个细胞 /ml,所述细胞可以产生条件培养基,所述培养基含有至少 0.5 – 1.0、优选至少约 1.0 微克 / $10^6$  个细胞 / 天的硫酸乙酰肝素,至少约 200 – 300、优选至少约 300 皮克 /ml/ 天的 TGF- $\beta_1$ ,以及低于约 200 皮克 /ml/ 天和优选不超过约 400 皮克 /ml/ 天的 b-FGF; 以及,所述细胞显示早前描述的抑制性表型。

[0185] 对于本发明来说,一般地,可流动颗粒材料的施用被定位到血管通路结构处、其邻近或附近的位置。可植入材料的沉积位置是腔外。如在此预期的,局部的、腔外的沉积可以如下实现。

[0186] 在特别优选的实施方式中,所述可流动组合物首先使用适合的针、导管或其他适合的透皮注射型递送装置透皮地施用,进入血管周围间隙然后沉积在腔外位置。做为选择,所述可流动组合物使用针、导管或其他适合的递送装置透皮地递送,连同鉴定步骤来便于向期望的腔外位置的递送。鉴定步骤可以在透皮肤递送之前或同时发生。所述鉴定步骤可以使用血管内超声、其他的常规超声、荧光检查和 / 或内窥镜检查方法来实现,略举数例。任选地进行所述鉴定步骤,而不是实践本发明的方法必要的。

[0187] 所述可流动组合物也可以腔内地,即,血管内地施用。例如,所述组合物可以通过能插入到血管内的任何设备来递送。在这种情况下,这样的管腔内递送装置具备横贯或穿透设备,其穿透血管的腔壁来到达血管的非腔表面。然后所述可流动组合物在血管通路结构位置处、邻近或附近沉积在血管的非腔表面上。

[0188] 在此预期的是,非腔的、也称为腔外的表面可以包括血管的外部表面或血管周表面,或可以处在血管的外膜、血管中层或内膜之内。对于本发明来说,非腔的或腔外的表面是除了管腔内表面之外的任何表面。

[0189] 在此预期的穿透设备可以允许,例如,单个递送点或以期望的几何构型排列的多个递送点来实现可流动组合物向血管的非腔表面的递送,而不破坏血管通路结构。可以排列多个递送点,例如,环形、牛眼形、或线列排列,略举数例。所述穿透设备也可以是展伸穿孔器的形式,例如但不限于,包括多个递送点的气球支架 (balloon stent)。

[0190] 根据本发明的优选实施方式,所述穿透设备在所述血管通路结构位置的近端或远端经由血管的内腔表面插入。在某些临床受试者中,穿透设备在血管通路结构位置处的插入可能破坏血管通路结构和 / 或引起动静脉移植物或外周移植物的开裂。因而,在这些受试者中,应当小心地在离血管通路结构一定距离的位置插入所述穿透设备,优选由临床医

师取决于手头的特定环境确定该距离。

[0191] 优选的,可流动组合物沉积在血管的血管周表面上,在要处理的血管通路结构的位置,或在血管通路结构位置的邻近或附近。所述组合物可以沉积在相对于血管通路结构的各种位置,例如,在近端接合点处、在远端接合点处、邻近于任一接合点、例如,接合点的上游,对着接合点的外部血管表面。根据优选的实施方式,邻近的位置位于血管通路结构位置的约 2mm 到 20mm 之内。在另一个优选的实施方式中,位置在约 21mm 到 40mm 之内;在又一个优选的实施方式中,位置在约 41mm 到约 60mm 之内。在另一个优选的实施方式中,位置在约 61mm 到 100mm 之内。做为选择,邻近的位置是任何其他的、临床医师确定的邻近位置,在此沉积的组合物能够展现对于血管通路结构附近的血管的期望效果。

[0192] 在另一个实施方式中,所述可流动组合物直接递送到血管通路结构处、邻近或附近的手术暴露的腔外位置。在这种情况下,通过对该位置的直接观察来引导和指导递送。还是在这种情况下,通过同时使用如上所述的鉴定步骤,可以帮助递送。再一次地,鉴定步骤是任选的。

[0193] 腔外施用。对于本发明来说,可流动组合物的施用被定位到邻近于、附近于、或需要处理的位置之处的位置。如在此预期的,局部的、腔外的沉积可以如下实现。

[0194] 使用针、导管或其他适合的递送装置透皮地递送可流动组合物。做为选择,与导引方法的使用同时地透皮递送所述可流动组合物,来便于向需要处理的位置的递送。在进入血管周围间隙时,临床医师将所述可流动组合物沉积在需要处理的位置之处、邻近或附近的腔外位置。透皮递送最佳地可以通过常规超声、荧光检查、内窥镜检查方法来导引和指导,略举数例。

[0195] 在另一个实施方式中,所述可流动组合物局部地递送到需要处理的位置之处、邻近或附近的手术暴露的腔外位置。在这种情况下,通过直接观察需要处理的位置来导引和指导递送;同样在这种情况下,通过同时使用如上所述的其他导引方法,可以帮助递送。

[0196] 适合按这种方式使用的可流动组合物的实例在同一天提交的共同待决申请 PCT/US05/44090(代理人编号 No ELV - 008PC) 中公开,其完整内容通过引用并入本文;以及在同一天提交的共同待决申请 PCT/US05/43844(代理人编号 No ELV - 009PC) 中公开,其完整内容通过引用并入本文。

[0197] 接合密封剂。在某些其他实施方式中,本发明的可流动组合物另外可以特别地充当接合密封剂,或一般地充当外科密封剂。在这种双重目的实施方式中,当与结构的外表面接触、或应用到外表面上的弧中、或绕圆周地应用时,所述组合物对于密封两个或多个管状结构的接点、或密封管状结构中的空隙也是有用的。这种密封剂可以消除缝合的需求,所述缝合可能进一步损伤血管组织,例如,引起腔内皮的伤害。这种密封剂可以在接合点附近提供额外的稳定性,从而加强任何缝合修复。所有需要的是,这种双重目的组合物的密封剂型性质不影响或损害细胞的期望表型的一致性表达和所述组合物的基于细胞的功能。

[0198] 对于某些密封剂实施方式来说,所述可流动组合物包含生物相容性基质,所述生物相容性基质本身包含具有密封剂性质的成分,例如但不限于血纤蛋白网络,同时还具有支持内皮细胞或内皮样细胞群体的必需性质。并且,生物相容性基质本身可以具有密封剂性质,以及支持细胞群体所需的那些性质。对于其他实施方式来说,密封剂功能可以由细胞至少部分地贡献。例如,预期的是,与该组合物相连的细胞可以产生能修饰基质的物质,从

而所述基质获得密封剂性质,同时还展现/维持它们的必需细胞功能。某些细胞可以天然地产生这种物质,而其他细胞可以被工程化来产生。

[0199] 制备、保存和转运可植入材料的方法

[0200] 获得和制备细胞的方法。所述可植入材料包含同种异体的、异种的或自体的内皮细胞或内皮样细胞。所述内皮细胞从患者、尸体或细胞库获得。所述内皮细胞来源于血管组织,更优选来源于主动脉组织、最优选冠状动脉组织、肺动脉组织或髂动脉组织。做为选择,内皮细胞或内皮样细胞来源于非血管组织或器官、内皮祖细胞或其他祖细胞,或来自干细胞。根据其他实施方式,所述细胞被遗传地改变、修饰或工程化。

[0201] 广泛地测试来自供体的每一批细胞的内皮细胞纯度,生物学功能,以及支原体、细菌、真菌、酵母、已知的人类病原体和其他外来试剂的存在。根据优选的实施方式,细胞从O型血的供体获得。所述细胞使用公知的技术进一步扩增至第2代或第4代、表征、并低温保存在 $-140^{\circ}\text{C}$ ,来形成主细胞库,用于稍后制备工作细胞库、在培养基中扩增以及随后在可植入材料中制剂。

[0202] 选择的主细胞库然后在含有约15mL内皮细胞生长培养基的T-75烧瓶中扩增形成工作细胞库。将烧瓶置于维持在大约 $37^{\circ}\text{C}$ 和5%  $\text{CO}_2$ /95%空气、90%湿度的孵化器中至少30分钟。从 $-160^{\circ}\text{C}$ — $140^{\circ}\text{C}$ 冷冻器中移出一个或两个小瓶,在大约 $37^{\circ}\text{C}$ 解冻。每瓶解冻的细胞以约 $3 \times 10^3$ 个细胞每 $\text{cm}^3$ ,但优选不低于 $1.0 \times 10^3$ 以及不超过 $7.0 \times 10^3$ 的密度播种到两个T-75烧瓶中。含有细胞的烧瓶放回孵化器中。在约8—24小时之后,除去消耗了的培养基,用新鲜培养基替换。每两到三天更换培养基,此后,直到细胞达到约85—100%的融合,但不低于60%和不超过100%。当所述可植入材料预计用于临床应用时,在细胞的解冻后培养中和本发明的可植入材料制备中仅使用无抗生素的培养基。

[0203] 然后除去内皮细胞生长培养基,用10mL HEPES缓冲盐水(HEPES)冲洗单细胞层。除去HEPES,添加2mL胰蛋白酶(约0.25mg/mL)来从T-75烧瓶表面剥离细胞。一旦发生分离,添加3mL胰蛋白酶中和溶液(TNS)来终止酶反应。添加另外5mL HEPES,使用血球计对细胞计数。对细胞悬液离心并使用没有抗生素的EGM-2调节到约 $1.75 \times 10^6$ 个细胞/mL的密度。

[0204] 如果细胞将被冷冻形成工作细胞库,使用额外的10% FBS(最终12% FBS)和10%二甲亚砜(DMSO)补充培养基。将一毫升体积的产生的细胞悬浮液分散到冷冻管中,并置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 的冷冻器中4—24小时。冷冻的细胞,即,工作细胞库,然后转移到设置在 $-140^{\circ}\text{C}$ 的冷冻器用于保存直到使用。在第5代时冷冻工作细胞库。

