



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112220802 A

(43) 申请公布日 2021.01.15

(21) 申请号 202010985318.5

(22) 申请日 2011.03.11

(30) 优先权数据

10040723 2010.03.11 GB

(62) 分案原申请数据

201180021595.3 2011.03.11

(71) 申请人 安托万·图瑞兹

地址 瑞士莫伦斯

(72) 发明人 安托万·图瑞兹

(74) 专利代理机构 北京方可律师事务所 11828

代理人 郝东晖 吴艳

(51) Int.Cl.

A61K 35/16 (2015.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61K 8/98 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

A61M 1/02 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

A61M 5/19 (2006.01)

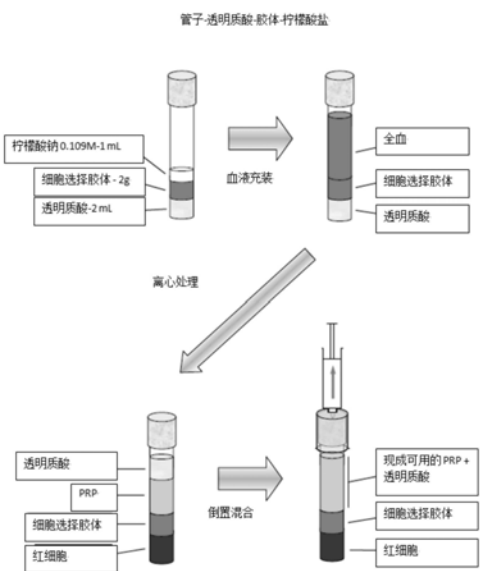
权利要求书3页 说明书46页 附图16页

(54) 发明名称

伤口修复剂组合物的制备工艺、管子及装置

(57) 摘要

本发明涉及组织再生领域。特别是涉及凝血酶、血小板浓缩液和伤口修复剂单独或合并细胞抽提物、细胞组合物的新工艺、管子和装置及其使用。



1. 一种管子, 用于制备富血小板血浆 (PRP) 与透明质酸组合物, 其适用于进行离心, 包括透明质酸和抗凝剂。

2. 根据权利要求1所述的管子, 其中, 所述管子仅预先填充所述透明质酸和所述抗凝剂。

3. 根据权利要求1所述的管子, 其中, 所述管子还包括细胞选择胶体。

4. 根据权利要求3所述的管子, 其中, 所述抗凝剂和所述细胞选择胶体选择为使得透明质酸在所述管子的底部, 所述细胞选择胶体在所述透明质酸的上方, 所述抗凝剂在最上方。

5. 根据权利要求4所述的管子, 其中, 所述抗凝剂为柠檬酸钠, 并且所述细胞选择胶体为触变胶体。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的管子, 其中, 所述管子为无菌的, 且具有可用的真空。

7. 一种试剂盒或医疗设备, 包括根据权利要求1至5中任一项所述的管子。

8. 一种组合物的制备方法, 该方法包括以下步骤:

a) 将全血采集到一个或多个权利要求1-7中任一项所述的管子中,

b) 将所述的管子离心; 并且

d) 收集含有所述透明质酸与富血小板血浆的上清。

9. 权利要求8组合物的制备方法, 其中, 所述方法在步骤b) 之后和步骤d) 之前进一步包括步骤c): 将所述透明质酸与所述富血小板血浆再悬浮或者混合。

10. 权利要求8组合物的制备方法, 其中, 在步骤c) 中, 通过将所述管子倒置来将含有所述透明质酸与所述富血小板血浆再悬浮或者混合。

11. 权利要求8至10中任一项所述的组合物的制备方法, 其中, 所述的方法还包括以下的步骤:

e) 将在步骤c) 和/或d) 中得到的富血小板血浆与凝血活化剂或者凝血酶血清混合。

12. 权利要求11所述的组合物的制备方法, 其中, 所述方法还包括以下步骤:

f) 提供至少一种细胞抽提物。

13. 权利要求12的组合物的制备方法, 其中, 所述方法还包括以下步骤:

g) 将步骤c) 和d) 中得到的含有透明质酸的血小板浓缩液混合物与f) 中得到的细胞抽提物混合。

14. 权利要求12的组合物的制备方法, 其中, 所述的细胞抽提物选自角质形成细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞 (fat cell)、肌肉细胞、脐带细胞、间叶干细胞 (MSC)、前成脂肪细胞、脂肪细胞 (adipocyte)、干细胞、骨膜细胞、牙龈细胞、内皮前体细胞、雪旺氏细胞、韧带细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物。

15. 权利要求14的组合物的制备方法, 其中, 所述肌肉细胞为成肌细胞或卫星细胞。

16. 根据权利要求8至10中任一项所述的组合物的制备方法, 其中所述的离心步骤进行到直到红细胞迁移到细胞选择胶体的下方, 和/或直到透明质酸迁移到所述富血小板血浆的上方。

17. 根据权利要求8至10中任一项所述的组合物的制备方法, 其中所述的离心步骤在1000g到最高2000g之间的力下, 进行选自3分钟到最高7分钟的时间。

18. 根据权利要求17的组合物的制备方法,其中所述的离心步骤在1500g下,进行选自3分钟到最高7分钟的时间。

19. 根据权利要求17的组合物的制备方法,其中所述的离心步骤在1500g的力下进行5分钟。

20. 根据权利要求11所述的组合物的制备方法,其中:

所述的凝血酶血清是自体的。

21. 根据权利要求8至10中任一项所述的组合物的制备方法,其中:

所述的全血和/或富血小板血浆是自体的。

22. 根据权利要求8至10中任一项所述的组合物的制备方法,其中:

所述的细胞抽提物是自体的。

23. 根据权利要求8至10中任一项所述的组合物的制备方法,其中在步骤b)中,所述的抗凝剂是0.10M或者0.109M的柠檬酸钠缓冲液,或者3.5mg/mL的无水柠檬酸钠。

24. 一种根据权利要求8至23中任一项所述的方法得到的组合物,所述组合物包括伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物、粘胶、生物胶、机械支撑或者填充材料。

25. 根据权利要求24的组合物,其进一步包括:

凝血活化剂或者凝血酶血清;和/或

至少一种细胞抽提物、细胞组合物、TCP、骨骼替代品、壳聚糖、另外的透明质酸、乳膏、乳膏膜、脂肪细胞、脂肪组织、骨髓浓缩液、润滑素、CD明胶、肉毒杆菌毒素、葡萄糖酸钙和/或干细胞。

26. 根据权利要求25的组合物,其中所述的细胞抽提物选自角质形成细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞(fat cell)、肌肉细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、脂肪细胞(adipocyte)、干细胞、骨膜细胞、牙龈细胞、内皮前体细胞、雪旺氏细胞、韧带细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物。

27. 根据权利要求26的组合物,其中所述的肌肉细胞为成肌细胞或卫星细胞。

28. 根据权利要求24的组合物,其中所述的组合物包括:

血浆;

浓度为至少 $300 \times 10^9$ 个细胞/L的血小板;

浓度为至少 $7 \times 10^9$ 个细胞/L的白细胞;

浓度为至少3mg/L的纤维蛋白原;和

透明质酸。

29. 根据权利要求28的组合物,其中所述组合物还包括:

凝血活化剂或者凝血酶血清;和/或

至少一种细胞抽提物、细胞组合物、TCP、骨骼替代品、壳聚糖、另外的透明质酸、乳膏、乳膏膜、脂肪细胞、脂肪组织、骨髓浓缩液、润滑素、CD明胶、肉毒杆菌毒素、葡萄糖酸钙和/或干细胞。

30. 根据权利要求28的组合物,其中所述的细胞抽提物选自角质形成细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞(fat cell)、肌肉细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、脂肪细胞

(adipocyte)、干细胞、骨膜细胞、牙龈细胞、内皮前体细胞、雪旺氏细胞、韧带细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物。

31. 根据权利要求30的组合物,其中所述的肌肉细胞为成肌细胞或卫星细胞。

32. 根据权利要求24到31中任一项所述的组合物,其中所述的凝血酶血清、富血小板血浆、细胞组合物、干细胞、脂肪细胞、脂肪组织、骨髓浓缩液和/或细胞抽提物是自体的。

33. 根据权利要求24到32中任一项所述的组合物作为化妆品、基质、细胞培养基、或者输送介质的用途。

34. 根据权利要求24到32中任一项所述的组合物在制备用于移植细胞的介质中的用途。

35. 根据权利要求24到32中任一项所述的组合物在制备用于治疗、伤口护理、牙医、矫形术、运动医学、外科手术、美容、中胚层疗法和/或眼科的材料中的用途。

36. 根据权利要求1-6中任一项所述的管子在制备用于治疗、伤口护理、牙医、矫形术、运动医学、外科手术、美容、中胚层疗法和/或眼科的试剂盒或者医疗设备中的用途。

37. 一种血袋系统,包括:

- a) 单入口导管;
- b) 一个带有多个接头导管的多导管接头;以及
- c) 至少两个袋子或两支管子,

其中所述单入口导管与所述多导管接头连接,其中所述多导管接头的每个所述接头导管都与单个袋子或管子连接。

## 伤口修复剂组合物的制备工艺、管子及装置

[0001] 本申请是申请日为2011年3月11日,申请号为201610412669.0,发明名称为“伤口修复剂组合物的制备工艺、管子及装置”的中国专利申请的分案申请;申请号为201610412669.0,发明名称为“伤口修复剂组合物的制备工艺、管子及装置”的中国专利申请为申请日为2011年3月11日,申请号为2011800215953的中国专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及组织再生领域。特别是涉及凝血酶、血小板浓缩液和伤口修复剂制剂、组合物的新工艺、管子和装置及其使用。

### 背景技术

[0003] 在各种文献中已经广泛论述过伤口愈合过程中生物自体材料的重要性。最重要的是,研究发现在血凝块形成过程中直接牵涉到两种生物自体材料,其提供一道止血屏障,确保止血效果及封闭伤口:(1)纤维蛋白,其通过血浆纤维蛋白原在凝血酶作用下分离成两部分而产生,以及(2)活化血小板膜。通常伤口愈合过程先后表现为凝血阶段、发炎过程和再生过程。凝血阶段(血液凝结或血凝块的形成)是一个非常复杂的过程,在这一过程中,受损的血管壁被纤维蛋白凝块覆盖,以阻止出血,并且由血小板 $\alpha$ 颗粒大量释放细胞活素和生长因子而发起受损血管的修复。血凝块的形成(在生理条件下由纤维蛋白、血小板和红细胞以及其他血成分而形成)是组织创伤及其在伤口愈合过程中以及骨折愈合中的作用所导致的一种自然现象,这已经众所周知。

[0004] 血液凝固是许多蛋白凝血因子一连串复杂相互作用的结果。一般而言,血管内皮损伤会导致内皮下结构裸露,由此吸引血小板,诱导血小板可逆聚集。在凝血通路活化过程中形成的蛋白凝血酶产生不可溶的交叉连接的纤维蛋白原纤维,并引起血小板不可逆聚集。由此产生的血小板纤维蛋白凝块是防止血管系统失血的有效屏障,同时也是后续血管内壁修复的支架。

[0005] 紧随血凝块形成过程的发炎过程是由白细胞和血小板释放的大量血管活性介质和趋化因子(以蛋白质形式出现的特殊信号)刺激而产生的一个过程。这些信号吸引巨噬细胞,这些巨噬细胞在新细胞迁移之前,“清除”伤口的细菌、外来粒子以及红细胞。组织再生阶段涉及由血凝块形成的支架(或生长基质)中未分化细胞的趋化和有丝分裂。在血小板生长因子刺激下繁殖的新细胞将取代被巨噬细胞损伤或摧毁的细胞。生长因子和大量的血浆蛋白质,也称为信号分子,能促进血凝块中的细胞迁移和分裂,在伤口愈合过程中发挥着关键作用。

[0006] 生物粘合剂和纤维蛋白胶代表较新的技术进步,其作用是复制最后凝血阶段的生物过程。一些临床试验报告记录了纤维蛋白胶在各种外科领域的效用,如心血管、胸、移植、头颈部、口腔、胃肠、矫正外科、神经外科及整形手术。在外科手术时,含有纤维蛋白胶的两种主要成分纤维蛋白原和凝血酶混合在一起形成血液凝块。血液凝块可在数秒钟内粘附在必要的组织、骨头、或神经上,但是在之后大约十天左右通过纤维蛋白溶解作用被身体重新

缓慢吸收。纤维蛋白胶的重要特征在于它能够：(1) 在血管吻合处，特别是在很难进行伤口缝合的部位或者缝合固定意味着额外风险的部位，实现止血；(2) 控制仅通过缝合无法控制的针眼或动脉裂缝流血；(3) 实现肝素化患者或凝血病患者的止血。参阅Borst, H.G. 等人在《胸心血管外科杂志》上发表的论文, 84:548-553 (1982)；Walterbusch, G.J 等人在《胸心血管外科杂志》上发表的论文, 30:234-235 (1982)；以及Wolner, F.J 等人在《胸心血管外科杂志》上发表的论文, 30:236-237 (1982)。

[0007] 理论上可以通过丢弃红细胞和提高生长因子的浓度来增强这些早期阶段在伤口愈合过程中的效果。

[0008] 血凝放大作用可以定义为“富化血凝块” (EC) 的形成。富化血凝块通过使用血小板浓缩液获得，在《血小板和巨核细胞》2004年第1、2卷中被描述为“结构与信号”，新泽西州胡马纳出版社Ed. Gibbins和Mahaut-Smith。富血小板血浆 (PRP) 可定义为少量血浆中的自体血小板浓缩液；它已经被开发成一种自体生物材料，而且已经被证明在组织愈合和再生方面非常有用 (Marx等人, 2004年,《国际口腔颌面外科杂志》，62, 489-496)。PRP不仅含有血小板浓缩液，同时还含有生长因子 (如由血小板衍生的生长因子PDGF、血管内皮生长因子VEGF、转化生长因子TGF和表皮生长因子EGF等)，这些生长因子由血小板积极分泌，并且已知在伤口愈合初始阶段发挥着极其重要的作用。

[0009] 例如，我们知道PDGF会发起结缔组织愈合，包括骨头再生和修复。PDGF还能够促进有丝分裂 (愈合细胞)、血管生成 (内皮有丝分裂成机能毛细血管) 以及巨噬细胞活化。同样已知的是粒细胞释放的VEGF对内皮细胞具有有效的血管生成、促有丝分裂和血管通透性增强作用。TGF- $\beta$ 促进结缔组织和骨头的细胞有丝分裂和分化，作用于间质干细胞、前成骨细胞和成纤维细胞，并且抑制破骨细胞的形成。已知EGF能够诱导上皮发育并促进血管生成。血小板浓缩液通常用于牙种植和骨外科，特别是在美国。人们已经开发出各种通过离心法制备PRP的技术。然而，由于血小板细胞的敏感性和从红细胞中分离血小板的方法之效率的变化性，在各种血小板浓缩液制备方法之间存在巨大的差别。Biomet PCCS&GPS (上述Marx等人于2004年发表) 的自动化设置在大血样流程中面临流程复杂、成本高昂这一缺点。在那些系统中，还出现了患者宝贵的生物组织的重大损失。因此，亟需开发一种可靠、高产量、易于使用并且经济合算的浆细胞采集流程。

[0010] 另外，获得血小板浓缩液还需要使用相对复杂的成套工具和成本高昂的专用机械设备以及需要成本同样高昂的专业技术人员的参与。这一缺点使现有的PRP制备方法无法适应就地医疗使用的需要。

[0011] 再者，鉴于移植、术后再生或出于美容目的之细胞或组织再生，细胞的制备面临细胞与组织长期保存这一难题。虽然通常采用组织或细胞冷冻保存方法来长期养护组织或细胞，特别是血小板，但是这项技术具有严重的缺点和问题，如结晶、渗透问题、聚集、蛋白合成能力受抑制以及因热应激反应而出现的应激蛋白表达。因此，已知组织或细胞低温保存会改变细胞活力和稳定性 (Agence française de sécurité sanitaire, 2003; Arnaud等人, 1999年,《低温生物学》，38, 192-199, Tablin等人, 2001年,《低温生物学》，43 (2), 114-23)。低温保存的某些副作用可能可以通过采用防冻剂进行限制，例如，二甲基亚砷 (DMSO)、甘油或其他冷冻保护剂 (US 5,589,617, Oh等人, Cornea, 26, 840-846)，但是这些化学剂的浓度必须进行改良以限制其毒性和副作用。

[0012] 因此,需要一种全新的或备选的细胞和组织制备方法,使细胞和组织可以就地使用,同时保存其完整性,特别是生长因子分泌能力和活力。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及组织再生领域。特别是涉及凝血酶、血小板浓缩液和伤口修复剂制剂、组合物的新工艺、管子和装置及其使用。本发明还涉及新型细胞制剂、新型富血小板 (PRP) 制剂、新型细胞制剂或PRP制剂的制备方法、此类细胞或PRP制剂的使用、以及可选地混入细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞 (MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。

[0015] 一方面,本发明提供一种完全自体的就地伤口修复剂或组织修复剂组合物的制备方法。该自体伤口修复剂或组织修复剂组合物的所有血成分均来自于即将应用该自体伤口修复剂或组织修复剂的单个患者(同一个患者)。

[0016] 一方面,本发明提供一种凝血酶血清的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0017] a) 用一支含有触变胶体的管子采集全血;

[0018] b) 离心处理该管子直到凝血酶血清释放;以及

[0019] c) 采集凝血酶血清。

[0020] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0021] a) 优选地,用一支含有透明质酸、触变胶体和/或优选含有抗凝血剂的柠檬酸钠的管子采集全血;

[0022] b) 优选地,离心处理该管子,直到红细胞迁移到触变胶体之下以及优选地,直到透明质酸迁移到富血小板血浆之上;

[0023] c) 可选地,将透明质酸和富血小板血浆混合,优选地采用倒置管子的方法进行混合;

[0024] d) 采集含有透明质酸和富血小板血浆的上清液。

[0025] 另一方面,本发明提供一种采集和分离流体样本的管子,包括:

[0026] i) 尺寸与直径不同的两个不同部分;

[0027] ii) 将这两部分隔离的滤网;以及

[0028] iii) 可选的触变胶体和抗凝血剂。

[0029] 在本发明的一个较佳实施例中,该管子由如图1~14所示的特征组成。

[0030] 另一方面,本发明涉及一种血袋系统或采血管装置,包含用于血成分采集、储存、使用和运送的多个袋子或管子。

[0031] 在一个优选方面,本发明提供一种图15所示的血袋系统或采血管装置。

[0032] 另一方面,本发明提供一种血袋系统或采血管装置,包含一支与多导管接头连接的单入口导管,接头导管与至少两个袋子或管子连接,其中多导管接头的每个接头导管都与单个袋子或管子连接。

[0033] 优选地,采血管要抽真空、密封并充满透明质酸和抗凝血剂。

## 发明内容

[0034] 本发明涉及组织再生领域。特别是涉及凝血酶、血小板浓缩液和伤口修复剂制剂、组合物的新工艺、管子和装置及其使用。本发明还涉及新型细胞制剂、新型富血小板 (PRP) 制剂、新型细胞制剂或 PRP 制剂的制备方法、此类细胞或 PRP 制剂的使用、以及可选地混入细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞 (MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。

[0035] 一方面,本发明提供一种完全自体的就地伤口修复剂或组织修复剂组合物的制备方法。该自体伤口修复剂或组织修复剂组合物的所有血成分均来自于即将应用该自体伤口修复剂或组织修复剂的单个患者(同一个患者)。

[0036] 一方面,本发明提供一种凝血酶血清的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0037] a) 用一支含有触变胶体的管子采集全血;

[0038] b) 离心处理该管子直到凝血酶血清释放;以及

[0039] c) 采集凝血酶血清。

[0040] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0041] a) 优选地,用一支含有透明质酸、触变胶体和/或优选含有抗凝血剂的柠檬酸钠的管子采集全血;

[0042] b) 优选地,离心处理该管子,直到红细胞迁移到触变胶体之下以及优选地,直到透明质酸迁移到富血小板血浆之上;

[0043] c) 可选地,将透明质酸和富血小板血浆混合,优选地采用倒置管子的方法进行混合;

[0044] d) 采集含有透明质酸和富血小板血浆的上清液。

[0045] 另一方面,本发明提供一种采集和分离流体样本的管子,包括:

[0046] i) 尺寸与直径不同的两个不同部分;

[0047] ii) 将这两部分隔离的滤网;以及

[0048] iii) 可选的触变胶体和抗凝血剂。

[0049] 在本发明的一个较佳实施例中,该管子由如图1~14所示的特征组成。

[0050] 另一方面,本发明涉及一种血袋系统或采血管装置,包含用于血成分采集、储存、使用和运送的多个袋子或管子。

[0051] 在一个优选方面,本发明提供一种图15所示的血袋系统或采血管装置。

[0052] 另一方面,本发明提供一种血袋系统或采血管装置,包含一支与多导管接头连接的单入口导管,接头导管与至少两个袋子或管子连接,其中多导管接头的每个接头导管都与单个袋子或管子连接。

[0053] 优选地,采血管要抽真空、密封并充满透明质酸和抗凝血剂。

## 附图说明

[0054] 附图并入本文中,构成本专利说明书的一个组成部分,显示本发明的较佳实施例,并与说明书一起描述本发明的原则。

- [0055] 图1A和图1B为本发明管子的示意图。
- [0056] 图2和图3为本发明管子内部的示意图。
- [0057] 图4为本发明管子滤网内部的示意图。该滤网由配有漏斗的内层和配有梯形结构的外层组成。
- [0058] 图5a为本发明管子内部的示意图。
- [0059] 图5b为盖子和管子连接处示意图。
- [0060] 图6为盖子示意图。
- [0061] 图7A和图7B为本发明管子滤网的两个不同视图。
- [0062] 图8为本发明管子滤网的仰视图。同时图8也是本发明外层或底层四个各有3个开孔部域的对称系列的示意图。
- [0063] 图9为本发明管子滤网的俯视图。图9也是本发明外层或底层四个各有2个开孔部域的对称系列的示意图。
- [0064] 图10和图11为本发明管子滤网的详细视图。
- [0065] 图12是本发明管子滤网内部中心部分的详细视图。
- [0066] 图13是本发明管子滤网内部的详细示意图。滤网由配有漏斗的内层和配有梯形结构的外层组成。每个漏斗和梯形以交替的方式与滤网集成为一体(第一个梯形后面为第一个漏斗,然后为第二个梯形,后面跟着第二个漏斗,最后为第三个梯形)。
- [0067] 图14是本发明管子中含有漏斗和梯形的滤网的详细示意图。
- [0068] 图15为本发明血袋系统或采血管装置的视图。
- [0069] 图16为含有PRP和透明质酸的伤口或组织愈合组合物制备方法的示意图。

## 具体实施方式

[0070] 下列段落提供本发明相关术语的定义,并在整个专利说明书和权利要求书中统一使用,除非有其他明确的定义给出更为广泛的定义。

[0071] “触变”表示一种在搅动或压力作用下会变成更具流体性质的胶体,例如,在搅动或压力作用下其粘性会降低的胶体。粘性这一术语是指决定胶凝程度的指定材料的那些特性,如材料的牢固性或硬度、材料抵制像流体一样流动的程度。本发明所用触变胶体含有不溶于水并对可用于本发明的血液组分具有化学惰性的聚酯胶体或混合物。血细胞分离所用的典型触变胶体用于诊断和蛋白质组学。触变胶体在本文中也称为“细胞选择胶体”。在本发明中也可使用其他胶体。

[0072] “就地医疗”是指在床边为患者提供的所有服务。

[0073] “放血附件”或“静脉穿刺附件”是指用针穿刺静脉进行抽血的附件。

[0074] “伤口修复剂”、“伤口密封剂”、“组织修复剂”、“组织密封剂”、“伤口愈合组合物”或“组织愈合组合物”的另外表达用语为“生物粘合剂”或“纤维蛋白胶”。

[0075] “伤口修复剂”、“伤口密封剂”、“组织修复剂”、“组织密封剂”、“伤口愈合组合物”、“组织愈合组合物”、“生物粘合剂”或“纤维蛋白胶”是指一种能够促进和/或提高伤口愈合速度和/或质量的药剂或组合物。伤口修复剂或密封剂能够促进组织再生。“伤口”是指任何受损的组织,例如,下列创伤或手术。例如,哺乳动物的伤口包括褥疮性溃疡、撕裂伤、烧伤、移植部位(移植供体和受体部位)、瘘管、牙周组织损伤、糖尿病引起的无法愈合伤口、以及

