



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I469993 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：099119088

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 11 日

(51)Int. Cl. : C07K14/78 (2006.01)

C12N5/077 (2010.01)

C12N5/0775 (2010.01)

(30)優先權：2010/02/04 美國

12/700,469

(71)申請人：劉華昌 (中華民國) LIU, HWA CHANG (TW)

臺北市大安區潮州街 48 巷 8 號 6 樓

林峰輝 (中華民國) LIN, FENG HUEI (TW)

臺北市中正區仁愛路 1 段 1 號

李幸懋 (中華民國) LEE, SHING MOU (TW)

新北市淡水區中正東路 2 段 29 之 1 號 8 樓

顏君哲 (中華民國) YEN, CHUN CHE (TW)

臺中市南屯區大業路 180 號 3 樓之 3

(72)發明人：劉華昌 LIU, HWA CHANG (TW)；林峰輝 LIN, FENG HUEI (TW)；李幸懋 LEE, SHING MOU (TW)；顏君哲 YEN, CHUN CHE (TW)

(74)代理人：江謝令涵

(56)參考文獻：

劉華昌，利用生物活性基質進行骨軟骨及韌帶之組織工程，行政院國家科學委員會研究計畫，2007 年 05 月 29 日。

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：2 共 13 頁

(54)名稱

修復軟骨損傷之外科移植物

SURGICAL GRAFTS FOR REPAIRING CHONDRAL DEFECTS

(57)摘要

本發明係關於一種包有類軟骨細胞的膠原蛋白基質之移植物，其修復軟骨損傷之用途及製備該移植物之方法。

An implant containing a collagen matrix embedded with chondrocyte-like cells, its use in repairing a chondral defect, and a method of preparing the implant.

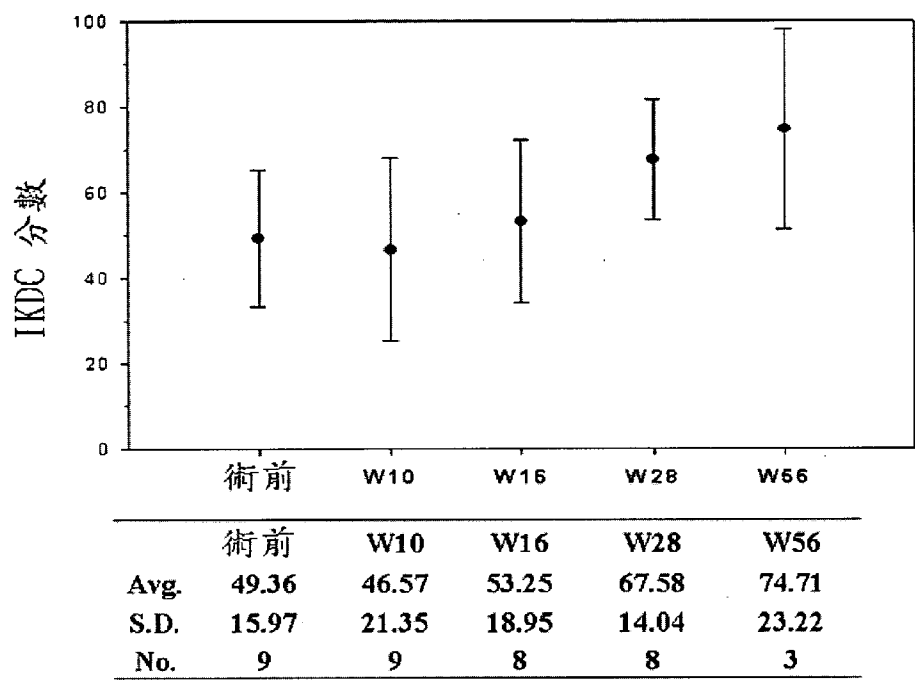


圖 1

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99119088

C07K14/78

(2006.01)

