

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97196887. X

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1321681C

[22] 申请日 1997.6.24 [21] 申请号 97196887. X

[30] 优先权

[32] 1996. 6. 28 [33] US [31] 08/672,618

[86] 国际申请 PCT/US1997/011208 1997. 6. 24

[87] 国际公布 WO1998/000183 英 1998. 1. 8

[85] 进入国家阶段日期 1999. 1. 29

[73] 专利权人 罗伯特·弗朗西斯·肖

地址 美国加州

[72] 发明人 E·B·胡恩兹克

[56] 参考文献

WO9503036A1 1995. 2. 2

WO9213565A1 1992. 8. 20

US5382514A 1995. 1. 17

EP530804A1 1993. 3. 10

CN1064813A 1992. 9. 30

审查员 王 宏

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 周中琦

权利要求书 2 页 说明书 30 页

[54] 发明名称

使用功能性屏障治疗和修复软骨或骨缺损或
损伤的方法及组合物

[57] 摘要

本发明提供了治疗和修复人和其它动物软骨或骨缺损如关节全方位缺损的方法和组合物。为了诱导软骨形成,用具足够大孔径的基质填充缺损,使软骨修复细胞能聚集于基质中。基质含有作为功能屏障的抗血管生成剂以防止血管形成并防止骨长入软骨区域。填充关节软骨缺损的基质也可包含增殖剂和趋化剂,及在适当载体系统中的转化因子。全方位缺损中,骨和软骨区域间的功能屏障也可以通过加热出血区域形成暂时组织屏障得到,该屏障防止血管和相关细胞从骨区域穿透到软骨区域。如果需要,全方位缺损的骨部分可以用具足够大孔径的基质填充以使细胞能聚集于基质中并形成血管。填充骨缺损的基质可以含有在适当载体系统中的血管生成因子和骨生成因子。本发明也提供用于牙科

和其它应用的促进骨和结缔组织再生的方法和组合物。

1. 含有效剂量抗血管生成剂的基质在制备用于治疗动物软骨全方位缺损的药物中的用途。

2. 权利要求 1 的用途，其中基质进一步包含有效剂量的转化因子以将修复细胞转化成为软骨细胞。

3. 权利要求 2 的用途，其中基质进一步包含有效剂量的增殖剂以刺激修复细胞的增殖。

4. 权利要求 3 的用途，其中基质进一步包含有效剂量的趋化剂以吸引修复细胞。

5. 权利要求 2 或 3 的用途，其中将转化因子与载体系统结合，该载体系统以足以将修复细胞转化成为软骨细胞的浓度释放转化因子。

6. 权利要求 5 的用途，其中抗血管生成剂以游离的形式和以与载体系统结合的形式包含在基质中以提供持久的释放。

7. 权利要求 1 的用途，进一步包括与载体系统结合的有效剂量的转化因子，当修复细胞已聚集于基质时，该载体系统向基质填充的缺损部分释放转化因子以将修复细胞转化成为软骨细胞。

8. 含有有效剂量的增殖剂以刺激修复细胞的增殖和有效剂量的与载体系统结合的转化因子的基质在制备用于治疗动物软骨全方位缺损的药物中的用途，该载体系统以足以将修复细胞转化成为软骨细胞的浓度释放转化因子，其中加热处理出血部位以形成暂时的生物膜，并且用基质填充全方位缺损的软骨部分。

9. 权利要求 8 的用途，其中基质进一步包含有效剂量的抗血管生成剂以防止血管长入软骨。

10. 权利要求 8 的用途，其中基质进一步包含有效剂量的趋化剂以吸引修复细胞。

11. 权利要求 2 的用途，进一步包括用第二种基质填充缺损的骨部分。

12. 权利要求 11 的用途，其中第二种基质含有有效剂量的血管生

成因子以刺激血管与相关细胞的形成和长入,并含有与载体系统结合的骨生成因子,该载体系统以足以诱导骨修复细胞分化成为形成骨的骨细胞的浓度释放骨生成因子。

13. 含有有效剂量的抗血管生成剂以防止血管长入软骨、有效剂量的趋化剂以吸引修复细胞、有效剂量的增殖剂以刺激修复细胞的增殖和有效剂量的与载体系统结合的转化因子的基质在制备用于治疗动物软骨缺损的药物中的用途,该载体系统以足以将修复细胞转化成为软骨细胞的浓度释放转化因子。

14. 权利要求 13 的用途,其中抗血管生成剂以游离的形式和以与载体系统结合的形式包含在基质中以提供持久的释放。

15. 权利要求 1、8 或 11 的用途,进一步包括用无菌的试剂溶液从缺损的表面降解蛋白聚糖,其中在用基质填充缺损之前去除该试剂。

16. 权利要求 15 的用途,其中降解蛋白聚糖的试剂是软骨素酶 AC。

17. 权利要求 6 的用途,其中载体系统选自脂质体、可生物腐蚀的聚合物、胶原蛋白纤维、基于碳水化合物的微粒和水油乳剂。

18. 权利要求 17 的用途,其中基质选自纤维蛋白、胶原蛋白、白明胶、琼脂糖及其组合。

19. 权利要求 11 的用途,其中用于填充缺损的软骨部分的基质选自纤维蛋白、胶原蛋白、白明胶、琼脂糖及其组合;用于填充缺损的骨部分的第二种基质选自含钙盐的基质。

20. 权利要求 2 的用途,其中抗血管生成剂是舒拉明。

21. 权利要求 2 的用途,其中转化因子选自 TGF- β 和 BMP。

22. 权利要求 12 的用途,其中转化因子选自 TGF- β 和 BMP;骨生成因子选自 TGF- β 、BMP 和 FGF。

23. 治疗软骨缺损的组合物,该组合物含有:

用于敷裹软骨缺损或损伤区域的可生物降解的基质或基质形成材料;

有效剂量的抗血管生成剂以防止血管长入软骨;以及

有效剂量的转化因子以将修复细胞转化成为软骨细胞。

使用功能性屏障治疗和修复软骨 或骨缺损或损伤的方法及组合物

发明的技术领域

本发明涉及软骨缺损或损伤及软骨和骨全方位缺损(full - thickness defect)或损伤的治疗和修复。更特别地,本发明涉及治疗软骨和骨缺损或损伤(本文中可以互换使用)的方法,并涉及软骨修复组合物,该组合物包含含有抗血管生成剂的基质,其中抗血管生成剂作为“功能性屏障”以防止血管从下面的骨组织长入新的软骨组织。软骨修复组合物也可含有一种或多种增殖剂和转化因子以促进软骨修复细胞的增殖和转化以形成新的坚固的软骨组织。也可用骨修复组合物治疗全方位缺损的骨部分,骨修复组合物包含含有血管生成因子和骨生成因子的基质以刺激血管和骨的形成。本发明的组合物和方法在治疗严重骨关节炎和其它产生软骨和骨损伤的疾病和创伤中发现的全方位损伤中特别有用。使用其它抗组织因子作为功能屏障的本发明的其它组合物和方法在治疗诸如牙周疾病中的其它损伤和缺损时,在需要抑制或延缓某些组织生长的地方有用。

背景技术

关节是骨架中骨骼联接的一般方式之一。正常关节联接的骨骼的末端由关节软骨组织覆盖,这可以使骨骼间无摩擦地相互运动[L.Weiss 编辑,细胞与组织生物学(Munche:Urban 和 Schwarzenburg, 1988)第 247 页]。

关节软骨以特定结构组成为特征。它由包埋在胞间物质(在文献中通常称为“软骨基质”)中的特定细胞(软骨细胞)构成,其中胞间物质富含蛋白聚糖(主要为 II 型胶原原纤维)、其它蛋白质和水[Buckwalter 等,“关节软骨:损伤与修复”,于:肌肉骨骼软组织的损伤和修复(Park Ridge, Ill: American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium, 1987),第 465 页]。软骨组织既不受神经支配,也没有血管或淋巴系统穿过。但是在

成年人的成熟关节中，在骨组织与软骨之间形成细窄连续板块，此骨板下面的软骨下骨组织受神经支配并有血管形成。在此骨板下，骨组织形成含有骨髓的小梁。在未成熟的关节中，关节软骨只衬有原始的骨小梁。关节中的半月板组织部分也由软骨构成，其组成与关节软骨相似[Beaupre, A. 等, Clin. Orthop. Rel. Res.第 72 - 76 页, (1986)]。

在软骨表面可识别两种类型的缺损，即全方位缺损和表面缺损。这两种缺损的区别不仅在于对软骨物理损伤的程度，而且在于每种损伤所能引起的修复应答的性质。

关节表面的全方位缺损包括对透明软骨、钙化软骨及含血管和骨髓的软骨下骨组织的损伤。对骨组织的损伤包括骨组织中的裂缝到更大的缺陷。由于骨板含有感觉神经末梢，所以全方位损伤会引起剧烈疼痛。这种缺损一般由严重创伤引起或者在退化性关节疾病，如骨关节炎的晚期产生。全方位缺损有时可能导致出血并且诱导来自软骨下骨组织的修复反应[Buckwalter 等, “关节软骨：组合物、结构、对损伤的反应和促进修复的方法” 关节软骨和膝关节功能：基础科学和关节镜检查(New York: Raven 出版社, 1990)第 19 - 56 页]。所形成的修复组织是血管化的纤维性类型软骨，其生物力学性能不足，并且不能长期保留[Buckwalter 等, (1990), 同上]。

关节软骨组织的表面缺损只限于软骨组织本身。这种缺损非常麻烦，因为它们不能治愈并且不引起修复反应。

表面缺损可以表现为软骨表面的裂隙、削起或裂口，或者在受侵袭的组织中具有“螃蟹肉”外观。它们没有象全方位缺损中可见的出血(血斑)。表面缺损可能的起因未知，但它们通常由导致软骨组织磨损的机械错位引起。机械错位可能由关节创伤例如撕裂的半月板组织移位至关节中、半月板切除术、韧带撕裂引起关节松弛、关节排列不齐或骨折引起，或由遗传性疾病引起。表面缺损还具有退化性关节疾病，例如骨关节炎早期的特征。由于软骨组织不受神经支配[Ham's Histology(第 9 版)(Philadelphia: J. B. Lippincott 公司, 1987), 第 266 - 272 页]或由于非血管化，所以表面缺损没有痛苦。尽管没有痛苦，但是表面缺损无法治愈并且经常转为全

