



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105561384 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201510736598. 5

A61P 1/02(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 10. 12

A61P 19/08(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 19/04(2006. 01)

10/965319 2004. 10. 14 US

11/159533 2005. 06. 23 US

(62) 分案原申请数据

200580042385. 7 2005. 10. 12

(71) 申请人 生物模拟治疗公司

地址 美国田纳西州

(72) 发明人 S • E • 林奇

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 彭昶

(51) Int. Cl.

A61L 27/12(2006. 01)

A61L 27/22(2006. 01)

A61L 27/56(2006. 01)

A61L 27/54(2006. 01)

A61K 38/18(2006. 01)

A61K 9/00(2006. 01)

权利要求书5页 说明书26页 附图2页

(54) 发明名称

血小板衍生生长因子组合物及其使用方法

(57) 摘要

一种在哺乳动物中促进骨、牙周组织、韧带或软骨生长的方法,该方法通过对骨、牙周组织、韧带或软骨施用组合物,所述组合物在药物可接受的液体载体和药物可接受的固体载体中包含约 0. 1mg/mL 至约 1. 0mg/mL 浓度范围的血小板衍生生长因子。

1. 一种用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料,所述植入材料由在其中掺入了液体的多孔 β -磷酸三钙组成,所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的血小板衍生生长因子(PDGF)组成,其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率,而且所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 范围内大小的颗粒组成。

2. 权利要求1的植入材料,其中所述PDGF为重组PDGF。

3. 权利要求1的植入材料,其中所述PDGF为重组PDGF-BB。

4. 权利要求3的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.2 mg/mL至0.75 mg/mL浓度范围内的PDGF组成。

5. 权利要求3的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.25 mg/mL至0.5 mg/mL浓度范围内的PDGF组成。

6. 权利要求3的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.3 mg/mL浓度PDGF组成。

7. 权利要求1-6任一项的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至3000 μm 范围内的大小颗粒组成。

8. 权利要求1-6任一项的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由250 μm 至1000 μm 范围内的大小颗粒组成。

9. 权利要求1-6任一项的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由250 μm 至2000 μm 范围内的大小颗粒组成。

10. 权利要求1-6任一项的植入材料,其中所述植入材料是可吸收的,因此当以1-5 g颗粒植入时,在植入后1年内至少80% β -磷酸三钙被吸收。

11. 权利要求1-6任一项的植入材料,其中所述掺入的液体吸收或吸附到所述 β -磷酸三钙。

12. 一种用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料,所述植入材料由在其中掺入了液体的胶原和多孔 β -磷酸三钙组成,所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的血小板衍生生长因子(PDGF)组成,其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率,而且其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 范围内大小的颗粒组成。

13. 权利要求12的植入材料,其中所述PDGF为重组人(rh) PDGF-BB。

14. 权利要求13的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至3000 μm 范围内的大小颗粒组成。

15. 权利要求13的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由250 μm 至2000 μm 范围内的大小颗粒组成。

16. 权利要求13的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由250 μm 至1000 μm 范围内的大小颗粒组成。

17. 权利要求12-16任一项的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.2 mg/mL至0.75 mg/mL浓度范围内的PDGF组成。

18. 权利要求12-16任一项的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.25 mg/mL至0.5 mg/mL浓度范围内的PDGF组成。

19. 权利要求12-16任一项的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.3 mg/mL浓度PDGF组成。

20. 一种用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料,所述植入材

料由在其中掺入了液体的胶原和 β -磷酸三钙组成,所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的血小板衍生生长因子(PDGF)组成,其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率,并且其中所述植入材料在材料体内植入后具有大孔性,并且所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 范围内大小的颗粒组成。

21. 权利要求20的植入材料,其中所述PDGF为重组人(rh)PDGF-BB。

22. 权利要求20的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至3000 μm 范围内的大小的颗粒组成。

23. 权利要求20的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由250 μm 至2000 μm 范围内的大小的颗粒组成。

24. 权利要求20的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙由250 μm 至1000 μm 范围内的大小的颗粒组成。

25. 权利要求20-24任一项的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.2 mg/mL至0.75 mg/mL浓度范围内的PDGF组成。

26. 权利要求20-24任一项的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.25 mg/mL至0.5 mg/mL浓度范围内的PDGF组成。

27. 权利要求20-24任一项的植入材料,其中所述液体由缓冲液中的0.3 mg/mL浓度PDGF组成。

28. 一种用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料,所述植入材料由在其中掺入了液体的 β -磷酸三钙组成,所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的血小板衍生生长因子(PDGF)组成,其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率,其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 范围内大小的颗粒组成;并且其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少25%。

29. 权利要求28的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少50%。

30. 权利要求28-29任一项的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少200%。

31. 权利要求28-29任一项的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少300%。

32. 一种用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料,所述植入材料由其中掺入了液体的胶原和 β -磷酸三钙组成,所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的血小板衍生生长因子(PDGF)组成,其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率,其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 范围内大小的颗粒组成;而且其中所述 β -磷酸三钙和胶原能够吸收一定量的PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙和胶原的重量的至少25%。

33. 权利要求32的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙和胶原能够吸收一定量的PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙和胶原的重量的至少50%。

34. 权利要求32或33的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙和胶原能够吸收一定量的PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙和胶原的重量的至少200%。

35. 权利要求32-33任一项的植入材料,其中所述 β -磷酸三钙和胶原能够吸收一定量的

PDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙和胶原的重量的至少300%。

36. 多孔 β -磷酸三钙和血小板衍生生长因子(PDGF)在制备用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料中的用途,其中所述植入材料由在其中掺入了液体的多孔 β -磷酸三钙组成,所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的血小板衍生生长因子(PDGF)组成,其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率,并且其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 范围内大小的颗粒组成。

37. 权利要求36的用途,其中所述PDGF的浓度为0.3 mg/mL。

38. 权利要求36的用途,所述PDGF的浓度为1.0 mg/mL。

39. 权利要求36-38任一项的用途,其中所述 β -磷酸三钙颗粒的大小范围为100 μm -3000 μm 。

40. 权利要求36-38任一项的用途,其中所述 β -磷酸三钙颗粒的大小范围为250 μm -1000 μm 。

41. 权利要求36-38任一项的用途,其中所述 β -磷酸三钙颗粒具有250至2000 μm 范围内的大小。

42. 权利要求36-41任一项的用途,其中所述植入材料在移植部位传递PDGF持续大于1天的时间。

43. 权利要求36-42任一项的用途,其中所述植入材料在移植部位传递PDGF持续大于1天且少于14天的时间。

44. 权利要求36-43任一项的用途,其中在给予后由植入材料释放PDGF的平均速率低于100 μg /天。

45. 权利要求36-44任一项的用途,其中所述缓冲液是无菌的。

46. 权利要求36-45任一项的用途,其中所述PDGF是PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC或PDGF-DD或其组合或衍生物。

47. 权利要求36-46任一项的用途,其中所述PDGF是重组人PDGF-BB。

48. 权利要求36-46任一项的用途,其中在生理条件下, β -磷酸三钙在不足5小时内硬化。

49. 多孔 β -磷酸三钙和rhPDGF在制备用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料中的用途,其中所述植入材料由在其中掺入了液体的多孔 β -磷酸三钙组成,所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的rhPDGF组成,其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率而且所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 范围内大小的颗粒组成。

50. 权利要求49的用途,其中 β -磷酸三钙具有以下粒度范围:200 μm 至3000 μm 或者250 μm 至2000 μm 。

51. 权利要求49的用途,其中 β -磷酸三钙具有100 μm 至3000 μm 粒度范围。

52. 权利要求49的用途,其中 β -磷酸三钙具有250 μm 至1000 μm 粒度范围。

53. 权利要求49-52任一项的用途,其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的rhPDGF液体,该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少25%。

54. 权利要求49-53任一项的用途,其中所述植入材料在移植部位传递rhPDGF持续大于1天且少于14天的时间。

55. 权利要求49-54任一项的用途, 其中在生理条件下, β -磷酸三钙在不足5小时内硬化。

56. 多孔 β -磷酸三钙和rhPDGF-BB在制备用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料中的用途, 其中所述植入材料由在其中掺入了液体的多孔 β -磷酸三钙组成, 所述液体由在乙酸钠缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的rhPDGF-BB组成, 其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率, 并且其中所述 β -磷酸三钙具有100 μm 至3000 μm 的粒度。

57. 权利要求56的用途, 其中rhPDGF-BB的浓度为0.3 mg/ml或1.0 mg/ml。

58. 权利要求56或57的用途, 其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的rhPDGF-BB液体, 该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少25%。

59. 权利要求56-57任一项的用途, 其中在生理条件下, β -磷酸三钙在不足5小时内硬化。

60. 权利要求56-57任一项的用途, 其中所述植入材料在移植部位传递rhPDGF-BB持续大于1天且少于14天的时间。

61. 胶原、多孔 β -磷酸三钙和rhPDGF-BB在制备用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料中的用途, 其中所述植入材料由在其中掺入了液体的胶原和多孔 β -磷酸三钙组成, 所述液体由在乙酸钠缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的rhPDGF-BB组成, 其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率, 并且其中所述 β -磷酸三钙具有100 μm 至3000 μm 的粒度。

62. 权利要求61的用途, 其中rhPDGF-BB的浓度为0.3 mg/ml或1.0 mg/ml。

63. 权利要求61或62的用途, 其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的rhPDGF-BB液体, 该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少25%。

64. 权利要求61-62任一项的用途, 其中在生理条件下, β -磷酸三钙在不足5小时内硬化。

65. 权利要求61-62任一项的用途, 其中所述植入材料在移植部位传递rhPDGF-BB持续大于1天且少于14天的时间。

66. 胶原、多孔 β -磷酸三钙和血小板衍生生长因子(PDGF)在制备用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料中的用途, 其中所述植入材料由在其中掺入了液体的胶原和多孔 β -磷酸三钙组成, 所述液体由缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的血小板衍生生长因子(PDGF)组成, 其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率, 并且其中所述 β -磷酸三钙由100 μm 至5000 μm 粒度范围的颗粒组成。

67. 权利要求66的用途, 其中PDGF的浓度为0.3 mg/ml。

68. 权利要求66的用途, 其中PDGF的浓度为1.0 mg/ml。

69. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述 β -磷酸三钙颗粒具有100 μm 至3000 μm 范围内的大小。

70. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述 β -磷酸三钙颗粒具有250至2000 μm 范围内的大小。

71. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述植入材料在移植部位传递PDGF持续大于1天的时间。

72. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述植入材料在移植部位传递PDGF持续大于1天且少于14天的时间。

73. 权利要求66-68任一项的用途, 其中在给予后由植入材料释放PDGF的平均速率低于100 $\mu\text{g}/\text{天}$ 。

74. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述缓冲液是无菌的。

75. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述PDGF是PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC或PDGF-DD或其组合或衍生物。

76. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述PDGF是重组人PDGF-BB。

77. 权利要求66-68任一项的用途, 其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的PDGF液体, 该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少25%。

78. 权利要求66-68任一项的用途, 其中在生理条件下, β -磷酸三钙在不足5小时内硬化。

79. 胶原、多孔 β -磷酸三钙和rhPDGF在制备用于促进哺乳动物的骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料中的用途, 其中所述植入材料由在其中掺入了液体的胶原和多孔 β -磷酸三钙组成, 所述液体由在缓冲液中的0.1 mg/mL至1.0 mg/mL浓度范围内的rhPDGF组成, 其中所述 β -磷酸三钙具有大于65%的孔隙率, 并且其中所述 β -磷酸三钙由100至5000 μm 范围内大小的颗粒组成。

80. 权利要求79的用途, 其中所述 β -磷酸三钙具有以下粒度范围: 200 μm 至3000 μm 或者250 μm 至2000 μm 。

81. 权利要求79的用途, 其中所述 β -磷酸三钙具有100 μm 至3000 μm 的粒度范围。

82. 权利要求79的用途, 其中所述 β -磷酸三钙具有250 μm 至1000 μm 的粒度范围。

83. 权利要求79-82任一项的用途, 其中所述 β -磷酸三钙能够吸收一定量的rhPDGF液体, 该吸收量等于 β -磷酸三钙本身重量的至少25%。

84. 权利要求79-82任一项的用途, 其中在生理条件下, β -磷酸三钙在不足5小时内硬化。

85. 权利要求79-82任一项的用途, 其中所述植入材料在移植部位传递rhPDGF持续大于1天且少于14天的时间。

血小板衍生生长因子组合物及其使用方法

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2005年10月12日,申请号为200580042385.7(PCT/US2005/036447),发明名称为“血小板衍生生长因子组合物及其使用方法”。

发明领域

[0002] 本发明涉及骨和结缔组织的愈合。

[0003] 发明背景

[0004] 生长因子是结合细胞表面上的受体的蛋白,主要结果是活化细胞增殖和/或分化。许多生长因子是相当多能的,在众多不同细胞类型中刺激细胞分裂;而其余的生长因子对特定细胞类型是特异性的。生长因子的实例包括血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子IGF-I和II、转化生长因子 β (TGF- β)、表皮生长因子(EGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)。PDGF是一种存在于多种细胞类型(包括循环血小板粒细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞和角质形成细胞)中的阳离子热稳定蛋白,已知其刺激成纤维细胞在体外合成蛋白和生产胶原蛋白。还已知其用作成纤维细胞、平滑肌细胞、成骨细胞和神经胶质细胞的体外有丝分裂原和趋化剂。