※申請日： 99.6.11

※IPC 分類：

~~A~~C12N5/077

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

修復軟骨損傷之外科移植物

C12N5/0775

(2006.01)

SURGICAL GRAFTS FOR REPAIRING CHONDRAL
DEFECTS

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種包有類軟骨細胞的膠原蛋白基質之移植物，其修復軟骨損傷之用途及製備該移植物之方法。

三、英文發明摘要：

An implant containing a collagen matrix embedded with chondrocyte-like cells, its use in repairing a chondral defect, and a method of preparing the implant.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是關於一種用於修復軟骨損傷之外科移植物。

【先前技術】

從 1994 年起，自體軟骨細胞移植已被用於治療軟骨損傷，包括從正常軟骨組織收集軟骨細胞，儘可能地在體外於培養基中擴增這些細胞，接著藉由將此等擴增的細胞移植於人工支架，以充填軟骨損傷。然而，仍有許多問題；例如，自體軟骨細胞的來源有限，軟骨細胞的增殖能力低下，以及它們獨特的表型在擴增時可能會消失 (Saadeh et al., Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. Ann Plast Surg 1999; 42:509-13)。

間質幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 能分化成結締組織細胞系之細胞，包括軟骨，也因此成為軟骨組織工程之受人矚目的細胞來源。許多方法曾被用於 MSCs 的軟骨生成誘導。Kavalkovich 等人提出團狀培養法來模擬胚胎軟骨發育之環境，其可獲得高細胞密度之細胞，但是帶有大量細胞的緊密細胞團卻只有小量的軟骨組織出現。因此，修復軟骨缺損需要相當大量的細胞團塊，而且大團塊顯示出周邊有存活的細胞但團塊中心則壞死 (Kavalkovich et al., Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2002;38:457-66.)。此外，團塊不易操作及塑型成多種形狀以供損傷修復所需。有鑑於此，團狀培養並無法用於手術應用。再者，發現將人類 MSCs (human MSCs, hMSCs)，包入洋菜膠或海藻酸鹽膠可被塑造成多種形狀並且形成實質上的軟骨新生 (Huang et al., Chondrogenesis of human bone

marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004; 278:428–36; and Ma et al., Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. J Biomed Mater Res A 2003; 64:273–81)。然而，海藻酸鹽或洋菜膠支架用於軟骨組織工程有其缺點：細胞貼附差，而且當二價陽離子擴散於周圍的培養基時，無法控制海藻酸鹽的降解。此外，海藻酸鹽基質過去曾用於活體內時，有報導指出當用於移植以治療實驗動物的軟骨之全層損傷（full-thickness defects）時，會有嚴重的異體性巨大細胞反應與免疫反應（Hunziker, Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 2001; 0:432–63）。因此，海藻酸鹽基質尚未曾用於人類患者的關節軟骨修復。

所以，仍有其需要來發展一種外科移植物以修復病患的軟骨損傷。

【發明內容】

本發明是基於兩個非預期的新發現，即（1）一種含包有類軟骨細胞之膠原蛋白基質之移植物，當其移植到軟骨損傷區時會修復軟骨損傷，以及（2）在移植物與移植位置的組織間無空隙形成。

因此，本發明一方面的特徵是一種軟骨損傷-修復移植物，其包括膠原蛋白基質，其包入類軟骨細胞並添加轉化生長因子- $\beta 1$ （Transforming growth factor beta one, TGF- $\beta 1$ ）。此移植物，不具骨陷窩（Lacuna），其製備方式是經由間質幹細胞（mesenchymal stem cells, MSCs）培養於含膠原蛋白之培養基，其添加轉化生長因子- $\beta 1$ （Transforming growth factor beta one, TGF- $\beta 1$ ），條件係容許 MSCs 之分化成為類軟骨細胞及移植物之形成。該類軟骨細胞分泌糖胺聚多糖。該 MSC

