



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104274256 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 14

(21) 申请号 201410270167. X

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2009. 11. 04

11105

代理人 张文辉

(30) 优先权数据

(51) Int. Cl.

61/111, 242 2008. 11. 04 US

A61F 2/04 (2013. 01)

61/113, 542 2008. 11. 11 US

A61L 27/38 (2006. 01)

61/114, 021 2008. 11. 12 US

A61L 27/58 (2006. 01)

61/114, 382 2008. 11. 13 US

A61L 27/18 (2006. 01)

61/114, 388 2008. 11. 13 US

61/201, 554 2008. 12. 10 US

61/201, 555 2008. 12. 10 US

61/201, 550 2008. 12. 10 US

(62) 分案原申请数据

200980153634. 8 2009. 11. 04

(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 约翰. W. 卢德洛 曼纽尔. J. 杰约

乔迪普. 巴苏 蒂莫西. A. 伯特拉姆

克里斯托弗. 金海默

凯利. I. 格思里 罗杰. 拉甘

迪帕克. 贾因 奥卢瓦托因. 奈特

理查德. 佩因 萨拉. F. 昆兰

H. S. 拉波波特 纳姆拉塔. 桑加

权利要求书3页 说明书179页

序列表3页 附图94页

(54) 发明名称

细胞支架构建体

(57) 摘要

本发明涉及使用接种有获自自体来源的细胞的支架而进行的层状结构的体腔器官或组织结构的再生、重建、修复、扩张或替换。

1. 一种用于受试者中的有缺陷的膀胱的尿流改道,包括:
 - a) 第一可植入的、生物相容性构建体,所述构建体包括管状支架,所述管状支架具有被构造为与腹腔壁截面相连接的第一末端和第二封闭末端,和至少一个被构造为与第一输尿管相连接的第一侧部开口;以及
 - b) 并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群,所述自体细胞群沉积在所述支架的表面上或其中。
2. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述支架还包括被构造为与第二输尿管相连接的第二侧部开口。
3. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述第一末端被构造为与所述腹腔壁的位置平齐。
4. 根据权利要求3所述的尿流改道,其中所述第一末端被构造为缝合在所述受试者的皮肤上。
5. 根据权利要求4所述的尿流改道,其中所述第一末端被构造为形成开孔。
6. 根据权利要求5所述的尿流改道,其中所述开孔还包括开孔扣。
7. 根据权利要求5或6所述的尿流改道,其中所述支架还包括被构造为形成开孔的垫圈环。
8. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述生物相容性支架为可生物降解的。
9. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述支架包括选自下列的材料:聚乙醇酸、聚乳酸、以及聚乙醇酸和聚乳酸的共聚物。
10. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述细胞群为平滑肌细胞群。
11. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述改道替换所述有缺陷的膀胱。
12. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述改道为临时性的。
13. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述改道为永久性的。
14. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述管状支架具有矩形截面构造。
15. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述管状支架具有三角形截面构造。
16. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述管状支架具有圆形截面构造。
17. 根据权利要求1所述的尿流改道,其中所述改道不含有尿道上皮细胞。
18. 一种用于需要的受试者中的有缺陷的膀胱的尿流改道构建体的制造方法,包括:
 - a) 提供第一可植入的生物相容性支架,所述支架包括管状支架,所述管状支架具有被构造为与腹腔壁区域相连接的第一末端和第二封闭末端,和至少一个被构造为与第一输尿管相连接的第一侧部开口;以及
 - b) 将并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群沉积在所述支架的第一区域上或其中,以形成尿流改道构建体。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述支架还包括被构造为与第二输尿管相连接的第二侧部开口。
20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述第一末端被构造为与所述腹腔壁的位置平齐。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述第一末端被构造为缝合在所述受试者的皮肤上。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述第一末端被构造为形成开孔。
23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述开孔还包括开孔扣。
24. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法,其中所述支架还包括被构造为形成开孔的垫圈环。
25. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述生物相容性支架为可生物降解的。
26. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述支架包括选自下列的材料:聚乙醇酸、聚乳酸、以及聚乙醇酸和聚乳酸的共聚物。
27. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述细胞群为平滑肌细胞群。
28. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述改道替换所述有缺陷的膀胱。
29. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述改道为临时性的。
30. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述改道为永久性的。
31. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述管状支架具有矩形截面构造。
32. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述管状支架具有三角形截面构造。
33. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述管状支架具有圆形截面构造。
34. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述改道不含有尿道上皮细胞。
35. 一种提供用于需要的受试者中的有缺陷的膀胱的尿流改道的方法,包括:
 - a) 提供第一可植入的生物相容性支架,所述支架包括管状支架,所述管状支架具有被构造为与腹腔壁截面相连接的第一末端和第二封闭末端,和至少一个被构造为与第一输尿管相连接的第一侧部开口;以及
 - b) 将并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群沉积在所述支架的一个第一区域上或其中,以形成尿流改道构建体;以及
 - c) 将所述构建体植入所述受试者中以形成所述尿流改道。
36. 一种提供用于需要的受试者中的有缺陷的膀胱的尿流改道的方法,包括向所述受试者中植入尿流改道构建体,所述尿流改道构建体包括:(a) 管状支架,所述管状支架具有被构造为与腹腔壁截面相连接的第一末端和第二封闭末端,和至少一个被构造为与第一输尿管相连接的第一侧部开口;以及(b) 并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群,所述自体细胞群沉积在所述支架的表面上或其中,以形成所述尿流改道。
37. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述支架还包括被构造为与第二输尿管相连接的第二侧部开口。
38. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述第一末端被构造为与所述腹腔壁的位置平齐。
39. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述第一末端被构造为缝合在所述受试者的皮肤上。
40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述第一末端被构造为形成开孔。
41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中所述开孔还包括开孔扣。
42. 根据权利要求 40 或 41 所述的方法,其中所述支架还包括被构造为形成开孔的垫圈环。
43. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述生物相容性支架为可生物降解的。
44. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述支架包括选自下列的材料:聚乙醇

酸、聚乳酸、以及聚乙醇酸和聚乳酸的共聚物。

45. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述细胞群为平滑肌细胞群。
46. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中其中所述改道替换所述有缺陷的膀胱。
47. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述改道为临时性的。
48. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述改道为永久性的。
49. 根据根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述管状支架具有矩形截面构造。
50. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述管状支架具有三角形截面构造。
51. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述管状支架具有圆形截面构造。
52. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述改道不含有尿道上皮细胞。
53. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述尿路管道构建体在植入后形成再生的组织。
54. 根据权利要求 53 所述的方法,其中所述再生的组织包括覆盖平滑肌的连续尿道上皮。
55. 根据权利要求 35 或 36 所述的方法,其中所述尿路管道构建体在植入后形成上皮化的粘膜。

细胞支架构建体

[0001] 本申请是基于申请日为 2009 年 11 月 4 日, 优先权日为 2008 年 11 月 4 日, 申请号为 200980153634.8 (PCT/US2009/063306), 发明名称为: “细胞支架构建体” 的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及使用接种有获自自体来源的细胞的支架而进行的层状结构的体腔器官或组织结构的再生、重建、修复、扩张或替换。

背景技术

[0003] 一些畸形可导致膀胱发育异常并需要进行手术扩张。例如后尿道瓣膜、双侧输尿管异位、膀胱外翻、生殖腔外翻和脊柱裂(即脊髓脊膜突出)的病症会使膀胱变得顺应性差, 从而导致膀胱容量变小并产生较高的压力。在临床上, 这会使患者发生失禁, 并增加由于泌尿系统压力过高而导致的肾衰竭的风险。目前对这些儿童患者的标准治疗是通过肠膀胱成形术进行的膀胱扩张 (Lewis et al. Br. J. Urol. (1990) ;65:488-491)。膀胱扩张包括从患者的大肠上取一部分, 并将该组织连接到已经存在的膀胱上, 以增加顺应性、降低压力和增加容量。这一手术相当复杂和昂贵。即使手术在技术上很成功, 在手术过程中也会伴随各种中间风险, 患者还可能发生慢性并发症。这些手术的侵入性、花费和并发症使得该手术只能被限制用于最严重的膀胱缺陷患者。对成人进行的类似手术过程是针对通常由于膀胱癌而需要进行膀胱替换的患者进行。对成人而言, 需要切除整个膀胱并用大肠来替换。尽管具有不利影响的风险, 每年在美国仍完成 10,000 例这样的手术, 其中约 10% 为患有先天性畸形的儿童, 90% 为患有后天失调例如膀胱癌的成年人。在医学上, 显然迫切地需要改进的方法来消除或至少大大减少由现行标准的护理引起的不利影响。

[0004] 在人类尿膀胱是一个肌性膜性的囊, 位于盆腔前部并作为尿液的储存装置, 它通过输尿管接收尿液并通过尿道排出尿液。在人类中, 膀胱位于盆腔中的髋骨(耻骨联合)的后方, 由膀胱向下和向后连接到被称为尿道的引流管, 尿道开口到体外。膀胱会发生多种疾病和损伤, 这引起了患者的膀胱恶化。例如, 膀胱恶化可能由传染性疾病、肿瘤和发育异常导致。此外, 膀胱恶化也可能由创伤(例如车祸和运动损伤)所导致。常常有必要对膀胱癌患者实行尿流改道。在美国每年新增超过 54,000 例的膀胱癌病例。大多数膀胱癌为上皮细胞起源, 全世界每年新增约 336,000 例尿路上皮癌(移行细胞癌(TCC))(Kakizoe(2006) Cancer Sci. 97(9)821)。

[0005] 当个体由于泌尿系统损伤或功能丧失而不能排尿时, 尿流改道是一种引导尿液从体内排出的方法。通常, 任何阻碍尿液流动并增加输尿管和/或肾内的压力的病症都可能需要尿流改道。一些需要尿流改道的适应症包括需要进行膀胱切除术的膀胱癌、损害肾功能的神经性膀胱功能障碍、膀胱的辐射损伤、女性的不可控性失禁以及慢性骨盆疼痛综合征。通常对于尿流改道有两种主要的策略: 尿道再造术(urostomy)和可控性尿流改道(continent diversion)。尿道再造术包括在腹部制造一个与体内管道相通的开孔, 所述体

内管道例如小肠粘膜下层 (SI) 的一小段,例如回肠、结肠或空肠。在这种方法中,所述短 SI 的另一端与输尿管相连接,输尿管正常情况下是将尿液从肾运输至膀胱。尿液通过输尿管流入所述短 SI,然后通过所述开孔流至体外的收集袋中。这种方法的另一种替代方案是将输尿管直接与所述开孔相连接,这也称为输尿管造瘘术 (ureterostomy)。可控性尿流改道包括在胃或小肠或大肠部位在体内制造一个袋或储存装置,这样可能需要或不需要再使用开孔。例如,可以取一段肠子并将其改造为更接近球形的形状,从而制造可控性皮肤储存装置。所述经过改形的区段的一端与输尿管连接,另一端与开孔连接并通向体外的收集袋。最后,将所述经过改形的区段放置在原来膀胱的位置,将其一端与输尿管连接,另一端与尿道连接,这样就完成了原位尿流改道,使得个体可以通过尿道排尿,而不必再通过所述开孔排尿。

[0006] 虽然小肠粘膜下层 (SI) 可用于尿流改道,但据报道除去粘膜和粘膜下层会使肠区段发生收缩 (参见例如 Atala, A., J. Urol. 156:338 (1996))。其他已有报道的由于使用胃肠区段进行膀胱手术的问题包括:形成结石、粘液产生增多、肿瘤形成、感染、代谢紊乱、长时间挛缩和吸收。已经表明,使用天然材料进行尿流改道时,由于膀胱组织具有其特殊的肌肉弹性以及尿道上皮的不透性功能,使其并不容易被替换。此外,使用患者自身的肠区段进行尿流改道需要进行至少两个不同的手术过程,第一个手术是取出肠区段,第二个手术是安装尿流改道。由于需要多个手术,从而增加了手术的总成本、患者的风险以及患者的总体不适程度。

[0007] 因此,鉴于与使用胃肠区段进行尿道改道相关的多种并发症以及需要多次手术过程,仍然需要方法和装置来为需要尿道改道系统的患者提供这类系统。

[0008] 尿失禁是一个普遍的问题,会发生于所有年龄和身体健康水平的人群,无论在社区还是在医疗机构中都会发生。医学上,尿失禁容易使患者发生尿路感染,褥疮,会阴部红疹和尿脓毒症。在社会学和心理学层面,尿失禁会引起尴尬、社会歧视、抑郁症,以及尤其是对老年人而言会引起寄居机构的风险增加 (Herzo et al., Ann. Rev. Gerontol. Geriatrics, 9:74 (1989))。在经济上,关于尿失禁的花费也是惊人的,仅美国每年花在关于失禁方面的费用就超过百亿美元。

[0009] 尿失禁可以归因于真性的尿压力 (膀胱及尿道过度活动) 或固有的括约肌功能障碍 (“ISD”) 或两种原因均有。尿失禁在妇女中尤其常见,并在较少程度上存在于儿童 (特别是 ISD) 和接受了前列腺根除术的男性。

[0010] 应激性尿失禁是不自主的尿液流失,发生于增加腹内压的物理活动的过程中,例如在咳嗽,打喷嚏,大笑或运动时。一个人可能患有上述两种类型的尿失禁中的一种或两种均有,当两种均有时,就被称为混合性尿失禁。虽然对尿失禁已有了一些认识,但是在大多数情况下的急迫性尿失禁是特发性的,这意味着具体原因无法确定。尿失禁可能发生在任何年龄的任何人群,并且在女性和老年人群中更为常见。

[0011] 逼尿肌是膀胱壁肌肉,它的收缩使得尿液从膀胱排出。逼尿肌功能异常例如逼尿肌反射亢进的结果包括膀胱顺应性变差、膀胱内压力升高和膀胱容量减小,所有这些结果都可能导致上尿路恶化。

[0012] 目前治疗急迫性尿失禁的一种方法是注射神经毒素,例如肉毒杆菌毒素,例如 Botox®。据认为,肉毒杆菌毒素通过麻痹膀胱壁上的逼尿肌或者可能影响膀胱传入途径

和减少膀胱上皮神经中感觉受体,从而发挥对膀胱活动过度的效果。肉毒杆菌毒素分子的大尺寸可以限制其扩散能力,从而防止其达到传入和传出神经纤维。因此,当前治疗膀胱活动过度症(OAB)的方法例如需要许多次地(通常是20至50次)将肉毒杆菌毒素注射进膀胱壁肌肉,从而增加了就医次数和相关的治疗费用。此外,慢性地和长期地抑制从膀胱释放的感觉神经递质的安全性尚未确定。

[0013] 其他治疗尿失禁的方法涉及给予具有膀胱松弛特性的药物,抗胆碱能药物是此类药物的主要代表。例如,抗胆碱药例如普鲁本辛(propanteline bromide),或者平滑肌松弛剂/抗胆碱能药物的组合例如消旋奥昔布宁和dicyclomin的组合,已被用来治疗尿失禁(参见例如,A. J. Wein, Urol. Clin. N. Am., 22:557(1995))。然而,这种药物治疗经常不能够对所有类型的尿失禁患者均获得完全的成功,并且经常导致患者出现明显的副作用。

[0014] 除了药物疗法之外,在本发明出现之前,本领域技术人员常用的方法包括人造括约肌(Lima S. V. C. et al., J. Urology, 156:622-624(1996); Levesque P. E. et al., J. Urology, 156:625-628(1996))、膀胱颈支撑假体(Kondo A. et al., J. Urology, 157:824-827(1996))、注射交联的胶原(Berman C. J. et al., J. Urology, 157:122-124(1997); Perez L. M. et al., J. Urology, 156:633-636(1996); Leonard M. P. et al., J. Urology, 156:637-640(1996))以及注射聚四氟乙烯(Perez L. M. et al., J. Urology, 156:633-636(1996))。

[0015] 一种最近为人们所熟知的治疗由ISD引起的尿失禁的方法是对患者实行尿道周内视镜的胶原蛋白注射。这扩张了膀胱肌肉,并致力于减少膀胱泄漏或应激性尿失禁的可能性。

[0016] 现有的治疗尿失禁的技术方案有着众所周知的缺点。虽然在内视镜指导下在膀胱颈周围注射胶原蛋白的方法对于括约肌缺陷获得了相当高的成功率,并且没有显著的发病率,但是胶原蛋白的使用可能会导致平均在两年之后发生的衰竭,并且还需要考虑到其成本效益问题((Khullar V. et al., British J. Obstetrics&Gynecology, 104:96-99(1996))。此外,对可能由于迁移现象而导致的患者控制力的恶化(Perez L. M. et al.)可能需要重复注射,以恢复控制力(Herschorn S. et al., J. Urology, 156:1305-1309(1996))。

[0017] 在前列腺根除术之后使用胶原来治疗应激性尿失禁的结果也通常令人失望(Klutke C. G. et al., J. Urology, 156:1703-1706(1996))。而且,一个研究提供证据表明,注射牛皮胶原会产生IgG和IgA类的特异性抗体(McCell and, M. and Delustro, F., J. Urology 155, 2068-2073(1996))。因此,可以预计的是,随着时间推移可能会出现患者对胶原的过敏。

[0018] 虽然仅获得了有限的成功,但是由于缺少其他合适的替代方法,经尿道的胶原注射仍然是一种可接受的固有括约肌缺陷的治疗方法。

[0019] 目前,医生们对于患有活动过度性膀胱障碍或急性尿失禁的患者起初都先进行非侵入性的药物治疗。然而,如果药物治疗无效,医生们都会推荐侵入性更强的治疗方案。

[0020] 因此,需要侵入性最小的由于扩张现有的层状结构的体腔器官或组织结构(例如膀胱)的方法。

[0021] 已经成功地应用组织工程学原理提供了可植入的细胞接种基质,以用于层状结构的体腔器官或组织结构的重建、修复、扩张或替换,所述体腔器官或组织结构例如膀胱、膀

胱的一部分或膀胱组件。如 Atala 的美国专利 No. 6, 576, 019 所述, 所述细胞可以来源于可以患者自身的组织, 包括膀胱、尿道、输尿管和泌尿生殖组织。然而, 作为使用最初的器官位置作为发育新的和健康的工程组织的基本单元的方法而言, 依赖于这样的细胞培养系统的开发和维持是有问题的。例如, 在治疗有缺陷的膀胱时, 细胞来源就是具体的问题, 因为用来源于有缺陷的膀胱的膀胱细胞进行培养, 结果可能培养出的细胞也是有缺陷的。使用这样的细胞并不是用于接种新的膀胱支架或基质的明智选择。因此, 需要另外的适用于接种可植入的新的器官 / 组织结构支架或基质的细胞来源。

[0022] 有大量文献支持这一观念: 人类脂肪组织是成人干细胞的丰富来源 (Devlin et al. (2004), *Cytotherapy*6:7-14; Awad, et al. (2003), *Tissue Engineering*9:1301-12; Erickson et al. (2002), *Biochemical and Biophysical Research Communications*290:763-769; Gronthos et al. (2001), *Journal of Cellular Physiology*189:54-63; Halvorsen et al. (2001); *Metabolism*50:407-413; Halvorsen et al. (2001), *Tissue Eng.* 6:729-41; Harp et al. (2001), *Biochemical and Biophysical Research Communication*281:907-912; Hicok et al. (2004), *Tissue Engineering*10:371-380; Safford et al. (2002), *Jun*7, 294(2):371-9; Safford et al. (2004), *Experimental Neurology*187:319-28; Sen et al. (2004), *Journal of Cellular Biochemistry*81:312-319; Sigal et al. (1994), *Hepatology*19:999-1006; Wickham et al. (2003), *Clinical Orthopedics and Related Research*, 412:196-212; Ashijian et al. (2003), *Plast Reconstr Surg.* 111:1922-31; De Ugarte et al. (2003), *Cells Tissues Organs.* 174:101-9; Mizumo et al. (2002), *Plast Reconstr Surg.* 109:199-209; Morizono et al. (2003), *Hum Gene Ther.* 14:59-66; Winter et al. (2003), *Arthritis Rheum.* 48:418-29; Zuk et al. (2001), *Tissue Eng*7:211-228; Zuk et al. (2002), *Mol Biol*13:4279-4295, 综述于 Gimble et al. (2003), *Cytotherapy*5:362-369)。这些细胞被称为脂肪来源的成人干 (ADAS) 细胞, 它们具有与 MSC 相似的免疫基因型和分化潜能 (Gronthos et al. (2001), *Journal of Cellular Physiology*189:54-63; Safford et al. (2002), *Biochem Biophys Res Commun.* 294(2):371-9; Zuk et al. (2002), *Mol Biol Cell*13:4279-4295)。

[0023] 在公众领域中已知能够从人类吸脂手术样本中分离成人干细胞的有效和可重复的方法 (Aust et al. (2004), *Cytotherapy*6:7-14; Halvorsen et al. (2001), *Metabolism*50:407-413)。所述方法包括将组织用胶原酶消化、差异离心和在培养中扩增。在经过 24 小时的培养之后, 一克组织能够产生 50, 000 至 100, 000 个基质细胞 (Sen et al. (2001), *J Cellular Biochemistry*81:312-319)。对来源于 20 个独立供体的样本的分析获得了一致的结果: 从 1ml 吸脂手术废液中平均能够收获 401, 000 个细胞, 其存活率为 94% (Aust et al. (2004), *Cytotherapy*6:7-14)。对这些细胞进行扩增, 可以在两周时间内从标准脂肪提取物中获得含有大于 5 亿个细胞的细胞群。

[0024] 在存在地塞米松、胰岛素、异丁基甲基黄嘌呤和噻唑烷二酮的条件下, ADAS 细胞会经历脂肪形成过程 (Sen et al. (2001) *Journal of Cellular Biochemistry*81:312-319)。ADAS 细胞的分化潜能并不限于分化为脂肪细胞谱系。已经报道了促使 ADAS 细胞向软骨细胞和成骨细胞途径分化的条件 (Awad, et al. (2003), *Tissue Engineering*9:1301-12;

Erickson et al. (2002), Biochemical and Biophysical Research Communications 290:763-769; Halvorson et al. (2001), Metabolism 50:407-413; Hicok et al. (2004), Tissue Engineering 10:371-380; Wickham et al. (2003), Clinic Orthopedics and Related Research 412:196-212)。在通过皮下植入被植入免疫缺陷型小鼠体内后,人类 ADAS 细胞与羟基磷灰石生物材料合成骨基质相结合 (Hicok et al. (2004), Tissue Engineering 10:371-380)。有大量数据能够证明,在存在抗氧化剂和其他培养基物的条件下培养的来源于鼠类或人类脂肪组织的成人干细胞(分别称为 muADAS 和 huADAS)会发生与神经分化相一致的形态学和基因型的变化 (De Ugarte (2003) Cells Tissues Organs. 174:101-9; Safford et al. (2002), 294(2):371-9; Safford et al. (2004), Experimental Neurology 187:319-28)。

[0025] 如 Jayo et al. Regen. Med. (2008) 3(5), 671-682(下文中称为“Jayo I”)所述,试图修复器官或组织的方法的特征在于频繁地通过胶原沉积或有时通过疤痕组织形成来不完全地替换组织。Jayo 等人还观察到一个更有利的组织工程学结果,就是组织结构或器官的原始结构和功能的再生。还可参见 Jayo et al., J. Urol. (2008) 180:392-397(下文中称为“Jayo II”)。已确信由某些分子与体内的再生过程有关。例如,趋化因子 MCP-1 是最熟悉的,它具有募集单核细胞的能力。然而,它似乎还是血管平滑肌细胞增殖的强有丝分裂原。MCP-1 将循环系统中的单核细胞募集至血管受损的区域,所述单核细胞通常转化为巨噬细胞并称为细胞因子和生长因子的储库。巨噬细胞还摄取胆固醇并氧化脂肪。巨噬细胞和肌肉前体细胞均被认为是 MCP-1 信号传导的靶标。CCR-2 受体是 MCP-1 (CCL2) 的配体,CCR-2 缺陷型小鼠表现出再生缺陷和增强的脂肪生成/纤维化。CCR-2 缺陷型小鼠的局部受到骨骼肌再生刺激时与正常小鼠相比具有如下区别:细胞间隙增多、出现大量炎性细胞、肌纤维肿大且变圆、细胞间隙中有更多的成纤维细胞积累、脂肪浸润与脂肪堆积周围的胶原分布、伴有钙沉积的纤维化 (Warren et al. (2005), FASEB J. 19:413-415; Selzman et al. (2002), Am J Physiol Heart Circ Physiol. 283(4):H1455-H1461; Shannon et al. (2007), Am. J. Cell Physiol. 292:C953-C967; Shireman et al. (2006), J. Surg. Res. 134(1):145-57. Epub 2006 Feb 20; Amann et al. (1998), Brit. J. Urol. 82:118-121; Schechter et al. (2004), J. Leukocyte Biol. 75:1079-1085; Deonaraine et al., (2007), Transl Med. 5:11; Lumeng et al. (2007), J Clin. Invest. 117(1):175-184)。

[0026] 本发明涉及来源于自体来源的细胞群,所述自体来源与将如本文所述被再生、重建、修复、扩张或替换的器官或组织结构不同;本发明还涉及分离这类细胞的方法、接种有这类细胞的新的器官/组织结构支架或基质(构建体)和制备它们的方法,以及使用这类新的器官/组织结构构建体治疗有需要的患者的方法。

[0027] 发明概述

[0028] 本发明涉及使用接种有来自受试者的自体细胞的支架,在受试者体内进行层状结构的体腔器官或组织结构的再生、重建、修复、扩张或替换。

[0029] 在一个方面,本发明提供了尿流改道构建体和制备和使用所述构建体的方法。在一个实施方案中,所述尿流改道针对受试者的有缺陷的膀胱,且包括:(a) 第一可植入的、生物相容性构建体,所述构建体包括管状支架,所述管状支架具有被构造为与腹腔壁区域相连接的第一末端和第二封闭末端,和至少一个被构造为与第一输尿管相连接的第一侧部

开口；以及 (b) 并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群，所述自体细胞群沉积在所述支架的表面上或其中。在另一个实施方案中，所述尿流改道针对受试者的有缺陷的膀胱，且包括：一个第一可植入的、生物相容性的管状支架，所述支架适于尿液的临时储存和通过，所述支架包括一个被构造为与所述受试者的腹腔壁上的开口相连接的第一末端，和至少一个适于与一个第一输尿管相连接的第一侧部开口，从而使得来自所述第一输尿管的尿液能够通过所述开口流至所述管状支架的内部；和 (b) 并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群，所述自体细胞群沉积在所述支架的表面上或其中。

[0030] 在一个实施方案中，本发明提供了制备用于有需要的受试者体内的有缺陷的膀胱的尿流改道构建体的方法，所述方法包括下述步骤：a) 提供一个第一可植入的生物相容性支架，所述支架包括一个管状支架，所述管状支架具有一个被构造为与腹腔壁区域相连接的第一末端和一个第二封闭末端，和至少一个被构造为与一个第一输尿管相连接的第一侧部开口；以及 (b) 将并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群沉积在所述支架的一个第一区域上或其中，以形成尿流改道构建体。在另一个实施方案中，所述方法包括下述步骤：a) 提供一个可植入的、生物相容性的管状支架，所述支架适于尿液的临时储存和通过，所述支架包括一个被构造为与所述受试者的腹腔壁上的开口相连接的第一末端和一个第二封闭末端，和至少一个适于与一个第一输尿管相连接的第一侧部开口，从而使得来自所述第一输尿管的尿液能够通过所述开口流至所述管状支架的内部；以及 (b) 将并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群沉积在所述支架的一个第一区域上或其中，以形成尿流改道构建体。

[0031] 在另一个实施方案中，本发明提供了制备用于有需要的受试者体内的有缺陷的膀胱的尿流改道构建体的方法，所述方法包括下述步骤：a) 提供一个第一可植入的生物相容性支架，所述支架包括一个管状支架，所述管状支架具有一个被构造为与腹腔壁区域相连接的第一末端和一个第二封闭末端，和至少一个被构造为与一个第一输尿管相连接的第一侧部开口；以及 (b) 将并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群沉积在所述支架的一个第一区域上或其中，以形成尿流改道构建体；以及 c) 将所述构建体植入所述受试者体内以形成尿流改道。在另一个实施方案中，所述方法包括下述步骤：a) 提供一个可植入的、生物相容性的管状支架，所述支架适于尿液的临时储存和通过，所述支架包括一个被构造为与所述受试者的腹腔壁上的开口相连接的第一末端和一个第二封闭末端，和至少一个适于与一个第一输尿管相连接的第一侧部开口，从而使得来自所述第一输尿管的尿液能够通过所述开口流至所述管状支架的内部；以及 (b) 将并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群沉积在所述支架的一个第一区域上或其中，以形成尿流改道构建体；以及 c) 将所述构建体植入所述受试者体内以形成尿流改道。在另一个实施方案中，所述方法包括将一个尿流改道构建体植入所述受试者体内的步骤，所述尿流改道构建体包括：(a) 一个管状支架，所述管状支架具有一个被构造为与腹腔壁区域相连接的第一末端和第二封闭末端，和至少一个被构造为与一个第一输尿管相连接的第一侧部开口；以及 (b) 并非来源于所述有缺陷的膀胱的自体细胞群，所述自体细胞群沉积在所述支架的表面上或其中，以形成所述尿流改道。

[0032] 在所有实施方案中，所述尿流改道支架还可包括一个被构造为与第二输尿管相连接的第二侧部开口。在所有实施方案中，所述第一末端可被构造为与所述腹腔壁的位置平齐。在所有实施方案中，所述第一末端可被构造为缝合在所述受试者的皮肤上。在所有实

施方案中,所述第一末端可被构造为形成开孔。在所有实施方案中,所述开孔还可包括开孔扣。在所有实施方案中,所述支架还包括被构造为形成开孔的垫圈环。在所有实施方案中,所述生物相容性支架为可生物降解的。在所有实施方案中,所述支架可包括选自下列的材料:聚乙醇酸,聚乳酸,以及聚乙醇酸和聚乳酸的共聚物。在所有实施方案中,所述细胞群为平滑肌细胞群。在所有实施方案中,所述改道可以替换所述有缺陷的膀胱。在所有实施方案中,所述改道可为临时性的。在所有实施方案中,所述改道可为永久性的。在所有实施方案中,所述管状支架可具有矩形或三角形或圆形的截面形状。在所有实施方案中,所述改道可不含有尿道上皮细胞。在所有实施方案中,本发明的方法可提供一种新的尿路管道,其特征在于能够再生类似尿道的组织。在所有实施方案中,所述再生的组织的特征可为具有下列一种或多种结构:尿道上皮、固有层和平滑肌束。在所有实施方案中,在所述再生的组织中可观察到下列一种或多种结构:输尿管-膀胱连接(UCJ)、所述导管的头区和所述导管的围腔区。在所有实施方案中,所述再生的组织的特征可为具有下列一种或多种结构:粘膜、粘膜下层和具有维管基质的平滑肌。在所有实施方案中,所述再生的组织为覆盖平滑肌的连续尿道上皮。在所有实施方案中,所述尿路管道在被植入后形成上皮化的粘膜。

[0033] 在一个方面,本发明涉及分离的平滑肌细胞群。在一个实施方案中,所述细胞群来源于外周血,并包含具有收缩功能的一种或多种细胞,并且对平滑肌细胞标记物呈阳性。在另一个实施方案中,所述细胞群来源于脂肪组织,并包含具有收缩功能的一种或多种细胞,并且对平滑肌细胞标记物呈阳性。

[0034] 在所有实施方案中,所述细胞群的特征可为具有选自下列的一种或多种平滑肌细胞标记物:心肌蛋白(myocardin)、 α -平滑肌肌动蛋白、钙结合蛋白(calponin)、肌球蛋白重链、BAALC、结蛋白(desmin)、成肌纤维细胞抗原和SM22。在所有实施方案中,所述细胞群可表达心肌蛋白(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。

[0035] 在所有实施方案中,所述细胞群的收缩功能可为钙依赖性的。

[0036] 在另一方面,本发明提供了直接来源于人类脂肪组织的平滑肌细胞(SMC)群。在一个实施方案中,至少一种生物标记物在所述SMC群中的表达相对于其在人类骨髓来源的MSC中的表达有差异,所述至少一种生物标记物选自:Oct4B、骨桥蛋白、BMP6、CD44,和IL-1B、GDF5、HGF、LIF、MCAM、RUNX2、VCAM1、PECAM、vWF和F1k-1。在另一个实施方案中,至少一种生物标记物在所述SMC群中的表达比其在人类骨髓来源的MSC中的表达水平要低,所述至少一种生物标记物选自:GDF5、HGF、LIF、MCAM、RUNX2、VCAM1、PECAM、vWF和F1k-1。在另一个实施方案中,在另一个实施方案中,至少一种生物标记物在所述SMC群中的表达比其在人类骨髓来源的MSC中的表达水平要高,所述至少一种生物标记物选自:Oct4B、骨桥蛋白、BMP6、CD44和IL-1B。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明提供了直接来源于人类脂肪组织的平滑肌细胞群,所述平滑肌细胞群的特征在于与人类骨髓来源的MSC中相应蛋白的表达水平相比:(a)GDF5、HGF、LIF、MCAM、RUNX2、VCAM1、PECAM、vWF和F1k-1中的至少一种的表达水平降低;和(b)Oct4B、骨桥蛋白、BMP6、CD44和IL-1B中的至少一种的表达水平升高。在又一个实施方案中,所述平滑肌细胞群的特征在于与人类骨髓来源的MSC中相应蛋白的表达水平相比:(a)GDF5、HGF、LIF、MCAM、RUNX2、VCAM1、PECAM、vWF和F1k-1的表达水平全部降低;和

(b) Oct4B、骨桥蛋白、BMP6、CD44 和 IL-1B 的表达水平全部升高。

[0038] 在另一个实施方案中,本发明提供了直接来源于脂肪组织的平滑肌细胞群,所述平滑肌细胞群包括 CD45+ 的一种或多种细胞和 / 或 CD117+ 的一种或多种细胞。

[0039] 在另一个实施方案中,本发明提供了直接来源于人类脂肪组织的平滑肌细胞群,所述平滑肌细胞群的增殖周期比人类骨髓来源的 MSC 短。

[0040] 在另一个实施方案中,本发明提供了直接来源于脂肪组织的平滑肌细胞群,所述平滑肌细胞群在培养物中表现出增殖的接触依赖性抑制。

[0041] 在又一个实施方案中,本发明提供了直接来源于脂肪组织的平滑肌细胞群,所述平滑肌细胞群的特征在于至少一种平滑肌细胞 (SMC) 标记物响应于凝血噁烷 A2 模拟物而下调。在一个实施方案中,所述 SMC 标记物选自心肌蛋白和肌球蛋白重链 - 平滑肌同种型 (SMMHC)。在另一个实施方案中,所述心肌蛋白和 SMMHC 响应于凝血噁烷 A2 模拟物而下调。

[0042] 在一个实施方案中,本文所述的平滑肌细胞群为纯化的细胞群。

[0043] 在一个方面,本发明提供了细胞来源于脂肪组织的细胞制品或细胞群。在另一个实施方案中,所述细胞群来源于脂肪组织的 SVF。在另一个实施方案中,所述 SVF 包括异源的细胞群。在另一个实施方案中,所述细胞群包括完全分化的平滑肌细胞。在又一个实施方案中,本发明提供了与人类骨髓来源的间充质干细胞 (MSC) 群有区别的人类脂肪来源的平滑肌细胞群。在一个实施方案中,所述区别指的是所述人类脂肪来源的 SMC 群与人类骨髓来源的 MSC 群相比,在转录物组学、蛋白质组学和功能属性方面有所不同。在一个实施方案中,所述来源于脂肪组织的细胞群从自体来源获得。

[0044] 在另一方面,本发明提供了从自体外周血或脂肪来源分离平滑肌细胞群的方法。

[0045] 在一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:(a) 将所述外周血样本与密度梯度材料相接触;(b) 离心所述样本以确定包括单核细胞级分的密度梯度;(c) 从所述密度梯度中提取所述单核细胞级分,其中所述级分包括含有一种或多种平滑肌细胞的细胞群,所述一种或多种平滑肌细胞具有收缩功能并对平滑肌细胞标记物呈阳性。在另一个实施方案中,所述方法还包括 (d) 培养所述细胞群的步骤。在一个实施方案中,所述被培养的细胞群在培养物中形成平滑肌细胞集落。在又一个实施方案中,所述集落在培养约 5 天至约 10 天后形成。在另外一个实施方案中,所述细胞群不形成内皮集落。在其他实施方案中,所述方法还包括扩增步骤 (d) 中的细胞群。在另一个实施方案中,所述被扩增的细胞群为纯化的细胞群。

[0046] 在另一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:(a) 用胶原酶消化脂肪组织样本;(b) 离心所述样本以确定基质血管级分 (SVF);和 (c) 从所述样本中提取 SVF,其中所述级分包括含有一种或多种平滑肌细胞的细胞群,所述一种或多种平滑肌细胞具有收缩功能并对平滑肌细胞标记物呈阳性。在另一个实施方案中,所述方法还包括 (d) 培养所述细胞群的步骤。在其他实施方案中,所述方法还包括扩增步骤 (d) 中的细胞群。在另一个实施方案中,所述被扩增的细胞群为纯化的细胞群。

[0047] 在另外一个实施方案中,本发明提供了提供分离的平滑肌细胞群的方法,所述方法包括下述步骤:a) 在不使用平滑肌细胞分化诱导培养基的条件下培养来源于人类脂肪 SVF 的平滑肌细胞制品;和 b) 从所述培养的细胞制品中分离完全分化的平滑肌细胞群。在

另一个实施方案中,在所述培养步骤之前先进行酶促消化脂肪组织的步骤。在另一个实施方案中,在所述培养步骤之前先进行离心所述被消化的脂肪组织以提供 SVF 的步骤。在其他实施方案中,在所述培养步骤之前先进行洗涤和平板接种所述 SVF 的步骤。在另一个实施方案中,所述培养步骤包括筛选与粘附至细胞培养载体的细胞。在又一个实施方案中,所述培养步骤不包括使用含有诱导平滑肌细胞分化的组分的培养基。在另一个实施方案中,所述培养步骤包括使用含有血清的细胞培养基,所述血清例如胎牛血清 (FBS),它包括几种内源性生长因子。在另一个实施方案中,所述培养步骤不包括选择并向所述细胞培养基中加入特异性和外源性生长因子。通常,“外源性”生长因子为除了内源性生长因子之外的选择并加入至细胞培养基中的生长因子,内源性生长因子通常已由培养基中的血清组分 (例如 FBS) 来提供。外源性生长因子可为重组生长因子。在一个实施方案中,所述培养步骤不包括使用含有外源性生长因子的细胞培养基。在另一个实施方案中,所述培养步骤不包括使用含有重组生长因子的细胞培养基。

[0048] 在所有实施方案中,所述平滑肌细胞群不是脂肪来源的干细胞群,和 / 或所述平滑肌细胞群不是间充质干细胞群。

[0049] 在另一方面,本发明提供了用于为有需要的受试者提供新的层状结构的腔体器官或组织结构的构建体。在一个实施方案中,所述构建体包括:(a) 包括聚合物基质或支架的可植入的构建体;和 (b) 沉积在所述聚合物基质的表面上或其中的自体细胞群,所述自体细胞群不来源于与新的器官或组织结构相应的天然器官或组织。

[0050] 在另一方面,本发明提供了为有需要的受试者提供新的膀胱或其部分的构建体。在一个实施方案中,所述构建体包括:(a) 包括聚合物基质或支架的可植入的构建体;和 (b) 沉积在所述聚合物基质的表面上或其中的且不来源于所述受试者的膀胱的自体细胞群。

[0051] 在某些实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体具有椭圆形的形状。在一些实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体在被植入时形成折叠构型。在一个实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体在被植入前经过处理,以使得所述成形的聚合物基质构建体在被植入时更为柔软。在另一个实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体的最大长度为约 10cm。在一个实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体的最大长度为约 4cm。在另一个实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体的最大长度为约 3cm。在又一个实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体的最大宽度为约 4cm。在一个实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体具有的二维表面积为约 30cm²。在另一个实施方案中,所述成形的聚合物基质构建体具有的二维表面积为约 25cm²。

[0052] 在其他实施方案中,所述构建体含有包括一种或多种外周血来源或脂肪组织来源的平滑肌细胞的细胞群,所述一种或多种外周血来源或脂肪组织来源的平滑肌细胞具有收缩功能,并且对于平滑肌细胞标记物呈阳性。在一个实施方案中,所述构建体的所述细胞群具有钙依赖性收缩功能。

[0053] 在所有实施方案中,所述构建体中不含有其他细胞群。在所有实施方案中,所述构建体可不含有尿道上皮细胞。在所有实施方案中,沉积在所述基质上的所述自体细胞群为本文所述的人类脂肪来源的平滑肌细胞群。在所有实施方案中,所述人类脂肪来源的 SMC 细胞群可为直接来源于 SVF 和完全分化的细胞群。在所有实施方案中,被接种在所述基质

上的人类脂肪来源的 SMC 细胞群在所述构建体被植入至所述受试者的所需部位后,具有产生 MCP-1 的能力。在一个实施方案中,所述 MCP-1 诱导天然间充质干细胞趋向于所植入的位置。

[0054] 在另一方面,本发明提供了适于被植入有需要的受试者体内的新的器官或组织结构构建体的制备方法。在一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:a) 获得人类脂肪组织样本;b) 从所述样本中分离完全分化的平滑肌细胞群;c) 培养所述细胞群;和 d) 将所述细胞群与成型的聚合物基质细胞构建体相接触,其中所述步骤 a)、b)、c) 和 d) 进行约 45 天或更短时间。在所有实施方案中,所述人类脂肪组织样本从自体来源获得。在另一个实施方案中,所述方法还包括检测平滑肌细胞标记物的表达的步骤。在另一个实施方案中,所述表达为 mRNA 表达。在另外一个实施方案中,所述表达为多肽表达。在一个实施方案中,通过细胞内免疫荧光方法检测所述多肽表达。

[0055] 在另一方面,本发明提供了为有需要的受试者提供层状结构的腔体器官或组织结构的方法。在一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:a) 提供生物相容性的、合成的或天然的聚合物基质,所述聚合物基质的形状与需要治疗的器官或组织结构的至少一部分相适应;b) 在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中沉积自体细胞群,所述自体细胞群不来源于与所述新的器官或组织结构相对应的天然器官或组织;和 c) 将所述成形的聚合物基质细胞构建体植入至所述受试者体内,以用于形成层状结构的腔体器官或组织结构。在另一方面,本发明提供了为有需要的受试者提供新的膀胱或其部分的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:a) 提供生物相容性的、合成的或天然的聚合物基质,所述聚合物基质的形状与膀胱或其部分相适应;b) 在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中沉积自体细胞群,所述自体细胞群不来源于所述受试者的膀胱;和 c) 将所述成形的聚合物基质细胞构建体植入至所述受试者体内,以用于形成新的膀胱或其部分。在另一个实施方案中,本文所述方法的步骤 b) 中的所述细胞群含有一种或多种外周血来源的平滑肌细胞,所述平滑肌细胞具有收缩功能且对平滑肌细胞标记物呈阳性;或者,步骤 b) 中的所述细胞群含有一种或多种脂肪组织来源的平滑肌细胞,所述平滑肌细胞具有收缩功能且对平滑肌细胞标记物呈阳性。在另一个实施方案中,所述细胞群的收缩功能为钙依赖性的。在所有实施方案中,沉积在所述基质上的自体细胞群为本文所述的人类脂肪来源的平滑肌细胞群。在所有实施方案中,被接种在所述基质上的人类脂肪来源的 SMC 细胞群在所述构建体被植入至所述受试者的所需部位后,具有产生 MCP-1 的能力。在一个实施方案中,所述 MCP-1 诱导天然间充质干细胞趋向于所植入的位置。

[0056] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括对被植入的管道构建体用所述受试者的网膜、肠系膜、肌肉筋膜和 / 或腹膜进行包裹以使其能够血管化的步骤。

[0057] 本发明还涉及使用接种有来源于有需要的受试者的自体细胞的支架来扩张所述受试者的层状结构的体腔器官或组织结构。在一个方面,本发明提供了在需要这种治疗的受试者体内扩张已有的层状结构的腔体器官或组织结构的方法,所述方法通过下述步骤实现:提供聚合物基质或支架,所述聚合物基质或支架的形状与需要治疗的器官或组织结构的至少一部分相适应,且所述聚合物基质或支架的大小足以使其通过腹腔镜方法而被植入;将不是来源于所述器官或组织结构的自体细胞群沉积在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中;以及通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入至所述受试者体内

的治疗位置,以使得所述已有的层状结构的腔体器官或组织结构被扩张。在某些实施方案中,所述腔体器官或组织结构为膀胱或膀胱的一部分。

[0058] 在另一方面,本发明提供了用于增加需要此治疗的受试者的膀胱容积的方法,所述方法通过下述步骤实现:提供生物相容性的、合成的或天然的聚合物基质或支架,所述聚合物基质或支架的形状与膀胱的至少一部分相适应,且所述聚合物基质或支架的大小足以使其通过腹腔镜方法而被植入;将不是来源于所述受试者的膀胱的自体细胞群沉积在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中;以及通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入至所述受试者体内的治疗位置,由此增加膀胱容积。在一个实施方案中,膀胱容积的增加量为约 50mL。在另一个实施方案中,膀胱容积的增加量为约 100mL。

[0059] 在又另一方面,本发明提供了用于扩张需要此治疗的受试者的膀胱中的膀胱切口位置的方法,所述方法通过下述步骤实现:提供生物相容性的、合成的或天然的聚合物基质或支架,所述聚合物基质或支架的形状与膀胱的至少一部分相适应,且所述聚合物基质或支架的大小足以使其通过腹腔镜方法而被植入;将不是来源于所述受试者的膀胱的自体细胞群沉积在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中;以及通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入至所述受试者体内的治疗位置,由此扩张膀胱切口位置。

[0060] 在又另一方面,本发明提供了治疗需要此治疗的受试者的尿失禁的方法,所述方法通过下述步骤实现:提供生物相容性的、合成的或天然的聚合物基质或支架,所述聚合物基质或支架的形状与膀胱的至少一部分相适应,且所述聚合物基质或支架的大小足以使其通过腹腔镜方法而被植入;将不是来源于所述受试者的膀胱的自体细胞群沉积在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中;以及通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入至所述受试者体内的治疗位置,由此增加膀胱容积。

[0061] 本发明还提供了包括本发明的聚合物基质或支架的成套工具及其使用说明书。

[0062] 在另一方面,本发明提供了用于在植入后监测受试者体内的新的器官或组织结构再生的预后方法。在一个实施方案中,所述方法包括检测获自所述受试者的测试样本和对照样本中的 MCP-1 表达水平,其中所述测试样本中的 MCP-1 表达水平高于对照样本则表明了受试者体内的再生。在另一个实施方案中,其中所述新的器官或组织结构来源于本文所述的自体平滑肌细胞群。在另一个实施方案中,检测 MCP-1 多肽表达。在另一个实施方案中,使用抗 MCP-1 试剂来检测 MCP-1 多肽表达。在另一个实施方案中,所述抗 MCP-1 试剂为抗体。在另一个实施方案中,使用免疫组化方法检测 MCP-1 多肽表达。在一个实施方案中,在所述检测步骤之前先进行从受试者获取所述测试样本的步骤。在另一个实施方案中,所述测试样本为血液。

[0063] 附图简述

[0064] 图 1 显示了膀胱扩张支架的一个实例。

[0065] 图 2 显示了膀胱替换支架的一个实例。

[0066] 图 3 显示了尿流改道或管道支架的一个实例。

[0067] 图 3A 显示了具有不同类型截面的尿流改道构建体的一个实例,还显示了被设计为与输尿管相连接的开口的可能位置。

[0068] 图 3B 显示了尿流改道构建体的几种变化方案(A - 开口呈卵形;B - 开口呈卵形的容器;C - 封闭的卵形容器和三个管)。

- [0069] 图 4 显示了尿流改道或管道构建体的不同应用。
- [0070] 图 5A-B 显示了肌肉等效物支架的实例。
- [0071] 图 6 显示了呈片状或带状形式的各种肌肉等效物支架的图。
- [0072] 图 7 显示了不同的肌肉等效物支架及其分别的植入方法。图 7a 显示了平面片状支架的形成。图 7b 显示了适于通过腹腔镜方法植入的支架,所述支架可在植入时被卷起并送入腹腔镜管中,然后在腹腔中展开。图 7c 显示了适于通过腹腔镜方法植入的支架片,所述支架片形成卷曲构型以便于通过腹腔镜管被插入,然后它将在腹腔中展开。图 7d 显示了适于通过腹腔镜方法植入的支架片,所述支架片形成卷曲构型或手风琴形的构型以便于通过腹腔镜管被插入,然后它将在腹腔中展开。图 7e 显示了用于植入肌肉等效物支架的可能的手术方法。图 7f 显示了在空膀胱和充盈的膀胱中的植入位置。图 7g 显示了带有手术切口的膀胱模型,显示了在表面上切割是产生的椭圆形切口。
- [0073] 图 8 显示了预折叠的手风琴形构型的支架片,以便于被插入通过腹腔镜管口。
- [0074] 图 9A 显示了被预先切为带状然后缝合在一起的支架,从而使其能够堆积和被插入腹腔镜管口中,并保证了在腹腔中的定位。
- [0075] 图 9B 显示了一个长 18.7cm、宽 2.0cm 的具有两折的支架。
- [0076] 图 9C 显示了一个长 13.3cm、宽 2.8cm 的具有三折的支架。
- [0077] 图 9D 显示了一个长 9.7cm、宽 4.0cm 的具有四折的支架。
- [0078] 图 9E 显示了一个包括两片的支架,其中每一片长 9.7cm、宽 2.0cm 并具有两折。
- [0079] 图 10 显示了被植入的管道构建体的构型的实例。
- [0080] 图 11 显示了临时性尿流改道构建体的植入组件的实例。
- [0081] 图 12 显示了永久性尿流改道构建体的植入组件的实例。
- [0082] 图 13 显示了尿流改道构建体的其他应用。
- [0083] 图 14 显示了犬外周血单核细胞级分(血块黄层)的培养物。
- [0084] 图 15 显示了犬外周血生长出的细胞。
- [0085] 图 16 显示了犬平滑肌细胞在传代几次之后的形态。
- [0086] 图 17 显示了从猪和人类的脂肪分离的平滑肌细胞。
- [0087] 图 18 显示了对平滑肌细胞标记物的基因表达的 RT-PCR 分析。
- [0088] 图 19 显示了平滑肌细胞标记物的免疫荧光蛋白表达。
- [0089] 图 20 显示了从人类外周血分离的平滑肌细胞的免疫染色。
- [0090] 图 21 显示了从血液(A)、脂肪组织(B)和膀胱组织(C)分离的猪平滑肌细胞的收缩力测定结果。
- [0091] 图 22 显示了从人类脂肪组织分离的平滑肌细胞的生长与每单位面积回收的细胞数之间的函数关系。
- [0092] 图 23 显示了从猪的脂肪(A)、外周血(B)和膀胱平滑肌(C)分离的平滑肌细胞生长与每代回收的细胞数之间的函数关系。
- [0093] 图 24 显示了从人类膀胱平滑肌、脂肪、外周血和膀胱尿道上皮分离的细胞中细胞因子 MCP-1 的表达。
- [0094] 图 25 显示了 MCP-1 的产生和接种细胞的密度之间的相关性。
- [0095] 图 26 显示了输尿管支架。

- [0096] 图 27 显示了一种新的管道构建体。
- [0097] 图 28 显示了一种与输尿管（实线箭头）相连接的新的管道构建体（虚线箭头）。
- [0098] 图 29 显示了与输尿管（实线箭头）相连接的构建体的内流端和朝向手术产生的开口（虚线箭头）的外流端。
- [0099] 图 30 显示了所述开孔和用于尿液引流的导管。
- [0100] 图 31-32 显示了植入有不含细胞的支架的动物的细胞检查图。
- [0101] 图 33 显示了植入有用血液来源的 SMC 接种的支架的动物的细胞检查图。
- [0102] 图 34-36 植入有用血液来源的 SMC 接种的支架的动物的细胞检查图。
- [0103] 图 37 显示了植入有用血液来源的 SMC 接种的支架的动物的细胞检查图。
- [0104] 图 38-39 显示了植入有用脂肪来源的 SMC 接种的支架的动物的细胞检查图。
- [0105] 图 40-42 显示了植入有用脂肪来源的 SMC 接种的支架的动物的细胞检查图。
- [0106] 图 43 显示了植入有用脂肪来源的 SMC 接种的支架的动物的细胞检查图。
- [0107] 图 44 显示了尿路管道的修整示意图。
- [0108] 图 45 显示了植入有新的尿路管道构建体的动物的亚肉眼照片。
- [0109] 图 46 显示了植入有新的尿路管道构建体的动物在输尿管 - 管道连接处附近的新的尿路管道的显微照片。
- [0110] 图 47 显示了植入有新的尿路管道构建体的动物在输尿管 - 管道连接处附近的新的尿路管道的显微照片。
- [0111] 图 48 显示了植入有新的尿路管道构建体的动物的管道中壁的显微照片。
- [0112] 图 49 显示了植入有新的尿路管道（膀胱 SMC 支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0113] 图 50 显示了植入有新的尿路管道（脂肪 SMC 支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0114] 图 51 显示了植入有新的尿路管道（脂肪 SMC 支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0115] 图 52 显示了植入有新的尿路管道（血液 SMC 支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0116] 图 53 显示了植入有新的尿路管道（血液 SMC 支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0117] 图 54 显示了植入有新的尿路管道（血液 SMC 支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0118] 图 55 显示了植入有新的尿路管道（血液 SMC 支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0119] 图 56 显示了植入有新的尿路管道（仅有支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0120] 图 57 显示了有新的尿路管道（仅有支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0121] 图 58 显示了有新的尿路管道（仅有支架）的动物的肾盂造影照片。
- [0122] 图 59 显示了后固定的管道 (A) 和修整示意图 (B)。图 59C 表明了管道的各区域。
- [0123] 图 60 显示了植入有新的尿路管道（脂肪 SMC 支架）的动物的显微照片。
- [0124] 图 61 显示了植入有新的尿路管道（膀胱 SMC 支架）的动物的显微照片。
- [0125] 图 62 显示了植入有新的尿路管道（脂肪 SMC 支架）的动物的显微照片。
- [0126] 图 63 显示了植入有新的尿路管道（膀胱 SMC 支架）的动物的显微照片。
- [0127] 图 64 显示了由再生的泌尿组织形成的新的膀胱管道的组织学特征。
- [0128] 图 65 显示了天然输尿管 - 膀胱连接处的三种肌肉组分。
- [0129] 图 66 显示了管道构建体受体的子宫 - 管道 (utero-conduit) 连接处。
- [0130] 图 67 显示了植入的管道构建体的组织学。
- [0131] 图 68 显示了猪的 (A) 膀胱来源、(B) 脂肪来源和 (C) 外周血来源的平滑肌细胞的

形态学特征。

[0132] 图 69 显示了猪的膀胱来源、脂肪来源和外周血来源的平滑肌细胞的平滑肌细胞相关标记物的 RT-PCR 分析。

[0133] 图 70 显示了猪的膀胱来源、脂肪来源和外周血来源的平滑肌细胞的平滑肌细胞相关标记物的免疫荧光分析。

[0134] 图 71 显示了猪的 (A) 膀胱来源、(B) 脂肪来源和 (C) 外周血来源的平滑肌细胞的收缩力。

[0135] 图 72 显示了 (A) 膀胱来源、(B) 脂肪来源和 (C) 外周血来源的外周血来源的平滑肌细胞的生长动力学。

[0136] 图 73 显示了从新的尿路管道构建体形成的再生的泌尿组织的组织学特征。

[0137] 图 74 显示了植入有尿流改道构建体的动物体内上皮化粘膜的存在。

[0138] 图 75 显示了植入的新的膀胱构建体在 4 个月时的膀胱造影照片。A - 膀胱来源的 SMC ;B - 血液来源的 SMC ;C - 脂肪组织来源的 SMC ;D - 天然膀胱对照。

[0139] 图 76 显示了植入的新的膀胱构建体随时间变化的 (A) 容积和 (B) 顺应性。

[0140] 图 77 显示了 4 个月以后的动物的平均体重。

[0141] 图 78 显示了 4 个月以后的动物的平均血清肌酸酐水平。

[0142] 图 79 显示了 4 个月以后的动物的平均 BUN。

[0143] 图 80 显示了 4 个月以后的动物的平均碱性磷酸酶 (ALP)。

[0144] 图 81 显示了 4 个月以后的动物的平均总蛋白水平。

[0145] 图 82 显示了 4 个月以后的动物的平均白细胞 (WBC) 水平。

[0146] 图 83 显示了植入的构建体在 4 个月以后的膀胱造影照片 (血液来源的 SMC)。

[0147] 图 84 显示了植入的构建体在 4 个月以后的膀胱造影照片 (脂肪来源的 SMCs)。

[0148] 图 85 显示了人类膀胱发育的周期。

[0149] 图 86 显示了随着年龄的膀胱容积增加和尿液输出量。

[0150] 图 87A-C 显示了循环影响再生的结果。

[0151] 图 88 显示循环对临床结果的再生 - 增强效果的转换。

[0152] 图 89 显示了肌肉等效物支架的植入。

[0153] 图 90 显示了动物在植入肌肉等效物支架后 4 周时的膀胱造影照片。

[0154] 图 91 显示了表达在脂肪来源的细胞群中各种标记物的水平 : (A) 脂连素 (adiponectin) 和 FABP-4 ; (B) SM α A、SM22、心肌蛋白、SMMHC ; (C) 钙结合蛋白 ; (D) VECAD、vWF、PECAM、FLT1 ; 和 (E) FLK 和 TEK。

[0155] 图 92 显示了平滑肌标记物对培养基类型的依赖性 : (A) SM α A、SM22、心肌蛋白、SMMHC ; 和 (B) 钙结合蛋白。

[0156] 图 93 显示了在脂肪来源的细胞和间充质干细胞中, 平滑肌标记物钙结合蛋白、心肌蛋白和 SMMHC 的表达的比较。

[0157] 图 94 显示了在释放来源的细胞中 SM α A、SM22、心肌蛋白和钙结合蛋白随时间的表达。

[0158] 图 95 显示了在脂肪来源的细胞和间充质干细胞中内皮标记物的表达。

[0159] 图 96 显示了脂肪来源的细胞中细胞表面标记物的表达。

[0160] 图 97 显示了间充质干细胞中细胞表面标记物的表达。

[0161] 图 98 显示了 MSC、膀胱来源的 SMC、Ad-SMC 和人类主动脉平滑肌细胞的蛋白质组学标记的比较性分析。

[0162] 图 99 显示了脂肪来源的细胞在培养物中随时间的增殖能力。

[0163] 图 100 显示了脂肪来源的细胞和间充质干细胞对 U46619 的响应。

[0164] 图 101 显示了中胚层分化标记物的 RT-PCR 分析结果。

[0165] 图 102 显示了在 MSC/AdSMC 中的 Oct4A/Oct4B 表达的 RT-PCR 分析结果。

[0166] 发明详述

[0167] 本发明涉及的细胞群来源于与将进行本文所述的重建、修复、扩张或替换的器官或组织结构不同的器官或组织结构来源,本发明还涉及分离这类细胞的方法、用这类细胞接种的新的器官/组织结构支架或基质(构建体)及其制备方法,以及使用这类新的器官/组织结构构建体治疗有需要的患者的方法。

[0168] 1. 定义

[0169] 除非另有定义,都在本文所使用和技术术语和科学术语的含义均与本发明所述技术领域的普通技术人员所通常理解的含义相同。Principles of Tissue Engineering, 3rdEd. (Edited by R Lanza, R Langer, & J Vacanti), 2007 为本领域技术人员提供了本申请所使用的许多术语的一般性指导。

[0170] 本领域技术人员应当认识到,许多与本文所述的方法和材料类似或等同的方法和材料都可用于实施本发明。实际上,本发明并不局限于本文所述的方法和材料。为了本发明的目的定义以下术语。

[0171] 本文所使用的术语“平滑肌细胞”或“SMC”指的是有收缩力的细胞,它们来源于与本文所述的重建、修复、扩张或替换构建体和方法所应用的目标器官或组织不同的天然器官或组织。所述 SMC 可来源于外周血或脂肪组织。对于脂肪组织而言,所述 SMC 可来源于含有血管组织的 SVF。因此,所述 SMCs 可来源于脂肪来源的血管床的毛细血管、动脉和小静脉,或所述 SMC 可来源于含有周细胞的血管周围环境。本发明提供的平滑肌细胞在被接种至本文所述的支架或基质上并在其上被培养后,能够形成常见于中空器官(例如膀胱、腹腔、胃肠道等等)壁上的非横纹肌,并具有能够收缩和舒张的特征。本领域普通技术人员能够知晓平滑肌细胞的其他特性。

[0172] 本文所使用的术语“细胞群”指的是直接从合适的哺乳动物组织来源分离并经过随后的体外培养而获得的多个细胞。本领域普通技术人员能够知晓适用于本发明的分离和培养细胞群的各种方法,以及适用于本发明的细胞群中的各种细胞数量。所述细胞群可为脂肪来源的、但其中基本不含脂肪细胞或非粘附性脂肪细胞的平滑肌细胞群(SMC)。所述 SMC 细胞群的特征可为与平滑肌细胞相关的标记物的表达。所述 SMC 细胞群也可为纯化的细胞群。所述 SMC 细胞群可来源于自体来源。

[0173] 本文所使用的术语“自体”指的是由同一个体衍生或转移而来。自体平滑肌细胞群来源于将作为本文所述可植入构建体的受体的受试者。

[0174] 术语“标记物”或“生物标记物”通常指的是 DNA、RNA、蛋白、碳水化合物或基于糖脂的分子标记物,它们在培养的细胞群中的表达或存在可通过标准方法(或本文所述的方法)进行检测,并且与培养的细胞群中一种或多种细胞为特定细胞类型的事实相一致。通

常,术语细胞“标记物”或“生物标记物”指的是在本文所述的细胞群中表达并通常由天然细胞表达的分子。所述标记物可为由细胞表达的多肽,或为在染色体上的可识别的位置,例如由天然细胞表达的基因、限制性内切酶识别位点或编码多肽的核酸(例如 mRNA)。所述标记物可为被称为“基因表达标记物”的基因的表达区域,或为不具有已知编码功能的一些 DNA 区段。

[0175] 术语“平滑肌细胞标记物”通常指的是 DNA、RNA、蛋白、碳水化合物或基于糖脂的分子标记物,它们在培养的细胞群中的表达或存在可通过标准方法(或本文所述的方法)进行检测,并且与培养的细胞群中一种或多种细胞为平滑肌细胞的事实相一致。通常,术语平滑肌细胞(SMC)“标记物”或“生物标记物”指的是通常由天然平滑肌细胞表达的分子。所述标记物可为由细胞表达的多肽,或为在染色体上的可识别的位置,例如由 SMC 细胞表达的基因、限制性内切酶识别位点或编码多肽的核酸。所述标记物可为被称为“基因表达标记物”的基因的表达区域,或为不具有已知编码功能的一些 DNA 区段。本发明考虑到的这类标记物包括但不限于下述标记物中的一种或多种:心肌蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、钙结合蛋白、肌球蛋白重链、BAALC、结蛋白、成肌纤维细抗原、SM22,以及上述标记物的任何组合。

[0176] 术语“差异表达的基因”、“有差异的基因表达”以及它们的同义词在本文中可以互换使用,指的是一种基因在第一种细胞或细胞群中被激活的表达水平高于或低于其在第二种细胞或细胞群表达的水平。这一术语还包括这样的基因,其表达在所述第一或第二种细胞在培养传代过程中的不同阶段被激活的表达水平有高低的区别。还应当理解的是,差异表达的基因可在核酸水平或蛋白水平上被激活或被抑制,或可能经历改变的天然剪接而生成不同的多肽产物。这种不同可能表现为例如多肽在 mRNA 水平、表面表达、多肽的分泌或其他分区方面的改变。差异的基因表达可包括两种或多种基因或其基因产物之间的表达的比较,或两种或多种基因或其基因产物之间的表达比例的比较,或甚至为同一基因的两种不同的加工产物之间的比较,上述比较是在所述第一种细胞和所述第二种细胞之间进行,并且两种细胞之间应存在差异。差异的表达包括例如所述第一种细胞和所述第二种细胞之间的基因或其表达产物的表达时序或细胞表达类型的定量和定性的差异。出于本发明的目的,认为“有差异的基因表达”指的是在所述第一和第二种细胞或在培养传代过程的不同阶段中,给定基因的表达差异为至少约 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。标记物的差异表达可为在脂肪来源的细胞(所述第一种细胞)中相对于在间充质干细胞或 MSC(所述第二种细胞)中的差异表达。

[0177] 术语“抑制”、“下调”、“低表达”和“降低”在本文中可以互换使用,意为基因的表达、或编码一种或多种蛋白或蛋白亚基的 RNA 分子或 RNA 等价物分子的水平、或一种或多种蛋白或蛋白亚基的活性相对于一种或多种对照(例如一种或多种阳性和/或阴性对照)而言有所下降。所述低表达可为在脂肪来源的细胞中相对于 MSC 中的表达降低。

[0178] 本文所使用的术语“上调”或“过表达”为意为基因的表达、或编码一种或多种蛋白或蛋白亚基的 RNA 分子或 RNA 等价物分子的水平、或一种或多种蛋白或蛋白亚基的活性相对于一种或多种对照(例如一种或多种阳性和/或阴性对照)而言有所上升。所述过表

达可为在脂肪来源的细胞中相对于 MSC 中的表达上升。

[0179] 术语“收缩功能”指的是平滑肌收缩功能,包括滑动的肌动蛋白和肌球蛋白纤维之间的相互作用,该相互作用由钙激活的肌球蛋白的磷酸化启动,并产生依赖于细胞内钙水平的收缩。

[0180] 术语“接触依赖性抑制”指的是当两个或多个细胞彼此接触时细胞生长的停止。如果在细胞培养物中观察到细胞彼此堆积,或类似地观察到转化细胞培养物中的集落形成,则认为细胞生长没有被接触抑制,也就是说细胞缺乏接触依赖性抑制的属性。间充质干细胞不具有这一属性。相反地,具有接触依赖性抑制属性的细胞不会被观察到在培养物中彼此堆积。

[0181] 术语“外周血”通常意为在全身循环的血液。

[0182] 术语“脂肪组织”或“脂肪”通常意为基本由脂肪细胞形成的松散的结缔组织。脂肪组织可从身体的各个部位获得,收缩部位包括但不限于皮下(皮下脂肪)和内部器官周围(内脏脂肪)。

[0183] 术语“构建体”指的是沉积在由一种或多种合成的或天然存在的生物相容性材料形成的支架或基质上的至少一种细胞群。所述细胞群可在体外或体内与支架或基质相结合。

[0184] 术语“样本”或“患者样本”或“生物学样本”通常意为获自个体、体液、身体组织、细胞系、组织培养物或其他来源的任何生物学样本。这一术语包括体液,例如,血液例如外周血或静脉血,尿液,以及其他生物学来源的样本,例如脂肪吸取物和固体组织活检样本,例如活检标本(例如脂肪组织活检标本),或组织培养物或来源于组织培养物的细胞以及其后代。这一定义还包括从来源获得后经过任何方式处理之后的样本,例如通过试剂处理、溶解或对某种组分(例如蛋白或多核苷酸)的富集。这一定义还涵盖临床样本,还包括培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物学液体和组织样本。样本的来源可为实体组织,例如来源于新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样本或活检样本或吸取物;血液或任何血液成分;体液例如脑脊液、羊水、腹水或细胞间液;来源于受试者任何发育阶段的细胞。所述生物学样本可含有并不天然存在于天然组织中的化合物,例如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养剂、抗生素等等。所述样本可用于诊断测定或监测测定。从哺乳动物获取样本的方法是本领域公知的。如果术语“样本”单独使用,它仍旧表示所述“样本”为“生物学样本”或“患者样本”,即所述术语可以互换使用。样本也可作为测试样本。

[0185] 本文所使用的术语“测试样本”指的是来源于已被植入本文所述的构建体的受试者的样本。所述测试样本可来源于哺乳动物受试者的各种来源,包括但不限于血液、血清、尿液、精液、骨髓、粘膜、组织等等。

[0186] 本文所使用的术语“对照”或“对照样本”指的是阴性对照,其中预期获得阴性结果以帮助与测试样本中的阳性结果相关联。或者,所述对照可为阳性对照,其中预期获得阳性结果以帮助与测试样本中的阴性结果相关联。适用于本发明的对照包括但不限于:已知具有正常的细胞因子水平的样本、从已知没有被植入本文所述的构建体的哺乳动物受试者获得的样本,和从已知为正常的哺乳动物受试者获得的样本。对照也可作为在受试者被植入本文所述的构建体之前从所述受试者获得的样本。此外,所述对照可为含有与测试样本所含细胞具有相同起源的正常细胞的样本。本领域技术人员能够知晓适用于本发明的其他对

照。

[0187] 本文所使用的术语“患者”指的是需要治疗的任何个体动物,更优选地为哺乳动物(包括人类动物,例如,狗、猫、马、兔、动物园动物、牛、猪、羊以及非人类灵长动物)。最优选地,本文所述的患者为人类。

[0188] 本文所使用的术语“受试者”意为应接受治疗的任何个体人类受试者,包括患者,它正具有或曾经具有一种或多种器官功能缺陷或衰竭的征兆、症状或指征,包括泌尿系统的缺陷、受损或功能不全。这样的受试者包括但不限于新近或之前被确诊的受试者和表现疾病复发的受试者,或者出于任何原因而具有器官功能缺陷或衰竭风险的受试者。所述受试者可能之前已经接受过与器官功能缺陷或衰竭相关的治疗或者未经治疗。受试者可为尿流改道治疗的候选者,包括但不限于患有膀胱癌而需要切除膀胱的受试者、患有神经性膀胱功能障碍而影响肾功能的受试者、患有膀胱放射性损伤的受试者和患有不自主性尿失禁的受试者。所述受试者可为新近或之前被确诊需要进行尿流改道的受试者和经历并发症的受试者,或者出于任何原因而具有泌尿系统功能缺陷、受损或功能不全风险的受试者。所述受试者可能之前已经接受过与泌尿系统功能缺陷、受损、或功能不全相关的治疗或者未经这样的治疗。

[0189] 本文所使用的术语“尿流改道”或“管道”指的是所述受试者与所植入的尿流改道构建体、愈合的输尿管和邻近的围腔经过一段时间相互作用之后所形成的器官或组织结构。围腔与允许尿液通过腹腔壁的区室前部相连接,可由连接所述构建体的尾端(位于腹腔内)和皮肤的腹腔包膜的最前管状部分形成。

[0190] 术语“尾”和“头”是相对于尿液产生和流动的描述性术语。术语“尾”指的是所述尿流改道构建体在植入后最接近所述开孔处的一端,而术语“头”指的是所述尿流改道构建体在植入后最接近肾脏和输尿管的一端。

[0191] 术语“碎屑”指的是在植入尿流改道构建体之后在愈合和再生过程中形成的碎片。碎屑可由脱落的组织细胞、炎性渗出物和支架生物降解产物形成。如果所述管道被这类碎片堵塞(外流不正常),那么停滞的碎片会在所述管道的腔中形成碎屑或半固体块。

[0192] 术语“清创术”指的是通过手术或非手术方法从管道中去除外来物质或被撕裂的、无生命力的、被污染的或死亡的组织,以防止感染、防止堵塞和促进愈合过程。所述清创术可包括去除碎屑。

[0193] 术语“开孔”指的是通过手术生成的用于使尿液从尿流改道构建体的引流管外流端流出体外的开口。尿液通常由体外的尿袋收集。

[0194] 术语“开孔端”或“开孔扣”指的是用于保持所述开孔的开口处完整的手段例如装置。

[0195] 本文所使用的术语“扩张”或“扩大”指的是增加已有的层状结构的腔体器官或组织结构的大小。例如,在本发明的一个方面,已有的层状结构的腔体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个百分点。在本发明的另一方面,已有的层状结构的腔体器官或组织结构可被扩大例如以增加已有的层状结构的腔体器官或组织结构的已有的容积。

[0196] 本文所使用的术语“容积”指的是在确定的区域内能够含有的液体的量。

[0197] “再生预后”或“再生性预后”通常指的是对植入本文所述的构建体后的可能过程

或结果的预报或预计。如本文所述,再生预后包括对下述一种或多种情况的预报或预计:在膀胱替换或扩张后膀胱功能的发展或改善、在管道植入后尿流改道功能的发展,改善的膀胱容积的发展和改善的膀胱顺应性的发展。如本文所述,“对再生的预后”意为对对植入新的器官或组织结构后的可能过程或结果提供预报或预计。在一些实施方案中,“对再生的预后”包括对下述一种或多种情况提供预报或预计:在膀胱替换或扩张后膀胱功能的发展或改善、在管道植入后尿流改道功能的发展,膀胱容积的发展或改善的膀胱容积,以及膀胱顺应性的发展或改善的膀胱顺应性。

[0198] “再生的组织”指的是在植入本文所述的构建体后发展出的器官或组织结构的组织。所述器官或组织结构可为膀胱或膀胱的一部分。所述再生的组织可包括衬有平滑肌的连续的尿道上皮。

[0199] 2. 细胞群

[0200] 本发明提供了用于层状结构的体腔器官或组织结构的重建、修复、扩张或替换的平滑肌细胞群,其中所述细胞群包括具有收缩功能并对一种或多种平滑肌细胞标记物呈阳性的至少一种细胞。

[0201] 如本文所述,已经应用组织工程学原理成功地提供了用于层状结构的体腔器官和组织结构的重建、修复、扩张或替换的可植入的细胞接种基质,所述体腔器官和组织结构例如膀胱或通常由尿道上皮和平滑肌层构成的膀胱组件。(Becker et al. Eur. Urol. 51, 1217-1228 (2007); Frimberger et al. Regen. Med. 1, 425-435 (2006); Roth et al. Curr. Urol. Rep. 10, 119-125 (2009); Wood et al. Curr. Opin. Urol. 18, 564-569)。平滑肌细胞可来源于患者自身的组织,包括膀胱、尿道、输尿管和其他泌尿生殖组织。然而,作为使用最初的器官位置作为发育新的和健康的工程组织的基本单元的方法而言,依赖于这样的细胞培养系统的开发和维持是有问题的(例如在膀胱癌的治疗过程中)。显然这样的癌细胞不适于接种在可植入的新的膀胱支架或基质上。

[0202] 本发明提供了来源于与将进行重建、修复、扩张或替换的器官或组织结构不同的器官或组织结构来源的细胞群。在一个实施方案中,所述来源为自体来源。

[0203] 在另一方面,所述细胞群表达与平滑肌细胞群一致的标记物或平滑肌细胞群典型的标记物。

[0204] 在另一方面,本发明提供了从与将进行重建、修复、扩张或替换的腔体器官或组织结构不同的器官或组织结构来源分离的平滑肌细胞群。在一个优选实施方案中,所述腔体器官或组织结构为膀胱或膀胱的一部分。

[0205] 在一个方面,所述来源为外周血。在一个实施方案中,所述外周血来源的平滑肌细胞群来源于患者样本。所述患者样本可为静脉血。

[0206] 在一个方面,所述来源为脂肪组织。在一个实施方案中,所述脂肪组织来源的平滑肌细胞群来源于患者样本。所述患者样本可为在吸脂手术过程中取出的脂肪组织或脂肪吸取物。在一个优选实施方案中,患者样本

[0207] 在再另一个实施方案中,本发明的分离的细胞群在被培养后可发展出多种平滑肌细胞特征,所述特征包括但不限于:“峰-谷”状形态学,一种或多种平滑肌细胞标记物的表达,收缩功能,纤维形成和细胞因子合成。

[0208] 在一个方面,被培养的细胞群的特征在于其具有“峰-谷”状形态学。具有“峰-谷”

状形态学的细胞可具有多种特征,包括但不限于:纺锤形状、在传代时具有平坦和纤维状、呈平行列状地延伸和排列、“漩涡”状的生长外观,以及上述任意特征的组合。在一个实施方案中,所述细胞群在合适的培养基中培养时发展出平滑肌细胞典型的“峰-谷”状形态学。

[0209] 在另一方面,被培养的细胞群的特征在于存在一种或多种平滑肌细胞标记物。在一个实施方案中,所述细胞群在合适的培养基中培养时表达可检测的平滑肌细胞标记物,所述标记物包括但不限于一种或多种下列蛋白:心肌蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、钙结合蛋白、肌球蛋白重链、BAALC、结蛋白、成肌纤维细胞抗原、SM22,以及它们的任意组合。

[0210] 在另一方面,被培养的细胞群的特征在于存在表达一种或多种细胞表面标记物的一种或多种细胞。在一个实施方案中,所述细胞群在合适的培养基中培养时含有对细胞表面标记物呈阳性的一种或多种细胞,所述细胞表面标记物包括但不限于下列一种或多种标记物:CD73、CD90、CD105、CD166、CD31、CD54、CD56、CD117,以及它们的任意组合。在另一个实施方案中,所述细胞群在合适的培养基中培养时含有 CD45⁺、CD31⁺、CD54⁺、CD56⁺、CD90⁺ 和 CD105⁺ 的一种或多种细胞。

[0211] 在另一方面,被培养的细胞群的特征在于存在具有收缩功能的一种或多种细胞。在一个实施方案中,所述细胞群在合适的培养基中培养时发展出收缩功能。在另一个实施方案中,所述收缩功能为钙依赖性的。在另一个实施方案中,所述钙依赖性的收缩功能可通过与钙螯合剂相接触的抑制而得到证实。在另一个实施方案中,所述钙螯合剂为 EDTA。本领域普通技术人员能够知晓其他本领域已知的合适的螯合剂。

[0212] 在又另一方面,被培养的细胞群的特征在于纤维形成。在一个实施方案中,所述细胞群在合适的培养基中培养时经历纤维形成。

[0213] 在一个方面,所述细胞群包括表达一种或多种细胞因子的至少一种细胞。在一个实施方案中,所述细胞因子选自:MCP-1、制瘤素 M、IL-8 和 GRO。

[0214] 在一个方面,本发明的细胞群在分离后的培养过程中具有有限的增殖寿命。在其他实施方案中,所述细胞群的增殖寿命为约 1 代、约 2 代、约 3 代、约 4 代、约 5 代、约 6 代、约 7 代、约 8 代、约 9 代、约 10 代、约 11 代、约 12 代、约 13 代、约 14 代、约 15 代、约 16 代、约 17 代或约 18 代。在一个优选实施方案中,所述细胞群在培养中的增殖寿命不超过 5 代。脂肪来源的 SMC 通常在培养中 3-5 天传一代,血液来源的 SMC 通常在培养中 14 天开始产生第一代,然后每 3-5 天传一代(详见实施例 1)。

[0215] 在一个方面,本发明提供了含有至少一种再生性细胞的再生性细胞群,所述再生性细胞当沉积在本文所述的支架或基质上并被植入至有需要的受试者体内时,能够使得按本文所述进行重建、修复、扩张或替换的器官或组织结构发生再生。再生性细胞群在被植入有需要的患者体内后能够刺激或起动脉状结构的体腔器官或组织结构的再生。通常,器官或组织结构的再生的特征为细胞组件、组织结构和架构、功能以及调节性发育的重建。此外,再生性细胞群最大程度上消除了细胞接种腔体器官或组织结构构建体植入位置上可能发生的不完整性或障碍。在植入职位处的组织破坏的表现胶原沉积增加和/或疤痕组织形成,这两者中的每一个都可以通过使用再生性细胞群而被最大程度地消除。此外,某些细胞事件是再生性过程的指征。对于通过本文所述的细胞群和支架再生的膀胱或膀胱的一部分而言,再生的器官或组织结构包括从朝向腔体表面延伸的多个微脉管放射性发散的具有维管组织的平滑肌薄壁组织,以及具有对齐粘膜表面的完全发育血管的基质元件(见上

文 Jayo II)。再生的膀胱或膀胱的一部分的特征还有存在纺锤样 / 间充质细胞和 α SMA 阳性的肌肉前体细胞。在一个实施方案中,所述 α SMA 阳性的纺锤样细胞可在新生基质组织中和多个新生血管(小动脉)周围观察到。

[0216] 在一个实施方案中,本发明提供的细胞群当沉积在本文所述的支架或基质上并被植入至有需要的受试者体内时,能够使得按本文所述进行重建、修复、扩张或替换的器官或组织结构发生修复。在其他实施方案中,修复效果的特征为疤痕组织形成和 / 或胶原沉积。本领域技术人员能够知晓本领域已知的修复的其他特征。

[0217] 在另一方面,所述再生性细胞群提供了再生性效果,其特征不在于对重建的层状结构的腔体器官或组织结构的大小的适应性调节。在一个实施方案中,所述再生性细胞群的再生性效果通过特异性针对接受了接种有所述再生性细胞群的支架或基质的受试者的适应性调节而得到确认。在一个实施方案中,所述适应性调节为使用本文所述的构建体的受试者的膀胱的替换或扩张,从而使得新的膀胱生长并发育为与所述受试者身体成比例的大小。

[0218] 在一个实施方案中,所述能够刺激再生的细胞群为产生 MCP-1 的细胞群,所述细胞群含有至少一种表达趋化因子产物 MCP-1 的细胞。MCP-1 再生性刺激的特征为某种细胞类型向植入位置的募集。在一个实施方案中,MCP-1 将肌肉祖细胞募集至植入位置以在新的膀胱中增殖。在另一个实施方案中,MCP-1 将单核细胞募集至植入位置,所述单核细胞又可以产生各种细胞因子和 / 或趋化因子以促进再生性过程。在另一个实施方案中,MCP-1 诱导网膜细胞发育为肌细胞。

[0219] 在一个方面,本发明提供了特异性细胞因子例如 MCP-1 作为组织再生的替代性标记物的用途。这类标记物可以与基于功能是否重建的再生评估组合使用。随着再生过程的时程对替代性标记物的监测可以作为再生的预后指征。

[0220] 在另一个实施方案中,所述细胞群为纯化的细胞群。本文所述的纯化的细胞群的特征在于基于形态学、标记物表达和功能中的一种或多种的表型。所述表型包括但不限于下列的一种或多种:峰-谷形态学、一种或多种平滑肌细胞标记物的表达、细胞因子的表达、在培养中有限的增殖寿命、收缩功能以及诱导纤维形成的能力。所述表型可包括本文所述的或本领域技术人员已知的其他特征。在另一个实施方案中,所述纯化的细胞群基本上与本文所述的平滑肌细胞群相同。基本相同的纯化的细胞群通常具有至少约 90% 的均一性,这可通过形态学、标记物表达和功能中的一种或多种来判断。在其他实施方案中,所述纯化的细胞群具有至少约 95% 的均一性、至少约 98% 的均一性或至少约 99.5% 的均一性。

[0221] 在另一个实施方案中,所述平滑肌细胞群直接来源于人类脂肪组织,并且其特征不在于下列一种或多种蛋白的表达水平与其在人类骨髓来源的间充质干细胞(MSC)中的表达水平有差异:骨桥蛋白、Oct4B、生长分化因子 5(GDF5)、肝细胞生长因子(HGF)、白血病抑制因子(LIF)、黑素瘤细胞粘附分子(MCAM)、脉管细胞粘附分子 1(VCAM1)、PECAM、vWF、Flk-1、发育不良相关转录因子 2(RUNX2)、骨形态发生蛋白 6(BMP6)、CD44 和 IL-1B。在另一个实施方案中,所述 SMC 细胞群与人类骨髓来源的 MSC 相比:(a) GDF5、HGF、LIF、MCAM、RUNX2、VCAM1、PECAM、vWF 和 Flk-1 中的一种或多种的表达水平下降;和 / 或 (b) Oct4B、骨桥蛋白、BMP6、CD44 和 IL-1B 中的一种或多种的表达水平上升。在另一个实施方案中,所述 SMC 细胞群与人类骨髓来源的 MSC 相比:(a) GDF5、HGF、LIF、MCAM、RUNX2、VCAM1、PECAM、vWF

和 Flk-1 的表达水平全部下降 ;和 / 或 (b) Oct4B、骨桥蛋白、BMP6、CD44 和 IL-1B 的表达水平全部上升。

[0222] 在另一个实施方案中,所述平滑肌细胞群直接来源于脂肪组织,所述脂肪组织包括一种或多种 CD45+ 细胞和 / 或一种或多种 CD117+ 细胞。

[0223] 在其他实施方案中,本发明提供了直接来源于人类脂肪组织的平滑肌细胞群,所述平滑肌细胞群与人类骨髓来源的 MSC 相比具有较短的增殖寿命。在另一个实施方案中,所述 SMC 细胞群在培养物中表现出增殖的接触依赖性抑制。在另一个实施方案中,所述直接来源于脂肪组织的 SMC 细胞群的特征在于至少一种平滑肌细胞 (SMC) 标记物响应于凝血噁烷 A2 模拟物而下调。在其他实施方案中,所述 SMC 标记物选自心肌蛋白和肌球蛋白重链 - 平滑肌同种型 (SMMHC)。在另一个实施方案中,所述心肌蛋白和 SMMHC 响应于凝血噁烷 A2 模拟物而下调。

[0224] 在所有实施方案中,所述 SMC 细胞群来源于自体来源。

[0225] 在一个方面,本发明考虑了本文所述的平滑肌细胞群用于呼吸疾病的应用。气道平滑肌存在于大多数脊椎动物的气管系统中。呼吸系统眼部疾病指的是所述受试者由于肺部肌肉的功能不正常而具有有缺陷的呼吸系统。据报道,某些细胞群在被给予至肺部时可提供有益的效果 (例如 Ohnishi et al. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2008 December ; 3(4) : 509 - 514)。这些 SMC 细胞群可对患有呼吸系统疾病 (例如哮喘、肺气肿或慢性阻塞性肺病 (COPD)) 的个体有益处。对于患有肺癌的个体也可能有益处。在一个实施方案中,自体 SMC 细胞群可从有需要的受试者的脂肪组织或外周血分离。可将所述细胞群接种于适于植入至所述受试者肺部位置的支架上。本发明的细胞群的一个优势为 :如果受试者的呼吸系统有缺陷 (例如患有肺癌) 时,可能不能从所述受试者的肺部获得合适的 SMC。所述细胞群可用于受试者的肺的全部或部分被切除的情况 (例如肺癌的情况)。在受试者的肺的全部或部分被切除后,可以从活检样本中分离自体 SMC 细胞群,经过培养后接种于合适的支架上并植入所述受试者体内,以提供新的肺或新的肺部组织结构。

[0226] 在另一方面,本发明考虑了本文所述的 SMC 细胞群用于眼部疾病的应用。眼部疾病指的是所述受试者由于眼部肌肉的功能不正常而具有眼部缺陷。平滑肌存在于眼内的睫状肌并控制眼的容积,以用于观察不同距离的物体并调节房水通过 Schlemm 氏管的外流。平滑肌还存在于眼部的虹膜。这些 SMC 细胞群可对患有眼部疾病 (例如老花眼和远视眼) 的患者有一处。对于患有肺癌的个体也可能有益处。在一个实施方案中,自体 SMC 细胞群可从有需要的受试者的脂肪组织或外周血分离。可将所述细胞群接种于适于植入至所述受试者眼部位置的支架上。本发明的细胞群的一个优势为 :如果受试者的眼部有缺陷或由于眼部组织的可用性受到限制时,可能不能从所述受试者的眼部获得合适的 SMC。可以从活检样本中分离自体 SMC 细胞群,经过培养后接种于合适的支架上并植入所述受试者体内,以提供新的眼部组织。

[0227] 在另一个实施方案中,可以不使用支架 (例如通过植入) 而将本发明的平滑肌细胞群给予患有呼吸系统疾病或眼部疾病的受试者。本领域普通技术人员能够知晓合适的植入方法。

[0228] 在一个实施方案中,自体 SMC 细胞群可从有需要的受试者的脂肪组织或外周血分离。可将所述细胞群接种于适于植入至所述受试者肺部位置的支架上。本发明的细胞群的

一个优势为：如果受试者的呼吸系统有缺陷（例如患有肺癌）时，可能不能从所述受试者的肺部获得合适的 SMC。所述细胞群可用于受试者的肺的全部或部分被切除的情况（例如肺癌的情况）。在受试者的肺的全部或部分被切除后，可以从活检样本中分离自体 SMC 细胞群，经过培养后接种于合适的支架上并植入所述受试者体内，以提供新的肺或新的肺部组织结构。在另一个实施方案中，可以不使用支架（例如通过植入）而将本发明的平滑肌细胞群给予患有呼吸系统疾病的受试者。本领域普通技术人员能够知晓合适的植入方法。

[0229] 3. 分离细胞群的方法

[0230] 自体细胞群直接来源于需要治疗的受试者。所述受试者提供来源的组织通常与需要治疗的器官或组织结构不同。自体细胞群可以来源于患者的自身组织，例如来源于脂肪组织或外周血。所述自体细胞可以从活检样本中分离。此外，所述细胞在使用前可被冷冻或扩增。

[0231] 为了准备构建细胞接种的支架，获自受试者的含有平滑肌细胞的样本被解离形成合适的细胞悬液。分离和培养细胞的方法在已授权的美国专利 No. 5, 567, 612 中有述，该专利文献通过援引的方式明确地纳入本文。将细胞解离为单细胞状态的过程并不是开始原代培养所必需的，因为在体外培养一段时间（例如一周）后就可以形成单细胞悬液。可以通过机械方法和酶学方法破坏连结细胞的细胞外基质和胞间连接，从而进行组织解离。如果需要，可以在体外培养自体细胞，以增加可用于接种支架的细胞的数量。

[0232] 在接种前，可以使用遗传物质转染细胞。在聚合物接种之前，可以用特异性基因转染平滑肌细胞。细胞-聚合物构建体可以携带能使宿主长期存活或使组织形成新的器官所需要的遗传信息。

[0233] 可以使用或不使用本领域技术人员已知的细胞分级步骤来制备细胞培养物。可以基于细胞大小、DNA 含量、细胞表面抗原和存活力来进行细胞分级。例如，可以从脂肪组织中富集平滑肌细胞，并同时减少内皮细胞和脂肪细胞以收集平滑肌细胞。虽然可以使用细胞分级，但是它并不是实施本发明所必需的。

[0234] 在本文所述的方法中，另一种任选的过程为冷冻保存。可以使用冷冻保存来例如降低对多次侵入性手术过程的需要。可以扩增取自活检样本或取自受试者的细胞，可以使用一部分扩增的细胞并将另一部分细胞冷冻保存。能够扩增和保存细胞就减少了必需的手术过程的次数。冷冻保存用途的另一实例是在组织库中的应用。自体细胞可在例如供体组织库中储存。当新的器官或组织结构需要细胞时，可以按照需要由冷冻保存的细胞提供。患病的或正接受可能危害其已有的器官或组织结构的治疗的患者可以冷冻保存一种或多种活检样本。然后，如果患者自身的器官或组织结构发生衰竭，就可以融化冷冻保存的自体细胞并用于治疗。例如，如果在经过治疗后的新的器官或组织结构中复发癌症，可以使用冷冻保存的细胞来重建器官或组织结构，就不再需要另外的活检样本。

[0235] 可以按照下述总体方法来从脂肪或外周血中分离平滑肌细胞。可以获得合适重量（例如以克为单位）和 / 或面积（例如以 cm^2 为单位）的脂肪活检标本。可以在在计划植入新的器官或组织结构构建体之前获得合适体积（例如以 ml 为单位）的外周血。

[0236] 下面描述一种适用于从脂肪的基质血管级分 (SVF) 中分离平滑肌细胞的代表性实例方法，所述脂肪的基质血管级分 (SVF) 代表了由多种细胞类型组成的不均一的细胞群，包括内皮细胞和平滑肌细胞，以及由国际细胞治疗协会 (International

Society for Cellular Therapy (ISCT)) 标准定义的 MSC 样细胞 (Domini et al. 2006 Cytotherapy 8:4, 315-317)。可以从活检样本中获得合适重量的 (以克为单位) 的脂肪组织 (例如 7-25g), 用 PBS 洗涤 (例如 3 次), 用手术刀和剪将组织剪碎, 转移至 50mL 锥形瓶中并在含胶原酶 (例如 0.1 至 0.3%) (Worthington) 和 1% BSA 的 DMEM-HG 溶液在 37°C 培养 60 分钟。可以持续振荡或间歇性振荡所述锥形瓶以促进消化。可以以 600g 离心 10 分钟以沉淀 SVF 并在添加 10% FBS 的 DMEM-HG 中重悬。然后使用基质-脉管级分来进行第 0 代细胞的接种。

[0237] 下面描述一种适用于从外周血中分离平滑肌细胞的代表性实例方法。可将合适的体积 (例如 25ml) 的外周血以 1:1 稀释于 PBS 中, 加入 25ml Histopaque-1077 (Sigma) 并置于 50mL 锥形瓶中以分层。在离心 (例如 800g, 30min) 后, 可以收集单核细胞级分, 用 PBS 洗涤一次并重悬于 α -MEM/10% FBS (Invitrogen) 中以进行第 0 代细胞的接种。

[0238] 本领域普通技术人员能够知晓其他用于分离平滑肌细胞的方法。

[0239] 在一个方面, 本发明提供了无需使用诱导分化为平滑肌细胞的条件而从 SVF 中分离出分离的平滑肌细胞群的方法。在一个实施方案中, 所述方法包括 a) 获得脂肪组织, b) 消化所述脂肪组织, c) 离心所述被消化的脂肪组织以提供基质血管级分 (SVF), d) 无需使用诱导分化为平滑肌细胞的条件而培养所述 SVF, 和 e) 从脂肪组织来源的 SVF 中分离平滑肌细胞群。在一个实施方案中, 所述培养步骤包括洗涤所述 SVF, 在细胞培养基重悬所述 SVF, 以及将所述重悬的 SVF 铺板。在另一个实施方案中, 所述培养步骤包括提供贴靠细胞培养载体 (例如培养板或容器) 的细胞群。在另一个实施方案中, 所述方法还包括扩增所述培养的细胞群。在其他实施方案中, 所述方法还包括分析所述平滑肌细胞群是否具有平滑肌细胞的特征。在一个实施方案中, 所述脂肪组织来源于自体来源。

[0240] 在一个实施方案中, 所述培养条件不需要使用能够诱导脂肪组织 SVF 来源的细胞群分化为平滑肌细胞的细胞培养组分。据 Jack et al., J Biomaterials 30 (2009) 3529-3270 报道, 在含有肝素的诱导培养基上培养来源于 SVF 的未分化的脂肪干细胞 6 周, 以使得干细胞分化为平滑肌细胞 (还可参见 Rodriguez 的美国专利 No. 7, 531, 355)。Jack et al. 报道的干细胞不需要在培养期间内被分份。在另一个实施方案中, 所述培养条件不需要使用诱导培养基, 包括含有肝素的诱导培养基。在另一个实施方案中, 本发明的方法包括使用不含有能够使细胞群分化为平滑肌细胞或培养和扩张细胞群所需的外源性生长因子的培养条件。

[0241] 本发明的方法与其他报道过的方法相比的优势包括省略了使脂肪来源的干细胞分化为平滑肌细胞的步骤, 这就减少了获得脂肪活检样本和从中分离平滑肌细胞群之间的时间。此外, 由于不再需要诱导分化的其他细胞培养基组分 (例如外源性生长因子), 也就具有了降低成本的优势。

[0242] 在另一方面, 本发明提供了分离和培养平滑肌细胞群的方法, 所述平滑肌细胞群含有至少一种具有收缩功能和对一种或多种平滑肌细胞标记物呈阳性的细胞。在一个实施方案中, 所述方法包括从需要重建、修复、扩张或替换层状结构的腔体器官或组织结构的患者获得样本的步骤, 其中所述样本不是从需要被重建、修复、扩张或替换的腔体器官或组织结构获得的。在另一个实施方案中, 所述平滑肌细胞来源于患者样本。在另一个实施方案中, 所述腔体器官或组织结构为膀胱或膀胱的一部分。在一个实施方案中, 所述样本为自体

样本。在另一个实施方案中,所述样本为外周血样本。在又一个实施方案中,所述样本为脂肪组织样本。所述脂肪组织可为通过腹部吸脂手术而取出的所述受试者的组织。

[0243] 在另一个实施方案中,在所述获得步骤之后还进行分离步骤。

[0244] 对外周血样本而言,所述分离步骤包括使样本与密度梯度材料相接触,离心所述样本以确定含有单核细胞级分的密度梯度,以及从所述密度梯度中提取所述单核细胞级分。在所述分离步骤之后还可以进行培养步骤,即培养来自所提取的级分的细胞。

[0245] 对于脂肪组织样本而言,所述纯化步骤包括用胶原酶消化所述样本,离心经过消化的样本,将离心的样本混合以从原代脂肪细胞中分离基质细,离心混合的样本以获得基质-脉管级分,该级分可被重悬以进行随后的培养。

[0246] 在一个方面,本发明提供了不使用诱导分化的细胞培养基而提供分离的平滑肌细胞(SMC)群的方法。在一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:a)获得脂肪组织活检样本,b)酶促消化所述脂肪组织,c)离心经消化的脂肪组织以提供含有不均一细胞群的基质血管级分(SVF),d)洗涤和铺板所述不均一的细胞群;e)在不使用平滑肌细胞分化诱导培养基的条件下培养所述细胞群,f)从培养的细胞中分离完全分化的SMC细胞群。在另一个实施方案中,所述培养步骤e)包括筛选贴靠细胞培养载体的细胞。在另一个实施方案中,所述培养步骤e)不包括使用含有外源性生长因子的细胞培养基。在一个实施方案中,所述培养方法包括使用含有最少必须培养基(例如DMEM或 α -MEM)和胎牛血清(例如10%FBS)的细胞培养基,并通过本领域普通技术人员已知的标准条件进行培养。在另一个实施方案中,所述平滑肌细胞群不是脂肪来源的干细胞群。在另一个实施方案中,所述平滑肌细胞群不是间充质干细胞群。

[0247] 4. 支架(Scaffolds)

[0248] 如Atala的美国专利No. 6576019(其全部内容通过援引的方式纳入本文)所述,支架或聚合物基质可由各种不同的材料构成。通常,生物相容性材料特别是可生物降解材料是用于构建本文所述的支架的优选材料。所述支架为具有至少两个分离表面的可植入的、生物相容性的、合成的或天然的聚合物基质。所述支架的形状与需要治疗的所述腔体器官或组织结构的至少一部分相适应。所述生物相容性材料是可生物降解的。生物相容性指的是所述材料没有毒性或对于生物学功能没有损害性效果。可生物降解指的是所述材料可以在患者体内被吸收或降解。可生物降解材料的实例包括例如可吸收的缝线。用于形成支架的代表性材料包括天然的或合成的聚合物,例如胶原,聚(α 酯)例如聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚原酸酯和聚酸酐以及它们的共聚物,它们可以通过水解以受控的速度降解并被吸收。这些材料可以实现对降解性、可操作性、大小和构型的最大程度的控制。优选的可生物降解聚合物材料包括以可吸收的合成缝线材料的形式开发的聚乙醇酸和聚羟基乳酸(polyglactin)。聚乙醇酸和聚羟基乳酸纤维可以以厂商提供的形式使用。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、聚苯并恶唑、聚碳酸酯、聚醚腈(polycyanoarylether)、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、聚恶二唑、聚苯醚、聚苯硫醚、聚丙烯、聚苯乙烯、聚硫、聚砜、聚四氟乙烯、聚硫醚、聚三唑、聚氨酯、聚乙烯,聚偏氟乙烯、再生的纤维素、硅酮、脲醛,或这些材料的共聚物或物理混合物。可用合适的抗微生物剂浸渍所述材料或者用有色添加剂对所述材料着色,以改善其视觉效

果和有助于手术过程。

[0249] 其他可生物降解的支架材料包括由 Ethicon 公司 (Ethicon Co., Somerville, N. J.) 生产的合成缝线材料, 例如 MONOCRYL™ (乙醇酸和 ϵ -己内酯的共聚物)、VICRYL™ 或 Polyglactin910 (乳酸和乙醇酸的共聚物, 涂覆有 Polyglactin370 和硬脂酸钙) 和 PANACRYL™ (乳酸和乙醇酸的共聚物, 涂覆有己内酯和乙醇酸的共聚物)。(Craig P. H., Williams J. A., Davis K. W., et al.: A Biological Comparison of Polyglactin910 and Polyglycolic Acid Synthetic Absorbable Sutures. Surg. 141; 1010, (1975)) 和聚乙醇酸。这些材料可以以厂商提供的形式使用。

[0250] 在又一个实施方案中, 所述基质或支架可以使用天然的去细胞化器官的一部分来产生。可以通过从器官中去除全部细胞和组织内容而对生物结构或器官部分去细胞化。去细胞化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打乱或破坏生物结构的复杂内部结构的剧烈提取过程。第一步包括除去细胞碎片和细胞膜的溶解。然后再溶解核胞质组分和核组分。

