



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102123745 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

- (21) 申请号 200980110042. 8 *A61L 27/56* (2006. 01)
- (22) 申请日 2009. 03. 02 *A61L 27/58* (2006. 01)
- (30) 优先权数据 *A61K 9/14* (2006. 01)  
PA200800307 2008. 02. 29 DK *A61K 9/16* (2006. 01)  
*A61K 9/50* (2006. 01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日  
2010. 09. 20
- (86) PCT申请的申请数据  
PCT/EP2009/052431 2009. 03. 02
- (87) PCT申请的公布数据  
W02009/106641 EN 2009. 09. 03
- (71) 申请人 科洛普拉斯特公司  
地址 丹麦胡姆勒拜克
- (72) 发明人 H·埃弗兰德 P·萨缪尔森  
J·范格 C·克劳森 M·R·加勒戈
- (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 刘晓东
- (51) Int. Cl.  
*A61L 27/18* (2006. 01)  
*A61L 27/38* (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 26 页

(54) 发明名称

用于受试者中活组织的增加和再生的组合物  
和方法

(57) 摘要

本发明提供了用于受试者中活组织的增加和再生的组合物,其包含生物可降解的聚合物的多孔微粒的群体、一个或多个哺乳动物细胞群体和任选地生物相容性粘着剂。



1. 一种组合物,其中包含生物可降解聚合物的多孔微粒的群体。
2. 权利要求 1 的组合物,其中孔隙度是 50 至 95%。
3. 前述权利要求中任一项的组合物,其中微粒的大小是 20-110  $\mu\text{m}$ 。
4. 用于受试者中活组织的增加和再生的前述权利要求中任一项的组合物。
5. 前述权利要求中任一项的组合物,其还包含一个或多个哺乳动物细胞群体。
6. 前述权利要求的任一项的组合物,其还包含生物相容性粘着剂。
7. 权利要求 1 的组合物,其中将一个或多个哺乳动物细胞群体附着至所述生物可降解聚合物的微粒群体。
8. 前述权利要求的任一项的组合物,其中微粒以生物可降解聚合物的微球体的形式存在。
9. 前述权利要求的任一项的组合物,其中微粒以不规则形状的形式例如生物可降解聚合物的薄片形式存在。
10. 前述权利要求的任一项的组合物,其中所述生物可降解聚合物包含选自下述的聚合物或由其组成:a) 乙交酯,例如 L-丙交酯、DL-丙交酯、内消旋丙交酯(聚丙交酯,PLA)、 $\epsilon$ -己内酯(聚己内酯,PCL)、1,4-二噁烷-2-酮、d-戊内酯、 $\beta$ -丁内酯、g-丁内酯、 $\epsilon$ -癸内酯、1,4-二氧杂环庚烷-2-酮、1,5-二氧杂环庚烷-2-酮、1,5,8,12-四氧杂环十四烷-7-14-二酮、1,5-二氧杂环庚烷-2-酮,6,6-二甲基-1,4-二噁烷-2-酮和三亚甲基碳酸酯的均聚物或共聚物;b) 单或双功能聚乙二醇与上述 a) 的聚合物的嵌段共聚物;c) 单或双功能聚亚烷基二醇与上述 a) 的聚合物的嵌段共聚物;d) 上述聚合物的混合物;和 e) 聚酸酐和聚原酸酯;例如聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、MPEG-PLGA(甲氧基聚乙二醇)-聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)的共聚物。
11. 前述权利要求的任一项的组合物,其中生物可降解的聚合物包含 PLGA 或 MPEG-PLGA 或由其组成。
12. 前述权利要求的任一项的组合物,其中所述微粒通过冷冻干燥在溶液中包含生物可降解的聚合物的溶液来制备。
13. 前述权利要求的任一项的组合物,其中所述微粒通过超声雾化来制备。
14. 权利要求 5 至 13 的任一项的组合物,其中所述细胞相对于受试者中所述活组织的细胞在来源上是自体的、同源的(同种异体的)或异种的。
15. 前述权利要求的任一项的组合物,其中组合物中细胞的浓度是大约  $0.1 \times 10^4$  个细胞至大约  $10 \times 10^6$  个细胞/ml。
16. 前述权利要求的任一项的组合物,其还包含促进细胞附着和/或向内生长以使组织再生至生物可降解聚合物的微粒的成分,例如选自下述的成分:硫酸软骨素、玻尿酸、透明质酸(HA)、硫酸肝素、硫酸类肝素、硫酸皮肤素、生长因子、血纤蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白例如 I 型和/或 II 型胶原蛋白、明胶和聚集蛋白聚糖或任何其他合适的细胞外基质成分。
17. 前述权利要求的任一项的组合物,其还在合成的生物可降解支架中包含化合物,其中所述化合物是生长因子,例如胰岛素样生长因子 1(IGF-1),或转化生长因子(TGF),例如 TGF- $\alpha$  或 TGF- $\beta$  或 FGF 例如 FGF-1 或 FGF-2 或骨形态发生蛋白(BMP)。
18. 前述权利要求的任一项的组合物,其中将透明质酸和/或硫酸皮肤素掺入生物可

降解聚合物的微粒。

19. 前述权利要求的任一项的组合物,其中至少一些微粒包含羟基磷灰石和 / 或磷酸钙。

20. 用于制备微粒,优选具有规则微粒结构的微粒例如微球体的群体的方法,所述方法包括:

- a) 制备聚合物在溶剂中的溶液;
- b) 将步骤 a) 中形成的溶液与非溶剂混合;
- c) 在低于室温(优选低于 0°C)下将步骤 b) 中形成的溶液雾化入非溶剂以形成微粒;
- d) 收集形成的颗粒,优选通过过滤收集;
- e. 任选地干燥颗粒,优选通过应用真空或通过冷冻干燥来进行。

21. 用于制备微粒,优选具有不规则微粒结构的微粒的群体的方法,所述方法包括:

- a) 制备聚合物在溶剂中的溶液;
- b) 将步骤 a) 中形成的溶液与非溶剂混合;
- c) 冷冻干燥步骤 b) 中形成的混合的溶液;
- d) 收集形成的颗粒;
- e) 任选地对颗粒进行大小分级分离,优选通过筛分进行。

22. 权利要求 21 的方法,其中 a) 中的溶剂选自 1,4- 二噁烷、碳酸二甲酯或 1,3- 二氧戊环。

23. 用于制备微粒,优选具有不规则结构的微粒的群体的方法,所述方法包括:

a) 制备聚合物在溶剂中的溶液;

b) 在低于室温(优选低于 0°C)下将步骤 b) 中形成的溶液,例如通过超声雾化,雾化入非溶剂以形成微粒;

- c) 收集形成的颗粒,优选通过过滤进行;
- d) 任选地干燥颗粒,优选通过使用真空或通过冷冻干燥来进行。

24. 用于制备微粒的群体的方法,所述方法包括:

- a. 制备聚合物在可被冷冻干燥的溶剂中的溶液;
- b. 将步骤 a) 中形成的溶液,例如通过超声雾化,雾化入冷室,从而将液滴冷冻成颗粒;
- c. 收集形成的颗粒,
- d. 通过冷冻干燥干燥颗粒。

25. 权利要求 20 至 24 中任一项的方法,其中聚合物是生物可降解的聚合物。

26. 权利要求 23 至 25 中任一项的方法,其中溶剂选自氯仿、1,4- 二噁烷、丙酮、乙酸甲酯等、丁酮、二氯甲烷和 1,3- 二氧戊环。

27. 权利要求 20 至 26 中任一项的方法,其中非溶剂选自:低级醇、二乙醚、二异丙醚、己烷、烷烃类和环烷烃类。

28. 由权利要求 20 至 27 中任一项的方法制备的微粒群体。

29. MPEG-PLGA 的微粒的群体。

30. 权利要求 29 的群体,其中颗粒具有 50 至 95% 的孔隙度。

31. 权利要求 29-30 中任一项的群体,其中微粒的大小是 20 至 110  $\mu\text{m}$ 。

32. 一种试剂盒,其包含

- a) 以形成液体的浓度存在的生物可降解聚合物的多孔微粒；
  - b) 用于放置细胞的装置。
33. 权利要求 32 的试剂盒,其中用于放置细胞的装置是具有针的注射器。
34. 权利要求 32 或 33 的试剂盒,其还以每 50-100mg 有 1 百万个细胞的浓度包含细胞。
35. 权利要求 32 至 34 中任一项的试剂盒,其用于肌肉的修复。
36. 权利要求 35 的试剂盒,其用于括约肌的修复。
37. 一种试剂盒,其包含：
- a) 以形成糊剂的浓度存在的生物可降解聚合物的多孔微粒；
  - b) 用于放置细胞的装置；
  - c) 组织胶。
38. 权利要求 37 的试剂盒,其中用于放置细胞的装置是无针但具有柔韧的出口的注射器。
39. 权利要求 37 或 38 的试剂盒,其还以 1 百万个 /cm<sup>2</sup> 的浓度包含细胞。
40. 权利要求 37 至 39 中任一项的试剂盒,其用于软骨修复。
41. 用于患者中活组织的再生或增加的方法,所述方法包括制备前述权利要求中任一项的组合物和将所述组合物施用入待再生或增加的活组织,例如前述权利要求的任一项中提及的活组织。
42. 权利要求 41 的方法,其中通过注射将组合物施用给所述组织。
43. 权利要求 41 或 42 中任一项的方法,其中所述活组织是肌肉组织,并且其中所述一个或多个哺乳动物细胞的群体包含成肌细胞或能够分化成成肌细胞的干细胞的群体。
44. 权利要求 43 的方法,其中所述方法是用于治疗与生殖泌尿系统病症相关的疾病,例如尿失禁的方法,并且所述活组织是括约肌,例如尿道括约肌。
45. 权利要求 41 或 42 中任一项的方法,其中所述活组织是软骨组织,并且其中所述一个或多个哺乳动物细胞的群体包含选自下述的细胞的群体:软骨细胞例如人关节软骨细胞、干细胞或能够转化成软骨细胞的等同细胞例如间充质干细胞。
46. 权利要求 41 或 42 中任一项的方法,其中所述活组织是骨组织,并且其中所述一个或多个哺乳动物细胞的群体包含成骨细胞或能够分化成成骨细胞的干细胞例如间充质干细胞的群体。
47. 前述权利要求中任一项的组合物,其用作药剂。
48. 前述权利要求中任一项的组合物,其用于治疗与生殖泌尿系统病症相关的疾病例如尿失禁、盆腔脏器脱垂和肛门失禁。
49. 前述权利要求中任一项的组合物,其用于治疗与软骨缺损相关的疾病。
50. 前述权利要求中任一项的组合物,其用于治疗与骨缺损或疾病相关的疾病。

## 用于受试者中活组织的增加和再生的组合物和方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及适合用于受试者中活组织的增加 (augmentation) 和再生的组合物和方法。

[0002] 发明背景

[0003] 使用细胞移植的组织工程方法是已知, 并且例如可牵涉例如开放性关节手术 (例如, 开放性膝手术), 在关节手术的情况下, 涉及较长时期的相对残疾以使患者复原从而确保获得最佳结果。此类方法非常昂贵, 并且需要多方面的医疗方法例如康复和物理疗法。

[0004] 使用不同形式的支架技术的方法 (其中将支架 (具有或不具有在支架中生长的细胞) 插入缺损) 在进行完全由关节镜检查指导的细胞移植过程中遭遇到困难。

[0005] 关节镜下自体细胞植入 (Arthroscopic Autologous Cell Implantation, 称为使用小手术干预的 AACI 或 ACI) 是治疗软骨或骨缺损的外科手术, 通过该外科手术将支架插入缺损处, 同时相伴地使用针例如“钝”针或导管将细胞悬浮液或细胞混合物与前体固定剂 (precursor fixative) 一起施加入所述缺损处。通过关节镜显现和指导该植入步骤。

[0006] WO 2004/110512 公开了可用于治疗哺乳动物中软骨或骨缺损的内窥镜法, 其包括确定缺损位置和将软骨细胞、成软骨细胞、骨细胞和成骨细胞施加入软骨或骨缺损。将细胞与可固化支持材料例如可溶性凝血酶和纤维蛋白原或胶原混合物一起使用。预期对于凸关节或凹关节中的手术, 可将多孔膜置于缺损部位, 但一旦血纤蛋白 / 细胞混合物在合适的位置凝固时即其取出。WO 2004/110512 中公开的方法使得组织能够在关节镜下修复, 即不需要开关节手术 (例如开膝手术)。

[0007] 支架是可向其中掺入细胞的多孔结构。它们可由生物相容性、生物可降解性的材料组成并且可被加入至组织以在形成功能性组织的过程中指导细胞的组织、生长和分化。使用的材料可以是天然或合成来源的。

[0008] WO 2007/028169 涉及用于通过细胞移植进行的组织工程的方法, 其包括在缺损部位原位使用支架, 其中只在将支架插入在组织缺损部位后才将治疗性细胞在适当的位置固定至支架内。

[0009] WO 2007/101443 提供了用于本发明部分的方法和试剂盒的优选支架材料。

[0010] 微粒已用作用于组织增加和支持的可注射支架。

[0011] WO 96/02209 报导了用于与润滑液或凝胶结合以用于增加尿道括约肌的可注射生物相容性光滑表面化碳包被的金属颗粒 (大小 100-1000 微米)。

[0012] Xu 和 Reid 等人 (Annals New York Academy of Sciences 第 944 卷 :144-159, 2001) 公开了使用直径 20 至 40 微米和 100 至 300 微米的多孔生物相容性和生物可降解的 (PLGA) 微载体珠粒 (球) 附着肝细胞瘤细胞以在培养物中形成三维细胞可降解的微载体集落。

[0013] Kang 等人 (J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 第 17 卷, No 8, pp925-939 (2006) 公开了 PLGA 微球体的制造和其作为用于兔子膝部软骨再生的可注射载体的用途。将珠粒过滤至 30 至 80 微米珠粒的范围内。弃去更小的珠粒, 因为它们可在植入后迁移至远处的器官。

- [0014] 本发明提供了用于受试者中活组织的增加和再生的新型和改进型组合物。
- [0015] 附图概述
- [0016] 图 1 :实验 1 的光学显微镜检查、SEM 和粒度分布。
- [0017] 图 2 :实验 2 的光学显微镜检查、SEM 和粒度分布。
- [0018] 图 3 :实验 3 的光学显微镜检查、SEM 和粒度分布。
- [0019] 图 4 :实验 4 的光学显微镜检查、SEM 和粒度分布。
- [0020] 图 5 :实验 5 的光学显微镜检查、SEM 和粒度分布。
- [0021] 图 6 :实验 6 的光学显微镜检查、SEM 和粒度分布。
- [0022] 图 7a :来自实验 2 的颗粒。
- [0023] 图 7b :来自实验 3 的颗粒。
- [0024] 图 8-I :与颗粒一起培养的成纤维细胞的中性红染色 - 活细胞被染成红色。
- [0025] 8-Ia :1 周 -10x ;8-Ib :1 周 -40x ;
- [0026] 8-Ic :2 周 -10x ;8-Id :2 周 -40x ;
- [0027] 8-Ie :4 周 -10x ;8-If :4 周 -40x。
- [0028] 图 8-II :与颗粒一起培养的肌细胞的中性红染色 - 活细胞被染成红色。
- [0029] 8-II a :4 周 -10x ;8-IIb :4 周 -40x。
- [0030] 图 8-III :无细胞的颗粒
- [0031] 8-IIIa :第 1 天 -10x ;S-IIIb :第 7 天 -10x ;
- [0032] 8-IIIc :第 2 周 -10x ;S-IIIcI :第 2 周 -40x ;
- [0033] 8-IIIe :第 4 周 -10x ;S-IIIf :第 4 周 -40x。
- [0034] 图 9 :实验 5- 降解样品的分子量。
- [0035] 图 10 :实验 5- 降解样品的标准化面积。
- [0036] 图 11-15 :实施例 7 中描述的实验 7-11 的光学显微镜检查 (A), SEM(B) 和粒度分布 (C)。
- [0037] 图 16-22 :实施例 8 中描述的实验 12-18 的光学显微镜检查 (A), SEM(B) 和粒度分布 (C)。
- [0038] 图 23 :在培养 14 天后附着至 MPEG-PLGA 微球体的 hAC (红色)。
- [0039] 图 24 :在培养 14 天后 MPEG-PLGA 微球体上由 hAC 进行的 ECM 合成 (蓝色)。
- [0040] 发明概述
- [0041] 本发明的发明者已令人惊讶地发现包含生物可降解聚合物的微球体和一个或多个哺乳动物细胞群体的组合物提供了特别合适的用于受试者中活组织的增加和再生的组合物。
- [0042] 本发明提供了用于受试者中活组织的增加和再生的组合物,其包含 :
- [0043] a. 生物可降解聚合物的微粒群体,
- [0044] b. 一个或多个哺乳动物细胞群体
- [0045] 和任选地,生物相容性粘着剂。
- [0046] 本发明提供了用于制备微粒,优选具有规则微粒结构的微粒(例如微球体)的群体的方法,所述方法包括 :
- [0047] a. 在溶剂中制备聚合物的溶液,

- [0048] b. 将步骤 a) 中形成的溶液与非溶剂混合,
- [0049] c. 在低于室温 ( 优选低于 0℃ ) 下将步骤 b) 中形成的溶液雾化入非溶剂中以形成微粒,
- [0050] d. 收集形成的颗粒, 优选通过过滤收集,
- [0051] e. 任选地干燥颗粒, 优选通过应用真空或通过冷冻干燥来进行。
- [0052] 本发明提供了制备微粒, 特别地具有不规则微粒结构的微粒的群体的方法, 所述方法包括:
- [0053] a. 在溶剂中制备聚合物的溶液,
- [0054] b. 将步骤 a) 中形成的溶液与非溶剂混合,
- [0055] c. 冷冻干燥步骤 b) 中形成的混合溶液,
- [0056] d. 收集形成的颗粒,
- [0057] e. 任选地对颗粒进行大小分级, 优选通过筛分进行。
- [0058] 本发明提供了制备微粒 ( 优选具有不规则结构 ) 的群体的方法, 所述方法包括:
- [0059] a. 在溶剂中制备聚合物的溶液,
- [0060] b. 在低于室温 ( 优选低于 0℃ ) 下将步骤 a) 中形成的溶液, 例如通过超声雾化, 雾化入非溶剂中以形成微粒,
- [0061] c. 收集所形成的颗粒, 优选通过过滤收集
- [0062] d. 任选干燥颗粒, 优选通过使用真空或通过冷冻干燥进行。
- [0063] 本发明提供了制备微粒的群体的方法, 所述方法包括:
- [0064] a. 在可冷冻干燥的溶剂中制备聚合物的溶液;
- [0065] b. 将步骤 a) 中形成的溶液雾化 ( 例如通过超声雾化 ) 入冷室, 从而将液滴冷冻成颗粒;
- [0066] c. 收集形成的颗粒,
- [0067] d. 通过冷冻干燥干燥颗粒。
- [0068] 本发明还提供了通过本发明的方法制备的微粒群体。
- [0069] 本发明提供了 MPEG-PLGA 的微粒。
- [0070] 本发明提供了 MPEG-PLGA 的微粒群体。
- [0071] 本发明提供了包含根据本发明的微粒群体的组合物, 其还包含生物相容性粘着剂, 和 / 或如本文中提及的另外的或其他一种或多种化合物。
- [0072] 本发明提供了用于制备组合物的方法, 其中将一个或多个哺乳动物细胞的群体附着至生物可降解聚合物的微粒群体, 所述方法包括以下步骤:
- [0073] a) 在体外将如前述权利要求的任一项中定义的一个或多个哺乳动物细胞群体与如本文中提及的生物可降解聚合物的微粒群体接触; 和
- [0074] b) 在体外将所述哺乳动物细胞与所述生物可降解聚合物的微粒群体一起培养一段时间, 以使哺乳动物附着至微粒。
- [0075] 本发明提供了试剂盒, 其包含:
- [0076] a. 装有生物可降解聚合物的微粒群体的区室, 和;
- [0077] b. 装有一个或多个哺乳动物细胞群体的区室, 和任选地;
- [0078] c. 可以与 a. 中提及的区室相同或不同的区室, 其包含生物相容性粘着剂, 和任选

地；

[0079] d. 具有所述生物相容性粘着剂的转换剂的区室，

[0080] 其中 a. 中提及的区室与 b. 中提及的区室是隔开的。

[0081] 本发明提供了用于患者中活组织的再生或增加的方法，所述方法包括制备根据本发明的组合物和将所述组合物施用入待再生或增加的活组织，例如前述实施方案的任一个中提及的活组织。

[0082] 本发明提供了根据本发明的微粒、微粒群体或组合物用作药剂的根据本发明的微粒、微粒群体或组合物。

[0083] 本发明提供了根据本发明的微粒、微粒群体或组合物用于治疗与生殖泌尿系统 (uro-gynaecological) 病症相关疾病 (例如尿失禁、盆腔脏器脱垂和肛门失禁)。

[0084] 本发明提供了根据本发明的微粒、微粒群体或组合物用于治疗软骨缺损。

[0085] 本发明提供了根据本发明的微粒、微粒群体或组合物用于治疗骨缺损、骨疾病或用于骨再生。

[0086] 本发明提供了根据本发明的微粒、微粒群体或组合物用于制备用于治疗与泌尿生殖系统病症相关的疾病 (例如尿失禁、盆腔脏器脱垂和肛门失禁) 的药剂的用途。

[0087] 本发明提供了根据本发明的微粒、微粒群体或组合物用于制备用于治疗软骨缺损的药剂的用途。

[0088] 本发明提供了根据本发明的微粒、微粒群体或组合物用于制备用于治疗骨缺损、骨疾病或用于骨再生的药剂的用途。

[0089] 发明详述

[0090] 本发明提供了用于本发明的组合物、方法和试剂盒的生物可降解聚合物的微粒。所述微粒包含生物可降解聚合物，例如本文中描述的生物可降解聚合物，或其组成。

[0091] 在广泛的方面，本发明的发明者预期所述微粒与根据本发明的细胞一起或根据本发明的组合物可用于增强身体中任何部位的衰弱的组织。

[0092] 本发明的一个方面涉及微粒与能够生长的细胞一起的样品。将该样品注射入对使用增加性材料的治疗有反应的区域或其周围。在一个实施方案中，将样品用于治疗尿失禁或膀胱输尿管反流 (vesicourethral reflux)、泌尿系统疾病，其中当对尿流的抗力已降至抗力不能再抗住腹内压的点时发生尿失禁。在另一个实施方案中，将样品用于治疗肛门括约肌失禁，微粒可增大括约肌，从而改善括约肌功能。可将样品注射入肛管的组织，其中选择的部位可以是例如内肛门或外肛门括约肌组织。所造成的组织的膨胀或增大将限制括约肌或肛道 (anal passage) 的大小，从而帮助克服大便失禁。申请者还相信本样品可用于胃反流应用。

[0093] 可将组合物注射入上胃肠道的组织，其中选择的部位可以是例如向食道内开放的胃的贲门口。所造成的组织的膨胀或增大将限制通道的大小，从而帮助克服胃液反流入食道。对于所有此类实例共同的是通过膨胀效果获得样品的瞬即效应的事实。然而，随着细胞生长和微粒降解，未形成结缔组织，但形成将活跃地参与正常闭合功能的再生的肌肉、软骨或其他组织。

[0094] 在另一个实施方案中，本发明涉及微粒与能够再生骨组织的细胞例如成骨细胞和/或间充质干细胞 (其具在体内有分化成成熟成骨细胞的能力或可在体外经诱导形成成熟

成骨细胞)一起的样品。细胞可以是自体、同种异体或异种来源的,包含此类细胞和微粒群体的组合物可用于骨缺损的修复和用于骨再生。因此可将组合物用于人体的不同骨例如股骨、胫骨、髌骨、脊椎骨、肱骨、臂骨和尺骨的骨折。此外,其可用于具有萎缩性上颌骨或下颌骨的患者中骨质增加的手术中。该组合物的可注射特征对于该临床适应症是特别重要的。应当指出,为了用于治疗骨缺损或用于骨再生,使用包含羟基磷灰石和 / 或磷酸钙的根据本发明的微粒和 / 或组合物将是有利的,所述组合物还包含羟基磷灰石和 / 或磷酸钙(例如作为可与本发明的微粒相独立(但在组合物内)的颗粒加入的)。此外,为了用于骨缺损修复或骨再生,本发明的组合物还可包含(骨形态发生蛋白)BMP,此类蛋白是对成骨细胞或骨源性分化间充质干细胞(osteogenic differentiated mesenchymal stemcell)具有非常强的效应的蛋白质。