[0205] 制备可植入材料的方法。生物相容性基质的预切片或可流动基质的等分量通过添加没有抗生素的EGM-2在大约 $37^{\circ}\text{C}$ 和5%  $\text{CO}_2$ /95%空气中12到48小时来再水化。然后从它的再水化容器中移出基质材料,放置到单独的组织培养皿中。用来自工作细胞库的细胞以大约 $1.5 - 2.0 \times 10^5$ 个细胞( $1.25 - 1.66 \times 10^5$ 个细胞/ $\text{cm}^3$ 基质)的优选的密度播种基质材料,放入维持在大约 $37^{\circ}\text{C}$ 和5%  $\text{CO}_2$ /95%空气、90%湿度的孵化器中3—4小时以促进细胞附着。根据一个实施方式,播种的基质然后放入具有带 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤器的帽子且装有EGM-2的、单独的可密封容器或试管,在大约 $37^{\circ}\text{C}$ 和5%  $\text{CO}_2$ /95%空气中孵育。每两到三天更换培养基,此后,直到细胞达到融合。根据可选择的实施方式,播种的基质放入具备栓塞密封盖的单独的可密封容器或试管中,并用10%  $\text{CO}_2$ 吹洗。根据这种方法,每次更换培养

基时用 10% CO<sub>2</sub> 吹洗容器。

[0206] 测定细胞融合和功能的方法。在或大约在第 3 或 4、6 或 7、9 或 10、以及 12 或 13 天时移出可植入材料的样品。对细胞计数并评定活力,构建生长曲线并进行评估,以评定生长特征和确定是否已经达到融合、近融合或融合后。通过使用 HEPES/CaCl<sub>2</sub> 溶液中的 0.5mg/mL 胶原酶的溶液完全消化可植入材料的等分量,实现细胞计数。在测量消化的可植入材料的体积之后,用 0.4% 锥虫蓝稀释已知体积的细胞悬液(细胞:锥虫蓝为 4:1),通过锥虫蓝排阻评定活力。使用血球计计数活细胞、非存活细胞和总细胞。通过将活细胞数目相对于培养天数作图来构建生长曲线。优选的,包含细胞的可植入材料在细胞达到融合之后植入,但可以使用融合后或近融合的细胞。如果到第 12 或 13 天细胞不融合,更换培养基,继续孵育额外一天。继续这个过程直到达到融合或直到播种后 14 天。在第 14 天,如果细胞还没有融合,该批次一般地但不是必需地被丢弃。如果在进行过程中检查之后确定细胞是融合的,进行最后的培养基更换。这种最后的培养基更换使用没有酚红和没有抗生素的 EGM-2 进行。在更换培养基之后立刻地给试管紧密地装上无菌栓塞密封帽用于装运。

[0207] 在植入之前进一步测试可植入材料的功能标志。例如,在培养期间收集条件培养基来确定培养的内皮细胞产生的硫酸乙酰肝素、转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、碱性成纤维细胞生长因子 (b-FGF) 和氧化氮 (NO) 的水平,以及细胞体外抑制平滑肌细胞生长和血栓形成的能力。根据早先描述的分析 and 参数评估条件培养基。当前优选的分析是硫酸乙酰肝素分析,其可以单独使用来确认功能。做为选择,它可以与用于移接的细胞产生的 TGF- $\beta_1$ 、b-FGF 和 NO 的一种或多种分析组合使用,和 / 或组合在此其他地方描述的体外抑制平滑肌细胞分析。

[0208] 低温保存可植入材料的组合物和方法。包含移接到生物相容性基质中的近融合、融合或融合后细胞群体的可植入材料,可以被低温保存用于延长保存数月到数年,或无限期保存。除了降低生产时间和成本之外,低温保存提供了可用的、完全测试的、活的和确认功能的可植入材料,用于在任何时候临床使用,而没有任何生产和运输相关的延迟。

[0209] 当细胞是近融合、融合或融合后的时,可植入材料可以被低温保存。根据各种实施方式,所述可植入材料在细胞播种到生物相容性基质中之后低温保存 10 到 14 天、更优选在播种之后保存 10 到 12 天、最优选播种之后保存 12 天。一般地,在播种后 10 天或约 10 天内皮细胞是融合前或融合的,在播种后 12 天或约 12 天内皮细胞是融合后 2-3 天的。

[0210] 在低温保存之前和任选低温保存之后,评估可植入材料的细胞数量、活力和功能指标。示范性的细胞功能分析包括评估硫酸乙酰肝素 (HS)、转化生长因子 (TGF)- $\beta_1$ 、碱性成纤维细胞生长因子 (b-FGF) 和氧化氮 (NO) 的水平,以及抑制培养的平滑肌细胞 (SMC) 生长的能力。此外,在向患者施用可植入材料之前,厂家和 / 或医师可以使用如上详细描述锥虫蓝分析评定细胞活力。根据优选的实施方式,如果总细胞计数等于或大于 400,000 个细胞 / cm<sup>3</sup>、80% 到 90% 或更多的细胞是存活的、硫酸乙酰肝素以 0.23  $\mu$ g/mL/天或更高的量存在, TGF- $\beta_1$  以 300pg/mL/天或更高的量存在,则所述可植入材料是可接受的。根据其他的实施方式,如果 b-FGF 的水平是 300pg/mL/天或更低,则所述可植入材料是可接受的。

[0211] 根据一个实施方式,所述可植入材料被低温保存在低温保存介质组合物中,所述低温保存介质组合物包含补充有多糖和血清的低温保存剂。根据优选的实施方式,所述可植入材料被低温保存在低温保存介质组合物中,所述低温保存介质组合物包含约 5mL 的

CryoStor™CS-10 溶液 (BioLife Solutions, Oswego, NY), 所述溶液含有约 10% DMSO 并补充有约 4.5% 葡聚糖和约 50% FBS。根据其他的实施方式, FBS 的浓度大于细胞培养中使用的 FBS 的量, 所述浓度是约 20% 到 80%, 更优选约 40% 到 60%, 最优选约 50%。根据其他的实施方式, DMSO 的浓度是约 5% 到 20% DMSO, 更优选约 7% 到 15%, 最优选约 10% DMSO。根据其他的实施方式, 葡聚糖的浓度是约 2% 到 8%, 更优选约 4% 到 6%, 最优选约 4.5%。根据一个实施方式, 葡聚糖具有约 10,000 到 500,000、更优选约 20,000 到 200,000、最优选约 70,000 的分子量。根据优选的实施方式, 所述低温保存介质组合物具有约 6.8 到 8.0、更优选约 7.2 到 7.6、最优选约 7.4 的 pH 值。

[0212] 根据低温保存的一种方法, 所述可植入材料从它的细胞培养物小瓶中转移到 15mL 冷冻瓶 (Nalgene®, Nalge Nunc Int'l, Rochester, NY) 中, 所述冷冻瓶中添加了约 5mL 的低温保存介质组合物。根据其他的实施方式, 所述冷冻瓶具有约 6 到 10mL 的体积, 更优选具有约 10 到 15mL 的体积, 和最优选具有约 15ml 的体积。根据一个实施方式, 所述冷冻瓶中低温保存介质与空气的体积比是约 1:1 到 1:2、更优选约 1:1 到 2:3、最优选约 1:1。

[0213] 根据低温保存的一种方法, 所述装有可植入材料和低温保存介质组合物的冷冻瓶被置于冷冻容器 (Mr. Frosty™, Nalge Nunc Int'l, Rochester, NY) 中。向所述冷冻容器中添加异丙醇来填充约二分之一的冷冻容器体积。根据一个实施方式, 所述冷冻容器然后转移到 -20°C 冷冻器中。根据另一个实施方式, 所述冷冻容器然后转移到 -80°C 冷冻器中。根据进一步的实施方式, 在 -80°C 冷冻器中保持约 16 小时之后, 冷冻容器被转移到液氮气相中 (大约 -140°C 到 -160°C)。根据各种实施方式, 所述冷冻容器被保持在约 -4°C 到 -160°C、更优选约 -20°C、约 -80°C 或 -160°C, 最优选约 -140°C 到 -160°C。根据各种实施方式, 所述可植入材料可以保持在低温保存状态 2 个月、4 个月、6 个月、8 个月、10 个月、12 个月和更久。

[0214] 如果所述可植入材料不被慢慢地解冻, 所述生物相容性材料倾向于分裂成几片, 降低基质完整性、细胞融合性和活力。通过慢慢地解冻所述可植入材料, 改善了材料的完整性。根据慢慢解冻可植入材料的优选的方法, 含有所述冷冻的可植入材料和冷冻保存介质的冷冻瓶从冷冻器 (约 -4°C 到 -80°C) 或液氮气相 (大约 -40°C 到 -160°C) 中取出, 在室温下解冻约 15 分钟, 随后在室温水浴中另外解冻 15 分钟。然后从所述冷冻瓶中移出可植入材料, 洗涤来除去剩余的低温保存介质。

[0215] 根据一个实施方式, 在实验室中解冻所述可植入材料用于体外评定。依据这种实施方式, 所述可植入材料在 15mL 洗涤培养基 (EBM-PRF 和 50 μg/ml 庆大霉素) 中在室温下洗涤两次达 5 分钟, 随后在约 15mL 洗涤培养基中在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 中最后洗涤 30 分钟。在洗涤过程之后, 可植入材料置于 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 的 10mL EGM-2 中达约 48 小时的恢复时间。在临床使用之前, 或用于随后可植入材料为了转运的包装, 任选地可以调整可植入材料另外 24 小时。

