



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102281868 A

(43) 申请公布日 2011.12.14

(21) 申请号 200980154601.5 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2009.11.19 A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
(30) 优先权数据 A61K 47/02 (2006.01)
0903803 2009.07.31 FR A61K 47/36 (2006.01)
61/116,144 2008.11.19 US A61K 38/18 (2006.01)
61/213,939 2009.07.31 US A61K 9/00 (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 A61L 24/00 (2006.01)
2011.07.15 A61L 27/46 (2006.01)
(86) PCT申请的申请数据
PCT/FR2009/001332 2009.11.19
(87) PCT申请的公布数据
W02010/058106 FR 2010.05.27
(71) 申请人 阿道恰公司
地址 法国里昂
(72) 发明人 G·索拉 R·索拉 O·索拉
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

权利要求书 8 页 说明书 36 页

(54) 发明名称
成骨蛋白复合物的新型施用形式

(57) 摘要

本发明涉及由包含至少一种不溶性钙盐和至少一种在成骨蛋白与多糖之间的复合物的共沉淀物组成的成骨组合物,所述共沉淀物以分开形式存在。本发明还涉及使得能够实施本发明的试剂盒。本发明还涉及制备以分开形式存在的共沉淀物的方法,所述共沉淀物包含至少一种不溶性钙盐和至少一种在成骨蛋白与多糖之间的复合物。本发明还涉及包含所述共沉淀物的制剂、药物产品和医学装置。

1. 由至少一种在成骨蛋白与以其不溶解化形式存在的阴离子多糖之间的复合物和至少一种不溶性钙盐构成的共沉淀物,所述共沉淀物以分开的方式存在。

2. 根据权利要求 1 的共沉淀物,其特征在于,所述不溶性钙盐选自正磷酸钙,其以无水或水合的形式,单独地或作为混合物地。

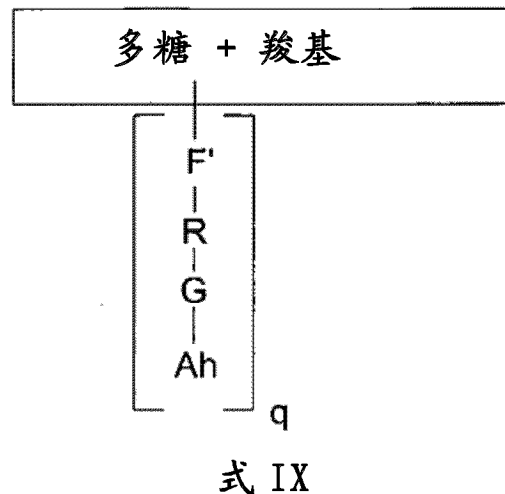
3. 根据前述权利要求中任一项的共沉淀物,其特征在于,所述共沉淀物另外还包含至少一种选自下列的不溶性钙盐:草酸钙、抗坏血酸钙、碳酸钙或硫酸钙。

4. 根据权利要求 1 的共沉淀物,其特征在于,所述不溶性钙盐选自在阳离子性钙离子与阴离子性离子之间形成的混合盐,所述阴离子性离子例如为单、二或三碱价的磷酸根类,多糖的羧酸根,碳酸根,氢氧化物,和可能的由碱所携带的阴离子。

5. 根据前述权利要求中任一项的共沉淀物,其特征在于,所述共沉淀物另外还包含至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子。

6. 根据前述权利要求中任一项的共沉淀物,其特征在于,所述阴离子多糖选自通过疏水性衍生物进行官能化的多糖。

7. 根据前述权利要求中任一项的共沉淀物,其特征在于,所述阴离子多糖选自通式 IX 的包含部分地被疏水性醇取代的羧基官能团的多糖:



其中

-q 表示被 F'-R-G-Ah 取代的多糖的羧基官能团的摩尔份数,并且为 0.01-0.7,

-F' 为酰胺官能团,

-G 为酯官能团、硫酯官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团,

-R 为包含 1-18 个碳的链,其任选地是支化的和 / 或不饱和的,任选地包含一个或多个杂原子,例如 O、N 或 / 和 S,并且具有至少一个酸官能团,

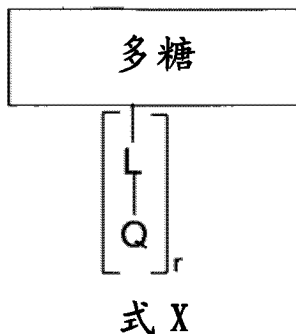
-Ah 为疏水性醇的残基,其从该疏水性醇的羟基官能团和由基团 R 所携带的至少一个亲电子官能团之间的偶联而产生,

- 当该多糖的羧基官能团不被 F'-R-G-Ah 取代时,那么该多糖的所述羧基官能团为阳离子的羧酸盐,所述阳离子优选地为碱金属阳离子,例如 Na⁺ 或 K⁺,

所述包含羧基官能团的多糖在中性 pH 下是两亲性的。

8. 根据前述权利要求中任一项的共沉淀物,其特征在于,所述包含羧基官能团的多糖为通式 X 的合成多糖,其从天然地包含羧基官能团的多糖获得或者从在其上嫁接有至少 15

个羧基官能团 / 100 个糖单元的中性多糖获得：



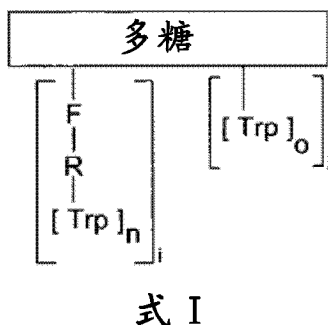
- 所述天然多糖选自多数地由 (1,6) 和 / 或 (1,4) 和 / 或 (1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键构成的多糖，

-L 为由于连接臂 Q 和该多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生的键，并且为酯官能团、硫酸酯官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团或醚官能团，

-r 表示取代基 L-Q 的摩尔份数 / 多糖的糖单元，

-Q 为包含 1-18 个碳的链，其任选地是支化的和 / 或不饱和的，包含一个或多个杂原子，例如 O、N 或 / 和 S，并且包含至少一个羧基官能团，-CO₂H。

9. 根据权利要求 1 至 6 中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述阴离子多糖选自这样的阴离子多糖，其占多数地包含 (1,4)、(1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键，通过至少一个色氨酸衍生物进行官能化，并且符合下述通式 I：



● 该多糖占多数地由 (1,4) 和 / 或 (1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键构成，

● F 由于连接臂 R 和该中性或阴离子多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生，为酯官能团、硫酸酯官能团、酰胺官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团、醚官能团、硫酸醚官能团或胺官能团，

● R 为包含 1-18 个碳的链，其任选地是支化的和 / 或不饱和的，包含一个或多个杂原子，例如 O、N 和 / 或 S，并且具有至少一个酸官能团，

● Trp 为 L- 或 D- 色氨酸衍生物的残基，其从该色氨酸衍生物的胺和由基团 R 所携带的所述至少一个酸和 / 或由该阴离子多糖所携带的酸之间的偶联而产生，

n 表示被 Trp 取代的 R 的摩尔份数，并且为 0.05-0.7，

o 表示被 Trp 取代的多糖的酸官能团的摩尔份数，并且为 0.05-0.7，

i 表示由基团 R 所携带的酸官能团的摩尔份数 / 糖单元，并且为 0-2，

j 表示由该阴离子多糖所携带的酸官能团的摩尔份数 / 糖单元，并且为 0-1，

(i+j) 表示酸官能团的摩尔份数 / 糖单元，并且为 0.1-2，

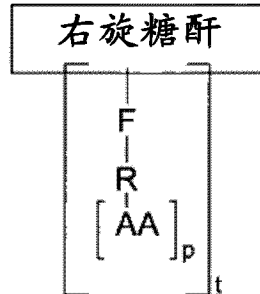
- 当 R 不被 Trp 取代时，那么基团 R 的所述酸为阳离子的羧酸盐，所述阳离子优选地为

碱金属例如 Na 或 K 的阳离子，

- 当该多糖为阴离子多糖时，当该多糖的酸官能团不被 Trp 取代时，那么所述酸官能团与阳离子成盐，所述阳离子优选地为碱金属阳离子，例如 Na⁺ 或 K⁺，

所述多糖在中性 pH 下是两亲性的。

10. 根据权利要求 1 至 6 中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述阴离子多糖选自下述通式 III 的经官能化的阴离子多糖：



式 III

● R 为包含 1-18 个碳的链，其任选地是支化的和 / 或不饱和的，包含一个或多个杂原子，例如 O、N 或 / 和 S，并且具有至少一个酸官能团，

● F 由于连接臂 R 和该中性或阴离子多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生，为酯官能团、硫酸酯官能团、酰胺官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团、醚官能团、硫醚官能团或胺官能团，

● AA 为疏水性 L- 或 D- 氨基酸残基，其从该氨基酸的胺和由基团 R 所携带的酸之间的偶联而产生，所述疏水性氨基酸选自色氨酸衍生物，例如色氨酸、色氨酸醇、色氨酸酰胺、2- 吡啶乙胺以及其碱金属阳离子盐，或者选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸以及其醇、酰胺或脱羧基衍生物，

t 表示取代基 F-R-[AA]_n 的摩尔份数 / 糖苷单元，并且为 0.1-2，

p 表示被 AA 取代的 R 的摩尔份数，并且为 0.05-1，

当 R 不被 AA 取代时，那么基团 R 的所述酸为阳离子的羧酸盐，所述阳离子优选地为碱金属阳离子，例如 Na⁺、K⁺。

11. 根据前述权利要求中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述成骨蛋白选自 BMP-2 (代勃特明-α)、BMP-4、BMP-7 (依托特明-α)、BMP-14 和 GDF-5，单独地或相组合地。

12. 根据权利要求 5 至 11 中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子为 PDGF。

13. 根据权利要求 6 至 12 中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述共沉淀物至少包含 BMP-2 和 PDGF-BB。

14. 根据权利要求 6 至 12 中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述共沉淀物至少包含 BMP-7 和 PDGF-BB。

15. 根据权利要求 6 至 12 中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述共沉淀物至少包含 GDF-5 和 PDGF-BB。

16. 根据权利要求 6 至 12 中任一项的共沉淀物，其特征在于，所述成骨蛋白选自 BMP-2 (代勃特明-α)、BMP-4、BMP-7 (依托特明-α)、BMP-14 和 GDF-5，单独地或相组合地；

并且所述至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子为 VEGF。

17. 用于制备成骨植入物的试剂盒,其至少包括:

a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

b- 包含至少一种多糖的组合物,

c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,

d- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物。

18. 根据前一项权利要求的试剂盒,其另外还包含额外的组合物,所述额外的组合物包含至少一种碱。

19. 根据前一项权利要求的试剂盒,其另外还包含可以被添加至组合物 b、c 或 d 的第二种碱。

20. 根据权利要求 17 至 19 中任一项的试剂盒,其特征在于,该包含成骨蛋白的组合物还可以包含用于形成复合物的多糖。

21. 根据权利要求 17 至 19 中任一项的试剂盒,其特征在于,该包含复合物的组合物还可以包含能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐,和 / 或碱。

22. 根据权利要求 17 至 19 中任一项的试剂盒,其特征在于,该包含多糖的组合物还可以包含能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐,和 / 或碱。

23. 根据权利要求 17 至 19 中任一项的试剂盒,其特征在于,该包含可溶性钙盐的组合物还可以包含碱。

24. 试剂盒,其包括:

a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

b- 包含至少一种阴离子多糖、至少一种碱和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物。

25. 试剂盒,其包括:

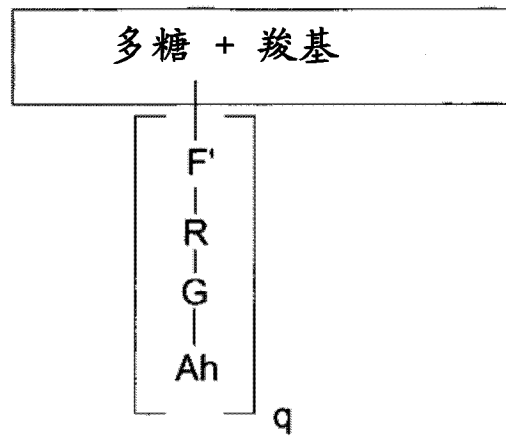
a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

b- 包含至少一种阴离子多糖和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

c- 包含至少一种可溶性钙盐和至少一种碱的组合物。

26. 根据权利要求 17 至 25 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述阴离子多糖选自通过疏水性衍生物进行官能化的多糖。

27. 根据权利要求 26 的试剂盒,其特征在于,所述阴离子多糖选自通式 IX 的包含部分地被疏水性醇取代的羧基官能团的多糖:



式 IX

其中

-q 表示被 F-R-G-Ah 取代的多糖的羧基官能团的摩尔份数, 并且为 0.01-0.7,

-F' 为酰胺官能团,

-G 为酯官能团、硫酯官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团,

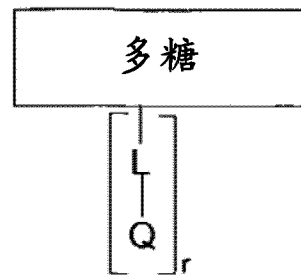
-R 为包含 1-18 个碳的链, 其任选地是支化的和 / 或不饱和的, 任选地包含一个或多个杂原子, 例如 O、N 或 / 和 S, 并且具有至少一个酸官能团,

-Ah 为疏水性醇的残基, 其从该疏水性醇的羟基官能团和由基团 R 所携带的至少一个亲电子官能团之间的偶联而产生,

- 当该多糖的羧基官能团不被 F' -R-G-Ah 取代时, 那么该多糖的所述羧基官能团为阳离子的羧酸盐, 所述阳离子优选地为碱金属阳离子, 例如 Na⁺ 或 K⁺,

所述包含羧基官能团的多糖在中性 pH 下是两亲性的。

28. 根据权利要求 26 的试剂盒, 其特征在于, 所述包含羧基官能团的多糖为通式 X 的合成多糖, 其从天然地包含羧基官能团的多糖获得或者从在其上嫁接有至少 15 个羧基官能团 / 100 个糖单元的中性多糖获得:



式 X

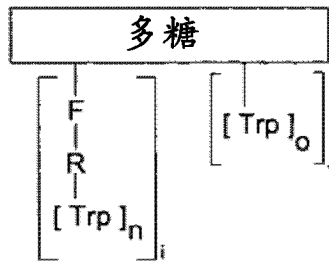
- 所述天然多糖选自多数地由 (1,6) 和 / 或 (1,4) 和 / 或 (1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键构成的多糖,

-L 为由于连接臂 Q 和该多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生的键, 并且为酯官能团、硫酯官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团或醚官能团,

-r 表示取代基 L-Q 的摩尔份数 / 多糖的糖单元,

-Q 为包含 1-18 个碳的链, 其任选地是支化的和 / 或不饱和的, 包含一个或多个杂原子, 例如 O、N 或 / 和 S, 并且包含至少一个羧基官能团, -CO₂H。

29. 根据权利要求 26 的试剂盒,其特征在於,所述阴离子多糖选自这样的阴离子多糖,其占多数地包含 (1,4)、(1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键,通过至少一个色氨酸衍生物进行官能化,并且符合下述通式 I:



式 I

● 该多糖占多数地由 (1,4) 和 / 或 (1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键构成,

● F 由于连接臂 R 和该中性或阴离子多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生,为酯官能团、硫酸酯官能团、酰胺官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团、醚官能团、硫酸醚官能团或胺官能团,

● R 为包含 1-18 个碳的链,其任选地是支化的和 / 或不饱和的,包含一个或多个杂原子,例如 O、N 和 / 或 S,并且具有至少一个酸官能团,

● Trp 为 L- 或 D- 色氨酸衍生物的残基,其从该色氨酸衍生物的胺和由基团 R 所携带的所述至少一个酸和 / 或由该阴离子多糖所携带的酸之间的偶联而产生,

n 表示被 Trp 取代的 R 的摩尔份数,并且为 0.05-0.7,

o 表示被 Trp 取代的多糖的酸官能团的摩尔份数,并且为 0.05-0.7,

i 表示由基团 R 所携带的酸官能团的摩尔份数 / 糖单元,并且为 0-2,

j 表示由该阴离子多糖所携带的酸官能团的摩尔份数 / 糖单元,并且为 0-1,

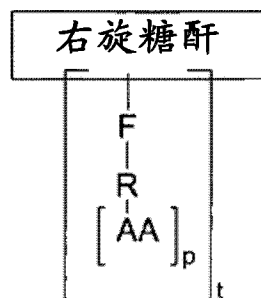
(i+j) 表示酸官能团的摩尔份数 / 糖单元,并且为 0.1-2,

- 当 R 不被 Trp 取代时,那么基团 R 的所述酸为阳离子的羧酸盐,所述阳离子优选地为碱金属例如 Na 或 K 的阳离子,

- 当该多糖为阴离子多糖时,当该多糖的酸官能团不被 Trp 取代时,那么所述酸官能团与阳离子成盐,所述阳离子优选地为碱金属阳离子,例如 Na⁺ 或 K⁺,

所述多糖在中性 pH 下是两亲性的。

30. 根据权利要求 26 的试剂盒,其特征在於,所述阴离子多糖选自下述通式 III 的经官能化的阴离子多糖:



式 III

● R 为包含 1-18 个碳的链,其任选地是支化的和 / 或不饱和的,包含一个或多个杂原

子,例如 O、N 或 / 和 S,并且具有至少一个酸官能团,

● F 由于连接臂 R 和该中性或阴离子多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生,为酯官能团、硫酸酯官能团、酰胺官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团、醚官能团、硫酸醚官能团或胺官能团,

