



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109562204 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780039442.9

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

(22)申请日 2017.04.26

代理人 过晓东

(30)优先权数据

62/328,313 2016.04.27 US

(51)Int.Cl.

A61L 27/46(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61L 27/52(2006.01)

2018.12.25

A61L 27/56(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61L 27/58(2006.01)

PCT/US2017/029651 2017.04.26

A61L 24/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/189733 EN 2017.11.02

(71)申请人 安尼卡医疗有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 E·S·安 林佳恩 C·D·怀特

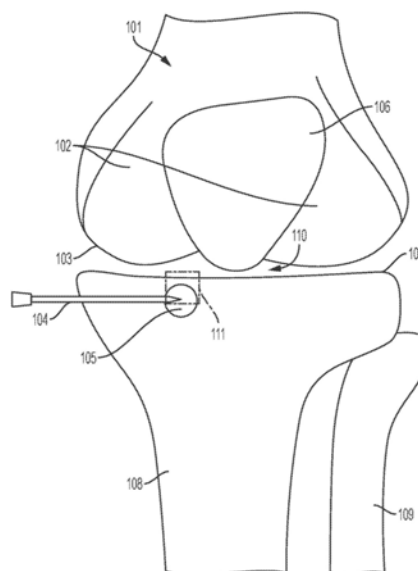
权利要求书15页 说明书40页 附图19页

### (54)发明名称

用于治疗骨骼退行性病变的方法和组合物

### (57)摘要

本公开涉及用于治疗患者的骨骼退行性病变的方法和组合物。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗,预防或延缓与骨骼退行性病变相关的骨病的发展,例如,骨关节炎(简称“OA”),类风湿性关节炎和缺血性坏死。



1. 一种可注射的生物材料,包括:
  - (a) 固体成分;以及
  - (b) 包含碳水化合物的液体成分;其中可注射生物材料在固体组分和液体组分混合后形成磷灰石晶体结构。
2. 权利要求1的可注射的生物材料的制作方法,包括:
  - (a) 通过以下方法创建液体组分:
    - (i) 提供液体溶剂;
    - (ii) 用pH调节剂调节药液的pH值;以及
    - (iii) 将碳水化合物溶解在液体溶剂中形成液体成分;
  - (b) 提供固体成分;以及
  - (c) 混合液体成分和固体成分形成可注射的生物材料。
3. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射生物材料在一段时间内凝固。
4. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射生物材料在一段时间内固化。
5. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射生物材料在完全固化之前凝固。
6. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分至少包含一种金属磷酸盐和一种金属碳酸盐。
7. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分包含反应性磷酸钙。
8. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分包括至少一种 $\alpha$ -磷酸三钙( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )、碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )和一水合磷酸钙( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )。
9. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分包含70-90% $\alpha$ 磷酸三钙、10-20%碳酸钙和0.5-2%磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。
10. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分包含80-89% $\alpha$ 磷酸三钙、11-19%碳酸钙和0.75-1.5%磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。
11. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分包含82-86% $\alpha$ 磷酸三钙、13-16%碳酸钙和0.9-1.2%磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。
12. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分包含84.3% $\alpha$ 磷酸三钙、14.7%碳酸钙和1.02%磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。
13. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中所述固体组分还包含一种或多种天然存在于人体内的一种或多种寡元素的离子化合物。
14. 根据权利要求13所述的可注射的生物材料或方法,其中至少一种离子化合物包含选自 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{H}^+$ 及其混合物的阳离子。
15. 根据权利要求13所述的可注射的生物材料或方法,其中至少一种离子化合物包含选自 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{HSO}_4^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{OH}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{SiO}_4^{4-}$ 及其混合物。
16. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中所述进一步液体成分包含盐。

17. 根据权利要求16所述的可注射的生物材料或方法,其中盐是金属盐。
18. 根据权利要求16-17中任一权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中盐选自磷酸盐、硅酸盐、氯化物盐、氢氧化物盐及其混合物。
19. 根据权利要求16-18中任一权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中盐至少包含磷酸氢二钠、硅酸钠、氯化钠和氢氧化钙中的一种。
20. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物选自葡聚糖、海藻酸盐、羧甲基纤维素和透明质酸组成的组。
21. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物为透明质酸或其酯、酰基脲、酰基异脲、二硫化物或酰胺。
22. 根据权利要求21所述的可注射的生物材料或方法,其中透明质酸选自透明质酸、透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸镁、透明质酸钙、透明质酸铵及其组合组成的组。
23. 根据权利要求21-22中任一权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中透明质酸包含至少一个交联。
24. 根据权利要求21-23中任一权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中透明质酸来源于细菌或动物。
25. 根据权利要求21-24中任一权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中透明质酸包含硫酸化透明质酸或其酯、酰基脲、酰基异脲、卡波姆、二硫化物或酰胺。
26. 根据权利要求25所述的可注射的生物材料或方法,其中透明质酸包含N-硫酸化透明质酸或其酯、酰基脲、酰基异脲、卡波姆、二硫化物或酰胺。
27. 根据权利要求21-26中任一权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中透明质酸包含透明质酸酯。
28. 根据权利要求27所述的可注射的生物材料或方法,其中透明质酸酯的酯化量约为20%至100%。
29. 根据权利要求28所述的可注射的生物材料或方法,其中非酯化的透明质酸用有机或无机碱盐化。
30. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物是水溶性的。
31. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中液体成分是水凝胶的形式。
32. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物以约0.1至约100mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。
33. 根据权利要求32所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物以约0.1至约50mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。
34. 根据权利要求32所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物以约0.1至约10mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。
35. 根据权利要求32所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物以约1至约10mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。
36. 根据权利要求32所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物以约2至约10mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。

37. 根据权利要求32所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物以约4至约8mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。

38. 根据权利要求32所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物以约5至约7mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。

39. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6 \text{Da}$ 至约 $1.0 \times 10^7 \text{Da}$ 。

40. 根据权利要求39所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6 \text{Da}$ 至约 $5.0 \times 10^6 \text{Da}$ 。

41. 根据权利要求39所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6 \text{Da}$ 至约 $4.0 \times 10^6 \text{Da}$ 。

42. 根据权利要求39所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6 \text{Da}$ 至约 $3.0 \times 10^6 \text{Da}$ 。

43. 根据权利要求39所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量约为 $1.5 \times 10^6 \text{Da}$ 至约 $3.0 \times 10^6 \text{Da}$ 。

44. 根据权利要求39所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量约为 $1.7 \times 10^6 \text{Da}$ 至约 $2.5 \times 10^6 \text{Da}$ 。

45. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物是分子量约为 $0.90 \times 10^6 \text{Da}$ 的透明质酸,浓度约为6.0mg/mL。

46. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物是分子量约为 $1.7 \times 10^6 \text{Da}$ 的透明质酸,其浓度约为6.0mg/mL。

47. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物是分子量约为 $2.6 \times 10^6 \text{Da}$ 的透明质酸,浓度约为6.0mg/mL。

48. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量稳定至少3个月。

49. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量稳定至少6个月。

50. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量稳定至少1年。

51. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量稳定至少2年。

52. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量稳定至少3年。

53. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量稳定至少4年。

54. 根据前述任何权利要求所述的可注射生物材料或方法,其中碳水化合物的分子量稳定至少5年。

55. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分与液体成分的质量比约为3比1。

56. 根据权利要求55所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分与液体成分的质

量比约为2比1。

57. 根据权利要求55所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分与液体成分的质量比约为1.5至1。

58. 根据权利要求55所述的可注射的生物材料或方法,其中固体成分与液体成分的质量比约为1比1。

59. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射生物材料在初始凝固之前通过针或套管注射。

60. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针或套管的尺寸至少为21号。

61. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针或套管的尺寸至少为20号。

62. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针或套管的尺寸至少为18号。

63. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针或套管的尺寸至少为16号。

64. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针或套管的尺寸至少为15号。

65. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针或套管的尺寸至少为14号。

66. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针或套管的尺寸至少为12号。

67. 根据权利要求59所述的可注射的生物材料或方法,其中针头或套管的尺寸至少为10号。

68. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在通过针或套管分配时不脱水。

69. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在通过针或套管分配时不会残留。

70. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料是粘性的。

71. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在其初始凝固时间内保持粘性。

72. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料粘附在骨上。

73. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在其初始凝固时间期间保持粘合到骨上。

74. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后可工作不到约60分钟。

75. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约50分钟。

76. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约40分钟。

77. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约30分钟。

78. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约20分钟。

79. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约10分钟。

80. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约5分钟。

81. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约4分钟。

82. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约3分钟。

83. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约2分钟。

84. 根据权利要求74所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后可工作不到约1分钟。

85. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约60分钟内出现最初凝固。

86. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到50分钟内出现最初凝固。

87. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约40分钟内出现最初凝固。

88. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约30分钟内出现最初凝固。

89. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约20分钟内出现最初凝固。

90. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约10分钟内出现最初凝固。

91. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约5分钟内出现最初凝固。

92. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约4分钟内出现最初凝固。

93. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约3分钟内出现最初凝固。

94. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体组分和液体组分混合后,在不到约2分钟内出现最初凝固。

95. 根据权利要求85所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体

组分和液体组分混合后,在不到约1分钟内出现最初凝固。

96.根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到约96小时内完全固化。

97.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到72小时内完全固化。

98.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到约48小时内完全固化。

99.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到24小时内完全固化。

100.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到12小时内完全固化。

101.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到6小时内完全固化。

102.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到5小时内完全治愈。

103.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到4小时内完全治愈。

104.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到3小时内完全固化。

105.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到2小时内完全固化。

106.根据权利要求96所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在固体成分和液体成分混合后不到1小时内完全固化。

107.根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的初始凝固和固化不会导致气体释放。

108.根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料在处于患者体内时不会显著改变相邻液体的pH值。

109.根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的初始凝固在处于患者体内时不会显著改变相邻流体的温度。

110.根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的固化产生与羟基磷灰石基本一致的磷灰石晶体结构。

111.根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射生物材料的固化产生至少约90%羟基磷灰石的磷灰石晶体结构。

112.根据权利要求111所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的固化产生至少约95%羟基磷灰石的磷灰石晶体结构。

113.根据权利要求111所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的固化产生至少约96%羟基磷灰石的磷灰石晶体结构。

114.根据权利要求111所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的固化产生至少约97%羟基磷灰石的磷灰石晶体结构。

115. 根据权利要求111所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的固化产生至少约98%羟基磷灰石的磷灰石晶体结构。

116. 根据权利要求111所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的固化产生至少约99%羟基磷灰石的磷灰石晶体结构。

117. 根据权利要求111所述的可注射的生物材料或方法,其中可注射的生物材料的固化产生大于约99%羟基磷灰石的磷灰石晶体结构。

118. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1至约2摩尔的Ca/P比。

119. 根据权利要求117所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1.3至约1.8摩尔Ca/P比。

120. 根据权利要求117所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1.4至约1.7摩尔Ca/P比。

121. 根据权利要求117所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1.5至约1.7摩尔Ca/P比。

122. 根据权利要求117所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1.5至约1.667摩尔Ca/P比。

123. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约20MPa的抗压强度。

124. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约15Mpa的抗压强度。

125. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约10Mpa的抗压强度。

126. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约9Mpa的抗压强度。

127. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中全套和固化的可注射的生物材料具有小于约8Mpa的抗压强度。

128. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约7Mpa的抗压强度。

129. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约6Mpa的抗压强度。

130. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约5Mpa的抗压强度。

131. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约4Mpa的抗压强度。

132. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约3Mpa的抗压强度。

133. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约2Mpa的抗压强度。

134. 根据权利要求123所述的可注射的生物材料或方法,其中完全凝固和固化的可注



射的生物材料具有小于约1Mpa的抗压强度。

135. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约5GPa的弹性模量。

136. 根据权利要求133所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约4GPa的弹性模量。

137. 根据权利要求133所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约3GPa的弹性模量。

138. 根据权利要求133所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约2GPa的弹性模量。

139. 根据权利要求133所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约1GPa的弹性模量。

140. 根据权利要求133所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约0.5GPa的弹性模量。

141. 根据权利要求133所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有小于约0.25GPa的弹性模量。

142. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料, 其中当在室温下测量时, 可注射的生物材料在混合固体组分和液体组分后立即具有约5Pa·s和约30Pa·s的粘度。

143. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料, 其中当在室温下测量时, 可注射的生物材料在混合固体组分和液体组分后立即具有约5Pa·s和约20Pa·s的粘度。

144. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料, 其中当在室温下测量时, 可注射的生物材料在混合固体组分和液体组分后立即具有约5Pa·s和约18Pa·s的粘度。

145. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中可注射的生物材料不能在生物力学上稳定骨骼。

146. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1g/cm<sup>3</sup>至约4g/cm<sup>3</sup>的真实密度。

147. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1.5g/cm<sup>3</sup>至约3.5g/cm<sup>3</sup>的真实密度。

148. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约1.83g/cm<sup>3</sup>至约3.14g/cm<sup>3</sup>的真实密度。

149. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有约2g/cm<sup>3</sup>至约3g/cm<sup>3</sup>的真实密度。

150. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约1μm的中值孔径。

151. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约0.8μm的中值孔径。

152. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约0.6μm的中值孔径。

153. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约0.5μm的中值孔径。

154. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约 $0.4\mu\text{m}$ 的中值孔径。

155. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约 $0.2\mu\text{m}$ 的中值孔径。

156. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约 $0.15\mu\text{m}$ 的中值孔径。

157. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约 $4\text{m}^2/\text{g}$ 的总多孔面积。

158. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约 $3\text{m}^2/\text{g}$ 的总多孔面积。

159. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包括小于约 $2\text{m}^2/\text{g}$ 的总多孔面积。

160. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料包含足够的孔隙率, 以防止至少一种炎症介质和非炎症介质的扩散通过。

161. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有骨诱导性。

162. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料具有骨传导性。

163. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中完全凝固和固化的可注射的生物材料是可吸收的。

164. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中可注射的生物材料的固化产生少于约5%的氧化钙。

165. 根据权利要求164所述的可注射的生物材料或方法, 其中可注射的生物材料的固化产生少于约4%的氧化钙。

166. 根据权利要求164所述的可注射的生物材料或方法, 其中可注射的生物材料的固化产生少于约3%的氧化钙。

167. 根据权利要求164所述的可注射的生物材料或方法, 其中可注射的生物材料的固化产生少于约2%的氧化钙。

168. 根据权利要求164所述的可注射的生物材料或方法, 其中可注射的生物材料的固化产生少于约1%的氧化钙。

169. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中液体成分是无菌的。

170. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中固体成分是无菌的。

171. 根据前述任何权利要求所述的可注射的生物材料或方法, 其中可注射的生物材料是可混合的。

172. 根据权利要求2—170中任一权利要求所述的方法, 其中pH调节剂选自有机酸和无机酸。

173. 根据权利要求2-172中任一权利要求所述的方法, 其中pH调节剂选自柠檬酸、甲酸、乙酸及其混合物组成的组。

174. 根据权利要求2-173中任一权利要求所述的方法, 其中pH调节剂s选自盐酸、磷酸、硝酸及其混合物组成的组。

175. 根据权利要求2-174中的任一权利要求所述的方法, 其中提供的固体成分还包括干燥固体成分。

176. 根据权利要求175所述的方法, 其中干燥包括使固体成分在一段时间内受热。

177. 根据权利要求176所述的方法, 其中受热温度至少约165°C。

178. 根据权利要求176所述的方法, 其中的期限至少约12小时。

179. 一种治疗有需要的患者的骨的受影响区域的方法, 该方法包括:

- a) 识别患者骨骼中的受影响部位;
- b) 在骨头中切开一条穿过骨皮质壁的切口, 以提供进入骨的受影响区域中的退化松质骨空间;
- c) 通过穿过骨皮质壁的切口, 向退化的松质骨空间施用一定体积的任何前述权利要求的可注射生物材料。

180. 根据权利要求179所述的方法, 其中受影响的骨区域与患者正在经历关节病的关节相邻。

181. 根据权利要求179-180中任一权利要求所述的方法, 其中关节病理是膝, 肩, 踝, 肘, 腕, 手, 脊柱或髋关节的病理。

182. 根据权利要求179-181中任一权利要求所述的方法, 其中关节病理选自疼痛, 骨关节炎, 类风湿性关节炎, 缺血性坏死和其联合组成的组。

183. 根据权利要求179-182中任一权利要求所述的方法, 其中所述方法用于治疗患者的骨关节炎。

184. 根据权利要求183所述的方法, 其中骨关节炎的Kellgren Lawrence (KL) 等级为1-3。

185. 根据权利要求179-184中任一权利要求所述的方法, 其中关节病理与关节不稳定无关。

186. 根据权利要求179-185中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域由于至少一种炎症介质和非炎症介质, 导致至少一种炎症或降解变化。

187. 根据权利要求186所述的方法, 其中至少一种炎症介质包含缓激肽、组胺、前列腺素、乳酸、P物质、血管活性肠肽、神经生长因子 (NGF)、降钙素基因相关肽 (CGRP) 及其混合物中的至少一种。

188. 根据权利要求186所述的方法, 其中至少一种炎性介质包含炎性细胞因子。

189. 根据权利要求188所述的方法, 其中炎性细胞因子选自AIMP1 (SCYE1)、BMP2、CD40LG (TNFSF5)、CSF1 (MCSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (GCSF)、FASLG (TNFSF6)、GM-CSF、IFNA2、IFNG、IL-1、IL-6、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN- $\gamma$ 、LTA (TNFB)、LTB、MIF、NAMPT、OSM、SPP1、TGF- $\beta$ 、TNF、TNF- $\alpha$ 、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (RANKL)、TNFSF13、TNFSF13B、TNFSF4 (OX40L)、VEGFA及其混合物。

190. 根据权利要求186所述的方法, 其中至少一种非炎性介质包含蛋白水解酶。

191. 根据权利要求190所述的方法, 其中蛋白水解酶选自基质金属蛋白酶(MMPs)、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS)、具有血小板反应蛋白基序的解聚素和金属蛋白酶(ADAM-TS)及其混合物组成的组。

192. 根据权利要求186所述的方法, 其中炎症介质包含炎症趋化因子。

193. 根据权利要求190所述的方法, 其中炎症趋化因子选自C5、CCL1(I-309)、CCL11(eotaxin)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL2(MCP-1)、CCL20(MIP-3a)、CCL22(MDC)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2、Eotaxin-2、, MPIF-2、Eotaxin-2)、CCL26(eotaxin-3)、CCL3(MIP-1A)、CCL4(MIP-1B)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(MCP-2)、, CX3CL1、CXCL1(GR01、GR0-alpha、SCYB1)、CXCL10(INP10)、CXCL11(I-TAC, IP-9)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL2(GR02、GR0-beta、SCYB2)、CXCL3、CXCL5(ENA-78, LIX)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)及其混合物。

194. 根据权利要求186所述的方法, 其中炎症介质包含白细胞介素。

195. 根据权利要求194所述的方法, 其中白细胞介素选自由IL13、IL15、IL16、IL17A、IL17C、IL17F、IL1A、IL1B、IL1RN、IL21、IL27、IL3、IL33、IL5、IL7、CXCL8、IL9及其混合物组成的组。

196. 根据权利要求186所述的方法, 其中炎症介质包括选自缓激肽、降钙素基因相关肽(CGRP)、组胺、乳酸、神经生长因子(NGF)、前列腺素、P物质、血管活性肠肽及其混合物组成的组。

197. 根据权利要求179-191中任一权利要求所述的方法, 通过MRI识别其中炎症或降解变化。

198. 根据权利要求197所述的方法, 其中MRI是T2核磁共振成像。

199. 根据权利要求186-198中任一权利要求所述的方法, 其中炎症性或降解性变化在松质骨中发生。

200. 根据权利要求179-199中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0到5英寸之间。

201. 根据权利要求179-200中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0到4英寸之间。

202. 根据权利要求179-201中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0到3英寸之间。

203. 根据权利要求179-202中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0到2英寸之间。

204. 根据权利要求179-203中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0到1英寸之间。

205. 根据权利要求179-204中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0英寸至约20毫米之间。

206. 根据权利要求179-205中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0英寸至约10毫米之间。

207. 根据权利要求179-206中任一权利要求所述的方法, 其中受影响的区域位于离患者关节0英寸至约5毫米之间。

208. 根据权利要求179-207中任一权利要求所述的方法,其中受影响的区域位于离患者关节0英寸至约1毫米之间。

209. 根据权利要求179-208中任一权利要求所述的方法,其中切口为经皮切开。

210. 根据权利要求179-209中任一权利要求所述的方法,其中提供进入松质骨间隙的途径包括在患者的骨中建立通道,使骨皮质壁上的切口连接到构成受影响区域的松质空间。

211. 根据权利要求210所述的方法,其中通道垂直于骨的长轴。

212. 根据权利要求210所述的方法,其中通道不垂直于骨的长轴。

213. 根据权利要求210-212中任一权利要求所述的方法,其中通道距离近端软骨下板约5英寸。

214. 根据权利要求210-213中任一权利要求所述的方法,其中通道距离近端软骨下板约4英寸。

215. 根据权利要求210-214中任一权利要求所述的方法,其中通道距离近端软骨下板约3英寸。

216. 根据权利要求210-215中任一权利要求所述的方法,其中通道距离近端软骨下板约2英寸。

217. 根据权利要求210-216中任一权利要求所述的方法,其中通道距离近端软骨下板约1英寸。

218. 根据权利要求210-217中任一权利要求所述的方法,其中通道在近端软骨下板约20mm内。

219. 根据权利要求210-218中任一权利要求所述的方法,其中通道在近端软骨下板约10mm内。

220. 根据权利要求210-219中任一权利要求所述的方法,其中通道在近端软骨下板约5mm内。

221. 根据权利要求210-220中任一权利要求所述的方法,其中通道在近端软骨下板约1mm内。

222. 根据权利要求210-221中任一权利要求所述的方法,其中通过套管接近通道,所述套管定位和插入都无需额外的靶向仪器。

223. 根据权利要求179-222中任一权利要求所述的方法,进一步包括在注射生物材料到受影响区域之前,对受影响区域的内容物进行减压和抽吸。

224. 根据权利要求223所述的方法,其中减压和抽吸减少了受影响区域的局部炎症。

225. 根据权利要求223所述的方法,其中减压和抽吸减少受影响区的骨内压力。

226. 根据权利要求223所述的方法,其中内容物包括液体。

227. 根据权利要求223所述的方法,其中液体包括至少一种炎症介质和非炎症介质。

228. 根据权利要求227所述的方法,其中至少一种炎症介质包含缓激肽、组胺、神经生长因子(NGF)、前列腺素、乳酸、P物质、血管活性肠肽、降钙素基因相关肽(CGRP)及其混合物中的至少一种。

229. 根据权利要求227所述的方法,其中至少一种炎症介质包含炎性细胞因子。

230. 根据权利要求229所述的方法,其中炎性细胞因子选自由AIMP1(SCYE1)、BMP2、

CD40LG (TNFSF5)、CSF1 (MCSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (GCSF)、FASLG (TNFSF6)、GM-CSF、IFNA2、IFNG、IL-1、IL-6、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN- $\gamma$ 、LTA (TNFB)、LTB、MIF、NAMPT、OSM、SPP1、TGF- $\beta$ 、TNF、TNF- $\alpha$ 、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (RANKL)、TNFSF13、TNFSF13B、TNFSF4 (OX40L)、VEGFA及其混合物。

231. 根据权利要求227所述的方法, 其中至少一种非炎性介质包含蛋白水解酶。

232. 根据权利要求231所述的方法, 其中蛋白水解酶选自基质金属蛋白酶 (MMPs)、金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMPs)、具有血小板反应蛋白基序的解聚素和金属蛋白酶 (ADAM-TS) 及其混合物组成的组。

233. 根据权利要求227所述的方法, 其中炎性介质包含炎性趋化因子。

234. 根据权利要求233所述的方法, 其中炎性趋化因子选自C5、CCL1 (I-309)、CCL11 (eotaxin)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-1d)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL2 (MCP-1)、CCL20 (MIP-3a)、CCL22 (MDC)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2、Eotaxin-2、MPIF-2、Eotaxin-2)、CCL26 (eotaxin-3)、CCL3 (MIP-1A)、CCL4 (MIP-1B)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (MCP-2)、CX3CL1、CXCL1 (GR01、GR0- $\alpha$ 、SCYB1)、CXCL10 (INP10)、CXCL11 (I-TAC, IP-9)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL2 (GR02、GR0- $\beta$ 、SCYB2)、CXCL3、CXCL5 (ENA-78、LIX)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG) 及其混合物。

235. 根据权利要求227所述的方法, 其中炎症介质包含白细胞介素。

236. 根据权利要求235所述的方法, 其中白细胞介素选自由IL13、IL15、IL16、IL17A、IL17C、IL17F、IL1A、IL1B、IL1RN、IL21、IL27、IL3、IL33、IL5、IL7、CXCL8、IL9及其混合物组成的组。

237. 根据权利要求179-236中任一权利要求所述的方法, 其中可注射的生物材料通过套管或针头给药。

238. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为21号。

239. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为20号。

240. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为18号。

241. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为16号。

242. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为15号。

243. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为14号。

244. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为12号。

245. 根据权利要求237所述的方法, 其中针头或套管的尺寸至少为10号。

246. 根据权利要求237所述的方法, 其中可注射的生物材料在通过针头或套管分配时不脱水。

247. 根据权利要求237所述的方法, 其中可注射的生物材料在通过针头或套管分配时不会残留。

248. 根据权利要求237所述的方法, 其中可注射的生物材料通过可操纵的套管给药, 以使手术损伤最小化。

249. 根据权利要求179-248中任一权利要求所述的方法, 将可注射的生物材料注射到受影响的区域, 同时最小程度地干扰软骨下板。

250. 根据权利要求179-249中任一权利要求所述的方法, 其中可注射的生物材料被注

射到受影响区域上方或下方约0mm至约20mm之间,同时最小程度地干扰软骨下板。

251. 根据权利要求179-25中任一权利要求所述的方法,其中可注射的生物材料被注射到受影响区域上方或下方约0mm至约10mm之间,同时最小程度地干扰软骨下板。

252. 根据权利要求179-251中任一权利要求所述的方法,其中可注射的生物材料被注射到受影响区域上方或下方约0mm至约5mm之间,同时最小程度地干扰软骨下板。