创伤或任何外科手术导致的伤口。一般来说,该术语还包括皮肤损伤,皮肤表面有某些凹陷,不一定为表面上有切口,如年龄相关的组织损伤(如,皱纹)和疤痕如痤疮(特别是皮肤磨削术治疗后出现的这种疤痕)或风疹疤痕。“PRP”是指富血小板血浆,优选地,是指哺乳动物或人的富血小板血浆;更加优选地,是指本发明过程中为了将红细胞制成丸状并剔除及提纯白细胞、凝血细胞和吸附蛋白中的血浆而制备的自体富血小板血浆,与原本的全血相对而言。“自体”、“自生”或“自身”用语是指一种活体内方法,其中使用单个供体的血液、组织和/或细胞,并且从该供体抽提的血液、组织和/或细胞准备供该供体本身使用。与此相反,“异体”方法是指从一个或多个第三方抽提血液、组织和/或细胞,供一个供体(“同源”或“异源”)使用。自体产品可避免与使用第三方生物材料相关的一些常见问题,例如,进行筛查以确保供体在生物学上或免疫方面与患者兼容以及避免感染肝炎、HIV、朊病毒、库贾氏病及类似疾病。“凝血活化剂”是指能够触发或激活血浆凝血和血小板聚集的一种药剂,例如,酶。凝血活化剂由凝血酶活化剂和/或纤维蛋白原活化剂和/或凝血酶和/或自体凝血酶和/或自体凝血酶血清和/或氯化钙和/或葡萄糖酸钙组成。为了改变组合物的硬度,可以将凝血合并。

[0076] “凝血酶活化剂”是指一种能够活化凝血酶并触发凝血的药剂。典型的凝血酶活化剂是一些辅助因子,如钠或钙。在本发明实践中,凝血酶活化优选地出现在钙离子中。通常把钙离子当作盐水添加到血小板浓缩液中,以提供最终浓度一般为或约为0.1mg/mL的血小板浓缩液。合适的钙盐包括但不限于碳酸钙(CaCO<sub>3</sub>)、硫酸钙(CaSO<sub>4</sub>)或氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)。在本发明中使用的优选钙盐是葡萄糖酸钙(CaGL)。葡萄糖酸钙为钙凝胶剂注射液形式,USP 10%(瑞士Regen实验室)。“纤维蛋白原活化剂”是指一种能够激活纤维蛋白原向纤维蛋白转化并触发凝块形成的药剂。典型的纤维蛋白原活化剂是凝血酶或类凝血酶。“凝血酶”这一术语可包括钙化凝血酶,特别每1mL 10%葡萄糖酸钙水溶液含大约100至10单位的凝血酶。它可能包括钙化牛凝血酶、异源凝血酶或重组人凝血酶,优选地包括异源凝血酶。纤维蛋白原活化剂可以为一种富化的凝血酶组合物,如美国专利6,472,162中所述的凝血酶组合物或本发明中的自体凝血酶血清。“治疗有效剂量”是指促进伤口愈合的必要组成元素或其组合的量,如缩小伤口体积或表面积,提高促进胶原蛋白生成、血管生长、成纤维细胞增殖或全面愈合的肉芽组织或其他生物材料的量;本文中所述的所有版本的发明都假设具有组成物质或组合的治疗有效剂量。“药学上可接受的载体”是预期的药学上可接受的额外组分,如稳定剂、抗微生物剂、缓冲剂、辅助剂、麻醉剂、皮质类固醇及类似组分。“美容上可接受的载体”是预期的美容上可接受的额外组分,如稳定剂、缓冲剂、着色剂、调味剂、辅助剂及类似组分。

[0077] “环烯烃共聚物”(COC)或“环烯烃聚合物”(COP)是指非晶态聚合物(amorphous polymer)、乙烯共聚物(Ethylene Copolymer);COC;COP;环烯烃共聚物(Cyclo Olefinecopolymer);环烯烃聚合物(Cyclic Olefin Polymer);乙烯/降冰片烯共聚物(Ethylene-norbornene Copolymer)。COP使用单一类型的单体,而COC则使用不同类型的单体。本发明包括基于不同类型的环状单体和聚合方法的环烯烃共聚物。本发明的环烯烃共聚物或多聚物可通过环状单体(如降冰片烯、1,2,3,4,4A,5,8,8A-八氢-1,4:5,8-二甲桥萘(带乙烯)、Ticona公司的戊菌唑、三井化学的APEL)链共聚合反应生产或通过各种环状单体开环易位聚合与氢化生产(如日本合成橡胶公司的ARTON、瑞翁化学公司的Zeonex和

Zeonor)。

[0078] “透明质酸”(也称为“透明质烷”或“透明质酸盐”)是指一种在结缔组织、上皮组织和神经组织中分布十分广泛的阴离子非硫酸化葡糖胺聚糖。在葡糖胺聚糖中它非常独特,因为它并不硫酸化,形成血浆膜而不是高尔基体,并且可以非常大,其分子重量通常达到百万级。透明质烷是细胞外基质的一种主要组分,对细胞增殖和迁移有重要的贡献。

[0079] “壳聚糖”是指一种由随机分布的 $\beta$ -1,4-糖苷键连接的D-葡糖胺(脱乙酰化单元)和N-乙酰-D-葡糖胺(乙酰化单元)组成的线性多聚糖。壳聚糖由对几丁质做脱乙酰处理进行商业化生产,它是甲壳纲动物(如蟹、虾等)外骨骼和蘑菇细胞壁的结构元素。脱乙酰的程度(%DD)取决于核磁共振波谱法。商业壳聚糖的%DD范围为60%~100%。平均而言,商业生产的壳聚糖的分子重量大约为3800至20000道尔顿。常用的壳聚糖合成方法是利用过量的氢氧化钠作为试剂并用水作为溶剂对几丁质进行脱乙酰处理。这一反应途径如果允许其完成(完全脱乙酰),产量可高达98%。壳聚糖的氨基的pKa值约为6.5,这会导致在酸性至中性溶液中产生质子化作用,其电荷密度取决于pH值和%DA值。这会使壳聚糖溶于水并且产生一种容易与带负电荷表面如粘膜粘合在一起的生物粘附物质。壳聚糖能增强极性药在上皮表面的输送,并且不会引起排斥,而且是生物可降解的。

[0080] 一方面,本发明提供了一种凝血酶血清的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0081] a) 优选地用一支优选含有触变胶体的管子采集全血;

[0082] b) 离心处理管子直到凝血酶血清释放;以及

[0083] c) 采集凝血酶血清。

[0084] 抽血会引起凝血反应,而且除非采取某种措施停止这一过程,否则会自然形成血凝块。

[0085] 优选地,触变胶体位于管子底部附近。在离心处理过程中,红细胞将迁移到胶体之下。同时发生纤维蛋白原聚合反应,在胶体之上形成一个血凝块。在足够的离心力作用下和/或有充足的离心时间时,血凝块会进一步沉淀,形成纤维蛋白网,该纤维蛋白网将释放出一种称为血清的上清液,其含有富化的活化凝血酶。凝血酶是一种刺激血液凝结的酶。

[0086] 优选地,只需要简单的几个步骤即可获得本发明的凝血酶血清,即,在充足的离心处理时间内对含有全血和触变胶体的管子进行离心处理。优选地,本发明制备凝血酶血清的方法提供一种可立即使用的凝血酶血清。

[0087] 在本文中凝血酶血清也被称为凝血酶富化制剂、凝血酶富化血清、富化活化凝血酶血清、富化活化凝血酶制剂、富凝血酶活化血清和富凝血酶活化制剂。

[0088] 另一方面,本发明提供一种凝血酶血清的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0089] a) 优选地用一支优选含有触变胶体的管子采集全血;

[0090] b) 离心处理管子,直到红细胞迁移到触变胶体之下,并且优选地,直到触变胶体上形成纤维蛋白网;以及

[0091] c) 采集上清液或凝血酶血清。

[0092] 在本发明一个较佳实施例中,离心处理步骤采用大约1500克的力处理大约30分钟。在另一个实施例中,离心处理步骤采用大约1000克至大约2000克的力处理大约20分钟至大于40分钟之间的一个时间,优选采用1500克的力处理大约25分钟至大约35分钟之间的一个时间,优选采用1500克的力处理大约30分钟。

[0093] 优选地,离心处理步骤进行足够长的时间,直到凝血酶血清释放。

[0094] 优选地,本发明所采用的方法能够保护液体血清,凝血酶仍然可溶。

[0095] 标准的方法主要是粉碎凝块,直到凝血酶血清释放。优选地,在按照本发明制备凝血酶血清时并不需要该步骤。在本发明中,这一备选凝血酶血清还可作为一种凝血酶富化制剂。

[0096] 有优势的是,不使用任何凝结剂,而是自发性发生凝结作用。这有两个优势,即降低成本和简化流程。因为管子中没有柠檬酸盐,有优势的是不需要使用凝结剂(也称为再生剂)来引发凝结。有优势的是,不需要采用乙醇溶液和/或氯化钙。

[0097] 有优势的是,本文中介绍的凝血酶血清制备工艺或方法简单易行,从而缩减了人在现场工作的时间,因为不需要人工研碎凝块,与传统的制备方法相比,该方法具有经济优势。

[0098] 在本发明中作为凝血酶富化制剂使用的备选自体凝血酶血清采用旧工艺制备,该工艺包括向采集在一支管子中的患者全血样本(如,10mL)中添加95%v/v乙醇溶液(如,1mL)和10%氯化钙(如,1mL)。然后让混合物在室温下沉淀大约30分钟。30分钟后,大约80%的抗凝血酶(在纤维蛋白原等其他蛋白质中)沉淀,然后对管子采用大约1500克的力进行大约8至大约10分钟的离心处理,处理后的自体凝血酶血清便可与富血小板浓缩液混合。

[0099] 优选地,本发明提供一种自体凝血酶血清的制备工艺或方法。优选地,本发明的所有方面和/或实施例都供自体使用。相应地,本发明还提供一种完全自体凝血酶血清的制备方法,其中供体和受体是同一个人或动物。

[0100] 在本发明的一个实施例中,制备凝血酶血清用的管子由玻璃制成,优选地该玻璃管是一种含有聚酯型触变胶体的玻璃分离管。

[0101] 在一个最佳实施例中,凝血酶血清制备方法采用本发明的管子,其中没有添加任何柠檬酸盐。

[0102] 另一方面,本发明提供一种伤口或组织愈合组合物的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0103] a) 优选地用一支优选含有触变胶体的管子采集全血;

[0104] b) 离心处理管子,优选地直到凝血酶血清释放;

[0105] c) 采集上清液或凝血酶血清;以及

[0106] d) 将凝血酶血清与PRP组合物或分离的血小板浓缩组合物混合。

[0107] 另一方面,本发明提供一种伤口或组织愈合组合物、细胞组合物和/或细胞制剂的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0108] a) 优选地用一支优选含有触变胶体的管子采集全血。;

[0109] b) 离心处理管子,优选地直到凝血酶血清释放;

[0110] c) 采集凝血酶血清;

[0111] d) 将凝血酶血清与PRP组合物或分离的血小板浓缩液组合物混合;以及

[0112] e) 将步骤d)中获得的组合物与细胞抽提物、细胞组合物、TCP、壳聚糖、透明质酸、乳膏、乳膏膜、脂肪细胞、脂肪组织、骨髓浓缩物、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶、肉毒杆菌毒素和/或干细胞混合。

[0113] 在一个实施例中,全血采集到至少一支管子中。在本文中可将管子称为分离管。优

选地,本发明所有方法和/或工艺可使用一支或多支本发明管子。

[0114] 在一个实施例中,本发明的所有方法和/或工艺可使用本发明的血袋系统或采血管装置或含有此种血袋系统或采血管装置的装置或成套工具采集的全血。

[0115] 本文中,“空”管子是指没有在其中插入和/或添加任何物质、组合物或其他东西的管子。

[0116] 本发明中的任何工艺或方法均可使用至少一支本发明管子。

[0117] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0118] a) 将全血采集至一支管子;

[0119] b) 离心处理该管子;

[0120] c) 采集凝块。

[0121] 优选地,没有使用任何凝结剂来制备伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物。优选地,伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物是可立即使用的成分。这种组合物可直接涂敷于糖尿病性溃疡。

[0122] 优选地,伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备工艺或方法用于牙科和/或整形外科。

[0123] 另一方面,本发明提供一种含有凝块的伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物,用于牙科、整形外科、关节炎、假关节炎或其他疾病。在一个实施例中,含有凝块的伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物被应用于牙腔、糖尿病性溃疡、穿孔性溃疡、糖尿病穿孔性溃疡或其他疾病。本发明也包括含有凝块的伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的治疗方法和使用。

[0124] 在一个实施例中,优选地在凝块形成之前,伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物可与磷酸三钙(TCP)或其他任何骨替代产品结合。

[0125] 含有TCP的伤口修复剂组合物可优选在小瓶中制备。

[0126] 在一个实施例中,优选地在凝块形成之前,伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物可与透明质酸结合。

[0127] 另一方面,本发明提供一种血小板浓缩液组合物或富血小板血浆组合物的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0128] a) 对本发明优选地含有柠檬酸钠和/或触变胶体的管子中的全血进行离心处理;以及

[0129] b) 采集富血小板血浆。

[0130] 离心处理步骤将清除血浆中的红细胞(RBC)。顶相是富血小板血浆(PRP),底相是抗凝血全血减去富血小板血浆。

[0131] 优选地,离心处理步骤采用1500克或大约1500克至大约2000克的力进行。优选地,离心处理步骤进行足够长的时间,以便在含血小板、淋巴细胞、单核细胞的血浆与含红细胞的胶体之间形成一道屏障。

[0132] 优选地,分离步骤b)通过从所述屏障顶部采集上清液而进行。在一个实施例中,通过除去含血小板血浆的那一半上清液,使富血小板血浆从全血浆中分离出来。优选地,与原来的全血相比,富血小板血浆含有富化的白细胞、凝血细胞和黏着蛋白(例如,纤维连接

蛋白(一种可溶蛋白)或玻璃体结合蛋白(一种由血小板分泌的蛋白)。

[0133] 在一个实施例中,制备富血小板血浆使用的管子选自:

[0134] i) 含有聚酯型触变胶体和柠檬酸钠缓冲液(0.10M)的玻璃分离管;

[0135] ii) 含有由聚合物混合物形成的高度触变胶体和无水柠檬酸钠(3.5mg/mL)的聚对苯二甲酸乙二醇酯分离管;

[0136] iii) 含有基于聚合物的触变胶体和柠檬酸钠缓冲液(0.10M)的环烯烃共聚物(COC)或环烯烃聚合物(COP)分离管;或

[0137] iv) 含有柠檬酸钠缓冲液(0.10M)或无水柠檬酸钠(3.5mg/mL)的环烯烃共聚物(COC)或环烯烃聚合物(COP)分离管。

[0138] 在一个最佳实施例中,血小板浓缩液制备方法采用本发明中的管子,管中添加了柠檬酸盐(例如,柠檬酸钠缓冲液(0.10M)或无水柠檬酸钠(3.5mg/mL))。

[0139] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂或组织修复剂组合物的制备方法或工艺,包括下列步骤:

[0140] a) 对本发明优选地含有柠檬酸钠和/或触变胶体的管子中的全血进行离心处理;

[0141] b) 采集富血小板血浆;以及

[0142] c) 将富血小板血浆与细胞抽提物、细胞组合物、TCP、壳聚糖、透明质酸、乳膏、乳膏膜、脂肪细胞、脂肪组织、骨髓浓缩物、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶、肉毒杆菌毒素和/或干细胞混合。

[0143] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂或组织修复剂组合物,含有:

[0144] a) 本发明的富血小板血浆或血浆浓缩液;以及

[0145] b) TCP、壳聚糖、透明质酸、乳膏、乳膏膜、脂肪细胞、脂肪组织、骨髓浓缩物、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶、肉毒杆菌毒素和/或干细胞。

[0146] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂或组织修复剂组合物,含有:

[0147] a) 本发明的凝血酶血清;

[0148] b) 优选地,本发明的富血小板血浆或血浆浓缩液;以及

[0149] c) TCP、壳聚糖、透明质酸、乳膏、乳膏膜、脂肪细胞、脂肪组织、骨髓浓缩物、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶、肉毒杆菌毒素和/或干细胞。

[0150] 凝块的形成是是一个多步骤过程或一连串过程,其中几个步骤需要使用钙离子。通过除去全血中的钙离子,如同在柠檬酸盐中采集血液的效果一样,可以防止血液结成凝块。钙螯合剂是一种与血液中的钙起反应的化学品,从而使钙在凝血过程中不起作用。最常用的螯合剂是柠檬酸盐,因为它对凝血系统组分的副作用最小。通过将血液采集至含有钙螯合剂的介质中,如柠檬酸盐,即可在最多几个小时内进行采样及对含柠檬酸盐的样品进行进一步制备。优选的钙螯合剂是柠檬酸钠。

[0151] 当经常使用3.5mg/mL柠檬酸盐采集介质采集和保存血液时,本领域的技术人员将认识到柠檬酸盐和全血的比率可以有不同的范围。

[0152] 另一方面,本发明提供一种分离的血小板浓缩液组合物,该组合物含有:

[0153] a) 血浆;

[0154] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板;

[0155] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞;

[0156] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原；

[0157] 以及浓度低于 $0.6 \times 10^{12}$ 个细胞/升的红细胞。

[0158] 在本文中，富血小板血浆也被称为血小板浓缩液组合物。

[0159] 在一个实施例中，本发明的血小板浓缩液组合物或富血小板血浆组合物可与在牙科(TCP, 10~30微米)和整形外科(TCP, 50微米)中用作容积矫正剂的磷酸三钙(TCP)和/或其他任何替代产品结合。

[0160] 另一方面，本发明提供一种伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备方法或工艺，包括下列步骤：

[0161] a) 对含有透明质酸的管子中的全血进行离心处理；

[0162] b) 可选地，将富化富血小板血浆和透明质酸从全血浆中分离出来；以及

[0163] c) 可选地，将富化富血小板血浆和透明质酸混合。

[0164] 优选地，管子含有透明质酸，优选位于管子底部，其上方为触变胶体，再上为抗凝血剂，优选为柠檬酸盐(参见图16)。

[0165] 优选地，分离步骤b) 通过从所述屏障顶部采集含有富化富血小板血浆和透明质酸的上清液实施。在一个实施例中，通过除去含贫血小板血浆的那一半上清液，使富化富血小板血浆和透明质酸从全血浆中分离出来。优选地，与原来的全血相比，富化血浆含有富化的白细胞、凝血细胞和黏着蛋白(例如，纤维连接蛋白(一种可溶蛋白)或玻璃体结合蛋白(一种由血小板分泌的蛋白))。

[0166] 另一方面，本发明提供一种伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备工艺或方法，包括下列步骤：

[0167] a) 优选地，用一支含有透明质酸、触变胶体和/或抗凝血剂优选为柠檬酸钠的管子采集全血；

[0168] b) 对管子进行离心处理，优选地直到红细胞迁移到触变胶体下方以及优选地，直到透明质酸迁移到富血小板血浆上面；

[0169] c) 可选地，将透明质酸和富血小板血浆混合，优选地采用倒置管子的方法进行混合；

[0170] d) 采集含有透明质酸和富化血浆的上清液；以及

[0171] e) 可选地，将所述透明质酸与所述富化血浆进一步混合。

[0172] 另一方面，本发明提供一种伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备工艺或方法，包括下列步骤：

[0173] a) 优选地，用一支含有透明质酸、触变胶体和/或抗凝血剂优选为柠檬酸钠的管子采集全血；

[0174] b) 对管子进行离心处理，优选地直到在管子顶部形成一层透明质酸作为第一层，随之为由富化血浆或PRP组成的第二层；

[0175] c) 可选地，将透明质酸和富血小板血浆混合，优选采用倒置管子的方法进行混合；

[0176] d) 采集含有透明质酸和富化血浆的上清液；以及

[0177] e) 可选地，将所述透明质酸与所述富化血浆进一步混合。

[0178] 离心处理步骤将清除血浆中的红细胞(RBC)。离心处理后，顶相是透明质酸，其下为富血小板血浆(PRP)，再下面是触变胶体，底相是含有红细胞的抗凝血全血减去富血小板

血浆(图16)。在离心处理过程中,透明质酸迁移到血浆上方(参见图16)。

[0179] 优选地,管子中含有约1mL至2mL的透明质酸、约2克的细胞选择组合物或触变胶体,以及约1mL的柠檬酸盐(0.109M)。

[0180] 图16所示为含有透明质酸和富血小板血浆(PRP)的伤口修复剂组合物制备方法示意图。

[0181] 优选地,通过简单地倒置管子将富血小板血浆和透明质酸混合。

[0182] 有优势的是,将富血小板血浆和透明质酸混合时,透明质酸因血浆和细胞膨胀而本身扩大。

[0183] 有优势的是,由此获得的伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物是可立即使用的组合物。有优势的是,获得的伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物是一种适合注射的粘胶或生物胶,例如,可将其用作机械支撑或填充材料。

[0184] 有优势的是,该伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或粘胶的制备方法或工艺经济、简便、快速。

[0185] 优选地,离心处理步骤要进行足够长的时间,直到红细胞迁移到触变胶体下方,并且优选地,直到透明质酸迁移到富血小板血浆上方。

[0186] 在本发明一个较佳实施例中,离心处理步骤采用的力为或大约为1500克,处理时间大约为5分钟。在另一个实施例中,离心处理步骤采用大约1000克至大约2000克之间的一个力处理大约3分钟至大约7分钟之间的一个时间,优选地,采用1500克的力处理大约3分钟至大约7分钟之间的一个时间。

[0187] 另一方面,本发明提供一种含有透明质酸和抗凝血剂的管子。在本发明的另一方面,本发明提供一种含有透明质酸、抗凝血剂和全血的管子。优选地,抗凝血剂为柠檬酸盐。

[0188] 另一方面,本发明提供一种含有透明质酸和细胞选择胶体的管子。另一方面,本发明提供一种含有透明质酸、细胞选择胶体和全血的管子。优选地,细胞选择胶体为触变胶体。

[0189] 另一方面,本发明提供一种含有透明质酸、抗凝血剂和细胞选择胶体的管子。另一方面,本发明提供一种含有透明质酸、抗凝血剂、细胞选择胶体和全血的管子。优选地,抗凝血剂为柠檬酸盐。优选地,细胞选择胶体为触变胶体。优选地,该透明质酸位于管子底部,上方为触变胶体,再上为抗凝血剂,优选为柠檬酸盐(图16)。

[0190] 另一方面,本发明提供一种含有透明质酸和PRP的管子。另一方面,本发明提供一种含有透明质酸、PRP和细胞选择胶体的管子。另一方面,本发明提供一种含有透明质酸、PRP和抗凝血剂的管子。另一方面,本发明提供一种含有透明质酸、PRP、抗凝血剂和细胞选择胶体的管子。优选地,抗凝血剂为柠檬酸盐。优选地,细胞选择胶体为触变胶体。

[0191] 优选地,本发明的管子用于本发明的方法或工艺中。

[0192] 另一方面,本发明提供一种含有透明质酸和PRP的组合物。另一方面,本发明提供一种含有透明质酸和PRP的组合物。其中所述组合物通过本发明伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物制备方法获得。

[0193] 另一方面,本发明提供一种含有本发明管子的成套工具或医疗装置。

[0194] 在进一步实施例中,本发明提供一种可用于制备伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的管子,其选自:

