[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 5/00
A61K 35/32

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02805230.7

[43] 公开日 2004 年 5 月 19 日

[11] 公开号 CN 1498266A

[22] 申请日 2002.1.30 [21] 申请号 02805230.7
[30] 优先权
[32] 2001. 1.30 [33] US [31] 60/265,053
[32] 2001. 1.30 [33] US [31] 60/265,064
[86] 国际申请 PCT/US2002/002640 2002.1.30
[87] 国际公布 WO02/060315 英 2002.8.8
[85] 进入国家阶段日期 2003.8.20
[71] 申请人 原基因公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 E·B·亨奇克
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 李华英
权利要求书 6 页 说明书 27 页

[54] 发明名称 使用滑膜衍生的组织或细胞治疗及修复关节软骨缺损或损伤的组合物及方法

[57] 摘要

本发明提供治疗动物和人类软骨缺损的组合物和方法。 本发明组合物含有滑膜组织，滑膜细胞和含滑膜(或形成层)组织或细胞的基质，用于填充软骨缺损。 该基质和滑膜组织或细胞制品还可含有增殖剂，转化因子或其它活性物质，以促进愈合。 可使用控释运送系统来施用转化因子。 本发明组合物还含有滑膜覆盖膜或灭活的筋膜层用于覆盖软骨缺损。 在本发明的方法中，进行侵入性极小的外科手术干预从关节中取出一小部分滑膜。将部分滑膜或体外扩增的细胞，单独或与基质一起植入到缺损部位中，在那里产生新的软骨组织，修复缺损。 或者，可在原位形成部分转化的滑膜衍生组织，并植入到缺损部位。

ISSN1008-4274

1. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：从动物中取出一部分滑膜组织；并用该滑膜组织填充软骨缺损。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述滑膜组织与生物可降解基质混合，将这两种材料都植入缺损。

3. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：从动物中取出滑膜组织片；向滑膜组织片加入有效量的转化因子；并用该转化因子和滑膜组织片填充软骨缺损，所述转化因子能够使滑膜组织中的滑膜细胞转化为软骨细胞。

4. 权利要求 3 的方法，其中转化因子选自：TGF-β, BMP, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9。

5. 权利要求 1-3 任一项的方法，进一步包括以下步骤：用一个或多个生软骨基因转染滑膜组织中存在的细胞，所述基因选自：BMP, BMP-2, BMP-9, TGF-β, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9，其中所述转染会导致产生一种或多种能实现滑膜细胞转化为软骨细胞的转化因子。

6. 权利要求 3 的方法，其中转化因子是与控释运送系统相结合。

7. 权利要求 6 的方法，其中控释运送系统选自脂质体，微球，生物可侵蚀聚合物，与硫酸肝素蛋白聚糖化学相连的胶原纤维，以及基于碳水化合物的微粒。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中使用滑膜覆盖膜覆盖缺损。

9. 权利要求 8 的方法，其中滑膜覆盖膜在使用前被部分灭活。

10. 权利要求 1-3 任一项的方法，进一步包括用矿化抑制剂处理缺损部位。

11. 权利要求 1-3 任一项的方法，进一步包括用钙化抑制剂处理缺损部位。

12. 治疗关节软骨缺损的组合物，含有：生物可降解基质或基质－形成材料；滑膜组织片制备物；和有效量的转化因子以使滑膜组织中的滑膜细胞转化为软骨细胞。

13. 权利要求 12 的组合物，其中转化因子选自：TGF-β, BMP, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9。

14. 权利要求 12 的组合物，进一步含有有效量的增殖剂，以刺激滑膜细胞的增殖。

15. 权利要求 12 的组合物，进一步含有有效量的抗血管生成剂，以防止在软骨缺损处血管向内生长和形成骨组织。

16. 权利要求 12 的组合物，进一步含有有效量的矿化抑制剂。

17. 权利要求 12 的组合物，进一步含有有效量的钙化抑制剂。

18. 治疗包括人在内的动物中软骨缺损的方法，该方法包括：将浸透了转化因子的垫靠近动物滑膜放置，使得滑膜内的滑膜细胞转化成软骨细胞；以及用所获的含软骨细胞的组织填充软骨缺损。

19. 权利要求 12-17 任一项的组合物，进一步含有纤维蛋白胶，转谷氨酰胺酶或纤连蛋白，以增强基质对缺损部位的粘附。

20. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：用治疗性制剂填充缺损以修复缺损，并用滑膜覆盖膜覆盖缺损。

21. 权利要求 20 的方法，其中滑膜覆盖膜是自体的。

22. 权利要求 20 的方法，其中滑膜覆盖膜是异体的。

23. 权利要求 20 的方法，其中滑膜覆盖膜上带有有效量的转化因子，以促进滑膜覆盖膜中的滑膜细胞转化为软骨细胞。

24. 权利要求 20-23 任一项的方法，其中滑膜覆盖膜在使用前被部分灭活。

25. 权利要求 23 的方法，其中转化因子选自：TGF-β, BMP, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9。

26. 治疗软骨缺损的组合物，其含有滑膜覆盖膜。

27. 权利要求 26 的组合物，进一步含有有效量的转化因子以促进滑膜细胞转化为软骨细胞。

28. 权利要求 27 的方法，其中转化因子选自：TGF-β, BMP, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9。

29. 权利要求 26-28 任一项的组合物，其中滑膜覆盖膜在使用前

被部分灭活。

30. 权利要求 1-11 任一项或权利要求 18 的方法，进一步包括用一种物质处理缺损，以降解缺损表面的蛋白聚糖，并在填充缺损的步骤之前除去该物质。

31. 权利要求 30 的方法，其中降解蛋白聚糖的物质是软骨素酶 AC。

32. 权利要求 2 的方法，其中基质选自纤维蛋白，胶原，明胶，琼脂糖及其组合。

33. 权利要求 8 或 20 的方法，其中使用浸透了转化因子的缝合线将覆盖膜连到缺损边缘。

34. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：用自体滑膜组织填充缺损，并用自体滑膜覆盖膜覆盖缺损。

35. 权利要求 34 的方法，其中自体滑膜上带有有效量的转化因子，以促进滑膜中的滑膜细胞转化为软骨细胞。

36. 一种固定放置于关节软骨缺损内的细胞或组织的方法，包括：在缺损的底部在多个位点穿透软骨下骨板；用膜覆盖缺损底部；在缺损底部和膜之间沉积生骨因子和/或生血管因子；在膜之上和介于膜与关节缺损顶部平面之间，沉积生软骨制剂，该制剂选自：细胞悬液，容纳在基质内的细胞，滑膜组织和容纳在基质内的滑膜组织；并用覆盖膜覆盖缺损。

37. 权利要求 36 的方法，进一步包括：在膜和覆盖膜之间放置转化因子。

38. 权利要求 36 的方法，进一步包括：在膜和覆盖膜之间放置抗血管生成因子。

39. 权利要求 36-38 任一项的方法，其中膜和覆盖膜包括滑膜。

40. 权利要求 36-38 任一项的方法，其中转化因子选自：TGF-β, BMP, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9。

41. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：从该动物中取出一部分滑膜；从取出的滑膜中得到滑膜细胞；体外培

养并增殖滑膜细胞；以及用该培养的滑膜细胞填充软骨缺损。

42. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：从该动物中取出一部分滑膜；从取出的滑膜中得到滑膜细胞；体外培养并增殖滑膜细胞；将该培养的滑膜细胞植入到生物可降解基质中；以及用该含有培养滑膜细胞的基质填充软骨缺损。

43. 权利要求 41 或 42 的方法，其中还使用有效量的转化因子填充软骨缺损。

44. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：从该动物中取出一部分滑膜；从取出的滑膜中得到单个的滑膜细胞；体外培养并增殖滑膜细胞；用转化因子刺激滑膜细胞以诱导滑膜细胞分化为软骨细胞；以及用该软骨细胞悬液填充软骨缺损。

45. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：从该动物中取出一部分滑膜；从取出的滑膜中得到滑膜细胞；体外培养并增殖滑膜细胞；用转化因子刺激滑膜细胞以诱导滑膜细胞分化为软骨细胞；将该软骨细胞植入到生物可降解基质中；以及用该含有软骨细胞的基质填充软骨缺损。

46. 权利要求 41，42，44 或 45 任一项的方法，其中还使用有效量的抗血管生成剂填充软骨缺损，以防止血管组织向内生成和形成骨组织。

47. 治疗包括人在内的动物中关节软骨缺损的方法，该方法包括：从该动物中取出一部分滑膜；从取出的滑膜中得到单个的滑膜细胞；体外培养并增殖滑膜细胞；用转化因子刺激滑膜细胞以诱导滑膜细胞分化为软骨细胞；刺激软骨细胞在体外产生软骨基质；以及用所得的由软骨细胞及其周围的软骨基质组成的软骨组织填充软骨缺损。

48. 权利要求 47 的方法，进一步包括以下步骤：在填充软骨缺损前，令产生的软骨基质经受部分酶促消化作用以释放形成软骨基质的软骨细胞。

49. 权利要求 41，42，44，45，47 或 48 任一项的方法，进一步包括用物质处理缺损部位，以降解缺损表面的蛋白聚糖，并在填充缺

损的步骤之前除去该物质。

50. 权利要求 49 的方法，其中降解蛋白聚糖的物质是软骨素酶 AC。

51. 权利要求 42，44 或 45 任一项的方法，其中基质选自纤维蛋白，胶原，明胶，琼脂糖及其组合。

52. 权利要求 46 的方法，其中抗血管生成剂选自：苏拉明，制管张素，金属蛋白酶抑制剂，抗-bFGF 抗体，抗-ESAF 抗体，烟曲霉素，和 AGM-1470。