可從骨髓、脂肪組織、肌肉組織、脫落乳牙的牙髓、臍帶血、瓦頓氏凝膠、胎盤或臍帶內膜獲得。

在實例中，該培養步驟係經以下達成：將該 MSCs 培養於含膠原蛋白之培養基，其添加 TGF- β 1，達 7 至 21 天，條件係容許該 MSCs 之分化成為類軟骨細胞，該類軟骨細胞係包於膠原蛋白基質中。該含膠原蛋白之培養基較佳具有約 1 至約 10% (w/v) (例如，約 3% (w/v)) 之膠原蛋白濃度。此培養步驟可實施於膠囊中。

本發明的另一方面特徵是一種修復軟骨損傷的方法，其在需要治療的個體中將上述移植物放置於軟骨損傷位置。在一實例中，該移植物以一種類注射器活塞遞送至缺陷位置。在另一實例中，裝載於膠囊內之移植物係藉由將其從膠囊中擠出並施用於該位置而遞送至缺陷位置。

以下將詳細說明本發明之各種具體實施例。本發明的其他特徵，將由以下的詳細說明與關於各種具體實施例的圖式及申請專利範圍而清楚地呈現。

【實施方式】

本發明的特徵是以一種用移植物修復患者軟骨損傷的方法，該移植物包括膠原蛋白基質，其包入類軟骨細胞並添加轉化生長因子- β 1 (Transforming growth factor beta one, TGF- β 1)，其中該類軟骨細胞係從間質幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 分化而來並且分泌糖胺聚多糖，藉此軟骨損傷得以修復且在移植物之間無任何空隙。

除另有定義外，此處使用的所有技術與科學術語具有的意義為熟習本發明所屬技藝之技術者所習知。此處所用，除另外指明，以下的術語有它們所屬之意義。

此處所用的冠詞「一」和「該」指的是一個或一個以上 (例如，至少一種) 之文法上受詞的冠詞。舉例來說，「該元素」指的是一個元素或一個以上的元素。

此處所稱「間質幹細胞」或「MSCs」指的是從成體組織取得之多能性幹細胞，包括但不限於骨髓、脂肪組織、肌肉組織、脫落乳牙的牙髓、臍帶血或瓦頓氏凝膠。

此處所稱「軟骨細胞」指的是成熟軟骨細胞，其被包入基質的骨陷窩（小空腔）內。

軟骨細胞的產生係經由間質軟骨生成細胞分化成軟骨母細胞，其為產生軟骨基質的最早期細胞。成熟軟骨細胞是大型分泌性細胞，帶有球狀細胞核與明顯的核仁。因此，軟骨細胞之骨陷窩之形成被認為是成熟軟骨細胞的特徵。

此處所稱「類軟骨細胞」指的是具有軟骨分泌性細胞的特性之細胞，例如，分泌糖胺聚多糖（glycosaminoglycan，GAG），但不形成骨陷窩（lacuna），其係成熟軟骨細胞的典型特性。

此處所稱「膠原蛋白基質」指的是組織工程產物，其係透過將 MSCs 培養於含膠原蛋白之培養基而形成，其包入類軟骨細胞，該類軟骨細胞能分泌糖胺聚多糖（GAG）且不具骨陷窩（lacuna）。

本發明提供一種用以修復患者軟骨損傷之方法，其包括：

提供一種移植物，其包含膠原蛋白基質，其包入類軟骨細胞並添加轉化生長因子- $\beta 1$ ，該類軟骨細胞係從間質幹細胞（MSCs）分化而來並且分泌糖胺聚多糖，以及

將移植物放置於患者軟骨損傷處；其中該移植物不具骨陷窩（lacuna）。

在本發明中，移植物包含膠原蛋白基質，其包入類軟骨細胞與添加轉化生長因子- $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ），可經由以下方法獲得：該 MSCs 培養於含膠原蛋白之培養基，其添加轉化生長因子- $\beta 1$ （Transforming growth factor beta one，TGF- $\beta 1$ ），其條件容許 MSCs 之分化成為類軟骨細胞及移植物之形成。

