



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102271723 B

(45) 授权公告日 2015.03.04

(21) 申请号 201080004422.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.01.12

A61L 27/26(2006.01)

(30) 优先权数据

A61L 27/50(2006.01)

61/193,947 2009.01.12 US

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

EP 0705878 A2, 1996.04.10, 说明书第3页
第9~32行。

2011.07.12

EP 0489206 A1, 1992.06.10, 参见说明书第
3页第44~53行、第4页第4~7和50~53行。

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 1816360 A, 2006.08.09, 全文。

PCT/IL2010/000028 2010.01.12

EP 0489206 A1, 1992.06.10, 参见说明书第
3页第44~53行、第4页第4~7和50~53行。

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2010/079496 EN 2010.07.15

审查员 唐敏健

(73) 专利权人 哈达斯特医疗研究服务和开发有

限公司

地址 以色列耶路撒冷

专利权人 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究
发展有限公司

(72) 发明人 迈克尔·弗里德曼 约尔·萨森

艾达·格林 拉米·摩谢夫

雅各布·拉赫米莱维茨

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书3页 说明书14页 附图16页

(54) 发明名称

组织再生膜

(57) 摘要

本发明涉及包括至少一种带正电荷的、合成的疏水聚合物、至少一种亲水聚合物和至少一种增塑剂的膜；其中所述膜是柔性的，并且能够支持细胞粘附、细胞增殖或细胞分化的至少一种。本发明还涉及本发明的膜在制备包括细胞递送系统、细胞生长表面和支架的可植入装置中的用途。本发明还提供在缺损组织区域施加本发明的膜而促进组织再生的方法。

1. 一种膜，所述膜包括至少一种带正电荷的合成的疏水聚合物、至少一种亲水聚合物和至少一种增塑剂；其中所述疏水聚合物是丙烯酸聚合物；其中所述至少一种亲水聚合物和所述增塑剂是范围从 300–20,000 的聚乙二醇；其中所述聚乙二醇以在 1% 和 30% (w/w) 之间的浓度存在；且

其中所述膜是柔性的，并且能够支持细胞粘附、细胞增殖或细胞分化的至少一种。

2. 一种膜，所述膜包括至少一种带正电荷的合成的疏水聚合物、至少一种亲水聚合物和至少一种增塑剂；其中：

所述带正电荷的合成的疏水聚合物是甲基丙烯酸铵共聚物 A 型 NF (AMCA)；

所述至少一种亲水聚合物选自由以下组成的组：聚乙烯醇、多糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、聚环氧乙烷和明胶；其中所述至少一种亲水聚合物以所述膜的 1% (w/w) 至 30% (w/w) 的浓度存在；

所述增塑剂是范围从 300–20,000 的聚乙二醇；且

其中所述膜是柔性的，并且能够支持细胞粘附、细胞增殖或细胞分化的至少一种。

3. 如权利要求 2 所述的膜，其中所述多糖为羟丙甲基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、藻酸钠或改性淀粉。

4. 如权利要求 2 所述的膜，其中所述亲水聚合物和所述增塑剂二者是范围从 300–20,000 的聚乙二醇。

5. 如权利要求 1 至 4 中的任一项所述的膜，其中所述亲水聚合物和所述增塑剂二者是聚乙二醇 400。

6. 如权利要求 5 所述的膜，其中所述聚乙二醇 400 以 10%、15% 或 25% w/w 的浓度存在。

7. 如权利要求 1 至 4 和 6 中的任一项所述的膜，其中所述膜还包括至少一种类型的细胞。

8. 如权利要求 5 所述的膜，其中所述膜还包括至少一种类型的细胞。

9. 如权利要求 7 所述的膜，其中所述细胞选自由以下组成的组：成体干细胞、多能干细胞、间充质干细胞、脐带血细胞、成骨细胞、成软骨细胞和 CD 105+ 细胞。

10. 如权利要求 9 所述的膜，其中所述成体干细胞是自体成体干细胞。

11. 如权利要求 1–4、6 和 8–10 中的任一项所述的膜，所述膜还包括至少一种活性剂，其中所述至少一种活性剂选自由以下组成的组：双膦酸盐、大麻素、β – 受体阻滞剂、骨诱导剂、生长因子、HMG-CoA 还原酶抑制剂和抗生素。

12. 如权利要求 1–4、6 和 8–10 中的任一项所述的膜，所述膜还包括至少一种活性剂，其中所述至少一种活性剂为药物。

13. 如权利要求 1–4、6 和 8–10 中的任一项所述的膜，所述膜还包括至少一种活性剂，其中所述至少一种活性剂为细胞因子。

14. 如权利要求 1–4、6 和 8–10 中的任一项所述的膜，所述膜还包括至少一种活性剂，其中所述至少一种活性剂为激素。

15. 如权利要求 5 所述的膜，所述膜还包括至少一种活性剂，其中所述至少一种活性剂选自由以下组成的组：双膦酸盐、大麻素、β – 受体阻滞剂、骨诱导剂、生长因子、HMG-CoA 还原酶抑制剂和抗生素。

16. 如权利要求 5 所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂为药物。

17. 如权利要求 5 所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂为细胞因子。

18. 如权利要求 5 所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂为激素。

19. 如权利要求 7 所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂选自由以下组成的组:双膦酸盐、大麻素、 β -受体阻滞剂、骨诱导剂、生长因子、HMG-CoA 还原酶抑制剂和抗生素。

20. 如权利要求 7 所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂为药物。

21. 如权利要求 7 所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂为细胞因子。

22. 如权利要求 7 所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂为激素。

23. 如权利要求 1-4、6 和 8-10 中的任一项所述的膜,所述膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂选自由以下组成的组:抑制素、雌激素、雄激素、普萘洛尔、转化生长因子 (TGF)、骨形态发生蛋白 (BMP)、胰岛素样生长激素、成纤维细胞生长因子 (FGF)、阿仑膦酸盐、利塞膦酸盐和甲状旁腺激素。

24. 如权利要求 23 所述的膜,其中所述至少一种活性剂是辛伐他汀或洛伐他汀。

25. 如权利要求 1-4、6、8-10、15-22 和 24 中的任一项所述的膜,其中所述膜能够在水合后为多孔的,且其中孔径是 0.1 至 5 微米。

26. 如权利要求 23 所述的膜,其中所述膜能够在水合后为多孔的,且其中孔径是 0.1 至 5 微米。

27. 如权利要求 5 所述的膜,其中所述膜能够在水合后为多孔的,且其中孔径是 0.1 至 5 微米。

28. 如权利要求 7 所述的膜,其中所述膜能够在水合后为多孔的,且其中孔径是 0.1 至 5 微米。

29. 如权利要求 11 所述的膜,其中所述膜能够在水合后为多孔的,且其中孔径是 0.1 至 5 微米。

30. 膜用于制备用于缺损组织区域的组织再生的三维中空植入物的用途,所述膜包括至少一种带正电荷的合成的疏水聚合物、至少一种亲水聚合物和至少一种增塑剂,且其中所述膜是柔性的,并且能够支持细胞粘附、细胞增殖或细胞分化的至少一种,其中所述组织选自韧带、腱、软骨、椎间盘、牙齿和骨,其中所述至少一种亲水聚合物选自由以下组成的组:聚乙烯醇、多糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、聚环氧乙烷和明胶;并且所述至少一种增塑剂选自由以下组成的组:聚乙二醇、聚环氧乙烷、柠檬酸三乙酯、乙酰柠檬酸三乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰柠檬酸三丁酯、三醋精、癸二酸二丁酯、邻苯二甲酸二乙酯、丙二醇、甲氧基乙二醇和明胶;并且其中所述至少一种亲水聚合物以所述膜的 1% (w/w) 至 30% (w/w) 的浓度存在,其中所述疏水聚合物是丙烯酸聚合物。

31. 如权利要求 30 所述的膜的用途,其中所述多糖为羟丙甲基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、藻酸钠或改性淀粉。

32. 如权利要求 2 所述的膜用于制备用于缺损组织区域的组织再生的三维中空植入物的用途,其中所述组织选自韧带、腱、软骨、椎间盘、牙齿和骨。

33. 如权利要求 30、31 或 32 所述的膜的用途,其中所述三维中空植入物选自由以下组成的组:管形植入物、圆筒形植入物、锥形植入物或平面式植入物。

组织再生膜

发明领域

[0001] 本发明涉及利用能够支持细胞粘附、增殖和分化的基于聚合物的膜或结构的组织再生领域,尤其是骨再生领域。

[0002] 发明背景

[0003] 骨不连接是骨折愈合的所有修复性过程中止而没有骨连接的病症 [1-3]。不连接还可描述为不存在逐步修复,在骨折后第 3 至第 6 个月放射照相未观察到该逐步修复 [2、4]。不连接可能是在骨折部位上的物理或生物环境差的结果,或是两种情况的组合 [2]。这种情况和其它情况要求操纵或强化自然愈合机制以与自然产生的新骨相比再生大量的新骨来实现手术目标 [5-7]。因此,用于修复或恢复受创、受损或丢失的骨的功能的新骨是主要的临床需要,并且骨组织工程已经被宣布为再生骨的替代策略 [8]。

[0004] 组织工程应用于骨时,集中于恢复包括承重骨的大节段的骨架。骨可通过以下策略再生 :成骨作用 - 细胞的转移 ;骨诱导 - 诱导细胞变成骨 ;骨传导 - 为骨形成细胞提供支架 ;或骨促进 - 通过激励愈合组织或再生组织的生物或物理环境而促进骨愈合和再生。

[0005] 跨越机械稳定、大的节段型骨缺损的聚合的聚 (L- 交酯) 管形膜显示促进编织骨形成和骨缺损的重建 [9]。Mosheiff 等开发了用于骨丢失治疗试验的兔极量缺损 (critical size defect) 模型。在这种模型中,将对兔的前臂产生极量缺损。极量缺损定义为在正常情况下不被骨架桥连的最小的骨内损伤 [10、11]。利用这种模型,我们的研究组成功地采用膜用于通过骨传导的引导性骨再生 (GBR) [10、12]。

[0006] Gugala 等证明间充质干细胞 (MSC) 在多孔膜上均匀生长,形成三维纤维状网络 [19]。

[0007] WO 2005/107826 公开了包括生物相容性颗粒 (如,生物陶瓷)、生物相容性聚合物和增塑剂的可模制的骨植入物。植入物可形成开放的多孔支架或复合基质,或可作为液态或塑性可变形植入物施用。

[0008] WO 2004/084968 公开了适于用作组织支架或注射制剂的多孔基质,优选地从可降解交联聚合物制备。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明是基于以下发现 :包括疏水聚合物和亲水聚合物二者且还包括增塑剂的新的基于聚合物的膜能够支持细胞粘附、增殖和分化,因而可用于强化组织再生,例如在治疗大的节段型骨缺损中。本发明的膜作为细胞递送系统和用于引导性骨再生的装置二者起作用,任选地带有促进细胞生长、粘附、分化和 / 或增殖的活性剂。

[0011] 特别地,本发明是基于以下发现 :还包括聚乙二醇 (PEG) 的基于聚合物的膜支持间充质干细胞 (MSC) 粘附、分化和增殖。

[0012] 因此,在其各方面之一,本发明提供包括至少一种带正电荷的、合成的疏水聚合物、至少一种亲水聚合物和至少一种增塑剂的膜 ;其中所述膜是柔性的,并且能够支持细胞粘附、细胞增殖或细胞分化的至少一种。

[0013] 本文所用的术语“膜”涉及薄的 (大致是二维的) 连续的均匀结构,厚度为

30–200 μm , 通常通过将至少一种带正电荷的、合成的疏水聚合物、至少一种亲水聚合物和至少一种增塑剂浇铸到模具中而构建。

[0014] 术语“带正电荷的、合成的疏水聚合物”涉及合成产生的聚合物，其不溶于水，由于聚合物的带正电荷的或部分带正电荷的单体基团（或所述单体上的取代基）而具有总的平均正（表面）电荷。

[0015] 在一些实施方案中，所述至少一种疏水聚合物是丙烯酸聚合物。在其它实施方案中，所述至少一种疏水聚合物是被至少一个胺基取代的甲基丙烯酸酯共聚物。术语“胺基”意图涵盖任何胺基，诸如例如 $-\text{NH}_3$ 、仲胺、叔胺和铵基。在具体的实施方案中，所述聚合物是甲基丙烯酸铵共聚物 (Ammonic Methacrylate Copolymer)，且更优选地甲基丙烯酸铵共聚物 A 型（例如，AMCA Eudragit RLT M Degussa 德国）。

[0016] 应理解的是，根据本发明的疏水聚合物还涵盖疏水性、带正电荷的聚合物与疏水性不带正电荷的聚合物的共聚物或混合物，例如，其中至少 30% 的疏水聚合物具有正电荷。在这样的实施方案中，疏水聚合物的混合物还可包括聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚酰胺 - 尼龙、聚乙烯醋酸乙烯酯、硝酸纤维素、硅酮、乙基纤维素、和其任何组合。