53. 权利要求 44，45，47 或 48 任一项的方法，其中转化因子选自：TGF-β, BMP, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9。

54. 权利要求 47 的方法，进一步包括以下步骤：在将软骨植入到缺损部位之前，修饰在体外产生的软骨的大小和形状以适合缺损部位。

55. 治疗软骨缺损的组合物，含有：生物可降解基质或基质－形成材料；滑膜细胞制品；和有效量的转化因子以转化滑膜细胞为软骨细胞。

56. 权利要求 55 的组合物，进一步含有有效量的增殖剂，以刺激滑膜细胞的增殖。

57. 权利要求 55 的组合物，进一步含有有效量的抗血管生成剂，以防止血管向内生长入软骨中。

58. 权利要求 55 的组合物，其中转化因子与控释运送系统相结合。

59. 权利要求 41，42，44，45，47，48 或 54 任一项的方法，进一步包括用覆盖膜覆盖被填充的缺损，以防止填充缺损的细胞丢失。

60. 权利要求 59 的方法，其中覆盖膜是滑膜覆盖膜。

61. 权利要求 41，42，44，45，47 或 48 任一项的方法，进一步包括用矿化抑制剂处理缺损部位。

62. 权利要求 55 的组合物，进一步含有矿化抑制剂。

63. 权利要求 41，42，44，45，47 或 48 任一项的方法，进一步包括用钙化抑制剂处理缺损部位。

64. 权利要求 55 的组合物，进一步含有钙化抑制剂。

65. 权利要求 42，45，47 或 48 任一项的方法，进一步包括用纤维蛋白胶或转谷氨酰胺酶和/或纤连蛋白处理缺损部位，以增强基质对缺损部位的粘附。

66. 权利要求 55 的组合物，进一步含有纤维蛋白胶或转谷氨酰胺酶和/或纤连蛋白，以增强基质对缺损部位的粘附。

67. 权利要求 42，44，45，47 或 48 任一项的方法，其中转化因子与控释运送系统相结合。

68. 权利要求 62 的方法，其中使用浸透了转化因子的缝合线将覆盖膜与缺损边缘相连。

使用滑膜衍生的组织或细胞治疗及修复关节软骨缺损或损伤的组合物及方法

本申请根据35U.S.C. §119(e)要求2001年1月30日提交的美国临时申请60/265,053和60/265,064的优先权。

技术领域

本发明涉及软骨缺损或损伤（本文中可互换使用）的治疗和修复。本发明的组合物包括基质和滑膜组织或细胞用于填充软骨缺损。也可以使用形成层细胞。基质和滑膜组织或细胞制品还可含有增殖剂和/或转化因子以分别促进滑膜细胞的扩增和滑膜细胞向软骨细胞的分化，引发软骨组织的形成。本发明的组合物还包括滑膜或形成层细胞，该细胞已用生软骨基因（chondrogenic gene）转染，使得该细胞可以表达软骨发生因子，而该因子能够促进软骨形成。本发明方法包括从对关节囊滑膜的最小侵入性活检中获得滑膜组织或细胞，向滑膜组织或细胞中加入适当的增殖和/或转化因子，并与结构基质一起或不加结构基质，将组织（膜片或碎块）或细胞置于缺损的部位。或者，可以用层叠的滑膜膜片填充缺损部位。滑膜组织可以在填充到缺损处之前被部分地失活（devitalized）。或者，可用含有软骨细胞的基质填充缺损部位，所述软骨细胞是在体外或原位从滑膜细胞或形成层细胞制备得到。或者，可用体外或原位形成的、部分转化的滑膜衍生组织填充缺损处。然后用覆盖膜覆盖被填充的缺损部位，优选该覆盖膜含有部分失活的滑膜片。本发明方法可特别用于治疗骨关节炎和其它导致软骨损伤的疾病及创伤中的关节软骨缺损。

将美国专利No. 5,206,023，5,270,300和5,853,746引入本申请作为参考。

背景技术

关节是骨骼中各块骨相连接的一种普遍方式。正常关节联接的骨

末端覆盖有关节软骨组织，软骨组织可以保证骨彼此之间几乎无摩擦的运动 [L. Weiss 编，Cell and Tissue Biology (Munchen: Urban and Schwarzenburg, 1988) 247 页]。

关节软骨的特征在于特殊的结构组成。其由包埋在细胞间物质（通常在文献中称为“软骨基质”）中的特别细胞（软骨细胞）构成，这种胞间物质富含蛋白聚糖、以 II 型为主的胶原纤维、其它蛋白和水 [Buckwalter 等，“Articular Cartilage: Injury and Repair,”Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues (Park Ridge, III.: American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium, 1987)，465 页]。该软骨基质由包埋其中的软骨细胞产生并维持。软骨组织既无神经分布支配，也没有血管或淋巴系统穿入。但是，在成人的成熟关节中，在下面的软骨下骨组织在骨组织和软骨之间形成了一层连续的薄板。该软骨下骨组织或骨板受神经支配，并具有血管。这层骨板之下，骨组织形成了含有骨髓的骨小梁。在未成熟的关节中，关节软骨之下即为初级骨小梁。关节中的半月板组织的一部分也由软骨构成，其构成与关节软骨类似[Beaupre, A.等，Clin. Orthop. Rel. Res.,72-76 页 (1986)]。

在关节表面中已发现了两种缺损类型，为全层缺损（full-thickness defects）和表浅缺损。全层缺损是穿入或穿通软骨下骨板的缺损；表浅缺损则不是。这些缺损的区别不仅在于软骨的物理损伤程度，而且还在于每种损伤所引发的修复反应的性质。

关节表面的全层缺损包括对透明软骨，钙化软骨层和带有其血管和骨髓的软骨下骨组织的损伤。全层缺损会引发剧烈疼痛，因为骨板中含有感觉神经末稍。这种缺损通常由严重的创伤而导致或在退行性关节疾病如骨关节炎的晚期发生。全层缺损有时会导致出血，并诱发软骨下骨的修复反应[Buckwalter 等，“Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair”，Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy (New York: Raven Press,1990) 19-56

页]。形成的修复组织是具有血管的纤维型软骨，其生物机械性能较差，并且不长期持续存在[Buckwalter 等，（1990），同上]。

关节软骨组织的表浅缺损仅限于软骨组织本身。这种缺损通常不会愈合，也不表现出修复反应倾向，因而很难治。

表浅缺损可能在软骨表面上以裂隙，刮伤或裂口出现，或者在患病组织中表现出“蟹肉”（crab-meat）外观。表浅缺损没有全层缺损中会出现的出血血管（血斑点）。表浅缺损可能没有明确的病因，但是通常是导致软骨组织磨损的机械损伤的结果。关节创伤可能导致机械损伤，如撕裂的半月板组织移位入关节，半月板切除术，撕裂的韧带导致的关节松弛，关节错位，骨折或遗传性疾病。表浅缺损还是早期退行性关节疾病（如骨关节炎）的特征。由于软骨组织不受神经支配[Ham's Histology (9^{th} ed.) (Philadelphia: J. B. Lippincott Co. 1987),266-272 页]，也没有血管，所以通常表浅缺损不产生疼痛感。尽管无痛，但是表浅缺损通常不会愈合，并经常退变为全层缺损。

通常认为由于关节软骨缺乏血运，所以受损的软骨组织不能接受充分或适当的刺激来激发修复反应[Webber 等，“Intrinsic Repair Capabilities of Rabbit Meniscal Fibrocartilage: A Cell Culture Model”，（30^{th} Ann. Orthop. Res. Soc., Atlanta, Feb.1984）; Webber 等，J. Orthop.Res.,3,36-42 页(1985)]。理论认为软骨组织中的软骨细胞在正常情况下，并不接触足量的修复刺激物质，如生长因子和通常存在于受损的血管化组织中的血纤维蛋白凝块。

使受损软骨组织接触修复刺激物的一个已经投入使用的方法是钻孔或刮通软骨到达软骨下骨以引起出血[Buckwalter 等，（1990）同上]。但不幸的是，组织对这种外科创伤的修复反应通常类似于在引起出血的全层缺损中观察到的天然发生的修复反应，即形成纤维型软骨，其生物机械性能不足，并且不会长期存在[Buckwalter 等（1990），同上]。

已经分离出多种生长因子，目前已用于研究和生物医学应用[参见，如 Rizzino, A., Dev. Biol.,130，411-422 页（1998）]。已有报道说这些生长因子中的一些，如转化生长因子β（TGF-β），能够在体外在

胚胎大鼠间充质细胞中促进软骨特异性分子的形成，如II型胶原和软骨特异性蛋白聚糖[如 Seyedin 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82,2267-71 页，(1985); Seyedin 等，J.Biol.Chem.261,5693-95 页，(1986); Seyedin 等，J.Biol.Chem.262, 1946-1949 页，(1987)]。

