



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108348644 B

(45) 授权公告日 2021. 06. 25

(21) 申请号 201680064011.3

(22) 申请日 2016.09.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108348644 A

(43) 申请公布日 2018.07.31

(30) 优先权数据
1515820.7 2015.09.07 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/071114 2016.09.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/042232 EN 2017.03.16

(73) 专利权人 UCL商业有限责任公司
地址 英国伦敦

(72) 发明人 P·德卡派 L·乌尔巴尼
A·乌尔乔洛

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 陈桢

(51) Int.Cl.
C12N 5/07 (2010.01)
A61L 27/38 (2006.01)

审查员 周丹

权利要求书2页 说明书19页 附图22页

(54) 发明名称
组织工程化

(57) 摘要

本发明大体涉及用于产生植入物特别是管腔组织植入物的方法和材料,其中所述植入物通过将无细胞支架或基质用肌细胞前体和成纤维细胞接种来工程化,例如使用特定比例的细胞注射接种。本发明提供产生用于植入受试者的组织工程化构建体的方法,其可利用本文所述的新颖接种方法来改善细胞植入和分化。另外,本发明描述了通过植入本发明的工程化构建体或组织来治疗个体的方法。

1. 产生适于植入受试者的组织构建体的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (i) 提供无细胞支架;
 - (ii) 将mesoangioblast和成纤维细胞的组合接种到支架内和/或支架上;和
 - (iii) 培养接种的支架以产生所述构建体,其中用于接种的mesoangioblast:成纤维细胞的比例为50:50至99:1。
2. 权利要求1的方法,其中所述受试者是人。
3. 权利要求1或2的方法,其中所述组织构建体适于植入管腔器官中或替代所述器官。
4. 权利要求1或2的方法,其中所述组织构建体是适于新生儿或婴幼儿的食管构建体。
5. 权利要求1或2的方法,其中用于接种的mesoangioblast:成纤维细胞的比例为65:35至90:10。
6. 权利要求5的方法,其中比例是85:15。
7. 权利要求1或2的方法,其中所述细胞同时接种。
8. 权利要求1或2的方法,其中所述细胞在彼此相隔48小时内依序接种。
9. 权利要求1或2的方法,其中所述细胞在液体或凝胶培养基中递送。
10. 权利要求9的方法,其中所述培养基中细胞的总浓度在 1×10^8 至 1×10^{10} 个细胞/mL之间。
11. 权利要求1或2的方法,其中接种是通过注射到支架中。
12. 权利要求11的方法,其中注射体积是1至50 μ L或5至10 μ L。
13. 权利要求11的方法,其中用于接种细胞的流速在1至25 μ L/s的范围内。
14. 权利要求11的方法,其中接种包括多次注射以实现至少 10^5 个细胞/5mm长度的细胞密度。
15. 权利要求1或2的方法,其中所述mesoangioblast和成纤维细胞是自体的。
16. 权利要求1或2的方法,其中所述细胞经由活检获得。
17. 权利要求1或2的方法,其中所述mesoangioblast细胞表达以下标志物:AP;NG2。
18. 权利要求1或2的方法,其中所述mesoangioblast细胞在接种前传代至少两次。
19. 权利要求1或2的方法,其中所述支架是管状的。
20. 权利要求1或2的方法,其中所述支架是合成的。
21. 权利要求1或2的方法,其中所述支架是脱细胞化的。
22. 权利要求21的方法,其中所述支架源自管腔器官。
23. 权利要求21的方法,其中所述支架是非人源的。
24. 权利要求23的方法,其中所述支架是猪源性的。
25. 权利要求21的方法,其包括以下步骤:
 - (ia) 提供源自生物来源的支架;
 - (ib) 使支架脱细胞化以提供无细胞支架。
26. 权利要求1或2的方法,其中在将所述细胞接种到支架上之后,使所述细胞在将接种的支架置于培养基中之前粘附到所述支架一段时间。
27. 权利要求1或2的方法,其中在将支架接种后,将构建体在无菌条件下在生物反应器中在适于所述mesoangioblast细胞生长和分化的一种或多种培养基中培养。
28. 权利要求27的方法,其中所述支架在静态培养条件下培养,接着在动态培养条件下

培养。

29. 权利要求27的方法,其中所述支架在动态培养条件下培养3至28天。

30. 权利要求28或29的方法,其中在动态培养期间,培养基由增殖培养基变为分化培养基。

31. 权利要求30的方法,其中所述动态培养包括至少1天的增殖培养基和至少6天的分化培养基。

32. 权利要求27的方法,其中对构建体进行培养直至所述mesoangioblast细胞已经分化成表达至少以下标志物:NG2;碱性磷酸酶。

33. 权利要求27的方法,其中所述培养条件使构建体经受脉动或蠕动力。

34. 权利要求27的方法,其中所述生物反应器引入有可移除的盒,所述盒可由脱细胞化生物反应器转移,经受接种,然后引入再细胞化生物反应器。

35. 权利要求1或2的方法,其中在步骤(iii)之后,将所述组织构建体植入受试者的异位部位用于血管形成。

36. 权利要求1或2的方法,其包括在至少一个表面上使所述组织构建体形成上皮的另一个步骤。

37. 权利要求36的方法,其中所述构建体具有管腔形状且在内部管腔表面上形成上皮。

38. 根据权利要求1至37中任一项的方法获得或可获得的组织构建体。

39. 权利要求38的构建体,其是适于植入新生儿、婴幼儿、儿童或成人的食管构建体或肠构建体。

40. 权利要求38或39的构建体在制备用于治疗组织或器官损伤或损失或用于修复或替换受试者中的组织或器官的药物中的用途。

41. 成纤维细胞在改善通过脱细胞化的生物支架的mesoangioblast而进行的细胞植入和定殖中的用途,其中所述成纤维细胞以mesoangioblast:成纤维细胞的比例在50:50至99:1的比例范围内使用。

42. 权利要求41的用途,其中所述改善的细胞植入和定殖包括mesoangioblast迁移的改善。

组织工程化

技术领域

[0001] 本发明大体涉及用于产生植入物特别是管腔组织植入物的方法和材料,其中所述植入物通过将无细胞支架或基质用肌细胞前体和成纤维细胞接种来工程化。本发明提供产生用于植入受试者的组织工程化构建体的方法,其可利用本文所述的新颖接种方法来改善细胞植入和分化。另外,本发明描述了通过植入本发明的工程化构建体或组织来治疗个体的方法。

背景技术

[0002] 组织或器官损伤、功能障碍或丧失是很多种医学病状的特征。在一些这类病状下,替换受损的组织或器官是最好的或甚至是唯一的选择。

[0003] 例如,食管闭锁是一种影响消化道的先天性医学病状,其在2500名活产婴儿中发生约1例。它导致食管结束于盲端袋,而不是正常连接到胃。最严重的食管闭锁病例有时称为食管发育不全,其中根本没有食管存在。大多数情况下最直接和有效的治疗是将食管两端彼此重新连接在一起的手术修复。

[0004] 来自人类供体(活体或尸体)的移植已取得显著成功且诸如肝脏、心脏和肾脏移植的程序正变得越来越普遍。然而,供体的严重短缺、收获器官的复杂性及将其传递给接受者和传染性病原体传播的可能性是这种方法的显著缺点,这同样也适用于儿科患者。

[0005] 如在例如W00214480中所解释的,组织工程化是寻求开发用于在实验室中培养替代组织和器官的技术的不断发展的领域。

[0006] 产生替代组织的一般策略利用接种到适当的底物上进行细胞培养的哺乳动物细胞。细胞可获自预期的接受者(例如来自活检组织),在这种情况下它们通常在用于接种底物之前在培养物中扩增。细胞也可获自其他来源(例如建立的细胞系)。接种后,细胞生长通常在植入工程化组织后在实验室和/或患者中继续。

[0007] 因此,例如开发用于损伤的腔管器官(诸如食管)的再生或替代的构建体需要支架和细胞的组合以产生功能性三维组织。

[0008] W00214480(其公开内容通过引用并入本文)描述了通过在体外在底物上生长细胞且然后使该构建体脱细胞化以产生主要由细胞外基质组分组成的脱细胞构建体来产生组织工程化构建体的方法。据报道该构建体可立即使用或储存直至需要。脱细胞构建体可用于进一步的组织工程化,其可包括用从构建体的预期接受者获得的细胞接种构建体。在产生构建体所需的任何生长阶段期间,开发中的构建体可经受各种组织工程化步骤,诸如施加包括脉动力的机械刺激。所述方法还包括通过从动物或人收获组织来制造工程化天然组织、在组织上进行一个或多个组织工程化步骤并使组织脱细胞化。然后脱细胞的工程化天然组织可进行进一步的组织工程化步骤。

[0009] W02003092471(也公开为US2005/0202058)描述了包含细胞外基质材料与添加的内皮细胞和至少一种另外添加的外源细胞群的组合的组织移植物构建体。

[0010] US2014/0341862涉及一种制备用于医疗目的的组织构建体的方法,其使用内皮祖

细胞(EPC),所述内皮祖细胞(EPC)尚未多次传代且具有一定含量的EOEC(早期外生内皮祖细胞)和LOEC(晚期外生内皮祖细胞)。这些细胞和成纤维细胞和/或肌细胞、成肌细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞或其祖细胞以活细胞形式接种在基质上或引入基质中以在进一步处理步骤后产生组织构建体。所述基质优选是蛋白质制剂,更特别地是纤维蛋白原制剂。

[0011] US2004/0028662涉及细胞定殖过程,由此生物细胞定殖在合成或天然组织基质上以获得组织植入物或组织移植物。通过添加由共培养细胞提供的介体、因子或辅因子来促进细胞的生长。

[0012] W003/095631涉及多能干细胞、其分离和体外扩增的方法、其体外分化过程及其用于再生或修复生物组织的用途。

[0013] 不幸的是,现有的细胞接种技术和组织工程化中的细胞组合方法常常表现出低细胞植入和支架上缺乏同质细胞群。这抑制了功能组织特别是管腔组织或器官的开发。

[0014] 因此,可以看出用于接种基质支架以产生具有改善的细胞植入或相关特性的可植入的管腔组织或器官的新方法将为本领域作出贡献。

发明内容

[0015] 令人惊讶的是,发明人已经显示根据本发明的方法将肌细胞前体和成纤维细胞的组合接种到组织支架或基质中以工程化用于修复或替换器官的构建体可改善细胞植入和定殖3D基质。

[0016] 在优选的实施方案中,将成纤维细胞和肌细胞前体的组合注入用于食管组织工程化的支架壁中。注射提供细胞悬液直接在支架内的成功分布。

[0017] 不希望受理论束缚,据信上述两种细胞群的递送允许在两种细胞系之间建立旁分泌效应。这出乎意料地导致细胞植入、增殖和迁移/侵入在整个支架中的改善及肌细胞祖细胞向成熟肌细胞的分化。此外,肌细胞和成纤维细胞的存在模拟了重要组织的异质性且这两种细胞类型的存在可避免需要向培养物中添加多种外源生长因子或粘附分子。

[0018] 此外,发明人惊讶地发现使用相等或较高比例的肌细胞前体与成纤维细胞提供均匀的细胞分布同时降低成纤维细胞过度生长的可能性。所得产物因此更密切地反映天然存在的组织且因此是理想的。

[0019] 因此,根据本文所述的优选方案的细胞类型的递送已经显示出提供在不同层的组织之间更均匀的细胞分布且由此提供与天然组织更相似的构建体。

[0020] 本发明提供产生用于植入体内的组织工程化构建体的方法,其利用本文所述的新的接种方法来改善细胞植入和分化。另外,本发明描述了通过植入本发明的工程化构建体或组织来治疗需要替换或增强(例如修复)组织或器官的个体的方法。现在将更详细地描述本发明的这些和其他方面。

[0021] 在一个方面,本发明提供产生或工程化组织或器官构建体例如管腔或其他中空组织构建体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0022] (i) 提供支架或基质;

[0023] (ii) 将mesoangioblast和成纤维细胞的组合接种到所述基质中和/或所述基质上,其中所述mesoangioblast和成纤维细胞分开、同时或依序接种;和(iii) 培养接种的支架以产生可植入构建体。

[0024] 根据本发明,组织或器官构建体包含通过接种的mesoangioblast和/或成纤维细胞的增殖和/或分化产生的哺乳动物组织,优选通过两种细胞类型的增殖和通过mesoangioblast在所提供的支架上和/或在所提供的支架中分化。本发明的产生方法及因此管腔组织或器官构建体的产生通常在体外进行。

[0025] 然而,应理解体内植入后可发生进一步的细胞增殖和/或分化和构建体的产生。因此,构建体的产生优选地在体外实施直至产生充分集群有细胞和/或其中前体细胞(mesoangioblast)充分分化以允许成功植入受试者的构建体。

[0026] 随后可例如在植入后在支架内和/或支架上进一步发生细胞增殖。因此,应理解支架不需要完全集群有接种的细胞以用于植入受试者(例如支架可具有不存在接种的细胞的区域,例如支架可在其表面的至少70%、80%、90%、95%或99%上具有接种的细胞)。

[0027] 产生的组织或器官构建体的大小和/或形状可典型地代表将要在需要所述组织或器官构建体的受试者或患者中治疗的损伤和/或损害的大小/形状。

[0028] 因此,例如如果受试者缺乏一部分管腔组织/器官,则产生的组织或器官构建体可对应于缺失部分的大小/形状。可选择地,产生的组织或器官构建体可具有比受试者的管腔器官中的损伤/损害的尺寸大的尺寸,例如大至少5%、10%、15%、20%、30%、40%或50%且可植入这种更大的构建体或可在产生后将构建体适当地确定大小/成形。构建体的大小和纬度可进一步取决于植入的受治疗者的年龄和大小。

[0029] 对“管腔”构建体等的提及是指适于替代或植入管腔器官或组织(诸如下文所述的那些)的构建体,而非严格地指构建体本身的结构。应相应地理解对组织构建体的提及。因此,对食管构建体的提及是指适于植入食管或作为食管替代物的构建体,而肠构建体是指适于植入肠或作为肠替代物的构建体。

[0030] 在一个实施方案中,如果例如所述构建体将用于提供管腔器官的缺失或不存在的部分或将其全部替换,则该构建体可具有管腔或管状形状。然而,管腔构建体不一定具有管腔或管状形状且如上所述,形状完全取决于待替换、插入或修复的组织。

[0031] 如前所述,所产生或生成的组织或器官构建体将包含支架或基质(特别是无细胞基质或支架诸如脱细胞支架或聚合物支架)和均匀的细胞分布(分化的mesoangioblast/非分化的mesoangioblast和成纤维细胞)。任选地,这可进一步修改或与用于连接或安装在接收者身体中的其他装置组合。

[0032] 此外,组织或器官构建体可包含其他细胞类型,特别是上皮和/或内皮或神经嵴细胞。在另一个实施方案中,本发明的方法包括在植入前将上皮细胞接种到构建体上或支架内和/或支架上的额外步骤。

[0033] 术语“组织”或“器官”在本文中相对于构建体可互换使用,除非上下文另有要求。

[0034] 用于产生本文所述的包含强力的有弹性的平滑肌的构建体的方案可应用于管腔/空心(术语可互换使用,除非上下文另有要求)器官诸如食管、气管、血管、肠道、尿道、肠等。通过本发明的方法产生的组织或器官构建体作为食管构建体具有特别的实用性。此外,根据上述方法产生的组织或器官构建体作为肠构建体具有特别的实用性。通过本发明的方法产生的构建体(例如食管和肠构建体)特别适用于治疗新生儿或婴幼儿。

[0035] 如上所述,发明人惊奇地发现引入相等或较高比例的mesoangioblast:成纤维细胞导致细胞在组织构建体中有利的均匀分布。因此,在一个优选的实施方案中涵盖在以下

比例范围内的mesoangioblast:成纤维细胞的组合用于引入支架或基质:50:50至99:1;65:35至90:10;70:30至90:10;80:20至90:10;83:17至88:12。优选地,可使用等于或大于70:30的mesoangioblast:成纤维细胞的比例,特别优选的比例为约85:15。

[0036] 应理解mesoangioblast和成纤维细胞的“组合”可同时、依序或分开接种。因此,细胞不需要一起和/或同时引入且在这种情况下的“组合”不应该被认为暗指同时递送细胞。依序递送可涉及在彼此相隔至少1、2、5、10、20、30、40、50或60分钟内或在彼此相隔约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、36或48小时内递送细胞群体。然而,同时递送是优选的,其中细胞从不同来源或从相同来源一起引入,其中细胞优选以上述合适比例预先混合在一起。

[0037] 为了接种目的,细胞可在合适的培养基诸如本领域已知的培养基中递送。实例包括MEGACELL、DMEM等或凝胶诸如基质胶(Matrigel)等。培养基可含有胶原蛋白、纤连蛋白等。

[0038] 待施用的细胞密度通常可在 1×10^8 至 1×10^{10} 个细胞/mL的范围内,例如约 1×10^9 个细胞/mL。

[0039] 接种优选通过注入支架或基质优选注入基质的肌肉层进行。在下文中更详细地讨论了合适的基质来源。发明人已经确定与细胞的表面施用相比,以这种方式注射提供优越的产品。

[0040] 在特别优选的实施方案中,可通过共注射将细胞接种到支架或基质上和/或支架或基质中。

[0041] 待施用的培养基的体积将取决于细胞密度,但优选的注射通常在1至50 μ L的范围内,例如1至50 μ L,最期望的是5至10 μ L,例如约5 μ L。

[0042] 最佳地,递送注射物时的流速在1至25 μ L/s的范围内,例如1至10 μ L/s,例如约5 μ L/s。

[0043] 可在支架上进行细胞的多次接种。因此,优选通过多次注射来实现接种以确保细胞尽可能多地分散在支架上。所期望的是,细胞的密度为至少 10^5 、 10^6 或 10^7 个细胞/5mm长度,更优选约 10^6 个细胞/5mm长度的密度,这已被证实导致高度有效的植入。因此,例如进行至少一次施用(例如注射)细胞,特别是至少2、3、4或5次施用(例如注射)。应理解注射的次数可取决于支架的大小和形状。

[0044] 作为非限制性实例,适用于新生儿的典型食管构造物当处于松弛状态时可以是约8-10mm宽和4-5cm长。此类构建体可经受例如每5mm环3次注射(周向)。

[0045] 管状支架可插管有例如NG管以使接种更容易进入和处理。

[0046] 本文使用的“mesoangioblast”是指前体或祖肌细胞且是存在于大血管中的平滑肌层的前体细胞。

[0047] mesoangioblast通常表达诸如碱性磷酸酶(AP)和NG2那样的标志物。

[0048] 术语“前体细胞”是指以下细胞,其没有完全分化,但能够自身变得较完全分化或产生能够进一步分化的一种细胞(或多种细胞)。前体细胞可产生一种或多种不同的细胞类型。前体细胞产生能够进一步分化的一种细胞(或多种细胞)的过程可涉及一轮或多轮细胞分裂。术语“祖细胞”还包括以下细胞,其可沿着分化途径进行一个或多个步骤,例如表达一种或多种分化标志物例如平滑肌分化标志物SM22和 α SMA。

[0049] 术语“成纤维细胞”应理解为最普遍的含义,包括血液中循环的成纤维细胞。

[0050] 本发明方法中使用的细胞通常是自体的,即源自或来自由本发明方法产生的组织或器官构建体的预期接受者。然而,用于该方法的细胞也可以是同种异体的,即获自或来自不是要产生的组织或器官构建体的接受者的受试者。此外,可使用异种细胞,即来自与组织/器官构建体的接受者不同物种的细胞。

