



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1471412 B

(45) 授权公告日 2010.10.20

(21) 申请号 01814068.8

A61L 27/22(2006.01)

(22) 申请日 2001.06.29

A61L 27/18(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2003.02.12

(56) 对比文件

CA 2219399 A1, 1999.04.24, 全文.

WO 9922747 A1, 1999.05.14, 说明书第6页  
第18行至第7页第2行.

US 5773033 A, 1998.06.30, 实施例1,2.

WO 9947186 A1, 1999.09.23, 全文.

WO 9907416 A1, 1999.02.18, 实施例1.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2001/000959 2001.06.29

(87) PCT申请的公布数据

W002/00272 EN 2002.01.03

(73) 专利权人 生物合成技术加拿大公司

审查员 周英

地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 卡罗琳·D·霍曼

迈克尔·D·布希曼 马克·D·麦基

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 黄益芬 巫肖南

(51) Int. Cl.

A61L 27/38(2006.01)

A61L 27/20(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 28 页 附图 28 页

(54) 发明名称

用于修复和再生软骨和其它组织的组合物以  
及该组合物的用途

(57) 摘要

本发明涉及修复人或动物的组织诸如软骨、  
半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、  
切除的肿瘤和溃疡等的新方法。该方法包括将  
温度依赖性聚合物凝胶组合物导入所述组织的  
步骤，使得所述组合物与该组织粘连并促进对修  
复该组织的细胞增殖的支持。所述的组合物除聚  
合物外优选包括血液成分，诸如全血、经处理的血  
液、静脉血、动脉血、来自骨的血液、来自骨髓的血  
液、骨髓、脐带血、胎盘血、红细胞、白细胞、单核细  
胞、血小板、血纤蛋白原、凝血酶和富含血小板的  
血浆。本发明还涉及用于本发明方法的新组合物。

1. 用于修复组织的聚合物组合物,所述的聚合物组合物包括聚合物和全血,其中所述聚合物是脱乙酰壳多糖。
2. 权利要求 1 所述的聚合物组合物,所述的聚合物可与全血混合,所述的聚合物在与所述全血混合时产生一种混合物,所述的混合物此时或在加热时转变成非液态,所述的混合物保留在导入部位并与其粘连而用于修复该组织。
3. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的聚合物起初溶于或悬浮于含有无机盐的缓冲液中。
4. 权利要求 3 所述的聚合物组合物,其中所述的无机盐选自由包括钠、钾、钙、和镁在内的盐组成的组。
5. 权利要求 3 所述的聚合物组合物,其中所述的无机盐选自由包括氯化物、磷酸盐和硫酸盐在内的盐组成的组。
6. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中将所述的组合物溶于或悬浮于含有有机盐的缓冲液中,所述的有机盐选自由甘油磷酸、果糖磷酸、葡糖磷酸、L-丝氨酸磷酸、腺苷磷酸、葡糖胺、半乳糖胺、HEPES、1,4-哌嗪双乙烷磺酸 (PIPES) 和 2-(N-吗啉代) 乙烷磺酸 (MES) 组成的组。
7. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的聚合物组合物具有 6.5-7.8 的 pH。
8. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的聚合物溶液具有调节至 250mOsm/L-600mOsm/L 之间生理值的渗透度。
9. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的全血选自由经处理的血液、静脉血、动脉血、来自骨的血液、来自骨髓的血液、骨髓、脐带血和胎盘血组成的组。
10. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的全血是经过抗凝处理的。
11. 权利要求 10 所述的聚合物组合物,其中所述的全血含有选自柠檬酸盐、肝素或 EDTA 的抗凝剂。
12. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的全血包括用于改善导入部位上的凝固 / 固化的促凝剂。
13. 权利要求 12 所述的聚合物组合物,其中所述的促凝剂选自由凝血酶、钙、胶原、鞣花酸、肾上腺素、腺苷二磷酸、组织因子、磷脂和凝固因子组成的组。
14. 权利要求 13 所述的聚合物组合物,其中所述的凝固因子是因子 VII。
15. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的全血是自体的或非自体的。
16. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中所述的聚合物相对于所述全血的使用比例在 1 : 100-100 : 1 之间改变。
17. 权利要求 2 所述的聚合物组合物,其中使用声波、搅拌、涡旋或用注射器多次抽吸将所述的聚合物与全血以机械方式混合。
18. 权利要求 2-17 中任意一项所述的聚合物组合物,其中所述的组织选自由软骨、半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤和溃疡组成的组。
19. 温度依赖性聚合物凝胶组合物在制备用于修复组织的药物中的应用,其中该组合物包含聚合物和全血,其中所述聚合物是脱乙酰壳多糖。
20. 权利要求 19 的应用,所述的聚合物可与全血混合,所述的聚合物在与所述全血混合时产生一种混合物,所述的混合物此时或在加热时转变成非液态,所述的混合物保留在

导入部位并与其粘连而用于修复该组织。

21. 权利要求 20 所述的应用,其中将所述的聚合物起初溶于或悬浮于含有无机盐的缓冲液中。

22. 权利要求 21 所述的应用,其中所述的无机盐选自由包括钠、钾、钙、和镁在内的盐组成的组。

23. 权利要求 21 所述的应用,其中所述的无机盐选自由包括氯化物、磷酸盐和硫酸盐在内的盐组成的组。

24. 权利要求 20 所述的应用,其中将所述的聚合物溶于或悬浮于含有有机盐的缓冲液中,所述的有机盐选自由甘油磷酸、果糖磷酸、葡糖磷酸、L-丝氨酸磷酸、腺苷磷酸、葡糖胺、半乳糖胺、HEPES、1,4-哌嗪双乙烷磺酸 (PIPES) 和 2-(N-吗啉代) 乙烷磺酸 (MES) 组成的组。

25. 权利要求 20 所述的应用,其中所述的聚合物组合物具有 6.5-7.8 的 pH。

26. 权利要求 20 所述的应用,其中所述的聚合物溶液具有调节至 250mOsm/L-600mOsm/L 之间生理值的渗透度。

27. 权利要求 20 所述的应用,其中所述的全血选自经处理的血液、静脉血、动脉血、来自骨的血液、来自骨髓的血液、骨髓、脐带血和胎盘血组成的组。

28. 权利要求 19 所述的应用,其中所述的全血是经过抗凝处理的。

29. 权利要求 28 所述的应用,其中所述的全血含有选自柠檬酸盐、肝素或 EDTA 的抗凝剂。

30. 权利要求 20 所述的应用,其中所述的全血包括用于改善导入部位上的凝固 / 固化的促凝剂。

31. 权利要求 30 所述的应用,其中所述的促凝剂选自由凝血酶、钙、胶原、鞣花酸、肾上腺素、腺苷二磷酸、组织因子、磷脂和凝固因子组成的组。

32. 权利要求 31 所述的应用,其中所述的凝固因子是因子 VII。

33. 权利要求 20 所述的应用,其中所述的全血是自体的或非自体的。

34. 权利要求 20 所述的应用,其中所述的聚合物相对于所述全血的使用比例在 1 : 100-100 : 1 之间改变。

35. 权利要求 20 所述的应用,其中使用声波、搅拌、涡旋或用注射器多次抽吸将所述的聚合物与全血以机械方式混合。

36. 权利要求 20-35 中任意一项所述的应用,其中所述的组织选自由软骨、半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤和溃疡组成的组。

37. 包含脱乙酰壳多糖溶液和全血的聚合物组合物在制备以细胞转运来修复或再生体内组织的药物中的应用,所述的脱乙酰壳多糖溶液包括 0.5-3% w/v 的脱乙酰壳多糖并将该溶液配制成热胶凝的溶液,使所述的溶液在注入待修复或再生的组织之前与细胞混合。

38. 权利要求 37 所述的应用,其中通过添加磷酸盐、甘油磷酸或葡糖胺诱导所述的脱乙酰壳多糖组合物成为热凝胶。

39. 权利要求 37 所述的应用,其中所述的脱乙酰壳多糖溶液具有 6.5-7.8 的 pH。

40. 权利要求 37 所述的应用,其中所述的细胞是自体的或非自体的。

41. 权利要求 37 所述的应用,其中所述的细胞选自原代细胞、传代细胞和遗传修饰的

细胞。

42. 权利要求 37 所述的应用,其中所述的细胞选自血小板、基质细胞和干细胞。
43. 权利要求 37 所述的应用,其中将所述的细胞悬浮于载体溶液中。
44. 权利要求 43 所述的应用,其中所述的载体溶液包括透明质酸、羟乙基纤维素、胶原、藻酸盐或水溶性聚合物。
45. 包含胶凝脱乙酰壳多糖溶液和全血的聚合物组合物在体外培养细胞中的应用,所述的脱乙酰壳多糖溶液包括 0.5–3% w/v 的脱乙酰壳多糖并将该溶液配制成热胶凝的溶液,使所述的溶液在体外培养前与细胞混合。
46. 权利要求 45 所述的应用,其中通过添加磷酸盐、甘油磷酸或葡糖胺诱导所述的脱乙酰壳多糖组合物成为热凝胶。
47. 权利要求 46 所述的应用,其中所述的脱乙酰壳多糖溶液具有 6.5–7.8 的 pH。
48. 权利要求 46 所述的应用,其中所述的细胞选自原代细胞、传代细胞和遗传修饰的细胞。
49. 权利要求 46 所述的应用,其中所述的细胞选自血小板、基质细胞和干细胞。
50. 权利要求 46 所述的应用,其中将所述的细胞悬浮于载体溶液中。
51. 权利要求 50 所述的应用,其中所述的载体溶液包括透明质酸、羟乙基纤维素、胶原、藻酸盐或水溶性聚合物。
52. 一种聚合物组合物,它含有 0.01–10% w/v 的脱乙酰壳多糖和全血,所述脱乙酰壳多糖是 20% –100% 脱乙酰化的,平均分子量在 1kDa–10MDa 范围。
53. 权利要求 52 所述的聚合物组合物,其中将所述的脱乙酰壳多糖溶于有机或无机磷酸盐缓冲液。
54. 权利要求 53 所述的聚合物组合物,其中所述的有机或无机磷酸盐缓冲液是含有磷酸盐或甘油磷酸盐的缓冲液。
55. 权利要求 53 所述的聚合物组合物,其中所述的脱乙酰壳多糖在所述组合物中是可溶态,所述的组合物具有 6.5–7.4 的 pH。

## 用于修复和再生软骨和其它组织的组合物以及该组合物的用途

[0001] 发明背景

### (a) 发明领域

[0002] 本发明涉及用于改善软骨组织和其它组织的修复并使它们再生的组合物和方法，所述的其它组织包括但不限于半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤和溃疡。

[0003] (b) 现有技术的描述

[0004] 1) 软骨的修复问题

[0005] 软骨：结构、功能、发育、病理学

[0006] 关节软骨覆盖动关节内的骨端以使运动力分布在骨结构下面，同时使关节具有几乎不产生摩擦的接触面。这些特性是由 II 型胶原和其它小胶原成分和高含量蛋白聚糖聚集蛋白聚糖组成的胞外基质所提供的。一般来说，纤维胶原网状结构耐拉伸和剪切力，而高度带电荷的聚集蛋白聚糖耐压缩和间隙液流。低摩擦特性是关节表面和滑液的特定分子组成以及组织间液加载在关节表面的过程中渗出的结果 (Ateshian, 1997 ;Higaki 等, 1997 ; Schwatz 和 Hills, 1998)。

[0007] 关节软骨是在前软骨间充质细胞凝聚和诱导表型从主要的 I 型胶原转换成 II 型胶原和聚集蛋白聚糖后的长骨发育过程中形成的 (Hall, 1983 ;Pechak 等, 1986)。当软骨细胞肥大并转变成 X 型胶原表达时由软骨形成骨，同时伴有血管侵入、基质钙化、成骨细胞出现和骨基质形成。在成年人中，薄层关节软骨保留在骨端并由软骨细胞通过合成、装配和更新胞外基质来维持 (Kuettner, 1992)。当因物理性创伤而发生骨折时或当更加逐渐的侵蚀（作为许多类型关节炎的特征）暴露软骨下的骨而产生关节痛症状时，发生关节软骨疾病 (McCarty 和 Koopman, 1993)。除关节软骨外，关节组织保留在成年人体内的几个身体部位上，诸如耳和鼻，这些区域通常是实施重建手术的主体。

[0008] 2) 软骨的修复：天然反应

[0009] 成年人对关节软骨的损伤具有有限的反应，这主要因缺乏血管化作用和存在致密的富含蛋白聚糖的胞外基质 (Newman, 1998 ;Buckwalter 和 Mankin, 1997 ;Minas 和 Nehrer, 1997)。前者抑制炎症和多能性修复细胞的发生，而后者拘禁了基质内居留的软骨细胞使之不易迁移。然而，透过软骨下骨的损害产生一个导管与高度血管化的骨连接而形成血纤蛋白凝块，俘获损害中骨和骨髓源的细胞，产生颗粒化组织。所述颗粒化组织中较深的部分重建软骨下的骨板，而上部转化成纤维软骨修复组织。这种组织可以短暂具有透明软骨的组织学外观，不过没有其力学性能 (Wei 等, 1997) 且由此不能够抵御局部受力，导致损伤后第一年结束前产生变性外观。因此，成年人关节软骨中对修复的自然反应是对部分厚度的损害不具有修复反应（而不是软骨流动和本位的软骨细胞克隆），而带有骨穿孔的全厚度损害显示出有限的和失败的反应。然而，年龄是一个重要因素，因为全厚度损害在未成熟关节软骨中愈合得情况好于在成年人关节软骨中的愈合情况 (DePalma 等, 1966 ;Wei 等, 1997)

且胎儿关节软骨中的浅撕裂伤在1个月内完全愈合而不涉及任何维管系统或骨衍生的细胞(Namba等,1998)。

[0010] 3) 用于辅助软骨修复的当前手段

[0011] 用于症状性软骨缺损的当前临床处理手段包括目的如下的技术:1)通过修整和清创术除去表面的不规则损害;2)通过钻孔、折断或磨蚀而穿透软骨下骨以便增加上述天然修复反应(即属于骨髓刺激技术);3)使用剩余软骨供咬合的关节重新排列或截骨术;4)药理调节;5)组织移植;和6)细胞移植(Newman,1998;Buckwalter和Mankin,1997)。已经证实这些方法中的大多数在减轻症状方面具有一定短期的疗效(几个月-几年),而没有一种能够一致证明在前几年后成功地修复关节损害。修整、清创、钻孔、折断和磨蚀关节成形术的骨髓刺激技术使得症状得到短暂缓解而产生最终降解的次级功能(subfunctional)的纤维软骨组织。对缺损部位提供生长因子的药理调节可以增加天然修复,但迄今为止仍不足以做到(Hunziker和Rosenberg,1996;Sellers等,1997)。含有存活软骨细胞的同种异体移植和自体移植骨软骨组织移植物可以使修复更为成功,但供体极为有限(Mahomed等,1992;Outerbridge等,1995)。

[0012] 4) 骨髓刺激

[0013] 骨髓刺激技术的种类包括清创术、修整、钻孔、显微断裂和磨蚀关节成形术。它们目前广泛用于矫形临床实践来治疗属于全厚度的即达到软骨下的骨且大小有限、一般为小于3cm<sup>2</sup>区域的关节软骨病灶损害。Pridie等人开始应用这些方法(Pridie,1959;Install,1967;DePalma等,1966),他们推断,因侵害软骨/骨界面而诱发骨出血进入无血管的软骨缺损处由此可能在关节软骨损害的区域内形成血块。然后这种血肿可以启动经典的伤口愈合情况级联发生,这些情况导致血管化组织的伤口内成功愈合或至少形成瘢痕(Clark,1996)。后来提出了对Pridie钻孔技术的变化技术,包括磨蚀关节成形术(Childers和Ellwood,1979;Johnson,1991)和显微断裂(Rodrigo等,1993;Steadman等,1997)。磨蚀关节成形术应用机械化设备以便研磨掉异常的致密软骨下骨而达到较软较深骨内的供血处。显微断裂技术应用尖锐的小工具或锥钻在软骨下骨板上钻足够深的孔(一般3-4mm),再次达到血供处并在软骨损害的内部形成血块。使用显微断裂技术的医师声称观察到高于钻孔的成功率,这是因缺乏任何加热诱发的坏死和软骨下骨板生物力学稳定性较低所造成的,所述的软骨下骨板带有大量较小的骨折孔而不是钻孔在板内产生的大缝隙(Steadman等,1998)。另一种用于治疗关节软骨病灶损害的相关技术是镶嵌式成形术(mosaicplasty)或骨软骨自体移植(OATS),其中软骨/骨圆柱体可从外周“未使用的”关节区转至含有软骨损害的高度负载的区域(Hangody等,1997)。

[0014] 在矫形专家中对于关节软骨各种损害应接受的治疗类型没有普遍一致的意见。也缺乏严格科学研究来证明这些治疗方法对特定适应证的功效。因此,对软骨损害治疗的选择主要取决于医师的训练、倾向和个人经验。缺乏一致意见的原因是多方面的,但包括所治疗损害类型的可变性,及“良好质量”血块成功形成的可变性,如果不受控制的话。与使用这些方法形成良好质量血块相关的某些问题在于:1)不受控制的骨出血性质,这种出血始终没有完全充满软骨损害处;2)在血块形成几分钟内发生的血小板介导的血块收缩减小了血块大小且可以使其从周围软骨中脱离(Cohen等,1975);3)滑液或循环关节镜检查液稀释骨血;和4)滑液的纤溶或血块溶解活性(Mankin,1974)。这些问题中的某些是离

体形成血块、然后将其切成一定大小并包入半月板缺损 (Arnoczky 等, 1988) 或骨软骨缺损 (Palette 等, 1992) 的一些研究的动机。与经典伤口愈合级联发生相类似的某些方法随后确实有助于缺损的愈合。这种方法确实使缺损更多地充满修复组织, 然而, 这种修复组织的质量一般是不可接受的, 它们主要是纤维性的而没有足够的力学性能。使用这种手段修复组织的满意度低, 其原因可能是 :1) 血小板介导的血块持续收缩 ;2) 因广泛离体操作而导致某些血液成分缺乏活力 ;和 3) 离体血块的固化妨碍了与软骨缺损周围的所有组织表面较好粘连并限制了缺损的填充。概括地说, 目前由矫形专家实施的用于治疗关节软骨病灶损害的临床方法主要取决于损伤内部血块的形成情况。然而, 能形成良好质量的血块, 充满损伤处并含有用于存活态伤口愈合的所有适宜成分 (血小板、单核细胞、血纤蛋白网状结构等), 产生了不持久且通常是不令人满意的结果。本发明的一个实施方案通过提供一种组合物和方法用于在全体积的非收缩基质中将这些血液产生的伤口愈合成分递送至关节软骨损伤部位从而改善了上述这种情况。

[0015] 5) 生物材料和生长因子

[0016] 已经提出了使用生物材料和生长因子来修复软骨损伤的几种实验性技术, 有时单独使用它们, 但通常将它们组合起来使用。与上述这类骨髓刺激技术的类似性是显而易见的。血块中的血纤蛋白支架可以被预制成的生物材料支架取代且血块中的天然促分裂因子和趋化因子可以被诸如重组生长因子这样的受使用者控制数量和种类的可溶性成分取代。这种手段的实例包括将血纤蛋白粘性物用于递送诸如胰岛素样生长因子 (Nixon 等, 1999) 和转化生长因子 (Hunziker 和 Rosenberg, 1996) 这样的重组蛋白。已经将其它生物制剂与诸如聚乳酸 (PLA)、聚乙醇酸 (PGA)、胶原基质和血纤蛋白粘性物包括骨形态发生蛋白 (Sellers 等, 1997 ;Sellers, 2000 ;Zhang 等, 专利 WO00/44413, 2000)、血管紧张肽样肽类 (Rodgers 和 Dizerega, 专利 WO 00/02905, 2000)、和含有称作骨蛋白或 BP 的多样蛋白质的骨提取物 (Atkinson, Patent WO00/48550, 2000) 这样的普通生物材料合并。在后一种方法中, 需要使用其它的基于血纤蛋白 / 凝血酶的粘合剂使 BP 浸渍的胶原海绵体保持在软骨缺损内, 从而产生相当的复杂且难以再生的伤口愈合环境。已经为辅助细胞粘连和细胞迁移而给生物材料包被纤连蛋白或 RGD 肽类 (Breckke 和 Coutts, 美国专利 6, 005, 161, 1999)。某些上述方法已经将骨髓刺激与手术后在滑液空间注入生长激素结合起来使用并取得了有限的成功 (Dunn 和 Dunn, 美国专利 5, 368, 051, 1994)。还提出了特定的生物材料组合物, 诸如胶原、脱乙酰壳多糖和糖胺聚糖类的混合物 (Collombel 等, 美国专利 5, 166, 187, 1992 ;Suh 等, 专利 WO99/47186, 1999)、粉碎的软骨和骨浆膏 (Stone, 美国专利 6, 110, 209, 2000)、基于多成分胶原的构建体 (Pahcence 等, 美国专利 6, 080, 194, 2000) 和可治愈的化学反应性的甲基丙烯酸酯树脂 (Braden 等, 美国专利 5, 468, 787, 1995)。这些手段中没有一种已经达到临床应用的标准, 这是由于它们不能克服下列这些问题 :1) 在软骨缺损中生物材料不能保留和粘连 ;2) 缺乏这些分子活性形式以有效的浓度长期持续释放 ;3) 递送分子的多种和未加控制的生物活性 ;4) PGA 和 PLA 的酸性降解产物的细胞毒性 ;5) 载体生物材料不适宜的降解动力学特性或免疫原性 ;和 6) 活性生物制剂不需要的全身或异位影响 (器官钙化)。成功实施这些手段需要解决这些问题中的某些或全部。

[0017] 6) 细胞移植

[0018] 近来对于涉及细胞移植的技术已引起了较多的关注, 这是因为它能通过将大量的

下列这几种细胞在离体传代和操作后导入关节缺损处而增强软骨修复,这些细胞是:自体软骨细胞(Grande等,1989;Brittberg等,1994和1996;Breinan等,1997)、同种异体软骨细胞(Chesterman和Smith,1968;Bently和Greer,1971;Green,1977;Aston和Bently,1986;Itay等,1987;Wakatini等,1989;Robinson等,1990;Freed等,1994;Noguchi等,1994;Hendrickson等,1994;Kandel等,1995;Sams和Nixon,1995;Specchia等,1996;Frankel等,1997;Hyc等,1997;Kawamura等,1998)、异种软骨细胞(Homminga等,1991)、软骨膜细胞(Chu等,1995;Chu等,1997)或自体和同种异体骨髓衍生的间充质干细胞(Wakatini等,1994;Butnariu-Ephrat,1996;Caplan等,1997;Nevo等,1998)。细胞移植手段具有超过其它软骨修复技术的某些潜在优点在于:它们1)最大程度地减轻其它软骨和骨的损伤;2)由于离体细胞产生而减少了对供体的依赖;3)可以模拟软骨发育的天然生物过程;和4)可以提供经处理的细胞类型以便进行更好的修复。使用自体的软骨细胞的一种技术属于公众领域且是已经用于几千美国和瑞典患者的可得到的技术(<http://www.genzyme.com>)。在这项技术中,从未加载区域的软骨活检组织分离软骨细胞,在几周内增殖,且在从患者胫骨收集的缝合和血纤蛋白密封的骨膜膜片下通过注射而重新导入软骨损害处。对其疗效提出了疑问(Messner和Gillquist,1996;Brittberg,1997;Newman,1998)且令人遗憾地不得而知,因缺乏完整的FDA所要求的有对照的和随机化的临床试验。近来的动物研究表明,注射了传代的自体软骨细胞几乎没有观察到愈合,其结果类似于使用骨髓刺激所观察到的结果(Breinan等,1997和Breinan等,2000)。因此,对缺损进行手术可能在该方法中同样是诱导修复的主要因素。不过,由于细胞移植存在许多潜在的效益,所以在过去两年中已经授于了大量专利来保护自体的软骨细胞处理的有关方面(Tubo等,美国专利5,723,331,1998;Villeneuve,美国专利5,866,415,1999)以及下列这些细胞的用途和制备:脂肪细胞(Meuller和Thaler,专利5,837,235,1998;Halvorsen等,专利EP 1 077 253,2001)、造血前体(Peterson和Nousek-Goebl,美国专利6,200,606,2001)、羊膜细胞(Saciker,1997)、间充质干细胞(Caplan和Hyansworth,美国专利5,811,094,1998;Naughton和Naughton,美国专利5,785,964,1998;Naughton和Willoughby,美国专利5,842,477,1998;Grande和Lucas,美国专利5,906,934,1999;Johnstone和Yoo,美国专利5,908,784,1999),并保护那些使用软骨细胞/成纤维细胞及它们的先祖细胞、上皮细胞、脂肪细胞、胎盘细胞和脐带血细胞的一般技术(Purchio等,美国专利5,902,741,1999),所有这些均用于软骨的修复。