[0216] 根据另一个实施方式, 在临床中解冻所述可植入材料用于患者植入。依据这种实施方式, 所述可植入材料从冷冻瓶中移出, 并在约 500mL 洗涤培养基中洗涤两次。根据各种实施方式, 在室温下, 所述洗涤培养基包含 USP 级别盐水、乳酸化的林格氏溶液和 EBM-PRF。所述可植入材料保持在第一洗涤培养基溶液里约 1 到 40 分钟, 更优选约 2 到 25 分钟, 保持在第二洗涤培养基溶液里约 1 到 20 分钟, 更优选约 1 到 10 分钟。从所述第二洗涤培

培养基中移出可植入材料并植入患者中。

[0217] 延长可植入材料的货架寿命的组合物和方法。包含包埋入生物相容性基质的近融合、融合或融合后的内皮细胞群体的可植入材料的实施方式可以在室温下以存活、货架稳定的条件维持用于保存和 / 或转运约 21 到 28 天。根据其他的实施方式,所述可植入材料可以在室温维持至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周。

[0218] 根据各种实施方式,在将细胞播种到生物相容性材料中之后 10 到 14 天,可以制备可植入材料用于在室温下保存。根据当前优选的实施方式,在播种后 12 天制备所述可植入材料用于在室温下保存。根据另一个当前优选的实施方式,在播种后 10 天制备所述可植入材料用于在室温下保存。

[0219] 在保存在转移培养基中之前或任选的之后,可以评估所述所述可植入材料的细胞数量、和活力与功能指标。示范性的细胞功能分析包括评估硫酸乙酰肝素 (HS)、转化生长因子 (TGF)- $\beta_1$ 、碱性成纤维细胞生长因子 (b-FGF) 和氧化氮 (NO) 的水平,以及抑制培养的平滑肌细胞 (SMC) 生长的能力。此外,在向患者施用可植入材料之前,厂家和 / 或医师可以使用如上详细描述锥虫蓝分析评定细胞活力。根据优选的实施方式,如果总细胞计数等于或大于 400,000 个细胞 / $\text{cm}^3$ 、80% 到 90% 或更多的细胞是存活的、硫酸乙酰肝素以 0.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 天或更高的量存在, TGF- $\beta_1$  以 300 $\text{pg}/\text{mL}$ / 天或更高的量存在,则所述可植入材料是可接受的。根据其他的实施方式,如果 b-FGF 的水平是 300 $\text{pg}/\text{mL}$ / 天或更低,则所述可植入材料是可接受的。

[0220] 所述可植入材料在室温下保持在包含补充的 EGM-2 的转移介质组合物中。当用于细胞培养目的时,标准的、未补充的 EGM-2 含有约 2% FBS、约 0.2 $\text{mg}/\text{mL}$  氢化可的松、约 2 $\text{ng}/\text{mL}$  VEGF、约 4 $\text{ng}/\text{mL}$  hFGF、约 5 $\text{ng}/\text{mL}$  R3-IGF-1、约 75 $\text{mg}/\text{mL}$  抗坏血酸、约 10 $\text{ng}/\text{mL}$  hEGF 和约 1 $\text{ng}/\text{mL}$  肝素。根据其他的实施方式,所述未补充的 EGM-2 进一步含有抗生素,包括但不限于约 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  庆大霉素或约 15 $\text{ng}/\text{mL}$  两性霉素 -B。

[0221] 根据优选的实施方式,所述可植入材料在室温下保存在转移介质组合物中,所述转移介质组合物包含没有酚红的约 50 $\text{mL}$  EGM-2 (Cambrex BioScience, East Rutherford, NJ)、补充有额外的约 2 $\text{ng}/\text{mL}$  VEGF、使转移培养基中 VEGF 的总浓度到约 4 $\text{ng}/\text{mL}$ 。根据其他的实施方式,正常的 EGM-2 补充以约 0.1 到 4 $\text{ng}/\text{mL}$  VEGF、更优选约 1 到 3 $\text{ng}/\text{mL}$  VEGF,以及最优选约 2 $\text{ng}/\text{mL}$  VEGF。根据优选的实施方式,在细胞暴露之前转移培养基 pH 值是约 7.4 到 8.0。随着对细胞的暴露的提高,转移培养基的 pH 值降低,在细胞暴露之后产生约 6.8 到 7.4 的转移培养基 pH 值。

[0222] 根据另一个实施方式,所述可植入材料在室温下保存在转移介质组合物中,所述转移介质组合物包含没有酚红的约 50 $\text{mL}$  EGM-2 (Cambrex BioScience, East Rutherford, NJ)、补充有额外的约 8% FBS、使转移培养基中 FBS 的总浓度到约 10%。根据其他的实施方式,正常的 EGM-2 补充以约 1 到 50% FBS、更优选约 2 到 20% FBS、和最优选约 8% FBS。

[0223] 转移培养基的体积是在低于约 37 $^{\circ}\text{C}$  的温度下,例如在室温下维持可植入材料的活力多至约 21 到 28 天的重要条件。转移培养基的体积应当足以提供最佳浓度或稀释度的细胞废物产物,而同时提供最佳浓度的细胞分泌的有益产物。一般地,维持可植入材料的转移培养基的最佳体积随着温度降低到低于 37 $^{\circ}\text{C}$  而提高,37 $^{\circ}\text{C}$  是细胞的标准细胞培养温度。根据

优选的实施方式,所述可植入材料在室温下保存在约 50mL 的转移培养基中。根据其他的实施方式,所述可植入材料保存在约 28 到 150mL 转移培养基、更优选约 50 到 100mL 转移培养基、和最优约 50mL 转移培养基中。根据一个实施方式,转运小瓶含有约  $4.2 - 17 \times 10^5$  个细胞/cm<sup>3</sup> 基质材料。根据另一个实施方式,所述转运小瓶含有约  $0.1 - 0.4 \times 10^5$  个细胞/mL 转移培养基。

[0224] 根据货架寿命保存的一种方法,可植入材料保持在它的细胞培养小瓶中用于保存和 / 或转运。根据优选的实施方式,所述细胞培养小瓶是 50mL 细胞培养小瓶 (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA ;Becton, Dickenson and Company, Franklin Lakes, NJ)。根据保存的另一种方法,所述可植入材料在 30mL 细胞培养小瓶中培养,然后在保存和 / 或转运之前从它的细胞培养小瓶中转移到 50mL 转运小瓶中以容纳更大体积的转移培养基。根据保存的进一步的方法,所述可植入材料从它的细胞培养小瓶中转移到 150mL 转运小瓶 (Nalgene®, Nalge Nunc Int'l, Rochester, NY) 中。根据各种实施方式,所述转运小瓶具有约 53 到 58mL 的体积,更优选约 54 到 56mL 的体积,和最优约 57mL 的体积。根据优选的实施方式,所述转运小瓶含有至少约 5 到 6mL 的 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气,或空气体积与培养基和可植入材料的体积的比例约为 1 :8 到 1 :12,更优选约 1 :10。在室温下保存之前,从小瓶移除过滤器帽,用栓塞密封帽 (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA) 密封小瓶,并盖紧帽子。

[0225] 用于可植入材料的地面和航空运输的包装。根据以下方法之一包装可植入材料的转运小瓶,其被包装用于环境温度下保存和设计用于经由地面载体或航空载体运输。根据一种方法,在两个可重新密封的塑料袋的每一个中装入三个转运小瓶,并密封袋子。两个袋子 (六个小瓶) 然后包装到内盒中。根据另一种方法,将每个小瓶置于单独的可重新封装的塑料袋中,将袋子密封。然后将四个小瓶包装到塑料圆筒中。所描述的包装结构的每一种是被设计以提供多个边界层以保护产物免于热量影响、转运损坏和维持清洁的无菌的环境。内盒或塑料圆筒然后包装到保温的外部装运盒中。所述外部装运盒利用泡沫填充物和凝胶填充物来维持期望的热环境 (优选约 15 - 25°C) 并保护对抗转运损坏。包括在每个产品中的是合适的文件。装有可植入材料的小瓶以及所述内盒或塑料圆筒和所述外部装运盒也被适当地标记。

[0226] 根据以下方法之一包装可植入材料的冷冻瓶,用于在 - 20°C、- 80°C、或 - 140°C 到 - 160°C 下保存和设计用于经由地面载体或航空载体运输。根据一种方法,将每个冷冻瓶置于单独的可重新封装的塑料袋中,将袋子密封。所述冷冻瓶然后包装到含有干冰的保温的内盒,例如 Styrofoam™ (Dow Chemical Co., Midland, MI) 内盒中。冷冻瓶被埋入或浸入干冰中。所述内盒利用干冰 (优选约 - 80°C) 来维持期望的热环境 (优选约 - 80°C 到 - 160°C), 和保护所述冷冻瓶对抗转运损坏。Styrofoam™ 内盒然后包装到保温的外部装运盒中。根据一个实施方式,在到达临床时,冷冻瓶被置于 - 20°C 或 - 80°C 冷冻器中持续延长的保存时间。根据另一个实施方式,在到达临床时,所述冷冻瓶经历清洗和解冻操作,如上所述,用于即时的患者植入。

[0227] 根据各种实施方式,在使用之前,所述可植入材料可以通过低温保存在低温保存介质中维持约一个月到一年,之前和 / 或之后是在约室温下在转移培养基中保存约至少三周,同时维持了所述可植入材料的活力和功能。

[0228] 在即将植入之前,所述可植入材料可以从转运、低温保存或条件培养基中移出,在约 250 — 500mL 无菌盐水 (USP) 中洗涤两次或三次来除去剩余的培养基成分,包括 FBS。在植入之前,可植入材料的样品等分量可以由厂家和 / 或由医师检测活力,例如使用以上详细描述锥虫蓝分析进行检测。