[0017] 本文所用的术语“具有胺基和甲基丙烯酸基团的聚合物”涉及具有被胺基取代的甲基丙烯酸基团作为单体的聚合物以及共聚物。这样的聚合物的实例可见于，例如，Aggeliki I. 等 [20]。

[0018] 术语“亲水聚合物”是指在水性介质诸如在体液（如，细胞外液、间质液、血浆、血液或唾液）中溶解的聚合物（包括聚合物的共聚物和混合物）。应注意，这样的聚合物在暴露于水性介质后在膜中产生孔。

[0019] 在一些实施方案中，所述至少一种亲水聚合物选自由以下组成的组：羟丙甲基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙烯醇、多糖、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、改性淀粉、聚乙二醇、聚环氧乙烷和明胶。

[0020] 术语“增塑剂”涉及能够赋予膜柔性的化合物。根据本发明使用的增塑剂应对细胞无毒。在一些具体实施方案中，所述增塑剂对干细胞无毒。

[0021] 在一些实施方案中，所述至少一种增塑剂选自由以下组成的组：聚乙二醇、聚环氧乙烷、柠檬酸三乙酯、乙酰柠檬酸三乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰柠檬酸三丁酯、三醋精、癸二酸二丁酯、邻苯二甲酸二乙酯、丙二醇、甲氧基乙二醇和明胶。

[0022] 在一些实施方案中，本发明的膜包括至少一种水溶性增塑剂。水溶性增塑剂的非限制性列表包括：PEG、柠檬酸三乙酯、乙酰柠檬酸三乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰柠檬酸三丁酯、三醋精、癸二酸二丁酯、邻苯二甲酸二乙酯、丙二醇、甲氧基乙二醇和明胶。

[0023] 在一些实施方案中，所述至少一种增塑剂和至少一种亲水聚合物是与干细胞相容的。

[0024] 如将在以下实施例中证明的，PEG 显示为对干细胞无毒。因此，在其中膜包括干细胞的具体实施方案中，优选的增塑剂和 / 或亲水聚合物是 PEG。

[0025] 术语“聚乙二醇 (PEG)”是指在水性介质中溶解的聚乙二醇聚合物。在一些实施方案中，本发明的膜中使用范围从 300–20,000 的 PEG。在其它实施方案中，在本发明的膜中使用 PEG 400。

[0026] 在一些实施方案中，所述亲水聚合物是范围从 300–20,000 的聚乙二醇。在其它实

施方案中,所述增塑剂是范围从 300-20,000 的聚乙二醇。在又进一步的实施方案中,所述亲水聚合物和所述增塑剂二者是范围从 300-20,000 的聚乙二醇。

[0027] 不希望受限于理论,在这种情况下,PEG 表现为在膜中实现双重功能;其对膜赋予柔性,并且其导致溶解后产生孔。如在以下实施例中证明的,孔隙率(膜中孔的数目)随着膜中 PEG 浓度增加。而且,孔隙率增加与细胞粘附增加关联。

[0028] 在本发明的其它实施方案中,所述至少一种亲水聚合物以膜的约 0.5% 重量 / 重量 (w/w) 至 30% (w/w) 的浓度存在。在其它实施方案中,所述至少一种亲水聚合物以膜的约 10% (w/w) 至约 25% (w/w) 的浓度存在。

[0029] 在具体的实施方案中,所述至少一种亲水聚合物选自由以下组成的组:羟丙甲基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素,浓度为膜的约 0.5% (w/w) 至 20% (w/w)。

[0030] 在另一具体的实施方案中,所述至少一种亲水聚合物是 PEG,浓度为膜的约 1% (w/w) 至 30% (w/w)、或约 10% (w/w) 至约 25% (w/w)、或约 15% (w/w)。

[0031] 在进一步的实施方案中,本发明的膜还包括至少一种类型的细胞。在一些实施方案中,所述细胞选自由以下组成的组:成体干细胞、胚胎干细胞、多能干细胞、间充质干细胞、脐带血细胞、成骨细胞、成软骨细胞和 CD 105+ 细胞。在其它实施方案中,所述干细胞是自体成体干细胞。

[0032] 多能间充质干细胞具有经历定型成为若干细胞谱系,包括成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞和肌细胞的能力。

[0033] 在一个实施方案中,本发明的膜包括 AMCA、范围从 300-20,000 的聚乙二醇(其量足以作为增塑剂和能够在接触含水流体后在原处形成孔的亲水聚合物二者)和成体干细胞。

[0034] 本文所用的术语“细胞粘附 (cell adhesion)”或“细胞粘附 (cell adherence)”是指细胞结合 / 附着到表面,同时保持活力。

[0035] 本文所用的术语“细胞增殖”或“细胞生长”是指繁殖和细胞数目增加,即,细胞分裂。

[0036] 本文所用的术语“细胞分化”是指较不特化的细胞藉以变为更加特化的细胞类型的过程。例如,在组织修复期间和正常细胞更新期间,成体干细胞分裂并产生完全分化的子代细胞,如,间充质干细胞可分化为成骨细胞。

[0037] 本发明的膜能够支持细胞粘附、细胞增殖和 / 或细胞分化。

[0038] 根据本发明的膜表现出诸如以下能力的特性:(i) 与现有组织形成直接粘附和粘合;(ii) 促进细胞功能;(iii) 提供用于形成新组织的支架或模板;和(iv) 促进组织再生,并用作生物活性材料的载体。

[0039] 在一些实施方案中,本发明的膜还包括能够促进组织繁殖 (tissue reproduction) 和 / 或在植入所述膜的位置递送所需的药物益处的至少一种活性剂。

[0040] 在其它实施方案中,本发明的膜还包括至少一种活性剂,其中所述至少一种活性剂选自由以下组成的组:细胞因子、激素、双膦酸盐、大麻素、 β -受体阻滞剂、骨诱导剂、生长因子、HMG-CoA 还原酶抑制剂(诸如抑制素)、药物和抗生素、和其任何组合。

[0041] 在一些实施方案中,所述活性剂选自由以下组成的组:抑制素、雌激素、雄激素、普

萘洛尔、转化生长因子 (TGF)、骨形态发生蛋白 (BMP, 诸如例如 BMP-2 和 BMP-7)、胰岛素样生长激素、成纤维细胞生长因子 (FGF)、阿仑膦酸盐、利塞膦酸盐和甲状旁腺激素。在又进一步的实施方案中, 所述活性剂是辛伐他汀或洛伐他汀。

[0042] 辛伐他汀是广泛地用作降胆固醇药物的 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂的抑制素家族成员。抑制素可通过合成代谢和抗分解代谢 (抗吸收作用) 机制而增加骨量。

[0043] 在一些实施方案中, 所述剂是以控释制剂形式。

[0044] 在另一具体实施方案中, 该膜包括 AMCA、PEG 和至少一种活性剂 (如, 辛伐他汀)。

[0045] 在一些实施方案中, 本发明的膜能够在水合后为多孔的 (例如通过与植入位置的体液接触而实现水合), 且其中孔径是约 0.1 至约 5 微米。

[0046] 在一些实施方案中, 本发明的膜可由于所述水溶性的增塑剂的水合而具有至少一种孔, 尺寸小于 5 微米。在其它实施方案中, 所述孔径小于 2 微米。在又其它实施方案中, 所述孔径是约 0.1 至约 5 微米。

[0047] 本文所用的术语“水合”是指本发明的膜暴露于水溶液或体液, 如, 间质液、血液、血浆、唾液, 这导致水溶性增塑剂的溶解。

[0048] 在另一方面, 本发明提供本发明的膜用于制备用于缺损组织区域的组织再生的三维中空植入物的用途。

[0049] 由于本发明的膜的柔性, 可能利用所述膜形成三维植入物而不需要将膜预浇铸或重塑或将膜暴露于热。从所述膜构建的三维结构可以是适合植入位置的任何类型结构, 并可在植入位置根据其中将使用所述植入物的部位而进一步调整。

[0050] 在一些实施方案中, 所述三维中空植入物选自由以下组成的组: 管形植入物、圆筒形植入物、锥形植入物或平面式植入物。

[0051] 在进一步的实施方案中, 在使用本发明的膜或由其制成的三维中空植入物后将再生的所述组织选自韧带、腱、软骨、椎间盘、牙质组织 (包括牙齿、釉质、牙质、牙骨质、牙髓、牙周韧带、牙槽骨、牙龈组织) 和骨。

[0052] 在进一步的方面, 本发明提供包括至少一种本发明的膜的三维中空植入物。在一个实施方案中, 包括在本发明三维中空植入物中的本发明的膜界定该植入物的表面。

[0053] 在另一个方面, 本发明提供包含本发明的膜的细胞递送系统。

[0054] 在又进一步的方面, 本发明提供包含本发明的膜的细胞生长表面。

[0055] 在其各方面的另一个方面, 本发明提供基本上由本发明的膜包被 (coated) 的支架。

[0056] 本发明还提供基本上由本发明的膜包被的颗粒材料。在某些实施方案中, 该颗粒材料主要由骨相容性陶瓷如基于钙的矿物质构成。

[0057] 本发明还提供促进缺损组织区域中组织再生的方法, 包括以下步骤: 提供本发明的膜; 和在所述组织缺损区域附近植入所述膜。在一些实施方案中, 所述缺损组织是由选自以下的情况导致的: 骨不连接、骨质疏松、牙周疾病或病症、溶骨性骨病、整形手术后、矫形植入后、神经外科手术后、牙槽骨增高术、脊柱融合术、脊椎骨折。

[0058] 附图简述

[0059] 为了理解本发明, 并且为了了解如何在实践中实施本发明, 现将通过仅为非限制

性的实例、参考附图来描述实施方案，附图中：

[0060] 图 1A-1F 显示聚苯乙烯组织培养皿上和 AMCA 膜上 hMSC 粘附的显微照片。将 CFSE- 标记的 hMSC 接种在聚苯乙烯组织培养皿 (A-C) 或膜 (D-F) 上。24h 后，用共聚焦显微镜观察 CFSE- 标记的细胞。显示每种培养条件的三个代表性图。

[0061] 图 2A-2F 显示 AMCA/PEG 膜上 hMSC 粘附的扫描电子显微照片。将 hMSC 接种在带有 PEG 400 的 AMCA 膜上。培养 24h 后，如材料和方法中所描述固定细胞，并利用扫描电子显微术 (SEM) 进行分析。各图从左到右的放大倍数是：上图 - $\times 200$ (图 2A)、 $\times 1000$ (图 2B)、 $\times 2000$ (图 2C)； $\times 4000$ (图 2D)、 $\times 5000$ (图 2E)、 $\times 6000$ (图 2F)。

[0062] 图 3A-3B 显示 CFSE 标记的 hMSC 的流式细胞术分析。将 1×10^5 荷有 CFSE 的 hMSC 在含有 15% PEG 400 的 AMCA 膜上 (图 3A) 或在聚苯乙烯组织培养皿上 (图 3B) 培养 24h、48h、96h 和 144h。在所示时间点收集细胞并进行流式细胞术分析。CFSE 的减少反映细胞分裂。

[0063] 图 4 是显示采用不同 PEG 400 浓度制备的 AMCA 膜上 hMSC 增殖的图。如图 3 所示地培养和分析荷有 CFSE 的 hMSC。数据展示为含有不同浓度 PEG 400 的 AMCA 膜相比于聚苯乙烯组织培养皿 (对照) 随时间的 CFSE 的平均荧光强度 (MFI)。MFI 的减少代表 MSC 随时间的增殖速率。

[0064] 图 5A-5C 显示 AMCA 膜的扫描电子显微照片：利用溶剂浇铸技术制备膜。然后利用 SEM 分析膜，或将膜浸入磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 24h，然后由 SEM 分析。(图 5A)：在 PBS 中浸泡之前的 15% PEG 400 膜 - 显示无孔隙率；(图 5B)：在 PBS 中浸泡后的 5% PEG 膜 - 略微多孔；(图 5C)：在 PBS 中浸泡后的 15% PEG 膜 - 多孔。放大倍数： $\times 5000$ 。

[0065] 图 6A-6B 显示 AMCA 膜上的 hMSC 分化。将 1×10^5 hMSC 在膜或聚苯乙烯组织培养皿上培养。3 天后，当细胞达到汇合 (confluence) 时，加入包含具有抗坏血酸 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)、地塞米松 (10^{-8}M) 和 β -甘油磷酸盐 (10mM) 的培养基的分化培养基，并且每周两次为细胞供应新鲜的分化培养基。在培养的第 17 天，用 70% 乙醇固定细胞并进行茜素红染色。(图 6A)：对照聚苯乙烯皿；(图 6B)：带有 15% PEG 400 的 AMCA 膜。