[0019] 7) 细胞递送问题

[0020] 用于辅助软骨修复的细胞移植必不可少地涉及一种技术使存活的和功能性移植细胞递送至并保留在损伤部位。当使用或不用支持物基质使细胞离体生长时,可以通过制备稍大于伤口的植入物并迫使其进入其中而进行压入配合(press-fitting)(Aston和Bentley 1986;Wakatini等,1989;Freed等,1994;Chu等,1997;Frankel等,1997;Kawamura等,1998)。压入配合要求应用的组织是离体形成的,由此对植入部位的几何、物理和生物因素而言均不能做到最佳。缝合或固定植入物有助于它的保留(Sams和Nixon,1995),然而已经知道,缝合对关节表面是又一种损伤,诱导另外的有限修复过程(Breinan等,1997)。已经尝试使用生物粘性物,获得了有限的成功(Kandel等,1995;Jurgenson等,1997)。当植入物不适用于压入配合时,如胶原凝胶或血纤蛋白凝块进行收缩,或当植入不

合支持物基质的单独细胞时,常使用骨膜或另一类似组织的缝合膜片来使植入物保留在缺损部位内(Grande 等,1989;Brittberg 等,1994;Grande 等,1989;Brittberg 等,1996;Breinan 等,1997)。这类技术的疗效可能是由于骨膜能刺激软骨的形成(O'Driscoll 等,1988 和 1994),但要再次经历缝合和涉及骨膜采集和关节切开术的手术的复杂性问题。还使用粘性透明质酸溶液递送细胞深入至全厚度的损伤部位(Robinson 等,1990;Butnariu-Ephrat,1996)。作为用于软骨修复的细胞来源,近来公布了软骨修复中的递送载体的几项专利,其范围是从凝胶基质(Griffith 等,1998;Caplan 等,1999)到缝合线与纤维(Vacanti 等,1998;Vacanti 和 Langer,1998a 和 1998b),到螺型装置(Schwartz,1998)和磁系统(Halpern,1997)。综合上述可表明,目前用于软骨修复的细胞递送技术显然还不是最佳的。理想的细胞递送载体将是载有细胞的聚合物溶液,它在注入缺损部位时固化、粘连并充满伤口且形成短暂的可生物降解的支架,允许适宜的细胞分化并合成和装配致密的具有力学功能的关节软骨胞外基质。

[0021] 8) 包括半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤和溃疡在内的其它组织的修复

[0022] 肌骨骼和其它组织的天然和辅助修复是非常宽的技术领域,具有大量复杂的生物过程且有多种途径来促进修复过程(如在骨修复中),在几乎没有内在修复能力(正如在软骨修复中)的组织中辅助修复,并减少瘢痕形成(正如在烧伤治疗中)(Clark,1996)。尽管在所涉及的生物元件和过程中必然有不同,但是伤口修复中(非胎儿)的总体情况是相同的。这些情况包括在组织破损部位处形成血块、从血小板中释放趋化因子和促分裂因子、流入炎症细胞和多能修复细胞、血管生成、和最终通过修复细胞的分化和合成胞外基质成分来完成修复过程。在一种成功的修复结果中,特定的局部组织环境和特定的局部多能性修复细胞群将会形成准确类型的组织、替换的骨、替换的皮肤等。考虑到组织修复过程中一般成分的相似性,所以并不令人意外的是在一种组织中帮助修复的方法也可以在一定程度上成功地帮助其它组织的修复。这种可能性越来越有希望,只要帮助修复的方法和组合物是基于增加自然伤口愈合的级联过程的有些方面而不显著偏离这种在不同程度上被优化的时间顺序。在本发明中,提出了特定的组合物和方法来为组织的修复部位提供更有效的、更具粘连性和非收缩的血块。本发明对最难以修复的组织之一即软骨的修复列出了实施例和优选实施方案。然而,保持相同基本原理来应用该组合物和方法及其改进来辅助修复其它组织包括半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤和溃疡,这对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0023] 9) 脱乙酰壳多糖在制药、伤口愈合、组织修复和作为止血剂的应用

[0024] 主要由虾和螃蟹壳的天然成分壳多糖的碱性脱乙酰化产生的脱乙酰壳多糖是一族含有 1-4 个连接的葡糖胺(占主要部分)和 N-乙酰基-葡糖胺单体的直链多糖(Austin 等,1981)。脱乙酰壳多糖及其氨基取代的衍生物是 pH 依赖性的、可生物降解的和生物相容性的阳离子型聚合物,已经将它们用于伤口愈合和骨诱导的生物医学工业(Denuziere 等,1998;Muzzarelli 等,1993 和 1994)、药物和基因递送(Carreno-Gomez 和 Duncan,1997;Schipper 等,1997;Lee 等,1998;Bernkop-Schnurch 和 Pasta,1998)及细胞生长和细胞包囊用的支架(Yagi 等,1997;Eser Elcin 等,1998;Dillon 等,1998;Koyano 等,1998;Sechriest 等,2000;Lahiji 等,2000;Suh 等,2000)。脱乙酰壳多糖称作粘性

(mucoadhesive) 聚合物 (Bernkop-Schnurch 和 Krajicek, 1998), 因为它通过离子和疏水作用与胃肠道上皮的粘液层粘连, 由此有利于口服药物的递送。脱乙酰壳多糖的生物降解作用是通过其对由壳多糖酶 (Fukamizo 和 Brzezinski, 1997)、溶菌酶 (Sashiwa 等, 1990)、纤维素酶 (Yalpani 和 Pantaleone, 1994)、蛋白酶 (Terbojevich 等, 1996) 和脂酶 (Muzzarelli 等, 1995) 产生的酶促裂解的易感性而发生的。近来已经证实软骨细胞能够表达人的脱乙酰壳多糖酶类似物 chitotriosidase (Vasios 等, 1999); 其生理作用可能发生在乙酰透明质酸的降解过程中, 这是一种与脱乙酰壳多糖具有一定相似性的直链多糖加工过程, 因为它由 N-乙酰基 - 葡糖胺的二糖和葡糖醛酸组成。

[0025] 在许多报导 (Sal1 等, 1987; Bartone 和 Adickes, 1988; Okamoto 等, 1995; Inui 等, 1995; Shigemasa 和 Minami, 1996; Ueno 等, 1999; Cho 等, 1999; Stone 等, 2000; Lee 等, 2000) 和发明 (Sparkes 和 Murray, 专利 4,572,906, 1986; Mosbey, 专利 4,956,350, 1990; Hansson 等, 专利 5,894,070, 1999; Gouda 和 Larm, 专利 5,902,798, 1999; Drohan 等, 专利 6,124,273, 2000; Jorgensen WO98/22114, 1998) 中已经提出脱乙酰壳多糖单独和含有其它成分的不同制剂可以刺激真皮、角膜和硬组织的修复。最常引用作为有益于伤口修复过程的脱乙酰壳多糖的特性是其生物降解性、粘连性、防脱水和作为细菌侵袭的屏障。已经声称的其它特性是其细胞活化和趋化性 (Peluso 等, 1994; Shigemasa 和 Minami, 1996; Inui 等, 1995)、其止血活性 (Malette 等, 1983; Malette 和 Quigley, 专利 4,532,134, 1985) 和明显能通过增加疏松型颗粒组织而限制纤维组织形成和瘢痕形成 (Bartone 和 Adickes, 1988; Stone 等, 2000)。尽管普遍认为脱乙酰壳多糖在伤口愈合中的有益作用是很显然的, 但是对其确切的作用机理尚不了解, 也没有最有效的施用方式, 即作为粉末、混悬液、海绵体、膜、固体凝胶等。其作用机理不明确的部分原因可能是许多预先的研究使用了化学上不确定 (乙酰基含量和分布、分子量) 且纯度不明的脱乙酰壳多糖。脱乙酰壳多糖有意义的止血能力还导致了将其直接用于减少移植植物和伤口部位处的出血 (Malette 等, 1983; Malette 和 Quigley, 专利 4,532,134, 1985)。一些研究指出脱乙酰壳多糖的止血活性仅来源于其粘着红细胞的能力 (Rao 和 Sharma, 1997), 而其它研究认为其聚阳离子型胺的性质可以激活血小板而释放凝血酶并启动经典的凝固级联机制, 由此使其可用作混有血纤蛋白和纯化的自体血小板的止血剂 (Cochrum 等, 专利 5,773,033, 1998)。在本发明的上下文中, 重要的是注意到在这些报导和发明中完全没有任何实施例来说明血液与脱乙酰壳多糖在溶液中混合并在治疗上通过使修复部位形成含有脱乙酰壳多糖的血块从而帮助组织修复。

[0026] 脱乙酰壳多糖在生理 pH 和离子强度下的低溶解性是通常存在的一种技术上的困难, 由此限制了其以溶液态的应用。因此一般说来, 脱乙酰壳多糖的溶解是通过在 3.0-5.6pH 的酸性水溶液中的胺基团质子化而实现的。这类脱乙酰壳多糖溶液保持可溶性至 pH 接近 6.2, 其中对胺基团的中和减少了链间静电排斥并使氢键、疏水作用和范德华力的吸引力在 pH 接近 6.3-6.4 下能产生聚合物沉淀。在先一项发明 (Chenite 专利 WO99/07416; Chenite 等, 2000) 已经指出了将多元醇 - 磷酸二盐 (即甘油 - 磷酸) 与脱乙酰壳多糖水溶液混合可以提高溶液的 pH, 同时避免沉淀。在这些特定盐存在的情况下, 基本浓度 (0.5-3%) 和高分子量 (>几百 kDa) 的脱乙酰壳多糖溶液在 pH 为 6.8-7.2 的生理上可接受的中性区域内在低温或室温下可长时间期限保持液体状态。这一方面有利于脱乙酰壳多糖与细胞以维持它们存活力的方式进行混合。另一种重要特性在于这类脱乙

酰壳多糖 / 多元醇 - 磷酸酯 (C/PP) 水溶液在加热至适宜温度下时固化或胶凝, 其中所述的适宜温度可使注入身体各部位 (例如其中可以在裸鼠皮下空间内) 的混合脱乙酰壳多糖 / 细胞溶液形成软骨结节 (Chenite 等, 2000)。重要的是注意到某些其它研究已经使脱乙酰壳多糖在生理 pH 下保持可溶性状态, 而这些研究必须降低脱乙酰壳多糖的浓度 (在 Lu 等的 Biomaterials 1999 中达到 0.1%) 或降低脱乙酰壳多糖分子量和脱乙酰化的程度 (在 Cho 等的 Biomaterials 1999 中分别达到了 ~ 350kD 和 50%)。其它研究也证实脱乙酰壳多糖提供了支持软骨细胞和成骨细胞表型的微环境 (Suh 等, 2000; Lahiji 等, 2000; Sechrist 等, 2000), 然而, 这些研究并非基于可以与细胞混合并注射形式的液体脱乙酰壳多糖。最终用 BMP7 浸渍 NN- 二羧甲基脱乙酰壳多糖海绵体并将其放入家兔的骨软骨缺损中 (Mattioli-Belmonte, 1999)。在此再次观察到了一些改善的组织化学和免疫组织化学的结果, 然而, 修复组织没有完全填充缺损且在该缺损内显然难以保留该结构, 看起来这是难以克服的难题。本发明克服了这些问题并提供了几种新型溶液用于递送修复软骨和其它组织用的组合物。

[0027] 10) 现有技术的概述

[0028] 在对辅助软骨修复的现有技术的概述中, 已经提出了并实验测试了用于改善极为有限的天然关节软骨修复反应的许多技术。这些技术中的某些已经达到了临床实践可接受的某种程度, 但这主要是由于没有任何实际和显著有效的改善修复反应的方法可与应用骨髓刺激技术时发现的情况相比较。本发明提出并解决了应用细胞和血液成分修复关节软骨中的几种主要疑难问题。对开发有效的软骨修复方法的一个主要阻碍在于没有一种组合物和方法可在需要进行软骨生长的空间 (需要组织形成整体或重建的软骨缺损或其它部位) 内提供一种适宜的大分子环境。这种大分子环境或基质应当是: 1) 适宜装载液态的活性生物成分 (细胞、蛋白质、基因、血液、血液成分); 2) 然后可注入缺损部位以便填充需要软骨生长的整个缺损或区域; 3) 有一个主要的非蛋白质环境以便限制细胞粘连和细胞介导的基质收缩, 这两者均可诱导纤维细胞表型 (纤维组织产生) 而不是软骨细胞表型 (软骨组织产生) 且还可能使基质与缺损壁脱离; 4) 有细胞相容性, 从而具有生理水平的 pH 和渗透压且不含任何细胞毒性成分; 5) 是可降解的, 但有足够长的时间以便使包括的生物活性成分完全重建一个能够支持力学负载而不会降解的软骨组织。此外, 可以应用这些特性的组合以最少的改变去修复其它组织诸如半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤和溃疡, 这是本领域技术人员显而易见的。

[0029] 因此需要有一种新的组合物用于修复和再生软骨组织。

[0030] 发明概述

[0031] 本发明的一个目的是提供一种用于修复和再生软骨组织的新型组合物。

[0032] 本发明提供了一种用于软骨组织或诸如半月板 (meniscus)、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤、和溃疡这样的其它组织的修复、再生、重建或形成整体的组合物。

[0033] 本发明还涉及一种可与生物成分混合并置于或注入体内部位的聚合物溶液的应用, 其中所述的混合物帮助组织的修复、再生、重建或形成整体 (bulking)。修复的组织例如包括但不限于软骨、半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤和溃疡。

[0034] 所述的生物成分优选基于血液、血液成分或分离的细胞, 来源于自体或非自体均

可。

[0035] 本发明还提供了一种修复患者组织的方法，所述的方法包括将温度依赖性聚合物凝胶组合物导入所述组织的步骤，使得所述的组合物与该组织粘连并促进对修复该组织的细胞增殖的支持。

[0036] 所述的组合物优选包括至少一种血液成分。

[0037] 本发明还提供了一种修复患者组织的方法，所述的方法包括将聚合物组合物导入所述组织的步骤，所述的聚合物组合物可与至少一种血液成分混合，所述的聚合物组合物在与所述血液成分混合时产生一种混合物，所述的混合物此时或在加热时转变成非液态，所述的混合物保留在导入部位并与其粘连而用于修复所述组织。

[0038] 所述的聚合物可以是改性的或天然的多糖，诸如脱乙酰壳多糖 (chitosan)、壳多糖 (chitin)、乙酰透明质酸 (hyaluronan)、糖胺聚糖 (glycosaminoglycan)、硫酸软骨素 (chondroitin)、硫酸角质素 (keratan)、硫酸皮肤素 (dermatan)、肝素和硫酸肝素。

[0039] 所述的聚合物组合物可以包括诸如可溶性胶原或可溶性明胶这样天然的、重组的或合成的蛋白质或诸如例如聚赖氨酸这样的聚氨基酸。

[0040] 所述的聚合物组合物可以包括聚乳酸、聚乙醇酸、含有羧基、氨基、磺酸基 (sulfonic)、膦酸基 (phosphonic)、氧次膦酸基 (phosphenic) 官能团的含或不含其它官能团的合成均聚物和嵌段共聚物，所述的其它官能团诸如例如但不限于羟基、硫醇基、烷氧基、芳氧基、酰氧基和芳酰氧基。

[0041] 将所述的聚合物组合物优选最初溶于或悬浮于含有无机盐的缓冲液中，所述的无机盐诸如有钠、氯化物、钾、钙、镁、磷酸盐、硫酸盐和羧酸盐。

[0042] 可以将所述的聚合物组合物溶于或悬浮于含有有机盐的缓冲液中，所述的有机盐诸如有甘油磷酸、果糖磷酸、葡糖磷酸、L-丝氨酸磷酸、腺苷磷酸、葡糖胺、半乳糖胺、HEPES、PIPES 和 MES。

[0043] 所述的聚合物组合物优选具有 6.5–7.8 的 pH 和调节至 250mOsm/L–600mOsm/L 之间生理值的渗量 (osmolarity)。

[0044] 所述的血液成分例如可以是但不限于全血、经处理的血液、静脉血、动脉血、来自骨的血液、来自骨髓的血液、骨髓、脐带血或胎盘血。它还可以包括红细胞、白细胞、单核细胞、血小板、血纤蛋白原、凝血酶或富含血小板的不含红细胞的血浆。

[0045] 所述的血液成分还可以包括诸如柠檬酸盐、肝素或 EDTA 这样的抗凝剂。与此相反的是所述的血液成分可以包括用于导入部位改善凝固 / 固化的促凝剂 (pro-coagulant)，所述的促凝剂诸如有凝血酶、钙、胶原、鞣花酸、肾上腺素、腺苷二磷酸、组织因子、磷脂和类似于因子 VII 这样的凝固因子。

[0046] 所述的血液成分可以是自体的或非自体的。

[0047] 所述的聚合物组合物与所述血液成分的应用比例优选在 1 : 100–100 : 1 之间改变。

[0048] 优选使用声波、搅拌、涡旋震荡或用注射器多次抽吸将所述的聚合物组合物与血液成分以机械方式混合。

[0049] 可以修复或再生的组织例如有但不限于软骨、半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、上颌面组织、颞下颌组织、脓肿、切除的肿瘤、或溃疡。在某些情况中，体内的导入

部位可以经手术方法为除去异常组织做好准备。这类过程可以通过穿刺 (piercing)、磨蚀 (abrading) 或打孔 (drilling) 进入相邻组织区域或血管化区域来进行,使其产生通道用于所述的组合物聚合物迁移入需要修复的部位。

[0050] 本发明进一步提供了一种脱乙酰壳多糖溶液,用于在体内细胞递送以便修复或再生组织,所述的脱乙酰壳多糖溶液包括 0.5–3% w/v 的脱乙酰壳多糖并将该溶液配制成熟胶凝的溶液,使所述的溶液在注入待修复或再生组织前与细胞混合。将溶液诱导成热凝胶的方法,仅举几个例子,如可以通过添加磷酸盐、甘油磷酸或葡糖胺。优选的是,该脱乙酰壳多糖溶液具有 6.5–7.8 的 pH。

[0051] 所述的细胞可以选自例如由原代细胞、传代细胞、选择的细胞、血小板、基质细胞、干细胞和遗传修饰的细胞组成的组。优选将所述细胞悬浮于载体溶液中,所述的载体溶液诸如含有透明质酸、羟乙基纤维素、胶原、藻酸盐或水溶性聚合物的溶液。

[0052] 本发明还提供了一种用于体外培养细胞的胶凝脱乙酰壳多糖溶液,所述的脱乙酰壳多糖溶液包括 0.5–3% w/v 的脱乙酰壳多糖并将该溶液配制成熟胶凝的溶液,使所述的溶液在体外培养前与细胞混合。

[0053] 优选的是,所述的聚合物组合物含有 0.01–10% w/v 的平均分子量为 1kDa–10Mda 的 20% –100% 的脱乙酰化的脱乙酰壳多糖和一种血液成分。

[0054] 本发明进一步提供了一种用于修复组织的聚合物组合物及其应用。还可以将该组合物用于制备组织修复用的药物。

[0055] 为了本发明的目的,下面定义了下列术语。

[0056] 术语“聚合物”或“聚合物溶液”两者在本申请中是可以互换使用的。它们是指但不限于聚合物溶液、聚合物混悬液、聚合物颗粒或粉末和聚合物胶束混悬液。

[0057] 术语“修复”在用于软骨和其它组织时是指但不限于组织的修复、再生、重建、重构或形成整体。

[0058] 附图简述

[0059] 附图 1A–1F 是聚合物溶液与细胞混合并在体外固化以及软骨生长培养的示意图;

[0060] 附图 2A–2C 说明了包裹在脱乙酰壳多糖 / 甘油磷酸凝胶中和培养后软骨细胞的存活力;

[0061] 附图 3A–3E 说明了根据糖胺聚糖 (GAG) 累积所确定的体外脱乙酰壳多糖凝胶内的软骨形成情况;

[0062] 附图 4 解释了在脱乙酰壳多糖凝胶中培养 0、14 和 20 天的原代软骨细胞对由其所表达的软骨特异性 mRNA 进行的 RNA 酶保护分析;

[0063] 附图 5 解释了在脱乙酰壳多糖凝胶中培养 0、14 和 20 天的原代软骨细胞对由其所表达的软骨特异性蛋白质进行的蛋白质印迹分析;

[0064] 附图 6 说明了与和不与软骨细胞一起培养的凝胶圆片的力学性能;

[0065] 附图 7 是聚合物与细胞混合并注入小鼠皮下的示意图;

[0066] 附图 8A 和 8B 说明了对在裸鼠皮下培养的软骨进行的甲苯胺蓝组织学分析;

[0067] 附图 9 解释了对于含有或不含原代软骨细胞的脱乙酰壳多糖凝胶的体内植入物中表达的软骨特异性 mRNA 进行的 RNA 酶保护分析;

[0068] 附图 10 解释了对用含有原代软骨细胞的脱乙酰壳多糖凝胶的小鼠植入物在体内

表达的软骨特异性蛋白质进行的蛋白质印迹分析；

[0069] 附图 11 说明了在裸鼠皮下培养的软骨植入物的力学性能；

[0070] 附图 12A 和 12B 说明了热胶凝脱乙酰壳多糖溶液与离体 (ex vivo) 猪完整关节的股骨髁 (femoral condyles) 内只有软骨缺损的粘连。

[0071] 附图 13A 和 13B 说明了将热胶凝脱乙酰壳多糖溶液加载在家兔体内的软骨缺损上和 24 小时的体内保留情况；

[0072] 附图 14 说明了热胶凝脱乙酰壳多糖溶液在注射后 24 小时在家兔的软骨缺损中的保留情况；

[0073] 附图 15A 是表示血液 / 聚合物混合物制备、混合和体外固化的示意图；

[0074] 附图 15B 和 15C 说明了液体血液 / 聚合物在琼脂糖孔 (附图 15B) 或由玻璃或塑料制成的管 (附图 15C) 中的体外固化情况；

[0075] 附图 16 说明了使用来自三个不同物种的血液的血液 / 脱乙酰壳多糖混合物与单独的血液相比的平均固化时间；

[0076] 附图 17A 说明了根据在玻璃小瓶中沉积后血浆随时间释放所确定的血液或血液 / 聚合物混合物的血块收缩情况；

[0077] 附图 17B 和 17C 说明了固体血液和血液 / 聚合物混合物收缩后 28 小时在玻璃管内 (附图 17B) 的或注在琼脂糖孔内且在蒂罗德 (Tyrode) 缓冲液中保温的自由溶胀 (free-swelling) 圆片 (附图 17C) 的物理外观；