- [0195] i) 含有聚酯型触变胶体、柠檬酸钠缓冲液 (0.10M) 和透明质酸的玻璃分离管;
- [0196] ii) 含有由聚合物混合物形成的高度触变胶体、无水柠檬酸钠 (3.5mg/mL) 和透明质酸的聚对苯二甲酸乙二醇酯分离管;
- [0197] iii) 含有基于聚合物的触变胶体、柠檬酸钠缓冲液 (0.10M) 和透明质酸的环烯烃共聚物 (COC) 或环烯烃聚合物 (COP) 分离管;或
- [0198] iv) 含有透明质酸、柠檬酸钠缓冲液 (0.10M) 或无水柠檬酸钠 (3.5mg/mL) 的环烯烃共聚物 (COC) 或环烯烃聚合物 (COP) 过滤分离管。
- [0199] 在进一步实施例中,本发明提供一种根据本发明的管子,管子可用于制备伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物,可进一步含有柠檬酸盐和透明质酸,例如,透明质酸和柠檬酸钠缓冲液 (0.10M) 或无水柠檬酸钠 (3.5mg/mL)。
- [0200] 优选地,在人类使用时没有使用邻苯二甲酸盐。
- [0201] 作为一种选择,水蛭素、苯甲酰基-DL-精氨酸-对硝基酰苯胺盐酸盐 (BAPA)、肝素、柠檬酸盐、枸橼酸葡萄糖 (ACD)、枸橼酸-茶碱-腺苷-潘生丁 (CTAD)、乙二胺四乙酸 (EDTA) 可用作为抗凝血剂。
- [0202] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物,含有:
- [0203] a) 血浆;
- [0204] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板;
- [0205] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞;
- [0206] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原;
- [0207] e) 约1mL至2mL的透明质酸;
- [0208] 以及浓度低于 $0.6 \times 10^{12}$ 个细胞/升的红细胞。
- [0209] 在一个实施例中,本发明的伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物可与在牙科 (TCP, 10~30微米) 和整形外科 (TCP, 50微米) 中用作容积矫正剂的磷酸三钙 (TCP) 和/或其他任何替代产品结合。
- [0210] 在一个实施例中,本发明的伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物、止血剂、血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物可在血液采集管子中与透明质酸结合。
- [0211] 另一方面,本发明提供一种止血剂、伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物的制备工艺或方法,包括将凝血酶血清或本发明的凝血酶血清与本发明的富血小板血浆组合物、伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物混合。
- [0212] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂的制备工艺或方法,包括下列步骤:
- [0213] a) 提供一种本发明血小板浓缩液或血小板浓缩液;
- [0214] b) 将血小板浓缩液与本发明的凝血活化剂、凝血酶血清或凝血酶血清混合;以及
- [0215] c) 可选地,混入细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、血液细胞、脐带细胞、间叶干细胞 (MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。
- [0216] 优选地,使用自体血小板浓缩液、自体凝血酶和/或自体细胞抽提物。更加优选地,使用自体血小板浓缩液、自体凝血酶和自体细胞抽提物。优选地,使用本发明的管子。

[0217] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0218] a) 将血小板浓缩液与本发明任何方面的自体凝血酶血清混合;以及

[0219] b) 可选地,混入至少一种细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。

[0220] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0221] a) 将自体血小板浓缩液与凝血酶血清混合,其中自体血小板浓缩液和/或凝血酶血清采用本发明的管子进行制备;以及

[0222] b) 可选地,混入至少一种细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。

[0223] 另一方面,本发明提供一种伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0224] a) 提供一种血小板浓缩液,优选为本发明的自体血小板浓缩液;

[0225] b) 将血小板浓缩液与凝血酶血清,优选为本发明的自体凝血酶血清,进行混合;以及

[0226] c) 可选地,混入至少一种细胞抽提物;优选地混入一种自体细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。

[0227] 优选地,本发明提供一种自体伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂制备方法或工艺。本文中的自体伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂是指其中血小板浓缩液或凝血酶血清为自体血小板浓缩液或凝血酶血清的组合物。

[0228] 在一个最佳实施例中,本发明提供一种完全自体伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂制备方法或工艺。本文中的完全自体伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂是指其中血小板浓缩液和凝血酶血清均为自体血小板浓缩液或凝血酶血清的组合物。在本发明的这个较佳实施例中,伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂的所有血液组分均来自于即将应用该伤口修复剂、组织修复剂或止血剂的同一个患者或动物。

[0229] 另一方面,本发明提供与至少一种自体细胞抽提物混合的完全自体伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂的制备方法或工艺。在这一方面,血小板浓缩液、凝血酶血清和细胞抽提物均来自于自体,因此都来自于同一个患者或动物。

[0230] 另一方面,本发明提供一种自体伤口修复剂组合物、自体组织修复剂组合物或自体止血剂的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0231] a) 将自体血小板浓缩液,优选为本发明的自体血小板浓缩液,与自体凝血酶,优选

为本发明的自体凝血酶,进行混合;以及

[0232] b) 可选地,混入至少一种细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。

[0233] 其中自体血小板浓缩液和自体凝血酶均来自于同一个患者或同一个动物。

[0234] 另一方面,本发明提供一种自体伤口修复剂组合物、自体组织修复剂组合物或自体止血剂的制备工艺或方法,包括下列步骤:

[0235] a) 将自体血小板浓缩液,优选为本发明的自体血小板浓缩液,与自体凝血酶,优选为本发明的自体凝血酶,进行混合;以及

[0236] b) 可选地,混入至少一种自体细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞的抽提物。

[0237] 其中自体血小板浓缩液、自体凝血酶和自体细胞抽提物均来自于同一个患者或同一个动物。

[0238] 本发明的富血小板血浆、自体富血小板血浆、凝血酶血清、自体凝血酶血清、伤口修复剂组合物或组织修复剂组合物或止血剂可与一种或多种细胞抽提物合并。在一个实施例中,细胞抽提物选自角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞或跟腱细胞。

[0239] 本发明的伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂将刺激细胞再生,起生物胶的作用,以促进组织粘连。

[0240] 在一个实施例中,可不用凝血酶血清,而使用备选凝血活化剂,例如,氯化钙,优选地,使用葡萄糖酸钙。

[0241] 在一个实施例中,多种凝血活化剂可合并使用,优选地凝血酶血清与葡萄糖酸钙合并使用。

[0242] 优选地,凝血酶活化剂或凝血酶血清与血小板浓缩液混合,体积比例大约为10:1至10:3(血小板浓缩液:凝血酶活化剂)。

[0243] 在本发明的一个较佳实施例中,按液体血清与富血小板血浆成1:1、3:1或10:1的比例采集液体血清。所采用的特定比例将改变止血剂的硬度。在比例为3:1时,可获得强止血剂。在比例为10:1时,可获得较柔和的止血剂。

[0244] 在一个实施例中,PRP或血浆浓缩液单独或者合并细胞提取物以及本发明制剂或组合物可与浸泡脱细胞基质合并或融合,以直接敷用于伤口,或可在敷用前在实验室中培养。可使用胶原蛋白或合成基质,例如,人工真皮(Integra)基质。

[0245] 另一个实施例是将人重组凝血酶原激酶直接与富血小板血浆混合,以形成伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂。另外,利用人重组凝血酶原激酶在少量血浆中生成凝血酶,然后将得到的凝血酶与富血小板血浆合并,以形成伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂。

[0246] 在一个实施例中,所使用的管子可具有可湿表面(如二氧化硅、硅藻土、高岭土等)或具有非可湿表面(如塑料、硅化玻璃等)。因为表面在凝血活化过程中起一定的作用,所选分离管表面取决于凝块形成的速度。还可使用化学活化剂如高岭土来加速凝血时间,然而后续也有必要将其剔除。

[0247] 有优势的是,本发明富血小板血浆、血小板浓缩液、凝血酶血清和伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂的制备并不需要使用乙醇和/或钙。通过利用本发明的自体凝血酶,本发明不需要回复血凝块形成过程。这样,不需要采用诸如氯化钙或葡萄糖酸钙等药剂(修复剂)来逆转(在修复含柠檬酸盐的血液的凝血活动中的)抗凝血剂的作用。

[0248] 虽然众所周知氯化钙是一种用作为修复剂的钙盐,但是任何一种以氯化钙方式起作用的钙盐均可以考虑作为修复剂。同样地,尽管目前人们相信很多凝血反应需要钙离子作为辅因子,但是可以考虑将已知或之后发现功能上与促进这些凝血反应的钙等效的任何物质作为修复剂,可单独或者与钙合并作为修复剂。如果所使用的抗凝血剂为肝素,则要使用肝素酶作为修复剂,以逆转抗凝血酶剂的作用。

[0249] 有优势的是,本发明提供富血小板血浆、血小板浓缩液、凝血酶血清、和伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或止血剂,其中消除与使用牛和重组人凝血酶相关的风险。

[0250] 有优势的是,采用本发明的方法可获得浓度较高的富血小板血浆、生长因子、粒细胞、纤维蛋白原和/或其他蛋白。有优势的是,与正常血液学水平相比,采用本发明方法可获得两倍浓度的富血小板血浆、生长因子、粒细胞、纤维蛋白原和/或其他蛋白。

[0251] 有优势的是,本发明方法为细胞扩张带来一种最佳的细胞生产力。

[0252] 有优势的是,本发明方法允许在整个过程中,从血液采集、操控直到在患者身上敷用或注射,在完全闭路的条件下操控血液。因此,所有设备和成套工具都适用于全闭路操控,以避免血液与空气直接接触。

[0253] 有优势的是,本发明方法可降低氧化应激并缩短离体操控时间。

[0254] 有优势的是,本发明方法可形成一种由聚集血小板和活化聚合纤维蛋白原组成的固体自体饱和膜。

[0255] 本发明制剂(例如骨髓细胞制剂)可单独使用或者混入本发明血小板浓缩液或者用葡萄糖酸钙再次进行离心处理,以形成可缝合膜,可用敷药器将其涂敷或注射至患者受伤部位。

[0256] 本发明骨髓细胞制剂可用于治疗骨质缺损或软骨缺损。骨细胞制剂可单独使用或者也可与本发明血浆浓缩液合并使用。软骨膜也可以与葡萄糖酸钙一起使用。

[0257] 在本发明一个较佳实施例中,离心处理步骤(例如,可缝合膜离心处理步骤)采用大约3000克的力处理约15至约25分钟的时间。在一个实施例中,离心处理步骤采用约2500克至约3500克之间的一个力处理约10至约30分钟之间的一个时间。

[0258] 在本发明一个实施例中,从人或动物身上采集全血。在本发明的一个较佳实施例中,从人身上采集全血。

[0259] 另一方面,本发明提供依照本发明制备的伤口或组织修复剂组合物或止血剂,含有:

[0260] a) 血浆;

[0261] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板;

[0262] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞;

[0263] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原;

[0264] e) 凝血活化剂、自体凝血酶血清或本发明自体凝血酶血清;

[0265] f) 可选的自体细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物。其中,红细胞浓度低于 $0.6 \times 10^{12}$ 个细胞/升。

[0266] 另一方面,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物或止血剂,含有:

[0267] a) 血浆;

[0268] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板;

[0269] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞;

[0270] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原;

[0271] e) 本发明的自体凝血酶血清;

[0272] f) 可选的自体细胞抽提物,如角质形成细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、脂肪组织、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物。其中,红细胞浓度低于 $0.6 \times 10^{12}$ 个细胞/升。

[0273] 优选地,凝血活化剂或自体凝血酶血清的体积比(血小板血浆:凝血活化剂)大约为10:1至10:3。

[0274] 有优势的是,与已知培养基相比,本发明的血浆代表理想的培养基。有优势的是,本发明的血浆代表理想的细胞运输介质。相应地,本发明的血浆包含实现最佳细胞生长和生存需要的所有细胞和生长因子。相应地,本发明的血浆表示非常适合将细胞移植至患者的介质,例如,用于外科手术伤口的特应性敷用,抗衰老注射、关节注射、肌肉注射、或胰腺再生(胰岛)。

[0275] 另一方面,本发明提供一种血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或本发明的自体凝血酶血清的制备设备。

[0276] 另一方面,本发明提供一种包括至少一支本发明管子的装置。

[0277] 优先地,该装置具有一个引入所述全血的入口,抽真空以便抽吸全血样本,无菌,具有大约8mL至10mL的可用真空,并且适用于离心处理。

[0278] 另一方面,本发明提供一种使用本发明血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清来制造一种伤口愈合或者促进骨头或牙周膜和/或骨头和/或组织再生的药物。

[0279] 另一方面,本发明提供一种使用本发明血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清来制造一种美容制剂的用途,制剂用作抗衰老剂或皮肤修复剂,如疤痕修复剂、皱纹填充和/或修复剂。

[0280] 另一方面,本发明提供一种根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清,用作为美容制剂、美塑制剂、抗衰老制剂、容积矫正剂、皱纹填充剂、祛褐斑制剂和/或头发生长剂。在一个实施例中,根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口修复剂组合物、组织修复剂

组合物或凝血酶血清被涂敷于眼睛、嘴唇、眼睑、脸、颈、胸、头皮、头发、手及身体所有其他部位上面或周围和/或男人和女人生殖器上面或周围。

[0281] 另一方面,本发明提供一种根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口修复剂组合物、组织修复剂组合物或凝血酶血清,用于韧带和/或软骨重建。有优势的是,与已知方法相比,使用本发明组合物的韧带和/或软骨重建时间要除以一个系数2或3。

[0282] 在一个实施例中,该美容制剂和/或美塑制剂与一种美容药剂、美容乳霜或美容面膜合并使用。

[0283] 另一方面,本发明提供一种药物组合物,包含根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清的药物组合物和药学上可接受的载体。

[0284] 另一方面,本发明提供一种美容组合物,包含根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清和美容上可接受的载体。

[0285] 另一方面,本发明提供一种可用于组织再生疗法的可植入装置,包括:

[0286] a) 含有根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂或伤口修复剂组合物的可渗透核心,可选地与透明质酸结合;以及

[0287] b) 可选地,一个围绕所述核心的外套,所述外套含有生物兼容材料,优选为生物吸收性材料,优选为透明质酸。

[0288] 另一方面,本发明提供包括至少一支本发明管子的成套工具。

[0289] 另一方面,本发明提供一种包括一支用于制备本发明血小板浓缩液的管子和/或一支用于制备本发明凝血酶血清的管子的成套工具。

[0290] 另一方面,本发明提供了一种成套工具,包括至少一支用于制备根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清的管子。

[0291] 在一个实施例中,该成套工具进一步包括一支或多支用于制备根据本发明的血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清的管子。

[0292] 在一个实施例中,该成套工具进一步包括伤口或组织修复剂制备附件和一个敷药装置(例如,双筒注射器),以便将本发明血小板浓缩液组合物、富血小板血浆组合物、止血剂、伤口或组织修复剂组合物或凝血酶血清同时涂敷到伤口上。

[0293] 在一个实施例中,该成套工具适用于组织再生。

[0294] 另一方面,本发明提供一种促进伤口愈合或组织愈合和/或封口和/或人或动物伤口或组织的组织和/或骨头再生的方法,包括:

[0295] a) 提供本发明的伤口修复剂或组织修复剂组合物或止血剂;以及

[0296] b) 在伤口、受损组织或受损骨头上敷用治疗有效量的伤口或组织修复剂或止血剂。

[0297] 另一方面,本发明提供一种治疗方法,包括:

[0298] a) 提供本发明的伤口修复剂或组织修复剂组合物或止血剂;以及

[0299] b) 在伤口、受损组织或受损骨头上敷用治疗有效量的伤口或组织修复剂或止血剂。

[0300] 另一方面,本发明提供一种在患有牙周病或因其他疾患需要牙周再生的哺乳动物的伤口或牙周缺损部位诱导牙周再生的方法,包括:

[0301] a) 提供本发明的伤口修复剂或组织修复剂组合物或止血剂;

[0302] b) 在伤口、组织或牙周缺损或腔体敷用治疗有效量的伤口或组织修复剂组合物或止血剂;

[0303] c) 可选地,插入牙周屏障;以及

[0304] d) 封闭伤口或组织。

[0305] 优选地,所述屏障位于牙龈组织和按步骤a)和b)治疗的伤口或组织之间。在一个实施例中,所述屏障选自薄膜、生物可降解聚合物和/或生物兼容性多孔材料。

[0306] 可按30:70或50:50的比例把PRP和葡萄糖酸钙(10%)混合获得该薄膜。离心处理时间大约30分钟。

[0307] 另一方面,本发明提供一种促进人或动物疤痕或皱纹皮肤再生的方法,包括:

[0308] a) 提供本发明的伤口或组织修复剂组合物或止血剂;以及

[0309] b) 用所述伤口或组织修复剂组合物或止血剂填充皮肤疤痕或皱纹线。

[0310] 另一方面,本发明提供一种细胞组合物的制备工艺,包括下列步骤:

[0311] a) 离心处理本发明管子中的全血;

[0312] b) 可选地,将富化富血小板血浆从全血浆中分离出来;以及

[0313] c) 重新悬浮富化血浆;

[0314] d) 提供细胞抽提物,如真皮细胞的抽提物,如角质形成细胞、成纤维细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、骨髓细胞、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、骨膜过滤细胞(perosteal filter cell)、角膜细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物;以及

[0315] e) 将步骤c)中获得的血小板浓缩液与步骤d)中获得的细胞抽提物混合。

[0316] 优选地,离心处理步骤采用的力为或大约为1500克至约2000克。优选地,离心处理步骤的处理时间应该足够长,以便在含血小板、淋巴细胞、单核细胞的血浆和含红细胞的丸子之间形成一道屏障。

[0317] 优选地,分离步骤b)通过从所述屏障顶部采集上清液而进行。在一个实施例中,通过除去含血小板血浆的那一半上清液,使富化富血小板血浆从全血浆中分离出来。优选地,与原来的全血相比,富化血浆含有富化的白细胞、凝血细胞和黏着蛋白或黏着蛋白(例如,纤维连接蛋白)。

[0318] 另一方面,本发明提供了一种伤口或组织愈合组合物的制备工艺,包括下列步骤:

[0319] a) 离心处理本发明管子或分离管中的全血;

[0320] b) 可选地,将富化富血小板血浆从全血浆中分离出来;

[0321] c) 重新悬浮富化血浆;

[0322] d) 将步骤c)获得的血小板浓缩液与凝血活化剂、凝血酶血清、自体凝血酶血清或本发明自体凝血酶血清混合。

[0323] e) 提供细胞抽提物,如真皮细胞的抽提物,如角质形成细胞、成纤维细胞、黑素细

胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、骨髓细胞、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、骨膜过滤细胞、角膜细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物；

[0324] f) 将步骤d) 中获得的血小板浓缩液混合物与步骤e) 中获得的细胞抽提物混合。

[0325] 优选地，离心处理步骤采用的力为或大约为1500克至约2000克。优选地，离心处理步骤的处理时间应该足够长，以便在含血小板、淋巴细胞、单核细胞的血浆和含红细胞的丸子之间形成一道屏障。

[0326] 优选地，分离步骤b) 通过从所述屏障顶部采集上清液而进行。在一个实施例中，通过除去含贫血小板血浆的那一半上清液，使富化富血小板血浆从全血浆中分离出来。优选地，与原来的全血相比，富化血浆含有富化的白细胞、凝血细胞和黏着蛋白或黏着蛋白(例如，纤维连接蛋白)。

[0327] 优选地，凝血活化剂或自体凝血酶血清的体积比(血小板血浆:凝血活化剂) 大约为10:1至10:3。

[0328] 另一方面，本发明提供一种根据本发明制备的分离细胞组合物，含有：

[0329] a) 血浆；

[0330] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板；

[0331] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞；

[0332] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原；

[0333] e) 细胞抽提物，如角质形成细胞、成纤维细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、骨髓细胞、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、骨膜过滤细胞、角膜细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物；

[0334] 优选地，该细胞浓度约为每毫升血浆或富化血浆 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞。红细胞浓度低于 $0.6 \times 10^{12}$ 个细胞/升。

[0335] 另一方面，本发明提供一种根据本发明制备的分离细胞组合物，含有：

[0336] a) 血浆；

[0337] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板；

[0338] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞；

[0339] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原；

[0340] e) 凝血活化剂、凝血酶血清、自体凝血酶血清或本发明自体凝血酶血清；

[0341] f) 细胞抽提物，如角质形成细胞、成纤维细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、骨髓细胞、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、成骨细胞、软骨细胞、骨膜过滤细胞、角膜细胞、脐带细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、雪旺氏细胞、跟腱细胞或胰岛细胞的抽提物；

[0342] 优选地，凝血活化剂或自体凝血酶血清的体积比(血小板血浆:凝血活化剂) 大约为10:1至10:3。

[0343] 优选地，所述细胞浓度约为每毫升血浆或富化血浆 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞。红细胞浓度低于 $0.6 \times 10^{12}$ 个细胞/升。

[0344] 另一方面，本发明提供含有本发明分离细胞组合物的伤口或组织修复剂组合物或

止血剂。

[0345] 另一方面,本发明提供一种促进伤口愈合或组织愈合和/或封口和/或人或动物组织和/或软骨和/或骨头和/或神经再生的方法,包括:

[0346] a) 提供本发明伤口或组织修复剂组合物、止血剂或细胞组合物;以及

[0347] b) 在伤口、受损组织、受损软骨或受损骨头上敷用治疗有效量的伤口或组织修复剂、止血剂或细胞组合物。

[0348] 另一方面,本发明为需要真皮脂肪移植或因其他疾患需要脂肪组织再生的哺乳动物提供一种增加脂肪组织体积的方法,包括:

[0349] a) 提供本发明脂肪细胞组合物;

[0350] b) 将治疗或美容有效量的脂肪细胞组合物与本发明PRP或血浆浓缩液合并,敷用至真皮脂肪移植或需要脂肪组织再生的脂肪组织上;以及

[0351] c) 可选地,插入一个外科瓣或植入物,其中该外科瓣或植入物位于需要再生或容积扩大的部位,所述外科瓣或植入物含有本发明脂肪细胞制剂和PRP、血浆浓缩液或富化血浆材料的混合物。

[0352] 另一方面,本发明提供一种在患有心肌缺失或因其他疾患需要心肌再生组织再生的哺乳动物身上诱导心肌再生的方法,包括:

[0353] a) 提供本发明肌肉细胞或骨髓细胞组合物;以及

[0354] b) 将治疗有效量的肌肉细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在需要再生的心肌组织上。

[0355] 另一方面,本发明提供一种在患有眼角膜缺失或因其他疾患需要眼角膜再生的哺乳动物身上诱导眼角膜再生的方法,包括:

[0356] a) 提供本发明角膜细胞组合物;以及

[0357] b) 将治疗有效量的角膜细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在需要再生的眼角膜组织上。

[0358] 另一方面,本发明提供一种在患有关节或软骨缺失或因其他疾患需要关节或软骨组织再生的哺乳动物身上诱导关节或软骨再生的方法,包括:

[0359] a) 提供本发明软骨细胞或骨髓细胞组合物;

[0360] b) 将治疗有效量的软骨细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在需要再生的关节或软骨组织上。

[0361] c) 可选地,插入一个外科瓣或植入物,其中该外科瓣或植入物位于关节缺损部位或位于骨膜片下,该外科瓣或植入物含有本发明软骨细胞或骨髓细胞制剂和PRP、血浆浓缩液或富化血浆材料的混合物。

[0362] 另一方面,本发明提供一种促进人或低等动物疤痕、皱纹或脂肪缺失部位皮肤再生的方法,包括:

[0363] a) 提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂或细胞组合物,与本发明PRP或血浆浓缩液合并使用;以及

[0364] b) 将伤口或组织修复剂组合物、止血剂或细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,填充皮肤疤痕、皱纹线或脂肪缺失部位。

[0365] 另一方面,本发明提供一种在患有末梢神经损伤、神经缝术或脊髓损伤或因其他

疾患需要末梢神经再生的哺乳动物身上诱导末梢神经再生的方法,包括:

[0366] a) 提供一种雪旺氏细胞组合物,合并使用本发明PRP或血浆浓缩液;以及

[0367] b) 将治疗有效量的雪旺氏细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用至需要再生的末梢神经上。

[0368] 另一方面,本发明提供一种在患有骨损伤、骨缺失或因其他疾患需要骨头再生的哺乳动物身上诱导骨头再生的方法,包括:

[0369] a) 提供一种骨髓细胞或成骨细胞组合物,与本发明PRP或血浆浓缩液合并使用;以及

[0370] b) 将治疗有效量的骨髓细胞或成骨细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在需要再生的骨头上。

[0371] 另一方面,本发明提供一种治疗哺乳动物I型糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病或高血糖症的治疗方法,包括:

[0372] a) 提供一种胰岛细胞组合物,与本发明PRP或血浆浓缩液合并使用;以及

[0373] b) 将治疗有效量的胰岛细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在患者身上,例如,采用注射方法。

[0374] 另一方面,本发明提供一种哺乳动物尿失禁或其他需要膀胱再生的疾患的治疗方法,包括:

[0375] a) 提供一种成肌细胞组合物,与本发明PRP或血浆浓缩液合并使用;以及

[0376] b) 将治疗有效量的成肌细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在需要再生的膀胱颈部。

[0377] 另一方面,本发明提供一种哺乳动物肛门失禁或其他需要肛门肌肉再生的疾患的治疗方法,包括:

[0378] a) 提供一种成肌细胞组合物,与本发明PRP或血浆浓缩液合并使用;以及

[0379] b) 将治疗有效量的成肌细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在需要再生的肛门周围。

[0380] 另一方面,本发明提供一种哺乳动物回流性食管炎、胃食道逆流疾病或其他需要食管括约肌再生的疾患的治疗方法,包括:

[0381] a) 提供一种成肌细胞组合物,与本发明PRP或血浆浓缩液合并使用;

