



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119677490 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202380041752.X	C • 布索拉托瓦尼
(22) 申请日 2023.03.23	(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
(30) 优先权数据 PCT/IB2022/000166 2022.03.23 IB	专利代理师 程伟 唐瑞庭
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.11.20	(51) Int.Cl.
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2023/057545 2023.03.23	A61K 6/17 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/180479 EN 2023.09.28	A61K 6/60 (2006.01)
(71) 申请人 日内瓦大学 地址 瑞士,日内瓦 申请人 国家科学研究中心 索邦大学	A61K 6/74 (2006.01)
(72) 发明人 T • 博尔托洛托 I • 克雷伊奇 N • 纳西夫 M • 拉马	A61K 6/75 (2006.01)
	A61K 6/838 (2006.01)
	A61K 6/891 (2006.01)
	权利要求书1页 说明书11页 附图10页

(54) 发明名称
用作牙本质替代品的组合物

(57) 摘要
本发明涉及用于牙本质修复的包含骨胶原微粒、仿生羟基磷灰石或仿生羟基磷灰石前体和 在生理学上相容的水性溶剂的组合物,所述骨胶原微粒包含大于90重量%的骨胶原。

1. 一种用于牙本质修复和再生的组合物,其包含:
 - 未交联且未变性的骨胶原微粒,其包含大于90重量%的骨胶原;
 - 仿生羟基磷灰石或仿生羟基磷灰石前体;和
 - 在生理学上相容的水性溶剂。
2. 根据权利要求1所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其中,所述骨胶原微粒具有通过电子显微镜测量的0.05微米至20微米范围的直径。
3. 根据权利要求1或2所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其中,所述骨胶原微粒是I型骨胶原微粒。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其中,所述在生理学上相容的水性溶剂是生理血清、磷酸盐缓冲液、碳酸氢钠或血液。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其中,所述组合物还包含一种或多种治疗剂或生物活性剂。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其中,所述骨胶原微粒与仿生羟基磷灰石的重量比或者所述骨胶原微粒与仿生羟基磷灰石前体的重量比的范围为10:90至90:10,优选30:70至80:20,更优选为30:70。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其中,水性溶剂与致密骨胶原微粒和羟基磷灰石或无定形磷酸钙的混合物的重量比的通常范围为1.8至10,优选2至9,更优选3至8。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其用于修复牙齿牙本质损伤的用途。
9. 根据权利要求1至7中任一项所述的用于牙本质修复和再生的组合物,其用于当龋洞已经形成时修复牙本质的用途。

用作牙本质替代品的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及牙本质的修复和再生领域。

背景技术

[0002] 世界人口的长寿命预期,加上患者终生保留他们牙齿的意愿,已经影响了牙科专业处理龋齿过程的方式。传统的由“龋洞-修复-新龋齿-修复替换-牙齿弱化-拔牙”组成的用于牙科护理的手术模式方法已逐渐被保守得多的医疗模式所取代,其中微创牙科占上风。在这种背景下,牙医越来越有兴趣尽可能地保留牙釉质和牙本质。此外,牙齿基质的再矿化可以被认为是龋齿预防和非手术治疗策略的基础。

[0003] 牙本质主要由羟基磷灰石(HAp)晶体和I型骨胶原组成。龋病是由细菌产生的酸引起的,这些酸溶解HAp晶体并破坏骨胶原纤维。除非脱矿过程通过增加局部pH值有利于牙本质上的矿物质沉积而逆转为矿化,否则龋齿过程将持续进行直至形成牙龋洞。这种龋洞需要用不同类型的材料填充,这是牙医日常临床工作的基础,填充龋洞,龋洞只不过是疾病的晚期症状,这种疾病最初是从牙齿表面的简单脱矿开始的。有时,龋洞的延伸和深度会损害牙齿的机械完整性和牙髓(神经)活力。

[0004] 国际专利申请W02007/009477公开了骨修复组合物用作医疗应用的生物材料,例如骨植入材料或牙科粘固粉,所述骨修复组合物包含基质构建聚合物(即骨胶原),其中含有羟基磷灰石颗粒(所述颗粒的50%的尺寸为5纳米或更小)。W02007/009477中使用的羟基磷灰石至少在化学组成、尺寸和形状方面与仿生羟基磷灰石不同。而且,组合物中的骨胶原浓度不足以获得液晶组织。此外,W02007/009477教导了可以用明胶代替骨胶原,或者可以在高达45°C的温度下制备组合物,从而允许在40°C以上工作,在此温度下骨胶原不可逆变性地体外变成胶凝材料。最后,W02007/009477中示例的组合物在使用前均干燥形成粉末,使得骨胶原变成易碎的海绵状材料,而不是包括条纹原纤维的水凝胶。

[0005] 在这种情况下,能够“修复”龋齿牙本质的齿状材料是理想的。具体地,需要一种能够在龋病的晚期阶段(即已经形成龋洞时)修复脱矿牙本质的齿状材料。

发明内容

[0006] 本发明涉及一种用于牙本质修复和再生的组合物,其包含:

[0007] -未交联且未变性的骨胶原微粒,其包含大于90重量%的骨胶原;

[0008] -仿生羟基磷灰石或仿生羟基磷灰石前体;和

[0009] -在生理学上相容的水性溶剂。

[0010] 本发明还涉及一种预成型的可植入基质,其包含本文公开的组合物。

[0011] 本发明的其他方面如本文和权利要求书中所公开的。

附图说明

[0012] 图1:混合式骨胶原材料的TGA热谱图,示出了初始重量(骨胶原微粒含有约10重

量%的水)与测量的有机和无机含量(初始骨胶原/羟基磷灰石比例1:1)之间具有良好的一致性。

[0013] 图2:对用盐水溶液制备的不同骨胶原材料的DSC分析,示出了典型的骨胶原变性的相似吸热峰。

[0014] 图3:对混合式骨胶原溶液的PLM观察:明亮的双折射纹理证明了各向异性组织。

[0015] 图4:矿化骨胶原材料的SEM显微照片,显示了原纤维形成之前(左)部分溶解的骨胶原微粒。原纤维形成之后(右),材料呈现出更明确的骨胶原原纤维。

[0016] 图5:矿化骨胶原凝胶(骨胶原/羟基磷灰石比例1:1)的SEM显微照片,显示了致密基质中的原纤维排列域。

[0017] 图6:具有高干物质含量的骨胶原/HA 50:50基质的未染色超薄切片的TEM显微照片,显示了骨胶原原纤维和羟基磷灰石纳米片的共排列。

[0018] 图7:牙本质/混合物界面处的能量色散X射线光谱(EDS)化学分布(每种情况:右栏:C平均值;中栏:P平均值,左栏:Ca平均值)。

[0019] 图8:实施例2的组合物在脱矿牙本质上的横截面扫描电子显微镜(SEM)微观形态。生物改性层的存在被标记在两条白线之间。

[0020] 图9:实施例3的组合物在脱矿牙本质上的横截面SEM微观形态。生物改性层的存在被标记在两条黑线之间。

[0021] 图10:实施例4的真空干燥的可注射混合式材料的SEM显微照片,显示了混合物3的紧密有机-无机结合。

[0022] 图11:实施例4的真空干燥的可注射混合式材料的SEM显微照片,显示了混合物3的紧密有机-无机结合。

[0023] 图12:应用在脱矿牙本质上的实施例4的真空干燥的可注射混合式材料的横截面SEM微观形态。生物改性层的存在被标记在两个白色箭头之间。

[0024] 图13:实施例4的真空干燥的可注射混合式材料的横截面SEM微观形态,显示了当应用到牙本质上时混合物3的仿生性质。

[0025] 图14:应用在脱矿牙本质上的实施例4的真空干燥的可注射混合式材料的横截面SEM微观形态。仿生界面用白色箭头标记。看到仿生混合物与下面的牙本质非常好地结合在一起。

具体实施方式

[0026] 本发明人已经发现,包含仿生羟基磷灰石或无定形磷酸钙和致密骨胶原微粒的组合物能够修复脱矿牙本质。注射后,该组合物在微观结构方面具有仿生性,可以作为促进牙本质修复的支架。这种组合物的主要优点在于,由于其与牙本质相似的组成,它用作牙本质粘附的新基质。

[0027] 因此,本发明涉及如下文所公开的组合物,其用于牙本质修复和再生,特别是用于修复牙齿牙本质的损伤。

[0028] 组合物

[0029] 根据本发明使用的组合物包含:

[0030] -致密骨胶原微粒(即微粒包含大于90重量%的骨胶原);

[0031] -仿生羟基磷灰石或仿生羟基磷灰石前体或无定形磷酸钙;和

[0032] -在生理学上相容的水性溶剂。

[0033] 该组合物适合注射和/或植入。那么该组合物可以被定义为可注射的和/或可植入的。

[0034] 该组合物的组分如下文详细描述。

[0035] 致密骨胶原微粒

[0036] 本文所用的术语“致密骨胶原微粒”是指骨胶原微粒包含大于90重量%的骨胶原,特别是大于91重量%、92重量%、93重量%、94重量%、95重量%、96重量%、97重量%、98%重量的骨胶原,剩余的是水。