[0051] 用于本发明方法的细胞可经由来自患者的小活检组织(例如来自肌肉)和分离的细胞获得,例如使用GMP级胶原酶和中性蛋白酶。

[0052] 特别地,所述方法中使用的mesoangioblast和成纤维细胞可方便地获自相同的活检组织。其他细胞也可用于本发明的方法中和/或可存在于所产生的组织或器官构建体中。特别地,可存在上皮细胞,其可获自与mesoangioblast/成纤维细胞相同或不同的活检组织。此外,可存在平滑肌细胞。

[0053] 在一个实例方案中,可在选择性培养基(Megacell)中的基质胶/胶原蛋白凝胶上铺板小的(2-3mm)肌肉活检组织以促进细胞生长。细胞可在Megacell培养基中生长并在60-70%融合时传代。

[0054] 此外,所述方法可在不存在内皮祖细胞的情况下进行,因此在一个实施方案中,产生的组织或器官构建体可不包含内皮细胞。

[0055] 一旦细胞已经传代,它们可用于接种。例如,它们可被胰蛋白酶消化(例如在第3、4、5、6或7次传代之间),然后混悬在选择凝胶或培养基中并保持在冰上。

[0056] 本发明的方法需要支架或基质(这些术语在本文中可互换使用)用于接种。

[0057] 特别地,使用无细胞支架或基质例如脱细胞支架或聚合物支架。此类支架及其生产方法是本领域中已知的。例如,W00214480涉及本领域中的五种一般类型的支架:(1)不可降解的合成聚合物;(2)可降解的合成聚合物;(3)非多孔的非人胶原蛋白凝胶;(4)加工成所需孔隙率的非人胶原蛋白网;和(5)人(尸体)脱细胞化胶原组织。

[0058] “无细胞”支架通常不包含细胞或细胞组分。然而,应理解例如在使用来自生物来源的支架例如脱细胞的支架的情况下有可能一些细胞可保留在支架上,例如在脱细胞化之后,如下所述。

[0059] 在本文的一个实施方案中,所述支架是人造合成聚合物支架。合成聚合物的实例包括可加工成各种纤维和编织物的达克龙(Dacron)和特氟隆(Teflon)。用作合成组织基质的其他聚合物包括聚丙交酯和聚二噁烷酮。

[0060] 其他合成支架在性质上可以是蛋白质性质的,例如主要由经纯化的蛋白质诸如胶原蛋白构成。

[0061] 非合成支架在性质上也可以是蛋白质性质的或主要由胶原性细胞外基质(ECM)构成。

[0062] 优选地,支架将是脱细胞(生物)基质,例如来自管腔器官诸如食管。典型地,支架来自产生的组织或器官构建体需要植入的管腔器官或组织类型。例如,如果组织或器官构建体需要植入食管,则通常可从脱细胞食管例如另一来源产生支架。

[0063] 在一个实施方案中,可使用新生儿人类供体组织。在另一个实施方案中,所述支架可来自人尸体。

[0064] 优选地,为了实用性,所述支架可以是异种的,即其源自或来自不同于接受者例如人接受者的物种的供体。

[0065] 就此而言,适于脱细胞化的底物尤其是脱细胞的动物源性支架,例如猪源性、大鼠源性或兔源性。例如,在优选实施方案中,所述支架可以是脱细胞小猪食管。

[0066] 可使用任何已知的脱细胞方法来提供支架。通常,脱细胞方法采用各种化学、生物化学和/或物理手段来分裂、降解和/或破坏细胞组分和/或改性其中嵌入有细胞的基质以促进细胞和细胞组分的去除,这通常留下ECM支架。W00214480(同上)描述了使天然组织脱细胞化的方法。本发明包括使用通过任何去细胞化技术产生的脱细胞支架,其去除大部分细胞同时使基质保持基本上完整。

[0067] 除去“大部分”细胞是指去除至少60%、70%、80%、90%、95%或99%的细胞。提及使基质保持“基本上完整”是指保留至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的基质例如ECM存在。

[0068] 本发明进一步提供上述方法,其额外包括通过适当底物(例如上述那些,特别是猪源性底物)的去细胞化获得支架或基质的步骤。

[0069] 所述支架通常可以是任何形状或大小,特别是其可对应于需要在受试者中替换、修复或处理的组织的大小/形状。可选择地,所述支架可大于或甚至小于损伤(细胞增殖可在体内发生)。

[0070] 在接种细胞后,在本发明的某些实施方案中,在将接种的支架置于培养基中之前,使细胞群粘附于基质一段时间。应理解可不需要所有接种的细胞都粘附于基质。然而特别地,至少60%、70%、80%或90%的接种细胞可粘附。

[0071] 此外,如W00214480中所解释的,可应用各种处理来增强细胞对支架的粘附。例如,在美国专利5,613,982中描述了适当的处理。此类处理包括将各种蛋白质例如生长因子或细胞外基质蛋白质应用于支架或生长中的构建体。例如,可将胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白或蛋白多糖应用于底物。可用生长因子浸渍底物或可在培养基中提供这些试剂。

[0072] 在本发明的方法中,将接种有细胞的构建体在适于细胞生长的环境中培养一定生长期以形成工程化构建体。

[0073] 哺乳动物细胞在培养时的合适生长条件是本领域已知的。细胞培养基通常包含必需营养素和任选的其他要素诸如生长因子、盐、矿物质、维生素等。可选择特定成分以增强细胞生长、分化、特定蛋白质的分泌等。通常,标准生长培养基包括补充有10-20%胎牛血清(FBS)或小牛血清和100U/ml青霉素的含有110mg/L丙酮酸盐和谷氨酰胺的Dulbecco改进的Eagle培养基低葡萄糖型(DMEM),其与本领域技术人员已知的各种其他标准培养基一样是适当的。

[0074] 优选细胞在无菌条件下在约5%CO₂的气氛中在细胞起源动物体温或接近细胞起源动物体温的温度培养。例如,人类细胞优选在约37℃培养。

[0075] 通常,生长期的长度将取决于正在产生的特定组织工程化构建体。可持续生长期直到构建体达到期望的性质,例如直到构建体达到特定的厚度、大小、强度、蛋白质性质组成的组成、细胞密度或适当细胞标志物的表达—例如mesoangioblast源性平滑肌细胞应表达标志物诸如SM22、 α SMA、钙调蛋白。评估这些参数的方法参见美国专利第5,613,982号和下文的实施例。

[0076] 典型地,接种构建体的培养将在“生物反应器”中进行。

[0077] 如例如在US2014/0341862中所讨论的,适用于各种不同组织构建体的反应器是本领域已知的。适用于管状构建体的是例如DE 199 15 610 (Bader) 中描述的反应器或EP 0 320 441 (Sulzer) 中描述的反应器。管状容器可夹在此类反应器中并因此经受介质或血液的通流,这与随后在身体中整合的自然情况最为接近。在下文的实施例中,动态培养已被证实优于静态条件,例如在改善细胞分布和迁移方面。

[0078] 通流可以是连续流。为了模拟心跳和血液循环的影响,可按脉动方式实现通流。这些措施可改善获得的构建体的机械强度并刺激细胞的组织以产生天然组装体。优选的动态培养系统包含用于改善肌肉植入指数的机械刺激(“蠕动样”培养)。美国专利申请09/109,427描述了如何使用与腔室内本体的内部连通的泵来提供压力的循环增加以使可扩张本体在构建体的内腔内膨胀且赋予构建体脉动拉伸力。

[0079] 该生物反应器可包含可移除的盒子,其可从脱细胞生物反应器转移,进行接种,然后引入再细胞化生物反应器。

[0080] 在使用中,管状构建体可缝合到允许分离腔室的内部和外部隔室的两个插入物(例如玻璃或塑料)。然后可将培养腔室(连接至生物反应器和储器)在两个隔室中填满增殖培养基。

[0081] 然后可在静态条件温育腔室,然后在内部腔室中开始流动以进行动态培养。

[0082] 经过一段时间(例如约24或48小时)培养后,腔室和贮器中的培养基均可从增殖培养基变为分化培养基—例如优选的方案是在增殖培养基诸如Megacell中约1至2天,接着在分化培养基(诸如富含TGFβ的DMEM低血清型)中9天。动态培养可在适当时间后停止,所述时间通常在6和14天之间,例如9天,在此期间至少一次完全的培养基变化。然而,培养可更长,例如长达21或28天。

[0083] 任选地,支架可在原位移植前例如4-6周植入网膜或其他异位部位以增强血管形成。

[0084] 此外,在培养之后且在使用之前所期望的是,使支架的一个或多个表面例如使用中的管腔表面形成上皮。当支架或构建体是管腔或管状本身时,可期望使支架或构建体的管腔侧或表面(即管状或管腔状支架或构建体的内表面)形成上皮。

[0085] 因此,本发明的方法可包括在构建体上接种上皮细胞的额外步骤。如果需要的话,构建体可然后进行进一步的培养。

[0086] 就获得mesoangioblast和成纤维细胞所进行的论述比照适用于提供上皮细胞以递送和接种到构建体上。例如,原代细胞来自构建体所针对的受试者的活检组织且特别是来自该受试者的管腔器官(其可能受损或退化)。

[0087] 上皮接种后,构建体将进一步培养以在使用前允许上皮层的生长或扩张。

[0088] 在本发明的另一方面,提供根据本发明的方法获得或可获得的组织或器官构建体(例如管腔组织或器官)。特别地,所述组织或器官构建体适于在其预期部位植入和吻合。

[0089] 在优选的实施方案中,本发明提供通过本发明的方法获得或可获得的食管或肠构建体。在特定的方面,食管构建体可适于植入新生儿或婴幼儿。如前所述,应理解构建体的尺寸将取决于接受构建体的受试者和已经经历的器官损伤或损害。

[0090] 此外,应理解所述构建体将包含支架、成纤维细胞及分化和非分化的mesoangioblast。特别地,在所述构建体中,引入/接种的mesoangioblast优选已经发生分

化。因此,在具体实施方案中,所有接种的mesoangioblast将已分化成肌细胞。然而,在所述构建体中,一些接种的mesoangioblast将可能尚未分化或尚未完全分化。特别地,在所述构建体中,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的mesoangioblast可已经分化成或开始分化成肌细胞(平滑肌细胞)。mesoangioblast向肌细胞的分化可通过测量标志物SM22或本文所述的其他标志物容易地进行评估。

[0091] 在另一个实施方案中,提供包含支架、平滑肌细胞、成纤维细胞且任选包含mesoangioblast的管腔组织或器官构建体,其中所述平滑肌细胞和/或mesoangioblast优选以与成纤维细胞相比50:50至99:1的比例且最特别是至少70:30或85:15的比例存在。

[0092] 另一方面,本发明提供使用本发明的组织或器官构建体且优选为包含来自该个体的自体细胞的组织或器官构建体治疗需要替换或修复组织或器官或患有组织或器官损害和/或丧失的受试者的方法。

[0093] 本文使用的术语“受试者”或“患者”是指任何哺乳动物,例如家养动物,诸如犬、猫等;农业动物,诸如马、猪或牛等;或人。特别地,受试者或患者可以是例如患有食管闭锁的新生儿或婴幼儿,特别是人类新生儿或婴幼儿,由此所述构建体是食管构建体。

[0094] 提及替换组织或器官是指替换部分或全部的管腔组织或器官,诸如前面所述的那些。因此,器官替换可指替换例如至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的器官或组织。当器官或其部分缺失、患病或受损时和/或当器官或其部分不起作用或功能降低时,可需要替换器官或组织。

[0095] 由于疾病(例如癌症)或暴露于损伤剂(诸如化学物质或热例如烧伤),可发生组织损伤或器官损伤。因此,部分或全部组织或器官可被损坏。此外,“组织或器官损失”可由此类损伤引起或可例如出现在出生时和出生前(例如出生缺陷或先天性疾病)。组织或器官的缺失可以是器官或组织部分或完全缺失。

[0096] 如前所述,本发明的构建体可用于治疗需要食管替换或患有食管损伤或缺失的受试者。这种方法优选利用适合植入食管的构建体,例如使用食管源性脱细胞支架或基质的构建体。

[0097] 在优选的实施方案中,本发明提供用本发明的管腔组织或器官构建体(例如食管构建体)治疗患有食管闭锁或发育不全的受试者的方法。

[0098] 术语“食管闭锁”是指食管在盲囊中结束且不与胃连接的情况且本文使用的“食管发育不全”是指食管完全不存在的特别严重的食管闭锁情况。

[0099] 在本发明的另一个优选的实施方案中,提供治疗肠损伤或缺失或治疗需要肠替换的受试者的方法,优选通过给予本发明的管腔构建体(例如使用脱细胞的肠支架产生的肠构建体)。

[0100] 在某些实施方案中,所述方法包括提供本发明的可植入管腔组织或器官构建体(例如根据本发明的方法)并根据标准外科手术将构建体或组织植入个体体内—例如原位植入或移植。

[0101] 植入后,来自个体的细胞可在体内迁移到组织中,补充接种的细胞群。例如,通过在植入之前或之后用生长因子、趋化因子或其他化合物处理构建体,可增强细胞向构建体中的迁移。。

[0102] 因此,根据本发明的治疗方法可包括将本发明的构建体手术植入患者的步骤。

[0103] 可选地,本发明提供用于治疗组织或器官损伤或缺失或用于组织或器官替换的本发明的构建体。特别地,本发明提供用于治疗食管闭锁或食管发育不全的构建体。

[0104] 此外,本发明提供本发明的构建体在制备用于在受试者中治疗组织或器官损伤或缺失或组织或器官替换的药物中的用途。

[0105] 还提供本发明的构建体在外科手术中的用途。

[0106] 还提供本发明的构建体,其用于外科手术。

[0107] 还提供本发明的构建体,其用于制备用于外科手术的产品。

[0108] 另一方面,提供成纤维细胞通过本文所述的3D支架或基质(例如用于管腔器官的管状)的mesoangioblast以改善细胞植入和定殖(包括改善的迁移和/或同质性)且具体为使纤维化最小化的用途。成纤维细胞优选以mesoangioblast:成纤维细胞的比例在50:50至99:1;65:35至90:10;70:30至90:10;80:20至90:10;83:17至88:12的比例范围内使用。优选的比例是约85:15。

[0109] 细胞植入和定殖的“改善”可包括例如粘附于基质的接种细胞的数量增加(例如增加至少10%、20%、30%或40%)和/或如上所述,与不接种成纤维细胞的支架或以mesoangioblast:成纤维细胞的次优比例接种的支架相比改善mesoangioblast在整个支架中的迁移。“改善的迁移”可包括增加mesoangioblast填充支架的速率(例如减少填充支架所需的时间)、增加在整个支架中迁移的mesoangioblast的数量和/或增加mesoangioblast迁移过的距离。与在没有成纤维细胞的情况下接种在相应支架(即相同或基本相同的支架)上的mesoangioblast相比,迁移率、迁移细胞数或迁移距离中的任何一个或多个可增加至少10%、20%、30%或40%。

[0110] 本文中的任何子标题仅为了方便而被包括且不被解释为以任何方式限制本公开。

[0111] 现在将参考以下非限制性附图和实施例来进一步描述本发明。鉴于这些,本领域技术人员将想到本发明的其他实施方案。

[0112] 本文引用的所有参考文献的公开内容,因为本领域技术人员可使用其来实施本发明,因此通过交叉引用明确并入本文。

附图说明

[0113] 图1:在无菌条件下NG管放置并将fMABS显微注射到食管基质的肌肉壁中。

[0114] 图2:显微注射和表面接种的支架,纵向打开并置于24个多孔板中进行静态培养。

[0115] 图3:用于构建体培养的培养腔室。

[0116] 图4:生物反应器和培养腔室。

[0117] 图5:将接种的食管支架网膜植入免疫受损的小鼠。

[0118] 图6:在增殖培养基中培养的fMABS表达AP和NG2标志物。当在骨骼肌分化培养基中培养时,它们融合形成对MF20呈阳性且含有MyoD阳性细胞核的肌管。当用在培养物中表达SM22和 α SMA的特异性培养基培养时,fMABS也显示出平滑肌分化标志物。

[0119] 图7:来自接种的大鼠食管支架的DAPI图像的细胞计数(图),其中细胞通过显微注射或表面接种用基质胶或培养基递送。

[0120] 图8:fMABS与小鼠FB一起接种或单独接种的共接种实验。代表性的图片以DAPI染色。

[0121] 图9:在第一个24h内在最初的静态培养物中建立培养腔室。用fMABS接种的动态培养支架的冷冻切片的DAPI染色。

[0122] 图10: (A) 植入裸鼠的网膜2周和4周的接种支架的切片上的H&E和人核免疫荧光。(B) 在DAPI染色切片的随机图片中计数的每个区域的细胞数目。(C) 人核和Ki67标志物的共染色。(D) 对人核呈阳性、对人核和Ki67 (小鼠细胞) 呈双阳性或仅对Ki67 (小鼠细胞) 呈阳性的细胞百分比。这三个类别在左侧棒上从上到下显示。如下所述,1个月后主要存在人核细胞。

[0123] 图11:获自培养的支架的冷冻切片的DAPI染色显示基质内的细胞植入和增殖(图11A、B),通过动态培养条件刺激和改善的细胞分布和迁移(H&E,图11C、D)。用MyoD染色(骨骼肌前体细胞的特异性标志物)确定骨骼肌分化(图11E、F)。

[0124] 图12:FB对ECM中人MAB植入的正面效应。以85:15的比例接种hMAB和mFB显示在培养5天后维持细胞比例,而在培养期间70:30的比例导致较高的成纤维细胞增殖,5天后得到50:50的比例。用人核染色确定细胞比例;hMAB表达基于肌肉分化定型的骨骼肌标志物SM22。

[0125] 图13:通过不同的比例和培养条件(增殖培养基中的天数+分化培养基中的天数)对脱细胞的大鼠支架上培养的mesoangioblast和成纤维细胞的体外细胞接种和培养条件的优化。

[0126] 图14:在脱细胞的大鼠支架上培养的mesoangioblast和成纤维细胞的体外细胞接种和培养条件的优化。将85:15混合物与单独的hMABS和新鲜大鼠食管的肌肉层进行比较。

[0127] 图15和16:脱细胞的兔食管支架中的体外细胞接种实验。细胞分布和迁移在单独的hMABS和平滑肌细胞(犬源)的动态与静态培养中进行比较。

[0128] 图17:分别将来自大鼠和兔供体动物的未接种无细胞支架原位移植到大鼠和兔模型中的优化。原始食管暴露反映出甲状腺叶和肌肉并除去一段食管(在1至2.5cm之间,取决于动物模型)(图17A)。然后进行远端和近端吻合术(图17B)以将支架的两端连接至现有食管(大鼠,图17C;兔,图17D、E)。

[0129] 图18:MTT细胞活力测定。A)以不同hMAB密度接种的大鼠食管支架的图像。在24小时后测量紫色甲臞产生间接检测细胞数;B)通过从接种的支架提取的甲臞的吸光度读数定量细胞活力。

