



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104684591 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201380047210. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 08. 08

A61L 27/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/681, 731 2012. 08. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 03. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/054158 2013. 08. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/026012 EN 2014. 02. 13

(71) 申请人 先进医疗技术有限责任公司

地址 美国得克萨斯

(72) 发明人 P·欧希隆

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 唐伟杰

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

从成纤维细胞生成离体软骨

(57) 摘要

本发明的实施方案包括从软骨细胞离体产生软骨,所述软骨细胞从成纤维细胞或干细胞分化。在特定的实施方案中,使成纤维细胞经历条件以产生软骨组织形式的软骨细胞,例如具有所需形状的软骨。在至少一些实施方案中,是从有需要的个体的身体区域的成像,产生用于软骨的所需形状的塑模,和在特定条件下将成纤维细胞接种在塑模中。

1. 生成离体软骨的方法,包括使成纤维细胞或干细胞经历条件的步骤,所述条件用于分化所述成纤维细胞或干细胞为离体软骨细胞以产生软骨。
2. 权利要求 1 的方法,其中软骨被配置成所需形状的形式。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述条件包括低氧,机械应力,或它们的组合。
4. 权利要求 2 的方法,其中所需的形状是至少部分的耳。
5. 权利要求 2 的方法,其中所需的形状是至少部分的鼻。
6. 权利要求 2 的方法,进一步包括产生所需形状的塑模的步骤。
7. 权利要求 1 的方法,进一步包括将软骨提供至需要修复软骨的个体的步骤。
8. 权利要求 2 的方法,其中所述所需的形状是用来取代或修复个体身体的一种或多种区域的软骨,其中所述区域需要结缔组织。
9. 权利要求 1 的方法,进一步包括成像个体身体的部分的步骤,所述个体需要软骨修复或是被怀疑需要软骨修复。
10. 权利要求 1 的方法,进一步包括成像个体身体的部分的步骤,所述个体需要软骨修复,和从所述成像产生所需形状的软骨的塑模。
11. 权利要求 1 的方法,进一步包括成像个体身体的部分的步骤,其中所述部分不需要修复和使用图像以生成塑模,所述塑模用于生长软骨以替代或修复需要修复的区域。
12. 权利要求 7 的方法,其中采用一种或多种的支持体将软骨提供给个体。
13. 权利要求 12 的方法,其中支持体是可吸收的。
14. 权利要求 12 的方法,其中支持体包括材料,所述材料在支持体的软骨形成功能完成期间和 / 或之后,由个体的身体吸收。
15. 权利要求 12 的方法,其中的支持体是不可吸收的。
16. 权利要求 15 的方法,其中支持体包括金属或一种或多种其他材料,所述材料可能留在身体中和作为支架以维持软骨的形态和功能。
17. 权利要求 7 的方法,其中软骨组织被送到鼻,耳,膝,肩,肘或身体其他部位,其中个体需要结缔组织。
18. 权利要求 7 的方法,其中软骨组织不被递送到关节。
19. 权利要求 7 的方法,其中软骨组织不被递送到椎间盘。

从成纤维细胞生成离体软骨

[0001] 本申请要求美国临时专利申请序列号 61/681731 的优先权,于 2012 年 8 月 10 日提出该申请,并通过引用将其全部内容纳入本文。

技术领域

[0002] 本发明的领域包括组织工程,医学,外科学,解剖学,生物学,细胞生物学和 / 或分子生物学领域。在某些实施方案中,本发明领域涉及用于治疗与需要软骨的身体部位相关的医学病症的方法和组合物。

[0003] 本发明的背景

[0004] 软骨是一种柔韧的结缔组织,其分布在哺乳动物中的各种位置,包括在骨之间的关节,肋骨,耳,鼻,支气管和椎间盘中;它是具有比肌肉弹性较小的刚性物质。软骨比比其他结缔组织慢的速度生长和修复,因为软骨不包含血管;相反,软骨细胞是由扩散得到供给,由通过关节软骨压缩或弹性软骨屈曲产生的泵作用得到帮助。此外,软骨结合在陷窝中和不能迁移到受损区域,所以软骨损伤是很难治愈的。本发明为软骨修复领域中的需求提供解决方案。

