

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 39/00
C12N 5/00 C12P 21/04
A01N 37/18



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02823309.3

[43] 公开日 2005 年 3 月 9 日

[11] 公开号 CN 1592635A

[22] 申请日 2002.9.24 [21] 申请号 02823309.3
[30] 优先权
[32] 2001. 9.24 [33] US [31] 60/324,453
[86] 国际申请 PCT/US2002/030343 2002.9.24
[87] 国际公布 WO2003/026689 英 2003.4.3
[85] 进入国家阶段日期 2004.5.24
[71] 申请人 维里根股份公司
地址 德国莱沃库森
[72] 发明人 M·H·曾 S·S·阿斯库莱

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李 波 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 9 页

[54] 发明名称 自体生长因子鸡尾酒组合物,生产方法以及应用

[57] 摘要

一种组合物,该组合物包括适于骨生成、腱生成或者软骨生成治疗的一种或者多种生长因子,其中该生长因子获自于培养的软骨细胞。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种组合物，该组合物含有至少一种被提取的生长因子，该生长因子适用于选自骨生成、腱生成、软骨生成以及它们的组合的治疗，其中该生长因子获自培养的软骨细胞并且大小为约 70kDa 到 10kDa，并且该生长因子的浓度为约 5ng/ml 到 15ng/ml。
2. 权利要求 1 的组合物，其中该生长因子为选自 TGF- β 、BMP、PTHrP、RANKL、IgF1 和 OPG 的一种或者多种生长因子。
3. 权利要求 1 的组合物，其中该生长因子获自软骨细胞的单层培养物。
4. 权利要求 1 的组合物，其中该生长因子以一种治疗有效浓度存在。
5. 权利要求 1 的组合物，该组合物进一步含有一种或者多种材料，该材料选自骨水泥、磷酸钙、硫酸钙、羟基磷灰石以及其它自体生长因子。
6. 一种制造生长因子组合物的方法，该方法包括的步骤有提供软骨细胞的单层培养物；以及从该软骨细胞单层培养物中提取至少一种生长因子。
7. 权利要求 6 的方法，该方法进一步包括对该生长因子进行浓缩的步骤。
8. 权利要求 6 的方法，其中该生长因子为选自 TGF- β 、BMP、PTHrh、RANKL、IgF1 和 OPG 的一种或者多种生长因子。
9. 权利要求 6 的方法，其中对软骨细胞进行培养的步骤包括对自体软骨细胞进行单层培养。
10. 权利要求 7 的方法，其中该生长因子被浓缩至治疗有效浓度。
11. 权利要求 6 的方法，该方法进一步包括将该浓缩的生长因子同一种或者多种材料进行组合的步骤，该材料选自骨水泥、磷酸钙、硫酸钙、羟基磷灰石以及其它自体生长因子。
12. 一种治疗骨、肌腱或者软骨缺陷的方法，该方法包括将骨、肌腱或者软骨缺陷同至少一种生长因子进行接触的步骤，其中该生长因子获自培养的软骨细胞。
13. 权利要求 12 的方法，其中该生长因子为选自 TGF- β 、BMP、PTHrh、RANKL、IgF1 和 OPG 的一种或者多种生长因子。
14. 权利要求 12 的方法，其中该生长因子同一种或者多种材料进行

组合，该材料选自骨水泥、磷酸钙、硫酸钙、羟基磷灰石以及其它自体生长因子。

自体生长因子鸡尾酒组合物，生产方法以及应用

背景

同大多数细胞一样，软骨细胞具有一个生命周期，该周期涉及到成熟与分化的阶段。软骨细胞可以以间质干细胞开始生命，该细胞在增殖期间成为前成软骨细胞（pre-chondroblast）。这些前成软骨细胞在分化/基质生成期间成为成软骨细胞。成软骨细胞可随后进行增生或者成熟化，从而形成软骨细胞。

发明概述

本发明涉及一种组合物，该组合物包括至少一种适用于骨生成、腱生成（tenogenesis）和/或软骨生成治疗的生长因子，但不限于这些，其中该生长因子获自培养的软骨细胞。

本发明还涉及一种制造生长因子组合物的方法，该方法包括对来自受试者的软骨细胞进行培养并且从软骨细胞培养物中对至少一种生长因子进行浓缩的步骤。

另外，本发明涉及一种治疗骨、肌腱或者软骨或其缺陷的方法，该方法包括将该组织或者缺陷同至少一种生长因子相接触的步骤，其中该生长因子获自于培养的软骨细胞。

图1所示为用自体软骨植物对软骨修复的分子控制。

图2所示为软骨细胞中的生长因子和转录因子的基因表达。

图3所示为软骨细胞中的生长因子、基质蛋白和转录因子的基因表达。

图4所示为软骨细胞中的生长因子、基质蛋白和转录因子的基因表达。

图5所示为软骨细胞中的RANKL及其受体的基因表达。

图6所示为软骨细胞中的甾体类激素受体的基因表达。

图7所示为未经浓缩的对照样品与经浓缩的样品之间的生长因子的Western印迹比较。

图8所示为未经浓缩的对照样品与经浓缩的样品之间的生长因子

的浓度比较。

图 9 所示为对人类软骨细胞培养物施用本发明的生长因子后的软骨细胞培养物。

详细描述

本文所使用的术语“约”指的是某一具体数值的值 $\pm 10\%$ 范围。例如，“约 20”包括 20 的 $\pm 10\%$ 或者说从 18 到 20（含 18 和 20）。

本文所使用的术语“基本”或者“基本上”指的是对一个较高程度或者量度的近似。

软骨细胞已经通过使用多种技术进行了培养。用于软骨细胞的单层培养、用于软骨细胞的胶原凝胶培养物、用于软骨细胞的藻酸盐凝胶培养以及用于软骨细胞的琼脂糖凝胶培养均有所描述。这些细胞被发现在琼脂糖凝胶中进行培养期间可产生细胞外蛋白。

在本发明的一个实施方案中，该培养物可具有约每 75cm^2 1 百万个细胞的平铺密度。这些软骨细胞可在含有抗坏血酸的 10%到 20%的自体溶液中进行生长。在一个实施方案中，用于本发明的应用的软骨细胞的适当生长条件在 WO 00/09179 和 5,989,269 中有所阐明，此二者均被全文引为参考。见实施例 6 到 10，这些实施例展示了用于本发明的典型的细胞培养方法。

如果软骨细胞产生了细胞外蛋白或者生长因子，通过软骨细胞在这些培养系统中的形态学外观来测定该细胞产生了何种类型的细胞外蛋白或者生长因子是困难的。因此，需要开发一些技术和方法以促进软骨细胞对细胞外基质蛋白和生长因子的生产。进一步，对细胞群所产生的生长因子的特征进行鉴定是必需的，该细胞群同软骨生成、腱生成以及骨生成的诱导相关联。

众多的生物化合物控制着软骨细胞的发育。这些化合物可从软骨细胞中，特别是从软骨细胞的单层培养物中进行提取和/或浓缩以形成一种生长因子组合物，一种所谓的生长因子“鸡尾酒”，该组合物可在治疗上用于治疗软骨、肌腱和/或骨组织和缺陷。例如，在一个实施方案中，本发明包括了经提取和/或浓缩的生长因子在整形外科手术中的应用，该生长因子获自本发明的一种组合物。

进一步，本发明的生长因子组合物可在重构方法和设备中具有治

疗价值，该方法和设备包括用于脊椎、髋、膝、肩、腕、踝和趾以及骨折固定和不愈合骨折的治疗的方法和设备，该组合物还可在其它的产品中具有医学价值，例如，结合剂，包括骨水泥、磷酸钙、硫酸钙、羟基磷灰石以及它们的组合，但不限于这些，该产品的例子还有其它5 的自体生长因子。本发明的组合物以及应用的方法在此后进行描述。

1. 生长因子

据发现，软骨细胞，特别是单层培养的软骨细胞具有产生多种生长因子的能力，所述生长因子包括，转化生长因子（TGF- β 3）、骨形态发生蛋白（BMP-2）、PTHrP、osteoprotegrin（OPG）、Indian Hedgehog、10 RANKL 以及类胰岛素生长因子（IgF1），但不限于这些。

在一个实施方案中，本发明的生长因子组合物，以及其它物质，根据下文描述可从软骨细胞的单层培养物中进行提取以形成本发明的组合物，该组合物可被用于治疗目的。另外，在另一个实施方案中，本发明的生长因子组合物可从一些含有适当的生长因子的组合物中进行15 提取以形成一些组合物，所述组合物含有一种或者多种基本上富集和/或浓缩的生长因子，这些生长因子根据下文的详尽描述可被用于治疗目的。

A) 生长因子的衍生

在一个实施方案中，本发明的生长因子组合物来自于一些细胞，这些细胞包括自体的软骨细胞，但不限于此。以此方式，来自于自体软骨细胞的生长因子的分布（profile）可基本上符合受试者的生长因子的天然分布。20

在另一个实施方案中，可以使用在 PCT 申请 No. PCT/IB02/02752 中所描述的技术对受试者的生长因子组合物进行初始鉴定，该申请的全文在此引为参考，特别是使用在该 PCT 申请的实施例 1、2 和 3 中所描述的技术，这些实施例在本文中以实施例 2、3 和 4 进行重申。其它的适当技术包括，western 印迹分析以及对受试者生长因子分布进行的免疫荧光表征，但不限于这些。25

一旦对受试者的生长因子分布进行了适当地鉴定，可将该分布同其它的测试分布进行比较以发现一种适当的生长因子组合物，该组合物所具有的分布基本上符合的待治疗细胞或者组织的生长因子分布。30 在一个实施方案中，该测试分布可从通过对一些生长因子进行鉴定而