在本發明之實例中，MSCs 係培養含膠原蛋白（例如，第一型或第二型膠原蛋白）之培養基，其添加轉化生長因子

- β 1 (TGF- β 1)，以分化 MSCs 成為類軟骨細胞，其透過評估糖胺聚多糖 (GAG) 含量來確認其特徵，以確保該 MSCs 已誘導成為類軟骨組織，並檢測是否已形成骨陷窩。收集包入類軟骨細胞的膠原蛋白基質；其係一種作為移植物之組織工程建構物。

在本發明之實例中，將該 MSCs 予以擴增及培養，然後包入並培養在包含膠原蛋白的培養基中，其添加轉化生長因子- β 1 (Transforming growth factor beta one, TGF- β 1)，條件係容許 MSCs 之分化成為類軟骨細胞及移植物之形成。收集包入分泌糖胺聚多糖 (GAG) 之類軟骨細胞的膠原蛋白基質。該膠原蛋白基質可透過常規方法來檢驗，確認未發生骨陷窩 (lacuna) 之形成以及包入其中的類軟骨細胞分泌 GAG。

在本發明中，可使用任何標準方法、條件或技術，容許 MSCs 之分化成為類軟骨細胞及膠原蛋白基質之形成作為移植物。

在本發明一實例中，膠原蛋白可以是第一型或第二型膠原蛋白或其組合。膠原蛋白的濃度可以約 1% 至約 10%，較佳地約 3%。

根據本發明，該移植物可以輕易地經由類注射器活塞遞送至軟骨損傷區。在本發明之一具體實施例中，移植物被裝入膠囊，且該移植物係藉由將其從膠囊中擠出並施用於軟骨損傷區而予以放置。

因此，本發明也提供一種用於修復軟骨損傷之移植物，其包括膠原蛋白基質，其包入類軟骨細胞並且添加轉化生長因子- β 1 (TGF- β 1)，該類軟骨從間質幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 分化而來並且分泌糖胺聚多糖，其中該移植物不具骨陷窩 (Lacuna)。

根據本發明，移植物可被透過以下方法製備，其包括：提供間質幹細胞 (MSCs)；以及將該 MSCs 培養於含膠原蛋白之培養基，其添加轉化生長因

子- $\beta 1$ (Transforming growth factor beta one, TGF- $\beta 1$), 其條件容許 MSCs 之分化成為類軟骨細胞及移植物之形成。

本發明現將參考以下具體實施例更具體地描述, 其目的係作為例示而非限制。

實例 1：分離及培養人類 MSCs

10mL 的肝素化骨髓血從骨盆的恥骨抽出, 並且從其分離出骨髓 MSCs。將 MSCs 培養在低葡萄糖基礎培養基 (Dulbecco's modified Eagle's medium with low glucose, DMEM-LG) 中包含 10%胎牛血清, 在 37°C、5% CO₂ 與 95% 的潮濕氣體下。培養基 1 週更換 2 次。細胞以胰蛋白酶處理後, 以每週 1:3 的比例繼代培養, 接著收集並包入 Porcogen™ 膠原蛋白溶液中 (3%第一型/第三型膠原蛋白, 双美生物科技, 台灣), 其僅含無血清的 DMEM-LG。細胞以 0.5mL 等分培養, 最終細胞密度為 2.6×10^6 細胞/cm², 在 37°C、1 小時膠化於 24-孔培養盤內, 接著每孔加入 2.0 mL 的培養基, 其包含無血清 DMEM-LG 含 ITS+預混劑、50 μ g/mL-抗壞血酸-2-磷酸、 10^{-7} M 糖皮質固醇、添加 10ng/mL TGF- $\beta 1$ (Pepro Tech; Rocky Hill, NJ)。細胞培養在前述培養基中 7 至 21 天, 培養基每 3 天更換, 讓細胞分散的包入膠原蛋白包含培養基以獲得包入類軟骨細胞之膠原蛋白基質。在細胞接種後 7、14 及 21 天分析細胞/膠原蛋白混合物, 確認已分泌 GAG 且骨陷窩尚未形成, 以獲得細胞-基質複合物。

