



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103221076 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201180023456. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 03. 08

A61L 27/38 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/312, 045 2010. 03. 09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 11. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/027609 2011. 03. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02011/112626 EN 2011. 09. 15

(71) 申请人 坦吉恩股份有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 J. W. 鲁德洛 K. I. 格思里

K. 约翰逊 A. T. 布鲁斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

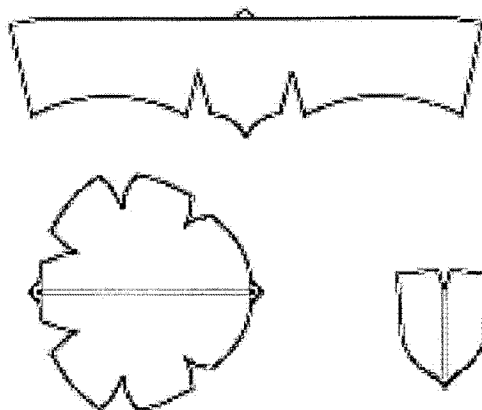
权利要求书2页 说明书44页 附图53页

(54) 发明名称

细胞支架构建体

(57) 摘要

本发明涉及使用支架和来源于腹膜组织的细胞进行的器官或组织结构的再生、重建、扩张或替代。



1. 一种可植入构建体,其包含:a) 具有第一表面的基质,其中所述基质被成形为适于有需要的受试者中的原始管腔器官或组织结构的至少一部分;和 b) 沉积在所述基质的所述第一表面上或第一表面中的腹膜来源的细胞群体,所述基质和所述细胞群体形成可植入构建体。

2. 一种可植入构建体,其包含:a) 具有第一表面的管状基质,其中所述基质被成形为允许流体从有需要的受试者中的原始管通过;和 b) 沉积在所述基质的所述第一表面上或第一表面中的腹膜来源的细胞群体,所述基质和所述细胞群体形成可植入构建体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的可植入构建体,其中所述细胞群体是平滑肌细胞(SMC)群体。

4. 根据权利要求 2 所述的可植入构建体,其中所述管状基质包含第一端部。

5. 根据权利要求 4 所述的可植入构建体,其中所述第一端部被配置成与所述受试者的腹壁接触。

6. 根据权利要求 5 所述的可植入构建体,其中所述第一端部被配置成与所述受试者腹壁中的开口吻合。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的可植入构建体,其中所述第一端部被配置成外置于所述受试者的皮肤。

8. 根据权利要求 4 至 6 中任一项所述的可植入构建体,其中所述管状基质进一步包含用于连接至所述原始管的第一侧开口。

9. 根据权利要求 8 所述的可植入构建体,其中所述原始管是第一输尿管。

10. 根据权利要求 9 所述的可植入构建体,其中所述管状基质进一步包含用于连接至第二输尿管的第二端部。

11. 根据权利要求 9 所述的可植入构建体,其中所述管状基质进一步包含用于连接至第二输尿管的第二侧开口。

12. 根据权利要求 9 所述的可植入构建体,其在植入后允许尿液从所述第一输尿管通过而到达所述管状基质的内部。

13. 根据权利要求 10 或 11 所述的可植入构建体,其在植入后允许尿液从所述第二输尿管通过而到达所述管状基质的内部。

14. 根据权利要求 12 所述的可植入构建体,其在植入后允许从所述受试者排出的尿液通过。

15. 根据权利要求 13 所述的可植入构建体,其在植入后允许从所述受试者排出的尿液通过。

16. 根据权利要求 7 所述的可植入构建体,其中在植入后所述管状基质的第一端部形成位于所述受试者外部的气门。

17. 根据权利要求 16 所述的可植入构建体,其中所述第一端部包含延伸通过所述受试者腹壁的气门端部。

18. 根据权利要求 17 所述的可植入构建体,其中所述气门端部连接至所述受试者的皮肤。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的可植入构建体,其在植入后在所述气门端部形成上皮化粘膜。

20. 根据权利要求 19 所述的可植入构建体,其中所述上皮化粘膜包含在所述气门端部的皮肤粘膜区。

21. 根据权利要求 20 所述的可植入构建体,其中所述上皮化粘膜包含与所述皮肤粘膜区相邻的前庭区。

22. 根据权利要求 21 所述的可植入构建体,其中所述上皮化粘膜以首先出现在所述前庭区并且通过所述皮肤粘膜区朝向所述气门端部逐渐增加的上皮为特征。

23. 根据权利要求 22 所述的可植入构建体,其中所述上皮的特征是上皮细胞标记的表达。

24. 根据权利要求 19 所述的可植入构建体,其中所述上皮化粘膜等效于天然存在的皮肤粘膜区。

25. 根据权利要求 1 至 24 中任一项所述的可植入构建体,其中所述构建体不含尿路上皮细胞,或者不含任何其他细胞群体。

26. 一种用于重建、扩张或替代需要此种治疗的受试者中的层状排列的管腔器官或组织结构的方法,其包括将根据权利要求 1 所述的构建体在所述治疗部位植入到所述受试者中,以便形成所述层状排列的管腔器官或组织结构。

27. 一种制备用于重建、扩张或替代需要此种治疗的受试者中的层状排列的管腔器官或组织结构的可植入构建体的方法,其包括:

a) 提供具有第一表面的基质,其中所述基质被成形为适形于所述受试者中的原始管腔器官或组织结构的至少一部分;和

b) 将腹膜来源的细胞群体沉积在所述基质的所述第一表面上或第一表面中以形成所述可植入构建体。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述形成的可植入构建体是根据权利要求 1 所述的构建体。

29. 一种将可植入构建体提供给需要此种治疗的受试者的缺陷膀胱的方法,其包括将根据权利要求 2 所述的构建体植入到所述受试者中。

30. 一种制备供需要此种治疗的受试者的缺陷膀胱用的可植入构建体的方法,其包括:

a) 提供具有第一表面的管状基质,其中所述基质被成形为允许流体从所述受试者中的原始管通过;和

b) 将腹膜来源的细胞群体沉积在所述基质的所述第一表面上或第一表面中以形成所述可植入构建体。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述形成的可植入构建体是根据权利要求 2 所述的构建体。

细胞支架构建体

技术领域

[0001] 本发明涉及使用种植有从腹膜组织来源获得的细胞的支架进行的层状排列的管腔器官或组织结构再生、重建、扩张或替代。

[0002] 发明背景

[0003] 若干异常可以导致膀胱异常发育并且需要手术扩张。诸如后尿道瓣膜、双边异位输尿管、膀胱外翻、泄殖腔外翻和脊柱裂（即脊髓脊膜突出）的病状可能会使得膀胱失去顺应性，导致产生高压的小容量膀胱。临床上，这会导致患者罹患尿失禁，同时由于泌尿生殖系统中的高压而导致他们肾衰竭的风险增加。针对儿科患者的治疗的现行标准是通过膀胱成形术进行的膀胱扩张（Lewis 等，Br. J. Urol. (1990);65:488-491）膀胱扩张涉及移出患者的一节大肠，然后将该组织连接至现有膀胱从而增加顺应性、降低压力和提高容量。该手术相对复杂并且昂贵。甚至在获得良好技术成果的患者中，该程序也伴随着许多即时风险和慢性并发症。这些手术的侵害性、费用和并发症限制它们仅在最严重的膀胱缺陷情况下使用。在很多是因为膀胱癌而需要膀胱替代的成人患者中进行类似的手术程序。在成人中，切除整个膀胱并用大肠替代。尽管存在产生副作用的风险，但是每年大约有 10,000 个此等程序在美国进行，包括约 10% 的具有先天性异常的儿童和 90% 的患有获得性病症如膀胱癌的成人。显然，医学上迫切需要可消除或至少基本上减轻与现行护理标准相关的副作用的改进途径。

[0004] 人膀胱是位于骨盆前部的用作尿液储器的肌膜囊，它通过输尿管接受尿液并通过尿道排出尿液。在人体内，膀胱位于骨盆骨（耻骨联合）后面的骨盆中，并且从上方和后方连接至称为尿道的排泄管，尿道通往体外。膀胱易受许多对患者的膀胱造成损害的疾病和损伤的影响。例如，感染性疾病、赘生物和发育异常可能会造成膀胱损害。进一步地，诸如车祸和运动损伤的创伤也可能造成膀胱损害。膀胱癌患者经常需要尿流改道。美国每年有超过 54,000 个的膀胱癌新病例。大多数膀胱癌起源于上皮，并且全世界每年大约有 336,000 个尿路上皮癌（移行细胞癌（TCC））新病例（Kakizoe (2006) CancerSci. 97 (9) 821）

[0005] 尿流改道是在个体由于受损的或非功能性的泌尿系统而不能排尿时为尿液设定路径（route）并使尿液从身体中排泄出去的一种方式。一般而言，阻断尿液流动并增加输尿管和/或肾脏中的压力的任何病状都可能需要尿流改道。尿流改道的一些常见适应症包括需要膀胱切除的膀胱癌、影响肾功能的神经源性膀胱障碍、对膀胱的放射性损伤、发生在女性中的顽固性尿失禁，以及慢性骨盆疼痛综合征。一般而言，尿流改道存在两种主要策略：尿道造口术（urostomy）和可控性尿流改道术（continent diversion）。尿道造口术涉及在腹部创建气门（stoma），该气门连接至身体内的管道（conduit）如一小段小肠黏膜下层（SI）如回肠、结肠或空肠。在这个程序中，短 SI 的另一端连接至输尿管，输尿管在正常情况下将尿液从肾脏运送至膀胱。尿液流经输尿管而进入短 SI 中，并从气门流出至外部收集储器。这种程序的一种替代方式是将输尿管直接附连至气门，这也称为输尿管造口术（ureterostomy）。可控性尿流改道术涉及在身体内用一节胃或小肠或大肠创建贮袋或储器，并且可能或可能不需要使用气门。例如，可以通过获取一段肠并将它修改成更加类似于

球形的形状来创建可控性皮肤储器。将经修改肠段的一端连接至输尿管,另一端连接至通往外部收集储器的气门。最后,可以通过安置重新成形的肠段代替初始膀胱来创建原位改道,使得个体可以通过尿道,而不是通过气门排尿,其中该重新成形的肠段的安置可以通过将其一端连接至输尿管,另一端连接至尿道来进行。

[0006] 虽然小肠黏膜下层(SI)可以用于尿流改道,但是已报道黏膜和黏膜下层的除去可能会导致肠段回缩(参见,例如Atala, A., J. Urol. 156:338(1996))还报道了某些胃肠段用于膀胱手术的其他问题,包括结石形成、粘液产生量增加、瘤形成、感染、代谢紊乱、长期挛缩和再吸收。用于尿流改道的天然材料的使用已经证明,想要替代膀胱组织以及它的特定肌肉弹性性质和尿路上皮不可渗透性功能并不容易。另外,使用患者自身的肠段用于尿流改道需要至少两个不同的手术程序,其中第一手术用于除去肠段,第二手术用于设置尿流改道。多个手术的需要增加了该程序的总费用、对患者的风险和患者的总体舒适性。

[0007] 因此,由于使用胃肠段用于尿流改道伴随着多种并发症并且需要多个手术程序,所以需要用于将尿流改道系统提供给需要此种系统的患者的方法和设备。

[0008] 尿失禁是影响到整个社区和医疗机构中的所有年龄和所有身体健康水平的人的一个普遍问题。从医学上来说,尿失禁使患者易患尿道感染、褥疮、会阴部皮疹和尿脓毒病。从社会和心理上来说,尿失禁与尴尬、社会耻辱、抑郁症,以及尤其对于老人而言的进收容机构(institutionalization)的风险增加关联(Herzo等, Ann. Rev. Gerontol. Geriatrics, 9:74(1989))。从经济上来说,费用是惊人的;仅在美国,每年花费在管理尿失禁上的费用就超过一百多亿美元。

[0009] 尿失禁可以归因于真性尿道压力(膀胱和尿道高活动度)、固有括约肌缺陷(“ISD”)或两者。尿失禁尤其多见于女性,而较少地出现于儿童(特别是ISD),以及接受根治性前列腺切除术后的男性中。

[0010] 压力性尿失禁是在增加腹内压的身体活动如咳嗽、打喷嚏、大笑或锻炼期间发生的尿液不自主排出。一个人可以罹患一种或两种类型的尿失禁,当罹患两种类型的尿失禁时,它称为混合性尿失禁。尽管所有与尿失禁相关的知识,但大多数急迫性尿失禁病例是特发性的,这意味着无法鉴定出具体原因。急迫性尿失禁可以发生在处于任何年龄的任何人中,并且它在妇女和老人中较常见。

[0011] 逼尿肌是收缩从而使尿液从膀胱排出的膀胱壁肌肉。诸如反射亢进的逼尿肌功能失常的后果包括膀胱顺应性差、膀胱内压力高和膀胱容量减小,所有这些都可能导致上泌尿道损害。

[0012] 当前治疗急迫性尿失禁的一种方法是注射神经毒素,如肉毒杆菌毒素,例如**Botox®**。据认为,肉毒杆菌毒素通过使膀胱壁中的逼尿肌麻痹(paralyzing)或者可能影响膀胱中的传入路径以及减少尿路上皮下(suburothelial)神经中的感觉受体而对膀胱活动亢进(bladder hyperactivity)发挥其作用。肉毒杆菌毒素分子的大尺寸可能会限制它扩散的能力,并因而阻止它到达传入和传出神经纤维。因此,应用于膀胱过度活动(OAB)的当前方法,例如需要向膀胱肌肉壁中注射毒杆菌毒素许多次(通常20至50次),因此增加就诊次数和相关治疗成本。而且,抑制感觉神经递质从膀胱中释放出来的慢性长期影响的安全性尚未确定。

[0013] 用于治疗尿失禁的进一步方途径涉及施用具有膀胱松弛性能的药物,其中抗胆碱

能药物是此类药物的支柱。例如,抗胆碱能药物如溴丙胺太林 (propantheline bromide), 以及联合的平滑肌松弛 / 抗胆碱能药物如外消旋奥昔布宁 (racemic oxybutynin) 和双环胺 (dicyclomin) 已经用于治疗尿失禁 (参见, 例如 A. J. Wein, Urol. Clin. N. Am., 22:557(1995))。然而, 通常情况下, 此类药物治疗不能在所有类型的尿失禁患者中获得完全的成功, 而且经常导致患者经历显著的副作用。

[0014] 除了药物治疗之外, 在本发明之前技术人员使用的其他可选方案包括使用人工括约肌 (Lima S. V. C. 等, J. Urology, 156:622-624(1996); Levesque P. E. 等, J. Urology, 156:625-628(1996))、使用膀胱颈支撑修补物 (Kondo A. 等, J. Urology, 157:824-827(1996))、注射交联胶原蛋白 (Berman C. J. 等, J. Urology, 157:122-124(1997); Perez L. M. 等, J. Urology, 156:633-636(1996); Leonard M. P. 等, J. Urology, 156:637-640(1996)), 以及注射聚四氟乙烯 (Perez L. M. 等, J. Urology, 156:633-636(1996))。

[0015] 用于治疗与 ISD 相关的尿失禁的一种最近熟知的途径是使患者经受内窥镜下尿道周围胶原蛋白注射。这扩张了膀胱肌肉以试图减少膀胱漏尿或压力性尿失禁的可能性。

[0016] 用于克服尿失禁的现有解决方案具有众所周知的缺陷。虽然在内窥镜引导下围绕膀胱颈注射胶原蛋白对于括约肌缺陷具有非常高的成功率并且没有显著的发病率, 但是胶原蛋白的使用可能会导致在平均两年后出现的破裂 (failure), 并且需要考虑其成本效益 (Khullar V. 等, British J. Obstetrics & Gynecology, 104:96-99(1996))。另外, 可能由迁移现象 (Perez L. M. 等) 引起的患者节制能力恶化可能需要重复注射以便恢复节制能力 (Herschorn S. 等, J. Urology, 156:1305-1309(1996))。

[0017] 在根治性前列腺切除术后使用胶原蛋白治疗压力性尿失禁的结果也是普遍让人失望的 (Klutke C. G. 等 J. Urology, 156:1703-1706(1996))。而且, 一项研究提供了注射的牛真皮胶原蛋白产生 IgG 和 IgA 类特异性抗体的证据。 (McCell and, M. and Delustro, F., J. Urology 155, 2068-2073(1996))。因而, 可以预计随着时间的推移患者可能对胶原蛋白有致敏性。

[0018] 尽管成功率有限, 但是经尿道胶原蛋白注射疗法仍然是固有括约肌缺陷的可接受的治疗, 因为缺少其他合适的替代方式。

[0019] 目前, 医生用非侵害性医疗产品对罹患膀胱过度活动症或急迫性尿失禁的个体进行初步治疗。然而, 如果这些非侵害性医疗产品未能成功, 则医生将会提供更具侵害性的解决方案。

[0020] 因而, 存在对于扩大现有层状排列的管腔器官或组织结构如膀胱的微创方法的需要。

[0021] 组织工程原理已应用于成功地提供可植入的细胞种植的基质, 该基质用于层状排列的管腔器官或组织结构如膀胱、膀胱一部分或膀胱组成部分的重建、修复、扩张或替代。如 Atala 的美国专利 6, 576, 019 (以引用的方式整体并入本文) 中所描述的, 细胞可以来源于患者自身的组织, 该组织包括膀胱、尿道、输尿管以及其他泌尿生殖组织。然而, 存在与对于作为用于形成新的健康工程组织的基本单元 (basic unit) 的、来自主要器官部位的细胞培养系统的发展和维持的依赖性相关的挑战。例如, 缺陷的膀胱的治疗带来有关细胞寻源 (sourcing) 的特定挑战, 因为有理由推断, 从缺陷的膀胱培养膀胱细胞将导致所培养的细

胞也是缺陷的。此类细胞不是用于定植在 (populating) 可植入新膀胱支架或基质上的明智选择。因此需要适合于种植在可植入新器官 / 组织结构支架或基质上的替代细胞来源。

[0022] 如 Jayo 等, Regen. Med. (2008) 3(5), 671-682 (下文称为“Jayo I”) 中所描述的, 频繁利用胶原蛋白沉积的不完整组织替代, 以及在一些情况下的疤痕组织形成是用以修复器官或组织的尝试的特征。Jayo 等还观察到, 组织工程的较理想结果是组织结构或器官的初始结构和功能的再生。可参见 Jayo 等, J. Urol. (2008) 180; 392-397 (下文称为“Jayo II”)。某些分子被认为与体内再生过程相关。例如, 趋化因子 MCP-1 最广为人知的是它募集单核细胞的能力。然而, 它也似乎是血管平滑肌细胞增殖的强效有丝分裂原。MCP-1 将循环单核细胞募集至血管损伤区域, 该循环单核细胞继而在通常情况下被转化成可用作细胞因子和生长因子储器的巨噬细胞。巨噬细胞还摄取胆固醇并且氧化脂质。巨噬细胞和肌肉前体细胞都被认为是 MCP-1 信号转导的靶标。CCR-2 受体是 MCP-1 (CCL2) 的配体, 并且 CCR-2 缺陷小鼠表现出脂肪生成 / 纤维化增强的再生缺陷。当用骨骼肌再生进行攻击时, CCR-2 缺陷小鼠的切片与正常小鼠相比展现出下列: 更多的组织间隙、高数量的炎性细胞、大而圆的肿胀肌纤维、组织间隙中积累更多的纤维母细胞、具有围绕脂肪沉积物的胶原蛋白分布的脂肪浸润, 和伴有钙沉积的纤维化 (Warren 等, (2005), FASEBJ. 19:413-415; Selzman 等, (2002), Am J Physiol Heart Circ Physiol. 283(4):H1455-H1461; Shannon 等, (2007), Am. J. Cell Physiol. 292:C953-C967; Shireman 等, (2006), J. Surg. Res. 134(1):145-57. Epub 2006Feb 20; Amann 等, (1998), Brit. J. Urol. 82:118-121; Schechter 等, (2004), J. Leukocyte Biol. 75:1079-1085; Deonaraine 等, (2007), Transl Med. 5:11; Lumeng 等, (2007), J Clin. Invest. 117(1):175-184)。

[0023] 本发明涉及来源于腹膜组织来源的细胞群体、分离此类细胞的方法、种植有此类细胞的新器官 / 组织结构支架或基质 (构建体) 以及制备该新器官 / 组织结构支架或基质的方法, 以及使用此类新器官 / 组织结构构建体治疗有需要的患者的方法。

[0024] 发明概述

[0025] 在一方面, 本发明提供了用于再生、重建、扩张或替代需要此种治疗的受试者中的层状排列的管腔器官或组织结构的可植入构建体。在一个实施方案中, 该可植入构建体包括: a) 具有第一表面的基质, 其中该基质被成形为适形于有需要的受试者中的原始 (native) 管腔器官或组织结构的至少一部分; 和 b) 沉积在基质的第一表面上或第一表面中的腹膜来源的细胞群体, 该基质和细胞群体形成可植入构建体。在另一个实施方案中, 该细胞群体是平滑肌细胞 (SMC) 群体。在另一方面, 本发明提供了用于重建、扩张或替代需要此种治疗的受试者中的层状排列的管腔器官或组织结构的方法。在一个实施方案中, 该方法包括将构建体在治疗部位植入到受试者中以便形成层状排列的管腔器官或组织结构的步骤。在一个其他方面, 本发明提供了制备用于重建、扩张或替代需要此种治疗的受试者中的层状排列的管腔器官或组织结构的可植入构建体的方法。在一个实施方案中, 该方法包括提供具有第一表面的基质的步骤, 其中该基质被成形为适形于受试者中的原始管腔器官或组织结构的至少一部分。在另一个实施方案中, 该方法包括将腹膜来源的细胞群体沉积在基质的第一表面上或第一表面中从而形成可植入构建体的步骤。在一个其他实施方案中, 该方法提供了可植入构建体。

[0026] 在另一方面, 本发明提供了用作新泌尿管道的可植入构建体。在一个实施方案中,

该构建体包括:a) 具有第一表面的管状基质,其被适配成允许流体从有需要的受试者中的原始管(native vessel)通过;b) 沉积在该基质的第一表面上或第一表面中的腹膜来源的细胞群体,该基质和细胞群体形成可植入构建体。在另一个实施方案中,该细胞群体是平滑肌细胞(SMC)群体。该管状基质可以具有第一端部。在一个实施方案中,该第一端部可以被配置或成形为与受试者的腹壁接触。该第一端部可以被配置或成形为与受试者腹壁中的开口吻合(anastomosis)。在另一个实施方案中,该第一端部可以被配置成使得它可以外置(exteriorized)于受试者皮肤。在一个其他实施方案中,在植入后,该管状基质的第一端部形成位于受试者身体外部的气门。该第一端部包括延伸通过受试者腹壁的气门端部。在一个实施方案中,该气门端部连接至受试者的皮肤。植入后,该构建体在气门端部形成上皮化(epithelialized)粘膜。该上皮化粘膜可以包括在气门端部的皮肤粘膜区。在一个实施方案中,该上皮化粘膜可以具有与皮肤粘膜区相邻的前庭区。该上皮化粘膜可以以首先出现在前庭区并通过皮肤粘膜区朝向气门端部逐渐增加的上皮为特征。在另一个实施方案中,该上皮的特征是表达上皮细胞标记。该上皮化粘膜等效于天然存在的皮肤粘膜区。

[0027] 在又一个实施方案中,该管状基质进一步包括用于连接至原始管的第一侧开口。该原始管可以是第一输尿管。在一个实施方案中,该管状基质进一步包括被成形为连接至第二输尿管的第二端部。该管状基质可以进一步包括被成形为连接至第二输尿管的第二侧开口。在另一个实施方案中,该构建体被成形为允许流体从第一和/或第二侧开口通过而到达管状基质的内部。在一个其他实施方案中,该构建体被进一步成形为允许流体从管状基质的内部通过而经由管状基质的第一端部到达外部。植入后,该构建体允许尿液从第一和/或第二输尿管通过而到达植入后的管状基质的内部。另外,植入后,该构建体允许从受试者身体排出的尿液从该基质内部通过。在一个其他方面,本发明提供了将可植入构建体提供给需要此种治疗的缺陷的膀胱的方法。在一个实施方案中,该方法包括植入本文描述的构建体的步骤。在另一方面,本发明提供了制备用于重建、扩张或替代需要此种治疗的受试者中的层状排列的管腔器官或组织结构的可植入构建体的方法。在一个实施方案中,该方法包括提供具有第一表面的基质的步骤,其中该基质被成形为适形于受试者中的原始管腔器官或组织结构的至少一部分。在另一个实施方案中,该方法进一步包括将腹膜来源的细胞群体沉积在该基质的所述第一表面上或第一表面中以形成所述可植入构建体的步骤。

[0028] 在另一方面,本文描述的可植入构建体包括平滑肌细胞群体,但是不含另外的细胞群体。在一个实施方案中,该构建体不含尿路上皮细胞。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1A-D 示出膀胱扩张支架的实例。

[0031] 图 2A-D 示出膀胱替代支架的实例。

[0032] 图 3A 示出尿流改道或管道支架的实例。图 3B-C 示出尿流改道构建体的实例,该尿流改道构建体具有不同类型的横截面面积,以及可被配置成连接至一个(多个)输尿管的开口的可能位置。图 3C 示出尿流改道构建体的变型(A:敞开要求(claim)的卵形体;B:敞开要求的卵形接受器;C:闭合的卵形接受器和三根管子)。

[0033] 图 4 示出尿流改道或管道构建体的不同应用。

[0034] 图 5A-B 示出肌肉等效支架的实例。

[0035] 图 6 示出补片(patch)或条带(strip)形式的各种肌肉等效支架的图像。

[0036] 图 7 示出不同肌肉等效支架和代表性植入方法。图 7A 示出支架的扁平薄片形成物。图 7B 示出在植入时可卷起并且可通过腹腔镜管送入并且可在腹腔中展开的适合腹腔镜的支架。图 7C 示出适合腹腔镜的支架薄片形成物,该支架薄片处于卷起构造从而使其容易通过腹腔镜管插入,并在插入后将在腹腔中被展开。图 7D 示出适合腹腔镜的支架薄片形成物,该支架薄片处于折叠构造或手风琴样式从而使其容易通过该管插入,并在插入后将在腹腔中被展开。图 7E 示出用于植入肌肉等效支架的可能的手术方法。图 7F 示出在空膀胱或满膀胱上的植入部位。图 7G 示出具有在切开表面后产生的呈现为椭球体的手术狭长切口的膀胱模型。

[0037] 图 8 示出用以使支架薄片容易通过腹腔镜端口插入的预先折叠的手风琴样式的所述支架薄片。

[0038] 图 9A 示出预先切割成条带,然后缝合在一起从而允许堆叠和插入到腹腔镜端口中并固定在腹腔内适当位置处的支架。图 9B 示出 18.7cm 长 × 2.0cm 宽的一个支架,该支架具有 2 个折叠部分。图 9C 示出 13.3cm 长 × 2.8cm 宽的一个支架,该支架具有 3 个折叠部分。图 9D 示出 9.7cm 长 × 4.0cm 宽的一个支架,该支架具有 4 个折叠部分。图 9E 示出由 9.7cm 长和 2.0cm 宽的 2 片组成的一个支架,每片均具有 2 个折叠部分。

[0039] 图 10 示出所植入管道构建体的构造的实例。

[0040] 图 11A 示出新泌尿管道支架的示例性构造。图 11B 示出所植入新泌尿管道支架的两个替代构造 (A 和 B)。

[0041] 图 12 示出永久性尿流改道构建体的植入组件的实例。

[0042] 图 13 示出尿流改道构建体的其他应用。

[0043] 图 14 示出用于从腹膜组织中分离细胞的代表方案的步骤。

[0044] 图 15 示出犬和猪来源的细胞的细胞形态。

[0045] 图 16A-B 示出平滑肌 α -肌动蛋白和钙调蛋白 (calponin) 在犬来源的膀胱细胞中的表达。图 16C-D 示出平滑肌 α -肌动蛋白和钙调蛋白在犬来源的网膜细胞中的表达。

[0046] 图 17A-C 示出通过犬网膜来源的细胞 SMC、上皮和内皮抗原标记的 FACS 分析得到的表型。

[0047] 图 18A-C 示出通过犬网膜来源的细胞 SMC、上皮和内皮抗原标记的 FACS 分析得到的表型。

[0048] 图 19 示出针对来自网膜和膀胱来源的犬 SMC 的平滑肌细胞相关标记的免疫荧光分析。

[0049] 图 20A-B 示出犬网膜来源的细胞的免疫荧光分析,其示出上皮、内皮和 SMC 抗原标记。

[0050] 图 21 示出针对来自网膜和膀胱来源的猪 SMC 的平滑肌细胞相关标记的免疫荧光分析。

[0051] 图 22 示出经 PCR 得到的犬来源的细胞的 SMC 基因表达。

[0052] 图 23 示出经 PCR 得到的犬来源的细胞的 SMC 基因表达。

[0053] 图 24 示出经 PCR 得到的猪来源的细胞的 SMC 基因表达。

[0054] 图 25 示出犬来源的网膜细胞的收缩表型。

[0055] 图 26 示出支架内犬网膜来源的细胞 SMC 的免疫荧光分析。

[0056] 图 27 示出支架内网膜来源的 SMC 的 MCP1 蛋白质分泌。

[0057] 图 28 示出对支架内网膜来源的细胞的 ECM 产生的免疫荧光分析。

[0058] 图 29 示出支架内网膜来源的 SMC 代谢。

[0059] 图 30 示出植入后的新泌尿管道的特征。

[0060] 发明详述

[0061] 本发明涉及使用种植有从腹膜组织来源获得的细胞的支架对有需要的受试者进行的层状排列的管腔器官或组织结构的再生、重建、扩张或替代。在另一方面,本发明提供了用作新泌尿管道的可植入构建体,该构建体含有从腹膜组织来源获得的细胞。

[0062] 本发明涉及来源于腹膜组织来源的细胞群体、分离此类细胞的方法、种植有此类细胞的新器官/组织结构支架或基质(构建体)以及制备该新器官/组织结构支架或基质的方法,以及使用此类新器官/组织结构构建体治疗有需要的患者的方法。本发明构建体可以用于如本文描述的器官或组织结构的重建、扩张或替代,或再生。

[0063] 1. 定义

[0064] 除非另外限定,否则本文所用的科学技术术语都具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。Principles of Tissue Engineering,第3版(由 R Lanza、R Langer 和 J Vacanti 编著),2007 为本领域技术人员提供了本申请中所用术语中的许多术语的一般指导。

[0065] 本领域技术人员将会意识到与本文描述的方法和材料类似或等效的许多方法和材料,这些方法和材料可以用在本发明的实践中。事实上,本发明不以任何方式局限于所描述的方法和材料。就本发明的目的而言,下面定义了以下术语。

[0066] 如本文所用的术语“平滑肌细胞”或“SMC”是指来源于与作为如本文描述的重建、修复、扩张或替代构建体和方法的对象原始器官或组织来源不同的收缩细胞。本发明提供的平滑肌细胞一旦种植和培养在本文描述的支架或基质上,就能够形成存在于中空器官(例如,膀胱、腹腔、胃肠道等)的壁中并且以收缩和放松的能力为特征的非横纹肌。本领域普通技术人员将会了解平滑肌细胞的其他性质。

[0067] 如本文所用的术语“细胞群体”是指通过从合适的哺乳动物组织来源直接分离并随后在体外进行培养获得的许多细胞。本领域普通技术人员将会了解用于分离和培养可与本发明一起使用的细胞群体的各种方法、适合于在本发明中使用的细胞群体中的细胞的各种数量,和适合于在本发明中使用的细胞群体中的细胞的各种数量。该细胞群体可以是来源于腹膜组织的平滑肌细胞群体(SMC)。该腹膜组织可以是网膜组织。该 SMC 群体可以以表达与平滑肌细胞相关的标记为特征。该 SMC 群体也可以是纯化的细胞群体。该 SMC 群体可以来源于自体或非自体来源。

[0068] 术语“自体”是指来源于同一个体的身体或从同一个体的身体转移。自体平滑肌细胞群体来源于将是如本文描述的可植入构建体的接受者的受试者。

[0069] 术语“非自体”是指来源于将不是如本文描述的可植入构建体的接受者的供者,或者从将不是如本文描述的可植入构建体的接受者的供者转移。此类非自体来源包括异基因(allogeneic)、同系(syngeneic)(自身基因 autogeneic)或同基因(isogeneic))来源,以及其任何组合。

[0070] 术语“标记”或“生物标记”一般指 DNA、RNA、蛋白质、碳水化合物,或基于糖脂的分

子标记,其在所培养的细胞群体中的表达或存在可以通过标准方法(或本文公开的方法)检测,并且与所培养细胞群体中的为特定细胞类型的一个或多个细胞一致。一般而言,术语细胞“标记”或“生物标记”是指表达在本文描述的细胞群体中表达的分子,其通常由原始细胞所表达。该标记可以是被细胞表达的多肽或染色体上的可识别的物理位置,如基因、限制性核酸内切酶识别位点或编码被原始细胞表达的多肽(例如,mRNA)的核酸。该标记可以是称为“基因表达标记”的基因的表达区域,或不具有已知编码功能的DNA的一些片段。

[0071] 术语“平滑肌细胞标记”一般是指DNA、RNA、蛋白质、碳水化合物,或基于糖脂的分子标记,其在所培养的细胞群体中的表达或存在可以通过标准方法(或本文公开的方法)检测,并且与所培养细胞群体中的为平滑肌细胞的一个或多个细胞一致。一般而言,术语平滑肌细胞(SMC)“标记”或“生物标记”是指通常被原始平滑肌细胞表达的分子。该标记可以是被该细胞表达的多肽或染色体上的可识别的物理位置,如基因、限制性核酸内切酶识别位点或编码被SMC表达的多肽的核酸。该标记可以是称为“基因表达标记”的基因的表达区域,或不具有已知编码功能的DNA的一些片段。本发明涵盖的此类标记包括但不限于下列的一种或多种:心肌蛋白(myocardin)、 α -平滑肌肌动蛋白、钙调蛋白、肌球蛋白重链、BAALC、结蛋白、肌纤维母细胞抗原、SM22,及其任何组合。

[0072] 可互换使用的术语“差异表达的基因”、“差异基因表达”及其同义词是指这样的基因,其在第一细胞或细胞群体中的表达相对于其在第二细胞或细胞群体中的表达被激活至较高或较低水平。该术语也包括这样的基因,其在培养中的第一细胞或第二细胞的传代期间随着时间的推移在不同阶段的表达被激活至较高或较低水平。还应理解,差异表达的基因可以在核酸水平或蛋白质水平上被激活或抑制,或者可以经受可变剪接从而产生不同的多肽产物。此类差异可以通过例如mRNA水平、表面表达、多肽的分泌或其他分配上的变化来证明。差异基因表达可以包括在2个基因或更多基因或其基因产物间的表达的比较,或在2个基因或更多基因或其基因产物间的表达比率的比较,或甚至在第一细胞与第二细胞之间不同的相同基因的两种不同的加工产物的比较。差异表达包括基因或其在例如第一细胞和第二细胞中的表达产物在时间或细胞表达模式上的定量及定性差异。就本发明的目的而言,“差异基因表达”在下列情况下被视为存在:当给定基因在第一细胞和第二细胞中的表达或者在培养中的细胞的传代期间随着时间的推移在不同阶段的表达之间存在至少约1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约10.5倍、至少约11倍、至少约11.5倍、至少约12倍、至少约12.5倍、至少约13倍、至少约13.5倍、至少约14倍、至少约14.5倍,或至少约15倍差异时。

[0073] 术语“抑制”、“下调”、“低表达”和“下降”可互换地使用,并且意指基因的表达,或者编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的RNA分子或等效RNA分子的水平,或者一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的活性相对于一个或多个对照如一个或多个阳性和/或阴性对照下降。

[0074] 术语“上调”或“过表达”用于意指基因的表达,或者编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的RNA分子或等效RNA分子的水平,或者一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的活性相对于一个或多个对照如一个或多个阳性和/或阴性对照升高。

[0075] 术语“收缩功能”是指涉及滑动肌动蛋白和肌球蛋白丝的相互作用的平滑肌收缩

功能,该相互作用由钙激活的肌球蛋白磷酸化引发,因而使得收缩依赖于细胞内的钙水平。

[0076] 术语“腹膜组织”一般意指来源于包括而但不限于壁层腹膜、脏层腹膜和网膜的腹膜的组织。腹膜组织可以与包括而但不限于胃、肝和 / 或肠的内部器官密切接触。网膜组织可以从包括而不限于大网膜和小网膜的不同来源获得。网膜组织可以经由切口和活检获得。

[0077] 术语“构建体”是指沉积在由一种或多种合成或天然存在的生物相容性材料构成的支架或基质的表面上或表面中的至少一种细胞群体。该细胞群体可以在体外或体内与支架或基质组合在一起。

[0078] 术语“样品”或“患者样品”或“生物样品”一般意指从个体、体液、机体组织、细胞系、组织培养物或其他来源获取的任何生物样品。该术语包括体液,例如血液如外周血或静脉血、尿液和生物来源的其他液体样品如脂肪抽吸物,和固体组织活检物 (biopsy) 如活检标本 (例如,腹膜组织活检物),或组织培养物或由此衍生的细胞及其子代。该定义还包括在从来源获取后已经经受任何方式的处理,例如通过用试剂处理、溶解,或针对某些组分如蛋白质或多核苷酸富集进行处理的样品。该定义还包括临床样品,并且还包括培养中的细胞、细胞上清液、细胞裂解液、血清、血浆、生物流体和组织样品。样品的来源可以是例如来自新鲜、冷冻和 / 或保藏器官或组织样品或活检物或抽吸物的固体组织;血液或任何血液成分;体液如脑脊髓液、羊膜液、腹膜液,或组织间液;来自受试者发育过程中的任何时间的细胞。该生物样品可以含有在自然界中不与该组织一起或者不在该组织中天然存在的某些化合物,如防腐剂、抗凝血剂、缓冲剂、固定剂、营养素、抗生素等。该样品可以用于诊断或监测测定。用于从哺乳动物中获取样品的方法在本领域中是熟知的。如果术语“样品”单独使用,则它仍然意指“样品”是“生物样品”或“患者样品”,即,这些术语可互换使用。样品也可以是测试样品。

[0079] “测试样品”是指植入本文描述的构建体后从受试者获取的样品。该测试样品可以源自哺乳动物受试者中的各种来源,包括而但不限于血液、血清、尿液、精液、骨髓、粘膜、组织等。

[0080] 术语“对照”或“对照样品”是指阴性对照,其中预期阴性结果有助于与测试样品中的阳性结果关联。或者,该对照可以是阳性对照,其中预期阳性结果有助于与测试样品中的阴性结果关联。适合于本发明的对照包括而但不限于已知具有正常水平的细胞因子的样品、从已知没有植入本文描述的构建体的哺乳动物受试者中获取的样品,和从已知为正常的哺乳动物受试者中获取的样品。对照还可以是在植入本文描述的构建体之前从受试者中获取的样品。另外,该对照可以是含有与包含在测试样品中的细胞具有相同来源的正常细胞的样品。本领域技术人员将会了解适合于在本发明中使用的其他对照。

[0081] 术语“患者”是指需要治疗的任何单一动物,更优选哺乳动物 (包括此类非人动物,如狗、猫、马、家兔、动物园的动物、牛、猪、羊,和非人类灵长类动物)。更优选地,本文的患者是人。

[0082] 术语“受试者”意指任何单一人受试者,包括正在经历或已经经历包括缺陷、受损或非功能性的泌尿系统在内的缺陷器官功能或衰竭的一个或多个体征、症状或其他指征的适宜于治疗的患者。此类受试者包括而不限于新近被诊断或先前被诊断并且正在经历再发或复发,或者不论什么原因而处于缺陷器官功能或衰竭的风险中的受试者。该受试者可能先前已接受针对与缺陷器官功能或衰竭相关的病状的治疗,或者没有接受这样的治疗。受

试者可以是尿流改道的候选者,包括而不限于患有需要膀胱切除的膀胱癌的受试者、患有影响肾功能的神原性膀胱障碍的受试者、膀胱受到辐射损伤的受试者,以及患有顽固性尿失禁的受试者。该受试者可能新近被诊断为需要尿流改道,或者先前被诊断为需要尿流改道并且正在经历并发症,或者不论什么原因而处于缺陷、受损或非功能性的泌尿系统的风险中。该受试者可能先前已接受针对与缺陷、受损或非功能性的泌尿系统相关的病状的治疗,或者没有接受这样的治疗。

[0083] 术语“尿流改道”或“管道”是指随着时间的推移由受试者与植入的尿流改道构建体、吻合的输尿管和任选的相邻开口腔 (atrium) 的相互作用产生的器官或组织结构。该开口腔是前连接室 (anterior connecting chamber),其允许尿液通过腹壁,并且可以由将构建体的尾侧端 (位于腹腔内) 连接至皮肤的腹膜包裹物的最前面的管状部分制成。

[0084] 术语“尾侧”和“颅侧 (cranial)”是与尿产量和尿流量相关的描述性术语。术语“尾侧”是指植入后与气门最接近的尿流改道构建体的端部,而术语“颅侧”是指植入后与肾脏和输尿管最接近的尿流改道构建体的端部。