[0229] 在由申请人或申请人的代理人收到对可植入材料的需求时,将启动以下例示的一系列事件:低温保存的植入物将如上所述在干冰中准备转运,植入物将如上所述在室温下准备转运,或将通过用细胞播种生物相容性基质来制备植入物并允许体外生长直到它展现如上所述的一种或多种功能表型。用于播种的细胞可以从以上解释的细胞库获得,或可以直接从植入物的预定接受者获得。不考虑可植入材料中存在的细胞来源或类型,不需要首先测试细胞与预定接受者的相容性。也就是说,使用本发明的可植入材料处理在生产或植入之前不需要相对于预定的接受者来细胞分型、细胞匹配或细胞相容性测试。当根据在此列出的教导制备时,使用可植入材料的治疗是与细胞类型无关的、细胞相容性自由的、匹配自由的治疗方式。本发明的这种特征与常规的基于细胞、组织或器官的治疗形成鲜明的对照,其通常需要预先测试来确定在预定接受者和要植入的细胞、组织或器官之间存在匹配;在缺乏匹配的情况下,将不进行治疗。本发明避免了预先测试以确定匹配存在的需要,从而为临床医师提供了可容易获得的、不间断的可植入材料供应,用于在此描述的任一种损伤或疾病的治疗。

[0230] 实施例

[0231] 实施例 1 :人 AV 瘘研究

[0232] 这个实施例提供了测试和使用可植入材料的优选的实施方式的实验方案,所述可植入材料包含血管内皮细胞来增强瘘的熟化和 / 或防止瘘熟化失败。使用标准的手术操作,在期望的解剖位置创建动静脉瘘。然后将柔性平面形式的可植入材料放置在手术创建的瘘邻近的血管周围间隙中;以下列出了一个示范性操作的细节。如较早描述的,可以改变可植入材料的放置和构型以适合临床环境。在这项研究中,在至少图 1 或 2A 中描绘了优选的示范性柔性平面形式。

[0233] 以下列出的实验和方案提供了足够的指导:

[0234] 1. 评估在 3 个月时熟化失败的动静脉瘘

[0235] 对于这项研究,熟化失败被定义为在瘘建成后约 12 周内不能允许瘘的重复性插管用于透渗析,和不能获得 35 — 500mL/ 分钟的范围内的足够的透渗析血流,优选至少 350mL/ 分钟的血流。采用标准的临床实践。

[0236] 2. 在第 5 天、2 周、1、3 和 6 个月和随后的时间点,通过彩色流动多普勒超声来评估通路流速和解剖结构(区域狭窄%)。

[0237] 如彩色流动多普勒超声所测量的,在基线测量(手术后第 5 天)和手术后 6 个月之间绝对通路流量降低。与基线(手术后第 5 天的值)相比时,在 6 个月时多普勒超声确定狭窄量。采用标准的临床实践。

[0238] 3. 评估与使用同种异体的细胞产品相关的 HLA 抗体反应。

[0239] 在第 5 天、2 周、1、3 和 6 个月时供体 HLA 抗体的存在的定量免疫学评估结果与手术前水平相比。采用标准的临床实践。

[0240] 特别地,该研究包括 10 位经历动静脉瘘手术的尿毒症患者。经历 AV 瘘手术的这

些患者将接受（手术后立即）两个 (2)  $1 \times 4 \times 0.3 \text{cm}$  ( $1.2 \text{cm}^3$ ) 柔性平面形式实施方式的应用；一个 (i) 置于接合接点，另一个纵向地置于远离接合点的近端静脉段上。其他 5 位患者将被编入，但不接受植入物。这 5 名患者将用于与标准护理比较。

[0241] 在第 5 天、2 周和在 1、3 和 6 个月时将进行临床跟踪。使用彩色流动多普勒超声的通路流量测定将在手术后第 5 天进行，来确定基线水平，随后在手术后 2 周、1 个月、3 个月和 6 个月进行。对展现了低于约  $350 \text{mL/分钟}$  的绝对流量、或在早先测量中展现了超过 25% 的流量降低、或展现大于 50% 区域狭窄（如多普勒超声所测量的）的患者进行血管造影。对于血管造影所测定的大于 50% 的狭窄病变，允许补救性临床介入，例如血管成形术。对具有 12 周内未能熟化的瘰的患者将进行诊断成像。允许标准的补救性临床介入，包括血管成形术和手术来打结侧枝或修正瘰，以帮助未能在 12 周内熟化的瘰实现功能性熟化。每位患者的研究参与持续时间将是 6 个月。

[0242] 从而，总共 15 名患者将加入这个试验。十名患者将各自接受 2 个植入物，接受标准护理的 5 名患者用于比较。经历用于血液透析通路的 AV 瘰放置的患者也将被编入。

[0243] 根据以下研究设计，用本发明的可植入材料处理的十名处理的患者将各自接受标准的 AV 瘰放置、药物治疗、处理和植入物。这些患者的前 5 名将接受柔性平面形式的两个移植物，一个处在结合点位置，另一个纵向地置于远离接合点的近端静脉段上。在处理了这个第一组中的最后一名患者之后，在下一组的处理之前存在一个月的观察期。在从前 5 名患者获得满意的 1 个月数据之后，将处理后 5 名患者。

[0244] 五名患者将被编入临床试验，将接受标准的 AV 瘰放置、药物治疗、处理，但没有可植入材料。这些患者将用于与标准护理比较，将接受与植入物处理的患者类似的成像和免疫学跟踪。

[0245] 常规的 AV 瘰手术操作将根据标准操作技术进行。在瘰完成之时，但在植入之前，进行对流出静脉直径的测量。

[0246] 无齿镊子被用于从清洗碗中轻轻地取出平面形式的可植入材料。在通路手术完成并在进行了所有基线测量的情况下确定流经瘰的流量之后，应用可植入材料。在放置可植入材料之前，控制所有的出血，使要处理的区域尽可能干燥。在植入物放置之后将不再冲洗该区域。一个或两个植入物将用于处理接合位置。另一个植入物用于处理远离接合点的近端静脉段。在某些实施方式中，通过将植入物的一端移至接合段下部，直到植入物的中部处在血管的汇合点上，来处理端对面血管连接。然后将两端卷绕缝合线，保持植入物中心在缝合线上。通过从接合位置开始将可植入材料纵向地沿静脉的长度放置，处理近端静脉段（远离静脉 - 动脉接合点）。可植入材料不需要完全地卷绕静脉的圆周。

[0247] 在 AV 瘰手术之后的医院恢复过程期间，使用标准的护理操作跟踪患者。紧密地监视生命体征。记录伴随的药物治疗。告知患者在第 5 天、2 周以及在 1、3 和 6 个月时的跟踪访问需求。

[0248] 将在手术后 5 天（基线）、2 周和此后 1、3 和 6 个月时记录通路流量。狭窄的程度还将通过多普勒超声在第 5 天测定来建立基线水平，再次在 2 周、1、3 和 6 个月测定用于比较目的。在手术后 5 天、2 周、1、3 和 6 个月获得  $5 \text{cc}$  全血样本来提供血清，用于测定抗 HLA 抗体水平。

[0249] 使用彩色流动多普勒超声在手术后第 5 天（ $\pm 24$  小时）测定通路流量来建立基线

测量值,并在手术后 2 周(±2 天)、1 个月(±4 天)、3 和 6 个月(±7 天)测定。对展现了低于约 350mL/ 分钟的绝对流量、或在他们早先测量中展现了超过 25% 的流量降低、或展现大于 50% 区域狭窄(如多普勒超声所测量的)的患者进行血管造影。对于血管造影所测定的大于 50% 狭窄的狭窄病变,允许补救性临床介入,例如血管成形术。对具有 12 周内未能熟化的瘘的患者将进行诊断成像。允许标准的补救性临床介入,包括血管成形术和手术来打结侧枝或修正瘘,以帮助未能在 12 周内熟化的瘘实现功能性熟化。这种介入可以继之以可植入材料的植入,来增强修正的瘘的熟化和 / 或维持修正的瘘的功能和援救正在失效或已失效的瘘。

[0250] AV 瘘研究的预期结果。预期的是,如上所述用本发明的可植入材料处理的患者将展示瘘熟化增强和 / 或防止瘘熟化失败的一种或多种标志。特别地,处理的患者将分别显示,例如,改善的血流量、直至足够透渗析的流量(例如,35 — 500mL/ 分钟范围内的血流,优选至少 350mL/ 分钟)和 / 或重复地套管插入所述瘘用于透渗析的改善的能力。瘘熟化的另一种标志是脉壁厚度;成功地熟化的或熟化中的瘘展现出脉壁增厚。这将根据标准的临床实践使用血管内超声(IVUS)来测量。简要地,IVUS 将用于测量脉壁厚度并描绘内膜和 中层之间的厚度。处理的瘘或对照瘘将被插入导管,超声探针置于目标静脉和动脉内部。功能性瘘的又一个标志是充足的管腔直径。预期的是,本发明的可植入材料将允许维持充足的管腔直径,从而允许血液以适合于有效透渗析的速度不受阻碍地流动,即,略大于透渗析机器的泵速度的血流量;或至少足以防止透渗析期间的再循环的血液速度。从瘘建成后第 5 天开始和此后的手术后至少 3 个月,使用瘘的血管造影来连续监视管腔直径。利用标准的多普勒超声方案,将手术后管腔的狭窄与血流速度相关联。预期的是,所述可植入材料将防止或延迟变窄,所述变窄阻挡血流使其低于在此描述的适合透渗析的速度。表征了失效瘘的这种管腔变窄,可以由于狭窄和内膜的相关增厚而引起,或可以通过血管的皱缩和 / 或收缩而没有任何相关的增厚而引起。对于实际的增厚来说,血管成形术介入是当前标准的临床手段;对于皱缩和 / 或收缩来说,例如由于消极组织重塑的皱缩和 / 或收缩,扩张术是当前标准的临床介入。预期的是,植入物处理的瘘将不需要血管成形术或扩张术。

