



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102846653 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 02

(21) 申请号 201210223133. 6

(22) 申请日 2012. 06. 28

(30) 优先权数据

13/173, 658 2011. 06. 30 US

(71) 申请人 德普伊米特克公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D. 苏 J. 王 B. J. 斯托里

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 孔青 李进

(51) Int. Cl.

A61K 31/728(2006. 01)

A61K 47/22(2006. 01)

A61K 47/26(2006. 01)

A61K 47/36(2006. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

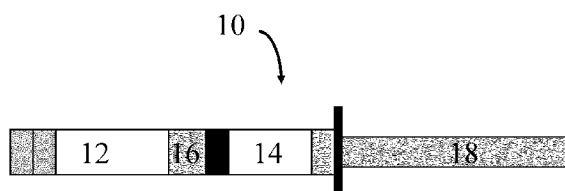
权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 9 页

(54) 发明名称

用于稳定的多糖制剂的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗关节病症诸如骨关节炎和/或与其相关的疼痛的组合物和方法。所述组合物和方法利用与至少一种稳定剂混合的第一组分,即透明质酸(“HA”)。所述组合物可包含增加所述HA的稳定性和保存期的稳定剂。在另一个实施例中,所述组合物和方法还可包含附加组分,诸如一种或多种糖胺聚糖(“GAG”)或GAG前体。GAG或GAG前体的例子可包括硫酸软骨素(“CS”)、硫酸皮肤素、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸角质素和葡糖胺(“GlcN”)。



1. 一种治疗关节病症的组合物,包含:
含有高分子量透明质酸 (HA) 的制剂;和
至少一种稳定剂,其中所述稳定剂增强所述制剂的稳定性。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述高分子量 HA 的分子量在约 1MDa 至 6MDa 的范围内。
3. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述 HA 以至少约 1mg/ml 的液体浓度存在。
4. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述 HA 是冻干的。
5. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述至少一种稳定剂选自生育酚、生育酚衍生物、甘露糖醇、蔗糖和海藻糖。
6. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述至少一种稳定剂为海藻糖。
7. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述至少一种稳定剂按所述组合物的重量计在约 0.1 重量 % 至 50 重量 % 的范围内存在。
8. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述制剂在室温下是稳定的。
9. 根据权利要求 1 所述的制剂,还包含至少一种附加组分。
10. 根据权利要求 9 所述的组合物,其中所述附加组分选自糖胺聚糖 (GAG) 和 GAG 前体,并以约 1:0.005 至 1:100 范围内的 HA 与附加组分之比存在于所述组合物中。
11. 一种试剂盒,包括:
高分子量透明质酸 (HA) 和至少一种稳定剂的组合物;和
在单室内包含所述 HA 和稳定剂的组合物的注射器。
12. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其中所述 HA 的分子量大于 1MDa。
13. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其中所述 HA 以至少约 1mg/ml 的液体浓度存在。
14. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其中所述 HA 是冻干的。
15. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其中所述至少一种稳定剂选自生育酚、生育酚衍生物、甘露糖醇、蔗糖和海藻糖。
16. 根据权利要求 11 所述的试剂盒,其中所述至少一种稳定剂按所述组合物的重量计在约 0.1 重量 % 至 50 重量 % 的范围内存在。
17. 根据权利要求 10 所述的组合物,其中所述组合物还包含选自糖胺聚糖 (GAG) 和 GAG 前体的至少一种附加组分。
18. 根据权利要求 17 所述的试剂盒,其中所述注射器还包括隔室,所述隔室包含所述至少一种附加组分。
19. 根据权利要求 17 所述的试剂盒,其中所述至少一种附加组分是冻干的。
20. 一种治疗关节的方法,包括:
对需要制剂的受试者施用包含高分子量透明质酸和至少一种稳定剂的制剂。
21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述施用步骤还包括在施用前将所述制剂在室温下贮存。
22. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述施用步骤还包括在施用前将所述制剂与至少一种附加组分混合。

用于稳定的多糖制剂的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明整体涉及用于治疗关节的组合物和方法。

背景技术

[0002] 骨关节炎 (“OA”) 是关节炎的最常见形式, 该类关节炎特征在于关节的骨骼、软骨和滑膜的退行性 (关节逐渐衰坏) 或异常变化。OA 通常特征在于相对关节表面的逐渐磨损, 有时伴随导致患者疼痛、肿胀和僵硬的炎症。OA 可能在关节创伤之后、关节感染之后或仅仅由于衰老, 在一个或多个关节中发生。此外, 有新的证据表明异常解剖结构、遗传因素和肥胖症可导致 OA 的早期发展。

[0003] OA 的治疗通常涉及运动、物理治疗、生活方式改变和止痛药的组合。对乙酰氨基酚通常为 OA 的一线治疗。对于轻度至中度症状而言, 其效力类似于非甾族抗炎药物 (“NSAID”), 如布洛芬。对于更严重的症状, NSAID 可能更有效。然而, 尽管 NSAID 更有效, 但 NSAID 在重症病例中伴随有更大的副作用, 如胃肠道出血和肾并发症。另一类 NSAID, 即 COX-2 选择性抑制剂 (如 Celecoxib) 与 NSAID 效力相同, 但在副作用方面并不更安全。有若干种可供局部使用的 NSAID, 包括双氯芬酸。通常, 它们的全身副作用比口服小, 且至少有一些疗效。尽管阿片类止痛药 (如吗啡和芬太尼) 可以改善疼痛, 但频繁的不良事件之弊超过了这种有益效果, 因此它们没有被常规使用。关节内类固醇注射也用于治疗 OA, 它们在减轻疼痛方面非常有效, 尤其在表现出 OA 炎性特点的患者中。然而, 镇痛的持续时间只限于 4 至 6 周, 并存在可能包括旁侧软骨损伤的不良影响。如果疼痛减弱, 可以用关节置换手术改善行动和生活质量。尚无经确证的治疗方法可减缓或治愈该病症。

[0004] 对于通过单纯的止痛药 (如对乙酰氨基酚) 或运动和物理治疗无法充分减轻疼痛的患者而言, 关节内注射透明质酸 (HA) 提供了另一种解决症状性疼痛的治疗选择, 并可以推迟进行全关节置换手术的需要。据知, OA 患者体内的天然 HA 的浓度和分子量不足, 因此认为关节注射外源 HA 可以补充这些分子并恢复滑液的粘弹性性质。正是这种性质起到润滑和缓冲关节的作用。还有证据表明, HA 通过结合到细胞表面受体上而具有生物活性, 并可以具有减轻炎症和软骨退变的作用。不管作用机理是什么, 观察到在一个疗程后, 镇痛持续约 6 个月。美国市场上的 HA 产品要获得这种镇痛的耐久性, 其疗程可以在单次注射至需要每周注射 3 至 5 次的其他注射方式之间变化。

[0005] 目前, 美国市场上的透明质酸 (“HA”) 制剂以预充式注射器中的即用液 HA 溶液形式商购获得。它们可以在室温下储存, 并通常具有两年的保存期。尽管低至中等分子量的 HA 可以是有效的, 但高分子量 HA 制剂可以具有附加的有益效果, 尤其是在较高的 HA 浓度下。然而, 溶液中的 HA 据知会在室温下随时间降解, 这由 HA 分子量的减小来测定, 其中 HA 分子量的减小会影响其作为 OA 治疗剂的功效。

[0006] 仍然需要改进的关节治疗方法和组合物, 具体地讲是单独使用高分子量 HA 或与附加组分联合使用, 以解决与目前治疗相关的稳定性和保存期问题的改进的关节治疗方法和组合物。

发明内容

[0007] 本发明提供了用于治疗关节病症（如骨关节炎和 / 或与其相关的疼痛）的组合物和方法。本文所公开的方法和组合物一般地涉及结合至少一种稳定剂而使用第一组分即透明质酸（“HA”）来治疗关节。

[0008] 在一个方面，本发明公开了用于治疗关节病症的制剂或组合物，其中包括一种制剂。所述制剂或组合物可以是液体形式。所述制剂在室温下可以还保持稳定。此外，所述制剂可以包括透明质酸（HA）溶液。HA 制剂可以是高分子量 HA。分子量可以是（例如）500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000kDa 或更大，或源自其中的任何范围。在示例性实施例中，HA 具有约 1MDa 至 6MDa 范围内的分子量。在另一个示例性实施例中，HA 具有大于 1MDa 的分子量。

[0009] 此外，HA 制剂可以特定浓度存在于液体、固体或冻干形式中。在一个实施例中，HA 以至少约 1mg/ml 的液体浓度存在。在另一个示例性实施例中，HA 具有至少约 5mg/ml，更优选地至少约 7mg/ml，更优选地至少约 10mg/ml，更优选地至少约 15mg/ml 的液体浓度，并且在一些实施例中，浓度可以为至少约 25mg/ml。在另一个实施例中，HA 的浓度可以在约 15mg/ml 至约 25mg/ml 范围内。

[0010] 在另一方面，所述制剂或组合物包含至少一种附加组分。添加到制剂或组合物中的附加组分可以是（例如）氨基酸、氨基糖、糖醇、蛋白质、糖类、二糖、寡糖类、多糖类、核酸、缓冲剂、表面活性剂、脂质、脂质体、其他赋形剂，以及它们的混合物。其他可用的组分可以包括类固醇、抗炎剂、非甾族抗炎剂、止痛药、细胞、抗生素、抗微生物剂、抗炎剂、生长因子、生长因子片段、小分子伤口愈合促进剂、激素、细胞因子、肽、抗体、酶、分离细胞、血小板、免疫抑制剂、核酸、细胞类型、病毒、病毒颗粒、必需营养物质、矿物质、金属或维生素，以及它们的组合。另外，制剂或组合物可以包括稀释剂，如水、盐水或缓冲剂。

[0011] 在一个示例性实施例中，所述制剂或组合物包括至少一种稳定剂或稳定赋形剂，例如生育酚、生育酚衍生物、甘露糖醇、葡萄糖、蔗糖和海藻糖。稳定剂的含量范围可以为约 0.1-70 重量%；约 0.1-50 重量%；约 0.1-20 重量%；或约 0.5-20 重量%。作为另外一种选择，赋形剂存在的浓度可以在约 1mg/ml 至约 700mg/ml 范围内，更优选地在约 1mg/ml 至约 500mg/ml 范围内，更优选地在约 1mg/ml 至约 200mg/ml 范围内，更优选地在约 5mg/ml 至约 200mg/ml 范围内。

[0012] 在另一方面，所述制剂或组合物包括至少一种附加组分，如糖胺聚糖（GAG），包括：如硫酸软骨素（“CS”）、硫酸皮肤素、肝素、硫酸乙酰肝素和硫酸角质素之类的 GAG，或 GAG 前体，如葡糖胺（“GlcN”）。在一个实施例中，存在于组合物中的 GAG 或 GAG 前体的浓度可以为至少约 0.1mg/ml，更优选地为至少约 2mg/ml，更优选地为至少约 5mg/ml，更优选地为至少约 7mg/ml，更优选地为至少约 20mg/ml。在另一个实施例中，GAG 可以具有多种分子量，但在某些示例性实施例中，分子量在约 5 至 1,000kDa 范围内，更优选地在约 6 至 500kDa 范围内，更优选地在约 7 至 300kDa 范围内，更优选地在约 8 至 200kDa 范围内，更优选地在约

9 至 100kDa 范围内,并且最优选地在约 10 至 80kDa 范围内。在其他实施例中,GAG 片段的分子量可以低于约 5kDa,甚至更优选地低于约 3kDa。在另一个实施例中,GAG 前体可以具有约 180Da 的分子量。在其他实施例中,GAG 前体可以具有至少约 100Da 的分子量。在一个示例性实施例中,GAG 前体可以具有约 100Da 至约 250Da 范围内的分子量。

[0013] 此外,所述制剂或组合物可以具有约 1 : 0.001 至约 1 : 100 范围内的 HA 与稳定剂的重量比,更优选地约 1 : 0.0125 至约 1 : 10、约 1 : 0.00125 至约 1 : 100 范围内的比率,更优选地约 1 : 0.01 至约 1 : 10 范围内的比率。作为另外一种选择,所述制剂或组合物可以包含约 1 重量%至约 75 重量%或更多的各个单独组分,如 HA 和稳定剂。

[0014] 另一个方面可以包括试剂盒和使用试剂盒的方法。所述试剂盒可以包括高分子量透明质酸 (HA) 溶液和至少一种稳定剂。所述试剂盒可以在室温下储存。另外,所述试剂盒可以包括在单室中包含 HA 溶液和稳定剂的注射器。另一个实施例可以包括含有 HA 溶液和稳定剂的单室以及具有附加组分(如 GAG 或 GAG 前体)的隔室。例如,糖胺聚糖 (GAG) 可以存在于试剂盒中与 HA/ 稳定剂溶液隔室中。附加组分可以液体、固体或冻干形式存在。试剂盒还可以包括稀释剂,如水、盐水和缓冲剂,以使组分、附加组分之一溶解。

