



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111107887 A

(43)申请公布日 2020.05.05

(21)申请号 201880061013.6

(22)申请日 2018.09.20

(30)优先权数据

18163717.4 2018.03.23 EP

62/561,045 2017.09.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/075544 2018.09.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/057861 EN 2019.03.28

(71)申请人 诺瓦迪普生物科学股份公司

地址 比利时蒙-圣吉贝尔

(72)发明人 丹尼斯·迪弗拉纳

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务
所(普通合伙) 11413

代理人 王春伟 刘继富

(51)Int.Cl.

A61L 27/12(2006.01)

A61L 27/36(2006.01)

A61L 27/38(2006.01)

C12N 5/0775(2006.01)

权利要求书1页 说明书52页 附图27页

(54)发明名称

包含脂肪干细胞的生物材料及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种生物材料,其包含脂肪干细胞(ASC)、生物相容性材料和细胞外基质。特别地,根据本发明的生物材料分泌护骨因子(OPG)。本发明还涉及用于制备生物材料的方法及其用途。

1. 一种具有多维结构的生物材料,所述生物材料包含成骨分化型脂肪干细胞(ASC)、生物相容性材料和细胞外基质,其中所述生物材料分泌护骨因子(OPG)。

2. 根据权利要求1所述的生物材料,其中所述生物材料分泌至少约5ng OPG/g生物材料,优选至少约10ng OPG/g生物材料。

3. 根据权利要求1或2所述的生物材料,其中所述生物相容性材料为颗粒形式。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的生物材料,其中所述生物相容性材料是脱矿骨基质(DBM)颗粒。

5. 根据权利要求4所述的生物材料,其中DBM颗粒的平均直径为约50 μm 至约2500 μm 。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的生物材料,其中所述生物相容性材料是磷酸钙颗粒。

7. 根据权利要求6所述的生物材料,其中所述磷酸钙颗粒的平均尺寸为约50 μm 至约1500 μm 。

8. 根据权利要求6或7所述的生物材料,其中所述磷酸钙颗粒是羟基磷灰石(HA)颗粒和/或 β -磷酸三钙(β -TCP)颗粒。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的生物材料,其中所述磷酸钙颗粒是HA/ β -TCP颗粒,其比例为10/90至90/10,优选为20/80至80/20。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的生物材料,其中所述生物材料包含至少约10ng VEGF/g生物材料。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的生物材料,其中所述生物材料是三维的。

12. 一种包含根据权利要求1至11中任一项的多维生物材料的医疗装置。

13. 一种用于制备根据权利要求1至11中任一项的多维生物材料的方法,其包括以下步骤:

- 使脂肪干细胞(ASC)增殖,
- 使第四代的ASC发生成骨分化,和
- 进行多维诱导,优选3D诱导。

14. 一种通过根据权利要求13所述的方法能够获得的多维生物材料。

15. 根据权利要求1至11中任一项所述的生物材料,其用于治疗骨缺损或软骨缺损。

包含脂肪干细胞的生物材料及其制备方法

发明领域

[0001] 本发明涉及干细胞领域及其在多维生物材料生产中的用途。特别地,本发明涉及包含脂肪干细胞(ASC)的生物材料、制备和使用这种生物材料用于治疗的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 骨缺损是在通常应有骨的身体区域缺乏骨组织。骨缺损可以通过各种手术方法治疗。但是,通常有一些因素会影响骨愈合,例如糖尿病、免疫抑制疗法、运动状态不佳以及计划手术时必须考虑的其他因素。

[0004] 骨缺损重建的外科方法尤其包括剥除、切除和固定、松质骨移植和Ilizarov横向骨搬移方法。但是,患者通常会出现长时间的行走障碍,并且功能和美学效果都不理想。

[0005] 组织工程涉及通过使用活细胞来恢复组织结构或功能。一般过程包括细胞分离和增殖,然后进行使用支架材料的再植入程序。间充质干细胞(MSC)提供了成熟组织细胞的良好替代品,并具有许多优势,可作为骨和软骨组织再生的细胞来源。

[0006] 根据定义,干细胞的特征在于其能够进行自我更新并且能够进行多向分化并形成终末分化细胞。理想情况下,用于再生医学应用的干细胞应符合以下标准:(i)应大量存在(数百万个至数十亿个细胞);(ii)可以通过微创程序收集和收获;(iii)可沿着多个细胞谱系途径以可重复的方式进行分化;(iv)可以安全有效地移植到自体或同种异体宿主中。

[0007] 研究表明,干细胞具有分化为中胚层、内胚层和外胚层来源的细胞的能力。MSC的可塑性通常是指保留在干细胞内的固有能力,其能够跨越谱系屏障并获得其他组织所特有的细胞的表型、生化和功能特性。例如,可以从骨髓和脂肪组织中分离成体间充质干细胞。

[0008] 脂肪干细胞是多能的,并具有深度再生能力。以下术语已用于标识相同的脂肪组织细胞群:脂肪干细胞/脂肪基质细胞(ASC);脂肪成体干细胞(ADAS)、脂肪成体基质细胞、脂肪衍生的基质细胞(ADSC)、脂肪基质细胞(ASC)、脂肪间充质干细胞(AdMSC)、成脂肪细胞、周细胞、前脂肪细胞、脂肪组织提取(PLA)细胞。使用这种多样化的命名法已导致文献上的重大混乱。为了解决这个问题,国际脂肪应用技术协会达成共识,采用术语“脂肪干细胞”(ASC)来标识分离的塑性黏附的多能细胞群。

[0009] 当将成骨分化型ASC接种到各种支架上后,它们在各种临床前模型中显示出巨大的治愈潜力,这些支架例如是 β -磷酸三钙(β -TCP)、羟基磷灰石(HA)、I型胶原、聚乳酸-co-乙醇酸(PLGA)和藻酸盐。国际专利申请W02013/059089涉及一种骨糊剂,其包含干细胞和磷酸钙黏固剂例如磷酸三钙和羟基磷灰石的混合物。US2011/104230公开了包括支架材料的骨贴剂,所述支架材料包含合成陶瓷材料、间充质干细胞和信号传导分子。

[0010] 然而,尽管在小型动物模型中取得了令人鼓舞的结果,但使用负载在支架上的ASC进行临界尺寸骨重建仍然受到大尺寸骨缺损的限制,并因此受到工程植入物的大小限制。接种细胞的细胞移植也受到氧气和营养素的不良扩散的限制。另外,细胞在支架内的位置是细胞体外和体内存活的主要限制。采用支架流动灌注的生物反应器旨在改善植入物内的细胞迁移,以实现更均匀的细胞分布,通过向植入物的核心输送氧气和营养素来改善细胞存活并改善骨原细胞分化(通过流体剪切力)。尽管这些技术很有前途,但是在大型动物模

型中相关的临床前和临床数据仍然有限。

[0011] 因此,在本领域中仍然需要用于骨组织再生的组织工程材料,其是完全生物相容的并且为指定的应用提供适当的机械特征。因此,本发明涉及由分化成多维成骨结构的ASC和生物相容性材料制成的移植物。

发明内容

[0012] 本发明涉及一种具有多维结构的生物材料,该生物材料包含成骨分化型脂肪干细胞(ASC)、生物相容性材料和细胞外基质,其中该生物材料分泌护骨因子(OPG)。

[0013] 在一个实施方案中,生物材料分泌至少约5ng OPG/g生物材料,优选至少约10ng OPG/g生物材料。

[0014] 在一个实施方案中,生物相容性材料为颗粒形式。

[0015] 在一个实施方案中,生物相容性材料是脱矿骨基质(DBM)颗粒。在一个实施方案中,DBM颗粒的平均直径为约50 μ m至约2500 μ m。

[0016] 在一个实施方案中,生物相容性材料是磷酸钙颗粒。在一个实施方案中,磷酸钙颗粒的平均尺寸为约50 μ m至约1500 μ m。

[0017] 在一个实施方案中,磷酸钙颗粒是羟基磷灰石(HA)颗粒和/或 β -磷酸三钙(β -TCP)颗粒。在一个实施方案中,磷酸钙颗粒是HA/ β -TCP颗粒,其比例为10/90至90/10。在另一个实施方案中,HA/ β -TCP的粒的比例为20/80至80/20。在另一个实施方案中,HA/ β -TCP颗粒的比例为65/35。

[0018] 在一个实施方案中,生物相容性材料是明胶颗粒。在一个实施方案中,生物相容性材料是猪明胶颗粒。

[0019] 在另一个实施方案中,生物材料包含至少约10ng VEGF/g生物材料。

[0020] 在一个实施方案中,生物材料是三维的。

[0021] 在一些实施方案中,生物材料是可模塑的或可成形的。

[0022] 本发明还涉及包含根据本发明的多维生物材料的医疗装置或药物组合物。

[0023] 本发明的另一个目的是一种用于制备根据本发明的多维生物材料的方法,其包括以下步骤:

[0024] -使脂肪干细胞(ASC)增殖,

[0025] -使第四代ASC发生成骨分化,以及

[0026] -进行多维诱导,优选3D诱导。

[0027] 本发明还涉及可通过根据本发明的方法获得的多维生物材料。

[0028] 本发明的另一个目的是用于治疗骨缺损或软骨缺损的根据本发明的生物材料。

[0029] 定义

[0030] 在本发明中,以下术语具有以下含义:

[0031] -在值之前使用术语“约”表示为所述值的 $\pm 10\%$ 以内。

[0032] -术语“脂肪组织”是指任何脂肪组织。脂肪组织可以是褐色或白色脂肪组织,其源自皮下、网膜/内脏、乳腺、性腺或其他脂肪组织部位。优选地,脂肪组织是皮下白色脂肪组织。这样的细胞可以包括原代细胞培养物或永生化细胞系。脂肪组织可以来自具有脂肪组织的任何活的或死的生物体。优选地,脂肪组织是动物的,更优选地是哺乳动物的,最优选

地,脂肪组织是人的。脂肪组织的方便来源是吸脂手术,但是,脂肪组织的来源或分离脂肪组织的方法对本发明不是关键的。

[0033] -如本文所用,术语“脂肪干细胞”(也称为“脂肪组织干细胞”)是指脂肪组织的“非脂肪细胞”部分。细胞可以是新鲜的,也可以是培养的。“脂肪干细胞”(ASC)是指源自脂肪组织的基质细胞,其可以充当多种不同细胞类型的前体,例如但不限于脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞。

[0034] -如本文所用,术语“陶瓷材料”是指无机非金属固体材料。陶瓷材料可以是磷酸钙(CaP)、碳酸钙(CaCO₃)、硫酸钙、氢氧化钙(Ca[OH]₂)或其组合的颗粒。陶瓷材料可以是颗粒形式。陶瓷材料可以是粉末、珠或颗粒的形式。陶瓷材料可以是多孔的。

[0035] -术语“再生”或“组织再生”包括但不限于来自本公开的ASC的新细胞类型或组织的生长、产生或重建。在一个实施方案中,这些细胞类型或组织包括但不限于骨原细胞(例如成骨细胞)、软骨细胞、内皮细胞、心肌细胞、造血细胞、肝细胞、脂肪细胞、神经元细胞和肌管。在一个特定的实施方案中,术语“再生”或“组织再生”是指来自本公开的ASC的骨原细胞(例如成骨细胞)的产生或重建。

[0036] -如本文所用,术语“生长因子”是促进组织生长、细胞增殖、血管形成等的分子。在一个特定的实施方案中,术语“生长因子”包括促进骨组织形成的分子。

[0037] -如本文所用,术语“培养的”是指在体外、体内或离体环境中经历细胞分裂或未经细胞分裂的一种或多种细胞。体外环境可以是本领域已知的适合于体外维持细胞的任何培养基,例如合适的液体培养基或琼脂。适用于细胞培养的体外环境的具体实例描述于Culture of Animal Cells:a manual of basic techniques(第三版),1994,R.I.Freshney(编),Wiley-Liss,Inc.;Cells:a laboratory manual(卷1),1998,D.L.Spector,R.D.Goldman,L.A.Leinwand(编),Cold Spring Harbor Laboratory Press;和Animal Cells:culture and media,1994,D.C.Darling,S.J.Morgan John Wiley and Sons,Ltd.中。

[0038] -术语“汇合”是指细胞培养表面(例如培养皿或烧瓶)中贴壁细胞的数量,即,被细胞覆盖的表面的比例。100%汇合表示表面完全被细胞覆盖。在一个实施方案中,表述“细胞达到汇合”或“细胞汇合”是指细胞覆盖了表面的80%至100%。在一个实施方案中,表述“细胞亚汇合”是指细胞覆盖了表面的60%至80%。在一个实施方案中,表述“细胞过度汇合”是指细胞覆盖了至少100%的表面和/或100%汇合持续数小时或数天。

[0039] -术语“冷藏”或“制冷”是指以低于对象正常生理温度的温度进行的处理。例如,在约-196℃至约+32℃的范围内选择一个或多个温度,持续延长的时间段,例如至少约一个小时、至少约一天、至少约一周、至少约4周、至少约6个月等。在一个实施方案中,“制冷”或“冷藏”是指在低于0℃的温度下进行处理。制冷可以手动进行,或者优选地使用能够执行制冷程序的专门设备来进行。在一个实施方案中,术语“冷藏”包括本领域中已知的“冷冻”和“超低温保存”的方法。技术人员将理解,制冷方法可包括其他步骤,包括为此目的添加试剂。

[0040] -如本文所用,术语“非胚性细胞”是指不是从胚胎分离的细胞。非胚性细胞可以是分化的或不分化的。非胚性细胞可以指几乎任何体细胞,例如从动物子宫外分离的细胞。在一个实施方案中,非胚性细胞包括生殖细胞。这些实例并不意味着是限制性的。

[0041] -如本文所用,术语“分化的细胞”是指已从非特异性表型发展为特异性表型的前体细胞。例如,脂肪干细胞可以分化为骨原细胞。

[0042] -如本文所用,术语“分化培养基”是指在本发明的培养系统中用于产生分化细胞的化合物的集合之一。化合物的作用方式无限制。例如,该试剂可以通过诱导或协助表型的改变、促进具有特定表型的细胞的生长或阻止其他表型的生长来辅助分化过程。它也可以作为可能在培养基中或由细胞群合成的其他因子的抑制剂,否则其他因子将导致细胞群沿不期望的细胞类型分化途径分化。

[0043] -术语“处理”、“治疗”或“缓解”是指目的是预防或减慢(减轻)骨缺损的治疗性处理。需要治疗的对象包括已经患有疾病的对象以及易于患有疾病的对象或要预防骨缺损的对象。如果对象在接受治疗量的根据本发明方法的生物材料后,患者显示出以下一种或多种情况的可观察到的和/或可测量的减少或不存在以下一种或多种情况,则成功地“治疗”了对象的骨缺损:骨缺损的减少和/或与骨缺损有关的一种或多种症状在某种程度上的缓解;发病率和死亡率降低,和生活质量问题改善。可以通过医师熟悉的常规程序容易地测量用于评估疾病的成功治疗和改善的上述参数。

[0044] 在所公开的生物材料的治疗用途的上下文中,对于“同种异体”疗法,供体和受体是同一物种的不同个体,而对于“自体”疗法,供体和受体是同一个体,对于“异种”疗法,供体来源于与受体不同物种的动物。

[0045] -术语“有效量”是指足以产生包括临床结果在内的有益或期望结果的量。可以一次或多次施用来施用有效量。

[0046] -术语“对象”是指哺乳动物,优选人。对象的实例包括人、非人灵长类、狗、猫、小鼠、大鼠、马、牛及其转基因物种。在一个实施方案中,对象可以是“患者”,即温血动物,更优选为人,其在等待或正在接受医疗护理、或曾经/现在/将要成为医疗程序的目标、或监测对象疾病的发展。在一个实施方案中,对象是成体(例如18岁以上的人类对象)。在另一个实施方案中,所述对象是幼体(例如18岁以下的人类对象)。在一个实施方案中,所述对象是雄性。在另一个实施方案中,所述对象是雌性。

[0047] -术语“生物相容的”是指与诸如细胞、细胞培养物、组织或生物体的生物系统相容的无毒材料。

[0048] -术语“脱矿骨基质”或“DBM”是指已经脱细胞且脱矿的骨片段。在一个实施方案中,根据本领域的最佳实践来制备DBM。在一个实施方案中,通过将人尸体同种异体骨粉碎至一致的大小,然后对矿化相进行温和的无机酸萃取来制备DBM。

[0049] -术语“多维”是指一个以上的维度,例如二维(2D)或三维(3D)。在一个实施方案中,具有多维结构的生物材料是指具有2D或3D结构的生物材料。

具体实施方式

[0050] 本发明涉及一种具有多维结构的生物材料,其包含脂肪组织干细胞(ASC)、生物相容性材料和细胞外基质,并且包含护骨因子(OPG)。

[0051] 如本文中所使用的,术语“具有多维结构的生物材料”可以在整个本发明中被术语“多维生物材料”代替。

[0052] 在一个实施方案中,细胞是从脂肪组织中分离的,在下文中被称为脂肪干细胞

(ASC)。

[0053] 在一个实施方案中,ASC组织是动物来源的,优选哺乳动物来源的,更优选人类来源的。因此,在一个实施方案中,ASC为动物ASC,优选为哺乳动物ASC,更优选为人ASC。在一个优选的实施方案中,ASC是人ASC。

[0054] 从脂肪组织中分离干细胞的方法在本领域中是已知的,并且例如在Zuk等人(Tissue Engineering.2001,7:211-228)中公开。在一个实施方案中,通过吸脂术从脂肪组织分离ASC。

[0055] 作为说明,可以通过穿刺活检或吸脂术吸取来收集脂肪组织。可以首先通过用磷酸盐缓冲盐水(PBS)全面地洗涤组织样品,来从脂肪组织中分离ASC,磷酸盐缓冲盐水(PBS)任选包含抗生素,例如1%青霉素/链霉素(P/S)。然后将样品置于具有胶原酶的无菌组织培养板中以进行组织消化(例如,在含2%P/S的PBS中制备的I型胶原酶),并在37°C、5%CO₂下孵育30分钟。胶原酶活性可以通过添加培养基(例如含有10%血清的DMEM)来中和。分解后,可以将样品转移到试管中。通过离心样品(例如,以2000rpm的速度离心5分钟)获得包含ASC的基质血管部分(SVF)。为完成基质细胞与原代脂肪细胞的分离,可大力振摇样品以彻底破坏团粒并混合细胞。可以重复离心步骤。旋转并吸出胶原酶溶液后,可将团粒重悬于裂解缓冲液中,在冰上孵育(例如10分钟)、洗涤(例如用PBS/2%P/S)并离心(例如以2000rpm离心5分钟)。然后可以吸出上清液,将细胞团粒重悬于培养基(例如基质培养基,即 α -MEM,补充有20%FBS,1%L-谷氨酰胺和1%P/S)中,并过滤细胞悬浮液(例如,通过70 μ m细胞过滤器)。最终可以将含有细胞的样品涂布在培养板上,并在37°C、5%CO₂下进行孵育。

[0056] 在一个实施方案中,本发明的ASC从脂肪组织的基质血管部分分离。在一个实施方案中,脂肪组织提取物可以在室温下保持数小时,或在使用前在+4°C下保持24小时,或在0°C以下,例如在-18°C下长期保存。

[0057] 在一个实施方案中,ASC可以是新鲜的ASC或冷藏的ASC。新鲜的ASC是未经冷藏处理的分离的ASC。冷藏的ASC是经过冷藏处理的分离的ASC。在一个实施方案中,冷藏处理是指低于0°C的任何处理。在一个实施方案中,可在约-18°C、-80°C或-180°C下进行冷藏处理。在一个具体的实施方案中,冷藏处理可以是超低温保存。

[0058] 作为冷藏处理的一个实例,可以在80%至90%汇合时收获ASC。经过洗涤和从培养皿上分离的步骤后,可以在室温下用冷藏保存培养基沉淀细胞,然后放入小瓶中。在一个实施方案中,冷藏保存培养基包含80%的胎牛血清或人血清、10%的二甲基亚砜(DMSO)和10%的DMEM/Ham's F-12。然后,将小瓶在-80°C下保存过夜。例如,可以将小瓶放置在酒精冷冻容器中,将小瓶以每分钟约1°C的速度缓慢冷却,直到达到-80°C。最后,可以将冷冻的小瓶转移到液氮容器中进行长期保存。

[0059] 在一个实施方案中,ASC是分化的ASC。在一个优选的实施方案中,ASC是成骨分化的ASC。换句话说,在一个优选的实施方案中,ASC分化为骨原细胞。在一个特定的实施方案中,ASC分化为成骨细胞。

[0060] 控制和评估成骨分化的方法是本领域已知的。例如,本发明的细胞或组织的骨分化的评估可以通过骨钙素和/或磷酸盐的染色(例如用冯库萨染色);通过对磷酸钙进行染色(例如用茜素红);通过磁共振成像(MRI);通过测量矿化基质的形成;或通过测量碱性磷酸酶活性来进行。

[0061] 在一个实施方案中,通过在成骨分化培养基(MD)中培养ASC来进行ASC的成骨分化。

[0062] 在一个实施方案中,成骨分化培养基包含人血清。在一个特定的实施方案中,成骨分化培养基包含人血小板裂解物(hPL)。在一个实施方案中,成骨分化培养基不包含任何其他动物血清,优选除人血清之外不包含其他血清。

[0063] 在一个实施方案中,成骨分化培养基包含或组成为补充有地塞米松、抗坏血酸和磷酸钠的增殖培养基。在一个实施方案中,成骨分化培养基还包含抗生素,例如青霉素、链霉素、庆大霉素和/或两性霉素B。在一个实施方案中,所有培养基均不含动物蛋白。

[0064] 在一个实施方案中,增殖培养基可以是本领域普通技术人员已知的被设计为支持细胞生长的任何培养基。如本文所用,增殖培养基也称为“生长培养基”。生长培养基的实例包括但不限于MEM、DMEM、IMDM、RPMI1640、FGM或FGM-2、199/109培养基,HamF10/HamF12或McCoy's 5A。在一个优选的实施方案中,增殖培养基是DMEM。

[0065] 在一个实施方案中,成骨分化培养基包含或组成为补充有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(Ala-Gln,也称为“Glutamax®”或“Ultraglutamine®”)、hPL、地塞米松、抗坏血酸和磷酸钠的DMEM。在一个实施方案中,成骨分化培养基包含或组成为补充有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、hPL、地塞米松、抗坏血酸和磷酸钠的DMEM、以及青霉素、链霉素和两性霉素B。

[0066] 在一个实施方案中,成骨分化培养基包含或组成为补充有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、hPL(约5%,体积/体积)、地塞米松(约1 μ M)、抗坏血酸(约0.25mM)和磷酸钠(约2.93mM)的DMEM。在一个实施方案中,成骨分化培养基包含或组成为补充有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、hPL(约5%,体积/体积)、地塞米松(约1 μ M)、抗坏血酸(约0.25mM)和磷酸钠(约2.93mM)的DMEM,青霉素(约100U/mL)和链霉素(约100 μ g/mL)。在一个实施方案中,成骨分化培养基还包含两性霉素B(约0.1%)。

[0067] 在一个实施方案中,成骨分化培养基组成为补充有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、hPL(约5%,体积/体积)、地塞米松(约1 μ M)、抗坏血酸(约0.25mM)和磷酸钠(约2.93mM)的DMEM。在一个实施方案中,成骨分化培养基包含或组成为补充有L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、hPL(约5%,体积/体积)、地塞米松(约1 μ M)、抗坏血酸(约0.25mM)和磷酸钠(约2.93mM)的DMEM,青霉素(约100U/mL),链霉素(约100 μ g/mL)和两性霉素B(约0.1%)。

[0068] 在一个实施方案中,ASC是传代后期的脂肪干细胞。如本文所用,术语“传代后期”是指至少在4代之后分化的脂肪干细胞。如本文所用,4代是指第四代,即第四次通过使细胞从培养容器的表面脱离,之后将细胞重悬于新鲜培养基中来分离细胞。在一个实施方案中,传代后期的脂肪干细胞在4代、5代、6代或多于6代之后分化。在一个优选的实施方案中,ASC在4代之后分化。

[0069] 如本文所用,术语“容器”是指任何细胞培养表面,例如烧瓶或孔板。

[0070] 原代细胞的初始代称为0代(P0)。根据本发明,P0代是指将来自沉淀的基质血管部分(SVF)的细胞悬浮液接种到培养容器上。因此,P4代是指将细胞从培养容器表面分离4次(在P1、P2、P3和P4)(例如,用胰蛋白酶消化),然后重悬在新鲜培养基中。

[0071] 在一个实施方案中,本发明的ASC在增殖培养基中培养直至第四代。在一个实施方案中,在第四次传代后于分化培养基中培养本发明的ASC。因此,在一个实施方案中,在P1代、P2代和P3代,将ASC从培养容器的表面分离,然后在增殖培养基中稀释至合适的细胞密

度。仍然根据该实施方案,在P4代,将ASC从培养容器的表面分离,然后在分化培养基中稀释至合适的细胞密度。因此,根据该实施方案,在P4,在分化之前(即在分化培养基中培养之前),直到本发明的ASC达到汇合,不对本发明的ASC在增殖培养基中进行重悬和培养,而是直接对其在分化培养基中进行重悬和培养。

[0072] 在一个实施方案中,将细胞保持在成骨分化培养基中至少直至它们达到汇合,优选70%至100%汇合,更优选80%至95%汇合。在一个实施方案中,将细胞在成骨分化培养基中维持至少5天,优选至少10天,更优选至少15天。在一个实施方案中,将细胞在成骨分化培养基中维持5天至30天,优选10天至25天,更优选15天至20天。在一个实施方案中,每2天更换分化培养基。然而,如本领域中已知的,一个供体与另一个供体的细胞生长速率可能略有不同。因此,成骨分化的持续时间和更换培养基的次数可能因各个供体而异。

[0073] 在一个实施方案中,将细胞保持在成骨分化培养基中至少持续到形成类骨质,即在骨组织成熟之前形成的骨基质的未矿化的有机部分。

[0074] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料为颗粒形式,在本文中称为生物相容性颗粒。在一个实施方案中,颗粒可以是珠、粉末、球体、微球等。

[0075] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料不被构造以形成预定的3D形状或支架,例如立方体。在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料不具有预定的形状或支架。在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料不具有立方体的形式。

[0076] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料可包含有机基质,例如脱矿骨基质(DBM)、纤维素等;聚合物,例如明胶、胶原、藻酸盐、聚乙二醇(PEG)、聚(乳酸-co-乙醇酸)(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己内酯(PCL)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、弹性蛋白等;或陶瓷,例如羟基磷灰石(HA)、 β -磷酸三钙(β -TCP)、羟基磷灰石/ β -磷酸三钙(HA/ β -TCP)、 α -磷酸三钙(α -TCP)、硫酸钙等。

[0077] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为约50 μ m至约2500 μ m,优选为约50 μ m至约1500 μ m,更优选为约100 μ m至约1000 μ m。在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为约200 μ m至约600 μ m。在另一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为约300 μ m至约700 μ m。

[0078] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至少约50 μ m,优选至少约100 μ m,更优选至少约150 μ m。在另一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至少约200 μ m,优选至少约250 μ m,更优选至少约300 μ m。

[0079] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至多约2500 μ m,优选至多约2000 μ m,更优选至多约1500 μ m。在另一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至多约1000 μ m,优选至多约900 μ m,更优选至少至多约800 μ m,甚至更优选至多约700 μ m。

[0080] 在一个特定的实施方案中,本发明的生物相容性颗粒是脱矿骨基质(DBM)。

[0081] 在一个实施方案中,DBM是动物来源的,优选哺乳动物来源的,更优选人来源的。在一个特定的实施方案中,人DBM通过研磨来自人供体的骨皮质获得。

[0082] 获得DBM的方法是本领域已知的。例如,首先,可以通过丙酮(例如99%)浸泡过夜来对人的骨组织进行脱脂,然后在去离子水中洗涤2小时。可在室温下通过浸入HCl(例如0.6N)中搅拌3小时(每克骨20mL溶液)来进行脱钙。然后,可以用脱盐水冲洗脱矿骨粉持续2

个小时,并控制pH值。如果pH太酸,则可在搅拌下用磷酸盐溶液(例如0.1M)缓冲DBM。最后,可以将DBM干燥并对其进行称重。可以按照本领域已知的技术,例如以约25kGy,通过 γ 辐照对DBM进行灭菌。

[0083] 在一个实施方案中,DBM是同种异体的。在一个实施方案中,DBM是同质的。在另一个实施方案中,DBM是异质的。

[0084] 在一个实施方案中,DBM为颗粒形式,在本文中称为脱矿骨基质颗粒或DBM颗粒。在一个实施方案中,DBM颗粒的平均直径为约50 μm 至约2500 μm ,优选为约50 μm 至约1500 μm ,更优选为约50 μm 至约1000 μm 。在一个实施方案中,DBM颗粒的平均直径为约100 μm 至约1500 μm ,更优选为约150 μm 至约1000 μm 。在一个实施方案中,DBM颗粒的平均直径为约200 μm 至约1000 μm ,优选为约200 μm 至约800 μm ,更优选为约300 μm 至约700 μm 。

[0085] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至少约50 μm ,优选至少约100 μm ,更优选至少约150 μm 。在另一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至少约200 μm ,优选至少约250 μm ,更优选至少约300 μm 。

[0086] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至多约2500 μm ,优选至多约2000 μm ,更优选至多约1500 μm 。在另一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒的平均直径为至多约1000 μm ,优选至多约900 μm ,更优选至少至多约800 μm ,甚至更优选至多约700 μm 。

[0087] 根据一个实施方案,脱矿骨基质的量是对于为生物材料提供3D结构而言最佳的量。在一个实施方案中,以每mL培养基约1mg至约25mg的浓度添加脱矿骨基质。在一个优选的实施方案中,以每mL培养基约1mg至约20mg,更优选每mL培养基约5mg至约20mg的浓度添加脱矿骨基质。

[0088] 在一个实施方案中,对于150 cm^2 的容器,以约500mg至约2000mg,优选约750mg至约1500mg,更优选约1000mg至约1250mg的浓度添加脱矿骨基质。

[0089] 在一个实施方案中,以每 cm^2 培养容器约3mg至约13mg,优选约5mg至约10mg,更优选约6.5mg至约8mg的浓度添加脱矿骨基质。

[0090] 在一个实施方案中,脱矿骨基质来自年龄小于40岁的供体。根据一个实施方案,骨基质的脱矿率为约90%至约99%,优选为约95%至约98%,甚至更优选为约97%。在一个实施方案中,脱矿率有利地获自持续使用0.6N HCl三个小时的过程。根据一个特定的实施方案,对脱矿骨基质进行灭菌。

[0091] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒是磷酸钙(CaP)、碳酸钙(CaCO_3)或氢氧化钙($\text{Ca}[\text{OH}]_2$)的颗粒。

[0092] 磷酸钙颗粒的实例包括但不限于羟基磷灰石($\text{HA}, \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)、磷酸三钙(TCP, $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$)、 α -磷酸三钙(α -TCP, $(\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$)、 β -磷酸三钙(β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)、磷酸四钙(TTCP, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$)、磷酸八钙($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、无定形磷酸钙($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)、羟基磷灰石/ β -磷酸三钙(HA/ β -TCP)、羟基磷灰石/磷酸四钙(HA/TTCP)等。

[0093] 在一个实施方案中,本发明的陶瓷材料包含或组成为羟基磷灰石(HA)、磷酸三钙(TCP)、羟基磷灰石/ β -磷酸三钙(HA/ β -TCP)、硫酸钙或其组合。在一个实施方案中,本发明的陶瓷材料包含或组成为羟基磷灰石(HA)、 β -磷酸三钙(β -TCP)、羟基磷灰石/ β -磷酸三钙(HA/ β -TCP)、 α -磷酸三钙(α -TCP)、硫酸钙或其组合。

[0094] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒是羟基磷灰石(HA)的颗粒。在另一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒是 β -磷酸三钙(β -TCP)的颗粒。在另一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒是羟基磷灰石/ β -磷酸三钙(HA/ β -TCP)的颗粒。换句话说,在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒是羟基磷灰石和 β -磷酸三钙颗粒的混合物(称为HA/ β -TCP颗粒)。在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒由羟基磷灰石颗粒和 β -磷酸三钙颗粒组成(称为HA/ β -TCP颗粒)。

[0095] 在一个实施方案中,HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒为颗粒、粉末或珠形式。在一个实施方案中,HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒为多孔颗粒、粉末或珠形式。在一个实施方案中,陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒为多孔陶瓷材料。在一个实施方案中,陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒为粉末颗粒。在一个特定的实施方案中,HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒为多孔颗粒形式。在另一个特定的实施方案中,HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒为粉末形式。在一个实施方案中,HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒不被构造以形成预定的3D形状或支架,例如立方体。在一个实施方案中,本发明的陶瓷材料不是3D支架。在一个实施方案中,陶瓷材料不具有预定的形状或支架。在一个实施方案中,本发明的陶瓷材料不具有立方体的形式。在一个实施方案中,本发明的生物材料是无支架的。

[0096] 在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒大于约50 μm ,优选大于约100 μm 。在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒的平均直径大于约50 μm ,优选大于约100 μm 。

[0097] 在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒的平均直径为至少约50 μm ,优选为至少约100 μm ,更优选为至少约150 μm 。在另一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒的平均直径为至少约200 μm ,优选至少约250 μm ,更优选至少约300 μm 。

[0098] 在另一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒的平均直径为至多约2500 μm ,优选为至多约2000 μm ,更优选为至多约1500 μm 。在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒的平均直径为至多约1000 μm 、900 μm 、800 μm 、700 μm 或600 μm 。

[0099] 在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒的平均直径为约50 μm 至约1500 μm ,优选为约50 μm 至约1250 μm ,更优选为约100 μm 至约1000 μm 。在一个实施方案中,本发明的陶瓷颗粒,优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒的平均直径为约100 μm 至约800 μm ,优选为约150 μm 至约700 μm ,更优选为约200 μm 至约600 μm 。

