

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 35/14 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02815834.2

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1272022C

[22] 申请日 2002.8.14 [21] 申请号 02815834.2

[30] 优先权

[32] 2001.8.14 [33] KR [31] 2001/49147

[32] 2001.8.14 [33] KR [31] 2001/49148

[86] 国际申请 PCT/KR2002/001552 2002.8.14

[87] 国际公布 WO2003/015802 英 2003.2.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.13

[71] 专利权人 美迪宝斯特有限公司

地址 韩国首尔

共同专利权人 河喆原

[72] 发明人 河喆原 梁允渲 梁成银

审查员 陈少君

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 王学强

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称

用于治疗关节软骨损伤的组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种用于治疗关节软骨损伤、损害或缺陷的组合物。本发明的治疗关节软骨损伤的组合物由从脐带血分离、增殖和/或分化而来的细胞组分和它们的介质组成，或者由上述细胞组分、它们的介质和生物相容性聚合物组成。与传统的治疗关节软骨损伤的细胞相比，本发明的组合物的细胞组分具有更强的扩增和分化能力，而且容易收集和获取。本发明的组合物中的聚合物具有下述特征中的一项或多项：生物相容性，生物降解性，加强细胞营养的能力，加强胞间基质形成的能力，适合于细胞移植和软骨组织再生的机械强度和弹性。



1. 一种治疗关节软骨损伤、损害或缺陷的组合物，其特征在于，它是由下列组成：(1) 从脐带血分离、增殖和/或分化而来的细胞，其是选自来源于脐带血的间叶干细胞、来源于所述间叶干细胞并可以分化成软骨细胞或造骨细胞的间叶祖细胞、前体细胞以及从所述间叶干/祖细胞分化而来的软骨细胞或造骨细胞中的一种或多种；(2) 它们的介质；和(3) 具有生物相容性、生物降解性、加强细胞营养的能力、加强胞间基质形成的能力中一项或多项特征的生物相容性聚合物。

2. 根据权利要求1的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，所述的生物相容性聚合物由选自下述组分的一种或多种组成：天然聚合物，含有羟基酸的合成聚合物或它们的衍生物，根据化学结合性形成三维晶格结构的有机聚合物和它们的衍生物、转化化合物。

3. 根据权利要求2的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，所述的生物相容性聚合物由选自任意形状或构型的下述组分中的一种或多种组成：纤维蛋白、明胶、胶原、透明质酸、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸、褐藻酸及其盐。

4. 根据权利要求3的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，所述的生物相容性聚合物中添加有任意形式的脱乙酰壳多糖。

5. 根据权利要求4的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，制备所述生物相容性聚合物，使之与细胞混合后聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的最终含量是30%。

6. 根据权利要求4的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，制备所述生物相容性聚合物，使之与细胞混合后透明质酸的最终含量是3-4%。

7. 根据权利要求4的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，制备所述生物相容性聚合物，使之与细胞混合后聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的最终含量为15-30%，透明质酸的最终含量为2-4%。

8. 根据权利要求7的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，通

过向所述的聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸和透明质酸的混合物中加入脱乙酰壳多糖来制备所述的生物相容性聚合物。

9. 根据权利要求 1-8 中任意一项的治疗关节软骨损伤的组合物，其特征在于，在 1ml 所述的最终组合物中含有 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 个细胞组分。

10. 权利要求 1-9 中任意一项的组合物在制备用于治疗关节软骨损伤的药物的用途。

用于治疗关节软骨损伤的组合物

技术领域

本发明涉及一种用于治疗关节软骨损伤、损害或缺陷的组合物。

背景技术

关节软骨的损伤会产生关节区域的疼痛、关节运动障碍等，并且会降低生活的质量和生产力。尤其是，关节软骨的损伤一旦发生就很难彻底治愈，因为它的自然愈合能力很弱，并且与整个关节损伤发展的程度有关。

