



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118215482 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 18

(21) 申请号 202280074901.8

(22) 申请日 2022.09.13

(30) 优先权数据

63/243638 2021.09.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/043391 2022.09.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/039298 EN 2023.03.16

(71) 申请人 意路希德姆有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·霍尔兹沃斯 S·萨拉斯瓦蒂

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 初明明 彭昶

(51) Int.Cl.

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

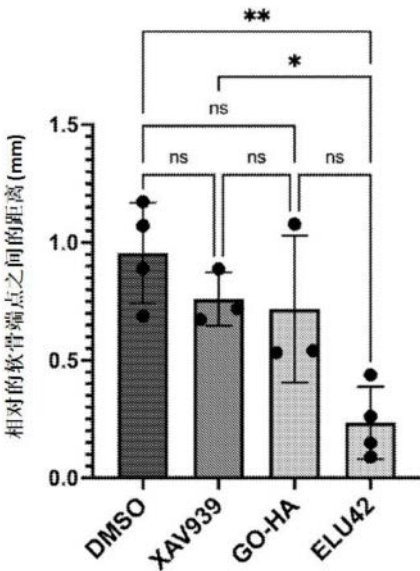
权利要求书4页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称

用于损伤后软骨再生和再生长方法的组合物

(57) 摘要

本发明提供了在哺乳动物受伤后增强软骨再生的方法,其包括:识别其正在经历软骨损伤的哺乳动物,向所述哺乳动物施用包含共价连接的氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)、XAV939、和水的组合物。所述方法的组合物还可包括表面活性剂,例如PEG。所述组合物可局部施用于受试者以治疗所述受试者的软骨损伤。



1. 刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法,其包含:
任选地识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;
任选地识别所述受到损伤的软骨的位置和范围;和
使所述受到损伤的软骨与有效量的组合物接触,所述组合物包含:
基质组分,其包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;
3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939);和
水;
任选地,其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述受到损伤的软骨是弹性软骨。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其中,所述组合物进一步包含表面活性剂。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述表面活性剂是聚乙二醇(PEG)、或泊洛沙姆(poloxamer)。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述表面活性剂是PEG,和所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。
7. 根据权利要求5或6所述的方法,其中,所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。
8. 根据权利要求1-7任一项所述的方法,其中,所述组合物进一步包含增稠剂。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述增稠剂包含羟丙基纤维素(HPC)。
10. 根据权利要求1-9任一项所述的方法,其中,所述连接体包含2-25个碳原子。
11. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中,所述连接体包含一个或多个-CH₂CH₂O-单元。
12. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中,所述连接体包含-R_x-R_s-R_y-,其中R_x和R_y各自独立地选自由以下组成的组:-CO-、-COO-、-NH-、-NH-NH-、-NH-NH-CO-、-CS-、-S-、和-O-,和其中R_s是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,R_x和R_y各自为-NH-NH-CO-。
14. 根据权利要求1-13任一项所述的方法,其中,XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。
15. 根据权利要求1-14任一项所述的方法,其中,所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。
16. 刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法,其包含:
任选地识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;
任选地识别所述受到损伤的软骨的位置和范围;和
每48小时一次使所述受到损伤的软骨与有效量的组合物接触,所述组合物包含:
基质组分,其包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;
3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939);和
水;

任选地,其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

17.根据权利要求16所述的方法,其中,所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。

18.根据权利要求17所述的方法,其中,所述受到损伤的软骨是弹性软骨。

19.根据权利要求16-18任一项所述的方法,其中,所述组合物进一步包含表面活性剂。

20.根据权利要求19所述的方法,其中,所述表面活性剂是聚乙二醇(PEG)、或泊洛沙姆。

21.根据权利要求20所述的方法,其中,所述表面活性剂是PEG,和所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。

22.根据权利要求20或21所述的方法,其中,所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。

23.根据权利要求16-22任一项所述的方法,其中,所述组合物进一步包含增稠剂。

24.根据权利要求23所述的方法,其中,所述增稠剂包含羟丙基纤维素(HPC)。

25.根据权利要求16-24任一项所述的方法,其中,所述连接体包含2-25个碳原子。

26.根据权利要求16-25任一项所述的方法,其中,所述连接体包含一个或多个-CH₂CH₂O-单元。

27.根据权利要求16-25任一项所述的方法,其中,所述连接体包含-R_x-R_S-R_y-,其中R_x和R_y各自独立地选自自由以下组成的组:-CO-、-COO-、-NH-、-NH-NH-、-NH-NH-CO-、-CS-、-S-、和-O-,和其中R_S是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。

28.根据权利要求27所述的方法,其中,R_x和R_y各自为-NH-NH-CO-。

29.根据权利要求16-28任一项所述的方法,其中,XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。

30.根据权利要求16-29任一项所述的方法,其中,所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

31.组合物,其用于刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法,所述组合物包含:

基质组分,其包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;

3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939);和
水;

任选地,其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%;和

其中所述方法包含:

任选地识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;

任选地识别所述受到损伤的软骨的位置和范围;和

使所述受到损伤的软骨与有效量的所述组合物接触。

32.根据权利要求31所述的组合物,其中,所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。

33.根据权利要求32所述的组合物,其中,所述受到损伤的软骨是弹性软骨。

34.根据权利要求31-33任一项所述的方法,其中,所述组合物进一步包含表面活性剂。

35.根据权利要求34所述的方法,其中,所述表面活性剂是聚乙二醇(PEG)、或泊洛沙姆。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中, 所述表面活性剂是PEG, 和所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。

37. 根据权利要求35或36所述的方法, 其中, 所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。