已有上百万人被诊断患有骨关节炎，即在其关节软骨中有退行性缺损或损伤。尽管已有多种方法声称可以在受损软骨中引发修复反应，但是这些治疗都没有投入实质性的应用[Buckwalter 等，(1990) 同上; Knutson 等，J.Bone and Joint Surg.,68-B, 795 页 (1986); Knutson 等，J.Bone and Joint Surg.,67-B, 47 页 (1985); Knutson 等，Clin.Orthop., 191, 202 页 (1984); Marquet, Clin.Orthop.,146, 102 页 (1980)]。一般这样的治疗通常只会带来暂时的缓解。"软骨保护剂"的全身应用据称会阻止骨关节炎的进展并减轻疼痛[Lohmander, L.S. 等，Ann.Rheum.Dis.,55(7), 424-31 页(1996)]。但是，这样的保护剂并未显示出促进软骨组织损伤或缺损修复的能力。

一种已被考虑的方法在美国专利 No 4,846,835 中描述。该专利中，通过活组织检查取出成熟的软骨组织，从中收集软骨细胞，然后在组织培养中生长或扩增细胞数目，然后将其置于胶原凝胶基质中一起植入到缺损部位，所述基质用于将软骨细胞固定在原位。利用骨膜层使移植的细胞（即移植物）牢固在缺损处。该方法的缺点是比本发明侵入性大，并在取出成熟软骨过程中造成了额外的软骨缺损。将关节软骨细胞用于修复缺损也有缺点，因为关节软骨细胞与滑膜细胞相比其增殖潜力较为有限。

另外一种方法是转化骨髓衍生的间充质干细胞，以在体外产生软骨细胞，用于植入软骨缺损[Caplan 和 Haynesworth, 美国专利 No. 5,811,094]。这些细胞只能通过骨髓活检获得，其可能伴有患者供体部位的长期局部病变（通常在骨盆的髂嵴）。然后必须使用复杂的技术纯化活检的骨髓细胞，体外扩增并接种于缺损部位[参见 Caplan 等，Clin.Orthop.342, 254-269 页(1997)]。

文献中另外一种方法是施加电压穿透缺损处周围的组织，以刺激

新组织的生长[美国专利 No. 4,506,673]。

美国专利 No. 5,270,300，5,206,023 和 5,368,858 公开了另外一种修复这种缺损的方法，其中本发明人描述了这样一种发明：将修复细胞从滑膜腔隙（synovial compartment）吸入缺损部位，在缺损处诱发其增殖，并分化为软骨细胞，合成新的软骨基质。

已有报道称将细胞维持在关节软骨缺损处的悬液或基质中的一种方法是将一层合适的覆盖薄膜缝合在缺损空隙的顶部。目前所用的覆盖膜材料源自于骨膜，软骨膜或者是肌肉筋膜。这些覆盖膜或其它人工覆盖膜的显著缺点是该覆盖膜本身不会转化为软骨组织，或仅有限程度地发生转化。这样，缺损空隙永远不会被修复软骨完全填充。而且，纤维型覆盖膜的降解速度极慢。另外，这些覆盖膜在缺损边缘处不会与天然的组织整合为一体。这种覆盖膜组织可含有成纤维细胞，该细胞不会转化为软骨细胞，而会导致不期望的疤痕样组织。这样，在某些现有技术的覆盖膜中，成纤维细胞可能会迁移出来进入修复空隙，将其污染并形成不期望的疤痕组织。

因此，需要一种简单，快速并且可靠的方法来治疗表浅及全层软骨缺损，如严重的机械损伤和骨关节炎。

发明概述

本发明提供有效的治疗组合物和方法，引发人类和其它动物软骨损伤的修复作用。本发明组合物和方法的应用还能够促进创伤和多种形式骨关节炎的痊愈，所述疾病会引发有效关节功能的丧失，而可能需要切除和用金属和/或塑料人工关节替换患病关节。

本发明中，对患有关节软骨缺损的患者在关节区域施用局部麻醉，或可采用全身麻醉。使用合适的外科工具取出一部分滑膜组织。优选从与缺损相同的关节取出滑膜组织，因为已显示，软骨和滑膜细胞成熟形式具备其所源自的特定关节的典型机械和结构特性[Kuettner, K.E.,Clin.Biochem.,25,155-63 页 (1992)(cartilage of different joints differ biochemically); Archer, C.W.,Ann.Rheum.Dis.,53, 624-30 页 (1994)(fetal cartilage differs joint to joint]。但是有些情况下，可能期

望从大关节中取出滑膜组织，用于修复含有不足量供体滑膜组织的小关节。这样获得的滑膜组织或细胞可按下文所述用于修复过程。或者，可以使用取自骨膜或软骨膜的形成层作为细胞或修复组织的来源。

在用修复材料填充缺损之前，优选利用蛋白聚糖-降解酶处理缺损部位的关节软骨边缘，以除去表面的蛋白聚糖。这种处理会使下面的胶原网络暴露，使得修复材料更好地与组织整合并粘附。

在本发明的一个具体实施方式中，将滑膜组织用于直接的再植术。优选在转化因子的存在下，再植滑膜或滑膜碎片，所述转化因子能够诱导滑膜细胞分化为软骨细胞，该软骨细胞依次会形成新的软骨，从而修复缺损。优选地，将滑膜或滑膜碎片分布在生物可降解基质中，然后植于缺损部位。转化因子可以利用控释运送系统给予。

在本发明的另一具体实施方式中，在手术室里用胶原酶和胰蛋白酶简短地消化滑膜碎片(30-45 分钟)，再快速纯化。然后将这些滑膜小碎块（bits）直接移植到缺损部位，悬浮在生物可降解基质中，该基质中含有转化因子，能够使其在植入后分化为软骨细胞。或者可将滑膜片排成多层堆叠，再填充到缺损处。加入适当的转化因子可以促进滑膜细胞在原位转化为软骨细胞。优选将这种因子置于各滑膜膜片之间。还可使用适当的抗血管生成剂，以防止新的软骨组织发生血管化，可使用适当的矿化/钙化抑制剂来防止新的软骨组织骨化。

或者，将整个骨膜，软骨膜，或优选骨膜或软骨膜形成层的膜片，填充到缺损处。以下任何组织构型均可：小碎块，膜片，点缀有小碎块的膜片，悬浮在生物可降解基质中的组织，或上述各种相结合。同样，可结合使用各种不同组织。例如，可将骨膜形成层膜片置于缺损处的底部，用含有滑膜或骨膜小碎块的生物可降解基质填充缺损处，再可用滑膜膜片覆盖缺损处。或者，可将滑膜膜片和骨膜或软骨膜膜片的混合物填充于缺损处。

滑膜细胞也可用于移植过程。从滑膜或滑液中制备滑膜细胞，或从骨膜或软骨膜的形成层中制备形成层细胞。如果细胞的数目尚不足够（如下述），可将细胞在体外培养并扩增。当培养的细胞已扩增到足

够的数量时，将其植入软骨缺损部位。优选地，将细胞植入可生物降解的基质中，再将基质植入缺损部位。在转化因子的存在下植入细胞，所述转化因子能够诱导滑膜细胞分化为软骨细胞，该细胞接下去可形成新的软骨，从而修复缺损。转化因子可以利用控释运送系统给予。

或者，可从转化的滑膜膜片中分离出软骨细胞，然后通过将其插入基质，或如上所述悬浮于基质中，植入到缺损空隙处。以这种方式诱导的软骨细胞还可在植入之前在体外扩增，以提高其数量，并选择软骨生成亚群。

在本发明的另一具体实施方式中，在转化因子的存在下，滑膜细胞在体外被诱导分化为软骨细胞，该细胞开始形成软骨组织。可进行细胞外周基质的部分酶促消化，以释放单个的软骨细胞，然后将其作为一团整体植入缺损部位。或者，可将体外形成的软骨组织植入生物可降解基质，然后将该基质植入缺损部位。

在本发明的另一具体实施方式中，滑膜细胞可在原位转化为软骨细胞。在本发明的这一方面，通过利用浸透分化因子的基质垫，诱导滑膜细胞在原位分化，该基质垫在一处滑膜隐窝或临近脂肪垫处与滑膜缝合。或者，也可将浸透分化因子的基质垫与滑膜组织就在紧靠关节间隙之外直接相连，而无需打开关节。切出转化的组织，并使用胶原酶和胰蛋白酶消化约 30-45 分钟，快速分离细胞。在原位植入以前，新转化的细胞还可进一步在体外扩增和/或分化。然后可将软骨细胞植入缺损部位，或悬浮其中（由覆盖膜覆盖，以防止细胞进入关节腔），或在基质中，以使细胞保持在缺损间隙。覆盖膜可在损伤顶部周边附近与缺损边缘缝合在一起。

在前述的每一具体实施方式中，优选将组织容纳在生物可降解基质中进行移植，以防止组织或细胞从缺损部位丢失，有效地填充缺损间隙，并作为所用于治疗缺损的任何药剂或因子的载体。或者，或额外地，优选移植后，用薄的生物可降解膜（“覆盖膜”）覆盖缺损部位的表面，以防止组织或细胞从缺损部位丢失。

在本发明的一个优选的具体实施方式中，可使用滑膜覆盖膜，优

选部分失活的（即，部分消除了巨噬细胞的）或完全天然的滑膜覆盖膜，覆盖填充的缺损处。或者，可使用筋膜组织膜片覆盖缺损，可通过三次冻融循环使其彻底失活（以防止暴露在底层修复基质中的生长因子以后，污染细胞过度生长）。或者，生物可降解膜可以是人工（如聚乳酸膜片，透明质酸膜片和薄（细）胶原网）或天然的（如骨膜，软骨膜）。当根据本发明使用生长因子时，并不优选天然的骨膜或软骨覆盖膜，因为这种因子会刺激这些覆盖膜中的细胞，从而会污染缺损区域。但是，当单独使用形成层时，通常不构成影响。

