



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202000899 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 01 日

(21) 申請案號：108107473

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 06 日

(51) Int. Cl. :

C12N5/07 (2010.01)

C12N5/00 (2006.01)

C12N5/02 (2006.01)

C12N5/077 (2010.01)

(30) 優先權：2018/03/06

美國

62/639,322

(71) 申請人：美商艾沛邦股份有限公司 (美國) EPIBONE, INC. (US)

美國

(72) 發明人：布利拉德納 賽琳德 BHUMIRATANA, SARINDR (TH)；凱利 泰瑞安 KELLY, TERRI-ANN (JM)；傑佛瑞斯 艾瑞克 米德 JEFFRIES, ERIC MEADE (US)；班奧莉維亞 史班瑟 BEANE, OLIVIA SPENCER (US)；黃 或君 HUANG, ANGELA HAI (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：15 共 79 頁

(54) 名稱

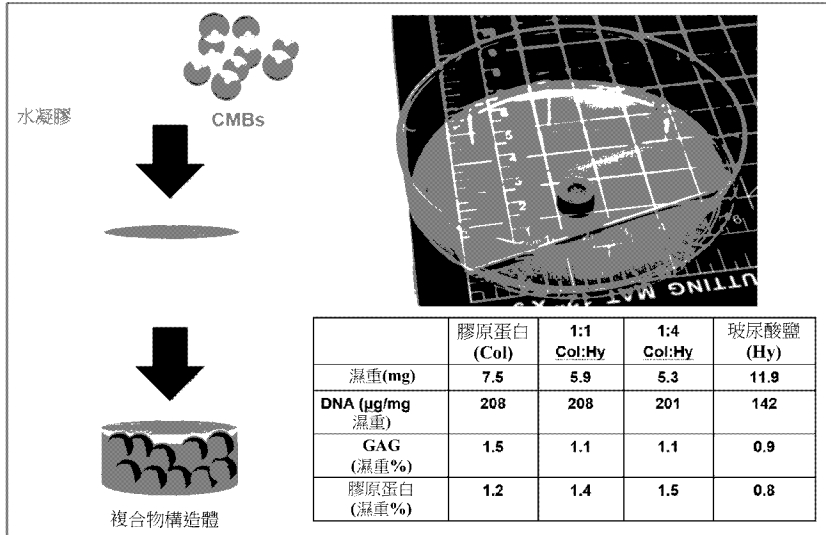
可注射之即用軟骨、肌腱及韌帶修復組合物及使用方法

(57) 摘要

本發明提供包含凝聚的間葉細胞體及水凝膠之組合物。該等組合物可進一步包括藥物或生長因子。該凝聚的間葉細胞體可包括結締組織細胞，或甚至能夠產生諸如膠原蛋白及葡萄糖胺聚糖之結締組織胞外基質之祖細胞。亦提供治療結締組織缺陷、軟骨損傷及軟骨退化之方法。

Compositions comprising a condensed mesenchymal cell body and a hydrogel are provided. The compositions may further include drugs or growth factors. The condensed mesenchymal cell body may include a connective tissue cell, or even a progenitor cell capable of producing connective tissue extracellular matrices such collagen and glycosaminoglycan. Also provided are methods of treating connective tissue defects, cartilage injury, and cartilage degradation.

指定代表圖：



【圖8】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

可注射之即用軟骨、肌腱及韌帶修復組合物及使用方法

【英文發明名稱】

INJECTABLE OFF-THE-SHELF CARTILAGE, TENDON, AND
LIGAMENT REPAIR COMPOSITIONS AND METHODS OF USE

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 軟骨損傷每年影響約一百萬美國人，導致超過50萬台軟骨相關手術[1]。治療軟骨損傷之當前方法包括清創術及微骨折術[2]、骨髓刺激、自體軟骨細胞植入(*autologous chondrocyte implantation* ; ACI) [3]、基質誘導之自體軟骨細胞植入(*matrix-induced autologous chondrocyte implantation* ; MACI) [4]、馬賽克鑲嵌術(*mosaicplasty*) [5]、骨軟骨自體移植及骨軟骨同種異體移植[6-8]。每年進行至少350,000個膝蓋關節形成術，其中> 60%之病例中存在軟骨病灶[9]。預測該等手術之數目會由於人口增長、長壽及診斷工具之進步而增加。

【0002】 軟骨病灶常常與其他關節損傷相關，且可發展為關節退化及骨關節炎(*osteoarthritis* ; OA) [10]。OA影響約20%之美國人，其中10%的患有OA之美國人具有活動侷限性。估計來自OA之每年費用超過1300億美元。世界衛生組織(*World Health Organization*)將OA評為在影響無病生存年限及殘疾方面之第四大病況，而疾病控制與預防中心(*Centers for Disease Control and Prevention*)確定關節炎為美國殘疾之首要原因[11]。骨關節炎甚至作為創傷後骨關節炎(*post-traumatic*

osteoarthritis ; PTOA)影響年輕人[12]。據估計，PTOA引起12%的髌及膝症狀性關節炎，相關費用每年超過30億美元。PTOA及其他常見軟骨損傷尤其影響現役軍人，與平民相比，其所有常見軟骨損傷的發生率約為十倍。作為一實例，ACL及半月板損傷每年分別影響1000名士兵中的3.65名及約6.5名。平民的對應比率為每1000人約0.34人及約0.45人[13]。非常需要治療軍人及年輕人之PTOA及軟骨損傷。

【0003】 治療骨軟骨缺陷之最常見手術為微骨折術、馬賽克鑲嵌術、同種異體移植或自體移植骨軟骨移植、ACI及近年來的MACI。所有技術均具有受尺寸限制、患者年齡及周圍軟骨之品質影響之若干缺點。缺點包括降低之生物機械特性、較長恢復、兩次手術及對供體組織之需求。成功率往往較低，手術後1-5年失敗之風險很高。

【0004】 自體移植骨軟骨移植及同種異體移植骨軟骨移植已用於治療軟骨損傷。已展示自體移植骨軟骨移植在直徑至多3 cm之病灶中有效，且即使在運動員中報導良好至極佳結果[14]。同種異體移植骨軟骨移植先前已用於格鬥士兵中，使其返回至其軍事崗位[15]。然而，已證實當與平民相比時，同種異體移植骨軟骨移植在現役軍人中較不成功。回溯性審查分析同種異體移植骨軟骨移植在現役人群膝蓋中的有效性，重點關注患者在手術後恢復至其狀態的能力[16]。儘管針對膝蓋之大的病灶之手術的此方法在平民患者中具有良好的成功率，但未能確保使受傷士兵繼續執勤，特別在其佔據體力要求高的軍事崗位時。藉由同種異體移植骨軟骨移植治療之許多患者尚未能夠在其先前角色中繼續執勤。對軍隊中彼等在軍隊中幾乎沒有替代選項之人來說，需要經改善之移植療法。對於彼等過著體力上較為活躍之生活方式的人，諸如專業及業餘運動員、消防員及警察，亦需要經改

善之移植療法。

【0005】 在製備用於移植之軟骨時仍需要改善。長時間以來，軟骨已成為組織工程化領域之主要關注點，此係由於強烈的臨床需要、此組織之無血管性質及低細胞密度。軟骨組織工程化已藉由利用自天然軟骨提取之初代軟骨細胞而大大進展。此等高活性，但表型穩定且成熟的細胞可產生軟骨基質。甚至簡單培養系統能夠對來自厚數毫米之初代軟骨細胞之可用軟骨組織構造體進行工程化。此外，在生物反應器中與動態流動環境一起培育產生具有與親本軟骨類似之生物化學組合物及機械硬度之軟骨。在軟骨組織工程化中，幼年牛軟骨細胞已與骨架材料結合使用以使機械特性接近於天然組織之機械特性的軟骨工程化[17, 18]。然而，此等方法具有有限可用性及自成人類軟骨細胞產生功能性軟骨之有限能力。

【0006】 除軟骨損傷以外，結締組織損傷為持續性臨床難題。在美國，受損肌腱、韌帶及關節囊每年占所報導之3200萬肌肉骨骼損傷之45%。此外，由於運動參與及老齡人口增加，此等發病率上升。結締組織非常難以修復。當前治療策略通常包括用骨骼-肌腱-骨骼自體移植物(諸如膝蓋骨肌腱)外科手術重建。此多組織組合物改善至宿主組織的固定及整合。然而，此等自體移植物不能充分模擬原始組織且不能恢復損傷前組織功能、複雜生物化學特性及接骨點結構。因此，自體移植物手術與高失敗率相關聯且需要校正手術，從而損害患者生活品質。

【0007】 祖細胞幹細胞具有形成軟骨及結締組織之潛能。已研究工程化來自幹細胞之軟骨及結締組織的許多嘗試，其目的為完全再生具有天然形式及功能之軟骨。軟骨樣組織可以間葉幹細胞[19]或軟骨細胞(諸如Neocart及MACI)為起始物質在活體外生長。然而，使用此等產物需要用

於投與之侵入性手術。尚未成功的產物旨在藉由微創手術(諸如關節鏡手術)再生軟骨及結締組織，或為現成的容易獲得的組織。

【0008】 鑒於以上，需要提供藉由再生天然樣組織來治療軟骨及/或骨軟骨缺陷之產物之經改善之組合物。

【發明內容】

【0009】 本文描述用於再生骨骼及結締組織(諸如軟骨、肌腱及韌帶)以用作多個缺陷範圍之治療模式的經改善之組合物及方法，該等缺陷諸如由於各種原因(諸如創傷、組織退化、創傷後骨關節炎、關節炎等)出現的軟骨/骨軟骨缺陷、軟骨、半月板組織、韌帶、肌腱及肌肉之撕裂或斷裂。

【0010】 本文所述之組合物及方法包括用於治療結締組織缺陷(諸如關節或非關節軟骨缺陷、肌腱缺陷及韌帶缺陷)之新穎及經改善的方法。優點包括：(1)可注射平台，其允許植入各種缺陷尺寸及幾何結構中；(2)易用性及精確填充缺陷；(3)可經歷軟骨生成、肌腱生成、組織生成且形成對於持久功能為重要的天然組織樣架構之祖細胞；(4)細胞發育成具有生物機械特性(壓縮模數、摩擦係數、拉伸強度及剪切強度)之天然樣組織之能力；(5)由細胞產生之凝聚的間葉細胞體在活體內成熟以使得與宿主組織形成無縫的機械性能良好的界面；及(6)基於現成的細胞之組織產物，其可按需求易於用於治療創傷性軟骨及結締組織損傷。細胞可在整個培養物中及在注射或植入前後存活。促進組織整合至宿主中。可避免重複手術及組織發病，以及臨床結果得到改善且恢復時間縮短。

【0011】 在一個態樣中，提供包含凝聚的間葉細胞體(CMB)及水凝膠之組合物。CMB可由會經歷軟骨生成之細胞產生。可替代地，CMB可

由形成結締組織之細胞產生。結締組織可包含膠原蛋白、蛋白聚糖、玻尿酸或彈性蛋白。膠原蛋白可包括I型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型或XI型膠原蛋白。蛋白聚糖可包括葡萄糖胺聚糖、硫酸乙醯肝素或硫酸軟骨素。CMB可發育成包含各種類型之胞外基質(extracellular matrix ; ECM)之組織。ECM可包含例如膠原蛋白、葡萄糖胺聚糖、彈性蛋白、纖維結合蛋白及/或層黏連蛋白。視產生何種結締組織類型而定，組合物可視情況包含一或多種藥物或生長因子。

【0012】 在一些實施例中，組合物進一步包含聚合物微球，其中生長因子中之一或多者囊封於聚合物微球中。在一些實施例中，該聚合物微球包含聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA)、聚(乳酸) (PLA)或PLGA及PLA之組合。在一些實施例中，CMB包含選自結締組織細胞及能夠形成軟骨細胞、肌腱細胞、韌帶細胞或半月板細胞之祖細胞的細胞。在一些實施例中，CMB包含自軟骨、肌腱、韌帶或半月板分離之細胞。在一些實施例中，細胞為肌腱細胞、肌腱母細胞、纖維細胞或纖維母細胞。在一些實施例中，CMB為軟骨細胞、選自間葉幹細胞(MSC)、胚胎幹細胞(ESC)、經誘導之多能幹細胞(iPS)之祖細胞、或自諸如軟骨、肌腱、韌帶及半月板之天然組織提取的細胞，其包括但不限於肌腱細胞、肌腱母細胞、纖維細胞、纖維母細胞。在一些實施例中，CMB包含幹細胞。在一些實施例中，幹細胞選自間葉幹細胞(MSC)、脂肪衍生之幹細胞(ADSC)、骨髓衍生之幹細胞(BMSC)、臍帶血幹細胞(UB-MSC)、神經脊幹細胞、經誘導之多能幹細胞、胚胎幹細胞、初代軟骨細胞及神經脊幹細胞。

【0013】 在一些實施例中，細胞或幹細胞(例如，MSC、ADSC、BMSC或UB-MSC)來自異源來源或自體來源。在一些實施例中，細胞或

幹細胞(例如, MSC、ADSC、BMSC或UB-MS)為抗免疫原性的及/或免疫抑制劑(參見例如Gimble, J.M.等人, 「Adipose-Derived Stromal/Stem Cells: A Primer」 Organogenesis, 2013, 9(1):3-10.)。在一些實施例中, CMB及/或細胞在約-80°C或低於約-80°C之溫度下冷凍保存或儲存至少約一天。在一些實施例中, CMB及/或細胞在約-196°C或低於約-196°C之溫度下冷凍保存或儲存至少約一天、約兩天、約三天、約四天、約五天、約六天或約一週。在一些實施例中, CMB及/或細胞在約-1°C至-25°C之間、或低於約-1°C之零下溫度下冷凍保存或儲存至少約一天、約兩天、約三天、約四天、約五天、約六天或約一週。在一些實施例中, CMB在約-20°C下、在-20°C下或在低於約-20°C下儲存至少一天、約兩天、約三天、約四天、約五天、約六天或約一週。在一些實施例中, CMB在約-10°C下、在-10°C下或在低於約-10°C下儲存至少一天、約兩天、約三天、約四天、約五天、約六天或約一週。在一些實施例中, CMB及/或細胞在約1°C至30°C之間、或低於約30°C之零下溫度下低溫保存或儲存至少約一天、約兩天、約三天、約四天、約五天、約六天或約一週。在一些實施例中, CMB在約4°C下、在4°C下或在低於約4°C下儲存至少一天、約兩天、約三天、約四天、約五天、約六天或約一週。在一些實施例中, CMB在約25°C下、在25°C下或在低於約25°C下儲存至少一天、約兩天、約三天、約四天、約五天、約六天或約一週。

【0014】 在一些實施例中, CMB中之細胞在細胞表面上不表現大量或可偵測量之人類白血球抗原(human leukocyte antigen; HLA) II類、CD40、CD80或CD86。在一些實施例中, 根據免疫檢定, 例如包括流式細胞量測術、ELISPOT、定量PCR及混合淋巴細胞反應檢定中之一或多

者的檢定，CMB中之細胞在細胞表面上不表現大量或可偵測量之人類白血球抗原(HLA) II類、CD40、CD80或CD86。

【0015】 在一些實施例中，CMB中之細胞在細胞表面上表現大量CD73、CD90、CD105或CD146。在一些實施例中，CMB中之細胞在細胞表面上表現可偵測量之CD73、CD90、CD105或CD146。在一些實施例中，根據免疫檢定，例如包括流式細胞量測術、ELISPOT、定量PCR及混合淋巴細胞反應檢定中之一或多者的檢定，CMB中之細胞在細胞表面上不表現大量CD73、CD90、CD105或CD146。在一些實施例中，根據免疫檢定，例如包括流式細胞量測術、ELISPOT、定量PCR及混合淋巴細胞反應檢定中之一或多者的檢定，CMB中之細胞在細胞表面上不表現可偵測量之CD73、CD90、CD105或CD146。

【0016】 在一些實施例中，水凝膠選自纖維蛋白膠、富血小板血漿(platelet-rich plasma; PRP)、I型膠原蛋白、II型膠原蛋白、聚葡萄糖胺糖、明膠、聚乙二醇二丙烯酸酯、玻尿酸、以及纖維蛋白膠、PRP、I型膠原蛋白、II型膠原蛋白、聚葡萄糖胺糖、明膠、聚乙二醇二丙烯酸酯及玻尿酸之任何組合。在一些實施例中，生長因子選自TGF- β 超家族成員，其包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8。在一些實施例中，生長因子選自TGF- β 超家族成員，其包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8及任何組合，其已展示協同地起作用(Choi, S.等人, *Int. J. Oral. Sci.*, 2013, 5(1):7-13及Hildner, F.等人, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2010, 94(3):978-87.)。

【0017】 在一些實施例中，生長因子為TGF- β 超家族成員。在一些實施例中，生長因子為選自由以下組成之群之形態形成蛋白：OP-1、OP-2、OP-3、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-15、BMP-16、BMP-17、BMP-18、DPP、CTGF、Vg1、Vgr-1、60A蛋白、GDF-1、GDF-2、GDF-3、GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-9、GDF-10、GDF-11、GDF-12、CDMP-1、CDMP-2、CDMP-3、NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP、NEURAL。在一些實施例中，組合物進一步包含以下中之一或多者：胰島素、運鐵蛋白、人類血清白蛋白、脯胺酸、牛血清白蛋白、硒酸、亞麻油酸、地塞米松(dexamethasone)及抗壞血酸。

【0018】 在一些實施例中，CMB中之細胞呈懸浮狀態。

【0019】 在一些實施例中，CMB由至少1,000個細胞形成。在一些實施例中，CMB由至少5,000個細胞、至少10,000個細胞、至少15,000個細胞、至少20,000個細胞、至少25,000個細胞、至少30,000個細胞、至少40,000個細胞、至少50,000個細胞、至少60,000個細胞、至少70,000個細胞、至少80,000個細胞、至少90,000個細胞、至少100,000個細胞、至少125,000個細胞、至少150,000個細胞、至少175,000個細胞、至少200,000個細胞、至少225,000個細胞、至少250,000個細胞、至少300,000個細胞、至少400,000個細胞或至少500,000個細胞產生。

【0020】 在一些實施例中，CMB之尺寸均勻。舉例而言，CMB之直徑可為約200 μm 、約300 μm 、約400 μm 、約500 μm 、約600 μm 、約800 μm 、約1 mm、約1.2 mm、約1.4 mm、約1.6 mm、約1.8 mm、約2.0

mm、約2.2 mm、約2.4 mm、約2.6 mm、約2.8 mm或約3 mm。

【0021】 在一些實施例中，CMB之尺寸變化。CMB之直徑可為200 μm 至3.0 mm。CMB之直徑可為200 μm 至800 μm 。CMB之直徑可為400 μm 至1.0 mm。CMB之直徑可為600 μm 至1.2 mm。CMB之直徑可為800 μm 至1.6 mm。CMB之直徑可為1.0 mm至1.8 mm。CMB之直徑可為1.2 mm至2.0 mm。CMB之直徑可為1.4 mm至2.4 mm。CMB之直徑可為2.0 mm至3.0 mm。

【0022】 在一些實施例中，組合物為可注射的。

【0023】 在另一態樣中，提供一種治療患者之軟骨缺陷的方法，該方法包含將上文及本文所述之組合物中之任一者投與至軟骨中或投與至軟骨周圍之區域中。

【0024】 在另一態樣中，提供一種預防患者之軟骨退化或治療軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症的方法，該方法包含將上文及本文所述之組合物中之任一者投與至軟骨中或投與至軟骨周圍之區域中。

【0025】 在以上方法之一些實施例中，軟骨為關節軟骨。在以上方法之一些實施例中，軟骨為非關節軟骨。在一些實施例中，非關節軟骨選自由以下組成之群：鼻軟骨、耳軟骨、氣管支氣管軟骨、肋軟骨、半月板及椎間盤。在一些實施例中，該方法可有效地在軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成包含1-20% (w/w)葡萄糖胺聚糖(GAG)之軟骨組織。在一些實施例中，該方法可有效地形成包含0.5-20% (w/w)膠原蛋白之軟骨組織。在一些實施例中，該方法可有效地在軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成包含至少1.2% (w/w)、1.3% (w/w)、1.4% (w/w)、1.5% (w/w)或1.6%

(w/w)膠原蛋白之軟骨組織。在一些實施例中，該方法可有效地在軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成楊氏模數為至少100 kPa且摩擦係數為至多0.8之軟骨。

【0026】 在一些實施例中，該方法可有效地在該軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成軟骨，且其中該軟骨在該部位處或該部位周圍與任何鄰近軟骨及軟骨下骨組織整合。

【0027】 在一些實施例中，該方法可有效地在組織撕裂或破裂、組織退化、損傷或退化性病變之部位中將天然組織連接在一起。在各種實施例中，諸如肌腱、韌帶、半月板、肌肉之組織與諸如軟骨、骨骼、肌肉之任何鄰近組織、其他結締組織或相同類型之組織整合。