[0078] 附图 18 说明了液体脱乙酰壳多糖混合物而非其它液体多糖溶液使肝素介导的抗凝逆转；

[0079] 附图 19A-19C 解释了血液 / 聚合物混合物的组织学情况；

[0080] 附图 20A 和 20B 说明了与脱乙酰壳多糖溶液混合后白细胞和血小板的存活力；

[0081] 附图 21 解释了血液蛋白从体外形成的血液 / 聚合物混合物中和单独的血液中的延长释放情况；

[0082] 附图 22A-22C 说明了用于改善关节软骨缺损愈合的聚合物 / 血液混合物的制备、混合和注射；

[0083] 附图 22D 和 22E 是治疗人体关节软骨使之愈合的示意图；

[0084] 附图 23A 和 23B 解释了血液 / 聚合物混合物递送至带有穿透骨的孔的软骨缺损后 1 周时, 来源于骨髓并迁移至该软骨缺损处的修复细胞增强的趋化性; 和

[0085] 附图 24A 和 24B 说明了用血液 / 聚合物混合物处理的缺损内透明软骨的生长情况与未处理的缺损内纤维组织的生长情况的比较。

#### [0086] 发明详述

[0087] 当与血液或血液成分合并时, 聚合物可以是水溶液形式或含水混悬液形式或颗粒态, 该聚合物制剂的主要特征在于: 1) 它可与血液或血液的选择成分混合; 2) 所得混合物是可注射的或可以将其放置在需要进行组织修复、再生、重建或形成整体的身体某一部位上或其内; 和 3) 该混合物对放置部位上的组织的修复、再生、重建或形成整体具有有益作用。

[0088] 优选的实施方案如实施例 5 中所示, 其中使用的天然多糖脱乙酰壳多糖溶液的浓度为 1.5% w/v 且它溶于 pH 为 6.8 的 0.135 摩尔 / 升甘油磷酸二钠缓冲液。按照 1 份聚

合物溶液与 3 份血液的比例将该溶液与家兔外周血混合。然后将这种聚合物 / 血液混合物注入经外科手术准备好的家兔关节软骨缺损，其中它在 5 分钟内固化（附图 22）。对愈合过程的组织学观察结果显示，在 6-8 周后产生透明软骨即促进了修复（附图 24）。不接受聚合物 / 血液混合物的对照组缺损非功能性纤维或纤维软骨组织的愈合或不完全愈合（附图 24）。该实施例表明聚合物 / 血液混合物的应用可以使所修复的组织比单纯在伤口部位上诱导放血更有效地愈合且功能性更强。对本领域技术人员而言显然可以对本发明稍加改变。可以用其它聚合物和聚合物或聚合物共混物的其它制剂取代脱乙酰壳多糖溶液，条件是它们保持上一段落中所述的三个特征。显然，这一方法可以平凡地用于修复软骨以外的组织，诸

[0089] 如半月板、韧带、腱、骨、皮肤、角膜、牙周组织、脓肿、切除的肿瘤、和溃疡。将其用在使组织形成整体和组织重建中也是显而易见的。

[0090] 我们提出一些实施例和实验证据来说明本发明可能的作用机理，它们包括：1) 使血液在固化前与聚合物混合由此来抑制典型的血小板介导的血凝块收缩（附图 17）；2) 产生维持整个体积的支架且由此更好地充满缺损以便于组织修复（附图 18）；3) 固化聚合物 / 血液混合物与周围组织粘连（附图 22A）；4) 趋化和促分裂蛋白因子从聚合物 / 血液混合物中释放比从简单的血凝块中释放较为缓慢（附图 21）；5) 白细胞和血小板在所述的聚合物 / 血液混合物中维持存活（附图 20）；和 6) 在修复部位中提供的多糖环境比纯蛋白基质更有助于软骨形成（附图 2-6、8-10、24）。经证实这些现象在我们的实施例中均出现了。然而，这些证明并不排斥其它重要情况发生的可能性，诸如那些涉及聚合物的细胞降解动力学和脱乙酰壳多糖的内源性因子结合 / 集中 (concentration) 的情况。

[0091] 本发明的第二个优选的实施方案如实施例 1 和 2 中所示，其中将热胶凝脱乙酰壳多糖溶液用于将原代软骨细胞递送至小鼠皮下区域或体外递送至培养室。在这种情况下，没有血液成分使单独的脱乙酰壳多糖溶液部分必须具有胶凝能力且这一特性是使用甘油磷酸和其它类似缓冲液的脱乙酰壳多糖溶液的特定制剂所赋予的。在我们的实施例中，我们证实可以将所述的聚合物溶液与细胞混合并将这种聚合物 / 细胞溶液在体内或体外进行注射，此时它会胶凝，从而维持细胞的功能性和存活力（附图 1-11）。可以在与脱乙酰壳多糖溶液混合前将细胞重新悬浮于生理缓冲液或诸如纤维素的等渗缓冲液这样的其它细胞载体混悬液中。当将原代软骨细胞与本聚合物溶液一起注射时，我们列出的数据表明软骨组织在体外（附图 2-6）和体内（附图 8-11）形成。将本发明的该实施方案稍加修改和扩展，对本领域技术人员来说是显而易见的，例如，其中可以使用其它细胞类型且可以改变脱乙酰壳多糖和缓冲液的浓度而获得相同的结果。

[0092] 通过参照下面的实施例可以更容易地理解本发明，给出这些实施例是用于解释本发明而不是用来限定本发明的范围。

[0093] 实施例 1

[0094] 将热胶凝脱乙酰壳多糖溶液与原代软骨细胞混合以用于软骨的体外生长

[0095] 将脱乙酰壳多糖 (0.22g, 85% 脱乙酰化的) 的 HCl 盐粉末暴露在紫外线照射的生物层流式通风橱内灭菌，然后将其溶于 7.5ml H<sub>2</sub>O 使 pH 近似为 5.0。将 D(+) - 葡糖胺 (0.215g, MW 215.6) 溶于 10ml 的 0.1M NaOH 并使用 22 μm 孔大小的盘式滤器进行过滤灭菌。将甘油磷酸 (0.8g, MW 297, 包括 4.5 摩尔水 / 摩尔甘油磷酸) 溶于 2.0ml 的 H<sub>2</sub>O 并使

用 $22\text{ }\mu\text{m}$ 孔大小的盘式滤器进行过滤灭菌。在无菌条件下将 $2.25\text{ml}$ 的葡糖胺溶液逐滴加到脱乙酰壳多糖溶液中，同时在 $4^\circ\text{C}$ 的温度下搅拌。然后在相同条件下加入 $1\text{ml}$ 的甘油磷酸溶液。这一最终溶液在延长的一段时期（例如数天）仍然是液体且保持如此，条件是将温度保持较低、即接近 $4^\circ\text{C}$ 。该溶液的pH是生理性的，在 $6.8$ ，且渗量也是生理性的，约为 $376\text{mOsm/kg-H}_2\text{O}$ 。将这两个参数保持在维持细胞存活力所要求的限度内是很重要的。这些限度随细胞类型的不同而改变，不过一般为 $6.6 < \text{pH} < 7.8$  和  $250\text{mOsm/kg-H}_2\text{O} < \text{渗量} < 450\text{mOsm/kg-H}_2\text{O}$ 。通过溶解 $150\text{mg}$ 羟乙基纤维素(Fluka)和 $6\text{ml}$  DMEM(Dulbecco改进的Eagles培养基)来制备一种溶液并使用 $22\text{ }\mu\text{m}$ 孔大小的盘式滤器进行过滤灭菌。使用 $2\text{ml}$ 羟乙基纤维素-DMEM溶液重新悬浮细胞沉淀物并将其混入脱乙酰壳多糖-甘油磷酸溶液。作为阴性对照，制备混有 $2\text{ml}$ 羟乙基纤维素-DMEM溶液但不含细胞的脱乙酰壳多糖溶液。当将该溶液加热至 $37^\circ\text{C}$ 时，它转化成类似于在先发明(Chenite等专利号 WO 99/07416)中公开的热胶凝溶液的固体水凝胶。最重要的是，这一在先发明没有证实在整个热胶凝过程中在这种脱乙酰壳多糖溶液中可以维持细胞存活力且由此不能为细胞递送、组织修复和组织再生而应用这种脱乙酰壳多糖溶液。

[0096] 将 $4^\circ\text{C}$ 下呈液态的上述溶液与以酶促方式分离的原代软骨细胞混合(Buschmann等, 1992)且然后倾入塑料培养皿(附图1A-1F)。在附图1A中，将细胞沉淀物在 $4^\circ\text{C}$ 下重新悬浮并混(附图1B)入液体脱乙酰壳多糖凝胶溶液。在附图1C和1D中，将这种液体溶液倾入组织培养皿并使其在 $37^\circ\text{C}$ 下固化30分钟，此后用DMEM洗涤含有细胞的固体凝胶并使用活检钻孔器给圆片中心打孔。在附图1E中，将 $1000\text{ }\mu\text{m}$ 网孔的栅板放置在48孔平板上。在附图1F中，将含有细胞的脱乙酰壳多糖凝胶圆片置于各孔内的培养物中。

[0097] 包含细胞的凝胶在 $37^\circ\text{C}$ 下的20分钟保温后形成。使用活检钻孔器将该凝胶打成 $6\text{mm}$ 直径和 $1\text{mm}$ 厚度的圆片并置于培养物中达3周。将圆片各自在下面有无菌尼龙 $1000\text{ }\mu\text{M}$ 网目以使培养基达到所有表面的48孔组织培养板上培养。超过 $90\%$ 的包裹细胞在包裹后立即存活且在整个培养期限过程中存活(附图2A-2C)。将样品在钙绿黄素AM和乙锭同型二聚体-1中保温以便显示存活(绿色)和死亡(红色)的细胞。将新近分离的软骨细胞(附图2A)包裹入凝胶、固化并即刻检测存活力(附图2B)或在该凝胶中培养20天后检测存活力(附图2C)。附图2C表示来自所述凝胶的中部、具有典型软骨细胞形态的细胞。

[0098] 几种不同的细胞类型在包裹和细胞培养后显示出相同的高度存活力，包括Rat-1、COS、293T和去分化牛关节软骨细胞，从而证实胶凝化过程维持了细胞存活力且由此可以将其用于通过注射在体内递送细胞。在培养22天后对含有细胞的凝胶进行甲苯胺蓝染色在包裹的原代软骨细胞周围显示出染色的异染环，从而表明累积了蛋白聚糖或GAG，它使紧密相邻的细胞之间开始融合(附图3D)。还用针对聚集蛋白聚糖、II型胶原和连接蛋白制备的抗体对这些区域进行染色。还发现脱乙酰壳多糖凝胶基质与甲苯胺蓝结合(附图3C)。这一特性使得能够在使用醛固定后观察到该凝胶的点阵结构。令人感兴趣的是，在软骨细胞周围观察到的GAG细胞周环几乎不含脱乙酰壳多糖基质，后者看起来已经被软骨细胞产生的因子所降解(附图3D)。以 $2\times 10^7$ 个原代软骨细胞/ $\text{ml}$ 将原代小牛软骨细胞包裹入脱乙酰壳多糖凝胶并作为 $6\text{mm}$ 圆片培养达20天。将原代小牛软骨细胞包裹并在 $2\%$ 琼脂糖中培养且进行平行分析。通过石蜡切片并对琼脂糖凝胶培养物(附图3A和3B)和脱乙酰壳多糖凝胶培养物(附图3C和3D)进行甲苯胺蓝染色来处理第0天和第20天的培养物。在

第 0 天时,核染成深蓝色(附图 3A 和 3C),而累积的细胞周 GAG 染成异染性蓝紫色(附图 3B 和 3D,大箭头)。这些细胞周区域对聚集蛋白聚糖、胶原(II)和软骨连接蛋白而言是免疫阳性的。在附图 3E 中的 40X 放大倍数下,使用 DMMB 试验对第 0 天、第 14 天和第 20 天培养物中存在的 GAG 进行的定量生化分析显示与琼脂糖凝胶相比 GAG 在脱乙酰壳多糖凝胶中的累积相似。

[0099] 对由包裹的软骨细胞表达的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖 mRNA 进行的 RNA 分析,在 14 天和 22 天培养物显示的高水平(附图 4 的分道 4 和 5)可与那些在软骨中关节软骨内观察到的那些水平(附图 4 的分道 6)相当。使与牛 II 型胶原、聚集蛋白聚糖和 GAPDH 互补的反义<sup>32</sup>P-标记的 RNA 探针的混合物与 tRNA(分道 1)杂交,或与来自牛肾(分道 2)、来自在脱乙酰壳多糖凝胶中培养 0 天(分道 3)、14 天(分道 4)或 20 天(分道 5)的原代软骨细胞( $10^7/ml$ )或成年牛关节软骨(分道 6)的总 RNA 杂交。将样品用 RNA 酶 A 和 T1 处理,然后使其进行电泳和放射自显影。显示出了表明存在各转录物的被保护带。通过聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的连续表达证实了在脱乙酰壳多糖 / 甘油磷酸凝胶中维持了软骨细胞表型。

[0100] 对由包裹细胞产生的蛋白质的蛋白质印迹分析证实在培养的 2-3 周之间累积了软骨基质连接蛋白(图 5)。提取总蛋白、通过 SDS-PAGE 分离并用识别波形蛋白、PCNA、II 型胶原的 C-前肽(propeptide)、或软骨连接蛋白的抗血清进行免疫印迹。所分析的样品包括不含细胞的脱乙酰壳多糖凝胶(分道 1)、牛肾(分道 2)、一式两份在脱乙酰壳多糖凝胶中培养的第 0 天(分道 3 和 4)、第 14 天(分道 5 和 6)或第 20 天(分道 7 和 8)的原代软骨细胞( $10^7/ml$ )样品、2 周小牛关节软骨(分道 9)、或成年牛软骨(分道 10)。结果表明在 14 天和 20 天时累积了软骨特异性蛋白 CP2 和连接蛋白且 PCNA 持续表达至培养的第 20 天作为细胞增殖的标记。

[0101] 使用单轴无限制压缩应力松弛试验(uniaxial unconfined compression stress relaxation test)在培养的第 4 天和第 13 天从力学上评价含有原代牛关节软骨细胞的圆片。通过与不含细胞的对照凝胶比较发现即使在第 4 天也观察到了显著的细胞依赖性劲度(degree of stiffening)且在第 13 天时变得更为显著(图 6)。通过在 10 秒过程中施加 5 次 10% 圆片厚度( $\sim 1.5\text{mm}$ )的压迫(ramp)并在随后的应力松弛过程中保持那个位移(第 2 次 10-20% 的压迫如图中所示)而在无限制压缩中从力学上测试来自第 4 天、第 13 天和第 19 天培养物的圆片( $\sim 5\text{mm}$  直径)。不含细胞的凝胶圆片表现的性能较弱,而加载细胞的凝胶在培养过程中随时间而变得显然更有劲度且在特征上更具粘弹性、类似于关节软骨。

[0102] 通过使用复合孔弹性模型(Soulhat 等,1999)分析这些数据发现非原纤基质模数加倍( $2.5 \pm 5\text{kPa}$ ),还发现原纤基质模数( $100 \pm 500\text{kPa}$ )增加 $5 \pm$ 且液压渗透性( $5 \pm 0.08 \pm 10-12\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}^4$ )接近降低 $100 \pm$ ,因仅在体外培养的 13 天过程中在这些凝胶中存在原代软骨细胞。这些结果合起来表明脱乙酰壳多糖凝胶是细胞相容的和可细胞降解的,适于维持软骨细胞表型,且这种凝胶可以在体外将新软骨基质加工成具有显著提高的力学劲度。

[0103] 实施例 2

[0104] 用于体内软骨生长的热胶凝脱乙酰壳多糖溶液与原代软骨细胞的混合与皮下注射

[0105] 为了证实可以将这种原位胶凝系统用于动物,给无胸腺小鼠(CD1 nu/nu)背部皮下注射100-300 μl实施例1中所述的含有1千万个小牛关节软骨细胞/ml的脱乙酰壳多糖凝胶(图7)。在4°C下将原代小牛软骨细胞的细胞沉淀与液体脱乙酰壳多糖凝胶混合而得到1-2x10<sup>7</sup>个细胞/ml的浓度并以液体形式的100 μl皮下背部植入物注入麻醉的裸鼠。注射后5-10分钟通过触诊感知原位胶凝。

[0106] 给对照小鼠以类似方式注射单独的脱乙酰壳多糖凝胶。在注射的10分钟内有明显的凝胶形成。在注射后21天、48天和63天时回收植入物。甲苯胺蓝染色显示由含有细胞的植入物大量产生富含GAG的胞外基质(图8A)。在单独的脱乙酰壳多糖凝胶植入物中没有观察到GAG累积(图8B)。以2x10<sup>7</sup>个细胞/ml液体凝胶将原代小牛软骨细胞以液体形式作为100 μl皮下背部植入物注入麻醉的裸鼠。对照小鼠接受100 μl单独的液体脱乙酰壳多糖凝胶的皮下背部植入物。注射后48小时收集植入物并加工用于石蜡组织学检查和甲苯胺蓝染色。异染性紫染色显示在使用软骨细胞的植入物中有GAG累积(图8A)。在仅使用脱乙酰壳多糖凝胶的植入物中没有检测到GAG累积。

[0107] 在注射后第48天时在体内使用原代软骨细胞的植入物中检测到了软骨特异性mRNA表达、II型胶原和聚集蛋白聚糖(图9)。

[0108] 在仅有脱乙酰壳多糖凝胶的植入物中没有检测到II型胶原或聚集蛋白聚糖表达(附图9)。使与牛II型胶原、聚集蛋白聚糖和GAPDH互补的反义<sup>32</sup>P-标记的RNA探针的混合物与tRNA(分道1)杂交,或与来自牛肾(分道2)、来自仅有脱乙酰壳多糖凝胶的体内裸鼠植入物的第48天(分道3)或2x10<sup>7</sup>个细胞/ml的使用原代软骨细胞的脱乙酰壳多糖凝胶的体内植入物的第48天(分道4)、或成年牛关节软骨(分道5)的总RNA杂交。将样品用RNA酶A和T1处理,然后使其进行电泳和放射自显影。显示出了表明存在各转录物的被保护带。通过聚集蛋白聚糖和II型胶原的表达证实了在脱乙酰壳多糖/甘油磷酸凝胶中体内维持了软骨细胞表型。

[0109] 在来自注射后48天和63天的使用原代软骨细胞的体内植入物中检测到了软骨特异性蛋白(图10)。在仅使用脱乙酰壳多糖凝胶的植入物中没有检测到软骨特异性蛋白(图10)。提取总蛋白质、通过SDS-PAGE分离并使用识别波形蛋白、PCNA、II型胶原C-前肽、或软骨连接蛋白的抗血清进行免疫印迹。所分析的样品包括不含细胞的脱乙酰壳多糖凝胶(分道1)、牛肾(分道2)、两种不同的第63天的仅有脱乙酰壳多糖凝胶的裸鼠体内植入物(分道3和4)、48天(分道5)或63天(分道6)的2x10<sup>7</sup>个小牛软骨细胞/ml凝胶的脱乙酰壳多糖凝胶体内植入物、2周小牛软骨(分道7)、或成年牛软骨(分道8)。结果表明仅在那些携带软骨细胞的脱乙酰壳多糖凝胶植入物中累积了软骨特异性胞外基质蛋白CP2和连接蛋白。首字母缩写PCNA指的是“增殖的细胞核抗原”。CP指的是2型胶原C前肽且连接蛋白指的是软骨连接蛋白。

[0110] 不含细胞的体内植入物具有糊状稠度,而可以将含有细胞的植入物打成3-5mm的圆片并进行力学测试以便显示出在不含细胞的体外圆片上没有发现的高力学劲度(图11)。这些数据表明可以通过注射在原位递送软骨细胞,其中使用脱乙酰壳多糖热凝胶溶液作为载体。经注射的软骨细胞保持存活且合成并装配了显著水平的富含蛋白聚糖的胞外基质,它在一定时间内变硬形成功能性软骨组织。在图11中,将原代小牛软骨细胞以2x10<sup>7</sup>个细胞/ml液体脱乙酰壳多糖凝胶的液体形式作为100 μl背部皮下植入物注入麻醉的裸鼠。

对照小鼠接受 100  $\mu$  l 单独的液体脱乙酰壳多糖凝胶的背部皮下植入物。注射后 48 天收集植入物。脱乙酰壳多糖凝胶植入物仅具有糊样稠度且不可以进行力学测试。含有原代软骨细胞的植入物具有软骨外观且在从植入物的中心打出 3mm 活检样品并使用 2.5% 厚度压缩与 0.05g/ 分钟的松弛标准的无限制压缩进行测试。就与 42 天期限过程中体外放置的对照圆片相比较的含有细胞的 48 天植入物而言, 显示了在 20% 和 50% 压缩偏移量下的平衡模数。在 48 天过程中加载体内生长的软骨细胞的凝胶因合成并装配了功能性软骨基质而已经显示出了实质性力学劲度 (附图 8A)。

[0111] 实施例 3

[0112] 热胶凝脱乙酰壳多糖溶液与软骨和骨表面的粘连

[0113] 用于软骨修复的这种脱乙酰壳多糖热胶凝制剂的最显著优点之一在于其适应并粘连不规则软骨缺损和体内需要组织修复、再生、重建或形成整体的其它不规则形状腔的能力。许多目前的组织修复过程在这方面受害极大。将不含细胞的脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸液体凝胶回体 (*ex vivo*) 递送至猪股骨髓软骨内 (不包括骨) 缺损。使用活检钻孔器在关节软骨中生成圆片形缺损 (图 12A) 并将实施例 1 中所述的脱乙酰壳多糖溶液注入这些缺损并使之在 37°C 下的培养箱中固化。以关节连接的软骨表面相对并进行模拟关节运动, 此后观察到该凝胶在软骨缺损中保留 (图 12B)。该凝胶不仅保留在缺损内, 而且与周围的骨和软骨表面粘连且不会收缩。在图 12A 和 12B 中, 使液体脱乙酰壳多糖凝胶沉积在 6mm 直径的完整厚度的软骨缺损中 (图 12A) 并使之在 37°C 下在加湿培养箱中固化 30 分钟。然后使关节闭合并将关节运动模拟几分钟。脱乙酰壳多糖凝胶在模拟关节运动后与全部缺损粘连并保留在其中 (图 12B)。

[0114] 另外在家兔髌骨沟 (patellar groove) 上软骨内缺损处进行体内填充。通过用微型手术刀从较硬的钙化软骨层上刮下软骨来形成矩形 (4mmx5mm) 缺损。使用 16 号针导入几个微型骨折孔。将实施例 1 中所述的热胶凝脱乙酰壳多糖溶液注入该缺损并使之固化 5 分钟 (图 13A) 且将家兔的膝关节缝合上。使家兔自由行走并在第 2 天实施安乐死且制备经处理的膝关节用于组织学分析 (图 13B)。将活的新西兰白色家兔麻醉并在股骨髌骨沟的滑车内形成 3x4mm 的只有软骨的缺损。使用 16 号针导入几个微型骨折孔。使液体热胶凝脱乙酰壳多糖加载在缺损上并使之在原位胶凝 5 分钟 (图 13A)。使关节闭合并恢复使家兔不受限制地运动 24 小时, 此后处死并进行关节解剖 (图 13B)。