[0095] 微粒还可原位提供柔韧的支架,从而提供可能来自哺乳动物细胞群体的细胞和 / 或来自围绕缺损周围的组织的细胞可在其上生长和形成新组织 - 从而再生活组织的结构。

[0096] 术语微粒,如本文中所使用的,是指具有 1 微米至 1000 微米大小的颗粒。应理解大小在这方面是指颗粒的直径或平均直径。

[0097] 群体中微粒可以例如采取薄片、丝、粉末、纤维、杆、球体或上述形式的任何中间体的形式。

[0098] 在一个实施方案中,形成群体的微粒在形状上是不规则的。

[0099] 在一个实施方案中,群体中的微粒的表面积 / 体积比大于相同平均直径的形状呈全球形的微球体的表面积 / 体积比,例如其表面积 / 体积比是相同平均直径的形状呈全球形的微球体的至少 1.25 倍,例如 1.5 倍,例如 2 倍,例如 4 倍,例如通过实施例 1 中描述的 Malvern 颗粒分析仪测量的。

[0100] 在形状上大体上非球形的或不规则的微粒的特征可能在于显示增强的流动粘性(当与球形或大体上球形的微球体的等同群体相比较时),这样其在体内可能特别有用,其中期望插入的微粒能够保持在插入的位置并且提供结构支持和增加。还认为这样的微球体在体内形成在它们与缺损组织表面的相互作用上更稳定(从而提供比等同的球形微粒更高层次的机械强度)的基质。

[0101] 在一个实施方案中,微粒在形状上不是球形的或基本球形的。在一个实施方案中,当使用扫描电子显微照片在 100x 的分辨率下分析时,微粒不具有光滑表面。

[0102] 这样,在一些应用中形状不规则和 / 或具有不规则表面形态学的微粒例如薄片被认为是有利的。此类颗粒彼此相互作用以提供其中细胞可在机体中生长的柔韧但刚性的基质。此类微粒被认为在用于软骨缺损的修复中是特别有用的,但其还可用于其他组织例如平滑肌或骨的修复。

[0103] 不规则微粒的其他形状包括薄片、丝、纤维、杆、球体或上述形式的任何中间体的任何形式。

[0104] 如实施例和图 1 至 6 中显示的,可能通过使用生物可降解的聚合物的超声处理和通过改变使用的溶剂和条件制备不规则形状的固体,可形成不同平均直径和形状复杂性的微粒。

[0105] 然而,在一个实施方案中,微粒可以为球形或大体上球形或椭圆形 - 通常此类微粒具有规则形状。在一个实施方案中,此类微粒被认为可用于治疗肌肉缺损,例如平滑肌缺

损例如括约肌失禁。

[0106] 要认识到,尽管球形的特征在于其三维表面上所有点都与一个固定点等距离(即完全球形),但在本发明的背景中,术语球形可包括与球体相似的形状,因为它们不具有任何确定的角或边,但可以不是完全辐射对称的,从而可包括具有卵圆形或椭圆形形状的固体形状-此类形状被认为包括在术语大体上球形中。

[0107] 在一个优选实施方案中,在本发明的组合物和治疗方法的背景中,哺乳动物细胞或至少一部分哺乳动物细胞附着至微粒支架上或甚至在微粒支架内。这提供了在插入患者后细胞与支架错综复杂地结合在一起的优点。

[0108] 在使用前,通常对生物可降解聚合物的微粒进行灭菌,以及除了加入哺乳动物细胞的群体外,在灭菌(无菌)条件下进行本发明的组合物的制备。这样可以制备出可直接用于医疗的组合物。

[0109] 本发明提供了制备包含支架(例如 MPEG-PLGA) 或由其组成的微粒的方法。

[0110] 可如实施例所述制备 MPEG-PLGA 的微粒。一个优选方法包括在合适的溶剂(通常是有机溶剂)中制备聚合物的溶液。使该聚合物溶液雾化以形成微粒的悬浮液。任选地过滤微粒,然后干燥(例如在真空下)。

[0111] 应当指出,本文中用于制备微粒的方法不必局限于生物可降解聚合物,而是可用于其他聚合物或聚合物系统。

[0112] 在一个实施方案中,所述微粒包含选自下述的聚合物或其由组成组成:a) 乙交酯、L-丙交酯、DL-丙交酯、内消旋丙交酯、ε-己内酯、1,4-二噁烷-2-酮、d-戊内酯、β-丁内酯、g-丁内酯、ε-癸内酯、1,4-二氧杂环庚烷-2-酮、1,5-二氧杂环庚烷-2-酮、1,5,8,12-四氧杂环十四烷-7-14-二酮、1,5-二氧杂环庚烷-2-酮,6,6-二甲基-1,4-二噁烷-2-酮和三亚甲基碳酸酯的均聚物或共聚物;b) 单或双功能聚乙二醇与如上 a) 所述聚合物的嵌段共聚物;c) 单或双功能聚亚烷基二醇与如上 a) 所述聚合物的嵌段共聚物;d) 上述聚合物的混合物;和 e) 聚酸酐和聚原酸酯。

[0113] 聚合物的微粒还可通过将非溶剂加入聚合物的溶液中(即在其中不溶的(或基本上不溶的)的聚合物)直至聚合物颗粒从溶液中析出(即加入非溶剂直至系统达到非溶剂边界)来形成。在这样的接近非溶剂边界的系统中进行的颗粒的制备将产生颗粒。

[0114] 关于术语‘基本上不溶的’,应指出在一些情况下,聚合物的非常微小程度的可溶性可以是可测量的,但可溶性的水平不足以在本发明的方法中阻止微粒的形成。

[0115] 如可在图 1 至 6 中看到的,通过改变有机溶剂,可制备具有不同平均大小范围和可在大体上球形变化到不规则形状之间变化的形状的不同微粒形式。更具体地,通过向聚合物溶液中加入非溶剂,你将最终达到溶液的溶剂转换成非溶剂以及聚合物开始沉淀的点。聚合物的良好与较差溶剂之间的边界称为 θ-溶剂。在本文中的实施例中,可看到在与非溶剂边界接近或具有一定距离的溶剂系统(丙酮/乙醇)中的聚合物溶液产生球形颗粒。相反地,良好溶剂中的溶液产生更不规则形状的颗粒。

[0116] 在一个实施方案中,合适的有机溶剂可选自丙酮和碳酸二甲酯。

[0117] 用于上述聚酯的合适的有机溶剂在一些实施方案中可以是氯仿、二氯甲烷、丙酮、丁酮、四氢呋喃、二噁烷、碳酸二甲酯。

[0118] 在一个实施方案中,溶剂可选自氯仿、二噁烷、丙酮、乙酸甲酯等。

[0119] 非溶剂在一个实施方案中可选自低级醇,例如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、异丁醇和叔丁醇、二乙醚、二异丙醚、己烷、烷烃类、环烷烃类和水。

[0120] 在溶液中制备的聚合物的浓度可以是例如 1 至 20%,例如 2 至 10% (w/v)。

[0121] 因此我们认为接近非溶剂边界的溶剂系统将在相似条件下产生球形颗粒。

[0122] 用于制备微粒的一种备选方法是通过冷冻干燥:支架的冷冻干燥被认为是制备不规则形状微粒例如薄片的一种有利方法。虽然通过冷冻干燥,然后机械破碎所制备的固体聚合物可以制备微粒,但如实施例所示,我们提供了一种方法,借助该方法,有可能冷冻干燥聚合物溶液而形成粉末制剂。在一个实施方案中,粉剂以薄片的形式存在。为使冷冻干燥实际可行,需要在其凝固点以下具有可观蒸气压的溶剂。较少的溶剂满足这一标准-溶剂可恰当地基于它们的高融化温度进行选择,例如 1,4-二噁烷、碳酸二甲酯、苯、DMSO 或 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇。在一个实施方案中,基于它们是聚酯的良好溶剂来选择溶剂,其实例有 1,4-二噁烷或碳酸二甲酯。如实施例中举例说明的,冷冻干燥使它们贯穿整个颗粒都是中空/多孔的。

[0123] 在已制备好微粒后,可任选地干燥它们,并且需要时,将它们进行筛分以获得具有期望大小或大小范围的颗粒。在一个实施方案中,在干燥前通过湿法筛分筛选微粒。

[0124] 所描述的方法的一个特别有利方面是它们不依赖于水作为溶剂。对于大多数生物可降解的支架而言,水解是降解过程(由于水的存在而催化的过程)的一部分。由于不使用水,避免了这样的过早降解。备选地,已鉴定了有用的挥发性溶剂。通过使用此类溶剂,我们可在低温下干燥颗粒,从而避免它们的融化。

[0125] 术语“哺乳动物细胞群体”(其在本文中还可称为“哺乳动物细胞”或“细胞”)是指获自或来源于从哺乳动物组织获得的细胞的任何细胞群体。在一个实施方案中,“哺乳动物细胞群体”是指来源于单个细胞克隆(从而在基因型和表型上相同)的细胞的群体。

[0126] 在本发明的一些实施方案中,使用多个类型的细胞,从而其可称为一个或多个哺乳动物细胞细胞群体。优选细胞是贴壁细胞。

[0127] 在本发明的一些实施方案中,按照下表使用多个类型的细胞:

[0128]

共培养的细胞类型 (与微粒一起)	适合于临床应用:
成骨细胞 - 软骨细胞 间充质干细胞 - 牙周膜细胞	骨关节炎 牙周组织再生 (牙周炎)
平滑肌细胞 - 尿道上皮细胞	膀胱再生
脐静脉内皮细胞 - 成纤维细胞	血管生成的改善
肝细胞 - 肝星状细胞	肝再生
角质细胞 - 成纤维细胞	皮肤再生
乳房道上皮细胞 - 前脂肪细胞	乳房再造
呼吸道上皮细胞 - 软骨细胞	气管再生

[0129] 在本发明的一个方面, 治疗或用途是如按照上表中提及的一个或多个治疗或用途。

[0130] 在本发明的一个方面, 哺乳动物细胞的群体包含上表中提及的一个或多个细胞类型。

[0131] 优选地, 在用于根据本发明的方法之前, 细胞已在体外进行了维持或培养。

[0132] 在一个优选实施方案中, “哺乳动物细胞群体”是指软骨细胞、成软骨细胞、骨细胞和成骨细胞、牙周膜细胞和 / 或其组合的群体。

[0133] 在一个实施方案中, 术语“哺乳动物细胞群体”是指成肌细胞或能够分化成成肌细胞的干细胞的群体。

[0134] 在一个实施方案中, 术语“哺乳动物细胞群体”是指成骨细胞或能够分化成成骨细胞的干细胞的群体。

[0135] 在一个实施方案中, 术语“哺乳动物细胞群体”是指软骨细胞或能够分化成软骨细胞的干细胞的群体。

[0136] 在一个优选实施方案中, 细胞获自或来源于该活的哺乳动物个体, 即是自体的。细胞还可以是同源的, 即与它们将应用的组织相容, 或可来源于多能干细胞或甚至亚全能干细胞 (例如以同种异体细胞的形式)。在一个实施方案中, 细胞可以是同种异体的, 来自另一个相似个体, 或异种的, 即来源于以待治疗的生物体不同的生物。同种异体细胞可以是已分化的细胞、祖细胞或来源于多能 (例如, 胚胎细胞或胚胎和成体特化细胞的组合)、亚全能干细胞 (来源于脐带血干细胞、成体干细胞等) 的细胞、通过来自其他细胞或基因构建体的基因的交流、插入或添加, 将已分化细胞的细胞核转移入胚胎干细胞或多能干细胞例如来源于脐带血细胞的干细胞产生的工程细胞。

[0137] 因此, 在一个实施方案中, 本发明的方法还包括干细胞和来源干细胞的细胞的使用

用,所述细胞可以优选获自与待治疗的哺乳动物个体相同的物种,例如人干细胞,或来源于其的细胞。

[0138] 在一个实施方案中,干细胞是胚胎干细胞。

[0139] 在一些特定的实施方案中,特别地对于软骨和 / 或骨的修复,所述细胞是间充质细胞或软骨形成细胞。

[0140] 在另外的一些特定的实施方案中,所述哺乳动物细胞获自或来源于脂肪组织或皮肤。

[0141] 在另外的一些特定实施方案中,所述哺乳动物细胞获自或来源于有待按照本发明的方法进行治疗的相同哺乳动物个体。获得和培养来自哺乳动物个体的细胞的此类方法公开于 W002/061052 中。

[0142] 哺乳动物细胞优选以细胞悬浮液或组织外植体的形式提供。组织外植体可直接取自所述哺乳动物个体的任何合适的部分。

[0143] 在一个实施方案中,在与微粒接触之前或同时,浸渍组织外植体,这样提供了单个细胞或结合在一起的细胞群体。

[0144] 在一个实施方案中,用于本发明组合物的细胞可以存在于还包含细胞外基质蛋白(例如在软骨细胞的情况下,由这些软骨细胞产生的软骨基质)的组合物中。应理解,可将软骨细胞维持在培养物中以分泌软骨基质,可按照本发明使用该细胞和软骨基质的组合物作为对无细胞外基质蛋白的细胞的另一选择。

[0145] 备选地,这样的细胞和细胞外基质蛋白的组合物可从组织外植体获得。

[0146] 哺乳动物细胞相对于根据本发明待治疗的活组织而言在来源上可以是自体的、同源的(同种异体的)或异种的。

[0147] 哺乳动物细胞可来源于多能或亚全能干细胞。

[0148] 在一个实施方案中,哺乳动物细胞选自:成纤维细胞、角质细胞、软骨细胞、内皮细胞、成骨细胞、神经细胞和牙周膜细胞。在一个实施方案中,细胞是间充质来源的细胞。

[0149] 在一个实施方案中,哺乳动物细胞群体是软骨形成细胞,例如软骨细胞,其对于软骨修复特别优选。

[0150] 术语“软骨形成细胞”是指获自或来源于从哺乳动物组织获得的细胞的任何细胞,其可以在用于根据本发明的方法之前已进行了体外维持或培养(优选在合适的培养基中)并且发育成或可发育成软骨细胞。预期还可使用干细胞,或当在缺损部位时能够原位成为或产生软骨细胞的其他合适的前体细胞。

[0151] 可如 WO 02/061052(其通过引用合并入本文)中所述制备软骨形成细胞。

[0152] 软骨形成细胞通常是哺乳动物软骨形成细胞,其一些实施方案中获自或来源于有待根据本发明治疗的所述哺乳动物个体。这样的获得和培养来自哺乳动物个体的细胞的方法公开于 W002/061052 中。

[0153] 哺乳动物软骨形成细胞可以以细胞悬浮液或组织外植体的形式提供。组织外植体可直接取自哺乳动物个体的其他部分,从而可以以组织移植例如膝关节半月板移植物的形式存在。

[0154] 哺乳动物软骨形成细胞可以是适合于产生生物合成软骨基质的任何软骨形成细胞。合适的软骨形成细胞可包括培养的软骨细胞,例如培养的膝关节半月板软骨细胞、软

骨细胞来源的细胞系例如 CHON-001、CHON-002 (ATCC® 号 :CRL-2846™、CRL-2847™) 或 TC28 细胞、美国专利申请 20050129673、20060148077、20030064511、20020094754、美国专利 6,841,151、美国专利 6,558,664、美国专利 6,340,592 中公开的软骨形成细胞。

[0155] 人关节软骨细胞是特别优选的。

[0156] 预期还可使用干细胞或能够成为或产生软骨细胞的任何其他合适的前体细胞。

[0157] 用于组合物的细胞以足以导致靶组织或缺损的再生或修复的细胞量,例如大约  $0.1 \times 10^4$  至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 /ml 或  $0.1 \times 10^6$  个细胞 /ml 至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 /ml 的量存在。

[0158] 在一个方面,用于组合物的细胞以足以导致靶组织或缺损的再生或修复的细胞量,例如大约  $0.1 \times 10^4 / 0.1 \text{cm}^3$  至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 / $0.1 \text{cm}^3$  或  $0.1 \times 10^6$  个细胞 / $0.1 \text{cm}^3$  至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 / $0.1 \text{cm}^3$  的量存在。

[0159] 当术语“大约”在本文中 with 具体的数值或数值范围结合使用时,该术语用于指数值的大致范围以及所提及的实际的具体数值。

[0160] 在使用之前,通常将软骨形成细胞与培养基一起置于合适的悬浮液中,所述培养基可任选地包含生长激素、生长因子、粘附促进剂 (adhesion-promoting agent) 和 / 或生理学可接受离子例如钙和 / 或镁离子 (参见 WO 2004/110512)。特别优选细胞悬浮液不包含显著水平的血清,即基本上不含血清,例如不含自体或同源血清,在血清包含可干扰在缺损部位处原位形成固定剂的成分的情况下尤其如此。

[0161] 在一个优选实施方案中,哺乳动物细胞是与所述活组织免疫相容的。然而,可以例如与免疫抑制药一起使用非免疫相容性哺乳动物细胞。

[0162] 本发明的组合物包含生物可降解聚合物的微粒群体、一种 (或多种) 哺乳动物细胞群体和任选地生物相容性粘着剂。

[0163] 通常,使用的细胞以足以导致靶组织或缺损的再生或修复的细胞量,例如大约  $0.1 \times 10^4$  至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 /ml 或  $0.1 \times 10^6$  个细胞 /ml 至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 /ml 的量存在。

[0164] 在一个方面,用于组合物的细胞以足以导致靶组织或缺损的再生或修复的细胞量,例如大约  $0.1 \times 10^4 / 0.1 \text{cm}^3$  至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 / $0.1 \text{cm}^3$  或  $0.1 \times 10^6$  个细胞 / $0.1 \text{cm}^3$  至大约  $10 \times 10^6$  个细胞 / $0.1 \text{cm}^3$  的量存在。

[0165] 存在于本发明的组合物中的微粒可以以例如  $0.1 \text{mg/ml}$  至  $300 \text{mg/ml}$  例如  $0.1 \text{mg/ml}$  至  $100 \text{mg/ml}$  的水平量存在或加入到组合物中。

[0166] 本发明的组合物中存在的微粒可以例如以至少  $0.1 \text{mg/ml}$ 、或至少  $0.25 \text{mg/ml}$ 、或至少  $0.5 \text{mg/ml}$ 、或至少  $1 \text{mg/ml}$ 、或至少  $1.5 \text{mg/ml}$ 、或至少  $2 \text{mg/ml}$ 、或至少  $5 \text{mg/ml}$ 、或至少  $10 \text{mg/ml}$ 、或至少  $20 \text{mg/ml}$ 、或至少  $50 \text{mg/ml}$ 、或至少  $70 \text{mg/ml}$ 、或至少  $90 \text{mg/ml}$ 、或至少  $100 \text{mg/ml}$  的量存在或加入到组合物中。

[0167] 本发明的组合物中存在的微粒可以例如以低于  $300 \text{mg/ml}$ 、或低于  $250 \text{mg/ml}$ 、或低于  $200 \text{mg/ml}$ 、或低于  $150 \text{mg/ml}$ 、或低于  $100 \text{mg/ml}$ 、或低于  $75 \text{mg/ml}$ 、或低于  $50 \text{mg/ml}$ 、或低于  $40 \text{mg/ml}$ 、或低于  $30 \text{mg/ml}$ 、或低于  $20 \text{mg/ml}$ 、或低于  $10 \text{mg/ml}$ 、或低于  $5 \text{mg/ml}$  的量存在或加入到组合物中。

[0168] 应认识到,本发明的组合物包括活的和可能地分裂的 (生长的) 细胞,这样优选在

开始制备组合物的时刻测量组合物中细胞群体的密度,但组合物中细胞群体的密度也可以是(在一个实施方案中就是)即将使用之前的细胞群体密度。

[0169] 同时应当认识到,本发明的组合物可包含增强细胞至微粒的结合或附着的试剂,在一个实施方案中,可向组合物加入一种或多种粘着剂-其目的是将组合物固定在插入身体或缺损的部位,以及在插入身体后增加所插入的组合物结构完整性。尽管认为在体外增强细胞至微粒的结合或附着的试剂可以是(在一个实施方案中就是)与粘着剂相同(类型的)的试剂,优选在即将使用之前向组合物中加入粘着剂或粘着剂前体。粘着剂应当是生物相容性的,这样可考虑经典的外科粘着剂(surgical adhesive)。

[0170] 粘着剂通常以粘着剂前体形式存在,所述前体在即将使用之前或使用期间原位转变成粘着剂。粘着剂前体还可被描述为固定剂前体。粘着剂或固定剂前体的转变可通过任何合适的方法起始,虽然在一个实施方案中可使用交联剂。

[0171] 适当地,在生物可接受的固定剂前体例如血纤蛋白原(其可重组制备或可从哺乳动物宿主细胞分离)存在的情况下应用和/或培养细胞。

[0172] 在一个实施方案中,使用的血纤蛋白原的浓度是1-100mg/ml。

[0173] 在一个实施方案中,使用微粒制备粘着剂前体,或将粘着剂前体与微粒结合-例如可在微粒的制备过程中将固定剂前体与生物可降解的聚合物组合以使微粒包含生物可降解的支架和固定剂前体。

[0174] 在一个实施方案中,在适合于将固定剂前体转变成固定剂材料的转换剂存在的情况下在体内应用细胞。

[0175] 在另一个实施方案中,可以以与血纤蛋白原相同的方式使用基于透明质酸的紫外光固化水凝胶。来自Zimmer Orthobiologics的Photofix HA是这样的材料的实例。

[0176] 应当理解,可使用其他生物可接受的固定剂(粘着剂)-重要的是在即将进行手术操作之前或在手术操作过程中加入或活化固定剂以免妨碍本发明的组合物的施用(其通常通过注射进行),但允许在注射部位快速形成包含细胞群体和微粒的固定组合物。微粒的使用允许在体内形成支架,所述支架可在修复的部位允许充分运动而不阻碍组合物在缺损部位上增加所述组织的能力,同时允许通过支架成分(微粒)的逐渐生物降解由插入的哺乳动物细胞群体随时间再生组织通常在生物修饰的时帧内,这可被来自周围组织的细胞的向内生长进一步加强。

[0177] 固定剂的使用允许细胞在插入部位被固定,而且还将微粒固定在插入部位-这极大地减少了与微粒和/或细胞(或两者的组合)移动至远离治疗部位的位点和器官相关的危险。细胞至远距离和不可预测的器官的移动可导致在身体其他地方的不恰当的组织生长,在使用的细胞是从细胞悬浮液分离的情况下尤其如此,在该情况下存在细胞分化包括形成癌前或甚至癌性细胞的危险。通过将细胞固定在注射部位,可容易地监控缺损的修复和已注射的细胞的命运。

[0178] 在一个实施方案中,转换剂是交联剂,例如凝血酶、凝血酶类似物、重组凝血酶或重组凝血酶类似物。

[0179] 在一个实施方案中,使用的凝血酶的浓度为0.1NIH单位至150NIH单位,和/或用于聚合1-100mg/ml血纤蛋白原的合适水平。

[0180] 将认识到,在原位制备粘着剂中,当粘着剂基于两个成分系统时,重要的是以例如

在体内形成（固定）粘着剂的方式组合成分。在一个实施方案中，交联剂可形成根据本发明组合物的一部分可在即将使用之前向其加入粘着剂前体。

[0181] 本发明的组合物可包含增强细胞附着（或微粒与细胞之间的相互作用）的化合物或试剂，例如任何合适组织的细胞外基质成分，例如来自膀胱、肠、皮肤的细胞外基质成分。

[0182] 因此，本发明的组合物可包含增强细胞附着（或微粒与细胞之间的相互作用）的化合物或试剂，例如选自下述的试剂：硫酸软骨素、透明质酸、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素、生长因子、血纤蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白例如 I 型和 / 或 II 型胶原蛋白、明胶和聚集蛋白聚糖。

[0183] 硫酸皮肤素 (DA) 和 / 或透明质酸 (HA) 是特别优选的，特别是相对于包含软骨形成细胞的组合物而言。

[0184] 在一个实施方案中，将增强细胞附着（或微粒与细胞之间的相互作用）的化合物或试剂以例如大约 0.1 至大约 15wt% 的比例掺入生物可降解的聚合物（或微粒）。