使用滑膜组织膜作为覆盖膜来覆盖关节软骨缺损，比现有技术中含骨膜组织或筋膜的覆盖膜有优势。滑膜组织可更为完全地转化为软骨细胞和软骨，并与周围的软骨组织更好地整合。骨膜组织和筋膜典型地含有许多成纤维细胞，该细胞不能被转化为软骨细胞和软骨，而以疤痕组织存留。无需在其下缺损中添加额外的治疗剂，通过转化为软骨细胞和软骨，滑膜组织膜已足以修复浅层缺陷。

当使用滑膜组织作为覆盖膜时，优选用转化因子处理待治疗的组织。还优选将转化因子与控释运送系统相结合使用。该转化因子，单独或者与控释运送系统一起，被加入滑膜覆盖膜；或将滑膜覆盖膜浸入转化因子的溶液，单独或者与控释运送系统一起。

本发明比现有技术的方法更加简单，快速。例如，本发明无需存在吸引因子以诱导修复细胞迁移入缺损部位，也不需要应用骨髓衍生的间充质细胞所必需的复杂提取和纯化过程。

在膝盖中，可从靠近髌后脂垫的隐窝或髌上隐窝中切除滑膜组织，其中存在着大量滑膜组织储备褶。这种滑膜组织的切除实际上并不损害关节功能。滑膜垫的切除并不伴有任何关节病理学，这些组织中的损伤会自发痊愈。

使用本发明的滑膜组织覆盖膜覆盖被填充的缺损还有一个比现有技术方法更加显著的好处：整个覆盖膜本身能够转化为软骨组织，并整合到新形成的修复软骨中。而且，它还能够很好地与临近的天然组织如骨整合。另外，使用转化生长因子很有好处，因为滑膜组织覆盖

膜主要含有生软骨前体细胞。

使用本发明的部分失活的组织覆盖膜也有益处。或者，可以使用筋膜覆盖膜。优选地，在使用前将这种筋膜覆盖膜彻底灭活（即，使用前冷冻及融化三次），以防止成纤维细胞，巨噬细胞和其它细胞类型污染新形成的软骨组织，避免形成不期望的疤痕组织。

为选择性地去除巨噬细胞而不是其它细胞，则优选部分灭活的滑膜组织覆盖膜。可通过单个冻融循环而完成，或其它本领域已知的方式来选择性去除巨噬细胞和其它炎症细胞（如：可使用抗巨噬细胞抗体或其它物质来选择性地中和巨噬细胞从而从滑膜或其它组织中去除巨噬细胞）。

在上述的每一个具体实施方式中，可局部使用抗炎剂来防止巨噬细胞迁移，活化和增殖，以及形成血管翳。抗炎剂包括甾体药物如强的松，和非甾体抗炎药物（"NSAIDs"），如布洛芬，酮洛芬，吡罗昔康，萘普生，舒林酸，阿司匹林，胆碱次水杨酸盐（choline subsalicylate），二氟尼柳，非诺洛芬，吲哚美辛，甲氯芬那酸，双水杨酸酯，托美丁和水杨酸镁。这种抗炎剂可容纳在含有滑膜组织或细胞的基质内，以控释运送系统施用给缺损处，或将其置于层叠的滑膜膜片之间。运送系统的实例包括聚（乳）酸（PLA），聚（D,L-乳酸-共-乙醇酸）（PLGA）或聚（ε-己内酯）(PCL)微球，脂质体，生物可侵蚀聚合物，与硫酸肝素蛋白聚糖化学相连的胶原纤维以及基于碳水化合物的微粒。

在前述的每一具体实施方式中，可通过自体移植滑膜组织或细胞来完成软骨修复，即来自相同的个体，或者，也可通过异体移植滑膜组织或细胞完成软骨修复。异体移植可能需要同时施用本领域已知的免疫抑制治疗。

本发明的滑膜组织覆盖膜还可与其它本领域已知的软骨修复技术一起使用，包括但不限于：美国专利5,206,023，5,270,300和5,853,746所公开的技术。

发明详述

为更好地理解本发明，提供下述详细的说明。说明中使用了下述术语。

抗血管生成剂：在本文中，是指具有防止血管从下面的骨组织向内生长入软骨组织中的生物活性的任何化合物或组合物，如抗侵袭因子（anti-invasive factor），软骨衍生的血管生成抑制剂、制管张素、金属蛋白酶抑制剂、抗血管生成诱导因子（包括 bFGF 和内皮细胞刺激血管生成因子（ESAF））的抗体，苏拉明(Germanin®，Bayer AG, Germany)，烟曲霉素，烟曲霉素类似物和 AGM-1470[Peacock，D.J.等，Cellular Immunology,160,178-84 (1995)]。测定抗血管生成剂的体内和体外试验是本领域公知的技术[如 Moses,M.A.等，Clinical & Exptl. Rheumatology，11（Suppl.8），567-69 （1993）；Moses,M.A.等，J.Cell Bio.,119(2), 475-82 (1992)；Moses,M.A.等，Science, 248, 1408-10 (1990)；Ingber, D 等，Nature, 348(6), 555-57 (1990)]。

关节镜检查：本文指使用关节镜来检查或进行关节外科手术。

形成层细胞：本文指在关节和骨的软骨膜及骨膜的形成层中存在的细胞。

软骨：本文指结缔组织的一种类型，其含有软骨细胞，该细胞包埋在细胞间物质（通常称为“软骨基质”）中，该基质含有胶原纤丝（主要为 II 型胶原以及较少的其它类型，如 IX 和 XI 型），多种蛋白聚糖（如硫酸软骨素-，硫酸角质素-和硫酸皮肤素-蛋白聚糖），其它蛋白和水。这里所用的软骨包括关节软骨和半月板软骨。关节软骨覆盖着关节中骨部分的表面，可使关节活动而无直接的骨与骨接触，从而防止并列的骨表面的磨损和伤害。多数正常的健康关节软骨还被描述为“透明”的，即具有毛玻璃的外观特点。半月板软骨通常存在于经受震动和运动的关节中。这种半月板软骨的位置包括颞下颌关节，胸锁关节，肩峰锁骨关节，腕关节和膝关节[Gray's Anatomy (New York: Bounty Books, (1977)]。

细胞粘附促进因子：本文指含有三肽 Arg-Gly-Asp 的任何化合物或组合物，其能够介导细胞与细胞外物质粘附，包括纤连蛋白和其它

肽，甚至小至四肽 [Ruoslathi 等，Cell, 44, 517-518 (1986)]。

软骨细胞：本文指能够产生软骨组织成分的细胞，所述成分如 II 型软骨纤丝和纤维及蛋白聚糖。

覆盖膜：本文指可在移植后用于覆盖被填充的缺损部位以防止细胞丢失到临近空间的任何材料，以及可被置于全层缺损的骨缺损部分和软骨缺损部分之间的任何材料，以防止细胞迁移以及血管从骨缺损部分侵入全层缺损的软骨缺损部分。本发明方法和组合物中所用的膜优选是生物可降解的，可包括滑膜，聚乳酸膜片，透明质酸膜片，薄（细）胶原网，骨膜，软骨膜或筋膜。滑膜通常转化为软骨组织，整合到修复软骨组织中。非生物可降解的膜包括特氟隆（Goretex®），Millipore®膜，或 Verigen®膜。

成纤维细胞生长因子（FGF）：FGF 多肽家族的任何成员 [Gimenez-Gallego 等，Biochem.Biophys.Res.Commun.，135，541-548（1986）；Thomas 等，Trends Biochem.Sci.,11, 81-84 (1986)]或其衍生物，可从天然，合成或重组来源获得，其能够在体外刺激多种细胞的 DNA 合成及细胞分裂[测定请参见如 Gimenez-Gallego 等，1986，同上；Canalis 等，J.Clin.Invest., 81, 1572-1577 (1988)]，所述细胞包括初级成纤维细胞，软骨细胞，血管和角膜内皮细胞，成骨细胞，成肌细胞，平滑肌和神经胶质细胞[Thomas 等，1986，同上]。根据 FGF 的等电点（pI），可将其分为酸性（a FGF）或碱性(b FGF)FGF。

基质：本文中指多孔复合固体或半固体物质，其具有足够大的孔或空间允许细胞入住其中。术语“基质”包括基质-形成材料，即，能够在软骨或骨的缺损部位基质－形成材料。基质-形成材料可能需要加入聚合剂以形成基质，如向含有纤维蛋白原的溶液中加入凝血酶以形成纤维蛋白基质。其它的基质材料包括但不限于：胶原，胶原和纤维蛋白的组合，琼脂糖（如 Sepharose®），明胶，hyaluronan，透明质酸与胶原相结合，可光聚合的基质，基于白蛋白的基质，基于聚乳酸的基质，基于聚羟基乙酸的基质和基于纤维蛋白的基质。磷酸钙盐，如磷酸三钙，羟基磷灰石或其它能够形成固体基质的钙盐都可单独，