[0005] 业已表明,重组人PDGF-BB(rhPDGF-BB)在动物和人中均可刺激伤口愈合和骨再生。其在美国和欧洲均已获准以局部施用用于人类用途,以加速慢性糖尿病足溃疡的痊愈。还已表明,重组hPDGF-BB单独或者与其它生长因子组合,有效改善牙周再生,即牙周围的骨、牙骨质和韧带的再生(参见例如美国专利第5,124,316号,其通过引用结合到本文中)。

[0006] 发明概述

[0007] 我们现在已证实,低剂量的rhPDGF(约0.1-1.0mg/mL)促进骨、牙周组织、韧带和软骨的修复。少量rhPDGF可吸附至可在修复部位植入的 β -TCP,使得rhPDGF在体内被释放。业已表明,和未处理的 β -TCP相比,向 β -TCP加入rhPDGF增强成骨细胞附着和增殖。

[0008] 在第一个方面,本发明的特征为一种在哺乳动物(例如人)中促进骨、牙周组织、韧带或软骨生长的方法,该方法给予含低于约1.0mg/mL浓度的血小板衍生生长因子(PDGF)的植入材料,使得植入材料促进骨、牙周组织、韧带或软骨生长。在一个实施方案中,PDGF以低于或等于0.3mg/mL的量给予。在另一个实施方案中,PDGF以约0.1至约1.0mg/mL范围的量给予。在几个实施方案中,PDGF以约0.2至约0.75mg/mL之间的量、约0.25至约0.6mg/mL之间的量和约0.25至约0.5mg/mL之间的量给予。在一个实施方案中,PDGF以约0.1mg/mL、0.3mg/mL或1.0mg/mL的量给予,优选以0.3mg/mL的量给予。在另一个实施方案中,PDGF是部分或基本纯化的。在再另一个实施方案中,PDGF由其它杂质中分离或纯化出来。在又一个实施方案中,PDGF在给予时由植入材料以0.3mg/天的平均速率释放。在另一个实施方案中,PDGF在给予时由植入材料以300 μ g/天的平均速率释放。在再另一个实施方案中,PDGF在给予时由植入材料以低于100 μ g/天、低于50 μ g/天、低于10 μ g/天或低于1 μ g/天的平均速率释放。优选地,PDGF在几天(例如1、2、5、10、15、20或25天,或直到28天或更多天)内传递。

[0009] 本发明的第二个方面的特征在于一种在哺乳动物(例如人)中促进骨、牙周组织、韧带或软骨生长的方法,该方法给予含低于约1.0mg/ml量的血小板衍生生长因子(PDGF)和药物可接受载体的植入材料,使得植入材料促进骨、牙周组织、韧带或软骨生长,并使骨、牙周组织、韧带或软骨生长。优选地,PDGF等于或低于约0.3mg/ml。在一个实施方案中,PDGF以约0.1-1.0mg/ml的范围给予。在其它实施方案中,PDGF的量为约0.1mg/ml、0.3mg/ml或1.0mg/ml,优选为0.3mg/mL。在另一个实施方案中,PDGF是部分或基本纯化的。在再另一个实施方案中,PDGF由其它杂质中分离或纯化出来。在将植入材料给予哺乳动物之前,所述方法可另外包括产生皮肤外科瓣的步骤,以暴露骨、牙周组织、韧带或软骨,在给予步骤后,放回外科瓣。在再另一个实施方案中,在产生外科瓣之后但在将植入材料给予骨、牙周组织、韧带或软骨之前,所述方法可另外包括平整骨或牙周组织的步骤,以去除骨或牙周组织中的有机物质。在再另一个实施方案中,所述方法促进受损伤或患病的骨、牙周组织、韧带或软骨的生长。在再另一个实施方案中,所述方法促进由于外科手术(例如拔牙、牙槽脊增强术、美容移植和窦底提升)而需要新骨形成的位置中的骨生长。

[0010] 本发明第三个方面的特征在于一种在哺乳动物(例如人)中促进骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料。所述植入材料包含药物可接受载体(例如生物相容性粘合剂、骨置换物、液体或凝胶)和以低于约1.0mg/mL浓度存在的血小板衍生生长因子(PDGF)。优选地,PDGF以等于或低于约0.3mg/ml的浓度存在于植入材料中。在一个实施方案中,PDGF以约0.1-1.0mg/ml的范围给予。在其它实施方案中,PDGF的量为约0.1mg/ml、0.3mg/ml或1.0mg/ml,优选为0.3mg/mL。在一个实施方案中,植入材料的药物可接受载体包括由生物相容性粘合剂(例如羧甲基纤维素)或骨置换物(β -TCP)组成的支架或基质,其能够吸收含PDGF的溶液(例如含约0.1mg/mL至约1.0mg/mL范围浓度的PDGF的溶液)。在另一个实施方案中,药物可接受载体能够吸收的PDGF溶液的量等于其自身重量的至少约25%。在其它实施方案中,药物可接受载体能够吸收的PDGF溶液的量等于其自身重量的至少约50%、75%、100%、200%、250%或300%。在一个实施方案中,通过将药物可接受载体浸在含PDGF的溶液中,使PDGF被植入材料的药物可接受载体吸收。优选地,PDGF以低于约1.0mg/mL的浓度存在于溶液中。在另一个实施方案中,PDGF以等于或低于约0.3mg/mL的浓度存在于溶液中。在另一个实施方案中,PDGF以约0.1-1.0mg/mL范围的浓度存在于溶液中。在再另一个实施方案中,PDGF存在于溶液中的量为约0.1mg/ml、0.3mg/ml或1.0mg/ml,优选为0.3mg/mL。在另一个实施方案中,PDGF是部分或基本纯化的。在再另一个实施方案中,PDGF由其它杂质中分离或纯化出来。

[0011] 本发明的第四个方面的特征在于一种制备在哺乳动物(例如人)中促进骨、牙周组织、韧带或软骨生长的植入材料的方法。该方法包括将低于约1.0mg/mL量的部分纯化或纯化的血小板衍生生长因子(PDGF)与药物可接受载体物质混合的步骤。优选地,PDGF以等于或低于约0.3mg/ml的浓度与药物可接受载体物质组合。在一个实施方案中,PDGF以约0.1-1.0mg/ml范围的量与药物可接受载体物质组合。在其它实施方案中,PDGF以0.1mg/ml、0.3mg/ml或1.0mg/ml的量混合。在另一个实施方案中,PDGF以0.3mg/ml的量混合。在再另一个实施方案中,PDGF被药物可接受载体吸收,以产生植入材料。

[0012] 本发明的第五个方面的特征在于一种在药物可接受液体中具有约0.1mg/mL至约1.0mg/mL浓度范围的血小板衍生生长因子(PDGF)的小瓶。在本发明该方面的一个实施方案

中,所述液体为无菌乙酸钠缓冲液。在另一个实施方案中,所述小瓶含约0.3mg/mL浓度的PDGF。在再另一个优选实施方案中,PDGF为PDGF-BB。在再其它实施方案中,PDGF在储存于约2°C-80°C范围的温度时,其在乙酸钠缓冲液中稳定至少约12个月,优选至少约18个月,更优选至少约24个月,最优选至少约36个月。

[0013] 本发明的第六个方面的特征在于一种含多孔磷酸钙的植入材料,在多孔磷酸钙中吸收了含约0.1mg/mL至约1.0mg/mL浓度范围的血小板衍生生长因子(PDGF)的液体。在几个实施方案中,PDGF的浓度为约0.3mg/mL,磷酸钙选自磷酸三钙、羟磷灰石、弱结晶态羟磷灰石、无定形磷酸钙、偏磷酸钙、二水磷酸二钙、磷酸七钙、焦磷酸钙二水合物、焦磷酸钙和磷酸八钙,PDGF在无菌液体例如乙酸钠缓冲液中提供。

[0014] 本发明的第七个方面的特征在于一种制备植入材料的方法,该方法将磷酸钙材料饱和在含约0.1mg/mL至约1.0mg/mL浓度范围的血小板衍生生长因子(PDGF)的无菌液体中。在几个实施方案中,PDGF的浓度为约0.3mg/mL,磷酸钙选自磷酸三钙、羟磷灰石、弱结晶态羟磷灰石、无定形磷酸钙、偏磷酸钙、二水磷酸二钙、磷酸七钙、焦磷酸钙二水合物、焦磷酸钙和磷酸八钙。

[0015] 在本发明所有方面的实施方案中,PDGF包括PDGF同二聚体和异二聚体,例如PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC和PDGF-DD及其组合和衍生物。

[0016] 在本发明所有方面的一个实施方案中,植入材料的药物可接受载体物质是或者另外包括以下的一种或多种:生物相容性粘合剂(例如天然或合成聚合物)、骨置换物、液体和凝胶。在另一个优选实施方案中,植入材料包括存在于药物可接受固体载体吸收的药物可接受液体载体中的PDGF。

[0017] 在本发明所有方面的另一个实施方案中,通过将分离的、部分纯化的、基本纯化的或纯化的PDGF与药物可接受载体物质混合制备植入材料,所述PDGF的量在0.1-1.0mg/ml的范围内,更优选0.1mg/ml、0.3mg/ml或1.0mg/ml,最优选0.3mg/ml,乃至低于0.1mg/ml,所述药物可接受载体物质例如为生物相容性粘合剂(例如天然或合成聚合物(例如胶原蛋白、聚乙醇酸和聚乳酸))、骨置换物(例如磷酸钙(例如磷酸三钙或羟磷灰石)、硫酸钙或去矿质骨(例如去矿质冻干皮层骨或松质骨))或市售可得的凝胶或液体(即粘性或惰性凝胶或液体)。

[0018] 在几个实施方案中,植入材料的载体物质是或另外包括一种或多种生物相容性粘合剂。生物相容性粘合剂是在混合物质之间产生或促进粘结的物质。合适的生物相容性粘合剂的非限制性实例包括选自以下的聚合物:多糖、核酸、糖、蛋白、多肽、聚(α -羟酸)、聚(内酯)、聚(氨基酸)、聚(酐)、聚(原酸酯)、聚(酐-亚胺共聚物)、聚(原碳酸酯)、聚(α -羟基烷酸酯)、聚(二噁酮)、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)、丙交酯-乙交酯共聚物(PLGA)、L-丙交酯-D,L-丙交酯共聚物、D,L-丙交酯-碳酸丙二醇酯共聚物、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(盐酸烯丙胺)、聚(氯化二烯丙基二甲基铵)、聚(乙烯亚胺)、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(乙醇醇)、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)聚酰胺以及其共聚物和混合物。其余的粘合剂包括藻酸、阿拉伯胶、瓜尔豆胶、黄原胶、明胶、几丁质、壳聚

糖、乙酸壳聚糖、乳酸壳聚糖、硫酸软骨素、N,O-羧甲基壳聚糖、葡聚糖(例如 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精或葡聚糖硫酸钠)、纤维蛋白胶、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)、葡糖胺、蛋白聚糖、淀粉(例如羟乙基淀粉或可溶性淀粉)、乳酸、Pluronic、甘油磷酸钠、胶原蛋白、糖原、角蛋白、丝蛋白及其衍生物和混合物。在某些实施方案中,生物相容性粘合剂是水溶性的。水溶性粘合剂在其体内植入后立即由植入材料中溶解出来,由此向植入材料中引入大孔性。这种大孔性通过增强植入部位的破骨细胞和成骨细胞的进入并由此增强其重建活性,增加了植入材料的骨传导性。

[0019] 生物相容性粘合剂可以不同量和在组合物制备过程中的不同阶段加入到植入材料中。本领域技术人员能够确定给定用途要求的粘合剂的量和纳入方法。

[0020] 在一个实施方案中,载体物质是或包括选自水、缓冲液和细胞培养基的液体。所述液体可以任意pH范围使用,但最经常在pH 5.0至pH 8.0的范围内使用。在一个实施方案中,pH与存在于植入材料中的PDGF的延长稳定性和效力相适,或与另一种需要的生物活性剂的延长稳定性和效力相适。在大部分实施方案中,液体的pH在pH5.5至pH 7.4的范围内。合适的缓冲液包括但不限于碳酸盐、磷酸盐(例如磷酸缓冲盐水)和有机缓冲液,例如Tris、HEPES和MOPS。最经常根据所述缓冲液与宿主组织的生物相容性及其与生物活性剂的相容性对缓冲液进行选择。对于其中植入材料含核酸、肽或抗生素的大部分应用来说,简单的磷酸盐缓冲盐水足矣。

