



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101772350 A

(43) 申请公布日 2010.07.07

(21) 申请号 200880102160.X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.06.19

A61K 38/18(2006.01)

A61L 24/10(2006.01)

(30) 优先权数据

60/936,198 2007.06.19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.02.05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/067562 2008.06.19

(87) PCT申请的公布数据

W02008/157733 EN 2008.12.24

(71) 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特医疗保健股份有限公司

(72) 发明人 伊莎贝尔·卡特拉斯

约瑟夫·德怀尔 万达·塞顿

谢恩·多诺万 萨姆·L·海尔格森

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 22 页 附图 11 页

(54) 发明名称

用于 PDGF 受控释放的纤维蛋白凝胶及其应用

(57) 摘要

总的来说,本发明涉及含有血小板衍生生长因子(PDGF)的纤维蛋白密封胶,通过原位受控释放用于治疗性应用,包括肌肉骨骼病症、软组织病症和血管疾病。

1. 用于改变血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白从纤维蛋白密封胶的释放的方法, 所述血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB, 其中纤维蛋白密封胶通过将纤维蛋白原复合物 (FC) 组分、凝血酶组分和 PDGF 组分相混合而产生, 该方法包括,

a) 确定从具有已知 PDGF 起始量和已知 FC 终浓度的第一种纤维蛋白密封胶中释放的 PDGF 的量, 以及

b) 改变在步骤 (a) 的第一种纤维蛋白密封胶中使用的 FC 的已知终浓度以产生第二种纤维蛋白密封胶, 其中第二种密封胶中 FC 的浓度与第一种密封胶中 FC 的已知终浓度相比的增加, 使从第二种密封胶释放 PDGF 的速率与从步骤 (a) 的第一种密封胶释放 PDGF 相比降低, 并且其中第二种密封胶具有与步骤 (a) 的第一种密封胶相同的 PDGF 起始量。

2. 用于改变血小板衍生生长因子 (PDGF) 从纤维蛋白密封胶的释放的方法, 所述血小板衍生生长因子蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB, 其中纤维蛋白密封胶通过将 FC 组分、凝血酶组分和 PDGF 组分相混合而产生, 该方法包括,

a) 确定从具有已知 PDGF 起始量和已知 FC 终浓度的第一种纤维蛋白密封胶中释放的 PDGF 的量,

b) 改变在步骤 (a) 的第一种纤维蛋白密封胶中使用的 FC 的已知终浓度以产生第二种纤维蛋白密封胶, 其中第二种密封胶中 FC 的浓度与第一种密封胶中 FC 的已知终浓度相比的降低, 使从第二种密封胶释放 PDGF 的速率与从步骤 (a) 的第一种密封胶释放 PDGF 相比增加, 并且其中第二种密封胶具有与步骤 (a) 的第一种密封胶相同的 PDGF 起始量。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中第一或第二种密封胶中 FC 的终浓度在大约 1mg/ml 到大约 150mg/ml 的范围内。

4. 权利要求 3 的方法, 其中第一或第二种密封胶中 FC 的浓度在大约 5mg/ml 到大约 75mg/ml 的范围内。

5. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中第一种纤维蛋白密封胶中 FC 的终浓度与第二种密封胶中 FC 的终浓度的差别为大约 1mg/ml 到大约 149mg/ml。

6. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中第一种纤维蛋白密封胶中 FC 的终浓度与第二种密封胶中 FC 的浓度的差别为大约 5mg/ml 到大约 75mg/ml。

7. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中第一种纤维蛋白密封胶中 FC 的终浓度与第二种密封胶中 FC 的浓度的差别为大约 10mg/ml 到大约 60mg/ml。

8. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中第一或第二种密封胶中凝血酶组分的终浓度在大约 1IU/ml 到 250IU/ml 的范围内。

9. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中 PDGF 的终浓度在大约 1ng/ml 到大约 1mg/ml 的范围内。

10. 在需要的患者中受控释放血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白的方法, 所述蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB, 该方法包括给所述患者施用含有 PDGF 的纤维蛋白密封胶, 其中至少 25% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。

11. 权利要求 10 的方法, 其中纤维蛋白密封胶通过将 FC 组分与凝血酶组分在混合物中混合而产生。

12. 权利要求 11 的方法, 其中在将 FC 组分与凝血酶组分混合之前, 将 PDGF 加入到 FC 组分中。

13. 权利要求 10 或 11 的方法,其中至少 35%到 90%的 PDGF 保留至少 3 天。
14. 权利要求 10 或 11 的方法,其中至少 45%到 75%的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。
15. 权利要求 10 或 11 的方法,其中至少 60%的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。
16. 权利要求 10 或 11 的方法,其中释放的 PDGF 是有生物活性的。
17. 在需要的患者中受控释放血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白的方法,所述蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB,该方法包括给所述患者施用含有 PDGF 的纤维蛋白密封胶,其中至少 20%的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。
18. 权利要求 17 的方法,其中纤维蛋白密封胶通过将纤维蛋白原复合物 (FC) 组分与凝血酶组分在混合物中混合而产生。
19. 权利要求 18 的方法,其中在将 FC 组分与凝血酶组分混合之前,将 PDGF 加入到 FC 组分中。
20. 权利要求 17 或 18 的方法,其中至少 25%到 75%的 PDGF 保留至少 10 天。
21. 权利要求 17 或 18 的方法,其中至少 45%到 55%的所述 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。
22. 权利要求 17 或 18 的方法,其中释放的 PDGF 是有生物活性的。
23. 权利要求 11 或 18 的方法,其中密封胶中纤维蛋白原复合物的终浓度在大约 1mg/ml 到大约 150mg/ml 的范围内。
24. 权利要求 11 或 18 的方法,其中密封胶中凝血酶的终浓度在大约 1IU/ml 到 250IU/ml 的范围内。
25. 权利要求 11 或 18 的方法,其中纤维蛋白原复合物的终浓度是 40mg/ml,和凝血酶的终浓度是大约 2IU/ml。
26. 权利要求 10 或 17 的方法,其中密封胶中 PDGF 的终浓度是大约 1ng/ml 到大约 1mg/ml。
27. 权利要求 10 或 17 的方法,其中 PDGF 是 PDGF-AB。
28. 权利要求 27 的方法,其中至少 60%的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,并且其中至少 40%的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白密封胶保留至少 10 天。
29. 权利要求 10 或 17 的方法,其中 PDGF 是 PDGF-BB 。
30. 权利要求 29 的方法,其中至少 55%的所述 PDGF-BB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,并且其中至少 25%的所述 PDGF-BB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。
31. 权利要求 10 或 17 的方法,其中患者患有选自肌肉骨骼疾病或病症、软组织疾病或病症和心血管疾病的疾病。
32. 权利要求 31 的方法,其中肌肉骨骼病症是骨疾病或骨病症。
33. 权利要求 32 的方法,其中患者患有心血管疾病。
34. 用于治疗患者的方法,该患者患有将得益于血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白的原位受控释放的病症或疾病,所述蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB,所述方法包括给所述患者施用含有 PDGF 蛋白的纤维蛋白密封胶,
其中纤维蛋白密封胶提供了 PDGF 的受控释放,其中至少 25%的 PDGF 在纤维蛋白密封

胶中保留至少 3 天,或其中至少 20%的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天,并且所述 PDGF 以有效治疗所述病症或疾病的速率释放。

35. 权利要求 34 的方法,其中纤维蛋白密封胶通过将纤维蛋白原复合物 (FC) 组分与凝血酶组分在混合物中混合而产生。

36. 权利要求 34 的方法,其中在将 FC 组分与凝血酶组分混合之前,将 PDGF 加入到 FC 组分中。

37. 权利要求 34 或 35 的方法,其中至少 35%到 90%的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。

38. 权利要求 34 或 35 的方法,其中至少 45%到 75%的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。

39. 权利要求 34 或 35 的方法,其中至少 60%的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。

40. 权利要求 34 或 35 的方法,其中至少 20%的所述 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。

41. 权利要求 34 或 35 的方法,其中至少 25%到 75%的 PDGF 保留至少 10 天。

42. 权利要求 34 或 35 的方法,其中至少 45%到 55%的所述 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。

43. 权利要求 34 或 35 的方法,其中释放的 PDGF 是有生物活性的。

44. 权利要求 34 的方法,其中密封胶中 FC 的终浓度在大约 1mg/ml 到大约 150mg/ml 的范围内。

45. 权利要求 34 的方法,其中密封胶中凝血酶的终浓度在大约 1IU/ml 到 250IU/ml 的范围内。

46. 权利要求 34 的方法,其中纤维蛋白原复合物的终浓度是大约 40mg/ml,和凝血酶的终浓度是大约 2IU/ml。

47. 权利要求 34 的方法,其中密封胶中 PDGF 的终浓度是大约 1ng/ml 到大约 1mg/ml。

48. 权利要求 34 的方法,其中 PDGF 是 PDGF-AB。

49. 权利要求 48 的方法,其中至少 80%的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,并且其中至少 60%的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。

50. 权利要求 34 的方法,其中 PDGF 是 PDGF-BB。

51. 权利要求 50 的方法,其中至少 55%的所述 PDGF-BB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,并且其中至少 25%的所述 PDGF-BB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。

52. 权利要求 34 的方法,其中患者患有选自肌肉骨骼疾病或病症、软组织疾病或病症和心血管疾病的疾病。

53. 权利要求 52 的方法,其中骨骼肌肉病症是骨疾病或骨病症。

54. 权利要求 52 的方法,其中患者患有血管疾病。

55. 用于制备含有血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白的纤维蛋白密封胶的试剂盒,所述血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB,并且所述纤维蛋白密封胶具有所需的 PDGF 释放速率,该试剂盒包含,

a) 含有纤维蛋白原复合物组分的第一个小瓶或第一个储存容器,其中小瓶任选含有

PDGF 组分, 以及 b) 具有凝血酶组分的第二个小瓶或第二个储存容器, 当所述第一个小瓶或第一个储存容器不包含 PDGF 组分时, 所述试剂盒任选包含具有 PDGF 组分的第三个小瓶或第三个储存容器, 所述试剂盒还包含其使用说明书。

56. 用于制备含有血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白的纤维蛋白密封胶的试剂盒, 所述血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB, 并且所述纤维蛋白密封胶具有所需的 PDGF 释放速率, 该试剂盒包含,

a) 含有纤维蛋白原复合物组分的第一个小瓶或第一个储存容器, 以及 b) 具有凝血酶组分的第二个小瓶或第二个储存容器, 其中小瓶任选包含 PDGF 组分, 当所述第二个小瓶或第二个储存容器不包含 PDGF 组分时, 所述试剂盒任选包含具有 PDGF 组分的第三个小瓶或第三个储存容器, 所述试剂盒还包含其使用说明书。

57. 含有血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白的纤维蛋白密封胶在制造用于治疗患有将得益于血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白原位受控释放的病症或疾病的患者的药物中的应用, 所述血小板衍生生长因子 (PDGF) 蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB, 并且所述纤维蛋白密封胶具有所需的 PDGF 释放速率。

用于 PDGF 受控释放的纤维蛋白凝胶及其应用

[0001] 本申请要求 2007 年 6 月 19 日提交的美国临时专利申请 No. 60/936, 198 的优先权，该临时专利申请在此以其全文引为参考。

发明领域

[0002] 总的来说，本发明涉及含有血小板衍生生长因子 (PDGF) 的纤维蛋白密封胶 (fibrin sealants)，通过原位可逆结合进行受控释放，用于治疗性应用，包括肌肉骨骼和血管疾病。

[0003] 发明背景

[0004] 纤维蛋白密封胶是一类外科“胶水”，由人类凝血蛋白制成，典型地在手术过程中用于控制出血。这些密封胶中的成分在使用过程中相互作用，形成了稳定的由血液蛋白纤维蛋白构成的凝块。目前，在外科手术中，纤维蛋白密封胶用于几种不同的目的：控制外科医生正在手术的区域中的流血，加速伤口愈合，封闭中空的身体器官或覆盖由标准缝合产生的孔，向外科手术过程中暴露的组织提供药物的缓释投送。

[0005] 纤维蛋白密封胶一般由两种人类血浆衍生的成分构成：(a) 高度浓缩的纤维蛋白原复合物 (FC)，它主要由纤维蛋白原和纤连蛋白以及催化量的因子 XIII 和纤维溶酶原构成，以及 (b) 高效凝血酶。纤维蛋白密封胶也可以含有抑蛋白酶肽。通过凝血酶的作用，(可溶性) 纤维蛋白原首先被转变成纤维蛋白单体，它们自发地聚集，形成了所谓的纤维蛋白凝块。同时，存在于溶液中的因子 XIII (FXIII)，在存在钙离子的情况下被凝血酶活化成因子 XIIIa。聚集的纤维蛋白单体和可能存在的任何残余纤连蛋白发生交联，通过形成新的肽键产生了高分子聚合物。通过这种交联反应，显著增加了形成的凝块的强度。一般来说，凝块与伤口和组织表面粘附良好，导致了粘合和止血效应 (美国专利 7, 241, 603)。因此，纤维蛋白粘合剂通常用作双组分粘合剂，它含有纤维蛋白原复合物 (FC) 组分以及凝血酶组分，此外还含有钙离子。

[0006] 纤维蛋白密封胶的特殊优点在于，粘合剂 / 凝胶不像外来物体一样残留在其施加位点处，而是被完全再吸收，就像自然伤口愈合中那样，并被新形成的组织代替。各种不同细胞、例如巨噬细胞和随后的成纤维细胞，迁移到凝胶中，裂解和重新吸收凝胶材料，并形成新组织。纤维蛋白密封胶已经被用于原位形成纤维蛋白凝胶，这些纤维蛋白凝胶已被用于投送细胞和生长因子 (Cox 等, *Tissue Eng* 10 :942-954, 2004 ;Wong 等, *Thromb Haemost* 89 :573-582, 2003)。

[0007] 对于组织修复来说，需要将生长因子和细胞定位于基质、例如纤维蛋白凝胶中。例如，纤维蛋白凝胶已被用于在各种不同的复杂混合物中投送 TGF- β ，该混合物包含胎牛血清、珊瑚颗粒和脂质体 (Fortier 等, *Am J Vet Res* 58(1) :66-70, 1997 ;Arnaud 等, *Chirurgie PlastiqueEsthetique* 39(4) :491-498, 1994 ;Arnaud 等, *Calcif Tissue Int* 54 :493-498, 1994 ;Giannoni 等, *Biotechnology and Bioengineering* 83(1) :121-123, 2003)。从纤维蛋白凝胶投送生长因子的可选手段，包括含有转谷酰胺酶底物、抗体和与生长因子结合的 VEGF 片段的结合物 (参见例如美国专利 Nos. 6, 506, 365, US 6, 713, 453

和美国专利公布 2003/0012818, 在此以其全文引为参考)。也可以参见美国专利申请 20030012818, 该专利申请描述了用于增进伤口愈合的药物投送基质。此外, 已经显示纤维蛋白凝胶诱导细胞生长(例如人类间充质干细胞(HMSC))和增殖, 以及在某种程度上诱导成骨分化, 这取决于基质中 FC 和凝血酶的浓度(Catelas 等, *Tissue Eng* 12 :2385-2396, 2006)。

[0008] 纤维蛋白密封胶将生长因子投送到身体中的特定位点的能力可能是有益的, 但是组织的适当重新生长, 需要向位点以特定的速率持续地/稳定地供应生长因子或细胞因子, 以便确保适合的治疗。在治疗蛋白在体内具有短的半衰期的情况下, 尤其是这样。目前使用的纤维蛋白密封胶, 为所播散的药物或药剂提供了一定程度的延迟释放, 但是延长药剂在密封胶中的寿命的能力将改进长期体内组织修复。

[0009] 因此, 在本技术领域, 对于开发用于体内投送治疗各种病症和疾病的生长因子的有效手段, 开发用于生长因子从纤维蛋白凝胶的受控释放的改进的方法, 仍然存在着需求。

[0010] 发明简述

[0011] 本发明提供了含有血小板衍生生长因子(PDGF)的纤维蛋白密封胶组合物, 通过生长因子的可逆结合在体外和体内进行受控释放。本发明还提供了通过改变用于配制密封胶的纤维蛋白原复合物(FC)组分的含量, 改变 PDGF 蛋白从纤维蛋白密封胶中的释放的方法。为了治疗病症或疾病, 考虑到了当 PDGF 从纤维蛋白密封胶释放后, 保留其生物学活性, 使得 PDGF 可以在体外或体内介导其预期的生物学活性。