● AA 为疏水性 L- 或 D- 氨基酸残基,其从该氨基酸的胺和由基团 R 所携带的酸之间的偶联而产生,所述疏水性氨基酸选自色氨酸衍生物,例如色氨酸、色氨酸醇、色氨酸酰胺、2- 咪唑乙胺以及其碱金属阳离子盐,或者选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸以及其醇、酰胺或脱羧基衍生物,

t 表示取代基 F-R-[AA]_n 的摩尔份数 / 糖苷单元,并且为 0.1-2,

p 表示被 AA 取代的 R 的摩尔份数,并且为 0.05-1,

当 R 不被 AA 取代时,那么基团 R 的所述酸为阳离子的羧酸盐,所述阳离子优选地为碱金属阳离子,例如 Na⁺、K⁺。

31. 根据权利要求 17 至 30 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述成骨蛋白选自 BMP-2(代勃特明-α)、BMP-4、BMP-7(依托特明-α)、BMP-14 和 GDF-5,单独地或相组合地。

32. 根据权利要求 17 至 30 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子为 PDGF。

33. 根据权利要求 17 至 30 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒至少包含 BMP-2 和 PDGF-BB。

34. 根据权利要求 17 至 30 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒至少包含 BMP-7 和 PDGF-BB。

35. 根据权利要求 17 至 30 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒至少包含 GDF-5 和 PDGF-BB。

36. 根据权利要求 17 至 30 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述成骨蛋白选自 BMP-2(代勃特明-α)、BMP-4、BMP-7(依托特明-α)、BMP-14 和 GDF-5,单独地或相组合地;并且所述至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子为 VEGF。

37. 根据权利要求 17 至 36 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述可溶性钙盐选自氯化钙、D- 葡萄糖酸钙、甲酸钙、D- 糖二酸钙、乙酸钙、L- 乳酸钙、谷氨酸钙或天冬氨酸钙。

38. 根据权利要求 17 至 36 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述可溶性钙盐为氯化钙。

39. 根据权利要求 17 至 38 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述能够与钙离子形成沉淀物的阴离子的可溶性盐为这样的可溶性盐,该可溶性盐的阴离子选自包括磷酸根离子 PO₄³⁻、磷酸氢根离子 HPO₄²⁻ 和磷酸二氢根离子 H₂PO₄⁻ 的磷酸根类阴离子。

40. 根据权利要求 17 至 38 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述碱选自无机碱或有机碱。

41. 根据权利要求 40 的试剂盒,其特征在于,所述无机碱选自氢氧化钠、碳酸氢钠或碳酸钠。

42. 根据权利要求 40 的试剂盒,其特征在于,所述有机碱选自胺和脱质子化的氨基酸。

43. 根据权利要求 40 的试剂盒,其特征在于,所述有机碱选自咪唑及其衍生物,尤其是组氨酸、脯氨酸、乙醇胺或丝氨酸。

44. 根据权利要求 17 至 43 中任一项的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒另外还包含至

少一种有机基质或无机基质或混合基质。

45. 根据权利要求 44 的试剂盒,其特征在於,所述基质为选自水凝胶和 / 或基于交联聚合物的基质的有机基质。

46. 根据权利要求 45 的试剂盒,其特征在於,所述水凝胶为通过聚合物链的化学或物理交联而获得的水凝胶。

47. 根据权利要求 45 的试剂盒,其特征在於,所述交联聚合物为经纯化的、经灭菌的且交联的天然胶原。

48. 根据权利要求 46 的试剂盒,其特征在於,所述水凝胶选自合成聚合物的组,其中包括乙二醇和乳酸的共聚物、乙二醇和乙醇酸的共聚物、聚(N- 乙烯吡咯烷酮)、聚乙烯酸、以及聚丙烯酰胺和聚丙烯酸。

49. 根据权利要求 45 的试剂盒,其特征在於,所述水凝胶选自天然聚合物的组,其中包括透明质酸、角质素、出芽短梗霉聚糖、果胶、右旋糖酐、纤维素和纤维素衍生物、藻酸、黄原胶、角叉菜聚糖、壳聚糖、软骨素、胶原、明胶、聚赖氨酸、纤维蛋白以及它们的在生物学上可接受的盐。

50. 根据权利要求 17 至 50 中任一项的试剂盒,其特征在於,构成该试剂盒的组合物为水溶液。

51. 根据权利要求 17 至 50 中任一项的试剂盒,其特征在於,构成该试剂盒的组合物为冻干物。

52. 制备在权利要求 1 至 16 中任一项之中所定义的共沉淀物的方法,其包括通过下述方式来获得共沉淀的步骤:

- 通过添加钙离子的盐的溶液而沉淀出在阴离子聚合物与成骨蛋白之间的复合物,
- 通过添加组合物而沉淀出钙离子,该所添加的组合物包含至少一种能够在确定的 pH 下形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐,

所述在阴离子聚合物与成骨蛋白之间的复合物通过向成骨蛋白的溶液中添加阴离子多糖的溶液来获得。

53. 根据权利要求 52 的方法,其特征在於,通过添加可溶性磷酸盐的溶液,以磷酸钙的形式来实施钙盐的沉淀。

成骨蛋白复合物的新型施用形式

[0001] 本发明涉及成骨制剂领域,更具体地涉及属于骨形态发生蛋白(BMP)家族的成骨蛋白的制剂。

[0002] 骨形态发生蛋白(BMP)是参与骨诱导机制的生长因子。也称为成骨蛋白(OP)的BMP最初于1965年由Urist进行了表征(Urist MR. Science 1965;150,893)。这些从骨密质分离出的蛋白质具有在许多动物中诱导骨形成的能力(Urist MR. Science 1965;150,893)。

[0003] BMP以前肽的形式进行表达,后者在翻译后成熟之后,具有104至139个残基的长度。它们彼此之间具有很大的序列同源性和具有类似的三维结构。特别地,它们具有6个在形成“半胱氨酸结(cysteine knot)”的分子内二硫键中所牵涉的半胱氨酸残基(Scheufler C. 2004 J. Mol. Biol. 1999;287,103;Schlunegger MP, J. Mol. Biol. 1993;231,445)。它们中的某些具有还在导致二聚体形成的分子间二硫键中所牵涉的第7个半胱氨酸(Scheufler C. 2004 J. Mol. Biol. 1999;287:103)。

[0004] 在其活性形式下,BMP装配成同二聚体,甚至异二聚体,如Israel等人所描述的那样(Israel DI, Growth Factors. 1996;13(3-4),291)。二聚体BMP与BMPR类型的跨膜受体相互作用(Mundy等人, Growth Factors, 2004, 22(4), 233)。该识别引发尤其牵涉Smad蛋白的细胞内信号传导级联,如此导致靶基因的激活或抑制。

[0005] BMP(除了BMP 1和3外)对于间充质细胞的分化起着直接或间接的作用,导致它们分化为成骨细胞(Cheng H., J. Bone and Joint Surgery, 2003, 85A 1544-1552)。此外,它们还具有趋化性并且诱导增殖、分化和血管生成。

[0006] 某些重组人BMP,尤其是rhBMP-2和rhBMP-7,清楚地显示出在人中于体内诱导骨形成的能力并且已被批准用于某些医学应用。因此,将重组人BMP-2(根据国际通用命名为代勃特明- α)配制在以InFUSE[®]的名称(在美国)和以InductOs[®]的名称(在欧洲)进行销售的产品中。该产品被指定用于腰椎的融合和胫骨的骨再生(对于称为骨不连合的骨折)。在用于腰椎融合的情况下,外科手术首先在于用rhBMP-2的溶液浸透胶原海绵,然后将海绵放置入预先植入到椎骨之间的空心支架(LT支架)中。

[0007] 重组人BMP-7(根据国际通用命名为依托特明- α)具有与BMP-2相同的治疗适应症并且构成了两种产品的基础:用于胫骨的开放性骨折的OP-1 Implant和用于腰椎融合的OP-1 Putty。OP-1 Implant由待接纳在0.9%盐水溶液中的包含rhBMP-7和胶原的粉末组成。然后,将所获得的糊状物在外科手术期间应用在骨折处。OP-1 Putty以两种粉末的形式存在:一种包含rhBMP-7和胶原,另一种包含羧甲基纤维素(CMC)。在外科手术过程中,CMC用0.9%盐水溶液来重构并与rhBMP-7和胶原相混合。将如此获得的糊状物应用在待处理的部位上。

[0008] 由于其不稳定性以及为了获得包含最小量的成骨蛋白的成骨制剂而出现的需要,成骨蛋白的施用是一个重要的问题。这是为了避免由这些蛋白质的高浓度而产生的副作用,并且也由于这些蛋白质的价格。

[0009] 已开发和正在开发许多制剂,例如在Seeherman的综述(Seeherman, H. 等人,

Spine 2002, 27 (16 Suppl 1), S16-S23) 中提及的那些, 在该综述中强调了递送系统的性质的重要性。

[0010] 所使用的递送系统应当使得能够增加在施用部位处所述蛋白质的停留时间, 获得所使用的蛋白质质量的完全释放, 和避免可以引起扩散至施用部位之外的过于急剧的释放。

[0011] 所使用的递送系统还应当可以用作在待处理的部位处骨生长的基质, 而同时使得能够将该骨生长限制在待处理的部位处。

[0012] 目前, 在递送系统中采用四种类型的材料: 天然聚合物、合成聚合物、无机材料以及这些材料的混合物。

[0013] 然而, 没有一个所开发的系统使得能够显著地减少 BMP 的剂量。这尤其要么与制剂中该蛋白质的不稳定性相关, 要么与由于支持物的结构而引起的该蛋白质的差的生物利用率相关。

[0014] 关于天然聚合物, 使用胶原、乙酰透明质酸、纤维蛋白、壳聚糖、藻酸盐和其他天然多糖。

[0015] 尽管基于重组胶原的海绵使得能够消除该天然聚合物的大部分已知缺点, 但在海绵中引入成骨蛋白至今仍不令人满意。

[0016] 以水凝胶形式的其他天然多糖基本上具有过快被吸除的不足之处, 除非预先以凝胶的形式进行交联, 这导致与前面对于胶原海绵而描述的那些相同的缺点。

[0017] 关于合成聚合物, 最经常使用的是聚(α -羟基酸)的聚合物, 例如聚交酯 (PLA)、聚乙醇酸交酯 (PLG) 以及其共聚物 (PLGA)。

[0018] 这些聚合物的主要缺点是由于其降解而引起的 pH 下降以及它们可能诱导的炎症反应。

[0019] 关于无机材料, 开发了将磷酸钙与骨诱导蛋白相组合的递送系统。

[0020] 其中, 提及基于磷酸钙的陶瓷, 例如羟基磷灰石 (HAP) 和磷酸三钙 (TCP), 以及“非陶瓷”磷酸钙类, 例如基于磷酸钙的骨水泥 (CPC)。

[0021] 自从 20 世纪 70 年代以来已知, 磷酸钙陶瓷对于骨重构可以具有益处, 如在 M. Böhner (Böhner, M., Injury 2000, 31 Suppl. 4, 37-47) 的综述中所提及的那样。

[0022] 但是, 承认了, 有效的 BMP-2 剂量在陶瓷中比在胶原海绵中更高。一项在人的后外侧融合术的临床研究 (Boden, S. D. 等人, Spine 2002, 27 (23), 2662-2673) 报告, 在与 BCP 颗粒 (60% HAP 和 40% TCP) (由 MEDTRONIC SOFAMOR 公司开发的产品) 一起时 BMP-2 的剂量 (40mg) 比在不含磷酸钙的胶原海绵中 (12mg) 更高。

[0023] 为了掩盖该缺点, 已经基于非陶瓷磷酸钙开发了非常大量的系统, 其中包括磷酸钙骨水泥。骨水泥是由 Brown 和 Chow 在 20 世纪 80 年代发现的, 并且符合下述定义: “磷酸钙骨水泥由水溶液和一种或多种磷酸钙类构成。当进行混合时, 磷酸钙类溶解并且以溶解度更低的磷酸钙的盐而沉淀出来。在沉淀过程中, 磷酸钙晶体增大并相互交错, 这导致骨水泥的机械刚性” (Böhner, M., Injury 2000, 31 Suppl 4, 37-47)。

[0024] Kim 的文章 (Kim, H. D. 等人, Methods Mol Biol 2004, 238, 49-64) 描述了由 EteX 公司开发的骨水泥 α -BSM 与 BMP-2 一起进行使用。该新产品很好地导致了基质的骨诱导活性。

[0025] 然而, 引入该基质中的 BMP-2 丧失了其活性的重大部分, 这导致必须增加所装入

的 BMP-2 的量。因此,在大鼠中在异位骨形成模型中使用 40 μ g BMP-2 的剂量,而在胶原海绵中使用 20 μ g BMP-2。

[0026] 这是因为,骨水泥具有两个缺点。首先,作为其前体的磷酸钙类必须预先在与所述蛋白质不相容的条件下合成。因此,在专利 US 5650176 中描述了对于制备作为 α -BSM 的化合物之一的无定形磷酸钙而言必需的反应条件。这些条件与所述蛋白质不相容,因为使用了非常大量的氢氧化钠。此外,这些产物需要加强的纯化,因为使用了毒性化合物例如硝酸钙。

[0027] 骨水泥的其他实例,例如由 Graftys 公司在专利 EP1891984A1 中所描述的那些,是在与所述蛋白质不相容的条件下获得的,因为在合成磷酸钙的过程中使用了二氯甲烷。由 Lisopharm 公司在专利 US2009/0155320 中所描述的骨水泥是在氢氧化钙存在下获得的,这也是与所述蛋白质不相容的。

[0028] 此外,通常地,骨水泥的形成通过使可溶性磷酸钙盐与在大于 400°C 下进行处理以使其具有反应性的固体磷酸钙盐进行反应来获得。这两种化合物之间的反应是不受控制的,往往是放热的,并且导致产生具有将该蛋白质隔离在其团块中的整块结构的骨水泥。

[0029] 在专利 US563461 中提及在固体中存在有“反应性空隙”,而不知道这是否这对于 BMP-2 的化学稳定性有害。

[0030] 为了减小在所形成的固体的团块中蛋白质的损失,在专利 US5650176 中描述了,向反应混合物中添加能够减少骨水泥的“整块”特性的起泡化合物是有利的。

[0031] 尽管有这些改进,但是必须看到,对于在异位大鼠模型中获得骨形成而言必需的蛋白质量仍是很大的。

[0032] 关于混合系统,它们目前还不允许解决上面提及的问题。

[0033] 总之,涉及使用合成聚合物、天然聚合物或者无机材料(例如磷酸钙陶瓷或磷酸钙骨水泥)的在现有技术中所描述的系统,不允许完全符合为骨修复的应用所规定的技术规格。

[0034] 本申请人的功劳是开发出了一种独创的方法,其在于使成骨蛋白与可溶性钙盐和可溶性磷酸盐相接触,这使得能够符合为骨修复的应用所规定的技术规格。

[0035] 该独创的方法使得能够,一方面使该蛋白质沉淀,同时避免在与所存在的反应物接触时的任何化学降解,和另一方面使该蛋白质与不溶性钙盐,优选地磷酸钙共沉淀,所述共沉淀物以分开的方式存在,这非常明显地限制了例如用骨水泥时所观察到的在固体的团块中的损失。

[0036] 因此,本申请人研发出了新的由共沉淀物组成的成骨组合物,所述共沉淀物包含至少一种不溶性钙盐和至少一种在成骨蛋白与多糖之间的复合物,所述共沉淀物以分开的方式存在。

[0037] 这两件事情的结合使得能够获得包含低得多的蛋白质量的非常成骨的制剂。

[0038] 这些新的组合物因此具有包含更低的蛋白质量(这是主要的目标)这样的优点,这为了减少在患者中在施用后的副作用。

[0039] 此外,它们使得能够通过减少蛋白质的量来降低治疗的成本,因为这些蛋白质是非常贵的。

[0040] 已知以本申请人名义的临时申请 61/129023 和 61/129617,其全部内容通过提及

而合并入本文中,它们描述和要求保护了包含至少一种成骨蛋白、二价阳离子的可溶性盐和基质的成骨组合物。

[0041] 已知以本申请人名义的临时申请 61/129011 和 61/129618,其全部内容通过提及而合并入本文中,它们描述和要求保护了包含至少一种成骨蛋白、至少一种血管生成蛋白、二价阳离子的可溶性盐、任选地阴离子多糖和任选地基质的成骨组合物。

[0042] 已知以本申请人名义的临时申请 61/129616 和 61/129012,其全部内容通过提及而合并入本文中,它们描述和要求保护了包含至少一种成骨蛋白 / 阴离子多糖复合物、至少二价的阳离子的可溶性盐和基质的成骨组合物。

[0043] 已知以本申请人名义的临时申请 US61/193216,其全部内容通过提及而合并入本文中,它描述和要求保护了包含至少一种成骨蛋白 / 阴离子多糖复合物、至少二价的阳离子的可溶性盐和形成水凝胶的聚合物的成骨组合物。

[0044] 已知以本申请人名义的于 2008 年 11 月 6 日提交的临时申请 US61/193217,其全部内容通过提及而合并入本文中,它描述和要求保护了包含至少一种成骨蛋白、至少二价的阳离子的可溶性盐和形成水凝胶的聚合物的成骨组合物。

