

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780022790.1

A61F 2/44 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月8日

[11] 公开号 CN 101478934A

[22] 申请日 2007.4.30

[21] 申请号 200780022790.1

[30] 优先权

[32] 2006.4.28 [33] US [31] 60/796,088

[86] 国际申请 PCT/IB2007/003272 2007.4.30

[87] 国际公布 WO2008/078157 英 2008.7.3

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.18

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 陈佩 张文智 陈振胜 陈志峰  
许婷恩

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 黄可峻

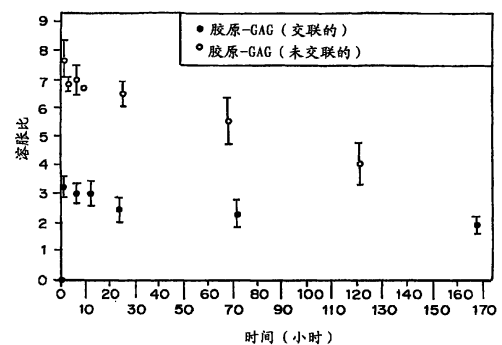
权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 6 页

## [54] 发明名称

生物工程化的椎间盘及其制备方法

## [57] 摘要

已经开发出了用于椎间盘置换的生物工程化 IVD, 其具有与天然 IVD 相似的机械性能和结构支持性能。在制造过程中, 细胞外基质 (ECM) 为活细胞组分提供支持并与活的细胞组分相互作用, 而不会引入毒性。该组合物用天然的或合成的来源制备, 优选天然来源制备, 并在足以支持细胞存活和生长的温和条件下, 诱导其自组装或者重建而形成其固态形式。细胞使该结构的体积发生变化, 导致尺寸、ECM 密度、细胞密度、机械性能和稳定性等发生改变; 通过如 ECM 密度、活细胞密度、相互作用的时间选择和血清浓度等因素, 可以精确控制该组合物的体积变化程度。通过交联处理来提高结构的支持性能。



1. 用于椎间盘置换的生物工程化的 IVD 的组合物，该组合物包括细胞外基质 (ECM)，所述细胞外基质在制造过程中给活细胞组分提供支持并且与活细胞组分相互作用，而不引入毒性。

2. 权利要求 1 的组合物，其中在支持细胞存活和生长的条件下，所述 ECM 被诱导自组装或者重建成其固体形式。

3. 权利要求 1 的组合物，其中所述 ECM 与活细胞或者其它 ECM 组分相互作用，以可控制的方式改变该结构的体积。

4. 权利要求 3 的组合物，其中通过 ECM 的密度、活细胞的密度、相互作用时间的选择或者血清浓度来控制体积的改变。

5. 权利要求 1 的组合物，其中所述 ECM 是从动物来源分离或者提取或者制备的或者合成的 I 型、II 型、III 型的胶原。

6. 权利要求 5 的组合物，其中所述动物来源包括大鼠尾部、猪皮、牛跟腱或者人胎盘。

7. 权利要求 1 的组合物，其中 ECM 包括从鲨鱼软骨提取的蛋白聚糖/GAG、弹性蛋白或者透明质酸。

8. 权利要求 1 的组合物，还包括来自自体的、同种异体的或者异种的来源的间充质干细胞 (MSC) 或者临床上可行的来源的其它细胞，呈单一细胞的悬浮液或者被包裹在基质微球体中的形式。

9. 权利要求 8 的组合物，所述 MSC 被 TGF- $\beta$  分化成软骨细胞系，并与椎间盘中的那些 MSC 相似。

10. 权利要求 1 的组合物，还包括一种或多种生长刺激信号，其是人血清、富含血小板的血浆和血液产品。

11. 一种用于扩增来自骨髓的 MSC 的方法，该方法包括将 BM-MSC 包裹在胶原微球体中。

12. 权利要求 11 的方法，其中对 BM-MSC 的包裹包括形成乳状液、生成液滴或者将 MSC 注射到预制的胶原微囊中。

13. 权利要求 11 的方法，还包括将包裹 MSC 的胶原微球体维持在培养液中。

14. 权利要求 11 的方法，还包括将包裹 MSC 的胶原微囊分离和铺板，并且以规则的时间间隔和特定的铺板密度重新铺板在新培养瓶中，以连续地供应 MSC，而不用胰蛋白酶消化。

15. 制备 IVD 结构的方法，该方法包括将活细胞与重建的胶原、细胞外基质或 GAG 接触。

16. 权利要求 15 的方法，其中将活细胞均匀地分布在整个 ECM 本体中，并且层与层之间密度不同或者形成密度梯度。

17. 权利要求 15 的方法，其中由细胞引起的所述结构的体积变化程度是通过胶原溶液的浓度、MSC 的密度、GAG 和其它 ECM 的浓度、血清浓度、胶原与 GAG 的比例、培养的持续时间来控制的。

18. 权利要求 15 的方法，还包括在植入和置换操作前，将 IVD 结构暴露于一种机械刺激中，以模拟 IVD 结构将要被暴露的压力。

19. 权利要求 15 的方法，还包括将胶原、ECM 或 GAG 交联。

20. 权利要求 15 的方法，其中所述 IVD 包括一个核心，该核心包括活细胞、胶原和 GAG，其比例与天然椎间盘的比例相似。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述 IVD 还包括内环，该内环具有将所述核心分开的致密的 ECM 薄层以及多个具有渐增的密度的胶原基质和具有渐减的密度的 GAG 以及密度渐增的均匀分布的细胞的薄层。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述 IVD 还包括具有多个高密度胶原和细胞的薄层的外环。

23. 权利要求 15 的方法，其包括将具有渐增的胶原密度、渐减的 GAG 密度和渐增的细胞密度的包裹所述核心的多层致密的 ECM 薄层层压而形成内环。

24. 权利要求 23 的方法，还包括将具有渐增的胶原密度和细胞密度的包裹先前形成的内环的多层致密的 ECM 薄层层压而形成外环。

25. 权利要求 24 的方法，其中通过调节细胞密度、ECM 密度、细胞与 ECM 之间的相互作用持续时间或血清浓度来提高 ECM 薄层的密度。

26. 权利要求 25 的方法，其中通过调节细胞密度、ECM 密度、细胞与 ECM 之间的相互作用持续时间或血清浓度来提高 ECM 薄层的密度。

27. 权利要求 15 的方法，其中所述核心具有一个含有 GAG 的核心结构，该核心结构比周围的薄层吸收更多水分。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述的内环或外环包括多个胶原薄层，在形成连续的薄层之前，对每个胶原薄层进行脱水而基本上不损害

---

细胞的存活力。

29. 权利要求 24 的方法，还包括在用激光光源照射之前，使该结构与一种光敏剂接触。

## 生物工程化的椎间盘及其制备方法

### 交叉参考相关申请

本申请要求享有 2006 年 4 月 28 日申请的 US 60/796,088 的优先权。

### 技术领域

本发明一般地涉及生物工程化的椎间盘。更特别地，本发明涉及用活细胞和天然的细胞外基质制备椎间盘样结构的方法和组合物，该结构具有与天然椎间盘相当的机械性能，用于置换在特别严重情形下的退行性椎间盘，本发明还涉及所得到的生物工程化的椎间盘。

### 背景技术

椎间盘 (IVD) 将脊柱的椎骨分开，其作用在于抵抗脊柱在日常生 活中所经受的负载，椎间盘具有独特的结构：内部的具有细胞外基质 (ECM) 的随机组织的富含水分的凝胶样核心 (NP)；外部的具有有序组织的胶原片层纤维环纤维变性 (AF)；和给椎间盘提供营养的薄的软骨终板。椎间盘的正常功能是由 NP 和 AF 的特定构造和差别水合性能来保证的。NP 主要呈蛋白聚糖形式，蛋白聚糖是亲水的，因此保持 80% 以上的水合状态，提供高静水力压来抵抗负载。AF 也含有 60% 以上水分，主要呈紧密堆积的胶原形式，提供了强有力的抗张强度，并且辅助 NP 抵抗负载。椎间盘细胞是软骨细胞样细胞，能够生成特定蛋白聚糖形式的 ECM，从而维持 IVD 的水合性能。

椎间盘退行性病变是影响世界范围内人群的常见临床问题，引起下腰痛和运动受限。尽管尚未完全知晓其发病机理，但是退行性椎间盘的结构和组成的变化已经被广泛地表征。在椎间盘退行性病变的早期，椎间盘细胞特别是 NP 细胞合成 ECM 的能力下降，而凝胶状的 NP 的纤维化程度提高，从而使椎间盘的含水量下降。随着疾病的发展，出现更多的 ECM 和结构的变化，例如蛋白聚糖和胶原发生降解、椎间盘的重量下降。在疾病的晚期，椎间盘结构崩塌并最后丧失其抗负载的功能。

对于晚期的退行性椎间盘病变来说，还没有令人满意的临床治疗方法。脊柱融合不能解决该问题，但是其确实能够缓解疼痛。然而，被融

合的脊柱丧失了运动性，是无功能的。临床上唯一可获得的置换选择是由金属和橡胶制成的人工椎间盘，其目的在于保持椎骨之间的运动。然而，这些假体不能与周围组织结合并形成新组织。修复失败和重新手术率高的结果已经被报道（Enker 等人，*Spine*, 18 (8): 1061-70 (1993)，Griffith 等人，*Spine*, 19 (16): 1842-9 (1994)）。

已经进行了广泛的研究和开发努力来修复椎间盘功能，范围从施用生长因子来刺激椎间盘细胞分泌 ECM，如多次注射转化生长因子 $\beta$ （TGF- $\beta$ ）、胰岛素样生长因子 1（IGF-1）和碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）（Walsh 等人，*Spine*, 29 (2): 156-63 (2004)）；用于呈递编码多种刺激 ECM 合成的生长因子的 cDNA 的基因治疗（Wallace 等人，*Spine*, 28 (15 Suppl): S93-8 (2003)），以及细胞治疗，其中将成熟的自体同源的椎间盘细胞、软骨细胞或者干细胞植入到椎间盘，补充细胞并增加 ECM 的生成（Brisby 等人，*Orthop. Clin. North. Am.*, 35 (1): 85-93 (2004)）。这些方法用于早期的退行性病变，此时椎间盘仍具有功能并且保持其结构完整性，这些方法不适用于需要进行结构和功能置换的退行性病变晚期。