[0015] 在另一方面,公开了用于治疗关节的方法,该方法包括给需要的受试者施用包含高分子量透明质酸的液体制剂。该方法可以包括稳定剂存在下的高分子量透明质酸。另外,在施用之前,可以将高分子量透明质酸储存在室温下的液体制剂中。所述方法可以还包括施用存于试剂盒或存于高分子量 HA 制剂或组合物中的 HA 溶液。

附图说明

[0016] 通过本文所包括的附图,上述特征、优点和目的会变得清晰,并能够更详细地了解。这些附图构成本说明书的一部分。然而,应当注意附图是对示例性实施例的举例说明,不应视为限制本发明的范围。

[0017] 图 1 为用于本发明组合物和方法的混合和递送系统的一个实施例的示意图;

[0018] 图 2 为用于本发明组合物和方法的混合和递送系统的另一个实施例的透视图;

[0019] 图 3 示出了当在 5°C 和 40°C /75% RH 下在 HA 和 CS 盐水溶液中储存 5 个月时通过尺寸排阻色谱法 - 高效液相色谱 (SEC-HPLC) 确定的 HA 的降解;

[0020] 图 4 示出了在 5°C 和 40°C /75% RH 下在具有 CS 的溶液中储存 5 个月时通过 SEC-HPLC 确定的海藻糖对 HA 的稳定作用;

[0021] 图 5 为接受了关节内海藻糖注射治疗的大鼠与未接受治疗的那些大鼠在大鼠内侧半月板撕裂 (MMT) 模型中的软骨损伤宽度的对比图;

[0022] 图 6 为接受了关节内海藻糖注射的大鼠与未接受治疗的那些大鼠在大鼠 MMT 模型中的软骨损伤深度比的对比图;

[0023] 图 7 为接受关节内海藻糖注射的大鼠与未接受治疗的那些大鼠在大鼠 MMT 模型中的胶原降解的对比图;

[0024] 图 8 示出了海藻糖对内侧胫骨坪的软骨降解的影响;以及

[0025] 图 9 示出了海藻糖对兔子骨关节炎前交叉韧带切断 (ACLT) 模型中软骨降解的影响。

具体实施方式

[0026] 一般而言,本发明提供了用于治疗关节病症(如骨关节炎和/或与其相关的疼痛)的组合物和方法。所述组合物和方法单独使用第一组分即高分子量透明质酸(“HA”),单独使用或者与附加组分联合使用,与稳定剂结合以延长保存期。在一个示例性实施例中,组合物包括使 HA 稳定的稳定剂或稳定赋形剂,以及(如果存在的话)GAG 或 GAG 前体。

[0027] 透明质酸

[0028] 透明质酸(HA)可以具有多种剂型并可以多种浓度和分子量提供。术语“透明质酸”、“透明质烷”、“透明质酸盐”和“HA”在本文中可互换使用,是指透明质酸或透明质酸盐,如钠、钾、镁和钙盐,等等。这些术语还旨在不仅包括纯透明质酸溶液,还包括具有其他痕量元素或在多种具有其他元素的组合物中的透明质酸。术语“透明质酸”、“透明质烷”和“HA”涵盖 HA 的化学或聚合或交联的衍生物。可对 HA 进行的化学改性的例子包括试剂与 HA 四个反应基团(即乙酰胺基、羧基、羟基和还原端)的任何反应。本申请中所用的“HA”意在包括天然制剂(从动物组织中分离)或合成制剂(源自细菌发酵)或它们的组合。HA 可以为液态,或者以可用稀释剂复原而获得合适浓度的固体剂型提供。

[0029] HA 为糖胺聚糖(GAG),具体地讲,HA 为由交替的葡糖醛酸和 N-乙酰基葡糖胺单元组成的非支链多糖。液体时,HA 具有粘弹性性质。HA 还作为聚集蛋白聚糖的重要结构成分存在于软骨细胞外基质中,其中聚集蛋白聚糖构成蛋白聚糖复合物。蛋白聚糖复合物的主要功能是将水保留在软骨基质中,以赋予其特有的膨压和机械回弹性。

[0030] HA 不仅有助于保持缓冲关节的软骨的良好机械性能,还是滑液的主要成分。

[0031] HA 异常是结缔组织疾病的共同点。因此,HA 可以用来预防、治疗结缔组织疾病或有助于其手术修复。

[0032] 在本发明的组合物和方法中,可以使用多种分子量的 HA。由于 HA 为聚合物分子,所以 HA 组分可以表现出一系列的分子量,几乎任何模态分子量平均数的 HA 制剂都可以用于本发明的组合物和方法,包括低分子量(“LWM”)透明质烷(约 500 至 700 千道尔顿(kDa))、中等分子量(“MMW”)透明质烷(700-1000kDa)和高分子量(“HMW”)透明质烷(1.0-6.0 百万道尔顿(MDa))。在某些示例性实施例中,HA 具有至少约 700kDa 的分子量,在某些实施例中,HA 为具有至少约 1MDa 的分子量的高分子量(“HWM”)HA。所述分子量可以是(例如)500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000kDa 或更大,或源自其中的任何范围。可以料想到,化学改性的 HA 可具有与上文所述大不相同的分子量。交联的 HA 同样可以具有比上述高得多的分子量。无论如何,这些物质同样适用于本发明。

[0033] HA 可以固体、冻干或液体形式存在。呈液态时,可以用溶剂溶解 HA。溶剂可以包括(但不限于),水、盐水或其他盐溶液、缓冲液(如磷酸盐缓冲盐水)、组氨酸、乳酸盐、琥珀酸盐、甘氨酸和谷氨酸盐、右旋糖、甘油,以及它们的组合。

[0034] HA 在制剂中的浓度也可以变化,但在一个示例性实施例中,HA 以药学上有效量提供。在一个实施例中,HA 具有至少约 1mg/ml 的浓度。在一个示例性实施例中,HA 具有至少约 5mg/ml,更优选地至少约 7mg/ml,更优选地至少约 10mg/ml,更优选地至少约 15mg/ml

的浓度,并且在一些实施例中,该浓度可为至少约 25mg/ml。在另一个实施例中,HA 可以具有约 15mg/ml 至约 25mg/ml 范围内的浓度。合适的 HA 浓度包括约 1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml、56mg/ml、57mg/ml、58mg/ml、59mg/ml、60mg/ml 或更高,或源自其中的任何范围。

[0035] 在一个实施例中,第一组分包含浓度在约 5 至 40mg/ml 范围内的高分子量 (1 至 6MDa) 的 HA。一种此类产品为由马萨诸塞州贝德福德市阿尼哥医疗公司 (Anika Therapeutics, Inc. of Bedford, MA) 制造的 Orthovisc®。Orthovisc® 为透明质酸的无菌、非致热、透明粘弹性溶液。Orthovisc® 由溶解于生理盐水中并具有 12.5 至 17.5mg/ml 之间的标称浓度的高分子量 (1.0–2.9MDa)、超纯天然透明质酸构成。Orthovisc® 通过细菌发酵分离。本领域技术人员会认识到,诸如资生堂 (Shiseido) 和生命中心 (Lifecore) 这些公司可以通过细菌发酵方法生产高分子量 HA。可得自美国的具有这些特性的 HA 产品的另一个例子是 Euflexxa®。

[0036] 稳定剂

[0037] HA 可以与至少一种稳定剂混合。本发明的方法和组合物中可以使用稳定剂。稳定剂可以是糖或衍生物,如糖类、二糖、改性的糖类、糖醇或多糖。在一个示例性实施例中,稳定剂可以是生育酚、生育酚衍生物、葡萄糖、甘露糖醇、蔗糖和 / 或海藻糖。

[0038] 制药工业中常用的稳定剂或稳定赋形剂为糖类、二糖、改性的糖类、糖醇和多糖。这些分子中的一些通常用作赋形剂,因为当药物为口服的片剂形式时,它们还可以当作甜味剂。根据美国专利 No. 7, 351, 798, 透明质酸和糖胺聚糖也可以是赋形剂。长期以来,人们一直认为这些多糖是稳定的分子。事实上,美国销售的所有 HA 材料都在室温下储存。这些 HA 产品中的一些是在缓冲液中,或在盐水溶液中,但均不包括任何其他赋形剂。这些 HA 产品在美国被认可为粘弹性补充器材,其被注入关节内以减轻因骨关节炎造成的疼痛。另外,市场上被称为 Viscoat (由爱尔康公司 (Alcon) 销售) 的产品是一种在缓冲液中加入透明质酸和硫酸软骨素并且不含其他赋形剂的制剂。该产品在人工晶状体植入过程中用于眼科手术。据知,HA 储存在室温下会导致稳定性逐渐丧失并降解成较低的分子量,尤其是在存在其他组分如硫酸软骨素的情况下,因此,Viscoat 需要冷藏。

[0039] 生育酚属于包含一、二和三甲基生育酚的一类化学化合物。许多生育酚表现出维生素 E 活性。 β 、 γ 和 δ 是 α -生育酚的立体异构体。生育酚的酯通常用于美容产品和个人护理产品中。这些酯包括生育酚乙酸酯,即生育酚的乙酸酯;生育酚亚油酸酯,即生育酚的亚油酸酯;生育酚亚油酸酯 / 油酸酯,即生育酚的亚油酸酯和油酸酯的混合物;生育酚烟酸酯,即生育酚的烟酸酯;以及生育酚琥珀酸酯,即生育酚的琥珀酸酯。磷酸抗坏血酸酯生育酚酯钾即维生素 E (生育酚) 和维生素 C (抗坏血酸) 这两者的盐,也可用于美容产品。

[0040] 可以存在于美容产品中的其他生育酚衍生的成分包括二油基生育酚甲基硅烷醇和托可索仑,其中二油基生育酚甲基硅烷醇是生育酚乙酸酯单醚与甲基硅烷三醇的二油基

醚,托可索仑也称为生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯。将琥珀酸和平均 22 个环氧乙烷基团添加到生育酚中会产生托可索仑,即生育酚的水溶形式。

[0041] 由于具有低吸湿性、优异的化学和物理药物相容性、较好的甜味和相对较慢的溶解动力学过程,甘露糖醇也是示例性稳定剂。它还具有相对低的水溶解性和良好的可分散性,通常在其他赋形剂无效时用来增强制剂稳定性。甘露糖醇可以多种多样的剂型使用,包括(但不限于)片剂、胶囊剂、小药囊、锭剂、液体、乳剂、混悬剂、油膏剂、糊剂、洗剂和静脉注射溶液。

[0042] 甘露糖醇还用作冻干法的基质形成添加剂。当以最高 10% w/v 的浓度使用时,甘露糖醇形成无定形(非晶形)基质,它支持蛋白质和其他生物分子进行冷冻干燥。它一般是惰性的,并且一旦冷冻干燥,就会快速再水化。冷冻时它的无定形结构防止它破坏蛋白质,同时在加工过程中为水升华提供通道。

[0043] 与甘露糖醇相似,蔗糖也因其甜味和适口性而被广泛地以口服片剂形式使用。蔗糖是广泛用作冻干保护剂的非还原性二糖(葡萄糖通过其异头碳连接到果糖上)。

[0044] 海藻糖(α -D-吡喃葡萄糖基 α -D-吡喃葡萄糖苷)是一种因其抗氧化剂性质而著称的二糖,它被称为由葡萄糖组成的非还原性糖类。如美国学术出版社(Academic Press, USA)出版的 *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 18, pp. 201-225(1963)(《糖化学进展》,第 18 卷,第 201-225 页,1963 年)和 *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, pp. 3, 213-3, 215(1990)(《应用与环境微生物学》,第 56 卷,第 3, 213-3, 215 页,1990 年)中所述,海藻糖广泛存在于微生物、蘑菇、昆虫等中,然而含量较低。海藻糖为非还原性糖类,所以它不与包含氨基的物质(如氨基酸和蛋白质)反应,不会引发氨基-羰基反应,也不会破坏包含氨基酸的物质。因此,可以使用海藻糖,而不用担心会产生令人不满的褐变和变质。

[0045] 海藻糖还能抑制炎症级联反应,从而抑制细胞因子产生。(Minutoli, et al, SHOCK, Vol. 27, No. 1, pp. 91-96, 2007 (Minutoli 等人,《休克》,第 27 卷,第 1 期,第 91-96 页,2007 年);和 Chen Q, Haddad GG: Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J Exp Biol* 207:3125-3129, 2004 (Chen Q, Haddad GG, 海藻糖磷酸合酶和海藻糖在缺氧情况下的作用:从苍蝇到哺乳动物,《实验生物学杂志》,第 207 卷,第 3125-3129 页,2004 年))。海藻糖是一种能够保护生物分子免受环境胁迫的独特的糖,它可以抑制继而导致氧化损伤和细胞因子产生的炎症级联反应。还表明,海藻糖可在暴露于一系列环境胁迫如热休克、脱水和缺氧时保持细胞活力。

[0046] 海藻糖还是常见的食品添加剂,因为它是强效抗氧化剂和甜味剂,并且它通常用作药物制剂中的稳定剂。海藻糖与蔗糖类似,是非还原性二糖(两个葡萄糖分子通过异头碳相连),可用作冷冻干燥蛋白质和其他生物分子的有效冻干保护剂。在冷冻干燥过程中,蛋白质可能会随着水被移除而变性,除非有替代分子支持蛋白质的结构。海藻糖填充水离开后留下的空隙,并防止发生这种变性。当以低至 2% 的浓度使用时,它可以有效地保护蛋白质和其他生物分子。