[0251] 作为整体,处理的患者预计在至少一种这些前述的熟化标志方面与对照相比至少显示了增加的差异。

[0252] 实施例 2 :AV 移植物动物研究

[0253] 这个实施例提供了实验方案,用于测试和使用本发明的优选的实施方式来促进动物测试受试者中功能性 AV 移植物的形成。使用标准的手术操作,在颈动脉和颈静脉之间创建 AV 移植物。然后将可植入材料放置在每个手术创建的 AV 移植物接合点邻近的血管周围间隙中;以下列出了一个示范性操作的细节。如较早描述的,可植入材料的放置和构型可以改变。在这项研究中,所述可植入材料具有如图 4A、图 4B 和图 4C 描绘的柔性平面形式。

[0254] 特别地,该研究包括经历了 AV 移植物手术的 26 名猪测试受试者。常规的 AV 移植手术操作将根据标准操作技术进行。在移植手术完成以及移植物通畅之后,可植入材料被应用到 AV 移植物接合点和周围,如以下描述的。

[0255] 对于经历了 AV 移植手术的每个测试受试者,将一个六毫米内径的 PTFE 移植物置于测试受试者的左侧颈总动脉和右侧外颈静脉之间。使用运动 6 — 0 聚丙烯缝合线,在移植物的每个末端创建倾斜的端对面接合点。在了之后,所有测试受试者接受内部起作用的

肝素和每天施用阿斯匹林。

[0256] 十位测试受试者在手术当天接受包含主动脉内皮细胞的可植入材料。五个这样的植入物被应用给每个测试受试者。两个接合位置的每一个都用两个植入物卷绕。在这种环境下,将可植入材料的一端移至接合段下部,直到植入物的中部处在血管和移植物的汇合点上。然后将植入物两端卷绕缝合线,保持植入物中心在缝合线上。末端最低限度地叠盖来固定材料就位。对于每个测试受试者,另外一个植入物场区那个接合点处开始沿着近端静脉段的长度纵向地放置。植入物不完全地卷绕静脉的圆周。

[0257] 用可植入材料缠绕接合点位置,例如,如图 4A 和图 4B 中说明的。另外,通过从接合位置开始将可植入材料纵向地沿静脉的长度放置,例如,如图 4C 中说明的,来处理近端静脉段(静脉-动脉接合点的远端)。

[0258] 十名测试受试者接受没有细胞的对照植入物,在手术当天将对照植入物卷绕接合点位置并置于移植物的近端静脉段上,例如,如图 4A、图 4B 和图 4C 中描绘的。其他 6 名测试受试者不接受任何一种类型的植入物。这 6 名测试受试者将用于与标准照料比较。根据体重的总细胞载荷是大约  $2.0 \times 10^5$  个细胞每 kg。预期的是,这种细胞载荷是如下所述将用于人类临床研究的估计的细胞载荷的大约至少 6—10 倍。

[0259] 手术操作。产生 15cm 的中线纵向颈部切口,分离左侧颈总动脉,之后是右侧外颈静脉。从周围组织剥离 8cm 静脉段,从静脉伸出的所有分支用 3—0 丝缝线连接。夹住左侧颈动脉,进行 7mm 直径的环向动脉切开术。使用连续的 6—0 聚丙烯缝合线,在动脉和 6mm 内径 PTFE 移植物之间产生倾斜的端对面接合点。一旦形成,除去动脉夹具,用肝素-盐水溶液冲洗移植物。记录动脉进入移植物的流量。移植物然后穿过胸锁乳突肌肉之下并进入右侧外颈静脉附近。

[0260] 直接在外颈静脉上进行 7mm 直径环向静脉切开术。然后使用连续的 6—0 聚丙烯缝合线在 PTFE 移植物和右侧外颈静脉之间以倾斜的端对面接合完成动静脉移植物,(移植物的长度在 15—25cm 之间,在放置之时记录)。除去所有夹具,确认移植物通畅。远离 PTFE 接合点的左侧颈动脉用 3—0 丝缝线双重地结扎。

[0261] 在完成接合之后,定位 PTFE 动静脉移植物以防止扭结。PTFE 动静脉移植物使用 23-规格 (gauge) 蝴蝶针在颈动脉-移植物接合点远端透皮地插管。为了确认放置,将血液吸出到具有 10cc 注射器的系统中。然后用 10cc 盐水冲洗系统。然后在研究动物的颈部上放置 C-臂荧光镜,从而可以显现静脉-移植物接合点和静脉流出道。在连续的荧光检查之下,注射 10—15cc 的含碘造影剂 (iodinated contrast) (Renograffin, 全强度)。记录并保存电影血管造影片,用于与预先处死而得到的血管造影片比较。

[0262] 在血管造影完成之后,将接合点位置包在湿润的 4"×4" 纱布棉拭中。维持接合点位置的持续大约 5 分钟的时间,之后除去纱布棉拭,检查接合位置。如渗血所证明的,如果还没有实现止血,再次缠绕该位置另外的 5 分钟。如果从该位置的出血是严重的,在外科医生的判断下放置其他缝合线。一旦实现止血,用无菌盐水填充颈部伤口,使用 6mm 跨音速流量探测器在远端静脉流出道处进行流量探测分析。如有必要,除去盐水,使接合点尽可能干燥,用包含主动脉内皮细胞的可植入材料或对照植入物来处理。一些位置不用任一种植入物处理,直到已经控制了所有的出血,确认移植物通畅,使该区域尽可能干燥。完成时,按层闭合伤口,容许动物从麻醉中恢复。

[0263] 在手术前作为 100U/kg 的弹丸注射加上 35U/kg/hr 的连续输注来施用肝素,维持直到手术结束。根据需要施用另外的弹丸剂量 (100U/kg),以维持  $ACT \geq 200$  秒。

[0264] 移植物开通性。在手术之后立即地、手术后 3 — 7 天以及此后每周一次地,使用彩色流动多普勒超声和跨音速流量探测器 (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY) 通过通路流量测定来确认 AV 移植物开通性。严密监视移植物的血流量。

[0265] 病理过程。动物试验受试者使用戊巴比妥钠 (65mg/kg, IV) 麻醉。暴露 PTFE 移植物,进行 PTFE 移植物和静脉接合点的数字摄影。PTFE 动静脉移植物然后使用 23- 规格蝴蝶针在颈动脉 - 移植物接合点远端透皮地插管。为了确认放置,将血液吸出到 10cc 注射器的系统中。然后用 10cc 盐水冲洗系统。然后在研究动物的颈部上放置 C- 臂荧光镜,从而可以显现静脉 - 移植物接合点和静脉流出道。在连续的荧光检查之下,注射 10 — 15cc 的含碘造影剂 (Renograffin, 全强度)。在 PTFE 移植物的  $0^\circ$  和  $90^\circ$  角处记录电影血管造影片。通过将尸检血管造影片的盲读数与放置后的血管造影片成对比较,测定移植物开通率和静脉流出道的狭窄程度。取决于血管造影片中观察的狭窄程度,在 0 — 5 的尺度上分级血管造影片。分级方案采用以下的: 0 = 0% 狭窄, 1 = 20% 狭窄, 2 = 40% 狭窄, 3 = 60% 狭窄, 4 = 80% 狭窄和 5 = 100% 狭窄。预料的是,在检查血管造影片时,与对照物相比,用本发明的可植入材料处理的移植物将展现降低的狭窄百分比。

[0266] 组织学。一半的动物测试受试者 (5 例细胞移接的植入物受试者; 5 例对照植入物受试者; 3 例没有植入物的受试者) 在手术后 3 天被执行安乐死。其余的动物测试受试者 (5 例细胞移接的植入物受试者; 5 例对照植入物受试者; 3 例没有植入物的受试者) 在手术后一个月被执行安乐死。

[0267] 在所有测试受试者上进行有限的尸检,被定义为施用位置的宏观检查,包括所有接合点和近端静脉位置、和周围组织,包括导液淋巴结。对于在手术后一个月被执行安乐死的所有测试受试者,收集来自主要器官,包括脑、肺、肾脏、肝脏、心脏和脾脏的组织,并保存。仅当从身体外表面的宏观检查或从施用位置和周围组织的显微镜检查产生异常发现时,器官才被分析。没有出现异常的发现,这保证了对被编入这项研究中的任何动物中主要器官进行进一步检查。

[0268] 所有的 AV 移植物接合位置和周围组织,包括每个接合的静脉和动脉的 5cm 段,被修整、固定在 10% 福尔马林 (或等效物) 中,并包埋在乙二醇甲基丙烯酸酯 (或等效物) 中。使用 C- 形不锈钢刀 (或等效物) 切下的大约 3  $\mu$ m 厚切片,从至少三个区域制备切片: 静脉移植物接合点、移植物 - 动脉接合点和静脉流出道。横断静脉移植物接合点地制作三个切片。穿过静脉流出道制作五个切片 (因而覆盖 1.5cm 的流出静脉)。以 1mm 的间隔穿过移植物 - 动脉接合点制作三个切片。这些切片固定在明胶包被的 (或等效物) 玻璃载片上,用苏木素和曙红或 Verhoeffs 弹性蛋白着色剂来染色。

[0269] 急性地 (3 天的受试者) 和长期地 (1 个月的受试者) 测定血管周炎症和管腔炎症。急性炎症标志是粒细胞、主要是嗜中性粒细胞,而慢性炎症标志是巨噬细胞和淋巴细胞。另外,切片也可以用于以下特异性标记物染色: 抗 CD45 来鉴定白细胞,抗 CD3 来鉴定 T 细胞, CD79a 来鉴定 B 细胞,以及 MAC387 来鉴定单核细胞 / 巨噬细胞。