[0251] 优选地, 通过使用温和的机械破坏方法除去包围器官部分的细胞膜和细胞碎片, 从而使所述生物结构例如器官部分被去细胞化。所述温和的机械破坏方法必须足以破坏细胞膜。然而, 所述去细胞化过程应避免损伤或打乱所述生物结构的复杂内部结构。温和的机械破坏方法包括刮去器官部分的表面、在合适体积的液体 (例如蒸馏水) 中搅拌器官部分或搅拌器官。在一个优选实施方案中, 所述温和的机械破坏方法包括在合适体积的蒸馏水中搅拌器官部分, 直至细胞膜被破坏且细胞碎片被从所述器官移除。

[0252] 在除去细胞膜后, 再除去所述生物结构的核和胞质组分。这可以通过溶解细胞和核组分但不破坏其内部结构的方式来进行。为了溶解核组分, 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包括但不限于: 可以获自 Rohm and Haas of Philadelphia, Pa. 的 Triton 系列产品, 包括 Triton X-100、Triton N-101、Triton X-114、Triton X-405、Triton X-705 和 Triton DF-16, 它们可从多个供货商处购得; Tween 系列产品, 例如单月桂酸酯 (Tween20)、单棕榈酸酯 (Tween40)、单油酸酯 (Tween80) 和聚氧乙烯-23-月桂醚 (Brij. 35)、聚氧乙烯醚 W-1 (Polyox) 等等, 胆酸钠、去氧胆酸盐、CHAPS、皂角苷、正癸基-D-吡喃葡萄糖苷、正庚基-D-吡喃葡萄糖苷、正辛基-D-吡喃葡萄糖苷和 Nonidet P-40。

[0253] 本领域技术人员能够知晓属于上述类别的化合物的描述和可商购的供货商, 这些也可见于 "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. and Judith Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem. R., Hoechst Celanese Corp., 1987。在一个优选实施方案中, 上述非离子型表面活性剂为 Triton 序列产品, 优选地为 Triton X-100。

[0254] 可以根据被去细胞化的生物结构的类型来改变上述非离子型去污剂的浓度。例如, 对于精细组织例如血管, 应降低去污剂的浓度。非离子型去污剂的优选浓度可为约 0.001 至约 2.0% (w/v)。更优选地为约 0.05 至约 1.0% (w/v)。再更优选地为约 0.1% (w/v) 至约 0.8% (w/v)。优选的浓度范围为约 0.001 至约 0.2% (w/v), 特别优选的范围为约

0.05 至约 0.1% (w/v)。

[0255] 对于包括致密的胞质纤维网络、细胞间复合物和顶端微细胞结构的细胞骨架组分,可以使用碱性溶液例如氨水进行溶解。包括铵盐及其衍生物的其他碱性溶液也可用于溶解细胞骨架组分。合适的铵盐溶液的实例包括硫酸铵、乙酸铵和氨水。在一个优选实施方案中,使用了氨水。

[0256] 可以根据被去细胞化的生物结构的类型来改变所述碱性溶液例如氨水的浓度。例如,对于精细组织例如血管,应降低去污剂的浓度。优选的浓度范围可为约 0.001 至约 2.0% (w/v)。更优选地为约 0.005 至约 0.1% (w/v)。再更优选地为约 0.01% (w/v) 至约 0.08% (w/v)。

[0257] 去细胞化的冻干的结构可储存于合适的温度下直至需要使用时。在使用前,可以将所述去细胞化的结构在合适的等渗缓冲液或细胞培养基中进行平衡。合适的缓冲剂包括但不限于磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、盐水、MOPS, HEPES, Hank's 平衡盐溶液等等。合适的细胞培养基包括但不限于 RPMI1640、Fisher's 培养基、Iscove's 培养基、McCoy's 培养基、Dulbecco's 培养基等等。

[0258] 其他可用的生物相容性材料包括不锈钢、钛、硅酮、金和硅橡胶。

[0259] 可以加固所述聚合物基质或支架。例如,可以在合成基质或支架形成的过程中加入加固材料,或者在植入之前将加固材料贴附在天然或合成的基质上。用于形成加固的代表性材料包括天然或合成的聚合物,例如胶原,聚(α 酯),例如聚(乳酸),聚(乙醇酸),聚原酸酯和聚酸酐,以及它们的共聚物,它们都可以以受控的速度通过水解降解并被吸收。这些材料可以实现对可降解性、可操作性、大小和构型的最大程度的控制。

[0260] 可以根据机械性质来表征所述可生物降解聚合物,例如使用 Instron 测试仪来测量拉伸强度,通过凝胶渗透色谱 (GPC) 来测量聚合物的分子量,通过差示扫描量热法 (DSC) 来测量转变温度,以及通过红外 (IR) 光谱来测量键结构;或者可以通过毒理学来表征所述可生物降解聚合物,初始的筛选测试包括 Ames 测定和体外致畸性测定和动物体内植入研究,以研究其免疫原性、炎性、释放和降解性质等。可以使用扫描电镜来测定体外细胞贴附和存活力,使用放射性同位素来进行组织学和定量测定。还可以根据被植入患者体内后材料降解所需的时间来表征可生物降解材料。通过变化所述构建方式,例如厚度和网筛大小,所述可生物降解材料基本上能够在约 2 年至约 2 个月之间、优选地在约 18 个月和约 4 个月之间、最优选地在约 15 个月和约 8 个月之间、最优选地在约 12 个月和约 10 个月之间发生生物降解。如果必要的话,可以构建所述可生物降解材料以使其在约 3 年或约 4 年或约 5 年更长时间内不发生降解。

[0261] 可以如上所述地使用可控的有孔结构编织所述聚合物基质或支架。可以使用孔的大小来确定细胞分布。例如,聚合物基质或支架上的孔的大小可以大到使得细胞能够从一个表面迁移至相对的表面。或者,所述孔可以小到仅能允许聚合物基质或支架的两侧进行液体流通但不允许细胞通过。为实现这一目的,合适的孔直径可为约 0.04 微米至约 10 微米、优选地为约 0.4 微米至约 4 微米。在一些实施方案中,聚合物基质或支架的表面可具有足够大的孔,以使得细胞群可以贴附和迁移至孔中。孔在聚合物基质或支架的底部可以变得比较小,以防止细胞从所述聚合物基质或支架的一侧迁移至相对侧。具有较小孔直径的聚合物基质或支架的一个实施方案为层状结构,其中在两层大孔材料之间夹有小孔材料。

聚碳酸酯膜是特别合适的,因为它们编织时可以精细控制孔的大小,例如孔的大小可为约 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。在亚微米水平上,所述聚合物基质或支架使得细菌、病毒和其他微生物可以透过。

[0262] 在设计每一种具体基质或其部分的时候要考虑以下特征或标准:(i) 形状、(ii) 强度、(iii) 硬度和刚性,和 (iv) 可缝合性(所述基质或其部分易于被缝合或以其他方式贴附至邻近组织的程度)。如本文所述,给定基质或支架的硬度透过弹性模量来定义,弹性模量是表示使支架变形的每单位面积上的压力与导致的变形程度之间比例的系数。(参见例如 Handbook of Biomaterials evaluation, Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials, 2nd edition, edited by Andreas F. von Recum, (1999); Ratner, et al., Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press (1996))。支架的刚性指的是给定支架具有的弹性(或缺乏弹性)的程度。

[0263] 上述标准的每一个都是变量,例如可以通过材料和制造工艺的选择而被改变,以使得所述基质或其部分能够最好地被放置和修饰,以治疗医学指征和实现其目的功能。例如,包括用于膀胱替换、重建和/或扩张的基质或支架的材料必须足够结实,以支持缝合不会破裂,同时还要有足够的顺应性以容纳变化的尿液体积。

[0264] 最佳地,所述基质或支架的形状应使得:在其生物降解后,所得的重建的膀胱与天然膀胱一样在空的时候可以收缩,且在从新的器官或组织结构中取出尿路导管后输尿管不会被堵塞也不会留下漏孔。生物工程膀胱构建体可以以整体方式生产,也可以各个部分独立生产,或者以特殊部分的方式生产再进行组合。生产的每一个特殊基质或支架部分可具有特殊功能。或者是为了便于制备而生产特殊部分。特殊部分可由特殊材料构建,并可被设计为具有特殊性质。特殊部分的性质可包括与天然组织(例如输尿管)相似的拉伸强度(0.5 至 1.5 MPa²)和 30 至 100% 的最终延展性,或者收缩拉伸强度为 0.5 至 28 MPa²,最终延展性为 10-200%,压缩强度可为 <12。

[0265] 优选的是由纤维形成的网筛状结构,所述纤维可为圆形、扇形、扁平型、星型,可以孤立或与其他纤维交织在一起。分支纤维的使用所基于的原理,与通常用于解决表面积对体积的比例增加的问题的原理相同。所有的多细胞生物体均利用这种重复分支结构。分支系统形成器官之间以及各器官的功能单位之间的通讯网络。使用细胞接种和植入这种构型使得可以植入大量细胞,每个细胞均与宿主的环境相接触,使得养分和废物能够自由交换,同时实现血管新生化。所述聚合物基质或支架可根据所需的最终形式、结构和功能制成弹性或刚性。

[0266] 在一个优选实施方案中,所述聚合物基质或支架由具有 15 μm 的平均纤维直径的聚乙醇酸纤维形成,并使用 4-0 Polyglactin 910 缝线形成膀胱形状模型。将所得的结构用液化共聚物涂覆,所述液化共聚物例如聚-DL-丙交酯-共-乙交酯 50:50, 80mg/ml 亚甲基氯,以获得合适的机械形式并固定其形状。

[0267] 在另外一个实施方案中,用生物相容性和可生物降解形凝材料涂覆本发明的支架。在一个实施方案中,所述形凝材料包括聚丙交酯-共-乙交酯共聚物。在另一个实施方案中,所述形凝材料为液化的。

[0268] 在另一方面,可以在植入前(在用细胞接种聚合物基质或支架之前或之后)用添加剂或药物处理本发明的支架,从而例如在植入后促进新组织的再生。因此,例如可以在所述聚合物基质或支架中加入生长因子、细胞因子、细胞外基质或支架组分以及其他生物活性材料,从而促进植入物愈合和新组织的再生。通常应根据待被重建、替换或扩张的组织或器官来选择这样的添加剂,以保证在植入的器官或组织中能够形成合适的新组织(对于用于促进骨愈合的这类添加剂的实例而言,可参见例如 Kirker-Head, C. A. Vet. Surg. 24(5):408-19(1995))。例如,当使用聚合物基质(任选地接种有内皮细胞)来扩张血管组织时,可以使用血管内皮生长因子(VEGF)(参见例如美国专利 No. 5,654,273)来促进新的血管组织的再生。如果使用加入的细胞,那么可以加入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)、成纤维细胞生长因子(FGF)、细胞因子、基因、蛋白等等)的量可超过在聚合物基质上接种的细胞所产生的任何这类生长因子的量(如果确实产生的话)。优选地,提供的这类添加剂的量足以促进新组织类型的再生,所述组织类型适合于将要被修复、替换或扩张的组织或器官(例如通过引起或加速宿主细胞向植入物中的渗透)。其他可用的添加剂包括抗菌药剂抗生素。

[0269] 一种优选的支撑基质或支架含有交叉的细丝,在所述细胞支撑物被植入后,它们可以使得营养物质通过很短的距离扩散至细胞而使得细胞能够存活。在植入后,随着细胞团的扩增,所述细胞支撑基质或支架能够同步地被血管化。

[0270] 在植入前在体外进行三维结构构建体的构建,可以促进细胞在植入后在体内的最终分化,并且尽可能地降低对所述基质的炎性反应的风险,由此避免了植入物的挛缩和收缩。

[0271] 在使用前,可以使用任何已知的方法对所述聚合物基质或支架进行灭菌。所使用的方法取决于在聚合物基质中所使用的材料。灭菌方法的实例包括蒸汽灭菌、干热灭菌、放射灭菌、用例如环氧乙烷的气体灭菌,以及气体和煮沸灭菌。

[0272] 组成支架的合成材料可使用例如溶剂浇铸、模压、拉细丝、结网、浸析、编织和涂覆等方法来成型。在溶剂浇铸方法中,将一种或多种聚合物溶于适当的溶剂例如二氯甲烷中形成溶液,将所述溶液浇铸在分枝形状的浮雕结构上。在溶剂蒸发后获得薄膜。在模压方法中,将聚合物在最高达 30,000 磅/平方英寸的压力下压成适当的形状。拉细丝包括从熔融聚合物中拉丝,结网包括通过将纤维压制成毛毡状的材料而形成网筛。在浸析方法中,将含有两种物质的溶液喷洒为接近所述构建体的最终形式的形状。然后用溶剂溶解掉其中一种组分,导致孔隙的形成(参见 Mikos, 美国专利 No. 5,514,378, 通过援引的方式纳入本文)。在成核方法中,将支架形状的薄膜暴露于放射性裂变产物以产生放射性损坏材料的痕迹。然后用酸或碱蚀刻聚碳酸酯层,将放射性损坏材料的痕迹翻印成孔。最后可以使用激光成型和在许多材料中烧穿成孔,以形成具有均匀孔径的结构。涂覆指的是用例如液化共聚物(聚-DL-丙交酯-共-乙交酯 50:50 80mg/ml 亚甲基氯)的材料涂覆或浸透聚合物结构,从而改变其机械性质。可以进行一层涂覆,也可以进行多层涂覆,直至获得所需的机械性质。上述成型技术可以组合使用,例如,聚合物基质或支架可被编织、模压和胶粘在一起。而且,通过不同工艺成型的不同聚合物材料可以连接在一起形成组合形状。所述组合形状可为层状结构。例如,可以将一种聚合物基质或支架贴附在一种或多种聚合物基质上以形成多层聚合物基质或支架结构。这种贴附可以通过使用液体聚合物胶粘或通过缝合来

进行。此外,所述聚合物基质或支架可以以固体块的形式形成,并通过激光或其他标准技术来成型至其所需的最终形式。激光成型指的是使用激光去除材料的过程。

[0273] 在一个优选实施方案中,所述支架由无纺聚乙醇酸(PGA)毛毡和聚(乳酸-共-乙醇酸)聚合物(PLGA)形成。在另一个优选实施方案中,所述支架为尿流改道支架。

[0274] 如 Bertram 等人的美国专利公布 20070276507(其全部内容通过援引的方式纳入本文),本发明的聚合物基质或支架可成型为任意数量的所需构型,以满足其任意数量的总体系统、几何学或空间的限制。所述基质可为三维基质,并且经过成型以符合层状结构的腔体器官或组织结构的尺寸和形状。例如,当使用聚合物基质进行膀胱重建时,可以使用经过成型而符合整个膀胱或其一部分的三维基质。天然地,所述聚合物基质可成型为不同的大小和形状,以符合不同体型的患者的膀胱。任选地,所述聚合物基质在成型后应使得在其生物降解后,所得的重建的膀胱在排空时能够像天然的膀胱一样地可收缩。所述聚合物基质也可成型为其他形式,以适应患者的特殊需要。例如,先前具有损伤或功能障碍的患者可能具有改变的腹腔,因此可能需要特殊的膀胱替换支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架和逼尿肌肌肉等效物支架来配合。

[0275] 在一个方面,本发明考虑了适于与本文所述的平滑肌细胞群一起使用的其他支架。例如,可以提供适于植入至肺部的支架。

[0276] A. 扩张或替换支架

[0277] 在另一方面,所述聚合物基质或支架的形状符合膀胱的一部分。在一个实施方案中,所述成型的基质为适于替换所述受体已有膀胱的至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%或至少约 95%。在另一方面,所述成型的聚合物基质或支架与膀胱的 100%或全部膀胱相符合。

[0278] 在一个实施方案中,所述聚合物基质包括一个第一可植入的、生物相容性的、合成的或天然的、具有两个分离表面的聚合物基质或支架;和一个第二可植入的、生物相容性的、合成的或天然的、具有两个分离表面的聚合物基质或支架,它们适合于彼此接合,并且其在接合时的形状符合需要治疗的腔体器官或组织结构至少一部分。所述第一和第二聚合物基质可由一个整体单元形成并被分为两个或多个不同部分,或者由两个或多个不同部分形成并适于接合。在一些实施方案中,所述第一和第二聚合物基质在接合后可用于腔体器官或组织结构的重建、修复、扩张或替换。

[0279] 在一些实施方案中,所述第一和第二聚合物基质是对称的,而在其他实施方案中,所述第一和第二聚合物基质是不对称的。在一个实施方案中,所述第一聚合物基质或支架具有半球形或准半球形的形状,有一个封闭的圆顶末端和一个开放的赤道状边缘;所述第二聚合物基质或支架具有适于与所述第一聚合物基质的赤道状边缘结合的卡圈。在另一个实施方案中,所述第一和第二聚合物基质均为半球或准半球状,有一个封闭的圆顶末端和一个开放的赤道状边缘。在又一个实施方案中,所述第一和第二聚合物基质各具有一个圆形或半圆形的底座和至少 2 个从所述底座呈放射状延伸的花瓣形部分。在这一实施方案中,所述第一和所述第二聚合物基质的底座和花瓣形部分彼此接合产生一个空心球状或准球状的基质或支架,从而使得在所述接合的聚合物基质的一侧形成一个纵向凸出的椭圆形开口,而在所述纵向开口的对侧形成一个圆形开口。在另一个实施方案中,所述第一和第二聚合物基质由三部分组成,包括适于接合的顶片、前片和侧片。在这一实施方案中,所述三

个不同的部分通过至少三个、优选为四个垂直接缝而接合，从而形成冠状的新的膀胱构建体。优选地，冠状构建体单独用作用于腔体器官的重建、修复、扩张或替换的装置。在一个实施方案中，所述构建体为膀胱扩张支架。膀胱扩张支架的一个实例示于图 1。在另一个实施方案中，所述构建体为膀胱替换支架。膀胱替换支架的一个实例示于图 2。

[0280] 此外，当所述构建体必须与天然脉管或管道相连接时，所述第一聚合物基质和/或所述第二聚合物基质可包括至少一个适于接受管状脉管或插入物的容器或端口。所述脉管或插入物本身例如圆柱状或管状的成型聚合物基质，各自具有至少一个位于所述圆柱状聚合物的第一末端的凸缘。优选地，所述所述脉管或插入物由与上述第一或第二聚合物基质相同的生物相容性材料构成。在一些实施方案中，所述脉管或插入物还包括适于包围所述圆柱状或管状脉管或插入物聚合物基质的垫片。例如，所述垫片为水凝胶。任选地，所述所述圆柱状或管状脉管或插入物包括垫片。所述垫片可为水凝胶。此外，所述圆柱状或管状插入物可为自我稳定的。

[0281] 在另一个实施方案中，当所述支架或基质（在用细胞接种后）必需与天然脉管或管道相连接时，所述适于接受管状脉管或插入物的容器或端口也应用于下文所述的其他基质。

[0282] B. 尿流改道

[0283] 本发明提供了可被细胞接种并用作在受试者的尿流改道的构建中替换胃肠道组织的新的尿流改道或管道支架。例如，本文所述的新的尿流改道可用于接受了膀胱根除术治疗的患者，否则所述患者可能需要使用回肠回路改道。

[0284] 在一个方面，本发明考虑了适于用作有需要的受试者的尿流改道的管道支架或基质，所述管道支架或基质由本文所述的方法形成。所述管道支架的一端可以与一条或多条输尿管相连接，另一端可以与受试者体外的尿液储库相连接。在一个实施方案中，所述管道可以通过开孔而通向受试者的体外。在另一个实施方案中，所述聚合物基质包括一个以管状形式提供的第一可植入的、生物相容性的、合成聚合物基质或支架。在一些实施方案中，所述管状支架包括一个被设计为与受试者的输尿管相连接的第一末端。在另一个实施方案中，所述第一支架还包括一个被设计为在受试者体内形成开孔或括约肌的第二末端。在另一个实施方案中，所述第一支架还包括至少一个被设计为与至少一条输尿管相连接的侧部开孔。在一些实施方案中，所述第一支架包括被设计为与第一输尿管相连接的第一侧部开孔和被设计为与第二输尿管相连接的第二侧部开孔。

[0285] 在另一个实施方案中，所述管状结构包括一个具有平滑边缘的第一末端和具有不均一或不平滑边缘的第二末端。所述不均一边缘可包括一个圆形的底座和从该底座呈放射状延伸的几个花瓣形部分。所述花瓣形部分的数目可为 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个。所述不平滑边缘可包括例如图 3 所示的一系列花瓣形部分。在一个实施方案中，所述管状结构具有适于用作有需要的患者的尿流改道系统或管道的形式。在另一个实施方案中，例如在输尿管切除术的情况下，所述系统使尿液从一条或多条输尿管改道至腹腔壁区域。在其他实施方案中，例如在膀胱切除术的情况下，所述系统使尿液从膀胱改道至腹腔壁区域。在另一个实施方案中，所述系统使膀胱和尿道相连接。在又一个实施方案中，可以用一个第一系统使尿液从一条或多条输尿管改道至腹腔壁区域，并使用一个第二系统使尿液从膀胱改道至腹腔壁区域。在所有实施方案中，所述系统可使尿液从一条或多条输尿管改道至

腹腔壁区域,例如形成开孔。

[0286] 在另一个实施方案中,所述管状基质或支架为尿流改道或管道支架。

[0287] 在一个实施方案中,所述尿流改道系统的管状结构的截面形状为矩形、圆形或三角形。图 3A 显示了本文所考虑的一些不同的截面形状。

[0288] 在另一个实施方案中,管状结构保留足够的刚性,以在植入后保持畅通。在另一个实施方案中,通过或不通过在上述管状结构的腔中使用导管来保持其刚性。当使用导管时,可将其置于所述管状结构的腔空间内以提供额外的通透性。

[0289] 在另一个实施方案中,所述管道支架还可包括一个圆形或卵形的第二支架,其被设计为将所述第一支架的第一末端与输尿管相连接。在又一个实施方案中,所述管道支架还可包括一个垫圈形的第三支架,其被设计为开孔或括约肌的形式并与所述第一管状支架的第二末端一起形成受试者身体的开孔。图 3B 显示了尿流改道构建体的变化方案(A - 开口呈卵形;B - 开口呈卵形的容器;C - 封闭的卵形容器和三个管)。

[0290] 在一些实施方案中,所述管状结构可包括垫片结构,以用于连接至组织、器官或身体部分,以实现吻合从而形成可控的开孔或括约肌。在另一个实施方案中,所提供的垫片的厚度小于约 1mm、小于约 1.5mm、小于约 2mm、小于约 2.5mm、小于约 3mm、小于约 3.5mm、小于约 4mm、小于约 4.5mm 或小于约 5mm。

[0291] 在一个实施方案中,所述尿流改道或管道支架被成型为图 3 所示的构型。

[0292] 在另一个实施方案中,所述管状结构包括一个具有平滑边缘的第一末端和一个具有不均一或不平滑边缘的第二末端。所示不均一边缘可包括一个或多个紧固件,被设计为与受试者的外部区域相连接,例如以开孔至受试者体外的形式。在一个实施方案中,所述管状结构的第一和第二末端可为图 3 所示的形式。所示紧固件的数量可为 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个。

[0293] 在另一个实施方案中,所述管状支架具有如图 27 所示的形式。

[0294] 图 4A 显示了正常人类泌尿系统的一部分解剖结构。

[0295] 在一个实施方案中,所述管状结构的形式适于用作有需要的患者体内的尿流改道或管道。在另一个实施方案中,在另一个实施方案中,例如在输尿管切除术的情况下,所述管道使尿液从一条或多条输尿管改道至腹腔壁区域(图 4D)。在其他实施方案中,例如在膀胱切除术的情况下,所述管道使尿液从膀胱改道至腹腔壁区域(图 4B)。在另一个实施方案中,所述管道使膀胱和尿道相连接(图 4D)。在又一个实施方案中,可以用一个第一管道使尿液从一条或多条输尿管改道至腹腔壁区域,并使用一个第二管道使尿液从膀胱改道至腹腔壁区域。在所有实施方案中,所述管道可使尿液从一条或多条输尿管改道至腹腔壁区域(图 4B)。在所有实施方案中,所述管道均可被设计为形成开孔。

[0296] 在一个实施方案中,所述尿流改道或管道支架的管状结构的截面形状为矩形、圆形或三角形。在另一个实施方案中,所述管状结构保留足够的刚性,以在植入后保持畅通。在另一个实施方案中,通过或不通过在上述管状结构的腔中使用导管来保持其刚性。在一些实施方案中,尿流改道支架还包括被设计为在植入后置于所述管状结构的腔空间内的导管。在一个实施方案中,所述导管为类似 Foley 氏管的球囊导管。当使用导管时,可将其置于所述管状结构的腔空间内以提供额外的通透性。本领域普通技术人员能够知晓可适用于本发明的本领域中已知的其他导管。

[0297] 在另一个实施方案中,所述支架的管状壁厚度应为小于约 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。

[0298] 在一些实施方案中,所述支架可具有可变的外径和内径。在一个实施方案中,所述支架的末端可为喇叭口形、非喇叭口形、封口形或圆形。

[0299] 在其他实施方案中,所述支架可允许尿液透过。在一个实施方案中,所述支架的孔径大于约 0 微米至约 500 微米。在另一个实施方案中,所述孔径为约 100 微米至约 200 微米。在另一个实施方案中,所述孔径为约 150 微米至约 200 微米。在其他实施方案中,所述孔径为约 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,所述孔径为约 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,所述支架的孔径构型包括单孔径分布、多孔径分布或梯度孔径分布。

[0300] 在另一个实施方案中,所述支架材料可缝合的,并且可以与组织形成不渗漏的连接。

[0301] 在其他实施方案中,选择所述管状支架的材料,以保证在为在植入应用的过程中保持通畅、支持细胞贴附和与宿主组织一起生长并保持柔性。在另一个实施方案中,所述材料的爆裂强度应超过其在与体内的正常体液循环接触时所承受的压力。在其他实施方案中,所述材料应具有与宿主组织生长相适应的降解时间。

[0302] C. 肌肉等效物

[0303] 在一个方面,本发明的聚合物基质或支架为肌肉等效物支架。在一个实施方案中,肌肉等效物支架为逼尿肌肌肉等效物支架。在另一个实施方案中,所述支架适用于通过腹腔镜手术植入。

[0304] 在一个方面,聚合物基质包括其形状适合于至少一部分需要所述治疗的器官或组织结构和其大小是足够通过腹腔镜方法植入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约为 3 至 20cm 之间。在一个实施方案中,聚合物基质或支架的最大长度约 20cm。在另一个实施方案中,聚合物基质或支架的最大长度约 15cm。在另一个实施方案中,聚合物基质或支架的最大长度约 10cm。在另一个实施方案中,聚合物基质或支架的最大长度约 8cm。在另一个实施方案中,聚合物基质或支架的最大长度约 4cm。在又一个实施方案中,聚合物基质或支架的最大长度约 3cm。在某些实施方案中,本发明的聚合物基质或支架的宽度约为 1 至 8cm 之间。在一些实施方案中,聚合物基质或支架的最大宽度约 4cm。在其他实施方案中,聚合物基质或支架的最大宽度约 3cm。在另外的实施方式中,聚合物基质或支架的最大宽度约 5cm。

[0305] 在一个实施方案中,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,聚合物基质或支架具有扁平形状。在一个实施方案中,所述扁平形状的聚合物基质或支架包括预处理区域以允许更大的灵活性。在某些实施方案中,该预处理区域在将要褶皱的区域中具有涂层。在一个实施方案中,聚合物基质或支架具有足够的延展性以便进行卷曲、折叠或成型以用于通过腹腔镜管和 / 或端口进行植入。在这种实施方式中,聚合物基质或支架具有足够的延展性以便展开、铺开或恢复到穿过腹腔镜管和 / 或端口插入之后的形状。在一个实施方案中,聚合物基质或支架在通过腹腔镜管和 / 或端口植入之前被切割成 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带。在某些实施方案中,该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带在通

过腹腔镜管和 / 或端口植入之前彼此接合。该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带可通过胶水、订书钉、缝线或本领域普通技术人员熟知的其他技术方式接合在一起。在这种实施方式中, 该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带为折叠的和 / 或堆叠的以穿过腹腔镜管和 / 或端口。在这种实施方式中, 该 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个条带在穿过腹腔镜管和 / 或端口插入之后为展开的和 / 或铺开的。在一些实施方案中, 在正确地穿过腹腔镜管和 / 或端口插入之后, 先前放置的接合装置被收紧。

[0306] 在一个实施方案中, 聚合物基质包括一个第一可植入的、生物相容性、合成的或天然的聚合物基质或支架, 其具有补片或条带样式。在一个实施方案中, 该补片具有适合于用作患者所需的膀胱中逼尿肌肌肉等效物的样式。在另一个实施方案中, 该补片具有适合于用作患者所需的增大已有膀胱容积的样式。在某些实施方案中, 该补片将膀胱的大小增大了约 50mL 至约 500mL。在一些实施方案中, 该补片增大了膀胱大小 50mL。在一些实施方案中, 该补片增大了膀胱大小约 450mL。在一个实施方案中, 表面面积增大了 30cm^2 使得 200mL 的膀胱容积增大到 250mL。在另一个实施方案中, 表面面积增大了 25cm^2 使得 350mL 的膀胱容积增大到 400mL。在一个实施方案中, 所述支架具有约 30cm^2 的二维表面积。在另一个实施方案中, 所述支架具有约 25cm^2 的二维表面积。在一个实施方案中, 所述补片为条带、圆盘、方形、椭圆或其他任意合适的样式。在其他实施方案中, 所述补片具有预折叠的样式, 例如风琴状。

[0307] 图 5A-B 示出了肌肉等效物支架或聚合物基质的示例。在一个实施方案中, 聚合物基质或支架为双楔形状, 例如图 5A 所示的形状。在另一个实施方案中, 聚合物基质成型为图 6-9 所示出的其中一种结构。

[0308] 在所有实施方案中, 聚合物基质或支架成型为以使得膀胱和基质或支架上的应变最小化。

[0309] 在另一个实施方案中, 聚合物基质包括一个第一可植入的、生物相容性、合成的或天然的聚合物基质或支架, 其具有补片或条带样式。在一个实施方案中, 该补片具有适合于用作患者所需的膀胱中逼尿肌肌肉等效物的样式。在另一个实施方案中, 该补片具有适合于用作患者所需的增大已有膀胱容积的样式。在一些实施方案中, 该补片增大了膀胱大小 50mL。在一个实施方案中, 所述补片为条带、圆盘、方形、椭圆或其他任意合适的样式。在其他实施方案中, 所述补片具有预折叠的样式, 例如风琴状。

[0310] 在一个实施方案中, 聚合物基质成型为图 1-9 或 27 所示出的其中一种结构。

[0311] 在所有实施方案中, 所述用于这些基质或支架生物相容性材料例如是可生物降解的。在全部这些实施方案中, 所述生物相容性材料可为聚乙醇酸。

[0312] 在所有实施方案中, 聚合物基质或支架涂覆有生物相容性和可生物降解的形凝材料。在一个实施方案中, 所述形凝材料可以包括液化共聚物。在另一个实施方案中, 所述液化共聚物可以包括液化乳酸 / 乙醇酸共聚物。在一个实施方案中, 所述液化共聚物可包括聚-DL-丙交酯-共-乙交酯。

[0313] 5. 构建体

[0314] 在一个方面, 本发明提供一种或多种至少接种了一种细胞群的聚合物支架或基质。这些支架已经接种了一种细胞群, 在本文中可被称为“构建体”。在一个实施方案中, 该细胞接种的聚合物基质或基质形成新的膀胱构建体, 该新膀胱构建体选自膀胱替代构建

体、膀胱扩张构建体、膀胱管道构建体和逼尿肌肌肉等效物构建体。

[0315] 本领域技术人员能够知晓本文描述的一种或多种细胞群的接种或沉积可以通过现有技术中各种已知的方法来实现。例如,生物反应器孵化和培养(美国公布的 Bertram 等人的专利申请 20070276507 ;McAllister 等人的美国专利 7,112,218 ;Auger 等人的美国专利 5,618,71 ;Niklason 等人的美国专利 6,537,567)、压力引诱接种 (Torigoe et al. (2007)Cell Transplant., 16(7):729-39 ;Wang et al. (2006)Biomaterials. May ; 27(13):2738-46) 和静电接种 (Bowlin 等人的美国专利 5,723,324) 可以使用。此外,最新的同时在电纺纤维外上细胞气溶胶衣的技术对接种或者沉积来说也可以是合适的 (Stankus et al. (2007)Biomaterials, 28:2738-2746)。

[0316] 在一个实施方案中,细胞的沉积包括将支架和增强细胞附着的蛋白质接触的步骤。在另一个实施方案中,该增强蛋白为纤维连接蛋白、胶原质和 MATRIGEL™ 的一种或多种。在另一个实施方案中,该支架不包含增强细胞附着的蛋白质。在另一个实施方案中,细胞的沉积包括在将支架与细胞群接触后的培养步骤。在又一个实施方案中,该培养可能包括一个生物反应器中脉动的和 / 或稳定的流动。

[0317] 从本文描述的脂肪或外周血分离的平滑肌细胞群可以在本文所述的支架上接种。

[0318] 以下为在支架上接种细胞的方法的代表性实例。脂肪的或外周血来源的平滑肌细胞可以扩增最长达 7 周,以产生在支架上接种所需的细胞数量。适于在支架上接种的细胞的密度如下所述。脂肪来源的平滑肌细胞可在细胞收获前扩增 2 代,以在支架上接种产生构建体。外周血来源的平滑肌细胞为在支架上接种的培养可在收获之前扩增 3-4 代。为提供细胞接种的支架,合适的材料(例如 PGA 毛毡)可以切成一定大小,缝合成合适的形状,并涂覆材料(例如 PLGA)。该支架然后可以用合适的方法灭菌(例如环氧乙烷)。在细胞接种的前一天,该灭菌的支架可以通过 60% 乙醇 / 40% D-PBS、100% D-PBS、D-MEM / 10% FBS 或 α -MEM / 10% FBS 预湿而饱和,接着室温下在 D-MEM / 10% FBS 或 α -MEM / 10% FBS 里培养过夜。支架可以接种脂肪来源的或外周血来源的平滑肌细胞,在湿润的、37°C 含 5% 的 CO₂ 的培养器中使构建体成熟,直至植入受试者体内(例如 7 天)。本领域普通技术人员能够知晓为制备用于细胞接种的支架和在支架上接种细胞的其他方法。

[0319] 在一个方面,本发明提供了在减少的时间框架下制备构建体的方法,这对等待植入构建体的所述受试者有益。据报道,来源于 SVF 的未分化的脂肪干细胞在分化成平滑肌细胞之前必须在诱导培养基中培养 6 星期 (Jack et al. 2009, 见上文)。在一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:a) 获得人类脂肪组织样本;b) 从样本中分离完全分化的平滑肌细胞群;c) 培养所述细胞群;和 d) 将所述细胞群与聚合物基质细胞构建体接触,其中步骤 a)、b)、c) 和 d) 需要实施约 45 天或少于 45 天的时间。在另一个实施方案中,该分离步骤是在没有细胞筛选的情况下实施的。在另一个实施方案中,该分离步骤 b) 是在完成步骤 a) 后实施约 72 小时或少于 72 小时的时间。在又一个实施方案中,所述培养步骤 c) 实施约 4 周或少于 4 周的时间。在其他实施方案中,该接触步骤 d) 实施约 10 天或少于 10 天的时间。在另一个实施方案中,步骤 a)、b)、c) 和 d) 实施 28 天或少于 28 天的时间。在另一个实施方案中,该分离步骤 b) 在完成 a) 步骤后实施约 48 小时或少于 48 小时的时间。在一个实施方案中,所述培养步骤 c) 实施约 2 周或少于 2 周的时间。在另一个实施方案中,该接触步骤 d) 实施约 5 天或少于 5 天的时间。在所有实施方案中,该人类脂肪组织样本均

从自体来源获得。在另一个实施方案中,所述方法还包括检测平滑肌细胞标记物的表达的步骤。在另一个实施方案中,所述表达为 mRNA 表达。在另外一个实施方案中,所述表达为多肽表达。在一个实施方案中,该多肽表达由细胞内免疫荧光检测。

[0320] 在一个实施方案中,该支架包括本文所述的细胞群。在另一个实施方案中,该支架基本上由本文所述的细胞群构成。在另一个实施方案中,该支架由本文所述的细胞群组成。

[0321] 所述第一聚合物基质或第二聚合物基质,如果有的话,或两者都有,包含至少一种细胞群,该细胞群沉积在所述第一聚合物基质的一个第一表面、所述第二聚合物基质的一个第一表面的表面上或表面中,或两者都有,以形成基质或支架加细胞的构建体,其中至少一种细胞群基本上包括一个肌细胞群。该肌细胞群例如为平滑肌细胞群。在一个优选实施方案中,所述第一表面和所述第二表面为所述第一和第二聚合物基质的每个外部表面。

[0322] 在另一个实施方案中,所述包含基质和细胞的构建体不含任何其他细胞群。在一个优选实施方案中,所述构建体不含有尿道上皮细胞。

[0323] 这些构建体是用于向有需要的受试者提供腔体器官或组织结构,如泌尿生殖器官,包括例如膀胱、输尿管和尿道。所述受试者可能需要重建、修复、扩张或替换这些器官或组织。在一个实施方案中,该腔体器官或组织结构为膀胱或其部分,该聚合物基质或支架在该基质表面沉积有平滑肌细胞。该构建体也可能用于提供尿流改道或管道、或逼尿肌肌肉等效物。

[0324] 在一个方面,本发明提供尿流改道或管道支架或接种本文所述的细胞群的基质。该支架已接种细胞群,在本文中可被称为“构建体”。在一个实施方案中,该尿流改道或膀胱管道构建体由本文所述的一种或多种支架和沉积于本文所述的一种或多种支架的一个或多个表面上的细胞群组成。

[0325] 在一个方面,本发明提供了肌肉等效物构建体,其可用于为有需要的受试者增强已有的腔体器官或组织结构如泌尿生殖器官,包括例如膀胱。所述受试者可能会需要这些器官或组织的扩张或治疗。在一个实施方案中,该腔体器官或组织结构为膀胱或其部分,该聚合物基质或支架在基质表面沉积有平滑肌细胞。在一个实施方案中,该构建体用于提供逼尿肌肌肉等效物。

[0326] 本领域普通技术人员能够知晓在基质或支架上沉积细胞群有数种合适的方法。

[0327] 在一个方面,构建体适合于植入需要新器官或组织结构的受试者体内。在一个实施方案中,所述构建体包括产生细胞因子 MCP-1 的细胞群。在另一个实施方案中,该 MCP-1 引起受试者或受体的天然间充质干细胞向植入位置迁移。在一个实施方案中,所述受体的迁移的天然间充质干细胞帮助新器官或组织结构的再生。

[0328] 在另一方面,本发明提供特定密度的细胞接种的支架。在一个实施方案中,一个支架由细胞密度约 20×10^6 至约 30×10^6 个细胞的平滑肌细胞群接种。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 个细胞。

[0329] 在另外一个实施方案中,该密度为约 20×10^6 至约 98×10^6 个细胞。在再另一个实施方案中,该密度为约 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

75×10⁶、约 40×10⁶ 至约 70×10⁶、约 45×10⁶ 至约 65×10⁶，或约 50×10⁶ 至约 60×10⁶ 个细胞。在一个优选实施方案中，该密度为约 24×10⁶ 至约 91×10⁶ 个细胞。

[0330] 在另一个实施方案中，该密度为约 2.5×10⁶ 至约 40×10⁶、约 5×10⁶ 至约 40×10⁶、约 7.5×10⁶ 至约 35×10⁶、约 10×10⁶ 至约 30×10⁶、约 15×10⁶ 至约 25×10⁶ 和约 17.5×10⁶ 至约 22.5×10⁶ 个细胞。在另一个实施方案中，该细胞密度为约 1×10⁶、约 2×10⁶、约 3×10⁶、约 4×10⁶、约 5×10⁶、约 6×10⁶、约 7×10⁶、约 8×10⁶、约 9×10⁶、约 10×10⁶、约 11×10⁶、约 12×10⁶、约 13×10⁶、约 14×10⁶、约 15×10⁶、约 16×10⁶、约 17×10⁶、约 18×10⁶、约 19×10⁶、约 20×10⁶、约 21×10⁶、约 22×10⁶、约 23×10⁶、约 24×10⁶、约 25×10⁶、约 26×10⁶、约 27×10⁶、约 28×10⁶、约 29×10⁶、约 30×10⁶、约 31×10⁶、约 32×10⁶、约 33×10⁶、约 34×10⁶、约 35×10⁶、约 36×10⁶、约 37×10⁶、约 38×10⁶、约 39×10⁶、约 40×10⁶、约 41×10⁶、约 42×10⁶、约 43×10⁶、约 44×10⁶、约 45×10⁶、约 46×10⁶、约 47×10⁶、约 48×10⁶、约 49×10⁶、约 50×10⁶、约 51×10⁶、约 52×10⁶、约 53×10⁶、约 54×10⁶、约 55×10⁶、约 56×10⁶、约 57×10⁶、约 58×10⁶、约 59×10⁶、约 60×10⁶、约 61×10⁶、约 62×10⁶、约 63×10⁶、约 64×10⁶、约 65×10⁶、约 66×10⁶、约 67×10⁶、约 68×10⁶、约 69×10⁶、约 70×10⁶、约 71×10⁶、约 72×10⁶、约 73×10⁶、约 74×10⁶、约 75×10⁶、约 76×10⁶、约 77×10⁶、约 78×10⁶、约 79×10⁶、约 80×10⁶、约 81×10⁶、约 82×10⁶、约 83×10⁶、约 84×10⁶、约 85×10⁶、约 86×10⁶、约 87×10⁶、约 88×10⁶、约 89×10⁶、约 90×10⁶、约 91×10⁶、约 92×10⁶、约 93×10⁶、约 94×10⁶、约 95×10⁶、约 96×10⁶、约 97×10⁶、约 98×10⁶ 或约 99×10⁶ 个细胞。

[0331] 在又另一方面，本发明提供接种细胞的支架，该细胞在一支架的每 cm² 有特定的细胞密度。在一个实施方案中，该密度为约 3,000 细胞 /cm² 至约 15,000 细胞 /cm²、约 3,500 细胞 /cm² 至约 14,500 细胞 /cm²、约 4,000 细胞 /cm² 至约 14,000 细胞 /cm²、约 4,500 细胞 /cm² 至约 13,500 细胞 /cm²、约 5,000 细胞 /cm² 至约 13,000 细胞 /cm²、约 4,500 细胞 /cm² 至约 13,500 细胞 /cm²、约 5,000 细胞 /cm² 至约 13,000 细胞 /cm²、约 5,500 细胞 /cm² 至约 12,500 细胞 /cm²、约 6,000 细胞 /cm² 至约 12,000 细胞 /cm²、约 6,500 细胞 /cm² 至约 11,500 细胞 /cm²、约 7,000 细胞 /cm² 至约 11,000 细胞 /cm²、约 7,500 细胞 /cm² 至约 10,500 细胞 /cm²、约 8,000 细胞 /cm² 至约 10,000 细胞 /cm²、约 7,500 细胞 /cm² 至约 9,500 细胞 /cm²，或约 8,000 细胞 /cm² 至约 9,000 细胞 /cm²。在一个优选实施方案中，该密度为约 3,000 细胞 /cm² 至约 7,000 细胞 /cm²，或约 9,000 细胞 /cm² 至约 15,000 细胞 /cm²。

[0332] 在一个方面，本发明的构建体适于在植入后为所述受试者提供特定的特征。在一个实施方案中，该构建体适于在植入后为所述受试者提供再生。在另一个实施方案中，该构建体适于促进受试者在植入位置的再生。例如，在植入之后，再生的组织可以在植入位置从所述构建体自身中形成。在另一个实施方案中，所述构建体可以在植入之后赋予所述受试者功能性的特征。例如，尿流改道构建体可适于赋予受试者的尿液从一个第一输尿管（例如第一侧部开孔）到管状支架的内部通路，和 / 或适于在受试者外部提供临时性尿液储存和通路（例如管状支架）。在一个实施方案中，尿流改道构建体可适于在植入后提供上皮化的粘膜。在另一个实施方案中，构建体可适于提供受试者体内的新器官或组织结构的稳态调节的发育。

[0333] 6. 使用方法

[0334] 在一个方面，本发明考虑了为需要这类治疗的受试者提供层状结构的腔体器官或

组织结构的方法。在一个实施方案中,该受试者可能需要重建、修复、扩张、或替换器官或组织。在一个实施方案中,所述方法包括提供生物相容性的合成的或天然的聚合物基质的步骤,这些基质成形,以根据器官或组织的需要符合至少器官或组织的部分。该提供步骤之后,可以沉积本文所述的至少一种非来源于需重建、修复、扩张或替换的所述受试者的该器官的组织结构的细胞群。该沉积步骤可以包括在聚合物基质上培养所述细胞群。在基质上沉积所述细胞群以提供构建体之后,可以将其植入患者体内的治疗位置以形成所需的层状结构的腔体器官或组织结构。在一个实施方案中,该层状结构的腔体器官或组织结构为膀胱或膀胱的一部分。

[0335] 在另一方面,本发明提供了为有需要的受试者提供层状结构的腔体器官或组织结构的方法。在一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:a) 提供生物相容性的合成的或天然的聚合物基质,该基质的形状符合需要所述治疗的该器官或组织结构的至少一部分;b) 在聚合物基质的第一区域上或其中沉积并非来源于与新器官或组织结构相应的天然器官或组织的自体细胞群;和 c) 将所述成型的聚合物基质细胞构建体植入所述受试者,以形成层状结构的腔体器官或组织结构。在另一方面,本发明提供了向有需要的受试者提供新的膀胱或其部分的方法。在一个实施方案中,所述方法包括 a) 提供生物相容性的合成的或天然的聚合物基质,该基质的形状符合膀胱或其部分;b) 在聚合物基质的第一区域上或其中沉积并非来源于受试者膀胱的自体细胞群;和 c) 将所述成型的聚合物基质细胞构建体植入所述受试者以形成新的膀胱或其部分。在另一个实施方案中,本文所述方法的所述步骤 b) 的细胞群中包含一种或多种外周血来源的平滑肌细胞,它们对平滑肌细胞标记物呈阳性并具有收缩功能,或步骤 b) 所述细胞群包含一种或多种脂肪组织来源的平滑肌细胞,它们对平滑肌细胞标记物呈阳性并具有收缩功能。在另一个实施方案中,所述细胞群的收缩功能是钙依赖性的。

[0336] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括用受试者的网膜、肠系膜、肌肉筋膜、和/或腹膜包裹管道构建体以使其血管化的步骤。

[0337] 在另一方面,本发明提供了为有需要的受试者的有缺陷的膀胱提供尿流改道或管道的方法。在一个实施方案中,所述给有需要的受试者提供尿流改道的方法包括下述步骤:(a) 提供生物相容性管道支架;b) 在所述支架的第一区域上或其中沉积第一细胞群,所述第一细胞群实质上为肌肉细胞群;和(c) 将步骤(b)的支架植入所述受试者以形成允许尿液流出所述受试者体外的管道。在另一个实施方案中,该生物相容性材料为可生物降解的。在其他实施方案中,该生物相容性材料为聚乙醇酸。在又一个实施方案中,所述第一细胞群实质上为平滑肌细胞群。

[0338] 在一个实施方案中,所述方法包括提供本文所述的尿流改道或管道支架的方法。在其它另一个实施方案中,该尿流改道或管道支架以多部分的形式提供,如第一个支架、第二个支架和第三个本文所述的支架。在另一个实施方案中,所述方法还包括沉积并非来源于该有缺陷的膀胱的细胞群以形成尿流改道或管道构建体的步骤。在另一个实施方案中,该沉积步骤可以包括在所述支架上培养所述细胞群。在一些实施方案中,所述方法还包括将尿流改道构建体植入有需要的患者的步骤。在另一个实施方案中,该植入是在有缺陷的膀胱的位置。

[0339] 在一个实施方案中,所述构建体的开口末端(例如,一个被设计为与腹腔壁相连

接的第一末端) 汇聚于贯穿腹部或耻骨弓壁的皮肤(造瘘术), 以形成开孔或括约肌。在另一个实施方案中, 将导管穿过开放的开孔插入所述构建体的空腔, 以提供尿液外流。

[0340] 图 10 显示了植入管道构建体的结构。

[0341] 在另一个实施方案中, 本发明的方法还包括监测在尿流改道构建体植入后的堵塞的步骤。所述堵塞可以是碎屑堆积引起的。如果检测到堵塞, 所述方法还可以包括从管道腔内清除碎屑的步骤。

[0342] 在一个方面, 本发明临时性地为有需要的受试者提供尿流改道。在一个实施方案中, 临时性尿流改道或管道构建体被植入受试者以形成一个开放的开孔, 导管或其它设备被临时性地穿过开孔插入至管道构建体内的内腔。在想要寻求有缺陷的膀胱的永久性解决方案时, 临时性管道提供了允许尿液从所述受试者排出的优势。例如, 所述管道构建体的植入可以在接种细胞群的新膀胱植入之前、之后或同时实施(参见例如 Bertram et al, 见上文)。图 11 显示了一个临时性尿流改道构建体的植入组件的实例。

[0343] 在一个实施方案中, 本发明的方法还包括用受试者的网膜、肠系膜、肌肉筋膜和/或腹膜包裹尿流改道或管道构建体以使其血管化的步骤。

[0344] 在一个方面, 本发明永久性地为有需要的受试者提供尿流改道。图 12 显示了永久性尿流改道构建体的植入组件的实例。

[0345] 在一个实施方案中, 本文所述的构建体可以用于前列腺尿道替换和尿流改道。这些步骤对于需要前列腺根除术来切除前列腺尿道的受试者来说是必须的。其他实施方案中, 该构建体可以用于经皮肤的改道管道, 以形成带有类阀门扭结的可控管道。在另一个实施方案中, 该构建体可用作膀胱颈手术中的膀胱颈吊索和包覆材料以及带有可控通道的尿液排出口或可导尿开口。这些实施方案的实例如图 13 所示。

[0346] 在一个方面, 本发明的尿流改道构建体提供上皮化的粘膜。在一个实施方案中, 所述构建体适于在植入上形成上皮化粘膜。在一个实施方案中, 上皮化粘膜包括前庭部分和粘膜皮肤部分。在另一个实施方案中, 前庭部分邻近于粘膜皮肤部分。在另一个实施方案中, 粘膜皮肤部分位于所述连接到受试者的腹腔壁和皮肤的构建体的开孔末端。通常, 天然存在的粘膜皮肤部分以存在粘膜和皮肤外皮为特征, 并且典型地存在于邻近于身体的外部皮肤末端和覆盖身体内部的粘膜开始的开口。所述由本发明的方法和构建体提供的上皮化粘膜在植入受试者体内后在该尿流改道构建体的所述第一末端发育。在另外一个实施方案中, 所述上皮化粘膜的特征是存在上皮细胞, 其首先出现在前庭部分并逐渐扩张或从粘膜皮肤部分向所述构建体的开口部繁殖。在另一个实施方案中, 上皮细胞的特征为上皮细胞标记物的表达。在另外一个实施方案中, 上皮细胞标记物为细胞角蛋白。所述细胞角蛋白可以是现有技术已知的角蛋白的一种或多种, 包括但不限于细胞角蛋白 1 至 19。在另一个实施方案中, 该角蛋白可以用 AE-1/AE3 抗体检测出。

[0347] 向待被扩张的器官或组织中植入支架可以根据实施例中所描述的方法或根据现有技术已知的方法来实现。通过把植入材料缝合于目标器官, 可以将该基质或支架植入到所述受试者的器官或组织。

[0348] 所述技术可以用于在需要此类治疗的患者体内, 以使已有的层状结构的腔体器官或组织结构扩张。例如, 已有的层状结构的腔体器官或组织结构可以通过下述步骤被扩张: 提供聚合物基质或支架, 该基质或支架的形状符合需要所述治疗的器官或组织的至少一部

分,并且其大小足以通过腹腔镜方法被植入;在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中沉积非来源于该器官或组织结构的自体细胞群;以及,通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入所述患者体内的所述治疗位置,从而使得已有的层状结构的腔体器官或组织结构被扩张。

[0349] 图 7e 显示了用于植入本文所述的肌肉等效物支架的可能的手术方法。图 7f 显示了在空的和充盈的膀胱上的植入位置。图 7g 显示了带有手术切口的膀胱模型,显示了在表面切片上产生的椭圆体。塑料管可用作有限可用空间的模型,以穿过本发明折叠的或卷曲的聚合物基质或支架。

[0350] 所述技术也可以用于增加需要该治疗的患者的膀胱容积。例如,膀胱容积可以通过下述步骤而得到增加:提供生物相容性的合成的或天然的聚合物基质,该基质或支架的形状符合需要所述治疗的器官或组织的至少一部分,并且其大小足以通过腹腔镜方法被植入;在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中沉积非来源于该器官或组织结构的自体细胞群;以及,通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入所述患者体内的所述治疗位置,从而使得膀胱容积增加。在一个实施方案中,本发明的所述基质或支架适合于增加膀胱容积约 50mL。在其他实施方案中,本发明的所述基质或支架适合于增加膀胱容积约 100mL。在其他实施方案中,本发明的基质或支架适合于增加膀胱容积约 60、约 70、约 80 或约 90mL。

[0351] 所述技术可以更进一步用于扩张需要该治疗的患者的膀胱切口位置。例如,膀胱切口位置可以通过下述步骤而被扩张:提供生物相容性的合成的或天然的聚合物基质,该基质或支架的形状符合需要所述治疗的器官或组织的至少一部分,并且其大小足以通过腹腔镜方法被植入;在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中沉积非来源于该器官或组织结构的自体细胞群;以及,通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入所述患者体内的所述治疗位置,从而使得膀胱切口位置被扩张。

[0352] 本发明的另一个非限制性应用包括对相应治疗有需求的患者的尿失禁的治疗方法。例如,尿失禁可以通过下述步骤得到治疗:提供生物相容性的合成的或天然的聚合物基质,该基质或支架的形状符合需要所述治疗的器官或组织的至少一部分,并且其大小足以通过腹腔镜方法被植入;在所述聚合物基质的一个第一区域上或其中沉积非来源于该器官或组织结构的自体细胞群;以及,通过腹腔镜方法将所述成形的聚合物基质构建体植入所述患者体内的所述治疗位置,从而使得膀胱容积增加。

[0353] 在一个实施方案中,本文所述的支架、细胞群和方法还可被用于制备治疗本文所述的障碍的药物。所述障碍包括需要再生、重建、修复、扩张或替换层状结构的体腔器官或组织结构的受试者的任何病症。在另一个实施方案中,所述器官或组织结构为膀胱或膀胱的部分。

[0354] 在另一个实施方案中,沉积在植入的构建体上的细胞产生 MCP-1 并在植入位置释放,它会刺激天然间充质干细胞 (MSC) 向植入位置迁移。在另一个实施方案中,所述天然 MSC 促进和 / 或加强植入构建体在植入位置的再生。

[0355] 在一个实施方案中,如本文所述,沉积的细胞群来源于外周血或脂肪组织平滑肌细胞 (SMC) 群。在另一个实施方案中,所述 SMC 细胞群包括至少一种有收缩功能并对平滑肌细胞标记物呈阳性的细胞,所述平滑肌细胞标记物例如心肌蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、钙

结合蛋白、肌球蛋白重链、BAALC、结蛋白、成肌纤维细胞抗原、SM22,以及它们的任意组合。在其他实施方案中,所述 SMC 细胞群包括至少一种表现心肌蛋白(MYOCD)表达的细胞。该 MYOCD 表达可以为 MYOCD 多肽或编码 MYOCD 多肽的核酸的表达。在另一个实施方案中,所述 SMC 的收缩功能是钙依赖性的。在一个实施方案中,需要重建、修复、扩张或替换的受试者所需的所述该层状结构的腔体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,所述聚合物基质不含有尿道上皮细胞。

[0356] 在所有实施方案中,本发明的方法利用植入一种支架,该支架以接种有本文所述的细胞群的膀胱替换支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架或逼尿肌肌肉等效物支架为基础。

[0357] 在另一个实施方案中,本文所述的层状结构的体腔器官或组织结构的再生、重建、修复、扩张或替换的方法包括以下步骤:a) 提供生物相容性的合成的或天然的聚合物基质,该基质的形状符合需要所述治疗的腔体器官或组织结构的至少一部分;b) 在所述聚合物基质的第一区域上或其中以本文所述的细胞密度沉积一个第一细胞群,所述细胞群实质上为肌肉细胞群;和 c) 将所述成形的聚合物基质细胞构建体植入所述患者的所述治疗位置,以形成层状结构的腔体器官或组织结构。在另一个实施方案中,在体内形成的所述层状结构的腔体器官或组织结构具有天然膀胱组织的顺应性。

[0358] 在另一方面,本发明提供了在植入有此需要的受试者后、基于生物力学刺激或循环而再生新的膀胱的方法。在一个方面,所述方法适用于促进已经为膀胱或其一部分的扩张或替换而植入的新的膀胱构建体的再生。在一个实施方案中,所述新的膀胱构建体由接种在新的膀胱基质或支架上的细胞形成。在另一个实施方案中,所述新的膀胱支架是膀胱替换支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架或逼尿肌肌肉等效物支架。

[0359] 在一个方面,本发明的所述方法可用于由接种在新的膀胱支架上的至少一种细胞群形成的植入的新的膀胱构建体。在一个实施方案中,所述细胞接种聚合物基质(或基质)为膀胱替换支架、膀胱扩张支架、膀胱管道支架或逼尿肌肌肉等效物支架。在一个实施方案中,所述至少一种细胞群实质上包括肌肉细胞群。在另一个实施方案中,所述肌肉细胞群可为平滑肌细胞群。如本文所述,可用使用不同的细胞接种密度。

[0360] 在一个方面,在新的膀胱植入后以不同的次数和不同的持续时间来实施本发明的方法。在一个实施方案中,该循环在一段时间内以日为基准,在一段时间以周为基准或者每隔一周实施。在另一个实施方案中,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 周或多于 14 周。

[0361] 在一个实施方案中,受试者的每日循环方法可以包括下述步骤:用约 1 小时填充该新的膀胱,用约 1 小时将该充满的新的膀胱排水,和通常允许新的膀胱自由排水过夜。该方法可以在受试者的每日循环方案的第一天实施。这种每日循环的操作可用在第一天之后连续实施几天。在一个实施方案中,该循环方案可以在第一天之后的某天实施,在这段时间内,该填充的步骤可以增加至约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时或比 4 小时更多。在另一个实施方案中,在允许新的膀胱自由排水之前,所述填充和排水的时间可以在一天之内重复多于一次。

[0362] 在另一个实施方案中,所述受试者在植入后再植入导管,该循环时间由夹住或者松开受试者的导管来进行控制。

[0363] 本领域普通技术人员能够理解,本文也考虑了其他的循环方案。

[0364] 一个循环方案的实例如下所述。在如本文所述地将由接种在新的膀胱基质或支架上的细胞而形成的新的膀胱构建体植入后,循环将会在每 2 周 (14 ± 2 天的间隔) 实施,从植入后的 1 个月后开始持续到约第 90 日。循环将在某些类型的评估(例如植入的新膀胱顺应性测量)之后但是在其它类型评估(例如荧光成像)之前完成。在顺应性测量完成后,可通过用消毒盐水以 10-25mL/min 的速率再充盈膀胱(通过保温箱预热)的方式实施循环。该循环将至少重复 5-10 次。刚开始将会达到 0-10 毫米贡柱的压力,并且从开始时就进行记录。针对每个循环在每个在导管周围观察到的时间逝去点(leakage)(又名逝去点),或者在输入的量与刚实施的顺应性测量相等的时候(以两者最先发生的时间为准),记录时间、输入的等渗溶液的体积和产生的压力。

[0365] 在一个实施方案中,本发明提供了促进植入受试者体内的新的膀胱再生的方法,所述方法包括下述步骤:(a) 用液体填充植入的新的膀胱;(b) 排空步骤(a)中填充的新的膀胱。在另一个实施方案中,所述方法包括步骤(c) 重复步骤(a)和(b)。在另一个实施方案中,所述方法在植入后两周内开始。在一个实施方案中,所述步骤(a)和(b)每天进行一次、每周进行一次或每两周进行一次。在其他一些实施方案中,所述填充步骤(a)进行约 1 小时,所述排空步骤(b)进行约一小时。在又另一个实施方案中,步骤(a)和(b)一直持续进行至植入后至少六周。在另一个实施方案中,步骤(a)和(b)一直持续进行至植入后不超过十周。在另一个实施方案中,步骤(a)和(b)一直持续进行至植入后超过十周。在其他实施方案中,所述填充步骤包括扩张所述新的膀胱。在另一个实施方案中,所述再生包括使受试者体内的新的膀胱的容量相对于未经过循环的新的膀胱而言有所增加。在另一个实施方案中,所述再生包括使受试者体内的新的膀胱的顺应性相对于未经过循环的新的膀胱而言有所增加。在其他实施方案中,所述再生包括使受试者体内的新的膀胱的细胞外基质发育相对于未经过循环的新的膀胱而言有所增加。在一个实施方案中,细胞外基质发育的增加包括弹性蛋白纤维的发育。

[0366] 在另一方面,本发明涉及为哺乳动物提供新的膀胱的稳态调节发育、从而使得植入的新的膀胱能够适应受体的需要的方法。在一个实施方案中,植入的新的膀胱生长至与所述受体成比例的大小。在另一个实施方案中,所述为受试者提供新的膀胱的稳态调节发育的方法包括下述步骤:(a) 提供生物相容性聚合物支架;(b) 在所述支架的一个第一区域上或其中沉积一个第一细胞群,所述第一细胞群实质上为肌肉细胞群;和(c) 将步骤(b)的支架植入所述受试者体内,以建立稳态调节发育。在另一个实施方案中,所述稳态调节发育包括器官大小和结构的重建。在另一个实施方案中,所述稳态调节发育包括与体重成比例的新的膀胱容量。在一个实施方案中,在植入后约四个月获得成比例的新的膀胱容量。在另一个实施方案中,所述为受试者提供新的膀胱的稳态调节发育的方法包括监测稳态调节发育的阶段或植入的新的膀胱的进展。所述监测可包括膀胱造影过程以显示植入的新的膀胱的位置和形状,和/或测量尿动力顺应性和容量。

[0367] 在另一方面,本发明提供了在患者体内植入新的器官或组织结构后对患者的预后进行评估的方法。在一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:检测获自所述受试者的测试样本中的 MCP-1 表达水平;(b) 确定测试样本中的 MCP-1 表达水平相对于对照样本(或对照参照值)的水平;和(c) 基于 MCP-1 表达水平的测定来预测所述患者的再生性预后,其中

如果测试样本中的 MCP-1 表达水平高于对照样本（或对照参照值）即为对所述受试者再生的预后。

[0368] 在另一方面，本发明提供了在患者体内植入新的器官或组织结构后对患者的预后进行评估的方法，所述方法包括：(a) 获得患者的生物学样本；和 (b) 监测所述生物学样本中的 MCP-1 表达，其中 MCP-1 的表达即为对患者的再生预后。在一些实施方案中，患者生物学样本中的 MCP-1 表达比对照样本（或对照参照值）高即为受试者的再生预后。在一些实施方案中，患者生物学样本中的 MCP-1 表达比对照样本（或对照参照值）低即为受试者的未再生预后。所述患者样本可为测试样本，包括体液例如血液或尿液。

[0369] 在一些实施方案中，所述测定步骤包括使用有合适的处理器执行的软件程序，并实现下述目的 (i) 测量测试样本和对照样本中的差异的 MCP-1 表达水平；和 / 或 (ii) 对测量测试样本和对照样本中的差异的 MCP-1 表达水平所得的数据进行分析。合适的软件和处理程序都是本领域公知的，并且可以商购获得。所述程序可被固化在软件中并存储与可读介质上，所述介质例如 CD-ROM、软盘、硬盘、DVD 或与处理器相关的内存，但是本领域技术人员容易理解的是，整个程序或其部分都可以以公知的方式在处理器以外的装置中运行和 / 或固化在固件中和 / 或专用硬件模块中。

[0370] 例如，在测定步骤之后，测量结果、发现、诊断、预测和 / 或治疗建议通常被记录并传送到技术员、医生和 / 或患者。在某些实施方案中，将使用计算机来将这类信息传送给相关人员，例如患者和 / 或主治医生。在一些实施方案中，可以进行测定或将所述结果或诊断传送到另一个国家或地区来进行分析。

[0371] 在一个优选实施方案中，以对具有差异水平的 MCP-1 表达的受试者测得的 MCP-1 表达水平为基础，在测定完成和预后 / 预测产生以后将得到的预后、预测和 / 或治疗建议尽快与受试者沟通。可以通过受试者的主治医生与所述受试者进行所述结果和 / 或相关信息的沟通。或者，可以通过任何沟通手段直接与测试受试者进行结果的沟通，所述手段包括书写和电子沟通形式，例如电话或电子邮件的沟通。在使用电子邮件沟通的情况下，使用计算机可以促进沟通。在某些实施方案中，可以使用本领域技术人员熟知的计算机硬件和软件的组合，自动地产生和传送基于测试的含有预后测试结果和 / 或所得结论和 / 或治疗建议的沟通信息。美国专利 No. 6, 283, 761 记载了健康护理定位沟通系统的一个实例；但是本发明并不限于使用这种特定沟通系统的方法。在本发明方法的某些实施方案中，所述方法的全部或部分步骤，包括样本的测定、预后和 / 或再生的预测、以及测定结果或预后的沟通，都可以在另外的环境（例如外部环境）中进行。

[0372] 在另一方面，本文所述的预后方法为评估植入的成功程度以及再生的康复 / 治疗方法提供了有用的信息。在一个实施方案中，所述方法包括下述步骤：检测获自所述受试者的测试样本中的 MCP-1 表达水平；(b) 确定测试样本中的 MCP-1 表达水平相对于对照样本（或对照参照值）的水平；和 (c) 基于 MCP-1 表达水平的测定来预测所述患者的再生性预后，其中如果测试样本中的 MCP-1 表达水平高于对照样本（或对照参照值）则表明新的器官或组织结构出于再生阶段。

[0373] 总体而言，本文所使用的术语“再生预后”包括对下述任意一种或多种情况的预报和预测：通过植入本文所述的构建体进行膀胱替换或扩张后功能性膀胱的发展和改善；在植入本文所述的构建体后功能性尿流改道的发展；在植入本文所述的构建体后膀胱容量的

发展或改进的膀胱容量 ; 或者在植入本文所述的构建体后膀胱顺应性的发展或改进的膀胱顺应性。

[0374] 在所有实施方案中, 为需要本文所述的治疗的患者提供层状结构的腔体器官或组织结构的方法可包括在植入后如本文所述地评估再生的步骤。

[0375] 在所有实施方案中, 本发明涉及为有需要的受试者提供新的器官或组织结构的方法, 所述方法包括某些植入后的监测步骤。在一个实施方案中, 监测植入的构建体的效果和表现, 例如在植入后的不同时间点通过超声成像、肾盂造影照片以及尿液和血液分析进行。这些监测步骤在实施例 3-6 中有更详细的描述。

[0376] 7. 试剂盒

[0377] 本发明还包括试剂盒, 所述试剂盒含有本发明的聚合物基质和支架以及相关材料和 / 或细胞培养基和使用说明书。使用说明书可包括例如培养细胞或给予所述细胞和 / 或细胞产物的说明。所述使用说明书还可包括为了通过腹腔镜植入而对本发明的聚合物基质和支架进行预处理、折叠或制备的说明。

[0378] 在一个实施方案中, 本发明提供了含有本文所述的支架和使用说明书的试剂盒。在另一个实施方案中, 所述试剂盒中的支架为下述一种或多种支架 : 膀胱扩张支架、膀胱替换支架、尿路管道支架或肌肉等效物支架。

[0379] 8. 报告

[0380] 当为了商业目的实施本发明的方法时, 通常会产生报告或再生性预后的总结。本发明的方法所产生的报告应包括在提供本文所述构建体的手术之前和之后对再生的可能过程和结果的预测。所述报告可包括对于预后任何指征的信息。本发明的方法和报告还可包括在数据库中存储所述报告。或者, 所述方法还可针对受试者从数据库中产生报告并在报告中记载数据。在一个实施方案中, 所述报告为纸质报告, 在另一个实施方案中, 所述报告为声音报告, 在另一个实施方案中, 所述报告为电子报告。已经考虑了将所述报告提供给医生和 / 或患者。所述报告的接收还可包括与含有数据和报告的服务器计算机建立网络连接, 并从所述服务器计算机请求数据和报告。本发明提供的方法的全部或部分都可以自动进行。

[0381] 提供下述实施例仅是出于说明的目的, 并不意欲以任何方式限制本发明的范围。

[0382] 本申请中引用的所有专利、专利申请和参考文献的全部内容均通过援引的方式纳入本文。

实施例

[0383] 实施例 1 作为 SMCs 源的外周血和脂肪组织

[0384] 血液源细胞

[0385] 成功分离犬, 猪, 和人类外周血平滑肌细胞。概括地说, 制备 50 毫升含有 1:1 外周血与磷酸盐缓冲液的稀释液且在中性粒细胞分离液中、一种密度梯度材料上分层, 并且在室温下在 1, 354xg 离心 20 分钟。离心作用后, 密度梯度 (从上到下) 清楚地显示为 4 层 : 血清, 血沉棕黄层, 中性粒细胞分离液, 红细胞。单核细胞位于血沉棕黄层, 其以乳白 / 灰色的带形式存在。血沉棕黄层被收回并且转移进一根单独的 50ml 圆锥试管。用 PBS 稀释到 50ml。将样品在室温下 711xg 离心 10 分钟至球团细胞。混悬球团且培养细胞。通过细胞

传代、当达到适当的细胞数量时,部分被固定进行终点分析,包括免疫检测平滑肌细胞蛋白质表达,平滑肌细胞 mRNA 转录物的核酸检测,细胞收缩,细胞因子和酶合成。

[0386] 结果

[0387] 培养基选择。单独的 40-40ml 单核部分犬外周血样混悬在 6 种不同介质配方内,接种于 6 孔 Primaria 细胞培养板或胶原层板中。

[0388] 如图 14A-E 中所示,在一周的培养后,在全部条件下观察到小的粘性的菌落和小细胞团块(DMEM 介质离析没被显示)但是细胞的种类难以识别。在 α -MEM+10% FBS 中生长时,在 Primaria 培养皿上观察到小串葡萄状和细胞团块,EGM-2 培养基和伴随添加物,和 EGM-2 培养基和伴随添加物(减去 VEGF 和 FGF2)(A, C, E)和胶原蛋白 I 型,在组织培养上涂上在相同的介质(B, D, F)里生长的塑料板。看到与生长在 DMEM 配方中(数据未显示)外周血培养相似的结果。

[0389] 如图 15 中所示,在两周的培养后,在 Primaria(左平板)和胶原层板(中间平板)上、 α -MEM 中观察到生长晕菌落和小单层。形态学上,这些菌落似乎是平滑肌(图 15,顶板)或者内皮(图 15,中间平板)。平滑肌(图 15,顶板)或者内皮(图 15,中间平板)形态的生长晕菌落也在其他介质/底材状态(合适的平板)下形成。一些巨噬细胞最初被保存在 α -MEM 中(图 15,底部左和中间平板),但是没带进随后的传代。隔离在 10% FBS 的 α MEM 中的 Primaria 盘上的细胞具有平滑肌(左上平板)或者巨噬细胞(底部左平板)形态。没有内皮细胞在这些条件(中间左平板)下被隔离。隔离在 10% FBS 的 α -MEM 中、胶原层板上的细胞具有平滑肌(最高的中间平板),内皮(中间中间平板)和巨噬细胞(底部中间平板)形态。其他介质/基质配方例如 EGM-2(最高位置平板)和 20% FBS 的 DMEM 补充剂(中间正确平板)也允许间充质和类内皮细胞的生长。

[0390] 12 种培养基/底材状态, α -MEM/10% FBS 的 Primaria 中包含大部分没有内皮细胞的均匀隔离的平滑肌细胞(图 15,左上平板)菌落。细胞在 Primaria 板上隔离,平铺在 Nunclon 表面(在 α -MEM/10% FBS 中)显示典型的“峰谷”形态的是平滑肌细胞(SMC),与在其他研究中的描述一致(Kassis et al. (2006);Koerner et al. (2006);Simper et al. (2002),上文)。

[0391] 如图 16 中所示,这些细胞经过数次传代后仍然保持其形态(图 16A-G)。猪颈动脉 SMC(图 16H)和狗膀胱 SMC(图 16I)的图像比较显示。在更晚传代(图 16F, G)的平滑肌细胞变得更大,更多展开。早期的传代(A-E)像平滑肌细胞(SMC)隔离自猪颈动脉(H)和狗膀胱(I)。过后平滑肌细胞(F, G)的传代更大,更多展开,产生一个平滑肌表现型。

[0392] 脂肪衍生细胞

[0393] 平滑肌细胞与猪脂肪组织隔离依照下列程序。全部程序在生物安全罩里进行。

[0394] 获取脂肪样品。在用于生物安全容器之前,在室温或者 4℃下储存不超过 24 小时。

[0395] 每 100ml PBS 中加入 1 克 BSA 和 0.1 到 0.3 克的胶原酶制备胶原酶溶液。通过 0.2 μ m 过滤装置过滤溶液。加热至 37℃。

[0396] 每脂肪体积加入等效体积的胶原酶溶液到每个离心瓶。需要组织体积的胶原酶溶液(例如,每 10ml 脂肪组织胶原酶溶液 10ml)。

[0397] 用消毒剂擦拭,盖上盖子,用石蜡膜包裹,并且放在 37℃培养箱里振荡 60 分钟。或者,试试管放在 37℃水浴器中,以每 20 分钟手动振荡一次。

[0398] 室温下 300xg 离心 5 分钟。

[0399] 从离心机中取出试管,积极地振动 10 秒,使细胞完全混合。这是完成基质细胞与主要脂肪细胞的分离。

[0400] 300xg 离心 5 分钟。小心吸出顶层的油,主要脂肪细胞(黄的层浮动的细胞),以及胶原酶溶液。在球团上留下大约 10ml 的棕色的胶原酶溶液,以便基质血试管的馏分(在底部的深色的红细胞)不被扰乱。

[0401] 混悬细胞团块于 1% BSA 的 PBS 中,用 Steri-Flip 过滤。

[0402] 300xg 离心细胞 5 分钟、吸出剩余的胶原酶溶液。吸出时,吸管的端从顶那里吸出,以便油被尽可能完全清除。细胞团应该密封在底部。

[0403] 每个离管中加入组织培养液 10ml,混悬细胞。把细胞集合到一根离心管中,离心。

[0404] 吸出上清液。用 10 毫升培养基悬浮细胞。

[0405] 平分细胞至对等数目的烧瓶的中。平板接种 24-72 个小时后,从烧瓶吸出培养基。以 PBS 洗涤并且吸出。

[0406] 每瓶加原始体积的新鲜培养基。

[0407] 细胞长到 80-90%合流,然后传代或者保存。

[0408] 通过细胞传代、当达到适当的细胞数量时,部分被固定进行免疫检测平滑肌细胞蛋白质表达。

[0409] 图 17 是关于培养的形态学评价。在培养 3 到 5 天后,评价形态学。从人和猪细胞脂肪组织分离得到的细胞显示平滑肌细胞形态特征(图 17)。那些细胞呈现峰-谷形态,并且显示另外特性例如细长形,在传代上变平和成纤维细胞样,拉长并且在平行排列,和一个“旋涡”形状,所有这些均是培养的平滑肌细胞的特点。

[0410] 平滑肌标志。增加收缩基因的表达(以及他们编码的蛋白质)与 SMC 成熟一致(Jeon et al. J Cell Sci 119, 4994-5005(2006); Ross et al. J Clin Inves. 116, 3139-3149(2006); Sinha et al. Am J Physiol Cell Physiol 287, 1560-1568(2004))。心肌是对平滑肌收缩蛋白进行编码的基因转录调节器,其中包括 SM22, α 平滑肌肌动蛋白,平滑肌肌浆球蛋白重链和钙调理蛋白(Qiu et al. (2005) Circ Res 983-991; Wang et al. (2003) Proc Natl Acad Sci 100: 7129-7134; Yoshida et al. (2003) Circ Res 92: 856-864)。心肌是平滑肌分化所必需的,并且足以驱动某些细胞平滑肌基因表达(Milyavsky et al. (2007) Cancer Cell 11: 133-146; van Tuyn et al. (2005) 上文; Wang et al. (2003), 上文; Yoshida et al. (2003), 上文)。我们确定是否从血或者脂肪组织中隔离的平滑肌细胞通过隔离总 RNA 并且进行半定量的 RT-PCR 表达平滑肌细胞标记心肌,平滑肌 α 肌动蛋白, SM22, 肌浆球蛋白重链,和钙调理蛋白。

[0411] 如图 18 中所示,结果表明,在基因水平这些细胞表达所有这些平滑肌细胞标记,和在膀胱平滑肌细胞里发现的平滑肌细胞标记一致。这些数据支持外周血或者脂肪组织隔离的这些平滑肌细胞具有平滑肌细胞性质的观点。

[0412] 表型特征。我们已经表明这些外周血隔离平滑肌细胞与平滑肌收缩蛋白(图 18)一样表达为平滑肌基因表达的转录调节器。图 18 显示 SMC 标志心肌,平滑肌 α 肌动蛋白, SM22, 平滑肌肌浆球蛋白重链和钙调理蛋白的 RT-PCR 分析。样品来自于猪脂肪,外周血和膀胱(传代 4)隔离的平滑肌细胞。从脂肪组织隔离的 SMCs 可以在每次传代之间培养 3-5

天,从血隔离的 SMCs 可以头次传代之前培养 14 天,3-5 天后进行再次传代培养。 β 肌动蛋白的基因表达当作凝胶用于内部的加载控制。从动物脂肪和外周血细胞隔离的细胞表达型与膀胱 SMC 的相符合。

[0413] 图 19 显示免疫荧光法染色,将多种抗体直接用于平滑肌细胞表达蛋白染色。标记 α 肌动蛋白,SM22,钙调理蛋白和平滑肌肌浆球蛋白重链在从猪脂肪,外周血和膀胱隔离的平滑肌细胞里检测。这些蛋白质全部涉及平滑肌细胞的收缩的功能。平滑肌 α 肌动蛋白,SM22,钙调理蛋白和平滑肌肌浆球蛋白重链在多次传代的平滑肌细胞中染色。这些蛋白质的亚细胞定位与膀胱 SMC 相比在平滑肌细胞里实际上相同。在细胞的应力纤维里的这些蛋白质的详细的染色被注意到。这是期望的典型的平滑肌细胞染色模型。

[0414] 图 20 显示的是从人外周血(传代 5)隔离的平滑肌细胞的免疫染色。使用平滑肌 α 肌动蛋白,SM22,钙调理蛋白的探针。同种细胞中两种蛋白质平滑肌的 α 肌动蛋白和钙调理蛋白(右平板顶部)双重染色法共同显示。在单个细胞中不止 1 个的平滑肌细胞标记同时表达更进一步支持这些是平滑肌细胞的观点。

[0415] 收缩性。由于外周血得到平滑肌细胞表达平滑肌收缩蛋白,我们进行一次三维的凝胶收缩测定评价他们的收缩性能。当被嵌入在三维的凝胶(Travis et al. (2001) Circ Res88:77-83)内时,SMC 已经显示自发引起胶原基质的收缩。脂肪组织得到的平滑肌细胞也被进行收缩性测试。

[0416] 图 21 显示与膀胱平滑肌细胞(C)的相比较猪血得到的(A)细胞和猪脂肪组织得到的(B)细胞收缩性更强。把 EDTA 加到混合物中抑制收缩,支持了收缩是依赖钙的想法,也是平滑肌细胞的另一种特性。数据表明直径较小依赖细胞的收缩,并且是在细胞容量内的功能。细胞种子为 500,000 细胞/毫升,通过在两天后减少胶原质凝胶直径证明其能进行收缩。猪膀胱平滑肌细胞作为阳性对照。证明收缩的钙依赖性,钙螯合剂 EDTA 加入到分开的样品中抑制收缩。结果确认细胞的收缩能力以钙依赖的方式类似于膀胱得到的平滑肌细胞。

[0417] 发展动力学。为了在细胞治疗应用里利用平滑肌细胞,确定是否在一个可接受的时间段内达到需要的细胞量是重要的。结果从对犬和猪研究表明,平滑肌菌落(从 40ml 外周血样品中)被观察到在早于 7 天后接种,并且能在不到 14 天(图 14 和 15)内通过。在研究中,在培养(传代 2 的端)的 18 天后获得 120 万细胞,在它们冷冻保藏期间。50 天后这些特别的细胞被融化,通常在约 80%融合时通过确定发展动力学。在融化后 6 天,细胞群体扩大到 1670 万个细胞(传代 3 的末期)。再培养 7 天后,细胞群体达到 3170 万个细胞(传代 4 的末期)。这项初始研究表明 30 天的培养可取得约 3000 万细胞。

[0418] 图 22 涉及到细胞有限的增殖潜能。图 22 显示每单位面积从人体脂组织隔离的平滑肌细胞作为功能性细胞恢复的数量变化的函数。这些数据表明在 4 和 5 传代之间,恢复的细胞数量开始下降,支持这些细胞是有限和有限增生的能力的论点,为祖细胞所独有的特征,但不是真实的干细胞。

[0419] 图 23 显示从猪脂肪,外周血和膀胱平滑肌隔离的平滑肌细胞的发展,作为每条传代恢复的细胞数量的函数。如图所示,在 2 和 3 传代之间,在超过 2-4 周的时间段,细胞数量方面取得巨大的扩大,使数十个数百万个细胞的恢复成为可能。这证明脂肪衍生细胞的有限或者有限的增殖潜能。

[0420] 增殖的接触抑制。从外周血和脂肪组织隔离的平滑肌细胞显示增殖的接触抑制。例如,在图 14-17 提供的这些细胞的形态学上的评价证明超过几条传代的增殖的接触抑制的存在。当细胞彼此接触时增殖停止。相反, MSCs 不显示增殖的接触抑制,在转换细胞培养过程中,观察到他们可以相互堆积,类似于焦点形成。例如, Zhou et al. 报道有关离析的情况,以及来自老鼠骨髓的单核细胞衍生的 MSCs 培养,并且观察到,以在 3 词传代之后,培养 MSCs 存在接触抑制(见 10850 页和图 1A) (Cancer Res. 2006 ;66(22):10849-10854)。

[0421] 细胞因子 MCP-1 的制备。MCP-1 是一种膀胱逼肌细胞产品。在主动脉平滑肌细胞里, MCP-1 在再生中起作用。MCP-1 以具有吸收单核细胞的能力而众所周知。类似于趋化因子;这也是血管损伤区域血管平滑肌细胞增生和循环吸收单核细胞的一种有效的促细胞分裂剂。单核细胞转换的巨噬细胞通常被用作细胞因子类和增长系数的存储器。巨噬细胞和肌前体细胞两个都是 MCP-1 信号目标。这和细胞因子在体内吸收干细胞和祖细胞相关,潜在的有助于再生过程。

[0422] 为测定人周血平滑肌细胞产生的 MCP-1 数量,来自 R&D 系统的一个基于酶联免疫吸附测定的测定系统被使用。培养基样品被一式两份、与标准曲线相比,分析得到的 MCP-1 水平,结果为 ug/24hr/ 百万个细胞。确定了从人膀胱平滑肌隔离的细胞,脂肪,外周血以及膀胱尿道上皮(阴性对照)细胞因子 MCP-1 的表达。

[0423] 图 24 显示,来自上述分析的结果表明人周血得到和人体脂组织得到的平滑肌细胞与人膀胱平滑肌细胞相比产生相当水平的 MCP-1。这些数据支持这一结论,正如膀胱 SMC 一样,从脂肪和外周血隔离的平滑肌细胞表达 MCP-1。另外,这些数据使我们假设 MCP-1 在再生中起关键作用,通过直接或者间接的引起肌祖细胞吸收/迁移,或者在构建体内扩散。

[0424] 讨论。从动物脂肪隔离的平滑肌细胞证明了平滑肌细胞的几种特征。我们的研究已经表明,使用标准酶消化和低速的离心作用可以轻易使细胞容从动物脂肪中隔离。细胞可以迅速扩大,在不到一个月时间内或许达到 3000 万细胞。我们的研究进一步证明这些细胞可以,实际上,描述一个平滑肌细胞群体而不是一个真实的干细胞数量,如同平滑肌标记早在传代 3 时存在。SMC 标记 mRNA 的表达在早于 P0 时就可被观察到,像被 RTPCR 证明的那样。而且,隔离的平滑肌细胞具有收缩功能如同按标准胶原质凝胶收缩测定证明的那样。

[0425] 平滑肌细胞的特性。我们已经显示在随后的传代期间,平滑肌细胞细胞形态被保留。在基因和蛋白质水平平滑肌标记具有良好的相关性。

[0426] 细胞因子诱导。脂肪的平滑肌细胞对 MCP-1 的表达引导我们假设, MCP-1 在新器官或者组织结构再生中起关键作用,通过直接或者间接的引起肌祖细胞吸收/迁移,或者在构建体内扩散。

[0427] 实施例 2 MCP-1 的制备和细胞密度

[0428] 使用商业上可用的工具检测和测定来自膀胱平滑肌细胞培养条件的培养基的 MCP-1。测试来自 9 个构建体(3 种,每种分别 3 种接种水平)的条件培养基样品和用于接种构建体的配对的 SMC 细胞 MCP-1 水平。结果如表 2.1 所示。

[0429] 表 2.1

[0430]

试验 ID	样品 ID	cIL2	cIL6	cIL10	cMCP-1	cIFNg	cTNFa	cTGFB
		pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
1	TT1	<1.0	<9.8	1.0	<3.7	<2.4	<0.2	
2	TT2	<1.0	8.8	<2.0	39.6	<2.4	<0.2	

[0431] 为了测定存在于构建体培养基的 MCP-1 的数量,对来自 R&D 系统的犬的 MCP-1 进行一次基于酶联免疫吸附测定的测定。培养基样品被一式两份、与标准曲线相比,分析得到的 MCP-1 水平。如图 25 中所示,来自这个分析的结果显示 MCP-1 的产生和细胞接种密度之间正相关。表 2.2 显示通过 R&D Systems ELISA 测定的 MCP-1 量。

[0432] 表 2.2

[0433]

组	构建体	MCP-1 pg/ml	组 平均	Std Dev
4 百万	1151	71	65	24
	1152	102		
	1153	59		
	1154	80		
	1155	74		
	1156	24		
	1157	70		
	1158	39		
12 百万	1159	253	188	135
	1160	85		
	1161	412		
	1162	167		
	1163	69		
	1164	349		
	1165	91		
	1166	78		
25 百万	1167	183	385	207
	1168	307		
	1169	181		
	1170	527		
	1171	771		
	1172	534		
	1173	260		
	1174	321		

[0434] 表 2.3 从每组显示的平均 MCP-1 水平进行比较,其中显然最终的比率与接种密度的差别相似。

[0435] 表 2.3

[0436]

组	平均 MCP-1	4百万 MCP-1	细胞 #	12百万 MCP-1	细胞#	25百万 MCP-1	细胞#
4百万	65			0.35	0.33	0.17	0.16
12百万	188	2.89	3.00			0.49	0.48
25百万	385	5.92	6.25	2.05	2.08		

[0437] 结果表明细胞数量和在培养基里发现的 MCP-1 水平之间呈正相关。可以明显观察到由再生犬膀胱（接种约 9 百万细胞）形成的 SMC 植入物含有比天然或再生犬组织更多的脂肪。当植入时这些组织较柔软，观察发现，与天然组织相比包含更大比例的脂肪组织。当富含脂肪的组织存在时，植入平板上的培养基表面上显示出“光泽（sheen）”。观察结果表明，MCP-1/CCR-2 在再生膀胱组织脂肪沉积 / 脂肪生成过程中起到相互作用的一个作用。

[0438] 实施例 3 猪新的尿路管道构建体的植入

[0439] 本项研究的目标是调查新尿路管道构建体的外科植入以及评估术后护理，以及评价植入新尿路管道构建体（NUC）检品后类尿组织的再生，以及腹膜为植入物提供血管支持和水密性的能力。

[0440] 新的尿路管道（NUC）建造试验产品由非织造聚乙醇酸（PGA）毡和聚（乳酸-co-乙醇酸）聚合物（PLGA）有或无自体平滑肌细胞（SMC）形成的支架构成。以前动物中移除的细胞用来产生所述构建体，均是用在同一动物里。构建体指包括由兼有自体的 SMC 的非织造聚乙醇酸（PGA）毡和聚（乳酸-co-乙醇酸）聚合物（PLGA）组成的无菌的试管状的支架生物材料。期限仅用于支架参考包括由非织造聚乙醇酸（PGA）毡和聚（乳酸-co-乙醇酸）聚合物（PLGA）组成没有电池的一个脚手架的无菌的试管状的生物材料。

[0441] 在这项研究过程中，使用的构建体测试的项目包括支架和 SMC 和支架的产品以及只包括支架，涉及包括支架而没有 SMC 的产品。7 只雌性的哥廷根小型猪被分成 3 组：组 1（仅用支架）的 N = 1，组 2（由血分离得到的 SMC 的支架）的 N = 3，组 3（接种由动物脂肪分离得到的 SMC 的支架）的 N = 3 在检品植入。

[0442] 由于猪和人之间相似的腹部和上泌尿道解剖，外科操作策略，气孔放置与治疗，术后护理，以及腹腔的解剖，猪是用于新的尿路管道的评估一种合适的动物模型。猪也是一种建立皮肤伤口愈合的良好的动物模型，接近与人体的治疗程，适合评估气孔愈合。哥廷根小型猪品种的选择基于在 3 个月研究期时间段他们低平均增长率。自体的 SMCs 在测试产品植入之前大约 10-11 周取自全部动物脂肪组织活检和静脉血样。每组指定的试验产品在 0 天时外科植入。在手术去除膀胱（总膀胱切除术）之后，输尿管是支架、带动试验产品的流入（颅）端吻合。由腹壁正中白线开始向左右两边腹壁分离得到壁腹膜。腹膜在左边横切，超向中线部位包裹植入物，其提供血管源和密封的尿通道，在植入物（位于腹内的洞）尾端与皮肤之间形成管状连接。植入物尾端在腹腔心房大约距离皮肤气孔 5 到 7 厘米内结束。心房延伸使用颅的腹腔包裹，横穿腹壁并且在剑突附近退出皮（离中线，右侧）。具体化的腹膜被连接到皮形成腹膜皮肤接合和腹腔有衬里的气孔中空。

[0443] 连接到输尿管支架的缝合线通过通过气孔的进一步去除外表化。这种剖腹术接受非可吸收的聚丙烯纺织纤维缝合。皮被用日常方式关闭。在治疗气孔期间一根 Foley 导管插入到气孔中允许尿通过。相同的外科程序用于全部动物，以下去除 Foley 导管，全部动物都装有 TRACOE® 气孔通道以促进排尿。动物能挪动气孔通道，因此 8Fr 福利导尿管用来帮助排尿。在心房和气孔内碎屑增加导致使用较大直径改性扩展的（特定研究）处理气孔。

[0444] 按计划每周维修和替换气孔，在需要的基础上。收集血样，分析，在基线记录结果，在植入后第 1 到 4 周每周进行一次，第 8 周，对其进行血液学和血清化学尸检。收集尿样，分析，结果在基线记录，尸检进行尿分析。研究期间在第 2, 4, 8 周对构建体（荧光检查，超

声探测术,和 / 或内窥镜检查),输尿管,和肾结石进行成像,且进行尸检。出现不利的临床体征(例如观察缺乏尿流动或者怀疑瘘管形成),也对其进行成像。瘘管指一根异常的导管或者传导,气孔,洞或者中空器官与体表或者另一个中空器官连结起来(例如,在肠之间或者在肠和导管之间)。

[0445] 在尸检时,打开腹腔,在导管气孔,肾结石和输尿管一起被移除前,对其进行直接观察及拍照。整个泌尿道代表性的组织样品是由肾到皮肤气孔,淋巴结部位,和其它可以明显观察到的伤口中获得。全部组织样品放入 10% 中性缓冲的福尔马林(NBF)进行组织学的处理和评估)。将组织固定后,盖上载玻片处理,用苏木素和曙红(H&E)以及 Masson's 三种颜色一起染色。用显微镜移动观察。

[0446] 结果:植入(外科方法学):全部动物无重大事故从植入手术中恢复,直观的看到气孔排尿。这种动物模型被认为可以用于插入 NUC(新的尿路管道)适合于外科手术评价。

[0447] 病状和死亡率:动物存活 28-83 天。七分之一的动物存活,直到计划处死(第 2 组动物 4,83 天)。七分之六的动物不定期死亡:第 3 组动物 5 在植入 28 天后执行安乐死进行组织病理学分析,5 只动物由于其糟糕的临床状态在植入后 38 到 63 天之间被执行安乐死。(第 1 组的动物 1,第 2 组的动物 2 和 3,以及第 3 组的动物 6 和 7)。这些不定期的死亡发生在全部处理组中,归病毒感染和 / 或病理学相关梗阻有对上泌尿道造成的损害。

[0448] 观察到 3/7 的动物感染是由猪环状病毒类型 -2 引起(在收获的组织进行组织病理学期间收集 PCV-2 证据)。有两个感染 PCV-2 的动物是不定期死亡的动物。包括在第 38 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 以及 63 天第 3 组的动物 7。第三个感染 PCV-2 的动物(第 2 组的动物 4)最后被按计划处死(83 天)。由于妨碍尿由导管向气孔流过导致 4/6 的动物不定期的死亡。包括在第 47 天执行安乐死的第 1 组的动物 1;在第 38 和 40 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 和 3;以及在第 39 天执行安乐死的第 3 组的动物 6。

[0449] 术后护理:植入后 1-30 天:全部动物要求手术后管理对气孔的不管理处理(注水并且清除碎片,按基础需要,在每周移除导管或者气孔时,对其进行替换)。碎片在治疗和再生过程期间形成。片状剥落组织细胞,发炎的渗出物和支架生物降解作用是碎片主要来源。如果没有适当的外流(例如,存在妨碍),使停滞的碎片形成一块碎屑:在导管的中腔内成半固体团。

[0450] 观察到全部动物存在食欲不振和倦怠。这些术后程序和临床体征在猪里腹部手术之后存在,并不罕见。在植入后前 30 天,在评估如何改变建立外科手术或者术后护理时,对非手术治疗后操作或者发现进行充分考虑。

[0451] 植入后第 31 天进行尸检:证明全部动物部分或者完全尿外流梗阻。管观察到尿流动梗阻在有或没有碎片积累的情况下。前侧腹部位置外科手术检品导致四足动物模型尿流梗阻的物理原因是腹部器官的叠压导致导管闭合,粘附和形成瘘管,第二个原因是上泌尿系统肾的并发症(例如,膨胀,炎症和 / 或输尿管或者肾感染)。粘附指两个组织表面结合。腹内和 / 或骨盆的粘附是常规术后并发症。在尸检时,对导管或者输尿管的粘附进行细致观察,X 线摄影,尝试其显微相关性。

[0452] 另外,使用腹膜形成心房,随后的碎屑增长和细菌感染引起部分或者全部尿梗阻,导致尿流出梗阻加重。心房指前面的连结的室,允许尿通过腹壁。由腹膜外皮较早类似管状部分的做成的节段使检品(位于腹腹腔内,大约距离皮肤 5 到 7 厘米)的尾端连接到皮。

[0453] 检品的外科放置在全研究动物中相同；因此，全部组的梗阻并发症有相似的生物病理学机制（即腹内压力和腹腔心房导致碎屑的增加）。

[0454] 再生：在早在 28 天的时候明显再生类尿组织，在选择安乐死的第 3 组动物 5 中（动物脂肪得到的 SMC）输尿管导管接合（UCJ）处有尿道上皮，固有层和平滑肌管束的存在。再生过程在输尿管端植入导致类尿组织形成和在动物中接受构建体植入（组 2 和 3）进行比较。构建体组（组 2 和 3）类尿组织再生程度受植入后动物生存时段的影响。一个被处死的动物（第 2 组的动物 4，第 83 天）存在 UCJ 上的尿道上皮和平滑肌，尽管检测到颅和导管中间部分存在病毒感染。不过，仅有腹膜的于心房不足以支持类尿组织的再生和组织形成心壁，如同纤维结缔组织没有泌尿道上皮粘膜内层一样。从导管向心房转变的点在各动物之间存有变化，尸检时，因为插入尾端的植入物在没有腹膜的包裹下自由移动，导致导管难以向心房转变。典型的（推测的）导管组成成分是有相关成纤维细胞和 / 或肌成纤维细胞与组织的胶原蛋白。腹膜心房看起来不满足于类尿组织的再生，但是腹膜确实作为 NUC 插入的一个维管化的源。

[0455] 结论：在本研究中证明，该猪动物模型证明适合于评价新的尿路管道的外科应用，因为全部动物从手术恢复，尿道变换被实现。另外，猪模型适合于评价尿流动梗阻的术后护理和它对上面泌尿道的影响。最后，猪模型适合于评价检品向类尿组织在碎屑积累，细菌繁殖，病毒感染，小肠，粘附和瘘管形成的环境下的再生能力。确定的外科方法学是成功的，虽然在四足的动物的前侧腹部上的尿道变换解剖放置导致尿外流部分梗阻。该动物模型适合于评价外科应用，术后护理和新的尿路管道的功能。

[0456] 在植入手术后第 1 个 30 天期间术后发现，猪尿流改道术是常规的。

[0457] 虽然几个混杂因子在研究（即前侧腹部层上的外科放置，使用腹腔心房且病毒感染）期间出现，在早在 28 天的时候明显再生类尿组织，在选择安乐死的动物中输尿管导管接合（UCJ）处有尿道上皮，固有层和平滑肌管束的存在（第 3 组动物 5，动物脂肪得到的 SMC）。

[0458] 构建体组（组 2 和 3）类尿组织再生程度受植入后动物生存时段的影响。一个被处死的动物（第 2 组的动物 4，第 83 天）存在 UCJ 上的尿道上皮和平滑肌，尽管检测到颅和导管中间部分存在病毒感染。

[0459] 在再生过程里观察到支架与由血或者脂肪分离得到的（第 2 和 3 组）SMC 结种并无差别，在促进再生过程中是相等同的 SMC 源。

[0460] 从位于房节中具有导管壁的腹膜中形成的组织由不含有泌尿道上皮内层的纤维结缔组织组成。

[0461] 试验设计

[0462] 概述：7 只雌性的哥廷根小型猪被分成 3 组：组 1（仅用支架）的 $N = 1$ ，组 2（由血分离得到的 SMC 的支架）的 $N = 3$ ，组 3（接种由动物脂肪分离得到的 SMC 的支架）的 $N = 3$ 在检品植入。自体的 SMCs 在测试产品植入之前大约 10-11 周取自全部动物脂肪组织活检和静脉血样。每组指定的试验产品在 0 天时外科植入。在手术去除膀胱（总膀胱切除术）之后，输尿管是支架、带动试验产品的流入（颅）端吻合。由腹壁正中白线开始向左右两边腹壁分离得到壁腹膜。腹膜在左边横切，超向中线部位包裹植入物，其提供血管源和密封的尿通道，在植入物（位于腹内的洞）尾端与皮肤之间形成管状连接。植入物尾端在

腹腔心房大约距离皮肤气孔 5 到 7 厘米内结束。心房延伸使用颇的腹腔包裹,横穿腹壁并且在剑突附近退出皮(离中线,右侧)。具体化的腹膜被连接到皮形成腹膜皮肤接合和腹腔有衬里的气孔中空。连接到输尿管支架的缝合线通过通过气孔的进一步去除外表化。这种剖腹术接受非可吸收的聚丙烯纺织纤维缝合。皮被用日常方式关闭。在治疗气孔期间一根 Foley 导管插入到气孔中允许尿通过。相同的外科程序用于全部动物。

[0463] 以下去除 Foley 导管,全部动物都装有 TRACOE® 气孔通道以促进排尿。动物能挪动气孔通道,因此 8Fr 福利导试管用来帮助排尿。在心房和气孔内碎屑增加导致使用较大直径改性扩展的(特定研究)处理气孔。在需要的基础上,按计划每周维修和替换气孔。

[0464] 收集血样,分析,在基线记录结果,在植入后第 1 到 4 周每周进行一次,第 8 周,对其进行血液学和血清化学尸检。收集尿样,分析,结果在基线记录,尸检进行尿分析。研究期间在第 2,4,8 周对构建体(荧光检查,超声探测术,和/或内窥镜检查),输尿管,和肾结石进行成像,且进行尸检。出现不利的临床体征(例如观察缺乏尿流动或者怀疑瘘管形成),也对其进行成像。在尸检时,打开腹腔,在导管气孔,肾结石和输尿管一起被移除前,对其进行直接观察及拍照。整个泌尿道代表性的组织样品是由肾到皮肤气孔,淋巴结部位,和其它可以明显观察到的伤口中获得。在船运至 Vet Path Services, Inc. 进行组织学处理和评估前,全部组织样品放入 10% 中性缓冲的福尔马林(NBF)中 24-48 小时。将组织固定后,盖上载玻片处理,用苏木素和曙红(H&E)以及 Masson's 三种颜色一起染色。用显微镜移动观察。病理学报告如下例所示。