[0005] 本发明的简要概述

[0006] 本发明涉及用于软骨组织工程以为有需要的个体产生软骨的方法和组合物。在特定的实施方案中,本发明涉及细胞和组织,其用于治疗软骨缺陷。本发明的示范性目标是提供修复或再生软骨的方法。本发明的方法产生任何一种软骨,包括弹性软骨,透明软骨或纤维软骨,它们的主成分的相对量不同。

[0007] 本发明涉及用于治疗有需要的个体的方法和组合物,包括治疗需要软骨修复的个体。本发明涉及用于生物修复任何种类的软骨的方法和组合物。在特别的方面,本发明涉及软骨修复的领域,包括任何种类的软骨修复。更特别地,本发明的实施方案包括用于在机械应力下使细胞生长,增殖,和 / 或分化为软骨细胞样细胞,产生离体软骨的方法,然后将软骨放置在个体体内。在本发明的特定方面,本发明采用的细胞经历机械应变,低氧(例如,小于 5%),或前述两者以进行软骨形成分化。在一些实施方案中,存在将人皮肤成纤维细胞分化为离体软骨细胞样细胞的方法。

[0008] 因此,在某些方面,例如,本发明从例如成纤维细胞产生天然的离体组织。更特别的是,但不完全,例如,本发明涉及使人成纤维细胞生长和分化成软骨细胞样细胞的方法(或与软骨细胞相同的能力发挥功能的细胞)。在某些实施方案中,这些细胞可以是自体或同种异体的或它们的混合物。

[0009] 在特定的实施方案中,本发明采用分化,使某些细胞分化为软骨细胞样细胞或以与软骨细胞相同的能力发挥功能的细胞。在特定的实施方案中,人皮肤成纤维细胞(HDFs),例如,是在特定条件下分化为软骨细胞样细胞。在任何适当的方式中,可能发生细胞向软骨细胞或软骨细胞样细胞的分化,包括在如在商业上或从活的个体或细胞或组织库获得成纤维细胞之后的离体方式。例如,示例性的成纤维细胞可从皮肤获得,例如通过活组织检查。在一些实施方案中,从需要软骨的个体获得成纤维细胞。

[0010] 在本发明的一些实施方案中,成像在需要软骨修复或被怀疑需要软骨修复的个体中的软骨。在正常体内条件下软骨不吸收 X 射线,但染料可以注射到滑膜关节,将导致 X 射线由染料吸收。在放射摄影胶片上在骨和半月板之间产生的空隙是软骨。其他成像软骨的方法是通过磁共振成像 (MRI)。在本发明的实施方案中,对个体的部分拍摄图像以便于所需形状的软骨组织的生成。至少在具体的实施方案中,图像是三维的。成像可以是任何种类的,只要它是适合允许所需的软骨形状生成。在特定的实施方案中,可以使用成像技术,如 MRI 或计算机断层扫描 (CT 扫描),对在身体位置的软骨进行成像,所述位置需要被修复或需要被成像以协助修复。例如,在耳或膝是需要修复的情况下,可以对相应的健康耳或膝成像,并产生所需的耳或膝的软骨组织的图像(镜像,在耳的情况下)。