[0012] 一方面, 本发明提供了用于改变血小板衍生生长因子(PDGF)蛋白从纤维蛋白密封胶的释放的方法, 所述蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB, 其中纤维蛋白密封胶通过将 FC 组分、凝血酶组分和 PDGF 组分相混合而产生, 方法包括, a) 确定从具有已知 PDGF 起始量和已知 FC 终浓度的第一种纤维蛋白密封胶中释放的 PDGF 的量, 以及 b) 改变在步骤 (a) 的第一种纤维蛋白密封胶中使用的 FC 的已知终浓度以产生第二种纤维蛋白密封胶, 其中第二种密封胶中 FC 的浓度与第一种密封胶中 FC 的已知终浓度相比增加, 使得从第二种密封胶释放 PDGF 的速率与从步骤 (a) 的第一种密封胶释放 PDGF 相比降低了, 并且其中第二种密封胶具有与步骤 (a) 的第一种密封胶相同的 PDGF 起始量。

[0013] 在相关方面, 本发明提供了用于改变 PDGF 蛋白从纤维蛋白密封胶的释放的方法, 所述蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB, 其中纤维蛋白密封胶通过将 FC 组分、凝血酶组分和 PDGF 组分相混合而产生, 方法包括, a) 确定从具有已知 PDGF 起始量和已知 FC 终浓度的第一种纤维蛋白密封胶中释放的 PDGF 的量, 以及 b) 改变在步骤 (a) 的第一种纤维蛋白密封胶中使用的 FC 的已知终浓度以产生第二种纤维蛋白密封胶, 其中第二种密封胶中 FC 的浓度与第一种密封胶中 FC 的已知终浓度相比降低, 使得从第二种密封胶释放 PDGF 的速率与从步骤 (a) 的第一种密封胶释放 PDGF 相比增加了, 并且其中第二种密封胶具有与步骤 (a) 的第一种密封胶相同的 PDGF 起始量。

[0014] 在一个实施方案中, 第一或第二种密封胶中 FC 的终浓度在大约 1mg/ml 到大约 150mg/ml 的范围内。在相关实施方案中, 第一或第二种密封胶中 FC 的终浓度在大约 5mg/ml 到大约 75mg/ml 的范围内。

[0015] 在另一个实施方案中, 考虑到了第一种纤维蛋白密封胶中 FC 的终浓度与第二种

密封胶中 FC 的终浓度的差别为大约 1mg/ml 到大约 149mg/ml。在另一个实施方案中,第一种纤维蛋白密封胶中 FC 的终浓度与第二种密封胶中 FC 的终浓度的差别为大约 5mg/ml 到大约 75mg/ml。在另一个实施方案中,第一种纤维蛋白密封胶中 FC 的终浓度与第二种密封胶中 FC 的终浓度的差别为大约 10mg/ml 到大约 60mg/ml。

[0016] 在某些实施方案中,考虑到了第一或第二种密封胶中凝血酶组分的终浓度在大约 1IU/ml 到 250IU/ml 的范围内。在另一个实施方案中,第一或第二种密封胶中 PDGF 的终浓度在大约 1ng/ml 到大约 1mg/ml 的范围内。

[0017] 另一方面,本发明考虑到了在需要的患者中受控释放 PDGF 蛋白的方法,所述蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB,包括给所述患者施用含有 PDGF 的纤维蛋白密封胶,其中至少 25% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。

[0018] 在相关方面中,本发明提供了在需要的患者中受控释放 PDGF 蛋白的方法,所述蛋白选自 PDGF-AB 和 PDGF-BB,包括给所述患者施用含有 PDGF 的纤维蛋白密封胶,其中至少 20% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。

[0019] 考虑到了从纤维蛋白密封胶释放的 PDGF 是有生物活性的。

[0020] 在某些实施方案中,至少 35% 到 90% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。在相关实施方案中,至少 45% 到 75% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。在另一个实施方案中,至少 60% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天。

[0021] 在另一个实施方案中,至少 25% 到 75% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。在相关实施方案中,至少 45% 到 55% 的所述 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。

[0022] 在相关实施方案中,考虑到了纤维蛋白密封胶可以在 3 天或 10 天或两者的时间内具有上述范围的释放动力学。

[0023] 在一个实施方案中,纤维蛋白密封胶通过将 FC 组分与凝血酶组分在混合物中混合而产生。在另一个实施方案中,在将 FC 组分与凝血酶组分混合之前,将 PDGF 加入到 FC 组分中。在另一个实施方案中,将 PDGF 加入到凝血酶组分中。

[0024] 在相关实施方案中,考虑到了 PDGF 的释放可以每天以规则的量减少。例如,纤维蛋白密封胶中 PDGF 的量可以以每天大约 1%、每天大约 2%、每天大约 3%、每天大约 4%、每天大约 5%、每天大约 6%、每天大约 7%、每天大约 8%、每天大约 9% 或每天大约 10% 的量减少,或可以根据用于配制纤维蛋白密封胶的 FC 浓度或凝血酶浓度来调整所需的释放量。

[0025] 本发明考虑到了密封胶中 FC 组分的终浓度在大约 1mg/ml 到大约 150mg/ml 的范围内。也考虑到了在某些实施方案中,密封胶中凝血酶组分的终浓度在大约 1IU/ml 到 250IU/ml 的范围内。在一个实施方案中,FC 终浓度是大约 5mg/ml、大约 10mg/ml、大约 20mg/ml 或大约 40mg/ml,凝血酶的终浓度是大约 2IU/ml。

[0026] 在一个实施方案中,密封胶中 PDGF 的终浓度在大约 1ng/ml 到大约 1mg/ml 的范围内。

[0027] 在另一个实施方案中,考虑到了 PDGF 是 PDGF-AB。在一个实施方案中,至少 60% 的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,其中至少 40% 的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。在另一个实施方案中,至少 80% 的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,并且其中至少 60% 的所述 PDGF-AB 在所述纤维蛋白

密封胶中保留至少 10 天。

[0028] 在相关实施方案中,考虑到了 PDGF 是 PDGF-BB。在一个实施方案中,至少 55% 的所述 PDGF-BB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,并且其中至少 25% 的所述 PDGF-BB 在所述纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天。

[0029] 在另一方面,本发明考虑到了用于治疗患者的方法,该患者患有可以得益于 PDGF 蛋白的原位受控释放的病症或疾病,所述蛋白选自 PDGF-AB 或 PDGF-BB,所述方法包括给所述患者施用含有 PDGF 蛋白的纤维蛋白密封胶,其中纤维蛋白密封胶提供了 PDGF 的受控释放,其中至少 25% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 3 天,并且所述 PDGF 以有效治疗所述病症或疾病的速率释放。

[0030] 另一方面,本发明考虑到了用于治疗患者的方法,该患者患有可以得益于生物活性 PDGF 蛋白的原位受控释放的病症或疾病,所述蛋白选自 PDGF-AB 或 PDGF-BB,所述方法包括给所述患者施用含有 PDGF 蛋白的纤维蛋白密封胶,其中纤维蛋白密封胶提供了 PDGF 的受控释放,其中至少 20% 的 PDGF 在纤维蛋白密封胶中保留至少 10 天,并且所述 PDGF 以有效治疗所述病症或疾病的速率释放。

[0031] 本发明还提供了使用含有选自 PDGF-AB 或 PDGF-BB 的 PDGF 蛋白的纤维蛋白密封胶来制造药物,用于治疗患有可以得益于 PDGF 蛋白的原位受控释放的病症或疾病的患者,其中纤维蛋白密封胶提供了如上所述的 PDGF 的受控释放。

[0032] 本发明考虑到,上述的释放动力学适用于可以得益于 PDGF 蛋白的原位受控释放的患者的治疗方法,或适用于使用纤维蛋白密封胶制造治疗所述患者的药物。

[0033] 一方面,患者所患有的可以得益于 PDGF 蛋白的体内受控释放的疾病,对于本技术领域的普通技术人员来说将是明显的。在一个实施方案中,疾病或病症选自肌肉骨骼疾病或病症、软组织疾病或病症,以及心血管疾病。

[0034] 在一个实施方案中,使用本技术领域熟知的方法,将纤维蛋白密封胶施用于患者,例如注射、喷洒、内视镜给药,或预形成的凝胶,以本身或与其它材料的组合,以及本技术领域的普通技术人员已知的其它方法。

[0035] 本发明还提供了用于制备含有生物活性 PDGF 蛋白的纤维蛋白密封胶的试剂盒,所述蛋白选自 PDGF-AB 或 PDGF-BB,所述纤维蛋白密封胶具有所需 PDGF 释放速率,试剂盒包含,a) 含有 FC 组分的第一个小瓶或第一个储存容器,其中小瓶任选含有 PDGF 组分,以及 b) 含有凝血酶组分的第二个小瓶或第二个储存容器,当第一个小瓶或第一个储存容器不包含 PDGF 组分时,所述试剂盒任选包含含有 PDGF 组分的第三个小瓶或第三个储存容器,所述试剂盒还包含其使用说明书。试剂盒也可以包含体外或体内使用或给药纤维蛋白密封胶的器械。

[0036] 从下面的详细描述中,本发明的其它特点和优点将变得明显。但是,应该理解,当说明本发明的具体实施方案时给出的详细描述和具体实施例,仅仅是为了说明,因为在本发明的精神和范围内的各种不同的改变和修饰,对于本技术领域的专业人员来说,将因这些详细描述而变得显然。

附图说明

[0037] 图 1 显示了 PDGF-AB 的量对它从 TISSEEL VH S/D 凝胶中的累积释放的影响 ([FC]

= 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml)。

[0038] 图 2 显示了 PDGF-BB 的量对它从 TISSEEL VH S/D 凝胶中的累积释放的影响 ([FC] = 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml)。

[0039] 图 3 显示了 FC 浓度对 PDGF-AB 从 TISSEEL VH S/D 凝胶中的每日释放 (图 3A) 和累积释放 (图 3B) 的影响 ([凝血酶] = 2IU/ml)。

[0040] 图 4 显示了 FC 浓度对 PDGF-BB 从 TISSEEL VH S/D 凝胶中的每日释放 (图 4A) 和累积释放 (图 4B) 的影响 ([凝血酶] = 2IU/ml)。

[0041] 图 5 显示了 TISSEEL VH S/D 批次号对 PDGF-AB 累积释放的影响 ([FC] = 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml)。

[0042] 图 6 显示了 TISSEEL VH S/D 批次号对 PDGF-BB 累积释放的影响 ([FC] = 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml)。

[0043] 图 7 显示了 PDGF-BB 的量对它从 TISSEEL VH 凝胶中的累积释放的影响 ([FC] = 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml)。

[0044] 图 8 显示了 FC 浓度对 PDGF-BB 从 TISSEEL VH 凝胶中的每日释放 (图 8A) 和累积释放 (图 8B) 的影响 ([凝血酶] = 2IU/ml)。

[0045] 图 9 显示了 TISSEEL VH 批次号对 PDGF-BB 累积释放的影响 ([FC] = 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml)。

[0046] 图 10 显示了 PDGF-AB 从 TISSEEL VH S/D 凝胶的释放对培养在单层中最多 7 天的 HMSC 增殖的影响。

[0047] 图 11 显示了 PDGF-BB 从 TISSEEL VH S/D 凝胶的释放对培养在单层中最多 7 天的 HMSC 增殖的影响。

[0048] 图 12 显示了从 TISSEEL VH S/D 凝胶释放的 PDGF-AB 对 ALP 活性的影响 (根据增殖进行归一化)。

[0049] 图 13 显示了从 TISSEEL VH S/D 凝胶释放的 PDGF-BB 对 ALP 活性的影响 (根据增殖进行归一化)。

[0050] 图 14 显示了 PDGF-AB (图 14A) 和 PDGF-BB (图 14B) 与来自 TISSEEL VH S/D 的 FC 相互作用的传感图。图 14C 显示了 PDGF-AB 与来自 TISSEEL VH S/D 的 FC 相互作用的结合和解离速率常数的图解测定。

[0051] 发明详述

[0052] 本发明提供了含有 PDGF 的纤维蛋白凝胶,通过原位可逆结合进行受控释放,用于治疗性应用中,包括肌肉骨骼疾病、软组织病症和血管疾病的治疗。本发明考虑到了从凝胶释放的 PDGF 保留其生物学活性,使得在体内或体外从纤维蛋白密封胶的释放调节了所需的生物学活性。本发明还提供了用于确定可用于配制纤维蛋白密封胶、以获得所需 PDGF 释放动力学的 FC 组分或凝血酶组分的浓度的方法。

[0053] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语,都与本发明所属技术领域的普通专业人员所通常理解的意义相同。下面的参考文献,为专业技术人员提供了许多在本发明中使用的术语的通用定义:Singleton 等,《微生物学和分子生物学词典》(1994 年第二版)(DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY(2d ed. 1994));《剑桥科学技术词典》(THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)(Walker 等,

1988) ;《遗传学词汇》(第五版)(THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED.), R. Rieger 等主编, Springer Verlag(1991); 以及 Hale 和 Marham, 《HARPER COLLINS 生物学词典》(THE HARPERCOLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY)(1991)。

[0054] 在本文中引用的每个出版物、专利申请、专利和其它参考文献, 在其与本公开相一致的程度上全文引为参考。

[0055] 在这里指出, 在本说明书和随附的权利要求书中使用的不带数量的名词形式, 包含了复数的指称, 除非上下文清楚地表明不是这样。

[0056] 在本文中使用时, 下面的术语具有属于它们的意义, 除非特别指明不是这样。

[0057] 本文中使用的术语“纤维蛋白密封胶”、“纤维蛋白凝胶”、“纤维蛋白粘合剂”、“纤维蛋白凝块”或“纤维蛋白基质”可以相互交换使用, 是指至少含有纤维蛋白原复合物 (FC) 组分和凝血酶组分的三维网络, 它们可以用作细胞生长和生物活性材料随时间释放的支架。

[0058] 本文使用的术语“受控释放”和“延迟释放”具有同样的意义, 是指药剂 (例如生长因子) 在纤维蛋白凝胶中的持留。受控释放不仅是由于生长因子通过扩散或通过被结合的生长因子的解离、然后从凝胶中释放, 而缓慢和稳定地分泌 / 释放, 而且还由于基质的解体和酶促裂解。

[0059] 本文中使用的“原位形成”是指或者在生理温度下和在注入身体的位点处形成, 或者纤维蛋白密封胶在适合的体外条件下形成。典型情况下, 该术语用于描述纤维蛋白密封胶中前体分子之间的共价连接的形成, 这些前体分子在给药前或给药时是基本上未交联的。

[0060] 本文中使用的“纤维蛋白原复合物 (FC) 组分”是指与凝血酶混合时产生凝块状纤维蛋白密封胶的纤维蛋白 / 纤维蛋白原溶液。FC 主要由纤维蛋白原和纤连蛋白构成, 也可以包含催化量的 FXIII 和纤维溶酶原。FC 组分也可以被称为密封剂蛋白 (Sealer Protein)。

[0061] 本文中使用的“凝血酶组分”是指与 FC 组分混合时产生凝块状纤维蛋白密封胶的凝血酶溶液。

[0062] 本文中使用的“血小板衍生生长因子组分”或“PDGF 组分”是指向液体形式的纤维蛋白密封胶添加的生长因子溶液。PDGF 组分、FC 复合物组分和凝血酶组分中的每一种, 可以分别添加, 以形成含有 PDGF 的纤维蛋白密封胶。任选, PDGF 组分在与凝血酶组分混合之前添加到 FC 组分中, 或在与 FC 组分混合之前添加到凝血酶组分中。PDGF 组分可以包含 PDGF-AB 或 PDGF-BB, 或 PDGF-AB 和 PDGF-BB 两者。

[0063] 本文中使用的“重组人类 PDGF”是指通过重组 DNA 技术获得的重组的人类血小板衍生生长因子 (rh PDGF)。它可以通过本技术领域任何已知方法来生产。