[0047] 可用的海藻糖形式可以包括海藻糖二水合物(TD),它是玻璃状的结晶的、无定形海藻糖(AT);以及海藻糖的无水形式,即无水无定形海藻糖(AAT)和无水结晶海藻糖(ACT)。粉末状的无水海藻糖可以包含 AAT 和 / 或 ACT。如本文所用,术语“海藻糖”是指海

藻糖的任何物理形式,包括无水的、部分水化的、完全水化的以及它们的混合物和溶液。来自 TD 的无水海藻糖的制造和使用可见于国际公布 No. PCT/GB97/00367,该公布的公开内容以引用的方式并入本说明书中。

[0048] 在制剂或组合物中添加海藻糖可以有助于使高分子量 HA 稳定以及抑制破坏性的炎症级联反应。海藻糖可以液体、固体、冻干或结晶形式存在。当以液体形式存在时,海藻糖可以在缓冲液中。可用于使海藻糖溶解的溶剂可以包括(但不限于)水、盐水或其他盐溶液、缓冲液(如磷酸盐缓冲盐水)、组氨酸、乳酸盐、琥珀酸盐、甘氨酸和谷氨酸盐、右旋糖、甘油以及它们的组合。具体地讲,海藻糖可以溶液形式存在于 HA 制剂中。

[0049] HA 制剂中可以存在至少一种稳定剂。可用于使稳定剂溶解的溶剂可以包括(但不限于)水、盐水或其他盐溶液、缓冲液(如磷酸盐缓冲盐水)、组氨酸、乳酸盐、琥珀酸盐、甘氨酸和谷氨酸盐、右旋糖、甘油以及它们的组合。具体地讲,稳定剂可以溶液形式存在于 HA 制剂中。

[0050] 存在于 HA 制剂中的至少一种稳定剂的浓度可以变化,但在一个示例性实施例中,至少一种赋形剂以药学上有效量提供。在一个示例性实施例中,所述至少一种稳定剂具有至少约 1mg/ml,更优选地至少约 5mg/ml,更优选地至少约 50mg/ml,更优选地至少约 100mg/ml 的浓度,并且在一些实施例中,浓度可为至少约 200mg/ml。至少一种稳定剂的合适浓度可以包括约 0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml、56mg/ml、57mg/ml、58mg/ml、59mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、160mg/ml、160mg/ml、170mg/ml、180mg/ml、190mg/ml、200mg/ml、300mg/ml、400mg/ml、500mg/ml、600mg/ml 或更高,或源自其中的任何范围。稳定剂的浓度范围还可以为约 0.1-60 重量%;约 0.1-50 重量%、约 0.1-45 重量%、或约 0.1-20 重量%。至少一种赋形剂的其他合适浓度可包括约 0.1 重量%、0.5 重量%、1 重量%、2.5 重量%、5 重量%、6 重量%、7 重量%、8 重量%、9 重量%、10 重量%、11 重量%、12 重量%、13 重量%、14 重量%、15 重量%、16 重量%、17 重量%、18 重量%、19 重量%、20 重量%、25 重量%、30 重量%、35 重量%、40 重量%、45 重量%、50 重量%、55 重量%或约 60 重量%。

[0051] 附加组分

[0052] 在一个示例性实施例中,也可以将至少一种附加组分与 HA 制剂或组合物组合。附加组分可以是冻干糖胺聚糖(GAG)或 GAG 前体。术语“糖胺聚糖”或“GAG”可互换使用,是指硫酸化粘多糖家族,通常包括肝素、硫酸肝素、软骨素、硫酸软骨素、硫酸角质素、硫酸皮肤素和它们相应的衍生物。

[0053] 糖胺聚糖(GAG)是包含重复二糖单元的长非支链多糖。二糖单元包含两个改性的糖 N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)或 N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)中的任一个,以及糖醛酸,如

葡萄糖醛酸酯或艾杜糖醛酸酯。GAG 是高负电分子,具有为混合物提供高粘度的伸展构象。GAG 主要位于细胞表面上或细胞外基质 (ECM) 中。GAG 的高粘度伴随着低压缩性,这使得这些分子特别适合关节中的润滑液。因此,GAG 可以帮助减缓炎性过程。同时,它们的硬度为细胞提供结构完整性,并提供细胞之间的通道,以便于细胞迁移。此外,已发现 GAG (如 CS) 存在于滑液中,并可以在关节健康方面发挥作用。因此,有利的是具有可以与 HA 同时递送 CS 的疗法。据信,CS 可以增强 HA 的功效。然而,已经观察到在存在 CS 的情况下 HA 会随时间发生降解。因此,为了防止这种降解,HA 必须被冷藏着直至使用。然而,大部分诊所和医院没有将这类产品储存在冰箱中的能力,所以有利的是提供稳定的并且能够在室温下储存的 HA 与 GAG 结合的产品。

[0054] GAG 可以具有多种分子量,但在某些示例性实施例中,分子量在约 5 至 1,000kDa 范围内,更优选地在约 6 至 500kDa 范围内,更优选地在约 7 至 300kDa 范围内,更优选地在约 8 至 200kDa 范围内,更优选地在约 9 至 100kDa 范围内,最优选地在约 10 至 80kDa 范围内。在其他实施例中,GAG 片段的分子量低于约 5kDa,甚至更优选地低于约 3kDa。

[0055] 存在于混合物中的 GAG 的浓度也可以变化,但在一个示例性实施例中,GAG 以药学上有效量提供。在一个示例性实施例中,GAG 具有至少约 0.1mg/ml,更优选地至少约 2mg/ml,更优选地至少约 5mg/ml,更优选地至少约 7mg/ml、更优选地至少约 20mg/ml 的浓度。在另一个实施例中,存在于组合物中的 GAG 或 GAG 前体的浓度可在约 0.1mg/ml 至约 20mg/ml 范围内。GAG 的合适浓度包括约 0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml、56mg/ml、57mg/ml、58mg/ml、59mg/ml、60mg/ml 或更高,或源自其中的任何范围。

[0056] 硫酸软骨素 (CS) 是软骨的基本组分,它由通过交替的 β (1,3) 和 β (1,4) 键连接的硫酸化和 / 或未硫酸化 D- 葡萄糖醛酸 (GlcA) 和 N- 乙酰基 -D- 半乳糖胺 (GalNAc) 残基的交替序列组成。这些化合物各自具有主要由约 40 至 100 次重复的二糖单元构成的聚合结构。CS 可以多种分子量和浓度使用,如上文对于 GAG 组分的讨论,但在一个示例性实施例中,CS 具有约 10,000 至 80,000kDa 范围内的分子量和约 0.1 至 100mg/ml 范围内的浓度。CS 可以从牛或海洋来源中分离。软骨素链可以有 100 种以上的独立糖,其中每一种都可以可变的位置和数量硫酸化。软骨素 -4 硫酸,也称为碳 4N- 乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 糖,它存在于牛和猪的鼻腔和气管软骨中。它还存在于这些动物的骨骼、肉体、血液、皮肤、脐带和尿液中。软骨素 -6 硫酸,也称为碳 6 GalNAc 糖,已从这些动物的皮肤、脐带和心脏瓣膜中分离。软骨素 -6 硫酸具有相同的组成,但物理性质与软骨素 -4 硫酸稍有不同。硫酸软骨素参与胶原的结合,还直接参与水分的保持。这两个都是有助于愈合过程的性质。本领域技术人员会知道,术语“硫酸软骨素”、“CS”、“软骨素”、“软骨素硫酸”和“康德灵”在本文中可以互换使用,并在本专利申请中还涵盖化学衍生物或异构体衍生物或交联衍生物。

[0057] 硫酸皮肤素 (DS) 也称为硫酸软骨素 B, 它主要由通过 β 1, 4 或 1, 3 键连接的 L- 艾杜糖醛酸和 N- 乙酰基 -D- 半乳糖胺的二硫酸化和 / 或三硫酸化二糖单元组成, 但有一种情况是重复单元中的一些包含糖醛酸形式的硫酸化 L- 艾杜糖醛酸或 D- 葡萄糖醛酸, 或包含非硫酸化 N- 乙酰基半乳糖胺或 4, 6- 二硫酸化 N- 乙酰基半乳糖胺, 而不是 N- 乙酰基半乳糖胺 -4- 硫酸。DS 通过 GalNAc 的存在而被定义为硫酸软骨素。DS 中存在艾杜糖醛酸 (IdoA) 将其与硫酸软骨素 -A (4-O- 硫酸化) 和 -C (6-O- 硫酸化) 区别开来, 并使得其与肝素和 HS 相似, 肝素和 HS 也包含该残基。据认为, 硫酸皮肤素在口服时被身体吸收。DS 的分子量和浓度可以变化, 如上文对于 GAG 组分的讨论, 但在一个示例性实施例中, 分子量在约 10 至 80kDa 范围内, 浓度在约 0.1 至 100mg/ml 范围内。本领域技术人员会知道, HA 是细菌发酵的, 因此具有可控的分子量, 与 HA 不同的是, 硫酸皮肤素是从动物组织中分离出来的并可以含有片段。因此, 硫酸皮肤素和其中包含的任何片段的分子量可以大幅变化。本领域技术人员同样会知道, 术语“硫酸皮肤素”、“DS”和“皮肤素”在本文中可以互换使用, 并且还包括硫酸皮肤素的硫酸化衍生物、硫酸皮肤素苄乙氧铵盐、硫酸皮肤素苄乙氧铵盐的过硫酸盐衍生物, 以及硫酸皮肤素钠盐。

[0058] 肝素和硫酸乙酰肝素 (HS) 由连接至 N- 乙酰基葡萄糖胺的葡萄糖醛酸 (GlcA) 组成。它们由 α 1-4 连接的包含糖醛酸和氨基糖的二糖重复单元组成。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖是基底膜的重要组成部分。HS 蛋白聚糖为分子质量高达 400kDa 的生物大分子, 它由共价键合到硫酸乙酰肝素链上的核心蛋白构成。多糖链的数量和核心蛋白的大小可以根据来源而有所不同。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖是通过糖部分结合到成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 VEGF 受体上的多功能分子, 它充当基质裂解蛋白 (MMP-7) 和其他基质金属蛋白酶的对接分子, 并在细胞增殖和分化中发挥重要作用。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖还通过结合到存在于细胞外基质中的多个分子上促进细胞附着, 所述多个分子包括层粘连蛋白、纤连蛋白、IV 型胶原和碱性成纤维细胞生长因子。HS 的分子量和浓度可以变化, 如上文对于 GAG 组分的讨论, 但在一个示例性实施例中, 分子量在约 3 至 30kDa 范围内 (从组织中分离时), 浓度在约 0.1 至 100mg/ml 范围内。

[0059] 硫酸角质素也称为硫酸角质 (KS), 它是高度带负电的并主要存在于聚集蛋白聚糖中, 是透明软骨、纤维软骨和弹性软骨的细胞外基质中最丰富的蛋白聚糖。KS 由二糖重复单元 -4GlcNAc β 1-3Gal β 1- 组成。硫酸盐化发生在半乳糖 (Gal) 或 GlcNAc 中任一者或两者的碳位置 6 (C6) 处。具体的 KS 类型由三个区域组成: 键合区域、重复二糖单元和链封端区域, 其中 KS 链在键合区域的一端连接到核心蛋白上, 链封端区域出现在 KS 链的与蛋白质键合区域相对的一端。KS 的分子量和浓度可以变化, 如上文对于 GAG 组分的讨论, 但在一个示例性实施例中, 分子量在约 5 至 10kDa 范围内 (从组织中分离时), 浓度在约 1 至 100mg/ml 范围内。

[0060] 存在于混合物中的 GAG 或 GAG 前体的浓度也可以变化, 但在一个示例性实施例中, GAG 或 GAG 前体以药学上有效量提供。在一个示例性实施例中, GAG 或 GAG 前体具有至少约 0.1mg/ml, 更优选地至少约 2mg/ml, 更优选地至少约 5mg/ml, 更优选地至少约 7mg/ml, 更优选地至少约 20mg/ml 的浓度。在另一个实施例中, 存在于组合物中的 GAG 或 GAG 前体的浓度可以在约 0.1mg/ml 至约 20mg/ml 范围内。GAG 或 GAG 前体的合适浓度包括约 5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、

16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml、56mg/ml、57mg/ml、58mg/ml、59mg/ml、60mg/ml 或更高,或源自其中的任何范围。

[0061] 本领域技术人员会知道,虽然冻干 GAG 或 GAG 前体特别适用于示例性实施例,但液体 GAG 或 GAG 前体也可以用于所述组合物中。例如,CS 可以粉末形式获得并与溶剂(如水)混合形成溶液。所述溶液可与液体 HA 混合而形成混合物,该混合物与单独的 HA 相比粘度有所降低。虽然能有效降低 HA 的粘度,但由于存在水,所得的混合物也会具有降低的浓度。因此,虽然液体形式的非冻干 GAG 可用于本发明,但在一个示例性实施例中,仍将 GAG 冻干以便于使用高浓度的 HA。