[0100] 在一个实施方案中,HA/ β -TCP颗粒的平均直径为约50 μm 至约1500 μm ,优选为约50 μm 至约1250 μm ,更优选为约100 μm 至约1000 μm 。在一个实施方案中,HA和 β -TCP颗粒的平均直径为约100 μm 至约800 μm ,优选为约150 μm 至约700 μm ,更优选为约200 μm 至约600 μm 。

[0101] 在一个实施方案中,颗粒中HA与 β -TCP的比例(HA/ β -TCP比例)为0/100至100/0,优选为10/90至90/10,更优选为20/80至80/20。在一个实施方案中,颗粒中的HA/ β -TCP比例为30/70至70/30、35/65至65/35或40/60至60/40。

[0102] 在一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为0/100,即颗粒为 β -磷酸三钙的颗粒。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为100/0,即,颗粒是羟基磷灰石的颗粒。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为10/90。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -

TCP的比例为90/10。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为20/80。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为80/20。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为30/70。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为70/30。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为35/65。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为65/35。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为40/60。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为60/40。在另一个实施方案中,颗粒中HA/ β -TCP的比例为50/50。

[0103] 根据一个实施方案,HA、TCP和/或HA/ β -TCP的量是对于向生物材料提供3D结构而言最佳的量。在一个实施方案中,对于150cm²的容器,以约0.5cm³至约5cm³,优选约1cm³至约3cm³,更优选约1cm³到约2cm³的浓度添加HA、TCP和/或HA/ β -TCP颗粒。在一个优选的实施方案中,对于150cm²的容器,以约1.5cm³的浓度加入HA、TCP和/或HA/ β -TCP颗粒。

[0104] 在一个实施方案中,以每mL培养基约7.10⁻³cm³至7.10⁻²cm³的浓度添加HA、TCP和/或HA/ β -TCP颗粒。在一个实施方案中,以每cm²容器约3.3.10⁻³cm³至3.3.10⁻²cm³的浓度添加HA、TCP和/或HA/ β -TCP颗粒。

[0105] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性颗粒是明胶。在一个实施方案中,本发明的明胶是猪明胶。如本文所用,术语“猪明胶”可以由“猪肉明胶”或“猪的明胶”代替。在一个实施方案中,明胶是猪皮肤明胶。

[0106] 在一个实施方案中,本发明的明胶是大孔微载体。

[0107] 猪明胶颗粒的实例包括但不限于Cultispher®G、Cultispher®S、Spongostan和Cutanplast。在一个实施方案中,本发明的明胶是Cultispher®G或Cultispher®S。

[0108] 在一个实施方案中,本发明的明胶,优选猪明胶的平均直径为至少约50 μ m,优选为至少约75 μ m,更优选为至少约100 μ m,更优选为至少约130 μ m。在一个实施方案中,本发明的明胶,优选猪明胶的平均直径为至多约1000 μ m,优选至多约750 μ m,更优选至多约500 μ m。在另一个实施方案中,本发明的明胶,优选猪明胶的平均直径为至多约450 μ m,优选至多约400 μ m,更优选至多约380 μ m。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的明胶,优选猪明胶的平均直径为约50 μ m至约1000 μ m,优选为约75 μ m至约750 μ m,更优选为约100 μ m至约500 μ m。在另一个实施方案中,本发明的明胶,优选猪明胶的平均直径为约50 μ m至约500 μ m,优选为约75 μ m至约450 μ m,更优选为约100 μ m至约400 μ m。在另一个实施方案中,本发明的明胶,优选猪明胶的平均直径为约130 μ m至约380 μ m。

[0110] 在一个实施方案中,对于150cm²的容器,以约0.1cm³至约5cm³,优选约0.5cm³至约4cm³,更优选约0.75cm³至约3cm³的浓度添加明胶。在一个实施方案中,对于150cm²的容器,以约1cm³至约2cm³的浓度添加明胶。在一个实施方案中,对于150cm²的容器,以约1cm³、1.5cm³或2cm³的浓度添加明胶。

[0111] 在一个实施方案中,对于150cm²的容器,以约0.1g至约5g,优选约0.5g至约4g,更优选约0.75g至约3g的浓度添加明胶。在一个实施方案中,对于150cm²的容器,以约1g至约2g的浓度添加明胶。在一个实施方案中,对于150cm²的容器,以约1g、1.5g或2g的浓度添加明胶。

[0112] 在一个实施方案中,当细胞在分化后达到汇合时,添加本发明的明胶。换句话说,在一个实施方案中,当细胞在分化培养基中达到汇合时,添加本发明的明胶。在一个实施方

案中,在P4之后至少5天,优选10天,更优选15天添加本发明的明胶。在一个实施方案中,在P4之后5天至30天,优选10天至25天,更优选15天至20天添加本发明的明胶。

[0113] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料是脱矿骨基质(DBM)、磷酸钙颗粒,优选HA和/或 β -TCP颗粒、或明胶,优选猪明胶。在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料是脱矿骨基质(DBM)、HA颗粒、 β TCP颗粒、HA/ β -TCP颗粒或明胶。在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料是脱矿骨基质(DBM)、HA颗粒、 β TCP颗粒、HA/ β -TCP颗粒或猪明胶。

[0114] 在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料选自包含或组成为脱矿骨基质(DBM)、磷酸钙颗粒,优选HA和/或 β -TCP颗粒,和明胶,优选猪明胶的组。在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料选自包含或组成为脱矿骨基质(DBM)、HA颗粒、 β TCP颗粒,HA/ β -TCP颗粒和明胶的组。在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料选自包含或组成为脱矿骨基质(DBM)、HA颗粒、 β TCP颗粒、HA/ β -TCP颗粒和猪明胶的组。

[0115] 在一个实施方案中,在细胞分化后将本发明的生物相容性材料添加到培养基中。在一个实施方案中,当细胞亚汇合时添加本发明的生物相容性材料。在一个实施方案中,当细胞过度汇合时,添加本发明的生物相容性材料。在一个实施方案中,当细胞在分化后达到汇合时,添加本发明的生物相容性材料。换句话说,在一个实施方案中,当细胞在分化培养基中达到汇合时,添加本发明的生物相容性材料。在一个实施方案中,在P4之后至少5天,优选10天,更优选15天添加本发明的生物相容性材料。在一个实施方案中,在P4之后5天至30天,优选10天至25天,更优选15天至20天添加本发明的生物相容性材料。

[0116] 在一个实施方案中,根据本发明的生物材料是二维的。在该实施方案中,本发明的生物材料可以形成小于1mm的薄膜。

[0117] 在另一个实施方案中,根据本发明的生物材料是三维的。在该实施方案中,本发明的生物材料可以形成厚度为至少1mm的厚膜。生物材料的大小可以依用途调整。

[0118] 在一个实施方案中,本发明的生物材料不包含支架。如本文所用,术语“支架”是指模拟包括人和动物组织在内的天然哺乳动物组织,例如天然哺乳动物,优选人的骨或细胞外基质的孔隙率、孔径和/或功能的结构。这种支架的实例包括但不限于人造骨、胶原海绵、水凝胶例如蛋白质水凝胶、肽水凝胶、聚合物水凝胶和木基纳米纤维素水凝胶等。在一个实施方案中,本发明的生物材料不包含人造骨。在一个实施方案中,本发明的生物相容性材料不是人造骨。

[0119] 在一个实施方案中,本发明的多维生物材料不归因于模仿天然细胞外基质结构的支架。在一个实施方案中,本发明的生物材料不包含模拟天然细胞外基质结构的支架。

[0120] 在一个实施方案中,本发明的多维生物材料归因于通过本发明的脂肪组织干细胞合成细胞外基质。

[0121] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含细胞外基质。在一个实施方案中,本发明的细胞外基质衍生自ASC。在一个实施方案中,本发明的细胞外基质由ASC产生。

[0122] 如本文所用,术语“细胞外基质”(ECM)是指非细胞多维大分子网络。ECM的基质组分彼此结合并与细胞黏附受体结合,从而在本发明的组织或生物材料中形成使细胞驻留于其中的复杂网络。

[0123] 在一个实施方案中,本发明的细胞外基质包含胶原、蛋白聚糖/糖胺聚糖、弹性蛋白、纤连蛋白、层黏连蛋白和/或其他糖蛋白。在一个特定的实施方案中,本发明的细胞外基

质包含胶原。在另一个特定的实施方案中,本发明的细胞外基质包含蛋白聚糖。在另一个特定的实施方案中,本发明的细胞外基质包含胶原和蛋白聚糖。在一个实施方案中,本发明的细胞外基质包含生长因子、蛋白聚糖、分泌因子、细胞外基质调节剂和糖蛋白。

[0124] 在一个实施方案中,本发明生物材料内的ASC形成组织,其在本文中称为ASC组织。在一个实施方案中,将本发明生物材料内的ASC和陶瓷材料,优选陶瓷颗粒,更优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒包埋在细胞外基质中。在一个实施方案中,ASC,优选分化为骨细胞的ASC与陶瓷材料,优选陶瓷颗粒,更优选HA、 β -TCP和/或HA/ β -TCP颗粒一起形成具有细胞外基质的3D结构。在一个实施方案中,ASC组织是血管化组织。在一个实施方案中,本发明的生物材料是血管化的。

[0125] 在一个实施方案中,ASC组织是细胞化的互连组织。在一个实施方案中,生物相容性材料,优选生物相容性颗粒被整合到细胞化的互连组织中。在一个实施方案中,生物相容性材料,优选生物相容性颗粒被分散于ASC组织内。

[0126] 在一个实施方案中,本发明的生物材料的特征在于在生物相容性材料,优选生物相容性颗粒之间形成的互连组织。在一个实施方案中,本发明的生物材料的特征在于围绕生物相容性材料,优选生物相容性颗粒的矿化。在一个实施方案中,可以通过组织回缩的发生来确认形成的生物材料的组织性质。

[0127] 在一个实施方案中,本发明的生物材料具有与具有骨钙素表达和矿化特性的真骨相似的特性。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含骨细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含骨细胞和细胞外基质。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含骨细胞和胶原。在一个特定的实施方案中,胶原是钙化和矿化的胶原。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含骨基质。

[0128] 在一个实施方案中,本发明的生物材料是生物材料中细胞的分化达到终点,且当植入时生物材料的表型将保持不变的那些生物材料。

[0129] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含生长因子。在一个实施方案中,在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周评估本发明生物材料的生长因子含量或分泌。

[0130] 护骨因子(OPG),也称为破骨细胞生成抑制因子(OCIF)或肿瘤坏死因子受体超家族成员11B(TNFRSF11B),是一种细胞因子受体。已经发现,OPG的过度表达或施用会抑制小鼠的破骨细胞生成。同样,已经确定,缺乏OPG的动物会加速破骨细胞生成并发展为严重的骨质疏松症。现在已知OPG是一种可溶性诱饵受体,其可与RANK竞争RANKL(核因子 κ -B配体的受体激活剂,也称为肿瘤坏死因子配体超家族成员11(TNFSF11)、TNF相关激活诱导的细胞因子(TRANCE)、护骨因子配体(OPGL)或破骨细胞分化因子(ODF))。已确定RANK/RANKL/OPG信号传导通路调节破骨细胞的分化和激活。因此,破骨细胞生成刺激因子RANKL和抑制剂OPG的表达之间的平衡决定了骨吸收的量。

[0131] 在一个实施方案中,本发明生物材料的OPG含量和/或分泌可以通过本领域已知的任何方法来定量,例如通过ELISA,优选在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周进行。

[0132] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含OPG。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌OPG。在一个实施方案中,本发明生物材料的ASC分泌OPG。在一个实施方案中,本发明的细胞工程生物材料分泌OPG。

[0133] 在一个实施方案中,本发明的生物材料在生物材料中分泌至少约250pg OPG/ 10^6 个细胞,优选至少500pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约750pg、800pg、850pg、900pg或950pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约1000pg、1100pg、1200pg、1300pg或1400pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约1000pg、1500pg、2000pg、2500pg或3000pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约2000pg、2100pg、2200pg、2300pg、2400pg或2500pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约2550pg、2600pg、2650pg或2750pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约1000pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约2500pg OPG/ 10^6 个细胞。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约2750pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约1000pg OPG/ 10^6 个细胞。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约2500pg OPG/ 10^6 个细胞。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约2750pg OPG/ 10^6 个细胞。

[0134] 在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约250pg至约10000pg OPG/ 10^6 个细胞,优选约500pg OPG/ 10^6 细胞至约5000pg OPG/ 10^6 细胞,更优选约1000pg OPG/ 10^6 细胞至约4000pg OPG/ 10^6 细胞。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约250pg OPG/ 10^6 个细胞至约5000pg OPG/ 10^6 个细胞,优选约500pg OPG/ 10^6 个细胞至约4500pg OPG/ 10^6 个细胞,更优选约750pg OPG/ 10^6 个细胞至约4000pg OPG/ 10^6 个细胞。在一个优选的实施方案中,本发明的生物材料以约1000pg/ 10^6 细胞至约3500pg/ 10^6 细胞的浓度分泌OPG。在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料以约1000pg/ 10^6 细胞或1200ppg/ 10^6 细胞的浓度分泌OPG。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料以约3000pg/ 10^6 细胞或3500ppg/ 10^6 细胞的浓度分泌OPG。

[0135] 在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约5ng OPG/g生物材料,优选至少约10ng OPG/g生物材料,更优选至少约15ng OPG/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约20ng OPG/g生物材料,优选至少约25ng OPG/g生物材料,更优选至少约30ng OPG/g生物材料。

[0136] 在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约35ng、40ng或45ng的OPG/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约50ng OPG/g生物材料,优选至少约60ng OPG/g生物材料,更优选至少约70ng OPG/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约75ng OPG/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少约80ng、85ng、90ng、95ng或100ng OPG/g生物材料。

[0137] 在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约5ng OPG/g生物材料至约200ng OPG/g生物材料,优选约10ng OPG/g生物材料至约175ng OPG/g生物材料,更优选约15ng OPG/g生物材料至约150ng OPG/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约5ng OPG/g生物材料至约150ng OPG/g生物材料,优选约5ng OPG/g生物材料至约140ng OPG/g生物材料,更优选约5ng OPG/g生物材料至约120ng OPG/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约10ng OPG/g生物材料至约150ng OPG/g生物材料,优选约10ng OPG/g生物材料至约140ng OPG/g生物材料,更优选约10ng OPG/g生物材料至约120ng OPG/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约15ng OPG/g生物材料至约

150ng OPG/g生物材料,优选为约15ng OPG/g生物材料至约140ng OPG/g生物材料,更优选约15ng OPG/g生物材料至约120ng OPG/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约30ng OPG/g生物材料至约150ng OPG/g生物材料,优选约30ng OPG/g生物材料至约140ng OPG/g生物材料,更优选约30ng OPG/g生物材料至约120ng OPG/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约5ng OPG/g生物材料至约100ng OPG/g生物材料、约10ng OPG/g生物材料至约100ng OPG/g生物材料、约15ng OPG/g生物材料至约100ng OPG/g生物材料、约20ng OPG/g生物材料至约100ng OPG/g生物材料、约25ng OPG/g生物材料至约100ng OPG/g生物材料、或约30ng OPG/g生物材料至约100ng OPG/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约5ng OPG/g生物材料至约90ng OPG/g生物材料、约10ng OPG/g生物材料至约90ng OPG/g生物材料、约15ng OPG/g生物材料至约90ng OPG/g生物材料、约20ng OPG/g生物材料至约90ng OPG/g生物材料、约25ng OPG/g生物材料至约90ng OPG/g生物材料或约30ng OPG/g生物材料至约90ng OPG/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约5ng OPG/g生物材料至约85ng OPG/g生物材料、约10ng OPG/g生物材料至约85ng OPG/g生物材料、约15ng OPG/g生物材料至约85ng OPG/g生物材料、约20ng OPG/g生物材料至约85ng OPG/g生物材料、约25ng OPG/g生物材料至约85ng OPG/g生物材料或约30ng OPG/g生物材料至约85ng OPG/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌约15ng OPG/g生物材料至约30ng OPG/g生物材料。

[0138] 在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料以约15ng/g生物材料的浓度分泌OPG。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料以约30ng/g生物材料的浓度分泌OPG。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料以约75ng/g生物材料的浓度分泌OPG。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料以约85ng/g生物材料的浓度分泌OPG。

[0139] 在一个实施方案中,在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料以如上所述的浓度分泌OPG。换句话说,在一个实施方案中,在多维诱导开始后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料以如上所述的浓度分泌OPG。

[0140] 在一个实施方案中,本发明生物材料的RANKL含量和/或分泌可以通过本领域已知的任何方法,例如通过ELISA来定量,优选在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周进行。

[0141] 在一个实施方案中,本发明的生物材料或生物材料的上清液(当在培养基中时)中的RANKL水平是检测不到的。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含或生物材料的ASC分泌每mL小于200pg的RANKL,优选地小于156pg/mL,优选地小于100pg/mL,更优选地小于78pg/mL,甚至更优选小于50pg/mL,甚至更优选小于10pg/mL,甚至更优选小于7.8pg/mL的RANKL。

[0142] 在一个实施方案中,本发明的生物材料基本上不包含RANKL。在一个实施方案中,本发明生物材料的ASC基本不分泌RANKL。

[0143] 在一个实施方案中,在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料以如上所述的浓度分泌RANKL。换句话说,在一个实施方案中,在多维诱导开始后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料以如上所述的浓度分泌RANKL。

[0144] 在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌OPG并且不分泌RANKL,或者不分泌可检测水平的RANKL。

[0145] 在一个实施方案中,本发明的生物材料分泌至少如上所述浓度的OPG,并分泌至多如上所述浓度的RANKL。

[0146] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含血管内皮生长因子(VEGF)。在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料包含高水平的VEGF。

[0147] 在一个实施方案中,本发明生物材料的VEGF含量可以通过本领域已知的任何方法,例如通过ELISA来定量,优选在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周进行。

[0148] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为至少约10ng/g生物材料,优选至少约20ng/g生物材料,更优选至少约30ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为至少约50ng/g生物材料,优选至少约60ng/g生物材料,更优选至少约70ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为至少约100ng/g生物材料,优选至少约125ng/g生物材料,更优选至少约150ng/g生物材料。

[0149] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约10ng/g生物材料至约250ng/g生物材料,优选约20ng/g生物材料至约225ng/g生物材料,更优选约30ng/g生物材料至约200ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约10ng/g生物材料至约50ng/g生物材料,优选约15ng/g生物材料至约45ng/g生物材料,更优选约20ng/g生物材料至约40ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约50ng/g生物材料至约150ng/g生物材料,优选约60ng/g生物材料至约125ng/g生物材料,更优选约70ng/g生物材料至约100ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约100ng/g生物材料至约250ng/g生物材料,优选约120ng/g生物材料至约225ng/g生物材料,更优选约140ng/g生物材料至约200ng/g生物材料。

[0150] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约35ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约75ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约95ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约135ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的VEGF的浓度为约190ng/g生物材料。

[0151] 在一个实施方案中,在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的VEGF。换句话说,在一个实施方案中,在多维诱导开始后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的VEGF。

[0152] 胰岛素样生长因子(IGF-1)与维持骨矿物质密度和获得更高的峰值骨量正相关,从而降低了随后的骨折风险。

[0153] 在一个实施方案中,本发明生物材料的IGF-1含量可以通过本领域已知的任何方法,例如通过ELISA来定量,优选在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周进行。

[0154] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含IGF-1。在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料包含高水平的IGF-1。

[0155] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为至少约5ng/g生物材料,优选至少约10ng/g生物材料,更优选至少约15ng/g生物材料,甚至更优选至少约20ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为至少约10ng/g生物

材料、11ng/g生物材料、12ng/g生物材料、13ng/g生物材料、14ng/g生物材料、15ng/g生物材料、16ng/g生物材料、17ng/g生物材料、18ng/g生物材料、19ng/g生物材料或20ng/g生物材料。

[0156] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为至少约50ng/g生物材料,优选至少约60ng/g生物材料,更优选至少约70ng/g生物材料,甚至更优选至少约80ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为至少约90ng/g生物材料、91ng/g生物材料、92ng/g生物材料、93ng/g生物材料、94ng/g生物材料、95ng/g生物材料、96ng/g生物材料、97ng/g生物材料、98ng/g生物材料、99ng/g生物材料或100ng/g生物材料。

[0157] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为约5ng/g生物材料至约500ng/g生物材料,优选为约10ng/g生物材料至约400ng/g生物材料,更优选为约15ng/g生物材料至约300ng/g生物材料。

[0158] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为约5ng/g生物材料至约200ng/g生物材料,优选约10ng/g生物材料至约150ng/g生物材料,更优选约15ng/g生物材料至约125ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为约5ng/g生物材料、10ng/g生物材料、15ng/g生物材料或20ng/g生物材料至约150ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为约5ng/g生物材料、10ng/g生物材料、15ng/g生物材料或20ng/g生物材料至约125ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为约5ng/g生物材料、10ng/g生物材料、15ng/g生物材料或20ng/g生物材料至约100ng/g生物材料。在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为约20ng/g生物材料至约100ng/g生物材料。

[0159] 在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含IGF-1的浓度为约50ng/g生物材料至约150ng/g生物材料,优选约70ng/g生物材料至约125ng/g生物材料,更优选约80ng/g生物材料至约110ng/g生物材料,甚至更优选约85ng/g生物材料至约100ng/g生物材料或约90ng/g生物材料至约100ng/g生物材料。

[0160] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含约20ng IGF-1/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的IGF-1的浓度为约90ng/g生物材料、91ng/g生物材料、92ng/g生物材料、93ng/g生物材料、94ng/g生物材料、95ng/g生物材料、96ng/g生物材料、97ng/g生物材料、98ng/g生物材料、99ng/g生物材料或100ng/g生物材料。在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料包含约90ng IGF-1/g生物材料。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料包含约95ng IGF-1/g生物材料。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料包含约100ng IGF-1/g生物材料。

[0161] 在一个实施方案中,在添加生物相容性材料后的4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的IGF-1。换句话说,在一个实施方案中,在多维诱导开始后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的IGF-1。

[0162] SDF-1 α ,也称为基质细胞衍生因子1- α 或CXCL12,在破骨细胞的分化和激活中起刺激作用。破骨细胞,尤其是破骨细胞前体,对SDF-1 α 的独特受体CXCR4为高度阳性。尽管SDF-1 α 直接诱导破骨细胞生成,但最近发现SDF-1 α 可通过上调RANKL表达间接影响破骨细胞生成。破骨细胞及其前体上存在RANK表明,存在于基质细胞上的破骨细胞分化因子可能是

RANKL。

[0163] 在一个实施方案中,本发明生物材料的SDF-1 α 含量可以通过本领域已知的任何方法,例如通过ELISA来定量,优选在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周进行。

[0164] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含SDF-1 α 。在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料包含低水平的SDF-1 α 。

[0165] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约1000ng/g生物材料,优选至多约750ng/g生物材料,更优选至多约500ng/g生物材料,甚至更优选至多约400ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约300ng/g生物材料,优选至多约275ng/g生物材料,更优选至多约250ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约290ng/g生物材料、280ng/g生物材料、270ng/g生物材料、260ng/g生物材料或250ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约240ng/g生物材料、230ng/g生物材料、220ng/g生物材料、210ng/g生物材料或200ng/g生物材料。

[0166] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约100ng/g生物材料,优选至多约75ng/g生物材料,更优选至多约50ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约70ng/g生物材料、65ng/g生物材料、60ng/g生物材料、59ng/g生物材料、58ng/g生物材料、57ng/g生物材料、56ng/g生物材料、55ng/g生物材料、54ng/g生物材料、53ng/g生物材料、52ng/g生物材料或51ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约49ng/g生物材料、48ng/g生物材料、47ng/g生物材料、46ng/g生物材料、45ng/g生物材料、44ng/g生物材料、43ng/g生物材料、42ng/g生物材料或41ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约39ng/g生物材料、38ng/g生物材料、37ng/g生物材料、36ng/g生物材料、35ng/g生物材料、34ng/g生物材料、33ng/g生物材料、32ng/g生物材料或31ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为至多约30ng/g生物材料。

[0167] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为约5ng/g生物材料至约1000ng/g生物材料,优选约15ng/g生物材料至约750ng/g生物材料,更优选约20ng/g生物材料至约500ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为约5ng/g生物材料至约300ng/g生物材料,优选约15ng/g生物材料至约275ng/g生物材料,更优选约20ng/g生物材料至约250ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为约25ng/g生物材料至约250ng/g生物材料,更优选约30ng/g生物材料至约250ng/g生物材料。

[0168] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为约100ng/g生物材料至约400ng/g生物材料,优选约150ng/g生物材料至约350ng/g生物材料,更优选约200ng/g生物材料至约300ng/g生物材料。

[0169] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为约5ng/g生物材料至约100ng/g生物材料,优选约15ng/g生物材料至约75ng/g生物材料,更优选约25ng/g生物材料至约60ng/g生物材料。在一个实施方案中,本发明的生物材料包含的SDF-1 α 的浓度为约30ng/g生物材料至约100ng/g生物材料,优选约30ng/g生物材料至约75ng/g生物材料,更

优选约30ng/g生物材料至约50ng/g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含SDF-1 α 的浓度为约30ng/g生物材料至约40ng/g生物材料。

[0170] 在一实施方案中,本发明的生物材料包含约250ng SDF-1 α /g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含约30ng SDF-1 α /g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含约40ng SDF-1 α /g生物材料。在另一个实施方案中,本发明的生物材料包含约50ng SDF-1 α /g生物材料。

[0171] 在一个实施方案中,在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的SDF-1 α 。换句话说,在一个实施方案中,在多维诱导开始后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的SDF-1 α 。

[0172] 骨形态发生蛋白2或BMP2在刺激骨发育中起重要作用。例如,已证明其有效诱导成骨细胞分化。

[0173] 骨形态发生蛋白7或BMP7在间充质细胞向骨的转化中起着关键作用,特别是通过诱导SMAD1和SMAD5的磷酸化,进而诱导众多成骨基因的转录来起作用。

[0174] 在一个实施方案中,本发明生物材料的BMP2和BMP7含量可以通过本领域已知的任何方法,例如通过ELISA来定量,优选在添加生物相容性材料后4周、5周、6周、7周或8周进行。

[0175] 在一个实施方案中,本发明的生物材料或生物材料的上清液(当在培养基中时)中的BMP2水平是检测不到的。在一个实施方案中,本发明的生物材料基本上不包含BMP2。在一个实施方案中,本发明生物材料的ASC基本不分泌BMP2。

[0176] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含或生物材料的ASC分泌小于100pg/mL的BMP2,优选小于85pg/mL,更优选小于75pg/mL,甚至更优选小于62.5pg/mL的BMP2。

[0177] 在一个实施方案中,本发明的生物材料或生物材料的上清液(当在培养基中时)中的BMP7水平是检测不到的。在一个实施方案中,本发明的生物材料基本上不包含BMP7。在一个实施方案中,本发明生物材料的ASC基本不分泌BMP7。

[0178] 在一个实施方案中,本发明的生物材料包含或生物材料的ASC分泌小于50pg/mL的BMP7,优选小于40pg/mL,更优选小于35pg/mL,甚至更优选小于31.2pg/mL的BMP7。

[0179] 在一个实施方案中,在添加生物相容性材料后的4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的BMP2和/或BMP7。换句话说,在一个实施方案中,在多维诱导开始后4周、5周、6周、7周或8周,本发明的生物材料包含如上所述浓度的BMP2和/或BMP7。

[0180] 在一个实施方案中,根据本发明的生物材料是矿化的。如本文所用,术语“矿化”或“骨组织矿物质密度”是指每平方厘米的骨或由生物材料形成的“骨样”组织的矿物质的量,也以百分比表示。因此,如本文所用,术语“矿化”或“骨组织矿物质密度”是指每平方厘米生物材料中矿物质的量,也以百分比表示。

[0181] 评估生物材料的矿化度的方法是本领域已知的。此类方法的实例包括但不限于微型计算机断层扫描(微型CT)分析、成像质谱、钙黄绿素蓝染色、骨矿物质密度分布(BMDD)分析等。

[0182] 在一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度不小于约1%。

[0183] 在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为至少约1%,优选至少约2%,更优选至少约5%。

[0184] 在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为至少约10%,优选至少约15%,更优选至少约20%,甚至更优选至少约25%。在一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%或38%。

[0185] 在一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为约1%至约50%,优选约1%至约45%,更优选约1%至约40%。在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为约5%至约50%,优选约10%至约45%,更优选约20%至约40%。在一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为约30%至约50%,优选约35%至约50%,更优选约35%至约45%,甚至更优选约35%至约40%。

[0186] 在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为约1%至约30%,优选约1%至约20%,更优选约1%至约10%。在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为约1%至约5%。

[0187] 在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为至少1%或1.24%。在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为至少2%、2.5%或2.77%。在另一个实施方案中,本发明的生物材料的矿化度为约1%或1.24%。在另一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度为约2%、2.5%或2.77%。

[0188] 在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料的矿化度为约2%。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料的矿化度为约20%。在另一个特定的实施方案中,本发明的生物材料的矿化度为约38%。

[0189] 在一个实施方案中,本发明生物材料的矿化度与OPG的分泌是成比例的。在一个实施方案中,生物材料包含的OPG越多,生物材料矿化得就越多。

[0190] 本发明还涉及用于制备包含分化为成骨细胞的脂肪组织干细胞(ASC)、生物相容性材料和细胞外基质的多维生物材料的方法,其中所述生物材料包含护骨因子(OPG)。

[0191] 在一个实施方案中,根据本发明的用于制备生物材料的方法包括以下步骤:

[0192] -使细胞增殖,

[0193] -使细胞分化,和

[0194] -进行多维诱导。

[0195] 在一个实施方案中,根据本发明的用于制备生物材料的方法包括以下步骤:

[0196] -使ASC增殖,

[0197] -使ASC成骨分化,和

[0198] -进行多维诱导,优选3D诱导。

[0199] 在一个实施方案中,根据本发明的用于制备生物材料的方法包括以下步骤:

[0200] -从对象中分离细胞,优选ASC;

[0201] -使细胞,优选ASC增殖,

[0202] -使增殖的细胞,优选ASC分化,和

[0203] -在生物相容性材料的存在下培养分化的细胞,优选ASC。

[0204] 在一个实施方案中,用于制备本发明生物材料的方法还包括在细胞增殖步骤之前进行的分离细胞的步骤,所述细胞优选为ASC。在一个实施方案中,用于制备本发明生物材料的方法还包括在细胞增殖步骤之前进行的分离细胞的步骤,所述细胞优选为ASC。

[0205] 在一个实施方案中,增殖步骤如上所述进行。在一个实施方案中,增殖步骤在增殖

培养基中进行。在一个特定的实施方案中,增殖培养基是DMEM。在一个实施方案中,增殖培养基补充有Ala-Gln和/或人血小板裂解物(hPL)。在一个实施方案中,增殖培养基还包含抗生素,例如青霉素和/或链霉素。

[0206] 在一个实施方案中,增殖培养基包含或组成为补充有Ala-Gln和hPL(5%)的DMEM。在一个实施方案中,增殖培养基包含或组成为补充有Ala-Gln、hPL(5%,体积/体积)、青霉素(100U/mL)和链霉素(100 μ g/mL)的DMEM。

[0207] 在一个实施方案中,增殖步骤进行至P8。在一个实施方案中,增殖步骤持续至P4、P5、P6、P7或P8。因此,在一个实施方案中,细胞增殖步骤包括至少3代。在一个实施方案中,细胞增殖步骤包括至多7代。在一个实施方案中,细胞增殖步骤包括3代至7代。在一个特定的实施方案中,增殖步骤进行至P4。因此,在一个实施方案中,细胞增殖步骤包括从培养容器的表面分离细胞,然后在P1、P2和P3时将它们稀释在增殖培养基中。在增殖至P6的一个实施方案中,细胞增殖的步骤包括从培养容器的表面分离细胞,然后在P1、P2、P3、P4和P5时将它们稀释在增殖培养基中。

[0208] 在一个实施方案中,增殖步骤持续至足以使细胞传代3次、4次、5次、6次或7次的时间。在一个特定的实施方案中,增殖步骤持续至足以使细胞传代3次的时间。在一个实施方案中,增殖步骤持续到在最后一次传代后细胞达到汇合为止,优选为70%至100%的汇合,更优选为80%至95%的汇合。在一个实施方案中,增殖步骤持续到在第三次、第四次、第五次、第六次或第七次传代后细胞达到汇合为止。

[0209] 在一个有利的实施方案中,在添加生物相容性颗粒之前在分化培养基中培养细胞,优选ASC是本发明方法的关键步骤。这样的步骤对于使ASC分化为成骨细胞是必需的。另外,该步骤对于获得多维结构是必需的。

[0210] 在一个实施方案中,在P4、P5、P6、P7或P8之后进行分化步骤。在一个实施方案中,在细胞未汇合时进行分化步骤。在一个特定的实施方案中,在P4、P5、P6、P7或P8之后进行分化步骤,无需培养细胞至汇合。

[0211] 在一个实施方案中,在P4、P5、P6、P7或P8时进行分化步骤。在一个实施方案中,在细胞未汇合时进行分化步骤。在一个特定的实施方案中,在P4、P5、P6、P7或P8时进行分化步骤,无需培养细胞至汇合。

[0212] 在一个实施方案中,通过在分化培养基,优选成骨分化培养基中孵育细胞来进行分化步骤。在一个实施方案中,通过将从培养皿表面分离的细胞重悬于分化培养基,优选成骨分化培养基中来进行分化步骤。

[0213] 在一个实施方案中,将ASC在成骨分化培养基中孵育至少3天,优选至少5天,更优选至少10天,更优选至少15天。在一个实施方案中,将ASC在成骨分化培养基中孵育5天至30天,优选10天至25天,更优选15天至20天。在一个实施方案中,每2天更换分化培养基。

[0214] 在一个实施方案中,通过在分化培养基中添加如上文所限定的生物相容性材料来进行多维诱导,优选3D诱导的步骤。在一个实施方案中,在多维诱导,优选3D诱导的步骤期间,将细胞保持在分化培养基中。