[0045] 关于本发明,本申请人还研发出了制备以分开形式存在的共沉淀物的方法,所述共沉淀物包含至少一种不溶性钙盐和至少一种在成骨蛋白与多糖之间的复合物。

[0046] 本发明还涉及包含所述共沉淀物的制剂、药物产品和医学装置。

[0047] 使得能够实施该方法和获得该共沉淀物的组合物和试剂盒也是下面所描述的发明。

[0048] 所述共沉淀通过下述方式来获得:

[0049] - 通过添加钙离子的盐的溶液而沉淀出在阴离子聚合物与成骨蛋白之间的复合物,

[0050] - 通过添加组合物而沉淀出钙离子,该所添加的组合物包含至少一种能够在确定的 pH 下形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐。

[0051] 在一个实施方案中,所述共沉淀物由同时沉淀而得到。

[0052] 在一个实施方案中,所述共沉淀物由顺次沉淀而得到。

[0053] 所述在阴离子聚合物与成骨蛋白之间的复合物通过向成骨蛋白的溶液中添加阴离子多糖的溶液来获得。

[0054] 在一个实施方案中,通过添加可溶性磷酸盐的溶液,以磷酸钙的形式来实施钙盐的沉淀。

[0055] 共沉淀物的性质和形式可以随所接触的溶液的 pH 而变化,因为磷酸钙盐随 pH 和随构成该复合物的阴离子多糖和蛋白质而具有不同的固相。

[0056] 本发明涉及由至少一种在成骨蛋白与以其不溶解化形式存在的多糖之间的复合物和至少一种不溶性钙盐构成的共沉淀物,所述共沉淀物以分开形式存在。

[0057] 在一个实施方案中,所述共沉淀物另外还包含至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子。

[0058] 在一个实施方案中,所述不溶性钙盐选自正磷酸钙,其以无水或水合的形式,单独地或作为混合物地。

[0059] 在一个实施方案中,所述共沉淀物另外还包含至少一种选自下列的不溶性钙盐:

草酸钙、抗坏血酸钙、碳酸钙或硫酸钙。

[0060] 所述不溶性钙盐可以为在阳离子性钙离子与阴离子性离子之间形成的混合盐,所述阴离子性离子例如为单、二或三碱价的磷酸根类,多糖的羧酸根,碳酸根,氢氧化物,和可能的由碱所携带的阴离子。

[0061] 正磷酸钙是由用钙盐中和各种不同酸度的磷酸而得到的盐,并且根据文献,在25°C下,pKa从2.12至12.67变化。

[0062] 主要的不溶性正磷酸钙为磷酸二钙(DCP,无水的或二水合的)、磷酸八钙(OCP)、磷酸三钙(TCP)、磷酸钙型羟基磷灰石(HAP或PCA)和磷酸四钙(TTCP)。

[0063] 所述“阴离子聚合物/成骨蛋白”复合物由在以本申请人名义的申请PCT/EP2008/059832中所描述的复合物构成。

[0064] 通过添加可溶性钙盐(如在申请FR 08 54621和61/129616中所描述的)来使它们不溶解化。

[0065] 根据所寻求的效应,任选地在碱存在下来施行该共沉淀,所述碱使得能够将pH调节至预定的值。

[0066] 该共沉淀使得能够获得处于分开状态的固体化学组合物,其尤其使得能够控制包含在该组合物中的成骨蛋白的递送。

[0067] 该处于分开状态的固体化学组合物在环境温度条件下自发地获得,并且其分开状态在体外在生理条件下是稳定的。

[0068] 在一个实施方案中,本发明涉及用于制备成骨植入物的试剂盒,其至少包括:

[0069] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

[0070] b- 包含至少一种多糖的组合物,

[0071] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,

[0072] d- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物。

[0073] 在一个实施方案中,所述试剂盒另外还包含额外的组合物,所述额外的组合物包含至少一种碱。

[0074] 在一个实施方案中,可以将第二种碱添加至组合物b、c或d。

[0075] 这些组合物中的某些可以在共沉淀物形成之前合并,以减少小瓶的数目。

[0076] 在一个实施方案中,该包含成骨蛋白的组合物还可以包含用于形成复合物的多糖。

[0077] 该包含成骨蛋白的组合物或该包含复合物的组合物还可以包含能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐,和/或碱。

[0078] 在一个实施方案中,该包含多糖的组合物还可以包含能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐,和/或碱

[0079] 在一个实施方案中,该包含可溶性钙盐的组合物还可以包含碱。

[0080] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0081] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

[0082] b- 包含至少一种阴离子多糖和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

[0083] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,

- [0084] d- 包含至少一种碱的组合物。
- [0085] 在该实施方案中,可以将与组合物 d 的碱相同或不同的第二种碱添加至组合物 b 和 c。
- [0086] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:
- [0087] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,
- [0088] b- 包含至少一种阴离子多糖的组合物,
- [0089] c- 包含至少一种可溶性钙盐和至少一种碱的组合物,
- [0090] d- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物。
- [0091] 在该实施方案中,可以将与组合物 c 的碱相同或不同的第二种碱添加至组合物 b 和 d。
- [0092] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:
- [0093] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,
- [0094] b- 包含至少一种阴离子多糖和至少一种碱的组合物,
- [0095] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,
- [0096] d- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物。
- [0097] 在该实施方案中,可以将与组合物 b 的碱相同或不同的第二种碱添加至组合物 c 和 d。
- [0098] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:
- [0099] a- 包含至少一种成骨蛋白和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,
- [0100] b- 包含至少一种阴离子多糖的组合物,
- [0101] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,
- [0102] d- 包含至少一种碱的组合物。
- [0103] 在该实施方案中,可以将与组合物 d 的碱相同或不同的第二种碱添加至组合物 b 和 c。
- [0104] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:
- [0105] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,
- [0106] b- 包含至少一种阴离子多糖的组合物,
- [0107] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,
- [0108] d- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐和至少一种碱的组合物。
- [0109] 在该实施方案中,可以将与组合物 d 的碱相同或不同的第二种碱添加至组合物 b 和 c。
- [0110] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:
- [0111] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,
- [0112] b- 包含至少一种阴离子多糖和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,
- [0113] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,
- [0114] d- 包含至少一种碱的组合物。

[0115] 在该实施方案中,可以将与组合物 d 的碱相同或不同的第二种碱添加至组合物 b 和 c。

[0116] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0117] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

[0118] b- 包含至少一种阴离子多糖、至少一种碱和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

[0119] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物。

[0120] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0121] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

[0122] b- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,

[0123] c- 包含至少一种碱的组合物。

[0124] 在该实施方案中,可以将与组合物 c 的碱相同或不同的第二种碱添加至其他组合物。

[0125] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0126] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

[0127] b- 包含至少一种阴离子多糖和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

[0128] c- 包含至少一种可溶性钙盐和至少一种碱的组合物。

[0129] 在该实施方案中,可以将与组合物 c 的碱相同或不同的第二种碱添加至组合物 b。

[0130] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0131] a- 包含至少一种成骨蛋白的组合物,

[0132] b- 包含至少一种阴离子多糖和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

[0133] c- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物。

[0134] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0135] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物的组合物,

[0136] b- 包含至少一种可溶性钙盐和至少一种碱的组合物,

[0137] c- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物。

[0138] 在该实施方案中,可以将与组合物 b 的碱相同或不同的第二种碱添加至其他组合物。

[0139] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0140] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物的组合物,

[0141] b- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,

[0142] c- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物。

[0143] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0144] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物的组合物,

[0145] b- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物,

[0146] c- 包含至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐和至少一种碱的组合物。

物。

[0147] 在该实施方案中,可以将与组合物 c 的碱相同或不同的第二种碱添加至其他组合物。

[0148] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0149] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

[0150] b- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物。

[0151] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0152] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐的组合物,

[0153] b- 包含至少一种可溶性钙盐和至少一种碱的组合物。

[0154] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0155] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐和至少一种碱的组合物,

[0156] b- 包含至少一种可溶性钙盐的组合物。

[0157] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0158] a- 包含至少一种“成骨蛋白 / 阴离子多糖”复合物和至少一种能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐和至少一种碱的组合物,

[0159] b- 包含至少一种可溶性钙盐和至少一种碱的组合物。

[0160] 在一个实施方案中,该包含至少一种成骨蛋白的组合物另外还包含至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子。

[0161] 在一个实施方案中,所述试剂盒另外还包含至少一种有机基质或无机基质或混合基质。

[0162] 在一个实施方案中,构成该试剂盒的组合物为水溶液。

[0163] 在一个实施方案中,构成该试剂盒的组合物为冻干物。

[0164] 在一个实施方案中,构成该试剂盒的组合物中的某些为冻干物。

[0165] 在该实施方案中,在反应之前,用水或用以溶液形式的其他组合物之一来使所述冻干物再水化。

[0166] 因此,例如,以冻干物形式的该包含成骨蛋白的组合物可以用该包含阴离子多糖的溶液,或者用该包含阴离子多糖和能够形成不溶性钙盐的阴离子的可溶性盐和 / 或碱的溶液来进行再水化。

[0167] 在一个实施方案中,包含所述沉淀物的制剂、医学装置和药物产品为水性悬浮液。

[0168] 在一个实施方案中,包含所述沉淀物的制剂和药物产品为冻干物。

[0169] 在该实施方案中,在使用之前,用生理盐水或血液来使所述冻干物再水化。

[0170] “成骨蛋白”是指成骨生长因子或 BMP,单独地或与选自具有治疗活性的 BMPs (骨形态发生蛋白) 的 BMP 相组合地。

[0171] 更特别地,所述成骨蛋白选自 BMP-2 (代勃特明 - α)、BMP-4、BMP-7 (依托特明 - α)、BMP-14 和 GDF-5,单独地或相组合地。

[0172] 所使用的 BMP 为重组人 BMP,其根据本领域技术人员已知的技术来获得,或者购自

供应商例如 Research Diagnostic Inc. (USA) 公司。

[0173] “具有化学吸引和血管生成能力的生长因子”是指这样的蛋白质，例如 PDGF，尤其是 PDGF-BB、VEGF 或 FGF，尤其是 FGF-2。

[0174] 在一个实施方案中，所述成骨蛋白选自 BMP-2(代勃特明- α)、BMP-4、BMP-7(依托特明- α)、BMP-14 和 GDF-5，单独地或相组合地；并且所述至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子为 PDGF。

[0175] 在一个实施方案中，该组合物至少包含 BMP-2 和 PDGF-BB。

[0176] 在一个实施方案中，该组合物至少包含 BMP-7 和 PDGF-BB。

[0177] 在一个实施方案中，该组合物至少包含 GDF-5 和 PDGF-BB。

[0178] 在一个实施方案中，所述成骨蛋白选自 BMP-2(代勃特明- α)、BMP-4、BMP-7(依托特明- α)、BMP-14 和 GDF-5，单独地或相组合地；并且所述至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子为 VEGF。

[0179] 在一个实施方案中，所述成骨蛋白选自 BMP-2(代勃特明- α)、BMP-4、BMP-7(依托特明- α)、BMP-14 和 GDF-5，单独地或相组合地；并且所述至少一种具有化学吸引和血管生成能力的生长因子为 FGF。

[0180] 所述可溶性钙盐为其阴离子选自负氯离子、D-葡萄糖酸根、甲酸根、D-糖二酸根、乙酸根、L-乳酸根、谷氨酸根或天冬氨酸根的钙盐。

[0181] 在一个实施方案中，所述可溶性钙盐为氯化钙。

[0182] “能够与钙离子形成沉淀物的阴离子的可溶性盐”是指这样的可溶性盐，该可溶性盐的阴离子选自包括磷酸根离子 PO_4^{3-} 、磷酸氢根离子 HPO_4^{2-} 和磷酸二氢根离子 H_2PO_4^- 的磷酸根类阴离子。

[0183] 在一个实施方案中，另外将选自草酸根阴离子、抗坏血酸根阴离子、碳酸根阴离子或硫酸根阴离子的第二种阴离子添加至该包含磷酸根阴离子的组合物。

[0184] 所述能够与钙离子形成沉淀物的阴离子的可溶性盐选自磷酸钠、草酸钠、抗坏血酸钠、碳酸钠、硫酸钠和碳酸氢钠。

[0185] “阴离子多糖”是指这样的多糖，其选自通过疏水性衍生物进行官能化的多糖。

[0186] 在一个实施方案中，所述多糖选自多糖衍生物，所述多糖衍生物占多数地包含 (1, 4) 和 / 或 (1, 3) 和 / 或 (1, 2) 类型的糖苷键，通过至少一个色氨酸衍生物进行官能化，如在申请 FR08/55567 中所描述的。

[0187] 这些多糖占多数地由 (1, 4) 和 / 或 (1, 3) 和 / 或 (1, 2) 类型的糖苷键构成。它们可以是中性的，即不携带酸官能团，或者是阴离子的且携带酸官能团。

[0188] 它们通过标注为 Trp 的至少一个色氨酸衍生物进行官能化：

[0189] 所述色氨酸衍生物通过与酸官能团的偶联而嫁接或连接至所述多糖，所述酸官能团可以是阴离子多糖的酸官能团和 / 或由连接臂 R 所携带的酸官能团，所述连接臂 R 通过官能团 F 而与该多糖相连接，所述官能团 F 由于连接臂 R 和该中性或阴离子多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生，

[0190] -F 为酯官能团、硫酸酯官能团、酰胺官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团、醚官能团、硫醚官能团或胺官能团，

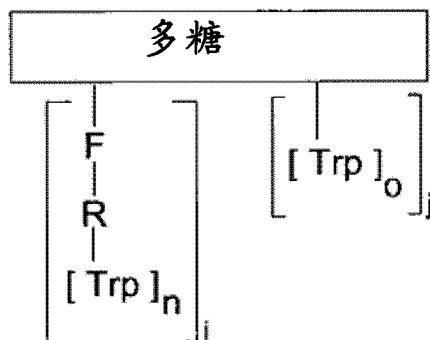
[0191] -R 为包含 1-18 个碳的链，其任选地是支化的和 / 或不饱和的，包含一个或多个杂

原子,例如 O、N 和 / 或 S,并且具有至少一个酸官能团,

[0192] Trp 为 L- 或 D- 色氨酸衍生物的残基,其从该色氨酸的胺和由基团 R 所携带的所述至少一个酸和 / 或由该阴离子多糖所携带的酸之间的偶联而产生。

[0193] 根据本发明,占多数地包含 (1,4)、(1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键并通过至少一个色氨酸衍生物进行官能化的多糖可以符合下述通式 I:

[0194]



式 I

[0195] ● 该多糖占多数地由 (1,4) 和 / 或 (1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键构成,

[0196] ● F 由于连接臂 R 和该中性或阴离子多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生,为酯官能团、硫酸酯官能团、酰胺官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团、醚官能团、硫酸醚官能团或胺官能团,

[0197] ● R 为包含 1-18 个碳的链,其任选地是支化的和 / 或不饱和的,包含一个或多个杂原子,例如 O、N 或 / 和 S,并且具有至少一个酸官能团,

[0198] ● Trp 为 L- 或 D- 色氨酸衍生物的残基,其从该色氨酸衍生物的胺和由基团 R 所携带的所述至少一个酸和 / 或由该阴离子多糖所携带的酸之间的偶联而产生,

[0199] n 表示被 Trp 取代的 R 的摩尔份数,并且为 0.05-0.7,

[0200] o 表示被 Trp 取代的多糖的酸官能团的摩尔份数,并且为 0.05-0.7,

[0201] i 表示由基团 R 所携带的酸官能团的摩尔份数 / 糖单元,并且为 0-2,

[0202] j 表示由该阴离子多糖所携带的酸官能团的摩尔份数 / 糖单元,并且为 0-1,

[0203] (i+j) 表示酸官能团的摩尔份数 / 糖单元,并且为 0.1-2,

[0204] - 当 R 不被 Trp 取代时,那么基团 R 的所述酸为阳离子的羧酸盐,所述阳离子优选地为碱金属例如 Na 或 K 的阳离子,

[0205] - 当该多糖为阴离子多糖时,当该多糖的酸官能团不被 Trp 取代时,那么所述酸官能团与阳离子成盐,所述阳离子优选地为碱金属阳离子,例如 Na⁺ 或 K⁺,

[0206] 所述多糖在中性 pH 下是两亲性的。

[0207] 在一个实施方案中,F 为酯、碳酸酯、氨基甲酸酯或醚。

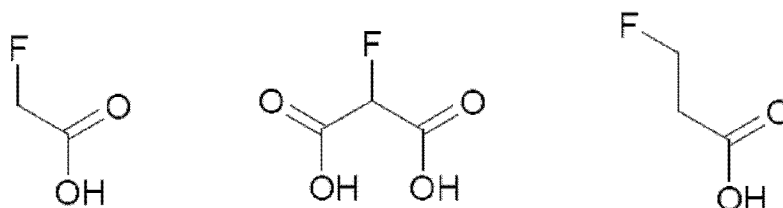
[0208] 在一个实施方案中,该多糖占多数地由 (1,4) 类型的糖苷键构成。