[0465] 下述表 3.1 提供研究的设计摘要。

[0466]

组No.	治疗	动物No.	组织切片工序(~天70)	外科手术工序(天0)	手术后工序	估计的验尸时间点
1	仅支架	1	除去脂肪活检,血液收集	囊切除,然后新-泌尿道植入,其中将输尿管调换至流入端。全部检品包裹在腹膜中,并且腹膜从检品端通过皮肤转移以产生失禁气孔	荧光和超声检查,通常健康评价和临床治疗(如果需要),临床病理学和尿分析	84±5天
2	自体血液 SMC	3				
3	自体脂肪 SMC	3				

[0467] 由于猪和人之间相似的腹部和上泌尿道解剖,外科操作策略,气孔放置与治疗,术后护理,以及腹腔的解剖,猪是用于新的尿路管道的评估一种合适的动物模型。猪也是一种建立皮肤伤口愈合的良好的动物模型,接近与人体的治疗程,适合评估气孔愈合。以前验证,网膜可用于为狗的泌尿组织再生提供供血和不透水表面。在当今的研究里,为 NUC 提供维管联结和不透水腹膜能力正在被评价,并且猪是有类似于人壁腹膜的唯一的大动物种类。哥廷根小型猪品种的选择基于在 3 个月研究期时间段他们的低平均增长率。

[0468] 材料和方法

[0469] 试验装置 - 检品 i) 一导管形状由合成丙交酯 / 乙交酯聚合物和自体动物脂肪分离得到的猪平滑肌细胞 (2.5×10^7 细胞或 2.5×10^7 细胞) 一起接种的支架; ii) 一导管形状由合成丙交酯 / 乙交酯聚合物和自体动物血分离得到的猪平滑肌细胞 (2.5×10^7 细胞或 2.5×10^7 细胞) 一起接种的支架; iii) 一导管形状仅由合成丙交酯 / 乙交酯聚合物, 没有任何细胞的支架。

[0470] 动物。共 7 种动物植入检品。动物初期被安放在各自的笼里。然后进行检品植入, 动物被转移进钢桶中, 每个钢桶两只猪。动物每天早晚共两次喂养。通过一个自动供水系统, 动物可随意饮食新鲜的过滤自来水。在检疫和研究期间, 动物被安放在一个区, 环境温度控制在 61 到 81° F, 相对湿度 30 到 70%。周期性地湿度弱偏离在范围之外。每 12 小时进行昼夜光照轮换, 房间每小时至少经过 10 次新鲜空气交换。在一个月的时间点时 (天 28), 七分之一植入入检品 (第 3 组) 的动物执行安乐死用以组织病理学评估。全部其他动物都是在研究过程中被执行安乐死。至少在动物活检和植入程序之前 12-24 小时禁食。不限制水的摄入。

[0471] 操作前程序。

[0472] 麻醉和中枢性止痛。对于活检和关键手术, 肌肉 (IM) 注射包含 20 毫克 / 千克氯胺酮, 2 毫克 / 千克赛拉嗪和 0.040 - mg/kg 阿托品的混合剂使动物镇静。每种动物插管吸入 2.5% - 4% 的异氟烷, 麻醉维持浓度在 0.5-2.5%, 通过可调节体积的呼吸器或者再呼吸装置。外科操作期间以 10 毫升 / 千克 / 小时给予 Ringer's 溶液。对于技术程序来说, 动物如上所述的相同的肌肉注射混合剂进行镇静。经主治医师辨别, 一些动物给予 10 毫升 10 - mg/ml 丙泊酚。对手术后的中枢性止痛来说, 应用芬太尼贴剂 (75 μ g/hr) 提供连续的痛救济。或者, Rimadyl (50 毫克) 或者 Buprenex (0.05 毫克 / 千克) 被按需要给药。

[0473] 抗生素疗法。广谱抗生素疗法 (大约 5 毫克 / 千克 Naxcel) 被在活检和植入手术给药全部动物。在术后多达 9 天的时间里按需要继续给药。

[0474] 外科制备。对于活检和植入手术来说, 在整个腹部上方区域毛发被限制增长。然后动物背躺。操作的区被聚维酮碘溶液和 70% 的乙醇交替擦洗清洁 3 次; 交替擦洗完成后, 再一次使用聚维酮碘溶液, 且进行干燥。然后这一区进行无菌外科遮盖。

[0475] 外科手术。

[0476] 活检 / 组织收集。在 0 天 (植入程序) 之后的 10-11 周获取全部动物 (1-3 组) 的活检脂肪组织以及静脉血。组织活检程序, 在腹部中线位置从脐向尾切口。在无菌条件下从中线交叉点取得柔软的 21-34 克脂肪活检, 易弯的皮下脂肪组织 (没有结缔组织)。分别收集组织样品, 无菌条件下和组织培养培养基 (Sponsor 提供) 一起转移到容器中, 然后用 bio-shipper (Sponsor 提供) 包装, 经过一夜时间运输后至 Sponsor 进行下步程序。这种剖腹术被适当尺寸可吸收的缝合材料一层一层地缝合。皮采用表皮下缝合方式缝合, 同样使用适当尺寸可吸收缝合材料。用血清采血管收集 6 份相同的 10 毫升静脉血, 放置于冰袋冷却容器 ($\sim 8^{\circ}\text{C}$) 中采血管。

[0477] 插管程序。在检品植入之前 12-18 天, 一根留置导管被放进每种动物的颈静脉使血收集变得容易。围绕右颈静脉的这个区域被如上所述方法剃净。所有动物都被插入一根无菌的 5.5 毫米的 ID 硅胶导管, 其被插入右颈外静脉并且缝合以防止运动。附上一个特大

的 DaVINCI 孔并且插入在皮下囊中。

[0478] 试验装置植入。从倾向脐进行一个约 5 厘米长的中线剖腹术,并且向尾部延伸大约 15 厘米。鉴定腹膜,然后仔细与腹壁(向左右两边在中线和两侧从线白陶土开始腹壁的边)分离。小心以保证组织保持完整和血管化。取出膀胱小心将尿排空,保证没有尿进入腹腔。辨别膀胱动脉和静脉,并对其进行结扎。找出输尿管,进行支架(两个 14 厘米 7Fr DaVINCI 非可吸收的输尿管支架,上升方式插入)并且从膀胱进行横切。当横切时,越过尿道缝和。膀胱然后被摘除。左输尿管延伸不受周围腹膜后的筋膜影响,应有足够的活动性到达检品的右边。右输尿管自由分开以达到检品的另一边。输尿管以 3-0Vicryl 以一种简单的连续的方式连接到检品上。在左边横切腹膜,用以朝中线右边包裹植入物,提供血管源和密封尿道,并且在皮肤和植入物(位于腹内的孔)的尾端形成一个管状连接(心房)。在腹腔心房中的植入物尾端大约距离皮气孔 5 到 7 厘米。腹膜以 3-0Vicryl 连接。心房延伸使用颅的腹腔包裹,横穿腹壁并且在剑突附近退出皮(离中线,右侧)。具体化的腹膜被连接到皮形成腹膜皮肤接合和腹腔有衬里的气孔中空。连接到输尿管支架的缝合线通过通过气孔的进一步去除外表化。这种剖腹术接受非可吸收的聚丙烯纺织纤维缝合。皮被用日常方式关闭。在治疗气孔期间一根 Foley 导管插入到气孔中允许尿通过。相同的外科程序用于全部动物,

[0479] 监控程序。生命体征(氧比率,氧 $[O_2]$ 饱和,脉搏次数,呼吸和体温)在整个程序期间每隔大约 20 分钟被监控一次。

[0480] 术后程序

[0481] 恢复。全部动物手术后在正常的环境条件下各自笼内进行恢复。

[0482] 操作的药物治疗。除上述所述的抗菌和止痛药治疗之外,术后在需要的基础上也按照兽医的指导使用 Flomax,以保证存活期的健康。

[0483] 气孔维护。植入后两周或者直到切口治愈,对手术区域裂开,异常排放,气味,刺激或者任何异常信号均进行评估。气孔区域和周边组织每天清洁两次,对气孔导管进行排尿观察。不往下滴时,注入无菌盐水冲洗导管以保证其开放。如果气孔被阻塞,在用含盐水冲洗之后,用钳子清除絮凝剂和堵塞物质。上述操作后如果不能恢复尿液的自由流动,在安全位置插入一根新导管并且聚丙烯线缝合。另外安装一个细孔口,2-0 聚丙烯线缝合。

[0484] 支架移除。在植入后 2-4 周各个时间点动物被如上所述支架移除麻醉方式进行麻醉。

[0485] 颈部切口。在每步骤中对颈部切口导管用注射盐水冲洗且每周一次使用肝素(100U/mL, 2-3mL) 封闭、直至第 4 周以保证开放。

[0486] 成像。

[0487] 超声探测。在尸检之前第 2、4、8 周对导管和肾结石进行超声成像

[0488] 膀胱镜检查。在第 4 用膀胱镜(与晶状体一起的灵活的光导纤维喜欢如望远镜或显微镜样的具有透镜的可弯曲的光学纤维)周膀胱镜检查,查看导管的内表面,并且如上所述清除输尿管支架。在这个程序中动物被麻醉。

[0489] 观察和健康评价。从试验开始至动物安乐死,每天观察两次动物出现的可能对健康造成不利影响的反常表现和行为。在每次检查(大约相隔 8 个小时一次),确认是否全部动物已经进食,并且是否在钢桶里有尿和粪便产生的证据。体征(例如倦怠,消瘦),异常发

声,解剖学缺失和划伤,以及异常的行为的符号,被注意到,如果存在。动物在这些天的评价期间未被从钢桶中移出。任何异常情况均进行记录。

[0490] 体重。体重在基线记录,在尸检之前每周一次。

[0491] 临床病理学。

[0492] 血收集。血液学 (CBC),通过存在颈静脉中的端口,在预定时间点收集(基线,尸检前第 1,2,3,4,和 8 周)凝结和血清化学参数分析的血样。

[0493] 血液学。用 2.0ml EDTA 管收集血液样品,在船运(湿冰上)至 Idexx 之前,冷藏储存或者冰藏(2-8℃)。运输 24 小时内收集的样品便于分析,如同治疗方案指定的那样。样品进行血液学参数评价:总白细胞计数(WBC);红细胞计数(RBC);血红蛋白浓度(HGB);血细胞容量计估价(HCT)1;平均血细胞比容(MCV);平均红细胞血红蛋白量(MCH)1;平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)1;片晶计数(板);有关的网织红细胞计数(棘轮),其中 1 = 计算值。

[0494] 凝结。凝结样品装在 1.8 毫升的柠檬酸钠管(3.8%的柠檬酸钠的 0.2 黄体生成素)中并且储存在潮湿的冰上,直至以 8,000 转数/分钟离心 10-15 分钟。血浆平分到两个贴有标签的小瓶中,然后在 -70℃ 冷冻。一个小瓶用干冰保护送至 Idexx 进行分析,剩下的水瓶被作为备用储存直至得出研究结论。样品进行下列参数评价:前凝血酶时间(PT);部分激活凝血活酶时间(APTT);血纤维蛋白(FIB)。

[0495] 血清化学。血清化学分析的血样用大约 4.0 毫升的血清分离管收集。血样以 10,000 转数/分钟离心 10-15 分钟,血清使用无菌技术抽出。血清平分到两个贴有标签的小瓶中,然后在 -70℃ 冷冻。一个小瓶用干冰保护送至 Idexx 进行分析,剩下的水瓶被作为备用储存直至得出研究结论。样品进行下列血清化学参数评价:葡萄糖(GLU);尿素氮(BUN);肌酸(CRE);总蛋白(TPR);白蛋白(ALB);球蛋白(GLOB)1;白蛋白/球蛋白比率(A/G)1;钙(CAL);磷(PHOS);钠(Na);钾(K);氯(GL);总胆固醇(CHOL);总胆红素(TBIL);甘油二酯(TRG);丙氨酸转氨酶(ALT);天冬氨酸转氨酶(AST);碱性磷酸酶(ALK);γ 谷氨酰转肽酶(GGT);其中 1 = 计算值。

[0496] 血内气体。动脉血内气体样品用注射器(~ 1.0mL)收集,将血液放入 CG8+i-STAT 桶,进行内部分析。样品进行下列血内气体参数评价:钠(Na)(mmol/L)PCO2(毫米汞柱);钾(K)(mmol/L)PO2(毫米汞柱);离子钙(iCa)(mmol/L)TCO2(mmol/L);葡萄糖(GLU)(mg/dL)HCO3(mmol/L);血细胞容量(Hct)(%)BEecf(mmol/L);pH 值;以及 SO2(%)。

[0497] 尿采集。尿样在基线和尸检前收集。分别用无菌容器为定性和定量分析收集大约 1.0ml 和 3.0ml 样品。定性分析在收集时使用 **Multistix®** 10SG 试验条。在收集的定量综合的尿分析样品被冷藏且在 24 小时内装运到 IDEXX 试验室(North Grafton, Massachusetts)。样品进行以下的定性尿分析参数评价:葡萄糖;胆红素;血;pH 值;蛋白质;酮;尿胆素原;比重;亚硝酸盐;以及白细胞,并且为以下的定量尿分析:细菌培养;总细菌;葡萄糖;以及总蛋白。

[0498] 解剖病理学

[0499] 垂死和早逝动物。对下一步计划观察前不太可能存活的动物(即,垂死的动物)进行称重,执行安乐死和尸检。动物经过有限的尸检,找出引起健康下降或者死亡的原因。收集来自这些样品的组织仅限于泌尿生殖系统。尸检在死亡当天进行,除非没注意到。尽

力从执行安乐死的垂死的动物中收集临床病理的末端标本。

[0500] 体格检查。在安乐死之前兽医对动物进行评价。记录动物的一般条件。

[0501] 安乐死。动物被注入戊巴比妥钠 (150 毫克 / 千克, IV) 执行安乐死。

[0502] 尸检。对于按计划 (84 ± 5 天) 执行安乐死的动物来说, 尸检特别集中于肾结石, 导管, 输尿管, 输尿管膀胱的接合, 中间导管, 导管皮接合和淋巴结 (腰和肠系膜)。

[0503] 组织收集。在安乐死和尸检的时候, 新的尿路管道构建体周围组织进行仔细检查且在原处给予拍照。收获肾结石, 附着输尿管的新导管以及淋巴结。肾结石是全裂的并且拍照。附着输尿管的新导管进行评价且用 10% 标准缓冲盐水进行压力灌注。全部收集到的组织储存在 10% 标准缓冲盐水中。

[0504] 组织学和组织病理学。泌尿器官被配平, 检查, 嵌入在石蜡里, 并且切割。样品切割计划的具体细节包括在病理学里报告 (下述) 中。载玻片用苏木素和曙红 (H&E) 以及 Masson' s 三种颜色一起染色。

[0505] 结果

[0506] 活检。按方案收集活检脂肪组织 (21-34 克) 和静脉血 (6x10ml 等分入肝素化管)。个体重量脂肪活检样品存在于附录 1 (EE = 执行安乐死 ;PCV-2 = 猪环状病毒 -2 ;SMC = 平滑肌细胞 ;S = 存活者 ;UD = 由于临床条件差导致的不定期死亡 ;X = 观察)。

[0507] 植入 (外科方法学)。全部动物无重大事故从植入手术中恢复, 直观的看到气孔排尿。这种动物模型被认为可以用于插入 NUC (新的尿路管道) 适合于外科手术评价。

[0508] 图 26 显示用于研究的输尿管支架。图 27 显示新导管构建体。图 28 显示附着输尿管的新导管构建体。图 29 显示附着输尿管的构建体流入端和朝向外科手术产生的气孔的流出端。图 30 显示排尿气孔和导管。

[0509] 死亡率。七分之一的动物存活, 直到计划处死 (第 2 组动物 4, 83 天)。七分之六的动物不定期死亡; 第 3 组动物 5 在植入 28 天后执行安乐死进行组织病理学分析, 5 只动物由于其糟糕的临床状态在植入后 38 到 63 天之间被执行安乐死。(第 1 组的动物 1, 第 2 组的动物 2 和 3, 以及第 3 组的动物 6 和 7)。这些不定期的死亡发生在全部处理组中, 归病毒感染和 / 或病理学相关梗阻有对上泌尿道造成的损害。

[0510] 七分之一动物的最终处理和死亡率如下表 3.2 所示 (EE = 执行安乐死 ;PCV-2 = 猪环状病毒 -2 ;SMC = 平滑肌细胞 ;S = 存活者 ;UD = 由于临床条件差导致的不定期死亡 ;X = 观察)。

[0511]

												死亡率结果	
												PCV-2	梗阻
1		1	仅有支架	0	24	60	74	周2(1) 和 周4(1)	47	UD			X
2		2	血液	2.5	21	60	71	周2	38	UD	X	X	
3		2	血液	2	30	60	72	验尸	40	UD			X
4		2	血液	2.5	25	60	71	周2	83	S	X		
5		3	脂肪	2	34	60	73	周3	28	EE			
6		3	脂肪	2	22	60	73	周2(1) 和 周3(1)	39	UD			X
7		3	脂肪	2.5	21	60	72	周 4	63	UD	X		

表3.2

[0512] 猪环状病毒-2(PCV-2) 感染。7 个动物中的 3 个发展成一种或多种有清楚病理学特点的、由猪皮炎和肾综合征 (PDNS) 导致的损害,与 PCV-2 感染相关。发现下列情况,动物

被分入受 PCV-2 感染 :1) 临床观察的紫色的皮肤变色 ;2) 细微脉管炎或者脉管炎 / 血周管炎感染肾 ;3) 肾脏发现管状坏死 / 积水 / 管型 / 肾小球肾炎或者病毒,包括肾小管上皮细胞。通过这些标准,猪 PCV-2 感染被在 3/7 的动物里确认。有两个感染 PCV-2 的动物是不定期死亡的动物。包括在第 38 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 以及 63 天第 3 组的动物 7。第三个感染 PCV-2 的动物 (第 2 组的动物 4) 最后被按计划处死 (83 天)。

[0513] 梗阻。从导管和气孔尿流梗阻导致 4/6 动物不定期的死亡。包括在第 47 天执行安乐死的第 1 组的动物 1 ;在第 38 和 40 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 和 3 ;以及在第 39 天执行安乐死的第 3 组的动物 6。前侧腹部位位置外科手术检品导致四足动物模型尿流梗阻的物理原因是腹部器官的叠压导致导管闭合,粘附和形成瘘管,以及肾的并发症 (例如,膨胀,炎症和 / 或输尿管或者肾感染)。梗阻因为使用腹膜形成心房被加重,在随后碎屑增长和细菌传染后引起部分或者完全尿的梗阻。检品外科的放置在全部研究动物过程中相同 ;因此,在所有组中梗阻并发症具有相似生物学病理机制 (因为四足动物的解剖学,腹部内脏放在导管上)。

[0514] 临床健康观察和术后护理

[0515] 分别对所有动物进行临床健康观察和术后护理 (数据未显示)。为识别检品植入后按照方案建立的术后护理与检品本身辅助的 3- 月试验性评价,下下述试验数据分成 2 个种类 :观察小于 30 天和观察大于 30 天。

[0516] 小于 30 天的临床健康观察和术后护理。对全部 7 种动物进行下述试验产品植入手术,在治疗气孔期间一根 Foley 导管插入到气孔中进行排尿。在植入后的前 30 天对全部 7 种动物每周按需要对导管进行维护 (例如,Foley 导管替换 [如果移动],冲洗气孔,清除预期的来自支架生物降解的碎片)。在前 30 天的时间内进行至少 8 次、最多 15 次。临床,植入后的第 1 个 30 天时间,7/7 的动物经历一次食欲不振 (厌食症) 或者变瘦。在第 1 组 (动物 1) 包括 1/1 的动物 ;在第 2 组 (动物 2 和 3) 的动物 2/3 和在第 3 (5,6, 和 7) 组的动物 3/3。7 种动物中的 7 只在植入后第 1 个 30 天嗜睡。在第 1 组 (动物 1) 包括 1/1 的动物 ;在第 2 组 (动物 2,3, 和 4) 的动物 3/3 和在第 3 组 (动物 5 和 7) 的动物 2/3。这些临床观察在猪泌尿道手术中是常见的。下述表 3.3 提供测试组的临床健康观察和术后护理资料 (植入后小于 30 天)。

[0517] 表 3.3

[0518]

临床观察	组 1N = 1	组 2N = 3	组 3N = 3	总 N = 7
气孔维护	1/1	3/3	3/3	7/7
厌食 (未食,瘦)	1/1	3/3	3/3	7/7
嗜睡	1/1	3/3	3/3	7/7

[0519] 大于 30 天的临床健康观察和术后护理。对 6 只动物的研究大于 30 天 (第 28 天执行安乐死的组 3 的动物 5)。一个重要的临床观察是排尿的间歇性梗阻。植入后第 1 个 30 天开始出现支架的生物降解,在四足动物的前侧腹部放置试验产品促进了梗阻的出现,在这一区域重量能导致导管闭合,粘附和瘘管形成以及肾病并发症 (例如,膨胀,炎症和 /

或输尿管或肾感染)。梗阻是因为使用腹膜形成心房而被加重,在随后由于碎屑的增加和细菌感染引起部分或完全排尿梗阻。因此,需要对这 6 只存活的动物从第 31 天到尸检前的气孔维护。从第 31 天到尸检前至少进行 4 次,最多 13 次。6 只动物中的 2 只种 30 天后(第 1 组的动物 1 和第 3 组的动物 7)出现厌食症。6 种动物中的 3 种在 30 天后嗜睡。在前 30 天出现倦怠的两种动物在 30 天之后继续出现倦怠(第 1 组的动物 1 和第 2 组的动物 4)。在前 30 天没出现倦怠的一只动物在 30 天(第 3 组的动物 6)之后出现倦怠。下述表 3.4 提供测试组的临床健康观察和术后护理资料(植入后大于 30 天)。

[0520] 表 3.4

[0521]

临床观察	组 1N = 1	组 2N = 3	组 3N = 2*	总 N = 6
气孔端口维护	1/1	3/3	2/2	6/6
厌食(未食,瘦)	1/1	0/3	1/2	2/6
嗜睡	1/1	1/3	1/2	3/6

[0522] * 组 3 的动物 5 在 28 天选择性安乐死

[0523] 支架移除。在植入后 2 到 4 周时间通过支架绳或超声将支架移除并用膀胱经进行恢复。一只动物中(第 2 组的动物 3)的支架不可见、未被移除,一直保留到尸检。分别收集输尿管支架的移除数据(未显示的数据)。

[0524] 气孔口/导管。分别收集数据(未显示的数据)。研究期间,气孔的维护进行变换。利用最初的一根 Foley 导管。被替换成TRACOE®气孔口。通过动物证明频繁的设备移动是不实用时,8Fr Foley 导管用来帮助排尿。这之后替换为经过改良延展性的更大的直径的导管以降低堵眼发生。在按需要的基础上每周进行维护或替换。

[0525] 体重。所用动物植入后体重下降。全部动物的体重在研究过程中发生波动。一只动物(组 2 的动物 4)直至被处死,从第 2 周到尸检其体重保持稳定或者增加。各自体重数据如下述表 3.5 所述。

[0526]

动物No.	植入体类型	基线	周1	周2	周2	周3	周4	周5	周6	周7	周8	周9	周12
1	仅有支架	17.8	16.3	16.4	15.2	15.4	16.1	NP	15.7	14.95	NA		
2	血液衍生的SMC	20.1	19.1	NP	17.4	16.5	17.9	15.9	NA				
3	血液衍生的SMC	17.4	15.9	16.3	16.3	16.6	17.25	NP	18.1	NP	19.6	19.8	19
4	血液衍生的SMC	17.4	15.5	16.1	NP	17.1	19.3	18.1	NA				
5	脂肪衍生的SMC	18.6	16.9	15.7	14.4	15.5	14.9	NP	NP	NP	16.65	13.4	NA
6	脂肪衍生的SMC	17.1	16.6	16.2	16.1	15.4	16.6	NP	17.2	NA			
7	脂肪衍生的SMC	16.9	15.1	14.3	13.7	12.5	11.3	NA					

表3.5

[0527] 临床病理学。分别收集每只动物的临床病理学数据。

[0528] 血液学。收集血液学数据（未显示的数据）。手术后收集的血样，血液学分析显示全部动物组白细胞增多。全部组的白细胞计数出现波动；不过，仅用支架的动物（第1组）

的白细胞计数在尸检时具有最高值。全部组红细胞计数 (RBCs) 出现波动,但在整个研究期间保持在标准范围内 (8-10MILL/uL)。全部组在研究期间血细胞容量计 (%) 出现波动。

[0529] 血清化学。收集血清化学数据 (未显示的数据)。总体而言,全部动物在尸检时候其血尿素氮,肌酸,总蛋白和钾升高。钾和钠以及白蛋白在尸检时一是降低的。虽然全部组表现出变化,通过尸检,仅用支架的动物 (第 1 组) 就有显著的变化。

[0530] 凝结。收集凝结数据 (未显示的数据)。尸检发现,除动物 5 和 7 之外,所有动物活性部分促凝血酶原激酶时间增加、而后又回归到基线。所有动物在尸检时发现,血纤维蛋白升高,并且在仅用支架动物中最高。

[0531] 尿分析。收集尿分析数据 (未显示的数据)。尿分析数据显示在基线和尸检之间所有的组的蛋白质,含血量,白血细胞数和细菌增殖增加。

[0532] 成像。超声数据如下述表 3.6 所示。

[0533]

表3.6

动物 No.	组类型	周2						周4						周8						周12								
		右肾			左肾			导管壁 厚度			右肾			左肾			导管壁 厚度			右肾			左肾			导管壁厚 度		
		L	W	L	W	L	W		L	W	L	W		L	W	L	W	(cm)	L	W	L	W		L	W	L	W	
1	仅有支 架	5.67	3.04	5.4 9	2.79	0.236		4.55	2.71	7.09	4.36	0.132						NA					NA					
2		4.52	3.33	5.5 5	3.96	0.139		9.45	3.54	8.08	3.59	0.16						NA					NA					
4		5	2.91	6.2 3	3.94	0.272		10.5	4.31	5.2	3.49	0.17		8.0 5	3.3 2	7.0 5	4.85	0.22		7.1 6	4.1 9	8.3 5	3.59	0.242				
3		4.5	2.57	5.8 7	3.2	0.172		6.47	3.7	5.39	3.18	0.176					NA						NA					
6		4.33	3.07	5.6 7	3.58	0.171		11.7	5.37	7.09	4.47	0.334					NA					NA						
5		5.18	3.26	5.6 5	2.77	0.246		4.1	2.1	5.08	2.76	0.147					NA					NA						
7		4.82	2.62	3.5 7	2.14	0.233		10.2	3.5	7.09	3	0.403		7.5 1	4.4	7.0 9	3.31	0.211					NA					

[0534] 图 31-43 显示的是代表性的膀胱镜检查图像。图 31 显示组 1 动物 1 在第 4 周的膀胱镜检查图像 4(植入无细胞支架)。图 32 显示的是同一只动物在尸检前 2 天,在第 6 周

检查时。

[0535] 图 33 显示的是第 2 组动物 2 在尸检之前的膀胱镜检查图像（接种血分离得到的 SMCs 的支架）。

[0536] 图 34-36 显示的是第 2 组动物 3 在第 4 周、第 5 周和尸检前的膀胱镜检查图像（接种血分离得到的 SMCs 的支架）。

[0537] 图 37 显示的是第 2 组动物 4 在尸检之前的膀胱镜检查图像（接种血分离得到的 SMCs 的支架）。

[0538] 图 38 显示的是第 3 组动物 5 在第 3 周的膀胱镜检查图像（接种血分离得到的 SMCs 的支架）。图像显示被棕白色无定形粒状 castsof 支架碎片覆盖的粘膜。图 39 显示同一动物在第 3 周的图像。粉红色附近或者在输尿管并接处显示支架移除留下粉红色血管化米粒组织床，且出现上皮细胞。

[0539] 图 40-42 显示的是第 3 组动物 6 在第 3 周、第 4 周以及尸检前的膀胱镜检查图像。

[0540] 图 43 显示的是第 3 组动物 7 在第 4 周的膀胱镜检查图像（接种血分离得到的 SMCs 的支架）。最初在超声成像下看见两支架（蓝色的材料）被，通过细胞检查指南进行移除。

[0541] 超声。各自和每组的超声探测术数据在上述表中已经描述。在研究过程期间的肾结石超声探测显示，全部治疗组表现出表面积（长度 x 宽度）增加的肾变化（肾积水）。肾表面积（L x W，cm²）数据如下述表 3.7 所示。

[0542] 表 3.7

[0543]

左肾						
组No.	组类型	动物No.	周2	周4	周8	周12
1	仅有支架	1	15.32	30.91	NA	NA
2	血液衍生的	2	21.98	29.01	NA	NA
2	血液衍生的	3	24.55	18.15	34.19	29.98
2	血液衍生的	4	18.78	17.14	NA	NA
3	脂肪衍生的	5	20.30	31.69	NA	NA
3	脂肪衍生的	6	15.65	14.02	NA	NA
3	脂肪衍生的	7	7.64	21.27	23.47	NA
右肾						

[0544]

组No.	组类型	动物No.	周2	周4	周8	周12
1	仅有支架	1	17.24	12.33	NA	NA
2	血液衍生的	2	15.05	33.45	NA	NA
2	血液衍生的	3	14.55	45.26	26.73	30.00
2	血液衍生的	4	11.57	23.94	NA	NA
3	脂肪衍生的	5	13.29	62.83	NA	NA
3	脂肪衍生的	6	16.89	8.61	NA	NA
3	脂肪衍生的	7	12.63	35.70	33.04	NA

[0545] 植入物壁厚度超声探测显示全部组表现出波动。下述表 3.8 说明这一点。

[0546] 表 3.8

[0547]

导管壁厚度(cm)						
组No.	组类型	动物No.	周2	周4	周8	周12
1	仅有支架	1	0.236	0.132	NA	NA
2	血液衍生的	2	0.139	0.160	NA	NA
2	血液衍生的	3	0.272	0.170	0.220	0.242
2	血液衍生的	4	0.172	0.176	NA	NA
3	脂肪衍生的	5	0.171	0.334	NA	NA
3	脂肪衍生的	6	0.246	0.147	NA	NA
3	脂肪衍生的	7	0.233	0.403	0.211	NA

[0548] 病理学报告如下述实施例 4 所述。

[0549] 在 3/7 的动物里观察到猪环状病毒类型-2 (PCV-2) 感染的证据。有两个感染 PCV-2 的动物是不定期死亡的动物。包括在第 38 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 以及 63 天第 3 组的动物 7。第三个感染 PCV-2 的动物 (第 2 组的动物 4) 最后被按计划处死 (83 天)。由于妨碍尿由导管向气孔流过导致 4/6 的动物不定期的死亡。包括在第 47 天执行安乐死的第 1 组的动物 1; 在第 38 和 40 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 和 3; 以及在第 39 天执行安乐死的第 3 组的动物 6。前侧腹部位置外科手术检品导致似足动物模型尿流梗阻的物理原因是腹部器官的叠压导致导管闭合, 粘附和形成瘘管, 第二个原因是上泌尿系统肾的并发症 (例如, 膨胀, 炎症和 / 或输尿管或者肾感染)。梗阻因为使用腹膜形成心房被加重, 在随后碎屑增长和细菌传染后引起部分或者完全尿的梗阻。检品外科的放置在全研究动物过程中相同; 因此, 在所有组中梗阻并发症具有相似生物学病理机制。在早在 28 天的时候明显再生类尿组织, 在选择安乐死的第 3 组动物 5 中 (动物脂肪得到的 SMC) 输尿管导管接合 (UCJ) 处有尿道上皮, 固有层和平滑肌管束的存在。再生过程在输尿管端植入导致类尿组织形成和在动物中接受构建体植入 (组 2 和 3) 进行比较。构建体组 (组 2 和 3) 类尿组织再

生程度受植入后动物生存时段的影响。一个被处死的动物（第 2 组的动物 4, 第 83 天）存在 UCJ 上的尿道上皮和平滑肌, 尽管检测到颅和导管中间部分存在病毒感染。不过, 仅有腹膜的于心房不足以支持类尿组织的再生和组织形成心壁, 如同纤维结缔组织没有泌尿道上皮粘膜内层一样。从导管向心房转变的点在各动物之间存有变化, 尸检时, 因为插入尾端的植入物在没有腹膜的包裹下自由移动, 导致导管难以向心房转变。典型的（推测的）导管组成成分是有相关成纤维细胞和 / 或肌成纤维细胞与组织的胶原蛋白。腹膜心房看起来不满足于类尿组织的再生, 但是腹膜确实作为 NUC 插入的一个维管化的源。

[0550] 结论。在本研究中证明, 该猪动物模型证明适合于评价新的尿路管道的外科应用, 因为全部动物从手术恢复, 尿道变换被实现。另外, 猪模型适合于评价尿流动梗阻的术后护理和它上面泌尿道的影响。最后, 猪模型适合于评价检品向类尿组织在碎屑积累, 细菌繁殖, 病毒感染, 小肠, 粘附和瘻管形成的环境下的再生能力。

[0551] 确定的外科方法学是成功的, 虽然在四足的动物的前侧腹部上的尿道变换解剖放置导致尿外流部分梗阻。该动物模型适合于评价外科应用, 术后护理和新的尿路管道的功能。

[0552] 在植入手术后第 1 个 30 天期间术后发现, 猪尿流改道术是常规的。

[0553] 虽然几个混杂因子在研究（即前侧腹部层上的外科放置, 使用腹腔心房且感染病毒）期间出现, 在早在 28 天的时候明显再生类尿组织, 在选择安乐死的动物中输尿管导管接合 (UCJ) 处有尿道上皮, 固有层和平滑肌管束的存在（第 3 组动物 5, 动物脂肪得到的 SMC）。

[0554] 构建体组（组 2 和 3）类尿组织再生程度受植入后动物生存时段的影响。一个被处死的动物（第 2 组的动物 4, 第 83 天）存在 UCJ 上的尿道上皮和平滑肌, 尽管检测到颅和导管中间部分存在病毒感染。

[0555] 在再生过程里观察到支架与由血或者脂肪分离得到的（第 2 和 3 组）SMC 结种并无差别, 在促进再生过程中是相等同的 SMC 源。

[0556] 从位于房节中具有导管壁的腹膜中形成的组织由不含有泌尿道上皮内层的纤维结缔组织组成。

[0557] 实施例 4 动物新的尿路管道构建体病理学

[0558] 如实施例 3 结论部分研究所述, 对动物进行解剖病理学被评价。

[0559] 组织收集。打开腹腔和导管, 即, 植入构建体或者仅有支架的检品的结果, 在动物设施原处进行直观观察和数字拍照。导管、肾和输尿管被整体移除。从导管中在距吻合处 3-4 厘米进行横切面分离。整个泌尿道代表性的组织样品是由肾到皮肤气孔, 淋巴结部位, 和其它可以明显观察到的伤口中获得。在船运至 Vet Path Services, Inc. 进行组织学处理和评估前, 全部组织样品放入 10% 中性缓冲的福尔马林 (NBF) 中 24-48 小时。

[0560] 组织学的处理。在固定之后, 导管被纵向切开（和外流相似）并且如图 44 所示分为背部和腹部两半。

[0561] 每半被平分为 3 个横断面（头、中间和尾截面被捕获用于背部一半和腹部一半）。来自每半的一部分取自导管心房接合处另外的部分从两输尿管导管接合处采集。另外一载玻片捕获皮肤表面的气孔和相邻的通过腹壁管。当导管的大小允许时, 计划制成 11 片载玻片。收集每种动物的组织。另外, 下列组织 / 器官部分是为组织学获取和准备的: 左

肾,右肾,左输尿管,右输尿管,腰淋巴结,肠系膜淋巴,结腹股沟淋巴结和任何严重损伤。

[0562] 在 VPS 组织修饰期间,进行数字拍照,为示例性目地。固定后,组织载玻化,用苏木素和曙红 (H&E) 以及 Masson’s 三种颜色一起染色。另外,为观察肾结石,5 个导管位点用 Brown 和 Hopps (Gram) 法染色。用显微镜观察载玻。

[0563] 适当时候,获得各个动物的微观观察数据且进行记录。

[0564] 结果

[0565] 死亡率。动物存活 28-83 天。七分之一的动物存活,直到计划处死 (第 2 组动物 4,83 天)。七分六的动物不定期死亡:第 3 组动物 5 在植入 28 天后执行安乐死进行组织病理学分析,5 只动物由于其糟糕的临床状态在植入后 38 到 63 天之间被执行安乐死。(第 1 组的动物 1,第 2 组的动物 2 和 3,以及第 3 组的动物 6 和 7)。这些不定期的死忘发生在全部处理组中,归病毒感染和 / 或病理学相关梗阻有对上泌尿道造成的损害。7 只动物中的每只的最后处置和死亡率如附录 1 所示,动物信息。治疗组的处置 (死亡率分类) 如下述表 4.2 所示 (组 1 = 仅用支架,组 2 = 血液分离得到的 SMC 构建体,组 3 = 脂肪分离得到的 SMC 构建体)。

[0566] 表 4.2

[0567]

组的未计划的和计划的死亡				
死亡率	组1 N=1	组2 N=3	组3 N=3	总 N=7
未计划的验尸(安乐死)	1/1	2/3	3/3*	6/7
计划的验尸	0/1	1/3	0/3	1/7

[0568] 猪环状病毒-2 (PCV-2) 的证据。7 个动物中的 3 个发展一损害或更多一致有清楚病理学特点认为是所作的猪皮炎和肾综合征 (PDNS),与 PCV-2 感染相关。7 个动物中的 3 个发展成一种或多种有清楚病理学特点的、由猪皮炎和肾综合征 (PDNS) 导致的损害,与 PCV-2 感染相关。发现下列情况,动物被分入受 PCV-2 感染 :1) 临床观察的紫色的皮肤变色 ;2) 细微脉管炎或者脉管炎 / 血周管炎感染肾 ;3) 肾脏发现管状坏死 / 积水 / 管型 / 肾小球肾炎或者病毒,包括肾小管上皮细胞。

[0569] 通过这些标准,猪 PCV-2 感染被在 3/7 的动物里确认。有两个感染 PCV-2 的动物是不定期死亡的动物。包括在第 38 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 以及 63 天第 3 组的动物 7。第三个感染 PCV-2 的动物 (第 2 组的动物 4) 最后被按计划处死 (83 天)。

[0570] 梗阻。从导管和气孔尿流梗阻导致 4/6 动物不定期的死亡。包括在第 47 天执行安乐死的第 1 组的动物 1 ;在第 38 和 40 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 和 3 ;以及在第 39 天执行安乐死的第 3 组的动物 6。前侧腹部位位置外科手术检品导致四足动物模型尿流梗阻的物理原因是腹部器官的叠压导致导管闭合,粘附和形成瘻管,以及肾的并发症 (例如,膨胀,炎症和 / 或输尿管或者肾感染)。梗阻因为使用腹膜形成心房被加重,在随后碎屑增长和细菌传染后引起部分或者完全尿的梗阻碍。检品外科的放置在全部研究动物过程中相同 ;因此,在所有组中梗阻并发症具有相似生物学病理机制。

[0571] 通过潜在发现分配计划内和计划外的死亡。潜在发现分配计划内和计划外的死亡

摘要如下述表 4.3 里所示（组 1 = 仅用支架, 组 2 = 血液分离得到的 SMC 构建体, 组 3 = 脂肪分离得到的 SMC 构建体）。表 4.3

[0572]

死亡类别	组 1N = 1	组 2N = 3	组 3N = 3	总 N = 7
PCV-2 感染的证据（未计划的和计划的死亡）	0	2* [^]	1	3
梗阻	1	2 [^]	1	4
选择性安乐死	0	0	1	1

[0573]

总未计划的死亡	1	2 [^]	3	6
总计划的死亡	0	1*	0	1

[0574] *— 组 2 的动物 4 存活直到计划的处死（83 天）

[0575] [^]— 组 2 的动物 2 显示 PCV-2 和梗阻相关的结果的证据

[0576] 手术注意事项。获得了全部动物的详细的宏观和微观发现的一览表（数据未显示）。

[0577] 肾, 输尿管组内发病率和其他发现如下述表所示。下述表 4.6 显示肾, 输尿管组内发病率和其他发现（（任何严重程度）发现的动物数量 / 检查的动物数量 ; U = 未检查）。

[0578] 表 4.6

[0579]

	1	2	3
	仅有支架	自体血液SMC	自体脂肪SMC
研究的平均天数:	47	54	43
左肾			
肾盂积水/慢性肾炎	1/1	1/3	1/3
慢性间质性肾炎(无肾盂积水)	0/1	1/3	0/3
肾盂肾炎	0/1	1/3	0/3
慢性活动性肾炎	0/1	1/3	3/3
再生肾小管上皮细胞	1/1	2/3	2/3
肾小管坏死/流体/铸型/血管球性肾炎	0/1	0/3	1/3
脉管炎/血管周围发炎	0/1	1/3	1/3
病毒包涵体	0/1	0/3	1/3
炎性慢性活动性胶囊/腹膜	0/1	0/3	1/3
细菌菌落胶囊/腹膜	0/1	0/3	1/3
右肾			
肾盂积水/慢性间质性肾炎	1/1	1/3	1/3
慢性间质性肾炎(无肾盂积水)	0/1	0/3	0/3
肾盂肾炎	0/1	1/3	0/3
慢性活动性肾炎	1/1	1/3	1/3
再生肾小管上皮细胞	0/1	2/3	3/3
肾小管坏死/流体/铸型/血管球性肾炎	0/1	2/3	0/3
脉管炎/血管周围发炎	0/1	1/3	0/3
病毒包涵体	0/1	0/3	0/3
炎性慢性活动性胶囊/腹膜	1/1	0/3	0/3
细菌菌落胶囊/腹膜	1/1	0/3	0/3
左输尿管			
扩张	0/1	1/3	1/3
空泡化变移上皮	0/1	1/3	0/3
炎性亚急性/慢性输尿管周围肠系膜	1/1	2/3	2/3
脉管炎/坏死肠系膜血管	0/1	1/3	2/3
右输尿管			
扩张	1/1	1/3	2/3
空泡化变移上皮	0/1	0/3	0/3
炎性亚急性/慢性输尿管周围肠系膜	1/1	1/3	2/3
脉管炎肠系膜血管	0/1	1/3	1/3
淋巴结、腹股沟(正常)	1/1	1/1	3/3

[0580]

淋巴结、腰椎(正常)	U	1/2	2/3
组织细胞增多症, 鼻窦	U	1/2	1/3
淋巴结, 肠系膜(正常)	U	2/2	2/3
渗透, 中性粒细胞	U	0/2	1/3
粘连和瘻管			
使导管粘连至肠(宏观和微观)	1/1	2/3	2/3
使导管粘连至肠(只微观)	0/1	1/3	0/3
使导管粘连至子宫(宏观)	0/1	1/3	0/3
使输尿管粘连至子宫/卵巢(宏观)	0/1	1/3	1/3
使输尿管粘连至肠(宏观)	0/1	0/3	1/3
瘻管(宏观) & 瘻管/中性粒细胞道(微观)	0/1	2/3	0/3
肉眼病变:			
皮肤, 左大腿和会阴内			
脉管炎, 急性, 坏死性真皮	U	1/1	U
出血, 真皮	U	1/1	U

[0581] 下述表 4.7 显示肾, 输尿管组内发病率和其他发现 ((任何严重程度) 发现的动物数量 / 检查的动物数量 ;U = 未检查) (无 PCV-2 感染的动物)。

[0582] 表 4.7

[0583]

	1	2	3
	仅有支架	自体血液SMC	自体脂肪SMC
左肾			
肾盂积水/慢性间质性肾炎	1/1	0/1	1/2
慢性间质性肾炎(无肾盂积水)	0/1	0/1	0/2
肾盂肾炎	0/1	0/1	0/2
慢性活动性肾炎	0/1	0/1	2/2
再生肾小管上皮细胞	1/1	0/1	1/2
肾小管坏死/流体/铸型/血管球性肾炎	0/1	0/1	0/2
脉管炎/血管周围发炎	0/1	0/1	1/2
病毒包涵体	0/1	0/1	0/2
炎性慢性活动性胶囊/腹膜	0/1	0/1	1/2
细菌菌落胶囊/腹膜	0/1	0/1	1/2
右肾			
肾盂积水/慢性间质性肾炎	1/1	0/1	1/2
慢性间质性肾炎(无肾盂积水)	0/1	0/1	0/2
肾盂肾炎	0/1	0/1	0/2
慢性活动性肾炎	1/1	0/1	0/2
再生肾小管上皮细胞	0/1	0/1	2/2
肾小管坏死/流体/铸型/血管球性肾炎	0/1	0/1	0/2
脉管炎/血管周围发炎	0/1	0/1	0/2
病毒包涵体	0/1	0/1	0/2
炎性慢性活动性胶囊/腹膜	1/1	0/1	0/2
细菌菌落胶囊/腹膜	1/1	0/1	0/2
左输尿管			
扩张	0/1	0/1	1/2
空泡化变移上皮	0/1	1/1	0/2
炎性亚急性/慢性输尿管周围肠系膜	1/1	1/1	2/2
脉管炎/坏死肠系膜血管	0/1	0/1	2/2
右输尿管			

[0584]

扩张	1/1	0/1	2/2
空泡化变移上皮	0/1	0/1	0/2
炎性亚急性/慢性输尿管周围肠系膜	1/1	1/1	2/2
脉管炎肠系膜血管	0/1	1/1	1/1
淋巴结、腹股沟(正常)	1/1	1/1	2/2
淋巴结、腰椎(正常)	U	1/1	2/2
淋巴结, 肠系膜(正常)	U	1/1	2/2
粘连和瘻管			
使导管粘连至肠(宏观和微观)	1/1	1/1	1/2
使导管粘连至肠(只微观)	0/1	0/1	0/2
使导管粘连至子宫(宏观)	0/1	0/1	0/2
使输尿管粘连至子宫/卵巢(宏观)	0/1	0/1	1/2
使输尿管粘连至肠(宏观)	0/1	0/1	1/2
瘻管(宏观) & 瘻管/中性粒细胞道(微观)	0/1	1/1	0/2

[0585] 由检品植入形成的脉易变形并且在前侧腹部的腹膜后间隙形成导管。输尿管由导管(输尿管导管接合, UCJ, 图 44) 的顶端进入。尿流通过腹腔包裹的植入物和心房并由气

孔排出。导管（附着输尿管）的颅端通常有双边球茎状的膨胀，称为膨部，认为是再生过程一部分，是间歇性梗阻的反射并且在导管的再生发展中反压导致膨胀。

[0586] 粘附和痿管。导管前侧粘结到腹壁的骨骼肌上，并且背侧被腹膜所覆盖。在尸检时观察到，在导管或者输尿管和其他腹部组织的粘附（例如，胃肠道，网膜或者其腹部组织）。导管的中腔充满碎屑。腹部粘附，包括各种腹部组织之间的粘附和导管与腹部组织之间的粘附，存在于 7/7 的动物中。粘附和痿管的发生数据如下述表 4.8 所述（组 1 = 仅用支架，组 2 = 血液分离得到的 SMC 构建体，组 3 = 脂肪组织分离得到的 SMC 构建体）

[0587] 表 4.8

[0588]

结果	组1 N=1	组2 N=3	组3 N=3	总 N=7
使导管粘连至肠	1/1	3/3	2/3	6/7
使导管粘连至子宫	0/1	1/3	0/3	1/7
使输尿管粘连至子宫或卵巢	0/1	1/3	2/3	3/7
使输尿管粘连至肠	0/1	0/3	1/3	1/7
痿管(导管至肠)	0/1	2/3	0/3	2/7

[0589] 7 只动物中的 6 只存在导管和肠的粘附（目视和用显微镜观察在第 1 组的动物 1 中；第 2 组的动物 3 和 4 以及第 3 组的动物 6 和 7；显微镜观察在第 2 组的动物 2）。7 只动物中的一只也存在可视的导管和子宫、或输尿管和子宫或卵巢（第 2 组的动物 4）粘附。一只动物存（第 3 组的动物 5）在输尿管和子宫或卵巢的粘附（可视的）。7 只动物中的一只（第 3 组的动物 6）存在可视的输尿管和子宫或者卵巢、输尿管和肠的粘附。痿管是可视的，且用显微镜到痿管 / 嗜中性粒细胞痕迹，在 2/7 动物（第 2 组的动物 2 和 3）导管和肠之间。痿管是可视的，且用显微镜到痿管 / 嗜中性粒细胞痕迹，在 2/7 动物（第 2 组的动物 2 和 3）导管和肠之间。

[0590] 输尿管和肾。通过潜在的生物显微观察到可视的加厚的输尿管。输尿管扩张（或输尿管积水）特征是具有正常的输尿管壁但具有扩展的输尿管腔。输尿管有时也因急性 / 慢性炎症而加厚，这在输尿管周围的肠系膜被胶原蛋白和成纤维细胞扩大时，或因偶然的淋巴细胞和巨噬细胞。移行细胞空泡形成其特征在于圆形、澄清空泡存在于上皮细胞中。这种炎症通常不影响肌膜或输尿管上皮。近输尿管炎症可能是由于输尿管与肠或生殖器官之间的粘附引起；但是在没有粘附时，也能发生。脉管炎，观察到在近输尿管区域，有或无血管的坏死。这可能与第 2 组的动物 2 的 PCV-2 病毒感染有关。显微镜观察，肾积水是以肾盂扩张为特点的肾皮质稀释和慢性炎症（纤维变性，淋巴细胞，浆细胞和偶然的巨噬细胞）。肾积水认为是下泌尿系统（输尿管，导管或者心房 / 气孔）充分或者部分梗阻导致。慢性肾盂肾炎，其与肾积水偶尔相关，以嗜中性白细胞和细胞碎片的渗入肾盂为特点，经常传播到远端的骨髓。肾盂肾炎是下泌尿道细菌传染导致，其上升进肾盂。慢性肾炎（没有肾积水）其特征是渗入炎症细胞（淋巴细胞，巨噬细胞，浆细胞和偶尔的嗜中性白细胞）导致肾皮质或骨髓的纤维化。有慢性肾炎的肾结石皮层看起来类似于动物里有肾积水 / 慢性肾炎；不过，慢性肾炎时骨盆不膨胀。慢性活性肾炎相似于慢性肾炎，区别在于嗜中性白细胞的渗入。管状坏死 / 积水 / 管型 / 肾小球肾炎是变化的丛其特征在中性白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞存在于肾小球中，个别管状上皮细胞坏死，蛋白质管型和 / 或管腔出血。在组 2 中的

动物 2 和 4 以及组 3 中的动物 7 观察到管状坏死 / 积水 / 管型 / 肾小球肾炎。通常动物中的管状坏死 / 积水 / 管型 / 肾小球肾炎是由脉管炎 / 血管周炎导致。囊 / 腹膜的慢性活性炎症其特征在于成纤维细胞导致肾囊膜增厚, 胶原纤维和 / 或血纤维蛋白, 中性白细胞, 淋巴细胞和巨噬细胞, 并且表现出腹膜炎。

[0591] 微小的输尿管积水和肾积水和 / 或肾盂肾炎。在 7 只动物中的 4 只观察到输尿管积水和肾积水。结果如下述表 4.9 所示 (组 1 = 仅用支架, 组 2 = 血液分离得到的 SMC 构建体, 组 3 = 脂肪组织分离得到的 SMC 构建体)。

[0592] 表 4.9

[0593]

输尿管积水, 肾盂积水和/或肾盂肾炎的发生率				
结果	组1 N=1	组2 N=3	组3 N=3	总N=7
输尿管积水, 单侧	1/1	0/3	1/3	2/7

[0594]

输尿管积水, 双侧	0/1	1/3	1/3	2/7
肾盂积水, 单侧	0/1	0/3	2/3	2/7
肾盂积水, 双侧	1/1	1/3	0/3	2/7
肾盂肾炎, 单侧	0/1	0/3	0/3	0/7
肾盂肾炎, 双侧	0/1	1/3	0/3	1/7

[0595] 单向输尿管积水 (2/7 的动物): 第 1 组 (动物 1) 的 1 只动物和第 3 组 (动物 6) 的 1 只动物。双向输尿管积水 (2/7 的动物): 第 2 组 (动物 2) 的 1 只动物和第 3 组 (动物 5) 的 1 只动物。单向肾积水 (2/7 的动物): 第 3 组 (动物 5 和 6) 的 2 只动物。双向肾积水 (2/7 的动物): 第 1 组 (动物 1) 的 1 只动物和第 2 组 (动物 2) 的 1 只动物。在 7 只动物中的 1 只观察到肾盂肾炎 (双边); 组 2 (动物 2)。按计划存活至处死的那只动物 (第 2 组的动物 4, 第 83 天) 没有输尿管积水, 肾积水或者肾盂肾炎。

[0596] 泌尿导管再生的相关发现。收集获取的各部分组织构成的详细数据 (未显示的数据)。

[0597] 组间导管再生发现的数据如下述表所示。下述表 4.17 显示的是 NUC 组间发现数据。

[0598] 表 4.17

[0599]

	1	2	3
	仅有支架	自体血液SMC	自体脂肪SMC
研究的平均天数:	47	54	43
通过导管位置来选择发现的发生率(# 发现结果的动物 / # 在该位置检查的动物)			
存在尿道上皮			
左输尿管管道结(载玻片14)	1/1	1/3	3/3
右输尿管管道结(载玻片16)	0/1	1/3	3/3
导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	0/1	1/3	0/3
导管体的中部(载玻片7或11)	0/1	1/3	0/3
导管体尾部/心房(载玻片8,9,12或13)	0/1	0/3	0/3
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	0/1	0/3	0/3
心房/导管中存在扁平上皮			
左输尿管管道结(载玻片14)	0/1	0/3	0/3
右输尿管管道结(载玻片16)	0/1	0/3	0/3
导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	0/1	0/3	0/3
导管体的中部(载玻片7或11)	0/1	0/3	0/3
导管体尾部/心房(载玻片8, 9, 12或13)	0/1	1/3	0/3
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	0/1	2/3	1/3
平滑肌			
左输尿管管道结(载玻片14)	1/1	0/3	1/3
右输尿管管道结(载玻片16)	0/1	1/3	1/3
导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	0/1	1/3	0/3
导管体的中部(载玻片7或11)	0/1	1/3	0/3
导管体尾部/心房(载玻片8,9,12或13)	0/1	0/3	0/3
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	0/1	0/3	0/3
慢性-活动性炎性/碎屑的表面			
左输尿管管道结(载玻片14)	0/1	3/3	1/3
右输尿管管道结(载玻片16)	1/1	2/3	1/3

[0600]

导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	1/1	3/3	3/3
导管体的中部(载玻片7或11)	1/1	3/3	3/3
导管体尾部/心房(载玻片8,9,12或13)	1/1	3/3	3/3
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	1/1	3/3	2/3
衰减, 尿道上皮	1/1	0/3	2/3
增生, 尿道上皮	0/1	1/3	1/3
空泡化尿道上皮	0/1	0/3	1/3
出血, 导管壁	1/1	1/3	1/3
支架材料, 导管壁	0/1	0/3	2/3
增加的胶原, 支架壁	1/1	0/3	0/3
粘附的GI道(P=存在)	0/1	2/3	0/3
瘻管/中性粒细胞道至肠	0/1	2/3	0/3
棘皮症, 皮肤, 气孔	0/1	2/3	1/3
Brown和Hopps Gram染色			
碎屑中的革兰氏阳性菌	1/1	3/3	3/3
碎屑中的革兰氏阴性菌	1/1	3/3	3/3

[0601] 下述表 4. 18 显示的是 NUC 组间发现数据 (无 PVC-2 感染动物)。

[0602] 表 4. 18

[0603]

	1	2	3
	仅有支架	自体血液SMC	自体脂肪SMC
研究的平均天数:	47	40	34
通过导管位置来选择发现的发生率(# 发现结果的动物 / # 在该位置检查的动物)			
存在尿道上皮			
左输尿管管道结(载玻片14)	1/1	0/1	2/2
右输尿管管道结(载玻片16)	0/1	0/1	2/2
导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	0/1	0/1	0/2
导管体的中部(载玻片7或11)	0/1	0/1	0/2
导管体尾部/心房(载玻片8,9,12或13)	0/1	0/1	0/2
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	0/1	0/1	0/2
心房/导管中存在扁平上皮			
左输尿管管道结(载玻片14)	0/1	0/1	0/2
右输尿管管道结(载玻片16)	0/1	0/1	0/2
导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	0/1	0/1	0/2
导管体的中部(载玻片7或11)	0/1	0/1	0/2
导管体尾部/心房(载玻片8,9,12或13)	0/1	0/1	0/2
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	0/1	1/1	0/2
平滑肌			
左输尿管管道结(载玻片14)	1/1	0/1	1/2
右输尿管管道结(载玻片16)	0/1	0/1	1/2
导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	0/1	0/1	0/2
导管体的中部(载玻片7或11)	0/1	0/1	0/2
导管体尾部/心房(载玻片8,9,12或13)	0/1	0/1	0/2
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	0/1	0/1	0/2
慢性-活动性炎性/碎屑的表面			
左输尿管管道结(载玻片14)	0/1	1/1	1/2
右输尿管管道结(载玻片16)	1/1	1/1	1/2
导管体的头(输尿管)端(载玻片6或10)	1/1	1/1	2/2
导管体的中部(载玻片7或11)	1/1	1/1	2/2
导管体尾部/心房(载玻片8,9,12或13)	1/1	1/1	2/2
心房-气孔-皮肤结(载玻片18)	1/1	1/1	1/2

[0604]

衰减, 尿道上皮	1/1	0/1	2/2
增生, 尿道上皮	0/1	0/1	0/2
空泡化尿道上皮	0/1	0/1	0/2
出血, 导管壁	1/1	0/1	1/2
支架材料, 导管壁	0/1	0/1	2/2
增加的胶原, 支架壁	1/1	0/1	0/2
粘附的GI道(P=存在)	0/1	1/1	0/2
瘘管/中性粒细胞道至肠	0/1	1/1	0/2
棘皮症, 皮肤, 气孔	0/1	1/1	1/2
Brown和Hopps Gram染色			
碎屑中的革兰氏阳性菌	1/1	1/1	2/2
碎屑中的革兰氏阴性菌	1/1	1/1	2/2

[0605] 检品外科植入后发展成导管, 由穿过植入物和心房达到前侧腹部的气孔的输尿管(颅端)形成的中空构成。构建体组(组2和3)类尿组织再生程度受植入后动物生存时段的影响。由于动物在植入后不同的时间点被处死、在不同的时期观察再生的过程、且基于植入后的时间和有无SMC, 类尿组织在各组之间存在的程度不同。

[0606] 输尿管-导管接合, 导管的颅和中间部分。围绕输尿管接合靠近颅端导管的组织的典型构成(UCJ; 图44第14、16部分)是尿道上皮叠压易变形的粘膜下层以及平滑肌纤

维和散布的结缔组织（图 27-28）。

[0607] 图 45 显示的是第 3 组动物 6（动物脂肪分离得到的 SMC）高层平板以及第 1 组动物 1 地层平板的亚肉眼照片。

[0608] 图 46 显示的是第 2 组动物 4（血分离得到的 SMC）输尿管结点的新输尿管构建体的显微照片（Massons' s 三色染色法）。尿道上皮明显存在于薄粘膜下层和光滑的肌肉层上方。

[0609] 图 47 显示的是第 3 组动物 6（血分离得到的 SMC）输尿管结点的新输尿管构建体的显微照片（Massons' s 三色染色法）。尿道上皮明显存在于薄粘膜下层和光滑的肌肉层上方。

[0610] 图 48 显示的是动物 1（组 1）（左平板）和动物 3（组 2）（右平板）中期导管壁的显微图片（Massons' s 三色染色法）。最接近于中腔的中间导管壁因为慢性活性炎症常具有线纹。仅用支架的（基团 1）动物的壁主要由蓝色标记的胶原蛋白（修理）形成，而在右边的构建体的壁主要由（再生）红色标记的纺锤形细胞（大概是肌细胞，成纤维细胞和肌成纤维细胞）组成。

[0611] 存活到被按计划处死的动物，部分颅和中间导管外形相似。尿道上皮和平滑肌分层存在于导管内，他们形式类似于输尿管，虽然导管壁厚通常比输尿管的大，特别是在膨部内。膨部通常呈平分的两倍分，导管从左至右从输尿管导管结点突出尾部。尿道上皮的典型的是具有适度的液泡和易变厚。尿道上皮厚度在最低 - 适中减弱（尤其在大肠盲囊内）和适度增生之间变化。

[0612] 在 5/7 的动物中（表 4. 19）尿道上皮存在于输尿管导管接合点（UCJ；图 44 第 14 部分和 / 或第 16 部分）：第 1 组（动物 1）中的 1 只动物，第 2 组（动物 4）的 1 只动物和第 3 组（动物 5, 6, 和 7）的 3 只动物。在 1/7 的动物中尿道上皮存在于颅和中间部分（图 44 的第 6 和 / 或 10 部分；图 44 的第 7 和 / 或 11 部分）：第 2 组（动物 4）的 1 只种动物。在 4/7 的动物中平滑肌存在于输尿管导管接合点（UCJ；图 44 的第 14 和 / 或 16 部分）：第 1 组（动物 1）的 1 只动物，第 2 组（动物 4）的 1 只动物和第 3 组（动物 5 和 6）的 2 只动物。在 1/7 的动物中平滑肌存在于颅和中间部分（图 44 的第 6 和 / 或 10 部分图 44 第 7 和 / 或 11 部分）：第 2 组（动物 4）的 1 只动物。

[0613] 类尿组织再生程度取决于植入后的时间一个被处死的动物（第 2 组的动物 4，第 83 天）有存在 UCJ 上的尿道上皮和平滑肌，存在导管的颅和中间部分。

[0614] 下述表 4. 19 显示的是存在 UJC，颅和中部分导管上的尿道上皮和平滑肌（组 1 = 仅用支架，组 2 = 血液分离得到的 SMC 构建体，组 3 = 脂肪分离得到的 SMC 构建体）。

[0615] 表 4. 19

[0616]

结果	组1	组2	组3	总
	N=1	N=3	N=3	N=7
存在尿道上皮				
UCJ(载玻片14和/或16)	1/1	1/3	3/3	5/7
导管体的头(输尿管)端(载玻片6和/或10)	0/1	1/3	0/3	1/7
导管体的中部(Mid)(载玻片7和/或11)	0/1	1/3	0/3	1/7
存在平滑肌				
UCJ(载玻片14和/或16)	1/1	1/3	2/3	4/7
导管体的头(输尿管)端(载玻片6和/或10)	0/1	1/3	0/3	1/7
导管体的中部(Mid)(载玻片7和/或11)	0/1	1/3	0/3	1/7

[0617] 导管的尾部。动物间从导管向心房的转变各不相同,因为植入物的尾端在腹腔壁里容自由漂浮,导致在尸检时难以确定从导管向心房的转变点。第8和12部分的典型组成成分是(认为尾的导管,图44)是由相关成纤维细胞和/或肌成纤维细胞形成的胶原蛋白组织。胶原壁内部和最接近于中腔的是慢性活动性感染层,由松弛排列胶原蛋白,毛细血管,丰富的中性白细胞,少量的淋巴细胞和巨噬细胞构成。炎症内部,中腔经常充满碎屑,由衰落或坏死的发炎的细胞(主要为中性白细胞),掺杂细菌菌落的细胞碎片构成。由布朗和霍普斯革兰氏染色法,细菌菌落既呈革兰氏阳性又呈革兰氏阴性。大多数革兰氏阳性菌是球菌;但是观察到,两个球菌和杆状革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌。仅用支架的动物(第1组)在靠近输尿管一侧仅仅最低的再生,并且导管体的剩余部分几乎仅仅包括胶原纤维及最低限度的成纤维细胞。在接受构建的动物里(第2和3组),再生程度更大,并且在导管的的其他部分,壁由胶原蛋白,成纤维细胞和其他纺锤形细胞(认为是肌成纤维细胞和肌细胞)构成。

[0618] 导管的心房和气孔部分。在导管(图44第9,13和18部分)的心房-气孔端区域,气孔心房接合是可见的,气孔真皮附着在心房壁上,形成胶原质和附件组织。这些部分主要由扁平上皮以及慢性活动性炎症/碎屑组成。在3/7的动物(第2组的动物3和4,以及第3组的动物7)里,皮肤的扁平上皮(表皮)距心房一定距离延伸成头盖形。心房的外表面由腹膜起源的疏松结缔组织构成。这个外覆盖层相当于一个浆膜层,且包含神经,血管,脂肪组织和部分面积的纤维结缔组织(胶原纤维和成纤维细胞)。在任何动物里均没有在心房-气孔端再生类尿组织的证据(图44第9,13和18部分)。

[0619] 其他发现。在2/7的动物中,在导管壁里观察到支架材料。观察第3组动物5(第28天)的各级导管体,和只在第3组动物6(第39天)的心房导管接合处观察。

[0620] 讨论。动物存活28-83天。七分之一的动物存活,直到计划处死(第2组动物4,83天)。七分之六的动物不定期死亡:第3组动物5在植入28天后执行安乐死进行组织病理学分析,5只动物由于其糟糕的临床状态在植入后38到63天之间被执行安乐死。(第1组的动物1,第2组的动物2和3,以及第3组的动物6和7)。

[0621] 观察到3/7的动物感染是由猪环状病毒类型-2引起(在收获的组织进行组织病理学期间收集PCV-2证据)。有两个感染PCV-2的动物是不定期死亡的动物。包括在第38天执行安乐死的第2组的动物2以及63天第3组的动物7。第三个感染PCV-2的动物(第2组的动物4)最后被按计划处死(83天)。在这3只动物中,在这项研究的过程中存在PCV-2感染的病理学特征号。一病毒感染有关的可视的发现是一只动物(第2组动物4)的皮肤变色。可视的发现包括由管状坏死/积水/管型/肾小球肾炎构成的肾变化,在

肾中嗜曙红细胞内夹杂肾小管上皮细胞,在肾和输尿管里有脉管炎/血管周炎。这些发现是在通常感染有 PCV-2 的猪的报告中。有 PCV-2 感染的动物(例如倦怠,腹泻,食欲不振)是由于较差的临床健康条件导致,随后尽快被执行安乐死。尿的妨碍流过导管和气孔导致 4/6 的不定期的死动物的病状。从导管和气孔尿流梗阻导致 4/6 动物不定期的死亡。包括在第 47 天执行安乐死的第 1 组的动物 1;在第 38 和 40 天执行安乐死的第 2 组的动物 2 和 3;以及在第 39 天执行安乐死的第 3 组的动物 6。梗阻的形成是由于在猪的腹膜底部放置检品、腹腔内脏的重量压迫植入物以及使用腹膜形成心房节把导管和皮连接起来导致从外部环境以及尿液(为猪正常)里的粘液形成碎屑。所有四足动物模型术后固有的相关并发症包括:(i) 腹部粘附导致形成瘻管的可能(ii) 检品与腹部组织的放置位置。当肠是被粘附的器官时,肠肌膜附着部分经常在粘附点缩小或者腐蚀,与心房壁一样。植入腹部的用腹膜包裹起来的检品,从输尿管至皮肤表面形成导管。检品被固定在输尿管的颅端,但是在腹腔尾端包裹内自由地漂浮,在那里腹膜形成腹壁到皮表面的通道。在 5/7 的动物里平滑肌和/或尿道上皮在导管-输尿管接合处附近形成,在一只按计划处死的动物的(组 2 动物 4,第 83 天)的导管颅端(检品移于腹腔外皮内)形成。中间和尾部导管包含纤维结缔组织、无尿道上皮覆盖(除了第 2 组动物 4,观察到其尿道上皮和平滑肌在导管中间位置)。在早在 28 天的时候明显再生类尿组织,在选择安乐死的第 3 组动物 5 中(动物脂肪得到的 SMC)输尿管导管接合(UCJ)处有尿道上皮,固有层和平滑肌管束的存在。再生过程在输尿管端植入导致类尿组织形成和在动物中接受构建体植入(组 2 和 3)进行比较。构建体组(组 2 和 3)类尿组织再生程度受植入后动物生存时段的影响。一个被处死的动物(第 2 组的动物 4,第 83 天)存在 UCJ 上的尿道上皮和平滑肌,尽管检测到颅和导管中间部分存在病毒感染。不过,仅有腹膜的于心房不足以支持类尿组织的再生和组织形成心壁,如同纤维结缔组织没有泌尿道上皮粘膜内层一样。从导管向心房转变的点在各动物之间存有变化,尸检时,因为插入尾端的植入物在没有腹膜的包裹下自由移动,导致导管难以向心房转变。第 8 和 12 部分典型成分(认为是尾端导管,图 44)是有相关成纤维细胞和/或肌成纤维细胞与组织的胶原蛋白。腹膜心房看起来不满足于类尿组织的再生,但是腹膜确实作为 NUC 插入的一个维管化的源。

[0622] 结论

[0623] 在早在第 28 天时输尿管-导管结合处尿道上皮、固有层和平滑肌管束的存在是类尿组织的再生的证据(动物 5,脂肪分离得到的 SMC)有。

[0624] 尽管动物模型由病毒感染导致并发症,构建体(支架用由血脂肪分离得到的 SMC 接种)植入(组 2 和 3,分别)形成由粘膜层和平滑肌层组成的具有类尿组织壁的导管。

[0625] 构建体组(组 2 和 3)类尿组织再生程度受植入后动物生存时段的影响。一个被处死的动物(第 2 组的动物 4,第 83 天)存在 UCJ 上的尿道上皮和平滑肌,尽管检测到颅和导管中间部分存在病毒感染。

[0626] 在再生过程里观察到支架与由血或者脂肪分离得到的(第 2 和 3 组)SMC 接种并无差别,在促进再生过程中是相等同的 SMC 源。

[0627] 动物模型解剖观察并发症(即,腹部检品放置位置,腹膜形成心房,腹部内容物的挤压导致形成粘附和瘻管,碎屑形成导致后续的梗阻)。

[0628] 在 3/7 的动物确认被 PCV-2 感染。两只感染 PCV-2 动物进行不定期的尸检。由于

检品放置位置以及腹腔内容物的挤压导致的排尿梗阻致 4/6 动物不定期死亡。一只动物（第 3 组动物 5）在第 28 天执行安乐死进行组织病理学评估。

[0629] 实施例 5 - 猪模型中植入的新的尿路管道构建体的评价

[0630] 本研究的目标是为了评价接种有来源于膀胱、脂肪或血液的自体平滑肌细胞（SMC）的新的尿路管道的安全性和功能性。此外，对只有支架处理（没有接种 SMC）进行了评价。

[0631] 方法：新的尿路管道（NUC）测试物由含有或无自体平滑肌细胞 SMC 的非织造聚乙醇酸（PGA）毡和聚（乳酸 - 乙醇酸）共聚物（PLGA）形成的支架组成。除非另有说明，此处为随后的协议基本上与例 3 随后的相同。

[0632] 本研究是由 32 个哥廷根小型猪（16 个雌性，16 个雄性）组成，被分成 4 组，8 个动物（每组 4 个雄性和 4 个雌性）被分配给 1/4 的测试物接受。在测试物植入前 6-10 周，从组 1、2 和 3（构建）的动物获得膀胱、脂肪组织的活检样本和静脉血样本。组 1、2 和 3 的动物分别被植入来源于膀胱、脂肪或血液接种有 SMC 的测试物。组 4 的动物不是活检的，并被植入只有支架测试物。组 1-3 的动物经受两次外科手术（活检 + 测试物植入），组 4 动物经受一次外科手术（测试物植入）。测试物在第 0 天通过除去膀胱（根治性膀胱切除术）和输尿管转移到测试物流入端被手术植入所有动物（组 1-4）中。测试物被置于腹腔的腹侧基板上，并不直接接触环境空气腹部内部不受清除剑突起附近的右上腹部四分区中线的皮肤开孔。腹膜缠绕着测试物以提供血管来源、水密封性和引导尿液流出皮肤气孔。腹膜缠绕通过腹壁到皮肤表面的通道超出测试物（位于腹腔内）的近尾端延伸约 5 至 7cm，以形成尿液流出的管道；本研究中被成为“围腔”的构建体。在指定的时间点采集血液和尿液样本，分析并记录结果。在本研究过程中的指定时间点对植入体、输尿管和肾脏进行成像（荧光镜检查、超声检查和 / 或内窥镜检查）。还需要响应观察的临床症状进行成像。

[0633] 腹腔是开放的，管道（植入构建或只有支架测试物的结果）是可视化的，并在现场数码拍摄动物设施。采用皮肤气孔、肾脏和输尿管整块除去管道。对输尿管进行测量，然后通过横切吻合 3-4 厘米从管道分离。得到肾脏、输尿管、淋巴结和观察到的任何其它严重病变的典型切片。将所有组织样本置于 10% 中性缓冲福尔马林（NBF）中 24-48 小时，用于组织处理和评价。固定后，定期将组织加工为载玻片，并使用苏木精和曙红（H&E）和 Masson 三色对其进行染色。对载玻片进行微观评价。

[0634] 结果

[0635] 死亡：在明确的手术过程中，对动物 30（组 4）的输尿管进行穿孔，从而防止测试物植入。在第 0 天使动物安乐死，并不放回，使植入测试物的动物的总 N（构建或只有支架）减少至 31 和组 4 至 7 动物的 N。所有其它动物被成功地植入测试设备，并从手术中痊愈。存活 6-84 天的动物植入后。使 24 个动物非预定死亡和 7 个动物存活至预定处死。

[0636] 与所述构建体和只有支架处理组安全性相关的结果：手术后临床观察在组间是类似的。这些中最普通的是开孔流中断（31/31 的动物）、食欲不振（30/31 的动物），软粪便（23/31 的动物）和身体消瘦（21/31 的动物）。在存活临床观察过程中，观察到与 PCV-2 感染一致的皮肤病变。12/24 的未预定死亡动物发生了与归因于猪皮炎和肾病综合症（PDNS）的病理特点一致的一种或多种病变，其与 PCV-2 感染相关。结果部分将不讨论 PCV-2 动物，由于 PCV-2 病症被认为是无关设备发病的确定性原因。得到所有动物的有效数据（数据不

显示)。如果观察到以下任一项,动物被归类为 PCV-2 感染:1) 临床观察到的紫色皮肤变色;2) 影响肾、皮肤或肺的显微血管炎或血管炎/血管周炎;3) 肾上皮细胞的管坏死/液/管型/肾小球肾炎或病毒性包裹体的肾结果;4) 在 1、2 或 3 存在下,腰部淋巴结中的淋巴细胞耗竭。

[0637] 按照这些标准,24 个未预定尸体剖检动物被鉴定出 12 个患有猪 PCV-2 感染:组 1 中 5/8 的动物、组 2 中 4/8 的动物、组 3 中 2/8 的动物和组 4 中 1/7 的动物。所有动物中的一个重要临床观察是含有或无心房、气孔或支架碎片堆积的尿液流出的间歇性阻塞。腹腔的腹侧部分和解剖关联的测试物植入似乎促进了阻塞,其中上覆腹部器官的重量可导致管道关闭、粘附和瘘管形成以及肾脏并发症(例如扩张、发炎和/或输尿管或肾感染)。

[0638] 测试物被同样地手术植入所有研究动物中;因此,所有组中的阻塞相关性并发症具有类似的疾病生物学机理(即,因为四足解剖或气孔中堆积的碎片,腹部脏器停留在管道上)。阻塞导致由输尿管积水、肾盂积水、肾盂肾炎、粘连和瘘管形成组成的安全明显安全性结果。输尿管积水和肾盂积水与尿液流出的间歇性完全性阻塞有关。肾盂肾炎被认为是继发于从排泄和皮肤的开孔的碎片和碎屑堆积以及细菌污染,并在只有支架组(组 4)中是最普遍的。组 1-3(活检和测试物植入)中动物的测试物外科定位和多种外科手术促进了腹部和骨盆粘连的形成。清创术协议(镇静动物中钳子的使用)、尿流阻塞、病毒性感染和肠道-管道粘连有助于肠道-管道性瘘管形成。

[0639] 与再生有关的结果:在由从输尿管(颅端)到腹部皮肤的气孔开口通过植入体和围腔层列的中央内腔组成的测试物手术植入后,形成管道。该管道壁组织学的外观变化取决于管道内的样本位置和动物的存活时间。在构建体(组 1-3)测试物植入后,不管 SMC 来源(即,膀胱、脂肪或血液),观察了以粘膜、粘膜下层和具有维管基质的平滑肌为特点的尿样组织再生。在植入构建测试物的多数动物中观察了由含有基础平滑肌的连续尿道上皮组成的尿路组织区域。相比之下,以具有有限平滑肌的维管基质支撑的异常粘膜为特点的只有支架测试物植入后,观察了修复过程。所述构建体组中尿样组织再生的范围受植入后动物存活时间的影响。

[0640] 结论:本研究中已完成 7/31(23%)动物。由于手术植入位点和压缩内腔的腹部量的结果,PCV-2 病毒性感染和偏向于尿流的完整尿路阻塞有助于 23/24 的非预定死亡。in-life 外科手术相关并发症有助于 1/24 的未预定死亡。与间歇性梗阻相关的安全性结果是肾盂积水、输尿管积水、肾盂肾炎、粘连和瘘管。

[0641] 在来源于任何所述构建体测试物的部分管道中观察到痊愈和再生,而来源于只有支架测试物的管道中观察到痊愈和再生,表明构建植入导致形成具有粘膜和平滑肌层组成的天然尿样组织壁的管道。

[0642] 所述构建体测试物(再生)和只有支架测试物(修复)之间痊愈的差异有助于只有支架测试物的肾脏研究中观察到明显的较高发生率,这导致认定只有支架测试物不适于进一步发展。

[0643] 观察到构建测试物之间的再生性过程和结果没有差异,这说明促进再生的 SMC 来源之间是等价的。

[0644] 本研究的目标是确定接种有来源于膀胱、脂肪或血液的自体平滑肌细胞(SMC)的新的尿路管道(NUC)的安全性和功能性。此外,对只有支架处理(没有接种 SMC)进行评价。

该目标是在手术除去膀胱（根治性膀胱切除）和输尿管再植入测试物流入末端后，再生一个尿样组织粘膜和壁组成的管状管道结构。本研究的使用阶段持续了约 5 个月。

[0645] 试验设计

[0646] 概述 . 32 个哥廷根小型猪被分成 4 组 (4/ 性别 / 组)。组 1-3 中的动物在测试物（构建）植入前 6-10 周进行了手术活检操作，以分离、表征和扩增产生构建所需的 SMC。构建或只有支架测试物（组 1-4）在第 0 天被用外科方法植入。在外科除去膀胱（根治性膀胱切除术）后，输尿管被转移到测试物的流入末端。测试物被置于腹腔的腹侧基板上，并被保护不直接接触环境空气腹部内部不受清除剑突起附近的右上腹部四分区中线的皮肤开孔的影响。腹膜缠绕着测试物以提供血管来源、水密封性和引导尿液流出皮肤气孔。腹腔缠绕还被延伸，以形成尿液通过腹壁从测试物（位于腹腔内）流出到皮肤表面的通道，本研究中被称为“围腔”的结构。测试物是自体 SMC（构建）或无 SMC（只有支架）接种的非织造聚乙醇酸 (PGA) 毡和聚（乳酸 - 乙醇酸）共聚物 (PLGA) 形成的管状支架。组 1 动物被植入膀胱来源的自体 SMC 接种的构建体，组 2 被植入脂肪来源的自体 SMC 接种的构建体，组 3 被植入血液来源的自体 SMC 接种的构建体，和组 4 动物被植入只有支架。表 5. 1 提供了研究设计的概要。

[0647] 表 5. 1

[0648]

组 No.	处理	动物编号 M F	活检操作 第~70天至 ~40天)	手术操作(第 0天)	手术后操作	预期的 尸体剖 检时间 点
1	自体膀胱SMC	4 4	膀胱和脂肪活检、血液采集的除去	囊肿切除术，接着采用输尿管至颅端移位植入新的尿路管道。整个测试物缠绕于通过皮肤从测试物末端转换的腹膜，以创建失禁气孔。	必要时，荧光和超声检查，基本健康评价和临床治疗，临床病理学和 尿分析	84±5 天
2	自体脂肪 SMC	4 4				
3	自体血液SMC	4 4				

[0649]

4	只有支架(无细胞)	4 4				
---	-----------	--------	--	--	--	--

[0650] 表 5. 2 提供了本研究的概述 (TA = 测试物 ;NA = 不适用的 ;M = 雄性 ;F = 雌性 ;N = 不 ;Y = 是 ;a- 动物被发现死亡 ;b- 动物在麻醉下死亡 ;c- 输尿管在手术前穿孔 ;动物不放回, d- 本研究中不利用备用动物)

[0651]

表 5.2

[0652]

	性别	组	细胞来源	细胞接种 密度 (x10 ⁶)	采集的 脂肪组 织(g)	植入日期 (第0天)/ 活检后天 数	支架除去 (天)	植入/尸体剖 检后天数 日期	非预定死亡 (Y/N)
1	F		膀胱	40.7	33.0	67	11	81	N
2	F			35.7	35.0	66	12	68	Y
3	F			29	33.0	64	11	69	Y
4	F			29	32.0	63	14	28	Y
5	M			24.9	5.0	63	14	44	Y
6	M			29	7.0	48	13	83	N
7	M			29	18.0	49	12	42	Y
8	M			29	13.0	51	NA	9	Y
9	F		脂肪	33.1	29.0	60	5	33	Y
10	F			29	26.0	68	8	30	Y
11	F			29.0	30.0	58	7	58	Y
12	F			40	35.0	73	5	70	Y
13 ^a	M			29	7.0	57	7	82	Y
14	M			29	9.0	55	8	63	Y
15	M			29	11.0	57	6	81	N
16 ^a	M			24	13.0	56	6	63	Y
17	F			29	35.0	59	6	48	Y
18	F			24.25	25.0	57	5	80	N
19	F			29	30.0	57	7	70	Y
20	F			40.7	40.0	58	5	6	Y
21	M			29	10.0	41	8	73	Y
22 ^b	M			29	0.0	56	7	51	Y
23	M			29	0.0	57	6	81	N
24	M			29	11.0	42	8	77	Y
25	F			NA	NA	0	9	84	N

26	F			NA	NA	0	9	84	N
27	F			NA	NA	0	9	20	Y
28 a	F			NA	NA	0	7	17	Y
29	M			NA	NA	0	7	48	Y
30 c	M			NA	NA	NA	NA	NA	Y
31	M			NA	NA	0	6	55	Y
32	M			NA	NA	0	6	31	Y
33 d	F			NA	26.0	NA	NA	NA	剩余
34 d	M			NA	0.0	NA	NA	NA	剩余

[0653] 在制定的时间点采集血液和尿液样本，并进行分析和记录。

[0654] 在本研究的指定时间点对植入体、输尿管和肾脏进行成像（荧光镜检查、超声检查和 / 或内窥镜检查）。还需要响应观察的临床症状进行成像。植入后动物存活 6-84 天。在尸体剖检时，腹腔是开着的，在管道整体和肾脏及输尿管除去前使管道可视化，并被拍摄。对输尿管长度和宽度进行测量，然后通过横切吻合 3-4 厘米从管道分离。得到肾脏、输尿管、淋巴结和观察到的任何其它严重病变的典型切片。将所有组织样本置于 10% 中性缓冲福尔马林 (NBF) 中 24-48 小时，用于组织处理和评价。固定后，定期将组织加工为载玻片，并使用苏木精和曙红 (H&E) 和 Masson 三色对其进行染色。载玻片是由被委员会认证的病理学家评价。

[0655] 病理报告显示于以下实例中。

[0656] 材料和方法。

[0657] 测试设备

[0658] 测试物是 i) 包含接种有自体膀胱来源的猪平滑肌细胞 (24.9×10^6 细胞, 40.7×10^6 细胞, 29×10^6 细胞, 24.25×10^6 细胞, 或 35.7×10^6 细胞) 的合成乳酸 / 羟基聚合物的管道形支架; ii) 包含接种有自体血液来源的猪平滑肌细胞 (40.7×10^6 细胞或 29×10^6 细胞) 的合成乳酸 / 羟基聚合物的管道形支架 iii) 包含接种有自体脂肪来源的猪平滑肌细胞 (24×10^6 细胞, 40×10^6 细胞, 33.1×10^6 细胞, 或 29×10^6 细胞) 的合成乳酸 / 羟基聚合物的管道形支架和 iii) 包含无任何接种细胞的合成乳酸 / 羟基聚合物的管道形支架。

[0659] 32 个哥廷根小型猪 (16 个雌性和 16 个雄性) 于 2008 年 5 月 13 日来自农场 (North Rose, New York)。该动物为 7 个月大。3 个其它的小型猪 (2 个雌性和 1 个雄性) 来自同一卖主。这些其它的动物为 6 个月大, 被作为备用获得。在收到后, 对动物进行疾病或损伤迹象检查。在最初的检查后, 最初装运的动物检疫从收到时开始被隔离 6 天, 并被批准用于体检后的研究。备用动物被隔离 4 天, 但本研究并没有使用。

[0660] 确认。每个动物被确认具有通过耳标和笔卡上显示的唯一编号。

[0661] 初步组分配是根据平均组重量。根据所收获组织和外周血的间接体内细胞扩张物, 对组 1-3 中动物的进行了分配变化。

[0662] 外科手术。

[0663] 活检 / 组织采集: 对于组 1-3 (构建测试物) 的动物, 在第 0 天 (植入操作) 前 6-10 周获得膀胱和脂肪组织以及静脉血的活检样本。组 4 动物 (支架 - 只有测试物) 不经受这些操作。对于组织活检操作, 立即开始在腹部中从尾端至脐部制得正中切口。从中线入口处采集约 20-50 克柔软易弯曲的皮下脂肪组织 (无结缔组织) 的脂肪活检样本, 如果可能的话。从膀胱的顶凸圆采集膀胱活检样本 (约 2.5 厘米 \times 2.5 厘米)。采集的组织样本被个别地无菌转移到含有组织培养基的容器中。采用吸收性缝线材料对膀胱缺损缝合至少两层。采用适当大小的吸收性缝线材料对腹部切口层进行缝合。采用适当大小的吸收性缝线材料以表皮的方式对皮肤进行缝合。

[0664] 将每个动物的约 6 个 10 毫升小份静脉血采集于肝素细胞准备管中。然后将血液小瓶装入一个冰袋冷却容器 ($\sim 8^\circ\text{C}$) 中。

[0665] 插管操作。第 0 天 (测试物植入), 将留置导管置于每个动物的颈静脉中, 以促进血液采集。右颈内静脉周围的区域被剃光, 并如上所述被准备。采用无菌 9.0Fr 空心硅导管对所有动物进行插管, 插入右颈外静脉并通过缝合线固定, 以防止移动。特大 DaVINCI 端口被固定并植入皮下凹坑中。

[0666] 测试设备植入。颅端至脐部 5 厘米和尾侧延伸约 15 厘米得到腹部正中切口。腹膜被确定, 然后小心地从腹部空格中分离。小心以确保组织管仍然完好无损, 并有血供应。

[0667] 然后使膀胱暴露, 小心地排空尿液, 确保没有尿液进入腹腔。供应膀胱的动脉和静脉被确定, 并结扎。输尿管被确定, 置于支架上, 并从膀胱小心翼翼地横切。当尿道横切时对其结束缝制。然后除去膀胱。将左输尿管小心翼翼地从前腹膜筋膜 (扩张至颅) 分离, 直到有足够的流动性, 以达到测试物的右侧。不受约束地解剖右输尿管, 直到其达到测试物的流入 (颅) 端。以简单连续的模式将输尿管缝合到 3-0Vicryl 的测试物上。将腹膜缠

绕测试物以提供血管来源、水密封性和流出皮肤气孔的尿液通道。腹膜缠绕还可从测试物（位于腹腔内）的尾端延伸约 5-7cm，以形成尿液通过腹壁外流出皮肤表面的通道。采用 3-0Vicryl 缝合腹膜。

[0668] 气孔和开孔端操作：在乳腺侧面的腹侧腹壁上创建一个开孔。无将构建或只有支架的腹膜围腔从腹内取出，并与皮肤缝合。从腹内取出没有构建或只有支架的腹膜围腔，并缝合至皮肤。沿着缝合线涂上手术粘合剂，其中腹膜退出体壁。通过开孔从腹内取出与支架连接的缝合线，以便将来除去。安装一个开孔端(Tracoe®)。在植入后约 1-3 个月，将研究特异性的开孔端用于余下的动物。对于这两种类型，在开孔端缝合后，采用非吸收缝合线对腹部切口进行封闭。皮肤以常规的方式被封闭。

[0669] 监测操作。在整个操作约 20 分钟时间间隔内对生命体征（氧速率、氧 [氧气] 饱和度和脉搏、呼吸和体温）进行监测。

[0670] 手术后操作。

[0671] 手术后药物治疗：除了氨基糖苷类、喹诺酮类和皮质类固醇之外，并行治疗允许保持良好的动物健康。每种药物的鉴定、剂量、给药途径和频率都被记录并保留于研究档案中。

[0672] 在存活期，发展的临床症状与本研究进展相关。这些都是通过药物治疗的治疗中心的兽医处理。利用了以下药物。丁丙诺啡被用来对照在后手术期的疼痛。Rimadyl（卡洛芬，消炎）被用于手术后和然后根据需要（即，气孔区的后清创术）。Excede（头孢噻呋）为一种长效头孢类抗生素。这被用于预防，以防止感染，特别是尿路。Baytril（恩诺沙星）为一种喹诺酮类抗生素，并被用于治疗肺炎和头孢噻呋没有响应的严重尿路感染。Reglan（胃复安）被用于治疗呕吐或便秘。Yobine 被用于扭转镇静甲苯噻嗪的影响。

[0673] 支架除去。从植入手术后 5-14 天的不同时间点，如上所述对动物进行麻醉，并除去输尿管支架。

[0674] 手术后管理。

[0675] 开孔端：对于 2 周后植入，对开孔端是否通畅进行评价（尿液引流）。如果在检查淋漓时没有观察到尿液，用生理盐水冲洗开孔端，以评估通畅。

[0676] 切口位置：在裂开、异常排放、气味（或直至痊愈）刺激性或任何异常植入（或直至痊愈）后 2 周，还每天对切口位置进行了评价。

[0677] 清创术：开始清创术操作，因为管道中累积了碎片 / 凝乳状材料，并潜在地阻碍尿液的自由流通。植入后研究的动物已达到 35-52 天。对于清创术，如所述使动物镇静。如果碎片材料大于开孔口，在开孔上创建一小切口，以有助于清创术。碎屑是外表上确定的，用钳子抓住，并轻轻牵引。一旦除去所有可见的碎片，开孔与盐溶液齐平。开孔切口靠近缝合线，插入新的研究特定开孔端，并确保缝合动。动物被允许按协议恢复。

[0678] 颈口：用注射生理盐水冲洗颈静脉口导管，并每周用肝素（100U/ 毫升，~ 2-3 毫升）锁定，直到其后每次使用的周 4，以保证通畅。

[0679] 成像

[0680] 静脉肾盂造影术：在第 8 周和尸体剖检之前过程中，在透视引导下肾动脉被直接注射入不透射线的造影剂后得到肾盂造影照片。为了操作，动物被给予镇静，通过任何接入是通过股动脉或外周静脉获得入口。

[0681] 肠曲造影术（逆行肾盂造影）。5 个动物 [组 2 中的动物 9（第 33 天）和 10（第 30 天）；组 3 中的动物 17（第 48 天）和组 4 中的动物 27（第 20 天）和 29（第 41 天）] 经受肠曲造影术以确认瘘管的存在。那些动物通过洗涤、漂洗和干燥开孔腹部区为透视成像作准备。比例为 3 : 1 的盐水和造影剂混合物通过开孔被注射入管道。随后进行透视成像。

[0682] 超声检查。在基线（只有肾脏）处进行管道和肾脏的超声成像，在第 2、6 和 10 周过程中以及尸体剖检前。对本操作的动物进行麻醉。

[0683] 观察。

[0684] 健康评价。从收到时间直至安乐死，可能显示对健康有不良影响的外观和行为异常的动物每天被观察两次。在每次检查（进行相差约 8 小时）时，技术人员走查研究室，以确认所有动物都已吃完，并且每个笼子里有尿液和粪便排出的证据。体征，例如，嗜睡、消瘦、异常发声、缺失解剖和裂伤以及异常行为迹象，被指出，如果存在的话。在这些日常评价过程中动物没有从其笼子里移除。任何异常迹象被记录在案。

[0685] 体重。在活检前（组 1-3）、植入手术前（组 1-4）和尸体剖检前（组 1-4）记录体重。

[0686] 临床病理学。

[0687] 血液。在活检前（组 1-3）、植入手术前（组 1-4）、第 1、2、3、4 和 8 周以及尸体剖检前通过颈静脉的内置口（组 4）采集血液学（CBC）分析、凝固和血清化学参数的血液样本。在活检前（组 1-3）和植入手术前（组 4）通过颈静脉或股静脉采集血液气体分析的血液样本。

[0688] 如例 3 中所述，进行了血液学、凝固、血清化学和血液气体的分析。

[0689] 其它分析。安乐死之前，从动物 23、18、12、6、1 和 15 采集肝素血液和血清样本。将一个 10 毫升的全血液样本采集于肝素管。将其它血液采集于两个 4.0 毫升血清分离管中，如上所述分离血清。

[0690] 尿液。两种方法（导管插入或试管捕捉方法）被用作在预定时间点（活检前 [组 1-3]、植入手术前 [组 4] 和尸体剖检前）采集尿液样本。所用的方法被记录。所需的样本大小为至少 3 毫升，其在 5 毫升无菌管中被分离为三小份。当样本采集困难时，定量样本采取先例。如例 3 所述对样本进行定性和定量参数评价。

[0691] 结果。

[0692] 活检。根据组 1、2、3 和备用中所有动物的协议得到膀胱组织和血液样本。得自所有雄性动物的脂肪组织活检样本小于协议规定的最低限 20 克。然而，从采集的组织扩增足够的 SMC 以产生被分配给组 2 的雄性动物的构建体。3 个动物（动物 22 和 23 以及备用动物 34）不能得到脂肪组织。动物 22 和 23 被分配给组 3。表 5.2 给出了脂肪活检样本的个别体重。

[0693] 植入。所有动物没有发生植入意外（有两个例外）。动物 30（雄性，组 4），具有尝试在测试物植入时置于支架被穿孔的解剖学上的小输尿管。该动物被麻醉，并不放回。动物 29（雄性，组 4），也具有在测试物植入时被穿孔的小输尿管。该动物被成功地植入，并存活于外科手术。

[0694] 支架除去。表 5.2 给出了个别支架除去数据。在植入后 5-14 天除去输尿管支架。

[0695] 死亡。表 5.2（以上）和表 5.5（以下）显示了植入测试物的 31 个动物中每一个

的植入后存活天数和最后处置。动物 30(组 4) 没有被植入测试物是因为输尿管穿孔。使动物安乐死,并不放回,减少总 N 至 31 和组 4-7 动物的 N。使 24 个动物非预定死亡和 7 个动物存活至预定处死。表 5.3 总结了按处理组的 24 个非预定死亡的处置(死亡分类)。

[0696] 表 5.3

[0697]

死亡	组 1	组 2	组 3	组 4	总
组 N	8	8	8	7	31
存活操作相关性死亡	0/8	0/8	1/8	0/7	1/31
发现死亡	0/8	2/8	0/8	1/7	3/31
安乐死	6/8	5/8	5/8	4/7	20/31
总的未预定的尸体剖检	6/8	7/8	6/8	5/7	24/31
预定的尸体剖检	2/8	1/8	2/8	2/7	7/31

[0698] PCV-2 相关性死亡: 在存活临床观察过程中,观察到与 PCV-2 感染一致的皮肤病变。12 个非预定死亡动物发生了与归因于猪皮炎和肾病综合症(PDNS)的病理特点一致的一种或多种损害,其与 PCV-2 感染相关。根据例 3 的标准,动物被归类为 PCV-2 感染。按照这些标准,24 个未预定尸体剖检动物被鉴定出 12 个患有猪 PCV-2 感染。这些包括组 1 中 5 个动物(动物 5、7、2、4 和 3);组 2 中 4 动物(动物编号:13、16、14 和 10);组 3 中 2 个动物(动物编号:20 和 19);和组 4 中 1 个动物(动物编号:28)。结果部分将不讨论 PCV-2 动物的微观结果,由于 PCV-2 病症被认为是无关设备发病的确定性原因。

[0699] 非 PCV-2 相关性死亡: 总共 12 个非预定死亡与检测到的 PCV-2 病毒感染(包括 1 个存活操作相关性死亡)不相关。不可归因于 PCV-2 感染的 12 个非预定死亡包括组 1 中的 1 个动物(动物 8);组 2 中的 3 个动物(动物 11、9 和 12),组 3 中的 4 个动物(动物 24、21、22 和 17)和组 4 中 4 个动物(动物编号:32、31、29 和 27)。这些动物临床下降中的重要事件是通过气孔的尿液和碎片外流的阻塞。腹腔的腹侧部分和解剖关联的测试物植入似乎促进了阻塞,其中上覆腹部器官的重量可导致管道关闭、粘附和瘘管形成以及肾脏并发症(例如扩张、发炎和/或输尿管或肾感染)。测试物被同样地手术植入所有研究动物中;因此,所有组中的阻塞相关性并发症具有类似的疾病生物学机理(即,因为四足解剖,腹部脏器停留在管道上)。

[0700] 通过潜在结果的非预定死亡分布。表 5.4 给出了 24 个非预定死亡中潜在结果的概要。

[0701] 表 5.4

[0702]

死亡目录	组 1	组 2	组 3	组 4	总

PCV-2 感染的迹象	5	4	2	1	12
非 PCV-2 相关性非预定死亡	1	3	4	4	12
非预定死亡总数	6	7	6	5	24

[0703] 表 5.5 显示了植入测试物的每个动物的死亡目录 (S = 预定处死 ;FD = 被发现死亡 ;E = 临床病情差的安乐死 ;A = 在手术后操作并发症中死亡 ;SMC = 平滑肌细胞 ;NA = 不适用的 ;F = Fe 雄性 ;M = 雌性 ;P = PCV-2 相关性死亡 ;Non-P = 非 PCV-2 相关性死亡 ;SURV = 存活至预定处死。)

[0704] 表 5.5

[0705]

动物	性别	组	SMC来源	研究天数	处置	死亡组
5	M		膀胱	44	E	P
2	F			68	E	P
8	M			9	E	非-P
4	F			28	E	P
1	F			81	S	SURV
3	F			69	E	P
6	M			83	S	SURV
7	M			42	E	P
13	M		脂肪	82	FD	P
16	M			63	FD	P

[0706]

10	F			30	E	P
9	F			33	E	非-P
11	F			58	E	非-P
14	M			63	E	P
12	F			70	E	非-P
15	M			81	S	SURV
18	F		血液	80	S	SURV
24	M			77	E	非-P
21	M			73	E	非-P
20	F			6	E	P
22	M			51	A	非-P
23	M			81	S	SURV
19	F			70	E	P
17	F			48	E	非-P
26	F		只有支架, 无	84	S	SURV
32	M			31	E	非-P
27	F			20	E	非-P
31	M			55	E	非-P
25	F			84	S	SURV
29	M			48	E	非-P
28	F			17	FD	P

[0707] 与安全性相关的结果。得到植入测试物的所有 31 个动物的个别和组数据（数据不显示）。讨论针对于存活至预定尸体剖检的 7 个动物和 12 个非 PCV-2 相关性非预定死亡。数据组织如下：

[0708] 临床健康观察和手术后护理。对所有动物的个别临床健康观察和手术后护理进行了观察（数据未显示）。要区分预期手术后临床观察，由于外科创伤和恢复以及预期与阻塞相关的临床观察（即，安全信号），以下的数据被分解为 2 个目录：观察 <30 天和观察 >31 天。

[0709] 7 个存活动物的临床健康观察和手术后护理。在植入后所述第 30 天，对任何动物进行清创术。观察到厌食（不吃），并对所有 7 个动物进行开孔端维护。3/7 的动物中观察到软粪便（腹泻）：组 1 中的 2/2（动物 1）和组 3 中的 1/2（动物 23）。这些结果在以下侵入性外科手术中并不少见。（表 5.6-7 个存活动物按组的相关临床性健康观察和手术后护理（<30 天 PI））。

[0710] 表 5.6

[0711]