[0066] 图 7 是通过平均骨痂面积显示骨再生的图。与未处理对照相比，在植入 AMCA 膜的骨中测量到平均骨痂面积增加。

[0067] 图 8A-8B 是显示在两个前肢产生极量缺损 (10mm) 的 6 只雄性新西兰兔中，对于乙基纤维素膜和控释辛伐他汀的乙基纤维素膜观察到的相对骨痂密度随时间变化 (图 8A) 和骨痂面积随时间变化 (图 8B) 的定量分析的图。向前肢插入含有辛伐他汀的乙基纤维素 (EC) 膜；向对侧肢插入 EC 膜。利用 Osirix 软件进行校准。

[0068] 图 9 显示采用 EC 膜的骨再生的显微 CT。在这一实验中，保留骨缺损未治疗。骨缺损处于不连接状态。箭头标出骨缺损区域。

[0069] 图 10 显示采用含有辛伐他汀的 EC 膜的骨再生的显微 CT (计算机断层照相法)。在这一实验中，骨缺损被治疗，并且显示了缺损的成功搭桥。箭头标出骨缺损区域。

[0070] 图 11A-11B 是显示加入或未加入控释辛伐他汀的本发明的 AMCA 膜的平均骨痂面积生长的图。A- 显示植入 AMCA 膜 + 辛伐他汀 4 周后获得的结果。B- 显示植入 AMCA 膜 + 辛伐他汀 8 周后获得的结果。

[0071] 图 12A-12D 是显示多种参数对辛伐他汀从本发明的膜释放的作用的图 (体外测

量) : 辛伐他汀浓度对辛伐他汀释放速率的作用(图 12A); 膜宽度对辛伐他汀释放速率的作用(图 12B); 增塑剂对辛伐他汀释放速率的作用(图 12C); 增塑剂类型对辛伐他汀释放速率的作用(图 12D)。

[0072] 图 13A-13B 是显示兔极量缺损模型中以携带 hMSC 的 AMCA 膜实现的骨再生参数的图。图 13A 显示骨痂面积生长。图 13B 显示植入膜 8 周后对缺损的组织学评价。

[0073] 实施方案详述

[0074] 本发明提供由至少三种成分构成的膜, 第一种是具有正表面电荷、在生理条件下不生物降解、合成的疏水聚合物; 在生理条件下生物降解的至少一种亲水聚合物, 和至少一种增塑剂。不希望受限于理论, 这些成分的组合产生柔性足以能够产生适于不同治疗应用的三维结构例如中空管的膜。而且, 暴露于流体后(体内或活体外), 亲水聚合物至少部分地崩解, 并且膜变得多孔, 从而使得能够粘附细胞。

[0075] 细胞可接种到本发明的膜上, 如将在以下进一步详细描述的。

[0076] 在进一步的实施方案中, 本发明的膜可还包括活性剂, 如以下进一步详细描述的。

[0077] 本发明的膜可用作允许引导性组织修复的基础结构以及细胞递送系统。本发明的膜还可用作用于消除不希望的细胞、血管和软 / 疤痕组织浸润进入被治疗区域的屏障膜, 和用于从周围组织分离所述膜中递送的细胞并阻止细胞和因子从膜内的空间渗漏到周围组织的屏障膜。

[0078] 本发明的膜可照这样使用, 例如, 通过覆盖向其递送细胞的区域, 然而, 在一些实施方案中, 本发明的膜可用于形成容纳待递送细胞的三维装置(例如中空管形装置), 或可包被含有待递送细胞的组织工程支架。

[0079] 在一些实施方案中, 本发明的膜折叠为期望的三维结构, 如, 管形装置。管形装置可用作基础结构以允许引导性组织修复以及向缺损的管形区域诸如骨缺损递送细胞, 并且膜可用于在装置中容纳递送的细胞和组分, 并阻止细胞、胞外基质和血管从周围组织浸润到装置包围的空间中。

[0080] 在其它实施方案中, 本发明的膜用于包被组织工程支架。这种膜包被的支架可容纳待递送到身体部位中的细胞。膜的包被分离支架中递送的细胞与周围组织, 并阻止细胞和可溶的因子从支架内的空间渗漏到周围组织。用本发明的膜包被支架可允许更好的细胞粘附和更高剂量的细胞递送到目标部位。

[0081] 在又其它的实施方案中, 在植入支架后, 可用本发明的膜包裹骨缺损区域, 以阻止细胞和可溶性因子渗漏, 并阻止软组织生长到支架中。

[0082] 术语“细胞递送”是指为了治疗目的, 将细胞引入个体的身体中期望的部位。

[0083] 本发明的膜适于接种任何类型的细胞, 例如干细胞(成体和胚胎干细胞二者)。在其它实施方案中, 细胞类型可选自以下非限制性列表: 间充质(基质)干细胞、脐带血细胞、成骨细胞、成软骨细胞或 CD105+ 细胞。本发明还涵盖接种胚胎来源的多能干细胞以及已被重编程以变成多能的成体细胞。细胞可以是自体、同种异体或异种的。

[0084] 在一些实施方案中, 细胞是自体成体干细胞, 例如, 从骨髓或脂肪组织获得。

[0085] 在一些实施方案中, 细胞接种在活体外进行。细胞可放置在膜(例如形成中空管形装置的膜)上或放置在由本发明的膜包被的组织工程基质(在本文还称为“支架”)中。组织工程基质的实例是从生物材料或合成的聚合物制造的组织工程基质。

[0086] 在某些实施方案中,将带有或不带有活体外接种细胞的本发明的膜、本发明的管形植入物、或本发明的包被支架放置在身体中期望的位置。这一位置通常是期望产生新组织的位置,此处的组织已经被外伤、手术介入、遗传或疾病过程损伤。

[0087] 在一些实施方案中,期望的部位是其中应从成体干细胞产生组织的部位;在一些实施方案中,这样的部位是韧带、腱、软骨、椎间盘、牙质组织或骨组织,最优先地是骨组织。

[0088] 骨组织的产生在以下情况中是需要的,诸如骨不连接、骨质疏松、牙周疾病或牙齿植入、溶骨性骨病、整形手术后、矫形植入后、包括去除颅盖骨的神经外科手术后、牙槽骨增高术、脊柱融合术和脊椎骨折。

[0089] 腱 / 韧带组织的产生在以下情况中是需要的,例如在由于外伤或炎性病症的组织撕裂后。

[0090] 软骨组织的产生在以下情况中是需要的,诸如类风湿性关节炎、骨关节炎、外伤、癌症手术或整容手术。

[0091] 包括髓核和纤维环的椎间盘组织在以下情况中是需要的,诸如髓核退化、纤维环破裂、或在髓核切除术或椎间盘切除术后。

[0092] 通常,诸如以中空管形式的膜通过植入被放置在期望的部位。

[0093] 在某些实施方案中,本发明的膜包括合成的、疏水性带正电荷的聚合物、亲水聚合物、增塑剂和活性剂,且还接种有细胞。

[0094] 在具体的实施方案中,本发明的膜包括合成的、疏水性带正电荷的聚合物和 PEG,且还接种有干细胞。

[0095] 本文所用的术语“细胞生长表面”是指适于细胞生长的任何人造表面,例如载玻片、器皿或细胞 / 组织培养皿。根据本发明的膜包被的细胞生长表面从而获得适于细胞粘附、增殖和 / 或分化的特性。

[0096] 本发明提供能够支持 MSC 粘附、增殖和分化的柔性膜。这种膜可用作用于骨再生应用的治疗。移植性骨折的愈合和骨缺损的再生不仅来自于局部存在的成骨细胞增殖,还牵涉前骨原细胞的募集、增殖和分化。多能成骨细胞性前体的分化是骨愈合和骨痂形成中的主要最初事件,尽管也可能牵涉先前存在的成骨细胞。这些祖先细胞的募集、建立、增殖和分化中的任何失败可导致骨连接延迟或骨不连接。关于极量骨缺损的愈合存在许多困难。大体上,这些困难来自于这样的事实,即宿主的骨原细胞的数目和 / 或活性不足以允许愈合。

[0097] 本发明的膜可引导骨再生以及阻止新形成骨中不需要的血管形成。膜还可保护骨缺损区域不受结缔组织和疤痕组织浸润,引导骨原细胞,并允许在膜包围的空间中储存成骨性组分,该成骨性组分可从骨末端和骨髓释放 [10、12]。而且,在极量缺损模型部位放置粘附于膜的 MSC 将为新的骨组织提供起始材料。因此,植入带有活体外扩增的 MSC 的 GBR 膜可大大地改进骨修复结果。

[0098] 如以下提供的实施例中证明的,联合多种增塑剂检验了多种聚合物。

[0099] 在一个实施方案中,由 AMCA 和 15% PEG 400 构成的膜可支持良好的 MSC 粘附、增殖和分化:(I) 由光学显微镜检查、荧光显微镜检查和 SEM 确定, MSC 粘附于带有 15% PEG 400 的 AMCA 膜。(II) 由 CFSE 标记和流式细胞术分析确定, MSC 保持其增殖活性。(III) 由茜素红染色确定, MSC 保持了其分化能力。

[0100] 含 15% PEG 400 的 AMCA 膜支持 MSC 分化为成骨细胞。

[0101] 材料和方法

[0102] 聚合物 : 甲基丙烯酸铵共聚物 A 型 NF (Ammonio Methacrylate Copolymer type A NF, AMCA, Eudragit® RL, Degussa, 德国) 和乙基纤维素 (EC, Ethocel® N 100, Hercules Inc, Wilmington, DL.)。

[0103] 增塑剂 : 聚乙二醇 400 (PEG 400, Merck, 德国)、三乙酸甘油酯 (三醋精, Fluka, Rehovot, 以色列)、甘油 (Frutarom, 以色列)、柠檬酸三乙酯 (Fluka, Rehovot, 以色列)、癸二酸二丁酯 (Fluka, Rehovot, 以色列)、邻苯二甲酸二丁酯 (Fluka, Rehovot, 以色列)。

[0104] 聚合膜制备和灭菌 - 膜利用 Friedman M. 和 Golomb G. J. [13] 公开的溶剂浇铸技术制备。通过将由聚合物、增塑剂和乙醇 (Frutarom, 以色列) 组成的溶液浇铸到 Teflon 模具 (圆盘, 内径 9.6cm), 并允许溶剂蒸发过夜而铸造聚合膜。膜宽度是 : 100±5 μ m。

[0105] 用于组织培养之前, 将膜浸入 PBS (Biological Industries, Beit Haemek, 以色列) 24 小时以洗去可能残留的乙醇, 然后 UV 照射 2hr 来灭菌。

[0106] 膜的表征 - 扫描电子显微术 (SEM) 显微照片 - 将含有 15% PEG 400 的 AMCA 膜用二甲砷酸盐缓冲液中的 2% 戊二醛 (0.1M ; pH = 7.2) 固定 2 小时。然后跳过乙醇脱水系列按照空气干燥方法处理样本 (乙醇溶解 AMCA; 因此应从样本制备排除乙醇)。这个过程由 100% 氟利昂 113 进行。剧烈摇动样本, 这允许快速蒸发氟利昂相。将膜放置在铜段上, 用金包被, 然后在 FEI quanta 200 中以 30KV 的加速电压检查。

[0107] 细胞收集和培养 - 在 Hadassah Medical Center Helsinki Ethics Committee 批准下按照知情同意, 从进行全髋部置换手术的患者丢弃的骨组织获得 hMSC。

[0108] 通过塑性粘附 (plastic adherence) 将 hMSC 与其它骨髓 - 驻留细胞分离, 然后在如 Krampera M. 等 [14] 和 Djouad F 等 [15] 所述的组织培养条件下生长。将细胞维持在补充 10% 热灭活胎牛血清、2mM 谷氨酰胺和青霉素 / 链霉素的低葡萄糖的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) (Biological Industries, Beit-Haemek, 以色列)。原代培养物通常维持 12-16 天, 然后通过胰蛋白酶消化剥离, 并继代培养 (Barry FP. 等 [16])。每 3-4 天更换培养基。

[0109] MSC 粘附于膜 - 对于 MSC 标记, 将 MSC 重悬在含 5- 羧基荧光素二乙酸基甲基酯 (BCECF/AM 或 CFSE ; 5 μ g/mL ; Calbiochem) 的 PBS 中 (10^7 细胞 / ml), 在 37°C 孵育 10min, 然后洗涤细胞三次。将细胞在 PBS 润湿的灭菌膜上培养, 在 150 μ l 培养基中 15×10^4 细胞, 在 37°C 孵育 6 小时。后来加入 3ml 培养基。接种 24 小时后以荧光显微镜检查细胞。组织培养聚苯乙烯皿用作细胞粘附试验中膜的阳性对照。