[0185] 本发明的组合物可包含其他成分，包括生物可接受的：润滑剂、等渗缓冲剂、抗生素、生长因子或刺激分子或控制干细胞向期望细胞类型的细胞分化的细胞因子。

[0186] 预期对于一些应用，本发明的组合物可包含至少一种刺激分子，所述刺激分子诱导成软骨细胞 / 软骨细胞中的信号转导，其选自胶原蛋白例如 II、VI、IX 和 XI 型胶原蛋白、蛋白聚糖例如聚集蛋白聚糖、核心蛋白聚糖 (decorin)、纤调蛋白 (fibromodulin) 和双糖链蛋白聚糖 (biglycan)，以及非胶原蛋白例如冷沉淀物、纤连蛋白、玻连蛋白、纤维蛋白原 (fibronogen)、原纤蛋白、去整合素 (kistrin)、锯鳞蝰素 (Echistatin)、von Willebrand 因子、腱糖蛋白 (tenascin) 和锚定蛋白 CII。

[0187] 在一个实施方案中，组合物还可包含一个或多个非合成生物聚合物例如多糖、多肽、木质素、聚磷酸酯或聚羟基链烷酸酯、明胶、透明质酸、胶原，例如 I 型和 / 或 II 型胶原、藻酸盐（酯）、壳多糖、壳聚糖、角蛋白、蚕丝、纤维素和其衍生物以及琼脂糖。

[0188] 在一个实施方案中，组合物还可包含生长因子，例如胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)、MGF 或转化生长因子 (TGF) 例如 TGF- $\alpha$  或 TGF- $\beta$  或 FGF 例如 FGF-1 或 FGF-2。

[0189] 在一个实施方案中，组合物还可包含羟基磷灰石和 / 或磷酸钙。此类物质可以是微粒的成分或组合物的分开的成分，例如包含羟基磷灰石和 / 或磷酸钙或由其组成的颗粒或微粒。

[0190] 在一个实施方案中，本发明的组合物还可包含骨形态发生蛋白 (BMP)。

[0191] 在由 K. Ooster 和其他人以前公开的内容（例如 WO 9808469、W002083878、W003028545 和美国专利 5,759,190 ;5,989,269 ;6,120,514 ;6,283,980 ;6,379,367 ;6,592,598 ;6,592,599 ;6,599,300 ;6,599,301）中，在将细胞和包含细胞的支架置于靶（例如软骨缺损）中之前将细胞用于支架中和培养入支架中进行一段时间。此类方法不使用微粒。

[0192] 本发明涉及用于制备组合物（其中将一个或多个哺乳动物细胞群体附着至生物可降解聚合物的微粒群体）的方法，该方法包括以下步骤：

[0193] a) 在体外将所述一个或多个哺乳动物细胞群体与生物可降解聚合物的微粒群体接触；和

[0194] b) 将所述哺乳动物细胞与该生物可降解聚合物的微粒群体一起在体外培养一段

时间。

[0195] 优选地,在步骤 b) 过程中,将哺乳动物细胞附着至微粒以产生微粒 / 哺乳动物细胞复合物。应理解,哺乳动物细胞将在表面上附着生长,或在多孔微粒的情况下可能在微粒内生长。

[0196] 术语“体外接触”,如本文中所使用的,是指步骤,在该步骤中,在体外条件下,即在活哺乳动物外的受控环境的条件下将哺乳动物细胞施加到生物可降解聚合物的微粒上,与其一起使用或在其中使用。

[0197] 术语“体外培养”,如本文中使用的,是指步骤,在该步骤中,在体外条件下,即在活哺乳动物外的受控环境的条件下维持哺乳动物细胞。备选地,本领域技术人员可使用体外“培养细胞”或“增殖细胞”的短语,其也在术语“培养”的意义内。当体外培养细胞时,可形成组织。

[0198] 在这点上,一旦已将细胞与微粒混合,即可将本发明的组合物培养一段时间。通常,培养步骤可以进行至少数小时,例如 1 至 24 小时,或者数天,例如 1 至 6 天,或者甚至数周,例如 1 至 6 周。在本说明书中“数”(小时、天、周等)可以是例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24。通常使用本领域技术人员熟知的合适的培养条件进行培养。某些形式的搅拌可能比较理想,以保持微粒个体本性。

[0199] 通常,在合适的培养基例如液体培养基中进行组合物的制备。我们已发现,在已向培养基加入微粒后,应用真空是有利的,这确保了培养基分布在周围和 / 或贯穿其中(在多孔性微粒的情况下),这促进了微粒在培养基中的分布。在这样的实施方案中,可在真空步骤之前或优选在之后接触细胞。

[0200] 上述方法还可包括加入上述其他成分(包括可增强细胞附着的试剂)的步骤。此类其他成分可形成微粒的部分或可被加入至围绕微粒和 / 或细胞的培养基中。

[0201] 在一些特定的方面,通常在培养皿或培养瓶中,将与培养基混合的哺乳动物细胞置于生物可降解聚合物的无细胞微粒的表面上或至少与其结合。哺乳动物细胞通常与促进细胞附着和 / 或向内生长的成分一起通过亲水性支架材料吸附。

[0202] 可使用任何哺乳动物细胞,将所述方法用于制备适合于受试者中活组织的增加和 / 或再生的微粒群体。

[0203] 应理解,在已将哺乳动物细胞用于生物可降解聚合物的微粒后,可使细胞穿过聚合物迁移和 / 或生长以固定在该聚合物的表面上或其结构内。在一个实施方案中,组合物包含促进细胞附着和 / 或向内生长的成分 - 所述成分在一个实施方案中可被整合入微粒。

[0204] 本发明提供了用于患者中活组织的再生或增加的方法,所述方法包括制备根据本发明的组合物和将所述组合物施用入待再生和 / 或增加的活组织。

[0205] 活组织通常是活哺乳动物个体的一部分。通常待治疗的活组织具有利用上述方法治疗的缺损。

[0206] 合适地,在一个优选实施方案中,通过注射进行施用。

[0207] 应当认识到,在本发明的组合物开始制备与其在体内增加 / 再生组织的应用之间可经历一段时间。事实上,据认为在许多情况下,将哺乳动物细胞群体与微粒一起培养可能是有益的 - 这允许细胞向微粒或甚至在其内部的附着或生长,而且还可允许干细胞分化成特定细胞类型或产生期望的细胞外基质。

[0208] “活哺乳动物个体”是适合于移植的任何活哺乳动物个体，优选是人，通常是患者。然而，本发明的方法还可适用于其他哺乳动物，例如狗、马或山羊。

[0209] 可作为手术方法或在手术方法过程中进行本发明的植入生物合成性软骨基质的方法，所述手术方法是例如内窥镜、关节镜或微创手术或者常规的或开放性手术的方法。

[0210] 在一个实施方案中，在重建手术或整容手术过程中进行植入。

[0211] 术语“缺损”，如本文中所使用的，是指组织的任何有害或损伤状况，其与现有的或将来的机能的丧失或受阻、残疾、不适或疼痛相关。缺损优选与正常组织的损失例如正常组织的显著损失相关，或与组织功能的丧失相关，例如针对括约肌失禁而言。

[0212] 预期可预防性使用本发明的方法，即用于预防缺损的发生或预防现有缺损的恶化，或者预防或减轻疾病的严重程度。缺损可以是例如组织中的空洞、组织中的撕裂伤或创伤、组织密度的损失、异常细胞类型的发生，或由手术切除非健康或损伤组织等引起的。

[0213] 在一个实施方案中，缺损可以是损伤的关节软骨、下至和 / 或包括骨的关节软骨缺损（骨关节炎）、软骨和骨缺损的组合、由正常软骨或骨围绕的骨中的缺损、或骨结构本身的缺损或需要通过加入骨细胞和支架（如在 SCAS 系统中）来增强的骨结构。在一个实施方案中，缺损存在于软骨中，例如关节软骨缺损。

[0214] 在一些实施方案中，在应用本发明的组合物之前，在临床条件下有意地在植入部位诱导一个或多个微小骨折。预期来自待治疗哺乳动物的宿主细胞将从微小骨折处迁移出来以帮助植入物附着至该植入部位。微小骨折的使用被认为对于软骨或骨缺损的治疗是特别合适的。

[0215] 术语“组织”，如本文中所使用的，是指作为活哺乳动物个体例如人的一部分的实体活组织。组织可以是硬组织（例如，骨、关节和软骨）。组织可选自：软骨，例如关节软骨、骨、牙周组织例如牙相关骨结构（teeth-associated bone structure）、牙相关韧带（teeth-associated ligament）和牙骨质、韧带和腱、肌肉例如平滑肌或任何其他间充质组织。

[0216] 在一个特定实施方案中，组织是肌肉。在这样的实施方案中，细胞群体是合适的成肌细胞或能够分化成成肌细胞的细胞（例如干细胞）。肌肉可以是平滑肌，例如括约肌。

[0217] 在一个实施方案中，本发明提供了用于括约肌的增加和 / 或修复的方法。

[0218] 在一个实施方案中，本发明提供了用于治疗失禁例如肛门失禁或尿失禁的方法。

[0219] 在一个实施方案中，组织是骨 - 在这种情形下缺损可以是人体各种骨内的骨折，例如股骨、胫骨、髌骨、脊椎骨、肱骨、桡骨和尺骨中，所述组织可以是上颌（上颌骨）或下颌骨（下颌骨）。

[0220] 本发明还涉及试剂盒，其包含下列独立的区室：

[0221] a. 包含生物可降解聚合物的微粒群体的区室；

[0222] b. 装有一个或多个哺乳动物细胞群体的区室，和任选地：

[0223] c. 包含生物相容性粘着剂的区室，其可以与 a. 中提及的区室相同或不同，和任选地；

[0224] d. 包含所述生物相容性粘着剂的转换剂的区室，

[0225] 其中 a. 中提及的区室与自 b. 中提及的区室是隔开的。

[0226] 试剂盒可包括可以与 a.、b. 或 c. 中提及的区室相同或不同的区室，其中所述区室

装有本文中提及的其他化合物或试剂,例如生长因子或促进细胞附着的成分。

[0227] 应认识到,各部分的试剂盒包含本发明组合物的成分,并且其用于制备根据本发明的组合物。在这点上,在使用组合物之前,将哺乳动物细胞的群体与微粒和任选地粘着剂(固定剂前体)以及任选地一个或多个其他成分组合。可在使用之前在微粒存在的情况下,任选地在增强细胞与微粒结合的试剂存在的情况下培养细胞一段时间。然后可在即将使用之前加入粘着剂和任选地其他成分。

[0228] 在一个优选实施方案中,各部分的试剂盒涉及用于软骨修复和其中存在空洞的其他缺损的试剂盒。这样的试剂盒优选包含:

[0229] a) 形成糊剂的浓度为 300mg/ml 的球体。球体可包含活性成分;

[0230] b) 对于 2mm 深度的缺损浓度为 1 百万个/cm<sup>2</sup> 的细胞;

[0231] c) 组织胶如血纤蛋白胶。

[0232] d) 用于将球体置于缺损中的装置。例如无针但具有柔韧出口的注射器,从而确保通过关节镜操作可能到达位于关节内不同位置的缺损。

[0233] 可通过将颗粒与水在 20-60% w/w 的范围内混合来获得糊剂。当将 0.2g 颗粒在 1ml 水中混合时,来自实验 13 的颗粒形成糊剂。

[0234] 还可在无 b) 所述细胞的情况下形成该试剂盒。

[0235] 在另一个优选实施方案中,各部分的试剂盒涉及用于肌肉修复例如括约肌置换的试剂盒。这样的试剂盒优选包含:

[0236] a) 形成液体的浓度为 10-150mg/ml 的球体。球体可包含活性成分;

[0237] b) 浓度为 1 百万个细胞/50-100mg 的细胞;

[0238] c) 用于将细胞置于肌肉中的装置。例如具有针的注射器。

[0239] 当将颗粒与水在 1 至 40% w/w 的范围内混合时,可获得颗粒的可注射悬浮液。当将 0.4g 颗粒在 1ml 水中混合时,来自实验 3 的颗粒形成可通过 23G 针注射的悬浮液。

[0240] 还可形成无 b) 所述细胞的该试剂盒。

[0241] 一种优选的固定剂(粘着剂)材料是血纤蛋白。

[0242] 在一个优选实施方案中,固定剂材料是水凝胶形式,即能够结合水的胶凝材料,例如通过固定剂前体血纤蛋白原与转换剂凝血酶的组合形成的血纤蛋白。

[0243] 术语“固定剂前体”,如本文中所使用的,是指通常通过在本文中称为“转换剂”的另一种化合物的作用可以转变成固定剂材料的化合物或材料。

[0244] 在一个实施方案中,转换剂可以是交联剂和/或聚合剂和/或胶凝剂。

[0245] 在一个优选实施方案中,固定剂前体向固定剂的转变通过使用转换剂发生。将转换剂添加至固定剂前体优选在将组合物即将用于缺损部位之前、同时或之后立即进行-即转换剂将固定剂前体转变成固定剂例如凝胶/水凝胶或固体的作用只有当细胞在合适的位置,在缺损的部位上时才发生。

[0246] 在一个实施方案中,转换剂是适合于将底物转变成凝胶例如血纤蛋白凝胶的酶。

[0247] 在一个实施方案中,转换剂是紫外光(例如对于 Photofix HA)。

[0248] 在一个实施方案中,生物可降解的聚合物是以这样的方式制备的,即在使用之前用 i) 固定剂前体或 ii) 能够保持其活性的转换剂(例如,由 HumaGene Inc., Chicago, Illinois 开发的凝血酶类似物)将其“浸渍”。随后在即将把本发明的组合物应用于缺损

部位之前、期间或之后加入 i) 转换剂或 ii) 固定剂前体有效地在原位产生粘着剂。

[0249] 用于本发明的一些实施方案中的固定剂前体可以是能够被多孔支架吸收并且转变成能够将软骨基质锚定至支架和将细胞锚定至支架的固定剂的任何形式的生物相容性胶或粘着剂,包括凝胶化试剂。

[0250] WO 2004/110512(通过引用合并入本文)提供了数种固定剂前体和固定剂前体与转换剂的合适组合的特定实例。合适地,固定剂前体对转换剂的比例可用于控制固定发生的速率和由固定剂提供的支持的水平。

[0251] 合适的固定剂前体可以是多糖,例如琼脂糖,或者藻酸酶或蛋白质,例如选自下述的蛋白质:血纤蛋白原、明胶、胶原蛋白、胶原蛋白肽(I型、II型和III型)。

[0252] 优选固定剂前体是生物相容性的,并且可以例如是已从人获得的或备选地重组产生的人蛋白质。人血纤蛋白原是一种优选的固定剂前体,其在例如暴露于例如凝血酶时将聚合。合适地,固定剂可以是生物相容性医用粘胶剂。

[0253] 在一个实施方案中,例如当固定剂前体是血纤蛋白原时,转换剂是凝血酶或凝血酶抑制剂。可加入其他凝固因子例如因子 XIII 以促进转变。在一个特定的实施方案中,可加入可促进凝血酶对血纤蛋白酶的切割作用导致聚合化的离子或盐例如钠、钙或镁等。可使用任何来源的凝血酶,虽然优选使用生物相容性形式-例如人重组凝血酶可用于治疗人组织缺损。备选地,可使用其他来源的凝血酶,例如牛凝血酶。

[0254] 固定可以是形成凝胶(即凝胶化)例如水凝胶的形式,其将细胞锁在支架中同时允许合适的培养基出入以便细胞迁移和生长,从而促进新软骨组织在整个支架中生长。

[0255] 在一个实施方案中,生物可接受的固定剂前体是从生物获得的或生物来源的成分,例如血纤蛋白原。

[0256] 血纤蛋白原可以是重组血纤蛋白原(例如,来自 HumaGene Inc., Chicago, Illinois, USA 的重组人血纤蛋白原)的形式。因此,重组血纤蛋白原可分离自重组哺乳动物宿主细胞(例如从与哺乳动物个体相同的物种或转基因宿主获得的或来源于其的宿主细胞)。

[0257] 备选地,血纤蛋白原是从血浆例如人血浆产生和纯化的。

[0258] 使用的血纤蛋白原的合适浓度包括 1-100mg/ml。

[0259] 在一个实施方案中,特别地当固定剂前体是血纤蛋白原时,转换剂可选自:凝血酶、凝血酶类似物、重组凝血酶或重组凝血酶类似物。

[0260] 使用的凝血酶的合适浓度是 0.1NIH 单位至 150NIH 单位,和/或用于聚合 1-100mg/ml 血纤蛋白原的合适凝血酶水平。

[0261] 标准 NIH 单位是指常规使用的用于衡量凝血酶的美国国立卫生研究院标准单位,根据 Gaffney PJ, Edgell(Thromb Haemostasis. 1995 Sep;74(3):900-3,其相当于 1.1 至 1.3IU,优选 1.15IU 的凝血酶。

[0262] 术语“生物相容性”是指当插入哺乳动物的身体例如患者的身体时,特别地当插入缺损的部位时,不导致显著的毒性或来自该个体的有害免疫反应的组合物或化合物。

[0263] 当选择组织胶时,优选调整固化以使在胶完全固化之前将球体、细胞和胶混合和应用(例如至缺损处)。

[0264] 在一个实施方案中,生物可降解的聚合物可选自:a) 乙交酯、L-丙交酯、DL-丙

交酯、内消旋丙交酯、ε-己内酯、1,4-二噁烷-2-酮、d-戊内酯、β-丁内酯、g-丁内酯、ε-癸内酯、1,4-二氧杂环庚烷-2-酮、1,5-二氧杂环庚烷-2-酮、1,5,8,12-四氧杂环十四烷-7-14-二酮、1,5-二氧杂环庚烷-2-酮,6,6-二甲基-1,4-二噁烷-2-酮和三亚甲基碳酸酯的均聚物或共聚物;b)单或双功能聚乙二醇与上述a)的聚合物的嵌段共聚物;c)单或双功能聚亚烷基二醇与上述a)的聚合物的嵌段共聚物;d)上述聚合物的混合物;和e)聚酸酐和聚原酸酯。

[0265] 在一个实施方案中,生物可降解的聚合物可选自:胶原、藻酸盐(酯)、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、MPEG-PLGA或PLGA。

[0266] 在一些实施方案中,生物可降解的聚合物是亲水性的。

[0267] 在其他一些实施方案中,生物可降解的聚合物或包含所述生物可降解聚合物的微粒对于水和/或等渗缓冲液是多孔的。

[0268] 在一个实施方案中,生物可降解的聚合物(基本上)由分子量(例如平均分子量)为大于大约1kDa,例如大约1kDa至大约1百万kDa,例如25kDa至75kDa的聚合物组成或包含这样的聚合物,例如大多数这样的聚合物。

[0269] 在一些优选实施方案中,生物可降解的聚合物是合成的。

[0270] 生物可降解聚合物或微粒的孔可以被促进细胞附着和/或向内生长以再生组织的成分部分占据,例如选自下述的成分:硫酸软骨素、透明质酸、硫酸肝素、硫酸类肝素、硫酸皮肤素、生长因子、血纤蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白、明胶和聚集蛋白聚糖。

[0271] 在一个有趣的实施方案中,以大约0.1至大约15wt%,例如0.1至10wt%,例如0.1至10wt%的比例将一定量的增强细胞迁移和/或组织再生的化合物例如透明质酸掺入生物可降解的聚合物或微粒中。在一个实施方案中,掺入水平低于15wt%,例如低于10wt%或低于5wt%。在一个实施方案中,掺入水平高于0.01wt%,例如高于0.1wt%,或高于1wt%。

[0272] 如上所述,生物可降解的聚合物或微粒可包含任何合适的生物学可接受的材料或由其组成,然而在一个优选实施方案中,支架一般由选自下组的化合物组成:聚丙交酯(PLA)、聚己内酯(PCL)、聚乙交酯(PGA)、聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、MPEG-PLGA(甲氧基聚乙二醇)-聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)、多羟酸。在该方面,支架(不包括孔空间和任何另外的成分,例如促进细胞附着和/或向内生长以再生组织的成分)可包含至少50%,例如至少60%,至少70%,至少80%或至少90%的本文中提供的一种或多种聚合物,包括聚合物的混合物。

[0273] PLGA和MPEG-PLGA是特别优选的。

[0274] 生物可降解的聚合物或微粒可通过冷冻干燥在溶液中包含所述化合物(例如上面所列的化合物)的溶液来制备。

[0275] 在一些实施方案中,生物可降解的聚合物或微粒可具有低于90%,例如低于70%,例如低于50%的孔隙度。

[0276] 在一些实施方案中,生物可降解的聚合物或微粒是无孔的或基本上无孔的,例如具有低于5%,低于2%或甚至低于1%的孔隙度。

[0277] 在其他一些实施方案中,生物可降解的聚合物或微粒可具有在20%至99%,例如50至95%,或75%至95%的范围内的孔隙度。

[0278] 孔隙度可以通过本领域内已知的任何方法,例如将孔的体积与实心颗粒的体积相比较来测量。这可通过测定微粒的密度与相同组合物的基本上无孔的样品作为微粒相比较来进行。备选地,可使用物理和化学气体吸附(例如通过多点 B. E. T. 氮吸附法测量的表面积)以及压汞法孔隙度分析(mercury intrusion porosimetry)或沉降技术。

[0279] 由此公开的实例提供的多孔微粒的一个用途是用于植入生物体(优选人)的植入物。通过提供多孔颗粒,我们获得了颗粒的结构完整性与向活生物体植入尽可能小的外来材料之间的平衡。结构完整性确保了颗粒在降解过程中不崩塌,但在细胞生长过程中可被组织替代。外来材料的植入的一个不利方面是来自 MPEG-PLGA 和 PLGA 的降解产物都是酸性的。因此,采用多孔结构和极小的植入材料可产生较少的酸性降解产物和周围组织的较低酸化。

[0280] 多孔颗粒的另一个有利方面是获得的粗糙表面。这样的粗糙表面可使得细胞更容易附着、生长和当形成组织时降解支架。

[0281] 在一个实施方案中,微粒的大小平均为 10 至 1000 微米,例如 25 至 500 微米,例如 20 至 400 微米,例如 40 至 200 微米。

[0282] 在一个实施方案中微粒的大小(粒度),或在另一个实施方案中微粒的平均大小(粒度),小于 1000 微米,例如小于 700 微粒,例如小于 500 微粒,例如小于 400 微粒,例如小于 300 微粒,例如小于 200 微粒或甚至小于 100 微米。

[0283] 所指定大小(粒度)范围的微粒的选择可以例如通过使用大小截止过滤器(size cut off filter)来获得。通常可初步获得一个范围的微粒大小(粒度),但优选的微粒大小(粒度)范围例如 20 至 100 微米的颗粒可通过经合适大小的过滤器筛分来获得。

[0284] 在一个实施方案中颗粒的大小(粒度),或在一个实施方案颗粒的平均大小(粒度)低于 200 微米(在直径上),例如低于 100 微米,例如低于 75 微米,例如低于 50 微米,例如低于 40 微米,例如低于 30 微米,例如低于 20 微米,例如是 1-50 微米,例如 1 至 40 微米,例如 1 至 30 微米,例如 1 至 20 微米,例如 1 至 10 微米。

[0285] 在一个实施方案中,颗粒的大小/粒度(或平均大小/粒度)是至少 10 微米,例如至少 20 微米,例如至少 30 微米,例如至少 40 微米,例如至少 60 微米,例如至少 70 微米,例如至少 80 微米,例如至少 90 微米,例如至少 100 微米。

[0286] 优选微粒较小。即,如实施例和图中所描述的,它们具有 20 至 110  $\mu\text{m}$  的粒度分布。

[0287] 在一个实施方案中,生物可降解的聚合物或微粒包含生物学聚合物,即生物聚合物,例如蛋白质、多糖、木质素、聚磷酸酯或聚羟基链烷酸酯(例如美国专利 6,495,152 中描述的)。合适的生物聚合物可选自:明胶、胶原蛋白、藻酸盐(酯)、壳多糖、壳聚糖、角蛋白、蚕丝、纤维素和其衍生物以及琼脂糖。其他合适的聚合物或生物聚合物包括 IV 型胶原蛋白或例如包含天然软骨材料(其已经历脱脂和其他处理,从而剩下 II 型胶原蛋白材料和糖胺聚糖)的其他改性胶原蛋白(美国专利 6,676,969)。备选地,可将纯化的 II 型胶原的颗粒与糖胺聚糖和任何其他所需添加剂混合。此类额外的添加剂可以例如包括软骨粘连蛋白或锚定蛋白 II 以帮助软骨细胞附着至 II 型胶原纤维和生长因子例如软骨诱导因子(CIF)、胰岛素样生长因子(IGF)和转化生长因子(TGF  $\beta$ )。