[0209] 在一个实施方案中,该占多数地由 (1,4) 类型的糖苷键构成的多糖选自出芽短梗霉聚糖、藻酸盐、乙酰透明质酸、木聚糖、聚半乳糖醛酸或水溶性纤维素。

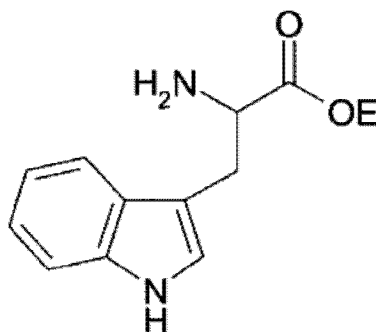
[0210] 在一个实施方案中,该多糖为出芽短梗霉聚糖。

[0211] 在一个实施方案中,该多糖为藻酸盐。

- [0212] 在一个实施方案中,该多糖为乙酰透明质酸。
- [0213] 在一个实施方案中,该多糖为木聚糖。
- [0214] 在一个实施方案中,该多糖为聚半乳糖醛酸。
- [0215] 在一个实施方案中,该多糖为水溶性纤维素。
- [0216] 在一个实施方案中,该多糖占多数地由(1,3)类型的糖苷键构成。
- [0217] 在一个实施方案中,该占多数地由(1,3)类型的糖苷键构成的多糖为凝乳聚糖。
- [0218] 在一个实施方案中,该多糖占多数地由(1,2)类型的糖苷键构成。
- [0219] 在一个实施方案中,该占多数地由(1,2)类型的糖苷键构成的多糖为菊粉。
- [0220] 在一个实施方案中,该多糖占多数地由(1,4)和(1,3)类型的糖苷键构成。
- [0221] 在一个实施方案中,该占多数地由(1,4)和(1,3)类型的糖苷键构成的多糖为葡聚糖。
- [0222] 在一个实施方案中,该多糖占多数地由(1,4)和(1,3)和(1,2)类型的糖苷键构成。
- [0223] 在一个实施方案中,该占多数地由(1,4)和(1,3)和(1,2)类型的糖苷键构成的多糖为甘露聚糖。
- [0224] 在一个实施方案中,根据本发明的多糖的特征在于,基团 R 选自下列基团:
- [0225]



- [0226] 或其碱金属阳离子盐。
- [0227] 在一个实施方案中,根据本发明的多糖的特征在于,所述色氨酸衍生物选自色氨酸、色氨酸醇 (tryptophanol)、色氨酸酰胺 (tryptophanamide)、2-吲哚乙胺以及其碱金属阳离子盐。
- [0228] 在一个实施方案中,根据本发明的多糖的特征在于,所述色氨酸衍生物选自式 II 的色氨酸的酯:
- [0229]



式 II

- [0230] 其中,
- [0231] E 为可能是下述基团的基团:

[0232] - 线性或支化的 (C1-C8) 烷基；

[0233] - 线性或支化的 (C6-C20) 烷基芳基或芳基烷基。

[0234] 所述多糖可以具有 10-10000 的聚合度 m 。

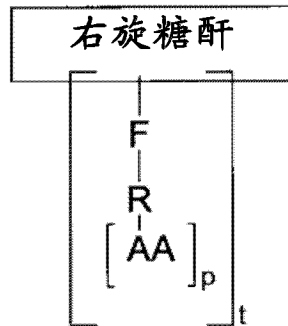
[0235] 在一个实施方案中,它具有 10-1000 的聚合度 m 。

[0236] 在另一个实施方案中,它具有 10-500 的聚合度 m 。

[0237] 在一个实施方案中,所述多糖选自用疏水性氨基酸(例如色氨酸和色氨酸衍生物)进行官能化的右旋糖酐,如在申请 FR 07/02316 中所描述的。

[0238] 根据本发明,所述经官能化的右旋糖酐可以符合下述通式 III:

[0239]



式 III

[0240] ● R 为包含 1-18 个碳的链,其任选地是支化的和 / 或不饱和的,包含一个或多个杂原子,例如 O、N 或 / 和 S,并且具有至少一个酸官能团,

[0241] ● F 由于连接臂 R 和该中性或阴离子多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生,为酯官能团、硫酸酯官能团、酰胺官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团、醚官能团、硫醚官能团或胺官能团,

[0242] ● AA 为疏水性 L- 或 D- 氨基酸残基,其从该氨基酸的胺和由基团 R 所携带的酸之间的偶联而产生,

[0243] t 表示取代基 F-R-[AA] $_n$ 的摩尔份数 / 糖苷单元,并且为 0.1-2,

[0244] p 表示被 AA 取代的 R 的摩尔份数,并且为 0.05-1,以及

[0245] 当 R 不被 AA 取代时,那么基团 R 的所述酸为阳离子的羧酸盐,所述阳离子优选地为碱金属阳离子,例如 Na^+ 、 K^+ ,

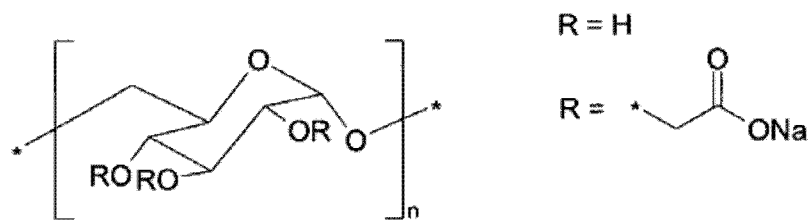
[0246] 所述右旋糖酐在中性 pH 下是两亲性的。

[0247] 在一个实施方案中,所述碱金属阳离子为 Na^+ 。

[0248] 在一个实施方案中,F 为酯、碳酸酯、氨基甲酸酯或醚。

[0249] 在一个实施方案中,根据本发明的多糖为式 IV 的羧甲基右旋糖酐:

[0250]

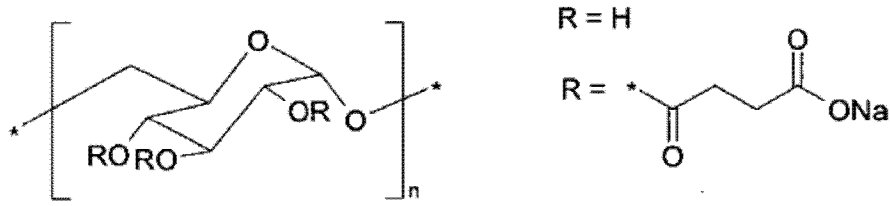


式 IV

[0251] 或相应的酸。

[0252] 在一个实施方案中,根据本发明的多糖为式 V 的右旋糖酐的单琥珀酸酯:

[0253]

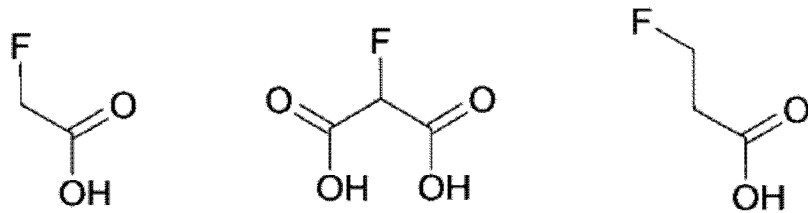


[0254] 式 V

[0255] 或相应的酸。

[0256] 在一个实施方案中,根据本发明的多糖的特征在于,基团 R 选自下列基团:

[0257]



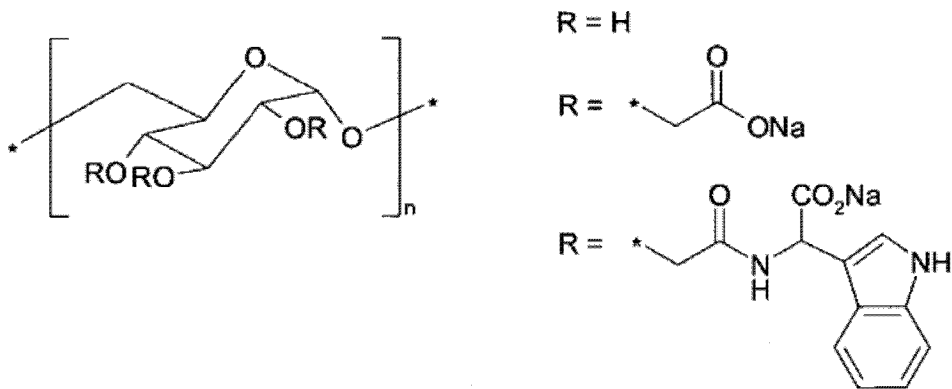
[0258] 或其碱金属阳离子盐。

[0259] 在一个实施方案中,根据本发明的右旋糖酐的特征在于,所述疏水性氨基酸选自色氨酸衍生物,例如色氨酸、色氨酸醇、色氨酸酰胺、2- 吡啶乙胺以及其碱金属阳离子盐。

[0260] 在一个实施方案中,根据本发明的右旋糖酐的特征在于,所述色氨酸衍生物选自如上定义的式 II 的色氨酸的酯。

[0261] 在一个实施方案中,根据本发明的右旋糖酐为式 VI 的通过色氨酸进行修饰的羧甲基右旋糖酐:

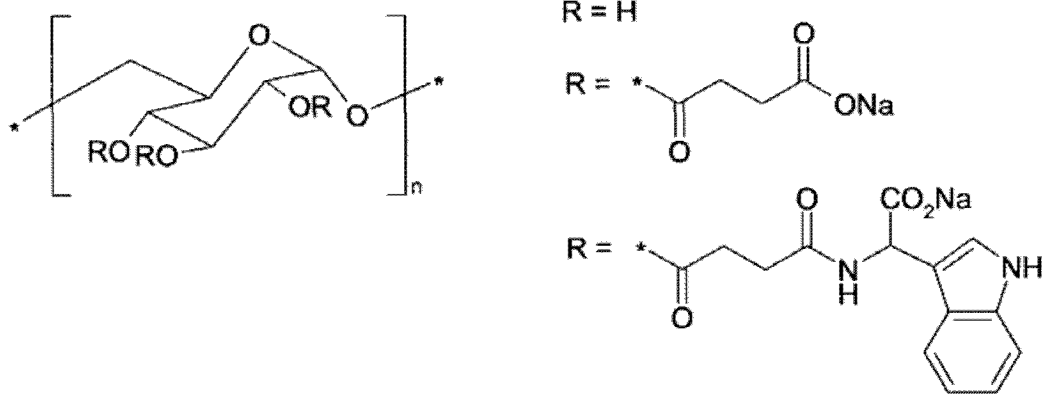
[0262]



式 VI

[0263] 在一个实施方案中,根据本发明的右旋糖酐为式 VII 的通过色氨酸进行修饰的右旋糖酐的单琥珀酸酯:

[0264]

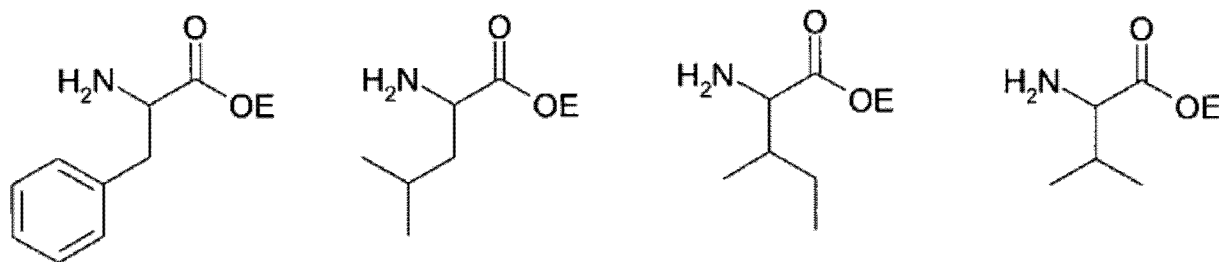


式 VII

[0265] 在一个实施方案中,根据本发明的右旋糖酐的特征在于,所述疏水性氨基酸选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸以及其醇、酰胺或脱羧基衍生物。

[0266] 在一个实施方案中,根据本发明的右旋糖酐的特征在于,所述苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的衍生物选自式 VIII 的这些氨基酸的酯:

[0267]



式 VIII

[0268] 其中,

[0269] E 如上所定义。

[0270] 在一个实施方案中,根据本发明的右旋糖酐的特征在于,所述疏水性氨基酸为苯丙氨酸,或者其醇、酰胺或脱羧基衍生物。

[0271] 所述右旋糖酐可以具有 10-10000 的聚合度 m。

[0272] 在一个实施方案中,它具有 10-1000 的聚合度 m。

[0273] 在另一个实施方案中,它具有 10-500 的聚合度 m。

[0274] 在一个实施方案中,所述多糖选自包含羧基官能团的多糖,例如在申请 FR 08/05506 中所描述的那些,所述羧基官能团中的至少一个被标注为 Ah 的疏水性醇的衍生物取代:

[0275] - 所述疏水性醇 (Ah) 通过偶联臂 R 而嫁接或连接至该阴离子多糖,所述偶联臂通过官能团 F' 而与该阴离子多糖相连接,所述官能团 F' 由于连接臂 R 的胺官能团和该阴离子多糖的羧基官能团之间的偶联而产生,并且所述偶联臂通过官能团 G 而与所述疏水性醇相连接,所述官能团 G 由于所述偶联臂的羧基、异氰酸酯、硫代酸或醇官能团和所述疏水性醇的官能团之间的偶联而产生,该阴离子多糖的未取代的羧基官能团以阳离子的羧酸盐形式存在,所述阳离子优选地为碱金属阳离子,例如 Na^+ 或 K^+ ,

[0276] ■ F' 为酰胺官能团,

[0277] ■ G 为酯官能团、硫酸酯官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团，

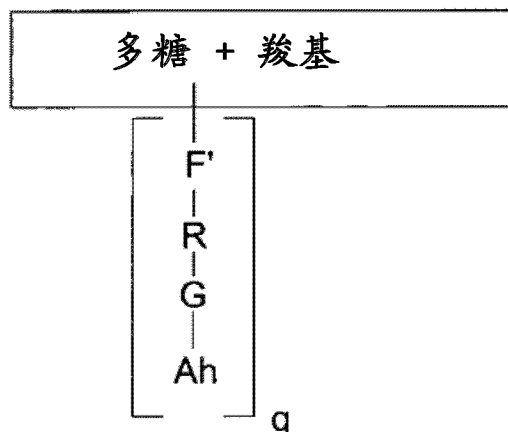
[0278] ■ R 为包含 1-18 个碳的链，其任选地是支化的和 / 或不饱和的，任选地包含一个或多个杂原子，例如 O、N 或 / 和 S，并且具有至少一个酸官能团，

[0279] -Ah 为疏水性醇的残基，其从该疏水性醇的羟基官能团和由基团 R 所携带的至少一个亲电子官能团之间的偶联而产生，

[0280] 所述包含羧基官能团的多糖在中性 pH 下是两亲性的。

[0281] 该包含部分地被疏水性醇取代的羧基官能团的多糖选自通式 IX 的包含羧基官能团的多糖：

[0282]



[0283] 式 IX

[0284] 其中

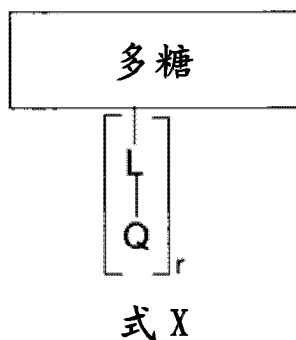
[0285] -q 表示被 F-R-G-Ah 取代的多糖的羧基官能团的摩尔份数，并且为 0.01-0.7，

[0286] -F'、R、G 和 Ah 符合上文给出的定义，并且当该多糖的羧基官能团不被 F'-R-G-Ah 取代时，那么该多糖的所述羧基官能团为阳离子的羧酸盐，所述阳离子优选地为碱金属阳离子，例如 Na⁺ 或 K⁺。

[0287] 在一个实施方案中，所述包含羧基官能团的多糖为天然地携带羧基官能团的多糖，并且选自藻酸盐、乙酰透明质酸、聚半乳糖醛酸。

[0288] 在一个实施方案中，所述包含羧基官能团的多糖为通式 X 的合成多糖，其从天然地包含羧基官能团的多糖获得或者从在其上嫁接有至少 15 个羧基官能团 / 100 个糖单元的中性多糖获得：

[0289]



[0290] -所述天然多糖选自占多数地由 (1,6) 和 / 或 (1,4) 和 / 或 (1,3) 和 / 或 (1,2) 类型的糖苷键构成的多糖，

[0291] -L 为由于连接臂 Q 和该多糖的 -OH 官能团之间的偶联而产生的键, 并且为酯官能团、硫酸酯官能团、碳酸酯官能团、氨基甲酸酯官能团或醚官能团,

[0292] -r 表示取代基 L-Q 的摩尔份数 / 多糖的糖单元,

[0293] -Q 为包含 1-18 个碳的链, 其任选地是支化的和 / 或不饱和的, 包含一个或多个杂原子, 例如 O、N 或 / 和 S, 并且包含至少一个羧基官能团, $-CO_2H$ 。