[0110] 基于 CFSE 的增殖测定 - 对于细胞分裂研究, 将 MSC 重悬在含 3' -O- 乙酰基 -2' , 7' - 双 (羧乙基) -4 或 5- 羧基荧光素二乙酸基甲基酯 (BCECF/AM 或 CFSE ; 5 μ g/mL ; Calbiochem) 的 PBS 中 (10^7 细胞 / ml), 在 37°C 孵育 10min, 并洗涤三次。然后如上述地将 CFSE- 标记的细胞接种在膜上或组织培养皿上。在所示时间点收集细胞, 并且细胞的增殖通过 CFSE 荧光的逐渐丧失来观察, 如在 FACSCalibre 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上利用 Cell Quest 软件分析。

[0111] 膜上的 MSC 分化 - 如上述地将 MSC 接种到膜上或接种到中心孔器官培养皿 (Falcon) 上用于对照。在 MSC 汇合后, 立即向培养基补充抗坏血酸 (50 μ g/ml)、地塞米松

(10^{-8} M) 和 β -甘油磷酸盐 (10mM)。每周两次更换培养基,持续 17 天,之后如以下所述地用茜素红对膜和皿染色。

[0112] 茜素红染色 - 用 NaOH 将蒸馏水中 2% 茜素红储备溶液调整到 pH4.2, 并经 0.22 μ m 过滤器过滤。用 150mM NaCl 漂洗中心孔器官培养皿中的培养物三次, 在冰冷的 70% 乙醇中固定, 用蒸馏水漂洗, 并在室温用每孔 500 μ l 茜素红储备溶液染色 10min。将各孔用蒸馏水漂洗 5 次; 用蒸馏水的第 6 次亦即最后一次洗涤进行 15min (Halvorsen YD. 等 [17])。由于膜带有正电荷, 膜比带负电荷的中心孔器官培养皿对茜素红染料有更高亲和性, 所以用蒸馏水漂洗不能充分地从膜除去染料。为了减少背景, 对膜施加一次 0.02M HCl 漂洗。然后获得显微照片。

[0113] 实施例 1- 利用本发明的膜的细胞粘附

[0114] 检验了多种膜支持细胞附着和生长的能力。检验的膜的聚合物和增塑剂类型不同。检验了多种增塑剂, 即, 甘油、聚乙二醇、柠檬酸三乙酯、癸二酸二丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、三醋精。检验的增塑剂是疏水或亲水的, 且加入的目的是赋予膜柔性。如上文所述地将 MSC 接种到灭菌膜上。

[0115] EC 膜 : MSC 细胞对 EC 膜的所有制品显示很少的粘附, 且细胞聚集是轻微的。各种增塑剂对细胞粘附或细胞形状没有影响。使用聚 -1- 赖氨酸包被的膜作为对照。聚 -1- 赖氨酸是一种高度带正电荷的氨基酸链, 通常用作包被剂以促进培养中的细胞粘附。细胞以单层纺锤体形状粘附于包被聚 -1- 赖氨酸的 EC 膜, 因此推断 EC 本身不支持细胞粘附。然而, 发现在聚 -1- 赖氨酸存在下 EC 无毒。

[0116] AMCA 膜 : 以甲基丙烯酸铵共聚物 A 型 (AMCA, Eudragit RLTM, Degussa, 德国) [85%] 与本文以上披露的各种增塑剂 [15%] 混合进行细胞粘附检验。

[0117] MSC 以纺锤体单层形状充分粘附于以各种增塑剂制备的 AMCA 膜 (图 1D-F)。AMCA 膜上的细胞铺展与用作细胞粘附阳性对照的聚苯乙烯皿上的铺展相似 (图 1A-C)。铺展模式指示细胞的良好状态。

[0118] 利用 SEM 进一步分析细胞粘附。如图 2 所示, AMCA 膜上的细胞是扁平和单层纺锤体形状的。而且, 在更高的放大倍数, 观察到细胞 - 膜相互作用, 细胞足粘附于膜 (图 2, D-F)。此外, 观察到从细胞表面释放许多液泡 (vacuole), 证明了细胞功能性。利用人类以及兔 MSC 二者获得相似结果。

[0119] 实施例 2- 利用本发明的膜的细胞增殖

[0120] MSC 的增殖能力利用细胞分裂的荧光标志物 CFSE 和流式细胞术分析来检验。这一方法是基于荧光素相关染料 CFSE, 其以显著保真性在子代细胞之间分配, 这允许体外和体内鉴定 8 至 10 个分散的代。该技术允许根据这一技术收集关于增殖动力学和分化的复杂信息; 对单独细胞加上不可逆地结合细胞质的荧光 CFSE 染料的标签。随着细胞分裂, 其荧光随着每一代减半, 允许随时间监测存在的任何单个细胞的增殖历史 (参见 Lyons AB. 等 [18])。

[0121] MSC 在 AMCA 和 PEG 400 膜上增殖 (图 3B) (但采用其它增塑剂未检测到增殖; 数据未显示), 但与在用作对照的组织培养皿上的增殖能力相比, 速率略微减少 (图 3A)。

[0122] 随后, 检验在含不同浓度 PEG 400 (10%、15%、20% 和 25% w/w) 的膜上 MSC 增殖速率随时间的变化。MSC 增殖速率与平均荧光强度值 (MFI) 反向相关 (图 4)。这一分析揭

示,含 15% PEG 400 的膜和含 20% PEG 400 的膜与聚苯乙烯对照相当接近,而其它浓度 PEG 导致较高或较低的增殖速率。

[0123] 此外,利用扫描电子显微术 (SEM) 表征带有 15% PEG 400 和带有 5% PEG 400 的 AMCA 膜。在 PBS 中浸泡之前和之后观察膜 (图 5)。注意,在每次 MSC 接种前,将膜浸入 PBS 24 小时以洗去残留的乙醇。因为 PEG 400 在水中可溶且从而是致孔的,因此仅在 PBS 中浸泡后才在膜表面上观察到孔 (图 5B-C)。对两种浓度的 PEG 400, SEM 图证明了多孔表面,平均孔径为 $0.18 \mu\text{m}$ 。孔分布与不同 PEG 400 浓度直接相关。

[0124] 实施例 3- 利用本发明的膜的细胞分化

[0125] 如上文所述地加入分化培养基。然后将膜和皿用茜素红染色 (图 6A 和 6B)。茜素红不可逆地结合二价阳离子,且对钙有尤其高的亲和性。钙从成骨细胞分泌,并作为产生胞外基质的部分沉积在膜上。因此钙的存在标志着从不分泌钙的 MSC 分化为成骨细胞。图 6 证明,AMCA 膜和聚苯乙烯对照二者上培养的 MSC 已经分化为成骨细胞并产生胞外基质。这一发现证实,带有 15% PEG 400 的 AMCA 膜支持 MSC 分化,且 MSC 在粘附于膜后保持其干细胞性状。

[0126] 实施例 4- 利用本发明的膜的体内骨再生研究

[0127] 研究组 : 对 5 只重 3.8-4.4kg 的雄性新西兰兔进行前肢中双侧干体中间桡骨段 (长 1cm) 的切除。在左前肢植入管形 AMCA 膜 (处理的骨切开术),而右肢用作对照 (未处理的骨切开术)。

[0128] 愈合过程的评价 : 放射照相评价 - 手术后 2、4、6 和 8 周获得前肢的侧面放射照片。为了获得再生愈合过程期间骨缺损的标准化测量,在标准条件 (42kV, 2mas) 进行两个前肢的标准侧位放射照相。利用 OsiriX 医学成像软件检查放射照片以评价新骨的面积和密度。

[0129] 测量的参数 :

[0130] - 再生骨组织 (在骨间隙缺损周围和其中出现的) 的总面积。为了消除骨尺寸变化性造成的可能偏差,利用鹰嘴在其最窄处的直径作为标准参考进行数据校准。该直径在每个样本中定义为 10mm。

[0131] - 间隙缺损中新再生骨的相对密度。划出分段的区域,然后测量密度。测量每个前肢中鹰嘴中央的骨密度作为用于校准的参考值。对于每个样本,鹰嘴的密度定义为 100% (参见 Mosheiff R. 等 [10])。

[0132] 结果 : 图 7 显示整个研究中 (2 至 8 周) 由平均骨痂面积 (mm^2) 表示的骨再生。在研究的第 2 周,对照臂中产生的平均骨痂面积大于用 AMCA 膜处理的臂,可能是因为在手术部位形成血肿或血块。当用膜包围该部位时,膜将该区域分离开,从而减慢血肿消退。然而从研究的第四周开始,用 AMCA 膜处理的肢中产生的骨痂的平均面积略微大于对照 (144.8mm^2 相比于 114.5mm^2)。这一趋势在第 6 周和第 8 周持续,相关联地,AMCA 膜处理的肢和对照肢的平均骨痂面积之间的差异加宽。在第 8 周,两个肢 (用 AMCA 膜和对照处理的) 中产生的平均骨痂面积的差异达到峰值,且为 143.91mm^2 (参见下表 1)。然而,由于这一初步研究的小样品数 ($n = 5$) 和如体内研究中经常发生的结果的高变化性,这一差异不是统计学上显著的。

[0133] 表 1 : 在研究第 8 周 (终点) 的放射照相参数

[0134]

测量的参数	显著性 (2尾)	平均差异 (mm ²)	对照		AMCA 膜	
			标准差	平均值 (mm ²)	标准差	平均值 (mm ²)
骨痂的表面积	0.08	143.91	85.633	129.74	277.203	273.65
骨痂的相对密度	0.68	20.54	39.8	123.33	101.95	143.87
近端四分之一的 相对密度	0.89	31.96	38.35	126.12	107.43	158.08
近端中部四分之一的 相对密度	0.68	55.84	51.93	96.44	126.81	152.28
远端中部四分之一的 相对密度	0.34	57.89	37.7	106.28	114.28	164.17
远端四分之一的 相对密度	0.5	40.41	41.99	110.07	88.78	150.48

[0135] 实施例 5- 利用还包含辛伐他汀的本发明的 EC 膜的体内骨再生研究

[0136] 在 6 只雄性新西兰兔的两个前肢产生极量缺损 (10mm)。在一个前肢插入含辛伐他汀的 EC 膜，对侧肢插入无活性剂的 EC 膜。测量骨痂密度和骨痂面积，并利用 Osirix 软件校准。图 8A 和 8B 显示放射照片的定量分析。

[0137] 图 9 显示采用 EC 膜的骨再生的显微 CT。在这一实验中，保留骨缺损未治疗。骨缺损处于不连接状态。箭头标出骨缺损区域。

[0138] 图 10 显示采用含有辛伐他汀的 EC 膜的骨再生的显微 CT。箭头标出骨缺损区域。

[0139] 在这一实验中，骨缺损被治疗，并且缺损的成功搭桥是明显的。

[0140] 实施例 6- 利用还含有辛伐他汀的本发明的 AMCA 膜的体内骨再生研究

[0141] 兔模型：在桡骨中产生 1cm 的极量骨缺损。5 只兔用控释辛伐他汀的 AMCA 膜处理，且另 5 只用无任何活性成分的 AMCA 膜处理。

[0142] 膜：

[0143] 含辛伐他汀的 AMCA 膜：

[0144] - 辛伐他汀 20% w/w-0.36g

[0145] -AMCA (eudragit RL) 70% w/w-1.26g

[0146] -PEG 400 10% w/w-0.18g

[0147] - 膜宽度是 180 微米。

[0148] 对照 AMCA 膜：

[0149] -AMCA (eudragit RL) 90% w/w-1.62g

[0150] -PEG 400 10% w/w-0.18g

[0151] - 膜宽度是 180 微米。

[0152] 图 11 显示在手术后前 2 周，在用控释辛伐他汀的 AMCA 膜处理的缺损部位形成显著更大的骨痂面积 (Wilcoxon 秩和检验)，以及骨痂生长速率增加—从临床角度可能是重要的。

[0153] 实施例 7- 辛伐他汀从本发明的不同膜的体外释放速率

[0154] 各种参数对辛伐他汀从本发明的膜释放的作用如下在体外测量：

[0155] 辛伐他汀浓度对辛伐他汀释放速率的作用显示在图 12A；测试的膜的组成如下：

膜组分	膜 1	膜 2	膜 3
辛伐他汀	20%	5%	10%
PEG 400	10%	10%	10%
Eudragit RL	70%	85%	80%
宽度 (微米)	90	75	87

[0157] 膜宽度对辛伐他汀释放速率的作用显示在图 12B ;测试的膜的组成如下 :

膜组分	膜 4	膜 5
辛伐他汀	20%	20%
PEG 400	10%	10%
Eudragit RL	70%	70%
宽度 (微米)	90 微米	220 微米

[0159] 增塑剂对辛伐他汀释放速率的作用显示在图 12C ;测试的膜的组成如下 :

膜组分	膜 6	膜 7	膜 8
辛伐他汀	20%	20%	20%
PEG 400	10%	5%	10% - Klucel HF
Eudragit RL	70%	75%	70%
宽度 (微米)	90	104	87

[0161] 增塑剂类型对辛伐他汀释放速率的作用显示在图 12D。

[0162] 实施例 8- 采用含 hMSC 的 AMCA 膜的骨再生

[0163] 兔模型 :在桡骨中产生 1cm 的极量骨缺损。两只兔的一个前臂用携带 hMSC 的 AMCA 膜处理, 另一前臂用无 hMSC 的 AMCA 膜处理。

[0164] 膜的特性 :

[0165] AMCA (eudragit RL) 85% w/w-1.512g

[0166] PEG 400 15% w/w-0.266g

[0167] 膜宽度为 180 微米。

[0168] 图 13A 证明在受影响骨中骨痂面积的发展。如图 13B 所示, 在手术后 8 周, 缺损骨区域各部分在植入携带 hMSC 的 AMCA 膜的骨中的组织学评分较高。

[0169] 参考文献

[0170] 1. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process :molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation (作为出生后发育过程的骨折愈合 :其调节的分子、空间和时间方面). J Cell Biochem 2003 ;88(5) :873-84.