253. 根据权利要求179-252中任一权利要求所述的方法,其中可注射生物材料被注射到受影响区域上方或下方约0mm至约1mm之间,同时最小程度地干扰软骨下板。

254. 根据权利要求179-253中任一权利要求所述的方法,其中将可注射生物材料注射到不是骨结构稳定性固有的区域。

255. 根据权利要求179-254中任一权利要求所述的方法,进一步包括用关节镜检查注射后的关节间隙,以确保关节中没有可注射的生物材料。

256. 根据权利要求179-255中任一权利要求所述的方法,可注射的生物材料在注射到受影响的区域期间流入松质骨的孔隙中。

257. 根据权利要求179-256中任一权利要求所述的方法,可注射的生物材料保持粘性并在注射到受影响区域期间实质上填充骨空隙。

258. 根据权利要求179-257中任一权利要求所述的方法,其中可注射的生物材料至少部分地涂覆松质骨空间和相邻关节之间的界面,以在凝固时提供保护层。

259. 根据权利要求179-258中任一权利要求所述的方法,其中可注射的生物材料防止炎性介质和非炎性介质中的至少一种从相邻关节空间扩散进入受影响区域。

260. 根据权利要求258所述的方法,其中保护层提供用于破骨细胞在骨重塑过程中消耗的牺牲层。

261. 根据权利要求179-260中任一权利要求所述的方法,其中可注射生物材料的给药不会引起应力屏蔽,导致无负荷骨的弱化。

262. 根据权利要求179-261中任一权利要求所述的方法,其中的方法不会造成实质性的手术后疼痛。

263. 根据权利要求179-262中任一权利要求所述的方法,其中的方法减少关节疼痛。

264. 根据权利要求179-263中任一权利要求所述的方法,其中该方法减缓关节中骨关节炎的进展。

265. 根据权利要求179-264中任一权利要求所述的方法,其中该方法用于治疗患者关节内的类风湿性关节炎。

266. 根据权利要求179-265中任一权利要求所述的方法,其中该方法减缓关节中类风湿性关节炎的进展。

267. 根据权利要求179-266中任一权利要求所述的方法,其中该方法减缓关节缺血性坏死的进展。

268. 一个试剂盒包括:

(a) 用于制备权利要求1-178中任何一种的可注射的生物材料的固体成分和液体成分;以及

(b) 使用说明。

269. 根据权利要求268所述的试剂盒,其中所述说明书是关于治疗有此需要的患者的

骨的受影响区域的方法。

270. 根据权利要求268所述的试剂盒, 其中治疗是针对疼痛, 骨关节炎, 类风湿性关节炎, 缺血性坏死或其组合。

271. 根据权利要求268-270中任一权利要求所述的试剂盒, 其中固体成分和液体成分分别置于单独的无菌容器中。

272. 根据权利要求268-271中任一权利要求所述的试剂盒, 其中包装配置允许固体成分和液体成分在2°C-25°C保持稳定至少三个月左右。

273. 根据权利要求268-272中任一权利要求所述的试剂盒, 其中包装配置允许固体成分和液体成分在2°C-25°C保持稳定至少约6个月。

274. 根据权利要求272所述的试剂盒, 其中包装配置允许固体成分和液体成分在2°C-25°C保持稳定至少一年左右。

275. 根据权利要求272所述的试剂盒, 其中包装配置允许固体成分和液体成分在2°C-25°C保持稳定至少两年。

276. 根据权利要求272所述的试剂盒, 其中包装配置允许固体成分和液体成分在2°C-25°C保持稳定至少三年左右。

277. 根据权利要求272所述的试剂盒, 其中包装配置允许固体成分和液体成分在2°C-25°C保持稳定至少四年。

278. 根据权利要求272所述的试剂盒, 其中包装配置允许固体成分和液体成分在2°C-25°C保持稳定至少五年。

279. 根据权利要求268-278中任一权利要求所述的试剂盒, 其中液体成分被放置在无菌注射器中。

280. 根据权利要求268-279中任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述固体组分被置于注射器中, 该注射器具有整合的混合装置, 用于原位混合固体组分和液体组分的预先测量的部分, 以形成可注射的生物材料。

281. 根据权利要求280所述的试剂盒, 注射器是无菌的。

282. 根据权利要求268-281中任一权利要求所述的试剂盒, 进一步包括一个鲁尔锁。

283. 根据权利要求268-282中任一权利要求所述的试剂盒, 还包括一个端盖。



## 用于治疗骨骼退行性病变的方法和组合物

### 相关申请的交叉引用

本申请案主张于2016年4月27日的提出申请的美国临时申请案第62/328,313之权利，其内容通过引用结合到本文中。

### 发明领域

本公开涉及用于治疗患者的骨骼退行性病变的方法和组合物。在一些实施方案中，本文公开的方法和组合物可用于治疗，预防或延缓与骨骼退行性病变相关的骨病的发展，例如，骨关节炎（简称“OA”），类风湿性关节炎和缺血性坏死。

### 背景技术

骨骼发生退行性病变的区域可能会给患者带来许多问题。例如，认为症状性骨关节炎，类风湿性关节炎和缺血性坏死的发作和发展，与受影响区域中或附近的骨骼退行性病变区域相关。虽然这些疾病的病因不同，但每种疾病通常伴有明显的疼痛和功能丧失。减缓，阻止和修复骨骼退化可以减轻疼痛，减缓，预防或逆转疾病进展。

被认为与骨骼退行性病变相关的病理学中一个例子就是骨关节炎。骨关节炎是最常见的关节炎形式，影响手、膝、髋、脊柱和其他关节，是导致生产力丧失的主要原因，估计影响约2700万美国人。Arthritis Foundation:What is Osteoarthritis可在<http://www.arthritis.org/about-arthritis/types/osteoarthritis/what-is-osteoarthritis.php>（上次访问时间2017年4月12日）查阅，其全部内容通过引用结合到本文中。关节炎可导致关节软骨损伤、疼痛、肿胀和运动问题。随着关节炎的发展，该区域的骨骼开始退化，导致骨刺和进一步的炎症。关节炎的病因尚未完全清楚，但普遍认为其原因包括创伤（例如骨折），变性，炎症，局部缺血，先天性关节异常，代谢缺陷，内分泌和神经性疾病以及感染等。<http://www.arthritis.org/about-arthritis/types/osteoarthritis/what-is-osteoarthritis.php>

最初出现与骨骼退行性病变相关的疼痛性骨病的患者通常通过非手术治疗。非手术治疗在暂时缓解疼痛方面有一定效果，但依旧有风险。例如，据报道药物干预（例如非甾体抗炎药）与显著的并发症有关，如胃溃疡、中风和心脏病发作。一般来说，非手术干预仅对缓解骨病引起的疼痛有效，并不能减缓或阻止疾病进展。

当患者采用非手术方式治疗骨病失败时，通常建议进行侵入性或微创介入外科手术。目前的侵入性外科手术方法旨在通过截骨术或其他方式将重量从受损软骨区域转移到健康软骨区域，来改变受影响关节区域的生物力学力，或通过使用关节置换完全替换关节并恢复生物力学功能。微创介入手术包括治疗骨骼退行性病变区域，如骨髓病变（“BMLs”），其存在与骨关节炎的发病和进展有关。参见，例如，Sharkey, P.F. et al. Am. J. Orthop. (Belle Mead NJ) 2012, 41 (9), 413-17，其全部内容通过引用结合到本文中。用于骨骼退行性病变的现有微创介入治疗技术包括将多种磷酸钙骨水泥（“CPCs”）注射到病变区域，使CPCs在生物力学上稳定关节。参见，例如，Hisatome, T. et al., J. Biomed. Mater. Res. 2002, 59 (3), 490-

98 (通过使用增强材料,如CPC,保留关节软骨的软骨下通路,因为其具有机械强度。并且使用CPC填补大的缺陷以防止塌陷并为保留关节软骨提供必要的支持)和Chatterjee,D.et al.Clin.Orthop.Relat.Res.2015,473 (7),2334-42 (公开了将孔径为150-500 $\mu$ m的CPC注入软骨下骨,以改善其结构完整性和生物力学强度),以上内容通过引用结合到本文中。其他现有技术的CPCs已被用于骨折固定或填充骨骼系统(例如四肢、颅面、脊柱和骨盆)的骨质空隙或间隙。参见,例如,Nishizuka,T.et al.PLoS One 2014,9 (8),e104603,其全部内容通过引用结合到本文中。

重要的是,这些现有技术的治疗方法在治疗关节炎等骨骼疾病时存在明显的缺陷。例如,侵入性手术治疗方法具有相当大的风险,包括感染、形成深静脉血栓,甚至会造成死亡。而且,全关节置换有效期仅有约20年。现有技术的微创介入治疗骨病也被证明对骨骼退行性病变晚期患者无效。参见,例如,Chatterjee,D.et al.Clin.Orthop.Relat.Res.2015,473 (7),2334-42,其内容以参考文献的形式全部纳入。最终,无论是使用侵入性还是非侵入性现有技术治疗,提供生物力学上稳定的骨骼,术后都会产生明显的疼痛。

此外,为骨提供生物力学稳定性的现有技术治疗也不能解决以骨退行性病变为特征的骨病的致病因素。在骨病的发病和发展过程中,受累区域的骨受到炎性和(或)非炎性介质的侵袭。这些介质从关节间隙发出并穿过软骨下骨板中的通道,该通道连接关节空间和受影响的骨区域。这些介质的流入引起骨的退化和弱化的小梁结构内的液体积聚,并且由于软骨下骨中伤害感受器的激活而导致剧烈疼痛。在更晚期的骨病病例中,由于至少一部分关节软骨被破坏,导致来自关节间隙、穿过皮质骨板和进入骨的受累区域的介质流动增加,因而受累区域的骨的损伤加重。

用于治疗骨病的CPCs需要以下几个特征才能有效治疗骨骼的受累区域,包括可注射性、流动性、可固化性、内聚力和与骨的粘附性。遗憾的是,传统的CPCs通常缺乏一种或多种所需特征,这阻碍了能够以微创方式施用于所需解剖位置的CPCs的发展。通常通过混合固体和液体来形成CPCs,以获得适于注射的糊剂,该糊剂在施用到骨的受影响区域后凝固并固化。现有技术的CPCs被设计成抗压强度高,且具有弹性模量,以便为骨骼的受累区域提供生物力学稳定性。这种CPC通常具有高固液比,因此具备较高的抗压强度和弹性模量,通常孔隙率较低,但由于需要较高的注入压力并且流动性较差,导致材料无法充分填充受影响区域的空间,因此可注射性较差。用这些高固液比制成的CPC在注入过程中也可以脱水,在仪器中留下水泥固体,防止CPC原位凝固和固化。试图通过制备固液比较低的CPC来解决这些问题,由于CPC具有亲水性且易与体液混合,导致粘结性差,给药后缺乏凝固和/或固化。另外,即使用这些较低的固液比制成的材料能够凝固,它们也不能保持骨骼的内聚力或粘附力,使得它们在给药后不会留在患处,而是流过多孔骨骼结构。

由于这些难题,可获得的CPC数量非常有限,它们具有为受影响区域提供生物力学稳定性的理想组合,同时保持可注射性和流动性以填充受影响的骨骼区域。参见,例如,**Subchondroplasty® Procedure AccuFill® Bone Substitute Material (BSM)**, available at <http://subchondroplasty.com/healthcare-professionals-bsm.html> (上次访问时间为2017年4月18日);另见Tofighi,A.et al.J.Biomimetics Biomat.Tissue Eng'g 2009,2,39-28,以上所有内容均通过引用结合到本文中。不幸的是,这些用于治疗骨病的CPCs治愈后形成了具有高度孔隙率的生物材料,导致术后产生显著疼痛。参见,例如,

Farr, J.; Cohen, S. B. Oper. Tech. Sports Med. 2013, 21 (2), 138-43; Eliaz, N.; Metoki, N. Materials 2017, 10, 334 以上所有内容均通过引用结合到本文中。<http://subchondroplasty.com/healthcare-professionals-bsm.html>

尽管现有技术已经提供了包括碳水化合物在内的某些CPCs,但这些材料凝固时间短,或制成的粉液比高,因此不能充分混合以直接从注射器制备和给药。参见,例如,, Pek, Y. S. et al. Biomat. 2009, 30, 822-28; Ahmadzadeh-Asl, S. et al. Adv. Applied Ceramics 2011, 110 (6), 340-45; 以上所有内容均通过引用结合到本文中。

因此,本领域需要更安全和有效的治疗方案,其骨骼退行性病变相关的骨病的根本原因,与现有技术方法相比风险和副作用更小。

## 发明内容

本申请公开了治疗骨骼退行性病变患者的方法和组合物。

一方面,本申请公开了一种可注射生物材料,其包含固体组分和含有碳水化合物的液体组分,其中可注射生物材料在固体组分和液体组分混合后凝固并固化,形成了磷灰石晶体结构。

另一方面,本申请公开了一种制备可注射生物材料的方法,包括通过提供液体溶液,用pH调节剂调节液体溶液的pH值,并将碳水化合物溶解在液体溶液中以形成液体组分;提供固体成分;并将液体成分和固体成分混合形成可注射的生物材料。

在一些实施方案中,可注射生物材料在一段时间内固化。在一些实施方案中,可注射生物材料在一段时间内治愈。在一些实施方案中,可注射生物材料组在完全治愈之前固化。

在一些实施方案中,所述固体组分包括至少一种金属磷酸盐和金属碳酸盐。在一些实施方案中,固体组分包含活性磷酸钙。在一些实施方案中,固体组分至少包含 $\alpha$ -磷酸三钙( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )、碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )和磷酸一钙一水合物( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )中的一种。在一些实施方案中,固体组分包含70-90% $\alpha$ -磷酸三钙、10-20%碳酸钙和0.5-2%磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。在一些实施方案中,固体组分包含80-89% $\alpha$ -磷酸三钙、11-19%碳酸钙和0.75-1.5%磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。在一些实施方案中,固体组分包含82-86%的 $\alpha$ -磷酸三钙、13-16%的碳酸钙和0.9-1.2%的磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。在一些实施方案中,固体组分包含84.3%的 $\alpha$ -磷酸三钙、14.7%的碳酸钙和1.02%的磷酸二氢钙一水合物(质量/质量)。在一些实施方案中,所述固体组分还包括至少一种天然存在于人体内的至少一种少量元素的离子化合物。在一些实施方案中,至少一种离子化合物包含选自 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ 及其混合物的阳离子。在进一步实施方案中,至少一种离子化合物包含选自 $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ 及其混合物的阴离子。

在一些实施方案中,液体组分还包括盐。在一些实施方案中,盐是一种金属盐。在一些实施方案中,该盐选自磷酸盐、硅酸盐、氯化物盐、氢氧化物盐及其混合物。在一些实施方案中,所述盐至少包含磷酸氢二钠、硅酸钠、氯化钠和氢氧化钙中的一种。

在一些实施方案中,碳水化合物选自葡聚糖、藻酸盐、羧甲基纤维素和透明质酸。在一些实施方案中,碳水化合物是透明质酸,或其酯,酰基脲,酰基异脲,二硫化物或酰胺。在一些实施方案中,透明质酸选自乙酰透明质酸,透明质酸钠,透明质酸钾,透明质酸镁,透明质

酸钙,透明质酸铵及其组合。在一些实施方案中,透明质酸包含至少一个交联。在一些实施方案中,透明质酸来源于细菌或动物。在一些实施方案中,透明质酸包含硫酸化透明质酸或其酯,酰基脲,酰基异脲,卡波姆,二硫化物或酰胺。在一些实施方案中,所述透明质酸包含N-硫酸化透明质酸或其酯、酰基脲、酰基异脲、卡波姆、二硫化物或酰胺。在一些实施方案中,透明质酸包含透明质酸酯。在一些实施方案中,透明质酸酯的酯化量约为20%至100%。在一些实施方案中,用有机或无机碱盐化非酯化透明质酸。

在一些实施方案中,碳水化合物是水溶性的。在一些实施方案中,液体组分是水凝胶的形式。

在一些实施方案中,碳水化合物以约0.1至约100mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。在一些实施方案中,碳水化合物以约0.1至约50mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。在一些实施方案中,碳水化合物以约0.1至约10mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。在一些实施方案中,碳水化合物以约1至约10mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。在一些实施方案中,碳水化合物以约2至约10mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。在一些实施方案中,碳水化合物以约4至约8mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。在一些实施方案中,碳水化合物以约5至约7mg/mL的浓度存在于可注射生物材料中。

在一些实施方案中,碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6$ Da至约 $1.0 \times 10^7$ Da。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6$ Da至约 $5.0 \times 10^6$ Da。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6$ Da至约 $4.0 \times 10^6$ Da。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量约为 $0.90 \times 10^6$ Da至约 $3.0 \times 10^6$ Da。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量约为 $1.5 \times 10^6$ Da至约 $3.0 \times 10^6$ Da。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量约为 $1.7 \times 10^6$ Da至约 $2.5 \times 10^6$ Da。在一些实施方案中,碳水化合物是分子量约为 $0.90 \times 10^6$ Da的透明质酸,以6.0mg/mL左右的浓度存在。在一些实施方案中,碳水化合物是分子量约为 $1.7 \times 10^6$ Da的透明质酸,以6.0mg/mL左右的浓度存在。在一些实施方案中,碳水化合物是分子量约为 $2.6 \times 10^6$ Da的透明质酸,以6.0mg/mL左右的浓度存在。

在一些实施方案中,碳水化合物的分子量稳定至少3个月。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量稳定至少6个月。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量稳定至少1年。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量稳定至少2年。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量稳定至少3年。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量稳定至少4年。在一些实施方案中,碳水化合物的分子量稳定至少5年。

在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为3比1。在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为2比1。在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为1.5至1。在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为1比1。

在一些实施方案中,可注射生物材料在初始凝固之前通过针或套管注射。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为21号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为20号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为18号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为16号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为15号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为14号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为12号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为10号。

在一些实施方案中,可注射生物材料在通过针或套管分配时不会脱水。在一些实施方

案中,可注射生物材料在通过针或套管分配时不会卡住。

在一些实施方案中,可注射生物材料是粘性的。在一些实施方案中,可注射生物材料在其初始凝固时间内保持粘性。

在一些实施方案中,可注射生物材料粘附在骨骼上。在一些实施方案中,可注射生物材料在其初始凝固时间期间保持与骨骼的粘合。

在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过60分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过50分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过40分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过30分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过20分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过10分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过5分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过4分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过3分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过2分钟。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料的可使用时间不超过1分钟。

在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约60分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约50分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约40分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约30分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约20分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约10分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约5分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约4分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约3分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约2分钟内凝固。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到约1分钟内凝固。

在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到96小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到72小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到48小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到24小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到12小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到6小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到5小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到4小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到3小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材

料在不到2小时内完全固化。在一些实施方案中,固体组分和液体组分混合后,可注射生物材料在不到1小时内完全固化。

在一些实施方案中,可注射生物材料的初始固化不会释放气体。

在一些实施方案中,当置于患者体内时,可注射生物材料不会显著改变相邻流体的pH。

在一些实施方案中,当置于患者体内时,可注射生物材料的初始固化不会显著改变相邻流体的温度。

在一些实施方案中,可注射生物材料的固化会产生与羟基磷灰石基本一致的磷灰石晶体结构。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化会产生磷灰石晶体结构,其中含至少约90%的羟基磷灰石。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化会产生磷灰石晶体结构,其中含至少约95%的羟基磷灰石。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化会产生磷灰石晶体结构,其中含至少约96%的羟基磷灰石。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化会产生磷灰石晶体结构,其中含至少约97%的羟基磷灰石。在一些实施方案中,可注射生物材料产生磷灰石晶体结构,其中含至少约98%的羟基磷灰石。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化会产生磷灰石晶体结构,其中含至少约99%的羟基磷灰石。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化会产生磷灰石晶体结构,其中含大于约99%的羟基磷灰石。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有约1至约2的摩尔Ca/P比。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有约1.3至约1.8的摩尔Ca/P比。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有约1.4至约1.7的摩尔Ca/P比。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有约1.5至约1.7的摩尔Ca/P比。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有约1.5至约1.667的摩尔Ca/P比。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约20MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约15MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约10MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约9MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约8MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约7MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约6MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约5MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约4MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约3MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约2MPa的抗压强度。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约1MPa的抗压强度。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约5GPa的弹性模量。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约4GPa的弹性模量。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约3GPa的弹性模量。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约2GPa的弹性模量。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约1GPa的弹性模量。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约0.5GPa的弹性模量。在一些实施方案中,完

全凝固和固化的可注射生物材料具有小于约0.25GPa的弹性模量。

在一些实施方案中,当在室温下测量时,可注射生物材料在混合固体组分和液体组分后,立即具有约5Pa·s和约30Pa·s的粘度。在一些实施方案中,当在室温下测量时,可注射生物材料在混合固体组分和液体组分后,立即具有约5Pa·s和约20Pa·s的粘度。在一些实施方案中,当在室温下测量时,可注射生物材料在混合固体组分和液体组分后,立即具有约5Pa·s和约18Pa·s的粘度。在一些实施方案中,可注射的生物材料在生物力学上不能稳定骨骼。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的真密度约为1g/cm<sup>3</sup>至约4g/cm<sup>3</sup>。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的真密度约为1.5g/cm<sup>3</sup>至约3.5g/cm<sup>3</sup>。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的真密度约为1.83g/cm<sup>3</sup>至约3.14g/cm<sup>3</sup>。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的真密度约为2g/cm<sup>3</sup>至约3g/cm<sup>3</sup>。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含小于约1μm的中值孔径。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含小于约0.8μm的中值孔径。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含小于约0.6μm的中值孔径。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含小于约0.5μm的中值孔径。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含小于约0.4μm的中值孔径。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含小于约0.2μm的中值孔径。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含小于约0.15μm的中值孔径。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含的总多孔面积小于约4m<sup>2</sup>/g。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含的总多孔面积小于约3m<sup>2</sup>/g。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含的总多孔面积小于约2m<sup>2</sup>/g。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料包含的孔隙足以防止产生炎性介质和非炎性介质扩散通道。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料是具有骨诱导性的。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料是具有骨传导性的。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料是可吸收的。

在一些实施方案中,可注射生物材料的固化产生的氧化钙不到5%。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化产生的氧化钙不到4%。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化产生的氧化钙不到3%。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化产生的氧化钙不到2%。在一些实施方案中,可注射生物材料的固化产生的氧化钙不到1%。

在一些实施方案中,液体成分是无菌的。在一些实施方案中,固体成分是无菌的。

在一些实施方案中,可注射生物材料是可混合的。

在一些实施方案中,pH调节剂选自有机酸和无机酸。在一些实施方案中,pH调节剂选自柠檬酸、甲酸、乙酸及其混合物。在一些实施方案中,pH调节剂s选自盐酸、磷酸、硝酸及其混合物。

在一些实施方案中,提供固体组分还包括干燥固体组分。在一些实施方案中,干燥包括使固体组分暴露一段时间并加热。在一些实施方案中,所述热量至少到达165℃。在一些实

施方案中,所述时间至少达到12小时。

在另一方面,本文公开了一种治疗有需要的患者的骨的受影响区域的方法,包括识别患者骨骼中的受影响区域;通过骨的皮质壁在骨中形成切口,以提供一个通路进入骨的受影响区域中的退化松质骨空间;通过穿过骨皮质壁的切口向退化的松质骨空间施用一定体积的任何前述权利要求的可注射生物材料。

在一些实施方案中,骨的受影响区域与患者正在经历关节病理的关节相邻。在一些实施方案中,关节病理指的是膝、肩、腕、手、脊柱、踝、肘或髋的病理。在一些实施方案中,关节病理选自疼痛、骨关节炎、类风湿性关节炎、缺血性坏死及其组合。在一些实施方案中,该方法用于治疗患者关节中的骨关节炎。在一些实施方案中,骨关节炎具有1-3的Kellgren Lawrence (KL) 分级。在一些实施方案中,关节的病理与关节不稳定无关。

在一些实施方案中,由于炎性介质和非炎性介质中的至少一种,受影响区域表现出炎性或降解性变化中的至少一种。

在一些实施方案中,通过核磁共振(MRI) 识别炎性或降解性改变。在一些实施方案中,MRI是T2MRI。

在一些实施方案中,炎性或降解性改变发生在松质骨中。

在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0英寸至约5英寸之间。在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0英寸至约4英寸之间。在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0英寸至约3英寸之间。在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0英寸至约2英寸之间,在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0英寸至约1英寸之间。在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0英寸至约20毫米之间。在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0毫米至约10毫米之间。在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0毫米至约5毫米之间。在一些实施方案中,受影响区域位于距患者关节约0毫米至约1毫米之间。

在一些实施方案中,切口是经皮的。

在一些实施方案中,提供进入松质骨空间的通路包括在患者的骨骼中创建通道,以将骨的皮质壁中的切口连接到包括受影响区域的松质骨空间。在一些实施方案中,通道垂直于骨的长轴。在一些实施方案中,通道不垂直于骨的长轴。在一些实施方案中,该通道距离近端软骨下板约5英寸。在一些实施方案中,该通道距离近端软骨下板约4英寸。在一些实施方案中,该通道距离近端软骨下板约3英寸。在一些实施方案中,该通道距离近端软骨下板约2英寸。在一些实施方案中,该通道距离近端软骨下板约1英寸。在一些实施方案中,该通道在近端软骨下板的约20毫米内。在一些实施方案中,该通道在近端软骨下板的约10毫米内。在一些实施方案中,该通道在近端软骨下板的约5mm内。在一些实施方案中,该通道在近端软骨下板的约1毫米内。在一些实施方案中,通过定位和插入的插管来访问通道,而无需额外的靶向仪器。

在一些实施方案中,该方法还包括在将可注射生物材料施用至患处之前对患处内容物进行减压和抽吸。在一些实施方案中,减压和抽吸减少了受影响区域的局部炎症。在一些实施方案中,减压和抽吸降低了受影响区域的骨内压力。在一些实施方案中,所述内容物包括流体。在一些实施方案中,所述流体至少包括炎性介质和非炎性介质中的一种。

在一些实施方案中,至少一种炎性介质包括缓激肽、组胺、前列腺素、乳酸、P物质、血管



活性肠肽、降钙素基因相关肽 (CGRP) 及其混合物中的至少一种。在一些实施方案中,至少一种炎性介质包含炎性细胞因子。在一些实施方案中,炎性细胞因子选自 AIMP1 (SCYE1), BMP2, CD40LG (TNFSF5), CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FASLG (TNFSF6), GM-CSF, IFNA2, IFNG, IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN- $\gamma$ , LTA (TNFB), LTB, MIF, NAMPT, OSM, SPP1, TGF- $\beta$ , TNF, TNF- $\alpha$ , TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (RANKL), TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF4 (OX40L), VEGFA 及其混合物。在一些实施方案中,至少一种非炎性介质包含蛋白水解酶。在一些实施方案中,蛋白水解酶选自基质金属蛋白酶 (MMPs)、金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMPs)、具有血小板反应蛋白基序的解聚素和金属蛋白酶 (ADAM-TS) 及其混合物。在一些实施方案中,炎性介质包含炎性趋化因子。在一些实施方案中,炎性趋化因子选自 C5, CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxin), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3a), CCL22 (MDC), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2, Eotaxin-2, MPIF-2, Eotaxin-2), CCL26 (eotaxin-3), CCL3 (MIP-1A), CCL4 (MIP-1B), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CX3CL1, CXCL1 (GR01, GR0-alpha, SCYB1), CXCL10 (INP10), CXCL11 (I-TAC, IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL2 (GR02, GR0-beta, SCYB2), CXCL3, CXCL5 (ENA-78, LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG) 及其混合物。在一些实施方案中,炎性介质包含白细胞介素。在一些实施方案中,白细胞介素选自 IL13, IL15, IL16, IL17A, IL17C, IL17F, IL1A, IL1B, IL1RN, IL21, IL27, IL3, IL33, IL5, IL7, CXCL8, IL9 及其混合物。在一些实施方案中,炎性介质包括选自缓激肽、降钙素基因相关肽 (CGRP)、组胺、乳酸、神经生长因子 (NGF)、前列腺素、P物质、血管活性肠肽及其混合物。