迄今为止，治疗关节软骨损伤的方法有软骨整形（chondroplasty）、软骨移植、自体软骨细胞移植等。

在上述的方法中，软骨整形最为常用。关节内窥手术是最有代表性的方法，它通过插入关节内窥镜（它固定有一个小摄像头，通过一个小于 1cm 的小孔进入关节腔）从而在 TV 监视器上放大和观察关节的内部，可以同时进行诊断和手术。

上述方法的优点在于可以减少患者的疼痛和负担，因为它不需要直接切开关节，并且可以在通过关节内窥镜观察到小的组织损伤以后立即治疗。但是，这种软骨整形方法的功能效果并不能令人满意，因为主要产生了纤维软骨，而不是关节活动所必需的透明软骨。

软骨移植能够产生透明的软骨，该方法是收集病人的软骨和正常位置产生的亚软骨组分，然后通过合适的小孔将它们移植到损伤软骨位置。这种方法已经在一些病人获得成功。但是，这种方法仍然不能称为是完美的方法，因为它在移植软骨和原始组织之间存在裂缝的问题；它也不能普遍使用，因为它仅仅适用于能够进行自体移植的病人。当损伤的软骨较大时，由于捐献软骨的限制，而且捐献软骨经常会发生并发症，这种方法也不能使用。而且，手术的过程相对复杂，有时不可能进行关节内窥镜手术。换句话说，这种方法存在许多缺点，比如在捐献位置产生新的疼痛，可能产生恢复缓慢、疼痛、骨折、流血等并发症和术后疤痕。

自体软骨细胞移植是最近才开始采用的一种方法，从病人的正常位置收集软骨组织获得骨细胞，根据最终的需要量来进行培养和生长，使用骨膜确保安全并把它们和介质一起注射到损伤的软骨位置，从而填充到这些细胞增殖损伤的软骨区域。

与产生软骨组织并注射到损伤区域的软骨移植方法相比，由于损伤区域填充了移植的骨细胞，它们直接在该损伤区域扩增，因而再生的透明软骨能够与正常区域相对较好的融合。但是，这种方法需要进行手术来获取骨细胞和并在外面培养以后移植到损伤的关节软骨区域，因而病人需要进行 2 次手术，并且手术过程很复杂和困难，也会加重病人的经济负担和痛苦。

软骨细胞也会存在一些问题，由于多数情况下是从完全生长的成年人获取软骨细胞，它们的生长、扩增处于非活化状态，要想在外面培养来获得移植所需的足够量的细胞需要花费大量的时间；如果细胞彻底丧失了扩增能力，也就不能完成治疗；由于软骨细胞在外面培养，细胞的表达形式也会发生变化。应该关注的是，通过重新培养完成生长的细胞来得到的软骨的寿命一般不会长。在第 2 次手术时，由于现有的关节内窥镜手术方法必须进行切口，疼痛、疤痕等术后并发症也就不可避免。

已经报导过一种方法获取间叶干细胞（MSCs，它是来自自体骨髓、肌肉、皮肤等间叶细胞组织的软骨细胞和造骨细胞的前体细胞）、体外培养扩增、然后和聚合物一起注射到关节软骨的损伤区域。

研究表明，在使用上述的来自完成生长的个体的间叶干细胞来治疗软骨损伤的方法中的细胞扩增能力要高于自体软骨细胞移植方法，因为获取了更多的未分化细胞进行体外培养。但是，上述方法在彻底治疗不同类型的软骨损伤方面仍然显示了较弱的细胞扩增能力。而且，上述方法需要很困难的收集骨髓的过程，受到基础结构（比如骨髓储存库等）的限制。

如上所述，目前已有的各种治疗关节软骨损伤的方法都在手术过程和效果方面存在缺陷。

发明内容

本发明的目的是提供一种用于治疗关节软骨损伤、损害或缺陷的组合物，它由从脐带血分离、增殖和/或分化而来的细胞组分和生物相容性的聚合物组成，它通过相对简单的手术就可以较好的治疗关节软骨损伤。