[0064] 本文中使用的术语“生物活性”或“生物学活性”, 是指其中溶液或纤维蛋白密封胶中的蛋白, 例如 PDGF 蛋白, 当与天然表达的 (即当重组表达或体内表达时) 蛋白相比时, 显示出同样的或类似的生物学活性的生物学性质。

[0065] 本文中使用的“可检测的部分”、“可检测标记物”或“标记物”, 是指可以通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的组合物。例如, 有用的标记物包括 ^{32}P 、 ^{35}S 、荧光染料、电子致密试剂、酶 (例如在 ELISA 中常用的)、生物素 - 链亲和素、洋地黄毒

甙、其抗血清或单克隆抗体可得的半抗原和蛋白,或具有与靶互补的序列的核酸分子。可检测部分通常产生可测量的信号,例如放射活性、显色或荧光信号,可用于对样品中结合的可检测部分的量进行定量。

[0066] 纤维蛋白密封胶

[0067] 已有许多形式的纤维蛋白用作纤维蛋白密封胶。纤维蛋白凝胶可以从自体血浆、冷沉淀血浆(例如纤维蛋白胶试剂盒,可以商购)、从血浆纯化的纤维蛋白原、以及重组纤维蛋白原和因子 XIIIa 合成。这些材料中的每种都提供了基本上相同的基质,在生物化学组成上有少许差别(Sierra DH, J Biomater Appl, 7, 309-352(1993))。这些材料之间在特定酶学生物活性和总的愈合应答方面存在相似性。

[0068] 可用于本发明的纤维蛋白凝胶从纤维蛋白密封胶形成,它由两种主要组分构成:纤维蛋白原复合物(FC)和凝血酶。FC主要由纤维蛋白原和纤连蛋白构成,也可以含有催化量的FXIII和纤维溶酶原。FC和凝血酶组分一般源自于人类血浆,但是也可以由重组/遗传工程技术生产。纤维蛋白密封胶的例子描述在US 5,716,645、US 5,962,405、US6,579,537中,包括TISSEEL VH和TISSEEL VH S/D(Baxter AG, Vienna, Austria)。

[0069] 为了形成纤维蛋白凝胶,首先将FC复溶、融化或按照包装说明书制备,根据需要使用稀释缓冲液进一步稀释,将治疗药剂加入到液体FC中。可选地,治疗药剂可以加入到凝血酶组分中。大多数可商购的纤维蛋白密封胶包含凝胶裂解抑制剂,例如抑蛋白酶肽,它们可以由用户自行斟酌添加到FC中。关于抑蛋白酶肽和其它凝胶裂解抑制剂的描述,提供在WO 99/11301中。凝血酶组分也用CaCl₂溶液复溶成液体形式,并根据需要使用稀释缓冲液进一步稀释。考虑到了将凝血酶组分与还含有PDGF的FC组分混合,以形成纤维蛋白凝胶。纤维蛋白密封胶也被设计成缺乏抑蛋白酶肽成分(EVICEL, Ethicon, Inc, New Jersey)。

[0070] 其它用于生产含有纤维蛋白原的、可以用作组织粘合剂的制备物的方法,包括从冷沉淀物生产,任选具有使用乙醇、硫酸铵、聚乙二醇、甘氨酸或β-丙氨酸的进一步洗涤和沉淀的步骤,以及分别从已知血浆分级方法范围内的血浆生产(参考例如《血浆蛋白分级方法》(Methods of plasma protein fractionation), 1980, Curling主编, Academic Press, 第3-15、33-36和57-74页,或Blomb ck B.和M.,《人和牛纤维蛋白原的纯化》(Purification of human and bovine fibrinogen), Arkiv Kemi 10, 1959, p. 415 f.)。纤维蛋白密封胶也可以使用患者自己的血浆制造。例如,CRYOSEAL(Thermogenesis Corp., Rancho Cordova, CA)或VIVOSTAT(Vivolution A/S, Denmark)纤维蛋白密封胶系统,能够从患者的血浆生产自体纤维蛋白密封胶组分。可用的纤维蛋白密封胶组分是冷冻干燥、深冻液体或液体的形式。

[0071] 以适合的浓度加入纤维蛋白凝胶组分,提供了所需的受控释放的类型。可以以不同的浓度添加FC组分,包括但不限于5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml, 20mg/ml, 25mg/ml, 30mg/ml, 35mg/ml, 40mg/ml, 45mg/ml, 50mg/ml, 直到150mg/ml(凝胶中的终浓度),或需要的中间浓度。此外,FC组分的浓度可以与任何适合浓度的凝血酶组分混合,包括但不限于1IU/ml, 2IU/ml, 5IU/ml, 7IU/ml, 10IU/ml, 15IU/ml, 20IU/ml, 25IU/ml, 30IU/ml, 35IU/ml, 40IU/ml, 50IU/ml, 60IU/ml, 70IU/ml, 80IU/ml, 90IU/ml, 100IU/ml, 125IU/ml, 150IU/ml, 175IU/ml, 200IU/ml, 225IU/ml和250IU/ml,或需要的中间浓度。

[0072] 考虑到了将药剂例如PDGF添加到纤维蛋白密封胶组合物中,以便制造用于治疗

药剂的受控释放系统。PDGF 可以以提供足够延迟释放剂型的任何浓度添加,在 1ng/ml 到 1mg/mL PDGF 的范围内。纤维蛋白密封胶中 PDGF 的示例浓度包括但不限于 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 15ng/ml, 20ng/ml, 40ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 750 μ g/ml 和 1mg/ml。

[0073] 考虑到了在纤维蛋白密封胶中使用的 FC 或凝血酶的浓度是使得添加在纤维蛋白凝胶中的 PDGF,以治疗有效的量在几天到数周的过程中释放。一种情况下, PDGF 从纤维蛋白凝胶中释放 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天或更长时间。

[0074] PDGF 以受控或延迟释放的方式从纤维蛋白密封胶释放,使得可以在持续的时间中可以原位获得 PDGF。考虑到了 PDGF 的释放可以以每天规则的量减少,例如 PDGF 水平的降低可以为每天大约 1%、每天大约 2%、每天大约 3%、每天大约 4%、每天大约 5%、每天大约 6%、每天大约 7%、每天大约 8%、每天大约 9%、每天大约 10%或以上。

[0075] 在相关的实施方案中,考虑到了至少 25%的 PDGF 在纤维蛋白凝胶中保留至少 3 天。在另一个实施方案中,至少 35%到 90%,至少 45%到 75%,或至少 60%的 PDGF 在纤维蛋白凝胶中保留至少 3 天。还考虑到了至少 25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或 90%的 PDGF 在纤维蛋白凝胶中保留至少 3 天。

[0076] 在另一个实施方案中,至少 20%的 PDGF 在纤维蛋白凝胶中保留至少 10 天。在另一个实施方案中,至少 25%到 75%,或 45%到 55%的 PDGF 保留至少 10 天。还考虑到了至少 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%或 75%的 PDGF 在纤维蛋白凝胶中保留至少 10 天。

[0077] 本发明提供了通过改变纤维蛋白密封胶的组分的浓度,配制具有所需释放动力学的纤维蛋白密封胶的方法。在一方面,方法考虑到了确定从具有已知 PDGF 起始量和已知 FC 终浓度的第一种纤维蛋白密封胶中释放的 PDGF 的量,改变在步骤 (a) 的第一种纤维蛋白密封胶中使用的 FC 的已知终浓度以产生第二种纤维蛋白密封胶,其中第二种密封胶中 FC 的浓度与第一种密封胶中 FC 的已知终浓度相比的增加或减少,与 PDGF 从步骤的第一种密封胶释放相比,调整了 PDGF 从第二种密封胶释放的速率,并且其中第二种密封胶具有与步骤中第一种密封胶相同的 PDGF 起始量。

[0078] 在一个实施方案中,第一或第二种密封胶中 FC 的终浓度,在大约 1mg/ml 到大约 150mg/ml 的范围内。在相关实施方案中,第一种纤维蛋白密封胶的 FC 浓度与第二种密封胶中 FC 的终浓度的差别为大约 1mg/ml 到大约 149mg/ml,为大约 5mg/ml 到大约 75mg/ml,或为大约 10mg/ml 到大约 60mg/ml。在另一个实施方案中,第一种纤维蛋白密封胶的 FC 终浓度

与第二种密封胶的 FC 终浓度的差别为大约 1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml，或这些浓度之间的任何量，直到大约 149mg/ml。

[0079] 考虑到了可用于本发明的纤维蛋白密封胶可以与目的在于体外或体内应用的其它材料或药剂混合。这样的药剂包括其它的治疗性药剂，包括但不限于生长因子、细胞因子、化学因子、凝血因子、酶、化学因子、可溶性细胞表面受体、细胞粘附分子、抗体、激素、细胞骨架蛋白、基质蛋白、蛋白伴侣、结构蛋白、代谢蛋白，以及本技术领域已知的其它药剂（参见例如《医生桌面参考》（第 62 版）(Physicians Desk Reference, 62nd Edition), 2008, Thomson Healthcare, Montvale, NJ)。

[0080] 其它可用于纤维蛋白密封胶的材料包括可以与密封胶混合用于肌肉骨骼疾病的材料，它们可以是承载材料，包括但不限于聚合物、珊瑚、陶瓷、玻璃、金属、骨骼衍生的材料、羟基磷灰石、合成的支架材料、这些材料的组合，以及本技术领域已知的其它材料（参见例如 Guehenec 等 (European Cells and Materials, 8:1-11, 2004), 美国专利 7, 122, 057 和美国专利 6, 696, 073)。

[0081] 在一个实施方案中，纤维蛋白凝胶可以用作载体系统，用于在可逆结合后、并通过调整 FC 和凝血酶的浓度以受控方式投送生物学活性 PDGF。

[0082] 在本发明的一个实施方案中，当纤维蛋白凝胶使用 5mg/ml 的 FC 和 2IU/ml 的凝血酶（凝胶中的终浓度）由 TISSEEL 蒸汽加热溶剂 / 去污剂 (TISSEEL VH S/D) 制成时，至少大约 65% 的添加的 PDGF-BB (15ng) 在凝胶中保留到 3 天后。在本发明的另一个实施方案中，当纤维蛋白凝胶使用 40mg/ml 的 FC 和 2IU/ml 的凝血酶（凝胶中的终浓度）由 TISSEEL VH S/D 制成时，至少大约 85% 的添加的 PDGF-BB (15ng) 在凝胶中保留到 3 天后。因此，当使用由 TISSEEL VH S/D 制成的纤维蛋白凝胶时，PDGF-BB 的持留随着 FC 浓度的升高而增加。

[0083] 在本发明的另一个实施方案中，当纤维蛋白凝胶使用 20mg/ml 的 FC 和 2IU/ml 的凝血酶（凝胶中的终浓度）由不同批号的 TISSEEL VH 制成时，至少大约 70% 的 PDGF-BB 在来自一个批号的凝胶中保留到 10 天后，在第二个批号的凝胶中有大约 60%、第三个批号的凝胶中有大约 40% 保留。这些批次之间的一个差别是因子 XIII 的含量（分别为 42. 2U/ml、33. 9U/ml 和 < 1U/ml）。在本发明的另一个实施方案中，当纤维蛋白凝胶使用 20mg/ml 的 FC 和 2IU/ml 的凝血酶（凝胶中的终浓度）由不同批号的 TISSEEL VH S/D 制成时，至少大约 60% 的 PDGF-BB 在来自所有批次的凝胶中保留到 10 天后。对于 PDGF-AB 的释放来说，在第三批中的两批中，至少大约 75% 保留到 10 天，至少 68% 的生长因子在第三批中保留到 10 天。

[0084] 对于本技术领域的普通专业人员来说，应该理解，上面提出的实施方案是 PDGF 从可商购纤维蛋白密封胶释放的示例性实施方案，并不意味以任何方式限制了本发明。

[0085] PDGF 蛋白

[0086] 血小板衍生生长因子 (PDGF) 由血小板在伤口和骨折愈合的早期阶段中分泌。已经显示，它能刺激成骨细胞和间充质祖细胞的迁移 (Mehrotra 等, J Cell Biochem 93: 741-52, 2004; Fiedler 等, J Cell Biochem 93: 990-98, 2004), 但是它在骨折愈合和骨骼修复中的作用还没有完全确定。PDGF 也调控血管发生的不同方面，血管发生本身在骨骼生长过程中也是关键的。PDGF 还在刺激血管发生中发挥作用，血管发生是组织的正常生长和发

育所需的基本过程,并参与从已存在血管增殖新的毛细血管。增加血管发生的速率在某些病症中是有用的,例如与组织灌注减少相关的病症,例如冠状动脉和外周血管疾病,这仅仅是举几个例子。

[0087] PDGF-A(Genbank 登记号 NP_002598) 和 PDGF-B(Genbank 登记号 NP_002599) 可以同源二聚或异源二聚,产生三种不同的同工型:PDGF-AA、PDGF-AB 或 PDGF-BB。PDGF-A 只能与 PDGF α -受体结合(PDGR- α 包括 PDGR- α/α 同源二聚体)。PDGF-B 可以与 PDGR- α 和第二种 PDGF 受体(PDGR- β) 结合。更具体来说,PDGF-B 可以与 PDGR- α/α 和 PDGR- β/β 同源二聚体、以及 PDGR- α/β 异源二聚体结合。

[0088] PDGF-AA 和 -BB 对于间充质来源的细胞来说是主要的有丝分裂原和化学吸引剂,但是对于内皮谱系的细胞没有影响或影响很小,尽管 PDGR- α 和 - β 二者都表达在内皮细胞(EC)上。已经显示,PDGF-AB 和 PDGF-BB 参与新形成血管的稳定化/成熟作用(Isner 等, Nature 415 :234-9,2002 ;Vale 等, J Interv Cardiol 14 :511-28,2001 ;Heldin 等, Physiol Rev 79 :1283-1316,1999 ;Betsholtz 等, Bioessays 23 :494-507,2001)。然而,其它数据显示,PDGF-AA 和 PDGF-BB 在体内通过 PDGR- α 信号传导,抑制了 bFGF 诱导的血管生成。PDGF-AA 是间充质细胞迁移的最有力刺激物之一,但是它或者不刺激或者仅最小程度地刺激 EC 迁移。在某些条件下,PDGF-AA 甚至抑制 EC 迁移(Thommen 等, J Cell Biochem. 64 :403-13,1997 ;De Marchis 等, Blood 99 :2045-53,2002 ;Cao 等, FASEB. J. 16 :1575-83,2002)。然而,已经显示,PDGR- α 拮抗 PDGR- β 诱导的 SMC 迁移(Yu 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 282 :697-700,2001),针对 PDGF-AA 的中和抗体增强了平滑肌细胞(SMC)的迁移(Palumbo, R. 等, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22 :405-11,2002)。因此,PDGF-A 和 -B 的血管生成/动脉生成活性,特别是当通过 PDGR- α 进行信号传导时,还有争论。

[0089] 已报道,PDGF-AA 和 -BB 在心血管和神经干/祖细胞的增殖和分化中发挥重要作用。PDGF-AA 通过 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白刺激少突胶质细胞前体增殖(Baron 等, Embo. J. 21 :1957-66,2002),而 PDGF-BB 诱导 Flk1+ 胚胎干细胞分化成血管壁细胞(Carmeliet, P., Nature 408 :43-45,2000 ;Yamashita 等, Nature 408 :92-6,2000),并潜在增加了源自于存活神经元的神经球(neurosphere)(Caldwell 等, Nat Biotechnol. 19 :475-479,2001)。

[0090] PDGF 蛋白已经成功地混合用于纤维蛋白凝胶制剂中。Thomopoulos 等(J Orth Res 25 :1358-68,2007)制备了含有纤维蛋白原、凝血酶、肽组分和肝素的纤维蛋白凝胶,并进一步添加了不同浓度的 PDGF-BB,以确定生长因子的被动释放动力学。研究显示,生长因子的释放依赖于纤维蛋白凝胶中肝素的量。PDGF 也已经在含有血浆血小板 T 制备物的纤维蛋白凝胶中检测到(参见例如 Yazawa 等, J Craniofac Surg 15 :439-46,2004),并用于刺激纤维蛋白支架中的胚胎干细胞(Willerth 等, Stem Cells. 25 :2235-2244,2007)。