产生, 这些生长因子来自 a) 非自体细胞, b) 在不同时间从受试者收取的自体细胞和 / 或 c) 具有不同于该受试者的软骨细胞的形态的自体细胞。或者, 该分布可以使用重组 DNA 技术产生, 即, 使用微生物以生产生长因子蛋白并且随后将这些蛋白进行混合以产生一种蛋白混合物, 该混合物所具有的分布基本上一致于该受试者的待治疗细胞或者组织的生长因子分布。

在另一个实施方案中, 一种生长因子组合物可通过添加或者除去一种或者多种生长因子蛋白以产生一种组合物而进行修饰, 该组合物所具有的常规分布或者分布可基本上符合受试者的分布或者另一种所需的分布。

B) 生长因子的功能

上述的生长因子在软骨、肌腱和骨再生中十分重要。首先, 在培养的软骨细胞的细胞增殖期间存在有 TGF- β 3、BMP-2、PTHrP、Indian Hedgehog、OPG、RANKL 以及 IGF1。据信这些因子以及其它因子可以控制软骨细胞、腱细胞和成骨细胞的增殖和分化, 从而影响软骨生成、腱生成和骨生成程序。因此, 通过以本文所描述的生长因子对受损伤的受试者进行适当地给药, 可以提高任何需要软骨细胞、腱细胞和成骨细胞参与的愈合, 由此而增强了从损伤或疾病的恢复。

在基质产生期间, II 型胶原和 / 或聚集蛋白聚糖以及其它基质物质可以控制基质产生的程度。据信这样的控制可以通过细胞反馈进行维持。具体来说, 一些生长因子和细胞因子调控着一些转录因子, 这些转录因子随后调控着细胞外基质蛋白的产生, 例如 II、IX 和 XI 胶原、聚集蛋白聚糖、CEP-68 和 GP39, 这些蛋白随即可调控生长因子和细胞因子的存在, 即, 通过降低这些生长因子和细胞因子的细胞外浓度。

图 1 所示为软骨细胞系的特征以及在自体软骨细胞移植之后的软骨修复的分子控制。在体外的增殖期间, 软骨细胞产生了一些生长因子和细胞因子, 包括, TGF- β 3、BMP-2、PTHrP、Indian Hedgehog、OPG、RANKL, 但不限于这些。在移植进入受试者之后, 软骨细胞在基质产生之前产生。同样还产生了 SOX-9、II 型胶原、聚集蛋白聚糖以及其它的细胞外基质蛋白。在基质产生之后, 包括维生素 D3 在内的多种因子可能调控着软骨细胞基质的成熟或者修饰。

图 2 所示为单层培养的软骨细胞中的生长因子和转录因子的表达。如图 2 所示, 生长因子 TGF- β 3 和 BMP-2 在软骨细胞中进行了表达。同样, 转录因子 SOX-9 也被表达。

图 3 显示, 当 SOX-9 被表达时基质蛋白 CEP-68 同样也被表达, 这
5 表明被检测的软骨细胞能够产生基质和生长因子。

图 4 显示, 当生长因子 TGF- β 3 被表达时基质蛋白聚集蛋白聚糖和 II 型胶原也被软骨细胞所表达。

使用逆转录酶 PCR 通过基因扩增的 30 个循环, 图 5 显示检测不到 RANKL 的表达。但是, 通过 34 个循环可以发现 RANKL 的 mRNA, 由此
10 显示可以发生 RANKL 的表达。进一步, 图 5 显示 RANKL 的细胞受体, 即 GADPH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶), 以及 OPG 在软骨细胞中也有所表达。这些数据提示, RANKL 对于软骨细胞生长可能是重要的。

图 6 显示, 甾体类激素受体 GADPH、GR α 、GR β 以及 VDR 在软骨细胞中有所表达。这些数据提示软骨细胞对于一种或者多种甾体类激素
15 的反应可能提供了一种途径, 该途径调控软骨细胞对于生长因子的生产。可能的适当的甾体类激素包括维生素 D3 和糖皮质激素, 但不限于这些。

因此, 在一个实施方案中, 单层培养物中的软骨细胞可产生多种生长因子, 包括, 转化生长因子、骨形态发生蛋白、PTHrP、
20 osteoprotegrin、RANKL 以及 Indian Hedgehog, 但不限于这些。这些生长因子形成了生长因子“鸡尾酒”, 该鸡尾酒可通过本发明的方法进行提取并且随后被递送进入受试者体内。根据本文的描述, 这些生长因子可获自受试者自身的自体软骨细胞并且被用于组织缺陷的治疗, 这些组织包括, 骨、肌腱和软骨缺陷, 但不限于这些。

例如, 通过将自体软骨细胞移植技术用于治疗软骨缺陷, 软骨细胞在体外进行增殖并且产生生长因子。在移植入受试者体内之后, 这些软骨细胞可以在基质产生阶段开始生产细胞外基质蛋白。通过软骨细胞进行的软骨发生过程的特征在于转录因子 SOX-9 的存在。
25

因此, 通过上文描述的信息, 发现在生长因子的表达和 / 或存在
30 与转录因子的表达之间存在着因果关系, 导致基质蛋白基质蛋白的表达和产生的这些转录因子的表达适于骨、肌腱和软骨组织和缺陷的再生和 / 或治愈。

2. 生长因子从软骨细胞中的分离

在本发明中，可以从被培养的软骨细胞的培养基之中对本文所描述的一种或者多种生长因子以及其它生长因子进行了提取和/或纯化，从而形成了本发明的组合物，这些组合物可被用于治疗目的。另外，在另一个实施方案中，可从被培养的软骨细胞的培养基之中对上

文所描述的生长因子进行浓缩，从而形成了本发明的组合物，这些组合物可被用于治疗目的。

在一个实施方案中，本发明的生长因子的提取纯化和/或浓缩可通过透析过滤而完成，该方法可被用于从血清和其它的生物流体之中除去小分子量的分子。在本发明中，透析过滤，或者更常用的名称“超滤”，使用净水压代替浓度梯度从软骨细胞培养物的上清液中对上述的生长因子进行提取、浓缩和/或纯化，在优选的情况下该软骨细胞培养物为人类软骨细胞培养物。在一个实施方案中，通过将细胞培养物加载至离心过滤设备，从而导致该细胞培养物物质分相而获得含有生长因子的上清液，在典型的情况下分相成为一个液相和一个固相，该设备的例子如 Millipore/Amicon 所制造的 Centriplus® 离心过滤设备。

在除去细胞碎片之后（典型情况下为固相），可对该培养物上清液通过一个或者多个低吸附的疏水 YMT 膜（Millipore/Amicon）或者分子筛进行再度离心，该分子筛所具有的孔大小在优选的情况下为大约 5 到 70kDa，更为优选的情况下为大约 10 到 30kDa。该上清液可首先通过一个较大的滤器，典型的情况下约 70 到 30kDa。因此，从该较大的滤器的流出液可通过一个较小的滤器，典型的情况下约 5 到 10kDa。本发明的生长因子在典型的情况下透过该较大的滤器（70 到 30kDa）并且在典型的情况下为该较小的滤器（5 到 10kDa）所截留，因此本发明的组合物可包括的分子具有的大小为约 70 到 30kDa 和约 5 到 10kDa，在优选的情况下为约 30kDa 到 10kDa。

应该注意的是，本发明的一些生长因子可以互相之间进行结合并且由此而形成较大的分子。因此，可从较大滤器的流出物和随后的较小滤器的存留物中获得的本发明的组合物可能包括一些分子，这些分子具有的大小大于该较大滤器的孔径。特别地，在通过上述的滤器对含有本发明的一种或者多种生长因子对上清液进行过滤之后，本发明

的组合物可能包括一些分子，这些分子所具有的大小为约 50kDa 到 5kDa，在一些实施方案中为约 70kDa 到 5kDa。

为较小孔径的滤器所存留的溶质可被收集以进一步被用作为浓缩的蛋白，这些蛋白包括本发明的生长因子。如图 7 中的 Western 印迹结果所显示，通过该方法，生长因子的浓度，例如 12kDa 的 TGF- β 3 的浓度，同对照（未浓缩的上清液）相比有所提高。在图 7 之中，用于对上清液进行过滤的两种滤器所具有的孔大小为 10kDa (YK10) 和 30kDa (YK30)。

在典型的情况下，用于提取和 / 或浓缩的离心可进行约 2 到 8 小时，在优选的情况下约 4 小时，温度低于约 15℃，在优选的情况下约为 4℃，离心速度高于约 2,000×g，优选的情况下约 3,000×g。

在一个备选的实施方案中，一种商业化的生物反应器可被用于收集培养基，对该生长因子进行提取和 / 或浓缩以形成本发明的组合物。这样的生物反应器已经在题为 “Bioreactor with Expandable Surface Area for Culturing Cell” 的临时专利申请中有所描述，该申请的序列号为 60/406224，于 2002 年 8 月 27 日提交，其内容在此引为参考。在一个实施方案中，该生物反应器包括一个容器，容器中的一个载体，一个流入口、一个流出口以及一种搅拌机制。该载体可包括一种可扩展的表面积，细胞可在其上进行培养。

在该生物反应器的一个实施方案中，该载体的表面积具有可逆的可扩展性，即，该表面积被扩展并且随后回减至原先的表面积。

在该生物反应器的一个方面中，该可逆的可扩展载体为一种组织培养板，该培养板具有多重可拆的边界，这些边界任选为同心边界，从而在该表面积由于细胞的增殖而变得不理想时通过拆除这些边界使该组织培养板的表面积而有所增加。这些边界的形状可以是任何规则或者不规则的形状，例如，正方形、矩形、三角形、环形、线形或者非线形。

一旦通过上述或者另外的适当方法进行了提取和 / 或浓缩，该组合物可包括有，一种或者多种以下的生长因子，TGF- β 3、BMP-2、PTHrP、OPG、Indian Hedgehog、IgF1 以及 RANKL，但不限于这些。这些生长因子可被浓缩至任何一种治疗有效的浓度。本文所使用的 “治疗有效” 指的是一种量，该量有效地使所需组织生长、修复组织中的缺陷以及