方位缺损。

一般认为, 由于关节软骨缺少血管系统, 损伤的软骨组织得不到足够的或适当的刺激以引起修复应答[Webber 等, “兔半月板纤维软骨的体内修复能力: 一种细胞培养模式”, (30th Ann. Orthop. Res. Soc., Atlanta, 1984 年 2 月); Webber 等, J.Orthop. Res., 3, 第 36 - 42 页(1985)]. 可以推理, 正常情况下软骨组织中的软骨细胞不能与足量的通常存在于损伤的血管化组织中的修复刺激剂如生长因子和血纤维蛋白凝块接触。

一种用来将损伤的软骨组织与修复刺激素接触的方法, 涉及通过软骨钻入或刮至软骨下的骨组织以引起出血[Buckwalter 等, 1990. 同上]。不幸的是, 组织针对这样的外科手术创伤的修复应答通常与引起出血的全方位缺损中所观察到的自然发生的应答相同, 都形成生物力学性能不足并且不能长期保留的纤维性类型软骨[Buckwalter 等, (1990)同上]。

已有各种生长因子得到分离, 目前已可供研究和生物医学应用[见例如 rizzino, A., Dev. Biol. 130, 第 411 - 422 页(1988)]. 已有报导, 这些生长因子中的一些如转化生长因子 β (TGF - β)能在体外促进大鼠胚胎间充质细胞中的软骨特异分子, 如 II 型胶原蛋白和软骨特异的蛋白聚糖的形成[例如 Seyedin 等, 美国国家科学院院报, 82, 第 2267 - 2671 页(1985); Seyedin 等, 生物化学杂志, 261, 第 5693 - 95 页(1986); Seyedin 等, 生物化学杂志, 262, 第 1946 - 1949 页(1987)].

而且, 已鉴定了一些明显刺激骨形成的蛋白因子。这些骨生成因子包括骨形态建成蛋白, 成骨素, 骨生成蛋白(BOP), TGF - β , 和重组的骨诱发蛋白。

已有无数患者被诊断为患有骨关节炎, 即在他们的关节软骨中有退化性缺损或损伤。然而, 尽管有各种方法声称可以在损伤的软骨中引起修复应答, 但是这些治疗方法都没有得到实际应用[Buckwalter 等(1990), 同上; Knutson 等, J. Bone and Joint Surg., 68 - B, 第 795 页(1986); Knutson 等, J. Bone and Joint Surg., 67 - B, 第 47 页(1985); Knutson 等, Clin. Orthop., 191, 第 202 页(1984); Marquet, Clin. Orthop., 146, 第 102 页(1980)]. 而且这些治疗方法一般只提供暂时缓解。也有报

导，可系统使用“软骨保护剂”以抑制骨关节炎的发展并缓解疼痛。但是这些保护剂没有表现出能促进软骨组织损伤或缺损的修复。

到目前为止，对患骨关节炎病人的治疗主要是通过使用止痛药和消炎药缓解症状。因为没有治疗能引起关节软骨表面缺损的修复，所以软骨经常磨损到软骨下的骨板。在疾病的这一阶段即严重骨关节炎阶段，持续疼痛和显著功能衰退经常导致整个关节被切除并被金属和/或塑料的人工关节替换。目前每年在膝和髋部进行 50 万例包括关节切除与人工关节移植的手术。[见例如 Graves, E. J., “1988 Summary; National Hospital Discharge Survey”, Advanced Data From Vital and Health Statistics, 185, 第 1 - 12 页, (1990 年 6 月 19 日)]。

因此需要可靠的治疗表面软骨缺损的软骨组织和全方位缺损的软骨和骨组织的方法，全方位缺损例如可见于严重关节炎病例中。

除了软骨组织缺损，也有需要改进其它缺损的治疗方法。需要改进治疗方法的一个领域是牙周组织的修复和再生。目前，通常使用以膜为基础的物理屏障来防止不利的分隔空间之间的组织生长，例如在严重 paradontitis 病例中。[见例如，Robet, P.M. 和 Frank, R.M., “Peridontal guided tissue regeneration with a new resorbable polyactic acid membrane,” J.Periodonto, 65.5, 第 414 - 422 页(1994)]。在矫形外科科学的定向的组织再生中也使用物理膜。[见例如，Farso, R.等, “兔的长骨缺损中定向的组织再生”, Acta Orthop, 63, 第 66 - 69 页(1992)]。然而这些方法不受欢迎，因为这些膜常常不是可生物降解的，所以需要第二次外科手术介入。另外，可生物降解的物理膜常常与长期持续的副作用有关，副作用包括炎症和慢性异物反应，慢性异物反应是因为膜的降解产物导致局部慢性炎症反应，以及与此相关导致周围组织分化过程的抑制。因此需要改进促进骨组织再生的方法以用于牙周组织和矫形外科修复。

发明概述

本发明提供了诱导人和其它动物软骨或骨损伤修复的有效治疗方法和组合物，从而解决了上面所提到的问题。使用本发明的方法和组合物也可促进外伤损伤的愈合和骨关节炎症状的治愈，否则骨关节炎将导致有效

关节功能的丧失，进而可能导致关节切除和移植。

概括地说，本发明的用于治疗表面软骨缺损或全方位缺损的软骨部分的方法包括用软骨修复基质填充缺损的软骨部分，其中软骨修复基质含有用于抑制血管向内生长的抗血管生成剂如抗侵袭因子、金属蛋白酶抑制剂或抗血管生成诱导因子的抗体。软骨修复基质将被掺入动物组织中，并且一般是可生物降解的；它也可以包含增生剂和转化因子。本发明的软骨修复基质对于治疗全方位缺损和明显的表面软骨缺损特别有用，这两种缺损可能在下面的骨中有裂缝。

在另一实施方案中，本发明的方法包括加热处理已出现出血的全方位缺损区域以产生暂时的组织屏障，然后用软骨修复基质填充缺损。在此实施方案中，可以从基质中省略抗血管生成剂。

在由于大面积骨损伤而必要或需要的情况下，本发明修复关节中全方位缺损的方法也包括用基质填充全方位缺损的骨部分缺损直到骨-软骨界面，基质将被掺入动物组织中，并且一般是可生物降解的。骨修复基质可以包含血管生成因子和骨生成因子。剩下的缺损的软骨部分用含抗血管生成剂的软骨修复基质填充到软骨表面的顶部，其中抗血管生成剂用于抑制血管向内生长。软骨修复基质也可含有增殖剂和转化因子。

使用本发明的方法治疗表面和全方位缺损可以在关节镜检查、开放式外科手术或经皮肤操作期间实施。根据本发明的某些方法，在鉴定全方位缺损之后，可以通过下列步骤治疗缺损：(1)用包含含有血管生成因子和骨生成因子的基质的组合物填充缺损的骨部分，其中血管生成因子和骨生成因子包装在适当的载体系统，例如脂质体中；和(2)用包含含有抗血管生成剂和转化因子的基质，优选地可生物降解的基质的组合物填充缺损的软骨部分，其中抗血管生成剂和转化因子包装在适当载体系统中。在第二步中，基质可以例如通过使用促粘附因子如谷氨酰胺转移酶结合到全方位缺损的软骨部分的表面。

用本发明的方法和组合物也可辅助牙周疾病的治疗。例如在治疗其中牙周韧带隐窝和牙颈暴露的疾病如 paradontitis 时，可以通过用含一种或多种刺激牙周组织形成的因子和一种或多种上皮形成抑制剂的基质填充

牙周结缔组织间隙来促进牙周结缔组织的再生。

用本发明的方法和组合物也可促进缺齿后骨的再生。特别地，可以通过用诱导骨生成的可生物降解的基质填充缺损区域来重建上颌骨或下颌骨脊部的骨，其中诱导骨生成的基质含有血管生成因子和骨生成因子以及抑制结缔组织细胞迁移和/或增殖和/或分化的抑制剂以促进骨组织的重新生长。可以在牙周结缔组织间隙内使用含一种或多种因子的可生物降解的基质以刺激牙周组织的形成。

本发明的方法和组合物也可用来防止例如关节移植后关节周的钙化和骨化，和在患末端骨折的年幼动物和儿童中防止骨长入软骨生长板。特别地，可以用含抗血管生成因子或抗骨因子的基质填充关节周结缔组织间隙或软骨生长间隙以防止钙化和骨组织的形成。

发明详述

为了能更充分地理解本发明，下面进行详细的描述。在描述中使用下列术语。

血管生成因子——此处所用的是指任何诱导或刺激血管和相关细胞(如上皮、血管周、间充质和平滑肌细胞)及血管相关基膜形成的肽、多肽、蛋白或其它化合物或组合物。体内体外对血管生成因子的检测方法在本领域内众所周知[例如 Gimbrone, M.A., 等, J.Natl. Cancer Inst., 52, 第 413 - 419 页(1974); Klagsbrum, M.等, 癌症研究, 36, 第 110 - 113 页(1976); Cross 等, 美国国家科学院院报, 80, 第 2623 - 2627 页(1983); Gospodarowicz 等, 美国国家科学院院报, 73, 第 4120 - 4124 页(1976); Folkman 等, 美国国家科学院院报, 76, 第 5217 - 5221 页(1979); Zetter, B.R., 自然(伦敦), 285, 第 41 - 43 页(1980); Azizkhan, R.G.等, J.Exp. Med., 152, 第 931 - 944 页(1980)]。

