



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102231992 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 200980145429. 7

A61L 27/54(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 09. 09

A61L 27/56(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/191641 2008. 09. 09 US

61/144088 2009. 01. 12 US

61/144126 2009. 01. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 05. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/056418 2009. 09. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/030714 EN 2010. 03. 18

(73) 专利权人 生物模拟治疗公司

地址 美国田纳西州

(72) 发明人 S·E·林奇 L·A·维斯纳-林奇

H·K·克斯特勒 刘彦春

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 梁谋 郭文洁

(51) Int. Cl.

A61L 27/24(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101198343 A, 2008. 06. 11, 说明书第2页第2段、第3页第2段、第5页第4段、第6页第1段、第7页第2段、第9页第3段、第20页最后一段至第21页第2段。

CN 1652829 A, 2005. 08. 10, 全文。

CN 101130111 A, 2008. 02. 27, 全文。

审查员 陈冲

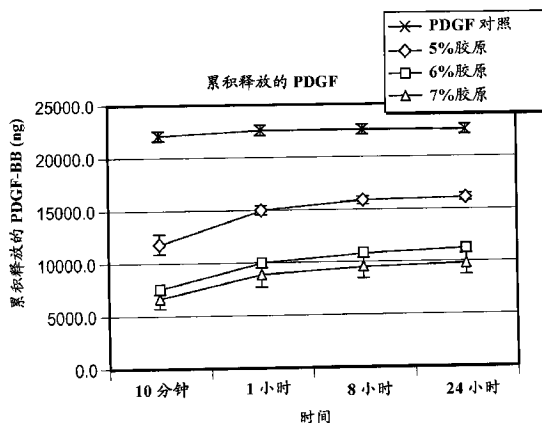
权利要求书3页 说明书51页 附图20页

(54) 发明名称

用于治疗肌腱和韧带损伤的血小板衍生生长因子的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供用于治疗肌腱和韧带损伤和/或修复受损肌腱和韧带的组合物和方法。本发明提供包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子(PDGF)的组合物。



1. 包含生物相容性胶原基质和血小板衍生生长因子 (PDGF) 的组合物在制备用于治疗个体的未涉及骨的肌腱损伤或韧带损伤的方法的药物中的用途, 所述方法包括将有效量的所述组合物给予到个体的损伤受累部位, 其中所述生物相容性胶原基质包含具有平均直径为 $1\ \mu\text{m}$ 至 1mm 的孔隙, 其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 80%, 且其中至少 50% 的 PDGF 在 24 小时内从所述生物相容性胶原基质释放出; 其中所述 PDGF 以包含 PDGF 的溶液剂存在, 其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 $0.1\ \text{mg/ml}$ – $2.0\ \text{mg/ml}$ 。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率选自: 至少为 85%、至少为 90%、至少为 92% 和至少为 95%。

3. 权利要求 1 的用途, 其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 90%。

4. 权利要求 1 的用途, 其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 92%。

5. 权利要求 1 的用途, 其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 95%。

6. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述孔隙的平均面积为 $2500\ \mu\text{m}^2$ – $20,000\ \mu\text{m}^2$ 。

7. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述孔隙的平均周长为 $200\ \mu\text{m}$ – $600\ \mu\text{m}$ 。

8. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述孔隙的直径为 $5\ \mu\text{m}$ – $500\ \mu\text{m}$ 。

9. 权利要求 7 的用途, 其中所述孔隙的直径为 $10\ \mu\text{m}$ – $500\ \mu\text{m}$ 。

10. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述孔隙是相互连接的孔隙。

11. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中至少 60% 的 PDGF 在 24 小时内释放。

12. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中至少 70% 的 PDGF 在 24 小时内释放。

13. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中至少 80% 的 PDGF 在 24 小时内释放。

14. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述生物相容性胶原基质在体内给予后 21 天内吸收。

15. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述生物相容性胶原基质在体内给予后 18 天内吸收。

16. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述生物相容性胶原基质在体内给予后 15 天内吸收。

17. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述胶原是可溶性的。

18. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述胶原是交联的。

19. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述生物相容性胶原基质还包含糖胺聚糖。

20. 权利要求 19 的用途, 其中所述糖胺聚糖是硫酸软骨素。

21. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述组合物为凝胶剂、颗粒剂、粉末剂、薄片剂、垫块剂、糊膏剂、贴片剂或海绵剂。

22. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述组合物是流动性的。

23. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述生物相容性胶原基质是 COLLATAPE®。

24. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 $0.1\ \text{mg/ml}$ – $0.4\ \text{mg/ml}$ 。

25. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 $0.9\ \text{mg/ml}$ – $1.5\ \text{mg/ml}$ 。

26. 权利要求 1–5 中任一项的用途, 其中在暴露于组合物后 4 天内细胞渗入组合物中。

27. 权利要求 1-5 中任一项的用途,其中所述方法还包括机械稳固损伤肌腱的步骤。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述稳固损伤肌腱或韧带的步骤包括缝合损伤肌腱或韧带,从而定位缝合的肌腱或韧带,使得受损肌腱或受损韧带的末端充分再接近。

29. 权利要求 1-5 中任一项的用途,其中所述给予步骤包括使用注射器将有效量的组合物给予到所述个体的损伤受累部位。

30. 权利要求 1-5 中任一项的用途,其中所述肌腱选自髌腱、胫骨前肌腱、跟腱、腓绳肌腱、半腱肌腱、股薄肌腱、外展肌腱、内收肌腱、冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。

31. 权利要求 1-5 中任一项的用途,其中所述韧带选自前十字韧带、外侧副韧带、后十字韧带、内侧副韧带、颅侧十字韧带、尾侧十字韧带、环甲韧带、牙周韧带、晶状体悬韧带、髌髁前韧带、髌髁后韧带、髌结节韧带、髌棘韧带、耻骨下韧带、耻骨上韧带、悬韧带、桡腕掌侧韧带、桡腕背侧韧带、尺侧副韧带和桡侧副韧带。

32. 权利要求 1-5 中任一项的用途,其中所述肌腱或韧带损伤是肌腱或韧带破裂、断裂、撕裂、层离、劳损或变形。

33. 包含生物相容性胶原基质和血小板衍生生长因子(PDGF)的组合物在制备用于使个体的肌腱与骨附着或使韧带与骨附着的方法的药物中的用途,所述方法包括将有效量的所述组合物给予到个体的肌腱与骨或韧带与骨之间的界面上,其中所述生物相容性胶原基质包含具有平均直径为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 至 1mm 的孔隙,其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 80%,且其中至少 50% 的 PDGF 在 24 小时内释放;其中所述 PDGF 以包含 PDGF 的溶液剂存在,其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 0.1 mg/ml - 2.0 mg/ml 。

34. 权利要求 33 的用途,其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 85%。

35. 权利要求 33 的用途,其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 90%。

36. 权利要求 33 的用途,其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 92%。

37. 权利要求 33 的用途,其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 95%。

38. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述孔隙的平均面积为 $2500\text{ }\mu\text{m}^2$ - $20,000\text{ }\mu\text{m}^2$ 。

39. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述孔隙的平均周长为 $200\text{ }\mu\text{m}$ - $600\text{ }\mu\text{m}$ 。

40. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述孔隙的直径为 $5\text{ }\mu\text{m}$ - $500\text{ }\mu\text{m}$ 。

41. 权利要求 40 的用途,其中所述孔隙的直径为 $10\text{ }\mu\text{m}$ - $500\text{ }\mu\text{m}$ 。

42. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述孔隙是相互连接的孔隙。

43. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中至少 60% 的 PDGF 在 24 小时内释放。

44. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中至少 70% 的 PDGF 在 24 小时内释放。

45. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中至少 80% 的 PDGF 在 24 小时内释放。

46. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述生物相容性胶原基质在体内给予后 21 天内吸收。

47. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述生物相容性胶原基质在体内给予后 18 天内吸收。

48. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述生物相容性胶原基质在体内给予后 15 天内吸收。

49. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述胶原是可溶性的。
50. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述胶原是交联的。
51. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述生物相容性胶原基质还包含糖胺聚糖。
52. 权利要求 51 的用途,其中所述糖胺聚糖是硫酸软骨素。
53. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述组合物为凝胶剂、颗粒剂、粉末剂、薄片剂、垫块剂、糊膏剂、贴片剂或海绵剂。
54. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述生物相容性胶原基质是 COLLATAPE®。
55. 权利要求 53 的用途,其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 0.1 mg/ml-0.4 mg/ml。
56. 权利要求 54 的用途,其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 0.9 mg/ml-1.5 mg/ml。
57. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中在暴露于组合物后 4 天内细胞渗入组合物中。
58. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述肌腱选自髌腱、胫骨前肌腱、跟腱、腓绳肌腱、半腱肌腱、股薄肌腱、外展肌腱、内收肌腱、冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。
59. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述韧带选自前十字韧带、外侧副韧带、后十字韧带、内侧副韧带、颅侧十字韧带、尾侧十字韧带、环甲韧带、牙周韧带、晶状体悬韧带、髌髁前韧带、髌髁后韧带、髌结节韧带、髌棘韧带、耻骨下韧带、耻骨上韧带、悬韧带、桡腕掌侧韧带、桡腕背侧韧带、尺侧副韧带和桡侧副韧带。
60. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述附着用于肌腱套损伤治疗。
61. 权利要求 33-37 中任一项的用途,其中所述附着用于前十字韧带重建。
62. 一种用于治疗个体的未涉及骨的肌腱或韧带损伤的药盒,其包括给予的装有生物相容性胶原基质的第一容器内容物和装有血小板衍生生长因子 (PDGF) 溶液剂的第二容器内容物,其中所述生物相容性胶原基质包含具有直径为 1 μ m 至 1mm 的孔隙,其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 80%,且其中至少 50% 的 PDGF 在 24 小时内释放;其中所述 PDGF 以包含 PDGF 的溶液剂存在,其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 0.1 mg/ml-2.0 mg/ml。
63. 一种用于使个体的肌腱或韧带与骨附着的药盒,其包括给予的装有生物相容性胶原基质的第一容器内容物和装有血小板衍生生长因子 (PDGF) 溶液剂的第二容器内容物,其中所述生物相容性胶原基质包含具有平均直径为 1 μ m 至 1mm 的孔隙,其中所述生物相容性胶原基质的孔隙率至少为 80%,且其中至少 50% 的 PDGF 在 24 小时内释放;其中所述 PDGF 以包含 PDGF 的溶液剂存在,其中所述溶液剂中的 PDGF 浓度为 0.1 mg/ml-2.0 mg/ml。

用于治疗肌腱和韧带损伤的血小板衍生生长因子的组合物 和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据 35 U.S.C. § 119(e), 本申请要求 2008 年 9 月 9 日申请的美国临时申请号 61/191,641、2009 年 1 月 12 日申请的美国临时申请号 61/144,088 和 2009 年 1 月 12 日申请的美国临时申请号 61/144,126 的权益;通过引用所述申请的整体而结合到本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于治疗肌腱或韧带损伤(例如肌腱或韧带破裂、断裂、撕裂或切断或者肌腱或韧带从骨上脱落)的组合物和方法,特别是通过给予包含生物相容性基质与血小板衍生生长因子(PDGF)组合的组合物治疗肌腱或韧带损伤的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 肌腱和韧带是连接肌肉与骨或骨与骨间的坚韧纤维,但是肌腱和韧带可能因许多原因而破裂、断裂或从骨上脱落。这类肌腱或韧带损伤通常可能由于受累肌腱/韧带发生直接创伤、由老年所致的肌腱/韧带弱化、偏心荷载、重复运动、过度使用和/或应力或活动过强引起或造成。这类急性损伤相当严重,通常使个体无法移动受累关节。

[0006] 肌腱破裂、肌腱断裂或从骨上脱落的最常见部位是(1)四头肌(一组四块肌肉,即股外侧肌、股内侧肌、股中间肌和股直肌),其正好在膝盖骨(髌骨)之上汇聚形成髌腱;(2)跟腱,位于足跟正上方脚的后(背)部,跟腱起连接小腿肌肉(腓肠肌)与脚跟(跟骨)的作用;(3)肌腱套,位于肩部,由四块肌肉(冈上肌(最常见的肌腱破裂)、冈下肌、小圆肌和肩胛下肌)组成;(4)臂二头肌,其起肘屈肌的作用,二头肌破裂分为近端(近)型和远端(远)型;和(5)手屈肌腱,例如短屈肌和长屈肌。韧带破裂、韧带断裂或从骨上脱落最常见的部位是前十字韧带(ACL)、后十字韧带(PCL)和内侧副韧带(MCL)。几乎所有的肌腱和韧带损伤都会相当疼痛(急性或慢性)、丧失活动能力以及受累关节或肢体无力。对于破裂或脱离的肌腱/韧带,为了使肌腱或韧带牢固附着在其骨上,或者将受累肌腱/韧带的破裂或断裂末端重新连接,外科手术是最常见的治疗手段。对于其它肌腱/韧带损伤,常规治疗包括休息、冰、NSAID、皮质甾类注射、热和超声。然而,尽管几十年的研究以及对这些损伤的临床关注增加,但其临床结果仍难以预料。

[0007] 就四头肌而言,髌腱破裂相对较少,但仍是致残损伤,这在 40 岁以下患者中最为常见。这往往发生在体育活动期间弯屈的膝部阻碍四头肌肌群的剧烈收缩时。破裂通常代表由髌腱重复轻伤引起的退变性腱病的最终阶段。

[0008] 就跟腱而言,在所有年龄段的运动员和非运动员都有发生损伤的风险,大多数损伤都出现于 30 岁至 50 岁年龄段的人(Boyden, E. 等, Clin Orthop, 317:150-158(1995); Hattrup, S. 和 Johnson, K, Foot and Ankle, 6:34-38(1985); Jozsa, L. 等, Acta Orthop Scandinavica, 60:469-471(1989))。跟腱炎和腱退变也常见于工作时踝和脚受力的个体,以及不大习惯运动以及只在周末或很少参加体育运动的“周末勇士”。

[0009] 在肌腱套损伤的情况下,尽管外科手术器械和技术取得进展,但现有技术不能实

现持久修复,一些研究列举的失效率高达 94%。肌腱修复的失效可能是因受损肌腱的愈合差和受损肌腱与骨的再附着差造成的。

[0010] 韧带与骨的牢固附着对许多韧带重建手术都是必需的。成功的韧带置换手术(例如前十字韧带重建)需要将肌腱移植体固定在骨通道(bone tunnel)上,骨逐步长入肌腱中,在骨和肌腱之间形成生物附着。组织学和生物力学研究表明,在肌腱移植体移植到骨后一般需要 6-12 周才实现骨长入、肌腱-骨附着、矿化和肌腱与骨之间更大的胶原-纤维连续性。参见 Rodeo S. A. 等, Tendon-Healing in a Bone Tunnel, 75(12):1795-1803(1993)。

[0011] 因此,需要提供新的组合物和新的方法,治疗各种肌腱/韧带损伤和肌腱/韧带与骨附着,以改进与外科手术修复或其它非外科手术治疗有关的愈合反应。

[0012] 本文引用的所有参考文献,包括而不限于专利、专利申请和科技文献,均通过引用其整体结合到本文中。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供治疗肌腱或韧带损伤的组合物和方法。

[0015] 本发明的一个方面,提供包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子(PDGF)的组合物,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50%的 PDGF 在约 24 小时内释放。

[0016] 另一方面,本发明提供用于治疗个体的未涉及骨的肌腱损伤或韧带损伤的方法,所述方法包括将有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子(PDGF)的组合物给予到个体的损伤受累部位,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50%的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,该方法还包括机械稳固损伤肌腱或韧带的步骤。在一些实施方案中,稳固肌腱或韧带损伤的步骤包括缝合肌腱或韧带损伤,其中将缝合的肌腱或韧带定位使得受损肌腱或韧带的末端充分再接近。在一些实施方案中,给药的步骤包括使用注射器将有效量的组合物给予到所述个体的损伤受累部位。

[0017] 另一方面,本发明提供用于将个体的肌腱与骨附着或再附着的方法,所述方法包括将有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子(PDGF)的组合物给予到所述个体的肌腱与骨之间的界面上,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50%的 PDGF 在约 24 小时内释放。

[0018] 另一方面,本发明提供用于将个体的韧带与骨附着或再附着的方法,所述方法包括将有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子(PDGF)的组合物给予所述个体的韧带与骨之间的界面上,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50%的 PDGF 在约 24 小时内释放。

[0019] 另一方面,本发明提供治疗个体的未涉及骨的肌腱或韧带损伤的药盒,该药盒包括装有生物相容性基质的第一容器和装有血小板衍生生长因子(PDGF)溶液剂的第二容器,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50%的 PDGF 在约 24 小时内释放。

[0020] 又一方面,本发明提供用于将个体的肌腱或韧带与骨附着的药盒,该药盒包括装有生物相容性基质的第一容器和装有血小板衍生生长因子(PDGF)溶液剂的第二容器,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约

50%的PDGF在约24小时内释放。

[0021] 本文所述的任何组合物均可用于本文所述的任何方法或药盒。下文中描述各个实施方案可与本发明的任何方面联用,正如对于本领域普通技术人员是显而易见的一样。

[0022] 在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率为至少约25%、至少约50%、至少约75%、至少约85%、至少约90%、至少约92%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、约80%—约95%、约85%—约95%、约85%—约90%、约90%—约92%或约92%—约95%。

[0023] 在一些实施方案中,孔隙的平均面积为约 $800\mu\text{m}^2$ —约 $3,000\mu\text{m}^2$ 、约 $13,000\mu\text{m}^2$ —约 $50,000\mu\text{m}^2$ 、约 $2500\mu\text{m}^2$ —约 $20,000\mu\text{m}^2$ 、约 $4500\mu\text{m}^2$ —约 $20,000\mu\text{m}^2$ 、约 $5000\mu\text{m}^2$ —约 $19,000\mu\text{m}^2$ 、约 $6000\mu\text{m}^2$ —约 $18,000\mu\text{m}^2$ 、约 $6000\mu\text{m}^2$ —约 $15,000\mu\text{m}^2$ 或约 $5000\mu\text{m}^2$ —约 $16000\mu\text{m}^2$ 。

[0024] 在一些实施方案中,孔隙的平均周长为约 $100\mu\text{m}$ —约 $200\mu\text{m}$ 、约 $400\mu\text{m}$ —约 $800\mu\text{m}$ 、约 $200\mu\text{m}$ —约 $500\mu\text{m}$ 、约 $200\mu\text{m}$ —约 $600\mu\text{m}$ 、约 $300\mu\text{m}$ —约 $600\mu\text{m}$ 或约 $300\mu\text{m}$ —约 $500\mu\text{m}$ 。

[0025] 在一些实施方案中,孔隙的平均直径为约 $1\mu\text{m}$ —约 1mm 。在一些实施方案中,孔隙的平均直径为至少约 $5\mu\text{m}$ 、至少约 $10\mu\text{m}$ 、至少约 $20\mu\text{m}$ 、至少约 $30\mu\text{m}$ 、至少约 $40\mu\text{m}$ 或至少约 $50\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ —约 $500\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ —约 $500\mu\text{m}$ 、约 $50\mu\text{m}$ —约 $500\mu\text{m}$ 、约 $100\mu\text{m}$ —约 $500\mu\text{m}$ 或约 $100\mu\text{m}$ —约 $300\mu\text{m}$ 。

[0026] 在一些实施方案中,孔隙包含相互连接的孔隙。

[0027] 在一些实施方案中,至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、约50%—约95%、约60%—约95%、约70%—约95%、约80%—约95%、约90%—约95%、约50%—约85%、约60%—约85%、约70%—约85%或约50%—约80%的PDGF在约24小时内释放。在一些实施方案中,至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、约50%—约95%、约60%—约95%、约70%—约95%、约80%—约95%、约90%—约95%、约50%—约85%、约60%—约85%、约70%—约85%或约50%—约80%的PDGF在约1小时、约6小时、约8小时、约12小时或约48小时内释放。在一些实施方案中,体内测定PDGF释放。在一些实施方案中,体外测定PDGF释放。在一些实施方案中,PDGF释放到周围区域。在一些实施方案中,PDGF释放到受损肌腱或韧带上。在一些实施方案中,PDGF释放在骨—肌腱或骨—韧带附着点附近的骨表面上。在一些实施方案中,PDGF释放到周围介质中。

[0028] 在一些实施方案中,在体内给予约1个月、约3个月、约6个月或约9个月内生物相容性基质被吸收。在一些实施方案中,在体内给予约30天、约25天、约21天、约18天、约15天、约10—14天或约10天内生物相容性基质被吸收。

[0029] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含胶原。在一些实施方案中,胶原包含I型胶原。在一些实施方案中,胶原是交联的。

[0030] 在一些实施方案中,胶原是可溶性的。在一些实施方案中,胶原是不溶性的。在一些实施方案中,胶原包含可溶性胶原单体组分和不溶性胶原聚合物组分。在一些实施方案中,可溶性胶原单体与不溶性胶原聚合物的比率为约1:10、约1:9、约1:8、约1:7、约1:6、约1:5、约1:4、约1:3、约1:2或约1:1。

[0031] 在一些实施方案中,生物相容性基质还包含糖胺聚糖。在一些实施方案中,糖胺聚糖是硫酸软骨素。在一些实施方案中,糖胺聚糖不是硫酸软骨素。

[0032] 在不同的实施方案中,组合物为凝胶剂、颗粒剂、粉末剂、糊膏剂、薄片剂、垫块剂、贴片剂或海绵剂。在一些实施方案中,组合物是可流动性的。

[0033] 在一些实施方案中,生物相容性基质是 COLLATAPE[®]。在一些实施方案中,生物相容性基质是 BIOBLANKET[®]。在一些实施方案中,生物相容性基质不是 BIOBLANKET[®]。在一些实施方案中,生物相容性基质不会氧化 PDGF。

[0034] 在一些实施方案中,PDGF 以包含 PDGF 的溶液剂存在,其中溶液剂中的 PDGF 浓度为约 0.1mg/ml-约 10.0mg/ml、约 5mg/ml-约 20mg/ml、约 0.1mg/ml-约 2.0mg/ml、约 0.1mg/ml-约 0.4mg/ml 或约 0.9mg/ml-约 1.5mg/ml。在一些实施方案中,PDGF 溶液剂的浓度为约 0.15mg/ml、约 0.3mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.5mg/ml、约 2.0mg/ml 或约 10.0mg/ml。

[0035] 在本发明的一些实施方案中,PDGF 是 PDGF 同二聚体,在其它实施方案中,PDGF 是异二聚体,包括例如 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、PDGF-DD 及其混合物和衍生物。在一些实施方案中,PDGF 包含 PDGF-BB。在其它实施方案中,PDGF 包含重组人 (rh)PDGF,例如重组人 PDGF-BB (rhPDGF-BB)。

[0036] 在本发明的一些实施方案中,PDGF 是 PDGF 片段。在一些实施方案中,rhPDGF-B 包含以下片段:完整 B 链的氨基酸序列 1-31、1-32、33-108、33-109 和 / 或 1-108。

[0037] 在一些实施方案中,在暴露于组合物后约 3 周、约 2 周、约 1 周、约 7 天、约 6 天、约 5 天、约 4 天、约 3 天、约 2 天或约 1 天内细胞渗入本发明的组合物中。在一些实施方案中,细胞是肌腱细胞。在一些实施方案中,细胞是成骨细胞。在一些实施方案中,细胞是韧带细胞。

[0038] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法可用于肌腱与骨的附着或韧带与骨的附着,并可应用于任何肌腱或韧带附着。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法通过在肌腱 / 韧带与骨附着的部位加固肌腱和 / 或骨和韧带和 / 或骨从而促进肌腱与骨附着或韧带与骨附着。受伤或受损肌腱和 / 或韧带的其它类型,例如出现撕裂、层离和 / 或任何其它劳损或变形的肌腱 / 韧带,也可通过本发明的方法治疗。可以治疗单一类型的损伤,或者可以同时治疗一种以上类型的损伤。在一些实施方案中,治疗包括治疗肌腱。在一些实施方案中,治疗包括治疗韧带。在一些实施方案中,肌腱移植物用于专门治疗肌腱和 / 或韧带组织。在其它实施方案中,韧带移植物用于专门治疗肌腱和 / 或韧带组织。

[0039] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法既可用于肌腱与骨的附着或再附着,又可用于任何未涉及骨的肌腱损伤。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法既可用于促进肌腱与骨的附着或再附着,又可用于任何未涉及骨的肌腱损伤。在其它实施方案中,本发明的组合物和方法既可用于韧带与骨的附着或再附着,又可用于任何不涉及骨的韧带损伤。在其它实施方案中,本发明的组合物和方法既可用于增强韧带与骨的附着或再附着,又可用于和任何不涉及骨的韧带损伤。

[0040] 在一些实施方案中,可采用本发明的组合物和方法治疗的肌腱包括但不限于肩胛下肌、冈上肌、冈下肌、小圆肌、股直肌、胫骨后肌、股四头肌、肱二头肌的肌腱,以及跟腱、髌腱、外展肌腱和内收肌腱,或者髋部的其它肌腱、伸肌总腱、屈肌总腱、指浅屈肌腱、指伸肌腱和小指伸肌 (extensor minimi) 腱或臂和手的其它肌腱。在一些实施方案中,可采用本

发明的组合物和方法治疗的肌腱选自：髌腱、胫骨前肌腱、跟腱、腓绳肌腱、半腱肌腱、股薄肌腱、外展肌腱和内收肌腱。在一些实施方案中，可采用本发明的组合物和方法治疗的肌腱选自冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱（肌腱套复合体）、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。在一些实施方案中，可采用本发明的组合物和方法治疗的肌腱选自髌腱、胫骨前肌腱、跟腱、腓绳肌腱、半腱肌腱、股薄肌腱、外展肌腱、内收肌腱、冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱（肌腱套复合体）、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。在一些实施方案中，可采用本发明的组合物和方法治疗的肌腱不选自冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱（肌腱套复合体）、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。

[0041] 在一些实施方案中，可采用本发明的组合物和方法治疗的韧带选自前十字韧带、外侧副韧带、后十字韧带、内侧副韧带、颅侧十字韧带、尾侧十字韧带、环甲韧带、牙周韧带、晶状体悬韧带、髌髁前韧带、髌髁后韧带、髌结节韧带、髌棘韧带、耻骨弓状韧带、耻骨上韧带、悬韧带、桡腕掌侧韧带、桡腕背侧韧带、尺侧副韧带和桡侧副韧带。

[0042] 在一些实施方案中，可通过本发明的组合物和方法治疗的骨包括但不限于例如胫骨、股骨和肱骨。

[0043] 在一些实施方案中，未涉及骨的肌腱或韧带损伤为肌腱或韧带破裂、断裂、撕裂、层离、劳损或变形。

[0044] 在一些实施方案中，肌腱与骨的附着是为了治疗肌腱套损伤。在一些实施方案中，肌腱与骨或韧带与骨的附着是为了前十字韧带重建。

[0045] 在一些实施方案中，提供用于治疗个体的肌腱或韧带损伤的方法，所述方法包括给予所述个体有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子（PDGF）的组合物，其中 PDGF 的浓度为约 0.1mg/ml–约 1.0mg/ml；且其中生物相容性基质形成包含孔隙的多孔结构，其孔面积的大小为约 4500 μm^2 –约 20000 μm^2 ，孔周长的大小为约 200 μm –约 500 μm 。

[0046] 在一些实施方案中，提供用于治疗个体的肌腱或韧带损伤的方法，所述方法包括将有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子（PDGF）的组合物给予所述个体的损伤受累部位，其中 PDGF 的浓度为约 0.1mg/ml–约 1.0mg/ml；且其中组合物是流动性的。

[0047] 在一些实施方案中，提供将个体的肌腱与骨附着或将韧带与骨附着的方法，所述方法包括将有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子（PDGF）的组合物给予到所述个体的腱与骨或韧带与骨之间的界面上，其中生物相容性基质形成包含孔隙的多孔结构，其孔隙率大于约 85%。

[0048] 在一些实施方案中，提供将个体的肌腱与骨附着用于前十字韧带重建的方法，所述方法包括将有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子（PDGF）的组合物给予到所述个体的肌腱与骨之间的界面上，其中生物相容性基质形成包含孔隙的多孔结构，其孔隙率大于约 85%。

[0049] 在本发明的一些实施方案中，所述方法可采用关节镜检查技术、内窥镜检查技术、腹腔镜检查技术或任何其它合适的微创技术进行。

[0050] 附图简述

[0051] 图 1 图示在 24 小时内不同胶原基质释放的累积 rhPDGF-BB。

[0052] 图 2 图示在 24 小时内不同的胶原基质释放的 rhPDGF-BB 的百分比。

- [0053] 图 3 图示 rhPDGF-BB 由不同的胶原基质释放后的生物效能。
- [0054] 图 4 图示示例性的缝合固定的横切跟腱。
- [0055] 图 5 图示按照本发明的一个实施方案将组合物给予稳固的受损跟腱的实例。
- [0056] 图 6A-6B 图示跟腱修复治疗的循环预适应结果（适应性延长和峰间延长），A）包括两个受血肿影响的样本和 B）不包括两个受血肿影响的样本。
- [0057] 图 7A-7B 显示跟腱修复治疗的破坏（失效）试验（the ramp to failure testing）结果（构件破坏时的极限力和构件总体刚度）。
- [0058] 图 8 显示包括或不包括两个受血肿影响的样本的跟腱修复治疗的修复组织刚度结果（分别为左图和右图）。
- [0059] 图 9A-9D 图示植入后 3 周植入胶原 A（图 a）、B（图 b）、C（图 c）和 D（图 d）的组织学切片。索引：B = 骨；C = 胶原；箭头指示未降解胶原。比例尺 = 200 μ m。
- [0060] 图 10 图示剥离趾长伸肌腱，用胶原海绵包覆趾长伸肌腱，将其穿过胫骨通道并附着在内侧骨皮质上。图片取自 Rodeo S. A. 等，Am. J. Sports Med. 27 :476-488(1999)。
- [0061] 图 11A-11C 图示包括形成穿过胫骨干骺端的通道的外科手术侧视图。图片取自 Rodeo S. A. 等，J. Bone Joint Surg. Am. ,75(12) :1795-1803(1993)。
- [0062] 图 12 图示组织学样本的取向。每块都可通过骨通道纵向等分，并用来切取横切片和全长纵切片。
- [0063] 图 13 图示样本的显微断层摄影术（显微 CT）。图片取自 Rodeo S. A. 等，J. Bone Joint Surg. Am. ,75(12) :1795-1803(1993)。
- [0064] 图 14 图示 Bench Top 关节镜检查模型。
- [0065] 图 15 是接种在添加 rhPDGF-BB（培养基终浓度为 30ng/ml）的 BIOBLANKET™基质 5%（图 a）、6%（图 b）、7%（图 c）和 COLLATAPE®（图 d）中的绵羊肌腱细胞的 SEM 图像。
- [0066] 图 16 图示肌腱套损伤治疗的动力预适应结果。图 16A：与仅缝合和缝合 + 胶原基质组相比，0.15mg/ml rhPDGF-BB 和 0.30mg/ml rhPDGF-BB 组进行显著较大的适应性延长。图 16B：任何组之间的峰间延长无显著差异。
- [0067] 图 17 图示肌腱套损伤治疗的破坏试验结果。图 17A：与仅缝合组相比，0.15mg/ml 和 0.30mg/ml rhPDGF-BB 的修复增强分别使破坏载荷增加 63.7% 和 63.3%。图 17B：较低的 rhPDGF-BB 剂量 0.15mg/ml 和 0.30mg/ml，优于较高的 1.0mg/ml PDGF 剂量，表现为破坏载荷分别增加 120% 和 119.3%。
- [0068] 图 18 图示通过以下治疗进行分组的组织病理学评分：1) 缝合 + 胶原基质 + 0.15mg/ml rhPDGF-BB 或 2) 缝合 + 胶原基质 + 0.3mg/ml rhPDGF-BB。给出了平均值，误差条线表示标准差。
- [0069] 图 19 图示通过以下治疗进行分组的组织病理学评分：1) 仅缝合；2) 缝合 + 胶原基质 + 0.15mg/ml rhPDGF-BB 或 3) 缝合 + 胶原基质 + 1.0mg/ml rhPDGF-BB。给出了平均值，误差条线表示标准差。
- [0070] 图 20 图示肌腱胶原（方框）与骨在纤维软骨界面（箭头）上交错排列的区域。A：缝合 + 胶原基质，20X。B：缝合 + 胶原基质 + 0.3mg/ml（或 150 μ g）rhPDGF-BB，20X。
- [0071] 发明详述
- [0072] 本发明部分基于这样的观察结果，即包含血小板衍生生长因子（PDGF）的生物相

容性基质可用于治疗未涉及骨的肌腱或韧带损伤及肌腱-骨和韧带-骨组织修复。

[0073] 除非另有说明,否则本发明将应用本领域技术人员熟知的分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学、核酸化学和免疫学的常规技术。除非另有说明,否则本发明还将应用本领域技术人员熟知的常规技术和外科手术仪器及其它医学方法。除非另有定义,否则本文使用的术语具有本发明所属领域普通技术人员通常理解相同含义。

[0074] 为了解释本说明书,将采用下列定义,适当时,单数形式还包括复数形式,反之亦然。如果下文中给出的任何定义与通过引用结合到本文的任何文献相抵触,则应以下文给出的定义为准。

[0075] 除非另有说明,否则本文使用的术语“治疗”是指给予个体有效量的包含生物相容性基质和血小板衍生生长因子的组合物,其减轻待治疗个体的病理、减缓待治疗个体的病理进程、加速治愈待治疗个体的病理、提高待治疗个体病理的愈合反应或修复待治疗个体的病理,和/或所述组合物导致一种或多种所需要的临床效果或治疗效果,其包括但不限于减轻与受损肌腱或韧带相关的疼痛、增加受累关节的运动范围以及提高修复部位的肌腱或韧带与肌腱或韧带、或者肌腱/韧带与骨的强度和附着。