[0270] 检查并记录染色的载玻片上平滑肌细胞和内皮细胞的存在,以及动脉或静脉接合点与人工移植物材料之间的整合指标。分离的组织的所有切片,包括每个静脉移植物接合

点、移植物-动脉接合点、静脉流出道的移植物材料、内膜/伪内膜、近管腔的血管中层的内部部分、近外膜的血管中层的外部部分以及外膜,将被评估和计分。每一个组织区室,例如内膜、血管中层和外膜的大小,将按微米来计量。将评估每个切片的每种以下标志的存在和/或程度。将评估炎症的标志,包括但不限于,嗜中性细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、嗜曙红细胞、巨细胞和浆细胞的存在和程度。将评估移植物切片是否存在成纤维细胞、新血管形成、钙化、出血、充血、血纤蛋白、移植物纤维化和移植物浸润(graft infiltration)。另外将评估组织切片的退化标志,包括但不限于退化、弹性蛋白损失和/或组织部分的缺失、平滑肌纤维的空泡化和/或组织的钙化。还将评估组织切片的内皮细胞增殖、内膜下细胞增殖,包括但不限于新血管形成以及平滑肌纤维、成纤维细胞和纤维化的存在。还将评估每个测量的组织切片的组织坏死和外来物质的存在。为每个变量按0到4的标度分配分值(0=没有显著的变化;1=最小的;2=轻微的;3=中度的;4=严重的)。

[0271] 仅仅来自1个月动物试验受试者的动静脉移植物接合位置的其他切片将被固定在玻璃载片并染色(Verhoeff's弹性蛋白)用于形态学分析。对每个切片使用具有图象显微镜的计算机化的数字面积法和定制的软件来进行腔、中层、内膜和总血管体积的测量。将对每个切片测定内膜增生的程度。定量内膜增生的一种方法是通过总血管壁面积来标准化内膜面积 $[(\text{内膜}, \text{mm}^2)/(\text{内膜} + \text{血管中层}, \text{mm}^2)]$ ,或通过测定残余管腔来标准化内膜面积 $[(\text{管腔}, \text{mm}^2)/\text{管腔} + \text{内膜}, \text{mm}^2]$ 。

[0272] AV移植物动物受试者的结果。如上所述用本发明的可植入材料处理的受试者显示了临床上功能性AV移植物形成的一种或多种标志。根据在此公开的材料和方法处理的AV移植物支持了足以允许透渗析的血流速度。有效的透渗析需要略大于透渗析机器的泵速度的血流量,或至少足够防止透渗析期间的再循环的血液速度。并且,处理的受试者分别显示了降低的开裂发生率,所述开裂被定义为接合的静脉或动脉从PTFE移植物分离,以及显示了改善的修复性桥整合,所述整合被定义为平滑肌细胞或内皮细胞进入修复性桥的管腔或在其内的增殖和/或迁移。静脉流出位置处AV移植物的血液流量与进入移植物位置的血液流量是可比较的。如在此使用的,可比较的意思是对于临床目的基本上是相似的。例如,期望的血流速度是约150—500mL/分钟,优选约300—500mL/分钟,更优选约350—400mL/分钟。

[0273] 另外,平滑肌细胞和/或内皮细胞进入修复性桥或在之内的迁移将作为整合的标志来测量。预期的是,本发明的可植入材料将促进平滑肌细胞增殖和内皮细胞增殖,以及两者向桥内的迁移。可以获得整个PTFE移植物上的三个五微米切片并对SMC肌动蛋白染色,进行评估来鉴定SMC和因子VIII(von Willebrands因子)和/或PECAM-1,以鉴定内皮细胞。内皮细胞将使用显微镜检查/形态测定法和定制软件来测定。

[0274] 功能性A/V移植物的又一个标志是充足的管腔直径。通过降低血管狭窄,本发明的植入物将允许维持充足的管腔直径,从而允许血液以适合于有效透渗析的速度不受阻碍地流动,即,有效的透渗析需要略大于透渗析机器的泵速度的血流量,或至少足以防止透渗析期间的再循环的血液速度。在动静脉移植物建成当天和即将30天处死之前,使用对动静脉移植物接合点的血管造影来监视管腔直径和狭窄百分比。利用标准的多普勒超声方案,将手术后管腔的变窄与血流速度相关联。

[0275] 与对照植入物相比,本发明的可植入材料降低了处理的接合点的狭窄的存在和程

度。对于研究中的每个测试受试者通过血管造影确定的狭窄百分比在以下表 1 中显示。平均起来,可植入材料降低了狭窄百分之九十五,从对照动物的 46%降低到接受包含细胞的移植物的动物的 2.5% ( $[46 - 2.5]/46 \times 100$ )。结果将组织学地确认。这些研究说明了,本发明阻止或延迟了变窄,从提高了 A/V 移植物接合点的功能,所述变窄阻挡血流使其低于适合于透渗析的速度。

[0276] 表 1AV 移植物研究的总结

[0277]

动物 #	组	狭窄百分比 (与移植物呈 0°角)	狭窄百分比 (与移植物呈 90°角)	平均狭窄百分比
1656	2	30%	20%	25%
1657	2	80%	80%	80%
1664	2	60%	80%	70%
1667	2	0%	20%	10%
1624	3	ND	0%	0%
1659	3	0%	0%	0%
1666	3	0%	20%	10%
1670	3	0%	0%	0%

组 2: 接受单独的生物相容性基质的对照植入物。

组 3: 接受包含细胞和生物相容性基质的柔性平面形式可植入材料。

[0278] 实施例 3:人 AV 移植物临床研究

[0279] 这个实施例提供了实验方案,用于测试和使用本发明来促进人临床测试受试者中形成功能性 AV 移植物。使用标准的手术操作,在期望的解剖位置创建 AV 移植物接合点,在动脉和静脉接合点之间放置 ePTFE 修复性桥。然后将可植入材料放置在每个手术创建的 AV 移植物接合点邻近的血管周围间隙中;以下列出了一个示范性操作的细节。如较早描述的,可植入材料的放置和构型可以由熟练医师按照常规方式改变。

[0280] 具体地,该研究包括经历了 AV 移植手术的人测试受试者。常规的 AV 移植手术操作将根据标准操作技术进行。在移植手术完成以及确认移植物通畅之后,本发明的可植入材料将被应用到 AV 移植物接合点和周围,如以下描述的。

[0281] 人临床受试者将在手术当天接受可植入材料的一个或多个部分。两到三个这种部分将应用于每个测试受试者。可植入材料的一个部分卷绕每个接合点位置。然后将一端移至接合段下部,直到缠绕物的中部处在血管和移植物的汇合点上。然后将植入物两端卷绕缝合线,保持植入物中心在缝合线上。末端可以叠盖来固定材料就位。对于每个测试受试

者,可植入材料的其他单个部分将置于动静脉移植物的近端静脉段,从接合点处开始沿着静脉的长度纵向地放置。可植入材料不需要完全地卷绕静脉的圆周。

[0282] 接合点位置将用优选的植入物处理,例如,如在图 4A、图 4B 和图 4C 中,或在图 5 中说明的。另外,在某些患者中,通过从接合位置开始将优选的植入物纵向地沿静脉的长度放置,处理近端静脉段(远离静脉-动脉接合点)。预期的是,基于体重的总细胞载荷将是大约  $2.0 \times 10^4$  个细胞每 kg 到大约  $6.0 \times 10^4$  个细胞每 kg。

[0283] 在第 5 天、2 周和在 1、3 和 6 个月时将进行临床跟踪。将在手术后第 5 天需要使用彩色流动多普勒超声进行通路流量测定,来确定基线水平,随后在手术后 2 周、1 个月、3 个月和 6 个月测定流量。对展现了低于约 350mL/ 分钟的绝对流量、或在早先测量中展现了超过 25% 的流量降低、或展现大于 50% 区域狭窄(如多普勒超声所测量的)的测试受试者进行血管造影。对于血管造影所测定的大于 50% 的狭窄病变,允许补救性临床介入,例如血管成形术。

[0284] 在基线处,在 3 个月时,进行移植物以及动脉和静脉接合位置的血管造影对比。对每个区域计算管腔直径,测量峰值收缩速度。

[0285] 人 AV 移植物临床研究的预期结果。预期的是,如上所述用本发明的可植入材料处理的受试者将显示临床上功能性 AV 移植物形成的一种或多种标志。特别地,治疗的受试者将分别显示,例如,改善的血流,高达至少足够透渗析的流量(例如,35 — 500mL/ 分钟范围内的血流,和优选至少 350mL/ 分钟),降低的开裂发生率,所述开裂被定义为接合静脉或动脉从 PTFE 移植物的分离,降低的移植物周围血清集中 (serous perigraft collection) 以及假动脉瘤的发生率,和 / 或改善的修复性桥整合,所述整合被定义为平滑肌细胞或内皮细胞进入修复性桥的管腔或在其内的增殖和 / 或迁移。静脉流出位置处 AV 移植物的血液流量与进入移植物位置的血液流量是可比较的。可比较的意思是对于临床目的基本上是相似的。例如,期望的血流速度是约 150 — 500mL/ 分钟,优选约 300 — 500mL/ 分钟,更优选约 350 — 400mL/ 分钟。

[0286] 另外,进入修复性桥或在其内的平滑肌细胞和 / 或内皮细胞迁移将作为整合的标志通过血管内超声来测量。预期的是,当如在此描述的使用时,本发明的可植入材料将促进平滑肌细胞增殖和 / 或内皮细胞增殖,以及两者向桥内的迁移。