[0021] 在本发明所有方面的另一个实施方案中,植入材料的载体物质是或者另外包括一种或多种骨置换物。骨置换物是一种可用于永久地或临时地置换骨的物质。在植入后,骨置换物可由机体保留,或者可由机体再吸收并用骨替代。示例性的骨置换物包括例如磷酸钙(例如磷酸三钙(例如 β -TCP)、羟磷灰石、弱结晶态羟磷灰石、无定形磷酸钙、偏磷酸钙、二水磷酸二钙、磷酸七钙、焦磷酸钙二水合物、焦磷酸钙和磷酸八钙)、硫酸钙或去矿质骨(例如去矿质冻干皮层骨或松质骨)。在一个实施方案中,载体物质是可生物再吸收的。在另一个实施方案中,骨置换物作为微米或亚微米大小颗粒(例如纳米大小的颗粒)的基质提供。颗粒大小可在约100 μm 至约5000 μm 的范围内,更优选在约200 μm 至约3000 μm 的范围内,最优选在约250 μm 至约2000 μm 的范围内,或者颗粒可在约1nm至约1000nm的范围内,优选低于约500nm,更优选低于约250nm。在另一个实施方案中,骨置换物具有多孔组合物。组合物的多孔性是令人期望的特征,因为其有利于细胞迁移和浸润入组合物中,使得细胞可分泌胞外骨基质。其还提供了血管化途径。多孔性还提供了用于增强活性物质的吸收和释放以及增加细胞-基质相互作用的高表面积。优选地,所述组合物具有的孔隙率大于40%,更优选大于65%,最优选大于90%。所述组合物可以适于植入的形状(例如球形、圆柱形或块状)提供,或者可在使用前定大小和定型。在一个优选实施方案中,骨置换物为磷酸钙(例如 β -TCP)。

[0022] 骨置换物还可作为可流动的、可塑的糊或膏提供。优选地,骨置换物是在体内植入之前或之后自硬化形成硬化磷酸钙的磷酸钙糊膏。本发明的磷酸钙组分可为本领域已知的任意生物可相容磷酸钙材料。可通过各种方法中的任一种并使用任何合适的起始组分生产磷酸钙材料。例如,磷酸钙材料可包括无定形磷灰石磷酸钙。磷酸钙材料可通过结晶磷酸钙反应物的固态酸碱反应产生,以形成结晶羟磷灰石固体。其它制备磷酸钙材料的方法是本

领域知晓的,其中一些在下文描述。

[0023] 磷酸钙材料可为弱结晶态磷灰石(PCA)磷酸钙或羟磷灰石(HA)。PCA材料描述于美国专利申请第5,650,176、5,783,217、6,027,742、6,214,368、6,287,341、6,331,312和6,541,037号,所有这些专利都通过引用结合到本文中。HA描述于例如美国专利Re.33,221和Re.33,161号。这些专利教导了磷酸钙再矿化组合物的制备以及基于相同磷酸钙组合物的细晶质、非陶瓷型、可逐渐再吸收的羟磷灰石载体材料的制备。由磷酸四钙(TTCP)和单磷酸钙(MCP)或其一水合物形式(MCPM)组成的相似磷酸钙系统描述于美国专利第5,053,212和5,129,905号。该磷酸钙材料通过结晶磷酸钙反应物的固态酸碱反应产生,以形成结晶羟磷灰石固体。

[0024] 可制备结晶HA材料(通常称为碳酸磷灰石),使其可流动、可塑并能够原位硬化(参见美国专利第5,962,028号)。这些HA材料(通常称为碳酸化羟磷灰石)可如下形成:将反应物与非水性液体混合,以提供基本均一的混合物,按需要将混合物定型,并使混合物在存在水的情况下硬化(例如在植入前或植入后)。在硬化过程中,混合物结晶成固体和基本整块的磷灰石结构。

[0025] 反应物一般由磷酸盐源(例如基本没有水、碱土金属(具体地说是钙)的磷酸或磷酸盐源)、任选的晶核(具体地说是羟磷灰石或磷酸钙晶体、碳酸钙)和生理可接受的润滑剂(例如本文描述的非水性液体中的任一种)组成。干的成分可预先制备为混合物,随后在其中发生基本均一混合的条件下与非水性液体成分混合。

[0026] 磷酸钙材料的特征在于其生物可再吸收性、生物相容性及其最小结晶性。其结晶特征基本与天然骨相同。优选地,在生理条件下,磷酸钙材料在不足5小时内硬化,在约1-5小时内基本硬化。优选地,所述材料在约10-30分钟内基本硬化。在生理条件下的硬化率可根据治疗需要通过改变如美国专利第6,027,742号所述的几个简单参数而变化,所述专利通过引用结合到本文中。

[0027] 在一个实施方案中,获得的生物可再吸收磷酸钙材料将是“钙缺乏的”,钙对磷酸根的摩尔比率低于约1.6,相比之下羟磷灰石的理想化学计量值为约1.67。

[0028] 期望的磷酸钙能够在潮湿环境中于体温或体温附近在不足5小时内硬化,优选在10-30分钟以内硬化。期望的材料是以1-5g颗粒植入时在1年内至少80%被再吸收的材料。优选地,所述材料可被完全再吸收。

[0029] 在本发明所有方面的几个实施方案中,植入材料可另外包含一种或多种生物活性剂。可掺入到本发明植入材料中的生物活性剂包括但不限于:有机分子、无机材料、蛋白、肽、核酸(例如基因、基因片段、基因调节序列和反义分子)、核蛋白、多糖、糖蛋白和脂蛋白。可掺入到本发明植入材料中的生物活性化合物的类别包括但不限于:抗癌剂、抗生素、镇痛药、抗炎剂、免疫抑制剂、酶抑制剂、抗组胺剂、抗惊厥剂、激素、肌弛缓药、抗痉挛药、眼用药、前列腺素、抗抑郁药、抗精神病物质、营养因子、骨诱导蛋白、生长因子和疫苗。

[0030] 抗癌药物包括烷基化剂、铂剂、抗代谢药、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗有丝分裂剂、芳香酶抑制剂、胸苷酸合酶抑制剂、DNA拮抗剂、法尼基转移酶抑制剂、质子泵抑制剂、组蛋白乙酰转移酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、TNF α 激动剂/拮抗剂、内皮缩血管肽A受体拮抗剂、视黄酸受体激动剂、免疫调节剂、激素和抗激素药、光动力药和酪氨酸激酶抑制剂。

[0031] 可使用表1中列出的任何生物活性剂。

[0032] 表1.

[0033]

烷基化剂	环磷酰胺 白消安 异环磷酰胺 美法仑 六甲密胺 噻替派 苯丁酸氮芥 氮烯唑胺 卡氮芥	洛莫司汀 甲基苄肼 六甲密胺 磷酸雌莫司汀 氮芥 链脲霉素 替莫唑胺 司莫司汀
铂剂	顺铂 奥沙利铂 螺铂 羧基邻苯二甲酸铂 四氯环己铂 ormiplatin 异丙铂	卡铂 ZD-0473 (AnorMED) 洛铂(Aeterna) 沙铂(Johnson Matthey) BBR-3464 (Hoffmann-La Roche) SM-11355 (Sumitomo) AP-5280 (Access)
抗代谢药	氮胞苷 吉西他滨 卡培他滨 5-氟尿嘧啶 氟尿苷 2-氯脱氧腺嘌呤 6-巯基嘌呤 6-硫代鸟嘌呤 阿糖胞苷 2-氯脱氧胞嘧啶 氮甲蝶呤 idatrexate	雷替曲塞 三甲曲沙 脱氧助间型霉素 氟达拉滨 戊糖苷 雷替曲塞 羟基脲 地西他滨(SuperGen) 氟法拉滨(Bioenvision) 伊洛福芬(MGI Pharma) DMDC (Hoffmann-La Roche) 乙炔基胞嘧啶(Taiho)

[0034]

拓扑异构酶抑制剂	胺苯吡啶 表阿霉素 依托泊甙 替尼泊苷或米托蒽醌 依利替康(CPT-11) 7-乙基-10-羟基-喜树碱 托泊替康 dexrazoxanet (TopoTarget) pixantrone (Novuspharma) 蝶霉素类似物(Exelixis) BBR-3576 (Novuspharma)	卢比替康(SuperGen) 甲磺酸依沙替康(Daiichi) quinamed (ChemGenex) gimatecan (Sigma-Tau) 氟替康(Beaufour-Ipsen) TAS-103 (Taiho) 依沙芦星(Spectrum) J-107088 (Merck & Co) BNP-1350 (BioNumerik) CKD-602 (Chong Kun Dang) KW-2170 (Kyowa Hakko)
抗肿瘤抗生素	放线菌素 D 阿霉素 脱氧柔比星 戊柔比星 柔红霉素 表柔比星 吡柔比星 去甲氧基柔红霉素 柔红霉素苯胺 plicamycinp 甲基丝裂霉素 氟吗啉代多柔比星 米托蒽醌(novantrone)	氨茶非特 azonafide 蒽吡唑 吡咯蒽醌 洛索蒽醌 硫酸博来霉素(blenoxane) bleomycinic acid 博来霉素 A 博来霉素 B 丝裂霉素 C MEN-10755 (Menarini) GPX-100 (Gem Pharmaceuticals)

[0035]

抗有丝分裂剂	紫杉醇 多烯紫杉醇 秋水仙碱 长春碱 长春新碱 长春瑞宾 去乙酰长春花碱酰胺 dolastatin 10 (NCI) 利索新(Fujisawa) mivobulin (Warner-Lambert) 西马多丁(BASF) RPR 109881A (Aventis) TXD 258 (Aventis) 埃坡霉素 B (Novartis) T 900607 (Tularik) T 138067 (Tularik) cryptophycin 52 (Eli Lilly) 长春氟宁(Fabre) auristatin PE (Teikoku Hormone) BMS 247550 (BMS) BMS 184476 (BMS) BMS 188797 (BMS) taxoprexin (Protarga)	SB 408075 (GlaxoSmithKline) E7010 (Abbott) FU- 1AL (cell Inerapeuncs) IDN 5109 (Bayer) A 105972 (Abbott) A 204197 (Abbott) LU 223651 (BASF) D 24851 (ASTAMedica) ER-86526 (Eisai) combretastatin A4 (BMS) isohomohalichondrin-B (PharmaMar) ZD 6126 (AstraZeneca) PEG-紫杉醇(Enzon) AZ10992 (Asahi) IDN-5109 (Indena) AVL B (Prescient NeuroPharma) 氮杂埃坡霉素 B (BMS) BNP-7787 (BioNumerik) CA-4 前体药物(OXiGENE) dolastatin-10 (NIH) CA-4 (OXiGENE)
芳香酶抑制剂	奥美定 来曲唑 瑞宁得 福美司坦	依西美坦 阿他美坦(BioMedicines) YM-511 (Yamanouchi)
胸苷酸合酶抑制剂	培美曲塞(Eli Lilly) ZD-9331 (BTG)	诺拉曲特(Eximias) CoFactor™ (BioKeys)
DNA 拮抗剂	trabectedin (PharmaMar) 葡磷酰胺(Baxter International) 白蛋白 + 32P (Isotope Solutions) thymectacin (NewBiotics) edotreotide (Novartis)	马磷酰胺(Baxter International) apaziquone (Spectrum Pharmaceuticals) O6 苄基胍(Paligent)
法尼基转移酶抑制剂	arglabin (NuOncology Labs) lonafamib (Schering-Plough) BAY-43-9006 (Bayer)	tipifarnib (Johnson & Johnson) 紫苏子醇(DOR BioPharma)

[0036]

质子泵抑制剂	CBT-1 (CBA Pharma) tariquidar (Xenova) MS-209 (Schering AG)	zosuquidar trihydrochloride (Eli Lilly) biricodar dicitrate (Vertex)
组蛋白乙酰转移酶抑制剂	tacedinaline (Pfizer) SAHA (Aton Pharma) MS-275 (Schering AG)	新戊酰氧基丁酸甲酯(Titan) depsipeptide (Fujisawa)
金属蛋白酶抑制剂	Neovastat (Aetema Laboratories) 马立马司他(British Biotech)	CMT-3 (CollaGenex) BMS-275291 (Celltech)
核糖核苷酸还原酶抑制剂	gallium maltolate (Titan) triapine (Vion)	tezacitabine (Aventis) Didox (Molecules for Health)
TNF α 激动剂/拮抗剂	virulizin (Loras Therapeutics) CDC-394 (Celgene) 英利昔单抗(Centocor, Inc.) 阿达木单抗(Abbott Laboratories)	revimid (Celgene) 伊那西普(Immunex Corp.)
内皮缩血管肽A受体拮抗剂	阿曲生坦(Abbott) ZD-4054 (AstraZeneca)	YM-595 (Yamanouchi)
视黄酸受体激动剂	芬维 A 胺(Johnson & Johnson) LGD-1550 (Ligand)	阿利维 A 酸(Ligand)
免疫调节剂	干扰素 oncophage (Antigenics) GMK (Progenies) 腺癌疫苗(Biomira) CTP-37 (AVI BioPharma) IRX-2 (Immuno-Rx) PEP-005 (Penlin Biotech) synchrovax 疫苗(CTL Immuno) 黑素瘤疫苗(CTL Immuno) p21 RAS 疫苗(GemVax)	Dexosome 疗法(Anosys) pentrix (Australian Cancer Technology) ISF-154 (Tragen) 癌症疫苗(Intercell) norelin (Biostar) BLP-25 (Biomira) MGV (Progemcs) β -alethine (Dovetail) CLL 疗法(Vasogen)