[0076] “有效量”是指一定时间必需的最低限度的剂量从而有效达到所需治疗效果或临床效果。可以一次或多次给药来提供有效量。

[0077] 本文使用的治疗“未涉及骨的肌腱损伤或韧带损伤”是指治疗不涉及受损骨或者肌腱/韧带从骨上脱落的受损或受伤的肌腱或韧带。这类肌腱或韧带损伤的实例包括但不限于肌腱/韧带断裂、肌腱/韧带破裂、肌腱/韧带出现撕裂、层离或者任何其它劳损或变形。待治疗的个体除肌腱或韧带损伤以外,还可能出现骨损伤或肌腱-骨/韧带-骨脱离,然而,治疗“未涉及骨的肌腱或韧带损伤”是指专门治疗肌腱和/或韧带组织。要理解的是,在一些实施方案中,可以治疗个体的未涉及骨的肌腱损伤或韧带损伤以及涉及骨的损伤,例如肌腱-骨或韧带-骨附着。在一些实施方案中,仅治疗未涉及骨的肌腱损伤或韧带损伤。

[0078] “个体”是指哺乳动物,包括人、家畜和农场动物以及动物园动物、竞技动物或宠物,例如黑猩猩及其它类人猿和猴物种、狗、马、兔、牛、猪、山羊、绵羊、仓鼠、豚鼠、沙鼠、小鼠、白鼬、大鼠、猫等。优选个体是人。该术语并不表示具体的年龄或性别。

[0079] “生物(可)吸收(的)”是指生物相容性基质在体内吸收或重建的能力。吸收过程包括通过体液、酶或细胞的作用降解和清除起始材料。吸收的材料可被宿主用于形成新的组织,或者可以其它方式被宿主再利用,或者可被排泄。

[0080] 本文所述胶原基质包括例如以下形式的材料:凝胶、糊膏、颗粒、粉末、薄片、贴片、垫块、糊膏或海绵。市售可获得的胶原基质通常由牛皮和/或牛肌腱的胶原提取物制备。在一些实施方案中,牛肌腱来源于牛深屈肌腱(跟腱)。在一些实施方案中,基质由胶原浆料制备,其中对于各种基质类型,浆料中胶原的浓度不同。例如,一种类型的胶原基质由胶原浓度为4.5%的浆料制备,这种胶原基质本文称为“胶原(4.5%)”或“胶原基质(4.5%)”;第二种类型的胶原基质由胶原浓度为5%的浆料制备,这种胶原基质本文称为“胶原(5%)”或“胶原基质(5%)”;第三种类型的胶原基质由胶原浓度为6%的浆料制备,这种胶原基质本文称为“胶原(6%)”或“胶原基质(6%)”;第四种类型的胶原基质由胶原浓度为7%的浆料制备,这种胶原基质本文称为“胶原(7%)”或“胶原基质(7%)”。对

于任何胶原基质,起始浆料中所用胶原的百分比不一定反映出最终胶原基质中胶原的百分比。

[0081] 本文使用的术语“将……附着”或本文使用的“附着”包括将肌腱与骨再附着或再附着在骨上,或者将韧带与骨再附着或再附着在骨上,还包括将移植物(例如肌腱或韧带移植物)与骨附着或附着在骨上。例如,用非限制性实例为例,在进行前十字韧带重建时,可从骨上除去受损韧带,并将移植物(例如肌腱或韧带移植物)与骨附着或附着在骨上以替换原来的韧带。

[0082] 本文使用的单数形式包括复数形式,除非另有说明。

[0083] 本文提及的某值或参数前的“约”包括(和描述了)涉及该值或参数本身的具体形式。例如,提及“约 X”的描述包括“X”。

[0084] 要理解的是,本文所述本发明的方面和实施方案包括“包含(包括)”各方面和各实施方案、由各方面和各实施方案“组成”以及“基本由各方面和各实施方案组成”。

[0085] 本发明的组合物和方法

[0086] 本文披露了用于治疗个体的未涉及骨的肌腱或韧带损伤的组合物和方法。总体说来,所述治疗方法包括将包含生物相容性基质和 PDGF 的组合物给予患有肌腱或韧带损伤的个体。准确地讲,所述治疗方法包括将包含胶原基质和 PDGF 的组合物给予肌腱或韧带损伤的部位。

[0087] 本文还披露了将个体的肌腱或韧带与骨附着或再附着或者将肌腱或韧带附着或再附着在骨上的组合物和方法。总体说来,附着方法包括将包含生物相容性胶原基质和 PDGF 的组合物给予肌腱/韧带与骨之间的界面上。

[0088] 生物相容性基质

[0089] 按照本发明的一些实施方案,生物相容性基质包含支架基质。按照本发明的一些实施方案,支架基质提供用于进行新组织(包括肌腱/韧带和/或骨组织)生长的构架或支架。

[0090] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含胶原基质。术语“胶原基质”可指例如胶原凝胶、糊膏、粉末、颗粒、贴片、垫块、薄片或海绵。在一些实施方案中,胶原基质包含任何类型的胶原,包括 I 型、II 型和 III 型胶原。在一些实施方案中,胶原包含胶原的混合物,例如 I 型和 II 型胶原的混合物。在其它实施方案中,胶原在生理条件下是可溶性的。在一些实施方案中,胶原在生理条件下是不溶性的。在一些实施方案中,胶原包含可溶性组分和不溶性组分。在一些实施方案中,胶原基质包含纤维性胶原例如可溶性 I 型牛胶原。在一些实施方案中,胶原基质包含来源于牛皮组织的纤维性可溶性胶原和酸性可溶性胶原。可以采用存在于骨或肌肉骨骼组织中的其它类型的胶原。重组形式、合成形式和天然形式的胶原可用于本发明。胶原可以是或不是交联的。

[0091] 适用于胶原基质的纤维性胶原可具有足够的机械性能(包括湿拉强度)以承受缝合并保持缝口不撕开。例如,纤维性胶原基质的湿撕裂强度可为例如约 0.75 磅-约 5 磅。

[0092] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含糖胺聚糖(GAG)。在一些实施方案中,生物相容性基质包含胶原和糖胺聚糖(GAG),例如交联胶原和 GAG。在一些实施方案中,GAG 是硫酸软骨素。在一些实施方案中,GAG 不是硫酸软骨素。其它 GAG 包括但不限于硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸乙酰肝素、透明质酸及其组合。在一些实施方案中,胶原与 GAG 的重

量 / 重量比约为 90 : 10。在一些实施方案中,胶原与 GAG 的重量 / 重量比约为 92 : 8。在一些实施方案中,胶原与 GAG 的重量 / 重量比约为 95 : 5。在一些实施方案中,生物相容性基质包含与硫酸软骨素交联的胶原。在其它实施方案中,生物相容性基质包含与 GAG 交联的胶原,其中 GAG 不是硫酸软骨素。

[0093] 在一些实施方案中,胶原基质获自商业来源,包括但不限于 COLLATAPE® (Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ); INTEGRA Flowable Wound Matrix (Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ); Cellerate RX、HyCure Hydrolyzed Collagen and Hydrolyzed Collagen/Ag Wound Gel (Hymed Group Corporation, Bethlehem, PA); 以及 BIOBLANKET™ 和 P 1076 流动性胶原 (Kensey Nash Corporation, Exton, PA)。在一些实施方案中,胶原基质不是 BIOBLANKET™。在一些实施方案中,胶原基质不是 COLLATAPE®。

[0094] 在一些实施方案中,本发明的生物相容性基质是流动性的。在一些实施方案中,可通过注射器和针或套管将流动性的生物相容性基质用于所需部位。在一些实施方案中,可经皮将流动性的生物相容性基质用于所需部位。在其它实施方案中,可将流动性的生物相容性基质用于外科手术暴露的部位。在一些实施方案中,可将流动性的生物相容性基质用于插入骨通道的肌腱或韧带移植。在一些实施方案中,例如在药盒中,以脱水粉末或颗粒提供生物相容性基质,其可在配制给予前制成流动性的基质。例如可以制备脱水形式的生物相容性基质,使用时加入适量的水化缓冲液或与适量的水化缓冲液混合。水化缓冲液可包括待给予的适量的 PDGF 作为生物相容性基质的组成部分。待加入的适量缓冲液根据例如所需要的 PDGF 浓度、所需要的胶原浓度、所需要的 GAG 浓度、所需要的流动性特性或其任何合适的组合而确定。

[0095] “流动性 (的)”是指物质的物理特性,其中施加给予这类物质通过套管或类似通道所需要的力时,物质便会流动,但是给予到待治疗个体的某一部位后,该物质大体上将保持不动,从而对该部位提供持续治疗。给予流动性物质的示例性装置是注射器,其中活塞可提供促使给出流动性物质所需要的力。合适的示例性装置可还包括针或其它合适的套管,使得更精确地递送和使用流动性物质。可以选择和使用给药装置的孔径、组成、构造、长度和任何其它合适的特征。本领域技术人员了解的是,合适递送装置的具体参数的选择以组合物的流动性特性为基础。例如,流动性相对较低的组合物可能更适于用套管孔径相对较大和 / 或套管较短的装置递送。在一些实施方案中,流动性组合物通过 21G、25G 或 27G 针递送。在一些实施方案中,用注射器和 / 或针递送允许流动性组合物经皮注射递送。在一些实施方案中,流动性组合物可用非套管装置 (例如匙、铲、刷等装置) 递送,这可供将组合物递送到需要位置。

[0096] 在一些实施方案中,生物相容性基质不会氧化 PDGF。

[0097] 按照一些实施方案,生物相容性基质可以适于植入的形状 (例如球形、圆柱形或块形) 提供。在其它实施方案中,生物相容性基质是可模压的或可挤压的。在这类实施方案中,生物相容性基质可以糊膏或油灰的形式提供。在一些实施方案中,生物相容性基质可以预定的形状提供,包括块形、球形或圆柱形或任何需要的形状,例如由模子或应用部位界定的形状。可模压的生物相容性基质可利于将本发明的组合物有效地放置在肌腱、韧带和 / 或骨上或放置在肌腱、韧带和 / 或骨周围,包括肌腱或韧带附着在骨上的部位或与骨附着

的部位,例如将肌腱或韧带移植物插入骨通道。在一些实施方案中,可以用铲或等同装置将可模压的生物相容性基质涂抹于骨和 / 或肌腱和 / 或韧带。在一些实施方案中,生物相容性基质可通过包裹 / 包覆肌腱或韧带(例如肌腱或韧带移植物)而应用于肌腱或韧带。

[0098] 本发明的胶原基质可由牛皮、牛肌腱(例如深屈肌腱(跟腱))或其它合适的胶原来源制备纯的胶原提取物。在一些实施方案中,胶原基质主要是 I 型胶原。在一些实施方案中,胶原基质由具有以下任一种胶原浓度(w/v)的胶原浆料制备:约 4.5%、约 5%、约 6% 或约 7%。在一些实施方案中,胶原是可溶性的。可溶性胶原可在其植入后不久溶解,从而将大孔性引入生物相容性基质。大孔性可通过增加入口而提高细胞(例如成骨细胞、肌腱细胞)进入植入材料的导入率,并因此提高细胞在植入物部位的重建活性。

[0099] 在一些实施方案中,胶原包含可溶性胶原单体组分和不溶性胶原聚合物组分。在某些实施方案中,可溶性胶原单体与不溶性胶原聚合物的比率为约 1 : 10、约 1 : 9、约 1 : 8、约 1 : 7、约 1 : 6、约 1 : 5、约 1 : 4、约 1 : 3、约 1 : 2 或约 1 : 1。

[0100] 在一些优选的实施方案中,生物相容性基质形成包含孔隙的多孔结构。在一些实施方案中,孔隙的平均面积为约 $800\mu\text{m}^2$ –约 $3,000\mu\text{m}^2$ 、约 $13,000\mu\text{m}^2$ –约 $50,000\mu\text{m}^2$ 、约 $2500\mu\text{m}^2$ –约 $20,000\mu\text{m}^2$ 、约 $3500\mu\text{m}^2$ –约 $20,000\mu\text{m}^2$ 、 $4500\mu\text{m}^2$ –约 $20,000\mu\text{m}^2$ 、约 $5000\mu\text{m}^2$ –约 $19,000\mu\text{m}^2$ 、约 $6000\mu\text{m}^2$ –约 $18,000\mu\text{m}^2$ 、约 $6000\mu\text{m}^2$ –约 $15,000\mu\text{m}^2$ 或约 $5000\mu\text{m}^2$ –约 $16000\mu\text{m}^2$ 。在一些实施方案中,孔隙的平均周长为约 $100\mu\text{m}$ –约 $200\mu\text{m}$ 、约 $400\mu\text{m}$ –约 $800\mu\text{m}$ 、约 $200\mu\text{m}$ –约 $500\mu\text{m}$ 、约 $200\mu\text{m}$ –约 $600\mu\text{m}$ 、约 $300\mu\text{m}$ –约 $600\mu\text{m}$ 或约 $300\mu\text{m}$ –约 $500\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,生物相容性基质的平均孔面积大小为约 $4500\mu\text{m}^2$ –约 $20000\mu\text{m}^2$,而平均孔周长大小为约 $200\mu\text{m}$ –约 $600\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,胶原基质包含平均孔面积大小为约 $4500\mu\text{m}^2$ –约 $20000\mu\text{m}^2$ 和平均孔周长大小为约 $200\mu\text{m}$ –约 $500\mu\text{m}$ 的孔隙。

[0101] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含多孔结构,其具有多向孔隙和 / 或相互连接的孔隙。按照一些实施方案,多孔结构可包含直径为约 $1\mu\text{m}$ –约 1mm 的孔隙,例如至少约 $5\mu\text{m}$ 、至少约 $10\mu\text{m}$ 、至少约 $20\mu\text{m}$ 、至少约 $30\mu\text{m}$ 、至少约 $40\mu\text{m}$ 或至少约 $50\mu\text{m}$ 。

[0102] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含直径为约 $100\mu\text{m}$ –约 1mm 的大孔隙。在另一个实施方案中,生物相容性基质包含直径为约 $10\mu\text{m}$ –约 $100\mu\text{m}$ 的中孔隙。在进一步的实施方案中,生物相容性基质包含直径小于约 $10\mu\text{m}$ 的微孔隙。本发明的实施方案提供包含大孔隙、中孔隙和微孔隙或其任何组合的生物相容性基质。

[0103] 在其它实施方案中,生物相容性基质包含具有孔隙不相互连接的多孔结构。在一些实施方案中,生物相容性基质包含具有孔隙相互连接和孔隙不相互连接的混合物的多孔结构。

[0104] 在一些实施方案中,生物相容性基质是多孔的,并且能够吸收量约 1 倍–约 15 倍生物相容性基质质量的水。在一些实施方案中,胶原基质是多孔的,并且能够吸收量约 1 倍–约 15 倍胶原基质质量的水。

[0105] 在一些实施方案中,生物相容性基质的多孔结构可供 PDGF 以增量方式从基质中释放。在一些实施方案中,正如体内或体外测定的一样,在特定时间内,胶原基质(5%)的多孔结构比胶原基质(6%)或胶原基质(7%)的结构释放较高百分比的 PDGF。在一些实施方案中,生物相容性基质的多孔结构可供 PDGF 在体内或体外给予约 24 小时内从基质中释放。在一些实施方案中,至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、

至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、约 50% - 约 95%、约 60% - 约 95%、约 70% - 约 95%、约 80% - 约 95%、约 90% - 约 95%、约 50% - 约 85%、约 60% - 约 85%、约 70% - 约 85%或约 50% - 约 80%的 PDGF 在约 24 小时内从基质中释放。在一些实施方案中,生物相容性基质的多孔结构可供 PDGF 在体内或体外给予约 1 小时、约 6 小时、约 8 小时、约 12 小时或约 48 小时内从基质中释放。在一些实施方案中,至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、约 50% - 约 95%、约 60% - 约 95%、约 70% - 约 95%、约 80% - 约 95%、约 90% - 约 95%、约 50% - 约 85%、约 60% - 约 85%、约 70% - 约 85%或约 50% - 约 80%的 PDGF 在约 1 小时、约 6 小时、约 8 小时、约 12 小时或约 48 小时内释放。在一些实施方案中,胶原基质是 COLLATAPE®。在一些实施方案中,胶原基质是类似于 COLLATAPE®的多孔牛胶原海绵。在一些实施方案中,生物相容性基质包含 COLLATAPE®,与胶原基质(5%)、胶原基质(6%)或胶原基质(7%)相比,其可供释放较高百分比的 PDGF。

[0106] 在一些实施方案中,PDGF 释放到周围区域。在一些实施方案中,PDGF 释放到受损肌腱或韧带上。在一些实施方案中,PDGF 释放到骨-肌腱或骨-韧带附着点附近的骨表面上。在一些实施方案中,PDGF 释放到周围介质中。

[0107] 在一些实施方案中,生物相容性基质的多孔结构可供细胞渗入基质的孔隙中。在一些实施方案中,细胞在暴露于组合物后约 3 周、约 2 周、约 1 周、约 7 天、约 6 天、约 5 天、约 4 天、约 3 天、约 2 天或约 1 天渗入组合物中。在一些实施方案中,细胞是肌腱细胞。在一些实施方案中,细胞是成骨细胞。在一些实施方案中,细胞是韧带细胞。在优选的实施方案中,生物相容性基质包含具有多孔结构的 COLLATAPE®,可供细胞渗入基质孔隙。在一些实施方案中,生物相容性基质包含具有多孔结构的 COLLATAPE®,与胶原基质(5%)、胶原基质(6%)或胶原基质(7%)相比,可供更多的细胞渗入基质的孔隙中。在一些实施方案中,生物相容性基质包含具有多孔结构的胶原基质(5%),与胶原基质(6%)或胶原基质(7%)相比,可供更多的细胞渗入基质的孔隙中。

[0108] 在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率至少约为 85%、约 90%、约 92%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%。

[0109] 在一些实施方案中,生物相容性基质是生物可吸收的。在一些实施方案中,生物相容性基质可以在体内给予 1 年内被吸收。在其它实施方案中,生物相容性基质可以在体内给予 1 个月、3 个月、6 个月或 9 个月内被吸收。在一些实施方案中,生物相容性基质在体内给予约 30 天、约 25 天、约 21 天、约 18 天、约 15 天、约 10-14 天或约 10 天内被吸收。生物可吸收性取决于:(1) 基质材料的性质(即其化学组成、物理结构和大小);(2) 基质在身体内放置的位置;(3) 所用基质材料的量;(4) 患者的代谢状况(糖尿病/非糖尿病、骨质疏松、吸烟者、老年、类固醇使用等);(5) 受治疗的损伤的程度和/或类型;和(6) 基质以外其它材料的使用,例如其它骨合成代谢因子、分解代谢因子和抗分解代谢因子。

[0110] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含至少一种磷酸钙。在其它实施方案中,生物相容性基质包含多种磷酸钙。在一些实施方案中,适于用作生物相容性基质材料的磷酸钙的钙原子与磷原子比例为 0.5-2.0。在一些实施方案中,生物相容性基质包含同种异体移植。在一些实施方案中,生物相容性基质用于治疗未涉及骨的肌腱或韧带损伤,且基质不含磷酸钙或同种异体移植。

[0111] 适于用作骨支架材料的磷酸钙包括但不限于非晶形磷酸钙、磷酸一钙一水合物 (MCPM)、无水磷酸一钙 (MCPA)、磷酸二钙二水合物 (DCPD)、无水磷酸二钙 (DCPA)、磷酸八钙 (OCP)、 α -磷酸三钙、 β -TCP、羟磷灰石 (OHAp)、结晶程度差的羟磷灰石、磷酸四钙 (TTCP)、十磷酸七钙 (heptacalcium decaphosphate)、偏磷酸钙、脱水焦磷酸钙、碳酸化磷酸钙和焦磷酸钙。

[0112] 支架材料和生物相容性粘合剂

[0113] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含支架基质和生物相容性粘合剂。生物相容性粘合剂可包含可操作的促进混合物质之间的粘连的材料。例如,生物相容性粘合剂可在生物相容性基质的形成中促进骨支架材料微粒之间的粘连。在某些实施方案中,相同材料可同时用作支架材料和粘合剂,只要这类材料起提高混合物质之间的粘连的作用,并且为新组织生长(包括肌腱、韧带和骨生长)提供构架结构。参见 W02008/005427 和美国申请顺序号 11/772,646(美国专利公布号 2008/00274470)。

[0114] 在一些实施方案中,生物相容性粘合剂可包括例如胶原、弹性蛋白、多糖、核酸、碳水化合物、蛋白质、多肽、聚(α -羟基酸)、聚内酯、聚氨基酸、聚酐、聚氨酯、聚原酸酯、聚(酐-酰亚胺共聚物)、聚原碳酸酯、聚(α -羟基链烷酸酯)、聚二氧杂环己酮、聚磷酸酯、聚乳酸、聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLLA)、聚乙交酯(PGA)、聚(丙交酯-乙交酯共聚物)(PLGA)、聚(L-丙交酯-D,L-丙交酯共聚物)、聚(D,L-丙交酯-1,3-亚丙基碳酸酯共聚物)、聚乙醇酸、聚羟基丁酸酯(PHB)、聚(ϵ -己内酯)、聚(δ -戊内酯)、聚(γ -丁内酯)、聚(己内酯)、聚丙烯酸、聚羧酸、聚(烯丙胺盐酸盐)、聚(二烯丙基二甲基氟化铵)、聚(亚乙基亚胺)、聚富马酸丙二醇酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、碳纤维、聚(乙二醇)、聚环氧乙烷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚(乙基噁唑啉)、聚环氧乙烷-聚环氧丙烷嵌段共聚物、聚对苯二甲酸乙二醇酯聚酰胺和/或其共聚物和/或混合物。

[0115] 在其它实施方案中,生物相容性粘合剂可包含海藻酸、阿拉伯胶、瓜尔胶、黄原胶、明胶、壳多糖、脱乙酰壳多糖、脱乙酰壳多糖乙酸盐、脱乙酰壳多糖乳酸盐、硫酸软骨素、N, O-羧甲基脱乙酰壳多糖、葡聚糖(例如 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精或硫酸葡聚糖钠)、纤维蛋白胶、卵磷脂、磷脂酰胆碱衍生物、甘油、透明质酸、透明质酸钠、纤维素(例如甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羟乙基纤维素)、氨基葡萄糖、蛋白聚糖、淀粉(例如羟乙基淀粉或可溶性淀粉)、乳酸、普朗尼克酸(pluronic acids)、甘油磷酸钠、糖原、角蛋白、蚕丝和/或其衍生物和/或混合物。

[0116] 在一些实施方案中,生物相容性粘合剂是水溶性的。水溶性粘合剂在其植入后不久便可从生物相容性基质中溶解,从而将大孔隙引入生物相容性基质。大孔隙可通过增加入口而提高植入材料的骨导入细胞性,并因此提高细胞(例如破骨细胞和成骨细胞、肌腱细胞)在植入物部位的重建活性。

[0117] 在一些实施方案中,生物相容性粘合剂在生物相容性基质中存在的量可以占基质的约 5%重量-约 50%重量。在其它实施方案中,生物相容性粘合剂可存在的量占生物相容性基质的约 10%重量-约 40%重量。在另一个实施方案中,生物相容性粘合剂可存在的量占生物相容性基质的约 15%重量-约 35%重量。在进一步的实施方案中,生物相容性粘合剂可存在的量占生物相容性基质的约 20%重量。

[0118] 血小板衍生生长因子

[0119] 本发明提供治疗个体的肌腱或韧带损伤的组合物和方法。总的说来,所述治疗方法包括将包含生物相容性基质和 PDGF 的组合物给予患有肌腱或韧带损伤的个体。准确地讲,所述治疗方法包括将包含胶原基质和 PDGF 的组合物给予肌腱或韧带损伤的部位。

[0120] 按照本发明的实施方案,生物相容性基质包含支架基质和 PDGF。PDGF 是由损伤部位的血小板释放的生长因子。PDGF 与 VEGF 协同作用以促进新血管形成并刺激趋化性和间充质衍生细胞(包括肌腱细胞、成骨细胞、软骨细胞和血管平滑肌细胞)的增殖。

[0121] 本发明提供的组合物和方法包括生物相容性基质和 PDGF 溶液剂,其中该溶液剂分散于生物相容性基质中。在一些实施方案中,PDGF 在溶液剂中存在的浓度为约 0.01mg/ml-约 10.0mg/ml、约 0.05mg/ml-约 5.0mg/ml、约 0.1mg/ml-约 1.0mg/ml 或约 0.1mg/ml-约 2.0mg/ml、约 0.1mg/ml-约 0.4mg/ml、约 0.9mg/ml-约 1.5mg/ml。在一些实施方案中,PDGF 在溶液剂中存在的浓度为 0.15mg/ml。在一些实施方案中,PDGF 在溶液剂中存在的浓度为 0.3mg/ml。在一些实施方案中,PDGF 在溶液剂中存在的浓度为 1.0mg/ml。在其它实施方案中,PDGF 以下列任一种浓度存在于溶液剂中:约 0.05mg/ml、约 0.1mg/ml、约 0.15mg/ml、约 0.2mg/ml、约 0.25mg/ml、约 0.3mg/ml、约 0.35mg/ml、约 0.4mg/ml、约 0.45mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.55mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.65mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.75mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.85mg/ml、约 0.9mg/ml、约 0.95mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.5mg/ml 或约 2.0mg/ml。要理解的是,这些浓度只是具体实施方案的实例,PDGF 浓度可以是上述浓度范围内的任何浓度。

[0122] 不同量的 PDGF 均可用于本发明的组合物。可以使用的 PDGF 的量包括但不限于下列范围中的量:约 1 μ g-约 50mg、约 10 μ g-约 25mg、约 100 μ g-约 10mg 和约 250 μ g-约 5mg。

[0123] 可采用美国专利号 6,221,625、5,747,273 和 5,290,708 中所述的酶联免疫测定法,或者通过本领域已知的测定 PDGF 浓度的任何其它测定法来测定本发明的实施方案中 PDGF(或其它生长因子)的浓度。至于本文使用的 PDGF 摩尔浓度,根据 PDGF 二聚体的分子量(例如 PDGF-BB, MW 约 25kDa)确定 PDGF 摩尔浓度。

[0124] 在本发明的一些实施方案中,PDGF 包含 PDGF 同二聚体和异二聚体,包括 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、PDGF-DD 及其混合物和衍生物。在一些实施方案中,PDGF 包含 PDGF-BB。在其它实施方案中,PDGF 包含重组人 PDGF,例如 rhPDGF-BB。

[0125] 在一些实施方案中,PDGF 可从天然来源获得。在其它实施方案中,PDGF 可通过重组 DNA 技术产生。在一些实施方案中,PDGF 或其片段可采用本领域技术人员已知的肽合成技术(例如固相肽合成)产生。

[0126] 当从天然来源获得时,PDGF 可来源于生物体液。按照一些实施方案,生物体液可包含与活体有关的任何处理或未处理的液体(包括血液)。生物体液还可包含血液成分,其中包括血小板浓缩液、单采血液成分提取的血小板、富集血小板的血浆、血浆、血清、新鲜冷冻的血浆和血沉棕黄层。生物体液可包含从血浆分离并重新悬浮于生理液体的血小板。

[0127] 当通过重组 DNA 技术产生时,可将编码单一单体(例如 PDGF B 链或 A 链)的 DNA 序列插入培养的用于表达的原核细胞或真核细胞中,以便随后产生同二聚体(例如 PDGF-BB 或 PDGF-AA)。在一些实施方案中,可使用通过重组技术产生的同二聚体 PDGF。在其它实施方案中,PDGF 异二聚体可如下产生:将编码异二聚体的两个单体单元的 DNA 序列

插入培养的原核细胞或真核细胞中,使翻译的单体单元通过细胞加工产生异二聚体(例如 PDGF-AB)。可从不同来源获得市售的重组人 PDGF-BB。

[0128] 在本发明的一些实施方案中,PDGF 包含 PDGF 片段。在一个实施方案中,rhPDGF-B 包含以下片段:完整 B 链的氨基酸序列 1-31、1-32、33-108、33-109 和 / 或 1-108。美国专利号 5,516,896 的图 15 中提供 PDGF B 链的完整氨基酸序列(aa 1-109)。要理解的是,本发明的 rhPDGF 组合物可包含完整 rhPDGF-B(aa 1-109) 及其片段的组合。可以使用 PDGF 的其它片段,例如美国专利号 5,516,896 中公开的片段。按照本发明的一些实施方案,rhPDGF-BB 包含完整 rhPDGF-B(aa1-109) 的至少 65%。按照其它实施方案,rhPDGF-BB 包含完整 rhPDGF-B(aa 1-109) 的至少 75%、80%、85%、90%、95% 或 99%。

[0129] 在本发明的一些实施方案中,PDGF 可以是高度纯化的形式。在加入本发明的溶液之前,本文使用的纯化 PDGF 包含大于约 95% (重量) 的 PDGF 的组合物。所述溶液可采用任何药学上可接受的缓冲剂或稀释剂制备。在其它实施方案中,PDGF 可以是基本纯的。在加入本发明的溶液之前,本文使用的基本纯的 PDGF 包含组成成分为约 5% - 约 95% (重量) 的 PDGF。在一个实施方案中,在加入本发明的溶液之前,基本纯的 PDGF 包含组成成分为约 65% - 约 95% (重量) 的 PDGF。在其它实施方案中,在加入本发明的溶液之前,基本纯的 PDGF 包含组成成分为约 70% - 约 95%、约 75% - 约 95%、约 80% - 约 95%、约 85% - 约 95% 或约 90% - 约 95% (重量) 的 PDGF。可将纯的 PDGF 和基本纯的 PDGF 掺入支架基质中。

[0130] 在进一步的实施方案中,PDGF 可以是部分纯的。在富集血小板的血浆、新鲜冷冻的血浆或需要收集和分离以产生 PDGF 的任何其它血液产品的情况下,本文使用的部分纯的 PDGF 包含具有 PDGF 的组成成分。本发明的实施方案设想,本文提供的任何 PDGF 同种型(包括同二聚体和异二聚体)可以是纯的或部分纯的。本发明的包含 PDGF 混合物的组合物可以部分纯的比例包含 PDGF 同种型或 PDGF 片段。在一些实施方案中,可按照美国申请顺序号 11/159,533 (美国专利公布号 20060084602) 中披露的方法制备部分纯的和纯的 PDGF。

[0131] 在一些实施方案中,将 PDGF 溶于一种或多种缓冲液中形成包含 PDGF 的溶液剂。适用于本发明的 PDGF 溶液剂的缓冲液可包括但不限于碳酸盐、磷酸盐(例如磷酸缓冲盐溶液)、组氨酸、乙酸盐(例如乙酸钠)、酸性缓冲液(例如乙酸和 HCl) 以及有机缓冲液例如赖氨酸、Tris 缓冲液(例如三(羟甲基)氨基乙烷)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES) 和 3-(N-吗啉代)丙烷磺酸(MOPS)。可根据与 PDGF 的生物相容性及缓冲液阻止不良蛋白质修饰的能力来选择缓冲液。另外,可根据与宿主组织的相容性来选择缓冲液。在一个实施方案中,采用乙酸钠缓冲液。可于以下不同的摩尔浓度或者这些范围内的任何摩尔浓度使用缓冲液:例如约 0.1mM-约 100mM、约 1mM-约 50mM、约 5mM-约 40mM、约 10mM-约 30mM 或约 15mM-约 25mM。在一些实施方案中,以约 20mM 的摩尔浓度使用乙酸盐缓冲液。

[0132] 在另一个实施方案中,包含 PDGF 的溶液剂可通过将冻干的 PDGF 溶于水中制备,其中在溶解前,将 PDGF 从合适的缓冲液中冻干。

[0133] 按照本发明的实施方案,包含 PDGF 的溶液剂的 pH 范围可为约 3.0-约 8.0。在一个实施方案中,包含 PDGF 的溶液剂的 pH 为约 5.0-约 8.0、更优选约 5.5-约 7.0、最优选约 5.5-约 6.5 或这些范围内的任何值。在一些实施方案中,包含 PDGF 的溶液剂的 pH 可与 PDGF 或任何其它所需要的生物活性剂的持久稳定性和功效相容。PDGF 一般在酸性环境中

更稳定。因此,按照本发明的一些实施方案,本发明包含 PDGF 溶液剂的酸性贮存制剂。按照本发明的一些实施方案,PDGF 溶液剂的 pH 优选为约 3.0-约 7.0,更优选约 4.0-约 6.5。然而,PDGF 的生物活性在中性 pH 范围的溶液中最佳。因此,在其它实施方案中,本发明包含 PDGF 溶液剂的中性 pH 制剂。按照该实施方案,PDGF 溶液剂的 pH 优选为约 5.0-约 8.0,更优选约 5.5-约 7.0,最优选约 5.5-约 6.5。

[0134] 在一些实施方案中,可以改变含 PDGF 的溶液剂的 pH 使 PDGF 与基质底物的结合动力学最优。如有需要,结合的 PDGF 可能会变得不稳定,因为该材料的 pH 会使相邻材料达到平衡。在一些实施方案中,包含 PDGF 的溶液剂的 pH 可由本文所述的缓冲液控制。各种蛋白质显示不同的 pH 范围,在此范围内蛋白质是稳定的。蛋白质稳定性主要受等电点和蛋白质的电荷影响。pH 范围可影响蛋白质的构象结构以及蛋白质对蛋白酶降解、水解、氧化和可引起蛋白质结构和 / 或生物活性改变的其它过程的敏感性。

[0135] 在一些实施方案中,包含 PDGF 的溶液剂还可包括其它成分,例如其它生物活性剂。在其它实施方案中,包含 PDGF 的溶液剂还可包含细胞培养基;其它稳定性蛋白质,例如白蛋白、抗细菌剂、蛋白酶抑制剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-二(β-氨基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、抑蛋白酶肽、ε-氨基己酸(EACA)等)和 / 或其它生长因子,例如成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)、角质形成细胞生长因子(KGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、骨形态发生蛋白(BMP)或其它 PDGF,包括 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC 和 / 或 PDGF-DD 的组合物。