[0382] b) 将治疗有效量的成肌细胞组合物合并本发明PRP或血浆浓缩液,敷用在需要再生的食管括约肌上。

[0383] 另一方面,本发明提供一种使用本发明伤口或组织修复组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂来制造一种药物的用途,药物用于愈合伤口或组织、化疗、肌肉或促进骨头或牙周膜生长和/或骨头和/或组织再生,如皮肤、软骨膜、肌肉、跟腱、脂肪组织、眼角膜、末梢神经、脊椎或骨头再生。

[0384] 另一方面,本发明提供一种使用本发明伤口或组织修复组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂来制造一种美容制剂的用途,制剂用作抗衰老剂或皮肤修复剂,如疤痕修复剂、脂肪萎缩修复剂、皱纹填充和/或修复剂。

[0385] 另一方面,本发明提供一种药物组合物,包含本发明伤口或组织修复组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂以及药学上可接受的载体。

[0386] 另一方面,本发明提供一种美容组合物,包含本发明伤口或组织修复组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂以及美容上可接受的载体。

[0387] 另一方面,本发明提供一种可用于组织再生疗法的可植入装置,包括:

[0388] a) 一个可渗透核心,含有本发明伤口或组织修复组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂,可选与透明质酸合并使用;以及

[0389] b) 一个围绕所述核心的外套,所述外套含有生物兼容材料,优选为生物吸收性材料,优选为透明质酸。

[0390] 在一个实施例中,本发明的组合物、伤口或组织修复剂组合物、细胞抽提物、细胞组合物、血浆浓缩液和凝血酶制剂使用异体物质、组合物、血液或细胞。

[0391] 本发明的用途、方法和组合物有益于组织、骨头和/或软骨膜再生和/或复新。

[0392] 本发明的用途、方法和组合物在治疗下列疾病或治疗方面特别有用:糖尿病神经性溃疡或褥疮溃疡;骨头和软骨损伤,如深层关节软骨或软骨损伤,如手术修复撕裂的跟腱;因外伤或年龄引起的关节炎;肩腱袖病;久治不愈的伤口,如马的下肢上因脉管炎引起的伤口;牙周疾病;植入外科手术;心血管、胸、一直、头颈、口腔、胃肠、整形外科、神经外科及整形手术;化疗和/或化疗注射;心肌损伤,如慢性心力衰竭、心力衰竭、缺血性及非缺血性病症及心肌病;胃食管反流;肛门或尿失禁;面部手术,如面部手术引起的秃头症(鬓脚部位因头发毛囊损失引起的秃头症)、脱发、脱发、整容手术(皱纹切除术)、鼻整形术、真皮脂肪移植(面部充填和面部先天性偏侧萎缩治疗如HIV/AIDS感染患者的先天性软骨鼻子萎缩和脂肪萎缩、生殖功能障碍、糜烂及关节镜检查);伤口愈合并发症,如眼睑成形术之后的伤口愈合并发症;角膜疾病,如化学烧伤引起的角膜混浊、史提芬约翰逊综合征损伤和角膜溃疡;干眼症;血液疾病,如地中海贫血;末梢神经损伤、神经缝合、及脊髓受损;骨质缺损或疾病如骨移植或骨裂、皮肤损伤或疾病如痤疮(特别是皮肤磨削术治疗之后)、烧伤、风疹或小痘疤痕、白癫风、脂肪萎缩、卡波济氏肉瘤、皮肤疤痕或掌跖纤维瘤病。

[0393] 本发明的用途、方法和组合物在组织愈合中有益,包括骨头再生与修复、有丝分裂、血管再生和/或巨噬细胞活化。

[0394] 本发明的另外优点和新颖特征不但将在以下说明中阐明,而且本领域技术人员通过查阅下列说明书可以显而易见或者可以通过实施本发明而掌握。本发明的目标和优点可通过相应手段、组合、组合物、以及随附的权利要求书中特别指出的方法而实现并获得。

[0395] 本发明的组合物、用途和方法在止血、组织再生、恢复、水合和/或刺激方面特别有用,可作为生物胶、生物粘合剂或生物填充材料。

[0396] 有优势的是,本发明的强力生物胶与其他已知产品相比具有更高的机械强度,特别适用于所有有创手术干预。本发明的此等生物胶通过含有相应的细胞、血小板、白细胞、生长因子及可减少/防止最终感染的其他因子而提高治疗受损组织的能力。

[0397] 本发明的组合物、用途和方法特别有益于伤口治疗、手术、整形外科用注射以及美塑、美容或容积矫正用注射。

[0398] 另一方面,本发明的组合物、用途和方法在皮肤组织再生和/或复新方面很有用,特别是在下列方面:促进和/或激发皮肤再生,如减少皱纹、深层皱纹、痤疮(特别是皮肤磨削术治疗后出现的这种疤痕)、烧伤、风疹或小痘疤痕、白癫风和脂肪萎缩(例如,抗衰老组合物和皮肤再生组合物)、鼻唇线改良与皮肤损伤或疾病治疗如皮肤烧伤、卡波济氏肉瘤、

皮肤瘢痕或掌跖纤维瘤病、减少与皮肤或组织相关的疼痛、以及痔座垫、勃起功能障碍、空洞、海绵体纤维化、派罗尼病(阴茎硬结症)、阴道和/或阴唇疾病。

[0399] 另一方面,本发明的组合物、用途和方法在下列方面特别有用:膝盖、肘、(撕裂的)肌肉、脊椎、椎间盘、跟腱及韧带的组织愈合、再生治疗或运动医学;创伤或手术伤口的治疗,如安装和/或承托和/或封闭自体移植或假肢移植(特别是皮肤、骨移植和或假牙或牙移植或类似的东西,还包括移植物供体部位);关节炎、膝关节炎、跟腱炎、肩袖的治疗;脉管炎、溃疡如糖尿病神经性溃疡或褥疮溃疡的治疗;放射性皮炎(例如,皮肤表皮样癌辐射治疗后)及瘘管闭合(如为自行车骑手所做)的治疗。

[0400] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗心脏疾患、心脏再生方面特别有用,例如,治疗心力衰竭、慢性心力衰竭、缺血性及非缺血性心力衰竭及心肌病。

[0401] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗尿失禁和/或肛门失禁方面特别有用。

[0402] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗回流性食管炎和/或胃食管反流病方面特别有用。

[0403] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗皮肤损伤和/或皮肤复新治疗方面特别有用,例如,辐射损伤(放射性皮炎或阳光灼伤皮肤)、老化皮肤或烧伤皮肤和/或面部皱纹、褶皱、痤疮(特别是皮肤磨削术治疗之后)、烧伤、风疹或小痘疤痕、白癜风、脂肪萎缩或脂肪代谢障碍、卡波济氏肉瘤、皮肤瘢痕或掌跖纤维瘤病。

[0404] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗脂肪萎缩方面特别有用,如HIV/AIDS患者脂肪萎缩及其他患者的面部先天性偏侧萎缩(如先天性鼻副软骨萎缩)。另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗骨头、软骨和关节疾病方面特别有用,如,软骨损伤、关节炎、软骨和/或骨头损伤(如深层软骨损伤和/或侵蚀和/或关节镜检查)、跟腱撕裂、及肩袖。

[0405] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗血液病如地中海贫血特别有用。

[0406] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗眼角膜基本方面特别有用,如,干眼症;眼角膜混浊,如化学烧伤引起的角膜混浊以及史蒂文斯-约翰逊综合征(又称口腔-粘膜-皮肤-眼综合征或多形性渗出性红斑症);眼角膜伤疤及眼角膜溃疡。

[0407] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗末梢神经损伤、神经缝合及脊髓方面特别有用。

[0408] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗I型糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病和/或高血糖症方面特别有用。

[0409] 另外,本发明的组合物、用途和方法在治疗骨质缺损或疾病方面特别有效,如,骨移植或骨裂。

[0410] 本发明所得的复合物的用途可在应用之前以及根据治疗目标做进一步修改。

[0411] 本发明组合物可以与骨填充材料一起使用,特别是可吸收的填充材料,如羟磷灰石(磷酸钙陶瓷,用作为生物材料)或不含矿物质的骨头,或者与骨头抽提物混合在骨头再生过程中使用,例如,在颅面和整形外科程序中使用。

[0412] 根据用途或疾病,本发明组合物可与10%透明质酸、20%透明质酸、30%透明质酸、40%透明质酸和/或50%透明质酸一起使用。

[0413] 本发明组合物可在整形手术包括烧伤移植和其他自由皮肤移植应用中用作为伤口封闭剂,例如,肿瘤治疗中皮肤再生,包括加速新血管形成。本发明组合物在皮肤移植供

体部位的伤口愈合治疗中特别有用。在健康皮肤上取下皮肤植片会在供体部位留下新的伤口,通常要12至14天才能自行愈合。然而,这种愈合对身体要求特别高,特别是当供体部位范围大或者当事人抵抗力弱(例如,烧伤受害者、有多种创伤的患者、用肾上腺皮质激素治疗的患者,少儿或老龄患者)以及新伤口流通损失引起的矿物质、微量元素及蛋白质损失甚至提高了能量损失时。另外,移植供体部位在前8天通常会出现疼痛。通常采取镇痛治疗,例如,使用止疼剂(例如吗啡)和/或囊水肿伤口敷料;然而,疼痛依然会持续,特别是在植片取下48小时至一周之内更换敷料时。另外,囊水肿伤口敷料的缺点是不仅非常昂贵,还会使伤口保持湿度,防止干燥、增加了伤口深度、有利于细菌感染,从而会导致难看的疤痕。因此,迫切需要刺激皮肤移植供体部位的愈合。

[0414] 本发明组合物特别适用于缺少足够血液循环的慢性伤口,可以加快伤口愈合一系列过程。

[0415] 本发明组合物和方法还可用于治疗牙周组织损失和/或损伤等牙周疾病,例如,其疗法包括将本发明组合物敷用在需要牙周组织再生的人或低等动物的牙周部位或腔体。

[0416] 本发明组合物能够有效消除或大大减少术后流血和在这些应用中浆液或其他流体外渗或损失,降低大多是细菌引起的感染风险和/或与自然愈合(即,没有使用外源性药剂)或通过使用已知方法制备的其他血小板浓缩液愈合相比能够增强结缔组织的形成。本发明组合物特别有用于制备促进和/或激发伤口愈合和/或组织再生的药物或制备促进皮肤再生,如消除皮肤皱纹,溃疡(特别是皮肤磨削术治疗后)、风疹或小痘疤痕、白癫风及脂肪萎缩的美容组合物(例如,抗衰老组合物和皮肤再生组合物)。

[0417] 本发明组合物可局部给药或注射在伤口或移植器官或移植器官附近或皮下注射。局部给药的方式多种多样,可以在损伤或缺损部位注射,在相应部位插入或附加固体载体,与乳膏或乳液混合,夹带在棉纸、纸或水凝胶载体中,直接局部涂敷本发明组合物,例如,以滴眼剂的形式。优选地,组合物为可注射的组合物。个体的给药方式和单剂或多剂的给药剂量随各种因素变化,包括药物动力学特性、患者病情和特点(性别、年龄、体重、将康状况、身高)、症状程度、并行治疗、治疗频率及期望效果。

[0418] 本发明组合物可以合并使用一种治疗组织再生有效的助剂如修复剂、一种皱纹填充剂、一种抗衰老剂如抗衰老复合维生素、一种抗菌剂、抗微生物剂、皮质甾类剂、镇痛剂及止疼剂、或麻醉剂如肾上腺素,等等。本发明包含与一种治疗组织再生有效的助剂合并的组合物,可在组织再生疗法如伤口愈合、骨头和牙周膜生长修复中同时、独立或顺序地使用。

[0419] 本发明组合物及本发明自体血小板浓缩液或细胞组合物的制备装置与程序在治疗中特别有用,特别是在止血系统中作为自体生物胶时,例如,在牙齿种植、皮肤和骨外科手术、软骨和跟腱手术、眼角膜和末梢神经再生以及心脏外科手术中,它能够加速组织再生的生物过程。本发明组合物及本发明自体血小板浓缩液或细胞组合物的制备装置与程序特别有用于美容用途,特别是作为自体复新材料用,例如,单独或与至少一种抗衰老剂混合作为皱纹、疤痕或脂肪缺损填充材料。

[0420] 本发明血小板浓缩液可与自体细胞抽提物制剂合并使用,例如,角质形成细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、骨外膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、骨膜过滤细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、角膜细胞、脐带细胞、跟腱细胞或胰岛细胞。角质形成细胞可通过Reinwald和

Green介绍的方法获得(1975,Cell,6(3):331-43)。上述提及的其他细胞可通过“Culture de cellules animales”(“méthologies-applications”,2003,Ed.Barlovatz-Meimom and Adolphe,INSERM editions,Paris)中介绍的方法获得。另外,细胞抽提物也可通过细胞库或细胞培养得到或通过下列例子中介绍的方法获得。

[0421] 实践已经证明本发明血小板浓缩液和细胞组合物在加速和/或促进伤口、甚至慢性久治不愈型伤口的愈合过程方面确实很有效,对于采用其他常规治疗数周都无效的伤口,能够成功实现伤口封口,降低感染风险,提高患者康复和舒适度,降低医疗成本,从美容上而言最终能够获得较好的治疗效果。

[0422] 当然,本发明组合物也可用几个可辨识的供体获得的血浆制备。本发明并不局限于自体生物材料,如从伤者自己的生物材料中采集浓缩血小板。本发明包含使用从一个或多个第三方获得的生物材料,所述一个或多个第三方并不一定非要是其伤口正在采用本文所述伤口修复剂组合物进行治疗的同一物种的患者,除非使用此等第三方生物材料会导致生物兼容性问题。在一个实施例中,本发明提供一种本文所述血小板浓缩液组合物或细胞组合物的制备工艺。

[0423] 在一个实施例中,本发明提供一种从全血中制备本文所述血小板浓缩液的装置。

[0424] 在另一个实施例中,本发明提供一种凝血酶血清和/或血小板浓缩液组合物的制备工艺,其中离心处理步骤以大约1500克至大约1700克离心处理大约3分钟至大约15分钟之间的一个时间,优选地,以1500克处理大约8分钟。

[0425] 在另一个实施例中,本发明提供一种血小板浓缩液组合物的制备工艺,其中,该管子具有一个引入所述全血的入口,其抽真空以便抽吸全血样本,无菌,具有大约8mL至10mL的可用真空,并且适用于离心处理。

[0426] 在另一个实施例中,本发明提供一种血小板浓缩液组合物制备工艺,其中,该管子为含有由聚合物混合物形成的高度触变胶体和无水柠檬酸钠(3.5mg/mL)的聚对苯二甲酸乙二醇酯管子。

[0427] 在另一个实施例中,本发明提供一种可从本发明工艺中获得的分离血小板浓缩液组合物。

[0428] 在另一个实施例中,本发明提供一种可从本发明工艺中获得的分离血小板浓缩液组合物,含有:

[0429] a) 血浆;

[0430] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板,优选地,浓度至少为 $350 \times 10^9$ 个细胞/升,更优选地,浓度至少为 $400 \times 10^9$ 个细胞/升;

[0431] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞,优选地,浓度至少为 $8 \times 10^9$ 个细胞/升;

[0432] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原;

[0433] 优选地,红细胞浓度低于 $0.4 \times 10^{12}$ 个细胞/升或 $0.5 \times 10^{12}$ 个细胞/升;

[0434] 另一方面,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物,含有:

[0435] a) 血浆;

[0436] b) 浓度至少为 $300 \times 10^9$ 个细胞/升的血小板,优选地,浓度至少为 $350 \times 10^9$ 个细胞/升,更优选地,浓度至少为 $400 \times 10^9$ 个细胞/升;

[0437] c) 浓度至少为 $7 \times 10^9$ 个细胞/升的白细胞,优选地,浓度至少为 $8 \times 10^9$ 个细胞/升;

[0438] d) 浓度至少为3mg/L的纤维蛋白原;

[0439] e) 本发明的凝血酶血清;以及

[0440] f) 可选地,自体细胞抽提物,例如,角质形成细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、骨外膜细胞、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞如成肌细胞和卫星细胞、骨膜过滤细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、前内皮细胞、角膜细胞、脐带细胞、跟腱细胞或胰岛细胞抽提物。

[0441] 优选地,凝血活化剂或凝血酶血清的体积比(血小板血浆:凝血活化剂)大约为10:1至10:3。

[0442] 优选地,所述细胞浓度约为每毫升血浆或富化血浆105至106个细胞。红细胞浓度低于 $0.4 \times 10^{12}$ 个细胞/升或 $0.5 \times 10^{12}$ 个细胞/升。

[0443] 在一个实施例中,本发明提供一种本文所述伤口或组织修复剂组合物的制备工艺。

[0444] 在一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物制备工艺,其中所混合的凝血活化剂是葡萄糖酸钙或10%的氯化钙。

[0445] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物制备工艺,其中,与血小板浓缩液(PRP)混合的凝血活化剂是凝血酶富化制剂,可以进一步与葡萄糖酸钙或氯化钙混合。美国专利6,472,162中介绍了一种用于生物胶的凝血酶制备方法,其中将8%至20%的乙醇添加至一定量的血浆中,该制剂可用作为本发明的凝血酶富化制剂。另外,自体凝血酶血清可用作为本发明的一种凝血酶富化制剂。本发明的备选自体凝血酶血清用包含下列步骤的工艺获得:(i)在用本发明分离管采集的患者的全血样(例如,8mL)中添加占最终体积10%的10%氯化钙和占最终体积10%的95%乙醇溶液制剂(例如,1mL)以及(ii)在室温下沉淀约30分钟。30分钟后,用大约1500克的力进行离心处理大约8至10分钟。在另一个较佳实施例中,凝血酶富化制剂和优选地本发明自体凝血酶血清与伤口的血小板浓缩液(PRP)直接混合。

[0446] 在另一个实施例中,本发明提供一种本发明伤口或组织修复剂组合物制备工艺,进一步包括一个步骤b'),其中,在步骤b)中获得的活化富血小板制剂组合物(将血小板浓缩液与凝血活化剂或自体凝血酶血清混合获得)可通过与被一软疏水层覆盖的伤口敷料接触进行部分脱水,以避免敷料中的微带感染,从而获得半固体胶体,该半固体胶体可采用相应的仪器操控,例如,可将其填入腔体或组织缺损部位,或者在等待自体细胞外基质重建时可用作为生长基质("支架")。获得的伤口或组织修复剂在伤口、组织或牙周缺损或腔体诱导牙周再生的方法中特别有用。

[0447] 在另一个实施例中,本发明的血小板浓缩液、伤口或组织修复剂组合物、细胞组合物可合并水凝胶诸如100%白蛋白Albugel(EP1543846)制剂或从白蛋白网状组织中获得的其他水凝胶以及其他化学复合物如聚乙二醇或任何其他成分,采用高度亲水的纸类载体与皮肤接触,直到富血小板血浆被吸收。

[0448] 添加钙离子会影响本发明的伤口或组织修复剂组合物的抗拉强度。因此,如果希望获得较强的伤口或组织修复剂组合物,可在血清与血小板浓缩液混合的时候添加钙离子。另外,可将钙离子直接引入血小板浓缩液,这样将分别形成伤口或组织修复剂组合物。

[0449] 如下面进一步详述,形成本发明伤口或组织修复剂组合物所需要的时期取决于添

加的血清量。血清与血小板浓缩液按1:4, 1:2和3:4的比例混合分别会在大约90秒、55秒和30秒左右形成伤口或组织修复剂组合物。另外, 优选地, 凝血酶在制备完成后的5个小时内使用; 优选地, 凝血酶在制备完成后2个小时内使用; 理想地, 凝血酶在制备完成后立即使用。因为常温下10天后凝血酶还有小, 凝血酶可在后期使用。另外, 血清可无限期冷藏或冷冻, 优选地, 在存储一个月之前使用。

[0450] 本发明伤口或组织修复剂组合物可用于封闭手术伤口, 方法是将适量的血小板浓缩液在其一开始变为胶体时立即敷至伤口。另外, 由于本发明伤口或组织修复剂组合物可单独用即将敷用该伤口或组织修复剂组合物患者的血成分进行制备, 因此造成患者患新型血液传染疾病的可能性为零。

[0451] 本发明的方法可进一步修改, 以便形成的伤口或组织修复剂组合物不仅可用作为止血剂, 还可用作伤口愈合的辅助药物以及传送具有其他生物活性的药物和蛋白质的基质。例如, 众所周知, 纤维蛋白胶具有很大的亲合力, 可将骨折片绑定在一起, 它在骨头重建方面非常有用, 如在整形外科手术或主要骨折修复中。因此, 为了保持本发明伤口或组织修复剂组合物的自体性质, 来自患者的自体骨头可以磨制成粉或类似的东西, 然后与本发明的血小板浓缩液混合。然后将含有凝血酶的血清与适量的血小板浓缩液和骨折片混合, 以便将获得的胶体敷用在想要其凝结的部位上。

[0452] 在所希望的本发明伤口或组织修复剂组合物要进一步用作为具有其他生物活性的药物和蛋白质输送设备的例子中, 本发明之方法可按如下所述进行修改。在将含有凝血酶血浆添加到血小板浓缩液之前, 也可将各种各样的含有其他生物活性的药物或蛋白质添加到血小板浓缩液中。在添加血清之前可添加到血小板浓缩液中的药剂例子包括但不限于止痛复合物、抗菌复合物(包括杀菌复合物和细菌抑制复合物)、抗生素(例如, 阿霉素、红霉素、庆大霉素、青霉素、托普霉素)、抗真菌复合物、消炎药、抗寄生复合物、抗病毒复合物、酶、酶抑制剂、糖蛋白、生长因子、重组药物(例如, 淋巴因子、细胞活素)、荷尔蒙、类固醇、糖皮质激素、免疫调制剂、免疫球蛋白、矿物质、神经松弛剂、蛋白质、肽、脂蛋白、杀肿瘤复合物、毒素及维生素(例如, 维生素A、维生素E、维生素B、维生素C、维生素D或其衍生物)。还预想到所选择的碎片、部分、衍生物或上述之部分或全部类似物均可使用。

[0453] 有许多用于测量及测定凝血及血液凝血相关的活动的不同医疗器械和测试方法。这些医疗器械和测试方法可用于辅助测定形成本发明伤口或组织修复剂组合物所需要的活化剂即凝血酶、血小板浓缩液和血浆的最佳配方。一些评估血液凝块和凝结的较为成功的技术是美国专利4,599,219 (Cooper等人)、美国专利4,752,449 (Jackson等人) 和美国专利5,174,961 (Smith) 所阐述的柱塞技术, 在此将其全部纳入本文, 以供参考。

[0454] 本发明的血浆浓缩液、PRP和组合物可与磷酸三钙(TCP)、透明质酸(HA)、壳聚糖、乳膏、乳膏膜、细胞抽提物、脂肪细胞、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶、和/或肉毒杆菌毒素混合。

[0455] 在一个实施例中, 本发明的血浆浓缩液或PRP组合物可与磷酸三钙(TCP)、透明质酸(HA)、壳聚糖、乳膏、乳膏膜、细胞抽提物、脂肪细胞、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶、和/或肉毒杆菌毒素混合。

[0456] 在一个实施例中, 优选地, 本发明的血浆浓缩液或PRP组合物可与磷酸三钙(TCP)、透明质酸(HA)、壳聚糖、乳膏、乳膏膜、细胞抽提物、脂肪细胞、润滑素、碳二亚胺衍生的明

胶、和/或肉毒杆菌毒素混合。

[0457] 在一个实施例中,优选地,本发明的血浆浓缩液或PRP组合物可与凝血酶优选为本发明凝血酶血清混合,并且可进一步与磷酸三钙(TCP)、透明质酸(HA)、壳聚糖、乳膏、乳膏膜、细胞抽提物、脂肪细胞、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶、和/或肉毒杆菌毒素混合。

[0458] 在一个实施例中,优选地,本发明的血浆浓缩液或PRP组合物可与凝血酶优选为本发明凝血酶血清混合,并且可进一步与细胞抽提物、磷酸三钙(TCP)、透明质酸(HA)、壳聚糖、乳膏、乳膏膜、其他细胞抽提物、脂肪细胞、润滑素、碳二亚胺衍生的明胶和/或肉毒杆菌毒素混合。

[0459] 采用柱塞技术测量和检查凝血或与凝血相关的活动的自动化装置通常包含一个柱塞传感器柱体或柱体和一个微处理器控制的、用于插装柱体的装置。该装置作用于柱体和在此放置的血样,以感应和检测与凝血相关的事件。该柱体包括多个测试单元,每个测试单元由一个管状的构件定义,该构件具有一个上反应室(柱体组件位于该反应室,并在该反应室进行分析测试)和一个包含试剂的试剂室。对于活化凝血时间(ACT)测试,例如,试剂包括激活血液凝结的活化试剂。一个塞子构件密封试剂室的底部。当测试开始时,试剂室的内容被迫进入反应室与流体样本,通常为人血或其组分,进行混合。作为该装置一部分的一个致动器提起并降下柱塞组件,因此使柱塞组件在反应室的流体池内往复运动。重力作用使该柱塞组件下降,并且由反应室中的流体的某个特性如其粘度对其进行抵抗。作为凝血相关的活动的开始或发生结果,当样品特性以预定的方式改变时,柱塞组件的下降率在此发生改变。当柱塞组件的下降率充分变化时,该装置就可以检测和指示与凝血相关的活动。