本发明的一种治疗关节软骨损伤的组合物的特征在于，它是由从脐带血分离、增殖和/或分化而来的细胞组分和它们的介质组成。

本发明的另外一种治疗关节软骨损伤、损害或缺陷的组合物的特征在于，它是由从脐带血分离、增殖和/或分化而来的细胞组分、它们的介质和生物相容性聚合物组成。

本发明的另外一种治疗关节软骨损伤、损害或缺陷的组合物的特征在于，它是由从脐带血分离、增殖和/或分化而来的细胞组分和生物相容性聚合物组成。

本发明的治疗关节软骨损伤、损害或缺陷的组合物中的细胞组分是一种或多种细胞组分，比如从脐带血分离和/或培养的间叶干细胞和/或间叶干/祖细胞、从上述间叶干细胞和/或干/祖细胞分化出的前体细胞，从上述脐带血来源的间叶干/祖细胞分化出的软骨细胞和/或造骨细胞。

在本发明的治疗关节软骨损伤的组合物中，脐带血（细胞组分的起始组织）是指从连接胎盘和胎儿的脐带中收集的血液。

本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的细胞组分中，从脐带血分离的间叶干细胞可以在合适的分化条件下分化成间叶组织，比如骨、软骨、脂肪组织、肌肉、腱等，因为它们与典型的骨髓基质细胞相比具有多能性。从脐带血分离的间叶干细胞可以在合适的条件下进行扩增，而不必分化成特定的细胞或组织，因为它们具有自我更新能力。

本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的细胞组分中，前体细胞包括在从脐带血间叶干细胞分化为软骨细胞或骨细胞、成软骨细胞、造骨细胞等源自脐带血间叶干细胞的细胞的过程中可以生成的所有细胞。

本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的细胞组分具有更强的扩增和

分化能力，因为它们与源自其他细胞（包括从骨髓、肌肉、皮肤等成年组织分离的间叶干细胞）的细胞相比则是源自更年轻的细胞。

在收集和获取本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的细胞组分的起始组织的过程中，收集细胞组分比从成年组织（比如骨髓）收集细胞更容易，因为后者需要进行手术。

而且，也容易找到脐带血的捐献者，因为在婴儿出生时储存脐带血是切实可行的，并且储存的脐带血可以很容易的在融化以后使用。而要想象储存脐带血一样来常规储存骨髓则是不可能的。

由于本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的细胞组分是细胞，其中大部分导致器官移植排斥反应的组织相容性抗原 HLA-DR（II 类）没有表达，自体脐带血和外源脐带血都可以使用，并且能够避免或者减少传统移植手术带来的排斥反应等免疫反应。

本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的介质是用于悬浮细胞组分。常用的细胞培养介质都可以使用，比如 McCoy's 5A 介质（Gibco）、Eagle 基础介质、CMRL 介质、Glasgow 最低基础介质、Ham's F-12 介质、Iscove 的改进 Dulbecco 介质、Liebovitz' L-15 介质、RPMI 1640 介质等。

在本发明中，如果必要的话，还可以向细胞培养介质中添加一种或多种第二组分，它是选自小牛、马、人等的血清中的一种或多种；青霉素 G、庆大霉素、链霉素硫酸盐等用于防止微生物污染的抗生素，两性霉素 B、制霉菌素等抗真菌剂也可以使用。

本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的生物相容性聚合物的特征在于，它具有下述特征中的一项或多项：生物相容性、生物降解性、加强细胞营养的能力，加强胞间基质形成的能力。本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的生物相容性聚合物具有类似于药膏或浆糊的半固体或凝胶状的性能，以及适合于细胞移植和软骨组织或骨再生的机械强度和弹性。

因此，本发明的治疗关节软骨损伤的组合物能够促进同时移植的软骨细胞的增殖和分化，这些软骨细胞连续的分布于损伤区域，并且在移植后形成恒定的形状；由于其形状可以很容易的适应软骨损伤区域可能