[0136] 进一步包含生物活性剂的组合物

[0137] 按照一些实施方案,除 PDGF 以外,本发明的组合物和方法还可包括一种或多种生物活性剂。除 PDGF 以外,可以掺入本发明的组合物中的生物活性剂可包含有机分子、无机材料、蛋白质、肽、核酸(例如基因、基因片段、小干扰核糖核酸(siRNA)、基因调节序列、核转录因子和反义分子)、核蛋白、多糖(例如肝素)、糖蛋白和脂蛋白。可掺入本发明的组合物中的生物活性化合物的非限制性实例包括例如抗癌药、抗生素、镇痛药、抗炎药、免疫抑制药、酶抑制剂、抗组胺药、激素类、肌肉松弛药、前列腺素类、营养因子、骨诱导蛋白、生长因子和疫苗,可参见美国申请顺序号 11/159,533(美国专利公布号 20060084602)。在一些实施方案中,可掺入本发明的组合物中的生物活性化合物包括骨诱导因子,例如胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子或其它 PDGF。按照其它实施方案,可掺入本发明的组合物中的生物活性化合物优选包括骨诱导因子和骨刺激因子,例如骨形态发生蛋白(BMP)、BMP 模拟物、降钙素、降钙素模拟物、他汀类、他汀衍生物、成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、生长分化因子和 / 或甲状旁腺激素。在一些实施方案中,用于掺入本发明的组合物的其它因子包括蛋白酶抑制剂,以及减少骨吸收的骨质疏松治疗药,包括二膦酸盐类和抗 NF-κB(RANK) 配体的抗体。

[0138] 递送其它生物活性剂的标准方案是本领域已知的。以允许将活性剂的合适剂量递送至受损肌腱和 / 或肌腱附着部位的量,将其它生物活性剂引入本发明的组合物中。在大多数情况下,应用从业人员已知的和适于所述具体药物的准则来确定剂量。本发明的组合物包括其它生物活性剂的量可取决于以下这类变量:病况的类型和程度、具体患者的整体健康状况、生物活性剂的制剂、生物相容性基质的释放动力学特性和生物吸收性。可应用标准临床试验使任何特定的其它生物活性剂的剂量和给药频率最优化。

[0139] 按照一些实施方案,将肌腱或韧带与骨附着或附着在骨上的组合物还包含一种或多种骨移植材料,包括例如自体骨髓、自体血小板提取物、同种异体移植物、合成的骨基质材料、异种移植物及其衍生物。治疗的肌腱、韧带和骨

[0140] 可通过本发明方法治疗的肌腱包括任何肌腱。肌腱的非限制性实例包括髌腱、胫骨前肌腱、跟腱、腓绳肌腱、半腱肌腱、股薄肌腱、外展肌腱、内收肌腱、冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱(肌腱套复合体)、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。在一些实施方案中,肌腱选自髌腱、胫骨前肌腱、跟腱、腓绳肌腱、半腱肌腱、股薄肌腱、外展肌腱和内收肌腱。在一些实施方案中,肌腱选自冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱(肌腱套复合体)、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。在一些实施方案中,肌腱不选自冈上肌腱、冈下肌腱、肩胛下肌腱、小圆肌腱(肌腱套复合体)、屈肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱和股四头肌腱。

[0141] 可通过本发明方法治疗的韧带包括任何韧带。韧带的非限制性实例包括前十字韧带、外侧副韧带、后十字韧带、内侧副韧带、颅侧十字韧带、尾侧十字韧带、环甲韧带、牙周韧带、晶状体悬韧带、髌髁前韧带、髌髁后韧带、髌结节韧带、髌棘韧带、耻骨弓状韧带、耻骨上韧带、悬韧带(例如阴茎或乳房悬韧带)、桡腕掌侧韧带、桡腕背侧韧带、尺侧副韧带或桡侧副韧带。

[0142] 可通过本发明的组合物和方法治疗的骨包括是肌腱或韧带的附着部位的任何骨,包括但不限于胫骨、股骨和肱骨。

[0143] 用于治疗未涉及骨的肌腱或韧带损伤的方法

[0144] 本发明提供用于治疗肌腱或韧带损伤的组合物和方法。用于治疗的方法可包括未涉及骨的受损肌腱或韧带的治疗,例如肌腱/韧带断裂、肌腱/韧带破裂、肌腱/韧带出现撕裂、层离或任何其它劳损或变形。

[0145] 在一些实施方案中,用于治疗肌腱或韧带损伤的方法包括将本发明的组合物给予受损肌腱或韧带。在一些实施方案中,受损肌腱或韧带可通过物理方法稳固来进行治疗。例如,可通过改进的Mason Allen缝合设计或任何其它合适的缝合法对受损肌腱或韧带进行缝合。在一些实施方案中,这类稳固方法可能是优选的,因为肌腱或韧带的受损端可能不允许直接的外科手术修复或末端重接。因此,稳固缝合可远端定位在一个或多个受损末端上。

[0146] 由于这种稳固缝合,受损肌腱或韧带得以定位,使得肌腱或韧带的受损末端基本上重新接近。在一些实施方案中,在重新接近的末端之间可保留适当大小的间隙,从而允许将流动性组合物引入间隙体积中,由此桥接或填充间隙。在一些实施方案中,所给予的组合物在间隙中可能是基本固定的。在一些实施方案中,包裹物(wrap)或其它合适的装置可有助于或提供这种基本固定性,使组合物包绕或粘合重新接近的末端,从而将损伤和组合物封闭其中。

[0147] 本发明的组合物可以是流动性的。在这种方式下,流动性组合物可更精确地递送至受损肌腱或韧带部位。可使用注射器或其它合适的装置给予本发明的组合物。注射器还可包括针或可供更精确地递送组合物的其它合适套管。可根据所需要的待递送的组合物体积或组合物的流动性特性,配置注射器和/或套管的构造,例如其孔隙、大小、长度等。本发明的组合物的另一个有利特性是组合物一旦递送,便可在其递送部位基本上保持不动。在一些实施方案中,流动性组合物通过21G、25G或27G针递送。在一些实施方案中,用注射器

和 / 或针递送允许流动性组合物经皮注射递送。在一些实施方案中,流动性组合物可用非套管装置(例如匙、铲、刷等装置)递送,这可将组合物递送至所需位置。

[0148] 在本发明的一个实施方案中,组合物的又一个有利特性是其流动性特征可供组合物进入和填充通常可能难以进入的损伤区域。例如,破裂肌腱或韧带可能在受损末端明显破损,从而使直接手术修复变得困难。因此,这类受损末端可能含有许多小的相对达不到的区域,例如裂缝和其它间质区域。可以给予本发明的流动性组合物,使得它可流入这类区域从而大致填满,因此允许并促进更有效的修复和损伤处的血管重建。

[0149] 在本发明的一些实施方案中,所述方法可采用关节镜检查技术、内窥镜检查技术、腹腔镜检查技术或任何其它合适的微创技术进行。

[0150] 在一些实施方案中,用于治疗个体的未涉及骨的肌腱或韧带损伤的方法包括将有效量的包含生物相容性基质和 PDGF 的组合物给予到个体的损伤受累部位,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,用于治疗个体的未涉及骨的肌腱或韧带损伤的方法包括给予个体有效量的包含生物相容性基质和 PDGF 的组合物,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50% 的 PDGF 在约 24 小时内释放,其中 PDGF 以包含 PDGF 的溶液剂存在,其中溶液剂中的 PDGF 浓度为约 0.1mg/ml-约 2.0mg/ml。在一些实施方案中,溶液剂中的 PDGF 浓度约为 1.0mg/ml。在一些实施方案中,生物相容性基质包含交联胶原和糖胺聚糖基质。在一些实施方案中,至少约 60% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,至少约 70% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,至少约 80% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率至少约为 85%。在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率至少约为 90%。在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率至少约为 92%。在一些实施方案中,组合物是流动性的。在一些实施方案中,生物相容性基质是 Integra Flowable Wound Matrix。在一些实施方案中,治疗是肌腱的治疗。在一些实施方案中,治疗是韧带的治疗。

[0151] 本发明还提供治疗跟腱损伤的方法。在一个实施方案中,治疗跟腱损伤的方法包括提供生物相容性基质和 PDGF,其中生物相容性基质是流动性的。

[0152] 本发明还提供治疗任何其它合适的肌腱损伤的组合物和方法,所述肌腱损伤包括但不限于肩胛下肌腱、冈上肌腱、冈下肌腱、小圆肌腱、股直肌腱、胫骨后肌腱、股四头肌腱、肱二头肌腱,以及跟腱、髌腱、外展肌腱和内收肌腱,或者髋部的其它肌腱、伸肌总腱、屈肌总腱、指浅屈肌腱、指伸肌腱和小指伸肌腱,或臂和手的其它肌腱。

[0153] 本发明还提供治疗任何其它合适的韧带损伤的组合物和方法,韧带损伤包括但不限于前十字韧带、外侧副韧带、后十字韧带、内侧副韧带、颅侧十字韧带、尾侧十字韧带、环甲韧带、牙周韧带、晶状体悬韧带、髌髁前韧带、髌髁后韧带、髌结节韧带、髌棘韧带、耻骨弓状韧带、耻骨上韧带、悬韧带(例如阴茎或乳房)、桡腕掌侧韧带、桡腕背侧韧带、尺侧副韧带或桡侧副韧带。

[0154] 肌腱与骨或韧带与骨附着的方法

[0155] 本发明提供将肌腱或韧带与骨附着或再附着或者在骨上附着或再附着以及加固肌腱或韧带与骨附着的方法。附着方法可包括在肌腱和骨之间以及韧带和骨之间的界面上使肌腱或韧带与骨整合或再整合。在一些实施方案中,用于将肌腱或韧带与骨附着或附着

在骨上的方法包括提供包含分布在生物相容性基质中的 PDGF 溶液剂的组合物以及将组合物涂覆于肌腱 / 韧带和骨之间的界面上。

[0156] 在一些实施方案中,附着的方法包括提供包含分布在生物相容性基质中的 PDGF 溶液剂的组合物,包覆脱离的肌腱,将组合物和肌腱插入骨通道中,并用缝线将肌腱与骨附着。

[0157] 在一些实施方案中,附着的方法包括提供包含分布在生物相容性基质中的 PDGF 溶液剂的组合物,包覆分离的韧带,将组合物和韧带插入骨通道中,并用缝线将韧带与骨附着。

[0158] 在一些实施方案中,附着的方法包括提供包含生物相容性基质的组合物,包覆脱离的肌腱,将组合物和肌腱插入骨中,将 PDGF 溶液剂注射到骨通道中,并用缝线将肌腱与骨附着。

[0159] 在一些实施方案中,附着的方法包括提供包含生物相容性基质的组合物,包覆分离的韧带,将组合物和韧带插入骨中,将 PDGF 溶液剂注射到骨通道中,并用缝线将韧带与骨附着。

[0160] 在一些实施方案中,可将 PDGF 溶液剂注射到用胶原基质包覆的肌腱的植入物部位附近的骨通道中。在一些实施方案中,可将 PDGF 溶液剂注射入骨通道的内侧。在一些实施方案中,可将 PDGF 溶液剂注射入骨通道的外侧。在一些实施方案中,PDGF 溶液剂注射可在骨通道周边的一个点上进行。在其它实施方案中,PDGF 溶液剂注射可在骨通道周边多个点上进行。例如,可以在通道口的 1/4、1/2、3/4 和 4/4 周缘处进行注射。

[0161] 在一些实施方案中,PDGF 溶液剂的浓度为约 0.1mg/ml- 约 2.0mg/ml。在一些实施方案中,PDGF 溶液剂的浓度为约 0.1mg/ml- 约 0.5mg/ml。在一些实施方案中,PDGF 溶液剂的浓度为约 0.15mg/ml。在其它实施方案中,PDGF 溶液剂的浓度为约 0.3mg/ml。

[0162] 本发明还提供用于将个体的肌腱附着在骨上以进行前十字韧带重建的方法,所述方法包括将有效量的包含生物相容性基质和 PDGF 的组合物给予到所述个体的肌腱与骨之间的界面上。在一些实施方案中,用于前十字韧带重建的方法包括提供包含分布在生物相容性基质中的 PDGF 溶液剂的组合物,包覆从外侧股骨插入附着部脱离的长屈肌腱,将组合物和肌腱插入经由胫骨干骺端的倾斜通道中,并用缝线将长屈肌腱附着在胫骨的内侧皮质上。

[0163] 在一些实施方案中,用于前十字韧带重建的方法包括提供包含生物相容性基质的组合物,包覆从外侧股骨插入附着部脱离的长屈肌腱,将组合物和肌腱插入由胫骨干骺端的倾斜通道中,将 PDGF 溶液剂注射入骨通道,并用缝线将长屈肌腱附着在胫骨的内侧皮质上。

[0164] 在一些实施方案中,本发明还提供在肌腱套损伤中将肌腱与骨附着或再附着的方法。W02008/005427 和美国申请顺序号 11/772,646 (美国专利公布号 2008/0027470) 论述了肌腱套损伤和肌腱套损伤修复治疗方法:开放性修复方法、小切口修复方法和全关节镜下修复方法。这些参考文献通过引用其整体结合到本文中。在一些实施方案中,治疗肌腱套损伤的方法包括提供包含分布在生物相容性基质中的 PDGF 溶液剂的组合物,以及将组合物涂覆于肌腱与肱头再附着的至少一个部位上。在一些实施方案中,将组合物涂覆于肌腱再附着的至少一个部位可包括将组合物浇铸在肱头再附着部位的轮廓上。例如,可将组

合物在肱头表面浇铸形成通道以容纳脱离的肌腱。可将组合物涂覆到肌腱插入骨的插入附着部位附近以进一步加固附着。

[0165] 在一些实施方案中,治疗肌腱套撕裂的方法还包括放置至少一种锚定工具,例如肱头中的骨锚钉,其中骨锚钉还包含 PDGF 组合物,且将至少一个脱离的肌腱与骨锚钉连接。在本发明的实施方案中,可通过缝线将肌腱固定在骨锚钉上。

[0166] 在本发明的一些实施方案中,所述方法可采用关节镜检查技术、内窥镜检查技术、腹腔镜检查技术或任何其它合适的微创技术进行。

[0167] 按照本发明方法的实施方案,适用于组合物的 PDGF 溶液剂和生物相容性基质与上文中提供的 PDGF 溶液剂和生物相容性基质一致。

[0168] 在一些实施方案中,将个体的肌腱或韧带与骨附着或附着在骨上的方法包括将有效量的包含生物相容性基质和 PDGF 的组合物给予个体的受累部位,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,PDGF 以包含 PDGF 的溶液剂存在,其中溶液剂中的 PDGF 浓度为约 0.1mg/ml–约 2.0mg/ml。在一些实施方案中,溶液剂中的 PDGF 浓度为约 0.1–约 0.4mg/ml。在一些实施方案中,溶液剂中的 PDGF 浓度为约 0.15mg/ml。在一些实施方案中,溶液剂中的 PDGF 浓度为约 0.3mg/ml。在一些实施方案中,生物相容性基质包含交联胶原基质。在一些实施方案中,生物相容性基质包含交联胶原和糖胺聚糖基质。在一些实施方案中,至少约 60% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,至少约 70% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,至少约 80% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率至少约为 85%。在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率至少约为 90%。在一些实施方案中,生物相容性基质的孔隙率至少约为 92%。在一些实施方案中,生物相容性基质是 COLLATAPE®。在一些实施方案中,治疗是肌腱与骨附着的治疗。在一些实施方案中,治疗是韧带与骨附着的治疗。

[0169] 缝线

[0170] 用于本发明方法的缝线或本文药盒中包括的缝线可包含 PDGF。通过包含 PDGF 的溶液,可将 PDGF 浸泡入缝线中或包覆在缝线上。在一些实施方案中,在溶液剂中 PDGF 以约 5.0–约 20.0mg/ml 的任何浓度存在,例如约 7.5–约 15mg/ml,例如约 10mg/ml。

[0171] 用于本发明方法的缝线或本文药盒中包括的缝线在体内可以是可吸收的或不可吸收的。吸收过程包括通过体液、酶或细胞的作用降解和清除起始物质。宿主可在新组织的形成中利用吸收的缝线,或者个体可通过其它方式再利用吸收的缝线,或者缝线可被排泄。缝线可由合成纤维或天然纤维或者两者的组合制备。

[0172] 本发明的药盒

[0173] 另一方面,本发明提供包括装有 PDGF 溶液剂的第一容器和装有生物相容性基质的第二容器的药盒。

[0174] 在一些实施方案中,提供治疗个体的未涉及骨的肌腱或韧带损伤的药盒,其包括给予的装有生物相容性基质的第一容器内容物和装有 PDGF 溶液剂的第二容器内容物,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50% 的 PDGF 在约 24 小时内释放。

[0175] 在其它实施方案中,提供用于将个体的肌腱或韧带与骨附着的药盒,其包括给予

的装有生物相容性基质的第一容器内容物和装有血小板衍生生长因子 (PDGF) 溶液剂的第二容器内容物,其中生物相容性基质包含孔隙,其中生物相容性基质的孔隙率至少约为 80%,且其中至少约 50%的 PDGF 在约 24 小时内释放。

[0176] 在一些实施方案中,生物相容性基质是脱水的。在一些实施方案中,溶液剂包含预定浓度的 PDGF。在一些实施方案中,PDGF 浓度可以根据待治疗的肌腱或韧带损伤预先确定。在一些实施方案中,生物相容性基质包含根据待治疗的肌腱或韧带损伤预先确定的量。在一些实施方案中,生物相容性基质包含根据待治疗的肌腱 / 韧带和骨的性质预先确定的量。

[0177] 在一些实施方案中,生物相容性基质包含交联胶原。在一些实施方案中,生物相容性基质包含可溶性胶原。在一些实施方案中,生物相容性基质包含交联胶原和糖胺聚糖。在一些实施方案中,生物相容性基质包含交联胶原和硫酸软骨素。

[0178] 在一些实施方案中,本发明提供包括装有 PDGF 溶液剂的第一容器和装有生物相容性基质的第二容器以及注射器的药盒。在一些实施方案中,注射器可利于 PDGF 溶液剂分散在生物相容性基质中以用于手术部位,例如肌腱或韧带与骨附着的部位。药盒还可包括使用说明书。

[0179] 下面提供的实施例仅用于说明目的,并无意以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0180] 实施例 1 :各种胶原基质的结构表征

[0181] 研究了 4 种胶原基质以测定精细结构和孔隙率的差异。胶原基质获自 Kensey Nash Corporation。基质由从牛皮中提纯的胶原提取物制备,牛皮是主要为 I 型胶原的来源。基质由不同胶原浓度 (4.5%、5%、6% 和 7% (w/v)) 的胶原浆制备。在用液氮吹扫后,将干胶原基质 (4.5%、5%、6% 和 7%) 凿成 5mm 圆片。按三个不同的方向 (顶部向上、底部向上和侧面向上) 将圆片安装在柱式样本台上,用金 - 钼涂覆,并用扫描电镜 (SEM) 检查。

[0182] SEM 图像显示,胶原基质 (4.5%) 和胶原基质 (5%) 的表面上有开孔。SEM 图像显示在胶原基质 (6%) 和胶原基质 (7%) 的表面上具有较小孔隙的致密层。虽然根据纵向剖面切片的 SEM 图像,各胶原基质似乎都是多孔的,但是用 SEM 评价的胶原基质 (5%) 似乎具有最大的总孔隙率。胶原基质中的孔隙似乎不是均一分布的,在一些区域根本没有孔隙。

[0183] 应用测定孔面积大小和周长大小的 ImageJ 软件对 SEM 图像进行了分析。ImageJ 是由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 的 Wayne Rasband 开发的图像分析程序 (world wide web :rsb.info.nih.gov/ij)。为了应用该图像分析程序,需要选择和设置合适的参数。从“analyze”菜单,将各 SEM 图像的比例尺输入程序以设置“scale”参数。接下来,选择“area”和“perimeter”的测定参数。随机选出各个图像的 10 个孔隙,测量尺寸,对面积大小和周长大小两者取平均值。记录各个图像的结果。表 1 表示一次分析的结果。

[0184] 表 1

[0185]

	面积(μm^2)		
	A 侧	横切面	B 侧
胶原(4.5%)	6813 $\pm$ 2854	8005 $\pm$ 2135	10505 $\pm$ 4689
胶原(5%)	11286 $\pm$ 4149	10591 $\pm$ 4016	11555 $\pm$ 6667
胶原(6%)	6206 $\pm$ 2159	13643 $\pm$ 6642	4779 $\pm$ 1706
胶原(7%)	4369 $\pm$ 3183	7993 $\pm$ 3113	2342 $\pm$ 998
	周长(μm)		
	A 侧	横切面	B 侧
胶原(4.5%)	308 $\pm$ 65	338 $\pm$ 38	393 $\pm$ 94
胶原(5%)	445 $\pm$ 99	417 $\pm$ 109	406 $\pm$ 110

[0186]

胶原(6%)	255 $\pm$ 48	428 $\pm$ 111	258 $\pm$ 50
胶原(7%)	445 $\pm$ 77	344 $\pm$ 70	180 $\pm$ 36

[0187] 按照 ImageJ 软件的分析,从 A 侧和 B 侧视图来看,胶原基质(5%)似乎具有最多孔的结构,且孔面积也最大。

[0188] 实施例 2:各种胶原基质的 PDGF 累积释放分析

[0189] 对不同胶原基质的 PDGF 累积释放进行了分析。胶原基质获自 Kensey Nash Corporation,与实施例 1 中所述一样。将各类型(5%、6%和 7%)的胶原基质(8mm 圆片)穿在 27½G 针上,用 80 μl 0.3mg/ml rhPDGF-BB 进行水合,并将样品于室温温育 10 分钟。然后将胶原圆片放入 2ml 微管中,加入 2ml 洗脱缓冲液(含有 2%胎牛血清的 MEM)以释放 rhPDGF-BB。每一测量使用一式三份样品。对照样品包括将 80 μl rhPDGF-BB 加入 2ml 洗脱缓冲液中。将微管在轨道式振荡器上于 37℃培养箱振荡培养。在 10 分钟、1 小时、8 小时和 24 小时后,从各管中取出洗出液,于 2-8℃保存。将等体积的新鲜洗脱缓冲液加入各管中。按照生产商的说明书,采用 DuoSet ELISA(R&D System)试剂盒,测定了各胶原基质的保存洗出液中的 rhPDGF-BB。

[0190] 胶原基质(5%)释放 rhPDGF-BB 的动力学特性与胶原基质(6%)和胶原基质(7%)的类似(图 1)。释放动力学的特征是在头 10 分钟内的最初快速大量地释放 rhPDGF-BB,接着在余下 23 个小时的研究时间内较慢稳定地释放。虽然释放动力学特性相似,但是从胶原基质(5%)释放的 PDGF 的最初量和总量大于从胶原基质(6%)或胶原基质(7%)释放的 PDGF 的最初量和总量。

[0191] 将胶原基质的 rhPDGF-BB 释放百分比与对照(单独的洗脱缓冲液中的 rhPDGF-BB)进行了比较。上述结果表明,与胶原基质(6%)或胶原基质(7%)相比,胶原基质(5%)的 PDGF 释放更快更多(图 2)。本项研究的结果另参见表 2。

[0192] 表 2

[0193]

	相对于对照释放的 PDGF 百分比			
	10 分钟	1 小时	8 小时	24 小时
胶原(5%)	53.5 ± 4.3	66.5 ± 4.3	70.2 ± 1.6	71.5 ± 1.5
胶原(6%)	34.1 ± 1.1	44.1 ± 0.9	48.0 ± 1.4	50.0 ± 1.3
胶原(7%)	30.3 ± 4.6	39.2 ± 5.1	42.4 ± 4.9	43.5 ± 4.8

[0194] 实施例 3 :各种胶原基质的 PDGF 释放的生物效能研究

[0195] 在细胞增殖测定法中,对不同胶原基质释放的 PDGF 的生物效能进行了评价。按照上文实施例 2 所述方案的改动方案制备样品。将洗脱缓冲液改为含有 2% 胎牛血清的 D-MEM。采用在 1 小时时间点采集的各个材料的一式两份样品。通过 DuoSet ELISA 测定法测定了 rhPDGF-BB 的浓度,结果用作将样品稀释至 1 μ g/ml 浓度的参比。0.3mg/ml 的 rhPDGF-BB 用作参比标准并用于所有板中。使用起始浓度 1 μ g/ml,将各样品加载到 96 孔微量滴定板(黑壁透明底)中,然后在同一行中连续稀释 1.667 倍。将约 10^4 个 NIH 3T3 细胞加入各孔中,每板最后一列除外,其用作空白对照。在 48 小时培养后,将溴脱氧尿苷(BrdU)标记加入各板。再培养 24 小时后,按照生产商的说明书,进行了 BrdU 细胞增殖测定。

[0196] 在 NIH 3T3 细胞增殖测定法中测定的从各基质释放的 rhPDGF-BB 表明,对于分析的 3 种基质,都保持了释放的 PDGF 的生物活性。(图 3)。

[0197] 实施例 4 :从胶原基质释放的 PDGF 的稳定性研究

[0198] 研究了从胶原基质释放的 rhPDGF 的稳定性。将各个类型(5%、6%和 7%)的胶原基质(8mm 圆片)穿在 27½G 针上,并用 50 μ l 1.0mg/ml rhPDGF-BB 进行水合。将各样品在装有 0.4ml 洗脱缓冲液(20mM 乙酸钠 +0.25N 氯化钠)的微管中温育 1 小时。然后用大小排阻 HPLC 分析释出的 PDGF。记录一式三份测量值。从胶原基质释放的 rhPDGF-BB 未发现显著的特征改变,这就表明了从胶原基质释放的 PDGF 的稳定性。

[0199] 实施例 5 :各种胶原基质的肌腱细胞渗入研究

[0200] 对肌腱细胞渗入不同胶原基质的能力进行了评价。胶原基质获自 Kensey Nash Corporation,如上所述由胶原浓度为 5%、6%和 7% (w/v) 的胶原浆制备。将胶原片(厚 1.5-2.0mm)凿成 8mm 直径圆片用于体外细胞迁移研究。

[0201] 自绵羊屈肌腱分离原代绵羊肌腱细胞(< 4 次细胞传代)。将细胞在生长培养基(含有 10% 胎牛血清(FBS)的 D-MEM/F-12)中培养,并在开始研究前 12 小时更换为碱性培养基(含有 2% FBS 的 D-MEM/F-12)。

[0202] 将碱性培养基中的肌腱细胞悬液 50 μ l (50,000 个细胞)加入各胶原圆片样品中。于 37°C 和 5% CO₂ 气氛下温育 1 小时后无培养基逸出,将接种细胞的圆片转移至预装入 2ml 单独的碱性培养基或与 rhPDGF-BB (30ng/ml) 组合的 24 孔板中。静置培养 12 小时后,将具有接种细胞圆片的板放在培养箱中的轨道式振荡器(60rpm)上。每 48 小时更换培养基。第 6 天,取各胶原基质和处理的样品一式四份用于组织学评价。

[0203] 总的来讲,组织学评价与下面的描述类似。培养 6 天后,从各孔中除去细胞培养基,并用 4% 磷酸缓冲福尔马林溶液(PBF)更换。将样品在 PBF 中于室温(RT)固

定约 30 分钟。在室温下,将样品置于真空中 1 小时以上以完成细胞固定。使用摇床 (shaker platform) 和真空箱,然后在约 5.5 小时内,使样本通过乙醇浓度递增系列 (70% -80% -95% -100%) 于室温脱水,在 2 小时内在 100%二甲苯中于室温脱色,在石蜡中渗透不少于 2 小时。然后将各处理组和基质中的样品包埋。将包埋样本从其包埋模子中取出,用轮转切片机“修整”和“削平”以暴露所有样本的最外层表面,然后置于冷冻室过夜。使用轮转切片机、热水浴和预标记的显微镜载玻片,以 3-4 个水平、相距约 100-150 微米切取 4-6 微米的切片 (2 切片 / 载玻片)。将载玻片在烘箱中于 60℃干燥过夜。最后,载玻片用 Hoescht 荧光染料染色后观察。

[0204] 结果表明,肌腱细胞渗入具有 PDGF 的胶原基质 (5%) 中,而肌腱细胞似乎没有渗入胶原基质 (6%) 和胶原基质 (7%) 中。对于胶原基质 (6%) 和胶原基质 (7%) 样品,大多数肌腱细胞在圆片边缘蓄积。因此,似乎胶原基质 (5%) 较大的孔隙率可供将更多数目的细胞渗入胶原基质中。

[0205] 实施例 6 :用胶原 /PDGF 组合物治疗跟腱损伤

[0206] 采用如下所述示例性研究评价了本发明的组合物和方法的功效。本发明包括包含胶原基质与 rhPDGF-BB 溶液混合的组合物和使用所述组合物的方法。例如,胶原基质是流动性胶原基质并包含交联的牛肌腱胶原和糖胺聚糖 (GAG) 基质。通过注射器或其它合适的装置容易将流动性组合物给予到损伤部位。

[0207] 在该示例性研究中,使用绵羊或其它合适的受试者作为人跟腱修复模型。绵羊由于其跟腱大小与人跟腱大小的相似性而特别适合。另外,绵羊的大小足以供标准矫形技术和放入组合物。本研究使用的绵羊是骨骼成熟的 (通过年龄 [3.5 岁以上] 和牙磨损确定)、步态正常的、体重至少为 120lb 和在手术时已经适应的绵羊。按照标准小反刍动物日粮给绵羊喂食进水。对于合适的研究相关事件 (例如麻醉),则停止给予食物和水。

[0208] 本研究使用 3 个治疗组 ($n = 8$ / 组),其中提供下列试验组合物并将其涂覆于急性跟腱断裂的损伤部位:(1) 流动性胶原基质的缓冲液,(2) 流动性胶原基质的缓冲液与 0.3mg/mL (150 μ g) rhPDGF-BB,和 (3) 流动性胶原基质的缓冲液与 1.0mg/mL (500 μ g) rhPDGF-BB。使用其它合适的治疗组,例如使用具有其它合适的 rhPDGF-BB 浓度的组合物的治疗组。

[0209] 示例性流动性胶原基质为 Integra™ Flowable Wound Matrix (IFWM), Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ。还可使用本领域已知的其它合适基质。

[0210] 实验综述

[0211] 横切本研究采用的绵羊的跟腱,接着立即修复。将绵羊分成 3 个示例性试验组 ($n = 8$ / 组),其中使用下列组合物:1) 流动性胶原基质的 20mM 乙酸钠缓冲液 (pH 6.0+/-0.5),置于重新接近的肌腱末端 (用改进的 Mason Allen 缝合设计稳固) (对照),2) 流动性胶原基质的 20mM 乙酸钠缓冲液,缓冲液含有 0.3mg/ml rhPDGF-BB,置于重新接近的肌腱末端 (用改进的 Mason Allen 缝合稳固),和 3) 流动性胶原基质的 20mM 乙酸钠缓冲液,缓冲液含有 1.0mg/ml rhPDGF-BB,置于重新接近的肌腱末端 (用改进的 Mason Allen 缝合稳固)。使用缝合材料,例如 #1 Ethilon 尼龙缝合 (Ethicon Endo-Surgery, Inc, Cincinnati, OH)。测定了模拟的跟腱破裂和再附着的生物力学性能和组织学反应。用于生物力学性能和组织学反应试验的动物的治疗分配和数目概括于表 3。

[0212] 表 3 :治疗分配

[0213]

	治疗组	动物(n)	rhPDGF-BB	终点
1	Collagen Flowable Wound Matrix (IFWM) + 缓冲液	8	0	生物力学 (N=6)/ 组织学 (N=2)
2	IFWM + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB	8	0.3 mg/ml	生物力学 (N=6)/ 组织学 (N=2)

[0214]

3	IFWM + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB	8	1.0 mg/mL	生物力学 (N=6)/ 组织学 (N=2)
---	----------------------------------	---	-----------	--------------------------------

同样可收集治疗组 1 的对侧跟腱
用于生物力学性能(n=6)和组织学反应(n=2)

[0215] 放置试验材料后,应用标准外科手术技术缝合切口,将夹板置于足下部以防止活动时膨出(knuckling)。在手术后一周内,监测手术部位的愈合异常或伤口裂开。允许动物正常走动 8 周,在手术后 2、4 和 8 周进行了超声评价。手术后 8 周,使全部动物安乐死,收集跟腱,包括近端和远端的肌肉肌腱连接处用于组织学和生物力学评价。收集对照动物(即仅流动性的胶原创伤基质)的对侧后肢未进行手术的正常肌腱及其肌肉肌腱连接处,使得可以对正常的未治疗肌腱进行组织学和生物力学试验。还采用最初外科手术部位和对侧对照的皮肤用于组织学评价。

[0216] 外科手术方案

[0217] 在手术当天,给予包括地西洋(0.22mg/kg)和氯胺酮(10mg/kg)的静脉内注射剂诱导全身麻醉。放置气管导管套,通过再呼吸系统用 100% 氧气(2L/分钟)中的异氟烷(1.5% -3.0%)维持全身麻醉。给动物接上呼吸机以帮助呼吸。可放入胃管。

[0218] 动物取左侧斜卧,剃去右腿羊毛,提供适当入口以准备手术部位。用聚维酮碘(Betadine)和酒精交替擦洗,对右踝关节上的皮肤进行无菌手术的准备。然后在手术部位盖上被单以备无菌手术。沿腿侧腹面打开一切口,然后穿过皮下组织深入以暴露出其跟骨上插入附着部位的肌腱。然后分离较大支的腓肠肌腱。触摸跟骨的跟腱附着部,用无菌划印器(marker)在距插入附着部位 2、4 和 6cm 处打上标记。

[0219] 在手术前,使用供应的装有干胶原和缓冲液 +/-rhPDGF-BB 的刻度无菌注射器,将 6.0cc 缓冲液 +/-rhPDGF-BB 加入 3.0cc 流动性胶原材料(IFWM)(2:1 v/v)中,将基质与合

