



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102470190 B

(45) 授权公告日 2015.09.02

(21) 申请号 201080026688.0

(22) 申请日 2010.06.29

(30) 优先权数据

MI2009A001171 2009.07.02 IT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.12.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/059183 2010.06.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/000820 EN 2011.01.06

(73) 专利权人 菲迪亚医药公司

地址 意大利阿巴诺泰尔梅

(72) 发明人 兰弗兰科·卡莱加罗

安娜·玛丽亚·扎内拉托

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

11018

代理人 陈万青 王珍仙

(51) Int. Cl.

A61L 27/20(2006.01)

A61L 27/38(2006.01)

A61K 35/18(2015.01)

A61K 35/28(2015.01)

(56) 对比文件

CN 101472622 A, 2009.07.01, 权利要求第1、3-5、32项, 以及说明书第7页第2段、第12页第3段.

CN 101112381 A, 2008.01.30, 权利要求1-5以及说明书第2页第1段、第3页第2段.

CA 2405345 A1, 2001.11.01, 全文.

US 6884428 B2, 2005.04.26, 全文.

CN 101495102 A, 2009.07.29, 全文.

审查员 罗平

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

适用于治疗骨关节炎、韧带损伤和关节失调的生物材料

(57) 摘要

本发明涉及一种生物材料, 包括:a) 液态载体, 包括含至少一种天然和/或半合成的多聚糖的粘性溶液, 并具有在20℃和剪切速率为 $D = 350s^{-1}$ 时测定的介于100cP和250cP之间的动态粘度, 和/或相同条件下测定的介于99cSt和248cSt之间的运动粘度;b) 间充质干细胞的培养, 和/或c) 富含血小板的血液衍生物。上述粘性液态材料特别适用于骨关节炎、韧带损伤, 特别是肌腱损伤和软骨损伤的治疗, 并可关节内给药、皮层内给药, 或原位直接施用, 而不会改变其中含有的间充质干细胞和/或血小板的性能。

1. 一种用于软骨和骨骼的缺陷、肌腱损伤、韧带损伤或皮肤损伤的治疗的生物材料,所述生物材料为粘性液态形式,适合关节内给药、皮层内给药,或直接施用于受损部位,且所述生物材料包括:

a) 液态载体,所述液态载体包括含至少一种天然和 / 或半合成的多聚糖的粘性溶液,并具有在 20 °C 和剪切速率为  $D = 350\text{s}^{-1}$  时测定的介于 0.1Pa·s 和 0.25Pa·s (100cP 和 250cP) 之间的动态粘度,和 / 或相同条件下测定的介于  $0.99 \times 10^{-4}\text{m}^2/\text{秒}$  和  $2.48 \times 10^{-4}\text{m}^2/\text{秒}$  (99cSt 和 248cSt) 之间的运动粘度,

b) 间充质干细胞的培养物或即时制备物,和 / 或

c) 富含血小板的血液衍生物;

其中组分 a) 的所述粘性溶液为浓度为 10mg/ml 的平均分子量为 450kDa 至 730kDa 的透明质酸或其药学上可接受的盐的水溶液。

2. 如权利要求 1 所述的生物材料,其中,所述间充质干细胞为自体同源型,并选自由骨髓间充质干细胞、外周血间充质干细胞、骨膜间充质干细胞、脐带间充质干细胞或脂肪组织间充质干细胞组成的组。

3. 如权利要求 1 所述的生物材料,其中,所述富含血小板的血液衍生物选自富含血小板的血浆、血小板浓缩物和血小板凝胶体。

4. 如权利要求 1 所述的生物材料,用于骨关节炎、软骨损伤、肌腱损伤、韧带损伤、关节组织失调、皮肤损伤或溃疡的治疗。

5. 如权利要求 4 所述的生物材料,其中,所述肌腱损伤为跟腱损伤。

6. 如权利要求 1 所述的生物材料,选自由以下材料组成的组:

包含组分 (a) 和组分 (b) 的生物材料,

包含组分 (a) 和组分 (c) 的生物材料,

包含组分 (a)、组分 (b) 和组分 (c) 的三种组分的生物材料。

7. 如权利要求 6 所述的生物材料,其中,所述富含血小板的血液衍生物和 / 或间充质干细胞为自体同源。

8. 如权利要求 1 所述的生物材料,其中所述透明质酸的药学上可接受的盐为透明质酸钠盐。

## 适用于治疗骨关节炎、韧带损伤和关节失调的生物材料

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种适用于治疗骨关节炎、肌腱损伤、韧带损伤、常规关节和连接组织不协调和皮肤损伤的粘性液态的生物材料。