出现的各种三维几何结构，手术过程也很方便。

可以在本发明的治疗关节软骨损伤的组合中使用的生物相容性聚合物可以是选自下述组分的一种或多种：蛋白、多聚糖等天然聚合物，含有羟基酸的合成聚合物或它们的衍生物，根据化学结合性形成三维骨架或晶格结构的有机聚合物和它们的衍生物、转换化合物。例如，天然聚合物中的蛋白包括纤维蛋白、凝胶、胶原，聚合物中的糖类包括透明质酸等，合成聚合物包括聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚乳酸、聚羟基乙酸，有机聚合物包括聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸(pluronic acid)、褐藻酸及其盐等。

通过加入脱乙酰壳多糖纤维可以增强本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的机械强度和弹性。

如果本发明使用单一聚合物，可以根据每一种聚合组分的分子量和特征来调节其含量。当单一使用聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸时，它与细胞混合后的较佳最终含量是30%；当单一使用透明质酸时，它与细胞混合后的较佳最终含量是3-4%。

如果本发明混合使用聚合物，优选的是使与细胞混合后聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的最终含量为15-30%，而透明质酸的最终含量为2-4%。

如果向上述聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸和透明质酸的混合聚合物中加入脱乙酰壳多糖纤维，优选加入和混合与上述混合聚合物等量的脱乙酰壳多糖纤维。

下面说明本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的制备方法和用它来治疗关节软骨损伤的方法。

本发明的治疗关节软骨损伤的组合物的制备方法包括以下步骤，收集脐带血；从脐带血分离、培养和/或分化间叶干细胞；混合这些间叶干细胞和聚合物；下面详细解释每一步骤：

在收集脐带血的步骤中，对于通常的阴道分娩，在婴儿出生以后，胎盘仍然保留在子宫内，可以从完全暴露在外面的脐静脉收集脐带血；

对于剖腹产，在婴儿出生以后，胎盘也一起从子宫内取出，可以从脐静脉收集脐带血。

在本发明中，如果在婴儿出生以后从完全脱离子宫的脐静脉收集脐带血，是按照无菌操作从连接胎盘和婴儿的脐静脉收集，这时可以使用两种收集方法：婴儿出生以后，在胎盘脱离子宫之前就收集脐带血，和在胎盘脱离之后在外面收集脐带血。脐静脉在保证安全之后，使用收集针把脐带血收集到含有抗凝血剂的收集袋中。

从上面收集的脐带血分离、培养间叶干细胞和间叶干/祖细胞的方法可以是所有的传统方法，包括韩国专利申请 10-2002-0008639 和 Pittinger MF, Mackay AM, et al., Science 1999;284: 143-7, Lazarus HM, Haynesworth SE, et al., Bone Marrow Transplant 1995; 16: 557-64 等记载的方法。其中的一个例子如下：

脐带血离心分离出单核细胞，冲洗数遍，以去除外来物。然后，它们涂平板后在培养盘和/或摇床和/或其他容器中培养，细胞发生扩增形成单层。其中，间叶干细胞和/或间叶干/祖细胞使用反相显微镜观察到的形状是均一的，它们以螺旋状的长细胞克隆的形式进行扩增。此后，当细胞生长到要汇合时，进行传代培养，以使细胞扩增到所需要的数目。

本发明的源自脐带血的间叶干细胞和间叶干/祖细胞可以直接用于手术，或者在它们分化以后再使用。

至于本发明的源自脐带血的间叶干细胞的分化方法，可以从常用的方法中选择和使用能够获得所需要的细胞的任何适当方法（Barry F, Boynton RE, et al. , Exp cell Res 2001; 268: 189-200, Jaiswal N, Haynesworth SE, et al. , J Cell Biochem 1997; 64: 295-312）。其中的一个例子如下：

当在合适的软骨分化介质或骨分化介质中培养源自脐带血的细胞时，可以通过下述方法确定分化进行到何种程度：测量酶的表达，免疫表达类型分析，组织化学染色，组织免疫染色，分子生物学检验，或细胞培养基分析。这样制备出了间叶干细胞，从它们分化出的细胞可以直