[0085] 术语“残屑 (detritus)”是指在继尿流改道构建体植入后发生的愈合和再生过程期间形成的碎片 (debris)。残屑可以由剥落的组织细胞、炎性渗出物和支架生物降解物构成。如果该管道被此种碎片阻塞 (不恰当地外流),则停滞的碎片在管道管腔内形成残屑或半固体团块。

[0086] 术语“清创术”是指手术或非手术地从管道中除去外来物,或者撕裂、衰亡、污染或死亡的组织,以便防止感染、防止阻塞和促进愈合过程。清创术可以涉及残屑的除去。

[0087] 术语“气门”是指手术创建的开口,该开口用于将尿液从尿流改道构建体的排泄流出端送往身体外。尿液通常收集在身体外部的储器中。

[0088] 术语“气门端口”或“气门按钮 (button)”意指例如用于维持气门开口的完整性的设备。

[0089] 如本文所用的术语“扩充”或“扩大”是指增加现有层状排列的管腔器官或组织结构的尺寸。例如,在本发明的一方面,现有层状排列的管腔器官或组织结构可被扩大10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%或29%。在本发明的另一方面,可以扩大现有层状排列的管腔器官或组织结构,以增加现有层状排列的管腔器官或组织结构的现有体积容量。

[0090] 如本文所用的术语“体积容量”是指能够包含在限定区域中的液体量。

[0091] “再生预后”或“再生的预后”一般是指对植入本文描述的构建体的可能过程或结果的预报或预测。如本文所用的再生预后包括对下列的任一条或多条的预报或预测:膀胱替代或扩张之后功能性膀胱的形成或改善、管道植入之后功能性尿流改道的形成、改善的膀胱容量的形成,和改善的膀胱顺应性的形成。如本文所用的“针对再生的预后”意指提供对植入新器官或组织结构的可能过程或结果的预报或预测。在一些实施方案中,“针对再生的预后”包括提供对下列的任一条或多条的预报或预测 (针对下列的任一条或多条的预后):膀胱替代或扩张之后功能性膀胱的形成或改善、管道植入之后功能性尿流改道的形成、膀胱容量或改善的膀胱容量的形成,以及膀胱顺应性或改善的膀胱顺应性的形成。

[0092] “再生的组织”是指在如本文描述的构建体植入之后形成的新器官或组织结构的组织。该器官或组织结构可以是膀胱或膀胱的一部分。该再生的组织可以包括具有底层

(underlying) 平滑肌的连续尿路上皮。

[0093] 2. 细胞群体

[0094] 本发明提供了用于层状排列的管腔器官或组织结构的重建、扩张或替代的平滑肌细胞群体,其中该细胞群体包含具有收缩功能并且对一种或多种平滑肌细胞标记呈阳性的至少一种细胞。

[0095] 如本文所讨论的,组织工程原理已成功地应用于提供可植入的细胞种植的基质,该基质用于层状排列的管腔器官和组织结构如通常由尿路上皮和平滑肌层组成的膀胱或膀胱组成部分的重建、扩张或替代。(Becker 等, Eur. Urol. 51, 1217-1228 (2007); Frimberger 等, Regen. Med. 1, 425-435 (2006); Roth 等, Curr. Urol. Rep. 10, 119-125 (2009); Wood 等, Curr. Opin. Urol. 18, 564-569)。平滑肌细胞可以来源于患者自身的组织,该组织包括膀胱、尿道、输尿管,以及其他泌尿生殖组织。然而,存在与对于作为用于形成新的健康工程组织的基本单元的、来自主要器官部位的细胞培养系统的发展和维持的依赖性相关的挑战,如在癌性膀胱组织的治疗期间发生的。显然,此类癌细胞不适合于定植在可植入新膀胱支架或基质上。

[0096] 本发明提供了来源于与作为重建、扩张或替代对象的器官或组织结构不同的来源的细胞群体。在一个实施方案中,该来源是自体来源。在另一个实施方案中,该来源是非自体来源。

[0097] 在另一方面,该细胞群体表达与平滑肌细胞群体一致或者平滑肌细胞群体所特有的标记。

[0098] 在一个其他方面,本发明提供了从不同于作为重建、修复、扩张或替代对象的管腔器官或组织结构的来源分离的平滑肌细胞群体。在优选的实施方案中,该管腔器官或组织结构是膀胱或膀胱的一部分。

[0099] 在一方面,该来源是腹膜组织。在一个实施方案中,腹膜组织来源的平滑肌细胞群体来源于患者样品或供者样品。该患者样品或供者样品可以是在活检期间取出的腹膜组织。该腹膜组织可以是网膜组织。

[0100] 在又一其他实施方案中,本发明的分离细胞群体在培养后可以形成各种平滑肌细胞特征,其包括而限于峰-谷形态、表达一种或多种平滑肌细胞标记、收缩功能、丝形成,以及细胞因子合成。

[0101] 在一方面,所培养的细胞群体以其峰-谷形态为特征。具有峰-谷形态的细胞可以具有各种特征,该特征包括而限于纺锤状、扁平状和传代后呈现的纤维母细胞样形态、细长状以及排列成平行的行、“旋转”的生长外观,以及其任何组合。在一个实施方案中,该细胞群体在适当的培养基中培养后形成培养的平滑肌细胞所特有的“峰-谷形态”。

[0102] 在另一方面,所培养的细胞群体以存在一种或多种平滑肌细胞标记为特征。在一个实施方案中,该细胞群体在适当的培养基中培养后形成可检出的平滑肌细胞标记,该标记包括而限于下列的一种或多种:结蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、肌球蛋白重链、钙调蛋白、心肌蛋白、波形蛋白、肌纤维母细胞、BAALC、SM22,及其任何组合。

[0103] 在一方面,所培养的细胞群体以不存在一种或多种上皮或内皮标记为特征。在一个实施方案中,该细胞群体在适当的培养基中培养后没有形成可检出的上皮或内皮标记,该标记包括而限于下列的一种或多种:荆豆凝集素 1 (UEA-1)、EpCam、CDH5、KDR、FLT1、

PECAM、TEK、vWF、细胞角蛋白 AE1 / AE3, 及其任何组合。

[0104] 在一个其他方面, 所培养的细胞群体以存在一种或多种具有收缩功能的细胞为特征。在一个实施方案中, 该细胞群体在适当的培养基中培养后形成收缩功能。在另一个实施方案中, 该收缩功能是钙依赖性收缩功能。在一个其他实施方案中, 钙依赖性收缩功能由钙螯合剂对收缩的抑制所证明。在另一个实施方案, 该钙螯合剂是 EDTA。本领域普通技术人员将会了解本领域中已知的其他螯合剂可能是合适的。

[0105] 在又一方面, 所培养的细胞群体以丝形成为特征。在一个实施方案中, 该细胞群体在适当的培养基中培养后经历丝形成。

[0106] 在一方面, 该细胞群体包括至少一种表达一种或多种细胞因子的细胞。在一个实施方案中, 该细胞因子是 MCP-1。

[0107] 在一方面, 本发明提供了含有至少一种再生细胞的再生细胞群体, 当将该再生细胞群体沉积在如本文描述的支架或基质上并且植入到有需要的受试者中时, 该再生细胞群体为作为本文所涵盖的重建、扩张或替代对象的器官或组织结构提供再生作用。在植入到有需要的受试者中后, 再生细胞群体具有刺激或引发层状排列的管腔器官或组织结构再生的能力。一般而言, 器官或组织结构的再生以细胞组分、组织排列结构 (organization) 和体系结构 (architecture)、功能和调节性发育的恢复为特征。另外, 再生细胞群体将倾向于在细胞种植的管腔器官或组织结构构建体的植入部位处发生的不完整 (incompleteness) 或紊乱减至最少。在植入部位处的组织破坏 (disorganization) 可以自身表现为胶原蛋白沉积增加和 / 或疤痕组织形成, 其中的任一者均可以通过使用再生细胞群体来减至最少。另外, 某些细胞事件指示再生过程。在使用本文描述的细胞群体和支架的再生膀胱或膀胱一部分的情况下, 再生器官或组织结构由平滑肌实质以及具有与粘膜表面齐平的良好发育的血管的基质成分 (stromal element) 组成, 该平滑肌实质具有围绕朝向管腔表面延伸的许多微血管呈辐射状散布的纤维血管组织 (参见 Jayo II, 出处同上)。再生膀胱或膀胱的一部分也以存在纺锤状细胞 / 间充质细胞以及 α SMA 阳性肌肉前体细胞为特征。在一个实施方案中, α SMA 阳性纺锤状细胞在新基质组织中和在多个新血管 (小动脉) 周围观察到。

[0108] 在一个实施方案中, 本发明提供了细胞群体, 当将该细胞群体沉积在如本文描述的支架或基质上并且植入到有需要的受试者中时, 该细胞群体为作为本文所涵盖的重建、扩张或替代对象的器官或组织结构提供修复作用。在其他实施方案中, 修复作用以疤痕组织形成和 / 或胶原蛋白沉积为特征。本领域技术人员将会意识到本领域中已知的修复的其他特征。

[0109] 在另一方面, 再生细胞群体提供了以恢复的层状排列的管腔器官或组织结构的尺寸的适应性调节为特征的再生作用。在一个实施方案中, 再生细胞群体的再生作用是建立对接受种植有再生细胞群体的支架或基质的受试者有特异性的适应性调节。在一个实施方案中, 该适应性调节是使用本文描述的构建体对受试者的膀胱进行替代或扩张, 使得该新膀胱生长并发育至与该受试者的身体尺寸成比例的尺寸。

[0110] 在一个实施方案中, 能够再生刺激的细胞群体是产生 MCP-1 的细胞群体, 其含有至少一种表达趋化因子产物 MCP-1 的细胞。MCP-1 再生刺激的特征是将某些类型的细胞募集至植入部位。在一个实施方案中, MCP-1 将肌肉祖细胞募集至植入部位从而使肌肉祖细胞在新膀胱中增殖。在另一个实施方案中, MCP-1 将单核细胞募集至植入部位, 该单核细胞

继而产生各种细胞因子和 / 或趋化因子从而促进再生过程。在一个其他实施方案中, MCP-1 诱导网膜细胞发育成肌肉细胞。

[0111] 在一方面, 本发明提供了特定细胞因子如 MCP-1 作为组织再生的替代标记的用途。此种标记可以与基于功能是否已被重建的再生评估结合使用。对再生时间进程内的替代标记的监测也可以用作再生的预后指标。

[0112] 在另一个实施方案中, 该细胞群体是纯化的细胞群体。如本文描述的纯化的细胞群体以基于一种或多种形态、对标记的表达和功能的表型为特征。该表型包括而不限于, 一种或多种峰 - 谷形态、对一种或多种平滑肌细胞标记的表达、对细胞因子的表达、在培养物中的有限增殖生命周期、收缩功能和诱导丝形成的能力。该表型可以包括本文描述或本领域普通技术人员已知的其他特征。在另一个实施方案中, 该纯化的群体对于如本文描述的平滑肌细胞群体而言基本上是同源的。基本上同源的纯化群体通常是至少约 90% 同源, 如通过一种或多种形态、对标记的表达和功能判断的。在其他实施方案中, 该纯化群体是至少约 95% 同源、至少约 98% 同源或至少约 99.5% 同源。

[0113] 在所有实施方案中, SMC 群体都来源于自体来源或非自体来源。

[0114] 在另一方面, 本发明涵盖了本文描述的 SMC 群体对于治疗眼部病症的应用。眼部病症是这样的病症, 其中受试者具有由眼睛肌肉的不适当运作所造成的眼睛缺陷。平滑肌作为睫状肌存在于眼睛中, 并且控制眼睛以变化的距离观察物体的调节功能, 并且调节通过施累姆氏管 (Schlemm's canal) 的房水流。平滑肌也存在于眼睛虹膜中。患有诸如老花眼和远视的眼部病症的个体可以从这些 SMC 群体中获得益处。在一个实施方案中, SMC 细胞群体可以从有需要的受试者或供者的腹膜组织中分离。可以将该细胞群体种植到适合于在受试者眼睛内某一部位处植入的支架上。本发明细胞群体的优点是如果受试者具有眼睛缺陷或者由于眼睛组织的利用度有限, 合适的 SMC 可能不能从受试者的眼睛来源获得。SMC 群体可以从活检物中分离, 培养, 种植在合适的支架上, 并且植入到受试者中从而提供新的眼组织。该腹膜组织可以是网膜组织。

[0115] 在另一个实施方案中, 可以在不使用支架的情况下将本发明平滑肌细胞群体施用给患有眼部病症的受试者, 例如通过移植进行。本领域普通技术人员将会了解合适的移植方法。

[0116] 在一方面, 本发明涉及来源于腹膜组织的分离的平滑肌细胞群体。在一个实施方案中, 该腹膜组织来源的细胞群体含有一种或多种具有收缩功能并且对平滑肌细胞标记呈阳性的细胞。

[0117] 在所有实施例中, 该细胞群体可以选自下列的一种或多种平滑肌细胞标记为特征: 心肌蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、钙调蛋白、肌球蛋白重链、BAALC、结蛋白、肌纤维母细胞抗原、波形蛋白和 SM22。在一些实施方案中, 该细胞群体可以表达心肌蛋白 (MYOCD)。在所有实施方案中, 术语“MYOCD”包括编码 MYOCD 多肽的核酸和 MYOCD 多肽。在所有实施方案中, 该细胞群体的收缩功能都可以是钙依赖性收缩功能。

[0118] 3. 分离细胞群体的方法

[0119] 自体细胞群体直接来源于需要治疗的受试者。非自体细胞群体来源于供者。源组织一般与需要治疗的器官或组织结构不同。一类细胞可以来源于患者自身的组织或供者组织, 例如来源于腹膜组织。在一个实施方案中, 该源组织是网膜组织。该细胞可以从活检物

中分离。另外,该细胞在使用前可以加以冷冻或扩充。

[0120] 为了对细胞种植的支架的构建作准备,将含有平滑肌细胞的一个(多个)样品解离成一种(多种)适当的细胞悬浮液。细胞分离和培养的方法在授权的美国专利第 5,567,612 号中讨论,该专利以引用方式明确地并入本文。将细胞解离至单细胞期对于初始的原代培养物而言不是必需的,因为在体外培养一段时间之后可以获得单细胞悬浮液。组织解离可以通过机械方法和酶方法破坏细胞外基质和将细胞连在一起的细胞间连接部来进行。需要时,可以在体外培养细胞以增加可用于种植在支架上的细胞数目。

[0121] 细胞在种植之前可以用遗传物质进行转染。平滑肌细胞在种植于聚合物上之前可以用特定基因进行转染。细胞-聚合物构建体可以携带宿主或组织工程化新器官长期存活所需的遗传信息。

[0122] 可以在存在或不存在细胞分级分离步骤的情况下制备细胞培养物。细胞分级分离可以利用本领域技术人员已知的技术进行。细胞分级分离可以基于细胞大小、DNA 含量、细胞表面抗原和活力进行。例如,可以从腹膜组织中富集平滑肌细胞,而可以减少平滑肌细胞收集物中的内皮细胞。虽然可以使用细胞分级分离,但是它对于本发明的实践不是必需的。该腹膜组织可以是网膜组织。

[0123] 在本文描述的方法中的另一种可选程序是低温贮藏。低温贮藏可能,例如对于减少对多个创伤性手术程序的需要有用。可以对取自来自受试者的活检物或样品的细胞进行扩增,并且可以使用扩增细胞的一部分,而将另一部分低温贮藏。扩增和贮藏细胞的能力可以将所需的手术程序数量减至最少。低温贮藏的实用性的另一个实例是贮藏在组织库中。可以将细胞储存在例如供者组织库中。当新器官或组织结构需要细胞时,可以根据需要使用低温贮藏的供应细胞。患有可能会危害其现有器官或组织结构的疾病或者经受可能会危害其现有器官或组织结构的的患者可以低温贮藏一种或多种活检物。以后,如果该患者自身的器官或组织结构损坏,则可以将低温贮藏的细胞解冻并用于治疗。例如,如果治疗后癌症再出现于新器官或组织结构中,则可以使用低温贮藏的细胞来重建器官或组织结构,而无需另外的活检物。

[0124] 可以基于下面的通用方案从腹膜组织中分离出平滑肌细胞。可以获取具有合适重量(例如,以克表示)和/或面积(例如,cm²)的活检标本。下面是适合于从网膜组织中分离平滑肌细胞的方案的代表性实例。可以通过活检获取合适的克重量的网膜组织(例如,7-25g),并用 PBS 洗涤(例如,洗涤 3 次),用手术刀和剪子切碎,将其转移到 50mL 锥形管中并在含有胶原酶(例如,0.1%至 0.3%)(Worthington)和 1%BSA 的 DMEM-HG 溶液中在 37℃ 下孵育 60 分钟。可以将该管子不断地摇动或者周期性地振动从而促进消化。可以通过在 600g 下离心 10 分钟来使消化的样品沉淀,并将其重新悬浮于 DMEM-HG+10%FBS 中。该沉淀物然后可以用来种植第 0 代(passage zero)。图 14 示出从腹膜组织中分离细胞的代表性方案。

[0125] 本领域普通技术人员将会了解用于分离平滑肌细胞的另外的方法。

[0126] 在一方面,本发明提供了从腹膜组织中分离出平滑肌细胞群体的方法。在另一方面,本发明提供了用于从腹膜组织中分离出分离的平滑肌细胞群体的方法。该腹膜组织可以是网膜组织。在一个实施方案中,该方法包括 a) 获取网膜组织, b) 消化网膜组织, c) 离心消化的网膜组织从而使含有 SMC 的级分沉淀, d) 培养沉淀的级分, 和 e) 从该级分中分离

出平滑肌细胞群体。在一个实施方案中,培养步骤包括洗涤沉淀物,将沉淀物重新悬浮在细胞培养基中,以及接种重新悬浮的沉淀物。在另一个实施方案中,培养步骤包括提供粘附到细胞培养支持物如板或管上的细胞群体。在另一个实施方案中,该方法进一步包括扩充所培养的细胞群体。在其他实施方案中,该方法进一步包括针对平滑肌细胞特征分析平滑肌细胞群体。在一个实施方案中,网膜组织来源于自体或非自体来源。

[0127] 在一个其他方面,本发明提供了分离和培养平滑肌细胞群体的方法,该平滑肌细胞群体含有至少一种具有收缩功能并且对一种或多种平滑肌细胞标记呈阳性的细胞。在一个实施方案中,该方法包括从需要重建、扩张或替代层状排列的管腔器官或组织结构的患者中获取样品的步骤,其中该样品不是从需要该重建、修复、扩张或替代的管腔器官或组织结构中获取的。在另一个实施方案中,平滑肌细胞来源于患者样品。在一个其他实施方案中,该管腔器官或组织结构是膀胱或膀胱的一部分。在一个实施方案中,该样品是自体样品或非自体样品。在另一个实施方案中,该样品是腹膜组织样品。该腹膜组织样品可以是网膜组织样品。

[0128] 在另一个实施方案中,该获取步骤之后是分离步骤。

[0129] 在网膜组织样品的情况下,该纯化步骤包括用胶原酶消化样品、离心所消化的样品、混合所离心的样品从而提供含有 SMC 的级分、离心所混合的样品从而获取可重新悬浮用于随后培养的级分。

[0130] 在一个实施方案中,该培养方法包括根据本领域普通技术人员已知的标准条件,使用含有最低限度基本培养基(例如,DMEM 或 α -MEM)和胎牛血清(例如,10%FBS)的细胞培养基。

[0131] 4. 支架

[0132] 如 Atala 的 U.S. 6576019(以引用方式整体并入本文)中所描述的,支架或聚合物基质可以由多种不同的材料组成。一般而言,生物相容性材料以及尤其生物可降解材料是用于构建本文所描述的支架的优选材料。该支架是可植入的、生物相容性的、合成或天然的具有至少两个独立表面的聚合物基质。该支架被成形为适形于需要治疗的管腔器官或组织结构的至少一部分。该生物相容性材料是生物可降解的。生物相容性是指对生物功能没有毒性或有害影响的材料。生物可降解是指可以在患者身体中被吸收或降解的材料。生物可降解材料的实例包括例如可吸收缝线。用于形成支架的代表性材料包括经由受控速率的水解而被降解并被再吸收的天然或合成聚合物,例如胶原蛋白、聚(α -羟基酯)如聚(乳酸)、聚(羟基乙酸)、聚原酸酯和聚酸酐以及它们的共聚物。这些材料提供了可降解性、可管理性、尺寸和构造的最大控制。优选的生物可降解聚合物材料包括作为可吸收合成缝合材料开发的聚羟基乙酸和丙交酯乙交酯共聚物(polyglactin)。聚羟基乙酸和丙交酯乙交酯共聚物纤维可以按照制造商供应的形式使用。其他支架材料包括纤维素醚、纤维素、纤维素酯、氟化聚乙烯、聚-4-甲基戊烯、聚丙烯腈、聚酰胺、聚酰胺酰亚胺、聚丙烯酸酯、聚苯并噁唑、聚碳酸酯、聚氰基芳基醚、聚酯、聚酯碳酸酯、聚醚、聚醚醚酮、聚醚酰亚胺、聚醚酮、聚醚砜、聚乙烯、聚氟烯烃、聚酰亚胺、聚烯烃、聚噁二唑、聚苯醚、聚苯硫醚、聚丙烯、聚苯乙烯、聚硫化物、聚砜、聚四氟乙烯、聚硫醚、聚三唑、聚氨酯、聚乙烯、聚偏二氟乙烯、再生纤维素、硅酮、脲甲醛,或这些材料的共聚物或物理共混物。该材料可以用合适的抗微生物剂浸渍,并且可以用着色添加剂染色以改进可见性以及为手术程序提供帮助。

[0133] 生物可降解的其他支架材料包括由 Ethicon Co. (Ethicon Co., Somerville, N. J.) 制造的合成缝合材料, 例如 MONOCRYL™ (乙交酯与 ϵ -己内酯的共聚物)、VICRYL™ 或 Polyglactin 910 (丙交酯与乙交酯的共聚物, 其上涂覆有 Polyglactin 370 和硬脂酸钙), 和 PANACRYL™ (丙交酯与乙交酯的共聚物, 其上涂覆有己内酯与乙交酯的聚合物)。(Craig P. H., Williams J. A., Davis K. W., 等: A Biological Comparison of Polyglactin 910 and Polyglycolic Acid Synthetic Absorbable Sutures. Surg. 141;1010, (1975)) 和聚羟基乙酸。这些材料可以按照供应商供应的形式使用。

[0134] 在又一个实施方案中, 该基质或支架可以使用天然脱细胞器官的部分创建。生物结构, 或器官的部分可以通过除去该器官中的整个细胞和组织内容物来脱细胞。该脱细胞过程包括一系列的连续提取。这种提取过程的一个关键特征是避免了可能会扰乱或破坏生物结构的复杂下层结构 (infra-structure) 的恶劣提取。第一步骤涉及细胞碎片的除去和细胞膜的溶解。在此之后是核细胞质成分和核成分的溶解。

[0135] 优选地, 该生物结构, 例如器官的部分可通过采用温和的机械破碎法除去围绕该器官部分的细胞膜和细胞碎片来脱细胞。该温和的机械破碎法必须足以破坏细胞膜。然而, 该脱细胞过程应当避免损害或扰乱生物结构的复杂下层结构。温和的机械破碎法包括刮削该器官部分的表面、搅动该器官部分, 或者在合适体积的流体例如蒸馏水中搅拌该器官。在一个优选的实施方案中, 温和的机械破碎法包括将该器官部分在合适体积的蒸馏水中进行搅拌, 直至细胞膜破碎并且细胞碎片已从该器官中被除去为止。

[0136] 在细胞膜已被除去后, 除去该生物结构的核和细胞质成分。这可以通过在不破坏下层结构的情况下溶解细胞和核成分来进行。为了溶解核成分, 可以使用非离子型去污剂或表面活性剂。非离子型去污剂或表面活性剂的实例包括但不限于, 得自 Rohm and Haas of Philadelphia, Pa. 的 Triton 系列, 其包括可商购自许多供货商的 Triton X-100、Triton N-101、Triton X-114、Triton X-405、Triton X-705 和 Triton DF-16; Tween 系列, 如单月桂酸酯 (Tween 20)、单棕榈酸酯 (Tween 40)、单油酸酯 (Tween 80), 和聚氧乙烯-23-月桂基醚 (Brij. 35)、聚氧乙烯醚 W-1 (Polyox) 等、胆酸钠、脱氧胆酸盐、CHAPS、皂草苷 (saponin)、n-癸基-D-吡喃葡萄糖苷、n-庚基-D-吡喃葡萄糖苷、n-辛基-D-吡喃葡萄糖苷和 Nonidet P-40。

[0137] 本领域技术人员将会意识到所描述的属于前述分类和供货商的化合物可以商购获得并且可以见于 "Chemical Classification, Emulsifiers and Detergents", McCutcheon's, Emulsifiers and Detergents, 1986, North American and International Editions, McCutcheon Division, MC Publishing Co., Glen Rock, N. J., U. S. A. 和 Judith Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem. R., Hoechst Celanese Corp., 1987。在一个优选的实施方案中, 该非离子型表面活性剂是 Triton 系列, 优选 Triton X-100。

[0138] 该非离子型去污剂的浓度可以根据被脱细胞的生物结构的类型改变。例如, 对于纤细的组织, 例如血管, 应当降低该去污剂的浓度。非离子型去污剂的优选浓度范围可以为约 0.001 至约 2.0% (w / v)。更优选约 0.05 至约 1.0% (w / v)。甚至更优选约 0.1% 至约 0.8% (w / v)。在从约 0.001 至约 0.2% (w / v) 的这些范围的优选浓度中, 约 0.05 至约 0.1% (w / v) 是特别优选的。

[0139] 包括致密细胞质丝网络、细胞间复合物和顶端 (apical) 微细胞结构的细胞骨架成分可以使用碱性溶液如氢氧化铵进行溶解。由铵盐或其衍生物组成的其他碱性溶液也可以用来溶解细胞骨架成分。其他合适的铵溶液实例包括硫酸铵、醋酸铵和氢氧化铵。在优选的实施方案中,使用氢氧化铵。

[0140] 碱性溶液例如氢氧化铵的浓度可以根据被脱细胞的生物结构的类型改变。例如,对于纤细的组织如血管,应当降低去污剂的浓度。优选的浓度范围可以为约 0.001 至约 2.0%(w / v)。更优选约 0.005 至约 0.1%(w / v)。甚至更优选约 0.01%(w / v) 至约 0.08%(w / v)。

[0141] 脱细胞的冻干结构可以储存在合适的温度下直至需要使用。使用前,可以将脱细胞的结构平衡在合适的等渗缓冲液或细胞培养基中。合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、生理盐水、MOPS、HEPES、汉克平衡盐溶液 (Hank's Balanced Salt Solution) 等。合适的细胞培养基包括但不限于 RPMI 1640 培养基、Fisher's 培养基、Iscove's 培养基、McCoy's 培养基、Dulbecco's 培养基等。

[0142] 可使用的另一些其他生物相容性材料包括不锈钢、钛、硅酮、金和硅橡胶。

[0143] 该聚合物基质或支架可以加强。例如,可以在合成基质或支架形成期间添加加强材料,或者可以在植入前将加强材料附连至天然或合成基质。用于形成加强物的代表性材料包括经由受控速率的水解而被降解并被再吸收的天然或合成聚合物,例如胶原蛋白、聚(α -羟基酯)如聚(乳酸)、聚(羟基乙酸)、聚原酸酯和聚酸酐以及它们的共聚物。这些材料提供了可降解性、可管理性、尺寸和构造的最大控制。

[0144] 可以针对机械性能表征该生物可降解聚合物,例如使用英斯特朗试验仪 (Instron tester) 表征抗拉强度,通过凝胶渗透色谱法 (GPC) 表征聚合物分子量,通过差示扫描量热法 (DSC) 表征玻璃化转变温度,以及通过红外 (IR) 光谱表征键结构;可以针对毒理学通过初步筛选试验表征该生物可降解聚合物,所述初步筛选试验涉及 Ames 测定和体外致畸测定以及针对免疫原性、炎症、释放和降解研究的在动物中的植入研究。可以使用扫描电子显微术、利用放射性同位素的组织学和定量评估对体外细胞粘附和活力进行评估。也可以针对当植入在患者中时该材料降解所需的时间来表征该生物可降解材料。通过改变构造,例如厚度和筛目大小,该生物可降解材料可以在约 2 年或约 2 个月间的时间内,优选在约 18 个月与约 4 个月之间的时间内,最优选在约 15 个月与约 8 个月之间的时间内,最优选在约 12 个月与约 10 个月之间的时间内大幅度降解。如果需要,该生物可降解材料可以被构建成在约 3 年、或约 4 年或约 5 年或更多年的时间内不大幅度降解。

[0145] 聚合物基质或支架可以利用如上面描述的受控孔隙结构制造。该孔隙的尺寸可以用来确定细胞分布。例如,聚合物基质或支架上的孔隙可以大到使得细胞能够从一个表面迁移至对立表面的程度。或者,该孔隙可以小到使得在聚合物基质或支架的两侧之间存在流体连通,但是细胞不能通过的程度。用于实现这一目标的合适的孔隙尺寸可以为约 0.04 微米至约 10 微米直径,优选约 0.4 微米至约 4 微米直径。在一些实施方案中,聚合物基质或支架的表面可以包含大到足以允许细胞群体附连和迁移到其中的孔隙。该孔隙尺寸在聚合物基质或支架内部中可以减小,从而阻止细胞从聚合物基质或支架的一侧迁移到对侧。具有减小的孔隙尺寸的聚合物基质或支架的一个实施方案是小孔隙材料夹在两种大孔隙材料中间的层合结构。聚碳酸酯膜尤其合适,因为它们可以被制造成具有完全受控的孔

隙尺寸,如约 0.01 微米、约 0.05 微米、约 0.1 微米、约 0.2 微米、约 0.45 微米、约 0.6 微米、约 1.0 微米、约 2.0 微米和约 4.0 微米。在亚微米级下,聚合物基质或支架可能不能被细菌、病毒和其他微生物穿透。

[0146] 在设计每种离散基质或其部分时尤其涵盖了下列特征或标准:(i) 形状、(ii) 强度、(iii) 刚度和硬度,和 (iv) 缝合能力(该基质或其部分容易缝合或以其他方式附连至相邻组织的程度)。如本文所用的给定基质或支架的刚度由弹性模量,即表示用来使支架变形的每单位面积的应力与由该应力引起的变形量之间的比率的系数限定。(参见,例如 Handbook of Biomaterials evaluation, Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials, 第 2 版,由 Andreas F. von Recum 编著,(1999); Ratner 等, Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press (1996))。支架的硬度是指给定支架表现出来的柔韧程度(或缺少柔韧性)。

[0147] 这些标准中的每一个均是变量,可以改变该变量(通过尤其是选择材料和制造工艺来改变)从而使得该基质或其部分能被最佳地放置和修饰以处理计划用该基质或其部分进行处理的医学指征和生理功能。例如,包含用于膀胱替代、重建和/或扩张的基质或支架的材料必须具有足以支持缝合而不出现撕破的强度,同时具有足够的顺应性以便容纳变动量的尿液。

[0148] 任选地,该基质或支架应当被成形为使得在该基质或支架生物降解后,由此产生的重建膀胱在空的时候可以以类似于天然膀胱的方式皱缩,并且当尿管已从新器官或组织结构中除去而没有留下泄露点时,输尿管将不会被阻塞。该生物工程膀胱构建体可以作为一片制造,或者每个零件可以单独地制造,或者部件的组合可以作为特定零件制造。每个特定基质或支架零件均可以被制造成具有特定功能。另外,为便于制造可以制造特定零件。特定零件可以由特定材料构建,并且可以设计用于赋予特定性能。特定零件性能可以包括与原始组织(例如,输尿管)类似的 0.5-1.5MPa. sup. 2 的拉伸强度,和 30-100% 的极限伸长率,或者该拉伸强度可以在 0.5-28MPa. sup. 2 的范围内,极限伸长率可以在 10-200% 的范围内,并且压缩强度可以 <12。

[0149] 优选由纤维形成的网状结构,该纤维可以是单独或与其他纤维交织在一起的圆形、扇形、扁平、星形纤维。分支纤维的使用基于相同的原理,该原理的性质已被用来解决与体积增加成比例地增加表面积的问题。所有多细胞生物体都利用这种重复分支结构。分支系统代表器官之间的通信网络,以及单个器官的功能单元。种植和植入具有细胞的这种构造允许植入大量细胞,这些细胞中的每一个均暴露于宿主的环境下,为在实现新血管化时的营养物和废物的自由交换提供基础。可以根据期望的最终形式、结构和功能将该聚合物基质或支架制成柔性或刚性的。

[0150] 在一个优选的实施方案中,该聚合物基质或支架由平均纤维直径为 15. μ m 的聚羟基乙酸形成,并且使用 4-0 polyglactin 910 缝线配置成膀胱成形模具。在由此产生的结构上涂覆液化共聚物,例如每毫升二氯甲烷 80 毫克的 DL-丙交酯-乙交酯共聚物 50:50,以便获得足够的机械特性并设定它的形状。

[0151] 在进一步的实施方案中,在本发明的支架上涂覆生物相容性且生物可降解的形状设定材料。在一个实施方案中,该形状设定材料含有丙交酯-乙交酯共聚物。在另一个实施例中,该形状设定材料是液化的。

[0152] 在一个其他方面,本发明支架可以在植入前(在该聚合物基质或支架上种植细胞之前或之后)用添加剂或药物进行处理,例如从而促进植入后新组织的再生。因而,可以将,例如,生长因子、细胞因子、细胞外基质或支架组分,以及其他生物活性材料添加到聚合物基质或支架中,从而促进移植物愈合和新组织的再生。此类添加剂一般将根据被重建、替代或扩张的组织或器官进行选择,从而确保适当的新组织形成在移植的器官或组织(例如,用于促进骨愈合的此类添加剂,参见例如 Kirker-Head, C. A. Vet. Surg. 24(5):408-19(1995))中。例如,当聚合物基质(任选地种植有内皮细胞)用于扩张血管组织时,可以采用血管内皮生长因子(VEGF)(参见,例如美国专利第 5,654,273 号)来促进新血管组织的再生。如果采用添加的细胞,则可以添加超过此类可由种植在聚合物基质上的细胞产生的生长因子(如果存在)的任何量的量的生长因子和其他添加剂(例如,表皮生长因子(EGF)、肝素结合表皮样生长因子(HBGF)、纤维母细胞生长因子(FGF)、细胞因子、基因、蛋白质等)。提供的此类添加剂的量优选足以促进适合于将被替代、重建或扩张的组织或器官的类型的新组织再生(例如通过促使或加速宿主细胞浸润到移植物中来促进再生)。其他有用的添加剂包括抗菌剂如抗生素。

[0153] 一种优选的支撑基质或支架由交叉丝(crossing filament)组成,一旦细胞支撑体被植入后,该交叉丝可以通过使营养物作短距离扩散而使得细胞能够存活。该细胞支撑基质或支架随着植入后细胞团块的扩充而被血管化。

[0154] 植入前的体外三维结构构建体的建立促进在体内植入后的细胞最后终末分化,并且将对该基质的炎性反应的风险减至最小,从而避免移植物挛缩和缩小。

[0155] 该聚合物基质或支架在使用前可以采用任何已知方法进行灭菌。所采用的方法取决于在聚合物基质中使用的材料。灭菌方法的实例包括蒸汽、干热、辐射、气体如环氧乙烷、气体和煮沸。

[0156] 可以使用诸如溶剂浇铸、压缩模塑、拉丝、制作网状物(meshing)、浸滤(leaching)、编织和涂覆的方法使构成支架的合成材料成形。在溶剂浇铸中,将一种或多种聚合物在适当溶剂如二氯甲烷中的溶液浇铸成分支式浮雕结构(branching pattern relief structure)。在溶剂蒸发后,获得薄膜。在压缩模塑中,以多达 30,000 磅/平方英寸的压力将聚合物压成合适的图案。拉丝涉及从熔融聚合物拉制,制作网状物涉及通过将纤维压制成毡状材料而形成网状物。在浸滤中,将含有两种材料的溶液散布成接近构建体的最后形式的形状。接着,使用溶剂溶解掉其中一种组分,导致孔隙形成。(参见, Mikos, 美国专利第 5,514,378 号,该专利以引用的方式并入本文)。在成核(nucleation)时,将支架形状的薄膜暴露于产生辐射损坏材料的轨迹的放射性裂变产物中。接着,用酸或碱蚀刻该聚碳酸酯薄片,使得该辐射损坏的材料的轨迹变成孔隙。最后,可以使用激光来成形和燃烧通过许多材料的各个孔洞从而形成具有均匀孔隙尺寸的结构。涂覆是指用诸如液化共聚物(DL-丙交酯-乙交酯共聚物 50:50, 80mg/ml 二氯甲烷)的材料涂覆或渗透聚合物结构,从而改变它的机械性能。涂覆可以在一层或者多层中进行,直至获得期望的机械性能。这些成形技术可以组合使用,例如,聚合物基质或支架的编织、压缩模塑和胶合可以一同进行。此外,通过不同工艺成形的不同聚合物材料可以接合在一起从而形成复合形状。该复合形状可以是层状结构。例如,聚合物基质或支架可以附连至一种或多种聚合物基质上,从而形成多层聚合物基质或支架结构。该附连可以通过用液体聚合物胶合或通过缝合来进

行。另外,该聚合物基质或支架可以以固体块体形式形成,并且可以通过激光或其他标准机械加工技术成形为其期望的最终形式。激光成形是指使用激光除去材料的工艺。

[0157] 在优选的实施方案中,该支架由非编织聚羟基乙酸(PGA)毡和聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(PLGA)形成。在另一个优选的实施方案中,该支架是尿流改道支架。

[0158] 如 Bertram 等的美国公布申请 20070276507(以引用的方式整体并入本文)中所描述的,本发明的聚合物基质或支架可被成形为许多期望的构造从而满足许多整体系统、几何结构或空间限制。该基质可以是被成形为适形于层状排列的管腔器官或组织结构的尺寸和形状的三维基质。例如,在使用聚合物基质进行膀胱重建时,可以使用已被成形为适形于整个膀胱或膀胱一部分的尺寸和形状的三维基质。自然地,该聚合物基质可以被成形为具有不同的尺寸和形状从而适形于不同体型的患者的膀胱。任选地,该聚合物基质应当被成形为使得在该聚合物基质生物降解后,由此产生的重建膀胱在空的时候可以以类似于天然膀胱的方式皱缩。该聚合物基质也可以以其他方式成形从而适应患者的特殊需要。例如,先前受伤或残疾的患者可能具有不同的腹腔,并且可能需要适于装配的膀胱替代支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架和逼尿肌等效支架。

[0159] 在一方面,本发明涵盖了适合于与本文描述的平滑肌细胞群体一起使用的另外的支架。例如,可以提供适合于植入到肺中的支架。

[0160] A. 扩张或替代支架

[0161] 在一个其他方面,该聚合物基质或支架被成形为适形于膀胱的一部分。在一个实施方案中,成形的支架适合于替代接受者现有膀胱的至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90% 或至少约 95%。在一个其他方面,该聚合物基质或支架被成形为适形于膀胱的 100% 或所有部分。

[0162] 在一个实施方案中,该聚合物基质包含第一可植入的、生物相容性的、合成或天然的具有至少两个独立表面的聚合物基质或支架,和第二可植入的、生物相容性的、合成或天然的具有至少两个独立表面的聚合物基质或支架,它们被适配成彼此配合并且被成形为当配合时适形于需要治疗的管腔器官或组织结构的至少一部分。该第一和第二聚合物基质可以由细分成两个或更多不同部分的一个整体单元形成,或者由被适配成彼此配合的两个或更多不同部分形成。在一些实施方案中,该第一和第二聚合物基质一旦配合,便可以用于重建、扩张或替代管腔器官或组织结构。

[0163] 在一些实施方案中,该第一和第二聚合物基质是对称的,而在其他实施方案中,该第一和第二聚合物基质是不对称的。在一个实施方案中,该第一聚合物基质或支架呈现具有封闭拱形端部和敞开赤道边界的半球形或类似半球形形状,并且该第二聚合物基质或支架是被适配成与第一聚合物基质的赤道边界配合的套环(collar)。在另一个实施方案中,该第一和第二聚合物基质均呈现具有封闭拱形端部和敞开赤道边界的半球形或类似半球形形状。在又一个实施方案中,该第一和第二聚合物基质各自包含圆形或半圆形基座和至少 2 个从每个基座径向延伸的花瓣(petal)。在这个实施方案中,使该第一和第二聚合物基质的基座和花瓣状部分配合,从而创建中空的球形或类似球形基质或支架,使得带有凸缘的纵向椭圆形开口创建在配合的聚合物基质的一侧上,而圆形开口创建在与纵向开口对立的侧上。在另一个实施方案中,该第一和第二聚合物基质由包含被适配成配合的顶件、前件和侧件的 3 个部分制成。在这个实施方案中,该 3 个不同部分使用至少 3 个,优选 4 个竖直

接缝配合,从而形成冠状新膀胱构建体。该冠状构建体优选单独地用作用于管腔器官重建、扩张或替代的设备。在一个实施方案中,该构建体是膀胱扩张支架。膀胱扩张支架的一个实例描绘在图 1A-D 中。