抗血管生成剂——此处所用的是指任何具有防止血管从下面骨组织长入软骨组织生物活性的化合物或组合物，如抗侵袭因子、软骨衍生的血管生成抑制剂、抗血管抑制素(angiostatin)、金属蛋白酶抑制剂、抗血管诱发因子[包括 bFGF 和上皮细胞血管生成刺激因子(ESAF)]的抗体、苏拉明(Suramin, Germanin® Bayer 公司, 德国)、烟曲霉素、烟曲霉素类似

物和 AGM - 1470[Peacock, D.J.等, 细胞免疫学, 160, 第 178 - 184 页(1995)]。体内体外测定抗血管生成剂的方法在本领域内众所周知[例如, Moses, M.A., Clinical & Exptl. Rheumatology, 11(Suppl.8)第 567 - 69 页(1993); Moses, M.A.等, 细胞生物学杂志, 119(2), 第 475 - 482 页(1992); Moses, M.A.等, 科学, 248, 第 1408 - 1410 页(1990); Ingber, D.等, 自然, 348 (6), 第 555 - 557(1990)]。

抗组织因子——此处所用的是指任何具有选择性防止不利的特定组织生长生物活性的化合物或组合物。例如, 选择性抑制上皮形成的抗上皮因子, 包括抗上皮抗体、维生素 A 抑制剂、抗维生素 A 抗体、抗基膜抗体、表皮生长因子抑制剂、富集纤连蛋白的基质、和任何其它抑制上皮细胞增生、生长或分化或上皮形成的因子[见例如, Adams, J.C.和 Watt, F.M., “纤连蛋白抑制人角质形成细胞的终末分化”, 自然, 340, 第 307 - 309 页(1989)]; 选择性抑制结缔组织形成的抗结缔组织因子, 包括抗结缔组织抗体、抗结缔组织特异生长因子的抗体、抗间充质细胞表面蛋白的抗体、和抑制间充质细胞增殖的因子; 选择性抑制骨组织形成的抗骨因子, 包括抗血管生成因子和抗 TGF - β 总类的成员的单克隆抗体或多克隆抗体或其组合。

关节镜检查——此处所用的是指使用关节镜对关节进行检查或进行外科手术。

骨——此处所用的是指主要包含以羟磷灰石形式沉积的钙和磷酸的网架、胶原蛋白(主要是 I 型胶原蛋白)和骨细胞如成骨细胞和破骨细胞的钙化结缔组织。

骨修复细胞——此处所用的是指当受到适当刺激时, 会分化并转化成骨细胞如成骨细胞或骨细胞, 继而形成骨的细胞。骨修复细胞包括血管周细胞、间充质细胞、成纤维细胞、成纤维样细胞和脱分化的软骨细胞。

软骨——此处所用的是指一种结缔组织, 该结缔组织含有被胞间物质(通常称作软骨基质)包埋的软骨细胞, 其中胞间物质包含胶原蛋白(主要是 II 型胶原蛋白和其它较少类型, 例如 IX 和 XI 型的胶原蛋白)的原纤维、各种蛋白聚糖(例如硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸角质素蛋白聚糖和硫酸皮

肤素蛋白聚糖)、其它蛋白质和水。此处所用的软骨包括关节和半月板软骨。关节软骨覆盖关节中骨部分的表面并使关节在运动时没有直接的骨-骨接触,由此防止磨损和破坏相对的骨表面。大部分正常健康的关节软骨也被描述为“玻璃样的”,即具有独特的毛玻璃外观。半月板软骨常常在受震动和运动的关节中发现。这样的半月板软骨定位包括颞下颌关节、胸锁关节、肩峰锁关节、腕关节和膝关节[Gray's Anatomy(New York: Bounty Books, 1977)]。

软骨修复细胞——此处所用的是指当受到适当刺激时,会分化并转化成软骨细胞的细胞。软骨修复细胞包括间充质细胞、成纤维细胞、成纤维样细胞、巨噬细胞和脱分化的软骨细胞。

细胞粘附促进因子——此处所用的是指任何介导细胞粘附到细胞外物质上的化合物或组合物,包括纤连蛋白和其它与四肽一样小的肽,包括三肽 Arg - Gly - Asp[Ruoslathi 等, 细胞, 44, 第 517 - 518(1986)]。

趋化剂——此处所用的是指任何能在体外趋化性分析中按标准吸引细胞的化合物或组合物,包括肽、蛋白质、糖蛋白和糖胺聚糖链[例如 wahl 等, 美国国家科学院院报, 84, 第 5788 - 5792(1987); Postlewaite 等, J.Exp.Med., 165, 第 251 - 256 页(1987); Moore 等, Int. J. Tiss. Reac., XI, 第 301 - 307(1989)]。

软骨细胞——此处所用的是指能够合成软骨组织成分例如 II 型软骨原纤维和纤维以及蛋白聚糖的细胞。

成纤维细胞生长因子(FGF)——从天然、合成或重组来源获得的 FGF 多肽家族的任何成员[Gimenez - Gallego 等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 第 541 - 548 页(1986); Thomas 等人, Trends Biochem. Sci., 11, 第 81 - 84 页(1986)] 或其衍生物,它们在体外能够刺激各种细胞包括主要的成纤维细胞、软骨细胞、血管和角膜上皮细胞、成骨细胞、成肌细胞、平滑肌和神经胶质细胞[Thomas 等, 1986, 同上]的 DNA 合成和细胞分裂[对于测定法可参见例如 Gimenez - Gallego 等, 1986, 同上; Canalis 等, J.Clin. Invest., 81, 第 1572 - 1577 页(1988)]。根据等电点(PI)可将 FGF 分成酸性 FGF(aFGF)或碱性 FGF(bFGF)。

基质——此处所用的是指具有足够大孔径或空隙使细胞能聚集于该基质中的多孔复合固体或半固体材料。术语基质包括基质形成材料，即能够在软骨或骨的缺损部位中形成基质的材料。基质形成材料可能需要添加聚合剂以形成基质，比如向含有纤维蛋白原的溶液中加入凝血酶，以形成纤维蛋白基质。其它基质材料包括胶原蛋白、胶原蛋白和纤维蛋白的组合、琼脂糖(例如 Sepharose®)和白明胶。在治疗骨缺损时也可单独使用或与其它基质材料结合使用形成固体基质的磷酸钙如磷酸三钙、羟磷灰石或其它钙盐。

膜——此处所用的是指任何可以放在全方位缺损的骨缺损部分和软骨缺损部分之间并防止全方位缺损中骨缺损部分向软骨缺损部分细胞迁移和血管渗入的材料。在本发明的方法和组合物中所用的用于修复全方位缺损的膜优选地可生物降解。

骨生成因子——此处所用的是指任何诱导或刺激骨形成的肽、多肽、蛋白或其它化合物或组合物。骨生成因子诱导骨修复细胞向骨细胞如成骨细胞或骨细胞分化。这个过程可以经由软骨组织中间状态达到。由骨细胞形成的骨组织将含有骨特异的物质如 I 型胶原蛋白原纤维、羟磷灰石矿质和各种糖蛋白及小量骨蛋白聚糖。

增殖(促有丝分裂)剂——此处所用的是指任何能够在体外刺激细胞增殖的化合物或组合物，包括肽、蛋白质和糖蛋白。在体外测定肽、多肽和其它化合物增殖(促有丝分裂)活性的方法在本领域内众所周知[见例如 Canalis 等, J.Clin.Invest., 第 1572 - 1577 页(1988); Gimenez - Gallego 等, biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 第 541 - 548 页(1986), Rizzino, “用于测定转化生长因子和促有丝分裂肽的软琼脂生长测定法”, 酶学方法, 146A(New York: Academic Press, 1987), 第 341 - 352 页; dickson 等, “Assays of Mitogen - Induced Effects on Cellular Incorporation of Precursors for Scavengers, de Novo, and Net DNA Synthesis”, 酶学方法, 146A(New York: Academic Press, 1987), 第 329 - 340 页]。一种测定化合物或组合物增殖(促有丝分裂)活性的标准方法是在体外测定其在软琼脂中诱导非转化细胞无贴壁依赖性生长的能

力[例如 Rizzino, 1987, 同上]。其它促有丝分裂活性测定体系也是已知的[例如 Gimenez - Gallego 等, 1986, 同上; Canalis 等, 1988, 同上; Dickson 等, 1987, 同上]。试剂的促有丝分裂效力常常是高度浓度依赖性的, 它们促有丝分裂的效力能在比最适浓度范围更低或更高的浓度下逆转。

转化因子——此处所用的是指任何诱导软骨修复细胞分化成为软骨细胞的肽、多肽、蛋白质或其它化合物或组合物。化合物或组合物诱导或刺激细胞合成软骨特异蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的能力可以通过现有技术已知的体外分析法测定[Seyedin 等, 美国国家科学院院报, 82, 第 2267 - 2271 页(1985); Seyedin 等, Path. Immunol. Res., 7, 第 38 - 42 页(1987)]。

转化生长因子 β (TGF - β)——从天然、合成或重组来源获得的 TGF - β 多肽家族的任何成员[Derynck, R.等, 自然, 316, 第 701 - 705 页(1985); Roberts 等, “转化生长因子 - β ”, 肽生长因子和它们的受体 I(Berlin: Springer Verlag, 1990)第 419 页]或其衍生物, 它们具有独特的 TGF - β 活性, 在软琼脂分析中可刺激正常大鼠肾(NRK)细胞生长并形成克隆[Roberts 等, “从非瘤性组织中纯化 β 型转化生长因子”, 制备用于无血清动物细胞培养的培养基、补料和基质的方法(纽约: Alank. Liss, Inc., 1984)]; 并且可由它们在体外诱导或刺激细胞合成软骨特异蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的能力证明, 它们能够诱导软骨修复细胞转化成为软骨细胞[Seyedin 等, 1985, 同上]。