【0028】 在另一態樣中，提供一種使用任何本文所述之組合物活體外或活體內形成軟骨組織的方法。

【0029】 在另一態樣中，提供一種治療患者之撕裂或斷裂結締組織的方法，該方法包含將以上組合物中之任一者投與至撕裂或斷裂結締組織中或投與至撕裂或斷裂結締組織周圍之區域中。在一些實施例中，該結締組織為韌帶、肌腱或半月板。

【圖式簡單說明】

【0030】 圖1展示測試低溫貯藏對ADSC介導之軟骨生成之影響的方案。左邊在「細胞(2-D)」下為展示在形成CMB之前如何處理ADSC之示意圖。「新鮮」ADSC不經歷任何冷凍保存，而「SVF低溫」及「p1低溫」ADSC在冷凍保存下且儲存在液氮中至少一個月。在冷凍保存之前，「p1低溫」ADSC經歷單次繼代，而「SVF低溫」ADSC在冷凍保存之前不繼代。右邊在「集結粒3-D」下為在多孔盤中形成CMB，隨後在測試樣

品中冷凍保存另一輪之描述。為了形成CMB，接種自新鮮人類脂肪抽吸物採集之基質體積部分(SVF)，且當採集ADSC時使其繼代至P0至P10，且以250,000個細胞/毫升再懸浮於軟骨形成培養基中。隨後，每孔1 mL細胞懸浮液分配於96孔深孔盤中，且在300 g下離心5分鐘。離心之後，將CMB保留在軟骨形成培養基中。

【0031】 圖2展示在未冷凍保存(新鮮)之樣品及ADSC中群體倍增時間相對於脂肪細胞衍生之幹細胞(ADSC)之繼代次數之圖，該等樣品在採集後立即冷凍保存，隨後解凍且繼代一至四次(SVF低溫)，且ADSC繼代一次、冷凍保存、解凍且繼代一至四次(P1低溫)。

【0032】 圖3展示用於測試冷凍保存對ADSC之影響的方案。該方案類似於圖1之方案，除了CMB不冷凍保存。

【0033】 圖4A-4F展示針對新鮮、SVF低溫及P1低溫ADSC群體之各種參數的測試結果。測試結果展示培養物中之新鮮、SVF低溫及P1低溫群體中之各者之直徑(圖4A)、濕重(圖4B)、DNA與濕重之質量比(圖4C)、GAG與濕重之質量比(圖4D)、膠原蛋白與濕重之質量比(圖4E)及外觀(圖4F)。圖4F中之比例尺為0.5 mm。

【0034】 圖5展示用於測試冷凍保存對由ADSC製備之凝聚的間葉細胞體(CMB)之集結粒之影響的方案。

【0035】 圖6A-6F展示針對新鮮、SVF低溫及P1低溫ADSC群體之各種參數的測試結果。測試結果展示培養物中之新鮮、SVF低溫及P1低溫群體中之各者之直徑(圖6A)、濕重(圖6B)、DNA與濕重之質量比(圖6C)、GAG與濕重之質量比(圖6D)、膠原蛋白與濕重之質量比(圖6E)及外觀(圖6F)。

【0036】 圖7A展示藉由流式細胞量測術分析軟骨形成CMB上之各種抗原的結果。在ISO抗體用作陰性對照物之情況下看見陰性表現，而在CD59及CD90用作陽性對照之情況下看見陽性表現。所測試之免疫原性標記物HLA II類、CD40、CD80及CD86之表現呈陰性。

【0037】 圖7B展示活ADSC上之各種抗原之表現量。

【0038】 圖8展示測試水凝膠與CMB在聚矽氧外植體缺陷模型中之組合的實驗方案。

【0039】 圖9A為在骨軟骨缺陷模型中之空缺陷之照片。圖9B為展示膠原蛋白凝膠-CMB填充之缺陷之照片。圖9C為展示保持缺陷內之填充組分之膠原蛋白凝膠-CMB填充之缺陷之半部分的照片。

【0040】 圖10A展示用於隨時間檢查藥物釋放之實驗方案。圖10B展示生長因子隨時間之所觀測之釋放。

【0041】 圖11A展示負載及未負載對照軟骨填充劑之GAG含量類似。

【0042】 圖11B展示按濕重計，與約5%膠原蛋白之未負載對照相比，負載將膠原蛋白含量提高至濕重之10%。

【0043】 圖12展示軟骨填充劑產物之示意性製造及遞送方法。製備個別細胞、水凝膠及生長因子組分，儲存直至需要，且隨後在針筒中組合以注入缺陷部位中。

【0044】 圖13展示纖維蛋白及各種玻尿酸/膠原蛋白水凝膠調配物遞送至牛軟骨外植體缺陷中。組合物之不透明度及保持率不同。

【0045】 圖14展示將一種具有CMB之水凝膠組合物遞送至外植體缺陷中。離體培養之後，新形成組織與天然軟骨整合且呈現與天然軟骨相當

之葡萄糖胺聚糖及膠原蛋白含量。

【0046】 圖15A展示用多種CMB、水凝膠及生長因子製造之軟骨構造體。組織可由50,000-250,000個細胞/CMB範圍內之多種細胞量製造。

【0047】 圖15B展示用各種CMB尺寸製造之軟骨構造體之組織學染色。結果揭示在實驗組中之相當的葡萄糖胺聚糖及膠原蛋白含量。

【0048】 圖15C展示用各種CMB尺寸製造之軟骨構造體之定量特徵。結果揭示實驗組中之相當的濕重及DNA、GAG及膠原蛋白含量。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0049】 本申請案主張2018年3月6日申請之美國臨時申請案第62/639,322號之優先權，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0050】 為促進對本發明之各種實施例之原理及特徵的理解，下文解釋各種說明性實施例。儘管詳細解釋本發明之例示性實施例，但應理解涵蓋其他實施例。因此，不希望本發明在其範疇內限於以下描述內容或實例中闡述之構造之細節及組分之配置。本發明能夠具有其他實施例或能夠以各種方式來實踐或進行。此外，在描述例示性實施例時，為了清楚起見，將採用特定術語。

定義

【0051】 必須注意，除非上下文另外明確指示，否則如本文所用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個參考物。舉例而言，提及一種組分亦意欲包括複數種組分之組合物。提及含有「一種」成分之組合物意欲包括除了指定成分之外的其他成分。換言之術語「一(a/an)」及「該」不表示量之限制，而實際上表示存在所提及項中之「至少一種」。

希望各術語涵蓋如由熟習此項技術者所理解之其最廣泛含義，且包括以類似方式操作以實現類似目的之所有技術等效物。

【0052】 範圍可在本文中表示為「約」、「大約」或「實質上」一個特定值及/或至「約」或「大約」或「實質上」另一特定值。當表示此類範圍時，其他例示性實施例包括一個特定值及/或至另一特定值。此外，術語「約」意謂如由一般熟習此項技術者所測定在特定值之可接受誤差範圍內，其將部分地視量測或測定值之方式，亦即量測系統之侷限性而定。舉例而言，根據此項技術中之實踐，「約」可意謂在可接受標準差內。可替代地，「約」可意謂在給定值之至多 $\pm 20\%$ ，較佳至多 $\pm 10\%$ ，更佳至多 $\pm 5\%$ 且再更佳至多 $\pm 1\%$ 之範圍內。可替代地，尤其相對於生物系統或方法，該術語可意謂在值之數量級內，較佳在兩倍內。若特定值描述於本申請案及申請專利範圍中，除非另外陳述，否則術語「約」為隱含的且在此上下文中意謂在特定值之可接受誤差範圍內。

【0053】 「包含」、「含有」或「包括」意謂至少已指定的化合物、元素、粒子或方法步驟存在於組合物或製品或方法中，但不排除其他化合物、材料、粒子、方法步驟之存在，即使其他該等化合物、材料、粒子、方法步驟具有與已指定的相同的功能。

【0054】 如本文所用，且除非另外規定，否則術語「水凝膠」及「骨架」可意謂但絕不限於本文所教示及所描述之水凝膠組合物，其包含包括離子、水溶性多醣之聚合物網，例如纖維素(例如，NaCS或NaCP)。

【0055】 如本文所用，術語「膠原蛋白」可意謂但絕不限於作為結締組織之主要組分存在的胞外密切相關之蛋白質之家族中之任一者。存在至少14種類型，各自由共用共同三螺旋形狀但在各類型之間組成略微不同

的原膠原蛋白單元構成，其中該等類型定位於不同組織、階段或功能。在包括最常見的I型之一些類型中，原膠原蛋白棒締合以形成原纖維或纖維；在其他類型中，該等棒不為原纖維的，但與原纖維膠原蛋白相關，而在其他類型中其形成非原纖維、非週期性但結構化的網。軟骨可含有軟骨細胞或軟骨細胞樣細胞及胞內材料、蛋白聚糖及其他蛋白。軟骨包括關節及非關節軟骨。

【0056】 亦稱為透明軟骨之「關節軟骨」係指無血管的非礦化結締組織，其在各關節中覆蓋骨骼之關節面，且充當兩個相對骨骼表面之間之減少摩擦的界面。關節軟骨允許關節移動而無骨骼與骨骼直接接觸。軟骨表面宏觀上看起來光滑且有珠光，且在高功率放大率下呈細粒狀。關節軟骨與II型及IX型膠原蛋白及各種良好表徵之蛋白聚糖之存在相關，且與X型膠原蛋白之缺乏相關，其與軟骨內化骨形成相關。

【0057】 「非關節軟骨」係指不覆蓋關節面且包括纖維軟骨(包括關節間纖維軟骨、纖維軟骨盤，其連接纖維軟骨及周圍纖維軟骨)及彈性軟骨的軟骨。在纖維軟骨中，微多醣網與突出的膠原蛋白束交錯，且比起在透明或關節軟骨中軟骨細胞更廣泛地分散。發現關節間纖維軟骨在暴露於腦震盪且經歷頻繁移動之關節中，例如，膝蓋之半月板。該等關節之實例包括但不限於顛下頷關節、胸鎖關節、肩鎖關節、腕關節及膝蓋關節。次級軟骨關節由纖維軟骨盤形成。

【0058】 術語「細胞」可意謂但絕不限於其常見生物學意義，且不只指整個多細胞生物體。細胞可例如在活體內、活體外或離體，例如在細胞培養物中，或存在於多細胞生物體(包括例如鳥類、植物及哺乳動物，諸如人類、奶牛、綿羊、猿、猴、豬、犬及貓)中。細胞可為原核細胞(例

如，細菌細胞)或真核細胞(例如，哺乳動物或植物細胞)。

【0059】 術語「纖維素」可意謂但絕不限於其常見生物學意義。纖維素為具有式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 之有機化合物，一種由例如具有數百至超過一萬個 $\beta(1\rightarrow4)$ 連接之D-葡萄糖單元之直鏈組成的多醣。

【0060】 術語「缺陷」或「缺陷部位」係指軟骨、骨軟骨組織、半月板、韌帶或肌腱之破壞。缺陷可呈現「空隙」之組態，其應理解為意謂三維缺陷，諸如間隙、空腔、孔或軟骨及/或骨軟骨組織、半月板、韌帶或肌腱之結構完整性之其他實質性破壞。缺陷亦可為軟骨自其連至骨骼或韌帶之連接點脫離。在某些實施例中，缺陷使得其不能進行內源性或自發性修復。缺陷可為事故、疾病及/或外科手術操作之結果。舉例而言，軟骨缺陷可為對關節之創傷的結果，諸如撕裂半月板組織位移至關節中。軟骨缺陷亦可由退化性關節疾病(諸如骨關節炎)產生。

【0061】 如本文所用，術語「生長因子」可包括能夠刺激細胞生長、增殖、修復及細胞分化之物質。生長因子可為藥物。藥物可包括合成物質及天然存在之物質。生長因子包括但不限於骨形態形成蛋白、纖維母細胞生長因子及血管內皮生長因子。

【0062】 如本文所用，術語「聚合物」可意謂但絕不限於由五種或更多種稱為單體之相同組合單元之化學聯合形成的大分子。在大多數情況下，單體之數目相當大，且通常不能精確已知。在合成聚合物中，可在預定程度上控制此數目。兩個、三個或四個單體之組合分別稱為二聚體、三聚體及四聚體，且統稱為寡聚物。聚合物可為無機的(例如，矽氧烷、硫鏈、黑磷、硼氮、聚矽氧)或有機的(意謂含有碳)。

【0063】 如本文所用，術語「均聚物」可意謂但絕不限於衍生自單

一單體之天然或合成聚合物。

【0064】 如本文所用，術語「多醣」可意謂但絕不限於長鏈天然或合成聚合物，其由連接的單糖(單醣)，諸如葡萄糖及/或相關分子(例如，葡萄糖醛酸鹽、半乳糖、半乳糖胺、葡萄糖胺、乙醯基葡萄糖胺)組成。兩個單醣分子可藉由醣苷鍵接合以形成雙醣作為例如在葡萄糖及果糖之鏈中以形成蔗糖。更複雜的多醣，諸如澱粉、肝醣、纖維素或甲殼素由許多藉由醣苷鍵接合之單醣單元組成。

【0065】 術語「修復」係指新組織形成，其足以在缺陷部位至少部分地填充空隙或結構不連續部分，且係指新近形成之組織與天然組織(諸如關節軟骨、非關節軟骨、韌帶及缺陷周圍之肌腱)之任何整合。然而，修復並不意謂完全癒合之過程或對將缺陷恢復至其缺陷前生理/結構/機械狀態100%有效的治療或以其他方式使其成為必需。

【0066】 術語「治療有效量」係指可有效地修復、再生、促進、加速、預防退化或形成軟骨組織之量。

【0067】 術語「患者」係指包括哺乳動物(例如人類)之動物。

【0068】 術語「醫藥學上可接受之載劑」或「醫藥學上可接受之佐劑」係指無毒載劑或佐劑，其可連同本發明之可溶性形態形成蛋白複合物一起向患者投與，基於熟練的從業者之知識，該可溶性形態形成蛋白複合物不破壞其藥理學活性，且不引起不可接受之免疫反應(例如，嚴重過敏或過敏性休克)。實例包括但不限於標準醫藥載劑中之任一者，諸如羧甲基纖維素(CMC)、磷酸鹽緩衝鹽水溶液、水、諸如油/水乳液之乳液及各種類型之濕潤劑。用於氣溶膠或非經腸投與之例示性稀釋劑為磷酸鹽緩衝鹽水或生理鹽水(0.9%)。

【0069】如本文所用，術語「幹細胞」可意謂但絕不限於能夠自體更新的具有高增殖性潛能之未分化細胞，其可遷移至損傷區域且可產生可能經歷最後分化成超過一種不同細胞表型之子細胞。此等細胞可能夠分化成各種細胞類型，且因此促進所關注之患病或受損組織再生或修復。術語「細胞分化」係指細胞藉由其獲得細胞類型之過程。如本文所用之術語「祖細胞」係指任何譜系之可分離細胞，其保持可塑性以分化成一或多種包括但不限於軟骨細胞、骨細胞及脂肪細胞之靶細胞類型。祖細胞稱為群落形成單位(colony-forming unit；CFU)或群落形成細胞(colony-forming cell；CFC)。祖細胞之特定譜系由後綴指示，諸如但不限於CFU-F (纖維母細胞)。祖細胞，如幹細胞可能夠分化成特定類型之細胞，但已比幹細胞更具特異性，且經推動或刺激以分化成其「靶」細胞。一般而言，幹細胞可無限複製，而祖細胞僅可分裂有限次數。

【0070】如本文所用，術語「骨祖細胞」、「軟骨祖細胞」、「骨軟骨祖細胞」、「間葉細胞」、「間葉幹細胞(MSC)」或「骨髓基質細胞」可互換使用以指多能幹細胞，其自能夠沿一種或若干譜系路徑分化成骨母細胞、軟骨細胞、肌細胞、脂肪細胞及肌腱細胞之CFU-F細胞分化。當提及骨骼或軟骨時，MSC通常稱為骨軟骨形成、骨形成、軟骨形成或骨祖細胞，因為單一MSC已展示視培養基及周圍環境而定分化成軟骨細胞或骨母細胞之能力。

【0071】如本文所用，術語「軟骨細胞」可意謂但絕不限於產生且維持軟骨基質之軟骨中所發現之細胞。自最少至最後分化，軟骨細胞譜系為(i)群落形成單位-纖維母細胞(CFU-F)；(ii)間葉幹細胞/骨髓基質細胞(MSC)；或(iii)軟骨細胞。術語「軟骨生成」係指自軟骨形成或軟骨勝任

細胞形成新軟骨。

【0072】術語「醫藥學上可接受」或「藥理學上可接受」可意謂但絕不限於在視需要向動物或人類投與時不產生不良、過敏或其他不適當的反應之實體及組合物。

【0073】術語「醫藥學上可接受之載劑」或「藥理學上可接受之載劑」可意謂但絕不限於與醫藥投與相容之任何及所有溶劑、分散液培養基、塗層、抗菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑及其類似物。適合載劑描述於領域中之標準參考文本-Remington's Pharmaceutical Sciences之最新版中，其以引用之方式併入本文中。該等載劑或稀釋劑之實例包括但不限於水、鹽水、芬格氏溶液(finger's solution)、右旋糖溶液及5%人類血清白蛋白。亦可在組合物中併入補充活性化合物。

【0074】在一個態樣中，提供包含凝聚的間葉細胞體(CMB)及水凝膠之組合物。組合物可視情況包含一或多種生長因子。

【0075】在一些實施例中，CMB包含間葉幹細胞(MSC)，諸如脂肪衍生之幹細胞(ADSC)、骨髓衍生之幹細胞(BMSC)、臍帶血衍生之間葉幹細胞(UM-MSC)、滑膜衍生之間葉幹細胞(SMSC)。諸如ADSC之幹細胞提供用於組織工程化之臨床上相關之細胞來源，因為其可自充裕脂肪組織獲得且擴增至較大數目而不損害細胞用於軟骨形成分化之能力。臨床級同種異體BMSC可自冷凍庫獲得且篩檢以選擇呈現最穩固程度之軟骨生成之細胞。此等MSC可能不具有免疫原性或可具有低免疫原性。除了具有自我更新及長期生長之能力以外，MSC亦可分化成不同細胞類型，包括脂肪細胞、骨母細胞、軟骨細胞、肝細胞、肌細胞、心肌細胞、神經元及上皮細胞。

【0076】 可使用熟習此項技術者已知之各種方法分離MSC。參見例如美國專利第6,153,432號。用於製備ADSC之脂肪組織可衍生自各種脂肪組織部位，諸如網膜脂肪組織。脂肪組織可藉由吸脂獲得或分離，其中所分離之例示性量在10至300 mL範圍內。用於製備BMSC之骨髓組織可衍生自各種骨髓組織部位，諸如胫骨脊。骨髓組織可藉由針抽吸獲得，其中所分離之例示性量在每公斤供體體重約20 mL之範圍內。

【0077】 MSC可經工程化以含有表現生長因子、激素及細胞介素之基因。舉例而言，ADSC可經工程化以表現有益的基因、細胞介素或生長因子。舉例而言，可將已經基因修飾以表現抗炎性細胞介素(例如，IL-2)之ADSC移植至正發生發炎之位置(例如，關節炎關節)中。由於ADSC除了表現有益的抗炎性細胞介素之外可變為軟骨細胞，移植隨後向個體提供雙重益處。

【0078】 包含MSC之組合物可用於治療骨關節炎(OA)之患者。OA之特徵在於關節軟骨退化、基質損失、纖維性顫動及裂隙形成。OA會導致軟骨表面完全損失。軟骨細胞為關節軟骨之唯一細胞，其藉由分泌大分子組分(膠原蛋白、葡萄糖胺聚糖及玻尿酸)及調整胞外基質轉換維持胞外基質之恆穩合成及退化。在OA中，相對於合成代謝物質及修復物質，過度產生破壞性及促炎性介體，引起關節軟骨之進行性破壞。

【0079】 MSC可為抗免疫原性的。在一些實施例中，MSC來自異源來源。

【0080】 異源細胞可能提供若干優點。由於異源細胞可自易於獲得之供體組織分離，因此可產生現成組合物。測試及比較跨越若干供體細胞批次之軟骨形成電位可改善任何最終產物之品質。來自通用供體之細胞將

降低費用及可變性，因為大細胞數目及若干產物可由單個批料產生[20]。

【0081】 擴增的未分化MSC可不表現MHC II類分子。軟骨誘導之MSC (諸如藉由應用生長因子TGF- β 3及BMP-6)亦可不表現MHC II類分子。可將來自異源來源之MSC，諸如不表現MHC II類分子之彼等植入供體中而不誘導免疫反應。可進行各種動物研究以確認經植入之ADSC不誘導免疫反應。

【0082】 在一些實施例中，根據流式細胞量測術及混合淋巴細胞反應檢定，組合物、CMB及MSC在細胞表面上不表現大量或可偵測量之人類白血球抗原(HLA) II類、CD40、CD80或CD86。缺乏表現HLA II類、CD40、CD80及CD86之細胞可視為免疫赦免的。