一种治疗晚期椎间盘退行性病变的方法是用一种组织工程化替代品来置换无功能的椎间盘，该替代品在植入后立即恢复椎间盘的功能，与周围组织整合并维持其功能。总体而言，该替代品由支架、埋植在支架中的细胞组分以及生长刺激信号组成，支架提供结构和功能支持，在很长时间内具有良好的稳定性以便新组织生成；细胞组分来自患者自身的细胞来源，在对局部环境反应时，这些细胞组分能够行使正常椎间盘细胞的职责，合成和调控新的 ECM，从而维持椎间盘的结构和功能；生长刺激信号确认局部环境，可以是生物的和物理的，从而引导细胞组分恰当地表现。

将细胞接种到预制支架上面或里面，这是组织工程化领域的主要方法。多孔的杂合材料，例如生物活性玻璃和合成聚合物，例如 D,L-聚（丙交酯-共-乙交酯）（PLGA）已经被用作基底，并与从核心中提取的细胞一起通过手术插入到退行性椎间盘中，如美国专利 US 5,964,807 和 US 6,240,926 中所述。US 6,723,335 公开了在经过光氧化交联处理稳定后，用来自供体椎骨的脱细胞的 IVD 核液来接种来自供体的活细胞。去端肽胶原支架已经被开发用于置换 NP（Sato 等人，*Med. Biol. Eng. Comput.*,

41 (3): 365-71 (2003), Sato 等人, *J. Biomed. mater. Res. A.*, 64 (2): 248-56 (2003)。已经证实, 在支持扩增和 ECM 生成方面, 同种异体植入物椎间盘细胞具有良好的支架相容性。可生物降解的合成聚合物聚乙醇酸 (PGA) 被用于置换 AF, 并用加载了椎间盘细胞后的藻酸盐水凝胶置换 NP (Mizuno 等人, *Spine*, 29 (12): 1290-7 (2004))。

细胞分布依赖于细胞在支架内的渗透和迁移。不幸的是, 细胞在预制支架内的渗透通常仅限于表面 (Seguin 等人, *Spine*, 29 (12): 1299-306 (2004))。细胞在支架内的渗透还依赖于支架的孔径。大孔径确保较好的渗透, 但是影响机械性能。如在植入和在支架中产生通道的过程中进行搅动已经使到达支架一半厚度的细胞数量增加到约 38% (Rose 等人, *Biomaterials*, 25 (24): 5507-14 (2004)), 但是高速搅动对细胞活力产生有害影响, 而宽的通道对支架性能产生有害影响。细胞植入方法的另一个局限在于, 细胞在支架内的分布不是均匀的, 这可能影响工程化组织结构的品质。

这些支架的机械性能尚未被描述, 但是所合成的 ECM 远远未达到如天然椎间盘所提供的充足机械支持的需求 (Masuda 等人, *Spine*, 29 (23): 2757-69 (2004))。考虑机械性能的要求, 尝试使用骨替代品多孔聚磷酸钙粉末来制备用于 NP 置换的支架 (Seguin 等人, *Spine*, 29 (12): 1299-306 (2004))。支架允许椎间盘细胞附着, 增加扩增和 ECM 生成, 但是该附着仅限于支架表面。此外, 该结构的抗压模量远远小于 100 KPa, 仅为天然椎间盘的一小部分 (Urban 等人, *Spine*, 29 (23): 2700-9 (2004)), 已经报道人椎间盘的抗压模量范围在 3 ~ 31 MPa (Elliott & Sarver, *Spine*, 29 (7): 713-22 (2004))。结果, 上述方法不具有足量的细胞外基质沉积, 来为椎间盘提供必需的机械支持。

最后, 使用预制支架的细胞植入方法不能被用于制备具有异质结构的组织, 该组织具有不同的细胞类型和密度, 以及不同的 ECM 类型和密度, 例如椎间盘。美国专利 US 6,783,546 公开了一种异质结构, 其在合成多聚物层之间夹着一层角蛋白水凝胶, 合成聚合物层例如是用于乳房重建和 NP 置换的硅树脂和聚乙烯。然而, 这些合成材料在生物相容性方面具有局限性。关于机械性能方面没有被报道。对角蛋白水凝胶的处理包括加热到一定温度, 例如 90°C, 该温度高于蛋白质变性和细胞损

坏的温度，以致于在制造过程中不能包括活组分。结果，保证了一种克服了细胞植入到预制支架上的局限性的更好的 IVD 组织工程化的构造方法。

### 发明概述

已经开发出用于椎间盘置换的生物工程化的 IVD，其可作为患有严重退行性病变 IVD 的患者的临床可行性治疗方法。椎间盘由数层细胞例如 MSC 建成，这些细胞被包裹在一种材料，例如胶原或细胞外基质中。该组合物可包括影响 MSC 分化的因子，例如用于软骨细胞系的 TGF- $\beta$ 。通过 MSC 引起的基质收缩，引发含有细胞外基质和活细胞的多层结构自组装，来制备生物工程化的 IVD。采用这种方法，MSC 或其它活细胞可均匀地分布在大部分 ECM 中。该方法制备了一种生物工程化的 IVD，其含有密度极高的胶原作为这种多层结构的最外层，该多层结构含有通过光化学交联然后进行受控的脱水而强化和稳定化的内环和外环的核。该方法以受控的方式对最外面的 ECM 层进行脱水。

还开发出了一种方法，其用于以与椎间盘结构“生成”进度相匹配的控制速度将来自骨髓的 MSC 扩张到足够数量，并维持在微球体这样更为接近生理状况的三维环境中，并且进行最小程度的体外操作。已经开发出一种方法，其将间充质干细胞分化成与椎间盘中类似的软骨细胞样细胞。

这种方法使得能够在短期内，优选在 10 天内，用活细胞和天然细胞外基质“生成”IVD 样结构，从而将对活细胞的体外操作时间降低到最少。该方法能够制备多种生物工程化的 IVD，该 IVD 用于多个椎间盘的同时置换，或者用于在体外利用生物反应器如商业购得的生物反应器进行测试后，选择功能特性最好的结构。这些方法能够制备其它的多层的或异质的组织结构，包括但是不限于消化道（G.I.）和血管。该方法可用于细胞包裹以及异常状况，例如心血管系统、神经系统和肌骨骼系统的异常状况的呈递治疗。

生物工程化的 IVD 具有与天然椎间盘相当的完整性、活性和机械性能，已经可用于植入治疗需要置换的严重退化的 IVD。生物工程化的 IVD 在结构上类似于天然椎间盘，其异质结构包括明显的核心、内环以及外环，核中的胶原与粘多糖（GAG）的比例类似于天然椎间盘，内环具有



将核心明显分开的分界、多个具有渐增的密度的胶原基质、具有渐减的密度的 GAG 以及密度渐增的均匀分布的细胞的薄层；外环具有几个高密度的胶原基质和细胞的薄层。胶原-GAG 核心被以不同的比例制备，其含水量与天然组织类似。该制备方法还提高了 GAG 在胶原-GAG 核心中的保留量。生物工程化的 IVD 具有与天然椎间盘相当的机械性能。

#### 附图简介

图 1 是生物工程化的 IVD 样结构的示意图。

图 2 显示胶原基质的直径 (mm) 变化，在该基质中以不同的细胞密度 ( $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^3$  和对照) 接种了 MSC。

图 3 显示以不同的胶原基质密度 (在每天的不同时间段上, 0.5 mg/ml、1 mg/ml 和 2 mg/ml) 接种了 MSC 的胶原基质的直径 (mm) 变化。

图 4A 是以  $2 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  和  $5 \times 10^5$  的不同细胞密度 (A) 和不同的铺板密度 (微球体/cm<sup>2</sup>) (B) 铺板后培养 3 天, 从胶原微球体中释放出来的 hMSC 数量的图表。

图 4C 是在包裹后微球体的直径 (微米) 随时间 (小时) 而变化的图表。

图 5 是显示在沉淀过程中 0.5 和 1 的胶原和硫酸软骨素-6 的质量比作为悬浮液中的 GAG (mg) 与所用的胶原 (mg) 的函数的图表。

图 6 是经过和未经过光化学交联的胶原-GAG (硫酸软骨素-6) 核心的溶胀比的图表。

图 7 是显示 GAG 在胶原-GAG 核心中的保留量 (在数小时内随着时间而释放的毫克量) 的图表。

图 8 显示在进行对照、6 小时、8 小时和 20 小时的控制脱水后, 胶原-细胞构建体的厚度改变的百分率。

图 9 显示在进行 5 小时、8 小时和 20 小时的控制脱水后, 胶原-细胞构建体的活力改变的百分率。

#### 发明详述

用于椎间盘置换的生物工程化的 IVD 包括细胞外基质 (ECM), 在制作过程中, 细胞外基质为活细胞组分提供支撑并且与活动细胞组分

相互作用，而不引入毒性。ECM 组分可以来自天然的或合成的来源，但是优选天然来源，并且在足够支持细胞存活和生长的温和条件下被诱导自我组装或者重建而形成固体形式。混合物中的细胞组分被诱导以某种方式与基质相互作用，使得该结构的体积发生收缩，导致尺寸、ECM 密度、细胞密度、机械性能和稳定性等发生改变。通过各种因素可以精确地控制该组合物的体积变化程度，包括但是不限于 ECM 的密度、不同 ECM 的组成、活细胞的密度、相互作用时间的选择和血清浓度。

### 1. 生物工程化的椎间盘

一种组合物被提供用于制备结构与天然椎间盘类似的生物工程化的 IVD，其具有异质结构，包括明显的核心、内环和外环。该组合物包括一个核心，其由比例与天然椎间盘类似的活细胞、胶原或者其它 ECM、以及 GAG 组成。该组合物还包括一个内环，其具有作为将核心明显分开的分界的致密 HCM 薄层、多个具有渐增的密度的胶原基质和具有渐减的密度的 GAG（GAG：胶原的比例渐减）以及具有渐增的密度的均匀分布的细胞的薄层。此外，该组合物还包括一个具有几个高密度胶原和细胞的薄层的外环。

#### A. IVD 的组成

该组合物由胶原和/或其它细胞外基质材料例如蛋白聚糖/GAG、弹性蛋白等以及来自人或者其它临床上可行的来源的间充质干细胞（MSC）或者活细胞以及生长刺激信号如人血清、富含血小板的血浆、其它血液产品等组成。在进行植入或置换操作前，可以诱导该组合物而自组装或者“生长”成预定的结构。