本发明涉及治疗软骨和骨缺损或损伤的组合物和方法。本发明的组合物包含具有足够大孔径的基质, 使细胞能聚集于该基质中。

为了用于修复表面缺损中的软骨或全方位缺损中的软骨层, 基质含有具有防止血管长入软骨组织生物活性的抗血管生成剂, 由此防止骨的形成和软骨组织的不完全修复。基质也可以包含增殖剂以刺激基质中软骨修复细胞的增殖。优选地, 其中增殖剂也作用为趋化剂以吸引软骨修复细胞至基质中。选择性地, 基质除了含有增殖剂, 还可含有趋化剂。在本发明优选的实施方案中, 基质也含有适当浓度的转化因子, 其中转化因子包含在

载体系统中或与载体系统结合以实现转化因子在适当的时候释放,转化因子将基质中增殖的软骨修复细胞转化成为软骨细胞,以形成稳定的软骨组织。该基质也可以包含细胞粘附促进因子。

修复全方位缺损使用的软骨修复基质可以不需要趋化剂或增殖剂,并且可以不必太多地延迟转化因子的释放。在全方位缺损中,可以充分地得到下面骨中的修复细胞,并且不必为此目的吸引滑膜细胞。修复细胞将迅速地从骨间隙迁移到软骨缺损部位。然而如果需要,尤其是缺损范围较大的地方,可以包含增殖剂和趋化因子。由于修复细胞将迅速地聚集到缺损部位,所以较多地延迟与转化因子的接触不如在表面缺损中重要,这是因为在表面缺损中需要更多的时间去吸引和扩增修复细胞。然而,如果缺损范围较大,转化因子可以被隔离以保证在与转化因子接触之前,在整个缺损区域增殖足够的修复细胞。另外,为了治疗全方位缺损,基质中可以包含游离形式的和与载体系统结合的抗血管生成剂和转化因子以提供在一定的时间范围内持久的浓度。

对于明显延伸到下面骨中的全方位缺损病例,优选地在用本发明的软骨修复基质填充缺损的软骨部分之前用骨修复基质填充缺损的骨部分。

在本发明的用于填充或敷裹软骨或骨缺陷的方法和组合物中适用的基质材料包括纤维蛋白原(在缺损或损伤中由凝血酶原激活形成纤维蛋白)、胶原蛋白、琼脂糖、白明胶和其它可生物降解的任何材料,这些材料形成具有足够大孔径的基质,使得软骨或骨修复细胞能够在此基质中聚集并增殖,并且这些材料在修复过程中可以被降解并被软骨或骨替换。在某些病例中,在治疗骨缺损时,可单独使用或与其它可生物降解的基质材料结合使用形成固体基质的含磷酸钙化合物,如磷酸三钙、羟磷灰石及其它钙盐。

在本发明组合物和方法中适用的基质可以预先制备或临时配制,例如通过聚合化合物和组合物如纤维蛋白原形成纤维蛋白基质。可以预先制备的基质包括胶原(例如胶原海绵和胶原毛状物)、化学修饰的胶原、白明胶珠或白明胶海绵、形成凝胶的物质如琼脂糖、其他任何由基质材料组成的形成凝胶或组合物的物质、或上述物质的混合物,这些物质将填充于缺

损处使软骨或骨修复细胞能聚集于基质中。

在本发明的一个实施方案中，使用纤维蛋白原溶液配制基质，在即将使用之前向其中加入凝血酶起始聚合作用。可以使用浓度为 0.5 - 5mg/ml 的纤维蛋白原水性缓冲溶液。优选地使用 1mg/ml 的纤维蛋白原水性缓冲溶液。该纤维蛋白原溶液在缺损区域中的聚合作用产生具有足够大孔径(例如约 50 - 200 μ m)的基质，以便软骨或骨修复细胞自由聚集于基质中并增殖以填充基质占据的缺损体积。优选地，在即将使用前向纤维蛋白原溶液中加入足量的凝血酶，以在完成聚合作用前给外科医生足够的时间将此材料填充于缺损区域。通常地，凝血酶的浓度应该使聚合作用在很少时间至几分钟(2 - 4 分钟)之内完成，因为已证明软骨长时间暴露于空气中将会引起损伤[Mitchell 等, J.Bone Joint Surg., 71A, 第 89 - 95 页(1989)]。不应使用过量的凝血酶，因为凝血酶能裂解生长因子分子并使它们灭活。加入到纤维蛋白原溶液中的凝血酶溶液可以按每毫升水性缓冲溶液中 10 - 500 单位，优选地每毫升中 100 单位的浓度制备。在本发明优选的实施方案中，在填充缺损前，将约 20 μ l 凝血酶(100 μ /ml)与每 ml 纤维蛋白原溶液(1mg/ml)混合 200 秒。如果加入的凝血酶浓度更低，那么聚合作用将更慢发生。应当理解，使纤维蛋白聚合作用在 2 - 4 分钟之内完成所需的凝血酶溶液的量只能大约地给出，因为这取决于环境温度、凝血酶溶液的温度和纤维蛋白原溶液的温度等。可选择地，如果方便，可在基质溶液被放入缺损部位之后将凝血酶加在基质溶液的顶部，使它扩散入溶液。通过观测凝血酶诱导的纤维蛋白原溶液体外样品的聚合作用，可以很容易地监测填充至缺损处的凝血酶活化的基质溶液的聚合作用。在本发明组合物和方法中，优选的纤维蛋白基质由自体纤维蛋白原分子形成，即纤维蛋白原分子来自与治疗品种相同的哺乳动物品种的血液。也可以使用来自其它物种的非免疫原性的纤维蛋白原。

在本发明的组合物和方法中也可使用含纤维蛋白和胶原蛋白，更优选地含纤维蛋白和白明胶的基质。胶原蛋白基质也可用于修复软骨缺损，包括全方位缺损。在本发明优选的实施方案中，更多的固体基质如含羟磷灰石或磷酸三钙的那些固体基质被用于修复深度全方位缺损的骨部分。

当用胶原作为基质材料时,可以例如使用 Collagen - Vliess®(“毛状物”)、Spongostan®、或白明胶-血液混合物制成足够粘的溶液,且不需要聚合剂。胶原蛋白基质也可与由聚合剂活化的纤维蛋白原溶液一起使用以便得到混合的基质。

当使用其它可生物降解的化合物配制基质时,也可能不需要使用聚合剂。例如,可以选择 Sepharose® 溶液,该溶液在 39 - 42 °C 时为液体基质溶液而在 35 - 38 °C 时变成固体(即凝胶状)。Sepharose 的浓度也应该使填充缺损的凝胶具有一定的筛目大小,从而使骨或软骨修复细胞自由聚集于基质和缺损区域。

在修复软骨使用的本发明的组合物中,可向基质溶液加入适当浓度范围的一种或多种抗血管生成剂以防止血管长入软骨组织。可以使用的抗血管生成剂包括任何具有防止血管从下面骨组织长入软骨组织生物活性的试剂。可用作本发明的抗血管生成剂的一些例子已在上文中举出。抗血管生成剂应该可以自由得到以在基质中及时提供活性,并且也可以以持久释放的形式存在,例如与如下述的载体系统结合以提供延长的活性。

可以在用于软骨修复的基质溶液中加入一种或多种增殖(促有丝分裂)剂。增殖剂应该以适当的浓度范围存在,以对填充缺损的基质中的软骨修复细胞具有增殖效应。优选地,同一增殖剂也应对细胞具有趋化效应(例如在 TGF - β 的例子中);然而,只具有增殖效应的因子也可以使用。选择性地,也可以使用两种不同的试剂以在产生趋化性细胞迁移后诱导细胞增殖,其中每种试剂仅具有这些特异效应的一种(趋化或增殖)。

在本发明的组合物和方法中用于刺激软骨修复细胞增殖的增殖(促有丝分裂)剂包括转化生长因子(“TGF”)如 TGF - α 和 TGF - β ; 胰岛素样生长因子(“IGF I”); 酸性或碱性成纤维细胞生长因子(“FGF”); 血小板衍生的生长因子(“PDGF”); 表皮生长因子(“EGF”)和造血生长因子如白细胞介素 3(“IL - 3”)和骨形态建成蛋白(“BMP”), 如骨形态建成蛋白 - 2(“BMP - 2”)[Rizzino, 1987, 同上; Canalis 等, 同上, 1988; 生物和医学中的生长因子, Ciba Foundation Symposium, 116(New York: John Wiley & Sons, 1985); Baserga, R.

编辑, 细胞生长和分化(Oxford: IRL Press, 1985); Sporn, M. A.和 Roberts, A. B.编辑, 肽生长因子和它们的受体, I 和 II 卷(Berlin: Springer - Verlag, 1990)]. 然而, 其不限于这些具体的例子。任何由体外细胞增殖实验证明能够刺激细胞增殖的化合物或组合物都可在本发明中用作增殖剂。这些测定法在本领域内已知[例如 Canalis 等, 1988, 同上; Gimenez - Gallego 等, 1986, 同上; Dickson 等, 1987, 同上; Rizzino, 1987, 同上]。

在本发明组合物和方法中用于吸引软骨修复细胞至软骨缺损的趋化剂包括例如 TGF - β 、FGF (酸性或碱性)、PDGF、肿瘤坏死因子(例如 TNF - α 、TNF - β)和蛋白聚糖降解产物如糖胺聚糖链[Roberts 等, (1990), 同上; 生物和医学中的生长因子, Ciba Foundation Symposium, 116(New York, John Wiley & Sons, 1985); R. Baserga, 编辑, 细胞生长和分化(Oxford: IRL Press, 1985)]. 测定多肽和其它化合物趋化能力的方法在本领域内已知[例如 Postlewaite 等, 1987, 同上; Wahl 等, 1987, 同上; Moore 等, 1989, 同上]。