[0037] 致密骨胶原微粒如在W02016/146954中所公开的。

[0038] 致密骨胶原微粒呈由非变性且未交联的骨胶原形成的实心球体或类球体颗粒的形式。颗粒的直径通常为0.05至20微米,特别是0.25至10微米,更特别是0.4微米至3微米。应当理解,颗粒直径范围是指直径分布。颗粒的直径通常为0.05微米的最小直径至20微米的最大直径。

[0039] 本文所用的术语“类球体”是指其形状类似于球体的固体。

[0040] 术语“直径”是指球体的直径或类球体的最大直径。直径可以例如通过电子显微镜或通过动态光散射来测量。

[0041] 本文所用的术语“非变性”是指保留了 α -三螺旋的二级结构的骨胶原。骨胶原的非变性或变性性质可以例如通过量热分析来观察。变性骨胶原具有变性蛋白质(明胶)的量热曲线特征,没有组织化大分子域的迹象。干燥的骨胶原(形成没有任何条纹原纤维的海绵状材料)和凝胶化的骨胶原被认为是“变性的”骨胶原。使用非变性的骨胶原的优点在于,它将提高组合物作为仿生支架的能力,能够募集和激活硬组织形成细胞以刺激牙本质发生并因此刺激再生。

[0042] 本文所用的术语“未交联的”是指其中不存在交联键的骨胶原,无论这些键是化学改性(例如通过戊二醛的处理)还是酶促或物理改性的结果。交联的不存在可以通过例如电泳来确定。

[0043] 致密骨胶原微粒可以由多种骨胶原制备。因此,骨胶原的来源无关紧要。骨胶原可以按照以下方案获得:从Wistar大鼠尾腱制备I型骨胶原的溶液。在层流柜中切除后,用无菌盐水磷酸盐缓冲溶液清洗腱。然后将腱浸入4M氯化钠溶液中,以去除剩余的完整细胞并沉淀一些具有升高的分子量的蛋白质。用盐水磷酸盐缓冲溶液清洗后,将腱溶解在无菌的500mM乙酸溶液中。通过在41000克下离心2小时来使获得的溶液澄清。除骨胶原以外的蛋白质在300mM氯化钠水溶液中选择性地沉淀,并通过在41000克下离心3小时去除。在600mM氯化钠溶液中沉淀,然后在3000g下离心45分钟,从而从上清液中回收骨胶原。将获得的丸粒溶解在500mM乙酸水溶液中,然后在相同的溶剂中透析以除去氯化钠离子。使用前将溶液保持在4°C并在41000g下离心4小时。这个详细的方案可以应用于其他类型的骨胶原。

[0044] 致密骨胶原微粒的骨胶原通常具有200至450KDa的分子质量范围。

[0045] 致密骨胶原微粒的骨胶原通常是I型骨胶原。然而,骨胶原也可以是II、III、V、XI、XXIV、XXVII型及它们的混合物。

[0046] 致密骨胶原微粒可以通过W02016/146954中公开的喷雾加工技术来制备。简而言

之,喷雾加工技术是将酸溶性骨胶原溶液(非变性且未交联的骨胶原)雾化,以形成非常细的液滴的雾,通过在受控的气氛中蒸发溶剂立即干燥(得益于液滴的高溶液/空气界面面积)。酸性骨胶原溶液中骨胶原的浓度通常在0.1至10mg/L的范围。酸性骨胶原溶液的pH低于7。该酸通常是乙酸。酸性骨胶原溶液中的乙酸浓度通常在0.1至1000mM的范围。雾化通常在约40°C以下,特别是约39°C、38°C或37°C以下的温度下进行,以获得粉末状组合物。骨胶原滴中的浓度足够高以诱导骨胶原分子的自组装和随后的液晶有序,例如,向列取向域。这种策略使得可以在几秒钟内获得高度浓缩的骨胶原微粒,从而避免I型骨胶原溶液粘度的大幅增加,该大幅增加通常会阻碍该蛋白质的快速加工,从而阻碍其在生物浓度下的使用。

[0047] 因此,有利地,相对于组合物的总重量,组合物包含40mg/mL的骨胶原。

[0048] 仿生羟基磷灰石

[0049] 仿生羟基磷灰石的化学式为 $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$,其中 $0 \leq x \leq 2$ 。

[0050] 术语“仿生羟基磷灰石”是指骨状羟基磷灰石片,通过透射电子显微镜测量,其长度通常约为10至200纳米,宽度为25至100纳米,厚度为1至10纳米。。

[0051] 仿生羟基磷灰石通常为粉末形式。

[0052] 仿生羟基磷灰石粉末可以按照Nassif等人2010年在Chemistry of Materials,22(12),第3653-3663页中描述的程序合成。简而言之,仿生羟基磷灰石是通过氨(NH_3)蒸气扩散到酸性磷酸钙($\text{CaCl}_2\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ -或可能与其他盐,特别是 NaHCO_3)溶液中基于热力学条件制备的,以避免其他磷酸钙相的沉淀。例如,仿生羟基磷灰石可以通过 $\text{CaCl}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 酸性溶液(乙酸,500mM)的沉淀来制备,其中钙与磷(Ca/P)的摩尔比与具有式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 的羟基磷灰石的形成一致,或者,通过 $\text{CaCl}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHCO}_3$ 酸性溶液(乙酸,500mM)的沉淀来制备,其中钙与磷酸盐加碳酸盐(Ca/[P+C])的摩尔比与具有式 $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ (其中 $0 \leq x \leq 2$)的羟基磷灰石的形成一致。通过添加氨水溶液(30%,w/w)引发沉淀。

[0053] 这种沉淀方法不含任何有机添加剂,优点是在室温下在数小时内进行,无需直接控制pH,并且不会产生任何副产物或不期望的(即非生理)相。

[0054] 已知Nassif等人于2010年公开的仿生羟基磷灰石的合成得到在水中表现出与天然骨磷灰石相似的自组装性能的纳米片(Wang,Yan等人,“Water-mediated structuring of bone apatite”,Nature materials,12.12(2013):1144-1153)。已知纳米片具有结晶核和无定形壳,其X射线衍射图与JCPDS N 9-0432相匹配。它们的平均尺寸通常为 $200 \times 100 \times 5 \text{ nm}^3$,并且观察到骨矿物质的碳酸盐替代。非仿生羟基磷灰石,特别是不表现出无定形层的羟基磷灰石颗粒,不表现出这种自组装性能。

[0055] 应该指出的是,羟基磷灰石的成分也可以进行修改,特别是富含锶(高达10%的钙替代),以结合抗骨质疏松作用(Tovani等人,“Formation of stable strontium-rich amorphous calcium phosphate:Possible effects on bone mineral”,Acta biomaterialia,2019)。在这种情况下,富含锶的仿生羟基磷灰石通常具有下式: $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}\text{Sr}_y(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$,其中 $0 \leq x \leq 2$ 且 $0 \leq y \leq 10-x$,y例如等于 $0.1 \times (10-x)$ 。

[0056] 仿生羟基磷灰石前体

[0057] 术语“仿生羟基磷灰石前体”是指例如在Nassif等人,Chemistry of Materials,22(12),pp.3653-3663,2010中描述的条件下导致仿生羟基磷灰石形成的前体离子。

[0058] 合适的仿生羟基磷灰石前体包括 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 NaH_2PO_4 和 NaHCO_3 以及可以在矿物骨

组合物中发现的盐,包括镁盐、锌盐、氟盐和锶盐。

[0059] Ca/P的摩尔比范围通常为1.5至2。

[0060] 钙与磷酸盐加碳酸盐(Ca/[P+C])的摩尔比与优选具有式 $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ (其中 $0 \leq x \leq 2$)的羟基磷灰石的形成(通常为1.67;骨组织约为1.2-1.5)一致(Von Euw, scientific reports 2019)。

[0061] 无定形磷酸钙

[0062] 术语“无定形磷酸钙”是指无定形磷酸钙颗粒。无定形磷酸钙通常为粉末形式。

[0063] 无定形磷酸钙粉末可以通过使用喷雾加工技术雾化仿生羟基磷灰石前体酸性溶液来合成,如在W02016/146954中公开的。如通过透射电子显微镜所测量的,无定形磷酸钙粉末的平均尺寸范围通常为3至6微米。

[0064] 水性溶剂

[0065] 水性溶剂可以是任何在生理学上相容的水性溶剂。合适的水性溶剂的非限制性实例包括生理血清、磷酸盐缓冲液、碳酸氢钠、无菌水、生理盐水、血液或血浆。

[0066] 有利地,水性溶剂与致密骨胶原微粒和羟基磷灰石或无定形磷酸钙的混合物的重量比的范围通常为1.8至10,优选2至9,更优选3至8。

[0067] 当使用仿生羟基磷灰石前体时,该重量比对应于水性溶剂与用仿生前体获得的致密骨胶原微粒和等价羟基磷灰石的混合物的重量比。

[0068] 该浓度的优点在于该组合物不干燥,从而避免了骨胶原变性,并且其浓度足以保持骨胶原分子的自组装和随后的液晶有序(具有向列取向域),而仍可注射。

[0069] 任选的治疗剂或生物活性剂

[0070] 组合物可以包含一种或多种治疗剂或生物活性剂,例如抗炎剂、唾液、抗生素、成骨蛋白、透明质酸和抗骨质疏松剂(例如盐)。

[0071] 根据本发明使用的组合物通常每毫升组合物包含致密骨胶原微粒20毫克至100毫克,优选40毫克至80毫克,更优选50毫克至70毫克。

[0072] 在一些实施方案中,在组合物中的致密骨胶原微粒与仿生羟基磷灰石或无定形磷酸钙的重量比的范围为10:90至90:10,优选30:70至80:20,更优选50:50或30:70(其可按照方法1制备)。