在一些实施方案中,可注射生物材料通过套管或针注射的。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为21号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为20号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为18号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为16号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为15号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为14号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为12号。在一些实施方案中,针或套管的尺寸至少为10号。

在一些实施方案中,当通过针或套管注射时,可注射生物材料不会脱水。

在一些实施方案中,当通过针或套管分配时,可注射生物材料不会被卡住。

在一些实施方案中,可注射生物材料是通过可控制的套管注射,以减少手术损伤。

在一些实施方案中,可注射生物材料被注射到受影响的区域,同时最小程度地干扰软骨下板。

在一些实施方案中,将可注射生物材料注射到受影响区域上方或下方约0mm至约20mm之间的层中,同时最小程度地干扰软骨下板。在一些实施方案中,将可注射生物材料注射到受影响区域上方或下方约0mm至约10mm之间的层中,同时最小程度地干扰软骨下板。在一些实施方案中,将可注射生物材料注射到受影响区域上方或下方约0mm至约5mm之间的层中,同时最小程度地干扰软骨下板。在一些实施方案中,将可注射生物材料注射到受影响区域上方或下方约0mm至约1mm之间的层中,同时最小程度地干扰软骨下板。

在一些实施方案中,将可注射生物材料注射到与骨结构稳定性无关的区域。

在一些实施方案中,该方法还包括用关节镜检查注射后的关节间隙,以确保关节中没有残留的可注射生物材料。

在一些实施方案中,可注射生物材料在注射到受影响区域时流入松质骨的孔隙中。

在一些实施方案中,可注射的生物材料在注射到受影响区域期间保持粘性并且基本上填充骨空隙。

在一些实施方案中,可注射生物材料至少部分地涂覆松质骨空间和相邻关节之间的界面,以在凝固时提供保护层。

在一些实施方案中,可注射生物材料防止至少一种炎性介质和非炎性介质从相邻关节间隙扩散进入受影响区域。

在一些实施方案中,保护层为破骨细胞在骨重建过程中的消耗提供了牺牲层。

在一些实施方案中,可注射生物材料的注射不会引起应力遮挡,导致卸载骨的弱化。

在一些实施方案中,该方法不会导致严重的术后疼痛。

在一些实施方案中,该方法减轻了关节的疼痛。

在一些实施方案中,该方法减缓了关节中骨关节炎的发展。

在一些实施方案中,该方法用于治疗患者关节中的类风湿性关节炎。在一些实施方案中,该方法减缓了类风湿性关节炎在关节中的发展。

在一些实施方案中,该方法减缓了关节中缺血性坏死的发展。

另一方面,本文公开了一种试剂盒,其包含固体组分和用于制备本文公开的可注射生物材料的液体组分及其使用说明书。

在一些实施方案中,该说明书涉及治疗有需要的骨病患者的骨骼受影响区域的方法。

在一些实施方案中,该治疗是针对疼痛、骨关节炎、类风湿性关节炎、缺血性坏死或其组合。

在一些实施方案中,固体组分和液体组分置于分开的无菌容器中。

在一些实施方案中,包装配置允许固体组分和液体组分在2°C-25°C下保持稳定至少三个月。在一些实施方案中,包装配置允许固体组分和液体组分在2°C-25°C下保持稳定至少六个月。在一些实施方案中,包装配置允许固体组分和液体组分在2°C-25°C下保持稳定至少一年左右。在一些实施方案中,包装配置允许固体组分和液体组分在2°C-25°C下保持稳定至少两年左右。在一些实施方案中,包装配置允许固体组分和液体组分在2°C-25°C下保持稳定至少三年左右。在一些实施方案中,包装配置允许固体组分和液体组分在2°C-25°C下保持稳定至少四年左右。在一些实施方案中,包装配置允许固体组分和液体组分在2°C-25°C下保持稳定至少五年左右。

在一些实施方案中,将液体组分置于无菌注射器中。

在一些实施方案中,将固体组分置于注射器中,该注射器具有集成混合装置,用于对所述固体组分和液体组分的预测部分进行原位混合,以形成可注射的生物材料。在一些实施方案中,注射器是无菌的。

在一些实施方案中,该套件还包括鲁尔接头。

在一些实施方案中,该试剂盒还包括一个端盖。

## 附图说明

图1显示了包括骨骼退行性病变区域的人体膝盖的示意图。

图2A-E显示出了包括图1的骨骼退行性病变的一部分区域的示意标注

图3A-B显示了与缺乏碳水化合物的可注射生物材料相比,根据本文所述的可注射生物材料每种都在磷酸盐缓冲盐水中。

图4A-D显示了与缺乏碳水化合物的可注射生物材料相比较,根据本文所述的可注射生物材料每种都在磷酸盐缓冲盐水中。

图5A-D显示了在去除过量磷酸盐缓冲盐水后,与缺乏碳水化合物的可注射生物材料相比,根据本文所述的可注射生物材料。

图6A-D显示出了注射有根据本文所述的可注射生物材料的锯骨的横截面,与注射有缺少碳水化合物的可注射生物材料的锯骨形成的对比。

图7A-B显示了注射有根据本文所述的可注射生物材料的锯骨的横截面,与注射缺乏碳水化合物的可注射生物材料的锯骨形成的对比。

图8A-B显示了扩散屏障实验的结果,该实验将缺乏碳水化合物的可注射生物材料和根据本文所述的可注射生物材料进行比较。

图9显示了根据本文所述的可注射生物材料的x射线粉末衍射图,后凝固和固化。

图10显示了根据本文所述的可注射生物材料的傅里叶变换红外(“FT-IR”)光谱仪。

图11A-C示出了在凝固和固化之后根据本文所述的可注射生物材料的扫描电子显微镜(“SEM”)图像。

图12A-B显示了在将本文所述的可注射生物材料注射到骨骼成熟的新西兰白兔的退行性病变骨骼中,6周后从不同平面拍摄的微计算机断层摄影(“微CT”)图像。

图13显示了将本文所述的可注射生物材料注射到犬股骨髓中的图像。

图14显示了将本文所述的可注射生物材料注射到人类尸体骨骼中的图像。

## 具体实施方式

本文所述涉及用于治疗骨骼退行性病变患者的方法和组合物。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗,预防或延缓与骨骼退行性病变相关的骨病的发展,例如,骨关节炎(简称“OA”),类风湿性关节炎和缺血性坏死。

发明者惊奇地发现,在可注射的生物材料中加入碳水化合物可以提供一种可注射的、可混合的、可流动的、可固定的、可固化的、粘附在骨上的组合物。此外,本文公开的可注射生物材料具有低孔隙率和高尺寸稳定性,其适用于各种骨疾病的微创治疗,这是现有技术的生物材料中不存在的。

不受理论局限,发明人认为低孔隙率和高尺寸稳定性的可注射生物材料可用于阻止涉及关节间隙和相邻骨的生化交流。发明者认为,这种生化交流是导致骨骼退化的许多症状(包括疼痛和液体积聚)发作的原因,并且持续的骨骼退化可以推进与骨退化相关的骨疾病(如OA、类风湿性关节炎和缺血性坏死)的发展。举例来说,当软骨和滑膜因创伤或过度使用而受伤时,两种组织都会释放出一系列炎症和/或非炎症介质。这些介质通过皮质骨平面中的通道进入骨骼,通过激活伤害感受器、液体积聚和骨骼受累区域中的退行性改变(如形成骨髓病变)刺激疼痛。发明人假设,由于关节空间和相邻骨之间的这种生化交流,使受影响的骨区域的稳态受到干扰,导致骨蛋白的合成和降解失调,形成了负责OA等病理进展的退行性正反馈回路。因此,阻断引起骨骼退化的炎性和/或非炎性介质的作用,对于治疗、预防和/或延迟骨病的进展是必不可少的。

因此,发明人着手制备具有低孔隙率和高尺寸稳定性的可注射生物材料,但其能够使用较低的固液比制备,允许其用于与骨骼退行性病变相关的骨病的微创治疗。在他们的研究过程中,发明人发现用于生产这种可注射材料的现有技术产生的材料,其内聚力,粘附性,凝固性和固化性质通常较差,使得这些材料不适合用于骨疾病的微创治疗。类似地,那些先前的技术通常能产生具有高孔隙率的材料,其不太适合于阻止受影响的骨区域与相邻关节空间之间的生化交流。参见,Eliasz,N.;Metoki,N.Materials 2017,10,334,at 13,其全部内容通过引用结合到本文中。然后,发明人惊奇地发现,向可注射的生物材料中添加碳水化合物,可以制备出具有较低固液比但仍然能够凝固,固化,保持骨的粘结性和粘附性的材料。并且与不添加碳水化合物的可注射生物材料相比,其具有低孔隙率和高尺寸稳定性。换言之,发明人发现,加入碳水化合物后,产生了一种可注射的生物材料,该材料具有可注射性、可混合性、流动性、可稳定性和固化性的关键组合,同时保持了所需的内聚性、粘附性、低孔隙率和高尺寸稳定性。因此,在一个实施方案中,本公开提供了可注射的生物材料,可以使用比先前可能的更低的固液比制备,但同时保有传统上用更高的固液比制备出的材料的粘结性、对骨的粘附性、低孔隙率和高尺寸稳定性。因此,公开的可注射生物材料能够阻止流动并防止炎性和非炎性介质从邻近关节间隙进入骨的受影响区域,同时不牺牲在待治疗的退化骨区域中混合、被注射、流入、保持和凝固并固化的理想能力,而不被正常体液交换功能清除。这些材料提供了这种令人惊讶和独特的性能组合,并且与本领域中侧重于提供高抗压强度和弹性模量材料的常识相反,出乎意料地是,与先前的组合物相比,这些材料能更好地治疗与骨退化相关的骨疾病。

不受理论的局限,发明人认为,本文公开的可注射生物材料,可以通过消除和预防受影响的骨区域与相邻关节间隙之间的生化交流的复发,来治疗与骨退化相关的骨病的潜在病因。本文公开的可注射生物材料为受影响的骨区域和邻近关节间隙之间提供了屏障,其能阻止炎性和/或非炎性介质从关节间隙进入,并且阻止蛋白水解酶和炎性细胞因子等介导的降解,并允许骨骼通过正常动力学(骨吸收)恢复。相比之下,先前的可注射生物材料解决了症状,但没有解决与骨退化相关的骨病的根本原因。

此外,所公开的可注射生物材料具有比现有技术中通常使用的材料更低的压缩强度。不受理论的局限,发明人认为,与本领域的普遍认识相反,提供一种可注射生物材料,其不能在生物力学上稳定骨骼的受影响区域,这在治疗、预防和减缓与骨退化有关的骨病进展方面提供了优越的结果。该领域的传统观点认为,需要具有高压缩强度的可注射生物材料(例如CPCs)通过提供生物力学稳定来适当地治疗关节病变。与这一传统观点相反,发明人惊奇地发现,通过提供一种不能为受影响区域提供生物力学支持的较弱的可注射生物材料,所公开的方法和组合物不会人为地改变关节暴露处的生物力学力,从而提供了一种解决此类病理问题的优越方法。不受理论的局限,发明人认为,通过将压力和应变转移到其他健康组织,来为退化骨区域提供生物力学支持可能是有害的,这可能导致骨病和/或其症状按照沃尔夫定律扩散。发明人认为这是由于不可能精确地再造健康的生物力学,这必然与其他位置上的过度应变有关。例如,高应力区域将变得更厚更硬,而低应力区域将根据沃尔夫定律重新吸收,该定律指出健康人或动物的骨骼将适应其所处的负荷。根据沃尔夫定律,如果特定骨骼的负荷增加,骨骼会随着时间的推移自我重塑,变得更强,以抵抗这种负荷。然而,这些正常的生物反应在骨病中是不可能的,因为在这些病症中存在的退行性生化反

馈回路会对正常的骨重建过程产生不利影响,还可能完全停止骨骼重塑。因此,通过不提供生物力学支持,公开的方法和组合物顾及到了允许受影响的骨区域通过自然骨重建来恢复和重建的生理条件,从而减缓和/或逆转骨疾病的进展,并且防止诸如症状性OA,类风湿性关节炎和缺血性坏死的骨疾病的发作和进展,以及防止疾病或症状扩散到邻近的健康组织。

在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的强度小于现有技术的可注射生物材料所提供的强度。例如,某些现有技术的可注射生物材料具有约50MPa的抗压强度,这是健康松质骨的平均5-15MPa抗压强度的4-10倍。参见,例如,**Norian®SRS®**Tibia plateau fractures, **Synthes®**, available at [http://www.rch.org.au/uploadedFiles/Main/Content/ortho/Norian\\_SRS\\_Tibia\\_plateau\\_fractures.pdf](http://www.rch.org.au/uploadedFiles/Main/Content/ortho/Norian_SRS_Tibia_plateau_fractures.pdf) (最后访问时间2017年4月24日),其全部内容通过引用结合到本文中。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的强度,其特征在于有一种或多种抗压强度和弹性模量。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约20MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约15MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约10MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约9MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约8MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约7MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约6MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约5MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约4MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约3MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约2MPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料抗压强度小于约1MPa。[http://www.rch.org.au/uploadedFiles/Main/Content/ortho/Norian\\_SRS\\_Tibia\\_plateau\\_fractures.pdf](http://www.rch.org.au/uploadedFiles/Main/Content/ortho/Norian_SRS_Tibia_plateau_fractures.pdf)

在进一步的实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量,小于现有技术的可注射生物材料所提供的弹性模量。在进一步的实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量接近于健康软骨下骨的弹性模量。不受理论的局限,发明人认为,提供一种弹性模量与健康软骨下骨相似的可注射生物材料,可降低改变自然生物力学的风险,并根据沃尔夫定律(即,应力屏蔽)导致进一步的骨质退化。参见,Eliaz, N.; Metoki, N. *Materials* 2017, 10, 334, at 3。例如,据报道人类软骨下骨样品的弹性模量约为1.15GPa。参见,例如Choi, K. et al. *J. Biomech.* 1990, 23 (11), 1103-13; 1990, 23 (11), 1103-13; 另见Brown, T. D.; Vrahas, M. S. *J. Orthoped. Res.* 1984, 2 (1), 32-38 (报告软骨下骨的机械加工帽的表观弹性模量为1.372GPa); Mente, P. L.; Lewis, J. L. *J. Orthoped. Res.* 1994, 12 (5), 637-47 (报告中的弹性模量是由 $2.3 \pm 1.5$  GPa的“纯”牛软骨下骨束计算出的), 以上所有内容均通过引用结合到本文中。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量小于约5GPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量小于约4GPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量小于约3GPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量小于约2GPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量小于约1GPa。在一些实施方

案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量小于约0.5GPa。在一些实施方案中,完全凝固和固化的可注射生物材料的弹性模量小于约0.25GPa。

此外,发明人惊奇地发现,所公开的可注射生物材料凝固并固化而没有显着的气体排放。不受理论的局限,发明人认为,在凝固和固化后给药期间不释放气体,这导致可注射生物材料在凝固和固化期间不膨胀,因此与现有技术材料相比能减少或消除了术后疼痛。此外,发明人认为,与现有技术材料相比,在凝固和固化后给药期间不释放气体,这有利于形成所需的孔隙率降低的结构。发明人认为,提供不含碳酸氢盐的可注射生物材料,可能有助于防止气体释放,从而降低生物材料的孔隙率,并不会引起手术后疼痛。

### 定义

此处所用的,关于可注射生物材料的术语“粘附于骨”是指对骨具有足够亲和力的材料,其不易被体液从注射部位清除。

此处所使用的术语“骨病”是指患者体内与骨骼退行性病变有关的疾病、病症或病理。例如,骨病可以影响与退化骨相邻的关节。

此处所用的,关于可注射生物材料的术语“内聚力”是指材料粘附于自身并被模制,使其在注射后能够在一段时间内较持久地保持其形状,并填充受影响的退化骨头区域。

此处所用的,关于可注射生物材料的术语“固化”是指可注射生物材料的组分,通过化学和物理反应形成最终所需的晶体结构的过程。“固化”的材料在抗压强度或孔隙度上不再发生明显的变化。此处所用的,关于可注射生物材料的术语“固化时间”和“固化中时间”是指可注射生物材料完全固化的时间。在一些实施方案中,本文公开的可注射生物材料固化会形成磷灰石晶体结构。

此处所用术语“减压”是指清除结构上的压力的过程。

此处所用术语“退化组织”是指发生了功能活性降低或活性减少的组织。

此处所用术语“退化骨”是指骨头的一个区域发生了变化,功能活性降低或活性减少。在一些实施方案中,退化骨表现出至少一种变化,选择自(1)相对于正常骨形成更高体积分数的骨小梁的变化;(2)与正常骨相比,矿物质-基质和碳酸盐-基质值降低;(3)与正常骨相比,骨内积液增加;且(4)与正常骨相比,纤维状胶原网向骨髓间隙的浸润增加。

此处所用术语“脱水”是指可注射生物材料,指固体成分和液体成分的分离。

此处所用术语“流动性”是指可注射的生物材料,指可能导致在压力或重力下流动的任何通常不可压缩的材料。

此处所用术语“炎症介质”是指在动物或人体内诱导炎症反应的生物成分。炎症介质包括但不限于趋化因子,如C5,CCL1(I-309),CCL11(eotaxin),CCL13(MCP-4),CCL15(MIP-1d),CCL16(HCC-4),CCL17(TARC),CCL2(MCP-1),CCL20(MIP-3a),CCL22(MDC),CCL23(MPIF-1),CCL24(MPIF-2,Eotaxin-2,MPIF-2,Eotaxin-2),CCL26(eotaxin-3),CCL3(MIP-1A),CCL4(MIP-1B),CCL5(RANTES),CCL7(MCP-3),CCL8(MCP-2),CX3CL1,CXCL1(GRO1,GRO-alpha,SCYB1),CXCL10(INP10),CXCL11(I-TAC,IP-9),CXCL12(SDF1),CXCL13,CXCL2(GRO2,GRO-beta,SCYB2),CXCL3,CXCL5(ENA-78,LIX),CXCL6(GCP-2),CXCL9(MIG);白细胞介素,如IL13,IL15,IL16,IL17A,IL17C,IL17F,IL1A,IL1B,IL1RN,IL21,IL27,IL3,IL33,IL5,IL7,CXCL8,IL9;细胞因子,如(AIMP1(SCYE1),BMP2,CD40LG(TNFSF5),CSF1(MCSF),CSF2(GM-CSF),CSF3(GCSF),FASLG(TNFSF6),GM-CSF,IFNA2,IFNG,IL-1,IL-6,IL-8,IL-15,IL-16,

IL-17, IL-18, IFN- $\gamma$ , LTA (TNFB), LTB, MIF, NAMPT, OSM, SPP1, TGF- $\beta$ , TNF, TNF- $\alpha$ , TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (RANKL), TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF4 (OX40L), VEGFA; 和其他炎症介质, 如缓激肽、降钙素基因相关肽 (CGRP)、组胺、乳酸、神经生长因子 (NGF)、前列腺素、P物质和血管活性肠肽; 及它们混合物。其他炎症介质是本领域技术人员已知的。

此处所用关于可注射生物材料的术语“初始凝固时间”是指 (1) 固体组分和液体组分的混合; (2) 尖端直径为1/24英寸 (1.06毫米) 的1磅 (454克) Gilmore针头不在不到1分钟的时间内无法穿透均匀厚度为3/16英寸 (5毫米) 的可注射生物材料样品。参见ASTM C414-03在7.2, 8.2 (2012年重新核准), 其全部内容通过引用结合到本文中。本文所用的关于可注射生物材料的术语“凝固”或“可凝固”是指可注射材料从上述点 (1) 到点 (2) 的状态转变。

本文所用的关于可注射生物材料的术语“可注射的”, 指的是一种材料, 它可以用不超过可接受的手压作用于柱塞杆上, 从注射器中挤出。可接受的手压是本领域技术人员已知的。在一些实施方案中, 可注射生物材料必须能够从注射器中挤出, 而不依靠机械优势, 例如螺旋驱动的注射器。在一些实施方案中, 注射器是3ml注射器。在一些实施方案中, 注射器是5ml注射器。在一些实施方案中, 注射器是10ml注射器。在一些实施方案中, 注射器是14ml注射器。在一些实施方案中, 可注射生物材料能够从不超过15磅的注射器中挤出。以6毫升/分钟的挤压力挤出。在一些实施方案中, 可注射生物材料能够使用不超过10磅从注射器中挤出。以6毫升/分钟的挤压力挤出。在一些实施方案中, 可注射生物材料能够使用不超过7.5磅的注射器挤出。以6毫升/分钟的挤压力挤出。在一些实施方案中, 可注射生物材料能够使用不超过5磅的注射器挤出。以6毫升/分钟的挤压力挤出。在一些实施方案中, 注射器与11号套管连接。在一些实施方案中, 注射器与14号套管连接。在一些实施方案中, 注射器与15号套管连接。在一些实施方案中, 注射器与18号套管连接。在一些实施方案中, 注射器与21号套管连接。在一些实施方案中, 注射器连接到套管上, 并且可注射的生物材料必须沿着套管的整个长度留下, 而不被卡住或脱水, 才能被认为是可注射的。在一些实施方案中, 套管长约11cm。在一些实施方案中, 套管长约15cm。

本文所用的关于可注射生物材料的术语“可混合的”是指当将固体组分和液体组分分别置于5ml注射器中时, 能实现固体组分和液体组分完全混合的能力, 其中将注射器连接并使用手压注射器, 挤出内容物1分钟, 没有可见的卡住或脱水。

本文所用的术语“大孔”是指具有肉眼可见的孔的材料。

本文所用的术语“中值孔径”是与累积侵入体积相比, 孔隙直径相当于总侵入体积的50%。直径图。参见Webb, P. An introduction to the physical characterization of materials by mercury intrusion porosimetry with emphasis on reduction and presentation of experimental data, Micromeritics Instrument Corp. (2001), 其全部内容通过引用结合到本文中。

本文所用的关于可注射生物材料的术语“骨传导性”是指成骨材料作为支持新骨生长的基质、支架或骨架的能力, 所述新骨生长由原生骨延续。

本文所用的关于可注射生物材料的术语“成骨”是指材料促进新骨组织生长的能力。示例性成骨材料包括但不限于骨髓抽吸物、骨髓抽吸浓缩物、富血小板血浆、贫血小板血浆、体细胞自体移植、干细胞自体移植、干细胞同种异体移植及其混合物。其他示例性成骨材料是本领域技术人员已知的。

本文所用的与可注射生物材料有关的术语“骨诱导性”是指成骨材料从宿主体内募集有潜力形成新骨和修复骨组织的细胞。根据本公开的骨诱导性可注射生物材料能刺激骨祖细胞分化成成骨细胞,然后成骨细胞开始新骨形成。示例性骨诱导材料包括但不限于BMP2、BMP7、BMP9、PDGF和P15。参见,例如,Neiva,R.F.et al.J.Periodontol.2008,79(2),291-99,其全部内容通过引用结合到本文中。其他骨诱导材料是本领域的技术人员已知的。

本文所用的术语“蛋白水解酶”是指能够分解各种蛋白质的酶。蛋白水解酶包括但不限于基质金属蛋白酶(MMPs),金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS),具有血小板反应蛋白基序的解聚素和金属蛋白酶(ADAM-TS)及其混合物。其他蛋白水解酶是本领域的技术人员已知的。

这里所说的“病人”是指人类和非人类,如灵长类动物、宠物和农场动物。

本文所用的与可注射生物材料术语相关的术语“可吸收”指的是材料随着时间的推移被分解并同化回体内的能力。

本文所用的关于可注射生物材料的术语“自固化”是指材料由于固体组分和液体组分的混合而形成磷灰石晶体结构的能力。相反,某些现有技术材料提供了磷灰石晶体结构,例如通过将预先形成的羟基磷灰石与水泥形成材料混合。而且,某些这样的骨水泥形成材料(例如,可膨胀聚合物)缺乏尺寸稳定性并且是可渗透的,因此不适于防止炎性和/或非炎性介质从邻近关节间隙进入。

本文所用的关于可注射生物材料的术语“夺取”是指可注射生物材料快速转化为不可注射的材料。

本文所用的关于可注射生物材料的术语“稳定的”是指可注射生物材料或其前体保持足够的物理和/或化学性质的能力,使其在一段时间后仍能按照本文所述的规定发挥其预期功能。例如,稳定性包括但不限于可注射生物材料混合、凝固和/或固化的能力。

术语“软骨下骨板”和“皮质骨板”在此可互换使用,指的是紧靠钙化软骨下方的薄皮层薄片。

此处使用的术语“总多孔面积”是指由所有孔隙壁面积的总和来自于每一个增量侵入步骤的体积。假设圆柱形孔,每个步骤*i*的壁面积是 $A_i = 4V_i/D_i$ ,其中 $V_i$ =孔体积, $D_i$ =孔径。参见,Webb,P.An introduction to the physical characterization of materials by mercury intrusion porosimetry with emphasis on reduction and presentation of experimental data,Micromeritics Instrument Corp.(2001),其全部内容通过引用结合到本文中。

本文所用术语“治疗”,通常指的是试图获得所需的药理学,生物学和/或生理学效果。其效果可以是完全或部分地预防或延迟症状的发生,或者是部分或完全的稳定、改善或补救症状的治疗。

本文所用的术语“真密度”是指质量除以固体体积或真正的骨骼体积。真密度通常是在物质被缩小,小到其尺寸不能容纳内部空隙后确定的。参见,Webb,P.An introduction to the physical characterization of materials by mercury intrusion porosimetry with emphasis on reduction and presentation of experimental data,Micromeritics Instrument Corp.(2001),其全部内容通过引用结合到本文中。可以例如通过氦比重计(例如通过使用AccuPyc II 1340比重瓶)测量真密度。