适的缓冲溶液 (20mM 乙酸钠缓冲液, pH 6.0+/-0.5)+/-rhPDGF-BB 混合。从装有 rhPDGF-BB 的注射器上取下顶盖, 换上供应的无菌路厄锁 (luer lock) 连接器, 然后将连接器与装有干胶原的注射器连接, 将所述材料混合。通过将所有缓冲液 +/-rhPDGF-BB 配入胶原注射器中, 来回推拉活塞至少 15 次混合直到混合物呈均质且所有材料可容易地在注射器间来回流动, 从而完成胶原基质的水合。将水合的流动性胶原基质在无菌容器中等分成 0.5cc 体积, 并于 4℃ 保存备用。

[0220] 在肌腱暴露后, 使用改进的 Mason Allen 设计, 将稳固缝线 (#1 Ethilon) 的一端缝在 2cm 标记处, 一端缝在 6cm 标记处。将 Mason Allen 缝线拉紧以保持肌腱长度, 但一端不打结以便用于肌腱末端的操作。然后在 4cm 标记处或 4cm 标记附近切断肌腱, 之后使肌腱远端再接近, 在肌腱的远端处将 Mason Allen 缝线的游离端打结。拍摄横切肌腱与直尺的照片, 记录距根骨附着部的距离。参见例如图 4 所示的示例性缝合的横切肌腱。在远端留下小的缝线头, 并将小的标识缝线 (3-0) 缝入近端, 以便尸体剖检后识别。将覆盖在上面的软组织缝合, 留下肌腱横切面附近的空用于流动性基质附着。然后将水合的流动性胶原基质材料按下列方式放入肌腱末端: 通过 20 规格针从注射器挤出 0.5cc 无菌等分材料, 将针的斜面面向切断肌腱的末端。沿各切断肌腱末端的表面挤出无菌等分材料的一半 (0.25cc)。小心地进行确保材料均匀地分布在缝隙空间。参见例如图 5 所示的将示例性的本发明流动性组合物递送至示例性缝合的切断肌腱中。

[0221] 按照标准外科手术规程, 将覆盖在上面的皮下组织和皮肤缝合。将由 OrthoGlass 制造的夹板固定在足下部, 防止活动时膨出。手术后, 立即将绵羊从手术台上转移, 并观察直到恢复吞咽反射, 此时给绵羊拔管。完成手术时, 以胸卧位支撑绵羊, 然后在整个研究期间关养。对绵羊使用夹板和 / 或铸模固定 (casting) 以减少膨出和 / 或修复肌腱的过度延长。提供手术后镇痛, 动物按照标准手术后护理规程管理。

[0222] 临床观察结果

[0223] 每天观察动物两次直到处死为止。在第一个周, 观察手术部位, 并获取愈合异常和伤口裂开的照片。在整个手术后研究期间, 观察动物的一般体态、食欲、经手术的下肢使用 (例如跛行) 和手术部位的外观。如果在手术部位发生感染, 则给予动物抗生素, 并记录在观察结果中。应用本领域已知方法, 在手术后 2 周、4 周和 8 周, 获得经过手术的和未经手术的对侧跟腱两者的所有治疗部位的超声图像。在所示手术后八 (8) 周, 处死所有动物, 收获组织。

[0224] 生物力学试验

[0225] 采用如上文实验综述部分中论述的三个不同的治疗组, 测定了模拟跟腱破裂和再附着的机械性能。

[0226] 材料与方法

[0227] 收获之后, 样本用盐水浸泡的纱布包裹, 并于 -20℃ 保存直到测试。使用高强度聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA), 将跖灌封在 2" PVC 管中。在灌封制备和生物力学试验期间, 以 15 分钟的间隔喷洒盐水, 保持样本湿润。将灌封跖安装在订制的试验固定装置上, 该固定装置与材料测试系统装载架 (MTS MiniBionix II, Edan Prairie, MN) 系统牢固相连。使用订制的冷冻钳 (cryoclamp) 以保护跟腱的天然横切面, 使软组织滑动减至最小, 并以与灌封跖约 135° 的角度向构件施加单轴牵引力。这样进行是模拟肌腱的生理力矢量。当与冷冻钳

连接的温差电偶显示 -22°C 时开始试验, -22°C 为以前报告的足以确保肌腱与钳子之间的牢固附着的温度。在试验前剪开未埋入组织的缝线材料。因此, 生物力学结果表示埋入缝线和修复组织的联合机械贡献。

[0228] 将 4 个后向反光标记缝在或粘贴在灌封的构件上: 一个在紧接修复部位的跟骨上, 两个在肌腱上 (一个在跟腱 - 修复组织界面的近端, 另一个在远端)。第四个粘贴在冷冻钳上。三部照相机 (Motion Analysis, Santa Rosa, CA) 记录了标记在 60Hz 下的空间移动。使用照相机系统进行标记位移测量以供实时监测修复组织内的局部组织位移 / 劳损。

[0229] 第一阶段: 30 次循环动力预适应

[0230] 最初采用循环载荷试验以对修复的肌腱进行预适应。采用外力控制方案, 给构件施加 10 牛顿 (N) 预载荷 2 分钟。对于所有构件这是规定的最初配置。然后在外力 - 控制方案中, 从 10N 到 50N 以 0.25Hz 对修复的构件进行循环预适应 60 次循环以达到稳定状态。根据我们实验室以往的实验选择六十 ($n = 60$) 次循环, 以往实验表明, 位移相对于时间曲线的斜率在 50 次和 60 次循环之间会聚于一点。目标参数包括适应性延长 (定义为第 1 次循环和第 60 次循环之间峰间位移的差异) 和峰间延长 (定义为第 58、59 和 60 次循环的局部最小值和最大值之间差异的平均值)。

[0231] 准静力破坏载荷

[0232] 在预适应后, 在位移控制下以 1mm/s 的速率对修复的构件加载荷至失效。目标生物力学参数包括破坏极限载荷 (ultimate load-to-failure)、准静力构件总刚度 (定义为载荷 - 位移曲线的斜率)、局部修复组织刚度、失效时的延长和失效时吸收的能量。最后, 记录各样本的失效机制。测试前、递增至破坏过程中和在构件破坏后拍摄数字图像和 / 或视频。

[0233] 统计分析

[0234] 应用单因素方差分析, 接着 Tukey 事后多重比较检验以确定 IFWM 对照与 0.3mg/mL PDGF 和 1.0mg/mL PDGF 治疗组之间连续生物力学参数中的显著性差异。显著性设定为 $p \leq 0.05$, 所有分析都使用 SigmaStat 3.1 (Systat Software, Inc., San Jose, CA) 进行。

[0235] 结果

[0236] 3 个治疗组间未观察到明显的外观差异。在 IFWM+0.3mg/ml rhPDGF-BB 组中, 6 个构件中有 2 个 (33%) 显示在修复组织的侧腹面有明显的血肿。这种血肿的存在影响修复的生物力学特性, 其证据在于: 在非常低的载荷下血肿部分发生破坏或失效。对有 ($n = 6$) 和无 ($n = 4$) 血肿影响的这两种样本进行了数据分析。在 0.3mg/ml rhPDGF-BB 组中, 测试包括 2 个受血肿影响的样本的循环预适应构件的原始数据参见表 4。在 IFWM、IFWM+0.3mg/ml rhPDGF-BB 或 IFWM+1.0mg/ml rhPDGF-BB 治疗组之间, 适应性延长 ($p = 0.636$) 或峰间延长 ($p = 0.813$) 中未发现显著性差异 (图 6A)。

[0237] 表 4A: 循环预适应分析的数据一览。数据用平均值 $\pm$ S.E.M 报告。

治疗	n	适应性延长 (mm)			峰间延长 (mm)		
IFWM	6	0.908	±	0.153	1.041	±	0.103
[0238] IFWM + 0.3 mg/mL rhPDGF-BB	6	0.905	±	0.110	1.084	±	0.054
IFWM + 1.0 mg/mL rhPDGF-BB	6	0.754	±	0.119	1.018	±	0.051
iCTL	6	0.188	±	0.045	0.553	±	0.016

[0239] 同样,在 IFWM、IFWM+0.3mg/ml rhPDGF-BB 或 IFWM+1.0mg/ml rhPDGF-BB 治疗组之间,未观察到适应性延长 ($p = 0.709$) 或峰间延长 ($p = 0.947$) 有显著性差异。图 6B。分析中不包括受血肿影响的样本的测试的循环预适应构件的原始数据参见表 4B。

[0240] 表 4B :循环预适应分析的数据一览。数据用平均值 $\pm$ S. E. M 报告。

治疗	n	适应性延长 (mm)			峰间延长 (mm)		
IFWM	6	0.908	±	0.153	1.041	±	0.103
[0241] IFWM + 0.3 mg/mL rhPDGF-BB	4	0.829	±	0.123	1.084	±	0.049
IFWM + 1.0 mg/mL rhPDGF-BB	6	0.754	±	0.119	1.018	±	0.051
iCTL	6	0.188	±	0.045	0.553	±	0.016

[0242] ** - 该组 6 个样本中有 2 个在修复组织的侧腹面有明显的血肿,在 RTF 试验中,明显开始组织破裂。这些已从统计比较中剔除。

[0243] 分析中包括 2 个受血肿影响的样本的生物力学试验的构件的递增至破坏 (失效) 的原始数据参见表 5A。在 IFWM、IFWM+0.3mg/ml rhPDGF-BB 或 IFWM+1.0mg/ml rhPDGF-BB 治疗组之间未发现手术修复的跟腱的任何准静力参数有显著性差异 ($p > 0.05$, 表 5, 图 7A)。虽然无显著性,但是与 IFWM 对照和 0.3mg/mL rhPDGF-BB 组相比,平均起来,1.0mg/mL rhPDGF-BB 剂量导致极限力至破坏分别增加 57.4% 和 55.0%。在 3 个治疗组间未观察到破坏时吸收的能量有显著性差异 ($p = 0.209$; IFWM, $6423.33 \pm 1811.26 \text{ N*mm}$; 0.3mg/mL rhPDGF-BB, $7346.00 \pm 2989.94 \text{ N*mm}$; 1.0mg/mL PDGF, $12173.33 \pm 2049.62 \text{ N*mm}$),可是平均起来,在 1.0mg/mL rhPDGF-BB 治疗组中破坏时吸收的能量分别比 IFWM 对照和 0.3mg/mL rhPDGF-BB 治疗组的大 89.5% 和 65.7%。

[0244] 表 5A :递增至破坏分析的数据一览。数据用平均值 $\pm$ S. E. M 报告。

[0245]

治疗	n	极限载荷 (N)		构件总刚度 (N/mm)		破坏时总位移 (mm)	
IFWM	6	922.04	± 149.91	96.61	± 8.56	14.55	± 2.42
IFWM+0.3 mg/mL rhPDGF-BB	6	936.50	± 231.74	82.43	± 9.75	14.66	± 2.04
IFWM+1.0 mg/mL rhPDGF-BB	6	1451.71	± 125.08	113.11	± 7.14	18.02	± 1.24
iCTL	6	3767.54	± 224.43	176.97	± 10.75	27.04	± 1.95

[0246] 分析中排除 2 个受血肿影响样本的生物力学试验的递增至失效构件的原始数据见表 5B。在 IFWM、IFWM+0.3mg/ml rhPDGF-BB 或 IFWM+1.0mg/ml rhPDGF-BB 组之间,未观察到手术修复的跟腱的任何总准静力参数有显著性差异 ($p > 0.05$, 表 5B, 图 7B)。虽然不显著,但与 IFWM 对照和 0.3mg/ml PDGF 组相比,平均起来,1.0mg/ml PDGF 剂量分别导致破坏极限力增加 57.4%和 22.2%。在 3 个组之间未观察到破坏时吸收的能量有显著性差异 ($p = 0.247$; IFWM, $6423.33 \pm 1811.26 \text{ N*mm}$; 0.3mg/ml PDGF, $9850.75 \pm 4006.36 \text{ N*mm}$; 1.0mg/ml PDGF, $12173.33 \pm 2049.62 \text{ N*mm}$),可是平均起来,1.0mg/ml PDGF 治疗组中破坏时吸收的能量分别比 IFWM 对照和 0.3mg/ml PDGF 治疗组的高 89.5%和 23.6%。

[0247] 表 5B:递增至破坏分析的数据一览。数据用平均值 $\pm$ S. E. M 报告。

治疗	n	极限载荷 (N)		构件总刚度 (N/mm)		破坏时总位移 (mm)	
IFWM	6	922.04	± 149.91	96.61	± 8.56	14.55	± 2.42
[0248] IFWM + 0.3 mg/mL rhPDGF-BB	4**	1188.31	± 266.12	93.81	± 7.17	16.16	± 2.61
IFWM + 1.0 mg/mL rhPDGF-BB	6	1451.71	± 125.08	113.11	± 7.14	18.02	± 1.24
iCTL	6	3767.54	± 224.43	176.97	± 10.75	27.04	± 1.95

[0249] 分析中包括 2 个受血肿影响的样本 (表 6, 图 8(左图)), 1.0mg/mL rhPDGF-BB 治疗组 ($n = 6, 312.56 \pm 20.86 \text{ N/mm}$) 中局部修复组织刚度平均比 0.3mg/mL 治疗组 ($n = 6, 176.30 \pm 31.17 \text{ N/mm}$) 测定的局部刚度大 77.3%。这个差异在统计上有显著性 ($p = 0.012$)。在 1.0mg/mL PDGF 治疗组和 IFWM 对照 ($n = 6, 215.23 \pm 33.23 \text{ N/mm}$, $p = 0.075$) 之间未观察到局部修复组织刚度的显著性差异。至于不包括 2 个受血肿影响的样本的分析 (图 8(右图)), 1.0mg/ml rhPDGF-BB 治疗组中局部修复组织刚度平均比 0.3mg/ml 治疗组 ($n = 4, 223.72 \pm 11.46 \text{ N/mm}$) 中测定的局部刚度大 39.7%。这个差异在统计上没有显著性 ($p = 0.096$)。然而, 1.0mg/ml 组的局部修复组织刚度 (45.2%, $p = 0.039$) 显著大于 IFWM 对照的局部修复组织刚度 ($215.23 \pm 33.23 \text{ N/mm}$)。

[0250] 表 6:递增至破坏分析的数据一览。数据用平均值 $\pm$ S. E. M 报告。

治疗	n	局部 构件刚度 (N/mm)		n	局部 构件刚度 (N/mm)	
IFWM	6	215.23	± 33.23	6	215.23	± 33.23
[0251] IFWM + 0.3 mg/mL rhPDGF-BB	6	176.30	± 31.17	4**	223.72	± 11.46
IFWM + 1.0 mg/mL rhPDGF-BB	6	312.56	± 20.86	6	312.56	± 20.86
iCTL	6	882.87	± 124.03	6	882.87	± 124.03

[0252] 在测试的十八个 ($n = 8$) 治疗构件中, $n = 16$ (88.9%) 个制备组织和完整跟腱之间的近端界面上失效。要注意的是, 在 IFWM+0.3mg/mL rhPDGF-BB 治疗组中两个 sic 构件在修复组织的侧腹面显示血肿, 这在解剖和随后的生物力学试验中明显可见。在 2 个构件中, 失效始于这些区域。余下的 $n = 2$ (11.1%) 个治疗构件在修复组织和完整跟腱之间的远端界面失效。 $n = 6$ 个完整对侧跟腱构件的失效方式不相同。2 个 ($n = 2, 33.3\%$) 完整构件因 PMMA 灌封材料内跖骨骨折而失效。3 个 ($n = 3, 50\%$) 完整构件因跟腱的中间物质撕裂失效, 1 个 ($n = 1, 16.7\%$) 因跟骨撕脱失效。

[0253] 结论

[0254] 在体内 8 周后, IFWM+1.0mg/mL rhPDGF-BB 治疗组观察到的生物力学数据始终升高, 与 IFWM 对照和 IFWM+0.3mg/mL rhPDGF-BB 治疗组相比, 平均具有较大的愈合反应。与 0.3mg/mL 和单独的 IFWM 治疗组相比, 这种剂量效应用破坏极限载荷分别增加 55% / 22.2% ($n = 6/n = 4$) 和 57.4% 表示。与 0.3mg/mL rhPDGF-BB 和单独的 IFWM 治疗组相比, 修复 (即局部) 组织刚度平均分别增加 77.3% / 39.7% ($n = 6/n = 4$) 和 45.2%。另外, 这项研究中观察到, IFWM+1.0mg/mL rhPDGF-BB 组的极限力比使用基质 (比使用与富含血小板的血浆血纤蛋白基质混合的胶原贴片进行 24 周修复的高 34.9 倍 (Sarrafian 等, Trans ORS, 33 :322 (2008)) 或蛋白质 (比用 CDMP-2 治疗修复 3 周的高 1.9 倍 (Virchenko, Arch Orthop Trauma Surg, 128 :1001-1006 (2008)) 的其它研究的极限力增加。

[0255] 组织学试验

[0256] 组织收获和修整

[0257] 在处以安乐死后, 收获经过手术的跟腱, 上夹板以防止组织卷缩, 并置于 10% 中性缓冲福尔马林进行组织处理。除经过手术的跟腱外, 收获 2 个未进行手术的对侧跟腱用于组织学分析。固定 24 小时后, 各跟腱用解剖刀切为内侧半和外侧半。在跟腱近端刻痕以便在整个组织处理中保持方向。1.0mg/ml rhPDGF-BB 组中 1 只动物因与研究无关的原因 (肺炎) 而在愈合 40 天 (5.8 周) 后处以安乐死。

[0258] 组织处理

[0259] 使用标准石蜡组织学技术和装置 (Shandon Citadel 2000 Processor and Shandon Histocentre 2, Thermo Shandon, Inc, Pittsburgh, PA), 将所有样本 ($n = 8$) 进一步固定、脱水、脱色、浸蜡并包埋。把石蜡块削平, 在 Shandon Finesse 轮转切片机 (Thermo Shandon, Inc, Pittsburgh, PA) 上切成约 10 微米切片。每个样本切取 5 个切片, 共计 40 个切片。各个组织切片用苏木精-伊红 (H&E) 染色。采用 Image Pro Imaging 系统 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 和 Nikon E800 显微镜 (AG Heinze, Lake Forest, CA),

对包括目标区域在内的整个染色载玻片逐个视野获取高分辨数字图像。

[0260] 定性组织病理学

[0261] 对所有组织切片进行了评价,以评定修复/愈合组织的质量、天然肌腱/修复组织界面、血管生成、炎症和胶原密度/纤维取向。在对治疗不知情的情况下评价切片。还采用 Image Pro Plus 成像系统,通过标准化整体数字图像测量了肌腱回缩。

[0262] 结果

[0263] 肌腱回缩

[0264] 所有手术样本在愈合 8 周后都显示某种程度的肌腱回缩。对于无剂量组,平均跟腱回缩 55.7 ± 16.1 , 0.3mg/ml rhPDGF-BB 剂量组回缩 $39.8 \pm 4.5\text{mm}$, 1.0mg/ml rhPDGF-BB 剂量组回缩 $44.4 \pm 1.5\text{mm}$ 。

[0265] 组织病理学

[0266] 在愈合 8 周后,不论 rhPDGF-BB 剂量如何,在所有样本中都可观察到流动性胶原。流动性胶原通常位于更朝向修复部位的远端。在少数情况下,流动性胶原移出修复部位的中心移向修复组织的背面。在一个样本中,观察到流动性胶原分布在修复部位的整个长度上。只在流动性胶原中及其附近观察到轻微炎症。与无剂量样本相比,在流动性胶原+rhPDGF-BB 组 (0.3mg/ml 和 1.0mg/ml 剂量) 中观察到炎症略有加重。炎症一般由多核异物巨细胞和/或单核细胞(淋巴细胞、单核细胞和浆细胞)炎症组成。一般观察不到嗜中性粒细胞。不论 rhPDGF-BB 剂量如何,在流动性胶原内都观察到具有由活化成纤维细胞产生的新胶原的纤维组织形成。虽然在流动性胶原中观察到一些纤维组织形成,但是在修复胶原纤维中出现中断。天然跟腱的近端和远端通常与修复组织的新胶原纤维充分整合。在少数情况下,远端界面比近端界面具有略微较好的整合。近端界面含有许多产生不成熟胶原的未成熟成纤维细胞,扭曲的天然跟腱端伴有轻微炎症。

[0267] 不论治疗或 rhPDGF-BB 剂量如何,由于具有高密度胶原纤维的激活成纤维细胞,会有相对较高的纤维组织形成和胶原产生。使用偏振光观察,主要的胶原纤维排列与天然跟腱胶原纤维的方向一致。在治疗之间成纤维细胞密度相似。在一个样本中,成纤维细胞的密度相对较低,胶原纤维较不成熟、不太密集、不太有方向。胶原纤维通常与天然跟腱纤维方向平行排列,尽管未观察到各组间胶原或成纤维细胞密度的差异。

[0268] 对于所有治疗,都在修复部位观察到炎症,且一般是轻微的。炎症由多核异物巨细胞和单核细胞(淋巴细胞、单核细胞和浆细胞)炎症组成。一般未观察到嗜中性粒细胞。炎症与缝合材料和流动性胶原的存在有关,并且最可能是由于宿主组织的局部损伤所致。对于所有治疗,还在修复部位内观察到大量的血管生成。炎症加重与更丰富的血管生成有关。所有 rhPDGF-BB 剂量都观察到血管肥厚、具有饱满内皮细胞的反应性血管和血管壁加厚。与无剂量样本相比,用 0.3mg/ml 和 1.0mg/ml 剂量治疗的样本观察到有更肥厚的血管。这些血管通常位于修复组织的背面浅表区内。在一个样本中(手术后 40 天),有大量血管生成,但这些血管较小,且未观察到肥厚性血管。在 2 个样本中,观察到伴有血肿腔(hematomatous space)和血纤维蛋白的出血。

[0269] 结论

[0270] 总的来说,根据所测定的有限数量样品,在 0.3mg/ml 剂量、 1.0mg/ml 剂量和对照(无剂量)组之间,跟腱修复方面没有定性差异。rhPDGF-BB 的存在不阻碍愈合,也不在组织

学上引起负面反应。0.3mg/ml 剂量和 1.0mg/ml 剂量治疗组间的愈合类似。所有手术样本都显示某种程度的肌腱回缩。不论 rhPDGF-BB 治疗或剂量如何,所有样本中都观察到流动性胶原,并且一般都位于朝向修复部位的远端。炎症一般是轻微的,由多核异物巨细胞与单核细胞(淋巴细胞、单核细胞和血浆细胞)炎症组成。与无剂量组相比,在 rhPDGF-BB(0.3mg/ml 和 1.0mg/ml 剂量)治疗的流动性胶原中观察到炎症略有加重。不论 rhPDGF-BB 治疗或剂量如何,在修复组织中,有大量的具有高密度胶原纤维的纤维组织形成正在进行。修复胶原纤维排列一般与天然跟腱胶原纤维方向平行。胶原和成纤维细胞密度在治疗组间类似。在所有样本中观察到大量血管分布。与无剂量组相比,在 0.3mg/ml 和 1.0mg/ml 剂量的样本中观察到认定为更肥厚的血管。在少数情况下,与近端界面相比,远端界面显示略微较好的整合,其中有不成熟的胶原和扭曲的天然跟腱端,并伴有轻微炎症。这可能是持续肌腱回缩和同时发生的由缝线滑动引起的局部组织损伤的结果。

[0271] 实施例 7:正常的和患病的原代人肌腱细胞响应 rhPDGF-BB 的增殖

[0272] 本项研究测定了 rhPDGF-BB 是否直接激活来源于腱病患者的原代肌腱细胞的增殖和/或趋化性。该结论可支持 rhPDGF-BB 在腱病中的治疗潜力的构想。

[0273] 患者与方法

[0274] 患者

[0275] 10 名腱病患者参与了该项研究,包括 5 名跟腱腱病患者和 5 名胫后肌腱(PTT)的腱病患者。还包括进行了全膝关节置换的另外 5 名患者。

[0276] 肌腱细胞的原代培养

[0277] 本应弃去的肌腱组织可获自在进行临床适应症的重建手术的正常和受损肌腱。这些组织包括跟腱或 PTT 腱的腱病部分,以及健康(无腱病)部分的屈趾长肌(FDL)肌腱组织、跟腱组织和髌腱组织。原代肌腱细胞外植块培养获自这些组织并在传代 3-5 次时进行了试验。通过在实时 PCR 测定法中用特异性引物,评价肌腱细胞特异性基因 scleraxis 和胶原 $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 基因的表达,来证实肌腱细胞特征。

[0278] 细胞增殖

[0279] 将肌腱细胞单层培养物用胰蛋白酶消化,重新悬浮于含有 0.5% 透析胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,使之贴壁过夜,然后与已测定浓度的 rhPDGF-BB 温育 24 小时。采用市售可得的测定法(Roche Applied Science, Indianapolis, IN),根据在细胞 DNA 合成期间掺入的 BrdU,评价细胞增殖率的改变。对于每种剂量的 rhPDGF-BB,对各培养物进行一式三份的测定。

[0280] 细胞迁移

[0281] 肌腱细胞单层培养物用胰蛋白酶消化,重新悬浮于含有 0.5% 透析胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,并接种到 96 孔 ChemoTx[®] 一次性细胞迁移系统(Neuro Probe, Gaithersburg, MD)的上室。下室装有已测定浓度的 rhPDGF-BB。使肌腱细胞跨分隔各室的膜迁移 48 小时。然后将 96 孔板离心,冻融三次以裂解迁移的细胞。采用市售可得的 Promega(Madison, WI)的试剂盒,根据胞质的乳酸脱氢酶(LDH),测量有活力的迁移细胞的量。

[0282] 统计分析

[0283] 应用单因素方差分析确定 rhPDGF-BB 刺激是否以剂量依赖性方式影响肌腱细胞

增殖。

[0284] 结果

[0285] 只有肌腱细胞培养物而不是对照肺成纤维细胞培养物或对照原代 T 淋巴细胞培养物表达 scleraxis mRNA, 而肌腱细胞和成纤维细胞而不是淋巴细胞表达胶原基因 mRNA。

[0286] 在所有情况下, 参与或不参与疾病进程的肌腱组织的肌腱细胞通过加快 BrdU 掺入来响应 rhPDGF-BB 刺激 ($p < 0.05$, 单因素方差分析)。该反应是剂量依赖性的, 并在 10ng/mL、50ng/mL 和 150ng/mL 的 rhPDGF-BB 下观察到。即使所有细胞培养物都对 rhPDGF-BB 刺激起反应, 但是在 rhPDGF-BB 刺激后的 BrdU 掺入量在患者中有显著差异。与对照非刺激培养物相比, BrdU 的掺入由 2.1 ± 0.2 倍的最小值增加到 10.7 ± 0.5 倍的最大值。得自 5 名患者的肌腱细胞的反应相互矛盾, 在较低 (10ng/mL) 浓度的 rhPDGF-BB 下 BrdU 掺入的增加比较高 (50ng/mL 和 150ng/mL) 浓度 rhPDGF-BB 的增加更大。在来源于这些患者的腱病组织和正常组织的肌腱细胞中观察到这种自相矛盾的反应。来源于 4 名患者健康肌腱的肌腱细胞在响应 rhPDGF-BB 刺激时掺入的 BrdU 比来源于患病组织的肌腱细胞的掺入多两倍。在 1 名患者中, 患病组织的肌腱细胞在响应 rhPDGF 刺激时掺入的 BrdU 比未受累组织的肌腱细胞多 4 倍。

[0287] 在所有情况下, 肌腱细胞对 50ng/mL 和 150ng/mL 的 rhPDGF-BB 都有趋化反应。未将肌腱细胞暴露于 10ng/mL rhPDGF-BB 中进行趋化性实验, 因为在预实验中的反应低下。此外, 反应是剂量依赖性的, 对 150ng/mL rhPDGF-BB 的趋化性大于对 50ng/mL rhPDGF-BB 的趋化性。然而, 起反应的 5 名患者的肌腱细胞对 50ng/mL rhPDGF-BB 的趋化性大于对 150ng/mL rhPDGF-BB 的趋化性, 迁移细胞的数目显著下降 ($p < 0.05$, 双侧斯图登 t 检验)。与非刺激对照相比, 患者中对 rhPDGF-BB 的最大趋化应答有变化, 从 1.4 ± 0.1 倍到 4.0 ± 0.5 倍增加不等。在来源于腱病或健康肌腱组织的匹配肌腱细胞培养物中, 肌腱细胞对 rhPDGF-BB 的趋化性没有统计显著性差异 ($p > 0.05$)。

[0288] 结论

[0289] 这些实验的结果表明, 来源于健康和腱病组织的肌腱细胞通过提高增殖速率和趋化速率 (chemotaxis rate) 而对 rhPDGF-BB 起反应。重要的是, 一些患者的肌腱细胞显示对 PDGF 的自相矛盾的反应, 其中比起较低的剂量, 较高剂量引起较少作用。同样重要的是, 在某些情况下, 相对于来自健康肌腱的肌腱细胞, 来自患病肌腱的肌腱细胞对 PDGF 的反应有差别, 这就表明在临床背景中适当剂量可能是最重要的。

[0290] 实施例 8: 评价应用于治疗肌腱与骨再附着的 4 种胶原基质与重组人血小板衍生生长因子 -BB (rhPDGF-BB) 的组合

[0291] 本研究评价了可与 rhPDGF-BB 联用于肌腱 - 骨界面以应用于治疗肌腱与骨附着 (例如前十字韧带重建) 的 4 种胶原基质的物理特性、生物相容性 (体外和体内) 和稳定性 (生物降解)。

[0292] 方法

[0293] (i) 材料和制备物

[0294] 在本研究中评价了 4 种 I 型胶原基质 (垫块)。3 种纤维性胶原基质 (A、B 和 C) 是不同胶原密度的牛皮衍生物 (A = 4.5% 胶原、B = 5% 胶原、C = 6% 胶原; BIOBLANKET™ 胶原由 Kensey Nash Corporation 供应的不同百分比的胶原浆料制备), 第 4 种纤维性基质

(D) 是牛肌腱衍生物,其特征是“高孔隙度(的)” (90%孔隙率) (COLLATAPE[®], Integra LifeSciences)。把所有胶原片(厚 1.5-2.0mm) 凿成直径 8mm 的圆片用于物理表征和体外(细胞相容性)评价。体内(生物相容性和生物降解)评价使用 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 垫块进行。rhPDGF-BB; 还以 0.3mg/ml 制备了重组人血小板衍生生长因子(rhPDGF-BB)。

[0295] 细胞来源为自绵羊屈肌腱分离的原代绵羊肌腱细胞(<4次传代), 将其在生长培养基(含有 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F-12) 中培养, 临用前 12 小时用碱性培养基(含有 2% FBS 的 DMEM/F-12) 负调节。

[0296] (ii) 体外细胞相容性研究

[0297] 将碱性培养基中的 $50 \mu\text{l}$ (50,000 个细胞) 肌腱细胞悬液加入各胶原圆片中。于 37°C 和 5% CO_2 气氛下温育 1 小时后无培养基逸出, 将接种细胞的圆片转移至预先装入 2ml 单独的碱性培养基或与 rhPDGF-BB (30ng/ml) 组合的 24 孔板中。静置培养 12 小时后, 将具有接种细胞圆片的板放在培养箱中的轨道式振荡器 (60rpm) 上。每 48 小时更换培养基。在第 2、4 和 6 天, 使用各材料和处理的样品一式三份进行了 ATP 测定法, 以测定胶原基质中 / 上的活细胞数。第 4 天, 使用各材料和处理的一个样品进行电子扫描显微镜 (SEM) 评价。第 6 天, 使用各材料和处理的样品一式四份进行组织学评价。

[0298] (iii) 体内生物相容性和生物降解研究

[0299] 本研究共使用了 12 只新西兰白兔。通过前内侧切口, 暴露出股骨。揭去骨膜后, 找出股骨腹面的中点, 用球钻在近端和远端离中点约 0.5-0.8cm 的两个区域 ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) 上去除皮质, 并大量冲洗以防骨过热。在内侧边和外侧边剥去皮质部位的中点上钻两个孔 (0.9mm)。最后, 将 5-0 蚕丝缝线穿过两个孔, 然后绑住胶原垫(用 $100 \mu\text{l}$ 0.3mg/ml rhPDGF-BB 预饱和) 以将该垫块固定在股骨表面上。手术在两侧进行, 使得每个股骨接受两个垫块, 每只动物接受 4 种不同胶原垫中的每 1 种。股骨上垫块的顺序是随机的。手术后 1 周、2 周和 3 周, 使 4 只动物安乐死, 将股骨与垫块和周围组织一起固定在 10% 中性缓冲福尔马林 (NBF) 中, 在甲基丙烯酸甲酯 (MMA) 中包埋, 用 Goldner 三色法染色。

[0300] 结果

[0301] (i) 体外细胞相容性研究

[0302] ATP 测定显示, 在 rhPDGF-BB 存在下, 在胶原圆片上 / 中生长的细胞显著增加, 并且培养中随时间增加, 在相同处理条件下, 在不同的基质中未观察到显著性差异。只有基质的 SEM 图像显示孔隙率的定性差异, 其中基质 D 具有最大孔隙率, 基质 A、B 和 C 显示孔隙率水平降低。在细胞接种后, 各基质的 SEM 结果表明, 在 3 种不同密度的纤维性基质表面上观察到较多细胞, 在“高孔隙度(的)” 基质 (D) 的表面上观察到的细胞最少。接种细胞的各基质横切面的组织学图像为 SEM 观察结果提供了进一步的支持, 表明细胞沿密度增加的基质垫的外表面分布, 基质 D 表明细胞在整个基质中具有最大的分布。