[0171] 2. Megas P. Classification of non-union (骨不连接的分类). Injury 2005 ;36 增刊 4 :S30-7.

[0172] 3. Crenshaw H. Delayed union and non-union of fractures (骨折的延迟愈合和

- 骨不连接). St. Louis :CV Mosby ;1987. 第 2053-118 页 .
- [0173] 4. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells(用于骨不连接的经皮的自体骨髓移植. 祖先细胞的数目和浓度的影响). J Bone Joint Surg Am 2005 ;87(7) :1430-7.
- [0174] 5. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration(间充质干细胞和骨再生). Vet Surg 2006 ;35(3) :232-42.
- [0175] 6. Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone(骨髓基质细胞及其在再生骨中的用途). Novartis Found Symp 2003 ;249 :133-43 ;discussion(讨论)143-7, 170-4, 239-41.
- [0176] 7. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone(软骨和骨的组织工程和细胞疗法). MatrixBiol 2003 ;22(1) :81-91.
- [0177] 8. Tsuchiya K, Mori T, Chen G, Ushida T, Tateishi T, Matsuno T, Sakamoto M, Umezawa A. Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet(用于通过接种骨髓基质细胞到网状生物可降解的复合片层上的骨再生的定制成形系统). Cell Tissue Res 2004 ;316(2) :141-53.
- [0178] 9. Meinig RP, Rahn B, Perren SM, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes:treatment of diaphyseal bone defects in the rabbit radius with poly(L-lactide)membrane. A pilot study(采用可吸收聚合膜的骨再生:用聚(L-乳酸)膜治疗兔桡骨中的骨干骨缺损. 初步研究). J Orthop Trauma 1996 ;10(3) :178-90.
- [0179] 10. Mosheiff R, Friedman A, Friedman M, Liebergall M. Quantification of guided regeneration of weight-bearing bones(承重骨引导性再生的定量). Orthopedics 2003 ;26(8) :789-94.
- [0180] 11. Ito K, Nanba K, Murai S. Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria(生物可吸收膜与不可吸收屏障膜对兔颅盖中骨质增大的作用). J Periodontal 1998 ;69(11) :1229-37.
- [0181] 12. Nasser NJ, Friedman A, Friedman M, Moor E, Mosheiff R. Guided bone regeneration in the treatment of segmental diaphyseal defects:a comparison between resorbable and non-resorbable membranes(节段型骨干缺损治疗中的引导性骨再生:可吸收膜与不可吸收膜之间的比较). Injury 2005 ;36(12) :1460-6.
- [0182] 13. Friedman M, Golomb G. New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. I. Development and kinetics of release(氯己定用于牙科应用的新缓释剂型. I. 开发和释放动力学). J Periodontal Res 1982 ;17(3) :323-8.
- [0183] 14. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory

antigen-specific T cells to their cognate peptide(骨髓间充质干细胞抑制天然和记忆性抗原特异性 T 细胞对其关联肽的应答). Blood 2003 ;101(9) :3722-9.

[0184] 15. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals(间充质干细胞的免疫抑制作用有利于同种异体动物中的肿瘤生长). Blood 2003 ;102(10) :3837-44.

[0185] 16. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells :clinical applications and biological characterization(间充质干细胞 :临床应用和生物学表征). Int J Biochem Cell Biol 2004 ;36(4) :568-84.

[0186] 17. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells(通过人类脂肪组织衍生的基质细胞的胞外基质矿物质化和成骨细胞基因表达). Tissue Eng 2001 ;7(6) :729-41.

[0187] 18. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution(利用流式细胞术测量 CFSE 染料稀释而体内和体外分析细胞分裂). J Immunol Methods 2000 ;243(1-2) :147-54.

[0188] 19. Gugala Z, Gogolewski S. Differentiation, growth and activity of rat bone marrow stromal cells on resorbable poly(L/DL-lactide)membranes(大鼠骨髓基质细胞在可吸收的聚(L/DL- 交酯) 膜上的分化、生长和活性). Biomaterials 2004 ;25(12) :2299-307.

[0189] 20. Aggeliki I. 等人 Macromolecules, 35(7), 2506-2513, 2002.