[0294] 在一个实施方案中, 该多糖占多数地由 (1,6) 类型的糖苷键构成。

[0295] 在一个实施方案中, 该占多数地由 (1,6) 类型的糖苷键构成的多糖为右旋糖酐。

[0296] 在一个实施方案中, 该多糖占多数地由 (1,4) 类型的糖苷键构成。

[0297] 在一个实施方案中, 该占多数地由 (1,4) 类型的糖苷键构成的多糖选自出芽短梗霉聚糖、藻酸盐、乙酰透明质酸、木聚糖、聚半乳糖醛酸或水溶性纤维素。

[0298] 在一个实施方案中, 该多糖为出芽短梗霉聚糖。

[0299] 在一个实施方案中, 该多糖为藻酸盐。

[0300] 在一个实施方案中, 该多糖为乙酰透明质酸。

[0301] 在一个实施方案中, 该多糖为木聚糖。

[0302] 在一个实施方案中, 该多糖为聚半乳糖醛酸。

[0303] 在一个实施方案中, 该多糖为水溶性纤维素。

[0304] 在一个实施方案中, 该多糖占多数地由 (1,3) 类型的糖苷键构成。

[0305] 在一个实施方案中, 该占多数地由 (1,3) 类型的糖苷键构成的多糖为凝乳聚糖。

[0306] 在一个实施方案中, 该多糖占多数地由 (1,2) 类型的糖苷键构成。

[0307] 在一个实施方案中, 该占多数地由 (1,2) 类型的糖苷键构成的多糖为菊粉。

[0308] 在一个实施方案中, 该多糖占多数地由 (1,4) 和 (1,3) 类型的糖苷键构成。

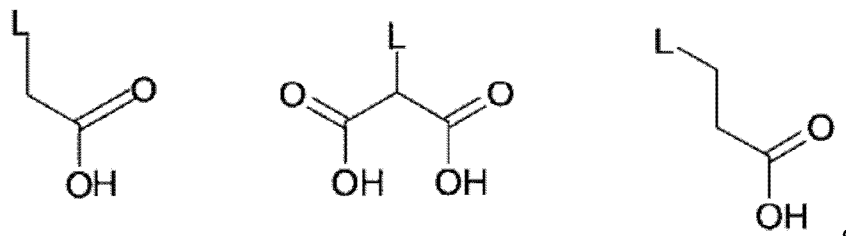
[0309] 在一个实施方案中, 该占多数地由 (1,4) 和 (1,3) 类型的糖苷键构成的多糖为葡聚糖。

[0310] 在一个实施方案中, 该多糖占多数地由 (1,4) 和 (1,3) 和 (1,2) 类型的糖苷键构成。

[0311] 在一个实施方案中, 该占多数地由 (1,4) 和 (1,3) 和 (1,2) 类型的糖苷键构成的多糖为甘露聚糖。

[0312] 在一个实施方案中, 根据本发明的多糖的特征在于, 基团 Q 选自下列基团:

[0313]



[0314] 在一个实施方案中, r 为 0.1-2。

[0315] 在一个实施方案中, r 为 0.2-1.5。

[0316] 在一个实施方案中, 根据本发明的基团 R 的特征在于, 它选自氨基酸。

[0317] 在一个实施方案中, 所述氨基酸选自 α -氨基酸。

[0318] 在一个实施方案中, 所述 α -氨基酸选自天然 α -氨基酸。

[0319] 在一个实施方案中,所述天然 α -氨基酸选自亮氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸。

[0320] 在一个实施方案中,所述疏水性醇选自脂肪醇。

[0321] 在一个实施方案中,所述疏水性醇选自自由包含 4-18 个碳的不饱和或饱和的烷基链构成的醇。

[0322] 在一个实施方案中,所述脂肪醇选自肉豆蔻醇、鲸蜡醇、硬脂醇、鲸蜡硬脂醇、丁醇、油醇、羊毛脂。

[0323] 在一个实施方案中,所述疏水性醇选自胆固醇衍生物。

[0324] 在一个实施方案中,所述胆固醇衍生物为胆固醇。

[0325] 在一个实施方案中,所述疏水性醇 Ah 选自生育酚。

[0326] 在一个实施方案中,所述生育酚为 α -生育酚。

[0327] 在一个实施方案中,所述 α -生育酚为 α -生育酚的外消旋物。

[0328] 在一个实施方案中,所述疏水性醇选自携带芳基的醇。

[0329] 在一个实施方案中,所述携带芳基的醇选自苕醇、苯乙醇。

[0330] 所述多糖可以具有 10-10000 的聚合度 m。

[0331] 在一个实施方案中,它具有 10-1000 的聚合度 m。

[0332] 在另一个实施方案中,它具有 10-500 的聚合度 m。

[0333] 在一个实施方案中,所述多糖选自通过色氨酸进行官能化的右旋糖酐、通过辛醇苯丙氨酸酯进行官能化的右旋糖酐、通过辛醇甘氨酸酯进行官能化的右旋糖酐、通过十二烷醇甘氨酸酯进行官能化的右旋糖酐或者通过色氨酸乙酯进行官能化的右旋糖酐。

[0334] 为了中和在该混合物中存在的酸性化合物,所述碱选自无机碱或有机碱。

[0335] 在无机碱中,将提及氢氧化钠、碳酸氢钠或碳酸钠。

[0336] 在有机碱中,将提及胺和脱质子化的氨基酸。

[0337] 在有机碱中,将提及咪唑及其衍生物,尤其是组氨酸、脯氨酸、乙醇胺或丝氨酸。

[0338] 在一个实施方案中,可以使用有机基质以便促进修复,它选自基于经纯化的、经灭菌的且交联的天然胶原的基质。

[0339] 天然聚合物例如胶原是促进细胞附着、迁移和分化的细胞外基质的组分。它们具有为极度生物相容的这样的优点,并且通过酶促消化机制而降解。基于胶原的基质获得自从牛或猪的腱或骨中提取的 I 或 IV 型纤维胶原。首先将这些胶原进行纯化,然后进行交联并随后灭菌。

[0340] 它们还可以通过自体骨在酸性介质中的吸除来获得,所述吸除导致大多数矿化组分的丧失,但保留了胶原性或非胶原性蛋白质,包括生长因子。这些脱矿质基质还可以在用离液剂进行提取后以无活性的形式来制备。这些基质基本上由不溶性的且交联的 I 型胶原组成。

[0341] 还可以使用混合材料,例如将胶原和无机颗粒相联合的基质。这些材料可以以具有强化的机械性质的复合材料的形式,或以“油灰 (putty)”的形式存在,或者胶原起粘合剂作用。

[0342] 可使用的无机材料主要地包括基于磷酸钙的陶瓷,例如羟基磷灰石 (HA)、磷酸三钙 (TCP)、双相磷酸钙 (BCP) 或无定形磷酸钙 (ACP),其主要优点是具有非常接近于骨的化

学组成的化学组成。这些材料具有良好的机械性质,并且是免疫学上惰性的。这些材料可以以各种形式存在,例如粉末、粒料或块料。依赖于其组成,这些材料具有非常不同的降解速率。因而,羟基磷灰石非常缓慢地(数月)降解,而磷酸三钙更快速地(数周)降解。为此目的,开发出了双相磷酸钙,因为它们具有中等的吸除速率。已知这些无机材料主要为骨传导性的。

[0343] 在一个实施方案中,所述有机基质为交联的水凝胶。

[0344] 交联的水凝胶通过聚合物链的交联来获得。链间共价键确定出了有机基质。可以用于构成有机基质的聚合物在题目为 Hydrogels for biomedical applications 的 Hoffman 的综述中进行了描述 (Adv. Drug Deliv. Rev, 2002, 43, 3-12)。

[0345] 在一个实施方案中,植入物可以包含非交联的水凝胶。

[0346] “非交联的水凝胶”是指能够吸附大量的水或生物学液体的聚合物的亲水性三维网状物 (Peppas 等人, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000, 50, 27-46)。该水凝胶由物理相互作用而构成,并因此不通过聚合物链的化学交联来获得。

[0347] 形成水凝胶的聚合物的列表非常广,并且在题目为 Hydrogels for biomedical applications 的 Hoffman 的综述 (Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, 43, 3-12) 中给出了一个大但非穷尽的列表。在这些聚合物中,可以找到合成聚合物以及天然聚合物。涵盖形成水凝胶的多糖的另一篇综述使得能够选择出对于本发明有用的聚合物 (Alhaique 等人, J. Control. Release, 2007, 119, 5-24)。

[0348] 在一个实施方案中,形成水凝胶的聚合物选自合成聚合物的组,其中包括乙二醇和乳酸的共聚物、乙二醇和乙醇酸的共聚物、聚(N-乙烯吡咯烷酮)、聚乙烯酸、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸。

[0349] 在一个实施方案中,形成水凝胶的聚合物选自天然聚合物的组,其中包括透明质酸、角质素、出芽短梗霉聚糖、果胶、右旋糖酐、纤维素和纤维素衍生物、藻酸、黄原胶、角叉菜聚糖、壳聚糖、软骨素、胶原、明胶、聚赖氨酸、纤维蛋白以及它们的在生物学上可接受的盐。

[0350] 在一个实施方案中,天然聚合物选自形成水凝胶的多糖的组,其中包括透明质酸、藻酸、右旋糖酐、果胶、纤维素及其衍生物、出芽短梗霉聚糖、黄原胶、角叉菜聚糖、壳聚糖、软骨素以及它们的在生物学上可接受的盐。

[0351] 在一个实施方案中,天然聚合物选自形成水凝胶的多糖的组,其中包括透明质酸、藻酸以及它们的在生物学上可接受的盐。

[0352] 在一个实施方案中,水凝胶可以紧在植入或注射之前制备。

[0353] 在一个实施方案中,可以制备好水凝胶并保存于预装填的注射器中,以便随后进行植入或注射。

[0354] 在一个实施方案中,水凝胶可以紧在植入或注射之前通过冻干物的再水化来制备,或者可以以脱水形式进行植入。

[0355] 在可使用的各种不同基质中,作为实例,将可以提及胶原海绵例如 Helistat® (Integra LifeSciences, Plainsboro, New Jersey), DBM (Demineralized Bone Matrix), 单独的或与其他有机材料例如多糖、甘油或明胶例如 Osteofil® (Medtronic)、Allomatrix® (WRIGHT)、Grafton® (Osteotech)、DBX® (MTF/Synthes)、Bioset® (Regeneration

Technologies) 相混合的,由矿物相构成的基质例如 Vitoss® (Orthivista)、Osteoset® (Wright), 或者混合基质例如 MasterGraft® (Medtronic)、Healos® (Depuy Spine)、CopiOs® (Zimmer)、Sunmax Collagen Bone Graft Matrix (Sunmax)。

[0356] 在共沉淀物形成后的系统由两相(液相和固相)构成。

[0357] 在后面的叙述中,当使用“体积”的概念时,它是指包括所述两相的总体积。

[0358] 在混合所述试剂盒的不同形式的组合物后所得到的产物之中的“量/单位体积”在下面给出,并且不包括当使用无机基质或混合基质时来源于所述基质的钙离子或磷酸根离子的量。

[0359] 在一个实施方案中,各种不同蛋白质的总量/单位体积为 0.01mg-2mg,优选地 0.05mg-1.5mg,和更加优选地 0.1mg-1.5mg/ml 所获得的悬浮液。

[0360] 磷酸根的总量/单位体积为 0.02mmol-0.5mmol,优选地 0.05mmol-0.25mmol/ml 所获得的悬浮液。

[0361] 钙的总量/单位体积为 0.01mmol-1mmol,优选地 0.05mmol-1mmol,和更加优选地 0.1mmol-0.5mmol/单位体积。

[0362] 固相中钙离子的百分比为所引入的钙离子的 60 至 95%。

[0363] 多糖的总量/单位体积为 1-100mg,优选地 2-40mg/ml 所获得的悬浮液。固相中多糖的百分比大于所引入的多糖的 80%。

[0364] 所使用的碱的量,相对于由磷酸根离子所提供的质子而言,相应于大约 0.1-2 当量。

[0365] 根据所使用的体积以及组合物的数目,可以通过计算来确定在起始组合物中所使用的量。这可以对于试剂盒的各种不同实施方案来进行。

[0366] 在一个实施方案中,对于脊椎植入物,成骨生长因子的剂量为 0.01mg-20mg,优选地 0.05mg-8mg,优选地 0.1mg-4mg,更加优选地 0.1mg-2mg,而文献中通常认可的剂量为 8-12mg。

[0367] 在一个实施方案中,对于脊椎植入物,成骨生长因子的剂量为 0.05mg-8mg,优选地 0.1mg-4mg,更加优选地 0.1mg-2mg。

[0368] 在一个实施方案中,为了配制包含根据本发明的共沉淀物的植入物,制备包括三个小瓶的试剂盒,所述小瓶包括:

[0369] 第一个小瓶,2-10mg 的以冻干形式的成骨蛋白;

[0370] 第二个小瓶,2-6ml 的多糖(浓度为 10-50mg/ml)和磷酸氢二钠 Na_2HPO_4 与磷酸二氢钠 NaH_2PO_4 的等摩尔混合物(浓度为 0.15-0.50M)的溶液;

[0371] 第三个小瓶,2-6ml 的浓度为 0.25-0.90M 的氯化钙溶液。

[0372] 在一个实施方案中,第二个小瓶另外还包含浓度为 0.05-0.8M 的碳酸氢钠溶液。

[0373] 在一个实施方案中,第二个和第三个小瓶另外还包含浓度为 0.02-0.2M 的组氨酸溶液。

[0374] 在一个实施方案中,第三个小瓶另外还包含浓度为 0.05-0.3M 的脯氨酸溶液。

[0375] 在进行植入之前,在体积为 15-30ml 的胶原海绵上同时地或相继地添加所述溶液。

[0376] 在一个实施方案中,为了配制包含根据本发明的共沉淀物的植入物,混合三种溶

液,所述三种溶液包括:

- [0377] 体积为 1-3ml 的第一种溶液,其包含浓度为 0.33-2mg/ml 的成骨蛋白;
- [0378] 体积为 1-3ml 的第二种溶液,其包含浓度为 5-15mg/ml 的多糖和浓度为 0.05-0.15M 的磷酸氢二钠 Na_2HPO_4 与磷酸二氢钠 NaH_2PO_4 的等摩尔混合物;
- [0379] 体积为 1-3ml 的第三种溶液,其包含浓度为 0.25-0.50M 的氯化钙。
- [0380] 在一个实施方案中,向所获得的混合物添加浓度为 0.20-0.4M 的碳酸氢钠溶液。
- [0381] 在一个实施方案中,向所获得的混合物添加浓度为 0.02-0.15M 的组氨酸溶液。
- [0382] 在一个实施方案中,向所获得的混合物添加浓度为 0.05-0.3M 的脯氨酸溶液。
- [0383] 然后,将包含根据本发明的共沉淀物的混合物进行冻干。
- [0384] 在使用之时,以起始体积的大约 35%,用可注射水和 / 或血液使所述混合物再水化。
- [0385] 本发明还涉及通过植入来使用本发明的组合物,例如用于填补骨质缺损,用于施行脊椎融合或上颌面修补,或者用于治疗骨折,特别是假关节类型的骨折。
- [0386] 本发明还涉及通过注射来使用本发明的组合物,用于治疗骨质缺损,尤其是由于骨质疏松而引起的骨质缺损,以及用于可以通过经皮途径进行治疗的任何其他病理学状态。
- [0387] 本发明还涉及根据本发明的组合物作为骨植入物的用途。
- [0388] 在一个实施方案中,所述组合物可以与脊椎假体或脊椎融合支架类型的修复装置相组合地进行使用。
- [0389] 本发明还涉及治疗和手术方法,其在骨重构中使用所述组合物。
- [0390] 在这些各种不同的治疗应用中,基质的尺寸和成骨生长因子的量依赖于待处理的部位的体积。
- [0391] 下面给出本发明的各种不同实施方案的实施例。
- [0392] 试剂盒的实施例以说明性而非限制性的方式给出。
- [0393] 实施例 1:包括 5 个小瓶的试剂盒的制备
- [0394] 试剂盒 1:具有 5 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的成骨蛋白的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的聚合物的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶,和一个包含冻干的或以溶液形式的碱的小瓶。
- [0395] 实施例 2:包括 4 个小瓶的试剂盒的制备
- [0396] 试剂盒 2:具有 4 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的成骨蛋白的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的聚合物的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐的小瓶,和一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶。
- [0397] 实施例 3:包括 4 个小瓶的试剂盒的制备
- [0398] 试剂盒 3:具有 4 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的成骨蛋白的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的聚合物和可溶性磷酸盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐的小瓶,和一个包含冻干的或以溶液形式的碱的小瓶。
- [0399] 实施例 4:包括 4 个小瓶的试剂盒的制备
- [0400] 试剂盒 4:具有 4 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的成骨蛋白

的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的聚合物的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐和碱的小瓶,和一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶。

[0401] 实施例 5:包括 4 个小瓶的试剂盒的制备

[0402] 试剂盒 5:具有 4 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的在成骨蛋白与聚合物之间的复合物的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶,和一个包含冻干的或以溶液形式的碱的小瓶。

[0403] 实施例 6:包括 3 个小瓶的试剂盒的制备

[0404] 试剂盒 6:具有 3 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的成骨蛋白的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的聚合物和可溶性磷酸盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐和碱的小瓶。

[0405] 实施例 7:包括 3 个小瓶的试剂盒的制备

[0406] 试剂盒 7:具有 3 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的成骨蛋白的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的聚合物和可溶性磷酸盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐的小瓶。

[0407] 实施例 8:包括 3 个小瓶的试剂盒的制备

[0408] 试剂盒 8:具有 3 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的在成骨蛋白与聚合物之间的复合物的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐和碱的小瓶。

[0409] 实施例 9:包括 3 个小瓶的试剂盒的制备

[0410] 试剂盒 9:具有 3 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的或以溶液形式的在成骨蛋白与聚合物之间的复合物的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐的小瓶。

[0411] 实施例 10:包括 2 个小瓶的试剂盒的制备

[0412] 试剂盒 10:具有 2 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的在成骨蛋白与聚合物之间的复合物和冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐的小瓶。

[0413] 实施例 11:包括 2 个小瓶的试剂盒的制备

[0414] 试剂盒 11:具有 2 个小瓶的试剂盒包括:一个包含冻干的在成骨蛋白与聚合物之间的复合物和冻干的或以溶液形式的可溶性磷酸盐的小瓶,一个包含冻干的或以溶液形式的可溶性钙盐和碱的小瓶。

[0415] 聚合物合成的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0416] 实施例 12:通过色氨酸进行官能化的右旋糖酐的制备