临床观察	组 1N = 2	组 2N = 1	组 3N = 2	组 4N = 2	总 N = 7
清创术	0/2	0/1	0/2	0/2	0/7
厌食（不吃）	2/2	1/2	2/2	2/2	7/7
开孔端维护	2/2	1/1	2/2	2/2	7/7
软粪便（腹泻）	2/2	0/1	1/2	0/2	3/7

[0712] 在 30 天（即第 31 天 -84 ± 5 / 尸体剖检）后，进行清创术以除去 4/7 动物中的碎片 / 碎屑：组 1 中的 1/2（动物 1）；组 2 中的 1/1（动物 15）；和组 3 中的 2/2（动物 23）。只有支架植入的动物（组 4）并未经受清创术操作。观察到 4/7 的动物厌食（不吃）：组 1 中的 1/2（动物 1）；组 2 中的 1/1（动物 15）；组 3 中的 1/2（动物 18）和组 4 中的 1/2（动物 26）。对所有 7 个动物的开孔端进行维护。5/7 的动物观察到软粪便（腹泻）：组 1 的 2/2（动物 1 和 6）；组 2 的 1/1（动物 15）和组 3 的 2/2（动物 23 和 18）（见表 5.7-7 个存活动物按组的相关临床性健康观察和手术后护理；(>30 天 PI)）。

[0713] 表 5.7

[0714]

临床观察	组 1N = 2	组 2N = 1	组 3N = 2	组 4N = 2	总共 N = 7
清创术	1/2	1/1	2/2	0/2	4/7
厌食（不吃）	1/2	1/1	1/2	1/2	4/7
开孔端维护	2/2	1/1	2/2	2/2	7/7
软粪便（腹泻）	2/2	1/1	2/2	0/2	5/7

[0715] 12 个非 PCV-2 非预定死亡的临床健康观察和手术后护理。在植入后所述第 30 天, 对任何动物进行清创术。11/12 的动物观察到厌食 (不吃): 组 1 中的 1/1 (动物编号 .8), 组 2 中的 3/3 (动物编号 .9、11 和 12), 组 3 中的 4/4 (动物编号 .17、21、24 和 22) 和组 4 中的 3/4 (动物编号 .27、32 和 29)。对所有 12 个动物的开孔端进行维护。5/12 的动物中观察到软粪便 (腹泻): 组 1 中的 1/1 (动物编号 .8), 组 2 中的 1/3 (动物编号 .11) 和组 3 中的 3/4 (动物编号 .21、22 和 24)。这些结果在以下侵入性外科手术中并不少见 (见表 5.8)。

[0716] 表 5.8

[0717]

临床观察	组 1N = 1	组 2N = 3	组 3N = 4	组 4N = 4	总 N = 12
清创术	0/1	0/3	0/4	0/4	0/12
厌食 (不吃)	1/1	3/3	4/4	3/4	11/12
开孔端维护	1/1	3/3	4/4	4/4	12/12
软粪便 (腹泻)	1/1	1/3	3/4	0/4	5/12

[0718] 在第 30 天前 2 个动物被麻醉; 组 1 动物 8 (第 9 天) 和组 4 动物 27 (第 20 天)。2 个动物在第 31 和 33 天被麻醉; 组 4 动物 32 和组 2 动物 9。这些动物被包括在 >30 天的分析之内。在第 30 天 (即第 31 天 -84 ± 5 / 尸体剖检) 后, 进行清创术以除去 5/12 动物的碎片 / 碎屑: 组 2 中的 2/3 (动物编号为 12 和 11) 和组 3 中的 3/4 (动物编号为 21、22 和 24)。使植入只有支架的动物 (组 4) 安乐死或在进行清创术操作之前被发现死亡。7/12 动物被观察到厌食 (不吃): 组 2 中 1/3 (动物编号为 11); 组 3 中 4/4 (动物编号为 17、21、22 和 24) 和组 4 中 2/4 的动物 (动物编号 .29 和 31)。对 10/12 的动物开孔端进行维护: 组 2 中的 3/3 (动物编号为 9、11 和 12), 组 3 中的 4/4 (动物编号 .21、22、17 和 24) 和组 4 中的 3/4 (动物编号为 29、31 和 32)。8/12 的动物被观察到软粪便 (腹泻): 组 2 中的 3/3 (动物编号 .9、11 和 12), 组 3 中的 4/4 (动物编号 .17、21、22 和 24) 和组 4 中的 1/4 (动物编号 .29)。不良的健康观察被认为是阻塞的结果。(表 5.9-12 个非 PCV-2 非预定死亡 (>30 天 PI) 按组的相关临床健康观察和手术后护理)。

[0719] 表 5.9

[0720]

临床观察	组1 N=1	组2 N=3	组3 N=4	组4 N=4	总 N=12
清创术	0/1*	2/3^	3/4	0/4◆▲	5/12
厌食(不吃)	0/1*	1/3^	4/4	2/4◆▲	7/12
开孔扣 维护	0/1*	3/3^	3/4	3/4◆▲	9/12
软粪便(腹泻)	0/1*	3/3^	4/4	1/4◆▲	8/12

[0721] *9. 在第 9 天使第 8 号动物安乐死

[0722] ◆在第 20 天使第 27 号动物安乐死

[0723] ▲在第 31 天使第 32 号动物安乐死

[0724] ^ 在第 33 天使第 27 号动物安乐死

[0725] 体重。以下表 5.10 和表 5.11 给出了所有动物的个别和组体重。

[0726]

表5.10

动物	组编号	组	性 别	重量(Kg)						
				Bx 前	Sx前	Δ: Bx前 →Sx前	% 重量B x前 →Sx前	尸体剖检	Δ: SX前 →Nx前	% 重量 ΔSX 前→Nx前
1	1	膀胱	F	12.8	19.8	7.0	55%	13.4	-6.4	-32%
2	1	膀胱	F	12.9	18.7	5.8	45%	16.6	-2.1	-11%
3	1	膀胱	F	14.4	18.7	4.3	30%	13.1	-5.6	-30%
4	1	膀胱	F	11.9	17.9	6.0	50%	15.8	-2.1	-12%
5	1	膀胱	M	14.0	16.0	2.0	14%	13.0	-3.0	-19%
8	1	膀胱	M	14.2	16.0	1.8	13%	11.5	-4.5	-28%
6	1	膀胱	M	15.2	15.9	0.7	5%	16.2	0.3	2%
7	1	膀胱	M	17.2	20.3	3.1	18%	17.0	-3.3	-16%
平均值				14.1	17.9	3.8	27%	14.6	-3.3	-19%
标准差偏差				1.6	1.8	2.3		2.1	2.1	
9	2	脂肪	F	16.2	19.7	3.5	22%	20.2	0.5	3%
10	2	脂肪	F	13.1	17.8	4.7	36%	15.5	-2.3	-13%
11	2	脂肪	F	16.5	18.5	2.0	12%	13.1	-5.4	-29%
12	2	脂肪	F	11.9	18.6	6.7	56%	19.2	0.6	3%
13	2	脂肪	M	17.7	17.4	-0.3	-2%	FD	NA	NA
14	2	脂肪	M	14.0	14.3	0.3	2%	16.4	2.1	15%
15	2	脂肪	M	15.4	17.1	1.7	11%	15.7	-1.4	-8%
16	2	脂肪	M	17.6	17.2	-0.4	-2%	FD	NA	NA
平均值				15.3	17.6	2.3	15%	16.7	-1.0	-5%
标准差偏差				2.1	1.6	2.5		2.6	2.7	

[0727]

表5.11

动物	组编号	组	性别	Bx 前	Sx前	Δ: Bx前 →Sx前	% 重量B x前 →Sx前	尸体剖检	Δ: SX前 →Nx前	% 重量 ΔSX前→Nx 前
17	3	血液	F	13.3	18.6	5.3	40%	17.4	-1.2	-6%
18	3	血液	F	13.2	16.8	3.6	27%	20.1	3.3	20%
19	3	血液	F	13.0	18.0	5.0	38%	12.3	-5.7	-32%
20	3	血液	F	14.8	20.1	5.3	36%	19.2	-0.9	-4%
22	3	血液	M	13.8	17.0	3.2	23%	16.0	-1.0	-6%
23	3	血液	M	13.2	16.6	3.4	26%	18.7	2.1	13%
21	3	血液	M	14.8	15.8	1.0	7%	10.9	-4.9	-31%
24	3	血液	M	16.2	18.1	1.9	12%	15.7	-2.4	-13%
平均值				14.0	17.6	3.6	26%	16.3	-1.3	-8%
标准差偏差				1.1	1.4	1.6		3.3	3.1	
25	4	支架	F	NA	16.5	NA	NA	17.3	0.8	5%
26	4	支架	F	NA	14.0	NA	NA	10.9	-3.1	-22%
27	4	支架	F	NA	15.0	NA	NA	12.8	-2.2	-15%
28	4	支架	F	NA	18.4	NA	NA	FD	NA	NA
29	4	支架	M	NA	16.1	NA	NA	13.0	-3.1	-19%
30	4	支架	M	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
31	4	支架	M	NA	18.2	NA	NA	16.3	-1.9	-10%
32	4	支架	M	NA	16.1	NA	NA	12.4	-3.7	-23%
平均值				NA	16.3	NA	NA	13.8	-2.2	-16%
标准差偏差				NA	1.6	NA	NA	2.5	1.6	

[0728] 7个存活动物的体重. 7个动物的体重在研究过程中波动是由于手术后并发症（例如动物模型并发症，导致肠阻塞、腹腔粘连、瘘管和肾脏并发症）（表 5.12）。虽然各组动物的数量小，所有接受构建体（组 1-3）的动物从活检前到手5术前体重增加。除了组 3 之外

的所有组从植入时直至尸体剖检体重减轻。

[0729] 表 5.12

[0730]

组	重量(Kg)--平均*						
	活检前	手术前	Δ: 活检前 → 手术前	% Δ: 活检前 → 手术前	尸体剖检 前	Δ: 手术前 → 尸体剖 检前	% Δ: 手术前 → 尸体剖 检前
1(N=2)	14.0	17.9	3.9	30%	14.8	-3.1	-15%
2(N=1)	15.4	17.1	1.7	11%	15.7	-1.4	-8%
3(N=2)	13.2	16.7	3.5	27%	19.4	2.7	16%
4(N=2)	NA	15.3	NA	NA	14.1	-1.2	-9%

[0731] 12 个非 PCV-2 非预定死亡的体重。在研究过程中,所有 12 个动物的体重波动是由于手术后并发症(例如动物模型并发症导致阻塞、腹部粘连、瘘管和肾脏并发症)(表 5.13)。接受构建体(组 1-3)的所有动物从活检前到手术前体重增加。所有组从植入时直至尸体剖检体重减轻,其中组 1 减轻体重量最多(N=1),组 2 减轻体重量最少。(表 5.13-12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均体重;NA=不适用的)。

[0732] 表 5.13

[0733]

组	体重(Kg)-平均						
	活检前	手术前	Δ: 活检前 → 手术前	% Δ: 活检前 → 手术前	尸体剖检 前	Δ: 手术前 → 尸体剖 检前	% Δ: 手术前 → 尸体剖 检前
1(N=1)	14.2	16.0	1.8	13%	11.5	-4.5	-28%
2(N=3)	14.9	18.9	4.1	30%	17.5	-1.4	-8%
3(N=4)	14.5	17.4	2.9	20%	15.0	-2.4	-14.2 %
4(N=4)	NA	16.4	NA	NA	13.6	-2.7	-17%

[0734] 临床病理学。以下给出了个别动物的临床病理学数据(血液学(CBC);凝固;血清化学;血液气体;和尿分析。

[0735] 血液学数据可在表 5.14(白色血液计数(THSN/UL)参考范围 11-22)中发现;5.15(红色血液计数(MILL/UL)参考范围 5-8);5.16(血红蛋白(%)参考范围 10-16);5.17(血细胞比容(%)参考范围 32-50);5.18(MCV(FL)参考范围 50-68);5.19(MCH(微微克)参考范围 17-21);和 5.20(PLATELET(THSN/UL)参考范围 325-715)。此数据是基于每组动物的个别值(数据未显示)。

[0736] 表 5.14

[0737]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	8.1	21.6	26.6	16.6	23.8	16.5	18.0
	标准偏差	1.3	12.5	14.6	5.5	9.9	3.5	8.1
2	平均值	6.6	15.6	17.0	20.3	18.1	21.9	25.4
	标准偏差	2.0	6.9	3.7	6.3	3.8	9.9	11.7
3	平均值	9.4	14.3	18.8	17.1	19.7	22.4	22.0
	标准偏差	2.6	4.0	5.4	4.4	4.8	7.7	10.6
4	平均值	11.5	14.5	25.2	30.9	25.3	27.3	34.5

[0738] 表 5.15

[0739]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	6.75	6.47	6.08	6.77	6.81	5.11	5.66
	标准偏差	0.95	0.99	1.54	1.03	0.69	0.33	1.71
2	平均值	6.36	6.64	6.03	6.48	5.89	6.03	5.68
	标准偏差	0.41	1.19	1.21	0.99	0.56	1.24	2.18
3	平均值	6.59	7.39	7.21	6.37	6.42	5.42	5.12
	标准偏差	0.71	1.26	1.38	1.25	0.83	0.92	1.28
4	平均值	6.45	6.32	6.41	7.10	6.80	6.11	5.11

[0740] 表 5.16

[0741]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	11.1	10.9	10.4	11.7	11.7	8.6	9.4
	标准偏差	1.7	1.2	2.7	1.9	0.8	0.9	2.8
2	平均值	10.0	10.5	9.6	10.3	9.4	9.3	9.1
	标准偏差	0.9	2.0	1.5	1.2	1.0	1.2	3.2
3	平均值	10.4	12.0	11.9	10.4	10.5	8.7	8.0
	标准偏差	1.2	2.3	2.7	2.1	1.2	1.2	2.3
4	平均值	9.6	9.5	9.7	10.6	10.1	8.9	7.3
	标准偏差	0.7	0.6	1.1	1.9	2.3	3.6	NA

[0742] 表 5.17

[0743]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	34.3	34.2	32.7	36.8	37.4	27.2	29.0
	标准偏差	5.3	3.9	8.2	5.8	2.5	2.7	8.5
2	平均值	31.0	32.8	30.3	33.1	30.6	30.0	27.9
	标准偏差	2.8	5.8	4.7	3.8	3.4	4.1	10.0
3	平均值	32.3	38.1	36.9	32.2	33.1	27.6	25.6

[0744]

	标准偏差	3.9	7.0	8.0	6.5	3.5	3.9	7.7
4	平均值	29.7	29.5	29.6	32.4	30.8	28.2	23.4
	标准偏差	2.0	1.7	3.5	5.5	6.9	11.2	NA

[0745] NA =不适用的, n 对标准偏差来说太小了。

[0746] 表 5.18

[0747]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	51	53	54	54	55	54	51
	标准偏差	4	3	3	4	3	4	4
2	平均值	49	49	51	52	52	50	49
	标准偏差	2	2	3	3	4	3	3
3	平均值	49	52	51	50	52	51	50
	标准偏差	3	3	3	3	3	5	3
4	平均值	46	47	46	46	45	46	47
	标准偏差	2	2	2	2	1	2	NA

[0748] 表 5.19

[0749]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	16.4	17.0	17.1	17.3	17.2	16.8	16.6
	标准偏差	1.3	1.0	1.0	1.3	1.1	1.6	1.1
2	平均值	15.6	15.8	16.0	16.0	16.0	15.7	16.1
	标准偏差	0.6	0.8	0.8	0.9	1.0	1.2	0.9
3	平均值	15.8	16.2	16.4	16.2	16.4	16.1	15.6
	标准偏差	1.0	1.1	1.2	1.2	1.0	1.5	1.0
4	平均值	15.0	15.0	15.1	14.9	14.9	14.4	14.2

[0750] 表 5.20

[0751]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	419	404	510	418	379	559	322
	标准偏差	89	176	167	171	126	172	397
2	平均值	488	407	531	490	489	605	478
	标准偏差	61	143	163	151	208	286	435
3	平均值	558	434	357	404	453	563	509
	标准偏差	130	104	107	115	198	366	388
4	平均值	568	473	667	537	429	450	557
	标准偏差	126	95	159	199	103	14	NA

[0752] NA =不适用的, n 对标准偏差来说太小了。

[0753] 表 5.21 显示了按时间点的 N- 值。

[0754] 表 5.21

[0755]

按时间点的N-值:							
组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	8	8	7	7	6	4	7
2	8	8	8	8	8	6	6
3	8	8	7	7	7	5	6
4	8	7	7	6	5	3	2

[0756] 表 5.22 提供了凝固数据（前凝血酶时间（秒）参考范围 10-15.5）;5.23（活化部分凝血酶原激酶时间（s）参考范围 18.4-27.7）;和 5.24（纤维蛋白原（毫克 / 分升）参考范围 100-500）。此数据是基于每组动物的个别值（数据未显示）。

[0757] 表 5.22

[0758]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	11.5	11.8	11.7	12.0	11.5	11.4	16.3
	标准偏差	0.8	1.1	1.6	0.7	0.8	0.7	5.5
2	平均值	11.3	11.4	11.4	10.9	11.3	11.5	12.6
	标准偏差	0.8	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4	1.2
3	平均值	11.4	11.2	11.7	10.9	11.4	11.3	12.2
	标准偏差	0.7	1.4	0.4	0.4	0.6	1.3	1.7
4	平均值	11.1	11.7	11.9	13.0	12.2	12.9	12.3
	标准偏差	0.3	0.2	0.7	0.9	0.6	2.0	0.6

[0759] 表 5.23

[0760]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	34.63	32.18	36.96	0.00	33.62	29.05	22.14
	标准偏差	9.47	9.06	15.08	0.00	10.19	8.09	7.70
2	平均值	33.88	32.89	39.53	37.20	29.95	20.57	20.18
	标准偏差	6.80	9.73	12.53	10.81	7.17	3.80	3.93
3	平均值	31.65	24.74	41.26	37.40	34.33	22.74	18.92
	标准偏差	6.36	5.47	17.12	14.67	14.41	7.61	5.20
4	平均值	40.51	41.66	30.29	36.10	30.52	38.00	29.05
	标准偏差	2.80	9.16	9.36	7.93	4.01	11.10	NA

[0761] 表 5.24

[0762]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	520	1561	837	1102	656	797	977
	标准偏差	155	2237	468	452	368	200	530
2	平均值	473	882	752	562	867	925	1218
	标准偏差	179	483	246	261	126	327	589
3	平均值	578	1140	591	610	1019	859	1339
	标准偏差	129	851	299	275	762	596	1276
4	平均值	700	1084	1908	1617	1051	1780	1496
	标准偏差	427	698	835	589	462	880	NA

[0763] NA =不适用的, n 对标准偏差来说太小了。

[0764] 表 5.25 显示了按时间点的 N- 值。

[0765] 表 5.25

[0766]

组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	8	8	7	7	6	4	7
2	8	8	8	8	8	6	6
3	8	8	7	7	7	5	6

[0767]

4	8	7	7	6	5	3	2
---	---	---	---	---	---	---	---

[0768] 表 5.26 提供了血清化学数据 (钠 (MEQ/L) 参考范围 135-150) ;5.27 (钾 (MEQ/L) 参考范围 4.4-6.7) ;5.28 (氯 (MEQ/L) 参考范围 93-106) ;5.29 (总钙 (MEQ/L) 参考范围 8.6-10.7) ;5.30 (磷 (毫克 / 分升) 参考范围 9.9-11.9) ;5.31 (AST SGOT(U/L) 参考范围 0-32) ;5.32 (ALT SGPT(U/L) 参考范围 0-0) ;5.33 (ALP(U/L) 参考范围 0-290) ;5.34 (γ - 谷氨酰转肽酶 (U/L) 参考范围 10-60) ;5.35 (葡萄糖 (毫克 / 分升) 参考范围 85-150) ;5.36 (BUN(毫克 / 分升) 参考范围 10-30) ;5.37 (肌酸酐 (MC/ 分升)1-2.7) ;5.38 (胆固醇 (毫克 / 分升) 参考范围 36-132) ;5.39 (甘油三酯 (毫克 / 分升) 参考范围 50-100) ;5.40 (总胆红素 (毫克 / 分升) 参考范围 0.0-1.0) ;5.41 (白蛋白 (毫克 / 分升) 参考范围 1.6-4.0) ;5.42 (总蛋白质 (G/ 分升) 参考范围 5.5-8.5) ;5.43 (球蛋白 (G/ 分升) 参考范围 1.5-6.9) ;和 5.44 (白蛋白 / 球蛋白之比参考范围 0.2-2.7) 。此数据是基于每组动物的个别值 (数据未显示) 。

[0769] 表 5.26

[0770]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	153	139	141	143	141	138	133
	标准偏差	15	3	2	5	4	4	15
2	平均值	147	141	136	139	139	137	137
	标准偏差	11	5	7	6	2	4	4
3	平均值	152	137	131	142	141	141	132
	标准偏差	12	6	8	3	4	4	11
4	平均值	140	138	136	131	136	135	140
	标准偏差	3	5	5	6	8	5	NA

[0771] 表 5. 27

[0772]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	4.4	4.2	4.6	4.8	4.8	4.3	5.6
	标准偏差	0.4	0.3	1.0	0.4	1.2	0.5	1.1
2	平均值	4.2	4.1	4.0	4.7	4.4	4.7	5.0

[0773]

	标准偏差	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.6
3	平均值	4.2	4.3	5.6	4.5	4.7	5.1	5.7
	标准偏差	0.2	0.9	2.3	0.4	0.3	0.7	1.7
4	平均值	3.9	4.1	5.3	4.3	5.0	4.3	4.6
	标准偏差	0.3	0.3	0.7	0.9	2.4	1.4	NA

[0774] 表 5. 28

[0775]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	111	98	101	101	98	103	97
	标准偏差	14	2	2	2	3	4	23
2	平均值	105	100	97	99	101	99	99
	标准偏差	12	6	5	4	2	5	11
3	平均值	111	96	94	102	100	103	102
	标准偏差	12	7	7	5	5	4	11
4	平均值	98	97	94	89	94	87	98
	标准偏差	4	6	6	7	10	10	NA

[0776] 表 5.29

[0777]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	10.9	9.9	10.0	10.4	10.3	9.9	9.8
	标准偏差	0.7	0.4	0.9	0.5	0.5	0.3	0.8
2	平均值	10.7	9.6	9.8	10.3	9.9	10.0	9.6
	标准偏差	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.4	0.6
3	平均值	10.6	10.0	10.3	9.9	10.2	10.3	9.9
	标准偏差	0.7	0.6	0.8	0.4	0.5	0.4	0.9
4	平均值	10.4	10.3	10.3	10.0	10.2	10.6	10.4
	标准偏差	0.3	0.7	0.6	0.6	0.7	0.3	NA

[0778] NA =不适用的, n 对标准偏差来说太小了。

[0779] 表 5.30

[0780]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	9.5	6.1	6.2	6.8	6.8	6.5	11.6
	标准偏差	1.1	0.6	0.9	0.8	1.2	0.8	5.9
2	平均值	8.6	5.8	6.8	6.9	6.8	6.2	9.0
	标准偏差	0.9	1.5	0.8	0.8	0.7	0.4	5.4
3	平均值	8.5	7.2	8.4	6.6	6.6	6.8	8.3
	标准偏差	1.4	3.0	3.7	1.7	0.8	0.7	1.8
4	平均值	7.7	6.6	7.4	7.4	7.6	6.8	6.6
	标准偏差	0.5	0.8	0.7	2.2	2.2	2.1	NA

[0781] 表 5.31

[0782]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	108	41	33	22	21	17	301
	标准偏差	202	15	14	10	7	5	577
2	平均值	30	45	17	17	20	39	76
	标准偏差	13	30	3	4	7	17	106
3	平均值	34	44	34	41	27	31	47
	标准偏差	15	26	10	25	19	17	26
4	平均值	29	18	27	42	110	23	46
	标准偏差	19	7	9	38	112	2	NA

[0783] 表 5.32

[0784]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	61	56	48	30	29	23	29
	标准偏差	48	19	19	19	6	10	15
2	平均值	35	51	33	29	28	22	26
	标准偏差	7	5	12	10	12	7	6
3	平均值	63	46	55	53	36	30	24
	标准偏	69	22	18	11	11	6	8

[0785]

	差							
4	平均值	34	29	25	21	41	20	19
	标准偏差	4	9	4	5	25	3	NA

[0786] 表 5.33

[0787]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	113	76	59	66	88	63	68
	标准偏差	32	30	14	23	34	27	34
2	平均值	129	87	75	83	76	66	72
	标准偏差	33	31	15	31	27	10	45
3	平均值	96	99	63	65	64	62	65
	标准偏差	26	47	14	26	19	19	57
4	平均值	102	63	54	65	85	81	91
	标准偏差	25	16	9	23	24	14	NA

[0788] NA =不适用的, n 对标准偏差来说太小了。

[0789] 表 5.34

[0790]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	64	62	47	58	47	48	50
	标准偏差	15	16	8	14	5	4	17
2	平均值	65	47	46	48	63	47	51
	标准偏差	16	8	9	6	15	8	12
3	平均值	59	65	63	49	47	44	50
	标准偏差	12	25	18	17	16	12	27
4	平均值	68	44	65	47	55	43	84
	标准偏差	16	9	28	9	8	5	NA

[0791] 表 5. 35

[0792]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	80	87	78	87	90	83	67
	标准偏差	19	16	29	17	24	15	33
2	平均值	87	75	86	75	74	76	58
	标准偏差	15	17	20	11	19	20	25
3	平均值	89	86	103	71	69	72	240
	标准偏差	22	14	43	7	7	17	390
4	平均值	77	92	96	69	92	100	76

[0793]

	标准偏差	14	9	19	24	32	8	NA
--	------	----	---	----	----	----	---	----

[0794] 表 5. 36

[0795]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	15	17	18	13	13	50	160
	标准偏差	8	10	11	6	2	30	138
2	平均值	12	29	16	19	14	27	140
	标准偏差	8	14	16	18	14	15	51
3	平均值	14	42	35	13	17	44	91
	标准偏差	7	40	46	10	12	34	59
4	平均值	7	13	30	49	33	76	44
	标准偏差	1	4	16	38	35	78	NA

[0796] 表 5.37

[0797]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	1.2	1.3	1.2	1.2	1.2	1.5	4.3
	标准偏差	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.5	4.2
2	平均值	1.1	1.6	1.1	1.1	1.0	1.2	2.0
	标准偏差	0.3	0.7	0.5	0.2	0.2	0.3	1.1
3	平均值	1.3	3.7	1.8	1.0	1.1	1.4	2.0
	标准偏差	0.4	5.6	1.3	0.2	0.4	0.4	1.1
4	平均值	1.1	1.1	1.5	1.9	1.8	6.3	3.5
	标准偏差	0.1	0.1	0.5	1.2	1.0	5.8	NA

[0798] 表 5.38

[0799]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	87	69	69	84	79	77	74
	标准偏差	38	14	12	13	16	19	38
2	平均值	71	80	83	92	79	74	71

[0800]

	标准偏差	27	24	23	28	36	29	26
3	平均值	73	71	65	75	77	73	66
	标准偏差	35	10	26	16	17	17	24
4	平均值	72	83	87	84	87	120	130
	标准偏差	27	31	51	54	41	37	NA

[0801] 表 5. 39

[0802]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	48	46	47	79	76	37	64
	标准偏差	49	11	30	57	62	19	24
2	平均值	40	47	132	41	25	45	57
	标准偏差	35	21	121	30	12	19	11
3	平均值	57	53	40	42	100	53	41
	标准偏差	55	12	20	17	55	27	25
4	平均值	21	27	34	48	45	97	45
	标准偏差	9	9	15	29	26	8	NA

[0803] 表 5. 40

[0804]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.5
	标准偏差	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.5
2	平均值	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3
	标准偏差	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2
3	平均值	0.1	0.3	0.2	0.1	0.0	0.1	0.2
	标准偏差	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1
4	平均值	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.4	0.1
	标准偏差	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.2	NA

[0805] 表 5.41

[0806]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	4.3	3.6	3.7	3.4	3.3	3.5	3.0
	标准偏差	0.4	0.3	0.6	0.3	0.2	0.3	0.4
2	平均值	4.1	3.5	3.4	3.5	3.4	3.2	3.1
	标准偏差	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.2	0.6
3	平均值	4.2	3.8	3.8	3.5	3.4	3.4	3.0
	标准偏差	0.4	0.4	0.3	0.3	0.5	0.3	0.9
4	平均值	4.2	3.7	3.8	3.4	3.4	3.0	3.1
	标准偏差	0.3	0.4	0.4	0.3	0.1	0.2	NA

[0807] 表 5.42

[0808]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	6.3	6.6	7.1	7.7	7.5	7.7	7.8
	标准偏差	0.6	0.7	0.8	0.6	0.7	0.8	0.9
2	平均值	5.7	6.4	6.6	6.9	6.8	7.1	7.0
	标准偏差	0.5	0.6	0.8	0.5	0.5	0.7	0.9
3	平均值	6.3	6.9	7.3	6.8	7.3	7.7	7.5
	标准偏差	0.7	0.6	1.0	0.7	0.7	0.5	1.4
4	平均值	6.1	6.3	7.5	7.4	7.7	8.6	8.1
	标准偏差	0.4	0.5	0.8	0.7	0.9	0.4	NA

[0809] 表 5. 43

[0810]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	2.0	3.1	3.4	4.2	4.2	4.2	4.8
	标准偏差	0.3	0.5	0.5	0.7	0.6	0.9	0.7
2	平均值	1.6	2.9	3.2	3.3	3.4	3.8	3.9
	标准偏差	0.3	0.4	0.5	0.4	0.3	0.7	0.6
3	平均值	2.1	3.1	3.5	3.3	3.9	4.3	4.5
	标准偏差	0.3	0.3	0.9	0.5	0.5	0.3	0.6
4	平均值	1.9	2.6	3.7	4.0	4.3	5.6	5.0
	标准偏差	0.2	0.3	0.6	0.4	0.9	0.4	NA

[0811] 表 5. 44

[0812]

组	Stat	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	平均值	2.1	1.2	1.1	0.8	0.8	0.9	0.6

[0813]

	标准偏差	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
2	平均值	2.7	1.2	1.1	1.1	1.0	0.9	0.8
	标准偏差	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
3	平均值	2.0	1.2	1.1	1.1	0.9	0.8	0.7
	标准偏差	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.1
4	平均值	2.3	1.4	1.1	0.9	0.8	0.5	0.6
	标准偏差	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	NA

[0814] NA = 不适用的, n 对标准偏差来说太小了。

[0815] 表 5.45 显示了按时间点的 N- 值。

[0816] 表 5.45

[0817]

组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1	8	8	7	7	6	4	7
2	8	8	8	8	8	6	6
3	8	8	7	7	7	5	6
4	8	7	7	6	5	3	2

[0818] 以下表 5.46 提供了血液气体数据 (pH) ;5.47(PCO₂(毫米汞柱)) ;5.48(PO₂(毫米汞柱)) ;5.49(BE_{ecf}(毫摩尔/L)) ;5.50(HCO₃(毫摩尔/L)) ;5.51(TCO₂(毫摩尔/L)) ;5.52(SO₂(百分比)) ;5.53(钠(毫摩尔/L)) ;5.54(钾(毫摩尔/L)) ;5.55(离子钙(毫摩尔/L)) ;5.56(葡萄糖(毫克/分升)) ;5.57(血细胞比容(百分比)),和 5.58(Hb)。此数据是基于每组动物的个别值(数据未显示)。表 5.46

[0819]

组	Stat	基线
1	平均值	7.327
	标准偏差	0.046
2	平均值	7.288
	标准偏差	0.050
3	平均值	7.329
	标准偏差	0.044
4	平均值	7.346
	标准偏差	0.048

[0820] 表 5.47

[0821]

组	Stat	基线
1	平均值	68.8

[0822]

	标准偏差	11.0
2	平均值	72.1
	标准偏差	11.1
3	平均值	65.8
	标准偏差	3.9
	平均值	58.6
	标准偏差	6.6

[0823] 表 5. 48

[0824]

组	Stat	基线
1	平均值	267
	标准偏差	201
2	平均值	220
	标准偏差	218
3	平均值	222
	标准偏差	244
4	平均值	287
	标准偏差	200

[0825] 表 5. 49

[0826]

组	Stat	基线
1	平均值	10
	标准偏差	2
2	平均值	8
	标准偏差	3
3	平均值	9
	标准偏差	4
4	平均值	6
	标准偏差	3

[0827] 表 5. 50

[0828]

组	Stat	基线
1	平均值	35.7

[0829]

	标准偏差	2.8
2	平均值	34.3
	标准偏差	3.2
3	平均值	34.7
	标准偏差	3.2
4	平均值	32.0
	标准偏差	2.1

[0830] 表 5. 51

[0831]

组	Stat	基线
1	平均值	38
	标准偏差	3
2	平均值	37
	标准偏差	3
3	平均值	37
	标准偏差	3
4	平均值	34
	标准偏差	2

[0832] 表 5. 52

[0833]

组	Stat	基线
1	平均值	93
	标准偏差	11
2	平均值	84
	标准偏差	19
3	平均值	85
	标准偏差	13
4	平均值	98
	标准偏差	5

[0834] 表 5. 53

[0835]

组	Stat	基线
1	平均值	147
	标准偏差	13
2	平均值	142
	标准偏差	9
3	平均值	146
	标准偏差	10
4	平均值	137
	标准偏差	2

[0836] 表 5.54
[0837]

组	Stat	基线
1	平均值	4.3
	标准偏差	0.5
2	平均值	4.0
	标准偏差	0.4
3	平均值	4.2
	标准偏差	0.3
4	平均值	3.9
	标准偏差	0.2

[0838] 表 5.55
[0839]

组	Stat	基线
1	平均值	1.39
	标准偏差	0.05
2	平均值	1.43
	标准偏差	0.07
3	平均值	1.39
	标准偏差	0.08
4	平均值	1.39
	标准偏差	0.04

[0840] 表 5. 56
[0841]

组	Stat	基线
1	平均值	80
	标准偏差	18
2	平均值	85
	标准偏差	13
3	平均值	88
	标准偏差	20
4	平均值	78
	标准偏差	11

[0842] 表 5. 57
[0843]

组	Stat	基线
---	------	----

[0844]

1	平均值	29
	标准偏差	3
2	平均值	28
	标准偏差	3
3	平均值	28
	标准偏差	3
4	平均值	27
	标准偏差	2

[0845] 表 5. 58
[0846]

组	Stat	基线
1	平均值	9.9
	标准偏差	1.1
2	平均值	9.6
	标准偏差	0.9
3	平均值	9.5
	标准偏差	0.9
4	平均值	9.3
	标准偏差	0.7

[0847] 表 5. 59 显示了按时间点的 N- 值。按时间点计的 N 值。

[0848] 表 5. 59

[0849]

组	基线
1	8
2	8
3	8
4	8

[0850] 表 5. 60 提供了定量微观尿液分析（尿液葡萄糖（毫克 / 分升）参考范围）和 5. 61（尿液总蛋白质（毫克 / 分升）参考范围 0-100）。此数据是基于每组动物的个别值（数据未显示）。

[0851] 表 5. 60

[0852]

组	Stat	基线	尸体剖检前
1	平均值	12.9	3.3
	标准偏差	9.6	3.9
2	平均值	9.8	2.5
	标准偏差	3.6	2.1
3	平均值	11.9	38.0
	标准偏差	7.0	39.2
4	平均值	13.1	2.0
	标准偏差	25.0	NA

[0853] 表 5.61
[0854]

组	Stat	基线	尸体剖检前
1	平均值	38.5	278.0
	标准偏差	38.3	575.2
2	平均值	25.6	24.7
	标准偏差	21.0	54.8
3	平均值	34.5	20.5
	标准偏差	45.2	33.2
4	平均值	9.3	82.5
	标准偏差	11.4	NA

[0855] 表 5.62 提供了每个动物细菌 (/HPF) 参考范围的个体档案。表 5.62
[0856]

动物 #	组	性别	基线	尸体剖检前
1	1	F	痕量	3+
2	1	F	痕量	1+
3	1	F	痕量	-
4	1	F	痕量	-
5	1	M	痕量	1+
8	1	M	痕量	-
6	1	M	痕量	痕量

[0857]

7	1	M	痕量	-
9	2	F	痕量	-
10	2	F	痕量	-
11	2	F	痕量	无
12	2	F	痕量	-
13	2	M	痕量	-
14	2	M	痕量	1+
15	2	M	痕量	痕量
16	2	M	痕量	-
17	3	F	痕量	-
18	3	F	痕量	2+
19	3	F	痕量	-
20	3	F	痕量	-
22	3	M	痕量	-
23	3	M	痕量	痕量
21	3	M	痕量	无
24	3	M	痕量	痕量
25	4	F	痕量	痕量
26	4	F	痕量	痕量
27	4	F	痕量	-
28	4	F	痕量	-
29	4	M	痕量	-
30	4	M	痕量	-
31	4	M	痕量	-
32	4	M	痕量	-

[0858] 还对每个动物进行了定量尿液分析：比重 (g/ 毫升) 参考范围 1.001-1.035；血液 (Ery/ μ L) 参考范围 Neg. (非溶血的)；痕量-Spur (溶血的)；pH 参考范围 4.6-8.0；蛋白质 (毫克/分升) 参考范围 <150 毫克；尿胆素原 (毫克/分升) 参考范围 ≤ 1 ；硝酸盐 (\sim Leu/ μ L) 参考范围 neg；和白血球 (\sim Leu/ μ L) 参考范围 neg (数据未显示)。

[0859] 获得尿液细菌培养和敏感性分析结果。由两种动物培养细菌。动物 18 被发现具有埃希氏杆菌属大肠杆菌 - 大于 100,000 有机体 / 每毫升；摩根氏菌属 MORGANIT- 大于 100,000 有机体 / 每毫升肠球菌种 2+ 肠球菌种 2+ 第二株。动物 32 被发现具有变形杆菌属 MIRABILIS- 大于 100,000 有机体 / 每毫升株 1 变形杆菌属 MIRABILIS- 大于 100,000 有机体 / 每毫升株 2 非肠溶 GRAMNEG ROD 不能形成物种 -10,000-50,000 有机体 / 每毫升。

[0860] 7 个存活动物的血液学。血液学的手术后血液采集显示了所有组的白血球增多症的发展。所述构建体组 (组 1-3) 的白血球计数从基线升至周 2-4, 然后达到平衡或之后降低；然而, 只有支架组 (组 4) 的白血球计数继续增加直至尸体剖检 (表 5.63-7 个存活动物按组的平均 WBC 计 (参考范围 11-22THSN/UL))。

[0861] 表 5.63

[0862]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 2)	7.3	29.4	47.6	23.6	24.0	19.1	13.2

2(N = 1)	5.7	10.3	17.9	31.4	15.1	17.7	12.3
3(N = 2)	9.5	15.6	17.0	12.9	22.0	19.6	13.2
4(N = 2)	10.3	11.9	14.8	28.1	25.4	27.6	34.5

[0863] 红血球计数 (RBCs) 和所有组交叉相似 (表 5.64)。在尸体剖检, 平均 RBC 在除组 3 之外的所有组的参考范围之内。(表 5.64-7 个存活动物按组的平均 WBC 计 (参考范围 5-8MILL/UL))。

[0864] 表 5.64

[0865]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 2)	6.8	6.6	5.3	5.8	6.9	5.4	6.4
2(N = 1)	6.3	6.2	5.7	5.8	5.7	5.6	5.9
3(N = 2)	6.4	6.7	6.4	6.5	6.8	5.5	4.7
4(N = 2)	6.2	6.4	6.2	7.5	7.0	6.8	5.1

[0866] 所有组的血细胞比容值低于或在基线参考的低端, 并在研究过程中波动, 具有周 8 和尸体剖检参考范围的下限值 (表 5.65-7 个存活动物按组的平均血细胞比容 (参考范围 32-50%))。

[0867] 表 5.65

[0868]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 2)	34.0	35.0	27.9	30.5	37.1	28.2	30.8
2(N = 1)	31.0	32.1	30.5	31.4	31.0	29.4	28.8
3(N = 2)	32.0	36.0	34.4	33.9	36.2	28.6	24.1
4(N = 2)	29.3	30.6	29.0	35.0	32.2	32.1	23.4

[0869] 12 个非 PCV2 非预定死亡的血液学。血液学的手术后血液采集显示了所有组的白血球增多症的发展。(表 5.66-12 个非 PCV2 非预定死亡按组的平均 WBC 计数 (参考范围 11-22THNS/UL))。

[0870] 表 5.66

[0871]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
---	----	-----	-----	-----	-----	-----	-------

1(N = 1)*	7.6	42.4	NA	NA	NA	NA	NA
2(N = 3)	5.4	11.9	19.1	21.1	16.2	31.0	23.8
3(N = 4)	10.0	13.4	17.5	18.5	18.2	28.5	24.3
4(N = 4)	11.8	15.6	27.6	32.4	25.3	26.8	NA

[0872] NA =不适用的

[0873] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0874] 红血球计数 (RBCs) 在正常范围内, 并和所有组交叉相似 (表 5. 67-12 个非 PCV2 非预定死亡按组的平均 RBC 计数 (参考范围 5-8MILL/UL))。

[0875] 表 5. 67

[0876]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 1)*	6.6	8.4	NA	NA	NA	NA	NA
2(N = 3)	6.5	7.1	6.9	7.4	6.3	6.5	6.4
3(N = 4)	6.3	6.9	7.4	5.7	6.2	5.6	5.6
4(N = 4)	6.5	6.4	6.5	6.9	6.7	4.7	NA

[0877] NA =不适用的

[0878] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0879] 只有支架组 (组 4) 的血细胞比容值在第 8 周显示了明显的降低 (血细胞比容值) (表 5. 68-12 个非 PCV2 非预定死亡按组的平均血细胞比容 (参考范围 32-50%))。

[0880] 表 5. 68

[0881]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 1)*	30.1	41.7	NA	NA	NA	NA	NA
2(N = 3)	31.5	34.4	33.8	36.4	31.0	31.8	30.2
3(N = 4)	30.8	35.6	37.6	28.9	31.5	28.8	28.1
4(N = 4)	29.6	29.2	29.2	31.1	29.9	20.5	NA

[0882] NA =不适用的

[0883] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0884] 7 个存活动物的凝固。凝固板显示了整个研究中所有组的纤维蛋白原升高。只有支架组 (组 4) 具有最高的浓度和从基线开始最高的纤维蛋白原 (表 5. 69-7 个存活动物按

组的平均纤维蛋白原（参考范围 100–500 毫克 / 分升毫克 / 分升）。

[0885] 表 5. 69

[0886]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 2)	673	968	1606	1076	344	785	789
2 (N = 1)	394	1116	381	947	1069	794	833
3 (N = 2)	529	1148	502	716	629	1052	1027
4 (N = 2)	419	546	1704	1469	868	1297	1496

[0887] 活化部分促凝血酶原激酶时间是升高的，并在整个研究中是高标准，

[0888] 而且与较高的纤维蛋白原浓度有关（表 5. 70–7 个存活动物按组的平均 APTT（参考范围 18. 4–27. 2 秒））。

[0889] 表 5. 70

[0890]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 2)	44. 15	30. 85	27. 05	38. 60	34. 00	29. 25	16. 30
2 (N = 1)	29. 00	23. 30	45. 00	29. 50	28. 30	25. 50	16. 20
3 (N = 2)	28. 25	20. 85	36. 50	28. 95	33. 00	24. 05	24. 30
4 (N = 2)	44. 35	41. 00	33. 40	38. 00	33. 75	44. 05	29. 05

[0891] 12 个非 PCV-2 非预定死亡的凝固，凝固板显示了整个研究中所有组的纤维蛋白原升高。只有支架组（组 4）具有最高的浓度和从基线开始最高的纤维蛋白原（表 5. 71–12 个非 PCV2 非预定死亡按组的平均纤维蛋白原（参考范围 100–500 毫克 / 分升））。

[0892] 表 5. 71

[0893]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 1)*	282	7056	NA	NA	NA	NA	NA
2 (N = 3)	406	1007	921	567	899	918	1531
3 (N = 4)	603	682	518	603	1253	1051	1859
4 (N = 4)	869	1432	1886	1691	1172	2745	NA

[0894] NA = 不适用的

[0895] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0896] 活化部分促凝血酶原激酶时间通常是升高的或在所有的组的整个研究中是高标准的。(表 5.72-12 个非 PCV-2 非预定死亡按组得到平均 APTT(参考范围 18.4-27.7 秒)。

[0897] 表 5.72

[0898]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 1)*	18.90	32.40	NA	NA	NA	NA	NA
2(N = 3)	35.03	31.20	31.90	41.15	31.20	16.80	22.77
3(N = 4)	31.95	27.45	48.13	42.88	33.88	27.00	17.07
4(N = 4)	39.88	42.88	29.60	35.15	28.37	25.90	NA

[0899] NA = 不适用的

[0900] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0901] 7 个存活动物的血清化学。

[0902] BUN 的增加显示于表 5.73-7 个存活动物按组的平均 BUN(参考范围 10-30 毫克/分升)。

[0903] 表 5.73

[0904]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 2)	12	22	26	17	13	46	89
2(N = 1)	8	34	9	7	6	44	214
3(N = 2)	12	38	30	21	15	48	42
4(N = 2)	8	11	23	45	25	34	44

[0905] 表 5.74 显示了肌酸酐的增加-7 个存活动物按组的平均肌酸酐(参考范围 1-2.7MC/分升)。

[0906] 表 5.74

[0907]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 2)	1.1	1.4	1.2	1.1	1.2	1.3	1.9
2(N = 1)	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.9	1.5
3(N = 2)	1.4	2.3	1.5	1.3	1.3	1.6	1.2

4(N = 2)	1.1	1.2	1.2	2.5	1.9	3.1	3.2
----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0908] 表 5.75 显示了钾的增加 -7 个存活动物按组的平均钾 (参考范围 4.4-6.7MEQ/L)。

[0909] 表 5.75

[0910]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 2)	4.1	4.4	4.5	5.1	6.3	4.1	6.2
2(N = 1)	4.6	3.2	4.4	4.1	4.4	4.4	4.8
3(N = 2)	4.3	3.3	5.2	4.2	5.1	5.2	5.2
4(N = 2)	3.7	3.9	4.9	4.2	3.6	3.8	4.6

[0911] 表 5.76 显示了总蛋白质的增加 -7 个存活动物按组的平均总蛋白质 (参考范围 5.5-8.5G/ 分升)。

[0912] 表 5.76

[0913]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 2)	6.2	6.5	6.8	7.3	7.2	7.1	7.8
2(N = 1)	5.0	5.8	6.2	6.7	6.7	6.8	7.2
3(N = 2)	6.5	7.1	7.4	7.4	7.7	8.0	8.3
4(N = 2)	6.2	6.6	7.5	7.5	7.8	8.7	8.1

[0914] 表 5.77 显示了钠的减少 -7 个存活动物按组的平均钠 (参考范围 135-150MEQ/L)。

[0915] 表 5.77

[0916]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1(N = 2)	154	137	143	140	144	138	141
2(N = 1)	147	131	145	144	140	133	140
3(N = 2)	146	139	136	139	144	142	140
4(N = 2)	138	139	135	129	138	135	140

[0917] 表 5.78 显示了磷的降低 -7 个存活动物按组的平均磷 (参考范围 9.9-11.9 毫克 / 分升)。

[0918] 表 5.78

[0919]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 2)	8.9	6.0	5.5	7.0	7.9	6.5	6.4
2 (N = 1)	8.3	3.1	7.9	6.2	6.9	6.4	5.7
3 (N = 2)	7.6	6.4	7.7	6.9	7.2	7.3	7.1
4 (N = 2)	7.5	6.6	7.5	7.5	6.8	5.7	6.6

[0920] 表 5.79 显示了白蛋白的降低 -7 个存活动物按组的平均白蛋白 (参考范围 1.6-4.0 毫克 / 分升)。

[0921] 表 5.79

[0922]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 2)	4.0	3.3	3.2	3.1	3.1	3.4	3.1
2 (N = 1)	3.8	2.9	3.2	3.3	3.2	3.4	3.9
3 (N = 2)	4.3	4.0	4.0	3.8	3.7	3.5	3.6
4 (N = 2)	4.4	4.0	4.0	3.5	3.4	3.1	3.1

[0923] 所有组中观察到表 5.73 至 5.79 显示的增加和减少。通常,接受构建植入体 (组 1-3) 的动物档案似乎是在规模和时间跨越上类似;然而,只有支架组 (组 4) 似乎具有表明更高级和严重的肾功能恶化的更大程度的血清变化。

[0924] 还对 12 个非 PCV-2 非预定死亡的血清化学进行了研究。

[0925] 表 5.80 提供了 BUN 的增加。内容表 34:12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均 BUN (参考范围 10-30 毫克 / 分升)。

[0926] 表 5.80

[0927]

组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1(N=1) *	6	8	NA	NA	NA	NA	NA
2(N=3)	12	28	24	19	9	35	124
3(N=4)	11	22	42	11	21	32	126
4(N=4)	6	13	31	51	39	162	NA

[0928] NA = 不适用的

[0929] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0930] 表 5.81 提供了肌酸酐的增加 -12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均肌酸酐（参考范围 1-2.7MC/ 分升）。

[0931] 表 5.81

[0932]

组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1(N=1) *	1.0	0.9	NA	NA	NA	NA	NA
2(N=3)	1.1	1.7	1.3	1.1	1.0	1.4	2.0
3(N=4)	1.0	1.4	2.0	0.9	1.2	1.3	2.6
4(N=4)	1.1	1.1	1.3	1.6	1.7	12.7	NA

[0933] NA = 不适用的

[0934] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0935] 表 5.82 提供了钾的增加 -12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均钾（参考范围 4.4-6.7MEQ/L）。

[0936] 表 5.82

[0937]

组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1(N=1) *	4.2	3.9	NA	NA	NA	NA	NA
2(N=3)	3.8	4.2	3.8	4.8	4.4	5.0	5.3
3(N=4)	4.2	4.5	6.2	4.6	4.5	5.3	5.8
4(N=4)	4.1	4.2	5.3	4.4	6.0	5.4	NA

[0938] NA = 不适用的；

[0939] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0940] 表 5.83 提供了磷的增加 -12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均磷（参考范围 9.9-11.9 毫克 / 分升）。

[0941] 表 5.83

[0942]

组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1(N=1) *	10.2	5.9	NA	NA	NA	NA	NA
2(N=3)	9.3	5.8	6.9	6.8	6.9	6.5	11.1
3(N=4)	8.6	6.4	9.3	6.5	6.4	6.8	9.4
4(N=4)	7.5	6.9	7.1	7.3	8.2	9.2	NA

[0943] NA = 不适用的

[0944] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0945] 表 5.84 提供了总蛋白质的增加 -12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均总蛋白质 (参考范围 5.5-8.5G/ 分升)。

[0946] 表 5.84

[0947]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 1)*	6.1	6.2	NA	NA	NA	NA	NA
2 (N = 3)	6.0	6.8	7.2	7.3	7.2	7.7	7.6
3 (N = 4)	6.0	6.9	7.2	6.5	7.2	7.6	7.1
4 (N = 4)	6.1	6.3	7.4	7.3	7.6	8.4	NA

[0948] NA =不适用的

[0949] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0950] 表 5.85 提供了钠的减少 -12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均钠 (参考范围 135-150MEQ/L)。

[0951] 表 5.85

[0952]

组	基线	周 1	周 2	周 3	周 4	周 8	尸体剖检前
1 (N = 1)*	140	139	NA	NA	NA	NA	NA
2 (N = 3)	152	145	130	139	138	138	135
3 (N = 4)	149	142	130	142	140	142	131
4 (N = 4)	142	137	139	132	135	134	NA

[0953] NA =不适用的

[0954] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0955] 表 5.86 提供了白蛋白的减少 -12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均白蛋白 (参考范围 1.6-4.0 毫克 / 分升)。

[0956] 表 5.86

[0957]

组	基线	周1	周2	周3	周4	周8	尸体剖检前
1(N=1) *	4.3	3.5	NA	NA	NA	NA	NA
2(N=3)	4.2	3.7	3.6	3.7	3.6	3.4	3.2
3(N=4)	4.0	3.8	3.8	3.5	3.4	3.4	2.7
4(N=4)	4.2	3.7	3.7	3.4	3.4	2.8	NA

[0958] NA =不适用的

[0959] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0960] 所有组中观察到表 5. 80 至 5. 86 显示的增加和减少。通常,接受构建植入体(组 1-3)的动物档案似乎是在规模和时间跨越上类似;然而,只有支架组(组 4)似乎具有表明更高级和严重的肾功能恶化的更大程度的血清变化。

[0961] 7 个存活动物和 12 个非 PCV-2 非预定死亡的血液气体数据。所血液气体数据均在所有 19 个动物的正常范围内。

[0962] 对于 7 个存活动物的尿分析和 7 个动物存活到预定的尸体剖检的 12 个非 PCV-2 非预定死亡,所有组的平均尿液蛋白质值均在 0-100 毫克/分升的正常范围内,但是只有支架组(组 4)具有尸体剖检(表 5. 87)的最高值。由于 12 个非 PCV-2 非预定死亡得到尸体剖检数据不足,不能进行比较。表 5. 87 提供了 7 个存活动物按组的平均尿液蛋白质。

[0963] 表 5. 87

[0964]

组	基线	尸体剖检前
1 (N = 22)	22	23
2 (N = 15)	15	12
3 (N = 19)	19	47
4 (N = 22)	2	83

[0965]

[0966] 成像. 对每个动物进行静脉内肾盂造影照片(IVPs)和肾袢造影摄片(逆行性肾盂造影照片)分析。输尿管和肾脏中一个或两个的IV肾盂造影照片可视化是不一致的。在某些情况下,肾脏、输尿管和管道是可见的(不透射线的),而在其他情况下,可见性是非常有限或没有的。由于本研究的性质,必须使用导致有限可视化的稀释造影液。

[0967] 7 个存活动物的 IVP. 在 6/7 的动物(编号 1、6、15、23、25 和 26)中,第 8 周的肾盂造影照片是可能的。第 8 周,动物 18(组 3)的肾盂造影照片不能(不注意地)被得到。然而,误差的影响局限于动物 18(组 3)的单一错失的肾盂造影照片。对所有 7/7 的动物进行

Preeuthanasia 肾盂造影照片分析。

[0968] 提供了典型的肾盂造影照片。图 49 显示了第 8 周 (A) 时和尸体剖检前 (B) 组 1 的动物 6 的肾盂造影照片。图 50 显示了第 8 周 (A) 时和尸体剖检前 (B) 组 2 的动物 15 的肾盂造影照片。图 51 显示了第 5 周时组 2 的动物 9 的肾盂造影照片 (肾袢造影摄片: 肠照明说明有瘘管)。图 52 显示了第 7 周时组 3 的动物 17 的肾盂造影照片 (肾袢造影摄片: 肠可视化说明有瘘管)。图 53 显示了第 8 周时组 3 的动物 21 的肾盂造影照片 (两个肾脏; 分别被照明的输尿管和管道)。图 54 显示了第 8 周时组 2 的动物 24 的肾盂造影照片 (可见的一个肾和输尿管)。图 55 显示了第 8 周 (A) 时和尸体剖检前组 2 的动物 23 的肾盂造影照片 - 含有开孔端的管道 (B)。图 56 显示了第 8 周 (A) 时和尸体剖检前 (B) 组 4 的动物 25 的肾盂造影照片。图 57 显示了第 8 周 (A) 时和尸体剖检前 (B) 组 4 的动物 26 的肾盂造影照片。图 58 显示了第 4 周时组 4 的动物 29 的肾盂造影照片 - 可见的 (A) 输尿管和第 4 周的肾袢造影摄片 - 肠瘘管 (B)。

[0969] 12 个非 PCV-2 非预定死亡的 IVP。这些动物并没有存活到规定的肾盂造影照片分析。并没有进行几个尸体剖检前肾盂造影照片是由于由于健康欠佳、管道 / 肠瘘的存在和早期安乐死。

[0970] 如上所述给出了 7 个存活动物的典型肾袢造影摄片 (逆行性肾盂造影照片)。在 7 个存活动物中, 对 1 个动物的肠溶管道瘘管形成进行评价 - 管道瘘管形成。在第 3 周对动物 25 进行肾袢造影摄片。管道被证实为无瘘管。动物上恢复, 并继续研究, 以成功完成。

[0971] 12 个非 PCV-2 非预定死亡的肾袢造影摄片 (逆行性肾盂造影照片), 在 4/12 个非 -PCV-2 非预定死亡动物中的存活位置研究过程中, 肠溶管道瘘管被确定: 在不同的时间点进行肾袢造影摄片 (逆行性肾盂造影照片), 以证实组 2 中动物 9 (第 33 天) 的瘘管存在; 组 3 中动物 17 (第 48 天) 和组 4 中动物 27 (第 20 天) 和 29 (第 41 天)。使这些动物安乐死, 并在植入后 20 至 48 天时进行尸体剖检。

[0972] 7 个存活动物的超声。附录 11 给出了个别和组超声检查数据。本研究期间肾脏上的超声检查显示了表面积的增加 (长度: 宽度), 表明所有处理组中的肾变化 (肾盂积水)。右和左肾的所有组的组平均随时间流逝是类似的 (表 5.88-7 个存活动物按组的平均肾表面积 ($L \times W, \text{cm}^2$))。

[0973] 表 5.88

[0974]

左肾					
组	基线	周2	周6	周10	尸体剖检前
1(N=2)	26.7	19.8	21.3	41.2	29.2
2(N=1)	16.2	18.4	27.8	21.0	39.3
3(N=2)	14.3	16.1	19.2	26.5	38.3
4(N=2)	14.7	15.2	23.5	39.8	17.1
右肾					
组	基线	周2	周6	周10	尸体剖检前
1(N=2)	22.1	20.3	26.0	35.8	23.7
2(N=1)	15.4	14.2	25.4	25.4	22.9
3(N=2)	13.4	13.5	13.5	43.2	24.8
4(N=2)	17.0	18.7	28.5	27.3	27.9

[0975] 对植入的超声检查显示了所述构建体组（组 1-3）中壁厚随时间而降低。只有支架组（组 4）显示了壁厚的显著增加（表 5.89-7 个存活动物（cm）按组的平均管道壁厚）。

[0976] 表 5.89

[0977]

组	周 2	周 6	周 10	尸体剖检前
1 (N = 2)	0.327	0.227	0.152	0.181
2 (N = 1)	0.172	0.169	0.099	0.114
3 (N = 2)	0.333	0.239	0.169	0.145
4 (N = 2)	0.196	0.248	0.179	0.222

[0978]

[0979] 12 个非 PCV-2 非预定死亡的超声。表 5.90 给出了个别和组超声检查数据 - 超声检查：肾测量值（cm）的概要结果。

[0980]

表 5.90

[0981] 表 5.91 提供了按时间点的 N- 值。
[0982]

组	Stat	活检前						周 2						周 6						周 10						尸体剖检前					
		右			左			右			左			右			左			右			左			右			左		
		Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid	Len	Wid
	平均值	6.29	2.93	6.08	2.92			6.68	3.17	6.88	3.12	7.14	3.38	6.49	3.19	8.78	5.19	8.11	4.75	7.25	3.27	7.63	3.76								
1																															
	Std. Dev	1.09	0.40	1.00	0.63			0.69	0.30	1.23	0.25	0.39	0.26	0.89	0.34	1.31	0.90	1.02	0.64	0.79	0.19	0.26	0.29								
	平均值	5.36	2.73	5.66	2.70			5.98	2.83	5.96	2.79	6.66	3.77	7.36	3.91	8.56	4.06	7.94	3.57	7.40	3.53	8.16	3.90								
2																															
	Std. Dev	0.79	0.29	0.92	0.33			0.93	0.30	0.77	0.40	0.66	0.50	0.56	0.55	0.63	0.78	0.64	0.71	2.50	0.89	1.97	0.52								
	平均值	6.08	2.91	6.31	2.99			6.02	2.99	5.87	2.99	6.40	2.97	7.69	3.38	9.30	5.16	8.01	4.37	8.58	4.51	7.01	3.30								
3																															
	Std. Dev	0.84	0.52	0.95	0.41			0.85	0.44	0.80	0.14	1.21	0.48	1.58	0.55	1.77	0.47	1.51	1.33	4.32	2.41	2.47	1.22								
	平均值	5.83	2.62	5.93	2.58			6.32	3.89	5.37	2.72	7.95	4.05	7.66	3.99	7.84	3.35	8.63	4.56	7.01	3.92	5.55	2.91								
4																															
	Std. Dev	0.74	0.26	0.42	0.21			1.78	1.30	0.88	0.37	1.98	1.58	1.51	0.43	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA								

Len = 长度
Wid = 宽度
NA = 不适用的, n对标准偏差来说太小了。

组	基线	周 2	周 6	周 10	尸体剖检前
1	8	7	5	4	3
2	8	8	6	3	4
3	8	7	7	3	4
4	8	7	4	2	2

[0983] 研究过程中对肾脏的超声检查显示了表明所有处理组中的肾变化（肾盂积水）的表面积（长 × 宽）增加。组平均类似于右和左肾的所有组随时间的变化（表 5.92-12 个非 PCV-2 非预定死亡（L×W, cm²）按组的平均肾表面积。

[0984] 表 5.92

[0985]

左肾					
组	基线	周2	周6	周10	尸体剖检前
1(N=1)	21.0	NA	NA	NA	NA
2(N=3)	14.5	19.8	15.5	13.1	18.8
3(N=4)	19.5	20.9	22.3	14.4	42.5
4(N=4)	13.9	21.7	20.2	NA	NA
右肾					
组	基线	周2	周6	周10	尸体剖检前
1(N=1)*	21.2	NA	NA	NA	NA
2(N=3)	12.9	16.4	18.7	12.3	20.0
3(N=4)	19.7	19.0	30.6	13.9	14.7
4(N=4)	15.5	14.4	19.2	NA	NA

[0986] NA = 不适用的

[0987] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0988] 对植入的超声检查显示了所述构建体组（组 1-3）中壁厚随时间而降低。只有支架组（组 4）显示了壁厚的显著增加；然而，分析的数据点是有限的（表 5.93-12 个非 PCV-2 非预定死亡按组的平均管道壁厚（cm）。

[0989] 表 5.93

[0990]

组	周 2	周 6	周 10	尸体剖检前
---	-----	-----	------	-------

1 (N = 1)*	NA	NA	NA	NA
2 (N = 3)	0. 225	0. 201	0. 157	0. 131
3 (N = 4)	0. 291	0. 184	0. 228	0. 144
4 (N = 4)	0. 203	0. 358	NA	NA

[0991]

[0992] NA =不适用的

[0993] * 第 9 天使动物 8 安乐死。

[0994] 病理学。以下实例显示了病理报告。

[0995] 阻塞结果的病毒性感染和非预定死亡减少了从 32 个至总共 7 个死亡的研究中的动物数量。对于存活至处死 (N = 7) 的动物,粘连存在于所有的动物中,肠-管道瘘管存在于 4/7 的动物中(以下病理学实例)。输尿管积水和肾盂积水(单侧或双侧)存在于所有的动物中,肾盂肾炎存在于 1/7 的动物中。患有肾盂肾炎的动物在只有支架处理组(组 4)中。对于非 PCV-2 非预定死亡 (N = 12),粘连存在于所有的动物中,瘘管存在于 7/12 的动物(肠-管道)和 1/12 的动物(输尿管-肠)中。输尿管积水和肾盂积水(单侧或双侧)存在于 8/12 的动物中,肾盂肾炎存在于 4/12 的动物中。3 个患有肾盂肾炎的动物在只有支架处理组(组 4)中,1 个患有肾盂肾炎的动物在血液来源的自体 SMC 处理组(组 3)中。尽管导致非预定死亡的并发症,所述构建体植入体作为导致尿道上皮和平滑肌层组成的组织的再生性过程的模板。再生在植入体的输尿管端是最显著的。管道尾部植入体和围腔段中的组织具有不含上皮内层的纤维结缔组织组成的壁。植入体输尿管端的再生性过程导致与构建组间可比较并与代表只有支架组的修复痊愈不同的尿组织形成。

[0996] 只有支架测试物被认定不适于进一步发展,是因为结果与正常尿组织不一致,这些动物具有双侧双侧肾脏并发症的较高发生率。观察了构建组中的结果,不管细胞来源是等价的。

[0997] 讨论。从手术恢复的 31 个动物中,7 个动物 (23% ;两个来自组 1、3 和 4 中的一个 ;和一个来自组 2) 成功完成了本研究中重获新生部分的完整时间。所有组中的宏观病理学是明显的,并包括病毒性感染、尿液流动的间歇性阻塞、管道中的碎片和碎屑堆积、腹部和盆腔粘连、瘘、肾盂积水和输尿管积水和肾盂肾炎的发生率。观察到接种有每个来源的 SMC(组 1-3,分别来源于膀胱、脂肪和血液的 SMC) 的构建植入体中不同程度的尿组织再生迹象。然而,只有支架植入的动物(组 4)中观察到不完整的尿组织痊愈和发生率上升的上尿路病变。12/31 动物 (39%) 感染上 PCV-2 病毒。虽然病毒性感染导致存活率降低,所述构建体组(组 1-3)中还观察到尿组织再生。测试物的手术植入被设计为是为了动物福利,以达到四足动物最佳的尿液排尿,为的是避免尿液和潜在早期病态及安乐死的刺激性接触性皮炎。然而,此外科途径导致测试物直接在上覆腹部器官下和这些器官的重量以及间歇性管道阻塞引起的腹部脏器压力。这种四足动物特异性的手术植入还有助于观察粘连、瘘管和上尿路并发症(例如扩张、炎症和 / 或输尿管或肾的感染)。然而,肠阻塞并没有在本研究中观察到。猪通常被作为研究发育和手术后粘连预防的动物模型,因此,一些粘连发

生率预计为简单地来自于构建动物（组 1-3）活检采集的剖腹手术。组 1-3 中的动物还经受了第二次外科手术，以植入该测试物，比经受简单的外科手术（只有测试物植入）的接受只有支架植入体的动物实质上增加了粘连的风险。本研究中观察到的粘连被认为是这些外科手术的结果。

[0998] 上尿路（输尿管积水，肾盂积水和肾盂肾炎）中指出的所有不利结果，是间歇性阻碍尿液通过管道流出的病症的后果。本研究的四足动物猪观察到的肾盂肾炎被认为是继发于碎片和碎屑堆积以及粪便和皮肤对开孔的细菌污染。肾盂肾炎在只有支架动物（组 4）中是最常观察到的。所有动物测试物的手术定位和组 1-3 中动物的多种手术（活检和测试物植入）促进了腹部的形成和骨盆粘连。此外，间歇性阻塞、用于开孔管理（在镇静动物中使用钳子，以除去碎屑堆积）的清创术协议、病毒性感染和肠道-管道粘连有助于肠溶管道瘘管形成和肾上疾病。尽管导致非预定死亡的并发症，所述构建体（组 1-3）植入体作为导致尿道上皮和平滑肌层（天然尿组织成分）组成的组织的再生性过程的模板。再生在植入体的输尿管端是最显著的。管道尾部植入体和围腔段中的组织具有不含上皮内层的纤维结缔组织组成的壁，这表明只有腹膜不能够支持尿组织的再生。植入体输尿管端的再生性过程导致与构建组间可比较并与代表只有支架组的修复痊愈不同的尿组织形成。只有支架测试物的结果与正常尿组织和可能易产生内腔疤痕和 / 或狭窄的维管结缔组织组成的壁不一致。接受只有支架植入体的动物中尿组织的不完整形成加剧了上述讨论间歇性阻塞的上尿路结果；组 4 动物具有双侧肾脏并发症的较高发生率。构建组中观察到结果是等价的，不管细胞来源。

[0999] 结论。本研究的目的是为了评价接种有来源于自体膀胱、脂肪或血液来源的平滑肌细胞（SMC）或只有支架（没有 SMC 的支架）的新的尿路管道（NUC）的安全性和功能性。功能性评价是尿流和尿组织再生。只有 7/31 (23%) 动物完成了本研究。24/31 非预定死亡潜在的初步安全性结果是 PCV-2 病毒性感染和导致上尿路损伤（肾盂积水、输尿管积水和肾盂肾炎）的管道间歇性阻塞。该阻塞是由清创术和气孔盐水冲洗控制的。在构建测试物植入后，观察到以粘膜、粘膜下层和具有维管基质的平滑肌为特点的尿样组织再生，不管 SMC 来源（即膀胱、脂肪或血液）。相比之下，以具有有限平滑肌的维管基质支撑的异常粘膜为特点的只有支架测试物植入后，观察到修复过程。猪粘连形成的处置和所有构建组中组织活检及测试物植入相关的两种外科手术导致所述再生组织和覆肠之间的粘连。开孔清洗和猪的四足站姿使瘘管形成加重。只有支架测试物中 SMC 的缺乏似乎有助于尿组织的不完整发育和阻塞后的死亡增加，导致认定只有支架测试物不适于进一步发展。

[1000] 实施例 6 - 新的尿路管道构建体植入后的动物病理

[1001] 当例 5 中所述的研究完结时，对测试动物的解剖病理进行了评价。

[1002] 组织采集。按照协议，腹腔是开放的，管道（植入构建或只有支架测试物的结果）是可视化的，并在现场数码拍摄动物设施。采用肾脏和输尿管整块除去管道。对输尿管进行测量，然后通过横切吻合 3-4 厘米从管道分离。得到肾脏、输尿管、淋巴结和观察到的任何其它严重病变的典型切片。将所有组织样本置于 10% 中性缓冲福尔马林（NBF）中 24 - 48 小时，用于组织处理和评价。

[1003] 组织学处理。固定后，该管道纵向上是开放的（与流出平行），并被分为背腹和腹侧两半，如以下修剪图所示。

[1004] 图 59A-B 显示了 DB-252 动物 18 的固定后管道组织和修剪图。图 59C 显示了输尿管、气孔、中间管道和憩室的位置。

[1005] 将每一半身体修剪为三横切面（腹背一半上的载玻片 5、6、7 和腹侧一半上的载玻片 9、10、11 分别捕获的颅、中和尾部）。围腔（腹背一半上的载玻片 8 和腹侧一半上的载玻片 12 捕获）减少了每一半的一个切片。一个其它切片摄于两个输尿管-管道交叉点（载玻片 13 上的左捕获，载玻片 15 上的右捕获）中的每一个。一个其它载玻片（数字 17）被用来捕获皮肤表面的开孔和邻近的通过腹壁的管道。当管道尺寸允许时，这个图导致了 11 个载玻片。有些管道长度太短而不能适应修剪计划，故现有管道被划分为较少的切片。每个动物所采集的切片包括管道 dorsal 颅、管道中背、管道背近尾、背气孔管道交叉点、管道腹侧颅、管道中腹、腹侧管道气孔交叉点、左输尿管管道气孔交叉点、右输尿管-管道交叉点和气孔皮肤交叉点。此外，得到以下组织/器官部分，并用于组织学：左肾（载玻片 1）、右肾（载玻片 2）、左输尿管（载玻片 14）、右输尿管（载玻片 16）、腰淋巴结（载玻片 3）、肠系膜淋巴结（载玻片 4）和任何总的损害（载玻片 18、19 等）。在组织修剪期间，为了说明，进行数码拍摄。固定后，组织通常被加工为微型载玻片，并采用苏木精和伊红（H&E 染色）和 Masson 三色进行染色。通过显微镜载对载玻片进行评价。在适当情况下，得到个别动物数据的微观观察，并进行得分。

[1006] 结果

[1007] 死亡。在明确的手术过程中，对动物 30（组 4）的输尿管进行穿孔，从而阻止测试物植入。使动物安乐死，并不放回，使植入测试物（构建或只有支架）的动物的总 N 减少至 31 和组 4 至 7 动物的 N。24 个动物为非预定死亡，7 个动物存活至预定处死。附录 1 显示了植入测试物的 31 个动物中每一个的植入后存活天数和最后处置、动物信息。24 个非预定死亡的处置（死亡分类）按处理组总结于表 6.2 中 - 按组的非预定死亡）。

[1008] 表 6.2

[1009]

死亡	组 1	组 2	组 3	组 4	总
组 N	8	8	8	7	31
存活操作相关性死亡	0/8	0/8	1/8	0/7	1/31
被发现死亡	0/8	2/8	0/8	1/7	3/31
使安乐死	6/8	5/8	5/8	4/7	20/31
总的非预定尸体剖检	6/8	7/8	6/8	5/7	24/31
预定尸体剖检	2/8	1/8	2/8	2/7	7/31

[1010] 以下部分讨论了非预定死亡观察到的潜在发现。

[1011] 病毒相关性死亡。在存活临床观察过程中，观察到与 PCV-2 感染一致的皮肤病变。12 个非预定死亡动物发生了与归因于猪皮炎和肾病综合症（PDNS）的病理特点一致的一种或多种病变，其与 PCV-2 感染相关。如果观察到以下任一项，动物被归类为 PCV-2 感染：

[1012] 1) 临床观察到的紫色皮肤变色；

[1013] 2) 影响肾、皮肤或肺的显微血管炎或血管炎 / 血管周炎；

[1014] 3) 肾上皮细胞的管坏死 / 液 / 管型 / 肾小球肾炎或病毒性包裹体的肾结果；

[1015] 4) 在 1、2 或 3 存在下，腰部淋巴结中的淋巴细胞耗竭

[1016] 按照这些标准，24 个未预定尸体剖检动物被鉴定出 12 个患有猪 PCV-2 感染。这些包括组 1 中 5 个动物（动物编号 . 5113342、7、2、4 和 3）；组 2 中 4 个动物（动物编号 . 13、16、14 和 10）；组 3 中 2 个动物（动物编号 . 20 和 19）；和组 4 中 1 个动物（动物编号 . 28）。结果部分将不讨论 PCV-2 动物的微观结果，由于 PCV-2 病症被认为是无关设备发病的确定性原因。

[1017] 非 PCV-2 相关性死亡 . 总共 12 个非预定死亡与检测到的 PCV-2 病毒感染（包括 1 个存活操作相关性死亡）不相关。不可归因于 PCV-2 感染的 12 个非预定死亡包括组 1 中的 1 个动物（动物编号 . 8）；组 2 中的 3 个动物（动物编号 . 119 和 12），组 3 中的 4 个动物（动物编号 . 24、21、22 和 17）和组 4 中 4 个动物（动物编号 . 32、31、29 和 27）。这些动物临床下降中的重要事件是通过气孔的尿液和碎片外流的阻塞。

[1018] 腹腔的腹侧部分和解剖关联的测试物植入似乎促进了阻塞，其中上覆腹部器官的重量可导致管道关闭、粘附和瘘管形成以及肾脏并发症（例如扩张、发炎和 / 或输尿管或肾感染）。测试物被同样地手术植入所有研究动物中；因此，所有组中的阻塞相关性并发症具有类似的疾病生物学机理（即，因为四足解剖，腹部脏器停留在管道上）。

[1019] 潜在发现的非预定死亡分布 . 表 6. 3 给出了 24 个非预定死亡的潜在发现的概要 - 按组的 PCV-2 和非 PCV-2 相关性非预定死亡 .

[1020] 表 6. 3

[1021]

死亡目录	组 1	组 2	组 3	组 4	总
PCV-2 感染的迹象	5	4	2	1	12
非 PCV-2 相关性非预定死亡	1	3	4	4	12
非预定死亡总数	6	7	6	5	24

[1022] 与安全性相关的结果 . 准备了所有动物的宏观结果和微观相关的完整清单（数据不显示）。得到个别微观动物数据（数据不显示）。宏观和微观结果的讨论为针对与借助于 7 个存活至预定处死的动物和 12 个非 PCV-2 相关性非预定死亡（N = 19）中的测试物解剖位置的尿液外流阻塞有关的那些。测试物植入形成的管道为位于腹部的后腹膜空间的大小和形状可变的导管。输尿管进入管道的颅端（输尿管 - 管道交叉点，UCJ 图 59）。尿液流动直接通过腹膜缠绕植入体和围腔，并出现在气孔。管道的颅端经常具有双侧球根扩张，称为被认为是间歇性阻塞后果的憩室。

[1023] 粘连和瘘管 . 该管道腹侧面粘附于筋膜和腹壁的骨骼肌，背侧被腹膜所覆盖。在尸体剖检时，管道往往很难想象，因为明显粘连（例如，管道至胃肠道、网膜、子宫、精囊、肝、胰、脾或生殖器官）。该管道管腔往往充满了碎屑。观察到管道和邻近的中空器官（例如肠）之间的瘘管。具体来说，对 19 个动物中观察到的管道 - 肠或管道 - 输尿管瘘管进行

评价。

[1024] 7 个存活动物中的粘连和瘘管。粘连存在于存活至预定处死的所有 7 个动物中（表 6.4）。4/7 的动物中观察到管道和肠道之间的瘘管：组 1 中的 2/2（动物编号.1 和 6）；组 2 中的 1/1（动物编号.15）和组 3 中的 1/2（动物编号.23）。表 6.4：17 个存活动物中粘连和瘘管的发生率。

[1025] 表 6.4

[1026]

宏观结果	组 1N = 2	组 2N = 1	组 3N = 2	组 4N = 2	总计
粘连	2/2	1/1	2/2	2/2	7/7
管道 - 肠瘘	2/2	1/1	1/2	0/2	4/7

[1027] 12 个非预定死亡中的粘连和瘘管。粘连存在于所有 12 个非 PCV-2 相关性早期死亡（表 6.5）中。7/12 的动物中观察到管道和肠道之间瘘管的存在：组 2 中的 3/3（动物编号.11、12 和 9）、组 3 中的 3/4（动物编号.21、22 和 17）和组 4 中的 1/4（动物编号.29）。组 4 动物（动物编号.27）中观察到肠和输尿管之间一个瘘管的存在。表 6.5：12 个非 PCV-2 非预定死亡中粘连和瘘管的发生率。

[1028] 表 6.5

[1029]

宏观结果	组 1N = 1	组 2N = 3	组 3N = 4	组 4N = 4	总计
粘连	1/1	3/3	4/4	4/4	12/12
管道 - 肠瘘	0/1	3/3	3/4	1/4	7/12
输尿管 - 肠瘘	0/1	0/3	0/4	1/4	1/12

[1030] 输尿管和肾脏。宏观观察到的增厚输尿管由微观评价的几个潜在结果造成。输尿管扩张（或输尿管积水）的特点为含有正常的输尿管壁结构的扩大管腔。过渡细胞增生症的特点为变移上皮中的细胞增多，空泡形成的特点为上皮细胞中圆而清晰的液泡。当输尿管周围的肠系膜通过含有偶然的淋巴细胞和巨噬细胞的胶原和纤维细胞被扩张时，发生周边输尿管肠系膜的亚急性 / 慢性炎症。这种炎症并不通常影响输尿管的肌肉膜或尿道上皮。周边输尿管炎症可能与输尿管和肠或生殖器官之间的粘连有关；但没有粘连情况下还可能发生。

[1031] 通过显微镜，肾盂积水的特点为含有肾皮质稀释和慢性炎症的肾盂的扩张（偶然的纤维化、淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞）。肾盂积水被认为是较低的泌尿系统（输尿管，管道或围腔 / 气孔）充分或部分阻塞的结果。慢性活性肾盂肾炎，往往与肾盂积水相关，其特点是通过中性粒细胞浸润和细胞碎片进入肾盂，通常扩散至远端髓质。

[1032] 肾盂肾炎被认为是进入肾盂上升的下尿路的细菌性感染结果。慢性肾炎（无肾盂积水）的特点是肾皮质或髓质中炎症性细胞浸润的纤维化（偶然的淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞和中性粒细胞）。患有慢性肾炎的肾脏皮质看起来类似于患有肾盂积水 / 慢性肾炎

的动物的那些肾脏皮质 ;然而,在慢性肾炎中,骨盆是不扩张的。慢性活性肾炎在外观上类似于慢性肾炎,但具有明显的中性粒细胞浸润。肾小管坏死 / 液 / 管型 / 肾小球肾炎是以中性粒细胞、肾小球中的淋巴细胞和巨噬细胞、个别肾小管上皮细胞的坏死,蛋白质的管型和 / 或肾小管腔的出血为特点的变化构象。

[1033] 7 个存活动物中的输尿管积水和肾盂积水和 / 或肾盂肾炎。通过显微镜观察了所有 7 个存活动物中输尿管积水和肾盂积水 (表 6.6)。单侧输尿管积水 (2/7 动物):组 3 中的 2 个动物 (动物编号 .23 和 18)。双侧输尿管积水 (5/7 动物):组 1 中的 2 个动物 (动物编号 .1 和 6),组 2 中的 1 个动物 (中的动物编号 .15),和组 4 中的 2 个动物 (动物编号 .25 和 26)。单侧肾盂积水 (6/7 动物):组 1 中的 2 个动物 (动物编号 .1 和 6),组 2 中的 1 个动物 (动物编号 .15),组 3 中的 2 个动物 (动物编号 .18 和 23) 和组 4 中的 1 个动物 (动物编号 .26)。双侧肾盂积水 (1/7 动物):组 4 (动物编号 .25)。1/7 动物中观察到肾盂肾炎 (单侧):组 4 动物编号 .26。表 6.6 :7 个存活动物中输尿管积水、肾盂积水和 / 或肾盂肾炎的发生率。表 6.6

[1034]

结果	组 1N = 2	组 2N = 1	组 3N = 2	组 4N = 2	总计
输尿管积水,单侧	0/2	0/1	2/2	0/2	2/7
输尿管积水,双侧	2/2	1/1	0/2	2/2	5/7
肾盂积水,单侧	2/2	1/1	2/2	1/2	6/7
肾盂积水,双侧	0/2	0/1	0/2	1/2	1/7
肾盂肾炎,单侧	0/2	0/1	0/2	1/2	1/7
肾盂肾炎,双侧	0/2	0/1	0/2	0/2	0/7

[1035] 12 个非预定死亡的输尿管积水和肾盂积水和 / 或肾盂肾炎。通过显微镜分别观察到 8/12 和 8/12 的非 PCV-2 相关性早期死亡中的输尿管积水和 / 或肾盂积水 (表 6.7)。单侧输尿管积水 (3/12 动物):组 2 中的 1 个动物 (动物编号 .12)、组 3 中的 1 个动物 (动物编号 .21) 和组 4 中的 1 个动物 (动物编号 .27)。双侧输尿管积水 (5/12 动物):组 3 中的 2 个动物 (动物编号 .22 和 24) 和组 4 中的 3 个动物 (动物编号 .32,31 和 29)。单侧肾盂积水 (5/12 动物):组 2 中的 2 个动物 (动物编号 .9 和 12),组 3 中的 1 个动物 (动物编号 .21) 和组 4 中的 2 个动物 (动物编号 .32 和 27)。双侧肾盂积水 (3/12 动物):组 3 中的 1 个动物 (动物编号 .24) 和组 4 中的 2 个动物 (动物编号 .31 和 29)。

[1036] 2/12 的动物中观察到单侧肾盂肾炎:组 3 中的 1 个动物 (动物编号 .24) 和组 4 中的 1 个动物 (动物编号 .32)。(2/12 的动物中观察到双侧肾盂肾炎):组 4 中的 2 个动物 (动物编号 .31 和 29)。表 6.7 :输尿管积水的发生率,12 个非 PCV-2 非预定死亡中的肾盂积水和 / 或肾盂肾炎。

[1037] 表 6.7

[1038]

结果	组 1N = 1	组 2N = 3	组 3N = 4	组 4N = 4	总计
输尿管积水, 单侧	0/1	1/3	1/4	1/4	3/12
输尿管积水, 双侧	0/1	0/3	2/4	3/4	5/12
肾盂积水, 单侧	0/1	2/3	1/4	2/4	5/12
肾盂积水, 双侧	0/1	0/3	1/4	2/4	3/12
肾盂肾炎, 单侧	0/1	0/3	1/4	1/4	2/12
肾盂肾炎, 双侧	0/1	0/3	0/4	2/4	2/12

[1039] 与尿路管道再生相关的结果。观察到组织成分的每一切片（数据不显示）。以下与再生相关结果的讨论针对存活至预定处死的 7 个动物和 12 非预定死亡的组织学评价（图 59）获得的切片。测试物手术植入后发展的管道由通过植入体和围腔到腹部皮肤的气孔开放的输尿管（颅端）层列的中央内腔组成。该管道壁的组织学外观变化取决于管道内的样本位置和动物存活时间。

[1040] 输尿管 - 管道交叉点和颅管道部分。包括输尿管管道交叉点的管道颅端附近的组织（UCJ；图 59 中的切片 13 和 15）和颅部分（图 59 中的切片 5 和 9）的典型构成为散布结缔组织的平滑肌纤维的尿道上皮覆层。管道的 UCJ 和颅部分形态学上类似于输尿管，虽然管道壁厚度通常大于输尿管壁厚度，特别是在憩室内。憩室表现为从左边和右输尿管管道交叉点尾部突出的管道的双向部分。尿道上皮的典型外观最小化至中度液泡和可变的厚度。尿道上皮厚度在最小至中度减弱（尤其是在大型憩室）和最小到轻度增生之间变化。对于存活至预定处死的 7 个动物，切片 5、9、13 和 15 中观察到的尿道上皮和平滑肌层发生率类似于所有 7 个动物。表 6.8：7 个存活动物中颅管道的尿道上皮和平滑肌发生率。

[1041] 表 6.8

[1042]

组织学结果	组1 N=1	组2 N=2	组3 N=2	组4 N=2
尿道上皮的存在				
UCJ(载玻片 13或15)	2/2	1/1	2/2	2/2
颅管道(载玻片 5或9)	1/2*	1/1	1/2*	1/2
平滑肌的存在				

[1043]

UCJ(载玻片 13或15)	2/2	1/1		2/2	2/2
颅管道(载玻片 5或9)	1/2*	1/1		1/2*	1/2

[1044] * 由于再生的管道的大小，得到评价组 1&3 中每组 1 个动物的部分不足组织。

[1045] 对于 12 个非 PCV-2 相关性早期死亡，切片 5、9、13 和 15 中尿道上皮和平滑肌层的发生率在构建植入体（组 1-3）的动物内和组间类似。接受只有支架植入体（组 4）的动物间切片 5、9、13 和 15 中尿道上皮和平滑肌层的发生率低于接受构建植入体的动物中所观察。表 6.9：12 个非预定死亡中颅管道的尿道上皮和平滑肌发生率。

[1046] 表 6.9

[1047]

组织学结果	组1* N=1	组2 N=3	组3 N=4	组4 N=4
尿道上皮的存在				
UCJ(载玻片13或15)	0/1	3/3	4/4	3/4
颅管道(载玻片5或9)	0/1	2/3	2/4^	0/4
平滑肌的存在				
UCJ(载玻片13或15)	0/1	2/3	4/4	2/4
颅管道(载玻片5或9)	0/1	2/3	2/4^	0/4

[1048] * 研究第 9 天的动物

[1049] ^ 由于再生的管道的大小,得到评价组 3 中 1 个动物的部分的不足组织。

[1050] 管道的中间和尾部. 对于所有 19 个动物,管道的中间(图 59 中的切片 6 和 10)和尾部(图 59 中的切片 7 和 11)的典型外观不同于 UCJ 和颅切片中观察到的外观。动物间管道-围腔的转换点不同,是因为植入体的尾端自由地浮于缠绕的腹膜内,使得从管道到围腔的转换点在尸体剖检时难以确定。切片 6、7、10 和 11 的典型组成为具有相关纤维母细胞的胶原。胶原壁内部和最接近内腔是由胶原、毛细血管和含有较少淋巴细胞和巨噬细胞的丰富中性和粒细胞松散排列组成的慢性-活性炎症层。炎症内部,内腔往往充满由退化或坏死炎症细胞(主要是中性粒细胞)和细胞碎片与细菌集落形成的混合物组成的碎屑。

[1051] 管道的围腔和开孔端离子. 在围腔-管道气孔端(图 59 中的切片 8、12 和 17),气孔-围腔交叉点是可见的,其中排列的胶原和气孔真皮附器使胶原壁(无附器)并列。对于所有 19 个动物,这些切片主要由扁平上皮和慢性-活性炎症/碎屑组成。通常情况下,皮肤的扁平上皮(上皮)在围腔之上延伸至颅一短距离。围腔的外表面由腹膜源的松散结缔组织组成。这种外部覆盖相当于浆膜层,并包含在神经、血液血管、脂肪组织和纤维结缔组织的某些区域(胶原纤维和纤维母细胞)之内。在一个瘘管的位点,异位肠粘膜被观察到覆盖管道邻近的瘘管的一小段。注意到,组 2 动物中有 1/7 存活(动物编号. 15)。

[1052] 接受构建或只有支架植入体的动物中的痊愈结果. 构建(组 1-3)测试物植入后,不管 SMC 来源(即,膀胱、脂肪或血液),观察了以粘膜、粘膜下层和具有维管基质的平滑肌为特点的尿样组织再生。在植入构建测试物的 4/5 存活动物和 4/8 非预定处死动物中观察了膀胱样组织的区域,其组成为具有基础平滑肌的连续尿道上皮。在占多数的只有支架动物中,管道组织形态学与修复过程一致,其特点为从仅与无基础平滑肌的输尿管-管道交叉点相距一短距离(约 1 毫米)延伸的尿道上皮。

[1053] 讨论. 7/31 的动物存活至预定的尸体剖检,在研究过程中,使 24/31 动物未预定安乐死或被发现死亡。病毒性感染有助于 12/24 的非预定死亡。在本研究过程中,有与 PCV-2 感染相配的临床和病理症状两种。宏观结果为皮肤的瘀斑(临床上,紫变色)和腹股沟淋巴结增大(观察到 11/24 非预定死亡中病毒性感染的宏观结果)。微观结果包括由管状坏死/液/管型/肾小球肾炎、肾管状上皮细胞的嗜酸性细胞内含物和肾脏和输尿管的血管炎/血管周围炎和肺炎(微观结果显示了在尸体剖检时 PCV-2 感染的其它动物,促使了 12/24 非预定死亡相关的全部病毒性感染)组成的肾脏变化。这些结果在所报道的 PCV-2 感染的猪中是普遍的。PCV-2 感染导致动物差的临床健康(例如,嗜睡、腹泻、食欲不振)和随后人

道的早期安乐死。12/24 的非预定死亡是非 PCV-2 相关性的；1/24 的未预定死亡是存活操作并发症和有助于 11/24 非预定死亡的阻塞的结果。阻塞是由沿着猪的腹部基板的手术植入测试物的组合引起，其中植入体压缩的腹部内脏和使用腹膜形成连接管道和皮肤的围腔段的重量造成外环境和尿液粘液（正常猪）的碎片堆积。

[1054] 四足动物模型中固有的相关手术后并发症包括：(i) 导致潜在瘘管形成的腹部粘连和 (ii) 与腹部器官相关的测试物植入位置。

[1055] 当肠是粘连器官时，肠粘连段的肌织膜往往是在减少或在粘连点被侵蚀，就像围腔壁一样。测试物被置于具有通过腹壁从测试物的近尾端延伸至皮肤的腹膜来源的管的腹部的腹腔内。测试物被固定于输尿管的颅端上，但在近尾端缠绕的腹膜内自由漂浮。痊愈导致从输尿管（颅端）到腹部（近尾端）皮肤开放的造口层列的中央管腔组成的尿路管道。管道颅端最常观察到的是尿道上皮和层状平滑肌的形成，其中植入测试物存在于腹膜缠绕之内。腹膜形成的围腔仅是由无泌尿道上皮覆盖物的结缔组织壁组成。

[1056] 颅管道（输尿管附近）中尿道上皮和 / 或平滑肌层的发生率在所述构建体组（组 1、2 和 3）中比只有支架组（组 4）高。植入体尾端附近摄制的切片观察到的再生程度是可变的，因为植入体尾端和围腔颅侧之间的边界在尸体剖检时是难以辨别的。推定为植入体中央部分的大部分切片（切片 6 和 10，图 59）无尿道上皮不存在。表 6. 10 显示了新的尿路管道按组的结果总结。

[1057] 表 6. 10

[1058]

组处理	1	2	3	4
	自体膀胱 SMC's	自体脂肪SMC's	自体血液 SMC's	只有支架
研究的平均天数	53	60	61	48
管道位置的选择结果的发生率(# 结果动物g / #检查位置的 动物)				
尿道上皮的存在				
左 输尿管 管道 交叉点(载玻片13)	5/8	6/8	7/8	3/7
右 输尿管 管道 交叉点(载玻片15)	7/8	6/8	4/7	4/7
管道体的输尿管端(载玻片5或9)	3/7	5/8	3/5	1/7
管道体的中心(载玻片6或10)	0/6	1/7	1/5	1/7
管道体的开孔端(载玻片7、8、11或12)	0/8	0/8	0/7	0/7
管道-气孔-皮肤交叉点(载玻片17)	1/8	0/8	0/8	0/7
扁平上皮的存在				
左输尿管 管道 交叉点(载玻片13)	0/8	0/8	0/8	0/7
右输尿管 管道 交叉点(载玻片15)	0/8	0/8	0/8	0/7
管道体的输尿管端((载玻片5或9)	0/7	0/8	1/5	0/7
管道体的中心(载玻片6或10)	0/6	1/7	0/5	0/7
管道体的开孔端(载玻片7、8、11或12)	6/8	3/8	4/7	2/7
管道-气孔-皮肤交叉点(载玻片17)	7/8	8/8	8/8	7/7
平滑肌的存在				
左输尿管 管道 交叉点(载玻片13)	4/8	4/8	7/8	2/7
右 输尿管 管道 交叉点(载玻片15)	4/8	4/8	5/8	3/7
管道体的输尿管端((载玻片5或9)	3/7	5/8	3/5	1/7
管道体的中心(载玻片6或10)	0/6	1/7	1/5	1/7
管道体的开孔端(载玻片7、8、11或12)	0/8	0/8	0/7	0/7
管道-气孔-皮肤交叉点(载玻片17)	0/8	0/8	0/8	0/7
慢性-活性炎症 /碎屑的表面				
左输尿管 管道 交叉点(载玻片13)	5/8	5/8	1/8	6/7
右输尿管 管道 交叉点(载玻片15)	3/8	5/8	3/8	5/7
管道体的输尿管端(载玻片5或9)	5/7	6/8	3/5	6/7
管道体的中心(载玻片6或10)	6/6	7/7	5/5	6/7
管道体的开孔端(载玻片7、8、11或12)	8/8	7/8	7/7	7/7

[1059]

管道-气孔-皮肤交叉点(载玻片17)	6/8	4/8	5/8	6/7
减弱, 尿道上皮	1/8	3/8	3/8	0/7
增生, 尿道上皮	3/8	6/8	5/8	4/7
空泡形成, 尿道上皮	6/8	6/8	6/8	4/7
胃肠粘膜异位	1/8	2/8	0/8	0/7
异位骨, 分上皮	1/8	0/8	2/8	0/7
出血, 管道壁	0/8	3/8	1/8	2/7
矿化	1/8	0/8	0/8	0/7
支架材料	1/8	0/8	1/8	1/7
GI 道粘连(P=存在)	6/8	6/8	1/8	5/7
脾粘连(P=存在)	0/8	0/8	0/8	1/7
精囊/子宫粘连(P=存在)	0/8	0/8	2/8	0/7
血管炎/血管坏死, 小血管血液	3/8	0/8	2/8	1/7
急性炎症/溃疡, 开孔附近皮肤	1/8	0/8	0/8	0/7

[1060] 表 6.11 显示了肾、输尿管和其它组织按组的结果概要。

[1061] 表 6.11

[1062]

组处理	1	2	3	4
	自体膀胱SMC's	自体 脂肪 SMC's	自体 血液 SMC's	只有支架
左肾				
肾盂积水/慢性肾炎	3/8	2/8	2/8	6/7
慢性肾炎(无肾盂积水)	1/8	2/8	1/8	0/7
肾盂肾炎	2/8	0/8	0/8	3/7
慢性活跃肾炎	1/8	4/8	1/8	5/7
炎症, 急性/亚急性	1/8	1/8	0/8	0/7
再生, 肾小管上皮细胞	5/8	6/8	4/8	1/7
肾小管坏死/液/管型/肾小球肾炎	1/8	2/8	0/8	1/7
病毒包涵体, 肾小管上皮细胞	1/8	2/8	0/8	0/7
血管炎/血管周围炎	1/8	1/8	1/8	0/7
炎症, 亚急性, 骨盆	2/8	0/8	1/8	0/7
增生, 移行上皮, 骨盆	1/8	0/8	1/8	0/7
炎症, 慢性活跃, 胶囊/腹膜	0/8	2/8	2/8	0/7
右肾				
肾盂积水/慢性肾炎	3/8	2/8	3/8	5/7
慢性肾炎(无肾盂积水)	2/8	1/8	2/8	0/7
肾盂肾炎	0/8	0/8	1/8	3/7
慢性活跃肾炎	1/8	2/8	0/8	1/7
炎症, 急性/亚急性	1/8	0/8	0/8	0/7
再生, 肾小管上皮细胞	4/8	2/8	4/8	1/7
肾小管坏死/液/管型/肾小球肾炎	1/8	2/8	0/8	0/7
病毒包涵体, 肾小管上皮细胞	1/8	1/8	0/8	0/7
血管炎/血管周围炎	3/8	0/8	2/8	0/7
炎症, 亚急性, 骨盆	1/8	0/8	0/8	0/7
增生, 移行上皮, 骨盆	1/8	0/8	1/8	1/7
炎症, 慢性活跃, 胶囊/腹膜	1/8	2/8	0/8	0/7
左输尿管				
扩张	4/8	2/8	3/8	7/7

[1063]

增生, 变移上皮	1/8	0/8	0/8	0/7
空泡形成, 变移上皮	1/8	0/8	1/8	0/7
炎症, 亚急性/慢性, 周边输尿管肠系膜	3/8	4/8	5/8	3/7
血管炎/坏死, 肠系膜血管血液	4/8	1/8	1/8	1/7
内腔中的性粒细胞	1/8	0/8	0/8	0/7
细菌栓塞, 肠系膜血管血液	0/8	0/8	0/8	1/7
右 输尿管				
扩张	4/8	2/8	4/8	6/7
增生, 变移上皮	1/8	0/8	0/8	0/7
空泡形成, 变移上皮	1/8	0/8	1/8	0/7
炎症, 亚急性/慢性, 周边输尿管肠系膜	1/8	3/8	6/8	1/7
血管炎, 肠系膜血管血液	4/8	1/8	2/8	1/7
淋巴结, 腰椎				
增生, 淋巴	1/3	0/3	1/2	U
出血	0/3	1/3	0/2	U
组织细胞增多症, 鼻窦	1/3	3/3	1/2	U
渗透物, 中性粒细胞	2/3	1/3	0/2	U
损耗, 淋巴细胞	1/3	3/3	1/2	U
淋巴结, 肠系膜				
出血	0/2	1/2	0/2	U
组织细胞增多症, 鼻窦	0/2	1/2	1/2	U
损耗, 淋巴细胞	0/2	0/2	1/2	U
充血	0/2	1/2	0/2	U
粘连和瘻管				
管道-肠粘连	8/8	8/8	5/8	5/7
瘻管(宏观或临床笔记)	5/8	7/8	6/8	2/7
瘻管/中性神经束(微观)	3/8	6/8	4/8	1/7
瘻管(宏观或微观)	5/8	8/8	6/8	3/7
输尿管-肠粘连	1/8	1/8	3/8	2/7
管道-脾脏粘连	0/8	0/8	0/8	2/7
管道-精囊粘连	0/8	0/8	1/8	0/7
管道-子宫粘连	0/8	0/8	1/8	0/7
输尿管-子宫粘连	1/8	0/8	1/8	0/7
总损害:				
腹壁				
骨异位, 开孔附近(P=存在)	4/4	3/5	2/2	1/1
炎症, 慢性-活性, 腹膜	1/4	2/5	0/2	0/1
纤维化, 筋膜	0/4	1/5	0/2	1/1
胃肠				
绒毛萎缩	2/2	0/1	0/1	U
充血	0/2	1/1	0/1	U
粘液增生, 胃	0/2	0/1	1/1	U
肝脏				
炎症, 慢性-活性, 胶囊/腹膜	U	1/1	U	U
肺部				

[1064]

炎症，急性/亚急性，多病灶的	1/1	0/1	3/3	U
细菌集落，多病灶的	1/1	0/1	1/3	U
血管炎，坏死/血栓	1/1	0/1	0/3	U
炎症，慢性，胸膜	0/1	1/1	0/3	U
淋巴结，腹股沟				
出血	1/1	0/2	U	U
渗透物，中性粒细胞	1/1	0/2	U	U
增生，淋巴	0/1	2/2	U	U
耗损，淋巴细胞	1/1	0/2	U	U
组织细胞增多症，鼻窦	0/1	1/2	U	U
网膜				
炎症，慢性-活性，	U	3/3	U	U
胰脏				
自身溶解(P=存在)	1/1	2/4	U	U
炎症、慢性-活性，腹膜	0/1	2/4	U	U
精囊				
炎症，慢性-活性(放大)	1/2	U	U	U
皮肤，耳朵				
血管炎，坏死	U	1/1	U	U
脾脏				
炎症，慢性，腹膜表面	U	U	U	1/1
子宫				
子宫输尿管粘连(P=存在)	1/1	U	U	U