本文所使用的关于可注射生物材料的术语“工作时间”是指(1)固体组分和液体组分的



混合与(2)可注射生物材料不再可行的点之间的最大时间量。如果在将固体成分和液体成分混合1分钟并注入退化骨区域(或替代物,如锯骨模型)后,注射生物材料在设定前流动以填充给药区域的孔隙率,则该注射生物材料是可行的。如果在将固体成分和液体成分混合1分钟并注入退化骨区域(或替代物如锯骨模型)后,注射生物材料在填充给药区域的孔隙率之前设置好,则注射生物材料不再可行。对工作时间的测试是本领域的技术人员已知的。例如,参见,ASTM C414-03在7.2,8.2(2012年重新核准),其全部内容通过引用结合到本文中。

### 骨结构

骨病常影响整个邻近关节。图1显示出了受骨病影响的关节的示意图。股骨101包括软骨102和股骨关节面103,而髌骨106显示在关节间隙110上方。图1的下部显示出了腓骨109和胫骨108,后者包括退化骨105的区域,套管104插入其中。胫骨关节面107的一部分由标注的111包围,其在图2A-E的示意图中更详细地示出,更详细地讨论如下。

软骨下骨在OA等骨疾病的发生和发展中起着至关重要的作用。本文所用术语“软骨下骨”是指位于钙化软骨远端的骨组件。软骨下骨包括软骨下骨板(又名皮质骨板)和软骨下骨小梁(又名松质骨)。软骨下骨板和松质骨没有被锐边分开,但仍然是不同的解剖实体。

如图2A-E所示,软骨下骨板是薄的皮质层,位于钙化软骨205的正下方。该骨板不是不可穿透的结构,而是具有明显的孔隙率。它被直接连接关节钙化软骨和软骨下小梁骨的通道所侵入。大量的动脉和静脉血管和/或神经(统称为202)穿透通道并将分支送入钙化软骨205。通道的分布和强度不仅取决于组织的年龄,还取决于关节内和关节间通过钙化软骨和软骨下骨传递的压缩力的大小。这些通道优先集中在关节的严重受压区域。通道形状和直径也随皮质板厚度的不同而不同。在板较厚的区域通道较窄,并且形成树状网状结构,而在软骨下骨板较薄的区域,通道往往较宽,类似于壶腹部。

来自软骨下骨板的是支撑小梁,它是构成和支撑骨小梁的结构,也包括更深的骨结构。软骨下骨小梁在正常关节中发挥重要的减震和支持作用,对钙化软骨的营养供给和代谢也很重要。相对于软骨下骨板207,软骨下骨小梁(未显示,但位于软骨下骨板207的关节间隙远端)更具有多孔性和代谢活性,包含血管、感觉神经和骨髓。软骨下骨小梁结构不均匀,随关节面203/208的距离而变化。它具有显着的结构和机械各向异性;也就是说,骨小梁表现出优先的空间取向和平行性。

软骨下骨是一种动态结构,独特地适应施加在关节上的机械力。除了骨密度模式和机械性能外,软骨下骨还能动态调整骨小梁取向和尺度参数,与主应力精确相关。机械应力也通过骨建模和重塑改变软骨下骨的轮廓和形状。软骨下骨和钙化软骨是动态应力承载结构,在关节承重中起互补作用。软骨下骨支撑覆盖关节软骨210,并在关节表面分布机械载荷,应力和应变逐渐过渡。软骨下骨较硬且柔韧性较差,往往会增加上覆软骨的负荷,导致继发性软骨损伤和退化。在关节软骨损伤或功能丧失后,传递到下面骨的负荷会显著增加。

关节软骨覆盖软骨下骨,并提供维持关节环境稳态的重要功能。它包括表浅的非钙化软骨210和更深的钙化软骨205。钙化软骨205可渗透小分子,并且在非钙化软骨210和软骨下骨之间的生化相互作用中起重要作用。它通过称为“潮标”(204)的边界与非钙化软骨210分离,该边界在组织切片中表现为嗜碱性线的动态结构。潮标204代表钙化软骨205的矿化前沿,并提供两个不同软骨区域之间的逐渐过渡。连续的胶原纤维穿过潮标,表明非钙化软

骨210和钙化软骨205之间有很强的联系。钙化软骨205和软骨下骨之间也有一个明显边界线,称为“水泥线”(206)。然而,与潮标204不同的是,没有连续的胶原纤维穿过水泥线。

鉴于关节软骨210和软骨下骨之间的密切接触,它们形成了一个紧密复合的功能单元,称为“骨软骨连接”(200)。骨软骨连接200特别复杂,由一层非钙化软骨210,潮标204,钙化软骨205,骨水泥线206和软骨下骨组成。

在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约50mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约40mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约30mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约20mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约15mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约10mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约9mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约8mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约7mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约6mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约5mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约4mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约3mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约2mm或更近的位置。在一些实施方案中,骨的受影响区域设在离受影响的骨骼区域的关节面约1mm或更近的位置。

#### 骨病的病因

关节软骨既无神经又无血管。因此,软骨不能直接产生疼痛,僵硬(例如,移动关节时疼痛的症状,运动范围丧失的症状,或运动范围缩小的体征),或骨病患者通常描述的任何症状。相反,软骨下骨,骨膜,关节周围韧带,关节周围肌肉痉挛,滑膜和关节囊都有丰富的神经支配,是骨病的痛感来源。此外,就疼痛,功能和病理而言,软骨下骨,关节软骨210和关节间隙211之间的交叉串扰(即,生物化学交流)对于与骨退化相关的骨病的发生和发展是至关重要的。任何组织的改变都会调节骨软骨连接200的其他部分的性质和功能。该地区存在强烈的压力转移和交叉串扰,这对关节的维持和退化起着重要作用。

钙化软骨205和软骨下骨板207的通透性允许交叉连通,并在软骨下骨和关节间隙211之间提供连接通道。体内研究表明,在软骨下骨重塑过程中,成骨细胞释放的前列腺素、白三烯和各种生长因子可达到覆盖关节软骨210。相反,关节软骨210释放的炎症和破骨细胞刺激因子也通过增加骨病中的骨重塑导致软骨下骨恶化。

在与骨退化相关的骨疾病期间,由软骨和软骨下骨组成关节的功能单位可以进行不受控制的分解代谢和合成代谢重塑过程,以适应局部生化和生物信号。软骨和软骨下骨的变化不仅仅是骨病的次要表现,而且是疾病的活跃成分,导致其严重程度。骨病期间,关节血管化和微裂纹的增加表明,促进分子通过滑膜和骨髓液从关节间隙移动到软骨下骨,反之亦然。两种组织产生的几种生物因子和信号分子可能从一个区域传递到另一个区域,影响邻近组织的稳态。分泌的细胞因子,生长因子和信号分子形成软骨-骨生化单位,通过WNT

(无翅型), BMP (骨形态发生蛋白), TGF- $\beta$  (转化生长因子 $\beta$ ) 和 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 信号通路等途径发挥调节作用, 改变骨病过程中关节的病理生理。软骨和软骨下骨的紧密接近为通过分子相互作用诱导彼此的物理和功能改变提供了充足的机会。

由于关节间隙211和软骨下骨之间的生物化学串扰, 引起退行性生化反应, 随着生物力学变化开始在骨病患者中表现出来, 这种反应就会加速。软骨下皮质板207和松质骨在骨病进展过程中表现出明显的行为差异, 因此必须将其视为单独的单元来理解关节变形。在骨病进展过程中, 软骨下骨转换比正常骨转换可增加20倍。与正常软骨下骨相比骨病患者的软骨下骨分泌高水平的碱性磷酸酶 (ALP), 骨钙素, 骨桥蛋白, IL-6, IL-8和进行性强直蛋白同系物 (ANKH), 尿激酶纤溶酶原激活物 (uPA), 前列腺素和生长因子, 如 IGF-1, IGF-2 和 TGF- $\beta$  以及 I 型胶原。这些分泌的生化因子有助于骨形成, 表明软骨下骨成骨细胞的骨合成代谢活性增强, 例如骨赘的形成和骨病中观察到的硬化。然而, 软骨下骨的骨形成活性不一定伴随着等效的矿化。未矿化的未成熟的新骨形成时可能导致软骨下骨 (无论是在皮质板水平还是在骨小梁水平) 产生丰富的类骨质, 从而对组织性质产生相反影响。

存在于滑液中的炎症介质也有助于软骨细胞的分解代谢, 从而使软骨细胞外基质重塑。从软骨细胞分泌并存在于滑膜液中的趋化因子, 细胞因子和蛋白酶改变了软骨的生化 (例如分解代谢) 和功能能力。在骨病期间, 软骨细胞分泌 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL1 $\beta$  转化酶 (caspase-1) 和 I 型 IL-1 受体。软骨细胞合成 IL-1 的浓度能够诱导蛋白水解酶的激活, 如基质金属蛋白酶 (MMPs), 聚集蛋白聚糖酶, 具有血小板反应蛋白基序 (ADAM-TS) 的解聚素和金属蛋白酶以及受影响软骨中基质耗竭区域中的其他分解代谢基因。此外, 在这些条件下, 刺激软骨细胞表达与软骨细胞肥大和终末分化相关的分子, 如 VEGF, runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 和 MMP-13。血管生成因子 (如 VEGF) 的分泌增加关节软骨深层内的血管分布, 同时产生微裂纹, 促进炎性和/或非炎性介质的分子运输, 通过关节空间扩散到关节软骨和软骨下骨中。细小的, 无髓鞘的神经 (C-纤维和交感神经) 也伴随着这些血管和正常的神经组织, 这是骨疾病疼痛的来源。此外, IL-6 与其他细胞因子如 IL1 $\beta$  结合, 可将成骨细胞从正常表型转变为硬化表型。所有这些因素都强化和刺激了骨重塑过程, 改变了软骨下骨的生理机能。

这些炎性和/或非炎性介质也影响滑膜组织和软骨下骨中的痛觉感受器。伤害感受器包括广泛的配体受体, 它们能改变这些神经元的特性, 因此需要较低的阈值来激发动作电位, 甚至在受体接合时自发地激发。这些配体包括但不限于细胞因子、趋化因子、神经肽和前列腺素, 它们在一些实施方案中都构成受累关节中生化环境的一部分。由于这种外周致敏, 正常范围内的关节运动变得疼痛 (称为机械性异常性疼痛的现象)。

此外, 诸如缓激肽, 组胺, 前列腺素, 乳酸, P 物质, 血管活性肠肽, 神经生长因子 (NGF) 和降钙素基因相关肽 (CGRP) 等炎症介质, 从例如滑膜成纤维细胞释放到关节中并迁移到软骨下骨和滑膜, 激活位于这些区域的痛觉感受器。这些介质降低了痛觉感受器的发射阈值, 使它们更有可能对非伤害性和伤害性疼痛刺激作出反应。随着疾病的进展, 越来越多的这些介质在关节中积聚, 迁移到软骨下间隙和滑膜中, 从而引发疼痛产生的自我延续循环。

随着损伤的进展, 软骨下骨的退行性变在影像学上可见。X 光片上关节损伤的严重程度可能与所经历的疼痛严重程度无关。然而, 利用核磁共振 (“MRI”) 等成像方式可见, 诸如骨退化、关节下骨损耗、滑膜骨质变性, 关节下骨质减少, 滑膜炎和积液等显着的结构关联与膝关节疼痛有关。

不受理论的局限,发明人认为本文公开的方法和组合物,任选地从软骨下骨吸入炎性和/或非炎性介质后,用可注射的生物材料填充受影响区域的相互连接的孔隙,来破坏关节间隙和骨的受影响区域之间的生物通信来解决这些问题。图2A显示出了可以根据本公开处理的患病关节的示例性实施方案的示意图。图2A-E是图1所示的退化骨105区域的标注。骨软骨交界处200包括退化骨209的区域,被血管/和/或神经202包围。一种由炎症和/或非炎症介质201组成的生物液体从关节间隙211穿过关节表面203/208,穿过关节软骨210、潮标204、钙化软骨205,并在骨退化区209处聚集。在图1所示的示例性实施方案中,如图2B所示,将套管211插入退化骨209的区域,并通过套管211抽吸生物流体201并将其移除。如图2C所示,根据本公开制备的可注射生物材料212填充受影响区域中的退化骨209的区域。如图2D所示,可注射生物材料固化形成低孔隙率、高维稳定性材料213,从而停止与关节间隙之间的生化通信并保护受影响区域和周围细胞。此外,可注射的生物材料在一段时间内保持原位,防止这些炎性和/或非炎性介质的再渗透。因此,通过阻断连接骨和关节间隙受累区域的孔隙,暂时阻断生化交流,使骨的受累区域恢复。通过屏蔽受影响的骨骼区域,可以防止关节的关节炎退化。后者是由于阻止了骨和邻近半月板及软骨组织的进一步生化变性,并减轻了关节的相应疼痛。此外,根据本文公开的某些可注射生物材料可用于受影响区域的生物力学修复,例如通过提供骨传导和/或骨诱导性表面以促进自然骨愈合,将损伤/修复平衡移向修复。图2E显示该示例性实施方案,其中破骨细胞214再吸收固化的可注射生物材料213,并且成骨细胞215开始构建新的健康骨216。重要的是,本文公开的组合物和方法实现了其预期效果,即停止与骨退化相关的骨病的潜在原因,而不进一步改变正在治疗的关节的生物力学稳定性或术后引起可能与气体体积膨胀相关的显著疼痛。因此,与现有的骨病治疗方法相比,它们提供了一些优势。

#### 鉴别治疗用骨

在一些实施方案中,根据本文公开的组合物和方法,通过MRI鉴定进行治疗的受影响区域。在进一步的实施方案中,MRI是一种膝关节MRI。在进一步的实施方案中,MRI是一种踝关节MRI。在一些实施方案中,MRI是负重MRI。在一些实施方案中,MRI是开放式MRI。在一些实施方案中,MRI是直立开放MRI。在进一步的实施方案中,MRI是低场强MRI。在进一步的实施方案中,MRI是一种超高场MRI。在进一步的实施方案中,MRI是肢体MRI。在进一步的实施方案中,MRI是全身扫描MRI。在一些实施方案中,通过T2加权脂肪饱和MRI图像上的高信号,识别受影响区域。在一些实施方案中,MRI T1 $\rho$ 值是早期软骨退化的指标,在覆盖骨髓病变的软骨中升高,软骨退化水平与骨髓病变中的T1 $\rho$ 信号强度成正比。在进一步的实施方案中,使用钆-99骨扫描来识别受影响的区域。在一些实施方案中,使用荧光镜识别受影响的区域。

不受理论的局限,发明人认为,与关节炎相关的受影响的骨区域距离关节不到50mm, 10mm或1mm。因此,在一些实施方案中,使用本文公开的方法和组合物来治疗位于距关节约0mm至约50mm之间骨的受影响区域。在进一步的实施方案中,骨的受影响区域位于距关节约0mm至约10mm之间。在另一实施方案中,骨的受影响区域位于距关节约0mm至约1mm之间。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约40mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约20mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约15mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约10mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约9mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约8mm或更近。在一些实施方

案中,骨的受影响区域距关节约7mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约6mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约5mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约4mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约3mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约2mm或更近。在一些实施方案中,骨的受影响区域距关节约1mm或更近。

在一些实施方案中,骨的受影响区域包括骨髓病变。在进一步的实施方案中,骨的受影响区域包括退化的松质骨间隙。

在一些实施方案中,通过研究先前捕获的受影响区域的图像来确定可注射生物材料的给药位置。在进一步的实施方案中,在手术期间使用附加指导确定可注射生物材料的给药位置。在一些实施方案中,附加指导包括实时荧光成像。在进一步的实施方案中,附加指导包括机器人装置。在其他实施方案中,附加指导包括支架,用于将关节保持在与先前捕获的关节图像一致的位置。在其他实施方案中,附加指导包括使用一个或多个标签。在一些实施方案中,一个或多个标签包括放射性标签。在一些实施方案中,放射性标签包括锝-99。在一些实施方案中,一个或多个标签包括放射性标签基准标记。

#### 可注射的生物材料

本文公开的可注射生物材料是一种生理上相容的材料,其能填充骨的受影响区域中的孔隙,这是骨病的症状。可注射生物材料具有某些特性,即它是可注射的,可混合的,可流动的,具有内聚性,并粘附于骨骼,使生物材料能够填充存在于骨骼受影响区域的孔隙,而不容易被体液清除。

本文公开的可注射生物材料包括固体成分和含有碳水化合物的液体成分。本文公开的可注射生物材料可以通过固体组分和液体组分的混合来制备。本文公开的可注射生物材料在固体组分和液体组分混合后,凝固形成磷灰石晶体结构。固体组分提供固体材料或材料混合物,当与液体组分结合时反应以形成磷灰石晶体结构。液体组分为固体组分的组分混合和反应形成磷灰石晶体结构提供了介质。在一些实施方案中,固体组分包含磷酸钙。在一些实施方案中,液体组分包含水。在一些实施方案中,固体组分和/或液体组分包括附加组分。

本文公开的可注射生物材料的液体成分包括碳水化合物。虽然碳水化合物本身可以不是液体,但当作为液体组分的组分提供时,它溶解或悬浮在其中。在一些实施方案中,液体组分为凝胶或水凝胶形式。

在一些实施方案中,固体组分和液体组分以特定比例混合以获得所需的可注射生物材料。在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为3比1。在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为2比1。在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为1.5至1。在一些实施方案中,固体组分与液体组分的质量比约为1比1。在一些实施方案中,这些固体成分与液体成分的比例提供了可注射的生物材料。虽然公开了包含固体组分和包含碳水化合物的液体组分的现有技术材料,但是这些材料利用了比根据本公开可以实现的更高的粉液比。参见,例如,Ahmadzadeh-Asl,S.et al.Adv.Applied Ceramics 2011, 110 (6), 340-45,其全部内容通过引用结合到本文中。因此,这些材料是不可混合的,并且需要很高的挤压力来分配整个材料,从而导致不能以微创方式轻易地使用目前已有的可注射生物材料。相反,本文公开的可注射生物材料易于混合,使得可以在单独的注射器中分别提

供固体组分和液体组分,所述注射器彼此耦合,所述内容物混合,然后直接施用至退化骨区域。这一特性不仅为生物材料的注射提供了额外的便利性,易于混合和使用,而且减少了污染的机会。相比之下,现有技术材料使用更高的粉末与液体比例,缺乏可混合性,因此它们必须在容器中人工混合,然后通过刮刀等工具转移到注射器中,从而增加了污染并损害了无菌性。参见,例如,Ahmadzadeh-Asl,S.et al.Adv.Applied Ceramics 2011,110 (6) ,340-45,at 341,其全部内容通过引用结合到本文中。发明人惊奇地发现,与传统观点相反,根据本文公开的可注射生物材料降低了粉末液比,仍然能够在商业上可行的时间内凝固,保持粘性,与骨粘合,并提供发明人所希望的降低了的强度以防止生物力学稳定。而且,利用碳水化合物的现有技术材料开始于能够凝固的材料,并且添加了碳水化合物以改善流动性和可注射性。与此相反,发明者惊奇地发现,在不能凝固或保持粘性的可注射生物材料中加入一种碳水化合物,令人惊讶的是,由于该碳水化合物的加入,它能够凝固并保持粘性。

根据本公开的,示例性可注射生物材料可包含磷酸钙粘固剂,可固化聚合物如赖氨酸二异氰酸酯,蛋白质如胶原,明胶及其衍生物,和碳水化合物,如透明质酸,藻酸盐,壳聚糖,纤维素,葡聚糖及其衍生物。在进一步的实施方案中,可注射生物材料包括骨,如自体移植物、同种异体移植物和人工或合成骨替代物。在某些实施方案中,可注射生物材料包含一种或多种富血小板血浆(“PRP”)、贫血小板血浆(“PPP”)、骨髓抽吸物(“BMA”)、骨髓抽吸物浓缩物(“BMAC”)或细胞裂解物。在进一步实施方案中,可注射生物材料包括至少一种聚合物材料。

在一些实施方案中,本文公开的可注射生物材料是自固化的。在一些实施方案中,本文公开的自固化可注射生物材料凝固并固化,形成具有主要相羟基磷灰石的完全固化可注射生物材料。在进一步实施方案中,主相至少95%为羟基磷灰石。参见,ASTM F1185-03 (reapproved 2014) ,at 4.2;ISO 13175-3 (2012) ,at 4.2.2,以上所有内容均通过引用结合到本文中。

在一些实施方案中,本公开的可注射生物材料是可流动的。相比之下,现有技术的材料缺乏足够的流动性,无法注入退化骨区域,使其流入并大量填充该区域。虽然一些现有技术的材料能够注入,但是当背压停止时它们就停止流动。因此,这些材料容易停留在直接施用位置,而不是流动来填补退化骨区域中增加的孔隙。此外,这些材料容易在给药之前完全凝固,和/或残留在仪器内。因此,这些材料不能提供必要的屏障来防止炎性和/或非炎性介质从相邻的关节间隙流入。

在一些实施方案中,固体成分可以包含多种成分。在一些实施方案中,这些组分反应形成磷灰石晶体结构。在一些实施方案中,所述组分是固体粉末。在一些实施方案中,所述成分的粉末颗粒大小可根据所需的凝固时间和固化时间进行调整。例如,可以减少组分的粒度使其与其他组分的更快反应,从而缩短初始凝固时间。相反,可以增加组分的粒度使其与其他组分较慢反应,从而延长初始凝固时间。参见,Bohner,M.et al.J.Mater.Chem.2008,18,5669-75,以上所有内容均通过引用结合到本文中。在一些实施方案中,固体组分基本上不含碳酸氢盐。

根据本发明的某些方面,可注射材料可注入骨中以填充患病区域。在一些实施方案中,生物材料的注射量从约1至约6mL。在一些实施方案中,生物材料的注射量约为6mL。在一些实施方案中,生物材料的注射量约为5mL。在一些实施方案中,生物材料的注射量约为4mL。

在一些实施方案中,生物材料的注射量约为3mL。在一些实施方案中,生物材料的注射量约为2mL。在一些实施方案中,生物材料的注射量约为1mL。不受理论的局限,发明人认为本文公开的可注射生物材料保护骨骼的受影响区域不受炎症和/或非炎症介质的影响,从而阻止、防止和/或逆转关节的退化。这是由于防止了骨和邻近半月板及软骨组织的进一步生化变性,并减轻了关节的相应疼痛。此外,本文公开的可注射生物材料为受影响区域提供生物力学修复,例如通过提供骨传导和/或骨诱导表面以促进天然骨愈合过程,将损伤/修复平衡转向修复。重要的是,本文公开的可注射生物材料实现了其所关注的效果,即停止骨病的潜在原因,而不进一步改变所治疗的关节的生物力学稳定性或可能与气体的体积膨胀有关的术后疼痛。

在一些实施方案中,可注射生物材料具有合适的粘度,从而可以通过10-21号套管从注射器将其注入患处。在一些实施方案中,注射生物材料的压力不超过平均的手和手指强度。平均手和手指强度的典型范围在本领域中是已知的,例如DiDomenico, A.; Nussbaum, M.A. *Ergonomics* 2003, 46 (15), 1531-1548, 以上所有内容均通过引用结合到本文中。在一些实施方案中,可注射生物材料能够从不超过约15磅的注射器中挤出。以6毫升/分钟的挤压力挤出。在一些实施方案中,可注射生物材料能够从不超过约10磅的注射器中挤出。以6毫升/分钟的挤压力挤出。在一些实施方案中,可注射生物材料能够从不超过约5磅的注射器中挤出。以6毫升/分钟的挤压力挤出。

在一些实施方案中,有足够的流动性,使得可注射的生物材料在最初凝固和/或固化之前流入受影响区域的骨中的孔隙中。在一些实施方案,对注射器施加压力使得注射用的生物材料流入骨中的孔隙。

在一些实施方式中,本文公开的可注射生物材料是有粘性的。可注射生物材料的内聚性表现在,材料在制备和将材料注入受影响区域所需的时间内抵抗相分离(例如脱水)的能力,同时保持足够的流动性,使得材料仍然可以被注射并流过退化骨的孔隙。

在一些实施方案中,液体组分具有可以改变的pH,以达到期望的工作、初始凝固和固化时间。参见,例如,Bohner, M. et al. *J. Mater. Chem.* 2008, 18, 5669-75, 其全部内容通过引用结合到本文中。例如,如果需要减少的工作时间,较短的初始凝固时间和固化时间,则可降低液体组分的pH值。在一些实施方案中,液体组分的pH值在约3~8之间。在一些实施方案中,液体组分的pH值在约3~7之间。在一些实施方案中,液体组分的pH值在约3~6之间。在一些实施方案中,液体组分的pH值在约4~6之间。在一些实施方案中,液体组分的pH值在约5~6之间。在一些实施方案中,液体组分的pH值约为6。在一些实施方案中,使用pH调节剂来调节液体组分的pH。在一些实施方案中,pH调节剂选自有机酸和无机酸。在一些实施方案中,pH调节剂选自柠檬酸、甲酸、乙酸及其混合物。在一些实施方案中,pH调节剂s选自自由盐酸、磷酸、硝酸及其混合。在一些实施方案中,pH调节剂是柠檬酸。

在一些实施方案中,液体组分包含一种盐,其浓度也可以被改变以改变所需的工作、初始凝固和固化时间。例如,如果需要减少的工作时间、初始凝固时间和固化时间,可以提高凝固溶液的盐浓度。在一些实施方案中,液体溶液包含浓度约为0.01至10M的盐。在其他实施方案中,盐的浓度约为0.1至约1M。在其他实施方案中,盐的浓度约为0.2至约0.4M。在其他实施方案中,盐的浓度约为0.3M。在一些实施方案中,盐是磷酸氢钠、硅酸钠、氯化钠、氢氧化钙或其混合物。在一些实施方案中,盐是磷酸二氢钠。



在一些实施方案中,液体组分包含水作为溶剂。

在一些实施方案中,可注射的生物材料固化形成具有钙与磷的摩尔比(“Ca/P”)为约1~2的材料。在进一步实施方案中,该材料具有约1.3~1.8的摩尔Ca/P比。在进一步实施方案中,该材料具有约1.4~1.7的摩尔Ca/P比。在进一步实施方案中,该材料具有约1.5~1.7的摩尔Ca/P比。在进一步实施方案中,该材料具有约1.5~1.667的摩尔Ca/P比。Ca/P比值可根据本领域已知的方法确定。在一些实施方案中,从理论上计算Ca/P比。在一些实施方案中,使用电感耦合等离子体质谱(“ICP-MS”)计算Ca/P比。在一些实施方案中,使用离子色谱法计算Ca/P比。