[0130] 图19:A)动态培养9天后hMAB接种的或共接种的支架的代表性图像;85:15样品也针对人核染色;B)在染色切片的随机图片中计数的每层中的每个场的代表性细胞数量(** $p < 0.01$ 和*** $p < 0.001$);C)层间细胞的分布,其表示为相对于每种条件下移植的细胞总数的百分比;D)接种的支架层的面积之间相对于未接种对照(表示为0)的比例;E)由随机图片中后者覆盖的细胞数量和面积计算的每层的代表性细胞密度(M:肌肉;S:粘膜下层)。

[0131] 图20:A)KI67⁺细胞的代表性图片。人类细胞(85:15)也针对人核标记;B)动态培养9天后KI67⁺细胞相对于随机图片中每层计数的细胞总数的百分比(** $p < 0.01$);C)层间KI67⁺细胞的以百分比表示的分布及mFB的贡献(M:肌肉)。

[0132] 图21:A)SM22⁺细胞的代表性图片。人类细胞(85:15)也针对人核标记;B)SM22⁺细胞相对于随机图片中每层计数的细胞总数的百分比(** $p < 0.01$);C)层间SM22⁺细胞的以百分比表示的分布和mFB的贡献(M:肌肉;S:粘膜下层)。

[0133] 图22:使用共培养与单独MAB实现的细胞密度的比较—结果证实共培养的优越性。

[0134] 图23:从小鼠后肢骨骼肌分离的小鼠成纤维细胞 (mFB) 在体外扩增 (针对增殖的Ki67染色) 后呈现特征性形态且对典型标志物诸如波形蛋白和TCF-4呈阳性 (条:100 μ m)。

[0135] 图24:A) 静态培养6天后支架内所有细胞的代表性示意图分布。B) 相同示意分布图的假设完美圆形切片的极性分布。C) 仅用hMAB接种或共接种的支架中的在针对DAPI和人核染色的随机切片中计数的每个区域的细胞总数。 $n \geq 3$ 。

[0136] 图25:A) 当用/不用mFB接种时对hMAB迁移影响的研究的示意图。将荧光素酶⁺hMAB与/不与野生型mFB一起接种在管状支架的中心且在持续5天的静态培养中每24小时使用IVIS测量生物发光。B) 培养1、3和5天后支架中显示荧光素酶⁺ (Luc⁺) 细胞的代表性生物发光图像。分析计算从注入点中心定位的8个感兴趣区域 (ROI) 中的辐射率的图像 (C)。在培养1、3和5天后在ROI 3至6测量的辐射率。

[0137] 图26:A) 用平开的 8.5×10^5 个hMAB或与/不与mFB一起的 1×10^6 个hMAB接种并在静态培养6天后用MTT染色的支架的代表性图像。沿着从细胞簇的中心到支架边缘径向绘制的8条随机线测量颜色强度 (灰度值) 分析从注射点的细胞迁移 (区段A-B)。B) 通过测量线A-B获得的代表性灰度值图, 其中在2个坪之间计算像素距离。C) 从注射点迁移的细胞覆盖的距离 (mm)。

[0138] 图27:A) 静态或动态培养后支架内所有细胞的代表性示意图分布。B) 相同示意分布图的假设完美圆形切片的极性分布。C) 在静态或动态条件下培养的支架中每个区域的细胞总数, 所述细胞在针对DAPI和人核染色的随机切片中计数 ($n \geq 3$)。D) 通过针对DAPI和人核染色的随机切片中的细胞计数确定在动态条件下培养的支架中hMAB和mFB的比例 ($n \geq 3$)。

[0139] 图28:A) 用Luc⁺hMAB和mFB共接种并在生物反应器中培养7天的支架的生物发光图像, 其显示由注射点的细胞迁移/分布。B) 从在不同时间点收集的图像计算的辐射值。

[0140] 图29:A) 静态或动态培养后支架 (黑色) 内所有细胞的代表性示意图分布。针对人核和SM22对细胞进行染色; 该图还显示出细胞hNuclei⁺SM22⁺和细胞DAPI⁺ (hNuclei⁻SM22⁻)。B) 静态或动态培养后的在不同切片的随机图像中计数的SM22⁺细胞的百分比 ($n \geq 3$) 及hMAB和mFB对总%的贡献 (** $p < 0.01$)。C) 针对人核和SM22的染色的代表性图像 (条:100 μ m)。D) 静态或动态培养后的在不同切片的随机图像中计数的Ki67⁺增殖细胞的百分比 ($n \geq 3$) (** $p < 0.01$)。

[0141] 图30: 用hMAB和mFB共接种的在生物反应器中培养的支架上针对 α SMA或钙调蛋白与SM22的共染色以评估平滑肌细胞的成熟水平。

实施例

[0142] mesoangioblast分离和表征

[0143] 胎儿mesoangioblast (fMABS) 从妊娠9-12周的人类胎儿的肌肉组织中分离。将样品铺板在用稀释的基质胶涂覆的板上并保持培养8天。收集从肌肉组织迁移的细胞并在培养物中扩增用于表征。细胞在传代培养第4、5、6和7代时表征具有免疫荧光、FACS及向平滑肌和骨骼肌分化的潜能。对于FACS分析, 将细胞与针对CD31、CD34、CD44、CD45、CD56、CD90和CD146的抗体一起温育。对于分化潜能, 将细胞用低血清培养基 (骨骼肌分化) 和添加有TGF β

的培养基(用于平滑肌分化)温育。

[0144] 肌细胞系的建立

[0145] 经患者在获取之前同意获得了六个供体肌肉活检组织(1名成人患者;5名儿科患者)。在六个活检组织中,三个原代mesoangioblast细胞系成功建立并在分化为骨骼肌和平滑肌之前进入第7代。在每次细胞传代时冷冻保存mesoangioblast细胞系以建立用于未来表征研究和再次培养的库。在胶原蛋白(胎盘源性)涂覆的T25烧瓶上建立mesoangioblast细胞系以允许与使用基质胶涂覆的培养皿的操作直接比较。使用MACSQuant流式细胞仪建立八色流式细胞图用于mesoangioblast细胞系在每次传代时的表型表征。对所有抗体进行滴定且该图针对mesoangioblast表征进行验证。

[0146] 随后在知情同意后获得另外两个成人肌肉活检组织。

[0147] 使用从UCL的Giulio Cossu教授转来的操作在胶原蛋白涂覆的培养瓶上成功建立原代mesoangioblast细胞系。总共五个细胞系从第0代一直冷冻保存到第7代。建立初步实验以确定解冻的mesoangioblast细胞系的细胞功能和表型以复制未来的临床制造过程。第3代的两个细胞系成功解冻并重新培养,其中对细胞功能、细胞分裂和扩增及表型没有不利影响。通过流式细胞术通过针对 α -平滑肌肌动蛋白和肌球蛋白重链的细胞内染色在两个mesoangioblast细胞系中研究骨骼肌和平滑肌分化的表征。两种抗体现均经过优化和验证。

[0148] 来自肌肉活检组织的原代成纤维细胞培养物的衍生

[0149] 从用于mesoangioblast分离的相同活检组织建立肌源性成纤维细胞的分离和扩增。

[0150] 获得用于组织消化的GMP级试剂(胶原蛋白酶和中性蛋白酶)并用一个成人肌肉活检组织成功进行测试。采用标准操作程序建立成纤维细胞系并扩增至第4代。

[0151] 来自一个活检组织的两个细胞系的衍生允许较容易的支架共接种以增强mesoangioblast细胞粘附。

[0152] 上皮细胞(EC)和成纤维细胞培养

[0153] EC和成纤维细胞培养(使用MRC5成纤维细胞)用在辐射的成纤维细胞的饲养层上培养的EC进行。

[0154] 数据(未显示)证实大鼠食管上皮细胞可有效地接种到脱细胞的食管上。

[0155] 大鼠食管脱细胞化

[0156] 用在管腔灌注中组成的去污剂-酶处理(DET)将大鼠食管脱细胞化,其中在4℃连续流体递送去离子水24小时,在室温(RT)连续流体递送4%脱氧胆酸钠4小时并在室温连续流体递送50kU/mL DNA酶-I/1M NaCl 3小时。无细胞支架在含有1%P/S的PBS中在4℃储存长达1个月。

[0157] 细胞接种

[0158] 对于无细胞支架中的细胞接种,将fMABS和小鼠成纤维细胞(仅用于共接种实验)在第5和7代之间用胰蛋白酶消化并混悬于1:2稀释的低生长因子(GFR)基质胶中或仅混悬于培养基中并保持在冰上。支架插管有NG管以使接种较容易进入和处理。使用胰岛素注射器注射细胞并进行每次约5 μ L的多次注射以尽可能多地覆盖食管支架的多个区域。使用放置于无菌罩中的立体显微镜将细胞以10⁶个细胞/5mm长度的密度直接注射到基质的肌肉层

中(图1)。可选择地,将混悬于1:2稀释的基质胶GFR中或混悬于培养基中的细胞接种在支架的表面上。

[0159] 根据测试的接种条件和结果,接种的支架可任选地:

[0160] -在含有增殖或分化培养基的多孔板中以静态条件培养为管状基质,

[0161] -纵向开放,在含有增殖或分化培养基的多孔板中以静态条件培养为扁平基质(图2),

[0162] -缝合到塑料或玻璃棚架作为管状基质并放置在生物反应器中进行24小时的静态培养,然后进行6-7天的动态培养。

[0163] 在静态或动态条件下培养的工程化食管在培养6-7天时用福尔马林固定并进行组织学和免疫荧光分析。

[0164] 生物反应器

[0165] 动态培养典型地使用由 Applikon[®] Biotechnology提供的经适当调整的生物反应器进行。生物反应器由两部分构成:装有传感器和搅拌器的可高压灭菌储器;监测pH值、温度、搅拌器速度、泡沫水平和配套管式泵的控制单元。另外还安装了PC作为界面。

[0166] 将食管接种支架放置在玻璃(尽管也可类似地使用其他材料)制成的定制腔室内,这允许对内部样品进行灭菌和视觉监测。将支架的每个边缘缝合到组织培养罩内无菌皿中的玻璃棒。然后将棒和支架轻轻地牵引通过玻璃腔室直到两根棒从各端伸出。然后连接盖子及垫圈和O型环并关闭。在另一端,装有鲁尔接口的管道将棒的开口端连接到储器以确保培养基循环。最后将支架托管室放置在标准培养箱内。

[0167] 为了建立脉动流,利用专用泵(iPump)。

[0168] 在使用中,将接种有fMABS的接种食管基质装入可高压灭菌的培养腔室中(参见例如图3)并在增殖培养基中静态培养24小时。然后将培养基从腔室(外部和内部隔室)中取出,用分化培养基更换并将腔室连接到带有灭菌管道和连接器的Applikon生物反应器以开始动态培养(图4)。生物反应器允许控制储器温度、培养基中的O₂和CO₂压力、流速、外部/内部隔室培养基回收利用。

[0169] 网膜中工程化食管的移植

[0170] 细胞接种后,在麻醉下将5mm管状支架植入裸鼠的腹腔并用可吸收缝线包裹网膜。在内腔中将NG管植入支架以避免基质塌陷并维持食管结构(图5)。植入后2和4周处死动物,收获支架并固定用于组织学。

[0171] 组织学和免疫荧光分析

[0172] 将组织样品和细胞培养物在PBS中的10%中性缓冲福尔马林溶液于4℃固定24小时(组织)或10分钟(细胞),然后在蒸馏水(dH₂O)中洗涤。组织在蔗糖溶液中脱水并在液氮中冻结以进行冷冻切片。将固定于板中的7μm切片和细胞用苏木精和曙红(H&E)染色或针对碱性磷酸酶(AP)、NG2、PDGFRβ、肌球蛋白重链(MyHC)、肌细胞生成素、α平滑肌肌动蛋白(αSMA)、SM22、人核、Ki67、CD68和MyoD进行免疫染色。然后将样品与荧光二抗一起温育,用DAPI复染并用水性封固介质封固。

[0173] 实施例1:胎儿MABS表征

[0174] 胎儿MABS显示与成人MABS相当的形态、特征和标志物表达。FACS分析检测到低水平的CD31、CD34、CD45、CD90(0-1%)、高水平的CD44(97-100%)及不同水平的CD56和CD146

(0-25%)。在具有增殖培养基的培养物中, fMABS针对AP反应和NG2染色(两种经典的MABS标志物)呈阳性(图6)。当用骨骼肌分化培养基温育时, 细胞能够融合并形成针对MF20呈阳性的成熟肌管并表达核标志物肌细胞生成素(MyoG)。当用添加富含TGF β 细胞因子的低血清培养基培养时, fMABS还表现出向平滑肌表型的分化能力。在平滑肌分化培养基中培养6天后, 细胞表达典型的平滑肌标志物诸如SM22和 α SMA。

[0175] 实施例2: 无细胞食管ECM中的细胞接种优化

[0176] 进行食管无细胞基质接种, 比较基质胶或培养基中的细胞递送以了解媒介物对细胞存活和植入的影响。另外, 分析在静态培养24和48小时后细胞粘附和迁移到支架中, 评价显微注射与表面接种比较。在基质胶中通过大鼠无细胞食管支架中的显微注射和表面接种递送的胎儿MABS在24和48小时后显示出细胞粘附和存活。在显微注射样品中, 基质表面上的细胞粘附比基质内的细胞植入有效; 然而细胞数量在显微注射基质的情况下随着时间而增加, 突出显示了较高的细胞增殖(图7)。仅用培养基接种的细胞显示较低的植入和增殖, 在静态培养的24和48小时之间没有实质性变化。这些数据有助于改善对基质胶和培养基的理解及接种技术对细胞存活和增殖至无细胞基质中的影响。

[0177] 实施例3: 无细胞支架中fMABS和mFB的共接种

[0178] 进行共接种实验以确定成纤维细胞(FB)当与fMABS一起接种时对基质内细胞存活和迁移的作用。我们显微注射比例为85:15和70:30的fMABS与小鼠FB或单独的fMABS作为对照, 总细胞密度为 1×10^6 个/5mm支架长度。然后将样品在静态条件培养5天。与接种单独的fMABS的样品相比, 在共接种的支架中用DAPI染色的接种支架的冷冻切片显示出相当数量的细胞和较好的细胞分布, 表明FB对ECM中fMABS植入的正面效应(图8)。此外, fMABS和mFB的最佳比例似乎是85:15, 在基质内表现出明显较多数量的细胞。这些数据将通过附加分析完成以在共培养6天后鉴定接种样品中的fMABS和mFB及其标志物表达规格。另外, 每个区域的确切细胞数量将在随机图片中确定。

[0179] 实施例4: 用生物反应器的动态培养

[0180] 与共接种实验平行, 使用生物反应器和用于中空器官的两个不同培养腔室进行动态培养实验。腔室具有相似的特征: 具有独立流量的内部和外部腔室, 可高温高压灭菌, 可通过无菌硅胶管道和连接器与培养基储器连接。尽管如此, 初步实验还是突出强调了一些与支架污染有关的问题、维持腔室内恒定和可调的培养基水平并将管状支架缝合到棚架。由于这些原因, 在最初尝试之后, 使用上述定制玻璃腔室进行动态培养实验。

[0181] 将胎儿MABS显微注射到食管无细胞支架中, 然后将构建体缝合到允许分离腔室的内部和外部隔室的两个玻璃插入物。组装培养腔室, 连接至生物反应器和储器并最终在两个隔室中填充增殖培养基。将腔室在静态培养条件温育6小时, 然后开始在内部腔室中进行培养基流动以进行动态培养(图9)。培养24小时后, 腔室和储器中的培养基均从增殖培养基变为分化培养基。6天后停止动态培养, 其中培养3天时进行完全培养基更换。从动态培养的接种支架获得的冷冻切片的初步分析来看, 在基质内存在明显的细胞植入和增殖(图9)。与初步证据相比, 动态培养的样品似乎改善了支架内的细胞迁移和较均匀的分布。此外, 本实验中使用的生物反应器设置改善了整体培养成功、避免污染、允许较好的流量控制、温度控制、培养基氧合和支架处理。

[0182] 实施例5: 接种支架的网膜植入

[0183] 为了研究体外无细胞支架血管形成和重塑,将MABS接种的管状支架植入免疫受损小鼠的网膜作为未来正交各向异性移植前的前血管化步骤。

[0184] 移植2周和4周后,在人核染色的支架中鉴定出人MABS(图10A)。H&E和免疫荧光分析显示来自宿主的细胞迁移(人核阴性),表明通过植入的ECM细胞归巢激活。组织学也突出强调了在移植2周后适度的基质重塑,其中食管ECM层仍然是可辨认的。另一方面,移植后1个月基质重塑更明显,其中原始结构消失。当相对于分析面积(cm^2)进行计数时,1个月时间点人类细胞数量是较少的(图10B)。当用增殖标志物(Ki67)分析时,约5%的细胞总数增殖人MABS,而移植后2周剩余的9%针对该标志物呈阴性(图10C和D)。1个月后,支架内没有发现增殖细胞。这些初步数据表明2周似乎是该体内步骤获得初始前血管化(由H&E染色切片中的小新血管的存在来证实)和保留原始ECM组织的有限基质重塑的良好折衷。样品的特征是存在巨噬细胞(CD68^+ 细胞)、平滑肌细胞(αSMA^+ 细胞)和MyoD(骨骼肌前体细胞)。人MABS对于平滑肌和骨骼肌标志物是阴性的,表明这些细胞的功能丧失,这些细胞在移植后几天停止增殖和分化。需要进一步分析和额外的实验来了解细胞行为并改善其植入和活化。在两个时间点均发现支架内巨噬细胞是均匀分布的,这支持了宿主细胞在支架中进行的重塑过程。

[0185] 实施例6:用脱细胞的大鼠支架的先前细胞接种实验的分析

[0186] 将mesoangioblast(MAB)注射到大鼠食管无细胞支架中并在增殖培养基中培养24小时,然后在分化培养基(向骨骼肌分化)中培养5天。从培养的支架获得的冷冻切片的初步分析(DAPI染色)来看,基质内存在明显的细胞植入和增殖(图11A、B)。更深入的分析突出强调了由动态培养条件刺激和改善的细胞分布和迁移(H&E,图11C、D)。如MyoD染色(骨骼肌前体细胞特异性标志物)所确定,细胞还表现出向骨骼肌分化的初始定型(图11E、F)。

[0187] 如前所述(图8),当MAB与小鼠成纤维细胞(mFB)以85:15和70:30的比例共注射并在静态条件培养5天时,相当数量的细胞实现了植入且与用单独的MAB接种的样品相比存在改善的细胞分布,表明FB对ECM中人MAB植入的正面效应(图12)。随后的分析显示以85:15的比例接种hMAB和mFB显示在培养5天后保持细胞比例(图12),而70:30比例在培养期间导致较高的成纤维细胞增殖,其中在5天后得到50:50比例。用人核染色确定细胞比例(图12)。此外,hMAB表达基于肌肉分化定型的骨骼肌标志物SM22。

[0188] 实施例7:在脱细胞的大鼠支架上培养的mesoangioblast和成纤维细胞的体外细胞接种和培养条件的优化

[0189] hMAB:mFB(85:15)的最佳共接种条件用于优化培养条件,与单独的hMAB比较。将注射有85:15共接种或仅hMAB的大鼠支架在增殖培养基中培养2天或4天,接着在含有TGF β 的分化培养基中培养7天(分别为2+7和4+7天)以诱导平滑肌分化。支架在静态和动态设置中培养。从静态培养的样品的DAPI染色来看,在2+7和4+7培养条件之间没有突出有显著差异(图13)。