[0011] 需要软骨修复的个体可以是任何种类的个体,只要在个体中有任何种类的可检测的软骨组织缺陷。在具体的实施方案中,软骨缺陷包括软骨损失。个体需要软骨修复的原因可能是,损伤,疾病,出生缺陷,环境化学暴露,对美容整形手术的欲望,过度和/或不合格的整形手术,肥胖的影响,突发性创伤,重复创伤,由磨损或撕扯引起的变性,髋关节发育不良的结果,药物滥用,过敏反应,或它们的组合。在有损伤的情况下,例如,损伤可以是任何种类,包括战争,战斗,或运动,或长时间的不动。这种疾病可能是任何种类的,包括遗传,骨性关节炎,软骨成长不全,复发性多软骨炎,等等。例如,出生缺陷可以是任何类型,如先天性小耳畸形(包括无耳)。有需要的个体可能有折断的,受伤的鼻。

[0012] 在本发明的某些方面,这些细胞分化为软骨细胞或软骨细胞样细胞,例如,其中软骨细胞或软骨细胞样细胞分泌选自聚集蛋白聚糖, II 型胶原, Sox-9 蛋白,软骨连接蛋白,基底膜蛋白聚糖,和它们的组合的分子。在具体情况下,细胞是由成纤维细胞分化,和示范性成纤维细胞包括皮肤成纤维细胞,肌腱成纤维细胞,韧带成纤维细胞,滑膜成纤维细胞,包皮成纤维细胞,或它们的混合物。

[0013] 在特定的实施方案中,没有对成纤维细胞提供生长因子,包括生长因子如骨形态发生蛋白 2 (BMP-2), BMP-4, BMP-6, BMP-7, 软骨源性形态发生蛋白 (CDMP), 转化生长因子 β (TGF- β), 胰岛素生长因子 1 (IGF-I), 成纤维细胞生长因子 (FGFs), 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), FGF-2, 血小板源性生长因子 (PDGF), 和它们的组合。然而,在其他实施方案中,在本发明方法中采用生长因子,例如,所述生长因子被提供给成纤维细胞,软骨细胞,和/或软骨组织,包括 BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, CDMP, TGF- β , IGF-I, FGFs, bFGF, PDGF, FGF-2, 及其组合

[0014] 在本发明的一些实施方案中,存在在有需要的个体中提供软骨至体内部位相关的方法和组合物,其中软骨是采用本发明的方法产生的。在特定的实施方案中,递送部位是在体内的,并且需要软骨细胞,包括需要软骨。例如,需要软骨的部位包括耳,鼻,膝,肩,肘,和身体的任何其他区域,其中存在或需要结缔组织。在某些情况下,软骨是用于关节,而在其他情况下,软骨不用于关节。

[0015] 在一些实施方案中,从需要软骨的个体获得成纤维细胞。在特定的实施方案中,由成纤维细胞产生的所得软骨细胞是递送到在个体中的至少一个位置。例如,在某些情况下,在得到后,成纤维细胞被操纵,无论它们是否是从有需要的个体获得或它们是否是由第三方或商业上获得。成纤维细胞可以在培养物中扩增。在某些实施方案中,在移植入个体之前或期间或之后,不为成纤维细胞提供生长因子,基质分子,机械应变,或它们的组合,虽然

在替代实施方案中,在移植入个体之前或期间或之后,为成纤维细胞提供生长因子,基质分子,机械应变,或它们的组合。

[0016] 虽然软骨可被存储在合适的条件下以用于个体,成纤维细胞源自所述个体,但是,在某些情况下,软骨是保存在合适的条件下以用于个体,成纤维细胞不源自所述个体。技术人员认识到,在最终被递送软骨的个体与提供原始成纤维细胞的个体不是相同的个体的情况下,一种或多种步骤可以被采取以防止由宿主体导致的组织排斥反应。

[0017] 在一些实施方案中,在软骨中既有成纤维细胞也有软骨细胞。在一些实施方案中,离体生成软骨组织,但仍保留一种或多种的成纤维细胞。这样的组织仍然可以在体内递送。