[0073] 本领域技术人员将容易地调整致密骨胶原微粒与仿生羟基磷灰石或无定形磷酸钙的重量比,以使组合物的配方适应预期的用途和施用部位。

[0074] 本发明的组合物可以容易地植入或注射或以其他方式施用至需要牙本质修复的部位。例如,可以用注射器将组合物直接适当地注射到待修复的缺陷部位。该组合物能够填充目标缺陷并呈现相同的3D形状。该组合物具有足够的粘合性/粘性,无需外部辅助或试剂即可固定在缺陷处。

[0075] 或者,可以将组合物注入模具中以形成预成型基质。预成型基质是可植入的。本发明还涉及包含本文所公开的组合物的预成型的可植入基质,其用于牙本质修复,特别是用于修复牙齿牙本质的损伤,更具体地用于当龋洞已经形成时修复牙本质。

[0076] 根据本发明使用的组合物可以如下文所公开的那样适当地制备。

[0077] 当根据方法1制备组合物时,组合物可以更具体地定义为包含:

[0078] -致密骨胶原微粒(即,包含超过90重量%骨胶原的微粒);

[0079] -仿生羟基磷灰石片或无定形磷酸钙;和

[0080] -在生理学上相容的水性溶剂。

[0081] 当根据方法2制备组合物时,组合物可以更具体地定义为包含:

[0082] -混合式致密骨胶原微粒(即,包含仿生羟基磷灰石前体的致密骨胶原微粒);和

[0083] -在生理学上相容的水性溶剂,其任选地包含仿生羟基磷灰石前体。

[0084] 当根据方法3制备组合物时,组合物可以更具体地定义为包含:

[0085] -致密骨胶原微粒(即,包含超过90重量%的骨胶原的微粒);和

[0086] -包含仿生羟基磷灰石前体的在生理学上相容的水性溶剂。

[0087] 制备组合物的方法

[0088] 方法1:混合致密骨胶原微粒与羟基磷灰石或无定形磷酸钙

[0089] 该组合物可以通过将所需重量的致密骨胶原微粒(通常为粉末形式)与所需重量的羟基磷灰石或无定形磷酸钙粉末混合来制备。致密骨胶原微粒、羟基磷灰石粉末和无定形磷酸钙粉末可以如上文所述制备。致密骨胶原微粒和羟基磷灰石或无定形磷酸钙粉末通常在研钵中混合。致密骨胶原微粒与羟基磷灰石或无定形磷酸钙粉末的混合通常以适当选择的重量比进行,以复制目标组织并可适应目标应用。合适的致密骨胶原微粒与羟基磷灰石或无定形磷酸钙粉末的重量比的非限制性示例包括以下比率:10/90至90/10,优选30:70至80:20,更优选50:50或30:70。

[0090] 在以适当的重量比混合致密骨胶原微粒与羟基磷灰石或无定形磷酸钙粉末后,将如上所述的水性溶剂添加到混合物中。水性溶剂与致密骨胶原微粒和羟基磷灰石或无定形磷酸钙粉末混合物的重量比的范围通常为1.8至10(即范围为0.18毫升至1毫升溶剂/100毫克致密骨胶原微粒和羟基磷灰石或无定形磷酸钙粉末的混合物),优选为2至9,更优选为3至8。

[0091] 然后,可以用一种或多种治疗剂或生物活性剂,例如抗炎剂或抗骨质疏松剂来补充混合物。

[0092] 混合后,可以将获得的糊状或液体形式的组合物插入无菌注射器中。

[0093] 所公开方法的所有步骤优选在无菌条件下进行。

[0094] 然后可以将注射器储存在干燥的地方,温度低于骨胶原的变性温度,优选在4°C的冰箱中。

[0095] 或者,可以通过雾化包含仿生羟基磷灰石前体和骨胶原的酸性溶液来制备组合物(方法2),或者可以将致密骨胶原微粒与含有仿生羟基磷灰石前体的水性溶液混合(方法3)。

[0096] 方法2:包含仿生羟基磷灰石前体的骨胶原溶液的雾化

[0097] 该组合物可以通过包括雾化含有羟基磷灰石前体和骨胶原的溶液的步骤的方法来制备。该溶液通常具有酸性pH(即严格低于7)。

[0098] 喷雾处理技术如W02016/146954所公开的那样进行。使用酸溶性骨胶原溶液(非变性且未交联的骨胶原)进行雾化。酸性骨胶原溶液中骨胶原的浓度通常在0.1至10mg/L的范围。酸性骨胶原溶液的pH低于7。该酸通常是乙酸。酸性骨胶原溶液中的乙酸浓度通常在0.1至1000mM的范围。将骨胶原溶液与所需体积/浓度的仿生羟基磷灰石前体溶液混合(即,酸性骨胶原溶液补充有羟基磷灰石的离子前体)。在优选的设置中,通过将仿生羟基磷灰石片

溶解在酸性溶液中来制备仿生羟基磷灰石前体溶液。

[0099] 雾化通常在约40°C以下,特别是约39°C、38°C或37°C以下的温度下进行,以获得未变性的粉末状组合物。

[0100] 由雾化产生的微粒在本文中被称为“混合式致密骨胶原微粒”。混合式致密骨胶原微粒是含有仿生离子前体(例如 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 NaH_2PO_4 和 NaHCO_3)的致密骨胶原微粒。可以获得具有不同离子组成的混合式微粒。乙酸钙可用作氯化钙的替代品,以避免氯化钠沉淀。

[0101] 混合式致密骨胶原微粒和在生理学上相容的水性溶剂(包含或不包含仿生羟基磷灰石前体)的混合通常以适当选择的重量比进行,以复制目标组织并且可以适应目标应用。

[0102] 混合后,可以将获得的糊剂或液体形式的组合物插入无菌注射器中。

[0103] 所公开方法的所有步骤优选在无菌条件下进行。

[0104] 然后将注射器储存在温度低于骨胶原变性温度的干燥地方,优选在4°C的冰箱中。

[0105] 方法3:混合致密骨胶原微粒与仿生羟基磷灰石前体溶液

[0106] 可以通过将所需重量的致密骨胶原微粒(通常为粉末形式)与所需体积的仿生羟基磷灰石前体溶液混合来制备该组合物。致密骨胶原微粒和仿生羟基磷灰石前体溶液可以如上文所述来制备。致密骨胶原微粒和仿生羟基磷灰石前体溶液通常在研钵中混合。致密骨胶原微粒和仿生羟基磷灰石前体溶液的混合通常以适当选择的重量比进行,以复制目标组织并且可以适应目标应用。添加到致密骨胶原微粒中的仿生羟基磷灰石前体溶液的体积通常导致骨胶原的最终浓度为80mg/mL。

[0107] 混合后,可以将获得的糊剂或液体形式的组合物插入无菌注射器中。

[0108] 所公开的方法的所有步骤优选地在无菌条件下进行。

[0109] 然后将注射器储存在温度低于骨胶原变性温度的干燥地方,优选在4°C的冰箱中。

[0110] 现在将通过以下实施例来描述本发明的实施方案,这些实施例仅出于说明性目的而提供,并且不旨在限制本发明的范围。

[0111] 实施例

[0112] 实施例1:0.9%盐水中的可注射混合式材料(骨胶原/羟基磷灰石比例50:50)

[0113] 碳酸化羟基磷灰石的合成

[0114] 根据Nassif等人(Chemistry of Materials, 22(12), pp.3653-3663, 2010)描述的程序进行碳酸化羟基磷灰石的合成。

[0115] 110mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、33mM NaH_2PO_4 和33mM NaHCO_3 的溶液在500mM乙酸中制备。用37%的HCl溶液将pH调节至2.2。两个烧瓶(35毫升)中装有20毫升的该溶液,并置于密封室中(即放入覆盖有石蜡的1升烧杯中),第三个小瓶含有8毫升的28-30质量%的 NH_3 水溶液。在关闭之前,用被针刺穿了6个孔的石蜡膜覆盖这3个烧瓶,以减慢氨的气态扩散。然后将该设备放置6天。然后,通过在室温下离心(6000rpm, 20分钟)来收集沉淀,用超纯水洗涤直至上清液的pH接近洗涤水的pH。最后将得到的白色粉末在37°C的烘箱中干燥7天。然后将干燥的粉末在研钵中用杵精细研磨以获得细粉。