【0083】 為了偵測此等標記物，解凍之CMB可藉由在I型膠原蛋白酶中在37°C下培育1小時而解離成單細胞懸浮液[21]。消化物將隨後用大約等體積之軟骨形成培養基及細胞懸浮液中和，且藉由經20G針再懸浮進一步解離。遵循流式細胞量測術之製造商之方案，單細胞可用表面標記物-特異性抗體及鈣黃綠素(Calcein) AM染色。可隨後使用流式細胞儀進行流式細胞量測術。

【0084】 在一些實施例中，CMB低溫保存。在一些實施例中，CMB在室溫下或在0°C至10°C之溫度下低溫保存。在一些實施例中，CMB例如在約-20°C之溫度下、在約-80°C之溫度下或在低於約-80°C之溫度下冷凍保存。在各種實施例中，CMB低溫保存或冷凍保存至少約一週。低溫保存或冷凍保存之CMB可呈現與不低溫保存或冷凍保存之可比較「新鮮CMB」類似的效能特徵。低溫保存或冷凍保存之CMB可呈現與新鮮CMB或非低溫保存或冷凍保存之CMB之細胞生存力相當的細胞生存

力(其可使用例如ORFLO MoxiFlo及Moxi GO II藉由LIVE/DEAD檢定測試)。低溫保存或冷凍保存可藉由將CMB引入包含諸如DMSO (例如，來自Gibco之Synth-a-Freeze®)之穩定劑之培養基中進行。CMB及包含CMB之組合物之低溫保存或冷凍保存可經最佳化以改善長期儲存及現成使用的特徵。

【0085】 可對低溫保存或冷凍保存之CMB進行各種測試。低溫保存或冷凍保存之CMB可在軟骨形成培養基(例如，StemPro SFM培養基(Life Technologies)，補充有抗壞血酸、地塞米松、ITS+ Premix (Corning)、MSC補充劑、TGF- β 3 (R&D Systems)及BMP6 (R&D Systems))中培養以評估軟骨形成品質之維持。經培養之CMB可隨後固定於10% (vol/vol)福馬林中用於組織學及免疫組織化學分析或儲存於TRI試劑中用於基因表現分析。固定後，樣品經石蠟包埋，切成5 μ m切片且用蘇木精及伊紅(H&E)、用於GAG之艾爾遜藍(Alcian blue)、三色染色法、膠原蛋白I、II、X及潤滑素(Abcam)染色。可使用TRI試劑方法(Life Technologies)根據製造商之說明書自樣品純化RNA。

【0086】 可評估以下基因中之一或多者之表現：聚集蛋白聚糖(ACAN)、I型膠原蛋白(COL1A1)、II型膠原蛋白(COL2A1)、X型膠原蛋白(COL10A1)、性別確定區域Y (SRY)- 盒9 (SOX9)及同源盒A2 (HOXA2)間葉凝聚轉錄因子、細胞黏附鈣黏素2 (CDH2)、凝聚胞外基質纖維結合蛋白(FN1)、肌腱蛋白C (TNC)、多配體蛋白聚糖3 (SDC3)、基質金屬蛋白酶13 (MMP13)、具有血小板反應蛋白模體-5之解整合素及金屬蛋白酶(ADAMTS5)、轉形生長因子 β (TGF- β 1及TGF- β 3)及骨形態生成蛋白6 (BMP6)。可使用TaqMan引子(Life Technologies)進行即時PCR以

便分析基因表現。可使用包括但不限於甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH)、S18、L37、EF1、EF2及肌動蛋白之管家基因比較新鮮與低溫保存的CMB之間的以上基因中之任一者之表現。

【0087】 CMB為用於軟骨形成之前驅體細胞結構。CMB可藉由培養諸如ADSC之人類MSC且使其形成聚集體來製備。舉例而言，在一天、兩天、三天、四天、五天、六天、七天、八天或甚至九天培養中之任一者之後，CMB可形成。已培養至少六天之CMB可形成邊緣或邊界且因此為「成熟CMB」。CMB可表現指示其為「成熟CMB」或具軟骨特異性CMB之以下標記物中之一或多者：聚集蛋白聚糖(ACAN)、I型膠原蛋白(COL1A1)、II型膠原蛋白(COL2A1)、X型膠原蛋白(COL10A1)、間葉凝聚轉錄因子性別確定區域Y (SRY)-盒9 (SOX9)、同源盒A2 (HOXA2)、細胞黏附鈣黏素2 (CDH2)、凝聚胞外基質纖維結合蛋白(FN1)、肌腱蛋白C (TNC)、多配體蛋白聚糖3 (SDC3)、基質金屬蛋白酶13 (MMP13)、具有血小板反應蛋白模體-5之解整合素及金屬蛋白酶(ADAMTS5)、轉形生長因子 β (TGF- β 1及TGF- β 3)及骨形態生成蛋白6 (BMP6)。不成熟CMB之融合可有效地修復現有軟骨，諸如在存在於包含CMB、水凝膠及一或多種生長因子之組合物中時。

【0088】 水凝膠可包含聚合物網或骨架，其可模擬胞外基質之天然凝膠狀培養基。在某些實施例中，天然凝膠狀培養基為膠原蛋白或片段化膠原蛋白或明膠。在某些實施例中，天然凝膠狀培養基為玻尿酸或經修飾之玻尿酸。水凝膠可包含包括親水性或水溶性多醣化合物之聚合物網或微原纖維網。在某些實施例中，可溶性多醣化合物為水溶性纖維素化合物。在某些實施例中，水溶性纖維素化合物為陰離子水溶性纖維素。

【0089】 水凝膠或骨架可進一步包含實質上不溶性纖維或長絲之基質或網狀物。(術語「水凝膠」及「骨架」在本文中可互換使用。)在某些實施例中，水凝膠包含足以在水凝膠內形成纖維或絲狀網狀物或基質之量的離子、水溶性纖維素化合物及聚離子多醣(例如聚陽離子多醣，例如聚葡萄糖胺糖)之聚合物網。在某些實施例中，聚陽離子多醣為聚葡萄糖胺糖。在額外實施例中，以水凝膠之重量計，聚葡萄糖胺糖之有效量包括在約0.01%至約20% (w/w)範圍內。

【0090】 水凝膠或骨架可進一步包含錯合劑或穩定劑，例如，相對離子(陰離子或陽離子)或化學交聯劑。錯合劑或穩定劑藉由與纖維素聚合物相互作用或錯合，例如經由疏水鍵、共價鍵、離子鍵、氫鍵、凡得瓦爾力(van der Waals force)或其他化學鍵賦予水凝膠額外生物化學及/或生物機械穩定性或兩者。在某些實施例中，水凝膠或骨架包含陰離子纖維素化合物及陽離子纖維素化合物。在某些實施例中，陽離子包含二價陽離子，諸如例如鈣離子、鎂離子、錳離子或鐵(II)離子。各種生物可再吸收聚合物、骨架及其組分可如2017年9月8日以WO2017/151619公佈之國際申請案第PCT/US2017/019956號中所述使用。

【0091】 在額外實施例中，水凝膠或骨架包含離子、水溶性纖維素化合物及化學交聯劑。各種適合化學交聯劑為此項技術中已知的。舉例而言，適用於本文所述之水凝膠的交聯包括與例如胺、硫酸根基團、羥基、硫醇基、二丙烯酸酯、醣苷鍵(諸如例如聚二烯丙基二甲基氯化銨(PDADMAC)及雙環氧化物)反應之交聯。在某些實施例中，交聯劑為二縮水甘油醚，例如二異山梨糖醇雙環氧化物。

【0092】 在一些實施例中，水凝膠包含葡萄糖胺聚糖(GAG)。在體

內，成年幹細胞通常定位於特定化學及拓樸複雜的微環境或生態棲位。在軟骨發育期間模擬微環境之特徵可為可行方法。在軟骨發育期間，最早事件中之二者為由細胞-細胞與細胞-基質黏附介導之細胞-細胞相互作用產生的預軟骨間葉細胞聚集及凝聚。GAG在軟骨發育期間存在，特定言之為軟骨素-4-硫酸酯、軟骨素-6-硫酸酯及硫酸肝素。生長因子可結合至此等GAG。

【0093】 在各種實施例中，水凝膠可占組合物之質量之約1.0%至約95%之間。在一些實施例中，組合物包含1.0至3.0%水凝膠、2.0至4.0%水凝膠、3.0至6.0%水凝膠、4.0至8.0%水凝膠、5.0至10.0%水凝膠、7.0至12.0%水凝膠、10.0至15.0%水凝膠、15至25%水凝膠、20至30%水凝膠、25至40%水凝膠、30至45%水凝膠、35至50%水凝膠、40至55%水凝膠或50至70%水凝膠。

【0094】 水凝膠可由由細胞可附著至之蛋白長絲構成之奈米纖維網或構架支撐。可溶性營養素可經由水凝膠擴散。在天然ECM中，水凝膠介導壓縮應力。水由GAG強吸收，其允許GAG提供其對壓力有抗性之軟骨。藉由由GAG構成之蛋白聚糖維持水凝膠稠度。此外，GAG螯合生長因子。GAG在其含有之己胺糖、己糖或己糖醛酸單元(例如葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖、半乳胺糖、葡萄糖胺)類型方面不同。具有生理重要性之特異性GAG為玻尿酸、硫酸皮膚素、硫酸軟骨素、肝素、硫酸乙醯肝素及硫酸角質素。

【0095】 水凝膠或骨架可包含至少兩種材料。在某些實施例中，材料為多醣，諸如兩種水溶性纖維素化合物。在某些實施例中，材料為膠原蛋白或基於膠原蛋白之基質。在某些實施例中，材料包含膠原蛋白及玻璃

酸。在某些實施例中，化合物如本文所述例如藉助於離子或化學相互作用交聯。

【0096】 生長因子包括能夠刺激細胞生長、增殖、修復及細胞分化之天然存在之物質。通常，生長因子為蛋白或小分子，例如甾類激素，其在靶細胞中/上結合至特異性受體。生長因子對於調節多種細胞過程而言為重要的且通常用作細胞之間的信號傳導分子。生長因子包括例如骨形態形成蛋白，而纖維母細胞生長因子及血管內皮生長因子刺激血管分化(血管生成)。

【0097】 可用於本文所教示及所述之實施例中之任一者的例示性生長因子包括但不限於：自分泌運動因子、骨形態生成蛋白(BMP)、表皮生長因子(EGF)、紅血球生成素(EPO)、纖維母細胞生長因子(FGF)、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、生長分化因子-9 (GDF9)、肝細胞生長因子(HGF)、肝癌衍生生長因子(HDGF)、似胰島素生長因子(IGF)、遷移刺激因子、肌肉抑制素(GDF-8)、神經生長因子(NGF)、腦衍生神經營養因子(BDNF)及其他神經營養素、血小板衍生生長因子(PDGF)、血小板生成素(TPO)、轉形生長因子 α (TGF- α)、轉形生長因子 β (TGF- β)、血管內皮生長因子(VEGF)、胎盤生長因子(PLGF)及/或胎牛生長激素(FBS)。

【0098】 在一些實施例中，生長因子為形態形成蛋白。形態生成蛋白包括骨形態生成蛋白(BMP)家族之成員，特定言之為BMP-6。此家族之成員為蛋白質之TGF- β 超級家族之子類別。可用作生長因子之例示性形態形成蛋白質包括OP-1、OP-2、OP-3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-

13、BMP-15、BMP-16、BMP-17、BMP-18、DPP、Vg1、Vgr-1、60A protein、GDF-1、GDF-2、GDF-3、GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-9、GDF-10、GDF-11、GDF-12、CDMP-1、CDMP-2、CDMP-3、NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP及NEURAL。

【0099】 生長因子(或藥物)可誘導ADSC在CMB中在位分化成軟骨細胞。在一些實施例中，生長因子為TGF- β 3、BMP-6或TGF- β 3及BMP-6之組合。若組合TGF- β 3及BMP-6，則其可以1:5、1:4、1:3、1:2.5、1:2、1:1.5、1:1.25、1:1、1.25:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1或1:5至1:3、1:4至1:2.5、1:3至1:2、1:2.5至1:1.5、1:2至1:1.25、1:1.5至1:1、1:1.25至1.25:1、1:1至1.5:1、1.25:1至2:1、1.5:1至2.5:1、2:1至3:1、2.5:1至4:1或3:1至5:1之質量比(TGF- β 3比BMP-6)存在。若微球存在於組合物中，且組合TGF- β 3及BMP-6，則其可以1:5、1:4、1:3、1:2.5、1:2、1:1.5、1:1.25、1:1、1.25:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1或1:5至1:3、1:4至1:2.5、1:3至1:2、1:2.5至1:1.5、1:2至1:1.25、1:1.5至1:1、1:1.25至1.25:1、1:1至1.5:1、1.25:1至2:1、1.5:1至2.5:1、2:1至3:1、2.5:1至4:1或3:1至5:1之質量比(TGF- β 3比BMP-6)存在。

【0100】 在一個實施例中，可在水凝膠或骨架基質中包括TGF- β 3。可在活體內發育期間在軟骨生成期間偵測到TGF- β 3。該固定可使用先前報導之方案偵測。舉例而言，在4°C下將各種濃度之含TGF- β 3之BSA-PBS添加至交聯NaCS膜中隔夜。用BSA-PBS洗滌各孔，且使用小鼠抗人類TGF- β 3 (Abeam, Inc.)，隨後使用與FITC (BD Biosciences, Inc)結合之次級抗小鼠IgG進行免疫螢光染色。螢光強度隨後使用螢光盤讀取器

(FLX800, Biotek, Inc.)偵測，且與TGF- β 3之量相關。

【0101】 在各種實施例中，生長因子可占每cc之組合物的約10至約10000 ng之間。在一些實施例中，組合物包含每cc之組合物1-15 ng生長因子、10至100 ng生長因子、20至200 ng生長因子、50至500 ng生長因子、100至1000 ng生長因子、200至2000 ng生長因子、500至3000 ng生長因子、1000至4000 ng生長因子、2000至5000 ng生長因子、3000至6000 ng生長因子、4000至7000 ng生長因子或5000至8000 ng生長因子、6000至10000 ng生長因子。

【0102】 存在於組合物中之生長因子可提供在注射組合物時在關節或其他部位中將CMB分化成軟骨細胞。存在於組合物中之生長因子可發信號給CMB以產生葡萄糖胺聚糖(GAG)或膠原蛋白或玻尿酸。存在於組合物中之生長因子以及水凝膠及CMB可有利地提供在植入後可能形成軟骨且與鄰近組織整合之間葉凝聚之生理發育過程。生長因子之量及釋放速率可經最佳化以提供該等發育過程。使用材料螯合及緩慢釋放生長因子可提供在發育過程期間CMB長期暴露於生長因子。

【0103】 在一些實施例中，組合物進一步包含聚合物微球，其中生長因子中之一或多者囊封於聚合物微球中。在一些實施例中，聚合物微球包含聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA)。聚合物微球可提供生長因子之受控釋放，使得該等生長因子可有效地誘導在數天或數週內在原位MSC之軟骨形成分化。不希望受理論所束縛，包含聚合物微球(諸如PLGA)之水凝膠可提供優於單獨的水凝膠之長期生長因子釋放。基於PLGA之微球可持續受控釋放生長因子，諸如VEGF、BMP6及TGF- β 3長達90天。以實質上恆定之方式的該受控釋放可允許形成用於骨軟骨修復之緻密及功能細胞層。

【0104】 另外，PLGA及其他聚合物微球為可凍乾且可儲存的，其可使得組合物現成地使用。

【0105】 在一些實施例中，組合物進一步包含穩定劑，諸如纖維蛋白、層黏連蛋白、聚-D-離胺酸及/或聚-L-離胺酸。當纖維蛋白由凝血酶及血纖維蛋白原形成時，此等組分可分開且隨後組合存在。舉例而言，凝血酶及血纖維蛋白原可在組合物注入需要軟骨修復之關節或其他部位之前立刻組合。層黏連蛋白(LN)為具有高分子量之黏著性醣蛋白。聚-D-離胺酸及聚-L-離胺酸可為有利的，因為其可由非生物來源製備。穩定劑之量可變化以使得組合物具有適合於在注射部位保存CMB、水凝膠及生長因子之凝膠狀稠度。

【0106】 在各種實施例中，組合物藉由混合CMB及水凝膠製備。可將一或多種藥物添加至組合物中。可將一或多種生長因子添加至組合物中。包含CMB及水凝膠之組合物可經冷凍保存且儲存於液氮中持續至少5天、10天、15天、20天、25天、30天、2個月、3個月、4個月、6個月、一年、三年、五年或甚至十年。在製備期間，組合物亦可在機械負載下經歷混合。機械負載可例如藉由攪動、藉由動態負載或藉由流體靜力壓人工地施加。

【0107】 在各種實施例中，在向個體或患者投與時，水凝膠或骨架能有效地支撐、促進及/或增強組織之生長、再生及/或修復。

【0108】 本文所述之組合物可連同醫藥學上可接受之載劑、賦形劑及/或佐劑一起投與。組合物可與至少一種額外生物活性劑及/或治療劑組合，諸如胺基酸、肽、多肽、化合物、藥物、抗體或其類似物或其組合。舉例而言，水凝膠或骨架組合物可包含至少一種額外生物活性劑及/或治

療劑，諸如胺基酸、肽、多肽、化合物、藥物、抗體或其類似物或其組合。

【0109】 水性懸浮液可含有與適用於製造水性懸浮液之賦形劑混雜的活性材料。該等賦形劑包括懸浮劑，例如羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基-甲基纖維素、海藻酸鈉、聚乙烯吡咯啉酮、黃蓍膠及阿拉伯膠(gum acacia)。例示性賦形劑亦包括分散劑或濕潤劑，例如卵磷脂，或環氧烷與脂肪酸之縮合產物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯。例示性賦形劑亦包括環氧乙烷與長鏈脂族醇(例如十七仲乙基氧基十六醇)之縮合產物，或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇之偏酯(諸如聚氧乙烯山梨糖醇單油酸酯)之縮合產物，或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己糖醇酸酐之偏酯(例如聚氧乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯)之縮合產物。

【0110】 水性懸浮液亦可含有一或多種防腐劑，例如對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸正丙酯；一或多種著色劑；一或多種調味劑；及一或多種甜味劑，諸如蔗糖或糖精。

【0111】 適合可注射使用之醫藥組合物包括無菌水溶液(其中水可溶)或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。注射用調配物可以單位劑型呈遞，例如安瓿或多劑量容器，其中添加有防腐劑。組合物可在油性或水性媒劑中形成為懸浮液、溶液或乳液，且可含有懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。

【0112】 對於靜脈內投與，適合載劑包括生理鹽水、抑菌水、Cremophor™. (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。組合物可為無菌的且為存在易於可注射性之程度之流體。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇及液體聚乙二醇及其類似物)及其適合

混合物之溶劑或分散液培養基。可例如藉由使用諸如卵磷脂之塗層、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。微生物活動之防止可藉由各種抗菌劑及抗真菌劑達成，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗壞血酸、硫柳汞及其類似物。等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇及氯化鈉)可包括於組合物中。可藉由將延遲吸收之試劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)包括在組合物中而實現可注射組合物之延長吸收。

【0113】 生物反應器可用於製備組合物，其中本文中所述之例示性生物反應器如2010年9月10日以WO 2010/102059公佈之國際申請案第PCT/US10/026120號及2014年10月23日以WO 2014/172575公佈之國際申請案第PCT/US14/034559號中所述。在製造期間，同種異體供體細胞可用於產生CMB，其隨後在最佳植入時間點低溫保存或冷凍保存。類似地，可產生且凍乾經生長因子輸注之微粒，使得其易於可用於用由供體細胞之較大同種異體池形成的CMB運送，以使得可現成使用。

【0114】 在各種實施例中，組合物或其任何組分可在向患者投與之前活體外測試或作為品質控制程序之一部分測試。在測試之前組合物可能已經低溫保存或冷凍保存。一種測試方式為檢定組合物或其中之CMB的軟骨形成特性。組合物之CMB可在適用時解凍，且隨後在軟骨形成培養基中培養。舉例而言，在解凍之後，CMB可在軟骨形成分化培養基(CDM)中培養一或多天且隨後在植入之前與水凝膠組合。可進行細胞生存力、組織學及基因表現中之一或多者之檢定。特定檢定描述於實例1中。舉例而言，經培養之CMB可經固定及染色。各種染色可用於組織學分析中，諸如蘇木精、伊紅、艾爾遜藍及三色染色法。對於基因表現，可進行

即時PCR以評估聚集蛋白聚糖、膠原蛋白、SOX9、HOXA2、鈣黏素2、纖維結合蛋白、肌腱蛋白C、多配體蛋白聚糖3、基質金屬蛋白酶(MMP)、具有血小板反應蛋白模體(ADAMTS)之解整合素及金屬蛋白酶、轉形生長因子 β 及骨形態生成蛋白。可進行該測試以使調配、低溫保存或冷凍保存及/或儲存組合物之方式最佳化或改良。

【0115】 可測試組合物之免疫原性。可諸如藉由流式細胞量測術測試存在於CMB中之MSC上免疫原性之標記物。例示性標記物包括但不限於人類白血球抗原(HLA) II類、CD40、CD80及CD86。該測試之實例描述於實例1中。