[0018] 因此,在具体的实施方案中,可以产生在膝,肩,肘,鼻,耳,等中的软骨的高清晰度/分辨率 MRI 或 CT 扫描或其他诊断成像模态图像。在一些实施方案中, MRI 图像将被用来生成期望的软骨形状的三维塑模。在一些实施方案中,采用根据本发明的人类皮肤成纤维细胞接种塑模。因此,塑模经历促进从成纤维细胞生成软骨细胞的条件,并在具体的实施方案中,条件包括低氧,机械应力,或任何其他的大气或生物条件,所述条件可以优化成纤维细胞分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞,或它们的组合。在特定的实施方案中,可分化为软骨细胞的成纤维细胞暴露于室,所述室提供软骨细胞分化的适宜条件。在这样的环境中,可以产生来自成纤维细胞的软骨细胞的分化和产生在塑模中的软骨组织。一旦形成组织,它可以放置在体内适当的位置。在特定的实施方案中,至少一种支持体被使用以支持软骨;在具体的实施方案中,支持体是可吸收的,虽然在某些情况下,支持体是不可吸收的并且对于个体是永久性有效的。在某些情况下,钛,聚合物,或其他材料用于支持软骨。

[0019] 在本发明的某些方面,除了本发明的方法,为个体提供了另一种疗法。例如,纤维细胞的递送之前,期间,和/或后,个体可能会接受一种或多种的抗生素。示例性的术后治疗包括非甾体抗炎药 (NSAIDs),简单的止痛药(镇痛药),和/或肌肉松弛剂,例如,如需要,紧随其后的可能是手术后,如在术后第一周,第二周,第三周或更久的功能康复。在特定的实施方案中,可以为个体提供一种或多种抗生素,抗真菌剂,或抗病毒药物。

[0020] 在另一个实施方案中,存在试剂盒,其包括成纤维细胞,所述成纤维细胞被放置在一种或多种适当的容器中。在特定的实施方案中,该试剂盒还包括一种或多种试剂,其适用于增强从成纤维细胞至软骨细胞或软骨细胞样细胞的离体分化。在一些实施方案中,本发明的试剂盒包括一种或多种设备,其用于递送软骨至个体。在某些情况下,该试剂盒包括一种或多种支持体,其用于在体内递送离体产生的软骨之后稳定软骨。

[0021] 上述内容概述了相当广泛的发明特征和技术优势,使得本发明的如下的详细描述可以更好地被理解。本发明的其它特征和优势将在以下被描述,其形成本发明的权利要求主体。本技术领域技术人员理解的是,公开的概念和具体实施方案可以容易地被用作修改或设计用于实施本发明相同目的其它结构的基础。本技术领域的技术人员还应该意识到,这样的等效结构不背离本发明的精神和附加权利要求规定的范围。根据以下的说明,当结合附图考虑时,被认为是本发明特性的新的特征,在它的组织和操作方法方面,以及进一步的目标和优势将被更好地理解。然而,被明确理解的是,提供每个附图仅仅是为了例证和说明的目的,不意欲限制本发明的定义。

[0022] 本发明的详细描述

[0023] 本发明通过引用将它的美国专利申请序列号 12/775720, 2010 年 5 月 7 日提交的,

全部并入本文。本发明通过引用将它的美国专利申请序列号 61/557479, 2012 年 11 月 9 日提交的, 全部并入本文。

[0024] 如在本文所使用的, 术语“一”或“一种”可能是一种或多种的。在本文权利要求中所用时, 当与词“包含”相结合使用, 词“一”或“一种”可能是一种或多于一种。本文所用的“另一个(种)”可能意味着至少第二个或更多个。在特定的实施方案中, 例如, 本发明的诸多方面可以“基本上包含本发明一种或多种元素或步骤”或“由本发明一种或多种元素或步骤构成”。本发明的一些实施方案可以由本发明的一种或多种元素, 方法步骤, 和 / 或方法构成或基本上由本发明的一种或多种元素, 方法步骤, 和 / 或方法构成。可以构思的是, 本文描述的任何方法或组合物可以与本文描述的任何其他的方法和组合物一同应用。