[0062] HA 制剂中还可以包含葡糖胺($C_6H_{13}NO_5$) (“GlcN”)或它的衍生物或其他 GAG 前体,以便通过为透明质烷和蛋白聚糖形成所需的两个反应供给原料来提高软骨和滑液的主要成分的合成。GlcN 为含有四个羟基和一个氨基的氨基糖,它是糖基化蛋白质和脂质的生物化学合成中的重要前体。GlcN 是具有营养和效应子功能的天然存在的分子。例如,GlcN 相容于并可促进干细胞生长和间充质干细胞的分化,以形成软骨细胞。GlcN 可在组织发育和修复方面具有一定的作用,一般而言例如软骨生长和发育。它用作抗击 OA 症状的营养补充物质,并在临床研究中显示能减缓对软骨的破坏作用。在一个实施例中,GlcN 可以与 CS 一起冻干。葡糖胺的盐形式在液相中只具有有限的稳定性。此外,GlcN 的 HCl 盐可充分降低 pH,足以使 HA 一旦被混合就降解。因此,为了保持组分的稳定性,有利的是在注射之前将冻干形式的 GlcN 用 HA 凝胶溶解。如本文所用,“葡糖胺”包括葡糖胺盐,如葡糖胺盐酸盐和葡糖胺硫酸盐,以及非盐形式,如 N-乙酰基葡糖胺。

[0063] GlcN 的浓度可以变化。合适的局部浓度可以为至少约 10mg/ml、约 9mg/ml、约 8mg/ml、约 7mg/ml、约 6mg/ml、5mg/ml、4.5mg/ml、4mg/ml、3.5mg/ml、3mg/ml、约 2.9mg/ml、约 2.8mg/ml、约 2.7mg/ml、约 2.6mg/ml、约 2.5mg/ml、约 2.4mg/ml、约 2.3mg/ml、约 2.2mg/ml、约 2.1mg/ml、约 2.0mg/ml、约 1.9mg/ml、约 1.8mg/ml、约 1.7mg/ml、约 1.6mg/ml、约 1.5mg/ml、约 1.4mg/ml、约 1.3mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.1mg/ml、约 1.0mg/ml、约 0.9mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.5mg/ml 等。本领域的技术人员在实施制药学领域已知的方法时可以确定 GlcN 的合适的局部浓度,通过这种确定可以控制所关注的 GlcN 组合物的性质和组成,以获得所需的 GlcN 浓度。

[0064] 也可以在 HA 制剂中添加缓冲剂,以控制 pH。缓冲剂的例子可以是以下试剂中的任何一种或多种(并且不限于):乙酸、碳酸铵、磷酸铵、硼酸、柠檬酸、甘氨酸、乳酸、磷酸、柠檬酸钾、偏磷酸钾、磷酸二氢钾、乙酸钠、柠檬酸钠、乳酸钠溶液、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、TRIS 和碳酸钠。

[0065] 另外,可以加入等渗剂,以控制 HA 制剂的离子浓度和/或渗透压。等渗剂的例子可以是以下试剂中的任何一种或多种(并且不限于):右旋糖、蔗糖、海藻糖、甘油、甘露糖醇、氯化钾、氯化钠。

[0066] 本领域技术人员会知道,本发明的组合物和方法可以包括多种其他关节治疗组

分,包括(例如)氨基酸、蛋白质、糖类、二糖、多糖、脂质、核酸、缓冲剂、表面活性剂以及它们的混合物。其他可用的组分可以包括类固醇、抗炎剂、非甾族抗炎剂、止痛药、细胞、抗生素、抗微生物剂、抗炎剂、生长因子、生长因子片段、小分子伤口愈合促进剂、激素、细胞因子、肽、抗体、酶、分离细胞、血小板、免疫抑制剂、核酸、细胞类型、病毒、病毒颗粒、必需营养物质或维生素以及它们的组合。

[0067] 冻干

[0068] 本发明组合物和方法中存在的组分的任何一种或多种可以用本领域已知的多种技术进行冻干。冻干是通常用于保存易腐材料的脱水方法,它的工作原理是将材料冷冻,然后降低周围压力并施加足够的热量,使材料中的冻结水能够直接从固相升华为气相。可以用本领域已知的标准冻干技术来冻干任何一种或多种组分。在一个示例性实施例中,HA 是冻干的。

[0069] 在冻干之前,可以用多种溶剂形成包含要冻干的组分的水性混合物。在一个示例性实施例中,通过将水与一种或多种组分混合来制备水性混合物。在一个示例性实施例中,组合物在冻干之前通过过滤法消毒,如用 0.2 μ m 过滤器。

[0070] 在一个实施例中,所述组分可以用如下的循环加以冻干:

[0071] 冷冻:在 15 分钟内从环境温度降至 5°C

[0072] 在 5°C 下保持 100 分钟

[0073] 在 50 分钟内降至 -45°C

[0074] 在 -45°C 下保持 180 分钟

[0075] 初次干燥:压力设为 50 毫托

[0076] 在 175 分钟内将搁板温度升至 -15°C

[0077] 在 -15°C 下保持 2300 分钟

[0078] 二次干燥:压力设为 75 毫托

[0079] 在 200 分钟内将搁板温度升至 25°C

[0080] 保持 900 分钟

[0081] 循环结束:回充氮气至约 730 托

[0082] 加盖和轧盖

[0083] 可以根据本领域技术人员所用的实施方法改变温度、时间和设置。变化可以包括(但不限于)冷冻循环的循环温度、干燥温度和结束循环。变化还可以包括冷冻、干燥和加盖/轧盖循环保持时间的差异。变化还可以包括干燥循环和加盖/轧盖循环设定压力的差异。此外,可以根据所用机器或要冻干的组分增加或减少干燥循环的数量。

[0084] 添加缓冲剂可以为冻干 HA 制剂中蛋白质的溶解度和稳定性的改善创造条件。可以使用本领域已知的生物相容性缓冲剂,如甘氨酸;乙酸根的钠、钾或钙盐;柠檬酸根的钠、钾或钙盐;乳酸根的钠、钾或钙盐;磷酸根的钠或钾盐,包括磷酸二氢盐、二盐基磷酸、三盐基磷酸以及它们的混合物。缓冲剂可以另外具有添加到组合物中充当增量剂的糖。可以优选地将 pH 控制在 pH5 与 pH10 之间,更优选地在 pH6 至 8 之间。

[0085] 制剂

[0086] 在一个实施例中,作为涉及关节接合的外科手术的一部分,HA 和至少一种附加组分(如赋形剂)可以设计成在临手术前、在手术期间或手术后随即被混合并施用到关节内。

作为另外一种选择, HA 和至少一种附加组分可以预先混合并在外科手术时作为混合制剂。其他组分在混合时可以形成所得组合物或混合物,其具有存在于组合物中的不同含量的每种组分。组合物中的每种组分的量可以变化,但在一个示例性实施例中, HA 与至少一种附加组分(如赋形剂)的混合比率可以具有约 1 : 0.001 至约 1 : 100 范围内、更优选地约 1 : 0.01 至约 1 : 10 范围内的 HA 与附加组分的重量比。作为另外一种选择,制剂可以包括总组成中约 1 重量%至约 75 重量%或以上的各种单独组分,如 HA 和至少一种附加组分(如赋形剂),作为另外一种选择,包括制剂总量中约 2.5 重量%、5 重量%、10 重量%、20 重量%、30 重量%、40 重量%、50 重量%、60 重量%、70 重量%或更多的 HA 和至少一种附加组分(如赋形剂)。在一个示例性实施例中,本发明所公开的制剂中存在的 HA 的含量可以为制剂总量的约 1 至 20 重量%,本发明所公开的制剂中存在的至少一种附加组分(如赋形剂)的含量可以为制剂总量的约 0.01 至 20 重量%。

[0087] 可用于溶解一种或多种组分的溶剂包括,例如,水、酸性溶剂、盐酸、乙酸、苯甲酸、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等,以及它们的组合。可用于溶解 HA 和 / 或附加组分的溶剂可以包括(但不限于)水、盐水或其他盐溶液、缓冲液如磷酸盐缓冲盐水、组氨酸、乳酸盐、琥珀酸盐、甘氨酸和谷氨酸盐、右旋糖、甘油、盐酸、乙酸、苯甲酸、酸性溶剂和其他合适的溶剂,以及它们的组合。制剂还可以包括生理上相容的其他组分,如分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。组合物中的等渗剂包括,例如,糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨醇)或氯化钠。制剂还可以包括微量的可延长制剂保存期或提高效力的辅助物质,如润湿或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0088] 可以将制剂复合在适于向受试者施用的药物组合物中。通常,药物组合物包含 HA 和另一种组分如至少一种赋形剂,以及可药用的载体。如本文所用,“可药用的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。可药用的载体的例子包括水、盐酸、乙酸、苯甲酸、酸性溶剂、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的组合中的一者或多者。在许多情况下,可能是有用的是在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨醇)或氯化钠。可药用的载体还可以包含可延长组合物的保存期或提高组合物的效力的微量辅助物质,如润湿或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0089] 组合物可以是多种形式。这些形式包括(例如)液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(例如适合注射和输注的溶液)、分散体或混悬剂、片剂、丸剂和散剂。示例性的形式可以取决于预期的施用方式 and 治疗应用。典型的组合物可以是适合注射或输注的溶液的形式,如与用于体内注射的组合物类似的组合物。在一个实施例中,示例性的施用方式为肠胃外给药(如,关节内、皮下、腹膜内、肌肉内给药)。在另一个实施例中,可以通过直接输注或注射到目标区域(如关节)中来施用组合物。在再一个实施例中,可以通过肌肉注射或皮下注射来施用组合物。

[0090] 根据需要,可以通过将活性化合物以治疗上有效或有益的量掺入到具有上文所列成分中的一种或组合(按需要)的合适溶剂中来制备无菌注射溶液,然后过滤消毒。一般来讲,通过将活性化合物掺入含有碱性分散介质和上文所列那些中的所需其他成分的无菌载体中来制备分散体。就用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言,实施例可以包括通过真空干燥和冷冻干燥获得粉末的制备方法,所述粉末包含活性成分和任何另外的所需成分,

它们来自前述的这些成分的无菌过滤溶液。

[0091] 递送系统

[0092] 所述方法和组合物包括用于治疗例如各个关节的关节疾病的试剂盒。试剂盒可以包括 HA 和至少一种稳定剂。可以将这两种组分和 / 或所有组分封装在单室中。试剂盒还可以包括具有至少一种稳定剂的 HA 和附加组分。所述附加组分可装在注射器的单室或隔室内,以便与由 HA 和至少一种稳定剂的 HA 混合物一起注射。HA 和至少一种稳定剂可以是冻干的。在一个示例性实施例中,HA 与至少一种稳定剂在单室中混合。在另一个实施例中,提供的试剂盒具有封装在同一室中的 HA 和至少一种稳定剂,以及封装在第二室中的附加组分。在另一个示例性实施例中,HA 与至少一种稳定剂混装在同一室中,GAG 或 GAG 前体装在第二室中。HA 组分可以包含最多约 10ml 的 Orthovisc[®],它包含约 150mg 透明质烷、90mg 氯化钠和最多约 10.0mL 的注射用水,并可以根据具体指征适当增减。例如,对于膝盖、肩部和臀部,单一注射产品的注射量可以在约 3ml 至 10ml 范围内,手部可以在约 500 μ l 和 1.5ml 范围内。HA 可以具有约 1.0 至 6MDa 范围内的分子量。HA 制剂或组合物中存在的至少一种稳定剂可以具有约 0.1mg/ml 至约 200mg/ml 范围内的浓度。至少一种稳定剂可以是冻干的,或者,作为另外一种选择,可以在溶液中,如上文所述,与 HA 组分组合。

[0093] 可以单独储存化合物,以延长保存期。可将单独的化合物冻干于或以固体形式置于一个注射器 / 注射筒中,而将稀释剂或第二化合物置于第二注射器 / 注射筒中。在一个实施例中,化合物之一为冻干形式或固体形式,第二化合物为能够与冻干 / 固体化合物混合的溶液。例如,至少一种冻干或固体组分可以储存在第一室中,溶解的 HA 可以储存在第二室中。在另一个实施例中,两种化合物均可以为冻干或固体形式并封装在注射器 / 注射筒的单室或隔室中。在另一个实施例中,可以在注射器或注射筒中直接冻干化合物。

[0094] 也可对于所述组分和组合物使用预充注双室注射器和 / 或注射筒。使用预填充的双室注射器能够通过单次注射器推送进行两种单独组合物的顺序施用,从而用一个注射器取代了两个注射器。单次递送能力的益处包括提高给药的速度和便捷性;通过减少连接数量降低感染风险;降低给药风险或减少顺序错误,以及更快地递送在给药前需要混合的组合物。双室注射器可以在前室中容纳冻干、粉末或液体制剂,在后室中容纳与它们混合的稀释剂、盐水或缓冲剂。