[0037]

激素和抗激素药	雌激素 缓合雌激素 炔雌醇 chlortrianisen idenestrol 己酸羟孕酮 甲羟孕酮 睾酮 丙酸睾酮; 氟甲睾酮 甲基睾酮 己烯雌酚 甲地孕酮 他莫西芬 toremofine 地塞米松	强的松 甲泼尼龙 强的松龙 奥美定 亮丙瑞林 戈舍瑞林 leuporelin 比卡鲁胺 氟他胺 奥曲肽 尼鲁米特 米托坦 P-04 (Novogen) 2-甲氧雌二醇(EntreMed) 阿佐昔芬(Eli Lilly)
光动力药	他拉泊芬(Light Sciences) Theralux (Theratechnologies) 莫特沙芬钆 (Pharmacyclics)	Pd-脱镁叶绿甲酯一酸(Veda) 得克萨菲琳镱(Pharmacyclics) 金丝桃素
酪氨酸激酶抑制剂	伊马替尼(Novartis) 来氟米特 (Sugen/Pharmacia) ZD1839 (AstraZeneca) 埃罗替尼(Oncogene Science) canertinib (Pfizer) 角鲨胺(Genaera) SU5416 (Pharmacia) SU6668 (Pharmacia) ZD4190 (AstraZeneca) ZD6474 (AstraZeneca) vatalanib (Novartis) PKI166 (Novartis) GW2016 (GlaxoSmithKline) EKB-509 (Wyeth) EKB-569 (Wyeth)	kahalide F (PharmaMar) CEP-701 (Cephalon) CEP-751 (Cephalon) MLN518 (Millenium) PKC412 (Novartis) phenoxodiol 曲妥珠单抗(Genentech) C225 (ImClone) rhu-Mab (Genentech) MDX-H210 (Medarex) 2C4 (Genentech) MDX-447 (Medarex) ABX-EGF (Abgenix) IMC-1C11 (ImClone)

[0038] 抗生素包括氨基糖苷(例如庆大霉素、妥布霉素、奈替米星、链霉素、氨丁卡霉素、新霉素)、杆菌肽、carbapenems(例如伊米配能/cislastatin)、头孢菌素、粘菌素、乌洛托品、单菌霉素(例如氨曲南)、青霉素(例如青霉素G、青霉素V、2,6-二甲氧基苯青霉素、nafcillin、苯唑青霉素、邻氯青霉素、二邻氯青霉素、氨苄青霉素、羟氨苄青霉素、羧苄青霉素、羧噻吩青霉素、哌拉西林、美洛西林、阿洛西林)、多粘菌素B、喹诺酮和万古霉素;以及抑菌剂,例如氯霉素、clindamycin、大环内酯(例如红霉素、阿奇霉素、克拉霉素)、林可霉素、呋

喃妥因、磺胺、四环素(例如四环素、强力霉素、二甲胺四环素、去甲金霉素)和甲氧苄啶。还包括甲硝唑、氟喹诺酮和ritampin。

[0039] 酶抑制剂是抑制酶反应的物质。酶抑制剂的实例包括依酚氯铵、N-甲基毒扁豆碱、溴新斯的明、硫酸毒扁豆碱、他克林、1-羟基马来酸、碘杀结核菌素、对溴四咪唑、10-(α -二乙基氨基丙酰基)-盐酸吩噻嗪、氯化卡米达佐、密胆碱-3,3,5-二硝基儿茶酚、二酰基甘油激酶抑制剂I、二酰基甘油激酶抑制剂II、3-苯基丙炔胺、N⁶-1-甲基-L-乙酸精氨酸、卡比多巴、3-羟苄基胍、胍苯吡啶、氯吉兰、盐酸司立吉林、羟胺、磷酸异丙烟胍、6-甲氧基-四氢-9H-吡啶并吡啶、烟胍酰胺、帕吉林、唑吡因、氨基胍、反苯环丙胺、N,N-二乙基氨基乙基-2,2-二苯基戊酸盐、3-异丁基-1-甲基咕吨、罂粟碱、吡啶美辛、2-环辛基-2-盐酸羟乙胺、2,3-二氯- α -甲基苄胺(DCMB)、8,9-二氯-2,3,4,5-四氢-1H-2-盐酸苯氮杂萘、对-氨基苯乙哌啶酮、对-氨基酒石酸苯乙哌啶酮、3-碘酪氨酸、 α -甲基酪氨酸、乙酰唑胺、二氯苯磺胺、6-羟基-2-苯并噻唑磺酰胺和别嘌呤醇。

[0040] 抗组胺药包括吡拉明、氯苯吡胺和四氢唑啉等。

[0041] 抗炎剂包括皮质类固醇、甾族抗炎剂(例如阿司匹林、保泰松、吡啶美辛、舒林酸、托麦汀、布洛芬、吡罗昔康和芬那酸)、对乙氨基酚、非那西汀、金盐、氯喹、D-青霉胺、甲氨蝶呤秋水仙碱、别嘌呤醇、丙磺舒和苯磺唑酮。

[0042] 肌弛缓药包括麦酚生、methocarbamol、盐酸环苯扎林、盐酸苯海索、左旋多巴/卡比多巴和吡哌立登。

[0043] 抗痉挛药包括阿托品、东莨菪碱、羟苯乙胺和罂粟碱。

[0044] 镇痛药包括阿司匹林、保泰松、吡啶美辛、舒林酸、托麦汀、布洛芬、吡罗昔康、芬那酸、醋氨酚、非那西汀、硫酸吗啡、硫酸可待因、美吡利啶、纳洛酚、吗啡药物(例如硫酸可待因、枸橼酸芬太尼、重酒石酸二氢可待因酮、洛哌丁胺、硫酸吗啡、那可汀、去甲可待因、去甲吗啡、蒂巴因、nor-binaltorphimine、似普罗啡、chlornaltrexamine、funaltrexamine、纳布啡、纳洛酚、纳洛酮、naloxonazine、纳曲酮和naltrindole)、普鲁卡因、利多卡因、丁卡因和二丁卡因。

[0045] 眼用药包括荧光素钠、玫瑰红、乙酰甲胆碱、肾上腺素、可卡因、阿托品、 α -胰凝乳蛋白酶、透明质酸酶、betaxalol、匹鲁卡品、噻吗洛尔、噻吗洛尔盐及其组合。

[0046] 前列腺素是本领域公知的,是一类天然化学相关的、具有各种生物作用的长链羧基脂肪酸。

[0047] 抗抑郁剂是能够防止或减轻抑郁的物质。抗抑郁剂的实例包括丙咪嗪、阿米替林、去甲替林、普罗替林、去甲丙咪嗪、阿莫沙平、多塞平、麦普替林、反苯环丙胺、苯乙胍和异唑胍。

[0048] 生长因子是其持续存在提升细胞的存活力或寿命的因子。营养因子包括但不限于嗜中性白细胞活化蛋白、单核细胞趋化蛋白、巨噬细胞炎性蛋白、血小板因子、血小板碱性蛋白和黑素瘤生长刺激活性;表皮生长因子、转化生长因子(α)、成纤维细胞生长因子、血小板衍生内皮细胞生长因子、胰岛素样生长因子(IGF,例如IGF-I或IGF-II)、神经胶质衍生生长营养因子、睫状神经营养因子、神经生长因子、骨生长/软骨诱导因子(α 和 β)、骨形态发生蛋白(BMP)、白介素(例如白介素抑制剂或白介素受体,包括白介素1至白介素10)、干扰素(例如干扰素 α 、 β 和 γ)、造血因子(包括促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、巨噬细胞集

落刺激因子和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子);肿瘤坏死因子、转化生长因子(β),包括 β -1、 β -2、 β -3,转化生长因子(α)、抑制素和活化素;以及骨形态发生蛋白,例如OP-1、BMP-2和BMP-7。

[0049] 激素包括雌激素(例如雌二醇、雌酮、雌三醇、二乙基己烯雌酚、炔雌醚、氯烯雌醚、乙炔雌二醇、雌醇甲醚)、抗雌激素(例如氯米芬、他莫昔芬)、黄体酮(例如甲孕酮、炔诺酮、羟孕酮、甲基炔诺酮)、抗黄体酮(米非司酮)、雄激素(例如环戊丙酸睾酮、氟羟甲睾酮、炔羟雄烯异唑、睾内酯)、抗雄激素(例如醋酸环丙孕酮、氟他米特)、甲状腺激素(例如三碘甲状腺素、甲状腺素、丙硫氧嘧啶、甲硫咪唑和iodixone)和垂体激素(例如促肾上腺皮质激素、somatotropin、催产素和抗利尿素)。激素通常用于激素替代疗法和/或用于节育用途。甾类激素如强的松也用作免疫抑制剂和抗炎剂。

[0050] 期望生物活性剂也选自已知为转化生长因子- β (TGF- β)超家族蛋白的蛋白家族,其包括活化素、抑制素和骨形态发生蛋白(BMP)。在一个实施方案中,所述活性剂包括选自一般称为BMP的蛋白亚类的至少一种蛋白,业已公开BMP具有成骨活性和其它生长和分化类型的活性。这些BMP包括BMP蛋白BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6和BMP-7,例如公开于美国专利第5,108,922、5,013,649、5,116,738、5,106,748、5,187,076和5,141,905号;BMP-8,公开于PCT申请W091/18098;和BMP-9,公开于PCT申请W093/00432;BMP-10,公开于PCT申请W094/26893;BMP-11,公开于PCT申请W094/26892;或BMP-12或BMP-13,公开于PCT申请W095/16035;BMP-14;BMP-15,公开于美国专利第5,635,372号;或BMP-16,公开于美国专利第5,965,403号。其它可在本发明的磷酸钙组合中用作活性剂的TGF- β 蛋白包括Vgr-2, Jones等, Mol. Endocrinol. 6:1961(1992)以及生长和分化因子(GDF)中的任一种,包括描述于PCT申请W094/15965、W094/15949、W095/01801、W095/01802、W094/21681、W094/15966、W095/10539、W096/01845、W096/02559等中的那些。本发明还可使用公开于W094/01557的BIP、公开于JP公开号:7-250688的HP00269以及公开于PCT申请W093/16099的MP52。所有以上申请的公开内容都通过引用结合到本文中。可用于本发明的一部分BMP包括BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13、BMP-14和MP52。所述活性剂最优选为BMP-2,其序列公开于美国专利第5,013,649号,其公开内容都通过引用结合到本文中。还可使用本领域已知的其它成骨物质,例如特立帕肽(ForteoTM)、Chrysalin[®]、前列腺素E2、LIM蛋白、成骨蛋白或去矿质骨基质(DBM)等。

[0051] 所述生物活性剂可为化学合成的、重组生产的或由所述生物活性剂天然存在于其中的来源纯化。所述活性剂如果是TGF- β ,例如BMP或其它二聚化蛋白,则其可为同二聚化的,或者可与其它BMP异二聚化(例如由BMP-2和BMP-6各自的一个单体组成的异二聚体),或者可与TGF- β 超家族的其它成员(例如活化素、抑制素和TGF- β)异二聚化(例如由BMP和TGF- β 超家族相关成员各自的一个单体组成的异二聚体)。这种异二聚化蛋白的实例例如描述于公开的PCT专利申请W0 93/09229,其说明书通过引用结合到本文中。

[0052] 其余的生物活性剂包括Hedgehog、Frizzled、Chordin、Noggin、Cerberus和卵泡抑制素蛋白。这些蛋白家族一般描述于Sasai等, Cell 79:779-790(1994)(Chordin); PCT专利申请W094/05800(Noggin); 和Fukui等, Devel. Biol. 159:131(1993)(卵泡抑制素)。Hedgehog蛋白描述于W096/16668、W096/17924和W095/18856。Frizzled蛋白家族是近来发现的蛋白家族,与称为卷曲蛋白的受体蛋白家族的胞外结合域具有高同源性。卷曲蛋白家

族的基因和蛋白描述于Wang等, J Biol. Chem. 271:4468-4476(1996)。所述活性剂还可包括其它可溶性受体, 例如描述于PCT专利申请W095/07982的截短可溶性受体。根据W095/07982的教导, 本领域技术人员会认识到, 可制备众多其它受体蛋白的截短可溶性受体。上述出版物通过引用结合到本文中。

[0053] 有效刺激目标活性(例如增加现有或浸润的祖细胞或其它细胞的成骨活性)的生物活性蛋白(例如成骨蛋白)量将取决于待治疗缺陷的大小和特性以及所使用载体。一般来说, 要传递的蛋白量在约0.1至约100mg的范围内; 优选约1至约100mg; 最优选约10至约80mg。

[0054] 传递上列物质的标准方法和方案是本领域已知的。将生物活性剂以允许传递合适剂量的物质至植入部位的量导入植入材料中。在大多数情况下, 使用操作者已知的且适用于所述具体物质的指引确定剂量。包含在本发明植入材料中的生物活性剂的代表量可能取决于以下变量, 例如病症类型和程度、具体患者的整体健康状态、活性剂的成分和使用的传递载体的生物再吸收能力。可使用标准临床实验优化任何具体生物活性剂的剂量和给药频率。