[0190] 当与单独的hMAB比较时,85:15接种的2+7和4+7条件显示出在支架内较好的植入、分布和细胞取向(图13)。相对于静态条件,共接种或仅hMAB接种的支架的2+7动态培养显示出显著的细胞植入和增殖(图14)。与所有先前的静态培养实验相比,培养2+7天后检测到的细胞数量较类似于新鲜大鼠食管的肌层(ME:外肌层,图14)。

[0191] 实施例8:脱细胞的兔食管支架的体外细胞接种实验

[0192] 将单独的hMAB接种在脱细胞的兔食管支架中并在静态和动态培养中培养7天。在平行实验中使用平滑肌细胞(犬源)作为对照(图15)。尽管仅接种hMAB,但当将动态培养与静态培养比较时,兔支架接种证实了较好的细胞分布和迁移。SMC接种样品显示出高细胞植入和存活,但是从注射部位的细胞迁移较低(图16)。hMAB在所有支架层中均表现出均匀的分布且沿着预先存在的肌纤维定向(H&E,图16)。

[0193] 实施例9:来自大鼠和兔供体动物的未接种无细胞支架分别原位移植至大鼠和兔模型的优化

[0194] 进一步优化无细胞食管支架的原位移植的操作。植入脱细胞化基质的片段而没有先前的细胞接种到大鼠和兔中以确定用于体内未来工程化构建体移植的步骤和条件。该操作被开发用于大鼠和兔动物模型。这包括暴露反映甲状腺叶和肌肉的原始食管,除去一段食管(在1-2.5厘米之间,取决于动物模型)并通过NG管以帮助在吻合过程中稳定和识别食管(图17A)。然后进行远端和近端吻合术(图17B)以将支架的两端连接至现有食管(大鼠,图17C;兔,图17D、E)。

[0195] 这些实验突出强调了本发明的构建体能够(i)有效缝合而没有即时泄漏,(ii)针对食物摄取的良好拉伸/应力性质,(iii)优异的生物相容性。

[0196] 实施例10:细胞接种密度的优化

[0197] 为了确立获得成功植入所必需的细胞量,使用MTT活力测定和成像测试不同的人mesoangioblast(hMAB)密度,其允许移植细胞的可视化及其间接定量。活细胞代谢所提供的底物(MTT)并产生可通过吸光度读数提取和量化的可见颜色变化产物(甲臃)。在进行测定前,将支架段接种并温育24小时。

[0198] 与MTT溶液温育4小时后,在支架内可见甲臃阳性细胞,突出强调了它们从注射位点的迁移(图18A)。图片的初步分析表明 1×10^6 个细胞/0.5cm的注射导致最有效的植入。对反应产物的量化进一步证实了该结果。吸光度测量证实反映活细胞数量的甲臃浓度在该条件下比在其他条件下高(图18B)。

[0199] 实施例11:在动态系统中培养的所有支架中的细胞分布和分化的研究

[0200] 为了增强支架内的细胞植入和分布,使用动态培养方法,允许持续的培养基流动,有利于营养物和氧气交换。如先前所确定的,将hMAB接种的和共培养物(hMAB和成纤维细胞)接种的食管在生长培养基中培养2天并在平滑肌分化培养基中培养7天。每天以2ng/ml的浓度提供新鲜的TGF β 。如图19A-B所示,总共9天的培养后,相比于共接种的情况,hMAB接种的支架的肌肉层承载显著高数量的细胞。粘膜下层显示出相反的趋势,在共接种的支架中比在单独的hMAB中明显填充较多的细胞。

[0201] 此外,相对于hMAB接种的样品,使用共接种方法,细胞较均匀地分布在共接种的支架中,证实了先前以静态进行的实验(图19C)。有趣的是,在培养期结束时,相比于未接种基质,在两种条件下所有食管层的尺寸均得到扩增(图19D)。特别是,hMAB接种的支架的肌肉层比共接种的情况宽。这种厚度的增加及较高数量的移植hMAB产生与85:15接种的支架相当的细胞密度(图19E)。

[0202] 通过检测KI67⁺细胞进行的增殖分析(图20A)显示相比于共接种的情况(10%),hMAB接种的支架中增殖细胞的百分比显著较高(24%)。值得注意的是,在hMAB接种的支架中,在肌肉层中检测到增殖细胞的最高百分比(85%),而在共接种的支架中,通过细胞密度

计算显示KI67⁺细胞似乎较均匀地分布(图20C)。

[0203] 就平滑肌分化而言,相比于共接种的情况,仅接种hMAB的支架中SM22⁺细胞的百分比比较高(40%)(图21A-B)。另外,如先前在静态条件下所证实的,大多数分化的细胞分布在hMAB接种的支架(85%)和共接种的支架(70%)两者的肌肉层中(图21C)。

[0204] 实施例12:支架的选择

[0205] 分析显示新生儿人类供体组织的供应可能不足以满足需求。因此,脱细胞的动物源性支架与制造的人细胞源性支架一起进行测试。

[0206] 当体内比较时,脱细胞的猪组织保持完整,而制造的人细胞源性支架降解,从而证实了猪组织的优越性。

[0207] 实施例13:生成组织工程化食管作为新生儿自体治疗的实施例方案

[0208] 1.收获猪食管,置于储存溶液中并运输至GMP生产场地。

[0209] 2.使用2(两)个循环的DET方案进行脱细胞化(水,24小时,室温;脱氧胆酸钠,4小时,室温;DNA酶,3小时,室温),照射支架(灭菌)并储存在缓冲溶液中。

[0210] 3.用mesoangioblast和成纤维细胞注射脱细胞的支架。mesoangioblast源自患者的肌肉活检组织,成纤维细胞来自皮肤活检查组织—两者均可在新生儿的胃造口术过程中从腹壁一起采集。

[0211] 4.在腔室中在确定的增殖培养基中培养接种的支架2天且在确定的分化培养基中培养9天,保持在湿润的37℃和5%CO₂条件下并通过生物反应器控制器对腔室条件进行外部控制。

[0212] 5.将上皮细胞递送至食管支架的管腔侧(源自患者现有残余食管的活检组织的原代细胞)。

[0213] 6.进一步培养后,运至腔室的手术室并移除以用于移植至患者。

[0214] 实施例14:实施例15至18中使用的成纤维细胞的表征

[0215] 通过酶消化从野生型小鼠后肢骨骼肌(趾长伸肌,EDL)和隔膜中分离出用于下述所有共接种实验的小鼠成纤维细胞(mFB)并将其铺板用于扩增。细胞显示出经典的细长形态和大小且在培养物中扩增时针对Ki67呈阳性,表现出几次传代的增殖能力(图23)。成纤维细胞针对波形蛋白和TCF-4等经典标志物也呈阳性。

[0216] 实施例15:脱细胞的大鼠支架上细胞接种实验中示意性细胞分布的分析

[0217] 如前所述,用hMAB或hMAB+mFB(比例为85:15)接种脱细胞的大鼠支架并在静态条件培养,固定,冷冻切片并针对人核和DAPI染色。对切片进行扫描以检测并计数支架中存在的所有细胞并产生细胞的示意性分布(图24A)。相比于单独的hMAB,从示意性和极性分布(假设完美圆形切片校正的细胞分布,图24A、B)的集合来看,我们检测到hMAB+mFB接种的支架中围绕组织切片的细胞植入和分布均匀性的明显改善。每个区域的细胞总数的计数证实了该趋势($n \geq 3$,图24C)。

[0218] 实施例16:hMAB或hMAB+mFB接种的支架中细胞迁移的研究

[0219] 为了评估在大鼠脱细胞的支架中与或不与mFB一起接种的hMAB的迁移能力,我们接种用荧光素酶Zs Green慢病毒(ZsGreen⁺Luc⁺hMAB)转导的hMAB。使用流式细胞术证实细胞的转导并使用FACS分选获得纯转导细胞群。使用体内成像系统(IVIS),生物发光成像(BLI)用于示踪支架上的细胞。细胞每24小时无创地示踪迁移(图25A)。成功从接种的细胞

中检测到BLI并分析图像以量化每24小时发射的辐射(图25B)。为了计算细胞的迁移,BLI由相对于注射点中心定位的8个不同感兴趣区(ROI)确定(图25C)。在培养1天后在ROI 3-6(中心ROI)测量的辐射率在仅用hMAB接种的支架中突出显示出较高的BLI(三角形,图25D)。这完全符合实验设置,因为只有hMAB是Luc⁺的且其在共接种条件(比例为85:15)下的初始数目较高。尽管如此,细胞数目在随后几天中即在培养3天和5天时如预期的那样减少之后,从hMAB+mFB支架检测到的总辐射率(正方形)与单独使用hMAB的总辐射率相当或较高,显示整个培养中不同ROI的清晰细胞增长和迁移。在第5天,与单独的hMAB相比,共接种的支架显示出较高的辐射率,特别是在距注射点较远的ROI 3和6(ROI 4和5之间),突出强调了大量沿着支架迁移的细胞的存在(图25D)。

[0220] 也使用MTT活力测定法确定细胞迁移,其允许在培养6天后在接种的支架上可视化细胞(图26)。接种有 8.5×10^5 个hMAB或与/不与mFB(比例为85:15)一起的 1×10^6 个hMAB的管状支架在静态条件培养6天,然后与MTT溶液温育4小时。在支架中可见甲臞阳性细胞,突出了3种条件之间迁移模式和程度的差异(图26A)。使用ImageJ软件测量沿着从细胞簇的中心至支架边缘径向绘制的8条随机线的颜色强度,针对细胞迁移分析平开支架的图像(代表性线A-B,图26A,中心)。考虑到2个坪之间的距离(图26B中的代表性图和量度),使用获自所有线的灰度值图来计算由细胞覆盖的像素的距离。共接种的支架中由细胞覆盖的平均距离(mm)高于用单独hMAB的其他两个条件($n=3$,由3名独立操作者以盲法进行计数,图4C),证实了用BLI量化(IVIS)确定的相同趋势。

[0221] 实施例17:在静态和动态条件培养的hMAB+mFB共接种的支架中细胞分布的较深入研究

[0222] 如前所述,对用hMAB+mFB共接种并在静态或动态条件培养的脱细胞大鼠食管的切片进行染色和扫描以检测和计数存在于支架中的所有细胞。细胞的示意性分布(图27A)和极性分布(假设完美圆形切片校正的细胞分布,图27B)显示相比于静态条件,在生物反应器中培养的支架中围绕组织切片的整体组织生长和较好的分布均匀度。每个区域的细胞总数的计数证实了这种显著差异($n \geq 3$, $*p < 0.05$,图27C)。在动态条件培养的支架中hMAB和mFB之间的比例通过针对DAPI和人核染色的随机切片中的细胞计数来确定以评估成纤维细胞的最终过度生长。培养11天后,存在的mFb仅为细胞总数的14%,显示这些细胞在支架内没有不受控制的扩张($n \geq 3$,图27D)。

[0223] 此外,使用IVIS示踪接种在大鼠支架中(Luc⁺hMAB+mFB)并在玻璃生物反应器中培养7天的细胞,我们能够在整个培养物中沿着支架可视化细胞分布(图28A)。在不同时间点收集IVIS图像,显示从注射点开始的清晰细胞侵入(在第1天的绿黄读取簇)朝向较均匀的分布和在第7天的组织覆盖。从在不同的时间点收集的图像中检测的辐射率值突出强调了在培养的最初几天后细胞数目减少,7天后恢复(图28B)。

[0224] 实施例18:在成纤维细胞存在下的静态和动态条件的mesoangioblast增殖和分化水平

[0225] 如前所述,用hMAB+mFB共接种并在静态或动态条件培养的脱细胞大鼠食管的切片针对人核、SM22(平滑肌分化标志物)和DAPI进行染色并进行扫描以检测并计数存在于支架中的所有细胞(黑色区域,图29A)。图29A中细胞的代表性示意分布显示分化的细胞类型之间的自动化区分:SM22⁺hMAB;SM22⁺mFB;SM22⁻hMAB;SM22⁻mFB,全部为灰度级。相比于静态条

件,这些图突出强调了生物反应器中培养的支架中分化的细胞的分布。当生物反应器提供机械刺激并较好地应用分化培养基时,SM22⁺细胞存在于支架的所有层中并均匀分布,而在静态条件培养的构建体仅在基质的表面上显示出平滑肌细胞(图29A、C)。在不同切片的随机图像($n \geq 3$)中计数的静态和动态培养后SM22⁺细胞百分比的计算证实在生物反应器中生长的支架中平滑肌分化细胞的百分比显著较高(** $p < 0.001$,图29B)。有趣的是,约10%的SM22⁺细胞是成纤维细胞且其在2种培养条件下的贡献相当。在用hMAB+mFB共接种的动态培养样品中,通过对 α SMA和钙调蛋白的免疫染色进一步证实了朝向平滑肌的成熟分化(图30)。细胞显示SM22与 α SMA和钙调蛋白两者在支架的所有层中的共表达,证实成熟水平的分化。