【0116】 可測試組合物在修復活體內軟骨缺陷中之功效。可在基於動物之軟骨外植體中形成或藉由使用諸如聚矽氧橡膠環之人造材料模擬軟骨缺陷。可替代地，可形成結締組織缺陷。隨後將組合物壓入缺陷中且在軟骨形成培養基中培養。視情況，向組合物中提供機械力以促進軟骨細胞發育或以其他方式活體內模擬病況，諸如在膝蓋或肩部中。隨後可測試組合物以測定機械強度(藉由量測壓縮楊氏模數)。此外，若諸如藉由動態負載提供機械力，則可進行上文及實例2中所述之組織學研究以評估機械力對軟骨細胞發育之影響。

【0117】 在另一態樣中，提供一種治療患者之軟骨缺陷的方法，該方法包含將上文及本文所述之組合物中之任一者投與至軟骨中或投與至軟骨周圍之區域中。可將組合物注入缺陷部位中。舉例而言，可將組合物注入膝蓋之半月板中。可替代地，軟骨可在膝蓋之半月板附近之部位注射。此外，可將組合物注入滑液中或與滑液接觸。

【0118】 在另一態樣中，提供一種預防患者之軟骨退化或治療軟骨

損傷或退化疾病或病症之方法，該方法包含將上文及本文所述之組合物中之任一者投與至軟骨中或投與至軟骨周圍之區域中。可將組合物植入且固定至軟骨病灶或缺陷中。因為軟骨病灶及缺陷可以多種形狀、尺寸及位置出現，所以該組合物可經模製成足以符合待治療之患者之軟骨中之特定軟骨缺陷或病灶的形狀及尺寸。舉例而言，組合物可經模製為薄片或基質。薄片或基質之厚度可為0.5至10 mm、1至1.5 mm、1.5至3 mm、2.5至4 mm、3.5至5 mm、4至6 mm、5至7 mm、6至8 mm或8至10 mm。厚度可在薄片或基質中變化。可視需要使用額外基質、網狀物及其他組分以將植入物固定至軟骨缺陷中。

【0119】 在另一態樣中，提供一種預防患者之結締組織退化或治療結締組織損傷或退化疾病或病症之方法，該方法包含將上文及本文所述之組合物中之任一者投與至結締組織中或投與至結締組織周圍之區域中。可將組合物植入且固定至結締組織病灶或缺陷中。因為結締組織病灶及缺陷可以多種形狀、尺寸及位置出現，所以組合物可經模製成足以符合待治療之患者之結締組織中的特定結締組織缺陷或病灶之形狀及尺寸。舉例而言，組合物可經模製為薄片或基質。薄片或基質之厚度可為0.5至10 mm、1至1.5 mm、1.5至3 mm、2.5至4 mm、3.5至5 mm、4至6 mm、5至7 mm、6至8 mm或8至10 mm。厚度可在薄片或基質中變化。可視需要使用額外基質、網狀物及其他組分以將植入物固定至結締組織缺陷中。

【0120】 在以上方法之一些實施例中，結締組織為半月板、韌帶或肌腱。在以上方法之一些實施例中，軟骨選自關節及非關節軟骨。在一些實施例中，非關節軟骨選自由半月板及椎間盤組成之群。在一些實施例中，該方法可有效地在結締組織缺陷、軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、

軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成包含1-20% (w/w)葡萄糖胺聚糖(GAG)之組織。組織可包含1.0至5.0% (w/w) GAG、3.0至6.0% (w/w) GAG、4.0至8.0% (w/w) GAG、5.0至10.0% (w/w) GAG、6.0至11.0% (w/w) GAG、7.0至12.0% (w/w) GAG、8.0至13.0% (w/w) GAG、9.0至14.0% (w/w) GAG、10.0至15.0% (w/w) GAG、11.0至16.0% (w/w) GAG、12.0至17.0% (w/w) GAG、13.0至18.0% (w/w) GAG、14.0至19.0% (w/w) GAG或15.0至20.0% (w/w) GAG。在一些實施例中，該方法可有效地在結締組織缺陷、軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成包含0.5-20 % (w/w)膠原蛋白之組織。組織可包含0.5至5.0% (w/w)膠原蛋白、1.0至5.0% (w/w)膠原蛋白、2.0至7.0% (w/w)膠原蛋白、3.0至8.0% (w/w)膠原蛋白、4.0至9.0% (w/w)膠原蛋白、5.0至10.0% (w/w)膠原蛋白、6.0至11.0% (w/w)膠原蛋白、7.0至12.0% (w/w)膠原蛋白、8.0至13.0% (w/w)膠原蛋白、9.0至14.0% (w/w)膠原蛋白、10.0至15.0% (w/w)膠原蛋白、10.0至15.0% (w/w)膠原蛋白、12.0至17.0% (w/w)膠原蛋白、14.0至19.0% (w/w)膠原蛋白或15.0至20.0% (w/w)膠原蛋白。組織可包含至少1.2% (w/w)、1.3% (w/w)、1.4% (w/w)或1.6% (w/w)膠原蛋白。在一些實施例中，該方法可有效地在軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成包含1% (w/w) GAG之組織。在一些實施例中，該方法可有效地在軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成楊氏模數為至少100 kPa且摩擦係數為至多0.8之軟骨。楊氏模數可為至少20 kPa、25 kPa、30 kPa、40 kPa、50 kPa、75 kPa、100 kPa、125 kPa、150 kPa、175 kPa、200 kPa、至少300 kPa、至少400 kPa、至少500 kPa、至少600

kPa、至少700 kPa、至少800 kPa、至少900 kPa、至少950 kPa、至少1000 kPa、至少1100 kPa、至少1200 kPa或至少1300 kPa。摩擦係數可為低於0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.40、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.30、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24或0.23。

【0121】 在一些實施例中，該方法可有效地在軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成軟骨。在一些實施例中，軟骨在在該部位或該部位周圍與任何鄰近軟骨及軟骨下骨組織整合。

實例

【0122】 亦藉助於以下實例描述及展示本發明。然而，說明書中任何地方之此等及其他實例的使用僅為說明性的且決不限制本發明或任何例示術語之範疇及意義。同樣地，本發明不限於本文所述之任何尤其較佳之實施例。實際上，本發明之許多修改及變化形式在熟習此項技術者閱讀本說明書時可為顯而易見的，且該等變化形式可在不背離本發明之精神或範疇之情況下進行。本發明因此僅受隨附申請專利範圍之項以及彼等申請專利範圍所授權之等效物之完整範疇限制。

實例1：展示冷凍保存之同種異體CMB的軟骨形成特性

【0123】 早期繼代，擴增的脂肪衍生之幹細胞(ADSC)由LaCell LLC獲得且充分測試抗原性。細胞使用GMP級組分擴增且繼代。在第四繼代之後，將ADSC引入軟骨形成培養基中，其中形成CMB。

【0124】 一旦已形成CMB，立即在Synth-a-冷凍(Gibco)中藉由以-1

°C/分鐘之速率將溫度降低至-80°C，接著在至少3天之後在-80°C下轉移至液氮來冷凍保存CMB。在冷凍保存一至五週之後，藉由在37°C水浴中快速再升溫至37°C來解凍冷凍CMB。使用LIVE/DEAD生存力/細胞毒性檢定套組(Invitrogen)或錐蟲藍(trypan blue)排斥來量測細胞生存力。藉由比較對解凍之CMB獲得之結果與未冷凍保存之CMB對解凍之CMB進行免疫組織化學及基因表現分析。

【0125】 此外，將冷凍保存之CMB在軟骨形成培養基(亦即，補充有抗壞血酸、地塞米松、ITS+ Premix (Corning)、MSC補充劑、TGF β 3 (R&D Systems)及BMP6 (R&D Systems)之StemPro SFM培養基(Life Technologies))中培養以評估軟骨形成品質之維持。簡言之，將經培養之CMB固定於10% (vol/vol)福馬林中用於組織學及免疫組織化學分析或儲存於TRIzol中用於基因表現分析。固定後，樣品經石蠟包埋，切成5 μ m切片且用蘇木精及伊紅(H&E)、GAG之艾爾遜藍、三色染色法、間葉凝聚轉錄因子性別確定區域Y (SRY)-盒9 (SOX9)、膠原蛋白I、II、X及潤滑素(Abcam)染色。使用TRIzol方法(Life Technologies)根據製造商之說明書自樣品純化RNA。即時PCR使用TaqMan引子(Life Technologies)進行以評估以下基因之表現：聚集蛋白聚糖(ACAN)、I型膠原蛋白(COL1A1)、II型膠原蛋白(COL2A1)、X型膠原蛋白(COL10A1)、間葉凝聚轉錄因子性別確定區域Y (SRY)-盒9 (SOX9)及同源盒A2 (HOXA2)、細胞黏附鈣黏素2 (CDH2)、凝聚胞外基質纖維結合蛋白(FN1)、肌腱蛋白C (TNC)、多配體蛋白聚糖3 (SDC3)、基質金屬蛋白酶13 (MMP13)、具有血小板反應蛋白模體-5之解整合素及金屬蛋白酶(ADAMTS5)、轉形生長因子 β (TGF β 1及TGF β 3)及骨形態生成蛋白6 (BMP6)。使用甘油醛-3-磷

酸脫氫酶(GAPDH)作為管家基因。

【0126】 為更好地理解在CMB形成之後同種異體ADSC之抗原性，藉由流式細胞量測術分析冷凍保存之樣品以偵測人類白血球抗原(HLA) II類、CD40、CD80及CD86表面標記物含量。缺乏表現前述標記物之細胞視為免疫赦免[22]。簡言之，解凍之CMB藉由將CMB在I型膠原蛋白酶中在37°C下培育1小時以打碎任何集結粒而解離成單細胞懸浮液。消化物用等體積的軟骨形成培養基中和。藉由再懸浮藉由20G針進一步解離細胞懸浮液。遵循晶載染色(Agilent)之製造商之方案，單細胞可用表面標記物-特異性抗體及鈣黃綠素AM染色。使用Agilent生物分析儀、Guava® easyCyte流式細胞儀或另一流式細胞儀進行流式細胞量測術。

【0127】 產生CMB之方法視需要最佳化以實現(i)冷凍保存/解凍之CMB相對於新鮮產物之效能不相上下，(ii)將ADSC均勻整合及融合至間葉細胞體(均勻葡萄糖胺聚糖結構，低肌腱蛋白沈積)中及(iii)在CMB形成之後細胞上不存在免疫原性表面標記物。

實例2：經投與之合同種異體CMB之水凝膠之活體外模型

【0128】 使用冷凍保存及新鮮形成之CMB測試CMB/水凝膠在填充活體外軟骨缺陷模型中之可行性及功效。在非活牛軟骨外植體(5 mm直徑及5 mm高度)中，形成3 mm直徑完整厚度軟骨缺陷。用各種水凝膠媒劑將CMB插入缺陷中。各媒劑包含I型膠原蛋白、玻尿酸及纖維蛋白中之一或多者，其中進行媒劑之比較性分析以確定最佳水凝膠組合物。隨後將水凝膠媒劑壓入缺陷中(圖4)。將構造體在含有如上文所定義之TGF-β3及BMP-6之軟骨形成培養基中培養至多5週且分析。進行組織學、生物化學及機械分析[19]。亦量測DNA、GAG及羥脯胺酸(膠原蛋白)含量。

【0129】簡言之，沿下方骨骼之表面分離軟骨及軟骨下區域且測定濕重。將樣品消化且使用PicoGreen檢定(Molecular Probes)測定DNA含量。提取物之硫酸化GAG (s-GAG)含量使用軟骨素-6-硫酸酯作為標準之1,9-二甲基亞甲基藍染料量熱式檢定測定。按羥脯胺酸之含量計，使用1:7.64羥脯胺酸比膠原蛋白質量比或大約13.5%之總膠原蛋白含量，使用酸水解來評估膠原蛋白之量。

【0130】隨後藉由非受限制壓縮量測軟骨之壓縮楊氏模數。應力-應變曲線藉由壓縮構造體(亦即，0.01%應變/秒，至多150 μm 脆變形，維持至多3,000秒)產生且量測壓縮負載。楊氏模數由應力-應變曲線之線性斜率計算。此外，在非受限制之壓縮組態中量測軟骨與玻璃之間的法線力、摩擦力、軸向變形及摩擦係數。隨後使用推來測試融合CMB與天然軟骨基質之間的整合強度。

【0131】對植入物之負載承載能力進行定量以測定負載對與周圍軟骨及下方骨骼整合的影響且隨時間檢查「失敗」參數。動態負載在1 Hz下使用10-15%表面至表面變形進行長達至多4小時/天、5至7天/週。如上文所概述，評估動態負載對胞外基質組合物及分佈(經由生物化學及組織學)之影響及所得組織之功能特性(經由非受限制壓縮測試)。

【0132】製備及投與含CMB之水凝膠的方法視需要經最佳化以實現具有機械刺激之所得組織的機械及生物化學特性的顯著改善，特定言之(i)形成緻密軟骨組織(含有3-6% w/w GAG及> 5% w/w膠原蛋白)以填充缺陷，(ii)生理機械特性(楊氏模數> 800 kPa，摩擦係數< 0.3)，及(iii)整合研發產物與鄰近軟骨及軟骨下骨組織。

實例3：使用PLGA微球作為遞送平台之生長因子(TGF β 3及BMP6)及

CMB軟骨生成之長期釋放

【0133】 為持續長期釋放來自骨軟骨移植物之生長因子，併入及測試控制釋放技術。在測試樣品中，微球用於遞送生長因子以誘導及增強軟骨生成。在對照樣品中，不使用微球。

【0134】 用基於PLGA之聚合物製得微球，其已用作其生物相容性、注射能力及可定製釋放曲線之可用蛋白質遞送媒劑。生長因子(GF)之受控釋放曲線經最佳化，其中該等曲線視包括所選GF之生物化學特性之多種因素而定。

【0135】 使用基於公開方案之油包水(w/o/w)乳液方法形成PLGA微球。簡言之，在二氯甲烷中混合PLGA (50:50 乳酸與乙醇酸比率)及GF之水溶液。將混合物均勻化以形成油包水乳液，將其添加至聚乙烯醇(PVA)中以形成雙重乳液。在延長攪拌之後，將內含物離心以移除上清液。隨後洗滌且凍乾微球集結粒。

【0136】 掃描電子顯微法用於藉由基於不同微球群之尺寸分佈及形態特性表徵來評估所產生的微球之品質。為使均勻GF釋放最佳化，選擇展示最均勻粒度及相異的個別球形形態的微球。藉由以下公開方案分析不同微球之GF釋放。簡言之，在微量離心管中將10 mg之微球懸浮於PBS中。為使GF負荷最佳化，所製備之微球負載有BMP6及TGFβ3之不同組合(5mg:5mg、3mg:7mg及7mg:3mg)。在30分鐘、1小時、5小時、1天、3天、7天及此後每7天檢查GF釋放。對於每個時間點，收集上清液且將等體積之新鮮PBS添加至微球中。重複此程序直至樣品中不存在集結粒，指示微球完全降解及生長因子釋放。對所收集之上清液執行ELISA以測定生長因子釋放隨時間之濃度。選擇可在最佳濃度(10 ng/ml)下對CMB軟骨生

成持續長期GF釋放之微球。

【0137】 條件經最佳化以製備具有長儲存壽命之聚合物微球。在4℃及25℃ (室溫)兩者下測試所產生微球之存放期，且在不同儲存時間評估GF釋放曲線。GF微球在4℃及25℃下儲存1天、7天、14天及21天，且評估GF釋放曲線以確定在4℃及25℃下儲存之可接受範圍。

【0138】 活體外分析生長因子(GF)輸注之微球以測定其係否可持續長期GF釋放且因此促進CMB成熟及軟骨形成。在此實驗中，藉由混合組分且將複合物注入定製模具中來製備水凝膠+CMB±GF微球複合物。複合物構造體在經最佳化培養基(根據實例1及2)中培養而不補充有GF。進行組織學及生物化學檢定以確認複合物構造體中在CMB成熟、軟骨生成及骨軟骨ECM沈積中之GF釋放之作用。在30分鐘、1小時、5小時、1天、3天、5天、7天及每7天收集此等構造體之改良性培養基以經由ELISA檢查在5週內之GF釋放。複合物構造體(水凝膠+CMB+GF微球)可呈現與水凝膠+CMB構造體之CMB成熟及軟骨生成程度相當的CMB成熟及軟骨生成程度，該等構造體在補充有BMP6及TGF-β3之培養基中培養。

實例4：產物投與模型及活體外軟骨缺陷模型之功效

【0139】 一旦來自實例1-3之方案已經最佳化且選擇適合條件及組分，則在活體外軟骨缺陷模型中測試由CMB、水凝膠及GF輸注之微粒製成之選定材料。將選定材料注入外植體軟骨缺陷模型中且如實例1及2中所述在機械負載下培養。外植體在無外源性GF補充的情況下生長於軟骨形成培養基中至多五週。如實例1及2中所概述，評估所得組織之官能性。另外，在各培養基變化處評估至培養基中之GF釋放以進一步測定此等平台對PTOA之長期治療之功效。亦進行組織學、生物化學及機械分析以評估

複合物構造體之生物及機械特性。藉由在缺陷中形成軟骨組織及將組織整合至鄰近軟骨及軟骨下骨骼來判定成功準則。

實例5：測試冷凍保存對軟骨生成之影響

【0140】 如圖1中所概述測試冷凍保存對ADSC介導之軟骨生成之影響。在圖1中，細胞在CMB培養之二維(2-D)或三維(3-D)階段期間冷凍保存。對於2-D條件，細胞(i)在無冷凍保存下(新鮮)繼代至P4，(ii)在採集基質血管部分(SVF)之後立即冷凍保存，解凍且繼代至P4 (SVF低溫)，或(iii)繼代至P1，冷凍保存，解凍且繼代至P4 (P1低溫)。對於3-D條件，在形成(對照)之後維持且不冷凍保存CMB，或在培養三天之後冷凍保存，且在冷凍保存後一至五週解凍。

【0141】 藉由離心脂肪組織之樣品以分離基質血管部分(SVF)來製備冷凍及對照「新鮮」樣品。將SVF轉移至燒瓶中且用TrypLE-Select繼代四次。隨後將樣品分為(i)不經歷冷凍保存之對照樣品及(ii)冷凍樣品，其中冷凍樣品如實例1中所述冷凍保存且儲存於液氮中一至五週。隨後解凍冷凍保存之樣品，得到冷凍樣品。對照及測試樣品兩者隨後經歷進一步檢定。

【0142】 藉由離心脂肪組織之樣品以分離基質血管部分(SVF)來製備測試及對照「SVF低溫」樣品。SVF如實例1中所述冷凍保存且儲存於液氮中至少一個月。隨後將SVF解凍，轉移至燒瓶中且繼代四次。隨後，將樣品分為對照及冷凍樣品，其中冷凍樣品如實例1中所述冷凍保存。隨後將樣品分為(i)不經歷冷凍保存之對照樣品及(ii)冷凍樣品，其中冷凍樣品如實例1中所述冷凍保存且儲存於液氮中一至五週。隨後解凍冷凍保存之樣品，得到測試樣品。對照及測試樣品兩者隨後經歷進一步檢定。

【0143】藉由離心脂肪組織之樣品以分離基質血管部分(SVF)來製備測試及對照「p1低溫」樣品。將SVF轉移至燒瓶中且繼代一次。繼代SVF如實例1中所述冷凍保存且儲存於液氮中至少一個月。隨後將SVF解凍，轉移至燒瓶中且繼代四次。隨後將樣品分為對照及冷凍樣品，其中冷凍樣品如實例1中所述冷凍保存。隨後將樣品分為(i)不經歷冷凍保存之對照樣品及(ii)冷凍樣品，其中冷凍樣品如實例1中所述冷凍保存且儲存於液氮中一至五週。隨後解凍冷凍保存之樣品，得到測試樣品。對照及測試樣品兩者隨後經歷進一步檢定。

【0144】隨後，分析ADSC冷凍保存對群體倍增時間之影響。在以下ADSC中進行比較：(i)在無冷凍保存之情況下(新鮮)繼代至P4；(ii)在採集基質血管部分(SVF)後立即冷凍保存、解凍且繼代至P4 (SVF低溫)之ADSC；及(iii)繼代至P1、冷凍保存、解凍且繼代至P4 (P1低溫)之ADSC。在最後一次冷凍保存步驟之後在四次繼代之各者處取樣品且隨後分析群體倍增時間。結果展示於圖2中，Y軸為群體倍增時間且X軸為進行之繼代次數。

【0145】對群體倍增時間(PDT)之分析揭示新鮮及P1低溫ADSC呈現類似趨勢，其中PDT隨著繼代增加。替代地，對於SVF低溫ADSC，PDT隨著繼代減少。對於「新鮮」樣品，群體倍增時間在繼代四次時自約1.5天(繼代一次)增加至約2天。相比之下，對於「SVF低溫」樣品(其中冷凍保存且解凍SVF)，群體倍增時間在繼代四次時自約2天(繼代一次)降至約1.5天。對於「p1低溫」樣品(其中SVF在冷凍保存及解凍之前繼代一次)，群體倍增時間為約2.5天且在更多繼代之情況下略微增加。