[0287] 功能性 AV 移植物的又一个标志是充足的管腔直径。预期的是,本发明的植入物将允许维持充足的管腔直径,从而允许血液以适合于有效透渗析的速度不受阻碍地流动,即,有效的透渗析需要略大于透渗析机器的泵速度的血流量,或至少足以防止透渗析期间的再循环的血流速度。在基线处(动静脉移植物建成后大约 5 天)和此后的手术后至少 3 个月,使用对动静脉移植物接合点的血管造影监视管腔直径。利用标准的多普勒超声方案,将手术后管腔的狭窄与血流速度相关联。预期的是,当如在此描述的使用时,本发明将防止或延迟变窄,所述变窄阻挡血流,使其低于在此描述的适合透渗析的速度。

[0288] 对于 AV 移植物来说,预期的是,本发明的可植入材料将防止或降低开裂的发生率。

[0289] 作为整体,处理的受试者预计在至少一种这些前述的功能标志方面与对照相比至少显示了增加的差异。

[0290] 实施例 4 :外周移植物研究

[0291] 这个实施例提供了实验方案,用于测试和使用本发明的优选的实施方式来促进测试受试者中形成功能性外周移植物。使用标准的手术操作,在期望的解剖位置创建外周移植物接合点,在接合点之间放置 ePTFE 修复性桥。然后将可植入材料放置在每个手术创建的外周移植物接合点邻近的血管周围间隙中;以下列出了一个示范性操作的细节。如较早描述的,可植入材料的放置和结构可以改变。

[0292] 具体地,该研究包括经历了外周移植手术的测试受试者。常规的外周移植物手术操作将根据标准操作技术进行。在移植手术完成以及确认移植物通畅之后,可植入材料将被应用到外周移植物接合点和周围,如以下描述的。

[0293] 测试受试者将在手术当天接受一个或多个优选的可植入材料。两到三个这种植入物将应用于每个测试受试者。一个这种植入物卷绕每个接合点位置。然后将可植入材料的一端移至接合段下部,直到缠绕物的中部处在血管和移植物的汇合点上。然后将植入物两端卷绕缝合线,保持植入物中心在缝合线上。末端可以相互叠盖来固定材料就位。对于每个测试受试者,其他的单个植入物可以置于外周移植物的近端静脉段,从接合点处开始沿着静脉的长度纵向地放置。植入物不需要完全地卷绕静脉的圆周。

[0294] 接合点位置将用可植入材料缠绕,例如,如在图 4A、图 4B 和图 4C 中,或在图 5 中说明的。另外,通过从接合位置开始将可植入材料纵向地沿血管的长度放置,处理近端血管段(远离接合点)。基于体重的总细胞载荷将是大约  $2.0 \times 10^4$  个细胞每 kg 到大约  $6.0 \times 10^4$  个细胞每 kg。

[0295] 在第 5 天、2 周和在 1、3 和 6 个月时将进行临床跟踪。将在手术后第 5 天需要使用彩色流动多普勒超声进行血流量测量,来确定基线水平,随后在手术后 2 周、1 个月、3 个月和 6 个月进行血流量测量。对展现了低于约 350mL/ 分钟的绝对流量、或在早先测量中展现了超过 25% 的流量降低、或展现大于 50% 区域狭窄(如多普勒超声所测量的)的测试受试者进行血管造影。对于血管造影所测定的大于 50% 的狭窄病变,允许补救性临床介入,例如血管成形术。

[0296] 将进行移植物以及接合位置的血管造影对比。对每个区域计算管腔直径,测量峰值收缩速度。

[0297] 外周移植物受试者的预期结果。预期的是,如上所述用本发明的可植入材料处理的受试者将显示临床上功能性外周移植物形成的一种或多种标志。根据在此公开的材料和方法处理的外周移植物将支持足以恢复或维持临床上可接受的血液循环的血流量。并且,处理的受试者将分别显示,例如,降低的开裂发生率,所述开裂被定义为接合的静脉从 PTFE 移植物分离,和 / 或显示改善的修复性桥整合,所述整合被定义为平滑肌细胞或内皮细胞进入修复性桥的管腔或在其内的增殖和 / 或迁移。流出位置处外周移植物的血液流量与进入移植物位置的血液流量是可比较的。如在此使用的,可比较的意思是对于临床目的基本上是相似的。例如,期望的血流速度是约 150 — 500mL/ 分钟,优选约 300 — 500mL/ 分钟,更优选约 350 — 400mL/ 分钟。

[0298] 另外,进入修复性桥或在其内的平滑肌细胞和 / 或内皮细胞迁移将作为整合的标志来测量。预期的是,本发明的可植入材料将促进平滑肌细胞增殖和 / 或内皮细胞增殖,以及两者向桥内的迁移。

[0299] 功能性外周移植物的又一个标志是充足的管腔直径。预期的是,本发明的植入物

将允许维持足够的管腔直径,从而允许血液以足够维持外周循环的速度不受阻碍地流动。在基线处,在移植物建成后至少3个月,使用外周移植物的血管造影监视管腔直径。利用标准的多普勒超声方案,将手术后管腔的狭窄与血流速度相关联。预期的是,本发明的可植入材料将防止或延迟变窄,所述变窄阻挡血流,使其低于在此描述的适合于外周循环的速度。

[0300] 对于外周旁路移植物来说,预期的是,使用本发明的可植入材料处理将产生允许临床上可接受的循环的血流速度、或近似正常的速度。移植物的流入和留出将是可比较的。可比较的意思对于临床目的基本上是相似的。例如,期望的血流速度是约150—500mL/分钟,优选约300—500mL/分钟,更优选约350—400mL/分钟。另外,预期的是,所述处理将促进平滑肌细胞和/或内皮细胞的增殖和迁移进入修复性移植物或天然移植物。

[0301] 对于外周旁路移植物来说,预期的是,本发明的可植入材料将防止或降低开裂的发生率。

[0302] 作为整体,处理的受试者预计在至少一种这些前述的功能标志方面与对照相比至少显示了增加的差异。

[0303] 本发明可以以其他特定的形式体现而不背离其精神和基本特征。当前的实施方式因而被认为是说明性的而非限制性的,本发明的范围由权利要求书而不是由上述说明书来表明,因而本发明包括处在权利要求书的含义和等效范围内的所有改变。

