



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102416020 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 18

(21) 申请号 201110295560. 0

(22) 申请日 2005. 12. 20

(30) 优先权数据

60/640, 749 2004. 12. 30 US

(62) 分案原申请数据

200580045353. 2 2005. 12. 20

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 F·巴约尔

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

A61K 31/728 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于关节内粘弹性补充的方案

(57) 摘要

本发明涉及用于关节内粘弹性补充的方案。本发明提供用基于 HA 粘弹性补充剂特别是关节内存留半衰期 ( $T_{1/2}$ ) 短于 3 周的粘弹性补充治疗骨关节炎和关节损伤的粘弹性补充方法。在本发明中使用的粘弹性补充剂可进一步表征为: 其中它们包含小于 20mg/ml HA, 其中至少 5% (w/w) 为凝胶形式, 比如例如 hylan B。在一个说明性的实施方案中, 单次注射  $6 \pm 2$ ml 给药膝关节内 hylan G-F 20 (Synvisc®)。

1. 一种包括透明质酸钠的粘弹性补充剂在制备用于治疗在膝的、肩膀的、颞下颌的和腕掌的关节、肘、髋部、腕、在脊柱中腰椎关节突的关节和踝关节中患有骨关节炎的患者的上述关节的药物中的用途,该用途包括一个治疗方案,该治疗方案的特征为在 24 小时期间内向所述患者的膝关节内给予单次给药剂量的粘弹性补充剂的步骤,

其中所述以单次给药剂量给予的粘弹性补充剂:

是不含有额外的活性成分的基于透明质酸钠的粘弹性补充剂;和

包括交联的透明质酸钠,和

包括 24mg-100mg 的透明质酸钠,和

在所述膝的、肩膀的、颞下颌的和腕掌的关节、肘、髋部、腕、在脊柱中腰椎关节突的关节和踝关节中具有 0.2 天-8.8 天的存留半衰期。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中关节内单次给药 4ml 或更多的粘弹性补充剂。

3. 根据权利要求 1 所述的用途,其中粘弹性补充剂包含小于 20mg/ml 透明质酸钠。

4. 根据权利要求 1 所述的用途,其中患者为人。

5. 根据权利要求 4 所述的用途,其中在单次给药中粘弹性补充剂的总量为  $6 \pm 2$ ml。

6. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述量为 6ml。

7. 根据权利要求 1 所述的用途,其中将粘弹性补充剂给药需要治疗关节痛的患者。

8. 根据权利要求 1 所述的用途,其中粘弹性补充剂的单次给药的治疗效果至少为 4 个月。

9. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该粘弹性补充剂的特征在于具有一种或多种如下特征:

i) 粘弹性补充剂具有 0.2 天-8.8 天的存留半衰期;

ii) 粘弹性补充剂包含小于 20mg/ml 透明质酸钠;和

iii) 在粘弹性补充剂中 5% (w/w) 或更多的透明质酸钠为凝胶形式。

10. 根据权利要求 9 所述的用途,其中存留半衰期大于 3 天。

11. 根据权利要求 1 所述的用途,其中粘弹性补充剂包含  $8 \pm 2$ mg/ml 透明质酸钠。

12. 根据权利要求 1 所述的用途,其中在粘弹性补充剂中的透明质酸钠来自动物。

13. 根据权利要求 12 所述的用途,其中粘弹性补充剂为由公鸡冠生成的。

14. 根据权利要求 1 所述的用途,其中在粘弹性补充剂中的透明质酸钠来自细菌。

15. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该弹性补充剂进一步包括与甲醛交联的透明质酸钠。

16. 根据权利要求 15 所述的用途,其中粘弹性补充剂包括 hylanA。

17. 根据权利要求 16 所述的用途,其中在该 hylan A 中的透明质酸钠的平均分子量为 6,000kDa。

18. 根据权利要求 1 所述的用途,其中粘弹性补充剂包括 hylan B。

19. 根据权利要求 1 所述的用途,其中粘弹性补充剂包含  $8 \pm 2$ mg/ml 透明质酸钠,其中 10% 重量为凝胶形式。

20. 根据权利要求 1 所述的用途,其中粘弹性补充剂包括 hylan A 和 hylan B。

21. 根据权利要求 20 所述的用途,其中以透明质酸钠的重量计,hylan A/hylan B 的比例为 9:1。

22. 根据权利要求 21 所述的用途,其中该粘弹性补充剂包含  $8 \pm 2\text{mg/ml}$  透明质酸钠。
23. 根据权利要求 22 所述的用途,其中关节是人体膝关节,并且关节内单次给药  $6 \pm 2\text{ml}$  粘弹性补充剂。
24. 根据权利要求 23 所述的用途,其中单次给药的粘弹性补充剂的量为  $6\text{ml}$ 。
25. 根据权利要求 1 所述的用途,其中治疗关节病症。
26. 根据权利要求 25 所述的用途,其中关节病症与骨关节炎相关。
27. 根据权利要求 22 所述的用途,所述粘弹性补充剂用于治疗人类患者膝关节的骨关节炎疼痛,其中关节内单次注射给药  $6 \pm 2\text{ml}$  所述的粘弹性补充剂。
28. 根据权利要求 27 所述的用途,其中所述的粘弹性补充剂的量为  $6\text{ml}$ 。
29. 一种粘弹性补充装置,包括包含  $4\text{ml}$  或更多的包含透明质酸钠的粘弹性补充剂的注射器。
30. 一种粘弹性补充装置,包括包含  $4\text{ml}$  的包括透明质酸钠的粘弹性补充剂的液体的注射器。
31. 根据权利要求 29 所述的粘弹性补充装置,其为无菌的。
32. 根据权利要求 29 所述的粘弹性补充装置,其中注射器包含  $6 \pm 2\text{ml}$  的粘弹性补充剂。
33. 根据权利要求 29 所述的粘弹性补充装置,其中在注射器中粘弹性补充剂的量为  $6\text{ml}$ 。
34. 根据权利要求 29 所述的粘弹性补充装置,其中该粘弹性补充剂进一步包括选自下述的组分:非甾体抗炎药、麻醉剂、麻醉性镇痛剂、皮质类固醇、抗肿瘤剂、抗病毒剂和细胞。
35. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述的透明质酸钠与醛、环氧化物、polyaziridyl、缩水甘油醚或二乙烯砜交联。
36. 一种包括  $4\text{ml}$  或更多透明质酸钠的混合物的粘弹性补充剂,用于治疗患者膝关节。