或与其它基质材料结合用于治疗骨缺损。

增殖（促有丝分裂）剂：本文指任何能够刺激细胞体外增殖的化合物或组合物，包括肽，蛋白，和糖蛋白。检测肽，多肽和其它化合物的增殖（促有丝分裂）活性的体外试验是本领域公知的技术[例如参见，Canalis 等，1988，同上；Gimenez-Gallego 等，Biochem.Biophys.Res.Commun., 135, 541-548 (1986)；Rizzino, "Soft Agar Growth Assay for Transforming Growth Factors and Mitogenic Peptides", Methods Enzymol., 146A (New York: Acadamic Press, 1987),341-52；Dickson 等，"Assay of Mitogen-Induced Effects on Cellular Incorporation of Precursors for Scavengers, de novo and Net DNA Synthesis", Methods Enzymol., 146A(New York: Acadamic Press, 1987),329-40]。测定化合物或组合物增殖（促有丝分裂）活性的一个标准方法是在体外测试其诱导未转化细胞在软琼脂中无贴壁依赖性生长的能力[如 Rizzino, 1987, 同上]。还已知其它的促有丝分裂活性试验系统[如 Gimenez-Gallego 等，1986，同上；Canalis 等，1988，同上；Dickson 等，1987，同上]。通常，物质的促有丝分裂作用与浓度密切相关，在比促有丝分裂作用的最佳浓度范围更低或更高的浓度下其效应可能逆转。

滑膜细胞：本文指与滑膜生理上相关联的细胞，或存在于滑膜下空间的细胞；来自关节滑膜或滑液的细胞。当暴露于适当的刺激时，滑膜细胞会分化并转化为软骨细胞。滑膜衍生的修复细胞包括间充质细胞，成纤维细胞，成纤维细胞样细胞，巨噬细胞，去分化的软骨细胞，滑膜衬细胞，和滑膜成纤维细胞样细胞。

转化因子：本文指能够诱导例如滑膜衍生细胞分化为软骨细胞的任何肽，多肽，蛋白或任何其它化合物或组合物。这还包括导入（例如通过转染）细胞内用于修复缺损的基因的产物。可通过本领域已知的体外试验来检测该化合物或组合物诱导或刺激细胞产生软骨特异性蛋白聚糖和 II 型胶原的能力[Seyedin 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82, 2267-71 (1985)；Seyedin 等，Path. Immunol.Res., 7, 38-42 (1987)]。

转化生长因子 β(TGF-β): TGF-β 多肽家族的任何成员[Derynck R 等, Nature, 316, 701-705 (1985); Roberts 等, "The transforming growth factor-β's", Peptide growth factors and their receptors I(Berlin: Springer Verlag, 1990), 419 页]或其衍生物, 可从天然, 合成或重组来源获得。其具有 TGF-β 的特点, 能够刺激正常大鼠肾(NRK)细胞生长并在软琼脂试验中形成集落[Roberts 等, "Purification of Type β Transforming Growth Factors From Nonneoplastic Tissues", Methods for Preparation of Media, Supplements, and Substrata for Serum-Free Animal Cell Culture (New York: Alan R.Liss, Inc., 1984)], 并能够诱导滑膜衍生的修复细胞转化为软骨细胞, 这已经被其在体外诱导或刺激细胞产生软骨特异性蛋白聚糖和 II 型胶原的能力所证实。[Seyedin 等, 1985, 同上]。

制备缺损并获得滑膜组织

为实施本发明的软骨缺损或损伤治疗方法, 首先鉴定待修复的关节软骨缺损。可通过关节镜检查关节简便地肉眼鉴定动物中的软骨缺损, 或在开放性外科手术中简单地检查缺损或损伤。还可使用计算机辅助的断层摄影(CAT 扫描), X-射线检查, 磁共振成像(MRI), 分析滑液或血清标记, 或本领域已知的任何其它方法来推论性地鉴定软骨缺损。

一旦鉴定了缺损, 在修复前或修复时, 外科医生可选择外科手术来修饰缺损以提高缺损物理地保持本文所述治疗方法所加入的滑膜组织, 细胞和/或基质材料的能力。优选地, 缺损处具有或被处理成具有垂直的边缘, 或侧凹, 而不要形成平的或很浅的凹面, 以更好地容纳如本文所述治疗方法中加入的滑膜组织, 细胞和/或基质材料。可通过一种称为"微骨折"的过程处理全层和浅层缺损, 以产生分散的出血区域, 这涉及在软骨下骨板整齐地穿孔。释放的骨髓成分会形成外科手术诱发的凝块, 其能够为新组织形成提供丰富环境[Steadman 等, Clin.Orthop., 391 Suppl., S362-69(2001.Oct)]。

在一个具体实施方式中, 在局部麻醉下进行小关节镜检查或外科

干预。可在移植前任选地用蛋白聚糖降解酶或其它材料处理缺损部位，以改善移植的滑膜组织，细胞或基质的粘附。使用无菌的吸收巾沾吸该区域从而干燥缺损的表面，用灭菌的酶溶液填充缺损空间 2-10 分钟，使软骨表面以及距缺损表面约 1-2μm 深局部的蛋白聚糖降解。可单独地或相结合地使用在灭菌缓冲水溶液中的多种酶来降解蛋白聚糖。应调整该溶液的 pH 值使酶活性达到最佳。

可用于本发明方法中降解蛋白聚糖的酶包括软骨素酶 ABC，软骨素酶 AC，透明质酸酶，胃蛋白酶，胰蛋白酶，胰凝乳蛋白酶，木瓜蛋白酶，链霉蛋白酶，溶基质素和 Staph V8 蛋白酶[Jurgensen K.等，J.Bone Joint Surg. Am.,79(2), 185-93(1997); Hunziker E.B.等，J.Bone Joint Surg.Br., 80(1), 144-50(1998)]。可根据酶溶液的活性来决定特定的酶或酶组合的适当浓度。

在本发明的一个优选的具体实施方式中，用 1U/ml 浓度的软骨素酶 AC 灭菌溶液填充缺损，进行消化 4 分钟。优选的软骨素酶 AC 浓度可根据实施例 1 所述确定。所用的任何其它酶都应该以一定的浓度，持续一定时间，以使仅深至约 1-2μm 处的表浅蛋白聚糖被降解。

应用酶溶液的时间应保持在降解主要在修复区域中的蛋白聚糖的最低限度。1U/ml 的软骨素酶 ABC 或 AC，消化时间大于 10 分钟，可能会对缺损区域之外的蛋白聚糖产生不必要的和可能有害的降解作用。另外，消化时间大于 10 分钟会使整个方法的总耗时延长。该方法的总耗时应尽可能维持在最短时间内，特别是在开放性的关节切开术过程中，因为暴露在空气之下可能会对软骨造成伤害[Mitchell 等，（1989）同上]。由于这些原因，在本发明方法的包括应用酶消化降解蛋白聚糖步骤的具体实施方式中，优选消化时间小于 10 分钟，最优选消化时间小于 5 分钟。

根据本发明的方法，当酶降解了缺损表面的蛋白聚糖之后，应该将酶溶液从缺损处去除。可通过使用带有细吸头的吸引器然后用棉状海绵擦拭来去除酶溶液。或者，可只用棉状海绵擦拭吸收来去除酶溶液。

去除酶溶液之后，用灭菌的生理盐水（如0.15M NaCl）彻底清洗缺损处，优选清洗三次。然后干燥经清洗的缺损处。可使用无菌纱布或棉质物干燥缺损部位。

为进行术中的滑膜再植或移植，必须大面积地清洗掉蛋白聚糖降解酶，以去除任何蛋白酶，从而防止加入的生长因子失活。

作为另一种选择，或者除酶处理步骤之外，还可将化合物敷于缺损处，如纤维蛋白胶（fibrin glue）或转谷氨酰胺酶(transglutaminase)，以提高基质对缺损部位的粘附性。在一个优选的具体实施方式中，当缺损处经酶处理后已被清洗并干燥后，将纤维蛋白胶或转谷氨酰胺酶应用于缺损处。纤维蛋白胶会促进基质纤丝与缺损表面软骨胶原纤丝的化学结合（交联）[参见 Gibble 等，Transfusion，30（8），741-47（1990）]。可使用转谷氨酰胺酶来达到同样的效果[例如参见，Ichinose 等，J.Biol.Chem.，265(23)，13411-14 (1990)；“Transglutaminase”，V.A.Najjar 和 L.Lorand 编，Martinus Nijhoff Publishers（Boston，1984）]。还可使用缝合、烧灼或除纤维蛋白胶或转谷氨酰胺酶之外的能够促进胞外物质粘附的化合物。

对患有缺损的患者在含缺损的关节处进行局部麻醉，或者全身麻醉，使用适当的外科器械（如活组织检查器械，手术刀或关节镜）从关节中取出适量的滑膜和/或滑液。在膝关节中，优选从膝关节脂垫或其附近的远端隐窝中取出滑膜材料，或者在髌上隐窝处取。当可使用额外的组织块完全填充缺损时，还可使用含有脂垫组织的滑膜组织。通常，应该从储备褶（reserve folds）的区域处取滑膜，而不是直接与关节软骨表面相对处。

使用滑膜组织

所获的滑膜组织可用于快速的术中滑膜移植过程。可任选地用单一冻融循环使滑膜组织部分失活，然后置于缺损处。含有增殖剂和/或转化因子的基质可任选地与滑膜组织共同使用来填充缺损。