在一些实施方案中,本文公开的可注射生物材料粘附于骨。在一些实施方案中,可注射生物材料表现出足够的骨粘附性,使其在给药部位驻留足够的时间以防止炎性和/或非炎性介质的再次渗透,并使受损的骨愈合。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留约30天。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留约2个月。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留约3个月。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留约6个月。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留长达一年左右。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留约18个月。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留长达2年左右。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留约30个月。在一些实施方案中,可注射生物材料在给药部位基本保持驻留长达3年左右。在一些实施方案中,可注射生物材料驻留在给药位置,直到可注射生物材料完全被再吸收。再吸收是破骨细胞分解可注射生物材料并用健康骨替代它的过程。参见,例如,Sheikh, Z. et al. Materials, 2015, 8, 7913-25.。在一些实施方案中,可注射生物材料粘附在骨骼上,可以防止炎性和/或非炎性介质渗入受影响的区域,以此愈合和/或修复退化的骨骼。在一些实施方案中,退化性骨愈合和/或修复可防止进一步的软骨损伤。

在一些实施方案中,可注射生物材料随着时间的推移是可吸收的。在一些实施方案中,可注射生物材料在30天左右被完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在约2个月内完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在约3个月内完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在约6个月内完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在一年左右被完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在约18个月内完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在约2年内被完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在约30个月内完全吸收。在一些实施方案中,可注射生物材料在3年左右被完全吸收。

在一些实施方案中,本发明公开的可注射生物材料在凝固或固化时是大孔隙的。大孔隙允许来自宿主的内源性细胞浸润。不受理论的局限,发明者认为大孔隙允许内源性细胞刺激受影响区域的骨重建。

在一些实施方式中,可注射生物材料在凝固和固化之前具有足够的内聚力,使其保持在给药位置,但缺乏受影响区域所需的后固化抗压强度,这需要实质上改变或支撑关节的现有生物力学或生物力学稳定。

因此,改变骨内应力分布的注射也将改变骨的结构。此外,根据Wolff定律,单独为退化骨区域提供生物力学支撑不能解决骨病和/或其症状的根本原因,并且可能导致关节其他区域的生物力学不稳定性增加。因此,本公开的方法和组合物不能通过提供生物力学支持



直接防止骨的进一步退化,而是为受影响的骨骼区域提供一个生化环境,保护骨骼免受炎性和/或非炎性因子的影响,从而使允许骨骼在没有Wolff定律干预的情况下自然愈合并恢复其原始状态。

在一些实施方案中,本文公开的可注射生物材料包括骨诱导成分。根据本文公开,骨诱导性可注射生物材料能够使前体细胞(例如骨祖细胞或间充质干细胞)分化成成骨细胞,然后在受影响区域开始新的骨形成,从而促进健康骨的重建。适用于本文公开的可注射生物材料的示例性骨诱导成分包括但不限于骨形态发生蛋白(“BMP”,例如rhBMP-2)、转化生长因子(例如转化生长因子 $\beta$ 或“TGF- $\beta$ ”)、成骨细胞、聚合物如透明质酸、聚甲基丙烯酸羟乙酯(“聚-HEMA”);金属如钛;多种形式的磷酸钙包括羟基磷灰石、磷酸三钙、天然陶瓷如羟基磷灰石和羟基磷灰石/碳酸钙,包括来源于珊瑚外骨骼的;磷酸三钙、磷酸二钙、无水磷酸二钙、羟基磷灰石、双相磷酸钙、磷酸八钙等合成非烧结磷酸钙陶瓷;焦磷酸、羟基磷灰石、双相磷酸钙、磷酸三钙、碳酸磷灰石等合成烧结磷酸钙;其他陶瓷如氧化铝、**Bioglass®**和**Pyrex®**等;复合材料,如羟基磷灰石/聚(D,L-丙交酯),以及其他各种已知的,可通过本领域技术诱导骨形成的有机物质。在一些实施方案中,该生物材料是用稀释的I型胶原悬浮液制备的。在一些实施方案中,骨诱导成分是BMP。在一些实施方案中,骨诱导成分是TGF- $\beta$ 。在一些实施方案中,骨诱导成分选自PRP、PPP、BMA条件培养基、BMAC、BMA裂解液、细胞裂解液及其混合物。

在一些实施方案中,本文公开的可注射生物材料包括骨传导成分。根据本公开的骨传导性可注射生物材料提供用于新骨生长的支架或框架,这些新骨由天然骨延续,从而促进健康骨的重建。天然骨的成骨细胞在形成新骨时,由骨传导性可注射生物材料支撑。适用于本文公开的可注射生物材料的示例性骨传导性组分包括但不限于脱矿骨基质(“DBM”),胶原蛋白,自体移植物,同种异体移植物,合成支架及其混合物。

在一些实施方案中,通过骨髓,血浆,患者的颗粒骨或市售材料提供骨传导性和/或骨诱导性。在一些实施方案中,通过羟基磷灰石,磷酸三钙,CaSO<sub>4</sub>和/或本领域技术人员已知的其他材料提供骨传导性和/或骨诱导性。

在一些实施方案中,本文公开的可注射生物材料具有足够的工作时间,以允许本领域的技术人员在将可注射生物材料转变为不再可注射的材料之前,将固体组分和液体组分混合后,将可注射生物材料施用至患者的受影响区域。

在一些实施方案中,本文公开的可注射生物材料的性质是在注射后获得的。例如,在一些实施方案中,可注射生物材料在注射前对骨的粘附性较小,但在注射到受影响的区域后对骨的粘附性更强。在一些实施方案中,可注射生物材料在初始凝固后对骨的粘附性更强。在一些实施方案中,可注射生物材料在固化后对骨的粘附性更强。

在一些实施方案中,可注射生物材料的凝固或固化没有明显的放热。在一些实施方案中,可注射生物材料的凝固或固化是等温的。在原位注射生物材料凝固和/或固化过程中释放热量可导致周围组织损伤,因此等温凝固和/或固化的可注射生物材料可防止对这些组织的损伤。

在一些实施方案中,碳水化合物选自葡聚糖、藻酸盐、羧甲基纤维素和透明质酸。在一些实施方案中,碳水化合物是透明质酸。在一些实施方案中,在可注射生物材料中包含透明质酸改善了可注射生物材料的可混合性、流动性和内聚力,同时提供了一种凝固和固化形

成磷灰石晶体结构的材料。在一些实施方案中,在可注射生物材料中包含透明质酸削弱了可注射生物材料以防止生物力学稳定。在一些实施方案中,本文公开的包括透明质酸的可注射生物材料表现出抗炎特性,可抑制破坏软骨下骨的炎症环境。

在一些实施方案中,可注射的生物材料与骨结合。在进一步的实施方案中,可注射的生物材料附着在骨上。在进一步的实施方案中,可注射生物材料粘附在骨上。在一些实施方案中,化学键通过原位生物过程形成。

[0001] 在某些实施方案中,可注射生物材料为流体形式。在进一步的实施方案中,可注射生物材料在室温下呈粘性液体的形式,其粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 和约 $30\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $25\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $24\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $23\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $22\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $21\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $20\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $19\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $18\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $17\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $16\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $15\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $14\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $13\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $12\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $11\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,粘度在约 $5\text{Pa} \cdot \text{s}$ 至约 $10\text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。在一些实施方案中,在混合固体组分和液体组分后立即测量粘度。在进一步实施方案中,可注射生物材料为半固体形式。在进一步实施方案中,可注射生物材料为凝胶形式。在进一步的实施方案中,可注射生物材料是水凝胶的形式。在进一步的实施方案中,可注射生物材料是分散体的形式。在进一步的实施方案中,可注射生物材料呈浆状。

在一些实施方案中,可注射生物材料在制备和/或注射后仍保持其原始注射状态。在进一步的实施方案中,在制备和/或注射后,可注射生物材料最初设定为较低流体状态。

在一些实施方式中,可注射生物材料在制备和/或注射后从液体转化为半固体。在一些实施方案中,在一段工作时间内,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化为半固体。在一些实施方案中,在初始凝固时间内,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化成半固体。在一些实施方案中,在固化时间内,可注射生物材料经过制备和/或注射后,从液体转化为半固体。在一些实施方案中,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化为凝胶。在一些实施方案中,在一段工作时间内,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化为凝胶。在一些实施方案中,在初始凝固时间内,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化为凝胶。在一些实施方案中,在固化时间内,可注射生物材料经过制备和/或注射后,从液体转化为凝胶。在一些实施方案中,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化为固体。在一些实施方案中,在一段工作时间内,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化为固体。在一些实施方案中,在初始凝固时间内,可注射生物材料在制备和/或注射后,从液体转化为固体。在一些实施方案中,在固化时间内,可注射生物材料经过制备和/或注射后,从液体转化为固体。

在一些实施方案中,用注射器提供可注射生物材料。在一些实施方案中,用注射器提供可注射生物材料,该注射器连接套管。在一些实施方案中,将可注射的生物材料注入骨中,

在原位形成可注射的生物材料。在一些实施方案中,在注射可注射的生物材料之前,在骨骼中创建一个开口。

在一些实施方案中,可注射生物材料在注射器中形成。在一些实施方案中,固体组分被放置在第一注射器中。在一些实施方案中,液体组分被置于第二注射器中。在一些实施方案中,第一和第二注射器中的至少一个包含集成混合系统。在一些实施方案中,将第二注射器的内容物注射到第一注射器中,从而将固体组分和液体组分混合形成可注射生物材料。在一些实施方案中,在第一和第二注射器之间通过反复挤压混合固体组分和液体组分。在一些实施方式中,通过使用集成混合系统混合固体组分和液体组分。集成的混合系统在本领域是已知的,如**Medmix®**P系统和F系统。参见,例如,Bone-Cement Delivery System (P-System),可见于<http://www.medmix.ch/portfolio-item/bone-cement-delivery-system-p-system/> (2017年4月20日最后一次访问)。在一些实施方案中,第一注射器与第二注射器连接。在一些实施方案中,耦合是由鲁尔锁。在一些实施方案中,鲁尔锁随后被断开,第一个注射器盖上端盖。在一些实施方案中,然后使用集成混合系统将第一注射器中的混合物混合以形成可注射生物材料。<http://www.medmix.ch/portfolio-item/bone-cement-delivery-system-p-system/>

在一些实施方案中,可注射的生物材料和/或其中储存有其或其前体的容器是无菌的。在一些实施方案中,无菌性包括物体具有 $10^{-3}$ 或更低的无菌保证水平(SAL)的条件。在进一步的实施方案中,无菌性包括一个物体具有 $10^{-6}$ 或更小的SAL的条件。在一些实施方案中,SAL是按照FDA现行的医疗器械指导方针确定的。在一些实施方案中,可注射材料无菌可长达5年。

在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为3个月左右。在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为6个月左右。在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为1年左右。在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为18个月左右。在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为2年左右。在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为3年左右。在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为4年左右。在一些实施方案中,可注射生物材料的保质期至少为5年左右。

### 治疗方法

本文公开的组合物和方法可用于治疗患者的骨骼退行性病变。在一些实施方案中,将退化骨置于骨的受影响区域中。在一些实施方案中,受影响的区域或骨骼是由于炎症和/或非炎症介质而表现出炎症和/或降解变化的骨区域。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗患者的骨病。

在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗受影响区域的关节疼痛。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗患处的骨痛。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗受影响区域中的关节炎疼痛。在一些实施方案中,患处是膝盖。在进一步的实施方案中,患处是臀部。在进一步的实施方案中,患处是肩部。在进一步的实施方案中,患处是脚踝。在进一步的实施方案中,患处是手腕。在进一步的实施方案中,患处是肘。在进一步的实施方案中,患处是椎骨。在进一步的实施方案中,患处是手。

在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗受影响关节中的关节炎。在一些实施方案中,关节炎是OA。在一些实施方案中,关节炎是类风湿性关节炎。在一些实施

方案中,受影响的关节是膝盖。在进一步的实施方案中,受影响的关节是髋关节。在进一步的实施方案中,受影响的关节是肩部。在进一步的实施方案中,受影响的关节是踝关节。在进一步的实施方案中,受影响的关节是手腕。在进一步的实施方案中,受影响的关节是肘。在进一步的实施方案中,受影响的关节是椎骨。在进一步的实施方案中,受影响的关节是手的近端连接。

在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗缺血性坏死。在一些实施方案中,受影响的关节是膝盖。在进一步的实施方案中,受影响的关节是髋关节。在进一步的实施方案中,受影响的关节是肩部。在进一步的实施方案中,受影响的关节是踝关节。在进一步的实施方案中,受影响的关节是手腕。在进一步的实施方案中,受影响的关节是肘。在进一步的实施方案中,受影响的关节是椎骨。在进一步的实施方案中,受影响的关节是靠近手的关节。

在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗受影响的骨中的局灶性骨软骨缺损。在一些实施方案中,受影响的骨是股骨髁。在一些实施方案中,受影响的骨头是肱骨头。在一些实施方案中,受影响的骨头是距骨。在一些实施方案中,受影响的骨头是肱骨的头状骨。在一些实施方案中,受影响的骨头是肘。在一些实施方案中,受影响的骨头是手腕。在一些实施方案中,受影响的骨头是手骨。在一些实施方案中,受影响的骨头是脚趾。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗股骨头。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗髌臼。在一些实施方案中,本文公开的方法和组合物可用于治疗胫骨平台。

在一些实施方案中,受影响的区域是紧密的、充满压力的环境。因此,在一些实施方案中,本文公开的方法包括减压或抽吸受影响区域的步骤。在一些实施方案中,进入受影响区域的步骤提供了受影响区域的减压。

在一些实施方案中,本公开的组合物和方法用于填充与骨结构稳定性无关的骨性空洞或间隙。通常,这些骨性空洞或间隙不是生物力学完整性差的区域。

在一些实施方案中,所公开的方法破坏了关节间隙和骨的受影响区域之间的生化通信。在一些实施方案中,本文公开的方法在骨的受影响区域周围提供保护性涂层,以抵抗炎性和/或非炎性介质。在一些实施方案中,本文公开的方法减少了与关节炎相关的疼痛。在一些实施方案中,本文公开的方法减缓了关节炎的进展。在一些实施方案中,本文公开的方法阻止了关节炎的进展。

在一些实施方案中,可注射生物材料通过套管施用到患处。在一些实施方案中,套管在10到21号之间。在一些实施方案中,套管具有一体式套管针,以使其能穿透皮质骨并在受影响的区域形成流体密封。在一些实施方案中,套管是有孔的,以允许定向注射可注射生物材料。在一些实施方案中,套管是无孔的。在某些情况下,套管被设计成便于通过位于套管壁上的开扣或通过套管远端的开口定向注射生物材料。按照这种类型的系统,提供了一个外套管和两个内套管。外套管在套管壁上设有开口和远端开口。第一根内套管在套管壁上设有开口和闭合的远端尖端。第二内套管包括远侧尖端中的开口,并且套管的侧壁中没有开口。然后,使用者可以选择第一内套管插入到外套管中,当第一内套管连接到注射器上并挤出内容物时,实现定向注射。或者,用户可以选择第二内套管插入到外套管,当第二内套管连接到注射器上并挤出内容物时,实现通过远侧尖端的注射。开口式和非开口式插管,如

Ranfac骨髓穿刺和通路针在本领域中是已知的。在一些实施方案中,因为需要对难以进入的受影响区域创建更多侵入性通路,所以套管是可控制的,以最大限度地减少手术损伤。可控制的套管,例如Osseon®Osseoflex®SN,在本领域中是已知的。在一些实施方案中,在注射之后,将注射器从套管中取出,用一根棒将放置在套管中的剩余的可注射生物材料推入受影响的区域。

在一些实施方案中,在不增加术后骨内压力的情况下注射可注射的生物材料,导致没有或最小的术后疼痛,这可能与气体的体积膨胀有关。

根据某些方面,通过视觉模拟评分(VAS)或任何其他临床接受的疼痛和/或功能测量,该程序在≤7天内产生的短期疼痛会减轻,并持续减轻疼痛和防止≥2年的全关节置换。

在一些实施方案中,要求患者术后保持部分负重和使用辅助器材。在一些实施方案中,术后允许完全承重。在一些实施方案中,需要进行干预后物理治疗。在一些实施方案中,患者需要常规的干预后护理、观察和随访。

在一些实施方案中,本文公开的方法还包括对骨骼施加电刺激以促进骨骼愈合。

### 试剂盒

另一方面,本公开提供了一种试剂盒,其中包括一种可注射的生物材料及其使用说明。

在一些实施方案中,该试剂盒件包括两个注射器。在一些实施方案中,固体组分置于第一注射器中,液体组分置于第二注射器中。当混合在一起时,固体成分和液体成分形成可注射的生物材料。在一些实施方案中,该试剂盒中至少一个注射器包括集合混合装置,用于原位混合来自第一和第二注射器中的每一个预测量的成分,其中所述成分在组合后形成可注射生物材料。在一些实施方案中,该试剂盒包括鲁尔锁。在一些实施方案中,该试剂盒包括一个端盖。在一些实施方案中,试剂盒包括套管。在一些实施方案中,所述套管包括内套管和外套管。在一些实施方案中,将至少一个注射器放置在密封袋中以保护内容物不受潮。在一些实施方案中,袋子由尼龙加强的箔片构成。

在一些实施方案中,该试剂盒包括骨骼工具。在一些实施方案中,骨骼工具适应于在骨中提供可注射生物材料注入的通道。在一些实施方案中,该试剂盒包括骨骼填充物,以密封注入可注射生物材料的骨中通道的开口端。在一些实施方案中,包含骨骼工具的试剂盒与包含固体组分和液体组分的试剂盒不同。

在一些实施方案中,至少有一部分试剂盒及其内容物是无菌的。在一些实施方案中,无菌包括物体具有 $10^{-3}$ 或更低的无菌保证水平(SAL)的条件。在进一步的实施方案中,无菌包括一个物体具有 $10^{-6}$ 或更低的SAL条件。在一些实施方案中,SAL是按照FDA现行的医疗器械指导方针确定的。在一些实施方案中,注射器是无菌的。

### 例子

以下示例进一步描述和演示本公开范围内的实施方案。这些例子仅供说明之用,而不应解释为对本公开的限制,因为在不脱离本公开的精神和范围的情况下,其中可能有许多变化。

#### 例1:需要治疗患者的诊断

本文描述了,根据本公开的需要治疗骨疾病的患者的示例性诊断。

患者出现关节疼痛,例如膝关节。使用诸如K00S, IKDC和/或Tegner Lysholm活动量表的临床评分来评估疼痛和活动,该评分能显示相对于未受影响的关节,增加的疼痛和降低

的功能。参见,例如,Collins,N.J.et al.Arthritis Care Res. (Hoboken) 2011,63 (011), S208-228,其全部内容通过引用结合到本文中。常规x线摄影不能揭示其明显原因。因此,患者接受T2MRI检查以确定骨质变性区域,在MRI输出中可见为强烈的白色区域。

## 例2:治疗方法

本文描述了根据本公开内容,对有需要的骨病患者进行治疗的示例性方法。

使用标准手术方案对手术区域进行覆盖和清洁。绑住患者的腿并放置微型透视装置,以便可以获得适当的膝关节正位和侧位图。根据骨骼受影响区域的位置确定合适的起始位置。确定套管运动轨迹,并在病人皮肤上切开一个切口,使其能够进入受影响的骨头区域。

使用骨髓抽吸针的套管针进入与患处相邻的区域,并将骨髓抽吸针的尖端插入穿破进入剩余的皮质或邻近患处的骨。可选地,在手术室进行透视检查,以确认仪器的位置。可选地,使用K线穿过皮质到达注射部位,并将套管放在K线上。将套管针从套管中取出,并且任选地吸出受影响的骨区域的内容物,例如通过抽吸。可选地,提供一个外部套管和两个内部套管。外套管在套管壁上设有开口和远端开口。第一根内套管在套管壁上设有开口和闭合的远端尖端。第二内套管包括远侧尖端中的开口,并且套管的侧壁中没有开口。然后,使用者可以选择第一内套管插入到外套管中,当第一内套管连接到注射器上并挤出内容物时,实现定向注射。或者,用户可以选择第二内套管插入到外套管,当第二内套管连接到注射器上并挤出内容物时,实现通过远侧尖端的注射。

接下来,根据本公开制备了包含可注射生物材料的注射器并与套管连接。对注射器施加压力,使可注射生物材料通过套管注射,注射量足以填充受影响区域的骨退化区域。给药可相对于骨的长轴垂直或相对于骨的长轴成一定角度。在移除套管之前,任选地允许可注射生物材料在受影响的区域中放置5-30分钟。在此期间,可注射生物材料的工作时间和/或初始凝固时间可能会到期。可注射生物材料的初始凝固可减少可注射生物材料通过流体(如体液或手术冲洗液)从受影响区域的清除。在移除期间,可任选地将额外的可注射生物材料挤压到空间中,以填充插管所在的空间。

获得最终的透视图像,以确认注射的生物材料的适当位置,并将关节镜插入膝盖以验证没有可注射的生物材料渗入胶囊中(例如,植入后关节间隙中不会发生可注射生物材料的挤出,例如通过微裂纹)。

在手术过程中。关节镜检查任选地用于解决手术期间的其他可矫正问题(例如,半月板撕裂,骨赘等)。从患者移除套管并缝合切口,例如通过简单的缝合线。

在一个月的临床评估之后,患者显示出临床评分的改善,例如K00S,IKDC和/或Tegner Lysholm活动量表。

## 例3:示例性固体组分

本文描述的是根据本公开的示例性固体组分。

### 固体组分1

制备了98.5g的固体组分,如下图所示。分别称取83.0g的 $\alpha$ 磷酸三钙(“ $\alpha$ -TCP,”  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 14.5g碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )和1.00g磷酸二氢钙一水合物(“磷酸一钙一水合物”,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ),以粉末的形式称重,在至少165°C的温度下分别干燥过夜至少12小时。然后将干燥的粉末放在罐中,用手振荡混合10分钟,得到98.5g的固体成分1,其中含有84.3%的 $\alpha$ 磷酸三钙、14.7%的碳酸钙和1.02%的磷酸钙一水合物(质量/质量)。

然后将所得固体组分的等分试样分配到包含集成混合装置 (Medmix Systems AG, Rotkreuz, Switzerland) 的无菌注射器中。向3ml无菌注射器中分装1.50g固体成分1。向14ml无菌注射器中分装4.00g固体成分1。

使用Malvern MasterSizer 2000对组分粉末进行粒度分析,以确保符合如下表1中详述的一组示例性粒度规格。

表1:固体组分成分粒度的示例性测量

成分	D <sub>10</sub> (μM)	D <sub>90</sub> (μM)
α-TCP	1.85	5.27
碳酸钙	2.01	5.73
钙	13.17	75.88

通过对水分散体的激光衍射,测量α-TCP和碳酸钙的粒度。通过对异丙醇分散体的激光衍射,测量磷酸二氢钙一水合物的粒径。粒度测量是根据USP<429>进行的,其全部内容通过引用结合到本文中。使用MasterSizer 2000进行粒度分析。所测得的颗粒大小在每个成分的可接受范围内。

#### 固体成分2

如下制备100g的固体组分。分别取83.0g的α磷酸三钙 (“α-TCP,”  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 16.0g碳酸钙 ( $\text{CaCO}_3$ ) 和1.00g磷酸二氢钙。将一水合物 (“磷酸一钙一水合物”, “ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ”), 以粉末的形式称重,在至少165℃的温度下分别干燥过夜至少12小时。然后将干燥的粉末放在罐中,用手振荡混合10分钟,得到100g的含有83.0%α磷酸三钙,16.0%碳酸钙和1.00%磷酸二氢钙一水合物的固体组分2(质量/质量)。

然后将所得固体组分的等分试样分配到包含集成混合装置 (Medmix Systems AG, Rotkreuz, Switzerland) 的无菌注射器中。向3ml无菌注射器中分装1.50g固体成分2。向14ml无菌注射器中分装4.00g固体成分2。

#### 示例4:示例性液体组分

本文描述的是根据本公开的示例性液体组分。

#### 对照液体成分

通过将磷酸氢二钠溶解于注射用无菌水中,至浓度为0.30M,来制备无碳水化合物的对照液体组分。一旦完全溶解,使用柠檬酸将溶液的pH调节至约pH6。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml对照液成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml对照液成分。

#### 液体成分1

将磷酸二氢钠溶解于灭菌注射用水,至浓度为0.30M,制备成包含透明质酸的液体成分,一旦完全溶解,用柠檬酸将溶液的pH调节至pH6左右。加入平均分子量为 $0.90 \times 10^6$ 的透

明质酸钠至最终浓度为6.0mg/mL。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml液体成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml液体成分。

#### 液体成分2

将磷酸二氢钠溶解于灭菌注射用水中,至浓度为0.30M,制备成包含透明质酸的液体成分,一旦完全溶解,用柠檬酸将溶液的pH调节至pH6左右。加入平均分子量为 $1.7 \times 10^6$ 的透明质酸钠至最终浓度为6.0mg/mL。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml液体成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml液体成分。

#### 液体成分3

将磷酸二氢钠溶解于灭菌注射用水中,至浓度为0.30M,制备成包含透明质酸的液体成分,一旦完全溶解,用柠檬酸将溶液的pH调节至pH6左右。加入平均分子量为 $2.6 \times 10^6$ 的透明质酸钠,至最终浓度为6.0mg/mL。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml液体成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml液体成分。

#### 液体成分4

将磷酸二氢钠溶解于灭菌注射用水中,至浓度为0.30M,制备包含海藻酸的液体成分,一旦完全溶解,用柠檬酸将溶液的pH调节至pH6左右。加入海藻酸钠(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),至最终浓度为6.0mg/mL。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml的液体成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml的液体成分。

#### 液体成分5

将磷酸二氢钠溶解于灭菌注射用水,至浓度为0.30M,制备包含壳聚糖的液体成分,一旦完全溶解,用柠檬酸将溶液的pH调节至pH6左右。加入中等分子量的壳聚糖(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)至终浓度为6.0mg/mL。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml的液体成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml的液体成分。

#### 液体成分6

将磷酸二氢钠溶于灭菌注射用水中,至浓度为0.30M,制备成包含纤维素的液体成分,一旦完全溶解,用柠檬酸将溶液的pH调节至pH6左右。加入微晶纤维素(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)至终浓度为6.0mg/mL。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml的液体成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml的液体成分。



### 液体成分7

将磷酸二氢钠溶于灭菌注射用水中,至浓度为0.30M,制备成包含葡聚糖的液体成分,一旦完全溶解,用柠檬酸将溶液的pH调节至pH6左右。葡聚糖提取自明串珠菌属。加入相对分子量450,000-650,000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),至最终浓度为6.0mg/mL。

然后将所得液体组分的等分试样分配到无菌注射器(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中。向3ml无菌注射器中分装1.50ml的液体成分。向5ml无菌注射器中分装4.00ml的液体成分。