[0115] 组织学分析 (图 14) 显示这种热胶凝脱乙酰壳多糖凝胶保留在家兔的极薄的软骨层内 (仅约 0.8mm 厚)。该凝胶与周围的骨和软骨组织坚固地粘连, 从而证明了良好的保留特性, 由此能够将其作为用于修复软骨和其它组织的可注射的热胶凝聚合物递送载体。将图 13B 中所示的关节和缺损 (填充了热胶凝脱乙酰壳多糖并在体内保留 24 小时) 固定、包埋在 IR 白色塑料树脂内、切片并用甲苯胺蓝染色。缺损的横截面显示在原位保留了所述的脱乙酰壳多糖凝胶且与缺损内的软骨和骨表面粘连。

[0116] 实施例 4

[0117] 血液 / 聚合物混合物的制备、混合和体外固化

[0118] 将几种不同的混合方法用于使血液与聚合物水溶液混合 (图 15A)。将血液和聚合物在接受器中混合, 从而产生血液与聚合物的均匀液体混合物。

[0119] 一般来说, 将 3 个体积的血液与 1 个体积的 1.5% 的多糖在等张 (isotonic) 和等

渗(iso-osmolaric)的溶液中混合。就脱乙酰壳多糖凝胶而言,将1.5%的脱乙酰壳多糖溶于70mM HCl和135mM? - 甘油磷酸。在第一种血液 / 聚合物混合方法中,给一支1cc注射器加入750μl外周全血并给第二支1cc注射器加入250μl液体聚合物溶液。使注射器相互连接并通过将两相来回抽吸40次进行混合,直到明显均匀为止。在第二种混合方法中,使625μl液体聚合物溶液沉积在2.0ml带有几个3mm-6mm钢珠的冷冻管(Corning)中。给该冷冻管充入1.875ml全血、旋上螺帽并将小瓶剧烈振摇10秒。在第三种混合方法中,使2ml液体聚合物溶液沉积在无菌的12ml硼硅酸盐玻璃小瓶(InterGlass 5cc血清小瓶)中。用橡胶塞和金属卷边器将小瓶密封并用10ml注射器和20号针头,将小瓶抽25ml空气真空。使用适当的静脉切开放血技术将来自家兔动脉或人或马的静脉中的外周血抽入无菌的10ml注射器。使20号针头与该注射器连接并通过橡胶塞插入小瓶。将6ml外周血抽入小瓶。以全速率将小瓶内含物涡旋混合10秒。在实施这些混合技术中的任意一种后,在室温下使所得混合物沉积入4ml硼硅酸盐玻璃小瓶,37°C下的塑料小瓶,或琼脂糖孔(图15B和15C)或回体(ex vivo)的关节软骨缺损。作为对照,仅用外周全血进行相同的处理。作为一个对照,将经EDTA处理的血液抽入采血管小瓶以便测定CBC和血小板数目。经测试的所有血样品对相应的种类显示了正常的CBC和血小板计数。不管是何种种类,所制备的血液 / 聚合物在混合后2.5-18分钟内固化在玻璃小瓶壁上并强力粘连(图16)。混合的外周全血普遍比血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶固化得更为缓慢(图16)。将各血液样品与或不与液体脱乙酰壳多糖凝胶混合并根据混合与获得原始混合小瓶或第二个接受器内的固体粘连团之间所经过的分钟数来确定固化时间。

[0120] 对包括血液 / 透明质酸、血液 / 羟乙基纤维素和血液 / 藻酸盐在内的其它血液 / 聚合物溶液的测试显示这些混合物也在与单独的血液相差无几的时间期限内固化(图17A)。由此得出结论是,将脱乙酰壳多糖凝胶混入外周全血加速了血块形成且血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶固化时间在临床应用上是可接受的。对混合的新鲜外周家兔血液或混合了PBS或包括脱乙酰壳多糖的甘油磷酸缓冲液在内的各种1.5%多糖溶液上测试了收缩情况。还分析了不进行混合的新鲜血液。也分析了肝素血 / 脱乙酰壳多糖的甘油磷酸缓冲液混合物。在37°C下使500μl各样品沉积在4ml玻璃管中。在不同时间点时从各管中取出所有排除的血浆并称重以便测定血块收缩的量。除血液 / 脱乙酰壳多糖甘油磷酸混合物外的所有样品均收缩至其原始体积的30-50%。血液 / 脱乙酰壳多糖混合物最低可收缩至维持其原始体积的约90%。

[0121] 为了测试固化血液 / 聚合物混合物相对于凝固全血的收缩程度,使用几个对照物对一系列血液 / 聚合物样品进行血块收缩试验(附图17A、17B和17C)。一组对照物由未搅拌的外周全血或搅拌的外周全血或与磷酸盐缓冲盐水按3 : 1(体积 : 体积)搅拌的外周全血组成。将这些样品与含有3个体积的拌有1个体积的溶于PBS的不同1.5%多糖溶液的外周全血的几个实验样品(藻酸盐、羟乙基纤维素或透明质酸)进行比较。另一个样品由3个体积的混有1个体积的脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸溶液的外周全血组成。固化后间隔达18小时,一式三份测定每种条件下排除的血清作为收缩程度的指示。含有外周血、±PBS的样品收缩至原始团块的30%(图17A)。混有多糖藻酸盐、羟乙基纤维素或透明质酸的外周血收缩至原始团块的40% - 50%(图17A)。血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶样品表现出的收缩可忽略不计,其中收缩至原始团块的90%(图17A)。肝素化血液 / 脱乙酰壳多糖

凝胶样品也耐收缩,达到原始团块的 85% (图 17A)。从这些数据中可以推断出血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶耐收缩并在软骨缺损内部形成了支撑的空间充满更多的血纤蛋白。在图 17B 和 17C 中,所示的样品包括血液 (1) 或混合的血液 (2)、血液 / PBS (3)、血液 / 脱乙酰壳多糖的甘油磷酸溶液 (4)、肝素血 / 脱乙酰壳多糖 (5)、血液 / 藻酸盐 (6)、血液 / 羟乙基纤维素 (7) 和血液 / 透明质酸 (8)。

[0122] 为了测试是否可以将抗凝血液用于生产血液 / 多糖原位固化植入物,将用 1.5mM EDTA、0.38% 柠檬酸盐酸、0.38% 葡糖柠檬酸或肝素钠 (Becton Dickinson) 处理的 3 个体积的血液与 1 个体积的脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸溶液混合。脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸溶液能够使肝素 - 介导的 (附图 18)、EDTA- 介导的和柠檬酸盐 - 介导的抗凝逆转。以 1 个体积的多糖溶液与 3 份的外周全血的比例混合 1.5% 脱乙酰壳多糖的甘油磷酸溶液或三种不同的 1.5% 多糖溶液。使 500  $\mu$ l 的各样品沉积入硼硅酸盐玻璃管并使之在 37°C 下固化 60 分钟。不同的多糖包括透明质酸 - PBS (1)、羟乙基纤维素 - PBS (2)、藻酸盐 - PBS (3) 和脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸 (4)。作为对照,仅分析肝素血 (5)。60 分钟后,将各管水平放置并拍照记录。仅脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸和肝素化血的混合物变成固体。

[0123] 使用羟乙基纤维素、藻酸盐或透明质酸的其它肝素血 / 多糖混合物难以固化 (图 18)。从这些数据中推断出可以使用抗凝血生产血液 / 脱乙酰壳多糖的原位固化植入物。

[0124] 对固体血液 / 聚合物样品的组织切片显示混合物是均匀的、红细胞在混合或固化后不会溶血,且血小板是活化的并且是功能性的 (正如因生成致密血纤蛋白网状结构所证实的) (图 19A-19C)。将固化的血液 / 脱乙酰壳多糖混合物固定、包埋入 LR 白色塑料、切片并用甲苯胺蓝染色。在图 19A 中,以 20x 放大倍数观察到混合显然总体上均匀。在图 19B 中,以 100x 放大倍数观察到明显存在红细胞与脱乙酰壳多糖氢化聚合物 (hydropolymer) 的相互混合体。以 2000x 放大倍数观察 (通过环境电子扫描显微镜) 在血液 / 脱乙酰壳多糖复合物中显然存在血纤蛋白纤维网状结构。

[0125] 在混合和固化后一定的白细胞可以保持存活数小时 (图 20)。将外周全血与脱乙酰壳多糖凝胶混合并使之固化。在图 20A 中,固化后 60 分钟放置填料用于使用钙绿黄素 AM / 乙锭同型二聚体 -1 进行的存活染色以便显示活的白细胞 (绿色细胞, 大箭头)、活的血小板 (绿色细胞, 小箭头) 和死亡的白细胞 (红色核)。在图 20B 中,将不同的样品在固化后 180 分钟时固定、包埋入 LR-White 并用透射式电子显微镜观察。反映出细胞存活力的外周单核细胞 (箭头) 的活性吞噬在混合且固化后 3 小时时的 TEM 显微照片上是明显的。

[0126] 在固化后对从血液或血液 / 脱乙酰壳多糖中失去的总血清蛋白进行分析。使等体积的血液或血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶在琼脂糖孔中固化。将圆片转入含有 1ml PBS 的 48 孔平板中的各孔并在 37°C 下保温 3 小时。在 37°C 下和 4、5、7 和 19 小时时将圆片依次改变成新制的 PBS 溶液。在分析前将 PBS 洗涤液轻度离心以便除去任何细胞。在 PBS 中 3 小时或 19 小时后对几个圆片提取总蛋白。通过 SDS-PAGE 和使用 Sypro Orange 进行总蛋白染色来分析存在于圆片或 PBS 洗涤物中的总蛋白。血清蛋白从血液 / 脱乙酰壳多糖样品中比从血液样品更为缓慢、更为持久地释放出来 (图 21)。这些数据提示与填充血块的缺损相比,涉及伤口愈合的血液和血小板衍生蛋白以更为缓慢和延长释放的方式从血液 / 脱乙酰壳多糖填充的缺损中释放出来。由 150  $\mu$ l 起始液体体积生产血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶的固体圆片或仅有血液的圆片。将所得的圆片用 1ml PBS 洗涤 3 小时,然后在 4、5、7 和 19 小

时时依次转移总计另外 4 个 1ml PBS 洗涤物。在 3 或 19 小时洗涤后,用 GuCl 提取有代表性的圆片以便保留的全部蛋白质溶解。可溶性蛋白质从等体积的 GuCl 提取物或 PBS 洗涤物中沉淀、将其在 SDS-PAGE 凝胶上分离并使用 Sypro Orange 对全部蛋白质进行染色。比较而言,在整个 19 小时洗涤期限过程中,更多的蛋白质保留在血液 / 聚合物圆片中而非血液圆片中。比较而言,在 19 小时洗涤期限过程中,从血液 / 脱乙酰壳多糖而非血液观察到血清蛋白较缓慢和长时间释放入 PBS 洗涤物。

[0127] 实施例 5

[0128] 用于改善关节软骨缺损愈合的血液 / 聚合物混合物的制备、混合和注射

[0129] 用作为液体递送的外周血 / 脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸混合物处理带有软骨下骨穿孔的软骨缺损并使之在原位固化 (图 22A-22C)。在图 22A 中,在成年 (大于 7 个月) 的新西兰白色家兔的股骨髌骨沟内形成完整厚度的软骨缺损 (3x4mm 方形)。在骨上钻 4 个 1mm 直径的微孔,直到观察到出血为止。在图 22B 中,以 3 个体积血液与 1 个体积脱乙酰壳多糖的甘油磷酸溶液的比例混合液体全血并使之沉积以充满缺损。在图 22C 中,看起来 5 分钟后血液 / 脱乙酰壳多糖植入物在原位固化。缝合囊与皮肤并恢复使动物可不受限制的运动。

[0130] 将在人类患者中的进行的类似处理绘制在图 22D 中,其中制备的软骨缺损接受原位固化的液体血液 / 聚合物的关节镜注射。或者,使关节镜注射的液体聚合物与骨衍生的血液在缺损部位混合 (图 22E)。在图 22D 中,使患者血液与聚合物离体 (ex vivo) 混合并通过关节镜注射递送至制备的缺损或 (附图 22E) 经关节镜或在开放性膝手术过程中递送该聚合物并在缺损部位与从缺损中流出的患者血液混合。

[0131] 作为概念验证研究,在家兔体内测试血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶处理的效果。用噻拉嗪 - 氯胺酮麻醉成年骨骼成熟的新西兰白色家兔 (7 个月和 7 个月以上),随后用异氟醚 (isofluorene) / 氧气麻醉。对股骨髌骨沟的滑车实施副髌骨切开和髌骨移位。使用微型手术刀在股骨髌骨沟滑车内切成达 4x5mm 的完整厚度的软骨缺损。通过微型钻孔及用 4°C PBS 持续冲洗或通过用定制的锥和锤穿刺而形成 4 个 4mm 深的 1mm 直径的穿透骨的孔。用 PBS 冲洗缺损且随着出血程度的不同,将达 200 μl 的无菌肾上腺素 (2 μg/ml) 的磷酸盐缓冲盐水注入出血的孔。给软骨缺损覆盖浸有 PBS 的无菌纱布。用来自 Becton Dickison 的 vacutainer™ 针头和未处理的硅化玻璃 4cc vacutainer™ 小瓶从耳部中央动脉中取家兔的外周血。

[0132] 在一种处理中,将 750 μl 血液抽入无菌的 1cc 注射器。使装有 250 μl 脱乙酰壳多糖 - 甘油磷酸溶液 (1.5% 脱乙酰壳多糖 / 70mM HCl / 135mM ? - 甘油磷酸) 的第二支注射器与带有无菌塑料连接器的含有血液的注射器相互连接。将注射器反复抽拉 40 次。将混合物抽入一支连接有 20 号针头的注射器。在排空半数混合物后使 1 滴 (约 25 μl) 沉积入缺损。在一种单独的处理中,将 2ml 血液加入含有 667 μl 1.5% 脱乙酰壳多糖 / 70mM HCl / 135mM ? - 甘油磷酸和 6 个无菌的 3.2mm 直径的不锈钢珠的聚丙烯冷冻管中。给该管加帽并剧烈振摇 10 秒 (约 40-50 次)。通过用 1cc 无菌注射器从小瓶中抽出所得的液体血液 / 脱乙酰壳多糖混合物并使 20g 针头与该注射器连接。在从该注射器中排空 200 μl 后使 1 滴 (约 25 μl) 沉积以便填充软骨缺损。使血液 / 脱乙酰壳多糖混合物固化 5 分钟,此后缝合囊与皮肤并给伤口消毒。在 1 周时 (n = 1, 雄性) 或在 51 天或 56 天时 (n = 2, 1 只雄性, 1 只雌性) 处死家兔。将关节固定、脱钙化、包埋入 LR/White 塑料、切片并用甲苯

胺蓝染色。在愈合 1 周时血液 / 脱乙酰壳多糖处理的缺损显示有大量趋化细胞迁移至血液 / 脱乙酰壳多糖填充的区域（图 23A）。未处理的缺损对位于缺损顶部的血凝块具有相对弱的趋化反应（图 23B）。在成年新西兰白色家兔的股骨髌骨沟中形成带有微型钻孔的软骨缺损，所述家兔中的 1 只填充有血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶，而对另一只保持不做处理。愈合后 1 周将关节固定、用 LR-White 处理并进行甲苯胺蓝染色。在软骨表面下 2-3mm 处有大量细胞明显迁移至充满血液 / 脱乙酰壳多糖的缺损（图 23A），而在未处理的缺损中的相同区域上观察到较少的迁移细胞（图 23B）。

[0133] 在愈合 5-8 周后，给血液 / 脱乙酰壳多糖处理的缺损填充 2 只家兔体内的透明修复组织（1 只雄性，1 只雌性）（图 24A）。这种基于血液 / 脱乙酰壳多糖的修复组织具有透明的富含 GAG 的软骨修复组织的外观。来自未处理的或仅血液处理的微型骨折缺损的修复组织具有纤维软骨外观（图 24B）。在递送后 3 周或 3 周以上在缺损部位内没有持续存在血液 / 脱乙酰壳多糖或血凝块的组织学证据。在成年新西兰白色家兔的两个股骨髌骨沟中都形成带有微型钻孔的软骨缺损，其中 1 个填充有血液 / 脱乙酰壳多糖凝胶，而对另一个保持不做处理。愈合后 51 天或 56 天时将关节固定、用 LR-White 处理并进行甲苯胺蓝染色。在附图 24A 中，来自血液 / 脱乙酰壳多糖处理的缺损的修复组织具有粘连缺损表面并填充该缺损的异染性染色的透明软骨的外观。在附图 24B 中，来自未处理的缺损的修复组织具有纤维软骨外观，其中实际上没有对 GAG 的异染性染色且仅填充了部分缺损。

[0134] 尽管已经具体参照解释性实施方案描述了本发明，但是可以理解的是本领域技术人员显然可以对其进行许多改变。因此，应将上述描述和附图看作是对本发明的解释而不是限制。例如，我们已经证实将脱乙酰壳多糖溶液与血液混合可以形成不会显著收缩的聚合物 / 血凝块、表明了趋化和促分裂血液蛋白的缓慢释放、维持了血细胞存活力并显著改善了关节软骨缺损的修复。对本领域技术人员而言显然可以以不同方式制备脱乙酰壳多糖溶液而获得相同的结果。实例包括：1) 改变的脱乙酰壳多糖浓度和与血液的混合比例；2) 通过改变缓冲液类型和种类的浓度而改变对水溶液的选择；3) 脱乙酰壳多糖聚集物的含水混悬液；4) 使用适当的混合技术合并颗粒状脱乙酰壳多糖粉末以便使这些颗粒充分分布入血液并使它们部分溶解。可以使用其它聚合物，诸如：1) 另一种类似于乙酰透明质酸的多糖，条件是通过将其配制成促凝状态 (procoagulating state) 来克服它的抗凝作用（诸如通过使用低浓度或将其与凝血酶合并）；和 2) 可以将诸如聚赖氨酸或胶原这样的蛋白质聚合物用于获得类似的结果。尽管因免疫原性、毒性和细胞粘附 / 收缩作用的原因而不认为后面这些手段与我们优选的实施方案可以同样成功，但是可以将这些和其它制剂看作本发明的部分，这是因为它们具有本发明的聚合物制剂的特征，即 1) 它可与血液或选择的血液成分混合；2) 所得混合物是可注射的或可以将其置于需要组织修复、再生、重建或形成整体的身体部位上或其内；和 3) 该混合物对所放置的部位上的组织修复、再生、重建或形成整体具有有益作用。

#### [0135] 参考文献

[0136] Arnoczky, S. P., R. F. Warren, 和 J. M. Spivak. 1988。“使用外源性血纤蛋白凝块进行的半月板修复。在狗体内的实验研究”。J Bone Joint Surg Am 70, no. 8 :1209-17.

[0137] Aston, J. E., 和 G. Bentley. 1986。“通过关节和生长板软骨的同种异体移植修复关节表面”。Journal of Bone & Joint Surgery-British Volume 68-B, no. 1 :29-35.

- [0138] Ateshian, G. A. 1997。“用于关节软骨边界摩擦的理论制剂”。Journal of Biomechanical Engineering 119, no. 1 :81–86。
- [0139] Austin, P. R. , C. J. Brine, J. E. Castle, and J. P. Zikakis. 1981. “壳多糖：新研究方面”。Science 212, no. 4496 :749–53。
- [0140] Atkinson,B. ,发明人。2000年8月24日。”用于再生和修复软骨损害的装置和方法”。Sulzer Biologics,受让人。WO Patent 00/48550。
- [0141] Bartone, F. F, E. D. Adickes, 1988,“脱乙酰壳多糖：对泌尿生殖组织中伤口愈合的作用：初步报告”：J Urol, v. 140, p. 1134–7。
- [0142] Bentley, G. , 和 R. B. Greer. 1971。“将分离的骺和关节软骨的软骨细胞以同种移植的方式植入家兔关节表面。Nature 230 :385–8。
- [0143] Bernkop-Schnurch, A. , 和 M. Pasta. 1998。“肠肽和蛋白质递送 – 防止受到酶攻击的新型生物粘合性药物载体基质”。Journal of Pharmaceutical Sciences 87, no. 4 : 430–434。
- [0144] Braden, M. , S. Downes, M. P. Patel, 和 K. W. M. Davy, 发明人。1995年11月21日。”用于组织修复的生物材料。” US Patent 5, 468, 787。
- [0145] Breinan, H. A. , T. Minas, H. P. Hsu, S. Nehrer, C. B. Sledge, 和 M. Spector. 1997.“培养的自体软骨细胞对犬模型中软骨缺损修复的作用”。Journal of Bone & Joint Surgery American Volume 79, no. 10 :1439–51。
- [0146] Breinan, H. A. , S. D. Martin, H. P. Hsu, 和 M. Spector. 2000。“用显微断裂、II型胶原基质或培养的自体软骨细胞治疗的犬关节软骨的愈合”。J Orthop Res 18, no. 5 :781–9。
- [0147] Brekke, J. H. , 和 R. D. Coutts, 发明人。1999年12月21日。”用于重建关节软骨的方法和装置”。THM Biomedicals, 受让人。US Patent 6, 005, 161。
- [0148] Brittberg, M. , A. Lindahl, G. Homminga, A. Nilsson, O. Isaksson, 和 L. Peterson. 1997.“对软骨修复的关键分析”。Acta Orthopaedica Scandinavica 68, no. 2 : 186–91。
- [0149] Brittberg, M. , A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, 和 L. Peterson. 1994。“用自体软骨细胞移植治疗膝内深度软骨缺损”。N. Engl. J. Med. 331, no. 14 :889–95。
- [0150] Brittberg, M. , A. Nilsson, A. Lindahl, C. Ohlsson, 和 L. Peterson. 1996。“用自体培养的软骨细胞治疗家兔关节软骨缺损”。Clinical Orthopaedics Related Research, no. 326 :270–83。
- [0151] Buckwalter, J. A. , 和 H. J. Mankin. 1997。“关节软骨。2. 变性和骨关节病、修复、再生和移植（综述）”。Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume 79A, no. 4 : 612–32。
- [0152] Buschmann, M. D. , Y. A. Gluzband, A. J. Grodzinsky, J. H. Kimura, 和 E. B. Hunziker. 1992. 琼脂糖培养物中的软骨细胞合成具机械功能的胞外基质。Journal of Orthopaedic Research 10, no. 6 :745–58。
- [0153] Butnariu-Ephrat, M. , D. Robinson, D. G. Mendes, N. Halperin, 和 Z. Nevo. 1996。“用来源于骨髓的软骨细胞对山羊关节软骨进行表面重整”。Clinical Orthopaedics &

Related Research, no. 330 :234–43。

[0154] Caplan, A. I. , M. Elyaderani, Y. Mochizuki, S. Wakitani, 和 V. M. Goldberg. 1997。

“软骨修复和再生机理”。 Clinical Orthopaedics & Related Research, no. 342 :254–69。

[0155] Caplan, A. I. , D. J. Fink, 和 R. G. Young, 发明人。1999 年 1 月 5 日。”用于软组织再生的生物基质”。 US Patent 5,855,619。

[0156] Caplan, A. I. , 和 S. E. Haynesworth, 发明人。1998 年 9 月 22 日。”使用间充质干细胞制品进行结缔组织再生”。 US Patent 5,811,094。

[0157] Carreno-Gomez, B. , 和 R. Duncan. 1997。“对可溶性脱乙酰壳多糖和脱乙酰壳多糖微球的生物特性的评价”。 Intl J of Pharmaceutics 148 :231–40。

[0158] Chenite, A. , C. Chaput, C. Combes, F. Jalal, A. Selmani。“离子多糖凝胶的温度控制的 pH 依赖性形成”。 WO Patent 99/07416。

[0159] Chenite, A. , C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binette, 和 A. Selmani. 2000。“脱乙酰壳多糖的新型可注射中性溶液在原位形成可生物降解的凝胶”。 Biomaterials21, no. 21 :2155–61。