[0095] 预填充注射器可以包含精确可递送剂量的所需化合物和稀释剂。预填充注射器的容积可以为约 0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml、0.5ml、0.6ml、0.7ml、0.8ml、0.9ml、1.0ml、1.5ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml、4.5ml、5ml、5.5ml、6ml、6.5ml、7ml、7.5ml、8ml、8.5ml、9ml、9.5ml、10ml 或更多或源自其中的任何值。

[0096] 双室注射器和 / 或注射筒可为具有单独注射器柱塞的混合进单室的并列室,或为具有一个柱塞的直列室。双室注射器和 / 或注射筒还可具有位于中间的阻挡件或连接器,以作为两个室之间的阻挡物。阻挡件或连接器可被移除,以允许混合或组合两个室中的化合物。

[0097] 图 1 示出了双室注射器 10 形式的混合与递送系统的一个实施例。如图所示,双室注射器 10 通常包括具有由阀 16 分开的近侧室 14 和远侧室 12 的壳体。柱塞 18 可滑动地设置在近侧室 14 内,并被构造成可将近侧室 14 内的流体注入远侧室 12 中,从而对组分进行混合。在一个实施例中,第一组分(例如具有至少一种稳定剂的液体 HA)可在近侧室 14

中,而附加组分(例如一种或多种附加组分)可在远侧室 12 中。作为另外一种选择,第一组分(例如液体 HA)可在具有至少一种稳定剂(如海藻糖)的近侧室 14 中,而至少一种附加组分(例如硫酸软骨素)可在远侧室 12 中。柱塞 18 可被推进而通过侧室 14,以将第一组分(例如具有至少一种稳定剂的液体 HA)注射进包含第二组分(例如一种或多种附加组分)的远侧室 12 中。在另一个实施例中,近侧室 14 可包含溶剂,诸如水或盐水,而远侧室 12 可包含所有固体组分。例如,远侧室 12 可包含具有至少一种稳定剂的冻干或固体 HA。柱塞 18 可被推进而通过侧室 14,以将溶剂注射进远侧室 12,从而将远侧室 12 中的组分溶解。一旦将所有的组分在远侧室 12 中混合后,即可将混合物递送到组织,例如通过将针头连接到双室注射器的远端来递送。

[0098] 图 2 示出混合与递送系统 20 的另一个实施例,其以商品名 MixJect[®] 销售。在此实施例中,该系统包括连接在注射器 24 和西林瓶 26 之间的流体控制组件 22。注射器 24 限定第一室 24a(未在图中标示),其可包含液体,诸如液体 HA 或溶剂,而西林瓶限定第二室 26a(未在图中标示),其可包含固体,诸如一种或多种附加组分。通过注射器 24 推动柱塞 28 能够通过控制系统将液体注射进西林瓶 26,其中固体将被液体溶解。一旦组分被完全溶解后,即可将西林瓶 26 倒转,然后可将柱塞 28 缩回以将混合物吸回注射器 24 的室 24a 中。然后可将西林瓶 26 从系统中移除,并可将混合物由注射器通过针头 29 注射进组织。

[0099] 本领域技术人员会知道,可使用本领域已知的任何双室系统,并且这些室可为具有单独注射器柱塞的混合进单室的并列室,或为具有单个柱塞的直列室。

[0100] 治疗

[0101] 所述方法和组合物可被用于非肠道的体内施用,通过注射或随时间逐渐灌注而施用。施用途径可为关节内、静脉内、腹膜内、肌内、皮下、腔内或透皮。对于体外研究,可将药剂添加或溶解在适当的生物学可接受的缓冲液中,然后添加到细胞或组织。

[0102] 非肠道施用的制剂包括无菌水溶液剂或非水溶液剂、混悬剂和乳剂。非水性溶剂的例子为丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油的植物油和诸如油酸乙酯的注射用有机酯。水性载体包括水、醇/水溶液、包括盐水和缓冲介质的乳液或悬浮液。非肠道载体包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠,乳酸化林格氏静脉内载体包括体液和营养补充剂、电解质补充剂(诸如基于林格氏右旋糖的那些)等等。也可以有防腐剂和其他添加剂,诸如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、生长因子和惰性气体等。

[0103] 常用的“载体”或“助剂”包括碳酸镁、二氧化钛、乳糖、甘露糖醇和其他糖、滑石、牛奶蛋白、明胶、淀粉、维生素、纤维素及其衍生物、动物和植物油、聚乙二醇类以及溶剂,诸如无菌水、醇、甘油和多元醇以及二甲基亚砜。静脉内载体包括体液和营养补充剂。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。其他可药用载体包括水溶液、无毒赋形剂(包括盐)、防腐剂、缓冲剂等,如例如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed. Easton: Mack Publishing Co.: 1405-1412, 1461-1487, 1975(《雷明顿药物科学》,第 15 版, Easton: Mack 出版公司,第 1405-1412 页和第 1461-1487 页, 1975 年;以及 The National Formulary XIV., 14th ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1975(《国家处方集 XIV》,第 14 版,华盛顿:美国药学会, 1975 年)中所述,它们的内容据此以引用方式并入。药物组合物的 pH 和各种组分的准确浓度根据本领域的常规技能而调节。参见 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7th ed.)

(《Goodman 和 Gilman 治疗药理学基础》(第 7 版))。

[0104] 本文所公开的组合物和方法可用的症状或疾病的例子涵盖治疗关节紊乱,诸如由感染、受伤、过敏、代谢紊乱等导致的关节炎,类风湿诸如慢性类风湿性关节炎,和系统性红斑狼疮;伴随痛风的关节紊乱,关节病诸如骨关节炎,关节内紊乱,关节积水,颈强直,腰痛等。效果根据组合物的用途或待治疗的疾病的类型而不同,药剂可对关节肿胀、疼痛、炎症和破坏产生所需的预防和缓解作用、或甚至治疗作用,而不严重影响活体。治疗关节紊乱的组合物可用于预防关节紊乱的发作,以及在其发作后改善、缓解和治愈症状。

[0105] 治疗方法可包括直接将组合物注射进目标区域,例如关节。注射的频度可为每日一次、每周一次、每周多次、每月两次、每月多次、每月一次或以缓解症状所需的频度进行注射。对于关节内用途,取决于关节的大小和病症的严重性,每只关节可注射约 1 至约 30mg/ml 的 HA。后续的注射进给定关节的频度按照该关节中症状复发的时间间隔而定。示例性地,组合物的人体剂量水平可为:膝盖,每次关节注射约 1 至约 30mg/ml;肩部,每次关节注射约 1 至约 30mg/ml HA;掌骨或近侧指节间,每次关节注射约 1mg/ml 至约 30mg/ml HA;以及肘部,每次关节注射约 1 至约 30mg/ml。注射的总量可在约 1mg/ml 至 200mg/ml HA 的范围内。

[0106] 然而,应当理解的是,任何特定患者的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所采用的具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康情况、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄率、药物组合和治疗中的特定疾病的严重性。可按剂量单位制备和施用药物组合物。然而,在某些情况下,较高或较低的剂量单位可能是合适的。剂量单位的施用可通过单次施用组合物而执行,或者施用可按多个较小的剂量单位而执行,也可通过按具体的间隔多次施用细分剂量而执行。

[0107] 在一个实施例中,医疗病症为骨关节炎(OA),并将组合物在关节空间施用,诸如膝盖、肩部、颞下颌和腕掌关节、肘部、臀部、腕部、踝以及脊柱中的腰椎关节突(小面)关节。可通过向膝盖或其他受折磨关节内单次注射或在数周时间内施用的多次关节内注射实现粘弹性补充。例如,罹患膝盖 OA 的受试者每只膝盖可接受约 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10ml 或更高剂量的一次、两次、三次、四次或五次注射。对于其他关节,施用量可基于关节的大小而调节。

[0108] 然而,应当理解的是,任何特定患者的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所采用的具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康情况、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄率、药物组合和治疗中的特定疾病的严重性。

[0109] 实验数据

[0110] 实例 1:具有多种稳定剂的液体 HA 和 CS 制剂的稳定性

[0111] 将 2.5mg/mL 的 HA 和 2.5mg/mL 的硫酸软骨素(CS)与不同的稳定剂一起配制,如表 1 中概略示出。在 5°C 和 40°C /75% RH 储藏条件下测试了制剂的 HA 稳定性(图 3)。五个月后,将测试样品通过尺寸排阻色谱法(SEC)-高效液相色谱法进行分析。简而言之,将测试样品用流动相(100mM 的磷酸钠缓冲液,pH 7)稀释,得到 0.1mg/mL 的 HA。然后将稀释的样品注入到流速为 0.6mL/min 的 HPLC 柱(菲罗门(phenomenex),Poly Sep-GFC-P 线性柱,目录号 00H-3147-K0)。以 207nm 的波长监测洗脱液的 HA 峰,将保留时间与 HA 分子量标准品进行比较,以确定测试样品的分子量。

[0112] 如表 1 中所示,在 40℃ 下与其他 40℃ 样品相比盐水制剂是最不稳定的制剂。图 3 显示了盐水制剂的色谱图。盐水制剂的 HA 峰向右大幅漂移,表明 HA 降解成了较小的分子。相比之下,40℃ 海藻糖制剂具有小得多的漂移,如图 4 所示。对蔗糖和甘露糖醇制剂观察到了类似的结果。在环境温度下与盐水制剂相比,这些制剂应具有更长的保存期。

[0113] 表 1. 液体 HA 和 CA 制剂在五个月时间点的稳定性研究

[0114]

赋形剂和浓度	样品 ID	分子量, 道尔顿
在流动相中新鲜制备	标准品	2014438
0.9% 9 (w/v) NaCl 的水溶液	盐水制剂, 5℃	2000484
	盐水制剂, 40℃	487429
0.9% (w/v)NaCl 与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH7	PBS 制剂, 5℃	1984656
	PBS 制剂, 40℃	783509
5% (w/v)葡萄糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	葡萄糖制剂, 5℃	2034540
	葡萄糖制剂, 40℃	511731
5% (w/v)甘露糖醇与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	甘露糖醇制剂, 5℃	2030504
	甘露糖醇制剂, 40℃	1765220
10% (w/v)蔗糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	蔗糖制剂, 5℃	2024464
	蔗糖制剂, 40℃	1688080
10% (w/v)海藻糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	海藻糖制剂, 5℃	2089824
	海藻糖制剂, 40℃	1706619
5% (w/v)甘露糖醇的水溶液	甘露糖醇 (无磷酸盐) 制剂, 5℃	2112776
	甘露糖醇 (无磷酸盐) 制剂, 40℃	734536

[0115] 还将 8mg/mL 的 HA 和 8mg/mL 的硫酸软骨素与多种稳定剂一起配制,如表 2 中概略示出。将配制的溶液以 0.5mL 每只西林瓶的量灌入 3-mL 玻璃西林瓶,然后冻干。将干燥的样品放在 40℃ /75% RH 下进行稳定性研究。4 个月后,将测试样品用注射用水复原,通过实例 1 中所述的 SEC-HPLC 方法进行分析。如表 2 所示,与含葡萄糖、甘露糖醇、蔗糖和海藻糖的制剂相比,含盐水的制剂具有较低的稳定性。实际上,当储藏在 40℃ 下四个月时,在这些冻干制剂中未检测到分子量的显著改变。

[0116] 表 2. 冻干 HA 和 CS 制剂在四个月时间点时的稳定性

[0117]

赋形剂和浓度 冻干前	样品 ID	分子量 kDa
0.9% (w/v) 盐水与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	PBS 制剂 A, 40℃	873
		869
5% (w/v) 葡萄糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	葡萄糖制剂 B, 40℃	2070
		2191
5% (w/v) 甘露糖醇与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	甘露糖醇制剂 C, 40℃	2020
		2028
2.5% (w/v) 甘露糖醇/5% (w/v) 蔗糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	甘露糖醇/蔗糖制剂 D, 40℃	2034
		2046
10% (w/v) 海藻糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	海藻糖制剂 E, 40℃	1939
		1968
10% (w/v) 蔗糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	蔗糖制剂 F, 40℃	2036
		2024
10% 海藻糖与 10mM 组氨酸缓冲液, pH 7	海藻糖制剂 G, 40℃	1962
		1960
0.9% 盐水溶液	盐水制剂 H, 40℃	964
		978

[0118] 还测试了高浓度的 HA。将 20mg/mL 的 HA 和 20mg/mL 的 CS 与多种稳定剂一起配制。在 5℃ 和 40℃ /75% RH 储藏条件下测试制剂的稳定性, 如表 3 中概略示出。三个月后, 使用 SEC-HPLC 方法分析了测试样品。如表 3 中示出, 与含海藻糖、蔗糖和甘露糖醇的制剂相比, 仅含盐水的制剂具有较低的稳定性。

[0119] 表 3. 液体高浓度 HA 和 CS 制剂在三个月时间点的稳定性

[0120]