[0303] (ii) 体内生物相容性和生物降解研究

[0304] 组织学评价显示, 所有 4 种胶原垫在植入后 1 周保持完整。在 4 种不同基质周围的组织中, 粒细胞和单核细胞的细胞渗入增加。在植入后两 (2) 周, 观察到基质 A、B 和 D 部分降解, 其中明显的细胞渗入与基质 D 有关。在植入后三 (3) 周, 基质 D 大多降解, 在正常成纤维细胞中仅观察到小的胶原片段 (图 9D)。接受皮肤来源的胶原基质衍生物的部位 (A、B 和 C) 出现降解, 其与胶原密度成反比。观察到这些基质有大量炎性细胞渗入, 这些基质在

三周观察期内变得更局部化（图 9A-9C）。

[0305] 结果表明,胶原基质 D 的孔最多,具有均质微细胶原纤维网,为细胞附着和迁移提供更易接近的表面面积。各基质的体内评价显示,胶原 D 具有最短的驻留期,似乎是最具生物相容性的材料,在植入后 3 周显示炎性细胞渗入最少,而不同密度的胶原基质表明,在植入后 3 周炎性细胞渗入增加,其局限于病灶中。

[0306] 实施例 9 :肌腱-骨或韧带-骨再附着山羊模型中使用 rhPDGF-BB 和胶原包裹加强肌腱的通道固定

[0307] 本研究评价了在经干骺端胫骨通道中插入和固定长屈肌腱之前,包裹浸泡在 rhPDGF-BB 剂量中的胶原海绵的组织学和生物力学益处。用于前十字韧带重建的粘贴移植物的方法参见 Rodeo 等, J. Bone Joint Surg. Am., 75(12):1795-1803(1993)。使用胶原垫与 rhPDGF-BB 组合以促进胫骨附着部位内肌腱或韧带进行更快速和全面的整合。

[0308] (A) 材料与方法

[0309] (i) 物种

[0310] 山羊因为其骨进行重建与人相似所以是合适的模型,骨重建是平衡的骨形成和骨吸收,从而形成正常的骨结构。较小动物(例如大鼠或小鼠)模型的骨不进行重建,因此并不代表作为肌腱与骨整合发生的生物学过程。此外,应用人体手术中使用的技术和仪器,可能比较容易操作,将较大动物(例如山羊)的肌腱再次附着。

[0311] 本研究采用共 24 只骨骼成熟山羊(雌性,混合遗传背景)。将这些动物分成 3 个治疗组(表 7)。第 1 组将长屈肌腱从其股骨附着部外侧准确剥离,接着将缝线穿过胫骨干骺端倾斜钻出的骨通道。一旦到达另一侧,用不锈钢缝线将肌腱附着在胫骨的内侧皮质上(参见图 10 和图 11)。第 1 组动物的对侧肢包括第 2 组的手术。第 2 组经过同样的外科手术,但是在将缝线穿过通道之前,肌腱用 25x15mm 胶原海绵(COLLATAPE[®], Integra LifeScience Corporation, Plainsboro, NJ) 包覆。一旦与胫骨内侧皮质附着,使用 1.0mL 乙酸钠缓冲液(20mM, pH 6.0) 使胶原基质水合。在每只动物内,接受这些处理的四肢是随机的(表 8)。第 1 组和第 2 组共使用 10 只动物,以使每个时间点(第 2 和 4 周)的 $n = 5$ 。生命期每个时间(用于各时间点和各处理的动物组)产生 3 个用于生物力学试验的样本和 2 个用于组织学试验的样本。

[0312] 对第 3 组动物进行与第 2 组相同的手术,只是胶原海绵用 1.0mL 1.0mg/mL 重组人血小板衍生生长因子 BB(PDGF-BB) 水合。在该组中,两肢接受 PDGF-BB 治疗。第 3 组包括 10 只动物;这使得各时间点(第 2 和 4 周)产生 $n = 10$ 个样品(两个经过手术的(前/后)肢/动物)。生命期每一时间产生 5 个用于生物力学试验的样本和 5 个用于组织学试验的样本。

[0313] 另外的 2 只动物用于初步手术研究以证实手术植入材料的可行性(1 只接受上述第 1 组和第 2 组中所述的处理,另一只接受上述第 3 组中所述的处理)。手术后观察这些动物 2 周以证实恢复正常步行以及不存在并发症。此后,使初步研究的动物安乐死,收集组织。如果手术和手术后评价期间不发生意外,则按计划进行研究(20 只动物)的其余部分。

[0314] (ii) 试验品和对照品

[0315] 试验品 1 为 1.0mg/ml rhPDGF-BB 的 20mM 乙酸钠缓冲液, pH 6.0 $\pm$ 0.5, 液体形式并保存于 2 $^{\circ}$ C -8 $^{\circ}$ C。试验品 2 为得自 COLLATAPE[®], Integra LifeSciences 的胶原, 固体形

式并保存于室温。

[0316] iii) 给药准备

[0317] 将胶原与 rhDGF-BB 混合

[0318] 将试验品和对照品混合。物品使用无菌制备。所有混合在室温下进行。配制的试验品和对照品在制备后至多 1 小时内使用。

[0319] 将胶原垫切成 $25 \times 15\text{mm}$, 包覆在肌腱上, 并用缝线穿过骨通道。用 27G 针, 将 1.0mL 的 1.0mg/mL rhPDGF-BB 注入胶原基质最终植入物部位附近的通道。通道的内侧孔和外侧孔接受约 0.5mL 共计 1.0mg/mL 的 rhPDGF-BB。在骨通道的内侧或外侧进行的注射经由注射通道周边的多个点进行, 大致为通道口的 1/4、1/2、3/4 和 4/4 周缘。

[0320] (iv) 试验系统 (动物和动物管理)

[0321] 使用骨骼成熟的雌性驯养山羊 (混交品种, $n = 24$), 30-40lb, 已检 Q 热, 具有健康证明书。无一动物曾用于既往实验。将动物放在每只山羊最小 10 平方英尺空间中自由活动。笼子由不锈钢构成, 按常规清洁。环境温度保持在 60-80 °F 之间, 湿度保持在 30-70% 之间。

[0322] 用水桶以及通过自动给水系统 (LIX-IT) 随意给山羊供水。连续提供干草, 并每天一次给山羊提供市面购买的山羊颗粒饲料。在第一天给药之前, 使研究动物适应它们的指定饲养室至少 14 天。该适应期使动物习惯研究室环境。给所有动物进行体检, 包括心率、呼吸和排泄漂浮物。只有兽医认定为健康良好的动物才允许进入该设施和接受研究。用 Ivomec (1cc/75lb) 和青霉素 G 和苯佐卡因 (1cc/10lb) 对动物进行预防性治疗。

[0323] (B) 实验设计

[0324] (i) 概述和手术方法

[0325] 使用山羊混合剂 [10cc 氯胺酮 (100mg/ml) + 1cc 赛拉嗪 (20mg/ml)] 以 1ml/10kg IM (肌肉) 术前给药, 在 30 分钟内诱导麻醉。诱导后, 放置头部静脉导管。轻轻将眼用软膏加在眼角膜上以使眼睛干燥降到最低。山羊用气管导管 (5-8ETT) 以及瘤胃导管插管。采用再呼吸回路, 用 100% 氧气递送的 1.5-2% 异氟烷维持麻醉。如有需要, 按照湿气量 (15mL/kg BW) 给山羊接入呼吸机。在整个麻醉过程中, 以 10mL/kg/ 小时给予每只山羊温热的乳酸盐林格氏液。

[0326] 在手术前 1 小时和手术后 EOD (结束当日) 给予青霉素 G 和苯佐卡因 (1cc/10lb BW) 共 3 剂。术后以 0.005mg/kg BW IM BID x 48 小时给予丁丙诺啡 (Buprenex)。

[0327] 无菌手术前进行手术部位准备 (3- 氯己定 [4%] 与无菌盐水溶液交替擦洗), 盖上被单。在无菌条件下, 将膝盖骨外侧切开, 并将趾长伸肌腱从其在股骨外侧髁的附着部准确剥离, 暴露出各膝关节 (图 10)。切开胫骨前肌肌肉的筋膜, 并将肌肉拉向外侧, 暴露出近端胫骨干骺端。

[0328] 以与胫骨长轴成 30 度和 45 度之间的角度, 在近端胫骨干骺端钻 5.6mm 直径的孔 (图 11)。所有钻孔都与充分冲洗一起进行, 并始于胫骨内侧髁近端 (触摸到的关节线以下 1cm), 终止于胫骨外侧远端 (触摸到的关节线以下 2cm)。用薄金属深度计测量钻孔深度后记录。用 25x15mm 胶原海绵包覆肌腱, 无重叠, 用 4-0 Vicryl 缝线加固, 然后用不锈钢丝穿过骨通道。一旦到达骨的另一侧, 便利用两个小孔和 4-0 不锈钢的间断缝合, 将肌腱固定在内侧皮质上。在将胶原包覆的肌腱与骨固定后, 使用 27G 注射器针, 分剂量将 1mL 乙酸钠缓冲

液 (pH 6.0) 注射入通道的两侧,使胶原海绵水合。对照动物的无胶原包覆的肌腱,只是用不锈钢丝穿过骨通道并固定内侧皮质上。生长因子处理的肌腱如上所述用胶原海绵包覆,用不锈钢丝穿过骨通道,固定在内侧皮质上,然后用 1mL 含有 1mg/mL PDGF-BB 的乙酸钠 (pH 6) 缓冲液水合。

[0329] 软组织用可吸收缝线 (例如 4-0Vicryl) 按层缝合。在缝合切口和皮肤后,拍摄各肢的放射照片记录通道位置和角度。理想的是选取放射照片的方向使得拍成胫骨通道的全长图像。

[0330] 当山羊站稳并能走动时,将它们送回它们的栏中。每只山羊可任食任饮。

[0331] 通过组织学和显微 CT 检查,预期加入插入干骺端骨通道的长屈肌腱部分中的 rhPDGF-BB 剂量使失效的生物力学载荷随时间增加 25%,并改善整合和矿化。

[0332] 在兽医在场的情况下,先对 2 只动物进行手术,以检查手术和动物管理的所有方面。14 天后,如果所有动物恢复而无意外,便实施该实验方案。如果出现困难,则研究人员与兽医人员合力工作,解决为动物提供最适管理并确保研究成功所必需的任何问题。手术期间,使动物麻醉,并且使动物镇静以进行采血步骤。

[0333] (ii) 分组安排和剂量水平

[0334] 表 7:处理组

[0335]

组	动物(n)	手术侧	基质	生长因子	处死	终点
1 和 2	10	随机、 两侧	裸露肌腱或 25mmx15mm 胶原海绵	无	2 周	组织形态测定
					4 周	(n=2) 生物力学(n=3)
3	10	两侧	25mm x 15mm 胶原海绵	1.0 mg/mL PDGF-BB	2 周 4 周	组织形态测定 (n=5) 生物力学(n=5)

[0336] 表 8:处理安排

[0337]

动物 编号	组	左肢	右肢	动物 编号	组	左肢	右肢
1	1 和 2	N	SP	11	1 和 2	SP	N
2	1 和 2	SP	N	12	1 和 2	N	SP
3	3	PDGF	PDGF	13	1 和 2	N	SP
4	3	PDGF	PDGF	14	3	PDGF	PDGF
5	1 和 2	N	SP	15	1 和 2	N	SP
6	1 和 2	SP	N	16	3	PDGF	PDGF
7	3	PDGF	PDGF	17	3	PDGF	PDGF
8	3	PDGF	PDGF	18	3	PDGF	PDGF
9	1 和 2	N	SP	19	1 和 2	SP	N
10	3	PDGF	PDGF	20	3	PDGF	PDGF

[0338] N:裸露肌腱

[0339] SP:将肌腱包裹在胶原海绵 (COLLATAPE®) 中

[0340] PDGF:将肌腱包裹在含有 rhPDGF-BB 的胶原海绵中

[0341] (C) 生命期观察和测量

[0342] 整个研究中至少每天观察动物。一旦预选标准完成便开始记录观察数据并持续直到研究结束。观察每只动物的整体外观和行为的改变,包括步态改变。在手术前和处死时测量体重。在其它时间点上测量的体重作为监测动物健康的必需条件。

[0343] 在手术后 1 周结束时,给在第 2 周处死的动物 IP(腹膜内)注射 10mg/kg 钙荧光素(销售商 TBD)。同样,在第 3 周,给在第 4 周处死的动物腹膜内注射 10mg/kg 钙荧光素(销售商 TBD)。这些注射给组织学样本的新的骨形成和生长入通道勾画出轮廓。

[0344] (D) 临床病理学评价

[0345] (i) 收集用于分析的血清

[0346] 手术前一次和处死前收集所有动物约 5ml 血液到无添加剂(即“凝血”)管中。血液经离心得到血清,并分成两个等分血清。将血清保存于 -70℃ 以下以备进一步分析。

[0347] (E) 解剖病理学

[0348] 在合适的研究终点处死全部动物。对发现死亡或在濒死状态下处死的每只动物进行肉眼尸检以确定死因。

[0349] (i) 尸体剖检

[0350] 按照美国农业部动物福利法和实验室动物管理和使用指南 (USDA Animal Welfare Act and The Guide for Care and Use of Laboratory Animals) (ILAR 出版, 1996, National Academy Press), 使山羊安乐死。首先以 1ml/10kg 肌肉内使用山羊混合剂 [10cc 氯胺酮 (100mg/ml)+1cc 赛拉嗪 (20mg/ml)] 使山羊镇静。然后,以 1cc/10lb BW IV 给予 Euthasol (360mg/ml 戊巴比妥钠)。通过听诊和缺乏反射作用(眨眼、回避等)确认死亡。

[0351] (ii) 组织收集和保存

[0352] 植入物部位的肉眼观察和照相

[0353] 在安乐死时,肉眼检查植入物部位,并记录部位的描述。采用数字照相术记录观察结果。

[0354] (iii) 病理学

[0355] 使后膝关节脱离,使用 Stryker 锯在胫骨中间锯断。尽可能修整周围的肌肉和皮肤,除进行临床评价所必需的骨创伤以外不暴露任何更多的骨创伤。每个样本用山羊编号标记并注明是右肢还是左肢。将组织放入中性缓冲福尔马林(10 体积固定液:1 体积组织),运送给发起者(shipped to the sponsor)。

[0356] (F) 终点

[0357] (i) 组织学和组织病理学

[0358] 进行组织处理。简单地讲,把组织包埋在甲基丙烯酸甲酯(MMA)中,切片并用苏木精/伊红、沙黄 O/固绿、Von Kossa/MacNeal 和/或 Van Gieson 染色以进行光学显微镜评价。用于评价的切片平面是相对于胫骨通道的横切面和纵剖面。设计评分系统以评价保留在各植入物部位的材料量、肌腱的矿化程度和沿通道壁生长的新骨的量。钙荧光素显影在用苏木精/伊红染色的切片附近的未染色切片上进行。

[0359] (ii) 生物力学

[0360] 将保留用于生物力学试验的样本于-20℃冷冻备用。为使通道的长轴与撕下来的肌腱方向成一线,将胫骨/肌腱复合体固定在多轴台上。这种取向使任何摩擦作用减至最小,并且可供直接测定肌腱与周围骨的整合/矿化。使失效的最大载荷测量值归一化至手工测量和手术后放射照片的通道长度。

[0361] (a) 研究设计

[0362] 本研究测定了胫骨骨通道中模拟趾伸肌腱再附着的机械性能。本研究使用 12 只波尔山羊。

[0363] (b) 生物力学试验

[0364] 将样本包裹在盐水浸泡的纱布中,并保存于-20℃直到测试。使用高聚甲基丙烯酸甲酯,将胫骨的远端部灌封在 2" PVC 管中。在灌封制备和生物力学试验期间,以 15 分钟的间隔用盐水喷洒,保持样本湿润。将灌封的胫骨安装在订制的试验固定装置上,该固定装置与材料测试系统装载架(MTS MiniBionix,Edan Prairie,MN;图 12)牢固相连。本研究使用设计来抓住肌腱天然横切面的订制的冷冻钳,以向该构件施加单轴牵引力。切断任何余留的外侧缝线。

[0365] 生物力学和组织学读数的分析通过协方差技术的分析进行。使用动物体质量和肌腱直径作为协变量,研究了 rhPDGF-BB 和 COLLATAPE®的作用。

[0366] 可在分析前通过合适的方法转化读数。

[0367] 第 1 阶段:30 个循环动力预适应

[0368] 最初采用循环载荷试验对肌腱修复进行预适应。施加 10 牛顿(N)预载荷,使构件力松弛约 40%。对于所有构件,这是设计的最初配置。然后修复的构件按照外力-控制方案以 0.25Hz 从 10N 到 30N 循环预适应 30 次循环以达到稳定状态。选择三十(n=30)次循环,因为我们实验室之前的实验表明,在 20 次和 30 次循环之间,位移相对于时间曲线的斜率似乎变稳定。

[0369] 第2阶段:准静力破坏载荷

[0370] 在预适应后,在位移控制下以 1mm/s 的速率对修复的构件加载荷至破坏。目标生物力学参数包括破坏极限载荷和准静力刚度(定义为载荷-位移曲线的斜率)。最后,记录每个样本的失效机制。当加载到测试装置上和破坏时,拍摄每个样本的数字图像来记录破坏的方式和状况。

[0371] (iii) 显微断层摄影术(CT)

[0372] 以通过样本大小确定的最佳分辨率扫描每个样本。参见图 13。在接近横切面到柱缺陷获取切片。采用半自动外形修整方法选择限于缺陷最初边缘周边的目标三维分区域(volume of interest, VOI)。选择最优化密度阈值和噪声滤波器,并且统一用于所有样本以便将骨与软组织分隔。计算通道内骨的平均总密度、平均密度和骨体积/总体积。

[0373] 实施例 10:通过 BenchTop 模型评价 rhPDGF-BB(重组人血小板衍生生长因子-BB)从 BIOBLANKET™和 COLLATAPE®基质中释放的特性

[0374] 本研究的目的是使用 BenchTop 模型于室温测量从具有不同密度的 BIOBLANKET™基质和 COLLATAPE®基质中释放的 rhPDGF-BB。

[0375] 试验材料

[0376] 表 9: BIOBLANKET™和 COLLATAPE®基质

[0377]

样品	批次编号
BIOBLANKET™胶原(5%)	R436-1
BIOBLANKET™胶原(6%)	R436-2
BIOBLANKET™胶原(7%)	R436-3
COLLATAPE®胶原	1080464

[0378] 研究设计

[0379] 研究设计参见表 10,表示对于所有样品组(BIOBLANKET™基质、COLLATAPE®基质和无胶原基质的对照组)最初的 5 分钟冲洗时间。

[0380] 表 10:研究设计

[0381]

样品	试验材料	最初冲洗时间
1-3	BIOBLANKET™胶原(5%)	5 分钟
4-6	BIOBLANKET™胶原(6%)	5 分钟
7-9	BIOBLANKET™胶原(7%)	5 分钟
10-12	COLLATAPE®	5 分钟
13-15	对照(仅 rhPDGF-BB)	5 分钟

[0382] 采用无菌技术,用活检钻孔器从每个 BIOBLANKET™和 COLLATAPE®薄片上钻取 8mm 圆片。使用注射器针轻轻将一个 BIOBLANKET™和 COLLATAPE®圆片穿刺在 27G11/4 针上,把针与安装在专门设计的槽中的 1mL 注射器头连接。将 50 μ l PDGF-BB (1.0mg/mL 的 20mM 乙酸钠缓冲液)加入各圆片上。然后将圆片于室温温育 10 分钟。按照图 14 所示,将关节镜检查套管装置硅管的一端与 20ml 注射器硅管的另一端连接。将 20ml 洗脱缓冲液 (EME+2% FBS) 装入注射器中,将硅管与 Varistaltic 泵装配。将用 rhPDGF-BB 饱和的胶原垫加到关节镜检查套管装置顶部。流速设置为 200ml/分钟 (预先校正)。打开泵并运行 5 分钟。对于对照,从关节镜检查套管装置的顶部将 50 μ l rhPDGF-BB 以 1.0mg/ml 加入系统中。冲洗 5 分钟后,在泵仍运行的同时,将硅管与 20ml 注射器拆开,将洗脱缓冲液收集到 50ml 圆锥管。样品保存于 2-4℃用于分析。按照下文 ELISA 测定法中所述,使用得自 R&D systems 的 DuoSet ELISA 试剂盒,测定各样品中洗脱的 rhPDGF-BB 的量。

[0383] ELISA 测定法

[0384] 将 56 μ l 俘获试剂储备溶液加入 10ml DPBS 中,从而在 DPBS 中将俘获试剂稀释成工作浓度 (0.4 μ g/ml),然后将 100 μ l 稀释的俘获试剂加到 96 孔板各孔中。用板封闭器将板密封,在振荡器中于室温温育过夜。排除多道移液分配管的气泡,板用洗涤缓冲液洗涤三次。将 200 μ l 洗脱缓冲液加入各孔中,摇动的同时于室温将板封闭 2 小时 (最多 4 小时)。板用洗涤缓冲液洗涤三次。

[0385] 将 50 μ l 链霉抗生物素 -HRP 储备溶液加入 10ml 试剂稀释缓冲液中,从而在试剂稀释缓冲液中将链霉抗生物素 -HRP 稀释成工作浓度 (200x 稀释度)。然后将 100 μ l 链霉抗生物素 -HRP 加入各孔中,盖上铝箔,在轨道式振荡器中于室温温育 20 分钟。紧接将链霉抗生物素 -HRP 加入板中之后,将所需体积的 SureBlue TMB 等分倒入包裹在箔纸中的 15ml 圆锥管中,置于试验台使之平衡到室温。每块板准备单独的管。然后将板用洗涤缓冲液洗涤三次。

[0386] 将 100 μ l Sure Blue 加入各孔中,用铝箔覆盖,并于室温温育 20 分钟。然后将 50 μ l 1N HCL 加入各孔中终止反应。在反应停止后 30 分钟内,读取 450nm 下的光密度,其校正设置为 540nm。

[0387] 数据计算

[0388] 使用 4 参数绘制标准品的曲线图,利用各板的标准曲线,计算各板每种稀释度下每个试验样品的 rhPDGF-BB 浓度。还计算得出各时间点两种稀释度下的一式三份样品每个的平均值和标准差 (SD)。

[0389] 将 rhPDGF-BB 浓度乘以每个样品的总体积,求出各样品中存在的总 rhPDGF-BB。将每个时间点上的 rhPDGF-BB 的量加上前一时间点的 rhPDGF-BB 的量,计算出各样品在各时间点上的 rhPDGF-BB 的累积量。

[0390] 绘制 4 个时间点每一个释放的 rhPDGF-BB 累积量的平均值 $\pm$ SD 的柱状图。将各个时间点的累积 rhPDGF-BB 释放除以同一时间点对照的平均值,计算出各样品的 rhPDGF-BB 释放百分比。还计算得出各时间点一式三份样品每个的 rhPDGF-BB 释放百分比的平均值。绘制了 4 个时间点每一个的 rhPDGF-BB 释放百分比的平均值 $\pm$ SD 柱状图。

[0391] 统计分析

[0392] 根据数据分布,通过合适的方法进行了各个时间点数据的统计比较。

[0393] 实施例 11:采用关节镜冲洗 BenchTop 模型表征重组人血小板衍生生长因子-BB(rhPDGF-BB)与胶原基质组合的释放、稳定性和生物效能

[0394] 进行了本研究以开发可再现高速液体流动关节镜检查环境并表征 rhPDGF-BB 的释放、稳定性和生物效能的新的 BenchTop 关节镜检查模型,所述 rhPDGF-BB 从用于肌腱与骨附着手术(例如前十字韧带重建手术或肌腱套损伤治疗手术)的 4 种不同的胶原基质中洗脱出。

[0395] 方法

[0396] 评价 4 种 I 型牛胶原基质:3 种为表皮来源的不同胶原浓度(A = 4.5%胶原;B = 5%胶原,C = 6%胶原,得自 Kensey Nash Corporation)的胶原基质,一种跟腱来源的基质(胶原 D, COLLATAPE[®],得自 Integra LifeSciences)。把所有基质凿成 8mm 圆片。为了评价 rhPDGF-BB(Novartis)从胶原基质的释放,每个圆片用 50 μ l rhPDGF-BB 以 1mg/ml (50 μ g) 水合,于室温温育 10 分钟,加样到预装入 20ml 洗脱缓冲液(含有 2% FBS 的 MEM)的 BenchTop 关节镜检查系统中(参见图 14),以 200ml/分钟流速冲洗 5 分钟。将等量的 rhPDGF-BB 加入系统中作为对照。采用 DuoSet ELISA 测定法(R&D systems),对用来洗涤基质的洗脱缓冲液样品进行了分析。采用反相和大小排阻高效液相色谱法(HPLC),得到从胶原基质释放的 rhPDGF-BB 谱用于评价天然/变性结构的 rhPDGF-BB 的改变/变化。采用溴脱氧尿苷(BrdU)细胞增殖测定法(Promega),测定了由胶原基质释放的 rhPDGF-BB 的生物效能。将 NIH3T3 成纤维细胞在含有 rhPDGF-BB (0-0.24 μ g/ml) 的释放物中培养,然后加入 BrdU,将细胞温育 48 小时。

[0397] 相对于 4 种胶原基质每一种的对照的 rhPDGF-BB 释放的平均百分比如下:胶原 A, 79%;胶原 B, 64.6%;胶原 C, 74.3%;胶原 D, 89.0%。胶原 D 显示 rhPDGF-BB 释放最大,这正如应用单因素方差分析 Fisher LSD 方法证实的显著大于基质 B 或 C 所观察到的释放。用反相 HPLC 证实,在下列与基质 D 的组合中未观察到 rhPDGF-BB 有明显改变,但是用胶原基质 A、B 和 C 出现轻微的 rhPDGF-BB 氧化,然而,这些变化似乎不影响生物效能(通过 BrdU 评价)。

[0398] 该研究表明,BenchTop 关节镜检查模型是评价递送被提议用于运动医学关节镜修复/再生手术的重组蛋白治疗药的基质的有效系统。胶原 A 和 D 比胶原 B 和 C 释放更多的 rhPDGF-BB,且胶原 D 不引起 rhPDGF-BB 的任何改变,在用于运动医学再生手术中具有巨大潜力。此外,该关节镜检查模型表示精准的体外工具,其可供制作重组蛋白治疗装置,以提供最大疗效的最优递送量。

[0399] 实施例 12:通过扫描电子显微镜(SEM)评价细胞在响应 rhPDGF-BB 时在不同密度的 BIOBLANKET[™]基质和 COLLATAPE[®]中的迁移

[0400] 本研究通过培养用或未用 rhPDGF-BB 处理的原代绵羊肌腱细胞,随后通过扫描电子显微镜(SEM)技术评价,评价了细胞迁移进入 BIOBLANKET[™]和 COLLATAPE[®]基质的程度。

[0401] 材料与方法

[0402] 将已知量的细胞接种到基质上,然后将所述基质培养 4 天,对绵羊肌腱细胞迁移进入 BIOBLANKET[™]基质和 COLLATAPE[®]进行了评价。然后基质通过临界点干燥处理,在扫描电子显微镜下评价了基质中的细胞分布和密度。

[0403] 试验材料包括 1) 5%、6% 或 7% BIOBLANKET[™](批次编号 R436-1、R436-2、R436-3);

2) COLLATAPE® (批次编号 1072549); 3) rhPDGF-BB (0.3mg/ml; 批次编号: BMTI204); 以及
4) 新鲜绵羊蹄, 在踝关节处切断。研究设计参见表 11。

[0404] 表 11: 样品设置

[0405]

样品 编号	材料	细胞悬液(P+) ^a		细胞悬液(P-) ^b	
		培养基 (P+) ^c	培养基 (P-) ^d	培养基 (P+)	培养基 (P-)
01	5%胶原	√			
02	5%胶原		√		
03	5%胶原			√	
04	5%胶原				√
05	6%胶原	√			
06	6%胶原		√		
07	6%胶原			√	
08	6%胶原				√
09	7%胶原	√			
10	7%胶原		√		
11	7%胶原			√	
12	7%胶原				√
13	COLLATAPE®	√			
14	COLLATAPE®		√		
15	COLLATAPE®			√	
16	COLLATAPE®				√

[0406] ^a悬液 (P+): 细胞接种悬液含有 1.2mg/ml rhPDGF-BB

[0407] ^b悬液 (P-): 细胞接种悬液不含 rhPDGF-BB

[0408] ^c培养基 (P+): 细胞培养基含有 30ng/ml rhPDGF-BB

[0409] ^d培养基 (P-): 细胞培养基不含 rhPDGF-BB

[0410] (i) 原代绵羊肌腱细胞的分离和培养

[0411] 将新鲜绵羊蹄用肥皂、水和 70% 酒精清洁、喷淋和洗涤。从屈肌腱表面切开约 3 英寸宽的皮肤。切口用 70% 酒精喷淋, 盖上手术被单。在肌腱鞘上方划出切口暴露出肌腱。然后从远侧切断肌腱。尽量拉长肌腱, 切断近端。然后将肌腱放入装满冰冷的 DPBS 的 50ml 圆锥管中。弃去蹄和无用组织。

[0412] 在层流超净台工作区, 将肌腱组织在无菌 120mm 细胞培养皿中切成小块。然后将切碎组织转移到新的 50ml 圆锥管中。切碎肌腱组织用 DPBS 洗涤两次, 用 DMEM/F-12 培养基洗涤一次。然后肌腱组织用 DMEM/F-12 培养基中的 500 单位 /ml 链霉蛋白酶消化 1 小时。吸出链霉蛋白酶, 用 DPBS 洗涤两次, 用无血清 DMEM/F-12 培养基洗涤一次。

[0413] 然后肌腱细胞用无血清 DMEM/F-12 培养基中的 0.2 胶原酶 P 加上 150 单位 /ml

DNA 酶 -II 释放 1 小时。消化液通过 75- μ m 细胞滤过滤器过滤。将滤过滤器中留下的组织放回 50ml 圆锥管中,肌腱细胞用无血清 DMEM/F-12 培养基中的 0.2% 胶原酶 P 加 150 单位 / ml DNA 酶 -II 释放 1 小时。以 1200-1500RPM 于 4℃ 离心 5 分钟使细胞沉淀。将细胞重新悬浮于 10ml DMEM/F12 生长培养基中,使用锥虫蓝和血细胞计数器进行细胞计数。将细胞以 5000-7500 个细胞 / cm^2 的密度接种到具有 DMEM/F-12 生长培养基的 T75 或 T150 培养瓶中。每 1 小时重复本段描述的整个过程,直到消化完所有的肌腱组织。每两天更换生长培养基,在将细胞接种到 BIOBLANKET™ 和 COLLATAPE ® 基质之前 24 小时,更换为碱性培养基。

[0414] (ii) 接种细胞并加入 rhPDGF-BB

[0415] 采用无菌技术,使用活检钻孔器从 BIOBLANKET™ 和 COLLATAPE ® 基质钻取 8mm 圆片。在 27 G1/2 针上轻轻穿上一片 BIOBLANKET™ 或 COLLATAPE ® 圆片,把针弯两次曲成 90 度角成为开口向上的长方形确保圆片不滑落。将穿有 BIOBLANKET™ 和 COLLATAPE ® 基质圆片的针在专门设计的槽中与 1ml 注射器头连接。将肌腱细胞用胰蛋白酶消化,并以 10^6 个细胞 /ml 的浓度悬浮 (少于 4 次传代) 于 1ml 含有 2% FBS 和抗生素的 DMEM 碱性培养基中。将总量 60ng (30ng/ml 于 2ml 培养基中) 的 rhPDGF-BB 加载到各个圆片上。然后将细胞接种在 BIOBLANKET™ 和 COLLATAPE ® 基质圆片上,在无培养基浸没的情况下,在培养箱的反应室内温育 1 小时。制备含有 2% FBS 的 DMEM 培养基,以 2ml 加入每 24 孔超低附着培养板的 8 个孔中,共 8 个孔作为 rhPDGF-BB 处理组。温育 1 小时后,从加样箱中取出接种细胞的圆片。用止血钳将针尖从塑料根部折断。将接种细胞的圆片与针尖一起转移到预装入含有不同组成成分的培养基的孔中。附在圆片上的针尖使圆片浮在培养基中,使得均匀地向圆片两侧的细胞提供营养。每种材料共进行了 4 次处理,每种材料和每次处理都制备一式三份样品。在培养箱中于 37℃ 和 5% CO_2 气氛中静置培养 12 小时后,将接种细胞的胶原基质的板放在培养箱中的轨道式振荡器上。每 48 小时更换成含有与第一次提供的养分相同组成成分的培养基。

[0416] (iii) 扫描电子显微镜方法

[0417] 在培养 4 天后,将各接种细胞的圆片从 24 孔板转移到浮出培养基的冷冻小瓶中。然后从冷冻小瓶中除去培养基,将样品在 DPBS 中洗涤两次。将样品在 2.5% 戊二醛中固定 2 小时。然后将样品在 DPBS 中洗涤 5 次,在 2% 四氧化锇中进行后固定 2 小时。将样品浸泡在去离子水中 10 分钟后,用去离子水洗涤 5 次以除去过量的四氧化锇。将样品在递增系列的乙醇中脱水,然后在 Polaron 临界点干燥器中干燥。样品用金 - 钼涂覆,用 Hitachi SEM 观察。

[0418] 结果和结论

[0419] 使肌腱细胞在所有具有不同胶原浓度浆料的 BIOBLANKET™ 基质的表面上生长,但在 COLLATAPE ® 基质的内部生长。生长在所有具有不同胶原浓度浆料的 BIOBLANKET™ 基质中的大多数肌腱细胞为圆形,但在 COLLATAPE ® 基质中的肌腱细胞为纺锤形。参见图 15。