在本发明优选的实施方案中, 在软骨修复时使用的基质含有 TGF - β 作为增殖剂和趋化剂。特别是, 可以使用 TGF - β I 或 TGF - β II 作为增殖剂和趋化剂。其它 TGF - β 形式(例如 TGF - β III、TGF - β IV、TGF - β V 等)或具有 TGF - β 活性的多肽[见 Roberts, 1990, 同上], 以及将要得到鉴定的这种物质的其它形式和其它生长因子也可用于此目的。为了用作增殖剂和趋化剂, 将 TGF - β 分子溶解或悬浮于基质中, 其浓度优选地是每毫升基质溶液中 2 - 50ng, 最优选地每毫升基质溶液中 2 - 10ng。选择性地, BMP - 2 可以以少于 1ng/ml 的浓度用作增殖剂。应当理解, 刺激软骨修复细胞增殖的 TGF - β 或 BMP - 2 的优选浓度可能随着接受治疗的具体动物变化而变化。

在修复软骨时基质溶液中还可以含有转化因子以便在软骨修复细胞聚集到基质之后, 将转化因子以足以促进软骨修复细胞向形成新的稳定的软骨组织的软骨细胞分化(即转化)的浓度释放至缺损部位。如果转化因子会抑制或干扰增殖剂的效力, 那么适当控制转化因子的释放时间是特别重

要的[见 Robetts 等(1990), 同上]。

在本发明的组合物和方法中用于促进软骨修复的转化因子包括任何诱导软骨修复细胞向合成软骨特异的蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的软骨细胞分化的肽、多肽、蛋白质或其它化合物或组合物。化合物或组合物在细胞中诱导或刺激软骨特异的蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白合成的能力可以用本领域已知的方法测定[例如 Seyedin 等, 1985, 同上; Seyedin 等, 1987, 同上]。在本发明的组合物和方法中适用的转化因子包括例如 TGF - β 、TGF - α 、FGF (酸性或碱性)和 BMP, 包括 BMP - 2。这些转化因子可以单独或在组合中使用。也可使用这些因子的二聚体和多聚体。另外, TGF - β 可以与 EGF 结合使用。

如果必要, 可以通过将转化因子包裹或结合在适当的载体系统中来实现转化因子适当地定时释放。在本发明组合物和方法中适用的载体系统包括转化因子能自动结合其上的脂质体、可生物腐蚀的多聚体、以碳水化合物为基础的微粒、纤维(如可以与硫酸肝素蛋白聚糖或其它这类分子化学联接的胶原蛋白)和渗透泵。载体系统例如带有结合的转化因子的脂质体、可生物腐蚀的多聚体、纤维和含有转化剂的以碳水化合物为基础的微粒可以与用于填充缺损的基质溶液混合。这些系统在本领域内已知并易得到[见 P.Johnson 和 J.G. Lloyd - Jones 编辑, 药物载体系统(Chichester, England: Ellis Horwood 有限公司(1987))。脂质体可以按照 Kim 等, Biochem. Biophys. Acta, 728, 第 339 - 348 页, (1983)中的方法制备。也可以使用其它脂质体制备方法。其它刺激软骨细胞合成软骨组织成分的因子可以和转化因子一起包含在载体系统中。可得到转化因子的时间应该与修复细胞增殖和填充到要治疗的缺损部位的速度相协调。当不必较多地延迟转化因子的释放时, 转化因子可以游离的形式或以与载体结合的形式包含在基质中以提供持续的适当浓度的释放。

在本发明优选的实施方案中, 修复软骨时所用的基质含有抗血管生成剂、TGF - β 或 BMP 作为增殖剂和趋化剂, 和包装在载体系统中的 TGF - β 或 BMP 作为转化因子。尤其是, TGF - β I 或 TGF - β II 或 BMP - 2 可以用作增殖剂、趋化剂和转化因子。其它 TGF - β 形式(例如 TGF

- β III、TGF - β IV、TGF - β V 或 TGF - β 家族的任何成员)或具有 TGF - β 活性的多肽(见 Roberts, 1990, 同上), 以及将来要得到鉴定的这种物质的其它形式和其它生长因子均可以用于此目的。优选地, 抗血管生长剂在基质中包含在含转化浓度的 TGF - β 和 BMP 的载体系统内, 以及以游离形式存在。

在修复软骨的优选的实施方案中, 用作增殖剂和趋化剂的 TGF - β 的浓度优选为 2 - 50ng/ml 基质溶液, 最优选地 2 - 10ng/ml 基质溶液。在基质组合物中, 高得多浓度的 TGF - β 也可以随后释放的形式存在于基质组合物中作为转化因子。优选地, TGF - β 的随后浓度大于 200ng/ml 基质, 最优选地大于或等于 500ng/ml 基质。可选择地, BMP 可以在优选的浓度 100 - 2000ng/ml 时用作转化因子。应当理解, 诱导修复细胞分化的 TGF - β 的优选浓度随受到治疗的具体动物变化而变化。

由于 TGF - β 在相对高浓度(例如大于 200ng/ml 基质溶液)时, 不仅可以使软骨修复细胞转化成为软骨细胞, 而且会抑制趋化性吸引修复细胞; 而在相对低浓度(例如 2 - 10ng/ml)时, TGF - β 吸引软骨修复细胞并刺激它们增殖, 但不会诱导软骨修复细胞转化成为产生软骨组织的软骨细胞, 所以必需错开软骨修复细胞与两种浓度 TGF - β 接触的时间。

在本发明优选的实施方案中, 当有必要保持趋化性和增殖, 然后转化的顺序时, 将 TGF - β 以游离的、非胶囊化的形式和胶囊化或隔离的形式配制于基质中。优选地, 为了吸引软骨修复细胞并诱导基质和缺损区域中的软骨修复细胞增殖, 将 TGF - β 分子以 2 - 10ng/ml 基质溶液的浓度溶解或悬浮于基质中。为了促进基质中的软骨修复细胞转化成软骨细胞, 在基质中也可存在按照 Kim 等, 1983, 同上的方法隔离在多囊脂质体中的 TGF - β 分子, 其浓度大于 200ng/ml 基质溶液, 优选的浓度为 500 - 800ng/ml。当吸引的修复细胞已聚集于基质中并开始降解基质时, 载有 TGF - β 的脂质体即破裂。在降解基质期间, 软骨修复细胞摄入和/或降解脂质体, 导致 TGF - β 以足以诱导软骨修复细胞向软骨细胞转化的浓度释放。

通过将转化浓度的 TGF - β 与可生物腐蚀的多聚体混合, 也可以实

现所需的趋化性和增殖浓度与转化浓度的 TGF - β 两阶段释放。选择性地,也可以使用泵,优选地植入的渗透泵来控制 TGF - β 在缺损处和基质中的浓度。在本发明的实施方案中,泵控制 TGF - β 在基质中的浓度,即泵可以以起始的趋化性和增殖刺激浓度释放 TGF - β , 并随后以转化浓度释放 TGF - β 。优选地,转化浓度的 TGF - β 在手术后大约 1 - 2 周由泵传送。转化因子向缺损体积的传运最好定位到缺损部位的基质中。

本发明组合物中的增殖剂和转化因子(当使用时)可在基质内施用于缺损部位。它们的存在被限制于非常局限的部位。这样做可避免它们自由注入或输注到关节腔中。这种自由输注可能产生刺激滑膜细胞的副作用,从而产生关节渗漏。

在本发明治疗全方位缺损的某些实施方案中,不必延迟与转化因子的接触。在一些全方位缺损中,可充分地得到修复细胞,延迟与转化因子的接触不如表面损伤中重要,因为表面损伤中需要更多的时间吸引和增殖修复细胞。然而,在深度缺损中,也可能需要延迟与转化因子的接触以使修复细胞聚集到整个损伤部位。

在本发明用于修复骨的组合物中,可向基质溶液加入一种或多种血管生成因子以刺激骨缺损区域血管和相关细胞(例如上皮、血管周、间充质和平滑肌细胞)及基膜的形成和长入。在本发明用于刺激整个骨缺损区域填充基质内血管形成的组合物和方法中有用的血管生成因子包括 bFGF、TGF - β 、PDGF、TNF - α 、血管生成素或促血管素。已发现硫酸肝素增强 bFGF 的血管生成活性。在本发明的优选的实施方案中,将 bFGF 以 5 - 10ng/ml 基质溶液的浓度与足以加强 bFGF 血管生成活性的一定量的硫酸肝素一起溶解、悬浮或结合于基质中。其它血管生成因子的优选浓度是: TGF - β 为 5ng/ml 基质溶液, TNF α 为 10ng/ml 基质溶液, PDGF 为 10ng/ml 基质溶液。然而, bFGF 与硫酸肝素结合是上述血管生成因子中最优选的血管生成因子。

骨生成因子也可存在于用于骨修复的基质中,以便在血管和相关细胞已聚集于基质中之后,当基质被降解时将骨生成因子以促进成骨细胞和骨细胞最终发育的浓度释放到骨缺损部位中。骨生成因子在基质内被适当载

体系统隔离或包装并在基质被降解时释放。在软骨修复组合物中所用的载体系统也适于本发明的骨修复组合物,例如脂质体或以碳水化合物为基础的微粒(见上文)。在本发明的一个实施方案中,在骨修复时使用的基质含有包装在载体系统中的 TGF - β 作为骨生成因子,优选的浓度为 100ng/ml 基质溶液。也可以使用更低和更高的浓度。在另一实施方案中,用于骨修复的基质含有包装在载体系统中的 BMP - 2 作为骨生成因子,优选的浓度为 100 - 2000ng/ml 基质溶液。在另一个实施方案中,基质含有包装在载体系统中的一定浓度的 FGF 作为骨生成因子。

在本发明的骨修复组合物中有用的骨修复因子包括任何诱导骨修复细胞向形成骨组织的骨细胞如成骨细胞和骨细胞分化的肽、多肽、蛋白或其它化合物或组合物。在本发明中适用的骨生成因子包括诸如 TGF - β [Sampath, T.R.等, 生物化学杂志, 265(22), 第 13198 - 13205 页 (1990)]、血管生成素[Luyten, F.P.等, 生物化学杂志, 264(15), 第 13377 - 13380(1989)]、骨形态建成蛋白(BMP)[Wang, E.等, 美国国家科学院院报, 87, 第 2220 - 2224(1990)]、FGF、和与表皮生长因子(EGF)结合的 TGF - β 的蛋白。