赋形剂和浓度	样品 ID	HA 分子量, kDa
在流动相中新鲜制备	标准品	2077
10% (w/v) 海藻糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	海藻糖制剂 A, 5℃	2041
	制剂 A, 40℃	1565
10% (w/v) 蔗糖与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	蔗糖制剂 B, 5℃	2039
	制剂 B, 40℃	1590
5% (w/v) 甘露糖醇与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	甘露糖醇制剂 C, 5℃	1965
	制剂 C, 40℃	1611
0.9% (w/v) 盐水溶液	盐水制剂 D, 5℃	1967
	制剂 D, 40℃	785
5% (w/v) 海藻糖/0.23% (w/v) 盐水与 3mM 磷酸盐缓冲液, pH 7	海藻糖/PBS 制剂, 5℃	2023
	海藻糖/PBS 制剂, 40℃	1852

[0121]

[0122] 实例 2:具有多种海藻糖浓度的 HA 制剂的稳定性

[0123] 将不同浓度的 HA 与多种浓度的海藻糖一起配制,如表 4 中概略示出。将一些配制好的溶液分成两组。将一组放入稳定性试验箱进行液体稳定性研究,将另一组冻干进行固体稳定性评估。在 5℃ 和 40℃ /75% RH 下储藏三个月后,使用 SEC-HPLC 方法分析测试样品。如表 4 所示,在具有不同浓度海藻糖的样品之间,未观察到分子量的显著差异。然而,无任何赋形剂时,仅与水配制的 HA 在液体形式和冻干形式下稳定性要低得多。

[0124] 表 4 具有多种海藻糖浓度的 HA 制剂的稳定性

[0125]

制剂组成	制剂 ID	分子量 kDa
10mg/mL HA 与 5% (w/v)海藻糖的水溶液	液体 177A, 5℃	2103
	液体 177A, 40℃	1902
2mg/mL HA 与 2% (w/v)海藻糖的水溶液	液体 146A, 5℃	2050
	液体 146A, 40℃	1713
	冻干 146A, 5℃	2090
	冻干 146A, 40℃	2036
2mg/mL HA 与 0.67% (w/v)海藻糖的水溶液	液体 146B, 5℃	2052
	液体 146B, 40℃	1690
	冻干 146B, 5℃	2112
	冻干 146B, 40℃	2013
无任何赋形剂	液体 171E, 5℃	2057
	液体 171D, 40℃	666
	冻干 171E, 5℃	2038
	冻干 171E, 40℃	731

[0126]

[0127] 实例 3:骨关节炎的大鼠 MMT 模型

[0128] 在骨关节炎的大鼠内侧半月板撕裂 (MMT) 模型中,内侧半月板横切术导致模拟人类骨关节炎的关节衰坏和负重减轻。在 300-400g 大鼠中的单内侧半月板撕裂导致急性软骨退行性变化,其特征在于软骨细胞和蛋白聚糖丢失、原纤化、骨赘形成和软骨细胞克隆。此类变化在半月板手术后 21 天时通常明显可见。关节衰坏的程度(主要通过形成的软骨病变的程度确定)可使用半定量组织学评分系统测量。

[0129] 为了测试海藻糖作为关节内注射化合物的载体的效用,将海藻糖溶液配制成 pH 为约 3 的在 3mM 甘氨酸盐酸缓冲液中的 5% 溶液。在大鼠 MMT 模型中测试溶液。对 15 只雄性 Lewis 大鼠执行在正下方附连到半月板的内侧副韧带的横切术。半月板在其最窄部位被切割(使之脱离小骨),注意到不使胫面受损。

[0130] 在 MMT 手术后三天开始,每周一次进行海藻糖溶液的关节内注射,持续五周,然后在第六周时实施安乐死。

[0131] 组织学结果表明,海藻糖溶液在软骨保护中达成了意想不到的改善。如图 5 所示,

海藻糖显著减小了明显软骨病变区的宽度,该宽度由其中软骨细胞和蛋白聚糖丢失达到原始软骨厚度 50% 或以上的胫骨软骨病变区的宽度定义。此类测量值用目镜测微尺从关节内侧间室的染色的组织学横切面测得。

[0132] 软骨保护的另一种度量在图 6 中示出。海藻糖展示了病变深度比的明显改善,病变深度比通过将病变的深度与原始软骨厚度比较而算出,而原始软骨厚度通过测量从推测的原始胫骨平台到潮标的距离而估计。这些测量值用目镜测微尺从关节内侧间室的染色的组织学横切面测得。

[0133] 软骨保护也与胶原变性的程度相关。图 7 显示了海藻糖明显减小了表现出胶原损耗(特征为显著或严重)的软骨病变的宽度,其使用目镜测微尺评估表现出胶原染色减少的软骨的横切面厚度而测量。胶原变性的程度定义如下:

[0134] 严重损坏(胶原到潮标的总损失或近总损失 > 90% 厚度)

[0135] 显著损坏(达到软骨厚度的 61-90%)

[0136] 中度损坏(达到软骨厚度的 31-60%)

[0137] 轻微损坏(达到软骨厚度的 11-30%)

[0138] 极微损坏(非常浅,仅影响上面 10%)

[0139] 海藻糖还改善了软骨退变评分,其为剩余软骨细胞活力的度量。软骨退变评分通过以下方式在组织学上确定:估计非存活(明显的软骨细胞和蛋白聚糖丢失,但胶原得以保留)和完全不存在软骨基质的面积,然后估计该面积与推测的原始软骨横切面积相比的百分比。指定 1-5 的评分,其中评分 1 表示 10% 或更少的软骨退变,而评分 5 表示完全的软骨退变。图 8 中,区域 1 指内侧胫骨平台最靠近横切半月板的三分之一。区域 1 是在 MMT 模型中具有最严重软骨损坏的范围,并且被视为极具挑战性的 OA 治疗目标。区域 3 是最远离手术部位的胫骨平台的三分之一,承受最少量的软骨损坏。区域 2 被视为中度软骨损坏的范围,并代表 OA 治疗的合理目标。海藻糖在统计学上改善了所有三个区域的软骨退变评分。

[0140] 实例 4:骨关节炎的兔 ACLT 模型

[0141] 还在 OA 的兔前交叉韧带切断 (ACLT) 模型中测试了上述海藻糖制剂 (pH 为约 3 的在 3mM 甘氨酸盐酸缓冲液中的 5% 海藻糖溶液)。ACLT 手术使兔膝关节失稳的程度大于半月板横切术,不仅导致明显的软骨衰坏还导致形成骨赘。在 OA 兔模型中探索骨赘形成的发展与调控的研究在 ACLT 后早至 4 周就检测到了板状形成,并在 ACLT 后 12 周检测到了所有膝盖间室中的骨赘生长。

[0142] 将兔麻醉。将髌骨脂肪垫牵开,并分离 ACL。用手术刀片将前交叉韧带切断。将纤维囊和皮下组织闭合,然后缝合皮肤。在手术后一周开始,每周一次进行关节内注射,持续七周,然后在第 8 周时实施安乐死。使用改良 Mankin 量表在组织学上测定软骨退变。较高的评分指示出更广泛的软骨退变,最高分为 18。

[0143] 如图 9 所示,与未治疗的动物 ($n = 15$) 相比,海藻糖制剂在改良 Mankin 评分中得到了明显的改善,指示出因关节内海藻糖注射而减轻了软骨退变。

[0144] 术语

[0145] “治疗有效量”或“有效量”是药剂达到药理作用的量。术语“治疗有效量”包括例如预防有效量。“有效量”是有效实现所需药理作用或治疗改善而无过度不良反应的量。例

如,有效量是指增强可手术性、改善生活质量、增强患者增加运动的能力、或增加负重载荷、或减轻疼痛、或增加一种或多种关节中骨骼和软骨的生长、或减轻关节变形、疼痛、肿胀或僵直。药剂的有效量将由本领域的技术人员根据特定的患者和疾病程度进行选择。应当理解,“有效量”或“治疗有效量”可在受试者之间变化,原因是存在以下方面的差异:治疗剂和/或促动力剂的代谢、年龄、体重、受试者的一般状况、进行治疗的病症、进行治疗的病症的严重性以及处方医生的判断。

[0146] “治疗”是指与骨骼、软骨或软组织(诸如滑膜)紊乱相关的紊乱或疾病的任何治疗;诸如预防紊乱或疾病在可能有发生该紊乱或疾病倾向但尚未确诊患有该紊乱或疾病的受试者中发生;抑制紊乱或疾病,如阻止紊乱或疾病的发展,缓解紊乱或疾病,使紊乱或疾病逆转,缓解紊乱或疾病导致的病症,或停止紊乱或疾病的症状。因此,如本文所用,术语“治疗”与术语“预防”同义使用。

[0147] 所谓“共同施用”是指以同一制剂的方式或以将组合成一个供施用制剂的两种不同制剂的方式同时施用。在一个实施例中,将HA和其他组分通过在同一制剂中递送而共同施用。

[0148] 如本文所用的术语“受试者”是指可受益于本发明组合物和方法的动物,在一个实施例中是指哺乳动物,并在另一个实施例中是指人。对可受益于本发明方法的动物类型并无限制。无论是人类还是非人类动物的受试者都可被称为个体、受试者、动物、宿主或受体。本发明的方法可用于人类医学、兽医学以及普通、家养或野生动物饲养。在一个实施例中,候选受试者为哺乳动物诸如人,实验室试验动物诸如小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠,或禽类诸如家禽,以及兽医动物诸如狗、猫、马、牛、羊等。

[0149] 本领域的普通技术人员根据上述各实施例,将会认识到本发明的更多特征和优点。因此,除如所附权利要求书所指出的之外,本发明不应受到具体所示和所述内容的限制。本文引述的所有出版物和参考文献都明确地以引用方式全文并入本文中。