[0160] Chesterman, P. J. , 和 A. U. Smith. 1968。“关节软骨和分离的软骨细胞的同种移植术。家兔中的实验研究”。 Journal of Bone & Joint Surgery-British Volume 50, no. 1 :184–97。

[0161] Childers, J. C. Jr, 和 S. C. Ellwood. 1979。“用于软骨软化的部分软骨切除术和软骨下骨钻孔”。 Clin Orthop, no. 144 :114–20。

[0162] Cho, Y. W. , Y. N. Cho, S. H. Chung, G. Yoo, S. W. Ko, 1999, “作为伤口愈合加速剂的水溶性壳多糖” :Biomaterials, v. 20, p. 2139–45。

[0163] Chu, C. R. , R. D. Coutts, M. Yoshioka, F. L. Harwood, A. Z. Monosov, 和 D. Amiel. 1995。“使用接种同种异体软骨膜细胞的可生物降解的多孔聚乳酸 (PLA) 进行的关节软骨修复 :组织改造研究”。 Journal of Biomedical Materials Research 29, no. 9 :1147–54。

[0164] Chu, C. R. , J. S. Dounchis, M. Yoshioka, R. L. Sah, R. D. Coutts, 和 D. Amiel. 1997。“使用软骨膜细胞进行的骨软骨修复。家兔中的 1 年研究”。 Clinical Orthopaedics & Related Research, no. 340 :220–9。

[0165] Clark, Richard A. F. 1996。“伤口修复的分子和细胞生物学”。 2ed. New York : Plenum。

[0166] Cochrum, K. C. , H. R. Parker, 和 M. M. C. Chu, 发明人。1998 年 6 月 30 日。”血纤蛋白原 / 脱乙酰壳多糖止血剂”。 The Regents of the University of California, 受让人。US Patent 5,773,033。

[0167] Cohen, I. , J. Gabbay, T. Glaser, 和 A. Oplatka. 1975。“血纤蛋白 - 血小板在收缩血块中的相互作用”。 Br J Haematol 31, no. 1 :45–50。

[0168] Collombel, C. , O. Damour, C. Gagnieu, F. Poisignon, C. Echinard, 和 J. Marichy, 发明人。1992 年 11 月 24 日。”含有胶原、脱乙酰壳多糖和糖胺聚糖类的混合物基质的生物材料、其制备方法及其在人体药物中的应用”。 Centre National de la Recherche, 受让人。US Patent 5,166,187。

- [0169] Denuziere, A. , D. Ferrier, O. Damour, 和 A. Domard. 1998。“脱乙酰壳多糖 - 硫酸软骨素和脱乙酰壳多糖透明质酸盐聚电解质复合物 :生物特性”。Biomaterials 19, no. 14 : 1275-85。
- [0170] DePalma, A. F. , C. D. McKeever, 和 D. K. Subin. 1966。“使用氯化胸苷进行的组织学和放射自显影证实的关节软骨修复方法”。Clinical Orthopaedics Related Research 48 : 229-42。
- [0171] Dillon, G. P. , X. Yu, A. Sridharan, J. P. Ranieri, 和 R. V. Bellamkonda. 1998。“3D 水凝胶支架中物理结构和电荷对轴突扩展的影响”。Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 9, no. 10 :1049-69。
- [0172] Drohan, W. N. , M. J. MacPhee, S. I. Miekka, S. S. Manish, Clive Elson, 和 John R. Taylor, 发明人。2000 年 9 月 26 日。“壳多糖水凝胶、其制备方法和应用”。Inc. Chitogenics, The American National Red Cross, and Coalition for Hemophilia, 受让人。US Patent 6,124,273。
- [0173] Dunn, A. R. , 和 S. L. Dunn, 发明人。1994 年 11 月 29 日。“关节软骨的再生方法”。US Patent 5,368,051。
- [0174] Eser, E. A. , Y. M. Elcin, 和 G. D. Pappas. 1998。“神经组织改造 :肾上腺素嗜铬细胞粘连和在脱乙酰壳多糖支架上的存活力”。Neurological Research 20 :648-54。
- [0175] Frankel, S. R. , B. Toolan, D. Menche, M. I. Pitman, 和 J. M. Pachence. 1997。“使用软骨修复用的胶原双层基质进行的软骨细胞移植”。J. Bone Joint Surg. 79-B, no. 5 :831-36。
- [0176] Freed, L. E. , D. A. Grande, Z. Lingbin, J. Emmanuel, . C. Marquis, 和 . Langer. 1994。“使用同种异体移植软骨细胞和合成的可生物降解的聚合物支架进行的关节表面重整”。Journal of Biomedical Materials Research 28, no. 8 :891-9。
- [0177] Fukamizo, T. , 和 R. Brzezinski. 1997。来自链霉菌属种类菌株 n174 的脱乙酰壳多糖酶 - 对其结构和功能的比较综述 (综述)。Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 75, no. 6 :687-96。
- [0178] Gouda, I. , 和 O. Larm, 发明人。1999 年 5 月 11 日。“使用脱乙酰壳多糖和肝素或硫酸肝素促进真皮伤口愈合的方法”。Medicarb, 受让人。US Patent 5,902,798。
- [0179] Grande, D. A. , 和 P. A. Lucas, 发明人。1999 年 5 月 25 日。“用于软骨修复的间充质干细胞”。Morphogen Pharmaceuticals Inc. , and North Shore University Hospital Research Corp. , 受让人。US Patent 5,906,934。
- [0180] Grande, D. A. , M. I. Pitman, L. Peterson, D. Menche, 和 M. Klein. 1989。“通过自体软骨细胞移植修复实验产生的家兔关节软骨内缺损”。J. Orthop. Res. 7, no. 2 :208-18。
- [0181] Green, W. T. 1977。“关节软骨修复。组织培养和随后同种异体移植过程中家兔软骨细胞的特性”。Clinical Orthopaedics & Related Research, no. 124 :237-50。
- [0182] Griffith-Cima, L. , A. Atala, C. A. Vacanti, 和 K. T. Paige, 发明人。1998 年 1 月 20 日。“通过注射在体内胶凝的细胞 - 聚合物溶液形成组织”。M. I. T. , 受让人。US Patent 5,709,854。
- [0183] Halvorsen, Y-D. C. , W. O. Wilkison, 和 J. Gimble, 发明人。2001 年 2 月 21 日。“脂肪组织衍生的基质细胞在软骨细胞分化和软骨修复中的应用”。EP Patent 1,077,253。

- [0184] Hall, B. K. 1983. *Cartilage*. New York, NY :Academic Press.
- [0185] Halpern, A. A., 发明人。1997年8月12日。“用于软骨修复的方法”。US Patent 5,655,546。
- [0186] Hangody, L., G. Kish, Z. Karpati, I. Szerb, 和 I. Udvarhelyi. 1997。“用于治疗股骨髁关节缺损的关节镜自体骨软骨镶嵌式成形术 (mosaicplasty)。一种初步报告”。*Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 5, no. 4 :262-7。
- [0187] Hangody, L., G. Kish, Z. Karpati, I. Szerb, and R. Eberhardt. 1997。“对距骨的分离性骨软骨炎的治疗 :镶嵌式成形术 (mosaicplasty) 技术的应用 - 一种初步报告”。*Foot Ankle Int* 18, no. 10 :628-34。
- [0188] Hansson, H-A., G. Johasson-Ruden, 和 O. Larm, 发明人。1999年4月13日。“硬组织刺激剂”。Astra Akiebolag, 受让人。US Patent 5,894,070。
- [0189] Hendrickson, D. A., A. J. Nixon, D. A. Grande, R. J. Todhunter, R. M. Minor, H. Erb, 和 G. Lust. 1994。“用于重整广泛关节软骨缺损表面的软骨细胞 - 血纤蛋白基质移植物”。*Journal of Orthopaedic Research* 12, no. 4 :485-97。
- [0190] Higaki, H., T. Murakami, 和 Y. Nakanishi. 1997。“关节表面上 langmuir-blodgett 膜作为界面润滑膜的润滑能力”。*JSME International Journal Series C-Mechanical Systems Machine Elements & Manufacturing* 40, no. 4 :776-81。
- [0191] Homminga, G. N., S. K. Bulstra, R. Kuijper, 和 A. J. van der Linden. 1991。“使用家兔肋骨软骨膜移植物修复绵羊关节软骨缺损”。*Acta Orthopaedica Scandinavica* 62, no. 5 :415-8。
- [0192] Hunziker, E. B., 和 L. C. Rosenberg. 1996。“对关节软骨内部分厚度缺损的修复 - 细胞从滑膜中复原”。*Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume* 78A, no. 5 :721-33。
- [0193] Hyc, A., J. Malejczyk, A. Osiecka, 和 S. Moskalewski. 1997。“对植入大鼠体内关节表面缺损的同种异体软骨细胞的免疫反应”。*Cell Transplantation* 6, no. 2 :119-24。
- [0194] Insall, J. N. 1967。“膝变性关节炎的关节内手术。对K. H. Pridie后工作的报告”。*J Bone Joint Surg Br* 49, no. 2 :211-28。
- [0195] Inui, H., M. Tsujikubo, S. Hirano, 1995,“对血管平滑肌内血小板衍生的生长因子的促分裂反应的低分子量脱乙酰壳多糖刺激”;*Biosci Biotechnol Biochem*, v. 59, p. 2111-4。
- [0196] Itay, S., A. Abramovici, 和 Z. Nevo. 1987。“培养的胚胎小鸡骺软骨细胞作为植入物在小鸡关节软骨缺损中的应用”。*Clinical Orthopaedics & Related Research*, no. 220 :284-303。
- [0197] Johnson, L. L., 1991。“关节镜摩擦关节成形术”。In *Operative arthroscopy*. McGinty, J. B. (Ed.) et al., 341-60. New York :Raven.
- [0198] Johnstone, B., 和 J. Yoo, 发明人。1999年6月1日。“人间充质干细胞的体外软骨发生诱导”。Case Western Reserve University, 受让人。US Patent 5,908,784。
- [0199] Jorgensen, T., J. Moss, 和 H. Nicolajsen, 发明人。1998年5月28日。“促进组织修复的方法”。Dumex-Alpharma, 受让人。WO Patent 98/22114。

- [0200] Jurgensen, K. , D. Aeschlimann, V. Cavin, M. Genge, 和 E. B. Hunziker. 1997。“用于软骨 - 软骨接触面 - 组织转谷氨酰胺酶的新生物粘性物”。Journal of Bone & Joint Surgery American Volume 79A, no. 2 :185-93。
- [0201] Kandel, R. A. , H. Chen, J. Clark, 和 R. Renlund. 1995。“将体外产生的软骨组织植入关节缺损”。Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech. 23, no. 5 :565-77。
- [0202] Kawamura, S. , S. Wakitani, T. Kimura, A. Maeda, A. I. Caplan, K. Shino, 和 T. Ochi. 1998。“关节软骨修复。使用胶原凝胶 - 生物基质和其中培养的软骨细胞进行的家兔实验”。Acta Orthopaedica Scandinavica 69, no. 1 :56-62。
- [0203] Koyano, T. , N. Minoura, M. Nagura, 和 K. Kobayashi. 1998。“成纤维细胞培养物在 pva/ 脱乙酰壳多糖混合水凝胶上的粘连和生长”。Journal of Biomedical Materials Research 39, no. 3 :486-90。
- [0204] Kuettner, K. E. 1992.“关节软骨在健康和疾病中的生物化学特性”。Clin Biochem 25, no. 3 :155-63。
- [0205] Lahiji, A, A Sohrabi, D S Hungerford, C G Frondoza, 2000, “脱乙酰壳多糖支持人成骨细胞和软骨细胞内胞外基质蛋白的表达” :J Biomed Mater Res, v. 51, p. 586-95。
- [0206] Lee, K. Y. , I. C. Kwon, Y. H. Kim, W. H. Jo, 和 S. Y. Jeong. 1998。“作为基因递送系统的脱乙酰壳多糖自聚集物的制备”。Journal of Controlled Release 51, no. 2-3 :213-20。
- [0207] Lee, YM, Y J Park, S J Lee, Y Ku, S B Han, S M Choi, P R Klokkevold, C P Chung, 2000, “使用脱乙酰壳多糖 / 磷酸三钙海绵体的组织改造的骨形成” :J Periodontol, v. 71, p. 410-7。
- [0208] Lu, J. X. , F. Prudhommeaux, A. Meunier, L. Sedel, 和 G. Guillemin. 1999。“脱乙酰壳多糖对大鼠膝软骨的作用”。Biomaterials 20, no. 20 :1937-44。
- [0209] Mahomed, M. N. , R. J. Beaver, 和 A. E. Gross. 1992。“新制的小片骨软骨同种异体移植植物长期成功用于膝关节内后创伤性缺损”。Orthopedics (Thorofare, NJ) 15, no. 10 :1191-9。
- [0210] Malette, W. G. , H. J. Quigley, R. D. Gaines, N. D. Johnson, W. G. Rainer, 1983, “脱乙酰壳多糖 :一种新型止血剂” :Ann Thorac Surg, v. 36, p. 55-8。
- [0211] Malette, W. G. , 和 H. J. Quigley, 发明人。1983 年 7 月 19 日。“实现止血的方法”。US Patent 4,394,373。
- [0212] Malette, W. G. , 和 H. J. Quigley, 发明人。1985 年 7 月 30 日。“在组织伤口中实现止血、抑制纤维组织形成和促进组织再生的方法”。US Patent 4,532,134。
- [0213] Mankin, H. J. 1974。“损伤的关节软骨和骨关节炎的反应 (两部分中的第一部分)”。N Engl J Med 291, no. 24 :1285-92。
- [0214] -. 1974.“损伤的关节软骨和骨关节炎的反应 (两部分中的第二部分)”。N Engl J Med 291, no. 25 :1335-40。
- [0215] Mattioli-Belmonte, M. , A. Gigante, R. A. Mazzarelli, R. Politano, A. De Benedittis, N. Speechia, A. Buffa, G. Biagini, F. Greco, 1999, “N, N- 二羧甲基脱乙酰壳多糖作为骨形态发生蛋白的递送剂用于修复关节软骨”。Med Biol Eng Comput, v. 37, p. 130-4。

- [0216] McCarty, Daniel J, 和 William J Koopman. 1993。“关节炎和并发症”。A textbook of rheumatology. Philadelphia :Lea 和 Febiger.
- [0217] Messner, K. , 和 J. Gillquist. 1996。“软骨修复 - 一种关键的综述（综述）”。Acta Orthopaedica Scandinavica 67, no. 5 :523-29.
- [0218] Minas, T. , 和 S. Nehrer. 1997。“治疗关节软骨缺损的最新概念”。(Review) (41 refs). Orthopedics (Thorofare, NJ) 20, no. 6 :525-38.
- [0219] Mosbey, D. T. , 发明人。1990 年 9 月 11 日。“伤口填充组合物”。Minnesota Mining and Manufacturing Company, 受让人。US Patent 4, 956, 350.
- [0220] Mueller, W. , 和 T. Thaler, 发明人。1998 年 11 月 17 日。“骨和软骨的再生方法”。Sulzer Medizinaltechnik AG. , 受让人。US Patent 5, 837, 235.
- [0221] Mazzarelli, R. A. A. , 和 G. Biagini. 1993。“外源性脱乙酰壳多糖在人伤口组织中的作用和结局”。Chitin Enzymology :187-96。
- [0222] Mazzarelli, R. A. A. , W. S. Xia, M. Tomasetti, 和 P. Ilari. 1995。“借助于麦胚脂酶制品解聚脱乙酰壳多糖和取代的脱乙酰壳多糖”。Enzyme & Microbial Technology 17, no. 6 :541-45。
- [0223] Mazzarelli, R. A. , M. Mattioli-Belmonte, C. Tietz, R. Biagini, G. Ferioli, M. A. Brunelli, M. Fini, R. Giardino, P. Ilari, 和 G. Biagini. 1994。“修饰的脱乙酰壳多糖发挥的对骨形成的刺激作用”。Biomaterials 15, no. 13 :1075-81。
- [0224] Namba, R. S. , M. Meuli, K. M. Sullivan, A. X. Le, 和 N. S. Adzick. 1998。“羊羔模型中关节软骨内的表浅缺损的自主修复”。Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume 80A, no. 1 :4-10.
- [0225] Naughton, G. K. , 和 B. A. Naughton, 发明人。1998 年 7 月 28 日。“三维遗传改造的细胞和组织培养系统”。US Patent 5, 785, 964.
- [0226] Naughton, G. K. , 和 J. Willoughby, 发明人。1998 年 12 月 1 日 1。“软骨的修复方法”。US Patent 5, 842, 477.
- [0227] Nevo, Z. , D. Robinson, S. Horowitz, A. Hasharoni, 和 A. Yayon. 1998。“再生骨骼组织中操作的间充质干细胞”。Cell Transplantation 7, no. 1 :63-70.
- [0228] Newman, A. P. 1998. 关节软骨修复。American Journal of Sports Medicine 26, no. 2 :309-24。
- [0229] Nixon, A. J. , L. A. Fortier, J. Williams, 和 H. Mohammed. 1999。“加载胰岛素样生长因子-I 的血纤蛋白复合物对广泛关节缺损的强化修复”。J Orthop Res 17, no. 4 :475-87.
- [0230] Noguchi, T. , M. Oka, M. Fujino, M. Neo, 和 T. Yamamuro. 1994。“使用培养的软骨细胞移植物修复骨软骨缺损。同种异体移植与同种移植物的比较”。Clinical Orthopaedics & Related Research, no. 302 :251-8.
- [0231] O' Driscoll, S. W. , F. W. Keeley, 和 R. B. Salter. 1988.“在持续被动影响下关节表面上的主要全厚度缺损内的游离自体骨膜移植物产生的再生关节软骨的耐久性。1 年时的随访报告”。Journal of Bone & Joint Surgery American Volume 70, no. 4 :595-606.
- [0232] O' Driscoll, S. W. , A. D. Recklies, 和 A. R. Poole. 1994。“骨膜外植体中的软骨发生。用于体外研究的器官培养模型”。Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume

76, no. 7 :1042-51。

[0233] Okamoto, Y, K Shibasaki, S Minami, A Matsuhashi, S Tanioka, Y Shigemasa, 1995, “壳多糖和脱乙酰壳多糖对狗体内开放性伤口愈合的评价”。J Vet Med Sci, v. 57, p. 851-4。

[0234] Outerbridge, H. K. , A. R. Outerbridge, 和 R. E. Outerbridge. 1995。“髌外侧自体移植植物在修复膝内较大骨软骨缺损中的应用”。Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume 77, no. 1 :65-72。

[0235] Pachence, J. M. , S. Frenkel, 和 D. Menche, 发明人。2000 年 6 月 27 日。”用于修复软骨损害的多阶段基于胶原的模板或植入物”。Hospital for Joint Disease Orthopaedic Institute, 受让人。US Patent 6, 080, 194。

[0236] Paletta, G. A. , S. P. Arnoczky, 和 R. F. Warren. 1992。“使用外源性血纤蛋白凝块修复骨软骨缺损。在狗体内进行的实验研究”。Am J Sports Med 20, no. 6 :725-31。

[0237] Pechak, D. G. , M. J. Kuwawa, 和 A. I. Caplan. 1986。“胚胎小鸡肢体中的骨发育形态学和骨再造”。Bone 7, no. 6 :459-72。

[0238] Peluso, G. , O. Petillo, M. Ranieri, M. Santin, L. Ambrosio, D. Calabro, B. Avallone, G. Balsamo, 1994, “脱乙酰壳多糖介导的对巨噬细胞功能的刺激”：Biomaterials, v. 15, p. 1215-20。

[0239] Peterson, D. R. 和 N. Nousek-Goebl. 2001 年 3 月 13 日。”前体细胞从造血和非造血组织中的分离及其在体内骨和软骨再生中的应用”。DePuy Orthopaedics, 受让人。US Patent 6, 200, 606。

[0240] Pridie, K. H. ,“重整骨关节炎性膝关节表面的方法”。1959. In Proceedings of the British Orthopaedic Association. J. Bone and Joint Surg. 41-B :618-619。

[0241] Purchio, A. F. , M. Zimber, N. Dunkelman, G. K. Naughton, 和 B. A. Naughton, 发明人。1999 年 5 月 11 日。”三维软骨培养物”。Advanced Tissue Sciences Inc., 受让人。US Patent 5, 902, 741。

[0242] Rao, S. B. , C. P. Sharma, 1997, “脱乙酰壳多糖用作生物材料”：对其安全性和止血潜能的研究：J Biomed Mater Res, v. 34, p. 21-8。

[0243] Robinson, D. , N. Halperin, 和 Z. Nevo. 1990。“使用包埋在新天然递送物质中的胚胎小鸡软骨细胞再生老龄鸡关节缺损内的透明软骨”。Calcif. Tissue Int. 46, no. 4 :246-53。

[0244] Rodgers, K. , 和 G. Dizerega, 发明人。2000 年 1 月 20 日。”用于加速骨和软骨生长和修复的方法”。University of Southern California, 受让人。WO Patent 00/02905。

[0245] Rodrigo, J. J. , J. R. Steadman, 和 J. F. Sillima. 1993.“膝骨关节损伤”。Operative orthopaedics. Second edition ed. , 2077-82。

[0246] Sackier, J. M. , C. B. Wood, R. Krishnan, G. R. Wigginton, 和 D. M. H. Butler, 发明人。1997 年 3 月 18 日。”使用羊膜细胞再生或取代软骨组织的方法”。Genethics Limited, 受让人。US Patent 5, 612, 028。

[0247] Sail, K. N. , J. K. Kreter, R. H. Keates, 1987, “脱乙酰壳多糖对角膜伤口愈合的作用”：Ann Ophthalmol, v. 19, p. 31-3。