[0460] 本文所述的伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物、分离的细胞组合物、细胞制剂或细胞抽提物可与血小板浓缩液(PRP)混合。

[0461] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为角质形成细胞抽提物。

[0462] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为角质形成细胞自体抽提物。

[0463] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为骨骼肌细胞如肌肉祖细胞或卫星干细胞的抽提物。

[0464] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为成纤维细胞抽提物。

[0465] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为脂肪细胞、前成脂肪细胞、前内皮细胞和间叶干细胞抽提物。

[0466] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为软骨细胞抽提物。

[0467] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为干细胞如脐带干细胞抽提物。

[0468] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为跟腱细胞抽提物。

[0469] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为骨膜过滤细胞或牙龈细胞抽提物。

[0470] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为角膜细胞抽提物。

[0471] 在另一个实施例中,本发明提供了一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为骨髓细胞抽提物。

[0472] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为造骨细胞抽提物。

[0473] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为雪旺氏细胞抽提物。

[0474] 在另一个实施例中,本发明提供一种伤口或组织修复剂组合物、止血剂、细胞组合物或细胞制剂的制备工艺,其中细胞抽提物为胰岛细胞抽提物。

[0475] 在另一个实施例中,分离血小板浓缩液组合物、伤口或组织修复剂组合物、凝血酶富化血清、细胞抽提物、伤口或组织修复组合物、止血剂、细胞组合物和/或本发明细胞制剂为自体材料。

[0476] 另一方面,本发明提供一种适用于本发明组织再生的成套工具,其中该成套工具进一步包括含有葡萄糖酸钙、白蛋白、壳聚糖、乳膏、润滑素、TCP、乙醇(ETOH)和/或氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)的小瓶子、注射器托架、夹紧器和/或具有双出口的尖式敷药器。本发明自体凝血酶血清的使用的优点为伤口修复剂或PRP制剂的制备并不需要ETOH和CaCl<sub>2</sub>等添加剂。

[0477] 在另一个实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,其中步骤d)或e)中提供的细胞抽提物通过含有下列步骤的工艺获得:

[0478] (A) 在本发明血小板浓缩液中提供所述细胞;

[0479] (B) 可选地,培养这些细胞;以及

[0480] (C) 将步骤(B)中获得的培养细胞重新悬浮为本发明血小板浓缩液。

[0481] 在另一个实施例中,本发明提供本发明细胞组合物制备工艺,其中步骤(A)中的细胞扩增在本发明的血小板浓缩液中实施,例如,血小板最终浓度大约为培养基的5%至40%。

[0482] 在另一个实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物的制备工艺,其中细胞培养步骤(B)至少包含一个细胞接种步骤,例如在细胞培养基表面(如皮氏培养皿或培养瓶)接种细胞。

[0483] 在另一个实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,包括细胞培养步骤(B)之后至少有一个收获细胞的步骤。

[0484] 在另一实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,其中细胞培养步骤(B)在37℃上进行。

[0485] 在另一个实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,其中细胞培养步骤(B)在含有氧气或空气和二氧化碳的气流下进行,通常该气流包含95%的氧气或空气和5%的二氧化碳。

[0486] 在另一实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,其中细胞培养步骤(B)的持续时间为3到4周。

[0487] 在另一实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,其中在细胞培养步骤(B)中细胞培养基在培育期间要定期更换,通常每3天更换一次。

[0488] 在另一实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,其中细胞培养步骤(B)包括至少一个将细胞暴露于可见光下的暴露步骤,通常波长大约为633nm,暴露时间大约为10分钟。另一方面,可见光下的暴露步骤在细胞培育期间每周重复一次。

[0489] 在另一实施例中,本发明提供一种本发明细胞组合物制备工艺,其中细胞组合物为角质形成细胞或成纤维细胞,细胞培养步骤(B)包括至少一个将细胞暴露于可见光下的暴露步骤,通常波长大约为633nm,暴露时间大约为10分钟。另一方面,可见光下的暴露步骤在细胞培育期间每周重复一次。

[0490] 在另一个实施例中,本发明提供本发明细胞组合物制备工艺,其中细胞培养步骤(B)包括至少一个添加本发明稀释血小板浓缩液的步骤,如最终的血小板浓缩液大约为培养基体积的5%至40%。

[0491] 在另一个实施例中,本发明提供本发明细胞组合物制备工艺,其中细胞组合物是角质形成细胞或成纤维细胞组合物,细胞培养步骤(B)包括至少一个添加本发明稀释血小板浓缩液的步骤,如最终的血小板浓缩液大约为培养基体积的5%至40%。

[0492] 在另一个实施例中,本发明提供一种可从本发明工艺中获得的分离细胞组合物。

[0493] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为脂肪细胞组合物,如脂肪细胞组合物。

[0494] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为肌肉细胞组合物,如成肌细胞或卫星干细胞组合物。

[0495] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为角膜细胞组合物。

[0496] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为软骨细胞组合物,如软骨细胞组合物。

[0497] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为皮肤细胞组合物,如成纤维细胞或角质形成细胞组合物。

[0498] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为骨膜过滤细胞或牙龈细胞组合物。

[0499] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为跟腱细胞组合物。

[0500] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为干细胞组合物,如脐带干细胞组合物。

[0501] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为骨髓细胞组合物。

[0502] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为雪旺氏细胞组合物。

[0503] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为胰岛细胞组合物。

[0504] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中分离细胞组合物为成

骨细胞组合物。

[0505] 在另一个实施例中,本发明提供一种分离细胞组合物,其中细胞浓度为每毫升血浆或富化血浆大约 $3 \times 10^5$ 个细胞至 $3 \times 10^6$ 个细胞。

[0506] 在另一个实施例中,本发明提供如本文所述可促进人或低等动物伤口的伤口或组织封口和/或组织和/或骨头再生的组合物、方法和用途。

[0507] 在另一个实施例中,本发明提供了能促进哺乳动物优选为人的伤口或组织封口和/或组织和/或骨头再生的组合物、方法和用途。另一方面,本发明提供如本文所述可在患有牙周病或因其他疾患的哺乳动物的伤口或牙周缺损部位诱导牙周再生的组合物、方法和用途。

[0508] 另一方面,本发明提供一种在患有牙周病或因其他疾患的哺乳动物的伤口或牙周缺损部位诱导牙周再生的方法,其中所述哺乳动物为人。

[0509] 在另一个实施例中,本发明提供依照本发明在伤口或牙周缺损部位或腔体诱导牙周再生的方法,其中以半固体或生长基质的形式将所述治疗有效量的所述伤口或组织修复剂组合物敷用至所述伤口或所述牙周缺损部位或腔体,如Garg等人在《牙体植入学近讯》发表的论文中所述(请参阅“2000,Dental Implantology Update,11(6),41-44”)。

[0510] 在另一实施例中,本发明提供一种促进本文所述疤痕或皱纹处皮肤组织再生的方法。

[0511] 在另一实施例中,本发明提供一种依照本发明诱导心肌再生的方法,其中所述治疗有效量的本发明所述肌肉细胞组合物与血小板浓缩液 (PRP) 一起被注射入心肌,通常是注射入左心室心肌。注射可以为直接注射或多导管注射。若本文所述,成肌细胞或卫星细胞可以被离体制成去上皮和紫外线辐射的人体生物羊膜和生物复合材料复合体,作为本文所述的单层。然后将羊膜缝合到缺血性心外膜上,从而使干细胞在基本组织中重新培育,以便提高心室壁和肌细胞的收缩力。

[0512] 在另一实施例中,本发明提供一种依照本发明诱导心肌再生的方法,其中所述治疗有效量的本发明所述肌肉细胞组合物与血小板浓缩液 (PRP) 的混合物以及治疗有效量的本发明成纤维细胞组合物与血小板浓缩液 (PRP) 混合物一起被注射入心肌。在另一实施例中,本发明提供一种依照本发明诱导心肌再生的方法,其中所述治疗有效量的本发明所述肌肉细胞组合物与血小板浓缩液 (PRP) 一起以羊膜补片优选地被培育成本发明成肌细胞和卫星干细胞组合物的形式而应用到心室表面。

[0513] 在另一实施例中,本发明提供了一种依照本发明诱导角膜再生的方法,其中所述治疗有效量的本发明所述角膜细胞组合物与血小板浓缩液 (PRP) 一起以羊膜补片的形式,优选地散布在可溶解的接触镜片上,而应用到角膜组织。

[0514] 所述伤口、组织或疾病治疗方法可包括使用本文所述任何组合物,也可包括使用采用本文所述任何方法制成的任何组合物。

[0515] 本发明方法、设备和成套工具的优点是能够提供提供一种具有时效性且相对低成本地在单次操作中获得血小板浓缩液的方法,其易于实现且适合即时使用。本发明方法的优点是获得的富化制剂中的浓缩血小板产量很高,而且其中的红细胞含量很低。本发明组合物的优点是血小板含量高,红细胞含量低,在随后的体内治疗使用中能够完全保持其特性。更特别的是,血小板保持了在几天(或凝血细胞30天寿命)内释放组织再生需要的主要

生长因子(PDGF、TGF- $\beta$ 、IGF、VEGF和EGF)的能力。另外,就由自体血液制成的本发明组合物而言,本文所述的发明降低了与使用由从一个或多个第三方生物材料制成的治疗材料相关的疾病传染和免疫反应的风险。因此,本发明提供一种改良的生物伤口修复和组织再生材料,优选为自体材料,它能够促进组织再生,如皮肤、软骨和骨头再生,特别是能够促进愈合和/或复新。本发明的优点包括一种适于即时服务的改良伤口修复和组织再生材料的快速简便的制备方法,实践已经证明了它能够缩短愈合时间,减少疼痛,并降低医疗成本。另外,所述伤口修复和组织再生材料能够降低移植排斥风险,提供移植成功率。另外,使用所述改良伤口修复和组织再生材料最后留下的伤疤能够具有更佳的美容效果,并且能够长期填充伤疤和皱纹。

[0516] 通常,细胞抽提物由组织切片获得,其中最好在血小板浓缩液混合物制成的当天实施组织活检。切片的大小适于所需的治疗目的以及制备本发明细胞组合物使用的细胞类型。下列“例子”部分介绍了不同类型组织的切片例子。另一方面,本发明提供一种管子,包括至少一个将该管子分隔成两部分的滤网。

[0517] 另一方面,本发明提供一个被至少一个优选为一个滤网分隔成两部分的管子。

[0518] 在一个实施例中,管子用于采集和/或分离流体样本。

[0519] 优选地,这两部分的尺寸和/或直径不同。

[0520] 另一方面,本发明提供一种采集和分离流体样本的管子,包括:

[0521] i) 尺寸与直径不同的两个不同部分;

[0522] ii) 至少一个将这两部分隔离的滤网;以及

[0523] iii) 可选地,抗凝血剂。

[0524] 在本发明的一个较佳实施例中,管子由如图1~14所示的特征组成。

[0525] 在一个较佳实施例中,管子由环烯烃聚合物(COP)或环烯烃共聚物(COC)制成。

[0526] 在一个实施例中,管子含有抗凝血剂,优选地为柠檬酸钠缓冲液或无水柠檬酸钠。

[0527] 在一个较佳实施例中,管子含有0.10M柠檬酸钠缓冲液或3.5mg/mL无水柠檬酸钠。

[0528] 在一个较佳实施例中,滤网固定在管子上。优选地,滤网垂直延长,以便具有延长的与管子接触的表面(沿管子的纵轴延长)。其优点是能够提高滤网的稳定性,进一步防止滤网移动。在一个较佳实施例中,管子包括一个两层滤网。优选地,滤网的两层重叠(一层重叠在另一层上;图4、图10至图14。)优选地,滤网外层垂直延长,以便具有延长的与管子接触的表面(沿管子的纵轴延长,图2、图3和图5A)。优选地,滤网内存也进行延长,以便与滤网外层对齐。在一个实施例中,滤网外层并未延长(仅限横轴)。在一个实施例中,管子包括2个、3个、4个、5个或更多的滤网。

[0529] 在一个较佳实施例中,位于管子的上部或顶部的管子第一部分的容积比位于管子下部或底部的第二部分大。在另一个较佳实施例中,含有滤网的管子的第一部分的容积为大约9.5立方厘米,第二部分的容积大约为3.5立方厘米(图5A)。

[0530] 在一个较佳实施例中,位于含有滤网的管子上部的管子第一部分占管子总容积的大约70%。在一个实施例中,位于含有滤网的管子上部的管子第一部分占管子总容积的大约51%、55%、60%、65%、68%、70%、73%、75%、80%、90%、95%或更多。在另一个较佳实施例中,位于管子下部的管子第二部分占管子总容积的大约30%。在一个实施例中,位于管子下部的管子第二部分占管子总容积的大约49%、45%、40%、35%、32%、30%、27%、

25%、20%、15%、10%、5%或更少。

[0531] 在一个较佳实施例中,管子总容积大约为13立方厘米(图5A)。

[0532] 在一个较佳实施例中,位于管子下部的管子第二部分的直径比位于管子上部的管子第一部分小。其优点是滤网可以在离心力或任何其他机械应力作用下保持停留在原位。

[0533] 在一个较佳实施例中,位于管子上部的管子第一部分的外径大约为15.5mm或15.4mm(图3)。在一个较佳实施例中,位于管子上部的管子第一部分的内径大约为13.32mm或13.31mm(图3)。

[0534] 在一个较佳实施例中,位于管子下部的管子第二部分的外径大约为13.7mm(图5A)。在一个较佳实施例中,位于管子下部的管子第二部分的内径大约为11.6mm。

[0535] 在一个较佳实施例中,一个两层滤网将管子的两部分隔。优选地,滤网的两层重叠(一层重叠在另一层上,图4、图10至图14)。

[0536] 图4和图7至图14所示为较佳滤网,优选地,滤网包括内层和外层(图10、图11和图13)。

[0537] 在一个较佳实施例中,滤网固定在管子上。在一个较佳实施例中,滤网并未固定在管子上。

[0538] 在一个实施例中,滤网包括多个带有开孔的对称部域系列,开孔的布置如图7A、图7B、图8和图9所示。优选地,滤网由4个对称部域系列组成,每系列2个部域,每个部域由一个开孔组成。对于朝向管子中心的第一个开孔部域,一个开孔的内部与另一个开孔的内部之间的距离大约为5.13mm(图4第4项)。对于朝向管子中心的第一个开孔部域,一个开孔的外部与另一个开孔的外部之间的距离大约为5.67mm(图4第3点)。对于朝向管子中心的第二个开孔部域,一个开孔的内部与另一个开孔的内部之间的距离大约为7.73mm(图4第2项)。对于朝向管子边界的第二个开孔部域,一个开孔的外部与另一个开孔的外部之间的距离大约为8.27mm(图4第1项)。在一个实施例中,每个开孔的距离大约为0.53mm或0.54mm(图9和图14第21项)。

[0539] 优选地,上层或内层由四个对称部域系列组成,每系列2个部域(图9、图13和图14),每个部域由数量合适、排列规则的漏斗组成(图13和图14)。优选地,每个漏斗底部的间隙或开孔的长度大约为0.27mm(图14第26项)。优选地,从漏斗一个端点至另一个端点之间的距离大约为1mm,对应于上层的厚度(图14第24项)。优选地,上层的厚度大约为1mm(图12第34项和图14第24项)。漏斗的数量取决于滤层的尺寸。优选地,漏斗在其底部包含一个封闭孔(图14第26项)。

[0540] 优选地,下层或外层由四个对称部域系列组成,每系列3个部域(图8、图13和图14),每个部域由数量合适、排列规则的梯形组成(图13和图14)。梯形的数量取决于滤层的尺寸。优选地,每个梯形相隔大约0.53mm(图14)。每个梯形底部长度大约为0.77mm(图14)。优选地,每个梯形的高度大约为0.5mm(图14)。优选地,下层的厚度大约为1mm(图12和图14)。

[0541] 优选地,上层和下层的部域总是交替布置。优选地,下层的第二梯形部域随后是上层的第一漏斗部域,上层的第一漏斗部域随后是下层的第二梯形部域,下层的第二梯形部域随后是上层的第二漏斗部域,上层的第二漏斗部域随后是下层的第三梯形部域(图4、图13和图14)。

[0542] 优选地,上层的每个漏斗的位置刚好使漏斗中心的延长线大约位于下层的两个梯形之间(图4、图13和图14)。更加优选地,上层的每个漏斗的位置刚好使漏斗中心的延长线刚好位于下层的两个梯形之间(图4、图13和图14)。优选地,梯形和漏斗连续交替。

[0543] 当本发明的管子进行离心处理时,在离心力的作用下,漏斗底部上的封闭孔(图14第26项)打开,使红细胞通过,红细胞被引导到两个梯形之间,最后到达管子的下部。一旦离心处理停止,漏斗的封闭孔将关闭,防止红细胞回流到管子上部。位于每个漏斗下方的下层梯形便于红细胞通过并抵达管子下部,并有助于防止红细胞回流。

[0544] 优选地,上层的容积大约为0.26立方厘米。优选地,下层的容积大约为0.29立方厘米。

[0545] 优选地,上层由聚丙烯(PP)制成。优选地,下层由热塑弹性体(TPE)制成。其他部件可根据本发明描述或业内人士所熟知的方法使用。

[0546] 优选地,滤网的中心为曲线型(图4以及图10至图13)。其优点是能够使全血呈运河状朝漏斗运动。优选地,漏斗的弯曲程度恰好能够使管子中心距离下层底座的长度大约为0.5mm(图12第36项)。

[0547] 优选地,下层的高度大约为8mm(图2和图10第14项)。优选地,下层的外径大约为12.74mm(图10第17项)。优选地,上层的内径大约为9.6mm(图10第16项)。优选地,从上层上部非弯曲面起算的层高大约为6mm(图10第9项)。优选地,从上层上部弯曲面起算的层高大约为5.5mm(图10第11项)。

[0548] 在本发明一个实施例中,管子只包括一个带漏斗的滤网。

[0549] 在本发明另一个实施例中,漏斗和/或梯形的数目可变。在本发明另一个实施例中,漏斗和/或梯形部域的数目可变。在本发明另一个实施例中,漏斗和/或梯形部域的对称系列的数目可变。在本发明另一个实施例中,管子包括两个对称系列的漏斗和/或梯形部域。

[0550] 本发明还包括一个管子,其中所有组件的长度与在此描述的组件的长度不同。本发明还包括一个管子,其中所有组件的长度与在此描述的组件的长度不同,长度大约为0.1mm、0.2mm、0.3mm、0.5mm、1mm、1.5mm、2mm、5mm、8mm、10mm、15mm、20mm、50mm、75mm、1cm、2cm、5cm、10cm或更长。

[0551] 在一个实施例中,滤网采用激光进行成形或造型。

[0552] 本发明的管子具有将高效力红细胞从血浆中分离出来的优点。与全血中红细胞的百分比相比,使用本发明的管子,可将血浆中红细胞的比率减少超过99%、98%、95%、93%、90%、85%、80%、75%、70%、65%或60%。

[0553] 除了能够节约成本并且是一种坚硬的高强度医用材料外,COC或COP还具有其自然状态下的透明度类似于玻璃这一优点。典型的COC材料的模数比高密度聚乙烯(HDPE或PEHD,一种由石油制成的聚乙烯热塑性塑料)和聚丙烯(PP,一种热塑性聚合物)。COC还为透明的聚合物提供高水分屏障以及具有低吸水率。在医学应用中,我们注意到COC是一种具有低可提取物的高纯度产品。COC还是一种无卤产品。

[0554] COC材料具有极佳的光学清晰度和高效的水蒸气屏障。它将优良特性与高保真度融为一体,能够抵御所有常见的杀菌方法并抵制水解和范围广泛的化学品。

[0555] COC材料还具有很好的抗热性,机械特性、硬度、尺寸稳定性以及电绝缘特性。因为

它具有极低的可提取物,并且具有极佳的体内及离体生物兼容性,它满足USP VI级和ISO 10993要求,而且已经能够收到了美国食品与药品管理局(FDA)药物与设备管理档案编号。

[0556] 另外,因其透明度、硬度、重量轻、耐热和耐化学品、生物兼容性、对水分屏障的尺寸稳定性(低透湿性)、模压性能以及无卤,使用COC具有很多优点。与玻璃相比,它能够减少设备和包装破裂现象,延长药物保质期,可在紫外线波长下获取诊断读数,并可支持制造更小、更快的诊断设备。另外,COC可耐受伽玛辐射、蒸汽和氧化乙烯杀菌,因此可采用所有常见的杀菌方法杀菌。

[0557] 另一方面,本发明提供一种图15所示的血袋系统或采血管装置。

[0558] 本发明血袋系统或采血管装置中采集和/或储存的血液可用于本发明的任何工艺、组合物、产品和用途。

[0559] 血液采集管子或袋子可排空和/或密封。血液采集管子或袋子可充满触变胶体和/或抗凝血剂。

[0560] 本发明血袋系统或采血管装置包含一个多通道采血器,可将血浆和细胞组分输送至多个袋子或管子中。

[0561] 另一方面,本发明提供一种血袋系统或采血管装置,含有一支与多导管接头连接的单入口导管,接头导管与至少两个袋子或管子连接,其中多导管接头的每个接头导管都与单个袋子或管子连接。

[0562] 另一方面,本发明提供一种血袋系统或采血管装置,包括:

[0563] a) 一个单入口导管;

[0564] b) 一个具有多个接头导管的多导管接头;以及

[0565] c) 至少两个袋子或管子。

[0566] 其中单入口导管与多导管接头连接,其中多导管接头的每个接头导管都与单个袋子或管子连接。

[0567] 在一个实施例中,本发明提供用于存放血成分的本发明血袋系统或采血管装置。

[0568] 优选地,血袋系统或采血管装置包含一个入口导管(1)、一个多导管接头(2)、接头导管(3)和至少两个袋子或管子(4),如图15所示。

[0569] 在一个实施例中,血袋系统或采血管装置进一步包含一个或多个固定装置(5),如图15所示。优选地,为每根接头导管提供一个固定装置。在一个实施例中,为每根接头导管提供两个或多个固定装置。

[0570] 优选地,血袋系统的每个血袋或采血管装置进一步包括一个盖子。图15显示了一个血袋系统或采血管装置,其中每个血袋(4)都包含一个盖子(6)。优选地,盖子可以松开或旋开,以便与无菌注射器连接。盖子的优点是便于在无菌条件下吸入袋子的内容物。在一个实施例中,可使用一次性螺口注射器。另外,可使用针取代盖子。

[0571] 优选地,入口导管和接头导管是弹性的。优选地,入口导管和接头导管是管状的。

[0572] 在一个实施例中,血袋系统或采血管装置包括2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、12个、14个、16个、18个、20个或更多个袋子或管子。优选地,血袋系统或采血管装置包含8个袋子或管子。

[0573] 优选地,本发明提供一次性袋子或管子。

[0574] 在一个实施例中,每个袋子含有大约1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL、9mL、

10mL、11mL、12mL、14mL、16mL、18mL、20mL、25mL、30mL或更多的血液。优选地，每个袋子含有大约10mL血液。优选地，每个袋子的容积适于单次使用。优选地，每个袋子中采集的血液量足够供单次使用。

[0575] 优选地，血袋系统或采血管装置提供密封的流传送。更加优选地，血袋系统或采血管装置提供密封的无菌流传送。

[0576] 优选地，每个袋子或管子一旦充满都可分别密封。其优点是具有单独的、随时可用的单个一次性袋子或管子。

[0577] 优选地，每个袋子都经过一个抽真空步骤。优选地，血袋系统或采血管装置经过一个抽真空步骤。

[0578] 在一个较佳实施例中，每个袋子都插入到另一个保护物或外封中。其优点是提供符合ISO包装标准 (ISO11607-1和/或ISO11607-2) 的双重保护。

[0579] 优选地，每个袋子在抽真空后均插入到第二个外封中。优选地，第二个外封经过抽真空和密封。杀菌、抽真空步骤以及双重保护使袋子或管子的使用非常安全。

[0580] 在一个实施例中，流体流可通过常规阀门装置进行控制，如关断塞、可拆卸塞或滑动夹。

[0581] 血袋或管子系统可以是由血液兼容的、弹性的、半透明的、可杀菌的塑料材料制成的常规结构。塑料可以为聚氯乙烯、聚酯、聚烯烃、聚亚安酯等，也可包括上述材料的混合物。入口导管和/或接头导管可由与血袋或管子塑料材料相同或不同的塑料材料制成。