[0025] 例如, 术语“软骨细胞样细胞”指的是, 不是原代软骨细胞 (primary chondrocyte) 但源自成纤维细胞的细胞。这些软骨细胞样细胞具有一定表型的软骨细胞 (软骨的细胞), 包括一定形状的软骨细胞 (例如, 多边形和 / 或菱形细胞) 和 / 或是能够凝聚和产生软骨基质成分, 例如, 如硫酸蛋白聚糖和 II 型胶原。因此, 示例性软骨细胞样细胞标记物包括一种或多种聚集蛋白聚糖, 例如, 其是硫酸软骨素, 角质素硫酸蛋白聚糖, II 型胶原, Sox-9 蛋白, 软骨连接蛋白和基底膜蛋白多糖, 其是肝素硫酸蛋白聚糖。

[0026] 虽然任何组织可能是由发明的方法至少部分修复, 包括任何软骨组织, 在特定示例性实施方案中, 不在关节中的软骨, 或在关节中的软骨被修复。发明的一般实施方案是使用 DHFs 作为细胞源以用于设计新软骨, 因为这些细胞是容易获得和成长。本发明包括这些细胞的离体分化成软骨细胞样细胞, 以产生所需形状的软骨组织。

[0027] 在特定实施方案中, 特定条件是被用于方便从成纤维细胞离体分化为软骨细胞, 其中包括, 例如以下: 1) 三维度; 2) 低氧张力; 和 3) 机械应力; 4) 断续流体静力压; 5) 流体剪切应力; 和 / 或 6) 其他外部条件, 其是有助于软骨形成分化。

[0028] 在一些实施方案中, 在软骨细胞分化和产生软骨之前和 / 或期间, 成纤维细胞可能被接种在基质中。在其中采用基质的实施方案中 (这可能被称为支架), 基质可包括材料或由材料组成, 其允许细胞附着到材料的表面和形成三维组织。这种材料可能是无毒的, 生物相容的, 生物可降解的, 可吸收的, 或其组合。在一些实施方案中, 有机聚合物, 如聚乙醇酸 (PGA), 聚乳酸-共-乙醇酸 (PLGA), 聚- ϵ -己内酯 (PCL), 聚氨基酸, 聚酸酐, 聚原酸酯; 天然水凝胶, 如胶原, 透明质酸, 海藻酸盐或酯, 琼脂糖, 壳聚糖; 合成的水凝胶, 如聚(氧化乙烯) (PEO), 聚(乙烯基醇) (PVA), 聚(丙烯酸) (PAA), 聚(延胡索酸丙烯酸酯-共-乙二醇) [P(PF-共-EG) 和其共聚物可被使用。在某些情况下, 海藻酸盐或酯的珠子可能被使用作为支架。在一些实施方案中, 例如, 在需要临时或永久结构的支持体的某些情况下, 陶瓷材料, 如羟基磷灰石, 和 / 或磷酸三钙 (TCP) 可以被使用作为支架。在某些情况下, 胶原材料可能被使用作为支架。

[0029] 细胞可能被放入由一种或多种的生物聚合物制成的基质中, 以模仿天然基质。可离体或体内接种这种支架, 并在某些方面为细胞, 基质, 或两者提供了生长因子。这种支架可放在室内, 所述室可是用于灌注介质的系统, 并且允许应用机械力至支架和 / 或特定的低氧条件。在递送力之后, 辅助细胞分化, 特别是为了产生软骨。在一些实施方案中, 在塑模内基质与细胞被采用 (类似于用于水泥的钢筋) 和 / 或在塑模插入之前基质与成纤维细胞可以被利用。