接用于手术，或进行冷冻，然后在必要时解冻、重新扩增备用。

冷冻本发明的细胞的方法可以是公知的方法（Doyle et al., 1995）。用于冷冻的培养基由 10-20%FBS(小牛血清)、10%DMSO（二甲亚砜）和 5-10%甘油。最终的悬浮液中的细胞浓度为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$ 培养基。

将上述细胞悬浮液分装到用于低温冷冻的玻璃或塑料安瓿瓶中，封口，放入预先调好温度的控速冷冻箱中。在冷冻细胞时，优选的冷冻进程是使温度每分钟降低 1°C ，以降低重新融解时对细胞的损害。安瓿管的温度一旦达到 -180°C ，便将其转移到液氮储罐中。冷冻的细胞可以储存数年。至少应该每 5 年周期性的检查一次细胞是否仍然保持存活能力。融解冷冻细胞时，将安瓿管从液氮储罐中迅速转移到 37°C 的水槽中。无菌条件下，将安瓿管中的融解物迅速转移到装有含有 10%FBS 和 5%ES 的培养基的培养容器中。将培养基中的细胞浓度调整到 $3 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5/\text{ml}$ 培养基。每天用反相显微镜观察细胞是否扩增。当细胞达到合适的浓度时，将细胞转移到新的培养基中进行继代培养。

以悬浮在合适的培养基中的状态，或者在与聚合物混合以后，上述培养的细胞可以直接移植到关节软骨损伤区域。换句话说，可以使用将悬浮在培养基中的没有与聚合物混合的细胞注射到软骨损伤区域相应的生物膜（比如骨膜）形成的空间的方法，封闭它们以使悬浮的细胞不会从骨膜的裂缝渗出，缝合手术的切口。或者，上述细胞及其培养基也可以与合适的聚合物混合使用，并使其状态与药膏或浆糊相似。在所有情况下，优选调整本发明的组合物中的细胞浓度到 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7/\text{ml}$ 。本发明的组合物的使用量可以根据要治愈的软骨损伤区域的大小进行增减，一般的，约 2cm^2 大小的成年膝关节优选使用约 2ml 的量。

在使用本发明的组合物治疗关节软骨损伤的方法中，要治疗的关节软骨区域优选通过关节内窥手术进行观察，损伤区域处理成便于手术的状态，然后将本发明的组合物应用到损伤区域，优选通过关节内窥镜来确认其是否稳固。本发明的组合物可以在应用到损伤区域之前预先配制成适合进入损伤区域的形式，或者在其应用到损伤区域之后改变成适合

状态。

如上所述，使用本发明的组合物治疗关节软骨损伤的方法可以确保手术的便利，并能减少病人的疼痛、后遗症和发病率，因为通过关节内窥镜手术可以充分治愈损伤的软骨，而传统的细胞移植方法则需要数次手术。

附图说明

图 1a 和 1b 测定了通过混合聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸和透明质酸来生产的聚合物、通过混合脱乙酰壳多糖纤维、聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸和透明质酸来生产的聚合物的粘度和强度；

图 2a 和 2b 显示了使用本发明的组合物治疗兔关节软骨损伤区域的结果；

图 3a 和 3b 是使用本发明的组合物新生的关节软骨损伤区域的放大图。

具体实施方式

下面的实施例将对本发明作进一步的解释，但是本发明并不仅仅局限于这些实施例，这些实施例不以任何方式限制本发明的范围。本领域的技术人员在权利要求的范围内所做出的某些改变和调整也应认为属于本发明的范围。

下面参考附图，以实施例详细说明本发明的组合物的制备方法和使用它来治疗关节软骨损伤的方法。

首先，按照下述方法分离、培养细胞组分，以制备本发明的组合物：

脐带血离心分离出单核细胞，冲洗数遍，以去除外来物。然后，它们涂平板后在培养盘和/或摇床和/或其他的培养容器中培养，细胞发生扩增形成单层。其中，间叶干细胞和/或间叶干/祖细胞使用反相显微镜观察到的形状是均一的，它们以螺旋状的长细胞克隆的形式进行扩增。此后，当细胞生长到要汇合时，进行传代培养，以使细胞扩增到所需要的数目。