#### 细胞

分离自 NP 和 AF 的 IVD 细胞已经被用于开发工程化的 IVD (Mizuno 等人, Spine, 29 (12): 1290-7 (2004), Seguin 等人, Spine, 29 (12): 1299-306 (2004))。然而，在晚期椎间盘退行性病变中，这些细胞被耗尽并且不具有功能性，因此它们是不可利用的。此外，获取自体的椎间盘细胞样本，造成供体部位发生病变，例如恶化，因此不是优选的。该组合物优选包括来自人或者其它临床上可行的来源的间充质干细胞（MSC），包括但是不限于自体的、同种异体的、胎儿的、胚胎的或者异种的来源，以单一细胞的悬浮液或者被包裹在基质微球体中的形式。由成人骨髓得到的 MSC 相对容易地以最小的侵入性大量获得。MSC 可

以来自自体的骨髓抽取物或者来自相匹配的供体（同种异体的）、胎儿的或胚胎的来源或者异种来源。在文献中，例如美国专利 US 6,541,024 中已经报道了人 MSC（hMSC）的分离。

#### 胶原或其它 ECM

给活细胞组分提供支持的 ECM 可以来自天然来源或者合成来源，优选是天然的。在足以支持细胞存活和生长的温和条件下，ECM 可被诱导自组装或者重建为其固体形式。ECM 以一定方式与活细胞或者其它 ECM 组分相互作用，该相互作用导致结构收缩并排出多余水分。体积收缩和缩小导致 ECM 组分的密度和活细胞的密度增加，从而增强了机械性能。通过各种因素可以控制 ECM 的收缩程度，包括但是不限于 ECM 的密度、活细胞的密度、相互作用时间的选择和血清浓度。

ECM 可以是任何类型的胶原，包括但是不限于从不同动物来源分离或提取或制备的 I、II、III 型的胶原，所述动物来源包括但是不限于大鼠尾部、猪皮、牛跟腱或人胎盘，在胶原提取过程的不同部分中，例如在酸可溶的、胃蛋白酶可溶的或者不溶的部分中。该组合物进一步包括其它 ECM，例如从软骨提取的蛋白聚糖/GAG、弹性蛋白和透明质酸或者其它类似材料。胶原可以从动物来源中，例如从大鼠尾部、猪皮、牛跟腱或人胎盘中分离、提取或者制备，可以来自胶原提取过程中的不同部分，是酸可溶的、胃蛋白酶可溶的或者不溶的，优选是酸可溶的。所用的胶原可以是已经被用于 FDA 批准的皮肤等价物 Integra® 和 Apligraf® 中的牛来源的胶原，可以是在临床上用于减少皱纹的软组织填充物或者产品，例如 DermaLive 和 DermaDeep（Bergeret-Galley 等人，*Aesthetic Plastic Surgery*, 25（4）：249-55（2001）），或者用于治疗尿失禁的产品（Corcos 等人，*Urology*. 65（5）：898-904（2005））。可以包括其它 ECM 组分，例如从鲨鱼软骨提取的 GAG、弹性蛋白和透明质酸。

#### 生长因子

另外地或可替代地，该组合物还包括生长刺激信号，例如人血清、富含血小板的血浆、其它血液产品。该组合物还包括影响 MSC 分化的其它因子，例如用于软骨细胞系的 TGF- $\beta$ 。该组合物还含有影响 MSC 分化的其它因子，例如用于软骨细胞系的 TGF- $\beta$ 。

在植入和置换操作前，还可以通过生物反应器或者等效装置将该组

合物暴露于除了可溶因子和血液产品之外的生长刺激信号中，例如模拟 IVD 将要被暴露的压力的机械刺激。在植入和置换操作前，该组合物被诱导而“生长”预定的结构。在植入和置换操作前，还可以通过在生物反应器或者等效装置中将该组合物暴露于除了可溶因子和血液产品之外的生长刺激信号，例如模拟 IVD 将要被暴露的压力的机械刺激。在植入或置换操作之前，在制作过程中包括自体的血清或血浆、汇集的人血浆和富含血小板的血浆、来自匹配供体的血液产品。包括重组蛋白质产品，例如 TGF- $\beta$ 。

治疗性、预防性和诊断性的试剂

该组合物中还包括其它治疗性、预防性和诊断性的试剂，例如抗炎药物和抗生素。

## II. 制造方法

提供一种方法来制备与天然椎间盘结构类似的生物工程化的 IVD，其具有包括明显的核心、内环和外环在内的异质结构。如实施例 1 中示例，通过诸如搅拌、旋涡、离心、摇晃等的方法，通过对酸可溶的胶原和 GAG 如软骨素-6-硫酸盐以特定比例进行诱导沉淀，该方法制备了所述的核。优选在胶原-GAG 核心中接种活细胞。如实施例 1 中所证明的，细胞密度、胶原与 GAG 的比例可以被预先确定具有特定的比例。在形成固相之前，将先前生成的结构掺入到重建的 ECM 的中心中，使得该结构被包裹并定位在凝胶化基质来包裹先前生成的结构，将 ECM 层压成薄层。重复该方法来制备不同尺寸的结构。

### 胶原或 ECM 结构的形成

在添加细胞悬浮液之前立即诱导胶原的重建，使得细胞在胶原溶液转变成固体凝胶时被包裹，从而制造 IVD 结构。使该结构不附着在周围环境中，使得该结构在特定的时间点上自由飘浮。使该结构维持在自由飘浮状态，直到达到收缩平衡。通过各种变量可以控制收缩程度、细胞和基质的密度以及机械性能，这些变量包括但是不限于胶原溶液的浓度、MSC 浓度、GAG 和其它 ECM 的浓度、血清浓度、胶原与 GAG 的比例、培养的持续时间。

优选地，生物工程化的 IVD 被制备成具有与天然椎间盘类似的异质结构，具有由比例与天然椎间盘类似的 I 型胶原与 GAG 组成的明显的核心和相对低的细胞密度。在优选的方法中，用浓度范围 0.25 ~ 4 mg/ml，

优选 1 mg/ml 的胶原溶液制备核样结构，中和并以优选约 3:1 (GAG/胶原) 的比例与来自例如鲨鱼软骨等来源的粘多糖 (GAG) 例如硫酸软骨素或者硫酸皮肤素以及适当的密度范围在  $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$  细胞/ml，优选  $1 \times 10^4$  细胞/ml 的 MSC 混合。

将该混合物倒入容器，例如 4 孔培养板中，或者模拟 IVD 形状的预先设计的容器中，在 37°C 培养箱中培养 5 分钟到 5 小时，优选 30 分钟，进行自组装或重建。将该结构与周围的连接分开，并转移到无附着性培养板，例如细菌培养皿。培养该结构，使其与活细胞相互作用 12 小时到 4 天，优选 1 天，直到得到预先设计的恒定大小，优选为哺乳动物如人的 NP 的实际尺寸。

#### 细胞的制备

以与椎间盘结构生长方案相匹配的控制速度，将来自骨髓抽吸的 MSC 扩增到足够数量，使得所分离的 MSC 经受最少的体外处理，并维持在更为接近生理学的环境下。在植入操作前的一段时间优选 2 周从患者获得骨髓抽吸物。可如文献，例如美国专利 US 6,541,024 中所述来分离骨髓 MSC。

通常以单层培养细胞，并在汇合时进行胰蛋白酶消化来持续提供细胞。但是，随着传代次数增加，细胞的形态和性能会发生改变。因此，一般认为在大部分情形下，仅前面的数代细胞可用于干细胞治疗。然而，从传代三次获得的细胞总数仍然是不足的，而对于在最短时间内生成多层的椎间盘样结构来说，连续传代之间的间隔太长。

在分离母液并冷冻保存后，对浓度已知的 MSC 进行扩增。将 BM-MSC 包裹在胶原微球体中，胶原微球体用于暂时存储 MSC。将胶原溶液配制成合适的浓度，在 0.1 ~ 100 mg/ml，优选在 0.3 ~ 4.0 mg/ml 的浓度范围下使用，进行中和并与培养液中的 MSC 混合，而且如果需要，通过适度离心的方法除气。用各种方法制备含有 MSC 的胶原微囊，这些方法包括但是不限于形成含有油相的乳状液，用定制的微球体生成器或者手动的或者自动的处理机或者分配器生成包裹细胞的胶原，以及用显微注射器将 MSC 细胞注射到预制的胶原微囊中。

将包裹细胞的微囊放置在培养箱中，在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下培养 5 分钟到 10 小时，优选 30 分钟，以重建成包裹 MSC 的胶原凝胶。在无菌 PBS 中洗涤包裹 MSC 的胶原微球体，并重新悬浮在全培养液中，优选

悬浮在含有 HS 的 DMEM 中。胶原溶液中的 MSC 密度范围在  $1 \times 10^3$  细胞/ml 到  $1 \times 10^7$  细胞/ml, 优选为  $1 \times 10^5$  细胞/ml。将包裹 MSC 的微球体铺板到培养平板上, 在全培养液中的密度在  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^4/\text{cm}^2$  之间, 优选为  $1 \times 10^3/\text{cm}^2$ 。将微球体在  $37^\circ\text{C}$  下培养 5 分钟到 10 小时, 优选为 30 分钟, 以允许在填充全培养液之前能够附着。早在铺板后 1 小时, MSC 从微球体中迁移出来。当在 12 小时到 10 天后, 优选在 1 天后, 从微球体中迁移出来的 MSC 达到一定密度时, 通过用 PBS 或培养液缓缓冲洗, 或者挑出微球体的方法, 从而从培养平板中取出微球体, 而不用胰蛋白酶消化。

使所收集的微球体在培养箱中沉积 15 分钟到 5 小时, 优选 1 小时, 或者以 500 ~ 2000 rpm, 优选 1000 rpm 的速度简单离心, 并重新铺板到新的培养平板上。以 12 小时到 5 天, 优选 1 天的连续时间间隔重复重新铺板的操作。可以将达到 80-90% 汇合度的 MSC 用胰蛋白酶消化, 以单层培养物形式来制备 IVD 结构。结果, 在 2 ~ 30 天, 优选 10 天的时期内, 这也正是“生成”IVD 结构所需的时期, 可以有规律的时间间隔, 优选每天, 从胶原微囊的同代中获得 MSC 供应, 并且仅进行一次胰蛋白酶消化。

这种方法允许用较为接近生理学环境, 以最少的体外处理程度, 以可控制的速度, 将骨髓来源的 MSC 扩增到充足数量。该方法包括使用但是不限于形成乳状液、生成小液滴和将 MSC 注射到预制的胶原微球体中的方法, 将 BM-MSC 显微包裹到三维胶原微球体中。该方法还包括包裹 MSC 的胶原微球体的培养和维持。从胶原微球体长出的 MSC 可用于制备 IVD 结构。该方法还进一步包括在一定时间间隔内将包裹 MSC 的胶原微球体重新铺板数次, 以获得持续的 MSC 供应, 而不需要进行胰蛋白酶消化。通过各种变量控制 MSC 的长出速度, 这些变量包括但是不限于微球体中的细胞密度、ECM 浓度和微球体的铺板密度。