[0582] 在一个实施例中，过滤装置可与本发明血袋系统或采血管装置集成为一体。过滤装置可包括一个由刚性聚氯乙烯或类似材料制成的外壳和管配件。过滤装置可以充满过滤介质，如，原棉、醋酸纤维素或合成纤维 (如聚酯、聚酰胺等)。过滤介质的量取决于要过滤的红细胞的量。通常，每200mL至250mL的红细胞浓缩液需要采用20克至50克的过滤介质。

[0583] 在一个实施例中，添加了添加液，以延长红细胞的保质期。例如，这种添加液可以是常规的红细胞储存液，每200mL至250mL红细胞浓缩液大约50mL至100mL，如在下列文献中所描述：“Ginzburg et al., Bibl. Haematol., 1971, No. 3, Pt. 2, 217-220; Wood et al., Blood, Vol. 42, No. 1, 1973, 17-25; Beutler, “The Red Cell in Vitro”, Grum and Stratton, New York, N.Y., 1974, p. 201; Lovric et al., Medical Journal of Australia, Vol. 2, 183-186, 1977; U.S. Pat. No. 4,267,269”。

[0584] 在一个实施例中，本发明血袋系统或采血管装置的袋子或管子可含有抗凝血剂，如，腺嘌呤-枸橼酸-葡萄糖 (ACD)、枸橼酸盐-磷酸盐-葡萄糖 (CPD)、枸橼酸-磷酸-葡萄糖-葡萄糖 (CP2D)、CPD加腺嘌呤、或其他常规抗凝血剂，采集的血将与这些抗凝血剂混合。然后，可以对采集的血液直接处理，并通常在4℃至6℃条件下储存。在处理过程中，可按照行业惯例对血袋系统进行离心处理，以便使血液中的红细胞在袋子底部沉淀。血浆用新鲜血浆和血小板浓缩液制备的常规技术进行表达。

[0585] 袋子或管子中含有的血液可用于本发明的任何方面和/或实施例。

[0586] 血袋系统或采血管装置易于制造和生产，在医药行业用途非常广泛。通过利用本发明，血液采集更容易，更安全、更高效。优选地，本发明提供更简便的可追溯性。优选地，本发明提供一种血袋系统或采血管装置或包含该血袋系统或采血管装置和/或成套工具和/或装置，使任何血成分的采集、储存和运送都很容易、快速和安全。另一个优点是，血成分的

采集、储存和运送在符合ISO标准的无菌条件下进行。另一个优点是,该血袋系统或采血管装置和/或成套工具和/或装置特别适合就地医疗使用。

[0587] 优选地,血成分的采集、储存和运送在无菌条件下进行。

[0588] 在另一实施例中,提供一个阀门,该阀门可为一次性阀门,采用丙烯酸树脂等材料制成。

[0589] 另一方面,本发明提供一种包括至少一个本发明血袋系统或采血管装置的无菌的成套工具和/或装置。存放血成分所要求的所有装置均包含在无菌的成套工具中,使血成分的存放安全、经济。

[0590] 本发明血袋系统或采血管装置和/或成套工具和/或装置提供的血液可用于制备凝血酶、富血小板血清、血小板浓缩液、细胞抽提物、细胞组合物、伤口修复剂和/或组织修复剂或止血剂或生物胶体,无论是否根据本文所述的任何方面和/或实施例。

[0591] 本发明血袋系统或采血管装置和/或成套工具和/或设备提供的血液可用于本文所述的所有应用。例如,本发明血袋系统或采血管装置和/或成套工具和/或设备提供的血液可用于手术、门诊或慢性伤口。

[0592] 本发明血袋系统或采血管装置和/或成套工具和/或设备提供的血液可用于同源或自体成分。

[0593] 当用作为同源成分时,本发明血袋系统或采血管装置和/或成套工具和/或装置提供的血液和/或血成分是已知系统的优选、高效、简便和低成本替代品。其在不可能采集自体血时采用。

[0594] 下面将通过参考附图所示的实施例来更详细地描述用来阐明本发明的例子。

[0595] 例子

[0596] 下列缩写词分别具有如下定义:

[0597] ATS:自体凝血酶血清;BU:Baxothrobin单元;DMEM:必需基本培养基;DMSO:二甲亚砜;EC:富化血块;FCS:胎牛血清;HT:愈合时间;IU:国际单位;PBS:磷酸盐缓冲盐水;PET:聚对苯二甲酸乙二醇酯;PRP:富血小板血清;PPP:贫血小板血清;USP:美国药典;cm厘米;dL:1/10公升;g:克;Gy:戈瑞;J:焦耳;L:升;min:分钟;mm:毫米;M:摩尔;mL:毫升;nm:纳米;rpm:转速;Vol:容积。

[0598] 常用程序和条件

[0599] 为了确定本发明组合物在促进伤口愈合和/或骨头和/或组织再生方面的疗效,我们做了下列试验。用本发明的分离管采集人的全血样。例如,可使用的管子可以是大约为10mL至15mL的玻璃管(直径为16mm,长度为120mm至130mm),含有2mL至3mL聚酯型触变胶体以及1mL柠檬酸钠缓冲液(0.10M),并含有)并具有0.8mL至10mL可用真空。该管子构成制备本发明血小板浓缩液组合物的可立即使用的装置。

[0600] 可使用的管子的另一个例子是大约为10mL的聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)管子,含有2mL由聚合物混合物和柠檬酸钠缓冲液(0.10M)组成的触变胶体,并具有0.8mL至10mL可用真空,该管子构成制备本发明血小板浓缩液的可立即使用的装置。可使用的管子的另一个例子为本发明管子。这些管子充满两种成分、抽真空、用辐射方法杀菌(如ISO 11137、UNI EN ISO 11737-2、UNI EN 552、UNI EN 556中所规定),并采用传统的盖子密封,例如,用于玻璃管的溴丁基常规橡胶塞和具有保护操作员安全的聚乙烯盖的氯化丁基塞。然后用

离心机采用为或大约为1500克直至为或大约2000克的力对管子离心处理大约3至10分钟,即转速为或大约为2500转/分钟直至为或大约为3800转/分钟,该离心机具有一个摆动转子,转子半径为14cm。如果使用的离心机具有一个固定角度大约为45度的转子,则离心处理时间应为5到约15分钟。另外,也可依照本发明对管子进行离心处理。

[0601] 离心处理后,采集血小板浓缩液,以用于本发明治疗或美容应用或用于制备进一步的组合物,该组合物含有通过与诸如细胞抽提物优选为自体细胞抽提物(例如角质形成细胞、成纤维细胞、骨髓细胞、成骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、角膜细胞、雪旺氏细胞、脂肪细胞、脐带干细胞、跟腱细胞、胰岛细胞、韧带及牙龈细胞、骨膜细胞)和/或骨头替代品和/或凝血活化剂混合获得的血小板浓缩液。

[0602] 本发明的血浆浓缩液、PRP和组合物可与磷酸三钙(TCP)、透明质酸(HA)、壳聚糖、乳膏、乳膏膜、细胞抽提物、脂肪细胞、润滑素、CD明胶、和/或肉毒杆菌毒素混合。

[0603] 为了制备本发明细胞组合物,细胞根据如下通用协议进行制备:

[0604] a) 活体切片

[0605] 相应组织的活体切片通过在无菌条件下采用适于将要采集的特定细胞的标准方法获得。可通过洗涤、离心处理或沉淀净化细胞。可通过离心处理和酶消化法(胰蛋白酶、胶原酶或重组胰蛋白酶)分离细胞。细胞可以立即使用或可选地在按如下所述离体培养和细胞增殖之后使用。

[0606] b) 离体培养和细胞增殖

[0607] 用于制备细胞组合物的细胞,如角质形成细胞、骨髓细胞、成纤维细胞、骨外膜或角膜细胞(如角膜缘干细胞)、黑素细胞、朗汉斯巨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞(如成肌细胞和卫星细胞)、成骨细胞、软骨细胞、脐带细胞、雪旺氏细胞、间叶干细胞(MSC)、前成脂肪细胞、内皮前体细胞、跟腱细胞或胰腺细胞,采用传统方法在涂有血小板浓缩液,优选为用纤维连接蛋白富化的自体血小板浓缩液的细胞培养板(如皮氏培养皿或培养瓶)上的细胞载体基质(如EMEM或Ham's)中进行扩增。有优势的是,使用浓度大约为5%至20%的本发明的血小板浓缩液或PRP时不需要使用细胞载体基质,如DMEM或Ham's。另外,有优势的是,这可使细胞制剂增效20%。细胞制剂最终可用纤维连接蛋白进行富化。如果是角质形成细胞,优选地可采用DMEM对培养基进行富化。对于成骨细胞、软骨细胞和成肌细胞等细胞,例如,在细胞接种前在有胶原酶或胰蛋白酶情况下,需要相应组织的酶消化。温度为37℃时在由95%的氧气或空气和5%的二氧化碳组成的气流中进行细胞培育。

[0608] 通常,细胞培育时间从10分钟到20分钟不等。最后细胞扩增可通过光线疗法(例如,在培育期间以2J/cm<sup>2</sup>的能量在波长为633nm的光线下暴露大约10分钟,每周一次)增强(例如,培育成肌细胞、成纤维细胞和软骨细胞时)。

[0609] 外植体可采用气液界面培养(air-lifting)技术("Molnar et al., 1996, Tissue & Cell, 28:547-556")和气界面培养法("Meller et al, 2002, Br. J. Ophth., 86, 463-471")在皮氏培养皿或培养瓶中培养,一般的外植体暴露于空气中。在细胞培育期间,培养基要定期更换,例如,每3天更换一次。例如,可为成肌细胞、成纤维细胞和软骨细胞在2D模式下获得细胞扩增(如平面单层)。例如,通过在培养基中添加本发明稀释自体血小板浓缩液组合物(血浆或富化血浆的体积大约为5%至40%)可为角膜细胞、成肌细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和角质形成细胞获得3D细胞生长模式。通常,在细胞培育期间,可以添加2到3次本发明的

稀释自体血小板浓缩液组合物。然后获得的3D生物支架可增强对自体干细胞转移有用的细胞外基质。

[0610] 细胞培育后,可使用温和的胰蛋白酶消化将细胞从培养器皿中释放出来,胰蛋白酶消化可转移细胞,并使细胞可以丸粒化。另外,细胞可培养为热感应细胞,可通过加热释放细胞(可使用由热感应聚合物涂敷的皮氏培养皿)。

[0611] c) 细胞治疗和安全检查

[0612] 可通过显微镜细胞计数、流式细胞计数器计数和采用标准技术对组织标志进行免疫化学测试等方法检测由此获得的细胞制剂的细胞活力。还可以在由胰蛋白酶释放细胞之后立即通过台盼蓝测试细胞活力。还可通过微生物学化验检查细胞制剂的安全性,以排除病毒或细菌污染,并避免人畜共患病感染的转移。避免使用胎牛血清,以防止疯牛病的传播。

[0613] d) 细胞制剂的给药方式

[0614] 最终采用上述方法获得的细胞制剂被放在本发明自体血小板浓缩液组合物中,在交付患者之前作为细胞运送的载体。然后将采用上述方法获得的细胞制剂注射或移植到患者身上。注射或移植方式必须适应本发明细胞制剂中含有的细胞类型和想要达到的治疗或美容效果。在下列例子中对本发明细胞组合物的制备方法和使用予以详述,更具体地根据细胞类型和想要达到的治疗或美容效果而言。

[0615] 本发明角质形成细胞或成纤维细胞制剂可在如上所述细胞采集或培养后轻而易举地使用。然而,本发明细胞制剂可在如上所述行细胞培养后进行制备。

[0616] 与在没有使用本发明自体血小板浓缩液组合物的培养基中制备的细胞相比,本发明细胞制剂具有更好的活力和稳定性(包括细胞特性得以完整保留,如,合成蛋白和传送生长因子的能力)。另外,如此所得的细胞增殖得到强化:与控制培养基和血清饥饿培养基相比,细胞生长速度加快(大约快2至5天),密度更大。本发明细胞组合物制备工艺的优点在于相同的自体培养基被用作为细胞培养、细胞保存和细胞注射的载体和细胞生物刺激和组织再生的载体。

[0617] 例子1:本发明自体血小板浓缩液与自体凝血酶富化血清混合后的治疗应用

[0618] 依照本发明制备即将用作为凝血酶富化制剂的自体凝血酶血清。

[0619] 本工艺的一个独创性在于可同时制备分别含有自体凝血酶血清制剂和血小板浓缩液制剂的分离管。用于制备自体凝血酶血清(ATS)的玻璃管的离心处理时间大约为8分钟至10分钟。用于制备血浆浓缩液和或PRP组合物的塑料管(COC或COP)或玻璃管的离心处理时间大约为8分钟至10分钟。因此,优选地,ATS和PRP组合物大约同时可供使用。

[0620] 为了只在伤口上敷用富血小板制剂的同时将纤维蛋白原聚合成纤维蛋白网(在凝血过程中发生),同时在伤口上敷用血小板浓缩液组合物和自体凝血酶血清(凝血活化剂),两者的容积比例大约为10:1、10:3至10:10(浓缩液与凝血活化剂之比)。比例不同,胶体效应的凝血速度不一样。

[0621] 例如,通过使用含有两个注射器的设备(如,用于注射血小板浓缩液组合物的10mL注射器和用于注射凝血酶血清的1mL或3mL注射器)可实现两种制剂的同时传送,可同时释放两种制剂,因此在与伤口接触时制剂将混合并聚合。

[0622] 例子2:本发明自体血小板浓缩液在美容上的使用

[0623] 本发明自体血小板浓缩液在美容上的用途包括：

[0624] 在将其敷用在伤口之前、手术之后或敷用在健康皮肤上，将本发明血小板浓缩液与乳膏，优选为乳状液，进行混合。在吸收过程中，血小板制剂被乳膏或乳状液载入皮肤，以放大水合效果并对皮肤再生或复新进行生物刺激。可以通过采用手工或无针装置反复注射的中胚层疗法技术，注射到外胚层中。还可以在皱纹处进行皮下注射，以进行容积矫正。为了实现填充效应和/或获得一致的容积矫正效果，可在皱纹、前额、面颊、后牙区、脸颊、下巴脖子和/或胸部注射按10:1或10:3之比混合的血小板浓缩液与自体凝血酶血清混合物。在适当的时候，为了实现重要的面部容积矫正，可在皮下注射按10:10之比混合的血浆浓缩液与新鲜抽吸脂肪组织混合物。在适当的时候，为了实现重要的胸部或形体容积矫正，可按10:3或10:2之比将血浆浓缩液与新鲜抽吸脂肪组织混合进行皮下注射。

[0625] 使用诸如100%白蛋白Albugel (EP1543846) 制剂水凝胶或从白蛋白及其他化学复合物如聚乙二醇或任何其他成分网状组织获得水凝胶，采用基于纸的高度亲水载体与皮肤接触，直到富血小板血浆被吸收。

[0626] 本发明包括下列化疗注射方法：

[0627] -乳突真皮层注射；

[0628] -网状真皮层皮下注射；或

[0629] -骨膜上方的深层注射。

[0630] 可单独使用血浆、血浆加脂肪组织和/或血浆加磷酸三钙进行三级注射（也被称为“医疗整容”）。

[0631] 例子3：自体肌肉细胞组合制剂

[0632] 本发明自体细胞组合的例子可采用本发明工艺制备，其中，骨骼肌细胞（肌肉祖细胞或卫星干细胞）在步骤(d) 或(e) 中提供。

[0633] a) 成肌组干细胞

[0634] 骨骼肌活体切片从股外侧肌获得，尺寸为7X 3cm。肌肉在活体切片前一天准备好，在拟定的活体切片部位（股外侧肌上方大腿侧面10X15cm皮肤区域，膝关节略微往上一，任意一侧）用地卡特隆和麻卡因（长效利多卡因）进行肌内注射。将肌肉切成小方块，然后用胶原酶、链霉蛋白酶和胰蛋白酶（Worthington）的混合物进行酶消化。肌肉外植体接种在涂敷了自体血小板浓缩液组合物的皮氏培养皿上，并在37℃时在由95%的氧气和5%的二氧化碳组成的气流中培育3到4周。结蛋白或D-56表达被用作成肌细胞标志，以便从成纤维细胞中识别出成肌细胞。图3所示为3D模式下的成肌细胞祖细胞增殖。在细胞培养过程中，可以2J/平方厘米的能量在633nm波长中暴露于光中10分钟，以增强细胞增殖。在移植的当天（例如，细胞培育3至4周之后），可通过胰蛋白酶或本文所述任何方法释放骨骼肌细胞，并将其放入本发明自体血小板浓缩液组合物。可采用直接注射的方式将其注入心肌或者可用多导管注射的方式将其注入左心室心肌。本发明成肌细胞制剂用于治疗心脏疾患，如，心脏再生以及心力衰竭、慢性心力衰竭、缺血性与非缺血性心力衰竭及非缺血性心肌病的治疗。对于骨骼肌成肌细胞的受体，射血分数可提高9%。

[0635] 上述细胞制剂也可用于治疗尿失禁（将按上述方法制备的成肌细胞抽提物注射入膀胱颈部）、回流性食管炎、胃食道逆流疾病（将按上述方法制备的成肌细胞抽提物注射入食管下端括约肌）和肛门失禁（将按上述方法制备的成肌细胞抽提物注射入肛门周围）。

[0636] 另外,可制备成纤维细胞和成肌细胞混合物(成纤维细胞存在于肌肉活体切片中并与肌管和卫星干细胞一起从肌束膜上抽芽)。在治疗心脏疾患时,将成纤维细胞制剂和成肌细胞制剂(按上述方法获得)按成纤维细胞/成肌细胞大约成30:70之比混合的混合物插入心肌。

[0637] 对于膀胱颈部失禁,在按上述方法培养成肌细胞的同时也进行单独的成纤维细胞培养,然后在超声控制下,将成纤维细胞制剂注射入尿道旁边,将成肌细胞注射入横纹括约肌。

[0638] b) 卫星干细胞

[0639] 成肌细胞和卫星干细胞在本发明自体血小板浓缩液组合物中进行离体培养。在原代培养7天之后观察细胞增殖的致敏情况。

[0640] 在细胞培育大约3至4周之后收获细胞,然后将细胞放入含有人去上皮羊膜补片4x4cm和本发明自体血小板浓缩液组组合物的培养基中(DMEM加5%至20%容积的本发明自体血小板浓缩液组合物)。另外,可使用活化的自体纤维蛋白聚合物补片。活化的自体纤维蛋白聚合物通过按血浆与葡萄糖酸钙之比约10:3或约10:10对血浆进行离心处理而制得。然后将制得物放在紫外线中辐射10分钟。在培育期间(通常约2至3周),细胞在羊膜复合体上扩散,形成单层。细胞活力和单层进度通过每周两次的补片边缘活体切片和单层厚度的组织学评估进行评估。

[0641] 移植当天(例如,细胞培育大约3至4周之后),心室表面散布有本发明自体血小板浓缩液组合物,然后将用上述方法获得的补片放置在缺血性心室的创面,有细胞的一面朝下,以便补片上的干细胞能够在注射入心肌之后能够充填缺血的节段。由羊膜保留细胞,羊膜为惰性,不会引发免疫反应。

[0642] 本发明卫星干细胞可作为心血管成形术的组织工程制剂,用于心脏再生和治疗心力衰竭。

[0643] 例子4:自体成纤维细胞组合制剂

[0644] 本发明自体成纤维细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,真皮成纤维细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0645] 真皮成纤维细胞根据下列程序分离和扩增。在活体切片前一个月,用维生素A处理准备好的供体皮肤部位(在腋前襞耳状部位后,例如,非太阳引起的老化部位),以活化真皮成纤维细胞。进行全厚度皮肤活体切片,尺寸为10X6mm,然后在显微镜下解剖,以除去所有上皮细胞。然后将上皮形成的活体切片(真皮)切成3x3mm的块,作为外植体。然后将乳突真皮放在上面,用气液界面培养技术(前述Molnar等人,1996年)和气界面培养法(前述Metier等人2002年)进行培养,将一半外植体暴露于空气。将外植体放在DMEM中接种(例如,每孔6个外植体),然后在37℃时将其放在皮氏培养皿或培养瓶中由95%的氧气和5%的二氧化碳组成的气流中进行培养。培养基每3天更换一次。在培育期间观察2D模式下(平面单层、静态生长)的成纤维细胞扩增。在细胞培育开始之后的7至9天,通过在培养基中添加稀释的5%至20%本发明自体血小板浓缩液组合物将细胞增殖和显型模式更改为3D:由自体血小板浓缩液组合物(0.2mL/孔)致敏的细胞刚好覆盖底部。然后细胞生长成3D成纤维蛋白胶基质。然后细胞分化,在纤维蛋白胶中形成生物支架或网。通过媒体在网格中计数测量细胞数量,以评估细胞凋亡:采用倒置显微镜(Olympus®)。

[0646] 在培育3至6周之后,可从纤维蛋白胶中收获细胞。可采用经典的台盼蓝方法和细菌性评估(包括病毒污染)测试细胞活力。将用上述方法获得的扩增成纤维细胞抽提物放在含有本发明自体血小板浓缩液组合物的注射器中,然后将该制剂注射入面部皱纹,更具体地,将其注射入皱纹下。必须在整个脸部注射,以覆盖前额、面颊、后牙区、脸颊、下巴和脖子。在细胞培养中,可通过将细胞暴露在波长为633nm的光下提高细胞扩增速度。本发明成纤维细胞制剂用于面部复新、改善面部皱纹和褶皱、治疗辐射损伤(放射性皮炎或阳光灼伤皮肤)、老化皮肤或烧伤皮肤和/或面部皱纹、褶皱、痤疮(特别是皮肤磨削术治疗之后)、烧伤、风疹或小痘疤痕、白癜风、脂肪萎缩或脂肪代谢障碍(如与艾滋病相关的脂肪代谢障碍)、卡波济氏肉瘤、皮肤瘢痕或掌跖纤维瘤病和/或皮肤复新治疗。

[0647] 例子5:自体脂肪组织和脂肪细胞组合制剂

[0648] 脂肪组织优选在下腹部抽吸,然后用PBS洗涤法进行净化,再进行离心处理,然后沉淀,以便将脂肪组织与甘油三酸酯和碎片分离。同时,采集血液,并进行离心处理,以制备本发明血浆浓缩液或PRP组合物。一旦甘油三酸酯减少,可通过使用抽吸PRP组合物的无菌转移装置在抽吸脂肪的注射器中将脂肪组织和PRP组合物混合。如果是供面部使用,血浆浓缩液与脂肪组织之比为10:10,如果是供胸部或造型使用,血浆浓缩液与脂肪组织之比为10:3。

[0649] 优选地,在两种浓缩细胞的最短制备时间内并在最短的细胞离体操控时间内立即注射。

[0650] 本发明自体细胞组合例子可采用本发明工艺制备,其中,例如,脂肪干细胞和间叶干细胞(MSC)在步骤(d)或(e)中提供。可用胶原酶(前成脂肪细胞、前内皮细胞)分离间叶干细胞(MSC),将其放入含PRP的悬浮液中,将该制剂注射,包括皮下注射、关节内注射,或用于矫形外科。该制剂可与浸泡脱细胞基质混合,直接敷用在伤口上,或者可在敷用前在实验室中培养。成体脂肪干细胞用标准培养方法在本发明5%至20%容积自体血小板浓缩液组合物中进行分离。然后采用敷药器将该制剂注射到患有组织缺损的患者身上,如外伤后缺损或四十岁左右患者与年龄相关的缺损。本发明脂肪细胞制剂用于治疗脂肪萎缩(如HIV/AIDS患者)及其他面部先天性偏侧萎缩。

[0651] 例子6:自体软骨细胞组合制剂

[0652] 本发明软骨细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,软骨细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0653] 将软骨与供体的膝盖(活体切片尺寸10x 5mm)分离,然后切块。软骨细胞在用本发明5%至20%稀释自体血小板浓缩液组合物富化的培养基中培养4至6周。然后用酶消化(胶原酶和链霉菌蛋白酶)释放软骨细胞。然后采用外科手术的方式将细胞制剂注入患有深层软骨缺损和损失的患者身上。