[0288] 在一些实施方案中,生物可降解的聚合物是亲水性的,即当置于水性溶液例如生理介质、缓冲液或水中时,具有吸收至少少量水或水性溶液(例如细胞悬液组合物,例如水

凝胶溶液)的能力,例如吸收支架体积的至少1%,例如至少例如至少2%,例如至少5%,例如至少10%,例如至少20%,例如至少30%,例如至少50%的水(或相当的水性溶液)的能力。对于一些应用,聚合物可吸收上述量的细胞悬浮液至其多孔结构中是有益的,这样可以在整个微粒中提供相对均匀的细胞分布。

[0289] 在一些实施方案中,生物可降解的聚合物是至少部分亲水的,即聚合物中具有可被认为是亲水的组分,例如 MPEG-PLGA 共聚物的 MPEG 部分。

[0290] 术语亲水可与术语‘极性’互换使用。

[0291] 在使用非极性聚合物或微粒的情况下,优选使用促进细胞更新的试剂例如湿润剂来预处理聚合物或微粒。还可将湿润剂与亲水聚合物结合使用来进一步提高细胞至多孔结构的渗透。

[0292] 微粒可包含聚酯或由其组成。通过将亲水性模块(部分)引入聚合物或微粒中,可提高聚合物或微粒的生物相容性,因为其提高了材料的湿润特征,并且初始细胞附着在非极性材料上是有所削弱的。

[0293] 在本发明的高度有趣的实施方案中,根据本发明的生物可降解的聚合物由一种或多种聚合物组成或包含所述聚合物,所述聚合物选自:聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(D/L-乳酸)(PDLLA)、聚(己内酯)(PCL)和聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)和其衍生物,特别是包含各自聚合物主链并加入了增强聚合物亲水性质的取代基或组成例如 MPEG 或 PEG 的衍生物。在本文中提供了实例,其包括高度优选的一组聚合物,如 MPEG-PLGA。

[0294] 在一个实施方案中,支架包含合成聚合物或由其组成。

[0295] WO 07/101443 公开了在本发明中用作生物可降解聚合物的合适的聚合物以及制备它们的方法。

[0296] 用于本发明方法的优选生物可降解聚合物由聚亚烷基二醇残基和一个或两个聚(乳酸-共-乙醇酸)残基构成。

[0297] 因此,在用于本发明方法的一个方面中,从具有下列通式的聚合物制备支架,或所述支架包含具有下列通式的聚合物或由组成:

[0298]  $A-O-(CHR^1CHR^2O)_n-B$

[0299] 其中

[0300] A 是分子量为至少 4000g/mol 的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基,其中聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中 (i) 丙交酯单位与 (ii) 乙交酯单位的摩尔比在 80 : 20 至 10 : 90,特别地 70 : 30 至 10 : 90 的范围内,更优在 60 : 40 至 40 : 60 或大约 50 : 50 的范围内,包括 50 : 50。

[0301] B 是如对于 A 所定义的聚(丙交酯-共-乙交酯)残基或选自氢、C<sub>1-6</sub>-烷基和羟基保护基团。

[0302] 各  $-(CHR^1CHR^2O)-$  单位中的 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 中的一个选自氢和甲基,并且同一  $-(CHR^1CHR^2O)-$  单位中的 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 中的另一个是氢,

[0303] n 代表聚合物链内的  $-(CHR^1CHR^2O)-$  单位的平均数目,其为 10-1000,特别地 16-250 的范围内的整数,

[0304] (iii) 聚亚烷基二醇单位  $-(CHR^1CHR^2O)-$  与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中 (i) 丙交酯单位和 (ii) 乙交酯单位的合并量的摩尔比是至多 20 : 80,

[0305] 并且其中共聚物的分子量是至少 10,000g/mol, 优选至少 15,000g/mol, 或甚至至少 20,000g/mol。

[0306] 因此, 用于本发明的方法的聚合物可以是二嵌段型或三嵌段型聚合物。

[0307] 应理解, 用于本发明的聚合物包含一个或两个残基 A, 即聚(丙交酯-共-乙交酯)残基。已发现此类残基应当具有至少 4000g/mol, 更特别地至少 5000g/mol 或甚至至少 8000g/mol 的分子量。

[0308] 聚合物中的聚(丙交酯-共-乙交酯)可在生理条件下, 即在体液和组织中降解。然而, 由于此类残基的分子量(和本文中所示的其他要求)的原因, 据认为降解将十分缓慢, 足以使得由聚合物制造的材料和物体可在聚合物被完全降解之前实现它们的目的。

[0309] 表述“聚(丙交酯-共-乙交酯)”包括许多聚合物变体, 例如聚(随机-丙交酯-共-乙交酯)、聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)、聚(内消旋丙交酯-共-乙交酯)、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)、聚(D-丙交酯-共-乙交酯), PLGA 中丙交酯/乙交酯的顺序可以是随机的、逐渐减少的(tapered)或是模块的形式, 并且丙交酯可以是 L-丙交酯、DL-丙交酯或 D-丙交酯。

[0310] 优选地, 聚(丙交酯-共-乙交酯)是聚(随机-丙交酯-共-乙交酯)(poly(random-lactide-co-glycolide))或聚(逐渐减少的-丙交酯-共-乙交酯)(poly(tapered-lactide-co-glycolide))。

[0311] 另一个重要特征是聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中(i)丙交酯单位与(ii)乙交酯单位的摩尔比应当在 80 : 20 至 10 : 90, 特别地 70 : 30 至 10 : 90 的范围内, 更优选在 60 : 40 至 40 : 60 或大约 50 : 50 的范围内, 包括 50 : 50。

[0312] 已普遍观察到, 对于其中聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中(i)丙交酯单位与(ii)乙交酯单位的摩尔比是 70 : 20 或更小的聚合物可获得最佳结果, 然而, 对于相应摩尔比高达 80 : 20 的聚合物, 只要(iii)聚亚烷基二醇单位-(CHR1CHR20)-与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中(i)丙交酯单位和(ii)乙交酯单位的合并量的摩尔比至多为 8 : 92 时, 也观察到相当好的结果。

[0313] 如上所述, B 是如对于 A 所定义的聚(丙交酯-共-乙交酯)或选自氢、C<sub>1-6</sub>-烷基和羟基保护基团。

[0314] 在一个实施方案中, B 是如对于 A 所定义的聚(丙交酯-共-乙交酯)即聚合物为三嵌段型的聚合物。

[0315] 在另一个实施方案中, B 选自氢、C<sub>1-6</sub>-烷基和羟基保护基团, 即聚合物是二嵌段型聚合物。

[0316] 最常见地(在本实施方案中), B 是 C<sub>1-6</sub>-烷基, 例如甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、叔丁基、1-戊基等, 最优选甲基。在其中 B 是氢, 即相应于末端 OH 基的情况下, 通常使用羟基保护基团作为 B 来制备聚合物。“羟基保护基团”是可在聚合物合成后通过例如氢解、水解或其他合适的方法除去而不破坏聚合物, 从而在 PEG- 部分上留下游离羟基的基团, 参见, 例如描述现有技术方法例如由 Greene, T. W. 和 Wuts, P. G. M. 描述的方法(Protecting Groups in Organic Synthesis, 第 3 或更后的版本)的教科书。其中特别有用的实例是苄基、四氢吡喃基、甲氧基甲基和苄氧羰基。可除去此类羟基保护基团以获得其中 B 是氢的聚合物。

[0317] 各  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-$  单位中的  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  中的一个选自氢和甲基, 并且同一  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-$  单位中的  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  中的另一个是氢。因此,  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})_n-$  残基可以是聚乙二醇、聚丙二醇或聚(乙二醇-共-丙二醇)。优选地,  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})_n-$  残基是聚乙二醇, 即各单位内的  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  都是氢。

[0318]  $n$  代表聚合物链内  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-$  单位的平均数目, 其为 10-1000, 特别地 16-250 的范围内的整数。应当理解,  $n$  代表聚合物分子库中  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-$  单位的平均数目。这对于本领域技术人员来说将是很显然的。聚亚烷基二醇残基  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})_n-$  的分子量通常在 750-10,000g/mol, 例如 750-5,000g/mol 的范围内。

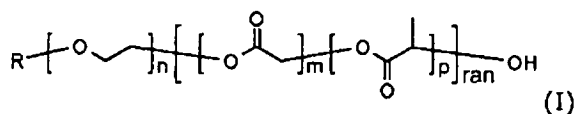
[0319]  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})_n-$  残基在生理条件下通常不降解, 但在另一方面可在体内例如从人体分泌。

[0320] (iii) 聚亚烷基二醇单位  $-(\text{CHR}^1\text{CHR}^2\text{O})-$  与聚(丙交酯-共-乙交酯)残基中 (i) 丙交酯单位和 (ii) 乙交酯单位的合并量的摩尔比还起着一定的作用, 并且应当至多为 20 : 80。最常见地, 该比率为至多 18 : 82, 例如至多 16 : 84, 优选至多 14 : 86, 或至多 12 : 88, 特别地至多 10 : 90, 或甚至至多 8 : 92。通常, 该比率在 0.5 : 99.5 至 18 : 82 的范围内, 例如在 1 : 99 至 16 : 84 的范围内, 优选在 1 : 99 至 14 : 86 的范围内, 或在 1 : 99 至 12 : 88 的范围内, 特别地在 2 : 98 至 10 : 90 的范围内, 或甚至在 2 : 98 至 8 : 92 的范围内。

[0321] 据信共聚物的分子量不是特别相关的, 只要其为至少 10,000g/mol 即可。然而, 优选地, 其分子量为至少 15,000g/mol。“分子量”应解释为聚合物的数均分子量, 因为本领域技术人员将理解聚合物分子库内聚合物分子的分子量将由围绕平均值分布的值代表, 例如由高斯分布代表。更常见地, 分子量在 10,000-1,000,000g/mol, 例如 15,000-250,000g/mol 或 20,000-200,000g/mol 的范围内。发现特别有趣的聚合物是分子量至少为 20,000g/mol, 例如至少 30,000g/mol 的那些聚合物。

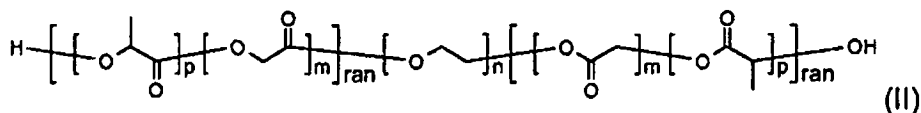
[0322] 如下举例说明聚合物结构(其中  $\text{R}$  选自自氢、 $\text{C}_{1-6}$ -烷基和羟基保护基团;  $n$  是如上定义的, 并且  $m$ 、 $p$  和  $r$  选择或满足对于聚(丙交酯-共-乙交酯)残基的上述规定):

[0323]



[0324] 二嵌段型聚合物

[0325]



[0326] 三嵌段型聚合物

[0327] 对于上述聚合物结构 (I) 和 (II) 的每一个而言, 将认识到, 取决于起始材料和反应条件, 由  $p$  和  $m$  代表的丙交酯和乙交酯单位可以是随机分布的。

[0328] 此外, 还应认识到, 丙交酯单位可以是 D/L 或 L 或 D 型, 通常 D/L 或 L 型。

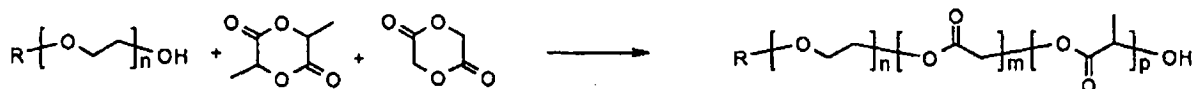
[0329] 如上所述, 聚(丙交酯-共-乙交酯)残基即聚酯残基在生理环境中通过水解降解, 聚亚烷基二醇残基从例如哺乳动物身体分泌。可如实验部分中所概述的估量生物可降

解性。

[0330] 原则上可按照本领域技术人员已知的原理制备聚合物。

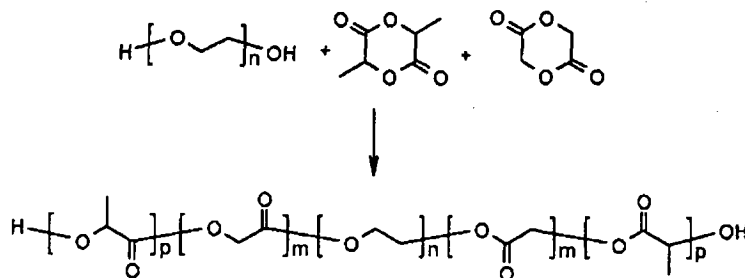
[0331] 原则上,可如下制备其中 B 不是残基 A 的聚合物(二嵌段型聚合物):

[0332]



[0333] 原则上,可如下制备其中 B 是残基 A 的聚合物(三嵌段型聚合物):

[0334]



[0335] 除非应用特殊条件,否则丙交酯单位和乙交酯单位的分布将在各聚(丙交酯-共-乙交酯)残基内随机分布或逐渐减少。

[0336] 优选支架内所用聚合物中存在的乙交酯单位与丙交酯单位的比率在大约 80 : 20 的上限与大约 10 : 90 的下限之间,更优选在大约 60 : 40 至 40 : 60 的范围内。

[0337] 优选地, PEG 含量的上限为至多大约 20 摩尔%,例如至多大约 15 摩尔%,例如 1-15 摩尔%之间,优选 4-9 摩尔%之间,例如大约 6 摩尔%。

[0338] 在本说明书中,生物可降解的聚合物意指在被导入生物系统后在体内在一段时间内消失的聚合物;其籍以消失的机制可以不同,其可被水解,被分解,被生物降解/生物可吸收/生物可吸附,溶解或以其他方式从生物系统消失。当在临床背景中使用,这是一个巨大的临床有利方面,因为不需要从修复部位取出任何东西。因此,新形成的组织不因临时支架的存在或甚至取出而受到扰乱或压迫。通常优选支架在 1 天至 10 周的时期内被分解。这取决于具体的应用。

[0339] 如实施例中所示,有可能通过利用体外模型测量一些聚合物的生物可降解性-和测定生物可降解的聚合物的体外降解。在一个实施方案中,聚合物在 60°C 下于磷酸盐缓冲液 (pH7) 中降解,这样在例如 10 天或 20 天或 30 天后剩下不超过 5% 的聚合物。

[0340] 对于一些聚合物,例如基于 PLGA 的聚合物,(生物)降解发生或在一定程度上牵涉自身降解过程。该过程可适当地通过外源施用辐射来加速。在一个实施方案中,可以例如通过施用辐射源例如  $\beta$  粒子来加速聚合物的降解。

[0341] 通过自由基分解降解的聚合物例如 PLGA 或 MPEG-PLGA 的生物可降解性可通过灭菌或预处理例如通过  $\beta$ -辐射起始。

[0342] 有可能通过改变丙交酯与乙交酯的摩尔比来改变 DL-丙交酯与乙交酯的共聚物的降解时间。纯的聚乙交酯具有 6 至 12 个月的降解时间,聚(D,L-丙交酯)具有 12-16 个月的降解时间,聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯) 85 : 15 具有 2-4 个月的降解时间。50 : 50 摩尔比的共聚物有最短的降解时间,为 1-2 个月。还可能通过改变分子量来改变降解时间,

但该效应与因为 L : G- 比率的可能变化相比较较小 ( 参见图 8 和 9 的报导 ) 。理论上对于非常低分子量的材料可能获得显著更快的降解, 但这些材料具有妨碍它们用于大多数医疗装置的机械性能。

[0343] 在实验部分进一步举例说明根据本发明的微球体和微粒的合成。

[0344] 聚合物或微粒可以例如是具有如上所述指定的孔隙度的生物可降解的多孔材料。

[0345] 聚合物或微粒材料的孔隙空间可以不被占据, 以允许或甚至促进细胞附着和 / 或向内生长到合成的生物可降解性聚合物或微粒内。在一个实施方案中, 材料的孔至少被来自细胞外基质的成分所部分占据。来自细胞外基质的成分的实例有硫酸软骨素、玻尿酸、透明质酸、硫酸肝素、硫酸类肝素、硫酸皮肤素、生长因子、血纤蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、胶原、明胶和聚集蛋白聚糖。

[0346] 如其他地方所论述的, 支架还可包含单独的或与上述成分之一组合的转换剂凝血酶。

[0347] 可以以不均匀分散的颗粒的形式或以表面包衣的形式加入细胞外基质的成分。来自细胞外基质的成分相对于合成聚合物的浓度通常在 0.5-15% (w/w) 的范围内, 优选低于 10% (w/w) 。此外, 细胞外基质的成分的浓度相对于材料的体积而言优选为至多 0.3% (w/v) , 例如至多 0.2 (w/v) 。

[0348] 可根据已技术, 例如 Antonios G. Mikos, Amy J. Thorsen, Lisa Acherwonka, Yuan Bao & Robert Langer. Preparation and characterization of poly(L-lactide) foams. Polymer 35, 1068-1077 (1994) 中公开的技术制备多孔材料。然而, 用于制备多孔材料的一个非常有用的技术是冷冻干燥。

[0349] 在一个实施方案中, 合成性的生物可降解聚合物或微粒是通过 W007/101443 中描述的方法制备的聚合物支架。该方法特别适用于从 PLGA 和 MPEG-PLGA 聚合物制备支架。

[0350] 在本发明的一些方面, 合成性的生物可降解聚合物或微粒是通过 W0 07/101443 中公开的方法制备的支架, 该方法包括以下步骤:

[0351] (a) 将如本文中定义的聚合物溶解在非水性溶剂中以获得聚合物溶液;

[0352] (b) 冷冻步骤 (a) 中获得的溶液以获得冷冻聚合物溶液; 和

[0353] (c) 冷冻干燥步骤 (b) 中获得的冷冻的聚合物以获得生物可降解的多孔材料。

[0354] (d) 任选地, 以及当需要时, 机械破碎步骤 (c) 中获得的材料和任选地对其大小分级分离至期望的颗粒大小 ( 粒度 ) 。

[0355] 应当就熔点选择用于 W0 07/101443 中所公开方法中使用的非水性溶剂, 以使其可适合于冷冻。其举例说明性实例是二噁烷 (mp. 12°C ) 和碳酸二甲酯 (mp. 4°C ) 。

[0356] 在一些实施方案中, 其中来自细胞外基质的成分的颗粒用于根据本发明的方法, 可在如步骤 (b) 中所定义的冷冻溶液 ( 分散体 ) 之前, 将此类细胞外基质成分分散在步骤 (a) 中获得的溶液中。

[0357] 可将来自细胞外基质的成分例如溶解在合适的溶剂中, 然后加入至步骤 (a) 中获得的溶液。通过与步骤 (a) 的溶剂即用于本文中定义的聚合物的溶剂混合, 来自细胞外基质的成分将最可能沉淀形成分散体。

[0358] 在一个方面, 将生物可降解的聚合物或微粒浸没在糖胺聚糖 ( 例如透明质酸 ) 的溶液中, 然后冷冻干燥。

## 实施例

[0359] 在下面, PSD 表示粒度分布。

[0360] 实施例 1

[0361] 设备

[0362] Sonics 20 kHz 超声波探头 (ultrasonic probe)

[0363] Sonotek 25kHz 超声波探头

[0364] NE-1000 注射泵, New Era Pump Systems, Inc.

[0365] 10, 25, 50ml Hamilton 注射器

[0366] 通过 1/16" PTFE 管线引入到超声探针内的聚合物溶液 :MPEG-PLGA2-30kDa

[0367] Malvern Mastersizer 2000(具有用于测量悬浮液的 Hydro 2000s 附件)。

[0368] 粒度分布的测定 :将颗粒与少量十二烷基硫酸钠悬浮于水中, 进行超声处理, 然后在 Malvern 上进行测量。

[0369] 光学显微镜 :Olympus BX60, 使用 Imagepro 5.1 处理图像。

[0370] 实验 1 :

[0371] 将聚合物在丙酮中的 4% (w/v) 溶液在一盆搅拌的冷 (-50-(-30) °C) 异丙醇上方雾化。将悬浮液搅拌 20 分钟, 通过抽吸冷过滤。不将颗粒完全吸干。将它们在真空 (0.04mbar) 中干燥 24 小时, 然后贮藏在封闭的小瓶中直至进一步表征。图 1 显示实验 1 的光学显微镜分析、SEM 和粒度分布。

[0372] 实验 2 :

[0373] 如实验 1 中所述雾化和收集聚合物在丙酮中的 10% (w/v) 溶液。图 2 显示实验 2 的光学显微镜分析、SEM 和粒度分布。

[0374] 实验 3 :

[0375] 使用乙醇将聚合物在丙酮中的 10% (w/v) 溶液稀释至聚合物在丙酮/EtOH 86/14 中的 8.8% 溶液, 然后如实验 1 中所述雾化 (超声雾化器, 25kHz) 和收集所述聚合物。图 3 显示实验 3 的光学显微镜分析、SEM 和粒度分布。

[0376] 对所得颗粒的 SEM 进一步表征示于图 3-I 和 3-II 中。颗粒的内部形态学的显现通过在 -25°C 下冷冻切片来获得。为此目的, 将颗粒包埋在来自 Tissue-Tek Sakura 的 O. C. T.™ 封片剂 (mounting medium) 中, 然后通过 SEM 显现。

[0377] 根据这些结果很明显的是, 由该方法制造的颗粒是中空的, 壳具有纳米范围内的孔隙度。

[0378] 实验 4 :

[0379] 如实验 1 中所示处理聚合物在 1,4-二噁烷中的 4% (w/v) 溶液。图 4 显示实验 4 的光学显微镜分析、SEM 和粒度分布。

[0380] 实验 5 :

[0381] 如实验 1 中所述处理聚合物在碳酸二甲酯中的 4% (w/v) 溶液。图 5 显示实验 5 的光学显微镜分析、SEM 和粒度分布。

[0382] 实验 6 :

[0383] 如实验 1 中所述处理聚合物在碳酸二甲酯中的 10% (w/v) 溶液。图 6 显示实验 6

的光学显微镜分析、SEM 和粒度分布。

[0384] 通过冷冻干燥从加入非溶剂的溶剂中析出颗粒：

[0385] 合适的溶剂的实例：二噁烷、碳酸二甲酯，

[0386] 非溶剂的实例：水、甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、正-丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、戊烷、异戊烷、环戊烷、己烷、环己烷、己烷类、庚烷、庚烷类。

[0387] 实施例 2

[0388] 将 2g MPEG-PLGA 2-30 溶解在 100ml 1,4-二噁烷中。向 50ml 该溶液加入 21.5ml 异丙醇 (IPA)。将该溶液倾倒入铝模具中，然后将其置于冷冻干燥器（储存温度  $-30^{\circ}\text{C}$ ）中。当溶液冷冻时，将 10ml 二噁烷和 4.3ml IPA 的混合物倒在上面，当该溶液冷冻时，应用真空。使用如下程序冷冻干燥产物：

[0389]  $-30^{\circ}\text{C}$ ，2 小时，

[0390]  $-20^{\circ}\text{C}$ ，5 小时，

[0391]  $+20^{\circ}\text{C}$ ，24 小时。

[0392] 所制得的产物是蓬松的粉末。通过经  $300\ \mu\text{m}$  的筛进行筛分除去少数更大的薄片。使用光学显微镜术来表征粉剂，看到粉剂由具有宽粒度分布的聚合物的不规则小片组成（图 7a）。

[0393] 实施例 3

[0394] 将 2g MPEG-PLGA 2-30 溶解在 100ml 碳酸二甲酯中。向 50ml 该溶液加入 21.5ml 乙醇 (EtOH)。将该溶液倒入铝模具中，然后将其置于冷冻干燥器中（储存温度  $-30^{\circ}\text{C}$ ）。当溶液被冷冻时，将 10ml 碳酸二甲酯和 4.3ml EtOH 的混合物倒在上面，当该溶液被冷冻时，使用真空。如实施例 2 中一样冷冻干燥产物。利用光学显微镜术表征粉剂（图 7b）。