實例6：測試ADSC冷凍保存對軟骨生成之影響

【0146】 進行冷凍保存對細胞(燒瓶中之2D)之影響的進一步檢定。以上文所述之方式且如圖3中所示製備對照「新鮮」、「SVF低溫」及「p1低溫」CMB。培養28天後，「新鮮」、「SVF低溫」及「p1低溫」樣品中之各者之CMB之直徑經量測且展示於圖4A中。新鮮CMB之直徑為大約1.9 mm，SVF低溫CMB之直徑為大約1.7 mm，且P1低溫細胞之直徑為大約1.6 mm。

【0147】 培養28天後，「新鮮」、「SVF低溫」及「p1低溫」樣品中之各者之CMB之濕重經量測且展示於圖4B中。新鮮CMB之濕重為大約4.0 mg。SVF低溫CMB之濕重為大約2.5 mg，且P1低溫CMB之濕重為大約1.7 mg。(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.005$ 。)

【0148】 培養28天後，「新鮮」、「SVF低溫」及「p1低溫」樣品中之各者之DNA與濕重之質量比(ng DNA/mg 濕重)經量測且展示於圖4C中。新鮮CMB之質量比為大約375 ng DNA/mg 濕重。SVF低溫CMB之質量比為大約85 ng DNA/mg 濕重。P1低溫CMB之質量比為大約105 ng DNA/mg 濕重。(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.005$ 。)

【0149】 培養28天後，「新鮮」、「SVF低溫」及「p1低溫」樣品中之各者之GAG與濕重($\text{w/w}\%$)之質量比經量測且展示於圖4D中。新鮮CMB之比為大約5.5 $\text{w/w}\%$ 。SVF低溫CMB之比為大約2.0 $\text{w/w}\%$ 。P1低溫CMB之比為大約4.8 $\text{w/w}\%$ 。(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.005$ 。)

【0150】 培養28天後，「新鮮」、「SVF低溫」及「p1低溫」樣品中之各者之膠原蛋白與濕重($\text{w/w}\%$)之質量比經量測且展示於圖4E中。新鮮CMB之比為大約3.5 $\text{w/w}\%$ 。SVF低溫CMB之比為大約5.2 $\text{w/w}\%$ 。P1低溫CMB之比為大約3.1 $\text{w/w}\%$ 。(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.005$ 。)

【0151】 培養28天後，「新鮮」、「SVF低溫」及「p1低溫」CMB中之各者之外觀展示於圖4F中。比例尺為0.5 mm。

【0152】 當3組ADSC用於產生CMB且生長於軟骨形成分化培養基(CDM)中4週時，冷凍保存顯著減小所得樣品($p < 0.01$)之直徑、濕重及DNA。雖然冷凍保存亦顯著降低GAG [$p < 0.01$]用於軟骨形成之標記物]且顯著增加SVF低溫CMB中之膠原蛋白含量($p < 0.05$)，但P1低溫CMB具有類似於新鮮CMB之特性的特性。圖4F展示培養28天後的典型CMB之影像。

【0153】 以上結果表明在一次繼代之後冷凍保存之ADSC (「p1低溫」)適用於現成可注射產物。

實例7：測試CMB冷凍保存對軟骨生成之影響

【0154】 進行冷凍保存對CMB集結粒(孔中之3-D)之影響的進一步檢定。

【0155】 對照「新鮮」及「p1低溫」樣品如圖5中所示製備。將脂肪組織之樣品離心以分離基質血管部分(SVF)。在「p1低溫」樣品中，將SVF置放於燒瓶中，繼代一次，隨後如實例1中所述冷凍保存，且儲存於液氮中一至五週。隨後將冷凍保存之樣品解凍且繼代四次。在「新鮮」樣品中，將SVF置放於燒瓶中且繼代四次。

【0156】 隨後將「新鮮」及「p1低溫」樣品中之各者分成對照及冷凍樣品。冷凍樣品如實例1中所述冷凍保存且儲存於液氮中至少一週。隨後將冷凍樣品解凍，轉移至多孔盤中。對照及冷凍樣品兩者隨後經歷進一步檢定。

【0157】 在多孔盤中培養(3-D培養)三天之後，且在軟骨形成分化

28天之後，量測「新鮮對照」、「p1低溫對照」、「新鮮冷凍」及「p1低溫冷凍」樣品中之各者中之細胞的直徑，結果展示於圖6A中。新鮮對照CMB之直徑為大約1.87 mm，新鮮冷凍CMB之直徑為大約1.20 mm，p1低溫對照CMB之直徑為大約1.82 mm，且p1低溫冷凍CMB之直徑為大約1.43 mm。

【0158】亦量測「新鮮對照」、「p1低溫對照」、「新鮮冷凍」及「p1低溫冷凍」樣品中之各者之細胞之濕重，結果顯示於圖6B中。新鮮對照CMB之濕重為大約3.15 mg，新鮮冷凍CMB之濕重為大約1.70 mg，p1低溫對照CMB之濕重為大約2.30 mg，且p1低溫冷凍CMB之濕重為大約1.20 mg。

【0159】「新鮮對照」、「p1低溫對照」、「新鮮冷凍」及「p1低溫冷凍」樣品中之各者之DNA與濕重之質量比(ng DNA/mg 濕重)經量測且展示於圖6C中。在長期軟骨形成誘導之前，CMB之DNA與濕重質量比在大約200至5000 ng DNA/mg CMB 之間。在軟骨形成誘導5週之後，新鮮對照CMB之DNA與濕重質量比為大約360 ng DNA/mg 濕重 ，新鮮冷凍CMB之質量比為大約230 ng DNA/mg 濕重 ，p1低溫對照CMB之質量比為大約345 ng DNA/mg 濕重 ，且p1低溫冷凍CMB之質量比為大約550 ng DNA/mg 濕重 。

【0160】「新鮮對照」、「p1低溫冷凍」、「新鮮冷凍」及「p1低溫冷凍」樣品中之各者之GAG與濕重(w/w\%)之質量比經量測且展示於圖6D中。新鮮對照CMB之質量比為大約5.70 (w/w\%)，新鮮冷凍CMB之質量比為大約6.55 (w/w\%)，p1低溫對照CMB之質量比為大約4.45 (w/w\%)，且p1低溫冷凍CMB之質量比為大約3.90 (w/w\%)。

【0161】 「新鮮對照」、「p1低溫對照」、「新鮮冷凍」及「p1低溫冷凍」樣品中之各者之膠原蛋白與濕重(w/w%)之質量比經量測且展示於圖6E中。新鮮對照CMB之質量比為大約3.65 (w/w%)，新鮮冷凍CMB之質量比為大約4.95 (w/w%)，p1低溫對照CMB之質量比為大約4.00 (w/w%)，且p1低溫冷凍CMB之質量比為大約2.40 (w/w%)。

【0162】 在多孔盤中培養(3-D培養)三天後且軟骨形成分化28天後，「新鮮對照」、「p1低溫對照」、「新鮮冷凍」及「p1低溫冷凍」CMB中之各者之外觀展示於圖6F中。

【0163】 在CMB冷凍保存下，對於直徑減小25-30%之對照CMB，直徑(圖6A)類似。此等差異由圖6F中之目視檢查資料發現。圖6B中之濕重資料顯示所有組之顯著差異，在ADSC及CMB冷凍保存之情況下發現顯著降低。

【0164】 DNA (圖6C)、GAG (圖6D)及膠原蛋白(圖6E)含量之生物化學分析視相關周邊而定展示不同反應。在新鮮對照、新鮮冷凍與P1低溫對照組之間，CMB之DNA含量並無顯著不同。然而，在P1低溫冷凍組中，相比於其他組，尤其新鮮冷凍組，存在DNA含量之增加。相較於新鮮CMB，P1低溫CMB之GAG含量較低。如圖6D中所概述，此等差異中之一些為顯著的。在對照組之間，原纖維膠原蛋白含量類似，然而，相比於其各別對照組，在新鮮冷凍組中存在膠原蛋白含量之增加，同時減少P1低溫冷凍組中之膠原蛋白含量。

實例8：軟骨形成CMB之流式細胞量測術分析

【0165】 藉由流式細胞量測術進行軟骨形成CMB之細胞表面標記物之分析。使用針對ISO之抗體作為陰性對照，其中針對CD59及CD90之抗

體用作陽性對照。測試HLA II類、CD40、CD80或CD86表現。此外，測試CD34、CD45、CD73、CD90及CD105之表現。在圖7A中，流式細胞量測術結果展示經由陰性HLA II類、CD40、CD80及CD86表現之軟骨形成CMB之抗原性。在ISO抗體用作陰性對照物之情況下亦看見陰性表現，而在CD59及CD90用作陽性對照之情況下看見陽性表現。

【0166】 圖7B展示在藉由流式細胞量測術進行表面標記物特徵分析之後各種抗原在活ADSC上之表現百分比。ADSC取自四個人類供體。可見典型的間葉幹細胞(MSC)分佈，其中伴隨CD73、CD90及CD105之高表現，存在CD34及CD45之低表現。此外，在冷凍保存之CMB中檢查抗原標記物顯示缺乏HLA II類、CD40、CD80或CD86表現，指示該等細胞不可能引發免疫原性反應。

實例9：測試水凝膠及CMB之組合的聚矽氧缺陷模型

【0167】 I型膠原蛋白、玻尿酸及I型膠原蛋白:玻尿酸鹽(以4:1、1:1及1:4之比率)作為用於CMB及生長因子-微粒之遞送媒劑檢查。為了最佳化吾等水凝膠遞送媒劑以及CMB及微粒參數，使用模擬外植體缺陷模型之聚矽氧橡膠環方法(5 mm內徑、2 mm厚度)，如圖8中所示。將水凝膠及CMB添加至聚矽氧缺陷。濕重、DNA質量比、GAG質量比及膠原蛋白質量比參數展示於圖8中之表中，所有凝膠調配物為遞送CMB之適合選項。在聚矽氧缺陷模型中進行針對各水凝膠膠凝之濃度及時間之最佳化。在用(i)膠原蛋白及(ii)膠原蛋白:玻尿酸鹽(1:1、4:1及1:4)遞送之填充有CMB的聚矽氧及軟骨缺陷模型兩者中進行額外最佳化，以確定哪一種條件提供軟骨表型及與周圍軟骨整合之最佳組合。

【0168】 在聚矽氧缺陷模型中最佳化之後，使用骨軟骨缺陷模型重

複測試。圖9A為在骨軟骨缺陷模型中之空缺陷之照片。圖9B為展示膠原蛋白凝膠-CMB填充之缺陷之照片。圖9C為展示保持缺陷內之填充組分之膠原蛋白凝膠-CMB填充之缺陷之半部分的照片。上文所述之參數之額外最佳化在骨軟骨缺陷模型中進行。

實例10：測試水凝膠及CMB之組合的聚矽氧缺陷模型

【0169】 將藥物併入CMB-水凝膠組合中以測試其係否可誘導hADSC軟骨生成。藥物釋放調配物經設計以等效於先前用於誘導hADSC軟骨生成之藥物補充方法，其中藥物直接添加至軟骨形成分化培養基中。平均尺寸為1-10 μm 之粒子負載有0.02% (w/w%)藥物。製造80 mg負載藥物之微粒且測試長期藥物釋放(至多35天)以測定成功誘導hADSC軟骨生成所需之最佳微粒濃度。使用圖10A中所述之實驗方案分析隨時間之藥物釋放。

【0170】 圖10B展示藥物隨時間之所觀測之釋放。10 mg之微粒經六天提供約10皮克/48小時或5皮克/天之釋放速率。

【0171】 為達成適合於維持具有5 mm直徑/1 mm厚移植物(20 μl 移植體積)之10 ng/ml生長因子濃度之20皮克/天釋放速率，可將40 mg之微粒負載至各移植物中。

實例11：測試由包含水凝膠、CMB及藥物之組合物再生軟骨的軟骨外植體缺陷模型

【0172】 將兩種藥物TGF- β 3及BMP-6添加至CMB-水凝膠組合中以測試其係否在離體模型中填充軟骨缺陷及動態變形負載係否影響GAG及膠原蛋白之含量。動態變形負載(1%皮重負載，隨後在1 Hz下10%表面至表面位移，每天3小時，5-7天/週[Ng等人, Cell Mol. Bioeng.,2009年9月1

日, 2(3):386-394])用於刺激ADSC分化成軟骨細胞且增加軟骨形成分化因子(諸如葡萄糖胺聚糖、軟骨寡聚蛋白(COMP)、連接蛋白、玻尿酸及膠原蛋白, 尤其II型膠原蛋白、IX型膠原蛋白、XI型膠原蛋白)之產量。分析經歷動態變形負載之軟骨填充劑及對照軟骨填充劑之GAG含量及膠原蛋白含量。結果展示於圖11A及11B中。

【0173】 圖11A展示負載及未負載對照軟骨填充劑之GAG含量類似。

【0174】 圖11B展示按濕重計, 與約5%膠原蛋白之未負載對照相比, 負載將膠原蛋白含量提高至濕重之10%。

實例12：測試遞送各種水凝膠組合物之軟骨外植體缺陷模型。

【0175】 在完整厚度軟骨外植體缺陷模型中測試不同組合物及水凝膠濃度之保持及膠凝時間。所測試之凝膠組分僅包括纖維蛋白及膠原蛋白/玻尿酸之各種組合。藉由將各種水凝膠組合物遞送至外植體缺陷中、固化且隨後在37°C下於PBS中攪動至多5天來測試凝膠保持能力。

【0176】 結果展示於圖13中。與高膠原蛋白組合物樣品相比, 僅纖維蛋白及高玻尿酸水凝膠組合物呈現優良的保持率。

【0177】 另外, 將具有由ADSC製成之CMB的水凝膠組合物遞送至外植體缺陷中。自骨架型成熟牛膝部採集10 mm直徑及10 mm厚度(1-2 mm之軟骨厚度)之牛骨軟骨外植體。使用活組織檢查鑽孔形成5 mm直徑之完整厚度(向下至骨骼)缺陷。此等缺陷隨後用1:1體積之CNB與膠原蛋白/玻尿酸水凝膠之混合物填充, 且在具有或不具有負載之情況下在含有TGF- β 3及BMP-6生長因子之培養基中培養至多5週。離體培養之後, 新形成組織與天然軟骨整合且呈現與天然軟骨相當之葡萄糖胺聚糖及膠原蛋白

含量。資料展示於圖14中。

實例13：在軟骨構造體品質上CMB尺寸之影響。

【0178】 評估CMB尺寸對軟骨構造體品質之影響。CMB由50K、100K及250K個細胞產生。構造體隨後用各CMB尺寸製造，培養4週且採集以用於目視檢查、組織學及定量評估。目視檢查揭示在所有實驗條件下之樣品呈現充分融合之CMB。資料展示於圖15A中。另外，構造體為不透明的，其指示軟骨樣品質。H&E之組織學染色證實目視觀測結果，揭示所有組中之融合CMB，如圖15B中所示。軟骨形成標記物GAG及膠原蛋白之組織學染色在實驗條件中展示相當的分化。亦在各組之間比較樣品濕重、DNA、GAG及膠原蛋白之定量以鑑別CMB尺寸如何影響構造體品質。資料展示於圖15C中。對於所有參數，在各組之間值相對一致。此等結果指示50K、100K及250K CMB尺寸全部產生相當的軟骨品質且可考慮用於軟骨填充產物製造。

參考文獻

1. Riboh, J.C., et al., Comparative efficacy of cartilage repair procedures in the knee: a network meta-analysis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 2016.
2. Goyal, D., et al., Evidence-based status of microfracture technique: a systematic review of level I and II studies. *Arthroscopy*, 2013. 29(9): p. 1579-88.
3. Brittberg, M., et al., Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin. Orthop.*, 1996(326): p. 270-83.

4. Jacobi, M., et al., MACI - a new era? Sports Med Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol., 2011. 3(1): p. 10.
5. Hangody, L., et al., Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc., 1997. 5(4): p. 262-7.
6. O'Driscoll, S.W., et al., The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. J. Bone Joint Surg. Am., 1986. 68(7): p. 1017-35.
7. Bobic, V., Current Status of the Articular Cartilage Repair. The Journal of Regenerative Medicine, 2000. 1(4): p. 37-41.
8. McNickle, A.G., et al., Overview of Existing Cartilage Repair Technology. Sports Med. Arthrosc. Rev., 2008. 16(4): p. 196-201.
9. Bobic, V., Tissue Repair Techniques of the Future: Options for Articular Cartilage Injury. Conference Report. Medscape Orthopaedics & Sports Medicine eJournal, 2000. 4(1).
10. Bos, P.K., et al., Articular cartilage repair and the evolving role of regenerative medicine. Open Access Surgery, 2010. 3: p. 109-122.
11. Rivera, J.C., et al., Posttraumatic Osteoarthritis Caused by Battlefield Injuries: The Primary Source of Disability in Warriors. J. Am. Acad. Orthop. Surg., 2012. 20(1): p. S64-69.

12. Anderson, D.D., et al., Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J. Orthop. Res.*, 2011. 29(6): p. 802-809.
13. Olson, S., et al., *Post-Traumatic Arthritis: Pathogenesis, Diagnosis and Management*. 2015: Springer.
14. Hangody, L., et al., Autologous osteochondral grafting - technique and long-term results. *Cartilage Repair*, 2008. 39(1): p. 32-39.
15. Eichinger, J.K., et al., Penetrating Blast Injury to the Knee of a United States Soldier Treated with Allograft Mosaicplasty. *Cartilage*, 2011. 2(3): p. 307-311.
16. Scully, W.F., et al., Allograft Osteochondral Transplantation in the Knee in the Active Duty Population. *Military Medicine*, 2011. 176(10): p. 1196-1201.
17. Lima, E.G., et al., Functional tissue engineering of chondral and osteochondral constructs. *Biorheology*, 2004. 41(3-4): p. 577-90.
18. Hu, J.C., et al., A self-assembling process in articular cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.*, 2006. 12(4): p. 969-79.
19. Bhumiratana, S., et al., Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown *in vitro* by mesenchymal condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2014. 111(19): p. 6940-5.
20. McIntosh, K.R., et al., Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2013. 9(2): p. 175-84.

21. Yodmuang, S., et al., Synergistic effects of hypoxia and morphogenetic factors on early chondrogenic commitment of human embryonic stem cells in embryoid body culture. *Stem Cell Rev.*, 2015. 11(2): p. 228-41.

22. Ryan, J.M., et al., Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflamm. (London)*, 2005. 2: p. 8.

* * *

本發明之範疇不受本文所述之特定實施例限制。實際上，除本文所述之彼等修改以外，根據前述描述，本發明之各種修改對熟習此項技術者而言將變得顯而易見。該等修改意欲屬於隨附申請專利範圍之範疇內。

本文中所引用之所有專利、申請案、公開案、測試方法、文獻及其他材料均以全文引用之方式併入本文中，如同在本說明書中物理上存在一般。



202000899

【發明摘要】

【中文發明名稱】

可注射之即用軟骨、肌腱及韌帶修復組合物及使用方法

【英文發明名稱】

INJECTABLE OFF-THE-SHELF CARTILAGE, TENDON, AND
LIGAMENT REPAIR COMPOSITIONS AND METHODS OF USE

【中文】

本發明提供包含凝聚的間葉細胞體及水凝膠之組合物。該等組合物可進一步包括藥物或生長因子。該凝聚的間葉細胞體可包括結締組織細胞，或甚至能夠產生諸如膠原蛋白及葡萄糖胺聚糖之結締組織胞外基質之祖細胞。亦提供治療結締組織缺陷、軟骨損傷及軟骨退化之方法。

【英文】

Compositions comprising a condensed mesenchymal cell body and a hydrogel are provided. The compositions may further include drugs or growth factors. The condensed mesenchymal cell body may include a connective tissue cell, or even a progenitor cell capable of producing connective tissue extracellular matrices such collagen and glycosaminoglycan. Also provided are methods of treating connective tissue defects, cartilage injury, and cartilage degradation.