/或者降低、消除、治疗、防止或者控制本文所描述的同特定组织或者缺陷相关联的症状和状况。

5 在一个实施方案中,在该浓缩上清液中的一种或者多种生长因子,例如 TGF- β 3,可以高于约 5ng/ml,更为优选的情况下高于约 15ng/ml 的量存在。在一些实施方案中,这些生长因子为约 1ng/ml 到 15ng/ml,更为优选的情况下为约 5ng/ml 到 15ng/ml。出于进行比较的目的,浓缩之前这些生长因子在该上清液中的浓度可为约 1ng/ml 或更低,如图 8 所示。

3. 治疗应用

10 在一个实施方案中,本发明的生长因子组合物的应用包括将本发明一种生长因子组合物同受损伤的身体器官、组织或者结构相接触,并且特别地包括将本发明的一种组合物同包括骨、肌腱或者软骨在内的组织相接触,但不限于这些组织。

15 在另一个实施方案中,生长因子疗法涉及到将本发明的一种组合物同组织缺陷相接触,该组织包括,骨、肌腱或者软骨,但不限于这些。该缺陷可由损伤或者其它创伤以及由衰老所引发的退化所导致。通过本发明的应用,该缺陷的治愈速度可通过在缺陷部位诱导软骨生成、腱生成和/或骨生成速度的提高而有所增强。进一步,该“鸡尾酒”浓缩生长因子对于人类软骨细胞培养物的应用在体外显示出软骨细胞增殖的提高,如图 9 所示。特别地,对于 YK10 和 YK30 滤器存留物,1:50 的存留物稀释液被发现在约 48 小时后特别有效。

20 可通过重构设备、骨代用品、骨折固定物以及在多种整形外科条件下对骨、肌腱和软骨再生的诱导而使用本发明的生长因子组合物的。进一步,本发明的生长因子组合物可在一些重构设备以及方法中具有治疗价值,这些设备以及方法用于脊椎、髌、膝、肩、腕、踝和趾以及骨折固定和不愈合骨折的治疗的以及其它的骨、腱和软骨缺陷的治疗。

30 对于一种或者多种骨软骨缺陷的治疗,本发明的自体生长因子“鸡尾酒”可以同一种支架载体进行部分或者完全地混合,这些载体包括“骨支持物”材料,磷酸钙支架、羟基磷灰石、硫酸钙或者胶原复合物。与传统的传统治疗相比较,该生长因子“鸡尾酒”可以在软骨下区室诱导骨形成,这些其它的传统治疗的例子如德国 Leverkusen 的

Verigen Transplantation Services International 所产的 Matrix Induced Autologous Chondrocyte Transplantation (MACI™), 该治疗可在软骨下骨上修复软骨缺陷。

对于骨缺陷的治疗, 该生长因子“鸡尾酒”可根据上文描述被加载入一种支架并且通过一些技术被植入该缺陷位置, 这些技术包括当缺陷位于脊椎之上或其附近时使用的气囊技术, 但不限于此。

另外, 本发明可同胶原支架相结合用于软骨、骨或者肌腱修复, 这包括关节软骨或者回旋肌腱套修复, 但不限于这些。

在一个实施方案中, 本发明的生长因子组合物可通过生物材料支架进行应用, 该生物材料支架的例子如 Chondo-Gide (Geislich, Switzerland)、Small Intestine Submucosa (SIS) Membrane (Depuy Orthopaedics), 如美国专利申请 No.10/121,449 (2002 年 4 月 12 日提交) 中的描述, 该文全文在此被引为参考。

包括本发明的组合物在内的其它的产品同样在本发明的范围内, 如水泥, 包括骨水泥, 但不限于此。这样的组合物可具有对于增强骨生成、腱生成和软骨生成的特定用途。

4. 剂量

治疗所必需的本发明的生长因子组合物的量应取决于多种不同的因素, 这些因素包括给药手段、目标位点、该受试者的生理状态以及进行给药的其它的生长因子和/或药物。因此, 应调整治疗剂量以优化安全性和有效性。在典型的情况下, 体外使用的剂量可为这些试剂的原位给药用量提供有用的指导。用于特定病症的治疗的有效剂量的动物试验将提供人类剂量的进一步预测指标。多种考虑已经有所描述, 例如, Gilman et al. (eds), Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press(1990); 以及 Remington's Pharmaceutical Sciences, 7th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1985); 此二者均在此全文引为参考。

本发明的生长因子组合物在以每天约 0.001mg 到约 10mg/kg 体重的剂量范围进行给药的情况下是有用的。或者, 在某些情况下, 也可以约 0.0001mg 到约 10mg/kg 进行给药。所使用的具体剂量取决于被治疗的特定组织状况、给药途径和/或根据主治医生基于诸如症状严

重程度，受试者的年龄和一般状况等等此类的因素而作出的判定。

5. 受试者和适应症

本文所使用的受试者 is 任何患有整形外科状况的人，这些状况包括，骨、软骨和 / 或腱损伤，但不限于这些。

- 5 下列实施例的给出是为了阐释本发明。然而，应当了解，本发明并不限于这些实施例所描述的具体的条件或者细节。在整个说明书中，对公开的文件的所有和全部参考被特别引为参考，这些公开的文件包括美国专利，但不限于此。

10 实施例 1 - 骨代用品同本发明生长因子组合物的组合

有效量的本发明的浓缩生长因子可同下文所描述的一种材料在以该材料和生长因子对受试者给药之前进行组合，该组合通过在一种适于该材料的混合器中进行混合而完成。

- 15 第一种骨代用品材料包括 Biomet Merck 制造的 Endobon®，这是一种特别适用于骨移植代用品的羟基磷灰石陶瓷 (HA 陶瓷)，Biomet Merck 的地址为 Fruiteninersstraat 23, Postbus 1138, 3330 CC Zwijndrecht, The Netherlands。该材料来源于生物并且是 osteoconductive。植入时，新骨由于陶瓷的相互连通的孔系统而可直接生长进入该陶瓷。Endobon®可被用于对骨折、骨囊肿、关节固定
- 20 术以及骨肿瘤所造成的骨缺陷进行包封。

- 第二种骨代用品材料包括同样由 Biomet Merck 制造的 Biohon®，这是一种可被再吸收的合成微晶磷酸钙水泥，它在体温之下由于内源热而硬化。该材料可被用于对骨缺陷进行填充或者重构。在将磷酸钙粉末同盐进行适当的混合之后，所产生的糊状物可应用于受试者，并
- 25 且 Biohon®可硬化成该骨缺陷的形状。在成型之后，其化学组成和晶体结构可同天然骨的磷酸钙组分表现的基本相同。

实施例 2 - 使用 RT-PCR 对软骨细胞进行的鉴定

- 对软骨分化的多种标记物进行了 RT-PCR，并且使用这些标记物的
- 30 核苷酸序列开发了一些 PCR 引物，这些标记物包括胶原 I (GenBank 编号 XM012651)、胶原 II (GenBank 编号 L 10347)、聚集蛋白聚糖 (GenBank 编号 XM083921)、SOX-9 (GenBank 编号 XM039094)、BMP-2

(GenBank 编号 NM001200)、TGF- β -3 (GenBank 编号 NM003239)、Cbfa-1、PTHrP (GenBank 编号 M57293, M32740)、碱性磷酸酶 (GenBank 编号 XM001826) 以及 Indian Hedgehog。这些引物和 PCR 条件分别见表 1 和表 2。

- 5 根据制造商 (Ambion Inc., Austin, TX) 的指导使用 RNazol 溶液从软骨细胞培养物中分离出总 RNA。为进行 RT-PCR, 使用逆转录酶 (Promega, Sydney Australia) 以一种寡聚-dT 引物从 2 μ g 总 RNA 中制备出单链 cDNA。将各个 cDNA 各取两 μ L 用于 30 个循环的 PCR, 该 PCR 使用 1.0 单位的 Taq 聚合酶 (Promega, Sydney Australia), 含有 0.4mMol/L 的引物、125Mol/L 的 dNTP 的 1 $\times$ PCR 缓冲液以及水, 总体积为 25 μ l (见表 2)。该扩增在一台 DNA 热循环仪中进行 (Model 2400; Perkin-Elmer)。

- 特异性的引物序列选自于目的基因的分离外显子, 从而避免了基因组 DNA 信号的污染。使用位于 <http://genzi.virus.kyoto-u.ac.jp/cgi-bin/primer3.cgi> 的软件程序对引物进行设计并且使用位于 <http://www.gensetoligos.com/australia> 的 Genset Oligos (Australia) 进行合成 (见表 1)。作为内部对照, 该单链 cDNA 使用一种管家基因, 甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的特异性引物进行 PCR 扩增。在 1.5% 的琼脂糖凝胶上对这些 PCR 产物进行电泳, 用溴化乙锭进行染色。

表 1

引物	序列	退火温度	片段长度
COL1F COL1R	GGTGCTAAAGGCGAACCTGG (SEQ ID NO:1) ACCAGCAGGACCAGTCTCAC (SEQ ID NO:2)	60°C	750bp
COL2F COL2R	GTCATTTCTTGTGCTCTCC (SEQ ID NO:3) ATGGGCAGCAGTGTCTCTCC (SEQ ID NO:4)	58°C	384bp
AGGF AGGR	GCATTCTGGATTTCTGGACC (SEQ ID NO:5) AGGTTAGCTTCGTGGAATGC (SEQ ID NO:6)	58°C	492bp
Sox9F Sox9R	GAGCGAGGAGGACAAGTTCC (SEQ ID NO:7) GGTGGTCCTTCTTGTGCTGC (SEQ ID NO:8)	58°C	320bp
BMP2F BMP2R	AACGGACATTCGGTCCTTGC (SEQ ID NO:9) GGTGATAAACTCCTCCGTGG (SEQ ID NO:10)	57°C	557bp
TGF3F TGF3R	ACCGAGTCGGAATACTATGC (SEQ ID NO:11) GTCGGAAGTCAATGTAGAGG (SEQ ID NO:12)	58°C	691bp
CBFF CBFR	GACTGTGGTTACTGTCATGG (SEQ ID NO:13) GGTGGCAGTGTCAATCATCTG (SEQ ID NO:14)	52°C	958bp
PTF PTR	CCTCCCATTTGCTAAGGTGC (SEQ ID NO:15) CAATCCTGCTGGTAGGGTTC (SEQ ID NO:16)	58°C	1597bp
APF APR	GAAGCTCAACACCAACGTGG (SEQ ID NO:17) TCTTCCAGGTGTCAACGAGG (SEQ ID NO:18)	55°C	641bp
IHF IHR	TGCATTGCTCCGTCAAGTCC (SEQ ID NO:19) AGTACAGCAGTTCAGGAGG (SEQ ID NO:20)	55°C	657bp