[0091] 可用于本发明的 PDGF 分子包括全长蛋白、蛋白前体、蛋白亚基或片段、及其功能性衍生物。指称 PDGF 意味着包括这些蛋白的所有可能形式,包括天然来源的蛋白制备物。

[0092] 根据本发明,术语重组 PDGF 没有隐含具体的限制,可以包括任何 PDGF,异源的或天然存在的,通过重组 DNA 技术获得的,或其生物学活性衍生物。在某些实施方案中,该术语涵盖了蛋白和核酸,例如基因、前 mRNA、mRNA,以及多肽、多态性变体、等位基因、突变体和种间同源物,它们(1)具有的氨基酸序列,在至少大约 25、50、100、150、200 个或以上氨基酸的区域中,与参比核酸编码的 PDGF-AB 或 PDGF-BB 多肽或本文描述的氨基酸序列,具有

高于大约 60% 的氨基酸序列同一性, 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或以上的氨基酸序列同一性; (2) 与针对含有本文描述的参比氨基酸序列、其免疫原性片段及其保守修饰变异体的免疫原产生的抗体、例如多克隆抗体, 特异性结合; (3) 在严紧杂交条件下, 与编码本文描述的参比氨基酸序列及其保守修饰变异体的核酸特异性杂交; (4) 具有的核酸序列, 在至少大约 25、50、100、150、200、250、500、1000、1500、2000 个或以上核苷酸 (最多为成熟蛋白的核苷酸全长序列) 的区域内, 与本文描述的参比核酸序列具有高于大约 95%、高于大约 96%、97%、98%、99%, 或更高的核苷酸序列同一性。

[0093] 多核苷酸或多肽序列典型情况下来自于哺乳动物, 包括但不限于灵长动物例如人类, 啮齿动物例如大鼠、小鼠、仓鼠, 奶牛、猪、马、绵羊或任何其它哺乳动物。本发明的核酸和蛋白可以是重组分子 (例如异源的和编码野生型序列或其变异体的, 或非天然存在的)。对于人类 PDGF 的结构, 参考由国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 维护的 Genbank 数据库: 人类 PDGF-A (Genbank 登记号 NP_002598, NM_002607.4), PDGF-B (Genbank 登记号 NP_002599, NM_002608)。PDGF-AB 和 PDGF-BB 是 PDGF-A 和 PDGF-B 序列的同源或异源二聚体。

[0094] PDGF 的生产可以包括本技术领域中的任何用于下述方面的方法: (i) 通过遗传工程生产重组 DNA, 例如通过 RNA 的反转录和 / 或 DNA 的扩增, (ii) 通过转染将重组 DNA 导入原核或真核细胞, 例如通过电穿孔或微注射, (iii) 以例如连续或分批方式培养所述转化细胞, (iv) 表达 PDGF, 例如组成性地或在诱导后, 以及 (v) 分离所述 PDGF, 例如从培养基或通过收获转化细胞, 以便通过例如阴离子交换层析或亲和层析获得纯化的 PDGF。

[0095] PDGF 可以通过在适合的原核或真核宿主系统中进行表达来生产, 这些宿主系统的特点是生产可药用的 PDGF 分子。常用的宿主细胞包括: 原核细胞例如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌, 即任何大肠杆菌 (*E. coli*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、酵母菌属 (*Saccharomyces*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 等的菌株。真核细胞的例子是昆虫细胞例如 D. Mel-2、Sf4、Sf5、Sf9, 以及 Sf21 和 High 5; 植物细胞和各种不同酵母细胞例如酵母菌属 (*Saccharomyces*) 和毕赤氏酵母属 (*Pichia*); 哺乳动物细胞例如 CHO (中华仓鼠卵巢) 细胞, 幼仓鼠肾 (BHK) 细胞, 人类肾 293 细胞, COS-7 细胞, HEK 293, SK-Hep 和 HepG2, 以及其它本技术领域已知的细胞。对用于生产或分离本发明的 PDGF 的试剂或条件没有限制, 可以使用本技术领域已知的或可商购的任何系统。在本发明的优选实施方案中, PDGF 通过在现有技术中描述的方法获得。

[0096] 许许多多的载体可用于制备 PDGF, 它们可以从本技术领域众所周知的真核和原核表达载体中选择。用于原核表达的载体的例子包括但不限于质粒, 例如 pRSET、pET、pBAD 等, 其中在真核表达载体中使用的启动子包括 lac、trc、trp、recA、araBAD 等。用于真核表达的载体的例子包括但不限于: (i) 用于在酵母中表达的载体, 例如 pAO、pPIC、pYES、pMET, 使用了启动子例如 AOX1、GAP、GAL1、AUG1 等; (ii) 用于在昆虫细胞中表达的载体, 例如 pMT、pAc5、pIB、pMIB、pBAC 等, 使用了启动子例如 PH、p10、MT、Ac5、OpIE2、gp64、poh 等, 以及 (iii) 用于在哺乳动物细胞中表达的载体, 例如 pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3、pBPV 等, 以及源自于病毒系统例如痘苗病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、反转录病毒等的载体, 使用了启动子例如 CMV、SV40、EF-1、UbC、RSV、ADV、BPV 和 β -肌动蛋白启动子。

[0097] 含有编码多肽的 DNA 或 RNA 的宿主细胞,在适合于细胞生长并表达 DNA 或 RNA 的条件下进行培养。表达多肽的那些细胞可以使用已知的方法鉴定,重组蛋白可以使用已知的方法分离和纯化;对多肽生产可以扩增,也可以不扩增。鉴定可以通过例如筛选表现出指示了编码蛋白的 DNA 或 RNA 存在的表型的遗传修饰的哺乳动物细胞来进行,例如 PCR 筛选,通过 Southern 印迹分析进行筛选,或筛选蛋白的表达。可以通过在 DNA 构建物中包含选择性标记物,并将含有选择性标记物基因的转染或感染细胞,在只适合于表达选择性标记物基因的细胞存活的条件下去进行培养,来实现已掺入编码蛋白的 DNA 的细胞的筛选。导入的 DNA 构建物的进一步扩增,可以通过将遗传修饰的细胞在适合于扩增的条件下培养来进行(例如,将含有可扩增标记物基因的遗传修饰细胞,在存在一定浓度的药物的情况下进行培养,在该药物浓度下,只有含有可扩增标记物基因的多个拷贝的细胞能够存活)。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,测试了从纤维蛋白凝胶释放的 PDGF 的生物学活性。人类间充质干细胞(HMSC)在来自添加有 PDGF 的凝胶的培养基上清液中(即在含有释放的 PDGF-BB 的培养基中)培养成单层后,形态转变成更细长的形状,以及细胞增殖增加的趋势,都指示了释放的生长因子的生物学活性。

[0099] 确定样品中蛋白浓度的方法

[0100] 治疗性蛋白,由于它们与内源产生的、天然存在的蛋白的相似性,通常难以在血清样品中进行检测。但是,测定已经给药的治疗性多肽、其片段、变异体或类似物的量,以评估治疗性蛋白是否显示出所需特征,例如较大的溶解性或稳定性、对酶消化的抗性、改善的生物学半衰期、以及本技术领域专业人员已知的其它特点,通常是有益的。方法还可以检测可能受到知识产权保护的治疗性蛋白的授权使用。

[0101] 本发明使用了方法来检测 PDGF 从含有 PDGF 的纤维蛋白凝胶的释放,并测定了蛋白的释放动力学。这些来自用不同浓度的 FC 组分制造的纤维蛋白密封胶的释放动力学的比较,有助于确定治疗性目的所需的释放速率。鉴定蛋白随时间从纤维蛋白密封胶中释放的量的能力,帮助在半衰期、吸附性、稳定性等的基础上确定最适治疗剂。检测分析方法可以是酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、闪烁亲近分析(SPA)、表面等离子体共振(SPR),或其它本技术领域已知的结合分析方法。

[0102] 一般来说,为了检测样品中 PDGF 的存在,将 PDGF 与 PDGF 结合剂进行结合,例如抗体、可溶性受体或其它结合 PDGF 的蛋白或试剂。

[0103] 对于生物学活性的检测步骤或测试来说,可以将 PDGF 蛋白与可检测部分或可检测标记物连接。可检测的部分或标记物是指可以通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的成分。可检测部分通常产生可测量的信号,例如放射活性、显色或荧光信号,它们可用于对样品中结合的可检测部分的量进行定量。可检测部分可以共价地、或通过离子键、范德华力或氢键掺入蛋白或与蛋白结合,例如掺入放射活性核苷酸,或链亲和素识别的生物素化的核苷酸。可检测部分可以是可直接或间接检测的。间接检测可以包括将第二个可直接或间接检测的部分与可检测的部分结合。例如,可检测部分可以是结合配偶体的配体,例如生物素,它是链亲和素的结合配偶体。结合配偶体本身可以是可直接检测的,例如,抗体可以用荧光分子进行标记。信号定量方法的选择可以通过例如闪烁计数、密度计量、或流式细胞术来实现。

[0104] 适合用于本发明的分析方法的标记物的例子包括放射活性标记物、荧光团、电子

致密试剂、酶（例如在ELISA中常用的）、生物素、洋地黄毒甙，或半抗原以及蛋白，所述半抗原以及蛋白可以例如通过将放射性标记物掺入半抗原或肽被制造成可检测的，或用于检测与半抗原或肽特异性反应的抗体。还考虑到了其抗血清或单克隆抗体可以获得的蛋白，或具有与靶互补的序列的核酸分子，纳米标签（nanotag），分子量珠子，磁性试剂，含有荧光染料的纳珠或微珠，量子点，量子珠，荧光蛋白，带有荧光标记物的树枝状聚合物，微转应答器（micro-transponder），电子供体分子或分子结构，或光反射颗粒。

[0105] 考虑到的其它可用于本发明的标记物包括但不限于荧光染料（例如荧光素异硫氰酸酯，德克萨斯红，罗丹明等），放射性标记物（例如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³²P），酶（例如辣根过氧化物酶，以及其它在ELISA中常用的酶），以及比色标记物例如胶体金、有色玻璃或塑料珠（例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等），和发光或化学发光标记物（例如铕（Eu）、MSD Sulfo-Tag）。

[0106] 标记物可以按照本技术领域熟知的方法直接或间接与所需的分析组分偶联。在具体实施方案中，标记物与组分共价结合，使用异氰酸酯或N-羟基琥珀酰亚胺酯试剂来结合本发明的活性药剂。在本发明的一种情况下，使用双官能异氰酸酯试剂将标记物结合到生物聚合物上，形成标记物生物聚合物结合物，其上没有结合活性药剂。标记物生物聚合物结合物可以用作中间体，用于合成本发明的标记的结合物，或可用于检测生物聚合物结合物。正如上面指出的，可以使用广泛的各种标记物，标记物的选择取决于所需的灵敏度，与所需分析组分结合容易性，稳定性要求，可用的仪器设备，以及废弃规定等。非放射活性标记物通常通过间接方式结合。一般来说，配体分子（例如生物素）被共价结合到分子上。然后将配体与另一个分子（例如链亲和素）结合，该另一个分子或者是本身可检测的，或者与信号系统共价结合，例如可检测的酶、荧光化合物或化学发光化合物。

[0107] 可用于本发明的方法的化合物也可以直接与信号产生化合物结合，例如通过与酶或荧光团结合。适合用作标记物的酶包括但不限于水解酶，特别是磷酸酶、酯酶和糖苷酶，或氧化酶（oxidotase），特别是过氧化物酶。适合用作标记物的荧光化合物包括但不限于上面列出的，以及荧光素衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、曙红、TRITC胺、奎宁、荧光素W、吖啶黄、丽丝胺罗丹明、B磺酰氯 erythroscein、钆（三、二吡啶鎓）、铕、德克萨斯红、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、黄素腺嘌呤二核苷酸等。适合用作标记物的化学发光化合物包括但不限于MSD Sulfa-TAG、铕（Eu）、钐（Sm）、萤光素和2,3-二氢酞嗪二酮，例如鲁米诺。对于可用于本发明方法的各种不同的标记和信号产生系统的综述，参见美国专利No. 4, 391, 904。

[0108] 用于检测标记物的手段对于本技术领域的专业人员来说是熟知的，取决于待检测的标记物的类型。因此，例如，当标记物是放射活性时，检测手段包括闪烁计数器（例如放射免疫分析，闪烁亲近分析）（Pitas等，Drug Metab Dispos. 34 :906-12, 2006）或照相底片，如同在放射自显影中那样。当标记物是荧光标记物时，它的检测可以通过用适当波长的光激发荧光团，并检测产生的荧光（例如ELISA，流式细胞术，或本技术领域已知的其它技术）。荧光可以通过使用电子检测器例如电荷耦合器件（CCDs）或光电倍增器等目测检测。同样地，酶标记物可以通过提供适合的酶的底物，并检测得到的反应产物来检测。比色或化学发光标记物可以简单地通过观察与标记物相关的颜色来检测。其它适合用于本发明的方法的标记和检测系统，对于本技术领域的专业人员来说是显而易见的。如此标记的介导体

和配体可用于疾病或健康状况的诊断中。

[0109] 方法任选包括至少一个或多个清洗步骤,其中在测量蛋白结合之前对结合的 PDGF 组合物进行洗涤,以减少由未结合的多肽引起的背景测量值。在多肽组合物温育后以及检测 PDGF 前 PDGF 的洗涤,在适当的缓冲液加去污剂中进行。适合的去污剂包括但不限于烷基二甲基胺氧化物,烷基葡萄糖苷,烷基麦芽糖苷,烷基硫酸盐(例如十二烷基硫酸钠(SDS)), NP-40, 烷基硫代葡萄糖苷,甜菜碱,胆汁酸, CHAP 系列,毛地黄皂苷、葡萄糖酰胺,卵磷脂 / 溶血卵磷脂,非离子性基于聚氧乙烯的去污剂、包括 TRITON-X, 聚山梨酸酯例如 **TWEEN® 20** 和 **TWEEN® 80**、**BRIJ®**、**GENAPOL®** 和 **THESIT®**,季铵化合物等。也可以参见《蛋白质科学现代方法》附录 1B 的增补 11 (Current Protocols in Protein Science, Appendix 1B, Suppl. 11, 1998, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ)。合适的去污剂可以使用常规的实验方法来确定(参见 Neugebauer, J., 《生物学和生物化学中去污剂的性质与应用指南》A Guide to the Properties and Use of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, Calif., 1988)。

[0110] 纤维蛋白密封胶的给药方法

[0111] 考虑到了使用本技术领域熟知的技术,将可用于本发明的纤维蛋白密封胶给药到对象,例如通过在所需位点注射或喷洒、使用内视镜、使用海绵状载体、预制的密封胶或本技术领域已知的其它方法。在一个实施方案中,密封胶被注射或喷洒,并使其在原地形成凝胶。

[0112] 考虑到了将这些纤维蛋白密封胶给药于将得益于 PDGF 在体内持续 / 受控释放的对象,这对于本技术领域的普通专业人员来说是明显的,包括但不限于下面列出的病症。在一个实施方案中,患者患有肌肉骨骼疾病,包括但不限于骨骼和软骨、肌肉、相关韧带以及其它结缔组织的疾病;软组织疾病或病症,包括但不限于影响肌肉、纤维组织、脂肪、血管和滑液组织的病症;或血管疾病。

[0113] 在一个实施方案中,纤维蛋白密封胶用于代替骨骼移植物,因此可以应用于许多相同的适应症中,包括但不限于脊柱融合器、不连缺损的愈合、骨骼增强、骨折修复加速、骨组织重建和牙齿再生。此外,在另一个实施方案中,密封胶可用于植入物整合。在植入物整合中,植入物可以用纤维蛋白密封胶包裹,诱导附近骨骼区域生长到植入物表面内,防止松散和其它相关问题。在另一个实施方案中,富含生长因子的基质可用于治愈皮肤中的慢性伤口。