[0116] 通过气溶胶合成骨胶原微粒

[0117] 骨胶原微粒的合成按照Nassif等人(巴黎, 2018年, Injectable collagen

suspensions, the preparation method thereof, and the uses thereof, particularly for forming dense collagen matrices, 美国专利申请15/558,787) 和Lama等人 (Self-Assembled Collagen Microparticles by Aerosol as a Versatile Platform for Injectable Anisotropic Materials, Small, 第1902224页, 2019年) 描述的程序进行。

[0118] 将骨胶原原液(通常为1.3至5mg/mL)用乙酸(500mM)稀释,得到浓缩至1.2mg/mL的骨胶原溶液。将250毫升的所述溶液在喷雾干燥器(Büchi B290)中干燥。将喷雾干燥器放置在通风橱下,靠近移动可逆空调。通风橱下的温度理想地应保持在19°C和21°C之间(不利地在25°C以上)。骨胶原溶液的注射速度(以1.2mg/mL)由雾化器的蠕动泵控制,等于0.6mL/min。喷嘴的设定温度保持在30°C。在真空下稳定一小时后(启动蠕动泵之前),喷嘴的实际温度在34°C和35°C之间波动。在干燥塔和颗粒收集旋风分离器之间测量的系统内部温度在19°C和25°C之间。喷嘴出口处负责液滴剪切的气流为414L/h。吸力控制喷嘴出口和收集器之间液滴的干燥,设置为干燥系统最大容量的50%,即20m³/h。“喷嘴”参数用于防止溶液在喷嘴末端凝结,设置为2。塔与旋风分离器连接处两侧均放置铝,从而尽可能地避免热量损失。形成的颗粒由连接到烧瓶的高性能旋风分离器收集。为了回收残留在旋风分离器壁上的所有粉末并使产量最大化,在雾化结束时关闭温度设定点,并以10%的步长增加吸力,从50%(20m³/h)至100%(40m³/h),每步等待5分钟。工艺效率在50%和60%之间。为了确保无菌条件,可以使用BEKO技术公司销售的不同尺寸过滤器的商业设备。还建议在喷雾骨胶原之前使用>94°乙醇对整个装置进行消毒。

[0119] 可注射组合物的制备

[0120] 将60毫克的如本文上述公开获得的骨胶原粉末和60毫克的如本文公开获得的羟基磷灰石粉末在研钵中混合。在研钵中加入1毫升的无菌盐水(NaCl 0.9%)。将整体混合约一分钟以获得均匀的糊剂。将糊剂转移至空的1毫升注射器中。将柱塞放回原位。然后可以将糊剂注入缺陷处。

[0121] 预成型基质的制备

[0122] 重复上述方案。将混合物通过注射器注入所需尺寸和总体积1毫升的硅胶模具中。在氨蒸气下过夜进行原纤维形成(凝胶化)。然后将凝胶从模具中取出并用盐水冲洗直至达到中性pH。然后可以将材料植入与模具形状相对应的龋洞中。

[0123] 可注射材料和预成型材料的表征

[0124] 方法:

[0125] 热重分析(TGA):使用NIETZSCH STA409PC仪器在热微天平上进行实验,在氧化气氛下从室温到850°C,加热速率为5°C/min。

[0126] 差示扫描量热法(DSC):使用TAQ-20机器进行实验。加热速率设定为5°C/min,温度范围为20°C至80°C。称取约20毫克的材料并放入密封的铝盘中。使用空的密封铝盘作为参考。

[0127] 偏光显微镜(PLM):将材料未经任何处理地放置在载玻片和盖玻片之间。使用传输器Zeiss AxioImager A2 POL进行观察。该显微镜配备了用于在偏振光(即正交偏振器)下检查双折射样品的标准附件和AxioCam CCD相机。

[0128] 扫描电子显微镜(SEM):将样品固定在2.5%戊二醛溶液中。在二甲胂酸盐/蔗糖缓冲溶液中洗涤后,使其通过乙醇浴(30%至100%乙醇)脱水。通过CPD-300(Leica)进行超临

界CO₂干燥。将干燥后的样品切成片,放在覆盖样品架的碳带上,覆盖15纳米金层。使用在3kV和30pA下操作的日立S-3400N显微镜进行观察。

[0129] 考虑到骨胶原微粒中存在水(约10%),材料的最终组成与初始混合物的组成一致(图1)。

[0130] 骨胶原的变性温度约为48°C。这接近报道的骨胶原凝胶的变性温度(Tiktopulo和Kajava,1998),表明添加盐水可以促进原纤维形成。事实上,当氨蒸气诱导原纤维形成时(矿化的骨胶原凝胶),变性温度保持不变。在骨胶原微粒和盐水混合物中添加羟基磷灰石似乎会引发有利的相互作用:变性焓更高,且吸热线半高处的宽度不太重要(图2)。这意味着添加HA往往会使骨胶原纤维(或微纤维)群体均质化。

[0131] 通过PLM观察到(图3),该解决方案显示出双折射域,证明了材料的各向异性,并证实这些条件下添加羟基磷灰石不会阻止液晶相中骨胶原的自组装。

[0132] 可以使用SEM,通过观察对齐的矿化骨胶原纤维群而看到这种局部各向异性(图4)。在原纤维形成之前,该材料还显示出部分溶解的骨胶原微粒。微粒的溶解可以通过注射前的混合时间来调节。原纤维形成后,观察到更明确的原纤维。

[0133] 实施例2:在2mM乙酸中的可注射混合式材料(骨胶原/羟基磷灰石比例50:50)

[0134] 可注射混合式材料的制备

[0135] 将40毫克如本文上述公开所获得的骨胶原粉末和40毫克如本文上述公开所获得的羟基磷灰石粉末在研钵中混合。将0.15毫升的2mM乙酸添加到研钵中。将整体混合约一分钟以获得均匀的糊剂。将糊剂转移至空的1毫升注射器中。将柱塞放回原位。然后可以将糊剂注入缺陷处。

[0136] 材料的表征

[0137] SEM观察显示纤维排列区域(图5)。该材料看起来致密。

[0138] SEM揭示了骨胶原原纤维和羟基磷灰石纳米片的共排列区域,类似于在致密骨中观察到的区域(图6)。

[0139] 实施例3:在2mM乙酸中的可注射混合式材料(骨胶原/羟基磷灰石比例30:70)

[0140] 可注射混合式材料的制备

[0141] 将24毫克如本文上述公开所获得的骨胶原粉末和56毫克如本文上述公开所获得的羟基磷灰石粉末在研钵中混合。将0.15毫升的2mM乙酸添加到研钵中。将整体混合约一分钟以获得均匀的糊剂。将糊剂转移至空的1毫升注射器中。将柱塞放回原位。然后可以将糊剂注入缺陷处。

[0142] 实施例4:在2mM乙酸中的可注射混合式材料(骨胶原/无定形磷酸钙比例30:70)

[0143] 无定形磷酸钙的制备

[0144] 无定形磷酸钙粉末是使用如W02016/146954中公开的喷雾加工技术,通过雾化110mM CaCl₂·2H₂O、33mM NaH₂PO₄和33mM NaHCO₃在500mM乙酸中的仿生羟基磷灰石前体酸性溶液来合成的。

[0145] 预成型混合式材料的制备

[0146] 将40毫克如本文上述公开所获得的骨胶原粉末和40毫克如本文上述公开所获得的无定形磷酸钙粉末在研钵中混合。将0.15毫升的2mM乙酸添加到研钵中。将整体混合约一分钟以获得均匀的糊剂。可以通过1毫升注射器将糊剂注入模具中或用抹刀将其涂抹到模

具中。原纤维形成在氨蒸气下进行三个小时。然后将凝胶脱模并用PBS冲洗直至达到中性pH。然后可以将材料植入与模具形状相对应的龋洞中。

[0147] 实施例5:可注射和预成型材料(致密骨胶原微粒与仿生羟基磷灰石前体溶液混合)

[0148] 可注射组合物的制备

[0149] 将90毫克如本文上述公开所获得的骨胶原粉末与1毫升如本文公开所获得的仿生羟基磷灰石前体溶液混合。将整体混合约一分钟以获得均匀的糊剂。将糊剂转移至空的1毫升注射器中。将柱塞放回原位。然后可以将糊剂注入缺陷处。

[0150] 预成型基质的制备

[0151] 重复上述方案。将混合物通过注射器注入所需尺寸和总体积1毫升的硅胶模具中。原纤维形成(凝胶化)在氨蒸气下进行过夜。然后将凝胶从模具中取出并用盐水冲洗直至达到中性pH。然后可以将材料植入与模具形状相对应的龋洞中。

[0152] 实施例6:通过气溶胶合成混合式骨胶原微粒

[0153] 骨胶原微粒的合成按照Nassif等人(巴黎,2018年,Injectable collagen suspensions,the preparation method thereof,and the uses thereof,particularly for forming dense collagen matrices,美国专利申请15/558,787)和Lama等人(Self-Assembled Collagen Microparticles by Aerosol as a Versatile Platform for Injectable Anisotropic Materials,Small,第1902224页,2019年)描述的程序进行。此外,在雾化之前将仿生羟基磷灰石前体中存在的盐添加到低浓度骨胶原酸性骨胶原溶液中,形成最终组合物:2mg/mL骨胶原,500mM乙酸,110mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,33mM NaH_2PO_4 和33mM NaHCO_3 。可以修改离子前体的组成,以形成具有不同矿物质/骨胶原比例的混合式骨胶原微粒,并负载不同的治疗离子,例如 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 。