[0215] 在一个实施方案中,当细胞在分化培养基中达到汇合,优选70%至100%汇合,更优选80%至95%汇合时,进行多维诱导,优选3D诱导的步骤。

[0216] 在另一个实施方案中,当出现形态变化例如结节预先形成时,进行多维诱导,优选

3D诱导的步骤。在一个实施方案中,当形成至少一个类骨质节结时,进行多维诱导,优选3D诱导的步骤。如本文所用,术语“类骨质”是指在骨组织成熟之前形成的骨基质的未矿化的有机部分。

[0217] 在另一个实施方案中,当细胞达到汇合时,当出现形态学变化时以及当形成至少一个类骨质节结时,进行多维诱导,优选3D诱导的步骤。

[0218] 在一个实施方案中,将本发明的细胞和生物相容性材料孵育至少5天,优选至少10天,更优选至少15天。在一个实施方案中,将本发明的细胞和生物相容性材料孵育10天至30天,优选15天至25天,更优选20天。在一个实施方案中,在多维诱导,优选3D诱导的步骤期间,每2天更换培养基。

[0219] 本发明还涉及可通过根据本发明的方法获得的多维生物材料。在一个实施方案中,多维生物材料是通过根据本发明的方法获得的。在一个实施方案中,多维生物材料是通过根据本发明的方法制备的。在一个实施方案中,通过本发明的方法能够获得的或获得的生物材料旨在植入人体或动物体内。在一个实施方案中,植入的生物材料可以是自体来源的或同种异体的。在一个实施方案中,本发明的生物材料可以被植入骨或软骨区域中。在一个实施方案中,该生物材料可以被植入人体或动物体的不规则区域中。

[0220] 在一个实施方案中,本发明的生物材料是均匀的,这意味着在整个组织中该生物材料的结构和/或构造是相似的。在一个实施方案中,该生物材料具有植入天然疾病区域所需的期望的处理和机械特性。在一个实施方案中,通过本发明的方法能够获得的或获得的生物材料可以用外科器械保持而不被撕裂。

[0221] 本发明的另一个目的是一种医疗器械,其包括根据本发明的生物材料。

[0222] 另一个目的是药物组合物,其包含根据本发明的生物材料和至少一种药学上可接受的载体。

[0223] 本发明还涉及根据本发明的生物材料或药物组合物,其用作药物。

[0224] 本发明涉及本发明生物材料作为医疗装置、或包括在医疗装置中、或在药物组合物中的任何用途。在一些实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物是油灰状材料,其可以在使用前被操作和成型。

[0225] 本发明还涉及一种在有需要的对象中治疗骨缺损或软骨缺损的方法,该方法包括向对象施用治疗有效量的根据本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物。

[0226] 如本文所用,术语“骨缺损”是指在其中通常应有骨或治疗上期望形成骨组织的身体区域中缺乏骨组织。

[0227] 如本文所用,术语“软骨缺损”是指在其中通常应有软骨或治疗上期望形成软骨组织的身体区域中缺乏软骨组织。

[0228] 本发明的另一个目的是根据本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物,其用于在有需要的对象中治疗骨缺损或软骨缺损。本发明的另一个目的是根据本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物在治疗有需要的对象中的骨缺损中的用途。

[0229] 骨缺损的实例包括但不限于骨折、骨脆弱、骨矿物质密度降低、关节炎、假关节例如先天性假关节、骨质疏松症、脊椎滑脱、脊椎前移、骨软化症、骨质减少、骨癌、佩吉特病、硬化性病变、骨的浸润性疾病、脊柱裂、延迟愈合、成骨不全、颅骨缺损(例如肿瘤切除或出血后的颅骨缺损)、骨坏死和代谢性骨质丢失。

[0230] 软骨缺损的实例包括但不限于软骨受损或身体区域缺乏软骨。软骨缺损的原因可能是由于外伤、骨坏死、骨软骨炎和其他病症。软骨缺损最常见于膝关节,通常由外伤引起,并与韧带损伤如前十字韧带 (ACL) 撕裂相关。

[0231] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于治疗骨缺损或用于治疗骨缺损的用途,所述骨缺损选自骨折、骨脆弱、骨矿物质密度降低、关节炎、假关节例如先天性假关节、骨质疏松症、脊椎滑脱、脊椎前移、骨软化症、骨质减少、骨癌、佩吉特病、硬化性病变、骨的浸润性疾病、松质和皮质骨坏死、脊柱裂、延迟愈合、成骨不全、颅骨缺损(例如肿瘤切除或出血后的颅骨缺损)、骨坏死和代谢性骨质丢失。

[0232] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于治疗骨缺损或用于治疗骨缺损的用途,所述骨缺损选自骨折、关节炎、先天性假关节、骨质疏松症、脊椎滑脱、脊椎前移、骨癌、佩吉特病、硬化性病变以及代谢性骨质丢失。

[0233] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于治疗脊椎滑脱和/或脊椎前移,或用于治疗脊椎滑脱和/或脊椎前移的用途。脊椎滑脱是椎弓峡部 (pars interarticularis) 的缺损或应力性骨折。脊椎前移或滑脱是一个椎骨相对于相邻椎骨的平移移位或非解剖排列,发生在约30%的脊椎滑脱患者中。

[0234] 在一个实施方案中,脊椎前移是发育不良、峡部裂性、退行性、创伤性、病理性和/或手术后/医源性的脊椎前移。在一个实施方案中,脊椎前移是来自第五腰椎的上骶关节面或下关节面的先天性异常的发育不良的脊椎前移(也称为1型)。在另一个实施方案中,脊椎前移是峡部裂性的脊椎前移(也称为2型),由峡部的缺损引起,但是也可以出现在细长的峡部中。在另一个实施方案中,脊椎前移是退行性脊椎前移(也称为3型),由关节面关节炎和关节重塑引起。在另一个实施方案中,脊椎前移是创伤性脊椎前移(也称为4型),由除了峡部以外的神经弓的急性骨折引起。在另一个实施方案中,脊椎前移是病理性脊椎前移(也称为5型),由感染或恶性肿瘤引起的。在另一个实施方案中,脊椎前移是手术后/医源性脊椎前移(也称为6型),由手术后的并发症引起。

[0235] 在一个实施方案中,根据Meyerdig分类,脊椎前移分为I级、II级、III级、IV级或V级。在一个实施方案中,脊椎前移为I级,其对应于以椎体宽度的百分比测量的0%到25%的滑脱度。在另一个实施方案中,脊椎前移为II级,其对应于25%至50%的滑脱度。在另一个实施方案中,脊椎前移为III级,其对应于50%至75%的滑脱度。在另一个实施方案中,脊椎前移为IV级,其对应于75%至100%的滑脱度。在另一个实施方案中,脊椎前移为V级,其对应于大于100%的滑脱度。

[0236] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于填充有需要的对象中待植入的椎间体间隙和/或椎间融合器 (fusion cage)。

[0237] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于治疗先天性假关节,或用于治疗先天性假关节的用途。在一个特定的实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于治疗先天性胫骨假关节 (CPT),或用于治疗先天性胫骨假关节的用途。CPT是指自然发生或在轻微创伤后发生的胫骨骨折的不愈合:胫骨显示节段性发育不良的区域,导致骨的前外侧弯曲。CPT通常与神经纤维瘤病相关,并且仍然是小儿矫形外科手术面临的最具挑战性和最可怕的病症之一。

[0238] 通常,这种疾病在小于一岁的儿童中明显存在,但是可能直到12岁仍未被发现。

[0239] 在一个实施方案中,根据克劳福德分类,CPT分为I型、II型、III型或IV型。在一个实施方案中,CPT为I型,对应于伴随皮质密度增加且髓质狭窄的前弓(anterior bowing)。在另一个实施方案中,CPT为II型,对应于伴随硬化性髓质狭窄的前弓。在另一个实施方案中,CPT为III型,对应于与囊肿或前骨折征兆相关的前弓。在另一个实施方案中,CPT为IV型,对应于伴随通常与胫骨和腓骨相关的假关节的前弓和明显骨折。

[0240] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于治疗小儿患者中先天性胫骨假关节,或用于治疗小儿患者中先天性胫骨假关节的用途。在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物用于治疗小儿先天性胫骨假关节,或用于治疗小儿先天性胫骨假关节的用途。

[0241] 本发明还涉及本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物在整形外科特别是颌面外科或整形外科中的用途。本发明的生物材料也可以用于风湿病学中。

[0242] 本发明还涉及使用本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物治疗、矫正或减轻手术、外伤或其他先天性或获得性异常后的先天性或获得性关节异常、颌颌面部上颌骨异常、正畸紊乱、骨或关节骨病症(例如需要更换),并用于支持其他肌肉骨植入物,尤其是人工和合成植入物的方法。

[0243] 在另一个方面,本发明涉及本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物,其用于骨重建。在一个实施方案中,本发明的生物材料用于填充人体或动物体的骨腔。

[0244] 在另一个方面,本发明涉及本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物,其用于重建手术或美容手术。

[0245] 在一个实施方案中,本发明涉及用于重建手术的本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物。在另一个实施方案中,本发明涉及用于美容手术的本发明的生物材料。

[0246] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物可以用作同种异体植入物或自体植入物。在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物可以用作异种植入物。在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物可以用于组织移植中。

[0247] 本发明的生物材料对于刺激血管生成也是有利的。实际上,生物材料的ASC释放出刺激新血管生长的血管内皮生长因子(VEGF)。

[0248] 在一个实施方案中,对象是人类对象。在另一个实施方案中,对象是动物对象,例如宠物,家畜或生产动物。在一个实施方案中,对象是哺乳动物对象。

[0249] 在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物可以用于人和/或动物。在一个实施方案中,本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物可以用于人类和兽医学。

[0250] 在一个实施方案中,对象患有骨缺损和/或软骨缺损。

[0251] 在一个特定的实施方案中,对象患有脊椎滑脱和/或脊椎前移。在另一个特定的实施方案中,对象患有先天性胫骨假关节(CPT)。在一个特定的实施方案中,对象患有小儿先天性胫骨假关节(CPT)。

[0252] 在一个实施方案中,对象已进行过骨缺损和/或软骨缺损的治疗。

[0253] 在一个特定的实施方案中,对象已进行过脊椎滑脱和/或脊椎前移的治疗。脊椎滑脱和/或脊椎前移的其他治疗方法的实例包括但不限于保守治疗,例如支撑、活动限制、伸

展运动、俯屈运动和腹部深部锻炼；以及诸如脊柱融合术和椎板切除术的手术。

[0254] 在另一个特定的实施方案中，对象已经进行过CPT治疗。用于CPT的其他治疗方法的实例包括但不限于支撑和手术，例如与骨移植物相关的髓内钉、血管化骨转移、Ilizarov技术、诱导膜和海绵状自体移植物。

[0255] 在一个实施方案中，对象对骨缺损和/或软骨缺损的至少一种其他治疗方法无响应。

[0256] 在一个实施方案中，对象是婴儿或儿童。因此，在一个实施方案中，对象是小儿对象。在一个实施方案中，对象为18岁以下，优选为15岁、12岁或10岁。

[0257] 在另一个实施方案中，对象是成人。因此，在一个实施方案中，对象超过18岁。

[0258] 在一个实施方案中，将本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物在骨骨缺损和/或软骨缺损手术例如脊柱融合手术期间施用于有需要的对象。

[0259] 在一个实施方案中，本发明的生物材料、医疗装置或药物组合物与清创术、一个或两个椎间融合器的放置以及双侧椎弓根螺钉的固定和/或康复术结合使用。

[0260] 本发明还涉及一种试剂盒，其包括根据本发明的生物材料、药物组合物或医疗装置以及合适的固定装置。合适的固定装置的实例包括但不限于外科胶，组织胶或任何外科用的具有生物相容性、无毒的且可生物吸收的黏合剂组合物。

[0261] 附图简要说明

[0262] 图1是显示与未经处理细胞相比，间接接触DBM的L929细胞（鼠成纤维细胞，在补充有5%FBS的RPMI培养基中培养）的以百分比计的细胞活力的直方图。

[0263] 图2是显示与未经处理的细胞相比，以三种不同浓度（ 1.5cm^3 、 2.85cm^3 和 5.91cm^3 ）间接接触HA/ β -TCP的hASC的以百分比计的细胞活力的直方图。

[0264] 图3是显示所形成的具有DBM (A)、HA/ β -TCP (B)、HA (C) 或 β -TCP (D) 的生物材料的宏观视图的一组照片。

[0265] 图4是显示所形成的具有DBM (A) 或HA/ β -TCP (B) 的生物材料的显微图的一组照片。

[0266] 图5是显示所形成的具有DBM (左) 或HA/ β -TCP (右) 的生物材料的苏木精-伊红 (A)、Masson三色 (B)、冯库萨 (C) 和骨钙素 (D) 染色的一组照片 (ND: 未检测)。

[0267] 图6是显示在三种不同比例 (A、B和C) 下形成的具有DBM (左) 或HA/ β -TCP (右) 的生物材料的微型CT分析的一组照片。

[0268] 图7是显示所形成的具有DBM (左) 或HA/ β -TCP (右) 的生物材料的IGF1 (深灰色)、VEGF (浅灰色) 和SDF-1 (中灰色) 含量的直方图。

[0269] 图8是显示在MP培养基和MD培养基中的2D培养中的以及在所形成的具有DBM的生物材料和所形成的具有HA/ β -TCP的生物材料的培养基中的以 $\text{pg}/10^6$ 个细胞计的ASC的OPG分泌的直方图。

[0270] 图9是显示在MD培养基的2D培养中的以及在所形成的具有DBM的生物材料和所形成的具有HA/ β -TCP、HA和 β -TCP的生物材料的培养中的以 ng/g 材料计的ASC的OPG分泌的直方图。

[0271] 图10是显示NVD-1 (A) 和NVD-0 (B) 的苏木精-伊红染色的两张照片。

[0272] 图11是显示与在MP (MP) 和MD (MD) 中的ASC相比，所形成的具有HA/ β -TCP (生物材料) 的本发明生物材料中基因FGFR1 (A)、IGFR1 (B)、RUNX2 (C)、TWIST1 (D)、TGFB1 (E)、SMAD2

(F)、SMAD4 (G)、SMAD5 (H) 的表达的一组图。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

[0273] 图12是显示与MP (MP) 和MD (MD) 中的ASC相比,所形成的具有HA/ β -TCP (生物材料) 的本发明生物材料中基因ANG (A)、EFNA1 (B)、EFNB2 (C)、VEGFA (D)、FGF1 (E)、LEP (F) 的表达的一组图。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

[0274] 图13是显示与MP (MP) 和MD (MD) 中的ASC相比,所形成的具有HA/ β -TCP (生物材料) 的本发明生物材料在低氧 (1%) 或常氧 (21%) 下的VEGF (A) 和SDF-1 α (B) 分泌的一组直方图。

[0275] 图14是显示对来自本发明生物材料的外植体进行血管性假血友病因子免疫染色的照片。HA/ β -TCP颗粒用符号*表示,容器用黑色箭头表示。

[0276] 图15是显示本发明生物材料中的血管面积百分比 (A) 和血管数/ mm^2 (B) 的一组直方图。

[0277] 图16是显示在大鼠中植入后第28天在本发明的生物材料中通过过氧化物酶显色 (在此由黑色箭头表示) 通过HLA/人白细胞抗原免疫染色所显示的褐色人细胞的存在照片。HA/ β -TCP颗粒用符号*表示。

[0278] 图17是显示在大鼠中植入本发明的生物材料 (左上和左下) 和单独植入HA/ β -TCP 颗粒 (右上和右下) 后1个月,股骨的微型CT扫描的一组照片。下部照片是上部照片的放大。虚线矩形代表植入部位。

[0279] 图18是显示植入HA/ β -TCP颗粒后1个月骨缺损的组织学的一组照片:苏木精-伊红染色,原始放大倍数 $\times 5$ (A);Masson三色染色,原始放大倍数 $\times 20$ (B)。白色箭头表示产品未整合和重要的纤维化。黑色箭头表示在天然骨与HA/ β -TCP植入物之间的界面处的缺损中没有软骨内成骨。

[0280] 图19是显示植入本发明生物材料后1个月的骨缺损的组织学的一组照片:苏木精-伊红染色,原始放大倍数 $\times 5$ (A);Masson三色染色,原始放大倍数 $\times 20$ (B);HLA-1免疫染色,原始放大倍数 $\times 10$ (C)。白色箭头表示产品整合和骨融合。黑色箭头表示在天然骨与生物材料之间直接接触的软骨内成骨,从而揭示了骨结合过程。

[0281] 图20是显示在骨分化培养基中培养2.5周 (A) 和培养7.5周 (B) 时,所形成的具有猪明胶 (Cultispher G) 和ASC的生物材料的宏观视图的一组照片。

[0282] 图21是显示了在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶 (Cultispher G) 和ASC的生物材料的苏木精-伊红染色的一组照片。原始放大倍数 $\times 5$ (A),放大倍数 $\times 10$ (B)。

[0283] 图22是显示在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶 (Cultispher G) 和ASC的生物材料的冯库萨染色的一组照片。原始放大倍数 $\times 5$ (A),放大倍数 $\times 10$ (B)。

[0284] 图23是显示在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶 (Cultispher G) 和ASC的生物材料的骨钙素表达的一组照片。原始放大倍数 $\times 5$ (A),放大倍数 $\times 10$ (B)。

[0285] 图24是显示与MP中的ASC (MP) 相比,在骨分化培养基中形成的具有ASC和Cultispher G (生物材料) 的本发明生物材料中基因ANG (A)、ANGPT1 (B)、EPHB4 (C)、EDN1 (D)、THBS1 (E)、PTGS1 (F)、LEP (G)、VEGFA (H)、VEGFB (I)、VEGFC (J)、ID1 (K) 和TIMP1 (L) 的表达的一组图。*: $p < 0.05$ 。

[0286] 图25是显示在骨分化培养基中以不同成熟水平形成的具有ASC和Cultispher G的

本发明生物材料的一组照片:4周(A)、8周(B)、12周(C)和25周(D)。矿化在透明显示的3D基质中以黄色显示。

[0287] 图26是在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶(Cultispher G或Cultispher S)和ASC的生物材料在裸大鼠中植入后第29天的“植入部位”的放射照相照片。

[0288] 图27是在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶(Cultispher G或Cultispher S)和ASC的生物材料在Wistar大鼠中植入后第29天的“植入部位”的放射照相照片。

[0289] 图28是显示在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶(Cultispher G或Cultispher S)和ASC的生物材料的冯库萨染色的照片。

[0290] 图29是显示在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶(Cultispher S)和ASC的生物材料的苏木精-伊红染色的照片。

[0291] 图30是显示在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶(Cultispher S)和ASC的生物材料在裸大鼠中植入后第29天的冯库萨染色的照片。

[0292] 图31是显示在骨分化培养基中培养7.5周时,所形成的具有猪明胶(Cultispher G或Cultispher S)和ASC的生物材料(A)和只具有颗粒的生物材料(B)在裸大鼠中植入后第29天的“植入部位”的放射照相的一组照片。

[0293] 图32是显示没有植入(A)、单独植入Cultispher S颗粒后(B)以及植入在骨分化培养基中培养8周后形成的具有猪明胶(Cultispher S)和ASC的生物材料后(C)第0天(D0)、第15天(D15)、第23天(D23)和第34天(D34)时大鼠腿部的伤口愈合情况(B)的一组照片。

[0294] 图33是显示相对于固定为100%的假手术组评估的,未经处理的(假)或单独用Cultispher S颗粒处理(Cultispher)的或用在骨分化培养基中培养8周后形成的具有猪明胶(Cultispher S)和ASC的生物材料处理(生物材料)的非缺血性腿的伤口大小的曲线下面积(AUC)的直方图。

[0295] 图34是显示单独用Cultispher S颗粒处理后的(正方形)、或用在骨分化培养基中培养8周时形成的具有猪明胶(Cultispher S)和ASC的生物材料处理后的(圆形)、或未经处理的(假,三角形)第0天至第34天的伤口面积百分比的图。

[0296] 图35是显示在单独用Cultispher S颗粒处理后的(点状直方图)、或用在骨分化培养基中培养8周形成的具有猪明胶(Cultispher S)和ASC的生物材料处理后的(黑色直方图)或未经处理的(假,条纹直方图)在第1天、5天、15天和34天的非缺血性腿的核心的表皮得分(A)、非缺血性腿的外围的表皮得分(B)、非缺血性腿的核心的真皮得分(C)、和非缺血性腿的外围的真皮得分(D)的一组直方图。

[0297] 实施例

[0298] 通过以下实施例进一步说明本发明。

[0299] 实施例1:本发明生物材料的制备

[0300] 分离hASC

[0301] 在知情同意和血清学筛查后,根据Coleman技术,通过吸脂术在腹部区域收集人皮下脂肪组织。

[0302] 从刚获得的脂肪组织中立即分离出人脂肪干细胞(hASC)。脂肪吸取物可以在+4℃下保存24小时,或在-80℃下保存长于24小时。

[0303] 首先,为了质量控制目的,分离出一部分脂肪吸取物,并测量脂肪吸取物的剩余体积。然后,通过在HBSS中制备的胶原酶溶液(NB 1, Serva Electrophoresis GmbH, 海德堡, 德国)消化脂肪吸取物(终浓度为约8U/mL)。用于消化的酶溶液的体积是脂肪组织体积的两倍。消化在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下进行50分钟至70分钟。在15分钟至25分钟后进行第一次间歇摇动,在35分钟至45分钟后进行第二次摇动。通过添加MP培养基(增殖培养基或生长培养基)来停止消化。MP培养基包含DMEM培养基(4.5g/L葡萄糖和4mM的Ala-Gln; Sartorius Stedim Biotech, 哥廷根, 德国),并补充有5%人血小板裂解物(hPL)(体积/体积)。DMEM是一种标准的培养基,其包含盐、氨基酸、维生素、丙酮酸和葡萄糖,经碳酸盐缓冲液缓冲,并且具有生理pH(7.2至7.4)。使用的DMEM包含Ala-Gln。人血小板裂解物(hPL)是用于刺激间充质干细胞(例如hASC)体外生长的生长因子丰富来源。

[0304] 将消化的脂肪组织离心(500g, 10min, 室温),并除去上清液。将沉淀的基质血管部分(SVF)重悬于MP培养基中,并通过200 μm 至500 μm 的滤网。将过滤的细胞悬液第二次离心(500g, 10min, 20°C)。将含有hASC的沉淀重悬于MP培养基中。可以保留一小部分细胞悬液用于细胞计数,并将全部剩余的细胞悬液用于接种一个75 cm^2 的T-培养瓶(称为P0代)。进行细胞计数(仅供参考),以估计接种细胞的数量。

[0305] 分离步骤的次日(第1天),将生长培养基从75 cm^2 的T-培养瓶中取出。用磷酸盐缓冲液冲洗细胞3次,然后将新鲜制备的MP培养基加入培养瓶中。

[0306] 人脂肪干细胞的生长和扩增

[0307] 在增殖阶段,将hASC传代4次(P1、P2、P3和P4),以便为该过程的后续步骤获得足够量的细胞。

[0308] 在P0和第四代(P4)之间,将细胞培养在T-培养瓶上,并用新鲜的MP培养基饲养。当汇合度 $\geq 70\%$ 且 $\leq 100\%$ (目标汇合度:80%至90%)时,将细胞传代。将来自1批的所有细胞培养受体同时进行传代。在每次传代中,用重组的不含动物细胞的解离酶TrypLE(选择1X;对于75 cm^2 培养瓶使用9mL,对于150 cm^2 培养瓶使用12mL),将细胞从培养容器中分离出来。在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下进行TrypLe消化5分钟至15分钟,并通过添加MP培养基终止。

[0309] 然后将细胞离心(500g, 5min, 室温),然后重悬于MP培养基中。收集收获的细胞以保证得到均质细胞悬液。重悬后,计数细胞。

[0310] 然后在第P1、P2和P3代中,将剩余的细胞悬液在MP培养基中稀释至合适的细胞密度,并接种在较大的组织培养表面上。在这些步骤中,75 cm^2 的培养瓶接种15mL体积的细胞悬液,而150 cm^2 的培养瓶接种30mL体积的细胞悬液。在每次传代中,接种 0.5×10^4 个细胞/ cm^2 至 $.8 \times 10^4$ 个细胞/ cm^2 的细胞。在不同的代之间,每3天至4天更换一次培养基。从一个供体到另一个供体的细胞行为和生长速率可能略有不同。因此,两次传代之间的持续时间以及代之之间的培养基更换次数可能会因各个供体而异。

[0311] 成骨分化

[0312] 在P4代(即第四代),将细胞第二次离心,并重悬于MD培养基(分化培养基)中。重悬后,第二次计数细胞,然后在MD培养基中稀释至合适的细胞密度,然后将70mL体积的细胞悬液接种在150 cm^2 培养瓶中,并注入成骨MD培养基。根据该方法,第四次传代后将细胞直接培养于成骨MD培养基中。因此,当细胞尚未达到汇合时,加入成骨MD培养基。

[0313] 成骨MD培养基由补充有地塞米松(1 μM)、抗坏血酸(0.25mM)和磷酸钠(2.93mM)的

增殖培养基 (DMEM, Ala-Gln, 5% 的 hPL) 构成。

[0314] 一个供体与另一个供体的细胞行为和生长速率可能略有不同。因此,成骨分化步骤的持续时间和代之间的培养基更换次数可能因各个供体而异。

[0315] 多维诱导细胞

[0316] 当细胞达到汇合时,如果出现形态学改变,并且如果在培养瓶中观察到至少一个类骨质结节(即在骨组织成熟之前形成的未矿化的骨基质有机部分),则开始进行3D诱导。

[0317] 暴露于成骨MD培养基后,将含有贴壁骨原细胞汇合单层的培养皿缓慢均匀地撒上各种生物相容性材料:

[0318] -DBM:对于150cm²培养瓶(RTI Surgical,美国)为1000mg至1200mg±10%,

[0319] -HA/β-TCP颗粒:比例为65/35,对于150cm²培养瓶(Teknimed,法国)为1.5cm³,

[0320] -HA颗粒:150cm²培养瓶(法国Biocetis)为1.5cm³,或

[0321] -β-TCP颗粒:150cm²培养瓶(法国Biocetis)为1.5cm³。

[0322] 将细胞保持在MD培养基中。在多维诱导过程中,每3天至4天进行常规培养基更换。通过小心地防止除去生物相容性材料颗粒和发展中的结构来进行那些培养基更换。

[0323] 实施例2:生物材料的表征

[0324] 材料和方法

[0325] 细胞毒性

[0326] 评估对L929细胞(鼠成纤维细胞,在补充有5%FBS的RPMI培养基中培养)的细胞毒性。然后进行Transwell插入程序以分析细胞毒性。

[0327] 该方法的目的是评估间接的细胞-材料接触(可浸出化学物质在培养基中的扩散)的毒性。用这种方法,将hASC和L929细胞以8000个细胞/cm²(每孔15200个细胞)接种,并在两个24孔板中于37℃下孵育72小时。然后,当细胞汇合时,去除培养基,并将生物相容性材料加入包含底部微孔膜的transwell插入物中:

[0328] -6.6mg/cm²的DBM,

[0329] -三种不同量的HA/β-TCP:对于150cm²的容器为1.5cm³、2.85cm³和5.91cm³,

[0330] -对于150cm²的容器为1.5cm³的HA颗粒,或

[0331] -对于150cm²的容器为1.5cm³的β-TCP颗粒,

[0332] 然后放入每个孔中,并在37℃/5%CO₂下孵育24小时。

[0333] 孵育后,根据供应商的说明,使用“CCK-8试剂盒”评估细胞活力,以定量增殖和细胞毒性试验(Sigma)中的活细胞数。简而言之,除去培养基并将100μL体积的CCK-8溶液添加到板的每个孔中。将混合物在37℃/5%CO₂下孵育2小时至4小时。稳定的四唑氮盐通过复杂的细胞机制裂解为可溶性甲臞染料。这种生物还原很大程度上取决于活细胞中糖酵解产生的NAD(P)H。因此,形成的甲臞染料的量与培养物中代谢活性细胞的数量直接相关。通过使用分光光度计读板器在450nm处测量光密度(OD)来评估甲臞染料的量。

[0334] 相对细胞活力(%)表示为相对于未处理的对照细胞的百分比。其如下确定:

$$[0335] \quad \text{相对细胞活力} = \frac{(\text{OD} - \text{空白})_{\text{经处理}}}{(\text{OD} - \text{空白})_{\text{未经处理}}} \times 100$$

[0336] (OD-空白)_{未经处理}:阴性对照(未经处理的细胞)的(OD-空白)的平均值。

[0337] 未撒上生物相容性材料的细胞用作阴性对照(未经处理的细胞)。将用1%Triton溶液处理的细胞用作阳性对照。

[0338] 组织学分析

[0339] 在添加生物相容性颗粒后第4周和第8周对MD培养基中的结构进行活检。

[0340] 细胞外基质的结构/细胞密度/存在

[0341] 用苏木精-伊红和Masson三色染色评估组织的结构、细胞外基质的细胞密度和存在。

[0342] 骨分化和矿化

[0343] 分别用骨钙素(骨钙素抗体稀释度为1/200,参考ab13418,Abcam)和微型CT评估组织的骨分化和矿化。

[0344] 使用Skyscan 1172G (Bruker) (Erwan Plougonven, ULg, Liège) 进行采集。在Bruker微型CT软件NRecon v.1.6.10.1上进行了重建。调整后,重建约1700x1700x700体素(3D像素)的3D图像。对于上述分辨率,体素的体积为985 μm^3 。衰减区域的平均体积和厚度测量值以总体积的%表示。衰减区域被同化为矿化区域。

[0345] 生长因子含量

[0346] 为了评估形成的组织的生物活性,在添加生物相容性颗粒后第4周和第8周进行活检,以进行蛋白质提取和定量。通过比色法(BCA蛋白质测定试剂盒,ThermoFisher Scientific)和ELISA(人Quantikine ELISA试剂盒,RD Systems)对BMP2、BMP7、VEGF、SDF1 α 、IGF1进行定量。

[0347] 破骨活性

[0348] 在无hPL条件下培养72小时后,收获(在MD培养基或MP培养基中)培养的ASC上清液和(通过在约8周期间添加DBM或HA/BTCP诱导的)多维培养的ASC上清液,并直接储存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 用于进一步定量。还单独提取生物相容性颗粒的蛋白质以定量OPG和RANKL水平。

[0349] 根据供应商的说明,使用ELISA试剂盒(人TNFSF11/RANKL/TRANCE ELISA试剂盒;人护骨因子ELISA试剂盒;LS Bio)对OPG和RANKL进行定量。

[0350] 结果

[0351] 细胞毒性

[0352] 未检测到DBM的细胞毒性。当使用Transwell插入程序将细胞与DBM培养24小时时,甚至注意到了细胞活力百分比的增加(高达170.3%,图1)。

[0353] 在低浓度(10mg/cm²)下,hASC与HA/ β -TCP颗粒的间接接触可改善细胞活力(与单独的细胞相比,细胞活力为111.1%)。相反地,浓度为19mg/cm²和39.4mg/cm²时,细胞活力分别降低了10%和52.3%(图2)。

[0354] 组织学分析

[0355] 与生物相容性颗粒一起孵育4周或8周后,在结构之间未发现显著差异。

[0356] 细胞外基质的结构/细胞密度/存在

[0357] 加入生物相容性材料几天后,骨原细胞和分散的生物相容性材料颗粒逐渐包埋在矿化的细胞外基质中。

[0358] 几天后,骨原细胞和生物相容性材料颗粒开始形成部分矿化的棕黄色可塑团块的大3维片(或少量较小的片),其从每个培养容器脱落。约15天后,形成多维生物材料,并且

可以从培养瓶中分离出来。

[0359] hASC与任何不同的颗粒(DBM、HA/ β -TCP、HA和 β -TCP)在成骨分化培养基中的共培养显示了3D结构的形成。这种结构可适于用镊子夹持,并且抵抗机械强度(图3)。

[0360] 两种组织都发现相似的细胞密度:对于所形成的具有DBM的生物材料,为 253 ± 66 个细胞/ mm^2 ($n=3$),对于所形成的具有HA/ β -TCP的生物材料为 262 ± 205 个细胞/ mm^2 ($n=7$)。所形成的具有DBM或HA/ β -TCP的生物材料的显微图如图4所示(分别为A和B)。

[0361] 通过苏木精-伊红和Masson三色染色的组织学分析显示,细胞和颗粒之间存在相互连接的组织,并且对于两种组织,颗粒都整合在细胞化的相互连接的组织中(分别为图5A和图5B)。

[0362] 骨分化/矿化

[0363] 两种组织的细胞外基质中骨钙素染色均为阳性(图5D),这表明ASC正确分化为骨原细胞。

[0364] 微型CT分析和冯库萨染色显示,所形成的具有HA/ β -TCP的生物材料的矿化度为 $38.2\% \pm 12.3$ ($n=5$),而形成的具有DBM的生物材料的矿化度为 1.9% (分别为图6和图5C)。

[0365] 生长因子含量

[0366] 与生物相容性颗粒一起孵育4周或8周后,在结构之间未发现显著差异。

[0367] 结果显示在下表1和图7中。

[0368]

	VEGF	IGF1	SDF-1a
DBM	188 ± 99	19 ± 14	247 ± 209
HA/ β -TCP	34 ± 57	94 ± 57	31 ± 24
HA	96.88	99.58	40.63
β -TCP	75.28	89.78	51.70

[0369] 表1:本发明生物材料的生长因子含量(以ng/g生物材料计)

[0370] 所形成的具有本发明的生物相容性颗粒的所有生物材料均包含VEGF、IGF1和SDF-1 α 。然而,SDF-1 α 的含量低于VEGF和IGF1的含量。在所有组织中均未检测到BMP2或BMP7。

[0371] 破骨活性

[0372] 定量MP/MD培养基中的hASC上清液中的、所形成的具有DBM的生物材料、所形成的具有HA/ β -TCP的生物材料的、所形成的具有HA的生物材料的和所形成的具有 β -TCP的生物材料中的OPG/RANKL分泌。