[0030] 在本发明的某些方面中,在具有特定条件的室内,生成软骨细胞,和产生软骨。所述室可以调节一种或多种以下参数:例如,温度,介质 pH,气体交换,机械刺激, pO_2 , PCO_2 ,湿度,和营养物质扩散。在特定的实施方案中,灌注系统可在室中,以提供不变的营养物质供应和有效的去除废产物。例如,可能提供了一种或多种机械应力的组合,如以间歇性的基础,包括细胞和组织变形,压缩和剪切力,流体流动,和在流体静力压的变化。在某些方面,这些条件可以在室内产生。

[0031] I. 本发明利用的细胞

[0032] 在本发明的某些实施方案中,可以使用任何细胞,只要细胞能够分化为软骨细胞或软骨细胞样细胞。然而,在具体实施方式中,例如,细胞是成纤维细胞,如皮肤成纤维细胞,肌腱成纤维细胞,韧带成纤维细胞或滑膜成纤维细胞。自体细胞可以被利用,虽然在替代实施方案中,同种异体细胞被利用;在具体实施方式中,同种异体细胞已针对疾病被检测,被认为适合人类传播。在本发明的某些方面,细胞或多种细胞是自体的,虽然在替代实施方案中,细胞是同种异体的。在细胞不是自体的情况下,在本发明中使用之前,细胞可以通过本技术领域标准方法处理以消除潜在的有害物质,病原体,等。

[0033] 用于利用自体 HDFs 作为细胞源的手段的理论如下:1) 例如 HDFs 可以是非侵入性地从打孔活组织检查获得,小至 3.0mm 直径的圆形皮肤标本;2) 来自另一个供体污染的风险(如乙型肝炎病毒,人类免疫缺陷病毒,克雅氏病,等)是不存在的。;3) 在特定培养条件下 HDFs 可以在培养物中容易地扩增,并且分化成软骨细胞样细胞。例如,其他的成纤维细胞群体可以被使用,如肌腱或韧带成纤维细胞。在一个实施方案中,自体成纤维细胞是优选的。本发明的某些方面可以使用商业购买的 HDFs,如从实验室(如级联的生物制剂(Cascade Biologics))商业购买的 HDFs。细胞可以是成人 HDFs 或新生儿 HDFs。例如,新生儿包皮成纤维细胞是一种非常方便的细胞来源。这些细胞在商业上被使用,都是容易获得的,并且容易生长。

[0034] 根据本发明,从个体的皮肤组织打孔活组织检查(6毫米)收获自体的 HDFs。在实验室,采用剪刀分割开皮下的脂肪和深真皮。剩余组织可以被切碎,和在 0.25%胰蛋白酶中在 4°C 孵育过夜。然后,真皮的和表皮的片段可以是分离的,例如机械地分离。所述活组织检查的所述真皮的片段可以被切碎,并且所得碎片可以被使用以启动外植体培养。从外植体收获的成纤维细胞可以是在 37°C 在 8%的二氧化碳中生长在含有 10%小牛血清的达尔伯克 MEM(Dulbecco's MEM) (DMEM) 中。在特定方面,这些细胞可被扩增,之后分化为软骨细胞。

[0035] 在特定方面,软骨细胞样分化可应用机械应变力促进人皮肤的成纤维细胞的。在所述发明的特定实施方案,在从成纤维细胞分化之后,所得体内细胞包括一定的生化标志物的表达,其指示 I 型和 II 型胶原蛋白和蛋白聚糖。

[0036] 在特别方面,人类皮肤成纤维细胞的软骨细胞样分化可能发生在体内,其中所述椎间盘的微环境有助于的软骨细胞分化。在特定实施方案中,在所述盘中流体静力学的负载,缺氧,细胞与细胞和残留的软骨细胞的相互作用和在椎间盘中的其他生化环境可以促进从成纤维细胞分化为软骨细胞。在发明特定的实施方案,在细胞移植之后,所述椎间盘细胞中的细胞将是纤维细胞和软骨细胞的组合,其产生纤维的和软骨的组织,伴有 I 型和 II 型胶原和 / 或诸多蛋白聚糖的生化标志物,它们被发现在软骨的和纤维的组织中。