[0114] 其它的骨骼或软骨疾病或病症包括但不限于骨关节炎、骨质疏松、骨营养不良、软骨病、骨软化、McCune-Albright 综合征、Albers-Schonberg 病、Paget's 病、类风湿关节炎、骨关节炎、软骨损伤、假体周围骨质溶解、成骨不全、转移性骨病、骨软骨瘤、骨生成、骨髓炎、骨病、骨骼石化症、骨硬化、多软骨炎、关节软骨损伤、软骨钙质沉着病、软骨发育不全、骺骨软化症、软骨肉瘤、肋软骨炎、内生软骨瘤、拇强直、半月板损伤、髌臼盂唇撕裂、剥脱性骨软骨炎 (ocd)、复发性多软骨炎,或任何将得益于刺激骨骼或软骨形成的病症。

[0115] 含有 PDGF 蛋白的纤维蛋白密封胶也可用于治疗将得益于增加的血管生成和血管生长的血管疾病或病症,包括但不限于局部缺血 / 再灌注、心肌梗塞、充血性心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、冠状动脉病 (CAD)、中风、血管或心脏钙化、血栓形成、外周血管病、血管壁重塑、心室重塑、快速心室起搏、冠状动脉微栓塞、压力超负荷、主动脉弯曲、冠

状动脉结扎、血管性心脏病、瓣膜疾病,包括但不限于由钙化、风湿性心脏病、心内膜炎或人工瓣膜的并发症引起的瓣膜变性;心绞痛、心力衰竭、高血压、心房纤颤、心包疾病,包括但不限于心包积液和心包炎;心肌病、心脏肥大或心血管发育紊乱。

[0116] 试剂盒

[0117] 在本发明的范围内也考虑到了试剂盒。典型的试剂盒可以包括含有 FC 和凝血酶组分的纤维蛋白密封胶。在一个实施方案中,试剂盒还包括用于掺入到纤维蛋白密封胶中的 PDGF 蛋白。在一种情况下,每种组分可以包含在它自己的独立的储存容器、小瓶或器皿中。在相关情况下,PDGF 可以与 FC 组分混合,而凝血酶组分可以在单独的储存容器中。在相关情况下,PDGF 可以与凝血酶组分混合,而 FC 组分可以在单独的储存容器中。在相关实施方案中,储存容器是小瓶、瓶子、袋子、储液器、管子、泡罩、小袋、贴片等。配方的一种或多种成分可以是冻干的、冷冻干燥的、喷雾干燥的,或者采取任何其它可以复溶的形式。如果需要,也可以提供各种不同的复溶介质。

[0118] 试剂盒的成分可以采取冷冻、液体或冻干的形式。进一步还考虑到了试剂盒含有适合于将纤维蛋白凝胶给药于对象的装置。在另一个实施方案中,试剂盒还含有用于制备和给药纤维蛋白密封胶的说明书。

[0119] 从下面的实施例中,本发明的其它方面和详细情况将变得明显,这些实施例目的是说明而不是限制。

实施例

[0120] 实施例 1:材料和方法

[0121] 释放动力学

[0122] 使用单一([FC] = 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml)的纤维蛋白密封胶制剂(TISSEEL VH S/D, S/D 是加入了病毒失活步骤以提供附加的安全性;Baxter AG, Vienna, Austria),分析了重组(rh)-PDGF(R&DSystems)的浓度对释放动力学的影响。分析了不同量的重组人类 PDGF-AB 或 BB(对于 0.3ml 凝胶为 5ng, 10ng, 20ng, 40ng 和 80ng)。在制备凝胶时,将 PDGF 重新悬浮在 FC 组分中。

[0123] 分析了 FC 浓度对最初悬浮在纤维蛋白的 FC 组分中的 PDGF-AB 和 PDGF-BB(固定在 15ng/0.3ml 凝胶)的释放动力学的影响。使用从 5-40mg/ml(在凝胶中的终浓度)的不同浓度的 FC,以及固定浓度的凝血酶(2IU/ml),制备了四种不同的纤维蛋白凝胶制剂(TISSEELVH S/D)。

[0124] 使用单一凝胶配方([FC] = 20mg/ml, [凝血酶] = 2IU/ml, 凝胶中的终浓度),对三个不同产品批次的 TISSEEL VH S/D 纤维蛋白密封胶的 PDGF-AB 和 BB(固定为 15ng/0.3ml 凝胶,即 50ng/ml 凝胶)的释放动力学进行了比较,以分析释放动力学依赖于纤维蛋白密封胶产品批次的任何变化性。

[0125] 分析了 PDGF-BB 从 TISSEEL VH 的释放动力学(PDGF-BB 浓度的影响,FC 浓度的影响,以及依赖于纤维蛋白密封胶产品批次的变化性),以观察使用 TISSEEL VH 和 TISSEEL VH S/D 时可能存在的差异。

[0126] 对于所有使用 TISSEEL VH S/D 的实验来说,凝胶在聚丙烯 Eppendorf 管中制备,而对于使用 TISSEEL VH 的实验来说,凝胶在 24 孔聚苯乙烯培养板中制备。在所有情况下,

将凝胶与标准的人类 MSC (HMSC) 生长培养基 (Lonza Walkersville Inc., Walkersville, MD) 在 37°C 下、5% CO₂ 中, 温育最多 10 天。每天更换培养基, 并将培养基样品冷冻直到通过 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) 测试 PDGF 的量为止。对于评估 FC 浓度的影响和 TISSEEL VH S/D 批与批之间变化的实验来说, 在 10 天的释放后, 使用尿激酶 (1U/ml) 将凝胶溶解在完全培养基中。测试获得的溶液中 PDGF 的量, 以便证实最初添加到凝胶中的生长因子的量的完全回收。

[0127] 生物学活性

[0128] 释放的 PDGF 对 HMSC 单层的影响:

[0129] 使用了一种 TISSEEL VH S/D 纤维蛋白制剂 (20mg/ml 的 FC 以及 2IU/ml 凝血酶, 均为在凝胶中的终浓度), 来分析从凝胶释放的 PDGF 的生物学活性 (将 120ng PDGF-AB 和 60ng PDGF-BB 加入到 FC 组分中, 然后将带有添加的 PDGF 的凝胶聚合)。将第 3 天时从凝胶收集的培养基上清液 (不每天更换培养基), 用作 HMSC 单层的培养基。首先, 将 HMSC 以 2500 个细胞/cm² 预先接种在 12 孔培养板中 (10,000 个细胞/孔), 在 37°C、5% CO₂ 中温育 4 到 5 小时, 以允许贴壁。然后, 除去细胞培养基, 用来自凝胶的培养基上清液替换。制备一些不加 PDGF 的凝胶用作对照样品, 以便确保使用来自于添加有 PDGF 的凝胶的培养基时观察到的任何变化, 确实是由释放的 PDGF 诱导的, 而不是由可能从凝胶自身释放的某些其它的潜在生物活性成分诱导的。含有新鲜制备的、添加有 30ng (15ng/ml) rh-PDGF 的培养基的孔, 被用作阳性对照。在阳性对照中添加 30ng PDGF, 是基于当在实验使用的凝胶制剂中添加 120ng PDGF-AB 或 60ng PDGF-BB 时, 在第 3 天时所发现的从凝胶释放的 PDGF 的大约量, 因此将很接近地模拟测试条件, 即在第 3 天时来自凝胶的、含有释放的 PDGF-AB 或 PDGF-BB 的培养基上清液。

[0130] 细胞增殖和细胞形态学变化的分析: 在第 1、4 和 7 天时分析了细胞增殖和形态学变化。将细胞培养基丢弃, 将细胞用含有钙黄绿素-AM 和溴乙锭同二聚体-1 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) 的存活/死亡 (Live/Dead) 染料溶液染色。将与来自添加有 PDGF 的凝胶的培养基上清液温育的细胞的增殖, 同与来自未添加 PDGF 的凝胶的上清液温育的细胞以及添加有 30ng PDGF 的新鲜制备的培养基温育的细胞的增殖 (阳性对照), 进行了比较。细胞的增殖通过在 50 分钟染色后用多孔板读板器 (Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 测量荧光强度来监测。在增殖读数后, 将板用基本培养基洗涤一次以除去残留的染色剂, 并使用装备有数字图像获取系统 (带有用于图像捕获的 Spot 软件 V. 2.1. 的 Spot 数字相机, Nikon) 的倒置荧光显微镜 (Nikon Eclipse TE200, Nikon Instruments Inc., Melville, NY), 观察细胞形态学变化。

[0131] 细胞分化分析 (软骨形成和骨形成): 为了分析在存在从纤维蛋白凝胶释放的 PDGF 的情况下, 可能的 HMSC 软骨形成或骨形成分化, 在培养 1、4、7 天后, 将细胞用爱茜蓝 (Alcian Blue) (用于软骨形成) 或茜素红 (用于骨形成) 染色。将与来自添加有 PDGF 的凝胶的培养基温育的细胞的染色强度, 同与来自未添加 PDGF 的凝胶的培养基温育的细胞以及与添加有 30ng PDGF 的新鲜制备的培养基温育的细胞 (阳性对照) 的染色强度, 进行了比较。

[0132] 为了进行爱茜蓝染色, 将细胞用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 清洗两次, 用聚甲醛 (SigmaAldrich Inc.) 固定 10 分钟, 用

0.1N HCl 中的 1% 爱茜蓝 (Sigma Aldrich Inc.) 染色 30 分钟。将细胞用 PBS 洗 5 次 (每次 2 分钟), 在装备有数字图像获取系统 (前面描述的带有用于图像捕获的 Spot 软件 V. 2. 1. 的 Spot 数字相机, Nikon) 的倒置光学显微镜 (Nikon Eclipse TE200) 下观察。为了进行茜素红染色, 首先将细胞用 PBS 洗两次, 在冰冷的 70% 乙醇中固定 10 分钟, 用 PBS 中的 2% 茜素红 (Sigma Aldrich Inc.) 染色 30 分钟。然后将细胞用 PBS 洗 5 次 (每次 2 分钟), 使用上述的倒置光学显微镜观察。

[0133] 除了用茜素红染色之外, 在培养 1、4 和 7 天后测量了碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 作为早期成骨分化的标志物。将 12 孔培养板中的细胞用 HBSS (Lonza Walkersville, Inc.) 洗涤两次, 用胰蛋白酶处理几分钟使它们分离。然后将细胞悬液转移到 Eppendorf 管中, 将孔用 0.5ml 基本培养基洗涤, 然后转移到相应的 Eppendorf 管中。然后将细胞离心 5 分钟, 用 0.5ml 含有 NaHCO_3 的 Tyrode's 盐溶液 (Sigma Aldrich, Inc.) 洗一次。弃去上清液, 将细胞沉淀重新悬浮在 $50 \mu\text{l}$ AMP 缓冲液 + MgCl_2 (Sigma Aldrich, Inc.) 中, 转移到 96 孔板中。将管用 $25 \mu\text{l}$ AMP 缓冲液 + MgCl_2 洗涤, 将其转移到 96 孔板的相应孔中。在 96 孔板的 3 个孔中加入 $75 \mu\text{l}$ AMP 缓冲液 + MgCl_2 , 用作空白。最后, 在每个孔中加入 $75 \mu\text{l}$ p-NPP (对硝基苯基磷酸酯, Sigma Aldrich, Inc.) 底物储液, 然后将板在 37°C 放置 30 分钟。在 30 分钟时, 使用微孔板读板器 (Thermomax, Molecular Devices Corp.) 分析所形成的与 ALP 活性成比例的对硝基酚产物在 405nm 处的吸光度。将首先以 IU/L 测量的结果, 根据增殖进行归一化。

[0134] PDGF-BB 对接种在纤维蛋白凝胶中的 HMSC 的影响:

[0135] 为了分析添加在纤维蛋白凝胶中的 PDGF-BB 对接种在纤维蛋白凝胶中的 HMSC 和接种在凝胶表面上的人脐带血管内皮细胞 (HUVEC, Lonza Walkersville, Inc.) 的行为的生物学效应, 使用单一培养细胞 (HMSC 或 HUVEC) 或 HMSC : HUVEC 比率为 4 : 1 的共培养的细胞, 制备了含有 10mg/ml FC 和 2IU/ml 凝血酶 (凝胶中的终浓度) 的 TISSEEL VH S/D 凝胶。在凝胶制备时, 在一半的共培养凝胶中, 在 FC 中添加 PDGF-BB ($60\text{ng}/0.3\text{ml}$ 凝胶), 以便比较在添加或未添加 PDGF-BB 的凝胶中细胞的行为。将制备在 24 孔培养板中的凝胶, 使用含有血清添加物的内皮细胞生长培养基 ($1\text{ml}/$ 凝胶), 在 37°C 下、 $5\% \text{CO}_2$ 中温育最多 21 天。在第 1、7、14 和 21 天分析细胞的形态学和增殖, 以及成骨分化。细胞形态学, 包括 HUVEC 重新组织成互相连接的细胞 - 细胞网络 (血管形成分化的早期事件), 在用钙黄绿素染料染色后通过荧光显微术观察。细胞增殖, 在用钙黄绿素染料染色后, 通过将凝胶在纯化的、浓缩的牛胰蛋白酶溶液中溶解后, 测量细胞悬液的总荧光强度来分析。最后, 在将凝胶在纯化的、浓缩的牛胰蛋白酶溶液中溶解、然后重新悬浮细胞后, 测量 ALP 作为成骨分化的早期标志物 (方案如前所述)。

[0136] 通过表面等离子体共振测定 PDGF 的结合:

[0137] 表面等离子体共振 (SPR) 是一种实时测量生物分子相互作用的技术。分析可以确定具体的分析物是否与给定配体结合, 并确定分析物与配体结合的结合亲和性和化学计量。基本的实验方法是首先将镀金的芯片与配体偶联。然后将在缓冲液 (流动相) 中制备的分析物注射到流动池中, 在那里它由缓冲液流运载通过镀层的芯片。如果分析物与配体之间发生生物分子相互作用, 表面上质量的局部增加导致金属表面上折射率单位 (μRIU) 的增加。(μRIU) 的变化可以作为时间的函数作图。

[0138] 在本研究中,重组人类 PDGF-AB 和重组人类 PDGF-BB 被用作分析物, TISSEEL VH S/D 的 FC 组分被用作配体。磷酸盐缓冲液 (PBS, 即生理盐条件溶液) 被用作缓冲液。将不同浓度的每种 PDGF 同工型分别通过 FC 包被的传感器芯片的表面。对于每个实验和每种浓度来说,测量结合和解离速率。

[0139] 统计学分析:

[0140] 释放动力学进行三份平行测试。增殖、ALP 活性、爱茜蓝和茜素染色的结果代表了三组实验。增殖和 ALP 活性进行了三份平行测试,染色实验进行了双份。每种 PDGF 浓度的 SPR 分析进行了三分平行测试。统计学分析使用 ANOVA 检验进行,以 5% 作为显著性水平。

[0141] 实施例 2 :PDGF 浓度对它从 TISSEEL VH S/D 释放的动力学的影响

[0142] 使用由 TISSEEL VH S/D 制造的单一纤维蛋白凝胶制剂 (FC 浓度为 20mg/ml, 凝血酶浓度为 2IU/ml, 均为凝胶中的终浓度), 分析了 PDGF 浓度对它从纤维蛋白凝胶释放的动力学的影响。释放动力学研究显示, PDGF-AB 和 BB 的释放量, 随着最初添加到 TISSEEL VH S/D 的 FC 组分中的生长因子的量而增加 (图 1 和 2)。

[0143] 总体来说, 累积释放结果显示, 在 10 天后, 只有大约 20% 到 35% 的最初添加的 PDGF-AB 释放了 (图 1)。如果考虑仅仅 3 天后的 PDGF-AB 累积释放, PDGF-AB 的累积释放是大约 8-13%。换句话说, 这些结果显示, 在第 10 天时保留了大约 65-80%, 在第 3 天时保留了大约 87-92%。

[0144] 使用 PDGF-BB 的结果也服从同样的趋势, 但表现出较高的总释放, 在 10 天后释放了大约 45% 到 70% (图 2)。如果考虑仅仅 3 天后 PDGF-BB 的累积释放, 累积释放是大约 20-35%。

[0145] 这些结果表明, PDGF-AB 和 BB 都与纤维蛋白具有强烈的结合相互作用。

[0146] 实施例 3 :FC 浓度对 PDGF 从 TISSEEL VH S/D 释放的动力学的影响

[0147] 为了确定当使用 TISSEEL VH S/D 纤维蛋白密封胶时 FC 浓度对 PDGF 释放动力学的影响, 使用具有固定的凝血酶浓度 (2IU/ml), 对 4 种不同 FC 浓度 (5、10、20 和 40mg/ml, 为在凝胶中的终浓度) 的 TISSEEL VH S/D 凝胶的释放进行了分析。