[0373] 未检测到RANKL。在MP或MD培养基的细胞上清液中未发现OPG。

[0374] 相反,发现所有3D结构都分泌OPG。所形成的具有DBM的生物材料分泌约 $1160 \text{pg}/10^6$ 个细胞,形成的具有HA/ β -TCP的生物材料分泌约 $3010 \text{pg}/10^6$ 个细胞(图8)。就每克组织的浓度而言,所形成的具有DBM的生物材料分泌约 $15.5 \text{ng}/\text{g}$,所形成的具有HA/ β -TCP的生物材料分泌约 $30 \text{ng}/\text{g}$,所形成的具有HA的生物材料分泌约 $76 \text{ng}/\text{g}$,而所形成的具有 β -TCP的生物材料分泌约为 $84 \text{ng}/\text{g}$ (图9)。

[0375] 还评估了由单独DBM和HA/ β -TCP引起的OPG分泌,发现其水平几乎无法检测到(图9)。

[0376] 实施例3:比较根据本发明形成的生物材料和根据不同方案形成的生物材料

[0377] 材料和方法

[0378] 组织制备

[0379] 将来自2个不同供体的脂肪干细胞用于制备组织。根据实施例1的方案使用DBM作为生物相容性材料制备NVD-1。NVD-0是根据NVD-1制备方案制造的,但有两个重要改变:(i)在NVD-0的培养基(MP和MD)中使用10%FBS(代替在NVD-1的培养基中使用的5%HPL)和(ii)在NVD-0制备的第四代,将细胞在增殖培养基(MP)中培养至汇合,然后在MD中培养直至成骨分化,并添加DBM颗粒(代替从第四代开始直接在MD中培养细胞,直到骨原细胞分化,并添加DBM颗粒以产生NVD-1)。

[0380] RTI Surgicals的DBM颗粒用于产生NVD-1和NVD-0。将组织保持在MD培养中(对于NVD-1使用5%HPL,对于NVD-0使用10%FBS),每3天至4天进行培养基更换,直到添加DBM颗粒后8周。

[0381] 添加颗粒后八周,通过组织学分析、生物活性评估和矿化定量对组织进行表征。另外,对一个供体进行了蛋白质组学分析,以表征细胞分泌的基质的组成。

[0382] 组织学分析

[0383] 在添加颗粒后的第8周对组织进行活检。将活检样品固定在甲醛中,并准备用于苏木精-伊红染色(HE染色,根据技术人员已知的方法)。对组织进行分析和组织学表征:在HE载玻片上进行细胞计数后,确定基质的细胞数和效价比。

[0384] 体外生物活性

[0385] 为了评估形成的组织的生物活性,在添加颗粒后第8周对每个组织取三份进行活检,并称重。将这27个活检样品放置在没有HPL或FBS的MD中72小时。然后收获上清液,用于通过ELISA对分泌的生长因子进行定量(BMP2、BMP7、IGF1、SDF1a、VEGF、OPG、RANKL)。

[0386] 活检样品用于蛋白质提取和定量。根据供应商的说明,分别通过比色法(Pierce BCA蛋白质测定试剂盒,ThermoFisher Scientific)和ELISA(人Quantikine ELISA试剂盒, RD Systems)来定量总蛋白质和生长因子含量(VEGF、SDF1a、IGF1、BMP2、BMP7、OPG、RANKL)。

[0387] 结果

[0388] 组织学分析

[0389] 组织学分析的结果(n=1)显示,与NVD-0相比,NVD-1中的细胞增多。发现两组中组织中基质的比例相似,但与NVD-0相比,观察到更重要的NVD-1的基质密度,如表2和图10所示。

	细胞密度 (个细胞/mm ²)	基质面积 (%)
[0390] NVD-1	267 ± 103	51 ± 10
NVD-0	132 ± 65	56 ± 13

[0391] 表2:NVD-1和NVD-0中的细胞密度

[0392] 体外生物活性

[0393] 在NVD-1和NVD-0之间存在显著差异,与NVD-0相比,NVD-1中的VEGF和SDF1a含量较高,IGF1和OPG含量较低(表3)。BMP2和RANKL低于定量下限。

	VEGF	IGF1	SDF-1 α	OPG	RANKL	BMP2	BMP7
[0394]	NVD-1	121.3	19.3	194.8	292.3	<LOQ	<LOQ
		± 27.6	± 4.0	± 122.3	± 104.3		± 4.0
	NVD-0	48.7	118.8	16.85	876.0	<LOQ	<LOQ
		± 27.2	± 41.1	± 23.83	± 628.9		± 12.2

[0395] <LOQ: 低于定量极限

[0396] 表3: NVD-1和NVD-0中的生长因子含量(以ng/g生物材料计)

[0397] 实施例4: 成骨和血管生成的潜力

[0398] 材料和方法

[0399] 使用Qiazol裂解试剂(Qiagen, Hilden, 德国)和Precellys匀浆器(Bertin仪器, 法国Montigny-le-Bretonneux), 从增殖培养基(MP)中的ASC(n=4, 来自4个不同的人类脂肪组织供体)、分化培养基(MD, 在没有颗粒的经典成骨培养基中培养细胞)中的ASC(n=4, 来自4个不同的人类脂肪组织供体)和所形成的具有1.5cm³HA/ β -TCP的生物材料(n=4, 来自4个不同的人类脂肪组织供体)中提取总RNA。根据制造商的说明, 使用Rneasy mini试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)纯化RNA, 并另外进行柱上DNA酶消化。使用分光光度计(Spectramax 190, Molecular Devices, 加利福尼亚, 美国)确定RNA的质量和含量。通过RT² RNA第一链试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)由0.5 μ g总RNA合成cDNA, 以通过商用PCR阵列(人RT² Profiler分析-血管生成; 人RT² Profiler分析-成骨, Qiagen)进行成骨和血管生成基因表达谱分析。使用ABI Quantstudio 5系统(Applied Biosystems)和SYBR Green ROX Mastermix(Qiagen, Hilden, 德国)检测扩增产物。根据 $\Delta \Delta$ CT方法进行定量。将每个样品的最终结果相对于三个管家基因(ACTB、B2M和GAPDH)的平均表达水平进行归一化。

[0400] 使用实时RT-PCR(人RT² Profiler Array, Qiagen)在mRNA水平分析成骨和血管生成基因表达。

[0401] 结果

[0402] 在测试的84个成骨基因中, 与MP中的ASC或MD中的ASC相比, 在本发明的生物材料中发现11种参与骨发育的基因(ACVR1、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、CSF1、EGFR、FGFR1、IGFR1、RUNX2、TGFBR1、TWIST1)、3种转录因子(SMAD2、SMAD4、SMAD5)、2种生长因子(VEGFA、VEGFB)和3种细胞黏附分子(ITGA1、ITGB1、ICAM1)被调节(图11)。

[0403] 矮小相关转录因子2(Runx2)是一种重要的成骨特异性转录因子, 其促进成骨相关基因的表达、调节细胞周期进程、改善骨微环境并影响软骨细胞和破骨细胞的功能(Bruderer M等人, Eur Cell Mater, 2014; Xu J等人, Am J Trans Res, 2015), 与MP或MD中的ASC相比, 其在本发明生物材料中的表达明显更高(图11C)。

[0404] TWIST相关蛋白1(TWIST1)在骨间充质中表达, 并在骨发育过程中在控制间质细胞谱系分配中发挥关键作用(Johnson D等人Mech Dev. 2000; Rice DP等人Mech Dev. 2000), 与在MD中的ASC相比, 其在本发明的生物材料中的表达也明显更高(p=0.09)(图11D)。

[0405] 成骨的重要途径是转化生长因子- β /骨形态发生蛋白(TGF- β /BMP)途径。TGF- β (通过TGFBR1激活)激活细胞内信号传导蛋白, 例如SMAD。这些因子调节TGF- β 调节的基因的转录, 从而激活成骨基因的转录, 促进成骨细胞的分化(Song B, Cytokine Growth Factor

Rev.Author,2010)。有趣的是,与MD中的ASC相比,在本发明的生物材料中发现了TGFBR1和SMAD2/5mRNA的更高表达(图11E至图11H)。

[0406] 在所测试的MP、MD和本发明的生物材料中的ASC的84个血管生成基因中,6个与生长因子相关的基因(ANG、EFNA1、EFNB2、VEGFA、FGF1、TGFB1)、2个ECM分子(LEP、TIMP1)和2个细胞相关黏附分子(ENG、THB S1)被调节(图12)。

[0407] 与MP中的ASC相比,在本发明的生物材料中发现血管生成素(ANG)mRNA的显著更高的表达(图12A)。血管生成素信号传导促进血管生成,通过该过程从先前存在的血管形成新的动脉和静脉(Fagian E等人,Cancer Lett,2013)。

[0408] 此外,发现与MP和MD中的ASC相比,在本发明的生物材料中的ASC的在胚胎发育和成体组织中调节血管生成的肝配蛋白A1(EFNA)mRNA(Pasquale EB.等人Nat Rev Mol Cell Biol 2005)高度表达(图12B和图12C)。

[0409] 与MP或MD中的ASC相比,本发明的生物材料中的ASC中的血管内皮生长因子A mRNA(VEGFA)的表达也显著提高(图12D)。VEGF是调节血管发育和血管生成的最重要的生长因子之一。由于骨是高度血管化的器官(血管生成是骨发生中的重要调节剂),因此VEGF也会对骨发育和产后骨修复产生积极影响(Hu K等人,Bone 2016)。

[0410] 与MP中的ASC相比,在本发明的生物材料中的成纤维细胞生长因子1(FGF1)mRNA(一种有效的促血管生成因子,Murakami M等人,Curr Opin Hematol 2009)和瘦素(LEP)mRNA的表达(一种重要的血管生成增强剂和VEGF表达诱导剂;Bouloumie A等人,Circ.Res.1998;Sierra-Honigmann MR等人,Science(New York,N.Y.)1998)也发生过表达(分别为图12E和图12F)。

[0411] 总之,通过所存在的细胞在分子水平上表达骨分化能力以及促进移植后细胞移植物的血管生成能力(在3D结构中),本发明的生物材料可以定义为成骨的。

[0412] 实施例5:移植后在纤维化环境中促进血管生成和成骨

[0413] 4.1. 体外

[0414] 组织损伤的最常见因素之一是缺氧。间质性损伤通常与凝血级联反应的激活有关,从而导致出现缺氧区域。在这种情况下,我们评估了本发明生物材料分泌VEGF的能力,VEGF是移植后血管化的关键生长因子(Madrigal M等人,J Transl Med.2014Oct 11;12:260)。已知各种组织中氧张力的降低会导致缺氧诱导因子(HIF-1 α)的激活,从而诱导血管生成基因例如血管内皮生长因子(VEGF)(Ahluwalia A等人,Curr Med Chem.2012;19(1):90-97;Hawkins KE等人,Regen Med.2013;8(6):771-782)以及MSC化学引诱物基质细胞衍生因子1(SDF-1 α)(Youn SW等人,Blood.2011;117:4376-4386.Ceradini DJ等人,Nat Med.2004;10(8):858-864)的转录。

[0415] 材料和方法

[0416] 为了评估低氧浓度对生物材料促血管生成特性的影响,将由来自3个供体的ASC和1.5cm³ HA/ β -TCP形成的生物材料用PBS洗涤两次,并一式两份在6孔板中的10mL不含hPL的成骨分化培养基(MD)中孵育(以避免培养基中的外源性生长因子)。将板置于缺氧(1%O₂)或常氧(21%O₂)、5%CO₂、37°C下72小时。然后收获上清液以用于通过ELISA定量VEGF和SDF-1 α 。

[0417] 此外,用PBS将在6孔板中的一式两份的来自3个供体的第4代汇合的ASC洗涤两次,

并置于5mL或10mL的无hPL的增殖培养基(MP)或成骨分化培养基(MD)中,在缺氧(1%O₂)或常氧(21%O₂)、5%CO₂、37℃下培养72小时。然后收获上清液以用于通过ELISA定量VEGF和SDF-1 α 。

[0418] 结果

[0419] 在低氧张力下,2D细胞(MP和MD)中的VEGF分泌增加(在1%和21%的O₂下,分别在MP中为242 \pm 51pg/10⁵个细胞和29 \pm 27pg/10⁵个细胞,MD中为565 \pm 507pg/10⁵个细胞和182 \pm 216pg/10⁵个细胞(p<0.05)),对于本发明的生物材料而言,发现低氧对VEGF分泌没有影响(在1%和21%的O₂下,分别为760 \pm 594pg/10⁵个细胞和806 \pm 530pg/10⁵个细胞)(图13A)。因此,低氧张力不是使用本发明生物材料的限制因素。

[0420] 另外,发现与1%和21%的O₂条件下的MP和MD中的ASC相比,在本发明的生物材料中的VEGF分泌更高(图13A)。

[0421] 虽然在低氧激发后观察到刺激MD中ASC的SDF-1 α 分泌(p=0.009),但是与21%O₂下MP和MD中的ASC相比,本发明的生物材料释放出显著更高量的SDF-1 α (分别为p=0.013和0.025)(图13B)。

[0422] 另外,证明了在1%O₂下,与ASC MP和本发明的生物材料(分别为p=0.009和0.013)相比,ASC MD的分泌较低(图13B)。

[0423] 将本发明的生物材料暴露于低氧张力(如在纤维化组织中存在的1%的氧)显示出ASC能够分泌血管生成的关键效应因子。与二维培养的增殖/成骨培养基中的ASC相比,具有细胞外基质的3维的ASC,即本发明生物材料中的ASC的这些分泌更有优势(在低氧和常氧时)。

[0424] 4.2. 体内

[0425] 为了确定本发明生物材料在低氧条件下的生物活性,进行了肌肉坏死的临床前模型。由Schubert等人(Biomaterials,2011;32(34):8880-91)阐述的异位模型是研究生物材料生物活性的金标准模型并且在于将测试物品(生物材料)植入腰部区域中、由烧烙过的椎旁肌构成的袋中。

[0426] 材料和方法

[0427] 在裸大鼠上进行了两次实验,以植入本发明的生物材料(人类来源),避免任何移植排斥。

[0428] 设计第一个实验以评估本发明的生物材料在植入后1个月时对组织重塑的作用。设计第二个实验以在分子水平上评估组织重塑(植入后第29天)。

[0429] 在这两个实验中,将生物材料双侧植入10只裸大鼠。植入的体积为约0.3cm³(相当于500mg或4.7*10⁶个细胞)的生物材料。

[0430] 在第一个实验中,在植入后第28天,对血管性假血友病因子进行免疫染色后,通过组织形态计量术对血管生成进行了定量,并通过针对HLA的免疫组织化学评估了人细胞的存在。

[0431] 在第二个实验中,在植入后第29天,通过针对HLA的免疫组织化学方法评估了人细胞的存在,并在进行了Masson三色染色后通过组织形态分析法评估了植入物的血管再生。

[0432] 此外,使用Qiazol裂解试剂(Qiagen,Hilden,德国)和Precellys匀浆器(Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux,法国)从外植体中提取总RNA。根据制造商的说明,

使用Rneasy mini试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)纯化RNA,并另外进行柱上DNA酶消化。使用分光光度计(Spectramax 190,Molecular Devices,加利福尼亚,美国)确定RNA的质量和含量。通过RT² RNA第一链试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)从0.5μg总RNA合成cDNA,以通过商用PCR阵列(人RT²Profiler分析-血管生成;人RT²Profiler分析-成骨,Qiagen)进行成骨和血管生成基因表达谱分析。使用ABI Quantstudio 5系统(Applied Biosystems)和SYBR Green ROX Mastermix(Qiagen,Hilden,德国)检测扩增产物。根据 $\Delta\Delta CT$ 方法进行定量。将每个样品的最终结果相对于三个管家基因(ACTB、B2M和GAPDH)的平均表达水平进行归一化。

[0433] 在植入后第29天,比较从本发明的生物材料获得的外植体之间的成骨基因表达。然后测试外植体的八十四种成骨基因。

[0434] 结果

[0435] 第一个实验

[0436] 植入后1个月,在生物材料内部证实了血管向内生长(图14)。

[0437] 血管表面积和血管数/mm²的结果如图15所示。

[0438] 本发明生物材料中人细胞的存在证明了本发明生物材料中人ASC在坏死宿主组织(随后对肌肉区域/植入部位进行烧烙)中的存活能力(图16)。

[0439] 第二个实验

[0440] 植入后第29天,证实了在本发明的生物材料中人细胞的存在(数据未显示)。

[0441] 如先前在第一个生物活性实验中所述,在植入后第29天确认了植入物的血管再生(数据未显示)。

[0442] 体内实验揭示了本发明生物材料诱导产品内血管生成的能力。

[0443] 实施例6:骨缺损的治疗

[0444] 为了研究本发明的生物材料在骨形成中的功效,设计了大鼠模型中的临界尺寸的骨缺损。在文献(Saxer等人,Stem Cells 2016-Manassero et al.,Journal of Visualized Experiments 2016)中充分地描述该模型。

[0445] 材料和方法

[0446] 选择雄性裸大鼠作为本发明的人生物材料的受体,以避免任何T细胞免疫应答。简而言之,使用RatFixSystem®(RISystem-瑞士)在14只裸大鼠中进行了大鼠股骨的临界尺寸骨缺损研究(分为2组,每组7个受体,分别接受单独的HA/β-TCP颗粒和生物材料)。产生5mm的缺损,并通过用螺钉固定的板将股骨的两个部分连接在一起。

[0447] 骨缺损诱导后三周,进行放射线检查以评估骨缺损的不可逆性并避免任何自发性骨再生。

[0448] 将HA/β-TCP颗粒(总体积为0.344cm³,对应于500mg)或形成的具有ASC和1.5cm³HA/β-TCP颗粒的本发明生物材料(总体积为0.313cm³,对应于500mg,具有4.7*10⁶个细胞)植入裸大鼠受体(具有持久的骨缺损,且没有任何固定材料断裂)。

[0449] 植入后1个月,对每只动物进行微型CT扫描和组织学检查,以评估植入物整合和骨融合的水平。

[0450] 结果

[0451] 植入后1个月,本发明的生物材料完全整合在股骨的两个部分之间,表现出双皮质

骨融合(2个股骨皮质结构的连续性)(图15,左上和左下),而单独的HA/β-TCP颗粒位于骨缺损中的情况没有发生任何整合(图17,右上和右下)。实际上,在没有双侧皮质融合(如图17右下的符号*所示)和萎缩的四肢股骨缺损的情况下,没有发现骨皮质与HA/β-TCP颗粒之间的桥梁。

[0452] 这些结果通过组织学证实(图18和图19)。单独植入HA/β-TCP颗粒后1个月,该产品未整合并且观察到重要的纤维化(图18A,白色箭头)。在天然骨与HA/β-TCP植入物之间的界面处的缺损中未发现软骨内成骨(图18B,黑色箭头)。在植入本发明的生物材料后1个月,观察到产品整合和骨融合(图19A,白色箭头)。在天然骨与生物材料之间的直接接触中发现软骨内成骨,这揭示了骨结合过程(图19B,黑色箭头)。HLA-1染色揭示了人细胞的存在(图19C)。

[0453] 这些体内研究证明(i)本发明的生物材料在缺氧环境中能够改善成骨性,和(ii)在临界尺寸骨缺损的情况下能够进行骨融合。与单独的HA/β-TCP颗粒相比,本发明的生物材料在成骨性和骨重塑方面显示出其优越性。

[0454] 实施例7:脊柱融合大鼠模型中生物材料的研究(研究CP-2017025-生物分布分支)

[0455] 研究目标

[0456] 进行GLP依从性研究(研究CP-2017025)是为了实现双重目标,即评估(i)在与研究产品的预期临床用途相关的条件下相关动物模型中生物材料的总体毒性(因此称为“CP-2017025-毒理学分支”,以及(ii)研究细胞的生物分布和异位组织的潜在连续发展(所谓的“CP-2017025-生物分布分支”)。

[0457] 选择免疫缺陷(裸)大鼠模型以避免免疫细胞动物所预期的人细胞排斥。选择脊柱融合手术模型作为相关模型,因为它在文献(Wang等人,J.Bone and Joint Surg.2003,85:905-911)中有完善的描述,并且它可以在相似组织环境中容纳比股骨骨缺损更大的植入体积(Belill等人,Comp.Med.2014,61(3):186-192)。另外,认为在脊柱融合手术过程中产生的植入环境与诸如骨股骨缺损的骨未愈合模型中产生的环境相比非常相似。

[0458] 研究设计

[0459] 出于“生物分布研究分支”的目的,将二十只(20)健康的9周龄纯合裸无胸腺大鼠(雄性10只和雌性10只,Hsd:RH-Foxn1 rnu/rnu)随机分为第1组和第2组(每组雄性5只和雌性5只)(表4)。

[0460]	组	大鼠数	治疗方法	剂量	施用途径	治疗方案	处死
[0461]	1	5 雄和 5 雌	研究的生物材料	1.1x10 ⁷	椎旁: 两个部位	Q1DX1	D29
	2	5 雄和 5 雌	假手术	-			D29

[0462] 表4:研究(CP-2017025-生物分布分支)设计

[0463] 按照以下所述的外科手术程序,用生物材料(根据与临床批次相同的方法制造的一批)在D0时处理第1组的动物。第2组的动物未用生物材料处理,但在D0时对其进行了与第

1组的动物进行了相同的外科手术。

[0464] 根据Wang等人描述的外科手术方法,沿着第5或第6腰椎切开皮肤和肌肉。撕开并分开背部肌肉,可以看到腰椎。L5腰椎横突形成了圆形的骨缺损。通过使用恒定直径的钻头来控制,以将缺损直径控制在2.0mm,深度控制在1mm,将骨缺损尺寸标准化。腰椎两侧缺损。对于第1组的动物,将生物材料(两个 0.375cm^3 的小块,分别包含 0.56×10^7 个细胞)移植到脊柱的两侧(左侧和右侧)所创建的孔和周围区域中。然后缝合背部肌肉和皮肤。基于大鼠体重,该生物材料的量表示相对安全裕度为10(250g的大鼠相对于30kg的患者)和23.4(250g的大鼠相对于70kg的患者)。

[0465] 在D29,处死大鼠并进行尸检。为了检测和定量大鼠组织中生物材料人细胞的存在,从施用部位、骨髓、脑、性腺、心脏、肠、肾、肝、肺、骨骼肌和脾中提取总基因组DNA,然后使用基于人Alu元素的qPCR方法进行分析。

[0466] 收集器官,称重并保持在 -80°C 直至提取DNA。然后使用机械方法将组织在提取缓冲液中完全均质化,然后进行DNA提取。用125ng的测试大鼠组织样品的基因组DNA或对照大鼠组织样品的基因组DNA在 $20\mu\text{l}$ 下进行qPCR实验。对每个样品进行三次重复测试。验证了基于Alu元素的qPCR方法的定量范围:来自大鼠的125ng特定组织DNA基质中掺入了20fg(所有器官的定量下限)或70fg(骨骼肌的定量下限)至7ng(定量上限)的人DNA。

[0467] 结果

[0468] 在第1组和第2组动物的骨髓、脑、性腺、心脏、肠、肾、肝、肺、骨肌和脾,以及来自第2组动物的施用部位处的样品中,未检测到人DNA或其低于定量极限。在第1组动物的所有施用部位和第1组10只动物中的1只的心脏中检测到人DNA。

[0469] 除了经生物材料处理的大鼠的所有植入部位外,在以生物分布为目的分析的10只经生物材料处理大鼠中的1只大鼠的心脏中检测到人DNA。虽然无法解释,但该结果也可能是由于采样期间的污染所致,因为在分析的10只动物中仅观察到了一只,并且检测到的DNA量很低(估计的心脏中的人细胞数量相当于166个细胞)。另外,在植入后29天,对10只经生物材料处理的大鼠的心脏进行的组织病理学分析中,没有组织病理学观察证据暗示异位组织形成。

[0470] 实施例8:脊柱融合大鼠模型中生物材料的研究(CP-2017025-毒理学分支)

[0471] 通过以下3项动物研究,包括2项GLP依从性研究,解决了生物材料开发的非临床毒理学问题:

[0472] -脊柱融合大鼠模型中生物材料的单剂量毒性研究(GLP研究CP-2017025-毒理学分支);

[0473] -NSG小鼠中生物材料的致瘤性研究(GLP研究CP-2017026);和

[0474] -NSG小鼠中生物材料的局部耐受性研究以及对肿瘤形成潜力的研究(CP-2017073)。

[0475] 背景和目标

[0476] 进行GLP依从性研究(研究CP-2017025)是为了实现双重目标,即评估(i)在与研究产品的预期临床用途相关的条件下相关动物模型中生物材料的总体毒性(因此称为“CP-2017025-毒理学分支”,以及(ii)研究细胞的生物分布和异位组织的潜在连续发展(所谓的“CP-2017025-生物分布分支”)。

[0477] “毒理学研究分支”的目的是鉴定、表征和量化潜在的毒性、其发作性(急性发作或延迟发作)和解决任何观察到的毒性的可能性。

[0478] 选择免疫缺陷(裸)大鼠模型以避免免疫细胞动物所预期的人细胞排斥。选择脊柱融合手术模型作为相关模型,因为它在文献(Wang等人2003)中有完善的描述,并且它可以在相似组织环境中容纳比股骨骨缺损更大的植入体积(Belill等人2014)。另外,认为在脊柱融合手术过程中产生的植入环境与诸如骨股骨缺损的骨未愈合模型中产生的环境相比非常相似。

[0479] 研究设计

[0480] 出于“毒性研究分支”的目的,将40只(40)健康的9周龄纯合裸无胸腺大鼠(雄性20只和雌性20只;Hsd:RH-Foxn1^{rnu/rnu})随机分为第1组和第2组(每组雄性10只和雌性10只)(表5)。

组	大鼠数	治疗方法	剂量	施用途径	治疗方案	处死
[0481]	10 雄和 10 雌	研究的生物材料	1.1×10^7	椎旁: 两个部位	Q1DX1	D29
	10 雄和 10 雌	假手术	-			D29

[0482] 表5:研究(CP-2017025-毒理学分支)设计

[0483] 按照以下所述的外科手术程序,用生物材料(根据与临床批次相同的方法制造的一批)在D0处理第1组的动物。第2组的动物未用生物材料处理,但在D0与第1组的动物进行了相同的手术程序。

[0484] 根据Wang等人描述的外科手术方法,沿着第5或第6腰椎切开皮肤和肌肉。撕开并分开背部肌肉,可以看到腰椎。L5腰椎横突形成了圆形的骨缺损。使用恒定直径的钻头来控制,以将缺损直径控制在2.0mm,深度控制在1mm,将骨缺损尺寸标准化。腰椎两侧缺损。对于第1组的动物,将生物材料(两个 0.375cm^3 的小块,分别包含 0.56×10^7 个细胞)移植到脊柱的两侧(左侧和右侧)所创建的孔和周围区域中。然后缝合背部肌肉和皮肤。基于大鼠体重,该生物材料的量表示相对安全裕度为10(250g的大鼠相对于30kg的患者)和23.4(250g的大鼠相对于70kg的患者)。

[0485] 手术后观察大鼠的麻醉后恢复情况,然后每天监测动物的伤口愈合、活动性、发病率、死亡率和明显的毒性迹象,直到D29。

[0486] 为了随机化目的,在D0时测量体重,然后每周至少测量两次。评估和比较第1组和第2组动物的体重变化。

[0487] 在D3和D29,收集来自第1组和第2组禁食大鼠的血液以测量血液学、凝血和生化参数。在D29,处死大鼠,并对其进行尸检。

[0488] 为了研究毒性,肉眼观察并收集每组每种性别5只动物的器官。称重脾、肝、肾和心脏。将所有收集的器官在室温下保存在4%福尔马林中,石蜡包埋,并制成载玻片(每个器官3个载玻片;20只动物)并进行显微镜分析。

[0489] 结果

[0490] 监测期间未报告相关观察。就体重而言,在第1组和第2组的动物之间没有观察到统计学上显著的体重差异。根据对第3天和第29天采集的血样进行的分析,第1组和第2组动物的血液学、生物化学和凝血参数没有相关差异的报告。宏观上,根据进行的尸检中没有相关的报告。在显微镜下,在第1组所有动物的植入部位观察到异物肉芽肿,可能是由于生物材料植入所致。没有其他可归因于生物材料植入的组织病理学系统性变化。

[0491] 总之,使用相关模型在裸大鼠体内植入生物材料后,没有发现毒性。

[0492] 实施例9:细胞转化风险评估

[0493] 在人类中可获得大量证据支持包括骨肉瘤在内的各种肉瘤来源于间充质。然而,尽管长期培养中出现了染色体异常,但尚未显示MSC在体外发生自发转化(Aguilar等人, *Stem Cells*.2007,25(6):1586-1594;Bernardo等人, *Cancer Res*.2007,67(19):9142-9149;Xiao等人, *Clin.Sarcoma Res*.2013,3(1):10)。已经描述了这些异常,并提出这些异常是对体外培养条件的自然适应,其与转化的风险增加无关(Tarte等人, *Blood*.2010,115(8):1549-1553)。

[0494] 通过用分子核型分析法(aCGH/SNP方法)研究生物材料原料药的细胞遗传学稳定性,在建议用于临床批次的方法所制备的3种以上开发批次的生物材料的制备期间,在体外评估了ASC自发细胞转化的潜力。阵列比较基因组杂交(aCGH)与高密度单核苷酸多态性(SNP)的结合是行之有效的分子基因分型方法,提供了全基因组范围内的拷贝数变化筛查和临床相关染色体异常和病症检测的替代方法,而无需事先分离有丝分裂细胞(Cooper等人, *Nat.Genetics*.2011,43(9):838-846;Slavotinek.A.M., *Hum.Genetics*.2008,124(1):1-17)。

[0495] 结果表明,在制造过程中以及在与生物材料原料药的释放测试相对应的传代水平上,hASC表现出细胞遗传学稳定性。

[0496] NSG小鼠中生物材料的体内GLP致癌性研究(研究CP-2017026)

[0497] 背景和目标

[0498] 尽管获得的结果既未证实也未排除对患者的致癌性风险,但在使用MSC衍生的细胞疗法的情况下,迄今尚未观察到人类患者的肿瘤形成(Barkholt等人, *Cytotherapy*.2013,15(7):753-759)。

[0499] 研究CP-2017026的目的是评估在植入NSG(NOD scid γ)免疫缺陷小鼠后长达6个月的时间里,生物材料中包含的人脂肪衍生的MSC细胞发生涉及致癌性潜力的细胞转化的风险。选择HT-29细胞系作为阳性对照,该细胞系经验证具有致癌性。

[0500] 研究设计

[0501] 这项研究包括30只(30)7周龄健康NSG雌性小鼠。将小鼠随机分为2组(第1组20只小鼠和第2组10只小鼠)。第1组动物通过切口(与研究CP-2017025中使用的为相同批次,其制备方法与临床批次相同)在皮下空间内植入生物材料(1g(\pm 1cm³)含有1.5x10⁷个细胞)。第2组动物通过皮下注射HT-29细胞(在200 μ l的0.9%NaCl中10⁷个细胞/小鼠)进行接种。

[0502] 每周两次记录小鼠的活力、行为和体重,直到实验结束。观察每只动物,每周两次在施用部位触诊新形成的结节。测量任何新形成的结节。观察第1组小鼠(用生物材料处理)长达6个月,同时监测第2组小鼠(用HT-29细胞处理),直到肿瘤体积达到1000mm³或直到观

察到坏死。

[0503] 尸检期间,对每只动物进行肉眼观察。对于第1组动物(测试物),准备了用于组织病理学检查的载玻片,用于植入部位、肝、脾、肺、心脏、肾、脑、腹股沟淋巴结(如果可见)。

[0504] 结果

[0505] 第2组的10只小鼠(HT-29,阳性对照)已显示出逐渐生长的肿瘤,D27(首次处死日)的平均肿瘤体积(MTV)为 $611.6 \pm 335.4 \text{mm}^3$ 。一只小鼠由于肿瘤坏死而处死,而另外9只小鼠因 $\text{TV} > 1000 \text{mm}^3$ 而处死。在第2组小鼠的尸检期间肉眼观察器官,未发现异常。

[0506] 第一组的一只小鼠由于在施用部位打开缝线而丢失了D0至D1期间的测试物。对于第1组的动物,植入后的平均植入部位体积(D2)为 $1194.6 \pm 392.7 \text{mm}^3$ (N=19)。植入后,一些小鼠出现严重的伤口,在施用部位水平上无法愈合。

[0507] 结果,出于伦理上的原因,由于施用部位的这些严重的皮肤伤口,在D3至D27期间处死了第1组的20只小鼠中的10只。在第1组的10只处死的小鼠中,有5只小鼠在植入部位出现皮肤干燥和发黄,在另外2只小鼠中观察到植入部位的坏死。组织病理学检查显示植入部位发炎,肿块有时会坏死。在上方的皮肤和周围的肌肉组织中观察到炎症和/或溃疡。

[0508] 对于第1组动物,研究结束时(D180)的植入部位平均体积为 1032.5 ± 245.3 (n=9) mm^3 ,与D2时的植入部位平均体积相比,体积没有增加。

[0509] 在第1组小鼠的尸检期间肉眼观察器官,未发现异常。对于在研究结束时(D180)处死的第1组小鼠,显微镜观察显示在植入部位有多囊肿块,没有坏死,组织附近通常没有发炎。在植入部位和所分析的其他器官的组织病理学检查中,在第1组的任何小鼠中均未观察到肿瘤。

[0510] 该研究是有效的,因为第2组的10只动物中至少有9只(HT-29细胞治疗)已显示出逐渐生长的肿瘤。单次皮下植入含有约 1.5×10^7 个细胞的测试物(1g生物材料)后,在任何第1组(雌性NSG)小鼠中,均未观察到肿瘤。

[0511] 组织病理学报告表明,在该实验条件下,“在6个月的观察期内,在NSG小鼠中皮下植入约1g[生物材料]不会诱导任何细胞增殖。在植入部位,存在多囊肿块,这与测试物直接相关。在某些小鼠中,由于皮肤溃疡和局部炎症反应,导致过早的处死。认为这与皮下植入大体积硬质材料引起的机械损伤有关。”