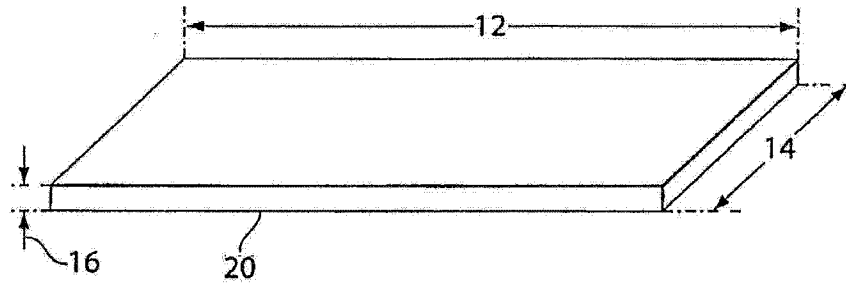


图 1

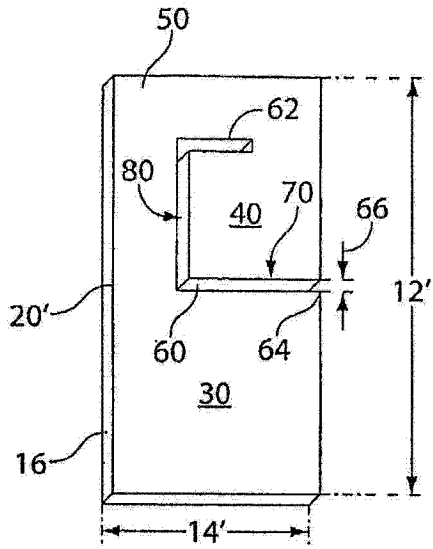


图 2A

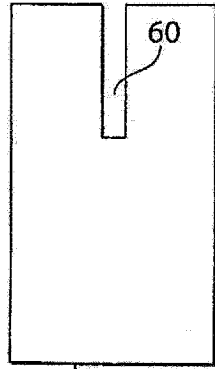


图 2B

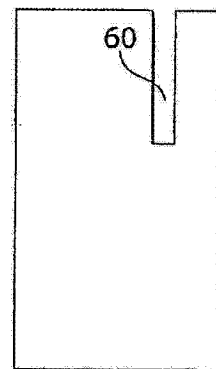


图 2C

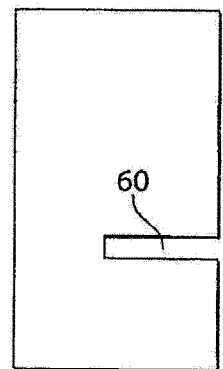


图 2D

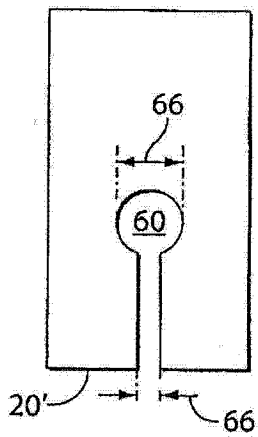


图 2E

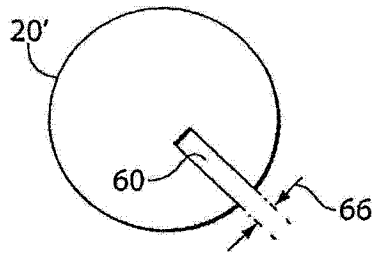


图 2F

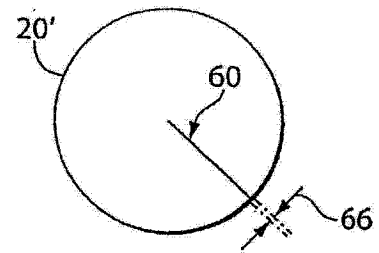


图 2G

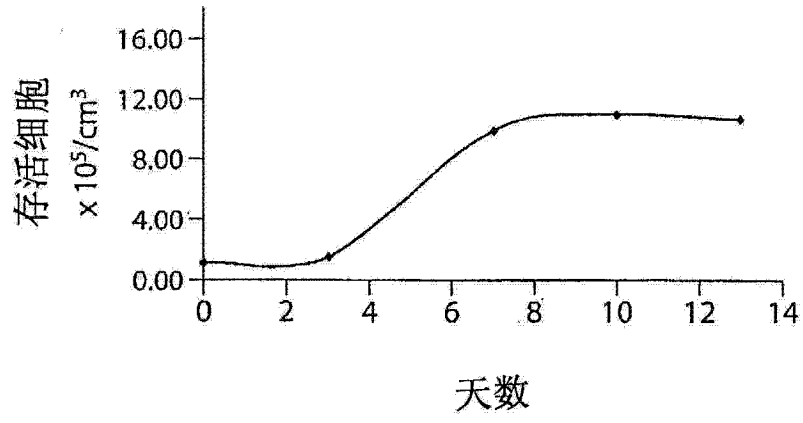


图 3A

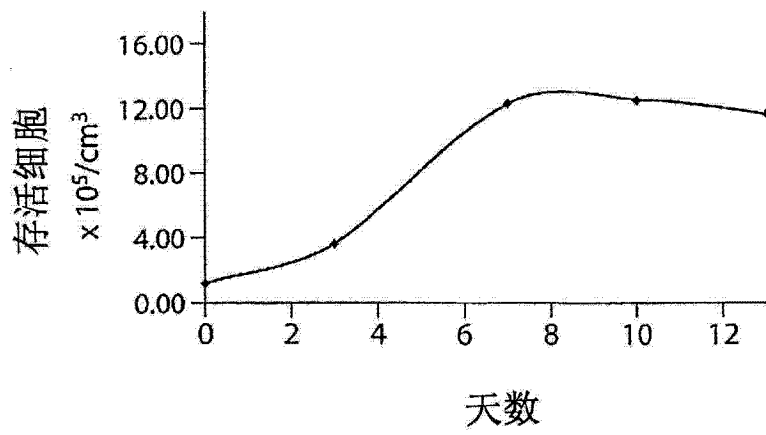


图 3B

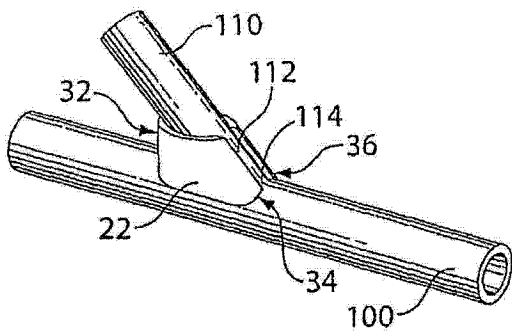


图 4A

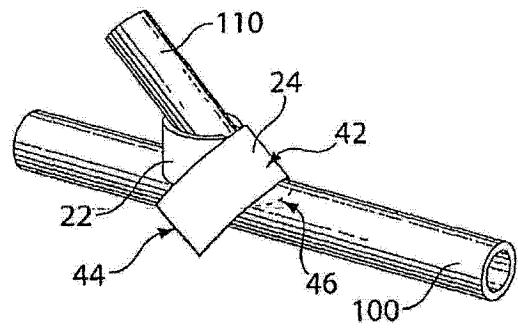


图 4B

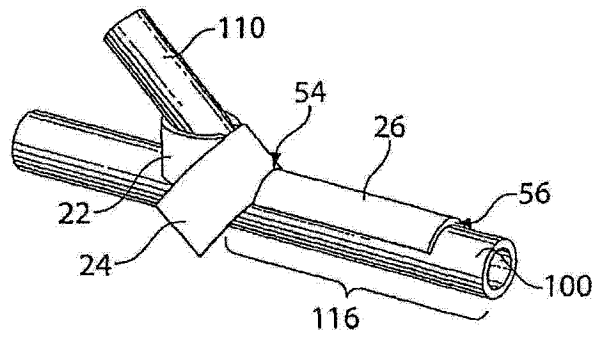


图 4C

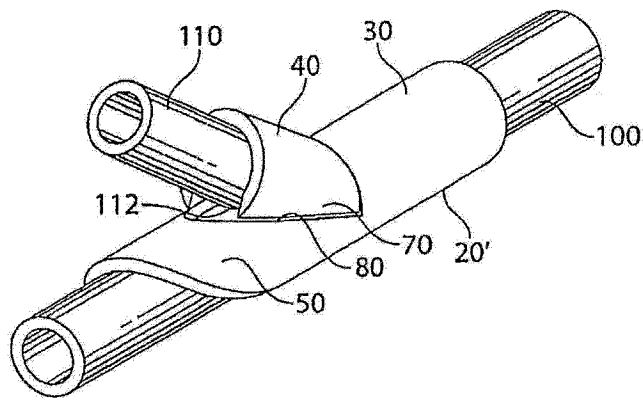


图 5

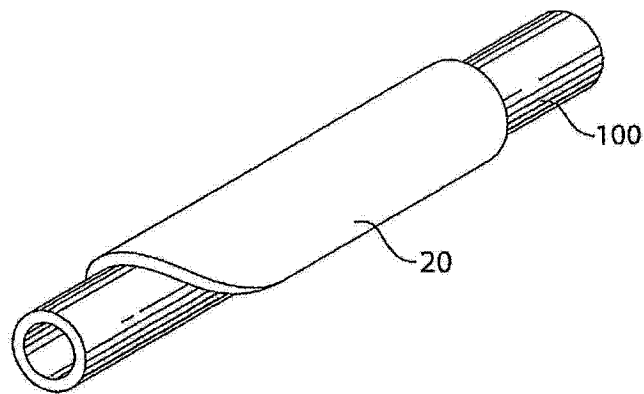


图 6

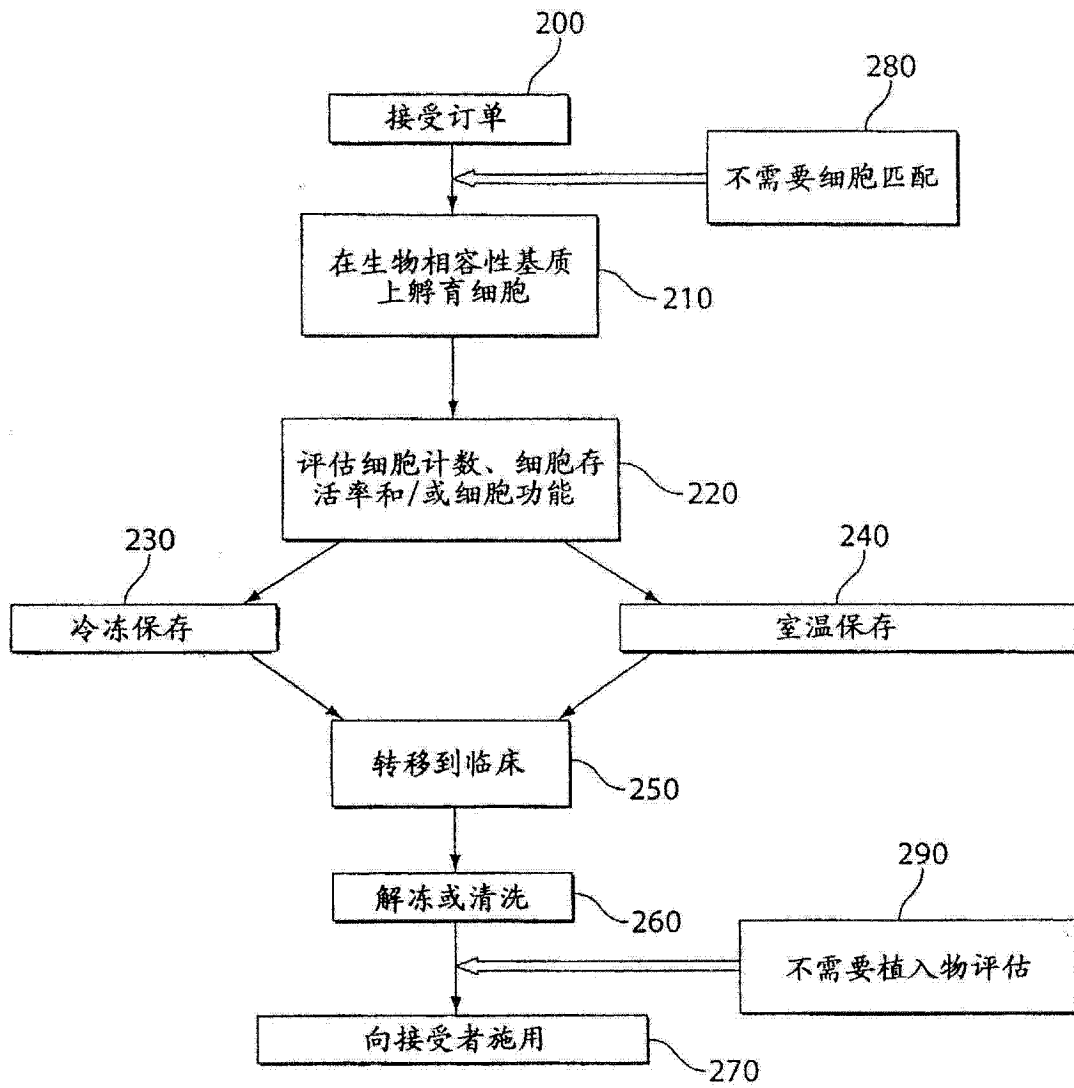


图 7