[0164] 在另一个实施方案中,该构建体是膀胱替代支架。膀胱替代支架的一个实例描绘在图 2-D 中。

[0165] 另外,第一聚合物基质、第二聚合物基质或两者可以含有至少一个接受器或端口,该接受器或端口被适配成在原始管或管需要构建体的连接时接受管状管或插入件。该管或插入件本身是,例如,圆柱形或管形状聚合物基质,其各自具有位于圆柱形聚合物第一端部上的至少一个凸缘。该管或插入件优选地由与上面描述的第一或第二聚合物基质相同的生物相容性材料组成。在一些实施方案中,该管或插入件还含有被适配成装配在圆柱形或管状管或插入聚合物基质周围的垫圈。例如,该垫圈是水凝胶。该圆柱形或管状管或插入件可以任选地含有垫圈。该垫圈可以是水凝胶。另外,该圆柱形或管状插入件可以是自我稳定的插入件。

[0166] 在另一个实施方案中,被适配成在原始管或管需要支架或基质(一旦种植有细胞)的连接时接受管状管或插入件的接受器或端口也适用于下面讨论的其他基质。

[0167] 在一方面,该支架是包括至少两个基质的器官或组织结构替代支架。在一个实施方案中,该支架包含具有第一表面的第一基质和具有第一表面的第二基质。该第一基质和第二基质可以经配置或适配以配合。在另一个实施方案中,该第一基质和第二基质可以被成形为当配合时适形于管腔器官的至少一部分。该第一和第二基质可以包含生物相容性材料。该生物相容性材料可以包含生物可降解材料。

[0168] 在一个实施方案中,第一基质可以呈现具有封闭端部和敞开赤道边界的半球形形状,并且第二基质可以具有被配置或适配成与第一基质的赤道边界配合的套环。该封闭端部可以是拱形。在另一个实施方案中,该第一基质和第二基质可以均呈现为具有封闭端部和敞开赤道边界的半球形形状。该封闭端部可以是拱形。在又一个实施方案中,第一基质可以进一步包含沿着第一基质的至少一个边界的带凸缘区域。第二基质可以进一步包含沿着第二基质的至少一个边界的带凸缘区域,并且其中第二基质的带凸缘区域被适配成与第一基质的带凸缘区域配合。

[0169] 在一个实施方案中,该支架包含第一生物相容性基质和第二生物相容性基质,其中该第一和第二基质可以各自包含基座,并且可以经配置或适配以配合。在一个实施方案中,该第一和第二基质可以被成形为当配合时适形于管腔器官的至少一部分。在另一个实施方案中,该第一和第二基质可以进一步包含至少两个从每个基座径向延伸的花瓣。

[0170] 在一个其他实施方案中,该第一和第二基质中的每个均可以最初源自包含基座和至少四个花瓣的型板。在一种构造中,一双对立的花瓣的长度可以短于其他花瓣。在另一个实施方案中,该第一和第二基质可以具有被适配成配合的两个不同单元。

[0171] 在一个实施方案中,该第一和第二基质的基座经适配以配合。在一些实施方案中,该第一和第二基质经由该第一和第二基质的花瓣状部分配合。

[0172] 在其他实施方案中,该第一和第二基质可以被配置或适配成形成中空的球形或类似球形形状,其具有在介于第一基质与第二基质之间的第一配合点处的纵向开口,和在介于第一基质与第二基质之间的第二配合点处的与纵向开口对立的圆形开口。该支架可以进

一步包括整合到第一或第二基质的基座中的至少一个侧翼 (flap)。在另一个实施方案中, 纵向开口具有唇缘 (lip) 和设置在纵向开口的唇缘处的至少一个侧翼。

[0173] 在另一方面, 该一个基质或多个基质可以连接至原始管。在一个实施方案中, 该第一基质、第二基质或两者各自被配置或适配成接受原始管。在另一个实施方案中, 该第一基质、第二基质或两者进一步包含至少一个接受器。该至少一个接受器可以被配置或适配成接受管状插入件。该管状插入件可以设置在接受器内。在一些实施方案中, 该管状插入件具有端部。该插入件可以具有位于该端部处的至少一个凸缘。在另一个实施方案中, 该管状插入件可以被配置或适配成连接至原始管。在进一步实施方案中, 该支架具有表面和围绕管状插入件设置的垫圈。该垫圈可以被配置或适配成形成介于凸缘和构建体的表面之间的不透水密封。在一些实施方案中, 该垫圈包含水凝胶。

[0174] 图 1 和 2 提供了包括至少两个基质的支架构造的代表性描述。

[0175] 在一方面, 该支架是包括一个或多个基质的器官或组织结构扩张支架。在一个实施方案中, 该支架包括具有基座和多个凹口的第一基质, 其中该第一基质被适配成形成当组装时适形于管腔器官的至少一部分的半形 (hemi-shape)。在另一个实施方案中, 该支架包括第二和第三基质, 其中第一、第二和第三基质可以经配置或适配以配合, 并且被成形为当配合时适形于管腔器官的至少一部分。第一、第二和第三聚合物基质可以来源于包含三个细分部分的型板。在另一个实施方案中, 第一、第二和第三基质来源于三个不同的型板, 并且可以经配置或适配以配合。在一个其他实施方案中, 第一、第二和 / 或第三基质包含生物相容性材料。该生物相容性材料可以包含生物可降解材料。

[0176] 在一个其他方面, 该支架由具有不同形状或构造的部分构成。在一个实施方案中, 该支架可以包括分别与顶件、前件和侧件对应的第一、第二和第三聚合物基质, 当它们配合在一起时形成第一冠状。在另一个实施方案中, 该前件和侧件可以各自包含第一边缘和第二边缘。该前件的第一边缘可以接合至该侧件的第一边缘。该前件的第二边缘可以接合至该侧件的第二边缘。在一个其他实施方案中, 该第一边缘可以通过接缝接合, 和 / 或该第二边缘可以通过接缝接合。在其他实施方案中, 该前件可以包括具有第一边缘和第二边缘的凹口。该第一和第二边缘可以例如通过接缝接合。在另一个实施方案中, 该顶件可以具有第一边缘, 该侧件具有第三边缘, 并且该前件具有第三边缘。该顶件的第一边缘可以接合至该侧件的第三边缘, 和 / 或该顶件的第一边缘可以接合至该前件的第三边缘。该第一和第三边缘可以通过接缝接合。在另一个实施方案中, 每个凹口都可以具有第一边缘和第二边缘。这些边缘可以例如通过接缝接合。在其他实施方案中, 该侧件可以包括至少一个侧翼。

[0177] 在所有实施方案中, 支架中的每个单独基质或所有基质都可以包含生物可降解材料。该材料可以选自由聚羟基乙酸、聚乳酸以及羟基乙酸和乳酸的共聚物组成的组。在其他实施方案中, 该一个基质或多个基质包含聚羟基乙酸以及羟基乙酸和乳酸的共聚物。

[0178] 在一个实施方案中, 该管腔器官是管状器官或中空器官。该器官可以是泌尿生殖器官。在另一个实施方案中, 该泌尿生殖器官选自由膀胱、输尿管和尿道组成的组。在一个其他实施方案中, 该泌尿生殖器官是膀胱或膀胱段。在一些实施方案中, 所使用的支架被配置或适配成形成表现出天然膀胱组织的顺应性的在体内再生的膀胱组织。

[0179] 在一个实施方案中, 配合的基质与沉积的细胞一起形成可植入构建体。在另一个实施方案中, 该至少第一细胞群体包含如本文描述的肌肉细胞群体。该肌肉群体可以是平

滑肌细胞群体。

[0180] 在另一个实施方案中,该支架可以具有沉积在第一基质的第一表面、第二基质的第一表面或两者上或中的至少第一细胞群体。在一个其他实施方案中,该支架可以进一步包括沉积在第一基质的第二表面、第二基质的第二表面或两者上或中的第二细胞群体。该第二细胞群体包含尿路上皮细胞。

[0181] 本文描述的扩张和替代支架,以及制备和使用它们的方法进一步描述于 Bertram 等的美国公布专利申请第 20070276507 号(其以引用的方式整体并入本文)中。

[0182] B. 泌尿管道支架

[0183] 本发明提供了可以种植细胞并且可以用作用于受试者中的尿流改道构建的胃肠组织的替代物的新尿流改道或管道支架。例如,本文描述的新尿流改道可以在根治性膀胱切除术治疗将以其它方式经受回肠袢改道的患者之后应用。

[0184] 在一方面,本发明涵盖了适合于用作有需要的受试者中的尿流改道、由如本文描述的方法形成的管道支架或基质。该管道支架的一个端部可以连接至一条或多条输尿管,而另一端部可以连接至位于受试者身体外部的尿液储器。在一个实施方案中,该管道可以由气门离开受试者的身体。在另一个实施方案中,该聚合物基质包含以管状形式提供的第一可植入、生物相容性、合成的聚合物基质或支架。在一些实施方案中,该管状支架包含被配置成连接至受试者的输尿管的第一端部。在另一个实施方案中,该第一支架进一步包括被配置成在受试者中形成气门或括约肌的第二端部。在另一个实施方案中,该第一支架进一步包括被配置成连接至至少一条输尿管的至少一个侧开口。在一些实施方案中,该第一支架包括被配置成附连至第一输尿管的第一侧开口和被配置成附连至第二输尿管的第二侧开口。

[0185] 在一方面,该支架被设计成柔性的,以便附连至受试者中的一条或两条输尿管。在一个实施方案中,该支架可以具有用于附连至管状结构侧面上的输尿管的一个或多个开口。在另一个实施方案中,该支架可以具有在管状结构的一个端部处的用于附连至输尿管的开口。如果待附连输尿管的端部与支架端部之间的距离小于输尿管的端部与支架侧面之间的距离,则将输尿管附连至该结构的一个端部而不是侧面可使输尿管承受较小的应力。

[0186] 在一方面,该管状管道支架所包含的该管的一个端部充当从一条或两条输尿管经过管状支架,最终从接受者身体内排出的尿液的流出端部。在一个实施方案中,该支架的流出端部被配置成终止于接受者的腹腔壁。图 11B(组 A) 示出该支架的示例性构造。

[0187] 在另一个实施方案中,该支架的流出端部被配置成通过腹壁延伸,即,经腹延伸,并且直接连接至皮肤气门的皮下层,即,经由皮肤连接至皮肤气门的皮下层。图 11B(组 B) 示出该支架的示例性构造。

[0188] 本领域普通技术人员将会了解不同的构造将取决于接受者的腹腔的特定尺寸。

[0189] 在一个其他实施方案中,该管状结构包括包含匀整边缘的第一端部,和包含非均匀或不匀整边缘的第二端部。该非均匀边缘可以包括圆形基座,该基座具有从该基座径向延伸的许多花瓣。花瓣的数目可以是 1、2、3、4、5 或 6 个。该不匀整边缘可以包含一系列花瓣,例如,图 3 中所示的那些。在一个实施方案中,该管状结构具有适合于用作有需要的患者中的尿流改道系统或管道的形式。在另一个实施方案中,该系统使尿液从一条或多条输尿管改道至腹壁段,例如,在输尿管造口术的情况下便是如此。在其他实施方案中,该系统

使尿液从膀胱改道至腹壁段,例如,在膀胱造口术的情况下便是如此。在一个其他实施方案中,该系统将膀胱连接至尿道。在又一个实施方案中,第一系统可以使尿液从一条或多条输尿管改道至腹壁段,而第二系统可以使尿液从膀胱改道至腹壁段。在所有实施方案中,该系统可以使尿液从一条或多条输尿管改道至腹壁段,例如在形成气门时便是如此。

[0190] 在另一个实施方案中,该管状基质或支架是尿流改道或管道支架。

[0191] 在一个实施方案中,该尿流改道系统的管状结构具有长方形、圆形或三角形的横截面面积。图 3A 示出本文涵盖的不同横截面构造中的一些。

[0192] 在另一个实施方案中,管状结构保留了足够的硬度从而在植入后保持通畅。在一个其他实施方案中,在管状结构的管腔中使用或不使用导管来维持该管状结构的硬度。若使用导管,则可以将它放置到管状结构的管腔空间中从而提供另外的通畅。

[0193] 在一个其他实施方案中,该管道支架可以进一步包括圆形或卵形连接器形式的第二支架,该第二支架被配置成将第一支架的第一端部连接至输尿管。在又一个实施方案中,该管道支架可以进一步包括垫圈环形式的第三支架,该第三支架被配置成利用第一管状支架的第二端部形成气门或括约肌从而在受试者中创建气门。图 3B 示出尿流改道构建体的变型(A—敞开要求的卵形;B—敞开要求的卵形接受器;C—闭合卵形接受器和三根管子)。

[0194] 在一些实施方案中,该管状结构可以包括用于连接至组织、器官或身体部分从而获得用于创建可控性气门或括约肌的吻合口的垫圈结构。在另一个实施方案中,该垫圈具有约小于 1mm、约小于 1.5mm、约小于 2mm、约小于 2.5mm、约小于 3mm、约小于 3.5mm、约小于 4mm、约小于 4.5mm,或约小于 5mm 的厚度。

[0195] 在一个实施方案中,该尿流改道或管道支架被成形为图 3 中所示的构造。

[0196] 在一个其他实施方案中,该管状结构包括包含匀整边缘的第一端部,和包含非均匀或不匀整边缘的第二端部。该非均匀边缘可以包括一个或多个紧固件,该紧固件被配置用于例如在形成位于受试者身体外部的的气门时附连至受试者的外部区域。在一个实施方案中,该管状结构的第一和第二端部可以为图 3 中所示的形式。该紧固件的数目可以为 1、2、3、4、5 或 6。

[0197] 在另一个实施方案中,该管状支架是图 27 中描绘的形式。

[0198] 图 4A 示出人泌尿系统的正常解剖结构的一部分。

[0199] 在一个实施方案中,该管状结构具有适合于在有需要的患者中用作尿流改道或管道的形式。在另一个实施方案中,该管道使尿液从一条或多条输尿管改道至腹壁段,例如在输尿管造口术(图 4D)的情况下便是如此。在其他实施方案中,该管道使尿液从膀胱改道至腹壁段,例如在膀胱造口术(图 4B)的情况下便是如此。在一个其他实施方案中,该管道将膀胱连接至尿道(图 4D)。在又一个实施方案中,第一管道可以使尿液从一条或多条输尿管改道至腹壁段,而第二管道可以使尿液从膀胱改道至腹壁段。在所有实施方案中,该管道可以使尿液从一条或多条输尿管改道至腹壁段(图 4B)。在所有实施方案中,该管道可以被配置成形成气门。

[0200] 在一个实施方案中,该尿流改道或管道支架的管状结构具有长方形、圆形或三角形的横截面面积。在另一个实施方案中,管状结构保留了足够的硬度从而在植入后保持通畅。在一个其他实施方案中,在管状结构的管腔中使用或不使用导管来维持该管状结构的硬度。在一些实施方案中,泌尿改道支架进一步包括被配置成在植入后放置在管状结构的

管腔空间内的导管。在一个实施方案中,该导管是Foley样气囊导管。若使用导管,则可以将它放置到管状结构的管腔空间中从而提供另外的通畅。本领域普通技术人员将会了解本领域中已知的其他导管可能适合于与本发明一起使用。

[0201] 在另一个实施方案中,该支架的管状壁厚度将小于约2mm、小于约2.5mm、小于约3.5mm、小于约4mm、小于约4.5mm、小于约5mm、小于约5.5mm或小于约6mm。

[0202] 在一些实施方案中,该支架可以具有可变的外径和内径。在一个实施方案中,该支架的端部可以是扩口式、非扩口式、密封的或滚圆的。

[0203] 在其他实施方案中,尿液可穿透该支架。在一个实施方案中,该支架的孔隙尺寸为约大于约0微米至约500微米。在另一个实施方案中,该孔隙尺寸为约100微米至约200微米。在另一个实施方案中,该孔隙尺寸为约150微米至约200微米。在其他实施方案中,该孔隙尺寸为约100微米、约110微米、约120微米、约130微米、约140微米、约150微米、约160微米、约170微米、约180微米、约190微米或约200微米。在一些实施方案中,该孔隙尺寸为约100微米、约200微米、约300微米、约400微米、约500微米或约600微米。在其他实施方案中,该支架包括为单一孔隙尺寸分布、多个孔隙尺寸分布或孔隙梯度分布的孔隙体系结构。

[0204] 在另一个实施方案中,该支架材料是可缝合材料,并且可以与耐泄露的组织形成连接。

[0205] 在其他实施方案中,对管状支架材料进行选择,以便在植入使用的整个持续时间内维持通畅,支持细胞粘附和宿主组织向内生长,并保留柔韧性。在另一个实施方案中,该材料将具有超出它在正常体内流体循环期间将经受的压力的破裂强度。在其他实施方案中,该材料将具有与向内生长的宿主组织相当的降解时间。

[0206] 本文描述的管道支架以及制备和使用它们的方法进一步描述于Ludlow等的美国公布申请第20100131075号(其以引用的方式整体并入本文)中。

[0207] C. 肌肉等效物

[0208] 在一方面,本发明的聚合物基质或支架是肌肉等效支架。在一个实施方案中,该肌肉等效支架是逼尿肌等效支架。在另一个实施方案中,该支架适合于在腹腔镜下植入。

[0209] 在一方面,该聚合物基质包含被成形为适形于需要所述治疗的器官或组织结构的至少一部分并且具有足够用于在腹腔镜下植入的尺寸的聚合物基质或支架。在某些实施方案中,本发明的聚合物基质或支架长度在约3cm与20cm之间。在一个实施方案中,该聚合物基质或支架的最大长度为约20cm。在另一个实施方案中,该聚合物基质或支架的最大长度为约15cm。在另一个实施方案中,该聚合物基质或支架的最大长度为约10cm。在另一个实施方案中,该聚合物基质或支架的最大长度为约8cm。在另一个实施方案中,该聚合物基质或支架的最大长度为约4cm。在又一个实施方案中,该聚合物基质或支架的最大长度为约3cm。在某些实施方案中,本发明的聚合物基质或支架的宽度在约1cm与约8cm之间。在一些实施方案中,该聚合物基质或支架的最大宽度为约4cm。在其他实施方案中,该聚合物基质或支架的最大宽度为约3cm。在又一个实施方案中,该聚合物基质或支架的最大宽度为约5cm。

[0210] 在一个实施方案中,该聚合物基质或支架具有三维(3-D)形状。在另一个实施方案中,该聚合物基质或支架具有扁平的形状(flat shape)。在一个实施方案中,该扁平形状

的聚合物基质或支架包含预处理区域从而允许更大的柔韧性。在某些实施方案中,该预处理区域包覆在待折皱的区域中。在一个实施方案中,该聚合物基质或支架具有足够的延展性从而能够被卷起、折叠,或以其他方式成形用于通过腹腔镜管和 / 或端口植入。在此类实施方案中,该聚合物基质或支架具有足够的延展性从而能够在通过腹腔镜管和 / 或端口插入后被展开、解开或以其他方式恢复形状。在一个实施方案中,在通过腹腔镜管和 / 或端口植入之前,该聚合物基质或支架被切割成 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带。在某些实施方案中,在通过腹腔镜管和 / 或端口植入之前使该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带配合。该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带可以使用胶合剂、卡钉、缝线或本领域技术人员已知的其他技术进行配合。在此类实施方案中,折叠和 / 或堆叠该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个配合的条带从而使其通过腹腔镜管和 / 或端口。在此类实施方案中,在通过腹腔镜管和 / 或端口插入后,解开和 / 或散开该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带。在一些实施方案中,在通过腹腔镜管和 / 或端口插入后,适当地张紧先前放置的配合工具。

[0211] 在一个实施方案中,该聚合物基质包含以补片形式或条带形式提供的第一可植入、生物相容性、合成或天然的聚合物基质或支架。在一个实施方案中,该补片具有适合于在有需要的患者膀胱中用作逼尿肌等效物的形式。在一个其他实施方案中,该补片具有适合于增加有需要的患者现有膀胱的体积容量的形式。在某些实施方案中,该补片使膀胱尺寸增加约 50mL 至约 500mL。在一些实施方案中,该补片将使膀胱尺寸以 50mL 的增量增加。在一些实施方案中,该补片使膀胱尺寸增加约 450mL。在一个实施方案中,表面积增加 30cm² 使得膀胱体积从 200mL 增加至 250mL。在另一个实施方案中,增加 25cm² 使得膀胱体积从 350mL 增加至 400mL。在一个实施方案中,该支架具有约 30cm² 的二维表面积。在另一个实施方案中,该支架具有约 25cm² 的二维表面积。在一个实施方案中,该补片为条形、盘形、方形、椭圆体或任何其他适当的构造的形式。在其他实施方案中,该补片以例如像手风琴一样的预折叠形式提供。

[0212] 图 5A-B 示出肌肉等效支架或聚合物基质的实例。在一个实施方案中,该聚合物基质或支架呈现双楔形形状,例如图 5A 中所示的形状。在另一个实施方案中,使该聚合物基质成形为图 6-9 所示构造中的一种构造。在图 9D 中,该折叠使得该植入物能够通过 12mm 管。

[0213] 在所有实施方案中,该聚合物基质或支架都被成形为使得将膀胱和基质或支架上的应力减至最小。

[0214] 在另一个实施方案中,该聚合物基质包含以补片形式或条带形式提供的第一可植入、生物相容性、合成或天然的聚合物基质或支架。在一个实施方案中,该补片具有适合于在有需要的患者膀胱中用作逼尿肌等效物的形式。在一个其他实施方案中,该补片具有适合于增加有需要的患者现有膀胱的体积容量的形式。在一些实施方案中,该补片将使膀胱尺寸以 50mL 的增量增加。在一个实施方案中,该补片为条形、盘形、方形、椭圆体或任何其他适当的构造的形式。在其他实施方案中,该补片以例如像手风琴一样的预折叠形式提供。

[0215] 在一个实施方案中,使该聚合物基质成形为图 1-9 所示构造中的一种构造。

[0216] 在另一个实施方案中,根据图 10-13 所示构造的一种构造将该聚合物基质植入到有需要的受试者中。

[0217] 在所有实施方案中,用于这些基质或支架的生物相容性材料都是例如生物可降解

的。在所有实施方案中,该生物相容性材料都可以是聚羟基乙酸。在所有实施方案中,该聚合物基质或支架上都涂覆有生物相容性且生物可降解的形状设定材料。在一个实施方案中,该形状设定材料可以包含液体共聚物。在另一个实施方案中,该液体共聚物可以包含液化丙交酯 / 乙交酯共聚物。在一个实施方案中,该液体共聚物可以包含 DL- 丙交酯 - 乙交酯共聚物。

[0218] 本文描述的肌肉等效支架以及制备和使用它们的方法进一步描述于 Ludlow 等的美国公布申请第 20100131075 号 (其以引用的方式整体并入本文) 中。

[0219] 5. 构建体

[0220] 在一方面,本发明提供了种植有至少一种细胞群体的一个或多个聚合物支架或基质。此类已种植有细胞群体的支架在本文可以称为“构建体”。在一个实施方案中,该一个或多个细胞种植的聚合物基质形成选自下列组成的组的新膀胱构建体:膀胱替代构建体、膀胱扩张构建体、膀胱管道构建体和逼尿肌等效构建体。

[0221] 本领域技术人员将会意识到,本文描述的一种或多种细胞群体的种植或沉积可以通过本领域中已知的各种方法实现。例如,可以使用生物反应器孵育和培养 (Bertram 等,美国公布申请 20070276507;McAllister 等,美国专利 7,112,218;Auger 等,美国专利 5,618,718;Niklason 等,美国专利 6,537,567);压力诱导的种植 (Torigoe 等,(2007)Cell Transplant., 16(7):729-39;Wang 等,(2006)Biomaterials. May;27(13):2738-46);以及静电种植 (Bowlin 等,美国专利 5,723,324)。另外,同时用细胞气溶胶涂覆静电纺丝纤维的最新技术可能适合于种植或沉积 (Stankus 等,(2007)Biomaterials, 28:2738-2746)。

[0222] 在一个实施方案中,细胞沉积包括使支架与细胞粘附增强蛋白接触的步骤。在另一个实施方案中,该增强蛋白是下列的一种或多种:纤维连接蛋白、胶原蛋白和 MATRIGEL™。在一个其他实施方案中,该支架不含细胞粘附增强蛋白。在另一个实施方案中,细胞沉积包括在使支架与细胞群体接触后培养的步骤。在又一个实施方案中,该培养可以包括经由生物反应器中的脉动流和 / 或稳定流的调节。

[0223] 然后可以将从如本文描述的腹膜组织中分离的平滑肌细胞群体种植在本文描述的支架上。该腹膜组织可以是网膜组织。

[0224] 以下是用于将网膜来源的平滑肌细胞种植在支架上的方案的代表性实例。可以将网膜来源的平滑肌细胞扩充数周 (例如,多达 7 周) 从而产生需要用来种植到支架上的细胞量。下面描述了适合于种植到支架上的细胞密度。可以将网膜来源的平滑肌细胞扩充许多代,然后收获细胞用于种植到支架上从而产生构建体。为了制备用于细胞种植的支架,可以将合适的材料 (例如,PGA 毡) 切割成一定尺寸,将其缝合成适当的形状,并用材料 (例如,PLGA) 涂覆。然后可以采用合适的方法 (例如,环氧乙烷) 对支架进行灭菌。在细胞种植前一天,可以通过用 60% 乙醇 / 40% D-PBS、100% D-PBS、D-MEM / 10% FBS 或 α -MEM / 10% FBS 饱和,接着在 D-MEM / 10% FBS 或 α -MEM / 10% FBS 中在室温下孵育过夜来连续地预先润湿灭菌的支架。然后将网膜来源的平滑肌细胞种植到该支架上,并且使经种植的构建体在加湿的 37°C 孵育器中在 5% CO₂ 下成熟,直至植入到受试者中 (例如,直到第 7 天)。本领域普通技术人员将会了解制备用于种植细胞的支架和将细胞种植到支架上的另外的方法。

[0225] 在一方面,本发明提供了制备具有腹膜来源的平滑肌细胞的构建体的方法。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:a) 获取人腹膜组织样品;b) 从该样品中分离平滑肌

细胞群体;c) 培养该细胞群体;以及 d) 使该细胞群体与成形的聚合物基质细胞构建体接触。该人腹膜组织样品可以从自体或非自体来源获得。该人腹膜组织样品可以是网膜组织。在一个其他实施方案中,该方法进一步包括检测平滑肌细胞标记的表达的步骤。在另一个实施方案中,该表达是 mRNA 表达。在进一步实施方案中,该表达是多肽表达。在一个实施方案中,该多肽表达通过细胞内免疫荧光检测。

[0226] 在一个实施方案中,该支架包含如本文描述的细胞群体。在另一个实施方案中,该支架基本上由如本文描述的细胞群体组成。在一个其他实施方案中,该支架由如本文描述的细胞群体组成。

[0227] 该第一聚合物基质或第二聚合物基质(如果存在)或者两者包含沉积在第一聚合物基质的第一表面、第二聚合物基质的第一表面或两者上或中的至少一种细胞群体,从而形成基质或支架加细胞的构建体,其中该至少一种细胞群体基本上包含肌肉细胞群体。该肌肉细胞群体是例如平滑肌细胞群体。在优选的实施方案中,该第一表面和第二表面均为该第一和第二聚合物基质的外表面。

[0228] 在另一个实施方案中,含有基质和细胞的构建体不含任何其他细胞群体。在优选的实施方案中,该构建体不含尿路上皮细胞。

[0229] 这些构建体用来向有需要的受试者提供管腔器官或组织结构,如泌尿生殖器官,包括例如膀胱、输尿管和尿道。该受试者可能需要重建、扩张或替代此类器官或组织。在一个实施方案中,该管腔器官或组织结构是膀胱或其部分,并且该聚合物基质或支架具有沉积在该基质表面上的平滑肌细胞。该构建体也可以用来提供尿流改道或管道或逼尿肌等效物。

[0230] 在一方面,本发明提供了种植有本文描述的细胞群体的尿流改道或管道支架或基质。此类已种植有细胞群体的支架在本文可以称为“构建体”。在一个实施方案中,尿流改道或膀胱管道构建体由如本文描述的一个或多个支架,和沉积在如本文描述的一个或多个支架的一个或多个表面上的细胞群体构成。

[0231] 在一方面,本发明提供了尿流改道构建体以及制备和使用它们的方法。在一个实施方案中,尿流改道供受试者的缺陷的膀胱用,并且包括(a) 第一可植入的生物相容性构建体,该构建体包含管状支架,该管状支架具有被配置成连接至腹壁段的第一端部、第二封闭端部,和被配置成连接至第一输尿管的至少第一侧开口;和(b) 沉积在该支架表面上或表面中的腹膜来源的细胞群体。在另一个实施方案中,尿流改道供受试者的缺陷膀胱用,并且包括(a) 被适配成尿液临时储存器和通道的可植入的生物相容性管状支架,该支架包含被配置成连接至在受试者腹壁中的开口的第一端部、第二封闭端部,和被适配成连接至第一输尿管从而允许尿液从第一输尿管通过而到达管状支架内部的至少第一侧开口;和(b) 沉积在支架表面上或表面中的腹膜来源的细胞群体。

[0232] 在一个实施方案中,本发明提供了制备供有需要受试者的缺陷的膀胱用的尿流改道构建体的方法,其包括以下步骤:a) 提供第一可植入的生物相容性支架,该支架包含管状支架,该管状支架具有被配置成与腹壁段接触的第一端部、第二封闭端部,和被配置成连接至第一输尿管的至少第一侧开口;和 b) 将腹膜来源的细胞群体沉积在该支架的第一区域上或第一区域中从而形成尿流改道构建体。在另一个实施方案中,该方法包括以下步骤:a) 提供被适配成尿液的临时储存器和通道的可植入的生物相容性管状支架,该支架包含被

配置成连接至在受试者腹壁中的开口的第一端部、第二封闭端部,和被适配成连接至第一输尿管从而允许尿液从第一输尿管通过而到达管状支架内部的至少第一侧开口;和 b) 将腹膜来源的细胞群体沉积在支架表面上或表面中从而形成尿流改道构建体。

[0233] 在一方面,本发明给有需要的受试者提供了肌肉等效构建体,该肌肉等效构建体可用来增强现有管腔器官或组织结构,如泌尿生殖器官,包括例如膀胱。该受试者可能需要此类器官或组织的扩充或治疗。在一个实施方案中,该管腔器官或组织结构是膀胱或其部分,并且该聚合物基质或支架具有沉积在该基质表面上的平滑肌细胞。在一个实施方案中,该构建体用来提供逼尿肌肌肉等效物。

[0234] 本领域普通技术人员将会了解存在将细胞群体沉积在基质或支架上的数种合适的方法。

[0235] 在一方面,该构建体适合于植入到需要新器官或组织结构的受试者中。在一个实施方案中,该构建体包含产生细胞因子 MCP-1 的一类细胞。在另一个实施方案中,MCP-1 诱使受试者或接受者的原始间充质干细胞迁移至植入部位。在一个实施方案中,迁移的接受者的原始间充质干细胞有助于新器官或组织结构的再生。

[0236] 在一个其他方面,本发明提供了具有以特定细胞密度种植的细胞的支架。在一个实施方案中,支架上以约 20×10^6 至约 30×10^6 个细胞的细胞密度种植了平滑肌细胞群体。在另一个实施方案中,该细胞密度为约 1×10^6 至约 40×10^6 、约 1×10^6 至约 30×10^6 、约 1×10^6 至约 20×10^6 、约 1×10^6 至约 10×10^6 或约 1×10^6 至约 5×10^6 。

[0237] 在进一步实施方案中,该细胞密度为约 20×10^6 至约 98×10^6 个细胞。在又一个进一步实施方案中,该细胞密度为约 21×10^6 至约 97×10^6 、约 22×10^6 至约 95×10^6 、约 23×10^6 至约 93×10^6 、约 24×10^6 至约 91×10^6 、约 25×10^6 至约 89×10^6 、约 26×10^6 至约 87×10^6 、约 28×10^6 至约 85×10^6 、约 29×10^6 至约 83×10^6 、约 30×10^6 至约 80×10^6 、约 35×10^6 至约 75×10^6 、约 40×10^6 至约 70×10^6 、约 45×10^6 至约 65×10^6 , 或约 50×10^6 至约 60×10^6 。在优选的实施方案中,该细胞密度为约 24×10^6 至约 91×10^6 个细胞。

[0238] 在另一个实施方案中,该细胞密度为约 2.5×10^6 至约 40×10^6 、约 5×10^6 至约 40×10^6 、约 7.5×10^6 至约 35×10^6 、约 10×10^6 至约 30×10^6 、约 15×10^6 至约 25×10^6 , 和约 17.5×10^6 至约 22.5×10^6 。在另一个实施方案中,该细胞密度为约 1×10^6 、约 2×10^6 、约 3×10^6 、约 4×10^6 、约 5×10^6 、约 6×10^6 、约 7×10^6 、约 8×10^6 、约 9×10^6 、约 10×10^6 、约 11×10^6 、约 12×10^6 、约 13×10^6 、约 14×10^6 、约 15×10^6 、约 16×10^6 、约 17×10^6 、约 18×10^6 、约 19×10^6 、约 20×10^6 、约 21×10^6 、约 22×10^6 、约 23×10^6 、约 24×10^6 、约 25×10^6 、约 26×10^6 、约 27×10^6 、约 28×10^6 、约 29×10^6 、约 30×10^6 、约 31×10^6 、约 32×10^6 、约 33×10^6 、约 34×10^6 、约 35×10^6 、约 36×10^6 、约 37×10^6 、约 38×10^6 、约 39×10^6 、约 40×10^6 、约 41×10^6 、约 42×10^6 、约 43×10^6 、约 44×10^6 、约 45×10^6 、约 46×10^6 、约 47×10^6 、约 48×10^6 、约 49×10^6 、约 50×10^6 、约 51×10^6 、约 52×10^6 、约 53×10^6 、约 54×10^6 、约 55×10^6 、约 56×10^6 、约 57×10^6 、约 58×10^6 、约 59×10^6 、约 60×10^6 、约 61×10^6 、约 62×10^6 、约 63×10^6 、约 64×10^6 、约 65×10^6 、约 66×10^6 、约 67×10^6 、约 68×10^6 、约 69×10^6 、约 70×10^6 、约 71×10^6 、约 72×10^6 、约 73×10^6 、约 74×10^6 、约 75×10^6 、约 76×10^6 、约 77×10^6 、约 78×10^6 、约 79×10^6 、约 80×10^6 、约 81×10^6 、约 82×10^6 、约 83×10^6 、约 84×10^6 、约 85×10^6 、约 86×10^6 、约 87×10^6 、约 88×10^6 、约 89×10^6 、约 90×10^6 、约 91×10^6 、约 92×10^6 、约 93×10^6 、约 94×10^6 、约 95×10^6 、约 96×10^6 、

约 97×10^6 、约 98×10^6 或约 99×10^6 。

[0239] 在进一步方面,本发明提供了具有以特定的每 cm^2 支架上的细胞密度种植的细胞的支架。在一个实施方案中,该密度为约 3,000 个细胞/ cm^2 至约 15,000 个细胞/ cm^2 、约 3,500 个细胞/ cm^2 至约 14,500 个细胞/ cm^2 、约 4,000 个细胞/ cm^2 至约 14,000 个细胞/ cm^2 、约 4,500 个细胞/ cm^2 至约 13,500 个细胞/ cm^2 、约 5,000 个细胞/ cm^2 至约 13,000 个细胞/ cm^2 、约 4,500 个细胞/ cm^2 至约 13,500 个细胞/ cm^2 、约 5,000 个细胞/ cm^2 至约 13,000 个细胞/ cm^2 、约 5,500 个细胞/ cm^2 至约 12,500 个细胞/ cm^2 、约 6,000 个细胞/ cm^2 至约 12,000 个细胞/ cm^2 、约 6,500 个细胞/ cm^2 至约 11,500 个细胞/ cm^2 、约 7,000 个细胞/ cm^2 至约 11,000 个细胞/ cm^2 、约 7,500 个细胞/ cm^2 至约 10,500 个细胞/ cm^2 、约 8,000 个细胞/ cm^2 至约 10,000 个细胞/ cm^2 、约 7,500 个细胞/ cm^2 至约 9,500 个细胞/ cm^2 或约 8,000 个细胞/ cm^2 至约 9,000 个细胞/ cm^2 。在优选的实施方案中,该密度为约 3,000 个细胞/ cm^2 至约 7,000 个细胞/ cm^2 ,或约 9,000 个细胞/ cm^2 至约 15,000 个细胞/ cm^2 。

[0240] 在一方面,本发明构建体被适配成在植入后为受试者提供特定特征。在一个实施方案中,该构建体被适配成在植入后为受试者提供再生。在另一个实施方案中,该构建体被适配成促进在受试者中植入部位处的再生。例如,在植入后,再生组织可以由植入部位处的构建体本身形成。在另一个实施方案中,该构建体可以在植入后赋予受试者功能属性。例如,尿流改道构建体可被适配成允许受试者的尿液从第一输尿管(例如,第一侧开口)通过而到达管状支架内部,和/或适配成提供从受试者身体排出的尿液的临时储存器和通道(例如,管状支架)。在一个实施方案中,尿流改道构建体可被适配成在植入后提供上皮化粘膜。在另一个实施方案中,构建体可被适配成在受试者中提供新器官或组织结构的稳态调节发育。

[0241] 6. 使用方法

[0242] 在一方面,本发明涵盖了将层状排列的管腔器官或组织结构提供给需要此种治疗的受试者的方法。在一个实施方案中,该受试者可能需要器官或组织的再生、重建、扩张或替代。在一个实施方案中,该方法包括提供被成形为适形于需要器官或组织结构的器官或组织结构的至少一部分的生物相容性的合成或天然聚合物基质的步骤。在该提供步骤之后可以接着沉积不是来源于作为重建、修复、扩张或替代对象的器官或组织结构的至少一种细胞群体。该沉积步骤可以包括在聚合物基质上培养细胞群体。在将细胞群体沉积在该基质上从而提供构建体后,可以将它在治疗部位植入到患者中以便形成所需的层状排列的管腔器官或组织结构。在一个实施方案中,该层状排列的管腔器官或组织结构是膀胱或膀胱的一部分。

[0243] 在一个其他方面,本发明提供了用于将层状排列的管腔器官或组织结构提供给有需要的受试者的方法。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:a) 提供被成形为适形于需要所述治疗的器官或组织结构的至少一部分的生物相容性合成或天然的聚合物基质;b) 将不是来源于与新器官或组织结构对应的原始器官或组织的细胞群体沉积在聚合物基质的第一区域上或第一区域中;以及 c) 将成形的聚合物基质细胞构建体植入到所述受试者中以便形成层状排列的管腔器官或组织结构。在一个其他方面,本发明提供了向有需要的受试者提供新膀胱或其部分的方法。在一个实施方案中,该方法包括:a) 提供被成形为适形于膀胱或其部分的生物相容性合成或天然的聚合物基质;b) 将不是来源于受试者膀胱

的细胞群体沉积在聚合物基质的第一区域上或第一区域中;以及 c) 将成形的聚合物基质细胞构建体植入到受试者中以便形成新膀胱或其部分。在另一个实施方案中,本文描述的方法的步骤 b) 中的细胞群体含有具有收缩功能并且对平滑肌细胞标记呈阳性的一种或多种腹膜来源的平滑肌细胞。在一个其他实施方案中,该细胞群体的收缩功能是钙依赖性收缩功能。该 SMC 可以来源于网膜。

[0244] 在一个实施方案中,本发明方法进一步包括用受试者的网膜、肠系膜、肌肉筋膜和/或腹膜包裹植入的管道构建体从而允许血管化的步骤。

[0245] 在一个其他方面,本发明提供了用于将尿流改道或管道提供给有需要的受试者中的缺陷膀胱的方法。在一个实施方案中,用于向有需要的受试者提供尿流改道的方法包括以下步骤:(a) 提供生物相容性管道支架;(b) 将第一细胞群体沉积在所述支架的第一区域上或第一区域中,所述第一细胞群体基本上为肌肉细胞群体;和(c) 将步骤(b)的支架植入到所述受试者中从而形成允许尿液从受试者身体中排出的管道。在另一个实施方案中,该生物相容性材料是生物可降解的。在其他实施方案中,该生物相容性材料是聚羟基乙酸。在又一个实施方案中,该第一细胞群体基本上是平滑肌细胞群体。

[0246] 在一个实施方案中,该方法包括提供如本文描述的尿流改道或管道支架的步骤。在其他另外的实施方案中,该尿流改道或管道支架分成多个部分,例如如本文描述的第一支架、第二支架和第三支架提供。在另一个实施方案中,该方法进一步包括沉积不是来源于缺陷的膀胱的细胞群体从而形成尿流改道或管道支架的步骤。在一个其他实施方案中,该沉积步骤可以包括在该支架上培养细胞群体。在一些实施方案中,该方法进一步包括将尿流改道构建体植入到有需要的患者中的步骤。在另一个实施方案中,该植入在缺陷的膀胱部位处进行。