将细胞添加到胶原或 ECM 中

将 MSC 或其它活细胞均匀地分布到大部分 ECM 中, 无论该结构的尺寸和形状如何。该方法包括在溶胶与凝胶状态相互转换完成之前, 在重建后立即在低温下将活细胞与胶原或者 ECM 溶液接触并与它们彻底混合, 从而在制造过程中形成固相。胶原从溶液自组装或者重建成由原纤维组成的固体凝胶是通过包括但是不限于改变 pH, 优选从酸性 pH 升

高到碱性 pH，改变温度，优选从 4°C 升高到 37°C，通过与高离子强度的溶液接触来改变离子强度在内的手段来诱导的。然后，将活细胞与含有全部必需的生长刺激因子和其它 ECM 的胶原溶液混合物接触。在最佳温度下，优选在 37°C 下，可以提高 ECM 的自组装或重建的速度。

可以将 MSC 或其它活细胞均匀地分布到大部分 ECM 中，而无论该结构的尺寸和形状。例如，在自组装或者重建的过程中，维持低温，优选 4°C，将降低这种自组装或者重建的速度，使得 MSC 或者其它活细胞能够与含有其它可溶的生长刺激因子和其它 ECM 的胶原溶液充分而彻底地混合。将温度提高到 37°C，或者与高离子强度的溶液例如 PBS 浓缩液接触，将优化自组装或者重建的速度。在自组装完成后以及在 5 分钟到 5 小时后，优选 30 分钟后，将获得含有均匀分布的 MSC 或其它活细胞的 ECM。

然后，在将该结构与周围环境分开后，包埋在自组装或者重建的 ECM 中的细胞可以与 ECM 相互作用，导致所得到的结构的性能发生改变，所述性能包括但是不限于尺寸、体积、含水量、ECM 密度、细胞密度、光学性能、机械性能、稳定性。通过调整包括但是不限于胶原溶液的浓度、MSC 的浓度、GAG 和其它 ECM 的浓度、血清浓度、胶原与 GAG 的比例、培养持续时间在内的各种参数，可以控制 ECM 的收缩程度。

#### 含细胞的胶原或 ECM 的交联

首先用光敏剂如玫瑰红 Bengal 平衡，并用氩激光器在 514 nm 下光照射一段时间进行充分的交联处理，对胶原-GAG 核心进行光化学交联，从而提高核心中的 GAG 在再水合时的保留量。

#### 层压形成多层

制备具有与天然椎间盘类似的异质结构的生物工程化的 IVD 的方法，除了核心之外，还可以制备成具有将核明显分开的分界和多个具有渐增的密度的胶原基质和具有渐减的密度的 GAG 以及密度渐增的均匀分布的细胞的薄层的内环。该方法将致密的胶原薄层层压到通过上面提及的方法制备的所述核心上。“包裹”所述核心的薄层作为所述核心与环之间的明显分界，通过首先中和范围在 0.25 ~ 4 mg/ml，优选 0.5 mg/ml 的低浓度胶原溶液，其次，在 37°C 培养箱中诱导重建之前，以较低比例优选 1.5:1 与 ECM 例如 GAG（即 GAG 与胶原的比例约 1:5）以及以  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$  细胞/ml，优选  $5 \times 10^5$  细胞/ml 的较高浓度与 MSC 在 4°C 下

充分混合来制备。

在简短培养 1 分钟到 1 小时，优选 5 分钟后，在同一容器中，将所述核心转移到胶原凝胶的中心，而不产生任何损害或气泡。将该结构培养 15 分钟到 5 小时，优选 30 分钟，并从培养皿中分离。活细胞和 ECM 之间的相互作用可以持续 12 小时到 4 天，优选 1 天，直到获得范围在 50 微米到 10 毫米的恒定尺寸，优选比所述核心厚 100 微米。

以规则的间隔将包裹先前生成的具有渐增的胶原密度、渐减的 GAG 密度和渐增的细胞密度的核心的多个致密的 ECM 层层压而形成内环。以规则的间隔将多个包裹先前生成的具有渐增的胶原密度和细胞密度的内环的致密的 ECM 层层压而形成外环。这些方法可用在具有不同形状的定制的容器上，以制备具有任意形状的结构。

将范围在 3~12 层，优选 3 层的几个更致密的胶原薄层层压到双层结构上作为内环。将范围在 0.25~4 mg/ml，优选分别为 0.5、1 和 2 mg/ml 的浓度渐增的胶原溶液中和，并分别与范围在 1:5~1:100，优选为 1:9、1:19 和 1:29 的递减的比例 GAG: 胶原以及在溶液中的范围在  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^9$  细胞/ml，优选为  $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$  和  $5 \times 10^6$  细胞/ml 的浓度递增的 MSC 混合。在 37°C 培养箱中进行重建培养之前，所有操作在冰浴中进行。在可以将新的细胞-基质层层压之前，在简短培养 5 分钟后，可以将生长的结构插入到刚重建的结构的中心中，允许该结构与活细胞相互作用范围在 4 小时到 4 天，优选 1 天的一段时间，达到范围从 50 微米到 10 毫米的恒定尺寸，优选比先前的结构厚 100 微米。

除了明显的核和内环外，还可以制备具有数层高密度胶原和细胞的外环。将范围在 3~15 层，优选 3 层的几层高度致密的胶原薄层层压到先前的多层结构上，作为外环。将范围在 0.25~4 mg/ml，优选分别为 0.5、1 和 2 mg/ml 的浓度渐增的胶原溶液中和，并与范围在  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$  细胞/ml，优选为  $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$  和  $5 \times 10^6$  细胞/ml 的浓度递增的 MSC 混合。在 37°C 培养箱中诱导重建之前，所有操作都在冰浴中进行。

在可以将新层层压之前，在简短培养 5 分钟后，将生长的结构插入到新生成的层的中心中，并与活细胞相互作用范围在 4 小时到 4 天，优选 1 天的一段时间，达到 50 微米到 10 毫米的恒定尺寸，优选比先前的结构厚 100 微米。

改进 IVD 的机械性能



对生物工程化的 IVD 进行改造使其具有与天然椎间盘相当的机械性能。这可以通过四种方法来实施：（1）由于机械性能随 ECM 的密度升高而提高，在允许活细胞与胶原和其它 ECM 相互作用后控制收缩程度，显著地提高 ECM 薄层的密度；（2）对各个胶原薄层进行脱水处理，从而提高 ECM 密度而不显著地损害细胞活性；（3）将含有最多水分和 GAG 的核结构包裹在致密的 ECM 包膜或薄层中，ECM 包膜或薄层有助于维持核的静水力学压力；和（4）借助于通过光化学交联，接着通过受控制的脱水来强化和稳定化的极度致密的最外层胶原层。

#### 改进椎间盘的密度

如实施例中所证实，机械性能与天然椎间盘相当。通过调节控制 ECM 收缩程度的变量，这些变量包括但是不限于细胞密度、ECM 密度、细胞与 ECM 的相互作用持续的时间以及血清浓度，可以调节 ECM 薄层的密度。该方法还包括在形成连续的薄层之前，对各个胶原薄层进行脱水处理，而不显著地损害细胞活性。用多个低 GAG 密度的薄层封装或包裹含有或保持核心的 GAG 结构，使得内部结构吸收较多水分，从而在再水合时膨胀得更厉害，这可用于保持较高的静水力学压力。IVD 结构可用通过光化学交联和控制脱水而强化和稳定化的极度致密的最外层胶原层包裹。

对最外层胶原层的光化学交联极大地改进了机械性能。将高密度胶原层层压到先前生成的多层结构上，在用光源照射之前，将该结构与光敏剂接触。所用的光敏剂可以是玫瑰红 Bengal、亚甲基蓝等。所用光源是激光、LED、氙气灯等。

通过各种方法对最终结构进行脱水处理，这些方法包括但是不限于，抵靠在强吸水剂，例如放在容器中的滤纸上，并以 500-5000 rpm，优选 1000 rpm 离心一段时间，范围在 1~100 分钟，优选 10 分钟，以去除多余的水分。沿所有方向对经过交联的结构进行离心，直到最外层脱水而形成一个致密层。在对最外层薄层的受控制的脱水的优选方法中，将经过交联处理的结构与溶剂，例如乙醇接触，采用一种将乙醇限制于表面上的方法，例如喷雾，直到该结构脱水到适当尺寸，优选比先前的多层结构厚 100 微米。在对最外层薄层的受控制的脱水的优选方法中，通过商业来源的或标准重量的生物反应器的压盘，对该结构重复实施无损害性的压力，将其压到吸水剂上。可以使该结构在介质中再水合，可

用于各种测试和植入。还通过将空气干燥的时间控制在 1~100 小时/次，优选 5 小时的范围，以及将空气干燥操作的次数控制在 1~100 次，优选 3 次的范围，每次在溶液中充分再水合，以可控制的速度在空气中干燥该结构。

对于每个薄层，用最佳的细胞和基质浓度，使得 MSC 诱导胶原基质收缩的时间最小化，并且采用离心或者压缩或溶剂水抽提，加快经过交联处理的最外层薄层的脱水速度，从而将加工时间降低到最少。

该方法使得能够 IVD 样结构的“生长”在最短时间内，优选 10 天内，由活细胞和天然细胞外基质自组装形成，从而使得活细胞的体外处理时间最小化。通过各种方法使得多层结构的每个薄层的生成时间最小化，所述方法包括但是不限于实时成像测定正在生长的结构的尺寸，使得在正在生长的结构达到稳定水平后，可以立即诱导第二个薄层的生长。也可以通过包括但是不限于去除多余水分，例如离心和溶剂水抽提的方法使得经过交联处理的薄层的控制式脱水的时间最小化。

该方法还确保生成多种生物工程化的 IVD，后者可用于同时置换多个椎间盘，或者在使用如商业购得的生物反应器进行体外测试后，选择具有最佳功能特性的结构。

该方法还能够用于制备具有多层设计的异质结构的其它生物工程化组织，包括但是不限于消化道，如食管、小肠、大肠，以及血管，具有所有可能的尺寸和形状，可使用不同来源的活细胞和不同类型的 ECM。

### III. 生物工程化的 IVD.

如图 1 中示意性地显示的，生物工程化的 IVD 在结构上与具有异质结构的天然椎间盘类似，包括明显的核心、内环和外环，该核心由比例与天然椎间盘类似的 I 型胶原和 GAG 以及密度相对低的细胞组成，内环具有将核心分开的明显分界以及多个具有渐增的密度的胶原基质、具有渐减的 GAG 密度和渐增密度的均匀分布的细胞薄层；以及具有几个高密度的胶原和细胞的薄层的外环。