[0037] II. 所述发明的示例性方法的实施方案,包括修复损伤的软骨的方法

[0038] 在所述发明的实施方案,存在分化细胞的方法,包括成纤维细胞(例如,人)分化为离体软骨细胞样细胞。方法可以包括为个体递送成纤维细胞入塑模以产生期望的软骨形状的步骤。成纤维细胞可以被暴露于缺氧条件和/或机械应变,之后离体产生软骨和体内递送。

[0039] 机械应力/应变是软骨形成的重要因素。本方法使用机械应变。在一些实施方案中,该方法是在其他类型的压力存在下,包括间歇流体静力压,剪切流体应力,等等。在一些实施方案中,该方法是在存在或不存在的低的氧张力,生长因子,在基质中培养,等等的情况下发生。

[0040] 成纤维细胞可从供体来源(同种异体)或自体皮肤活组织检查获得。可以被使用的是,从皮肤分离细胞和在培养物中扩增它们,和在某些情况下,细胞不受操纵或最低限度操作(例如,暴露于血清,抗生素,等)。

[0041] 在本发明的具体方面,细胞被诱导以分化成软骨细胞或软骨细胞样细胞。这种分化发生在体内的递送之前。在本发明的具体实施方案中,机械应力,低氧,或其他条件刺激HDFs的软骨形成分化。

[0042] 在本发明的一些方法中,在获得成纤维细胞之后,可以扩增一定量的细胞,虽然在其他实施方案中,在没有任何先前扩增的情况下,成纤维细胞被用于软骨生成。技术人员认识到,在培养物中的细胞需要营养,和可以将介质,如FBS(胎牛血清)提供给细胞。在某些情况下,可以防止污染或感染(例如,通过添加抗生素)。在产生软骨细胞之前,例如,可以用DMEM培养基洗涤细胞以去除FBS和抗生素,并且细胞可用于产生软骨。例如,悬浮液可能含有少量的介质,其包括缓冲液,氨基酸,盐,葡萄糖和/或维生素。成纤维细胞的体外生长可以包括至少一天或多天的生长,之后离体使用以用于软骨生成。在某些情况下,细胞可以被检测或监测,以确保至少有一些细胞分裂。不分裂的细胞可能会被移除。

[0043] 在本发明的实施方案中,例如从接受治疗的个体中获得成纤维细胞,从另一个个体(例如,包括尸体或活供体)得到成纤维细胞,或从商业上得到成纤维细胞。可以进行皮肤活组织检查,在一些实施方案中可以操纵皮肤活组织检查。例如,可以消化皮肤组织过夜以获得成纤维细胞,培养细胞以扩增,并将它们提供至系统以产生软骨。在递送至个体之前,细胞可传代一次或更多次,这取决于所需的细胞数,例如,包括1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,或更多次。传代可以在一天或多天的过程中出现,例如,所述过程包括2,3,4,5,6,7,8,9,或10天,或1,2,3,4,或更多周。在一些实施方案中,例如,细胞传代5-7天。

[0044] III. 支持实施方案

[0045] 在某些情况下,与软骨的一种或多种支持体结合的通过本发明的方法产生的软骨在体内提供至个体。支持体是可生物降解或不可生物降解的和/或可吸收或不可吸收的,这取决于需要。在支持体是可吸收的情况下,支持体材料可以是本技术领域中的任何材料,包括生物聚合物。可吸收聚合物的例子是,丙交酯基聚合物,其包括合成聚酯,如聚丙交酯及乙交酯与 ϵ -己内酯的共聚物。在支持体是非吸收性的情况下,支持体材料可以是本技术领域中的任何类型,包括金属或聚合物。非吸收性聚合物包括聚缩醛树脂和/或聚醚醚酮。缓慢可吸收材料,如陶瓷和胶原,可用于支持体。