[0247] 在一个实施方案中,该构建体的敞开端部(例如,被配置成连接至腹壁的第一端部)通过腹壁或耻骨上壁与皮肤吻合(造口术)从而形成气门或括约肌。在另一个实施方案中,将导管通过气门开口插入并且插进该构建体的管腔中从而提供尿液外流。

[0248] 图 10 示出已植入的管道构建体的构造。

[0249] 在一个其他实施方案中,本发明提供了将尿流改道提供给有需要的受试者的缺陷膀胱的方法,其包括以下步骤:a) 提供第一可植入的生物相容性支架,该支架包含管状支架,该管状支架具有被配置成连接至腹壁段的第一端部、第二封闭端部,和被配置成连接至第一输尿管的至少第一侧开口;和 b) 将腹膜来源的细胞群体沉积在该支架的第一区域上或第一区域中从而形成尿流改道构建体;以及 c) 将该构建体植入到受试者中以便形成尿流改道。在另一个实施方案中,该方法包括以下步骤:a) 提供被适配成尿液的临时储存器和通道的可植入的生物相容性管状支架,该支架包含被配置成连接至在受试者腹壁中的开口的第一端部、第二封闭端部,和被适配成连接至第一输尿管从而允许尿液从第一输尿管通过而到达管状支架内部的至少第一侧开口;和 b) 将腹膜来源的细胞群体沉积在支架表面上或表面中从而形成尿流改道构建体;以及 c) 将该构建体植入到受试者中以便形成尿流改道。在一个其他实施方案中,该方法包括将尿流改道构建体植入到受试者中的步骤,该尿流改道构建体包含(a) 管状支架,该管状支架具有被配置成与腹壁段接触的第一端部、第二封闭端部,和被配置成连接至第一输尿管的至少第一侧开口;和(b) 沉积在该支架表面上或表面中用于形成尿流改道的腹膜来源的细胞群体。

[0250] 在所有实施方案中,该尿流改道支架可以进一步包含被配置成连接至第二输尿管的第二侧开口。在所有实施方案中,该第一端部可以被配置成以与腹壁齐平的方式定位。在所有实施方案中,该第一端部可以被配置成与受试者的皮肤缝合。在所有实施方案中,该第一端部可以被配置成形成气门。在所有实施方案中,该气门可以进一步包含气门按钮。在所有实施方案中,该支架进一步包含被配置成形成气门的垫圈环。在所有实施方案中,该生物相容性支架是生物可降解的。在所有实施方案中,该支架可以包含选自下列组成的组的材料:聚羟基乙酸、聚乳酸,以及聚羟基乙酸和聚乳酸的共聚物。在所有实施方案中,该细胞群体是平滑肌细胞群体。在所有实施方案中,该改道可以是对缺陷膀胱的替代。在所有实施方案中,该改道可以是临时性的。在所有实施方案中,该改道可以是永久性的。在所有实施方案中,该管状支架可以具有长方形横截面构造或三角形横截面构造,或圆形横截面构造。在所有实施方案中,该改道可以不含尿路上皮细胞。在所有实施方案中,本发明方法可以提供以泌尿样组织再生为特征的新泌尿管道。在所有实施方案中,再生的组织可以以存在下列的一种或多种为特征:尿路上皮、固有层和平滑肌束。在所有实施方案中,再生的组织可以在下列的一个或多个位置处观察到:输尿管-管道连接部(UCJ)、该管道的颅侧部,以及该管道的中间开口腔(mid-atrium)部分。在所有实施方案中,再生的组织可以以存在下列的一种或多种为特征:粘膜、粘膜下层和具有纤维血管基质的平滑肌。在所有实施方案中,再生的组织是具有底层平滑肌的连续尿路上皮。在所有实施方案中,泌尿管道在植入后形成上皮化粘膜。

[0251] 在另一个实施方案中,本发明方法进一步包括在尿流改道构建体植入后监测管道以便确定是否存在阻塞的步骤。该阻塞可能由残屑的累积引起。该方法可以进一步包括在检测到阻塞时从该管道管腔中除去残屑的步骤。

[0252] 在一方面,本发明向有需要的受试者临时性地提供尿流改道。在一个实施方案中,将临时尿流改道或管道构建体植入到受试者中从而形成气门开口,并将导管或其他设备通过气门临时插入到该管道构建体的管腔中。临时管道提供了在尝试针对缺陷膀胱的永久性解决方案时允许尿液从受试者身体中排出的优点。例如,管道构建体的植入可以在种植有细胞群体的新膀胱构建体的植入之前、之后或与它同时进行(参见,例如 Bertram 等,出处同上)。图 11 示出临时性尿流改道构建体的植入组件的实例。

[0253] 在一个实施方案中,本发明方法进一步包括用受试者的网膜、肠系膜、肌肉筋膜和/或腹膜包裹植入的尿流改道或管道构建体从而允许血管化的步骤。

[0254] 在一方面,本发明提供了向有需要的受试者永久性地提供尿流改道。图 12 示出永久性尿流改道构建体的植入组件的实例。

[0255] 在一个实施方案中,本文描述的构建体可以用于前列腺尿道替代和尿流改道。需要根治性前列腺切除术的受试者需要此种程序来除去前列腺尿道。在其他实施方案中,可以在经皮改道管情况下使用该构建体来形成具有阀样扭结(valve-like kink)的可控管。在另外的实施方案中,该构建体可以用作在膀胱颈手术中使用的膀胱颈吊带和包裹材料,以及具有可控性通道或可导开口的尿出口。此类实施方案的实例描绘在图 13 中。

[0256] 尿液经由尿道口从身体排出,尿道口是一种整合了使开口抵御局部感染和/或上行性感染的特征并且在女性的阴道前庭和男性的舟状窝中排空的独特结构。具体地,这个区域中的皮肤粘膜是非角化的复层鳞状上皮,其由为保护内源性乳酸菌菌群提供底物的富

含糖原细胞组成。而且,因为上皮靠近皮肤,所以它与指示分泌杀菌化合物的噬菌体的存在的酸性磷酸酶活性和溶菌酶样免疫反应性相关 (HolsteinAF 等 (1991)Cell Tissue Res 264:23)。

[0257] 在一方面,本文描述的尿流改道或新泌尿管道 (NUC) 构建体可以导致介于尿道粘膜与皮肤上皮之间的原始样过渡区 (native-like transition) 的形成,该过渡区具有在原始尿道中观察到的皮肤粘膜区的结构特征。该过渡区可以称为上皮化粘膜。在一个实施方案中,该构建体被适配成在植入后形成上皮化粘膜。在一个实施方案中,该上皮化粘膜包含前庭区和皮肤粘膜区。在另一个实施方案中,前庭区与皮肤粘膜区相邻。在另一个实施方案中,皮肤粘膜区位于连接至受试者腹壁和皮肤的构建体的气门端部。一般而言,天然存在的皮肤粘膜区以存在粘膜和皮肤的皮肤为特征,并且通常存在于身体上的孔口附近,在该身体上的孔口中外部皮肤结束而覆盖身体内部的粘膜开始。由本发明构建体和方法提供的上皮化粘膜在尿流改道构建体植入进受试者身体后在尿流改道构建体的第一端部处形成。在进一步实施方案中,该上皮化粘膜以存在首先出现在前庭区中并且通过皮肤粘膜区朝向构建体的气门端部逐渐扩充或增加的上皮为特征。在另一个实施方案中,该上皮以表达上皮细胞标记为特征。在进一步实施方案中,该上皮细胞标记是细胞角蛋白。该细胞角蛋白可以是本领域中已知的细胞角蛋白中的一种或多种,包括而不限于细胞角蛋白 1-19。在一个其他实施方案中,该细胞角蛋白是可利用 AE-1 / AE3 抗体检测的细胞角蛋白。

[0258] 本文描述的构建体形成上皮化粘膜的能力提供了解决经由腹部气门实现尿流改道所面临的主要挑战的解决方案。人们普遍认为经皮设备的寿命经常受到出口部位感染的限制 (Knabe C 等 (1999)Biomaterials 20:503)。诸如导管、插管、修复附件和葡萄糖传感器的经皮设备,不论它们的预期医学目标是什么,都穿透皮肤、破坏皮肤的保护屏障,并创建了细菌侵入的窦道 (Isenhath SN 等 (2007)J Biomed Mater Res A 83:915)。由不适当的表皮愈合、缺少生物相容性或机械应力造成的产品 - 皮肤接口破裂可能会导致另外的失败风险 (von Recum AF 和 Park JB. (1981)Crit Rev Bioeng 5:37)。

[0259] 在另一方面,该尿流改道构建体通过与接受者的组织相互作用而使管状类器官再生。在一个实施方案中,该构建体与接受者组织的相互作用是由经腹 - 经皮放置所引起。在一个其他实施方案中,该管状类器官允许尿液从输尿管流到接受者身体外部。尿液从接受者身体流出,同时维持在膀胱、尿道和气门 (即,口或开口) 中发现的原始样功能性质。该粘膜 - 皮肤连接部类似于在前尿道开口,在分别为人类女性和男性的阴道前庭和舟状窝中发现的连接部。这些天然连接部被对于可提供抵御上行性感染的保护的湿 - 干表面关键的粘膜区带所覆盖。这些粘膜区带的鳞状上皮 1) 富含糖原,2) 具有分泌作用 (可以释放酶和杀菌剂),和 3) 具有吞噬作用;并且可以迅速地迁移至受损伤表面。

[0260] 可以根据实施例中描述的方法或者根据本领域认可的方法,将支架移植到待扩大器官或组织中。可以通过将移植材料与靶标器官缝合来将基质或支架移植到受试者的器官或组织中。

[0261] 所描述的技术可以用来扩充需要此种治疗的患者中的现有层状排列的管腔器官或组织结构。例如,现有层状排列的管腔器官或组织结构可以通过以下步骤来扩大:提供被成形为适形于需要所述治疗的器官或组织结构的至少一部分并且具有足够用于在腹腔镜下植入的尺寸的聚合物基质或支架;将不是该器官或组织结构来源的细胞群体沉积在所述

聚合物基质的第一区域上或第一区域中 ;以及在腹腔镜下将成形的聚合物基质构建体在所述治疗部位植入到所述患者中,使得现有层状排列的管腔器官或组织结构得以扩充。

[0262] 图 7e 示出用于植入本文描述的肌肉等效支架的可能的手术方法。图 7f 示出在空膀胱和满膀胱上的植入部位。图 7g 示出具有在切开表面后产生的呈现为椭球体的手术狭长切口的膀胱模型。塑料管可以用作可用有限空间的模型,以便通过本发明的折叠或卷起的聚合物基质或支架。

[0263] 所描述的技术也可以用来增加需要此种治疗的患者的膀胱体积容量。例如,膀胱体积容量可以通过以下步骤来增加:提供被成形为适形于需要所述治疗的器官或组织结构的至少一部分并且具有足够用于在腹腔镜下植入的尺寸的生物相容性合成或天然的聚合物基质;将不是该器官或组织结构来源的细胞群体沉积在所述聚合物基质的第一区域上或第一区域中;以及在腹腔镜下将成形的聚合物基质构建体在所述治疗部位植入到所述患者中,使得膀胱体积容量得以增加。在一个实施方案中,本发明的基质或支架适合于使膀胱体积容量增加约 50mL。在其他实施方案中,本发明的基质或支架适合于使膀胱体积容量增加约 100mL。在其他实施方案中,本发明基质或支架适合于使膀胱体积容量增加约 60mL、约 70mL、约 80mL 或约 90mL。

[0264] 所描述的技术可以进一步用来扩充需要此种治疗的患者的膀胱切口部位。例如,膀胱切口部位可以通过以下步骤来扩充:a) 提供被成形为适形于需要所述治疗的器官或组织结构的至少一部分并且具有足够用于在腹腔镜下植入的尺寸的生物相容性合成或天然的聚合物基质;b) 将不是该器官或组织结构来源的细胞群体沉积在所述聚合物基质的第一区域上或第一区域中;以及 c) 在腹腔镜下将成形的聚合物基质构建体在所述治疗部位植入到所述患者中,使得膀胱切口部位得以扩充。

[0265] 本发明的另一个非限制性应用包括用于治疗需要此种治疗的患者的尿失禁的方法。例如,尿失禁可以通过以下步骤来治疗:提供被成形为适形于需要所述治疗的器官或组织结构的至少一部分并且具有足够用于在腹腔镜下植入的尺寸的生物相容性合成或天然的聚合物基质;将不是该器官或组织结构来源的细胞群体沉积在所述聚合物基质的第一区域上或第一区域中;以及在腹腔镜下将成形的聚合物基质构建体在所述治疗部位植入到所述患者中,使得膀胱体积容量得以增加。

[0266] 在一个实施方案中,本文描述的支架、细胞群体和方法可以进一步用于制备对治疗本文描述的病症有用的药品。该病症包括需要层状排列的管腔器官或组织结构的再生、重建、扩张或替代的受试者的任何病状。在另一个实施方案中,该器官或组织结构是膀胱或膀胱的一部分。

[0267] 在另一个实施方案中,沉积在所植入构建体上的细胞产生 MCP-1 并且在植入部位将它释放出来,MCP-1 刺激原始间充质干细胞(MSC)迁移到植入部位。在一个其他实施方案中,原始 MSC 促进和 / 或增强植入部位处所植入构建体的再生。

[0268] 在一个实施方案中,所沉积的细胞群体是来源于如本文描述的腹膜组织的平滑肌细胞(SMC)群体。该腹膜组织可以是网膜。在另一个实施方案中,该 SMC 群体包括具有收缩功能并且对平滑肌细胞标记呈阳性的至少一种细胞,例如心肌蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、钙调蛋白、肌球蛋白重链、BAALC、结蛋白、肌纤维母细胞抗原、SM22、波形蛋白及其任何组合。在其他实施方案中,该 SMC 群体包括展现出心肌蛋白(MYOCD)表达的至少一种细胞。

该 MYOCD 表达可以是编码 MYCOD 多肽的核酸或 MYCOD 多肽的表达。在另一个实施方案中,该 SMC 的收缩功能是钙依赖性收缩功能。在一个实施方案中,作为重建、扩张或替代的对象的层状排列的管腔器官或组织结构是膀胱或膀胱的一部分。在另一个实施方案中,该聚合物基质不含尿路上皮细胞。

[0269] 在所有实施方案中,本发明方法利用用于植入的构建体,该构建体基于已种植有如本文描述的细胞群体的膀胱替代支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架或逼尿肌等效支架。

[0270] 在另一个实施方案中,本文描述的层状排列的管腔器官或组织结构的再生、重建、扩张或替代的方法包括以下步骤:a) 提供被成形为适形于需要所述治疗的管腔器官或组织结构的至少一部分的生物相容性合成或天然的聚合物基质;b) 将第一细胞群体以本文描述的细胞密度沉积在所述聚合物基质的第一区域上或第一区域中,所述第一细胞群体基本上为肌肉细胞群体;以及 c) 将成形的聚合物基质细胞构建体在所述治疗部位植入到所述患者中,以便形成层状排列的管腔器官或组织结构。在一个其他实施方案中,在体内形成的层状排列的管腔器官或组织结构表现出天然膀胱组织的顺应性。

[0271] 在一个其他方面,本发明提供了在植入到需要它的受试者中之后基于生物力学刺激或循环使新膀胱再生的方法。在一方面,该方法适用于促进已被植入用于扩张或替代膀胱或膀胱一部分的植入的新膀胱构建体的再生。在一个实施方案中,该新膀胱构建体是通过在新膀胱基质或支架上种植细胞而形成。在另一个实施方案中,该新膀胱支架是膀胱替代支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架或逼尿肌等效支架。

[0272] 在一方面,本发明方法适用于通过在新膀胱支架上种植至少一种细胞群体而形成的植入的新膀胱构建体。在一个实施方案中,一个细胞种植的聚合物基质(或多个细胞种植的聚合物基质)是膀胱替代支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架或逼尿肌等效支架。在一个实施方案中,该至少一种细胞群体基本上包含肌肉细胞群体。在另一个实施方案中,该肌肉细胞群体可以是平滑肌细胞群体。如本文所描述的,用于种植的细胞的不同密度可能是合适的。

[0273] 在一方面,本发明方法在不同时间进行并且在植入新膀胱后持续不同的时间。在一个实施方案中,该循环在每日的基础上进行一段时间、在每周的基础上进行一段时间,或每隔一周进行一次。在另一个实施方案中,该每日循环方案的持续时间为约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 9 周、约 10 周、约 11 周、约 12 周、约 13 周、约 14 周或长于 14 周。

[0274] 在一个实施方案中,用于受试者的每日循环方案可以包括以下步骤:填充新膀胱约 1 小时、使填充的新膀胱排泄约 1 小时,以及让新膀胱自由排泄,通常过夜。这种方案可以在循环方案的第一天在受试者中进行。这种每日顺序可以在第一天后持续进行许多连续日。在一个实施方案中,该循环方案可以在第一天后的一天进行,其中填充步骤的持续时间增加至约 2 个小时、约 3 小时、约 4 小时或超过约 4 个小时。在另一个实施方案中,在让新膀胱自由排泄之前,可以每天重复填充和排泄步骤一次以上。

[0275] 在另一个实施方案中,在植入后将导管插入到受试者身体中,并且通过夹紧和松开受试者身体中的导管来控制循环时间。

[0276] 本领域普通技术人员将会了解本文涵盖了另外的循环方案。

[0277] 循环方案的实例如下。在植入通过在新膀胱基质或支架上种植如本文描述的细胞

而形成的新膀胱构建体后,循环将每 2 周进行一次(14 ± 2 天间隔期),从植入后的约第 1 个月开始,一直持续到大约第 90 天。循环在某些类型的评估如所植入新膀胱的顺应性测量之后完成,但是在其他类型的评估如荧光镜成像之前完成。在顺应性测量完成之后,通过以 10 - 25mL/min 的速率给膀胱再填充无菌盐水(通过孵育器加热)来进行循环。该循环将重复至少 5-10 次。将获得 0 - 10mmHg 的起始压力,记录该起始压力以及起始时间。在导管周围观察到泄漏(亦称泄漏点)的时候,或者当递送的体积等于刚刚进行的顺应性测量的体积时,不论这两者哪一者先发生,均针对每个循环记录时间、递送的等渗溶液体积和所获得的压力。

[0278] 在一个实施方案中,本发明提供了促进植入受试者中的新膀胱再生的方法,其包括以下步骤:(a) 用流体填充植入的新膀胱;(b) 排空步骤(a)中的填充的新膀胱。在另一个实施方案中,该方法包括重复步骤(a)和(b)的步骤(c)。在一个其他实施方案中,该方法在植入后的前 2 周内开始。在一个实施方案中,步骤(a)和(b)每日一次、每周一次或每隔一周一次地进行。在一些其他实施方案中,填充步骤(a)进行约 1 个小时,排空步骤(b)进行约 1 个小时。在又一个实施方案中,步骤(a)和(b)要至少进行到植入后的约第 6 周。在一个其他实施方案中,步骤(a)和(b)不会持续进行到超过植入后的约 10 周。在另一个实施方案中,步骤(a)和(b)持续进行到超过植入后的约 10 周。在其他实施方案中,该填充包含扩充新膀胱。在另一个实施方案中,该再生包含使该新膀胱的容量与没有经受循环的受试者的新膀胱相比增加。在一个其他实施方案中,该再生包含使该新膀胱的顺应性与没有经受循环的受试者的新膀胱相比增加。在其他实施方案中,该再生包含使新膀胱中的细胞外基质发育与没有经受循环的受试者的新膀胱相比增加。在一个实施方案中,细胞外基质发育的增加包含弹性蛋白纤维的发育。

[0279] 在一个其他方面,本发明涉及用于提供哺乳动物中的新膀胱的稳态调节发育,使得所植入新膀胱对接受者的需求作出反应的方法。在一个实施方案中,所植入新膀胱生长至与接受者相称的尺寸。在另一个实施方案中,用于提供受试者中的新膀胱的稳态调节发育的方法包括以下步骤:(a) 提供生物相容性聚合物支架;(b) 将第一细胞群体沉积在所述支架的第一区域上或第一区域中,所述第一细胞群体基本上为肌肉细胞群体;以及(c) 将步骤(b)的支架植入到所述受试者中从而建立稳态调节发育。在一个其他实施方案中,该稳态调节发育包含器官尺寸和结构的恢复。在另一个实施方案中,该稳态调节发育包含与体重相称的新膀胱容量。在一个实施方案中,该相称的新膀胱容量在植入后约 4 个月实现。在另一个实施方案中,用于提供受试者中的新膀胱的稳态调节发育的方法包括监测所植入新膀胱的稳态调节发育或进展的状态的步骤。该监测可以包括用于显示所植入新膀胱的位置和形状的膀胱造影程序,和/或尿流动力学顺应性和容量的测量。

[0280] 在另一方面,本发明提供了在植入新器官或组织结构后对患者进行预后评价的方法。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:检测在从所述受试者获取的测试样品中的 MCP-1 表达水平;(b) 根据与对照样品(或对照参考值)有关的 MCP-1 表达水平来确定该测试样品中的表达水平;以及(c) 基于确定的 MCP-1 表达水平来预测患者的再生预后,其中测试样品中的 MCP-1 表达水平与对照样品(或对照参考值)相比较是对受试者中的再生的预后。

[0281] 在另一方面,本发明提供了在患者中植入新器官或组织结构后对患者进行预后评

价的方法,该方法包含:(a) 获取患者生物样品;和(b) 检测该生物样品中的 MCP-1 表达,其中 MCP-1 表达是对患者中的再生的预后。在一些实施方案中,患者生物样品中的 MCP-1 表达相对于对照样品(或对照参考值)增加是对受试者中的再生的预后。在一些实施方案中,患者样品中的 MCP-1 表达相对于对照样品(或对照参考值)减小不是对受试者中的再生的预后。该患者样品可以是包含体液如血液或尿液的测试样品。

[0282] 在一些实施方案中,该确定步骤包含使用由合适的处理器执行的软件程序,以便(i) 测量测试样品和对照中的 MCP-1 表达的差异水平;和/或(ii) 分析从测量测试样品和对照中的 MCP-1 表达的差异水平获得的数据。合适的软件 and 处理器是本领域中熟知的并且可商购获得。该程序可以在存储于诸如 CD-ROM、软盘、硬盘驱动器、DVD 或与该处理器有关的存储器的有形介质上的软件中实施,但是本领域普通技术人员将容易了解整个程序或其部分可以替代地被除处理器以外的设备执行,和/或以熟知的方式在固件和/或专用硬件中实施。

[0283] 在该确定步骤之后,通常记录测量结果、研究结果、诊断、预测和/或治疗建议并且将其传达至例如技术人员、医生和/或患者。在某些实施方案中,将使用计算机来传达此种信息至利害关系人,例如,患者和/或主治医生。在一些实施方案中,该测定将在与结果或诊断被传达至的国家或司法管辖区不同的国家或司法管辖区中进行,或者测定结果将在与结果或诊断被传达至的国家或司法管辖区不同的国家或司法管辖区中进行分析。

[0284] 在优选的实施方案中,在测定完成以及预后和/或预测产生后,尽可能快地将基于在具有差异水平的 MCP-1 表达的测试受试者中测得的 MCP-1 表达水平的预后、预测和/或治疗建议传达至受试者。该结果和/或相关信息可以通过受试者的治疗医生传达至受试者。或者,该结果可以通过任何通信手段直接传达至测试受试者,该通信手段包括书面、电子形式的通信,如电子邮件,或电话。通信可以通过使用计算机来促成,例如在电子邮件通信的情况下便是如此。在某些实施方案中,含有预后测试结果和/或从该测试得出的结论和/或基于该测试的治疗建议的通信可以使用计算机硬件和软件组合产生并自动递送至受试者,该计算机硬件和软件组合是电信领域技术人员熟悉的。面向保健的通信系统的一个实例描述在美国专利第 6,283,761 号中;但是本发明不局限于利用这种特定通信系统的方法。在本发明方法的某些实施方案中,包括样品测定、再生的预后和/或预测,以及测定结果或预后的传达在内的该方法步骤的全部或一些步骤可以在不同(例如外国的)司法管辖区中进行。

[0285] 在另一方面,本文描述的预后方法向利害关系人提供有关植入是否成功,以及再生的康复/治疗方案的信息。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:检测在从所述受试者获取的测试样品中的 MCP-1 表达水平;(b) 根据与对照样品(或对照参考值)有关 MCP-1 表达水平来确定该测试样品中的表达水平;以及(c) 基于确定的 MCP-1 表达水平来预测患者的再生预后,其中测试样品中的 MCP-1 表达水平与对照样品(或对照参考值)相比较是器官或组织结构的再生状态的指示。

[0286] 一般而言,如本文使用的再生预后包括对下列的任何一条或多条的预报或预测:在通过植入本文描述的构建体进行的膀胱替代或扩张之后功能性膀胱的形成或改善,在本文描述的构建体植入之后功能性尿流改道的形成,在本文描述的构建体植入之后膀胱容量或改善的膀胱容量的形成,或在本文描述的构建体植入之后膀胱顺应性或改善的膀胱顺应

性的形成。

[0287] 在所有实施方案中,将层状排列的管腔器官或组织结构提供给如本文描述的需要此种治疗的受试者的方法可以包括如本文描述的在植入后进行的再生预后评价步骤。

[0288] 在所有实施方案中,本发明涉及将新器官或组织结构提供给有需要的受试者的方法,该方法包括某些植入后的监测步骤。在一个实施方案中,监测所植入构建体的效果和性能,例如通过在植入后的不同时间点的超声成像、肾盂造影照片以及尿液和血液分析来进行。

[0289] 7. 试剂盒

[0290] 本发明进一步包括试剂盒,该试剂盒包含本发明的聚合物基质和支架及相关材料,和/或细胞培养基以及使用说明书。使用说明书可以含有,例如对细胞培养的说明或者对细胞和/或细胞产物的施用的说明。使用说明书还可以含有对于预处理、折叠或以其他方式制备本发明聚合物基质和支架用于在腹腔镜下植入的说明。

[0291] 在一个实施方案中,本发明提供了包含如本文描述的支架和说明书的试剂盒。在另一个实施方案中,该试剂盒中的支架是下列的一种或多种:膀胱扩张支架、膀胱替代支架、泌尿管道支架或肌肉等效支架。

[0292] 8. 报告

[0293] 当为了商业目的实施时,本发明方法一般会产生再生预后的报告或概述。本发明方法将会产生包含对在用于提供本文描述的构建体的任何手术程序之前和之后再生的可能进程或结果的预测的报告。该报告可以包含关于与预后有关的任何指标的信息。本发明方法和报告可以进一步包括将报告存储在数据库中。或者,该方法可以进一步为受试者在数据库中创建病历(record),并且在该病历中填充数据。在一个实施方案中,该报告是纸质报告,在另一个实施方案中,该报告是听觉报告,在另一个实施方案中,该报告是电子病历。包括将该报告提供给医生和/或患者。该报告的接收可以进一步包括与包括数据和报告的服务器计算机建立网络连接,以及从服务器计算机请求数据和报告。由本发明提供的方法还可以整体或部分地自动化。

[0294] 下列实施例仅为了说明目的而提供,而并非旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0295] 本说明书中引用的所有专利、专利申请和参考文献据此以引用的方式整体并入本文。

实施例

[0296] 实施例 1- 作为 SMC 来源的网膜

[0297] 已经从犬和猪网膜中成功地分离出平滑肌细胞。首先,从犬或猪网膜组织中分离出网膜来源的平滑肌细胞,通过在缓冲盐水中洗涤该组织从而除去表面污染物来进行。如图 14 中的图解所示,然后使该网膜经受一系列酶消化和离心步骤,从而产生分离的网膜来源的细胞用于进一步培养和表征。简言之,在 37°C 下将洗涤的网膜组织用含有 0.1% 胶原酶 I (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) 和 1% BSA (Sigma, St. Louis, MO) 的 DMEM-HG (Invitrogen, Carlsbad, CA) 溶液消化 1 小时。为了促进组织消化,在该 37°C 下的 1 小时孵育过程中,将该溶液放在置于平台振荡器上的 50ml 锥形管中以 50 的速度和 15 的倾斜度搅拌。消化后,将该溶液在 300xg 下离心 5 分钟,然后将由此产生的含有网膜来源的

细胞的沉淀材料通过一系列步骤进行洗涤,该一系列步骤涉及将该材料重新悬浮在 PBS 1% 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中,以及通过在 300xg 下离心 5 分钟来使其沉淀从而除去脂肪块 (fatty plug) 和其他非必需的组织碎片。洗涤后,将该细胞重新悬浮在包含 DMEM+10%FBS 的培养基中,并接种在 T 型烧瓶上。在补充有细胞因子和生长因子的市售培养基中进行培养以便进行离体 (ex vivo) 扩充。当经由随后的细胞传代而达到适当的细胞数目时,观察细胞形态并且固定和处理等分试样用于表达的平滑肌细胞蛋白的免疫检测。为了比较分析,还从通过采用 Atala 等, (J. Urol. 150:608, 1993) ;Cilento 等, (J. Urol. 152:655, 1994) ;和 Atala 的美国专利 6, 576, 019 (以引用的方式整体并入本文) 中描述的方案培养组织外植体获得的膀胱平滑肌层中分离出细胞。本领域技术人员将会意识到其他合适的细胞分离方法。

[0298] 实施例 2-SMC 表征

[0299] 形态学。图 15 示出犬和猪来源的网膜细胞与犬和猪来源的膀胱细胞的细胞形态的比较。当在 DMEM+10%FBS 中生长时,犬和猪膀胱平滑肌及网膜来源的细胞的细胞形态如果不是相同的形态,则表现出相似性。细胞为纺锤状并且细长,有旋转和峰-谷形成物的证据。因而,网膜来源的细胞的形态似乎是平滑肌细胞。

[0300] 细胞表面标记的荧光激活细胞分选 (FACS) 分析。图 16A-D 示出通过 FACS 分析进行的细胞表型表征,该分析表明犬来源的网膜细胞对平滑肌细胞标记 α -肌动蛋白和钙调蛋白呈阳性。简言之,将 0.5×10^6 - 1×10^6 个细胞 / 数据点固定在 2% 低聚甲醛中,并封闭 Fc 受体从而阻止非特异性结合。然后按照制造商建议的,将细胞与针对平滑肌细胞 α -肌动蛋白 (SMA) 和钙调蛋白的抗体一起孵育。同种型对照抗体 (IgG1 或 IgG2a) 用作阴性对照。在最后洗涤 (PBS, 0.1%Triton X-100) 之后,利用 BD FACS Aria 1 或 Guava EasyCyteMini Express Assay 系统使用适当的荧光通道进行抗原检测。从每个样品采集最低 5,000-10,000 个事件。与膀胱平滑肌细胞 (图 16A 和 B) 类似,从网膜分离的细胞 (图 16C 和 D) 的 98% 以上表达平滑肌细胞标记 α -肌动蛋白和钙调蛋白。因而,就特征性细胞表面标记而言,网膜来源的细胞与从膀胱中分离的平滑肌细胞具有相同的表型。

[0301] 图 17 和图 18 示出通过查看平滑肌细胞标记以及上皮和内皮抗原标记对来自两种不同动物的犬网膜来源的细胞进行的进一步 FACS 抗原表达分析。用 1 μ g/ml 的一抗和二抗在网膜来源的细胞上进行染色。如下表 2.1 中概括的,犬网膜来源的细胞对平滑肌细胞标记呈阳性,而对上皮和内皮细胞标记呈阴性。

[0302] 表 2.1

[0303]

标记	表达	类型	来源	%阳性 狗 85	%阳性 狗 90
心肌蛋白 C-端	区分平滑肌细胞- 人、大鼠、小鼠	多克隆	家兔	阴性	阴性
BAALC	发育和成熟肌肉细 胞-小鼠	多克隆	山羊	67.45	56.80
平滑肌 α 肌动蛋 白	平滑肌细胞-人、狗	单克隆	小鼠	82.02	61.11
细胞角蛋白 AE1/AE3	上皮来源, 尿路上 皮-人、狗	单克隆	小鼠	阴性	阴性
上皮粘附分子 EP-CAM	上皮细胞-人	单克隆	小鼠	阴性	阴性
荆豆凝集素 1- UEA 1	内皮细胞-人、羊	单克隆	小鼠	21.41	18.35

[0304] 免疫荧光分析。图 19-21 通过各种平滑肌细胞标记的免疫荧光分析以及与内皮和上皮细胞标记的比较, 进一步证明网膜和膀胱来源的平滑肌细胞的平滑肌细胞样表型。简言之, 将细胞用 2% 多聚甲醛 (Sigma) 进行固定, 并用 10% 马血清 (Gibco)/0.2% Triton X-100 (Sigma)/D-PBS (Gibco) 进行封闭。添加一抗, 并将板在 4℃ 下孵育过夜。将细胞用 2% 马血清 / 0.2% Triton X-100 / D-PBS 洗涤 3 次, 然后用二抗: 山羊抗小鼠 IgG1 和山羊抗小鼠 IgG2a 的 1:500 稀释液在室温下孵育 1-3 小时。将胞核用 Hoechst 33342 复染色。小鼠 IgG1 (Invitrogen) 和小鼠 IgG2a (Invitrogen) 同种型对照用作阴性对照 (未示出)。利用运行简单 PCI 软件的 Leica DMI4000B 落射荧光显微镜捕捉图像。

[0305] 图 19 示出犬网膜和膀胱来源的细胞中的钙调蛋白、平滑肌 (SM) α -肌动蛋白和转凝蛋白 (SM22) 表达的免疫染色。绿色荧光证实, 网膜来源的细胞表达的这三种平滑肌特异性蛋白的水平与膀胱平滑肌细胞表达的水平相当。

[0306] 图 20A 和 20B 示出犬网膜来源的细胞的免疫荧光分析, 用以表明这些细胞对平滑肌细胞标记 (平滑肌肌动蛋白、波形蛋白、心肌蛋白和 baal1c (脑和急性白血病细胞质蛋白)) 呈阳性, 而对上皮和内皮细胞标记 (UEA-1 和 EpCam) 呈阴性。在每幅图左侧的图像是验证像场的细胞内容物的对照图像。在每幅图右侧的图像显示出绿色荧光, 证实网膜来源的细胞表达平滑肌特异性蛋白。

[0307] 图 21 示出免疫染色分析, 该分析表明根据免疫荧光, 与膀胱来源的细胞类似, 猪网膜来源的细胞也对平滑肌细胞标记呈阳性。这另外的免疫荧光数据显示出在来源于猪网膜和猪膀胱的 SMC 中的平滑肌肌动蛋白、baal1c、心肌蛋白和肌球蛋白重链的表达。

[0308] 将利用抗原标记表达进行的细胞表型分析的概括提供于下表 2.2 中, 该表示出犬和猪网膜来源的细胞与人膀胱平滑肌细胞的比较。这些数据共同证明, 犬网膜来源的细胞 (从 3 只不同的狗中提取, 在 3 种不同类型的培养基中培养, 处在第 2 代和 3 代) 和猪网膜来源的细胞 (PODS, 在 2 种不同类型的培养基中培养, 处在最后的第 5 代) 对 6 种不同的平滑肌标记呈阳性, 而对上皮和肌纤维母细胞标记呈阴性。这些相同的标记表达于用作对照的人膀胱平滑肌细胞 (Hu1022, 第 5 代)。进一步支持这一概念, 即, 网膜可以是 SMC 的替代

来源。因此,这些免疫组化数据进一步支持平滑肌细胞是从网膜组织中分离的发现。

[0309] 表 2.2

[0310]

利用抗原标记表达分析的细胞表型								
样品	结蛋白	SM-肌动蛋白	肌球蛋白	钙调蛋白	心肌蛋白	波形蛋白	肌纤维母细胞	CKAE1/AE3
人膀胱 SMC								
Hu1022 SMCp5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-) 30%
犬网膜来源的细胞								
狗 1083 p3 SMC	(+) 15%	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
狗 1089 p3 SMC	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
狗 1083 p3 PM-1	(+) 5-10%	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
狗 1089 p2 MCDB+Hep	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
狗 1089 p3 PM-1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
狗 1090 p3 SMC	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
狗 1090 p3 PM-1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
狗 1090 p2 MCDB+Hep	(+) 5-10%	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
猪网膜来源的细胞								
PODS SMC p5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
PODS PM-1 p5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

[0311]

[0312] 基于聚合酶链反应 (PCR) 的基因表达分析。通过 PCR 评估内皮和平滑肌细胞基因表达分析。根据制造商说明书,利用 RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen) 分离样品 RNA。根据制造商说明书,使用 SuperScript VILO cDNA SynthesisKit(Invitrogen) 由 2ug RNA 产生 cDNA。在 cDNA 合成后,将每种样品用蒸馏水以 1 : 10 稀释。使用表 2.2 中列出的 TaqMan 引物和探针 (AppliedBiosystems, Carlsbad, CA) 以及包含 10ul master mix(2X)、1ul 引物 / 探针和 9ulcDNA(1 : 10 稀释) 的反应混合物,设置定量逆转录 - 聚合酶链反应 (qRT-PCR)。反应在使用默认循环参数的 ABI 7300 实时热循环器中进行。使用 RelativeQuantitation(RQ) 方法通过 Comparative Ct 对 PCR 数据进行分析。相对数量是根据内源参照并相对于校准器归一化的目标量,并通过如下等式得出 : $2^{-\Delta\Delta CT}$ 是 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{测试}} - \Delta CT_{\text{校准}}$ 。该内源参照 (内部对照) 是 18S rRNA。人主动脉内皮细胞 (人 AEC) 用作这些基因的表达的阳性对照。表 2.3 列出针对 PCR 实验中的表达测试的基因。

[0313] 表 2.3

[0314]

基因	缩写	标记	TaqMan Cat#
平滑肌 α 肌动蛋白	ACTA2/SMAA	平滑肌	Hs00909449_m1
转凝蛋白 /SM22	SM22	平滑肌	Hs00162558_m1
心肌蛋白	MYOCD	平滑肌	Hs00538076_m1
平滑肌肌球蛋白重链	MYH11/SMMHC	平滑肌	Hs00224610_m1
钙调蛋白	CNN1	平滑肌	Hs00154543_m1
钙粘蛋白 5	CDH5/VECAD	内皮	Hs00174344_m1
血管性血友病因子 (vonWillebrand Factor)	vWF	内皮	Hs00169795_m1
血小板 / 内皮细胞粘附分子	PECAM1	内皮	Hs00169777_m1
FMS- 相关酪氨酸激酶 1	FLT 1/VEGFR	内皮	Hs01052936_m1
激酶插入域受体	KDR / FLK1	内皮	Hs00176676_m1
酪氨酸激酶	TEK	内皮	Hs00945155_m1
18S 核糖体 RNA	18S	内源对照	4319413E

[0315] 图 22 示出平滑肌细胞标记肌动蛋白 (第 1 代细胞)、SM22、肌球蛋白重链和钙调蛋白在犬网膜来源的细胞、犬膀胱来源的平滑肌细胞与作为对照的人膀胱细胞之间的基因表达水平。网膜和膀胱来源的平滑肌细胞都表现出与人膀胱对照相比增高的平滑肌细胞基因的表达。

[0316] 图 23 示出内皮细胞标记 CDH5、FLT1、KDR、PECAM、TEK 和 vWF 在犬网膜来源的细胞、犬膀胱来源的平滑肌细胞与作为对照的人膀胱细胞中的基因表达水平。除了 FLT1 以及以非常低的程度表达的 KDR,其余内皮基因没有被膀胱平滑肌细胞或网膜来源的细胞表达。若存在,网膜平滑肌细胞和膀胱平滑肌细胞表现出相同的有限的内皮细胞标记表达。

[0317] 图 24 示出平滑肌细胞标记 (MYOCD、SMA、SM22、SM-MHC、CNN、B-ACTIN) 在猪来源的细胞中的基因表达水平。通过凝胶电泳定性分析获得的 qRT-PCR 结果表明,猪网膜来源的平滑肌细胞基因表达与猪膀胱来源的平滑肌细胞的基因表达类似。

[0318] 凝胶收缩功能测定。本领域中常用的平滑肌细胞的功能测定是当包埋在胶原蛋白凝胶中时的收缩能力。将来自犬膀胱或犬网膜的平滑肌细胞以 500,000 个细胞 / mL 悬浮在含有 2mg / mL 至 3mg/mL 大鼠尾胶原蛋白 I (BDBiosciences, San Jose, CA., USA) 的溶液中。补充有 1.8mg / mL NaHCO₃ (Sigma, St Louis, MO, USA) 和 2.3mg / mL L- 谷氨酰胺 (Invitrogen) 的浓缩 MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA) 用作稀释剂,并用 3.7mg / mL HEPES (Invitrogen) 调节 pH 从而允许胶原蛋白聚合。在阴性对照水凝胶中补充 5uM EDTA (Invitrogen) 从而抑制 Ca²⁺ 依赖性细胞收缩。对于每个平行测定,将 250uL 细胞悬浮

液分配到 48 孔板的单个孔中。一旦胶原蛋白凝胶聚合,就轻轻地松动孔板中的胶原蛋白凝胶,从而减少可阻止完全收缩的摩擦或粘附。将无血清 DMEM(250uL) 添加到孔板中的每个凝胶顶部上,并在加湿的含 5%CO₂ 的大气中在 37℃ 下孵育。在 0 小时、24 小时,和 48 小时时间点,使用 Molecular Imager ChemiDoc XRS System(BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 对所有凝胶成像。用 ImageJ 软件版本 1.40g 测量图像,并以像素单位表示。从表面积计算孔板胶原蛋白凝胶直径从而提高精度。凝胶直径的减小指示凝胶收缩。