[0420] 实施例 12 :绵羊模型中使用 rhPDGF-BB 和 I 型牛胶原基质修复肌腱套

[0421] 本研究的目的在于采用绵羊模型测定加载 rhPDGF-BB 的基质将促进冈下肌腱更牢固地与肱骨再附着用于修复肌腱套的功效。实验设计提供如下 :1) 仅缝合 ($n = 9$) ;2) 缝合 + 胶原基质 + 缓冲液 ($n = 9$) ;3) 缝合 + 胶原基质 + 0.15mg/ml (或 75 μ g) rhPDGF-BB ($n = 9$) ;4) 缝合 + 胶原基质 + 0.30mg/ml (或 150 μ g) rhPDGF-BB ($n = 9$) ;5) 缝合 + 胶原基质

+1.0mg/ml (或 500 μ g) rhPDGF-BB ($n = 9$); 以及 6) iCTL ($n = 9$) 完整对侧对照。仅缝合、缝合 + 胶原基质 + 缓冲液和 3 种剂量组的 9 只动物用于生物力学试验, 各组 3 只动物用于组织学试验。iCTL 组较少, 6 只动物用于生物力学试验, 3 只动物用于组织学试验。

[0422] 外科手术

[0423] 通过手术将骨骼成熟绵羊 (3.5 岁以上) 的冈下肌腱暴露出来, 快速从肱头剥离。剥去肌腱附着部位的皮质, 在骨上凿 3 个孔以引导出血。将测试物作为位间移植物放置在肌腱与骨之间。采用 Mason-Allen 技术将 2 条缝线穿过肌腱, 通过包括 3 个骨通道的单排修复而将肌腱绑在肱头上。采用标准方法将手术部位缝合, 使绵羊正常走动。手术后 12 周处死动物。

[0424] 材料与方法

[0425] 生物力学试验

[0426] 收获分配用于生物力学试验的动物肩部, 剥去所有肌肉系统, 同时保留肱骨 - 冈下肌腱构件完整。对共 51 个肩部进行了生物力学评价。在清洗后, 将样本包裹在盐水浸泡纱布中, 于 -20°C 保存直到进行生物力学试验。使用高强度聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 树脂将肱骨灌封在 2" PVC 管中。在灌封制备和生物力学试验期间, 以 15 分钟的间隔喷洒盐水, 保持样本水合。将灌封的肱骨安装在订制的试验固定装置上, 该装置与材料测试系统装载架 (MTS MiniBionix, Edan Prairie, MN) 牢固相连。设计来保护冈下肌腱的天然横切面并使软组织滑动减至最小的订制的冷冻钳以与灌封的肱骨成约 135° 的角度向构件施加单轴牵引力。这样做是模拟肌腱的生理力矢量。当与冷冻钳连接的温差电偶显示 -22°C 时开始试验, -22°C 为之前报告足以确保肌腱与冷冻钳牢牢相连的温度。

[0427] 将 3 个后向反光标记缝合或粘贴在灌封的构件上: 一个在紧近修复部位的肱骨上, 一个在修复界面近端的肌腱上, 而第三个则在冷冻钳上。3 部照相机 (Motion Analysis, Santa Rosa, CA) 记录标记在 60Hz 下的空间移动。使用照相机系统测量标记位移可供实时监测横跨肌腱套修复部位的局部组织变形。

[0428] 第一阶段: 30 次循环动力预适应

[0429] 最初采用循环载荷试验以对肌腱套修复进行预适应。在外力控制下施加 10 牛顿 (N) 预载荷 2 分钟, 之后在外力 - 控制方案中, 在 0.25Hz 下以 10-50N 对将修复的构件进行循环预适应 60 次循环以达到稳定状态。我们实验室的预实验表明位移相对于时间曲线的斜率在 50 和 60 次循环之间达到可重复的稳态性能, 据此选择六十 ($n = 60$) 次循环。在循环预适应试验期间, 测定了适应性延长和峰间延长。适应性延长定义为第 1 次循环最大值和第 60 次循环最大值之间 y 位移的距离。峰间延长定义为第 58、59 和 60 次循环的局部最小值到最大值的平均值。

[0430] 第 2 阶段: 准静力破坏载荷

[0431] 在预适应后, 在位移控制下以 1mm/s 的速率对修复的构件加破坏载荷。目标生物力学参数包括破坏极限载荷和准静态刚度 (定义为载荷 - 位移曲线的斜率)。最后, 记录各样本的失效机制。适当时拍摄数字图像。

[0432] 统计分析

[0433] 应用单因素方差分析和事后 Fisher LSD 和 Tukey 检验确定治疗组 (不包括完整对照) 之间连续生物力学参数的显著性差异。显著性设定为 $p \leq 0.05$, 所有分析都用

SigmaStat 3.1 (Systat Software, Inc., San Jose, CA) 进行。

[0434] 结果

[0435] 循环预适应试验组件的原始数据参见表 12。与仅缝合和缝合+胶原基质组相比, 0.15mg/ml PDGF 和 0.30mg/ml rhPDGF-BB 组承受显著较大的适应性延长 (Tukey 检验: $p \leq 0.024$; Fisher LSD: $p \leq 0.003$)。图 16A。在任何组之间峰间延长没有显著性差异 ($p = 0.111$, 图 16B)。

[0436] 表 12: 循环预适应分析的数据一览。数据用平均值 $\pm$ S. E. M 报告。

处理	n	适应性延长			峰间延长		
		(mm)			(mm)		
仅缝合	9	0.510	$\pm$	0.058	0.765	$\pm$	0.056
缝合+胶原基质+缓冲液	9	0.492	$\pm$	0.086	0.729	$\pm$	0.055
[0437] 缝合+胶原基质+ 0.15 mg/ml PDGF	9	1.069	$\pm$	0.103	0.908	$\pm$	0.051
缝合+胶原基质+ 0.30 mg/ml PDGF	9	0.971	$\pm$	0.119	0.841	$\pm$	0.028
缝合+胶原基质+ 1.0 mg/ml PDGF	9	0.689	$\pm$	0.133	0.913	$\pm$	0.086
iCTL	6	0.070	$\pm$	0.017	0.354	$\pm$	0.030

[0438] 生物力学试验从递增至破坏组件的原始数据参见表 13。与仅缝合组相比, 0.15mg/ml 和 0.30mg/ml rhPDGF-BB 的修复增强分别引起破坏载荷增加 63.7% 和 63.3% (Tukey 检验: $p = 0.176$; Fischer LSD: $p = 0.029$; Tukey 检验: $p = 0.181$; Fisher LSD: $p = 0.030$, 图 17A)。此外, 破坏载荷数据表明, 较低的 rhPDGF-BB 剂量 0.15mg/ml 和 0.30mg/ml 优于 1.0mg/ml PDGF 的较高剂量, 表现在破坏载荷分别提高 120% 和 119.3% ($p = 0.023$ 和 $p = 0.023$ (Fisher: $p = 0.003$))。组间未发现构件刚度有统计性差异 ($p = 0.254$, 图 17B)。与仅缝合组相比, 0.15mg/ml 和 0.30mg/ml rhPDGF-BB 组中的构件在失效时具有显著较大的延长 (分别为 $p \leq 0.018$ 和 $p \leq 0.024$)。Fisher LSD 表明, 0.15mg/ml 和 0.30mg/ml PDGF 组比缝合+胶原基质缓冲液组的显著延长 (分别为 $p = 0.015$ 和 $p = 0.011$)。0.15mg/ml、0.30mg/ml 或 1.0mg/ml rhPDGF-BB 组间, 在失效时未发现延长差异 ($p \geq 0.054$)。

[0439] 表 13: 递增至破坏试验的数据一览。数据用平均值 $\pm$ S. E. M 报告。

[0440]

治疗	n	最大力 (N)	总刚度 (N/mm)	最大延长 (mm)
仅缝合	9	910.39 $\pm$ 156.13	131.41 $\pm$ 14.23	8.96 $\pm$ 0.62
缝合+胶原基质+缓冲液	9	1120.36 $\pm$ 157.43	157.33 $\pm$ 18.99	10.16 $\pm$ 1.01
缝合+胶原基质+ 0.15 mg/ml PDGF	9	1490.51 $\pm$ 224.51	134.44 $\pm$ 15.53	15.17 $\pm$ 0.98
缝合+胶原基质+ 0.30 mg/ml PDGF	9	1486.59 $\pm$ 228.95	147.47 $\pm$ 13.71	15.38 $\pm$ 2.35
缝合+胶原基质+ 1.0 mg/ml PDGF	9	677.75 $\pm$ 105.94	104.25 $\pm$ 21.36	11.48 $\pm$ 1.34
iCTL	6	4211.61 $\pm$ 229.57	300.31 $\pm$ 17.68	16.79 $\pm$ 1.30

[0441] 对于仅缝合、缝合+胶原基质+缓冲液和缝合+胶原基质+1.0mg/ml rhPDGF-BB 治疗组, 每个样本的构件破坏表现在肱骨上附着部位的中间物质组织失效。在这 3 个组的任

何 ($n = 27$) 肌腱中未观察到肱骨撕脱性失效。相比之下, 0.15mg/ml rhPDGF-BB 和 0.30mg/ml rhPDGF-BB 治疗组中的失效方式是混合型的, 表现为肱骨上附着部位的中间物质组织失效或伴有一些骨撕脱的中间物质组织失效。具体地讲, 在 0.15mg/ml rhPDGF-BB 组中, 9 个肩中的 6 个 (66.7%) 显示某种程度的骨撕脱, 而在 0.30mg/ml rhPDGF-BB 组中, 9 个肩中的 5 个肩 (55.6%) 显示某种程度的骨撕脱。完整对侧构件的失效表现在肱骨中间骨干折断 ($n = 5$) 或肱骨冈下肌腱附着部位的骨撕脱 ($n = 1$)。

[0442] 结论

[0443] 在绵羊模型中, 与仅缝合、缝合 + 胶原基质 + 缓冲液和缝合 + 胶原基质 + 1.0mg/ml rhPDGF-BB 组相比, 用 0.15mg/ml 和 0.30mg/ml rhPDGF 3 个月后肱骨冈下肌腱再附着增强提高了机械功能。较低剂量的 rhPDGF-BB 的生物力学完整性提高表现为破坏载荷比仅缝合组的破坏载荷增加 63%, 比 1.0mg/ml rhPDGF-BB 组的破坏载荷增加 120%。本文报告的数据支持对肌腱套的增强作用呈剂量依赖性, 其中与 1.0mg/ml 较高剂量的生长因子相比, 较低 rhPDGF-BB 剂量引起较大的愈合反应。此外, 0.15mg/ml rhPDGF-BB 和 0.30mg/ml rhPDGF-BB 治疗组中的失效方式类似于在完整的未经手术的肩中连续观察到的失效方式, 因为在 0.15mg/ml rhPDGF-BB 组中, 9 个肩中的 6 个 (66.7%) 显示某种程度的骨撕脱, 而在 0.30mg/ml rhPDGF-BB 组中, 9 个肩中的 5 个肩 (55.6%) 显示某种程度的骨撕脱。这种研究结果表明, 在 12 周愈合期间, 较低剂量的 PDGF (例如 rhPDGF-BB) 促进肱骨粗隆 (humeral tuberosity) 的更大肌腱整合 (tendinacious integration), 且较低剂量的 PDGF 更适于增强肌腱套修复。

[0444] 实施例 13: 绵羊模型中使用 rhPDGF-BB 和 I 型牛胶原基质进行肌腱套修复: 组织学结果

[0445] 本研究被设计来评价重组人血小板衍生生长因子-BB (rhPDGF-BB) 结合 I 型牛胶原基质促进绵羊肌腱套附着部的愈合和再生的疗效。肌腱套损伤的最适愈合包括肌腱在原有附着部位 (肌腱“足印部位”) 上重新附着在骨上。在肌腱纤维未重新附着在骨上的情况下, 愈合部位被认为比原来的附着“弱”, 可能限制功能并且再损伤的可能性更大。之前的研究报告了在肌腱套修复后失效率相对较高 (参见例如 Boileau P. 等, J Bone Joint Surg Am, 87:1229-1240 (2005); Galatz L.M. 等, J. Bone Joint Surg Am., 86:219-224 (2004)); Gazielly D.F., Clin. Orthop Relat Res, 304:43-53 (1994)); Gerber C.J. 等, Bone Joint Surg Am, 82:505-515 (2000); 以及 Harryman D.T. 等, J. Bone Joint Surg Am, 73:982-989 (1991)), 这被假设为是由不同因素引起的 (参见例如 Goutalier D. 等, Clin Orthop, 304:78-83 (1994); Gerber C. 等, J Bone Joint Surg Br, 76:371-380 (1994); Warner J.P. 等, J Bone Joint Surg Am, 74:36-45 (1992))。研究指出, 肌腱组织质量和肌腱-骨愈合是造成肌腱套修复失效的两个最重要的因素, 而且研究提出了递送生长因子或细胞增强肌腱-骨愈合是使这些损伤愈合达到最优的方法 (参见例如 Gamradt S.C. 等, Tech in Orthop, 22:26-33 (2007) 和 Dovacevic D. 等, Clin. Orthop Relat Res, 466:622-633 (2008))。PDGF-BB 是充分表征的已知对间充质来源的细胞 (包括骨细胞 (成骨细胞) 和肌腱细胞 (腱细胞)) 有趋化性 (细胞迁移) 和促有丝分裂 (细胞增殖) 的创伤愈合蛋白。另外, 已经证实, PDGF-BB 上调血管内皮生长因子 (VEGF), 导致血管生成 (血管重建) 增加, 这是成功的再生过程所必不可少的。本研究的目的是利用生物力学和组织学结

果测量值,确定在肌腱修复的部位 rhPDGF-BB 以及 I 型牛胶原基质增加和改善肌腱再附着的功效。

[0446] 研究设计

[0447] 本研究包括共 17 只骨骼成熟绵羊。动物进行手术剥离,接着使用缝线穿过骨通道,立即将右冈下肌腱与肱骨大结节再附着。在第一部分的实验中,实验动物 ($n = 3$) 在腱-骨界面接受 I 型胶原载体以及 20mM 乙酸钠 (乙酸盐) 缓冲液中的浓度为 0.15 ($n = 3$) mg/ml 或 0.3 ($n = 3$) mg/ml 的 rhPDGF-BB。所有动物的存活时间为 12 周。治疗分配参见表 14。

[0448] 表 14:分配进行组织学测定的样本

[0449]	治疗组	动物(n)	存活时间 (周)	rhPDGF-BB 剂量	终点
	缝合+胶原基质+ 0.15 mg/ml rhPDGF-BB	3	12	0.15 mg/ml	组织学
	缝合+胶原基质+ 0.3 mg/ml rhPDGF-BB	3	12	0.3 mg/mL	组织学

[0450] 在第二部分的实验中,实验动物 ($n = 3/\text{组}$) 在腱-骨界面上接受 I 型胶原载体 (胶原基质) 以及 20mM 乙酸钠 (乙酸盐) 缓冲液中的浓度为 1.0mg/mL 的 rhPDGF-BB 或单独的胶原基质。表 15。

[0451] 表 15:分配进行组织学评价的样本

[0452]	治疗	样品大小
	仅缝合	n=3
	缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液	n=3
	缝合+胶原基质+ rhPDGF-BB (1.0 mg/ml)	n=3
	完整对照	n=2
	用于组织学评价的样本总数	n=11

[0453] 组织收获和修整

[0454] 愈合 12 周后将动物人道地处以安乐死,收获经过手术的 (右) 肩,置于 10% 中性缓冲福尔马林中进行组织处理。使用肌腱解剖刀和肱骨金刚石刀片锯 (Exakt Technologies, Oklahoma City, OK),将每个肩经过冈下肌腱及其肱骨附着部位切成前半部和后半部。在修整期间拍摄每个样本的数字图像。一半 (前半部或后半部) 加工用于脱钙组织学分析;另一半加工用于未脱钙组织学分析。

[0455] 脱钙组织处理

[0456] 对前半部或后半部任一个进行处理用于脱钙组织学分析,并包埋在石蜡中。采用标准石蜡组织学技术和设备 (Sakura Tissue TEK V.I.P.Processor, Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA and Shandon Histocentre 2, Thermo Shandon, Inc, Pittsburgh, PA),

将样本固定,脱钙,脱水,脱色,浸蜡和包埋。将石蜡块削平,并在Shandon Finesse轮转切片机(Thermo Shandon, Inc, Pittsburgh, PA)上切成约 $8\mu\text{m}$ 切片。以约250微米的空间厚度增量,从各肩获得了5个组织学切片。采用Image Pro Imaging系统(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)、Nikon E800显微镜(AG Heinze, Lake Forest, CA)和Spot数字照相机(Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI)和具有扩充内存能力的Pentium IBM型计算机(Dell Computer Corp., Round Rock, TX),对整个染色载玻片和目标区域逐个视野地获取高分辨数字图像。

[0457] 半定量组织病理学

[0458] 按照分级标准,对所有组织切片进行评分,以评价肌腱回缩(如有的话)的程度、评价修复/愈合组织、肌腱骨界面、组织对治疗的反应、血管生成、炎症、胶原取向/纤维排列和交错排列及附着部位处穿通纤维的存在。首先在对处理不知情的情况下对切片进行了评价,并评价了相互比较的整体愈合,得到愈合分值。对于各分值的标准描述参见表16。还采用Image Pro Plus成像系统(Media Cybernetics, Silver Spring, MD),通过标准化整体数字图像,测定了肌腱回缩(如有的话)的程度。

[0459] 表16:愈合分值的描述

[0460]	愈合分值	描述
	高:	大部分胶原纤维呈原初排列,胶原纤维密度较高,存在一些穿通纤维
	中:	一些胶原纤维呈原初排列,胶原纤维密度中等,存在一些穿通纤维
	低:	少量胶原纤维呈原初排列,胶原纤维密度较低并且取向普通,存在少量穿通纤维或无穿通纤维

[0461] 结果

[0462] (i)

[0463] 在第一部分实验中(胶原基质+0.15mg/ml rhPDGF-BB或0.3mg/ml rhPDGF-BB),不论如何处理,所有手术样本在愈合12周后都具有一定程度的肌腱回缩。平均起来,对于0.15mg/ml rhPDGF-BB剂量组,冈下肌腱从骨槽回缩为 $41.8 \pm 3.5\text{mm}$ (平均值 $\pm$ 标准差),对于0.3mg/ml rhPDGF-BB剂量组回缩为 $45.2 \pm 8.9\text{mm}$ 。

[0464] 在第一部分实验中,通过处理取平均的组织病理学评分参见表17;这些结果的图示参见图18。在愈合12周后,在6个样本中有4个观察到缝线在骨通道内保持完整,这就表明引起肌腱回缩的失效发生在缝线-肌腱界面,而不是骨-缝线界面。

[0465] 总的来说,不论处理如何,肱骨和天然肌腱末端的修复组织包括纤维血管组织(高度血管化的纤维性组织),其具有活跃的纤维组织形成,并存在密度适中的可极化胶原纤维。在处理之间未观察到成纤维细胞密度的差异。所有样本都显示平行于原肌腱的原初胶原纤维排列和不太规则纤维的小袋。处理组间的平均胶原纤维取向和纤维密度类似。

[0466] 表17:按处理分类的组织病理学分值和求平行值

[0467]

处理		肌腱最终位置 1=肌腱与肱骨附着 2=肌腱略微回缩 3=肌腱完全回缩	炎性细胞 0=无 1=一些 2=许多	血管生成 0=无 1=一些 2=大量	骨-肌腱界面(肌腱与骨之间交错/穿通纤维) 0=0%肌腱-骨附着区整合 1=25%肌腱-骨附着区整合 2=50%肌腱-骨附着区整合 3=75%肌腱-骨附着区整合	胶原纤维取向 0=无 1=一些 2=大部分 3=全部	胶原纤维密度 1=低 2=中 3=高
0.15 mg/ml rhPDGF-BB	平均值	3.0	0.8	2.0	1.6	1.7	2.5
	标准差	0.0	0.2	0.0	0.5	0.6	0.0
0.3 mg/ml rhPDGF-BB	平均值	3.0	0.9	2.0	1.4	1.8	2.1
	标准差	0.0	0.3	0.0	1.5	0.2	0.3

[0468] 在再生的附着部位,所有样本都观察到修复性肌腱组织的胶原穿通纤维直接与骨胶原附着和交错或通过纤维软骨层与骨胶原附着和交错。观察到交错排列平均超过总的剥离骨表面的约 30-40%,此观察结果在所有治疗组中均一致。在经过手术的样本中观察到的穿通纤维比完整对照更不成熟;然而,这些再生的纤维与骨下面的胶原有附着和连续性。在少数情况下,在经手术的肩中观察到部分原有的天然肌腱附着部位。

[0469] 在大多数样本中,在原有附着部位的去皮质区观察到骨表面的之前的破骨细胞吸收。其通过有圆齿的骨表面(吸收腔隙)(其中破骨细胞不再存在)或者有圆齿的嗜碱性反转线(reversal line)(其中表面被新的骨组织覆盖)来识别。通常,之前吸收的区域被一层其中存在成骨细胞的反应性编织骨覆盖。反应性骨常常具有穿通纤维附着。吸收程度是可变的。不论如何处理,存在超过约 10-50%的总骨表面,且通常被新的编织骨覆盖。在修复组织中偶尔观察到反应性编织骨和/或纤维软骨岛。

[0470] 在所有样本中,在愈合组织内观察到轻微的异物炎症,并主要集中在缝合材料附近。在少数情况下,在修复组织内观察到单核细胞炎症的小袋,可能与血管生成或病灶损伤组织有关。炎症主要为单核细胞与多核巨细胞炎症。通常未观察到嗜中性粒细胞。不论如何处理,在所有样本中都观察到在愈合组织内存在大量血管生成。在少数样本中还观察到表明新血管产生的成血管细胞增殖,并且与具体处理无关。这种增殖很可能是由与愈合过程有关的正在进行的适应性改变所致。

[0471] 已知脂肪渗入是肌腱套肌腱撕裂的结果,并证实与肌腱回缩的程度有关(Nakagaki 等, J. Clin Orth Rel Res(2008) 和 Björkenheim J.M. 等, Acta Orthop Scand. 60(4):461-3(1989)。在少量样本中,在邻近肌肉的外周组织中观察到脂肪渗入。这只是在在一个样本(0.3mg/ml rhPDGF-BB 剂量)的修复组织中心观察到。

[0472] (ii)

[0473] 在第二部分的实验中(缝合、缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液、缝合+胶原基质+rhPDGF-BB 或完整对照),对于仅缝合组,冈下肌腱从骨槽回缩 $28.1 \pm 2.8\text{mm}$,对于缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液组回缩 $39.0 \pm 4.6\text{mm}$,对于缝合+胶原基质+rhPDGF-BB 组回缩

40.9±8.3mm。

[0474] 在愈合 12 周后,所有样本的缝线在骨通道内都保持完整,这就表明引起肌腱回缩的失效发生在缝线-肌腱界面,而不是骨-缝线界面。处理组内和处理组间的愈合是可变的。就处理组的最优愈合到最差愈合范围内的样本而言,仅缝合组的愈合的可变性最大。缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液样本的评分范围为中/高至中/低愈合,缝合+胶原基质+rhPDGF-BB 样本的范围为中/低至低愈合。在任何染色组织学载玻片中未观察到处理物本身。各组所有样本愈合分值参见表 18,愈合分值排列为从最优愈合至最差愈合。

[0475] 表 18:各样本的愈合分值

样本	治疗	愈合分值
BS32	仅缝合	高
BS12	缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液	中/高
BS11	仅缝合	中
BS13	缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液	中
[0476] BS9	缝合+胶原基质+rhPDGF-BB	中/低
BS24	缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液	中/低
BS30	缝合+胶原基质+rhPDGF-BB	中/低
BS19	缝合+胶原基质+rhPDGF-BB	低
BS6	仅缝合	低

[0477] 按处理取平均值的组织病理学评分参见表 19 和图 19。总的来讲,不论如何处理,肱骨和天然肌腱末端之间的修复组织包括纤维血管组织(高度血管化的纤维性组织),其具有活跃的纤维组织形成,并存在可极化胶原纤维。在各处理之间未观察到成纤维细胞密度的差异。一些样本具有原初胶原纤维排列的区域(其胶原排列平行于原有肌腱纤维的排列),而其它的则没有;大多数样本具有有序的和无序的胶原纤维排列两者的区域。总的说来,在骨表面附近的胶原排列优于回缩肌腱末端附近的排列。

[0478] 表 19:按处理分类的组织病理学评分和求平均值

[0479]

处理		肌腱最终位置 1=肌腱与肱骨附着 2=肌腱略微回缩 3=肌腱完全回缩	炎性细胞 0=无 1=一些 2=许多	血管生成 0=无 1=一些 2=大量	骨-肌腱界面(肌腱与骨之间 交错/穿通纤维,增量 0.25) 0=0%肌腱-骨附着区整合 1=25%肌腱-骨附着区整合 2=50%肌腱-骨附着区整合 3=75%肌腱-骨附着区整合 4=100%肌腱-骨附着
仅缝合	平均值	3	1	2	0.4
	标准差	0	0	0	0.2
缝合+胶原基质+ 乙酸盐缓冲液	平均值	3	1.2	2	0.3
	标准差	0	0.2	0	0.2
缝合+胶原基质+ rhPDGF-BB	平均值	3	1	2	0.1
	标准差	0	0	0	0.1

[0480] 总的说来,在肌腱附着部观察到肌腱的胶原穿通纤维及其与骨胶原通过一层纤维软骨交错排列,但只是在非常小的区域;一般在小于 10%的骨总附着表面上观察到交错排列。在所有 3 个仅(单独)缝合样本中、在 2 个缝合+胶原基质+乙酸盐缓冲液样本中以及在所有缝合+胶原基质+rhPDGF-BB 样本中观察到小区域的穿通纤维附着。在少数情况

下,在经过手术的肩中观察到部分原有天然肌腱附着部位。

[0481] 在大多数样本中,在原有附着部位的去皮质区观察到骨表面的破骨细胞吸收。通过有圆齿的骨表面(吸收腔隙)(其中不再存在破骨细胞)或已被其它组织覆盖的表面识别。不论如何处理,吸收发生在约 10-20%的总骨表面上。在所有 3 个仅缝合样本和 1 个缝合 + 胶原基质 + 乙酸盐缓冲液样本中,在修复组织内和在骨表面上观察到反应性编织骨和/或纤维软骨。

[0482] 在所有样本中,在主要集中在缝合材料附近的愈合组织内观察到轻微的异物炎症。在少数情况下,在修复组织内观察到单核细胞炎症的小袋,可能与病灶损伤组织有关。炎症主要为单核细胞与多核巨细胞炎症。一般未观察到嗜中性粒细胞。不论如何处理,在所有样本的愈合组织中都观察到大量血管生成。不论如何处理,在少数样本中还观察到表明新血管产生的成血管细胞增殖,可能代表愈合过程中正在进行的适应性改变。

[0483] 结论

[0484] 用浸泡 rhPDGF-BB 的胶原基质增加肱骨冈下肌腱再附着并不能阻止缝合-组织界面的失效。在愈合 12 周后,在所有样本中肌腱由肱骨回缩并被修复性纤维血管组织替换,这就表明回缩发生在手术后头几周内。

[0485] 样本具有不同程度的新的骨形成、炎症、血管分布和将肌腱在插入附着部位插入骨的穿通纤维。在肌腱回缩、炎性细胞、血管生成或穿通纤维的评价中,在仅缝合、缝合 + 胶原和缝合 + 胶原 + 1.0mg/ml rhPDGF-BB 组中未观察到差异。缝合 + 胶原基质 + 0.15mg/ml rhPDGF-BB 和缝合 + 胶原基质 + 0.3mg/ml rhPDGF-BB 组的组织学切片显示增强肌腱修复和肌腱胶原与骨胶原在纤维软骨界面的交错排列附着。图 20A 和图 20B。

[0486] 除非另有定义,否则本文使用的所有术语的含义是本发明所属领域技术人员通常理解的含义。要理解的是,本发明不限于所描述的特定方法、方案和试剂,因为这些都可以改变。本领域技术人员还要理解的是,还可以使用类似或等同于本文所述方法和材料的任何方法和材料实施或验证本发明。