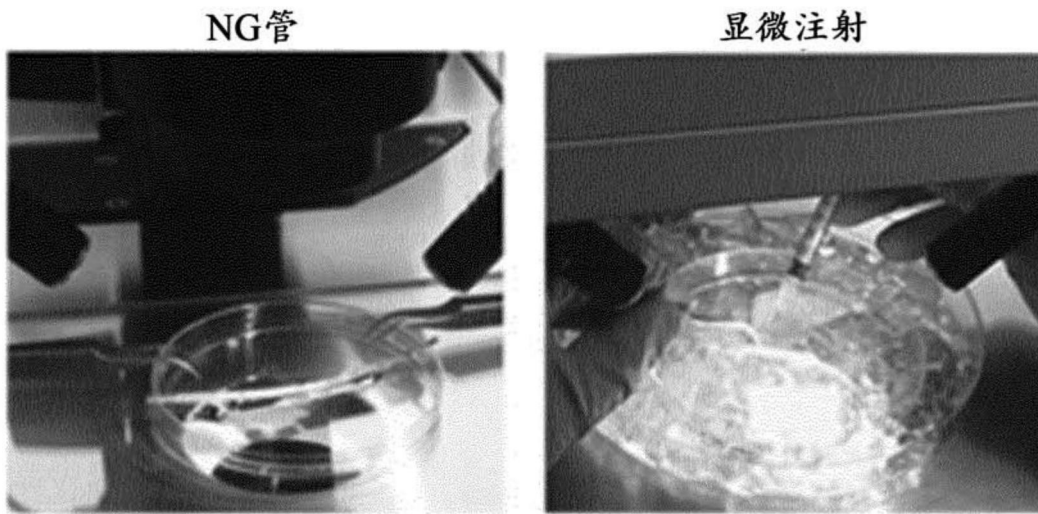


图1

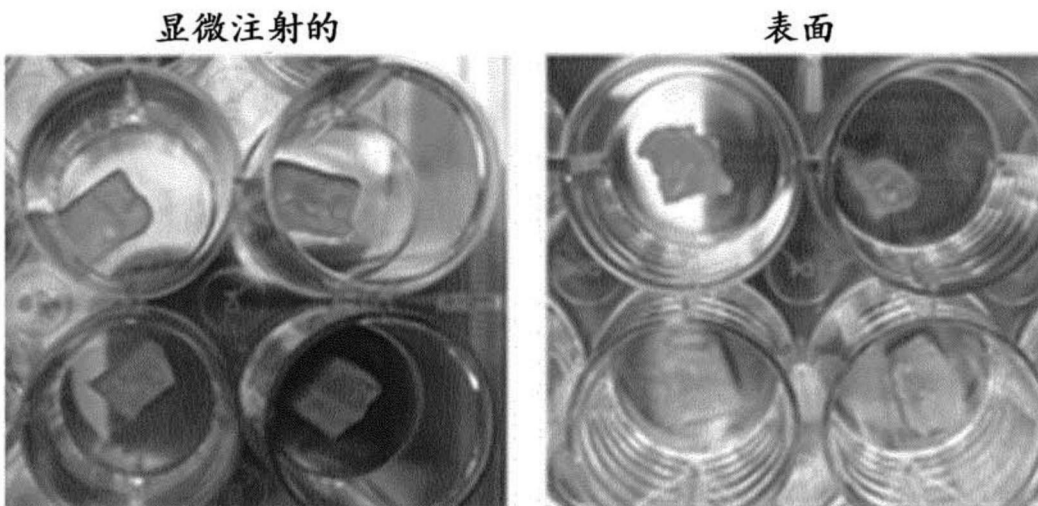


图2

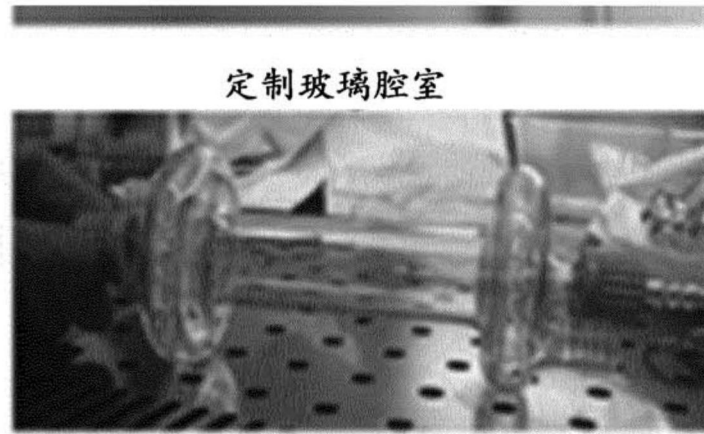


图3

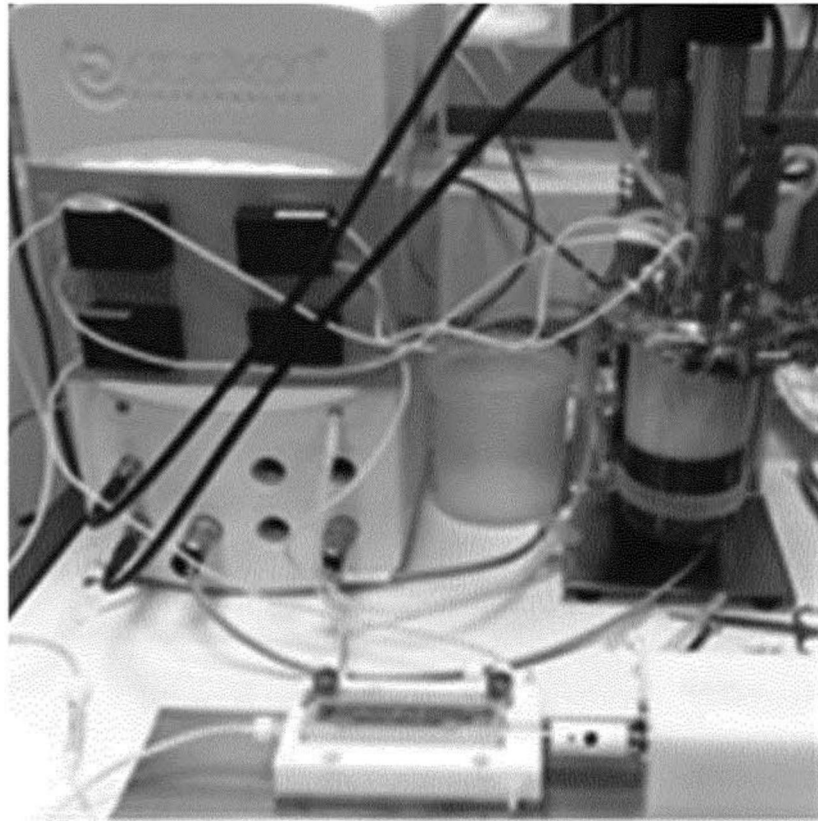


图4

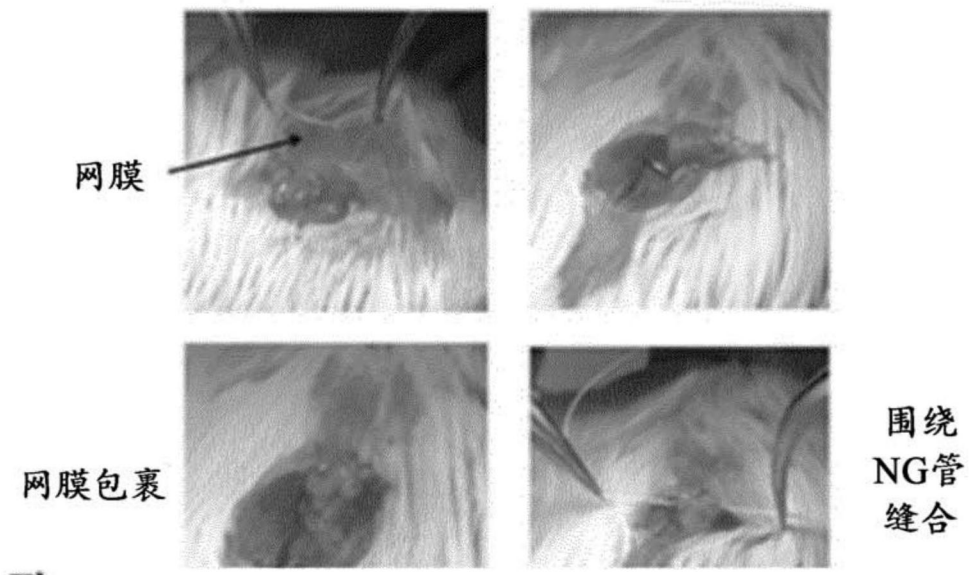


图5

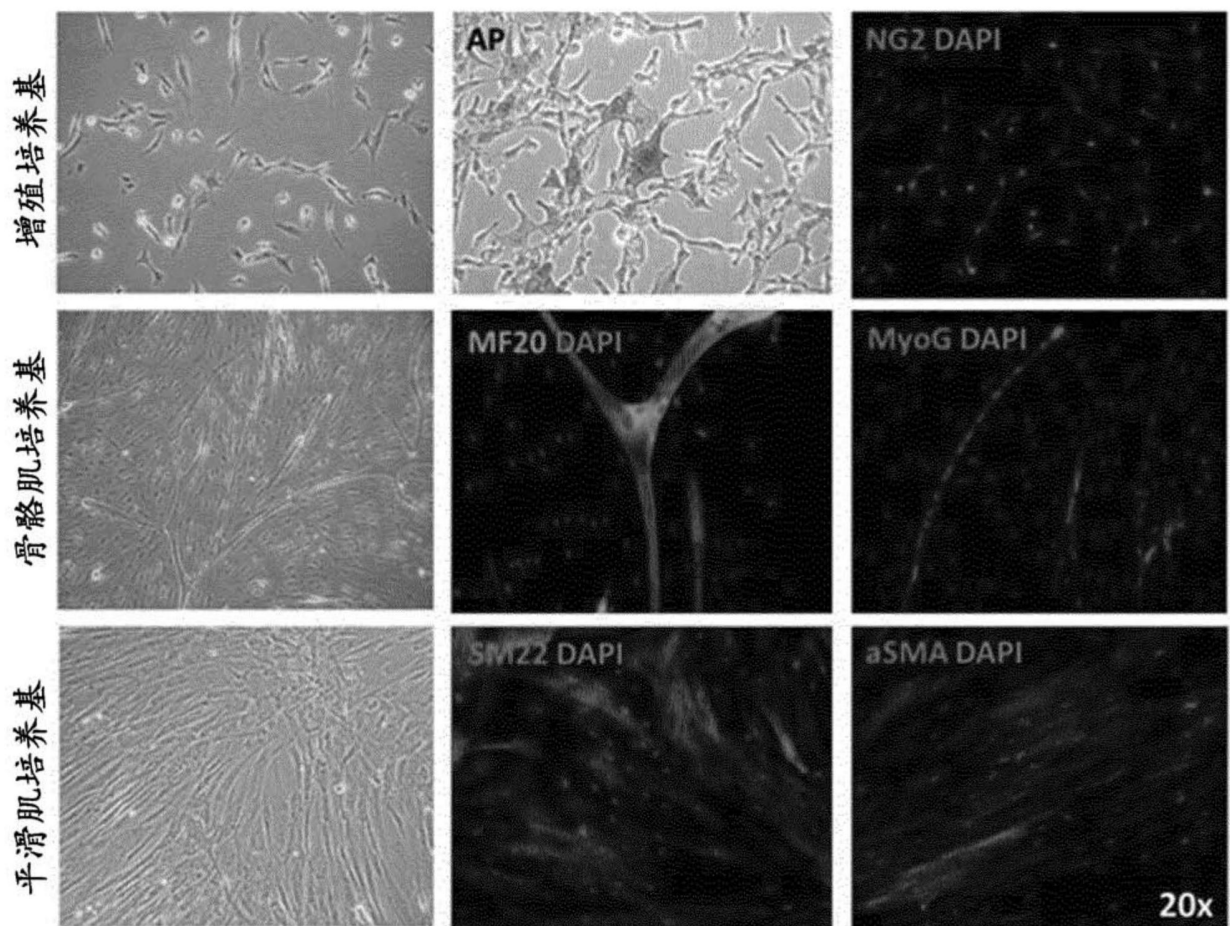


图6

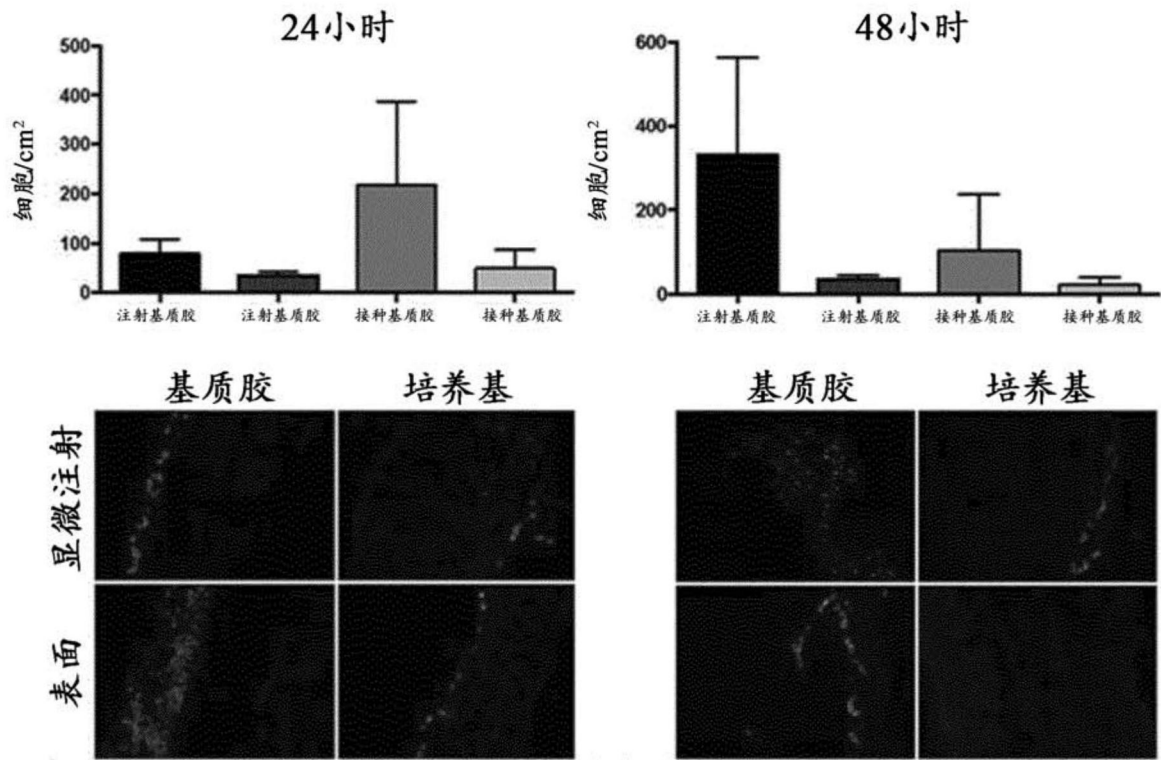


图7

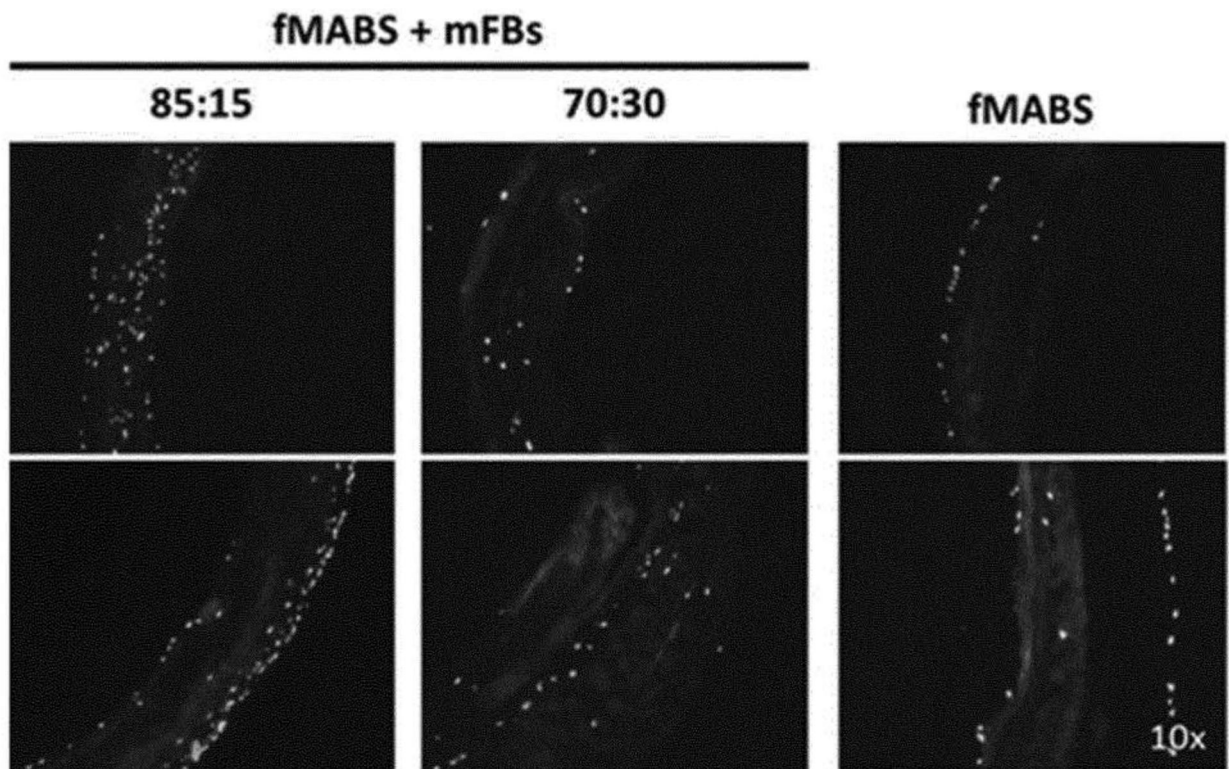