在本发明的一个具体实施方式中，滑膜组织被直接移植到缺损部位。为防止移植的滑膜组织掉到关节间隙内，可用薄层生物可降解覆

盖膜覆盖缺损部位表面。该覆盖膜可以是人工或天然的（如滑膜，如下所述）。用缝合线，纤维蛋白胶，组织转谷氨酰胺酶，烧灼等将该覆盖膜封到缺损部位边缘。如果使用缝合线与滑膜相连，该缝合线可用适当浓度的转化因子如 BMP-2 浸透，以促进膜中的滑膜细胞分化为软骨细胞。

在本发明的另一具体实施方式中，将滑膜从隐窝中取出，并切成非常小的碎片（即，切碎成小碎块）用于移植。可用胶原酶和胰蛋白酶简短地消化切碎的滑膜（30-45 分钟），然后在手术室里快速纯化。或者，可利用物理刮削和/或对骨膜或软骨膜组织的温和蛋白水解消化作用获得并切碎形成层细胞。将切碎的滑膜或形成层组织混合到基质中，并与基质一起移植到缺损部位。优选该基质含有趋化/增殖剂，以使得细胞繁殖填充整个基质，该基质还优选含有与控释释放系统一起的转化因子，以在该基质内诱导软骨组织转化。可用滑膜组织覆盖膜或其它膜覆盖整个基质，以使得基质保留在缺损处。

在本发明的另一具体实施方式中，一层或多层被切除的滑膜膜片被相互层叠堆积直到缺损处被填充满。可将顶层的边缘，以及任选地下层的边角缝合到或胶到缺损处的边缘，以保留整个层叠在原位。在各层之间存在转化生长因子以诱导滑膜片的软骨转化，优选使用如上所述的控释运送体系。这可通过在每层间沉积一薄层基质层（如纤维蛋白或胶原）来完成，所述基质层已浸透了转化因子，以诱导组织转化为软骨。或者，可向滑膜膜片之间加入含有转化因子的微粒，微球，纳米球或脂质体，无需基质。另一实施方式是将含有这类因子的乳剂置于膜片之间。或者可在再植之前将滑膜片浸泡在转化生长因子溶液中。

上述具体实施方式中的被切碎滑膜，形成层组织和滑膜片还可通过单次的冻融循环而使其部分失活，以减少细胞密度，并减少不期望的细胞。或者可使用抗巨噬细胞抗体或其它物质来耗尽巨噬细胞群。

还可使用部分转化的滑膜组织来填充缺损处。在第一次外科干预中，浸透了转化生长因子以进行缓释的基质垫被缝合到并贴附到关节

滑膜的隐窝处，或者连到就在紧靠滑膜囊之外的滑膜组织上。该手术后 8-14 天，该基质垫下的组织将已经转化为软骨样组织。然后将其取出并用部分转化的滑膜组织层叠堆积填充缺损处。还可在这种组织片间加入本领域公知的其它转化因子和维持因子（如 IGF I, IGF II 和 IGF-BP's）。

在缺损延伸到血管化组织（如软骨下骨骼和软骨下骨髓间隙（或靠近丰富血管化的滑膜处））的区域中，有可能会有向内生长的血管污染缺损处的修复组织。为防止这种不期望的血管向内生长，可向基质中加入抗血管生成因子，或在滑膜组织各层之间，滑膜小碎块之中或滑膜衍生的移植软骨细胞或滑膜细胞之中沉积该因子。

使用滑膜细胞

如上所述制备的滑膜样品被部分消化，使得单个的滑膜衬细胞和滑膜下成纤维细胞样细胞能够从膜组织中释放出来。可使用标准的胰蛋白酶酶解或其它从周围组织离解细胞的方法。收集单个的细胞（如，通过利用 Ficoll 密度梯度的差示沉降）并在标准细胞培养条件下体外培养，确保其快速增殖和扩增（可加入增殖剂使得该步骤更快实现）。滑膜细胞培养技术是本领域公知的技术[Taguchi K 等，Cell Struct. Funct., 22, 443-53(1997), Rodel J 等，Exp.Toxicol.Pathol.，48，243-7（1996）]。在几个星期内，滑膜细胞会扩增到足够的数目（如 10000-300000 个细胞/ml 溶液或基质），根据缺损的大小，即可将其移植到缺损处。

在本发明的另一具体实施方式中，培养的滑膜细胞被诱导在体外分化。已显示间充质干细胞可被诱导在体外分化[Caplan 和 Haynesworth, 美国专利 No. 5,486,359]。还已显示在体外用 BMP（骨形成蛋白）刺激的滑膜衍生的间充质型细胞可分化为软骨[Iwata 等，Clin. Orthop., 296, 295-300(1993)]。

在该具体实施方式中，在 TGF-β 和/或 BMP（优选浓度在下文给出）的存在下，培养从患者取出的滑膜细胞，以诱导其分化为软骨细胞。之后将所得到的软骨细胞植入到缺损部位，如前述实施方式中所

述，即作为悬液或作为基质体系的一部分。

在另一个实施方式中，使被 TGF－β和/或 BMP 诱导分化为软骨细胞的滑膜细胞在体外产生软骨组织。对软骨组织的大小和形状进行塑造以充分适合缺损后，将由此制备的软骨组织植入缺损部位。或者，用酶部分消化软骨基质，以收集产生软骨的软骨细胞，然后将其以悬浮物或固体团块移植。

使用滑膜组织覆盖膜

当使用滑膜作为覆盖膜时，优选进行部分灭活的步骤，因为该组织含有巨噬细胞，其不利于软骨组织形成，因为其能够导致炎症细胞增殖或产生信号物质，该物质会吸引血管，这样会导致不期望的骨化。可通过单次快速的冻融过程去除巨噬细胞，该过程会减少滑膜覆盖膜中细胞的数目。这主要会去除巨噬细胞，而间充质细胞的数目尽管有所下降，仍足以形成软骨细胞，并由此最终形成软骨。另外，通过减少细胞密度，部分灭活会产生出更适于在修复组织中形成软骨的生理细胞密度。还可额外使用本领域已知的去除巨噬细胞的其它方法（如抗巨噬细胞抗体），或作为备选的一种方法。

还可使用预先转化的滑膜来替代如上所述的直接滑膜组织自体移植步骤来覆盖缺损。该方法使用两步外科手术法。第一个步骤是关节镜干预，其中将浸透了转化因子（如 BMP-2, TGF-β）的基质垫与下述缝合:（1）隐窝中的滑膜,（2）就在紧靠滑膜间隙之外的滑膜组织，包括脂垫，或（3）滑膜下结缔组织，靠近滑膜衬细胞。选项（2）和（3）的优点在于无需打开关节。3-4 周后，该基质垫所面向的滑膜将会转化为软骨样组织。第二个步骤是外科手术干预，将该软骨样组织切除，并移植到缺损处，使其填充和/或覆盖缺损。在带有很薄关节软骨层的小关节（如指关节）中，这种部分转化的滑膜可能足以填充整个缺损间隙。这种在膝关节中被诱导并自体移植到较小的指关节（或其它关节）的部分转化滑膜，可用于重建目的。

本发明所用的滑膜覆盖膜作为覆盖以维持组织和/或基质材料，可上下翻转或者取生理方向；每种方式都可行。可作为完全有活力的或

部分失活的材料应用，以消除特异性细胞类型，优化结果。

在本发明包括使用滑膜覆盖膜的具体实施方式中，可使用滑膜覆盖膜覆盖全层缺损的底部，或者微骨折的全层或浅层缺损（仅到达软骨下骨板）的底面。这种覆盖膜可在这些缺损中作为结构和功能屏障。在含有一个或多个出血点的全层或浅层缺损中，可在缺损骨部分的基底部置入生骨因子，还可任选地利用控释系统（如微球，脂质体或容纳在基质中），然后用第一层滑膜覆盖膜覆盖。任选地，可在第一层滑膜覆盖膜下加入血管生成剂以进一步促进骨形成，尽管血液中的因子也会促进骨形成。可使用缝合线，烧灼，胶，其它方式，或不用任何方式，将滑膜覆盖膜固定到位。可在第一层滑膜覆盖膜周边使用抗血管生成剂以抑制血管侵入其上的软骨修复部位。

在第一层滑膜覆盖膜之上，即不临近缺损的骨部分，可单独或与基质一起使用生软骨剂以促进软骨形成。优选用层叠的滑膜填充缺损，中间插入生软骨剂。除利用滑膜层叠物之外，还可以单独或与基质一起，使用基于细胞的治疗手段，以促进软骨形成。这种基于细胞的治疗包括应用滑膜细胞，软骨细胞，骨髓基质细胞，用生软骨基因转染的细胞，或任何生软骨细胞/基质系统。

已填充了生软骨细胞/基质系统后，优选用第二层滑膜覆盖膜覆盖缺损空隙的顶端，该覆盖膜可直接覆盖生软骨剂，以促进其完全转化为软骨组织，并同时作为填充在缺损空隙的生软骨细胞/基质系统的保留装置起作用。

以上具体实施方式中的第一层滑膜覆盖膜可行使锚定装置的作用，在全层缺损中行使三种修复功能:（1）滑膜覆盖膜朝向全层缺损骨部分或者浅层缺损出血点的那一面，会参与骨形成，并在大约 1-4 星期内最终与新形成的骨融合;（2）滑膜覆盖膜背离缺损骨部分的那一面将参与软骨形成，并最终与新形成的软骨融合；以及（3）第一层滑膜覆盖膜本身会作为暂时的屏障，阻止血管从骨部分或从缺损的脂肪组织向上生长，并且还阻止多种来源的干细胞从骨和脂肪组织向缺损的软骨修复部位进行不期望的迁移和污染。