### 背景技术

[0002] 关节软骨特别适用于抵御压力，因为它既没有血液供应和淋巴排泄，也完全没有神经末梢。这意味着关节软骨不能自我再生补偿其表面损伤，除非其下层的软骨下层未损伤。

[0003] 因此如果软骨损伤不深，就不会有再生反应。相反，如果损伤很深并深入软骨下骨，就会触发自我修复过程，因此骨髓干细胞开始软骨细胞分化过程，该分化过程可导致受损软骨的部分修复。

[0004] 例如关节（如膝盖）疼痛和肿胀等症状的产生，可能是软骨损伤的结果，上述症状的进一步恶化会发展成骨关节炎。

[0005] 由于关节损伤和姿势缺陷以及与患者年龄有关的软骨的正常磨损，这种类型的损伤可经常在职业运动员（由于他们更易于受到外伤）或年老的病人身上出现。

[0006] 实际上，在膝关节的软骨损伤中，包括物理疗法和药物疗法的非手术疗法不能实现软骨损伤完全痊愈。在进行非常具有创新性的关节内的外科植入疗法之后，反而以很好的成功率实现了软骨损伤完全痊愈。

[0007] 现有技术中已知的主要的外科软骨修复技术有：

[0008] 1、依次通过至少两个不同的外科步骤来实现自体同源软骨细胞的移植：第一步是微创的，用于病人关节的其它非受损区域或非关节软骨病人的正常的软骨组织的采集（通过关节内镜检查法）。采集的样品于是送到实验室用于体外细胞的膨胀。一旦软骨细胞增殖后，接着实际的外科操作是直接在受损位点移植生成的软骨细胞（以盐溶液为媒介），该生成的软骨细胞可用自体同源骨膜组织“在原位固定”。这个步骤极其昂贵，因为需要两次外科手术和对软骨细胞的体外培养过程。因而需要病人两次住院，因此病人需经受两次麻醉和两次药理治疗。

[0009] 2、第二种较简单的治疗方法是在关节表面进行穿孔以到达受损区域的下软骨组织，从而允许间叶细胞状血凝块的形成，间叶细胞状血凝块能到达软骨的缺陷表面，在该表面这些细胞可部分分化成软骨细胞。但是，新生成的软骨组织主要是与原始软骨相似的纤维质的和非透明的，因而，它不具有与原关节组织的相同的物理和机械性能。

[0010] 3、已知的治疗骨软骨的损伤的方法是含软骨细胞和 / 或间充质干细胞的外科培植物或聚合物骨骼的嵌入。在这种情况下，构成骨骼的物质可以是半合成的多聚糖，例如透明质酸 (1) 的衍生物或者胶原基质。如前面所述，这个过程极其昂贵且需要病人两次住院和两次手术。

[0011] 另一类非常常见的连接组织的损伤和 / 或炎症类型是韧带或肌腱的损伤，尤其是跟腱的损伤，特别是在职业运动员中，因为需要部分或者全部重新构建受损的组织，通常需

要外科手术治疗（作为最严重的形式）。迄今为止，用于修复韧带的外科方法基于组织移植和合成修补物，然而，随着时间的过去，其效果有限。近期的科学出版物反而已经证明干细胞重建受损的肌腱和韧带组织的能力：自相同干细胞采集的间充质细胞被导入伤运动员的跟腱，事实上分化成了肌腱细胞（常规的肌腱细胞）。因为使韧带柔韧并坚固的胶原质产量的增加，肌腱因而得到了修补。

[0012] 最近，不仅在上颌面和骨外科中，而且（和首先）在连接组织外科（特别是在韧带 / 肌腱和皮肤的重建 / 再生过程中），富含血小板的血液衍生物的使用越来越普遍，因为这类材料富含营养因子，例如 AGF（自体同源生长因子浓缩物），具体的 PDGF-AB 和 TGF  $\beta$  等 (3) (4)。