[0395] 实施例 4：成纤维细胞和肌细胞与 MPEG-PLGA 的颗粒一起生长

[0396] 在聚 HEMA 包被的细胞培养瓶中检测成纤维细胞和骨骼肌细胞在 MPEG-PLGA 颗粒上的附着和生长，其中使细胞和颗粒悬浮以防止细胞附着至培养孔。

[0397] 将具有颗粒 (MRG 08095-11, 甲氧基-聚乙二醇-聚(丙交酯-共-乙交酯) ( $M_n$  2,000-30,000, L : G 1 : 1)) 的两个离心管称重，然后于 70% 乙醇中清洗，以 300g 离心 7 分钟，然后分别于含有 10% 胎牛血清 (FCS)、青霉素 (Pen)、链霉素 (Strep) 和两性霉素 B (AmpB) 的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM) 或具有 20% FCS 并含有 Pen/Strep 和人 FGF 的 F10 中清洗。将管以与之前相同的方式再次离心，然后将其溶解在具有 10% FCS 和 Pen/Strep/AmpB 的 DMEM 中或具有 20% FCS pen/strep 和 FGF 的 F10 中。

[0398] 将从乳房缩小术产物 (mamma reductions) 分离的原代人成纤维细胞和从肌肉活检组织分离的原代人肌肉细胞培养在细胞培养瓶中。将成纤维细胞和肌肉细胞分别培养在具有 10% FCS 和 Pen/Strep/AmpB 的 DMEM 中或具有 20% FCS pen/strep 和 FGF 的 F10 中。在研究的当天使用胰蛋白酶 /EDTA 从培养瓶释放两种细胞类型。

[0399] 在用聚(甲基丙烯酸 2-羟乙基酯) (polyHEMA, 相应于  $0.8\text{mg}/\text{cm}^2$ ) 涂铺的细胞培养瓶中，加入颗粒和细胞至  $1.5\text{mg}$  颗粒 /ml 和  $2 \times 10^4$  个细胞 /ml 的终浓度（相应于  $1.3 \times 10^4$  个细胞 /mg 颗粒）。将具有颗粒但无细胞的细胞培养瓶用作对照。将培养瓶于  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  下在摇床上低速培养 24 小时，然后在不振荡的情况下培养 4 周。每周更换培养基一次。在第 1 和第 7 天以及在 2 和 4 周后就成纤维细胞评估细胞附着、形态学、生长和微粒的群体，

但只在 4 周后对肌肉细胞进行评估。用中性红对细胞进行染色,然后使用配备有 Evolution MP 冷色照相机 (cooled colour camera) (Media Cybernetics) 的 Leica DMIRE2 倒置显微镜进行评估。使用 Image Pro Plus 5.1 软件 (Media Cybernetics) 获取数字图像。

[0400] 在最初的 24 小时中,只有部分成纤维细胞以单个细胞附着在单个颗粒上或以单个细胞附着在两个颗粒之间,但许多活细胞四处飘浮在培养基中。使用倒置显微镜观察培养瓶,追踪观察悬浮液中剩余的细胞另外 24-48 小时,在此期间所有细胞都附着至颗粒。在 1 周后,细胞附着至成小簇中的更多颗粒上,其中所述小簇由大约 10 个颗粒和许多细胞组成,在 2 周后,簇变得甚至更大,它们中的一些似乎生长在一起成为甚至更大的聚集体。最后在 4 周后,只发现有大大聚集体 (图 8-I)。

[0401] 只在 4 周后才分析肌肉细胞,但它们如成纤维细胞一样在大大小小的聚集体中生长 (图 8-II)。

[0402] 在无细胞的培养基中孵育的颗粒在最初两周中没有显示显著的大小或外观变化。4 周后,颗粒变得更透明但似乎未变得更小。在高倍放大下,有可能看到颗粒开始降解,颗粒中出现空洞 (图 8-III)。

[0403] 总之,本研究显示成纤维细胞和肌肉细胞都能附着在沉淀的 MRG0895-11 上并且在其上增殖,并且这导致由许多通过许多细胞结合在一起的颗粒组成的大聚集体。

[0404] 实施例 5 :生物可降解的 MPEG-PLGA

[0405] 下列方法可用于测定聚合物的生物可降解性 :

[0406] MPEG-PLGA 2-30 在 60°C 下于磷酸盐缓冲液中的加速降解研究显示在 10 天后完全降解。这相应于在 37°C 下进行 50 天。

[0407] 材料和方法 :

[0408] 支架 (具有 50 : 50DL- 丙交酯对乙交酯比率的 MPEG-PLGA 2-30)。12ml 螺口小瓶

[0409] GPC

[0410] 缓冲液 :将 7.4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶解在 900ml 水中。使用稀释的  $\text{H}_3\text{PO}_4$  将 pH 调整至 7.0,将体积调整至 1L。

[0411] 称取大约 4mg 支架至小瓶 (x5),加入 3ml 缓冲液。将小瓶置于 60°C 烘箱中,然后在第 3、4、5、6 和 10 天取出小瓶 (将小瓶放置在冰箱中直至进一步处理)。将小瓶于 -5°C 下冷冻干燥过夜,在真空干燥器中干燥过夜,将其溶解在 2ml THF : DMF 1 : 1 中,过滤,然后在 GPC 上进行分析。

[0412] 结果 :

[0413]

天数 (60°C)	重量 (mg)	Mn	Mw	RI 面积	Mn (平均)	Mw (平均)	面积 (平均)	面积 (标准化)
0	5,61	50421	96460	16,55				1,000
0		47678	96218	18,19	49049	96339	17,37	1,099
3	4,39	5872	19190	13,22				0,817
3		6669	19769	12,38	6270	19479	12,8	0,765
4	4,43	4466	12103	9,5				0,582
4		4549	11876	8,99	4507	11989	9,245	0,550
5	4,13	4388	11902	8,02				0,527
5		4274	11965	7,79	4331	11933	7,905	0,511
6	3,87	3517	8875	5,21				0,365
6		4460	9609	4,16	3988	9242	4,685	0,291
10	4,67	1973	2477	1,16				0,067
10		2184	2512	0,71	2078	2494	0,935	0,041

[0414] 10 天后,观察到完全降解,在色谱图中剩下的唯一的峰是 MPEG。这相应于在 37°C 下进行大约 50 天。参见图 9 和 10。

[0415] 实施例 6

[0416] 与 MPEG-PLGA 微粒混合的软骨细胞

[0417] 将人关节软骨细胞 (hAC, 第 1 代) 与如在之前的实施例中制备的 MPEG-PLGA 微粒 (1.5mg/ml) 一起培养在含有 16% 胎牛血清 (FBS)、抗坏血酸 (75  $\mu$ g/ml)、两性霉素 B (2.4  $\mu$ g/ml) 和庆大霉素 (10mg/ml) 的 DMEM-12 中。

[0418] 将 hAC 与微粒一起在 5% CO<sub>2</sub> 中于 37°C 的温度下培养 14 天。

[0419] 在培养 14 天后,将用 hAC 包被的微粒分成各个样品。用中性红 (Sigma-Aldrich) 对一个样品进行染色以显现软骨细胞至微粒的附着,将另一个样品包埋在 Tissue-Tek (Sigma-Aldrich) 中,然后在 -26°C 下在低温恒温器中以 10  $\mu$ m 的厚度切片。用 0.5% 甲苯胺蓝 (Sigma-Aldrich) 对切片染色以显现样品中 ECM 蛋白的合成。

[0420] 在图 23 和 24 上,显示将 hAC 与 MPEG-PLGA 微粒组合导致了 hAC 至微粒的附着以及附着的 hAC 能够在微粒上及微粒中产生细胞外基质。

[0421] 实施例 7 超声雾化 - 沉淀

[0422] 一般设备

[0423] 通过使用来自 Sonics 的 20kHz 探头和来自 Sonotek 的 25kHz 圆锥形探头进行下述实验。在雾化的聚合物击中其保持在 -70°C 下的室中的收集容器之前其飞行距离为 40-50cm。使用致冷系统控制接收室内和收集容器中的温度。

[0424] 一般方法

[0425] 利用超声波探头将于丙酮中或于丙酮与非溶剂例如乙醇或己烷的混合物中的 10、7.5 和 5% (w/v) 2-30MPEG-PLGA 聚合物溶液雾化至 -70°C 的室中并且接收至 -65°C 至 -70°C 下的异丙醇浴中。通过抽吸过滤颗粒的悬浮液或倾析所述悬浮液,然后在真空下干燥颗粒,将其冷冻贮存在密闭小瓶中。

[0426] 包括的实验参数示于下表中。

[0427]

实验编号	聚合物浓度 % (w/v)	非溶剂 9% (v/v)	超声雾化仪 (kHz)	表征 图的编号.
7	5	无	25	11
8	7.5	无	25	12
9	7.5	BtOH	25	13
10	10	BtOH	25	14
11	7.5	己烷	25	15

[0428] 实施例 8 超声雾化 - 冷冻干燥

[0429] 一般方法

[0430] 利用超声探头将碳酸二甲酯 (DMC) 或二噁烷或 DMC 与二噁烷组合中的 10、7.5 和 5% (w/v) 2-30MPEG-PLGA 聚合物溶液雾化至  $-70^{\circ}\text{C}$  的室中并且接收至保持在相同温度下的铝盘中。将包括喷雾的盘转移至  $-20^{\circ}\text{C}$  下的冷冻干燥器, 然后干燥过夜。然后将颗粒转移至干燥器 (desecator) 以进一步在真空下干燥, 然后将其冷藏在密闭小瓶中。

[0431] 包括的实验参数示于下表中

[0432]

实验编号	溶剂	聚合物浓度 (% w/v)	超声雾化仪 (kHz)	图中显示的特征
12	DMC	10	25	16
13	DMC	10	20	17
14	DMC	7.5	25	18
15	DMC	5	25	19
16	二噁烷	7.5	25	20
17	二噁烷	10	25	21
18	二噁烷: DMC (1:1)	7.5	25	22

[0433] 实施例 9 通过堆密度测量对微粒进行表征

[0434] 将颗粒收集入装有塞子和容积刻度的密闭容器中。通过施加  $1-2.5\text{N}/\text{mm}^2$  范围内的缓慢压缩力来挤压颗粒。

[0435] 记录颗粒重量和点据的体积。

[0436] 针对所选样品获得的数据示于下表中：

---

实验编号	堆密度 (g/ml)
3	0,24
[0437] 10	0,29
12	0,13
13	0,15
14	0,12

---

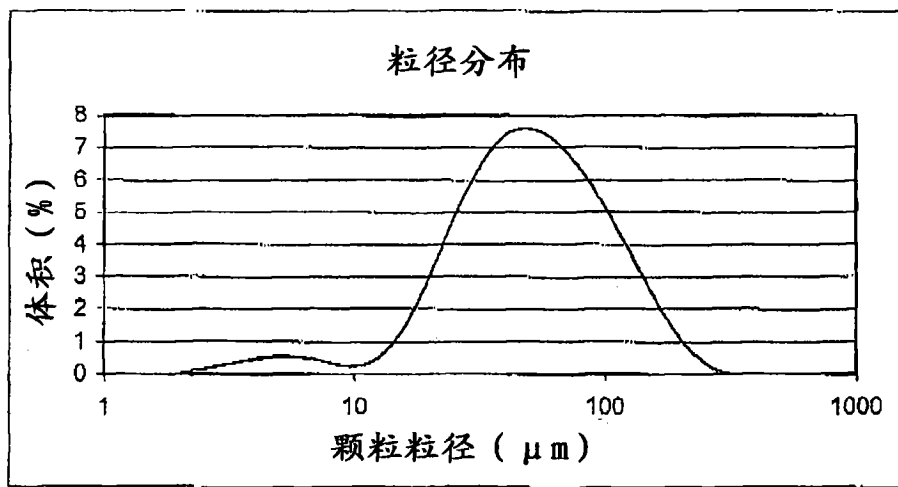
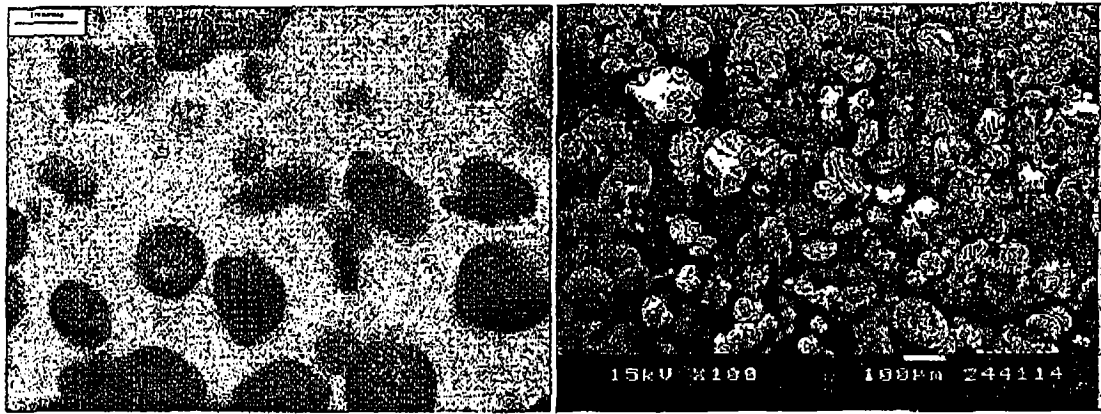


图 1

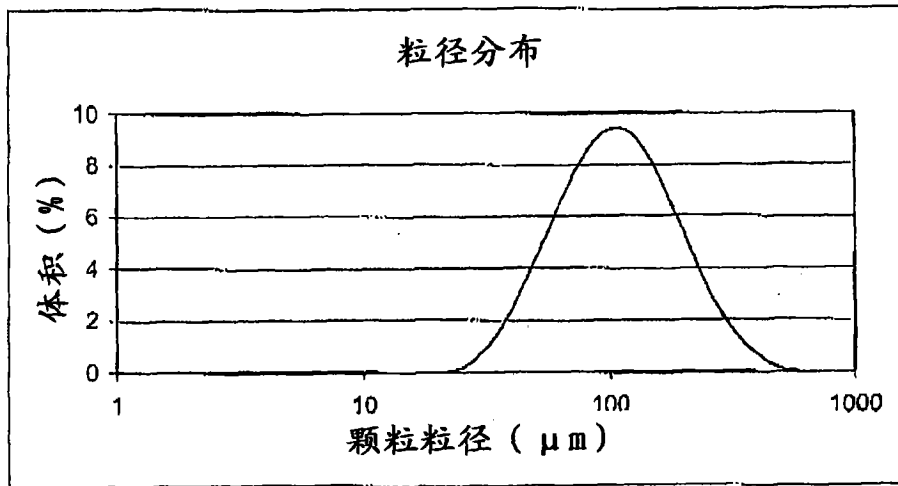
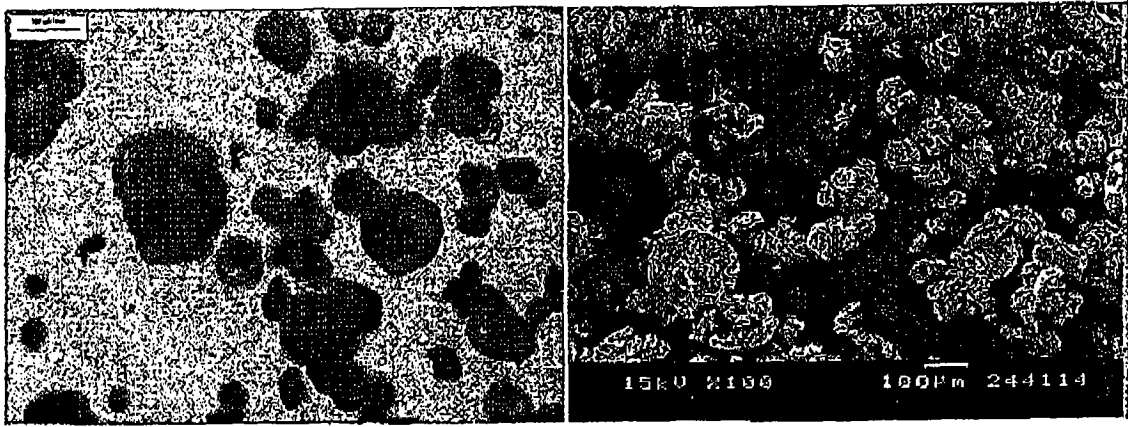


图 2

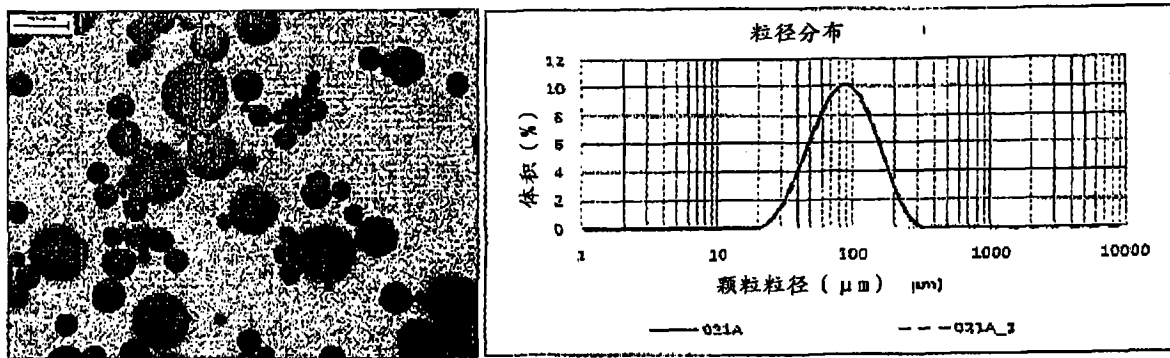


图 3

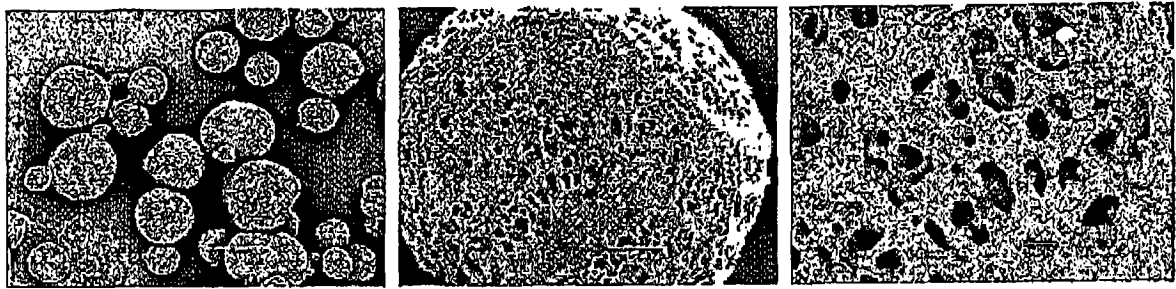


图 3-I

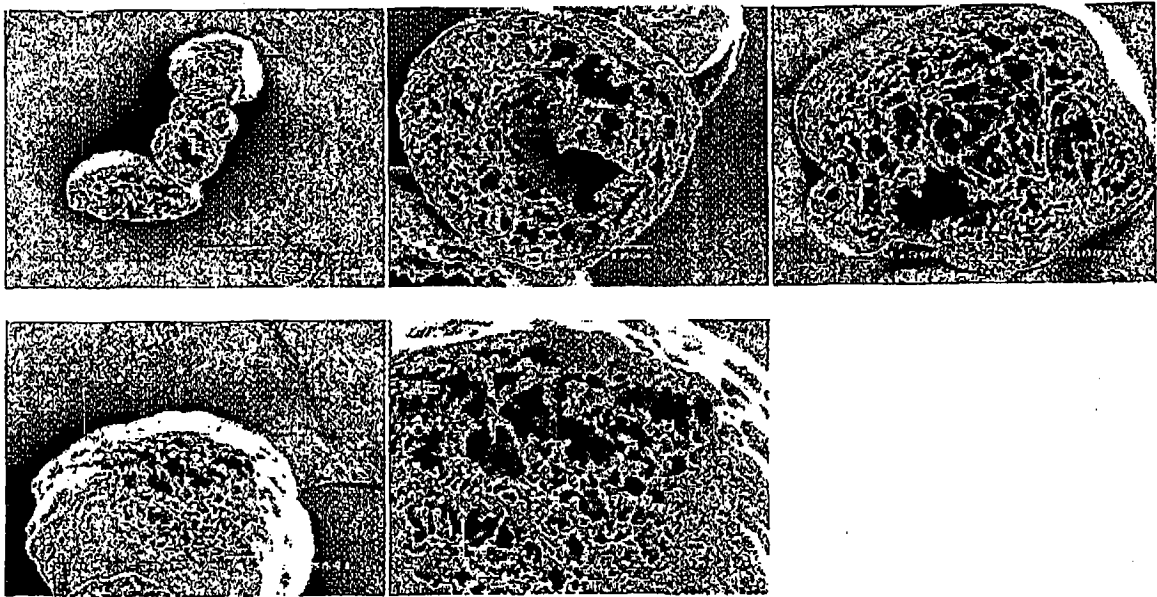


图 3-II

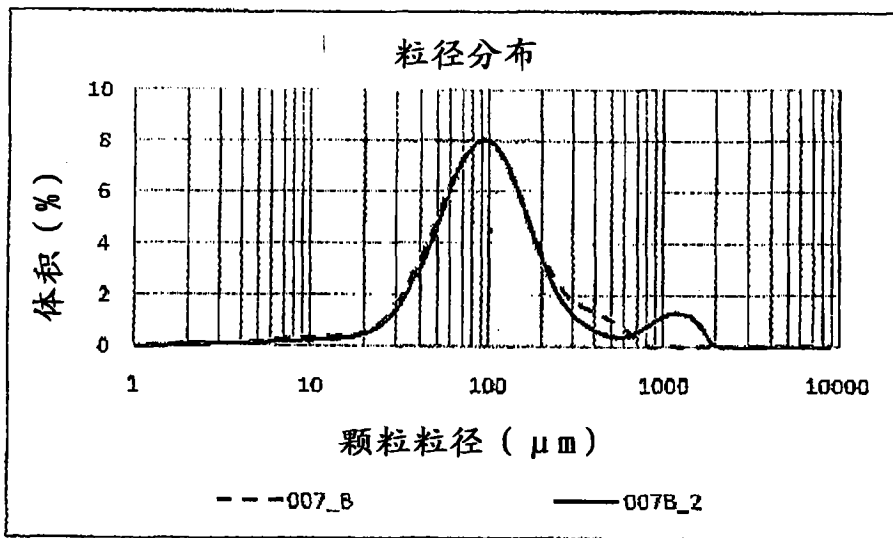
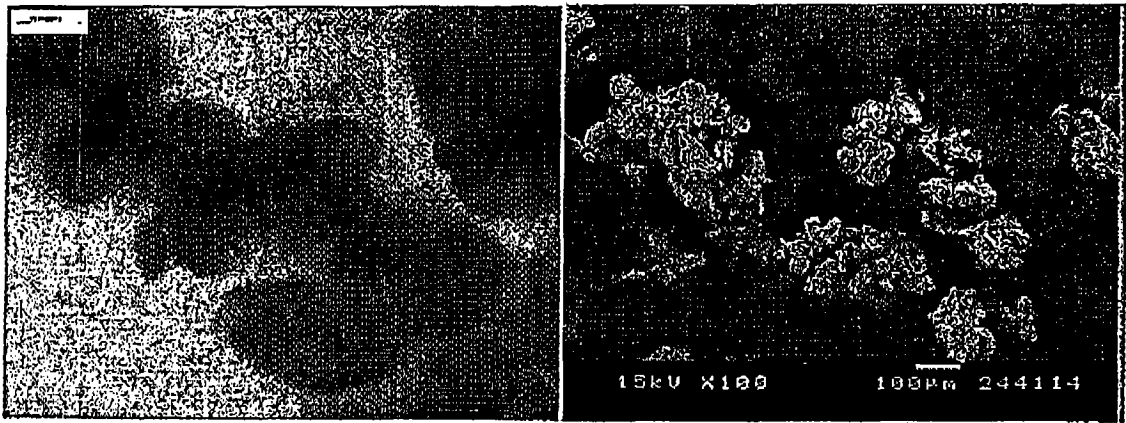