[0319] 图 25 表明网膜和膀胱来源的平滑肌细胞具有经过证明的收缩能力,收缩能力是平滑肌细胞的特征功能。

[0320] 实施例 3- 种植在新泌尿管道支架中的网膜来源的平滑肌细胞

[0321] 如本文描述的新泌尿管道由管(管道)形状的生物可降解支架和种植在该支架上的平滑肌细胞构成。对于这项研究,将来源于网膜组织的平滑肌细胞种植到使用与新泌尿管道相同的工艺制备的支架材料上。针对包括下列的平滑肌细胞特征评价支架内的细胞:经由抗原表达分析的细胞表型、蛋白质表达、细胞外基质(ECM)产生和代谢活性谱。

[0322] 免疫组化染色。图 26 示出在种植到支架材料上后的膀胱和网膜来源的平滑肌细胞的免疫组化染色。固定细胞种植的支架,并且用针对如上所述的平滑肌 α -肌动蛋白的抗体进行染色。支架内的网膜来源的平滑肌细胞表型的免疫染色分析显示出平滑肌 α -肌动蛋白的表达。因而,网膜来源的细胞在支架内保留了平滑肌细胞表型,并且在种植到支架上时似乎与膀胱来源的平滑肌细胞具有相同的表现。

[0323] MCP1 蛋白分泌。MCP-1 是膀胱平滑肌细胞的正常产物,并且可以用作效力、身份(identity)和功能性的标记。采用来自 R&D Systems 的对犬 MCP-1 有特异性的基于 ELISA 的测定系统。样品按一式两份测定,并将其与标准曲线作比较从而提供评价的在构建体介质中的 MCP-1 水平。如图 27 所示,种植到支架上的网膜来源的平滑肌细胞产生 MCP1 蛋白。

[0324] ECM 产生。为了评估网膜来源的细胞产生 ECM 蛋白的能力,在将膀胱和网膜来源的平滑肌细胞种植到支架材料上后对它们进行免疫组化染色。固定细胞种植的支架,并用针对如上所述的纤连蛋白的抗体进行染色。如图 28 所示,网膜来源的平滑肌细胞合成了细胞外基质材料纤连蛋白,纤连蛋白对于细胞粘附、迁移、生长和分化是重要的。而且,当种植到支架上时,网膜平滑肌细胞再次与膀胱平滑肌细胞具有相同的表现。

[0325] 代谢谱分析。在将犬膀胱来源的平滑肌细胞和网膜来源的细胞种植到支架上后,进一步分析它们的代谢谱。在 6 天的时间过程内获取介质样品。使用自动化系统(Biolyzer)分析样品。简言之,将介质添加到样品室中并注射到该机器中从而测量各种代谢物的水平。如图 29 所示,犬膀胱平滑肌细胞和网膜来源的细胞的代谢谱在 Gln、Glu、Gluc、Lac 和 NH₄⁺ 的水平上相似。因而,证明当种植到支架上时,网膜来源的细胞具有代谢活性。

[0326] 这些研究表明平滑肌细胞可以从网膜组织中有效地分离。网膜来源的细胞与从膀胱分离的平滑肌细胞具有相同的特征。网膜来源的细胞在分离和扩充时展现出平滑肌细胞形态。利用抗原标记进行的表型分析与在膀胱平滑肌细胞上发现的相同。基因表达对于网膜和膀胱来源的细胞是相似的。内皮细胞标记的表达与在膀胱平滑肌细胞中检测到的相同。而且,在细胞培养物中没有检测到脂肪标记(数据未示出),与膀胱平滑肌细胞的情况相同。最后,网膜来源的细胞与膀胱来源的细胞相似,也展现出收缩表型。因而,依据这些

观察结果,我们发现平滑肌细胞已经从犬和猪网膜中成功地分离。

[0327] 我们还证明了当种植在新泌尿管道支架上时,网膜来源的平滑肌细胞与从膀胱组织分离的平滑肌细胞具有相同的表现,如下列特征所展示的:抗原标记表达(平滑肌 α -肌动蛋白)、蛋白质表达(MCP-1)、ECM产生(纤连蛋白)、代谢(葡萄糖摄取、乳酸盐(酯)产生等)。

[0328] 图30示出种植有另一类来自替代来源的平滑肌细胞(脂肪来源的平滑肌细胞)的新泌尿管道在植入后的特征。原始样再生可以在第三个月观察到,而没有出现免疫反应(A)。另外,在输尿管和皮肤连接部处的粘膜衬里允许尿液不透水地流动(B)。没有出现异常细胞生长或组织发育、尿液吸收、粘膜分泌或免疫排斥的证据。

[0329] 这些研究结果表明网膜可以用作用于新泌尿管道的产生的平滑肌细胞的替代来源。

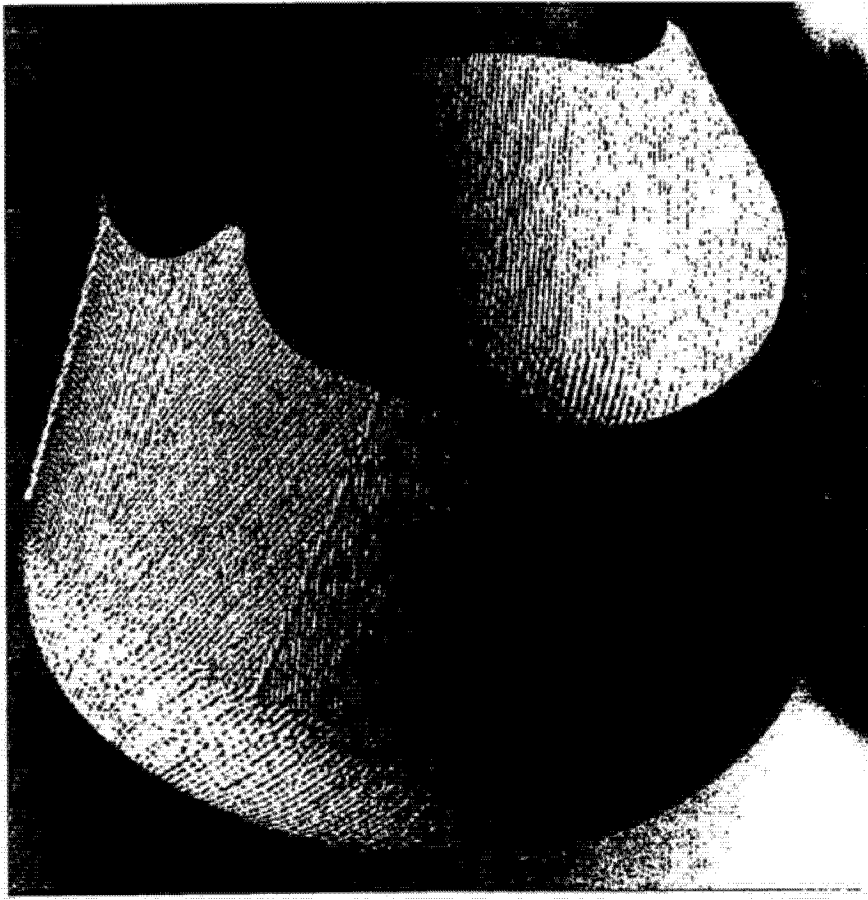


图 1A

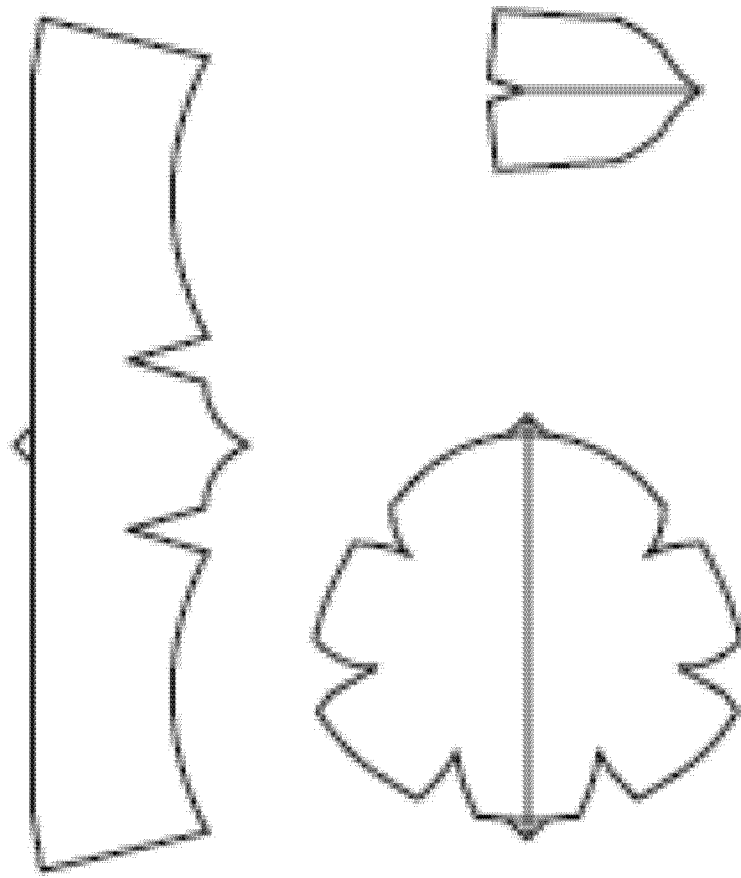


图 1B

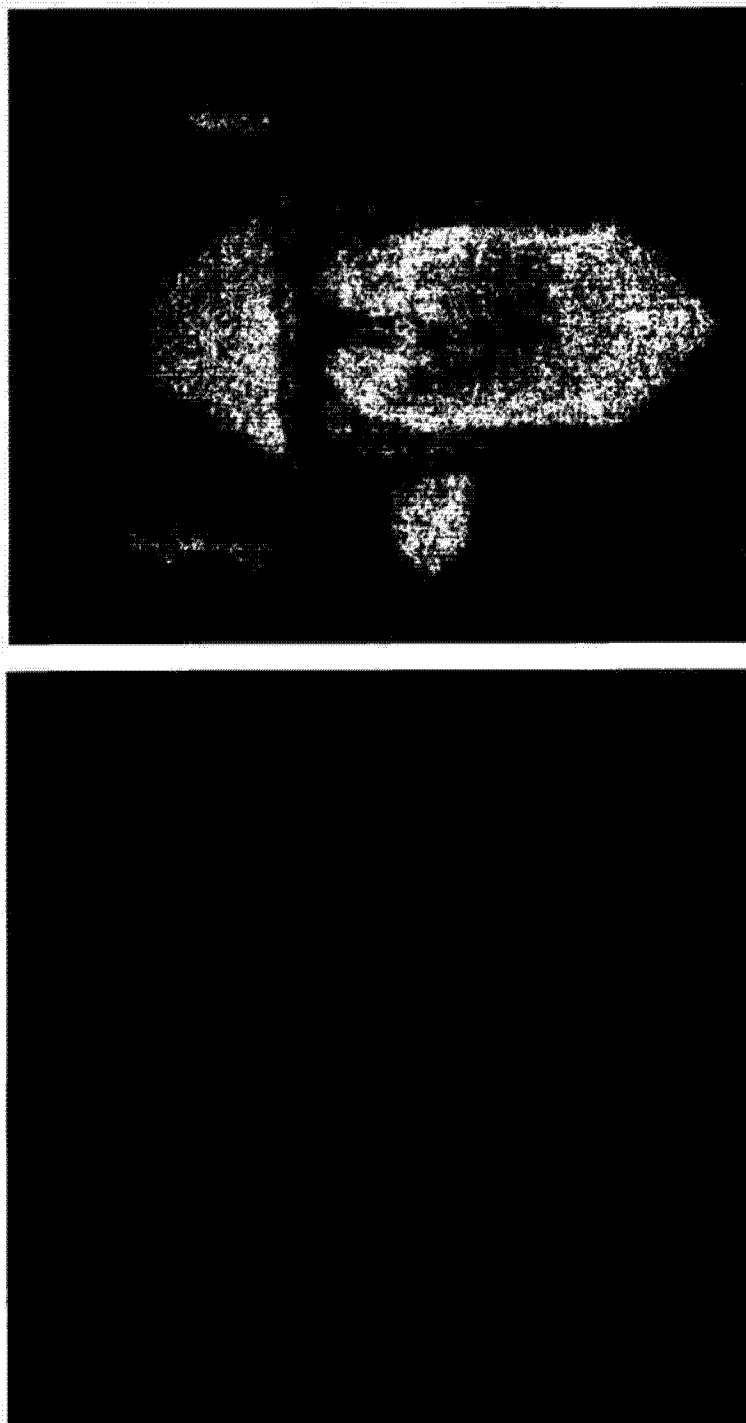


图 1C

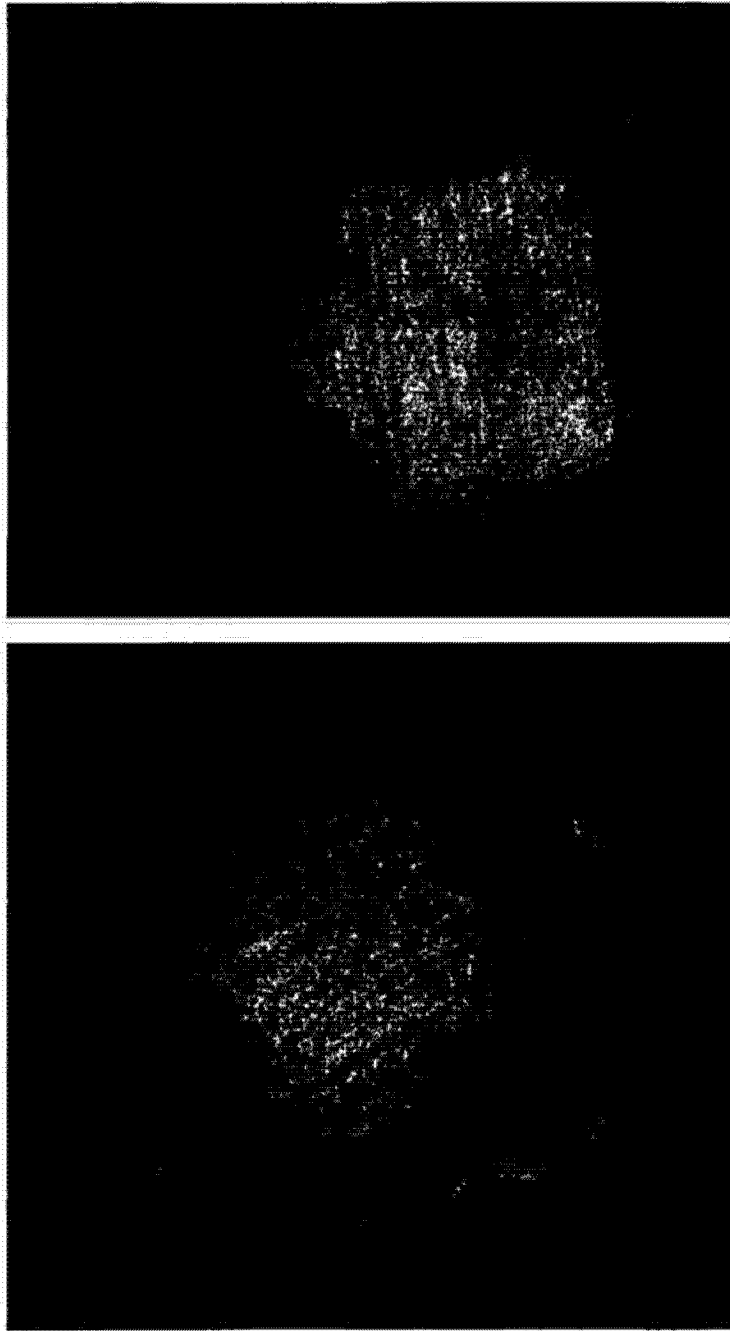


图 1D

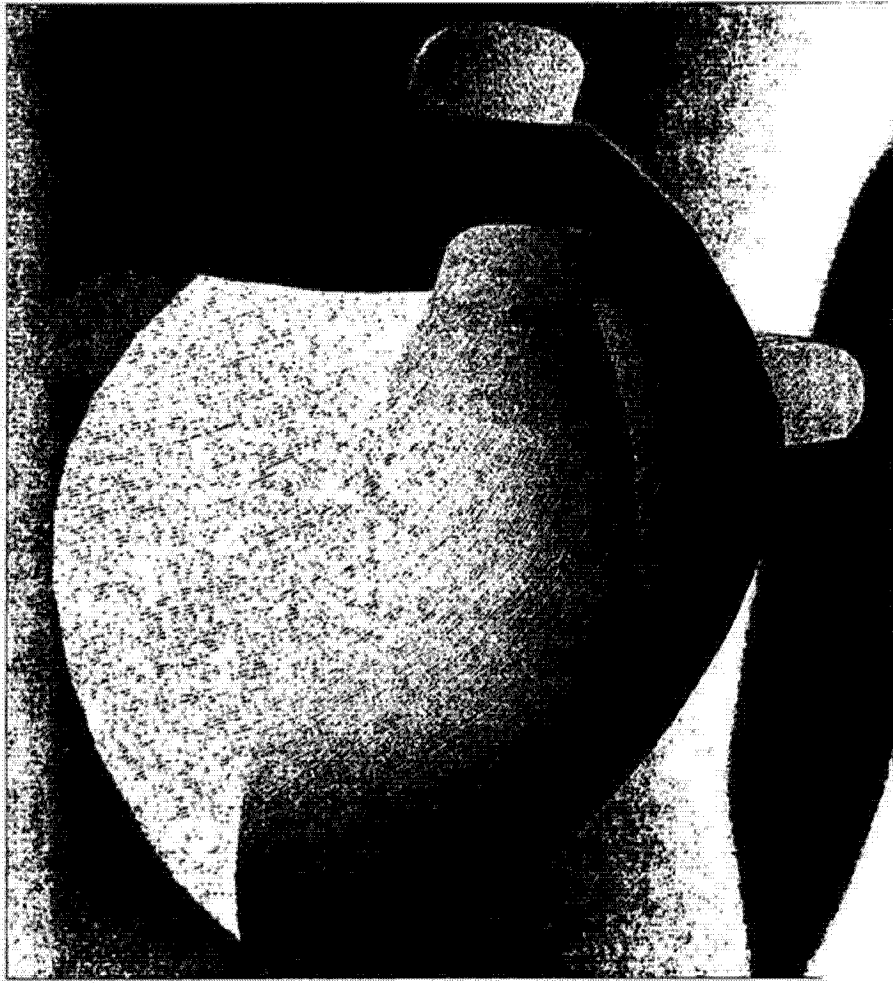


图 2A

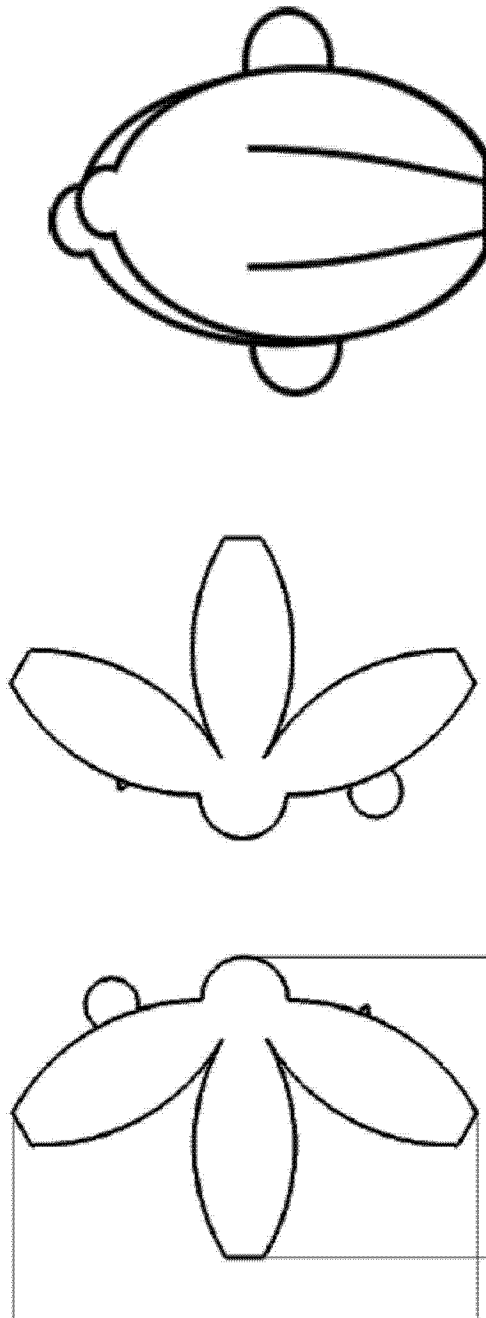


图 2B

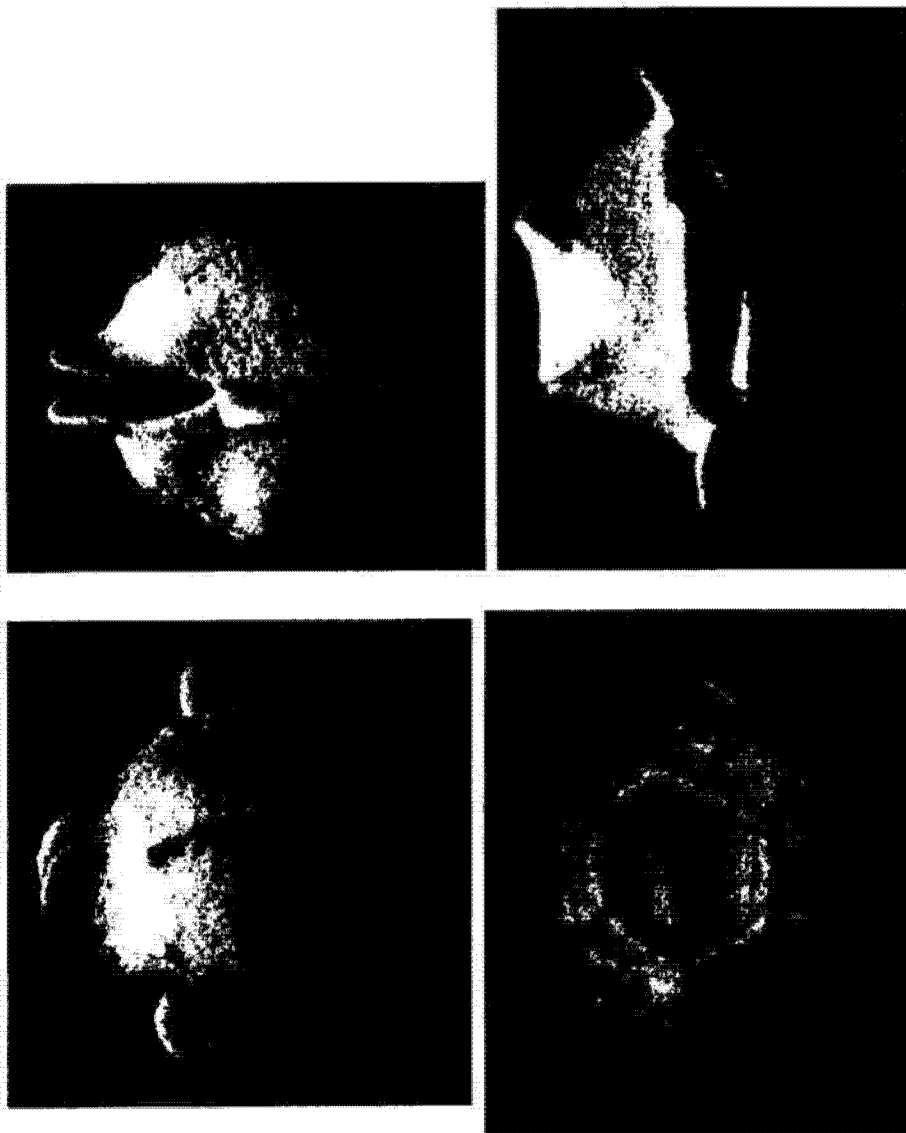


图 2C

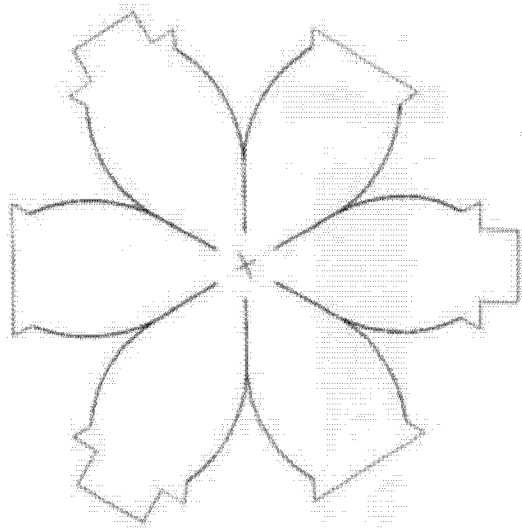


图 2D

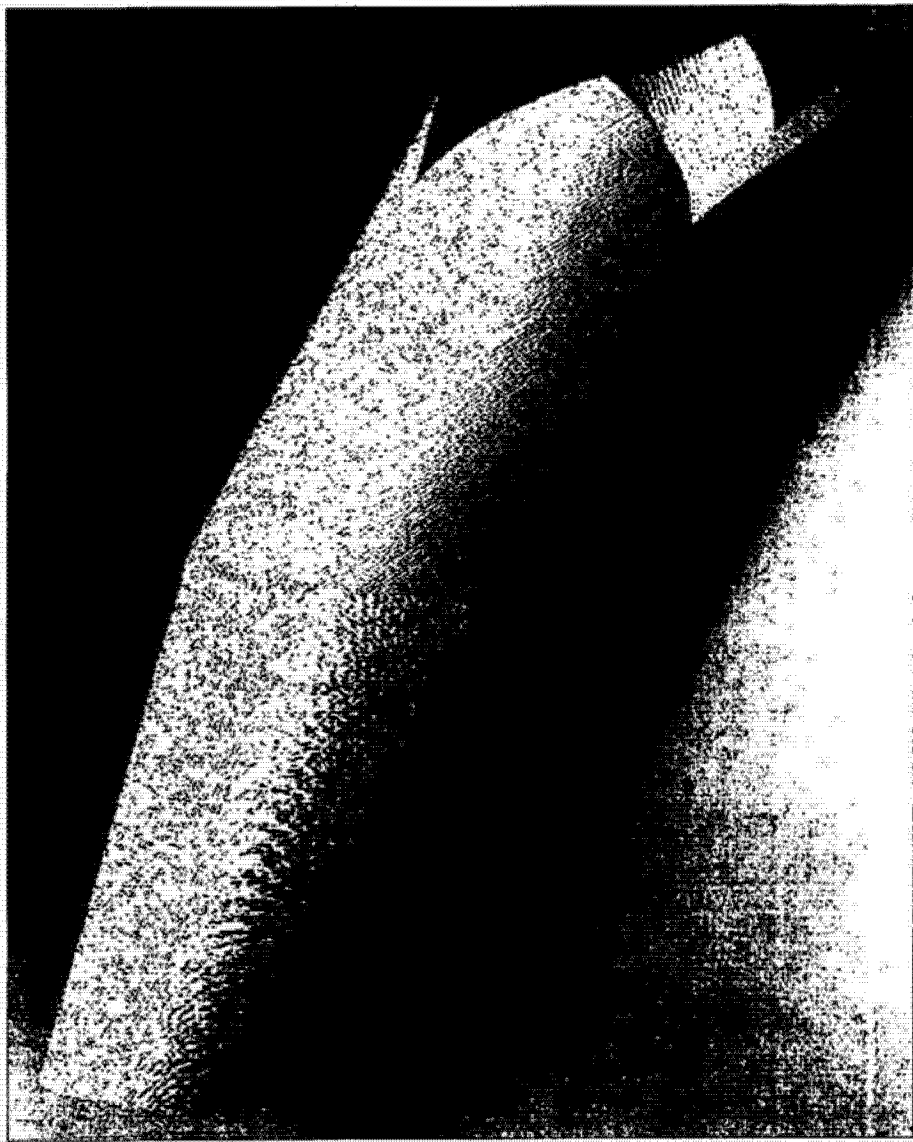


图 3A

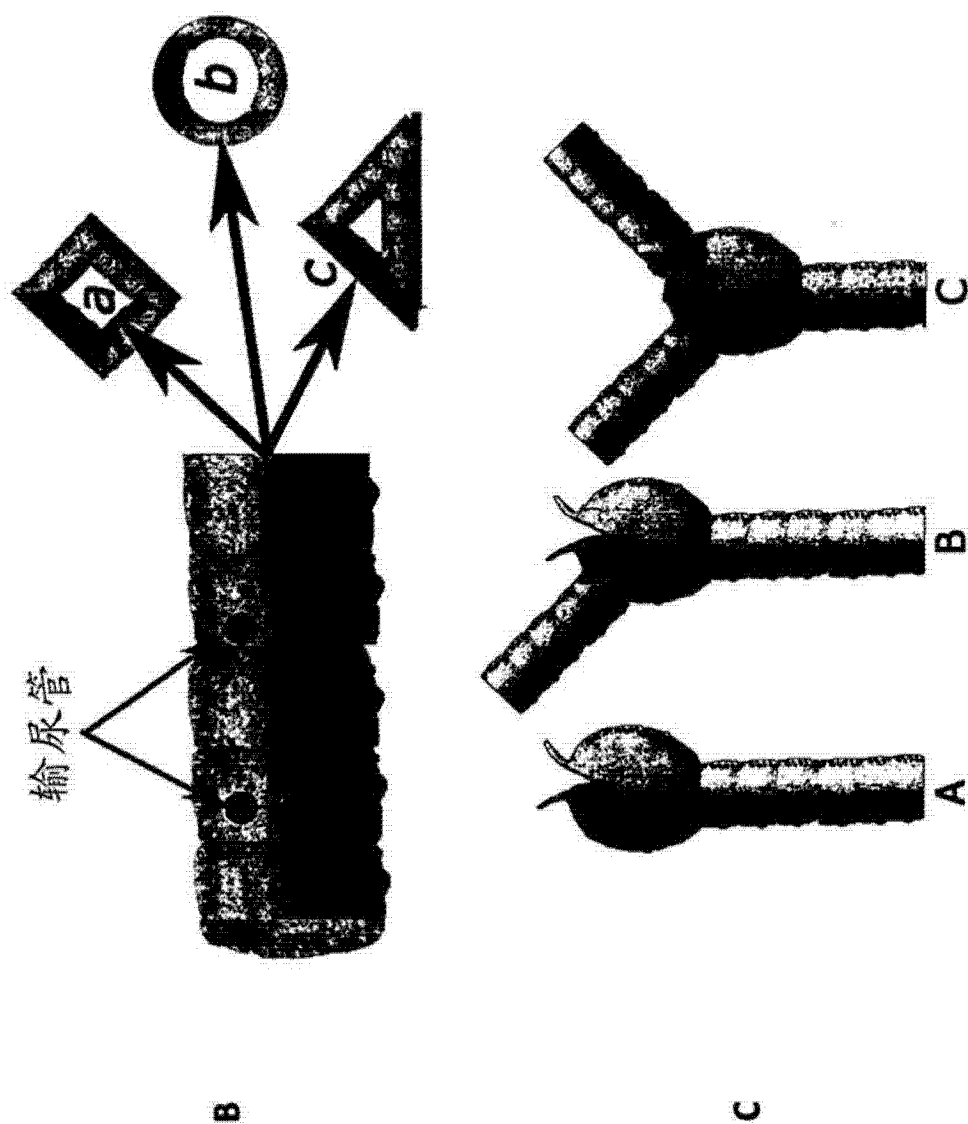


图 3B-C

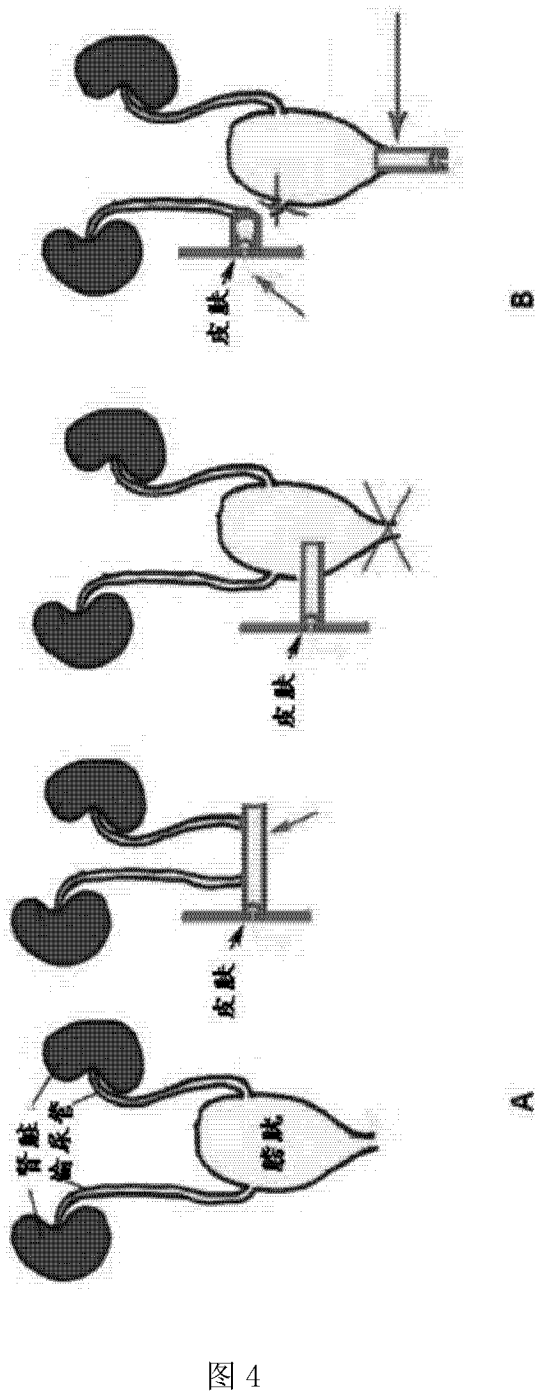
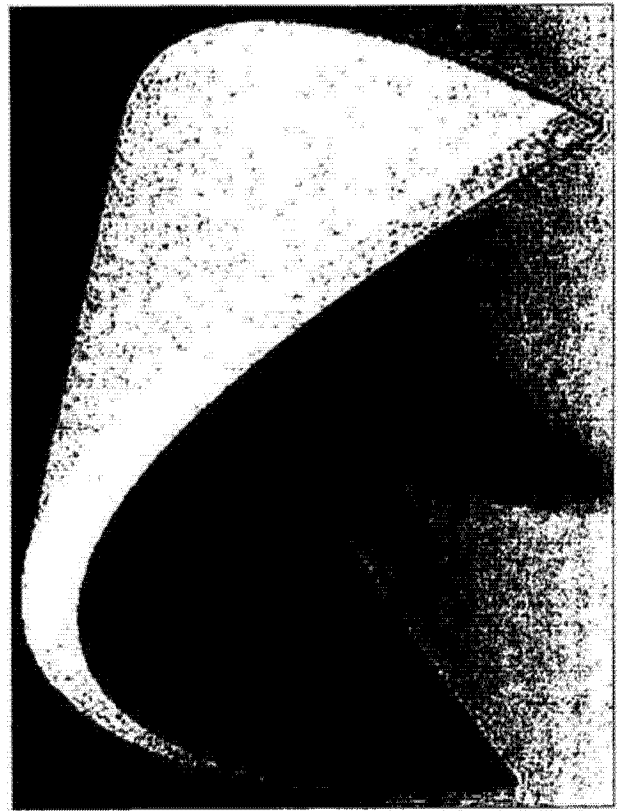