[0055] 在本发明所有方面的一个实施方案中, 所述组合物可另外包含自体骨髓或自体血小板提取物。

[0056] 在上述所有方面的另一个实施方案中, PDGF和/或其它生长因子可得自天然来源(例如血小板), 或者更优选地通过重组DNA技术生产。当得自天然来源时, PDGF和/或其它生长因子可得自生物流体。生物流体包括与活体生物体相关的任何处理或未处理的流体(包括悬浮液), 具体地说是血液, 包括全血, 温血或冷血, 以及储存血或新鲜血; 处理的血液, 例如用至少一种生理溶液稀释的血液, 包括但不限于盐水、营养液和/或抗凝结溶液; 血液组分, 例如血小板浓缩物(PC)、机采血小板、富血小板血浆(PRP)、贫血小板血浆(PPP)、无血小板血浆、血浆、血清、新鲜冷冻血浆(FFP)、得自血浆的组分、压积红细胞(PRC)、血沉棕黄层(BC); 得自血液或血液组分或得自骨髓的血制品; 分离自血浆并重悬浮在生理性液体中的红细胞; 以及分离自血浆并重悬浮在生理性液体中的血小板。可处理生物流体, 以在按照本发明处理前去除某些白细胞。本文使用的血制品或生物流体指上述组分, 以及指通过其它方法获得并具有相似特性的类似血制品或生物流体。在一个实施方案中, PDGF得自富血小板血浆(PRP)。PRP的制备描述于例如美国专利第6,649,072、6,641,552、6,613,566、6,592,507、6,558,307、6,398,972和5,599,558号, 这些专利通过引用结合到本文中。

[0057] 在本发明所有方面的一个实施方案中, 植入材料在至少1天以上的时间段内于植入部位传递PDGF。在几个实施方案中, 植入材料在至少7、14、21或28天内于植入部位传递PDGF。优选地, 植入材料在约1天至7、14、21或28天之间的时间内于植入部位传递PDGF。在另一个实施方案中, 植入材料在超过约1天但少于约14天的时间内于植入部位传递PDGF。

[0058] 所述“可生物再吸收的”指植入材料在体内被吸收或重塑的能力。吸收过程包括通过体液、酶或细胞的作用降解和消除最初的植入材料。再吸收的材料可由宿主用于形成新组织, 或者可由宿主以其它方式再利用, 或者可排泄出来。

[0059] 所述“分化因子”指含至少6个氨基酸的链的多肽, 其刺激一种或多种靶细胞分化为具有软骨或骨形成潜力的细胞。

[0060] 所述“纳米大小的颗粒”指亚微米大小的颗粒, 一般定义为1000纳米以下的颗粒。

纳米大小的颗粒是介于分子和宏观物质之间的中间态的固体颗粒材料。纳米颗粒定义为一米的十亿分之一(1纳米=10⁻⁹m)。纳米材料已知为具有毫微尺度的粉末、纤维、薄膜或块。

[0061] 所述“牙周组织”指牙齿周围和支持牙齿的组织。牙周组织支持、保护牙齿并为牙齿提供营养。牙周组织由骨、牙骨质、上颌骨和下颌骨的牙槽突、牙周韧带和齿龈组成。牙骨质是一层薄的钙化组织,完全覆盖牙根的牙质。牙骨质在牙根的发育过程中形成,贯穿牙齿终生,起牙周韧带纤维的附着区域的作用。牙槽突是上颌骨和下颌骨的骨质部分,牙齿包埋在这里,牙根在其中得到支持。牙槽是牙槽突中的空穴,其中牙根由牙周韧带保持。分开一个槽与另一个槽的骨叫做牙间隔膜。当存在多根牙时,所述骨叫做根间隔膜。牙槽突包括皮质板、牙槽嵴、骨小梁和固有牙槽骨。

[0062] 所述“促进生长”指骨、牙周组织、韧带或软骨的痊愈和这种组织和结构的再生。优选地,骨、牙周组织、韧带或软骨受损或受伤,需要再生或痊愈。

[0063] 所述“促进牙周组织生长”指已被疾病或外伤损坏的牙齿支持组织(包括牙槽骨、牙骨质和插入的牙周韧带)的再生或康复。

[0064] 所述“纯化的”指生长因子或分化因子(例如PDGF)在与载体物质混合前为95%重量或以上,即所述因子基本无与其天然结合的其它蛋白、脂质和糖。术语“基本纯化的”指较低纯度的因子,具有例如仅5%-95%重量的所述因子,优选65-95%。纯化的蛋白制品一般在聚丙烯酰胺凝胶上产生单一主带。最优选地,根据氨基末端的氨基酸序列分析来判断,用于本发明植入材料的纯化因子是纯的。术语“部分纯化的”指在PRP、PPP、FFP或需要例如通过离心收集和分离来生产的任何其它血制品背景中提供的PDGF。

[0065] 作为实例,当PDGF约为50%纯时,具有约1.0mg/mL PDGF的溶液等同于约2.0mg/mL 总蛋白。

[0066] 本发明的植入材料至少部分地通过促进结缔组织、骨和牙骨质的生长帮助牙周组织再生。可制备植入材料,使得它们直接促进产生结缔组织、骨和牙骨质的细胞的生长和分化。或者,可制备植入材料,使得它们通过例如吸引促进结缔组织、骨和牙骨质生长必需的细胞间接起作用。和使用系统抗生素或单独的手术清创术获得的效果相比,使用本发明组合物的再生治疗牙周疾病或骨损伤更有效。

[0067] PDGF、多肽生长因子和分化因子可通过固相肽合成或通过重组DNA技术由人组织或细胞(例如血小板)获得。因此,就术语“多肽生长因子”或“分化因子”而言,我们指组织或细胞源的、重组或合成的材料。如果所述因子是二聚体,例如PDGF,则重组因子可为重组异二聚体,其如下制备:将编码所述因子的两个亚单位的DNA序列插入到培养的原核细胞或真核细胞中,然后让翻译的亚单位被细胞加工,以形成异二聚体(例如PDGF-AB)。或者,可将仅编码其中一个亚单位(例如PDGF B-链或A-链)的DNA插入细胞中,然后培养细胞,以生产同二聚化因子(例如PDGF-BB或PDGF-AA同二聚体)。用于本发明方法的PDGF包括PDGF同二聚体和异二聚体,例如PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC和PDGF-DD及其组合和衍生物。

[0068] 可通过使用如例如美国专利第6,221,625、5,747,273和5,290,708号(这些专利通过引用结合到本文中)描述的酶联免疫吸附测定或本领域已知用于测定蛋白浓度的任意其它实验,测定本发明的PDGF或其它生长因子的浓度。当在本文中提供时,基于PDGF二聚体分子量(PDGF-BB;MW=约25kDa)测定PDGF的摩尔浓度。

[0069] 本发明的方法和植入材料可用于治愈哺乳动物的骨损伤,例如骨折、植入体容纳

部位和牙周疾病部位。相比于天然愈合(即没有外源物质)或通过加入系统抗生素补充的愈合,植入材料促进结缔组织生长以及修复和增强骨形成。与天然愈合、常规外科治疗或抗生素不同,本发明的植入材料当施用于受损或患病组织或牙周疾病侵袭部位时,迅速增加骨、结缔组织(例如软骨和韧带)和牙骨质形成。这些组织的恢复导致受侵袭区域的预后改善。这些因子刺激新骨形成的能力还使其可适用于治疗由其它类型的感染或手术或意外损伤引起的骨缺损。

[0070] 由以下的本发明实施方案的描述和权利要求书显而易见本发明的其它特征和优势。

[0071] 附图简述

[0072] 图1A-1G是显微照片,显示了治疗后8周时对骨形成的作用。图1A是显微照片,显示了单独的手术对骨形成的作用。图1B是显微照片,显示了单独的 β -TCP对骨形成的作用。图1C是显微照片,显示了 β -TCP+0.3mg/mL PDGF对骨形成的作用。图1D是显微照片,显示了 β -TCP+1.0mg/mL PDGF对骨形成的作用。图1E是显微照片,显示了单独的去矿质冻干骨同种异体移植物(DFDBA)对骨形成的作用。图1F是显微照片,显示了去矿质冻干骨同种异体移植物(DFDBA)+0.3mg/mL PDGF对骨形成的作用。图1G是显微照片,显示了去矿质冻干骨同种异体移植物(DFDBA)+1.0mg/mL对骨形成的作用。

[0073] 图2A-2C是显微照片,显示了治疗后16周时对骨形成的作用。图2A是显微照片,显示了单独的 β -TCP对骨形成的作用。图2B是显微照片,显示了 β -TCP+0.3mg/mL PDGF对骨形成的作用。图2C是显微照片,显示了 β -TCP+1.0mg/mL PDGF对骨形成的作用。

[0074] 发明详述

[0075] 我们现在描述了本发明的几个实施方案。以下列出了两个实例,其表明了PDGF作为骨和牙周组织愈合剂的用途。

实施例

[0076] 实施例1:PDGF的制备

[0077] 按照本发明,通过组合部分纯化或纯化的PDGF与上述任何药物可接受的载体物质,治疗骨伤口,例如牙周疾病或创伤之后的骨伤口,并再生牙周组织,包括骨、牙骨质和结缔组织。纯化的PDGF可得自重组来源或人血小板。市售重组PDGF可得自R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN)、BD Biosciences (San Jose, CA)和Chemicon, International (Temecula, CA)。部分纯化和纯化的PDGF也可如下制备:

[0078] 将500-1000单位的清洗过的人血小板沉淀悬浮在1M NaCl(2ml/血小板单位)中,并加热至100°C达15分钟。然后通过离心分离上清液,用1M NaCl提取沉淀两次。

[0079] 混合提取物,并对0.08M NaCl/0.01M磷酸钠缓冲液(pH 7.4)透析,于4°C与用该缓冲液平衡的CM-Sephadex C-50混合过夜。然后将混合物倾入柱(5×100cm)中,用0.08M NaCl/0.01M磷酸钠缓冲液(pH 7.4)彻底清洗,用1M NaCl洗脱,同时收集10ml各级分。

[0080] 合并活性级分,对0.3M NaCl/0.01M磷酸钠缓冲液(pH 7.4)透析,离心,并于4°C通过用0.3M NaCl/0.01M磷酸钠缓冲液(pH 7.4)平衡的2.5×25cm Blue sepharose (Pharmacia)柱。然后用所述缓冲液流洗该柱,用1M NaCl和乙二醇的1:1溶液洗脱部分纯化的PDGF。

[0081] 部分纯化的PDGF级分与1M NaCl稀释(1:1),对1M乙酸透析,并冻干。冻干样品溶解在0.8M NaCl/0.01M磷酸钠缓冲液(pH 7.4)中,并通过用所述缓冲液平衡的1.2×40cm CM-Sephadex C-50柱。然后用NaCl梯度(0.08-1M)洗脱PDGF。

[0082] 合并活性级分,对1M乙酸透析,冻干,并溶解在少量1M乙酸中。0.5ml部分上样至用1M乙酸平衡的1.2×100cm Biogel P-150(100-200目)柱。然后用1M乙酸洗脱PDGF,同时收集2mL各级分。

[0083] 冻干含100-200mg蛋白的各个活性级分,溶解在100mL 0.4%三氟乙酸中,在苯基Bondapak柱(Waters)上进行反相高效液相层析。用线性乙腈梯度(0-60%)洗脱获得纯PDGF。

[0084] 可如下制备通过重组DNA技术产生的PDGF:

[0085] 来源于人血小板的血小板衍生生长因子(PDGF)包含两个多肽序列(PDGF-B和PDGF-A多肽;Antoniades,H.N.和Hunkapiller,M.,Science 220:963-965,1983)。PDGF-B由位于染色体7的基因编码(Betsholtz,C.等,Nature 320:695-699),PDGF-A由位于染色体22(Dalla-Favera,R.,Science 218:686-688,1982)的sis癌基因编码(Doolittle,R.等,Science 221:275-277,1983)。sis基因编码与PDGF-2多肽密切相关的猿猴肉瘤病毒(SSV)转化蛋白。人细胞c-sis也编码PDGF-A链(Rao,C.D.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:2392-2396,1986)。因为PDGF的两条多肽链由位于单独染色体中的两种不同基因编码,所以存在以下可能性:人PDGF由二硫键合的PDGF-B和PDGF-A的异二聚体组成,或由两种同二聚体(PDGF-BB同二聚体和PDGF-AA同二聚体)的混合物组成,或由异二聚体和两种同二聚体的混合物组成。

[0086] 已表明,在用含PDGF-A链编码基因的猿猴肉瘤病毒感染的培养物中哺乳动物细胞合成PDGF-A多肽,并将其加工成二硫键合的同二聚体(Robbins等,Nature 305:605-608,1983)。另外,PDGF-A同二聚体与针对人PDGF产生的抗血清反应。而且,分泌的PDGF-A同二聚体的功能特性类似于血小板衍生的PDGF的功能特性,因为其在培养的成纤维细胞中刺激DNA合成,在185kD细胞膜蛋白的酪氨酸残基处诱导磷酸化,并能够与人(¹²⁵I)-PDGF竞争结合特异性细胞表面PDGF受体(Owen,A.等,Science 225:54-56,1984)。来源于培养的正常人细胞(例如人动脉内皮细胞)或表达sis/PDGF-2基因的人恶性细胞(Antoniades,H.等,Cancer Cells 3:145-151,1985)的sis/PDGF-A基因产物显示出相似特性。