图8

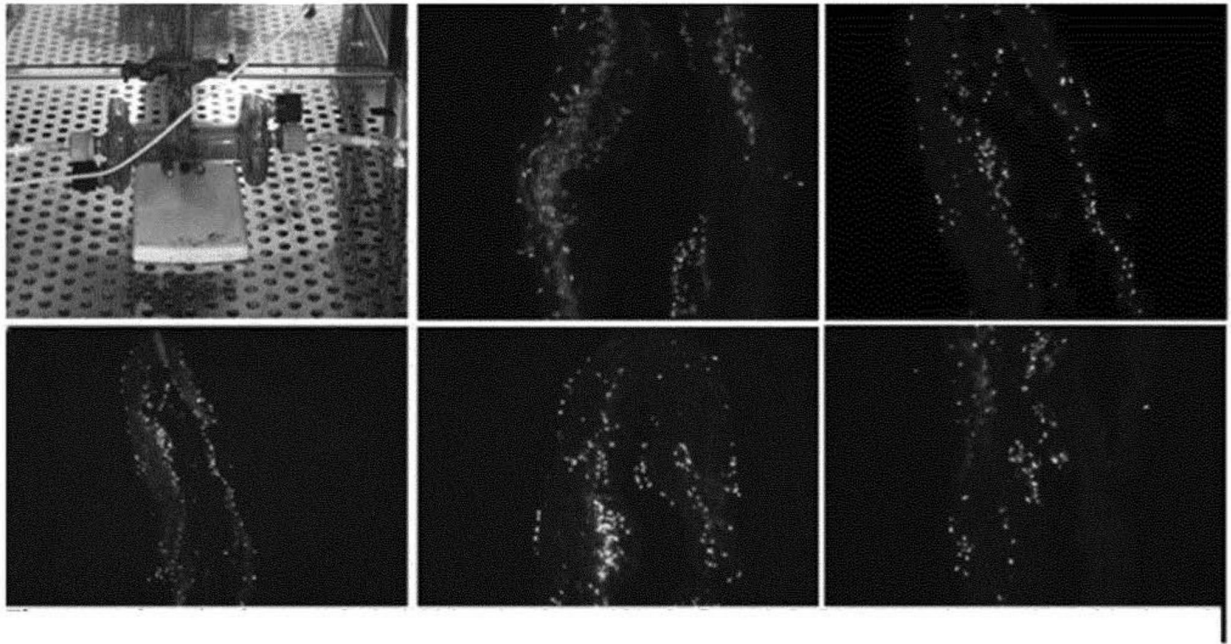


图9

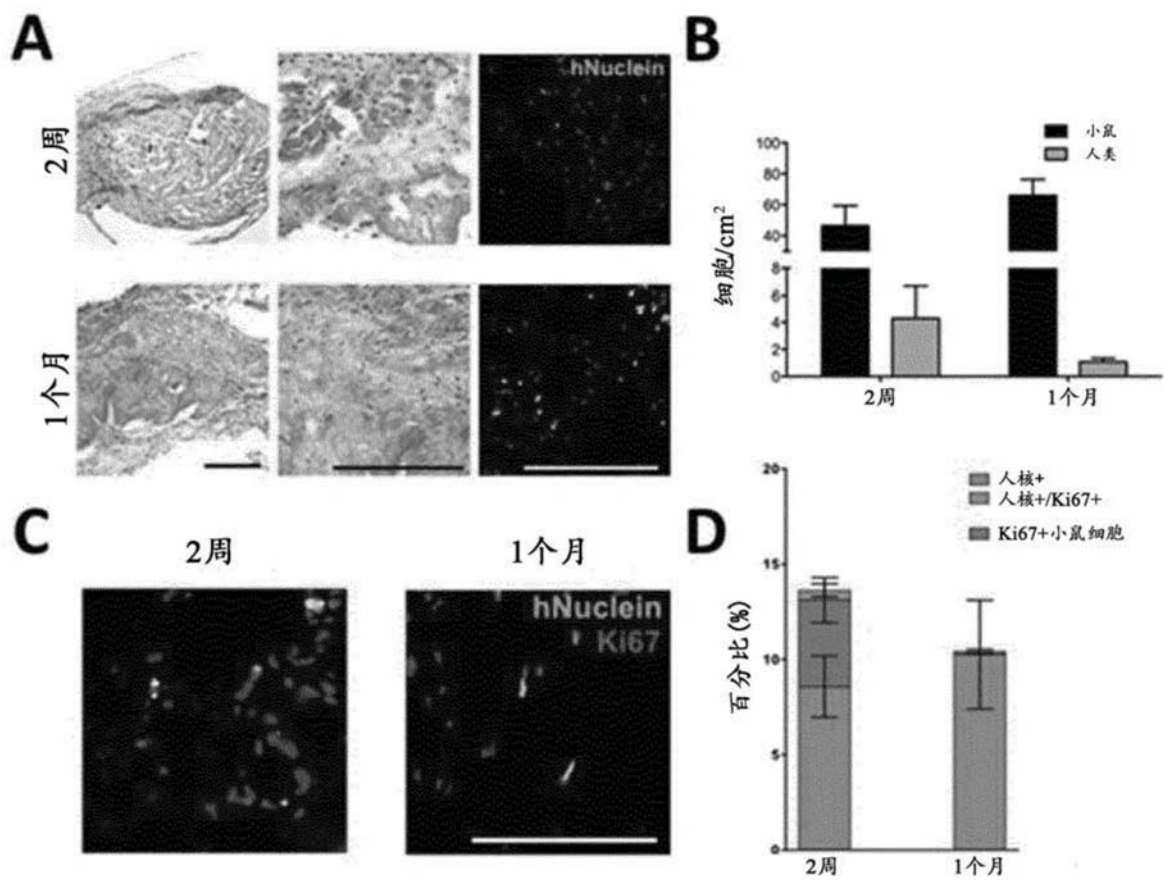


图10

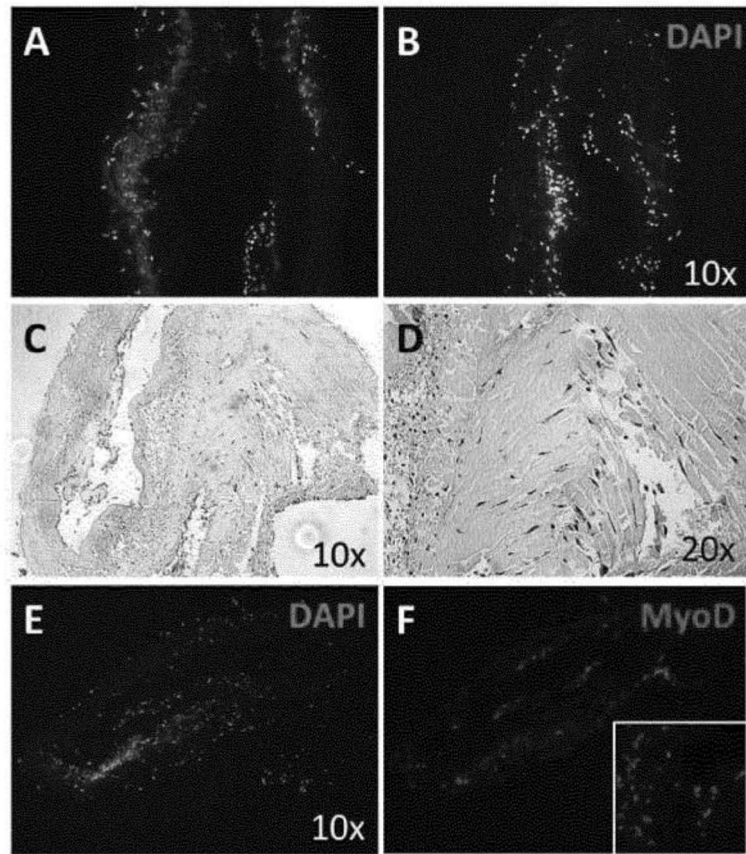


图11

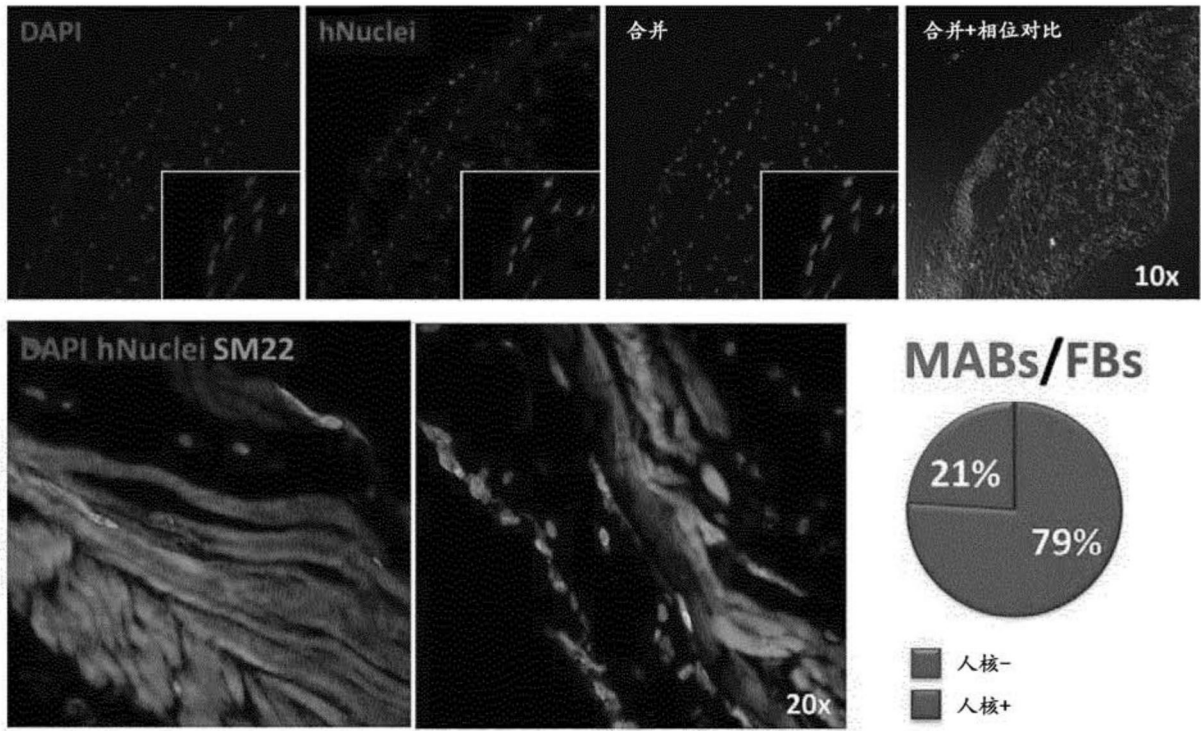


图12

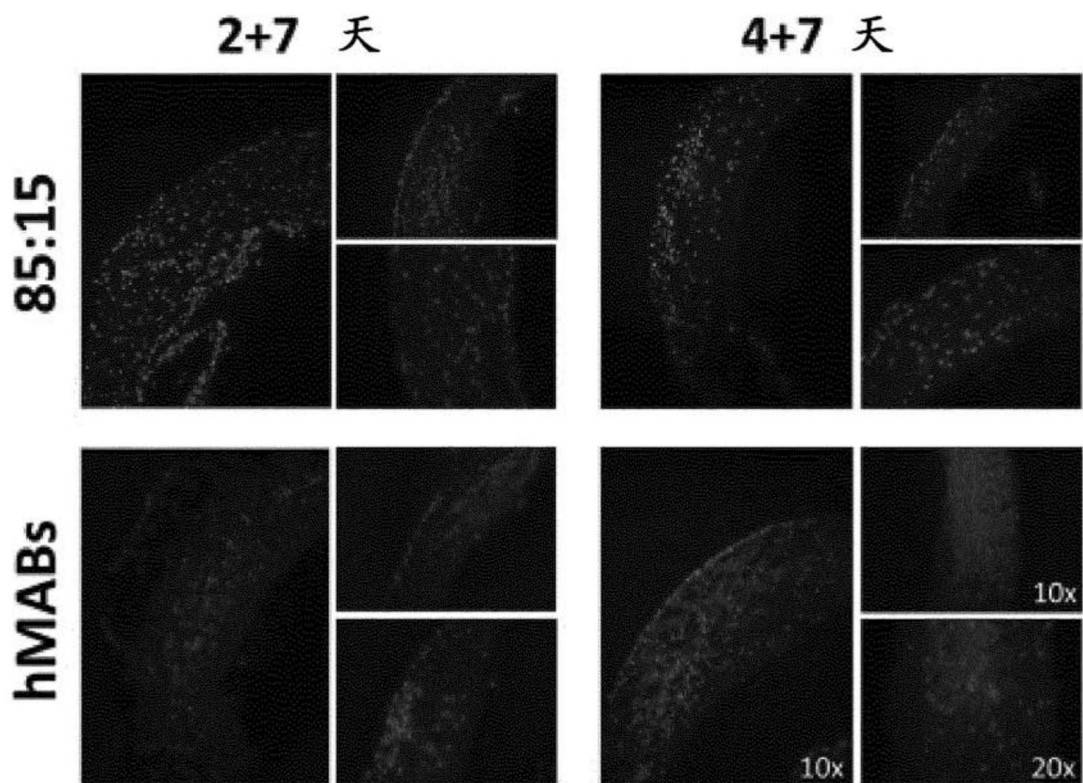


图13

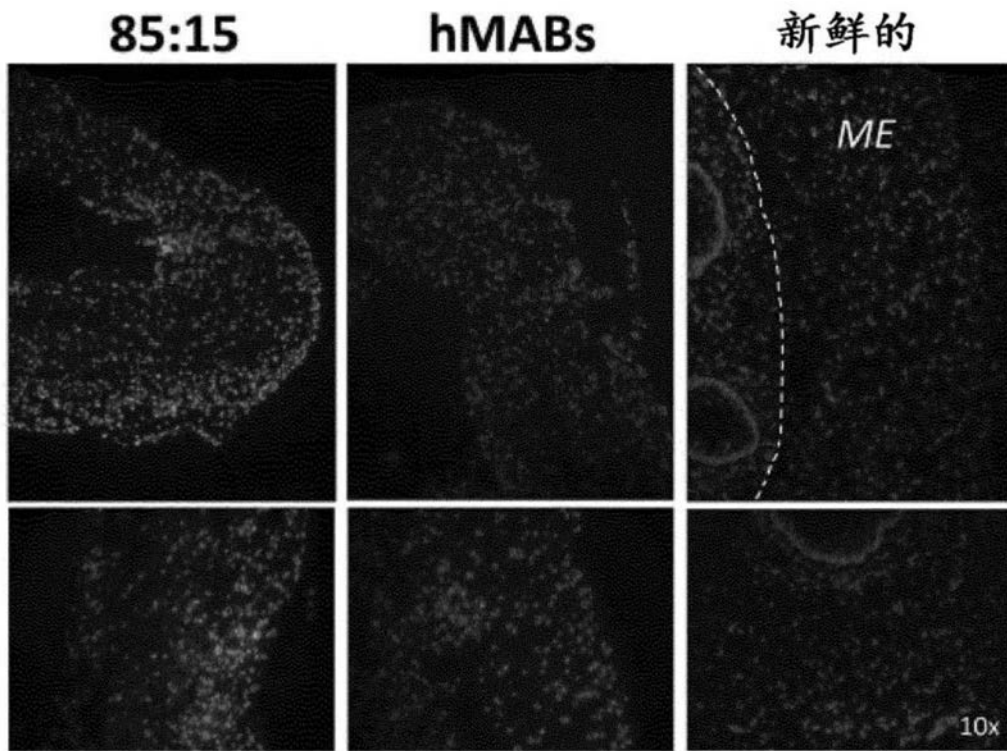


图14

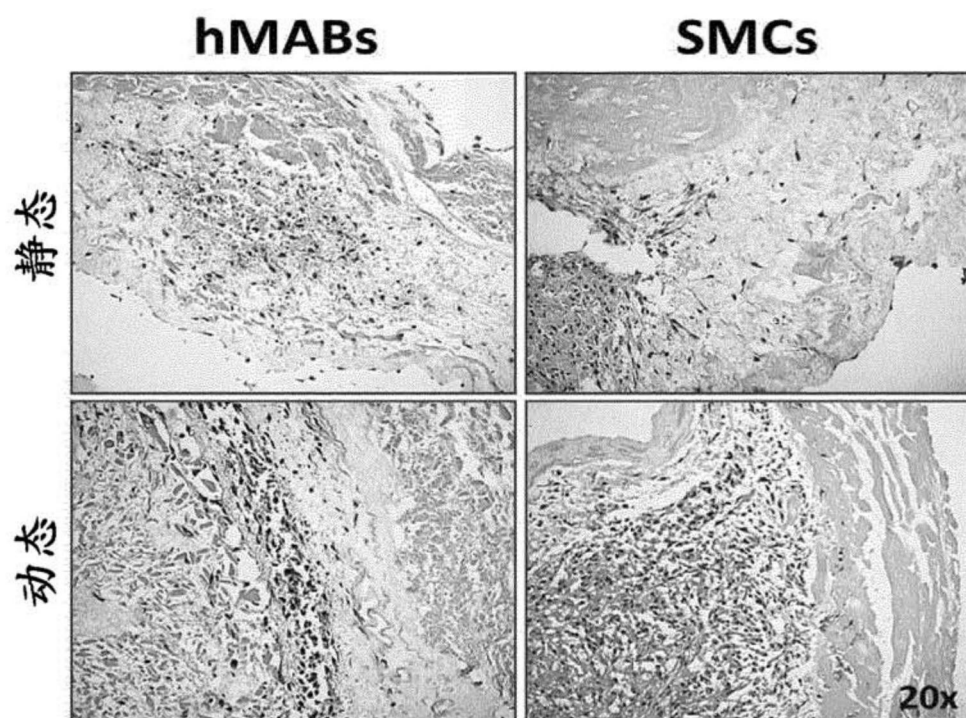


图15