5

表 2

方案, 1×反应混合物

10×PCR 缓冲液	2.5μl
dNTP (5mM)	2.0μl
有义引物 (约 15-25μM)	0.5μl (终浓度为 0.3-0.5μM)
反义引物 (约 15-25μM)	0.5μl
双蒸水	17.0μl
DNA 聚合酶	0.5μl
cDNA	2.0μl
总计	25.0μl

所使用的循环条件:

94℃	3min
94℃	1 min
退火	1 min
72℃	35 个循环
	1 min
72℃	7 min
4℃	保持

实施例 3 - 使用 Western 印迹分析进行的软骨细胞鉴定

包括 II 型胶原、聚集蛋白聚糖和 S-100 蛋白以及其它蛋白在内的多种标记物可被用于对培养的软骨细胞使用 Western 印迹分析进行鉴定。针对这些标记物的抗体可购自, 例如, Sigma (St. Louis, MO)、
5 Dako (澳大利亚) 以及 R&D System (Minneapolis, MN)。

用于软骨细胞的 Western 印迹分析的材料和方法在此进行详细描述。

通过收集约 10^3 - 10^4 的培养的软骨细胞并且将之离心成为沉淀而对
10 细胞进行裂解。倒去上清液并将沉淀重悬浮于 250 μ L 的 NET-gel 裂解缓冲液 (Quagen GmbH, Germany) 之中并且在冰上温育 20 分钟。使用微移液吸头将细胞碎片和裂解缓冲液转至一个 1.5 毫升的 Eppendorf™ 管中并且在 4 摄氏度下以 12000g 离心 2 分钟。将上清液取至新的管中并且对该上清液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。使用 Mini
15 Trans-blot 电泳转移槽 (Bio-Rad, California, USA) 将该凝胶对一个 Hybond TMC 0.45 μ m 的硝酸纤维素膜 (Amersham, Piscataway, NJ) 在 30V 下进行转移过夜。该转移在转移缓冲液中进行, 该缓冲液在 2 升水中含有 7.57 克甘氨酸、369 克 Tris 以及 400 毫升甲醇 (Sambrook et al. 1989, In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
20 Spring Harbor Laboratory Press, New York)。用于 Western 印迹的标准方案可见, 例如, Sambrook et al. (1989, In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) 以及 Ausubel et al. (1997, In: Current Protocol in Molecular Biology, Green & Wiley, New York), 这些均在此引为参考。

变性和复性步骤

对浓度为 6M、3M、1M 和 0.4M 的四种盐酸胍 (G-HCl) 溶液进行了制备。表 3 提供了用于在该步骤中使用的 G-HCl 溶液制备的细节。

当制备该 G-HCl 溶液之时, 所有的成分应当新鲜制备。将奶粉溶于水中, 随后加入至其它成分中从而在该 G-HCl 中产生终浓度为 2% 的奶。将该膜在室温下洗涤四次, 每次 30 分钟, 6M G-HCl、3M G-HCl、1M G-HCl 和 0.4M G-HCl 各一次。随后在 4 摄氏度下以加入了 2% 奶粉的亲和层析 (AC) 缓冲液洗涤该膜过夜。

AC 缓冲液如下制备:

50mL 甘油 (最终为 10% 的甘油)

10 mL 5M 的 NaCl (最终为 100mM NaCl)

10mL 1M Tris, pH 7.6 (最终为 20mM Tris)

1mL 0.5M EDTA (最终为 0.5mM EDTA)

5mL 10% 的 Tween-20 (最终为 0.1% 的 Tween-20)

置于冰上

表 3: 用于变性 / 复性步骤的盐酸胍溶液

	6M	3M	1M	0.1M	2%奶粉
甘油	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL
5M NaCl	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
1M Tris (pH7.5)	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
0.5M EDTA	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
10% Tween-20	0.25 mL	0.25 mL	0.25 mL	0.25 mL	0.25 mL
8M 胍	18.75 mL	9.30 mL	3.13 mL	0.31 mL	----
奶粉	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g
双蒸水	2.45mL	12.82 mL	18.07 mL	20.89 mL	21.20 mL
1M DTT (最后)	25μL	25μL	25μL	25μL	25μL
总体积	25mL	25mL	25mL	25mL	25mL

洗涤和封闭步骤

随后使用 1×TBS-Tween 洗涤该膜两次, 每次 5 分钟, 随后使用 AC

缓冲液洗涤 5 分钟。随后在室温下以封闭溶液对该膜温育一小时，该封闭溶液使用 2%的脱脂乳和 1×TBS-Tween 进行制备，随后使用 1×TBS-Tween 进行两次洗涤，每次 5 分钟。

对目的蛋白的探测

- 5 将探测反应混合物（20 1×TBS-Tween 中含有 2%脱脂乳、50μL 的蛋白探针以及 20L 1M DTT）加至该膜并且在 4 摄氏度下温育 2 小时，随后在 4 摄氏度下使用 1×TBS-Tween 进行两次洗涤，每次 5 分钟。该蛋白探针为抗目的蛋白的抗体。在本情况下，该蛋白探针为 TGF-β-3。随后在 4 摄氏度下使用 10mL 含 2%脱脂乳的 1×TBS-Tween 再度进行 15
10 分钟的洗涤，随后在 4 摄氏度下使用 1×TBS-Tween 进行 20 分钟的第二次洗涤。

一抗的加入

使用一种摇动设备对该膜再洗涤两次，每次 5 分钟。

- 15 制备含有 1×TBS-Tween 和 1%脱脂乳（0.2g）的 20mL 试管，并且分装成为两个 10mL 试管以用于一抗和二抗。将 1μL 抗 V5 抗体加入该一抗管以获得 1/10000 的最终抗体稀释度，并且温和地混匀。将该一抗溶液倒入该膜之上并且在摇动设备上在室温下温育 2 小时。或者，该抗体溶液可在 4 摄氏度下温育过夜。

二抗的加入

- 20 在温育之后使用 1×TBS-Tween 进行三次洗涤，每次 5 分钟。

将 5μL 的二抗（抗小鼠 IgG-Fab）吸入该二抗溶液中以达到 1/2000 的二抗稀释度，并温和地混匀。将该二抗溶液倒至该膜之上并且在室温下在摇动设备上温育 45 分钟。

检测溶液的加入

- 25 在以二抗溶液进行温育之后，使用 1×TBS-Tween 进行两次洗涤，每次在摇动设备上进行 5 分钟。仅仅使用 1×TBS 再进行两次洗涤，每次在摇动设备上进行 5 分钟。

- 30 检测溶液通过将 2mL 的 Lumigen 检测溶液 A 和 50μL 的 Lumigen 检测溶液 B（ECL plus, Sydney, Australia）进行混合而制备并且被加之于该膜之上，确保该膜被该检测溶液均匀地覆盖。摇动去除多余的检测溶液并且将该膜封闭于塑料套之中，确保该套中无任何皱褶。将该膜置于胶片架中的一张胶片之上并且进行约 30 分钟的曝光（曝光

时间可变), 随后进行显影。

通过使用上文所述的方法, 显示了在培养的软骨细胞中对 TGF- β -2 的检测。

5 实施例 4—免疫组织化学和免疫荧光分析

同 Western 印迹分析类似, 用于软骨细胞的多种标记物, 包括 II 型胶原、聚集蛋白聚糖和 S-100 蛋白在内, 可被用于通过免疫组织化学和免疫荧光对培养的软骨细胞进行鉴定。这些方法可被直接用于 MACI[®] (基质诱导的自体软骨细胞植入物) 的软骨细胞。

10 这些材料和方法在此进行描述。

使用 5% 的低聚甲醛溶液对 MACI[®] 膜上的软骨细胞进行固定并且将其用于直接免疫荧光。或者, 这些软骨细胞可在固定之后进行石蜡包被。随后在 0.2M 的 Tris 缓冲地盐水 (TBS) 中对这些细胞进行洗涤, 并且通过在 35% 的过氧化氢 (H_2O_2) 中进行温育以对内源过氧化物酶进行
15 封闭。随后以 20% 的正常马血清对这些细胞进行预温育, 并且使用一抗进行温育。使用 TBS 洗涤这些细胞并且使用二抗 (该二抗可以是偶联地) 进行温育。使用诸如 3'3'-二氨基联苯胺这样的用于检测与链亲合素偶联的过氧化物酶的颜色反应检测系统对软骨细胞标记物进行检测。

20 使用上述方法根据通过免疫荧光的检测而证明了 TGF- β -3 在培养于胶原膜上的软骨细胞中的表达。

实施例 5

为使 Surgicel[®] 根据本发明而被用于防止血管在自体移植的软骨
25 或者软骨细胞内发育, 首先使用某种固定剂, 例如戊二醛对 Surgicel[®] 进行处理。简言之, 使用 0.6% 的戊二醛对 Surgicel[®] 进行 1 分钟的处理, 随后进行多次洗涤以除去戊二醛残余物, 否则该残余物可对组织具有毒性。或者, 根据实施例 2 的描述, 在以戊二醛进行处理之前使用名为 Tisseel[®] 的纤维蛋白粘合剂处理 Surgicel[®]。据发现, 在使
30 用诸如戊二醛这样的固定剂进行固定, 以无菌生理盐水 (0.9%) 进行洗涤并且在冰箱中进行保存的情况下, Surgicel[®] 在 1 到 2 个月内不会溶解。一般情况下, Surgicel[®] 在 7 到 14 天的期间内被再吸收。这