[0087] 使用表达载体通过将c-sis/PDGF-B基因的cDNA克隆导入小鼠细胞中获得重组PDGF-B同二聚体。用于表达的c-sis/PDGF-B克隆得自正常人培养内皮细胞(Collins,T.等,Nature 216:748-750,1985)。

[0088] PDGF的用途

[0089] 单独的或与其它生长因子组合的PDGF可用于促进骨愈合、骨生长和再生或者创伤或疾病损伤的牙齿支持结构的愈合。其还可用于促进拔牙部位、下颌脊增高或植牙部位的愈合。在骨折部位或感染区域(例如骨髓炎)或肿瘤部位的骨愈合也应增强。PDGF还可用于促进韧带(例如牙周韧带)和牙骨质的生长和愈合。

[0090] 在使用时,PDGF或其它生长或分化因子直接应用于需要愈合或再生的区域。一般来说,其应用在为液体或固体的可再吸收或不可再吸收载体中,然后用绷带或接近的薄纱包裹该部位。对于1cm²面积,足以促进骨生长的量一般在500ng至5mg之间,但1cm²面积的上

限事实上为1mg,优选的PDGF施用量为0.3mg/mL。

[0091] 实施例II:采用rhPDGF-BB处理的骨传导性支架的牙周再生

[0092] PDGF促进牙周组织和骨生长的有效性由以下研究证实。

[0093] 狗体内研究

[0094] 猎犬是用于测试推定的牙周再生材料和方法的最广泛使用的动物模型(Wikesjo等, J Clin. Periodontol. 15:73-78, 1988; Wikesjo等, J. Clin. Periodontol. 16:116-119, 1999; Cho等, J. Periodontol. 66:522-530, 1995; Giannobile等, J Periodontol. 69:129-137, 1998; 和 Clergeau等, J Periodontol. 67:140-149, 1996)。菌斑和结石累积可诱发可导致周边骨质流失的齿龈炎,狗和人中的牙周炎病原学是可比较的。但是,在天然疾病中,缺损之间没有一致性。另外,由于已对犬育种群中的口部健康给予了更多关注,所以获得具有天然牙周疾病的动物已变得不切实际。因此,手术诱发的横向III型分叉模型已变成研究牙周愈合和再生的最常用模型之一。

[0095] 使用本发明的PDGF组合物治疗具有横向III型分叉缺损的猎犬。15只成年猎犬提供了60处处理过的缺损。治疗后2个月活检42处缺损,在治疗后4个月活检15处缺损。

[0096] 缺损创建

[0097] 使用如众多研究者描述的“极限”牙周缺损模型(参见例如Wikesjo, 1988和1999, 出处同上; Giannobile, 出处同上; Cho, 出处同上; 和Park等, J. Periodontol. 66:462-477, 1995)。使用没有全身和口部健康问题的16只雄性猎犬(2-3岁)的左右两个下颌骨。在给药前1个月,在用IV注射戊巴比妥钠(25mg/kg)麻醉前约30分钟,皮下注射阿托品(0.02mg/kg)和乙酰丙嗪(0.2mg/kg)使动物镇静。在用盐酸利多卡因加肾上腺素1:100,000局部浸润手术部位后,翻开全厚瓣,拔出第一和第三前臼齿(P1和P3)。另外,切除第一臼齿牙冠的近中部分。

[0098] 然后使用凿子和水冷碳化物以及金钢砂钻去除包括分叉区在内的P2和P4整个周缘附近的牙槽骨。建立横向骨缺损,使得分叉穹窿距骨嵴的距离为5mm。所述缺损约1cm宽,这取决于牙齿宽度。用刮匙和超声设备平整所有实验牙齿的根,并用锥形金钢砂钻处理,以去除牙骨质。在建立标准化骨缺损后,缝合龈瓣,以实现一期缝合。动物喂饲软食,在研究过程中每日接受洗必泰淋洗。

[0099] 移植材料的应用

[0100] 随机化15只动物左右下颌骨每一个中的P2和P4的牙周缺损,然后使用封膜处理。在创建缺损后约4周,如上所述再麻醉动物,翻开左右两个下颌骨中的全厚瓣。使用1/2球钻在余下骨嵴处的牙根表面做一个切迹,以用作以后的组织参照点。该部位用无菌盐水冲洗,为了净化和去除涂层,如前所述用柠檬酸处理牙根(参见例如Cho, 出处同上, 和Park, 出处同上)。在此阶段中,用rhPDGF-BB溶液(0.3或1.0mg/ml)饱和其量足以填补牙周缺损的 β -TCP或DFDBA,令rhPDGF-BB/移植混合物在无菌手术台上静置约10分钟。然后以轻微压力将rhPDGF-BB饱和的移植物挤入缺损中,达到理想的骨再生水平。

[0101] 在植入移植材料后,使用邻间(interproximal)间断(interrupted)的4.0膨体聚四氟乙烯(ePTFE)缝线与牙骨质牙釉质交界(CEJ)近似水平地缝合全厚瓣。在缝瓣后,轻轻地将葡萄糖酸洗必泰胶敷在牙齿和齿龈周围。

[0102] 治疗和对照组

[0103] 缺损接受以下的任一种：

[0104] 1. β -TCP

[0105] 2. β -TCP+rhPDGF-BB(0.3mg/ml rhPDGF-BB)

[0106] 3. β -TCP+rhPDGF-BB(1.0mg/ml rhPDGF-BB)

[0107] 4. 狗DFDBA

[0108] 5. 狗DFDBA+rhPDGF-BB(0.3mg/ml rhPDGF-BB)

[0109] 6. 狗DFDBA+rhPDGF-BB(1.0mg/ml rhPDGF-BB)

[0110] 7. 假手术(仅通过开瓣清创术处理,无移植物)

[0111] 在两个月时活检每个治疗组的6处缺损(共42个部位)。另外,在4个月时活检治疗组1、2和3中的5处缺损(共15个部位)。

[0112] 表2. 实验设计

[0113]

组别	测试部位数量	治疗	时间点
1	11	单独的 β -TCP	8 和 16 周 n = 6, 8 周 n = 5, 16 周
2	11	β -TCP + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB	8 和 16 周 n = 6, 8 周 n = 5, 16 周
3	11	β -TCP + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB	8 和 16 周 n = 6, 8 周 n = 5, 16 周
4	6	单独的 DFDBA	8 周
5	6	DFDBA + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB	8 周
6	6	DFDBA + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB	8 周
7	6	手术, 无移植	8 周

[0114] 因此,在8周时,将11只狗中的42个部位分为7组。在16周时,将4只狗中的15个部位分为3组(1只狗相距8周交错接受两种治疗手术,因此为8周和16周时间点各自提供了两个部位)。

[0115] 术后治疗

[0116] 通过在术后前4周当中喂饲狗软食保护手术部位。为确保最佳愈合,前2周提供采用苜蓿青霉素G的全身抗生素治疗,在整个实验中,通过每日用2%葡糖酸洗必泰冲洗维持菌斑对照。在3周后去除缝线。

[0117] 数据收集

[0118] 数据收集点的基本原理

[0119] 选择8周的时间点,因为这是文献中针对该模型报告的最常见时间点,因此有丰富

的历史数据。例如Wikeshjo等,出处同上和Giannobile等,出处同上也在相同模型中选择8周时间点分别评价BMP-2和OP-1的再生作用。另外,Park等,出处同上在8周时于猎犬模型中评价了直接应用于有和没有GTR膜的病态根表面的rhPDGF-BB作用。这些研究强有力地表明,8周周期对表明不同治疗模式中的潜在重要作用应是最优的。

[0120] 选择16周时间点,以评价生长因子治疗的长期作用。先前的研究(Park等,出处同上)表明,至该时间时存在显著的骨缺损自发愈合。不过,有可能评价rhPDGF-BB治疗是否导致任何不常见或不正常的组织反应,例如改变的骨重建、肿瘤发生或根再吸收。

[0121] 活检和治疗评价

[0122] 在活检时,动物用4%多聚甲醛灌注并处死。然后取出下颌骨并置于固定剂中。对根尖周进行放射照相,使用金刚石锯将治疗部位切成单独的块。以纱布缠绕编码的(盲的)块,浸入到4%多聚甲醛溶液中、处理并分析。

[0123] 在处理过程中,活检品在乙醇中脱水,在甲基丙烯酸甲酯中浸润和包埋。用低速金刚石锯和冷却剂获得约300 μ m厚度的未脱钙切片。将切片粘合在乳光丙烯酸玻璃上,研磨至约80 μ m的最终厚度,用甲苯胺蓝和碱性品红染色。获得近远中径平面的分步连续切片。

[0124] 对覆盖载玻片进行组织形态计量学分析。评价以下参数:

[0125] 1.全新附着物的长度(CNAA):以旧骨牙冠高度和新骨牙冠高度之间的距离检测牙周再生,仅包括邻接新牙骨质的新骨以及在新骨和新牙骨质之间具有功能定向的牙周韧带。

[0126] 2.新骨填充(NB):检测分叉中形成的新骨的横切片区域。

[0127] 3.结缔组织填充(CT):检测分叉中由齿龈结缔组织占据的区域。

[0128] 4.空隙(V0):其中没有组织的退缩区域。

[0129] 结果

[0130] A.临床观察

[0131] 在临床上,所有部位都愈合良好。根据术后1周内存在健壮的粉红齿龈的指示,有一个印象是rhPDGF-BB治疗的部位愈合得更快速。根据治疗部位目检评价,任何治疗组都未经历不利事件。似乎在接受单独的 β -TCP或DFDBA的组别中的齿龈退缩增加。

[0132] B.放射照相观察

[0133] 经放射照相观察,其它组相比,根据组2、3(β -TCP+rhPDGF-BB,分别为0.3和1.0mg/ml)和6(DFDBA+rhPDGF-BB 1.0mg/ml)中射线不透性增加来判断,有证据表明在2个月时骨形成增加(图1A-G)。在4个月时,与两个月的时间点相比,有证据表明所有组中的骨形成都增加。没有放射照相证据表明在任何组中存在任何异常的骨重建、牙根吸收或关节强硬。

[0134] 表3.放射照相结果。等级次序

[0135]

在第 8 周*时骨 填充的定量评价	治疗
6	单独的 β -TCP
1	β -TCP + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB
2	β -TCP + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB
7	单独的 DFDBA
5	DFDBA + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB
3	DFDBA + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB
4	手术, 无移植

[0136] *1=大部分填充;7=少部分填充

[0137] C.组织形态计量学分析:

[0138] 对新牙骨质、新骨和新牙周韧带(CNAA)的长度进行组织形态计量学评价,以及评价新骨填充、结缔组织填充和空隙空间,并以百分率表示。就CNAA而言,各个测试组的值代表CNAA检测结果(mm长度)/可用的CNAA总长度(mm) $\times 100\%$ 。评价骨填充、结缔组织填充和空隙空间,并以总分叉缺损区域的百分率表示。

[0139] 单因素方差分析(ANOVA)用于测试治疗组中的整体差异,使用Student's t检验进行成对对比。在分析编码载玻片时发现组间的显著差异。表4显示了两个月时的结果。

[0140] 表4.两个月时的组织计量学分析

[0141]

组别	治疗	CNAA 牙周 再生%	骨填充%	结缔组织 填充%	空隙%
1	单独的 β -TCP	37.0 $\pm$ 22.8 **	28.0 $\pm$ 29.5	36.0 $\pm$ 21.5	12.0 $\pm$ 17.9
2	β -TCP + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB	59.0 $\pm$ 19.1*, †	84.0 $\pm$ 35.8 †, ‡	0.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 17.9
3	β -TCP + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB	46.0 $\pm$ 12.3 *	74.2 $\pm$ 31.7 ‡	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
4	单独的 DFDBA	13.4 $\pm$ 12.0	6.0 $\pm$ 8.9	26.0 $\pm$ 19.5	30.0 $\pm$ 27.4
5	DFDBA + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB	21.5 $\pm$ 13.3	20.0 $\pm$ 18.7	36.0 $\pm$ 13.4	18.0 $\pm$ 21.7
6	DFDBA + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB	29.9 $\pm$ 12.4	46.0 $\pm$ 23.0 $\neq$	26.0 $\pm$ 5.48	8.0 $\pm$ 13.04
7	假手术, 无移植	27.4 $\pm$ 15.0	34.0 $\pm$ 27.0	48.0 $\pm$ 35.64	10.0 $\pm$ 22.4