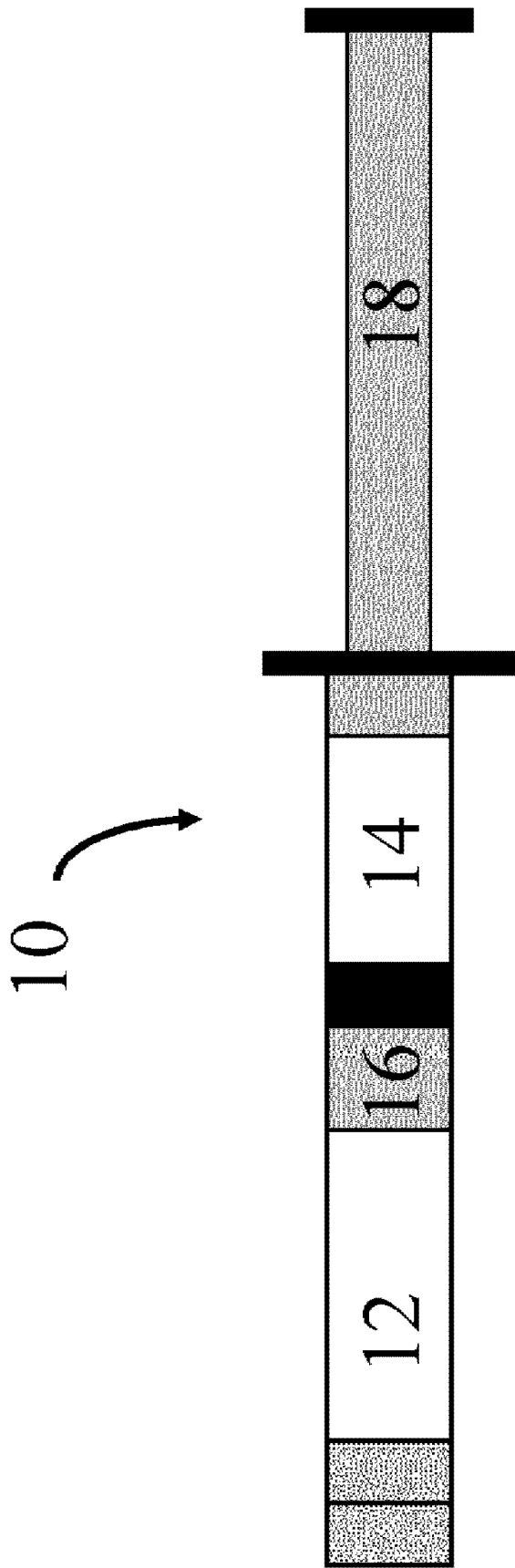


图 1

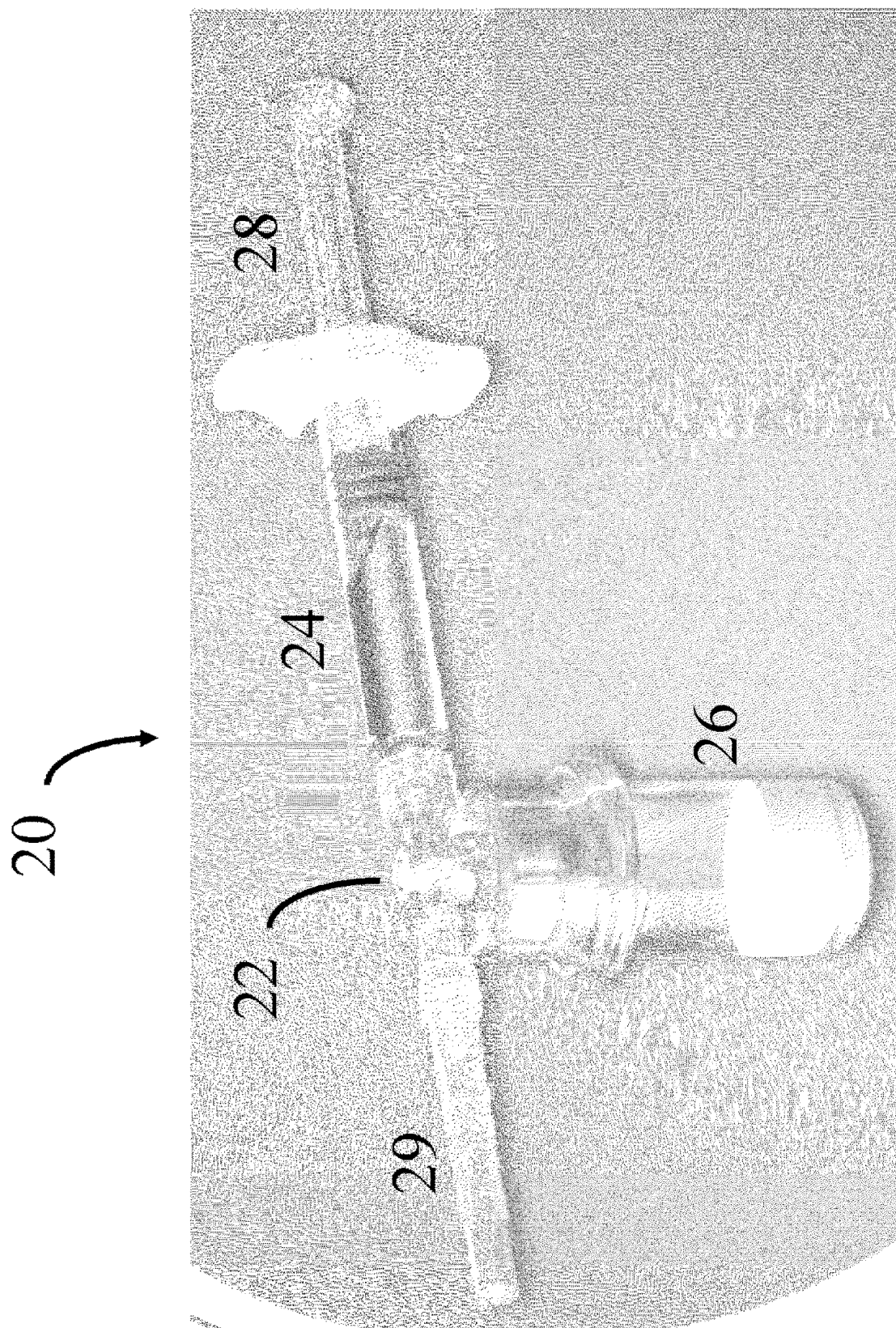


图 2

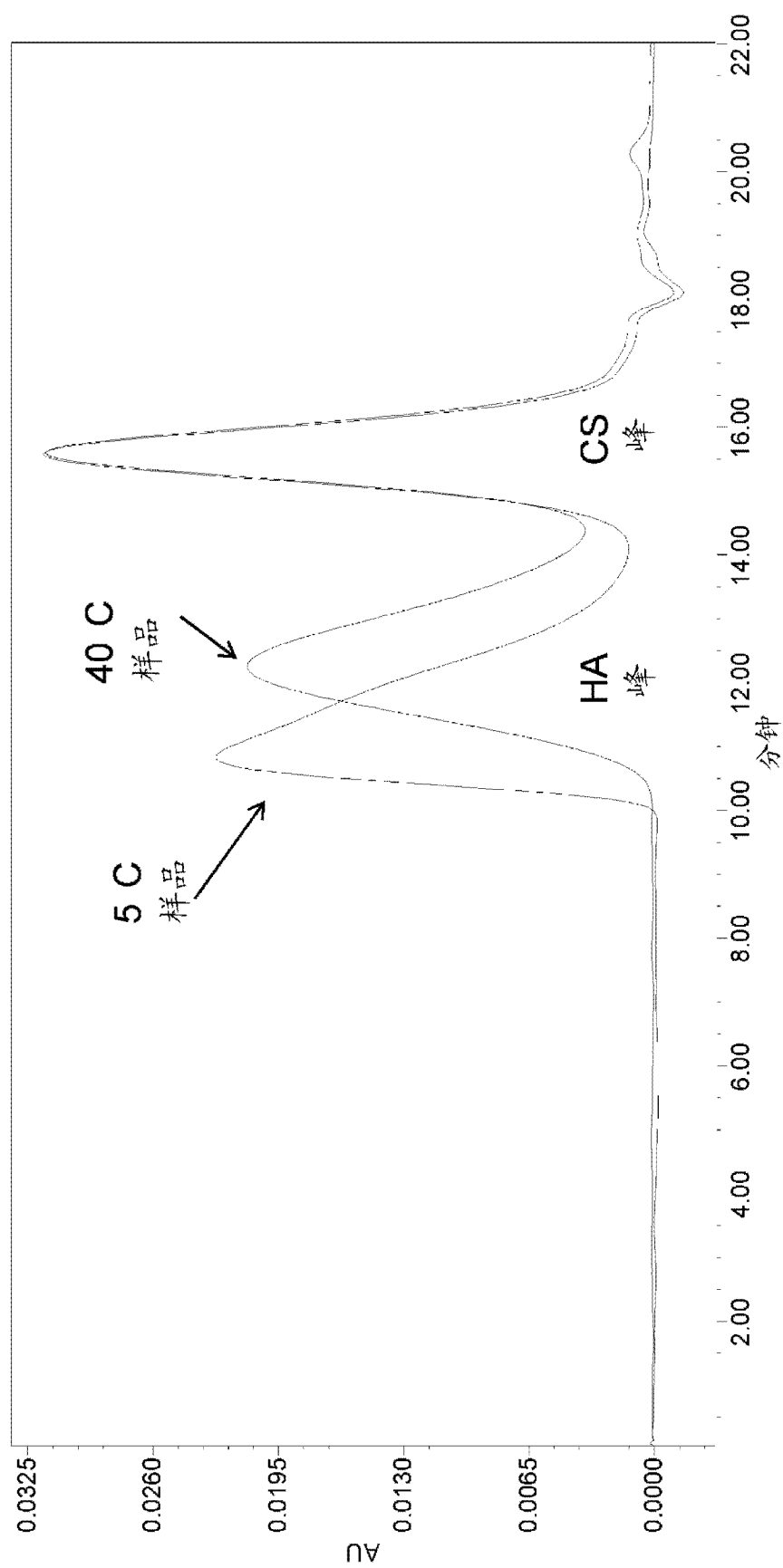


图 3

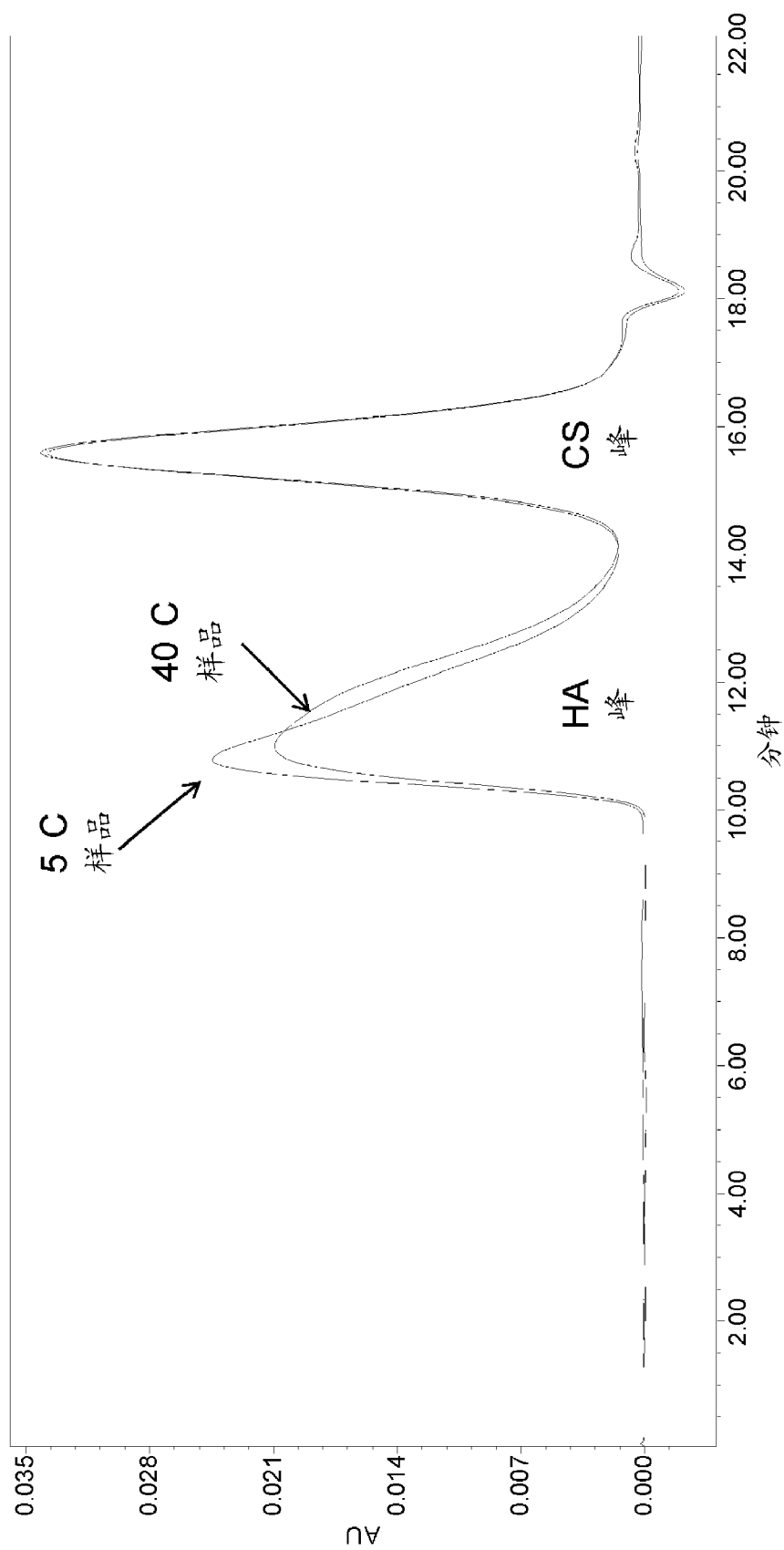


图 4

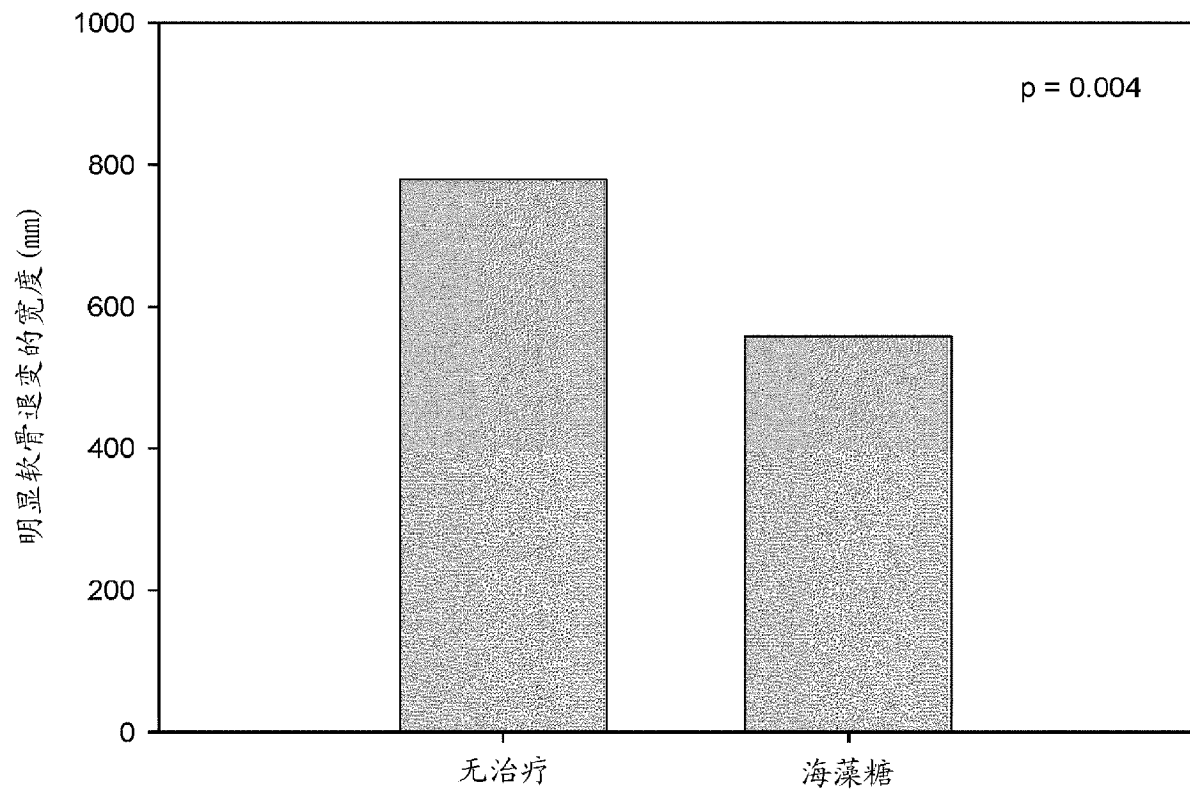