由骨生成因子诱导的间充质细胞的分化可能包括中间组织如纤维状的、透明的和钙化的软骨的形成;和软骨内成骨,软骨内成骨导致编织骨组织的形成,进而将重建并转化为成熟的板层骨组织。在某些情况下,骨可以直接由间充质细胞形成而不出现中间组织。在基质内骨组织形成的过程通常出现在由于基质中所含的血管生成因子而形成血管并渗入基质中之后 3 - 4 周。尽管不加血管生成因子和骨生成因子时(在较大缺损中需要使用至少一种基质材料)骨仍将长入骨缺损部位,但是使用这些因子大大地提高了修复过程的速度。

在需要时,在本发明中所述的用于修复关节全方位缺损的骨部分的基质组合物也可用于治疗任何骨组织的缺损。这样的缺损包括骨折、关节折断、未连接(non-Union)和错误连接(delay-Union)、经皮肤的关节固定术、假关节炎以及由先天性缺损、创伤、肿瘤侵染、退化性疾病和其它骨组织缺损原因导致的骨缺损。骨修复基质组合物也可用于假肢的植入和假肢稳

定性的增强、用作内部固定方法的植入材料的骨整合的加强、牙科植入材料的稳定、韧带着生处的加速愈合和脊柱或其它关节融合过程。纤粘蛋白或含有氨基酸序列 Arg - Gly - Asp 的其它任何化合物, 包括象四肽这样小的肽, 也可以用作细胞粘附促进因子[Ruoslathi 等, 细胞, 44, 第 517 - 518 页(1986)]以加强软骨或骨修复细胞起始粘附到填充缺损部位的基质上。纤维蛋白和某些胶原蛋白基质已经含有此序列[Ruoslathi 等, 1986, 同上]。当使用其它可生物降解的基质时, 这些细胞粘附促进因子可在基质用于填充或敷裹缺损之前与基质材料混合。含有 Arg - Gly - Asp 的肽也可以与基质材料(例如与纤维或网孔)化学偶联, 或者与加入基质的化合物例如白蛋白偶联。

前面所述的组合物适用于在所选动物的软骨或骨组织缺损部位诱导软骨或骨的形成。

本发明的方法可以用于治疗动物包括人的软骨和骨缺损, 该方法易于使用并且局限在受侵袭的关节区域的局部。全部治疗可以通过关节镜或开放式外科手术或经皮肤的方法进行。

根据本发明, 为了实施治疗软骨或骨缺损或损伤的方法, 对缺损或损伤进行鉴定、制备, 并敷用根据本发明的基质组合物。

对于软骨修复, 基质组合物可以含有抗血管生成剂以防止血管长入。增殖(促有丝分裂)剂也可以适当浓度存在于基质组合物中以刺激基质和缺损或损伤中的软骨修复细胞增殖。如果所用的因子具有综合的细胞增殖和趋化效应, 那么在此浓度的同一试剂也可以作为趋化剂以吸引软骨修复细胞(例如 TGF - β 于 2 - 10ng/ml 基质时)。选择性地, 在基质中可存在两种不同的试剂, 一种具有特异的增殖效应, 另一种具有特异的趋化效应。在替换的实施方案中, 在用基质敷裹缺损区域之后, 可以将抗血管生成剂、如果需要增殖剂和趋化剂直接注射到基质填充的缺损区域。注射应定位到基质和填充的缺损区域以避免滑膜细胞与生长因子接触, 导致细胞增殖和关节渗漏。

在用基质组合物敷裹缺损部位(并且, 在纤维蛋白基质的例子中, 一旦基质固化)和如果需要将抗血管生成剂或增殖剂注射入基质填充的缺损

部位之后，可以合上关节囊和皮肤切口并终止关节镜和开放式外科手术。

在随后的软骨修复步骤中，将基质中的软骨修复细胞在适当的时候转化因子(于足以将软骨修复细胞转化成为产生稳定软骨组织的软骨细胞的浓度)接触。这可以通过在上述基质组合物内包含适当的含有转化因子的载体系统来实现。选择性地，可以在适当的时候通过直接注射或通过渗透泵来向基质填充的缺损区域传送转化剂。在表面软骨缺损中不能从骨组织得到修复细胞，应该使细胞在开始将基质植入缺损区域后约1 - 2周得到转化浓度的转化因子。在全方位缺损中，根据缺损的大小，可使转化因子更早得到。其它因子可以加到载体系统中或者直接注射以更好地促进此时间点的软骨基质成分的合成。而且，其它的抗血管生成剂也可以包含在载体系统中或直接注射。

在关节的关节镜检查过程中或者在开放式外科手术简单检查损伤或缺损的过程中，很容易通过肉眼鉴定动物软骨或骨缺损。软骨或骨缺损也可以通过使用计算机辅助X射线断层照相(CAT扫描)检查、磁共振成像(MRI)分析滑液或血清标记或通过任何本领域已知的其它方法推理鉴定。

一旦缺损得到鉴定，外科医生可以选择通过外科手术修饰缺损，以提高缺损物理上留住在此处所述的治疗方法中加入的溶液和基质材料的能力。优选地，为了更好地保留在此处所述的治疗方法中加入的溶液和基质材料，缺损具有或形成垂直的边缘或是深凹的，而不是平的或浅凹面的几何形状。

根据本发明的方法，可以用骨修复基质组合物填充全方位缺损的骨缺损部位直至骨软骨界面的钙化软骨层并形成平整表面。用骨修复基质填充骨缺损对于几毫米或更深的缺损特别有用。骨修复基质可以包含包装在适当载体中的血管生成因子和骨生成因子。

剩下的缺损的软骨部分用刺激软骨修复的基质组合物填满。用于修复软骨的基质包含含有抗血管生成剂和如果需要增殖剂和趋化剂的基质材料。在本发明的组合物和方法中适用的抗血管生成剂包括任何具有抑制血管形成的生物活性的试剂。本发明也考虑到，抗血管生成剂可以包括能够

抑制血管生成的一种或多种分子。在此步骤中所用的组合物也可以含有包装在载体系统中的和如果适合游离形式的转化因子。在本发明最优选的软骨修复方法中，基质包含抗血管生成因子(以游离形式和包装或结合于载体系统中以持久地释放)、增殖剂、趋化剂(可与增殖剂相同)和转化因子(包装或结合于载体系统中)，使转化因子在聚集于基质中的修复细胞已开始重建细胞间物质时释放。优选的组合物如上述。

如美国专利 5,270,300 所述，在填充全方位缺损的软骨部分之前，全方位缺损的骨-软骨界面可用物理膜，优选地不能渗入细胞的(例如孔径小于 $5\ \mu\text{M}$)可生物降解的膜隔离。膜放置在基质填充的骨缺损上，在软骨-骨连接的区域膜的边缘必须密封到缺损的周边以防止血管长入软骨缺损区域。在这种方法中，不易得到来自骨区域的修复细胞以聚集于软骨缺损区域，因此在软骨修复基质中需要增殖剂和/或趋化剂以吸引来自滑膜的修复细胞并刺激增殖。

在本发明优选的治疗全方位缺损的实施方案中，在骨-软骨界面不放置膜。根据需要，可以用或不用骨修复组合物填充缺损的骨部分。如上所述，缺损的软骨部分用含抗血管生成剂和转化因子及如果需要增殖剂和/或趋化剂的基质组合物填充。软骨修复基质组合物中的抗血管生成剂作用为功能屏障以防止血管的长入和软骨区域中骨的形成，并避免物理膜的必要性，允许来自骨区域的修复细胞迁移。

在本发明的另一个治疗全方位缺损的方法的实施方案中，骨-软骨界面由暂时的生物膜隔离，此生物膜由加热的装置在骨-软骨界面形成。加热的装置可施用于出血的部位以使血凝固并形成沉淀的蛋白层，由此产生生物的物理屏障防止血管的长入和缺损部位中骨组织形成。加热的装置的例子包括但不限于加热的手术刀、加热的剪刀或加热的镊子。应当将装置加热到约 $200\ ^\circ\text{C}$ 温度。加热的装置应施用于全方位缺损的基部。在另一实施方案中，可以通过 CO_2 ， N_2 或钕-钇铝石榴石激光器进行加热。结合或替代在软骨修复基质中包含抗血管生成剂，可以使用加热形成的骨-软骨界面处的暂时生物膜。当使用热处理方法时，在软骨修复基质中应含有增殖剂和/或趋化剂。

化学方法也可以加强基质粘附。这些方法包括降解缺损表面的软骨蛋白聚糖表层以暴露软骨的胶原蛋白原纤维, 这样它们可以与基质的胶原蛋白原纤维(当使用胶原蛋白基质时)或与基质中的纤维蛋白原纤维(当使用纤维蛋白基质时)相互作用。软骨表面的蛋白聚糖不仅会干扰纤维蛋白或其它可生物降解的基质到粘附软骨上, 而且会局部抑制凝血酶的活性。有利的是, 蛋白聚糖降解产物也可能具有对修复细胞的趋化作用〔Moore, A. R. 等, *Int. J. Tiss. React.*, XI(6)第 301 - 307 页(1989)〕。

根据本发明方法的一个实施方案, 通过用无菌吸水纸吸去缺损区域的液体使缺损表面干燥, 并用无菌酶溶液填充缺损体积 2 - 10 分钟以降解软骨表面上存在和位于缺损表面下深约 1 - 2 μ m 处的蛋白聚糖。可以单独或组合使用在无菌缓冲水溶液中的各种酶以降解蛋白聚糖。溶液的 pH 值应调节至使酶活性最佳。