- [0248] Sams, A. E. , 和 A. J. Nixon. 1995。“用于重整广泛关节软骨缺损表面的加载软骨细胞的胶原支架”。*Osteoarthritis & Cartilage* 3, no. 1 :47–59。
- [0249] Sashiwa, H. , H. Saimoto, Y. Shigemasa, R. Ogawa, 和 S. Tokura. 1990。“部分脱乙酰化壳多糖的溶菌酶易感性”。*International Journal of Biological Macromolecules* 12, no. 5 :295–6。
- [0250] Shipper, N. G. M. , S. Olsson, J. A. Hoogstraate, A. G. Deboer, K. M. Varum, 和 P. Artursson. 1997。“脱乙酰壳多糖作为难吸收药物的吸收促进剂。2. 吸收促进机理”。*Pharmaceutical Research* 14, no. 7 :923–29。
- [0251] Schwarz, R. E. , 发明人。1998 年 5 月 12 日。“软骨修复装置及其装配方法”。Matrix Biotechnologies Inc. , 受让人。US Patent 5,749,874。
- [0252] Schwarz, I. M. , and B. A. Hills. 1998. “表面活性磷脂作为 lubricin 的润滑成分”。*British Journal of Rheumatology* 37, no. 1 :21–26.
- [0253] Sechriest, V. F. , Y. J. Miao, C. Niyibizi, A. Westerhausen-Larson, H. W. Matthew, C. H. Evans, F. H. Fu, 和 J. K. Suh. 2000。“GAG- 增加的多糖水凝胶 : 用于支持软骨形成的新型生物适合性和可生物降解材料”。*J Biomed Mater Res* 49, no. 4 :534–41。
- [0254] Sellers, R. S. , D. Peluso, 和 E. A. Morris. 1997。“重组人骨形态发生蛋白 -2(rhBMP-2) 对全厚度关节软骨缺损愈合的作用”。*Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume* 79, no. 10 :1452–63。
- [0255] Sellers, R. S. , R. Zhang, S. S. Glasson, H. D. Kim, D. Peluso, D. A. D'Augusta, K. Beckwith, 和 E. A. Morris. 2000。“用重组人骨形态发生蛋白 -2(rhBMP-2) 处理后关节软骨缺损的修复”。*J Bone Joint Surg Am* 82, no. 2 :151–60。
- [0256] Shigemasa, Y. , 和 S. Minami. 1996。“壳多糖和脱乙酰壳多糖在生物材料中的应用”。*Biotechnol Genet Eng Rev* 13 :383–420。
- [0257] Soulhat, J, M. D. Buschmann, 和 A. Shirazi-Adl. 1999。“无限制压缩中的显微网状结构强化的软骨双相模型”。*Journal of Biomechanical Engineering* 121, no. 3 :340–7。
- [0258] Sparkes, B. G. , 和 D. G. Murray, 发明人。1986 年 2 月 25 日。“基于脱乙酰壳多糖的伤口敷盖物”。Her Majesty the Queen in right of Canada, 受让人。US4572906。
- [0259] Specchia, N. , A. Gigante, F. Falciglia, 和 F. Greco. 1996。“用于修复关节软骨缺损的胎儿软骨同种移植植物”。*Bulletin-Hospital for Joint Diseases* 54, no. 4 :230–5。
- [0260] Steadman, J. R. , W. G. Rodkey, K. K. Briggs, 和 J. J. Rodrigo. 1998.“显微断裂步骤：用于治疗关节软骨缺损的基本原理、技术和临床观察”。*J. Sports Traumatol. Rel. Res.* 20, no. 2 :61–70。
- [0261] Stone, C. A. , H. Wright, T. Clarke, R. Powell, V. S. Devaraj, 2000,“覆盖有脱乙酰壳多糖的皮肤移植供体部位上的愈合”：*Br J Plast Surg*, v. 53, p. 601–6
- [0262] Stone, K. R. , 发明人。2000 年 8 月 29 日。“用于关节软骨移植的方法膏浆”。US Patent 6,110,209。
- [0263] Suh, J. , H. Matthew, P. Fu, 和 F. Fu, 发明人。1999 年 9 月 23 日。“含有糖胺聚糖类的基于脱乙酰壳多糖的复合材料用于软骨修复”。University of Pittsburg, 受让人。WO Patent 99/47186。

- [0264] Suh, J. K. , H. W. Matthew, 2000, “基于脱乙酰壳多糖的多糖生物材料在关节软骨改造中的应用” :a review :Biomaterials,, v. 21, p. 2589–98。
- [0265] Terbojevich, M. , A. Cosani, 和 R. A. A. Muzzarelli. 1996。 “在木瓜蛋白酶辅助下解聚的脱乙酰壳多糖的分子参数”。 Carbohydrate Polymers 29, no. 1 :63–68。
- [0266] Tubo, R. A. , L. M. Barone, 和 C. A. Wrenn, 发明人。 1998 年 3 月 3 日。 “用于修复哺乳动物体内关节软骨缺损的方法和组合物。” Genzyme Corp. , 受让人。 US Patent 5,723,331。
- [0267] Ueno, H. , H. Yamada, I. Tanaka, N. Kaba, M. Matsuura, M. Okumura, T. Kadosawa, T. Fujinaga, 1999, “脱乙酰壳多糖对狗体内实验开放性伤口早期愈合的加速作用” : Biomaterials, v. 20, p. 1407–14。
- [0268] Vacanti, J. P. , 和 R. S. Langer, 发明人, 1998a, 6 月 23 日。 “用于粘连细胞以便在体内产生血管化组织的三维纤维支架的制备” 。 US Patent 5,770,193。
- [0269] Vacanti, J. P. , 和 R. S. Langer, 发明人。 1998b, 6 月 23 日。 “含有用于体内产生血管化组织的粘连细胞的三维纤维支架” 。 US Patent 5,770,417。
- [0270] Vacanti, J. P. , C. A. Vacanti, 和 R. S. Langer, 发明人。 1998 年 4 月 7 日。 “含有用于软骨结构的体内产生的软骨细胞的可生物降解的合成聚合纤维性基质” 。 M. I. T. , 和 Children' s Medical Center Corp., 受让人。 US Patent 5,736,372。
- [0271] Vasio, G. W. , P. D. DiBenedetto, C. A. Preston, R. A. Tubo, 和 J. M. McPherson. 1999。“Chitotriosidase 在正常软骨细胞中的表达和在来源于骨关节炎软骨的软骨细胞中的增量调节”。 45th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society.
- [0272] Villeneuve, P. E. , 发明人, 1999 年 2 月 2 日。 “使软骨和骨缺损愈合的材料” 。 US Patent 5,866,415.
- [0273] Wakitani, S. , T. Kimura, A. Hirooka, T. Ochi, M. Yoneda, H. Owaki, K. Ono, 和 N. Yasui. 1989。 “使用包埋在胶原凝胶中的软骨细胞的同种异体移植物修复家兔关节表面”。 Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi-Journal of the Japanese Orthopaedic Association 63, no. 5 :529–38。
- [0274] Wakitani, S. , T. Goto, S. J. Pineda, R. G. Young, J. M. Mansour, A. I. Caplan, 和 V. M. Goldberg. 1994。 “较大的全厚度关节软骨缺损的基于间充质细胞的修复”。 J Bone Joint Surg Am 76, no. 4 :579–92。
- [0275] Wei, X. , J. Gao, 和 K. Messner. 1997。 “家兔膝关节内未处理的骨软骨缺损的成熟依赖性修复”。 Journal of Biomedical Materials Research 34, no. 1 :63–72。
- [0276] Yagi, K. , N. Michibayashi, N. Kurikawa, Y. Nakashima, T. Mizoguchi, A. Harada, S. Higashiyama, H. Muranaka, 和 M. Kawase. 1997。 “果糖修饰的脱乙酰壳多糖作为肝细胞粘连的支架的有效性”。 Biological & Pharmaceutical Bulletin 20, no. 12 :1290–4。
- [0277] Yalpani, M. , 和 D. Pantaleone. 1994。 “氨基聚糖类对酶水解的异常易感性的检验”。 Carbohydrate Research 256, no. 1 :159–75。
- [0278] Zhang, R. , E. Morris, 和 D. Peluso, 发明人, 2000 年 8 月 3 日。 “用于关节软骨的愈合与修复的方法和组合物” Inc. Genetics Institute, 受让人。 WO Patent 00/44413。