[0417] 聚合物 1 为通过 L-色氨酸的钠盐进行修饰的右旋糖酐甲基羧酸钠,其根据专利申请 FR07.02316 中所描述的方法从具有 40kg/mol 的重均摩尔质量的右旋糖酐 (Pharmacosomes) 获得。通过色氨酸进行修饰或未进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 III 中的 t,为 1.03。通过色氨酸进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 III 中的 p,为 0.36。

[0418] 实施例 13:通过辛醇苯丙氨酸酯进行官能化的右旋糖酐的制备

[0419] 聚合物 2 为通过 L- 苯丙氨酸的辛醇酯进行修饰的右旋糖酐甲基羧酸钠,其根据专利申请 PCT/IB2009007054 中所描述的方法从具有 40kg/mol 的重均摩尔质量的右旋糖酐 (Pharmacosmos) 获得。通过 L- 苯丙氨酸的辛醇酯进行修饰或未进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 X 中的 r,为 1.11。通过 L- 苯丙氨酸的辛醇酯进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 IX 中的 q,为 0.09。

[0420] 在生产结束时聚合物 2 的溶液为 30.45mg/mL。

[0421] 实施例 14 :通过辛醇甘氨酸酯进行官能化的右旋糖酐的制备

[0422] 聚合物 3 为通过 L- 甘氨酸的辛醇酯进行修饰的右旋糖酐甲基羧酸钠,其根据专利申请 FR08.05506 中所描述的方法从具有 40kg/mol 的重均摩尔质量的右旋糖酐 (Pharmacosmos) 获得。通过 L- 甘氨酸的辛醇酯进行修饰或未进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 X 中的 r,为 1.09。通过 L- 甘氨酸的辛醇酯进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 IX 中的 q,为 0.22。

[0423] 实施例 15 :通过色氨酸进行官能化的右旋糖酐的制备

[0424] 聚合物 4 为通过 L- 色氨酸的钠盐进行修饰的右旋糖酐甲基羧酸钠,其根据专利申请 FR07.02316 中所描述的方法从具有 70kg/mol 的重均摩尔质量的右旋糖酐 (Pharmacosmos) 获得。通过色氨酸进行修饰或未进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 III 中的 t,为 1.14。通过色氨酸进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 III 中的 p,为 0.41。

[0425] 实施例 16 :通过辛醇苯丙氨酸酯进行官能化的右旋糖酐的制备

[0426] 聚合物 5 为通过 L- 苯丙氨酸的辛醇酯进行修饰的右旋糖酐甲基羧酸钠,其根据专利申请 FR08.05506 中所描述的方法从具有 40kg/mol 的重均摩尔质量的右旋糖酐 (Pharmacosmos) 获得。通过 L- 苯丙氨酸的辛醇酯进行修饰或未进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 X 中的 r,为 1.12。通过 L- 苯丙氨酸的辛醇酯进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 IX 中的 q,为 0.22。

[0427] 实施例 17 :通过十二烷醇甘氨酸酯进行官能化的右旋糖酐的制备

[0428] 聚合物 6 为通过 L- 甘氨酸的十二烷醇酯进行修饰的右旋糖酐甲基羧酸钠,其根据专利申请 FR08.05506 中所描述的方法从具有 40kg/mol 的重均摩尔质量的右旋糖酐 (Pharmacosmos) 获得。通过 L- 甘氨酸的十二烷醇酯进行修饰或未进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 X 中的 r,为 1.04。通过 L- 甘氨酸的十二烷醇酯进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 IX 中的 q,为 0.13。

[0429] 实施例 18 :通过色氨酸的乙酯进行官能化的右旋糖酐的制备

[0430] 聚合物 7 为通过 L- 色氨酸的乙酯进行修饰的右旋糖酐甲基羧酸钠,其根据专利申请 FR07.02316 中所描述的方法从具有 40kg/mol 的重均摩尔质量的右旋糖酐 (Pharmacosmos) 获得。通过色氨酸的乙酯进行修饰或未进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 III 中的 t,为 1.09。通过色氨酸的乙酯进行修饰的甲基羧酸钠的摩尔份数,即在本申请的式 III 中的 p,为 0.47。

[0431] 实施例 19 :通过色氨酸进行官能化的右旋糖酐的溶液的制备

[0432] 通过将 9.13g 聚合物 1 的冻干物 (大约 25% 的含水量) 溶解在 35.24g 水中来制备聚合物 1 的浓溶液。将该溶液搅拌 30 分钟。聚合物 1 的浓度为 162.9mg/g,其通过干提

取物来测定。密度为 1.08。因此,聚合物 1 的浓度为 175.9mg/mL。

[0433] 实施例 20 :通过辛醇苯丙氨酸酯进行官能化的右旋糖酐的溶液的制备

[0434] 通过将 3.12g 聚合物 2 的冻干物(14%的含水量)溶解在 64g 水中来制备 40mg/g 的聚合物 2 的溶液。

[0435] 实施例 21 :通过辛醇甘氨酸酯进行官能化的右旋糖酐的溶液的制备

[0436] 通过将 3.95g 聚合物 3 的冻干物(4%的含水量)溶解在 100g 水中来制备 38mg/g 的聚合物 3 的溶液。

[0437] 成骨蛋白的溶液或冻干物的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0438] 实施例 22 :在 1mM HCl 缓冲液中的 rhBMP-2 溶液

[0439] 通过向 1.5mg 冻干的 rhBMP-2 添加 10mL 1mM HCl 溶液来制备 10mL 0.15mg/ml 的 rhBMP-2 溶液。让该溶液在 4°C 下温育两小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0440] 实施例 23 :在 InFUSE 缓冲液中的 rhBMP-2 溶液

[0441] 通过在装有 800mL 水的 1L 的量瓶中溶解 5g 蔗糖、25g 甘氨酸、3.72g 谷氨酸、0.11g 氯化钠和 0.11g 聚山梨醇酯 80 来制备 1L InFUSE 缓冲液。然后,通过添加 16.8mL 1N 氢氧化钠将该溶液的 pH 调节至 4.5。最后,将该量瓶装满至刻度线处,以获得 InFUSE 缓冲液。通过向 1.5mg 冻干的 rhBMP-2 添 1mL 缓冲液来制备 1mL 在 InFUSE 缓冲液中的 1.5mg/ml 的 rhBMP-2 溶液。让该溶液在 4°C 下温育两小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0442] 此外,可以将该溶液冻干。

[0443] 实施例 24 :在 10mM HCl 缓冲液中的 rhBMP-7 溶液

[0444] 通过向 3.8mg 冻干的 rhBMP-7 添加 1mL 1mM HCl 溶液来制备 3.8mg/ml 的 rhBMP-7 溶液。该溶液的 pH 为 2.2。让该溶液在环境温度下温育 15 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0445] 实施例 25 :在 5%乳糖缓冲液(pH 3.5)中的 rhBMP-7 溶液

[0446] 通过向 30.3mg 冻干的 rhBMP-7 添加 7.8mL 5%乳糖溶液(其 pH 通过添加 1M HCl 而固定至 3.5)来制备 3.8mg/ml 的 rhBMP-7 溶液。该溶液的 pH 为 3.5。让该溶液在环境温度下温育 15 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0447] 实施例 26 :在 10mM HCl 缓冲液中的 rhGDF-5 溶液

[0448] 通过向 1.5mg 冻干的 rhGDF-5 添加 1mL 10mM HCl 溶液来制备 1mL 1.5mg/ml 的 rhGDF-5 溶液。让该溶液在 4°C 下温育两小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0449] 制备可溶性磷酸盐溶液的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0450] 实施例 27 :磷酸钠溶液

[0451] 在量瓶中,从无水磷酸氢二钠和磷酸二氢钠的等摩尔混合物(Sigma)来制备 1M 的磷酸钠溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0452] 从上面所描述的母液来制备更为稀释的磷酸钠溶液。

[0453] 制备可溶性钙盐溶液的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0454] 实施例 28 :2M 的氯化钙溶液

[0455] 溶液 1 :在量瓶中,从无水或二水合氯化钙(Sigma)来制备 2M 的氯化钙溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0456] 实施例 29 :0.75M 的氯化钙溶液

[0457] 溶液 2 :通过从在前一个实施例中所述的 2M 的氯化钙溶液开始进行稀释来制备 0.75M 的氯化钙溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0458] 实施例 30 :0.75M 的乙酸钙溶液

[0459] 溶液 3 :在量瓶中,从乙酸钙 (Sigma) 来制备 0.75M 的乙酸钙溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0460] 实施例 31 :0.75M 的葡糖酸钙溶液

[0461] 溶液 4 :在量瓶中,从葡糖酸钙 (Sigma) 来制备 0.75M 的葡糖酸钙溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0462] 制备碱溶液的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0463] 实施例 32 :1M 的组氨酸溶液

[0464] 溶液 5 :在 1L 的量瓶中,通过在对于达到刻度线而言必需的体积的去离子水中溶解 155.2g L-组氨酸 (Sigma) 来制备 1M 组氨酸溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0465] 实施例 33 :2M 的脯氨酸溶液

[0466] 溶液 6 :在 1L 的量瓶中,通过添加 230.2g L-脯氨酸 (Sigma)、200mL 10N 氢氧化钠和对于达到刻度线而言必需的体积的去离子水来制备 2M 的脯氨酸溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0467] 实施例 34 :2M 的丝氨酸溶液

[0468] 溶液 7 :在 1L 的量瓶中,通过添 210.2g L-丝氨酸 (Sigma)、200mL 10N 氢氧化钠和对于达到刻度线而言必需的体积的去离子水来制备 2M 的丝氨酸溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0469] 实施例 35 :2M 的甘氨酸溶液

[0470] 溶液 8 :在 1L 的量瓶中,通过添加 150.1g L-甘氨酸 (Sigma)、200mL 10N 氢氧化钠和对于达到刻度线而言必需的体积的去离子水来制备 2M 的甘氨酸溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0471] 实施例 36 :2M 的丙氨酸溶液

[0472] 溶液 9 :在 1L 的量瓶中,通过添加 178.2g L-丙氨酸 (Sigma)、200mL 10N 氢氧化钠和对于达到刻度线而言必需的体积的去离子水来制备 2M 的丙氨酸溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0473] 实施例 37 :2M 的赖氨酸溶液

[0474] 溶液 10 :在 1L 的量瓶中,通过添加 292.4g L-赖氨酸 (Sigma)、200mL 10N 氢氧化钠和对于达到刻度线而言必需的体积的去离子水来制备 2M 的赖氨酸溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0475] 通过要么用水,要么用前面所描述的钙盐溶液进行稀释,来获得这些不同碱的更低浓度的溶液。

[0476] 实施例 38 :碳酸氢钠溶液

[0477] 在量瓶中,从无水碳酸氢钠 (Sigma) 来制备 1.2M 的碳酸氢钠溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0478] 从上面所描述的母液来制备更为稀释的碳酸氢钠溶液。

[0479] 实施例 39 :TRIS 溶液

[0480] 在量瓶中,从超纯的三(羟甲基)氨基甲烷(Sigma)来制备 0.5M 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液,并且用 1M 盐酸调节至 pH 7.4。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0481] 制备包含聚合物和可溶性磷酸盐的溶液的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0482] 实施例 40 :pH 6.5 的包含聚合物 1 和磷酸钠的溶液

[0483] 溶液 11 :通过混合 8.6mL 在实施例 15 中所描述的 175.9mg/mL 聚合物 1 溶液、17mL 在实施例 27 中所描述的 1M 磷酸钠溶液和 11.9mL 水来制备包含 40mg/mL 聚合物 1 和 0.45M 磷酸盐的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0484] 实施例 41 :包含聚合物 1 和磷酸钠的溶液

[0485] 溶液 12 :通过混合 5.5mL 在实施例 15 中所描述的 175.9mg/g 聚合物 1 溶液、5.5mL 在实施例 27 中所描述的 1M 磷酸钠溶液和 13.0mL 无菌水来制备包含 40mg/mL 聚合物 1 和 0.23M 磷酸钠的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0486] 实施例 42 :pH 6.5 的包含聚合物 2 和磷酸钠的溶液

[0487] 溶液 13 :通过混合 10mL 在实施例 20 中所描述的 40mg/g 聚合物 2 溶液、9mL 在实施例 27 中所描述的 1M 磷酸钠溶液和 1mL 水来制备包含 20mg/mL 聚合物 2 和 0.45M 磷酸盐的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0488] 实施例 43 :包含聚合物 1、磷酸钠和碳酸氢盐的溶液

[0489] 溶液 14 :通过混合 5.5mL 在实施例 15 中所描述的 175.9mg/g 聚合物 1 溶液、5.5mL 在实施例 27 中所描述的 1M 磷酸钠溶液、12.4mL 在实施例 38 中所描述的通过母液稀释而获得的 0.6M 碳酸氢钠溶液和 0.6mL 无菌水来制备包含 40mg/mL 聚合物 1、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0490] 实施例 44 :包含聚合物 1、磷酸钠和组氨酸的溶液

[0491] 溶液 15 :通过混合 5.5mL 在实施例 15 中所描述的 175.9mg/g 聚合物 1 溶液、5.5mL 在实施例 27 中所描述的 1M 磷酸钠溶液、10.8mL 在实施例 32 中所描述的通过母液稀释而获得的 0.2M 组氨酸溶液和 2.2mL 无菌水来制备包含 40mg/mL 聚合物 1、0.23M 磷酸钠和 0.09M 组氨酸的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0492] 实施例 45 :包含聚合物 2、磷酸钠和碳酸氢盐的溶液

[0493] 溶液 16 :通过混合 3.45mL 在实施例 13 中所描述的 30.45mg/mL 聚合物 2 溶液、2.0mL 根据实施例 27 而获得的 1.2M 磷酸钠溶液、2.7mL 在实施例 38 中所描述的 1.2M 碳酸氢钠溶液和 2.4mL 无菌水来制备包含 10mg/mL 聚合物 2、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0494] 实施例 46 :包含聚合物 5、磷酸钠和碳酸氢盐的溶液

[0495] 溶液 17 :通过混合 1.3mL 在实施例 16 中所描述的 36.87mg/mL 聚合物 5 溶液、0.45mL 根据实施例 27 而获得的 1.2M 磷酸钠溶液和 0.6mL 在实施例 38 中所描述的 1.2M 碳酸氢钠溶液来制备包含 20mg/mL 聚合物 5、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠的溶液。让该溶

液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0496] 实施例 47:包含聚合物 6、磷酸钠和碳酸氢盐的溶液

[0497] 溶液 18:通过混合 1.0mL 在实施例 17 中所描述的 46.7mg/mL 聚合物 6 溶液、0.45mL 根据实施例 27 而获得的 1.2M 磷酸钠溶液、0.6mL 在实施例 38 中所描述的 1.2M 碳酸氢钠溶液和 0.3mL 无菌水来制备包含 20mg/mL 聚合物 6、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0498] 实施例 48:包含聚合物 7、磷酸钠和碳酸氢盐的溶液

[0499] 溶液 19:通过混合 1.26mL 在实施例 18 中所描述的 75.9mg/mL 聚合物 7 溶液、0.45mL 根据实施例 27 而获得的 1.2M 磷酸钠溶液、0.6mL 在实施例 38 中所描述的 1.2M 碳酸氢钠溶液和 0.06mL 无菌水来制备包含 40mg/mL 聚合物 7、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0500] 制备在成骨蛋白与聚合物之间的复合物的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0501] 实施例 49:“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物的制备

[0502] 溶液 20:向 267 μ l 60.0mg/ml 聚合物 1 溶液和 351 μ l 无菌水添 22 μ l 1.46mg/ml rhBMP-2 溶液。该 rhBMP-2 和聚合物 1 的溶液处于 pH 7.4。让该溶液在 4°C 下温育两小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0503] 实施例 50:“rhBMP-7/ 聚合物 1”复合物的制备

[0504] 溶液 21:将 50 μ l 1.5mg/ml rhBMP-7 溶液与 100 μ l 60.6mg/ml 聚合物 1 溶液相混合。该 rhBMP-7 和聚合物 1 的溶液处于 pH 7.4。让该溶液在 4°C 下温育两小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0505] 实施例 51:“rhBMP-7/ 聚合物 2”复合物的制备

[0506] 溶液 22:将 50 μ l 0.15mg/ml rhBMP-7 溶液与 100 μ l 22.7mg/ml 聚合物 2 溶液相混合。该 rhBMP-7 和聚合物 2 的溶液处于 pH 7.4。让该溶液在 4°C 下温育两小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0507] 实施例 52:“rhGDF-5/ 聚合物 2”复合物的制备

[0508] 溶液 23:将 50 μ l 1.5mg/ml rhGDF-5 溶液与 100 μ l 22.7mg/ml 聚合物 2 溶液相混合。该 rhGDF-5 和聚合物 2 的溶液处于 pH 7.4。让该溶液在 4°C 下温育两小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0509] 实施例 53:在磷酸钠存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物的制备

[0510] 溶液 24:用 19mL 在实施例 41 中所描述的溶液来接纳处于仅包含 7.85mg rhBMP-2 的 InFUSE 缓冲液中的 184.0mg rhBMP-2 冻干物。让该溶液在 4°C 下温育两小时。所获得的溶液是澄清的,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0511] 实施例 54:在磷酸钠和碳酸氢钠存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物的制备

[0512] 溶液 25:用 17.1mL 在实施例 43 中所描述的溶液来接纳处于仅包含 6.95mg rhBMP-2 的 InFUSE 缓冲液中的 165.5mg rhBMP-2 冻干物。让该溶液在 4°C 下温育两小时。所获得的溶液是澄清的,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0513] 实施例 55:在磷酸钠和组氨酸存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物的制备