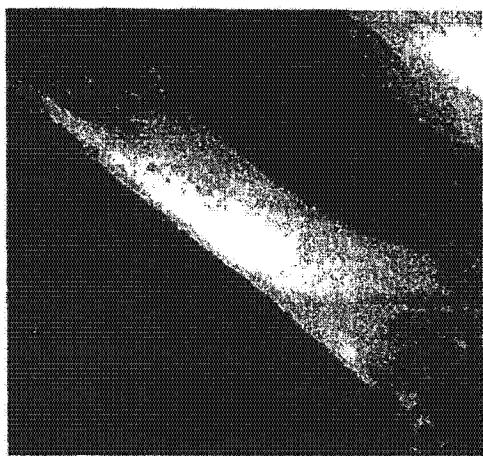


图 1A

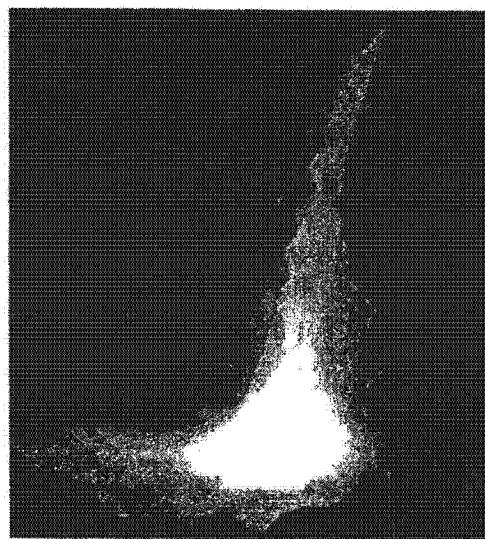


图 1B

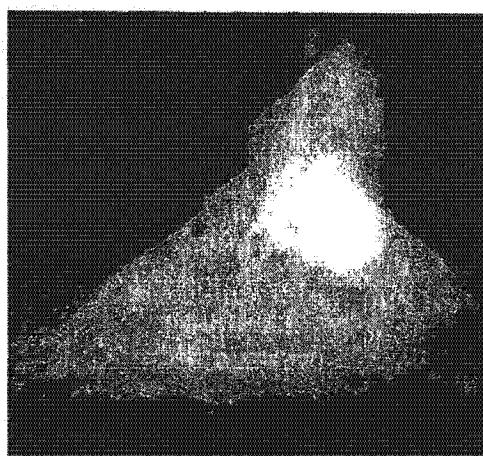


图 1C

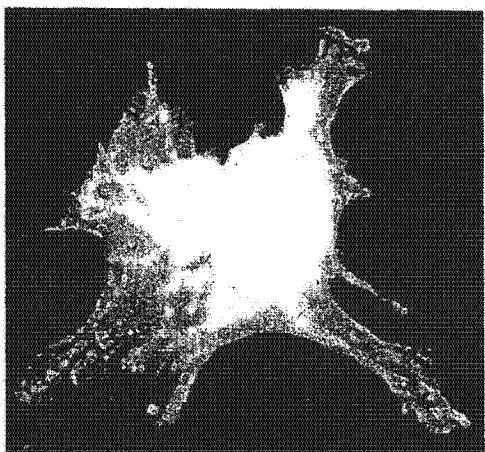


图 1D

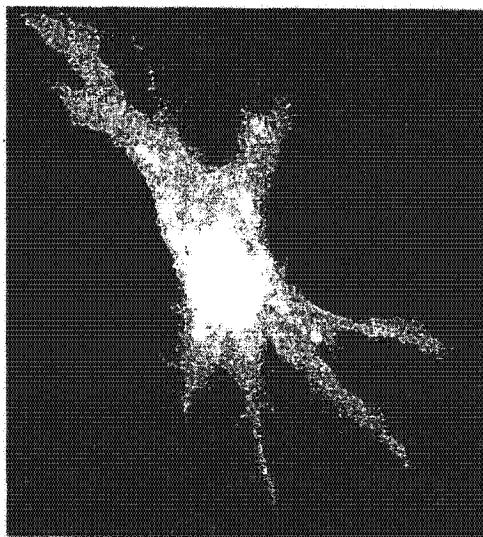


图 1E

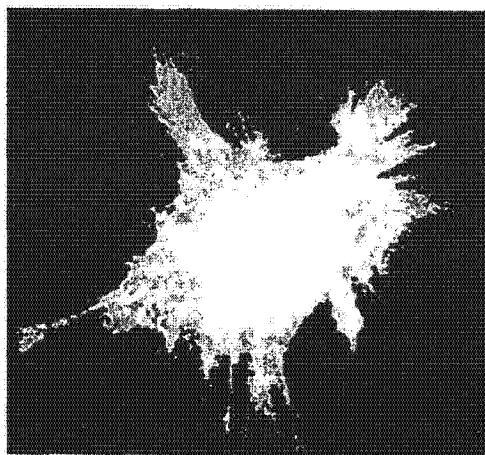


图 1F

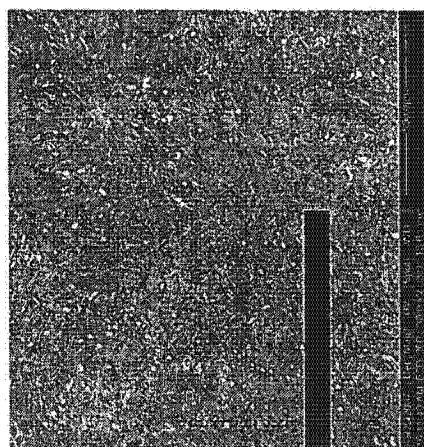


图 2A

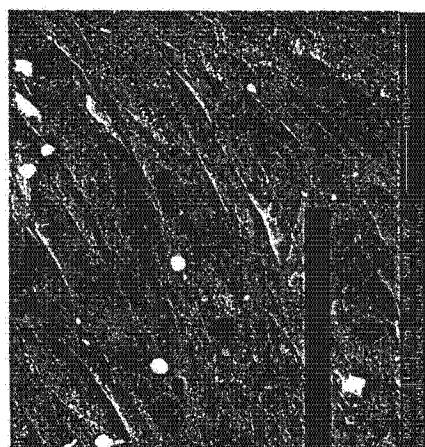


图 2B

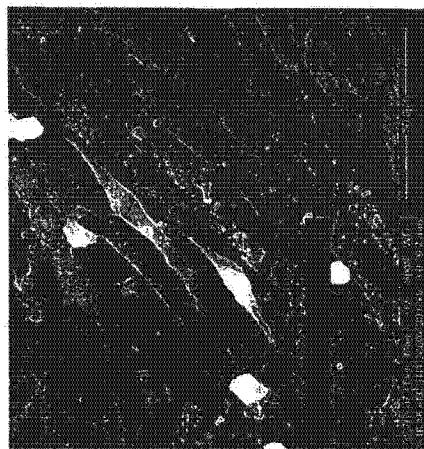


图 2C

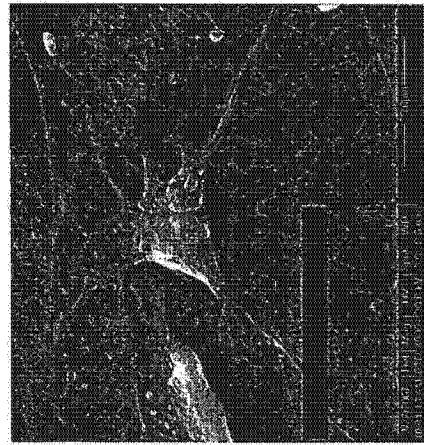


图 2D

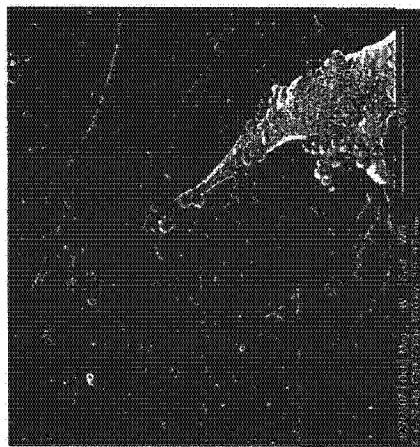