## 用于关节内粘弹性补充的方案

[0001] 本申请是申请号为 200580045353.2, 申请日为 2005 年 12 月 20 日, 发明名称为“用于关节内粘弹性补充的方案”的中国专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及风湿病学和整形外科。更具体而言, 本发明涉及通过粘弹性补充 (viscosupplementation) 治疗软骨组织病症 (例如骨关节炎)。

### 背景技术

[0003] 骨关节炎 (OA) 为渐进性退化性疾病, 特征为关节内软骨破坏、关节连接中存在的滑液变质和伴有骨赘形成的软骨下骨质硬化。患有 OA 的患者通常表现出严重的疼痛, 其影响了它们日常生活的许多方面。OA 的流行随着年龄而增加, 超过 60% 的 60 岁或更年长的那些人可能患有某些软骨异常 (Bjelle(1982) Scand. J. Rheumatol. Suppl., 43 : 35-48)。OA 已经成为关节炎中花费最高的形式, 总计占西方国家国民生产总值达 1-2.5% (Reginster(2002) Rheumatology, 41 (Suppl. 1) : 3-6)。

[0004] 滑液润滑和保护关节内的关节面。该液体主要由高分子量的多糖透明质烷 (HA, 透明质酸的钠盐, 也称为透明质酸钠)。在正常人滑膜关节液体中 HA 的浓度为约 3mg/ml。HA 由 N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸钠的重复二糖单元组成 (图 1)。在正常的关节滑液中的 HA 包含 12,500 个二糖单元, 总分子量 (MW) 为 5MDa (Balazs 等 (1993) J. Rheumatol. Suppl., 39 : 3-9)。在 OA 患者中, 滑液中 HA 的浓度和 MW 降低, 导致保护软骨的液体的能力的减少。

[0005] 已经表明, 关节内注射包含高分子量 HA 的弹粘性溶液可恢复患病关节的正常内环境稳定。这一过程, 称为粘弹性补充, 已证实可有效地减少疼痛和增加关节功能 (参见, 例如 Balazs 等 (1993) J. Rheumatol. Suppl., 39 : 3-9 ; Wobig(1998) Clin. Ther., 20 (3) : 410-423)。

[0006] 许多基于 HA 粘弹性补充剂为市售的, 且新产品正在研究中。粘弹性补充剂在许多特性方面不同, 若有的话, 包括, 例如, HA 的来源 (动物 - 衍生的或细菌), HA 的浓度和 MW, 使用的类型和化学交联度。通常, 大部分粘弹性补充剂包含 5-15mg/ml HA, 一旦注射具有的存留半衰期为几小时至几天。将这样的粘弹性补充剂以 2-3ml 单位容积注射到膝中, 每隔一周分别注射三至五次。在某些情况下, 疼痛缓解可发生在几天内, 连续持续几周, 通常持续几个月, 甚至达到一年。例如, 已经证实, 在每周给药, 三次 (每次 2ml) **Synvisc®** (hylan G-F 20 ; Genzyme Corp., Cambridge, MA) 的膝粘弹性补充比在 6 个月内用非甾体抗炎药 (NSAIDs) 的连续口服加关节穿刺术的治疗 (Adams 等 (1995) Osteoarthritis and Cartilage, 3 : 213-225) 至少要好, 或较好, 且比生理盐水安慰剂或关节穿刺术对照更有效 (Moreland(1993) Am. Coll. Rheumatol. (57th Ann. Sci. Meeting, Nov. 7-11, San Antonio, TX), 165 ; Wobig(1998) Clin. Ther., 20 (3) : 410-423)。

[0007] 连续多次注射被认为对于延长治疗骨关节炎疼痛的 (六个月或一年) 效果是必需的, 主要是因为大部分粘弹性补充剂的存留半衰期短 (Peyron(1993) J. Rheumatol.,

20 (Suppl. 39) :10-15)。例如,如在兔子中测定时,1%具有平均 MW 为 1.7-2.6MDa 的 HA 的关节内存留半衰期为 11 小时。当 HA 的 MW 增加时,存留半衰期也延长(例如,其中 HA 的平均 MW 为 6MDa 的 1% hylan A 具有的半衰期为  $1.2 \pm 1$  天)。然而,即使是不溶性凝胶,例如包含 0.4% HA 的 hylan B,具有  $7.7 \pm 1$  天的相对短的存留半衰期。按照半衰期数据,对于减少 OA 疼痛而言,与二次 2ml 注射相比,将三次 2ml 的 **Synvisc®** 注射入 OA 膝中证实可显著地更有效 (Scale 等 (1994) Curr. Ther. Res. ,55(3) :220-232)。

[0008] 对于用 **Synvisc®** 治疗患有髌部 OA 的患者,推荐剂量为一次 2ml 注射,如果没有感受到足够的疼痛缓解,可在一至三月内进行第二次任选的注射给药 (Chevalier (2000) Am. Coll. Rheumatol. (64th Annual Scientific Meeting, Oct. 30-Nov. 3, Philadelphia, PA))。在髌部 OA 患者中,截止三个月(研究的持续时间)内,在大多数登记得患者中,以 2ml 单次关节内注射 **Synvisc®** 显示出即刻的和持续的症状疗效。还没有研究与多次注射 2-3ml 或单次注射 2ml 相比,用更少次注射较大体积的粘弹性补充剂例如 **Synvisc®** (例如 4、6ml 或更多) 是否可提供相等的或较好的功效。就目前已知的而言,使用较大体积可造成局部副作用例如疼痛、肿胀和渗出的危险。

[0009] Durolane™ (Q-Med AB, Uppsala, Sweden) 为被推荐以 3ml 注射一次的唯一粘弹性补充剂。其为环氧交联的粘弹性补充剂,具有较长报告的半衰期(4 周)和较高的 HA (20mg/ml)。延长的保留时间被认为使注射次数减少。然而,单次注射 Durolane™ 没有证实高于安慰剂的统计学益处 (Altman 等 (2004) Osteoarthritis and Cart. ,12 :642-649)。

[0010] 这样,在本发明之前,还不知道单次注射基于 HA 的粘弹性补充剂,尤其是一种具有短保留期的,是否可产生想要的长期治疗效果。

[0011] 利用较少次注射提供了高于多次注射明显的优点,包括避免了副作用、降低了成本和较好的患者顺应性。仍旧存在研究新的粘弹性补充剂的需要,其能提供对 OA 患者的有效缓解,而不需要多次注射。