[0013] 事实上这些血液衍生物主要被用于糖尿病患者出现静脉溃疡后，刺激受损皮肤的修复过程。

[0014] 上述刺激通常通过不同的方法触发，例如：

[0015] a) 机械性刺激，

[0016] b) 生长因子的局部施用，

[0017] c) 组织工程产品的局部施用。

[0018] 机械性刺激包括用干法消毒的纱布或手术刀打磨损伤组织的底部和边缘直至出血。溶解于血浆中的生长因子和血小板浓缩物的局部施用可使 PDGF（具有有丝分裂原和脉管生成作用）、TGF- $\beta$ （用于刺激纤维原细胞）、EGF（用于刺激表皮细胞和间叶细胞）和 IGF（作为细胞增殖的促进剂）。虽然这些血液衍生物难于对其进行操作且其在原位的持久性持续时间很短，但是试验已经证明组织血管形成的增加。

[0019] 组织工程产品较新，是以生物相容材料为载体的异源的纤维原细胞和角化细胞的形式，或者以透明质酸为载体的自体同源的纤维原细胞的形式。

[0020] 这需要在装载到载体之前，使用外科实践从患者身上取细胞，以体外培养。

[0021] 考虑到现有技术的上述状态，关于细胞成分关节内给药和皮层内给药，和用血小板产品处理肌腱 / 韧带或皮肤的受伤区域（细胞成分和富含血小板的血液衍生物通过专门的注射器给药），需要提供一种“载体”，这种载体具有充足的流动性，还能同时确保：

[0022] - 优良的物理 / 机械一致性，容许上述给药保护细胞膜的活性、形态，以及同时保护载体细胞 (vehicled cell) 的增殖和分化能力，但，此外，该一致性：

[0023] - 允许上述细胞保持在受损位点，而不要求进一步的固定，需要随后的缝合和药物处理。

[0024] 基于同样的原因，需要提供一种能维护将被使用的血小板血液衍生物完整性的“载体”，以保证其中包含的蛋白质（即上述的营养因子）的所有生化和酶学特性的完整性，最重要的是，这使得能在损伤位点保持已给药的活性成分。

## 发明内容

[0025] 现在，本申请发现借助于本发明的生物材料可克服现有技术中的上述缺陷。

[0026] 具体地，根据本发明的生物材料包括：

[0027] a) 液态载体，包括含至少一种天然和 / 或半合成的多聚糖的粘性溶液，并具有在 20°C 和剪切速率是  $D = 350s^{-1}$  时测定的介于 100cP 和 250cP 之间的动态粘度，和 / 或介于

99cSt 和 248cSt 之间的运动粘度（测量条件相同），

[0028] b) 间充质干细胞的培养物或即时制备物，和 / 或

[0029] c) 富含血小板的血液衍生物。

[0030] 这种类型的材料适于骨关节炎、软骨损伤、肌腱损伤（特别是跟腱损伤）、韧带损伤的治疗，通常地，常规关节和连接组织不调和皮肤损伤。

[0031] 此外，本申请还涉及包括本发明的生物材料的药物组合物，具体地说，不仅适于关节和皮层内给药，还可以在损伤部位直接施用。

### 具体实施方式

[0032] 关于本申请，术语“粘性溶液”在此被用于表示存在两种或更多种组分的均质混合物，在该均质混合物中溶质，即天然和 / 或半合成的多聚糖完全溶解在通常为水的溶剂中，其中术语“水”被用来表示是用于注射剂和盐水等的水。

[0033] 上述类型的溶液不能与所谓的凝胶或水凝胶，即半固态产品混淆，它们的组分不溶于溶剂，而是悬浮于其中，通常是由凝胶和 / 或溶剂的各种组分间的共价化学型的三维键（所谓的交联）、氢键或者范德华键的形成而获得的物质构成。

[0034] 根据本发明，上述生物材料中的液态载体 (a) 优选含天然和 / 或半合成的多聚糖的粘性溶液。

[0035] 根据本发明一个更优选的实施方式，上述液态载体 (a) 为基本由天然和 / 或半合成来源的多聚糖和水组成的粘性溶液。

[0036] 关于本申请，“基本由……组成”的表述是指上述粘性溶液可能含有第三种成分，第三种成分占粘性溶液总重量的 0.9% 至 0.001%。

[0037] 上述天然来源的多聚糖优选自透明质酸 (HA)、纤维素、胶凝糖、壳质、壳聚糖、果胶或胃酸、琼脂糖、褐藻酸、藻酸盐、淀粉、多聚甘露糖和聚多糖，上述多聚糖的分子量和分子类型能实现 / 保证形成具有上述范围内的动态粘度或运动粘度的粘性溶液（非凝胶体）。