用胰蛋白酶处理本发明的上述源自脐带血的间叶干细胞和间叶干/祖

细胞，冲洗后悬浮到 DMEM 培养基中，以便它们可以在后续步骤中与聚合物混合。

其次，为了制备本发明的组合物，按照下面的方法来制备聚合物，并预先通过实验来确定它们的化学的、生物的和/或机械学的性能。

为了根据含有聚合物的组分的浓度或增减来判断机械强度，制备了聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的终含量为 30% 的聚合物、透明质酸的终含量为 4% 的聚合物、透明质酸的终含量各不相同（透明质酸的终浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 和 4.0%）而聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的终含量为 15% 的聚合物、含有上述聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸和透明质酸的混合物且含有等量脱乙酰壳多糖纤维的聚合物。

每一种聚合物都是通过混合上述组分来制备，并评价其是否具有适当的性能。

结果如图 1a 所示，透明质酸的终含量各不相同而聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的终含量为 15% 的聚合物具有较好的机械强度。但是随着透明质酸浓度的降低，机械强度也降低。尤其是，当透明质酸的终含量低于 0.5% 时，机械强度会显著降低，如果将试管倒置，则会观察到聚合物沿着试管壁向下流。

另一方面，含有上述聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸和透明质酸的混合物且含有等量脱乙酰壳多糖纤维的聚合物显示出了较好的弹性，这使它在应用到损伤区域时可以适应其形状，并且保持这一机械形状，无论其中透明质酸的含量是多少。聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的终含量为 30% 的聚合物也显示出了合适的机械强度和弹性。

因此，可以选择适用于治疗关节软骨损伤区域的具有合适强度和弹性的聚合物和它的混合组合物。

第三，为了制备本发明的组合物，在制备的上述聚合物中，例如，选择聚丙二醇与环氧乙烷的聚醚酸的终含量为 30% 的聚合物，取 0.3g 与 0.9ml DMEM 培养基充分混合。然后，离心浓缩第一步的含有 1×10^7 细胞的悬浮液，弃去上清，将第二步制备的聚合物加入到细胞中。向上述

混合物中加入合适量的培养基以使终体积为 1ml。换句话说,本发明的治疗关节软骨损伤的组合物在 1ml 培养基中含有 30% (0.3g) 的聚合物、 1×10^7 细胞。如果需要的量更多,则可以按比例放大混合。

第四,使用本发明的治疗关节软骨损伤的组合物治疗关节软骨损伤。

为了设计关节软骨损伤的模型,选择一只健康的兔子并根据其体重确定合适量的克他明(ketamine, 35mg/kg)和甲苯噻嗪(xylazine, 5mg/kg)进行肌肉注射。确定兔子完全麻醉以后,剃光两条腿的膝关节,用橡皮膏固定,并保持仰卧姿势。用倍塔汀(betadine)对两个膝关节消毒以后,用手指触摸确定它们的位置,此后沿着经过膝关节上下部分和膝盖骨内侧的手术线的中央到达膝关节的内部,在将膝盖骨向外推的同时弯曲膝关节,从而观察到关节的内部。

确认没有病变现象以后,用锐利的手钻在股骨的末端中央槽口前上端以上 4mm 的位置处打一个中心螺旋状的凹孔,然后用钻子在其中心位置打一个直径 3mm、深 3mm 的洞。直径 3mm 的打孔机也可以用于相同的区域,这样就建立了一个全厚的软骨缺陷。按照上述方法建立软骨损伤以后,继续观察损伤区域 3-4 个月。确定软骨损伤区域没有自己愈合。

用注射器将 0.25ml 在上述第三步制备的本发明的组合物注射到兔软骨损伤区域。

以后,将膝盖骨恢复到其正常位置,用可吸收的缝合线修理膝盖骨周围的软组织,用不可吸收的缝合线缝合皮肤。相对位置的腿作为对照,它只是应用了可生物降解的聚合物。

确认兔子脱离麻醉清醒以后,允许其自由活动,施用抗生素来防止术后感染,直到第二天。11 周以后,获取每只兔子的受到损伤并进行治疗的关节软骨区域断面,观察新形成的软骨。对照结果如图 2a 和 2b 所示。