[0154] 例如,可以将 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 添加到仿生羟基磷灰石前体溶液中以获得相对于 Ca^{2+} 的10% Sr^{2+} (mol/mol)。

[0155] 可注射组合物的制备

[0156] 将如本文上述公开所获得的90毫克骨胶原粉末与1毫升500mM乙酸混合。将整体混合约一分钟以获得均匀的糊剂。将糊剂转移至空的1毫升注射器中。将柱塞放回原位。然后可以将糊剂注入缺陷处。可以使用不同重量的离子来获得不同的矿物质/骨胶原比例。

[0157] 预成型基质的制备

[0158] 重复上述方案。将混合物通过注射器注入所需尺寸和总体积1毫升的硅胶模具中。在氨蒸气下过夜进行原纤维形成(凝胶化)。然后将凝胶从模具中取出并用盐水冲洗直至达到中性pH。然后可以将材料植入与模具形状相对应的龋洞中。

[0159] 实施例7:通过实施例2和3的组合物研究Ca和P离子对来自I类龋洞的脱矿深层牙本质的恢复

[0160] 牙龋洞的制备

[0161] 在匿名收集的拔除臼齿中制备深I类龋洞。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)和马血清溶液进行管内流体流动,以模拟活体牙齿的生物环境,如在Bortolotto T,Onisor I,Krejci I,Proximal direct composite restorations and chairside CAD/CAM inlays: Marginal adaptation of a two-step self-etch adhesive with and without

selective enamel conditioning, Clin Oral Invest 2007;11:35-43中所公开的。

[0162] 在龋洞制备后,考虑了四种牙本质治疗。

[0163] 健全牙本质的阳性对照

[0164] 将玻璃离聚物粘固粉(Fuji IX, GC)填充到位于健全牙本质上的制备好的牙龋洞中,并在牙本质灌注下于37°C保存15天。

[0165] 脱矿牙本质的阴性对照

[0166] 将制备好的牙龋洞用37% H_3PO_4 水溶液蚀刻20秒,然后填充玻璃离聚物粘固粉,并在牙本质灌注下于37°C保存15天。

[0167] 用实施例2或3的组合物涂覆的脱矿牙本质的制备

[0168] 将制备好的牙龋洞用37% H_3PO_4 水溶液蚀刻20秒。然后施加实施例2或实施例3的组合物层。将薄层的光固化粘结剂(Optibond FL的粘结剂)放置在顶部,以将混合物层与粘固粉隔离开并避免任何化学相互作用。施用玻璃离聚物粘固粉后,将牙齿在牙本质灌注下于37°C保存15天。

[0169] 材料的表征

[0170] 将牙齿样品切片、抛光,并提取牙本质/混合物界面处的扫描电子显微镜(SEM)微形态评估和能量色散光谱(EDS)化学概况。

[0171] 通过EDS评估,钙(Ca)、磷(P)和碳(C)峰根据牙本质表面处理类型而变化。C峰与暴露的骨胶原量相关,因为当Ca(8)和P(2)的峰最低时,在脱矿牙本质(DD)中观察到高达41的峰(图7)。

[0172] 实施例2(HAp骨胶原混合物1)和实施例3(HAp骨胶原混合物2)的组合物呈现出最接近健全牙本质的峰,表明生物改性发生在脱矿牙本质表面上。鉴于牙本质表面上良好整合的层的形态,SEM显微照片证实了这些假设(图8和图9)。

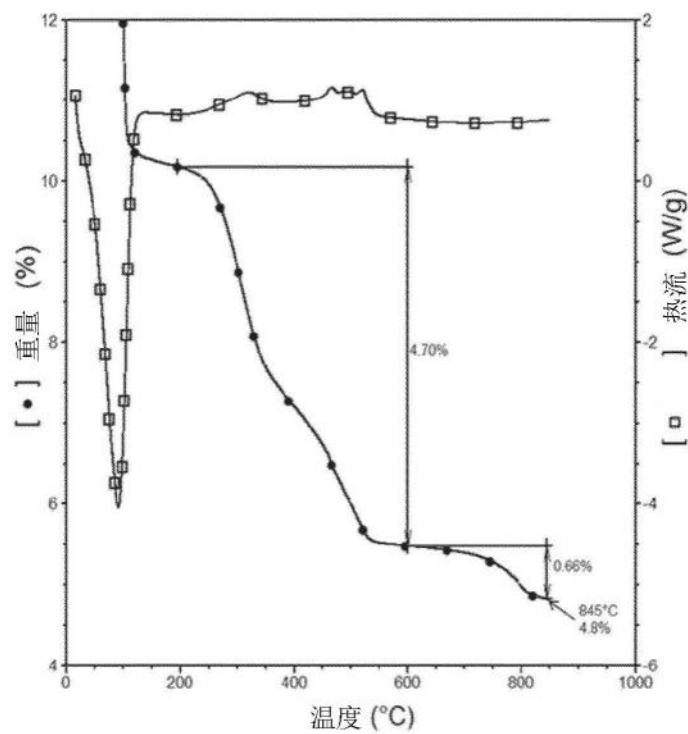
[0173] 因此,看来可以通过整合新形成的羟基磷灰石/骨胶原层来恢复脱矿牙本质,该新形成的羟基磷灰石/骨胶原层的特征与在健全牙本质上观察到的特征相似,特别是在使用实施例3的组合物(骨胶原/羟基磷灰石比例为30:70;“HAp骨胶原混合物2”)时。

[0174] 实施例8:使用实施例4的组合物对来自I类龋洞的脱矿深部牙本质的Ca和P离子图谱的研究(无定形磷酸钙40毫克+骨胶原/无定形磷酸钙44.4毫克,比例70/30,在2mM乙酸中:混合物3)

[0175] 以下步骤与实施例7相同:牙龋洞的制备、健全牙本质的阳性对照、脱矿牙本质的阴性对照、涂覆有实施例4的组合物的脱矿牙本质的制备以及材料的表征。

[0176] SEM显微照片显示矿化骨胶原材料在两种组分之间表现出非常紧密的结合(图10和图11)。牙本质与混合物3之间的界面特征是典型的仿生新层,其结构与下面的牙本质非常相似(图12至图14)。