[0487] 本文提供的标题不是对本发明的各方面或实施方案的限制,其可供参阅整个说明书。

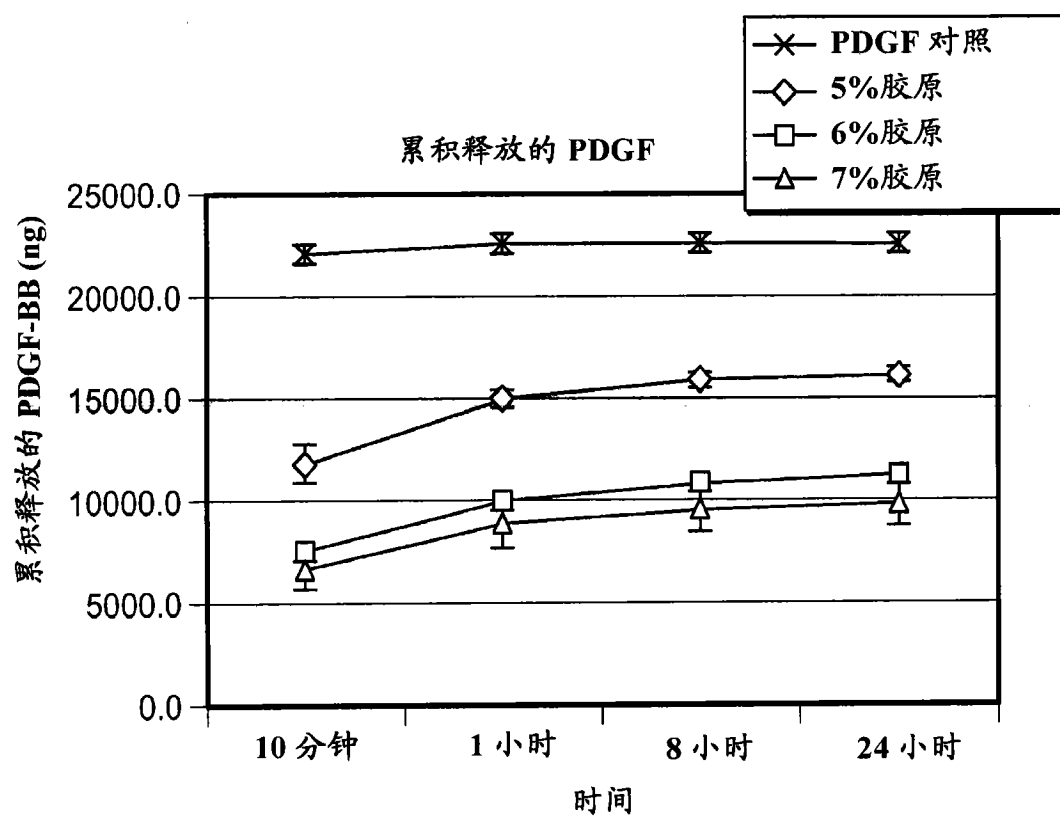


图 1

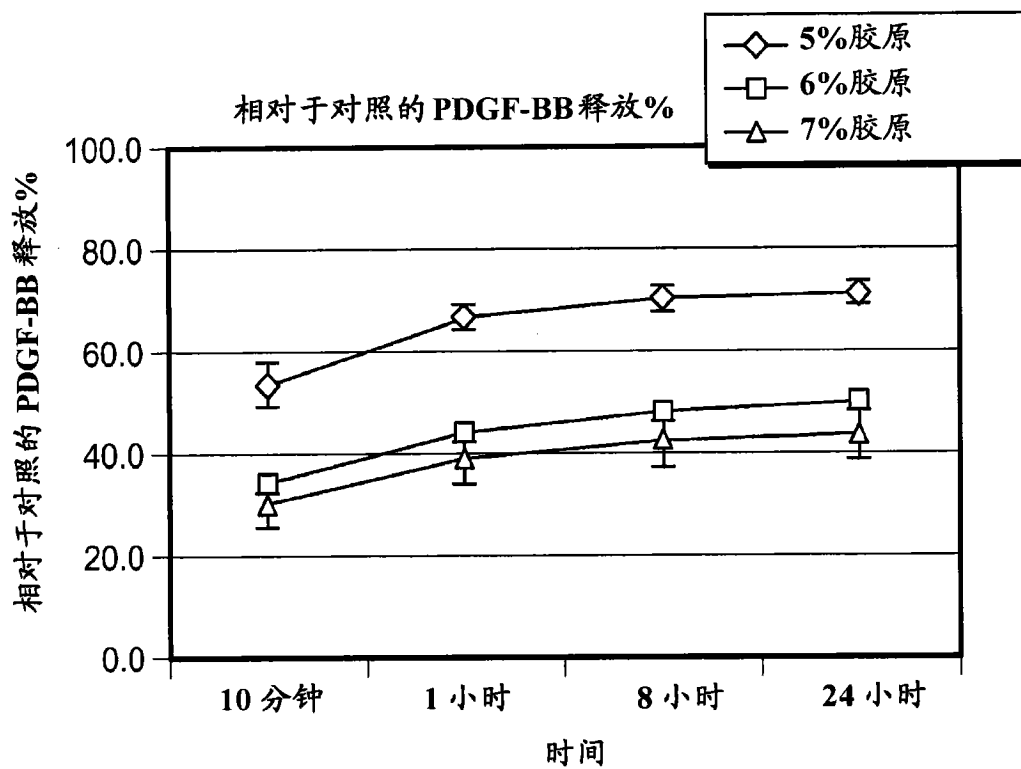


图 2

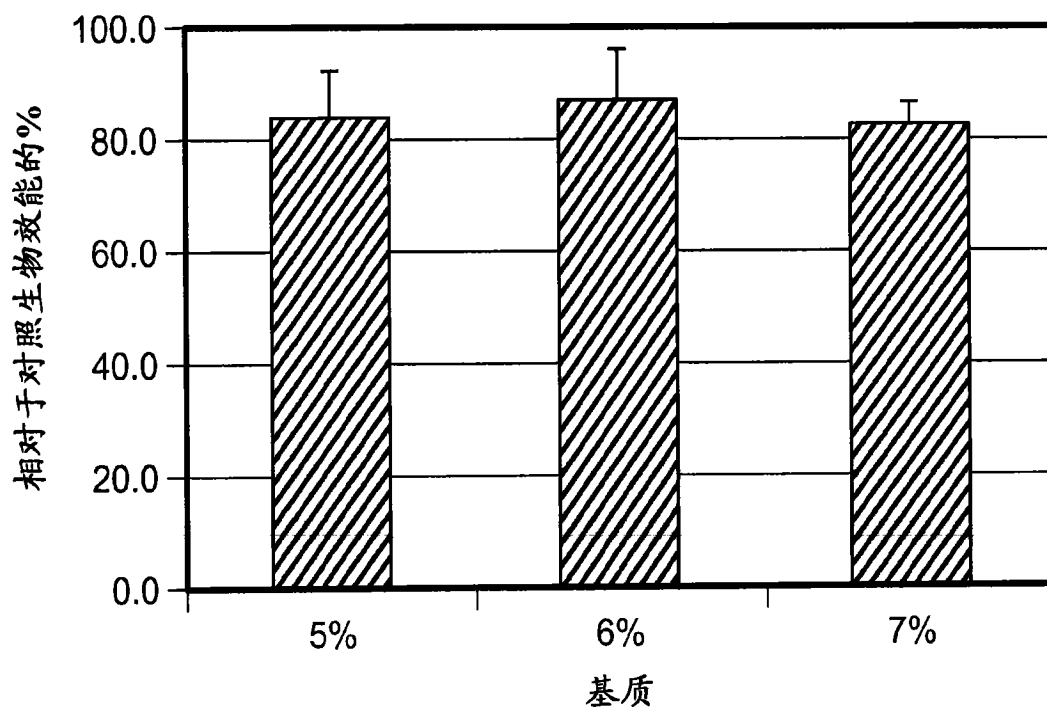


图 3

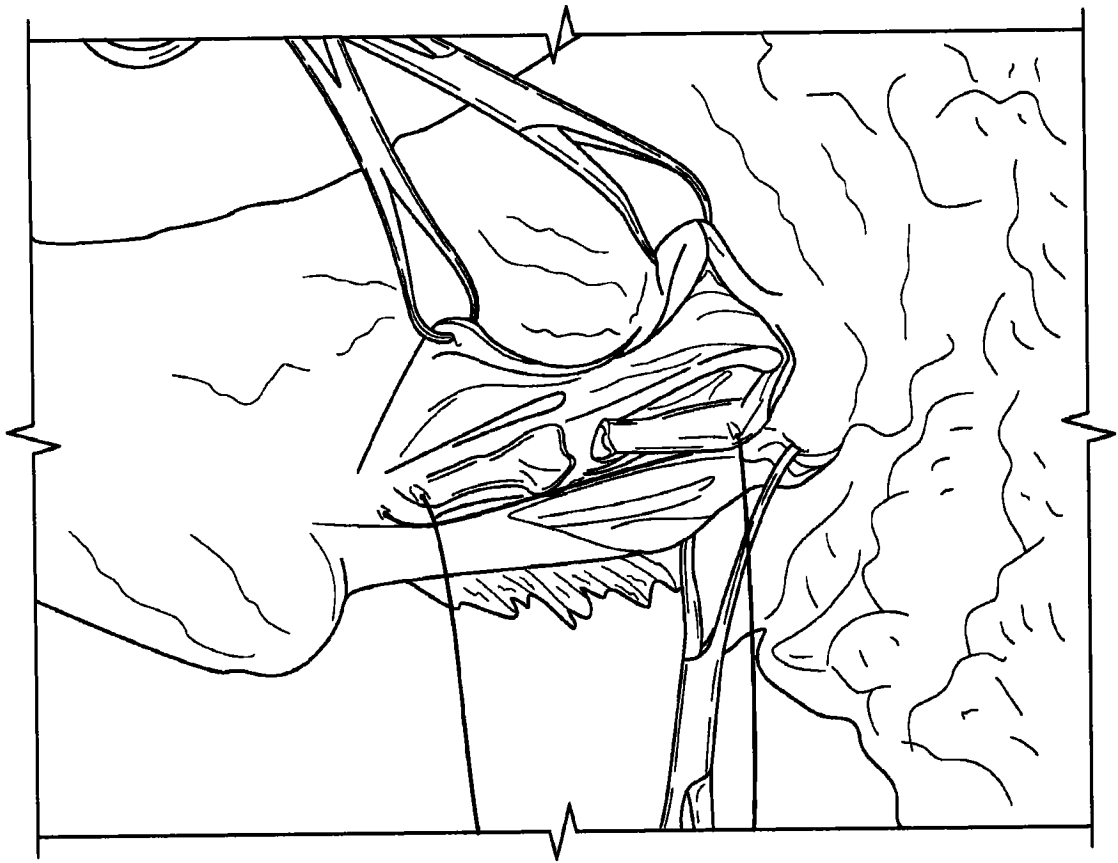


图 4

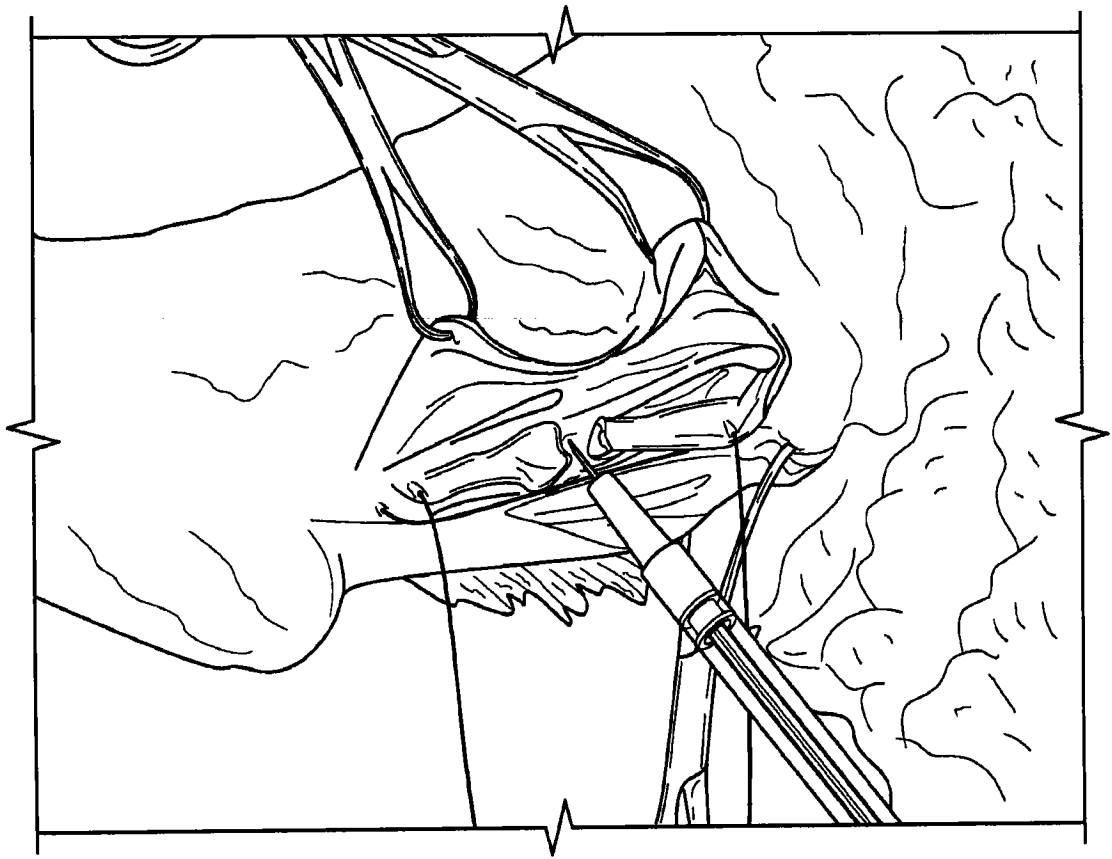
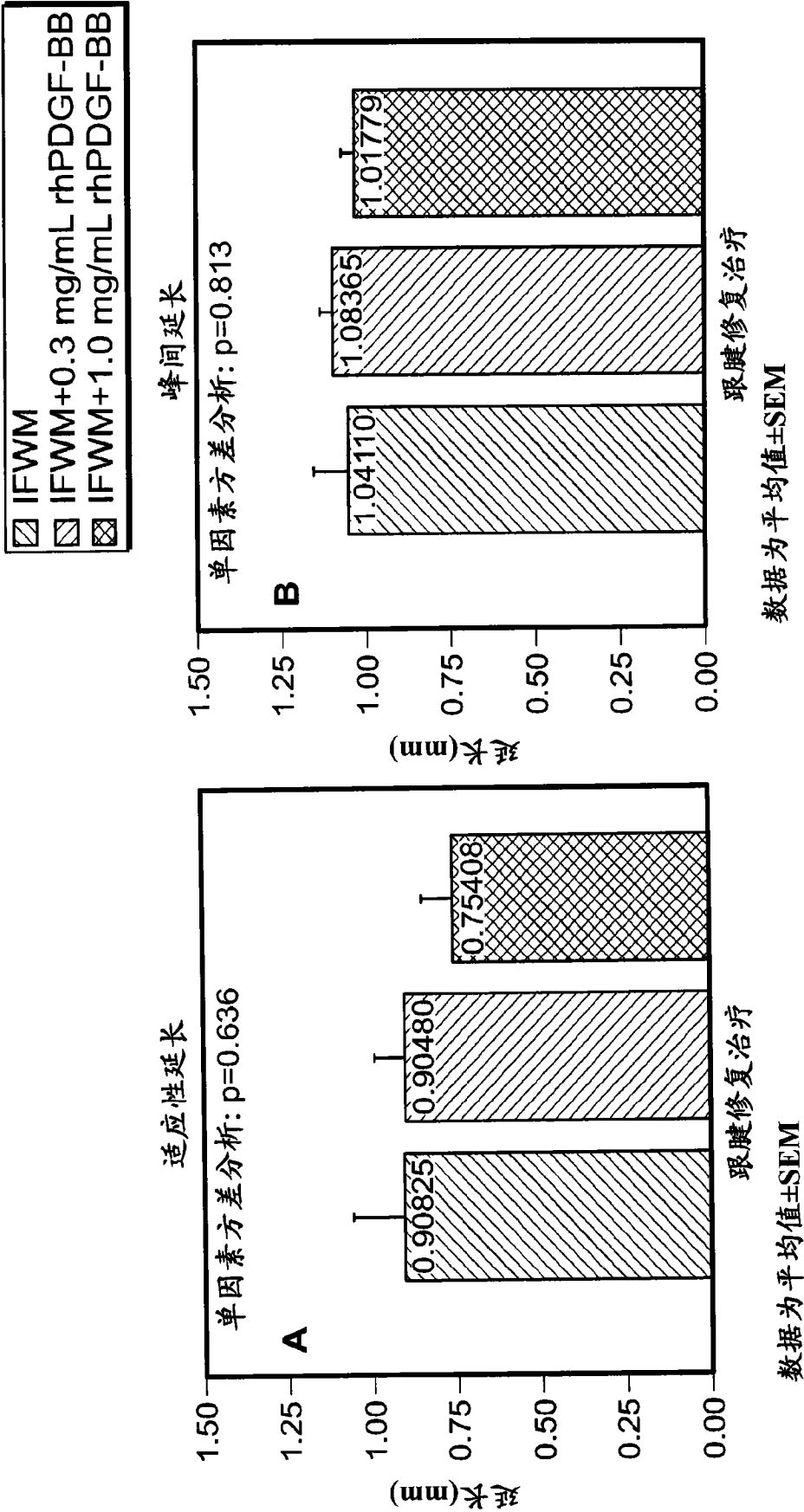
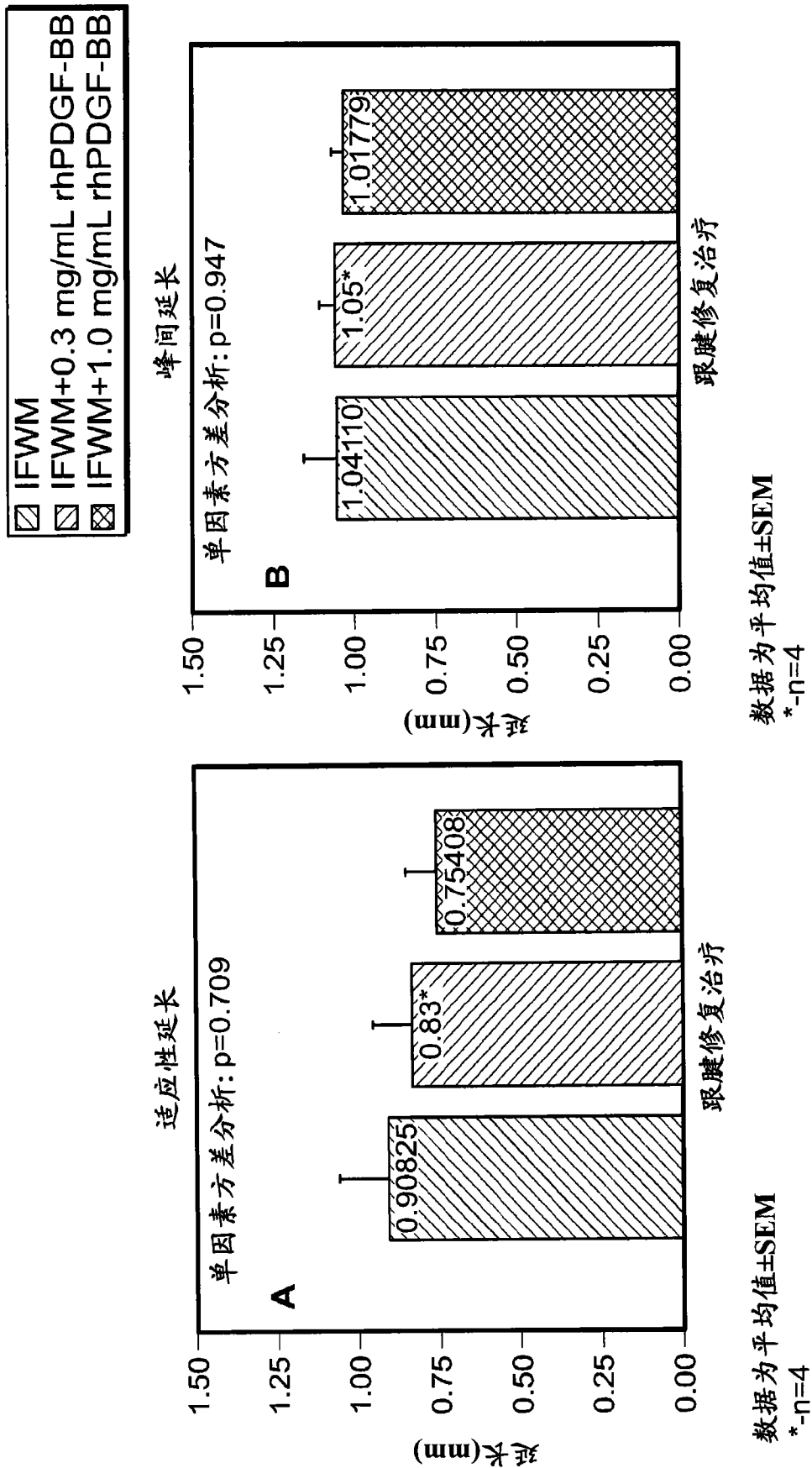