图 4

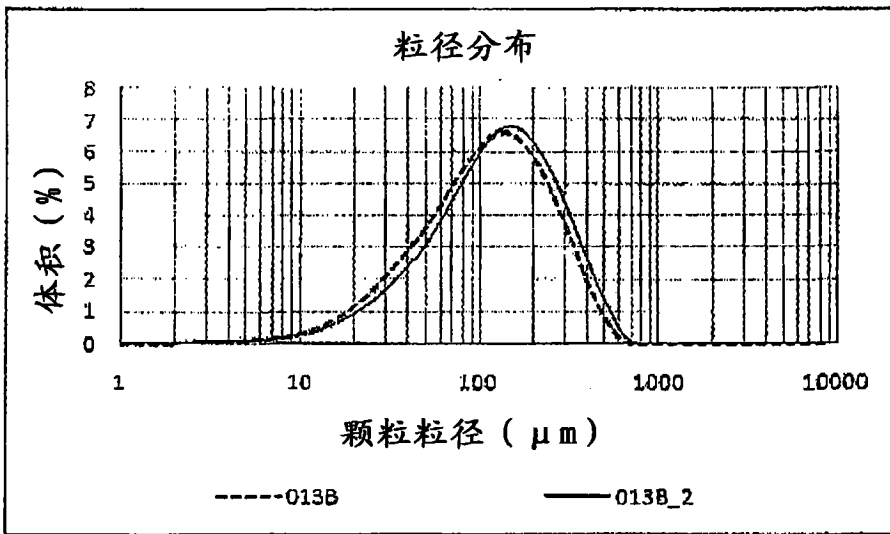
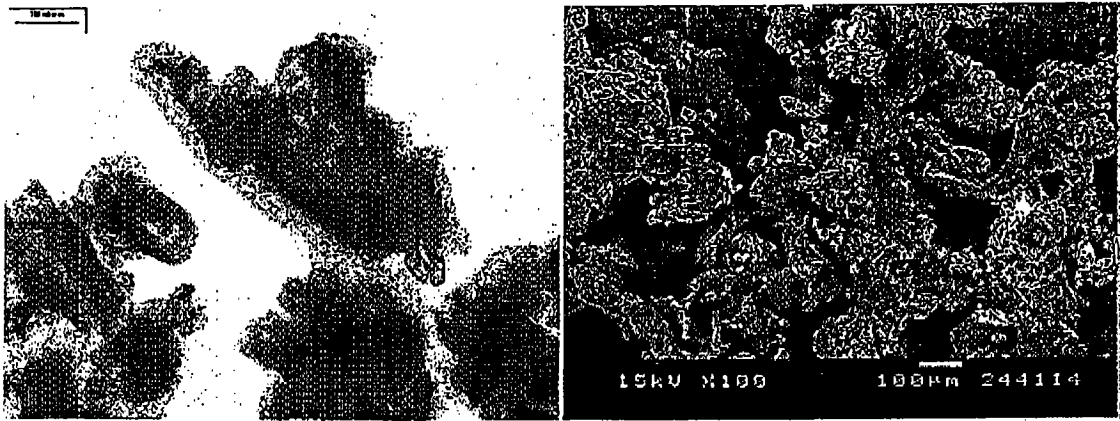


图 5

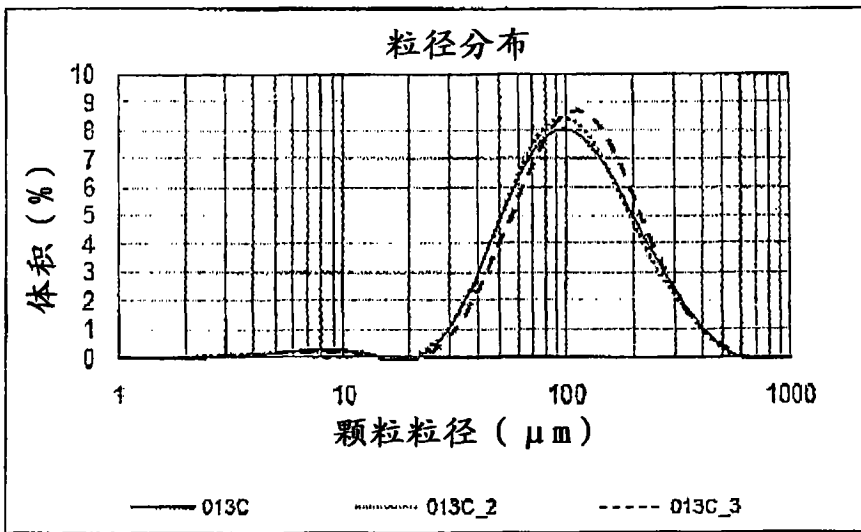
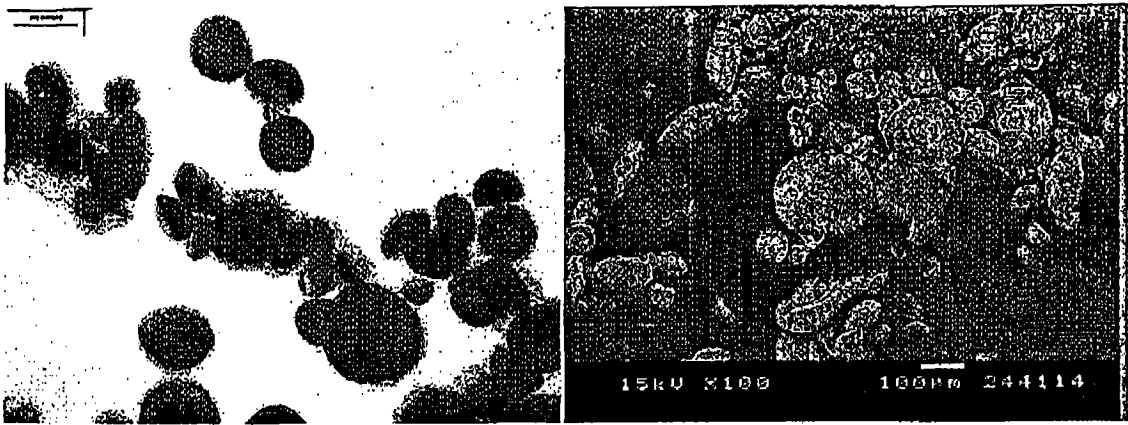