## 发明内容

[0012] 本发明提供用于治疗关节病症和用于减少与此病症有关的疼痛和不适的方法和组合物。这种病症的实例包括骨关节炎和关节损伤。

[0013] 本发明是,至少部分是,基于发现了单次关节内注射较大体积的粘弹性补充剂可提供相当于小体积连续注射产生的长期治疗益处。在进行与本发明有关的研究中,一组膝 OA 患者接受如下标准顺序的治疗:在三周期间内,在膝部,注射 **Synvisc®** 三次,每次 2ml;而另一组接受在同等条件下的 6ml 的单次注射。出人意外地是,如在治疗后 26 周评价,发现治疗效果在两组中是相当的。因此,单次注射较大体积的粘弹性补充剂例如 **Synvisc®** 可以和几次小体积注射同样有效,而保持了良好的安全特性。

[0014] 因此,本发明提供用基于 HA 的粘弹性补充剂用于关节内粘弹性补充的方案,所述粘弹性补充剂特别是具有关节内存留半衰期 ( $T_{1/2}$ ) 短于 3 周的粘弹性补充剂。在本发明中使用的粘弹性补充剂可进一步表征为:其中它们包含小于 20mg/ml HA (衍生的和 / 或非衍生的),其中至少 5% 为凝胶形式,比如例如 hylan B。在一个说明性的实施方案中,粘弹性补充剂为 hylan G-F 20 (**Synvisc®**),其包含  $8 \pm 2$  mg/ml HA,其中 10% 重量为凝胶形式。

[0015] 在某些实施方案中,粘弹性补充剂以足量单次注射给药,在注射后,所述剂量提供

了达 6 个月的治疗效果。在某些实施方案中,大体积单次注射的治疗效果基本上与在治疗过程内三次注射给药(每次大体积的 1/3)获得的相同。在一个说明性的实施方案中,在三周期间内,**Synvisc®**以 6ml 单次注射给药,而不是三次 2ml 注射。

[0016] 也提供给药的方法、组合物和在本发明的方法中使用的装置。

[0017] 上述简述及其后的说明并不是限制要求保护的本发明。

## 附图说明

[0018] 图 1 图解了透明质烷(透明质酸钠)的结构。

## 具体实施方式

### [0019] 定义

[0020] 术语“关节内半衰期”、“存留半衰期”和它们的同源词指如下时间,其为适于将给定的粘弹性补充剂注射入关节内区域的任何时间中较大(的时间):(a) 清除 50% 注射的 HA 凝胶组分需要的时间;(b) 清除 50% 注射的 HA 液体组分需要的时间;和(c) 清除 50% HA 需要的时间,无论其是否为液体、凝胶或另一种形式。用于计算存留半衰期的目的,除非另有说明,注射被认为是给药进入成年人的膝关节的关节内区域。用于测定存留半衰期的方法是本领域已知的,说明性的方法为在实施例中描述的。

[0021] 术语“HA 液体”、“HA 液体相”、“HA 液体组分”、“可溶性 HA”和它们的同源词指具有小于 20MDa 的平均 MW 的非交联的或微交联的 (lightly crosslinked) 水溶性 HA。

[0022] 术语“HA 凝胶”、“HA 凝胶相”、“HA 凝胶组分”和它们的同源词指 HA 凝胶,其为不包含可溶性 HA 或包含小于 10% (w/w) 可溶性 HA 的基于 HA 的组合物的水不溶性部分。典型地,给定基于 HA 的组合物中凝胶的含量可以通过从 HA 液体中分离 HA 凝胶来测定,所述组合物包含 HA 凝胶和 HA 液体的混合。分离可通过例如 45  $\mu$  过滤器过滤组合物来实现,所述过滤器使可溶性 HA 穿过,而保留不溶相。为了使更粘性组合物中的可溶性 HA 从 HA 凝胶中的释放达到最大,需要在过滤前用几体积有或没有使其达到平衡的溶剂稀释组合物。而且,通常,基于它们的流变学性质,纯凝胶可与纯液体区分,所述流变学性质例如储能(弹性的)模量 (storage(elastic)modulus ( $G'$ )) 和损耗(粘性的)模量 (loss(viscous)modulus) ( $G''$ )),其分别表示随着变形速率(测试频率)的改变,物质可以回收(弹性应答 (elastic response)) 或流动(粘性应答 (viscous response)) 的相对程度。这两个模量都为频率的线性函数。它们已被证明是聚合物溶液和凝胶结构的灵敏的探针。 $G'$  和  $G''$  随着频率的增加而增加,但是一个比另一个增加的更快。在其中  $G' = G''$  时,该频率被称为交叉频率 ( $f_c$ )。交叉频率随着聚合物分子量或浓度的增加而降低。对于在低频率的聚合物溶液,弹性应力松弛和粘应力占主导,因此,在频率低于  $f_c$  时,  $G''$  大于  $G'$ 。相反,对于凝胶,不会存在  $G'$  和  $G''$  交叉,在频带中  $G'$  大于  $G''$ 。除非另有说明,测试频率为 0.04-7Hz。对于粘弹性材料的物理性能和测定这些性质的方法的综述,参见,例如“Polymers as Rheology Modifiers”,由 Schulz 和 Glass 编辑,ACS Symposium Series 462,1991;“An Introduction to Rheology,”H. A. Barnes, J. F. Hutton 和 K. Walters, Elsevier, 1989; 和 Bohlin Rheometer Application Notes MRK544-01, MRK556-01 和 MRK573-01。

[0023] 术语“HA”、“透明质酸盐”、“透明质烷”可交换使用,除非另有说明,指任意 HA,而

不考虑来源（细菌发酵的或动物衍生的）、分子量、其物理形式（例如凝胶或液体），或存在或不存在化学改性（例如交联的或其它衍生化的）或制备方法。

**[0024] 方案**

**[0025]** 本发明提供粘弹性补充方法和相关的方法。根据本发明，粘弹性补充方法包括在 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26 周内单次关节内注射给药粘弹性补充剂，给药量足以在注射后提供达 4、5 或 6 个月的治疗效果。在某些实施方案中，大体积单次注射的治疗效果基本上与在治疗过程内三次注射给药（每次为大体积的 1/3）获得的相同。在某些实施方案中，单次注射方案提供在注射后关节痛减少直至 4、5 或 6 个月。