凝胶：骨胶原+羟基磷灰石（HA）+NaCl 0.9%



组分	初始重量 (mg)	测量重量 (mg)
骨胶原	60	47
HA + NaCl	60+9	55

图1

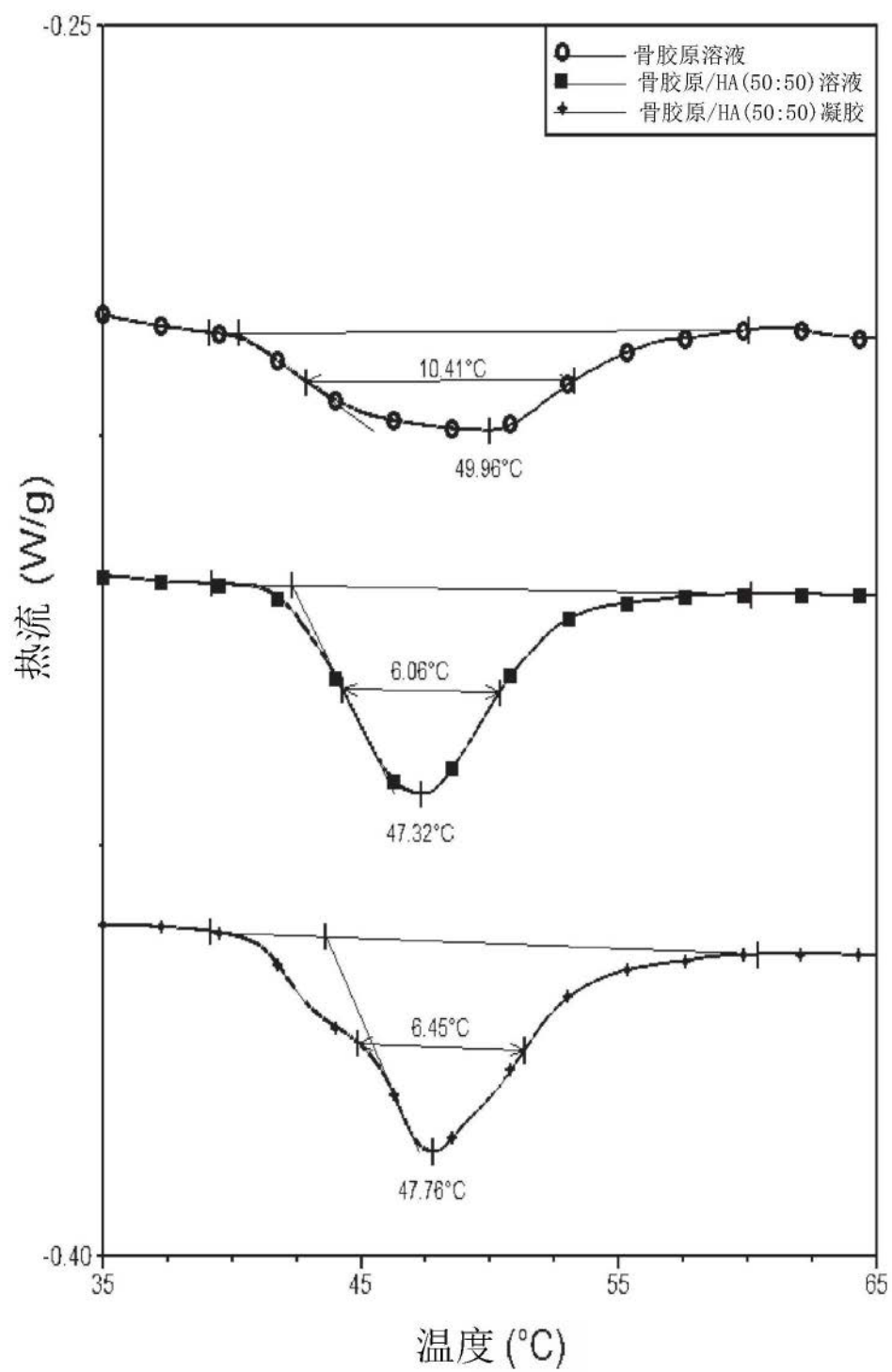


图2

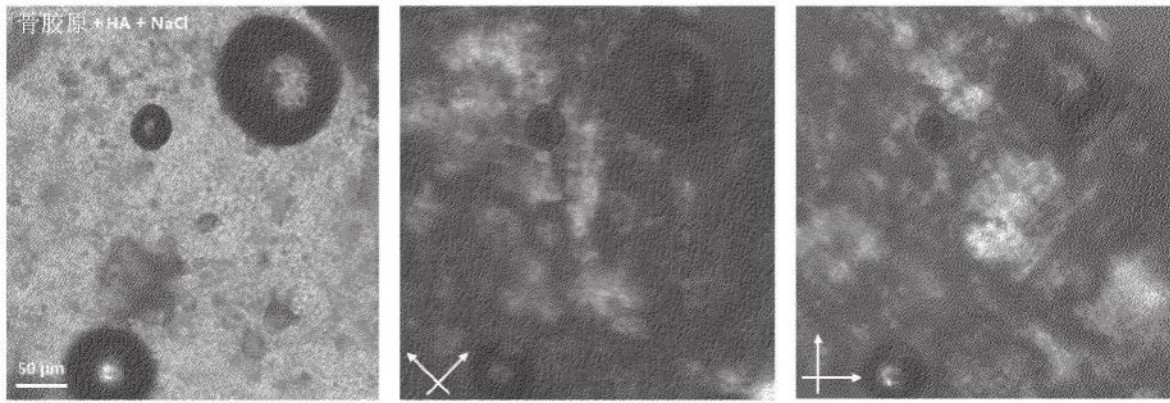


图3

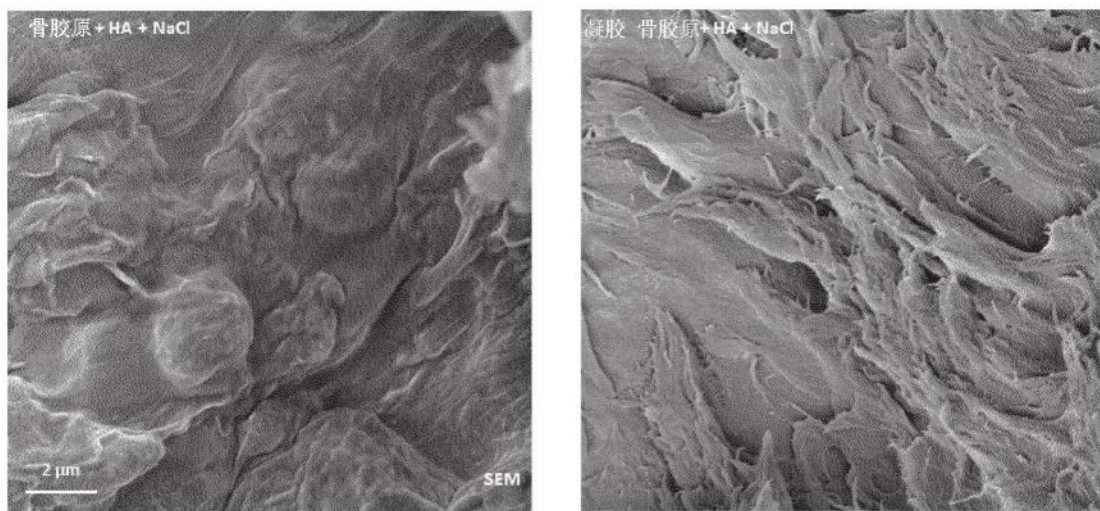


图4