### 例5:可注射生物材料的制备

本文描述了根据本公开的示例性可注射生物材料的制备。

根据以下程序制备下表2中所示的可注射生物材料。第一个注射器包含示例3中所述的指示固体组件,并包含集成混合设备,通过鲁尔锁连接到第二个注射器,该注射器包含示例4中描述的指示液体组件。第一个注射器的内容物被排入第二个注射器中。取出鲁尔锁和第二个注射器,并将一个端盖连接到第一个注射器上。启动集成的混合装置,将第一个注射器的内容物混合1分钟。所合成的可注射生物材料可通过或直接或通过与第一个注射器连接的套管或注射器,通过移除末端帽和挤压内容物来配制。

表2:示例性的可注射生物材料

名称	固体成分 (量)	液体成分 (量)
控制的 <sup>1</sup> 可注射生物材料	1 (1.50 g)	对照品(1.50 毫升)
可注射生物材料 1	1 (1.50 g)	1 (1.50 mL)
可注射生物材料 2	1 (1.50 g)	2 (1.50 mL)
可注射生物材料 3	1 (1.50 g)	3 (1.50 mL)
可注射生物材料 4	1 (4.00 g)	1 (4.00 mL)
可注射生物材料 5	1 (4.00 g)	2 (4.00 mL)
可注射生物材料 6	1 (4.00 g)	3 (4.00 mL)

### 例6:与无碳水化合物化合物的可注射生物材料的对比

本文所述是根据本公开的示例性可注射生物材料与无碳水化合物化合物的材料的比较。

如实施方案5所示,制备可注射生物材料对照组和可注射生物材料3的样品。制备后立即将含有各成分的注射器与18号针头连接。将各个注射器的内容物各自排出到单独的小瓶中,每个小瓶在37°C下含有10.0mL磷酸盐缓冲盐水(“PBS”)。将小瓶放置在125rpm的振动筛板上15分钟。从振动筛板中取出后,立即拍摄小瓶,如图3A-B所示。如图3A所示,对照用的可注射生物材料(即,无碳水化合物)产生未凝固的粉末混合物。其部分悬浮于溶液中并均匀地沉降在小瓶的底部。材料的均匀沉降表明缺乏凝固和内聚性,并且表明该材料不适用于本文公开的退化骨的治疗。相反,图3B表明,根据本公开的可注射生物材料(即,可注射生物

材料3)是粘性的并且凝固以形成适合于治疗本文公开的退化骨的材料。

#### 例7:与无碳水化合物可注射生物材料的第二次对比

本文所述是根据本公开的示例性可注射生物材料与无碳水化合物的材料的比较。

在另一个实例中,根据本公开使用不同分子量的碳水化合物与无碳水化合物的材料进行生物注射材料的性能比较,分别制备对照组可注射生物材料、可注射生物材料1、可注射生物材料2和可注射生物材料3的组合物,如实施方案5所示。制备后立即将含有每种组合物的注射器与18号针头连接。将各个注射器的内容物各自排入单独的小瓶中,每个小瓶在37℃下含有10.0mL PBS。将小瓶放置在125rpm的振动筛板上15分钟。从振动筛板中取出后,立即拍摄小瓶,如图4A-D所示。如图4A所示,对照用的可注射生物材料(即,无碳水化合物)产生未凝固的粉末混合物。其部分悬浮于溶液中并均匀地沉降在小瓶的底部。材料的均匀沉降表明缺乏凝固和内聚性,并且表明该材料不适用于本文公开的退化骨的治疗。相反,图4B(可注射生物材料1)、图4C(可注射生物材料2)和4D(可注射生物材料3)表明,根据本公开的,用具有多种分子量的碳水化合物制成的可注射生物材料是粘性的,并且凝固形成适合于治疗本文公开的退化骨的材料。

图5A-D显示了用移液管除去过量PBS后,用另外的PBS(3×10mL)洗涤材料并干燥(100℃,3小时)后与图4A-D相同的材料。如图5A所示,对照组可注射生物材料(即,无碳水化合物)产生均匀分布在小瓶底部的未固化的松散粉末混合物。材料的均匀沉降表明缺乏凝固和内聚性,并且表明该材料不适用于本文公开的退化骨的治疗。相反,图5B-D表明,根据目前公开的利用具有一定分子量范围的碳水化合物制成的可注射生物材料是粘性的并且被设定为形成适合于本文公开的治疗退化骨的材料。

在去除过量液体之前和之后测量,图4A-D和图5A-D中所示的可注射生物材料的质量。图4A和图5A所示的对照组可注射生物材料(即无碳水化合物),仅保留其质量的54%,表示形成的材料的数量有相当大的损失。相反,图4B-D和图5B-D中所示的根据本公开的可注射生物材料分别保留了其质量的92%,95%和88%,表明所需材料的收率高得多。

#### 例8:可注射生物材料在锯骨中的评估

本文描述了与无碳水化合物的材料相比,当注入锯骨时,根据本公开的示例性可注射生物材料的评价。锯骨提供了一种有用的模型,用于评估患者骨中可注射生物材料的性能,因为它模拟了松质骨的孔隙度。参见,例如,Patel,P.S.D.et al.BMC Musculoskeletal Disorders 2008,9,137,以上所有内容均通过引用结合到本文中。

使用钢锯将锯骨开放细胞块15PCF(1522-524,Pacific Research Laboratories,Vashon Island,WA)分成几个样本块。在一个水平面上,每个样品块的平面钻有直径约6mm,深12mm的孔,以模拟骨的退化区域。每个样品块在37℃下浸没在PBS中。将18号针头与含有对照组可注射生物材料,可注射生物材料1,可注射生物材料2和可注射生物材料3的组合物的注射器偶联,如实施方案5所示,分别制备。将每根针头插入样品块的一侧并进入模拟的骨退化区域,并注射组合物。在加热的PBS溶液中静置15分钟后,将样品块从培养基中取出,用去离子水洗涤以去除水泥碎片,部分模拟体液的正常功能。摇动块以除去多余的水,用压缩空气干燥并照相,如图6A-D所示。如图6A所示,没有可察觉量的对照组可注射生物材料(即无碳水化合物)残留并凝固于缺陷中,使缺陷基本不受影响。相反,如图6B-D所示。可注射生物材料1,可注射生物材料2和具有各种分子量的可注射生物材料3显示出内聚力并凝

固为实质,填充了锯骨样品块中的缺陷。这些结果证明了根据本公开的可注射生物材料在保持粘结性和粘附到骨样物质上的效用,可以有效地填充和保护模仿患者体内退化骨区域的材料。

#### 例9:锯骨中可注射生物材料的二次评价

本文描述了与无碳水化合物的材料相比,当注入锯骨时根据本公开的示例性可注射生物材料的评价。

在另一个实例中,根据本公开的可注射生物材料与无碳水化合物的材料的性质比较,如实施方案5中所示单独制备对照可注射生物材料和可注射生物材料3的组合物。使用钢锯制备两个大致圆柱形锯骨开放细胞块15PC模型((1522-524, Pacific Research Laboratories, Vashon Island, WA)。在一个水平面上,每个样品块的平钻有直径约6mm、深12mm的孔,以模拟骨质的退化区域。每个样品块在37℃下浸没在PBS中。将18号针头与含有对照组可注射生物材料和可注射生物材料3组合物的注射器连接。将每根针头插入样品块的一侧,插入模拟的骨退化区域,并注射组合物。在加热的PBS溶液中静置15分钟后,将样品块从培养基中取出,用去离子水洗涤以去除水泥碎片,部分模拟体液的正常功能。摇动块体以除去多余的水,用压缩空气干燥,用钢锯横切模拟缺损,拍照,如图7A-B所示。如图7A所示,少量对照可注射生物材料(即无碳水化合物)残留并凝固于缺陷中,使缺陷基本不受影响。相反,如图7B所示,根据本公开制备的可注射生物材料3是粘性的并凝固为实质,填充了锯骨样品块中的缺陷。这些结果证明了根据本公开的可注射生物材料在保持粘结性和粘附到骨样物质上的效用,可以有效地填充和保护模仿患者体内退化骨区域的材料。

#### 例10:可注射生物材料扩散渗透性的评估

本文描述了与无碳水化合物的对照组合物相比,根据本公开的示例性可注射生物材料的扩散渗透特性的评估。

在体外实验中,将根据本公开的可注射生物材料的扩散渗透性与无碳水化合物的可注射生物材料进行比较。该实验使用Transwells® (Corning Inc., Corning, NY),由两部分组成的托盘组件,其包含具有多个接收孔的下部隔室,所述接收孔与上部隔室连接,所述上部隔室包括与接收孔接合但在其底部包括膜的对应孔。请参阅Transwell®可渗透支架选择和使用指南,详见[http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/transwell\\_guide.pdf](http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/transwell_guide.pdf) (最后一次访问时间2017年4月24日)。Transwells®可用于测量沉积在膜上的渗透性测试材料,方法是用对照液填充接收孔,将上层托盘固定在下层托盘上,并将含有溶质的液体(例如颜色指示剂)置于测试材料的顶部。然后可以定性或定量(如通过吸收光谱法)评估穿透试验材料和薄膜扩散到下层孔中的对照液中的溶质量。[http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/transwell\\_guide.pdf](http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/transwell_guide.pdf)

在该实验中,进行了三种渗透性测试:(1)不含可注射生物材料的对照膜(如图8A-B(i)栏所示),(2)用对照可注射生物材料处理的膜(即无碳水化合物)(如图8A-B(ii)栏所示)和(3)用可注射生物材料3处理的膜(如图8A-B(iii)栏所示)。下部孔用PBS填充,上部托盘固定在下部托盘上。如实施方案5所示,制备对照组可注射生物材料和可注射生物材料3。视情况,将这些材料从注射器挤出到每个膜上,然后在每个上部托盘孔中的材料顶部加入1mL 0.026M (0.25g/40mL) 茜素红溶液。如图8A所示,然后将托盘组件在37℃温育过夜并拍照。然后取出上层托盘,结果如图8B所示。如图8A-B所示,染色的液体能够穿透(i)中的膜以及

(ii) 中用对照组可注射生物材料处理的膜,但基本上不能穿透根据(iii)所示的本公开的可注射生物材料3处理的膜。与无碳水化合物的对照组合物相比,这些结果证明了根据本公开的可注射生物材料提供的扩散屏障是有效的。

本实验的定量是通过制备茜素红的储备溶液,并通过测量450nm波长下各种稀释剂的吸收来建立校准曲线。然后在450nm处测量通过Transwells®的最终溶液,并与基于外推的特定吸光度相关。与缺乏碳水化合物的对照组合物相比,以渗透百分比表示的结果预期结果证明了,根据本公开的可注射生物材料提供的扩散屏障是有效的。

#### 示例11:测试工作时间和可注射性的方法

本文所述是,测试根据本公开的示例性可注射生物材料的工作时间和可注射性。

使用ASTM C414-03 7.2,8.2 (2012年重新核准)中详述的程序来评估工作时间和可注射性,以上内容通过引用结合到本文中。简而言之,将大约0.5oz (15g)的可注射生物材料以所需的时间间隔挤出,并在光滑、清洁和干燥的水平表面上打孔。可注射的生物材料如果保持在施用位置而不跟随镊刀,或在扩张时不卷曲在镊刀后面,则被认为是可行的。当注射生物材料在扩散时不能保持在施加位置,它不再可行。

还使用如实施方案5中公开的14mL可注射生物材料6的测试工作时间和可注射性。准备完毕后,静置注射器5分钟。注射器连接到15号套管上,使用正常的手压排出内容物。使用Instron 3342测量所需的可注射压力。

如例5所示制备的可注射生物材料3的样品,对其也测试了工作时间。将整个体积的可注射生物材料挤出在干净的表面上并形成球。当戴上干燥的戴手套接触到表面时感觉发粘,则认为该材料是可行的,如手套手指上有可见的残留物。当表面不再粘到戴着干燥手套的手上时,则认为该材料是不可行的,如手套的手指上没有可见的残留物。每15秒重复测试一次。工作时间大约6分15秒。

#### 例12:粘度测试方法

本文所述是,测试根据本公开的示例性可注射生物材料的粘度。

如实施方案5所示,制备可注射生物材料1的样品。将所得材料在25℃下直接挤到AR 1000型流变仪上。使用60mm 1度不锈钢板,截断间隙为28μm,截断速率为1s<sup>-1</sup>。10秒后稳定,记录粘度。粘度为18.69Pa • s。

#### 示例13:测试内聚力的方法

本文所述是,测试根据本公开的示例性可注射生物材料的内聚。

根据例5所示,制备可注射生物材料3的样品。制备后立即将含有该组合物的注射器与18号针头连接。将注射器的内容物在37℃下排入装有10.0ml PBS的小瓶中。该材料在视觉上是有粘性的并且在溶液中不分解。

#### 示例14:测试初始凝固时间的方法

本文所述是,测试根据本公开的示例性可注射生物材料的初始凝固时间。

根据例5所示,制成可注射生物材料3。将14号插管连接到注射器上,并将内容物挤到铝盘上。使用直边刮刀均匀地将表面划掉。将剩余的材料在混合盘中展开至均匀厚度3/16英寸(5mm)。在37℃下将平底锅浸没在PBS中15分钟,然后取出。取出后,尖端直径为1/24英寸(1.06mm)的1磅(454克)Gilmore针头在大于1分钟的时间内穿透样品,初始凝固时间不超过15分钟。见ASTM C414-03at 7.2,8. (2012年重新核准),其全部内容通过引用结合到本文

中。

每隔15秒进行一次额外测试,可以对初始凝固时间进行更精确的评估。

#### 例15:挤压力的测试方法

本文所述是,测试根据本发明公开的示例性可注射生物材料的挤出力。

按照本公开的方法制备可注射生物材料。将材料装入内尖直径为800mm的10mL注射器中,将注射器装入计算机控制的挤出力试验机中,如Zwick/Roell-HCr 25/400,设置十字头速度为5mm min<sup>-1</sup>。通过垂直安装在柱塞顶部的压缩载荷挤出可注射生物材料。预计可使用小于约150N的峰值力将本公开的可注射生物材料完全挤出。

#### 例16:相组成的X射线衍射测试

本文描述了,测试根据本公开的示例性可注射生物材料的阶段的方法。ASTM和ISO要求最低羟基磷灰石含量为95%的结晶相,氧化钙的最大质量分数为1%的结晶相。见ASTM F1185-03 (2014年重新核准),第4.2页;ISO 13175-3 (2012),第4.2.2页,其全部内容通过引用结合到本文中。

根据例5制成可注射生物材料3。将样品注入37℃的PBS中,静置约16小时。收集所得固体,在氧化锆研钵和研杵中研磨,烧结(1小时,1100℃),然后冷却至室温,使用Rigaku Mini flex II台式x射线衍射仪2005H302型,用x射线衍射(“XRD”)分析,扫描范围2 $\theta$ 。如图9所示,仅检测到结晶相,没有无定形物质。另外,确定羟基磷灰石的特征峰,测定羟基磷灰石的百分比大于99%。见国际衍射数据中心(“ICDD”)9-342。发现氧化钙的量小于1%。见ICDD4-777,其全部内容通过引用结合到本文中。

#### 例17:相组成的FT-IR测试

本文描述了,测试根据本公开的示例性可注射生物材料的阶段的方法。

根据例5制成可注射生物材料3。将样品注入37℃的PBS中,静置约16小时。收集所得固体,在氧化锆研钵和研杵中研磨并烧结(1小时,1100℃),然后冷却至室温并进行FTIR。如图所示。如图10所示,羟基磷灰石的特征谱带如下:P04<sup>3-</sup>吸收带在563,598,961,1019和1086cm<sup>-1</sup>;在629和3570cm<sup>-1</sup>处存在OH<sup>-</sup>带。没有观察到其他条带。该光谱表明形成羟基磷灰石而不存在其他矿物相。

#### 例18:可注射生物材料的电子显微镜扫描图像

本文所述是,根据本公开的可注射生物材料的电子显微镜扫描图像。

如例5所示,制备可注射生物材料3的样品。在37℃下将所得材料放入PBS中,静置约16小时。干燥(100℃下保持3小时)后,样品断裂并通过电子显微镜扫描(“SEM”)成像。如图11A-C所示,代表性的SEM图像显示了纳米尺寸,互锁,互连的晶体结构,典型的羟基磷灰石晶体结构。

#### 例19:元素分析方法

本文所述是,测试根据本公开的示例性可注射生物材料的元素组成的方法。ASTM和ISO要求规定了用于骨水泥的组合物的某些元素的最大含量。见ASTM F1185-03 (2014年重新核准),第4.3页;ISO 13175-3 (2012),第4.1页,其全部内容通过引用结合到本文中。

根据例5制成可注射生物材料3。在37℃条件下将样品注入PBS中,静置约16小时。收集所得固体,并在氧化锆研钵和研杵中研磨。然后将材料分开,样品1烧结(1小时,1100℃),然后冷却至室温,样品2不烧结。然后用ICP-MS对两种样品进行分析。对每个样品进行了三次

重复试验以确认结果。无论是否烧结,结果基本相同,并且符合规格。表3提供了这些实验的结果。

表3:有和没有烧结的可注射生物材料3的ICP-MS元素分析结果

元素	规格(上限, ppm)	样品 1(ppm)			样品 2(ppm)		
		运行 1	运行 2	运行 3	运行 1	运行 2	运行 3
Pb	30	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
汞	5	0.03	0.05	0.05	0.4	0.4	0.4
砷	3	0.04	0.05	0.04	0.1	0.1	0.1
Cd	5	0.02	0.03	0.03	0.3	0.3	0.3

#### 示例20:测试凝固反应温度的方法

[0002] 本文所述是,根据本公开测量可注射生物材料的凝固反应温度的示例性方法。

在根据例5制备的可注射生物材料上测试凝固反应的能量特性。将所得材料挤到由聚四氟乙烯 (PTFE)、聚(邻苯二甲酸乙烯酯)、聚甲醛、高密度聚乙烯或超高分子量聚乙烯 (UHMWPE) 制成的放热模具中,并配上编号为No.24规格线热电偶的放热模具,或类似的装置,其结点位于模具中心,内腔中的高度为3.0mm。柱塞直接安装在c型夹或合适的压力机上,以产生6.0mm的试样高度。在生产柱塞座时,在剩余的程序中移除多余的材料和C形夹或压力机。从混合液体成分和固体成分开始到观察到冷却的时间内连续记录温度。记录的最高温度报告精确到1℃。

至少测试三个独立样本。见ASTM 451-16,第7.6页,其全部内容通过引用结合到本文中。预计结果表明固化反应基本上是等温的,并且不会显著改变固化材料附近的温度。

#### 例21:抗压强度的测试方法

本文所述是,测试根据本公开的可注射生物材料的抗压强度的示例性方法。

测试了根据例5制备的可注射生物材料3的抗压强度。将14号插管连接到注射器上,使用手压将混合物挤压到浸没在37℃PBS中的模具中,以产生约12mm高和6mm直径的圆柱体形状的测试样品。24小时后,取出样品并归档,使每个样品的末端平面平行。然后使用欧米茄测力计模型DFG35-100对样品进行抗压强度测试,该模型用于读取12.7毫米/分钟的破坏力,从而提供抗压强度。见ASTM F451-16,第7.9页,其全部内容通过引用结合到本文中。每个样品共记录3次抗压强度读数。结果表明抗压强度为 $5.7 \pm 1\text{MPa}$ 。

#### 示例22:测试尺寸稳定性的方法

本文所述是,测试根据本公开的可注射生物材料的尺寸稳定性的示例性方法。

根据本公开的实例,制备可注射生物材料。混合开始5分钟后,将14号插管连接到注射器上,使用手压将混合物挤压到浸没在37℃PBS中的高约12mm、直径6mm的模具中。15分钟后,样品从模具中弹出,用数字卡尺测量其高度和直径。然后将样品浸入37℃PBS中24小时,然后重新测量其高度和直径。然后将样品置于烘箱中干燥(60℃,24小时)。在第一次,第二

次和第三次测量期间,每个样品总共记录三次读数。预期结果表明第一,第二和第三读数之间的高度或直径没有显著变化,表明高尺寸稳定性。三次试验中任何尺寸的最大变化预计小于10%,小于7.5%,小于5%或小于3%。

#### 例23:在体内测试骨形成的方法

本文所述是,根据本公开的使用示例性可注射生物材料的兔子骨形成的体内测试。

切开骨骼发育成熟的新西兰大白兔的皮肤,利用骨膜提升器在股骨远端内侧反射骨膜。使用带有6mm平钻的毛刺和深度指示器控制双侧临界尺寸缺损(直径6mm,深10mm)。内侧上髌被用作解剖学标志。在盐水冲洗下制备缺损以最小化热损伤。在制备过程中和完成时用无菌生理盐水冲洗缺损以去除残留的骨。使用刮刀将约0.3mL可注射生物材料6(根据例5制备)填充至原始皮层的高度。用3-0Dexon封闭皮肤。动物们在手术后接受了镇痛治疗,并回到他们的笼子里。动物术后可自由活动 and 负重。每天监测动物,包括皮肤,皮毛,眼睛和粘膜的变化,以及行为模式、中枢神经系统和躯体运动活动。

在植入后6-12周,将动物安乐死,采集右侧和左侧股骨并用数码相机拍照。检查皮肤切口的总体完整性以及肉眼可见的和下划线皮下组织。切取内脏器官(如心脏、肝脏、肺脏和脾脏),拍照,保存于10%中性缓冲福尔马林(NBF)中,待进一步处理。固定后,将内脏器官包埋,切片并用苏木精和曙红(H&E)染色。使用HP Faxitron和高分辨率钼靶x线照相胶片在24kv下对收获的股骨进行前后和侧面的x线摄影,时间为45秒。还采用Inveon活体微型计算机断层扫描仪为代表性动物拍摄微型计算机断层扫描(简称“微型CT”)切片,以获得骨形成和受试物吸收的高分辨率图像。扫描股骨远端,使用西门子软件将原始图像重建为DICOM数据。在轴面、矢状面和冠状面检查图像,以评估愈合部位的总体质量和任何局部反应。如图12A-B所示,植入后6周,可注射的生物材料(以纯白显示)仍然驻留在给药部位。

在植入后6,12,18和26周进行附加分析以确定是否通过微型计算机断层摄影术检测到新骨形成。

#### 例24:给犬科动物注射可注射生物材料

本文所述是,根据本公开的示例性可注射生物材料在犬科动物中的体内测试。

以0.5mg/1b的剂量,肌肉注射马来酸乙酰丙嗪注射液,作为预先用药麻醉动物。随后,以4.5mg/1b的剂量作为麻醉剂肌内注射Telazol®(盐酸瓦他明和盐酸唑拉西泮,Zoetis)给动物。允许在异氟醚麻醉前以1.5-2%的比率插入气管导管。最后,以1-3μg/1b的剂量肌内注射丁丙诺啡给动物。确保无痛手术。剃去膝关节周围的所有毛发,用酒精浸泡的纱布从手术部位除去多余的毛发。最后,使用2%氯己定/70%异丙基配置粘着剂,以确保覆盖,从手术部位的中间开始,顺时针不断扩张,清洁整个手术部位。

在股骨远端和胫骨近端切开两个内侧或外侧切口,显露筋膜。通过这些切口,一次一个,通过手压将15号,4英寸的套管打入股骨远端或胫骨近端的骨中。通过实时透视成像,确保套管放在正确的位置。将套管针从套管中取出,将一个装有如例5所述制备的含有可注射生物材料3的注射器与套管连接,然后将材料从注射器挤出,通过套管,进入给药部位。通过荧光透视监测注射是否成功。

可注射生物材料在开始混合后放置15分钟。套管留在原位。以0.1mL/1b的剂量静脉注射Euthasol®对动物实施安乐死。然后解剖筋膜,暴露骨骼。通过在受影响关节上下锯切,从动物身上取下骨头。将所得样品置于环氧树脂中并沿矢状平面切片。如图13所示,固化的

可注射材料1302侵入股骨髓中松质骨的现有孔隙中。套管1301仍然驻留在给药部位。

#### 例25: 向人尸体骨骼注射可注射生物材料

本文所述是, 根据本公开的示例性可注射生物材料在人体尸体骨骼中的体内测试。

对人体尸体膝关节进行手术。适当地定位样本并在内侧和外侧上做切口, 允许套管插入远端股骨或胫骨平台。将11号外套管插入松质骨, 移除套管针, 并将15号内套管插入外套管中, 以便通过远端尖端开口或侧向开口进行注射。将关节镜置于膝关节内, 用于监测骨水泥外溢到关节间隙的情况, 并且定位荧光镜以使手术器械和可注射生物材料的定位可视化。

将一个装有如例5所述制备的含有可注射生物材料3的注射器与内套管连接, 然后从注射器中挤出材料, 通过套管, 并使用正常手压强度注入给药部位, 注射过程无背压阻碍。未观察到注射材料泄漏到关节间隙或手术器械。注射后解剖松质骨间隙。如图14所示, 固化的可注射生物材料1402侵入人股骨远端松质骨的已有孔隙中。空隙1401显示放置套管的位置。

#### 援引并入

每个专利文献的全部公开内容, 包括更正证书, 专利申请文件, 科学文章, 政府报告, 网站和本文提及的其他参考文献, 出于所有目的通过引用结合到本文中。

#### 组合

应当理解, 为了清楚起见, 在单独实施方案的上下文中描述的本公开的某些特征, 也可以在单个实施方案中组合提供。

相反, 为简洁起见, 在单一实施方案中所描述的本公开的各种特征, 可以单独提供, 也可以任何适当的子组合提供。本公开内容具体包括实施方案的所有组合, 并且在本文中公开, 就像每个组合都是单独和明确地公开一样。此外, 本公开还具体包含描述这些变量的实施方案中列出的所有子组合, 并且在此公开, 就像每个这样的子组合都是单独和明确地公开一样。

#### 等价物

通过阅读本公开内容, 对于本领域普通技术人员显而易见的是, 在不脱离本公开的精神或基本特征的情况下, 本公开可以用不同于上面具体公开的形式体现。因此, 上述特定实施方式应认为是说明性的而非限制性的, 或者局限于本公开。仅使用常规实验, 本领域技术人员将认识到或能够确定本文所述具体实施方案的许多等同物。本公开的范围如所附权利要求及其等价物。在权利要求的含义和等同范围内的所有修改都包括在其中, 而限于上述说明中的实施例。