基质和其它修复材料

可在本发明中用于填充或敷于软骨缺损的基质材料包括纤维蛋白原（由凝血酶激活以在缺损或损伤处形成纤维蛋白），胶原，琼脂糖，明胶和任何其它可生物降解的材料，其能够形成多孔基质，所述孔的大小足以使滑膜细胞或软骨细胞进入并在整个基质中增殖，该基质可被降解并在修复过程中可被软骨替代。

本发明方法所用基质可预制或在原位形成，例如，通过聚合化合物和组合物如纤维蛋白原，以形成纤维蛋白基质。可预制的基质包括胶原（如胶原海绵和胶原织物），化学修饰的胶原，明胶珠或海绵，成胶物质如琼脂糖或任何其它成胶或复合物质，该物质由基质材料构成，所述基质材料可以填充缺损，并使培养的或天然的滑膜细胞或软骨细胞在基质中定居，或上物质的混合物。

在本发明的具体实施方式中，使用纤维蛋白原或切碎的滑膜组织的溶液形成基质，在即将使用前向其中加入凝血酶，使其开始聚合。可使用 0.5-5mg/ml 缓冲水溶液的纤维蛋白原浓度。优选使用 1mg/ml 缓冲水溶液的纤维蛋白原溶液。该纤维蛋白原溶液在缺损部位的聚合会产生孔径足够大（如约 50-200μM）的基质，可以使滑膜细胞或软骨细胞自由入住基质并增殖，以填充由基质占据的缺损部位空间。优选地，在即将应用纤维蛋白原溶液前，向其中加入足量的凝血酶，使外科医生有充足的时间能够在完成聚合前，将该材料沉积在缺损处。典型地，凝血酶的浓度应该使聚合在数（2-4）分钟内完成，因为已经显示，将软骨长时间暴露在空气中会导致损伤[Mitchell 等，J.Bone Joint Surg., 71A, 89-95(1989)]。不应使用过量的凝血酶，因为凝血酶能够酶切生长因子分子并使其失活。可制备 10-500 单位/ml，优选 100 单位/ml 缓冲水溶液的凝血酶溶液，用于加入纤维蛋白原溶液。

在本发明的一个优选具体实施方式中，在填充缺损之前，将大约 20μl 凝血酶（100U/ml）与每 ml 纤维蛋白原溶液（1mg/ml）混合约 200 秒。如果加入浓度更低的凝血酶，则聚合速度会更慢。可以理解，要获得使纤维蛋白在 2-4 分钟内聚合的凝血酶溶液量只能大约给出，

因为这要视环境温度，凝血酶溶液的温度，纤维蛋白原溶液的温度等等而定。或者，为方便起见，当基质溶液已被置于缺损部位后，可将凝血酶置于基质溶液的顶端，将其加入，使其扩散到基质溶液中。通过观察纤维蛋白原溶液外部样品的凝血酶诱导的聚合，可以轻松地监测填充在缺损部位的凝血酶激活基质溶液的聚合情况。优选地，在本发明的组合物和方法中，纤维蛋白基质由来自与待治疗物种相同的哺乳动物物种血液的纤维蛋白原分子形成。其它物种来源的无免疫原性的纤维蛋白原也可以使用。

还可将含有纤维蛋白和胶原的基质，更优选含有纤维蛋白和明胶的基质，用于本发明的组合物和方法。胶原性基质也可以用于修复软骨缺损，包括全层缺损。请注意对于修复深的全层缺损的骨部分，可使用美国专利 Nos. 5,270,300 和 5,853,746 所公开的方法。

如果使用胶原作为基质材料，可利用 Collagen-Vliess®（"织物"），Spongostan®，或明胶-血液-混合物来制备足够粘的溶液，无需聚合剂。还可与聚合剂激活的纤维蛋白原溶液一起使用胶原基质，这样得到组合的基质。

当使用其它生物可降解化合物制备基质时，也可以不必使用聚合剂。例如，可选择 Sepharose®溶液，该溶液在 39-42°C 为液态基质溶液，在 35-38°C 时变为固态（凝胶状）。Serpharose 的浓度应使填充缺损的凝胶具有这样的网格大小：使滑膜衍生的修复细胞或软骨细胞能够自由占据基质和缺损部位。

使用转化因子和基质

一旦被置于缺损部位，植入的滑膜组织或滑膜细胞悬液就会部分自发地转化为软骨细胞，该细胞最终会生成成熟的软骨组织，起初会粘附到用蛋白聚糖降解酶处理的表面[Hunziker E.B 等，J.Bone Joint Surg.Br., 80(1),144-50(1998)]。优选地，可向植入的滑膜组织中加入适当浓度的转化因子来诱导均相分化为软骨细胞，如转化生长因子 β（TGF-β），骨形成蛋白（BMP's）[Majumdar M.K., J.Cell.Physiol., 189(3), 275-84(2001)]，软骨衍生的形态发生蛋白(CDMP)[Luyten F.P.,

Acta Orthop. Scand. Suppl., 266, 51-4(1995)]，印度刺猬蛋白（indian hedgehog protein）(IHH 蛋白)[St-Jacques B 等，Genes Dev., 13(16), 2072-86(1999)]，sonic hedgehog 蛋白（SHH 蛋白）[Iwamoto M.等，Crit. Rev.Oral Biol.Med., 10(4), 477-86(1999)]或 SOX-9[Kolettas E 等，Rheumatology, 40(10), 1146-56(2001)]。优选以控释运送系统施用转化因子。持续地增殖和产生软骨会填充缺损处，从而修复缺损。由于新的软骨形成并变得致密，该软骨替代生物可降解基质，而薄层覆盖膜会溶解或整合到修复组织中，损伤即被修复。还可使用本领域已知的维持因子（如 IGF I, IGF II 和 IGF-BP's），来稳定缺损内的修复细胞群。

可用于本发明组合物和方法的促进软骨修复的转化因子包括任何肽，多肽，蛋白或任何其它化合物和组合物，其能够诱导滑膜衍生的修复细胞分化为软骨细胞，该软骨细胞可以产生软骨特异性蛋白聚糖和 II 型胶原。转化因子还可以诱导细胞形成骨或其它细胞类型。可使用本领域已知的实验来检测化合物或组合物诱导或刺激细胞生成软骨特异性蛋白聚糖和 II 型胶原的能力[例如参见，Seyedin 等，1985，同上; Seyedin 等，1987，同上]。可用于本发明组合物和方法的转化因子包括，如 TGF-β, TGF-α, FGF(酸性或碱性)和 BMP，包括 BMP-2。这些转化因子可单独或相结合使用。也可使用这些因子的二聚物和多聚物。另外，TGF-β 可与 EGF 结合使用。

特别地，TGF-βI 或 TGF-βII 或 BMP-2 可用作转化因子。其它的 TGF-β 形式（如 TGF-βIII, TGF-βIV, TGF-βV, 或 TGF-β 超家族的任何成员）或具有 TGF-β 活性的多肽（参见 Roberts, 1990,同上）也可以用于该目的，以及有待在将来检测的该物质的其它形式和其它生长因子。

在一个优选的具体实施方式中，TGF-β 的浓度优选大于 200ng/ml 基质，最优选大于或等于 500ng/ml 溶液或基质。或者，可使用 BMP 作为转化因子，浓度优选为 100-2000ng/ml。可以理解诱导滑膜细胞分化的 TGF-β 或 BMP 的优选浓度会随着待治疗的特定物种或个体而有

所改变。

在本发明组合物中的转化因子容纳在基质中应用于缺损处。这样它们的存在就限制在非常局限的部位。这是为防止它们自由地注入或输入关节间隙。这种自由输入可能会产生刺激周围滑膜的细胞的不良作用，而产生关节渗出液。

在本发明的一个优选具体实施方式中，待植入的组织或基质除TGF-β或BMP作为转化因子外，还含有抗血管生成剂。

在本发明的另一具体实施方式中，用蛋白聚糖降解酶和/或如上述的另一种粘附增强化合物处理缺损部位。首先将滑膜组织或培养的滑膜细胞加入生物可降解基质系统。然后将含有适当浓度（如10000-300000细胞/毫升组织，溶液或基质）滑膜组织或细胞的基质系统植入到缺损处。如上所述，可将一薄层人工或天然的覆盖膜密封在缺损表面上，以防止组织丢失到关节间隙；但是，特别是当处理较小缺损时，可不必使用覆盖膜，因为用于填充缺损处的含有滑膜组织或细胞的基质会保持在缺损之内。用于填充缺损的滑膜组织内的细胞会在基质系统内增殖。

在使用如上所述基质系统的具体实施方式中，在植入后在基质系统内会提供转化因子，优选TGF-β超家族成员，这样植入的滑膜细胞会被诱导分化为产生软骨的软骨细胞。可使用运送系统运送转化因子，使得植入的细胞能够持续地，长时间地接触转化因子。适当运送系统的实例包括聚乳酸微球和脂质体。可根据病例的具体参数，如缺损部位的大小和密度，指定时间靶细胞的浓度以及所用的转化因子，来决定运送方案。这种系统如美国专利5,206,023所公开的。