图 2E

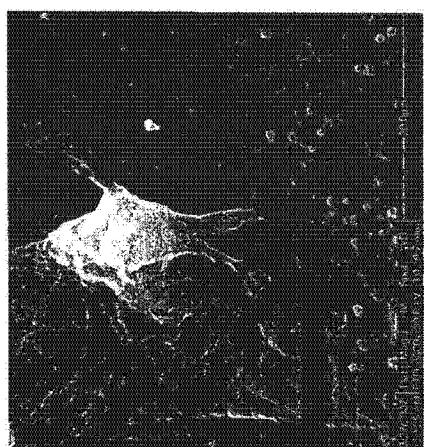


图 2F

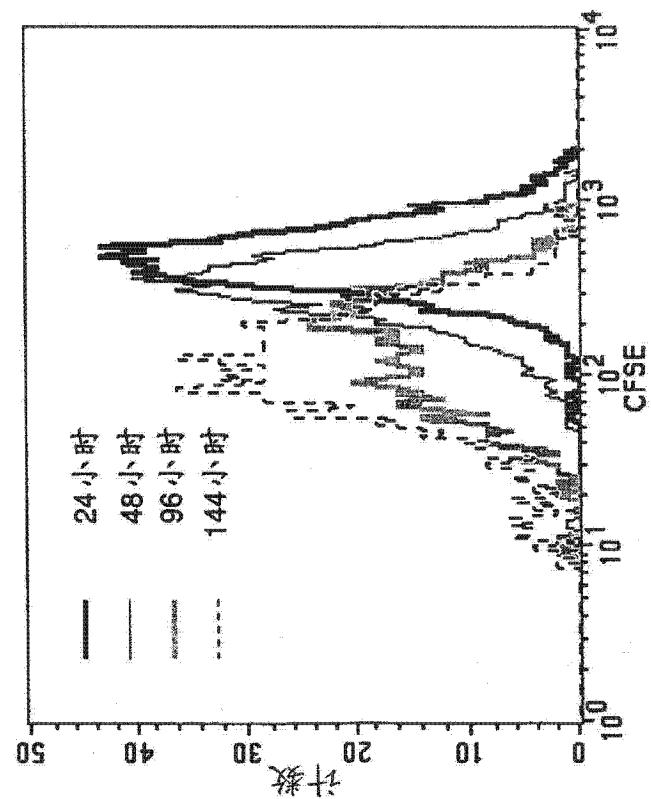


图 3A

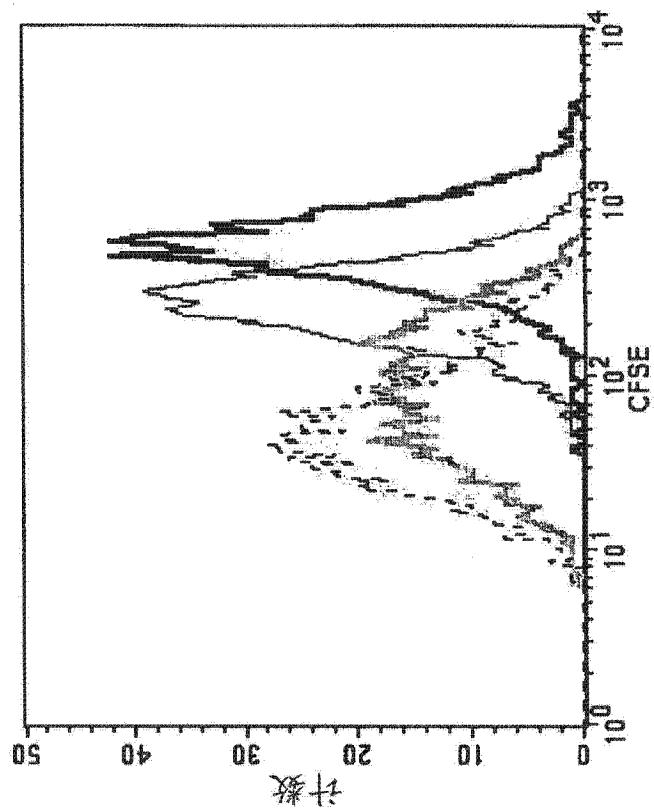


图 3B

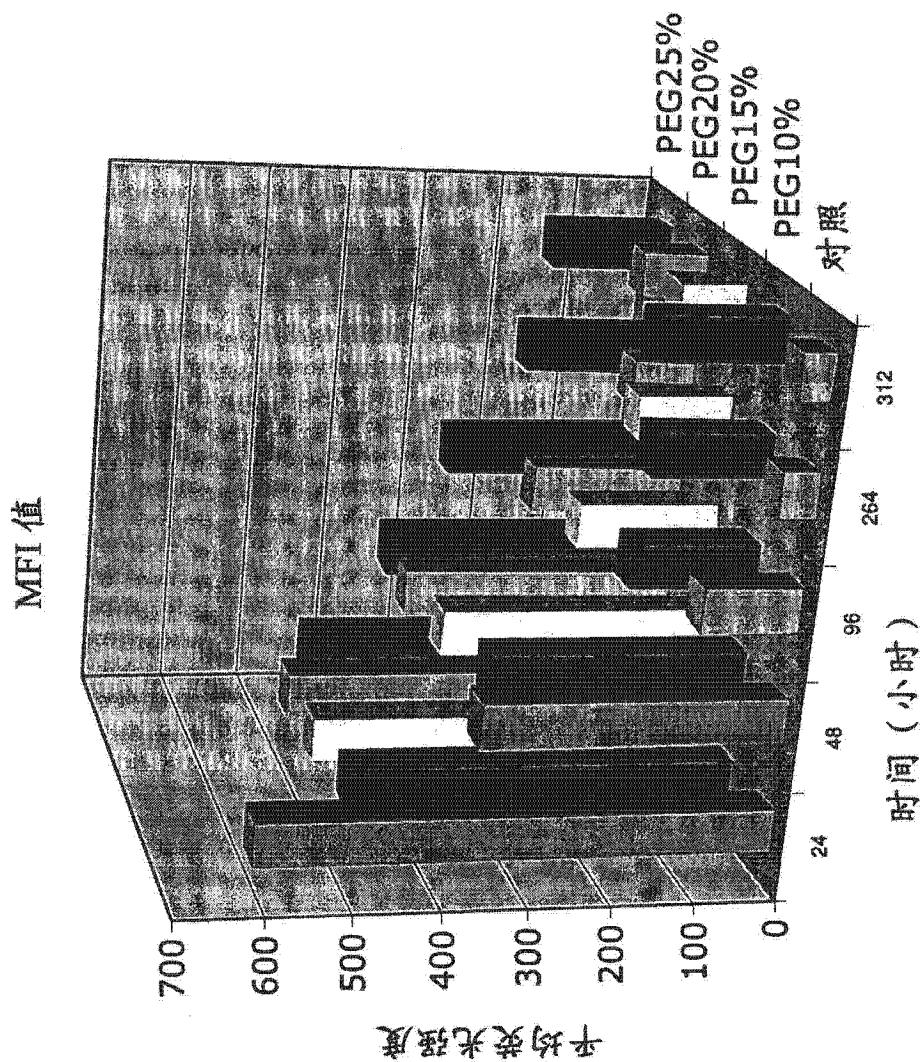


图 4

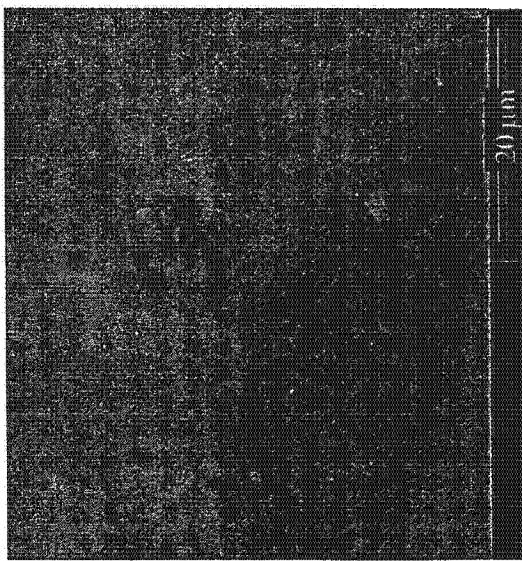


图 5A

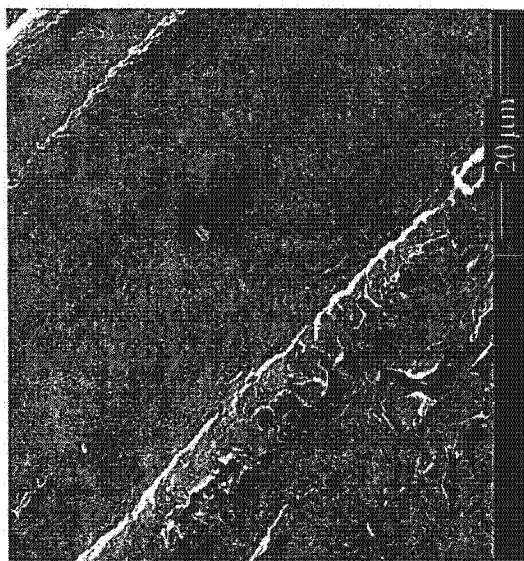


图 5B

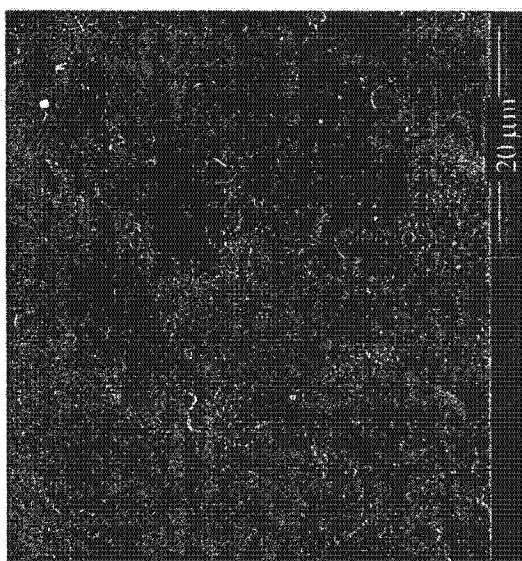


图 5C



图 6A

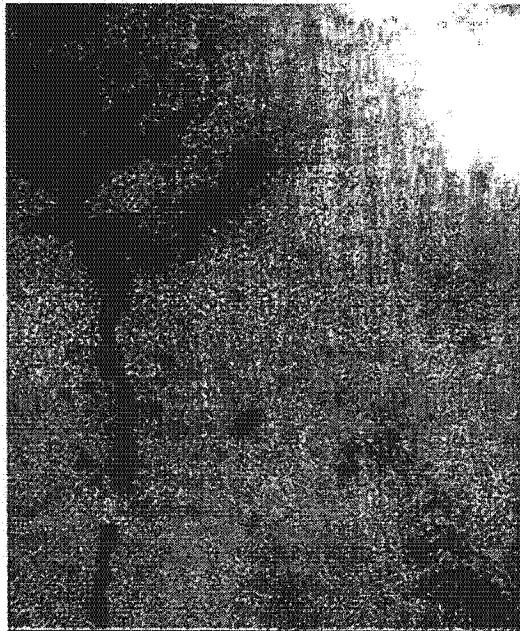


图 6B

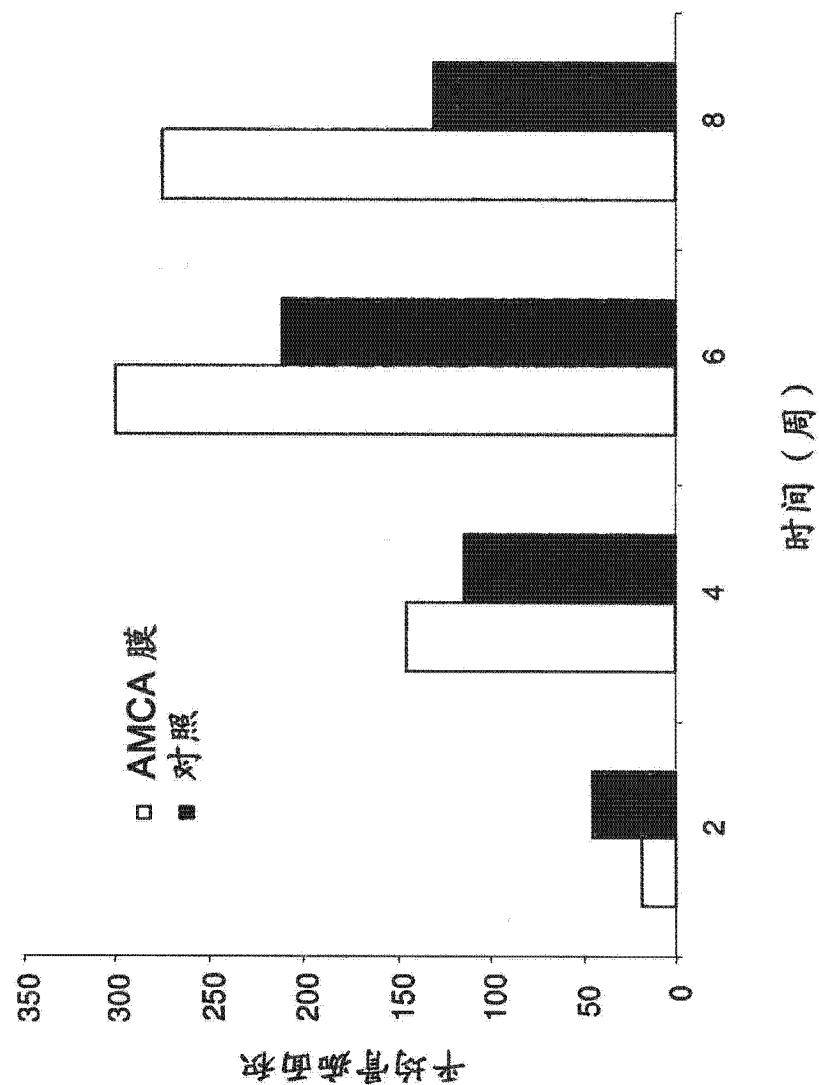


图 7

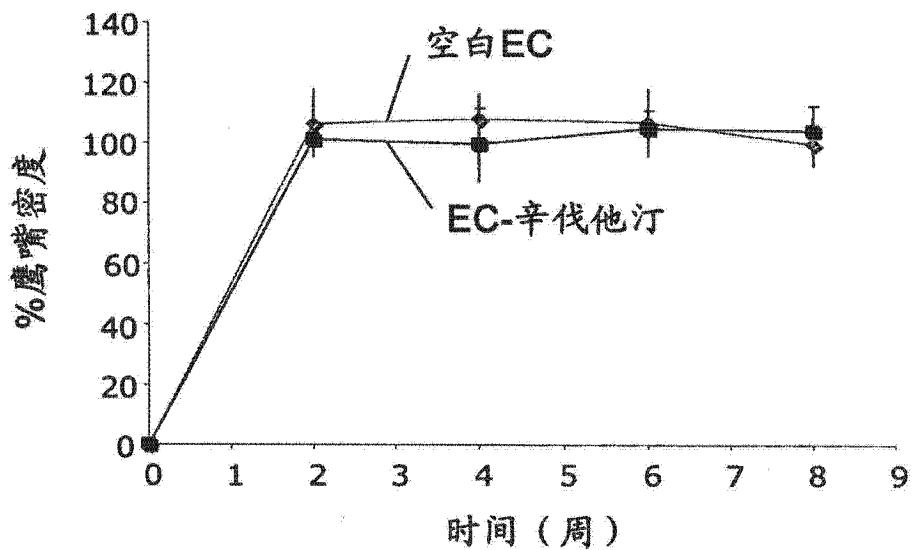


图 8A