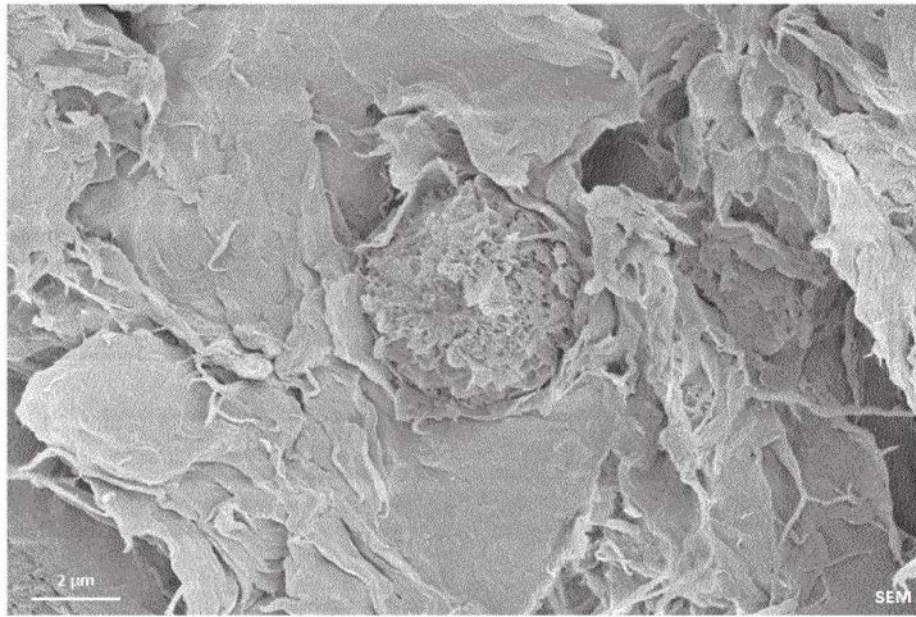


图5

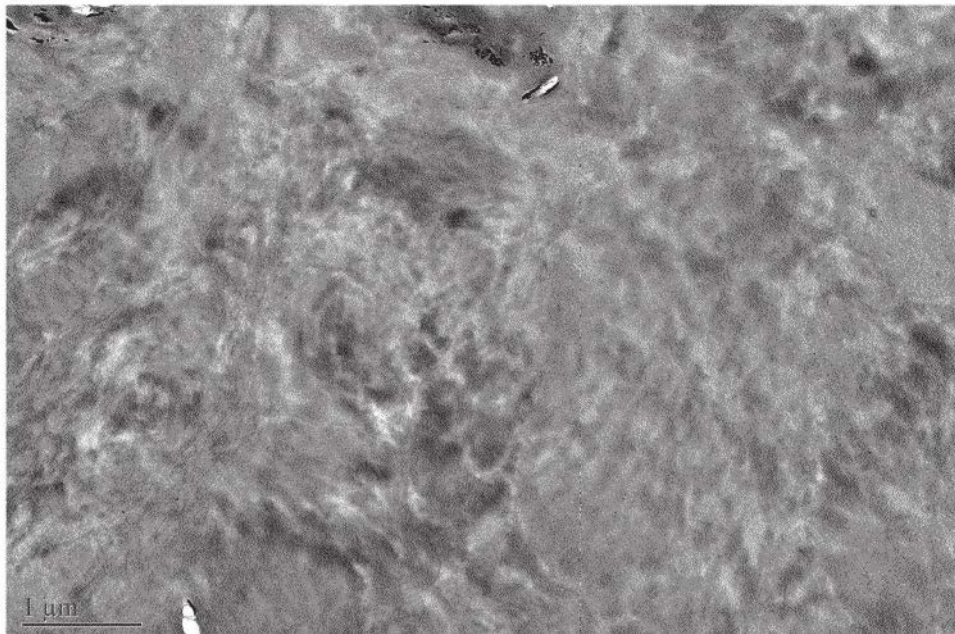


图6

在四个牙本质条件中的EDS元素峰

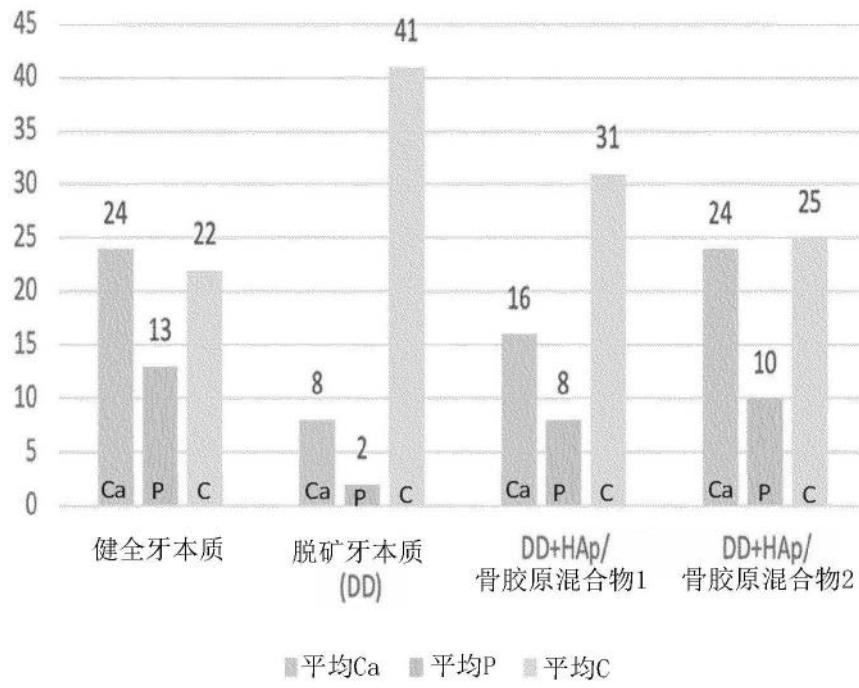


图7

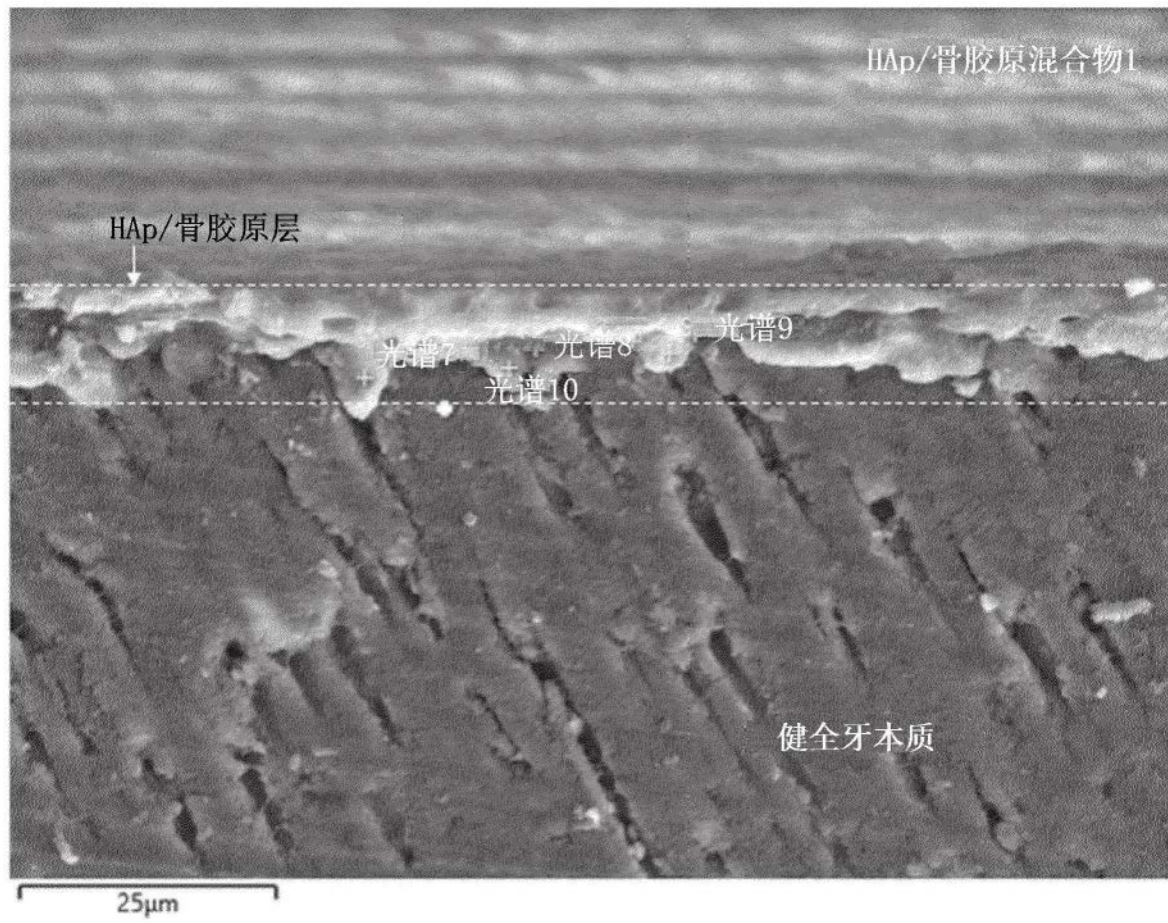


图8

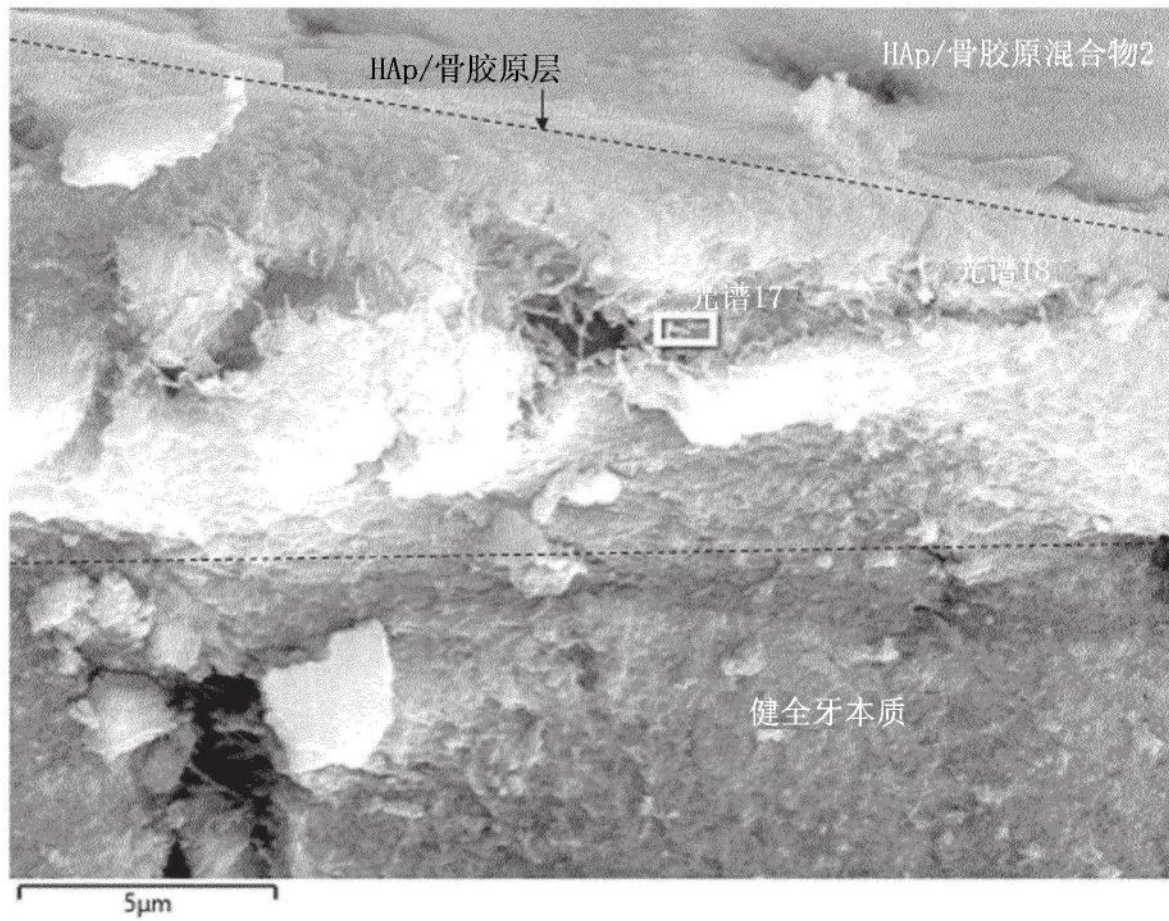


图9