图 5

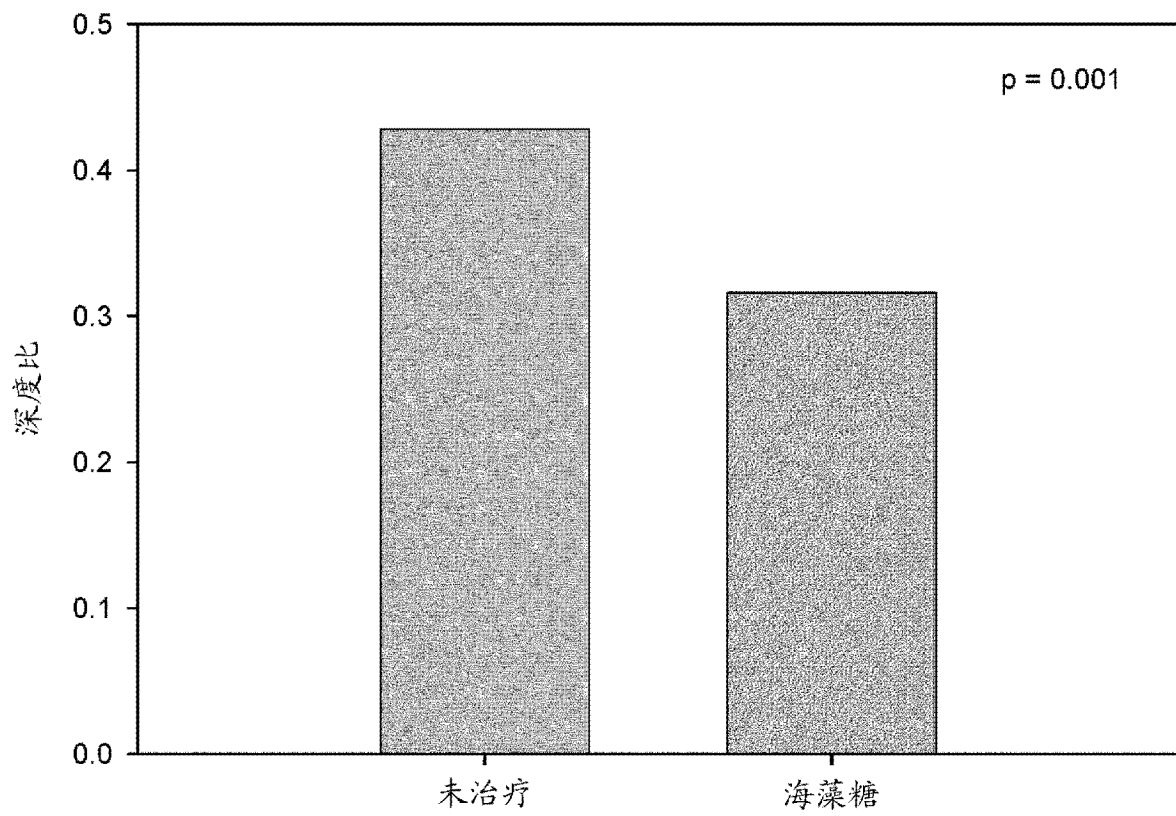


图 6

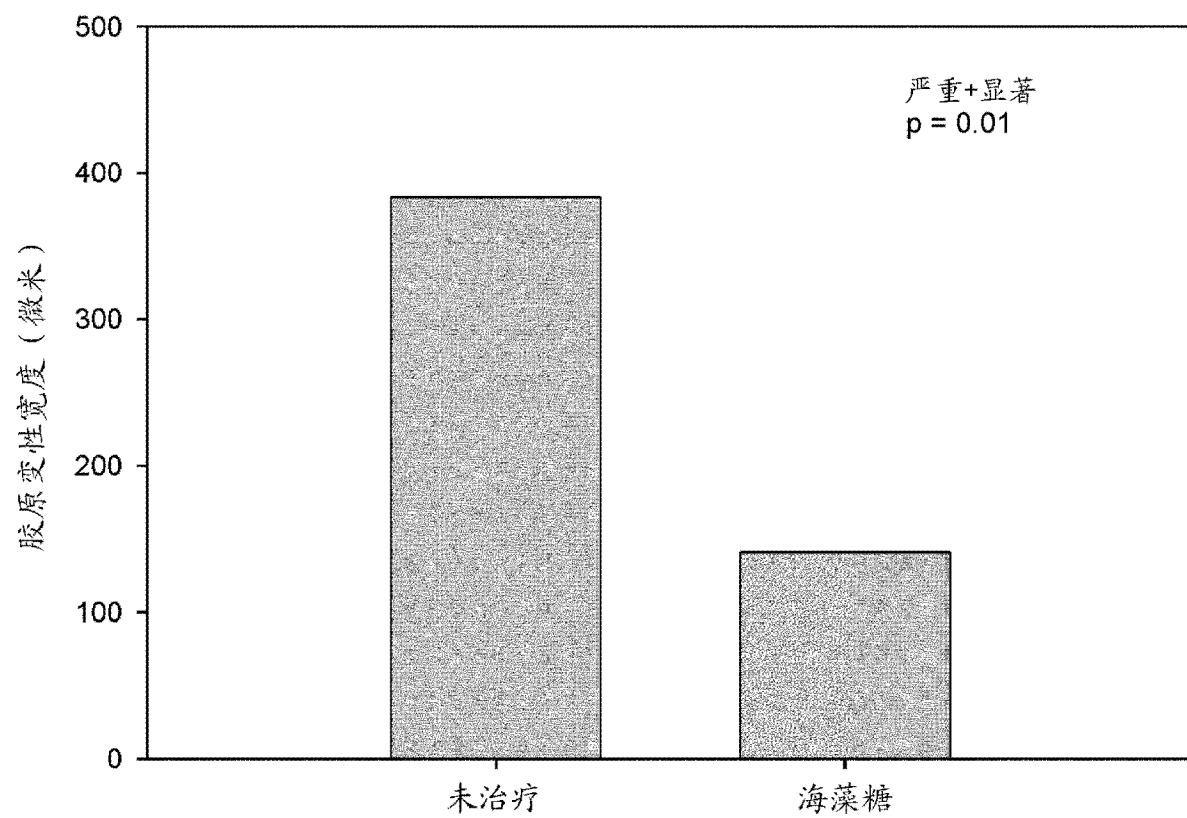


图 7

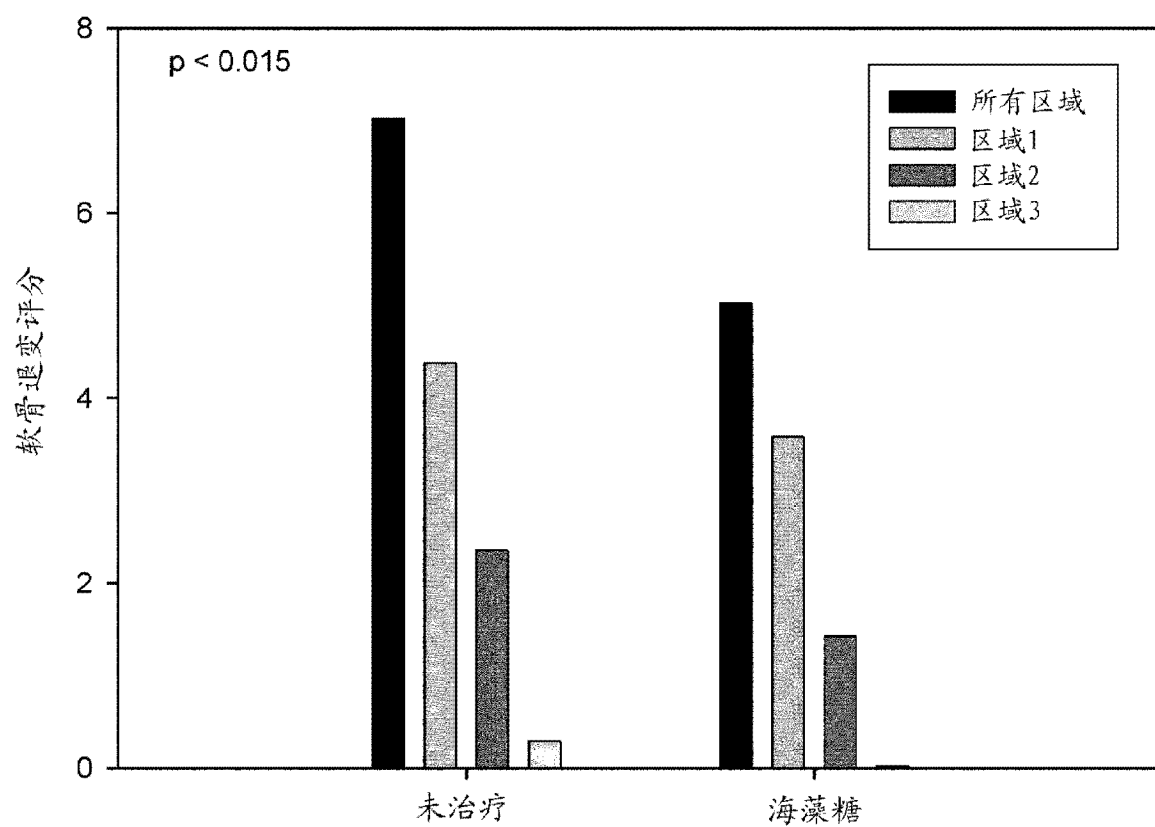


图 8

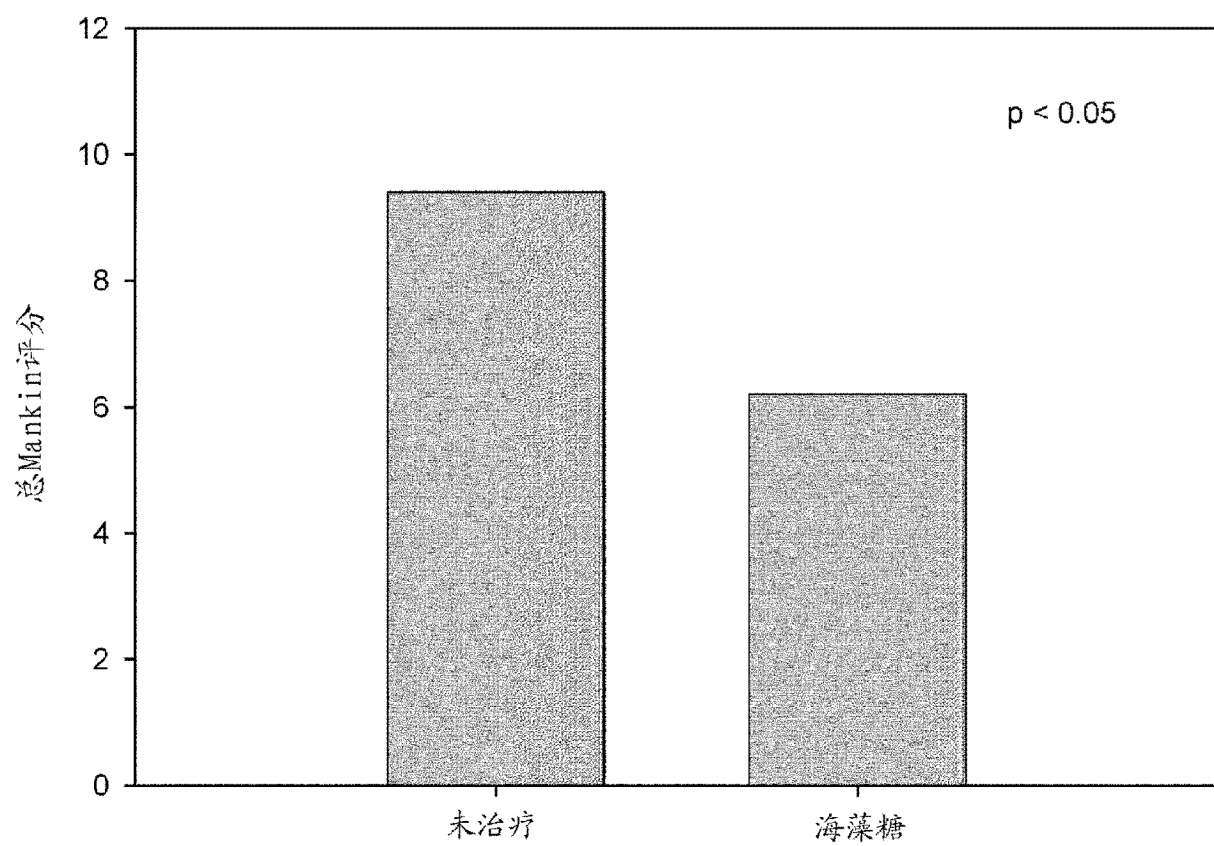


图 9