[0038] 上述半合成来源的多聚糖优选自本领域技术人员公知的透明质酸衍生物，例如专利文献 EP216453 中介绍的透明质酸的苄基酯，透明质酸的辛基、十八烷基、十二烷基和十六烷基酰胺衍生物 (EP1095064)，和纤维素酯类，例如羧甲基纤维素 (CMC) 和胶原质衍生物。无论如何，这些天然和 / 或半合成的多聚糖的分子量必须保证粘度在上述范围内，此外，它们必须展示出导致粘性溶液形成，而非凝胶形成的分子特性 / 理化特性。

[0039] 只有这种类型的粘度，才使得获得的剂型适于：

[0040] 关节内注射或在肌腱和 / 或韧带的损伤部位注射，

[0041] 皮肤损伤的情况下的皮内给药，

[0042] 能同时确保包含其的细胞的最高活力，以及整体保持富含血小板的血液衍生物中包含的营养因子的所有生物化学性质和酶性质。

[0043] 根据一个特别优选的本发明的实施例，使用：

[0044] 透明质酸或其药学上可接受的盐，优选钠盐，平均分子量介于 450kDa 和 730kDa 之间（中分子量 (MW) HA）；浓度介于 5mg/ml 和 15mg/ml 之间，更优选为 10mg/ml。

[0045] 透明质酸或其药学上可接受的盐，优选钠盐，灭菌后测定的平均分子量介于 1000kDa 和 1800kDa 之间（高分子量 (MW) HA）；浓度介于 2mg/ml 和 12mg/ml 之间，更优选为

6mg/ml 至 8mg/ml。

[0046] 透明质酸的辛基酰胺优选具有中分子量 (MW), 因此透明质酸的平均分子量在上述的 450kDa 至 730kDa 范围内;透明质酸的辛基酰胺浓度为 1mg/ml 至 10mg/ml, 更优选为 2mg/ml 至 3mg/ml。

[0047] 透明质酸的十六烷基酰胺优选具有中分子量 (MW), 因此透明质酸的平均分子量在上述的 450kDa 至 730kDa 范围内;透明质酸的十六烷基酰胺的浓度为 0.2mg/ml 至 1.5mg/ml, 更优选 0.5mg/ml 至 1mg/ml。

[0048] 凝胶糖浓度为 2mg/ml 至 8mg/ml, 更优选 4mg/ml。

[0049] CMC 浓度为 15mg/ml 至 40mg/ml, 更优选 25mg/ml。

[0050] 间充质干细胞可以是自体同源和异源类型的, 优选来自骨髓、外周血、骨膜、脐带或脂肪组织。

[0051] 对于本申请的范围,“富含血小板的血液衍生物”的表述被用来表示所有的富含血小板的血液衍生物,例如,富含血小板的血浆 (PRP),即来自静脉血离心分离的上层液体;血小板浓缩物 (PC),即来自富含血小板的血浆离心分离的重液相;以及最后一种,血小板凝胶体,即由于沉淀剂(例如凝血酶)的作用转变为凝胶体的血小板浓缩物<sup>(5)</sup>。

[0052] 根据预期的应用及损伤类型可选择富含血小板的血液衍生物的类型。事实上,上述三种产物含丰富的上述营养因子。

[0053] 根据本发明的生物材料包括组分 (a) 和组分 (b), 组分 (a) 和组分 (c), 或者组分 (a)、组分 (b) 和组分 (c) 三种组分。

[0054] 此外,优选将自体同源的组分 (c) 加入到包含组分 (a) 和组分 (b) 的生物材料中:上述富含血小板的血液衍生物来自同一个患者,且上述制品可以在患者接受上述的关节内注射或皮内给药前即时制备,或者在上述材料直接施用于受损部位前即时制备。

[0055] 因此根据本申请,上述药物组合物可被用于软骨和骨缺陷治疗(主要是即时性的)的矫形术(包括牙科中的局部施用以促进植入物固定 (favour the plants grip));和被直接注射到受损的肌腱和/或韧带的受损部位;或者可在皮肤病学中用作用于皮内给药的注射组合物或通常用于难于愈合/恢复的皮肤溃疡/损伤的局部治疗。