[0142] *组2和3显著高于($p < 0.05$)组4和7。

[0143] **组1显著高于($p < 0.05$)组4。

[0144] †组2显著高于($p < 0.05$)组5。

[0145] ‡组2和3显著高于组1、4和7。

[0146] ≠组6显著高于组4。

[0147] 在无移植物的手术组和手术+单独的 β -TCP组中的平均牙周再生百分率(CNAA)分别为27%和37%。相反,含rhPDGF-BB的 β -TCP组表现出的牙周再生显著高于($p < 0.05$)无移植物的手术或单独的DFDBA(对于0.3和1.0mg/ml浓度分别为59%和46%,相比之下对于单独的手术为27%,对单独的DFDBA为13%)。最后,含0.3mg/ml rhPDGF-BB的 β -TCP组表现出的牙周再生显著高于($p < 0.05$)与同种异体移植组合的相同浓度rhPDGF-BB(59%对21%)。

[0148] 在 β -TCP+0.3mg/ml rhPDGF-BB(84.0%)和 β -TCP+1.0mg/ml rhPDGF-BB(74.2%)组中的骨填充显著高于($p < 0.05$)单独的 β -TCP(28.0%)、单独的手术(34%)或单独的DFDBA(6%)治疗组。与DFDBA+0.3mg/ml rhPDGF-BB组相比, β -TCP+0.3mg/ml rhPDGF-BB组的骨填充显著较高($p < 0.05$)(分别为84%和20%)。

[0149] 检查DFDBA组和单独的手术组的8周数据的分析组(组4、5、6和7)表明,就牙周再生而言(CNAA),在DFDBA组和单独的手术组之间没有统计学显著的差异。存在着以下趋势:和单独的DFDBA相比,用1.0mg/ml rhPDGF-BB增强的DFDBA治疗的部位再生较高。与单独的DFDBA相比,用DFDBA+1.0mg/ml rhPDGF-BB治疗的部位的骨填充显著较高($p < 0.05$)(分别为46和6%)。存在着以下趋势:和单独的DFDBA或单独的手术相比,含0.3mg/ml rhPDGF-BB的DFDBA治疗的部位的骨填充较高。但是,和单独的手术相比,用单独的DFDBA治疗的部位表现出进入缺损的骨填充较少(分别为6和34%),大部分缺损没有任何填充或由齿龈(软)结缔组织组成的填充。

[0150] 在治疗后的4个月,牙周再生仍有显著差异。由于广泛的关节强硬,单独的 β -TCP产生36%再生,而用含rhPDGF-BB的 β -TCP治疗的部位在0.3和1.0mg/ml rhPDGF-BB浓度具有58%和49%的平均再生。在全部3个治疗组中都存在显著的骨填充。单独的 β -TCP产生70%骨填充, β -TCP+0.3mg/ml rhPDGF获得100%填充,而1.0mg/ml rhPDGF组具有75%填充。

[0151] D.组织学评价

[0152] 除了一个由于处理过程中遇到困难而不能评价以外,对其余的所有活检品进行组织学评价。

[0153] 示例性显微照片示于图1A-G和2A-C。图1A显示了用单独的手术(无移植物)治疗的部位的结果。该样本显示了在切迹区域中显现出来的有限的牙周再生(新骨(NB)、新牙骨质(NC)和牙周韧带(PDL)),并仅向牙冠方向伸出短距离。分叉区主要由密集软结缔组织(CT)占据,新骨(NB)形成最少。

[0154] 对于用单独的 β -TCP治疗的部位(图1B),存在的牙周再生类似于对单独手术样本所观察到的,其由切迹底部向牙冠方向伸出短距离。如在单独手术样本中所观察到的,新骨形成非常少,最大的分叉区由软结缔组织占据。

[0155] 相反,图1C显示了对用 β -TCP+0.3mg/ml rhPDGF-BB治疗的部位所获得的结果。显示出显著的牙周再生,新骨、新牙骨质和牙周韧带沿着分叉区的整个表面延伸。另外,分叉区被新骨填充,新骨将分叉的完整高度延伸至穹窿。

[0156] β -TCP+1.0mg/ml rhPDGF-BB治疗的部位的示例性结果示于图1D。尽管在分叉中有显著的牙周再生,但其没有沿着分叉的整个表面延伸。存在新骨形成连同在缺损的牙冠部分观察到的软结缔组织,以及在分叉穹窿处没有任何组织的小空间(V0)。

[0157] 图2A、2B和2C表明了对同种异体移植治疗组所获得的结果。单独的DFDBA组(图2A)的示例性结果显示出非常差的牙周再生,其局限于切迹区域,仅在牙冠方向上稍微延伸。新骨形成有限,沿着剩余的DFDBA移植材料表面由少量骨形成组成(沿着较亮的粉色岛的黑红色染色)。另外,新骨被在牙冠方向上延伸以填充分叉内明显区域的大量软结缔组织包围。最后,大空隙空间由软结缔组织的牙冠范围延伸至分叉穹窿。

[0158] DFDBA+0.3和1.0mg/ml rhPDGF-BB的组织学结果分别示于图2B和2C。相比于单独的DFDBA,两组都表现出较高的牙周再生,全新附着物(新骨、新牙骨质和牙周韧带)由根中的切迹底部向牙冠方向延伸短距离(箭头)。它们还在分叉区中具有更大的骨填充,尽管存在软结缔组织对分叉的显著填充。

[0159] 结论

[0160] 基于研究结果,使用0.3mg/mL或1.0mg/mL的rhPDGF-BB与合适载体物质(例如 β -TCP)组合治疗牙周缺损,产生的牙周再生高于现有产品或方法,例如采用单独的 β -TCP或骨同种异体移植物的移植或没有移植物的牙周手术。

[0161] 用0.3mg/mL和1.0mg/mL浓度的rhPDGF治疗引起牙周再生。与1.0mg/ml浓度的rhPDGF相比,0.3mg/ml浓度的rhPDGF在与 β -TCP混合时表现出更好的牙周再生和骨填充百分率。

[0162] β -TCP在与任何浓度的rhPDGF-BB混合时都比同种异体移植更有效。在所有组中新骨一般随时间(0、8和16周)成熟(重建)。在rhPDGF组中,关节强硬或牙根吸收没有增加。实际上,接受rhPDGF-BB的部位出现的关节强硬往往少于对照部位。该观察结果可能由以下事实引起:rhPDGF-BB对牙周韧带细胞是促有丝分裂的和趋化性的。

[0163] 材料和方法

[0164] 使用的材料:测试和对照样品

[0165] 使用的 β -TCP具有为牙周用途而优化的颗粒大小(0.25mm-1.0mm)。基于使用犬模型的研究,给予的 β -TCP在3个月内约80%被再吸收,并在愈合过程中被自体骨置换。

[0166] DFDBA由Musculoskeletal Transplant Foundation(MTF)提供。该材料是狗同种异体移植,由在完成了另一个研究后被处死的狗的骨制备,所述另一个研究被检验为对骨骼组织没有作用的手术方法。

[0167] 重组hPDGF-BB由BioMimetic Pharmaceuticals提供,由FDA批准的人用rhPDGF-BB的唯一供应商Chiron, Inc生产。该rhPDGF-BB由FDA批准为伤口愈合制品,商标名称为**Regranex®**。

[0168] 含两个单独浓度的0.5ml无菌rhPDGF-BB的1ml注射器依照FDA的人用材料标准并按照现行适用的药品生产质量管理规范(cGMP)制备。测试浓度包括0.3mg/ml和1.0mg/ml。

[0169] β -TCP在含0.5cc无菌颗粒的小瓶中提供。

[0170] DFDBA在含1.0cc无菌、去矿质的冻干狗骨同种异体移植物的2.0ml注射器中提供。

[0171] 材料制备

[0172] 在手术过程中,通过将rhPDGF-BB溶液与基质材料混合制备最终植入的移植。简

单地讲,将其量足以完全填充骨缺损的TCP或同种异体移植物置于无菌皿中。然后加入足以完全饱和基质的rhPDGF-BB溶液,混合材料,使其于室温在手术盘上静置约10分钟,然后填于骨缺损中。

[0173] 与 β -TCP材料的10分钟温育时间足以获得生长因子的最大吸收(参见附件A)。这对临床部门外科医生也是将制品填入牙周缺损之前拥有的适宜时间量。同样,在商品市场中,rhPDGF-BB和基质材料可在试剂盒的单独容器中提供,所述材料可在填入前直接混合。该试剂盒理念应极大地简化了制品有效期/稳定性因素。

[0174] 实施例III:PDGF治疗人中的牙周骨缺损的用途

[0175] 测试重组人PDGF-BB(rhPDGF-BB)在人受试者中对牙周骨再生的作用。给予两个测试组0.3mg/mL(组I)或1.0mg/mL(组II)的rhPDGF-BB。rhPDGF-BB在乙酸钠缓冲液中制备,在 β -磷酸三钙(β -TCP)载体中给予。对照组组III仅给予在乙酸钠缓冲液中的 β -TCP。

[0176] 临床研究的目标是评价含 β -TCP和0.3mg/mL或1.0mg/mL的rhPDGF-BB的移植材料在1-3壁骨内牙周缺损管理中的安全性和有效性,以及评价其在骨和软组织中的再生能力。

[0177] 研究设计和治疗时程

[0178] 研究是在需要手术治疗邻近自然牙列的骨缺损的受试者中进行的双盲、受控、前瞻、随机、平行设计、多中心临床实验。所述受试者以相等比例随机化,产生3个治疗组,每组约60名受试者(共180名)。研究时程为植入研究装置后6个月。研究招募了180名受试者。

[0179] 诊断和主要入选标准

[0180] 在至少一个部位具有需要手术治疗以修正骨缺损的晚期牙周疾病的25-75岁男性和女性受试者被许可进入研究。其它入选标准包括:1)在筛查随访时检测出7mm或以上的牙周袋探诊深度;2)在手术清创后,具有至少1骨壁的4mm或以上的垂直骨缺损(BD);3)足量的角化组织,以使组织完全覆盖缺损;和4)根据放射照片,缺损底部在牙冠方向距牙齿顶部至少3mm。明确允许1天吸烟达1包并具有I型和II型分叉病变的受试者入选。

[0181] 给予的剂量和方式

[0182] 所有的治疗试剂盒都包含0.25g β -TCP(阳性对照),各治疗组还包含单独的0.5mL乙酸钠缓冲溶液(组III)、0.3mg/mL rhPDGF-BB(组I)或1.0mg/mL rhPDGF-BB(组II)。

[0183] 在整个清创术和根面平整术之后,测试溶液与 β -TCP在无菌容器中混合,使得 β -TCP被完全饱和。使用四环素、EDTA或柠檬酸使牙根表面病态化。然后将水合的移植物挤入骨缺损中,组织瓣用牙间缝合保护,以实现对手术部位的完整覆盖。

[0184] 有效性检测

[0185] 主要的有效性检测包括基线和术后6个月之间临床附着水平(CAL)的变化(组I对组III)。次要的有效性检测包括以下结果:1)基于放射照片评价,由基线至术后6个月的线性骨生长(LBG)和骨填充%(BF)(组I和组II对组III);2)基线和术后6个月之间的CAL变化(组II对组III);3)基线和术后6个月之间的牙周袋探诊深度减少(PDR)(组I和组II对组III);4)基线和术后6个月之间的齿龈退缩(GR)(组I和组II对组III);5)在术后前3周当中手术部位的伤口愈合(WH)(组I和组II对组III);6)基线与3和6个月之间的CAL变化的曲线下面积(组I和组II对组III);7)在术后6个月时BF的95%置信下限(LCB)(组I、II和III对如在文献Parashis等,J.Periodontol.69:751-758,1998中公开的去矿质冻干骨同种异体移植物(DFDBA));8)在术后6个月时的线性骨生长的95%LCB(组I、II和III对如在文献

Persson等, J.Clin.Periodontol. 27:104-108, 2000中公开的去矿质冻干骨同种异体移植(DFDBA)); 9) 基线和6个月之间的CAL变化的95%LCB(组I、II和III对EMDOGAIN®-PMA P930021, 1996); 和10) 基线和6个月之间的CAL变化的95%LCB(组I、II和III对PEPGEN P-15™-PMA P990033, 1999)。

[0186] 统计方法

[0187] 通过描述性统计检验和总结安全性和有效性数据。分类检测表示为数字和百分率, 连续变量表示为平均值、中值、标准偏差和范围。测试物治疗组(组I和II)和对照(组III)之间的统计对比使用针对分类变量的卡方和Fisher精确检验以及针对连续变量的t检验或方差分析法(ANOVA)进行。治疗组间顺序变量的对比使用Cochran-Mantel-Haenszel法进行。对于CAL、LBG和%BF, $P \leq 0.05$ (单侧)被认为是统计学显著的。

[0188] 通过以临床和放射照相评价的不利事件的频率和严重性评价安全性数据。3个治疗组在基线时没有显著差异。在3个治疗组中, 在不利事件(AE; 全因)发生率方面也没有观察到统计学显著的差异。安全性分析未鉴别出由于移植材料植入而引起的任何受试者风险增加。

[0189] 有效性结果的总结

[0190] 与阳性对照单独的 β -TCP(组III)和历史对照(包括DFDBA、EMDOGAIN®和PEPGEN P-15™)相比, 两个治疗组(组I和II)的统计分析的结果在临床上和统计学上均显示出显著的利益。