图 6

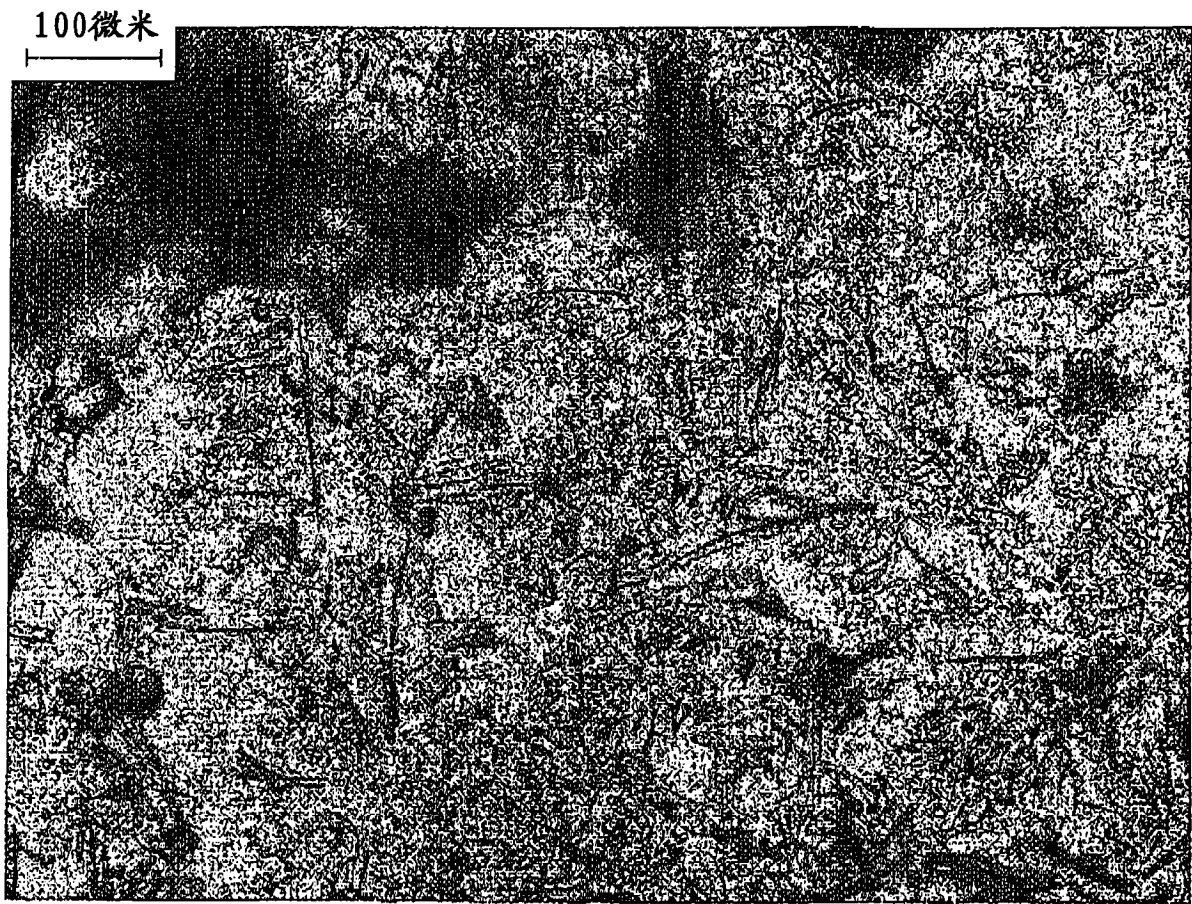


图 7a

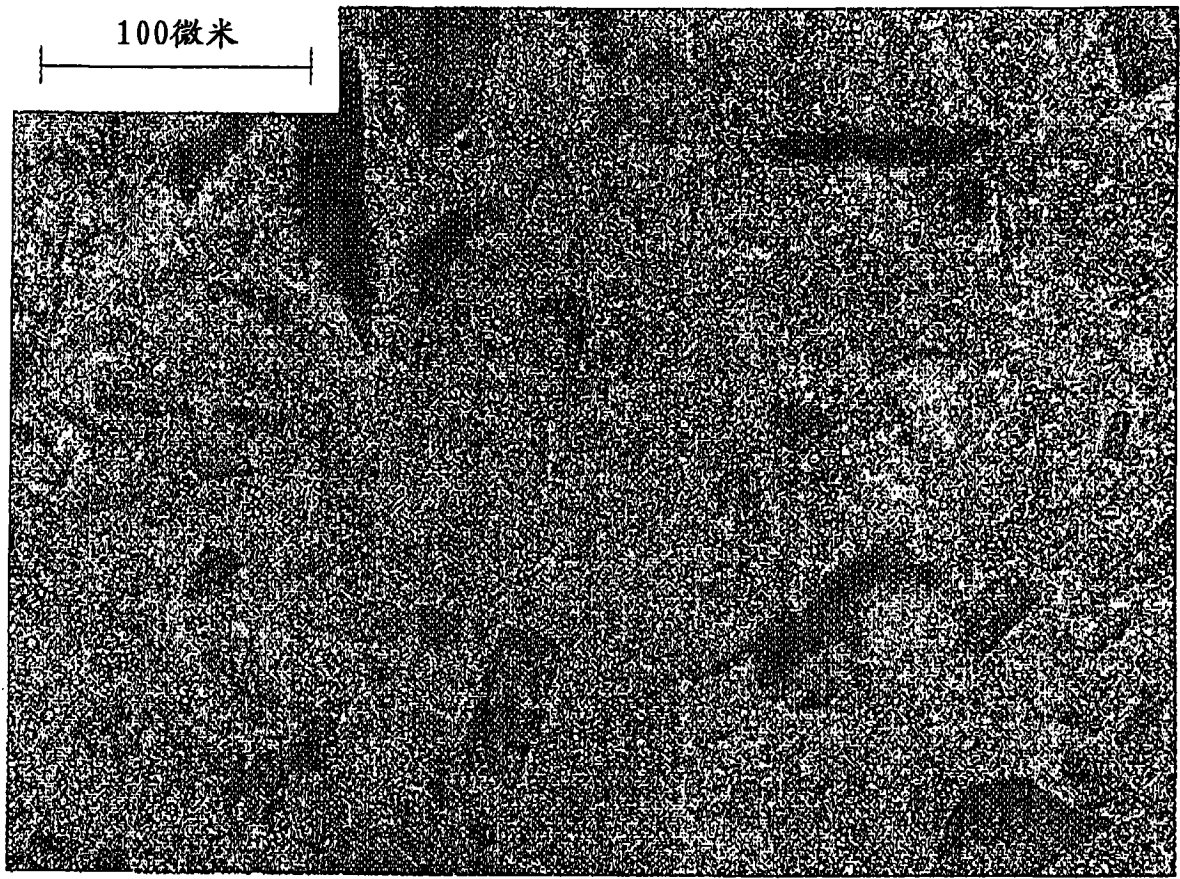


图 7b

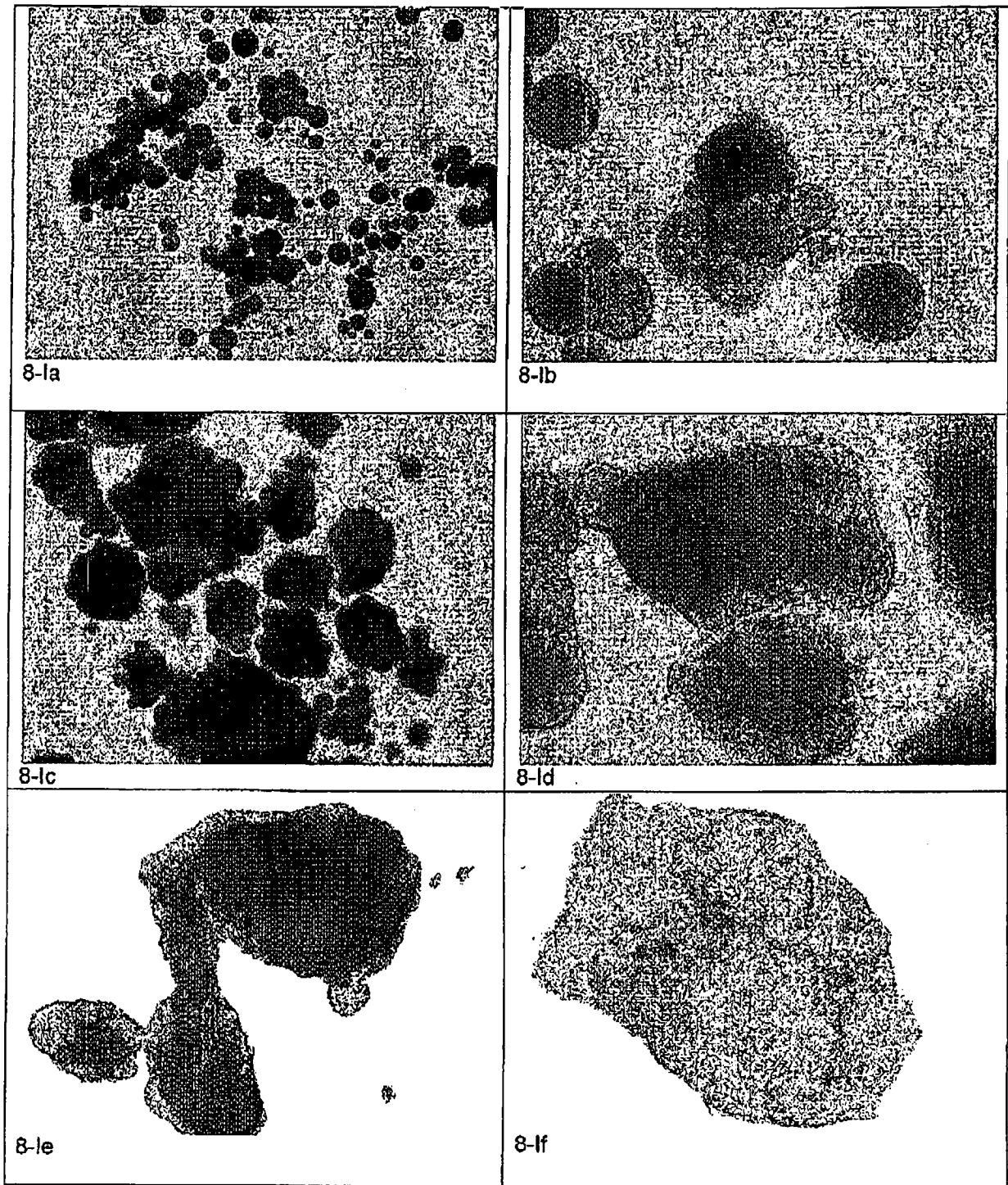


图 8-I

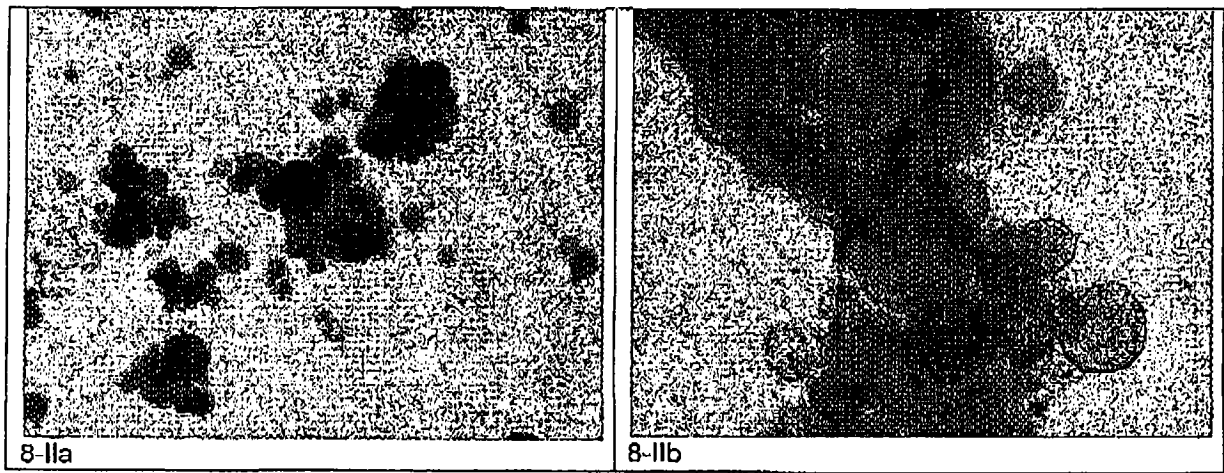


图 8-II

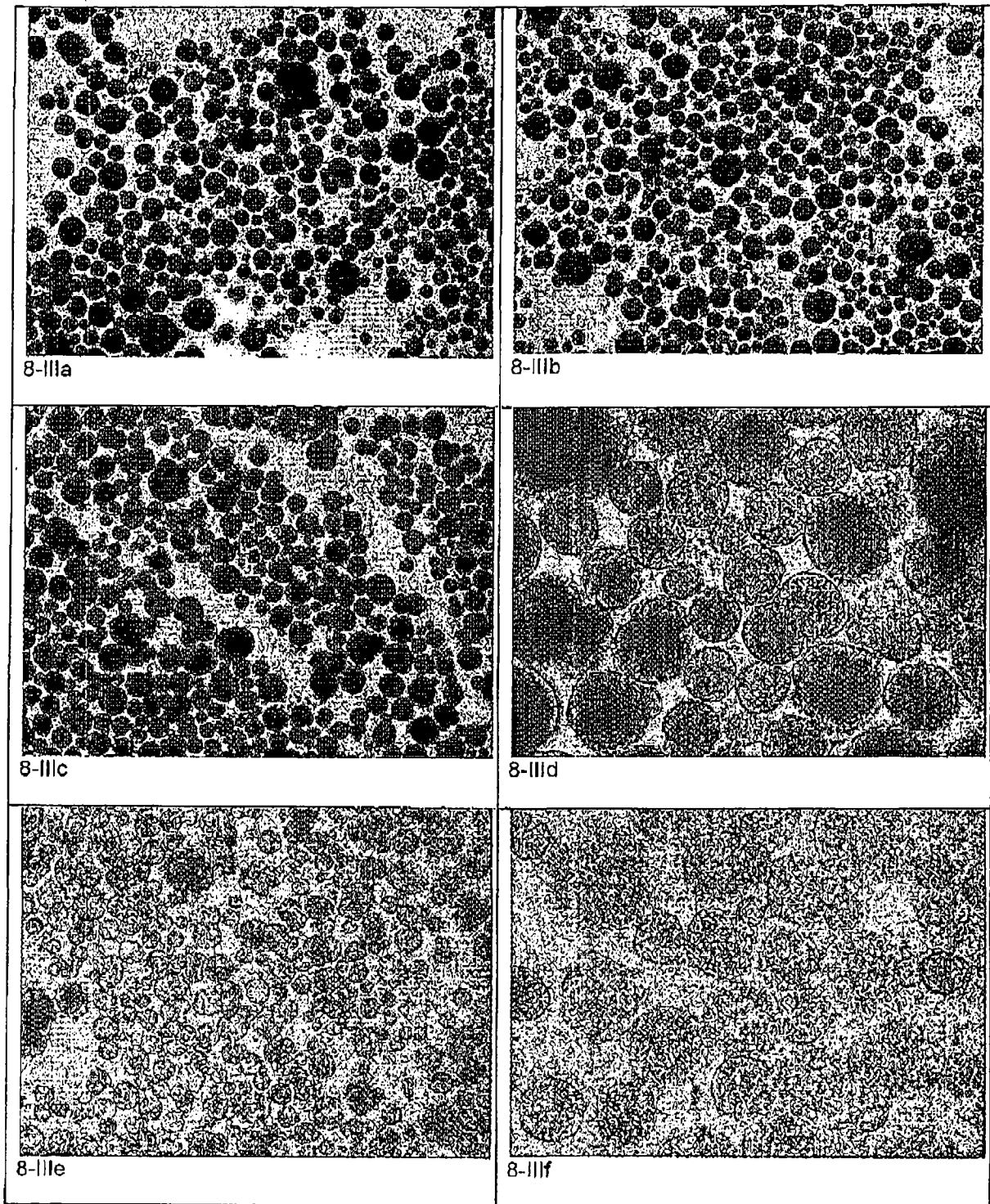


图 8-III

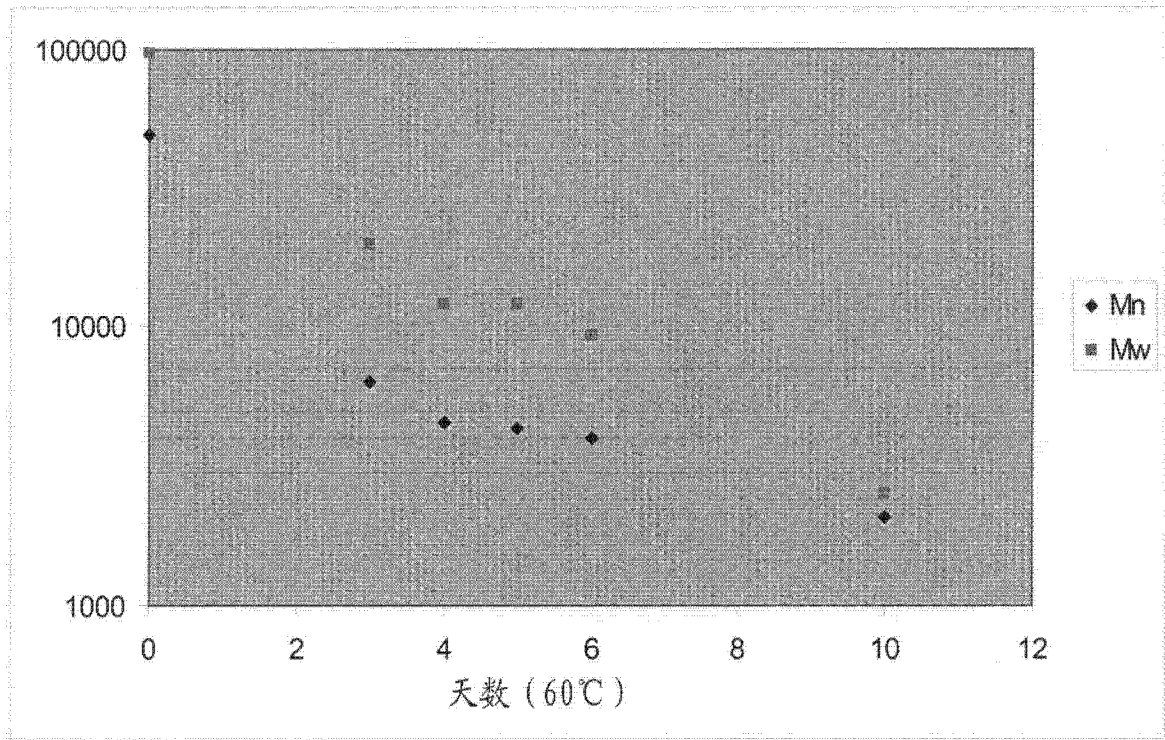


图 9

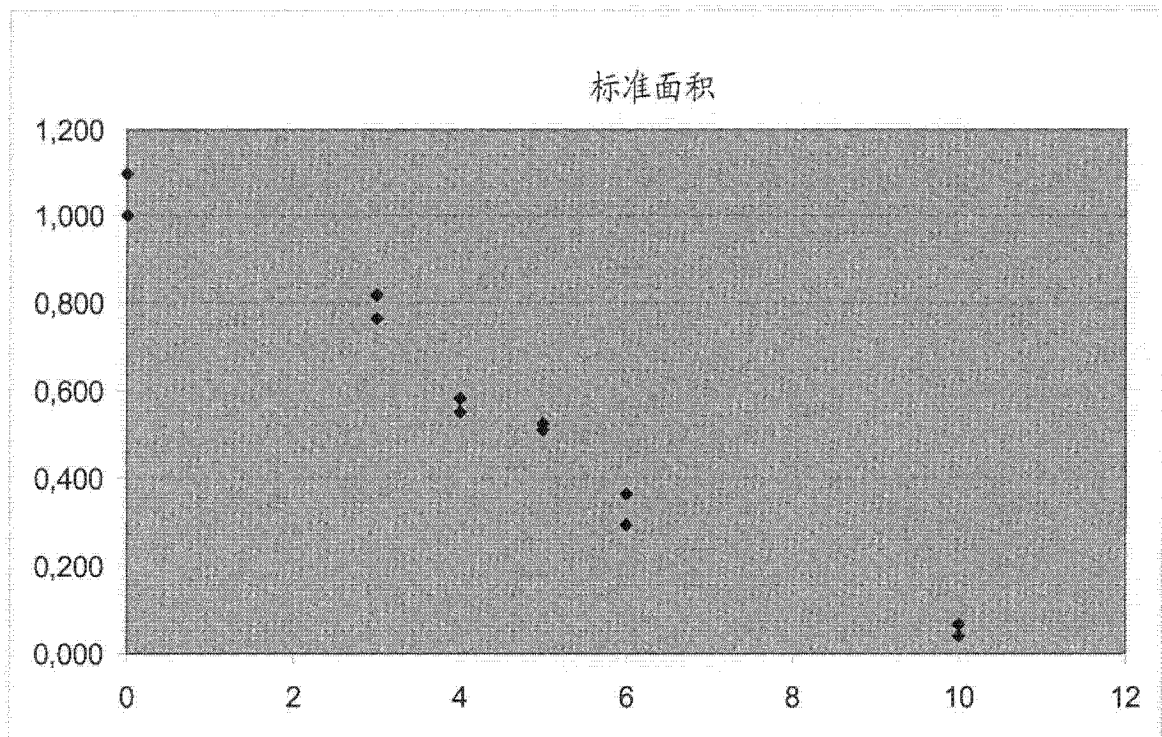
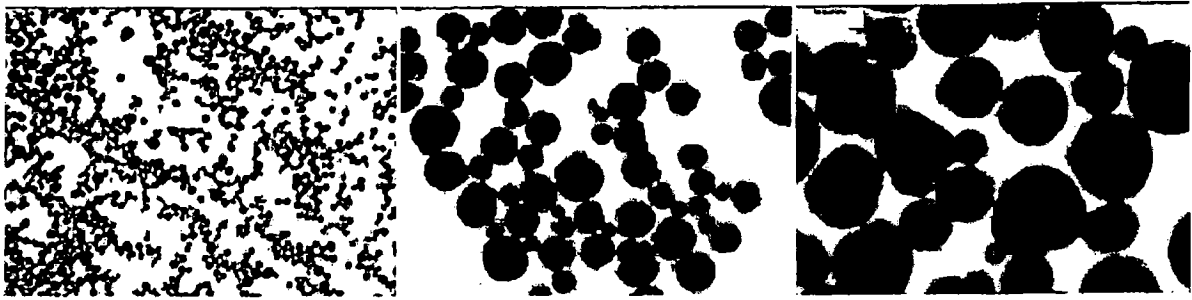
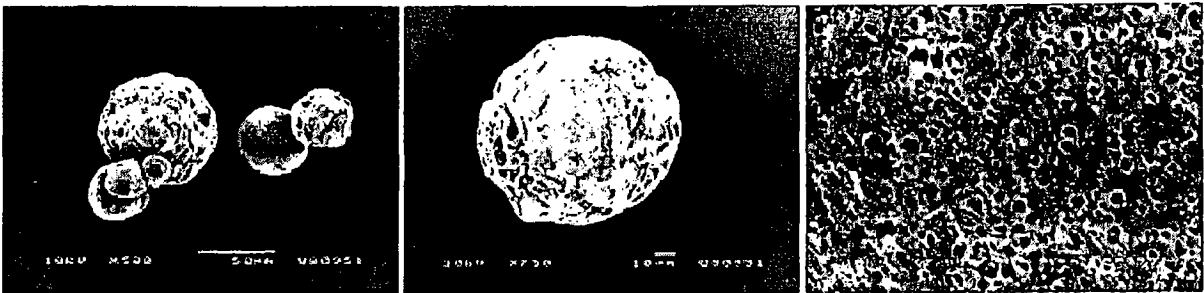


图 10

11.A



11.B



11.C

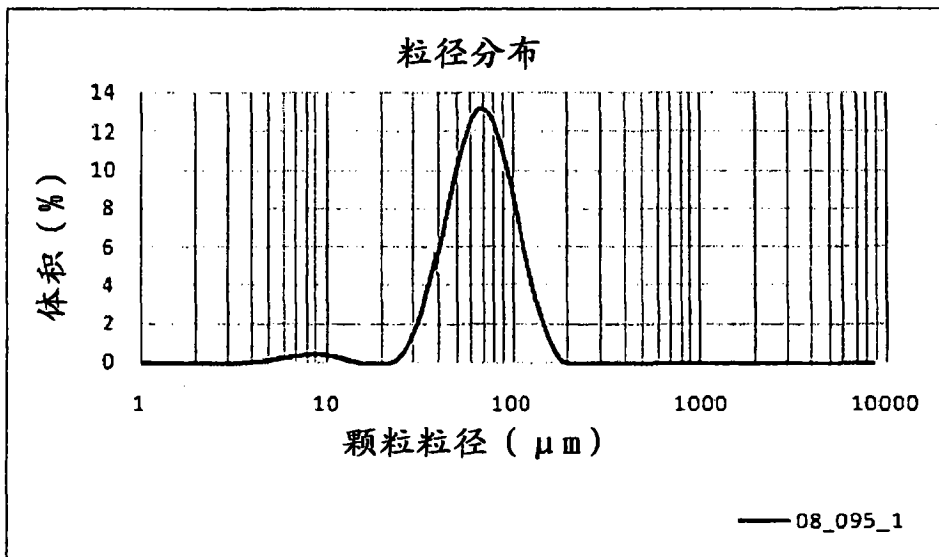
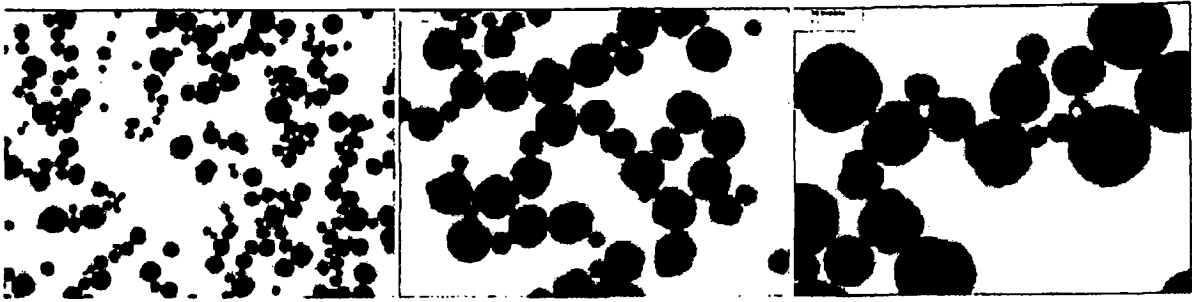
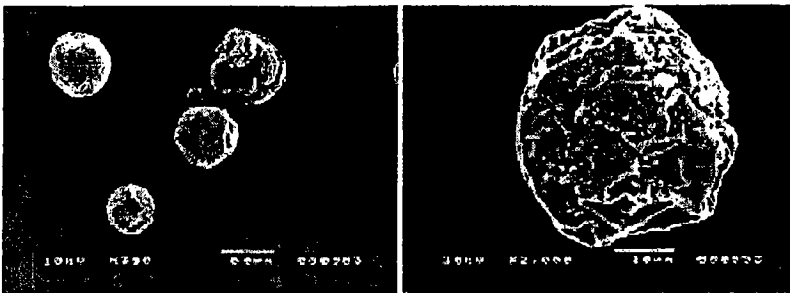


图 11

12.A



12.B



12.C

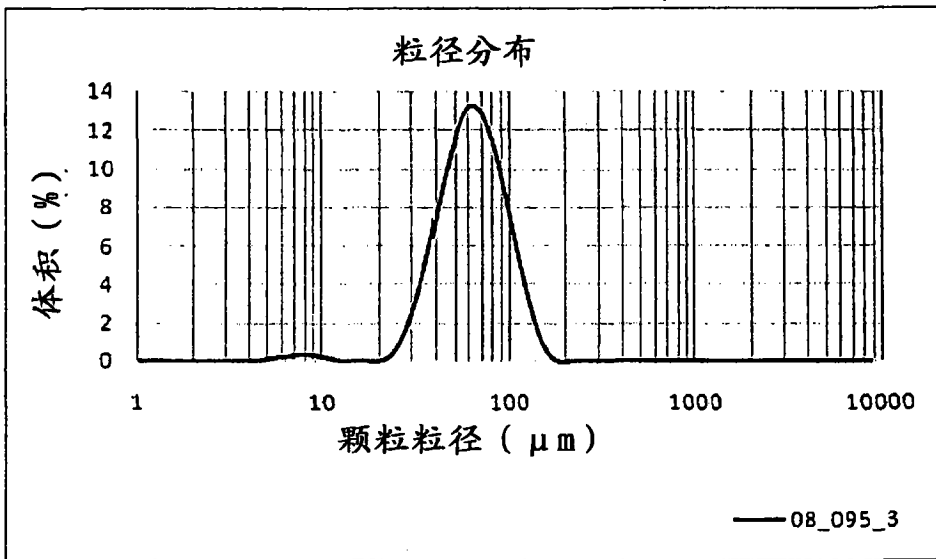
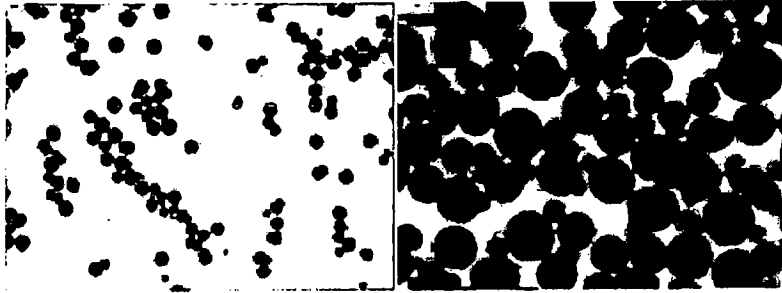
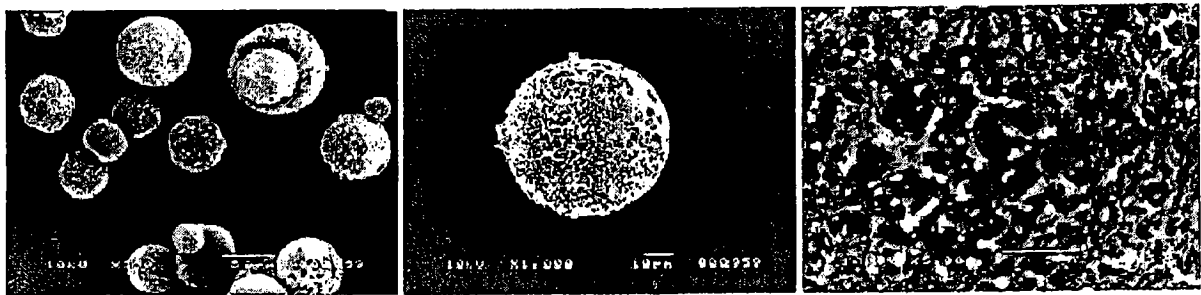


图 12

13.A



13.B



13.C

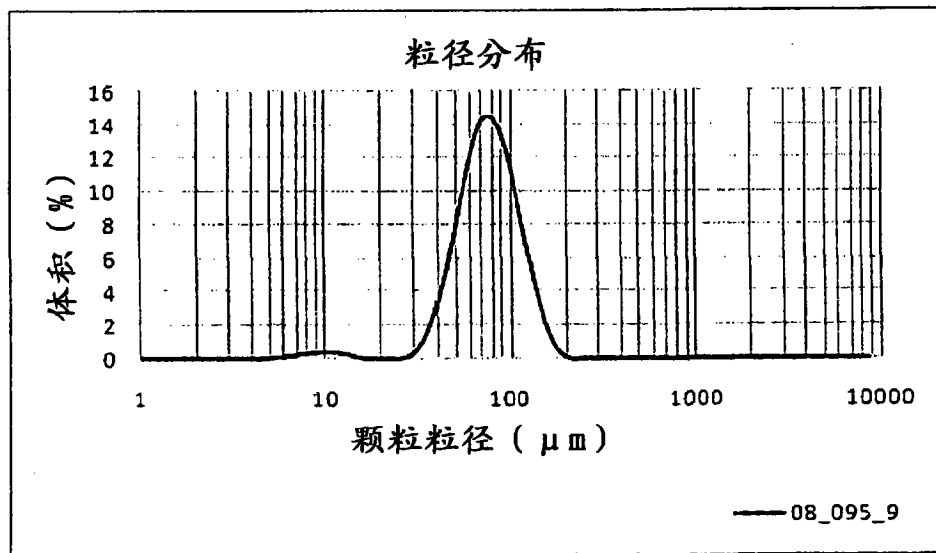
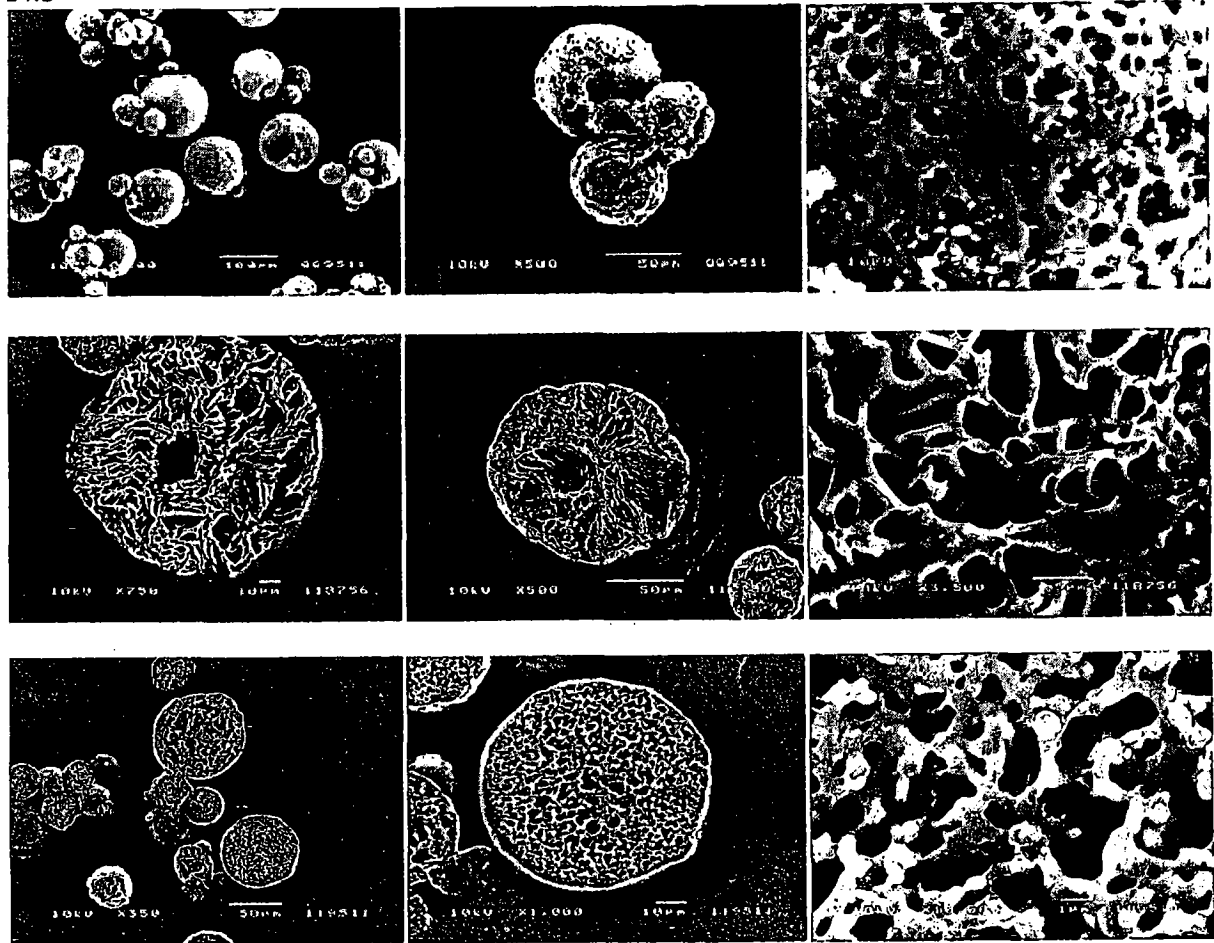


图 13

14.A



14.B



14.C

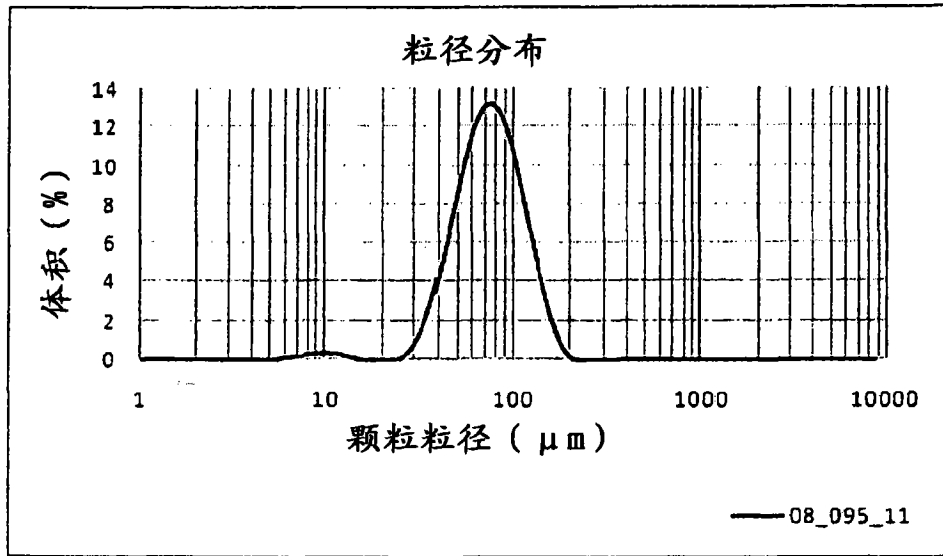
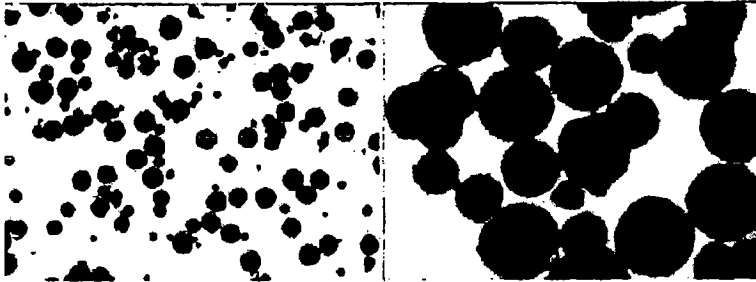
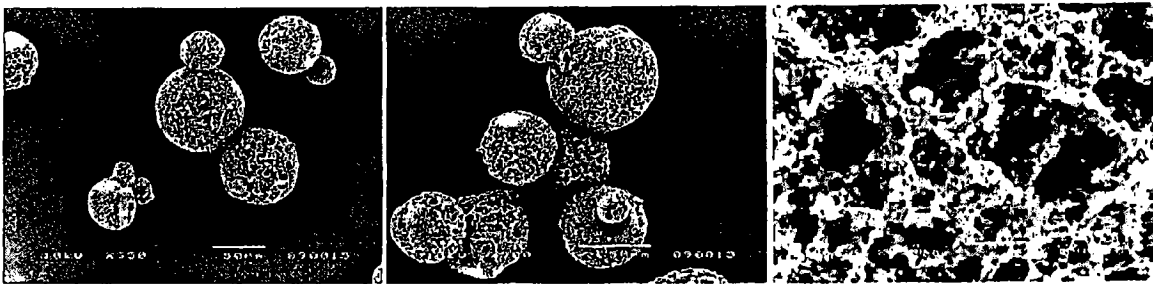


图 14

15.A



15.B



15.C

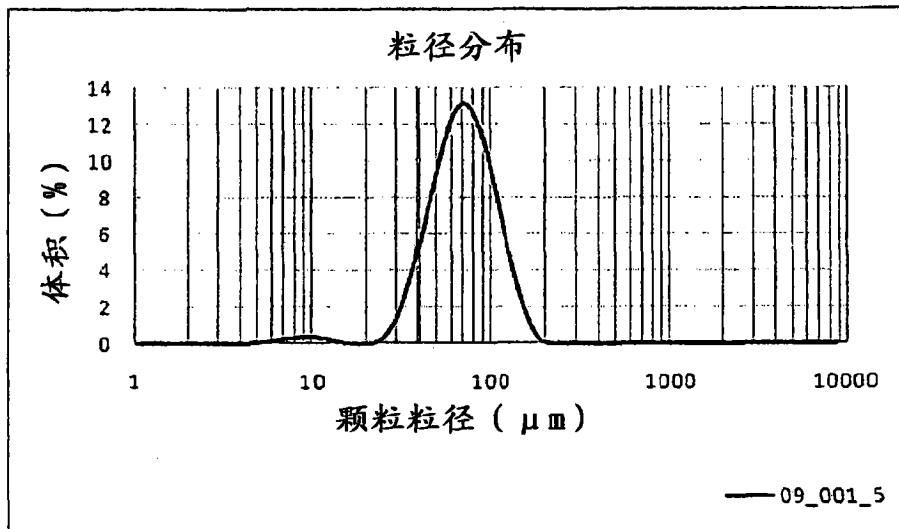
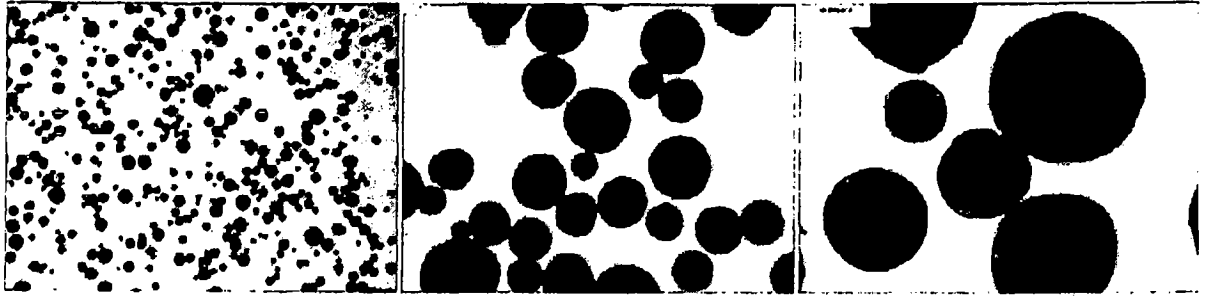