**[0026]** 治疗效果可以通过任意适宜的方法（参见，例如，Altman 等 (1996) *Osteoarth. Cart.*, 4:217-243）评价。例如，治疗效果可通过测定关节痛的减少来评价。关节痛的程度可以根据五点 Likert 分类（例如没有、轻度、中度、严重、非常严重），或者按如在实施例中描述的 100mm 直观类比尺 (scale) (VAS) 分类。其它适宜的疼痛指数包括健康状态评估调查表 (HAQ) (Fries 等 (1980) *Arthritis Rheumatol.*, 23:137-145) 和关节炎影响检测尺 (Arthritis Impact Measurement Scale) (AIMS) (Meenan 等 (1980) *Arthritis Rheumatol.*, 23:146-154)。

**[0027]** 治疗效果也可通过测定功能缺损程度的改善来评价。功能缺损可使用分离有效的多维指数 (segregated validated multidimensional index) (SMI)，例如用于髌部和膝 OA 的 Western Ontario 和 McMaster 's 大学 (WOMAC™) OA 指数 (Bellamy 等人 (1988) *J. Rheumatol.* 34:1833-1840；也参见实施例)；或聚集的多维指数 (aggregated multidimensional index) (AMI)，例如用于髌部或膝的痛-函数指数 (Algo-Functional Index) (AFI) (Lequesne 等人 (1987) *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 65:85-89)。

**[0028]** 治疗效果也可由患者或医师通过总体状况评估来评价。总体状况可利用 Likert 或 VAS 尺来评价，例如在实施例中描述的。

**[0029]** 治疗效果的其它标记可包括关节检查（参见，例如 Theiler 等人 (1994) *Osteoarth. Cart.*, 2:1-24），基于性能测定 (performance based measures)（参见，例如 Rejeski 等人 (1995) *Osteoarth. Cart.*, 3:157-168）等。

**[0030]** 在某些实施方案中，给药进入膝关节的粘弹性补充剂的量为 6±2ml 或更高，例如 4、4.25、4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75、6、6.25、6.5、6.75、7、7.25、7.5、7.75、8ml 或更高。

**[0031] 粘弹性补充剂**

**[0032]** 在本发明的方法中使用的基于 HA 的粘弹性补充剂具有下述任一项、任两项或所有的特征：

**[0033]** (i) 粘弹性补充剂具有小于 3 周的存留半衰期。

**[0034]** (ii) 粘弹性补充剂包含小于 20mg/ml HA；

**[0035]** (iii) 在粘弹性补充剂中 5% (w/w) 或更高的 HA 为凝胶形式。

**[0036]** 在一个说明性的实施方案中，在本发明中使用的粘弹性补充剂为 **Synvisc®**。**Synvisc®** 包含两种形式的 8±2mg/ml HA：可溶性形式，hylanA（平均 MW 6,000kDa）和在生理学可接受的溶液中的水合凝胶形式，hylan B。按 HA 的重量计，在 **Synvisc®** 中的 hylanA/hylan B 比例为 9：1。Hylan A 为通过用少量醛共价交联来化学改

性的水溶性透明质烷,所述醛典型地为甲醛,而 hylan B 为用二乙烯砜进一步交联的 hylan A。Hylan 液体为水合的 hylan A,用少量交联进行的改性形式的透明质烷,所述交联增加了其平均分子量和增加了其粘弹性性质。Hylan 凝胶为 hylan B 的水合形式,其为使用二乙烯砜作为双功能的交联剂通过将 hylanA 交联成连续聚合的网状结构制备的。

[0037] 通常,在本发明提供的方案中使用的粘弹性补充剂包括具有关节内存留半衰期短于 22 天例如 21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4 和 3 天的基于 HA 的粘弹性补充剂。在某些实施方案中,粘弹性补充剂的存留半衰期大于 2、3、4、5、6 或 7 天。

[0038] 在本发明中使用的粘弹性补充剂可进一步表征为:其中它们包含小于 20mg/ml HA,例如在 1-15、1-10、1-5、5-15、5-10、10-15、6-10 和 7-9mg/ml 的范围。在给定组合物中的 HA 的含量可通过任意适宜的方法测定,如例如在实施例描述的方法。

[0039] 在本发明中使用的粘弹性补充剂组合物可进一步表征为:其中在粘弹性补充剂中至少 10% 重量的 HA 为凝胶形式。例如,在某些实施方案中,粘弹性补充剂包含至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或更高的 HA 凝胶。在某些实施方案中,粘弹性补充剂包含 10-90%、10-75%、10-50%、10-40%、10-25% HA 凝胶。在某些实施方案中,在粘弹性补充剂中 HA 凝胶 / HA 液体的比例包含 1 : 50-10 : 1 (w/w),例如 1 : 50、1 : 25、1 : 15、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1 和 10 : 1。

[0040] 在本发明的方法中使用的粘弹性补充剂可进一步在液体相中包含水溶性的 HA,其具有 HA 的 MW 为 500-20,000kDa,例如 500-1,000 ; 500-1,500、500-3,000 ; 500-5,000 ; 500-7,000 ; 500-10,000 ; 500-15,000 ; 1,000-1,500 ; 1,000-3,000 ; 1,000-5,000 ; 1,000-7,000 ; 1,000-10,000 ; 1,000-15,000 ; 5,000-10,000 ; 和 10,000-15,000kDa。

[0041] HA 可以是动物源的,例如来源于公鸡冠或脐带或非动物源,例如细菌发酵的。细菌发酵的 HA 可以如在例如 Cooney 等人 (1999) Biotechnol. Prog., 15 : 898-910 中描述的。细菌发酵的 HA 也可以为市售的 (例如 Shiseido, Japan ; Sigma-Aldrich, USA)。

[0042] HA 可以是衍生的 (例如交联的或另外改性的或稳定的) 或非衍生的。交联剂的实例包括醛、环氧化物、polyaziril、缩水甘油醚 (例如 1,4- 丁二醇二缩水甘油醚) 和二乙烯砜。