一时间过于短暂，因为在被植入的软骨细胞生长形成固体软骨层之前，需要较长时间以防止从骨结构到被植入的软骨的血管生成或者血管化。换句话说，需要对血管化进行较长时间地充分抑制，例如，一个月时间。因此，该产品在这一时间之前应不被显著地吸收。或者说，最后才需要再吸收。因此，被用作为抑制性屏障的有机材料应当具有这些能力，并且据发现经如此处理的 Surgicel®提供了这种功能。

实施例 6

该 Surgicel®还使用一种有机胶水进行了包被。在本实施例中，所使用的胶水为 Tisseel®，但其它胶水也可使用。这种产品同 Surgicel®一起产生了一种用于本发明的特定目的的可用屏障。可以使用任何其它的止血剂或者血管抑制屏障。Tisseel®如下文所描述进行混合。随后通过将 Tisseel®喷涂于该 Surgicel®材料的两侧直至浸透而对 Surgicel®进行包被。随后使该 Tisseel®（纤维蛋白胶水）在室温下固化。就在固化即将完成之前，该被包被的 Surgicel®被随即置于 0.6%的戊二醛之中一分钟，并且随后使用无菌生理盐水（0.9%）进行洗涤。随后使用 PBS 和 / 或 NaOH 调节 pH 直至 pH 稳定于 7.2 到 7.4。此后将由由此进行处理的 Surgicel®在组织培养基中进行洗涤，如，含有 15mM Hepes 缓冲液的基本必需培养基 / F12。

正如本实施例所提及，我们已经使用了 Tisseel®作为纤维蛋白粘合剂以包被 Surgicel®。进一步，该纤维蛋白粘合剂或者胶水还可以直接用于朝向骨的伤口的底部，Surgicel®在其上被粘合。代替体内测试所使用的体外系统由一种用于细胞研究工作的 NUNCTM Delta 六孔无菌一次性平板（NUNC, InterMed, Rockilde, Denmark）组成。各孔的直径约为 4 cm。

在本发明中该纤维蛋白粘合剂可以为任何粘合剂，该粘合剂同纤维蛋白成分一起可产生一种为人类所能耐受的胶水（Ihara, N, et al., Burns Incl. Therm. Inj., 1984, 10, 396）。本发明预计可使用任何其它可用于代替纤维蛋白粘合剂的胶水成分。在本发明中我们使用了 Tisseel®或者 Tissucol®（Immuno AG, Vienna, Austria）。该 Tisseel®试剂盒由以下成分组成：

Tisseel®, 一种冻干的灭活病毒的封闭剂，该封闭剂含有可凝的

蛋白质：纤维蛋白原、血浆纤连蛋白（CIG）和因子 XIII，以及纤溶酶原。

抑肽酶溶液（牛）

凝血酶 4（牛）

5 凝血酶 500（牛）

氯化钙溶液

该 Tisseel®试剂盒含有一种 DUPLOJECT®应用系统。该纤维蛋白粘合剂或者使用了双组分封闭剂的 Tisseel®试剂盒可按照 Immuna AG 产品插页的方式进行组合。

10

实施例 7

软骨细胞在基本必需培养基中在 37℃ 下的 CO₂ 温育箱中进行生长，该培养基中含有 HAM F12 和 15mM 的 Hepes 缓冲液以及 5-7.5% 的自体血清，并且在位于 Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhargen, Denmark 的 100 级实验室中进行操作。其它培养基组成可被用于该软骨细胞的培养。使用胰蛋白酶 EDTA 对这些细胞进行 5 到 10 分钟的消化并且在 Burker-Turk 室内使用台盼蓝存活力染色进行计数。将细胞计数调整至 7.5×10^5 细胞/ml。在该 100 级实验室中暴露 NUNCLON™ 平板。

20 将该 Surgicel®止血屏障切成匹配该 NUNCLON™ 组织培养平板中的孔底的适当大小。在这种情况下，在无菌的条件下切出一个大约直径为 4cm 的圆形（但可为任何可能的大小）并且置于用于细胞研究工作的 NUNCLON™ Delta 六孔无菌一次性平板（NUNC, InterMed, Rockilde, Denmark）的孔底。置于该孔底部的止血屏障根据实施例 1 中的描述进行预处理。该处理显著地延缓了 Surgicel®的吸收。随后在蒸馏水中洗涤该止血屏障数次直至未反应的戊二醛被洗净。含有血清的少量细胞培养基被用于吸收进入该止血屏障，从而保持位于该孔底部的止血屏障的湿润。

30 将 1ml 培养基中的约 10^6 个细胞直接置于该止血屏障的顶部，散布于该止血屏障的表面，该屏障根据前述经过 0.4% 的戊二醛的预处理。随后在 37℃ 下的 CO₂ 温育箱中将该平板温育 60 分钟。小心地将 2 到 5ml 含 5 到 7.5% 的血清的组织培养基加至含有细胞的孔中，同时在排出培

培养基时通过将微量移液吸头同孔壁相切而避免溅起细胞。该培养基的 pH 显得过低 (pH 约为 6.8)。随后将该 pH 调节至 7.4 到 7.5。第二天一些软骨细胞开始在该止血屏障上生长, 排列成簇。一些细胞由于在 pH 调节之前的低 pH 暴露而死。将该平板温育三到七天, 在第三天换培养基。

在温育期末, 将该培养基倒出并且冷冻。含有 0.1M 二甲砷酸的钠盐 (亦称为二甲砷酸钠, 使用 HCl 将 pH 调节至 7.4) 的 2.5% 的戊二醛作为固定剂被加入以用于对该细胞和支持物 (止血屏障) 进行制备以进行电子显微照相。

实施例 8

软骨细胞在最低必需培养基中在 37℃ 下的 CO₂ 温育箱中进行生长, 该培养基中含有 HAM F12 和 15mM 的 Hepes 缓冲液以及 5-7.5% 的自体血清, 并且在位于 Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Denmark 的 100 级实验室中进行操作。其它培养基组成可被用于该软骨细胞的培养。使用胰蛋白酶 EDTA 对这些细胞进行 5 到 10 分钟的消化并且在 Burker-Turk 室内使用台盼蓝存活力染色进行计数。将细胞计数调整至 7.5×10^5 细胞/ml。在该 100 级实验室中暴露 NUNCLON™ 平板。

根据实施例 1 的描述, 使用 0.6% 的戊二醛对该 Surgicel® (用作止血屏障) 进行一分钟的处理, 并且以 0.9% 无菌氯化钠进行洗涤或者在优选的情况使用诸如 PBS 这样的缓冲液或者诸如 MEM/F12 这样的培养基进行洗涤, 这是因为进行戊二醛处理后的 pH 为 6.8 而在优选的情况下应为 7.0 到 7.5。使用 DUPLOJECT® 系统将 Tisseel® 应用于该 Surgicel® 的两侧, 由此以纤维蛋白粘合剂将该 Surgicel®, 即, 要使用的贴片的两侧均进行了包被。在无菌条件下使该胶水干燥至少 3 到 5 分钟。将该“经包被”的止血屏障置于细胞研究工作的 NUNCLON™ Delta 六孔无菌一次性平板 (NUNC, InterMed, Rockkilde, Denmark) 的孔底。含有血清的少量组织培养基被用于吸收进入该止血屏障。将 1ml 组织培养基中的约 10^6 个细胞直接置于该止血屏障的顶部, 散布于该止血屏障的表面。随后在 37℃ 下的 CO₂ 温育箱中将该平板温育 60 分钟。小心地将 2 到 5ml 含 5 到 7.5% 的血清的组织培养基加至含有细

胞的孔中，同时在排出培养基时通过将微量移液吸头同孔壁相切而避免溅起细胞。3 到 6 天之后，显微镜检查显示这些细胞粘附于该 Surgicel®并且令人满意地在其中生长，这表明 Surgicel®并未对软骨细胞显示出毒性并且这些软骨细胞令人满意地生长进入该 Surgicel®。

将该平板温育三到七天，在第三天换培养基。在温育期末，将该培养基倒出并且冷冻。含有 0.1M 二甲砷酸的钠盐（亦称为二甲砷酸钠，使用 HCl 将 pH 调节至 7.4）的 2.5%的戊二醛作为固定剂被加入以用于对该细胞和支持物（止血屏障）进行制备以进行电子显微照相。

实施例 9

软骨细胞在基本必需培养基中在 37℃下的 CO₂ 温育箱中进行生长，该培养基中含有 HAM F12 和 15mM 的 Hepes 缓冲液以及 5-7.5%的自体血清，并且在位于 Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Denmark 的 100 级实验室中进行操作。使用胰蛋白酶 EDTA 对这些细胞进行 5 到 10 分钟的消化并且在 Burker-Turk 室内使用台盼蓝存活力染色进行计数。将细胞计数调整至 $7.5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 细胞/ml。在该 100 级实验室中暴露 NUNCLON™ 平板。

已经发现 Bio-Gide®可被用作为一种可再吸收的双层膜，该膜将被用作为覆盖关节缺陷的贴片或者绷带，该关节中被移植入培养的软骨细胞以及止血屏障。Bio-Gide®为一种通过标准化的受控制造程序（E. D. Geistlich Sohne AG, CH-6110 Wolhusen）而获得的纯胶原蛋白。该胶原提取自兽医认证的猪，并且经小心纯化以避免抗原性反应，并且在双隔仓（double blisters）中经过伽马照射灭菌。双层膜具有一个多孔表面和一个致密表面。该膜由 I 型和 III 型胶原制成，未经进一步交联或者化学处理。该胶原在 24 周内被再吸收。该膜甚至在润湿的情况下仍然保持结构的完整性并且可通过缝合线或者固定钉进行固定。该膜还可使用诸如 Tisseel®这样的纤维蛋白粘合剂同邻近的软骨或者组织进行粘合，该粘合可代替缝合或者与之共用。