图 15

16.A



16.B



16.C

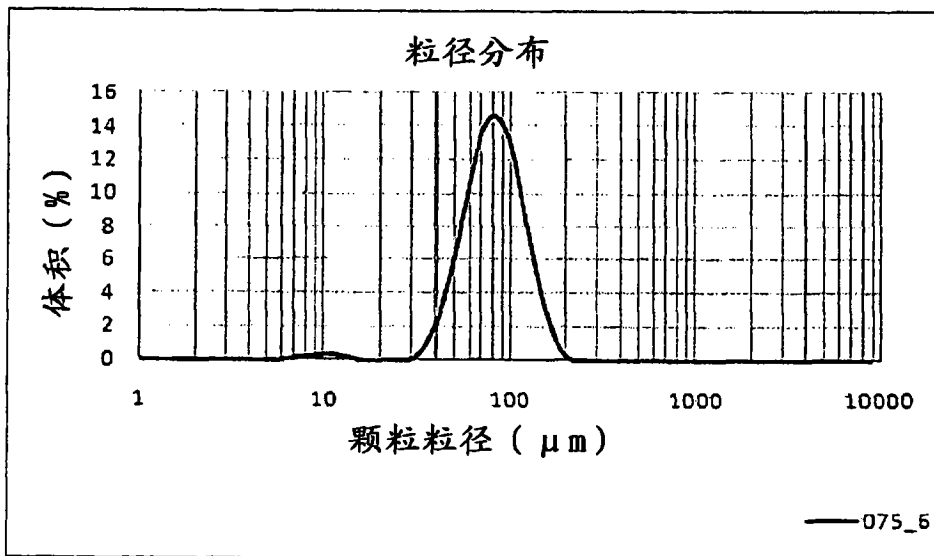
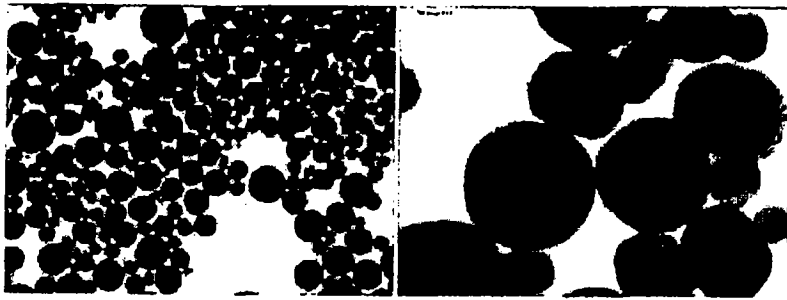
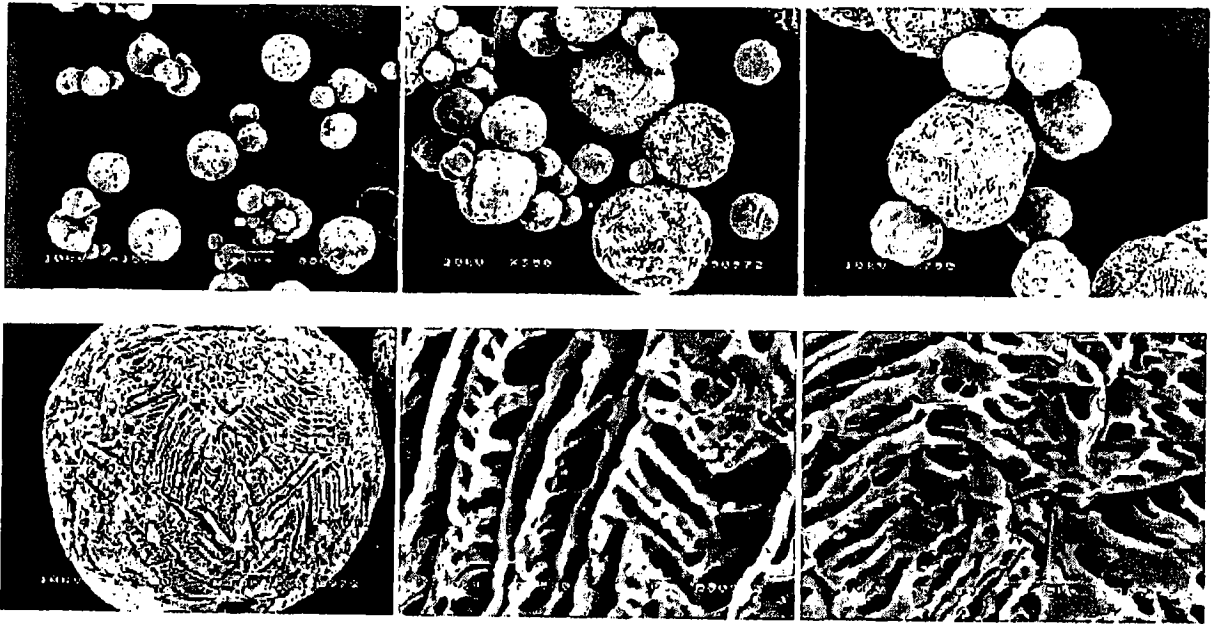


图 16

17.A



17.B



17.C

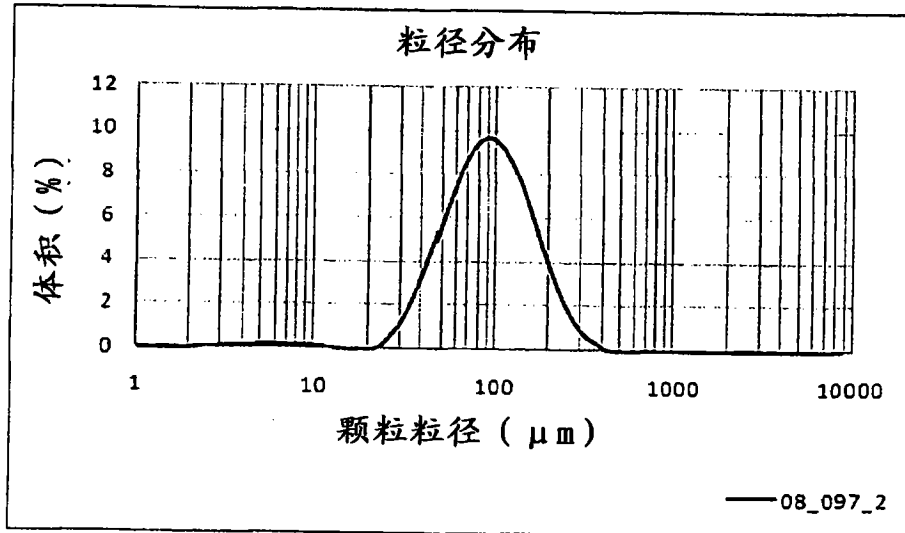
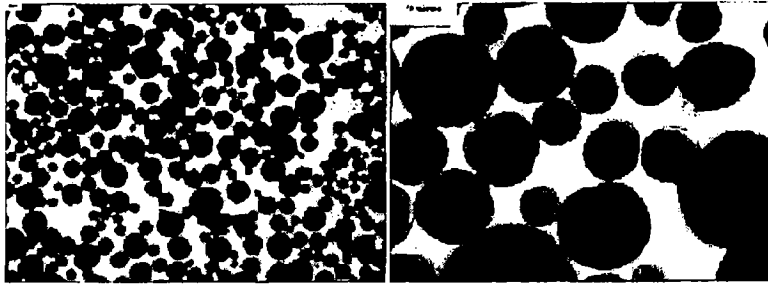
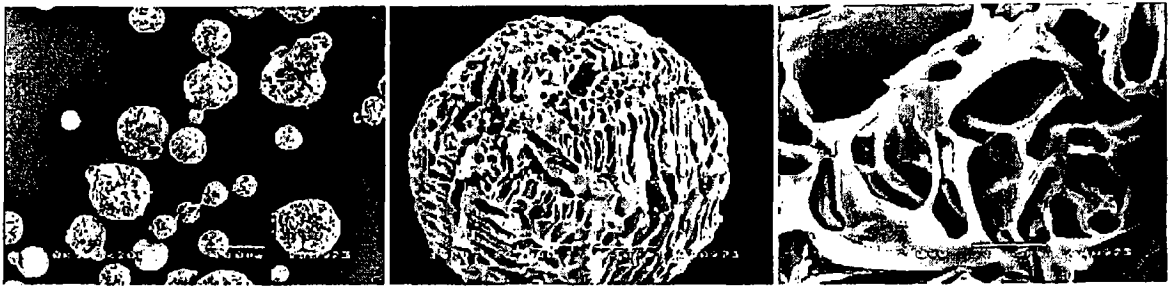


图 17

18.A



18.B



18.C

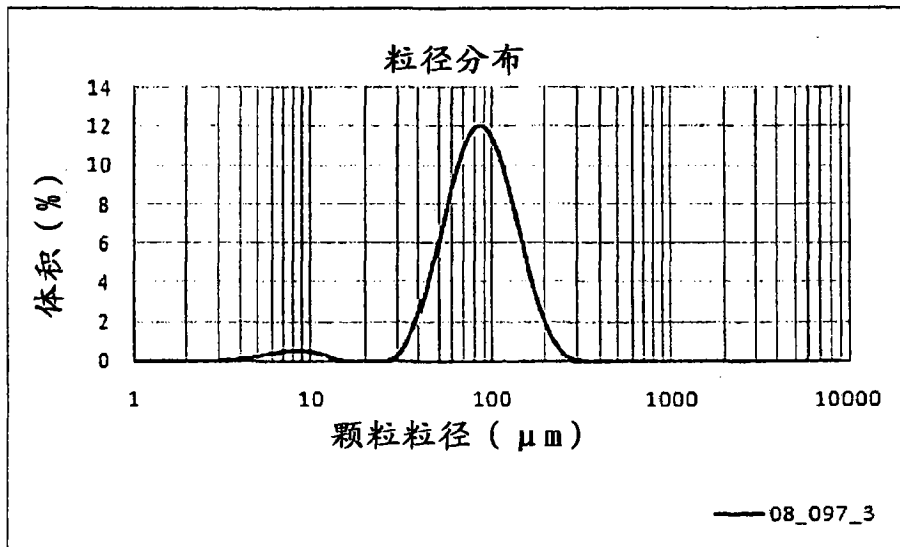
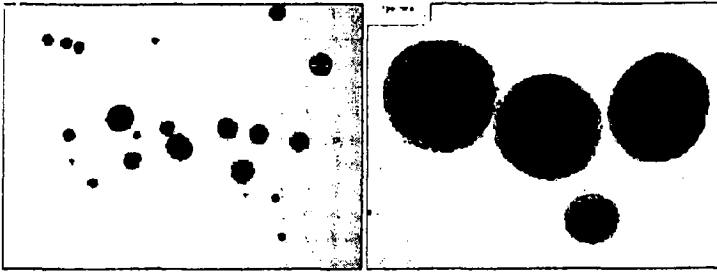
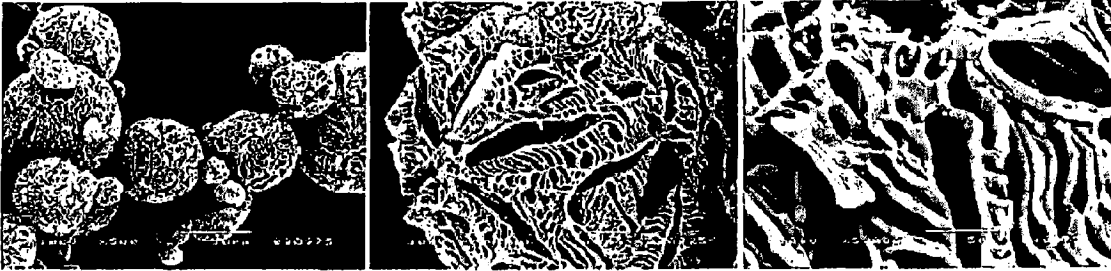


图 18

19.A



19.B



19.C

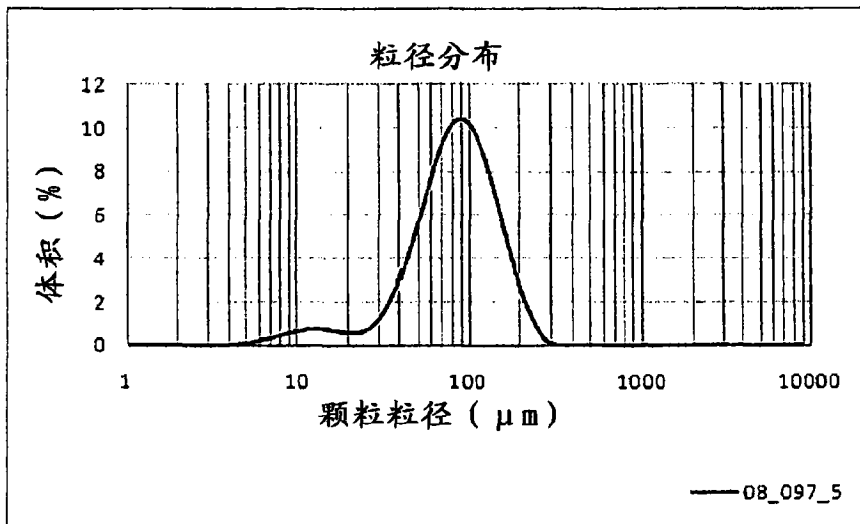
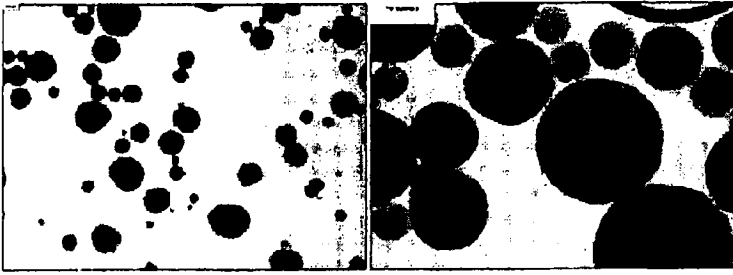
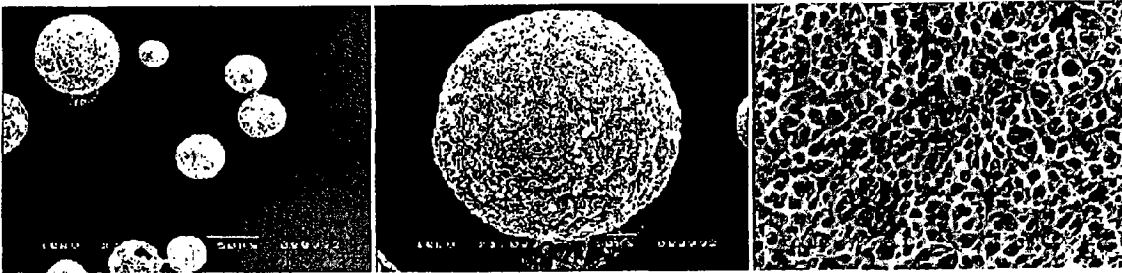


图 19

20.A



20.B



20.C

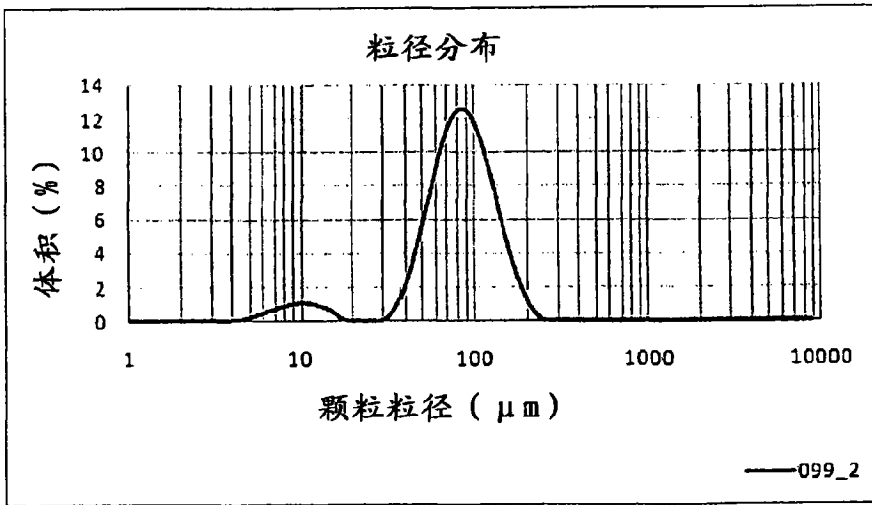
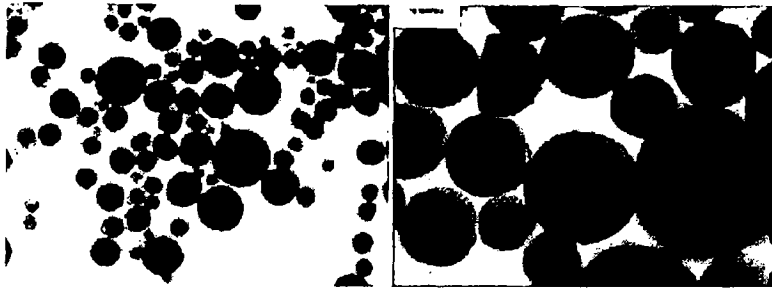
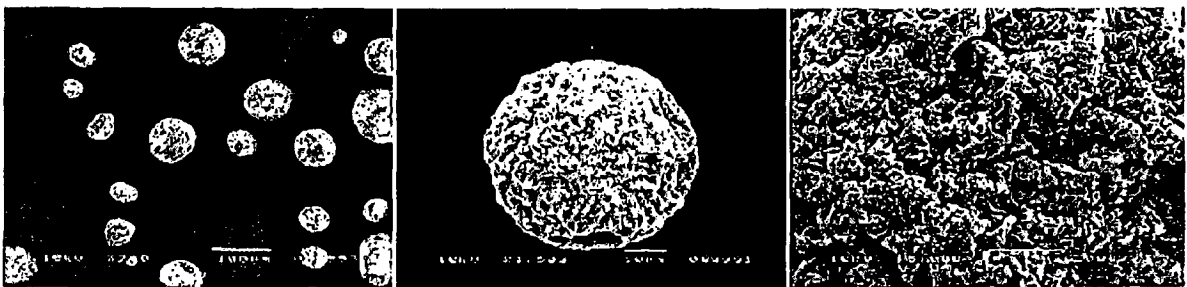


图 20

21.A



21.B



21.C

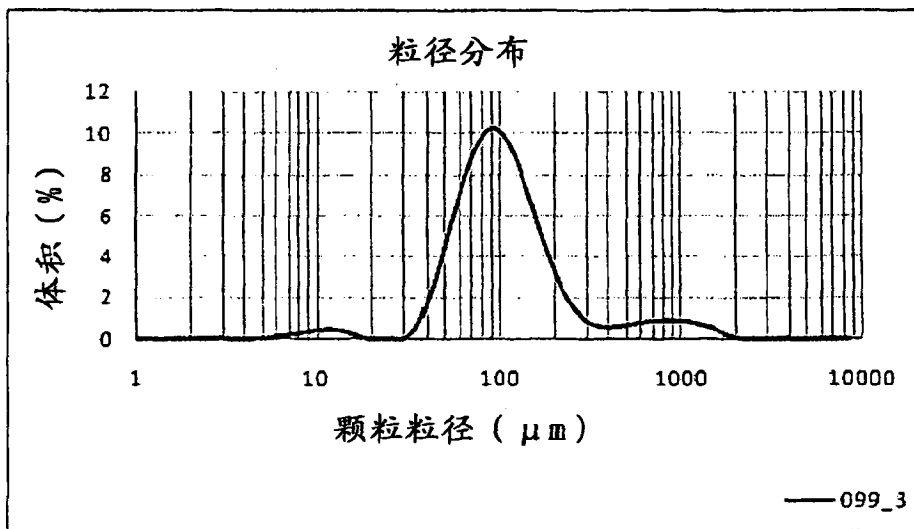
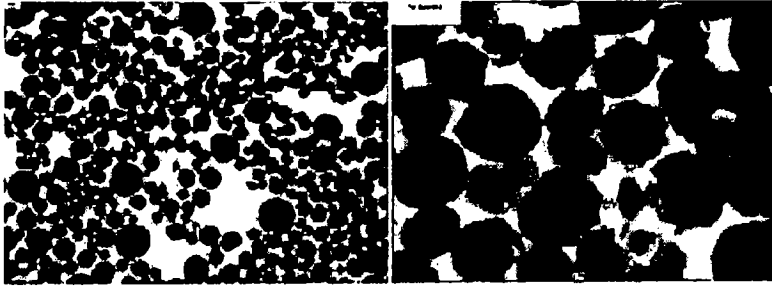
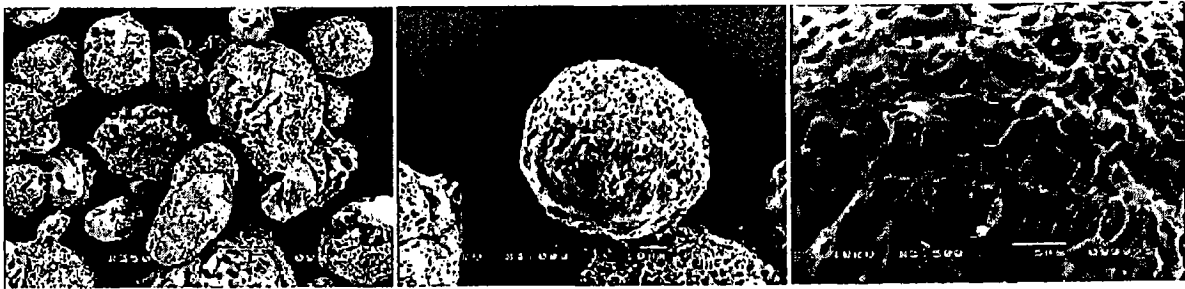


图 21

22.A



22.B



22.C

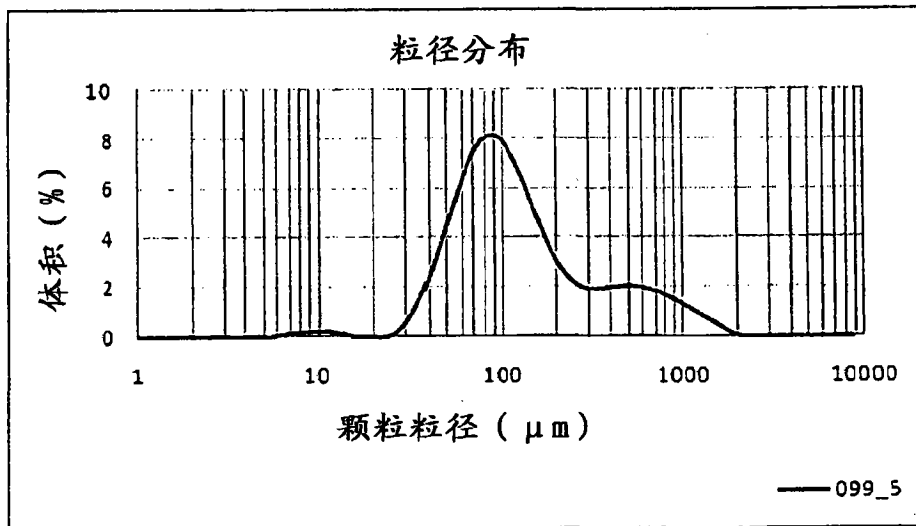


图 22



图 23

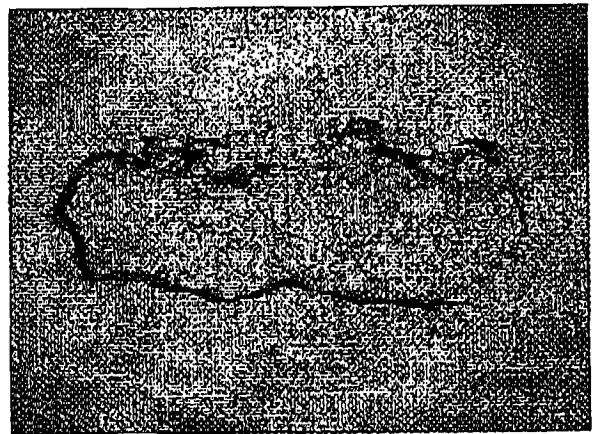


图 24