图 4

B



A

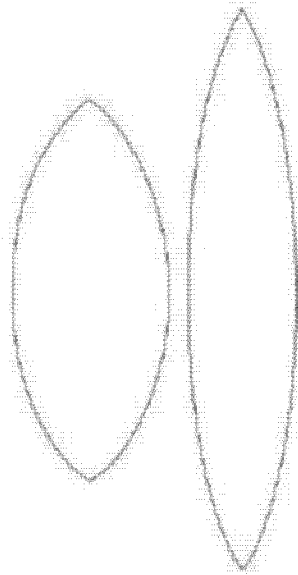


图 5A-B

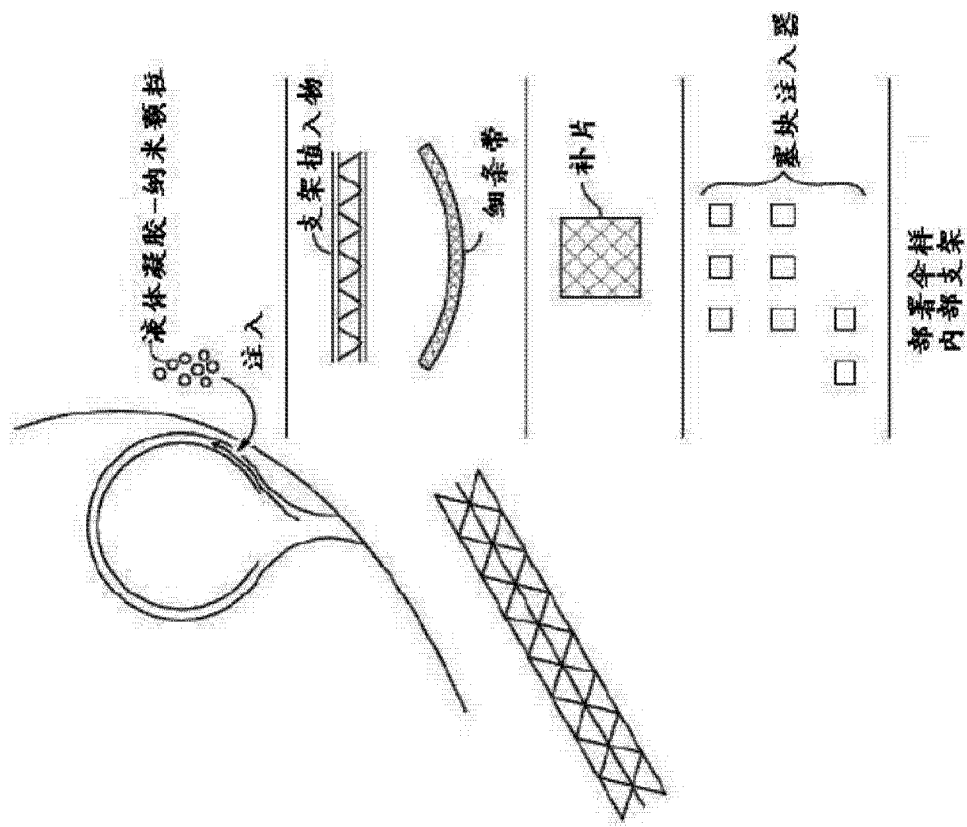


图 6

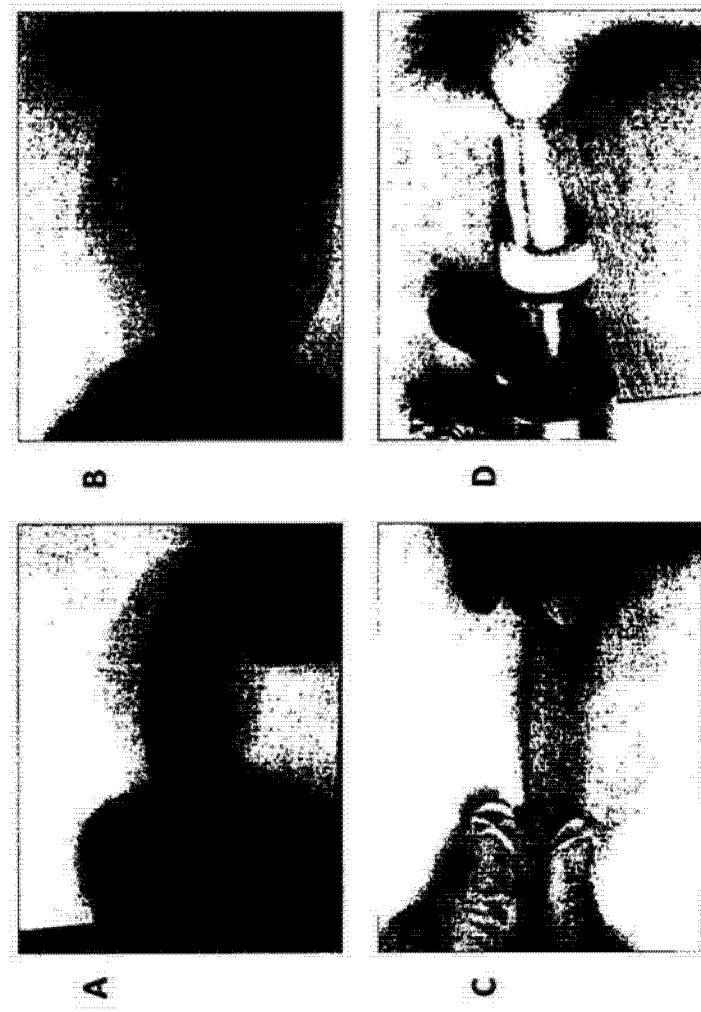


图 7A-D

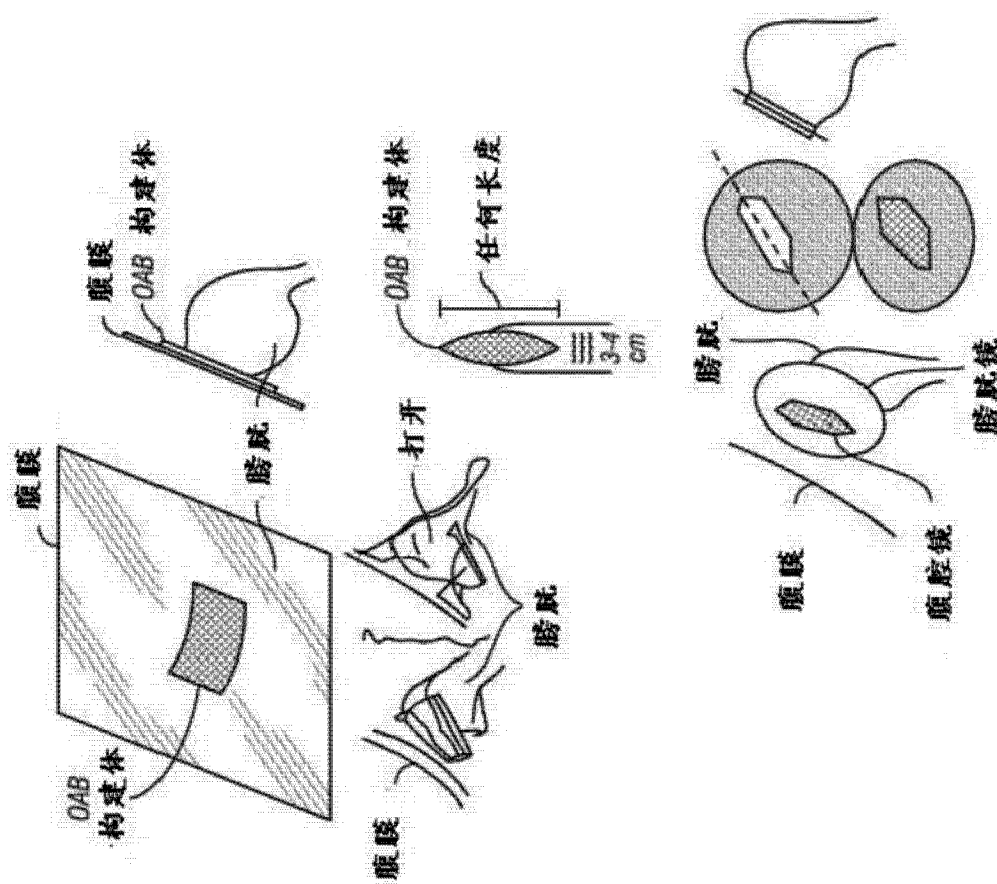


图 7E

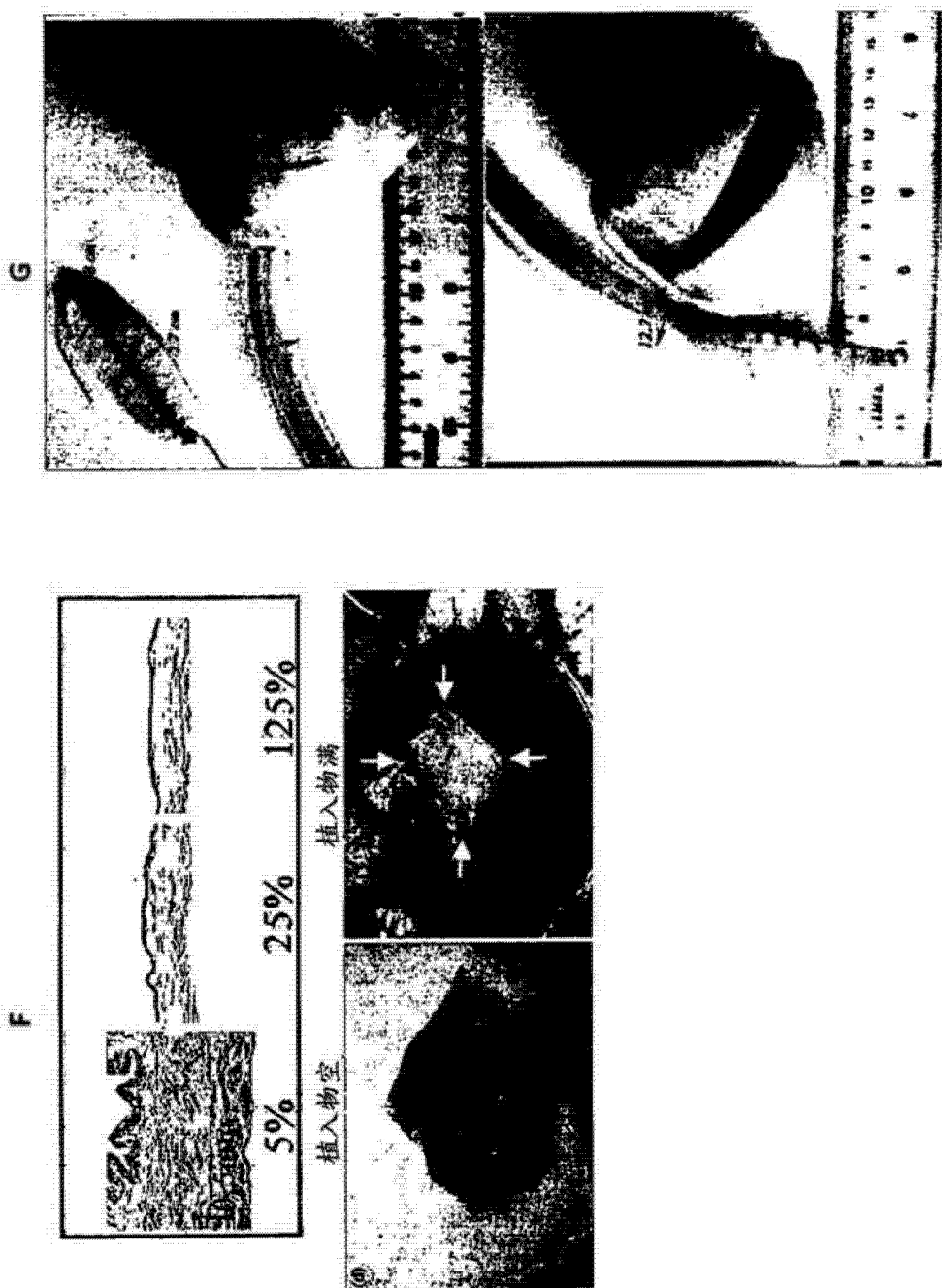


图 7F-G

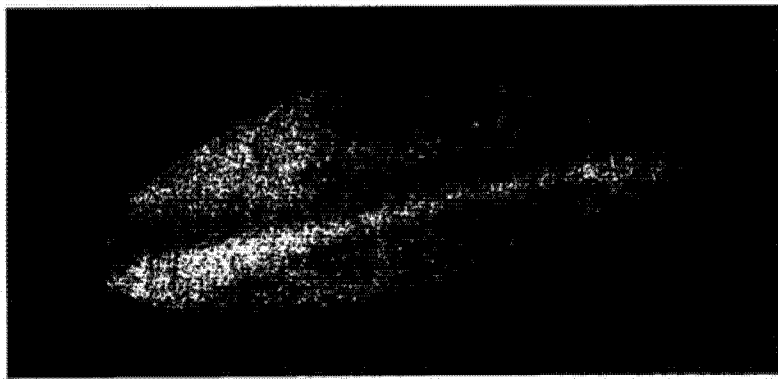


图 8

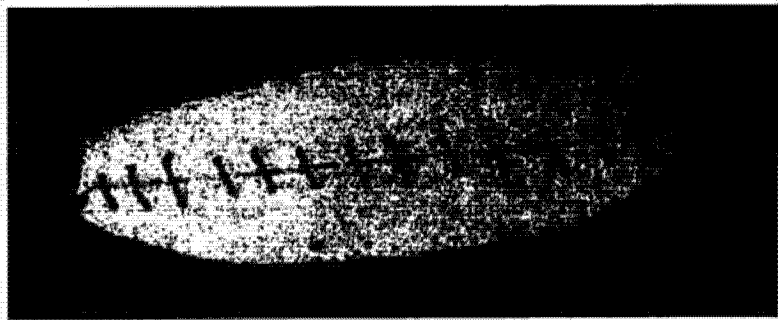


图 9A

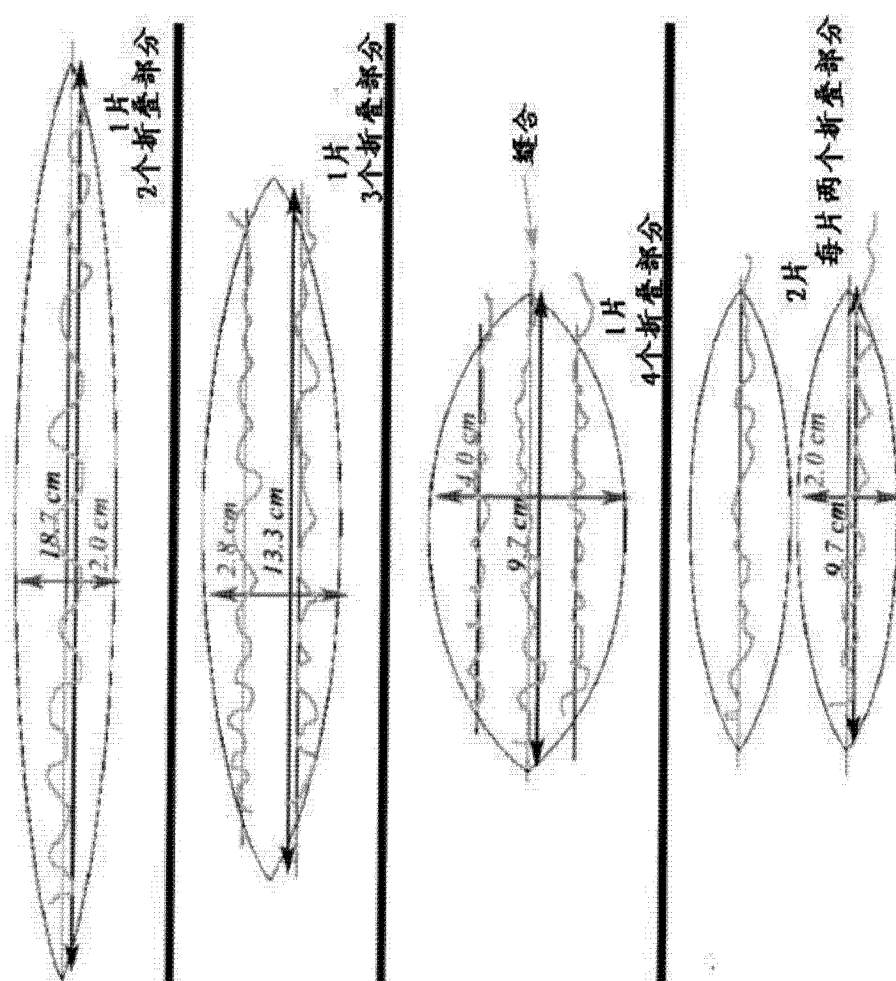


图 9B-E

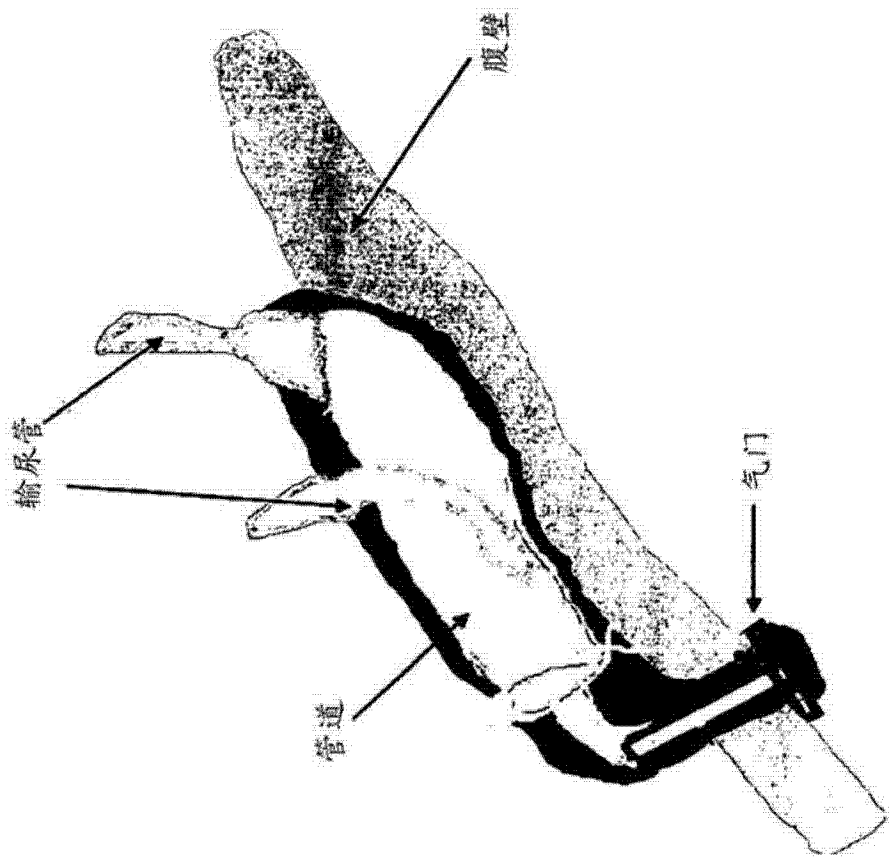


图 10

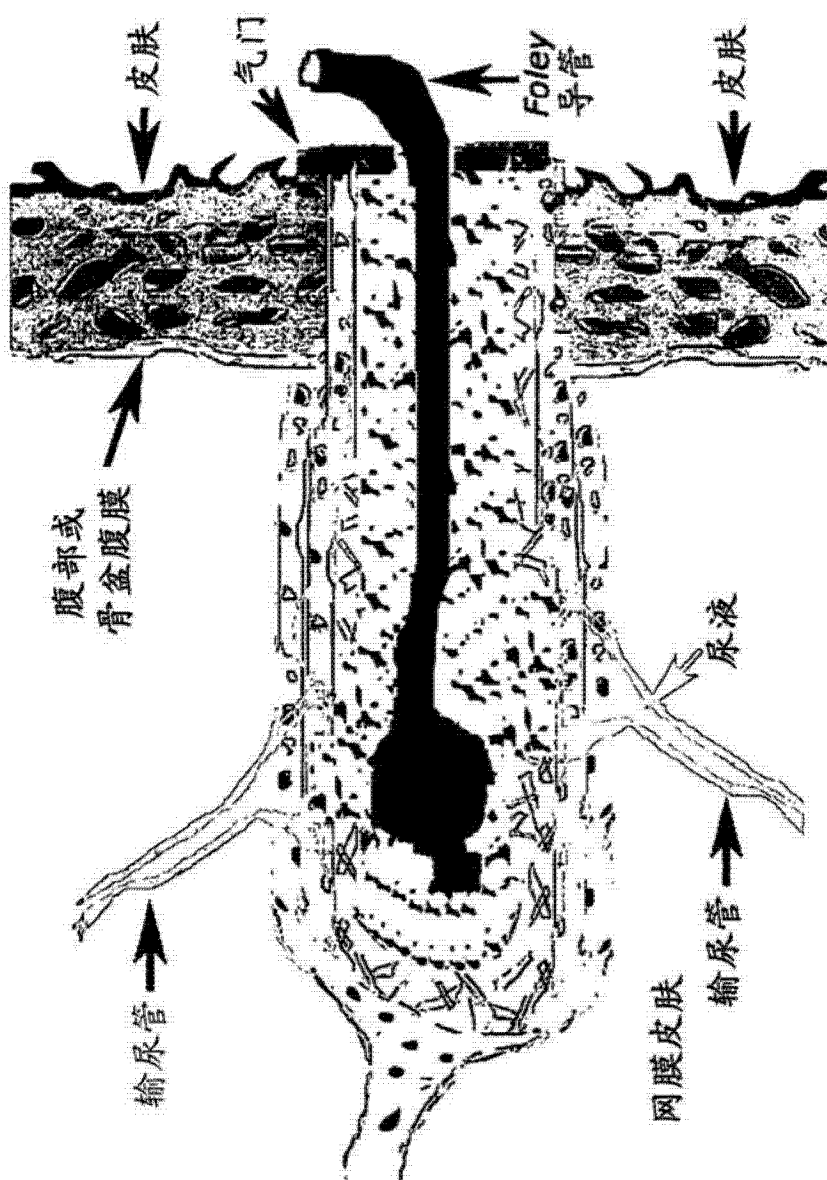


图 11A

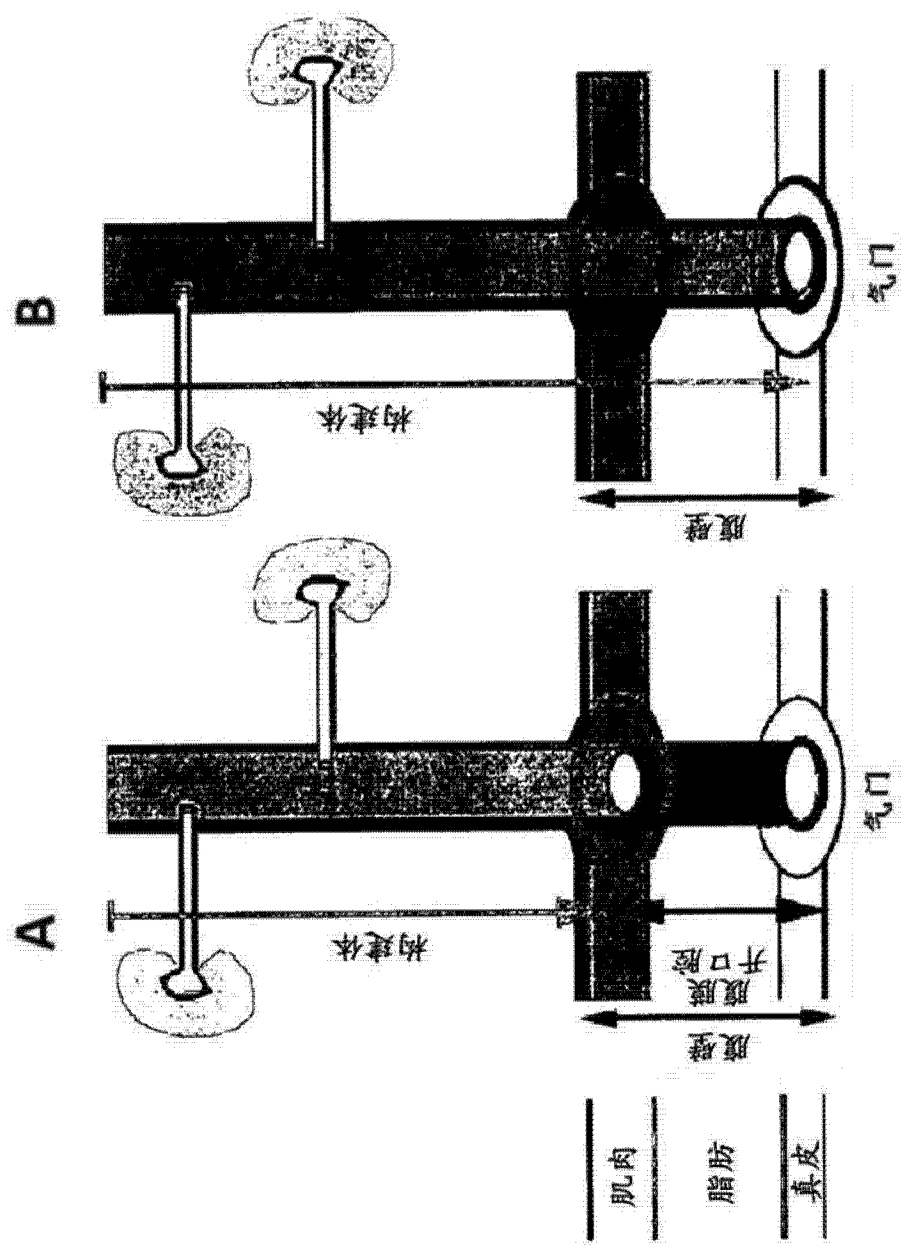


图 11B

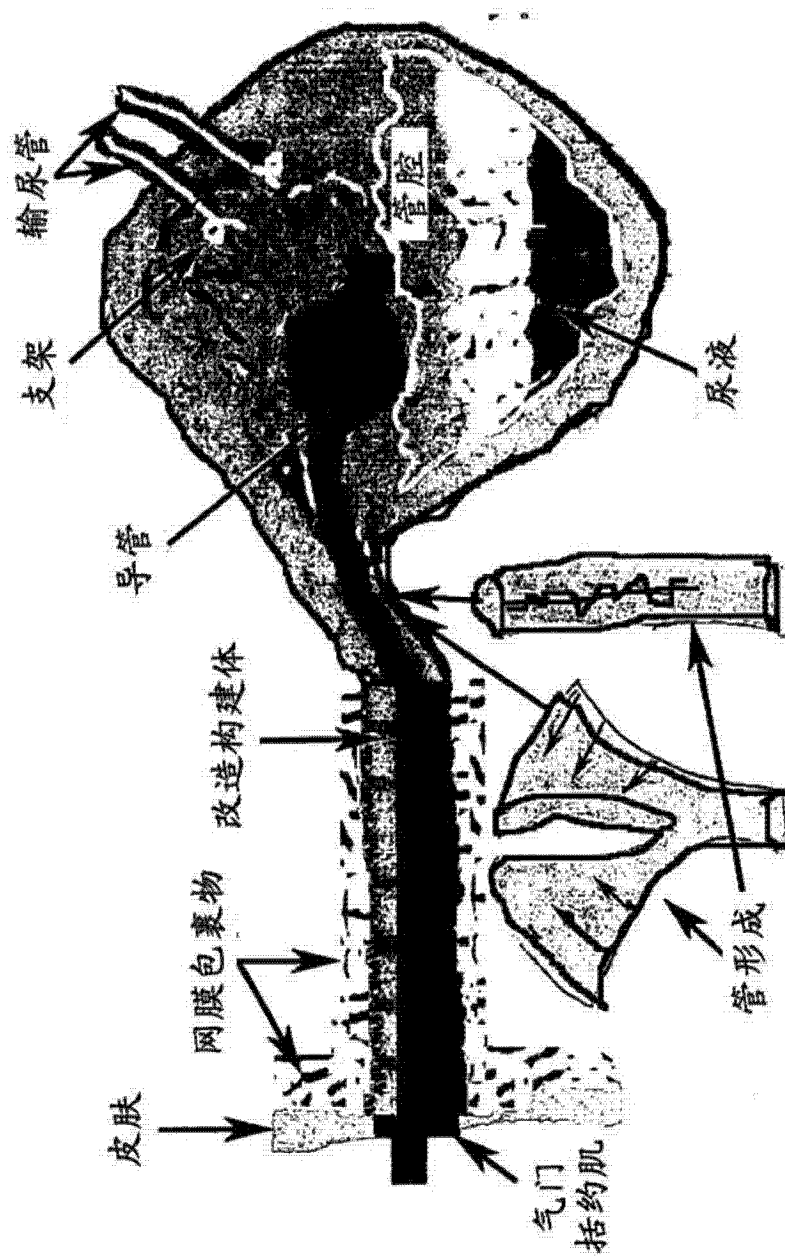


图 12

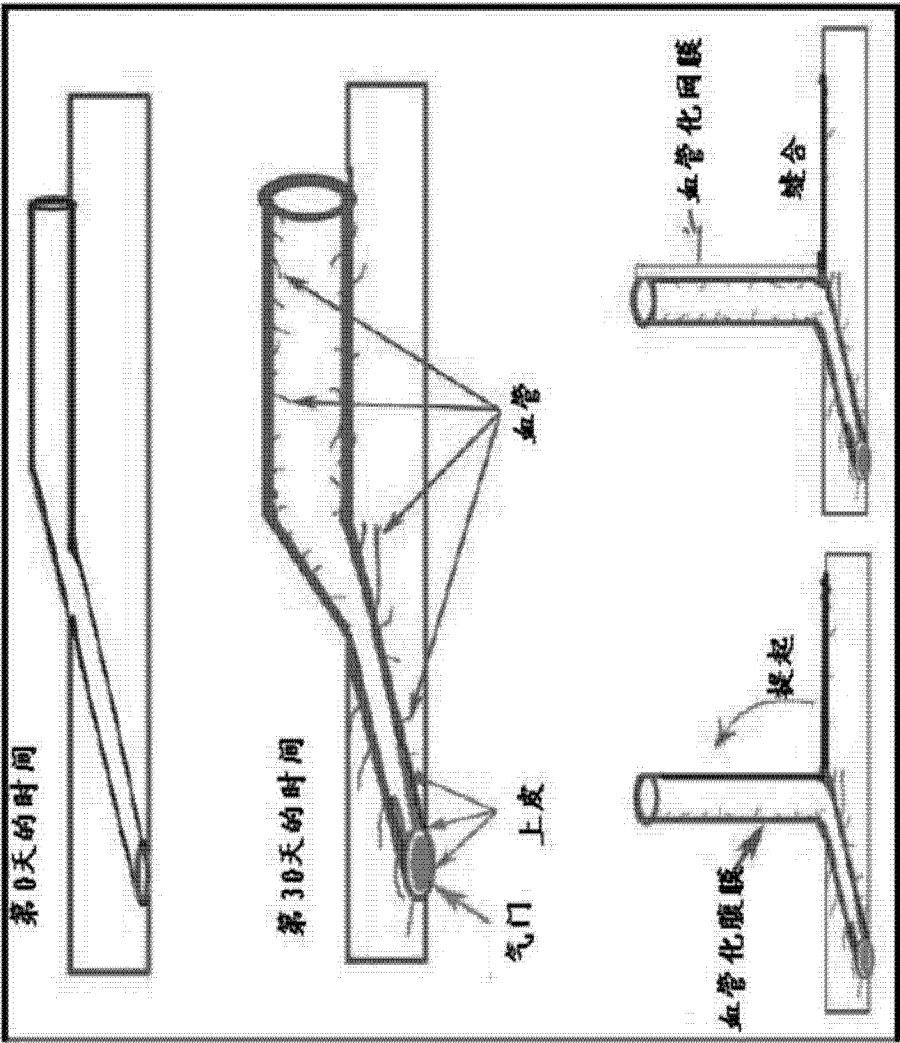


图 13

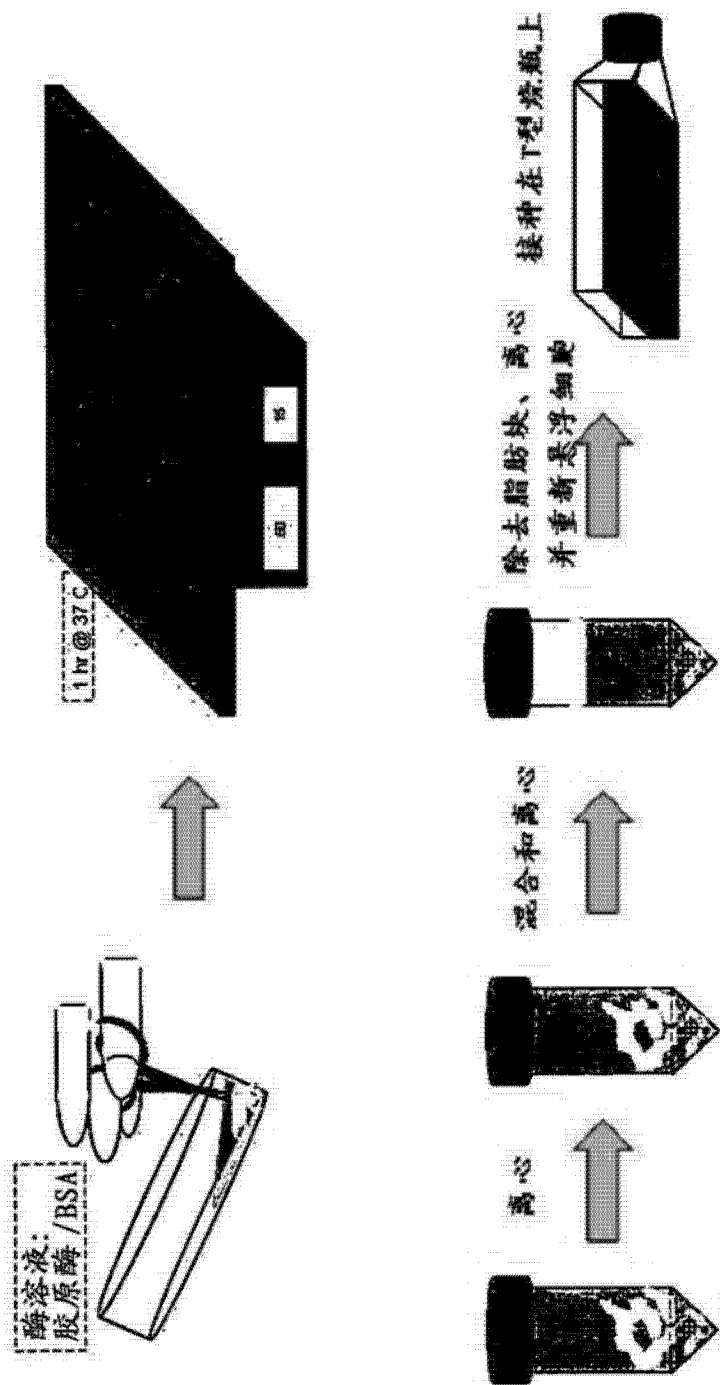


图 14