另外，如果缺损相对于用来填充缺损的滑膜样品内细胞浓度或细胞悬液较大，可向滑膜样品或基质中加入增殖剂以扩增填充缺损的滑膜细胞数目。增殖剂应以适当的浓度范围存在，以达到促进缺损内滑膜细胞增殖的效果。优选地，相同物质也应该对细胞具有趋化作用（如TGF-β的情况）；但是，可使用仅具有增殖作用的因子，特别是存在一层覆盖膜以维持组织和细胞在缺损空隙内的时侯。或者，为了对置于

缺损处的细胞产生趋化作用，随后诱导细胞增殖，可使用两种不同的物质，其中每种都只具备这些特定作用中的一种（趋化或增殖）。这种物质在美国专利 No. 5,206,023 中描述。纤连蛋白或其它细胞粘附促进因子也可容纳在基质中，如美国专利 No. 5,206,023 所述。随后施用如上所述的转化因子会诱导滑膜样品中的细胞或细胞悬液分化成产生软骨的软骨细胞。可使用上述的控释运送系统施用增殖剂和转化因子之一或这两者。

在本发明的另一具体实施方式中，特别是软骨缺损达全层时，可向滑膜组织，细胞溶液或基质中加入适宜浓度范围的抗血管生成剂，以防止血管长入软骨组织。可使用的抗血管生成剂包括任何具有防止血管从在下面的骨组织或临近滑膜生长到软骨组织中的生物活性的物质。这种抗血管生成剂如美国专利 No. 5,853,746 描述。可用于本发明的抗血管生成剂的某些实例如上所述。抗血管生成剂应该随意可得，以提供快速直接的活性，也可以持续释放形式存在，如与延长活性的运送系统相结合。这种系统亦在美国专利 No. 5,853,746 中有所描述。

或者，在植入滑膜组织，细胞或基质前，面朝骨组织放置一层膜，防止血管和血管周围的细胞从在下面的骨髓空隙或其它周围组织向内生长，从而防止在缺损部位形成骨组织。参见美国专利 No. 5,270,300 和 5,853,746。还可在控释运送系统内加入抗炎剂，以防止炎症细胞的污染。

在以上包括体外细胞培养或者滑膜组织或细胞原位转化的具体实施方式中，可用一个或多个生软骨基因稳定地或瞬时地转染滑膜细胞。如果是体外细胞培养，可在植入到缺损之前，在体外细胞培养过程中进行该操作。如果是原位转化，可以用本领域公知的方法，如脂质体或腺病毒载体，也在原位进行转染。

一个涉及转染的生软骨基因的具体实施方式是缺损处应用了层叠的滑膜组织，该层叠组织间隔插有选择的转染载体，这样可实现原位转染。生软骨基因的例子包括但不限于：BMP, BMP-2, BMP-9, TGF-β, CDMP, IHH, SHH 和 SOX-9，并可根据本领域已知的方法进行转染，

如电穿孔，脂质体运送和病毒载体，可视情况而定。本领域公知的生软骨基因的编码DNA可使用从已公开的待转染生软骨基因的DNA序列所获得的引物序列，通过PCR扩增市售DNA文库而获得。

在以上的每个具体实施方式中，组织或基质可能在修复组织区域非特异性地矿化或钙化。因此可向组织或基质中加入钙化或矿化抑制剂如双膦酸酯类，以防止这种不期望的矿化或钙化，保持修复组织的透明样特点。还期望抑制软骨细胞分化为肥大软骨细胞，该细胞会使组织修复区域矿化。可使用甲状旁腺激素受体蛋白或其它已知的活性剂来完成该抑制。

在前述的每一具体实施方式中，在植入滑膜组织或细胞，以及任选地用生物可降解覆盖膜覆盖被填充的缺损处之后，分层次地手术关闭关节间隙。

本发明方法可以治疗动物，包括人类的软骨缺损，该方法操作简单，并仅限于患病关节区域。整个治疗可以通过关节镜，开放性手术或经皮操作来完成。

为更好地理解本发明，提供下述实施例。应该理解，这些实施例是用于举例说明本发明的目的，而不是以任何方式限制本发明。

实施例1.使用滑膜在体内覆盖关节软骨缺损

为测试用滑膜覆盖关节软骨缺损的效果，利用刨工工具在成熟山羊体内形成5mm宽，10mm长，0.7mm深的缺损。用纤维蛋白基质填充新缺损，该基质含有40ng/ml游离增殖剂（IGF-1）和1.0μg/ml脂质体包封的转化生长因子（BMP-2）。然后用从关节壁切出的相同尺寸的滑膜覆盖缺损，并用vycril7.0缝合材料通过采用简单间断缝合，将其与缺损边缘缝合到一起。关闭关节后，将动物关节保持固定在软模中超过4周（n=6只动物）。实行安乐死，并进行组织学分析，发现滑膜已很好地并入周围软骨组织边界中，还已转化为软骨样组织。在其中的三只动物中，滑膜组织的取向为滑膜衬细胞朝向关节腔，而在另外三只中，衬细胞朝向缺损空隙。这两组都获得了类似的结果（即覆盖膜的朝向在本发明方法中似乎无关紧要）。

实施例 II .A. 使用滑膜碎块在体内修复关节软骨缺损

在较大的关节软骨缺损中，滑膜细胞从滑膜向关节软骨缺损处迁移以使可转化为软骨细胞以修复软骨的细胞占据缺损的过程可能太慢，或者提供的细胞数目不足以在术后最初几周内通过细胞增殖和组织分化而实现完全填充缺损。为提供更多细胞来源数目用于修复，可将滑膜材料切割成小组织碎块，并与纤维蛋白基质混合，再与转化因子一起置于缺损处。然后用滑膜覆盖膜覆盖缺损，如以上实施例 I 所述。除了向纤维蛋白基质中加入滑膜小碎块之外，该试验全部如上所述。处死动物后，存在大量组织转化区域，修复细胞的数目足以形成新的软骨组织。

实施例 II. B. 移植前部分灭活滑膜组织

修改实施例 II. A.（上述）：将移植的滑膜覆盖膜单次冷冻并立即解冻。也同样处理滑膜组织小碎块，以减少滑膜组织中存在的巨噬细胞的数目。加入该步骤，可获得更加均相的软骨组织转化。

实施例 III. 使用层叠的滑膜在体内修复关节软骨缺损

实施例 I（以上）所述的实验按如下改变：用尺寸约为缺损本身大小的滑膜层叠物填充缺损。在置入缺损之前，将每层滑膜都浸入 4.4mg/ml 的 BMP-2 溶液，以诱导转化为软骨组织。另外，在滑膜层之间，沉积少量的含转化因子（BMP-2, 4.4mg/ml）的纤维蛋白基质或微球，以实现转化因子控释。肉眼可见滑膜组织已转化为软骨样组织。

实施例 IV. 使用培养的滑膜细胞在体内修复关节软骨缺损

类似实施例 I（以上）所述的缺损治疗可如下进行：进行外科手术干预，取出适量的滑膜和/或滑液，优选取自待修复的关节，然后将获得的滑膜细胞体外培养，直到浓度达到 10000-300000 细胞/毫升溶液。可使用增殖剂加速培养滑膜细胞群的扩增。

然后将培养的滑膜细胞群悬液直接植入到缺损部位。局部麻醉下，进行小关节镜或手术干预。使用无菌的吸收巾，沾吸干燥缺损表面，然后用灭菌的蛋白聚糖降解酶溶液填充缺损空腔，处理 2-10 分钟，使软骨表面以及距缺损表面约 1-2μm 深处局部的蛋白聚糖降解。然后去

除蛋白聚糖降解酶，清洗缺损处。

然后将悬液或基质(优选浓度为 10000-300000 细胞/毫升溶液或基质）中的培养滑膜细胞植入到缺损处，优选与转化因子相结合，如 TGF-β，以促进滑膜细胞分化为产生软骨的软骨细胞。为防止植入细胞丢失到关节间隙，用一薄层生物可降解覆盖膜覆盖缺损部位表面，优选用滑膜。用缝合线，纤维蛋白胶，组织转谷氨酰胺酶等将覆盖膜与缺损部位边缘封住。如果使用缝合线连接滑膜覆盖膜，可将缝合线用适当浓度的转化因子如 BMP-2 浸透，以促进覆盖膜中的滑膜分化为软骨细胞。

植入培养的滑膜细胞以及覆盖生物可降解覆盖膜后，有层次地手术关闭关节腔。

实施例 V. 滑膜组织的原位转化

检查成年兔子中滑膜组织在 BMP-2 作用下的原位转化过程。研究共设五组，每组五只兔子。将含有 100ng/ml 负载 BMP-2 的脂质体的胶原基质缝合至每只动物膝关节的滑膜。植入胶原基质后，有层次地手术关闭关节腔。

在第 0，6，8，12 和 14 天进行关节的组织学检查。固定整个关节，并包埋在塑料中，然后制备 1.5mm 的连续切片。以这种方法可以观察到组织构成随时间而发生的改变。可分辨出四种组织类型：（1）正常滑膜组织；（2）新的结缔组织；（3）新软骨；和（4）新骨（具有骨髓）。

在第 6 天，只观察到正常的滑膜组织和新的结缔组织。第 8 天出现了软骨灶。第 10 天，新的软骨形成更多。第 12 天，出现骨灶，第 14 天，除了软骨外，可以见到相当量的骨。这些结果说明膝关节中的滑膜组织含有成熟干细胞，在适当的条件下，其能够转化为软骨和骨。