如图 2a 和 2b 所示,使用本发明的组合物以后新生成的修复层的总厚度(图 2b)比仅仅使用聚合物(图 2a)要大两倍。

图 2a 和 2b 的放大图如图 3a 和 3b 所示,以对照新生成的软骨修复

组织的性能。

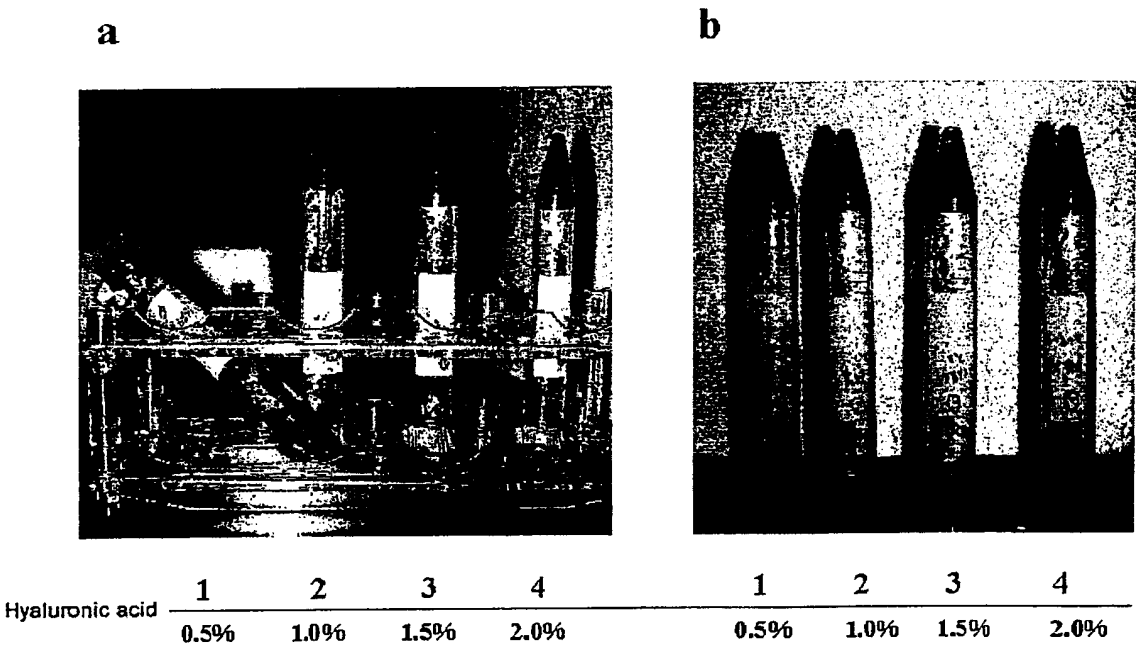
如图 3a 和 3b 所示，当使用本发明的组合物时（图 3b），可以重新生成与原始正常外软骨组织（右侧）具有几乎相同外观的软骨组织（左侧），虽然细胞密度比原始正常软骨组织更高。另一方面，如果仅仅使用聚合物（图 3a），与正常细胞相比，细胞的形状是粗糙的，而且其密度较低。

因此，本发明的组合物能够高效的在关节软骨损伤区域生成软骨组织，有效的治疗关节软骨损伤。

总之，本发明的治疗关节软骨损伤的组合物在治疗软骨损伤的组织学方面显示了优良的效果。与常规的治疗关节软骨损伤方法相比，使用本发明的组合物治疗关节软骨损伤可以减少时间、精力和花费，因为本发明的方法能够通过简单的程序（比如关节内窥镜手术或更简单的手术）充分修复关节软骨损伤。

虽然本发明用一个优选实施例来描述，本领域的技术人员应该认识到，本发明可以在权利要求的范围进行修改来实施。

[FIG. 1]



[FIG. 2]**a****b**

[FIG. 3]