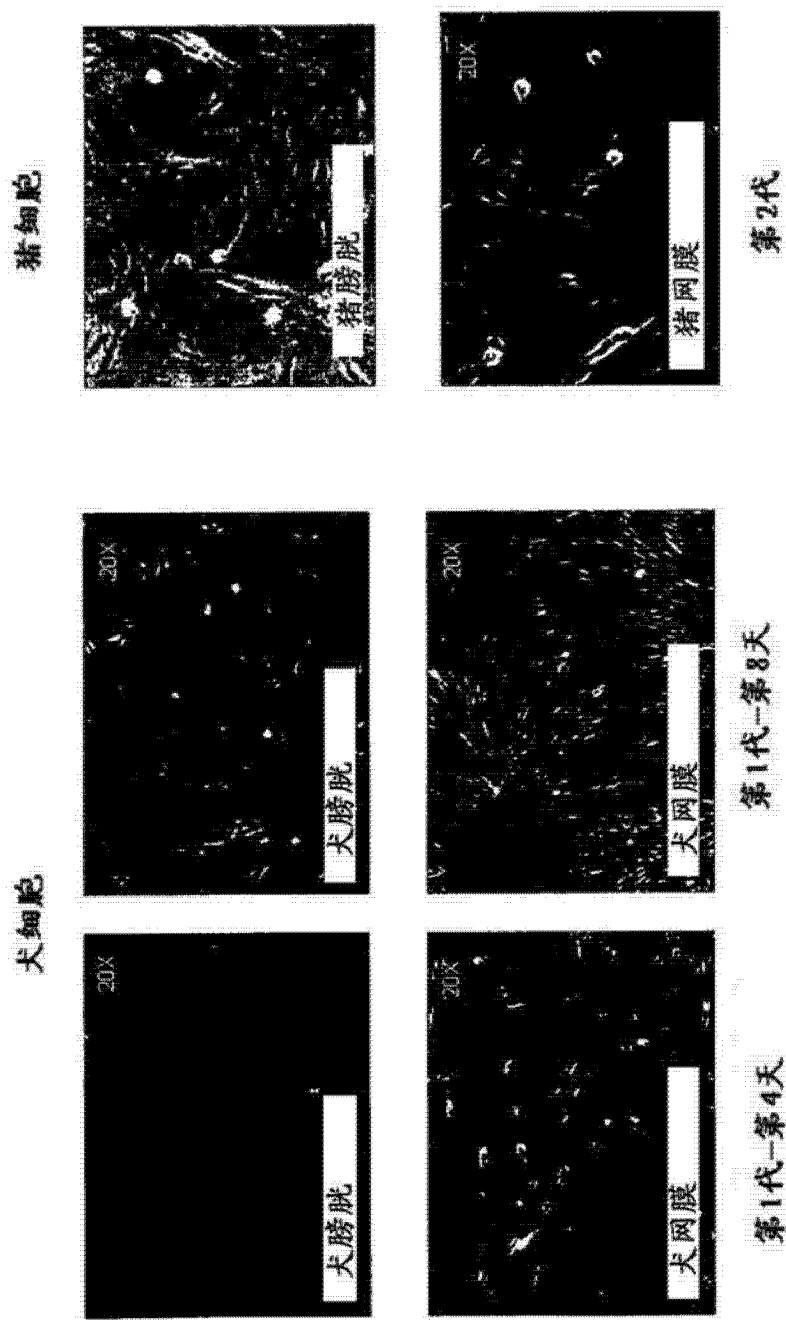


图 15

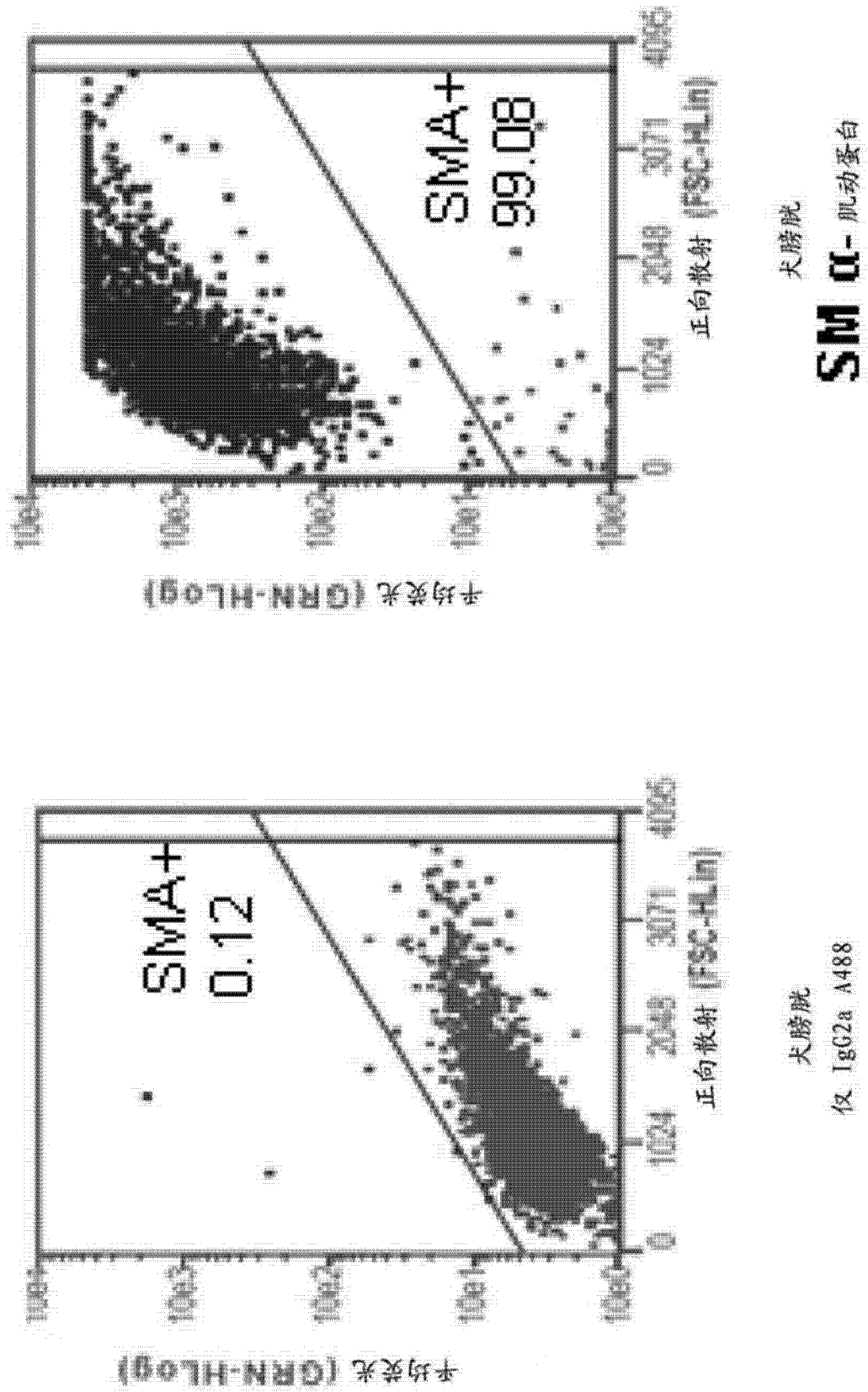


图 16A

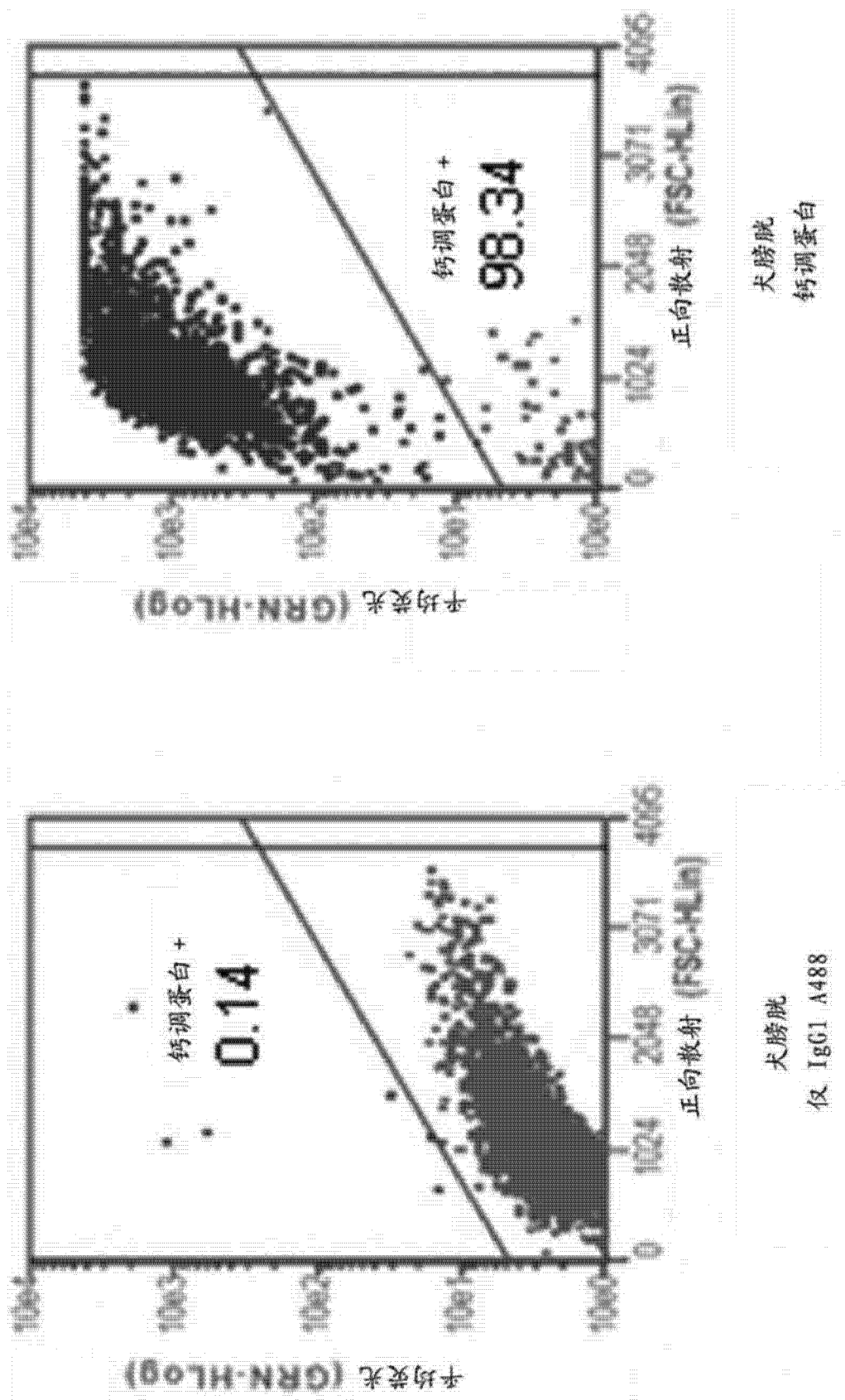


图 16B

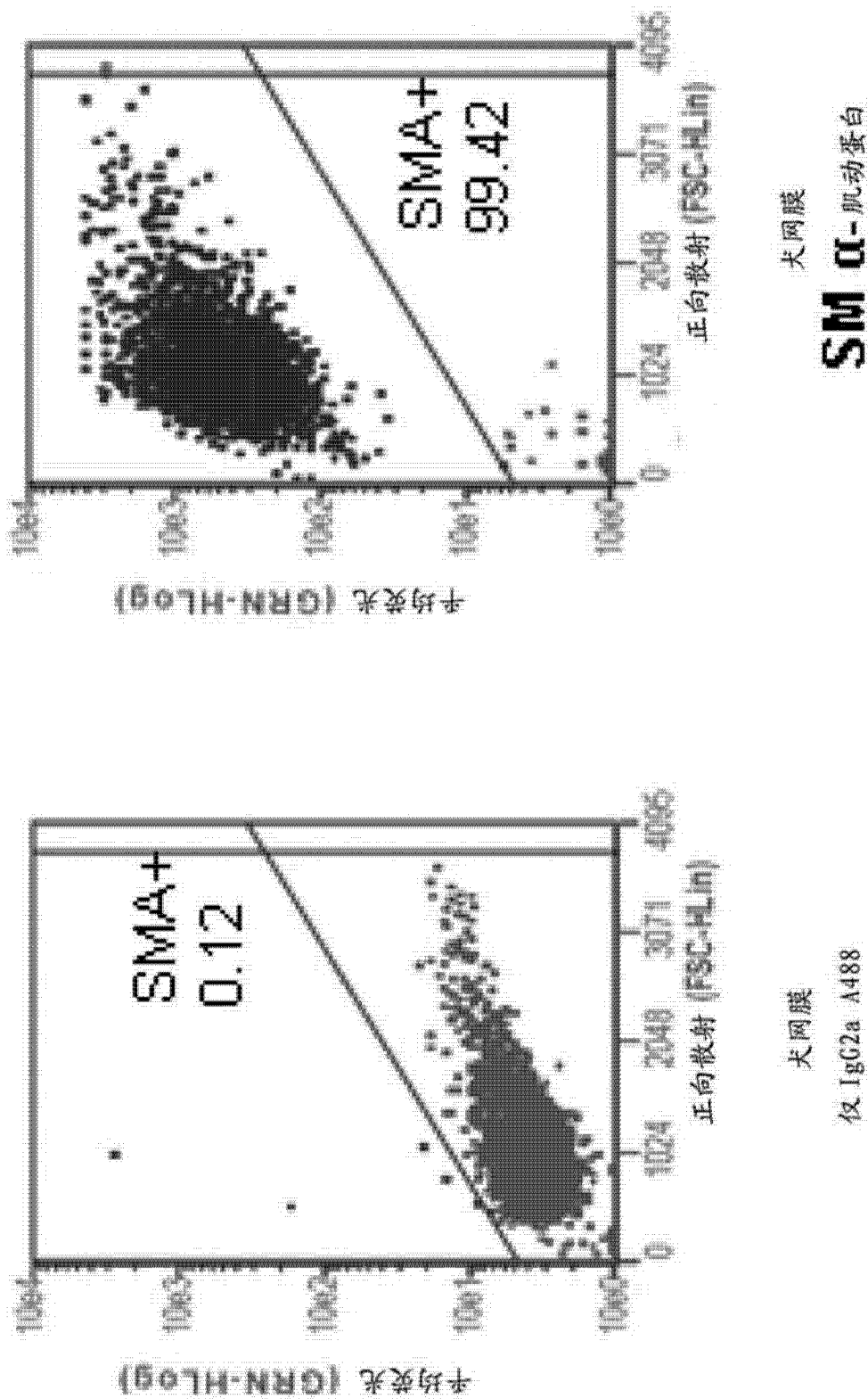


图 16C

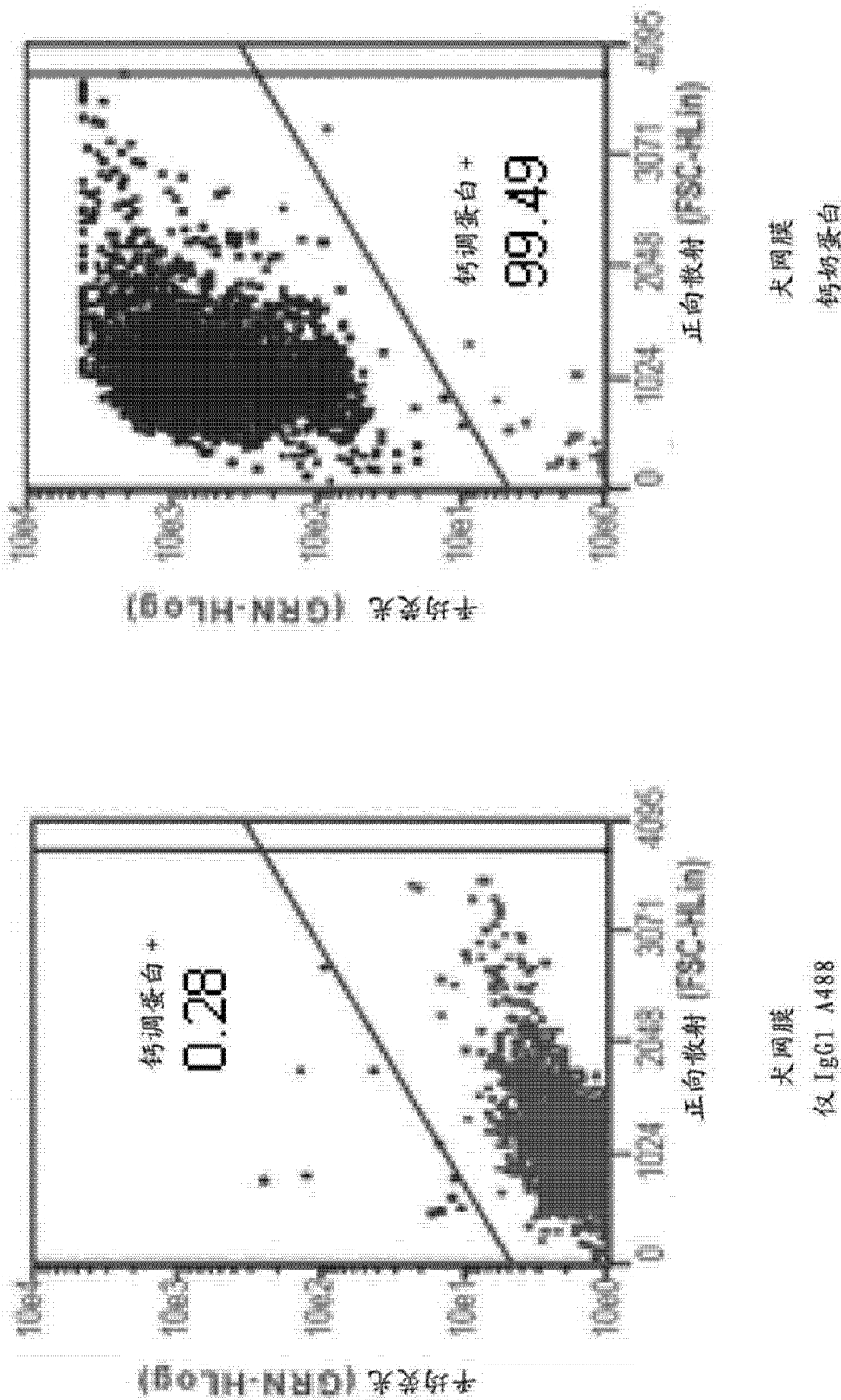


图 16D

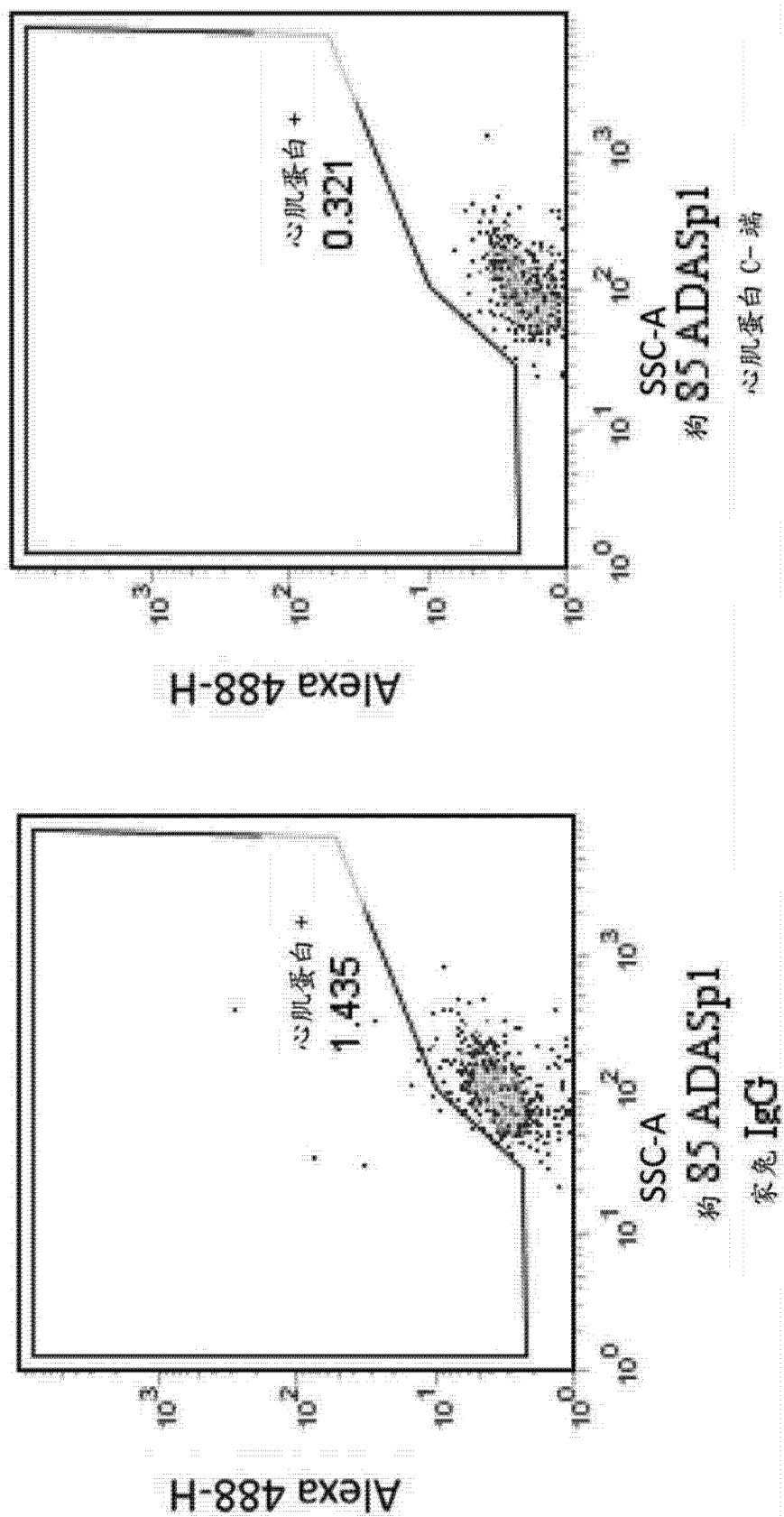


图 17A

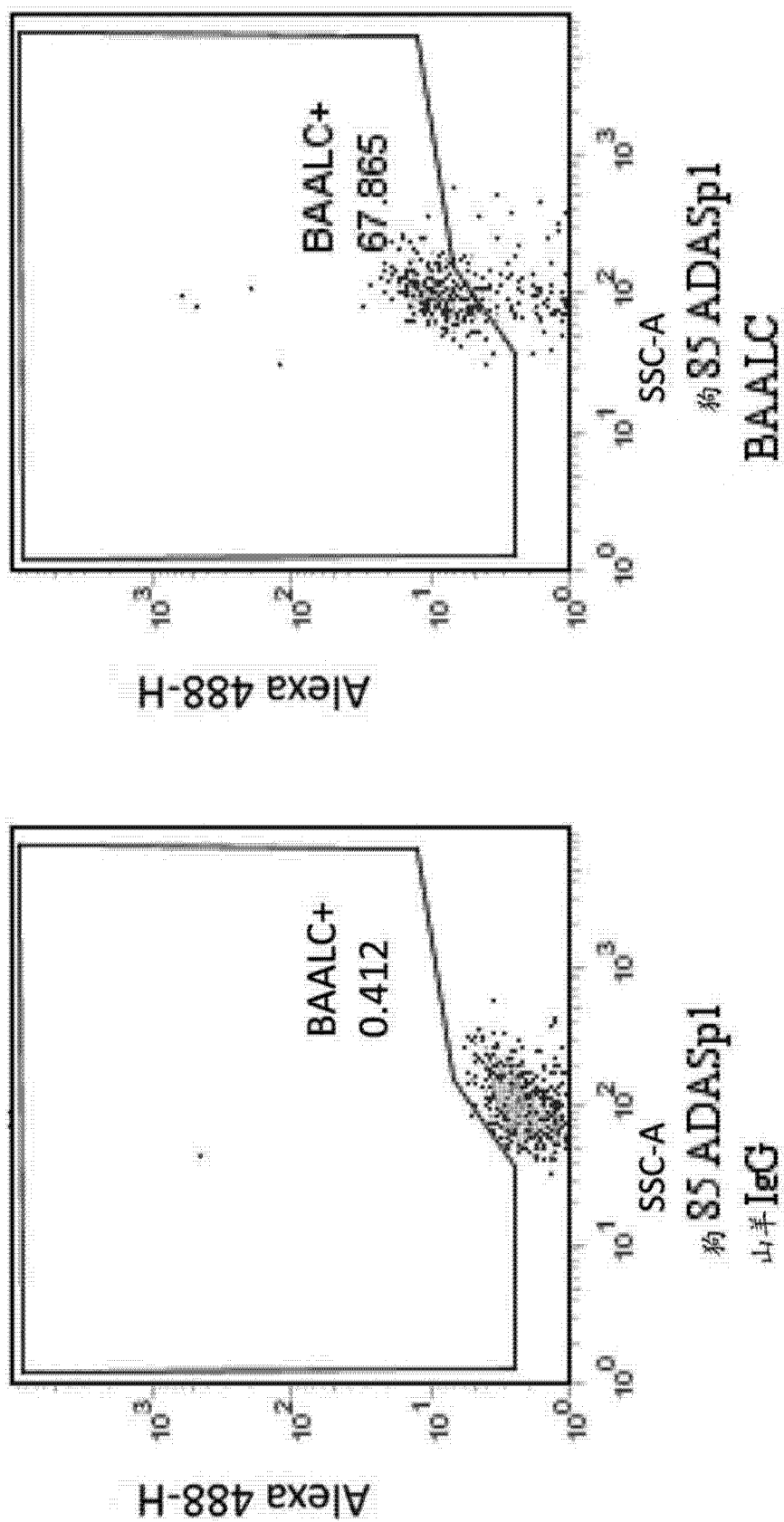


图 17B

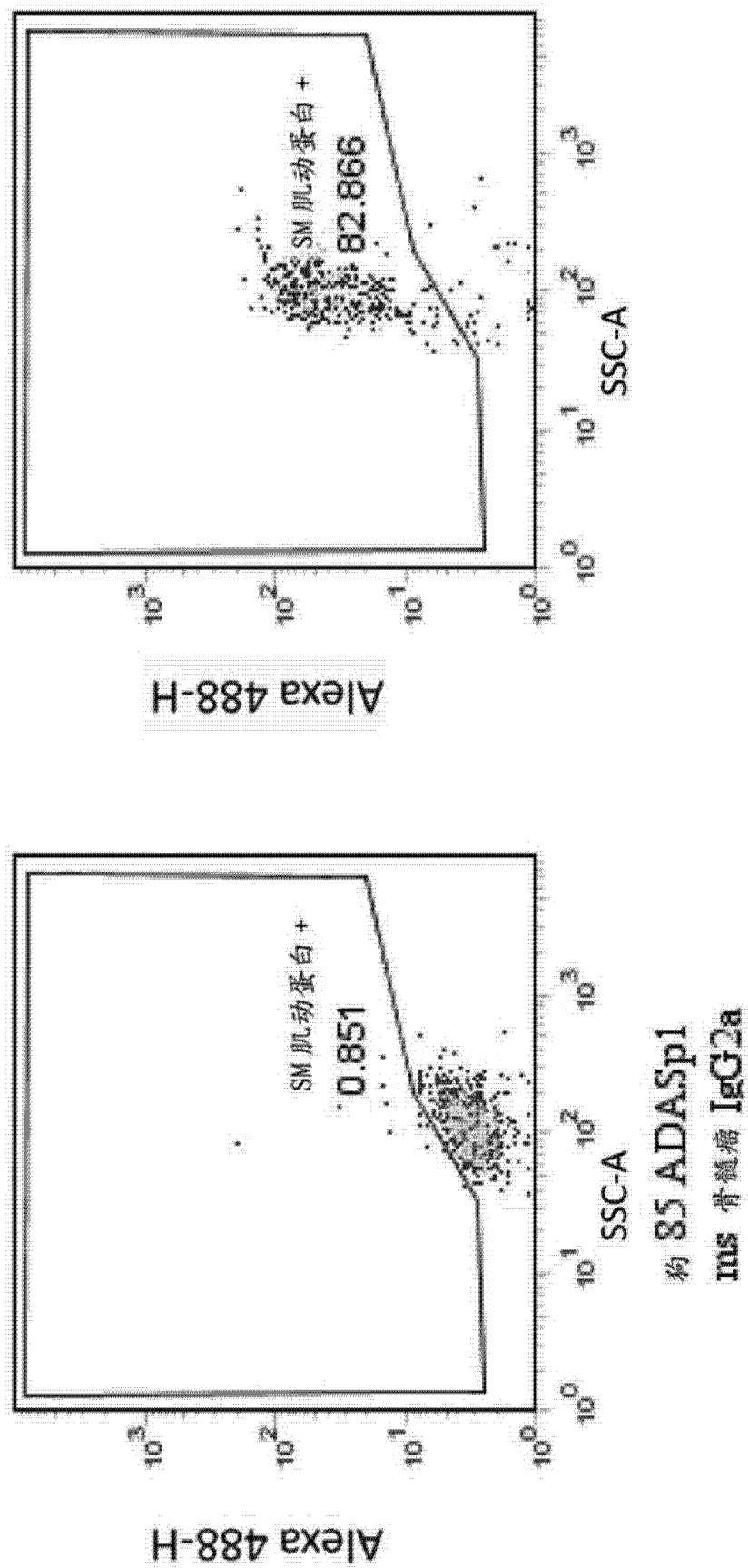


图 17C

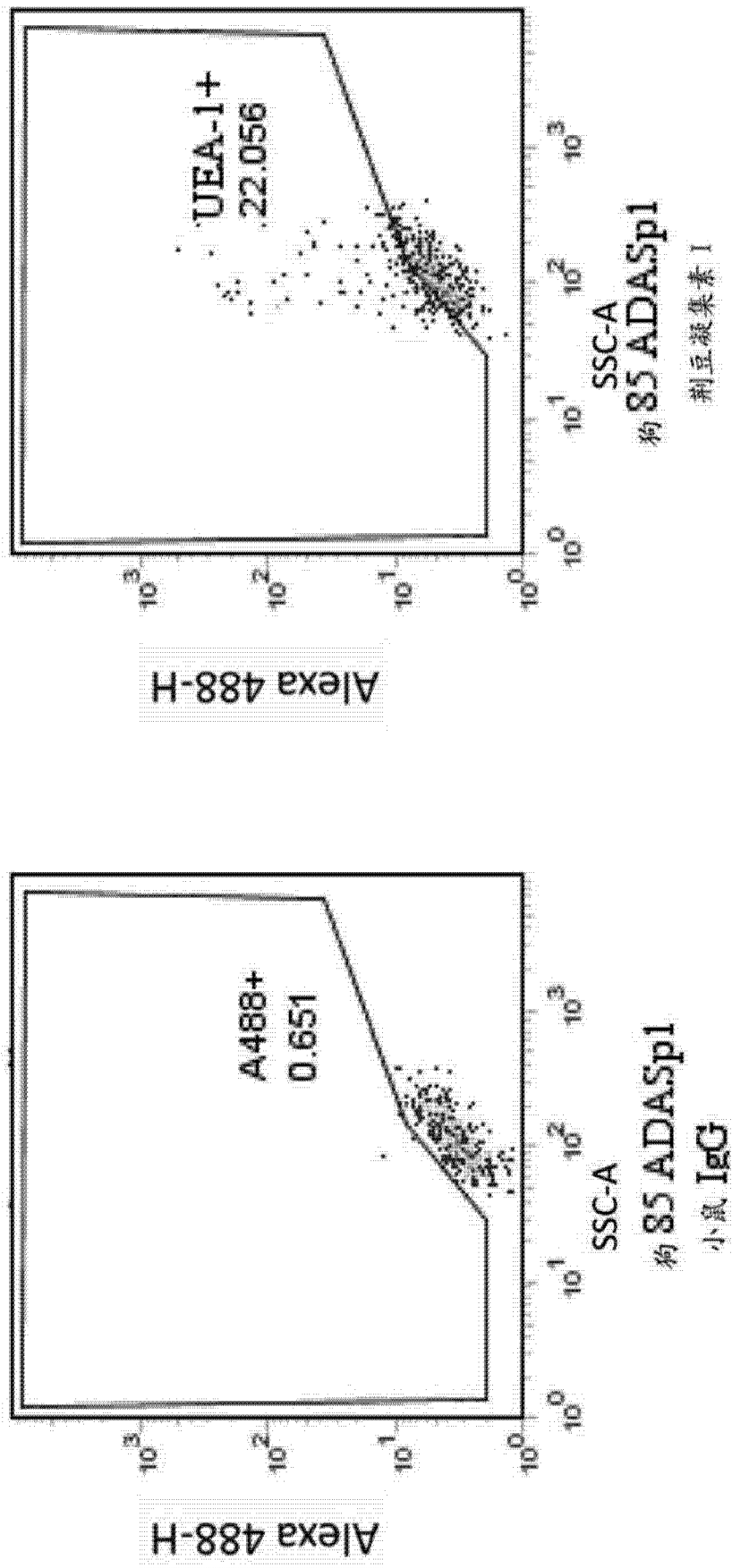


图 17D

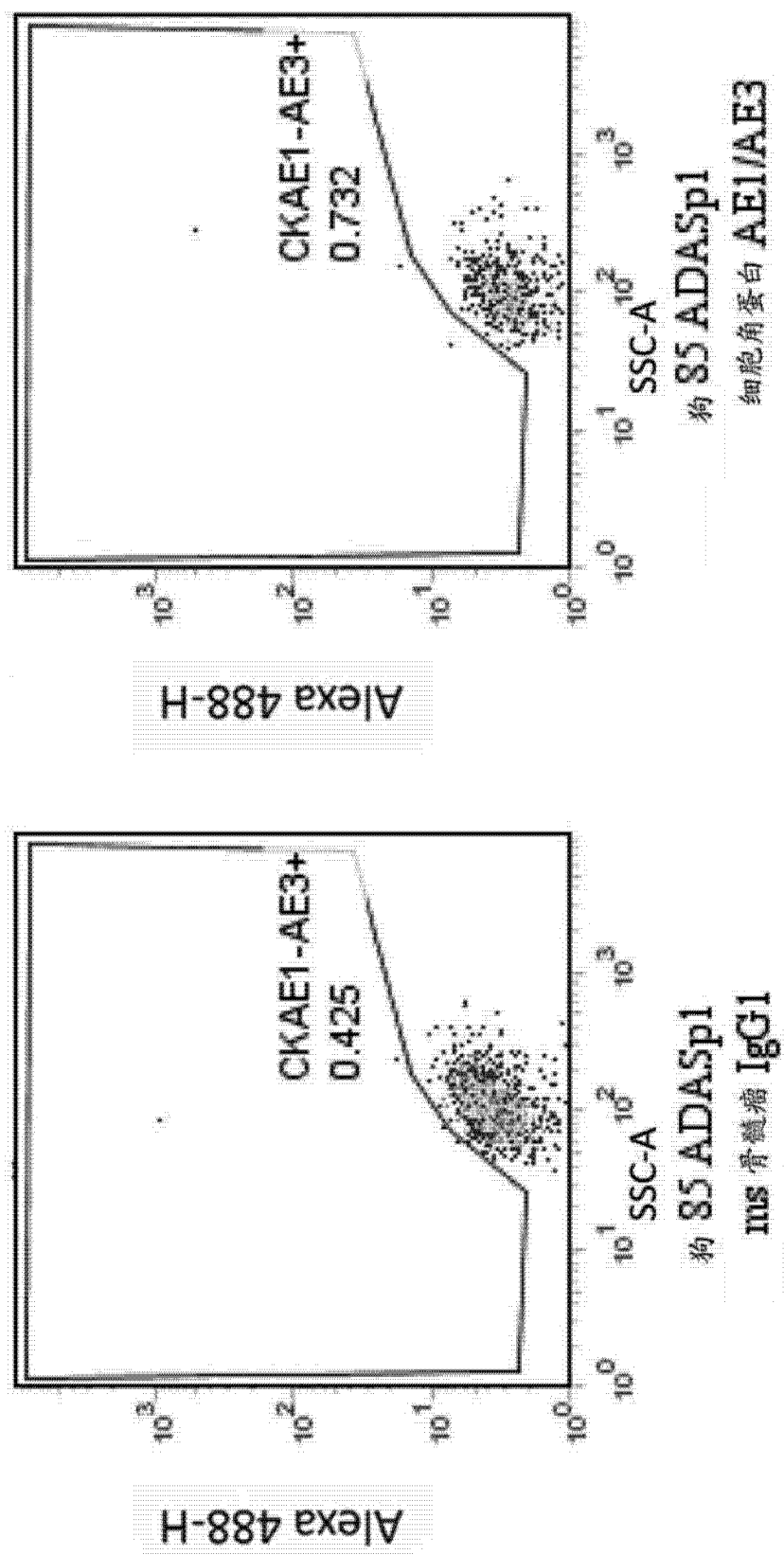


图 17E

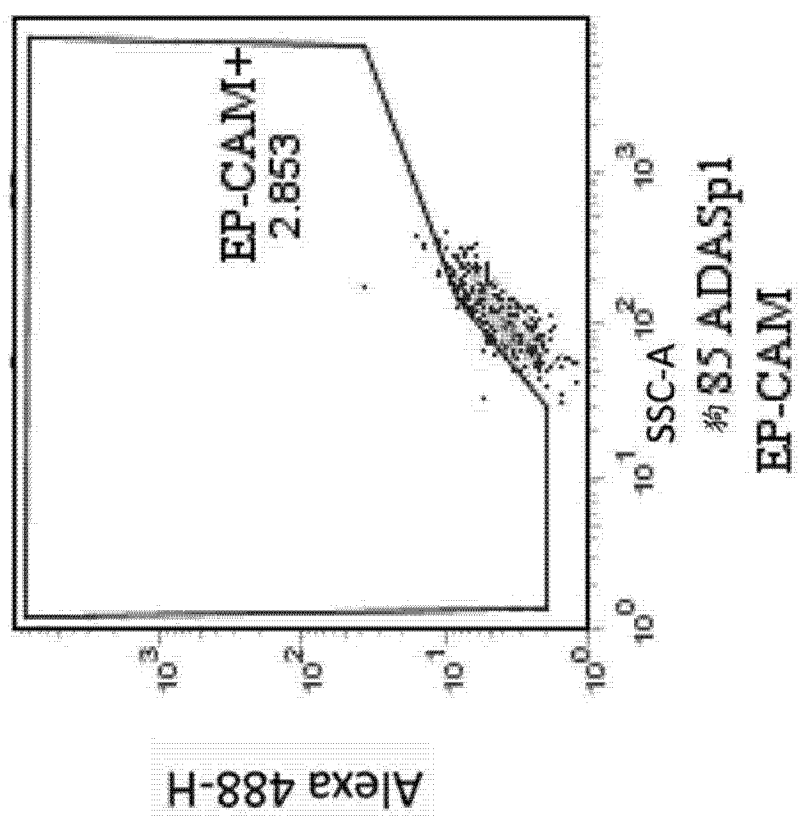


图 17F

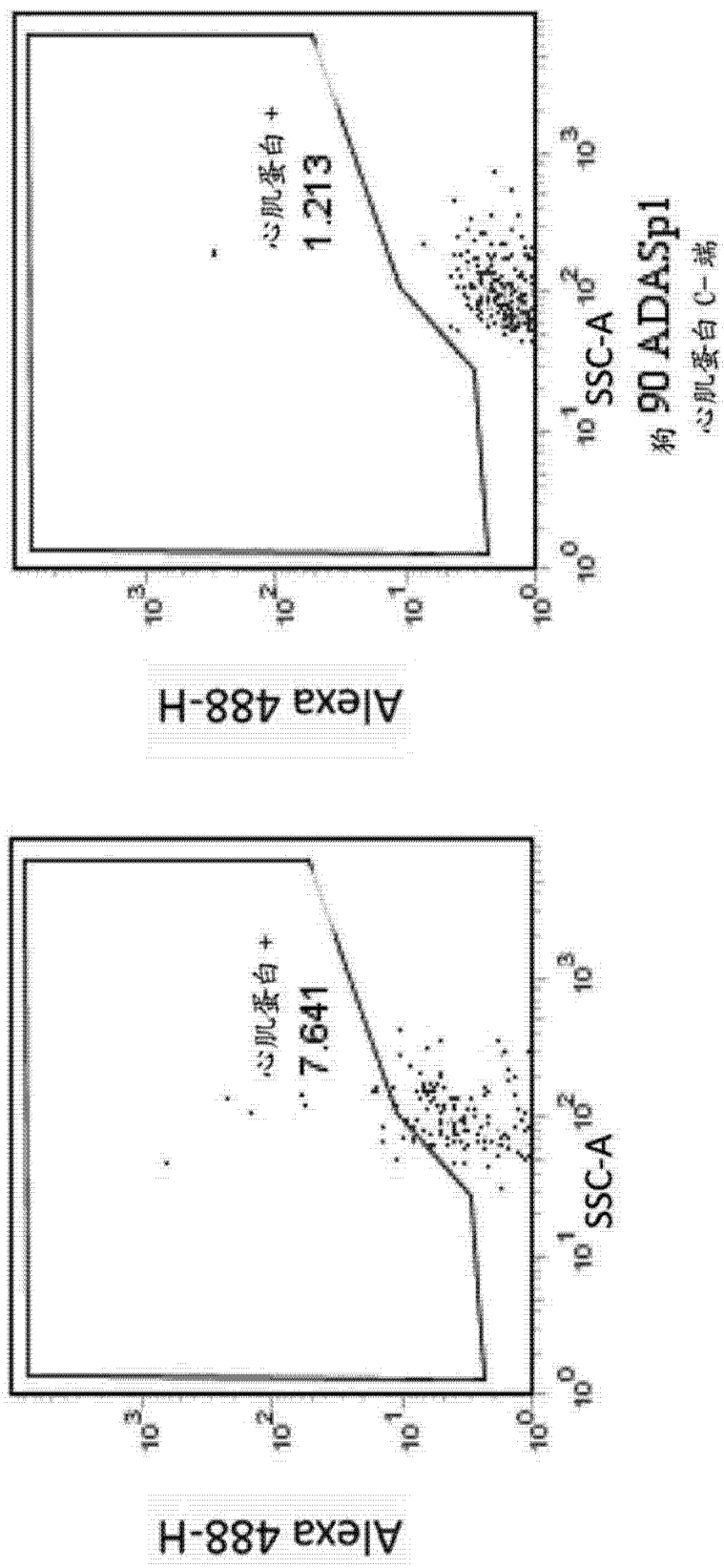


图 18A

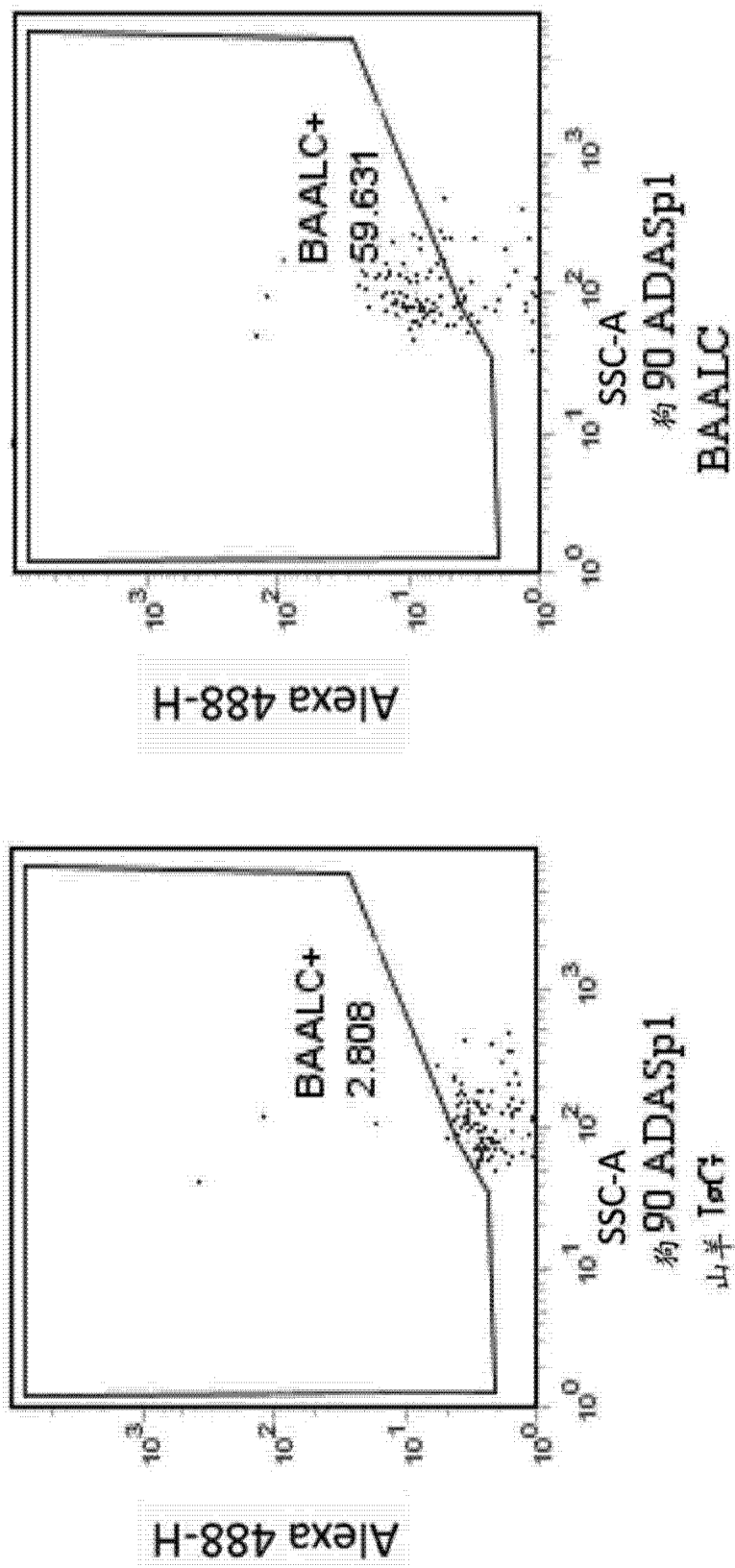


图 18B

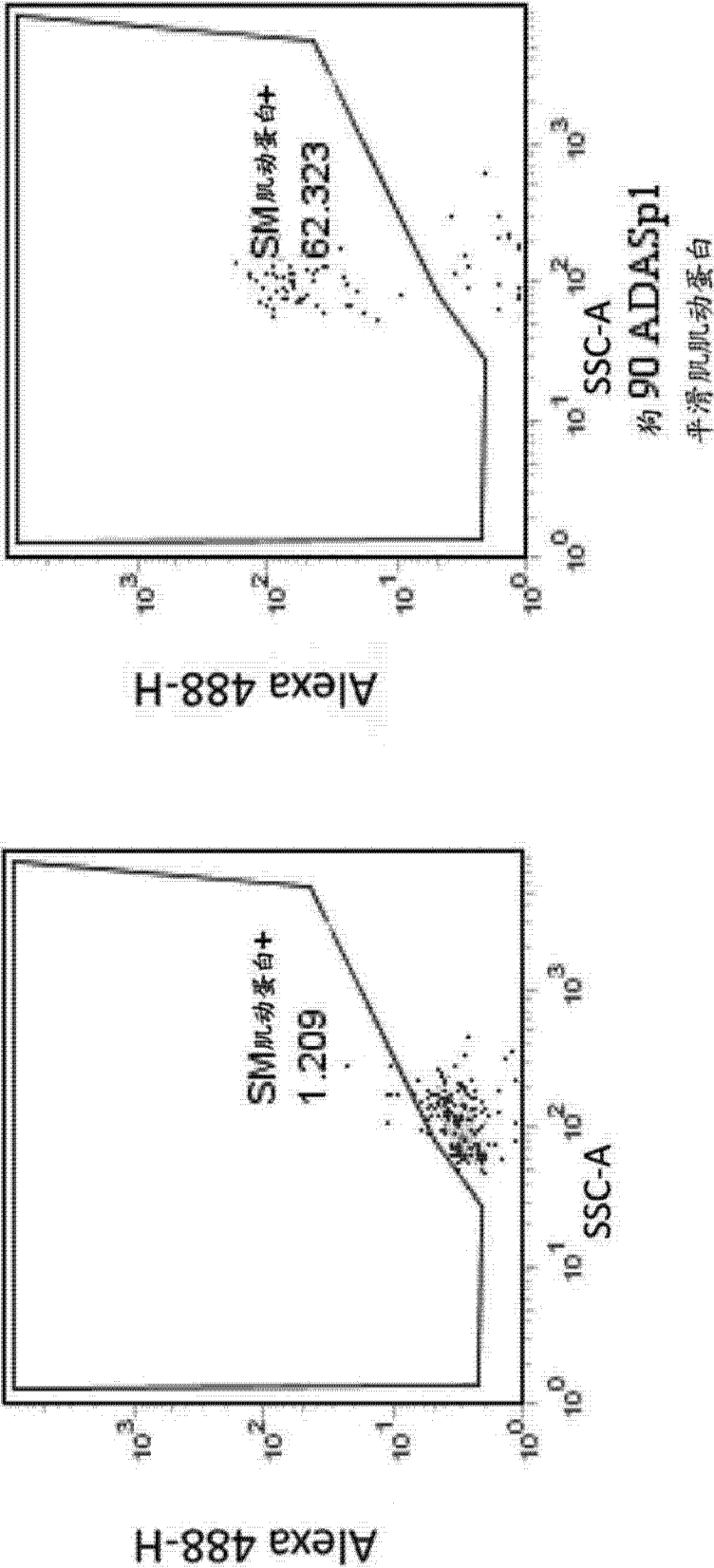


图 18C

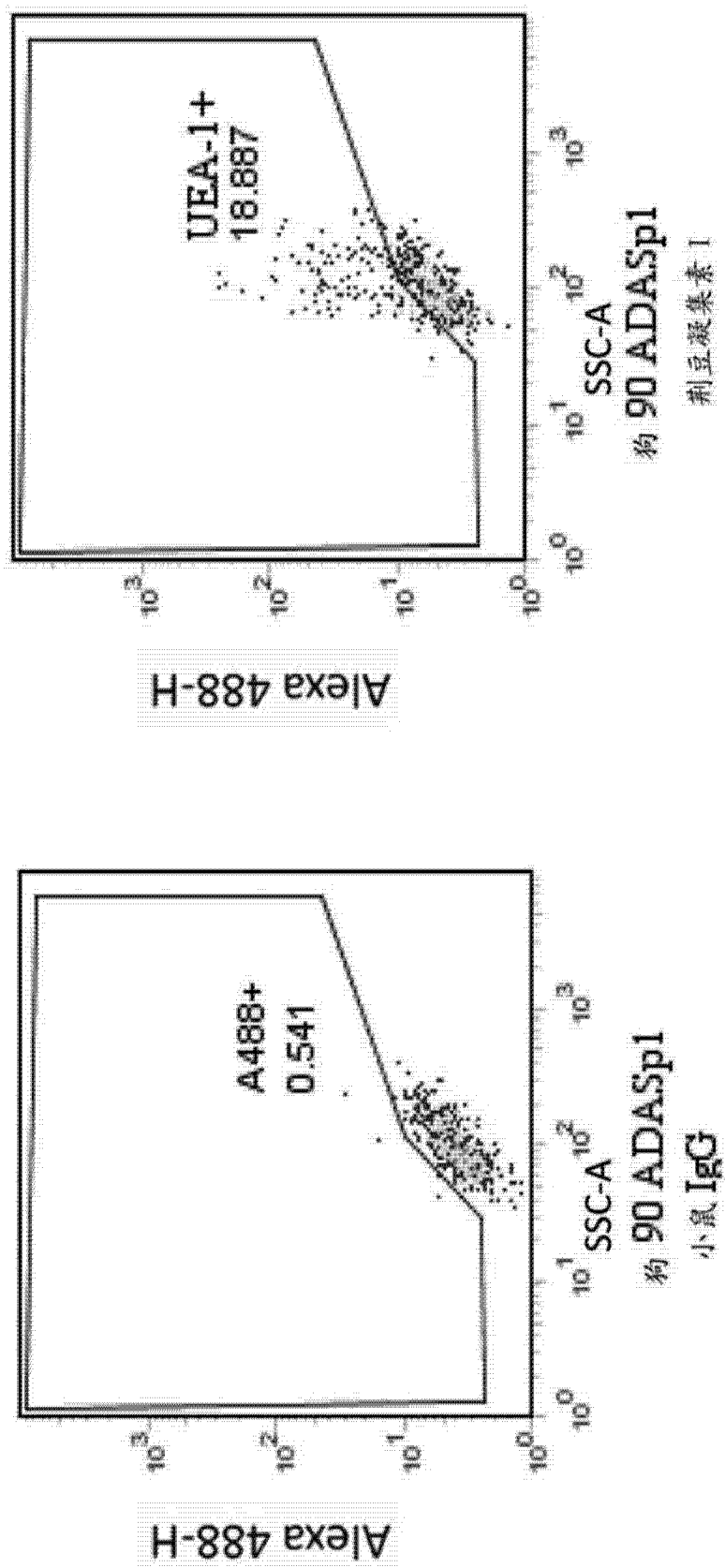