[0043] 在本发明的方法中使用的粘弹性补充剂的特定实例包括 Adant™、Arthrease™、Arthrum™、Fermathron™、Goon™、Hyalart™/Hyalgan™、Hy-GAG™、Hya-ject™、Hyalubrix™、NeoVisc™、Supartz™/Artz™、**Synvisc®**、Orthovisc™、Ostenil™、Sinovial™、Suplasyn™ 和 Synochrom™、Viscorneal™ (参见,例如 Physicians' Desk Reference™, 2004)。其它适宜在本发明的方法中使用的产物包括在美国专利 Nos. 5, 143, 724 ; 4, 713, 448 ; 5, 099, 013 ; 5, 399, 351 ; 6, 521, 223 ; 5, 827, 937 ; 美国专利申请 No. 60/533, 429 中描述的粘弹性补充剂。

[0044] 包括 hylan A 和 hylan B 的 hylans 和粘弹性补充剂的制备为在例如美国专利 Nos. 5, 143, 724 ; 4, 713, 448 ; 5, 099, 013 和 5, 399, 351 中描述的。

[0045] 在某些实施方案中,粘弹性补充剂不包括 Durolane™ 和 / 或其它的具有存留半衰期比 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 天长的粘弹性补充剂。

[0046] 粘弹性补充剂也可包含另外的活性或无活性化合物,包括例如非甾体抗炎药(NSAIDs),例如 Ibuprofen<sup>TM</sup>、Diclofenac<sup>TM</sup>和 Piroxicam<sup>TM</sup>;麻醉剂例如,Lidocaine<sup>TM</sup>和 Bupivacaine<sup>TM</sup>;麻醉性镇痛剂,例如,可待因和吗啡;皮质类固醇,例如,地塞米松和泼尼松;抗肿瘤剂例如 Methotrexate<sup>TM</sup>,5-氟尿嘧啶和 Paclitaxel<sup>TM</sup>和抗病毒剂,例如,Acyclovir<sup>TM</sup>和 Vidarabine<sup>TM</sup>。粘弹性补充剂也可包含组分例如细胞(例如软骨细胞或间充质干细胞)、蛋白质、DNA、维生素或其它想要的生物学活性物质。

#### [0047] 用途和给药

[0048] 本发明提供用于治疗患有关节病症的患者和用于减少与这种病症有关的疼痛和不适的方法和组合物。这种病症的实例包括骨关节炎(原发性(自发性)或继发性)、类风湿性关节炎、关节损伤(例如重复性的运动损伤)、软骨组织病症(软骨软化)和关节炎前状况。本发明进一步提供减少与这种病症有关的疼痛的方法。该方法可在需要用于关节病症治疗的人类中或在非人类患者中实施。

[0049] 给药部位的实例包括膝的、肩膀的、颞下颌的和腕掌的关节、肘、髋部、腕、踝和在脊柱中腰椎关节突(小平面)的关节。注射到任一个这些关节中的体积将至少为用于那些关节的目前推荐剂量的双倍。

[0050] 本发明进一步提供粘弹性补充装置,包括前灌注的、单次使用的注射器,其包含  $6 \pm 2\text{ml}$  的单次单元剂量的 **Synvisc®**,例如 4、4.25、4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75、6、6.25、6.5、6.75、7、7.25、7.5、7.75、8、8.25、8.5、8.75、9、9.25、9.5、9.75、10ml 或更多。尽管其优选地提供使用本文中提供的单次注射器的单次给药剂量,但是需要的剂量可以由两个或多个注射器提供。例如,单次给药 6ml 可以使用每个包含 2ml 的 3 个注射器完成。

[0051] 下述实施例提供说明性的实施方案。所述实施例不以任何方式限制本发明。本领域普通技术人员将认识到在本发明的范围内可进行多种修饰和改变。因此,这样的修饰和改变包括在本发明内。

#### [0052] 实施例

##### [0053] 实施例 1:在患有 OA 的患者中 **Synvisc®** 的关节内注射

[0054] 进行预期的、开放标记的研究用于评价在患有有症状的胫腿节 OA(在研究的膝中的总体 OA 疼痛,在 100mm VAS 尺上为 50-80)的非卧床病人中进行关节内注射 4ml 或 6ml **Synvisc®** 的安全和功效(包括作用的持续时间),所述关节内注射 4ml 或 6ml **Synvisc®** 与目前三次关节内注射 2ml **Synvisc®** 的配药方案相反。包含的其它条件为:年龄在 40 岁以上;最近的 3 个月内通过 X 射线测定的 Kellgren-Lawrence 等级为 II-III;没有压力渗出液(tense effusion)、机能损耗(mechanical deficit)或最近(<2 年)的创伤。将 100 名患者(从 59 到 66 岁,平均年龄 61 年,55% 女性)随机分为五组:

[0055] 第 1 组:一次注射 6ml;

[0056] 第 2 组:一次注射 4ml;

[0057] 第 3 组:隔两周注射 4ml 两次;

[0058] 第 4 组:隔一周注射 4ml 三次;和

[0059] 第 5 组:标准方案:隔一周注射 2ml 三次

[0060] 然后,随访患者 6 个月(在第 2、3、8、16 和 24 周)。使用的第一和第二评价点为如下所述的:

[0061] A. OA 疼痛的患者自我评价

[0062] 该研究的基本功效点用于评价在患有膝 OA 的患者中用Synvisc®粘弹性补充对研究膝 OA 疼痛缓解的功效。这点可在过去的 48 小时内患者自我评价的 100mm VAS 上测定, 没有疼痛的点 (0mm) 至极度疼痛 (100mm); 在第一次注射后的 24 周进行。

[0063] B. 患者总体自我评价

[0064] 患者在 100-mm VAS 上估计它们的靶标膝的整体状况, 100-mmVAS 其从很好 (0mm) 至很差 (100mm), 考虑 48 小时内所有相关的体征和症状。呈给患者的准确说明为下述的: “请利用下面的垂直线指出你的 (研究) 膝在这次探访时的整体一般状况左侧或 ‘0’ 分表示 ‘非常好’, 而 ‘100’ 分表示 ‘非常差’”。

[0065] C. WOMAC™

[0066] 患者完成了 WOMAC™ 的 VAS 模型 (version), 如在 Bellamy 等的 (1988) J. Rheumatol., 15(12):1833-40 中描述的。该尺为三维的、疾病特异性、自己管理的、健康状态测定方法。其探查疼痛区域内、四肢强直和躯体功能总共 24 个问题的临床重要的患者相关的症状。将 WOMAC™ 以当地语言提供给患者, 通常在小于 5 分钟内完成。WOMAC™ 的分部为下述的。