在本发明的方法中, 适用于降解蛋白聚糖的酶包括软骨素酶 (Chondroitinase) ABC、软骨素酶 AC、透明质酸酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、Chmotrypsin、木瓜蛋白酶、链霉蛋白酶、基质溶素和 Staph V8 蛋白酶。具体的酶或酶组合的适当浓度取决于酶溶液的活性。

在本发明优选的实施方案中, 用 1U/ml 浓度的软骨素酶 AC 的无菌溶液填充缺损, 允许消化进行 4 分钟。根据实施例 1 所述的方法决定软骨素酶 AC 的优选浓度。任何其它酶的使用浓度和使用时间应使只有深至约 1 - 2 μ m 的表面蛋白聚糖被降解。

酶溶液施用的时间应保持在最小, 使其主要在修复区域影响蛋白聚糖的降解。对于 1U/ml 浓度的软骨素酶 ABC 或 AC, 消化时间超过 10 分钟可能导致缺损区域以外的蛋白聚糖不必要的和潜在有害的降解。而且, 消化时间超过 10 分钟会使操作的总时间过长。尤其在开放式关节切开术过程中, 操作的总时间应保持在最小, 因为软骨可能由于暴露在空气中而受到损伤〔Mitchell 等, (1989), 同上〕。由于这些原因, 在包括了通过酶消化降解蛋白聚糖步骤的本发明方法的实施方案中, 优选消化时间少于 10 分钟, 最优选消化时间少于 5 分钟。

根据本发明的方法, 在酶已降解缺损表面的蛋白聚糖之后, 应该将酶

溶液从缺损区域除去。通过使用装有细吸头的抽气器，然后在用带有棉状物的海绵吸收，可以有效地除去酶溶液。选择性地，可以只用带有棉状物的海绵吸去酶溶液。

除去酶溶液后，应该用无菌生理盐水（例如 0.15M NaCl）彻底清洗缺损处，最优选地洗三次。然后应将清洗过的缺损部位干燥。可以用无菌纱布或棉状物对缺损部位进行干燥。

基质对软骨缺损的粘附也可以通过使用纤维蛋白胶粘物（即血液因子 XIII 或纤维蛋白稳定因子）促进基质原纤维与缺损表面上软骨胶原原纤维的化学结合（交联）来加强〔见 Gible 等，输血，30（8），第 741 - 747 页（1990）〕。谷氨酰胺转移酶也有相同的作用〔见例如 Ichinose 等，生物化学杂志，265（23），第 13411 - 13414 页（1990）；“谷氨酰胺转移酶”，编辑：V. A. Najjar 和 L. Lorand, Martinus Nijhoff Publishers (Boston, 1984)〕。也可以使用其它能促进胞外物质粘附的化合物。

也可以用本发明的方法和组合物辅助治疗牙周疾病。例如治疗其中牙周韧带和牙颈暴露的疾病如 paradontitis 时，可以促进牙周结缔组织的再生。尤其是，可用包含一种或多种刺激牙周形成的因子如 IGF 或 FGF，和一种或多种抑制上皮形成的抗上皮因子如表皮生长因子（EGF）的抑制剂、抗基膜的抗体、维生素 A 抑制剂、抗视网膜抗体的可生物降解的基质和富含纤连蛋白的基质填充牙周结缔组织即韧带空隙。抗上皮因子应该以游离形式和包装或结合于载体系统中的形式存在以基质填充区域内提供持久的释放。优选的基质材料是具有足够粘附牙齿和牙床能力的交联的白明胶或胶原蛋白基质。

也可以通过本发明的方法和组合物促进缺齿后骨的再生。当缺齿时，固定牙齿的骨腔隙通常萎缩凹陷。这个区域即下颌或上颌边缘必须在牙齿移入之前并重新建立和形成。然而，骨的再生常常被包围它的迅速生长的结缔组织阻止。这一点可以通过使用如上所述的那些骨修复基质防止，基质中包含有效剂量的一种或多种抑制结缔组织细胞迁移和/或增殖和/或分化的抑制剂。例如，可以将包含与载体系统结合的血管生成因子和骨生成

因子及抗结缔组织因子如抑制间充质细胞增殖的因子的基质放入此区域以重建骨组织。为促进牙周结缔组织腔隙周围的结缔组织的重新形式，可以将包含刺激结缔组织干细胞和前体细胞迁移、增殖和分化的因子如 IGF - 1 和 FGF 的可生物降解的基质填充在牙周组织内的空隙。结缔组织基质也可以包含抗上皮因子。

本发明的另一方面是防止例如在关节移植如整个髋关节移植之后出现骨周围结缔组织腔隙的关节周钙化和骨化。可以将包含抗骨因子如抗血管生成因子、抗 TGF - β 和 BMP 化合物的抗体或其组合的基质施用于关节周结缔组织空隙以防止钙化和骨组织形成，其中抗骨因子以游离的形式和结合或包装于载体系统中的形式存在以提供持久的释放。

本发明的进一步应用是在年幼动物和儿童中防止骨组织长入穿过软骨生长板的骨折部位，这可能在长骨顶端骨折时出现。与防止骨周围结缔组织腔隙骨化一样，可以用含抗骨因子如抗血管生成因子、抗 TGF - β 和 BMP 化合物的抗体或其组合的基质填充软骨生长板区域的骨折裂缝。

为了使本文所述的发明得到更充分地理解，举出下列实施例。应当理解这些实施例是用于举例说明而不是用来以任何方式限制本发明。

实施例 1 测试用于清除蛋白聚糖的酶

为了促进和改善基质与关节软骨组织表面缺损的表面的粘附，可以将表面软骨基质内的蛋白聚糖分子酶解清除，以使胶原纤维网与外部施用的基质和迁移的修复细胞接触。各种蛋白酶和糖胺聚糖降解酶都适用于此目的，但是应该控制 pH 值以使每种酶达到最大活性。

在此实施例中，我们对软骨素酶 ABC (0.5-5U/ml) 和胰蛋白酶 (0.5-4%) 清除蛋白聚糖的能力进行了测试。使用的是来自当地屠夫的刚宰杀的兔膝关节。将机械产生的表面软骨缺损放在酶溶液中 4 分钟。然后用吸水纸除去溶液，并用生理盐水彻底清洗缺损部位。完成此程序后，软骨组织立刻在含有 0.7% (重量/体积) 六胺三氯化钨 (RHF) 的 2 % (体积/体积) 戊二醛溶液 (用 0.05M 卡可酸钠缓冲， pH7.4) 中固定以进行组织检查。固定后的培养基含有 1 % RHT' - 四氧化钨溶液 (用 0.1M 卡可

酸钠缓冲)。将组织在级配的一系列乙醇中脱水并包埋在 Epon 812 中。将组织学切成薄切片，用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色，并用电子显微镜检查。在这些切片中，RHT 固定的（即沉淀的）蛋白聚糖呈现为黑色染色颗粒。清除不超过 1 - 2 μ m 厚的蛋白聚糖表层的酶浓度定义为最佳（酶更深的渗透会影响下面的软骨细胞）。发现软骨素酶 ABC 在约 1U/ml 浓度时具最佳活性。胰蛋白酶在约 2.5% 浓度时具最佳活性。其它糖胺聚糖酶或蛋白酶的最佳活性范围可以用相似的方法测定。任何缓冲液，只要是非毒性的并且其最大缓冲容量与最大酶活性所需的 pH 值接近的地方出现，都可以与酶结合使用。

实施例 2 基质对表面缺损的粘附

对通过可控制的软骨表面蛋白聚糖的酶解消化来促进基质对缺损表面粘附的可能性进行研究。通过用整平刀刮在三只成年兔的膝关节上形成缺损。这些缺损不用酶处理。用纤维蛋白基质填充缺损，该基质在填充缺损前约 200 秒时通过将 20 μ l 凝血酶溶液（100U/ml 水性缓冲液）与每 ml 纤维蛋白原溶液（1mg/ml 水性缓冲液）混合来配制。一个月后将兔子杀死，检查膝关节以测定纤维蛋白基质对缺损部位的粘附程度。将结果与在用纤维蛋白基质填充缺损前已用软骨素酶 ABC（1U/ml，4 分钟）处理缺损的兔子（见实施例 3、4 和 5）进行比较。

未用酶处理过的填充在缺损区域的纤维蛋白基质粘附缺损表面的亲和力低。酶处理后，纤维蛋白基质的粘着能力（通常测量粘附的机械强度，即通过测试用镊尖人工推开基质的容易程度，以及通过记录在整个实验过程中其中基质成功地保持粘着的缺损数目间接测定）显著增加。基质对未用酶处理的缺损表面亲和力低可能是由于蛋白聚糖分子对基质粘着的局部抑制以及对纤维蛋白聚合作用的抑制。都可以通过将沿着缺损表面区域的表面蛋白聚糖酶解清除来防止这两种影响。

实施例 3 将生长因子施用于缺损部位以趋化性地刺激修复细胞使之迁移至缺损区域并诱导修复细胞增殖

对各种生长因子刺激修复细胞趋化性迁移至缺损区域以实现缺损愈合的作用进行测试。

所使用的生长因子包括 a)表皮生长因子(EGF), b)碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), c)胰岛素样生长因子 I (IGF I), d)人生长激素(hGH), 和 e)浓度为 5 - 10ng/ml 的转化生长因子- β (TGF - β)。

如实施例 2 所述用软骨素酶 ABC 处理并清洗之后, 将每种生长因子局部施用于膝关节中产生的缺损。总共使用了 10 只动物(每种生长因子两只)。每种生长因子都能够充分地趋化性吸引或局部刺激修复细胞增殖到缺损表面以完全覆盖缺损表面。但是, 细胞只存在于缺损的表面, 并且修复细胞的增殖不能充分地填充缺损体积。

可以相信, 蛋白聚糖降解产物本身, 即不加入任何其它试剂, 可产生足够的趋化效应以吸引修复细胞至缺损部位。Moore, A. R. 等 [Int. J. Tiss. Reac., XI(b), 第 301 - 307 页, 1989] 已证明蛋白聚糖降解产物本身具有趋化效应。