[0512] NSG小鼠中生物材料的体内局部耐受性研究以及肿瘤形成潜力的研究(研究CP-2017073)

[0513] 背景和目标

[0514] 在GLP致瘤性研究CP-2017026中,观察到生物材料植入物的局部耐受性差,并认为这与NSG免疫缺陷小鼠皮下植入大体积硬质材料引起的机械损伤有关。

[0515] 发起研究CP-2017073以进一步研究在单个部位(如研究CP-2017026中所进行的那样)(n=8)或两个部位(每个部位0.5g)(n=8)中进行植入后的1g($\pm 1 \text{cm}^3$)生物材料的局部耐受性(按照原始计划,为期两周)。

[0516] 值得注意的是,在研究CP-2017073期间,与研究CP-2017026相比,即使观察到病变(例如,植入部位的黄色皮肤,在肌肉水平上没有黏附),也不会由于施用部位的严重皮肤伤口而出于伦理道德原因处死植入具有1g生物材料的动物。然后决定,为了补充研究CP-2017026中已经产生的致瘤性数据,对第1组(n=8)的动物进行监测的时间要长于最初限定

的2周随访时间(长达6个月)。

[0517] 研究设计

[0518] 将7周龄的十六(16)只健康NSG(NOD scid γ)免疫缺陷雌性小鼠随机分为2组(每组8只小鼠)。第1组动物通过在右肋皮下的切口植入生物材料(1g,含有 1.5×10^7 个细胞)。第2组动物通过在右肋皮下和左肋皮下的切口植入生物材料(2x0.5g,每个部位含 0.75×10^7 个细胞)。每周两次记录小鼠的活力、行为和体重,直到实验结束。每天观察每只动物的临床体征和局部反应。观察第1组小鼠(用测试物在一个部位对其进行处理)长达6个月。监测第2组小鼠(用测试物在两个部位对其进行处理)15天。对每只动物进行肉眼尸检。对于第1组动物(测试物),准备了用于组织病理学检查的载玻片,用于植入部位、肝、脾、肺、心脏、肾、脑、腹股沟淋巴结(如果可见)。

[0519] 结果

[0520] 除了第1组的一只小鼠的体重从D79至D85出现降低之外,每只小鼠的体重均从D0开始逐渐增加直到处死。发现那只老鼠死于D89。

[0521] 对于第1组的动物,D2时的平均植入部位体积为 $1228.3 \pm 195.3 \text{mm}^3$ ($n=8$)。在研究结束时(D180),平均植入部位的体积减少至 $945.5 \pm 92.7 \text{mm}^3$ ($n=7$),这表明在皮下植入测试物后,研究期间未观察到任何植入部位的尺寸增加。

[0522] 第1组(1个部位)和第2组(2个部位)所有小鼠的监测参数(运动和步态、运输、行为、呼吸、眼睛、皮肤(植入部位除外)、毛皮、黏液膜、排泄和无麻痹)均正常。

[0523] 处死时,肉眼观察第1组小鼠(一个部位)或第2组小鼠(两个部位),未发现器官异常。对于在D180处死的第1组小鼠,组织病理学分析没有发现任何细胞增殖。在植入部位观察到多囊矿化,但在上皮和附近的肌肉组织中没有发炎。该矿化材料被解释为植入的测试物。

[0524] 在此实验的条件下,可以得出以下结论:

[0525] • 即使在两组中均观察到植入部位的皮肤呈现黄色,在一个或两个部位施用生物材料仍不会对局部耐受性产生明显影响。关于该观察结果,在D44时注意到自最后一次观察到植入部位的黄色皮肤以来,第1组动物得以恢复。

[0526] • 经过6个月的随访,通过肉眼和显微镜观察,单次皮下植入含有 1.5×10^7 个细胞的生物材料不会在雌性NSG小鼠中诱导肿瘤形成。

[0527] • 组织病理学报告表明,向NSG小鼠皮下植入1g含 1.5×10^7 个细胞的生物材料在6个月内没有诱导任何细胞增殖。在植入部位,存在多囊矿化,这与测试物直接相关。

[0528] 实施例10:本发明生物材料的制备

[0529] 10.1. 分离hASC

[0530] 在知情同意和血清学筛查后,根据Coleman技术,通过吸脂术在腹部区域收集人皮下脂肪组织。

[0531] 从刚获得的脂肪组织中立即分离出人脂肪干细胞(hASC)。脂肪吸取物可以在+4°C下保存24小时,或在-80°C下保存长于24小时。

[0532] 首先,为了质量控制目的,分离出一部分脂肪吸取物,并测量脂肪吸取物的剩余体积。然后,通过在HBSS中制备的胶原酶溶液(NB 1, Serva Electrophoresis GmbH, 海德堡, 德国)消化脂肪吸取物(终浓度为约8U/mL)。用于消化的酶溶液的体积是脂肪组织体积的两

倍。消化在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下进行50分钟至70分钟。在15分钟至25分钟后进行第一次间歇摇动,在35分钟至45分钟后进行第二次摇动。通过添加MP培养基(增殖培养基或生长培养基)来停止消化。MP培养基包含DMEM培养基(4.5g/L葡萄糖和4mM的Ala-Gln; Sartorius Stedim Biotech, 哥廷根, 德国), 并补充有5%人血小板裂解物(hPL)(体积/体积)。DMEM是一种标准的培养基, 其包含盐、氨基酸、维生素、丙酮酸和葡萄糖, 经碳酸盐缓冲液缓冲, 并且具有生理pH(7.2至7.4)。使用的DMEM包含Ala-Gln。人血小板裂解物(hPL)是用于刺激间充质干细胞(例如hASC)体外生长的生长因子丰富来源。

[0533] 将消化的脂肪组织离心(500g, 10min, 室温), 并除去上清液。将沉淀的基质血管部分(SVF)重悬于MP培养基中, 并通过 $200\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$ 的滤网。将过滤的细胞悬液第二次离心(500g, 10min, 20°C)。将含有hASC的沉淀重悬于MP培养基中。可以保留一小部分细胞悬液用于细胞计数, 并将全部剩余的细胞悬液用于接种一个 75cm^2 的T-培养瓶(称为P0代)。进行细胞计数(仅供参考), 以估计接种细胞的数量。

[0534] 分离步骤的次日(第1天), 将生长培养基从 75cm^2 的T-培养瓶中取出。用磷酸盐缓冲液冲洗细胞3次, 然后将新鲜制备的MP培养基加入培养瓶中。

[0535] 10.2. 人脂肪干细胞的生长和扩增

[0536] 在增殖阶段, 将hASC传代4次(P1、P2、P3和P4), 以便为该过程的后续步骤获得足够量的细胞。

[0537] 在P0和第四代(P4)之间, 将细胞培养在T-培养瓶上, 并用新鲜的MP培养基饲养。当汇合度 $\geq 70\%$ 且 $\leq 100\%$ (目标汇合度: 80% 至 90%)时, 将细胞传代。将来自1批的所有细胞培养受体同时传代。在每次传代中, 用重组的不含动物细胞的解离酶TrypLE(选择1X; 对于 75cm^2 培养瓶使用9mL, 对于 150cm^2 培养瓶使用12mL), 将细胞从培养容器中分离出来。在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下进行TrypLe消化5分钟至15分钟, 并通过添加MP培养基终止。

[0538] 然后将细胞离心(500g, 5min, 室温), 然后重悬于MP培养基中。收集收获的细胞以保证得到均质的细胞悬液。重悬后, 计数细胞。

[0539] 然后在第P1、P2和P3代中, 将剩余的细胞悬液在MP培养基中稀释至合适的细胞密度, 并接种在较大的组织培养表面上。在这些步骤中, 75cm^2 的培养瓶接种15mL体积的细胞悬液, 而 150cm^2 的培养瓶接种30mL体积的细胞悬液。在每次传代中, 接种 0.5×10^4 个细胞/ cm^2 至 $.8 \times 10^4$ 个细胞/ cm^2 的细胞。在不同的代之间, 每3天至4天更换一次培养基。从一个供体到另一个供体的细胞行为和生长速率可能略有不同。因此, 两次传代之间的持续时间以及代之间的培养基更换次数可能会因各个供体而异。

[0540] 10.3. 成骨分化

[0541] 在P4代(即第四代), 将细胞第二次离心, 并重悬于MD培养基(分化培养基)中。重悬后, 第二次计数细胞, 然后在MD培养基中稀释至合适的细胞密度, 然后将70mL体积的细胞悬液接种在 150cm^2 培养瓶中, 并注入成骨MD培养基。根据该方法, 第四次传代后将细胞直接培养于成骨MD培养基中。因此, 当细胞尚未达到汇合时, 加入成骨MD培养基。

[0542] 成骨MD培养基由补充有地塞米松($1\mu\text{M}$)、抗坏血酸(0.25mM)和磷酸钠(2.93mM)的增殖培养基(DMEM, Ala-Gln, 5%的hPL)构成。

[0543] 一个供体与另一个供体的细胞行为和生长速率可能略有不同。因此, 成骨分化步骤的持续时间和代之间的培养基更换次数可能因各个供体而异。

[0544] 10.4. 多维诱导细胞

[0545] 当细胞达到汇合时,如果出现形态学改变,并且如果在培养瓶中观察到至少一个类骨质结节(即在骨组织成熟之前形成的未矿化的骨基质有机部分),则开始进行3D诱导。

[0546] 暴露于成骨MD培养基后,向含有贴壁骨原细胞汇合单层的培养容器缓慢均匀地撒上明胶颗粒(Cultispher-G和Cultispher-S, Percell Biolytica, Astorp, 瑞典),对于150cm²的容器,该明胶颗粒浓度为为1cm³、1.5cm³和2cm³。

[0547] 将细胞保持在MD培养基中。在多维诱导过程中,每3天至4天进行常规培养基更换。通过小心地防止除去明胶颗粒和发展中的结构来进行那些培养基更换。

[0548] 实施例11:生物材料的表征

[0549] 11.1. 材料和方法

[0550] 11.1.1. 结构/组织学

[0551] 测试了由ASC以及Cultispher G和Cultispher S颗粒获得的3D结构的形成。将Cultispher颗粒添加至来自6个不同供体的第4代的汇合ASC。测试了不同的体积:对于150cm²的每个容器为1cm³、1.5cm³、2cm³的颗粒。将细胞维持在分化培养基(DMEM、4.5g/L葡萄糖、Ultra谷氨酰胺+1%青霉素/链霉素+0.5%两性霉素AB+地塞米松(1μM)、抗坏血酸(0.25mM)和磷酸钠(2.93mM))中,并每3天至4天更换培养基。

[0552] 为了比较MP和MD中的培养,在添加颗粒后5天、14天和8周对MD中的3D结构进行活检。

[0553] 为了评价细胞密度,在添加Cultispher颗粒后4周、8周和12周对3D结构进行活检。

[0554] 将它们固定在甲醛中,并准备用于苏木精-伊红染色、Masson三色染色、骨钙素染色和冯库萨染色。

[0555] 分别在骨钙素染色和冯库萨染色的载玻片上评估组织的骨分化和矿化。用苏木精-伊红染色和Masson三色染色评估细胞外基质的组织结构、细胞密度和存在。

[0556] 11.1.2. 生物活性

[0557] 生物活性的体外研究通过(i)终产物中生长因子VEGF、IGF1、SDF-1α的提取和定量和(ii)低氧和高血糖条件(例如糖尿病伤口的愈合条件)下本发明生物材料的生长因子分泌能力/生长因子含量进行评估。另外,(iii)通过qRT-PCR在分子水平上表征了本发明生物材料的生物活性特性。

[0558] 生长因子含量

[0559] 为了评估形成的组织的生物活性,在添加明胶(1.5cm³)后第4周和第8周进行活检,以进行蛋白质提取和定量。根据供应商的说明书,通过比色法(BCA蛋白质测定试剂盒, ThermoFisher Scientific)和ELISA(人Quantikine ELISA试剂盒, RD Systems)对VEGF、SDF1α、IGF1的总蛋白和生长因子的含量进行定量。

[0560] 低氧和高血糖下的培养

[0561] 为了评估本发明的生物材料的生物活性以及血氧和高血糖对这种3D结构的生物活性的影响,用PBS对8周时形成的具有Cultispher G(1.5cm³)和来自3个供体的ASC的组织活检样品进行两次冲洗,并一式两份放入6孔板的10mL MD中,该MD含有4.5g/L(高血糖条件)或1g/L(正常血糖条件)葡萄糖不含HPL。将板置于缺氧(1%O₂)或常氧(21%O₂)、5%CO₂、37°C下72小时。然后收获上清液,以分别通过比色法(BCA蛋白质测定试剂盒, ThermoFisher

Scientific)和ELISA(人Quantikine ELISA试剂盒, RD Systems)定量BMP2、BMP7、VEGF、SDF-1 α 、IGF1、FGFb的总蛋白质和生长因子。处理组织以进行蛋白质提取、纯化以及总蛋白质和生长因子含量的定量。

[0562] qRT-PCR

[0563] 通过分析涉及血管生成和血管新生的基因的表达,研究了本发明生物材料的促血管生成潜力。分析了处于不同状态的脂肪干细胞的基因表达:在增殖培养基中的脂肪干细胞(无表型取向,MP)、在没有颗粒的经典成骨培养基(MD)中的脂肪干细胞、最后是本发明的生物材料中的脂肪干细胞(考虑到诱导由细胞外基质形成3维无支架结构,具有1.5cm³的颗粒的脂肪干细胞)。

[0564] 使用Qiazol裂解试剂(Qiagen,德国希尔登)和Precellys均质机(Bertin仪器,法国Montigny-le-Bretonneux)从增殖培养基(MP)(n=4,不同来源的人脂肪组织)中培养的 ≥ 2000 个ASC中和从约1cm²的本发明生物材料的活检样品(n=5)中提取总RNA。根据制造商的说明,使用Rneasy mini试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)纯化RNA,并另外进行柱上DNA酶消化。使用分光光度计(Spectramax 190,Molecular Devices,加利福尼亚,美国)确定RNA的质量和含量。通过RT²RNA第一链试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)由0.5 μ g总RNA合成cDNA,以通过商用PCR阵列(人RT²Profiler分析-血管生成)进行成骨和血管生成基因表达谱分析。使用ABI Quantstudio 5系统(Applied Biosystems)和SYBR Green ROX Mastermix(Qiagen,Hilden,德国)检测扩增产物。根据 $\Delta \Delta$ CT方法进行定量。将每个样品的最终结果相对于三个管家基因(ACTB、B2M和GAPDH)的表达水平平均值进行归一化。

[0565] 11.1.3. 生物材料成熟度对其性能的影响

[0566] 通过矿化水平评估、组织学评估(细胞密度确定)和生物活性评估(生长因子VEGF、IGF1、SDF-1 α 的提取和定量)来评估生物材料(也称为“组织”)成熟度对其特性的影响。生物材料的成熟度在本文中是指将ASC与Cultispher颗粒一起在分化培养基中培养的持续时间。

[0567] 在添加Cultispher颗粒后4周(1个供体)、8周(6个供体)、12周(3个供体)和25周(1个供体)进行了3D结构活检,并将其在甲醛中固定以进行微型CT扫描仪分析。使用外围定量CT机(Skyscan 1172G,Bruker微型-CT NV,比利时Kontich)来评估3D结构的矿化。

[0568] 此外,将组织活检样品(4周(n=3)、8周(n=8)、12周(n=3)和25周(n=1))固定在甲醛中,准备用于苏木精-伊红染色、Masson三色染色和冯库萨染色。

[0569] 11.2. 结果

[0570] 11.2.1. 结构/组织学

[0571] 当将Cultispher颗粒与hASC一起在增殖培养基中培养时,没有获得3D结构。由于未发现宏观3D结构,因此未进行显微结构分析。

[0572] 与增殖培养基相反,将Cultispher与ASC一起在成骨分化培养基中培养时显示出片状3D结构的形成(图20A)。此外,这种结构易于用镊子夹持(图20B)。

[0573] 将Cultispher与ASC一起在成骨分化培养基中培养时的组织学检查显示,颗粒之间存在细胞化的互连组织。此外,在颗粒的孔中发现了细胞外基质和细胞(图21)。冯库萨染色显示存在单独的矿化颗粒。相反,细胞外基质未被冯库萨染色(图22)。最后,在互连组织中发现骨钙素表达(图23)。

[0574] 11.2.2.生物活性

[0575] 生长因子的含量和分泌

[0576] 在单独的Cultispher G和S中无蛋白质含量。仅检测到痕量的IGF-1,但低于ELISA方法的定量下限。

[0577] 在成骨分化培养基中一起培养的Cultispher与ASC的活检上清液中检测到的IGF-1和BMP7水平低于ELISA方法的定量下限,同时测量到痕量的BMP2和FGFb。相反,发现VEGF和SDF-1 α 大量分泌。

[0578] 发现培养条件对生长因子分泌无显著影响(表6)。

	血氧	血糖	分泌 (ng/g)	
			VEGF	SDF-1 α
[0579]	21% O ₂	1 g/L	74 \pm 24	19 \pm 20
		4.5 g/L	50 \pm 28	27 \pm 27
	1% O ₂	1 g/L	130 \pm 51	14 \pm 10
		4.5 g/L	106 \pm 60	26 \pm 10

[0580] 表6:培养条件对本发明生物材料的VEGF和SDF-1 α 分泌的影响

[0581] 在成骨分化培养基中一起培养的Cultispher与ASC的活检样品的蛋白质提取物中检测到的BMP2、BMP7和FGFb水平低于ELISA方法的定量下限。相反,发现IGF-1、VEGF和SDF-1 α 的含量很高。

[0582] 发现培养条件对VEGF含量无显著影响。然而,与其他组相比,在葡萄糖为4.5g/L、常氧条件(21%O₂)下,IGF-1含量更高(p<0.05)。与低氧相比(1和4.5g/L葡萄糖),常氧和正常血糖条件下的SDF-1 α 含量更高(p<0.05)(表7)。

	血氧	血糖	分泌 (ng/g)		
			VEGF	SDF-1 α	IGF1
[0583]	21% O ₂	1 g/L	123 \pm 47	117 \pm 79**	53 \pm 37
		4.5 g/L	104 \pm 61	139 \pm 208	25 \pm 22*
	1% O ₂	1 g/L	152 \pm 80	36 \pm 29	109 \pm 85
		4.5 g/L	155 \pm 101	36 \pm 44	94 \pm 78

[0584] *:p<0.05,与其他组相比

[0585] **:p<0.05,与1%的O₂(1g/L和4.5g/L)相比

[0586] 表7:培养条件对本发明生物材料的VEGF、SDF-1 α 和IGF1含量的影响

[0587] qRT-PCR分析

[0588] 在通过qRT-PCR分析的84种促血管生成基因中,有13种mRNA在不同培养条件间发生变化。与增殖培养基中的ASC相比,在本发明的生物材料中,有10个基因被上调(ANG、ANGPT1、EPHB4、EDN1、LEP、THBS1、PTGS1、VEGFA、VEGFB和VEGFC),并且发现与MP中的ASC相比,在本发明的生物材料中,有两个基因被下调(ID1、TIMP1)(图24)。

[0589] 与MP中的ASC相比,在本发明的生物材料中发现血管生成素(ANG和ANGPT1)mRNA的

显著更高的表达(图24A和B)。血管生成素信号传导促进血管生成,通过该过程从先前存在的血管形成新的动脉和静脉(Fagian E的人,Cancer Lett,2013)。

[0590] 与MP中的ASC相比,在本发明的生物材料中,在血管生成中起重要作用的跨膜蛋白EPHB4(肝配蛋白受体B4)、有效的血管收缩剂内皮素(EDN1)(Wu MH,Nature,2013)、血管舒张剂血小板应答蛋白1(THBS1)、和调节内皮细胞的环氧合酶1(PGSI/COX-1)显著上调(分别为图24C、D、E和F)。

[0591] 与MP中的ASC相比,在本发明的生物材料中,瘦素(LEP)mRNA(一种重要的血管生成增强剂和VEGF表达诱导剂;Bouloumie A等人,Circ.Res.1998;Sierra-Honigmann MR等人,Science(New York,N.Y.)1998)也是过表达的(图24G)。

[0592] 最后,与MP中的ASC相比,在本发明生物材料中的ASC中,血管内皮生长因子A、B和C的mRNA(VEGFA/B/C)的表达也显著提高(分别为图5H、I和J)。VEGF是调节血管发育和血管生成的最重要的生长因子之一。由于骨是高度血管化的器官(血管生成是骨发生中的重要调节剂),因此VEGF也会对骨发育和产后骨修复产生积极影响(Hu K等人,Bone 2016)。

[0593] 相反,与MP中的ASC相比,在本发明的生物材料中,与体内血管生成减少有关的DNA结合蛋白抑制剂(ID1)和金属蛋白酶抑制剂1(TIMP1)(Reed MJ等人,Microvasc Res 2003)被下调(分别为图24K和L)。

[0594] 总体而言,这些分子分析表明,当细胞嵌入本发明生物材料中的3D基质中时,ASC的促血管生成潜力被上调。

[0595] 11.2.3. 生物材料成熟度对其性能的影响

[0596] 矿化水平评估

[0597] 3D移植体在第4周、8周、12周和25周的宏观照片显示出相同的宏观结构(图6,上图),并在微型CT中进行了分析。确定了矿化体积的百分比:第4周为0.07%、第8周为0.28% \pm 0.33%、第12周为1.24% \pm 0.35%、第25周为2.77%(图25,下图)。

[0598] 因此,成熟度越高,矿化度越高。

[0599] 组织学评估

[0600] 发现组织成熟度对细胞含量没有影响,因为在所分析的不同组织中定量了相似的细胞密度(数据未显示)。

[0601] 相较而言,组织中ECM的比例随成熟度增加而增加,第4周的ECM比例明显较低,而第25周的ECM比例较高(在4周、8周/12周和25周时,ECM分别为28 \pm 7%和33 \pm 11%/34 \pm 11%和56 \pm 8%($p < 0.05$))(表8)。

[0602]

	个细胞/mm ²	ECM(%)
4周	160 \pm 104	28 \pm 7*
8周	175 \pm 86	33 \pm 11
12周	177 \pm 70	34 \pm 11
25周	191 \pm 77	56 \pm 8*

[0603] *: $p < 0.05$,与其他组相比

[0604] 表8:在不同的成熟时间对本发明的生物材料进行的组织形态分析。

[0605] 在成熟的12周和25周发现较高的矿化度,如更明显的冯库萨染色所示(数据未显示)。

[0606] 生物活性评估

[0607] 在蛋白质提取、纯化和通过ELISA对生长因子(VEGF、IGF1、SDF-1 α)进行定量后,研究了成熟4周、8周、12周和25周时生物材料的生物活性(表9)。

[0608]	VEGF (ng/ml)	IGF (ng/ml)	SDF-1 α (ng/ml)
4周	117 \pm 7	108 \pm 17	105 \pm 42
8周	102 \pm 91	50 \pm 83	189 \pm 180
12周	181 \pm 12	436 \pm 18	663 \pm 27
25周	128	94	424

[0609] 表9:成熟4周、8周、12周和25周时组织中蛋白质和生长因子的含量

[0610] 实施例12:体内血管生成和成骨特性的研究

[0611] 12.1.材料和方法

[0612] 12.1.1.使用裸大鼠进行的体内实验

[0613] 在第0天,将十份本发明生物材料的复制品(如实施例10中所述在7.5周的成熟过程中与1.5cm³的Cultispher G或S一起培养的ASC)缝合在裸大鼠的烧烙过的腰部肌肉上。植入后第29天,收集生物材料以进行图像和组织学分析。

[0614] 12.1.2.使用Wistar大鼠进行的体内实验

[0615] 在第0天,将十份本发明生物材料的复制品(如实施例10中所述在7.5周的成熟过程中与1.5cm³的Cultispher G或S一起培养的ASC)缝合在Wistar大鼠的烧烙过的腰部肌肉上。植入后第29天,收集生物材料以进行图像和组织学分析。

[0616] 在实验期间,每天检查动物的一般临床状态。

[0617] 使用用于小动物成像的高分辨率X射线微型CT系统SkyScan1076进行30个样品的矿化分析。使用CTvol和CTan软件(Skyscan)进行三维重建扫描和矿化组织分析。

[0618] 对肌肉样品进行了组织学分析,以评估产品的体内血管生成和骨诱导特性(苏木精-伊红、Masson三色、冯库萨(以精确地确定组织中矿化的位置),人组织标记物Ku80(以确认动物组织中的细胞的人来源)和CD3(以描述组织中CD3+免疫细胞的重新分配)染色)。

[0619] 12.2.结果

[0620] 12.2.1.使用裸大鼠进行的体内实验

[0621] 在体内实验过程中,未发现任何不适迹象或明显病变,这表明该产品未对动物造成不良影响。

[0622] 在第29天进行的放射线检查中,在裸大鼠中观察到不透射线的结构,这表明存在矿化现象(图26)。

[0623] 在裸大鼠样品中突出显示了人细胞的存在。当存在时,人细胞在两组中平均占到植入部位的细胞的一半,不包括边缘。除了边缘处仅存在大鼠细胞,来自大鼠和人的细胞均匀地分布在植入部位。

[0624] 12.2.2.使用Wistar大鼠进行的体内实验

[0625] 在Wistar大鼠中,在第29天进行的放射照片上观察到存在不透射线的结构,这表明存在矿化现象(图27)。

[0626] 矿化分析表明在每个植入部位均存在矿化组织。

[0627] 冯库萨染色表明矿化位于颗粒上(图28)。

[0628] 实施例13:体内生物活性研究

[0629] 13.1.材料和方法

[0630] 13.1.1.样品准备

[0631] 准备十个约0.5g生物材料的样品(如实施例10中所述在8周的成熟过程中与1.5cm³的Cultispher S一起培养的ASC),以用于植入10只裸大鼠的椎旁肌肉组织中。另外,将2个约0.5g的Cultispher S颗粒样品用作对照。

[0632] 为了评估样品中生长因子的含量,准备生物材料样品以用于蛋白质提取和定量(VEGF、IGF1、SDF-1 α)。

[0633] 为了评估生物材料的质量,将一个样品在甲醛中固定以进行苏木精-伊红(HE)和冯库萨(VK)染色。脱细胞处理功效的评估通过对HE染色后组织中的细胞数进行计数来评估。

[0634] 13.1.2.动物设施中的安置

[0635] 将动物饲养在经过兽医机构批准的“Centre Préclinique Atlanthera”动物设施中,并按照目前的现行法规进行所有实验程序(2013年2月1日用于实验动物目的第2013-118号法令)。在研究开始之前,使动物适应至少7天,在此期间每天跟踪动物的总体状况。将动物圈养在装有空调的动物房中,并装在标准尺寸的塑料盒中。白天/夜晚的人造光周期设置为12小时光照和12小时黑暗。所有动物都可以自由饮水,并随意进食商业饲料。通过耳标(环)识别每只动物。

[0636] 13.1.3.实验方案

[0637] 在第0天,将生物材料的复制品缝合在10只裸大鼠的烧烙过的腰部肌肉上,而将单独的颗粒植入1只裸大鼠的烧烙过的腰部肌肉内。植入后第29天,收集含有生物材料的肌肉,以进行图像和组织学分析。

[0638] 植入腰部肌肉

[0639] 将动物完全麻醉以在最佳条件下进行手术。在手术前约30分钟开始注射丁丙诺啡的镇痛步骤,然后在第二天再次进行注射。

[0640] 手术:对于每只动物,沿着腰部的脊柱进行纵向皮肤切口。对于1只大鼠,在皮肤切口的两侧进行肌肉定位(即对腰部肌肉进行定位)。对植入部位进行烧烙。仅将颗粒植入这些部位中。对于10只大鼠,将生物材料缝合在烧烙过的腰部肌肉上。手术后,使用手术钉缝合皮肤伤口。

[0641] 临床随访

[0642] 在实验期间,每天检查动物的一般临床状态。每周两次,进行详细的临床随访,重点是:呼吸、眼睛、心血管、胃肠道症状;运动活动和行为;痉挛迹象;评估皮肤;植入部位的炎症。

[0643] 此外,在详细的临床随访的同时,每周两次测量体重。

[0644] 最终程序和验尸分析

[0645] 在第29天,通过放血处死动物并进行宏观评估。在尸检过程中,观察尸体的外表,并记录任何病理性液体损失、和认证的可能的内部病变异常。

[0646] 大幅度打开胸腔和腹腔以评估内脏器官的任何病变,重点是心脏、肾、脾、肝和肺。

[0647] 植入部位的宏观评估

[0648] 暴露出肌肉植入部位,并针对局部组织反应以及植入物的存在和定位(射线照相分析)进行了详细的宏观评估。

[0649] 取出肌肉植入部位。将外植体在室温下于中性缓冲福尔马林溶液中固定48小时。

[0650] 3D组织形态分析

[0651] 使用用于小动物成像的高分辨率X射线微型CT系统SkyScan1076进行样品的矿化分析。

[0652] 使用以下参数在室温下扫描肌肉样品:源电压:50kV;旋转步:0.5°;像素大小:18μm;每个位置1帧。

[0653] 使用CTvol和CTan软件(Skyscan)进行三维重建扫描和矿化组织分析。

[0654] 在每个样品中,确定与骨矿化组织(阈值40/255)相似的信号量(标识为骨体积:BV)。使用的“组织体积”值是配制的植入物的体积。

[0655] 组织病理学和2D组织形态学分析

[0656] 为了评估产品的体内血管生成和骨诱导性质,对肌肉样品进行了组织学分析。

[0657] 将经福尔马林固定的外植体在15%EDTA中脱钙13天。然后,将样品脱水并包埋在石蜡中。使用显微切片机切割4μm至5μm的切片,并在载玻片上铺展。以相距150μm的两个不同水平进行切片。

[0658] 在这两个切片区域进行了苏木精-伊红(HE)、Masson三色(MT)和CD146的免疫组织化学检查(使用了石蜡包埋或冷冻的样品切片)。

[0659] 使用数字载玻片扫描仪(Nanozoomer,Hamamatsu)获取完整染色切片的图像。使用NDPview2软件对血管(Trichrome Masson,CD146)占据的面积进行定量:根据组织特征手动划定目标区域,以在切片上定义“植入部位”的区域。手动勾勒每个血管以量化目标区域中血管所占据的面积。报告了相对于“植入部位”的总面积,与血管相对应的表面积和血管数。

[0660] 13.2.结果

[0661] 13.2.1.组织学分析

[0662] HE染色后确定组织中的细胞数(图29): 146.5 ± 50.4 个细胞/ mm^2 。

[0663] 组织的冯库萨染色显示出颗粒上的较少矿化(图30)。

[0664] 13.2.2.生物材料生物活性的体内研究

[0665] 未发现任何不适迹象或明显病变,这表明该产品未对动物造成不良影响。在实验过程中记录的动物体重表明,所有动物在第2天都没有出现体重增加,然后在第2天至28天期间出现了规律的体重增加。经常观察到刚手术后体重没有增加,并且不认为这表明所测试产品有任何毒性。在第2天至第28天期间观察到的常规体重增加证实了这些颗粒不影响动物的新陈代谢。在体内实验结束时,尸检未发现任何宏观器官病变。

[0666] 植入部位的矿物质含量

[0667] 在第29天进行的放射线照片上,在植入生物材料的所有部位均观察到存在不透射线的结构,从而表明发生了矿化(图31)。

[0668] 为了量化矿化组织在肌肉中的形成百分比,使用用于小动物成像的高分辨率X射线微型CT系统SkyScan1076进行“植入部位”矿化分析。结果列于表10中。

样品	BV 40/255 (mm^3)	TV (mm^3)	BV/TV (%)
NG-987	76.7677	514.6821	0.1492

NG-988	22.7560	518.1965	0.0439
NG-989	121.3495	470.9364	0.2577
NG-990	137.0365	724.1618	0.1892
NG-991	44.8830	519.4913	0.0864
NG-992	23.1673	560.8324	0.0413
NG-993	48.1291	496.7399	0.0969
NG-994	21.2821	791.3064	0.0269
NG-995	123.9947	638.3353	0.1942
NG-996	52.9368	561.4798	0.0943

[0670] 表10:用于小动物成像的高分辨率X射线微型CT系统SkyScan1076的结果

[0671] 分析表明,在植入生物材料的每个部位均存在显著含量的矿化组织,其中BV/TV的平均值为0.118。

[0672] 植入物的新血管形成

[0673] 检查纤维结缔组织中毛细血管的存在,以记录新血管形成。

[0674] 对Masson三色染色后的植入物内的和肌肉与植入部位之间的交界处的血管数/面积和血管密度进行了定量。

[0675] 通过Masson三色染色发现具有生物材料的植入物已血管化,并且数量为 40.8 ± 18.5 个血管/ mm^2 。

[0676] 实施例14:高血糖/缺血性异种大鼠模型的体内功效研究

[0677] 14.1.材料和方法

[0678] 14.1.1动物

[0679] 250g至300g的56只Wistar雌性大鼠腹膜内接受链脲佐菌素(50mg/kg)。链脲佐菌素施用后七天至十天,通过血糖试纸测量尾静脉血中的血糖水平。葡萄糖水平 $>11.1\text{mM}$ 的大鼠被认为是高血糖的,并被纳入研究(n=42只大鼠)中。

[0680] 如Levigné等人(Biomed Res Int 2013)所述,在每只大鼠的左肢中诱发缺血。穿过在剃过的腹股沟区域中的纵向切口,从髂总动脉至隐性动脉切开髂外动脉和股动脉。为了引起缺血条件,将切开的动脉从左肢髂总动脉中切除,而保留右肢动脉,将该肢视为非缺血的。所有外科手术均在手术显微镜下进行(Carl Zeiss, Jena, 德国),通过使动物吸入5%异氟烷诱导麻醉并通过3%异氟烷维持麻醉。

[0681] 将动物随机分为3组:

[0682] -假手术组(n=10只雌性Wistar大鼠);