【指定代表圖】

圖8

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種組合物，其包含

- a)凝聚的間葉細胞體(CMB)；及
- b)水凝膠。

【第2項】

如請求項1之組合物，其進一步包含

- c)一或多種藥物或生長因子。

【第3項】

如請求項1或2之組合物，其進一步包含聚合物微球，其中該等藥物或該等生長因子中之一或多者囊封於該聚合物微球中。

【第4項】

如請求項3之組合物，其中該聚合物微球包含聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(乳酸)(PLA)或PLGA及PLA之組合。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之組合物，其中該CMB包含選自結締組織細胞及能夠形成軟骨細胞、肌腱細胞、韌帶細胞或半月板細胞之祖細胞的細胞。

【第6項】

如請求項1至4中任一項之組合物，其中該CMB包含自軟骨、肌腱、韌帶或半月板分離之細胞。

【第7項】

如請求項6之組合物，其中該細胞為軟骨細胞、肌腱細胞、肌腱母細

胞、纖維細胞或纖維母細胞。

【第8項】

如請求項5之組合物，其中該CMB包含選自以下之幹細胞：間葉幹細胞(MSC)、脂肪衍生之幹細胞(ADSC)、骨髓衍生之幹細胞(BMSC)、臍帶血幹細胞(UB-MS C)、神經脊幹細胞、經誘導之多能幹細胞、胚胎幹細胞、初代軟骨細胞及神經脊幹細胞。

【第9項】

如請求項5之組合物，其中該細胞來自異源來源或自體來源。

【第10項】

如請求項5之組合物，其中該細胞為抗免疫原性的及/或免疫抑制劑。

【第11項】

如請求項5之組合物，其中該CMB在低於約-1°C之溫度下冷凍保存至少一天。

【第12項】

如請求項5之組合物，其中該CMB在介於0°C至30°C之間的溫度下低溫保存至少一天。

【第13項】

如請求項1至12中任一項之組合物，其中該CMB中之該等細胞在該細胞表面上不表現大量或可偵測量之人類白血球抗原(HLA) II類、CD40、CD80或CD86。

【第14項】

如請求項1之組合物，其中該水凝膠選自纖維蛋白膠、富血小板血漿(PRP)、I型膠原蛋白、聚葡萄糖胺糖、明膠、聚乙二醇二丙烯酸酯、玻尿酸

酸、以及纖維蛋白膠、PRP、I型膠原蛋白、聚葡萄糖胺糖、明膠、聚乙二醇二丙烯酸酯及玻尿酸之任何組合。

【第15項】

如請求項2之組合物，其中該生長因子為TGF- β 超家族成員。

【第16項】

如請求項2之組合物，其中該生長因子為選自由以下組成之群之形態形成蛋白：OP-1、OP-2、OP-3、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-15、BMP-16、BMP-17、BMP-18、DPP、Vg1、Vgr-1、60A蛋白、GDF-1、GDF-2、GDF-3、GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-9、GDF-10、GDF-11、GDF-12、CDMP-1、CDMP-2、CDMP-3、NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP、NEURAL。

【第17項】

如請求項1至16中任一項之組合物，其進一步包含以下中之一或多者：胰島素、運鐵蛋白、人類血清白蛋白、脯胺酸、牛血清白蛋白、硒酸、亞麻油酸、地塞米松及抗壞血酸。

【第18項】

如請求項1之組合物，其中該等CMB與單細胞一起呈懸浮狀態。

【第19項】

如請求項1之組合物，其中該等CMB之尺寸均勻或不均勻。

【第20項】

如請求項1之組合物，其中該組合物為可注射的。

【第21項】

一種治療患者之結締組織缺陷之方法，該方法包含將如請求項1至20中任一項之組合物投與至該結締組織中或投與至該結締組織周圍之區域中。

【第22項】

一種預防患者之軟骨退化或治療軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之方法，該方法包含將如請求項1至20中任一項之組合物投與至該軟骨中或投與至該軟骨周圍之區域中。

【第23項】

如請求項22之方法，其中該軟骨為關節軟骨。

【第24項】

如請求項22之方法，其中該軟骨為非關節軟骨。

【第25項】

如請求項24之方法，其中該軟骨選自由以下組成之群：鼻軟骨、耳軟骨、氣管支氣管軟骨、肋軟骨、半月板及椎間盤。

【第26項】

如請求項21至25中任一項之方法，其中該方法有效地在該軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成包含1-20% (w/w)葡萄糖胺聚糖(GAG)之組織。

【第27項】

如請求項21至25中任一項之方法，其中該方法有效地在該軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成包含至少0.5% (w/w)膠原蛋白之組織。

【第28項】

如請求項21至27中任一項之方法，其中該方法有效地在該軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成楊氏模數為至少100 kPa且摩擦係數為至多0.8之軟骨。

【第29項】

如請求項21至28中任一項之方法，其中該方法有效地在該軟骨缺陷、軟骨退化、軟骨損傷、軟骨退化疾病或軟骨病症之部位中形成軟骨，且其中該軟骨在該部位處或該部位周圍與任何鄰近軟骨及軟骨下骨組織整合。

【第30項】

一種使用如請求項1至20中任一項之組合物活體外或活體內形成軟骨組織的方法。

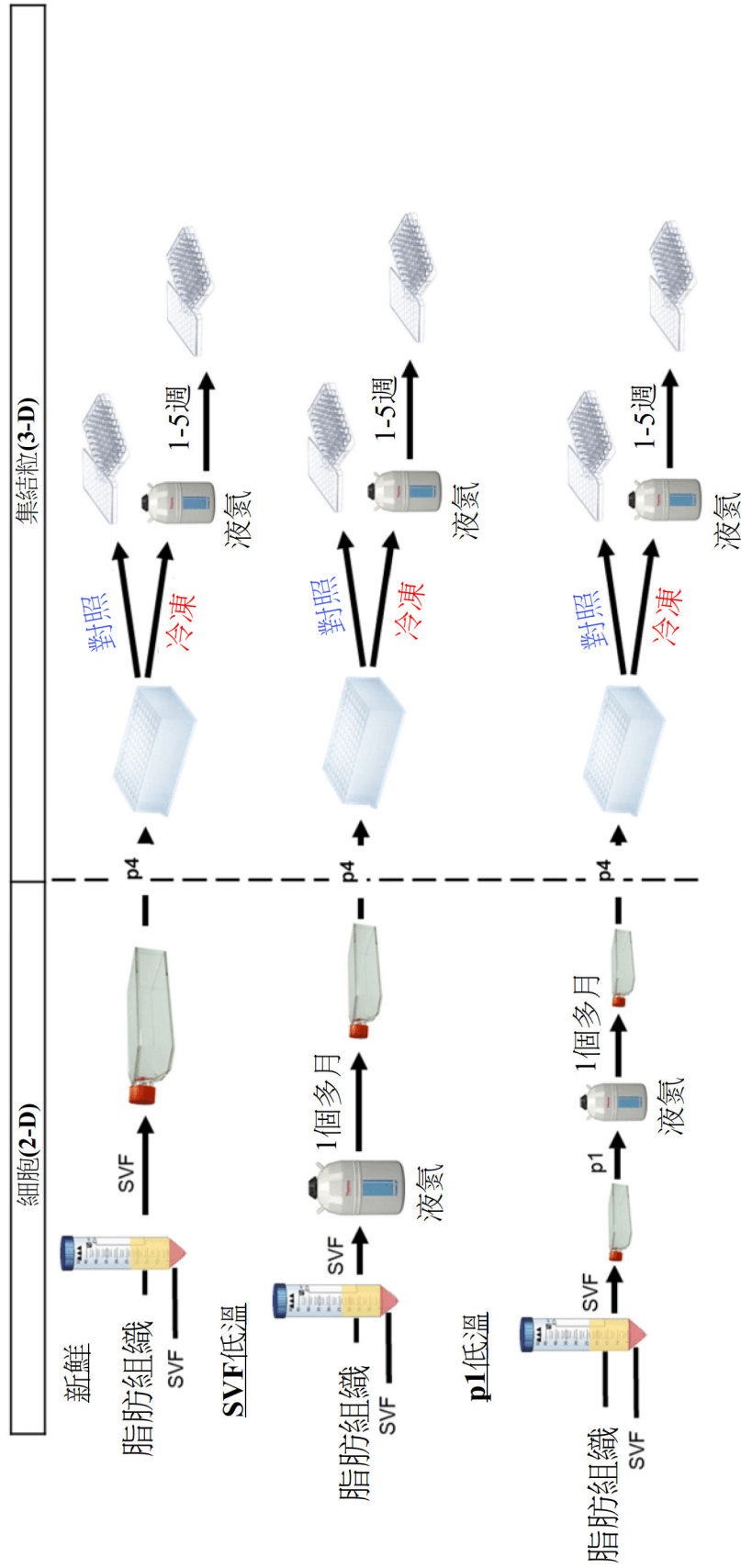
【第31項】

一種治療患者之撕裂或斷裂結締組織之方法，該方法包含將如請求項1至20中任一項之組合物投與至該撕裂或斷裂結締組織中或投與至該撕裂或斷裂結締組織周圍之區域中。

【第32項】

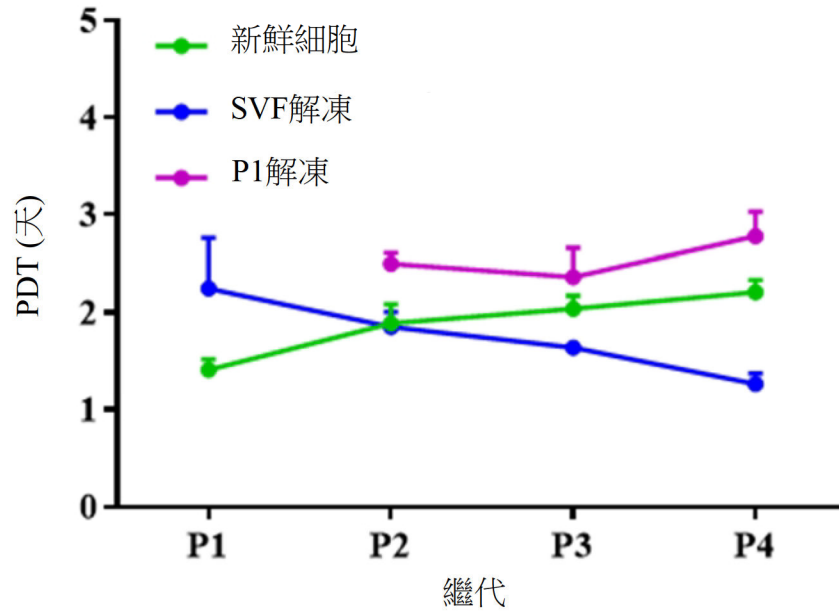
如請求項31之方法，其中該結締組織為韌帶、肌腱或半月板。

【發明圖式】



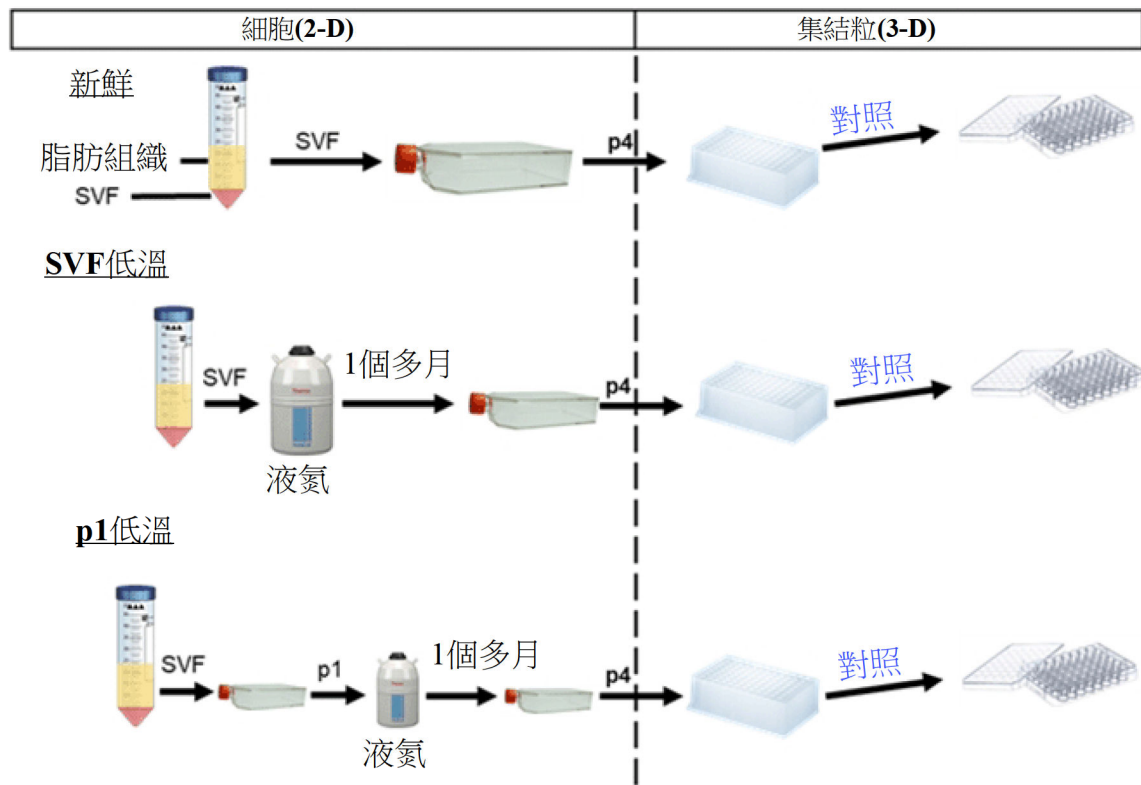
【圖1】

群體倍增時間

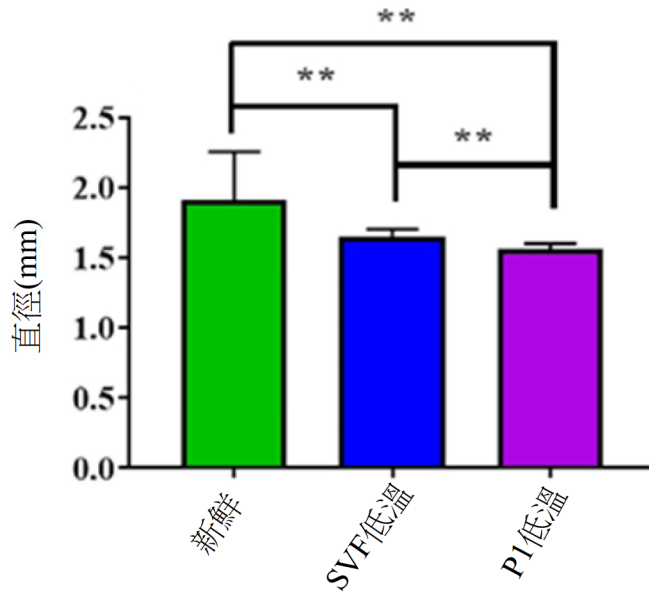


ADSC之群體倍增時間(PDT)