[0148] ELISA 结果显示, 对于所有被分析的 FC 浓度来说, 第 1 天时有峰值释放, 随后释放减少直到第 10 天 (图 3A)。当在凝胶中加入 15ngPDGF-AB 时, FC 浓度 (从 5 到 40mg/ml) 对释放动力学没有显著影响。累积释放显示, 在 10 天后释放起始量 (15ng) 的大约 27% 到 32% (图 3B), 而 3 天后仅释放 10% 到 20%。换句话说, 10 天后的保留为大约 70%, 而仅仅 3 天后保留高达 80-90%, 并且不受 FC 浓度的影响, 表明 5mg/ml FC 足够结合 15ng PDGF-AB。

[0149] 但是, 使用 PDGF-BB 的结果显示出 FC 浓度对总释放百分率的影响 (图 4)。事实上, 第 10 天时, 在较低 FC 浓度下 PDGF-BB 从 TISSEELVH S/D 的累积释放较高 (使用 5mg/ml FC 为 65%, 使用 40mg/ml FC 为 25%)。第 3 天时的累积释放分析也显示出了对 FC 浓度的依赖性, 使用 5mg/ml FC 时释放为大约 35%, 使用 40mg/ml FC 时释放为大约 10%。换句话说, 这些结果显示, 10 天后, 最小保留为是大约 35% (使用 5mg/ml FC), 最大保留为大约 75% (使用 40mg/ml FC), 而 3 天后, 最小保留为大约 65%, 最大保留为大约 90%。释放动力学对 FC 浓度的依赖性, 表明通过改变 FC 浓度, PDGF-BB 有可能受控释放。

[0150] 在将凝胶溶解以回收凝胶中残留的 PDGF-AB 后, ELISA 结果显示, 回收到了最初添加的 PDGF-AB 量的至少 85%。在将凝胶溶解以回收凝胶中残留的 PDGF-BB 后, ELISA 结果

显示,回收到了最初添加的 PDGF-BB 量的 65%到 75%。因此,对于 PDGF-BB 来说回收不完全,PDGF-BB 的释放百分率可能被略微低估了。

[0151] 实施例 4:使用 TISSEEL VH S/D 不同产品批次的影响

[0152] 当观察使用具有单一凝胶配方(20mg/ml FC 和 2IU/ml 凝血酶,均为凝胶中的终浓度)的 TISSEEL VH S/D 的不同 FC 产品批次的影响时,结果显示,对于所有被分析的批次来说,直到 10 天时具有恒定的释放。取决于 FC 批次,10 天后 PDGF-AB 的累积释放在大约 23%到 32%的范围内(图 5),因此对于 3 个批次来说是相似的。取决于 FC 批次,10 天后 PDGF-BB 的累积释放在大约 38%到 42%的范围内(图 6),因此对于 3 个批次来说也是相似的。

[0153] 这些结果显示,在纤维蛋白批次之间,PDGF 的释放没有显著差别,因此在释放动力学中不必担心批次之间的差异。

[0154] 在将凝胶溶解以回收凝胶中残留的 PDGF-AB 后,ELISA 结果显示了最初加入的 PDGF-AB 量被完全回收。在将凝胶溶解以回收凝胶中残留的 PDGF-BB 后,ELISA 结果显示回收了最初加入的 PDGF-BB 量的大约 65%。因此,对于 PDGF-BB 来说回收不完全,PDGF-BB 的总释放百分率可能被略微低估。

[0155] 实施例 5:PDGF-BB 从 TISSEEL VH 释放的动力学

[0156] 分析了 PDGF-BB 从 TISSEEL VH 释放的动力学,以观察在使用 TISSEEL VH 和 TISSEEL VH S/D 时可能存在的差别。

[0157] 测量了 PDGF-BB 浓度对从 TISSEEL VH 释放的动力学的影响。结果显示,释放量随着最初添加到 FC 组分中的生长因子的量而增加(图 7)。总体来说,累积释放结果显示,10 天后,最初添加的 PDGF-BB 只有大约 20%到 40%被释放,即比使用 VH S/D 时观察到的释放低大约 2 倍。在仅仅 3 天后,结果显示 PDGF-BB 的累积释放为大约 15-20%。但是,应该指出,这些值可能被低估了,这是因为对 TISSEEL VH 进行的实验使用的是聚苯乙烯板(与此相比 TISSEEL VH S/D 使用的是聚丙烯管),PDGF 可能与聚苯乙烯板非特异性结合。没有测量 10 天释放实验结束时凝胶中残留的生长因子的回收来证实这种可能的低估。

[0158] 当观察 FC 浓度对每日 PDGF-BB 从 TISSEEL VH 释放的影响时,ELISA 结果显示,对于所有被分析的浓度来说,第 1 天表现出峰值释放,此后释放减少,一直到第 10 天(图 8A)。结果还显示出,当在 TISSEEL VH 凝胶中加入 15ng PDGF-BB 时,FC 浓度(从 5 到 40mg/ml)不影响释放动力学,累积释放显示出在 10 天后,释放了大约 30%到 35%的起始添加量(15ng)(图 8B)。该结果表明,来自 TISSEEL VH 的 5mg/ml FC 足够结合 15ng PDGF-BB。但是,至于 PDGF-BB 浓度影响的结果,应该指出,使用 TISSEEL VH 时的这些值由于使用了聚苯乙烯板,可能被低估了。

[0159] 最后,当观察使用具有单一凝胶配方(20mg/ml FC 和 2IU/ml 凝血酶,均为凝胶中的终浓度)的 TISSEEL VH 的不同 FC 产品批次的影响时,结果显示,对于所有被分析的批次来说,直到 10 天时具有恒定的释放。10 天后 PDGF-BB 的累积释放在大约 30%到 60%的范围内(图 9),因此依赖于 FC 批次号,这与使用 TISSEEL VH S/D 时的结果相反。被分析的 3 个批次的 TISSEEL VH 的一种差异是因子 XIII 的含量(批次 1 可以忽略,批次 2 为 33.9U/ml,批次 3 为 42.2IU/ml),表明在因子 XIII 的量与 PDGF-BB 从 TISSEEL 的释放速率之间可能存在关联。

[0160] 实施例 6 :释放的 PDGF 在体外对 HMSC 单层的生物学活性

[0161] 人类间充质干细胞 (HMSC) 是多能祖细胞,可以分化成不同的特化组织细胞类型,包括软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞和肌细胞 (Caplan AI, J Orthop Res 9 :641-650, 1991)。这些细胞的定向和分化由各种不同的因素介导,包括细胞相互作用,但是也包括特异性生长因子。PDGF 家族的成员已经被鉴定为 MSC 成熟的调节剂。

[0162] 测量了释放的生长因子对 HMSC 的影响。正如在材料与方法部分中陈述的,在第 3 天时 (不每天更换培养基),从纤维蛋白凝胶 (将 120ng PDGF-AB 和 60ng PDGF-BB 添加到 FC 组分中,然后对添加有 PDGF 的凝胶进行聚合) 收集培养基上清液,并用作 HMSC 单层的培养基。某些凝胶在制备时不加入 PDGF,用作对照样品,以便确保使用来自于添加有 PDGF 的凝胶的培养基时观察到的任何变化确实是由释放的 PDGF 诱导的,而不是由可能从凝胶自身释放的某些其它的潜在生物活性成分诱导的。

[0163] 用来自添加有 PDGF-AB 或 PDGF-BB 的 TISSEEL VH S/D 凝胶的培养基上清液、即含有释放的 PDGF 的培养基 (最初用 20mg/ml FC、2IU/ml 凝血酶制备的凝胶) 培养的 HMSC,早在第 4 天就显示出细胞形态学的变化,在第 7 天时甚至更明显。它们与来自未添加 PDGF 的凝胶的培养基上清液培养的细胞相比,具有更细长的形状,与用含有新鲜添加的 PDGF 的培养基培养的细胞更为类似。使用 PDGF-BB 时效果甚至更明显。

[0164] 将第 4 和 7 天时细胞的增殖根据第 1 天时的增殖 (基线) 进行归一化。当用来自添加有 PDGF 的 TISSEEL VH S/D 凝胶的培养基上清液 (即含有释放的 PDGF 的培养基) 培养 7 天时, HMSC 增殖趋于增加,但是差异不明显 ($p > 0.05$) (图 10 和 11)。用新鲜添加有 PDGF 的培养基培养的细胞的增殖,明显较高。

[0165] 用来自添加有 PDGF 的 TISSEEL VH S/D 凝胶的上清液培养的 HMSC,与来自未添加 PDGF 的 TISSEEL VH S/D 凝胶的上清液和用含有新鲜添加的 PDGF 的培养基培养的 HMSC 相比,其中的碱性磷酸酶 (ALP) 活性明显较低 (图 12 和 13)。

[0166] 在直到 7 天时,所有时间点的爱茜蓝 (软骨形成分化的指示剂) 和茜素红 (晚期骨形成分化的指示剂) 都为阴性。

[0167] 总的来说,在存在来自于 TISSEEL VH S/D 纤维蛋白凝胶的释放的 PDGF 的情况下,所有 HMSC 行为中观察到的变化在使用 PDGF-BB 时都更明显。总体上,结果显示,从 TISSEEL VH S/D 纤维蛋白凝胶释放的 PDGF 仍然是生物学活性的,主要诱导了 HMSC 形态学的变化和 ALP 活性的抑制。

[0168] 实施例 7 :PDGF-BB 对接种在纤维蛋白凝胶中的 HMSC 和接种在纤维蛋白凝胶表面上的 HUVEC 的影响

[0169] 为了分析 PDGF 对接种在纤维蛋白凝胶中的 HMSC 和接种在凝胶表面上的人类脐带血管内皮细胞 (HUVEC, Lonza Walkersville Inc.) 的行为的影响,按照在材料和方法中的描述制备了含有细胞的凝胶。

[0170] 简单来说,使用单一培养细胞 (HMSC 或 HUVEC) 或以 4 : 1 的 HMSC : HUVEC 比率共培养的细胞,制备了含有 10mg/ml FC 和 2IU/ml 凝血酶 (在凝胶中的终浓度) 的凝胶。在凝胶制备时,在一半的共培养凝胶中,在 FC 中添加了重组 PDGF-BB (60ng/0.3ml 凝胶)。使用含有血清补充的内皮细胞生长培养基 (Lonza Walkersville Inc.), 在 37°C 下、5% CO₂ 中将凝胶温育 21 天。在第 1、7、14 和 21 天时,分析细胞形态学和增殖,以及成骨分化。

[0171] 荧光显微术分析显示,随着时间, HMSC 以较高的数量均匀地分散,当接种在单一培养物凝胶中时,具有更细长的形状。它们在添加有 PDGF-BB 的共培养凝胶中也均匀地分散和伸长,但是在未添加 PDGF-BB 的情况下,它们较小、数量较少,并倾向于朝向共培养凝胶的底部迁移。在单一培养物凝胶和含有附加的 PDGF-BB 的共培养物凝胶中,与未添加 PDGF-BB 的共培养凝胶相比, HUVEC 重新组织成互相连接的细胞-细胞网络(血管形成的早期事件)开始得较早,发生的程度更高。

[0172] 细胞增殖随着时间而增加。在添加和未添加 PDGF-BB 的凝胶之间没有观察到明显的差别,但是在第 7 天和 14 天时,在含有添加的 PDGF-BB 的凝胶中注意到了更高增殖的趋势。ALP 活性保持在低水平,表明添加到凝胶中的 PDGF-BB 没有诱导接种在凝胶中的 HMSC 的成骨分化。

[0173] 实施例 8 :通过表面等离子体共振 (SPR) 测定的 PDGF 的结合

[0174] SPR 被用于研究 PDGF-AB 和 PDGF-BB 与 TISSEEL VH S/D 的 FC 组分之间的相互作用的性质。相互作用的传感图显示在图 14A-14B 中。对曲线的结合和解离部分进行了作图,并使用非线性回归分析,分别拟合成单相指数结合和解离曲线(图 14C)。如图 14B 所示, PDGF-BB 的解离曲线是双峰的。这使得不能精确地测定 PDGF-BB 与 TISSEELVH S/D 的 FC 组分之间相互作用的 K_D 值。但是, SPR 被成功地用于计算 PDGF-AB 与 TISSEEL VH S/D 的 FC 组分的相互作用的 K_D 值(在存在缓冲液(PBS, pH 7.4)的情况下)。对传感图结合相的分析,提供了速率常数 (K_{obs}), 将它对分析物浓度进行了作图(图 14C)。通过线性回归对这些图进行了分析,获得了斜率和截距,它们分别对应于结合速率常数 (K_{on}) 和解离速率常数 (K_{off})。平衡解离常数 (K_D) 通过用解离速率常数除以结合速率常数来计算。

[0175] 平衡解离常数 (K_D) 也可以通过互补的方法 (complementary method) 来才确定,这依赖于结合传感图的解离相。在这种方法中, PDGF-AB 的解离速率常数 (K_{off}) 从传感图的解离相的非线性回归分析计算。解离平衡常数 (K_D) 通过用解离速率常数 (K_{off}) 除以结合速率常数 (K_{on}) (它从传感图的结合相的分析获得) 来计算。

[0176] 使用这两种方法, PDGF-AB 与 TISSEEL VH S/D 的 FC 组分结合的 K_D 值为 $342 \pm 41 \text{ nM}$ 。

[0177] 归纳

[0178] 上面测量的释放动力学显示,在纤维蛋白凝胶中添加的重组 PDGF 逐渐从凝胶释放,表明了 PDGF 与纤维蛋白(原)的结合相互作用。这种结合相互作用得到了 10 天后累积释放低于最初添加的 PDGF 量的进一步证实。PDGF-BB 表现出比 PDGF-AB 释放得更快 (PDGF-BB 的持留更低), FC 浓度表现出影响了 PDGF-BB 从 TISSEEL VH S/D 纤维蛋白凝胶的释放速率,表明不同的 FC 浓度可用于控制 PDGF-BB 的释放速率。总的来说,这些结果表明了这两种形式的 PDGF、特别是 PDGF-AB, 与纤维蛋白的结合相互作用。使用 SPR 时,结果显示 PDGF-AB 和 PDGF-BB 二者都与 TISSEEL 的 FC 组分结合。最后,生物活性结果证实,释放的 PDGF 仍然是生物学活性的,主要诱导了 HMSC 形态学的变化,但是不诱导骨形成和 / 或软骨形成的分化。

[0179] 总的来说,本研究表明,纤维蛋白凝胶是用于投送生物活性 PDGF 的潜在载体系统,并证明了 TISSEEL 纤维蛋白密封胶的 FC 组分结合 PDGF-AB 和 BB 的内在性质。

[0180] 对于本技术领域的专业人员来说,预计可以对上面的说明性实施例中提出的本发明进行大量改变和改变。因此,只有在随附的权利要求书中出现的那些限制才对本发明生