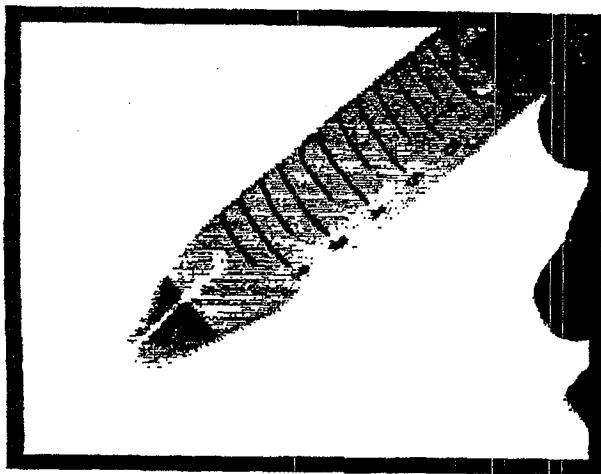


图 1A

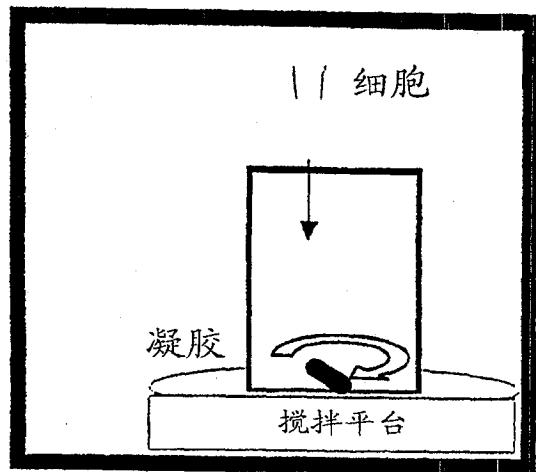


图 1B

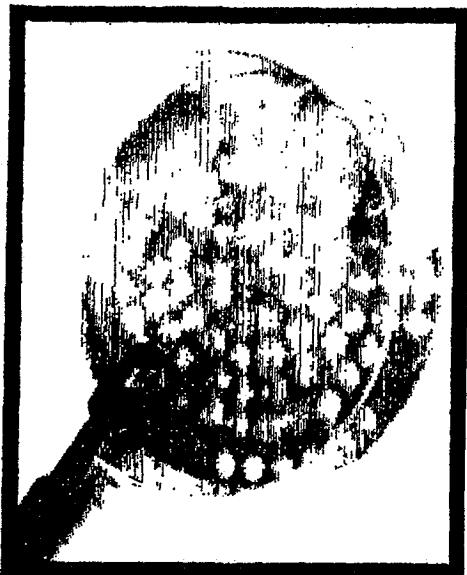


图 1C

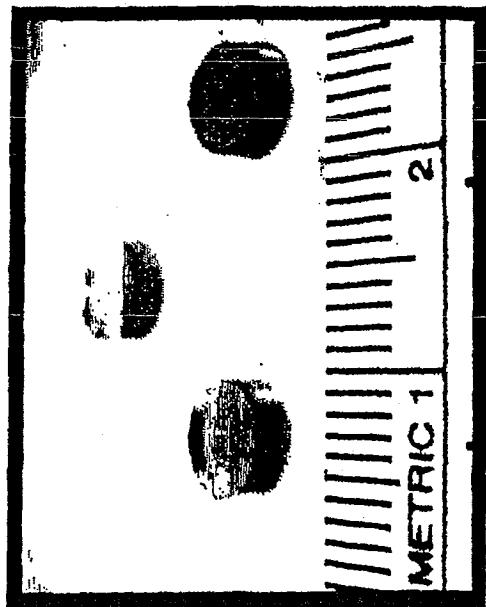


图 1D

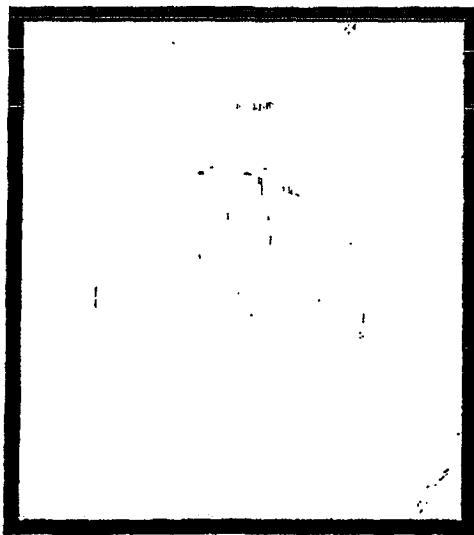


图 1E

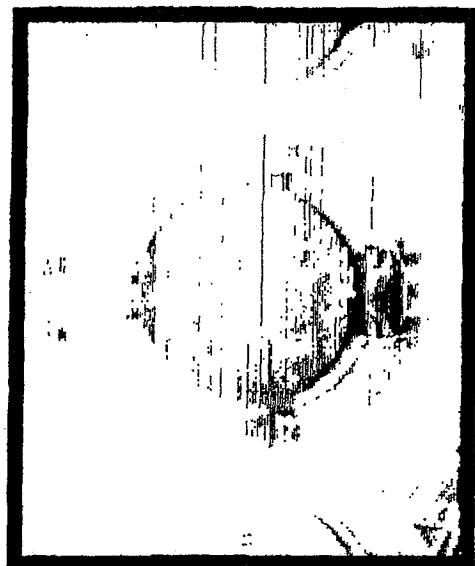


图 1F

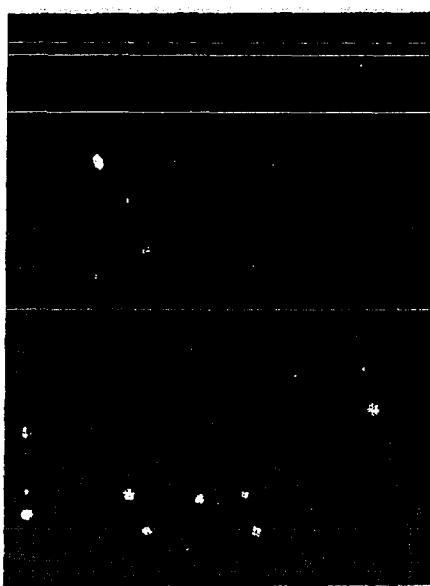


图 2A

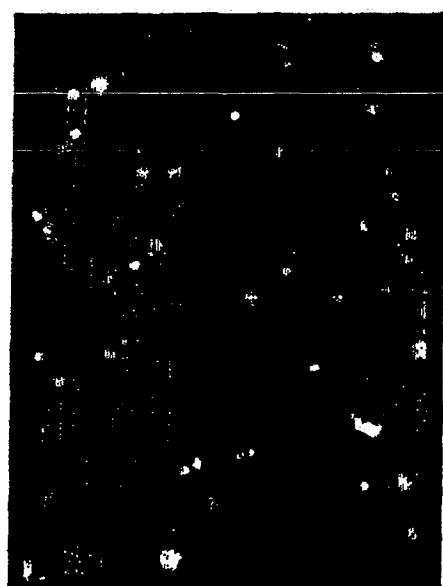


图 2B

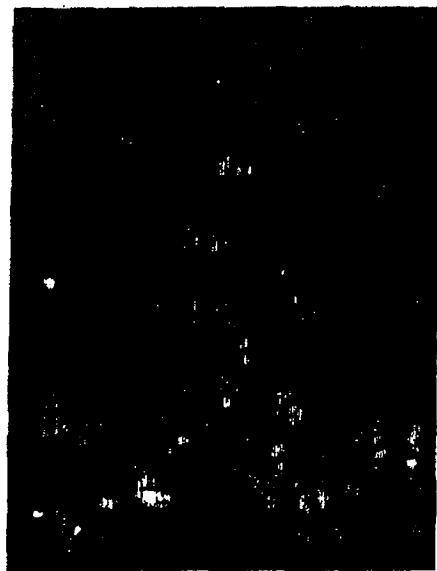


图 2C



图 3A

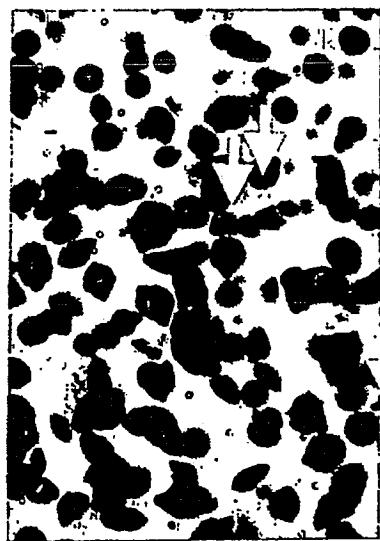


图 3B

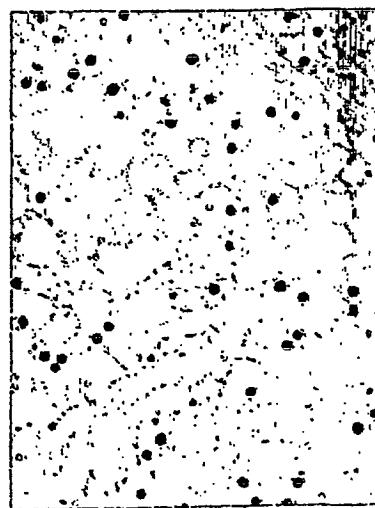


图 3C

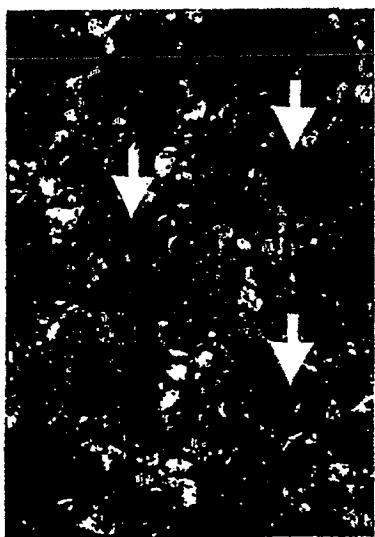


图 3D

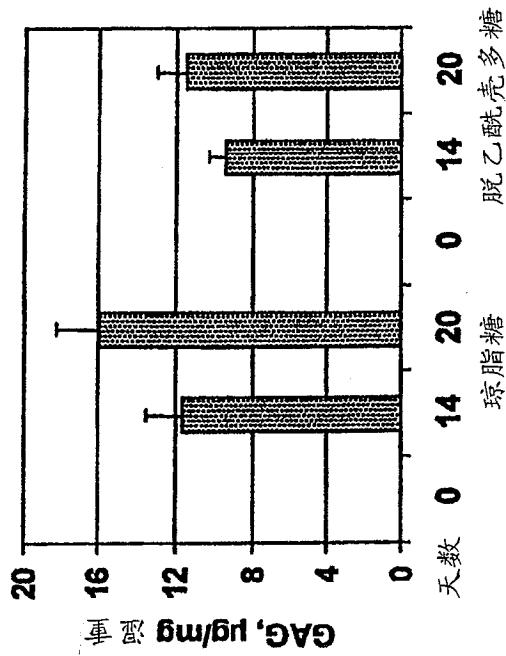


图 3E

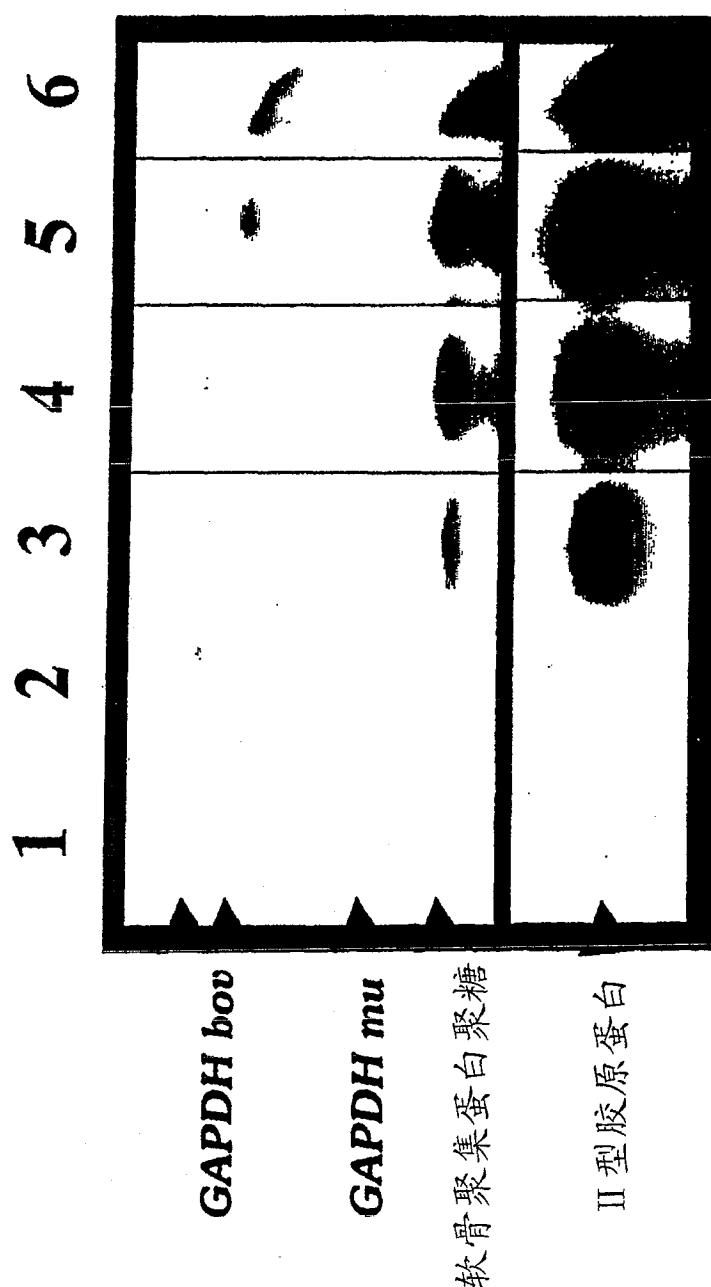


图 4

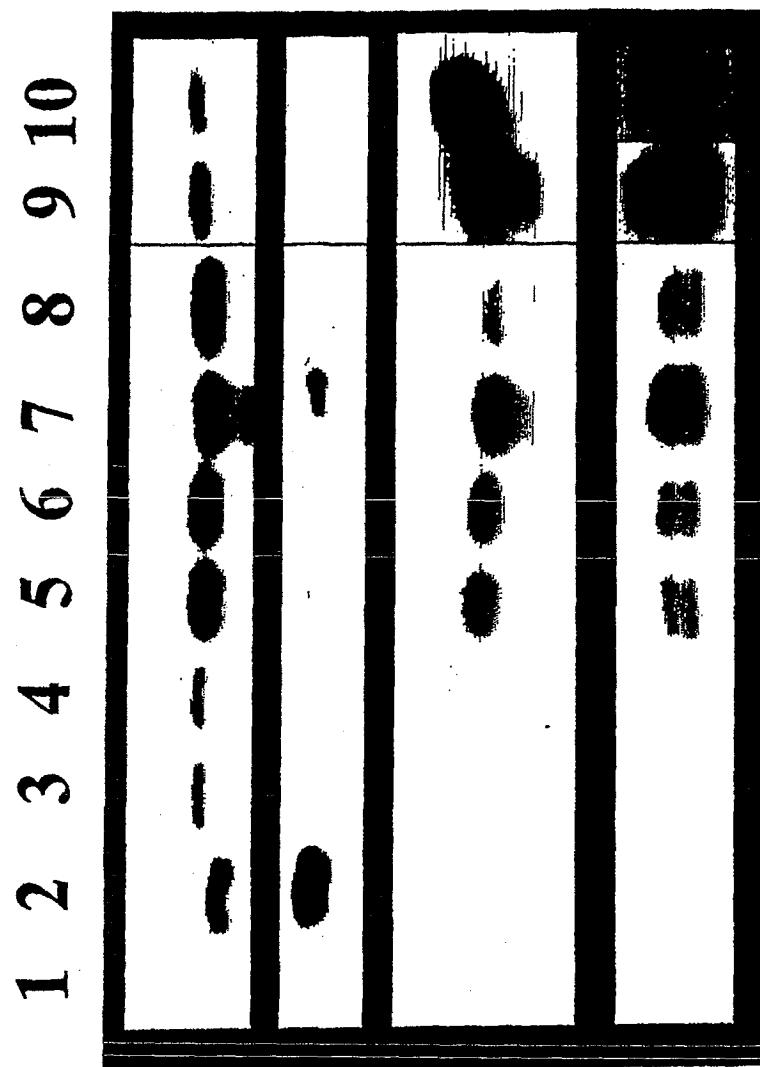


图 5

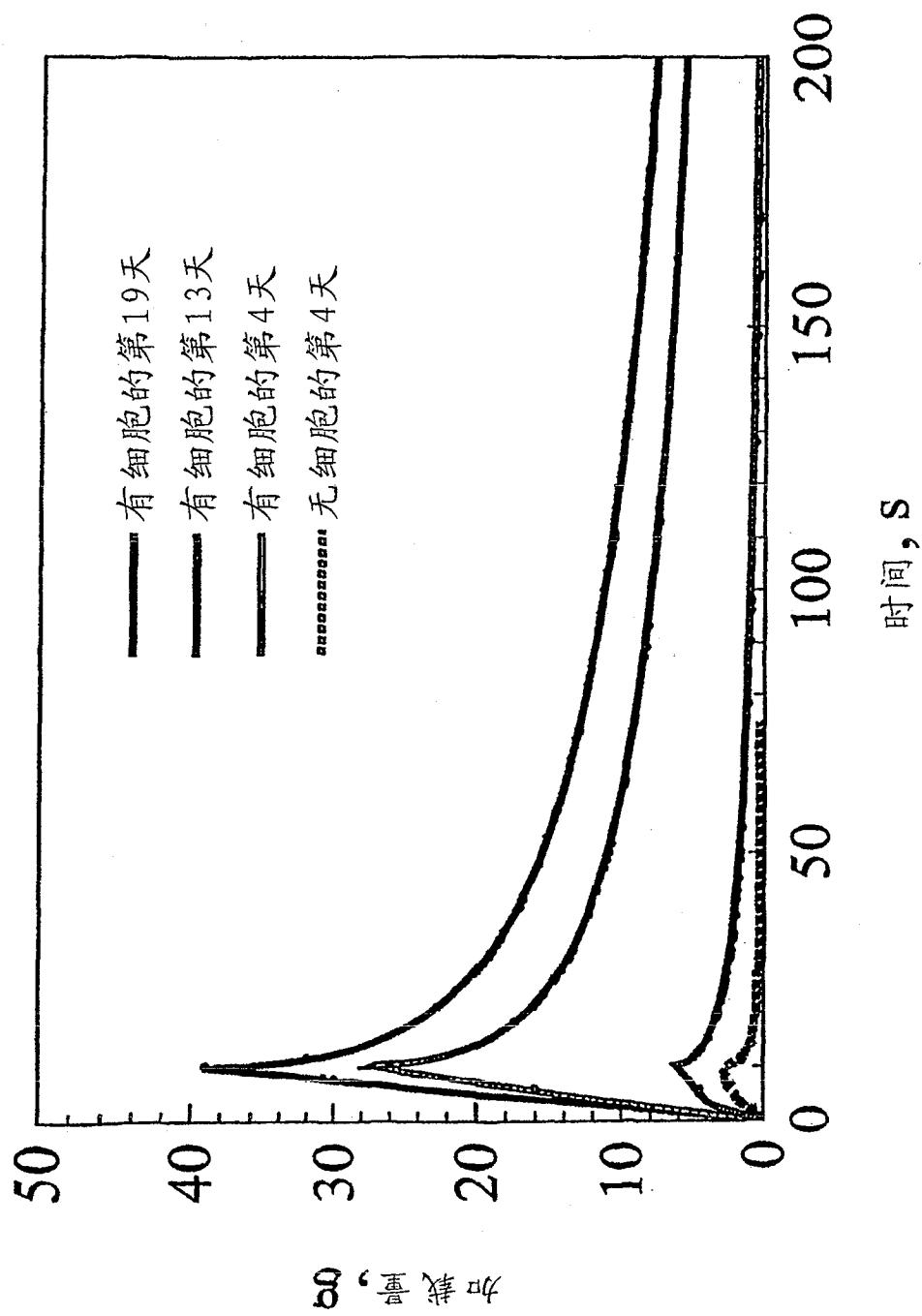


图 6

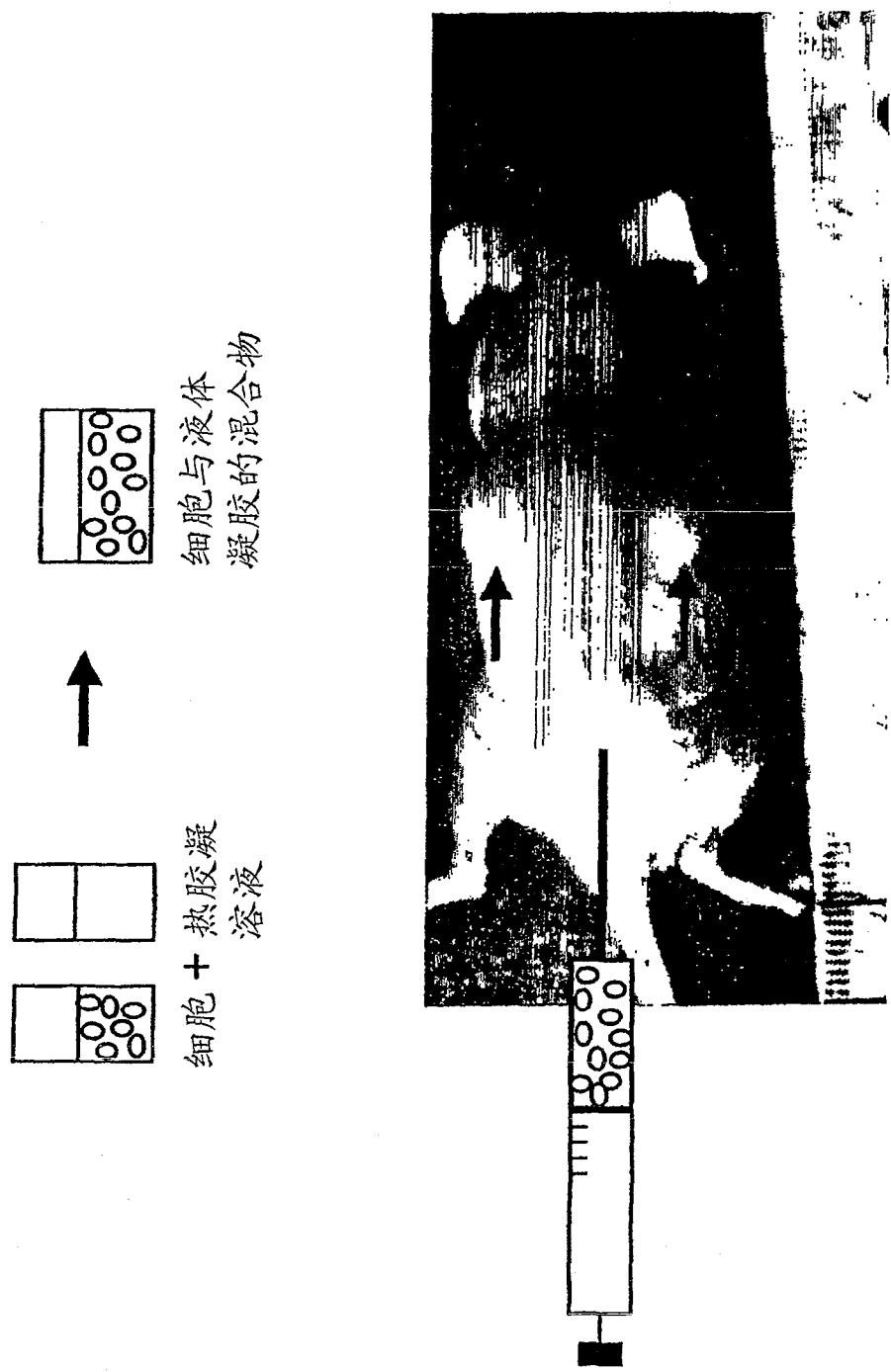


图 7



图 8A



图 8B

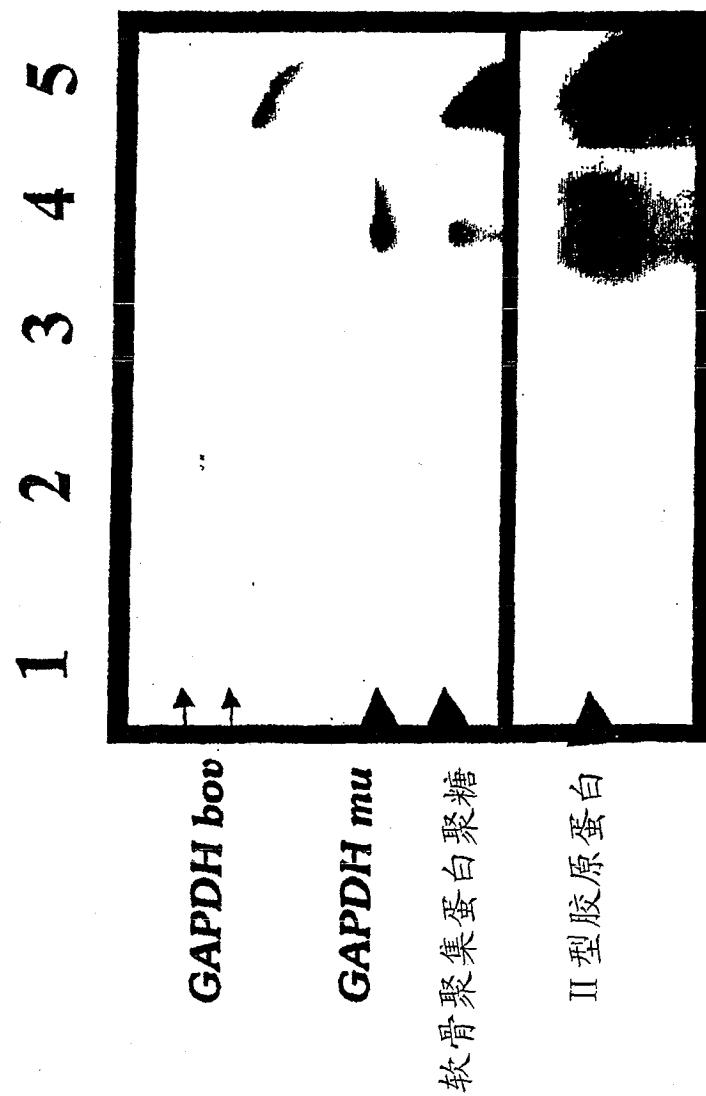


图 9

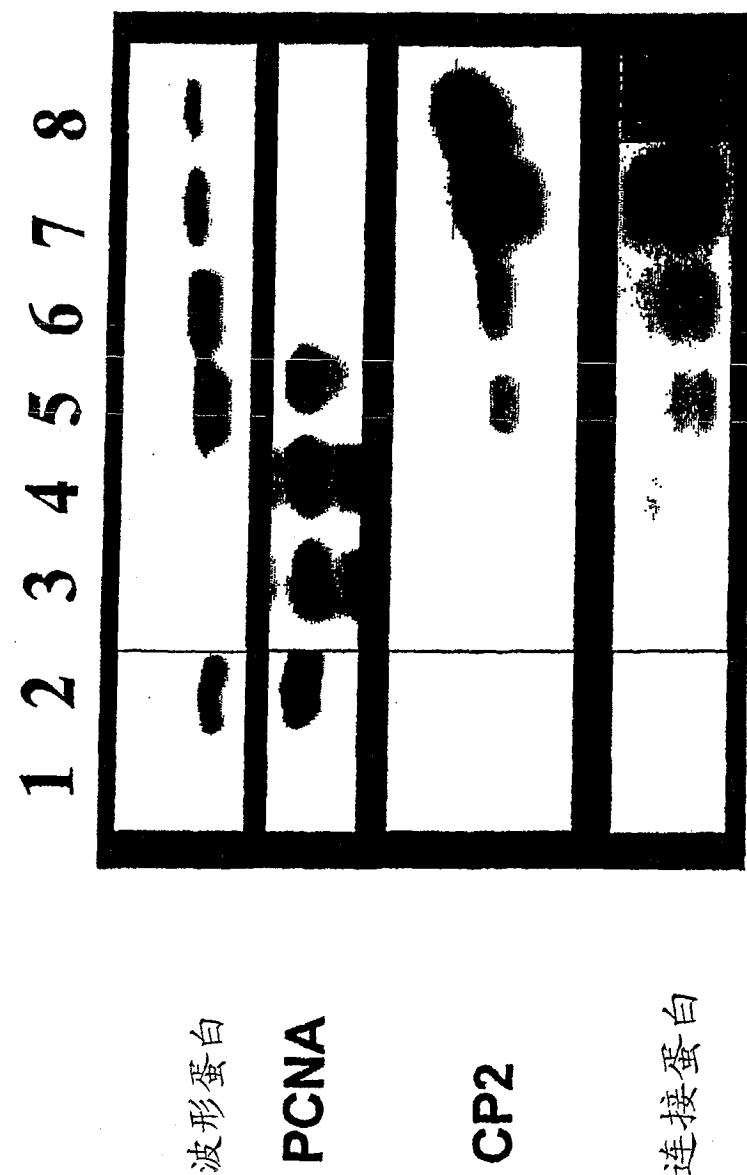


图 10

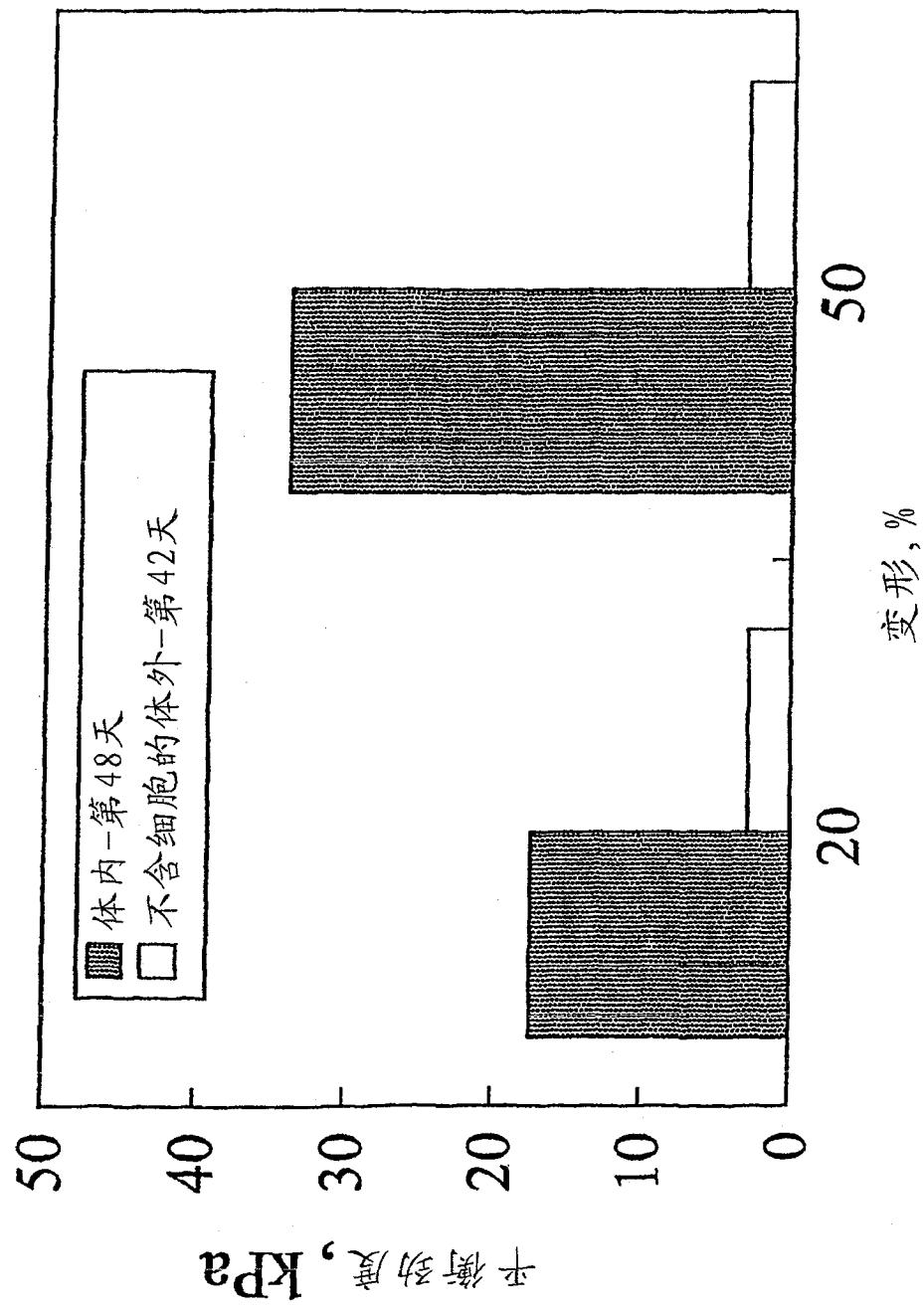


图 11



图 12A



图 12B



图 13A



图 13B

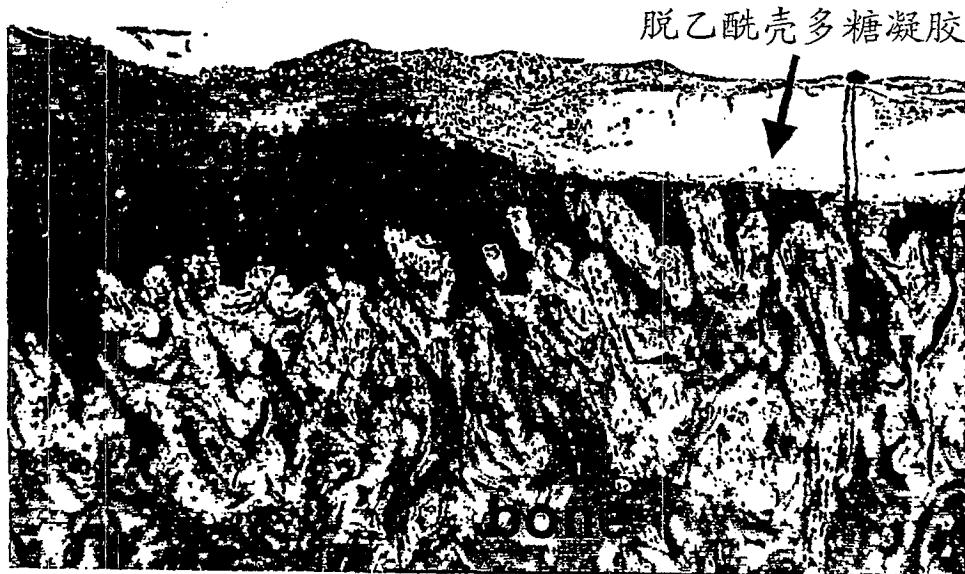


图 14

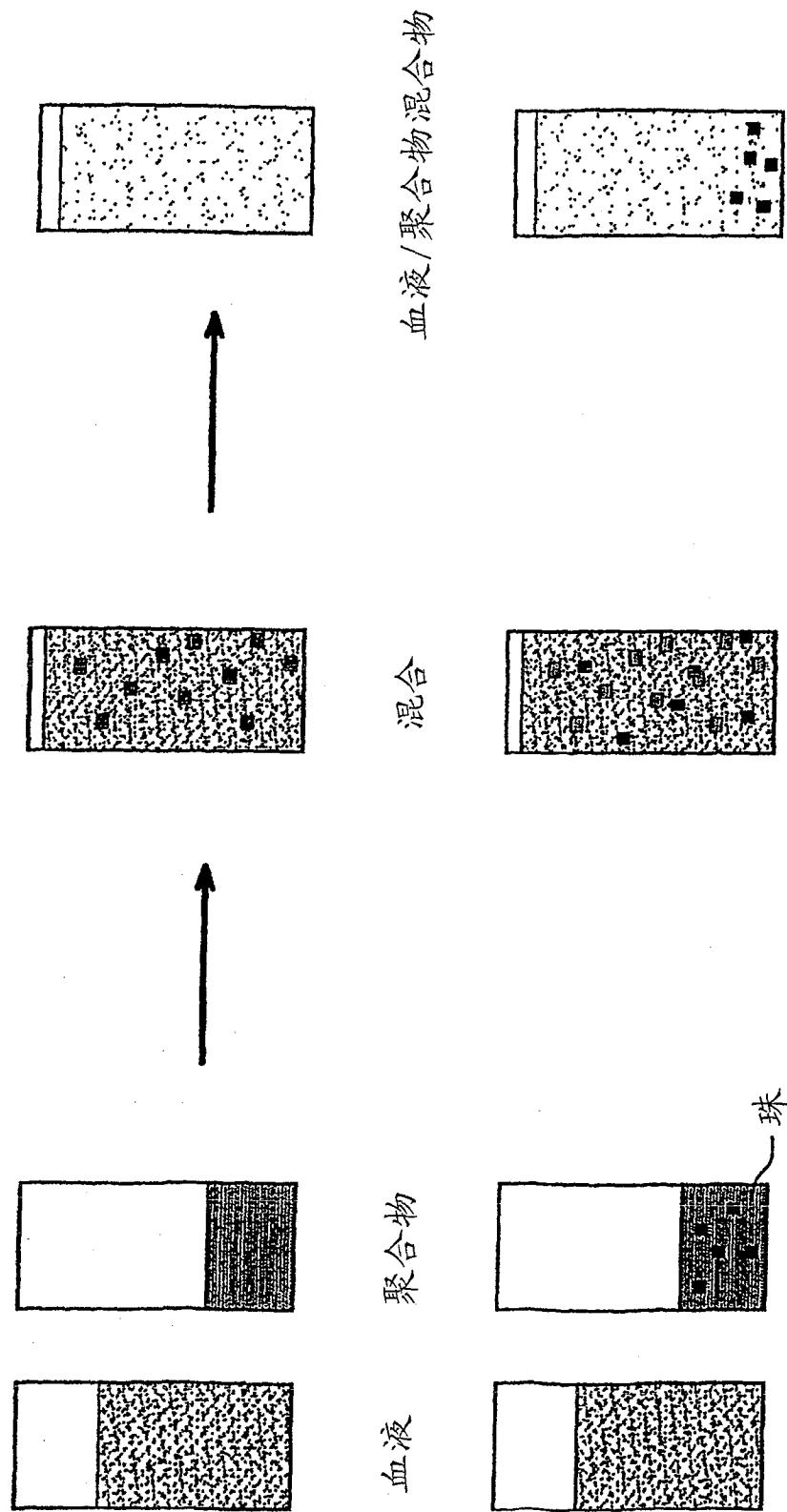
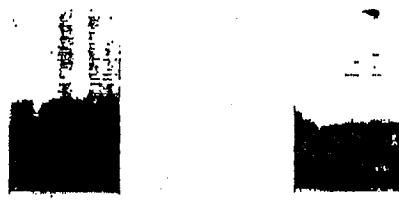