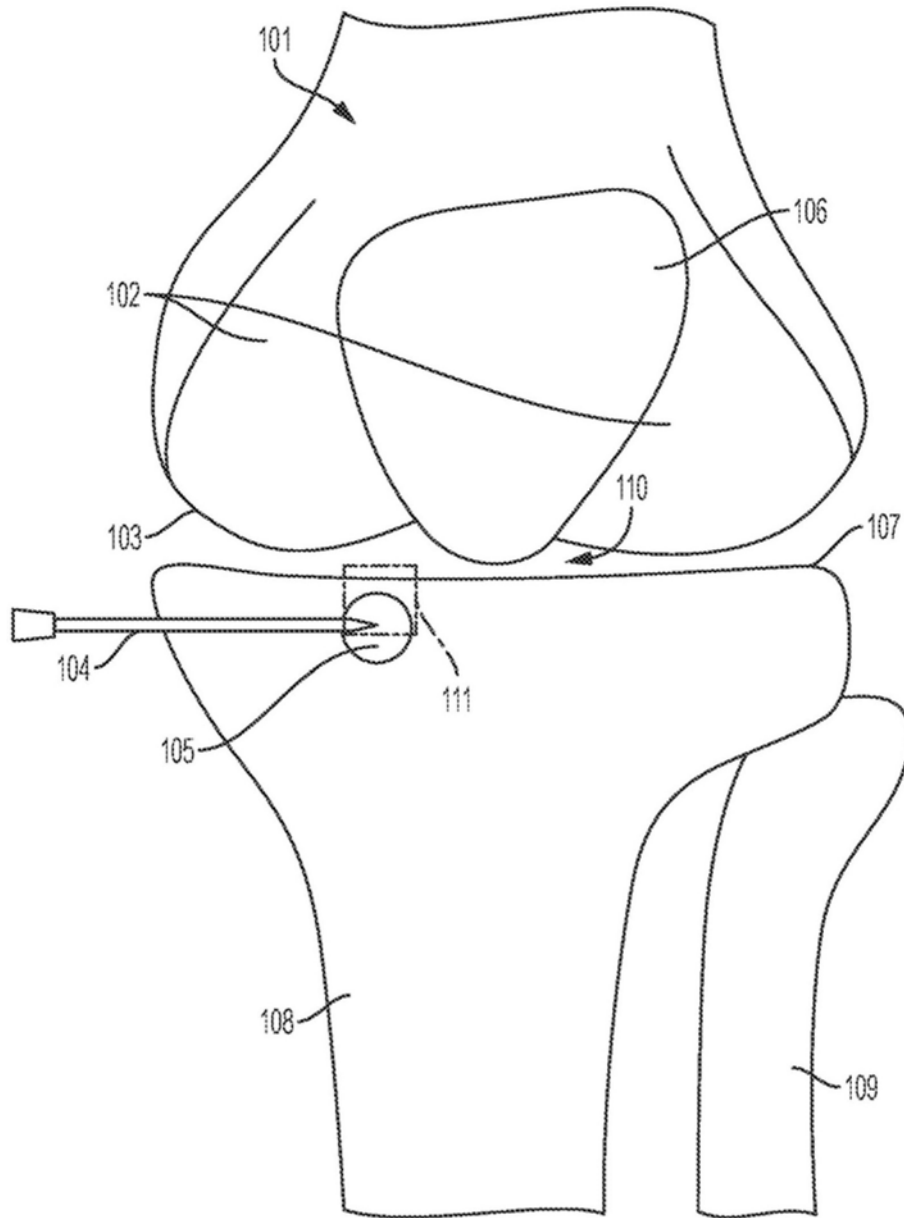


图1

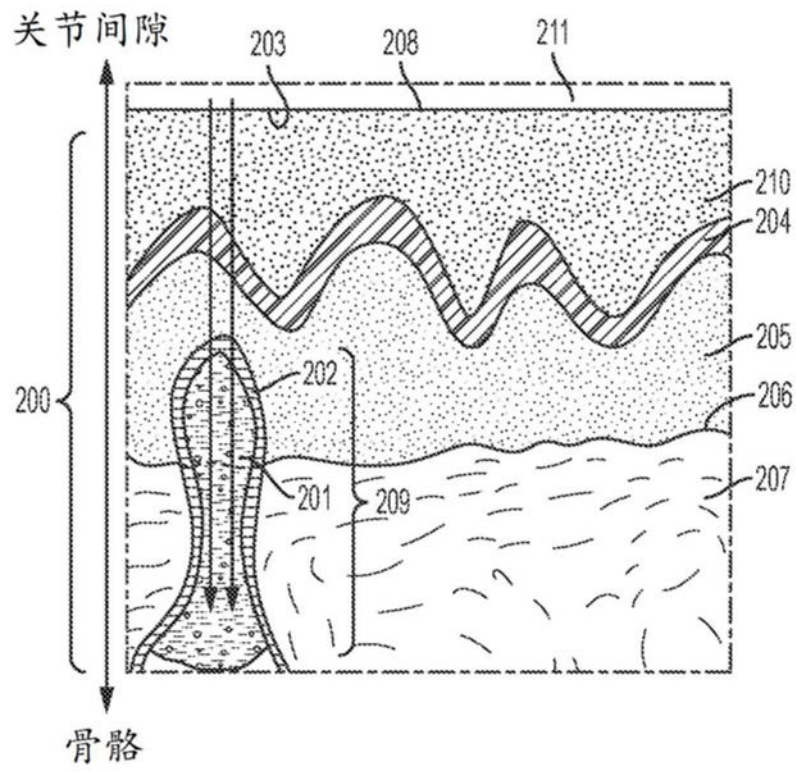


图2A

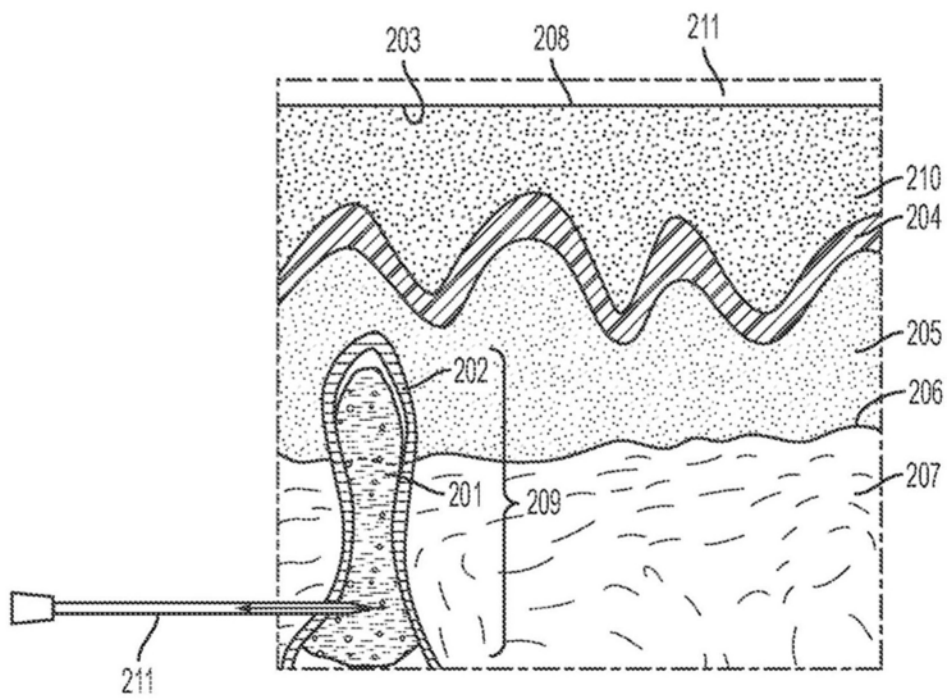


图2B

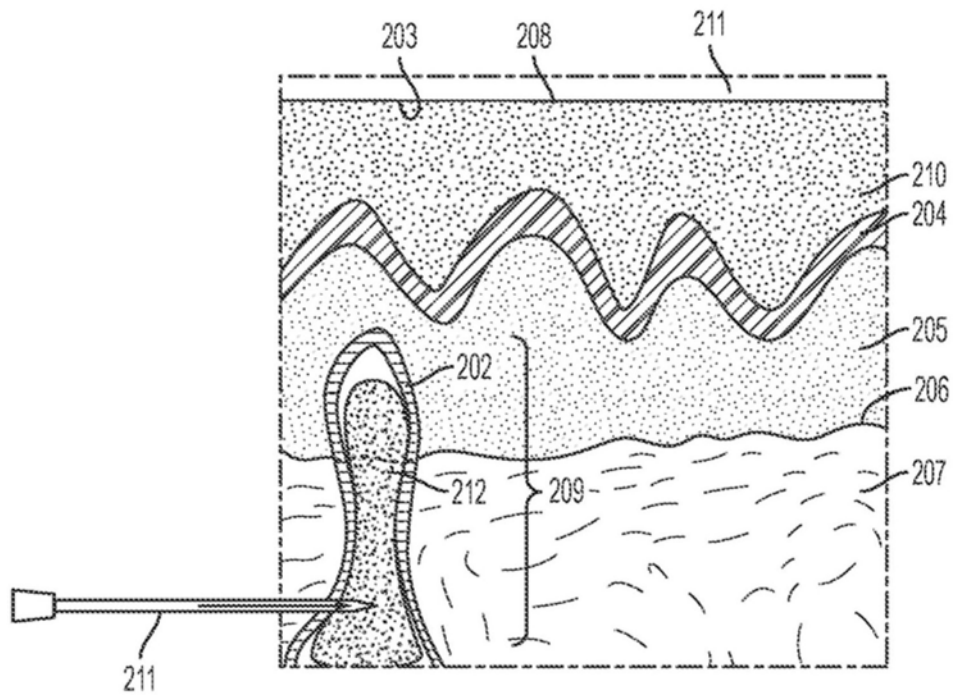


图2C

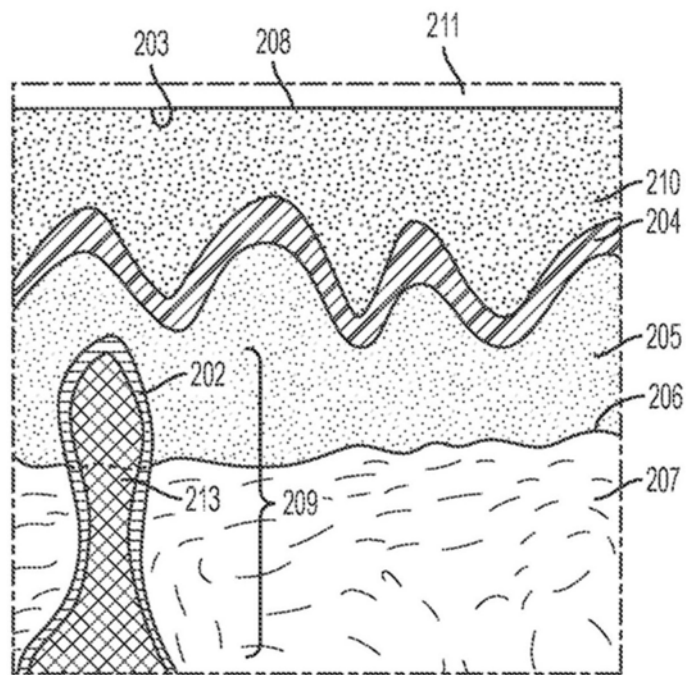


图2D

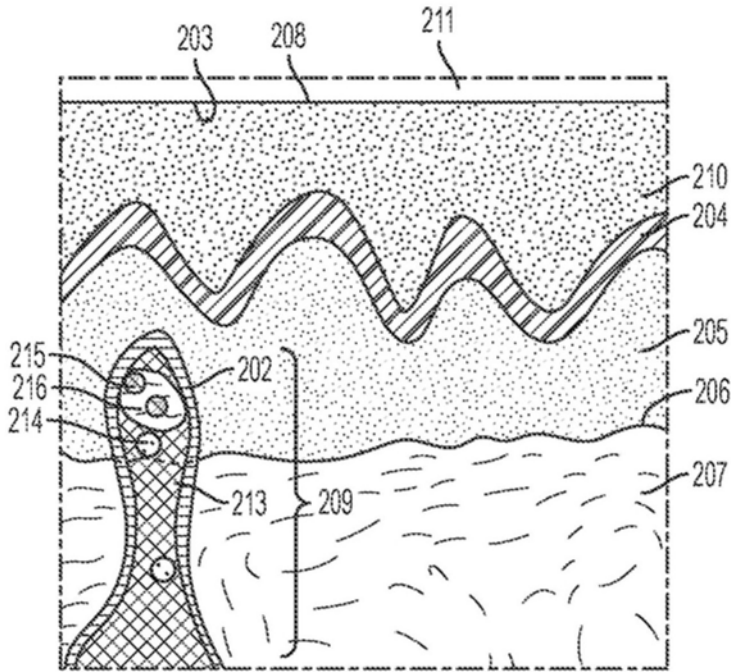


图2E

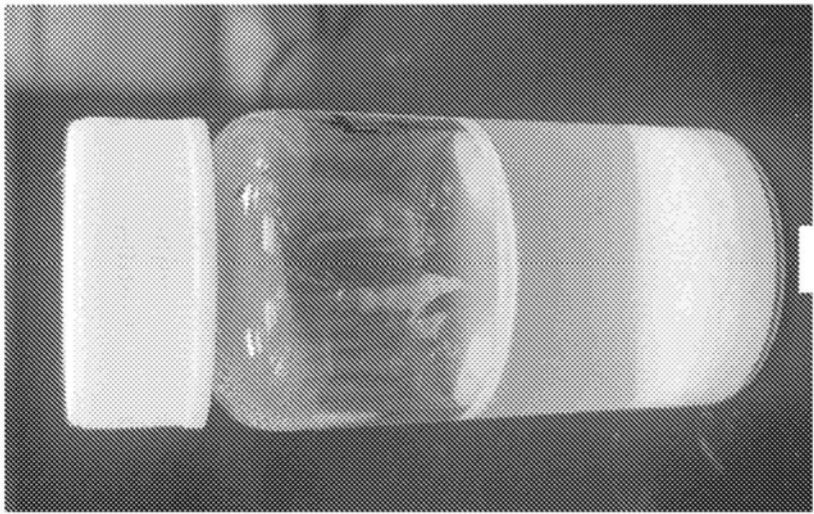


图3A

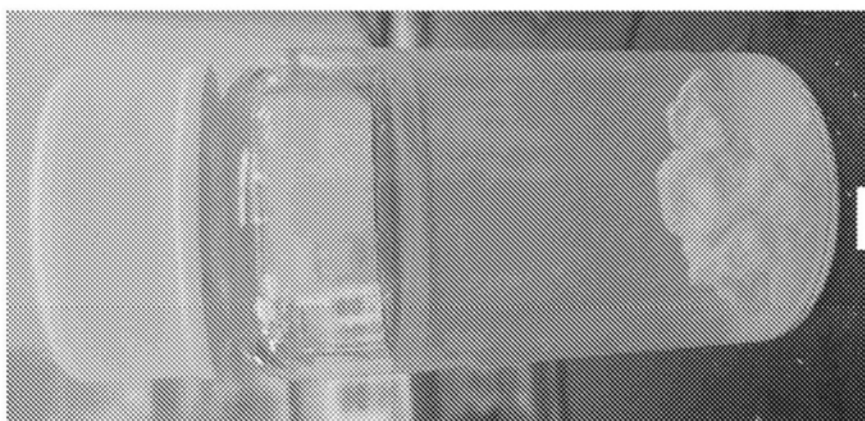


图3B

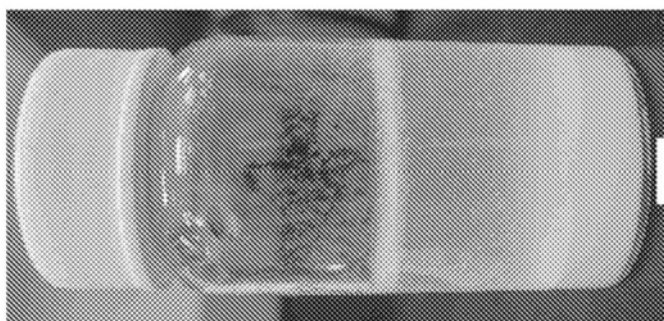


图4A

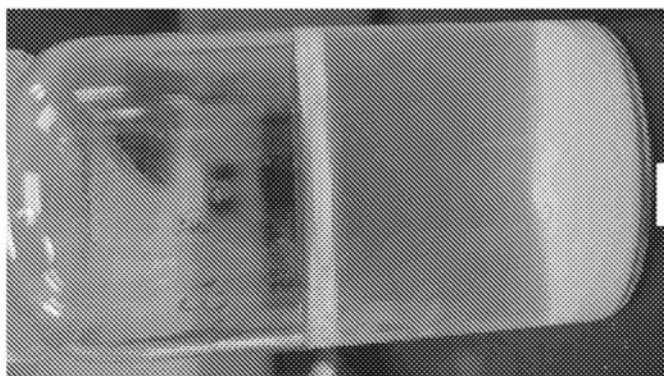


图4B

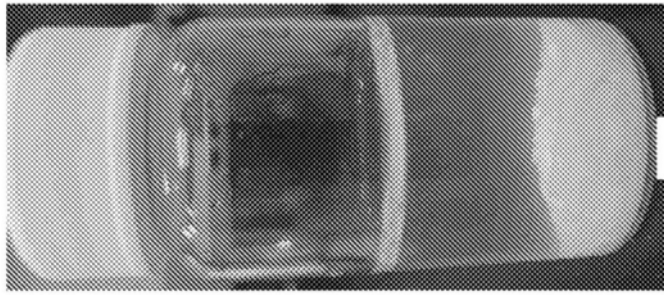


图4C

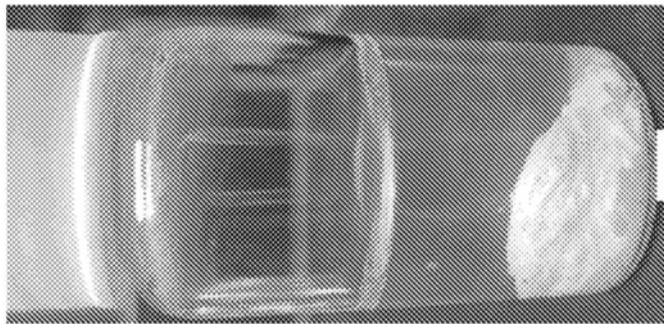


图4D

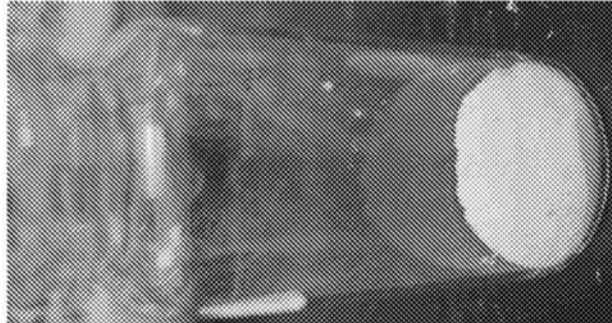


图5A



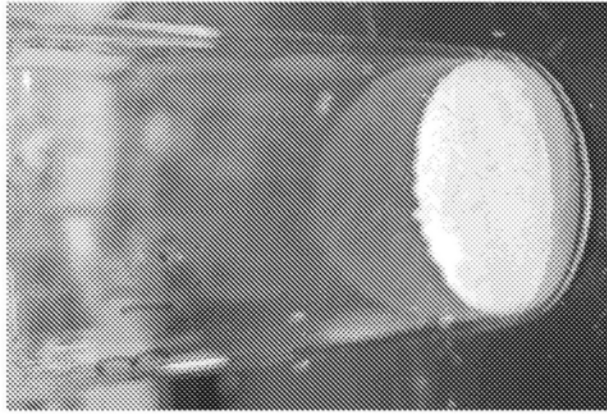


图5B

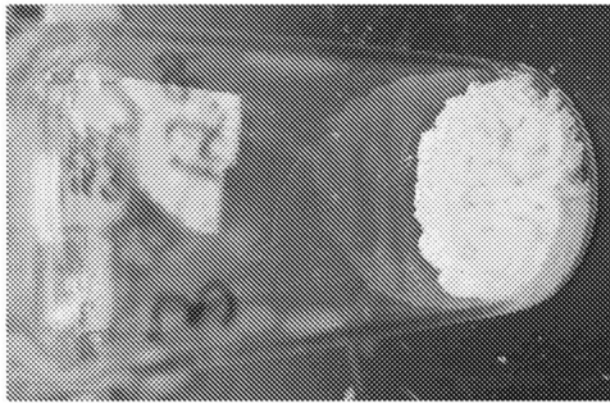


图5C

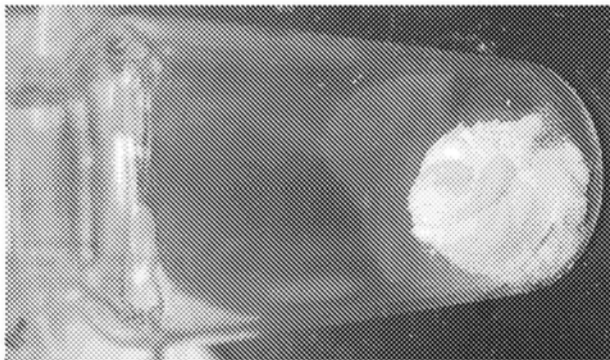