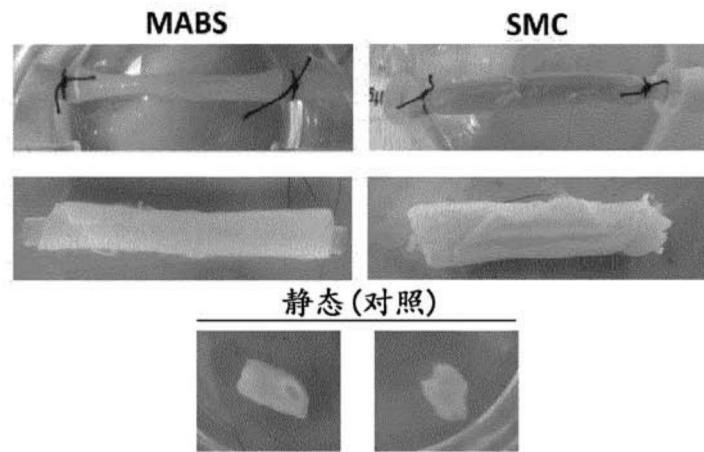


图16

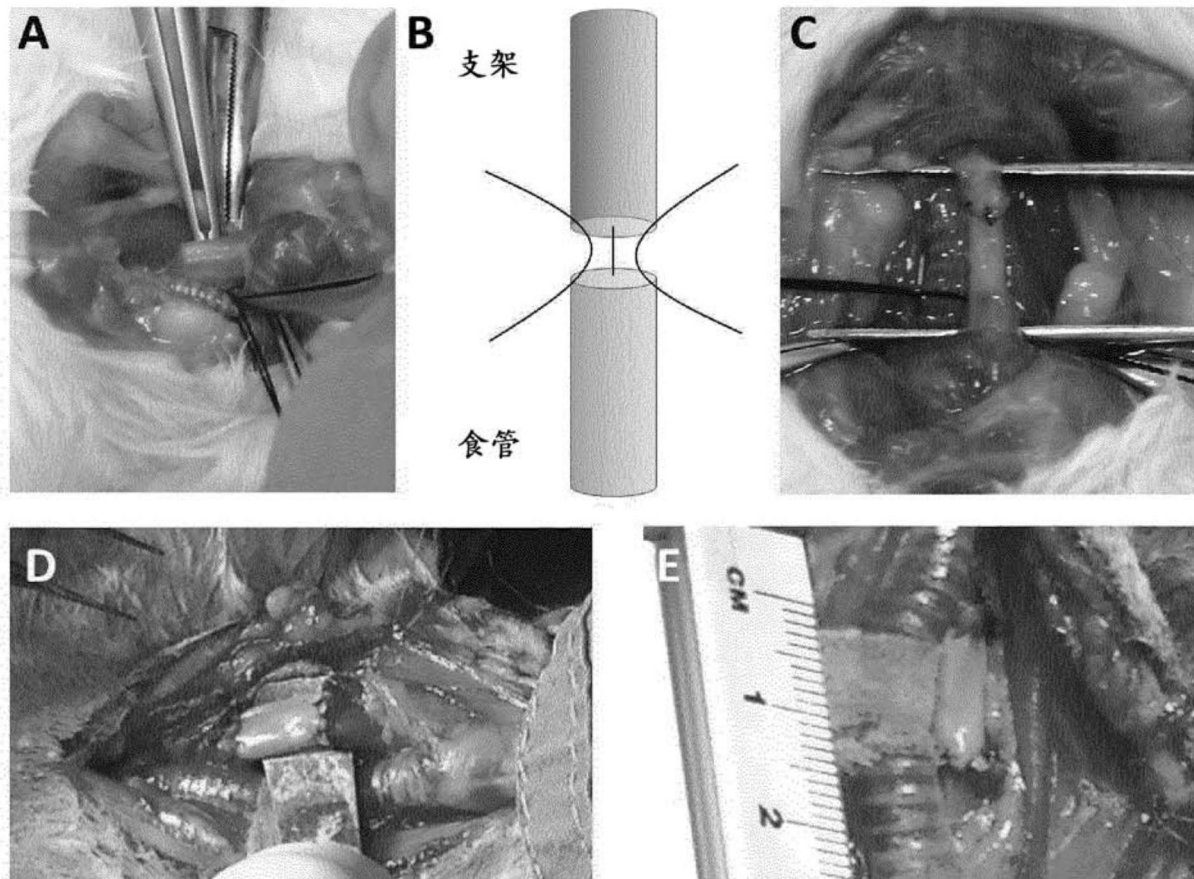


图17

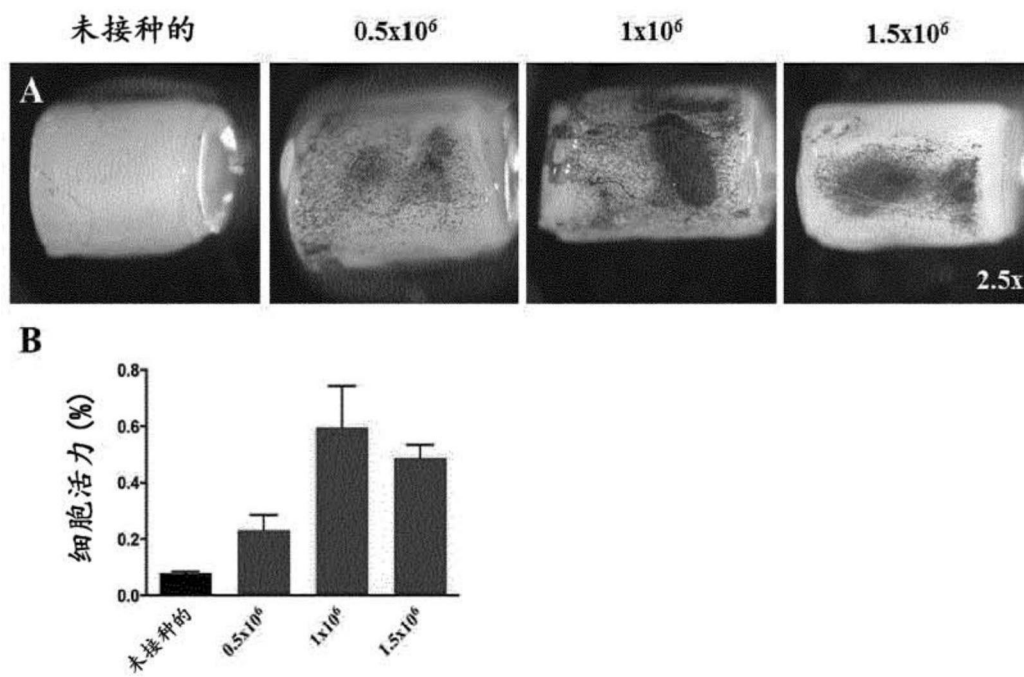


图18

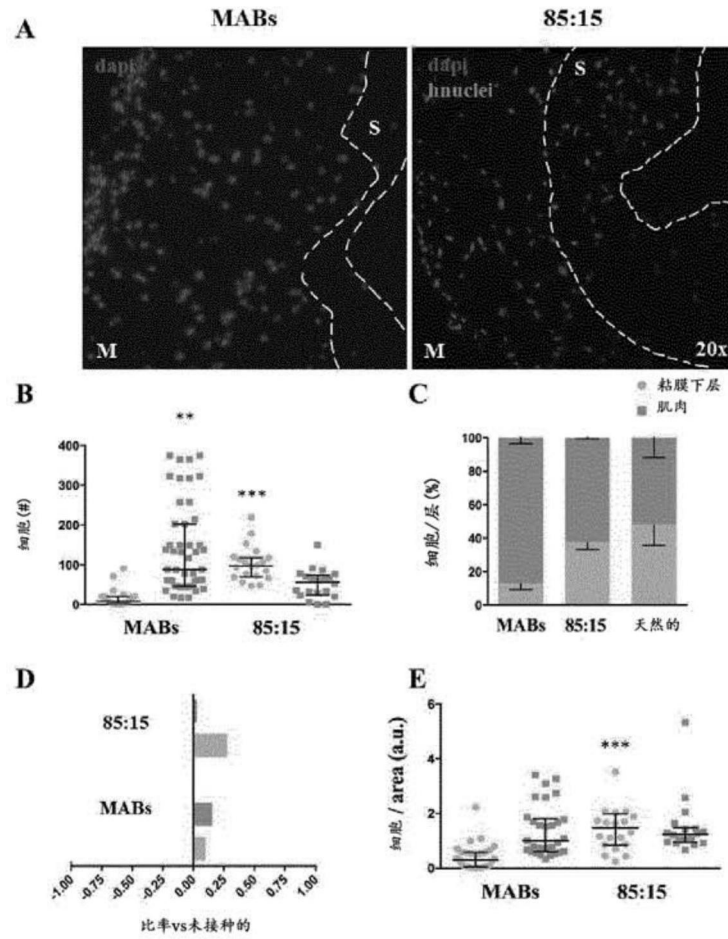


图19

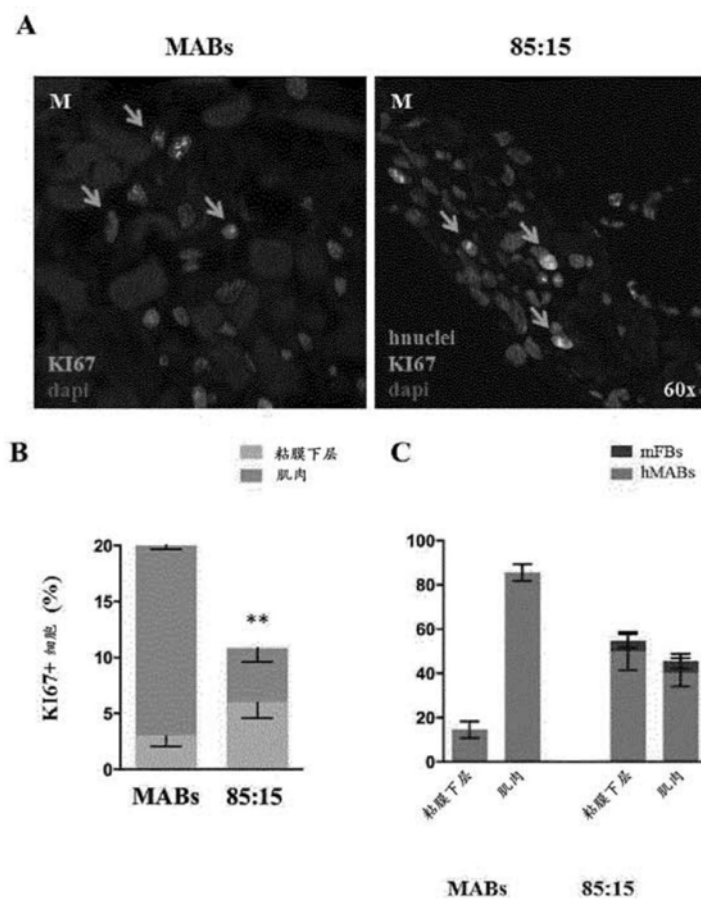


图20

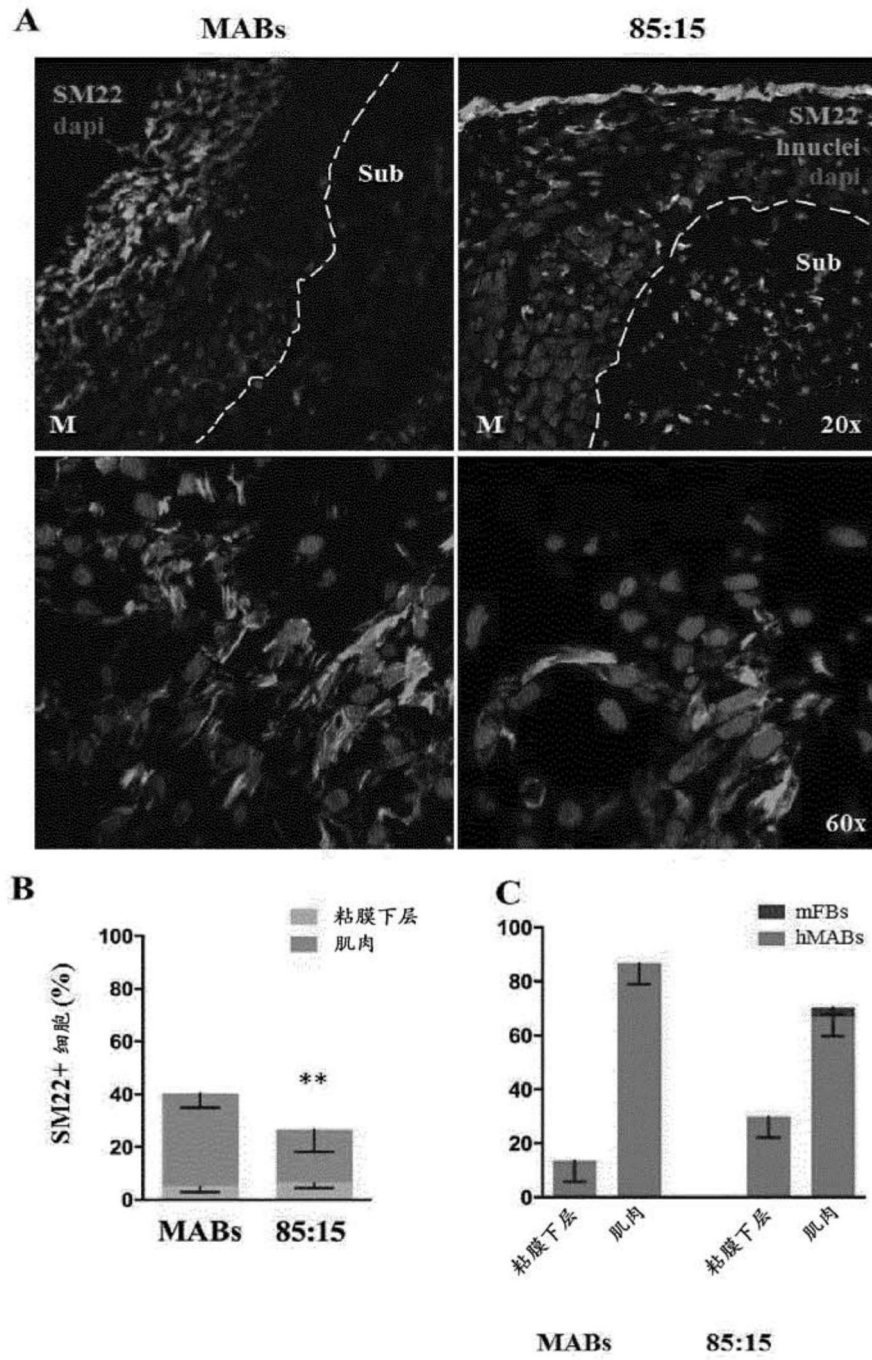


图21

主要定量产出

● 细胞密度=细胞数/单位面积

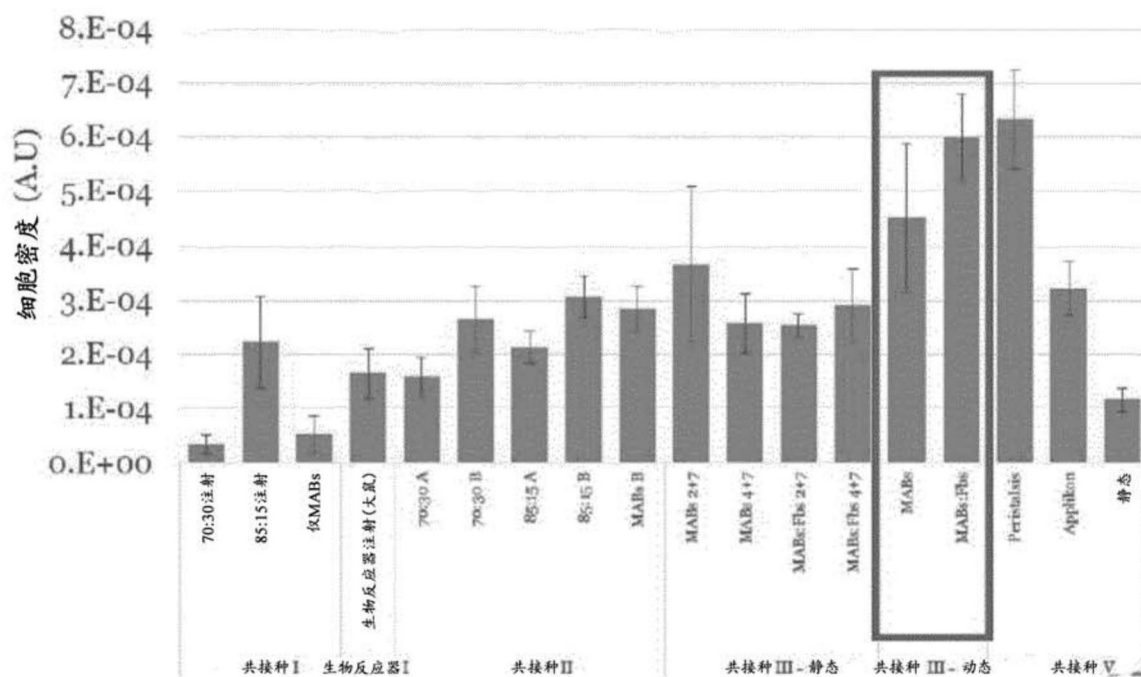


图22

成纤维细胞