图 18D

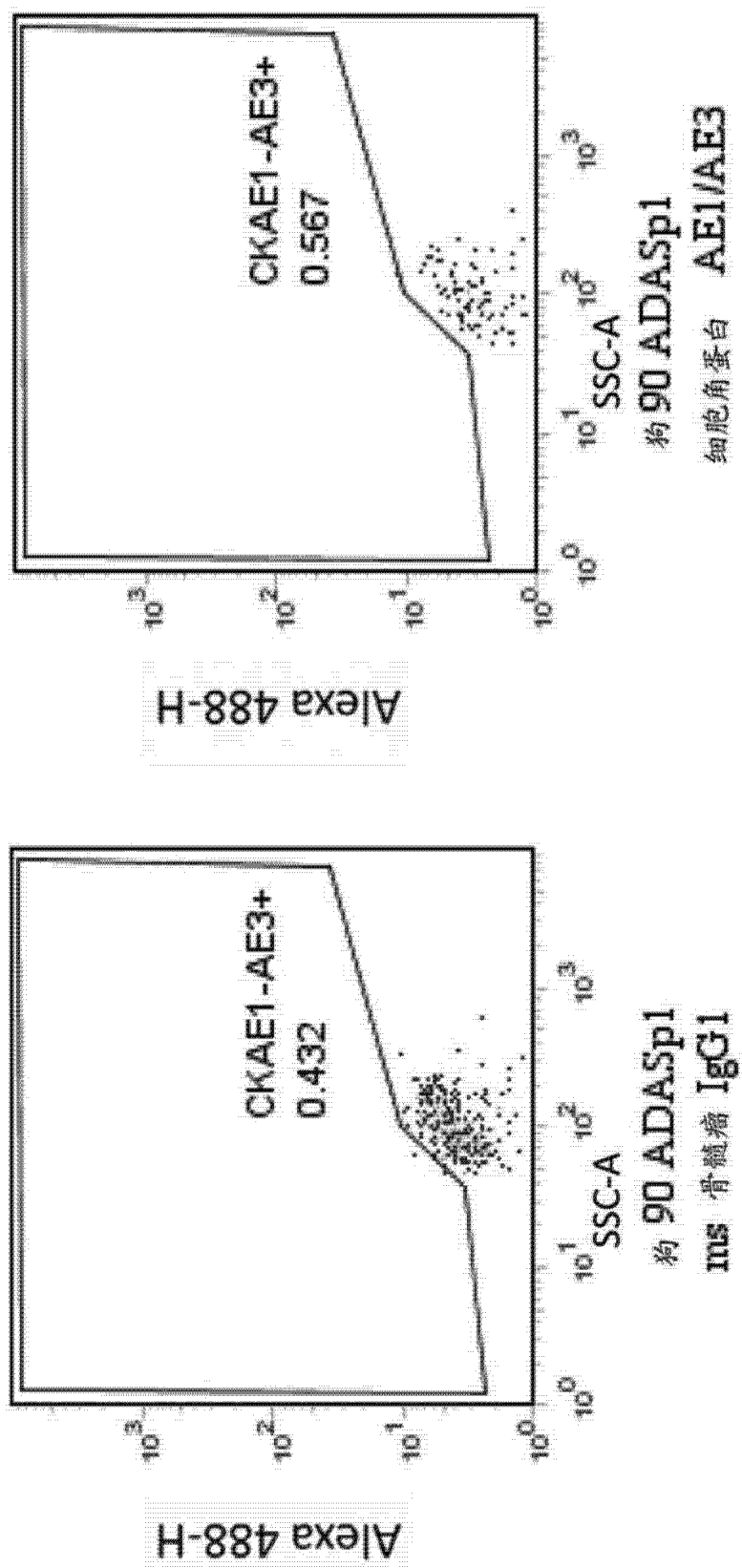


图 18E

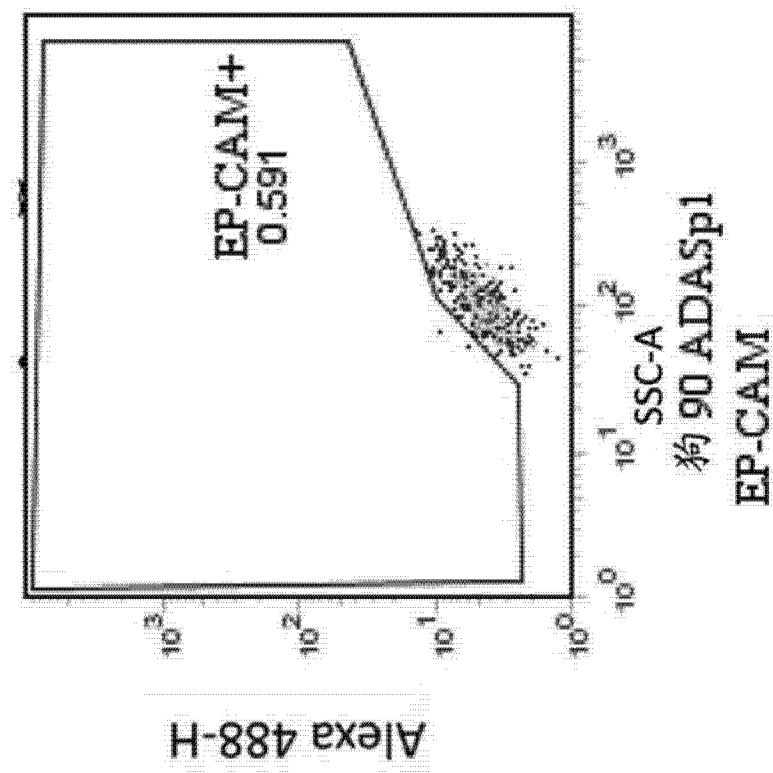


图 18F

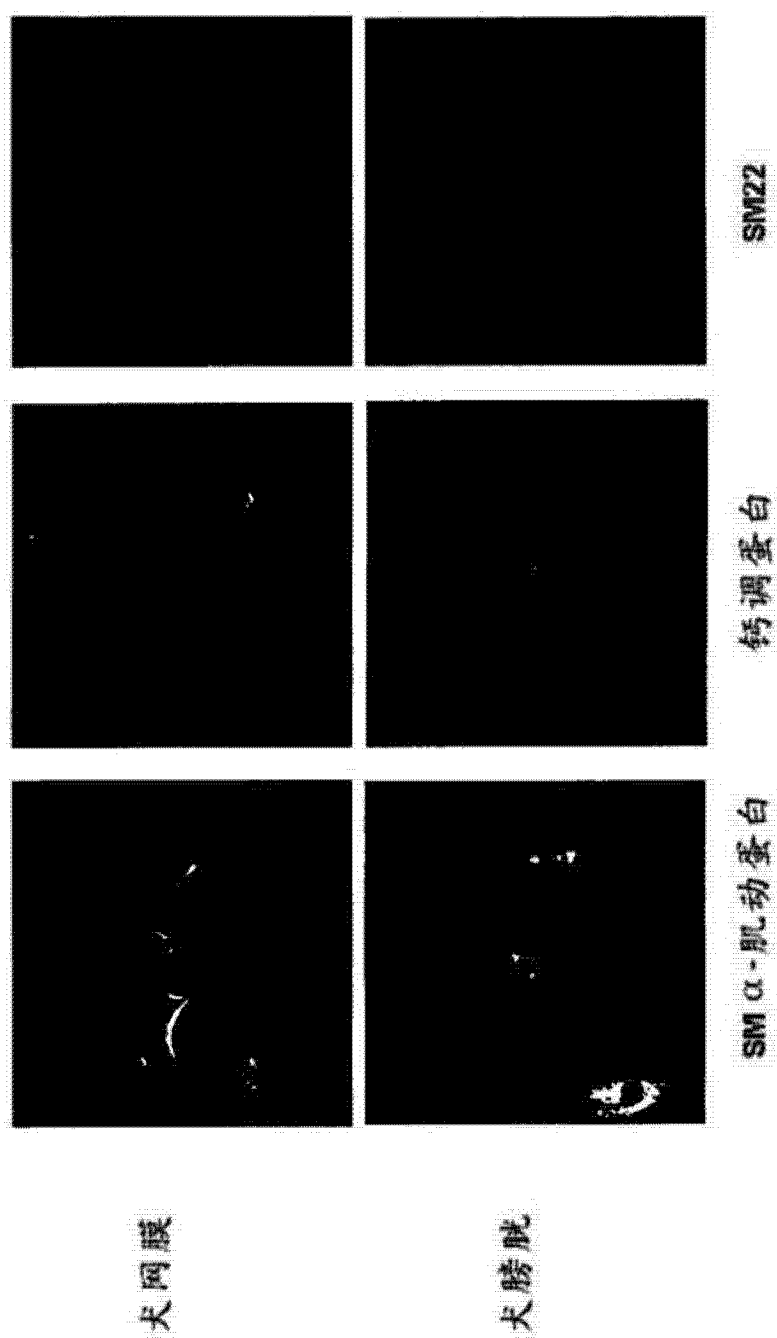


图 19

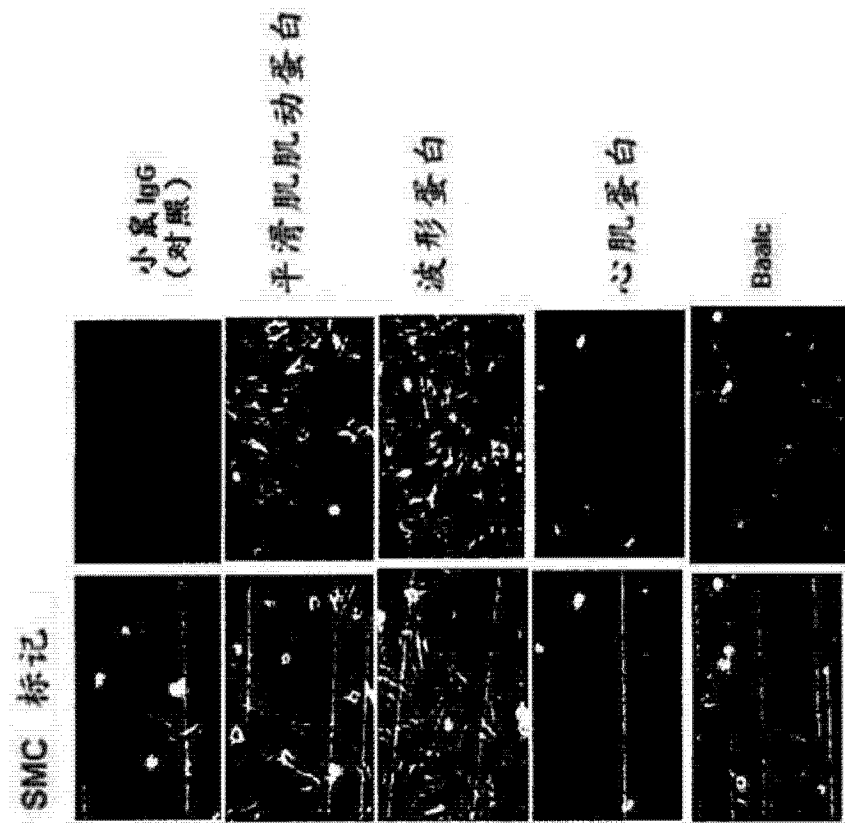


图 20A

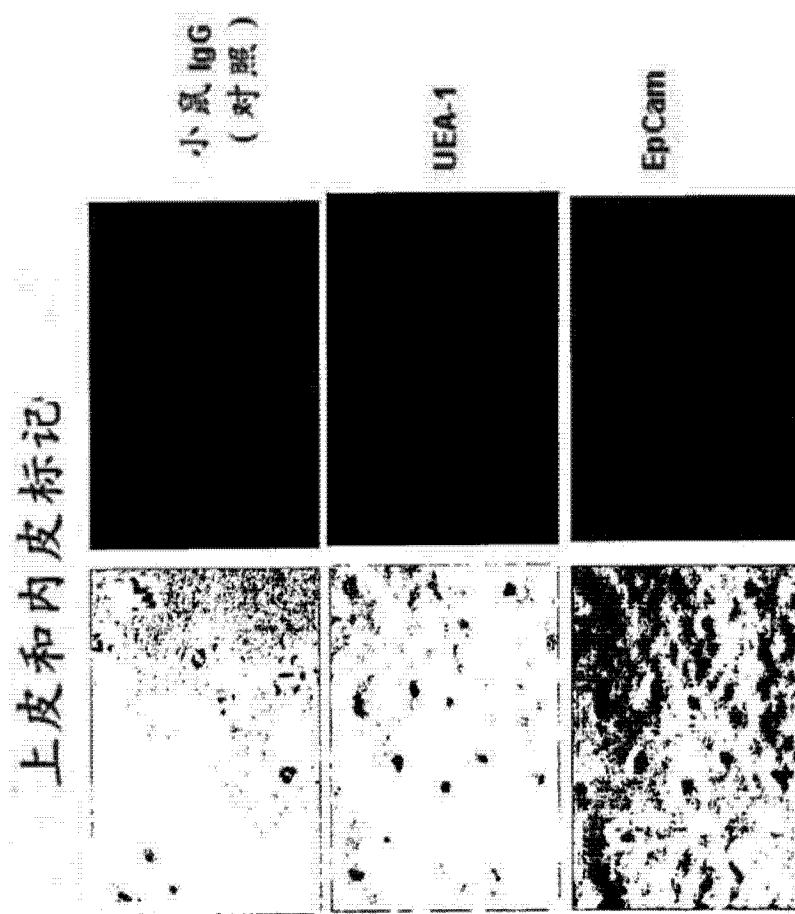


图 20B



图 21

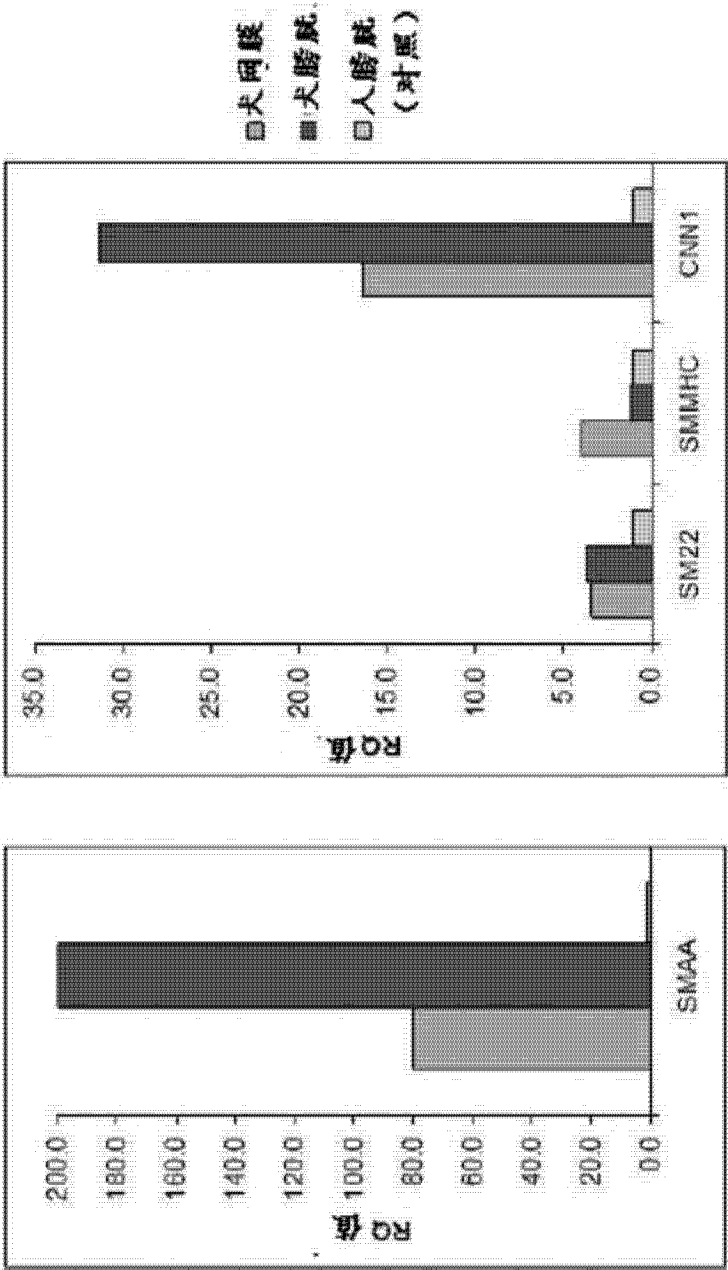


图 22

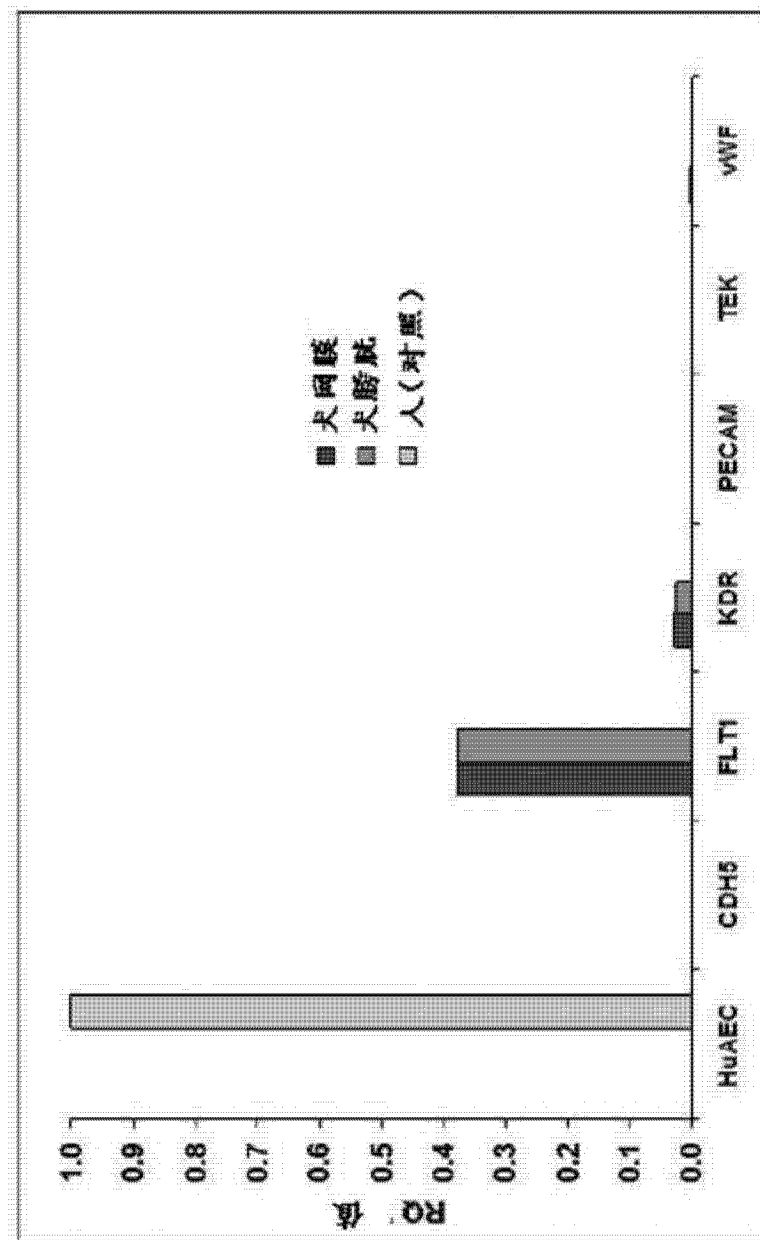


图 23

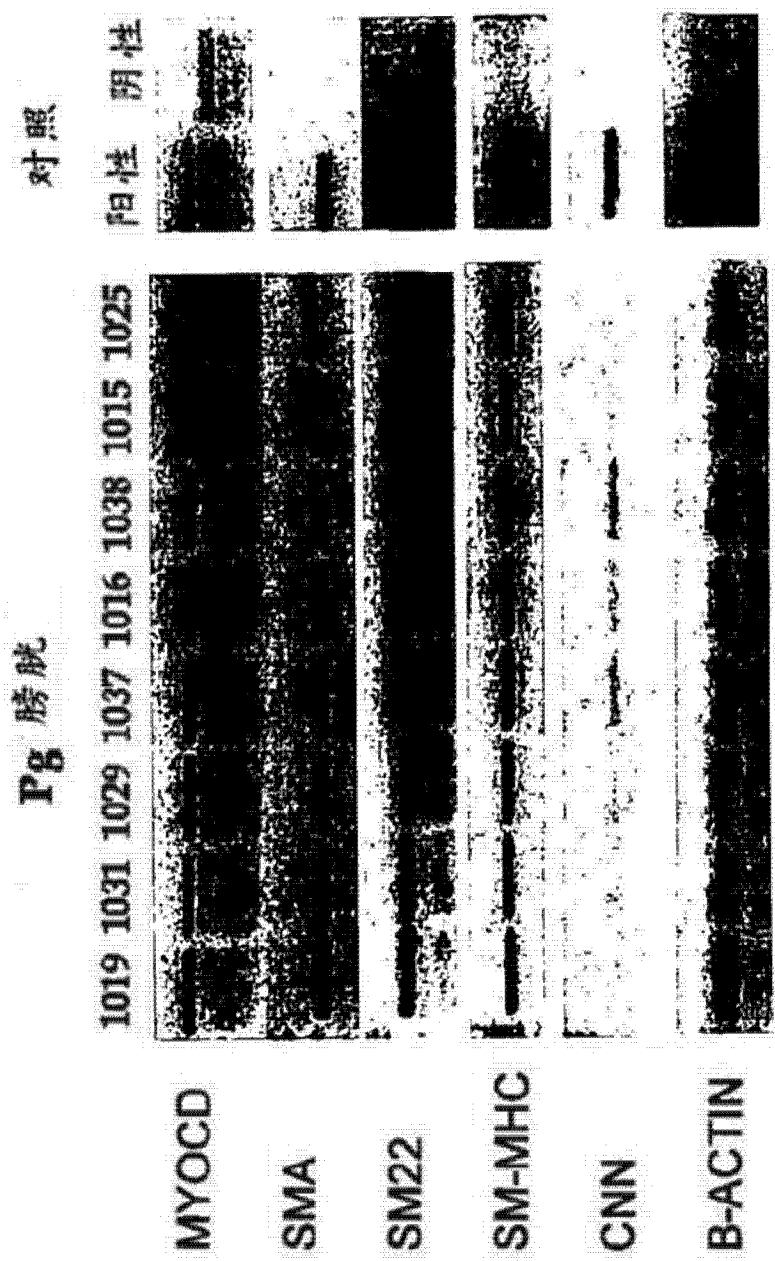


图 24

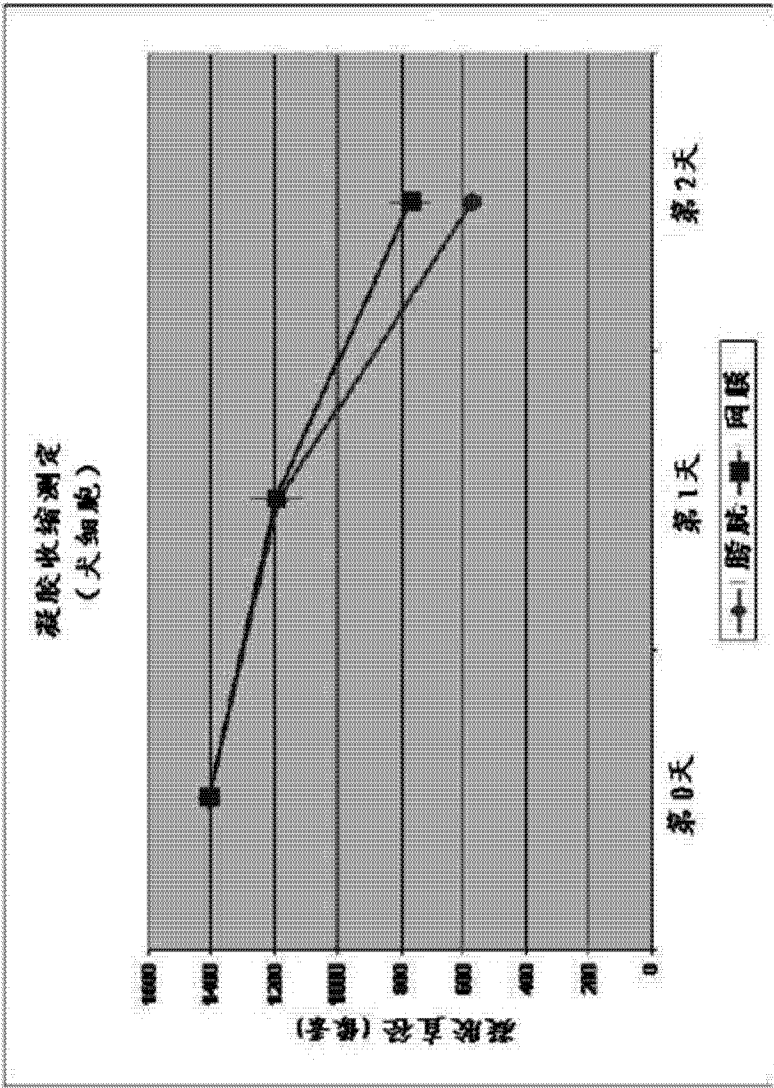


图 25

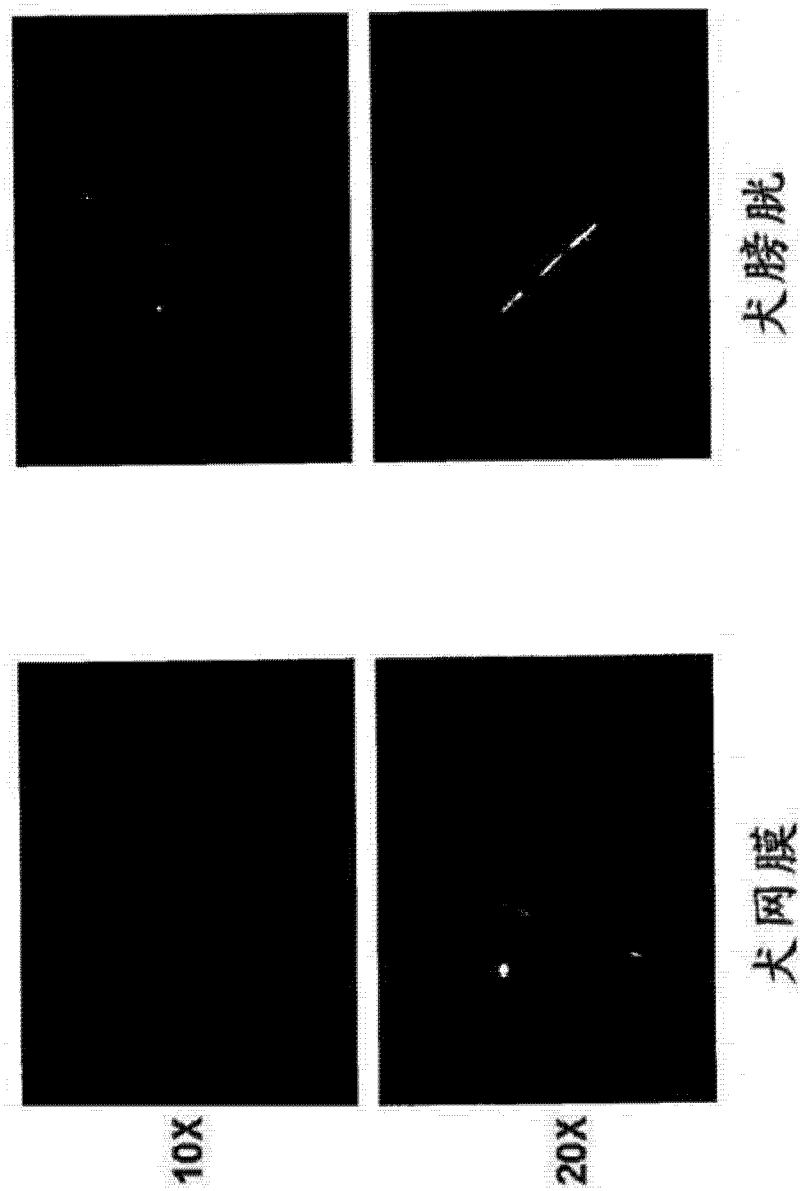


图 26

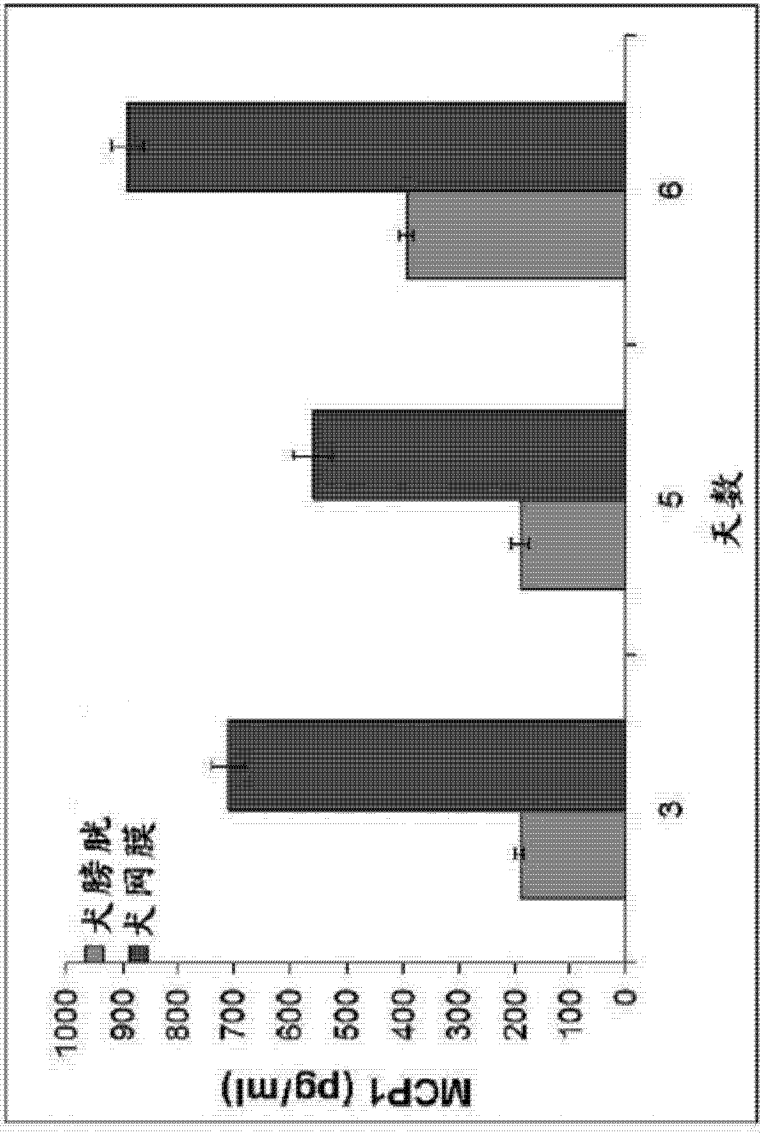


图 27

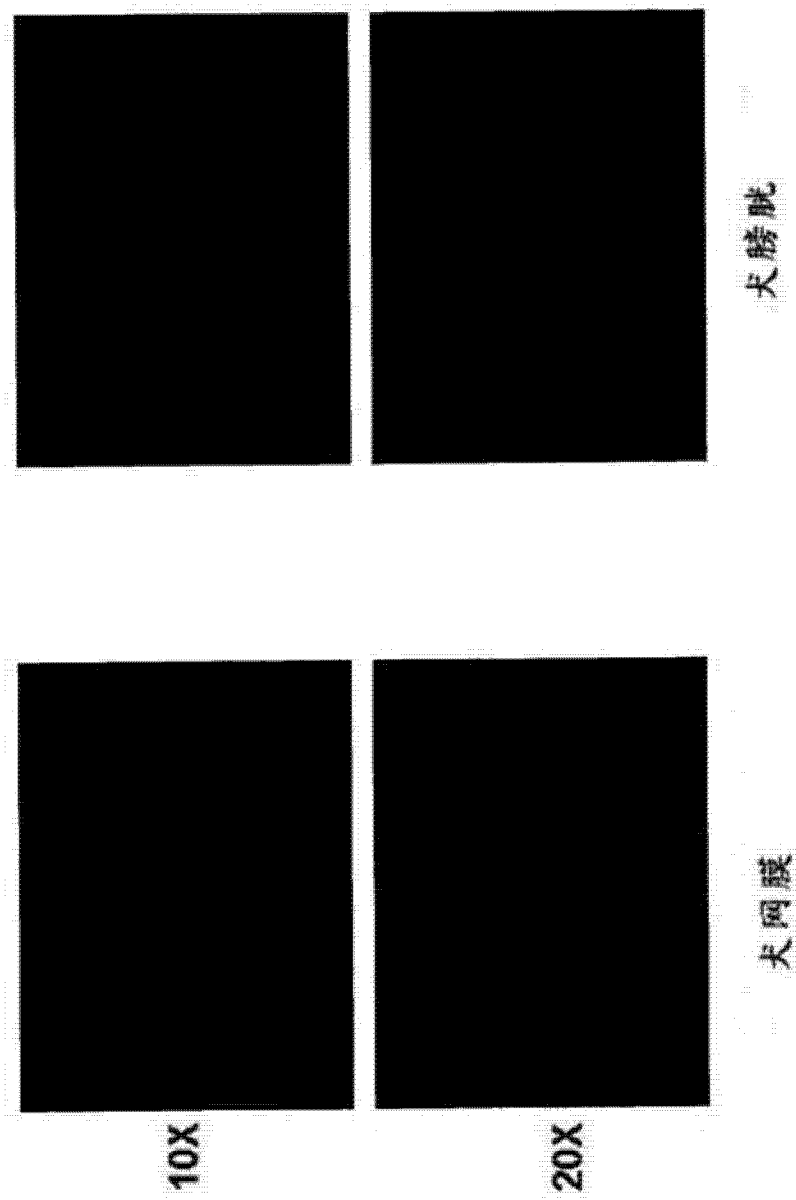


图 28

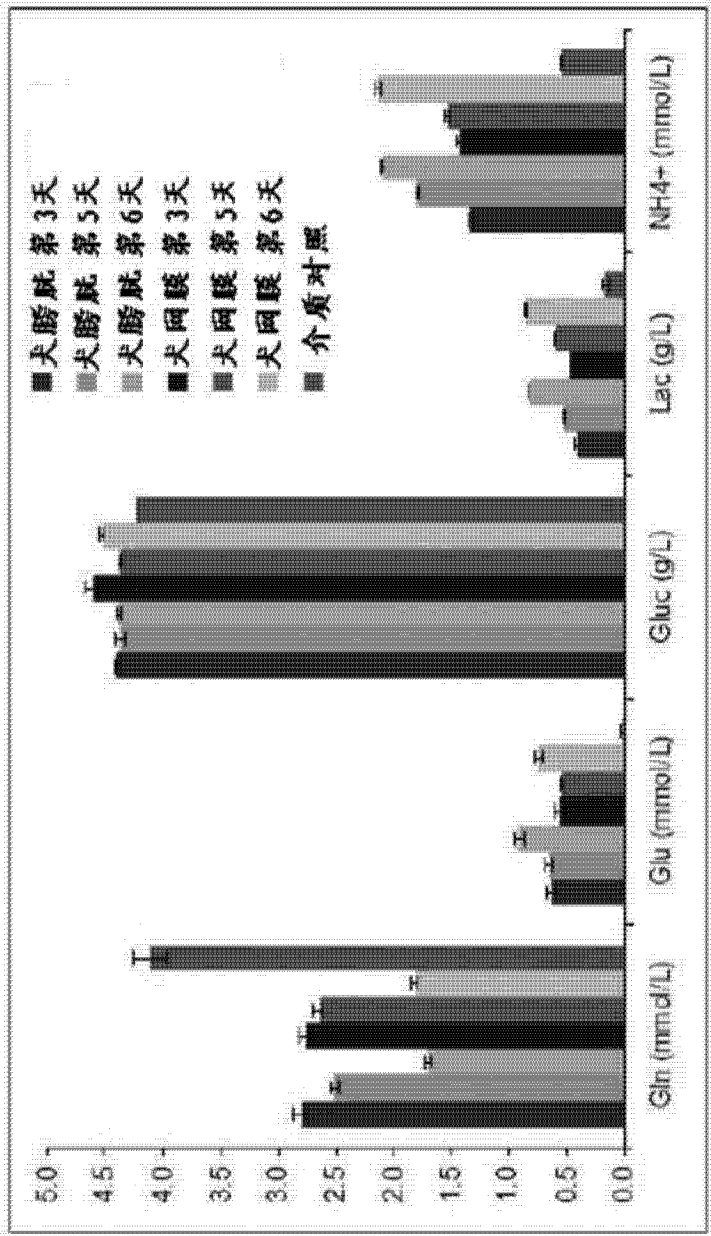


图 29

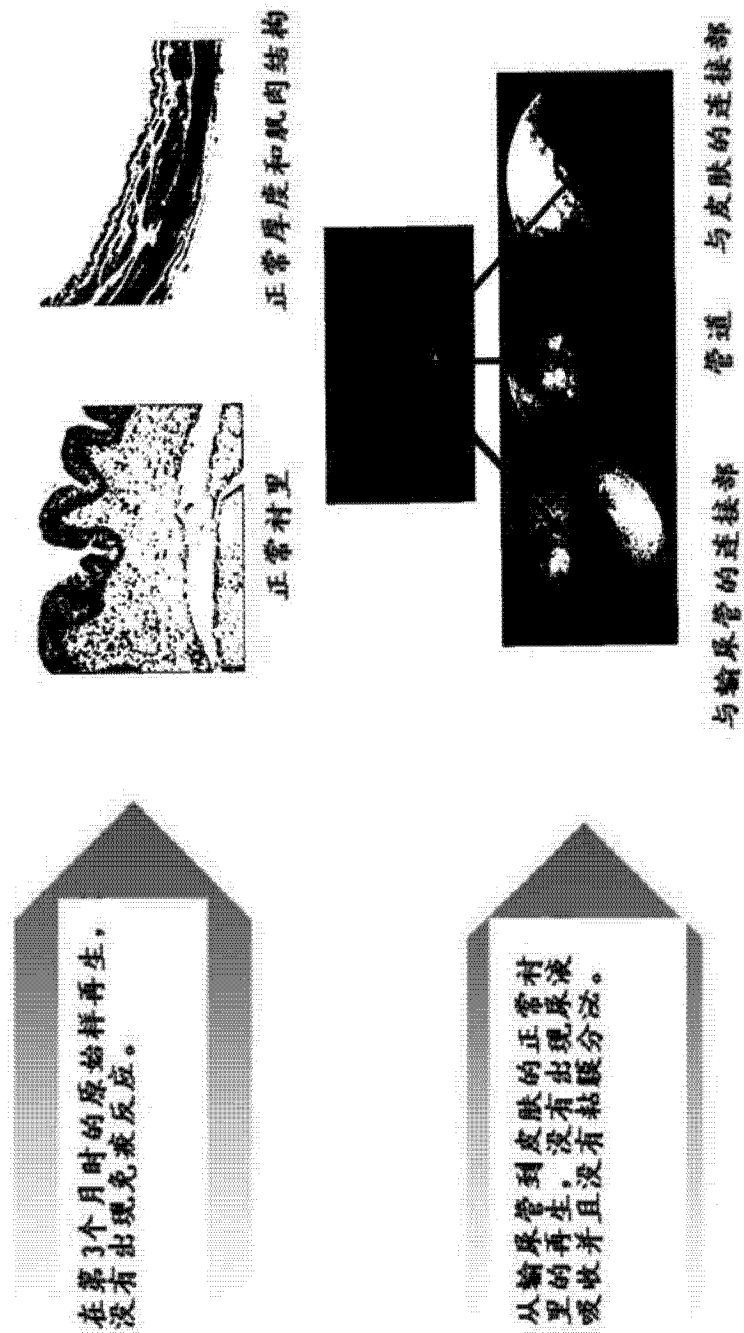


图 30