实施例 4 将包裹在可生物降解的基质中的生长因子施用于缺损部位以趋化性地刺激修复细胞迁移至缺损区域并诱导修复细胞增殖

既然在实施例 3 的条件下局部施用生长因子不能诱导足以填充缺损体积的修复细胞增殖, 那么这次将同样的生长因子包裹在可生物降解的基质中, 重复此实验。所使用的可生物降解的基质是纤维蛋白, 胶原蛋白和 Sepharose。足量的含有生长因子的基质将用于完全地填充缺损体积。

在填充缺损前约 200 秒时, 将 20 μ l 凝血酶溶液 (100U/ml 水性缓冲液: Veronal 乙酸盐缓冲液, pH7.0) 与每 ml 纤维蛋白原溶液 (1mg/ml 水性缓冲溶液: 0.05M Tris, pH7.4, 0.1M NaCl) 混合制成纤维蛋白基质。对胶原蛋白基质, 使用 Collagen-Vliess[®] 或白明胶 - 血液混合物制成足够粘度的溶液。对于 Sepharose 基质, 用液体 Sepharose 溶液于 39 - 42 $^{\circ}$ C 填充缺损。冷却 (35 - 38 $^{\circ}$ C) 后, 在缺损处形成 Sepharose 基质、

使用 30 只兔子 (每种基质和生长因子两只兔子) 进行此实验。在所有填充基质保持与缺损粘附的例子中, 已由成纤维细胞样修复细胞完全聚

集。早在手术后 8 - 10 天就可发现这种现象。除了可生物降解的基质由修复细胞重建并且被松散的、结缔组织类型的胞外基质替代之外,直到在手术后 4 周没有出现修复组织结构组成的进一步改变。

该组织没有转化成为软骨组织。

实施例 5 将包裹在可生物降解的基质中的生长因子施用于缺损部位以趋化性地刺激修复细胞迁移至缺损区域并诱导修复细胞增殖;然后在第二阶段定时、局部释放转化因子以使缺损部位转化成为透明软骨

在施用生长因子后,缺损体积内的基质被修复细胞完全填充,并且这些细胞能重建填充的基质(见实施例 4),结果促使我们研究导入胶囊化形式(例如脂质体)的转化因子(如 TGF - β)的影响,其中转化因子在基质被修复细胞完全占据,修复细胞开始重建胞间结构时,得到释放。

为促进最初的趋化和增殖效应,将 TGF - β 以低浓度(例如 2 - 10ng/ml 混入纤维蛋白原溶液(1mg/ml)中。另外根据 Kim 等(1983),上文的方法将 TGF - β 包裹在脂质体中。将含有 TGF - β 的脂质体加入到同样的纤维蛋白原溶液中,所用浓度足以在这些脂质体破裂并释放 TGF - β 时提供更高浓度(100 - 1000ng TGF- β /ml 纤维蛋白原)的 TGF - β ,以便在聚集于纤维蛋白基质的修复细胞开始重建胞间物质的第二阶段促进修复细胞向软骨细胞的转化和基质填充的缺损向软骨的转化。

如实施例 2,使 10 只成年兔的膝关节表面软骨产生缺损,并通过对缺损部位施用含有游离的和脂质体包裹的 TGF - β 的纤维蛋白原混合物进行治疗。在这一系列实验的各个实验中,游离 TGF - β 的浓度保持在 2 - 10ng/ml 纤维蛋白原范围内,同时改变胶囊化 TGF - β 的浓度以便以 100ng 的间隔(根据从脂质体释放 TGF - β 的多少)提供 100 - 1000ng TGF- β /ml 纤维蛋白原的浓度。在所有实验的治疗部位都有透明软骨组织的形成。在浓度高于 200ng 胶囊化 TGF - β /ml 纤维蛋白原溶液时,优选地高于 500ng TGF- β /ml 纤维蛋白原溶液时得到重复性最好的结果。

实施例 6 测定组织转化的时间点

在此实验中, 根据实施例 2 所述对一组 6 只成年兔进行膝外科手术, 以产生表面缺损。使用用于表面缺损修复的全面治疗方案, 即用软骨素酶 ABC (1U/ml) 处理 4 分钟, 然后用含有游离 TGF- β (2 - 10ng/ml) 和脂质体包裹的 TGF- β (800ng/ml) 的纤维蛋白基质(1mg/ml 纤维蛋白原溶液, 20 μ l 100U/ml 凝血酶溶液/ml 纤维蛋白原溶液) 填充缺损部位。在手术后第 8、10 和 12 天杀死三只兔子, 在第 20、24 和 28 天杀死剩余的三只。在这种动物模型中, 原始的成纤维细胞样的修复细胞组织向透明软骨组织的转化在第 12 - 20 天之间出现。这是根据组织学检查确定的。在第 8 - 12 天, 仍然存在松散的纤维性修复组织(所施用的纤维蛋白基质被部分或全部重建); 而在 20 天及 20 天以后, 缺损的空间由透明软骨组织部分或完全填充。

实施例 7 在微型猪模型中使用软骨修复方法

将上面用于兔模型的实验方法用于更大的动物模型微型猪(mini-pig)。通过用整平刀刮在四只成年微型猪(2 - 4 岁, 80 - 110 磅)的髌骨沟和内侧髌产生表面缺损(0.6mm 宽, 0.6mm 深, 10 - 15mm 长)。然后用软骨素酶 ABC (1U/ml, 如上面对兔子所用的) 处理缺损 4 分钟。除去酶溶液, 使缺损干燥, 用生理盐水清洗, 然后再干燥。然后用纤维蛋白原基质溶液填充缺损部位。用于此实验的纤维蛋白原基质溶液每 ml 含有 2 - 6ng 游离的 TGF- β 和 1500 - 2000ng 脂质体包裹的 TGF- β 。在填充缺损前, 如上面兔子实验中所述, 将凝血酶加入基质溶液中。

手术后 6 周将微型猪杀死, 对基质填充的缺损部位进行组织学检查。所有部位看来已愈合, 即在治疗部位形成了透明软骨组织。

实施例 8 使用抗血管生成剂修复关节软骨全方位缺损

在成年微型猪膝关节的髌骨沟和内侧髌造成 1mm 深、10mm 宽的全方位关节软骨缺损。使用整平仪器在两只动物中各形成五处损伤。在每个髌骨沟的头部形成两处缺损, 尾部形成两处缺损, 另一处缺损在股骨内侧髌。通过肉眼观察流血的出现控制每处缺损向软骨下骨组织(包括骨血管

和骨髓细胞)的垂直深入以确保在关节中已形成全方位缺损。然后用软骨素酶 AC (1U/ml) 处理缺损 4 分钟。除去酶溶液,使缺损干燥,用生理盐水洗,然后再干燥。然后用软骨修复基质填充缺损部位。在此实验中使用的基质溶液含有白明胶 (Gelfoam, Upjohn) 共聚物 (于 100mg/ml 时使用) 和纤维蛋白原 (在 200mg/ml 时使用)。在基质填充缺损之后,将凝血酶加入缺损表面的顶部并使之扩散入基质。

软骨修复基质含有浓度约为 40ng/ml 基质体积的游离的增殖剂胰岛素生长因子 - I (IGF - I) 作为转化因子和浓度为 500ng/ml 基质体积的脂质体包裹的 TGF - β 1 作为转化因子。另外,在含 TGF - β 1 的相同脂质体中加入浓度为 10m mol/升基质体积的游离舒拉明(Suramin)和 10m mol/升基质体积浓度的脂质体包裹的舒拉明。在对照损伤中,用相同方法处理损伤,但是不加舒拉明。

手术治疗后约 8 周,将动物杀死并对基质填充的缺损部位进行组织学检查。缺损空隙与关节软骨组织毗连的部分,即用含舒拉明的基质组合物填充的区域已由关节软骨组织填充。在对照损伤中,即未用舒拉明处理的缺损空隙的相同部分已由新形成的骨组织填充。

用浓度为 1000ng/ml 基质体积的 BMP - 2 代替 TGF - β 1 重复上述实验,得到相同的结果。

实施例 9 使用加热方法修复关节软骨的全方位缺损

在成年微型猪的内侧髌和髌骨沟中造成 1mm 深、10mm 宽的全方位关节软骨缺损。在每个出现出血的部位,通过向缺损表面上施用加热的仪器诱导凝血以形成生物的物理屏障。我们使用加热至 220 °C 的手术刀边缘造成暂时的组织屏障。

在一只微型猪中,一个关节中的关节软骨缺损用含 TGF - 1 (浓度为约 40ng/ml 基质体积) 和脂质体包裹的 TGF - β 3 (浓度为 50ng/ml 基质体积) 的软骨修复基质填充。在另一个关节中的缺损中,如实施例 8 所述基质中含有舒拉明。

在第二只微型猪中,一个关节中的缺损用含 TGF - 1 (浓度为

40ng/ml 基质体积) 和脂质体包裹的 BMP - 2 (浓度为 1000ng/ml 基质体积) 的软骨修复基质填充。在第二只微型猪的另一个关节的缺损中, 如实施例 8 所述基质中含有舒拉明。

如前面的实验, 在手术治疗后第 8 天将动物杀死并检查。在两只动物中, 与关节软骨组织毗连的缺损空隙中没有骨组织形成。而且缺损空隙已由关节软骨组织填充。

实施例 10 使用抗血管生成剂修复关节软骨的深度全方位缺损

可以在成年微型猪膝关节的内侧髁和髌骨沟中造成深达 5mm 的非常深的全方位关节软骨缺损。使用整平仪器在维持全身麻醉的动物中实施损伤。缺损的骨部分用如上所述的骨修复基质填充。缺损的骨部分应用基质填充至软骨-骨界面。关节软骨缺损空隙用如上面例如实施例 8 - 9 中所的含抗血管生成因子的软骨修复基质填充。