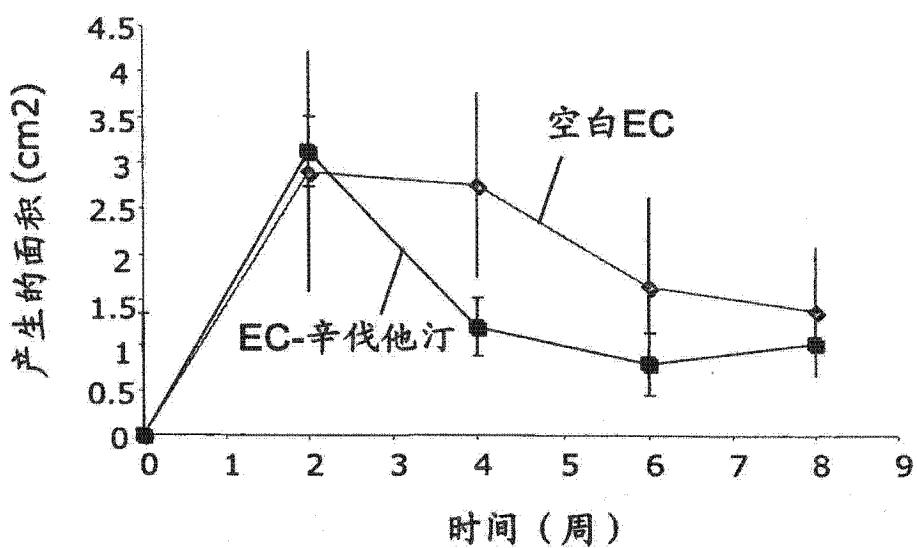


图 8B

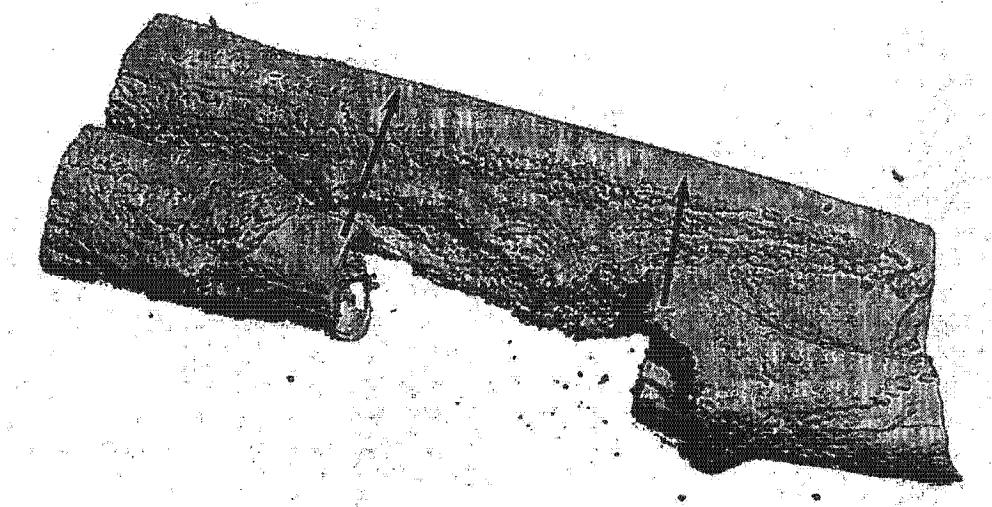


图 9

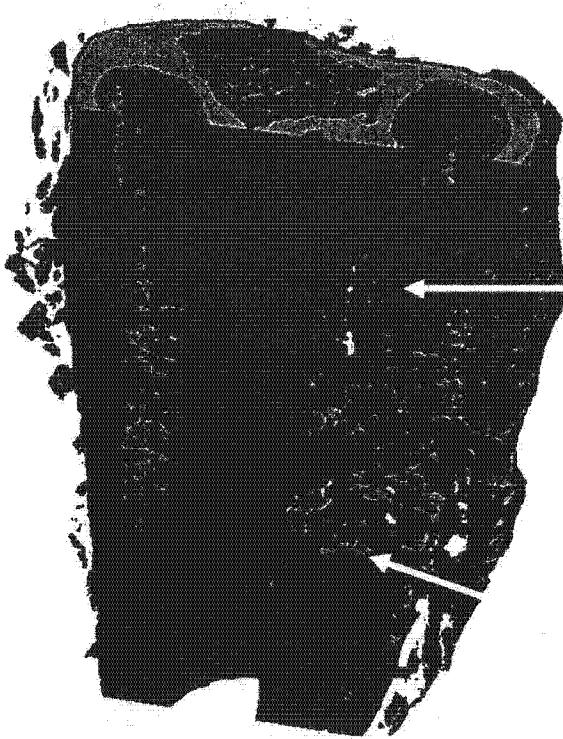


图 10

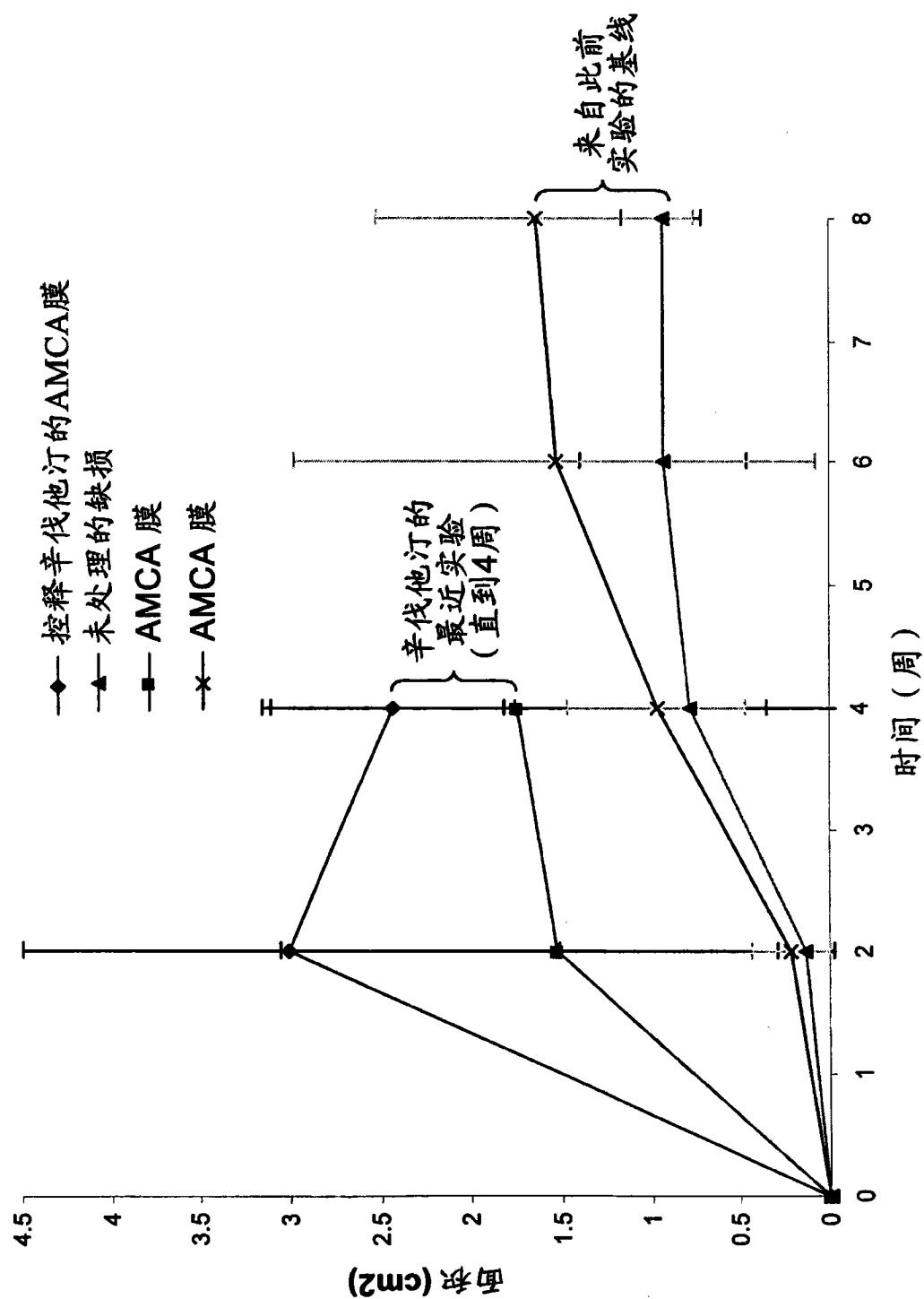


图 11A

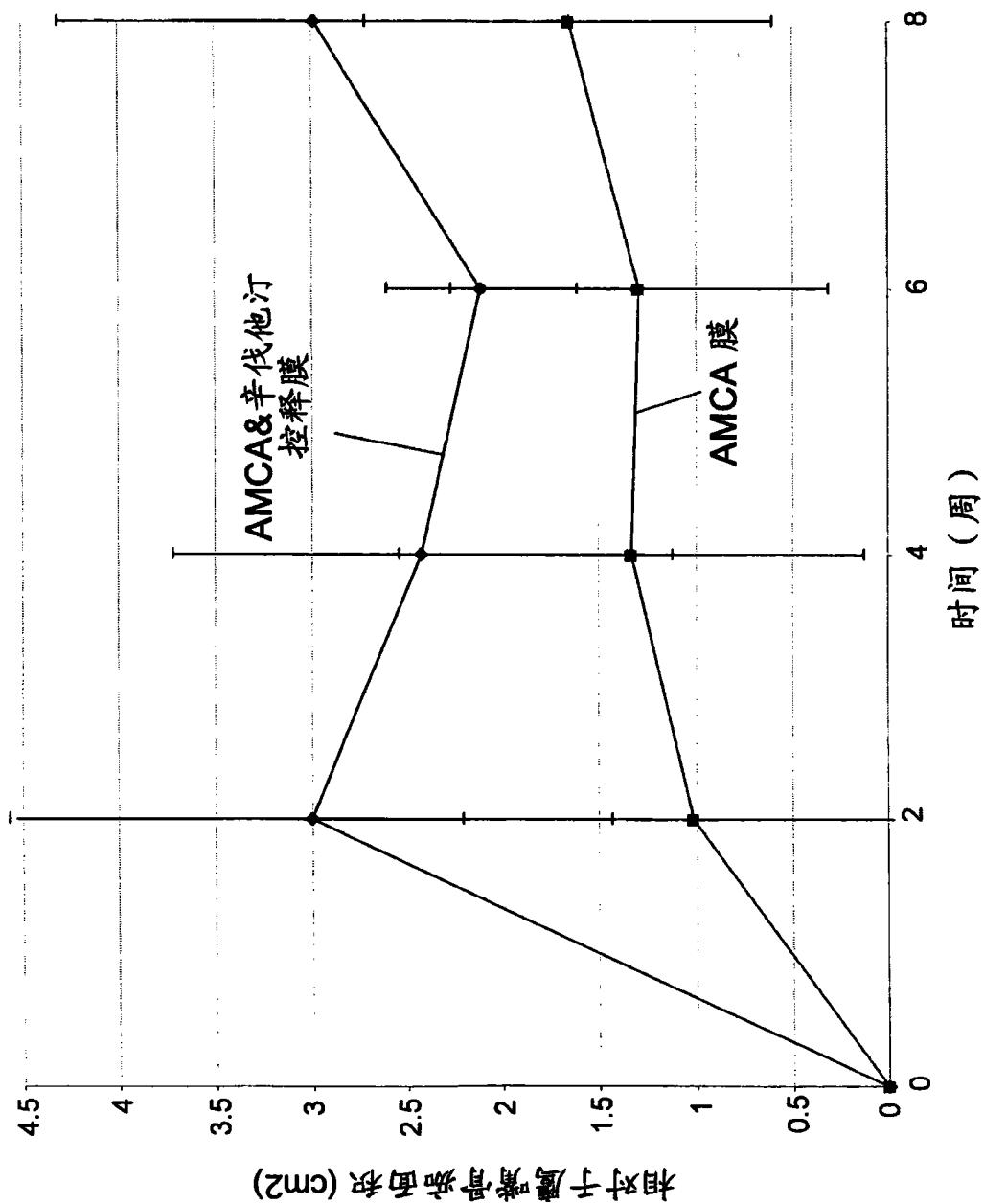


图 11B

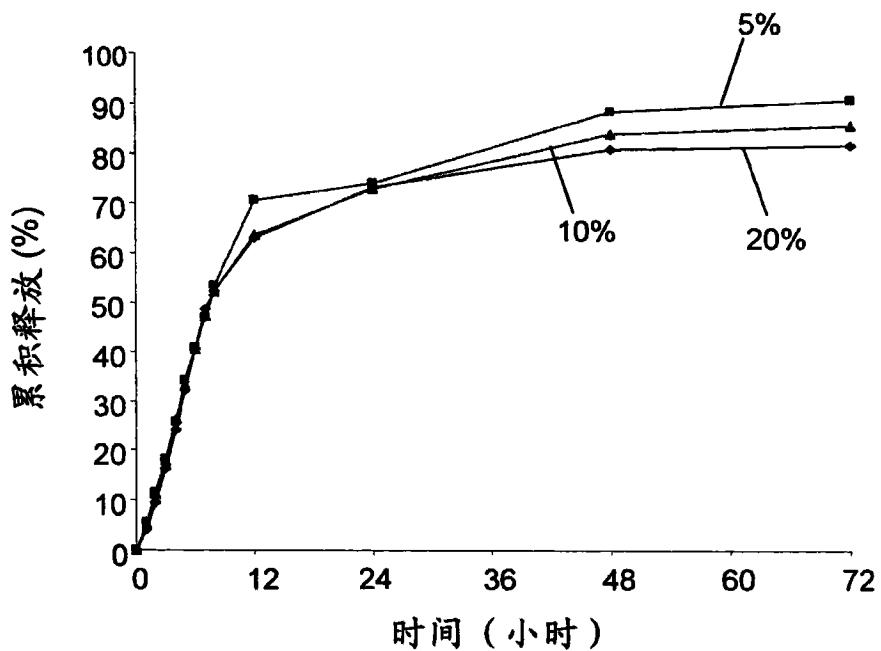


图 12A

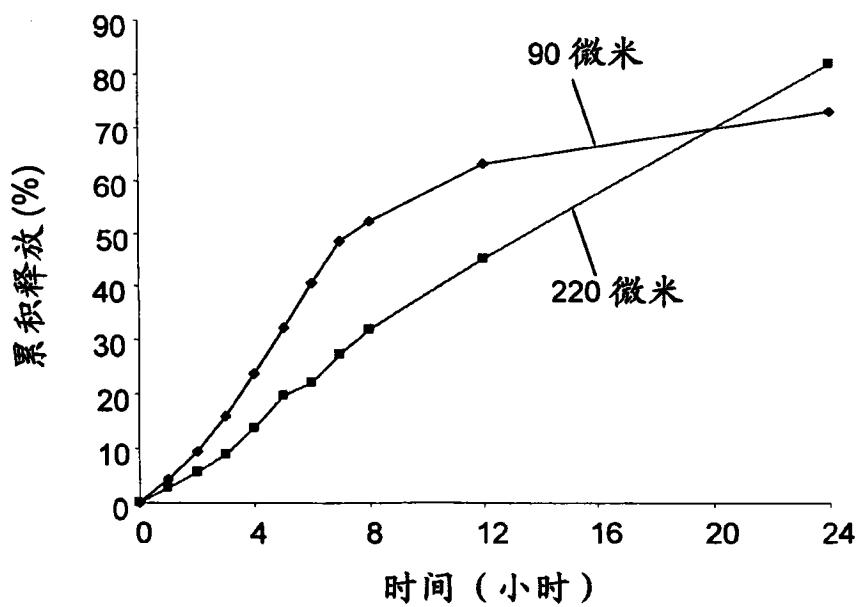


图 12B

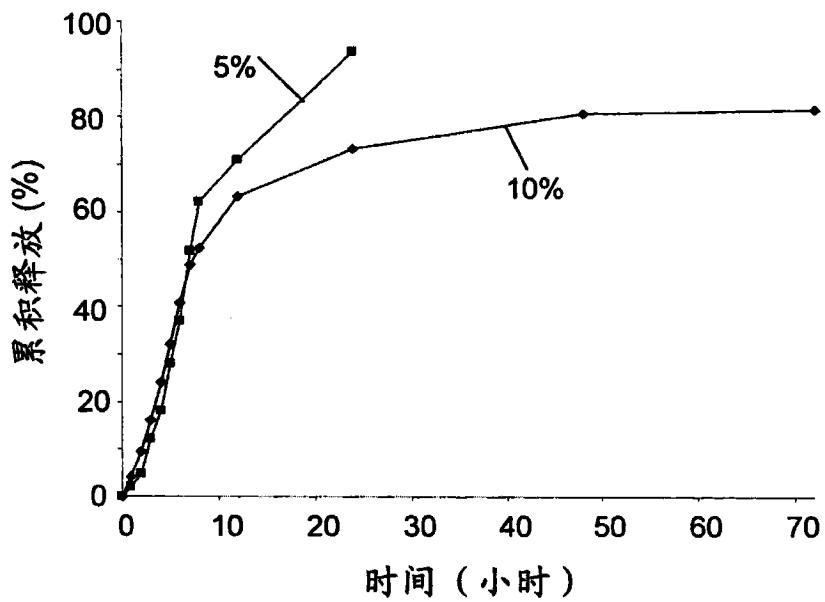


图 12C

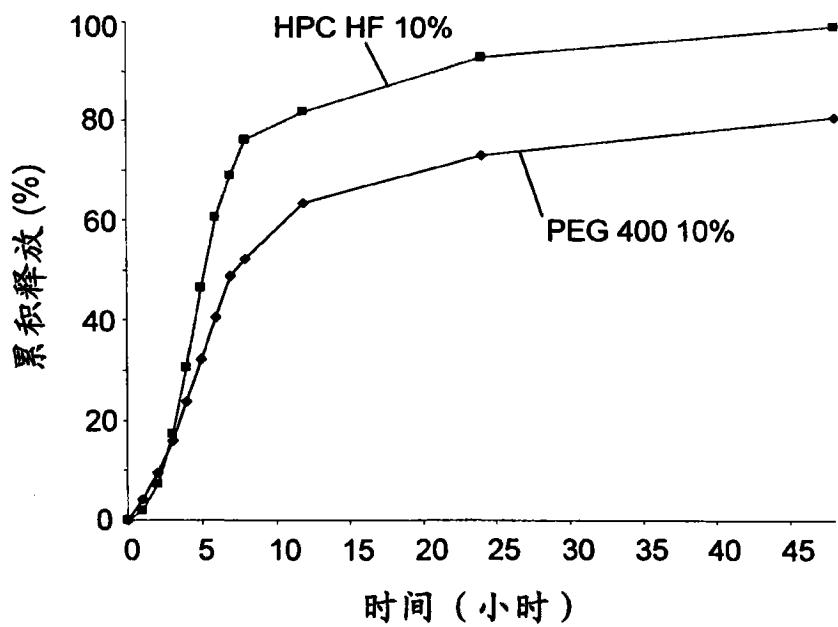


图 12D

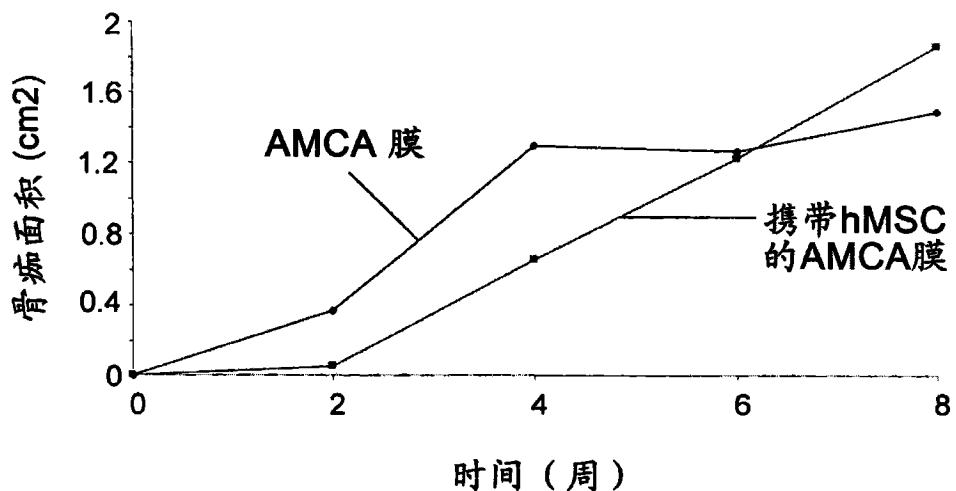


图 13A

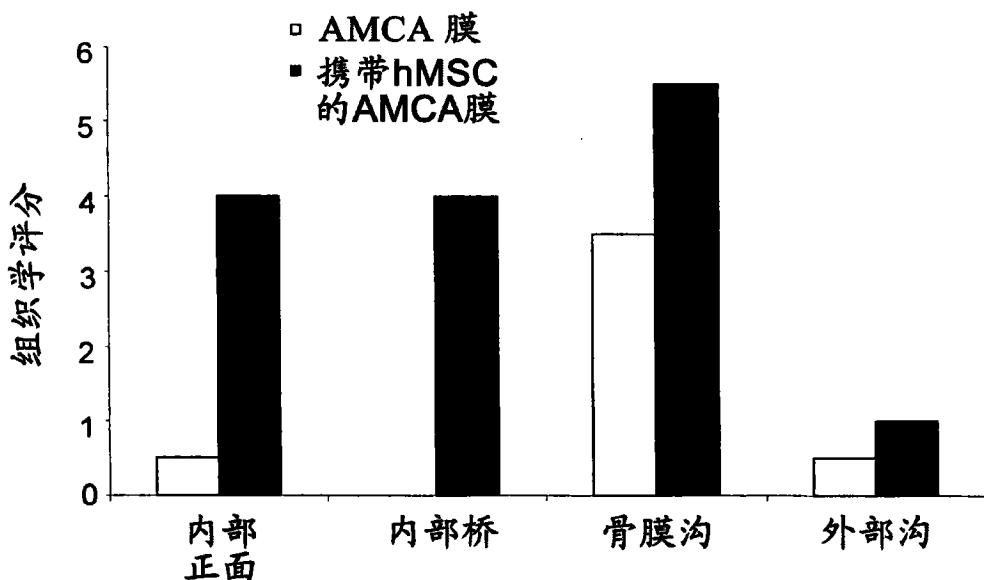


图 13B