### IV. 植入方法

在制备了多层结构之后，可以安排具有严重退行性 IVD 的患者进行 IVD 置换；在全身性麻醉后，通过手术将该结构插入到两个椎骨之间，保持后韧带和肌肉的完整性。可以使用内部固定来临时地提供支持，并

在通过 X 射线照相评价宿主对植入物的整合状况后被移除。

参考如下非限制性实施例，将进一步理解本发明。

实施例 1: 将 MSC 包裹在胶原微球体中。

#### 材料与amp;方法

将大鼠尾部 I 型胶原溶液中和，并在不同浓度 ( $2 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  和  $5 \times 10^5$  细胞/ml) 的人骨髓来源的 MSC 存在下在含有 10% FBS 的 DMEM 中稀释成 0.5 mg/ml。在使用前，将该溶液保存在 4°C 的冰浴中。用分配器将 5  $\mu$ l 的少量混合物滴加到无附着性的基底上。在 37°C 培养箱中培养 2 小时，允许含有 hMSC 的微球体重建成包裹细胞的微球体，然后用无附着性的基底将它们收集到含有 DMEM 介质的培养液中。在 37°C 下对所收集的微囊进行三维培养，在它们已经可以铺到传统的培养皿之前，对该球体的形态学改变和尺寸改变进行 48 小时的记录。

#### 结果

第 0 天的微球体显示正包埋在胶原基质中的各个细胞，该微球体仍然是透明的。随着时间的推移，微球体收缩，并且变得更加不透明和致密，表明细胞正在重组基质，形成更为密实的含有基质的微球体。

实施例 2: 胶原微囊中的 MSC 的三维培养，从附着的微囊中长出以及微囊的重新铺板

#### 材料与amp;方法

以不同的密度(每个培养皿 50、125 和 250 个微球体)，将包裹 hMSC 的胶原微球体铺到直径 10 mm 的培养瓶中，用 1~2 ml 全培养液覆盖培养皿，培养 1~2 小时。然后，往培养皿中轻轻加入超过 8~9 ml 培养液。培养微球体 3 天，对从微球体中长出的细胞的形态学进行评价。

#### 结果

对于细胞从微球体中长出来说，微囊附着到培养瓶上是必需的，并且取决于细胞密度以及包裹细胞的胶原微球体在培养皿中的铺板密度。从胶原微球体中长出的 hMSC 具有相似的形态学，具有纺锤体和拉长的形状。用全培养液冲洗，使得包裹 hMSC 的胶原微球体被从培养皿中释放出来，并重新铺板到新培养皿中，而将从微球体中长出的细胞用胰蛋白酶消化，用于细胞计数。分别如图 4A 和 4B 所示，hMSC 从胶原微球

体中长出的速度取决于微球体中的细胞密度和微球体在培养皿中的铺板密度。

来自兔骨髓的 MSC 从胶原微球体长出时，其形态学与传统单层培养的 MSC 相似。如图 4C 所示，胶原微囊中长出的 rMSC 的生长速度与在单层培养中的 MSC 相似，并且在与单层培养的 MSC 相似的时间段，即在铺板后 4 天汇合。

然后用胰蛋白酶消化长出的 MSC，随后用于制备 IVD 结构。首先用全培养液冲洗或者通过挑取，将胶原微球体与培养瓶分开，重新使用。然后在铺板到新培养瓶使之附着之前，使微囊沉积。从微囊中长出的再铺板 MSGs 的形态学和生长率与单层培养的 MSGs 类似。

实施例 3: 制备植入 MSC 的胶原基质，MSC 引起胶原基质收缩；  
控制收缩程度的参数的分析

#### 材料与方法

在存在浓度为  $4 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  和  $5 \times 10^5$  细胞/ml) 兔骨髓来源的 MSC 的情况下，将大鼠尾部 I 型胶原溶液中和，并稀释成浓度为 0.5、1 和 2 mg/ml。将胶原 MSC 混合物彻底混合，并且如果需要，进行除气处理，并浇铸到 4 孔平板中，在培养箱中，在  $37^\circ\text{C}$  下培养 30 分钟。用无菌移液管枪头或者注射器针头，将凝固的结构从培养平板上分开，而不破坏该结构，并转移到无附着性的培养皿，例如细菌培养皿中。按照时间记录该结构的尺寸和该结构中的 MSC 的形态学，作为该结构的体积收缩指数。

#### 结果

胶原基质收缩程度取决于所存在的活细胞。不存在细胞时，体积不缩小。ECM 的体积的收缩和缩小程度取决于细胞密度。当细胞密度升高时，不透明程度增加。在解剖显微镜下通过测微尺测量椎间盘结构的直径的缩小值。基质收缩程度与细胞密度正相关，随着细胞密度升高，提高了收缩程度，而胶原密度相反，随着胶原密度升高，降低收缩程度。在培养 4 天后，通过测量收缩结构的直径，以及在显微镜下测量该结构的冷冻部分的厚度，评价体积的缩小值。不同浓度 ( $4 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$  细胞/ml) 的 MSC 导致胶原基质体积缩小 20 ~ 75 倍。

#### 实施例 4: 制造具有不同的细胞和基质密度的多层结构

##### 材料与amp;方法

如实施例 1 和 2 中所述, 用胰蛋白酶消化从胶原微囊长出的 MSC, 用于制备多层结构。在密度为  $5 \times 10^4$  细胞/ml 的兔骨髓来源的 MSC 的存在下, 将大鼠尾部 I 型胶原溶液中和并稀释成 0.5 mg/ml。将胶原 MSC 混合物浇铸到 4 孔平板中, 在 37°C 下被诱导而自组装或重建成固体凝胶持续 30 分钟。将该结构从培养平板上分开, 并在 37°C 下发生相互作用和收缩 24 小时。中和后, 以  $1 \times 10^5$  细胞/ml 的浓度将 0.5 mg/ml 的第二层胶原基质与从胶原微囊制备的 MSC 彻底混合。在将收缩结构插入到第二种结构之前, 将该结构在 37°C 下短暂培养 5 分钟。再培养 30 分钟后, 将双层结构从培养平板上分开, 并在 37°C 下培养 24 小时。第二天, 用 0.5 mg/ml 胶原溶液和  $5 \times 10^5$  细胞/ml 的如实施例 1 和 2 制备的 MSC 制备第三种胶原 MSC 结构。在将双层结构插入到第三种结构的中心之前, 在 37°C 下短暂诱导第三种结构重建 5 分钟。在 37°C 下培养 24 小时后, 并在制备用于组织学分析的 10 微米冷冻切片之前, 测定三层结构的尺寸并用 4% 多聚甲醛固定。

#### 实施例 5: 制造通过光化学交联强化和稳定化的胶原膜

##### 材料与amp;方法

如实施例 3 所述重建大鼠尾部胶原, 并用过量的溶于蒸馏水中的浓度为 0.01% (w/v) 光敏剂玫瑰红 Bengal 平衡 2 小时, 连续搅拌, 接着用蒸馏水彻底洗涤。使用氩激光器进行交联。激光束的光点直径为 1.5 cm, 覆盖整个胶原凝胶, 呈递 125 个 0.2W 的脉冲, 脉冲持续时间为 1 秒, 相当于 25J。将未经处理的胶原凝胶用作对照。染料对照和激光对照是分别单独用光敏剂和激光处理的胶原凝胶。将经过处理的胶原凝胶在空气中干燥 96 小时以上, 以获得用于形态学分析和理化性能测定的膜。用 0.2% 戊二醛溶液处理胶原凝胶 2 小时所制备的另一化学交联胶原对照组被用于比较。在室温下, 将胶原膜在 PBS (pH 7.4) 中完全再水合 24 小时以上, 用定制的冲压器, 将膜雕刻成倾斜的钟形, 宽度为 3 mm, 规格长度为 6 mm, 规格长度用墨水标记。

用 Quick Vision QVPro202 系统 (Mitutoyo) 测量胶原样本的尺度。使用与精确度为 0.5% 的 10N 的加载室相连的应变测试器 (LR50K, Lloyd

Instruments, UK)。将完全再水合的样本放在与机器连接的定制的固定设备上。将多层 Kimwipe 纸巾放置在样本剪切端的周围，以避免样本与固定设备直接接触。这能够防止在应变测试过程中发生滑动和过早受到破坏。通过浇灌 PBS 使胶原样本保持湿润，在进行应变测试之前除去表面上的多余液体。对样本施加恒定应变标准为 5 mm/min 的单轴向压力，以每秒 50 个数据点的采集率记录压力和位移。在应变测试过程中，用 CCD 照相机以 25 帧/秒的速度记录胶原样本的标准长度上的标记的时间变化，分辨率为 540 x 720 象素。用 Photoshop 7.0 计算象素来测量标记之间的相对位移，分析应变结果。获得压力-应变曲线，计算胶原支架的机械性能，包括最大负荷、极限压力、断裂应变和 90%断裂应变下的正切系数。

### 结果

通过光化学交联增强了机械性能。

### 实施例 6: 多层交联的胶原基质的抗压模量

#### 材料与方法

将如上所说制备的交联的干燥胶原支架在 PBS (pH 7.4) 或水中再水合 30 分钟。将经过再水合的胶原膜在水或其它等张溶液中洗涤，将再水合支架表面上的水分用 kimwipes 纸巾或其它吸水剂吸干。将支架小心地放倒在容器的底部，使胶原凝胶重建。容器的直径为 15 mm，厚度约 7.5 mm。将 1.5 ml 浓度为 4 mg/ml 的经过除气处理的酸可溶大鼠 I 型胶原溶液小心地浇铸到胶原膜上。除去在该过程中产生的任何气泡。将含有膜的胶原溶液在氨水室中放置 30 分钟。重复该操作以获得双层的交联的胶原膜。在空气中干燥 24 小时以上使支架脱水。

### 结果

重复实施例 1 和 2 的操作，获得具有适当厚度的胶原支架。例如，如实施例所述方法制备的厚度约 1~2 mm 的 6 层或 10 层的胶原支架可用于椎间盘组织工程化。将实施例 2 中制备的多层胶原结构在 pH 7.4 的磷酸缓冲生理盐水中充分膨胀 2 周。未经过交联处理的结构扩张性地膨胀成厚度约 2 mm 的软凝胶样结构。该结构十分不牢固，以致不能用镊子操作，并且不能将缝合线穿过该结构。相反，经过交联处理的结构适度膨胀为厚度约 1 mm，并且足够强硬。然后将该结构放置在安装了