[1065] 尿道上皮再生不依赖于测试物中细胞的存在，并预计不会在围腔面对管道内腔的表面上发生；因此，尿组织再生的评价被限制于管道（切片 5、9、13 和 15）的颅端。

[1066] 测试物的布置和上覆腹部器官的重量可有助于所有组的内腔中排水不畅和碎屑堆积；然而，接受只有支架植入体的动物中在尸体剖检时有不同的结果。上尿路病变的存在与造成尿液反压的间歇性或完全阻塞相关 - 颅管道中憩室形成和输尿管和肾损害的发生率可以证明。任何组中没有观察到输尿管或管道狭窄的迹象。然而，组 4 动物相对于组 1、2 和 3 动物（100% 和 69% 分别结合）增加了输尿管积水和肾盂积水的发生率。只有支架测试物中 SMC 的存在似乎有助于继阻塞和尿组织的不完整发育后死亡的增加，导致认定只有支架测试物不适于进一步发展。

[1067] 构建测试物植入后，不管 SMC 来源（即，膀胱、脂肪或血液），观察了以粘膜、粘膜下层和具有维管基质的平滑肌为特点的尿样组织再生。相比之下，以具有有限平滑肌的维管基质支撑的异常粘膜为特点的只有支架测试物植入后，观察了修复过程。所述构建体组中尿样组织再生的范围受植入后动物存活时间的影响。

[1068] 图 60-63 提供了新的尿路管道显微照片。图 60 显示了组 2 中雌性动物 11 的 NUC 颅部分的显微照片（Masson 皮毛染色）。尿道上皮会出现在平滑肌层。

[1069] 图 61 显示了组 1 中雌性动物 1 的 NUC 颅部分的显微照片（Masson 皮毛染色）。尿道上皮会出现在平滑肌层。

[1070] 图 62 显示了组 2 中雌性动物 15 左输尿管附近 NUC 的显微照片（Masson 皮毛染色）。尿道上皮会出现在平滑肌层。

[1071] 图 63 显示了组 1 中雄性动物 5 的 NUC 颅部分的显微照片 (Masson 皮毛染色)。在这个层面上,管道壁为由纤维结缔组织组成。碎屑覆盖腔表面。这种外观是 NUC 尾部部分最常观察到的。

[1072] 结论

[1073] PCV-2 病毒性感染和偏向于尿流的完整尿路阻塞有助于 23/24 的非预定死亡。内腔和尿阻塞压缩相关的结果为粘连、瘘管、输尿管积水、肾盂积水和肾盂肾炎。in-life 外科手术相关并发症有助于 1/24 的未预定死亡。

[1074] 在来源于任何所述构建体测试物的部分管道中观到痊愈和再生,而来源于只有支架测试物的管道中观察到痊愈和再生,表明构建植入导致形成具有粘膜和平滑肌层组成的尿样组织壁的管道。

[1075] 所述构建体测试物(再生)和只有支架测试物(修复)之间痊愈的差异有助于只有支架测试物的肾脏研究中观察到明显的较高发生率,这导致认定只有支架测试物不适于进一步发展。

[1076] 观察到构建测试物之间的再生性过程和结果没有差异,这说明促进再生的 SMC 来源之间是等价的。

[1077] 实施例 7- 接种有 SMC 的新的尿路管道支架的体内植入

[1078] 进行了利用猪模型评价合成支架 (PGA) 和细胞构建体产生允许尿液从输尿管流出体外的再生性新的尿路管道 (NUC) 而没有上尿路或代谢异常的损害迹象可能性的 3 个月临床研究 (根据例 3 协议)。

[1079] 对采用 SMC 接种 PLGA 可生物降解支架或新的尿路管道 (NUC) 以建立失禁尿流改道的可行性进行了评价。对经皮改道猪模型中的只有支架对照和接种有自体 SMC 分离的血液、脂肪或膀胱的 NUC 进行了 3 个月的评价。通过管道内腔和气孔的早期手术后管理对尿液外流进行维护。

[1080] 构建体由并不导致上尿路改道的上皮细胞内层和平滑肌层组成的血液、脂肪或膀胱来源再生的新管道得到的平滑肌细胞 (SMC) 组成。没有发现肌酸酐、代谢异常或改变血液学参数提高的迹象。

[1081] NUC 改道发展为再生的尿组织 (上皮细胞内层和血管平滑肌壁) 组成的管道,不管细胞来源。上尿路没有明显的改道,观察到肌酸酐升高或血液或代谢异常。相比之下,只有支架植入的动物发展为主要由纤维结缔组织和有限平滑肌发育组成的新的上皮内层管道。该组还具有高频率的输尿管积水和肾盂积水。在这两个组中,管道内腔和开孔的早期手术后管理都必须在研究期间保持通畅。

[1082] 图 64 显示了形成新的膀胱管道的再生泌尿系统组织的组织学特性是类似的,不管 SMC 来源。在临时分析 (48 天) 和研究结束 (3 个月末处死) 时进行了分析。

[1083] 这些研究表明,接种有各种来源 (血液,脂肪或膀胱) 的自体 SMC 的合成的新尿路管道 (NUC) 能够建立尿液除去的囊肿切除术后管理的新失禁尿流改道。NBC 植入的动物没有表现出通常与 GI 来源的尿流改道或只有支架植入体相关的后遗症。新的膀胱管道可能表示通过失禁尿流改道天然改道为囊肿切除术后管理的 GI 组织。

[1084] 根据 Pirker et al. (2007) J Urol. Apr ;177(4) :1546-51, 输尿管 - 膀胱交叉点 (UVJ) 的三种肌肉成分是在胎龄为 60 天的猪胎中是易区别的。这包括 1) 输尿管 (U) 平滑

肌,2) 逼尿肌 (D) 平滑肌和 3) 周边输尿管鞘平滑肌。输尿管平滑肌的特点为无数的小直径肌肉束 (长箭头), 而逼尿肌肌肉由向多个方向伸展的大直径肌肉束和所有年龄组中按它们中间的纤维尺寸、位置和方向沿着壁内输尿管 (短箭头) 可区分的周边输尿管鞘的肌纤维组成。U = 输尿管内腔; B = 膀胱内腔, α -SMA 株, 减少 $\times 40$ 。此如图 65 所示。

[1085] 如图 66 所示, 82 天后, 脂肪组动物显示了新形成的输尿管 - 管道交叉点 (UCJ) 和 UVJ 的 Pirker 描述之间的相似性。组织学上, UCJ 切片主要显示了胎龄为 60-90 天的猪胚胎发育的相似性。Masson 三色对 UCJ 的组织切片进行染色。原始的总放大率 $10\times$ 。U = 输尿管内腔; C = 管道内腔, 箭头显示了具有输尿管和周边输尿管的肌纤维混合物的类似性。

[1086] 图 67 显示了植入管道的组织学, 并指出了平滑肌细胞壁、腹壁、上皮细胞覆盖、管道和管道内腔位置。

[1087] 实施例 8 - 由非膀胱细胞来源重新合成的功能性新尿路管道

[1088] 我们在此描述了表型和功能上无异于膀胱来源平滑肌细胞的猪外周血和脂肪的平滑肌细胞的分离和表征。我们表明, 外周血和脂肪来源平滑肌细胞可用于接种合成和可生物降解管状支架结构, 这些接种支架植入猪囊肿切除术模型术, 导致功能上无异于膀胱来源平滑肌细胞接种的新的尿路管道的成功再生。通过外周血或脂肪来源的平滑肌细胞接种合成支架重新产生泌尿系统结构的能力将大大促进泌尿系统组织工程学技术转化为临床实践。

[1089] 虽然平滑肌细胞还从其它组织来源的组得到分离的, 例如骨骼肌和网膜 (Wilschut et al. *JcellBiochem* 105, 1228-1239 (2008); Hernando et al. *Eur J Vasc Surg* 8, 531-536 (1994)), 我们选择把重点放在外周血和脂肪的平滑肌细胞回收上, 因为根据样本采集的容易这些代表具有良好潜在的临床应用的来源组织。相对于膀胱来源的平滑肌细胞在细胞 / 支架复合材料中的应用, 猪囊肿切除术模型被选定为评价外周血 - 和脂肪来源的平滑肌细胞的性能 (Baldwin et al. *J. Endourol.* 17, 307-312 (2003); Akbal et al. *J Urol.* 176, 1706-1711 (2006))。

[1090] 一个猪囊肿切除术模型评估外周血性能 - 和脂肪来源的平滑肌细胞相对膀胱提出申请后在细胞 / 支架复合材料来源的平滑肌细胞。

[1091] 图 68 显示了猪 (A) 膀胱、(B) 脂肪和 (C) 外周血来源的平滑肌细胞。所有 3 个组织类型的平滑肌细胞共享完全分化的平滑肌细胞特有的形态学特性, 其中包括扁平、梭形纤维母细胞的外观和旋转的“山和谷”型组织。

[1092] 图 69 显示了猪膀胱、脂肪和外周血来源平滑肌细胞的平滑肌细胞相关标记物的 RT-PCR 分析。平滑肌细胞相关标记物 $\text{Sm}\alpha\text{A}$ 、SM22、心肌蛋白、SMMHC 和钙结合蛋白的表达在所有平滑肌细胞类型中为可比较的, 不管组织来源。通过 RNA 质量和 β -肌动蛋白表达使样品标准化。得到涉及初级细胞培养的个别猪的数量。

[1093] 图 70 显示了猪膀胱、脂肪 & 外周血来源的平滑肌细胞的平滑肌细胞相关标记物的免疫荧光分析。平滑肌细胞相关标记物 $\text{Sm}\alpha\text{A}$ 、SM22、心肌蛋白、SMMHC 和钙结合蛋白的表达在所有平滑肌细胞类型中为可比较的, 不管组织来源, 但除了脂肪来源的 SMC 负对照中没有显示出可检测染色 (数据不显示) 的 SM22 表达之外 (IgG 同型)。

[1094] 猪的外周血来源的单核细胞部分的直接电镀导致典型的平滑肌细胞形态学 (图 68) 集落的结果。筛选的所有 (100%) 动物 ($n = 24$) 产生从 50 毫升外周血过零回收

的 2.44×10^3 – 2.37×10^6 平滑肌细胞的平滑肌细胞集落。平滑肌细胞的回收不受培养基配方、细胞密度或表面涂层（数据不显示）的变化的影响。途径被用于研究皮下或脂源性间质来源的脂肪作为平滑肌细胞来源的潜在应用。脂肪的间质血管部分 (SVF) 表示包括内皮细胞、平滑肌细胞以及有限间充质电势²² 的祖细胞的细胞的异源种群。我们能够产生效率 ($n = 24$) 为 100 % 猪脂肪平滑肌细胞的集落（扩张为单层）（图 68）细胞回收率为 1.37×10^5 – 4.36×10^5 细胞 /g 脂肪组织。相比之下，平滑肌细胞可从回收率为 1.29×10^6 – 9.3×10^6 细胞 /g 膀胱组织的膀胱组织分离。外周血或脂肪的平滑肌细胞集落扩张导致培养膀胱来源的平滑肌细胞（图 68）特有的典型旋转的“山和谷”型组织细胞单层的形成。

[1095] 通过采用已被证实特别不利于间充质干细胞生长和扩张的高细胞密度和高葡萄糖培养基促进了平滑肌细胞的富集 (Lund et al. 2009 上文)。为了这个目的,对表明脂肪来源的平滑肌细胞和间充质干细胞之间表型和功能特性的主要差异的进行系统比较分析（见下例）。

[1096] 外周血或脂肪来源的平滑肌细胞的体外功能性质分析证明它们无异于膀胱来源的平滑肌细胞。与平滑肌收缩性相关的蛋白质表达增加为平滑肌细胞分化和成熟的性能特点 (Jeon et al, 2006 上文; Ross et al., 2006 上文; Sinha et al., 2004 上文)。心肌蛋白为平滑肌细胞分化所需的关键转录因子,并用于介导对包括 SM22、 α -平滑肌肌动蛋白 (SM α A)、平滑肌肌球蛋白重链 (SMMHC) 和钙结合蛋白 (CNN) 的收缩性必要的平滑肌标记物的表达。平滑肌标记物 SMMHC 和 CNN 的表达通常被视为成熟平滑肌细胞的诊断 (Qiu et al., 2005 上文; Wang et al., 2003 上文; Yoshida et al., 2003 上文)。如图 69 所示,这些关键平滑肌细胞标记物表达的半定量 RT-PCR 分析证明血液和脂肪来源的平滑肌细胞为能直接与膀胱来源的平滑肌细胞相比。

[1097] 通过平滑肌细胞特异性蛋白质表达的免疫荧光分析证实了这些结果。 α SMA、SM22、CNN 和 SMMHC 表达于与膀胱来源的平滑肌细胞（图 70）所观察到相同定位模式的外周血和脂肪来源的平滑肌细胞中。压力纤维的定位被观察到在膀胱来源的平滑肌细胞中是典型的。SM22 的着色被观察到在脂肪来源的平滑肌细胞中弱。

[1098] 图 71 显示了猪 (A) 膀胱、(B) 脂肪和 (C) 外周血来源平滑肌细胞的收缩性。所有 3 个组织来源的平滑肌细胞显示了胶原凝胶基质中的 Ca^{2+} 依赖性收缩。数量是指来源于个别动物的细胞系。

[1099] 通过三维钙离子依赖性的收缩性试验进一步评价外周血和脂肪来源的平滑肌细胞的功能。当被嵌入三维凝胶时,平滑肌细胞自发地诱导 Ca^{2+} 依赖方式的胶原基质的收缩性 (Travis et al. 2001 上文)。如图 71 所示,当观察到样本-样本变化时,外周血和脂肪-来源细胞缩短至膀胱来源的平滑肌细胞可比的程度,这种收缩性为 EDTA (已知的 Ca^{2+} 螯合剂) 所抑制。

[1100] 图 72A–C 显示了猪 (A) 膀胱 (B) 脂肪和 (C) 外周血来源平滑肌细胞的生长动力学。数量是指来源于个别动物的细胞系。

[1101] 用于泌尿系统再生性药物的脂肪和外周血来源的平滑肌细胞的应用为能够在可接受的时间框架获得安全的足够细胞数量。为了这个目的,我们已经观察到平滑肌细胞集落（得自猪外周血或 7–25g 猪脂肪的 50 毫升样本）在接种后 7 天内被鉴定出,可能在 14 天

内通过。如图 72A-C 所示,除了未知原因的膀胱平滑肌样本不能增殖之外,一百万至一千万平滑肌细胞在 2-4 周 ($n = 24$) 内被从膀胱、外周血或脂肪回收。在接种合成的新尿路管道支架的细胞收获之前,膀胱和脂肪来源的平滑肌细胞被扩张至 2 个通路。外周血来源的平滑肌细胞被扩张至 3-4 个通路,以产生等价的细胞数量。平均而言, $30-40 \times 10^6$ 平滑肌细胞被用来接种新的尿路管道支架。

[1102] 我们以前曾表明,膀胱来源的平滑肌细胞可用于接种合成的生物聚合物支架,其植入导致膀胱重新再生增强的膀胱囊肿切除术的体内临床模型中 (Jayo I 上文)。然而,由于膀胱来源的平滑肌细胞可能在临床上使用不理想,我们接着评价了尿失禁的 3 个月猪模型中外周血和脂肪来源的平滑肌细胞的体内临床疗效 (Baldwin et al. 2003 上文; Akbal et al. 2006 上文)。膀胱、脂肪和外周血来源的平滑肌细胞被用于接种 PGA/PLGA- 基支架,以创建允许尿液从输尿管直接流出身体外表面的再生性新尿路管道。我们注意到,构建体由并不导致上尿路改道的上皮细胞内层和平滑肌层组成的血液、脂肪或膀胱来源再生的新管道得到的平滑肌细胞组成。没有发现肌酸酐、代谢异常或改变血液学参数提高的迹象。

[1103] 图 73 显示了具有脂肪、外周血和膀胱来源的平滑肌细胞接种合成支架的猪囊肿切除术模型中的新的尿路管道的再生。接种有脂肪、外周血或膀胱来源的平滑肌细胞的新尿路管道复合材料导致具有尿路和平滑肌层的尿样组织的再生。新的尿路管道的颅背侧 / 腹侧方面、邻近的输尿管 / 支架交叉点中观察到平滑肌细胞束。在所有组中,管道中间部分得到的典型切片中观察到纤维母细胞和平滑肌细胞。只有支架组发展为主要由与修复相关的纤维结缔组织和有限平滑肌束组成的新尿路管道。Masson 三色染色被用来鉴定再生的平滑肌束 (红色) 和富含胶原基质 (蓝色) 中组成的由纤维母细胞和平滑肌细胞的早期细胞组织的存在。核染上深棕色。在所有组中,管道中间部分得到的典型切片中观察到纤维母细胞和平滑肌细胞。膀胱和支架组中分别观察到较高浓度的胶原,其特点为 Masson 三色染色的蓝着色。只有支架组发展为主要由纤维结缔组织和有限平滑肌束组成的新尿路管道。

[1104] 如图 73 所示,形成新的尿路管道的再生泌尿系统组织的组织学特性通常是相似的,不管平滑肌细胞群来源。相比之下,只有支架植入的动物发展为主要由纤维结缔组织和有限平滑肌发育组成的新的上皮内层管道。在这两个组中,管道内腔和开孔的早期手术后管理都必须在研究期间保持通畅。此研究表明接种有来源于多种潜在细胞来源 (血液,脂肪或膀胱) 的自体平滑肌细胞的合成的可生物降解支架复合材料能够被用于在临床前猪模型中改造新的尿路管道。通过外周血或脂肪来源的平滑肌细胞接种合成支架重新产生泌尿系统结构的能力将大大促进泌尿系统组织工程技术转化为临床实践。

[1105] 材料和方法。

[1106] 猪膀胱、脂肪和外周血的平滑肌细胞产生。从用于产生自体新的尿路管道构建体的膀胱 & 脂肪活检样本以及外周血分离平滑肌细胞。在最终的新尿路管道的计划植入前约 8 周,从 24 个哥廷根猪中的每一个获得 1cm^2 膀胱活检样本、 2cm^2 脂肪活检样本和 50 毫升外周血。

[1107] 对于膀胱来源的平滑肌细胞的分离,通过膀胱活检解剖切开上皮细胞层,其余的平滑肌层被切为 1 平方毫米,并排列于组织培养板的表面上。将活检片在生物安全柜中干燥 10-30 分钟。将 DMEM-HG (Gibco) + 10% FBS 加入活检样本和在 37°C 、5% CO_2 潮湿条件下培养的平板中。

[1108] 采用 PBS 清洗 3 次脂肪组织 (7-25g), 用解剖刀和剪刀切碎, 转移入一个 50 毫升圆锥管中, 并于 37℃ 下在 0.3% 胶原酶 (Worthington) 溶液和 DMEM-HG (1% BSA) 中共培养 60 分钟。该管可不断地摇动或定期地摇动以促进消化。通过在 600g 下离心 10 分钟和再悬浮于 DMEM-HG+10% FBS 中使基质血管部分形成小球。然后, 该基质血管部分被用来接种通路 0。

[1109] 25 毫升猪外周血在 PBS 中被稀释为 1:1, 并采用 25 毫升 Histopaque-1077 (Sigma) 在 50 毫升圆锥管中分层。离心后 (800g, 30min), 采集单核细胞部分, 使用 PBS 清洗一次, 并再悬浮于 α -MEM/10% FBS (Invitrogen) 中, 以接种通路 0。

[1110] 新的尿路管道细胞 / 支架复合材料的组装。膀胱、脂肪和外周血来源的平滑肌细胞被分别地扩张直到 7 周, 以产生接种 NUC 支架需要的 10^7 细胞。膀胱和脂肪来源的平滑肌细胞在用于支架接种的细胞收获前被扩张至 2 个通路, 以产生最终的构建。外周血来源的平滑肌细胞培养在用于支架接种的细胞收获前被扩张至 P3-4。为了制备 NUC 支架, 将 PGA 毡切成一定尺寸, 缝合为 NUC 形状, 然后涂覆 PLGA。然后采用环氧乙烷对这种构建进行杀菌。在细胞接种前一天, 通过 60% 乙醇 / 40% D-PBS、100% D-PBS、D-MEM/10% FBS 或 α -MEM/10% FBS 的饱和浓度对 NUC 支架进行预润湿, 接种于室温下连夜在 D-MEM/10% FBS 或 α -MEM/10% FBS 中共培养。然后采用膀胱 -, 脂肪 -, 或外周血来源的平滑肌细胞对 NUC 支架进行接种, 接种构建成熟于湿润的 37℃ 培养箱 (5% CO₂) 中直至自体宿主猪植入第 7 天。

[1111] RNA 分离和半定量 RT-PCR 分析。采用 RNeasy Plus RNA 微型分离试剂盒 (Qiagen) 从猪膀胱、脂肪和周边血液来源平滑肌细胞分离 RNA。采用 Quantitect cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen) 对每个样本的 1 μ g RNA 进行逆转录。以下平滑肌细胞特异性引物被用来进行 RT-PCR 反应 (5' -3') : β -肌动蛋白 (F:TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG, R:CGT TCA CAC TTC ATG ATG GAG T), SM22(transgelin) (F:GAT CCA ACT GGT TTA TGA AGA AAG C, R:TCT AAC TGA TGA TCT GCC GAG GTC), SM α A (F:CCA GCA GAT GTG GAT CAG CA, R:AAG CAT TTG CGG TGG ACA AT), SMMHC (F:GCT CAG AAA GTT TGC CAC CTC, R:TCC TGC TCC AGG ATG AAC AT), CNN(钙结合蛋白) (F:CAT GTC CTC TGC TCA CTT CAA C, R:CCC CTC GAT CCA CTC TCT CA), MYOCD (F:AAG AGC ACA GGG TCT CCT CA, R:ACT CCG AGT CAT TTG CTG CT)。循环条件: 变性 95° (2 分钟), 变性 95° (45 秒), 退火 (45 秒), 延长 72° (45 秒), 最后延伸 72℃ (5 分钟)。35 个循环 (心肌蛋白 40 周期)。退火温度: β -肌动蛋白 = 58, SM22 = 56°, SM α A = 55°, SMMHC = 60°, CNN = 51°, 心肌蛋白 = 52。采用 GoTaq 绿色 PCR 混合物 (Promega) 和循环的 iQcycler (Bio-Rad) 进行了 PCR 反应。

[1112] 免疫荧光分析。以下抗体被用于免疫荧光分析: SM α A (Dako#M0851), CNN (Dako#M3556), SM-MHC (Sigma#M7786), 心肌蛋白 (Santa Cruz#SC3428), SM22 (Abcam#ab28811-100), 抗 msIgG1/Alexafluor488 (Invitrogen#A21121), 抗 msIgG2a/Alexafluor488 (Invitrogen#A21131), 抗 gtIgG/Alexafluor488 (Invitrogen#A11055)。除了 10 μ g/ 毫升 SMMHC 使用 10 μ g/ 毫升之外, 所有主要抗体使用 5g/ 毫升的终浓度。

[1113] 收缩性试验。根据前述进行了收缩性试验 (Travis et al., 2001 上文)。

[1114] 生长动力学。组织分离到新的尿路管道支架接种的平滑肌细胞是通过汇合率 $\geq 70\%$ 连续的通路进行扩张。

[1115] 猪囊肿切除术模型中重新改道的新尿路管道形成的 GLP 临床前分析。总囊肿切除术和失禁输尿管造口术的 32 个哥廷根猪（由 4 个雄性和 4 个雌性组成的 8 个动物的每个数据点）被用于 GLP 临床前分析，以确定接种有自体平滑肌细胞来源于膀胱、血液或脂肪组织的组织 - 工程 NUC 构建体的安全性和功能性。在 32 个动物中，所述第一组（4 个雄性，4 个雌性）被植入接种有膀胱来源的平滑肌细胞的 NUC，第二组被植入接种有脂肪来源的 SMCs 的 NUC 支架，第三组被植入接种有血液来源的 SMCs 的 NUC 支架，第四组仅仅被植入没有接种的 NUC 支架。通过超声成像、肾盂造影照片以及尿液和血液分析在本研究的不同时间点对设备的效果和性能进行监测。在恢复期（第 84+/-5 天）完成时，使所有动物安乐死，并进行尸体剖检，以收获肾脏、管道和用于组织学制品和病理学检查的相关器官和组织。

[1116] 实施例 9 - 猪中新的尿路管道的评价

[1117] 本研究的目的是为了确定接种有在手术除去膀胱（全囊肿切除术）和改道输尿管至构建植入体系统流入端后用于管道植入和组织再生的来源于膀胱、血液或脂肪的自体平滑肌细胞的 Tengion 新的尿路管道（NUC）构建使用的安全性和功能性。Peritonewn 将被用于缠绕整个构建。所述构建体排泄流出端将是定向的，并结合于手术方式创建的开孔，以通过尿液。在本研究中，将对新的尿路管道构建体的性能和相关器官和组织的效果进行评价。末端测量包括肾盂造影照片、超声、血液分析和组织病理学。

[1118] 本研究中将采用 20 个动物（10F，10M）。1（I）组含有 4 个动物（2F 和 2M）（自体膀胱 SMCs）。2 组含有 8 个动物（4F，4M）：自体脂肪 SMCs 和自体血液 SMCs。第一组将被植入接种有膀胱来源的 SMCs 的 NUC 支架，第二组被植入接种有脂肪来源的 SMCs 的 NUC 支架，第三组被植入接种有血液来源的 SMCs 的新的尿路管道支架。通过超声成像、肾盂造影照片以及尿液和血液分析在本研究的不同时间点对设备的效果和性能进行监测。在恢复期（第 84-5 天）完成时，应使动物安乐死，并进行尸体剖检，以收获肾脏、管道和用于组织学制品和病理学检查的相关器官和组织。16/20 的动物将经受两次大手术。第一手术将是膀胱活检。在后期，将进行第二外科手术，以植入接种有自体膀胱 SMCs 的新尿路管道构建体。剩余 16 个动物将经受一次小外科手术，以从腹部和静脉血采集脂肪组织。组织将被用于接种新的尿路管道构建体的细胞构建所用自体细胞的收获。此操作需要构建体所需的足够自体组织样本。两种组织将从 16 个动物采集，以提供用于组选择的最优过程。这些相同的动物将被植入接种有来源于血液或脂肪组织的支架的自体 SMC。还对腹膜用作管道植入体的血管来源进行评价。

[1119] 测试动物：常用名：Yorkshire 猪；品种 / 种类：野猪；动物数量（按照性别）：10 雌性 & 10 雄性；体重范围：25±5Kg。

[1120] 处理组：本研究的目的是为了对雌性和雄性 Yorkshire 猪模型中的 Tengion 的新尿路管道构建体进行 12 周的评价。表 9.1 显示了本研究的 5 个阶段。

[1121]

概要	
阶段 A	基线数据采集，用于支架的平滑肌细胞的组织收获
阶段 B	通过赞助商产生测试物（构建）

阶段 C	20 个动物的外科植入手术
阶段 D	存活 :手术后护理和监测、观察、数据采集
阶段 E	尸体剖检前追踪 & 组织收获和组织学的尸体剖检

[1122] 表 9.2 提供了研究设计的概要。在活检前、手术前和尸体剖检前对体重进行测量。14 天或直至痊愈期间每天对切口位置进行评价。在研究的整段时间根据需要对开孔扣进行维护。根据需要对标准动物进行清创术。

[1123] 表 9.2

[1124]

组No.	处理	动物编号 M F	活检操作	外科手术 (第 0 天)	手术后操作	预期的尸体剖检时间点
1	自体膀胱 SMC	2 2	从每个动物采集 2.5 cm ² 组织样本	完整囊肿切除术，接着对与 NUC 构建流入端连接的输尿管进行移位		
2	自体脂肪 SMC	4 4	从每个动物采集： 25-50 g脂肪组织样本 外周血的8×10 毫升管	完整囊肿切除术，接着对与 NUC 构建流入端结合的输尿管进行移位，输尿管为含有支架的~7天支架型的，腹膜用于缠绕和覆盖整个构建。所述构建体的排泄流出端通过腹壁结合，并不需要自制气孔退出皮肤。	临床健康评价、体重、开孔扣和切口位置维护、血液和尿液分析、肾盂造影照片和超声	植入后约 3 个月(从植入时84 ±5天)
3	自体血液 SMC	4 4		永久放置的开孔扣以保持通畅		

[1125] 测试设备 .

[1126] 测试物组 1 :含有自体膀胱来源的 SMCs 的 PGA/PLGA 新的尿路管道构建体。说明 :包含接种有自体膀胱来源的 SMCs 的合成乳酸 / 羟基聚合物的支架。

[1127] 测试物组 2 :含有自体脂肪来源的 SMCs 的 PGA/PLGA 新的尿路管道构建体。说明 :包含接种有自体脂肪来源的 SMCs 的合成乳酸 / 羟基聚合物的支架。

[1128] 测试物组 3 :含有自体血液来源的 SMCs 的 PGA/PLGA 新的尿路管道构建体。说明 :

[1129] 包含接种有自体血液来源的 SMCs 的合成乳酸 / 羟基聚合物的支架。

[1130] 手术前禁食

[1131] 操作说明 :手术前,所有动物将被禁食至少 8 小时。在每次手术前将禁止采食。

[1132] 操作的时间 / 频率 :每个约 8 小时的手术时间之前的单事件晚上。

- [1133] 操作性能 :食物禁食将由 DaVINCEs 工作技术员以动物青霉素进行。
- [1134] 操作记录 :数据将被记录在 DaVINCI 动物室维护表 (每天两次评估表或动物进展注释) 上。
- [1135] 体重 :
- [1136] 操作说明 :在校准天平上对动物进行称量。
- [1137] 操作的时间 / 频率 :活检前 ;手术前和尸体剖检前。其它体重可任凭兽医处理获得。
- [1138] 操作性能 :体重将通过训练的技术人员进行称量。
- [1139] 镇静 / 安乐死 :
- [1140] 操作说明 :活检和测试设备植入操作 :在手术制品前将使每个动物镇静,然后对其进行麻醉 (根据 DaVINCI SOP DAV-SURG-003)。将采用 20 毫克 /kgIM 氯胺酮、2 毫克 /kg 甲苯噻嗪 (FYI) 和阿托品 (0.04 毫克 /Kg) 使每个动物镇静。然后将管子插进每个动物,并使其接受吸入通过容积调控性呼吸器或再呼吸装置传送的 2.5% -4% r 异氟烷以用于诱导和 0.5-2.5% 异氟烷以用于保持麻醉。将静脉鞘置于外周血管或右颈内静脉中。在外科手术期间 (只有植入动物) 将施用 10 毫升 / 公斤 / 小时的乳酸林格氏液。
- [1141] 超声和其它瞬态操作 :如上方一段所述将使动物镇静。另外,采用 Telazol (2-5 毫克 /kg) IM 使动物镇静,并采用吸入所需的异氟醚使动物麻醉 (通过圆锥体传送)。任凭兽医或外科医生处理,将管子插进动物中。
- [1142] 操作的时间 / 频率 :贯穿 n-life 操作或手术的每天
- [1143] 操作性能 :通过 DaVINCI 外科医生操作以及训练的技术人员协助在 DaVINCEs 手术室进行麻醉。
- [1144] 操作记录 :数据将被记录在 DaVINCI 动物手术表格上。
- [1145] 手术制品 :
- [1146] 操作说明 :对于所有动物 (在活检和植入那天), 对于所有动物 (在活检和植入那天), 将剑突至耻骨联合上的毛发剪除 3 英寸。然后将该动物定位于背卧。然后将采用聚维酮碘溶液和 70% 酒精对手术区域进行三次交替擦洗 ; 一旦交替擦洗完成, 将最终应用聚维酮碘溶液, 并让其干燥。将对无菌外科手术的区进行铺单。
- [1147] 操作的时间 / 频率 :活检前和手术前。每次事件的手术制品将需要约 30 分钟。
- [1148] 尿液样本采集和分析 :
- [1149] 操作说明 :在活检前和尸体剖检前将通过导管插入或试管捕获方法采集两种尿液样本。
- [1150] 约 3.0int 量的尿液样本 (定量和 2int 定性测试的 -1 毫升) 将被采集于定性分析的无菌容器中。
- [1151] 较小的量可足以分析 ; 然而, 如果尿液采集困难, 定量样本采用定性样本的先例。采集的尿液将被移入 5 毫升无菌管中, 并在采集 24 小时冷冻和发运。
- [1152] 定性尿分析 :采集当天, 将 0.5 毫升尿液在 DaVINCI 上进行分析。将采用 Multistix10SG 试纸在采集时间进行定性测量。
- [1153] 定量尿分析 :1 毫升或大于 1 毫升将被移入 5 毫升无菌试管中, 冷藏, 并采用冷却冰袋在采集 24 小时内发运。定性和定量测量的目标参数包括 :定性尿分析 :试纸 - 葡萄糖、

胆红素、酮、比重、血液、pH 值、蛋白质、尿胆素原、亚硝酸盐和白血球。

[1154] 定量尿分析:细菌、葡萄糖和总蛋白质的定性量。其它参数可任凭便利的兽医处理。样本将用 AniLytics 进行分析。

[1155] 操作的时间/频率:每个动物的操作持续了约 15 分钟。采集将在活检前和尸体剖检前完成。任凭便利的兽医和研究主任处理,进行其它尿液分析以评价动物健康。

[1156] 操作性能:尿液采集操作将通过训练的技术人员进行。

[1157] 操作记录:采集信息和定性结果将被抄写在 DaVINCI 编写表格上。定量尿液结果将被分析试验室以硬拷贝形式记录,并和研究原始数据存档。

[1158] 定量尿液结果将与研究报告提交的原始数据分析试验室和印刷。

[1159] 血液采集。

[1160] 血液学、凝固、血清化学、血液气体。

[1161] 血液学:血液学样本将被采集于 2.0ml EDTA 管中,并被储存于湿冰上或冷藏(2-8℃)。将样本进行标记,并在采集 24 小时内进行分析。对血液样本的以下指定参数进行评价:总白血球计数(WBC);红血球计数(RBC);血红蛋白浓度(HGB);血细胞比容值(HCT)1;平均红细胞体积(MCV);平均红细胞血红蛋白(MCH)1;平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)1;血小板计数(PLT),其中 1 = 计算值。

[1162] 凝固:1.8 毫升总血液将被采集于 1.8 毫升柠檬酸钠管(0.2 毫升的 3.8%柠檬酸钠)中。柠檬酸盐血液样本将被保存于冰上,直至准备好在 1,000 至 1300×g 下离心 10 至 15 分钟。在冷冻前,将血浆以 1/2 分成两份,然后在 -70℃ 下冷冻。柠檬酸盐血浆样本需要被保存于 -70℃ 下。将对样本的以下参数进行评价:前凝血酶时间(PT);活化部分促凝血酶原激酶时间(APTT);和纤维蛋白原(FIB)。

[1163] 血清化学:血清化学的样本将被采集于约 4.0ml 血清分离管中。将血液样本进行离心(1300-1600zg for 10-15 分钟),并采用无菌技术进行萃取。然后将血清冷冻于 -70℃ 下。对样品的以下血清化学参数进行评价:葡萄糖(GLU);尿素氮(BUN);肌酐酞(CRE);总蛋白质(TPR);白蛋白(ALB);球蛋白(GLOB)1;白蛋白/球蛋白之比(A/G)1;钙(CAL);磷(PHOS);钠(NA);钾(K);氯(CL);总胆固醇(CHOL);总胆红素(TBIL);甘油三酯(TRG);丙氨酸转氨酶(ALT);天冬氨酸转氨酶(AST);碱性磷酸酶(ALK);γ 谷氨酰转氨酶(GGT);其中 1 = 计算值。

[1164] 血液气体:血液气体/Spun 血细胞比容/总蛋白质监测:动脉血液样本(-1.0 毫升)将被采集,并采用校准 i-STAT 分析仪和适当的墨盒进行分析。对样品的以下血液气体参数进行评价:钠(Na)(毫摩尔/L)PCO2(mm Hg);钾(K)(毫摩尔/L)PO2(mm Hg);离子钙(iCa)(毫摩尔/L)TCO2(毫摩尔/L);葡萄糖(Glu)(毫克/分升)HCO3(毫摩尔/L);血细胞比容(Hct)(%)BEecf(毫摩尔/L);pH;和 SO2(%)。操作的时间/频率。在 CBC 前采集血液样本,活检前、第 4&8 周和尸体剖检前进行临床化学和凝固。血液气体将在活检前被采集。每种动物的每种血液采集操作持续了约 15 分钟。

[1165] 生命特点监测操作:

[1166] 操作说明:在植入手术期间对以下小瓶进行监测:将对动物的氧速率、SaO2、脉搏率、呼吸量和体温约每 20 分钟监测一次。

[1167] 操作的时间/频率:约 20 分钟时间间隔贯穿整个外科手术。程序性能:生命体征

监测操作将由 DaVINCI 手术室中经过培训的技术人员进行。

[1168] 用于细胞培养的血液采集、脂肪组织采集和膀胱组织采集：

[1169] 操作说明：血液采集（组 2&3）：从肝素细胞准备管中的 16 个（16）动物（8M,8F）采集约 8×10 ml 小份静脉血。将血液打包到发货人所提供的赞助商中，并连夜发货至赞助商进行处理。脂肪组织采集（组 2&3）：为了进入脂肪组织和膀胱，立即从尾部至脐部的腹部开端中线进行切口。从采集血液的相同 16 个动物，皮下脂肪组织将从其腹部无菌采集，相当于约 25–50 克的组织。活检组织将被立即保存于含有组织培养基的赞助商所提供的广口瓶中，然后根据第 14.8 章进行无菌包装，并连夜发货至赞助商进行处理。

[1170] 膀胱组织采集（组 1）：在剩余的 4(4) 个动物中，膀胱将被暴露，并无尿液。一个圆顶片（ $\sim 2.5 \times 2.5$ 厘米）的膀胱组织将从膀胱被切除。该膀胱组织将被立即无菌保存于赞助商提供的组织培养基中，然后根据第 14.8 章进行包装。然后利用适当的技术和吸收性缝合材料将对膀胱的缺陷进行封闭。

[1171] 腹部切口将被适当大小的吸收性缝合材料层封闭。皮肤将再次采用适当大小的吸收性缝合材料以表皮下的方式被封闭。

[1172] 操作的时间 / 频率：每一次每种来源动物持续约 1 小时。

[1173] 操作性能：将进行活检采集和保存。可在动物笼区域或手术套房尽可能无菌采集血液。

[1174] 通过囊肿切除术管道对输尿管进行移位：

[1175] 操作说明概要：通过剖腹手术进行输尿管移位操作。将在腹部开始 5 厘米延伸至脐部颅尾约 15 厘米创建正中切口。腹膜将被确定，小心地从腹部空间分离直至组织足够长以覆盖新的尿路管道构建体，并形成以通过体壁退出的管道。将腹膜进行测量和切割，以便缠绕所述构建体，并形成以通过体壁延伸出的管道。采用 3-0Vicryl 在所述构建体周围缝合腹膜。进行护理以确保该组织保持完整和有血供应。然后使膀胱暴露，小心地排空尿液，确保没有尿液进入腹腔。供应膀胱的动脉和静脉被确定，并结扎。输尿管被确定，将两个 7Fr14cm 非吸收性输尿管支架（DaVinci 制得）以上升的方式插入，并从膀胱小心地横切输尿管。将在横切时缝合尿道。然后除去膀胱。将左输尿管小心翼翼地从前腹膜筋膜（扩张至颅）分离，直到有足够的流动性，以达到右侧。不受约束地将右输尿管切开，以到达所述构建体的末端。以简单连续的模式将输尿管缝合到 3-0Vicryl 的所述构建体上。在乳腺侧面的腹侧腹壁上创建一个开孔。将从腹内取出腹膜管道，对皮肤缝合。沿着缝合线涂上手术粘合剂，其中腹膜退出体壁。通过开孔从腹内取出与支架连接的缝合线，以便将来除去，将合适长度的 VINCI 开孔扣 / 导管插入在真个存活期间允许充分排泄的开孔中。一旦确保，将采用非吸收缝合线封闭腹部切口。以常规的方式封闭皮肤。然后该动物将会在动物的笼子中恢复。注：必须对腹膜非常谨慎地进行处理和操作，以通过脉管系统防止血液流动。非降解支架的输尿管将被保留在原处约 7 天，除非诊断评价表明需要过早地取出它们（例如肾脏阻塞）。

[1176] 操作的时间 / 频率：在每个动物的第 0 天，每个动物一次持续约 2–4 小时。

[1177] 开孔扣护理和维护 & 切口位置评价

[1178] 操作说明：

[1179] 开孔扣 / 导管（Foley 或等价物）：在明确的手术后，开孔导管（DaVINCI 产生开孔

扣或等价物：根据不同时间点所需要的 3-10cm) 将被重新插入,并确保采用缝合线缝合动物。开孔扣将被保存于本研究期间的位置。当该导管不滴水时,将采用生理盐水对其进行冲洗,以确保通畅。注：在第 7 至 21 天之间,经过退化和微粒(蛋白质相关)的支架材料开始在尿液中脱落。这可使得开孔扣阻塞和以上尿流量保留或所述构建体容量超出。因此,必要时对开孔和或新的管道进行清创术。

[1180] 切口位置评价：最初 14 天或直至治愈每天对切口位置进行评价。对开孔区和周围组织一天清洗两次。开孔将会观察到尿液排放,将根据切口位置对裂开、异常排泄、气味、刺激性或任何异常进行评价。

[1181] 停滞开孔组织清创术操作：含有气孔/管道内停滞组织的动物将经受清创术操作。根据协议将使动物镇静。小切口可在开孔上得到,以促进用于清创术的钳子的插入。停滞组织将在外观上是识别的,并用钳子抓住,轻轻拉扯。一旦除去所有的停滞组织,可用生理盐水溶液冲洗气孔/管道。采用缝合线对切口进行封闭,将重新插入开孔扣,并确保采用缝合线缝合动物。动物将在单独的笼中进行恢复。

[1182] 操作的时间/频率：外科手术如下：开孔扣：日常观察,接着根据需要观察导管不滴水时进行维护。时间需要约 15 分钟。切口位置评价：最初 14 天或直至痊愈每日和/或任凭便利的兽医处理。时间需要约 15 分钟。14.11.3 操作性能：便利的兽医或培训的技术人员通过对导管护理和切口位置进行评价。

[1183] 临床观察：

[1184] 操作说明：恢复：紧随每个手术完成后,动物将被允许从麻醉中恢复,并被转移到家笼里。植入后临床观察 4 周期间：植入后,每周将对进食和 fecalU 尿液输出的个别动物在植入后 4 周日常地进行 5 天的评价(即,周一至周五)。观察期间可为扩大至任凭便利的兽医和/或研究主任处理。存活：植入后/再植入手术恢复动物将存活一段 84+/-5 天的时期。

[1185] 操作的时间/频率：恢复：在任何外科手术结束时进行,约 1 小时。植入/再植入手术后临床观察 5 天：临床观察每周将日常地进行 5 天。

[1186] 每日动物健康评价：每天将进行两次,从隔离到尸体剖检(约 10 分钟)的整个研究期间约 8 小时。

[1187] 肾盂造影照片和超声：

[1188] 操作说明：

[1189] 根据对比的荧光镜检查注射,通过外周静脉或交替地通过股动脉导管插入将对照物直接注射入肾动脉中进行肾盂造影照片。在肾脏和新的尿路管道全身麻醉情况下,进行超声。

[1190] 操作的时间/频率：

[1191] 肾盂造影照片：尸体剖检前,每个动物的操作持续了约 30 分钟。超声：活检前(肾脏),周 4、8 和尸体剖检前(肾脏和新的尿路管道)。任凭研究主任和主诊兽医处理时,根据需要在其它时间获得其它超声成像,以评价动物的临床健康。

[1192] 动物处死和尸体剖检。

[1193] 操作说明：

[1194] 非预定尸体剖检 - 被发现死亡、垂死或经受非预定安乐死的任何动物将进行有

限的尸体剖检。探索尸体剖检将试图确定导致安乐死的死亡或问题的任何可能原因。组织采集将被局限于泌尿生殖系统。组织微观分析将通过研究主任和主办单位代表的共同讨论确定。非预定和预定安乐死 - 根据可接受的美国兽医协会 (AVMA) 准则, 将采用苯巴比妥钠 (150 毫克 /kg, IV) 对所有动物进行注射, 以造成安乐死。预定安乐死将在植入后第 12 周 (第 84 ± 5 天) 进行。

[1195] 体格检查 - 安乐死之前, 通过便利的兽医将对所有动物进行评价。该检查将包括记录动物的基本情况: 直肠体温、呼吸率、心率和毛细管注满时间。尸体剖检 - 所有动物将经受尸体剖检。将特别着重于肾脏、管道、输尿管、输尿管 - 膀胱交叉点、中间管道、管道 - 皮肤交叉点和淋巴结 (腰椎和肠系膜)。将对肾脏、输尿管、尿道 (如果存在)、管道、气孔、胸、腹及盆腔以及它们的器官和组织进行总的评价。如果观察到任何大体病变、粘连和 / 或器官的变化 (包括生殖), 将对它们的组织病理学评价进行评估、拍摄和采集。将采集腹腔的主要器官, 并为可能的进一步微观分析而保存。该主要器官为肝脏、脾脏、胰脏、大肠 (盲肠、结肠和直肠), 小肠 (十二指肠、空肠和回肠) 和气孔 (贲门、胃底和幽门)。完整的新尿路管道区将是可视化的, 并在原位被进行拍摄。其它照片和 / 或大体病变可任凭解剖员处理。通过向气孔中灌输福尔马林并加压管道和输尿管, 将完成管道固定。这将使用 Foley (或等价物) 导管完成, 而对气孔进行结扎, 以保持压力。14. 15. 2 操作的时间 / 频率: 每个动物的单一活动时间为第 $84 (\pm 5)$ 天的约 1/2 小时

[1196] 组织学 / 病理学试验室

[1197] 操作说明: 固定的泌尿器官 (即, 植入的新管道、肾脏和相关组织) 将被采集、修剪、检查、嵌入石蜡和切片中。将使用苏木和伊红 (H&E) 和 Masson 的三色 (弹性纤维) 对载玻片进行染色。

[1198] 实施例 10 - 具有上皮粘膜的导管的形成

[1199] 根据上述实施例 9 的记载, 动物被植入接种有脂肪 -, 外周血 -, 或膀胱来源的平滑肌细胞的 NUC 支架的。

[1200] 所有三个治疗组的手术后临床观察是相似的。术后, 各组的所有动物均立即有尿液从造口流出。一个月内各组所有动物均临床正常。各组所有动物需维持开孔, 并通过清创术保持尿液自开孔处流出。基线处, 所有治疗组的肾功能血清标记物 (尿素氮 [BUN] 和血清肌酐) 相似。第 4 周, 各组数值均增加 (数据未显示)。所有治疗组基线处的炎症和 / 或安全问题 (总白血细胞和纤维蛋白原) 的血液学指标是相似的。第 4 周, 所有动物的数值均增加 (数据未显示)。

[1201] 然后剖检, 收集固定的泌尿器官 (即植入的新导管, 肾脏, 和相关的组织), 修整, 检查, 石蜡包埋, 和活组织检查。载玻片用苏木精和曙红 (H&E) 和 Masson 三色染色剂 (弹性纤维) 染色。检查动物体内形成的导管, 发现造口末端具有上皮粘膜特征。如图 74, 上皮粘膜位于造口末端 (用脂肪衍生的 SMC 接种新的尿路导管)。用 AE-1/AE-3 检测细胞角蛋白标记物作为上皮细胞指示物。

[1202] 实施例 11 - 三角区保留膀胱切除术后的新膀胱扩大构建体

[1203] 这项研究的新膀胱构建体将由可生物降解支架的形成, 受试者自身器官特异性细胞在其上生长。其目标是为所述受试者构建一个可以被植入病变部位的新膀胱, 缓解对“泄殖腔”的需要。这项研究的目的是测定新膀胱构建体对膀胱扩大的等同性。

[1204] 试验设计。6 组犬均包括 3 只雌性和 3 只雄性,测试其泌尿道上皮细胞 (UCs) 和平滑肌细胞 (SMCs) 的不同密度。用以下细胞接种膀胱扩大支架。

[1205]

组	描述	细胞来源
1	10x10 ⁶ UC 和 10x10 ⁶ SMC	膀胱
2	0.1x10 ⁶ UC 和 20x10 ⁶ SMC	膀胱
3	0.01x10 ⁶ UC 和 20x10 ⁶ SMC	膀胱
4	0UC 和 20x10 ⁶ SMC	膀胱
湖 5	0UC 和 20x10 ⁶ SMC	血液
6	0UC 和 20x10 ⁶ SMC	脂肪组织

[1206] 组织活组织检查步骤。组 1-4 使用采自膀胱活组织检查的 SMCs 和 UCs。在此日之前或麻醉动物获得膀胱活组织检查过程中,需从每只动物的外围血管采集无菌血液,并在无菌条件下采集大约 60mL 的静脉血 (6 只装有硫酸氢钠肝素的 10mL 血液管)。在腹部正中切口进行膀胱活组织检查,将暴露脂肪组织并切除。从腹部无菌采集的脂肪组织相当于大约 20-50g 的组织。如确定未采集足够数量的组织,应切开腹股沟脂肪垫和皮下组织获取脂肪组织。暴露膀胱,如膀胱中有尿液,将其排空。从膀胱尖切除大约 2cm×1cm 的一片膀胱。

[1207] 手术步骤 (第 1 天)- 植入新膀胱构建体后进行三角区保留膀胱切除术。术后步骤- 循环,顺应性测量,荧光镜检查,总体健康评估,必要的临床治疗。剖检时间点- 植入后约 6 个月, (从植入起 182±2 天)。

[1208] 动物。使用家犬 (*Canis familiaris*) (系- 杂种狗)。12 只公犬 (加 1 只候补)。未生产和未孕的 12 只母犬 (加 1 只候补)。活组织检查阶段的动物为年轻的成年犬且体重为 15-25kg。

[1209] 术前步骤。

[1210] 镇痛和麻醉。在麻醉诱导前给动物使用术前用药硫酸阿托品。(0.04mg/kg, 皮下 [SC]), 丁丙诺啡 (0.01mg/kg, SC), 和美洛昔康 (0.2mg/kg, SC)。在外周血管中放置静脉导管,且在使用阿托品至少 10 分钟后,用异丙酚® (4 - 10mg/kg, 静脉注射 [IV]) 麻醉动物。将插管插入动物并用吸入性麻醉剂异氟醚维持其麻醉状态,转给体积调节呼吸机维持效果。过程中给予乳酸林格氏液,速度约 5 - 20mL/kg/hr。在每只动物腹部切口处 (≤ 2mg/kg, SC) 给予布比卡因条。

[1211] 抗生素治疗。为了防止感染,活组织检查后立即给予动物头孢噻肟 (50mg/kg, IV)。如需要可以给予附加剂量。确定的手术时间 (第一天),术前和结束后立即给予动物头孢噻肟 (50mg/kg, IV)。

[1212] 动物准备。给双眼使用Lacrilube® (或其他合适的眼部润滑剂)。保持整个准备和手术过程中动物的温暖。剔除整个腹部的毛。手术部位做无菌的手术准备,先用聚维

酮碘擦洗剂擦拭除去所有碎屑,再用 70% 异丙醇浸泡的海绵擦拭。晾干该区域。将动物送至手术室,背卧放置。将温度探测器插入到食道,以监测体核温度。活组织检查手术时,将双腔导管(或同类)插入膀胱,获得基线顺应性测量。测量后将该导管去除。在确定的手术时间时,膀胱中插入 Foley 导尿管。前两个步骤前,再次用聚维酮碘擦洗剂彻底洗净手术部位,用 70% 异丙醇浸湿的海绵擦拭,晾干。DuraPrep™(或类似)溶液用于该部位并晾干。为严格消毒的手术该区域将被适当的覆盖。

[1213] 手术步骤

[1214] 尿膀胱活组织检查。在腹部正中切口,从近尾侧至脐部。暴露膀胱,如膀胱中有尿液,将其清空。从膀胱尖切除一片大约 2cm×1cm 的膀胱。在组织培养基(DMEM 培养基或同类)中保存膀胱组织。用可吸收缝合材料(PDS 或同类)封闭至少 2 层的膀胱缺损。或者,用手术钉封闭膀胱,用缝线(PDS 或同类)缝合。用适当大小的可吸收材料封闭腹部切口。再次使用适当大小的可吸收缝合材料在表皮下封闭皮肤。或用手术钉封闭皮肤。

[1215] 植入新膀胱扩大构建体。植入用上述 UCs 和 / 或 SMCs 接种的新膀胱扩大支架,形成新膀胱扩大构建体。腹部正中切口,从近尾侧至脐部。用自身维持腹部牵引器打开切口。暴露膀胱,如膀胱中有尿液,将其清空。识别三角区,将膀胱切除,但保留完整的三角区和输尿管瓣膜。将导尿管推进到所述构建体的腔道中,使其通过三角区的粘膜下层 / 浆膜下层腔道。用适当的缝合材料将此导尿管固定在膀胱浆膜上,并使其通过腹部肌肉,皮下组织和皮肤,经肚脐附近延至动物体外。

[1216] 用羟乙酸乳酸聚酯 910 缝合材料,采用取决于手术实际时间的一系列缝合模式使所述构建体与正常膀胱组织吻合。用不可吸收缝线标记吻合部位的外侧边缘(包括右和左),以帮助在剖检时确定吻合口线。将该网膜拉过膀胱构建体并用手术胶固定。

[1217] 腹部切口用适当大小的可吸收缝合材料层封闭。再次使用适当大小的可吸收缝合材料做表皮下方法封闭皮肤。或用手术钉封闭皮肤。保留 Foley 导尿管以方便膀胱扩大后用测试设备采集术后尿液。

[1218] 切口位置观察。手术后,每日至少观察和评估一次手术切口的感染,炎症,和总体完整性,至少 14 天(或直至痊愈)。术后 7 至 21 天之间可除去皮肤钉(如果使用)。根据需要开展适当的治疗。

[1219] 术后尿液采集。确定的手术后,采集导尿管中的尿液,直到其移除。所有导尿管将与负压储器连接以收集动物尿液。根据需要清空该储器并记录体积。用犬夹克(dog jacket)或同类物将该储器系于动物身上,以防止其受干扰。这些犬可穿 Elizabethan 或类似的项圈,直到充分愈合和实现节制。

[1220] 清理母犬的会阴处,外阴,和阴道,一天两次,每日两次用抗生素乳膏对阴道做无菌输注。同样清理雄性包皮。此外,检查剩余的导尿管外露部位,且每日至少清理两次。根据需要冲洗导尿管。由于腹腔可能存在尿液,如果需要,可进行腹腔灌洗。

[1221] 在此期间采取适当措施防止导尿管破裂和尿液渗漏。留置于尿道的导尿管(即 Foley)可在植入约 7 天内取出。耻骨弓上的 / 浆膜下层的 / 经皮的导尿管将在手术后约 14 - 21 天移除。如果 Foley 和耻骨弓上的导尿管被移除,则通过插管术或“代谢笼收集”(pan caught)方法采集尿液。

[1222] 顺应性测量。活组织检查前,每月,植入后约 30±3 天开始,剖检当天,进行顺应性

测量。将双腔导尿管插入膀胱。排出全部残留尿液并记录导管的大小和长度位置,以确保后续过程的一致。其中一个腔体与直流电线连接,另一腔体用于注射无菌生理盐水(由孵化器加热)速度为 10 - 25mL/min。开始压力为 0-10mmHg,并根据起始时间记录。观察导尿管(又名渗漏点)周围渗漏时的时间,除去的体积,和获得的压力。抽吸总注入盐水量至膀胱排空(完全或部分取决于是否进行循环或荧光镜检查)并记录回收体积。根据 13.7 部分的概述使动物保持镇静。如果渗漏压力为零,则至少重复测量 1 次,但不超过 3 次。

[1223] 循环。植入后约 1 个月开始,每 2 周(14 ± 2 天的间隔)进行一次循环,直到术后第 90 天左右。在顺应性测量后和荧光镜检查前进行循环。顺应性测量完成后使用无菌生理盐水(孵化器加热)通过膀胱重新加压进行循环,速度 10 - 25mL/min。该循环将重复至少 5-10 次。启动压力为 0-10mmHg,并根据起始时间记录。观察记录每个循环导尿管(又名渗漏点)渗漏时,或刚刚完成顺应性测量时达到的体积,以先到者为准,周围的时间,体积,和获得的压力。

[1224] 荧光镜检查。每月,植入后约 30 ± 3 日开始和剖检当天进行荧光镜检查。通过向膀胱中注入造影剂进行荧光镜检查并记录。顺应性测量或循环完成后(适当的时间点)进行荧光镜检查。抽取约总注入盐水的一半并用 50/50 混合的无菌生理盐水和对比溶液代替(孵化器加热)使膀胱扩大到最新的膀胱渗漏量。完全使用 50/50 混合输液进行荧光镜检查。膀胱造影照片使用的体积为获得渗漏点压力处的体积。

[1225] 日常观察和测量。

[1226] 濒死/死亡率检查。每天两次(上午和下午)进行濒死/死亡检查。检查所有的动物的总体健康,死亡率,和濒死。

[1227] 临床观察。活组织检查后,每周至少进行一次临床观察。植入后,开始的前 2 周每天至少进行两次(至少隔 6 个小时)临床观察,然后每天直到第 30 天。此后,继续临床观察,至少每周一次(7 ± 1 天)。观察所有的动物;记录观察结果。

[1228] 体重。记录试验前,活组织检查前 5 天,植入前 5 天内,此后所述前 3 个月每周(7 ± 1 天)(即,直到第 90 天),和每月(时间间隔为 30 ± 2 天),直至剖检动物。

[1229] 体检。每只动物进入试验前和剖检前进行体检,包括总体状况,直肠体温,呼吸,心率,和毛细血管再充盈时间。

[1230] 并行治疗。按照公认的兽医惯例,根据需要动物可接受并行治疗(例如抗生素或输液治疗)以维持动物良好的常规健康。必要时可给予并行治疗。

[1231] 样品采集。

[1232] 血液。外围血管中采集血液。血液量代表全血容积和近似的数量。血液样品采集时间表如下。

[1233]

时间点	血液学	血清化学	凝血
活组织检查和植入前(第1天前)	X	X	X

[1234]

植入后第1个月每周(间隔 7 ± 1 天), 此后每2周(间隔 14 ± 2 天), 和剖检日	X	X	X
全血容积	0.75 mL	1.1 mL	1.3 mL
抗凝血剂	EDTA	无	柠檬酸钠

[1235] 尿液。通过Foley导尿管(留置时), 取出Foley导尿管后通过插管术, 或“代谢笼收集”方法采集尿液样本。采集后, 将样本转至相应的试验室进行处理和分析。尿液样品采集时间表如下。

[1236]

时间点	尿液
活组织检查和植入前(第1天前)	X
植入后第1个月每周(间隔 7 ± 1 天), 此后每2周(间隔 14 ± 2 天), 和剖检日	X
尿液容积	3.0mL
抗凝血剂	无

[1237] 临床病理

[1238] 血液学。评估血液样本的以下参数: 红血细胞总数, 血红蛋白浓度, 红细胞压积, 平均红细胞体积, 平均红细胞血红蛋白浓度, 平均红细胞血红蛋白, 网织红细胞计数, 红血细胞形态学, 血小板计数, 血小板形态学; 白血细胞计数; 中性粒细胞计数; 淋巴细胞计数; 单核细胞计数; 嗜酸性粒细胞计数; 嗜碱性粒细胞计数, 其他细胞(如适用)。

[1239] 凝血。离心血液样本, 提取血浆, 评价血浆样本的以下参数: 凝血参数; 活化部分凝血活酶时间, 凝血酶原时间, 纤维蛋白原。

[1240] 血清化学。离心血液样本, 提取血清, 评价血清样本的以下参数: 血清化学参数, 谷丙转氨酶, 谷草转氨酶, 碱性磷酸酶, γ -谷氨, 总胆红素, 血液尿素氮(BUN); 肌酐; 钙, 磷, 总蛋白; 白蛋白; 球蛋白; 白蛋白/球蛋白比值, 葡萄糖, 胆固醇, 甘油三酯, 钠, 钾, 氯化物。

[1241] 尿液分析。评价尿液样本的以下参数: 体积, 颜色, 澄清度; 比重; 尿液沉积物微观评价; 尿液试纸分析, 包括: pH值, 蛋白质, 葡萄糖, 胆红素, 酮, 血液, 尿胆素原, 亚硝酸盐, 白细胞。

[1242] 处死。处死当天, 动物最初保持镇静并进行顺应性测量和荧光镜检查。处死(用戊巴比妥钠深度麻醉, $35-60 \text{ mg/kg}$, 静脉注射, 至生效, 然后放血)。

[1243] 大体剖检。所有动物均进行完整的大体剖检。剖检包括尸体和肌肉骨骼系统检查, 所有外表面和孔口, 颅腔和脑的外表面, 和所有胸部, 腹部, 和盆腔及与其相关的器官和组织的检查。重点关注膀胱。

[1244] 组织采集和保存。打开腹腔, 可见扩大的膀胱, 在原位拍照。评价方法(组织病理学)是移除完整的膀胱(三角, 吻合位, 和新膀胱), 结扎输尿管, 与顺应性测量期间发生的相似, 用适当的固定剂(即10%中性缓冲福尔马林[NBF])将导尿管相应的插入尿道已使其在压力下固定。10%的NBF固定处理21-48小时后, 将组织转移到70%的乙醇中。此外, 在

原位检查下述器官（或器官的样本）和组织，游离解剖，用 10% NBF 或其他合适的固定剂固定。

[1245] 采集下述组织：肾上腺（一对），动物标识（尸检收集保留标识）；主动脉；骨髓；胸骨；脑（大脑，小脑，脑干）；宫颈；附睾（一对）；食管；眼（一对）（戴维森液固定）；胆囊；心脏；肠，盲肠；肠，结肠；肠，十二指肠；肠，回肠（Peyer 氏斑）；肠，空肠；肠，直肠；肾脏（一对）；泪腺（一对）；肝；肺；淋巴结，下颌；淋巴结，肠系膜；淋巴结，髂；乳腺腺；神经，视神经（一对）（戴维森液固定）；神经，坐骨神经；卵巢（一对）；胰腺；甲状旁腺；垂体腺，前列腺腺体；唾液腺，下颌（一对）；骨骼肌；皮肤；脊髓（颈椎，胸椎，腰椎）；脾；胃（心脏，胃底，幽门）；睾丸（一对）（改良戴维森溶液固定）；胸腺；甲状腺（一对）；舌头；气管；子宫，阴道；大体损伤 / 主要部分（改良戴维森溶液固定）。

[1246] 组织学研究。将固定的泌尿的新膀胱切成背侧一半和腹部一半（输尿管由背侧表面进入膀胱）。再沿颅侧 / 尾侧线将膀胱分成两部分制成膀胱组织的 4 象限。收集组织各象限的 3 个样本，宽度达 ~ 0.5cm（完整厚度）。作为辅助鉴定手段，样本长度依次减少，样本 1（最长），样本 3（最短）。此外，组织定位辅助手段，在每个样本的尾部末端的浆膜 / 外膜部分作缺口切口。

[1247] 当手术接口明显时，从跨越天然膀胱和新膀胱的手术接口区域收集各象限的 2 个样本（即样品 1 和 2）。这些样本来自上述输尿管刚刚插入的膀胱区域（外面而不是里面）。第 3 个样本（即样品 3）来自颅侧区域的每个象限，手术接口代表泌尿的新膀胱样本，且不可跨越手术接口。

[1248] 当手术接口不明显时，按线性方式从尾部（即，三角区）到颅侧（即顶点）收集三个样本。

[1249] 收集每个扩大的膀胱的全部 12 个样本。剔除组织样本，石蜡包埋，切片和组织学评价。不计切片时间，将各象限的 3 个样本嵌入 1 组，每个膀胱应该有 4 组。当组织样本进行切片时，将其按这样方式嵌入，切片包括组织的所有层面，而不是表面（例如仅上皮）。

[1250] 用苏木精和曙红（H&E）和马林三色染色剂（弹性蛋白）染色组织病理学载玻片。

[1251] 此外，剔除输尿管，尿道，肾脏，各自的三角区样本，和局部淋巴结，石蜡包埋，切片。载玻片用 H&E 染色。

[1252] 膀胱壁厚度。定量测量每一部分的壁厚，评估内 - 和外组比较值。对膀胱壁的主要组成部分进行盲测，合并尿道上皮 / 固有层（Uro/LP），和肌层（TM），用目镜为 4× 倍率的测微计手动进行测量并记录标线。将该标线转换为毫米及 Uro/LP，TM 的平均厚度，并计算总壁厚。采用近似解剖常态（即‘解剖’）解析这些切片，在组织学阶段做比较分析。采用这些测量值比较膀胱的 3 个标记区域的相对厚度（即膀胱三角区，中，尖端区）并评估总壁厚和其组成部分的比例及百分比的整体一致性。所有值均以平均数的形式给出。

[1253] 统计分析。给出动物个体数值和计算平均值的汇总数值和标准偏差的数据。进行体重，血液学，凝血，血清化学的统计分析。确定适当的统计测试，使用 SAS® 系统根据统计决策树设定每个数据集。各间隔下每组至少需要 3 只雌性动物和 3 只雄性动物进行统计分析。先用 Shapiro-Wilk 检验测试这些数据的常态，然后用 Levene 检验评价方差齐性。测试或拒绝假设均需要 $p \leq 0.05$ 的显着水平。如果这两个假设均满足，根据作为因子得动物分组，利用 $p \leq 0.05$ 显着水平，进行单因素方差分析。如果参数方差分析的 $p \leq 0.05$ ，在

$p \leq 0.05$ 水平上用 Dunnett 检验考察对照组和各测试项目治疗组的统计学差异。如果任一参数的假设均不满足,用 Kruskal-Wallis 非参数方差分析方法评估组间差异 ($p \leq 0.05$)。如果此项 ANOVA 有意义则进行 Dunn 多重比较试验,再利用 $p \leq 0.05$ 的生物显著性水平。

[1254] 实施例 12 - 三角区保留膀胱切除术后体内植入新膀胱扩大构建体

[1255] 按上述实施例的所述将新膀胱扩大构建体植入受试犬体内后,通过荧光镜检查检测植入的构建体,其容积和顺应性。图 75 为 4 个月时植入的构建体的膀胱造影照片。A 为膀胱平滑肌细胞接种的构建体。B 为血液平滑肌细胞接种的构建体;C 为脂肪组织平滑肌细胞接种的构建体 D 为天然膀胱基线。图 76 为植入的新膀胱构建体的 (A) 容积和 (B) 顺应性。所有膀胱组的全部血液学和血清化学物质均在正常范围内。

[1256] 5 个月,动物临床表现良好,体重按预期增加,所有膀胱组的全部血液学和血清化学物质均在正常范围内。此外,未见输尿管积水/肾积水。脂肪组出现 (i) 相对于血液 SMC 组平均膀胱容积较高,和 (ii) 与 5 个月的膀胱 SMC 组类似 (10/10, 0.01/20 和 0/20)。5 个月内所有组的顺应性相似。图 77 为动物的平均体重。图 78 为动物的平均血清肌酐。图 79 为动物 BUN。图 80 为动物的平均碱性磷酸酶 (ALP)。图 81 为动物的平均总蛋白水平。图 82 为动物的平均白血细胞计数 (WBC)。图 83 (血液) 和图 84 (脂肪) 为植入的构建体的膀胱造影照片。表 12.3 为天然膀胱与新膀胱支架构建体的容积对比。

[1257] 表 12.3

[1258]

第个月	天然	支架	天然	支架	天然	支架
	>0.50		>0.65		>0.85	
膀胱 10,10(N=6)	5	5	4	5	4	4
膀胱 0.1,20(N=4)	2	3	2	3	2	1
膀胱 0.01,20(N=6)	6	5	5	4	5	4
膀胱 0,20(N=5)	4	3	4	3	3	3
血液 0,20(N=6)	5	5	4	3	4	2
脂肪0,20(N=6)	5	4	4	3	3	2

[1259] 实施例 13 - 整体再生膀胱的特征

[1260] 简介和目标:评价根治性膀胱切除术后,植入自体新膀胱替换构建体 (NBR) 物,犬的新膀胱的耐久性和功能性及接种到以 PLGA 为基础的可生物降解聚合物支架的平滑肌细胞 (SMC) 总数。

[1261] 方法:用 25, 12, 和 4×10^6 细胞 / 构建体 ($n = 8/\text{grp}$) 3 种密度的 SMC 接种 NBR。A 组 (8 例), 立即再植入 (R) 完全移除的膀胱作为对照。进行为期 9 个月的进行生命评估 (X 光, 尿液, 和尿动力学)。研究终止时进行新膀胱组织的离体药理和组织学研究。

[1262] 结果:动物临床健康, 节制, 植入后 3 周能排尿。植入后 9 个月, 所有组 (NBR 和 R) 均有具有动态顺应值的功能性膀胱, 新膀胱组织的组织学 (包括粘膜和浆膜, 逼尿肌肌肉, 血管, 和神经组件) 与天然膀胱一致。在所有组中, 对不同浓度的氯化氨甲酰胆碱 (Car) 和

苯肾上腺素 (PE) 的收缩反应是相似的。然而,对 α - β -甲基-三磷酸腺苷 (AA) 的收缩反应仅显示植入用 25×10^6 SMC 接种的 R 和 NBR。除受电场刺激 (EFS) 外,各组膀胱组织的 Logistic 分析显示出类似的 EC50 和斜率因子值。

[1263] 结论:作为具有与天然膀胱类似的结构性,尿动力学,和药理学特性的整体器官,在手术植入后长达 9 个月内,自体新膀胱替换构建体具有再生膀胱的能力。目前还没有组织异常,免疫反应证据,或新膀胱再生的全身反应。药理学和尿动力学反应显示在自体同源的 SMCs 接种的各新膀胱植入构建体的数量和用 12×10^6 SMC 接种获得的组织再生和尿动力学结果及用 25×10^6 SMC 接种获得的组织再生、尿动力学和药理学结果的最后的再生性结果间呈正相关,与 R 相似。

[1264] 实施例 14- 再生膀胱大小的适应性调节

[1265] 在特定器官,组织,和体重或大小间,体内平衡调节保持器官大小和结构的关系是复杂的。在组织再生或器官形成期间可以观察到调节性发育,或细胞或组织损失后器官大小和结构的修复。再生性治疗的一些目标既包括结构和功能的修复和建立受体适应性调节特性。比较植入细胞接种的 PLGA 基础支架的接受膀胱切除术的动物的适应性调节与因脊柱裂而患有神经性膀胱功能障碍的儿童的特engion 自体新膀胱扩大™(NBA) 二期临床试验的早期结果的适应性调节。

[1266] 分别测定植入 (p. i.) 6 个月后,植入细胞接种的 PLGA 基础支架的接受膀胱切除术的动物的新膀胱容量和体重。测量膀胱测压容积和排尿间隔 (VI) 并计算两个年龄段和相应体重的 II 期 NBA 临床试验受试者 (PT1 和 pT2) 的基线处和 NBA 植入体后 12 个月的公式预测膀胱容量 (FPBC)。

[1267] 试验期间接受植入的动物保持健康和节制,并在 p. i. 6 个月内获得与体重一致的新膀胱容积。新膀胱组织的组织学和免疫组织化学显示与天然膀胱类似的结构和功能,膀胱再生指标。PT1 的基线容积为 33% 的 FPBC。p. i. 12 个月,PT1 的容积相对基线增加了 84% 并到达 60% 的 FPBC。PT2 在基线处和 p. i. 12 个月处有 100% 的 FPBC 能力。PT1 和 PT2 均增加。

[1268] 这些结果表明,自体新膀胱再生和生长与受体动物和人类的体积相适应。这些数据支持这项结论:Tengion 自体新膀胱扩大™ 植入体产生的新膀胱有受体需要的生物反应性。

[1269] 实施例 15- 新膀胱再生的生物力学刺激 (循环) 作用

[1270] 生物力学刺激是促进组织再生和最佳治疗的过程。膀胱再生是通过循环 (灌装,储存和排泄) 进行生物力学的刺激,此过程在子宫中开始且在早期儿童时期作用于人体功能性膀胱的发育。神经性膀胱功能障碍患者因先天 (即脊柱裂) 或后天损伤 (即脊髓损伤) 导致有意义的功能和结构变化而使循环受阻。

[1271] 评价循环对接受膀胱切除术的动物植入细胞接种的 PLGA- 基础支架的膀胱组织再生的影响,并研究神经性膀胱功能障碍的脊柱裂患者适用于 Tengion 自体新膀胱扩大™(NBA) 二期临床试验的结果。

[1272] 在 p. i. 后 2 周,3 天 / 周启动植入后 (p. i.) 的新膀胱循环。收集 3 个循环参数:总周数,hr/ 天,和总小时数。基于求得的平均参数评价 3 个同期组群的尿动力学:高 (10 周, >3.75hr/ 天, >60hrs), 低 (10 周, <2.25hr/ 天, <25hrs), 和无循环。高同期组群生成

具有改善的顺应性和容量的新膀胱,是低同期组群的 3 倍 ($p < 0.0001$)。p. i. 6 个月后高同期组群获得天然基线容积的 90%,而低同期组群仅获得 40%。动物不循环(节制时)生成管状泌尿组织转移。新膀胱壁组织学显示循环的膀胱与先天组织结构和细胞外的基质成分(例如弹性蛋白)更相似。早期 NBA 二期数据研究表明术后循环(例如开放膀胱颈,低压力高回流)中激发的患者相对于未激发患者有较低的临床和尿动力学的结果。

[1273] 为促进动物和人类的自体细胞接种的 PLGA- 基础支架植入后的再生性治疗,早期植入后的循环是必须的。临床前的研究结果与二期 NBA 试验的早期结果一致,确认膀胱再生中循环的重要性。

[1274] 图 85 为循环在人类膀胱发育中的作用。肌肉和弹性纤维增加,而胶原蛋白减少。括约肌紧张性发育短期促进循环动力学 (Wahl et al. BJU Int., 2003. 91:255)。图 86 表明,膀胱容量随着年龄增长和尿液输出而增大。尿量的增加促使膀胱容量增加 (Kim et al. J. Urol., 1991 ;146:524)。

[1275] 图 87A-C 表明循环影响再生性的结果。检查植入类似大小的新膀胱支架的两组犬,发现增加循环导致更高的膀胱容积。图 87A 为植入的已被循环的新膀胱与植入的未被循环的新膀胱的组织学比较。在循环膀胱中观察到弹性蛋白纤维。图 87B 显示了基于循环时间的两种不同膀胱的容积差。图 87C 为循环膀胱与非循环的膀胱的膀胱容量。

[1276] 图 88 为对临床结果的循环的再生-增强效应的解释。观察植入新膀胱植入体且能接受循环的人类患者,可见相比于未接受循环的患者的膀胱容量有所改善。这表明,循环或生物力学刺激促进再生,对提高临床结果是重要的。

[1277] 实施例 16 - 肌肉等效构建体

[1278] 用 PGA/PLGA 感材料制造三维 (3-D) 构建体。具体而言,由用 PLGA 包衣的 PGA 感构建体制成 3-D 膀胱状可降解多孔支架,并用细胞接种。图 9a-E 描绘附加构建体。

[1279] 为了确定最佳的支架组成,预先制成七种不同的支架构建体,并进行手术测试其优势。使用 1 到 10 (1 = 最不像 ;10 = 最像和优选) 定性每个构建体的成绩。该支架构建体包括表 16.1 中概述的七个支架构建体。表 16.1. 支架构建体。

[1280]

支架 No.	支架名称	规格&规格参数表*
1	预冷轧, 常规大小, 平面支架	• 椭圆形 长10cm×宽3.7cm(参见图5a顶部构造); 二维表面积为 29.1 cm ² • 6c及6d为预冷轧构造图
2	2 个2倍预冷轧支架	• 两个支架, 与支架No.1长度相同, 宽为支架No.1的, 总面积相同(见图8d) • 预轧构造
3	常规大小的支架	• 椭圆形长10cm×宽3.7cm(参见图5a顶部构造); 二维表面积为 29.1 cm ²
4	50°C灭菌的支架	在较高温度下灭菌, 这可能导致进一步降解和较高的柔韧性。
5	2 个2倍常规大小的支架	两个支架, 与支架No.1长度相同, 宽为支架No.1的, 总面积相同(见图8d)
6	常规大小的支架减半	与支架No. 1性状相同, 中心下切和缝合, 方法类似于图8
7	可切割成所需形状的矩形板	矩形, 外科医生切割成所需形状。

[1281] * 除另有说明外, 所有支架均在 30°C 下灭菌。

[1282] 手术优势测试结果如表 16. 2。

[1283] 表 16. 2 手术优势测试结果

[1284]

支架编号	等级 (1-10)	注释
1	6	预冷轧良好将难于铺平
2	2	太硬将难以操作
3	8	硬度好, 易于操作
4*	8	硬度好, 易于操作
5	10	易于操作, 记忆性好
6	9	易于操作, 记忆性好, 感觉薄
7	1	太硬难以处理, 易折

[1285]

[1286] * 比其他支架的消毒温度高。

[1287] 实施例 17 - 体内

[1288] 试验时间表 - 体内: 试验前步骤 (活组织检查): (-20)-(-30) 天; 试验开始 (0 天): 约 20 - 30 天, 预试验后活组织检查; 剖检开始: 30±3d 天和 84±3d 天; 初步报告: 收到病理报告后 2-3 周; 公布的最终报告: 初步报告批准后 2 个周; 体内试验完成: 84 天 × 3d

[1289] 试验动物: 通用名称: Yorkshire Pig; 品种 / 类别: Sus Scrofa; 动物数量 (按性

别计) :至少 12 雌性 ;至少 2 只雄性 ;年龄范围 :见文件 ;重量范围 :>45kg

[1290] 研究设计 :研究设计如下表 17.1 ((a) :组织捐献者与实验动物 (b) :聚 (乳酸 - 羟基乙酸) 的网状支架 + 自体平滑肌细胞 (c) 仅尿液 (d) 30d 动物的预剖检样本 (e) 平滑肌细胞 = SMC)。

[1291] 表 17.1. 试验设计

[1292]

组#	动物编号	试验装置	SMC 来源	血管来源	血液 & 尿液 采集	膀胱造影照片	切片	植入体	剖检
1	2 雄性	来源 ^a	NA	NA	NA	NA	~20天 植入前	NA	NA
2	2 雌性	构建 ^b	膀胱	网膜	基线; 定期 第一个 48 小时 ^c 1, 2, 3, 4 ^d & 8周; 剖检前	基线, Sx后, 4 ^d & 8 周, 剖检 前	NA	0天	1F 天 30+/-3 1F 天 84+/-3
3	2 雌性	构建 ^b	膀胱	腹膜	基线; 定期 第一个 48 小时 ^c Wks 1, 2, 3, 4 ^d & 8;	基线, Sx后, 4 ^d & 8 周, 剖检 前	NA	0天	1F 天 30+/-3 1F 天 84+/-3

[1293]

					剖检前				
--	--	--	--	--	-----	--	--	--	--

[1294] 测试仪器 :新膀胱扩大构建体 w/ 膀胱平滑肌细胞 (SMC) ;说明 :支架 No. 1, 如上述实施例所述 (椭圆形长 10cm× 宽 3.7cm (参见图 5a 顶部构造) ;二维表面积为 29.1cm²), 由合成的乳酸 / 羟基乙酸聚合物和自体膀胱平滑肌细胞组成。标签浓度 :化验单提供接种在构建体上的 SMC 数。存储温度 :22℃ ±5。

[1295] 技术和分析步骤

[1296] 手术前禁食 :

[1297] 步骤描述 :手术前所有动物至少禁食 8 小时。手术前一天禁食。

[1298] 持续时间 / 步骤频率 :单次事件, 手术前晚, 持续的时间约 8 小时。

[1299] 体重 :

[1300] 步骤描述 :动物体重最好在标准平衡内。

[1301] 持续时间 / 步骤频率 :基线, 植入手术前, 所述第一个月的每周, 然后每月 (±2 天) 和剖检前。

[1302] 镇静状态 / 麻醉 :

[1303] 步骤描述 :手术准备前给予每只动物镇静剂, 然后麻醉。给予每只动物镇静剂氯胺酮 20mg/kg IM 和二甲苯胺噻啉 2mg/kg (IM)。每只动物插管, 并吸入 2.5% -4% 异氟醚作为诱导, 用 0.5-2.5% 维持麻醉, 转给体积调节呼吸机或再呼吸仪器。将静脉鞘放置于外周血

管或右颈内静脉中。手术期间给予 10ml/kg/hr 的乳酸林格氏液（仅扩大动物）。

[1304] 时间 / 频率的程序 :存活期每天或手术时。

[1305] 外科手术准备 :

[1306] 步骤描述 :所有动物（活组织检查和扩大），剪除全部腹部毛发。动物背卧式放置。将膀胱中尿液排空后，将无菌导尿管轻插入膀胱。

[1307] 小心处理确使膀胱在排空步骤中未受损伤。然后用三聚维酮碘溶液和 70%乙醇交替清洁手术区域三次；交替擦拭完成后，最终用三聚维酮碘溶液处理并晾干。该区域盖上无菌手术单。

[1308] 持续时间 / 步骤频率 :手术前单一事件

[1309] 活组织检查（仅公猪）:过程描述 :腹部正中切口接近膀胱。收集膀胱组织前，排空膀胱中尿液并切除一片 2cm×2cm（大约）的膀胱组织。

[1310] 立即将活组织检查组织保存在含有组织培养基的无菌罐中，然后包装。此外，收集 >35ml 的静脉血或动脉液于 EtO 消毒的无菌罐中，罐中装有收集血液总量 0.05%的肝素。

[1311] 时间 / 频率的程序 :每种来源的动物每只持续约 1 小时。

[1312] 导尿管植入（仅母猪）:

[1313] 步骤描述 :每只动物均在颈内静脉及膀胱内留置导管，以便收集血液和尿液。

[1314] 膀胱插管术 :腹部正中切口以接近膀胱。排空膀胱尿液并插入一个 8-9.5Fr 开放腔导管，缝合于膀胱以防止运动。插入点在膀胱背侧，远离预期的腹面扩大点。固定在膀胱上后，从动物的侧面导出导尿管，连接该位置并将其植入皮下袋中。

[1315] 颈内静脉插管术 :剃掉右或左侧颈内静脉周围的毛，做无菌准备。将 9.5Fr 硅胶导管插入静脉，缝合，以确保防止运动。固定后，连接另一大型 DaVINC 位点，并将其植入皮下袋中。

[1316] 持续时间 / 步骤频率 :扩大手术前至少 10 天。每只动物均进行此步骤，每只动物大于 1 小时。

[1317] 尿液样本的采集和分析（仅母猪）:

[1318] 步骤描述 :通过插管术或代谢笼收集方法收集两个尿液样本。约 1.0mL 和 3.0mL 样本，收集在无菌容器中分别进行定性和定量分析。用最小量分析；但如果尿液收集困难，定量样本优先于定性样本。收集的定量尿液倒入 5mL 无菌试管中，冷藏且收集 24 小时内运送。收集时使用 **Multistix®** 10SG 试纸进行定性测量。定性和定量测量的重要参数包括：葡萄糖，胆红素，血液，pH 值，蛋白质，酮，尿胆素原，比重，亚硝酸盐，细菌 1（仅定量），和白细胞。

[1319] 持续时间 / 步骤频率 :基线，第一个 48 小时，植入后 1,2,3,42 及 8 周和剖检前定期进行。每只动物的过程大约持续 15 分钟。

[1320] 膀胱造影照片 :

[1321] 步骤描述 :制备用于荧光镜检查的每只动物的膀胱 :将消毒的开放腔 Foley 导尿管置于膀胱内，接近位点；• 接上注射器并抽出尿液排空膀胱；注射 3:1 的生理盐水 :造影剂通过开放腔导尿管充满膀胱；进行荧光镜检查。

[1322] 持续时间 / 步骤频率 :基线，手术后 42, 8 周和剖检前。每只动物过程持续大约 10-30 分钟。

[1323] 血液采集（仅母猪）：

[1324] 血液学，凝血，血清化学和血气血液学：将血液样本收集至 2.0ml EDTA 试管中，并保存在湿冰中或冷藏（2-8℃）。标记样品并用冰包装。收集 24 小时内完成分析。评价血液样本的下述参数：总白细胞计数（WBC），红细胞计数（RBC）；血红蛋白浓度（HGB）；血细胞比容值（HCT）_a；平均红细胞体积（MCV）；平均红细胞血红蛋白含量（MCH）_a；平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）_a；血小板计数（PLT）；网织红细胞计数（RTC）；白血细胞分化；_a = 计算值。

[1325] 共收集 1.8mL 的血液到 180mL 的柠檬酸钠试管（0.2mL 的 3.8% 柠檬酸钠）中。在冰中保存含枸橼酸盐的血液样品，直到准备好进行 15 分钟的 1,700×g 离心。冻结前，将血浆分成两份，-70℃ 冷冻。一份送往指定试验室，另一份作为备份保存，直到研究结束。在 -70℃ 条件下存放含枸橼酸盐的血液样品。

[1326] 测量的凝血参数包括：凝血酶原时间（PT），活化部分凝血活酶时间（APTT）· 纤维蛋白原（FIB）。

[1327] 血清化学：收集化学血清样品至约 4.0ml 血清分离试管中。血液标本离心（10,000RPM, 10 分钟），使用无菌技术提取血清。血清均匀分装在不同标记的两个离心管中。在 -70℃ 下冷冻血清。评价血清样本的以下参数：葡萄糖（GLU）；尿素氮（BUN）；肌酐（CRE）的；总蛋白（TPR）；白蛋白（ALB）；球蛋白（GLOB）₁；白蛋白 / 球蛋白比值（A/G）₁；钙（CAL），磷（PHOS）；电解质：钠（Na），钾（K）和氯化物（CL）；总胆固醇（CHOL）；总胆红素（TBIL）；甘油三酯（TRG）；谷丙转氨酶（ALT）；谷草转氨酶（AST）；碱性磷酸酶（ALK）；γ 谷氨酶（GGT）；₁ = 计算值

[1328] 血气：血气 / 短纤血细胞比容 / 总蛋白监测：收集动脉血液样本（~ 1.0mL），并使用校准的 i-STAT 分析仪和相应的试剂盒分析。评估样品以下血气参数：钠（Na）（mmol/L）；钾（K）（mmol/L）；钙离子（iCa）（mmol/L）；血糖（Glu）（mg/dL）；血细胞比容（Hct）（%）；pH 值，PCO₂（mm Hg）；PO₂（mm Hg）；TCO₂（mmol/L）；HCO₃（mmol/L）；BE_{ecf}（mmol/L）；pH 值；和 SO₂（%）。

[1329] 持续时间 / 采集血液样本的步骤频率：基线，1, 2, 3, 4 周（30 天动物的预剖检样本）& 植入后 8 周和剖检前。每只动物过程持续大约 15 分钟。

[1330] 生命体征监测步骤：步骤描述：植入手术过程中监测下述体征：

[1331] 体温：通过食道探头监测体温。

[1332] 直接血压和心率：连接血压线监测动脉收缩压（SAP），动脉舒张压（DAP），平均动脉压（MAP）。颈动脉内置入诱导鞘用于监测血压。

[1333] 呼出气体：CO₂ 和 SaO₂

[1334] ECG：监测导致 II ECG

[1335] 持续时间 / 步骤频率：整个手术约间隔 20 分钟。

[1336] 腹腔镜膀胱扩大：

[1337] 步骤描述：

[1338] 定位和接口安排：采用四接口经腹膜技术，获得进入膀胱和腹膜内的空间的腹腔镜检查。进行四次穿刺：在肚脐上 ~ 1cm 插入 12-mm 的主要接口；肚脐侧面 ~ 7-10cm 和肚脐下 ~ 3-4cm 分别插入 12-mm 次要接口；插入 5-mm 耻骨弓接口，应用 CO₂ 和 / 或促进网膜，

腹膜和新膀胱的操作的腹腔镜检查建立气腹。另外,使用 Veress 针在脐下进行第五腹部穿刺,使用 CO₂ 建立气腹至压力达到约 15mm Hg。

[1339] 膀胱扩大:根据使用的血管的来源(即,大网膜或腹膜)采用三种膀胱扩大技术。

[1340] 使用腹膜的膀胱扩大:从内腹壁上小心的分离无张力的可以超越到达 12-mm 主要接口距离的适合的腹膜片段。然后使大于构建体尺寸的腹膜瓣外部化通过一个 12-mm 接口,仔细摊开腹膜,以适应构建体。然后从培养基中移去接种的构建体,所述构建体数目与验证的动物文件相适应。然后通过手术粘合或缝合将所述构建体固定在腹膜上,使腹膜与整个构建体部分重叠。轻轻注入生理 pH 值的盐水,在此过程中用无菌生理盐水保持所述构建体湿润。所述构建体固定后,通过 12-mm 接口仔细内化腹膜/构建体单元使其进入腹腔灌注区,并纵向定位在恰好在尿道上(输尿管口对面)的膀胱腹面的膀胱尖上。使用适当大小的手术钉将所述构建体的一面固定在膀胱上,例如,横向尺寸 0.45cmX 纵向尺寸 0.47cm。固定到膀胱上后,模仿所述构建体的位置在膀胱上进行纵向切口,将切开的膀胱组织用手术钉固定在所述构建体未固定的一面。采取预防性措施以限制切开的膀胱中的残留尿液到达腹腔的量。使用手术粘合将构建体的任意重叠固定到腹膜上。

[1341] 使用网膜的膀胱扩大:从内腹壁上小心的分离无张力的能达到膀胱的整体长度的网膜的适合片段。网膜片段被纵向定位在膀胱腹面的膀胱尖上,恰好在尿道上(输尿管口对面)。用手术粘合将网膜血管的一侧固定在膀胱表面。网膜片段固定到膀胱上后,从培养基中移去接种的构建体,所述构建体数目与验证的动物文件相适应。仔细内化构建体通过 12-mm 接口进入腹腔灌注区,并模仿固定的网膜线纵向置于膀胱上。用适当大小的手术钉将靠近固定网膜的构建体纵向固定在膀胱上。沿固定构建体相同线将膀胱纵向切口。切开的膀胱组织固定在构建体未固定的一面上。采取预防性措施以限制切开的膀胱中的残留尿液到达腹腔的量。使用手术粘合将构建体的任意重叠固定到网膜上。使用腔道导尿管检查扩大的膀胱渗漏以确保足够的封闭性和水密封性。拆除 4 个腹腔镜接口,用适当大小的可吸收缝合材料闭合腹腔穿刺。使用适当大小的可吸收缝合材料在皮下闭合皮肤。

[1342] 持续时间/步骤频率:每次每只动物持续大约 5 小时,第 0 天每只动物。

[1343] 经剖腹手术使用网膜的膀胱扩大:将上述网膜膀胱扩大步骤中的腹腔镜检查变为剖腹手术。为了便于比较,用剖腹手术进行二种腹膜膀胱扩大操作,如下面的表 17.2 所示。

[1344] 表 17.2. 剖腹手术试验设计

[1345]

DB-猪	支架	细胞来源 & #	组织	植入后剖检时间
1	支架	猪膀胱来源的	网膜	30 ± 2 天
2			网膜	84 ± 5 天
3			腹膜	30 ± 2 天
4			腹膜	84 ± 5 天

[1346] * 如上所述

[1347] 简单地说,在腹部正中从尾端开始至脐部切口。鉴定网膜和腹膜,从腹腔中小心地分离出网膜和腹膜,直到组织长度足以覆盖扩大的膀胱剖面。小心处理以确保组织的血管

化。暴露膀胱并小心排空膀胱中尿液,避免尿液进入腹腔。按上述同样的方法使构建体扩大至膀胱。固定后,用适当大小的可吸收缝合材料封闭腹部切口各层。使用适当大小的可吸收缝合材料在皮下闭合皮肤。

[1348] 操作的持续时间:每次每只动物持续大约 5 小时,第 0 天每只动物。

[1349] 手术后和复原镇痛:

[1350] 步骤描述:存活的动物接受:抗生素治疗-每只动物在手术前和扩大手术后的第 0 天起给予大约 2mg/kg Naxcel(头孢噻唑)或肌肉注射同等的抗生素。治疗持续到第 3 天,每日一次,或直至兽医认为适当的时间。

[1351] 术后镇痛 - 大约 0.1mg/kg, IM 手术(扩大步骤[0 天])后每隔 8-12 小时给予丁丙诺啡,共注射两次。确定的手术(1-3 天)后继续每日二次的镇痛治疗,最多持续 3 天,共注射 6 次。

[1352] 并行治疗-根据 Facility Veterinarian and Study Director 的规定,为维持其良好的健康状态,动物可接受并行治疗(如抗生素或液体治疗)。时间/频率的程序:手术后立刻及其后每天,根据 Facility Veterinarian 的意见。

[1353] 动物的处死和剖检

[1354] 步骤描述:

[1355] 计划外和计划内处死 - 所有动物均通过注射戊巴比妥钠(150mg/kg, IV)处死。按计划活组织检查日(仅公猪),扩大后 30 天和 84 天处死。

[1356] 剖检 - 剖检所有母猪。重点关注膀胱。使完整的膀胱(三角区,吻合口,和新膀胱)可视化并进行原位造影,然后整体切除并用 10% NBF 固定。

[1357] 持续时间/步骤频率:单一事件,每只动物大约持续 1/2hr,第 30&84 天(±3 天)。

[1358] 组织学/实验室病理学

[1359] 步骤描述:对固定的膀胱(即扩大的新膀胱)进行包括经正常膀胱和构建体的接口分离各部分的修整。修整组织样本,石蜡包埋,切片。载玻片用苏木精和曙红(H&E)及 Masson 三色染色剂(弹性蛋白)染色。

[1360] 持续时间/步骤频率:在获得样本的 3 个月内进行组织学和病理性检验。

[1361] 结果:如表 17.3 和 17.4 所示,根据对体重的测量,植入体不影响动物生长能力,且与膀胱容积的增加有关。图 8f 为植入本发明斑块 4 周后的膀胱造影照片。

[1362] 表 17.3. 体重。

[1363]

体重(Kg)			
动物编号	植入体	28天	55天
1	60.0	71.7	--
2	55.9	67.8	81.6
3	63.1	71.2	89.7
4	56.8	68.0	--

[1364] 表 17.4. 膀胱容积。

[1365]

膀胱容积(mL)			
动物编号	植入体	28天	55天
1	700	1200	--

[1366]

2	750	1100	2350
3	775	1250	2650
4	1100	1400	--

[1367] 图 89 为支架的植入。

[1368] 图 90 为植入本发明斑块 4 周后的膀胱造影照片

[1369] 实施例 18 - 脂肪来源的平滑肌细胞与间质干细胞 (MSCs) 的对比

[1370] 脂肪组织代表了由内皮细胞, 脂肪细胞, 平滑肌细胞和有限分化潜能的祖细胞组成的异质细胞群。我们已经用定量 RT-PCR, 抗原表达, 蛋白质指纹轮廓, 生长动力学和功能分析评价采自人类脂肪的粘附的, 血管基质部分 (SVF) 的细胞组成。我们发现, 培养基配方直接决定了脂肪 SVF 的平滑肌细胞隔室的富集。很难区别这些采自人类脂肪的平滑肌细胞 (Ad-SMC) 与采自人膀胱的平滑肌细胞在功能上的区别, 在表型和功能上与间质干细胞 (MSC) 或其他脂肪衍生祖细胞群的不同。

[1371] 我们已经通过使用实时定量 PCR 方法 (TaqMan) 调查了原始的“0 代”粘附的人类 SVF 细胞群的细胞组成。我们发现虽然这种采自起始粘附 SVF 的细胞群是由表达为内皮, 平滑肌和脂肪细胞相关标志物的细胞组成, 但在选择与 MSC 生长不同的定义培养基条件下, 通过采自 SVF 的细胞的扩大, 我们能鉴别并培养出生物学特性有显著差异的细胞群 (Gong et al. Tissue Eng Part A 2008 ;15:319-330 ;Lund et al. Cytotherapy 2009 ; 11:189-197)。尽管分化潜能和历史上与 MSC 相关的标记物的表达部分重叠, 但基于 FACS 和 RT-PCR (逆转录 PCR) 分析的主要核物质和细胞表面标记物的表达, 这个细胞群相对于 MSC 显然有更明显的平滑肌细胞表型。与 MSC 相比, 此细胞群内皮特异性基因表达也显著减少。平滑肌细胞表型的表达形式与传代数、脂肪供体来源或对重组细胞因子及生长因子的定向分化的要求无关。此外, 这一平滑肌细胞富集细胞群有明确区别于 MSC 的独特的蛋白组学的标记。最后, 我们促使这种平滑肌细胞样细胞群和 MSC 的直接相反的应答向凝血噁烷 A2 模拟物 U46619 改变以记录两种细胞类型之间的明确的功能性对分。综上, 这些数据支持将这一群体为采自脂肪的平滑肌细胞 (Ad-SMC) 的描述更准确, 和相比于包括脂肪细胞, 内皮细胞和 MSC 在内的其他的脂肪源性细胞等级, 其代表独具特色的细胞种类的结论。

[1372] 方法和材料

[1373] 脂肪组织制备。通过皮下或使脂肪塌陷 (lipoaspiration) (Zen-Bio, Research Triangle Park, NC) 获得人类脂肪样本, 用等体积的 PBS/ 庆大霉素洗涤 3-5 遍 (Gibco) (5 μ g/ml)。37 $^{\circ}$ C 下用过滤器消毒的胶原酶 I (Worthington) (0.1 %, DMEM-HG 中 1 % BSA (Gibco)) 处理 1 小时使脂肪被消化, 然后在 300g 下于 50ml 锥形管中离心 5 分钟。将血管基质部分再次悬浮在 PBS/1 % BSA 中, 并通过 100 μ m 的 Steriflip 真空过滤机进行过

滤。所述细胞群在 300g 下再次沉淀 5 分钟,再次悬浮于 DMEM-HG+10% FBS+ 庆大霉素 5 μ g/ml。二代底部的采自骨髓的 MSC 由商业供应商 (Lonza) 提供。为研究培养基类型对平滑肌细胞标记物表达的影响,对采自 SVF 的细胞进行天然修饰,悬浮于 α -MEM(Gibco)+10% FBS, SMCM(ScienCell) 或 L15(Sigma) 中。

[1374] Taq-Man qRT-PCR. 根据生产厂商的说明,用 RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen) 从 MSC 或 Ad-SMC 中纯化 RNA。根据生产厂商的说明,使用 SuperScript VIL0 cDNA Synthesis Kit(Invitrogen) 用 2 μ g 的 RNA 制备 cDNA。合成 cDNA 后,将各样本按 1:10 稀释。然后使用 TaqMan 引物和下述探针进行 qRT-PCR 组装:10 μ l 母代混合物 (2X), 1 μ l 引物 / 探针, 9 μ l cDNA (稀释成 1:10)。

[1375] 使用下述 TaqMan 引物评价平滑肌、内皮和脂肪的基因表达:Sm α A (平滑肌 α 激动蛋白):Hs00909449_m1, SM22:Hs00162558_m1, 心肌蛋白:Hs00538076_m1, SMMHC (平滑肌肌球蛋白重链):Hs00224610_m1, 钙结合蛋白:Hs00154543_m1, 脂肪细胞因子:Hs00605917_m1, FABP-4 (脂肪酸结合蛋白 #4):Hs1086177_m1, CDH5/VECAD (血管内皮钙粘着蛋白):Hs00174344_m1, vWF (von Willebrand 因子):Hs00169795_m1, PECAM1 (血小板内皮细胞粘附分子 #1):Hs00169777_m1, FLT1/VEGFR (VEGF 受体):Hs01052936_m1, KDR/FLK1 (胎肝激酶 #1):Hs00176676_m1, TEK (酪氨酸激酶, 内皮的):Hs00945155_m1。使用 18s rRNA 作为内源性对照,所有样本均用膀胱平滑肌细胞 cDNA 校正。用 Applied Biosystems 固定所有引物 / 探针。所有反应均使用系统设定的循环参数在 ABI7300 实时热循环仪中进行。通过 Comparative Ct 采用相对定量 (RQ) 方法进行 PCR 数据的分析。

[1376] 阵列 -RT-PCR。根据生产厂商的说明,使用 SABiosciences MSC (PAHS-082A) 和 Cell Surface Marker PCR 阵列 platform (PAHS-055A) 进行 35 个循环的实时基于阵列的 qRT-PCR 分析。

[1377] FACs 分析。在 2% 多聚甲醛中固定 0.5×10^6 - 1×10^6 细胞 / 数据点,封闭 F_c 受体阻止非特异性结合。然后根据生产厂商的推荐,用直接结合抗体培养细胞,得到细胞表面标记物 CD31, CD45, CD54, CD56, CD73, CD90, CD105, CD117 或 CD133 (BD Biosciences)。在最后的洗涤 (PBS, 0.1% Triton X-100) 后,使用适当的荧光通道利用 BD FACS Aria1 或 Guava EasyCyte Mini Express Assay 系统进行抗原检查。每个样本获得最小 5000-10,000 个事件。