[0654] 本发明软骨细胞制剂用于治疗深层软骨损失和破损或关节镜检查。

[0655] 本发明软骨细胞制剂的另一个应用例子是用于鼻成形术,无需外科手术,而是采用单次注射程序:患有先天性鼻软骨萎缩的患者。

[0656] 在注射前一天,取软骨活体切片0.4x 0.4cm,然后将其放在充满DMEM和抗生素的无菌容器中。然后用包括胰蛋白酶和胶原酶在内的酶消化法处理活体切片。然后将释放的软骨细胞在本发明自体血小板浓缩液组合物中重新悬浮。患者首先进行局部麻醉和鼻子消

毒。然后将上述软骨细胞制剂注射到软骨表面和/或需要体积增大或垫高的部位的骨膜。在第二阶段,将本发明自体血小板浓缩液组合物注射到鼻子皮肤的浅部,以便生物刺激再生和皮肤复新。一小时后,注射完成,患者即可回家。我们观察到或细胞的额外恢复:恢复和注射的软骨细胞和血浆细胞的数量大约为109个细胞。因此,软骨细胞制剂有助于治疗鼻子软骨缺陷,不需要进行外科手术,只需要注射即可。

[0657] 例子7:自体脐带干细胞组合制剂

[0658] 本发明自体细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,脐带干细胞在步骤(d)或(e)中提供。将脐带干细胞分离出来,然后冷冻保存,用于治疗血液疾患。

[0659] 本发明脐带干细胞用于治疗血液系统疾病(如地中海贫血)。

[0660] 注射过程是干细胞在血浆浓缩液中的再悬浮过程,然后是再次注射。

[0661] 例子8:自体跟腱细胞组合制剂

[0662] 本发明跟腱细胞组合例子可采用本发明工艺制备,其中,跟腱细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0663] 根据本标准操作程序,将在本发明5%至20%容积的自体血小板浓缩液组合物中的跟腱成纤维细胞分离出来。在用本发明自体血小板浓缩液组合物富化的培养基中将跟腱成纤维细胞培养大约1至3周。在注射之前,在新鲜加工的血浆浓缩液中将细胞再悬浮。然后将该细胞制剂注射如患者的受伤部位(例如,跟腱撕裂、关节炎部位)。为了便于定位受损部位和植入溶液更好的移植,可采用扫描方式进行注射。

[0664] 也可以在肩袖边上注射跟腱成纤维细胞制剂:首先利用关节镜修复肩袖撕裂处,然后沿长导管将跟腱成纤维细胞制剂注射如缝合部位。这样有助于肩袖边缘跟腱成纤维细胞的愈合,防止肩峰下有限空间中出现血肿,并可通过加速愈合以及增强修复和关键运动预防冻肩。本发明跟腱细胞制剂用于治疗跟腱撕裂、创伤或上年龄引起的关节炎以及肩袖。

[0665] 例子9:自体韧带及牙龈细胞组合制剂

[0666] 本发明韧带及牙龈细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,骨膜及牙龈细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0667] 在全身麻醉和局部麻醉下,在无菌条件下从四条健康的母小猎犬下颌体颊侧获取骨膜(大约10x 10mm)。然后将获取的骨膜切成3x 3mm的切片。然后将该组织直接放置在6孔细胞培养板上,然后在37℃时,将该其放在采用本发明5%至20%自体血小板浓缩液组合物富化的培养基上并在由5%二氧化碳和95%空气组成的湿空气中进行培养(培养大约3至大约[β]周)。采用酶消化法分离骨膜和牙龈细胞,然后采用静态技术进行培养。

[0668] 通常,6周的培养就足以获得相应的可供移植的骨膜厚度。

[0669] 在再悬浮之后,将自体血小板浓缩液组合物和细胞制剂注射入患者受伤部位。

[0670] 例子10:自体角膜细胞组合制剂

[0671] 对于没有使用酶解液的细胞采集,如胶原酶或胰蛋白酶,在配备热敏涂层膜的皮氏培养皿中制备制剂。

[0672] 本发明自体细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,角膜细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0673] 从角膜边缘的内眦取活体切片,在覆有本发明自体血小板浓缩液组合物的皮氏培养皿或培养瓶中经过4周的培养,扩增角膜缘干细胞,以便在同一名患者身上做自体移植。

[0674] 在用本发明培养的活角膜角质形成细胞悬浮液种植该复合体之后,可采用离体方式将(缘源)角膜缘干细胞布放在单层去上皮人羊膜表面。大约有500,000个细胞用于种植,在进一步再培养大约3周之后,可将细胞覆盖具有细胞的复合体表面。在大约原代细胞培养3周之后对细胞进行工程加工,可能需要重新种植。最后得到的由胶原蛋白、羊膜纤维和角膜角质形成细胞组成的生物细胞—细胞复合材料复合体包括膜和细胞单层。本发明角膜细胞制剂可以散布在可溶解的接触镜片上,该接触镜片将被应用到受损角膜。接触镜片消失后,细胞封闭角膜缺损。本发明角膜细胞制剂可以滴眼剂的形式局部为患有干眼症的患者给药。另外,上述羊膜可单独用于受损角膜或者所述复合体和本发明细胞制剂可以粘附在生物或人工接触镜片内,然后又能够用于角膜,并用眼垫覆盖。

[0675] 另外,在应用之前,可将角膜细胞放在新鲜加工的血浆浓缩液中再悬浮。

[0676] 本发明角膜细胞制剂用于减轻干眼疼痛,治疗因酸和碱腐蚀烧伤导致的史提芬约翰逊综合征损伤和角膜色盲、角膜溃疡(如拗性神经营养、疱疹和免疫引起的角膜溃疡形成)。

[0677] 例子11:自体骨髓细胞组合制剂

[0678] 本发明自体细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,骨髓细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0679] 抽吸臀部骨髓,收获骨髓,然后在现成的设备上离心处理,制备骨髓浓缩液,以便分离红细胞。

[0680] 骨髓细胞制剂可单独使用或者混入本发明血小板浓缩液或者用葡萄糖酸钙再次离心处理,以形成可缝合膜,并用敷药器进行涂敷或注射至患者受伤部位。本发明骨髓细胞制剂用于治疗骨质缺损或软骨缺损。该骨髓细胞制剂可单独使用或者与本发明血浆浓缩液合并使用。软骨膜也可以与葡萄糖酸钙结合使用。

[0681] 例子12:自体雪旺氏细胞组合制剂

[0682] 本发明自体细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,雪旺氏细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0683] 在局部麻醉下,对下肢隐神经或腓肠神经做活体切片。将神经活体切片切成小块,在含有本发明自体血小板浓缩液组合物的皮氏培养皿中诱导原代培养。

[0684] 在3D模式下扩增单层,最后用酶消化法收获细胞,然后将其在注射器中新鲜收获的血小板浓缩液中再悬浮,以便局部渗滤手术暴露和损失的脊髓。培养的细胞包含髓磷脂。本发明雪旺氏细胞制剂用于治疗末梢神经损失、神经缝合和脊髓损伤。

[0685] 例子13:自体人胰岛细胞制剂

[0686] 本发明自体细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,胰岛细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0687] 通过切开式活体切片获取胰岛,然后用常规的酶消化法和聚蔗糖(Ficoll)和泛影葡胺(Hypaque)分离法(Page et al,2007,Diba.Vas.Dis.Res.,7-12)进行分离,然后在用本发明自体血小板浓缩液组合物富化的培养基中再悬浮。

[0688] 然后通过门静脉将胰岛细胞制剂注射入肝脏。

[0689] 本发明胰岛细胞制剂用于治疗I型糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病和逆转糖尿病多血糖症。

[0690] 例子14:自体人成骨细胞制剂

[0691] 本发明自体细胞组合的例子可采用本发明工艺制备,其中,成骨细胞在步骤(d)或(e)中提供。

[0692] 在局部麻醉下,从髂嵴或等效部位(上颌骨)打孔获取皮层骨活体切片。在无菌条件下,由富有骨头和成骨细胞离体培养经验之人士将骨头活体切片放在4℃的DMEM中或等效的输送基质中。然后将骨头活体切片切成小块,并在37℃时在层流净化罩中,将其放在10% I型胶原酶(Sigma或Boehringer)中消化和稀释大约15分钟。另外,也可使用胰蛋白酶消化法(Worthington)。4℃时,在10% DMEM中用本发明自体血小板浓缩液组合物清洗三次结束酶消化法。然后将该制剂进行离心处理,制丸并再悬浮。在本发明自体血小板浓缩液组合物中,用气液界面培养技术将骨片接种在皮氏培养皿或培养瓶中,作为外植体。该制剂在37℃,在由95%的空气和5%的二氧化碳组成的气流下用抗生素、庆大霉素和两性霉素B进行培养。培养基每周更换三次,每次在DMEM培养基中添加本发明10%至20%容积的自体血小板浓缩液组合物。细胞活力和形态学每周评估三次,以评估细胞蠕动、细胞凋亡和3D单层进展。用倒置显微镜(Olympus®)评估细胞微纤维的形成和分化。检查是否有细菌和病毒污染。可在新鲜收获的纤维蛋白多聚体膜(由含葡萄糖酸钙的血小板浓缩液离心处理获得,两者比例大约10:3或10:10)中制造成骨细胞。纤维蛋白多聚体具有缝合作用。在采用上述方法获得的100000个细胞进行膜种植后,可以将成骨细胞设计在人羊膜上,以创建细胞生物复合材料支架和细胞单层载体/复合体,让单层膜扩增3至4周,使得可形成独特的成骨细胞-羊膜-膜复合体,以使用和转移细胞,覆盖任何部位骨折不结合的骨质缺损或移植部位。另外,在注射/应用之前,也可将成骨细胞与信息的骨髓浓缩液和血小板浓缩液混合,然后在需要软质凝胶时,可进一步将其与自体凝血酶血清混合。