100N 加载室的微力测试机的样本台上。

在预先施加约 0.1K 的压力后，将应变设定为 0，实施频率为 0.1 Hz 和最大应变为 0.5 的动力压力循环。计算施加压力和未施加压力的位移曲线，而第 20 个循环的曲线用于数据分析。获得用样本尺寸归一化的抗压模量。

### 结果

比较未经过交联处理和经过交联处理的结构的压力应变曲线。未经过交联处理的结构的模量最小，而经过交联处理的结构的平均值为 4.65 Mpa。该数值与大鼠尾部和腰部的椎间盘的相当，其平均值分别为 4.03 Mpa 和 2.16 Mpa，其它报道的人的数据范围在 3~8 Mpa。图 13 给出了经光化学交联处理的胶原层的第 12 个重复加压的负载曲线。图 14 给出经光化学交联处理的胶原层的平均抗压模量，与人、兔、大鼠和小鼠的天然椎间盘的腰部运动节段相比较。

## 实施例 7: 胶原-GAG 核心的制造及其表征

### 材料与方法

用硫酸软骨素-6 沉淀酸可溶的胶原溶液来制备胶原和粘多糖 (GAG) 核心。通过旋涡混合物 1 分钟，离心固体物质来诱导沉淀，然后用 PBS 洗涤该固体物质。如图 5 中所示，确定胶原与 GAG 的最佳质量比为 4:1。如实施例 5 中所述，对胶原-GAG 核心进行化学交联。

对胶原-GAG 核心进行脱水、称重，并在 PBS 中再水合，如图 6 中所示，在不同时间点测定湿重来计算核心的膨胀率。

### 结果

未经过交联处理的胶原-GAG 迅速膨胀到 7.5 的比例，这与约 88% 的含水量相当，而经过交联处理的核心膨胀速度较为缓慢，膨胀率约为 3，与约 75% 的含水量相当。高含水量对于将其插入到椎间盘间隙时产生膨胀压力是重要的。当 GAG 组分高度溶于水时，胶原-GAG 核心中的溶胀比开始下降，并且该核心开始将 GAG 释放到周围液体中。如图 7 中所示，与未经过交联处理的核心相比，光化学交联能够保留更多 GAG。这与在稍后的时间点上稳定的溶胀比水平是一致的。GAG 保留在胶原-GAG 核心中对于植入后维持核心的结构来说是重要的。胶原-GAG 核心由纳米级别的原纤维组成，并且有孔，从而允许细胞和分子渗透。

### 实施例 8: 胶原-细胞构建物的控制脱水

#### 材料与amp;方法

如实施例 4 中所述, 用成纤维细胞和 I 型胶原溶液制造植入细胞的胶原层。以在培养箱中提供最少量的培养液以防止完全脱水的方式, 控制胶原-细胞构建物在空气中脱水。使用潮润培养室来维持较好的局部湿度。在受控制的脱水后, 胶原-细胞层收缩成更高密度, 如图 8 所示, 在不同时间点上脱水后, 各层的平均厚度下降。将脱水后的胶原-细胞构建物用酶消化, 用台盼蓝测试检查构建物中的细胞的活性。

#### 结果

以完全供应培养液方式维持对照, 而连续 8 小时的受控制的脱水与对照之间没有差别。但是, 如图 9 所示, 过夜脱水 20 小时导致显著地损失较多活性。将酶消化释放的细胞重新铺到培养皿上, 对细胞形态学进行检查。来自被脱水的层的那些细胞与对照细胞相同, 表明该细胞仍然是活的, 并且在脱水后能够附着并且正常地生长。

### 实施例 9: 人间充质干细胞在胶原凝胶中体外分化成软骨细胞

#### 材料与amp;方法

如实施例 1、3 和 4 中所述, 将 MSC 接种到微球体或者薄层形式的胶原凝胶中。根据两个可变参数制造样本: 细胞接种密度 ( $1 \times 10^5$  或  $5 \times 10^6$  细胞/ml) 和胶原浓度 (1 或 3 mg/ml)。将接种了 hMSC 的凝胶在含有转化生长因子  $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ) 的软骨细胞分化培养液中培养 3 周。

#### 结果

免疫组织化学分析结果表明在以高细胞接种密度 (即  $5 \times 10^6$  细胞/ml) 制造的凝胶中合成了 II 型胶原和聚集蛋白聚糖。切片被 Aldan 蓝染料强烈地染色, 标志着高含量的硫酸化粘多糖 (GAG)。对于用低细胞接种密度 (即  $1 \times 10^5$  细胞/ml) 和低胶原浓度 (即 1 mg/ml) 制备的样本来说, 细胞在中心聚集, 产生局部的高细胞密度区。检测到 II 型胶原和聚集蛋白聚糖。但是, 与具高细胞接种密度的凝胶相比, 这些凝胶含有明显较低含量的 GAG。对于用低细胞接种密度 (即  $1 \times 10^5$  细胞/ml) 和高胶原浓度 (即 3 mg/ml) 制备的样本来说, 未观察到细胞聚集, 而且细胞仍然均匀地分布在基质中。在这些样本中未检测到 II 胶原, 而且 GAG 的含量低。这些结果表明 hMSC 能够朝向软骨细胞路径分化, 细



---

胞是软骨细胞样的。这些细胞也表达特定的细胞外基质标记,包括 GAG、聚集蛋白聚糖和 II 型胶原,这些标记在椎间盘基质中被表达。该结果也表明胶原和细胞密度都影响向软骨细胞分化的程度。