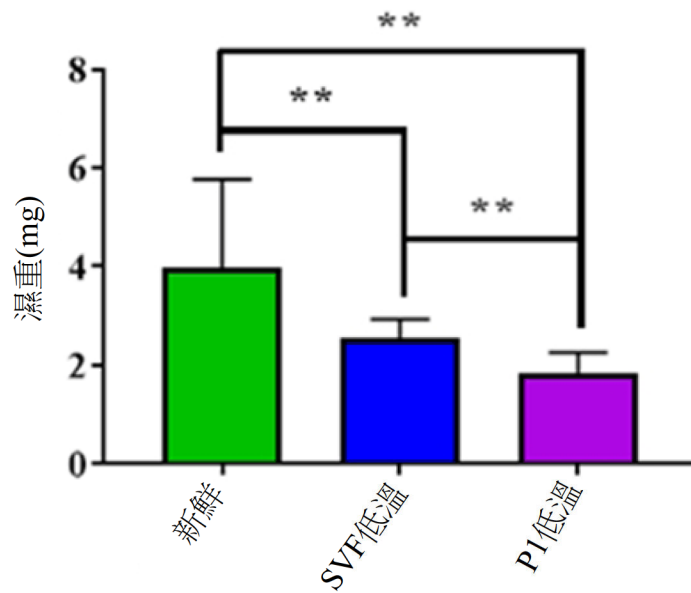
【圖2】



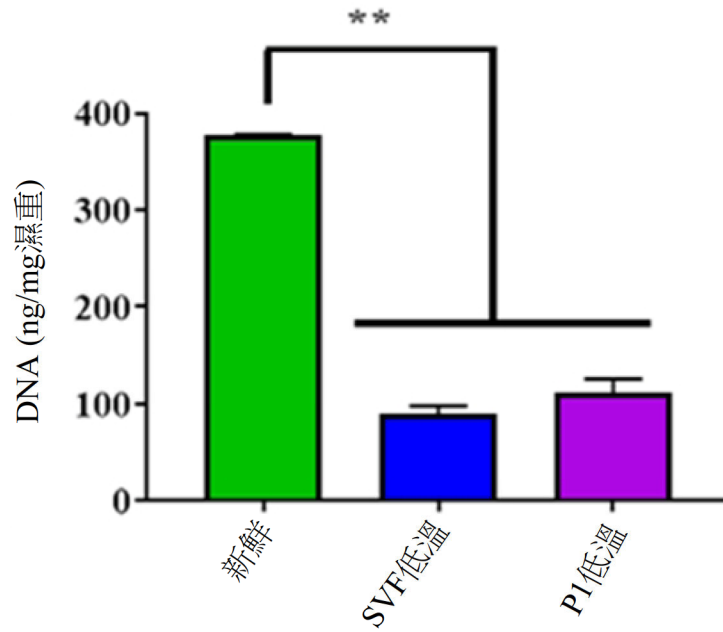
【圖3】



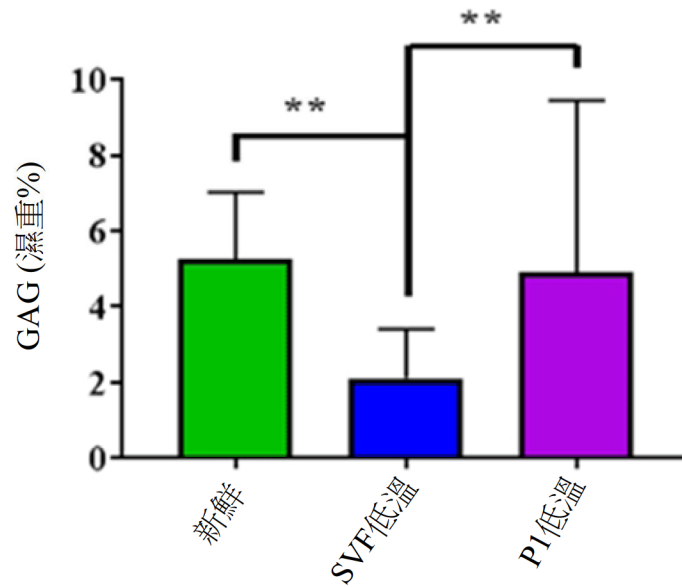
【圖4A】



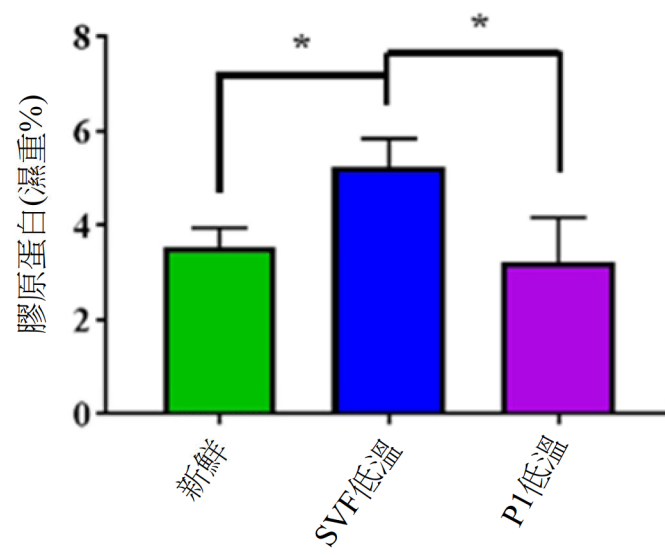
【圖4B】



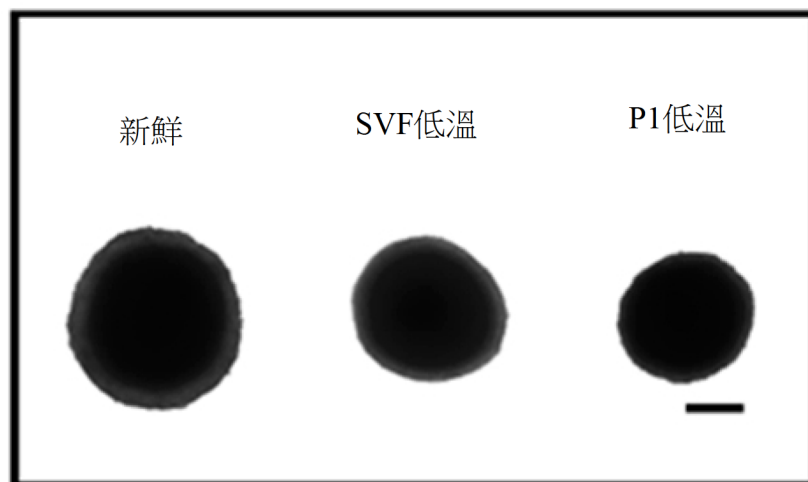
【圖4C】



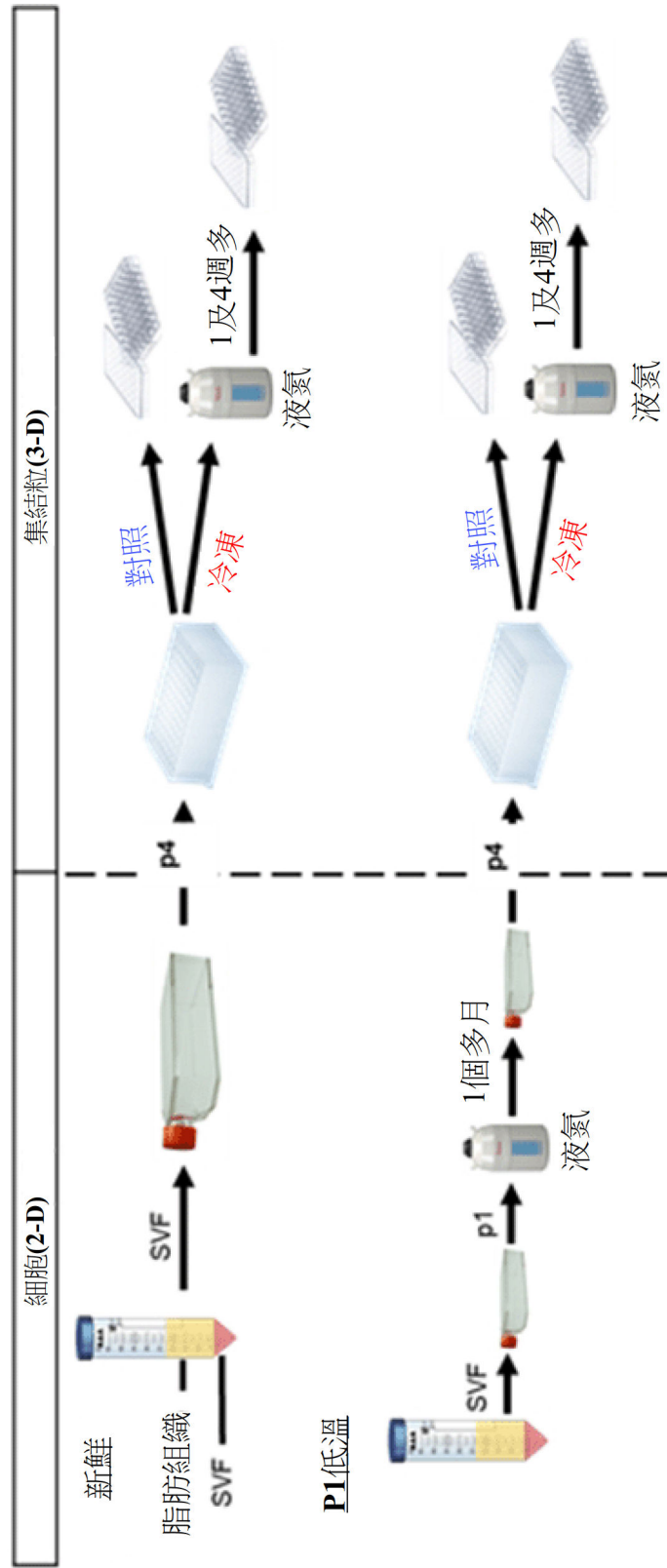
【圖4D】



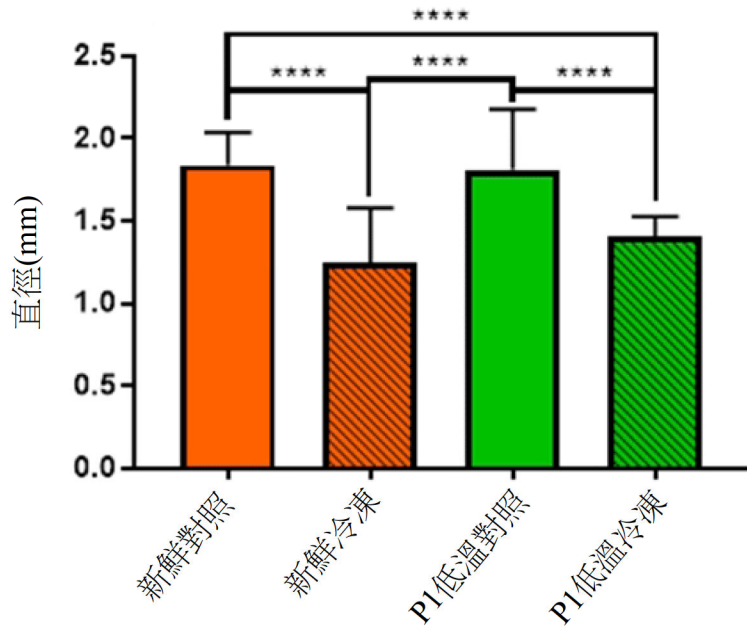
【圖4E】



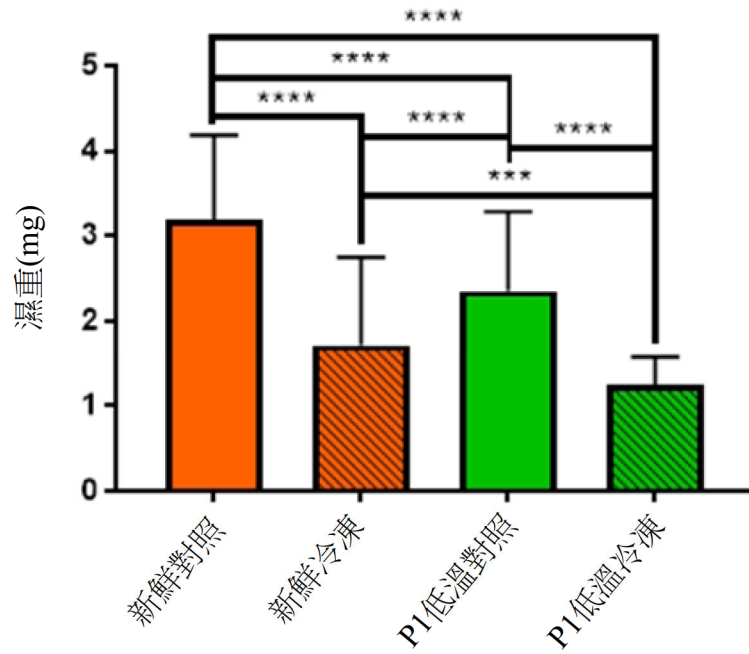
【圖4F】



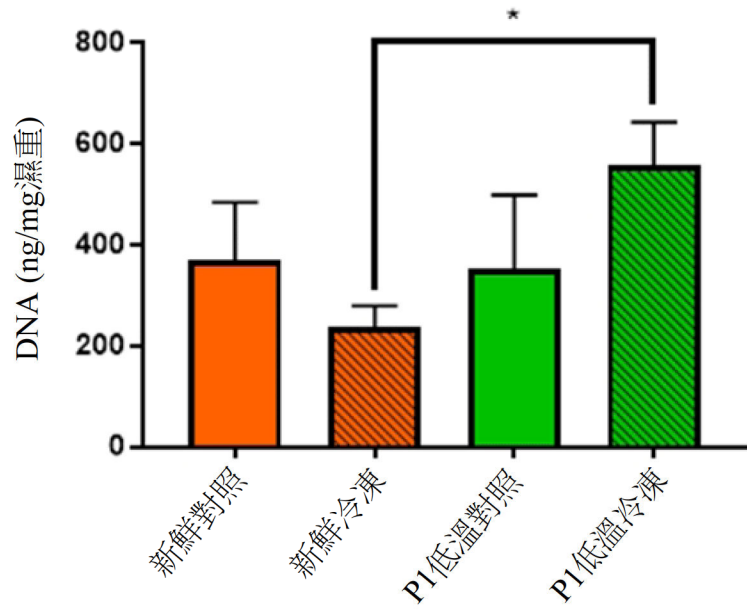
【圖5】



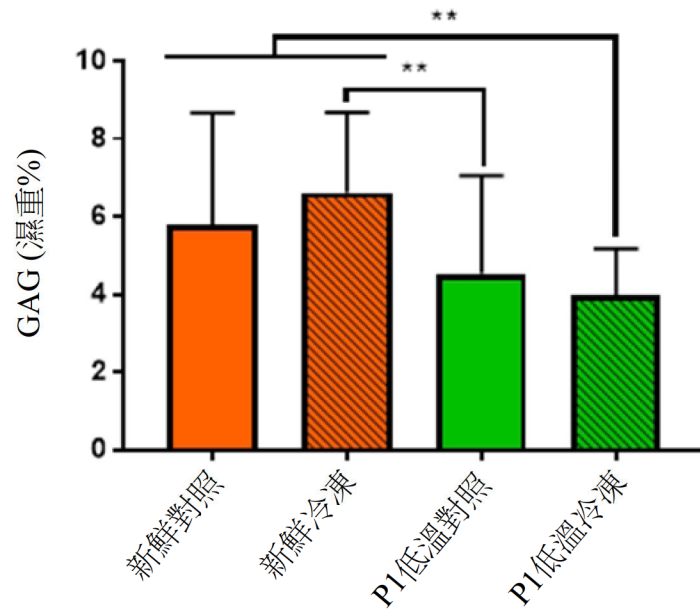
【圖6A】



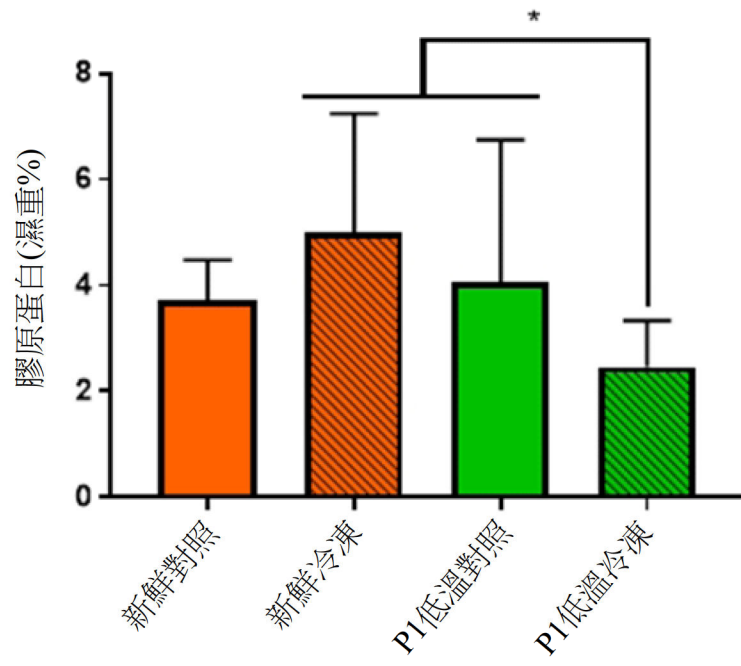
【圖6B】



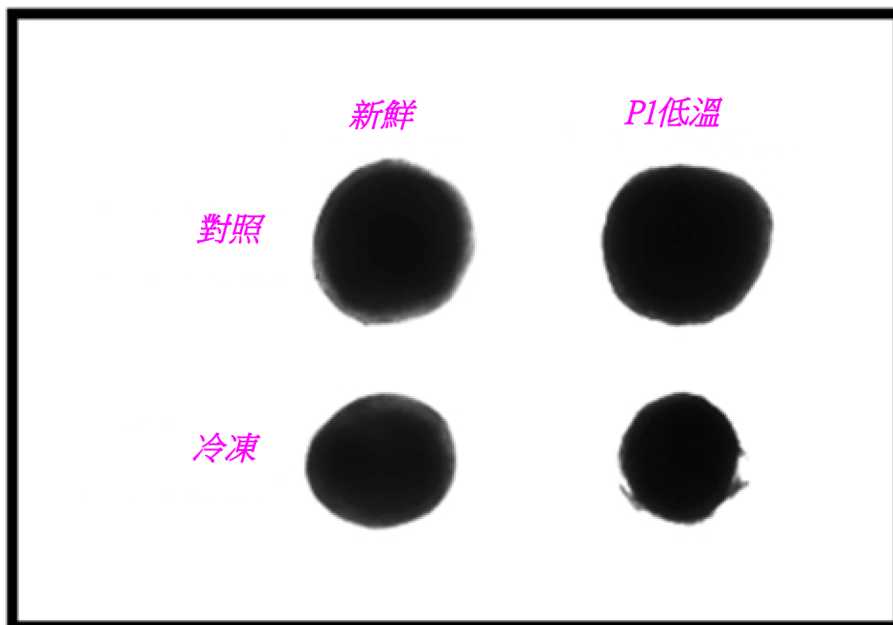
【圖6C】



【圖6D】

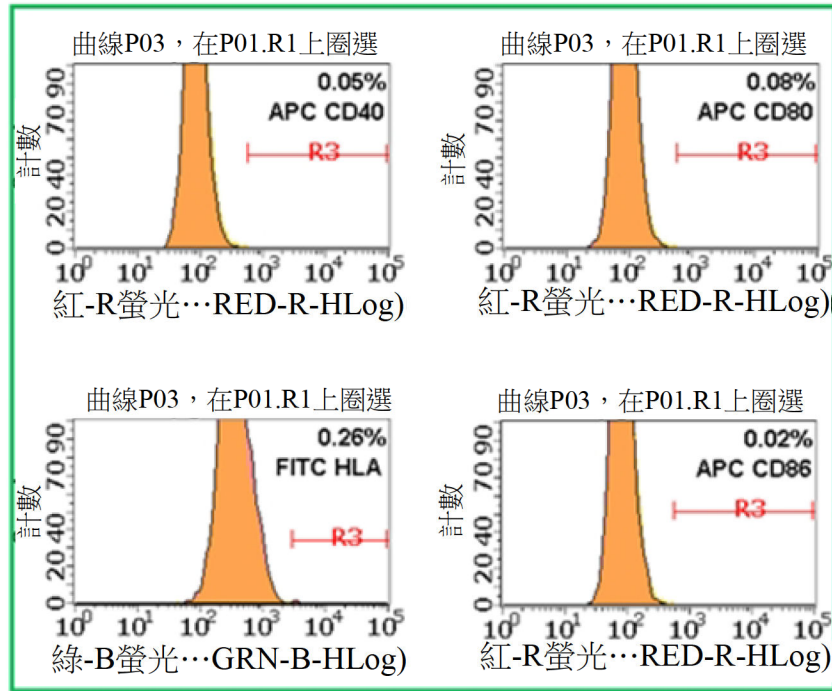


【圖6E】

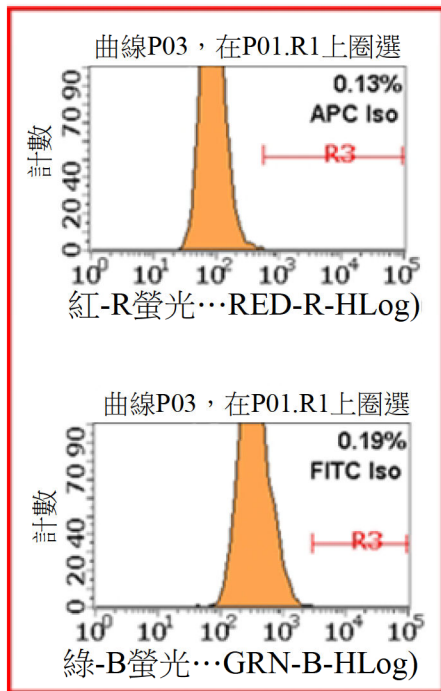


【圖6F】

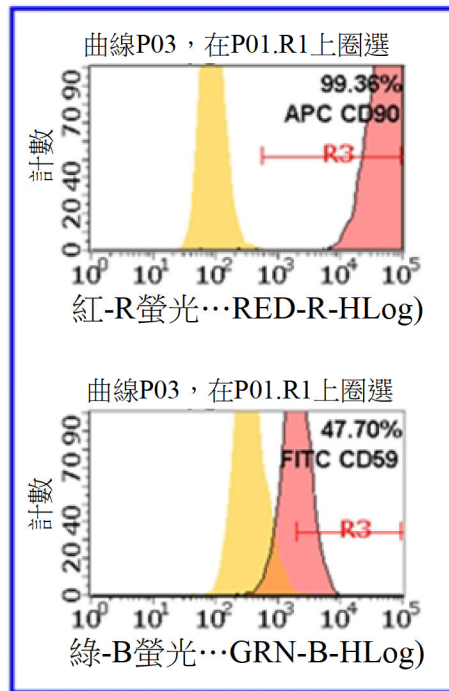
典型供體之免疫原性資料集



免疫原性標記物



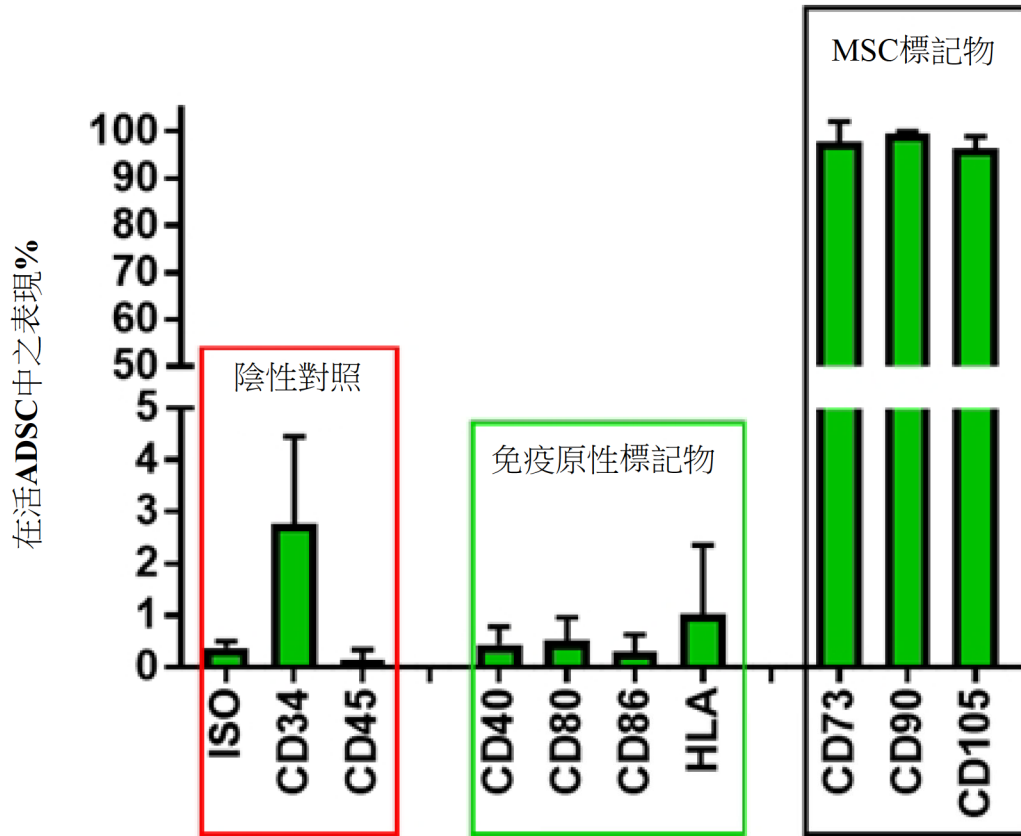
陰性對照



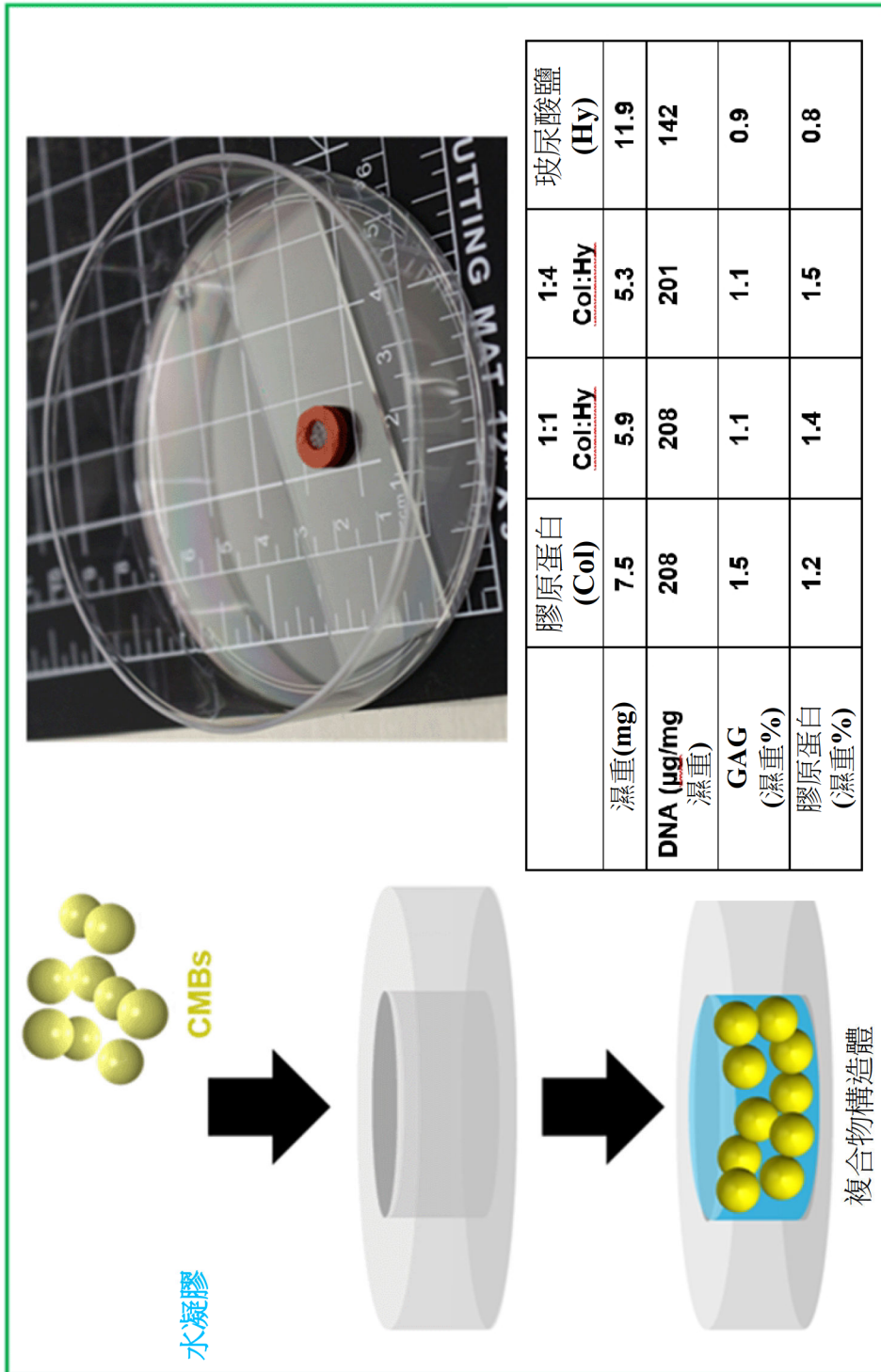
陽性對照

【圖7A】

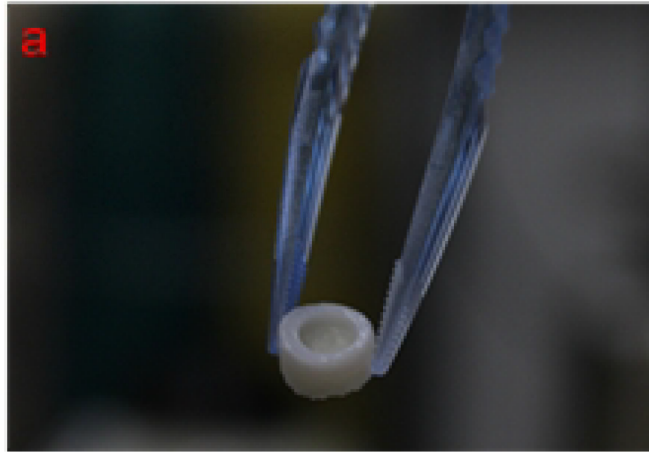
ADSC之表面標記物特徵



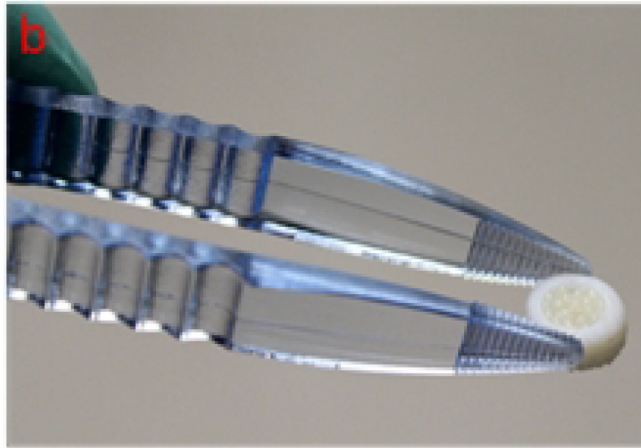