[0683] -Cultispher组(n=10只雌性Wistar大鼠),即仅为颗粒;

[0684] -生物材料组(n=14只雌性Wistar大鼠),即ASC与明胶颗粒形成的组织。

[0685] 14.1.2测试物

[0686] 准备14个约0.5g的Cultispher颗粒的样品,进行 γ 射线辐照。

[0687] 准备14个约 2cm^2 的生物材料的样品(如实施例10中所述在8周的成熟过程中与 1.5cm^3 的Cultispher S一起培养的ASC)以用于植入。

[0688] 为了评估样品中生长因子的含量,准备一个生物材料样品以用于蛋白质提取和定量(VEGF、IGF1、SDF-1 α)。

[0689] 为了评估生物材料的质量,将样品固定在甲醛中以用于苏木精-伊红 (HE) 染色。脱细胞处理功效的评估通过对HE染色后组织中的细胞数进行计数来评估。

[0690] 14.1.3 伤口愈合的宏观评估

[0691] 在植入后第0天、15天、24天和34天拍摄腿的照片。

[0692] 为了量化伤口闭合,由两个独立的操作员使用Image J软件通过图像分析来测量伤口面积。根据在D0和D34期间的每个时间点测量的伤口面积计算曲线下面积,并通过与固定为100%的假手术组比较进行表示。

[0693] 14.1.4 伤口愈合的微观评估

[0694] 解剖腿以取出伤口组织,并使其最后呈横向取向,以获得具有整个组织厚度的组织学切片。制备5 μ m的组织学切片,并用HE染色以对表皮 (op 't Veld RC等人,Biomaterials 2018) 和真皮 (Yates C等人,Biomaterials 2007) 进行评分:

[0695] 在伤口的三个代表性部位 (中心和周围) 对表皮愈合进行评分:

[0696] -0: 上皮细胞无迁移,

[0697] -1: 部分迁移,

[0698] -2: 完全迁移,且没有角质化/部分角质化,

[0699] -3: 完全迁移,且完全角质化,

[0700] -4: 晚期过度增大。

[0701] 在伤口的三个代表性部位 (中心和周围) 对真皮愈合进行评分:

[0702] -0: 没有愈合,

[0703] -1: 炎性浸润,

[0704] -2: 肉芽组织存在-纤维化和血管生成,

[0705] -3: 胶原沉积代替肉芽组织>50%,

[0706] -4: 肥大性纤维化反应。

[0707] 此外,还进行了Masson三色染色,以通过组织形态测定法评估血管区域,并进行了CD3、CD68免疫染色以评估免疫和炎症反应。另外,进行KU80染色以鉴定植入后人细胞的存在。

[0708] 14.2. 结果

[0709] 在接受链脲佐菌素注射的56只大鼠中,有42只发展为高血糖并被选为研究对象,而14只表现为低血糖并产生手术并发症,因此被排除在研究之外。

[0710] 14.2.1. 伤口愈合的宏观评估

[0711] 伤口的宏观图片如图32所示。与其他组 (假手术对照组和仅颗粒组) 相比,在生物材料组中,从术后第15天 (D15) 起可以观察到更好的伤口愈合。这种差异对于缺血性和非缺血性伤口都是可见的。

[0712] 非缺血性伤口的曲线下面积结果如图33所示。与未经处理的动物相比,仅植入Cultispher的伤口愈合降低了23%。相比之下,在用本发明生物材料处理的组中发现了更好的伤口愈合 (25%)。