[0067] WOMAC™ 部分 A 包括有关活动期间疼痛水平的询问, 用没有疼痛 (0mm) 至极疼痛 (100mm) 的 VAS 对回答评分 (由患者)。疼痛的评价采用下述方案:

[0068] 1. 在平面上行走? [ 走 ]

[0069] 2. 上楼或下楼? [ 爬楼梯 ]

[0070] 3. 在晚上在躺床上时? [ 夜间的 ]

[0071] 4. 坐着或躺着? [ 静止 ]

[0072] 5. 站直? [ 负重 ]

[0073] WOMAC 部分 A 的平均得分是基于每人对部分 A 问题的回答。

[0074] WOMAC™ 部分 B (四肢强直评分) 包括有关活动期间强直严重性的询问, 用没有四肢强直 (0mm) 至极端四肢强直 (100mm) 的 VAS 对回答评分 (由患者)。四肢强直的评价采用下述方案:

[0075] 1. 在早晨苏醒后? [ 早晨四肢强直 ]

[0076] 2. 在白天剩余的后来时间 (duing rest later in the day)? [ 在白天晚些存在的四肢强直 ]

[0077] 部分 B 的平均得分是基于每人对部分 B 问题的回答。

[0078] WOMCC™ 部分 C 包括有关活动期间功能缺损的询问, 用没有困难 (0mm) 至极困难 (100mm) 的 VAS 对回答评分 (由患者)。功能缺损的评价采用下述方案:

[0079] 1. 下楼梯? [ 早晨四肢强直 ]

[0080] 2. 上楼梯? [ 在白天晚些存在的四肢强直 ]

[0081] 3. 从坐着站立? [ 起立 ]

[0082] 4. 站? [ 站 ]

[0083] 5. 弯向地板? [ 弯曲 ]

[0084] 6. 在平面上行走? [ 平走 ]

[0085] 7. 上下车? [ 汽车 ]

[0086] 8. 上街? [购物]

[0087] 9. 穿短袜 / 长袜 [脱短袜 / 长袜]

[0088] 10. 卧床 [卧床]

[0089] 11. 进入 / 出浴池 [进 / 出浴池]

[0090] 12. 坐 [坐]

[0091] 13. 上 / 下洗手间 [上 / 下洗手间]

[0092] 14. 重的家庭工作 [重的家务]

[0093] 15. 轻的家庭工作 [轻的家务]

[0094] 部分 C 的平均得分是基于每人对部分 C 问题的回答。

[0095] 从总 WOMAC™ 得分基线上的改变来自分析在第一次注射后作为第二端点的所有时间点的 3 个 WOMAC™ 部分 (A、B 和 C)。

[0096] D. 医师 OA 总体评价

[0097] 在患者完成总体评价和 WOMAC™ 后,研究者用从很好 (0mm) 至很差 (100mm) 的 100-mm VAS 评价探访时患者膝的整体状况。这一评价是基于患者的病征、功能能力和身体检查。医师被要求指出在这次探访时患者膝的整体一般状况,利用具有如下特征呈现的线 (line): 线的左侧 (“0”) 端指 “很好”, 右端 (“100”) 指 “非常差”。

[0098] E. 结果

[0099] 在第一次注射后 24 周,与基线相比表现出疼痛减少的结果 (在过去 48 小时内的 VAS ;0 相当于没有疼痛,100 相当于极疼) 显示在表 1 中。与在 3x2ml 组中的 36.7mm 相比,在 1x6ml 组中疼痛按 34.9mm 减少,其得分是最好的。在用 1x4 或 2x4ml 治疗组中,这一减少相当少 (仅 24mm 减少)。

[0100] 表 1. OA 疼痛的患者自我评价 (自基线的变化)

[0101]

| 组     | 1<br>1x6ml       | 2<br>1x4ml       | 3<br>2x4ml       | 4<br>3x 4ml      | 5<br>3x 2ml      |
|-------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 平均值   | -34.9            | -24.3            | -24.0            | -32.6            | -36.7            |
| 标准偏差  | 16.4             | 28.3             | 22.9             | 25.3             | 26.9             |
| 95%CI | -42.5 ,<br>-27.2 | -37.2 ,<br>-11.5 | -35.0 ,<br>-13.0 | -44.4 ,<br>-20.8 | -42.9 ,<br>-24.1 |

[0102] 包括疼痛、四肢强直和功能缺损改善的第二功效点,如通过 Western Ontario 和 McMaster Universities Osteoarthritis 指数 (WOMAC™) (表 2 为 WOMAC™ A)、患者 (表 3) 和医师 (表 4) 总体膝 OA 评价测定的,显示出相同的趋势。按照功效和结果排序的处理组显示在表 5 中。在第 1 组中观察的效果的延长持续时间是令人惊奇的。依据安全性,在每个组 (1x6ml 和 3x2ml) 中 10% 的患者报告了最少强度或中等强度的相关局部膝副作用 (adverse events) (疼痛、肿胀或渗出)。

[0103] 表 2. WOMAC™A 疼痛得分 (自基线的变化)

[0104]

| 组     | 1<br>1x6ml       | 2<br>1x4ml      | 3<br>2x4ml      | 4<br>3x 4ml      | 5<br>3x 2ml      |
|-------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| 平均值   | -25.8            | -14.7           | -16.6           | -27.7            | -25.6            |
| 标准偏差  | 22.5             | 24.2            | 24.8            | 27.2             | 24.6             |
| 95%CI | -36.3 ,<br>-15.3 | -25.7 ,<br>-3.7 | -28.5 ,<br>-4.6 | -40.5 ,<br>-14.9 | -37.1 ,<br>-14.1 |

[0105] 表 3. 患者总体评价 (自基线的变化)

[0106]

| 组     | 1<br>1x6ml  | 2<br>1x4ml | 3<br>2x4ml | 4<br>3x 4ml | 5<br>3x 2ml |
|-------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 平均值   | -31.3       | -14.3      | -19.8      | -35.9       | -24.4       |
| 标准偏差  | 26          | 31         | 24         | 32.9        | 32.3        |
| 95%CI | -43.3,-19.1 | -28.4,-0.2 | -31.2,-8.2 | -41.3,-10.5 | -39.5,-9.3  |

[0107] 表 4. 医师总体评价 (自基线的变化)