在 100 级实验室中暴露该 Bio-Gide®并且在无菌条件下置于用于细胞研究工作的 NUNCLON™ Delta 六孔无菌一次性平板（NUNC, InterMed, Rockilde, Denmark）的孔底，该双层膜的多孔表面或者

致密表面均可朝上。将 1ml 组织培养基中的约 10^6 个细胞直接置于该 Bio-Gide® 的顶部，散布于该 Bio-Gide® 的多孔或者致密表面。随后在 37℃ 下的 CO₂ 温育箱中将该平板温育 60 分钟。小心地将 2 到 5ml 含 5 到 7.5% 的血清的组织培养基加至含有细胞的孔中，同时在排出培养基时通过将微量移液吸头同孔壁相切而避免溅起细胞。

在这些软骨细胞被置于含有 Bio-Gide® 的孔中之后的第二天，在一台尼康反相显微镜下检查这些细胞。一些软骨细胞被注意到已经粘附于该 Bio-Gide® 的边缘。使用该显微镜通过该 Bio-Gide® 本身进行观察当然是不可能的。

10 将该平板温育 3 到 7 天，在第 3 天换培养基。在温育期末，将该培养基倒出并且冷冻。含有 0.1M 二甲砷酸的钠盐（亦称为二甲砷酸钠）的 2.5% 的戊二醛作为固定剂被加入以用于对该细胞和在多孔表面或者致密表面上培养有细胞的 Bio-Gide® 支持物进行制备，使用 HCl 将 pH 调节至 7.4。该 Bio-Gide® 贴片随即被送至 Department of Pathology, Herlev Hospital, Denmark 进行电子显微照相。

电子显微照相显示，在该 Bio-Gide® 的致密表面上进行培养的软骨细胞并未生长进入该 Bio-Gide® 的胶原结构，而该 Bio-Gide® 的多孔表面上进行培养的软骨细胞实际上生长进入了该胶原结构并且更进一步还显示出了蛋白聚糖的存在并且没有纤维原细胞结构的迹象。20 些结果表明，当该胶原贴片，例如 Bio-Gide® 贴片，被当作覆盖软骨缺陷的贴片进行缝补时，该多孔表面应当面向下对着将受到培养软骨细胞注射的缺陷。这些细胞将能够穿过该胶原，并且产生符合完整表面的光滑的软骨表面，并且在这一区域可建立一层光滑的蛋白聚糖。然而，当该胶原的致密表面朝下面对该缺陷处时，被植入的软骨细胞25 将不会同该胶原进行融合，并且这些细胞将不会产生与上述相同的光滑表面。

实施例 10

软骨细胞在基本必需培养基中在 37℃ 下的 CO₂ 温育箱中进行生长，该培养基中含有 HAM F12 和 15mM 的 Hepes 缓冲液以及 5-7.5% 的自体血清，并且在位于 Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhargen, Denmark 的 100 级实验室中进行操作。使用胰蛋白酶 EDTA30 对这些细胞进行 5 到 10 分钟的消化并且在 Burker-Turk 室内使用台

盼蓝存活力染色进行计数。将细胞计数调整至 $7.5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 细胞/ml。在该 100 级实验室中暴露 NUNCLON™ 平板。

根据产品插页，被用作为可再吸收双层膜的 Bio-Gide® 还可以同一种有机胶水共同使用，例如 Tisseel®，其中使用了额外的显著高于 Tisseel® 所含抑肽酶的含量。通过将抑肽酶的含量增加至约 25,000 KIU/ml，该材料的再吸收将延迟几个星期而非通常的几天跨度。

为在体外对该特征进行测试，该 Tisseel® 应用于 NUNCLON™ 平板的孔底并且进行不完全的固化。随后将诸如 Bio-Gide® 的胶原贴片用于该 Tisseel® 之上并且粘至该孔底。Bio-Gide® 和 Tisseel® 的这一组合被设计用作为止血屏障，该屏障将抑制或者阻止血管向软骨细胞移植区域的发育或者浸润。这一杂合胶原贴片现在既可在伤口的底部（最接近待修复的表面）被用作为止血屏障，亦可被用作为软骨形成的支持物，这是因为该远端表面可以是该胶原贴片的多孔侧并且由此而促进了软骨细胞以及软骨基质的浸润。因此，这种杂合胶原贴片也可以被用于覆盖该移植物的顶部，其中该胶原多孔表面朝向被植入的软骨细胞并且该屏障形成顶部。具有提高的抑肽酶含量的该杂合胶原贴片也可在无任何诸如 Tisseel® 这样的有机胶水的情况之下使用并且被直接置于该缺陷处，通过自然力进行粘附。因此，该胶原贴片既可被用作为止血屏障，亦可被用作为该修复/移植位点的无细胞覆盖物，其中该贴片的多孔表面朝向该移植软骨细胞/软骨。另一个变例使用了一种胶原贴片，该贴片由 II 型胶原组成（即，来自于 Geistlich Sohne AG, CH-6110 Wolhusen）。

因此，本发明提供了一种杂合贴片，其中该贴片是一种具有提高水平的抑肽酶成分的胶原基质，在优选的情况下约 25,000 KIU/ml，该胶原基质同一种有机基质胶水联合使用，其中该胶原成分类似于 Bio-Gide® 可再吸收双层材料或者 II 型胶原，并且该有机胶水类似于 Tisseel® 材料。在另一个实施方案中，该杂合胶原贴片并未使用任何有机胶水以对该修复位置进行粘附。