[0713] 图34显示了D0和D34期间非缺血性伤口的伤口面积变化。注意,与其他组相比,用本发明的生物材料处理的伤口从D21到D34呈现出更少的未愈合组织。

[0714] 14.2.2. 伤口愈合的微观评估

[0715] 图35中显示了在每个时间点对非缺血性伤口进行评估的表皮和真皮得分。与其他组相比,发现本发明的生物材料具有更快的真皮和表皮愈合。

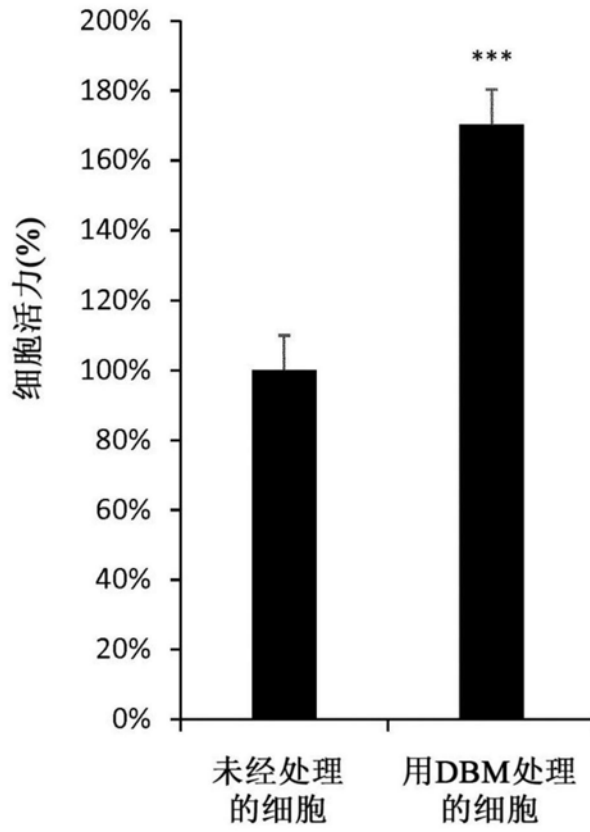


图1

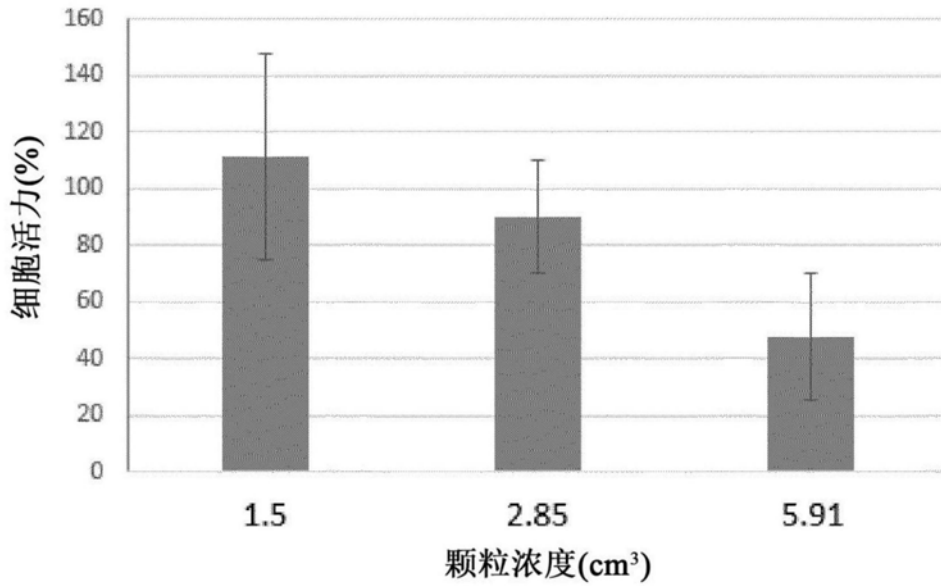


图2

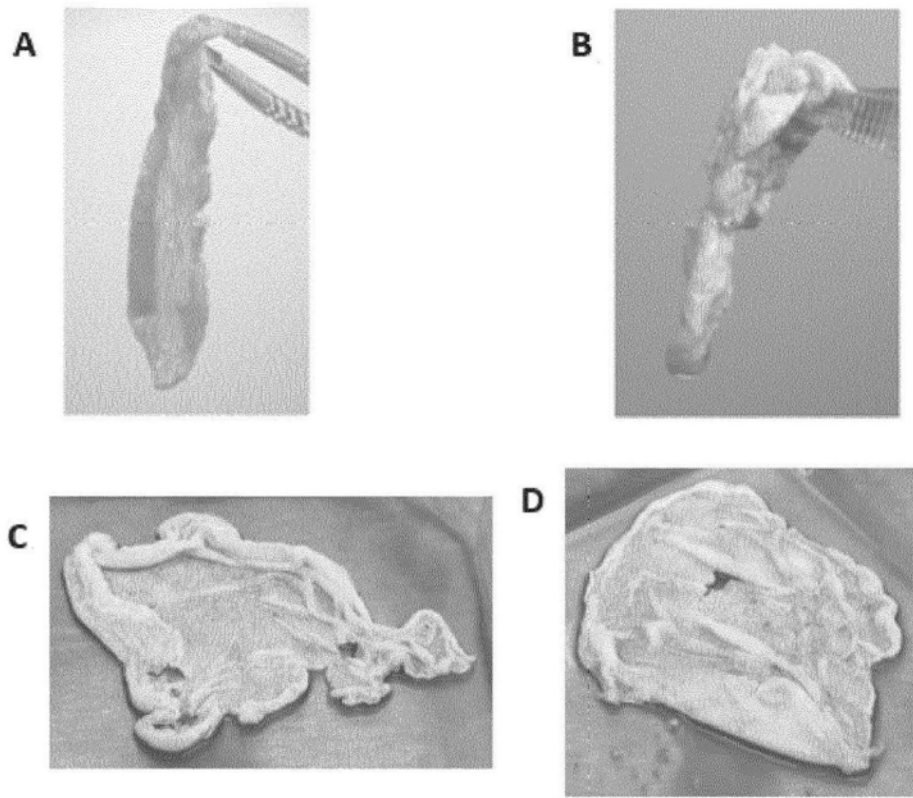


图3

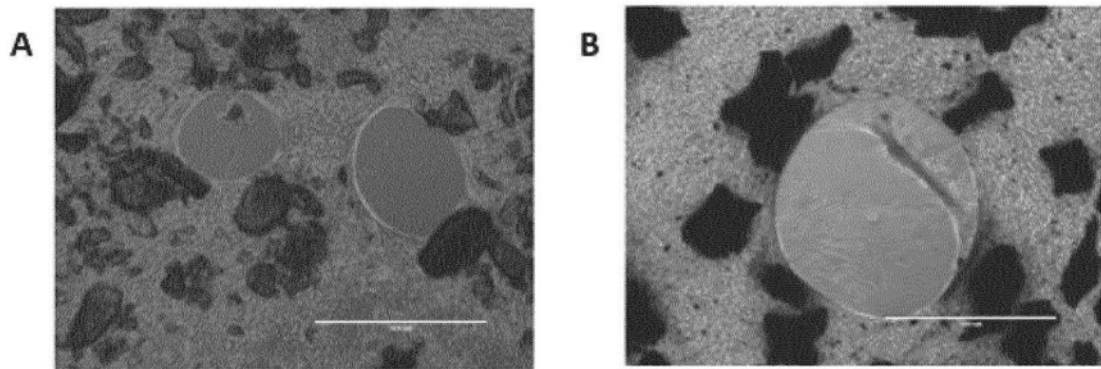


图4

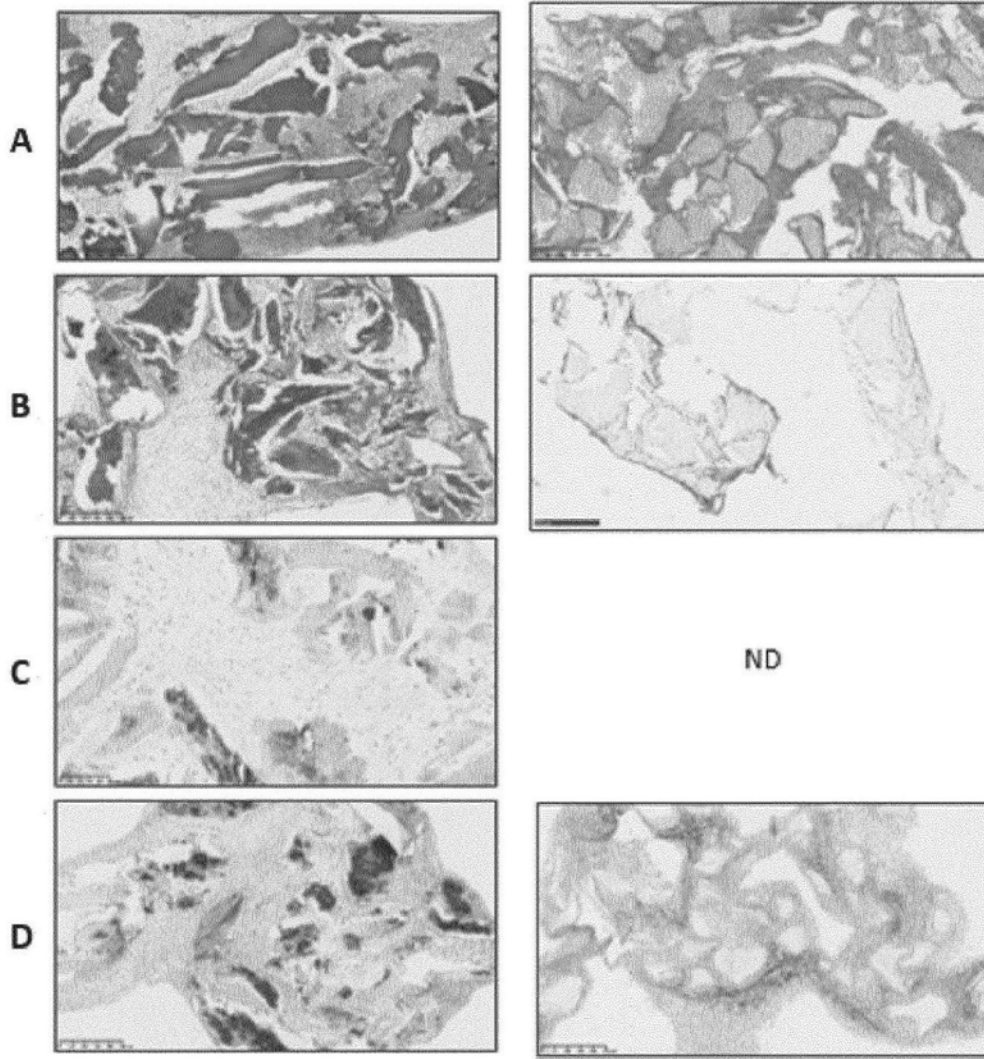


图5

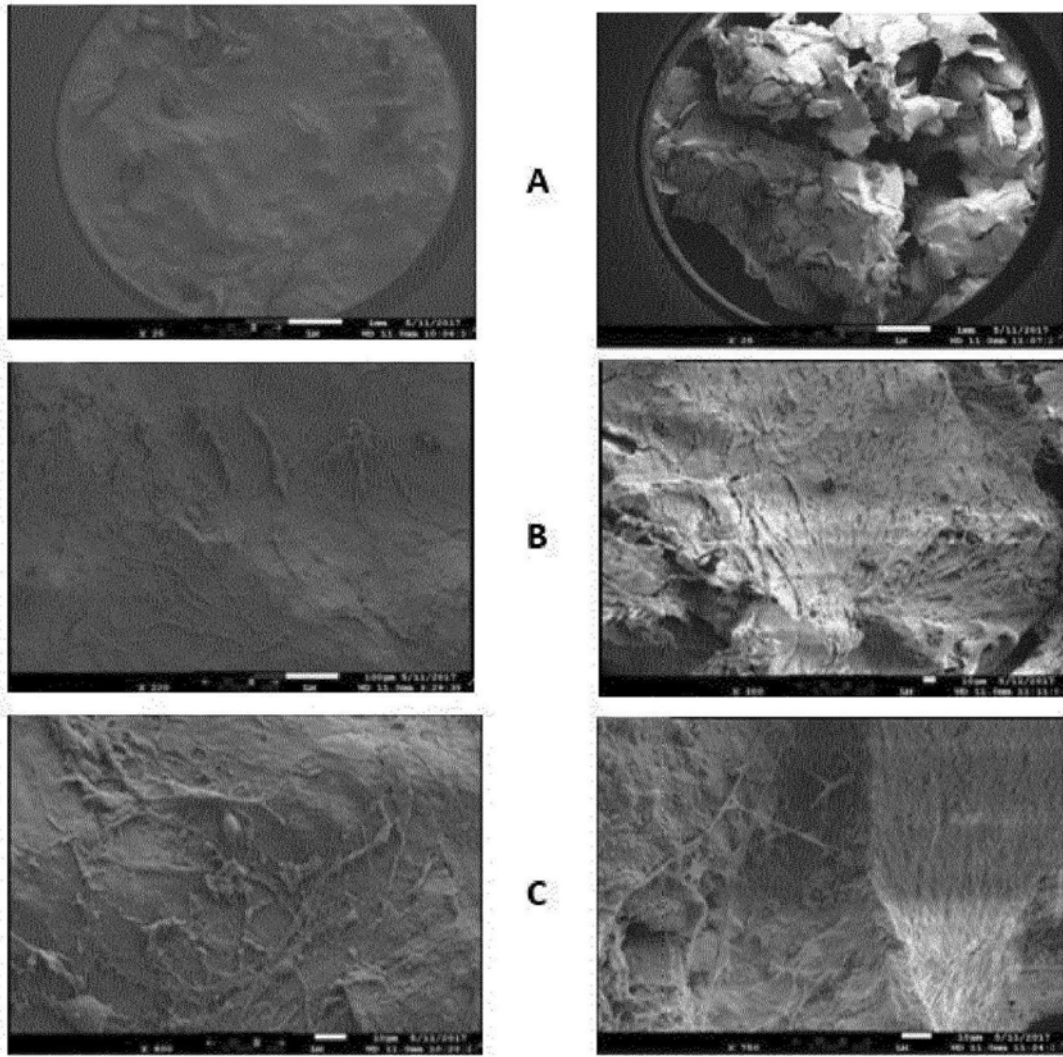


图6

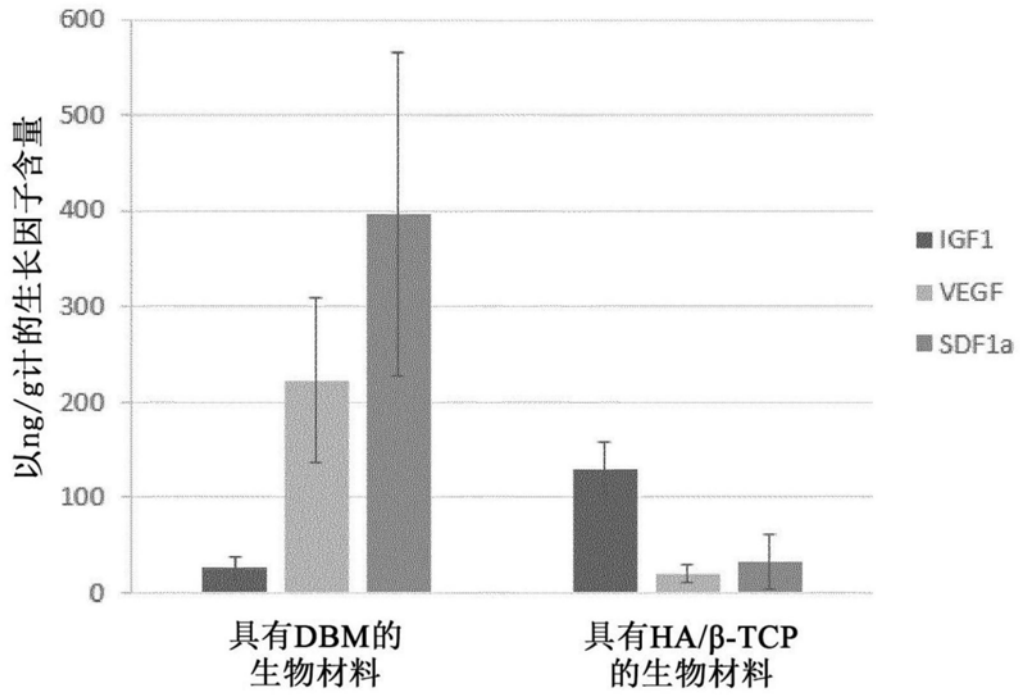


图7

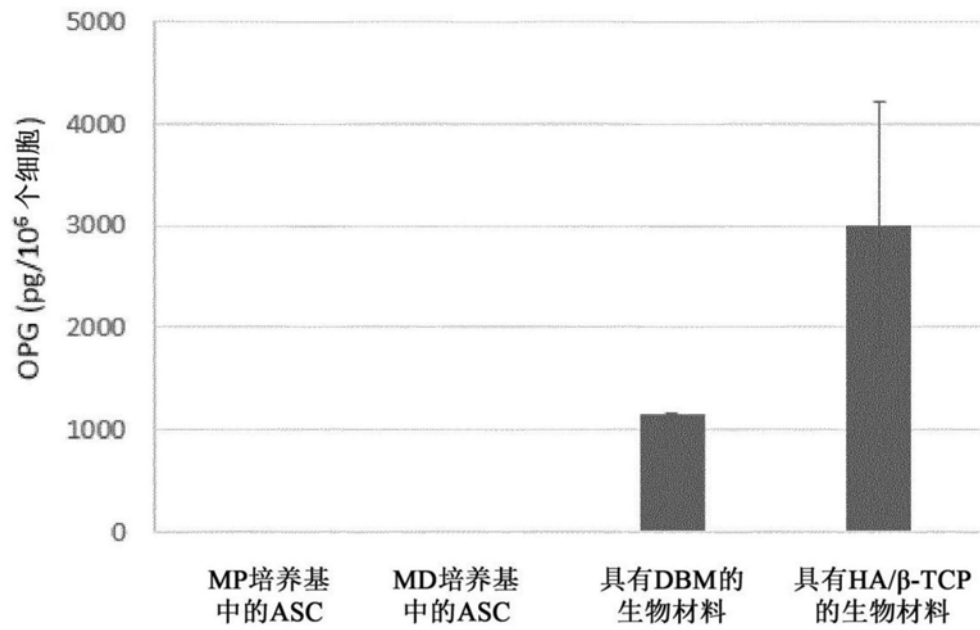


图8

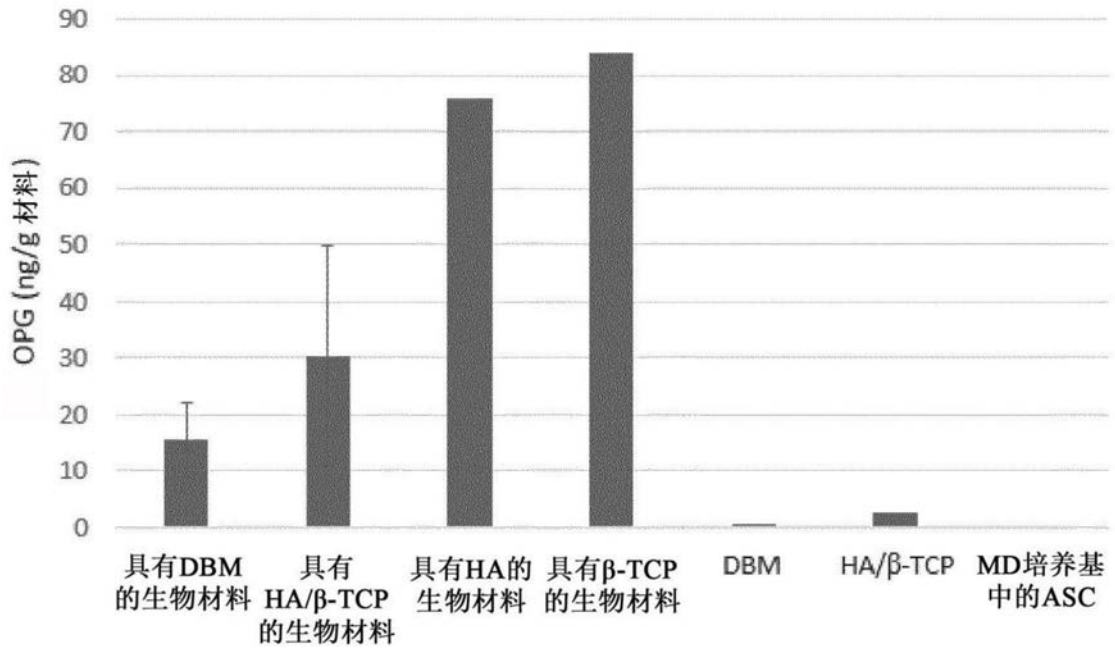


图9

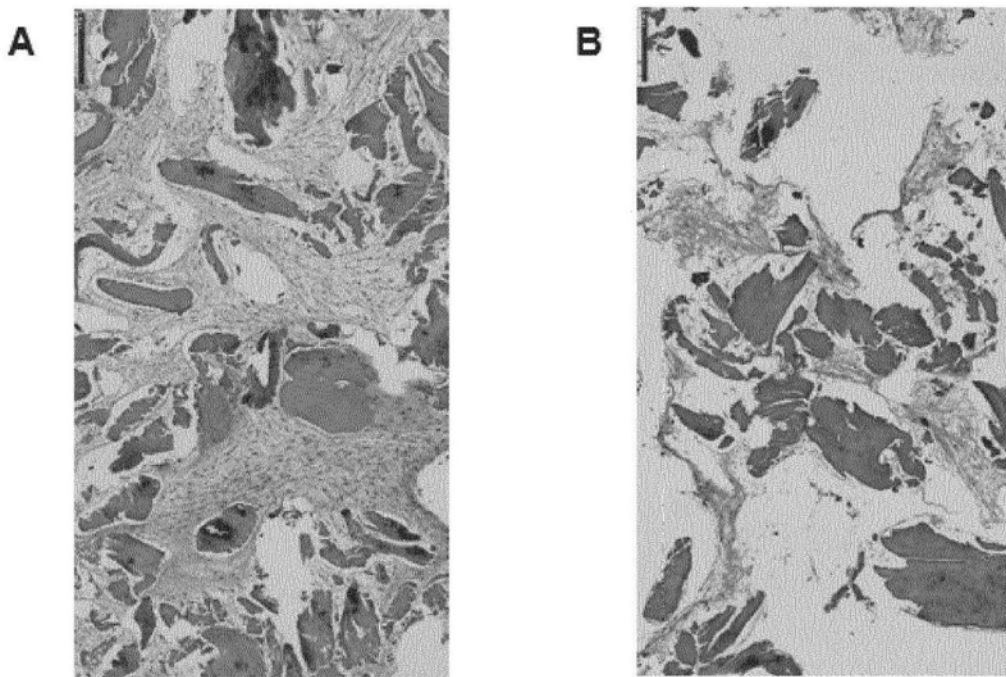


图10

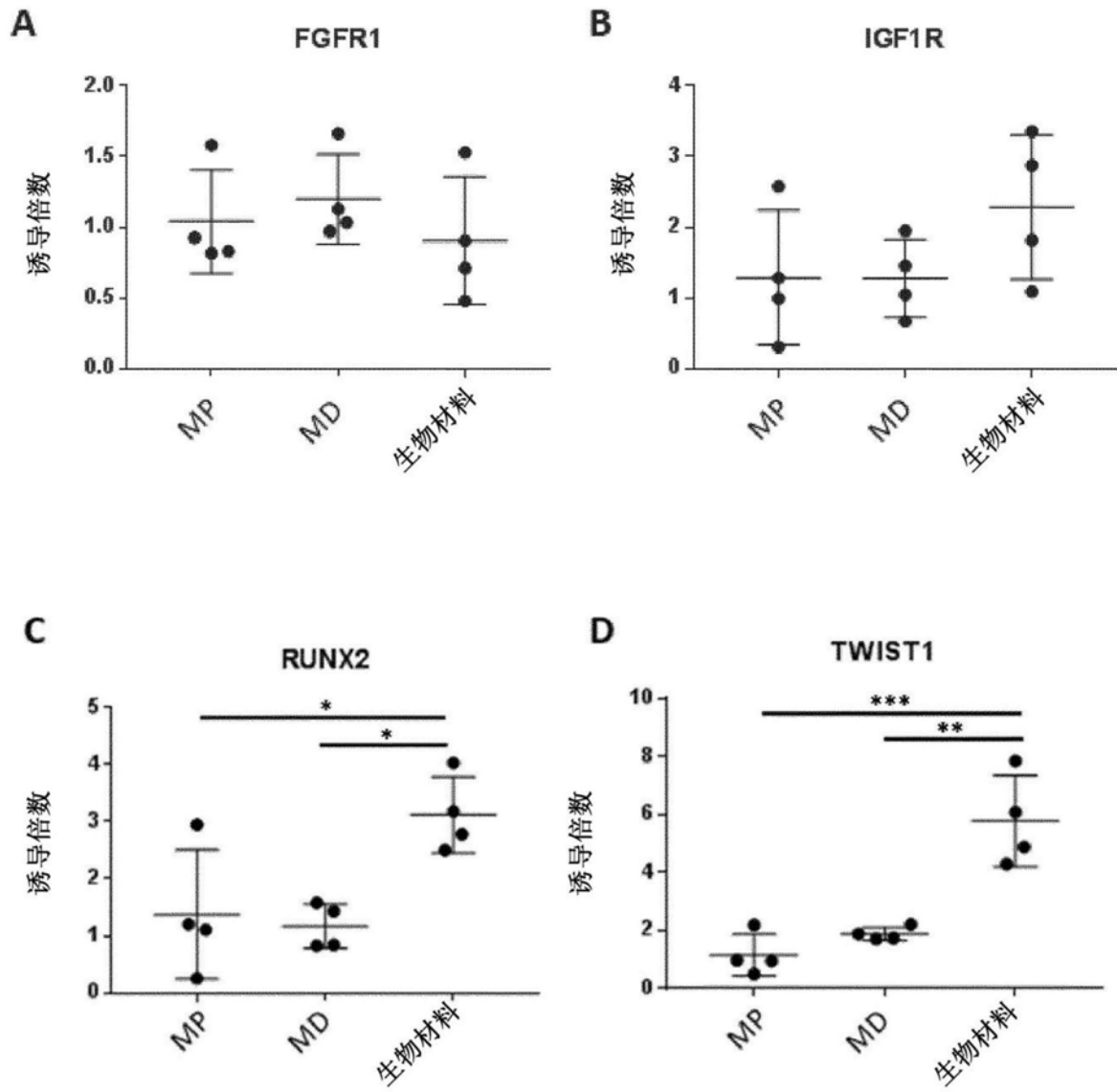


图11A-D

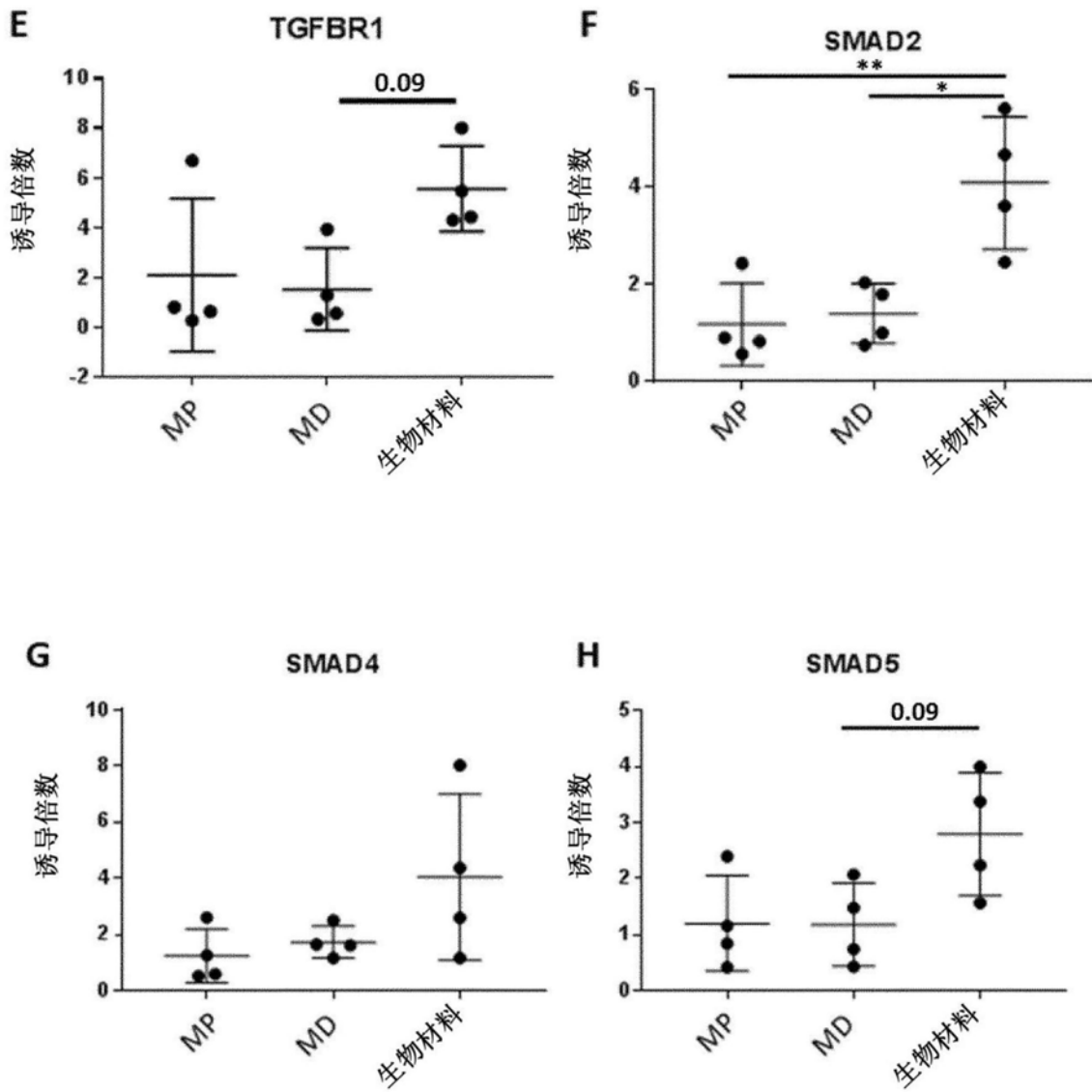


图11E-H

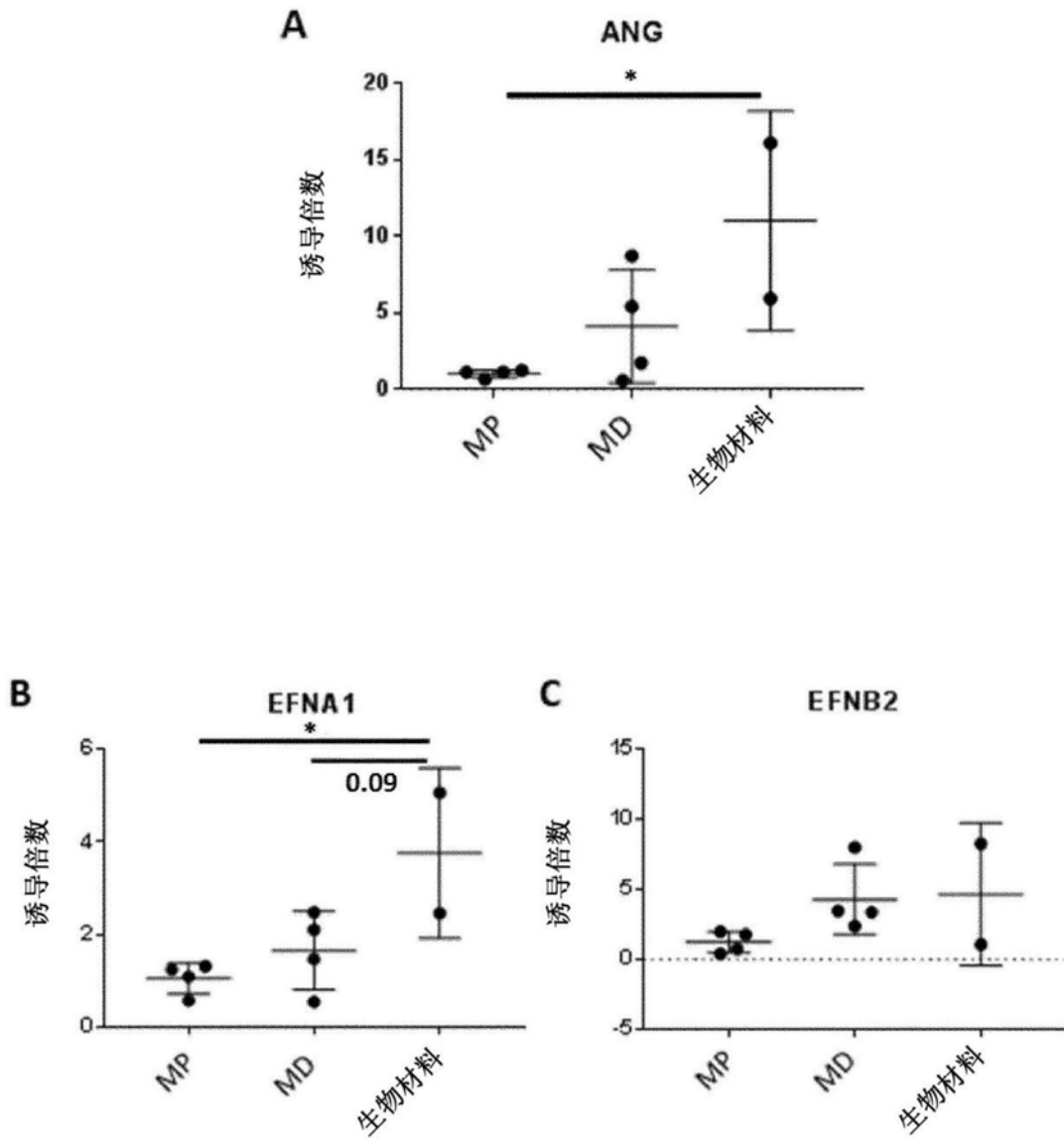


图12A-C

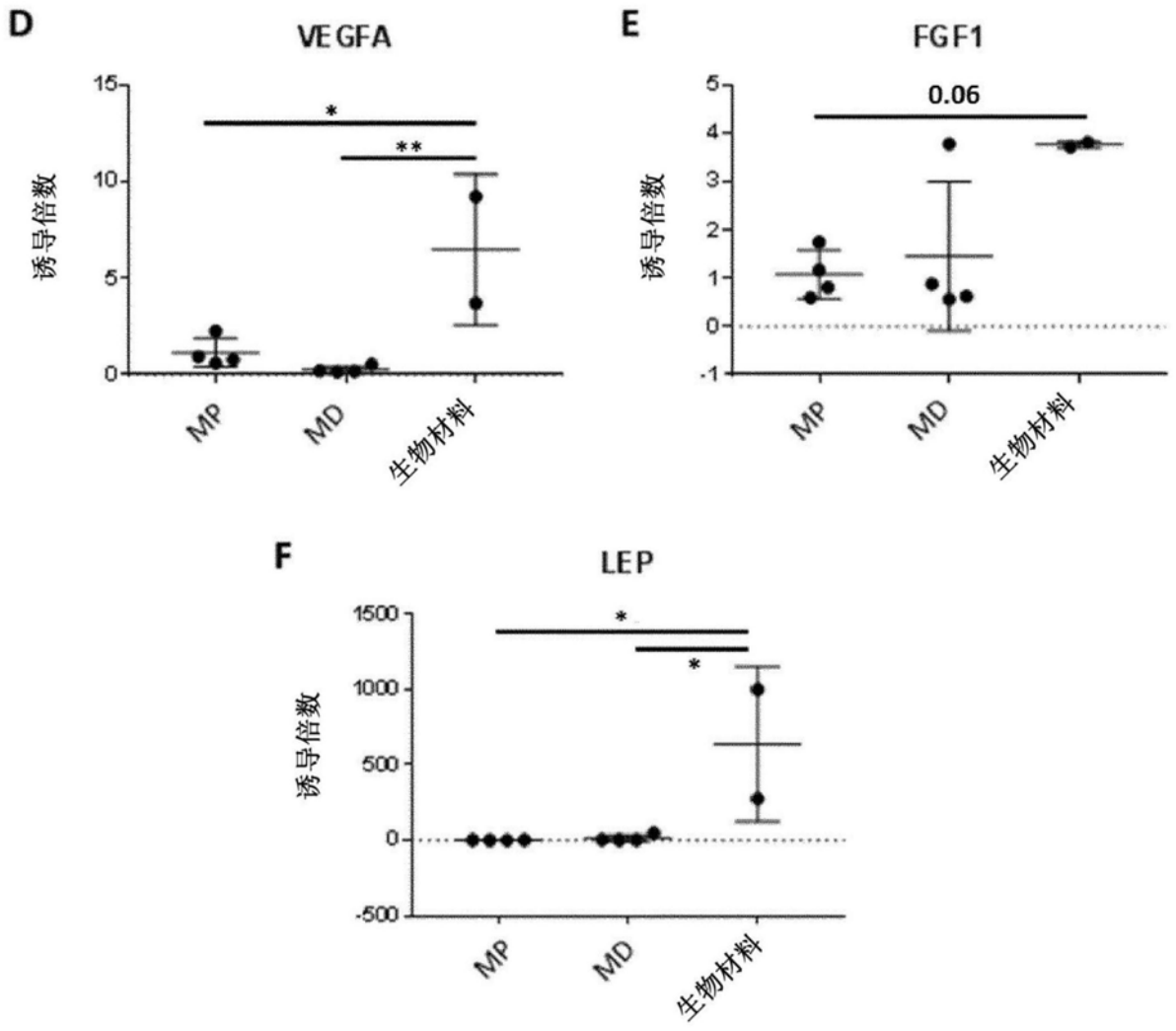


图12D-F

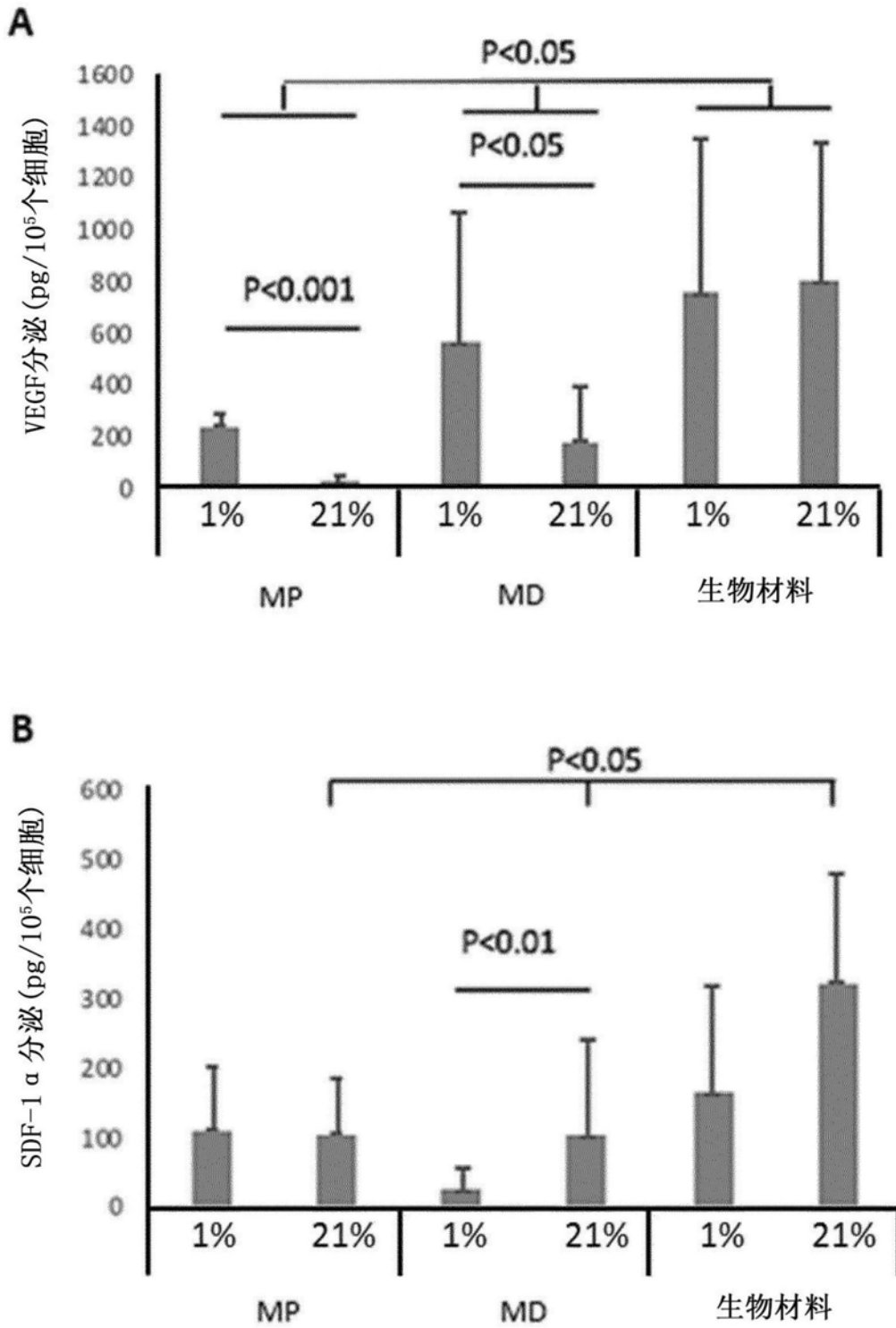


图13

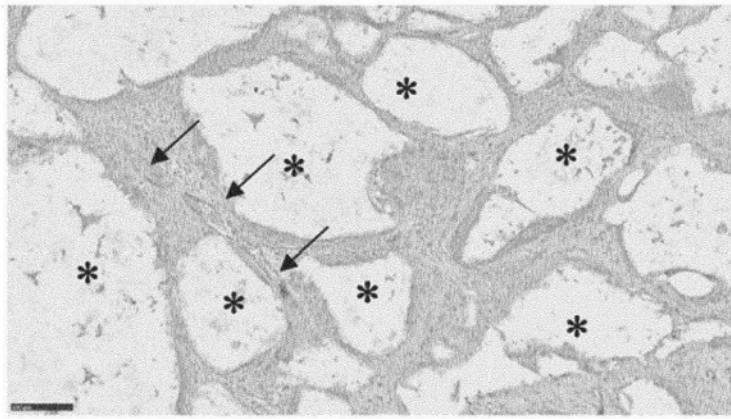


图14

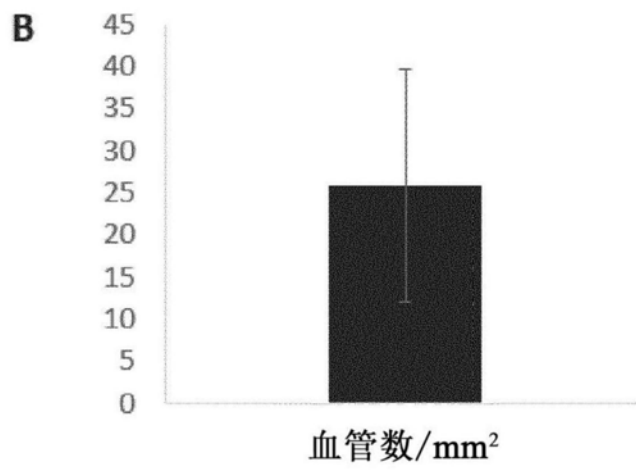
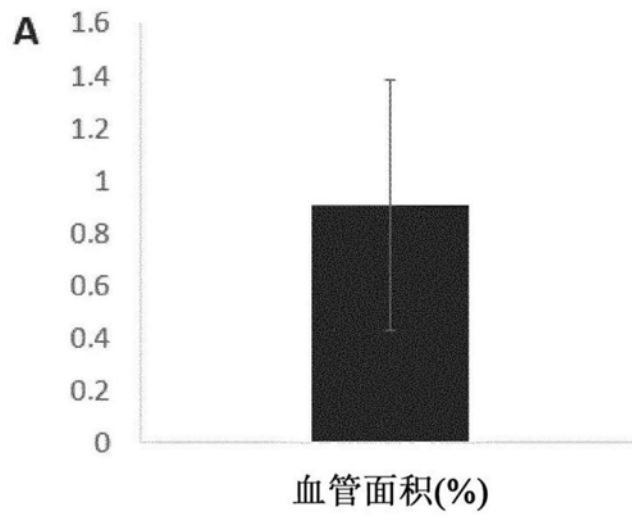