[0108]

| 组    | 1<br>1x6ml | 2<br>1x4ml | 3<br>2x4ml | 4<br>3x 4ml | 5<br>3x 2ml |
|------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 平均值  | -30.7      | -16.8      | -22.9      | -25.9       | -27.7       |
| 标准偏差 | 18.3       | 24.8       | 26.9       | 25.0        | 29.6        |

[0109]

|       |             |            |             |             |             |
|-------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 95%CI | -39.5,-21.9 | -28.1,-5.5 | -35.8,-10.0 | -37.5,-14.2 | -41.6,-13.8 |
|-------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|

[0110] 表 5 :处理组排列

[0111]

| 组        | 1<br>1x6ml | 2<br>1x4ml | 3<br>2x4ml | 4<br>3x 4ml | 5<br>3x 2ml |
|----------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Pt.疼痛    | 2          | 4          | 5          | 3           | 1           |
| Pt.总体    | 1          | 5          | 4          | 2           | 3           |
| Phy.总体   | 1          | 5          | 4          | 3           | 2           |
| WOMAC™ A | 2          | 5          | 4          | 1           | 3           |
| WOMAC™ B | 4          | 5          | 3          | 2           | 1           |
| WOMAC™ C | 2          | 4          | 5          | 1           | 3           |

[0112] 关于安全性,在处理组之间没有观察到大的差异,一般而言,仅仅第1组(1x6ml)具有最小副作用。这些结果也建议比2ml大的**Synvisc®**体积可安全地给药,以减少患有膝骨关节炎的患者的疼痛。

[0113] 实施例2:**Synvisc®**存留半衰期的测定

[0114] A. 将<sup>14</sup>C-乙酸酯加入到公鸡冠的器官培养物的透明质烷中

[0115] 用颈脱位法处死幼公鸡(3-6个月龄)。用(80%)乙醇彻底地清洗鸡冠,然后,利用解剖刀在基部切除。将过量的血从鸡冠中挤出,将其放置在无菌盐溶液中,转移到层流净化罩中,用另外体积的无菌盐溶液清洗三次。然后,沿着血管中线解剖鸡冠,切除长方形的粉红色皮组织部分。用解剖刀将鸡冠组织部分切成切片,放置在Ventrex培养基HL-1(Ventrex Labs)中:5mg/ml丙酸睾酮(Belmar Laboratories, Inwood, NY)、20  $\mu$  Ci/ml的<sup>14</sup>C-醋酸(ICN Radiochemicals, Irvine, CA 1 mCi/ml)、0.1mg/ml青霉素、0.1mg/ml链霉素和0.1mg/ml两性霉素B(Hazleton, Lenexa, KS)。将单独培养物置入60mm塑料培养皿中,其包含约1.5g的鸡冠组织和15ml的培养基。在5% CO<sub>2</sub>环境中培养培养物72小时,之后,通过在10,000g离心10分钟将组织从培养基中分离。将组织片冷冻在30mm培养皿中。典型地,在继续制备hylan的过程前,将冷冻的鸡冠组织保存在冰箱中1-72小时。

[0116] B. 放射标记的hylan液体的制备

[0117] Hylan A纤维为如下制备的。将冷冻的放射标记的鸡冠组织的切片以0.75g组织每1g反应培养基的比例放置在反应培养基中,所述反应培养基包含丙酮、福尔马林(37%甲醛溶液)、氯仿和醋酸钠。允许反应进行18-20小时,之后采集组织切片,在丙酮中洗涤三次,然后在层流净化罩中干燥。然后,将四体积的蒸馏水加入到干的组织切片中,以便提取放射标记的hylan。该水溶液提取在4-6℃下进行,之后,除去水提取物,加入同样体积的水,进行第二次提取。将固体醋酸钠溶解在含水提取物中至浓度为1%,通过缓慢加入四体积的95%乙醇沉淀hylan纤维。在丙酮中洗涤放射标记的hylan纤维两次,将其储存在冷的丙酮下。

[0118] 集中放射标记的 hylan A 纤维 (40.3mg), 通过在 4℃ 缓慢的翻滚式混合 (end-over-end mixing) 3 天, 将其溶解在 3.0ml 无菌、无热原的磷酸盐缓冲盐水溶液 (Biotrics Inc., Ridgefield, NJ, lot 122-1) 中。在完成溶解后, 用未标记的 hylan 液体稀释放射性 hylan 液体五倍。将混合物在 4℃ 以翻滚式混合保存另外 5 天。

#### [0119] C. 放射标记的凝胶的制备

[0120] 将氟化水 (New England Nuclear, 100 mCi/ml) 混入用于将 hylan 液体 (hylan A) 交联成 hylan 凝胶 (hylan B) 的反应混合物中。按如下进行交联反应。将 Hylan A 纤维在氟化水中膨胀约三小时。加入浓缩氢氧化钠, 强力搅拌混合物直到溶液为均相的 (约 15 分钟)。在水中, 将二乙烯砷稀释至 50% 的浓度, 在强力搅拌下, 将其加入反应混合物中。将反应混合物保存在室温下 (22℃) 另外 55 分钟, 期间, 通过二乙烯砷将多糖链交联成连续聚合的凝胶 (hylan 凝胶)。通过在氟化水中进行该反应, 氟共价附着在二乙烯基磺酰基交联内的碳上。通过加入十体积的无菌无热原的盐溶液以降低 pH 低于 12 来终止该反应。生理盐水洗涤也引起 hylan 凝胶肿胀至其饱和水合 (equilibrium hydration)。用生理盐水洗涤 hylan 凝胶以除去未反应的二乙烯砷、未反应的氟及其它反应产物, 并使 pH 降至 7。通过过滤从凝胶中分离过量的生理盐水, 之后, 使凝胶穿过 25g 针 5 次, 使固体凝胶分裂成易于可注射的形式。在这种形式中, 用无菌无热原的生理盐水彻底地渗析氟化的凝胶以除去任意非共价结合的氟。

#### [0121] D. hylan 凝胶-hylan 液体混合物的制备

[0122] 将氟化的 hylan 凝胶 (3.04g) 直接加入到 11.63g 的  $^{14}\text{C}$ -hylan 液体中, 将混合物置于 Glen 粉碎混合机中 48 小时。然后, 使混合物连续穿过 18g、21g 和 25g 针 10 次, 以确保均匀性和易于注射。