尽管上文具体描述的仅仅是本发明的特定实施方案，应当认为，在不偏离本发明的精神以及范围的情况下对本发明进行修改或者变化。

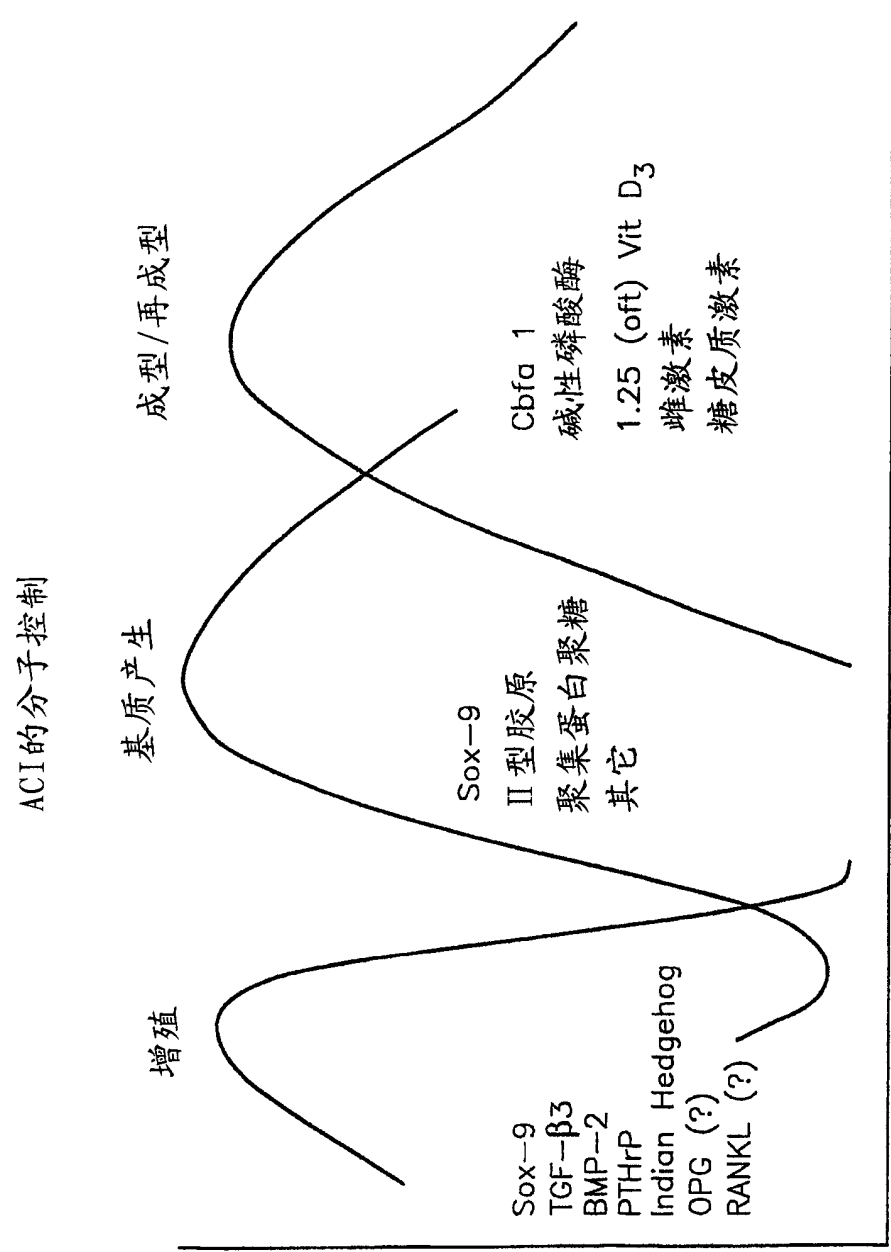


图 1

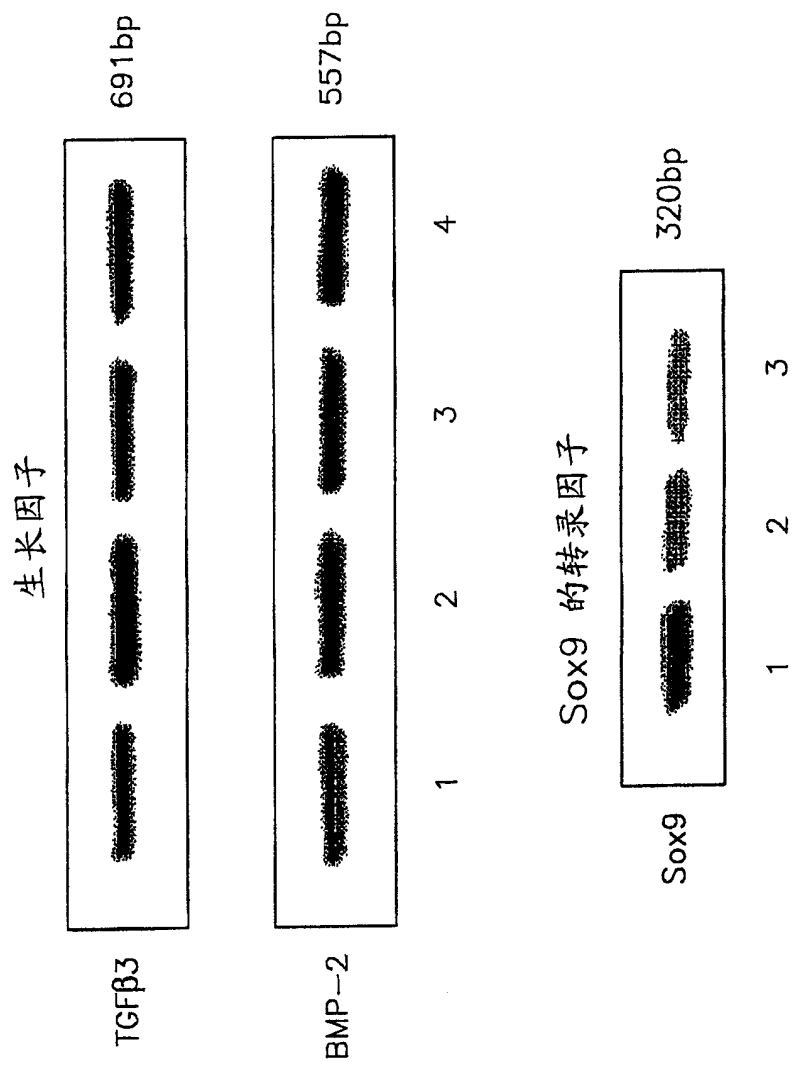


图 2

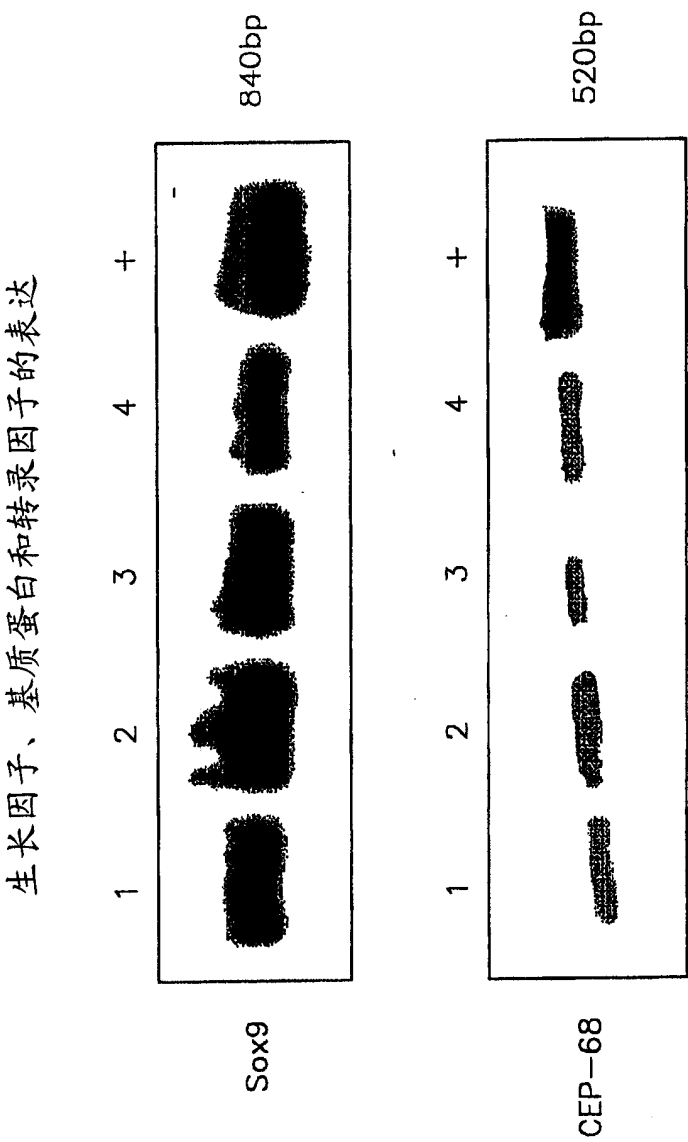


图 3

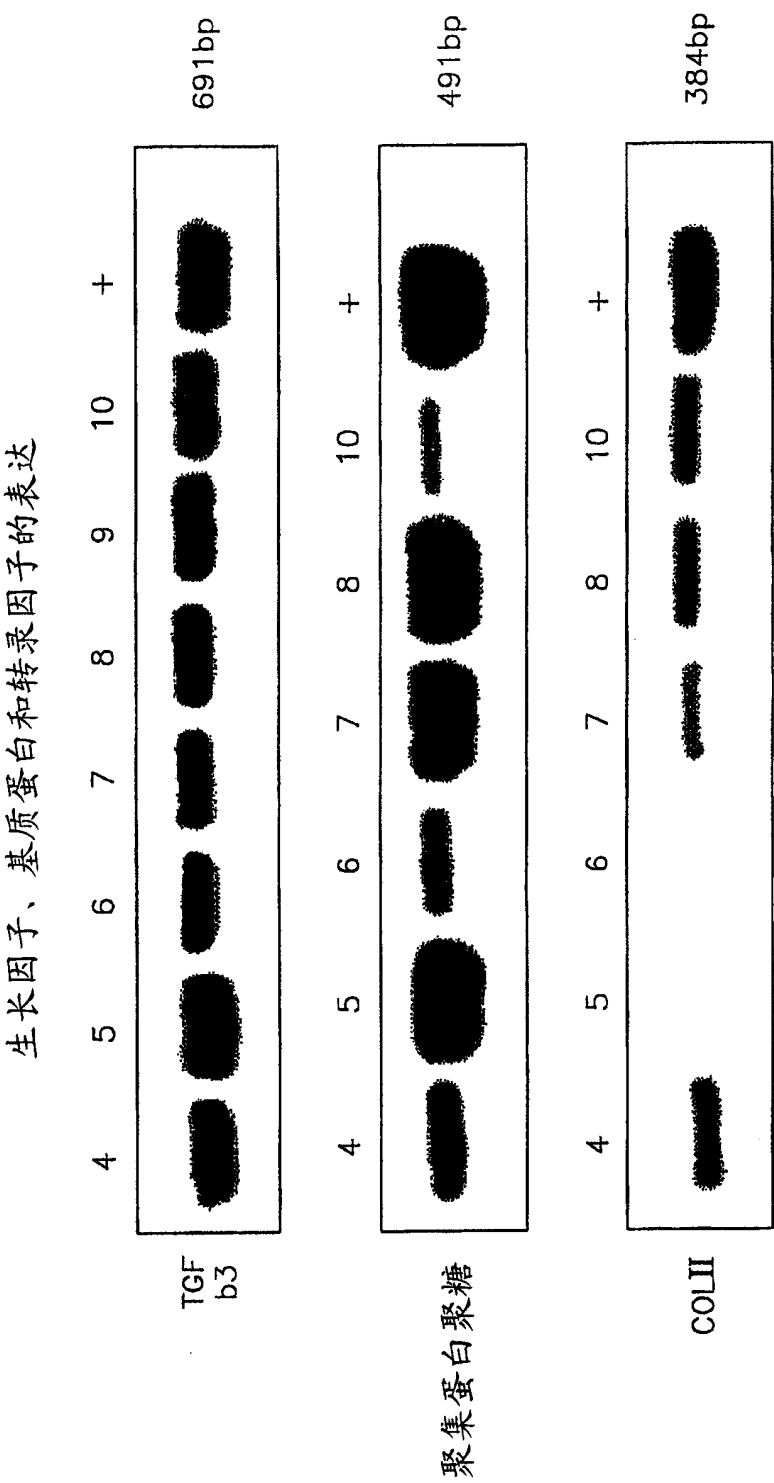


图 4

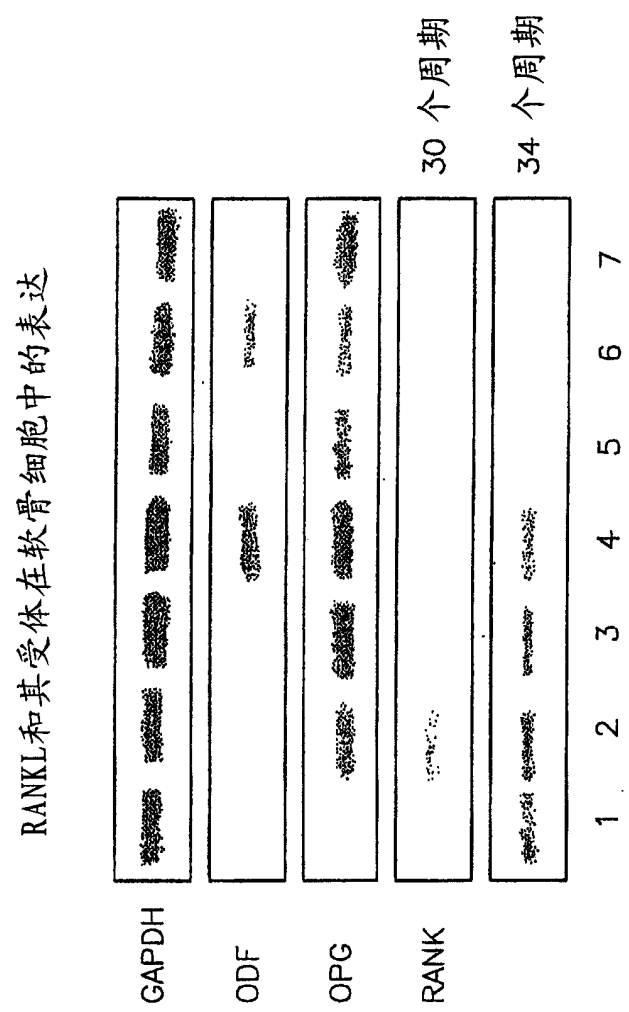


图 5