[0046] 可通过可植入储蓄器或容器在体内产生软骨,所述储蓄器或容器用于软骨形成的

细胞形成的目的,软骨形成后可以去除储蓄器,或容器可以由可吸收材料制成,在软骨形成期间或之后,所述材料将被身体吸收。

[0047] 支持体可以是任何形状,在某些情况下,包括符合软骨形状的形状。支持体的形状可以是基本上与支持体相同的形状。在某些情况下,支持体不符合软骨的形状,但仍然具有支持功能。一些支持体的形状包括线形,圆形,管状,矩形,球状的,螺旋状,圆锥形,带螺纹的,杯,盒,等等。

实施例

[0048] 下面的实施例被包括以说明本发明的优选实施方案。本技术领域技术人员应该理解的是,实施例中公开的技术,其遵循发明人发现的代表性技术以在实现本发明中良好地发挥功能,因此可以被认为构成其实现的优选模式。然而,本技术领域的技术人员,根据本发明的公开内容,应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,在公开的具体实施方案中,可以进行许多变化,并且仍然获得相同或类似的结果。

[0049] 实施例 1

[0050] 从成纤维细胞离体产生软骨

[0051] 对需要软骨或被怀疑需要软骨的个体进行本发明方法。对需要软骨的个体,如丧失软骨或有有缺陷的软骨的个体,例如,进行本发明方法。在特定的实施方案中,个体被诊断为需要软骨。在一些实施方案中,个体不需要椎间盘修复。

[0052] 从个体获得成纤维细胞或干细胞,如从皮肤,例如,虽然在具体实施方案中,从另一个个体或商业上获得成纤维细胞或干细胞。成纤维细胞在被获得后可被培养。成纤维细胞经历促进软骨细胞分化的条件,如低氧,机械应力,或它们的组合。

[0053] 在某些情况下,通过适当的方法,例如,如 MRI 或 CT 扫描,对有缺陷的软骨或有缺陷的软骨的代表(例如,在如膝,肩,或耳中的有缺陷的软骨的镜像)进行成像。然后,图像被用来产生有缺陷的软骨所需的形状的塑模。成纤维细胞被提供至塑模,并且因为在塑模/成纤维细胞经历适当的条件,成纤维细胞在塑模中分化成软骨细胞,以产生软骨组织。然而在具体实施方案中,单独的成纤维细胞经历适当的条件以产生软骨细胞,之后在塑模中进行接种,在某些情况下,在塑模中进行接种之前或之后,成纤维细胞经历适当的条件以产生软骨细胞。塑模本身能够产生必要的条件,或塑模可以插入到另一个容器中,所述容器产生那些条件。

[0054] 得到的软骨被提供给有需要的个体,其中,从所述个体获得成纤维细胞,即提供被软骨的个体与获得成纤维细胞的个体是同个体,和/或得到的软骨被提供给需要软骨修复的另一个个体。在特定的实施方案中,在递送之前,软骨组织与一种或多种支持体相结合,以方便将软骨安全放置在所需的位置,虽然在某些情况下,支持体是不需要的。支持体可是可吸收的或不是可吸收的,这取决于所需的位置,软骨的厚度,等等。

[0055] 尽管本发明及其优势进行了详细的描述,应该了解的是,可以在不背离所附权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下,进行各种变化,替换和改变。此外,本申请的范围不意欲被限于说明书中描述的工艺,机器,制造,物质的组合物,手段,方法和步骤的特定的实施方案。因为本技术领域普通技术人员将很容易理解发明的公开内容,根据本本发明可以利用的是,工艺,机器,制造,物质的组合物,手段,方法,或步骤,所述工艺,机器,制造,

物质的组合物,手段,方法,或步骤是目前存在的或以后被开发的,实现与本文描述的相应实施方案基本相同的功能或实现与本文描述的相应实施方案基本上相同的结果。因此,附加权利要求意欲在其范围内包括这样的工艺,机器,制造,物质的组合物,手段,方法或步骤。