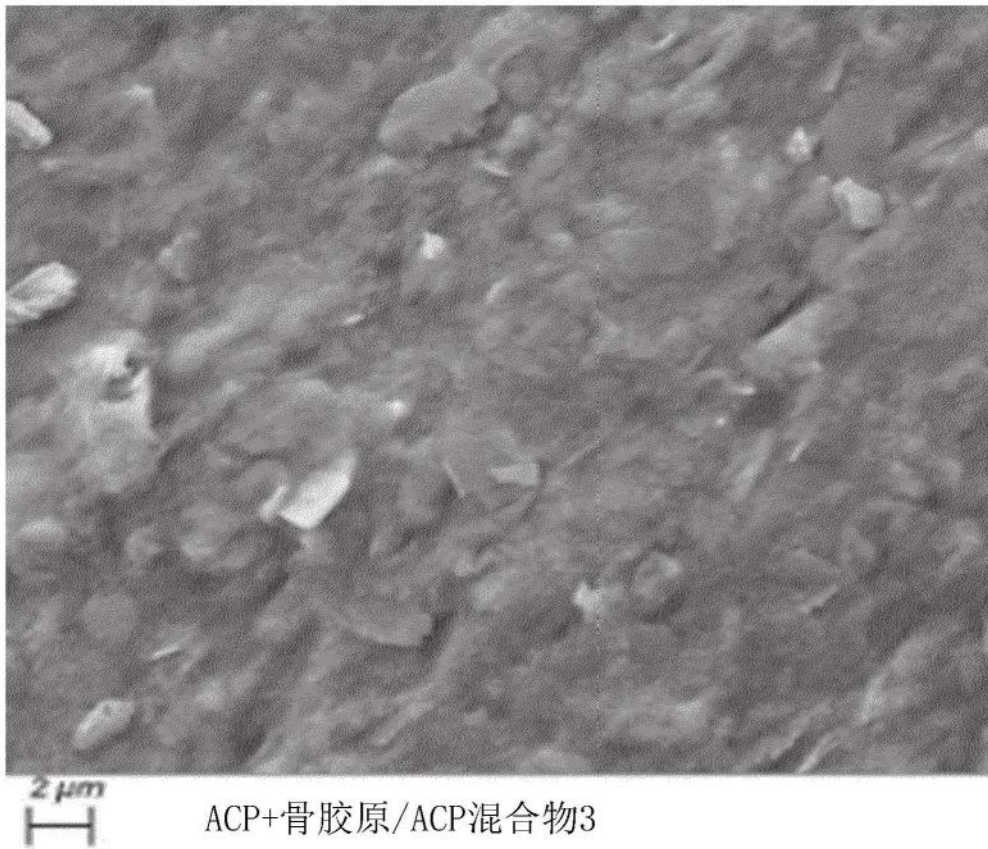


图10

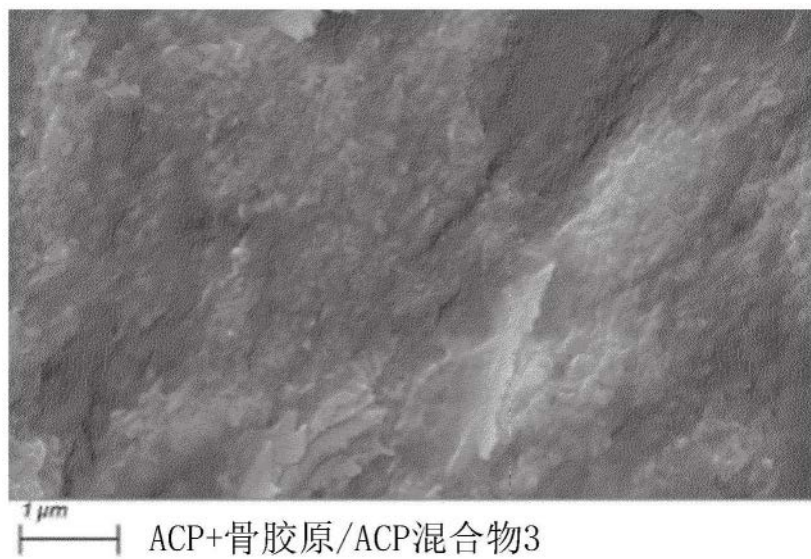


图11

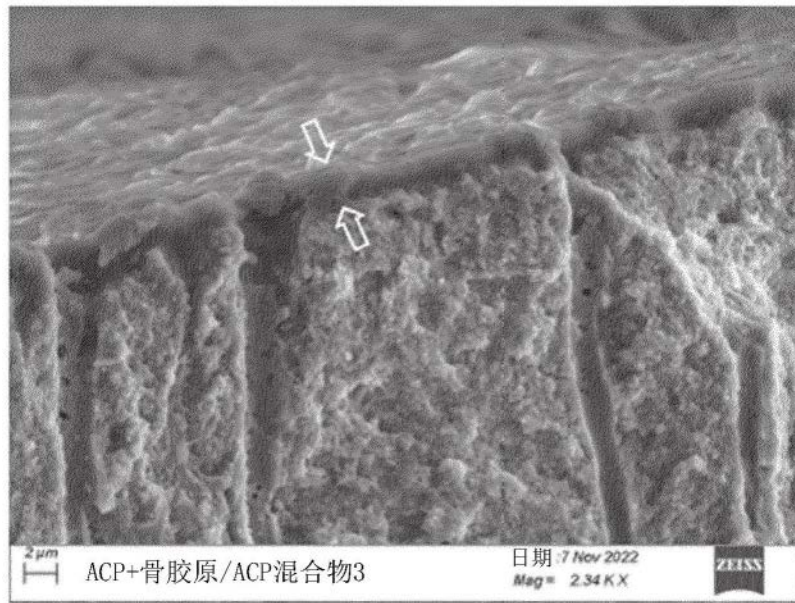


图12

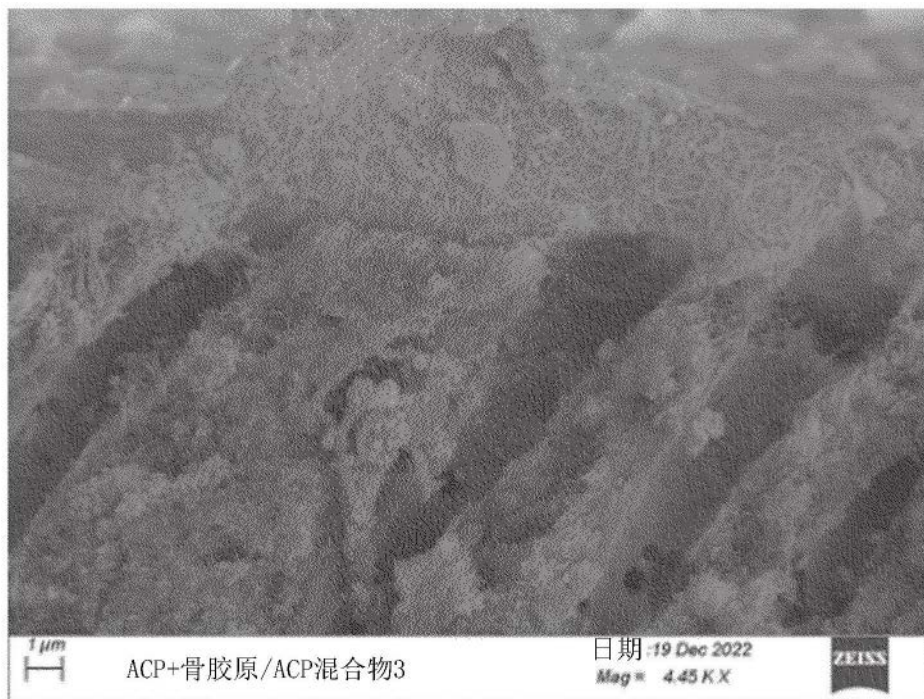


图13

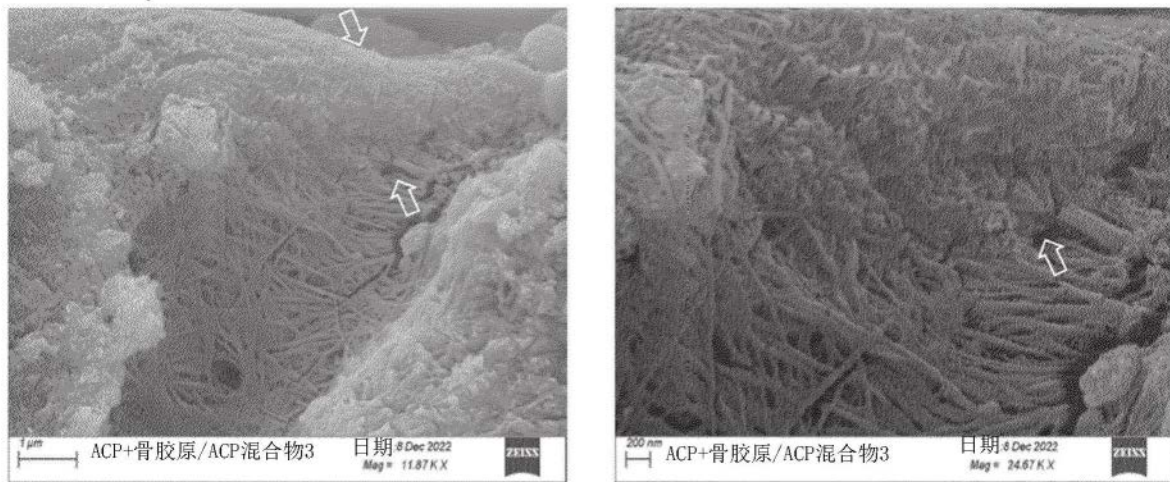


图14