實例 2：細胞-基質複合物的特徵

將取得的細胞-基質複合物包入石蠟並且切成 5 μ m 切片。將這些切片去除石蠟並且復水, 透過連續浸泡在 100%二甲苯、100%酒精、70%酒精與水。樣本切片用蘇木紫-伊紅染色 (Muto, Tokyo, 日本) 來評估細胞型態。另外, 用愛爾新藍染色 (Sigma) 來評估糖胺聚多糖 (GAG) 含量。

實例 3：人類患者的研究

1. 患者族群

選擇之患者帶有來自剝脫性骨軟骨炎或內側股骨髁之骨壞死的軟骨或從骨軟骨炎，或體重支撐區域骨關節炎之局部性軟骨損傷。然而，患者帶有未成熟骨，嚴重性退化關節炎而必須進行人工關節置換，其他損傷如十字韌帶斷裂和半月板受傷，關節炎（如類風濕性關節炎和痛風性關節炎），與感染性疾病（如 AIDS 和 B 型肝炎）；患者完全地臥床 3 個月以上；患者長期施用皮質類固醇超過兩周並且非酒精中毒者，則排除在外。總共招募 10 位患者。其中，6 位是女性，4 位是男性。患者平均年齡為 66 歲（範圍從 47 到 83 歲）。

2. 手術

於膝蓋上施以前正中切開術並且使用內側髁骨切開術使內側股骨髁之關節表面露出。膝蓋極度地彎曲，讓進入骨軟骨損傷變得容易。清除骨損傷並填滿從上部脛骨取得的海綿狀骨。然後，將從實例 1 得到的細胞-基質複合物當作手術的移植物移植到損傷處上。最後，從近端脛骨取得骨膜用來覆蓋手術移植物。術後，所有患者接受規律的四頭肌訓練與練習來改善膝蓋的運動範圍。

3. 臨床評估

所有 10 位患者膝蓋功能係透過國際膝部文件委員會主觀膝部評分表（International Knee Documentation Committee Subjective Knee Form, IKDC）進行評分，並進行 X 光檢查，包括術前及 1.5、3、6 和 12 個月的術後追蹤。在術後 6 個月與 12 個月實施核磁共振造影術（Magnetic Resonance Imaging, MRI）。在術後 12 個月實施關節內視鏡檢與組織切片，若病患接受此建議的話。學生 t 檢定用於統計分析。

4. 結果

除了一位患者於術後 6 個月不願回來評估，其餘 9 位患者術後定期地追蹤至 12 個月。如圖 1 所示，依本發明方法處

理後，患者的 IKDC 分數經由學生 t 檢定後發現，術後 6 個月與 12 個月有顯著改善。所有 9 位患者在術後 6 個月覺得好多了。4 位患者術後追蹤超過 12 個月並且其中 3 位接受關節內視鏡檢查。發現在軟骨損傷處的透明軟骨帶有中度硬度，密合而無任何空隙在移植處與移植物之間（見圖 2）。

綜上，包括類軟骨細胞之細胞基質複合物會分泌 GAG，但不具骨陷窩（lacuna），且依本發明所製備的基質，在患者的軟骨損傷修復顯示出極好的功效，當移植到受移植處後，該處形成透明軟骨而且在移植處與經由細胞-基質製作的手術移植物之間無任何空隙。