图5D

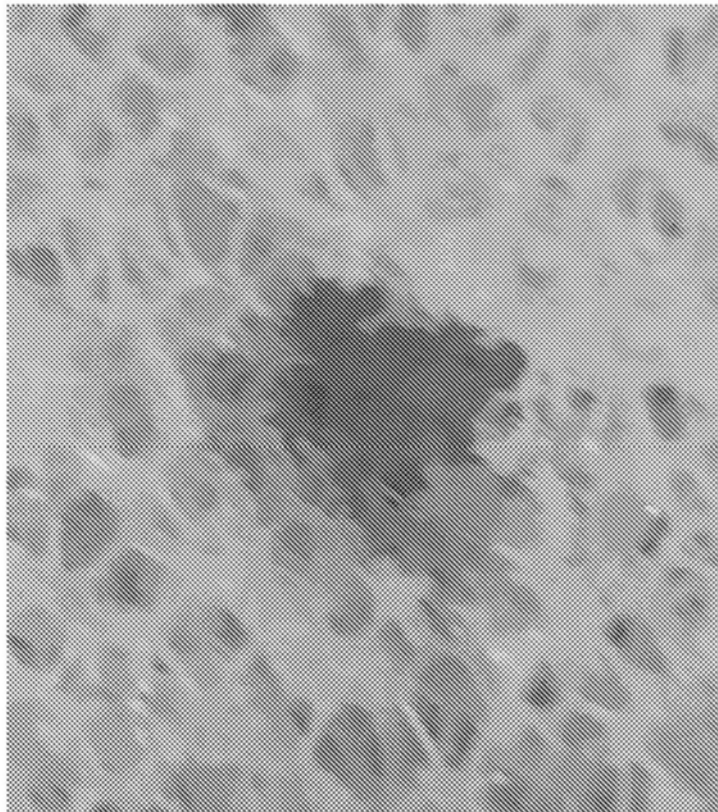


图6A

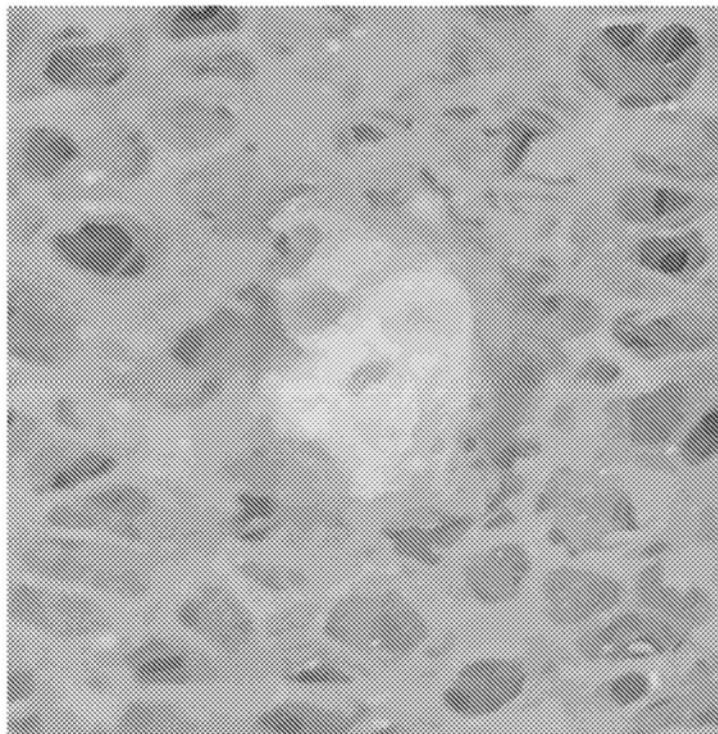


图6B



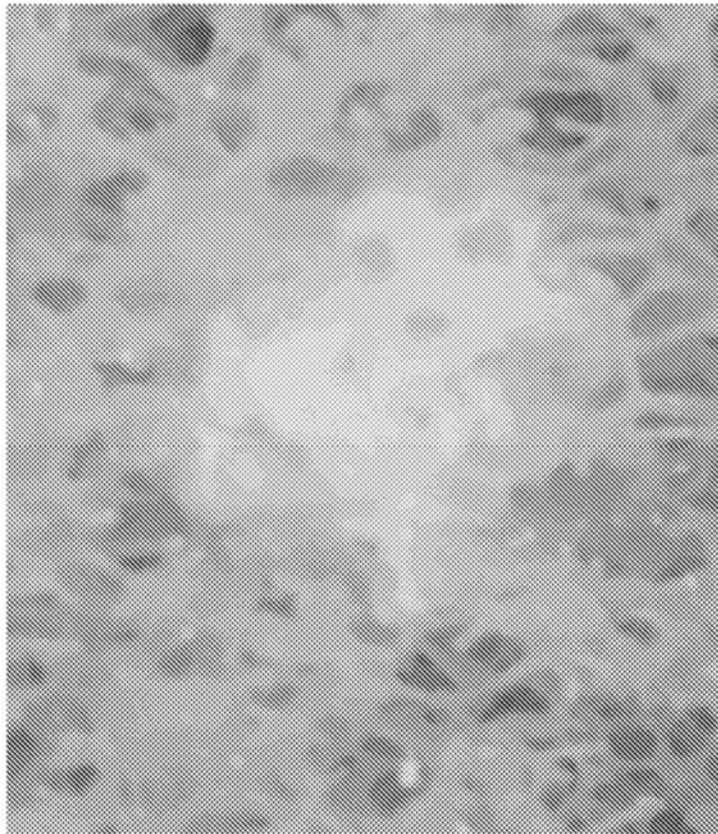


图6C

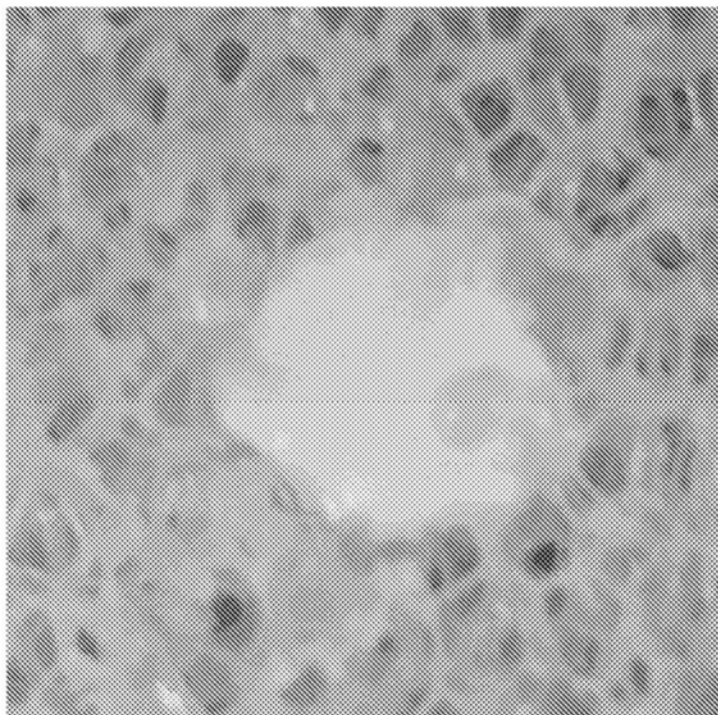


图6D

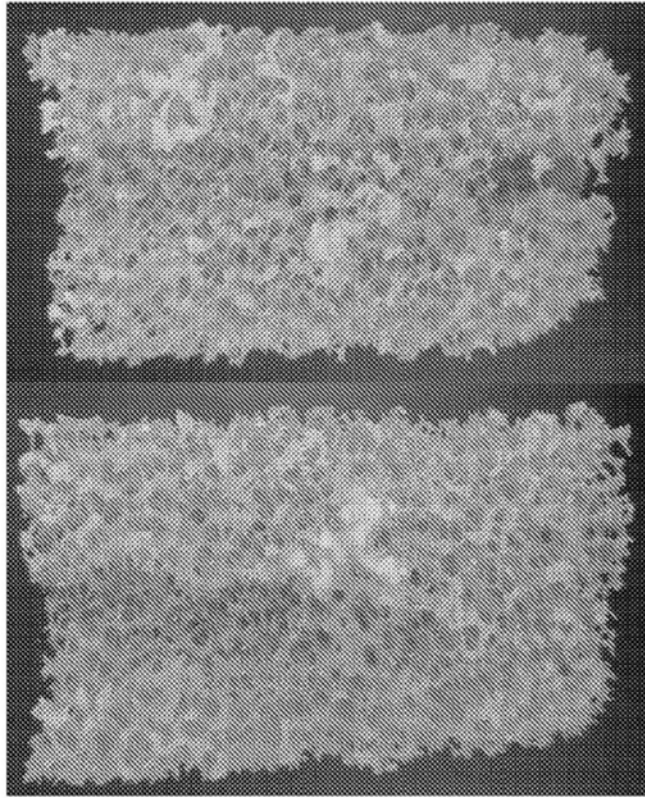


图7A

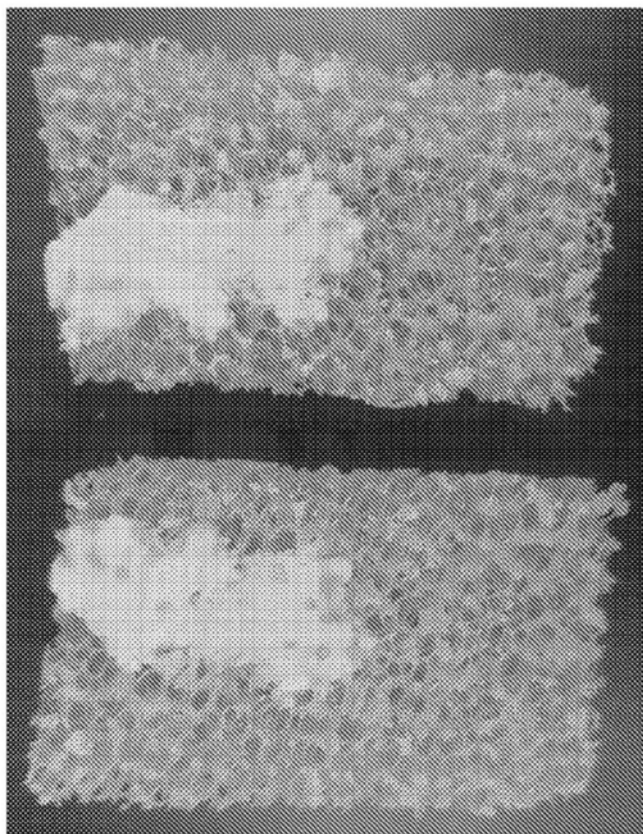


图7B

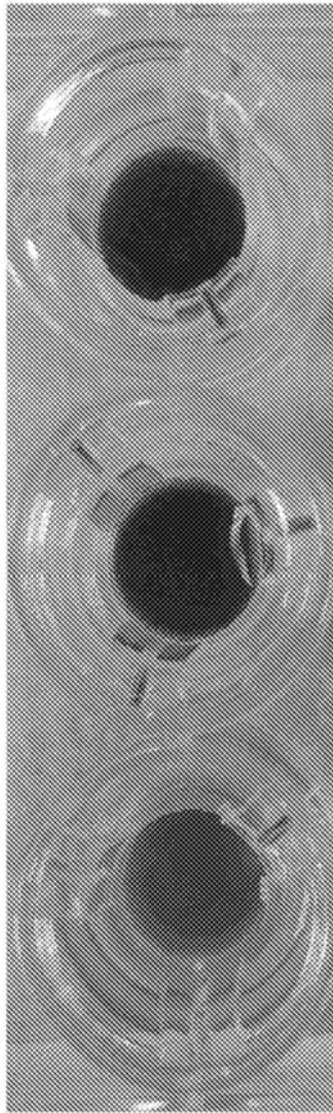


图8A

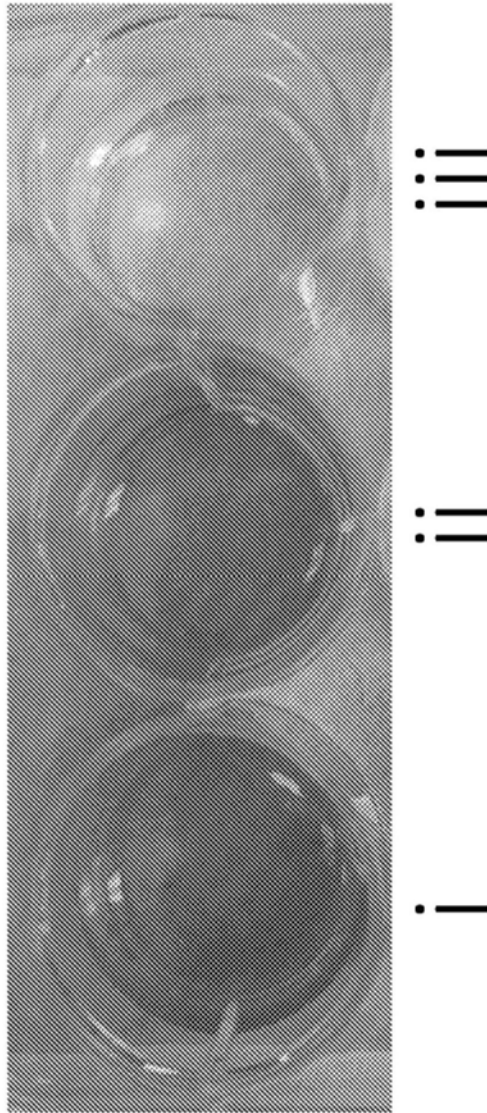


图8B

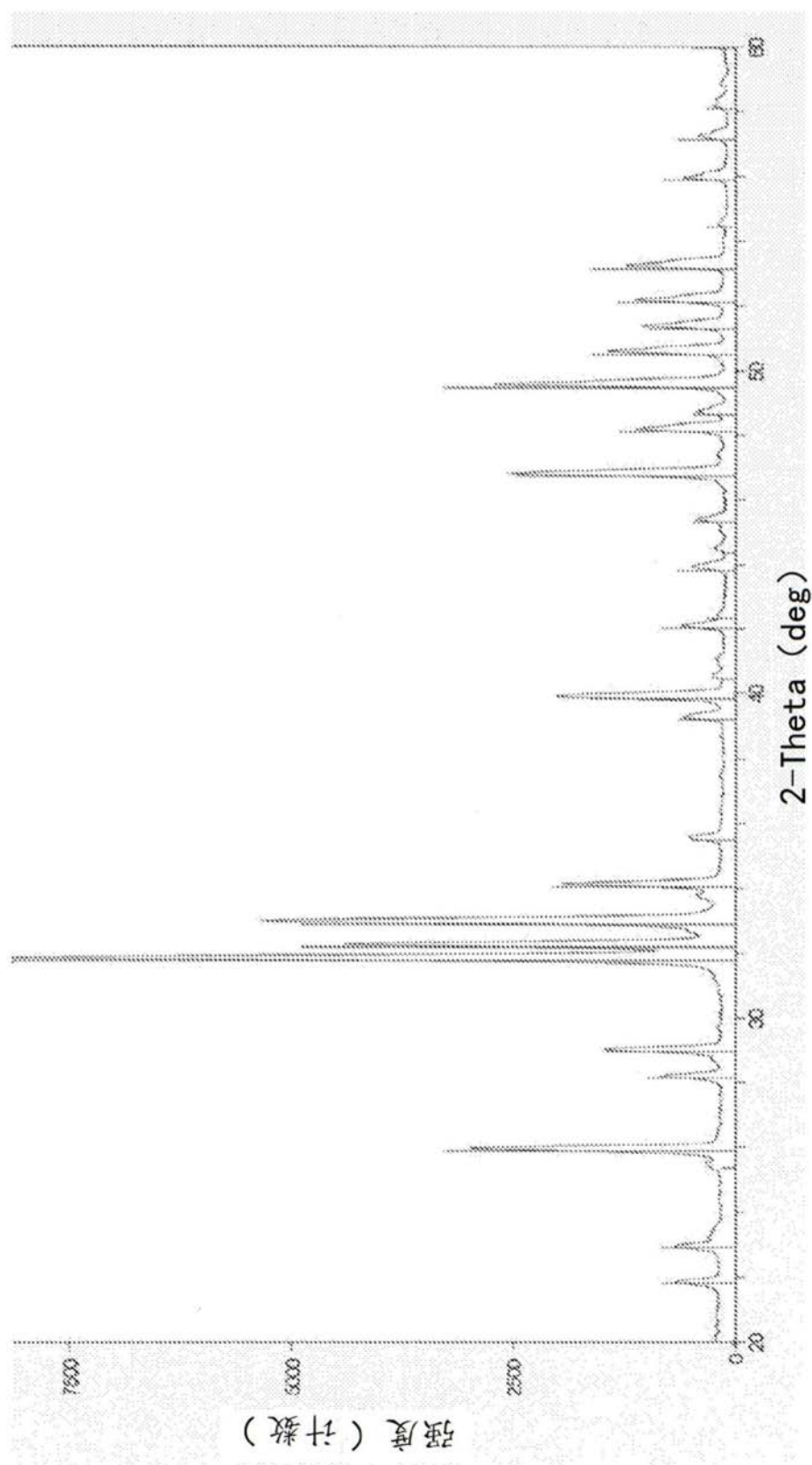


图9

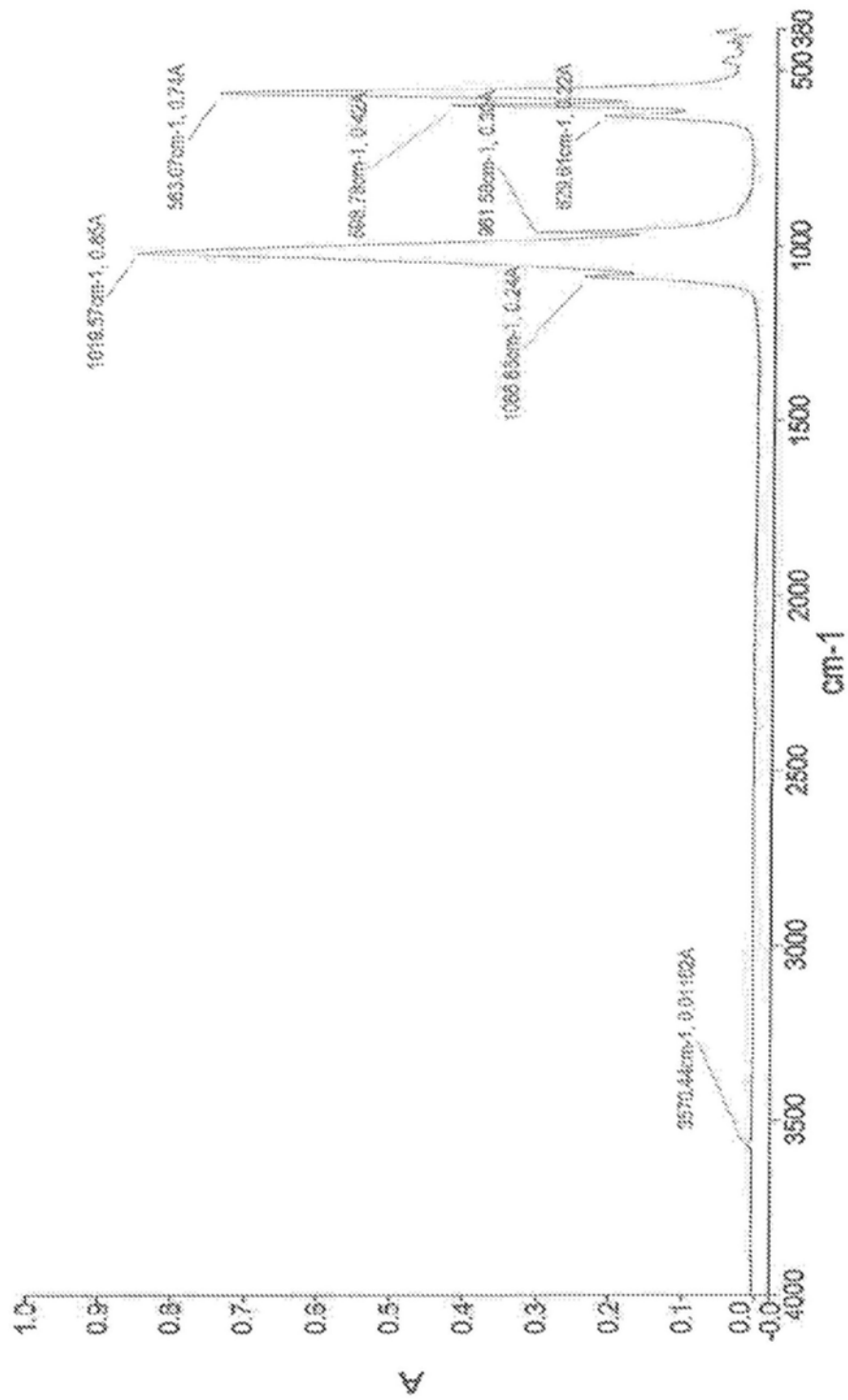
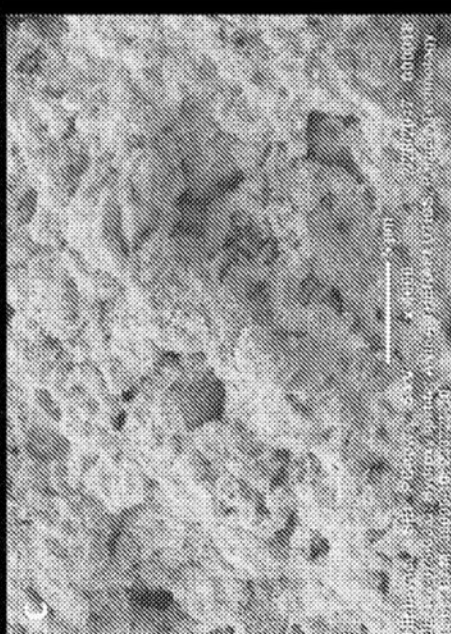
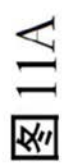
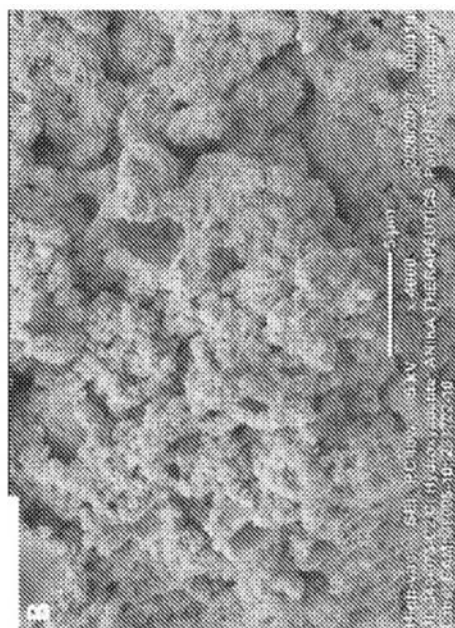


图10





11C



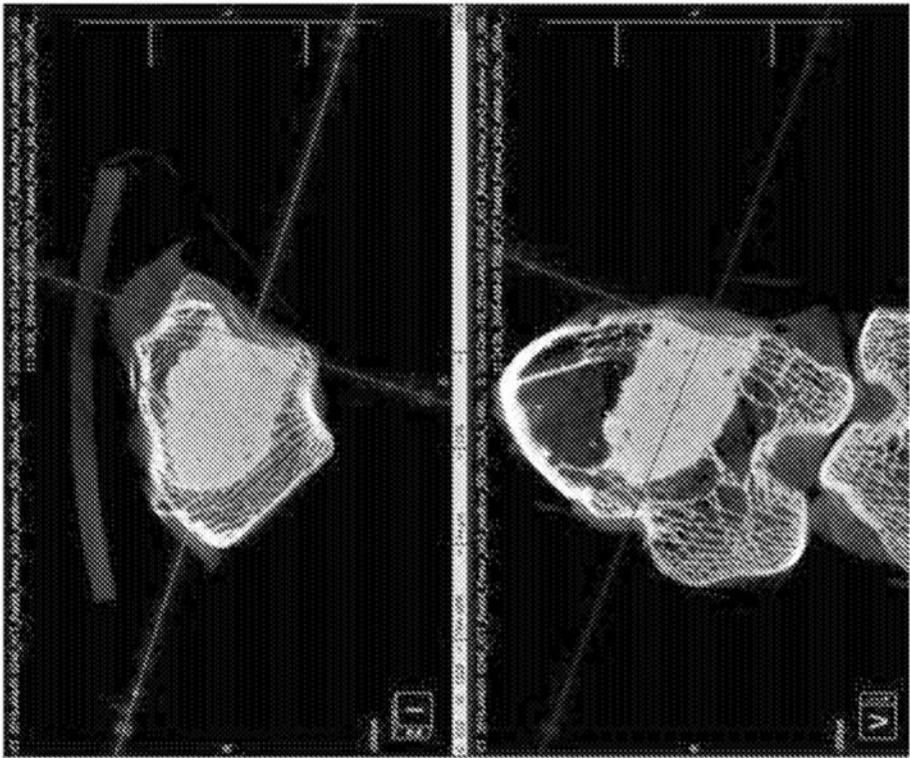


图12A

图12B

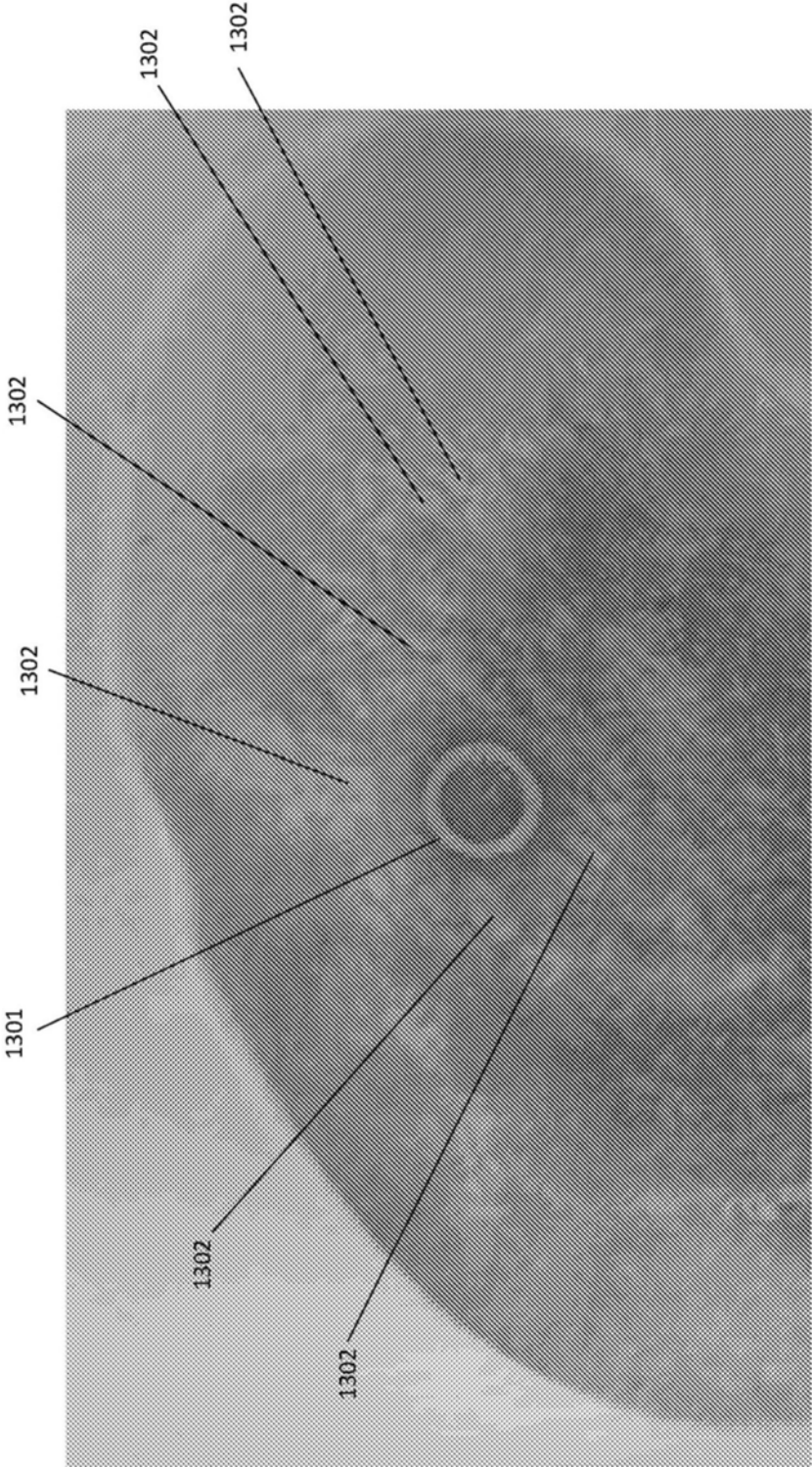


图13

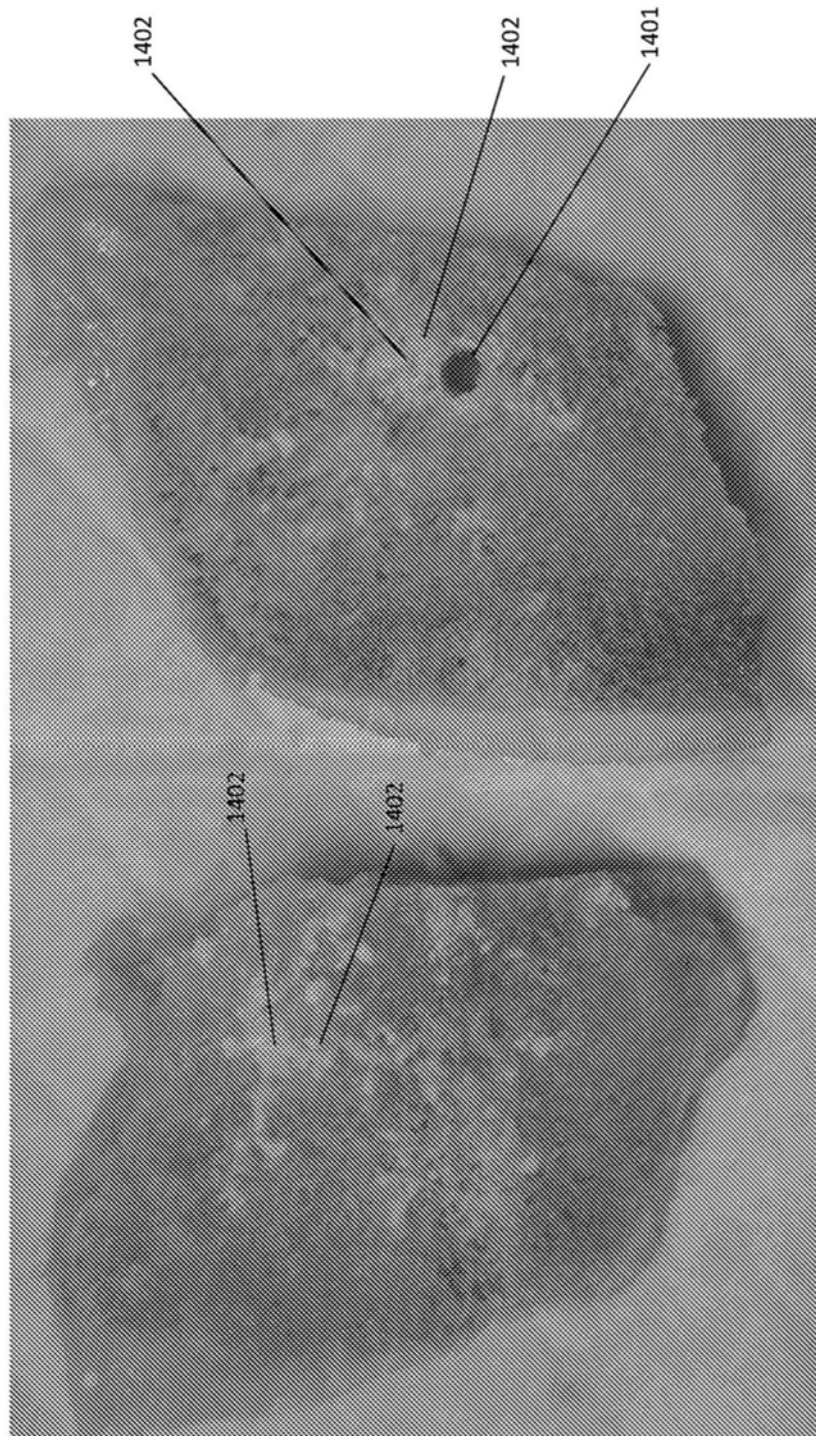


图14