#### [0123] E. HA 浓度和放射性标记量的测定

[0124] 混合物的凝胶和液体组分中 hylan 多糖的浓度为通过用于试验其重复葡萄糖醛酸单体 (3) 的自动化卡唑法来测定, 并乘以 (2.07) 以计算多糖链的其余部分的浓度。在葡萄糖醛酸测定之前, 通过在紧密封的顶部有罗纹的管中 (tightly capped screw top tubes) 将称重的 0.1g 凝胶样品加入到 0.2ml 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中水解 hylan 凝胶, 在 100℃ 进行酸性水解 2 小时。在通过用卡唑法分析 HA 之前, 用 0.2ml 的 1N NaOH 中和在该过程中完全地溶解的样品。

[0125] 卡唑法包括测定样品中己糖醛酸 (葡萄糖醛酸) 的含量。Dische 等人 (1947), 在 J. Biol. Chem., 167:189-198 中报道了通过比色法测定己糖醛酸浓度的方法。该方法是基于用硫酸和卡唑对己糖醛酸进行显色反应。Balazs 等人在 (1965) Anal. Biochem., 12: 547-558 中报道了用于测定己糖醛酸的最新的自动化方法。在硫酸/硼酸酯介质中加热样品, 并与卡唑反应。卡唑与己糖醛酸反应形成具有在 530nm 有最大吸光率的粉红色复合物。对于自动化方法, 通过使用蠕动泵抽吸样品和标准品穿过连续流量分析器。将试剂 (酸和卡唑) 加入反应室并加热, 通过连续流量比色计在 530nm 读取吸光率。

[0126] 试验产品的放射性含量可在 ISOCAP 300 液体闪烁计数器 (Nuclear Chicago) 中使用 Scintiverse Bio HP (Fisher Scientific) 作为闪烁剂通过闪烁计数来测定。使用 ISOCAP 300 的外标比例程序将原始 CPM 数据转化成 DPM, 所述程序相对于氟液体闪烁淬灭标准 (Tritium Liquid Scintillation Quench Standards) 或碳-14 液体闪烁淬灭标准

(Carbon-14 Liquid Scintillation Quench Standards) (Amergham, Arlington Heights, II) 进行标准化。

[0127] F. **Synvisc®** 存留半衰期的测定

[0128] 在称重为 2.5 至 3.5kg 的新西兰白兔中测定来自膝关节的 **Synvisc®** 和其凝胶和液体组分的清除。将兔子分别在 24 小时、3、7 和 28 天处死。给药基本上如上所述制备的放射性物质,如关节内注射 0.3ml (0.086ml/kg 体重)。该剂量水平预期相当于单次 6ml 给药 **Synvisc®** 至 70kg 的人。同样地,在其它动物中给药的相应量与动物的重量成正比。

[0129] DPMs 为如上述的每个组织中获得的,当适宜时,直接计算 DPM/mg。分别对每种动物计算每个关节组织回收的总 DPMs 以及和 DPMs 和 DPM/mg。然后,在每个时间点,平均这些值,表示为平均值  $\pm$  平均标准误差。计算的平均数以至少二位有效数字来报道,即使在其中值很小并且动物与动物差别很大的情况下。通过均分独立的动物总数计算在每个时间点关节恢复的总的平均 DPM。

[0130] 通过将每次的平均数拟合成指数函数 ( $Y = Ae^{kx}$ ) 进行半衰期的确定。估计的标准误差是从曲线拟合获得的,除以 A 以获得预期的误差百分数。其可乘以半衰期获得半衰期的预计误差。

[0131] G. 结果

[0132] **Synvisc®** 的凝胶组分 (hylan B) 为具有较长半衰期的部分。根据放射性物质的清除率,测定凝胶组分的存留半衰期为 7.7-8.8 天。这样,在 30 天,超过 95% 的凝胶将被清除。根据实验测定的凝胶的半衰期,进行理论计算以估计预期在单次 6ml 注射后人类关节中的凝胶含量。假设将约 6mg 的凝胶注入人类患者的膝中,在注射后第 21 天,剩余凝胶的含量将为约 0.9mg。

[0133] **Synvisc®** 的液体组分 (hylan A) 比凝胶组分清除的更快。液体组分的半衰期确定为 1.2-1.5 天。在第 7 天,99% 注射的物质从兔子的膝关节中清除。

[0134] 也进行兔子肌肉植入物研究。在植入后第 7 和 30 天的显微镜检查没有检测出任意剩余试验材料,其与关节内清除率的研究一致。

[0135] 根据在说明书内引用的参考的教导,说明书可被最彻底地理解。在说明书内的实施方案提供了本发明实施方案的说明,其将不会被解释为限制本发明的范围。本领域技术人员易于认识到许多其它的实施方案包括在本发明内。在该公开的内容中引用的所有出版物和专利以其全部引入作为参考。至此,通过参考被人本申请的材料与本说明书矛盾或不一致时,以本说明书内容为准。在本文中任意参考的引证都是允许的,这样的参考都是本发明的现有技术。

[0136] 除非另有说明,在包括权利要求的说明中使用的所有的表示成分量、细胞培养和处理条件等的数字应当理解为在所有条件下可通过术语“约”来修改。因此,除非另有相反说明,数字参数为近似值,可根据寻求通过本发明获得想要的性质进行改变。除非另有说明,在一组成分前的术语“至少”应当理解为指组中的每个成分。本领域技术人员将认识到或能仅仅使用常规实验来确定,许多本文中描述的本发明特定实施方案的同等方案。这样的同等方案指下述权利要求书包括的。

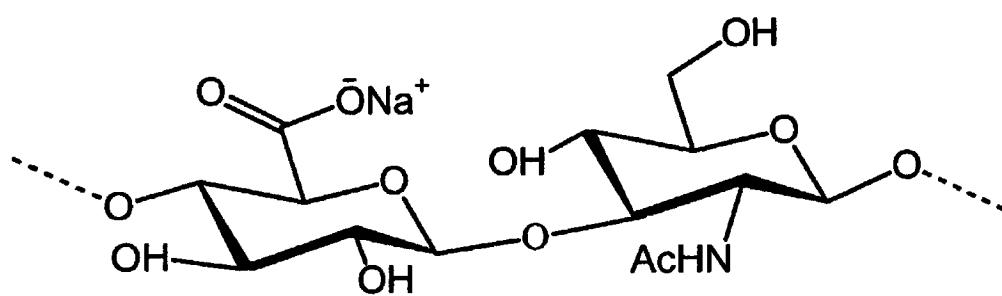


图 1