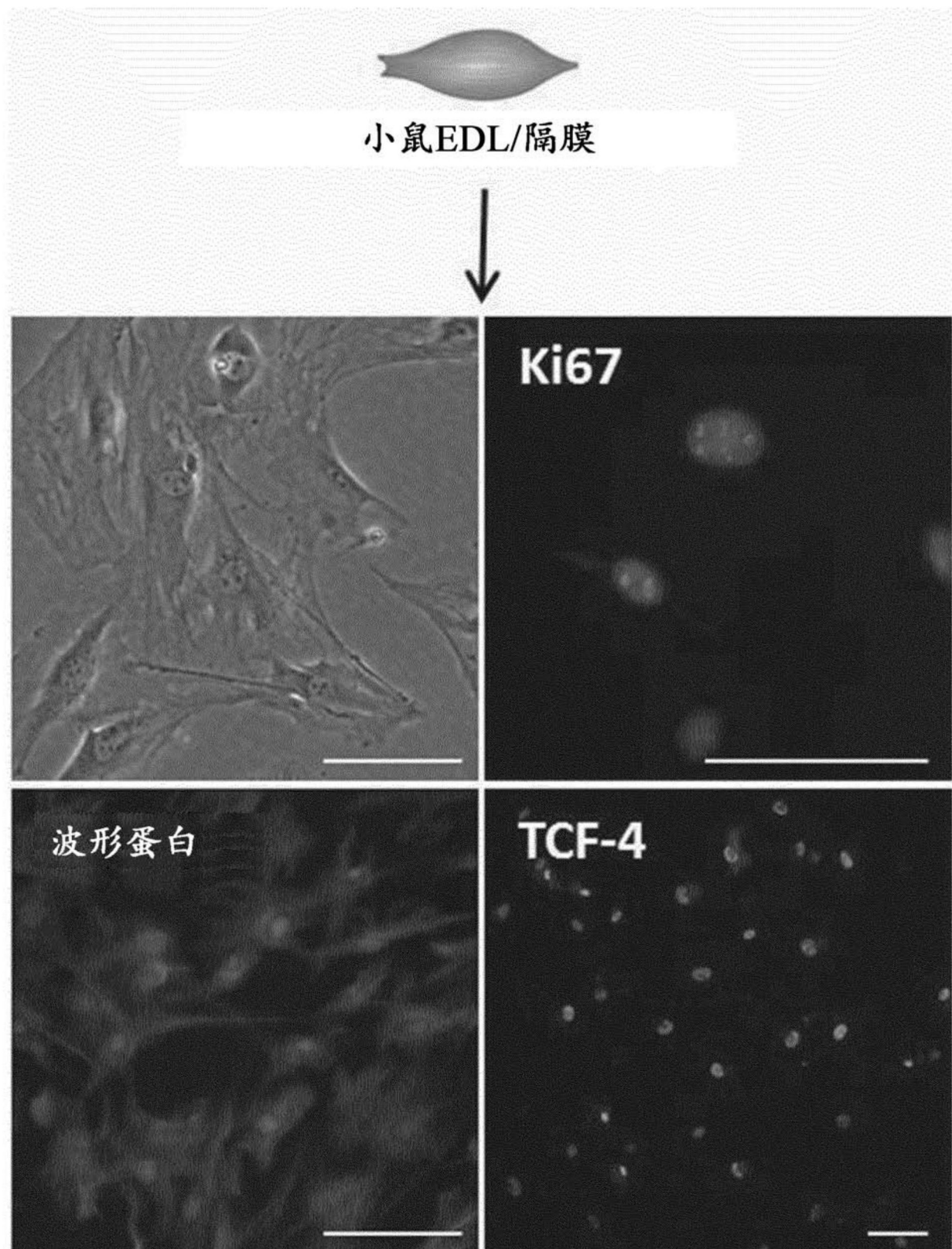


图23

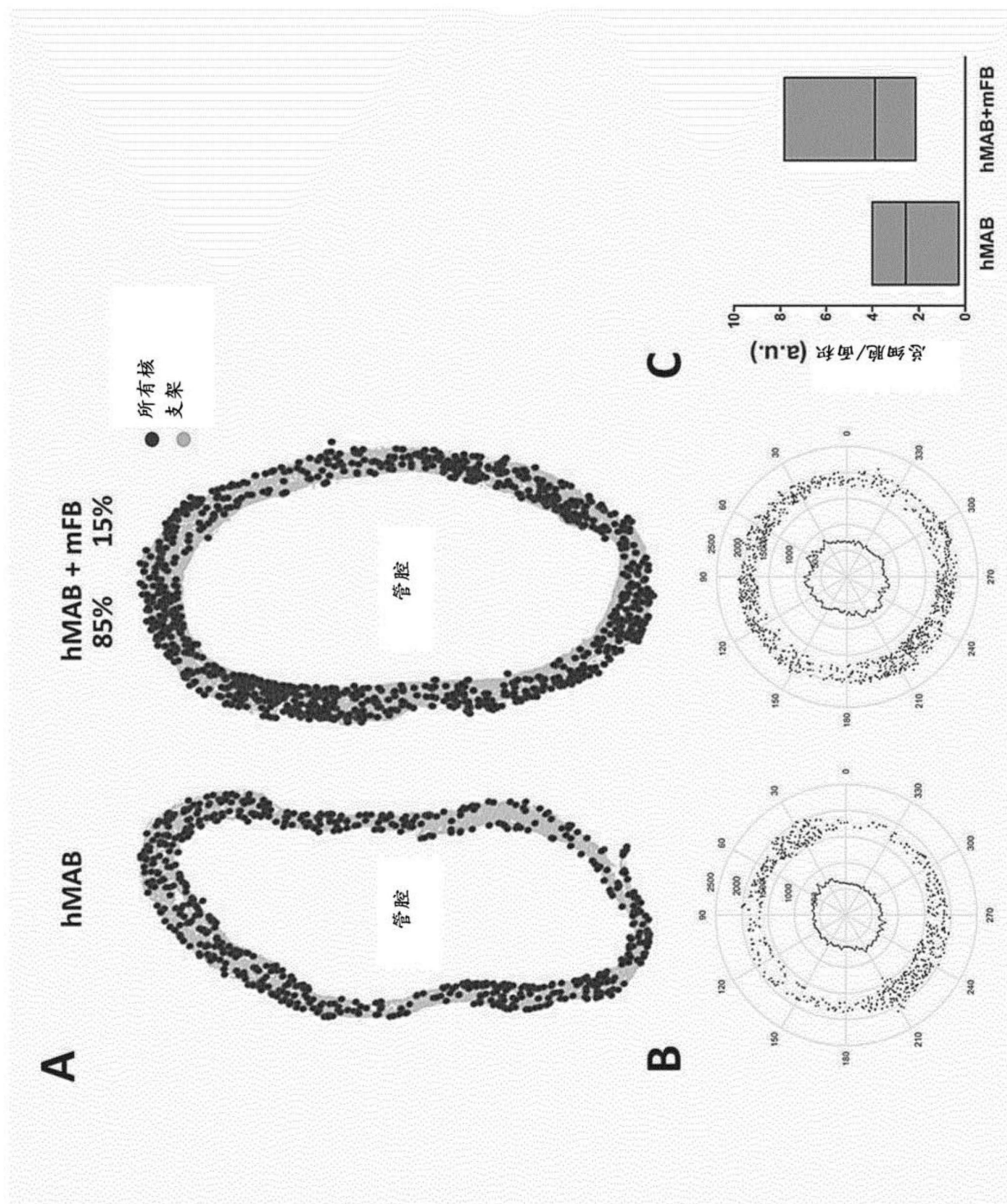


图24

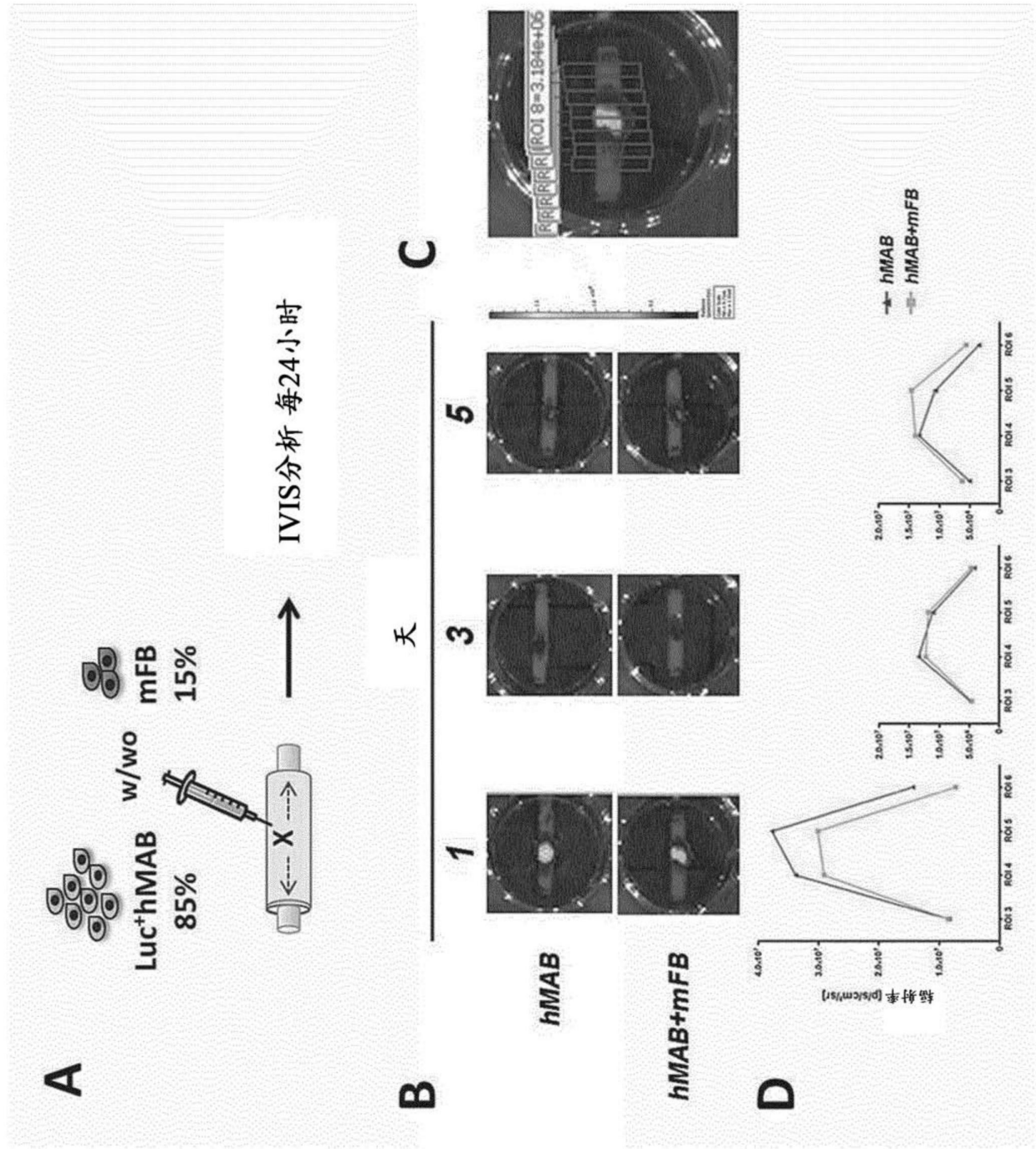


图25

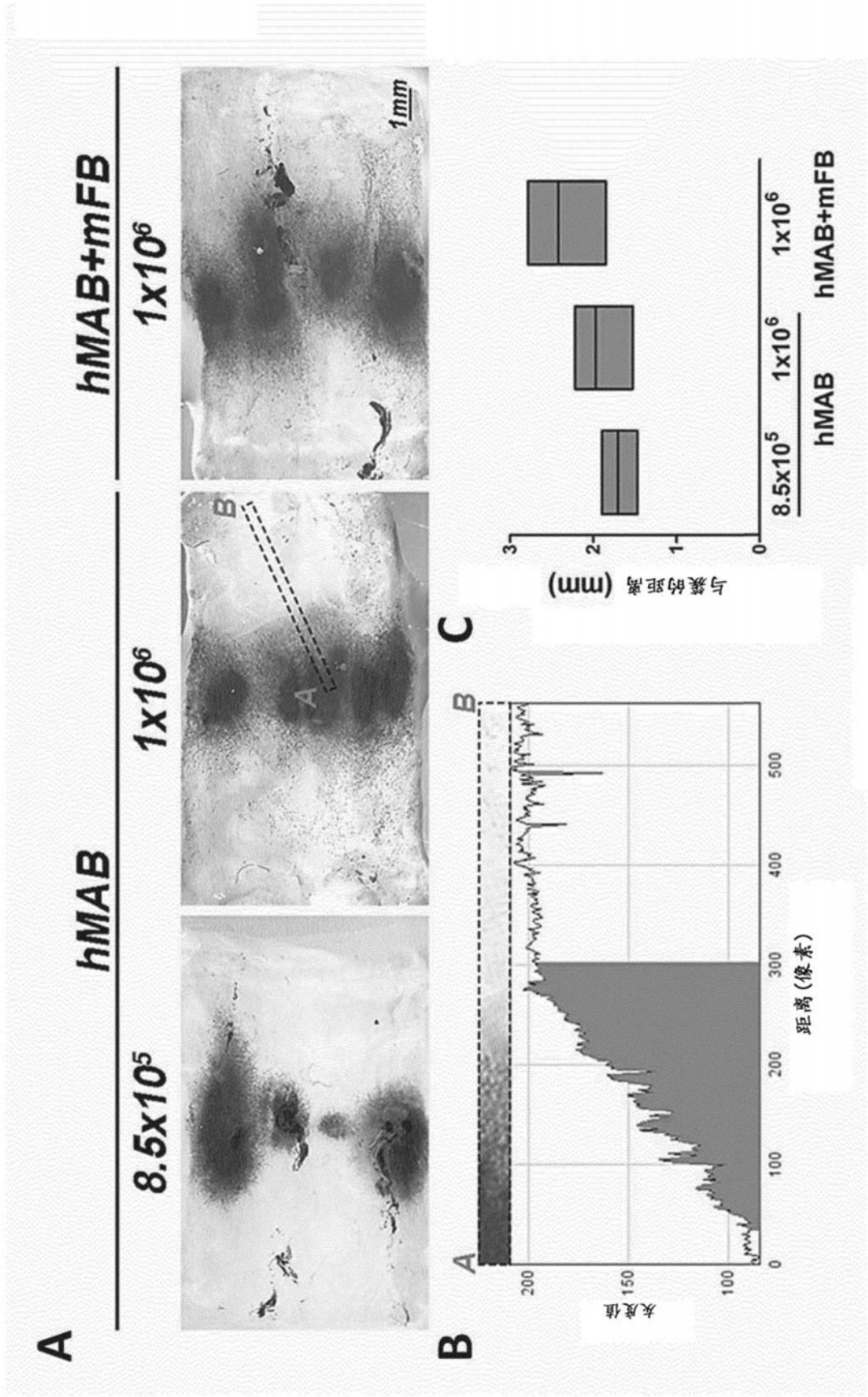


图26

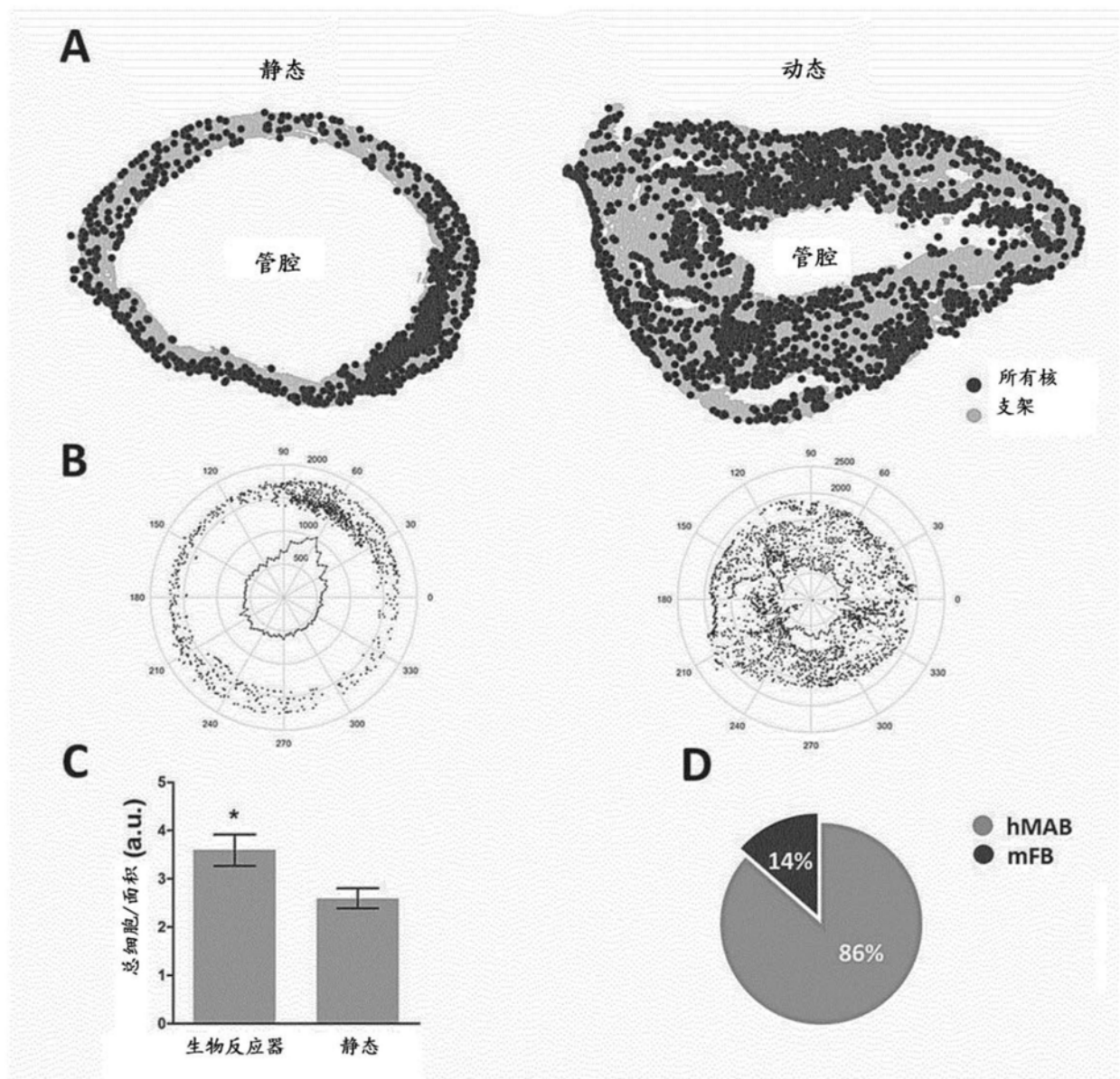


图27

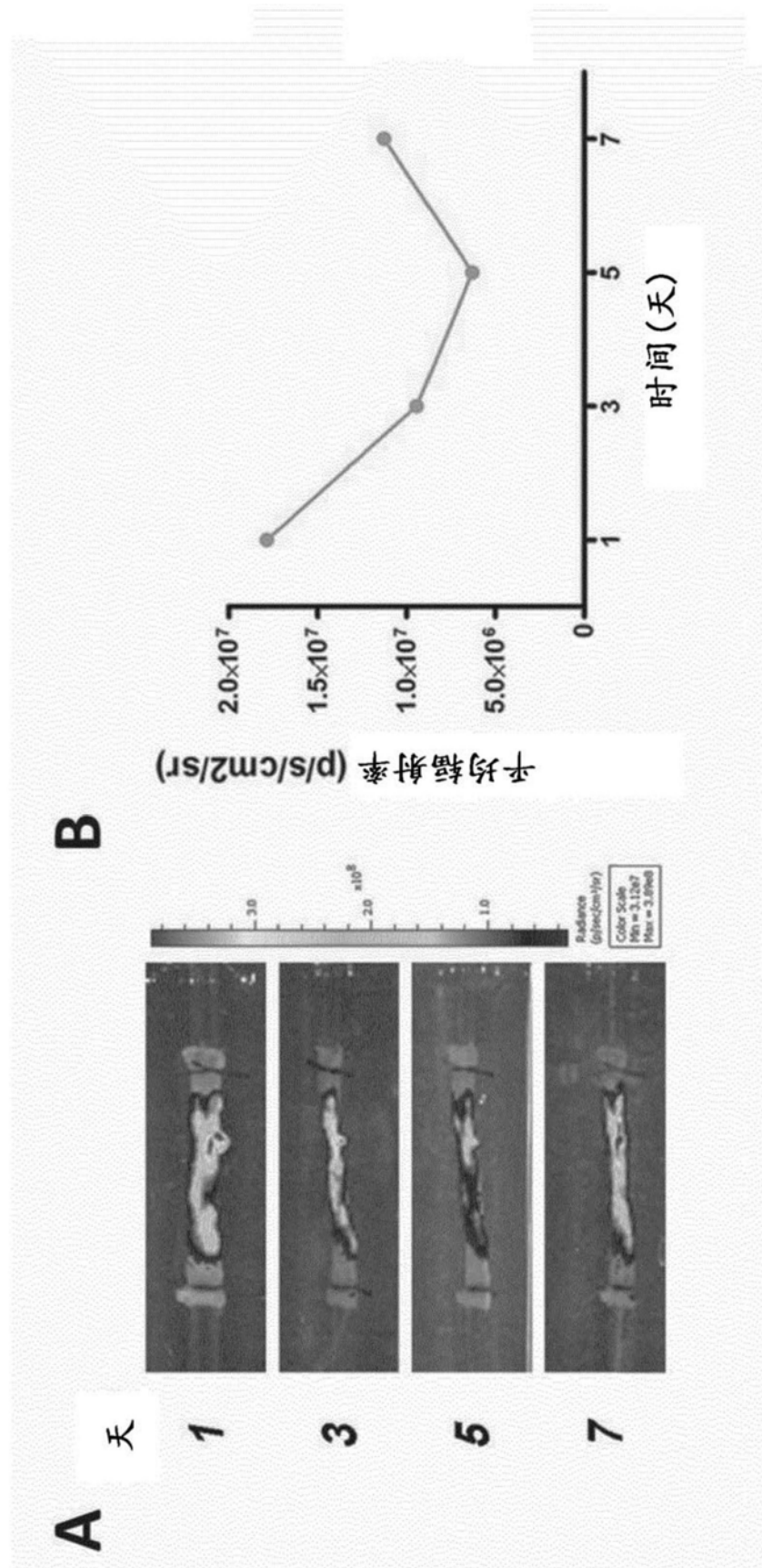


图28

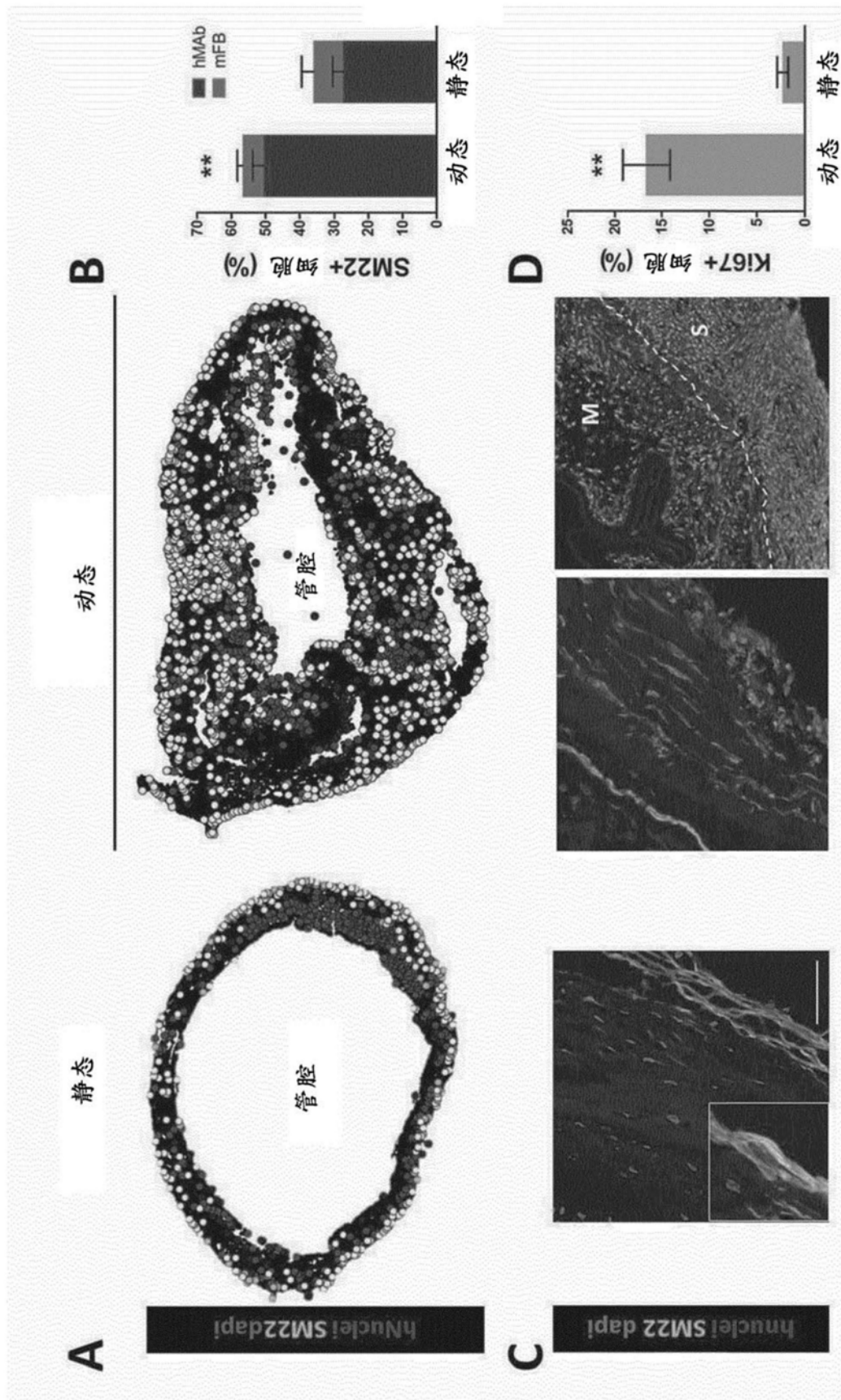


图29

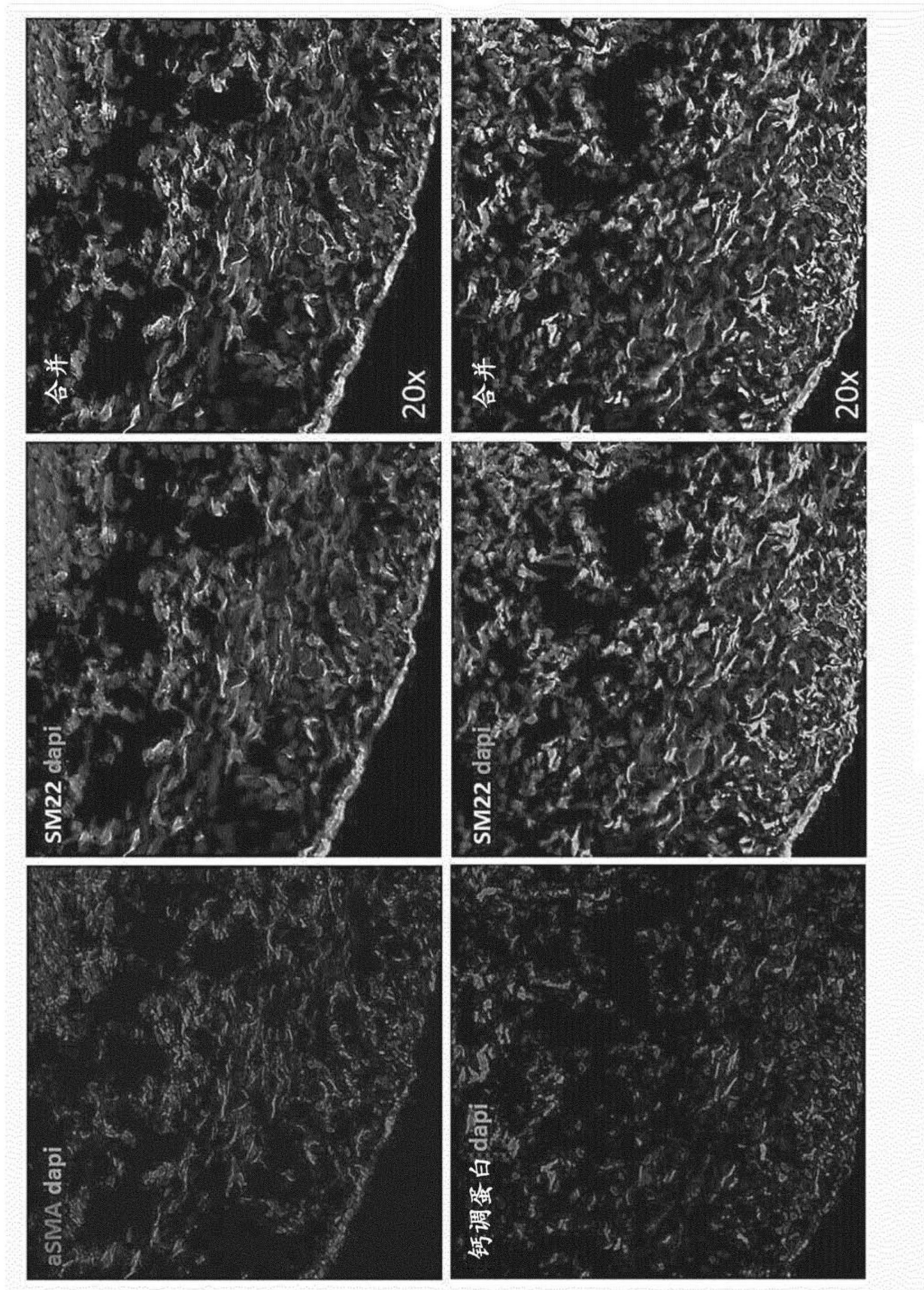


图30