[1378] 2D 蛋白质生物学分析。将由采自骨髓的 MSC 和 Ad-SMC 的控制传代 (P2 尾部) 溶解在 Lysis Buffer (50mM Tris pH8; 150mM NaCl; 0.5% NP40 和蛋白酶抑制剂, Roche) 中,根据生产厂商的说明,在 pH4.0-7.0 Zoom IEF strip (Invitrogen) 中将采自各细胞类型的 40 μ g 的蛋白质溶解产物展开。将二 / 三丙烯酰胺凝胶涂于各载玻片上,在二维上进行展开。根据生产厂商的说明,用 SYPRO Ruby 染色剂 (Invitrogen) 染色。

[1379] 结果

[1380] Ad-SVF 中的标记物表达。铺板后最初的 24-48 小时内,使用定义的内皮、脂肪细胞的和平滑肌细胞特异性 TaqMan 引物,对粘附在组织培养瓶上的采自脂肪组织的血管基质部分的细胞群进行定量 TaqMan RT-PCR 分析。用于分析原始粘附细胞群中的表达标记物,并确定基线用于后续传代、时间和培养基配方对平滑肌细胞特异性基因表达影响的分析。如图 91A,在第一个 24 小时内,观察粘附细胞群中 FABP-4 和脂肪细胞因子的低但可测水平,与

存在残留的脂肪细胞一致。同样,在此时间点,存在由 VECAD, vWF, PECAM, FLT1, FLK 和 TEK 的表达定义的内皮细胞群(图 91D-E)。在最早的粘附细胞群中,也可见由 SM α A, SM22, 心肌蛋白, SMMHC 和钙结合蛋白的表达定义的平滑肌细胞群(图 91B-C)。涂片 24-48 小时内,能够检测到相当水平的全部三种细胞群。如下所述,从此细胞群混合中分离平滑肌细胞。

[1381] 依赖于培养基类型的平滑肌标记物表达。因为脂肪是由多种细胞组成的异源组织,所以预计培养基配方对平滑肌细胞富集影响超过内皮细胞或 MSCs 的是合理的。采自骨髓和脂肪的未分化的 MSCs 的分离,紧密依赖于培养基配方(Gong et al. 2009 上文)。特别是当培养基中存在较高水平的葡萄糖或在高密度下,不利于 MSC 扩大(Lund et al. 2009 上文;Stolzing et al. Rejuv Res2006;9:31-35)。我们推理在 MSC 和其他细胞群的扩大中,培养基配方的调制对平滑肌细胞富集是有益的。如图 92A-B(按培养基类型的 SMC 标记物表达的 Taqman 分析),采自脂肪 SVF 的平滑肌细胞富集的细胞群的扩大紧密依赖于 DMEM-HG 培养基中的生长。如表现出的 SM α A, SM22, 心肌蛋白, SMMHC 和钙结合蛋白的减量表达,在 α -MEM, SMC 或 L15 中的扩大与显著降低的平滑肌细胞显型相联系。

[1382] 相对于 MSC, Ad-SMC 与平滑肌细胞更相似。我们使用半定量 RT-PCR 评价平滑肌细胞相关的 Ad-SMC 和 MSC 的基因表达信号。如图 93,相比于 MSC,在 Ad-SMC 中关键平滑肌标记物钙结合蛋白,心肌蛋白和 SMMHC 的表达更显著,这支持相比于 MSC,此细胞群与平滑肌细胞更相似的假设。而且评价了在多重非依赖性脂肪制备中($n = 4$),培养基中传 5 代以上的 SMC 特异性标记物表达的稳定性。如图 94(传代的 Ads 的 RT-PCR),传代过程中 Sm α A, SM22, SMMHC, 心肌蛋白和钙结合蛋白的表达始终保持一致,且与供体无关,说明平滑肌细胞显型的表达是稳定的。这些结果与分化更充分的,表型稳定的细胞群的 Ad-SMC 一致。

[1383] 基于阵列的 RT-PCR 分析表明 Ad-SMC 和 MSC 间的关键标记物的基因表达的显著差异。使用 SABiosciences MSC Marker Array 组对传代控制的 (P2) Ad-SMC 和 MSC 间的基因表达的差异进行系统性识别。此组概述了在 MSC 多功能性和自我更新中涉及的 84 个基因的表达情况。通过 Ad-SMC 和 MSC 间的差异识别关键标记物的总结如表 18.1。

[1384] 表 18.1

[1385]

标志	描述	MSC Ct	Hu Ad-SMC P4 Ct	Ad-SMC vs MSC 的调节倍数
BMP6	骨成型蛋白6	34.09	28.57	35.5555
CD44	CD44分子(印第安血液组)	31.87	23.06	347.7725
IL1B	白细胞介素1, β	35	29.62	32.2673
GDF5	生长分化因子5	25.34	31.89	-120.9276
HGF	肝细胞生长因子(肝细胞生长素A, 分散因子)	27.95	32.77	-36.4539
LIF	白血病抑制因子(类胆碱能分化因子)	29.37	35	-63.9113

[1386]

MCAM	黑素瘤细胞粘附分子	27.99	33.67	-66.1652
RUNX2	侏儒相关转录因子2	27.69	30.58	-12.1426
VCAM1	血管细胞粘附分子	24.36	34.1	-1103.5987

[1387]

已定义细胞表明标记物				
标志	描述	MSC Ct	Hu Ads P4 Ct	SMC vs Ads的调节倍数
ALCAM	活性白细胞细胞粘附分子(CD166)	24.88	24.44	1.0512
ENG	内皮糖蛋白(CD105)	23.06	22.57	1.0882
NT5E	5'-核苷酸酶, 外部(CD73)	25.2	24.38	1.3679
THY1	Thy-1 细胞表面抗原(CD90)	29.54	29.68	-1.4221

[1388] 可见 Ad-SMC 中 GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2 和 VCAM1, 相对于 MSC, 有意义 (至少 10

倍) 的负向调节。可见 Ad-SMC 中 BMP6, CD44, 和 IL1 β , 相对于 MSC, 有意义 (至少 10 倍) 正向调节。观察到的这些基因表达中的关键性差异仍然与独立传代或细胞样本一致 (n = 6, 数据未给出)。

[1389] 使用 SABiosciences Surface Marker Array 继续分析基因表达。已检测的 P0 和 P4 的 Ad-SMC 的关键结果总结如表 18.2。

[1390] 表 18.2

[1391]

PCR阵列目录#PAHS-055A人细胞表面 标记物在人脂肪zhu05 SQRT 300xg DMEM上					
细 胞 类 型	标志	描述	Ct P0	Ct P4	P0 到 P4 的 调节倍数
	MYH9	肌凝蛋白, 重链, 非肌 肉	23.59	24.2	-2.5245
	MYH10	肌凝蛋白, 重链, 非肌 肉	25.94	26.05	-1.7851

[1392]

	MYOCD	心肌蛋白	35	33.09	2.2721
内皮	ENG	内皮蛋白 (Osler-Rendu-Weber 综合症 1)	23.84	22.73	1.305
	ICAM2	细胞间粘附分子2	27.35	29.02	-5.2634
	NOS3	一氧化氮合酶3(内皮 细胞)	30.01	31.66	-5.191
	PECAM1*	血小板/内皮细胞粘附 分子(CD31 抗原)	29.07	35	-100.8453
	SELP	选择蛋白 P(小颗粒膜 蛋白质 140kDa, 抗原 CD62)	35	35	N/A
	TEK*	TEK 酪氨酸激酶, 内 皮的(静脉畸形, 多重皮肤和粘膜)	31.27	25.68	29.1212
	VCAM1*	血管细胞粘附分子 1	25.88	34.16	-514.1338
	VWF*	Von Willebrand 因子	27.2	31.49	-32.3569
成纤维 细胞	ALCAM	活性白细胞粘附分子	28.6	24.98	7.4333
	COL1A1	胶原蛋白,I型, $\alpha 1$	20.26	20.65	-2.1675
	COL1A2	胶原蛋白,I型, $\alpha 2$	19.36	18.2	1.351
	HLA-A	主要组织相容性复合 体, I级, A	24.53	24.7	-1.8609
	HLA-DRA*	主要组织相容性复合 体, II级, DR α	26.57	34.12	-309.9733
	CD74*	主要组织相容性复合 体, II级 不变链	28.13	35	-193.4746
其他	NT5E	5'-核苷酸酶, 外部 (CD73)	27.43	24.24	5.5174
	NCAM1	神经细胞粘附分子 1	35	35	N/A

[1393] 当平滑肌细胞特异性标记物为 MYH10, MYH9 和 MYOCD 时, 传代中成纤维细胞的 / 基质标记物 ALCAM, COL1A1 和 COL1A2 的表达保持不变。脂肪细胞标记物 RETN 无预期结果的细胞群, 表明存在粘附脂肪细胞引起的最小污染。重要的是, MSC 的关键差异性 MHC II 阴性, 虽然最初时是 HLA MHC II 是阳性的, 但在 4 次传代中 Ad-SMC 的 HLA MHC II 是阴性的。另一个有趣的现象是由内皮标记物 ENG, ICAM2, NOS3, PECAM1, SELP, TEK, VECAM 和 VWF 负向调节的总趋势判断, 随着传代 Ad-SMC 组成的内皮逐渐减少。RT-PCR 分析证明这一数据是独立的, 见图 95。

[1394] 为了进一步比较取自脂肪的平滑肌细胞 (Ad-SMC) 和间质干细胞 (MSC) 间的基因表达轮廓, 对人类间质干细胞标记物进行了基于 PCR 的基因阵列分析 (SABiosciences ;PCR 阵列目录 #PAHS-082A) (数据未给出)。结果显示了 Ad-SMC, MSC, 和典型非 MSC 细胞类型, 人类大动脉内皮细胞 (HuAEC) 间的同源基因表达的范围。在分析的 84 个人类 MSC 基因中, 仅 27% 的人类 Ad-SMC 与最初分离时的人类 MSC 相同 (84 个基因中的 23 个) (数据未给出)。

相比之下,有 49% 的典型的,非 MSC, HuAEC 与 MSC 相同 (84 个基因中的 41 个)。这支持了结论:Ad-SMC 与 MSC 相同的部分明显少于 HuAECG,是众所周知的非 MSC 细胞类型。因此,与 MSCs 相比,Ad-SMC 与 HuAEC 更相像,进一步支持了结论分离自脂肪组织的 Ad-SMC 细胞是 Ad-SMC,而不是 MSC。

[1395] Ad-SMC 的细胞表面轮廓与定义的 MSC 细胞表面轮廓明显不同。我们观察到 MSC 和 Ad-SMC 共有常规与 MSC 有关的表面标记物 CD73, CD90, CD105 和 CD166 的表达 (表 18.1)。然而,如下所述,这些标记物除其与 MSC 的常规相关性外,没有内在的生物学意义。图 96A-C (Ad-SMCs) 和图 97A-B (MSCs) 中所示的比较 FACs 分析大体反映出细胞表面标记物 RT-PCR 分析的基因表达结果,这显示了 Ad-SMC 为 CD31+, CD45+, CD54+, CD56+, CD90+, CD105+。重要的是 Ad-SMC 为 CD45+ 和 CD117+, 明显区别于 MSC 的 CD45-、CD117-。CD73 的表达与先前报道的脂肪血管基质部分一致 (da Silva Meirelles et al. J Cell Sci., 119:2204(2006)), 但与来自骨髓的 MSC 不同。我们还能观察到小的但截然不同的 CD133+ 细胞群,可能反映小的,多能细胞亚群。

[1396] 传代控制的 MSC 和 Ad-SMC 具有唯一的蛋白质生物学信号。图 98 为 MSC, 采自膀胱的 SMC, Ad-SMC, 和人类大动脉平滑肌细胞的完整的蛋白质生物学信号的比较分析。最上面的二组说明 Ad-SMCs 与 MSC 截然不同,且明显区别于分离自脂肪组织及其他等级的干细胞和祖细胞的 MSC (Roche et al.; Proteomics 2009; 9:223-232; Noel et al. Exp Cell Res 2008; 314:1575-1584)。在两个凝胶上的箭头强调了 MSCs 和 AdSMCs 间的差异;蛋白质的浓度不同, pH 梯度和分子量范围中截然不同的位置。拥有这种蛋白质浓度的 MSC 更接近 pH7.0, 且分子量大于或等于 60,000。相反, AdSMC 拥有这种蛋白质浓度,更接近 pH4.0 且分子量小于 60,000。pH7.0 时沿凝胶的右外缘涂片表明,在 pI 大于 7 时 AdSMC 中的蛋白质多于 MSC。分析膀胱平滑肌细胞作为对照。方框表明所有样本的相似区域。很明确 AdSMC 蛋白质轮廓与采自膀胱的 SMC 的轮廓最相像 (左下组), 与所见 MSC 的方式截然不同。分析大动脉平滑肌细胞,作为额外的平滑肌细胞对照 (右下组)。大动脉平滑肌细胞和膀胱平滑肌细胞的蛋白质生物学信号几乎是一样的。综上, AdSMC, 膀胱和大动脉平滑肌细胞轮廓中的相似度与 MSC 轮廓明显不同,支持结论分离自脂肪组织的是 SMCs 而不是 MSCs。所有凝胶均用 SPRYO Ruby 染色剂染色,得到可视化蛋白质指纹轮廓。

[1397] Ad-SMC 的生长动力学与 MSC 的明显不同。Ad-SMC 的增殖潜力与 MSC 的明显不同,已经成功的进行了 40 代以上的传代 (Bruder et al., J Cell Biochem., 64:278-294(1997))。如图 99, 培养第 4-5 天后, Ad-SMC 的增殖能力显著下降。我们还可以观察到与 MSC 不同, As-MSC 显示增殖的依赖性接触抑制。这些现象说明 Ad-SMC 不具有自我更新的能力,因此,根据定义不是干细胞或祖细胞。MSCs 未显示出增殖的接触抑制,而可见其在顶部彼此堆积,与转换的细胞培养中集落形成作用相似。这与之前的观察结果一致 (Zhou et al. 2006 上文)。

[1398] 用 U46619 治疗 Ad-SMC 和 MSC 的反应截然相反。做为我们评价涉及平滑肌细胞相关的发育通路中的以信号级联放大为靶点的小分子影响成果的一部分,主要集中在 U46619, 一种凝血噻烷 A2 模拟物,其作用包括增加细胞内 Ca^{2+} 水平和 RhoA, CaM 和 MLC 激酶信号级联放大的活性。如前所述 (Kim et al. 2009, stem cell. 27(1):191-199), 我们已确定用 U46619 (1 μM) 治疗导致 MSC 中关键平滑肌细胞标记物心肌蛋白和 SMMHC 的正向调

节。然而,Ad-SMC 对如图 100 所示的明确的心肌蛋白和 SMMHC 表达的负向调节治疗有相同的响应。这些结果为 Ad-SMC 和 MSC 间的功能二歧提供了明显的证据。

[1399] 功能标记物的表达。图 101 提供了中胚层分化标记物的 RT-PCR 分析的结果。行内容:1:MSC 对照值;2:MSC 试验值;3:AdSMC 对照值;4:AdMSC 试验值;5:外周血对照值;6:外周血试验值;和 7:H₂O。MSC 和 AdSMCs 的中胚层分化标记物的表达进行脂肪分化。标准条件下的生长期间,相对于 MSC,AdSMC 的如骨桥蛋白表达明显增加(n=1)。Oct4B 的表达,Oct4A 的剪接变体,多种能力的稳定标记物(Kotoula et al.,2008,Stem Cell126(1):290-1),在脂肪衍生的细胞中,相对于 MSC,为有意义的正向调节。无论是 MSC 或脂肪衍生的细胞均不显示 Oct4A 的表达。

[1400] 图 102 为 MSC/AdSMC 中 Oct4A/Oct4B 表达的 RT-PCR 分析的结果。行内容:1:膀胱 SMC;2:HFF-1(人类成纤维细胞);3:MSC;4:AdSMC;5:外周血;6:H₂O。评价 MSC,AdSMC,成纤维细胞和 SMC 系中紧密相关的转录异构体 Oct4A 和 Oct4B 的表达。虽然所有细胞系预计表达 Oct4B,但未观察到多能性标记物 Oct4A(ong et al.2009 上文)的表达。

[1401] 讨论。在本申请中,我们已经评估了脂肪衍生细胞群的标记物表达。脂肪组织代表细胞类型的异源混合,包括内皮细胞,外皮细胞,平滑肌细胞,脂肪细胞和 MSC(Lin et al.,Stell Cell Dev2008;17:1053-1063)。通常将不同条件下分离脂肪的血管间质部分的粘附细胞,及在不同的密度和培养基配方下的扩大统称为 MSC,无确定不同条件下细胞组成的系统方法(Rebelatto et al.,2008 上文;Liu et al.2007 上文;Jack et al.Biomaterials;30:3259-3270)。同样,通常统称采自骨髓单核细胞部分的粘附细胞为 MSC。然而,多所试验室声称已经分离出不同的骨髓衍生干细胞或祖细胞群,虽然,在体内这些独特的细胞类型是否具有代表性仍有待确定,但其具有实全异的,重叠的显性和功能的性质(Ulloa-Montoya et al.,J Biosci Bioeng2005;100:12-27;Ratajczak et al.Folia Histochem et Cyto2004;42:139-146;Lodie et al.Tissue Eng2002;8:739-751)。同样,很多研究报道了关于脂肪和骨髓衍生的 MSC 的功能和表型的相似性程度的相互矛盾的结论(Roche et al.Proteomics2009;9:223-232;Noel et al.Exp Cell Res2008;314:1575-1584)。通过体内的异位植入小骨构成试验,如 MSC 等任何非骨髓衍生前体细胞群的鉴定受到质疑,这表明仅骨髓衍生基质细胞可被列入 MSC(Kalz et al.Stem Cell12008;26:2419-24)。根据定量基于 PCR 的线性分析的评价,可从脂肪衍生 MSC 和骨髓衍生 MSC 共有重叠但各具特色的分化潜能的公开文献评论中得出这些数据是合理。(Roche et al.2009 上文;Noel et al.2008 上文;Rebelatto et al.2008 上文;Liu et al.2007 上文)。

[1402] 我们使用 TaqMan Q-RT-PCR,分析原始粘附脂肪血管基质部分-衍生细胞。如图 91&92,我们能够分离出始终表现出平滑肌细胞表型的细胞群,通过 SM α A, SM22, SMMHC, 钙结合蛋白和心肌蛋白的表达表示。虽然在涂片后最初 24-48hr 的窗口期内也能检测到内皮的和脂肪细胞标记物,但当其他细胞特性随传代下降时,此细胞群仍保持平滑肌特性(图 91, 92, 表 7)。脂肪形成的标记物的表达迅速下降(表 7)。与其他报告描述的来自脂肪及其后续组织工程学中的应用的 MSCs 的分离不同,对平滑肌相关的基因表达信号的直接分化来说非诱导细胞因子或增加的,外源性生长因子是必要的。(Jack et al.2009 上文)。

[1403] 根据平滑肌细胞相关标记物和 Ca²⁺ 依赖收缩性的基因和蛋白质表达,

Ad-SMCs 直接类似于膀胱衍生平滑肌细胞 (Basu et al., 2009 in preparation; Basu et al. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting, July 8-11, 2009)。Ad-SMCs 的分离直接依赖于如图 91B 所示的特定配方中的分离, 平滑肌细胞标记物的表达取决于在 DMEM-HG 培养基中的扩大。其他培养基类型中的生长导致平滑肌细胞相关特征损失, 并可能导致更多间质祖细胞的富集 (Gong et al. 2009 上文)。最后, 培养基中存在的高葡萄糖水平或高密度的扩大物不利于富有活力的 MSC 分化潜能的表现 (Lund et al. 2009 上文)。追加的研究显示在低葡萄糖培养基中 MSC 的骨原分化潜能相比于在高浓度葡萄糖培养基中增加 (Jager et al. Biomed Tech (Berl) 2003; 48:241-244)。这显示存在与葡萄糖和其他糖相关的可能导致 MSC 中分化潜能损失的后期糖化终产物 (Kume et al. J Bone Miner Res 2005; 20:1647-1658)。综上, 这些结果说明了在高密度和高浓度葡萄糖条件下, 脂肪 SVF 衍生的细胞的扩大导致对平滑肌细胞显型的选择, 与 MSC 特性的需要不同。

[1404] 继续基因表达方法, 在表 18.1 和 18.2 中我们已经使用了阵列 PCR 数据组鉴定标记物的核心组, 从 MSC 中一致的和明确的区分出 Ad-SMC。BMP6, CD44 和 IL-1 β 在 Ad-SMC 中的表达至少是 MSC 中的 30 倍, 但是 GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2 和 VCAM1 在 MSC 中表达至少是 Ad-SMC 中的 30 倍。这些结果在多供体样本 ($n = 3$) 中是一致的, 说明我们的结果不是由供体变化或基因表达水平上的随机变化得到的。BMP6 是与 MSC 分化期间软骨形成和骨形成调节有关的 TGF- β 族中的一种 (Henning et al. J Cell Physiol 2007; 211:682-291; Friedman et al. J Cell Biochem 2006; 98:538-554)。我们的数据显示的骨髓衍生 MSC 的 BMP6 表达的正向调节明显区别于来自脂肪衍生 MSC 的 Ad-SMC 中的 BMP6 表达的负向调节 (Henning et al. 2007 上文)。有趣的是, 带有外源性 BMP6 脂肪衍生 MSC 的诱导导致 TGF- β 1 受体表达的正向调节 (Henning et al. 2007 上文)。已建立的 TGF- β 信号通路在平滑肌细胞特异性生长通路的活化中具有关键性的作用 (Owens et al. Acta Physiol Scand 1998; 164:623-635)。CD44 是众所周知的 MSC 样细胞标记物, 广泛涉及到细胞生长, 迁移和回归 (Khalidoyanidi S. Cell Stem Cell 2008; 2:198-200)。从整体表达, 转录的剪接变体调节, 和基因表达的总稳定性来说, 脂肪和骨髓衍生 MSCs 间的 CD44 表达是相似的。 (Peroni et al. Exp Cell Res 2008; 314:603-615)。

[1405] 相对于包括 GDF5 在内的 Ad-SMC, MSC 中的基因被正向调节, 这在 MSC 和 HGF 的软骨形成和骨形成分化的调节中是重要的。HGF 及其同族受体 c-met 以骨髓衍生 MSC 中的运动性和增殖的调节而闻名 (Neuss et al. Stem Cells 2004; 22:405-414)。与最早的报告一致, 我们观察到引发炎症的细胞因子 LIF 的表达是区分 MSC 和 Ad-SMCs 的关键特点 (Majumdar et al. J Hematother Stem Cell Res 2000; 9:841-8)。重要的是, LIF 在 MSC 中起祖细胞状态的关键标记物的作用, 为最大分化潜能的代表 (Whitney et al. Tissue Eng Part A 2009; 15:1)。这一结果与 Ad-SMC 代表平滑肌细胞群的说明是一致的。MCAM (CD146) 为脂肪外周血管壁 (Zannettino et al. J Cell Physiol 2008; 214:413-421) 和骨髓 (Baksh et al. Stem Cell 2007; 25:1384-92) 衍生的 MSC 紧密相关的细胞表面标记物。CD146 的表达与来自脂肪或骨髓的 MSC 样细胞群干细胞潜能极其近似 (Zannettino et al. 2008 上文; Baksh et al. 2007 上文; Gronthos et al. J Cell Physiol 2001; 189:54-63)。RUNX2 是 MSC 分化过程中与骨形成调节相关的转录因子 (Isenmann et al., Stem Cell 2009)。细胞

粘着标记物 VCAM1 (CD106) 的表达也具有分离自脂肪或骨髓的 MSC 的特点 (Zannettino et al. 2008 上文) (Brooke et al. Stem Cell Dev 2008 ;17:929-40)。最后, Ad-SMC 表现出强烈的 MHC 类 II 表达, 与分离自脂肪或骨髓的 MSC 不同 (Niemeyer et al. Tissue Eng 2007 ; 13:111-121)。

[1406] 综上, 基因表达数据说明 Ad-SMC 代表更完全分化的 SMC 细胞群, 而不是 MSC 样细胞群。图 39 中表示的 Ad-SMC 和 MSC 的 2D 全蛋白质生物学比较支持这种解释, 证明 Ad-SMC 和 MSC 具有不同的且唯一的蛋白质生物学信号。Ad-MSC 蛋白质生物学轮廓与报道的脂肪衍生 MSC 和干细胞或祖细胞的其他级别的其他差异很小, 如果有, 也是明显重叠的 (Noel et al. 2008 上文 ;Rebelatto et al. 2008 上文)。与膀胱衍生的平滑肌细胞相比, 多重成熟平滑肌细胞标记物相关的表达和内皮标记物的损耗及功能性收缩 (Basu et al., 2009 ;in preparation ;Basu et al. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting, July 8-11, 2009) 的数据强烈的说明事实上 Ad-SMC 是平滑肌细胞, 而不是 MSCs。

[1407] 研究上述基因表达的同时, 我们还采用 FACS 检测了关键 MSC 相关的细胞表面标记物在骨髓衍生的 MSC 和 Ad-SMC 上的表达。两种细胞类型对 CD90+ 和 CD105+ 均成阳性, 但对好的 MSC 确定标记物 CD73 成阴性, 表明其在标准 MSC 标记物的表达中相当大的潜在非均质性 (Chamberlain et al. Stem Cell 2007 ;25:2739-49)。而且, Ad-SMC 是 CD45+CD117+, (图 96) 这可以将其明确的从脂肪或骨髓来源的衍生 MSC 中区分出来 (Lee et al. Cell Physiol Biochem 2004 ;14:311-324)。与 MSC 不同, CD45+ 隔室的鉴定说明存在造血器官的亚细胞群。尽管存在这些结果, 但我们相信鉴定细胞表面标记物是没有内在的生物学意义的, 例如 MSC 的 CD73, CD90 和 CD105, 这可能是在此领域的历史进程中人为创造的 (Dominici et al. 2006 上文)。虽然 AD-SMC 可能与 MSC 共享一些原型细胞表面标记物 (例如, CD90 和 CD105), 但在其他确定的标记物 (例如 CD34、CD45 和 CD117) 的表达中它们与 MSC 是截然不同的。因此相信这些标记物具有识别能力价值是具有挑战性的, 因为我们和别人已经观察到多元的、完全分化的细胞类型, 稳健地表达为通常与 MSC 相关的许多相同标记物 (Jones et al. Rheumatology 2008 ;47:126-131)。现在的报道中存在的 MSC 和 Ad-SMC 的联合转录, 蛋白质生物学和功能对评价 MSC 和 Ad-SMC 是否代表生物学上截然不同的细胞群可能更有用 (Lodie et al. 2002 上文 ;Gong et al. 2009 上文)。

[1408] 我们对 Ad-SMC 和 MSC 的功能比较集中在生长动力学的分析上, 平滑肌显型和对以平滑肌细胞特异性信号通路为靶点的小分子药物的应答。干细胞的关键特点是自我更新能力。扩大至少 25-40 代仍同时保留了多线性分化的潜能, 证明了 MSC 具有自我更新能力 (Tintut et al. Circulation 2003 ;108:2505-2510 ;Reyes et al. Blood 2001 ; 98:2615-2625 ;Bruder et al. J Cell Biochem 1997 ;64:278-294)。相比之下, 如图 99, 在最初接种的 4-5 天内 Ad-SMC 的生长潜能急剧下降, 与它们作为终期分化的平滑肌细胞类型的鉴定是一致的。没有任何自我更新能力的迹象。

[1409] 联合使用外源性生长因子, ECM 和细胞外环境的其他对照标记成分, 根据定义的发展代系, 干和祖细胞群的其他特点对直接的分化是必须的。许多报道集中在来自脂肪或骨髓的调控分化在组织工程学和再生性药物中的应用。例如, 在接种前聚合的膀胱顶装支架结构使用含有 100U/ml 肝素的诱导培养基培养 6 周, 使脂肪衍生的 MSC 分化为平滑肌样细胞, 证明了大鼠膀胱切除术模型的功能性 (Jack et al. 2009 上文)。此

外, TGF- β 或以 TGF- β 信号通路为靶点的小分子激动剂, 包括神经鞘氨醇磷酸胆碱 (sphingosylphosphorylcholine), 缓激肽和血管紧张素 II 均已被用于来自脂肪或骨髓衍生的 MSC 的平滑肌样表型诱导剂 (Gong et al. 2009 上文; Kim et al. Cell Signal 2008; 20:1882-1889; Jeon et al. 2006 上文; Kim et al. Int J Biochem Cell Biol 40; 2482-2491)。较低的目标方法, 使用 DNA 去甲基化试剂 5-azaC 的基因组重组使骨髓衍生 MSC 导向心肌细胞样表型 (Xu et al. Exp Biol Med 2004; 229:623-631)。使用 TGF- β 去分化的脂肪细胞也可能是沿平滑肌代系传递的, 并且已有有关对小鼠膀胱损伤模型中的膀胱组织再生具有作用的报道 (Sakuma et al. J Urol 2009 Jul; 182(1):355-65. Epub 2009 May 20)。最后, 有 TGF- β 诱导来自骨髓衍生细胞的平滑肌细胞分化的方法报道 (Kanematsu et al. Am J Pathol 2005; 166:565-573; Becker et al. Int J Artif Organs 2008; 31:951-9)。综上, 在使用诱导的细胞因子或小分子药物治疗前, 这些报道通常呈现出 MSC 样细胞群, 具有很小的或没有任何平滑肌细胞相关标记物的表达。

[1410] 与之形成鲜明的对比, 我们能过直接分离并扩大包括典型的与成熟平滑肌细胞 (Sm α A, SM22, SMMHC, 钙结合蛋白和心肌蛋白) 相关的在内生物表达所有关键的平滑肌相关的标记物的来自脂肪的平滑肌细胞群, 而不需要用任何外源性试剂对分化进行控制 (Owens et al. Physiol Rev 2004; 84:767-801), 这一结果强烈的表明从起始分离起 Ad-SMC 代表的细胞群已被更进一步的完全分化与功能性 MSC 截然不同。最近已经出现了猪骨髓衍生 MSC 通过多次传代后高密度下不添加外源性生长因子外源性生长因子, 获得平滑肌样特点, (Shukla et al. World J Urol 2008; 26:341-349)。然而, 相比于本报道, 经多重的, 独立的制备方法, 我们能从最早的传代中分离出具有明确平滑肌细胞表型的 Ad-SMC ($n = 174$ 如图 94 所示)。通过融合长时间的生长, 而不需要“分化”。

[1411] 通过完全不同的相对独立的激酶, 用 U46619, 凝血噁烷 A2 (TxA2) 稳定类似物调整信号级联调节收缩型性的多重平滑肌细胞特异性基因表达通路的律动调节, 所谓的“兴奋-转录”耦联 (Wamhoff et al. Circ Res 2006; 98:868-878)。已知使用 U46619 治疗导致脂肪衍生 MSC 和 SRF 和心肌蛋白的表达增加, 和相关的平滑肌细胞特异性标记物 SM α A, 钙结合蛋白, 平滑肌蛋白和 SMMHC 的正向调节 (Kim et al. 2009 上文)。TxA2 对兴奋-转录耦联的影响表现为作为 MSC 功能性指纹, 而与器官的组织无关。我们已经观察到在用 U46619 的治疗时骨髓衍生的 MSC 再次正向调节平滑肌标记物, 如脂肪衍生的 MSC 所见观 (Kim et al. 2009 上文)。然而, 如图 100, 在直接的相反的方法中, Ad-SMC 对 U46619 作出应答, 显示明确的关键功能的平滑肌标记物心肌蛋白和 SMMHC 的负向调节。显然, 如 MSC 中所见, 信号级联的组织性和控制参与兴奋-转录耦联, 是与 Ad-SMC 的基本差异。这一结果明确的证明了 Ad-SMC 与脂肪或骨髓衍生的 MSC 是截然不同的, 事实上其代表了一种生物学上唯一的细胞群。

[1412] Ad-SMCs 的起源是哪里, 与 MSC 的关系是什么? 脂肪是严重血管化组织, 大量研究显示血管外周龛影作为 MSC 及平滑肌和内皮细胞的潜在的来源 (Caplan J Pathol 2009; 217:318-324)。已经从血管及全身的多重器官系统中直接分离出具有 MSC 分化潜能的周细胞 (da Silva Meirelles et al. 2006 上文; da Silva Meirelles et al. Tissue Eng Part A 2009 Feb; 15(2):221-9; Tintut et al. 2003 上文)。然而, 虽然已经将 SM α A+ 细胞划分为脂肪衍生的血管床的所有的毛细血管, 小动脉和小静脉, 但 STRO-1 的表达, 关键

MSC- 特异性标记物, 与内皮紧密相关, 而且发现仅存在与血管亚类中 (Lin et al. Stem Cell Dev 2008 ;17:1053-1063)。而且, 很少观察到干细胞特异性标记物 Oct4 的表达和端粒酶, 说明真正的多能性祖细胞与脂肪中的不一致 (Lin et al. 2008 上文)。在其全文中, 这些结果表明在广泛的血管周龛影中, MSC、内皮和平滑肌占有截然不同的空间。尽管如此, 在发展代系过程中仍保留有相当大的消长潜力。例如, 在对 TGF- β 的反应中或原血管源因子的消耗和内皮细胞-细胞间接触的丧失中, 内皮细胞表现出对平滑肌细胞样表型代系转化的能力 (Krenning et al. Trends Cardiovasc Med 2008 ;18:312-323 ;Krenning et al. Biomaterials 2008 ;29:3703-3711)。

[1413] 最后, 已证实成熟的外周血中, 带有内皮和平滑肌显型的粘附细胞类型及有限的间质分化潜能的循环 (He et al. Stem Cell 2007 ;25:69-77)。这种循环的平滑肌细胞可能对脂肪衍生的平滑肌细胞的细胞群是有利的, 虽然我们还不能直接从人类成熟的外周血中直接纯化。出有意义的数量 (未公开的结果)。长时间培养得到的 MSC 也遵循平滑肌细胞样分化通路 (Dennis et al. Stem Cell 2002 ;20:205-214), 综上, 我们相信公开的数据及结果与广泛的平滑肌连续体, 内皮和具有可变量增生性和分化潜能的 MSC 细胞类型来源的外周血龛影是一致的。虽然是通过 MSC 分化或从脂肪中直接分离繁殖平滑肌细胞, 但其继续显示间质分化可塑性的 (Kim et al. 2009 上文 ;我们未公开的文献), 但是, 相对于骨髓或脂肪 SVF 来源的 MSC, 我们相信在光谱相反为结尾处存在明确的脂肪衍生平滑肌细胞有明确的功能和表型的差异。

[1414] 最后, 我们已经证明了直接从脂肪的 P0 粘附基质血管部分分离的 Ad-SMCs 与培养基配方紧密相关。平滑肌细胞标记物的表达是充分的且始终如一的, 且独立于捐赠来源和传代。我们已经表明, 由基因表型, 蛋白质生物学和表面标记物分析证明 Ad-SMCs 在表型上区别于 MSC, 且由其对以信号通路相关的平滑肌细胞为靶点的药理学试剂可知在功能上区别于 MSC。与其他公开的报道相比, 这些平滑肌细胞的分离不需要用 TGF- β 或相关小分子直接分化。在 4-5 代内, Ad-SMC 可能增殖到 10^7 个细胞, 表达平滑肌细胞相关标记物的全部范围, 且体外 (Ca²⁺- 依赖收缩) 和体内 (猪膀胱切除术模型中新尿路管道的再生) (Basu et al., 2009, 在文献 ;Basu et al. International Society for Stem cell Research, 7th Annual Meeting, July 8-11, 2009) 功能上与膀胱衍生 SMC 相似。这些数据支持以下结论 : 与包括内皮细胞和 MSC 在内的脂肪衍生细胞的其他级别相比, 将此细胞群描述为脂肪平滑肌细胞 (Ad-SMC) 更准确, 它代表了单独的、截然不同的细胞群。

[0001]

序列表

<110> 坦吉恩股份有限公司 (Tengion, Inc.)
J·W·路德
M·J·杰尤
J·巴苏
T·A·博特伦
C·W·金海莫
K·I·古斯利
R·易拉贾
D·贾安
O·A·科耐特
R·佩尼
S·F·昆兰
H·S·拉珀波特
N·D·桑哈

<120> 细胞支架构建体

<130> TGN-1014 US

<140> 12/612,606

<141> 2009-11-04

<150> 61/201,550

<151> 2008-12-10

<150> 61/201,554

<151> 2008-12-10

<150> 61/201,555

<151> 2008-12-10

<150> 61/114,382

<151> 2008-11-13

<150> 61/114,388

<151> 2008-11-13

<150> 61/114,021

<151> 2008-11-12

<150> 61/113,542

<151> 2008-11-11

<150> 61/111,242

<151> 2008-11-04

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 1

tctacaatg agctgcgtgt g

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

[0002]

<400> 2 cgttcacact tcatgatgga gt	22
<210> 3 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 3 galccaactg gtttatgaag aaagc	25
<210> 4 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 4 tctaactgat gatctgccga ggtc	24
<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 5 ccagcagatg tggatcagca	20
<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 6 aagcatttgc ggtggacaat	20
<210> 7 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 7 gtcagaaag ttgtccacct c	21
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	

[0003]

<400> 8 tcctgctcca ggatgaacat	20
<210> 9 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 9 catgtcctct gctcacttca ac	22
<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 10 cccctcgatc cactctctca	20
<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 11 aagagcacag ggtctcctca	20
<210> 12 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成引物	
<400> 12 actccgagtc atttgctgct	20