【圖式簡單說明】

為了說明本發明之目的，圖式顯示目前最佳具體實施例。然而，應瞭解的是，本發明不受所示最佳實施例所示之限制。

在圖式中：

圖 1 顯示 9 位患者依照本發明方法處理後的 IKDC 分數，其中經由學生 t 檢定發現，術後 6 個月和 12 個月有顯著改善。

圖 2 顯示依本發明方法處理後的患者在移植 12 個月後的內視鏡觀察影像；在移植位置與細胞-基質複合物所製作的手術移植物之間無空隙。

七、申請專利範圍：

1. 一種類軟骨細胞在製備用於修復軟骨損傷之移植物之用途，其中，藉由將間質幹細胞（MSCs）培養於含膠原蛋白之培養基中 7-20 天，以形成不具骨陷窩（lacuna）之移植物，該移植物包含包埋有類軟骨細胞的膠原蛋白基質，該培養基添加轉化生長因子- $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ），培養條件係容許該等 MSCs 之分化成為該等類軟骨細胞及該移植物之形成，其中，該等類軟骨細胞係分泌糖胺聚多糖的。

2. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該等 MSCs 係分離自骨髓、脂肪組織、肌肉組織、脫落乳牙的牙髓、臍帶血、瓦頓氏凝膠（Wharton's jelly）、胎盤或臍帶內膜。

3. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該膠原蛋白基質包含第一型或第二型膠原蛋白。

4. 一種用於修復軟骨損傷之移植物，其包含包埋有類軟骨細胞的膠原蛋白基質，該移植物不具骨陷窩（lacuna）且係藉由將間質幹細胞（MSCs）培養於含膠原蛋白之培養基中 7-20 天以製備，該培養基添加轉化生長因子- $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ），培養條件係容許該 MSCs 之分化成為該等類軟骨細胞及該移植物之形成，其中，該等類軟骨細胞係分泌糖胺聚多糖的。

5. 如申請專利範圍第 4 項之移植物，其中該等 MSCs 係分離自骨髓、脂肪組織、肌肉組織、脫落乳牙的牙髓、臍帶血、瓦頓氏凝膠（Wharton's jelly）、胎盤或臍帶內膜。

6. 如申請專利範圍第 4 項之移植物，其中該膠原蛋白基質包含第一型或第二型膠原蛋白。

7. 一種製備如申請專利範圍第 4 項之移植物之方法，包含：
提供間質幹細胞（MSCs）；以及

將該等 MSCs 培養於含膠原蛋白之培養基中 7-20 天，該培養基添加轉化生長因子- $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ），培養條件係容許該等 MSCs 之分化成為該等類軟骨細胞及該移植物之形成。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該等 MSCs 係分離自骨髓、脂肪組織、肌肉組織、脫落乳牙的牙髓、臍帶血、瓦頓氏凝膠 (Wharton's jelly)、胎盤或臍帶內膜。
9. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該膠原蛋白以約 1% 至約 10% (w/v) 的濃度包含於該培養基中。
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該膠原蛋白以約 3% (w/v) 的濃度包含於該培養基中。
11. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該培養基包含第一型或第二型膠原蛋白。
12. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該培養步驟係在膠囊中進行。