效。

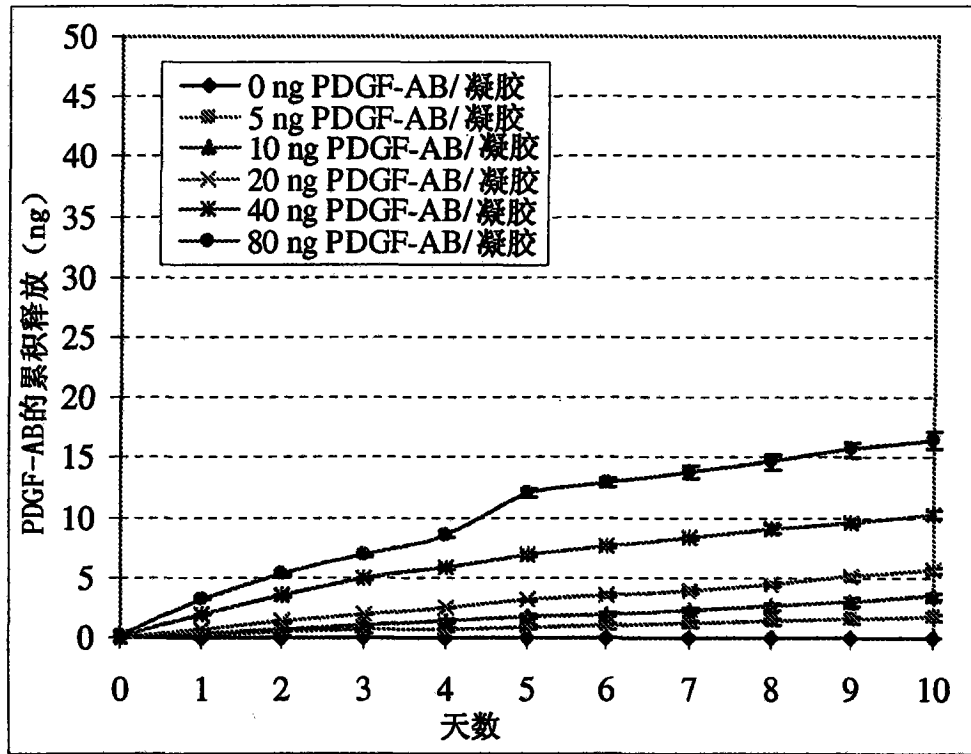


图 1

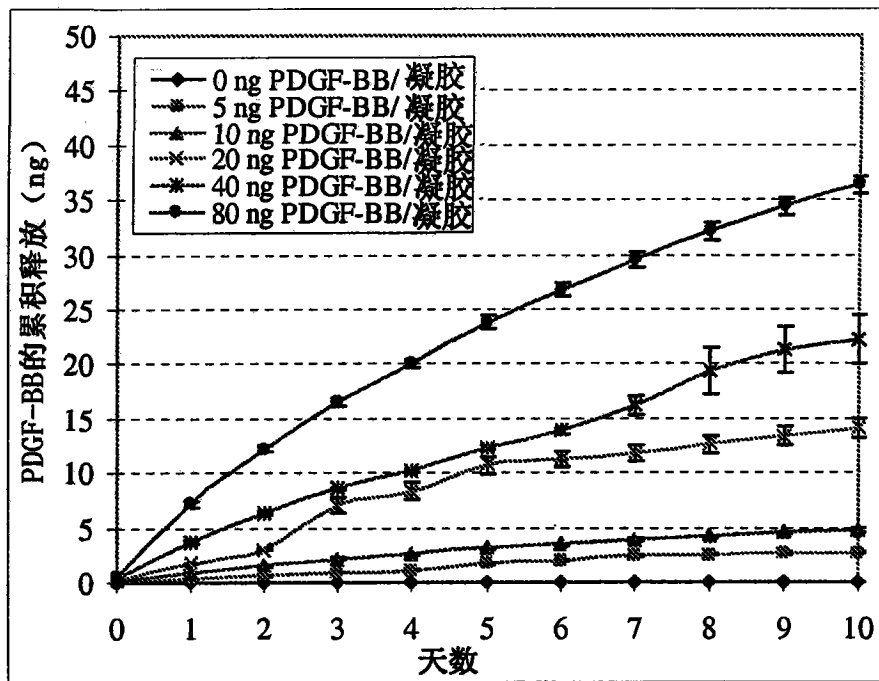


图 2

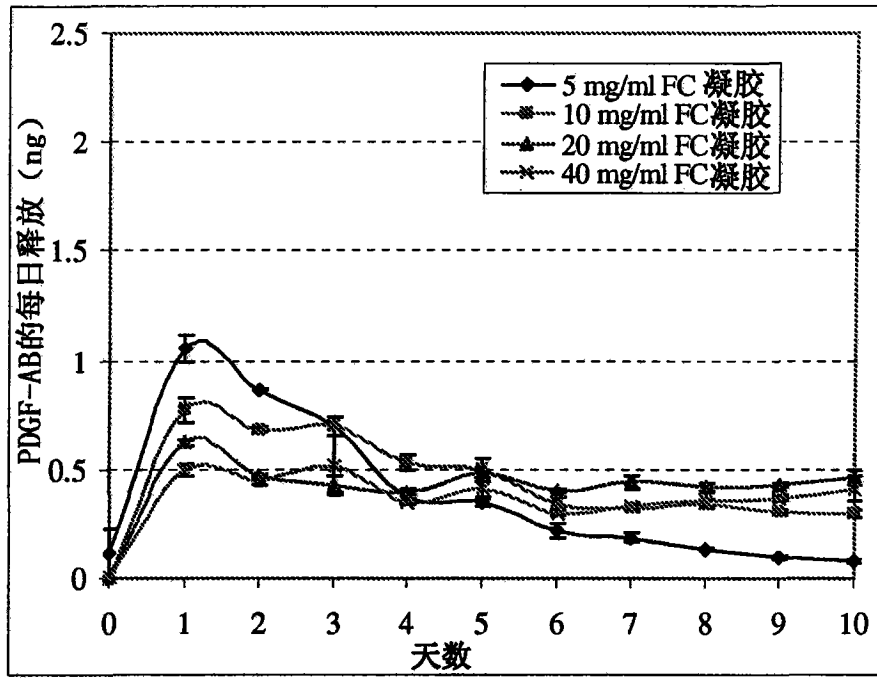


图 3A

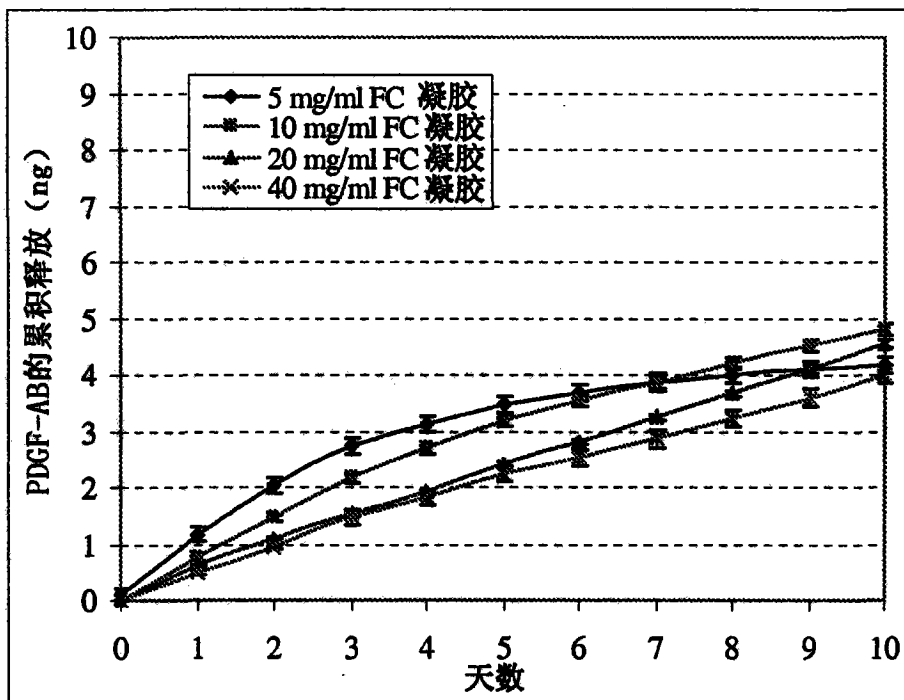


图 3B



图 4A

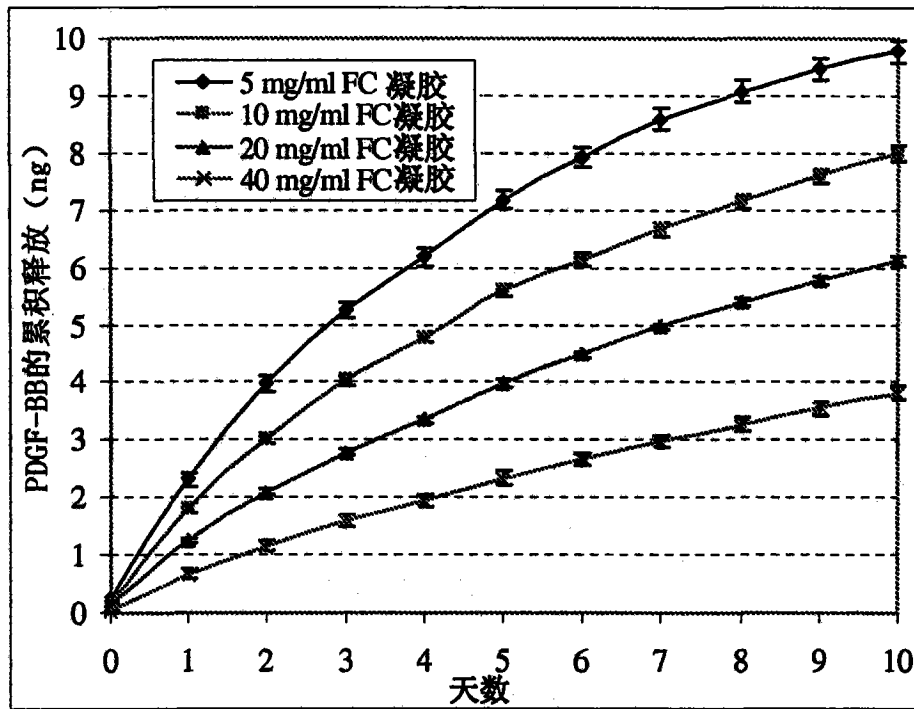


图 4B

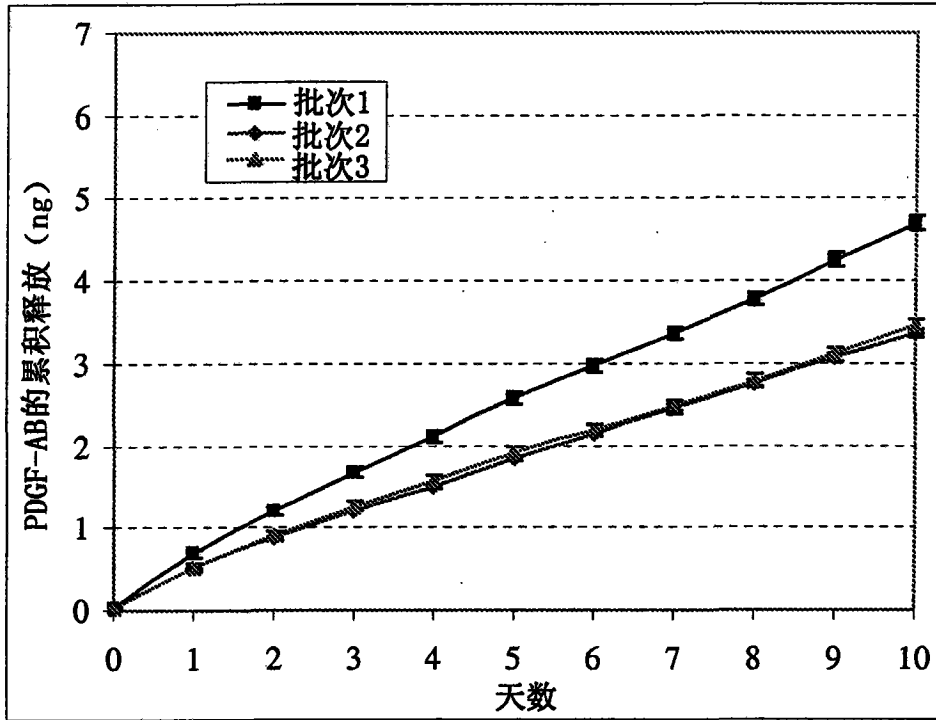


图 5

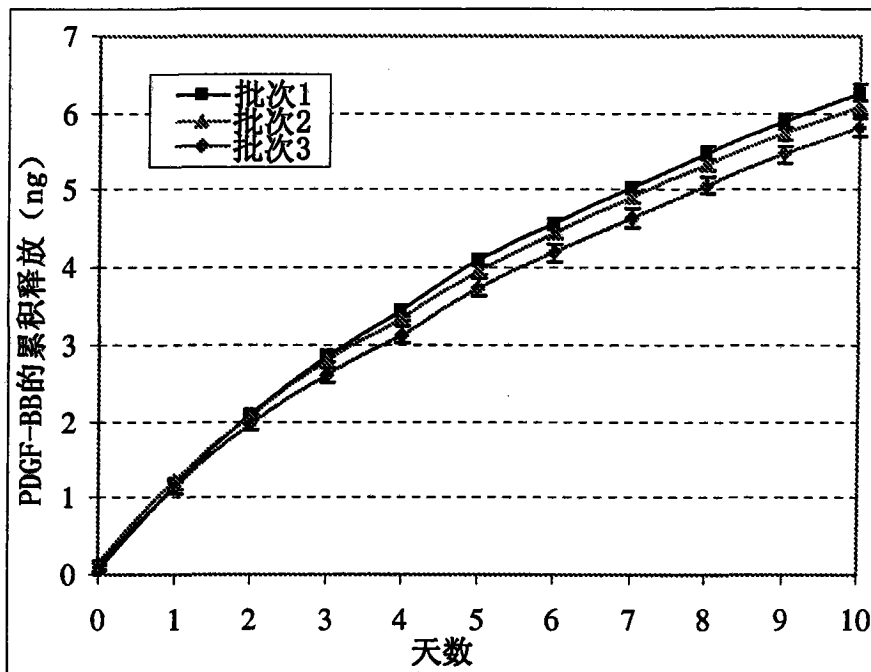


图 6

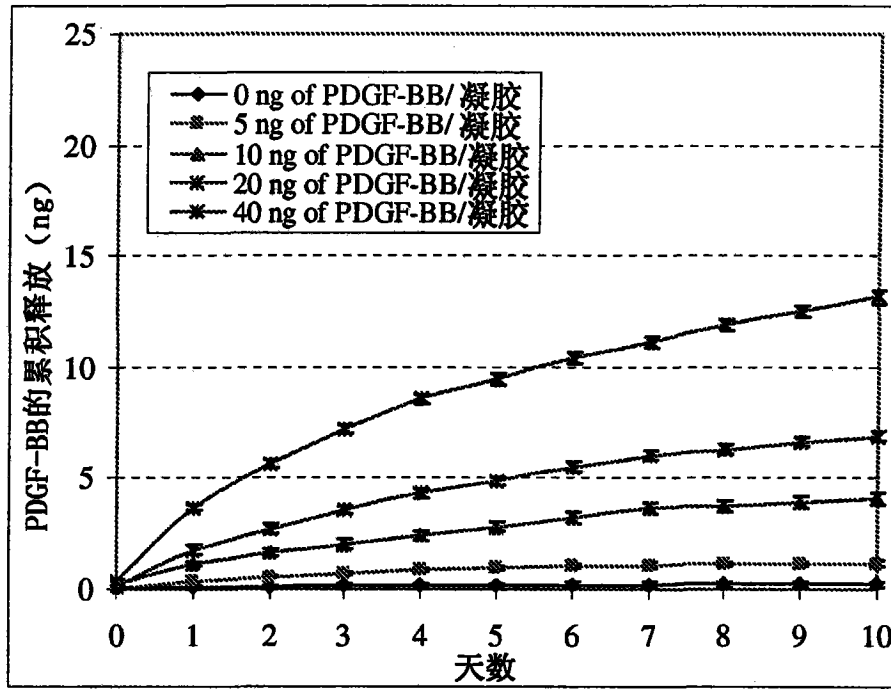


图 7

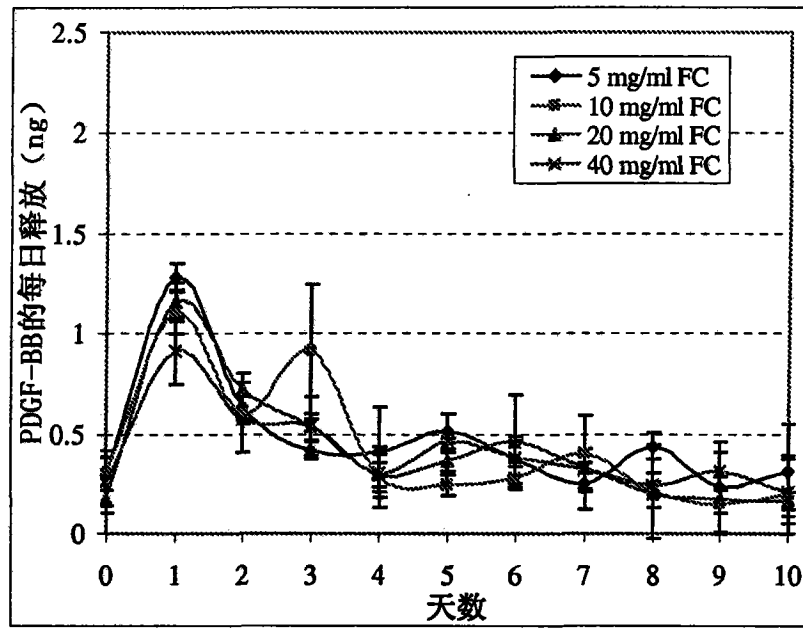