图15

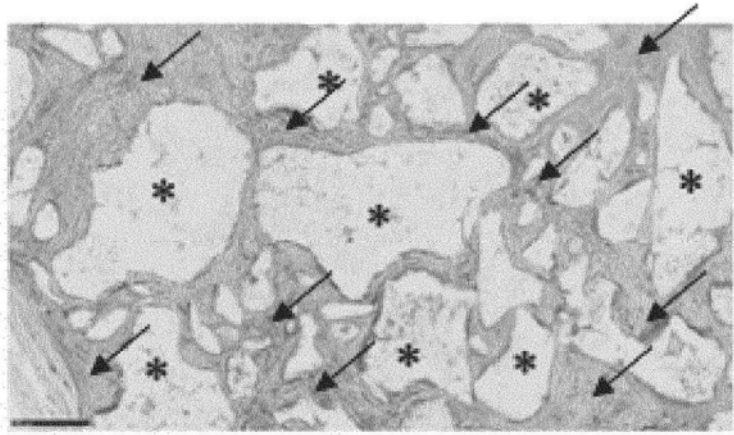


图16

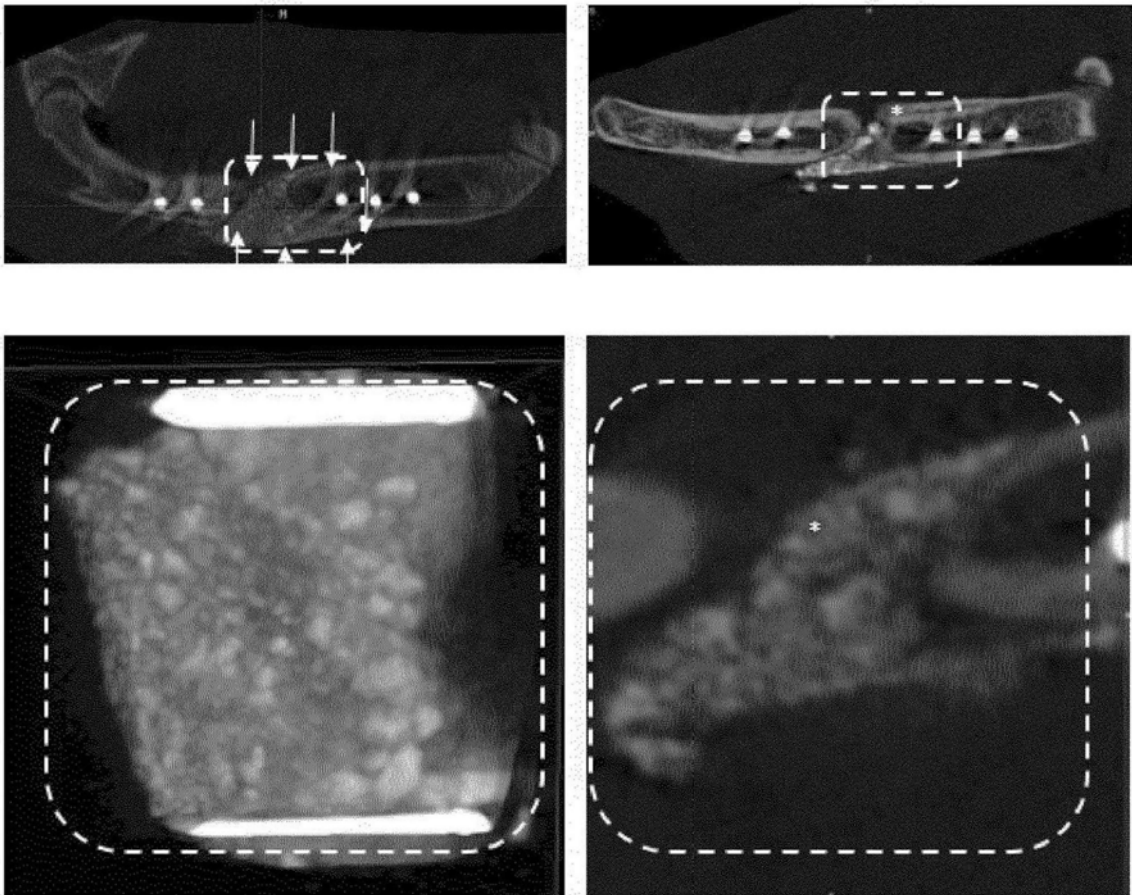


图17

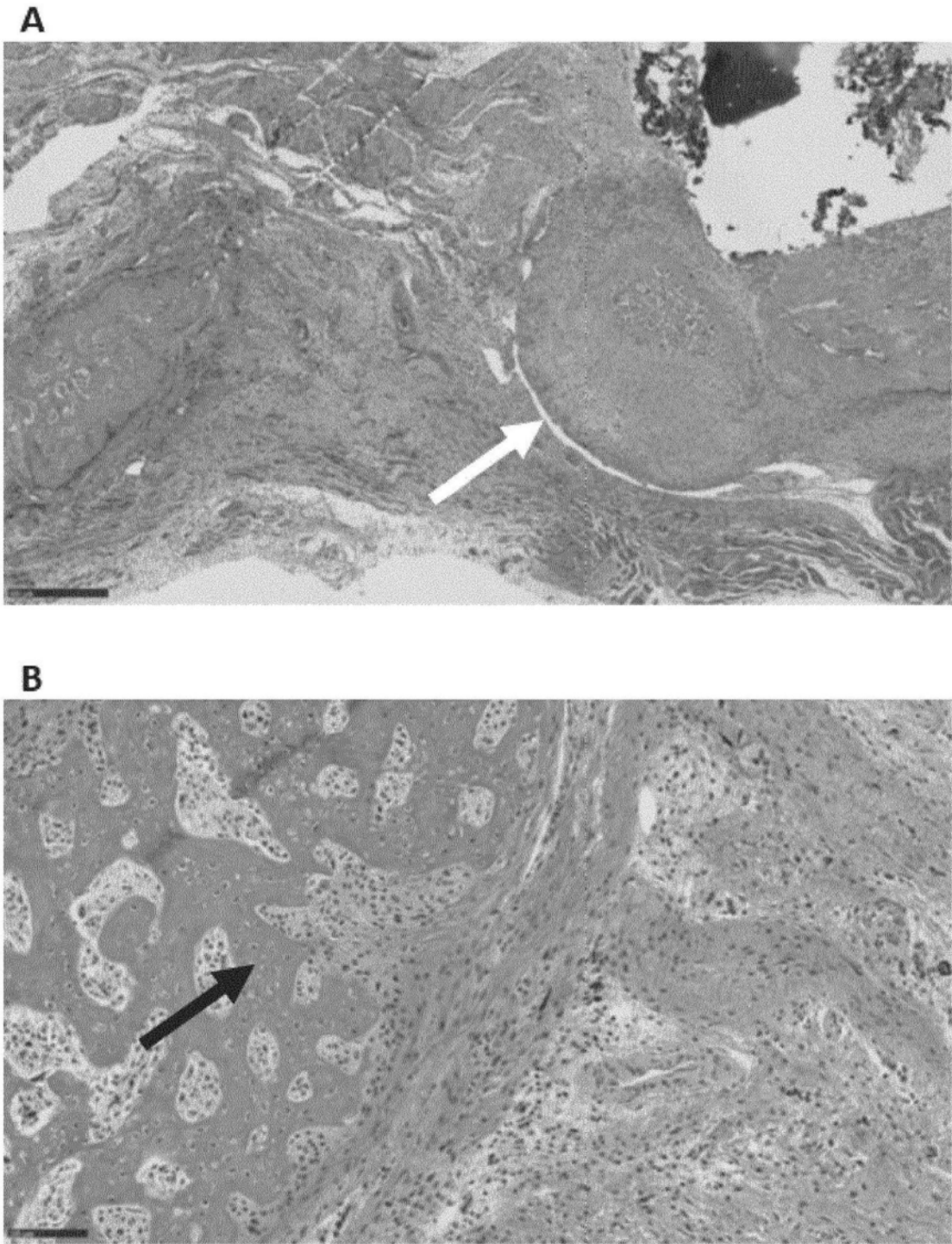


图18

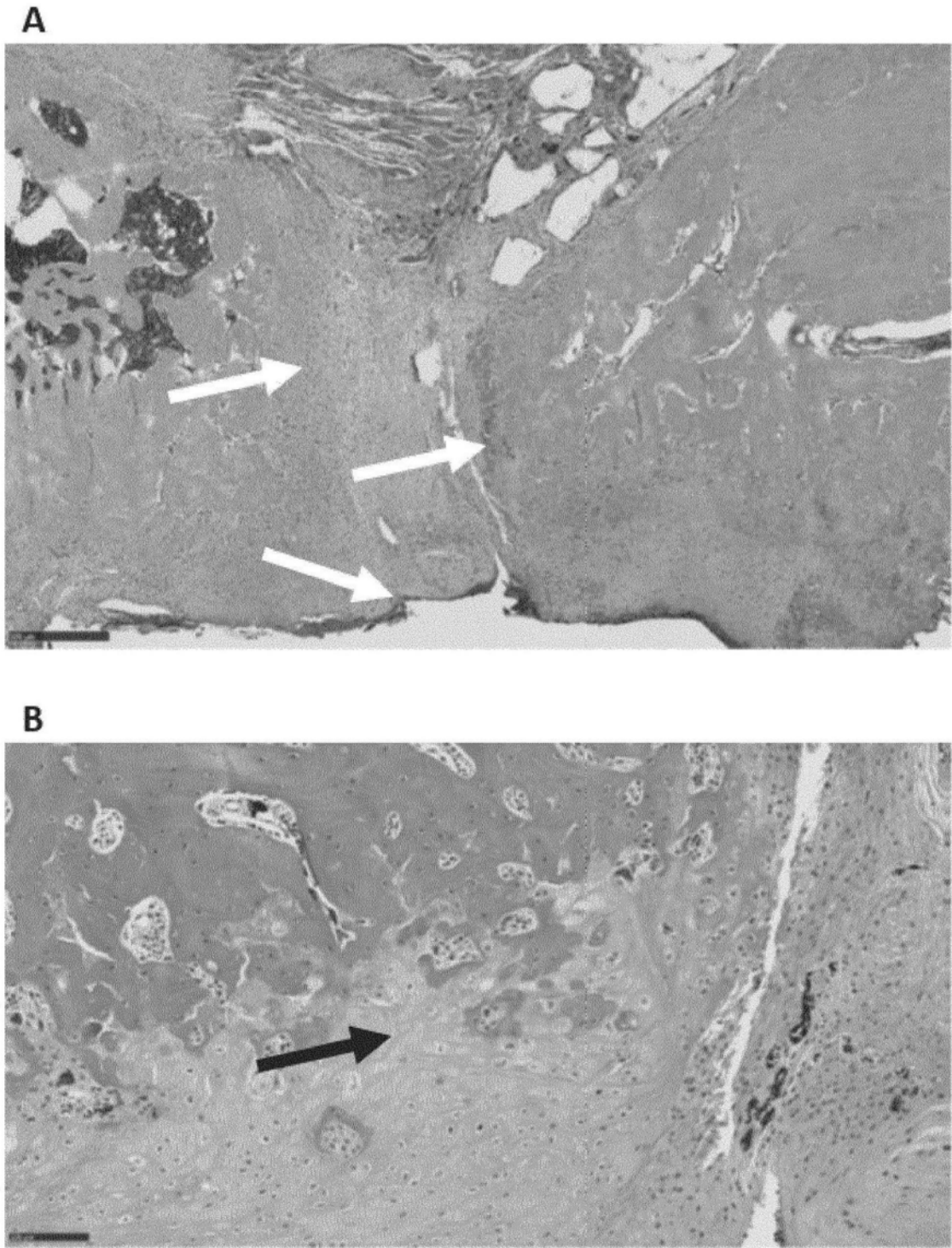


图19A-B

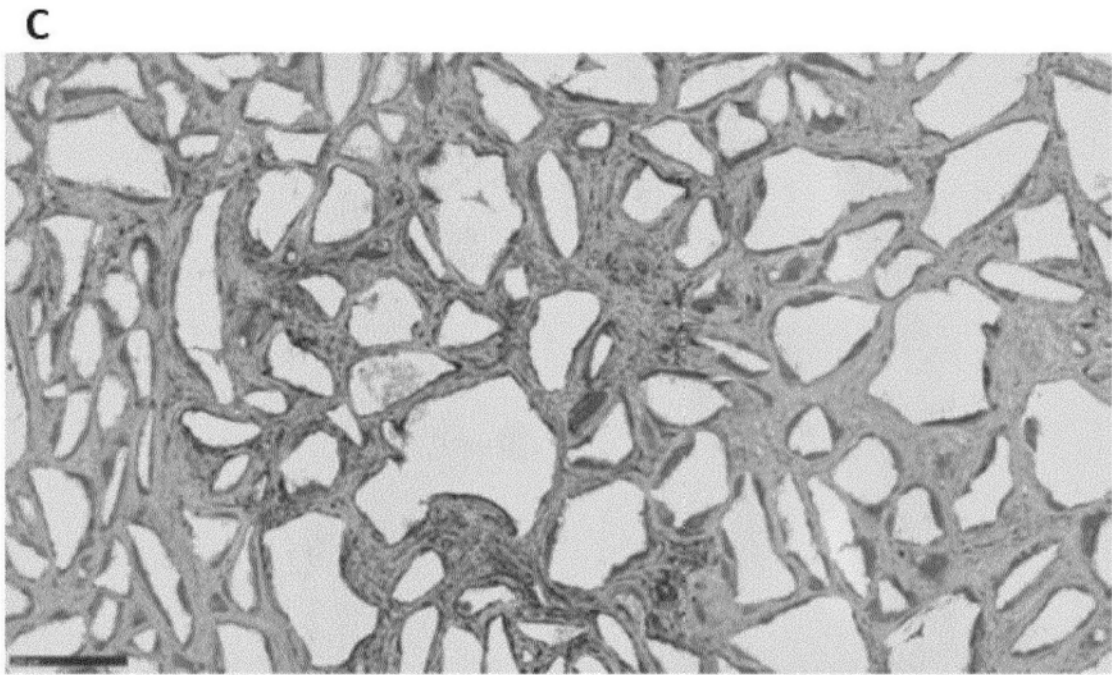


图19C

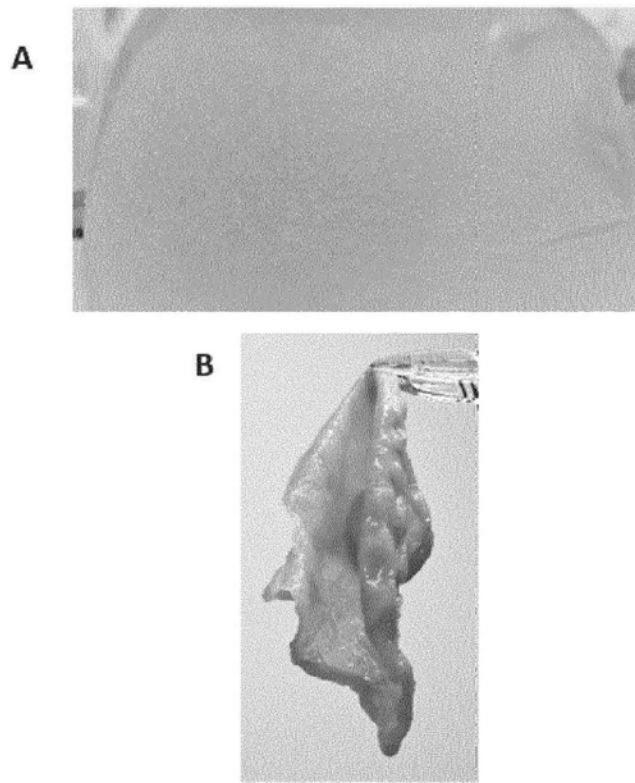


图20

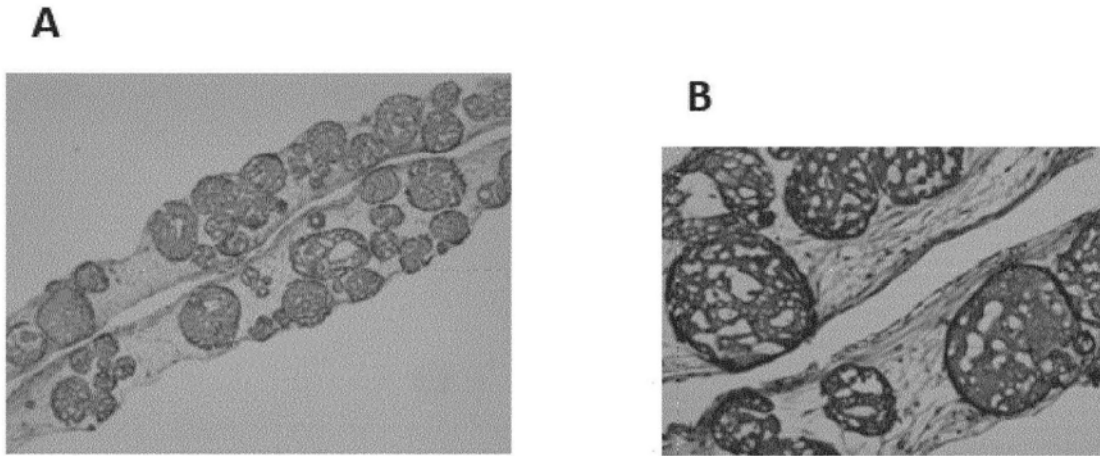


图21

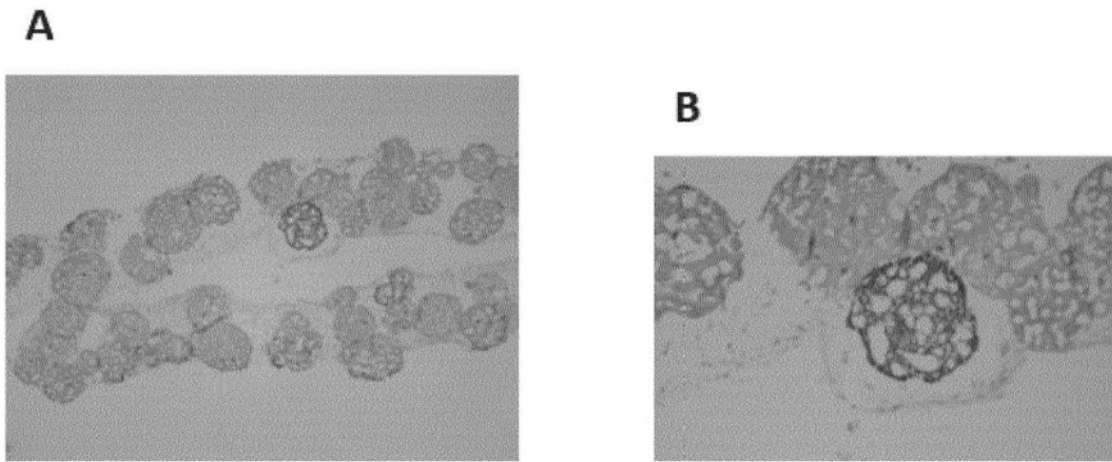


图22

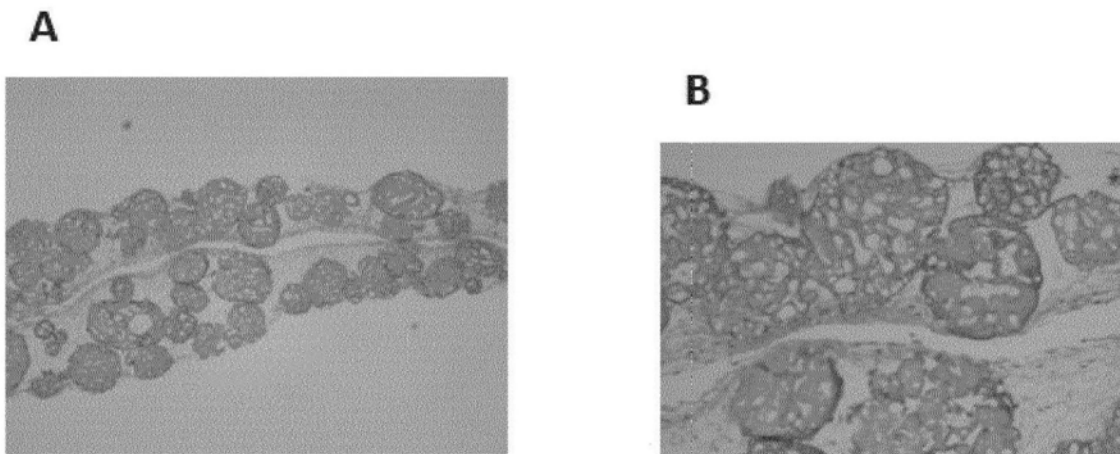


图23

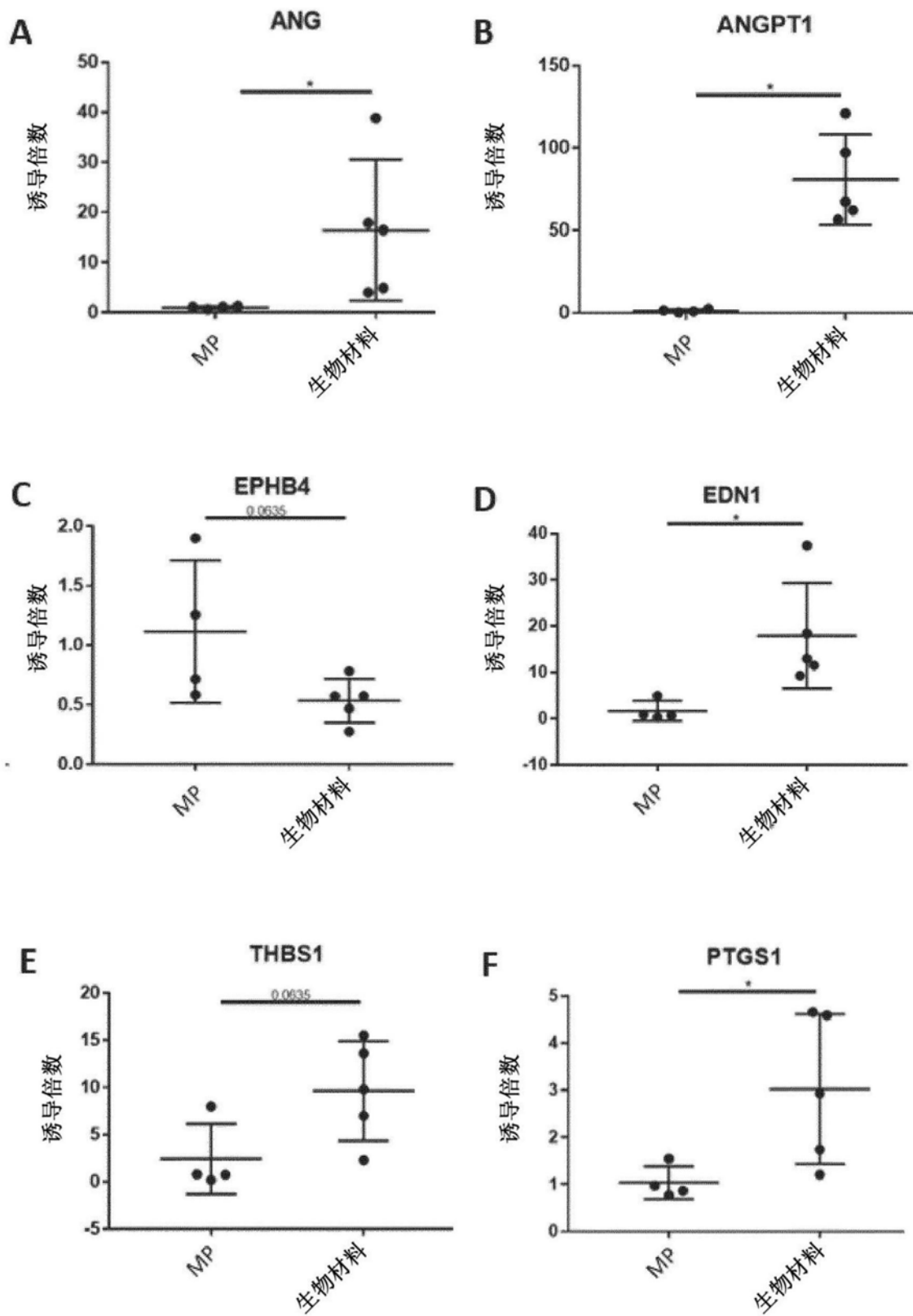


图24A-F

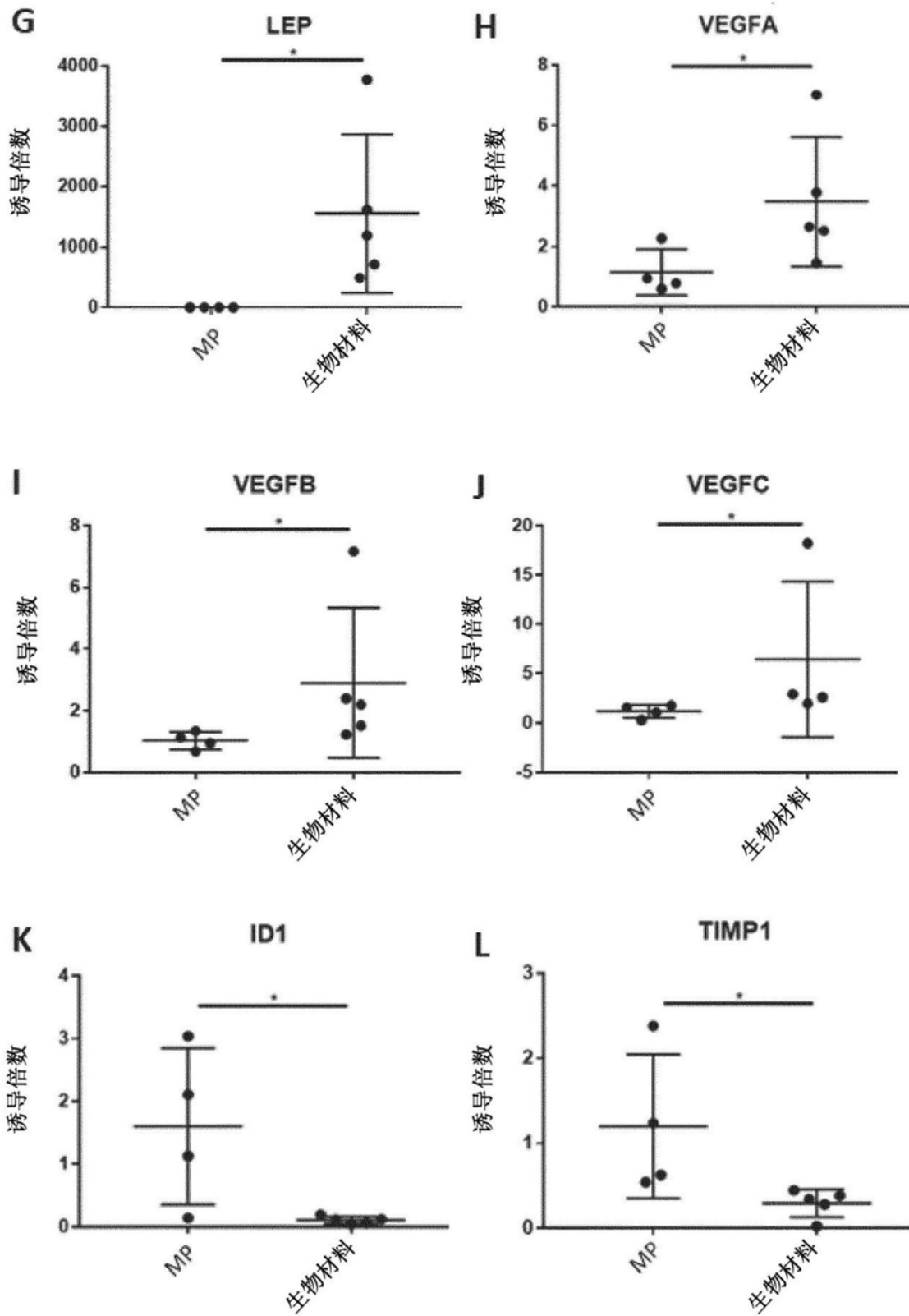


图24G-L

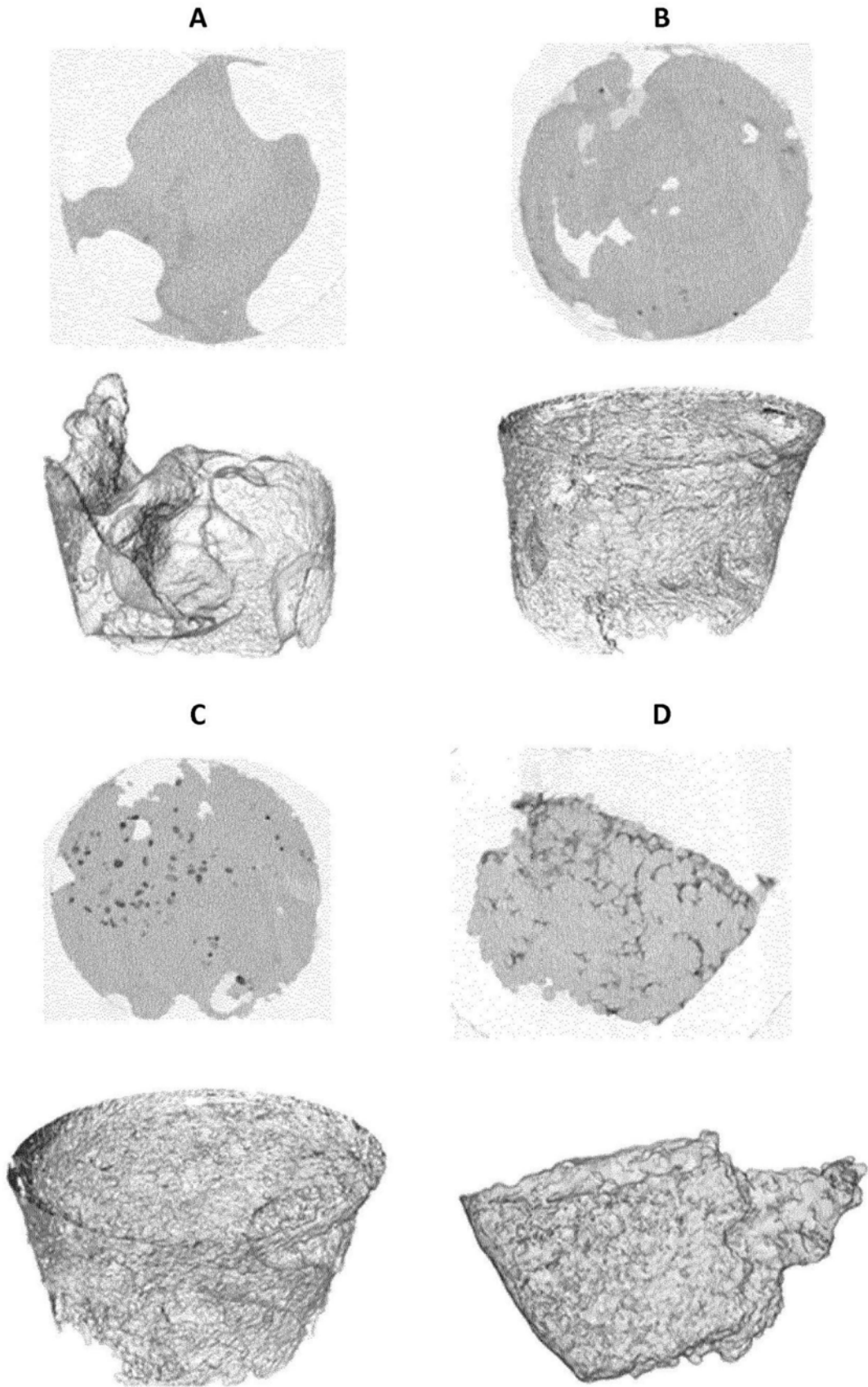


图25

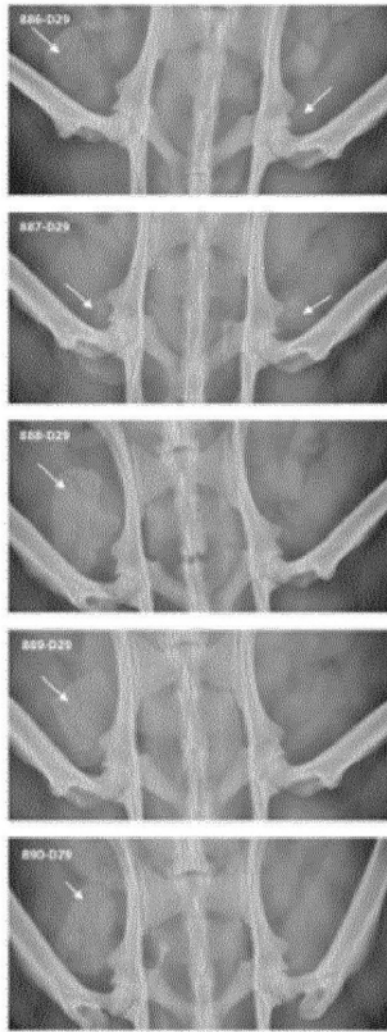


图26

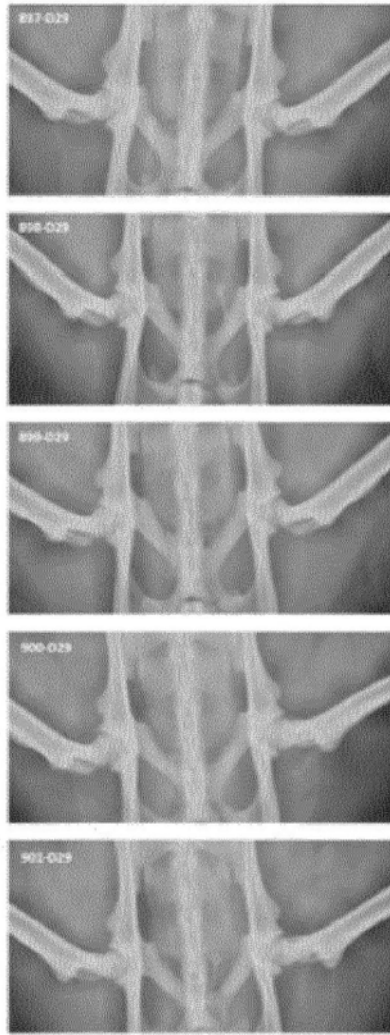


图27

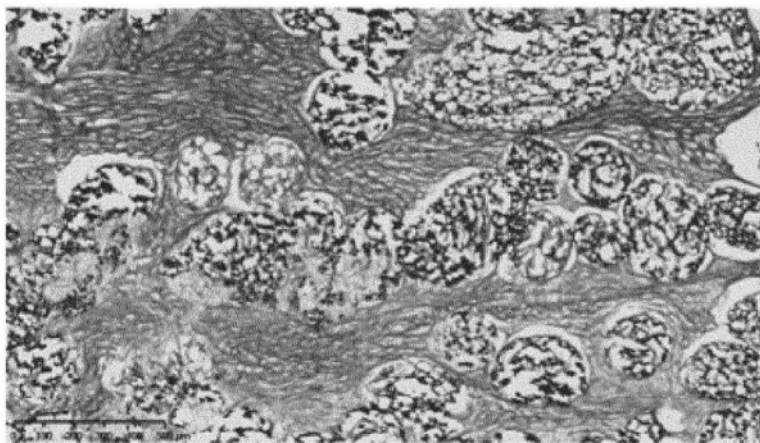


图28

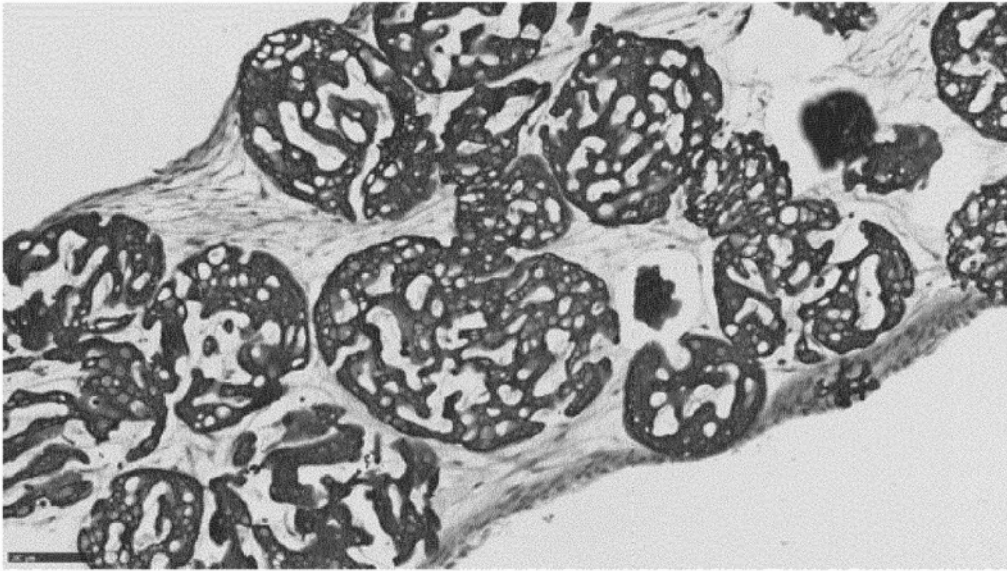


图29

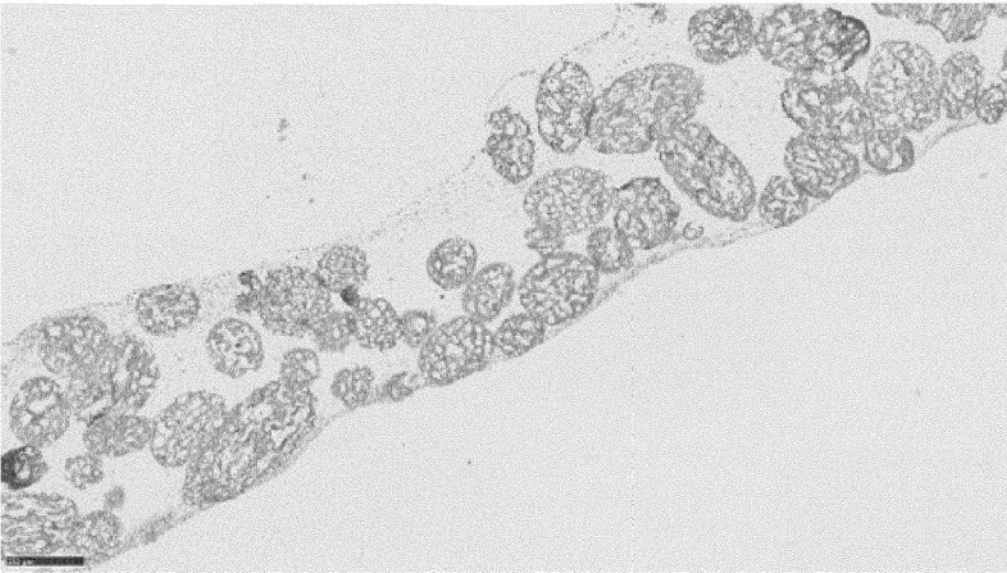


图30

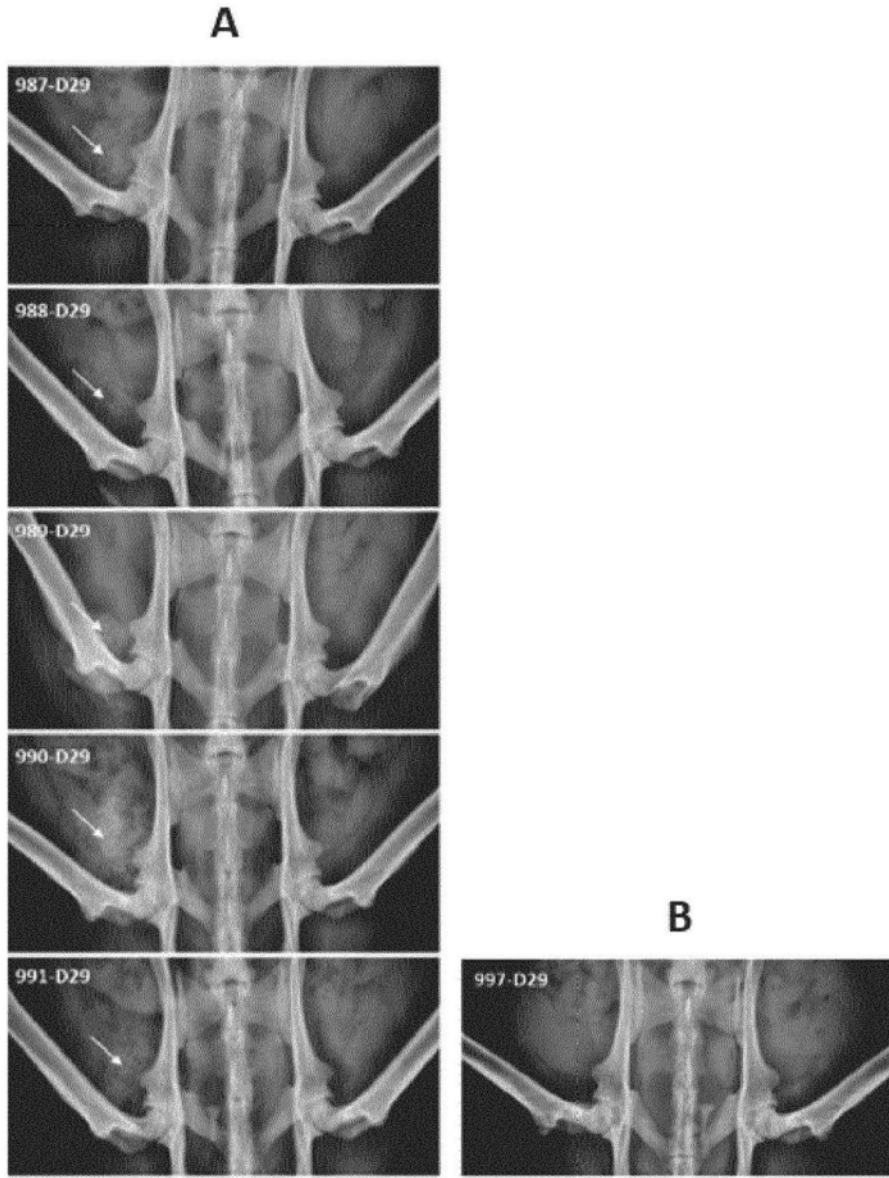


图31

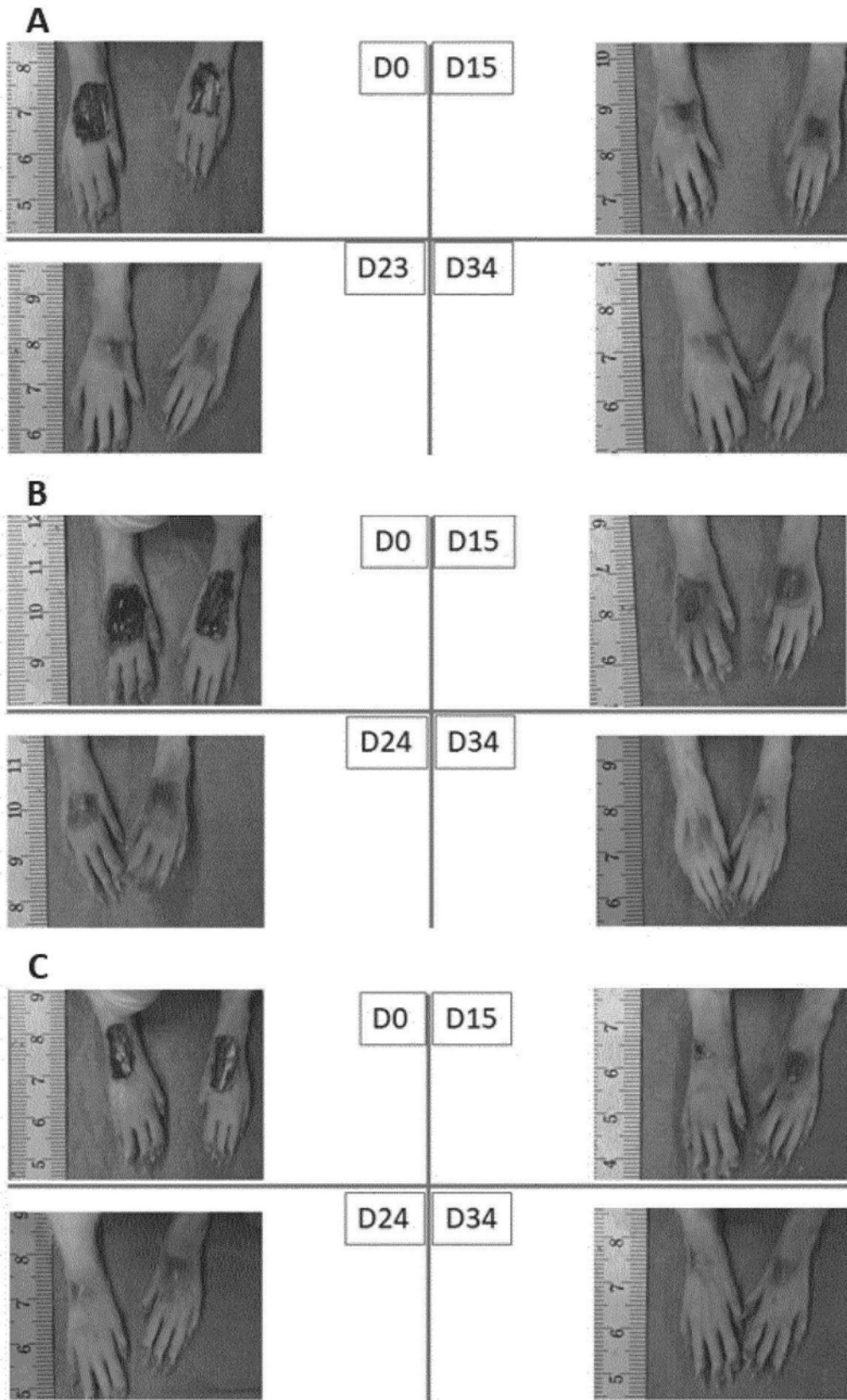


图32

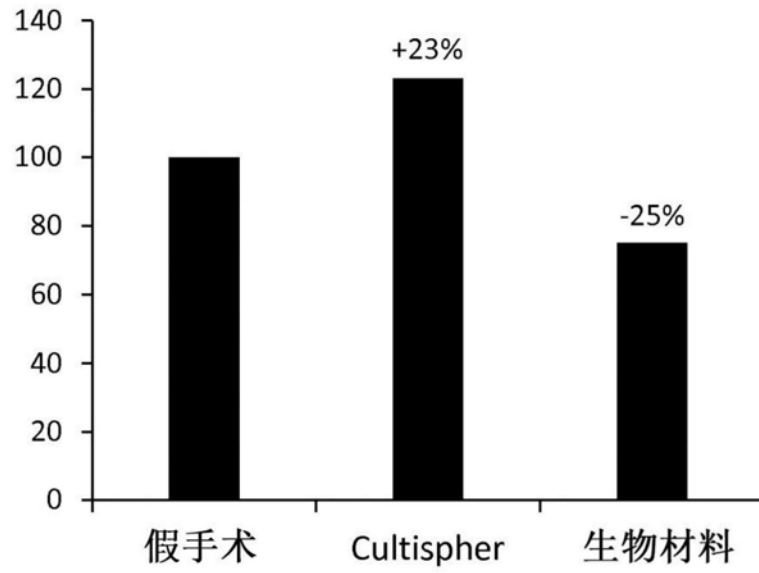


图33

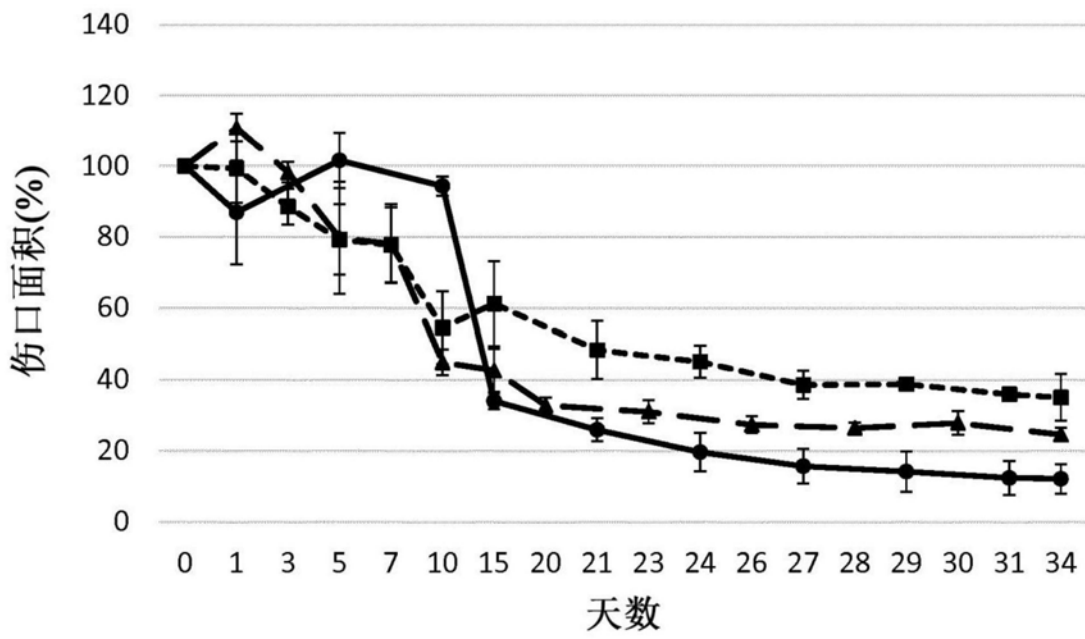


图34

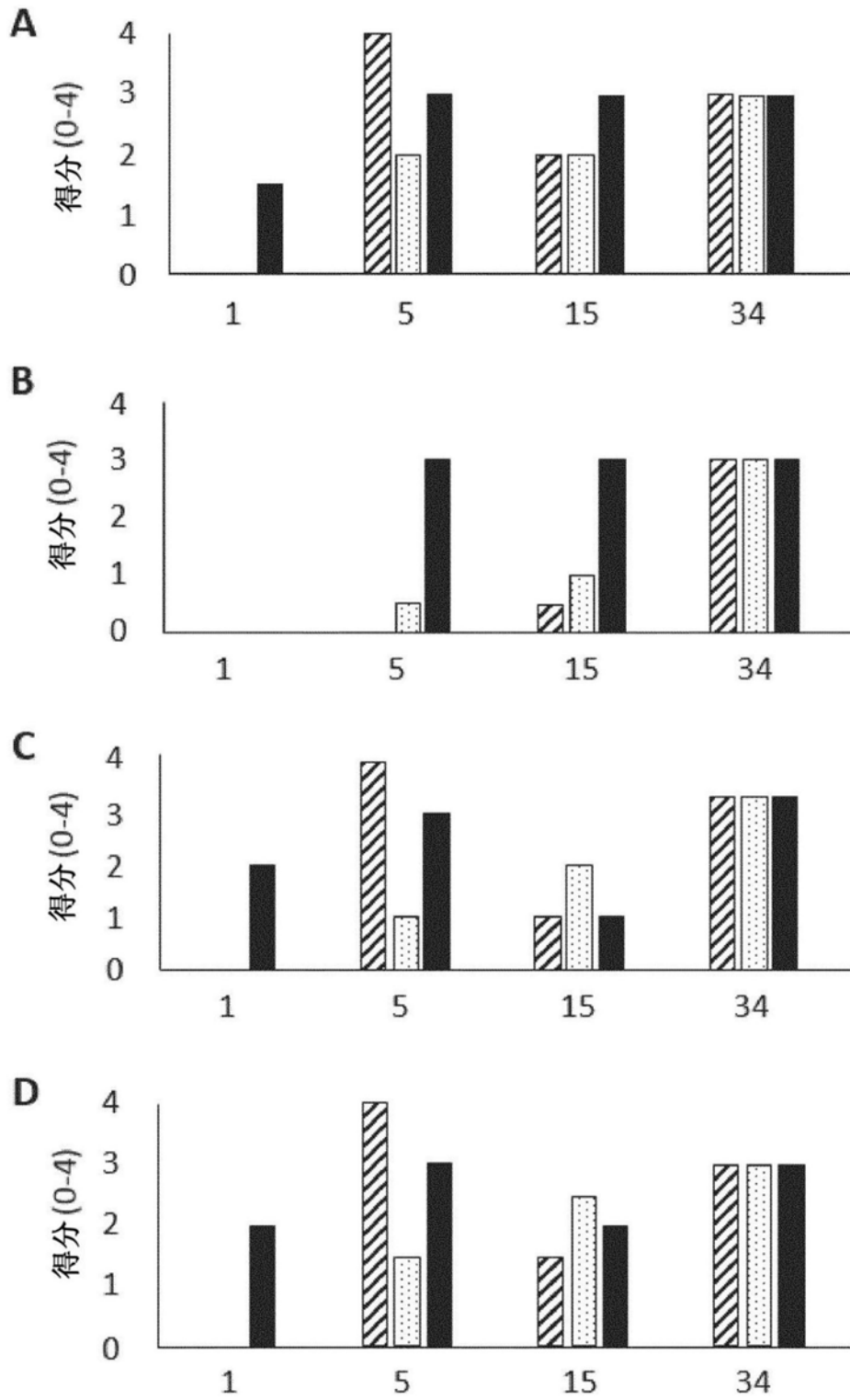


图35