八、圖式：

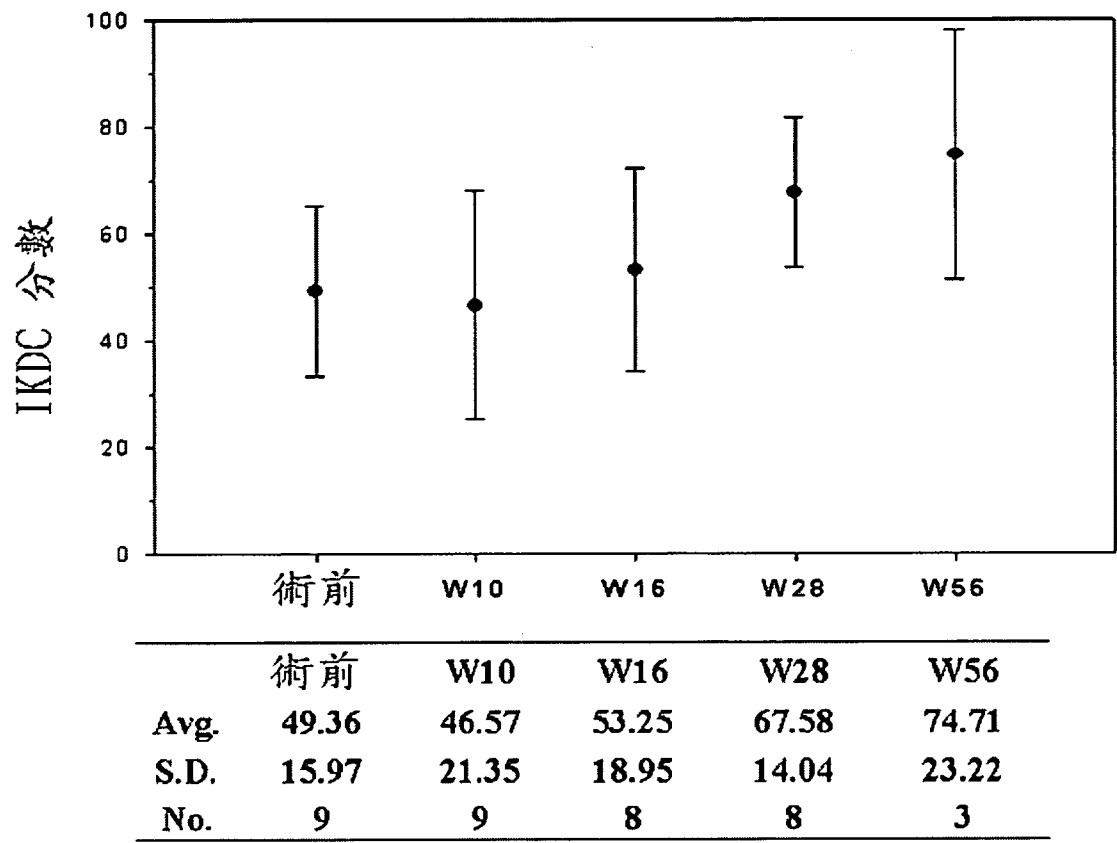


圖 1

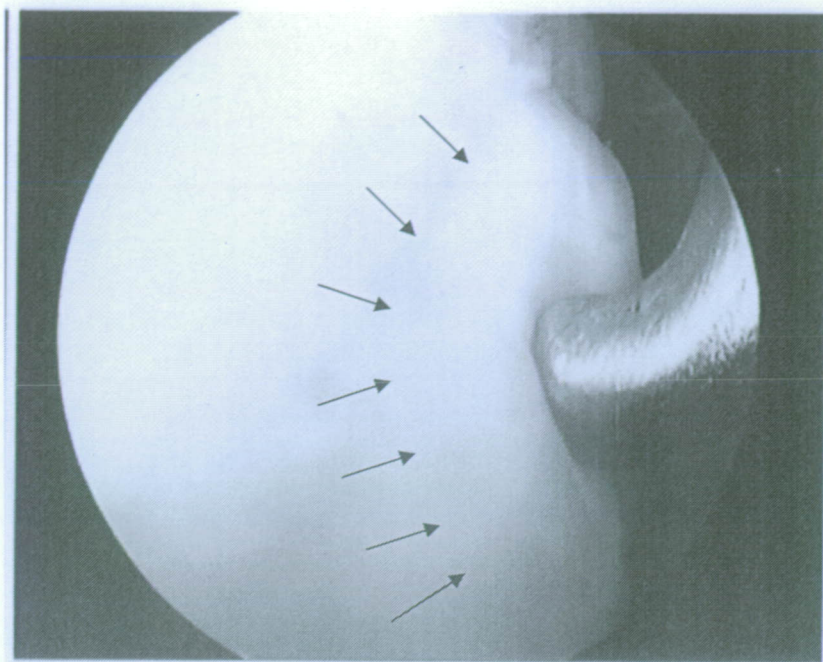


圖 2