图 8A

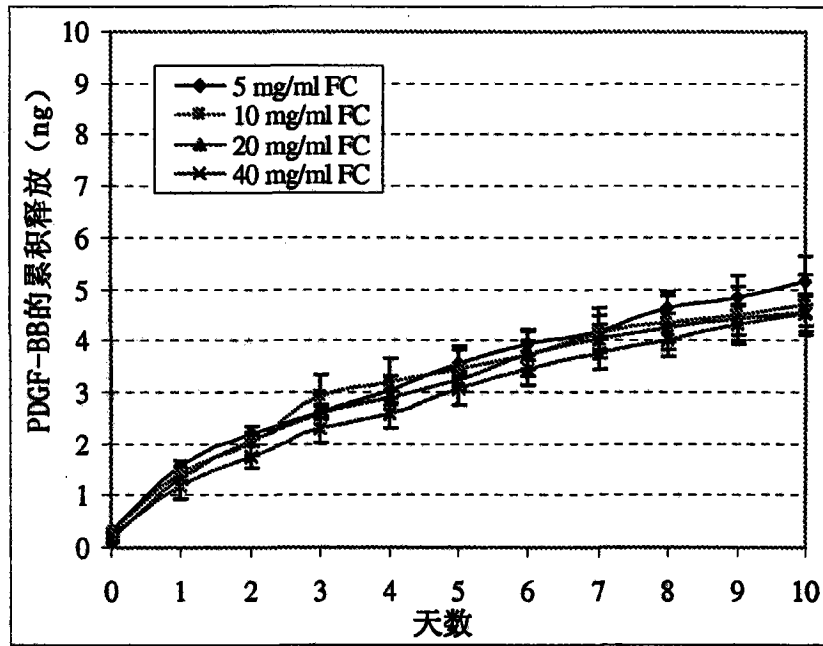


图 8B

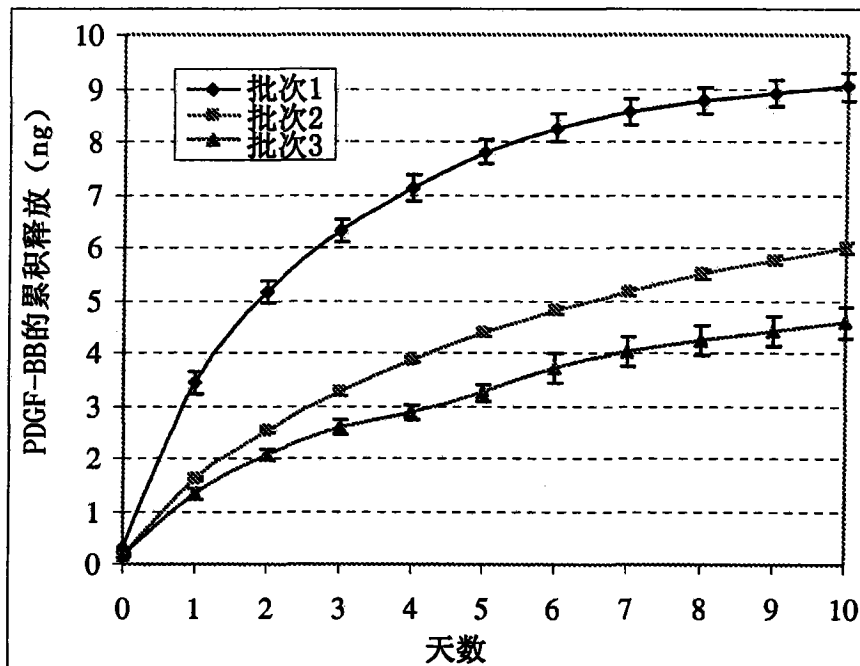


图 9

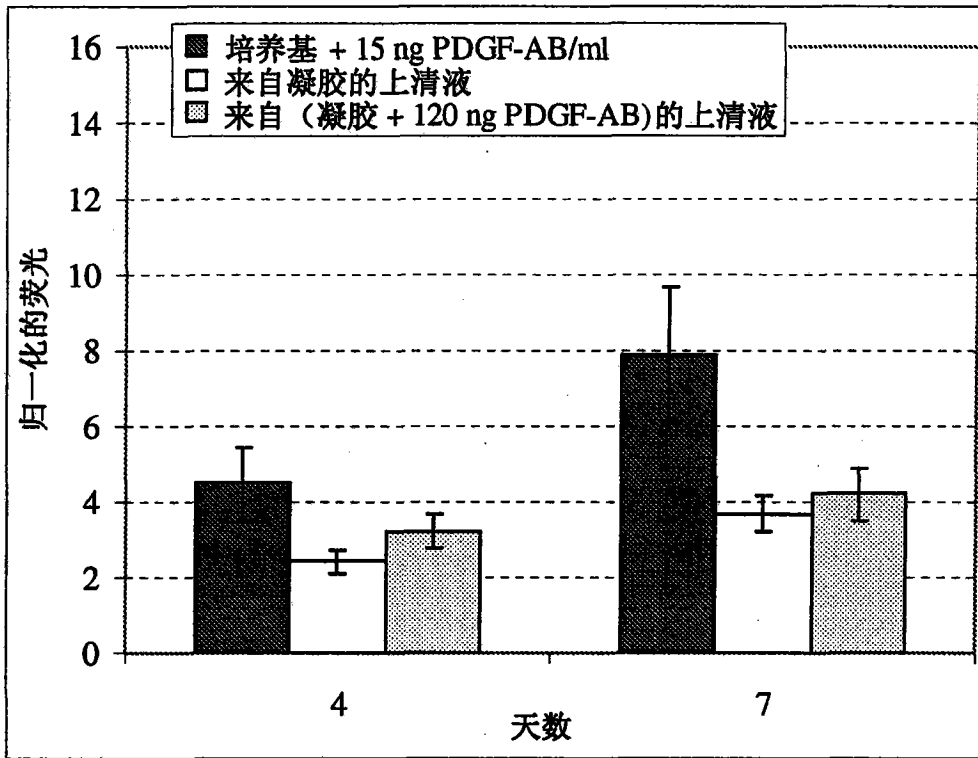


图 10

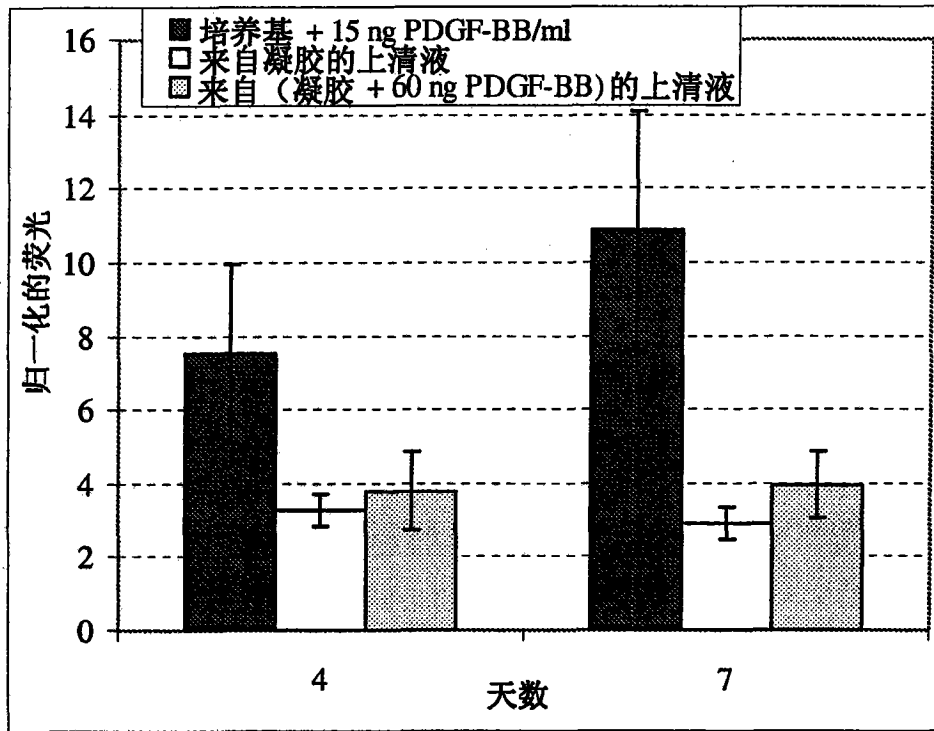


图 11

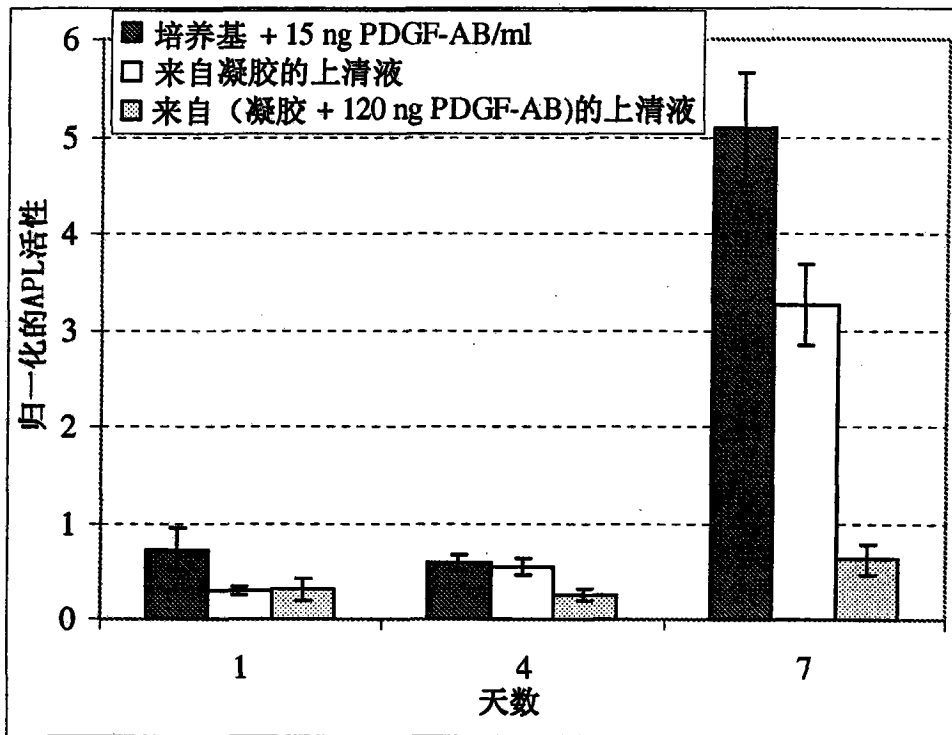


图 12

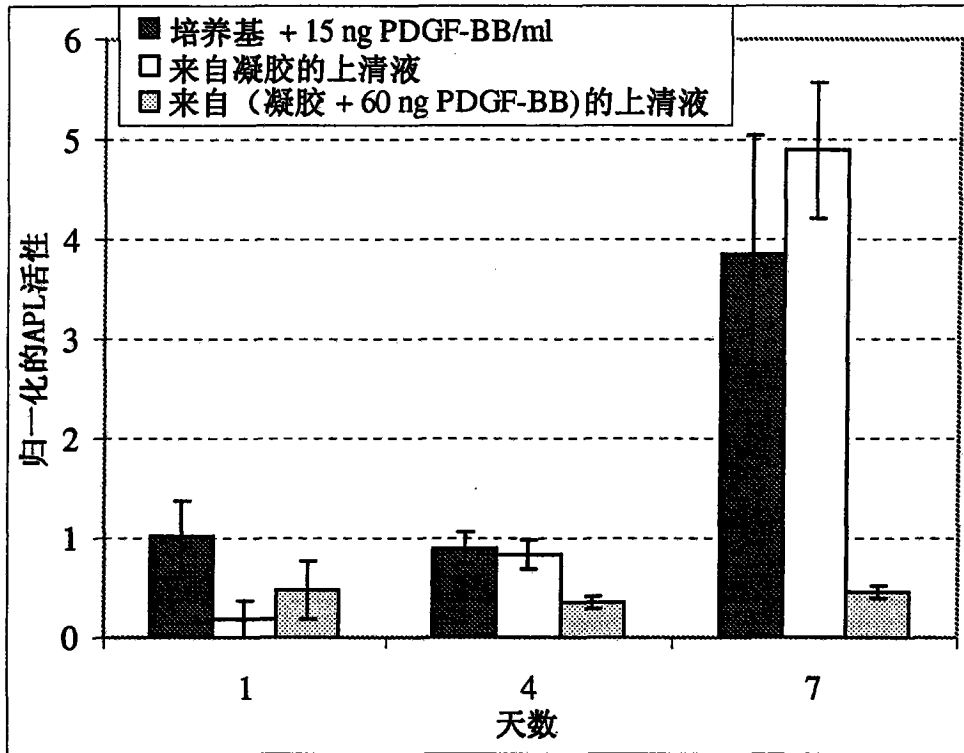
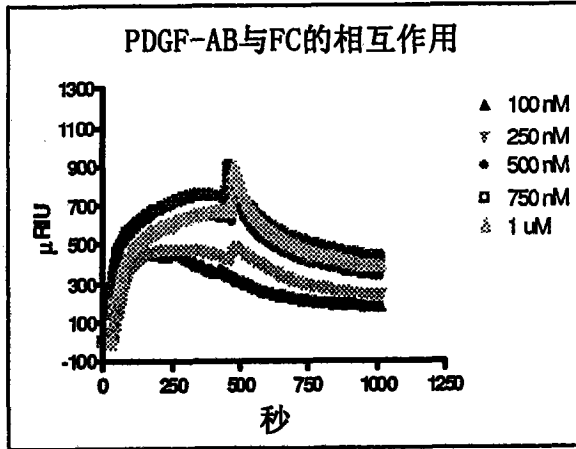
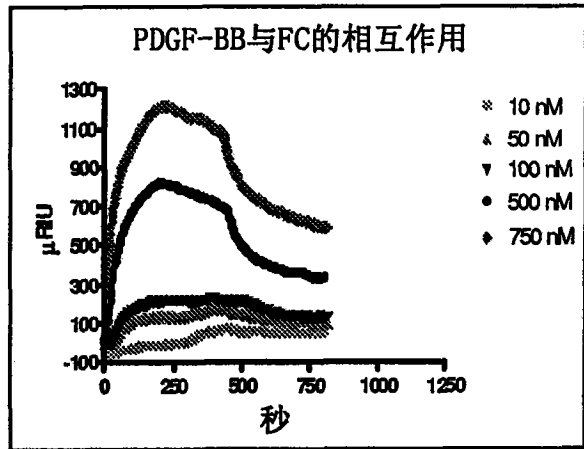


图 13

A.



B.



C.

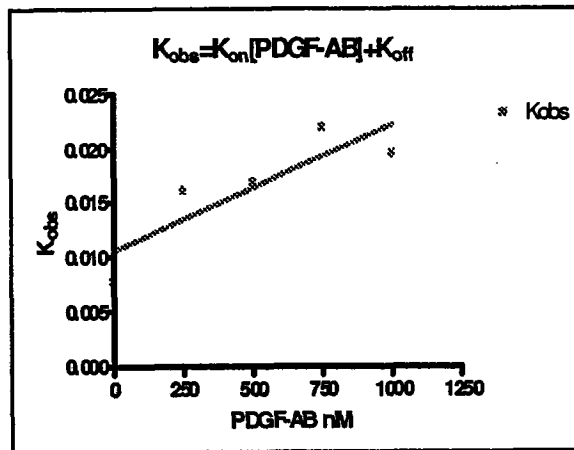


图 14