【圖7B】



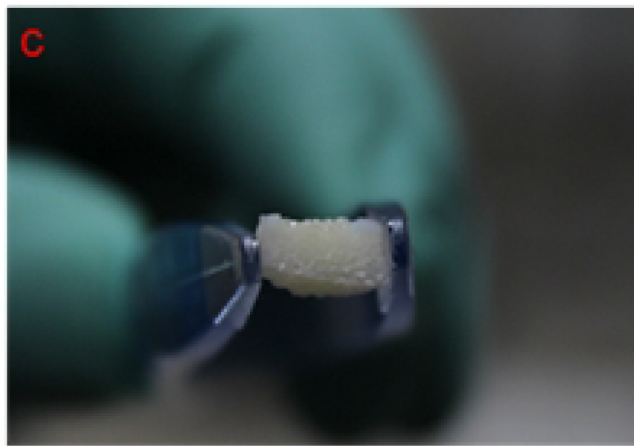
【圖8】



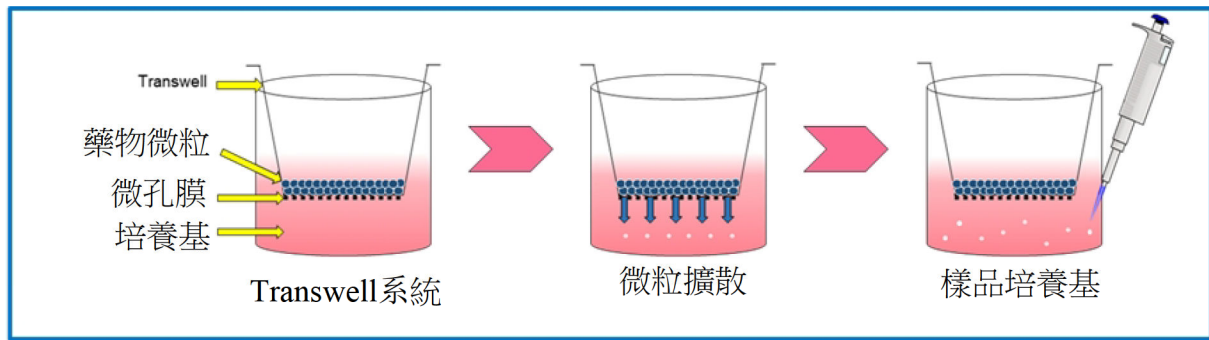
【圖9A】



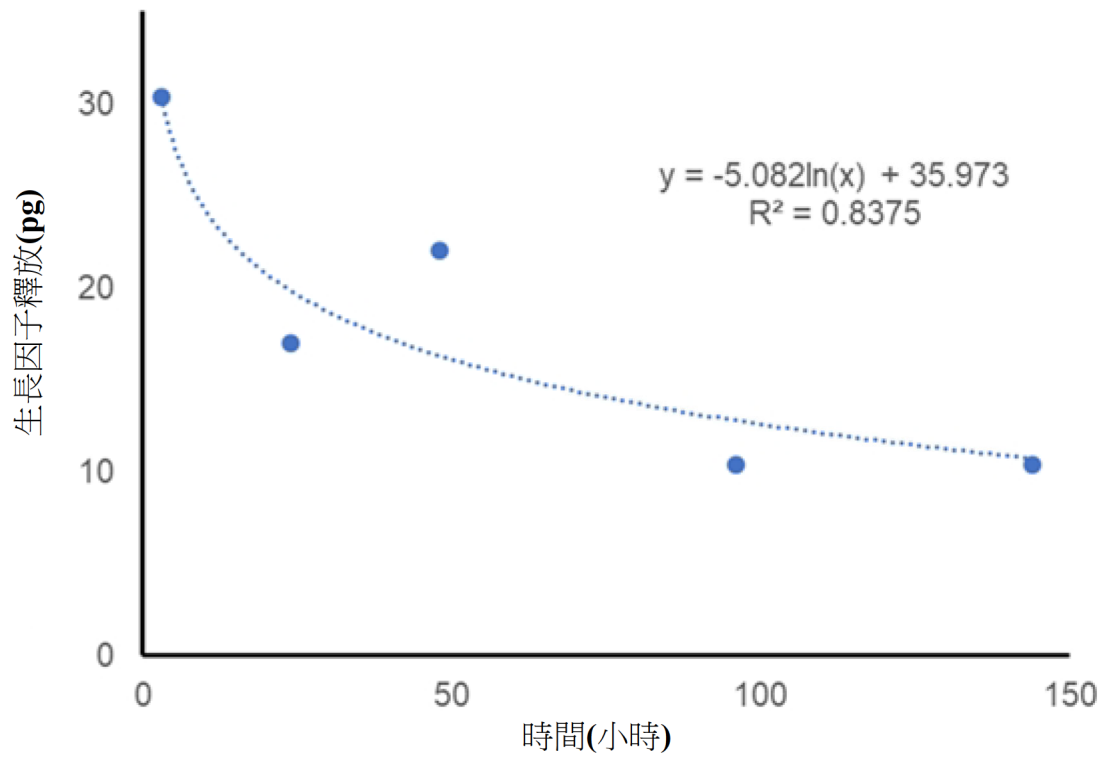
【圖9B】



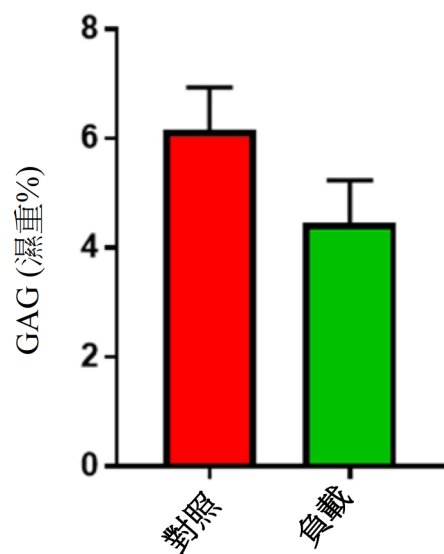
【圖9C】



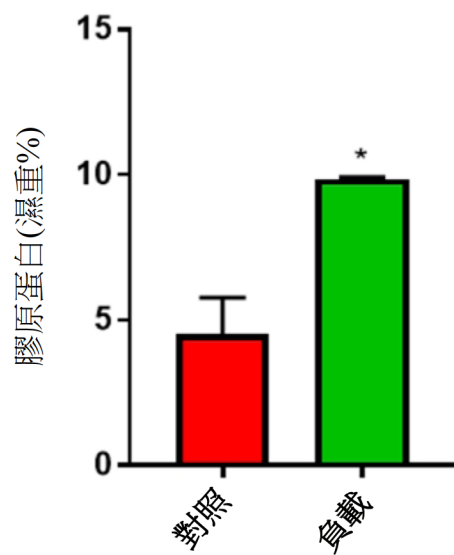
【圖10A】



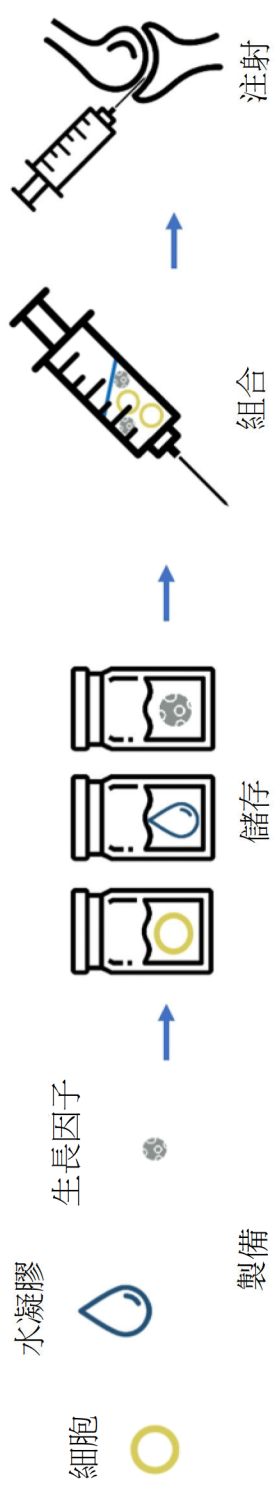
【圖10B】



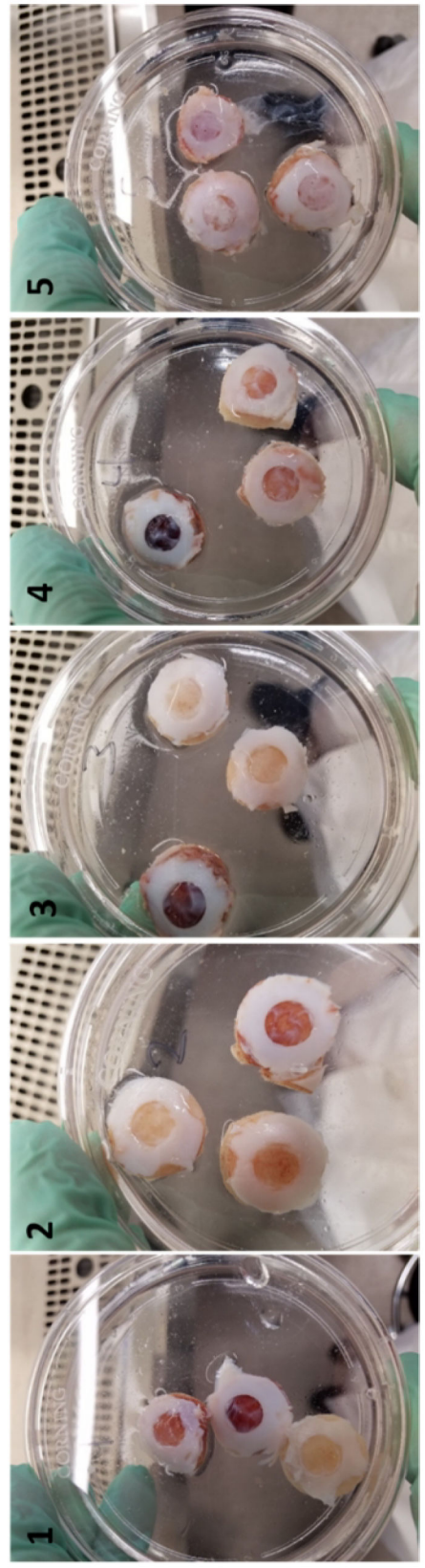
【圖11A】



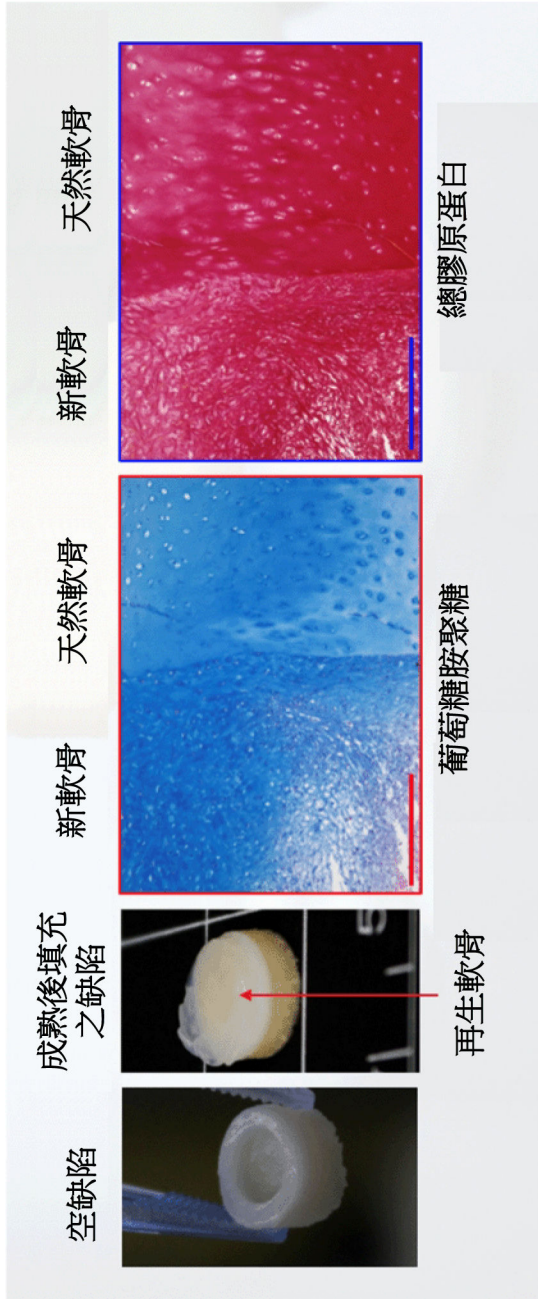
【圖11B】



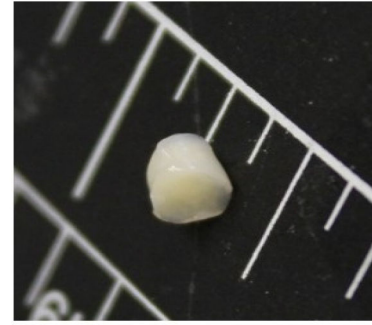
【圖12】



【圖13】



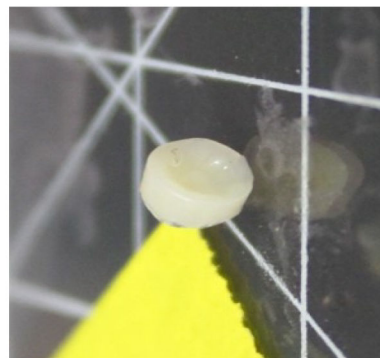
【圖14】



50K/CMB

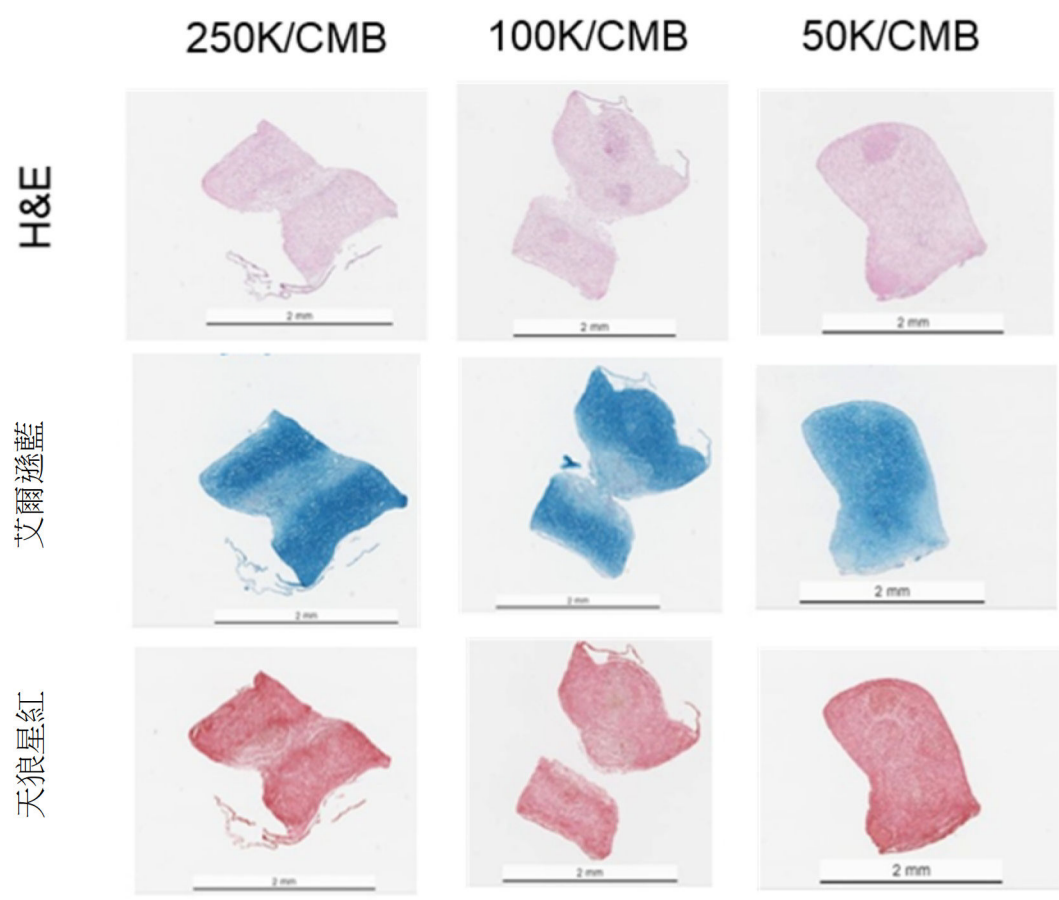


100K/CMB



250K/CMB

【圖15A】



【圖15B】

組別	細胞數	濕重(mg)	DNA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	GAG (濕重%)	膠原蛋白(濕重%)
A	250k	13.7 \pm 2.7 (n=2)	1.3 \pm 0.3 (n=2)	4.1 \pm 0.1 (n=2)	1.8 \pm 0.2 (n=2)
B	100k	15.0 \pm 6.1 (n=3)	0.9 \pm 0.1 (n=2)	3.1 \pm 0.3 (n=2)	1.6 \pm 0.4 (n=2)
C	50k	17.9 \pm 0.6 (n=3)	0.9 \pm 0.1 (n=3)	3.2 \pm 0.4 (n=3)	1.6 \pm 0.2 (n=3)

【圖15C】