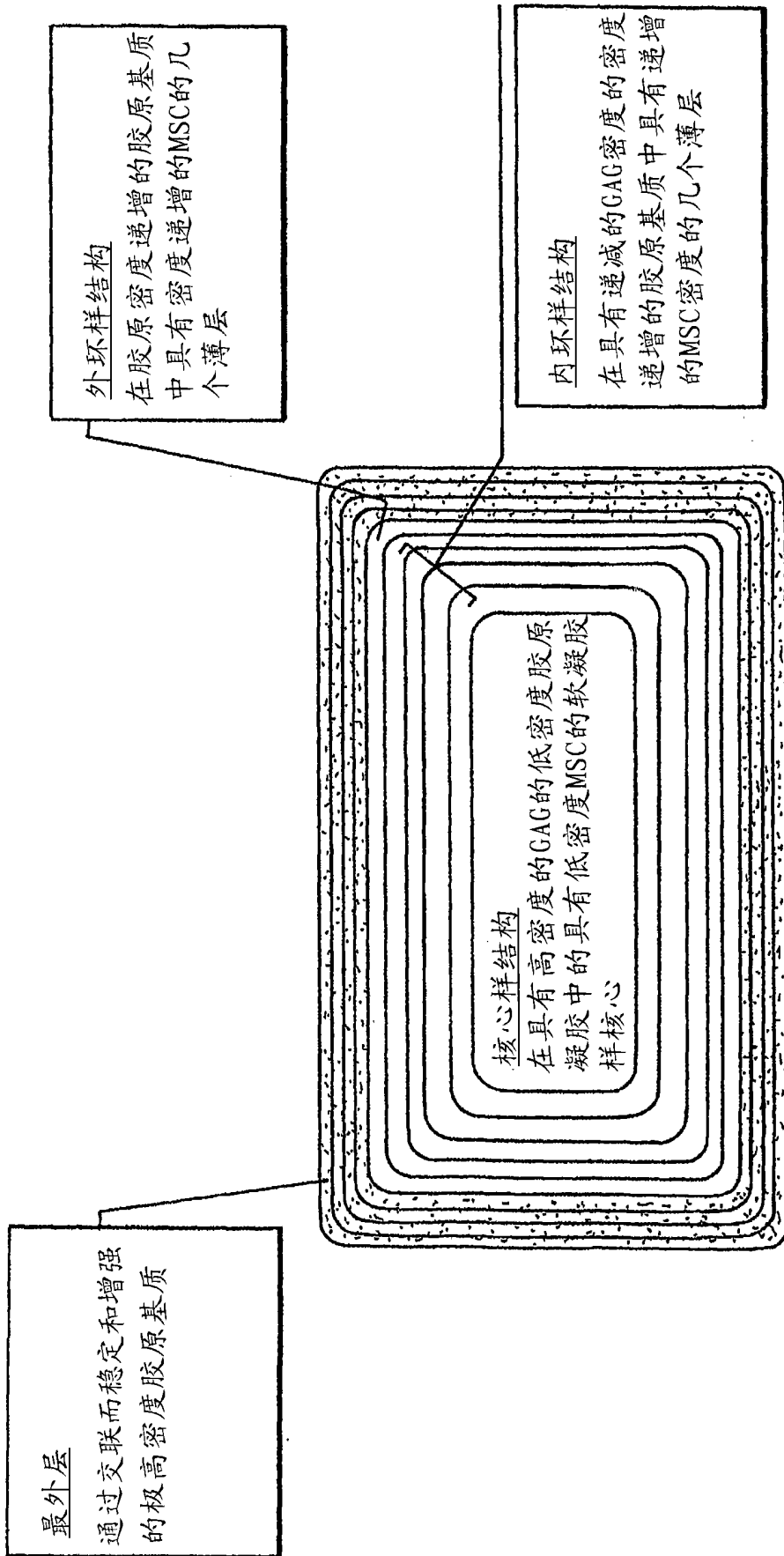


图 1

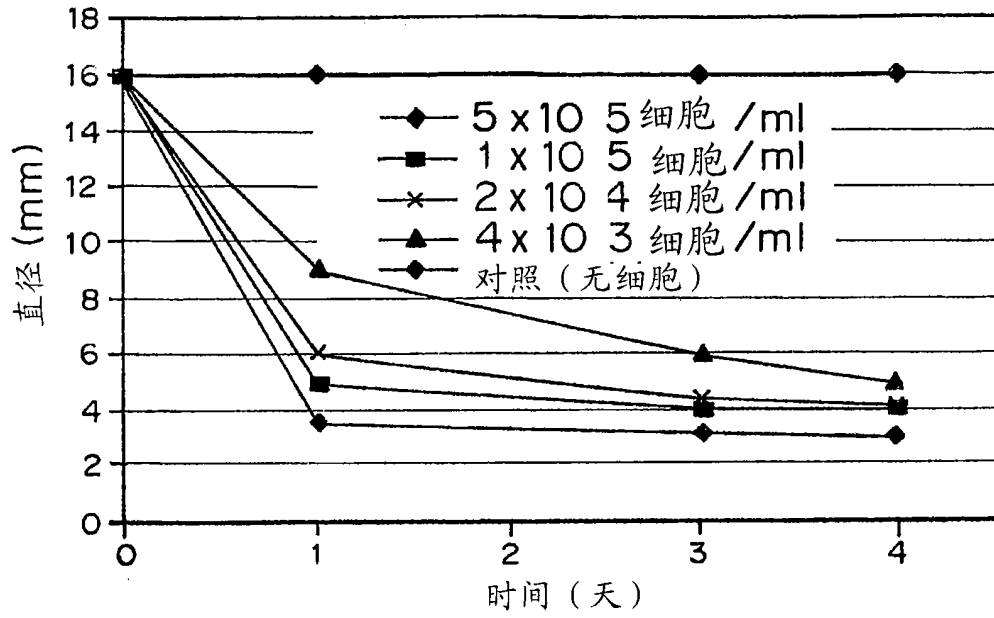


图 2

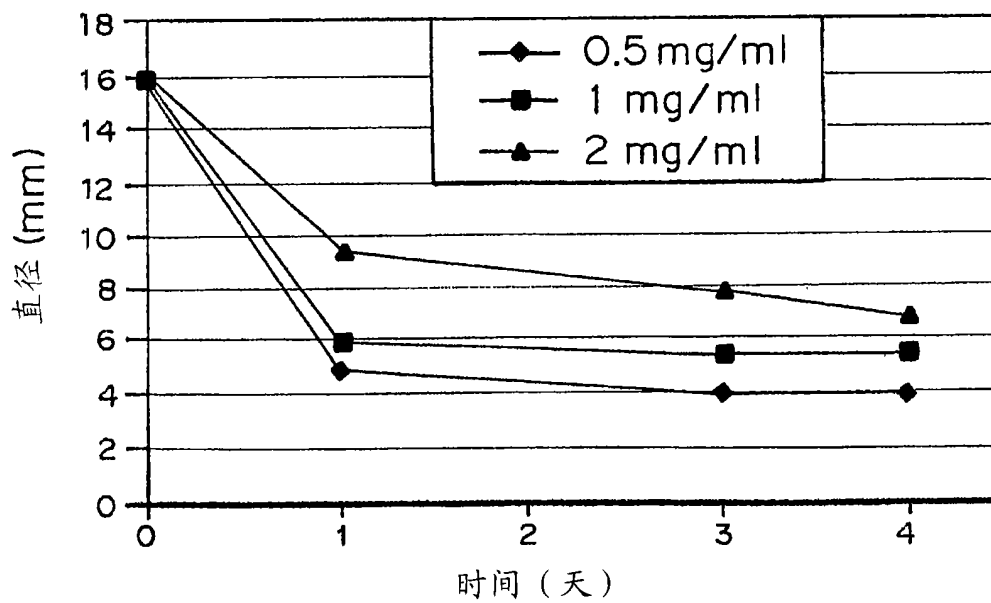


图 3

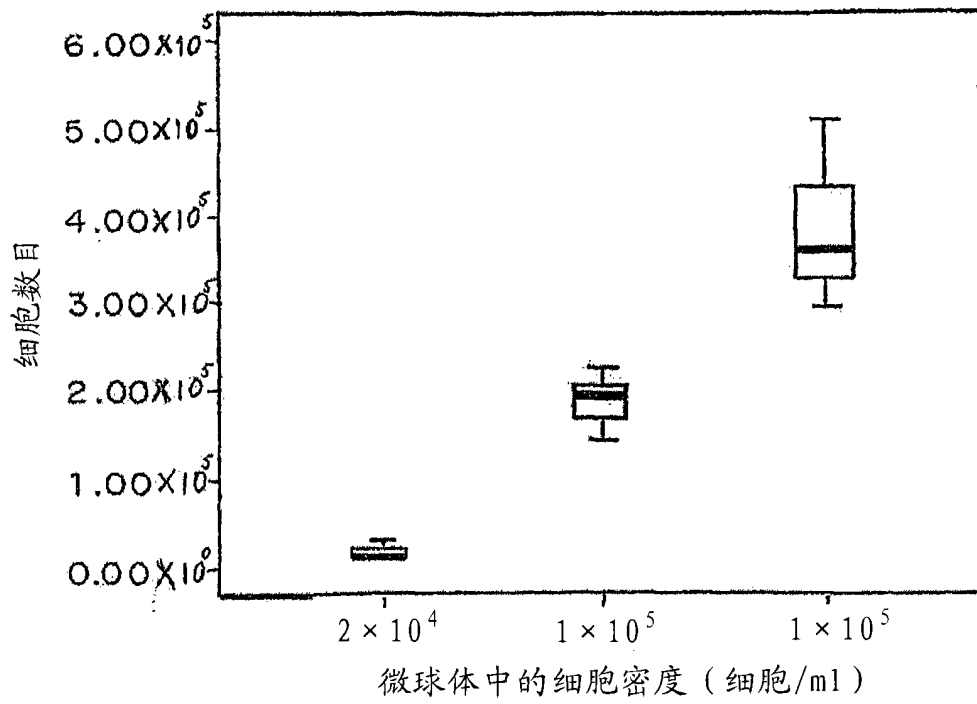


图 4A

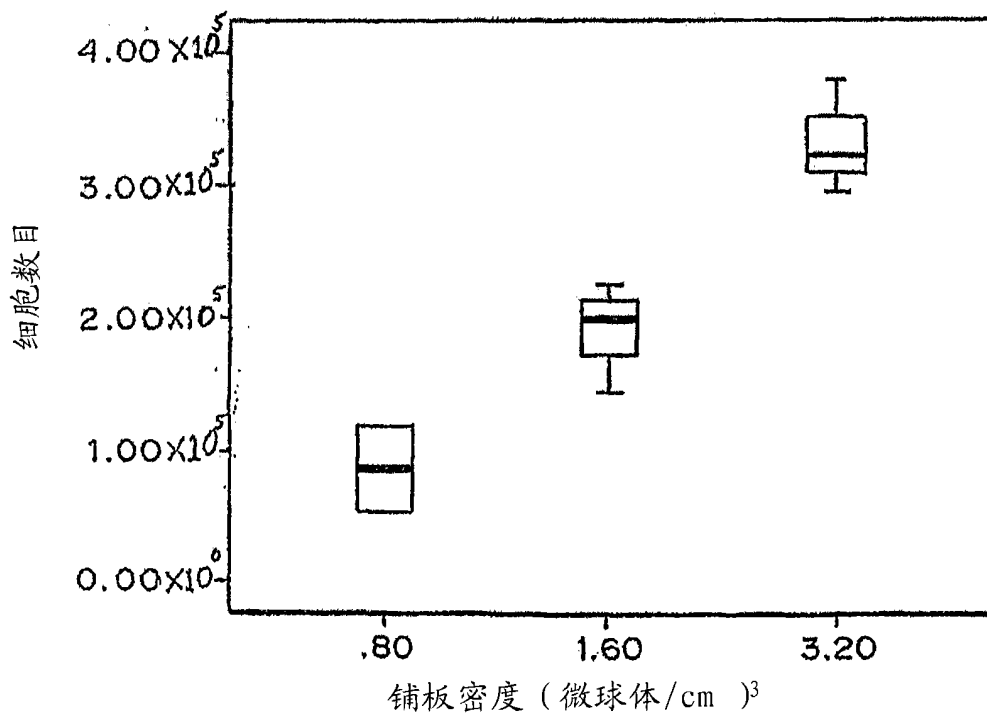


图 4B

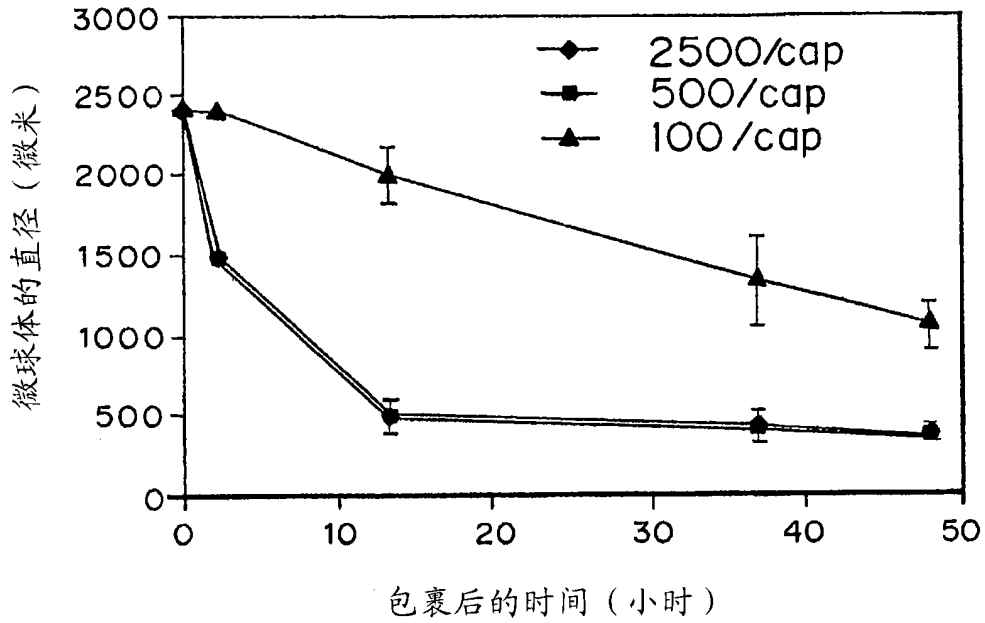