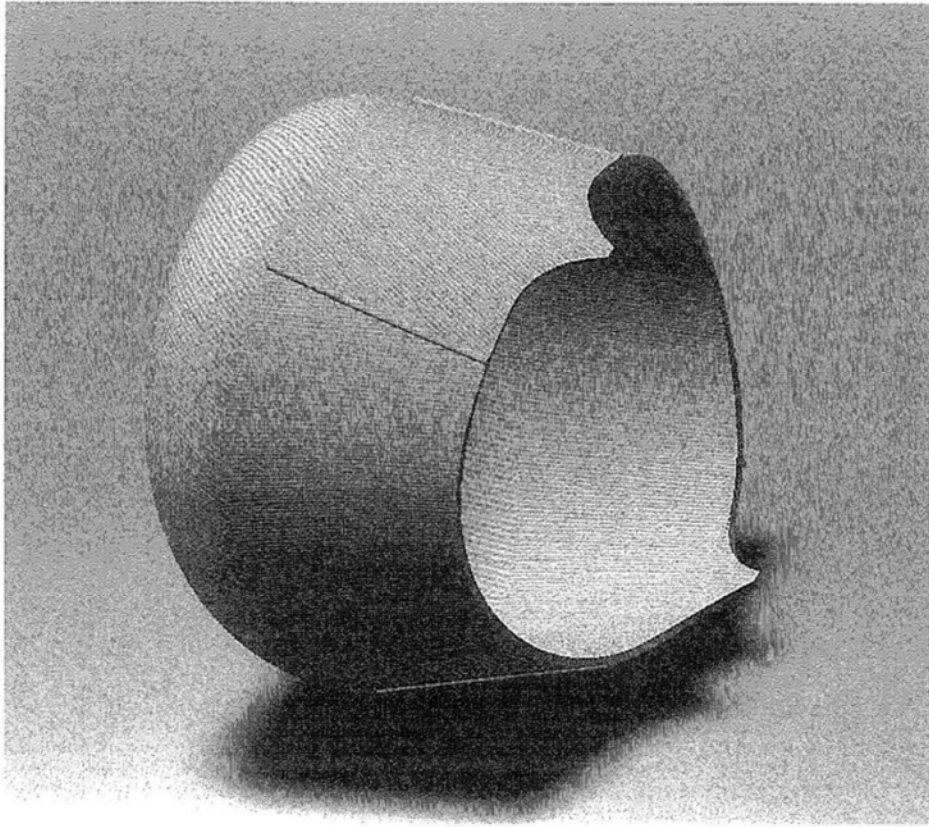


图 1

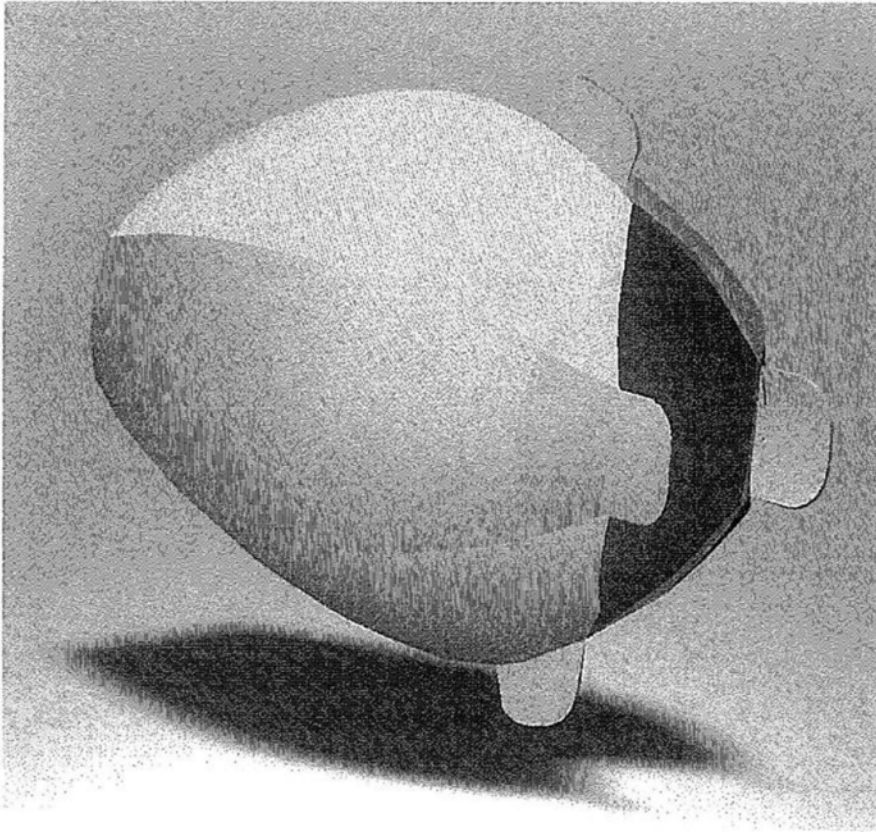


图 2

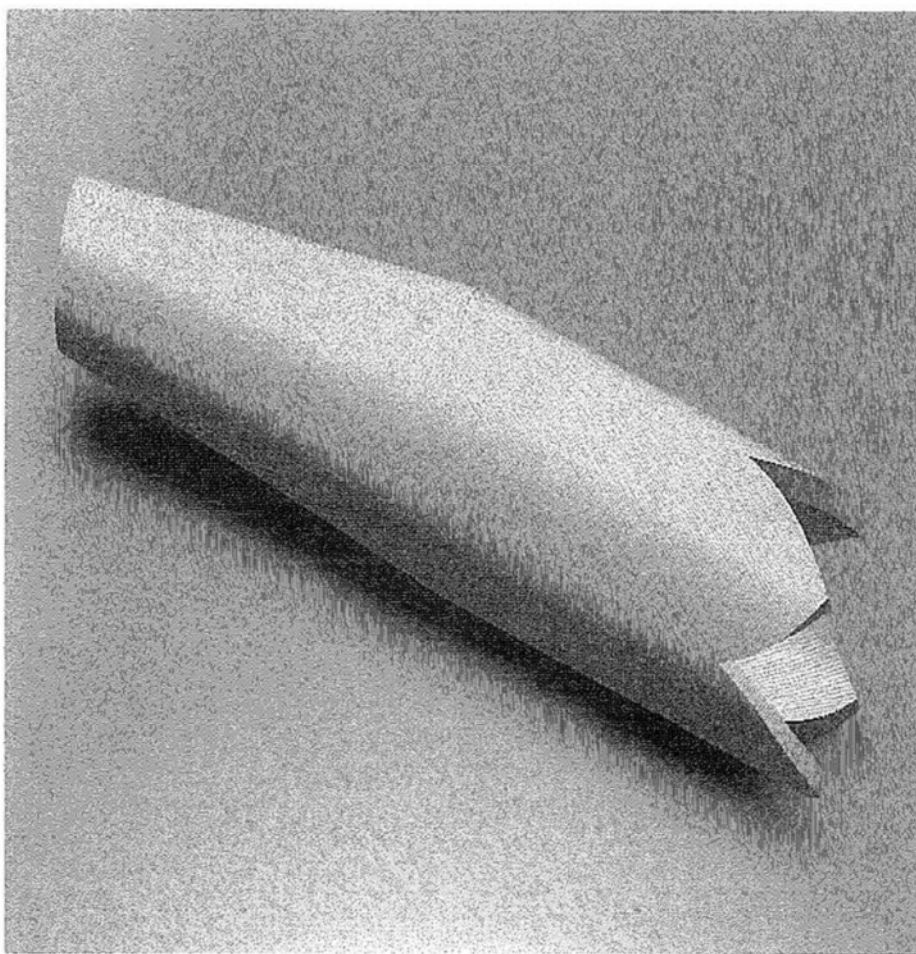


图 3

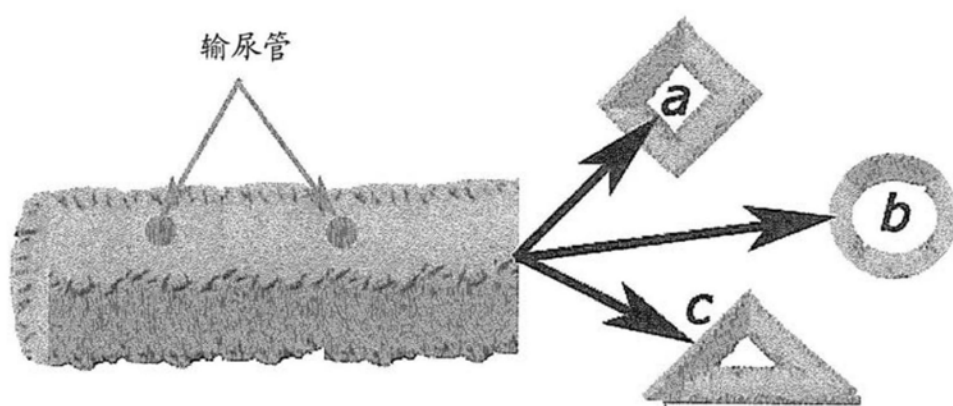


图 3A

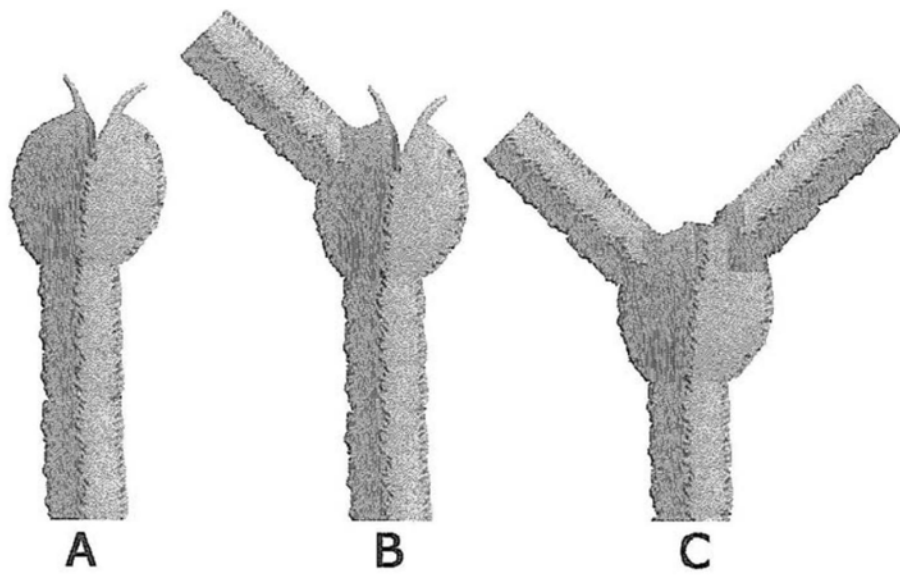


图 3B

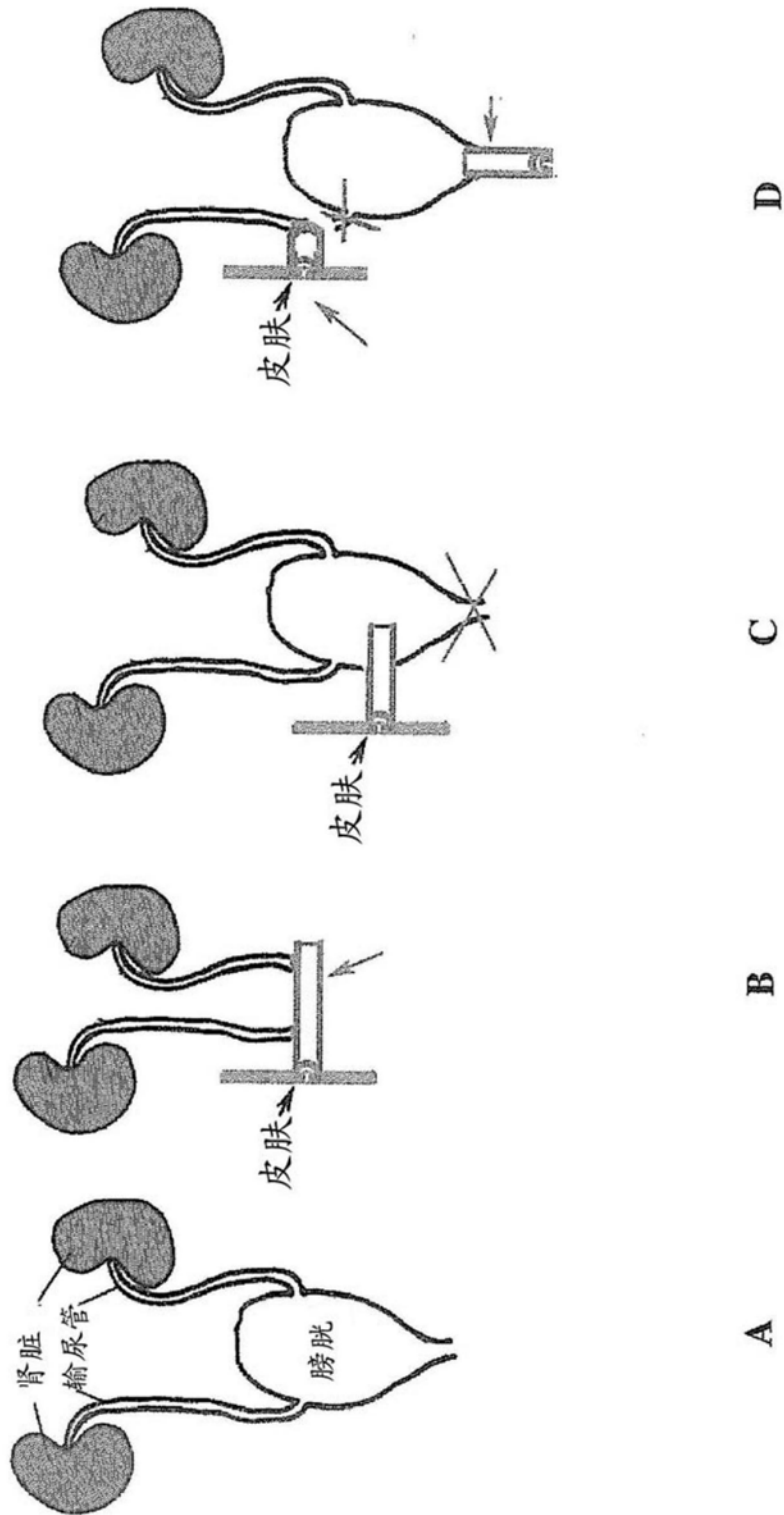


图 4

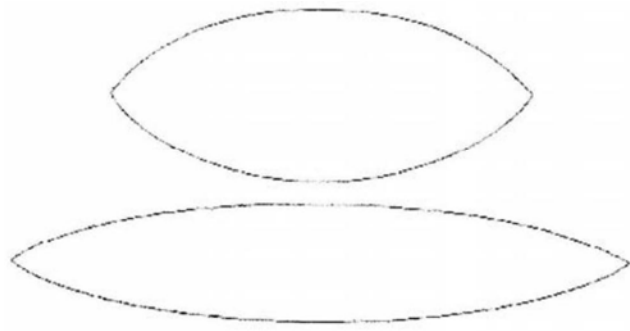


图 5A

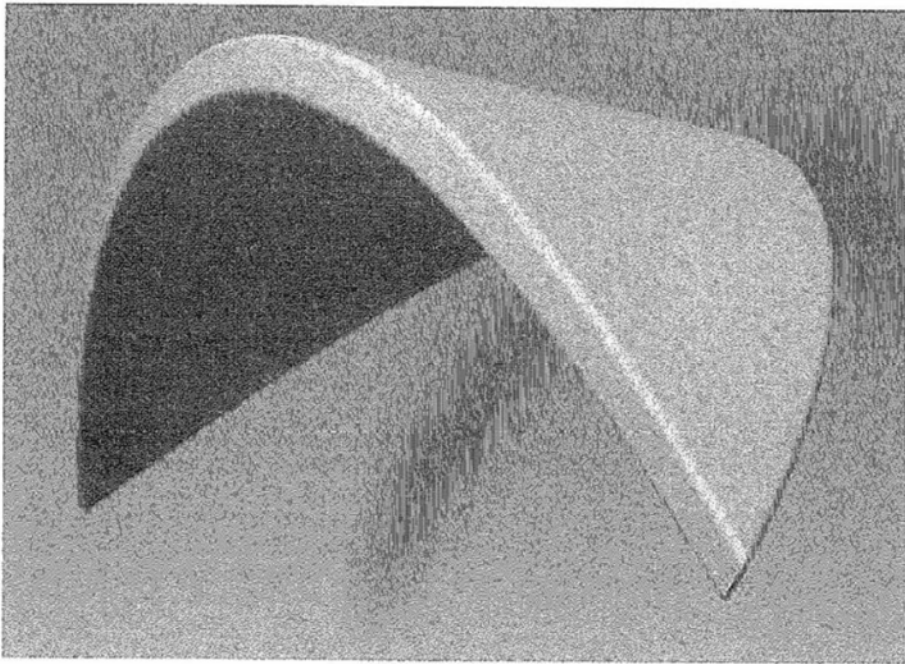


图 5B

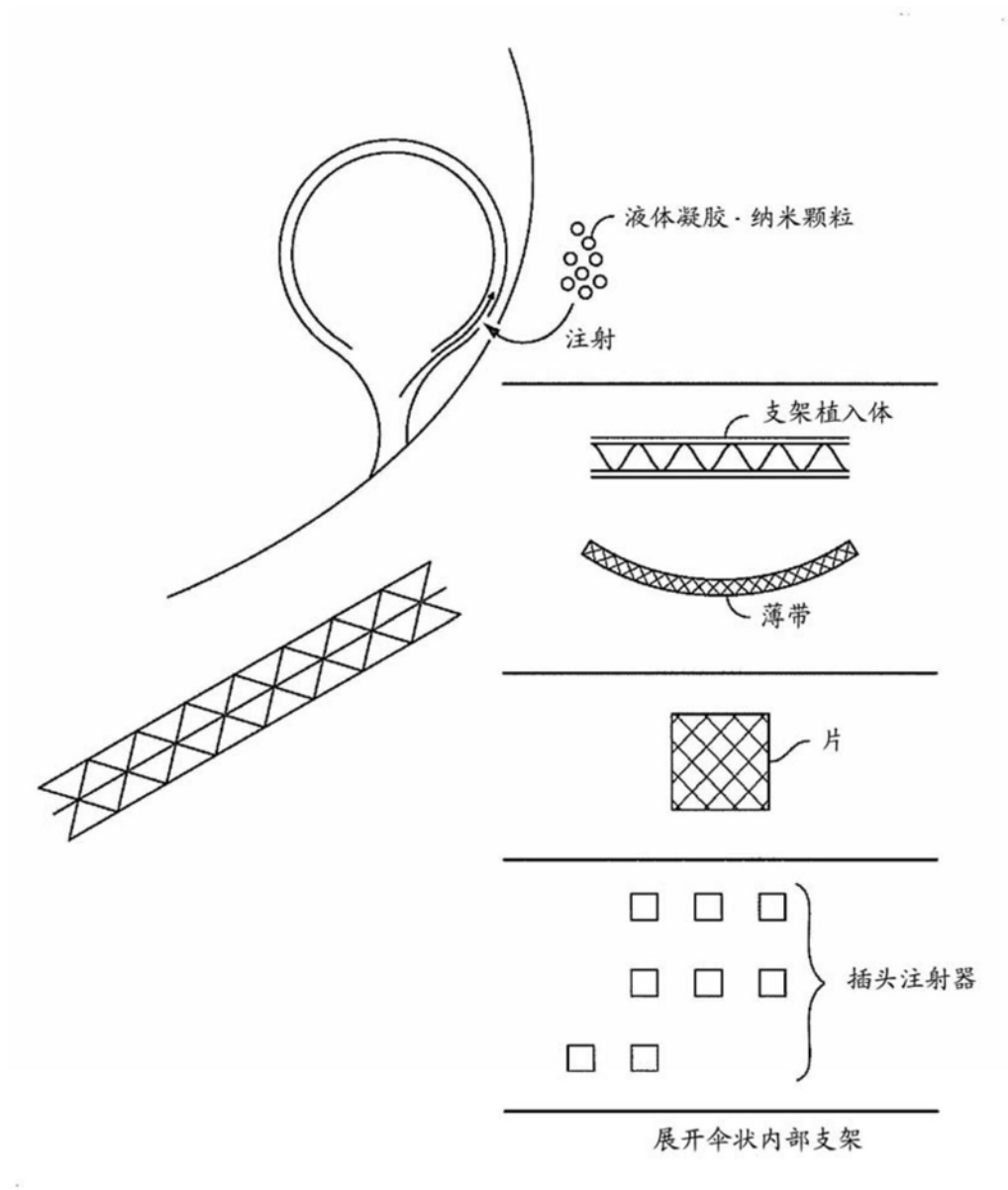


图 6

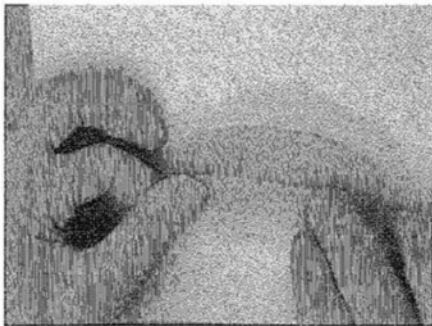


图 7A

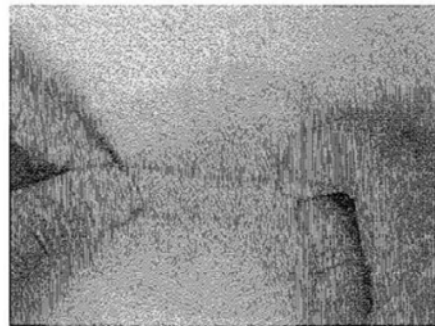


图 7B

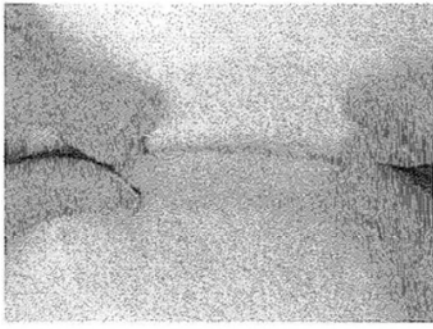


图 7C

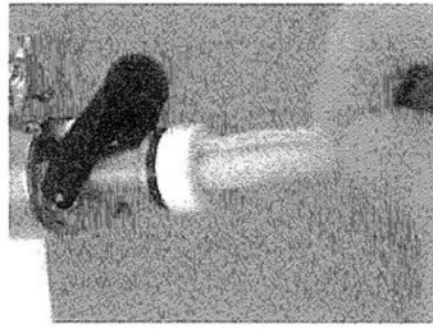


图 7D

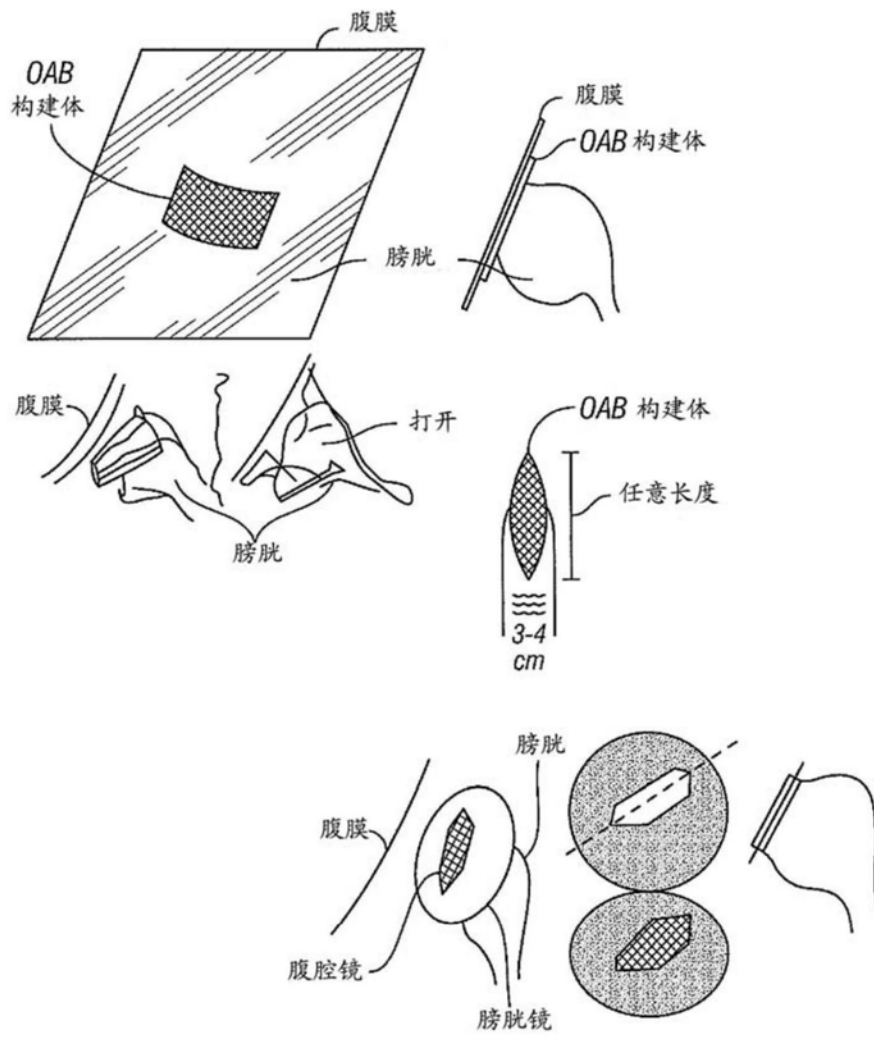


图 7E

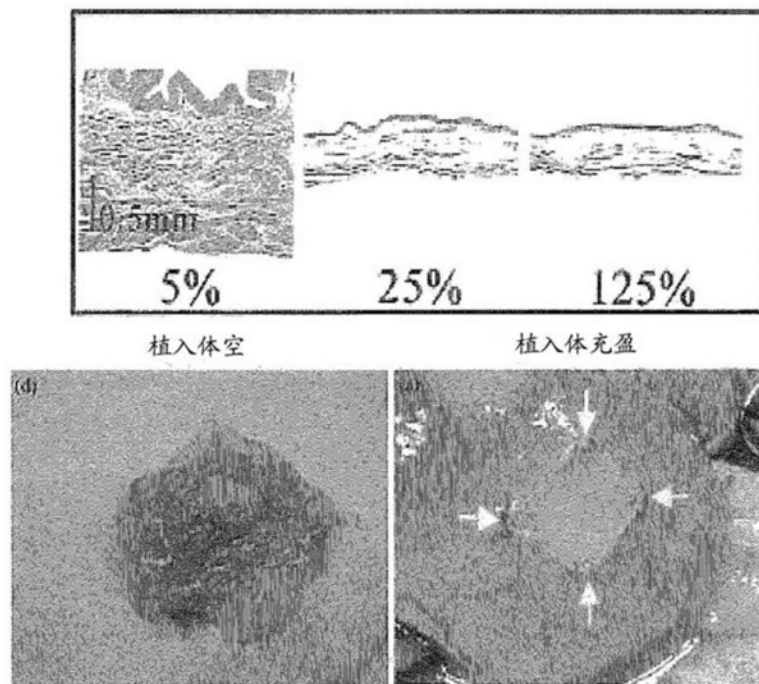


图 7F

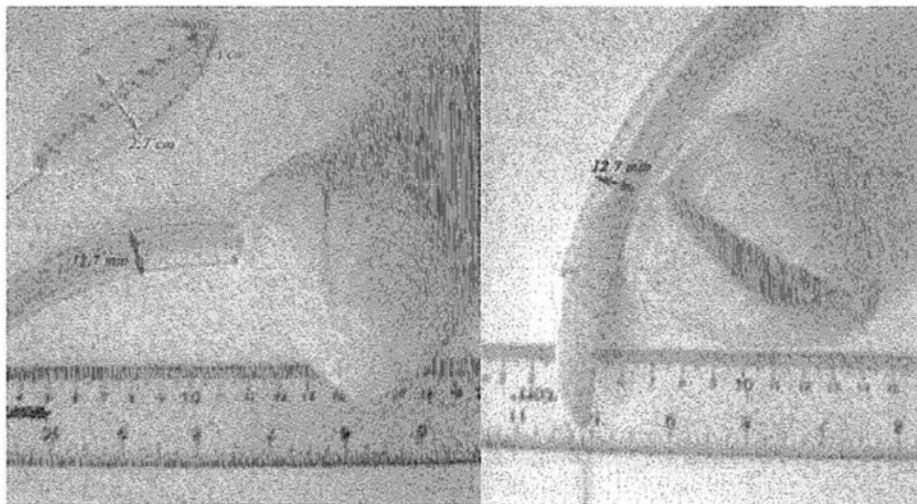


图 7G

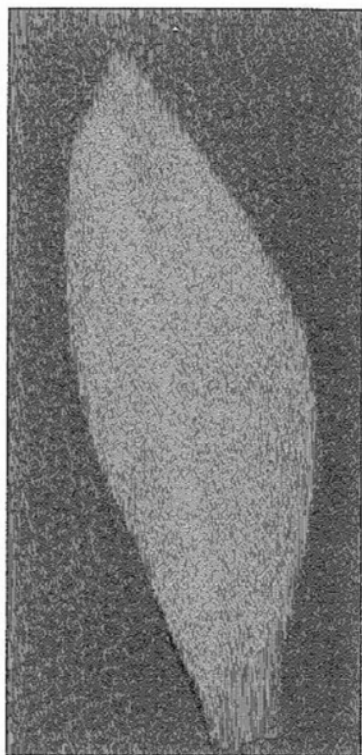


图 8

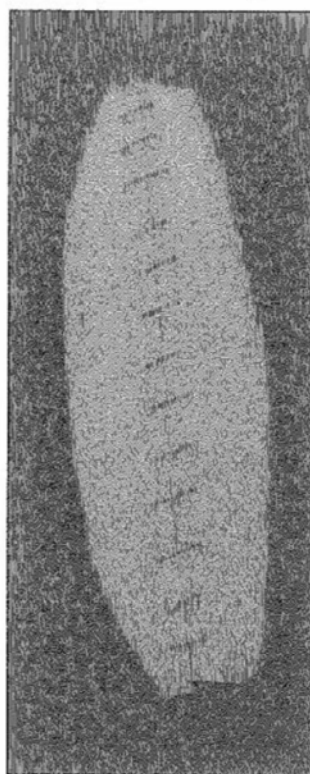


图 9A

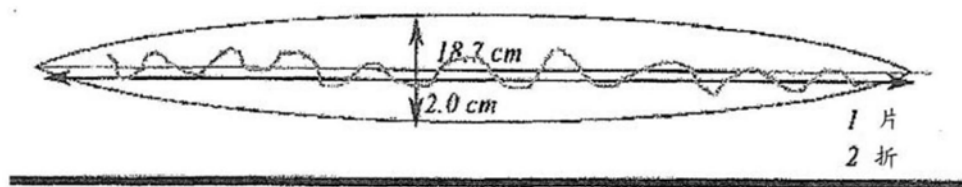


图 9B

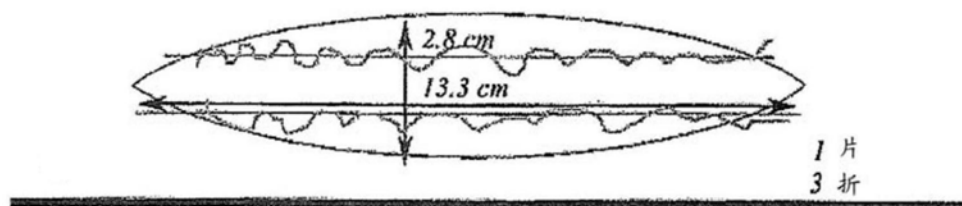


图 9C

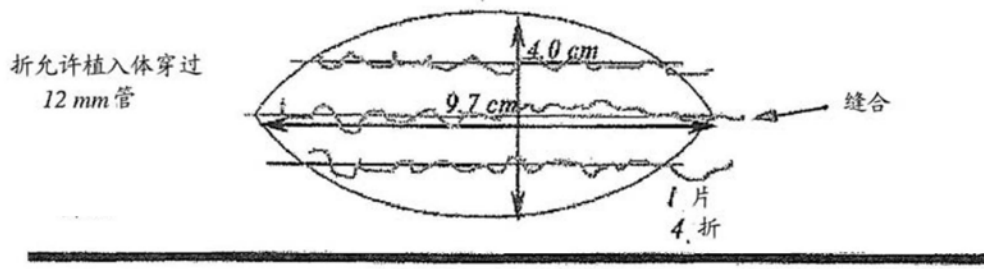


图 9D

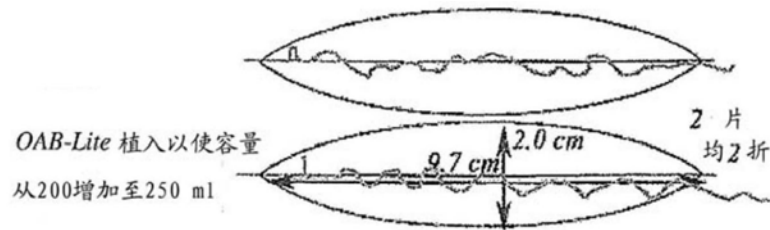


图 9E

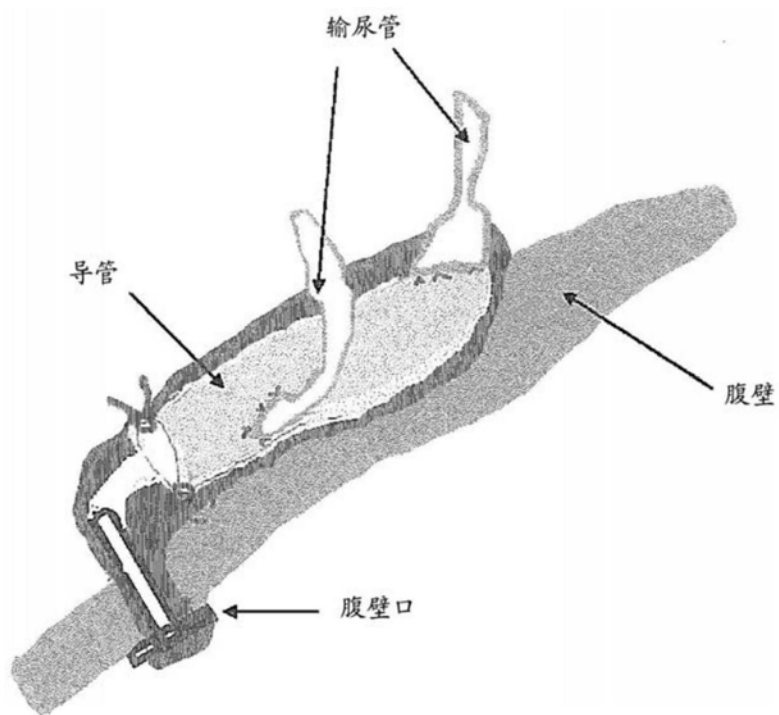


图 10

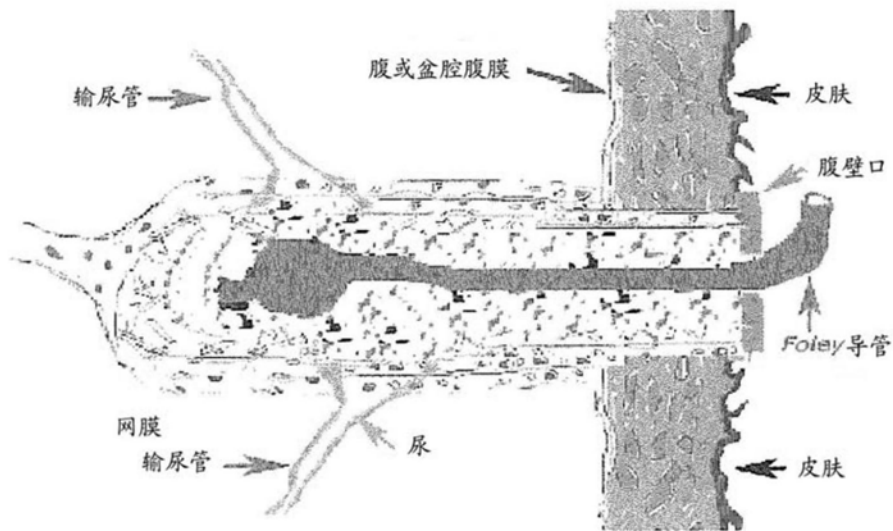


图 11

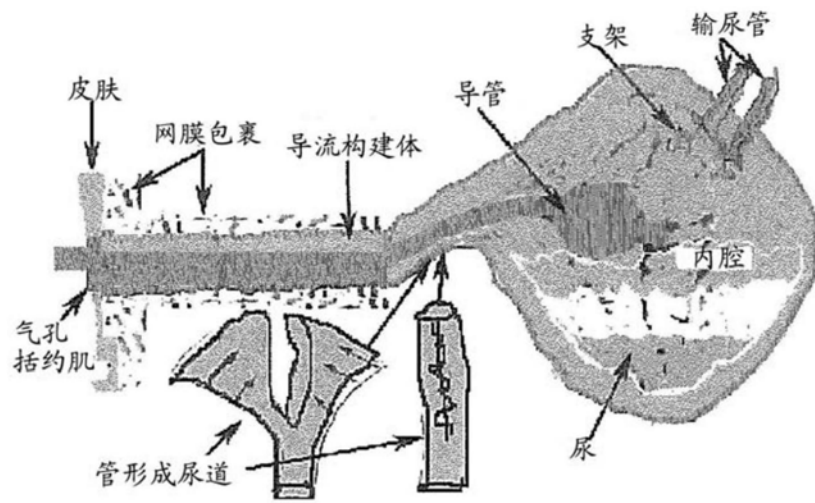


图 12

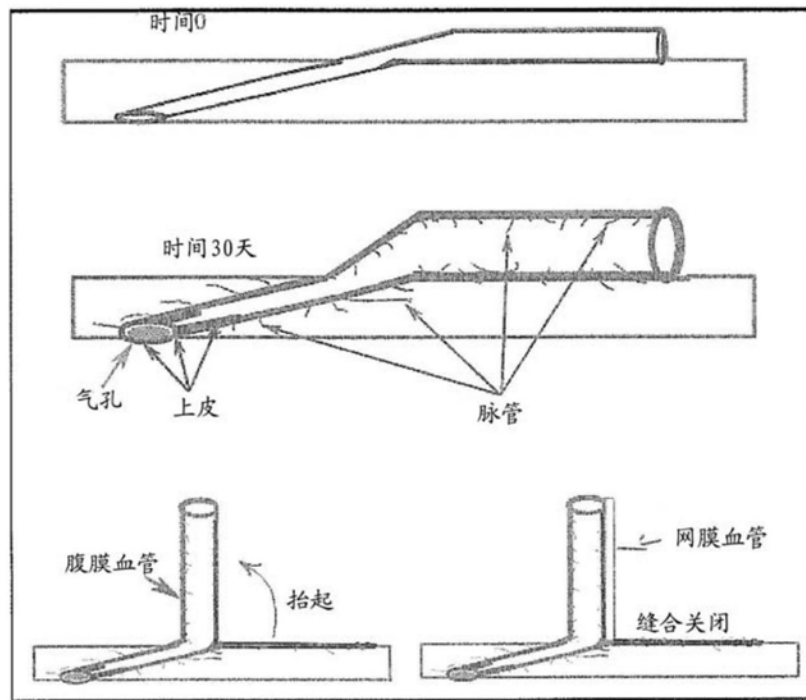


图 13

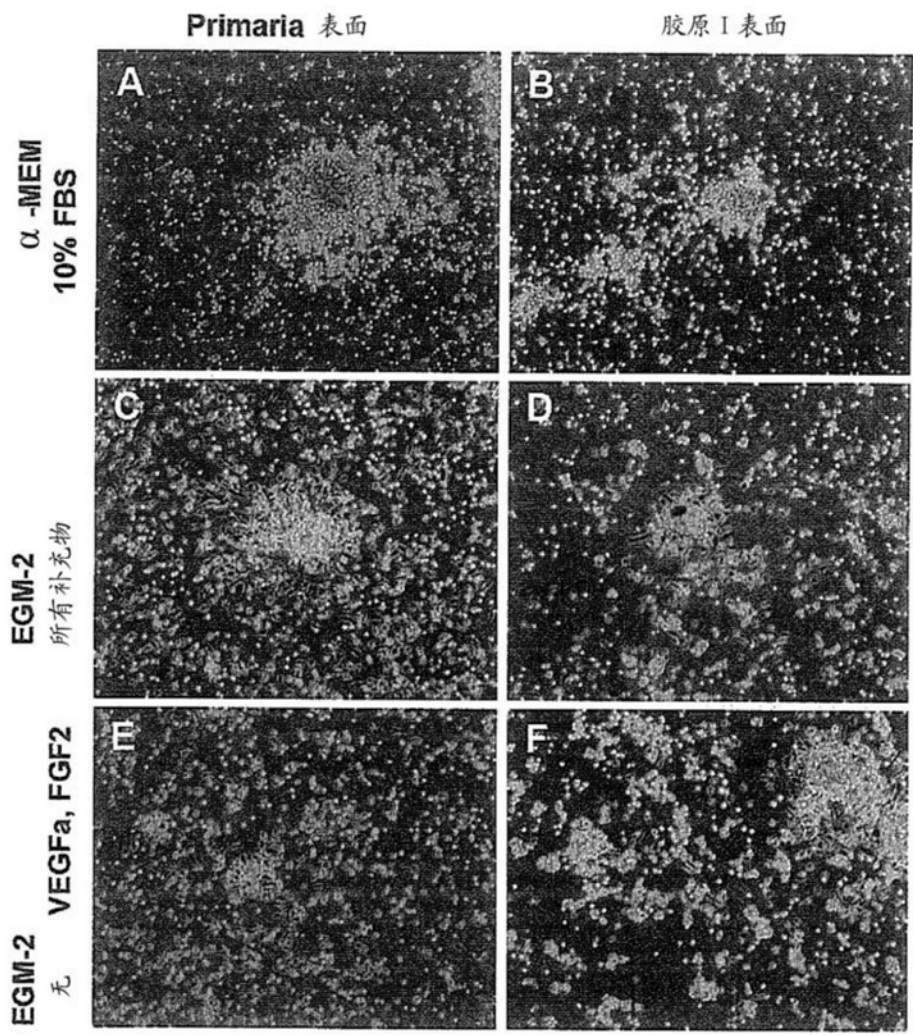


图 14

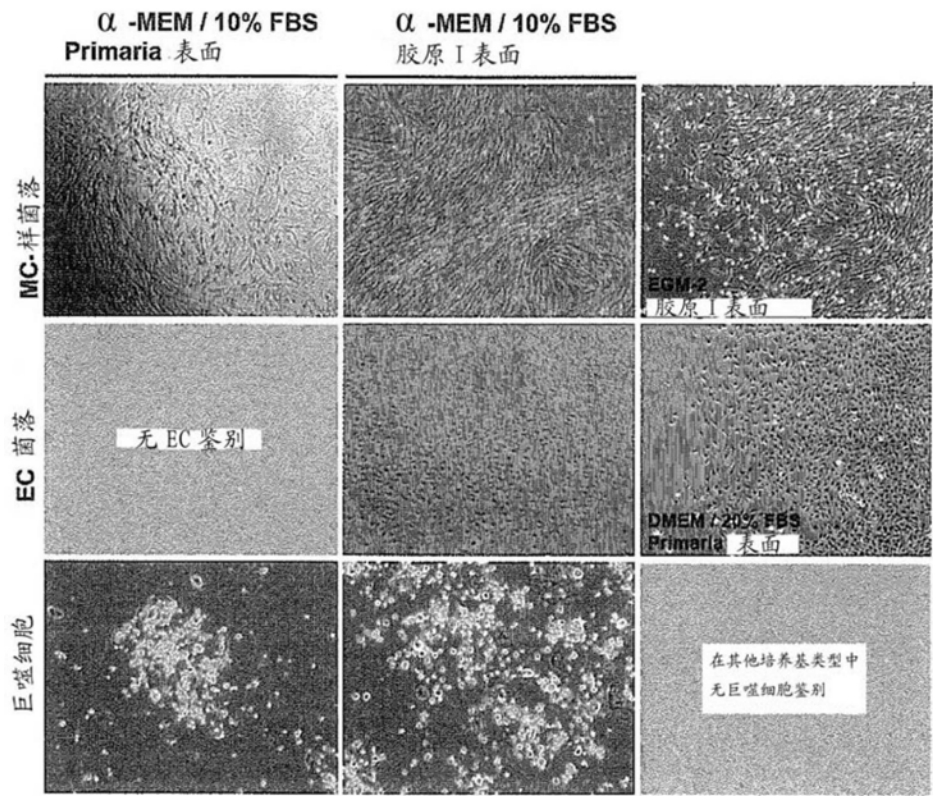


图 15

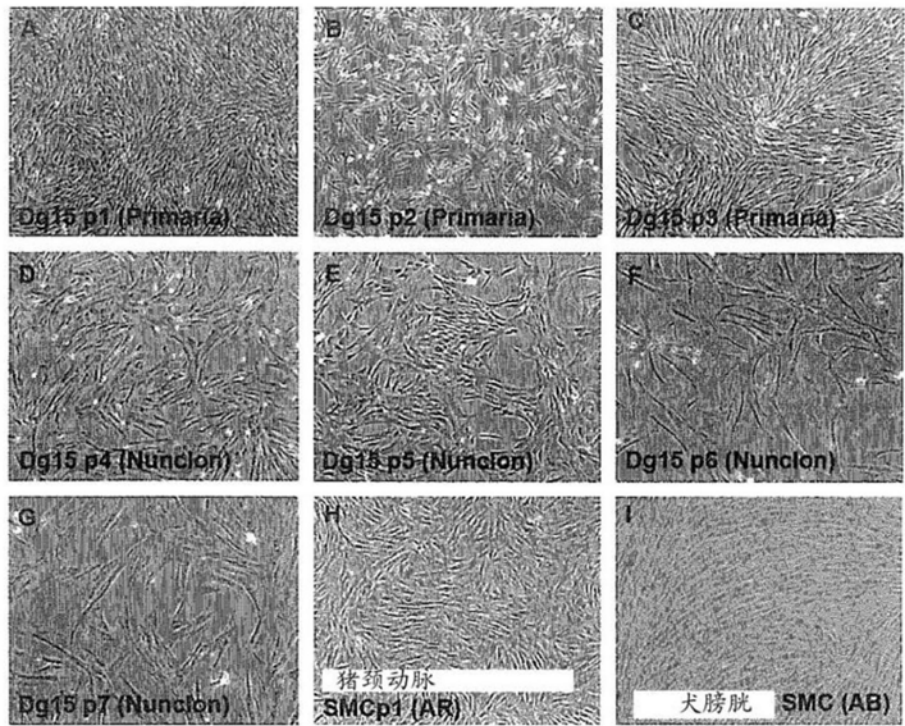


图 16

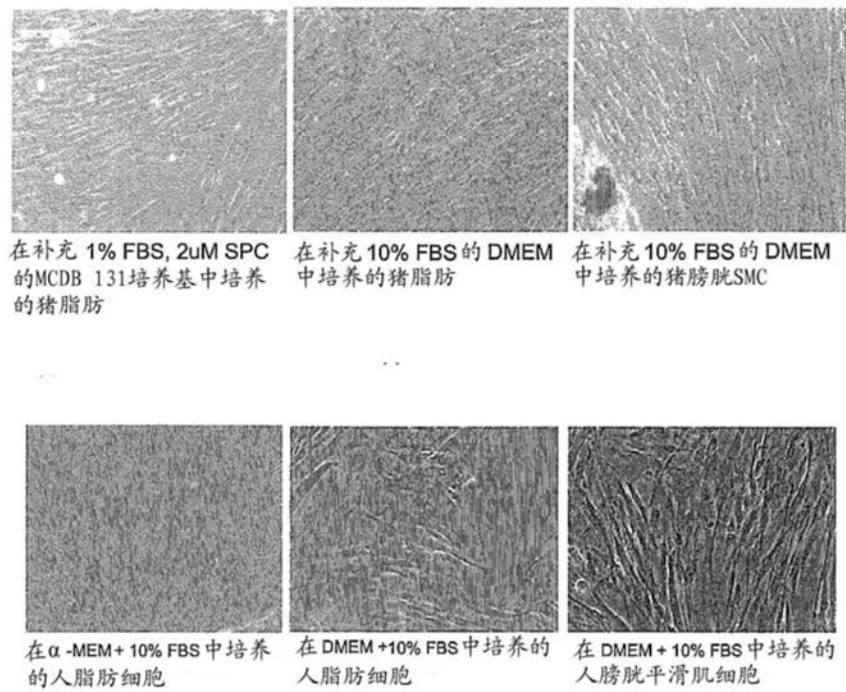


图 17

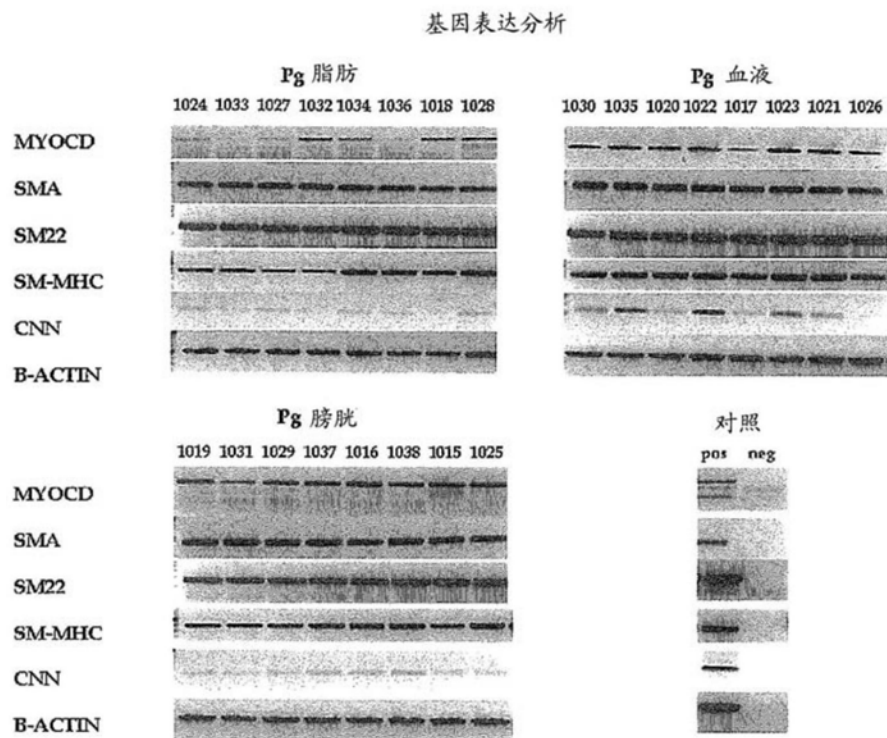


图 18

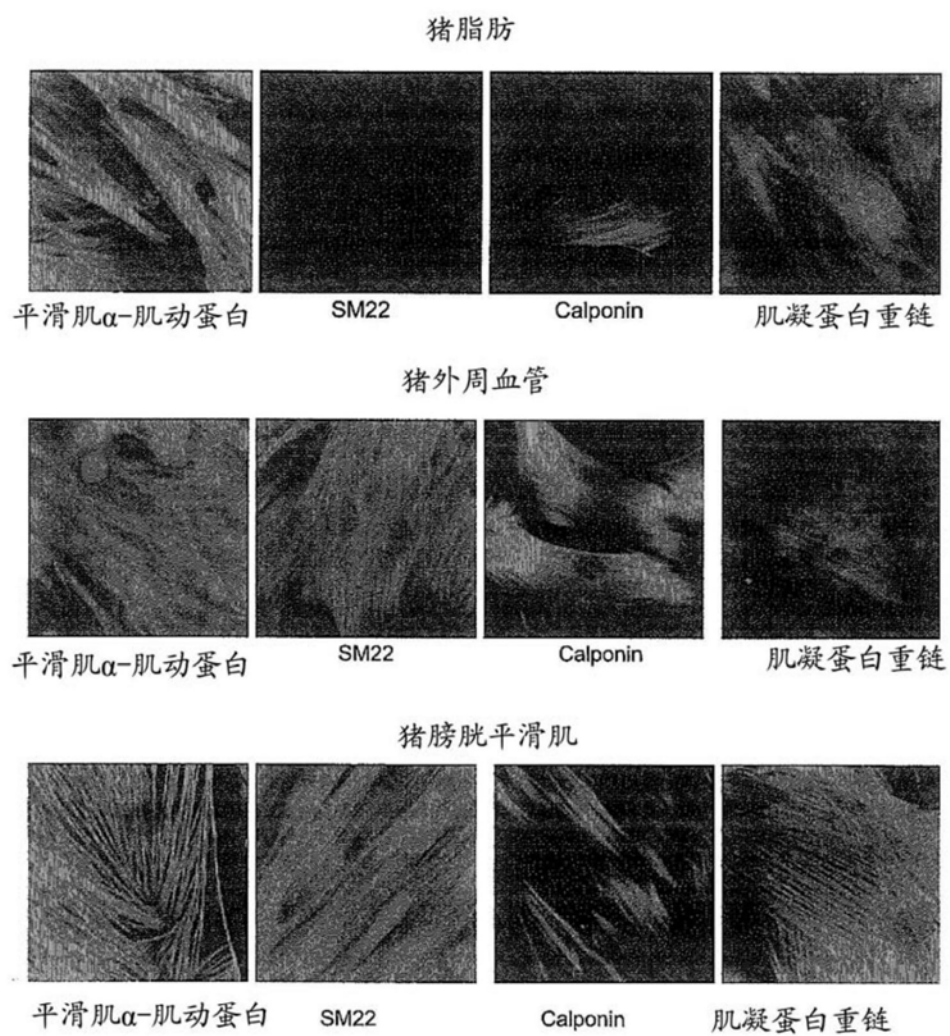


图 19

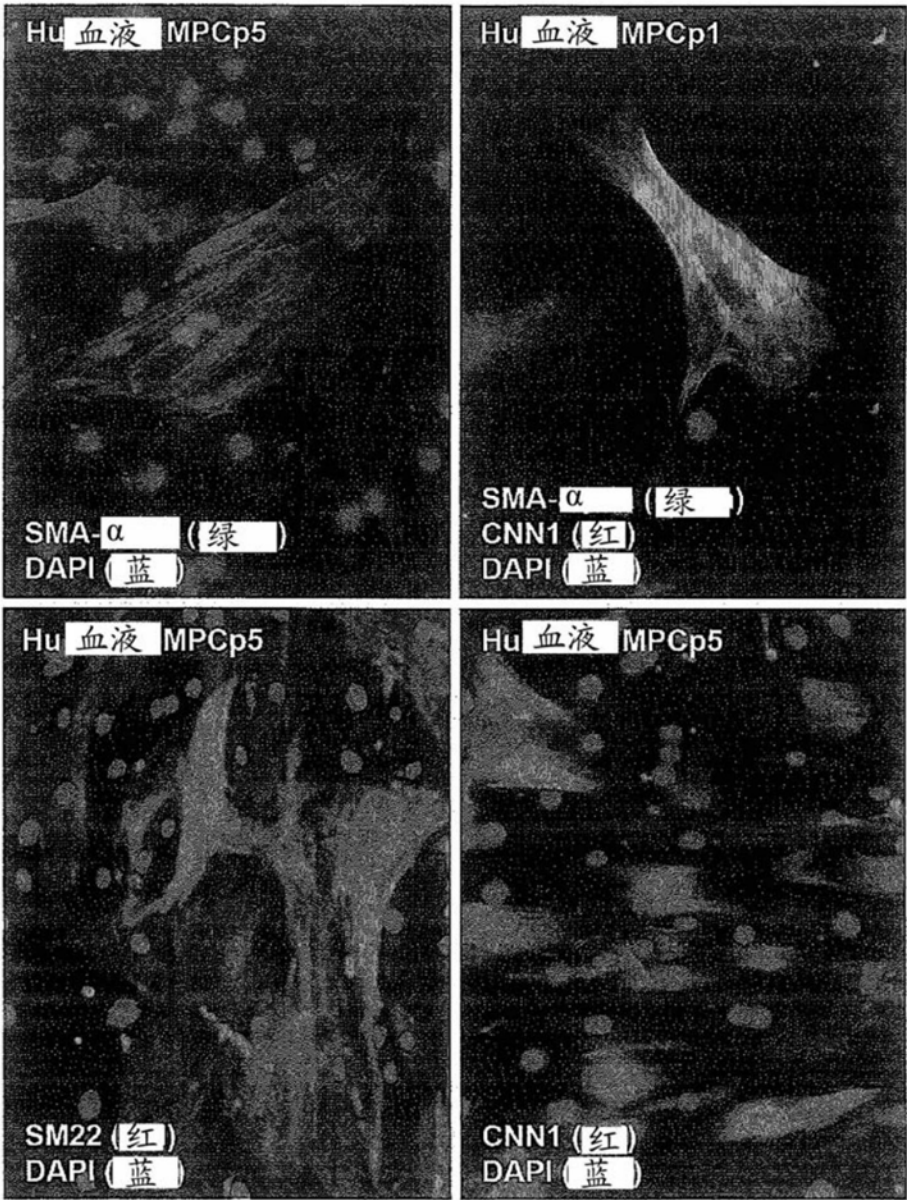


图 20

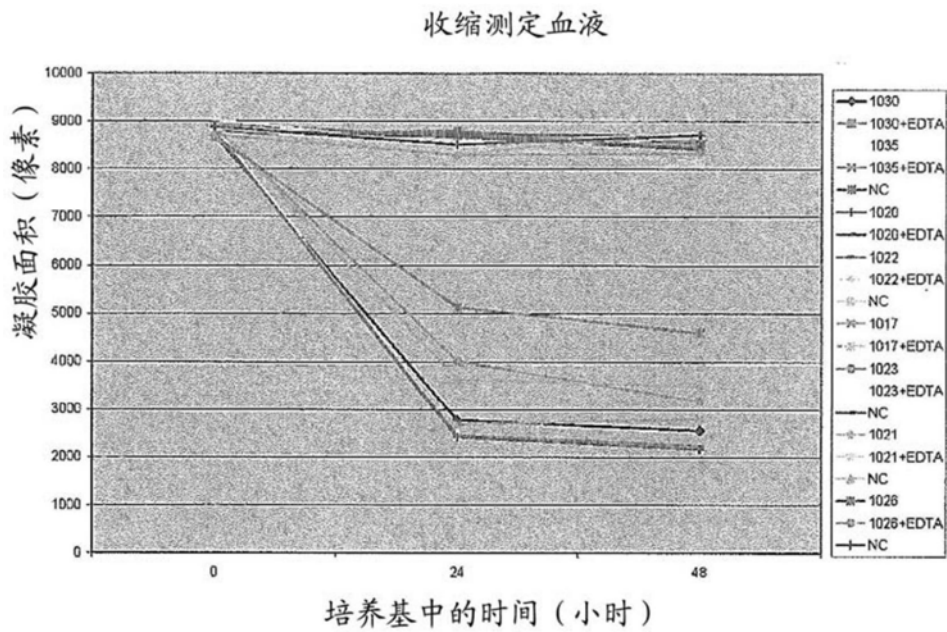


图 21A

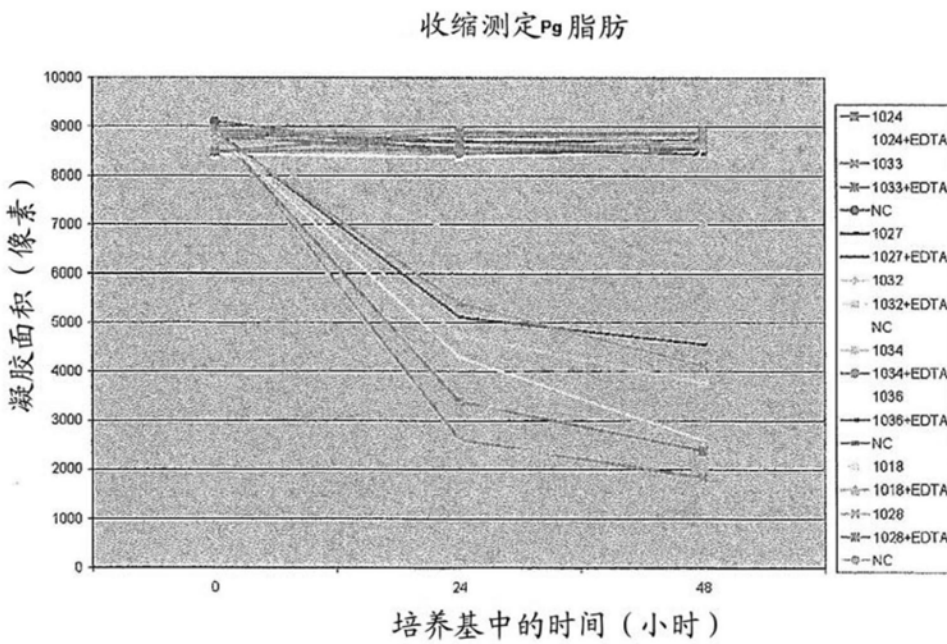


图 21B

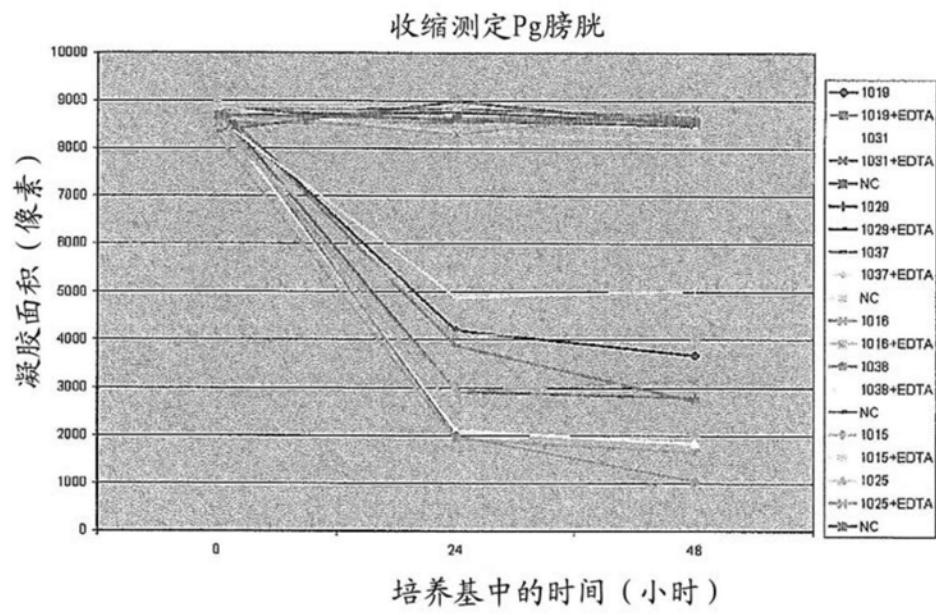


图 21C

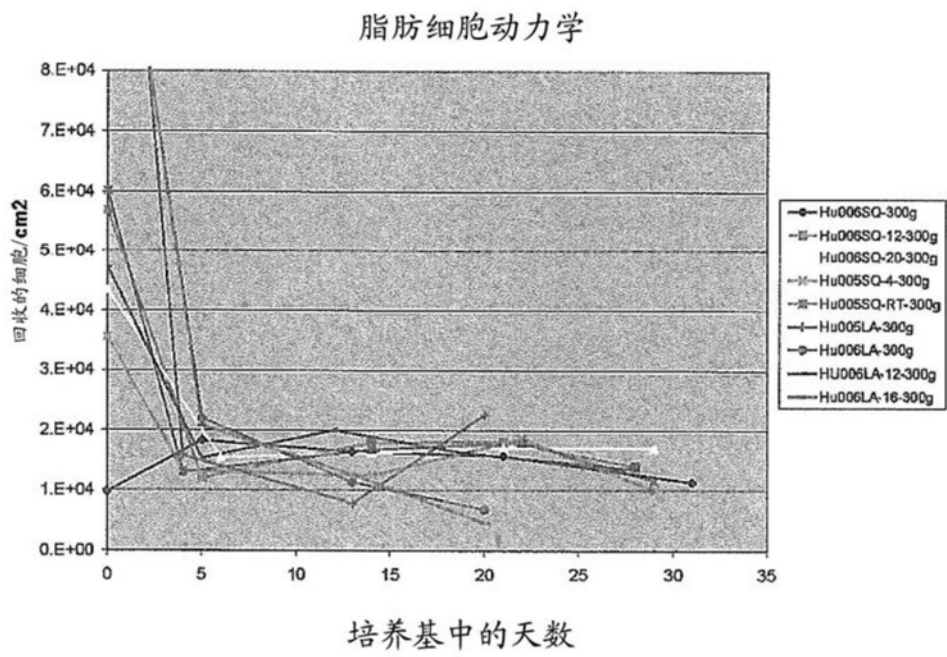


图 22

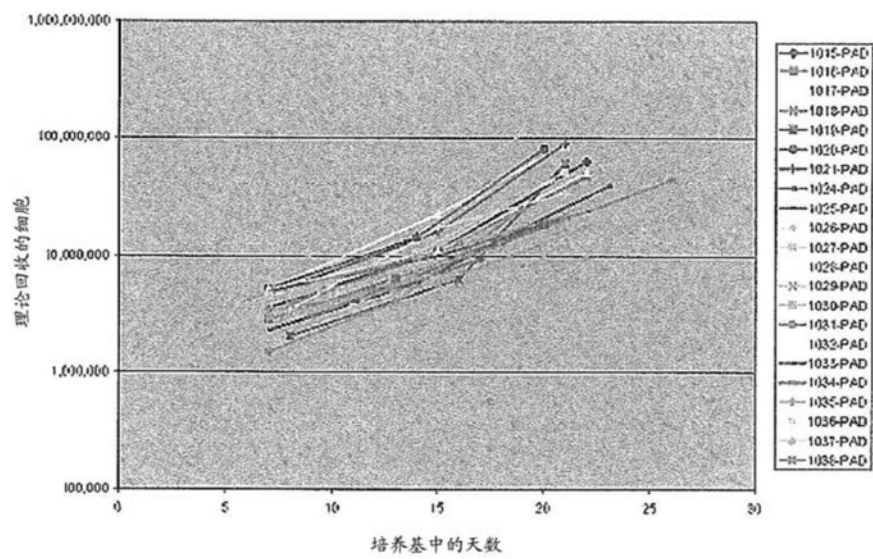


图 23A

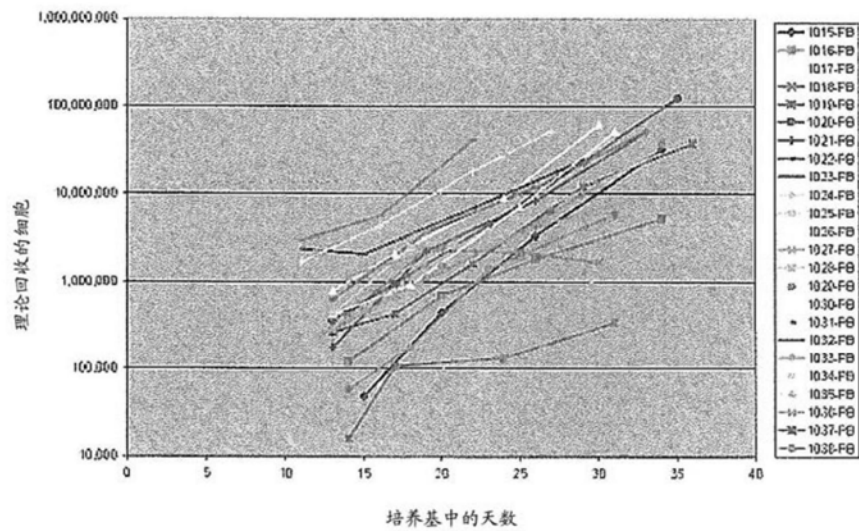


图 23B

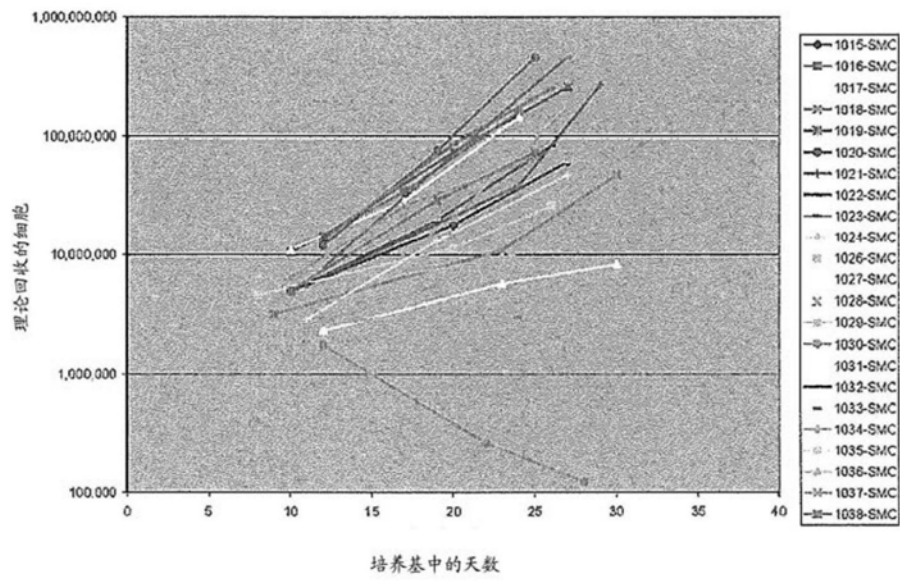


图 23C

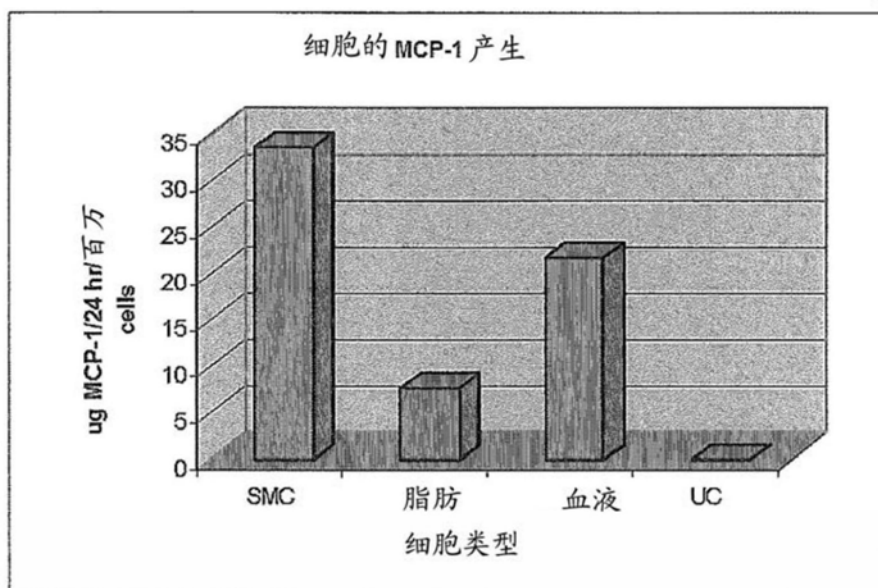


图 24

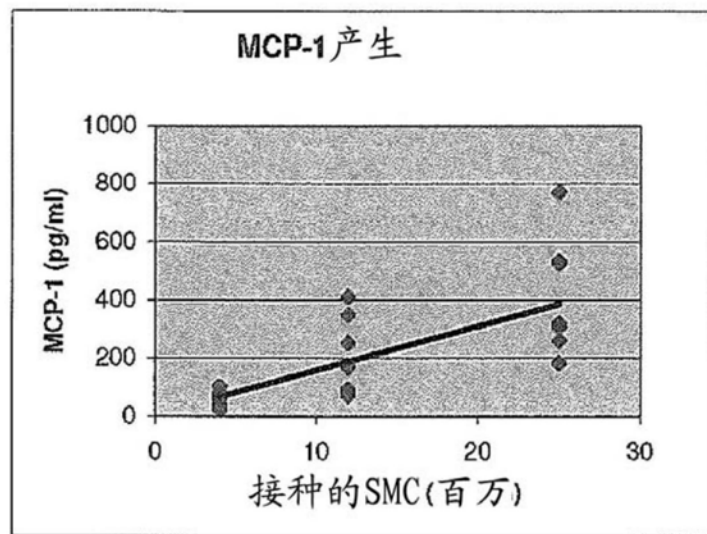


图 25

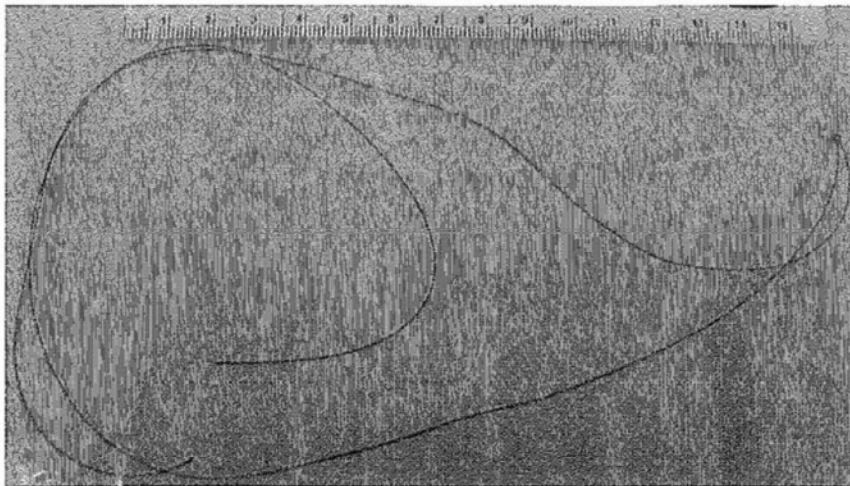


图 26

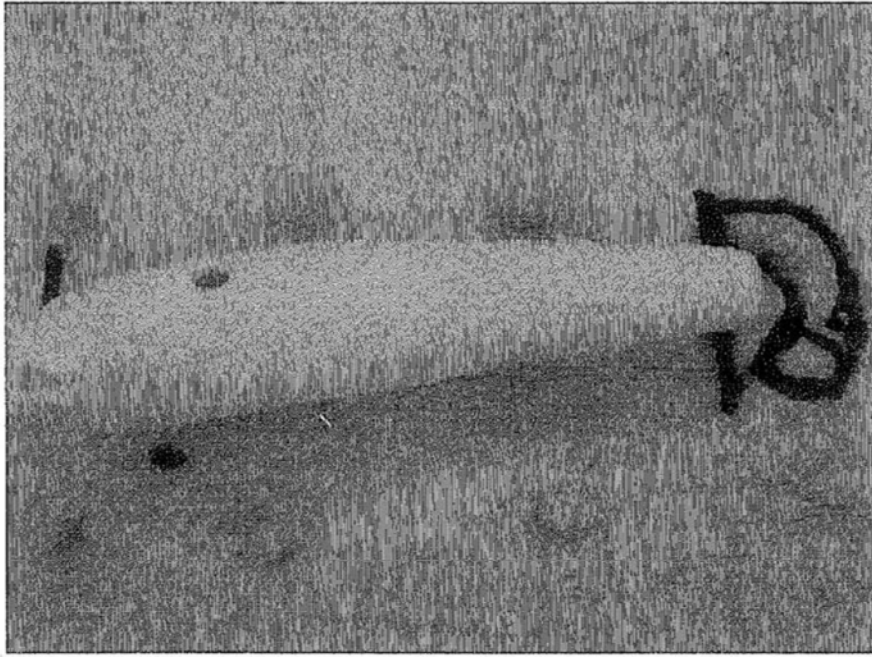


图 27

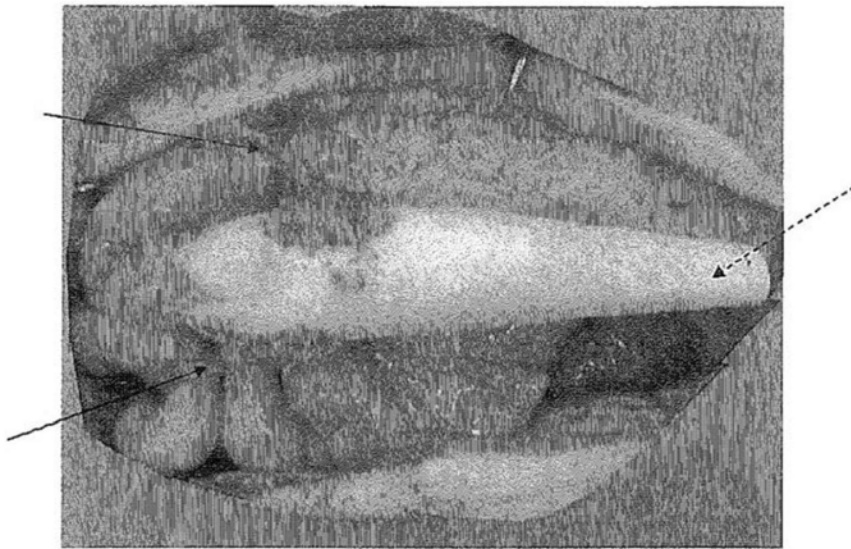


图 28



图 29



图 30

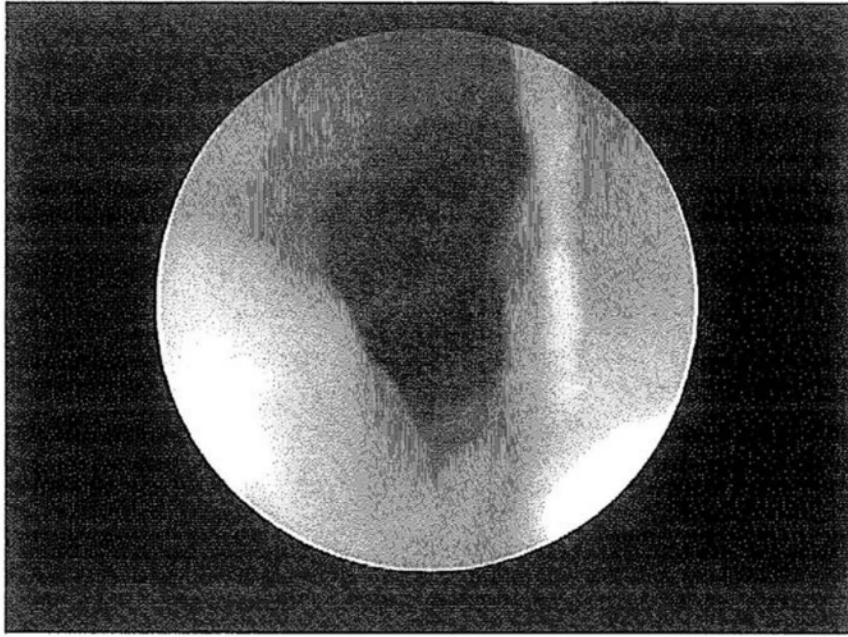


图 31

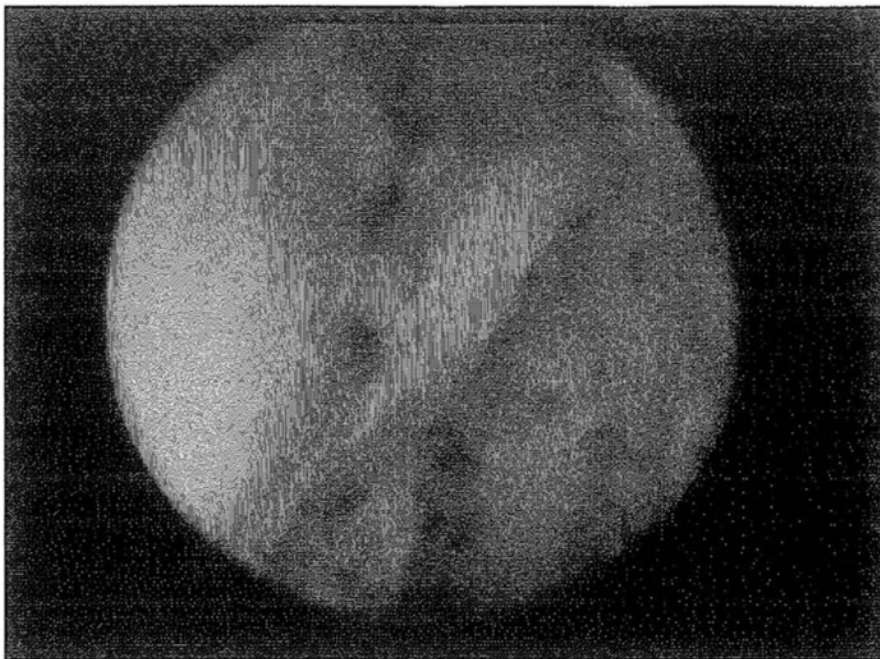


图 32

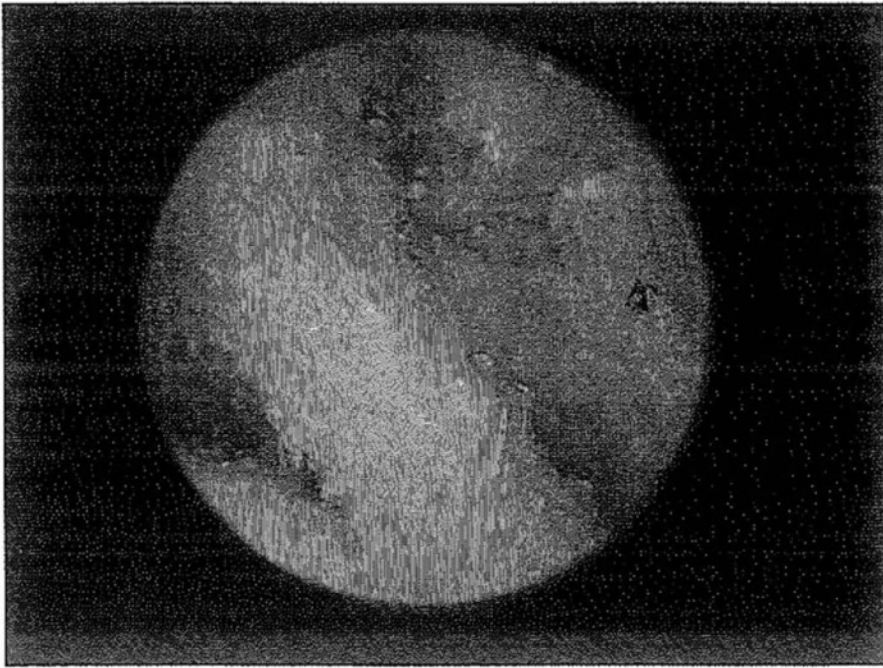


图 33

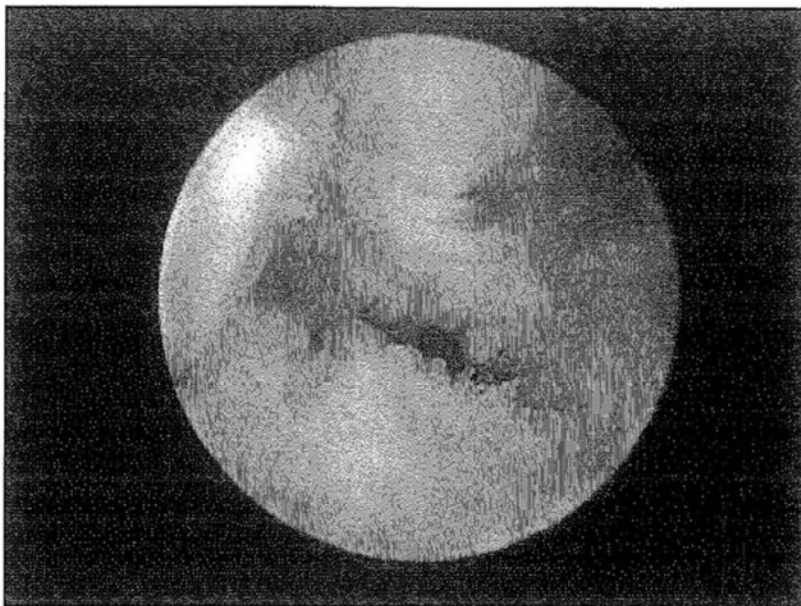


图 34

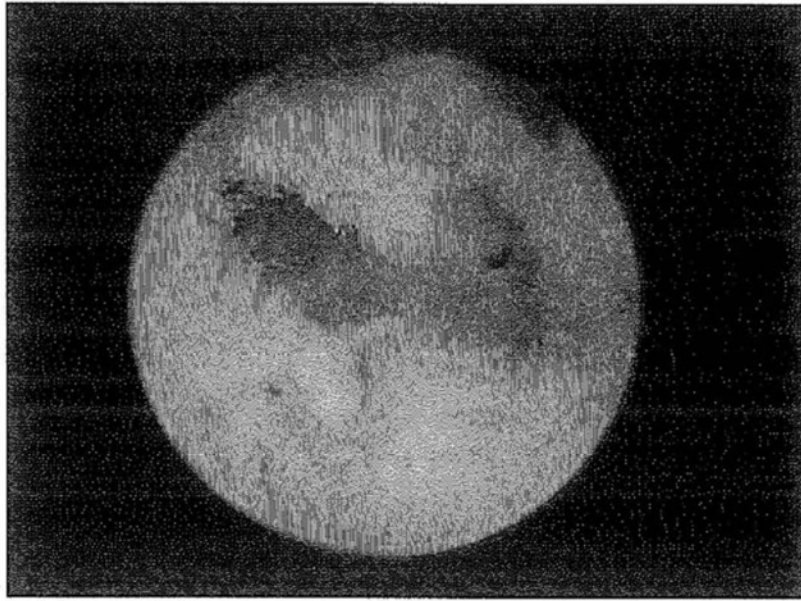


图 35

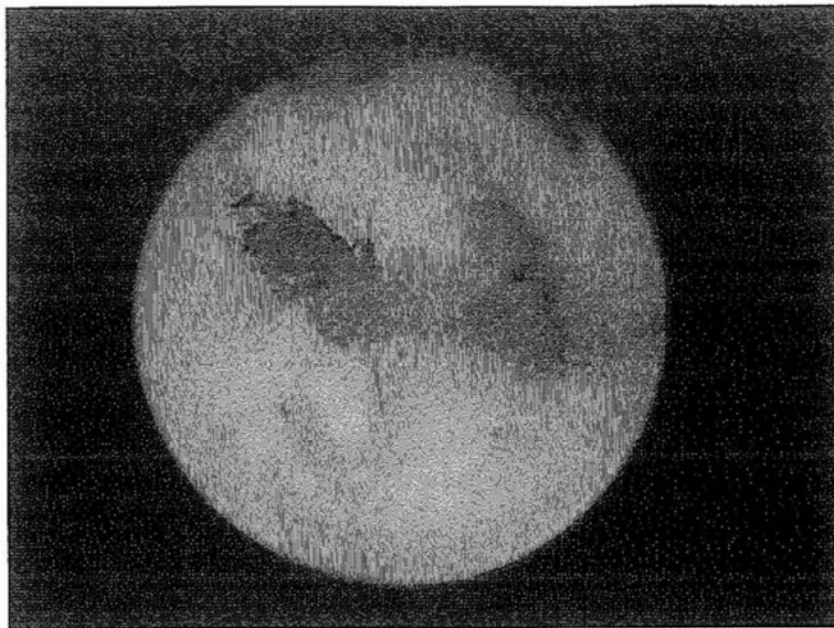


图 36

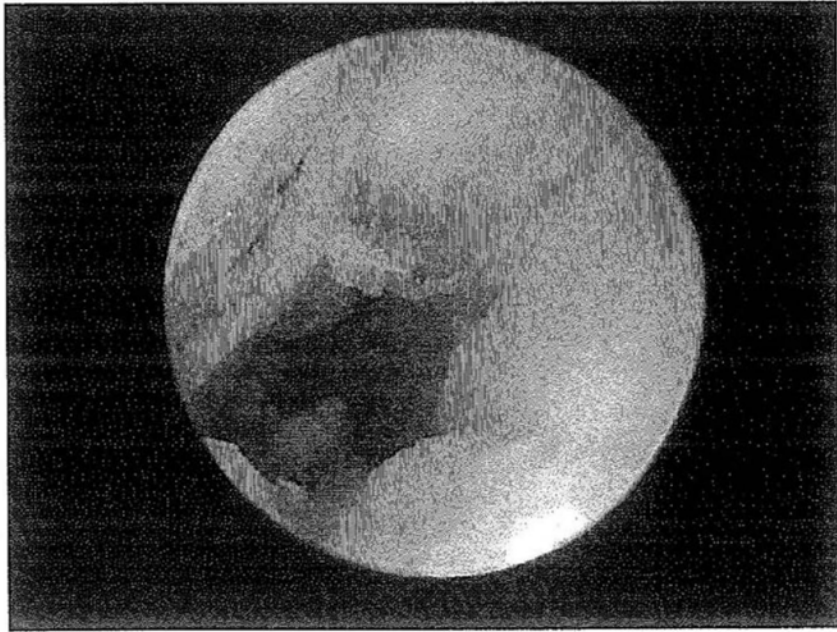


图 37

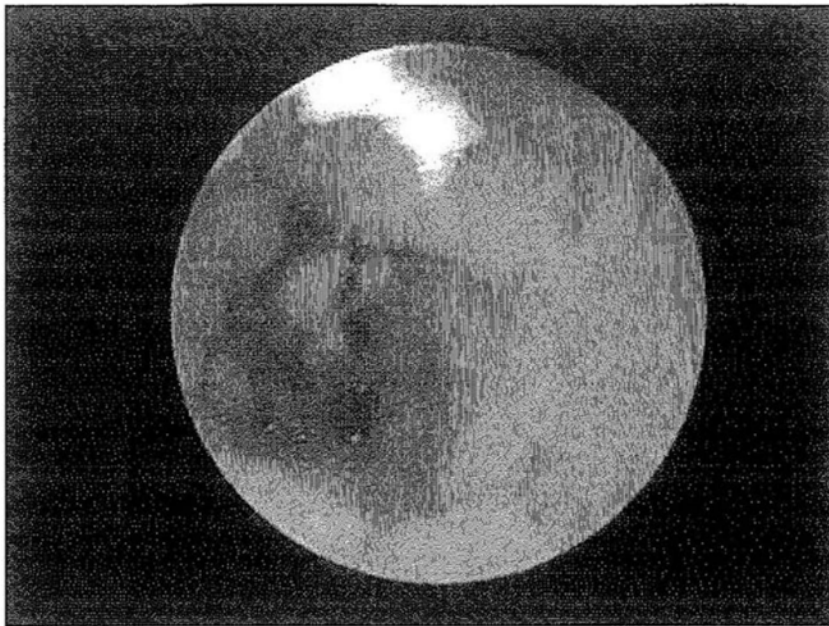


图 38

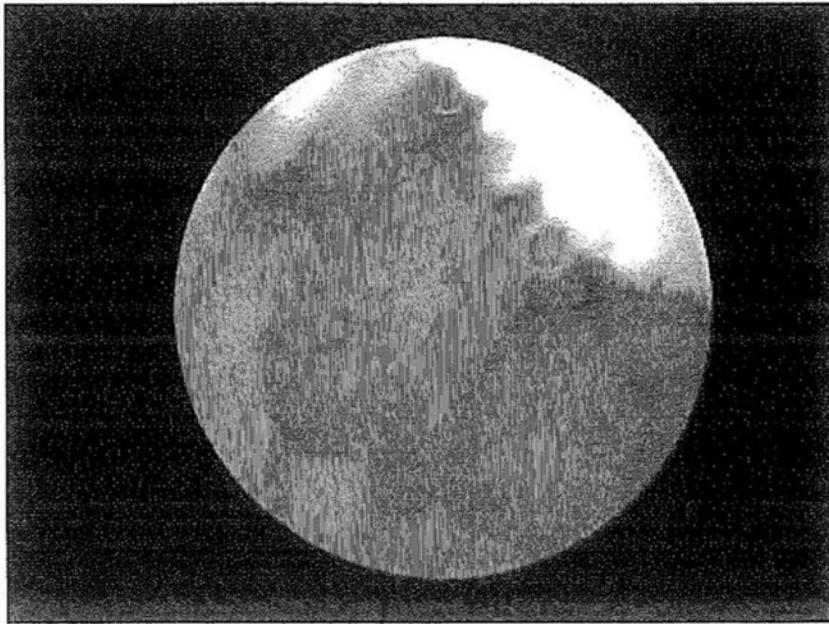


图 39

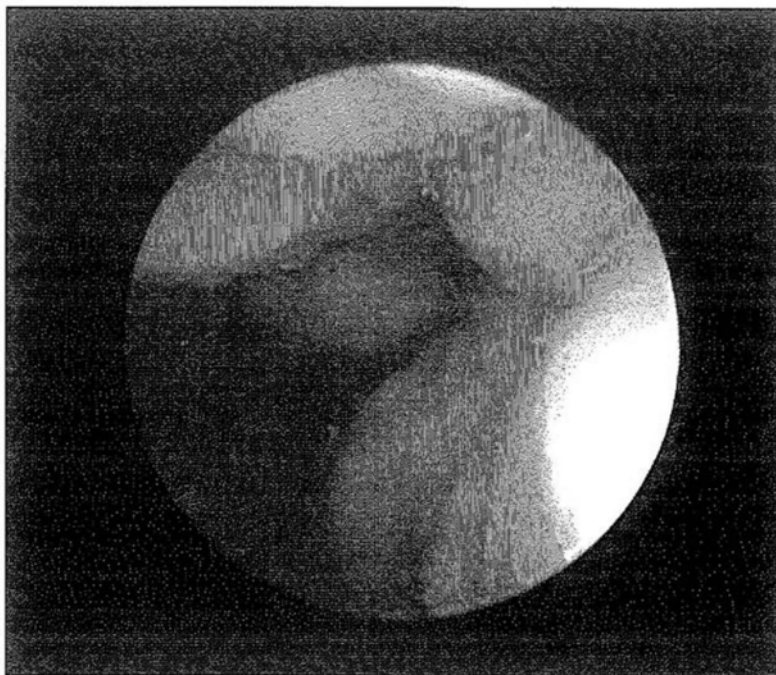


图 40

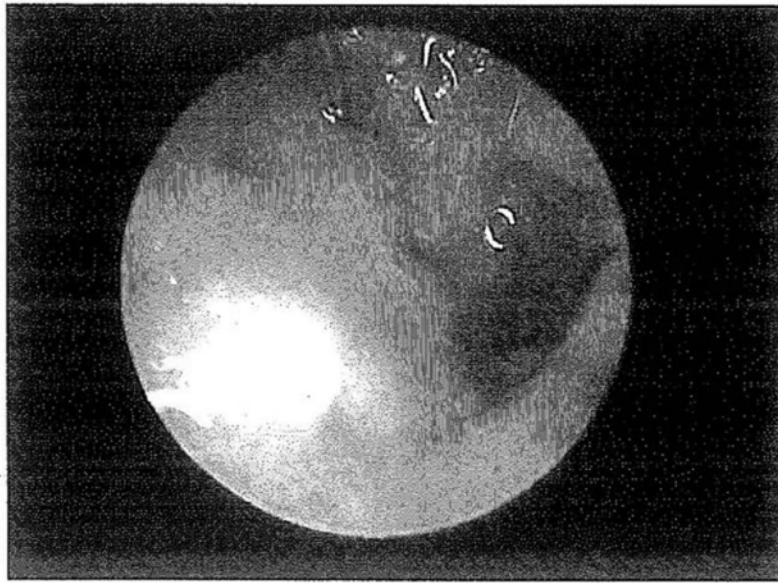


图 41

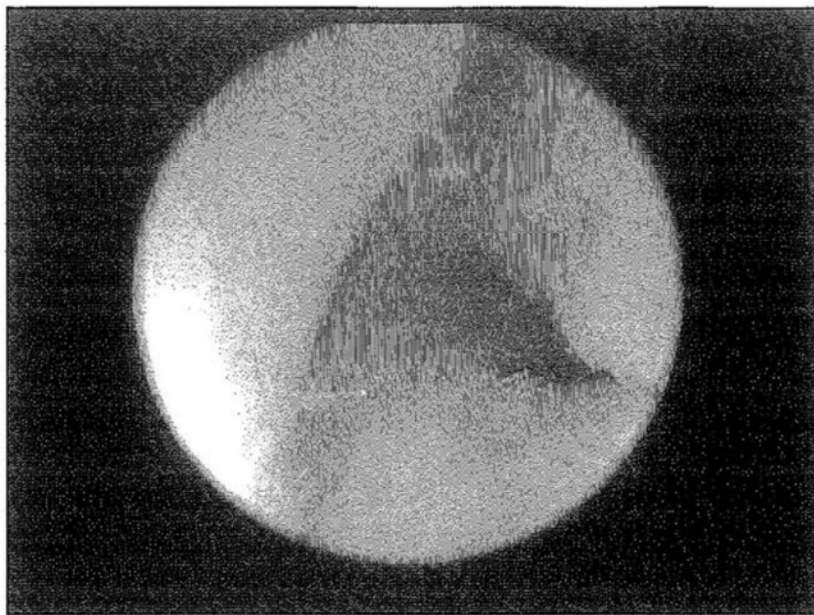


图 42

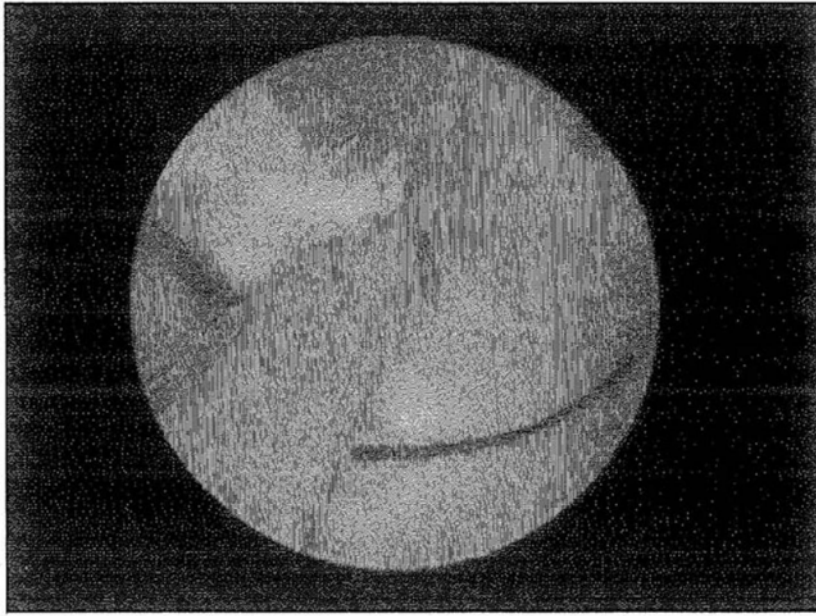


图 43

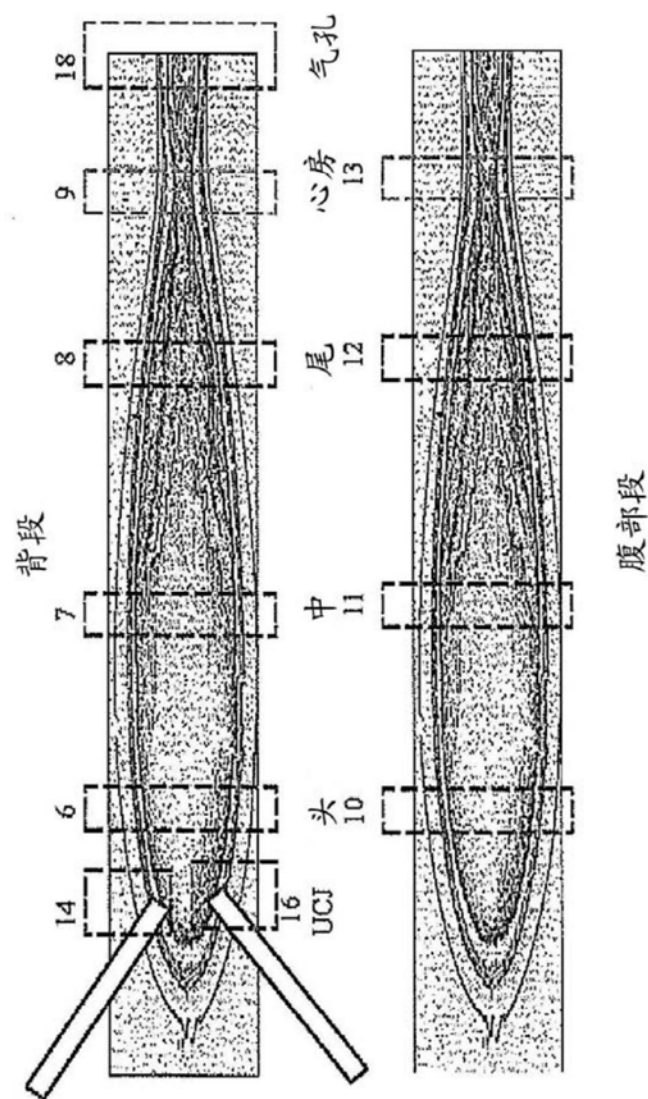


图 44

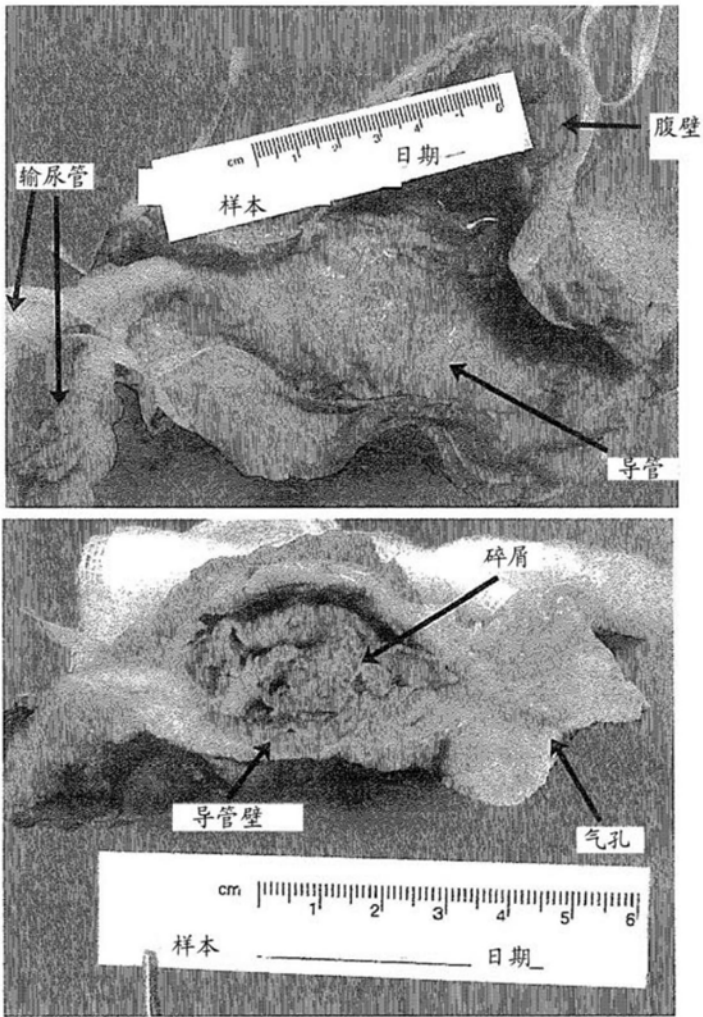


图 45

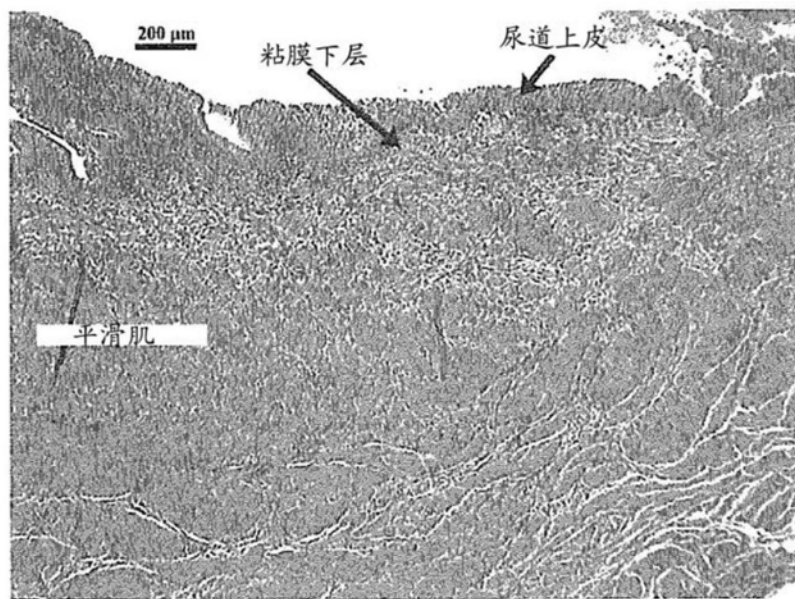


图 46

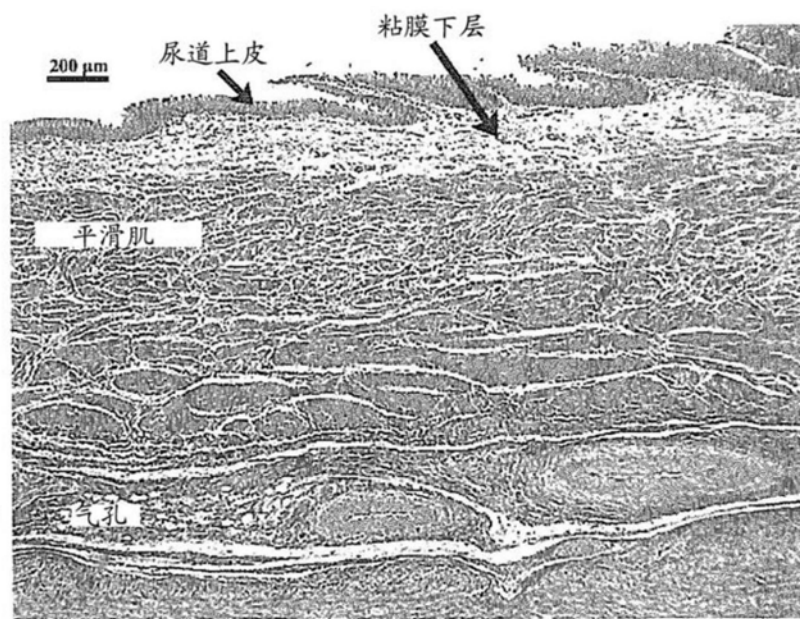


图 47

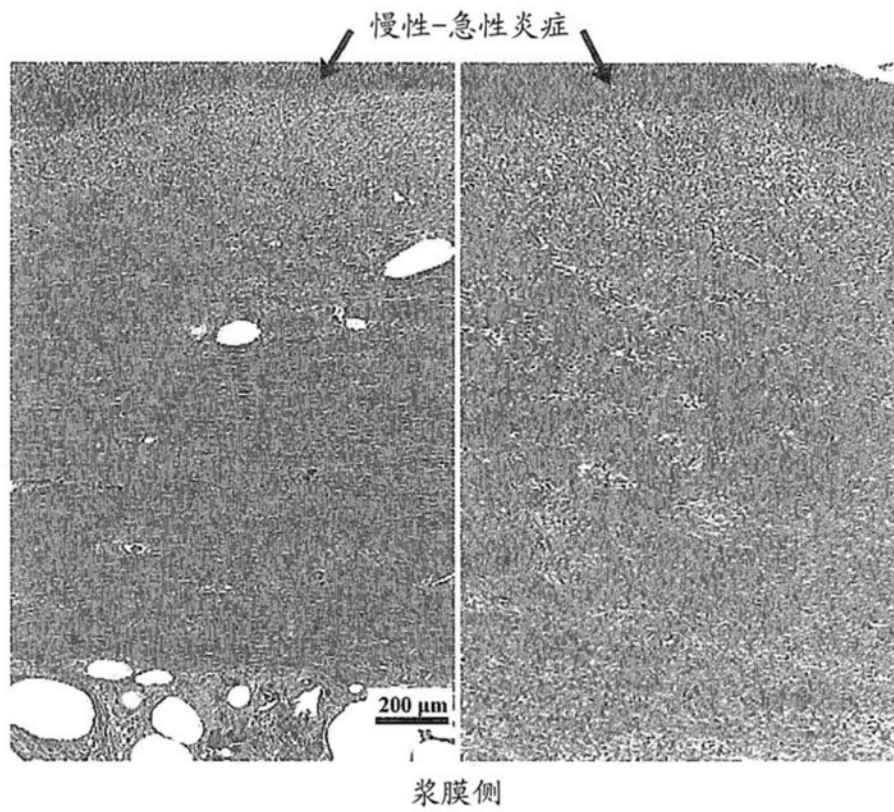


图 48

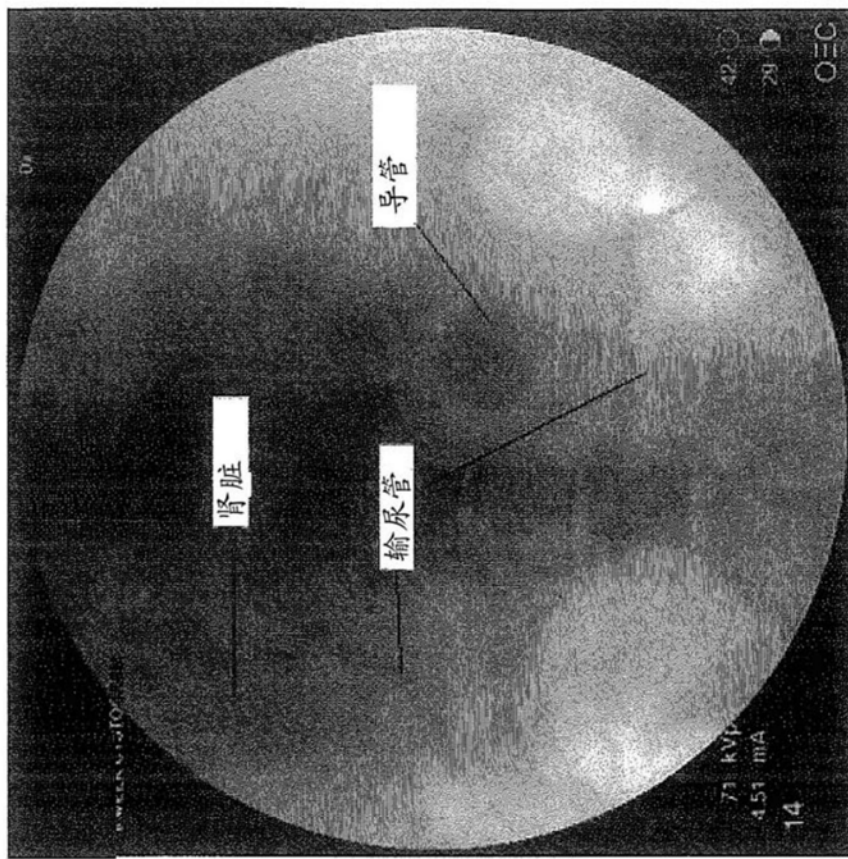


图 49A

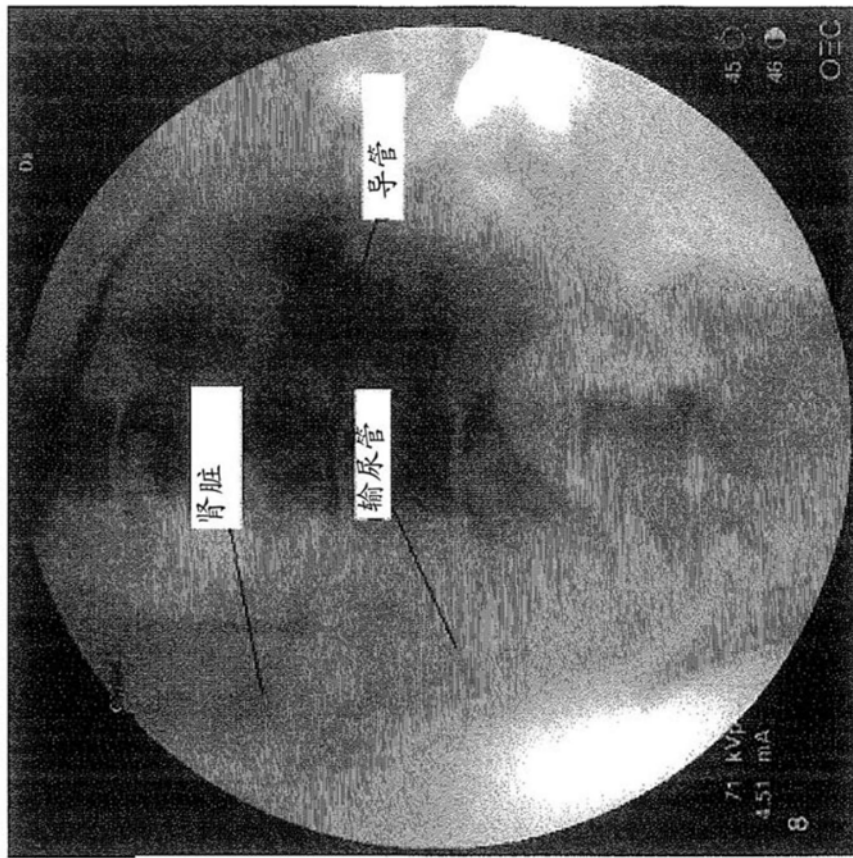


图 49B

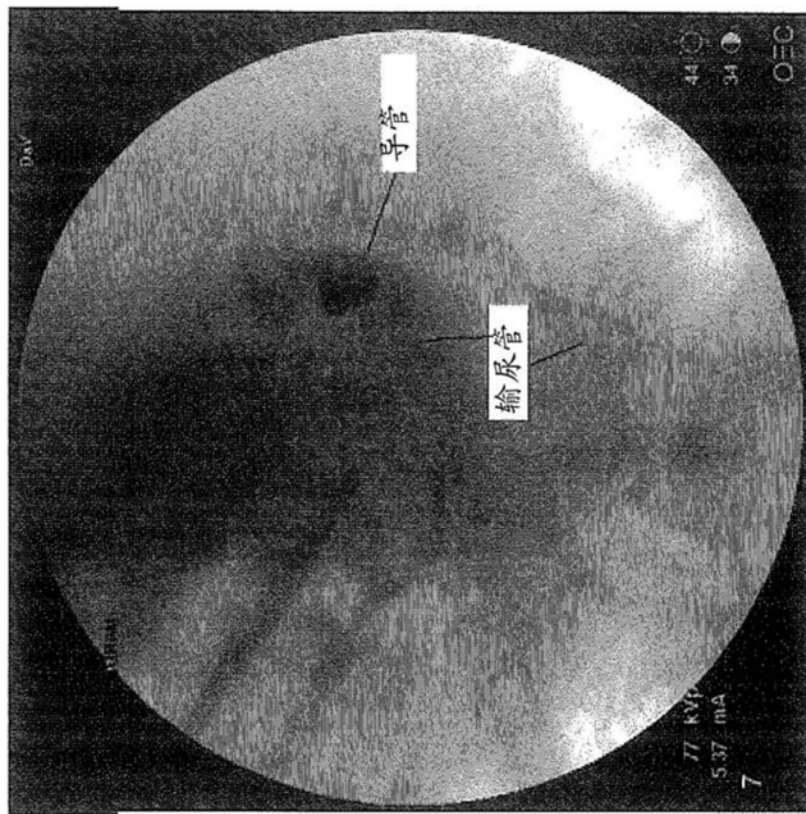


图 50A

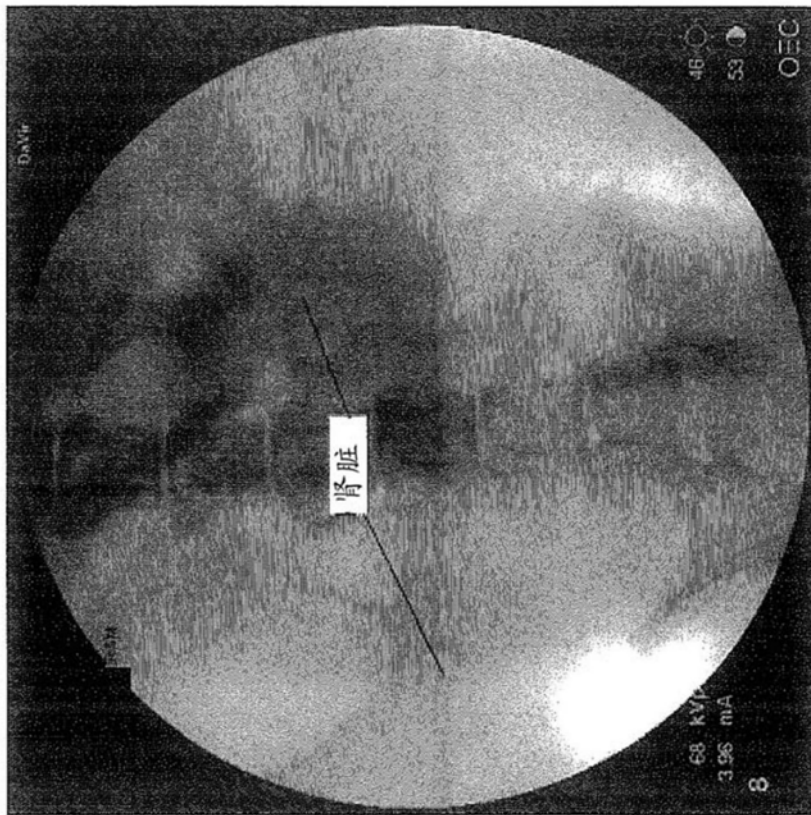


图 50B

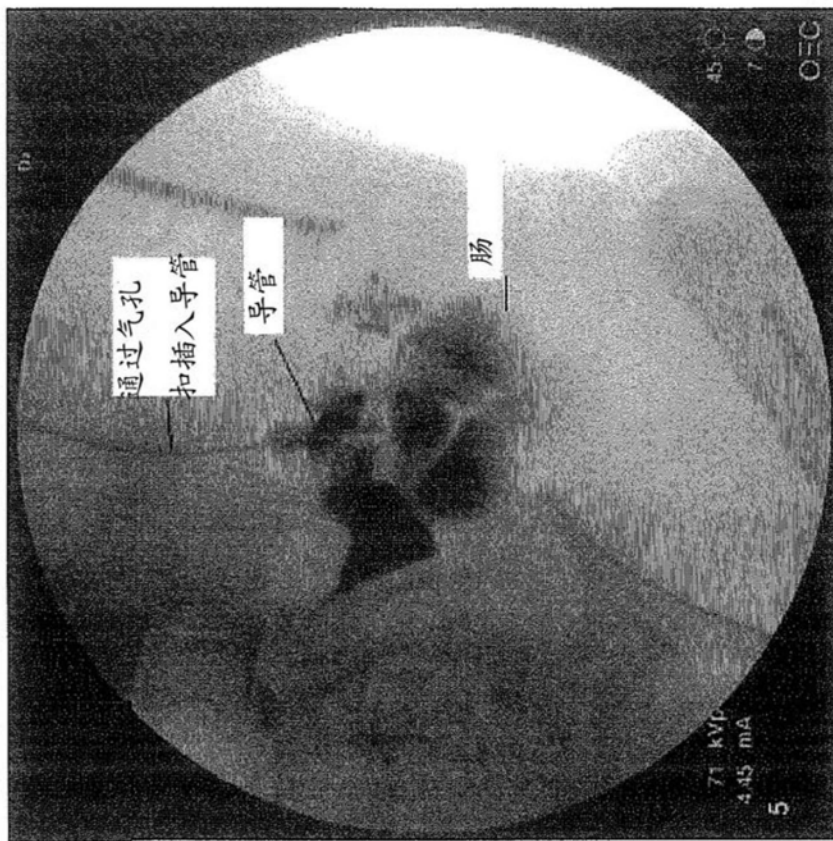


图 51

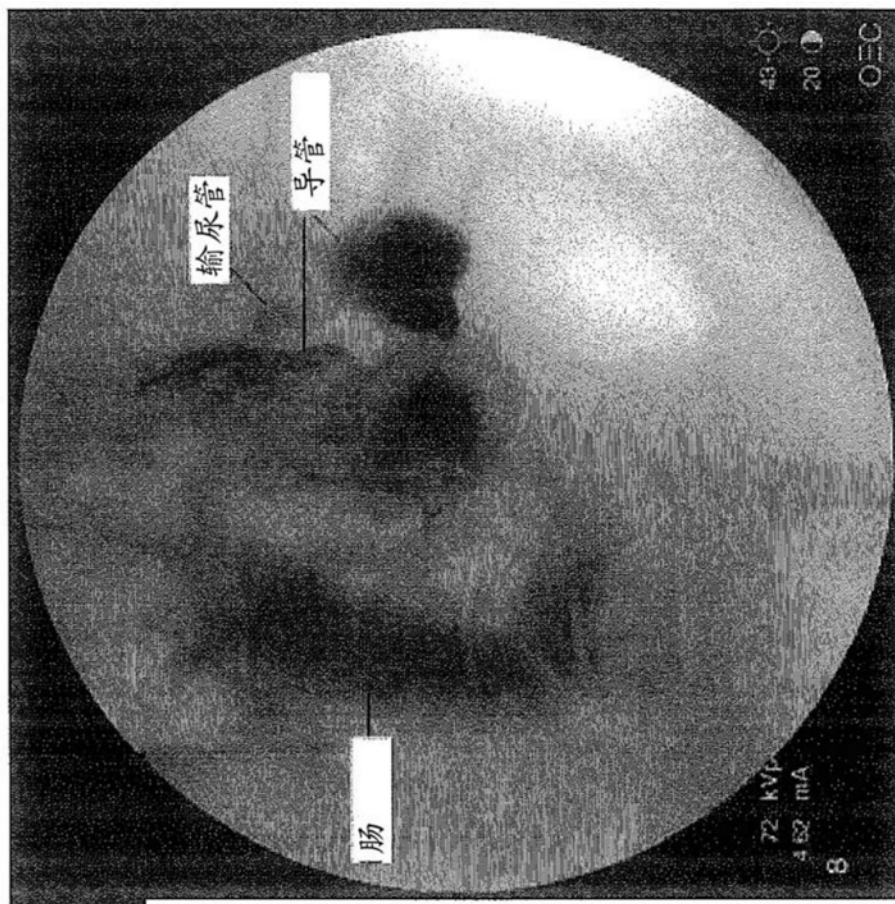


图 52

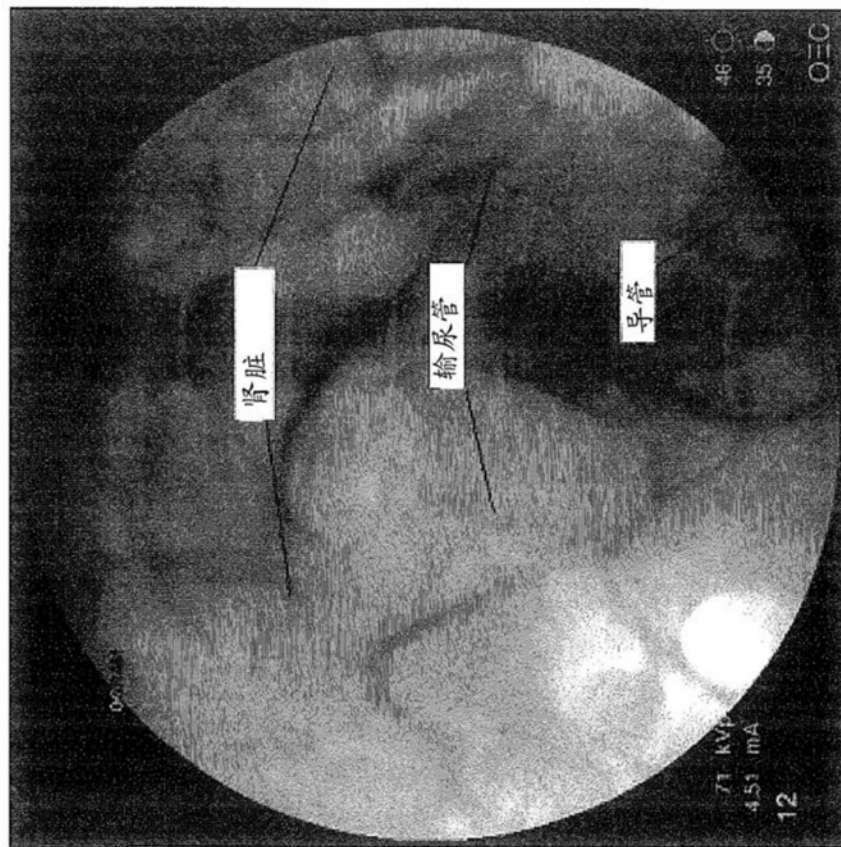


图 53

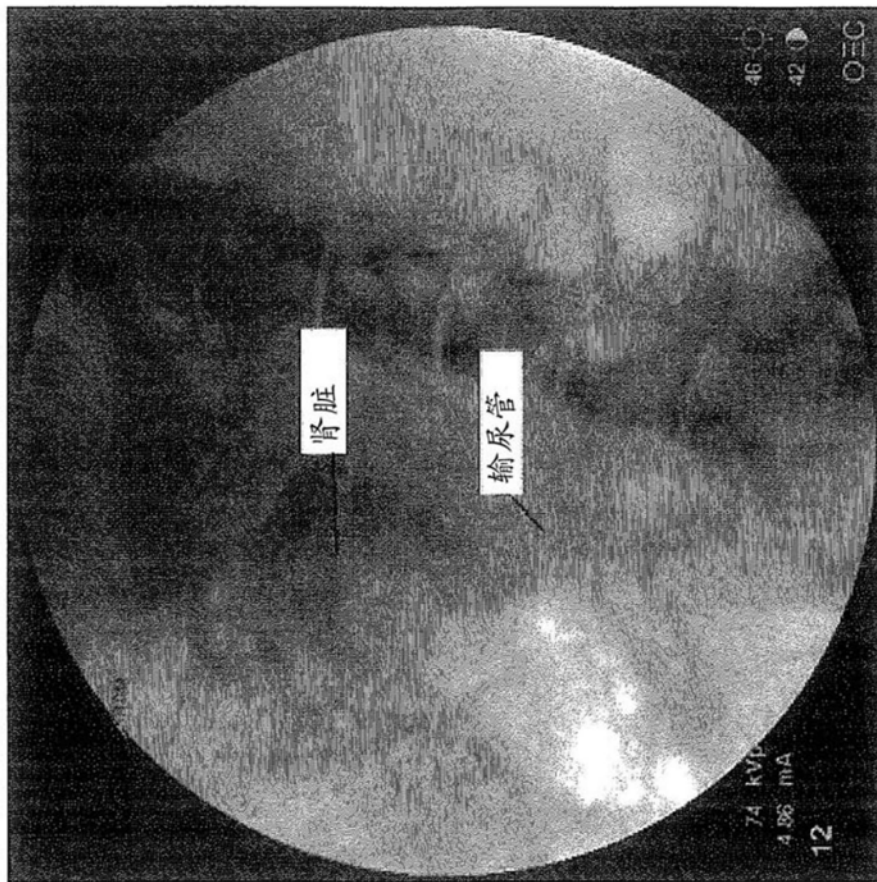


图 54

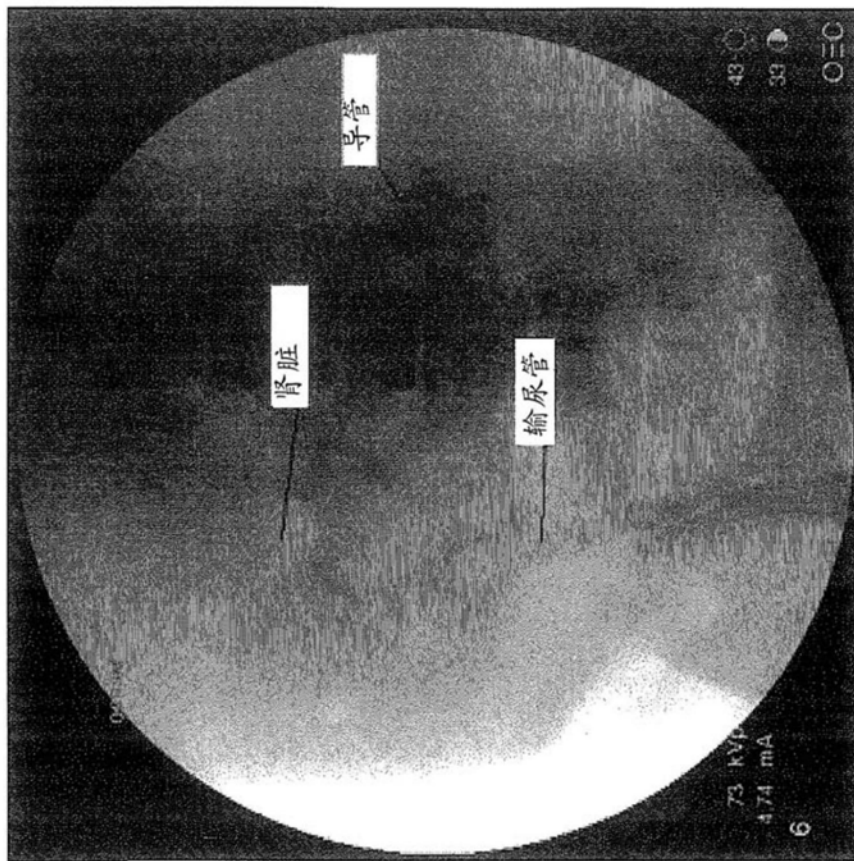


图 55A

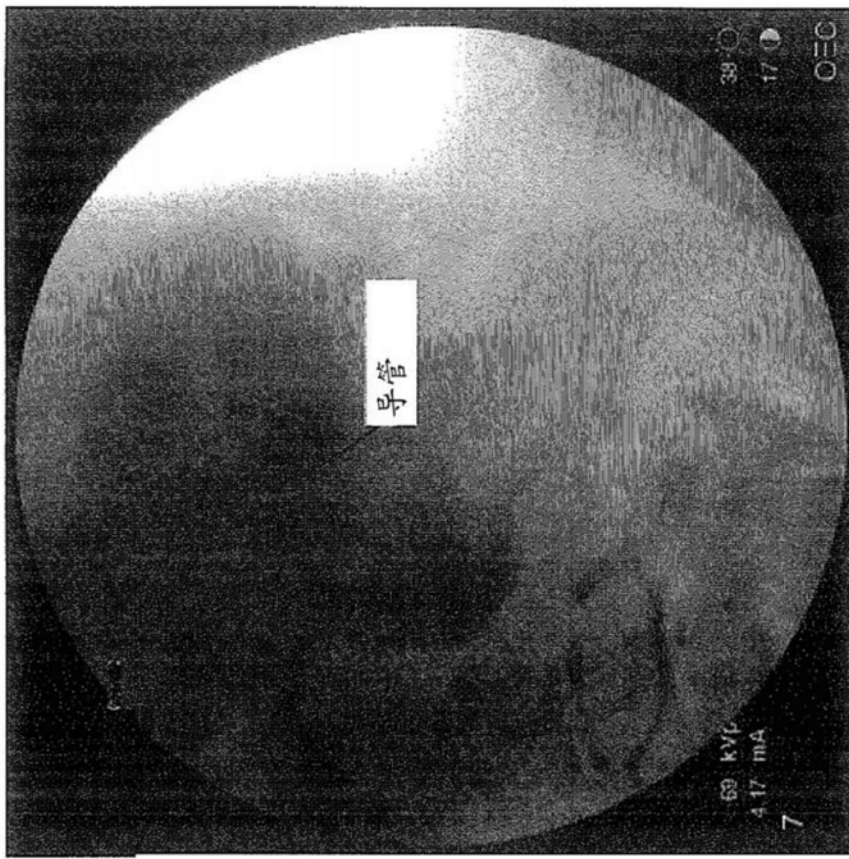


图 55B