[0191] 在术后3个月, 观察到由基线开始的统计学显著的CAL增加, 组I大于组III($p=0.041$), 表明PDGF对CAL增加有显著的早期利益。在术后6个月时, 这种趋势继续是组I超过组III, 尽管这种差异不是统计学显著的($p=0.200$)。代表基线和6个月之间CAL增加的累积作用(即速度)的曲线下面积分析(AUC)接近统计学显著性($p=0.054$), 组I比组III大。此外, 相比于在6个月时对EMDOGAIN®和PEPGEN P-15™观察到的CAL增加, 所有治疗组的95%置信下限(LCB)分析都证实了组I和II的有效性。

[0192] 除了观察到的CAL临床利益之外, 包括线性骨生长(LBG)和骨填充百分率(%BF)的放射照相分析揭示了组I和II相对于组III在骨量增加方面的统计学显著改善。%BF定义为根据放射照相检测的新骨填充原骨缺损的百分率。与组III(0.9mm, $p<0.001$)相比, LBG在组I中显示出显著改善(2.5mm)。与组III相比, LBG对组II(1.5mm)也是显著的($p=0.021$)。

[0193] 与组III(18%)相比, 术后6个月时组I(56%)和组II(34%)中的骨填充百分率(%BF)显著增加, 分别为 $p<0.001$ 和 $p=0.019$ 。与最广泛使用的牙周移植法材料DFDBA的公开放射照片结果相比, 在术后6个月时线性骨生长和%骨填充的95%置信区间下限支持了组I和II的有效性。

[0194] 在3个月时, 与组III相比, 组I有显著较少的牙龈退缩(GR)($p=0.041$), 这与用CAL观察到的有益作用一致。在6个月时未观察到PDR和GR方面的统计学显著差异。在3周时表现出完全伤口愈合(WH)的部位数目的描述性分析揭示, 相对于组II(60%)和组III(55%), 组I(72%)有改善, 表明愈合改善的趋势。

[0195] 为评价临床和放射照相结果的累积有益作用, 进行综合有效性分析, 以确定具有成功结果的患者的百分率, 成功结果定义为在6个月时 $CAL > 2.7\text{mm}$ 和 $LBG > 1.1\text{mm}$ 。CAL和LBG成功基准由所植入移植植物达到的这些参数的平均水平来确立, 所述参数在以上的“有效性

检测”章节中确定。结果表明,相比于组III患者的30.4%,61.7%的组I患者和37.9%的组II患者满足或超过成功的综合基准,产生组I相对于组III的统计学显著利益($p < 0.001$)。%BF揭示了组I(70.0%)相对于组III(44.6%)的相似利益, p 值为0.003。

[0196] 总之,相比于单独的 β -TCP阳性对照组(组III),组I在3个月时实现了CAL和GR的统计学有益结果,以及在6个月时实现了LBG和%BF的统计学有益结果。这些结果的临床显著性由与历史对照的对比进一步证实。由此断定,含PDGF的移植材料至6个月时显示出获得了治疗牙周骨缺损的临床和放射照相有效性。

[0197] 表5:PDGF移植有效性的总结

[0198]

终点		组 I	组 II	组 III
CAL 增加(mm): 3 个月		3.8 ($p = 0.04$)	3.4 ($p = 0.40$)	3.3
CAL: AUC 分析(mm×周)		67.5 ($p = 0.05$)	61.8 ($p = 0.35$)	60.1
CAL(mm): 95% LCB 6 个月 (对 EMDOGAIN 的 2.7 mm 和 PEPGEN 的 1.1 mm)		3.3	3.2	3.1
GR (mm): 3 个月		0.5 ($p = 0.04$)	0.7 ($p = 0.46$)	0.9
LBG (mm): 6 个月		2.5 ($p < 0.001$)	1.5 ($p = 0.02$)	0.9
%BF: 6 个月		56.0 ($p < 0.001$)	33.9 ($p = 0.02$)	17.9
综合分析 (%成功)	CAL-LBG	61.7% ($p < 0.001$)	37.9% ($p = 0.20$)	30.4%
	CAL-%BF	70.0% ($p = 0.003$)	55.2% ($p = 0.13$)	44.6%

[0199] 在研究达6个月、包含180名受试者的大型随机化临床实验中,含0.3mg/mL和1.0mg/mL PDGF的移植材料(即 β -TCP)表明在患有中度至晚期牙周炎的牙齿周围的牙槽骨和临床附着水平恢复方面是安全和有效的。这些结论基于下文概述的经验证的放射照片和临床检测结果。

[0200] 与上文论述的含PDGF的移植材料的生物相容性数据和各个单独组分(即单独的 β -TCP或单独的PDGF)的历史性安全应用相一致,该研究揭示了没有局部或全身不利作用的证据。没有可归因于移植材料的不利结果,发现所述遗传材料是安全的。

[0201] 结论

[0202] 据3个月时与阳性对照相比显著改善的CAL所示,对于软组织附着水平和骨的恢复而言,发现植入含0.3mg/mL或1.0mg/mL PDGF的 β -TCP是有效治疗。我们的观察结果还与表明基线和6个月之间的CAL增加改善的AUC分析一致。基于和阳性对照相比的LBG和%BF的显著改善,还发现植入含0.3mg/mL或1.0mg/mL PDGF的 β -TCP是有效治疗。与单独的 β -TCP阳性对照相比,软组织和硬组织检测这二者的综合分析所表明的临床结果显著改善也证实了上述治疗方法的有效性。最后,发现给予含0.3mg/mL或1.0mg/mL PDGF的 β -TCP的结果超过了既有的在临床和放射照相这二个方面的有效性基准。

[0203] 该实验的结果连同体外、动物和人体研究的广泛切实数据一起表明,含PDGF的移植材料在牙周缺损中刺激软组织和硬组织再生,当在移植材料中给予0.1-1.0mg/mL(例如0.1mg/mL、0.3mg/mL或1.0mg/mL)范围的PDGF时作用更显著。而且,在移植材料中以0.3mg/mL的量给予的PDGF有效再生软组织和骨。

[0204] 其它实施方案在以下的权利要求书的范围内。

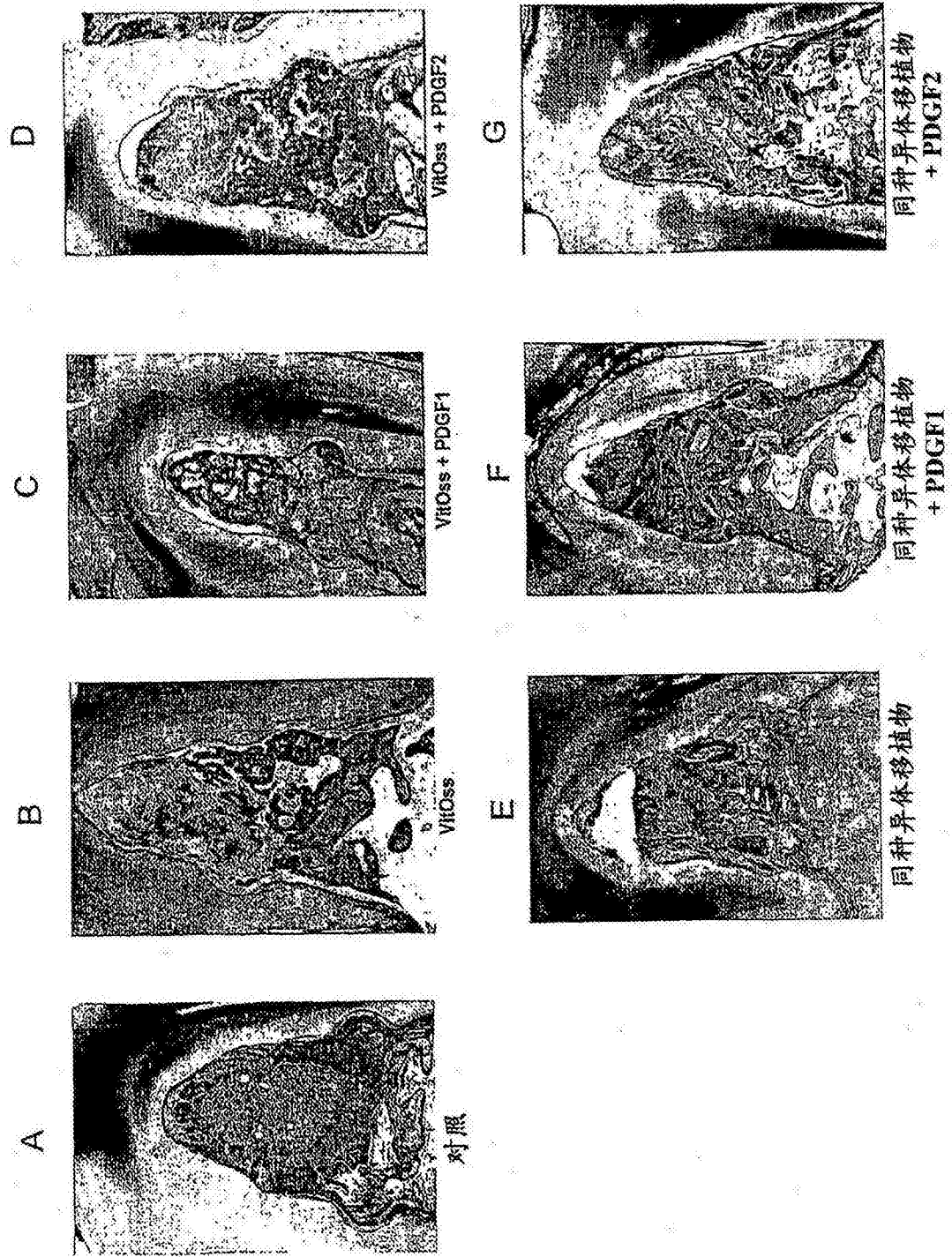


图1

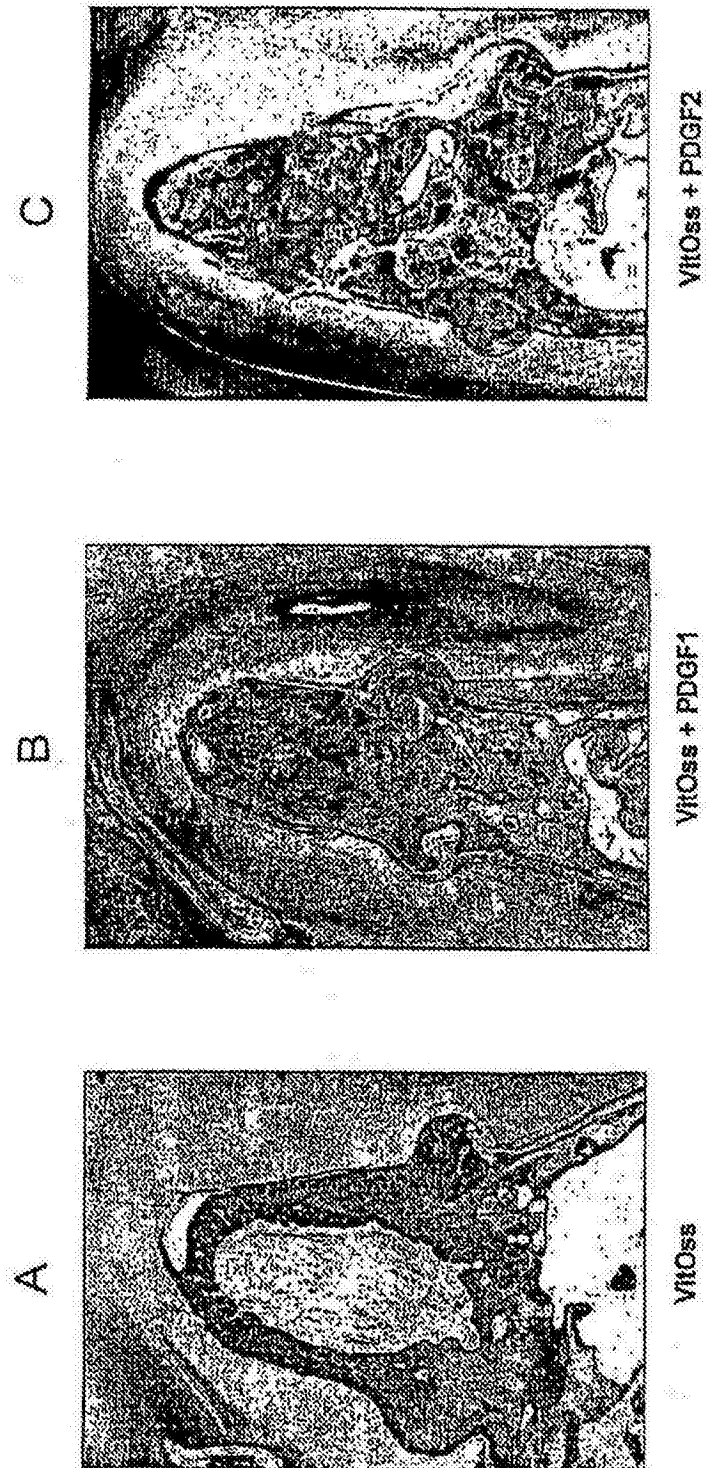


图2