[0056] 实施例 1

[0057] 制备含中分子量 HA 的粘性溶液

[0058] 第一步:水合

[0059] 称量 100mg 的 HA 钠盐多聚糖 (500 ~ 730KDa MW) 以制备最终浓度是 10mg/ml 的粘性溶液。使用注射剂用的 0.9% 的氯化钠盐溶液、磷酸盐缓冲液或水使各粉料水合为所需最终体积的一半体积 (5ml), 以获得想要的最终浓度。

[0060] 第二步:溶解

[0061] 将如第一步所述获得的产物在室温下进行磁力搅拌至少 1 小时。

[0062] 依次加入剩余体积 (5ml) 以达到确定的最终浓度,搅拌至少 2 小时直至粉料完全溶解后静置。

[0063] 获得的溶液经高压灭菌或紫外辐射的方式灭菌,然后,在 20℃,剪切速率是  $D = 350s^{-1}$  的条件下,用 HAAKE RS150 型血流速度计测量动态粘度。

[0064] 获得的动态粘度是 155cP, 因此产物具有 153.6cSt 的运动粘度。

[0065] 实施例 2

[0066] 制备含高分子量 HA 的粘性溶液

[0067] 与实施例 1 一样进行该过程,由高分子量 HA 粉料制备在 WIF 级的水中制备最终浓度分别是 6mg/ml 和 8mg/ml 的两种粘性溶液。

[0068] 制备的溶液经灭菌,然后在 20℃,剪切速率是  $D = 350s^{-1}$  的条件下,用 HAAKE RS150 型血流速度计测量动态粘度。

[0069] 获得的动态粘度分别是 158cP 和 246cP。

[0070] 实施例 3

[0071] 制备含胶凝糖的粘性溶液

[0072] 与实施例 1 一样进行该过程,由胶凝糖粉料在盐溶液中制备最终浓度是 4mg/ml 的粘性溶液。

[0073] 制备的溶液经灭菌,然后在 20℃,剪切速率是  $D = 350s^{-1}$  的条件下,用 HAAKE RS150 型血流速度计测量动态粘度。

[0074] 获得的动态粘度是 110cP。

[0075] 实施例 4

[0076] 制备含 CMC 的粘性溶液

[0077] 与实施例 1 一样进行该过程,由 CMC 粉料在磷酸盐缓冲液中制备最终浓度是 25mg/ml 的粘性溶液。

[0078] 获得的溶液经灭菌,然后在 20℃,剪切速率是  $D = 350s^{-1}$  的条件下,用 HAAKE RS150 型血流速度计测量动态粘度。

[0079] 获得的动态粘度是 220cP。

[0080] 实施例 5

[0081] 制备含中分子量 (MW) 透明质酸的辛基酰胺或透明质酸的十六烷基酰胺的粘性溶液

[0082] 与实施例 1 一样进行该过程,由中分子量的透明质酸的辛基酰胺 (或十六烷基酰胺) 粉料在 0.9%氯化钠盐溶液中制备最终浓度是 2mg/ml 和 3mg/ml (对于十六烷基酰胺,最终浓度是 0.5mg/ml 和 1mg/ml) 的两种粘性溶液。

[0083] 获得的溶液经灭菌,然后在 20℃,剪切速率是  $D = 350s^{-1}$  的条件下,用 HAAKE RS150 型血流速度计测量动态粘度。

[0084] 获得的动态粘度分别是:对于透明质酸的辛基酰胺为 143cP 和 220cP,对于透明质酸的十六烷基酰胺为 160cP 和 230cP。

[0085] 引用的参考文献

[0086] <sup>(1)</sup>EP 0863776 ;

[0087] <sup>(2)</sup> " Fattori di crescita autologhi nella chirurgia ossea ricostruttiva dopo infezione " Carlo R.Romanón et al, Unita operativa Chirurgia delle ComplicanzeOsteoarticolari Settiche(CO.S., Istituto Ortopedico Gaetano Pini).

[0088] <sup>(3)</sup> " Different preparation methods to obtain components as a source of growth factors for local applications" R.Zimmermann et al., Transfusion 2001; 41 :1217-1224.

[0089] <sup>(4)</sup>Platelet-rich plasma preparation using three devices:Implications for platelet growth factor release " P.A.M.Everts et al., Growth Factors, September 2006 ;24(3).165-171.

[0090] <sup>(5)</sup>US 6,841,170