[0514] 溶液 26:用 17.1mL 在实施例 44 中所描述的溶液来接纳处于仅包含 6.95mg rhBMP-2 的 InFUSE 缓冲液中的 165.5mg rhBMP-2 冻干物。让该溶液在 4°C 下温育两小时。

所获得的溶液是澄清的,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0515] 实施例 56 :在磷酸钠和碳酸氢钠存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物的制备

[0516] 溶液 27 :向 3.5mL 174.7mg/g 聚合物 1 溶液添加 1.98mL 1.55mg/mL 的在 InFuse 缓冲液中的 rhBMP-2 溶液。接着,还添加 9.6mL 包含 0.74M 磷酸钠和 1.2M 碳酸氢钠的溶液,和 0.28mL 无菌水。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。该混合物的组成为 0.2mg/mL rhBMP-2、40mg/mL 聚合物 1、0.45M 磷酸钠和 0.75M 碳酸氢钠。

[0517] 实施例 57 :在磷酸钠和碳酸氢钠存在下的“rhBMP-7/ 聚合物 1”复合物的制备

[0518] 溶液 28 :向 3.4mL 在实施例 15 中所描述的 175.9mg/g 聚合物 1 溶液添加 1.71mL 3.69mg/mL 的在 10mM HCl 缓冲液中的 rhBMP-7 溶液。接着,添加 3.3mL 在实施例 27 中所描述的 1M 磷酸钠溶液,和 7.5mL 在实施例 38 中所描述的通过母液稀释而获得的 0.6M 碳酸氢钠溶液,和 14.1mL 无菌水。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。该混合物的组成为 0.2mg/mL rhBMP-7、20mg/mL 聚合物 1、0.11M 磷酸钠和 0.15M 碳酸氢钠。

实施例 58 :在磷酸钠和碳酸氢钠存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 2”复合物的制备

[0519] 溶液 29 :用 10.5mL 溶液 16 来接纳处于 InFuse 缓冲液中的 65.2mg rhBMP-2 冻干物。让该溶液在环境温度下温育 1 小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。该混合物的组成为 0.4mg/mL rhBMP-2、10mg/mL 聚合物 2、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠。

[0520] 实施例 59 :在磷酸钠和碳酸氢钠存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 5”复合物的制备

[0521] 溶液 30 :用 2.4mL 溶液 17 来接纳处于 InFuse 缓冲液中的 25.7mgrhBMP-2 冻干物。让该溶液在环境温度下温育 1 小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。该混合物的组成为 1.5mg/mL rhBMP-2、20mg/mL 聚合物 5、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠。

[0522] 实施例 60 :在磷酸钠和碳酸氢钠存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 6”复合物的制备

[0523] 溶液 31 :用 2.4mL 溶液 18 来接纳处于 InFuse 缓冲液中的 24.8mg rhBMP-2 冻干物。让该溶液在环境温度下温育 1 小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。该混合物的组成为 1.5mg/mL rhBMP-2、20mg/mL 聚合物 6、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠。

[0524] 实施例 61 :在磷酸钠和碳酸氢钠存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 7”复合物的制备

[0525] 溶液 32 :用 2.4mL 溶液 19 来接纳处于 InFuse 缓冲液中的 25.6mgrhBMP-2 冻干物。让该溶液在环境温度下温育 1 小时,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。该混合物的组成为 1.5mg/mL rhBMP-2、40mg/mL 聚合物 7、0.23M 磷酸钠和 0.31M 碳酸氢钠。

[0526] 制备包含可溶性钙盐和碱的溶液的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0527] 实施例 62 :氯化钙和组氨酸的溶液

[0528] 溶液 33 :通过添加 112.5mL 2M 氯化钙溶液、120mL 1M 组氨酸溶液和 67.5mL 去离子水来制备包含 0.75M 氯化钙和 0.4M 组氨酸的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0529] 实施例 63 :氯化钙和脯氨酸的溶液

[0530] 溶液 34 :通过添加 112.5mL 2M 氯化钙溶液、112.5mL 2M 脯氨酸溶液和 75mL 去离子水来制备包含 0.75M 氯化钙和 0.75M 脯氨酸的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μ m 进行无菌过滤。

[0531] 实施例 64 :氯化钙和甘氨酸的溶液

[0532] 溶液 35 :通过添加 112.5mL 2M 氯化钙溶液、112.5mL 2M 甘氨酸溶液和 75mL 去离

子水来制备包含 0.75M 氯化钙和 0.75M 甘氨酸的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μm 进行无菌过滤。

[0533] 实施例 65:氯化钙和丙氨酸的溶液

[0534] 溶液 36:通过添加 112.5mL 2M 氯化钙溶液、112.5mL 2M 丙氨酸溶液和 75mL 去离子水来制备包含 0.75M 氯化钙和 0.75M 丙氨酸的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μm 进行无菌过滤。

[0535] 实施例 66:氯化钙和赖氨酸的溶液

[0536] 溶液 37:通过添加 112.5mL 2M 氯化钙溶液、112.5mL 2M 赖氨酸溶液和 75mL 去离子水来制备包含 0.75M 氯化钙和 0.75M 赖氨酸的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μm 进行无菌过滤。

[0537] 实施例 67:氯化钙和丝氨酸的溶液

[0538] 溶液 38:通过添 112.5mL 2M 氯化钙溶液、112.5mL 2M 丝氨酸溶液和 75mL 去离子水来制备包含 0.75M 氯化钙和 0.75M 丝氨酸的溶液。让该溶液在环境温度下温育 30 分钟,并且通过 0.22 μm 进行无菌过滤。

[0539] 制备包含 BMP、聚合物、可溶性钙盐、可溶性磷酸盐和 / 或碱的可注射悬浮液的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0540] 实施例 68:在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 2”复合物的可注射悬浮液的制备

[0541] 通过混合 400 μL 包含 0.4mg/mL rhBMP-2(即 160 μg rhBMP-2)、10mg/mL 聚合物 2(即 4mg 聚合物 2)、0.23M 磷酸钠(即 92 μmol)和 0.31M 碳酸氢钠(即 124 μmol)的溶液 29 与 400 μL 0.38M 氯化钙(即 153 μmol)溶液来获得基于“rhBMP-2/ 聚合物 2”复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨悬浮液。在注射前,将所获得的悬浮液在环境温度下保存 15 分钟。该悬浮液是用 27 号针头可注射的。

[0542] 实施例 69:在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物的可注射悬浮液的制备

[0543] 通过混合 1250 μL 包含 0.52mg/mL BMP-2(即 650 μg BMP-2)、20mg/mL 聚合物 1(即 25mg 聚合物 1)、0.23M 磷酸钠(即 288 μmol)和 0.31M 碳酸氢钠(即 388 μmol)的溶液与 1250 μL 0.38M 氯化钙(即 477 μmol)溶液来获得基于“BMP-2/ 聚合物 1”复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨悬浮液。在注射前,将所获得的悬浮液在环境温度下保存 15 分钟。该悬浮液是用 27 号针头可注射的。

[0544] 制备包含 BMP、聚合物、可溶性钙盐、可溶性磷酸盐和 / 或碱的植入物的实施例以说明性而非限制性的方式给出。

[0545] 在下面实施例中所描述的植入物用 Helistat 类型的、无菌的、交联的 I 型胶原海绵(Integra LifeSciences, Plainsboro, New Jersey)来制备。该海绵的体积根据应用而变化,对于在大鼠中的异位部位处应用而言为 200 μL ,对于在兔中的脊椎融合的应用而言为 4.5mL。

[0546] 实施例 70:冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’这类植入物的制备

[0547] 植入物 1:将 40 μl 溶液 20 引入到无菌的 200mm³ 的交联胶原海绵中。让该溶液在胶原海绵中温育 30 分钟,然后再添加 10 μl 浓度为 1.64M 的氯化钙溶液。最后,将通过混合 80 μL

磷酸钠 (22.5mg/mL) 与 10 μ L 1N 盐酸而获得的 90 μ L 浓度为 0.053M 的经中和的磷酸钠溶液添加至该海绵。然后,将该海绵无菌地进行冷冻和冻干。在所述海绵中 rhBMP-2 的剂量为 2 μ g。

[0548] 实施例 71 :冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’这类植入物的制备

[0549] 植入物 2 :将 40 μ l 溶液 20 引入到无菌的 200mm³ 的交联胶原海绵中。让该溶液在胶原海绵中温育 30 分钟,然后再添加 10 μ l 浓度为 6.85M 的氯化钙溶液。最后,将通过混合 80 μ L 磷酸钠 (93.8mg/mL) 与 10 μ L 1N 盐酸而获得的 90 μ L 浓度为 0.22M 的经中和的磷酸钠溶液添加至该海绵。然后,将该海绵无菌地进行冷冻和冻干。rhBMP-2 的剂量为 2 μ g。

[0550] 实施例 72 :冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和抗坏血酸钠存在下的 BMP-2/ 聚合物 1 复合物’这类植入物的制备

[0551] 植入物 3 :将 40 μ l 溶液 20 引入到无菌的 200mm³ 的交联胶原海绵中。让该溶液在胶原海绵中温育 30 分钟,然后再添加 10 μ l 浓度为 1.64mg/ml 的氯化钙溶液。最后,将 80 μ L 浓度为 0.41M 的抗坏血酸钠溶液添加至该海绵。然后,将该海绵无菌地进行冷冻和冻干。rhBMP-2 的剂量为 2 μ g。

[0552] 实施例 73 :冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’这类植入物的制备

[0553] 植入物 4 :从尺寸为 5.02 \times 2.54 \times 0.35cm (即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 2mL 具有 0.325mg/mL rhBMP-2 (即 650 μ g rhBMP-2)、64.5mg/mL 聚合物 1 (即 129mg 聚合物 1) 和 0.18M 磷酸钠 (pH 7.4) (即 360 μ mol) 的溶液,接着添加 500 μ L 1.2M 氯化钙 (即 600 μ mol 氯化钙) 溶液,和最后添加 500 μ L 0.54M 氢氧化钠 (即 270 μ mol 氢氧化钠) 溶液。然后,将这些植入物在 -80 $^{\circ}$ C 下进行冷冻,并冻干。在植入之前,将每个冻干的海绵用 1mL 自体血液浸透 30 分钟。

[0554] 实施例 74 :冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’这类植入物的制备

[0555] 植入物 5 :从尺寸为 5.02 \times 2.54 \times 0.35cm (即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 2mL 具有 0.163mg/mL rhBMP-2 (即 326 μ g rhBMP-2)、32.5mg/mL 聚合物 1 (即 65mg 聚合物 1) 和 0.18M 磷酸钠 (pH 7.4) (即 360 μ mol) 的溶液,接着添加 500 μ L 1.2M 氯化钙 (即 600 μ mol) 溶液,和最后添加 500 μ L 0.54M 氢氧化钠 (即 270 μ mol 氢氧化钠) 溶液。然后,将这些植入物在 -80 $^{\circ}$ C 下进行冷冻,并冻干。在植入之前,将每个冻干的海绵用 1mL 自体血液浸透 30 分钟。

[0556] 实施例 75 :冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’这类植入物的制备

[0557] 植入物 6 :从尺寸为 5.02 \times 2.54 \times 0.35cm (即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 2mL 具有 0.081mg/mL rhBMP-2 (即 162 μ g rhBMP-2)、16.3mg/mL 聚合物 1 (即 32.5mg) 和 0.18M 磷酸钠 (pH 7.4) (即 360 μ mol) 的溶液,接着添加 500 μ L 1.2M 氯化钙 (即 600 μ mol) 溶液,和最后添加 500 μ L 0.54M 氢氧化钠 (即 270 μ mol 氢氧化钠) 溶液。

然后,将这些植入物在 -80°C 下进行冷冻,并冻干。在植入之前,将每个冻干的海绵用1mL自体血液浸透30分钟。

[0558] 实施例76:冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的rhBMP-2/聚合物4复合物’这类植入物的制备

[0559] 植入物7:从尺寸为 $5.02\times 2.54\times 0.35\text{cm}$ (即4.52mL的海绵体积)的交联胶原海绵来获得基于rhBMP-2/聚合物4复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加2mL具有0.040mg/mL rhBMP-2(即 $80\mu\text{g}$ rhBMP-2)、8mg/mL 聚合物4(即16mg)和0.18M 磷酸钠(pH 7.4)(即 $360\mu\text{mol}$)的溶液,接着添加 $500\mu\text{L}$ 1.2M 氯化钙(即 $600\mu\text{mol}$)溶液,和最后添加 $500\mu\text{L}$ 0.54M 氢氧化钠(即 $270\mu\text{mol}$ 氢氧化钠)溶液。然后,将这些植入物在 -80°C 下进行冷冻,并冻干。在植入之前,将每个冻干的海绵用1mL自体血液浸透30分钟。

[0560] 实施例77:‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的rhBMP-2/聚合物4复合物’这类植入物的制备

[0561] 植入物8:从尺寸为 $5.02\times 2.54\times 0.35\text{cm}$ (即4.52mL的海绵体积)的交联胶原海绵来获得基于rhBMP-2/聚合物4复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 $1060\mu\text{L}$ 具有0.311mg/mL rhBMP-2(即 $330\mu\text{g}$ rhBMP-2)、62.3mg/mL 聚合物4(即66mg)和0.34M 磷酸钠(pH 7.4)(即 $360\mu\text{mol}$)的溶液,接着添加 $270\mu\text{L}$ 3.4M 氯化钙(即 $920\mu\text{mol}$)溶液,和最后添加 $270\mu\text{L}$ 1.37M 氢氧化钠(即 $370\mu\text{mol}$ 氢氧化钠)溶液。

[0562] 实施例78:‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的rhBMP-2/聚合物4复合物’这类植入物的制备

[0563] 植入物9:从尺寸为 $5.02\times 2.54\times 0.35\text{cm}$ (即4.52mL的海绵体积)的交联胶原海绵来获得基于rhBMP-2/聚合物4复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 $1060\mu\text{L}$ 具有0.151mg/mL rhBMP-2(即 $160\mu\text{g}$ rhBMP-2)、30.2mg/mL 聚合物4(即32mg)和0.34M 磷酸钠(pH 7.4)(即 $360\mu\text{mol}$)的溶液,接着添加 $270\mu\text{L}$ 3.4M 氯化钙(即 $920\mu\text{mol}$)溶液,和最后添加 $270\mu\text{L}$ 1.37M 氢氧化钠(即 $370\mu\text{mol}$ 氢氧化钠)溶液。

[0564] 实施例79:‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的rhBMP-2/聚合物4复合物’这类植入物的制备

[0565] 植入物10:从尺寸为 $5.02\times 2.54\times 0.35\text{cm}$ (即4.52mL的海绵体积)的交联胶原海绵来获得基于rhBMP-2/聚合物4复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 $1060\mu\text{L}$ 具有0.311mg/mL rhBMP-2(即 $330\mu\text{g}$ rhBMP-2)、62.3mg/mL 聚合物4(即66mg)和0.34M 磷酸钠(pH 7.4)(即 $360\mu\text{mol}$)的溶液,和最后添加 $540\mu\text{L}$ 1.7M 氯化钙(即 $920\mu\text{mol}$)溶液。

[0566] 实施例80:冻干的‘胶原海绵’/‘在氯化钙和磷酸钠存在下的rhBMP-2/聚合物1复合物’这类植入物的制备

[0567] 植入物11:从尺寸为 $5.02\times 2.54\times 0.35\text{cm}$ (即4.52mL的海绵体积)的交联胶原海绵来获得基于rhBMP-2/聚合物1复合物与磷酸钙颗粒的沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 $1500\mu\text{L}$ 具有0.107mg/mL rhBMP-2(即 $160\mu\text{g}$ rhBMP-2)、21.3mg/mL 聚合物1(即32mg)的溶液,接着添加 $500\mu\text{L}$ 1.2M 氯化钙(即 $600\mu\text{mol}$)溶液,接着添加 $500\mu\text{L}$ 0.72M 磷酸钠(pH 7.4)(即 $360\mu\text{mol}$)溶液,和最后添加 $500\mu\text{L}$ 0.54M 氢氧化钠(即 $270\mu\text{mol}$ 氢氧化钠)溶液。然后,将该植入物在 -80°C 下进行冷冻,并冻干。在植入之前,将所述冻干

的海绵用 1mL 自体血液浸透 30 分钟。

[0568] 实施例 81: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和组氨酸存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 4 复合物’ 这类植入物的制备

[0569] 植入物 12: 从尺寸为 5.02×2.54×0.35cm(即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 4 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 800 μ L 具有 0.413mg/mL rhBMP-2(即 330 μ g rhBMP-2)、20.65mg/mL 聚合物 4(即 16.5mg) 和 0.115M 磷酸钠 (pH 7.4)(即 92 μ mol) 的溶液, 和最后添加 800 μ L 具有 0.3M 氯化钙(即 240 μ mol) 和 0.2M 组氨酸(即 160 μ mol) 的溶液。

[0570] 实施例 82: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和组氨酸存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 4 复合物’ 这类植入物的制备

[0571] 植入物 13: 从尺寸为 5.02×2.54×0.35cm(即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 4 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 800 μ L 具有 0.413mg/mL rhBMP-2(即 330 μ g rhBMP-2)、20.65mg/mL 聚合物 4(即 16.5mg) 和 0.24M 磷酸钠 (pH 7.4)(即 192 μ mol) 的溶液, 和最后添加 800 μ L 具有 0.4M 氯化钙(即 320 μ mol) 和 0.4M 组氨酸(即 320 μ mol) 的溶液。