[0693] 本发明成骨细胞制剂可用于治疗骨质缺损、骨移植或骨疾病。

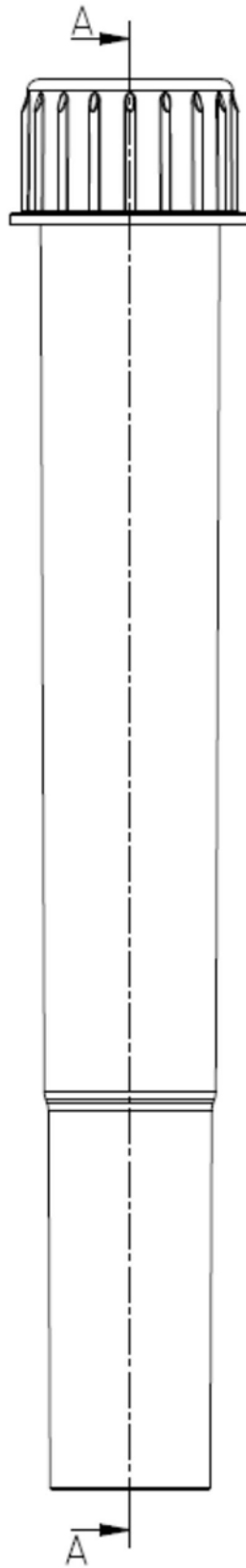


图1A

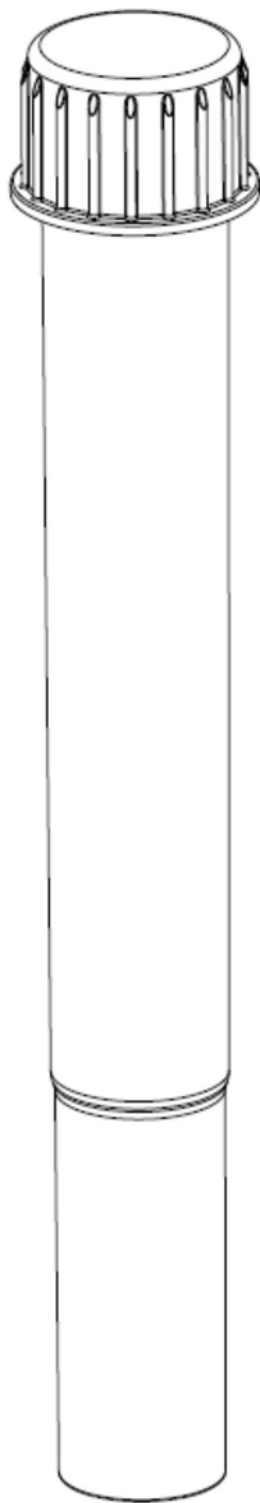


图1B

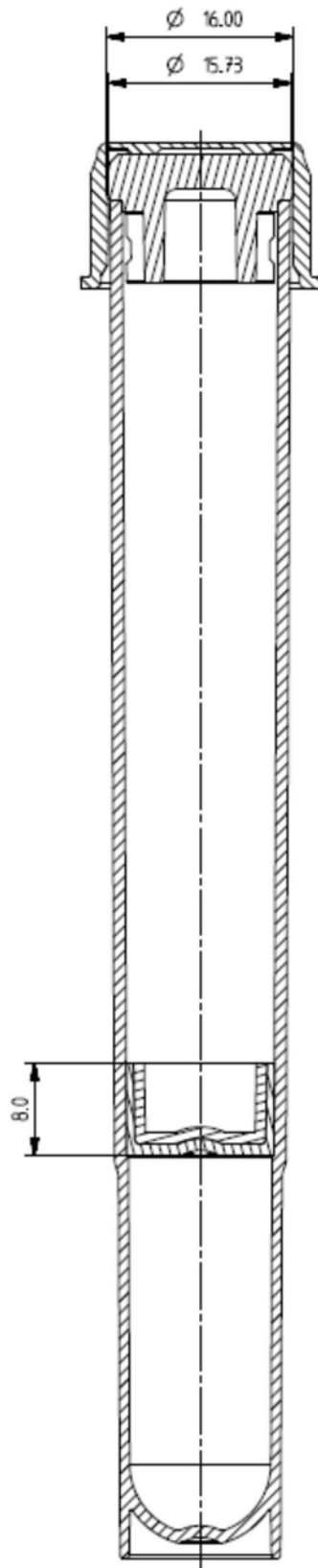


图2

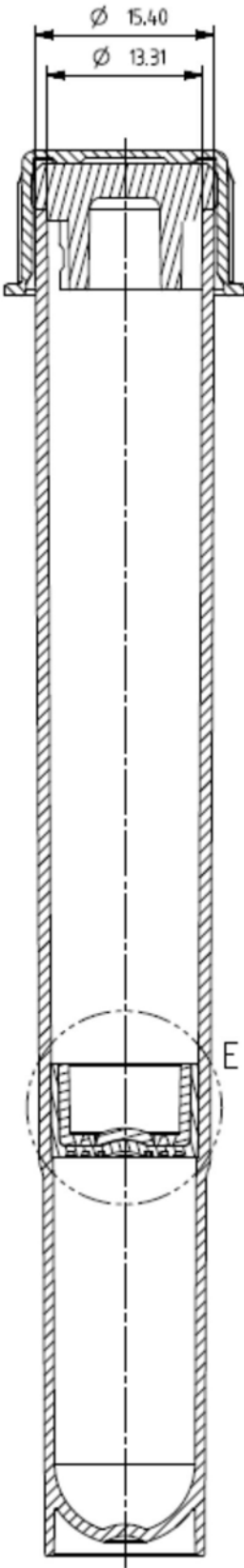


图3

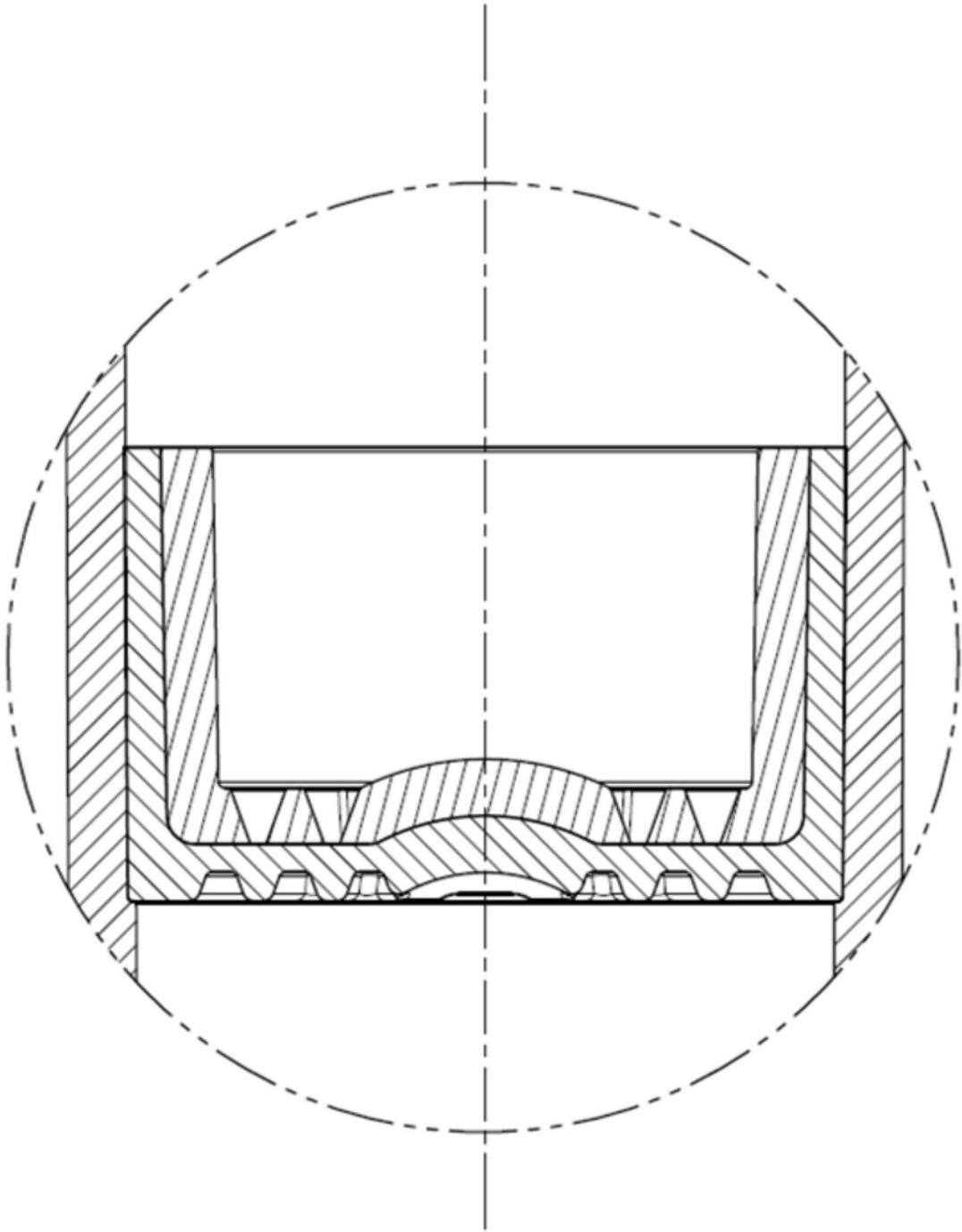


图4

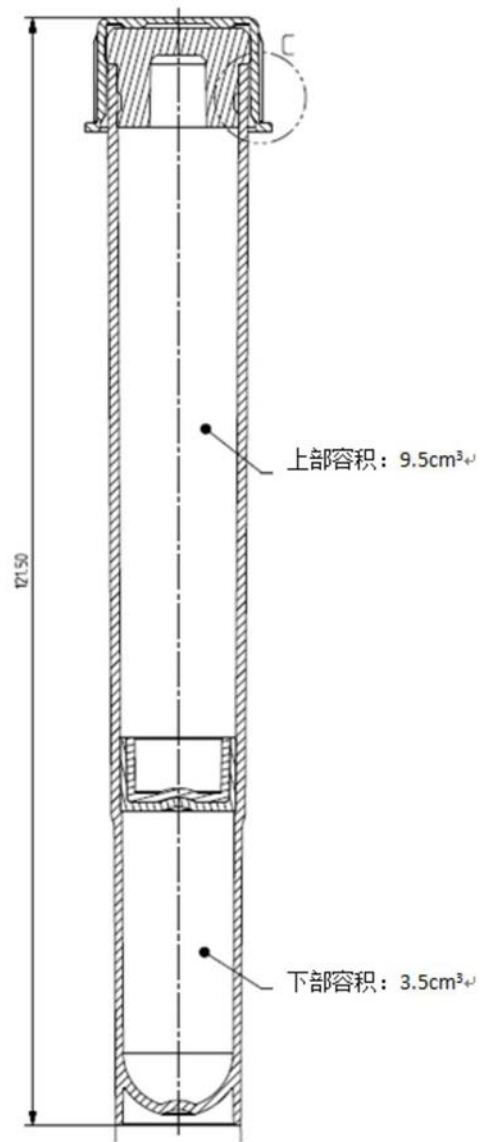


图5A

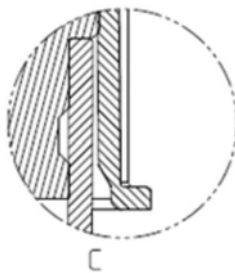


图5B

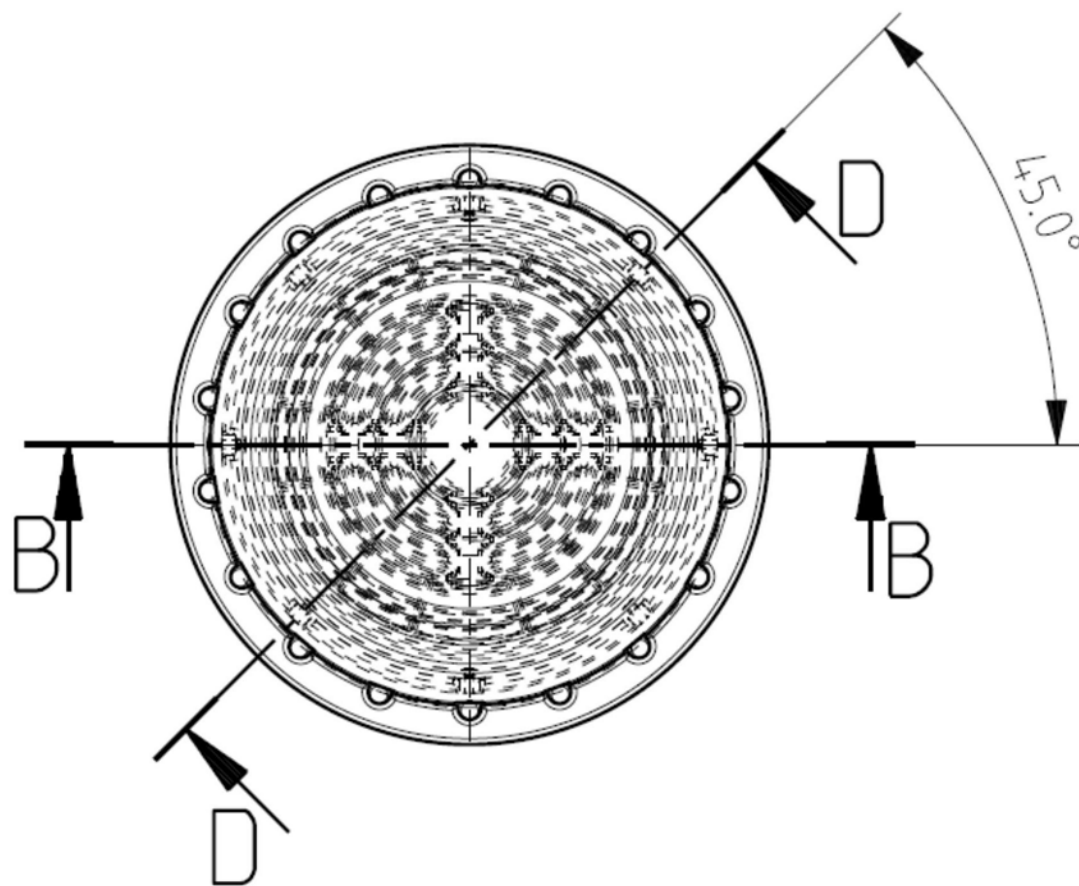


图6

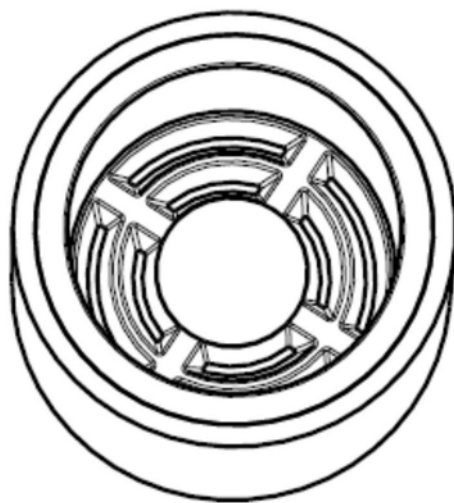


图7A

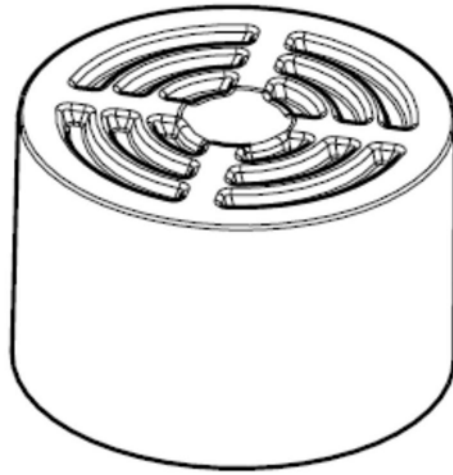


图7B

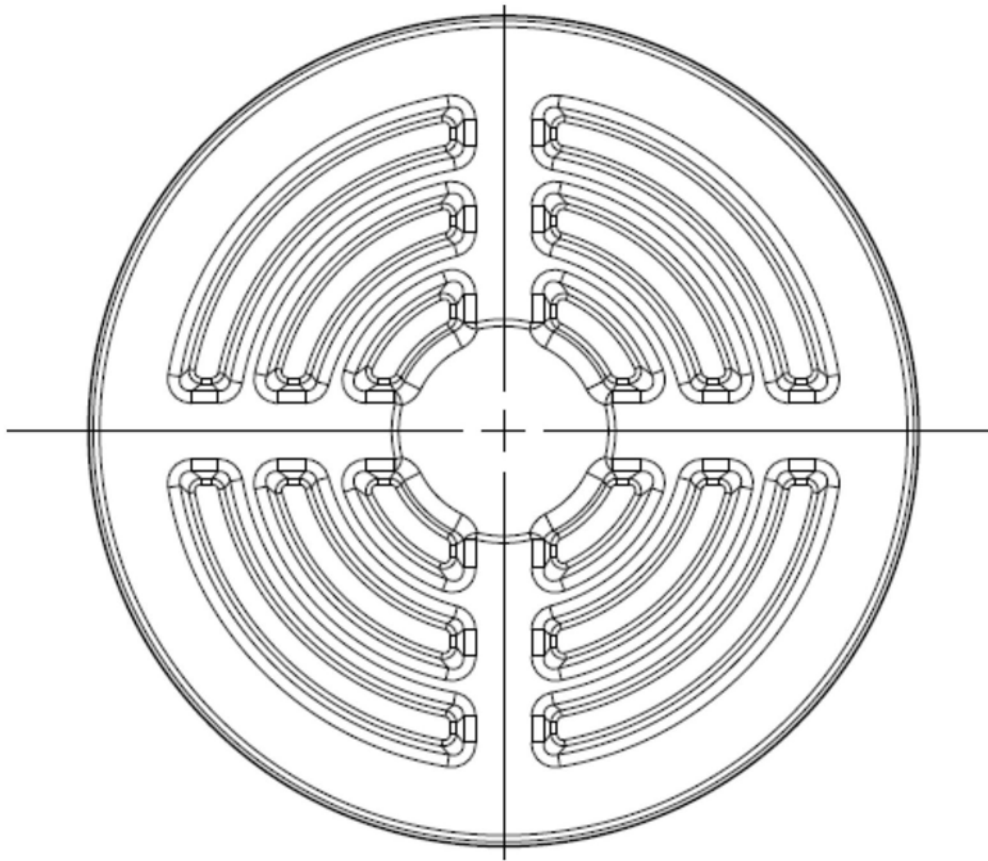


图8

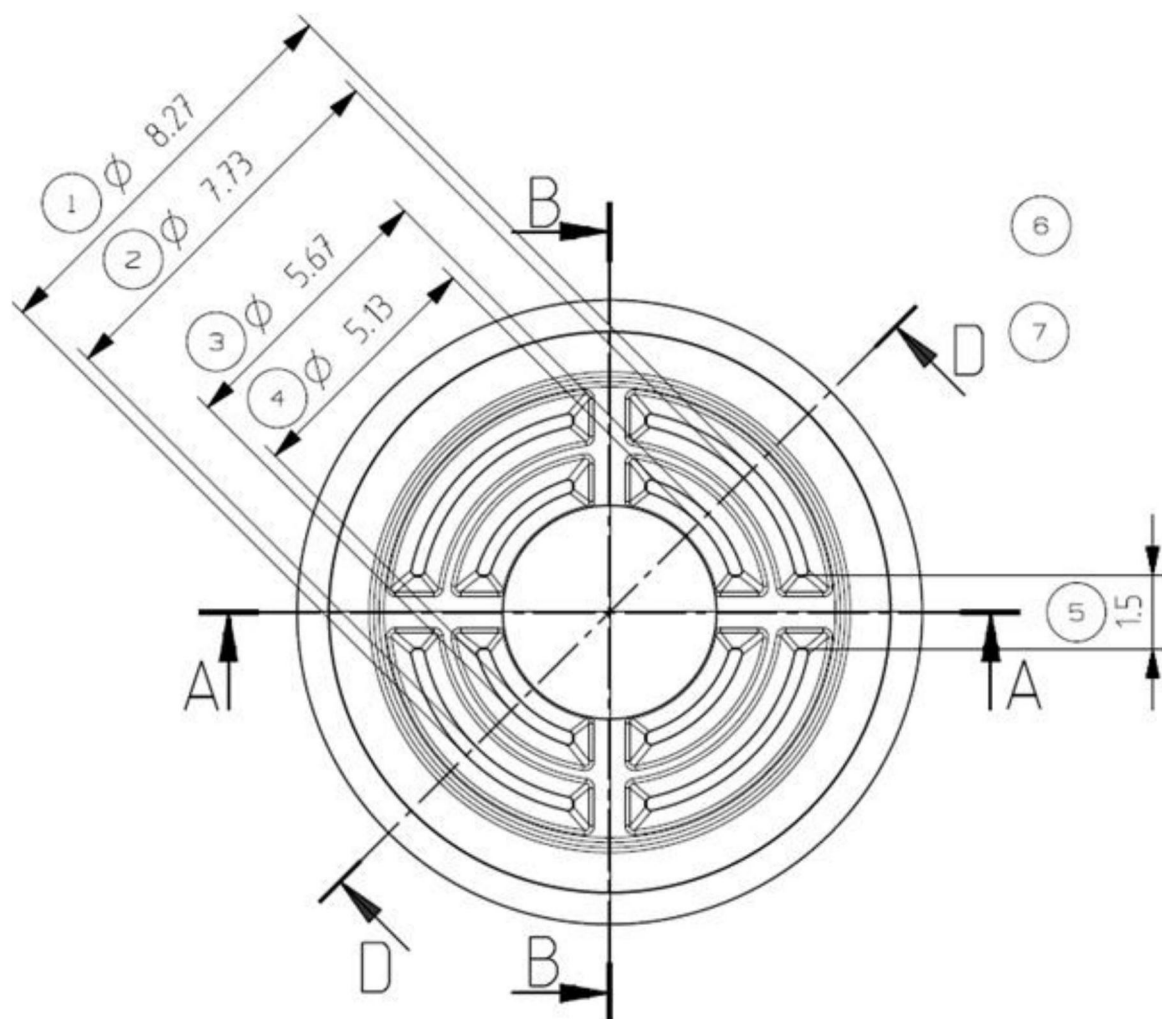
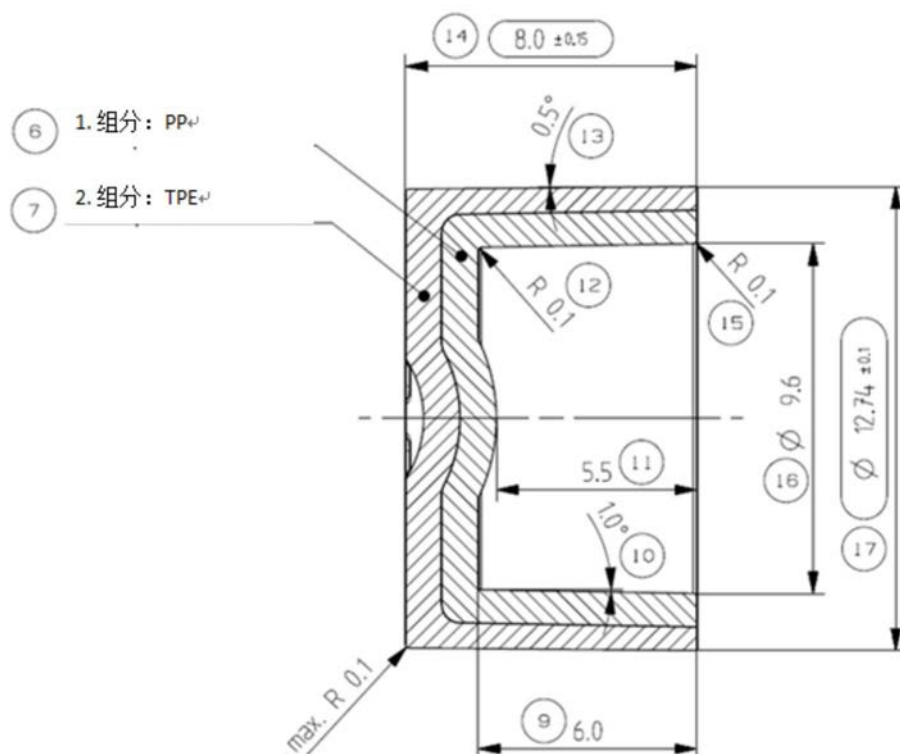


图9



Komponente = Component (组分)

PP = Polypropylene (聚丙烯)

TPE= Thermoplastic elastomer (热塑弹性体)

图10

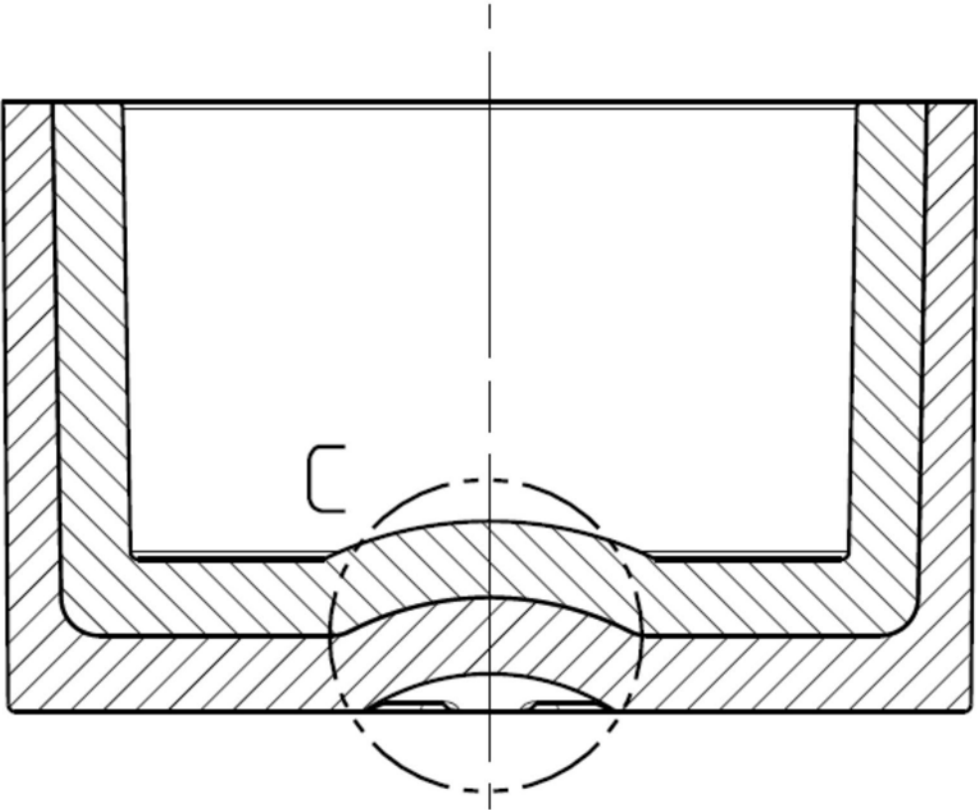
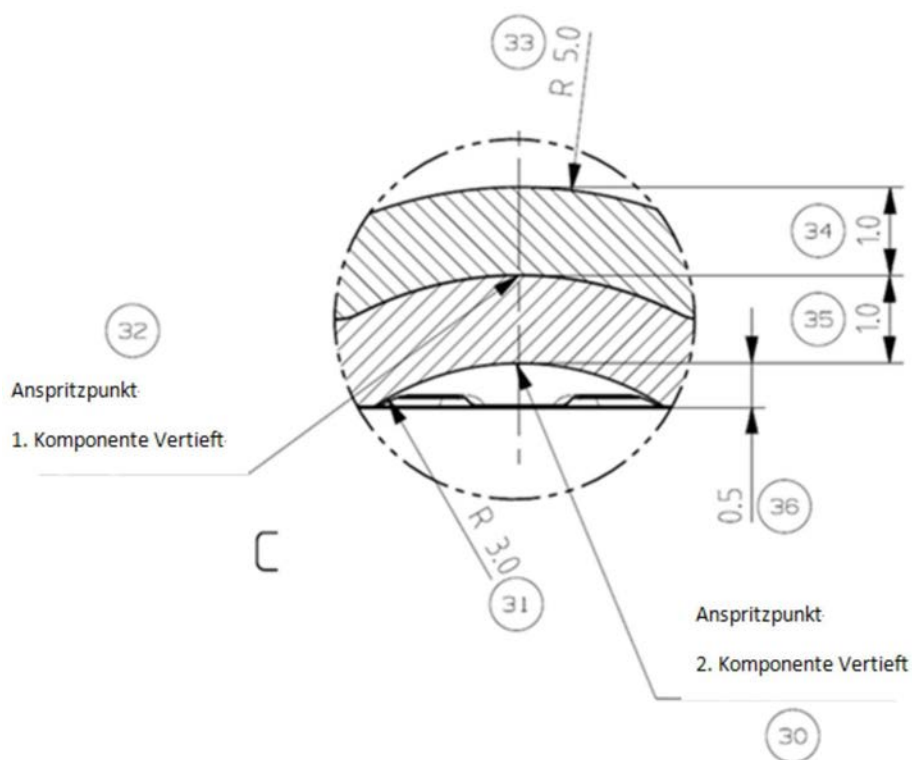


图11



Ansprittpunkt = injection point (注射点)

Komponente vertieft = consolidated component (合并组分)

图12

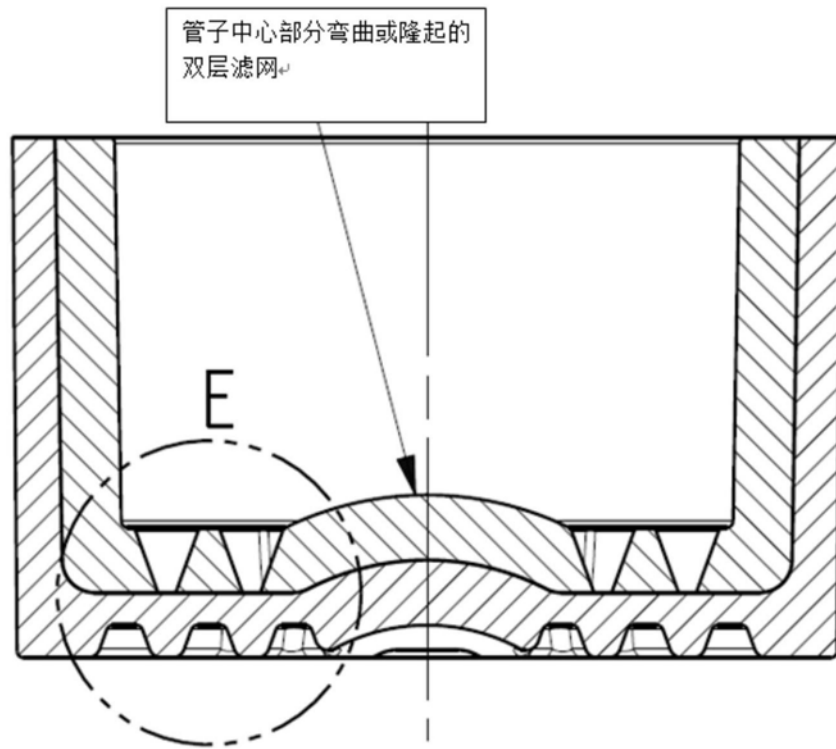
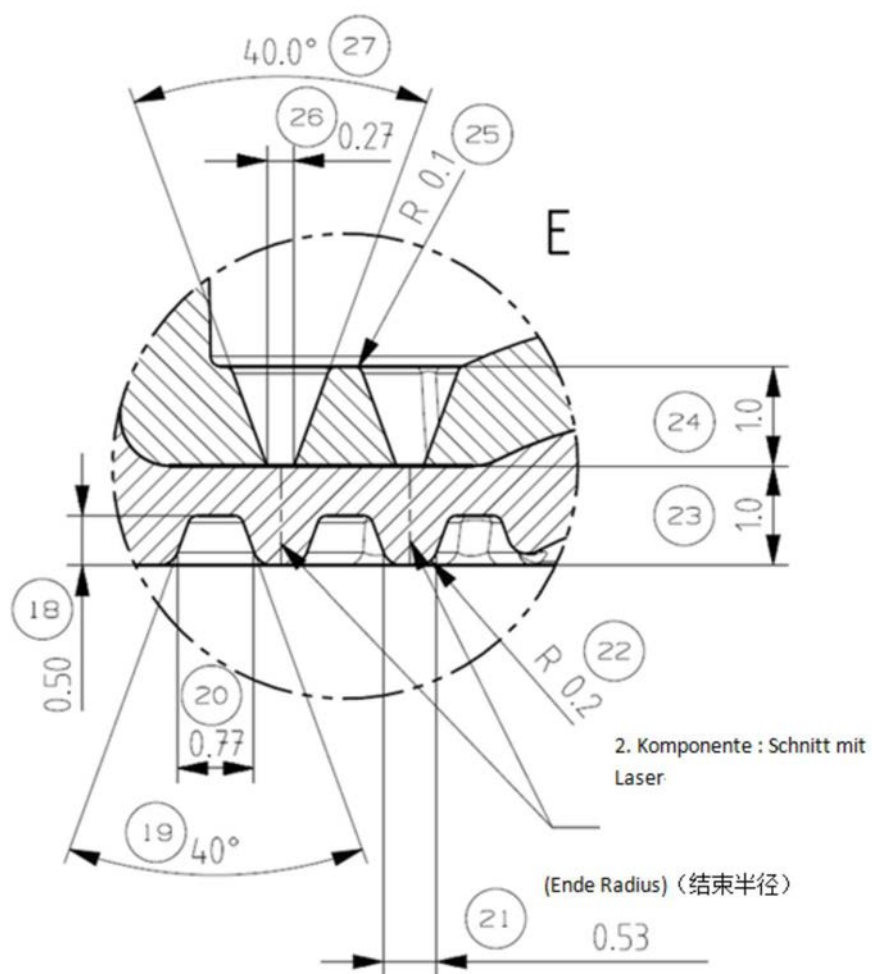


图13



Komponente= Component (组分)

Schnitt mit laser= Modeling with laser (激光建模)

图14

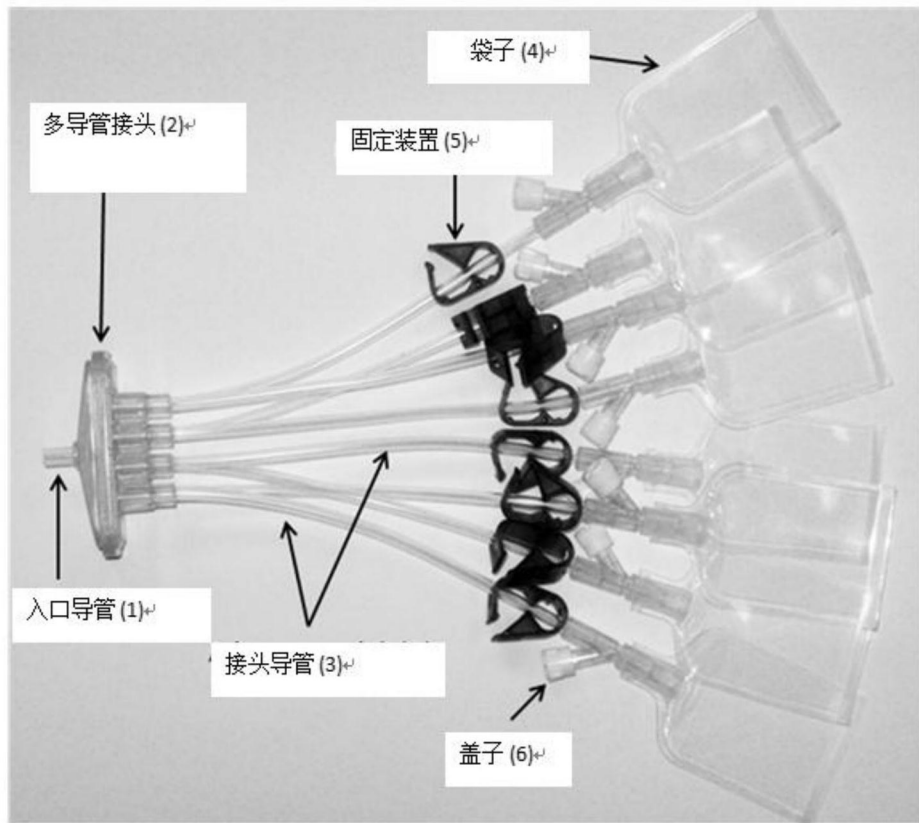


图15

管子-透明质酸-胶体-柠檬酸盐

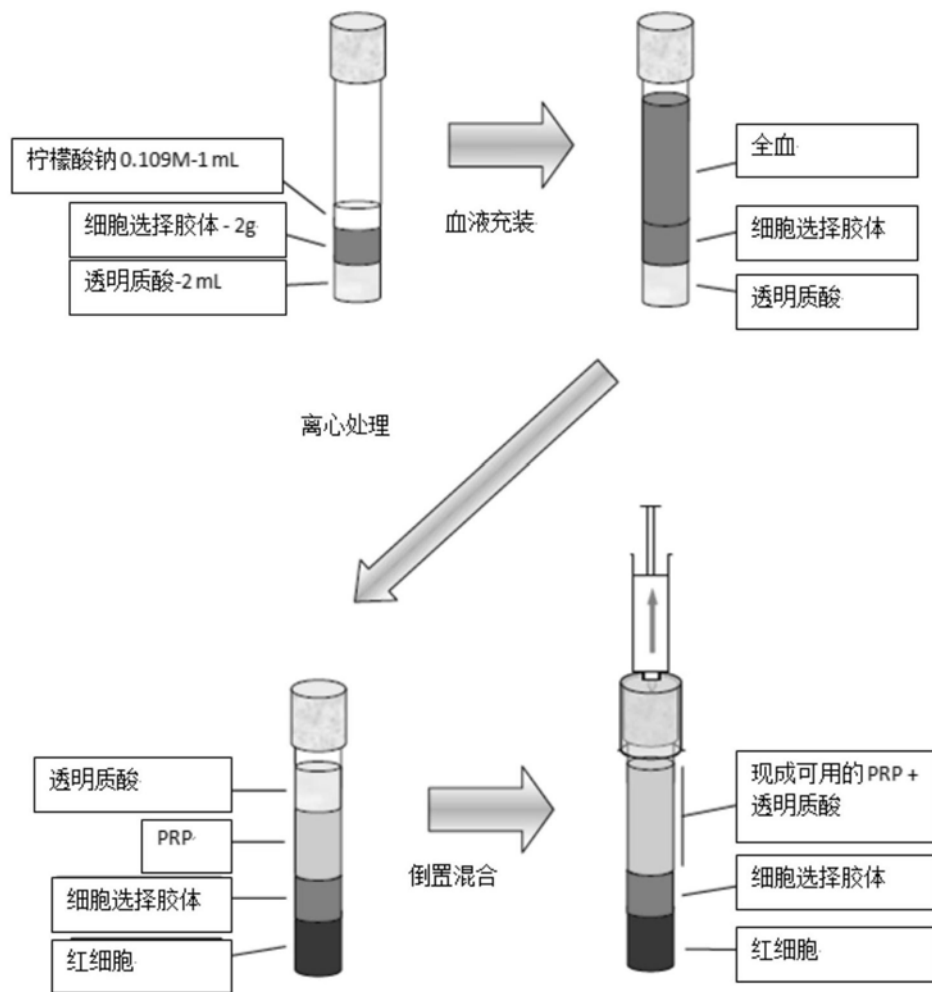


图16