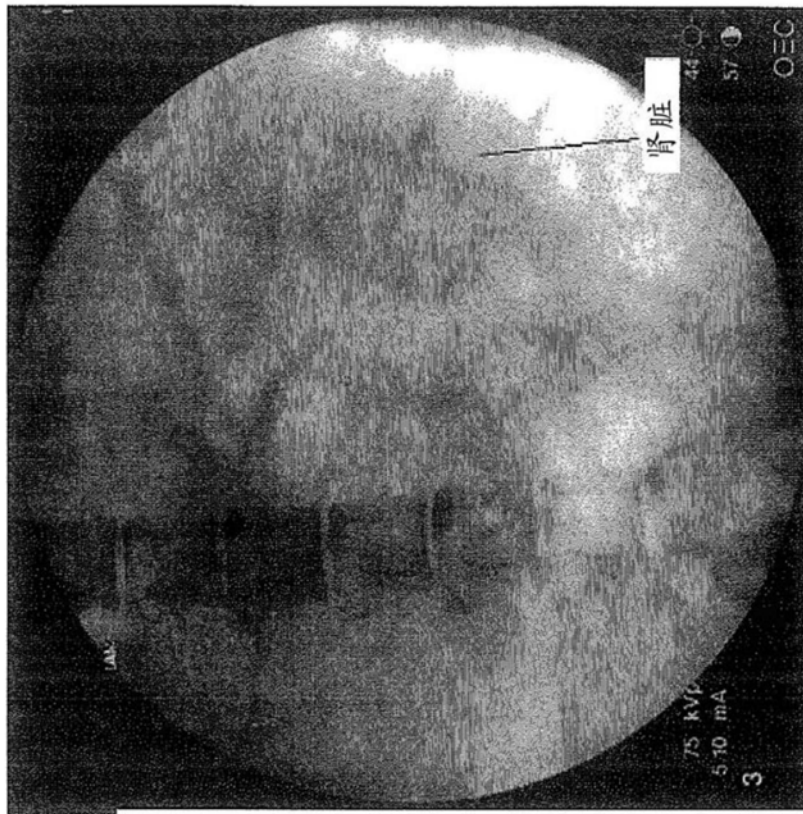


图 56A



图 56B

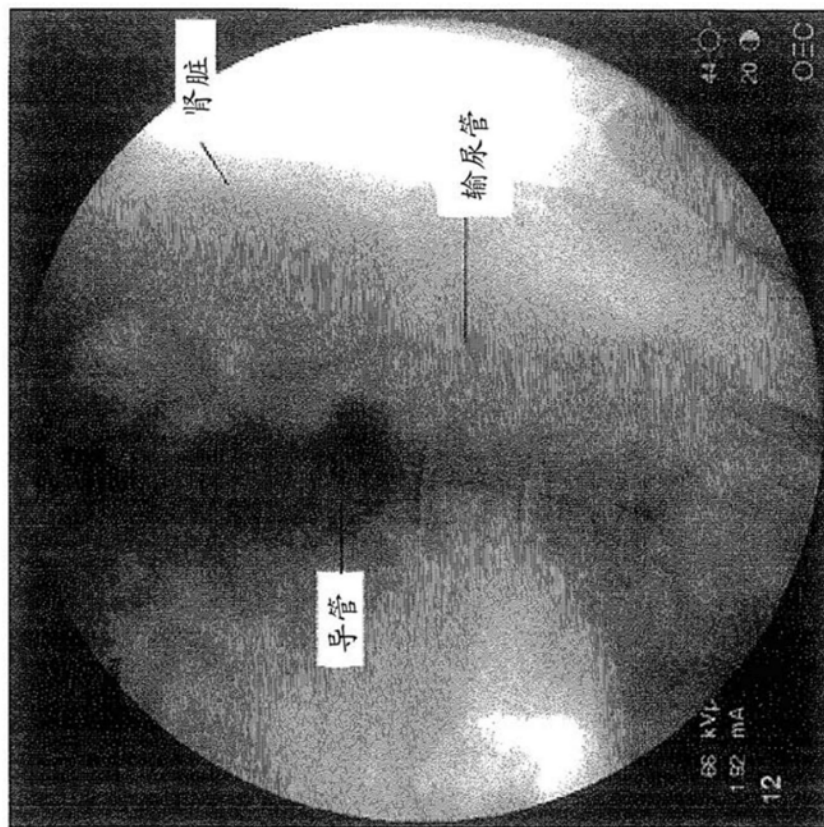


图 57A

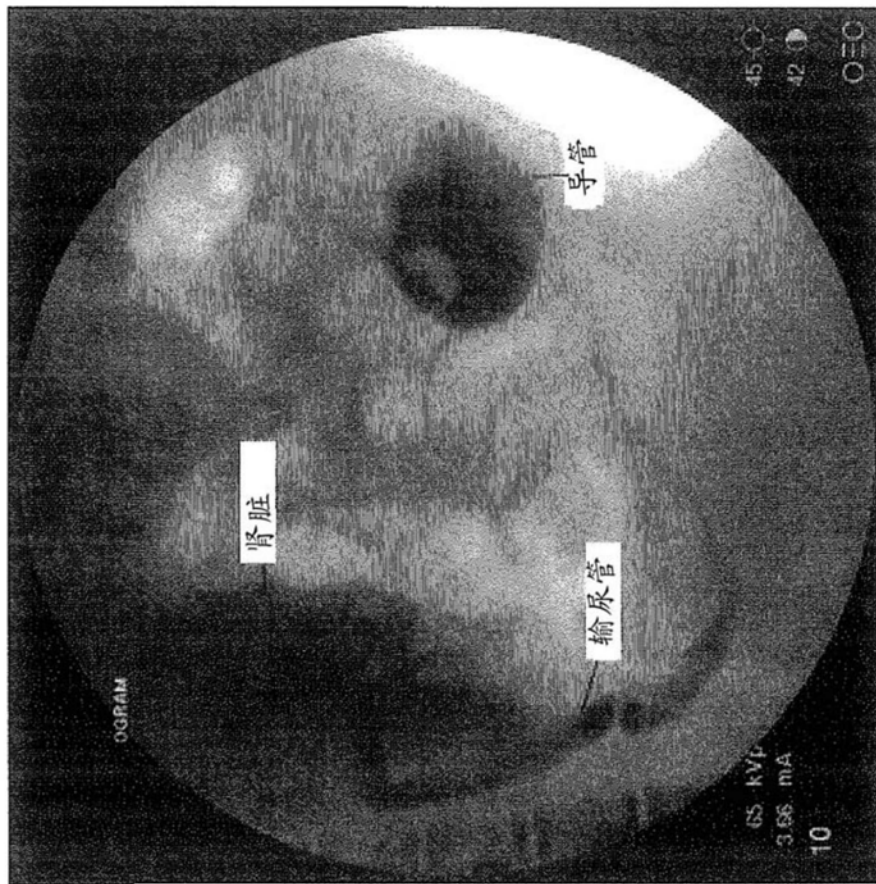


图 57B

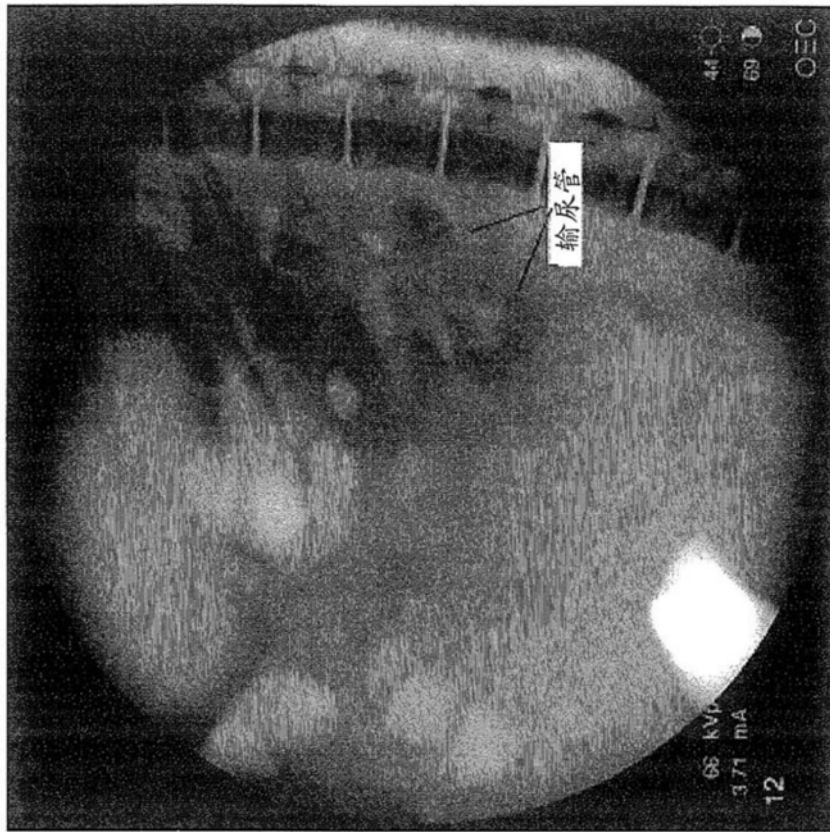


图 58A

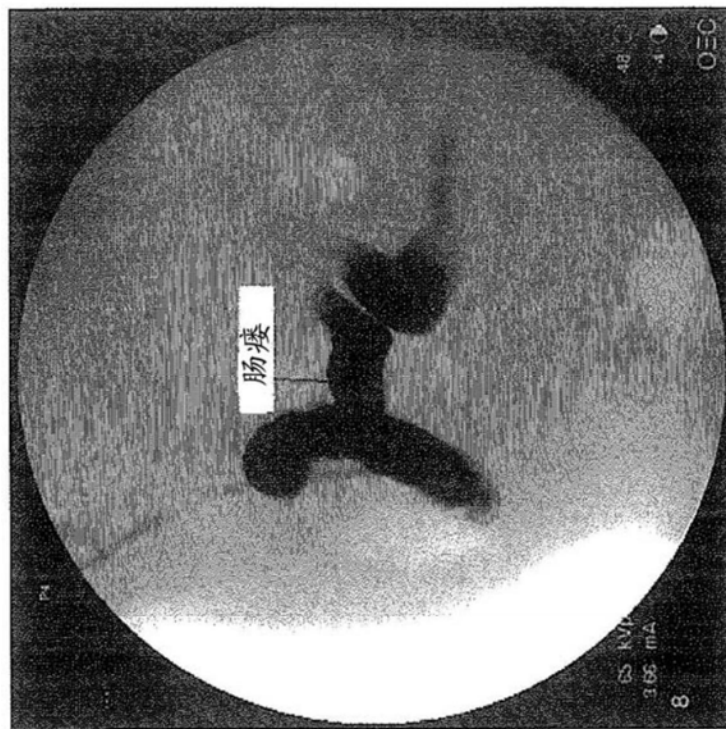


图 58B

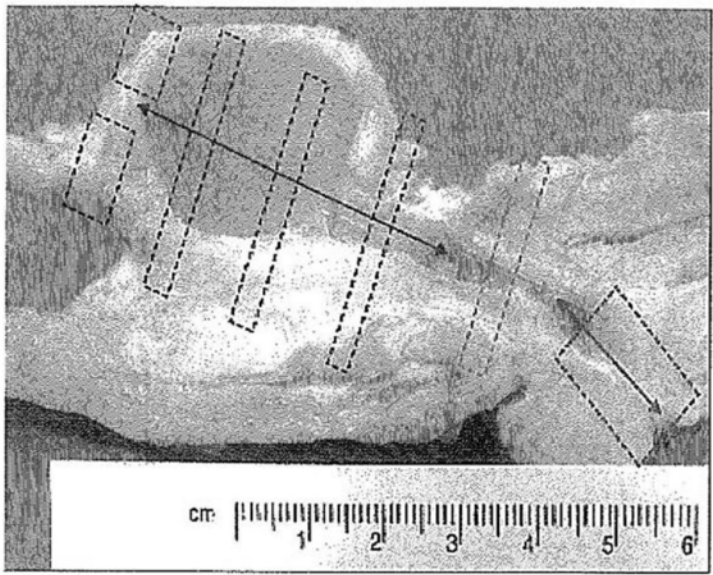


图 59A

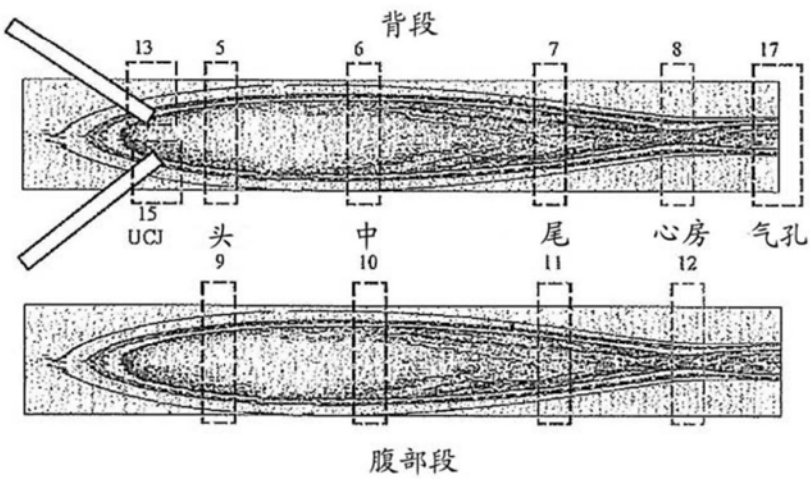


图 59B

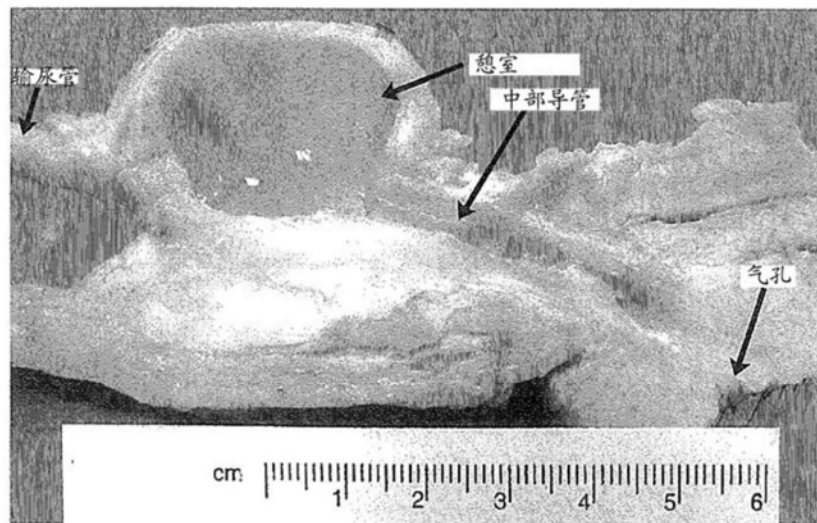


图 59C

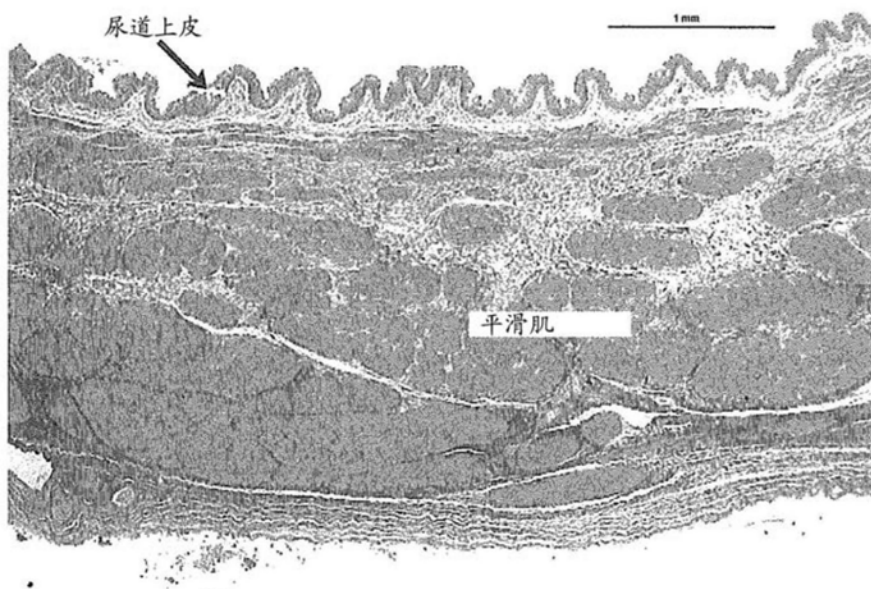


图 60

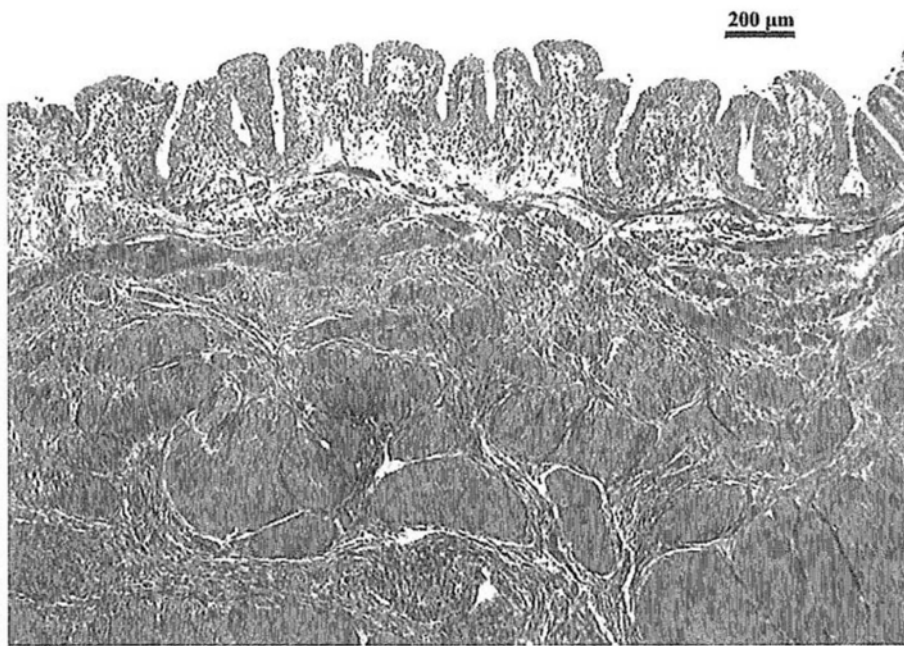


图 61

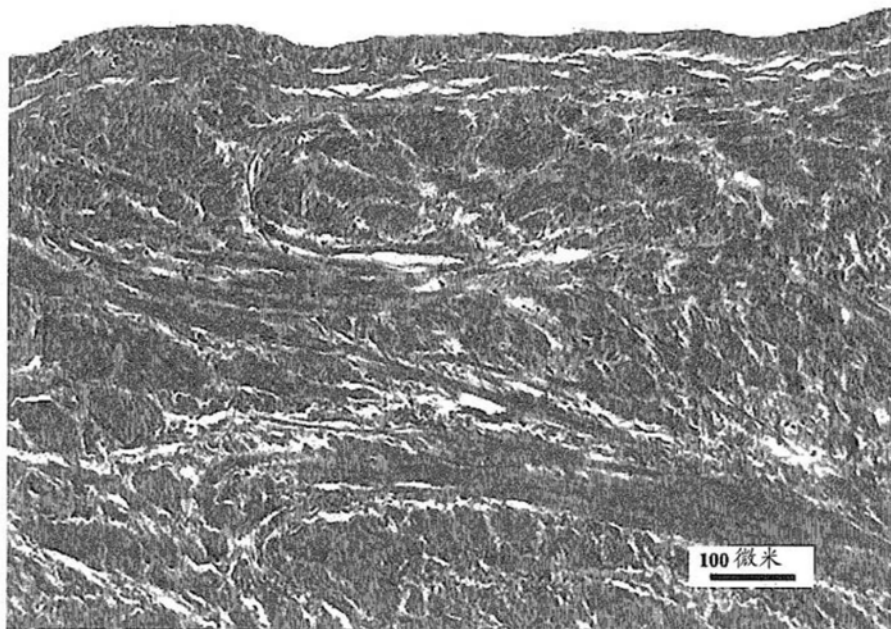


图 62

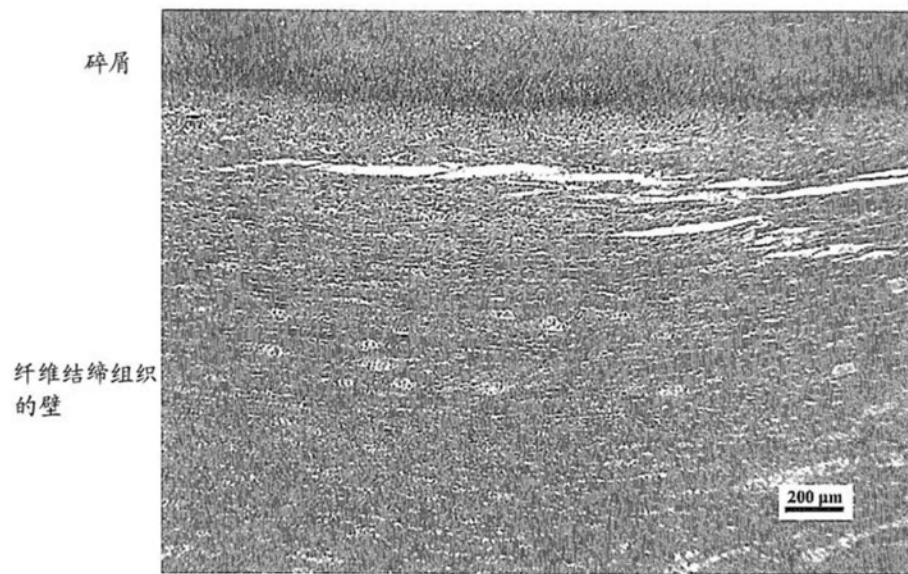


图 63

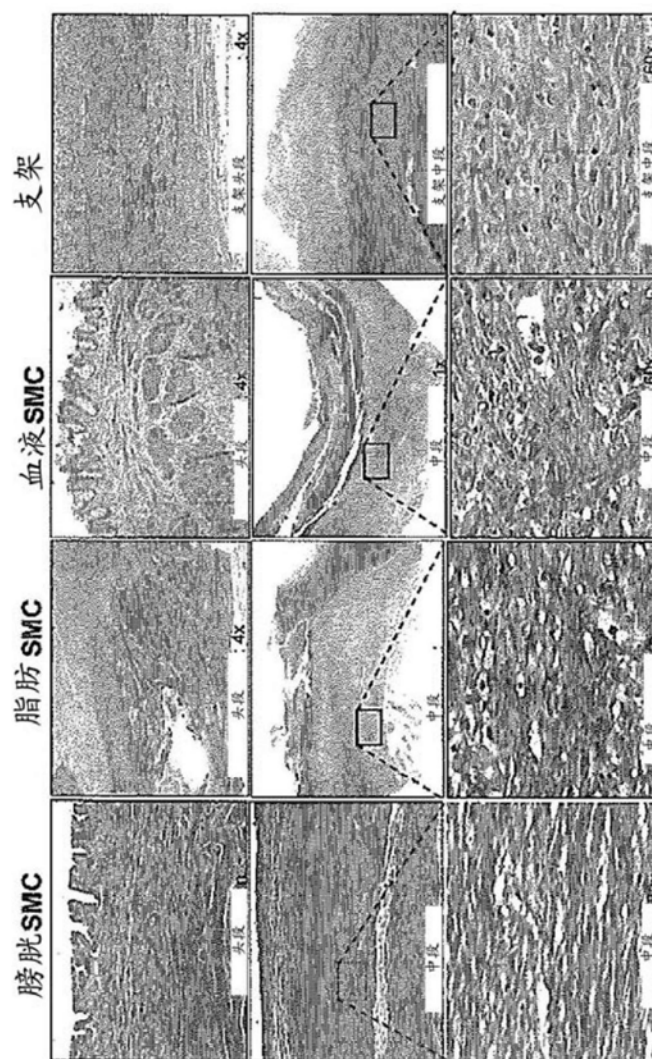


图 64

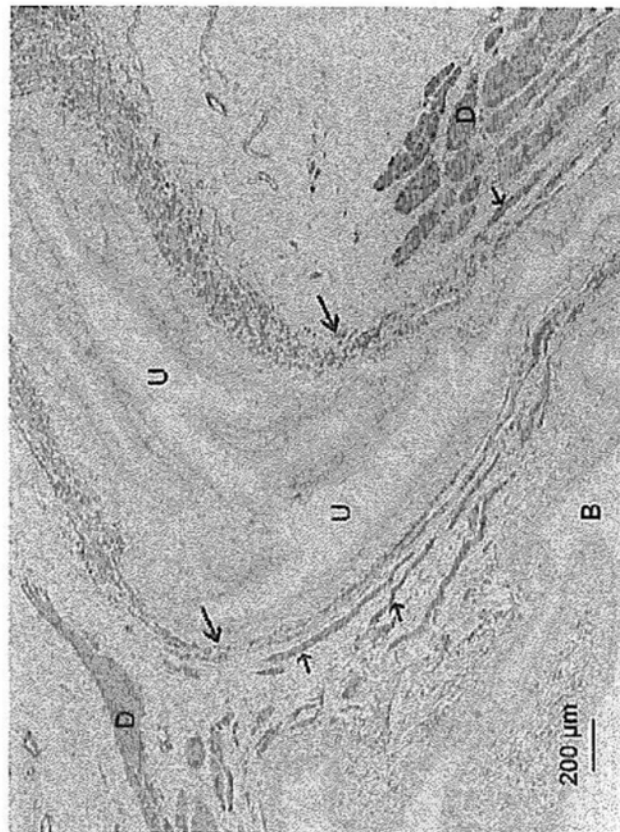


图 65



图 66

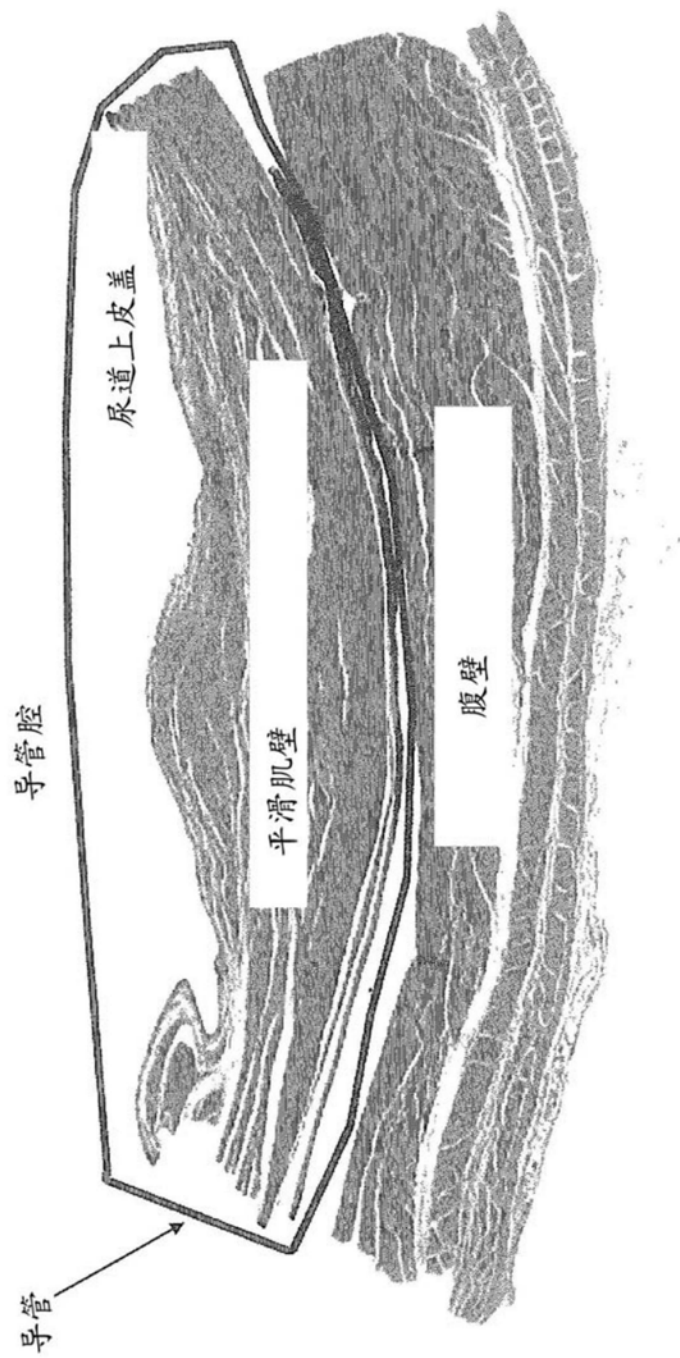


图 67

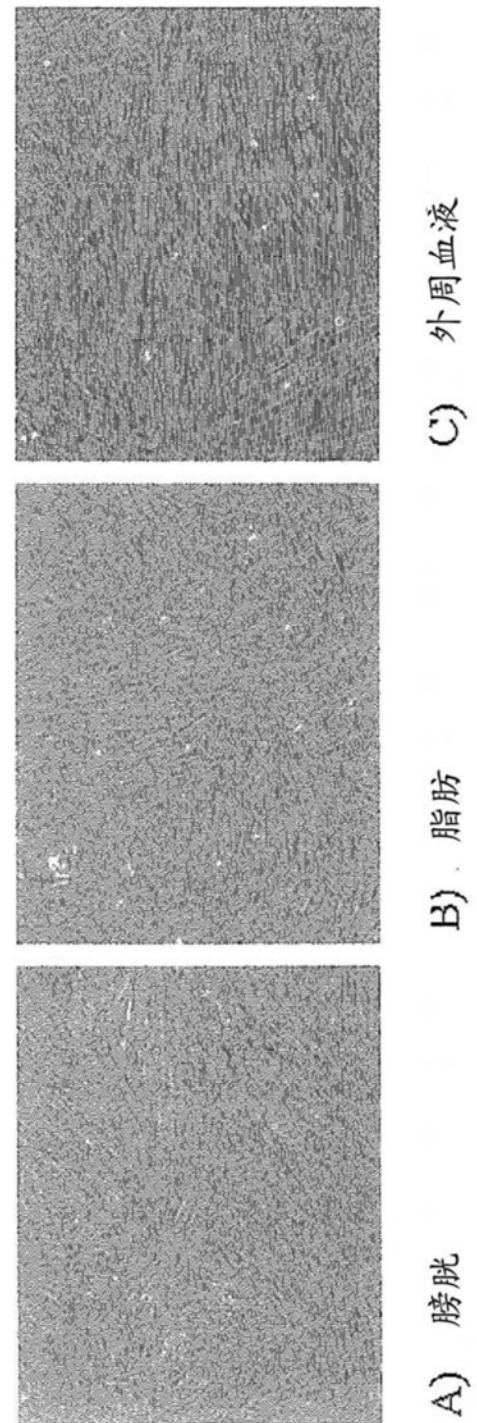


图 68 :来自猪的膀胱、脂肪和外周血液的平滑肌细胞的分离

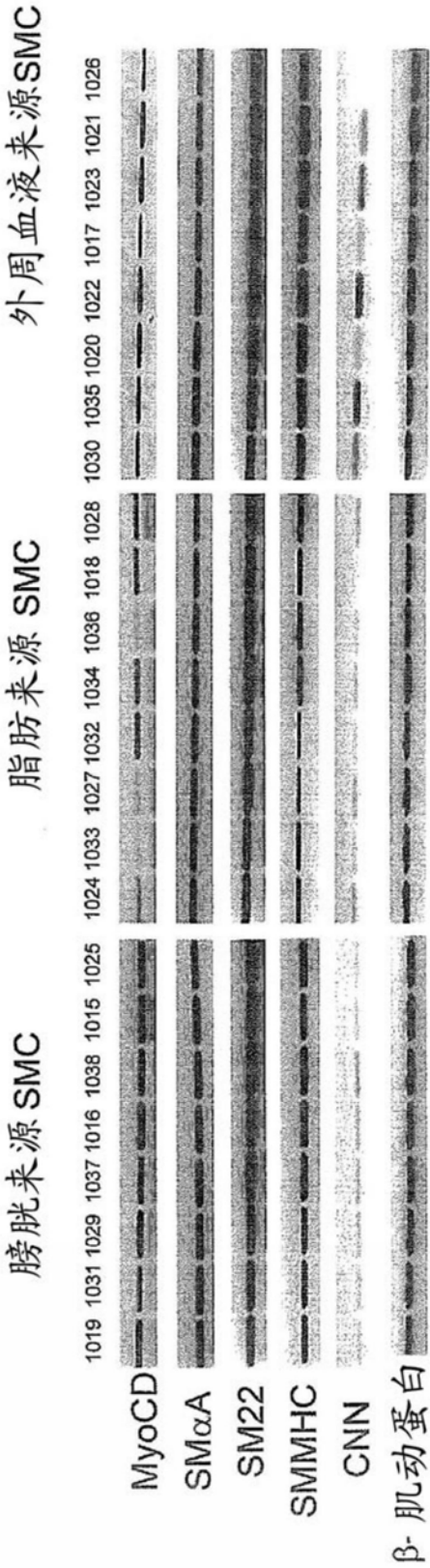


图 69 :膀胱来源、外周血液来源或脂肪来源的平滑肌细胞的平滑肌细胞标记物的表达的 RT-PCR 分析

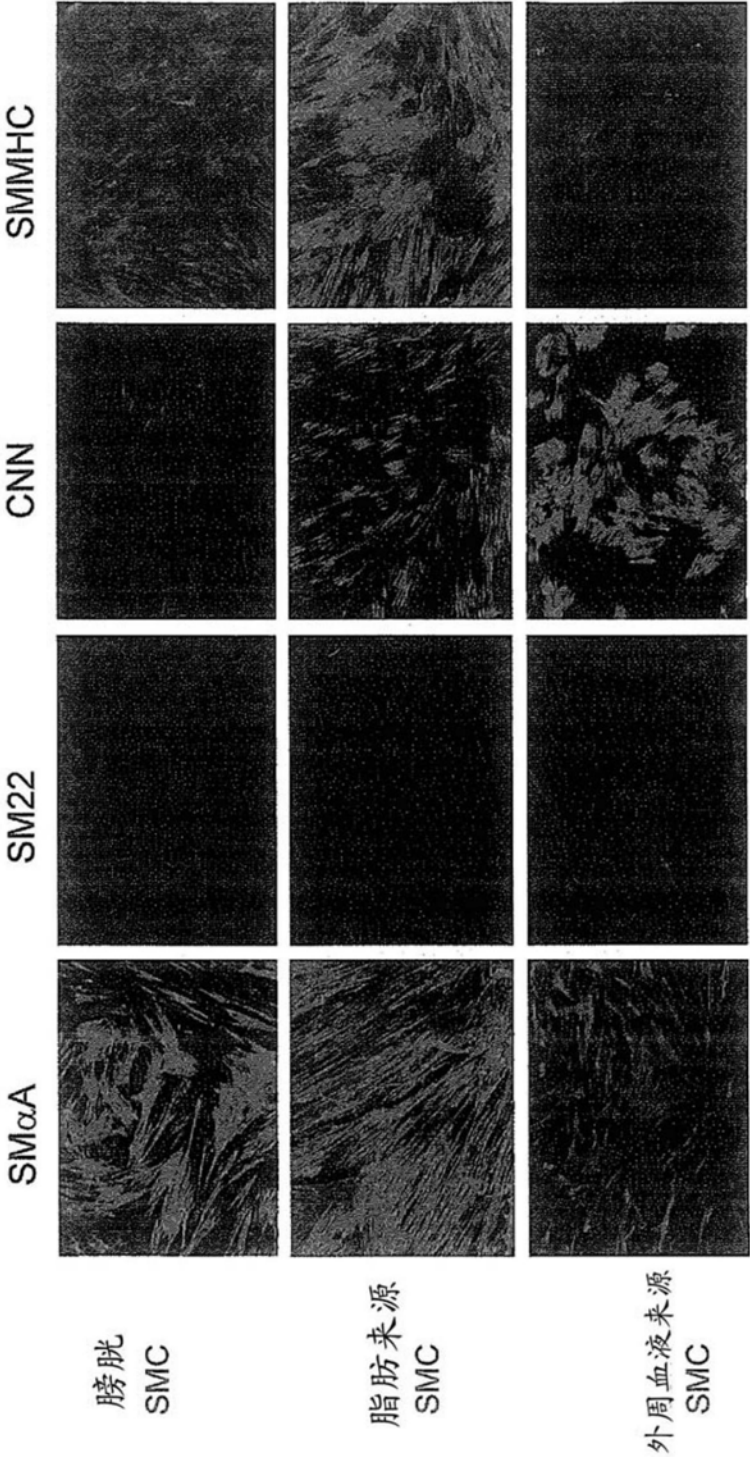


图 70 :猪的膀胱来源、脂肪来源和外周血液来源的平滑肌细胞的平滑肌标记物表达的免疫荧光分析

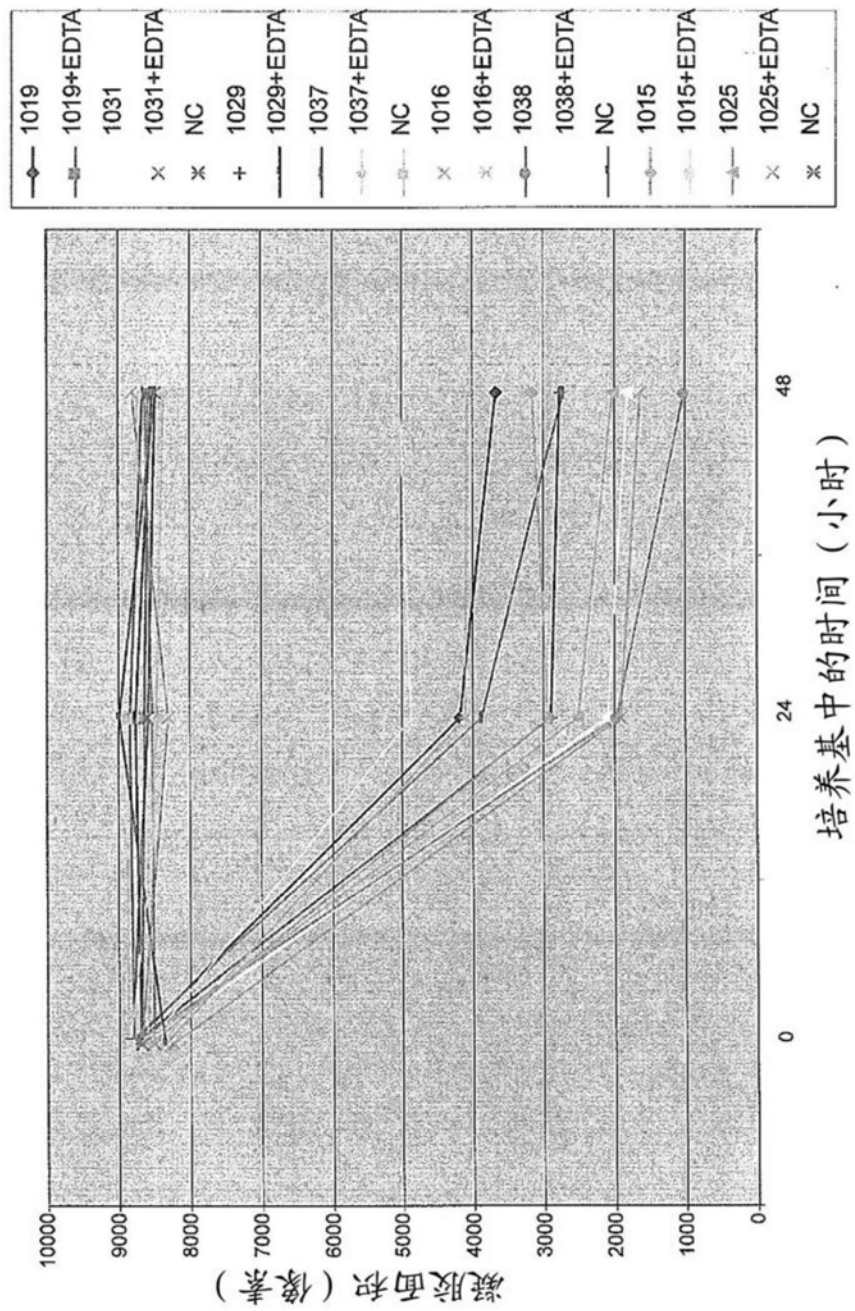


图 71A :猪的膀胱来源的平滑肌细胞的收缩

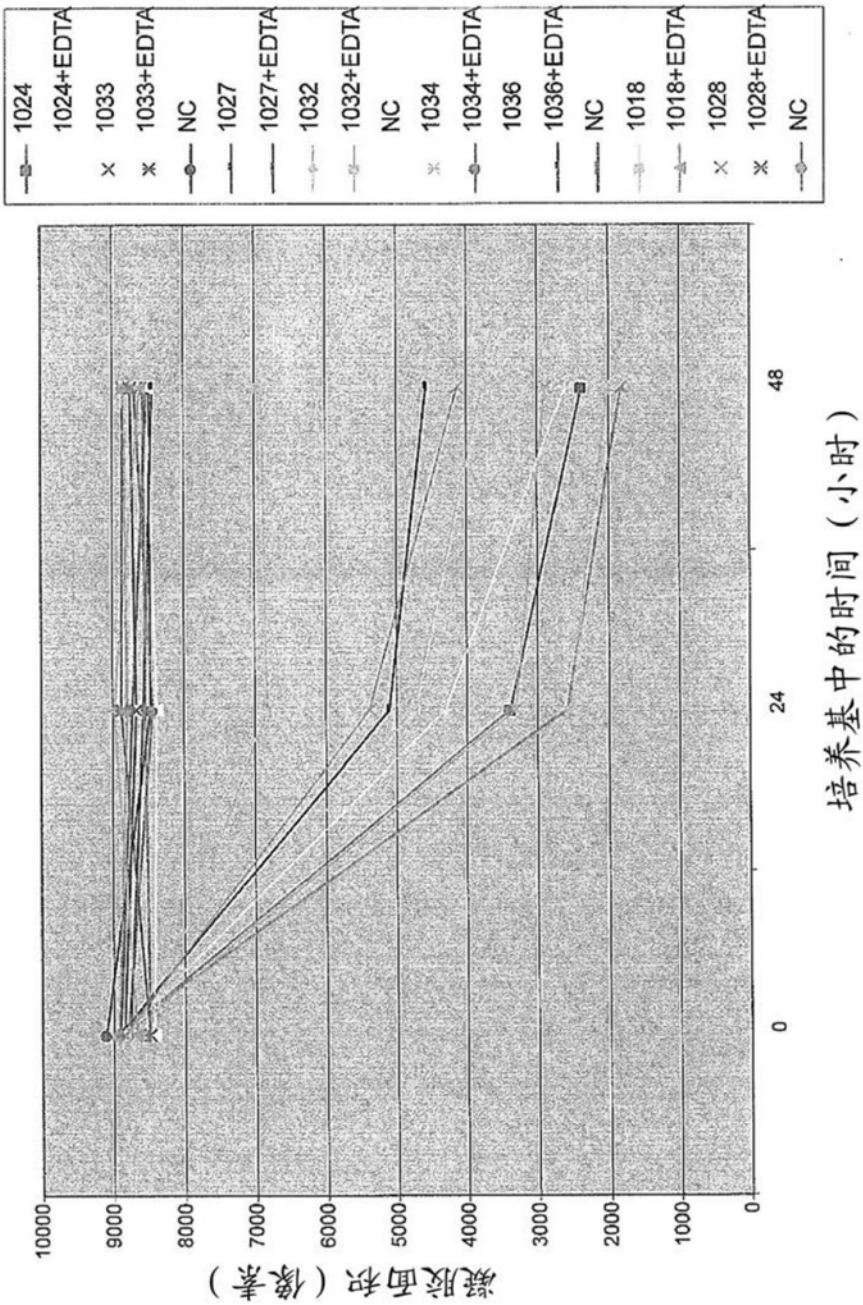


图 71B :猪的脂肪来源的平滑肌细胞的收缩

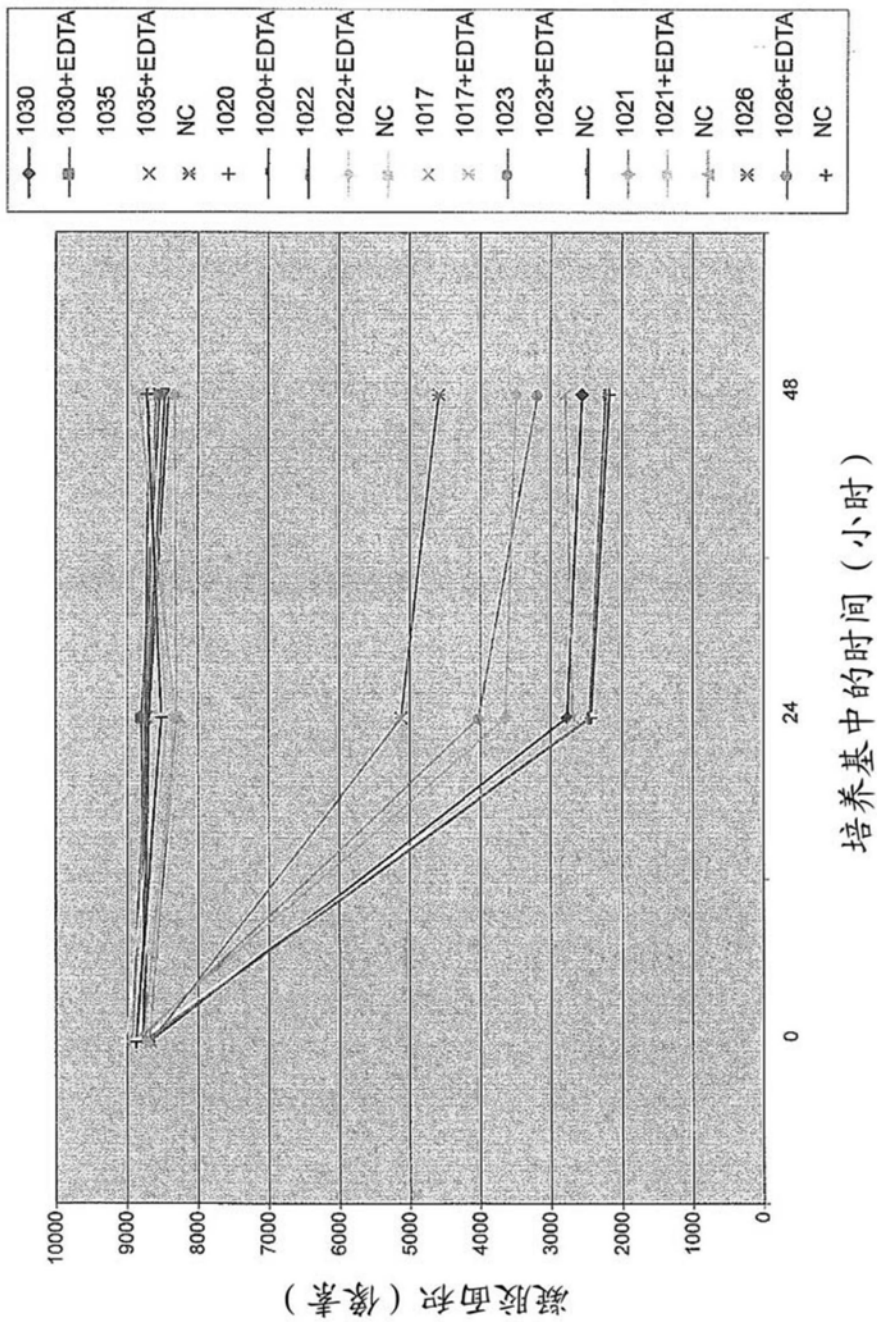


图 71C :猪的外周血液来源的平滑肌细胞的收缩

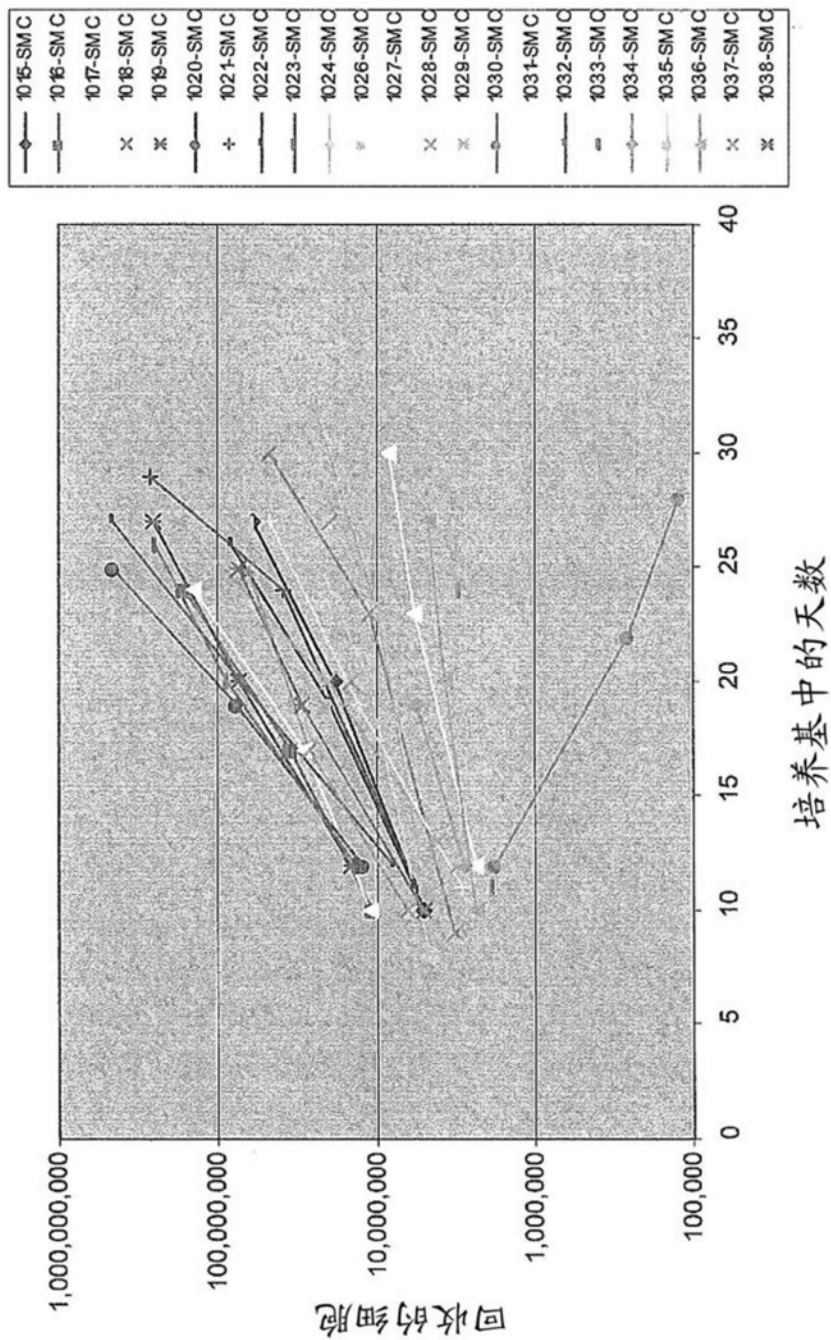


图 72A :猪膀胱来源的平滑肌细胞的生长动力学

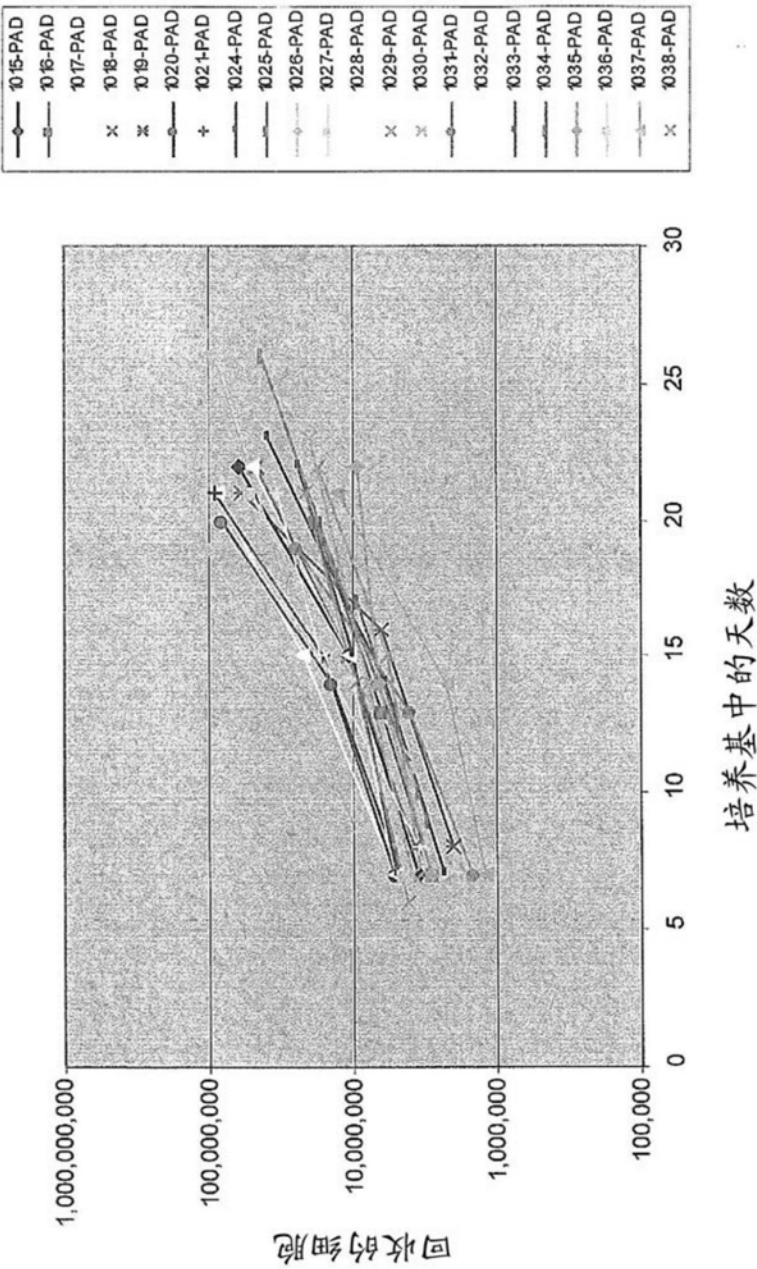


图 72B :猪脂肪来源平滑肌细胞的生长动力学

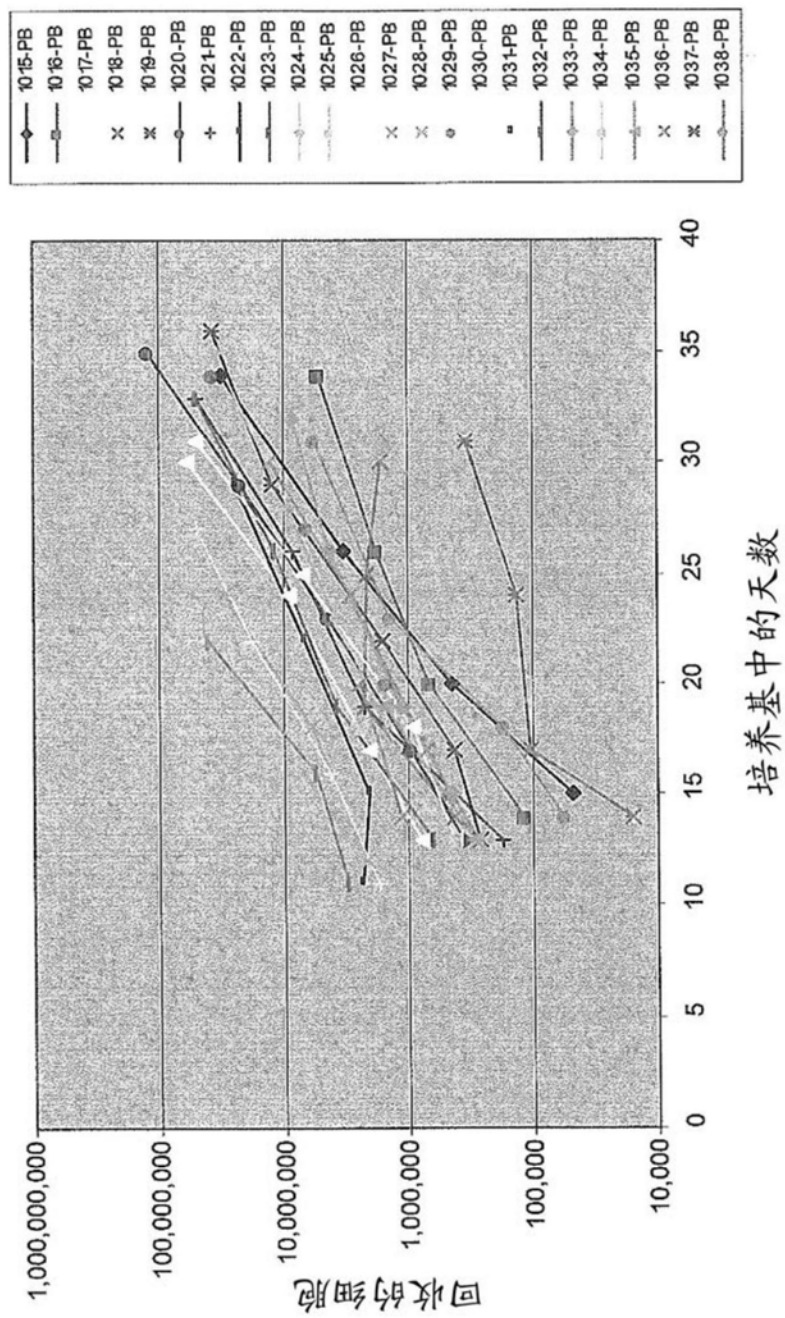


图 72C :猪外周血来源的平滑肌细胞的生长动力学

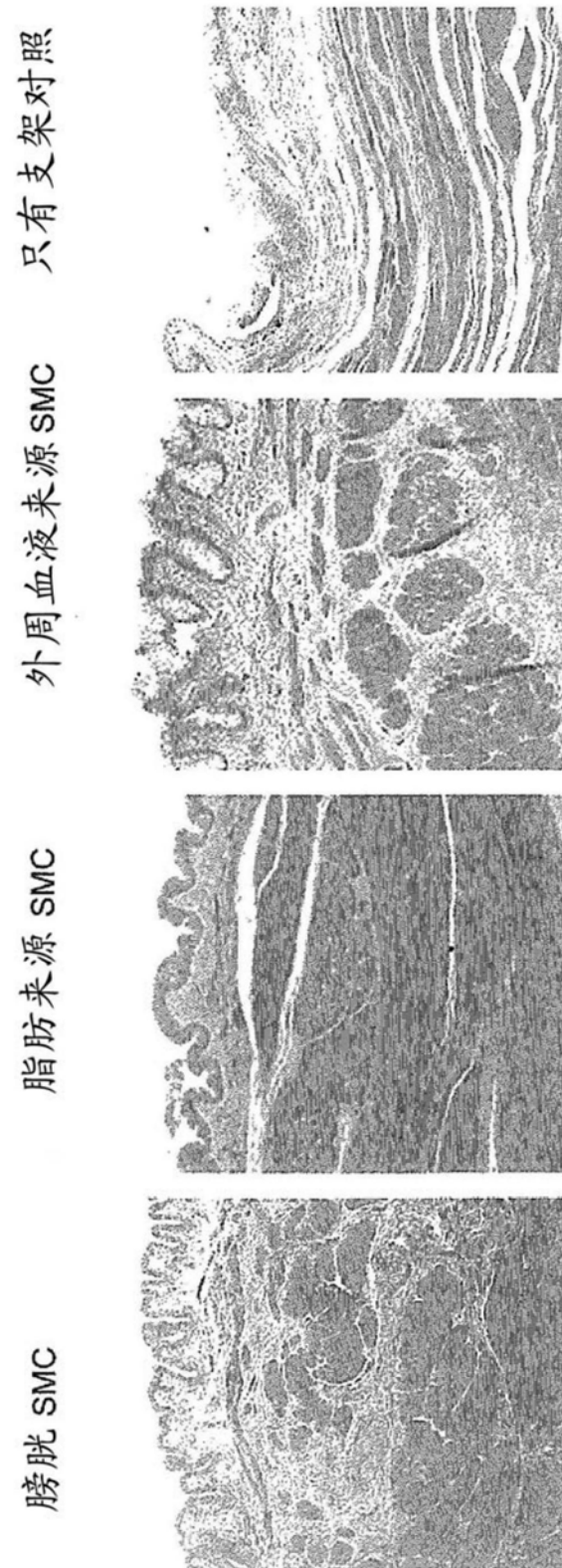


图 73 :使用膀胱来源、脂肪来源和外周血液来源的平滑肌细胞接种的新的尿路管道的组织学

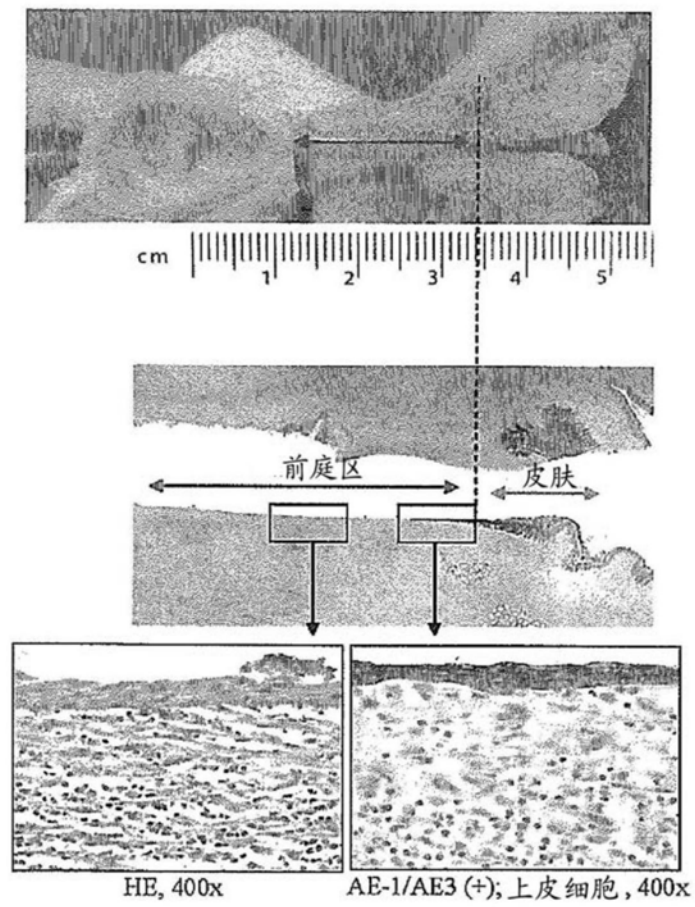


图 :74

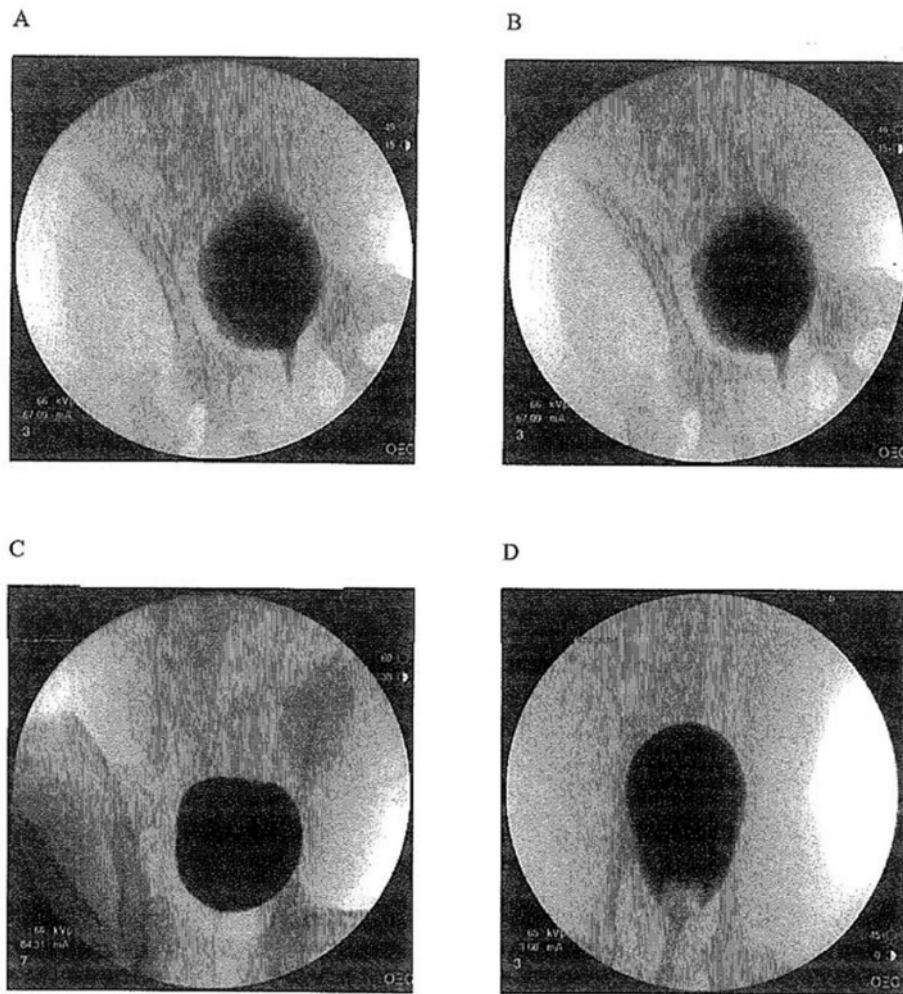


图 :75

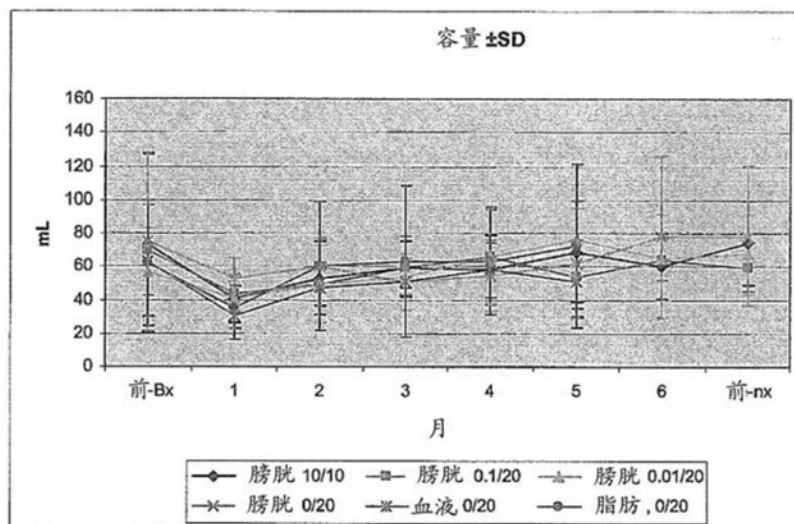


图 :76A

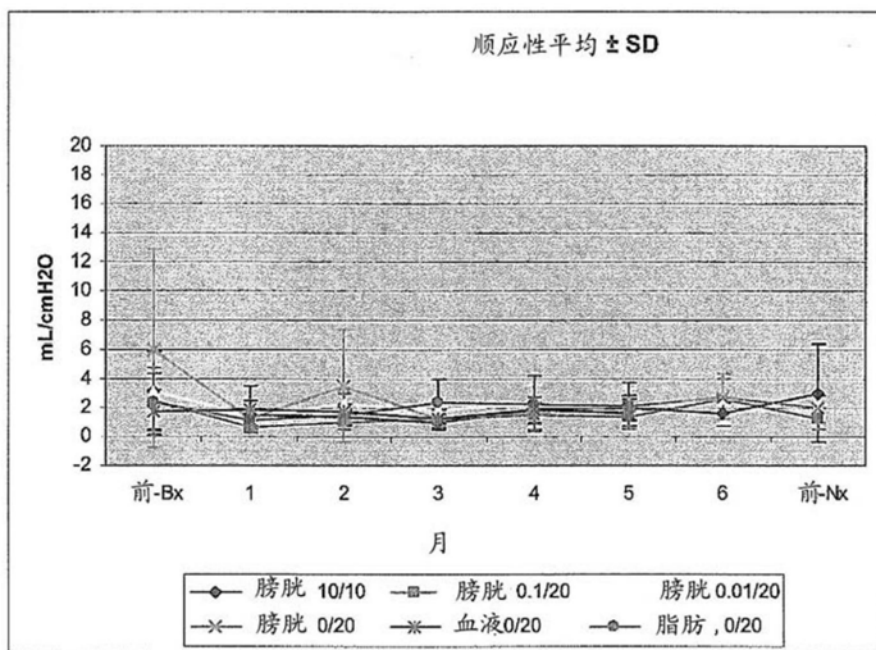


图 :76B

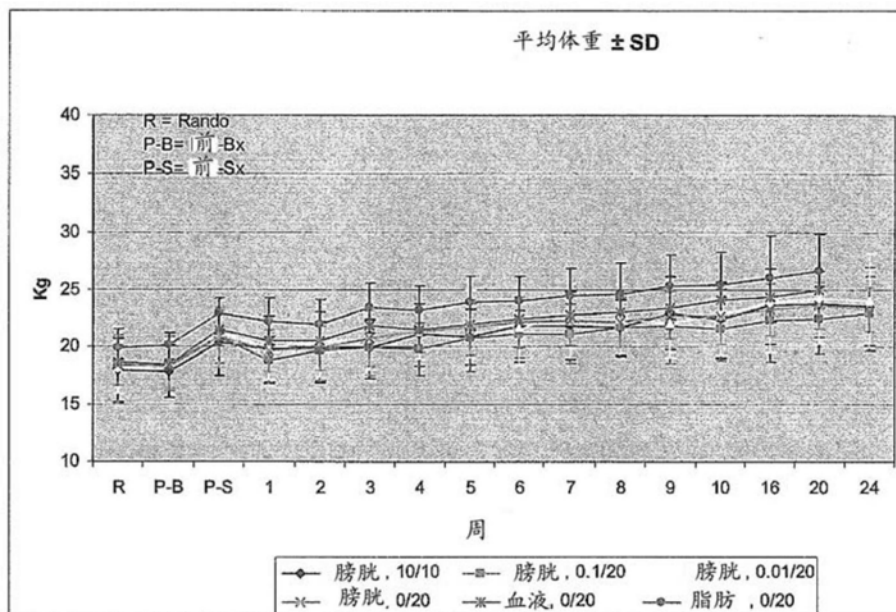


图 :77

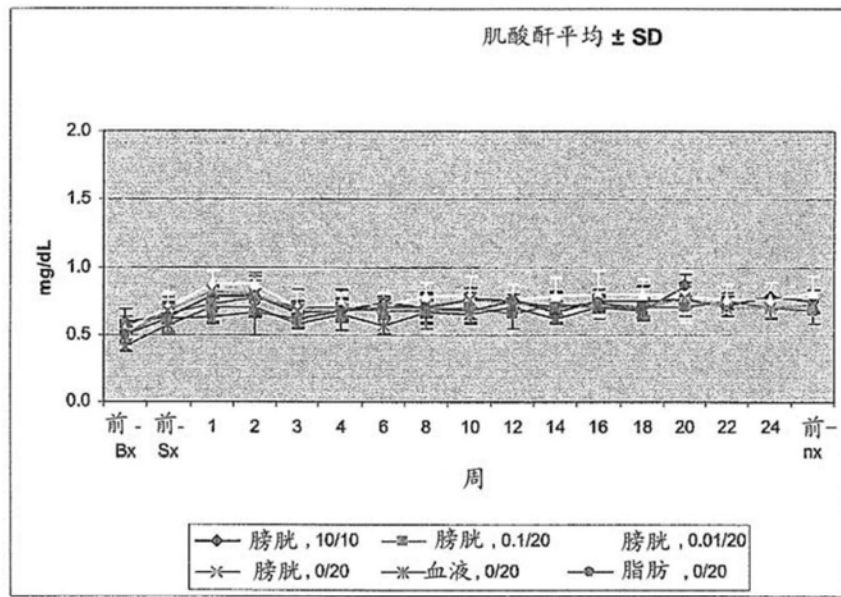


图 :78

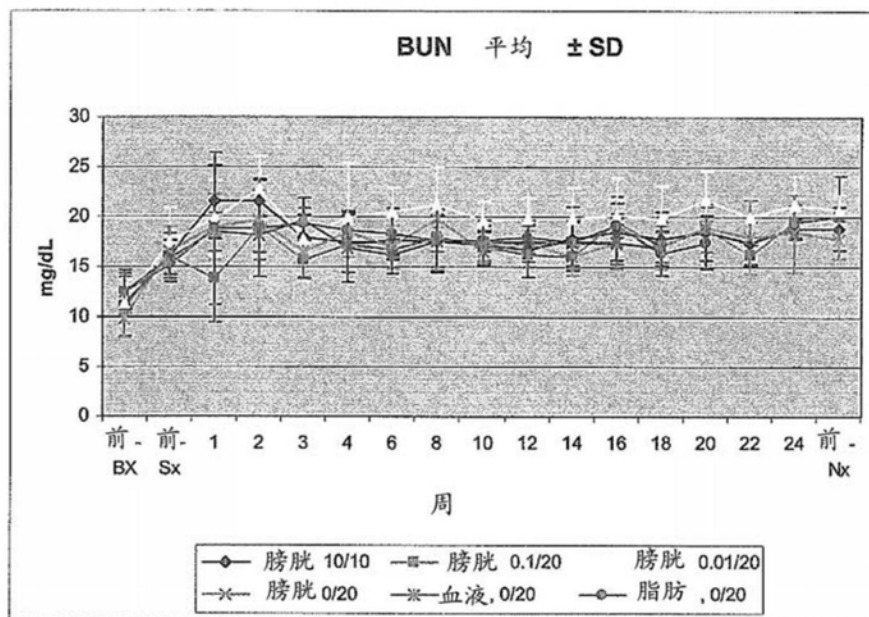


图 :79

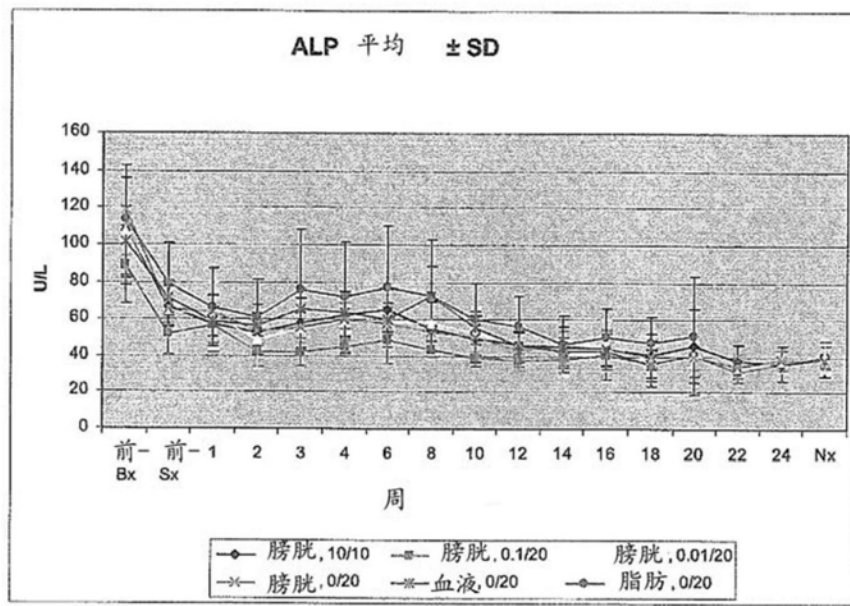


图 80

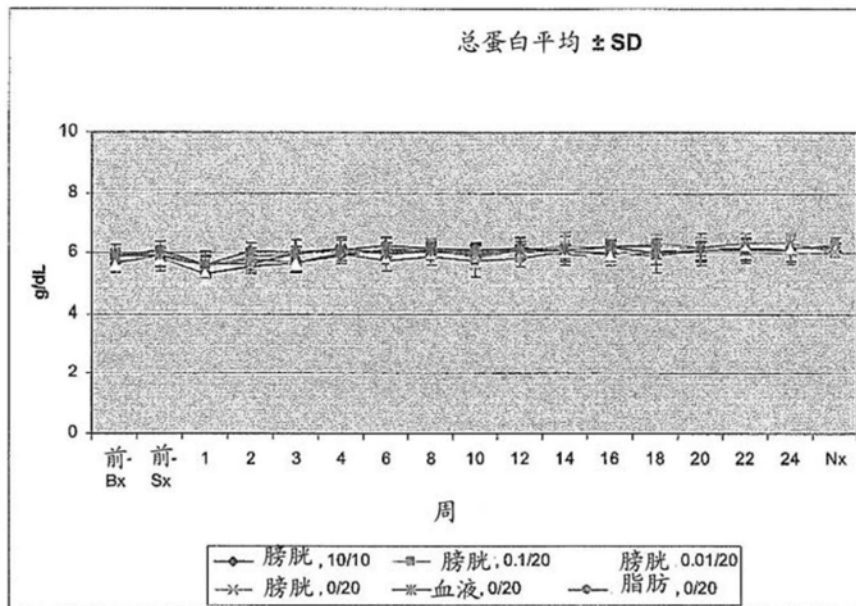


图 81

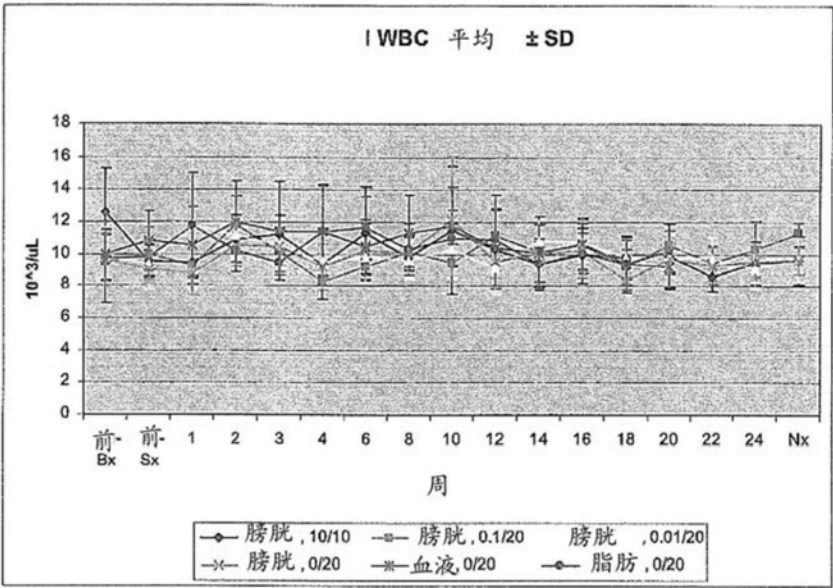


图 82

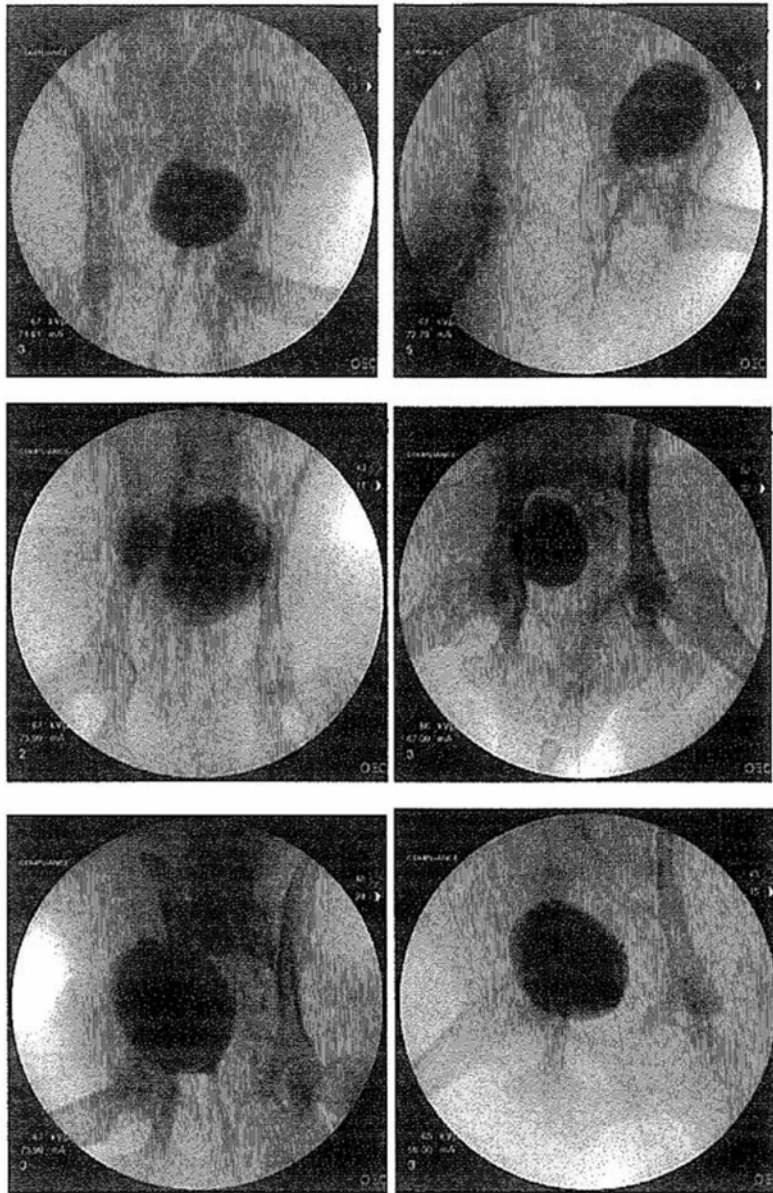


图 83

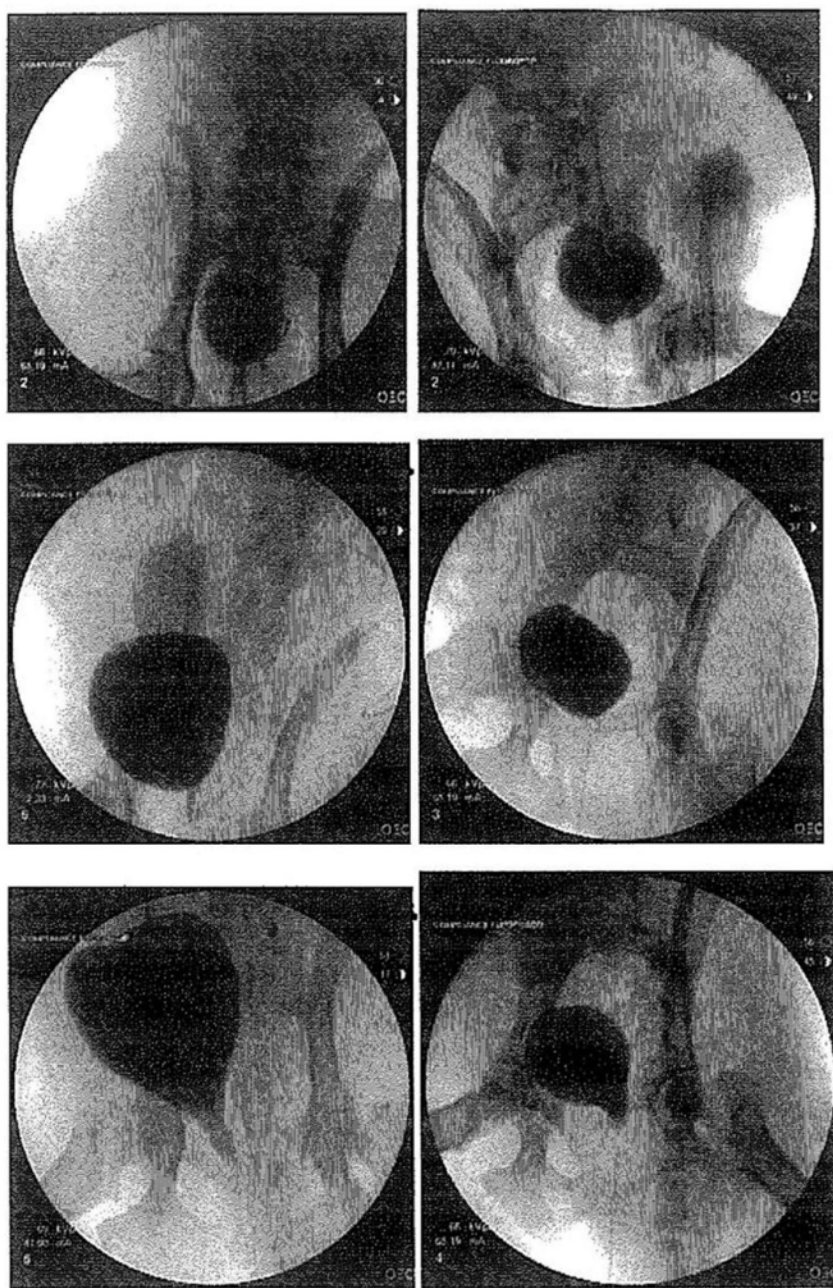


图 84

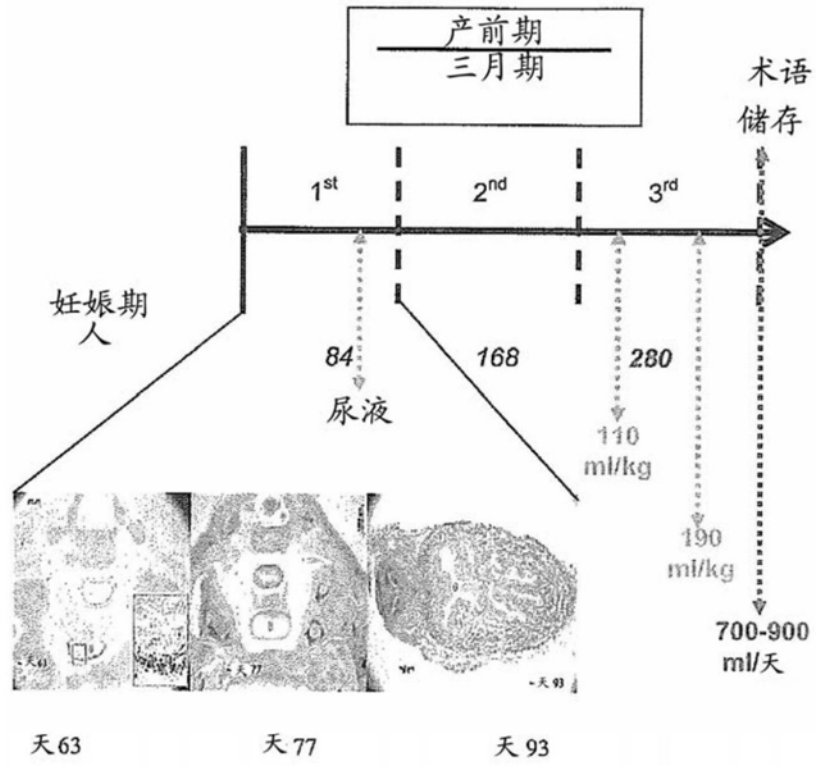


图 85

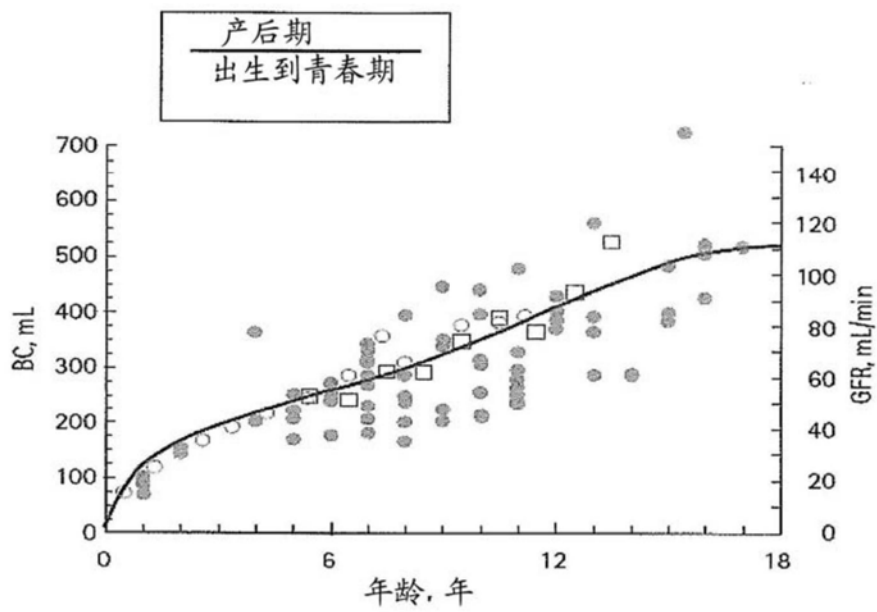


图 86

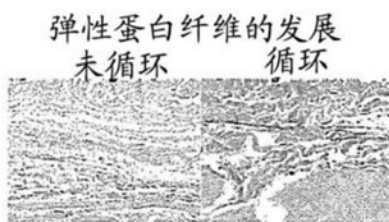


图 87A

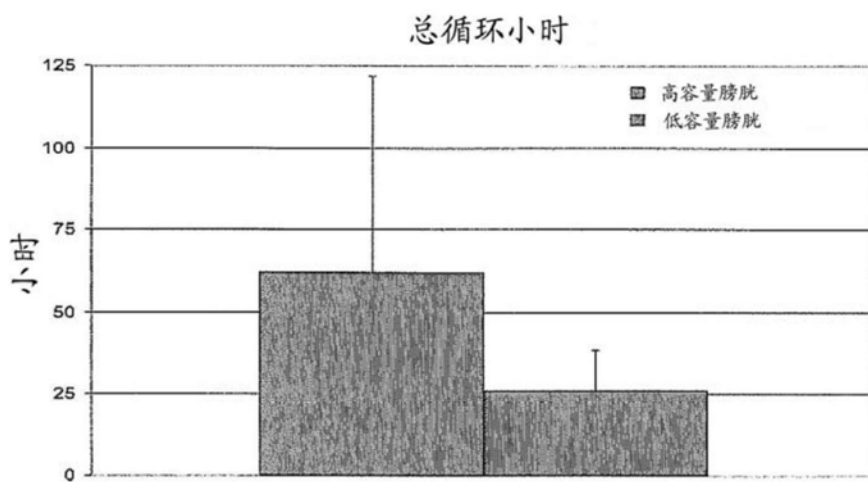


图 87B

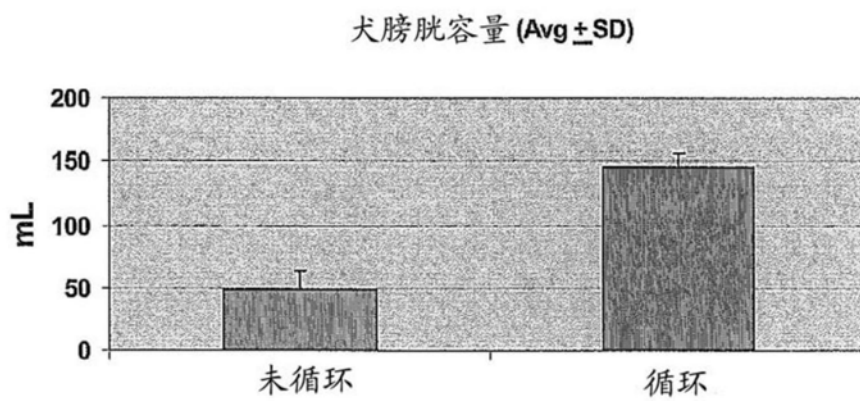


图 87C

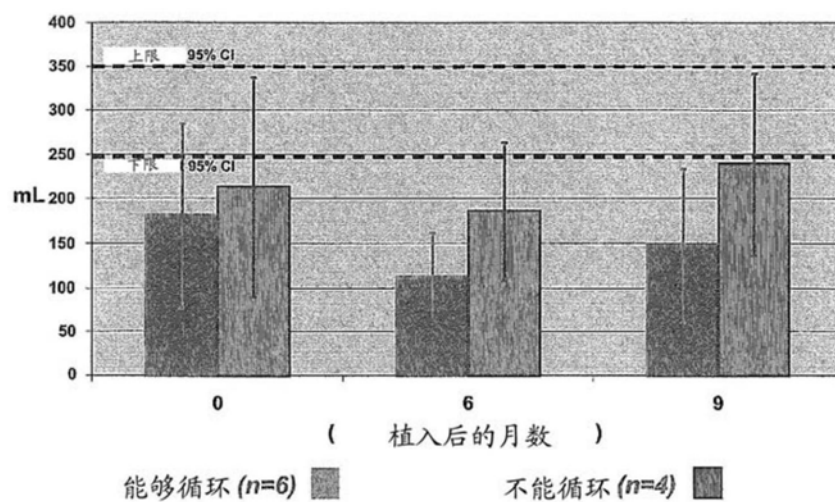


图 88

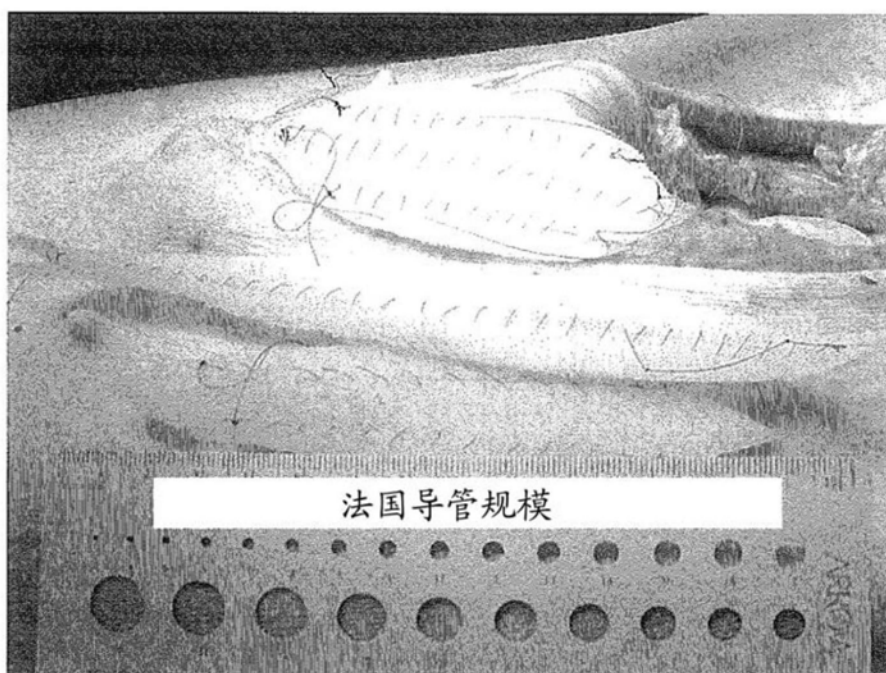


图 89

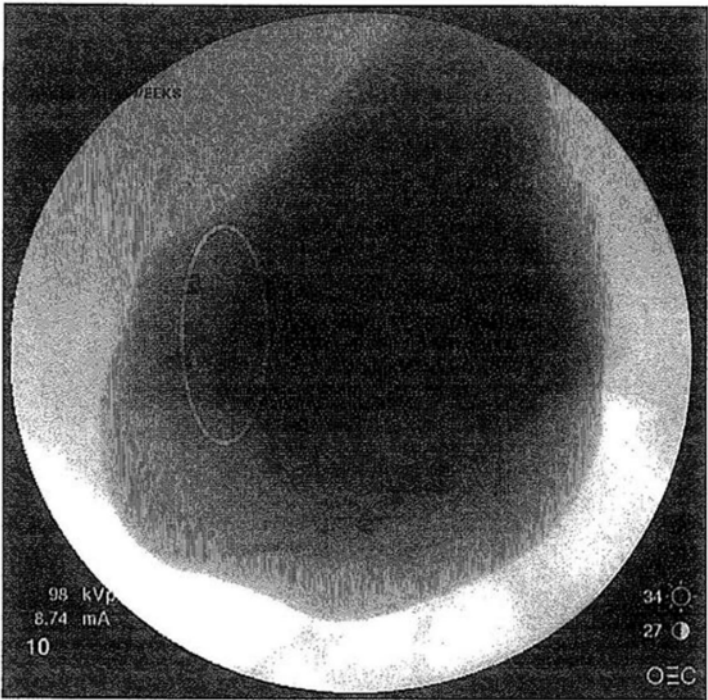


图 90

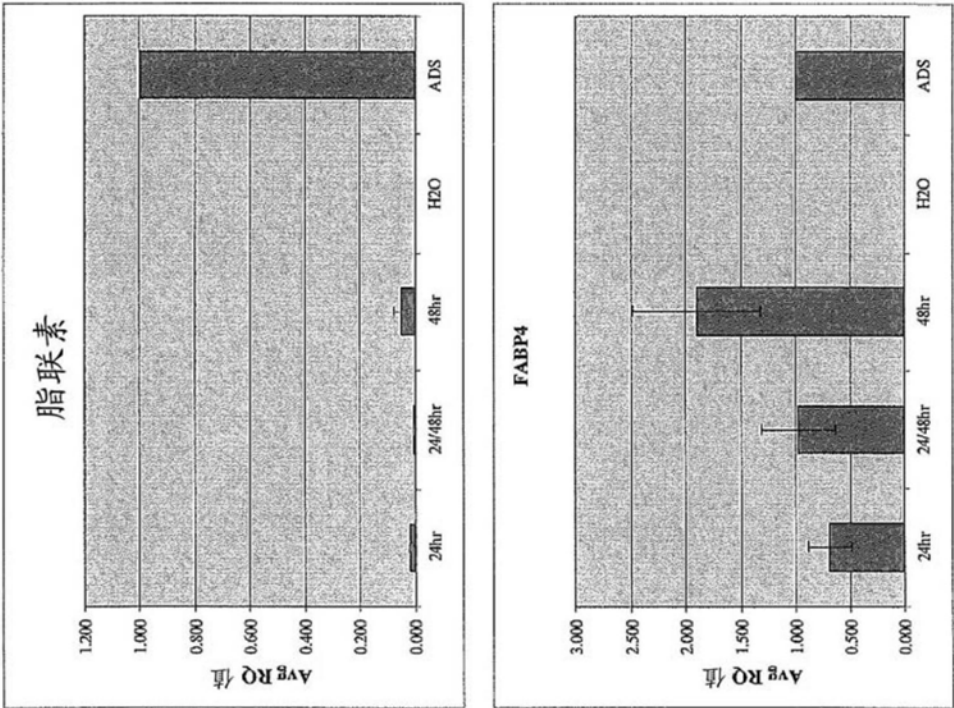


图 91A

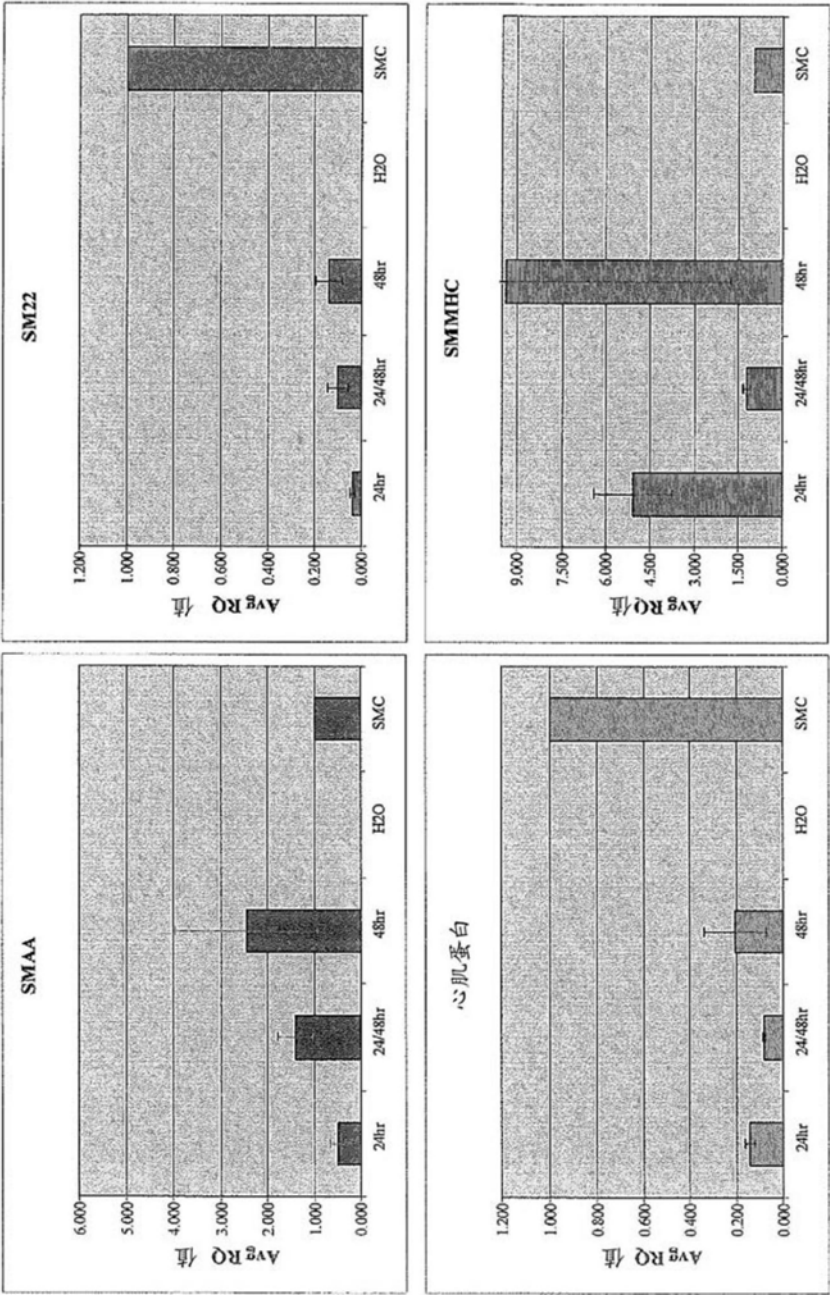


图 91B

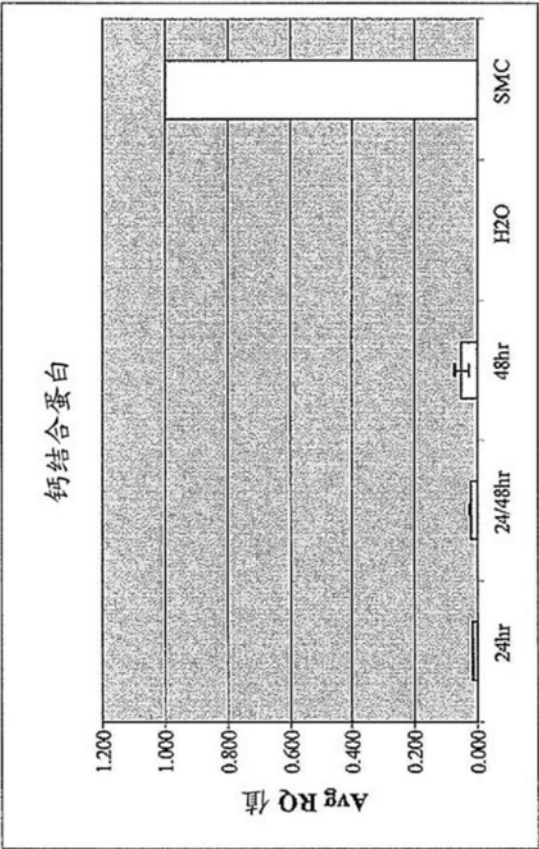


图 91C

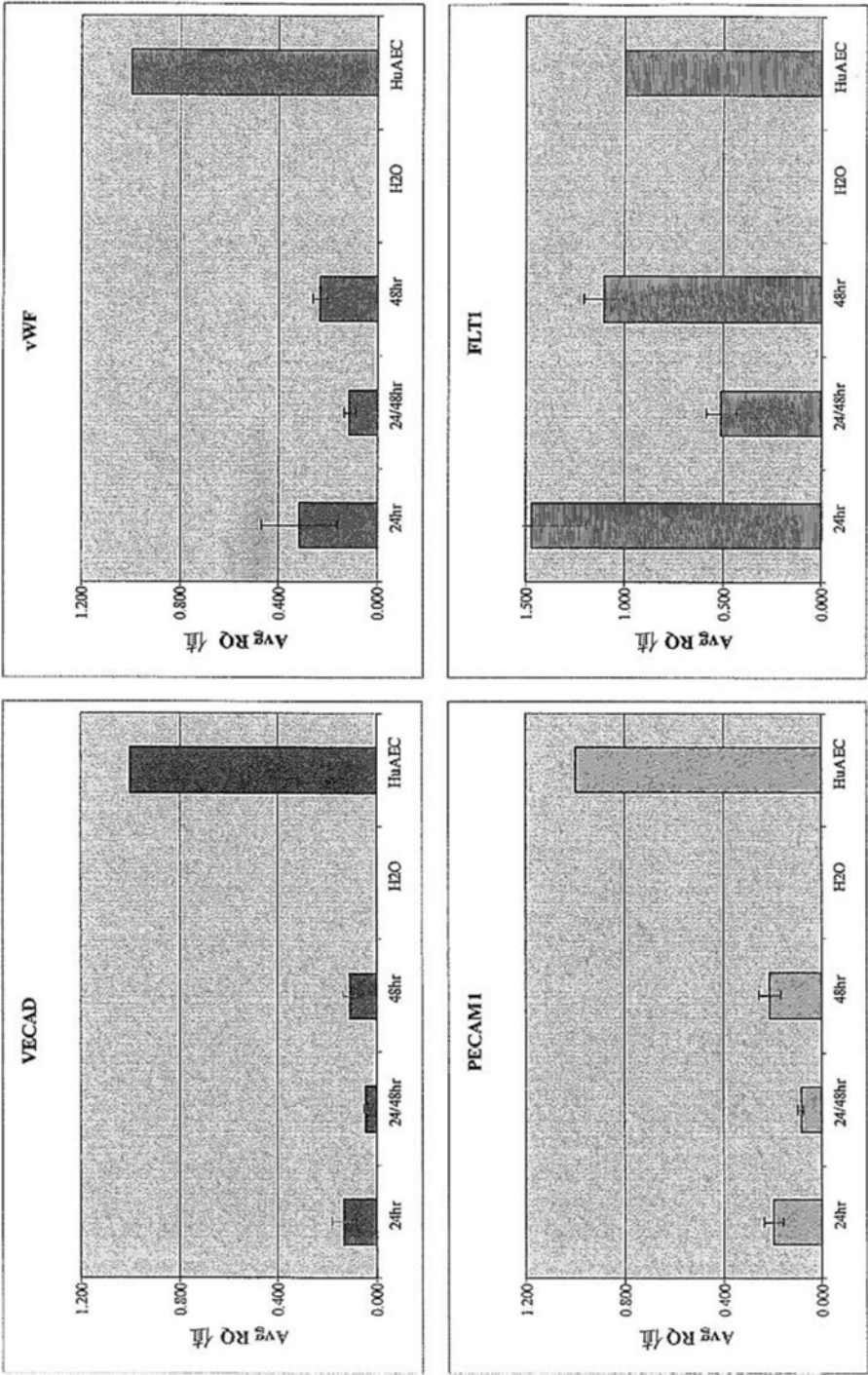


图 91D

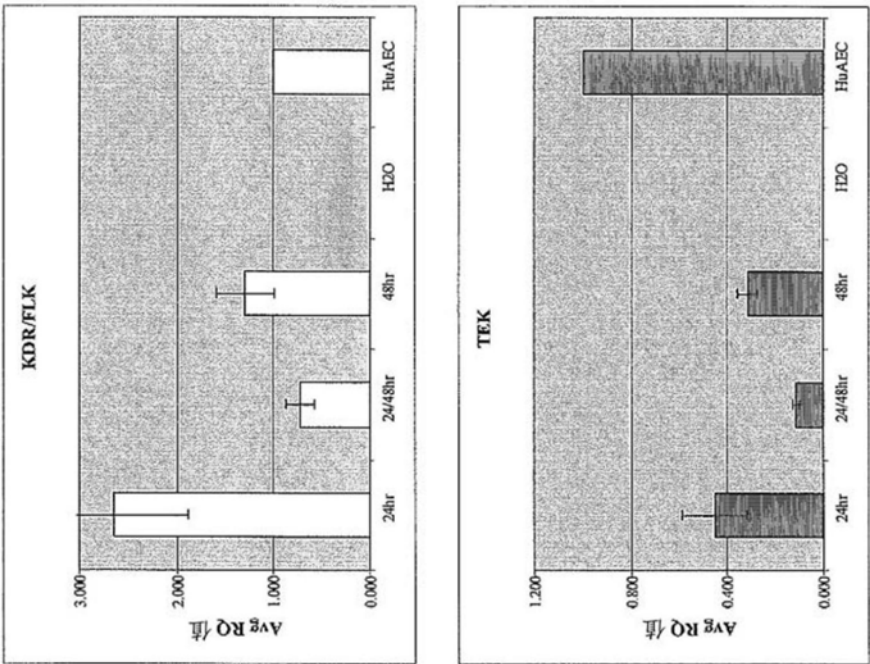


图 91E

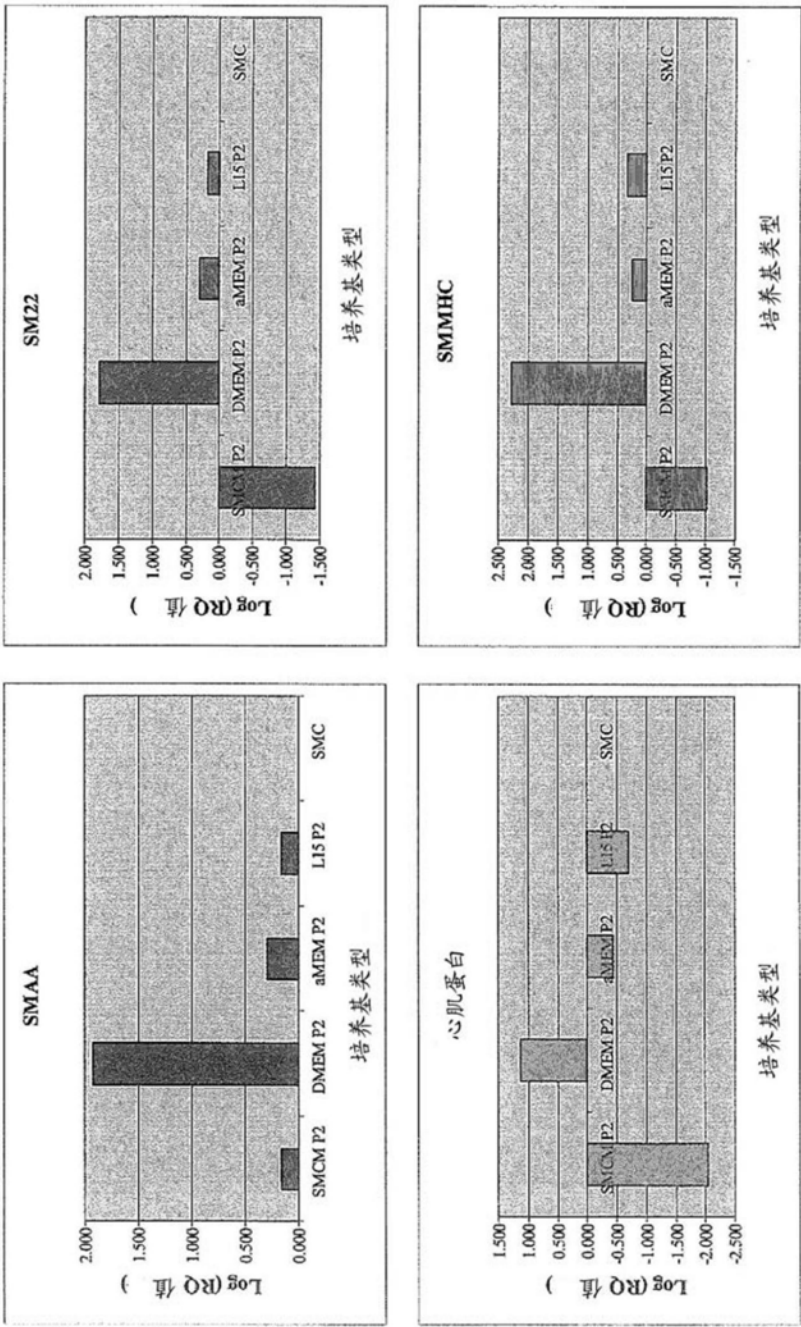


图 92A

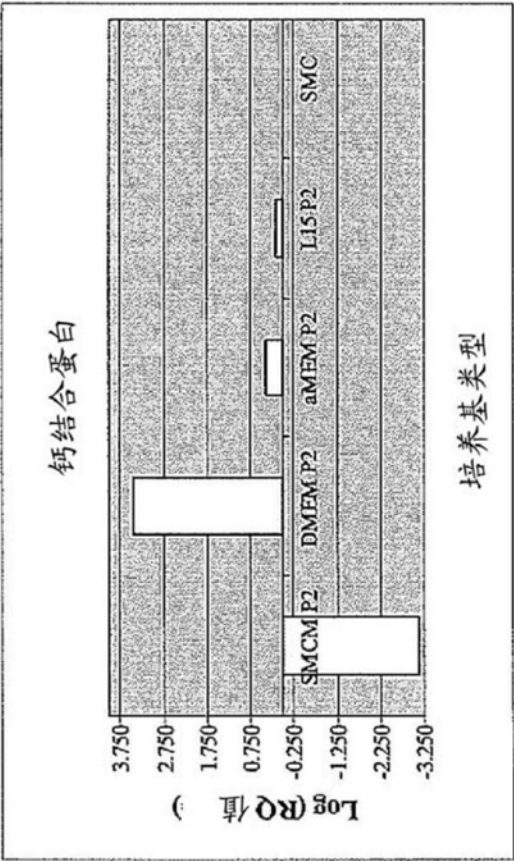


图 92B

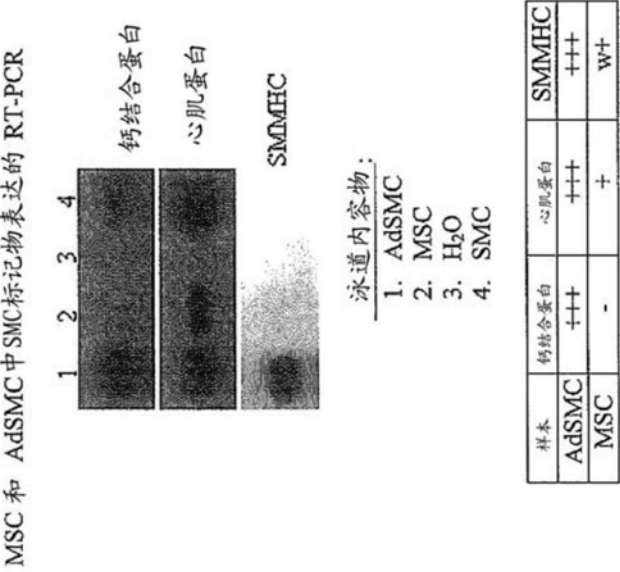


图 93

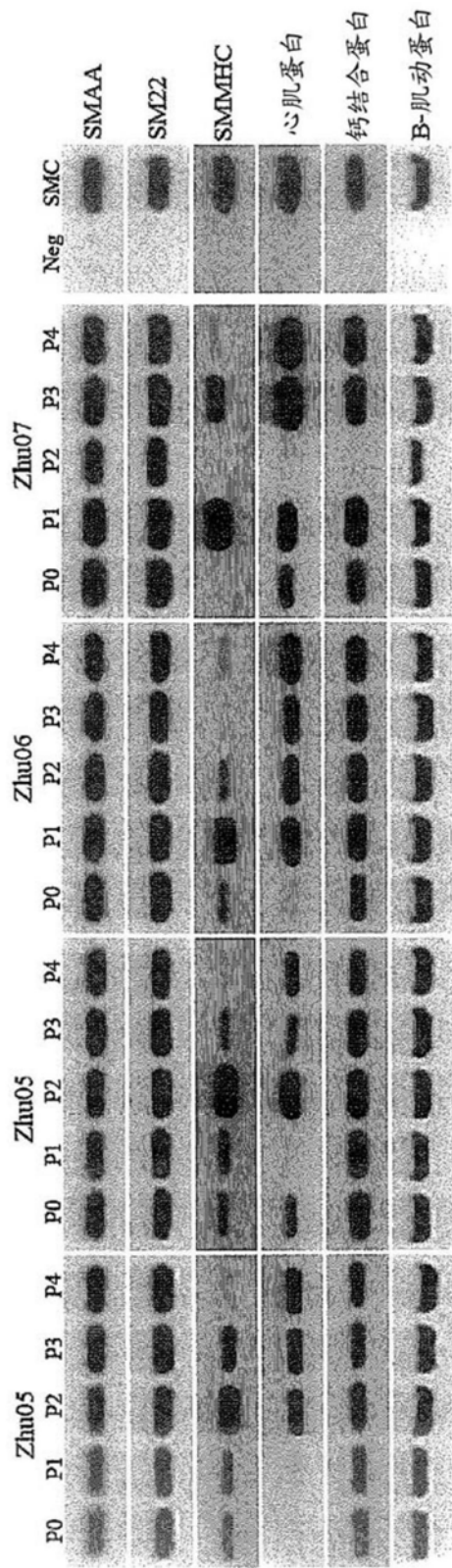


图 94

MSC 和 AdSMC 中上皮标记物表达 RT-PCR

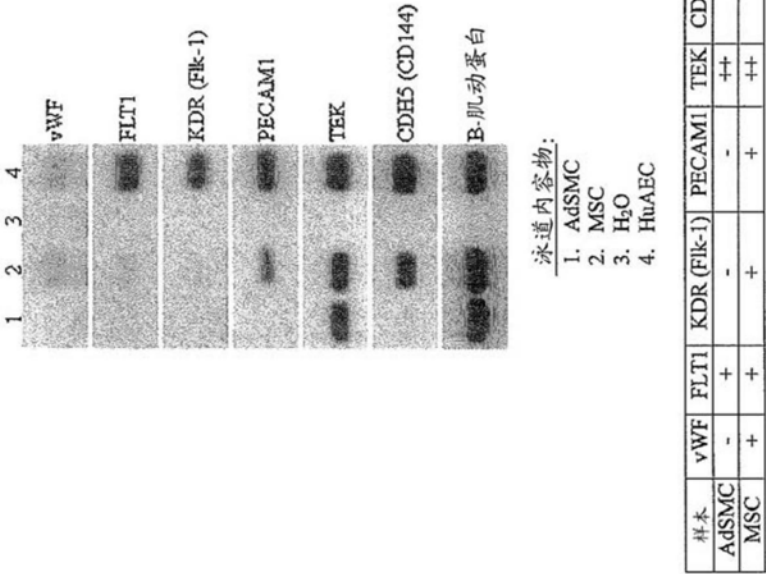


图 95

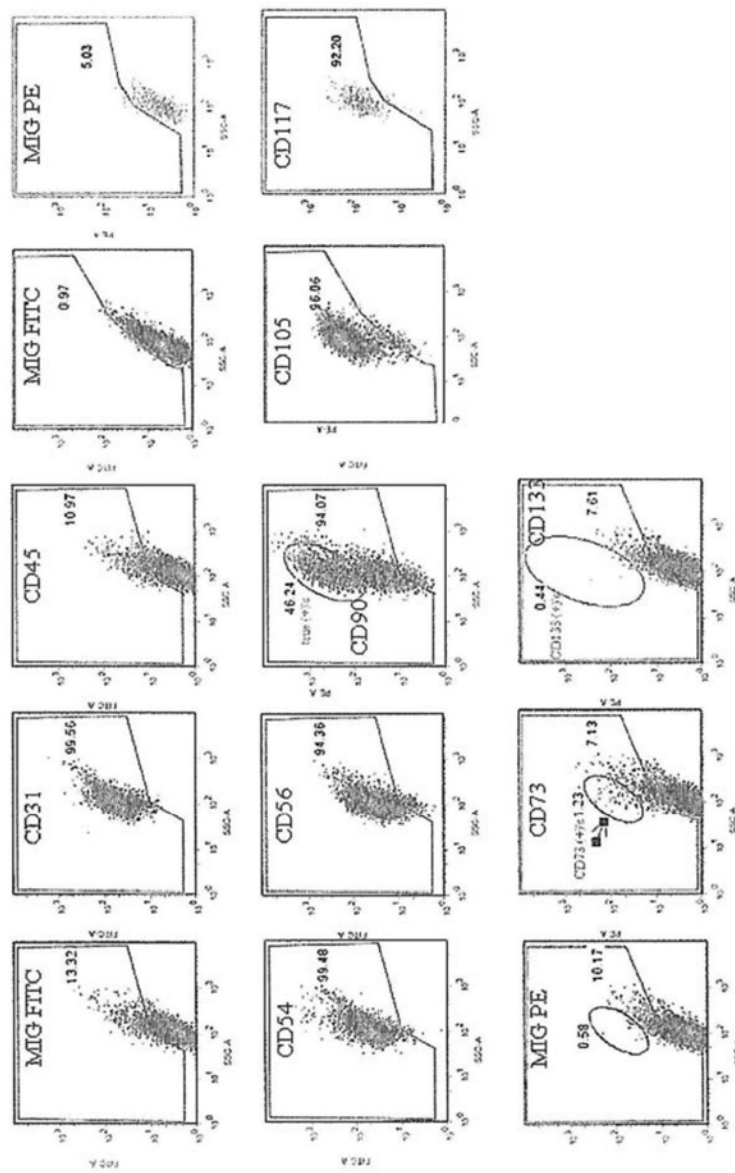


图 96

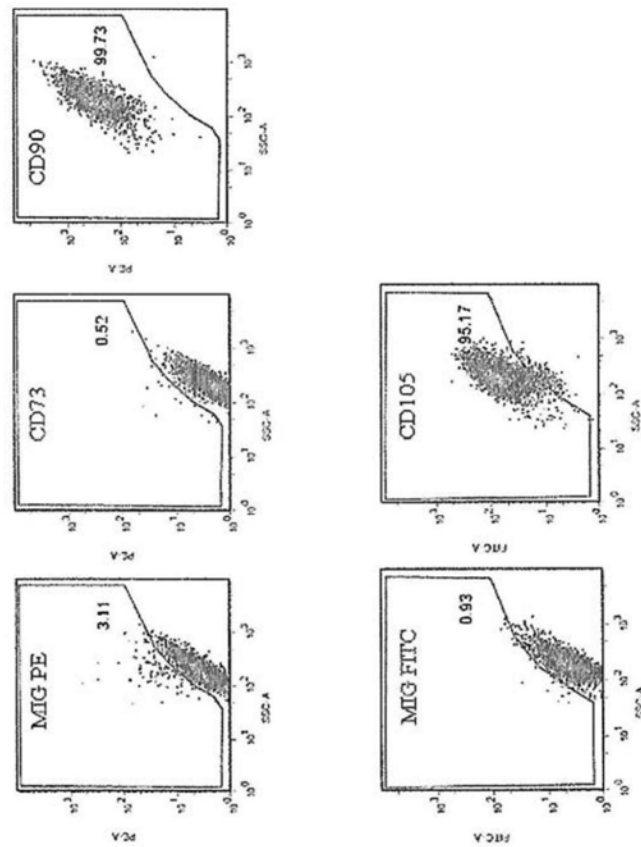


图 97

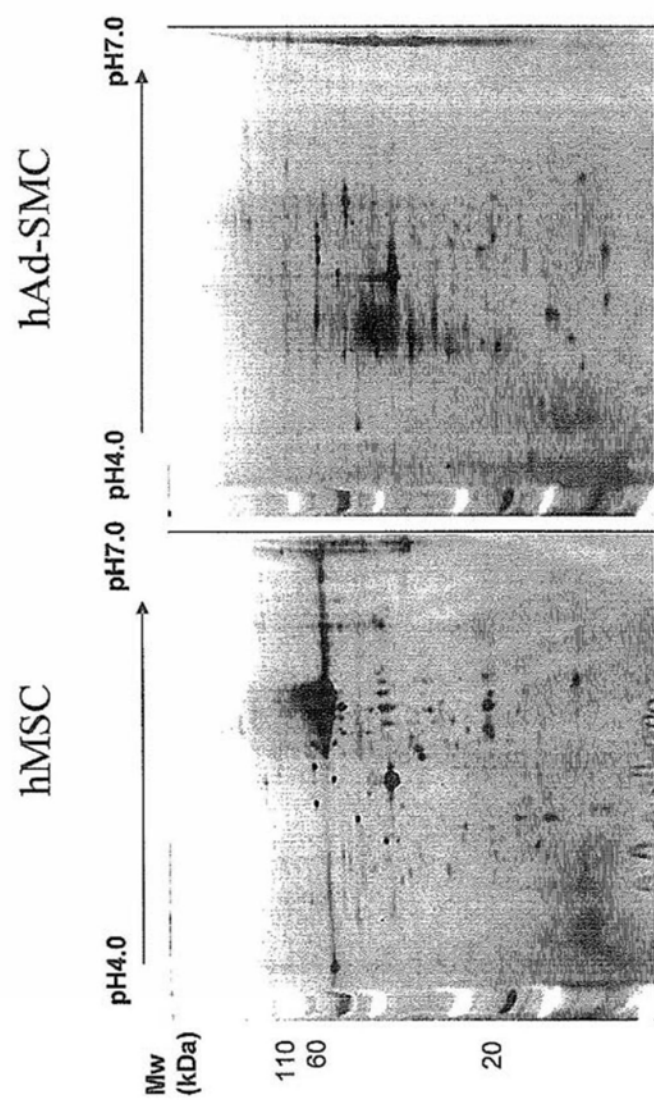


图 98

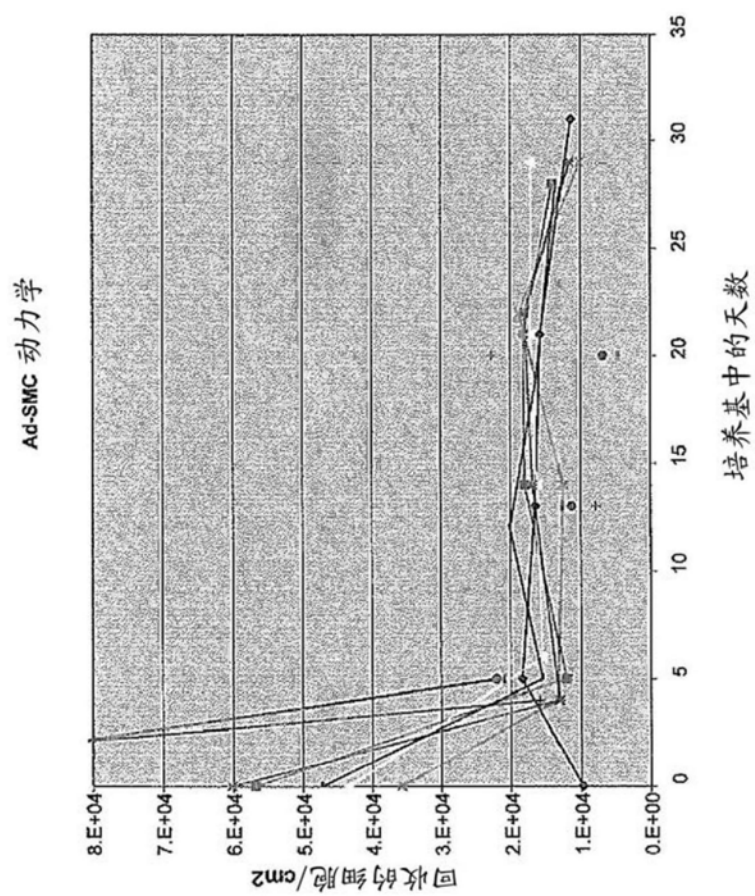


图 99

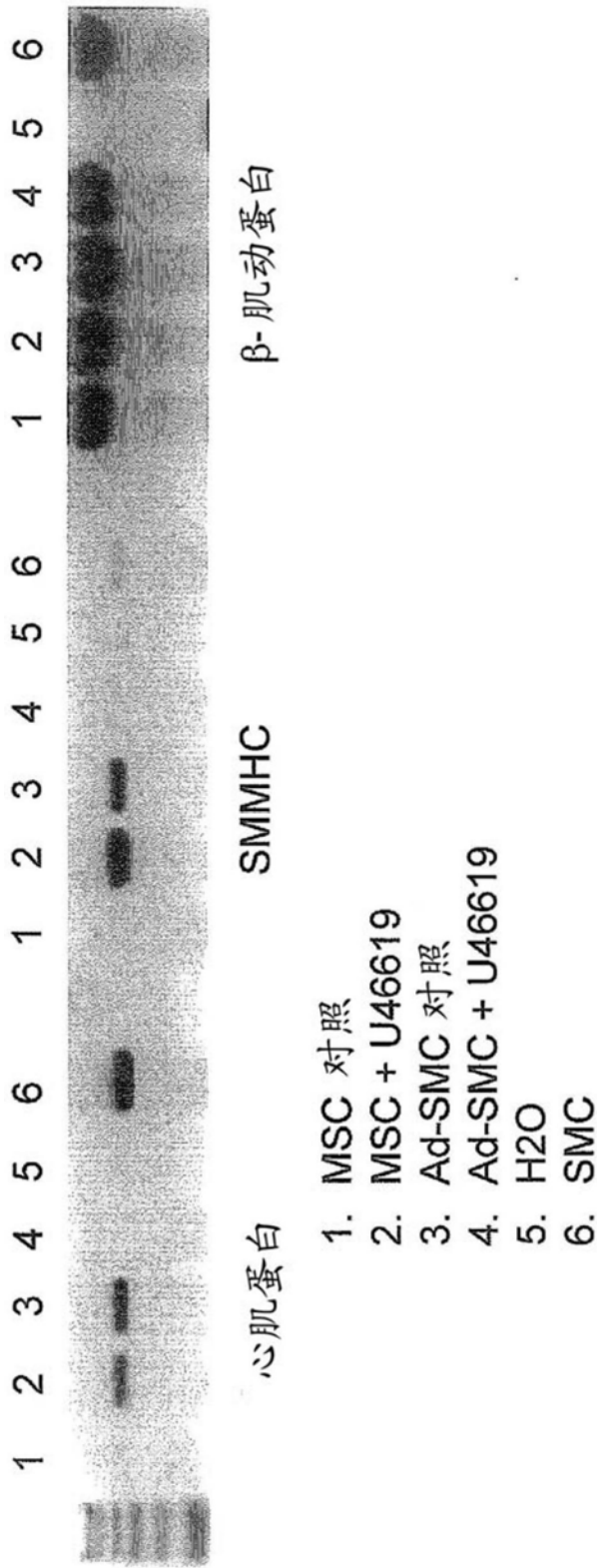


图 100

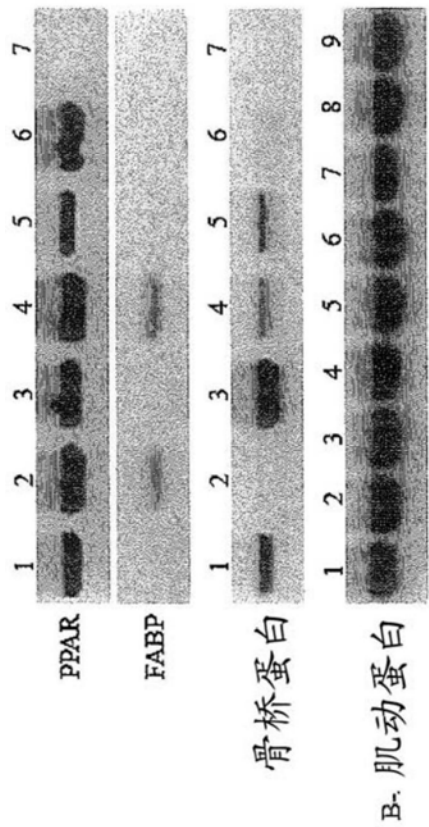


图 101

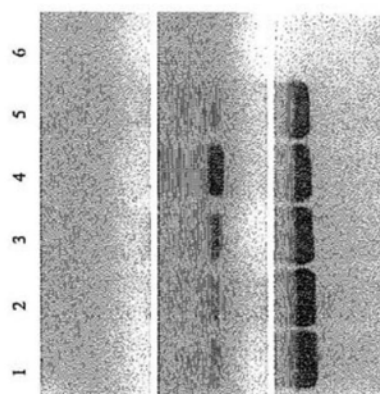


图 102

Abstract

The present invention relates to the regeneration, reconstruction, repair, augmentation or replacement of organs or tissue structures using scaffolds and autologous cells that are not derived from such organs or tissues.