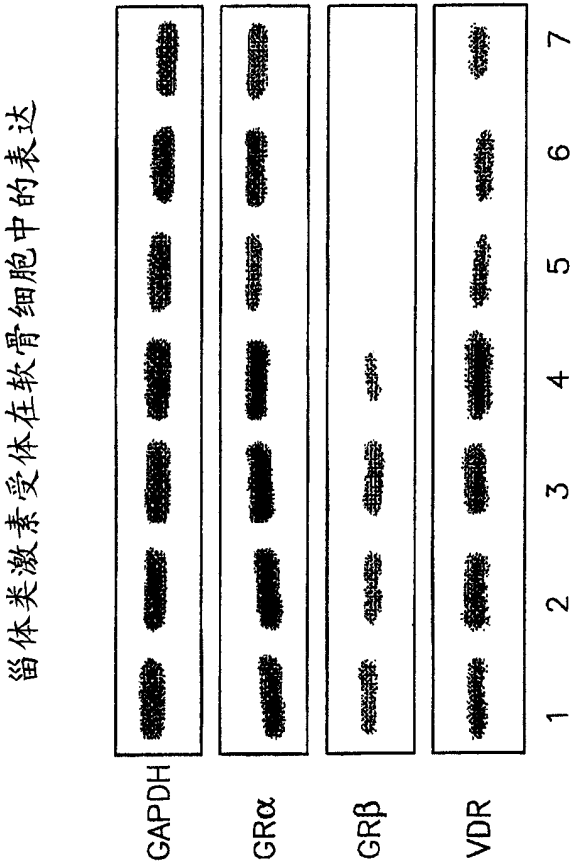
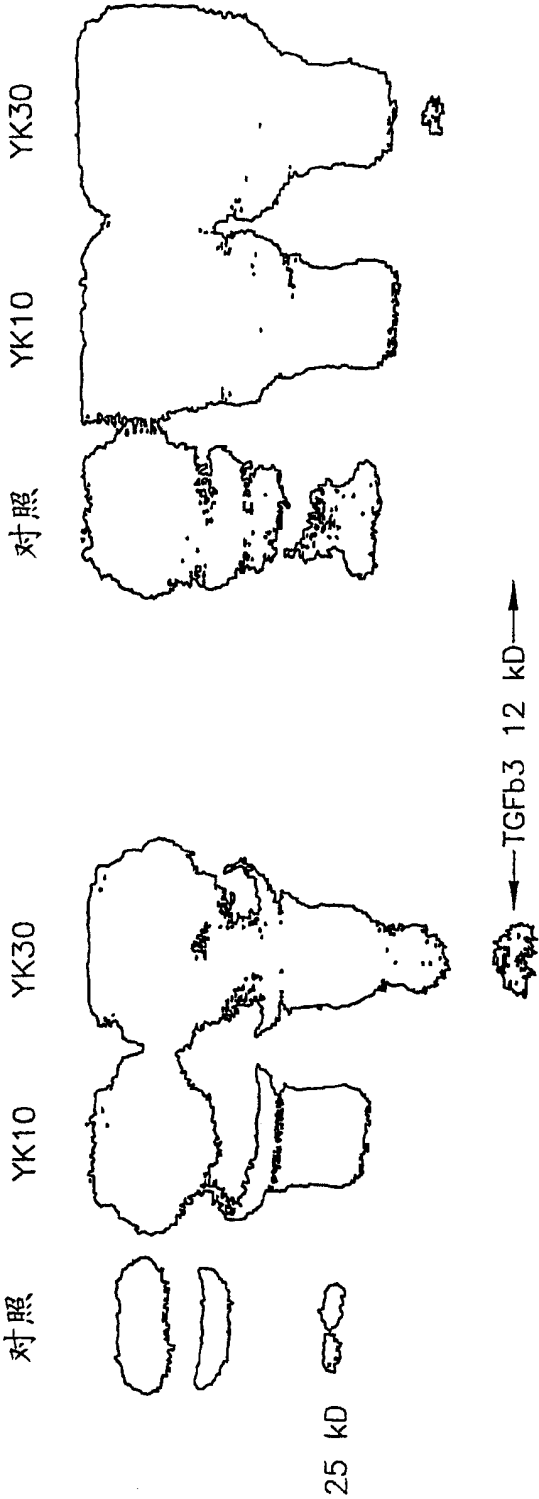


图 6

Western印迹中的TGFb3浓度



TGFb3浓度在通过过滤器进行浓缩后有所提高,
该过滤器截留分子量为10, 30kDa (YK10, YK30)

图 7

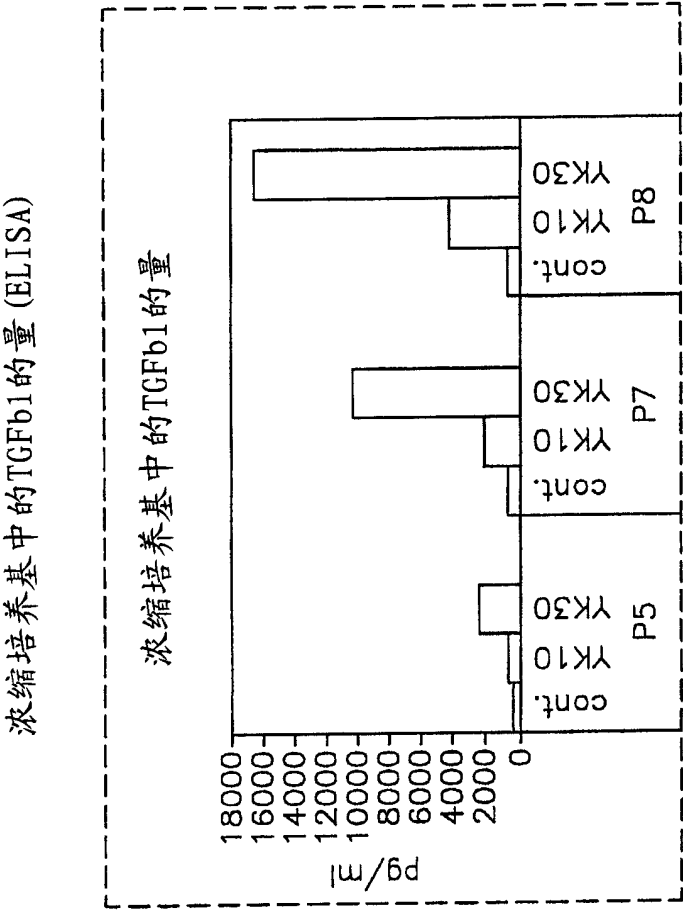


图 8

在将经浓缩的上清液应用于人类
软骨细胞培养物之后的细胞增殖

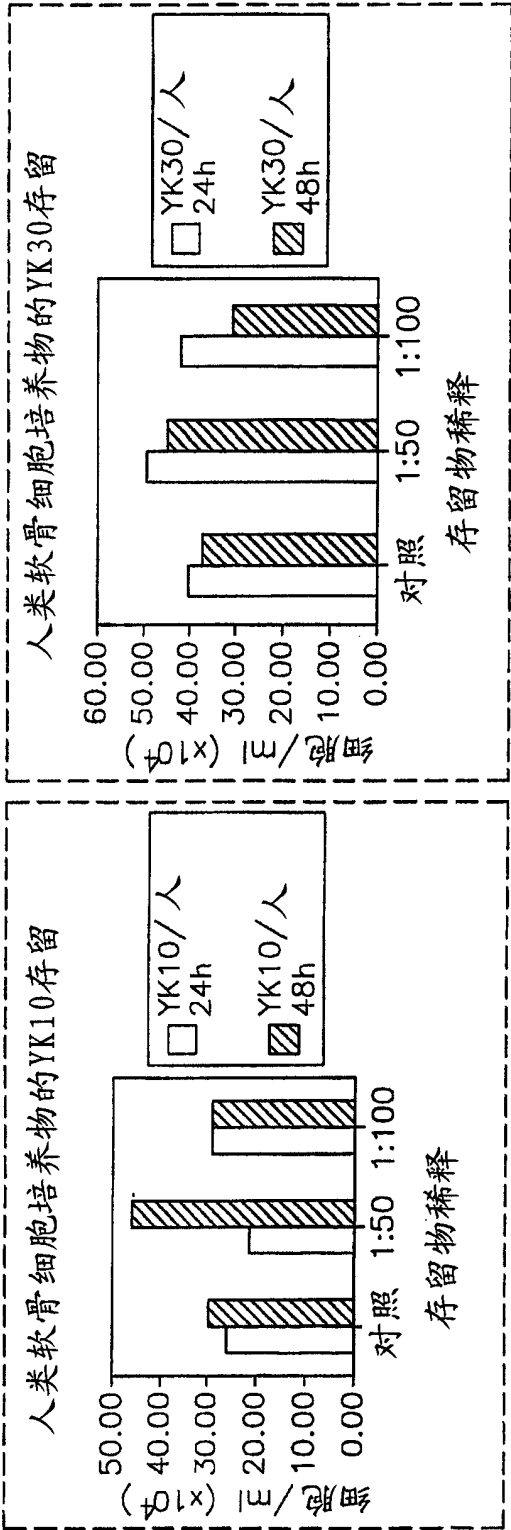


图 9