图 4C

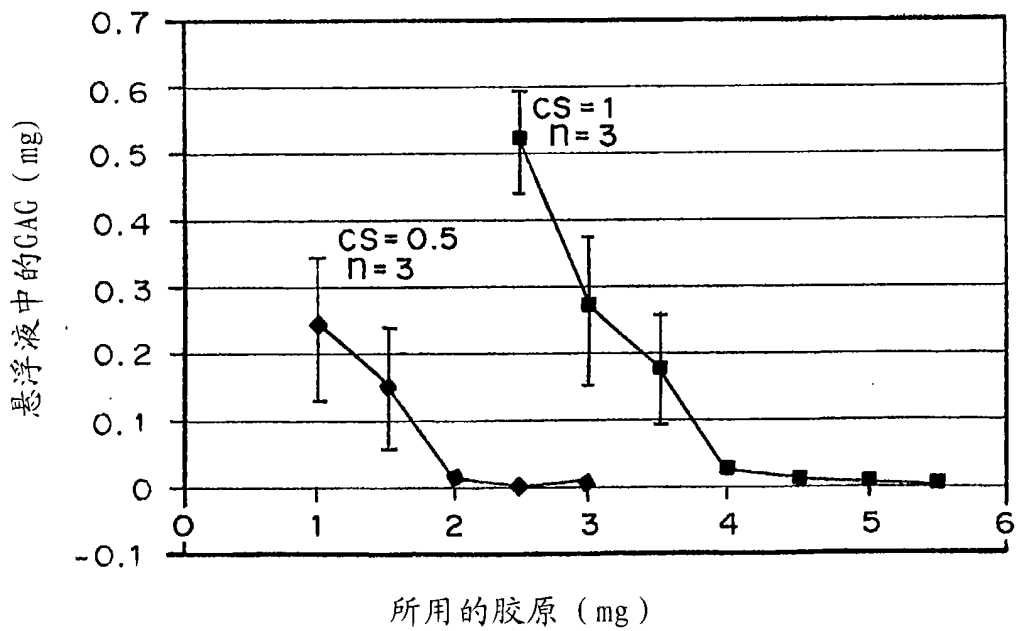


图 5

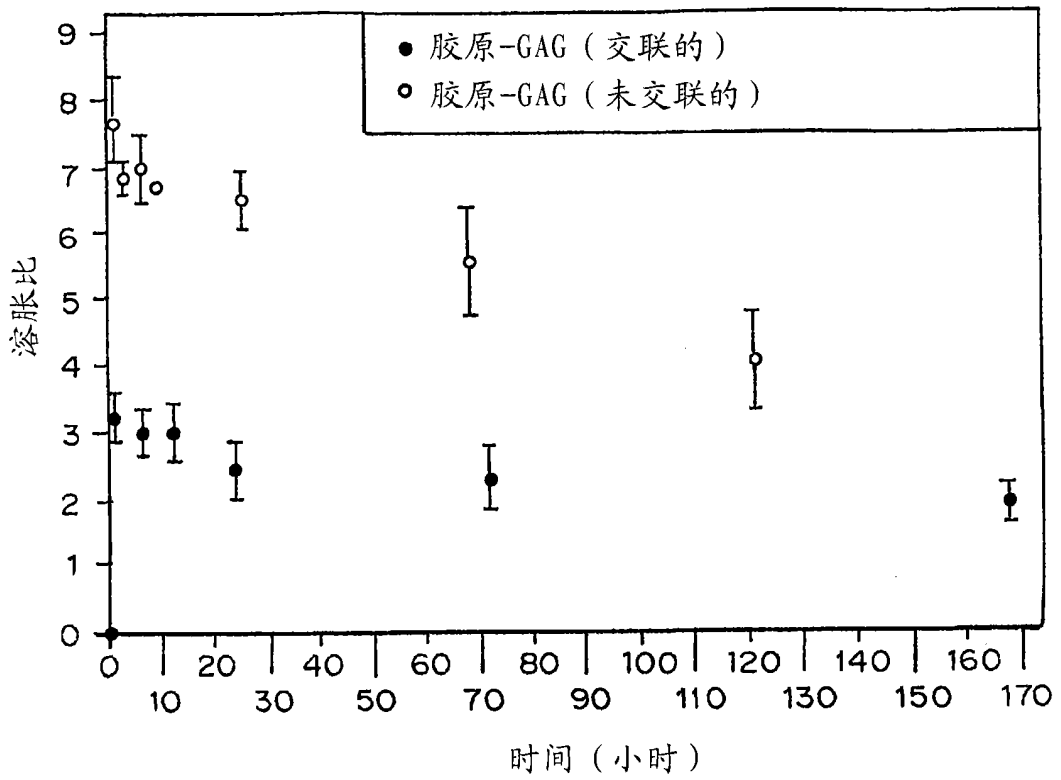


图 6

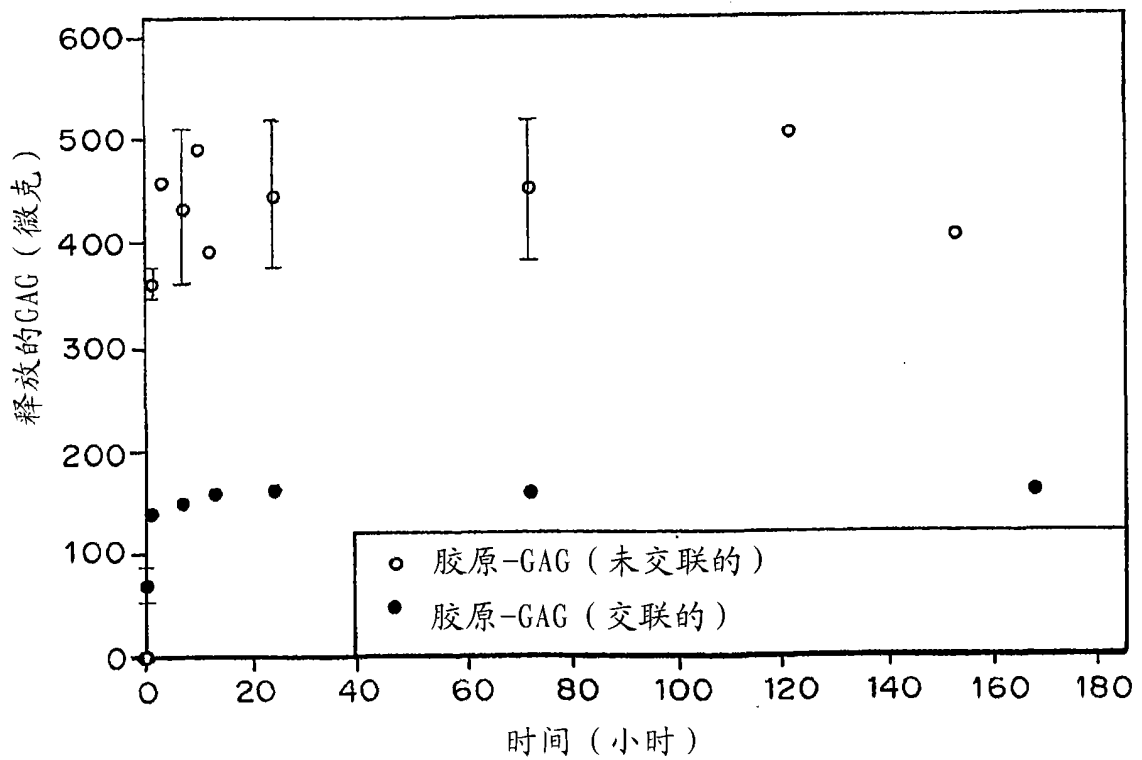


图 7

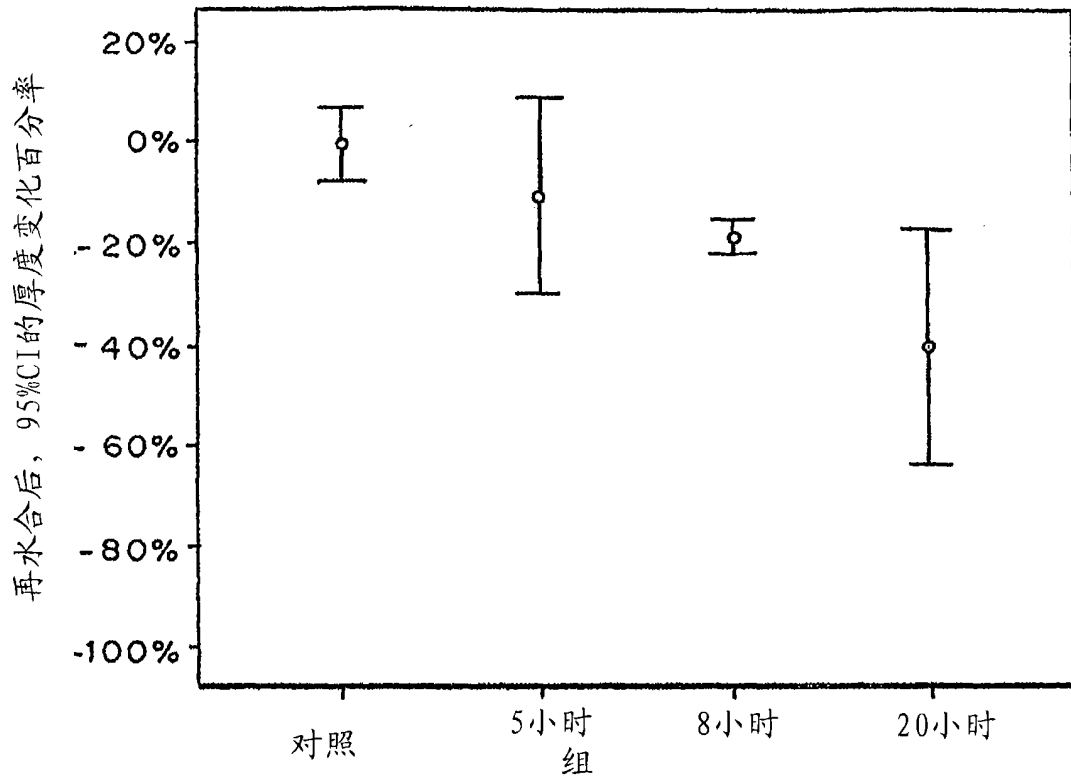


图 8

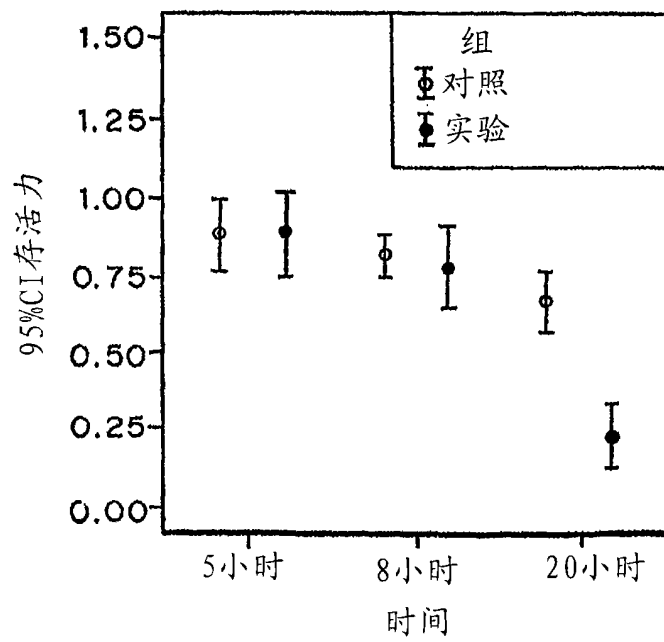


图 9