[0572] 实施例 83: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’ 这类植入物的制备

[0573] 植入物 14: 从尺寸为 5.02×2.54×0.35cm(即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 800 μ L 具有 0.2mg/mL rhBMP-2(即 160 μ g rhBMP-2)、40mg/mL 聚合物 1(即 32mg)、0.45M 磷酸钠 (pH 7.4)(即 360 μ mol) 和 0.75M 碳酸氢钠(即 600 μ mol) 的溶液, 和最后添加 800 μ L 具有 0.75M 氯化钙(即 600 μ mol) 的溶液。

[0574] 实施例 84: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’ 这类植入物的制备

[0575] 植入物 15: 从尺寸为 5.02×2.54×0.35cm(即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 800 μ L 包含 0.2mg/mL BMP-2(即 160 μ g rhBMP-2)、8mg/mL 聚合物 1(即 6.4mg)、0.45M 磷酸钠(即 360 μ mol) 和 0.75M 碳酸氢钠(即 600 μ mol) 的溶液, 和最后添加 800 μ L 0.75M 氯化钙(即 600 μ mol) 溶液。

[0576] 实施例 85: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’ 这类植入物的制备

[0577] 植入物 16: 从尺寸为 5.02×2.54×0.35cm(即 4.52mL 的海绵体积) 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 800 μ L 包含 0.2mg/mL BMP-2(即 160 μ g rhBMP-2)、20.6mg/mL 聚合物 1(即 16.5mg)、0.24M 磷酸钠(即 192 μ mol) 和 0.75M 碳酸氢钠(即 600 μ mol) 的溶液, 和最后添加 800 μ L 0.4M 氯化钙(即 320 μ mol) 溶液。

[0578] 实施例 86: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-7/ 聚合物 1 复合物’ 这类植入物的制备

[0579] 植入物 17: 在用 70 μ L 具有 0.071mg/mL BMP-7(即 5 μ g BMP-7)、31.3mg/mL 聚合

物 1 (即 1.5mg 聚合物 1)、0.24M 磷酸钠 (pH 7.4) (即 16.8 μmol) 和 0.4M 碳酸氢钠 (即 28 μmol) 的溶液,接着用 70 μL 具有 0.4M 氯化钙 (即 28 μmol) 的溶液顺次浸渍 198 μL 的圆柱形的交联的 I 型胶原海绵后,获得了基于 BMP-7/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。然后,将所述植入物在 -80°C 下进行冷冻,并冻干。在植入之前,将所述冻干的海绵用 45 μL 自体血液浸透 30 分钟。

[0580] 实施例 87: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 2 复合物’ 这类植入物的制备

[0581] 植入物 18: 从海绵体积为 2.25mL 的交联胶原海绵来获得基于 rhBMP-2/ 聚合物 2 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在该海绵上添加 400 μL 包含 0.4mg/mL rhBMP-2 (即 160 μg rhBMP-2)、10mg/mL 聚合物 2 (即 4mg)、0.23M 磷酸钠 (即 92 μmol) 和 0.31M 碳酸氢钠 (即 124 μmol) 的溶液 29, 并且最后添加 400 μL 0.38M 氯化钙 (即 153 μmol) 溶液。在添加之后,让每个溶液与海绵接触 15 分钟。在这些浸渍持续时间之后,该海绵即可用于植入。

[0582] 实施例 88: ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-7/ 聚合物 3 复合物’ 这类植入物的制备

[0583] 植入物 19: 在用 800 μL 包含 0.41mg/mL BMP-7 (即 330 μg BMP-7)、17.5mg/mL 聚合物 3 (即 14mg 聚合物 3)、0.45M 磷酸钠 (即 360 μmol) 的溶液,接着用 800 μL 包含 0.4M 氯化钙 (即 648 μmol) 和 0.61M 脯氨酸 (即 488 μmol) 的溶液顺次浸渍体积为 4520 μL 的交联的 I 型胶原海绵后,获得了基于 BMP-7/ 聚合物 3 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在添加之后,让每个溶液与海绵接触 15 分钟。在这些浸渍持续时间之后,该海绵即可用于植入。

[0584] 实施例 89: 冻干的 ‘胶原海绵’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和组氨酸存在下的 rhGDF-5/ 聚合物 2 复合物’ 这类植入物的制备

[0585] 植入物 20: 在用 1500 μL 包含 0.5mg/mL GDF-5 (即 750 μg GDF-5)、20mg/mL 聚合物 2 (即 30mg 聚合物 2) 的溶液,接着用 750 μL 包含 0.8M 氯化钙 (即 600 μmol) 和 0.38M 组氨酸 (即 285 μmol) 的溶液,最后用包含 0.48M 磷酸钠 (即 360 μmol) 的溶液顺次浸渍体积为 4520 μL 的交联的 I 型胶原海绵后,获得了基于 GDF-5/ 聚合物 2 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。在添加之后,让每个溶液与海绵接触 15 分钟。在这些浸渍持续时间之后,将所述海绵在 -80°C 下进行冷冻,并冻干。在植入之前,将所述冻干的海绵用 1.5mL 自体血液浸透 30 分钟。

[0586] 在下面的实施例中所描述的植入物用抗压基质 (CRM, Compressive Resistant Matrix) 来制备。这种材料是由下列组分组成的混合基质: I 型牛胶原, 和由 15% 羟基磷灰石和 85% β -磷酸三钙组成的磷酸钙矿物相, 该材料由 Medtronic 以 MasterGraft Matrix 的名称进行销售。该基质的体积根据应用而变化, 对于在大鼠中的异位部位处应用而言为 140 μL , 对于在兔中的脊椎融合的应用而言为 5mL。

[0587] 实施例 90: 围绕包含 ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 2 复合物’ 的 CRM 的胶原海绵这类植入物的制备

[0588] 植入物 21: 在兔中进行植入之前, 将植入物 16 缠绕在体积为 5.0mL (5.0 \times 1.0 \times 1.0cm) 的干 CRM 周围。

[0589] 实施例 91: ‘CRM’/ ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 2 复合物’ 这类植入物的制备

[0590] 植入物 22: 在用 35 μ L 具有 0.14mg/mL BMP-2 (即 5 μ g BMP-2)、14mg/mL 聚合物 2 (即 0.5mg 聚合物 2)、0.23M 磷酸钠 (即 8 μ mol) 和 0.31M 碳酸氢钠 (即 11 μ mol) 的溶液 (15 分钟), 接着用 35 μ L 具有 0.38M 氯化钙 (即 13 μ mol) 的溶液 (15 分钟) 顺次浸渍体积为 140 μ L 的 CRM 后, 获得了基于 BMP-2/ 聚合物 2 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。所述 CRM 即可用于植入。

[0591] 实施例 92: 冻干的 ‘CRM’ / ‘在氯化钙、磷酸钠和组氨酸存在下的 rhGDF-5/ 聚合物 2 复合物’ 这类植入物的制备

[0592] 植入物 23: 在用 35 μ L 具有 0.86mg/mL GDF-5 (即 30 μ g GDF-5)、14mg/mL 聚合物 2 (即 0.5mg 聚合物 2)、0.23M 磷酸钠 (即 8 μ mol) 的溶液 (15 分钟), 接着用 17.5 μ L 0.34M 组氨酸 (即 6 μ mol) 溶液 (15 分钟), 和最后用 17.5 μ L 0.74M 氯化钙 (即 13 μ mol) 溶液顺次浸渍体积为 140 μ L 的 CRM 后, 获得了基于 GDF-5/ 聚合物 2 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。然后, 将所述 CRM 在 -80°C 下进行冷冻, 并冻干。在植入之前, 将所述冻干的 CRM 用 45 μ L 自体血液浸透 30 分钟。

[0593] 实施例 93: ‘CRM’/ ‘在氯化钙、磷酸钠和碳酸氢盐存在下的 rhBMP-2/ 聚合物 1 复合物’ 这类植入物的制备

[0594] 植入物 24: 在用 1250 μ L 具有 0.52mg/mL BMP-2 (即 650 μ g BMP-2)、20mg/mL 聚合物 1 (即 25mg 聚合物 1)、0.23M 磷酸钠 (即 288 μ mol) 和 0.31M 碳酸氢钠 (即 388 μ mol) 的溶液 (15 分钟), 接着用 1250 μ L 具有 0.38M 氯化钙 (即 477 μ mol) 的溶液 (15 分钟) 顺次浸渍体积为 5.0mL 的 CRM 后, 获得了基于 BMP-2/ 聚合物 1 复合物和磷酸钙颗粒的共沉淀的成骨植入物。所述 CRM 即可用于植入。

[0595] 相反实施例 1: 包含 20 μ g rhBMP-2 的胶原海绵这类植入物的制备

[0596] 植入物 25: 将 40 μ l 0.5mg/ml 的在 INFUSE 类型缓冲液中的 rhBMP-2 溶液无菌地引入到无菌的 200mm³ 的交联胶原海绵中。在植入之前, 让该溶液留在胶原海绵中 30 分钟。

[0597] 在植入物 25 中 rhBMP-2 的剂量为 20 μ g。

[0598] 相反实施例 2: 包含 2 μ g rhBMP-2 的胶原海绵这类植入物的制备

[0599] 植入物 26: 将 40 μ l 0.05mg/ml 的在 INFUSE 类型缓冲液中的 rhBMP-2 溶液无菌地引入到 Helistat 类型的无菌的 200mm³ 的交联胶原海绵 (Integra LifeSciences, Plainsboro, New Jersey) 中。在植入之前, 让该溶液留在胶原海绵中 30 分钟。

[0600] 在植入物 26 中 rhBMP-2 的剂量为 2 μ g。

[0601] 相反实施例 3: 包含 5 μ g rhBMP-7 的胶原海绵这类植入物的制备

[0602] 植入物 27: 在用 140 μ L 具有 0.036mg/mL BMP-7 (即 5 μ g) 的溶液浸渍 198 μ L 的圆柱形的交联的 I 型胶原海绵后, 获得了基于 BMP-7 的冻干的成骨植入物。然后, 将所述植入物在 -80°C 下进行冷冻, 并冻干。在植入之前, 将所述冻干的海绵用 45 μ L 自体血液浸透 30 分钟。

[0603] 相反实施例 4: 包含 2.3mg rhBMP-2 的胶原海绵这类植入物的制备

[0604] 植入物 28: 通过用 1600 μ L 具有 1.45mg/mL rhBMP-2 (即 2.3mg) 的溶液浸渍尺寸为 5.02 \times 2.54 \times 0.35cm (即 4.52mL 的海绵体积) 的交联的 I 型胶原海绵而获得了成骨植入物。在植入之前, 让该溶液留在胶原海绵中 30 分钟。

[0605] 相反实施例 5 :包含 1.3mg rhBMP-2 的胶原海绵这类植入物的制备

[0606] 植入物 29 :通过用 1600 μ L 具有 0.80mg/mL rhBMP-2 (即 1.3mg) 的溶液浸渍尺寸为 5.02 \times 2.54 \times 0.35cm (即 4.52mL 的海绵体积) 的交联的 I 型胶原海绵而获得了成骨植入物。在植入之前,让该溶液留在胶原海绵中 30 分钟。

[0607] 实施例 94 :各种不同制剂的骨诱导能力的评价

[0608] 该研究的目的是在大鼠中的骨异位形成模型之中证实各种不同制剂的骨诱导能力。将 150-250g 的雄性大鼠 (Sprague Dawley OFA-SD, Charles River Laboratories France, B. P. 109,695921' Arbresle) 用于该研究。

[0609] 在外科手术之前,实施镇痛处理 (丁丙诺啡, Temgesic[®], Pfizer, France)。通过吸入 O₂- 异氟烷混合物 (1-4%) 来使大鼠麻醉。通过在宽的背侧区域上剃毛而去除皮毛。用聚维酮碘的溶液 (Vetedine[®]溶液, Vetoquinol, France) 对该背侧区域的皮肤进行消毒。

[0610] 实施大约 1cm 的椎旁切口,以便脱离出右侧和左侧的背侧椎旁肌肉。通过经筋膜的切口来实现对肌肉的接近。将每个植入物以使得在其上不能施加任何压力的方式置于袋中。植入了 4 个植入物 / 大鼠 (2 个植入物 / 部位)。然后,使用聚丙烯线 (Prolene 4/0, Ethicon, France) 缝合植入物的开口。使用非吸收性缝线来使皮肤再闭合。然后,将大鼠重新放回其各自的笼中,并且在它们恢复过程中保持处于观察之下。

[0611] 在 21 天时,通过注射替来他明 - 唑拉西洋 (ZOLETIL[®] 25-50mg/kg, IM, VIRBAC, France) 来使动物麻醉。

[0612] 然后,通过注射一个剂量的戊巴比妥 (DOLETHAL[®], VETOQUINOL, France) 来使动物安乐死。然后,进行每个部位的肉眼观察,根据下述量表来对局部不耐性的任何征候 (炎症、坏死、出血) 以及骨和 / 或软骨组织的存在进行记录和评分 :0 :不存在,1 :弱,2 :中等,3 :显著,4 :重大。

[0613] 将每个外植体从其植入部位中取出,并获取宏观照片。然后,测定外植体的尺寸和重量。然后,将每个外植体保存在经缓冲的 10% 福尔马林溶液中。

[0614] 结果 :

[0615] 该体内实验使得能够测量置于大鼠背部肌肉中的 rhBMP-2 的骨诱导效应。该非骨部位被称为“异位的”。各种不同实施例的结果概括在下表中。

[0616]

	骨组织的存在	外植体的质量 (mg)
植入物 25	3.6	38
植入物 26	-	-
植入物 1	3.4	100
植入物 2	3.1	132
植入物 3	3.5	124

[0617] 在胶原海绵中的 20 μ g rhBMP-2 的剂量 (植入物 25, 相反实施例 1) 导致在 21 天

后获得平均质量为 38mg 的骨化外植体。

[0618] 在胶原海绵中的 2 μ g rhBMP-2 的剂量 (植入物 26, 相反实施例 2) 不具有足够的骨诱导能力以便能够在 21 天后发现胶原外植体。

[0619] 在“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物、氯化钙和磷酸钠存在下, 在胶原海绵中的冻干的 2 μ g rhBMP-2 的剂量 (植入物 1, 实施例 70 ; 和植入物 2, 实施例 71) 使得能够产生骨化外植体, 这与相同剂量的单独的 rhBMP-2 相反。此外, 这些外植体具有 4 倍的质量, 其具有与使用单独的 rhBMP-2 时的植入物等价的骨得分。因此, 该制剂使得能够改善 rhBMP-2 的成骨活性。

[0620] 同样地, 向包含“rhBMP-2/ 聚合物 1”复合物和氯化钙的胶原海绵 (植入物 3, 实施例 72) 添加抗坏血酸钠也使得能够获得质量为 4 倍的骨化外植体, 其具有与使用单独的 rhBMP-2 时的植入物等价的骨得分。该制剂也使得能够改善 rhBMP-2 的成骨活性。

[0621] 实施例 95 : 各种不同制剂在后外侧融合中的骨诱导能力的评价

[0622] 该研究的目的是在兔中的后外侧融合模型之中证实各种不同制剂的骨诱导能力。该研究按照在 JP Lawrence 的出版物 (Lawrence, J. P. 等人, Spine 2007, 32(11), 1206-1213) 中所描述的实验方案来进行, 除了用烟碱进行处理之外, 因为不希望诱导假关节。

[0623] 通过外植的脊柱的手触诊来评价椎骨的融合。椎骨之间不存在活动性就意味着融合。在 12 周时还用显微-CT (micro-CT) 来分析脊柱, 以评价在椎骨范围内骨的存在。对于各种不同植入物而获得的结果概括在下表中。

[0624]

	蛋白质	蛋白质的剂量 (mg)	融合
植入物 28	BMP-2	2.3	2/2
植入物 29	BMP-2	1.3	7/8
植入物 5	BMP-2	0.33	3/3
植入物 14	BMP-2	0.16	5/5
植入物 15	BMP-2	0.16	6/6
植入物 16	BMP-2	0.16	6/6
植入物 19	BMP-7	0.33	2/2
植入物 20	GDF-5	0.75	5/5

[0625] 从这些在兔中的后外侧融合的研究之中得出 : 与磷酸钙盐共沉淀的“BMP-2/ 聚合物”复合物使得能够将 BMP-2 的剂量减少至相对于单独的 BMP-2 (1.3mg 单独的 BMP-2, 这是根据文献获知的在该模型中的有效剂量) 而言的 1/4 至 1/8, 而具有等价的融合结果。甚至在 0.16mg BMP-2 的剂量下, 在与磷酸钙盐共沉淀的“BMP-2/ 聚合物”复合物的情况下, 在所有兔中均观察到后外侧融合。

[0626] 对于低的BMP-7剂量(0.33mg BMP-7/植入物),包含与磷酸钙盐共沉淀的“BMP-7/聚合物”复合物的植入物也导致椎骨的融合。文献的结果显示,甚至在3.5mg BMP-7的剂量(比所研究的剂量大很多的剂量)下也未达到100%的在兔中的脊椎融合(Yao,G.等人., Spine 2008,33(18),1935-1942)。

[0627] 对于低的GDF-5剂量(750 μ g GDF-5/植入物),包含与磷酸钙盐共沉淀的“GDF-5/聚合物”复合物的植入物也导致100%的脊椎融合。文献的结果显示,甚至在2.5mg GDF-5的剂量(比所研究的剂量大很多的剂量)下也未达到100%的在兔中的脊椎融合(Magit, David P. 等人, Spine 2006,31(19),2180-2188)。