图 5

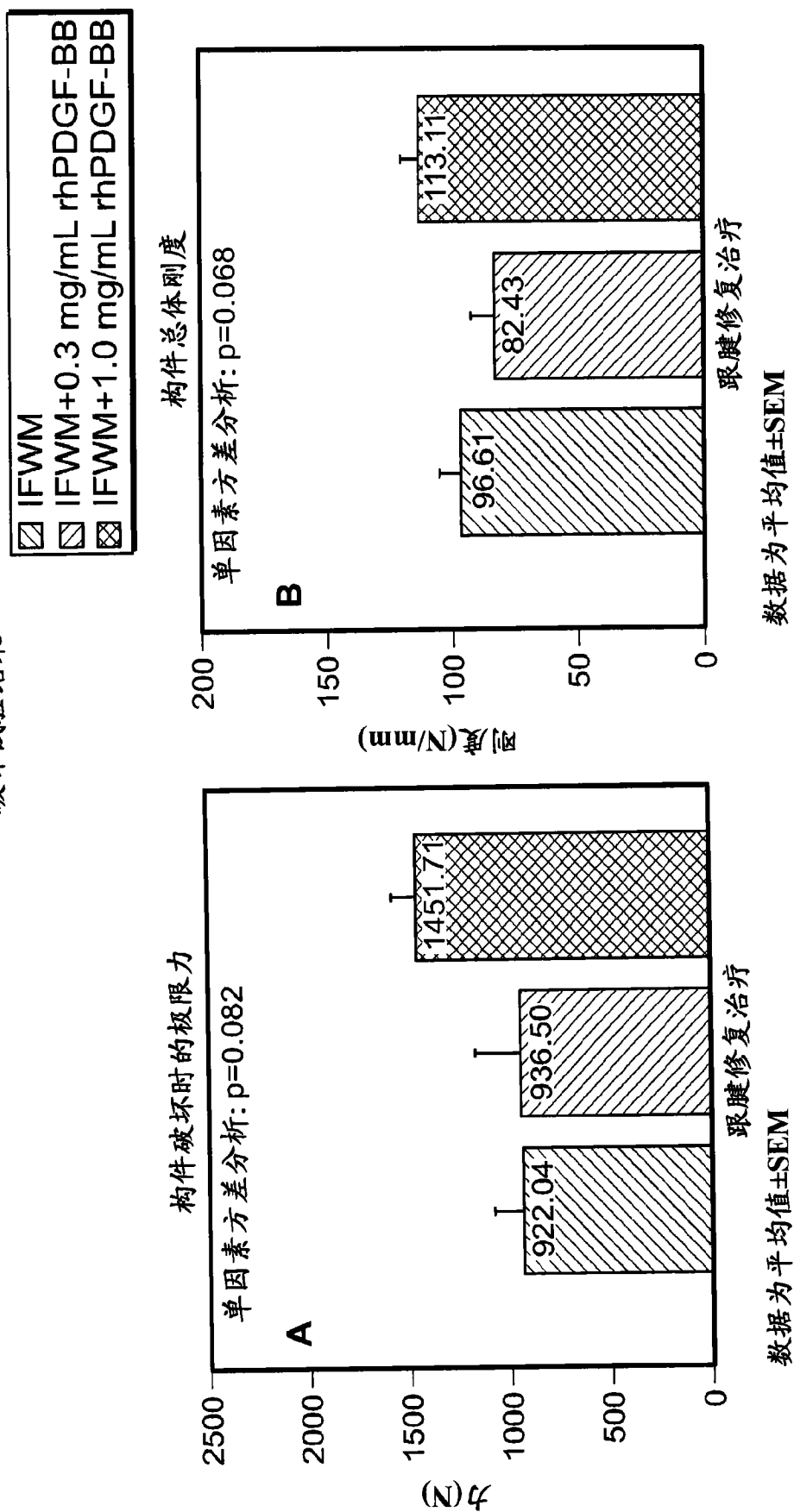
循环预适应结果



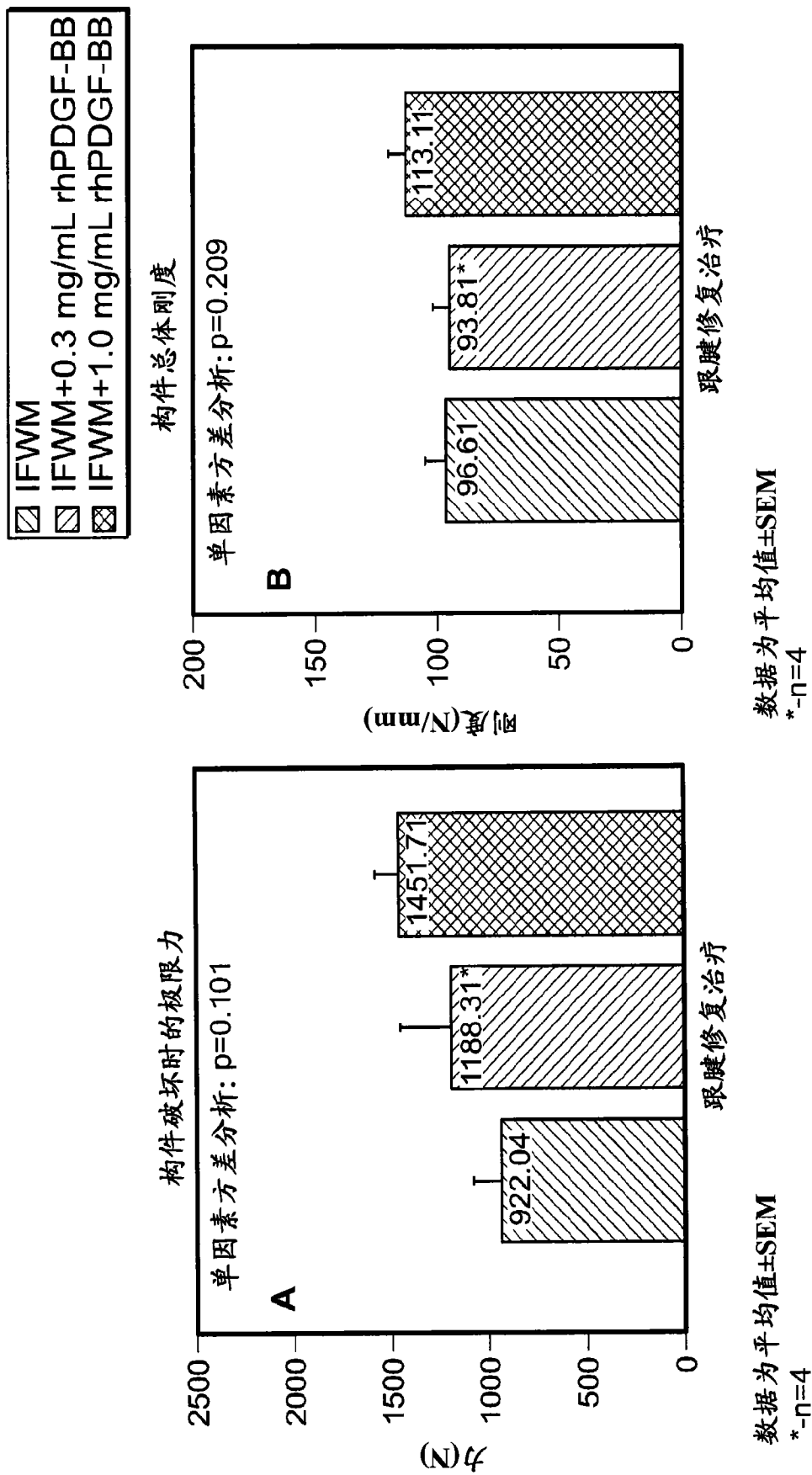
循环预适应结果



破坏试验结果



破坏试验结果



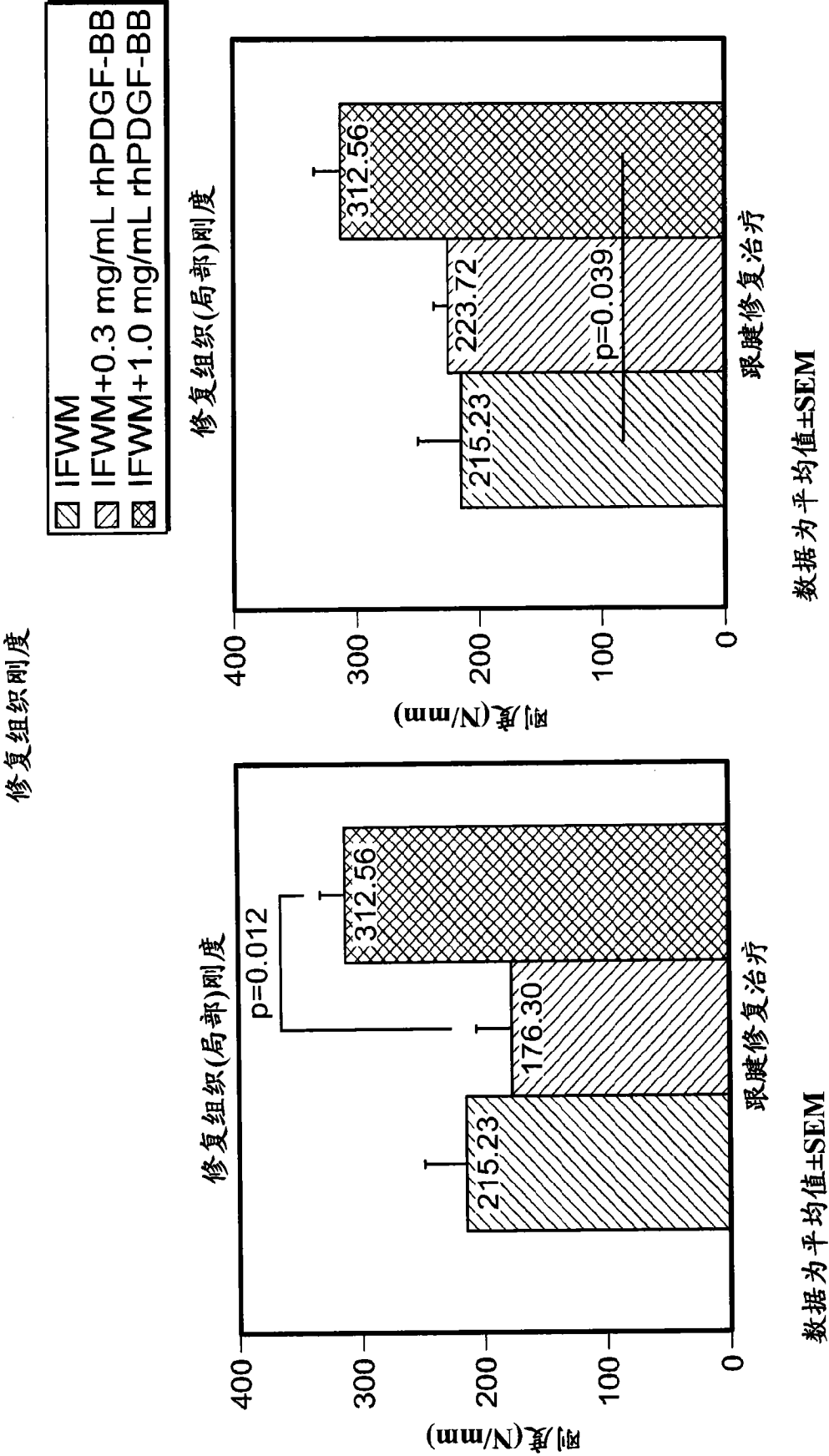


图 8

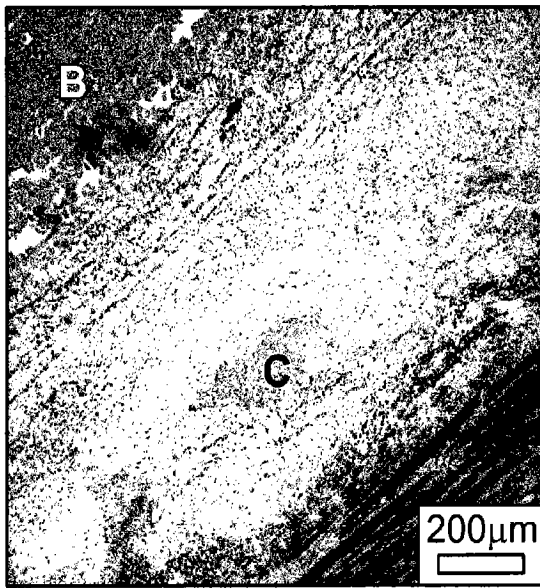


图 9A

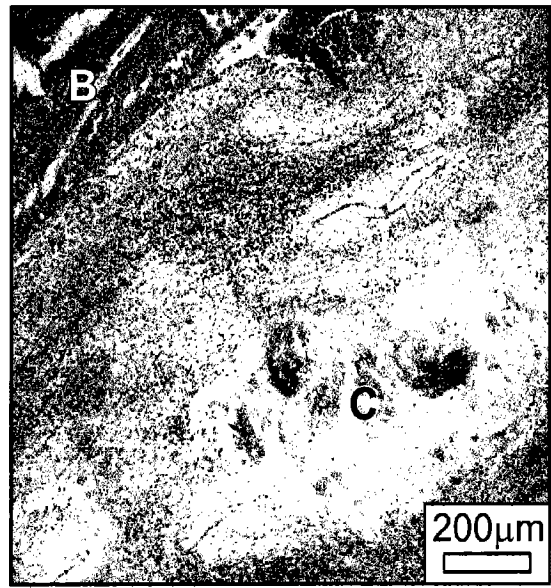


图 9B

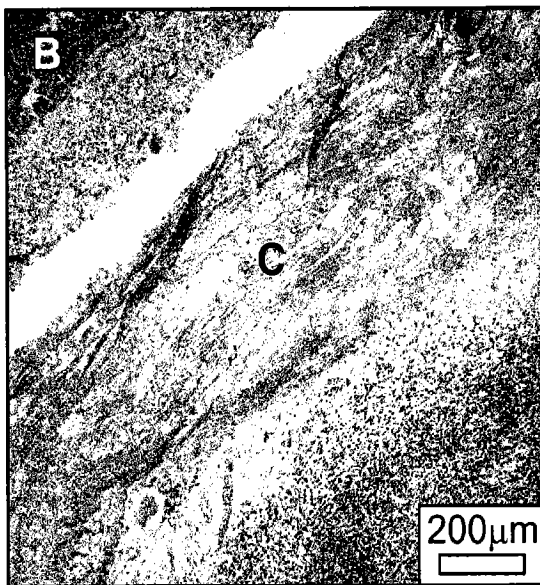


图 9C

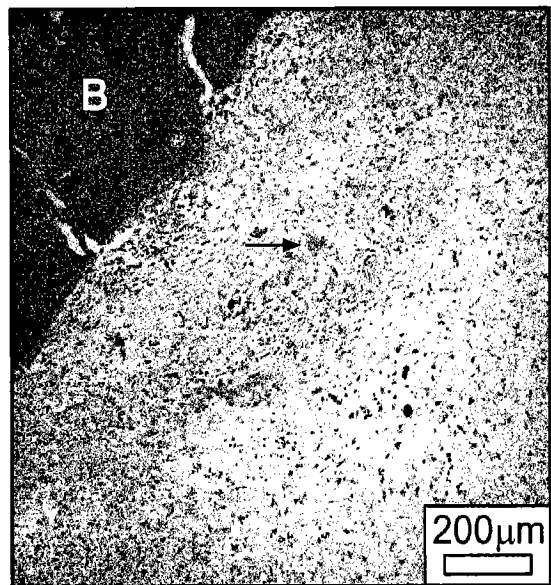


图 9D

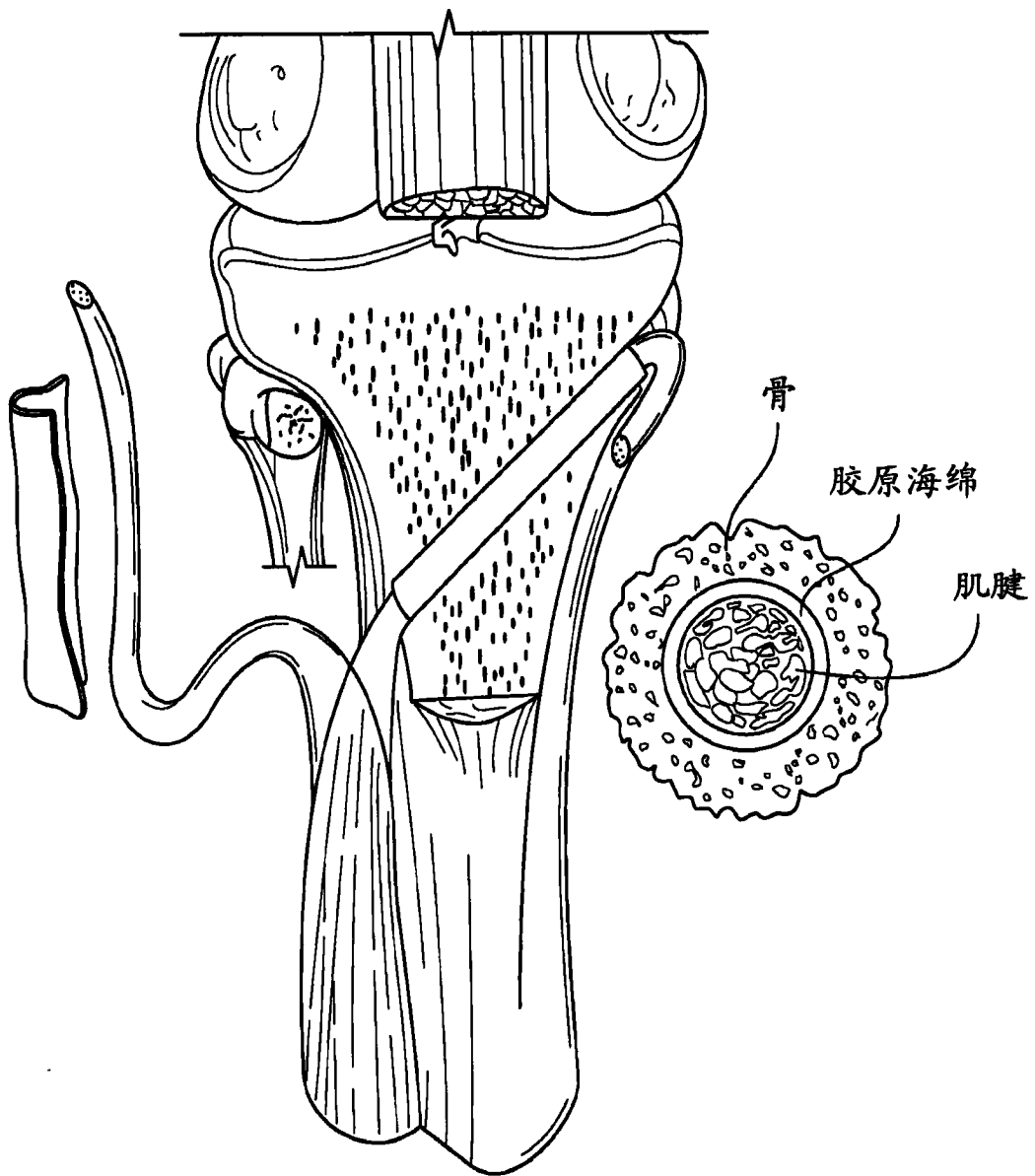


图 10

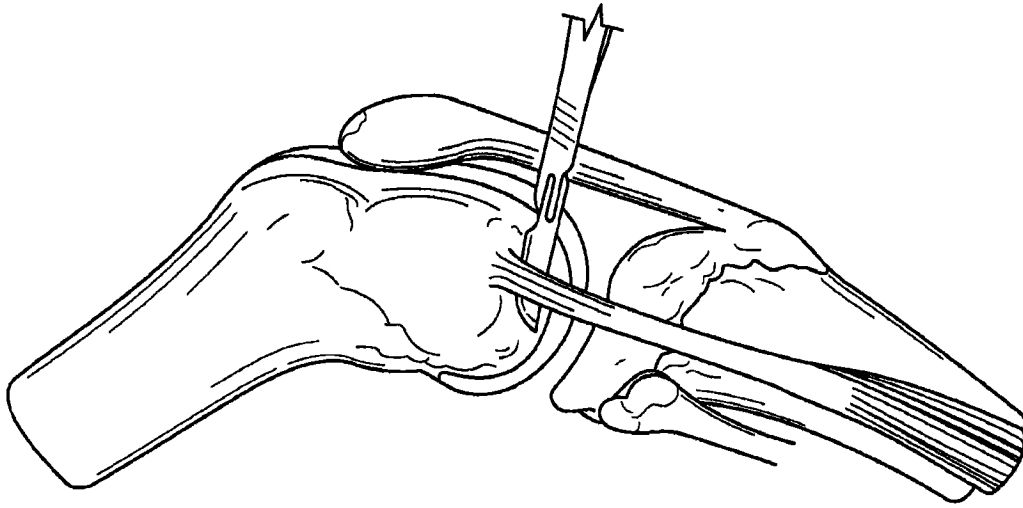


图 11A

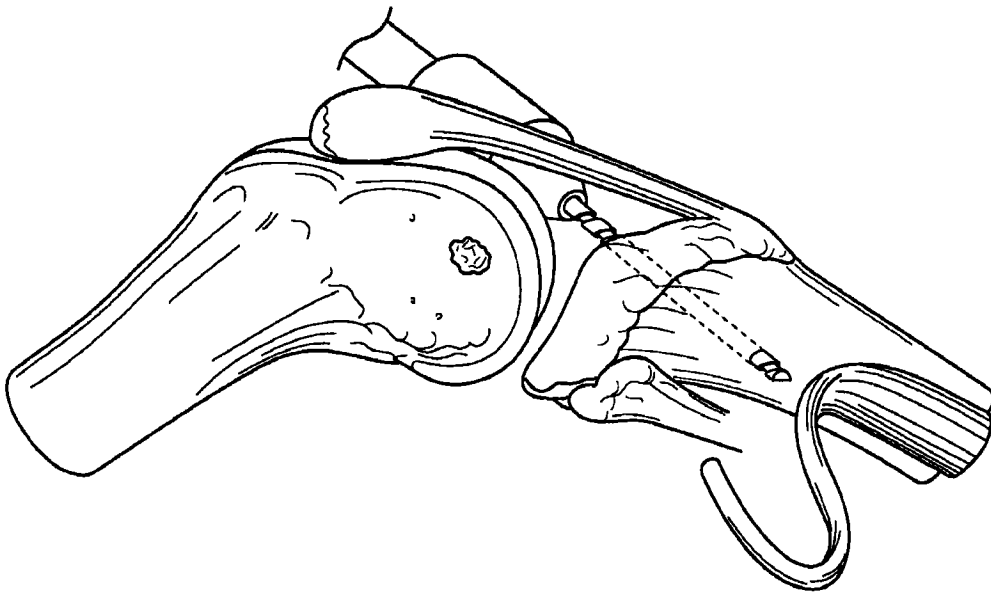


图 11B

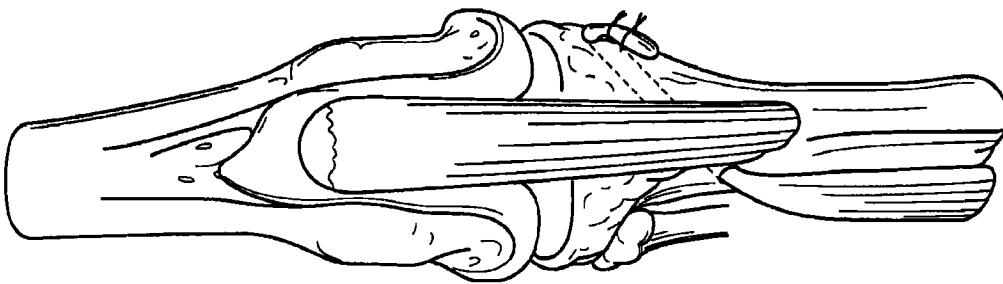


图 11C

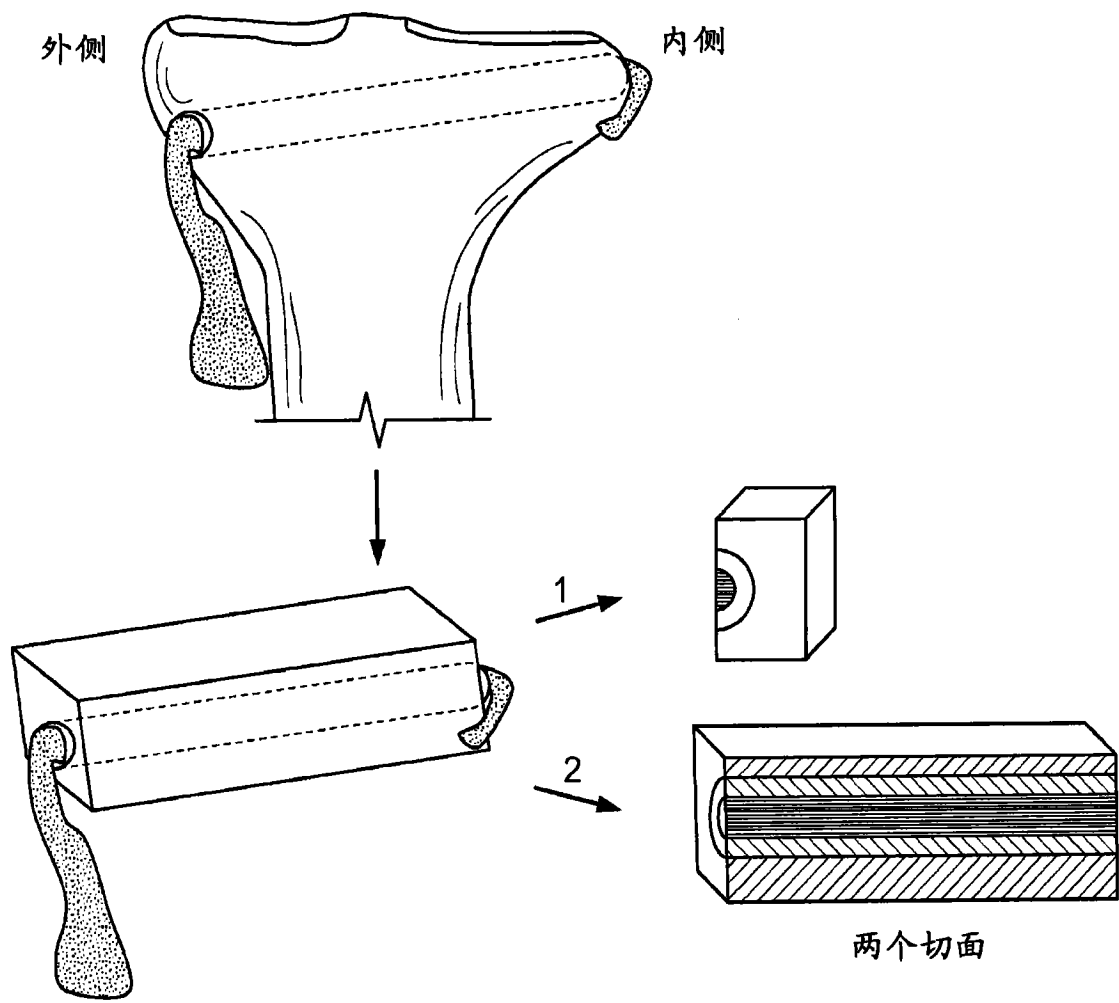


图 12

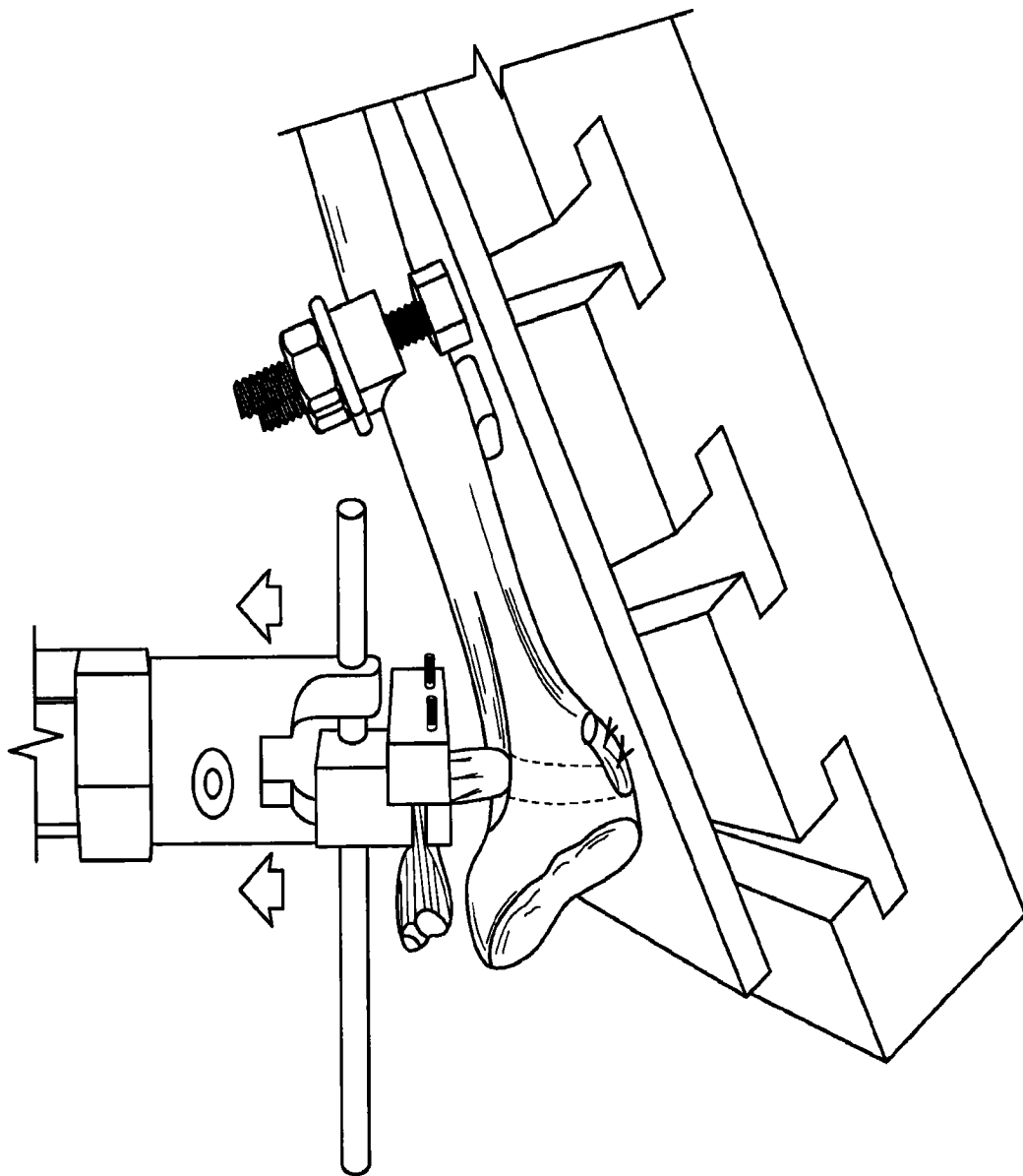


图 13

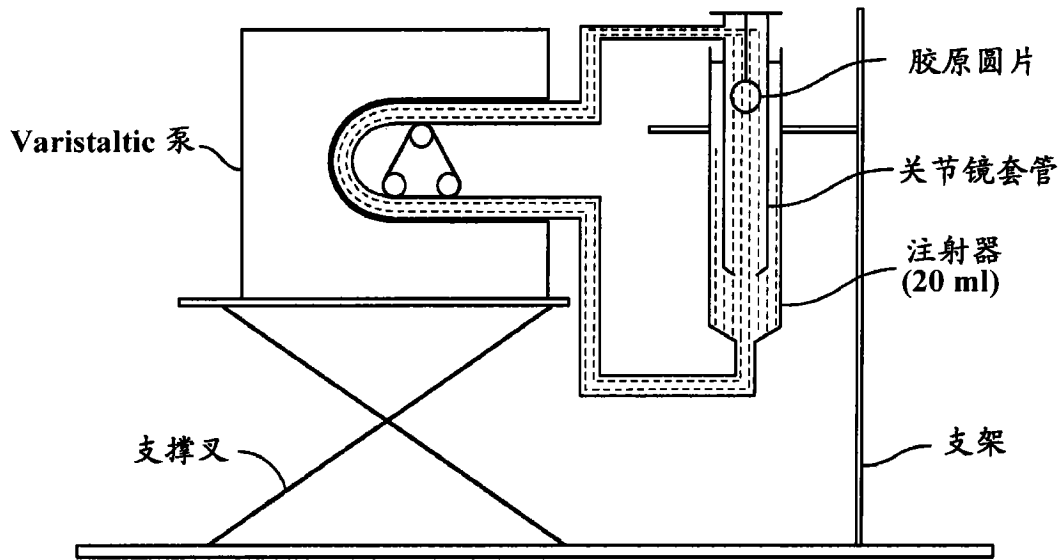


图 14

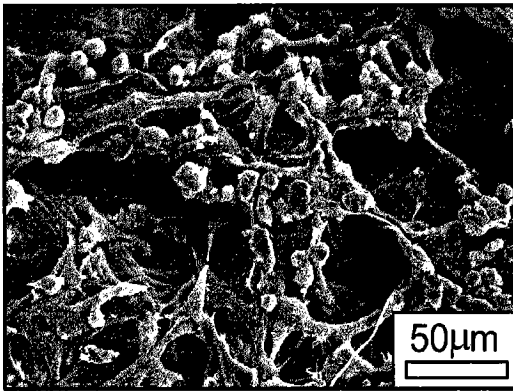


图 15A

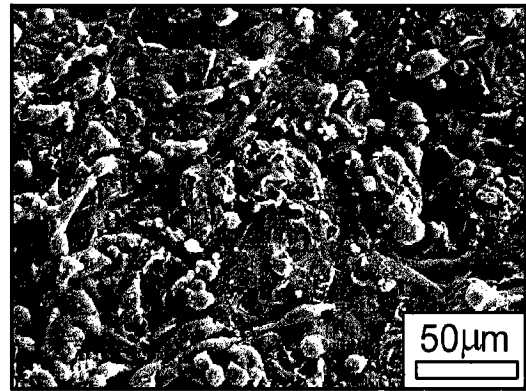


图 15B

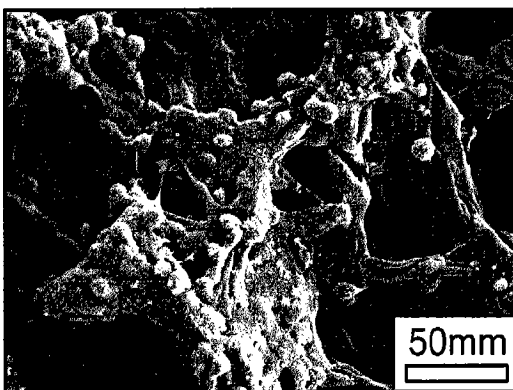


图 15C

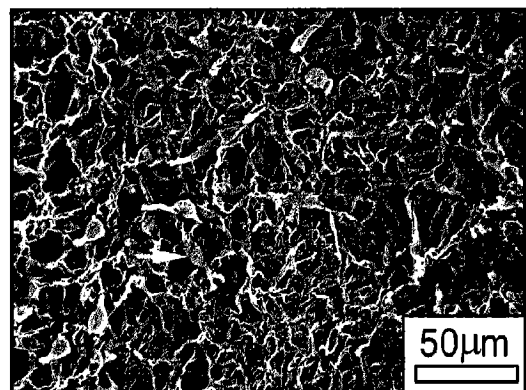


图 15D

动力预适应结果

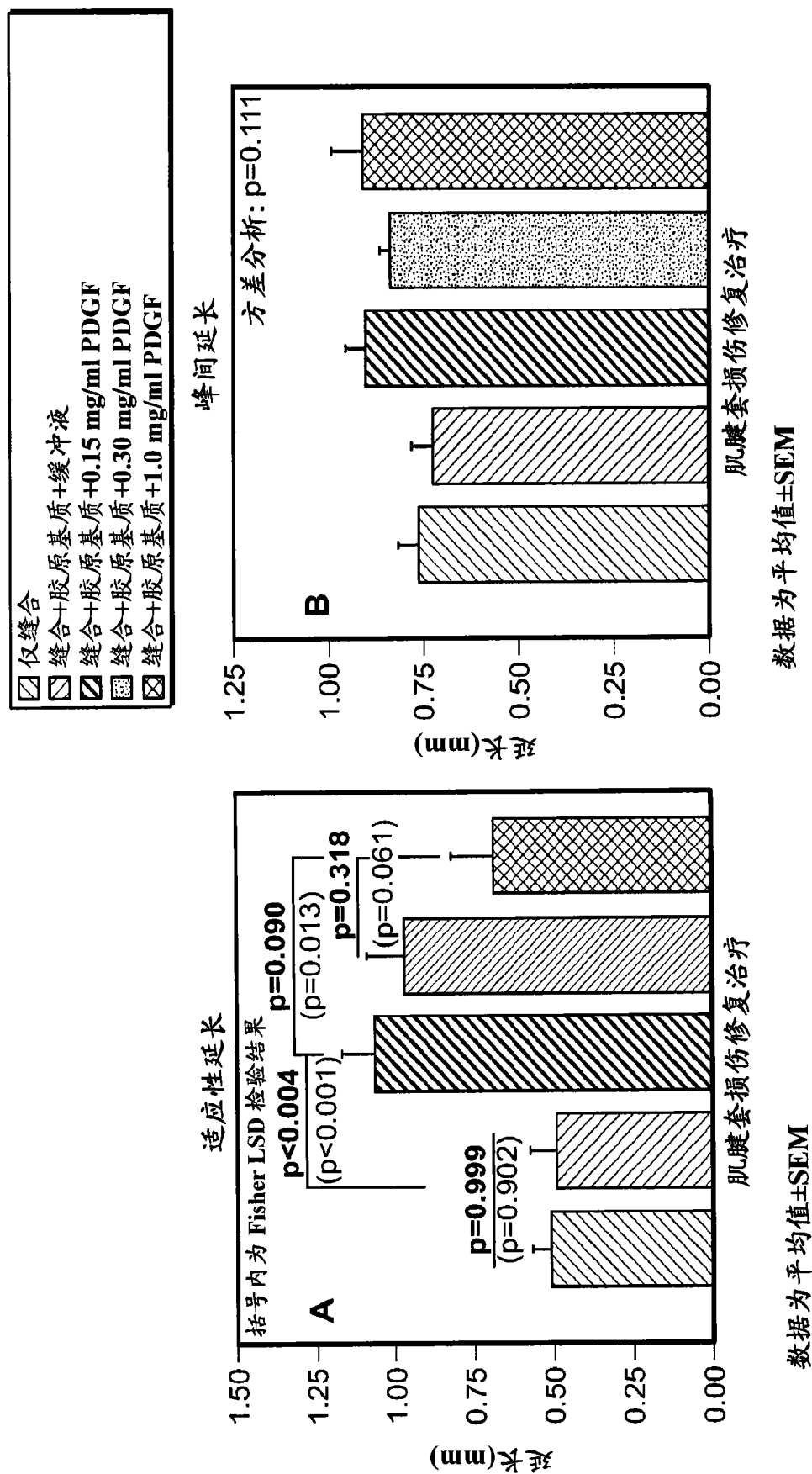


图 16

破坏试验结果

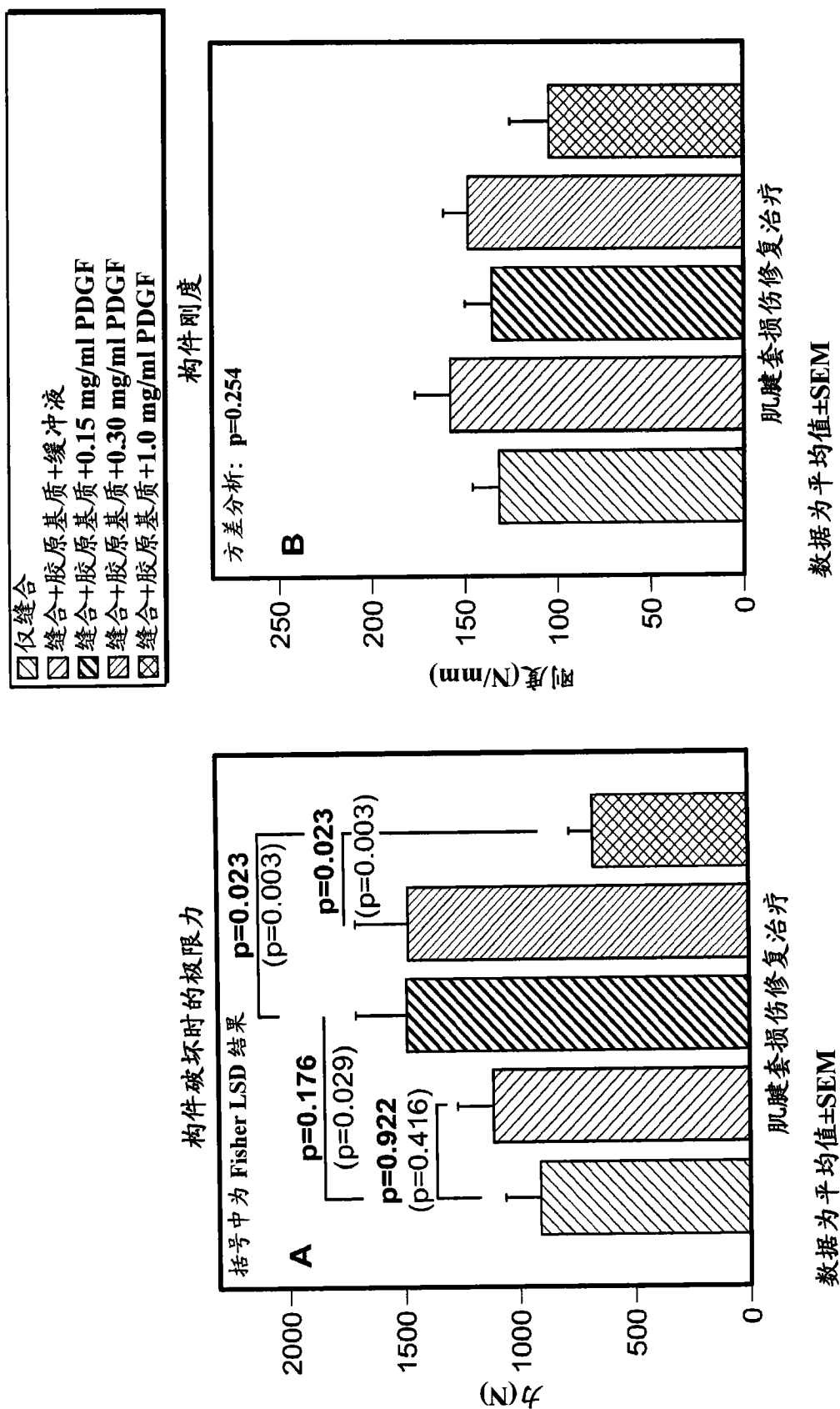


图 17

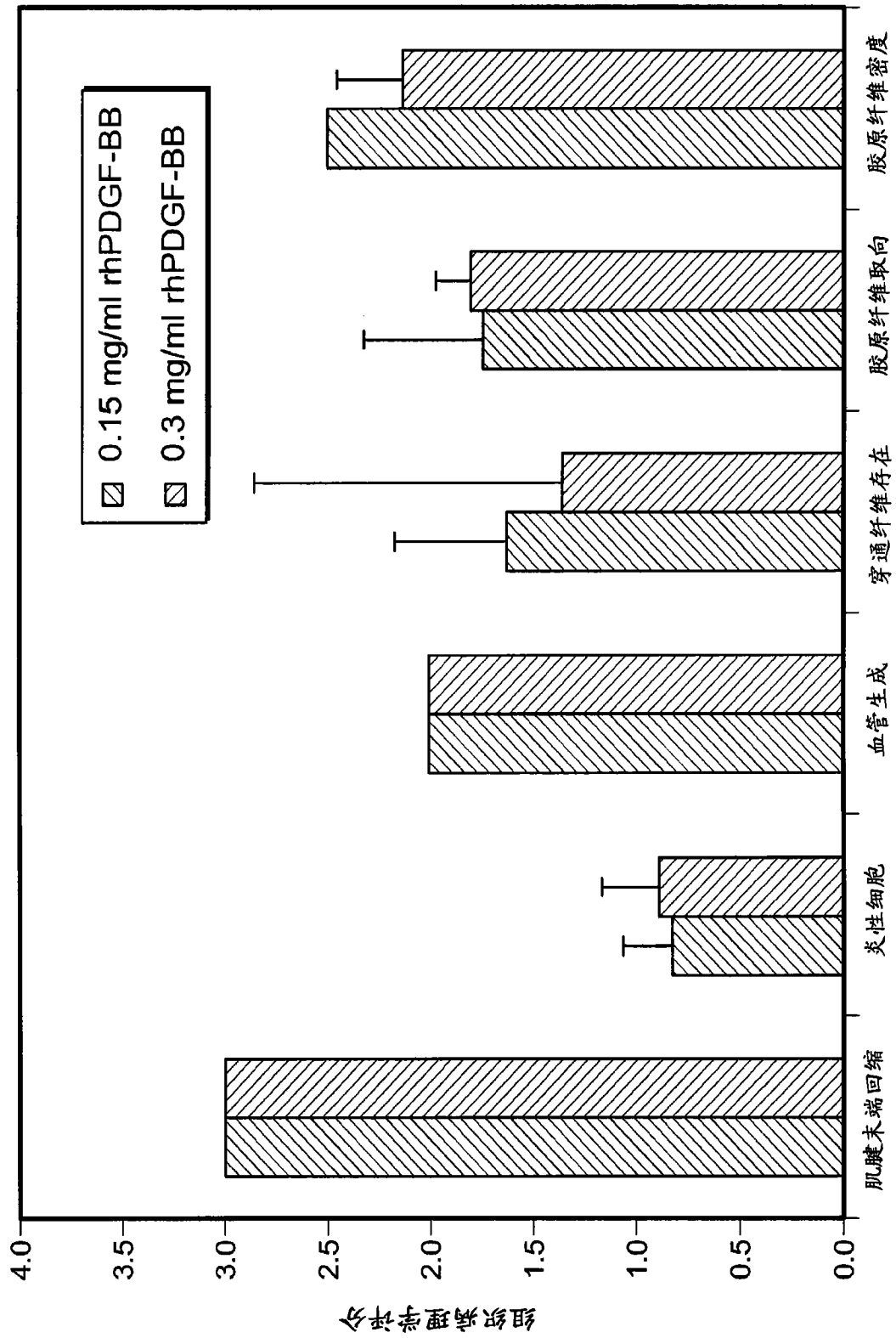


图 18

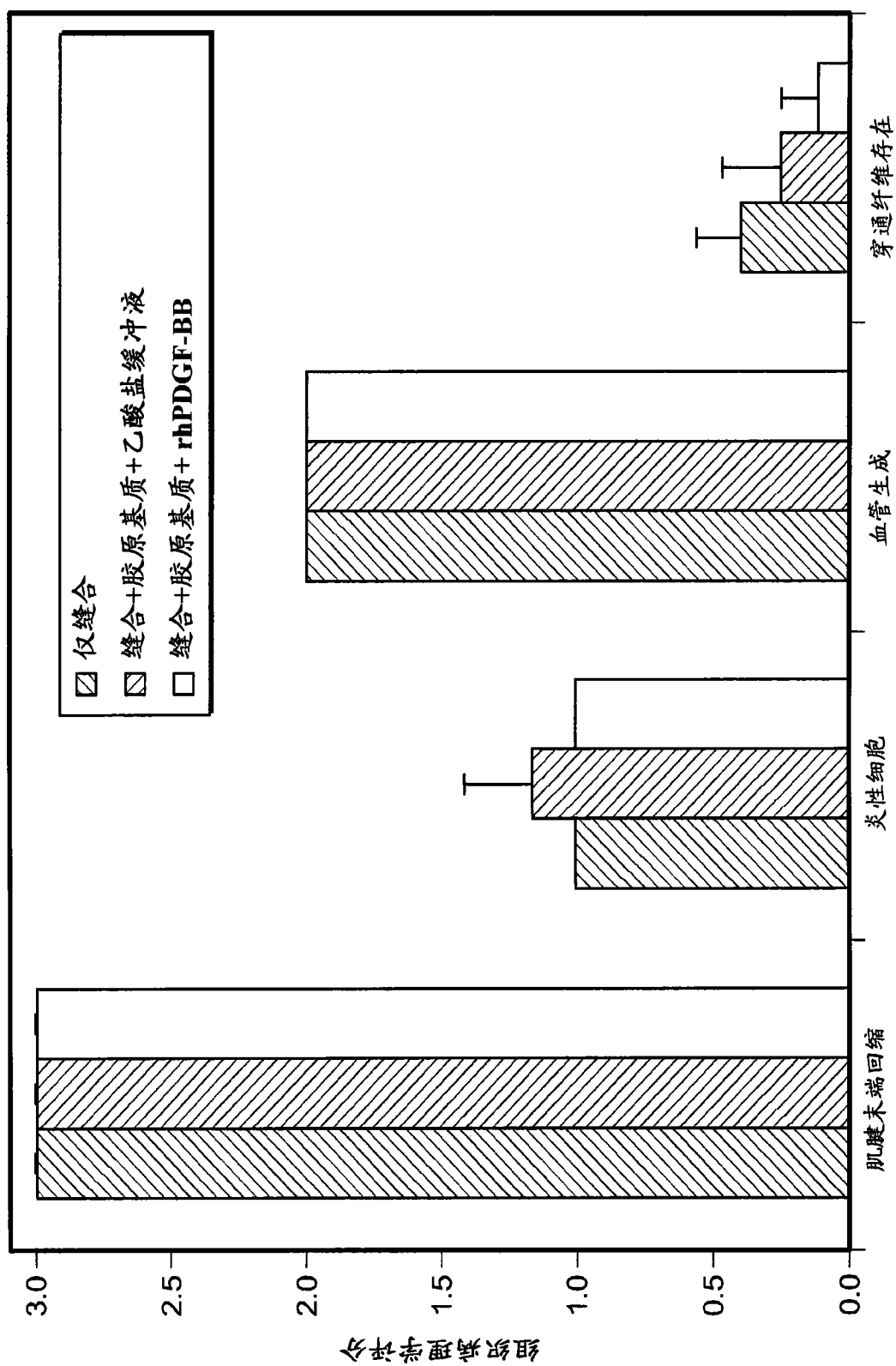


图 19

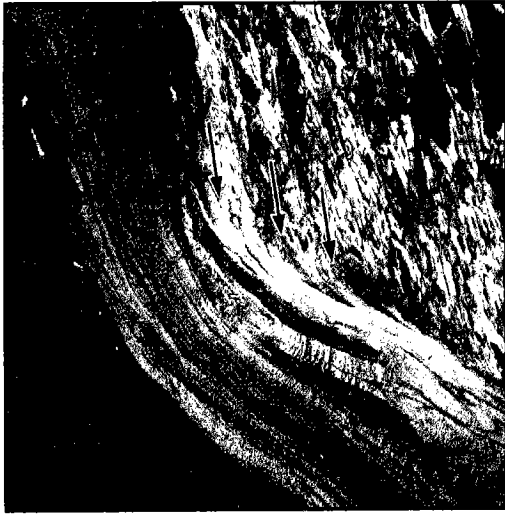


图 20A

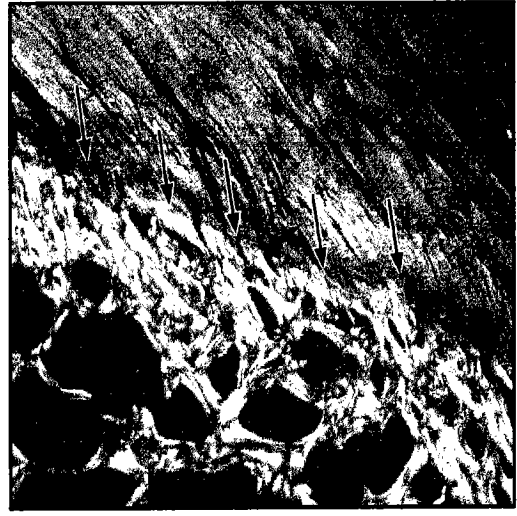


图 20B