图 15A



血液/聚合物  
混合物

图 15B



血液/聚合物  
混合物

图 15C

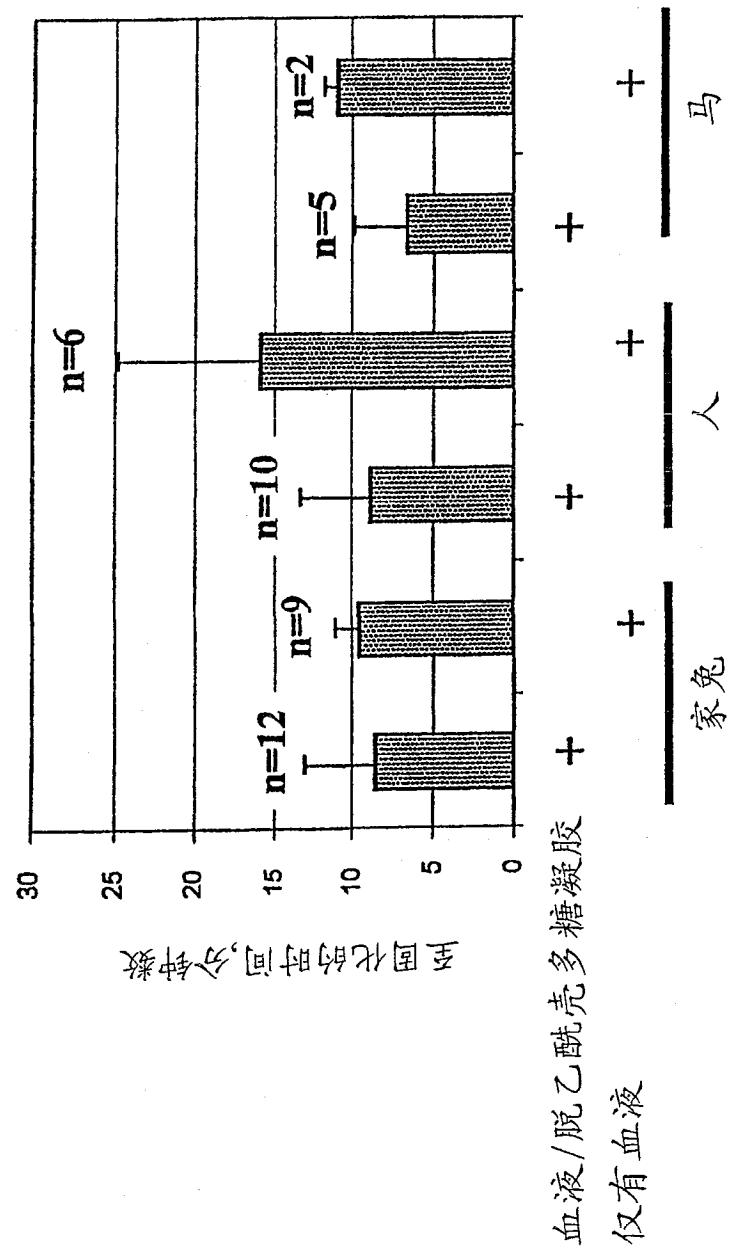


图 16

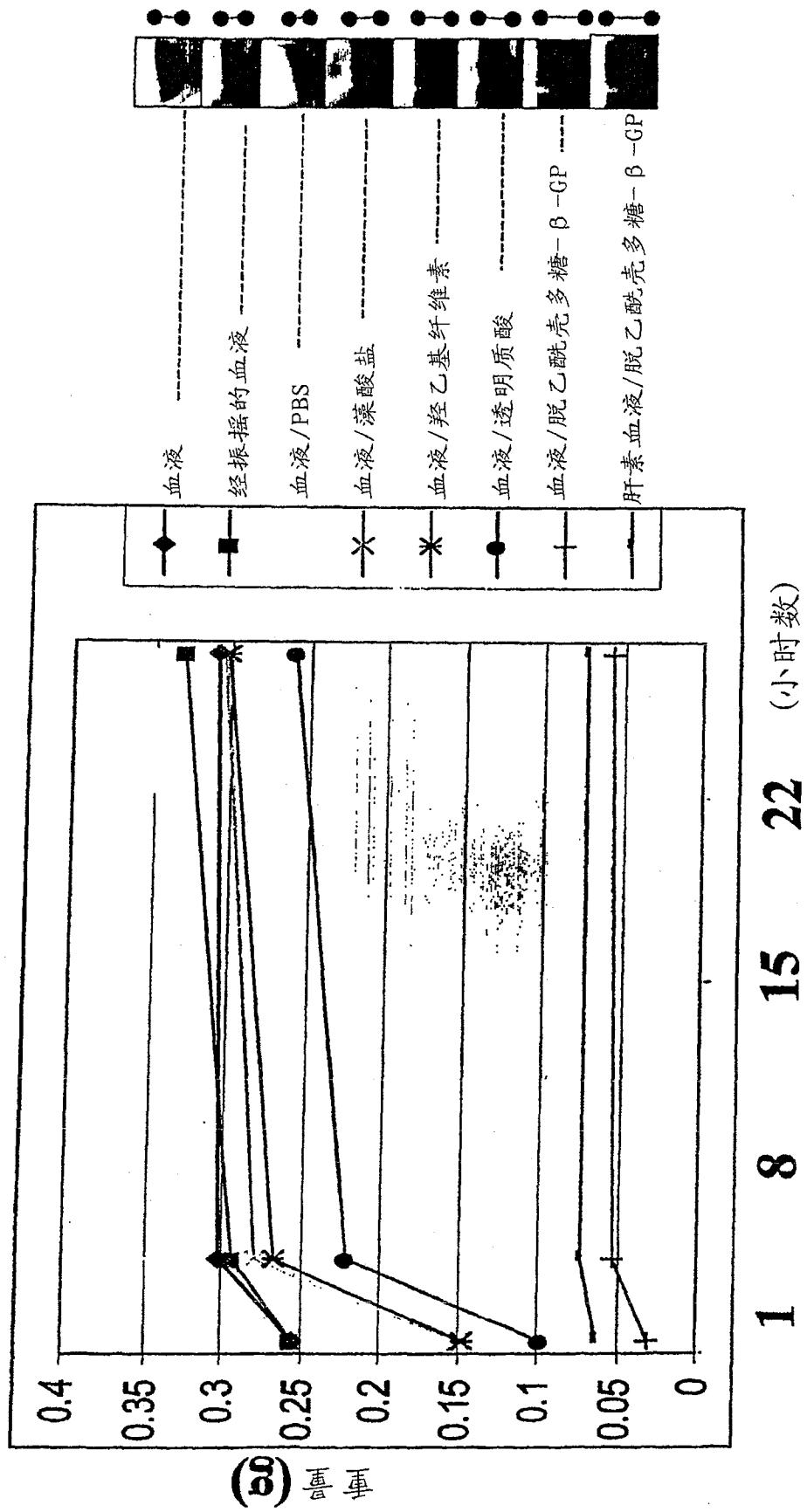


图 17A

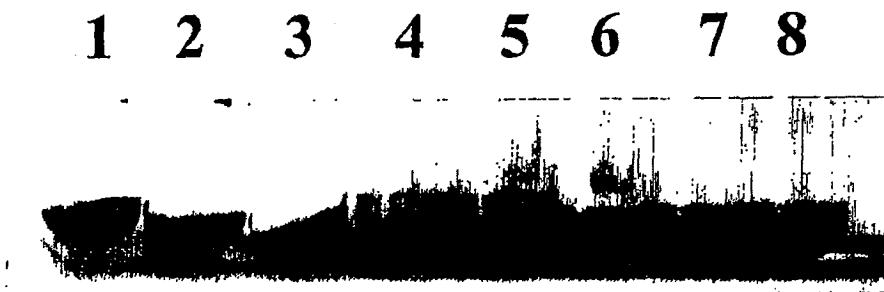


图 17B

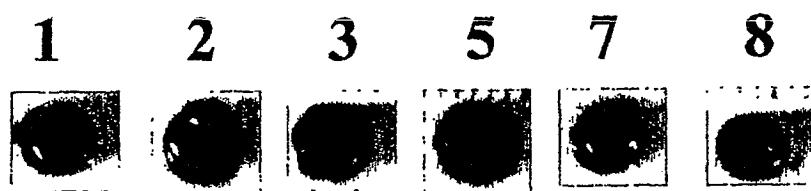


图 17C



图 18

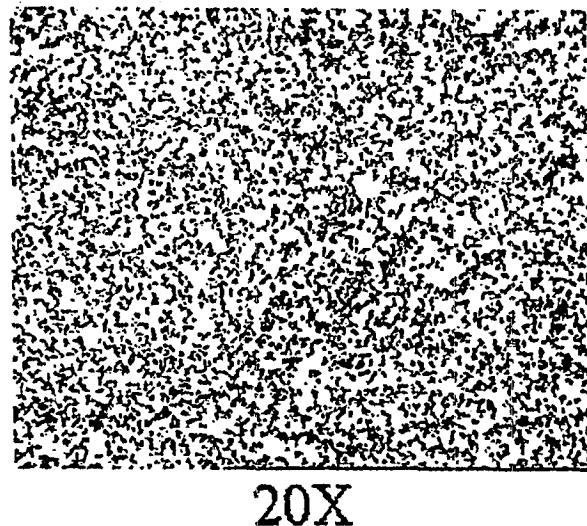


图 19A

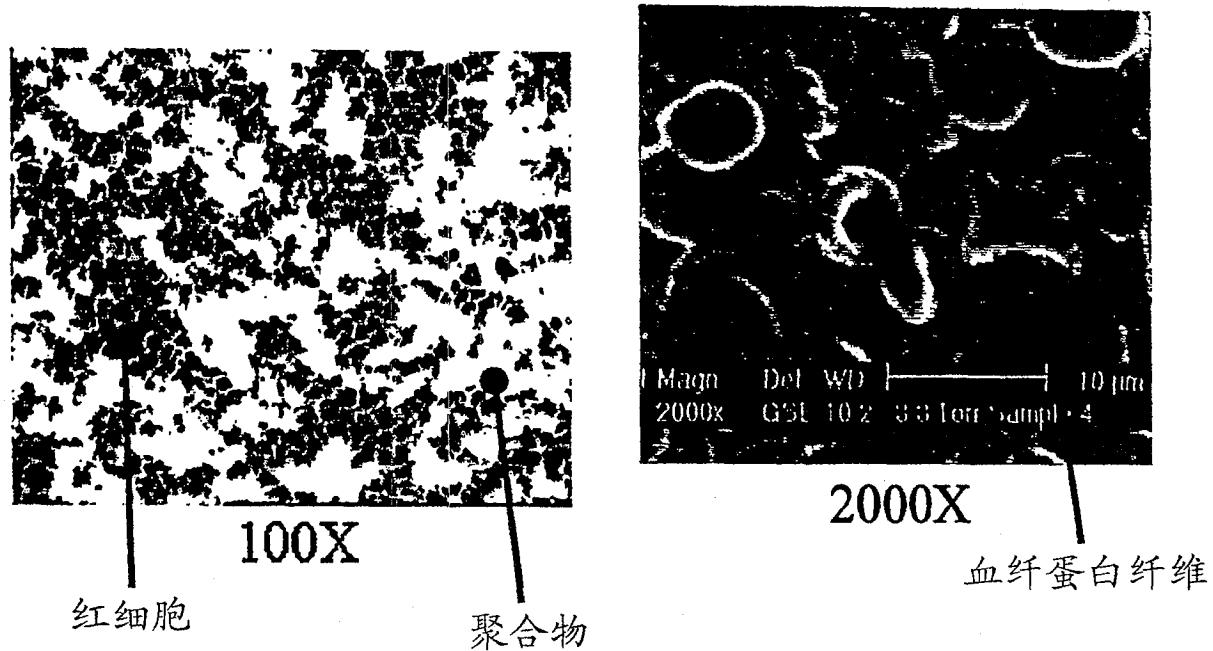


图 19B

图 19C

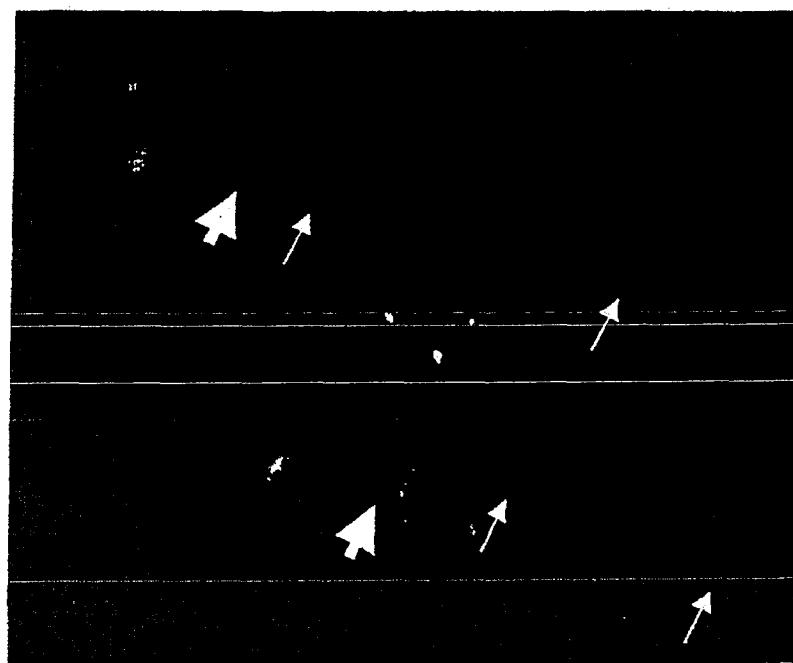


图 20A

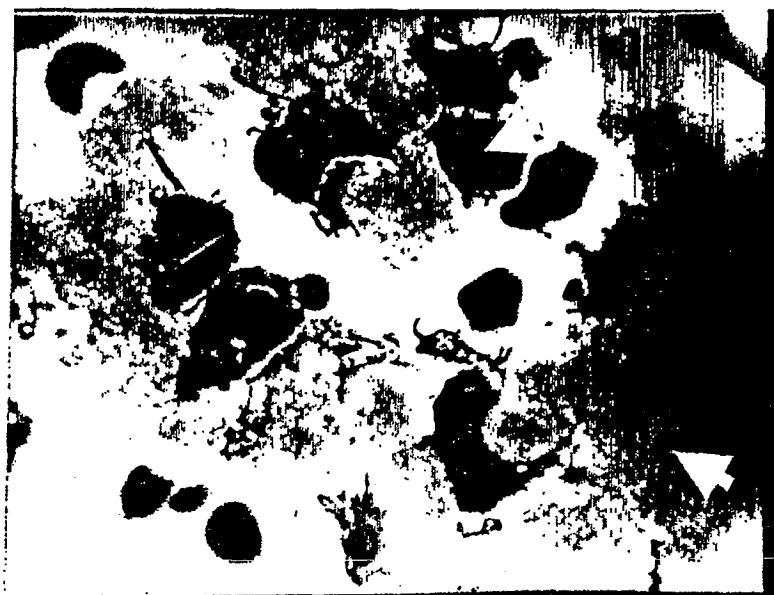


图 20B

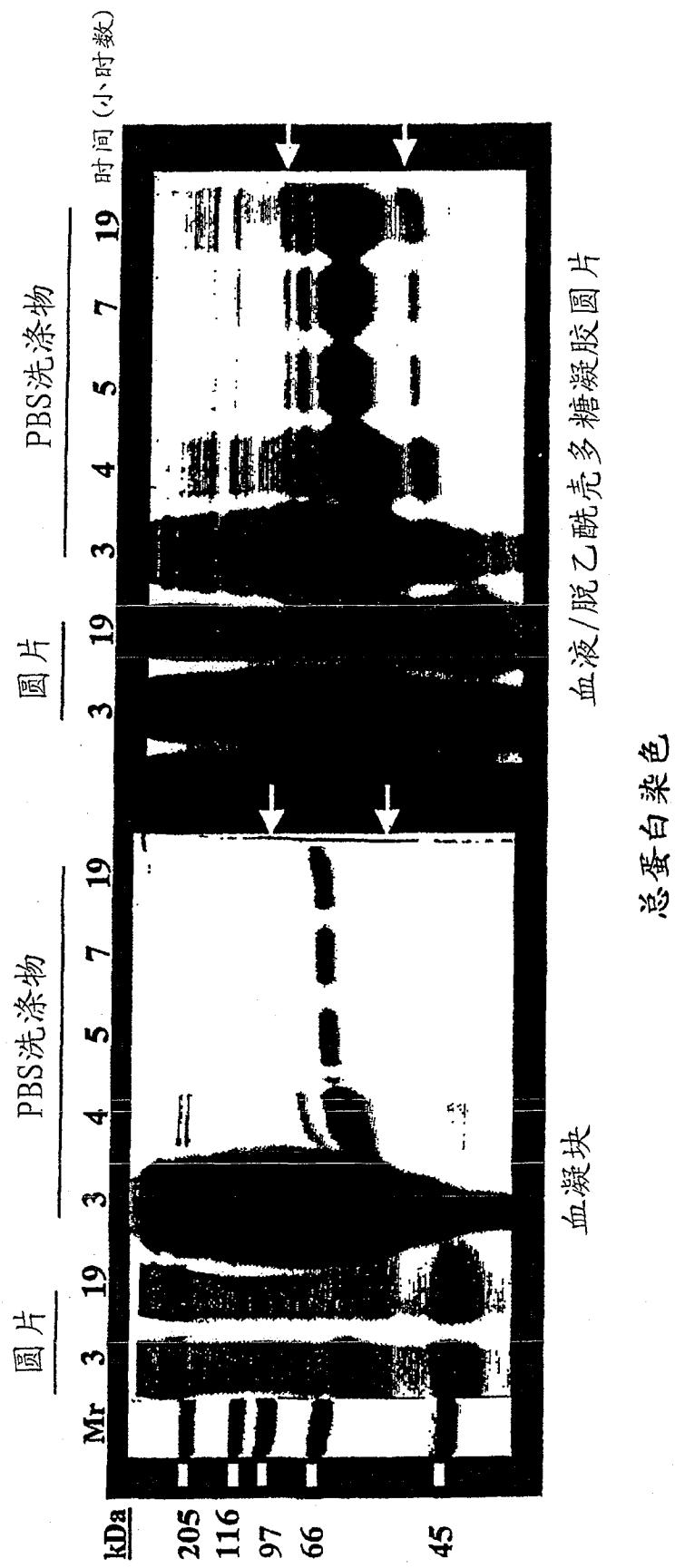


图 21

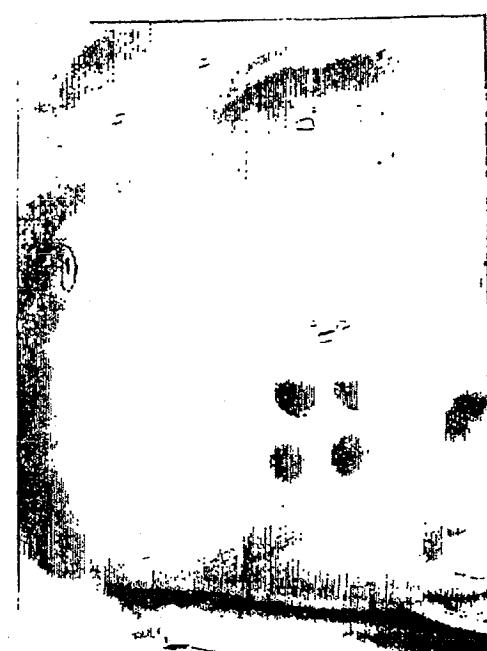


图 22A

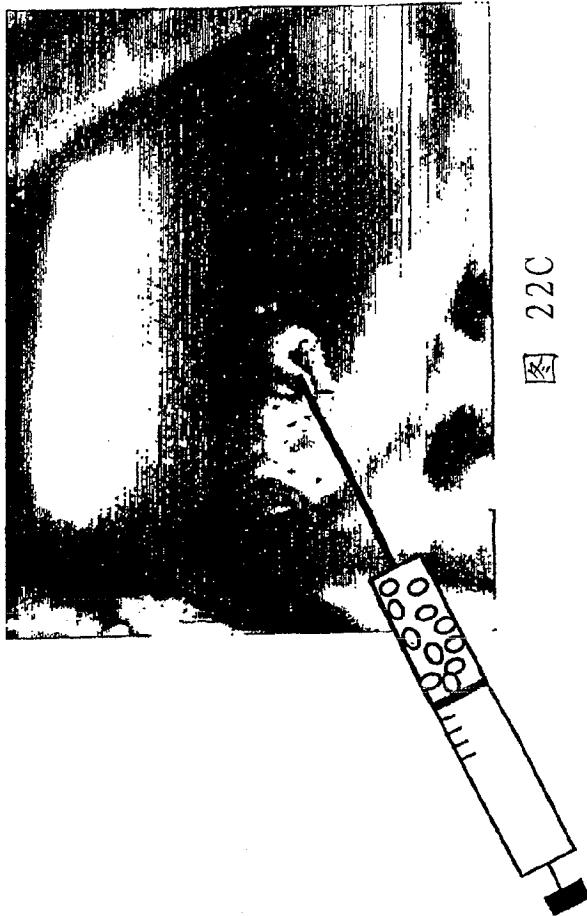


图 22C

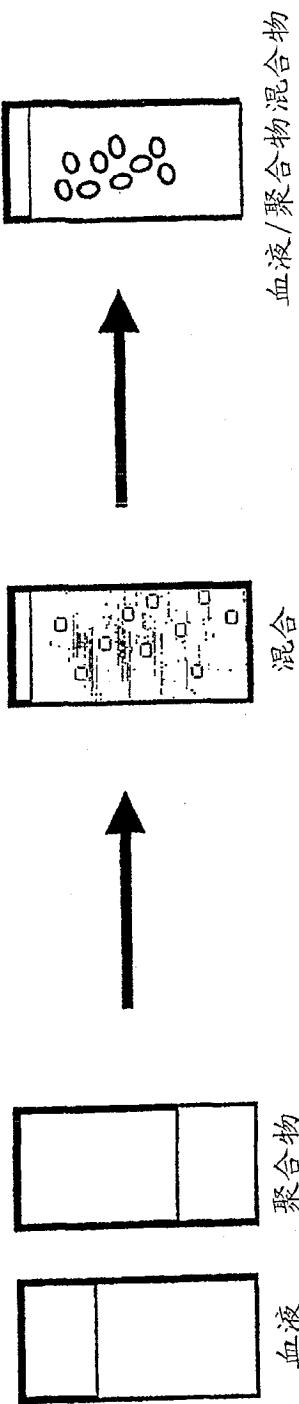
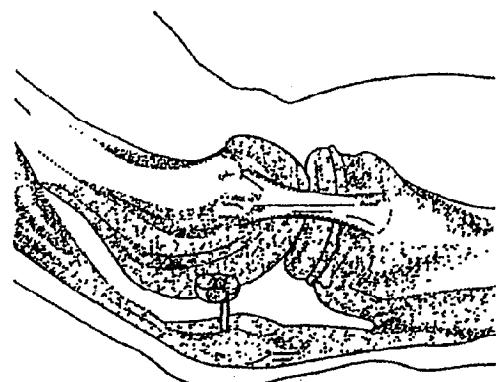
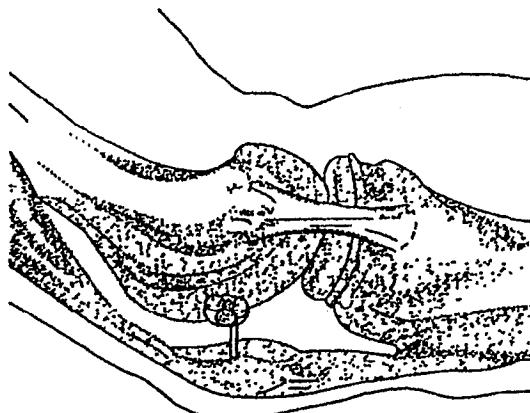
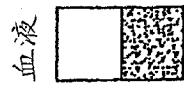


图 22B



关节注射



关节注射

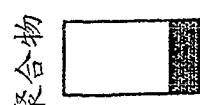


图 22E

图 22D



经血液/脱乙酰壳多糖凝胶治疗的

图 23A



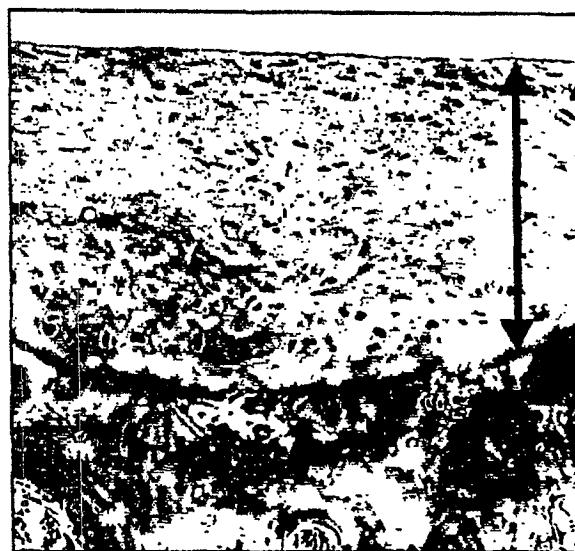
未治疗的缺损

图 23B



经血液/脱乙酰壳多糖凝胶治疗的

图 24A



未治疗的缺损

图 24B