38. 根据权利要求31-37任一项所述的方法, 其中, 所述组合物进一步包含增稠剂。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中, 所述增稠剂包含羟丙基纤维素 (HPC)。

40. 根据权利要求31-39任一项所述的方法, 其中, 所述连接体包含2-25个碳原子。

41. 根据权利要求31-40任一项所述的方法, 其中, 所述连接体包含一个或多个-CH₂CH₂O-单元。

42. 根据权利要求31-40任一项所述的方法, 其中, 所述连接体包含-R_x-R_s-R_y-, 其中R_x和R_y各自独立地选自由以下组成的组: -CO-、-COO-、-NH-、-NH-NH-、-NH-NH-CO-、-CS-、-S-、和-O-, 和其中R_s是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中, R_x和R_y各自为-NH-NH-CO-。

44. 根据权利要求31-43任一项所述的方法, 其中, XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。

45. 根据权利要求31-44任一项所述的方法, 其中, 所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

46. 组合物, 其用于刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法, 所述组合物包含:

基质组分, 其包含氧化石墨烯 (GO) 与透明质酸 (HA) 偶联物 (GO-HA), 其中所述GO与HA经由连接体共价连接;

3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮 (XAV939); 和水;

任选地, 其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%; 和

其中所述方法包含:

任选地识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;

任选地识别所述受到损伤的软骨的位置和范围; 和

每48小时一次使所述受到损伤的软骨与有效量的所述组合物接触。

47. 根据权利要求46所述的组合物, 其中, 所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。

48. 根据权利要求46所述的组合物, 其中, 所述受到损伤的软骨是弹性软骨。

49. 根据权利要求46-48任一项所述的方法, 其中, 所述组合物进一步包含表面活性剂。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中, 所述表面活性剂是聚乙二醇 (PEG)、或泊洛沙姆。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中, 所述表面活性剂是PEG, 和所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。

52. 根据权利要求50或51所述的方法, 其中, 所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。

53. 根据权利要求46-52任一项所述的方法, 其中, 所述组合物进一步包含增稠剂。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中, 所述增稠剂包含羟丙基纤维素 (HPC)。

55. 根据权利要求46-54任一项所述的方法, 其中, 所述连接体包含2-25个碳原子。

56. 根据权利要求46-55任一项所述的方法, 其中, 所述连接体包含一个或多个-CH₂CH₂O-单元。

57. 根据权利要求46-55任一项所述的方法, 其中, 所述连接体包含-R_x-R_s-R_y-, 其中R_x和R_y各自独立地选自由以下组成的组: -CO-、-COO-、-NH-、-NH-NH-、-NH-NH-CO-、-CS-、-S-、和-O-, 和其中R_s是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中, R_x和R_y各自为-NH-NH-CO-。

59. 根据权利要求46-58任一项所述的方法, 其中, XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。

60. 根据权利要求46-59任一项所述的方法, 其中, 所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

用于损伤后软骨再生和再生长方法的组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求并享有于2021年9月13日提交的美国临时申请号US63/243,638的权益,此临时申请出于所有目的通过引用明确并入本申请。

发明领域

[0003] 本发明公开内容涉及用于治疗软骨损伤,特别是用于软骨损伤后增强软骨再生的组合物及方法。

[0004] 发明背景

[0005] 本申请中引用的所有出版物、专利及专利申请均通过引用其全文并入本发明,其范围如同将每个单独的出版物、专利申请或专利的公开内容被具体且单独地表明通过引用其全文并入一样。

[0006] 软骨是哺乳动物结缔组织的重要形式,在体内提供结构和功能活动。软骨由三大类组成:最普遍的形式是透明软骨,通常存在于形成关节一部分的骨头末端;弹性软骨,例如在耳或鼻中发现的提供身体结构的弹性软骨;以及在韧带和肌腱插入处发现的纤维软骨。

[0007] 虽然在胎儿发育期间或幼年时观察到软骨的修复,但成年哺乳动物受伤后的软骨修复和再生几乎完全不存在。虽然现有技术已认识到生长因子及伤口病变边缘整合在修复过程中的作用,但对改善损伤后软骨再生及愈合的治疗剂需求尚未得到满足。

[0008] Wnt通路已被证明在真皮纤维化和疤痕形成中发挥关键作用。Wnt通路是一条进化保守通路,在胚胎发育过程中,调节细胞命运决定、细胞极性、细胞迁移、神经模式和器官发生的关键方面。此通路有助于确保胚胎的正常组织发育及成人的组织维护。Wnt信号转导参与皮肤发育的初始阶段。原肠胚形成后,外胚层及中胚层的胚胎细胞分别分化形成表皮层和真皮层。

[0009] 尽管信号转导过程涉及至少三种不同的Wnt信号通路,但经典(或 β -连环蛋白(β -catenin)依赖性)Wnt通路是最被理解的。 β -连环蛋白是经典Wnt通路信号转导产生的关键效应分子,其蛋白质水平通过“破坏复合物”进行调节。在缺乏Wnt信号的情况下,转录激活因子 β -连环蛋白在细胞中通过称为“破坏复合物”的蛋白质复合物的作用而被主动降解。在此复合物中,Axin-1(轴蛋白1)和Axin-2与腺瘤性息肉大肠杆菌形成支架结构,其通过酪蛋白激酶19a和糖原合酶激酶3 β 来促进 β -连环蛋白磷酸化。磷酸化的 β -连环蛋白经识别并泛素化,使得其蛋白体降解。端锚聚合酶(Tankryase) I和端锚聚合酶II (TK1和TK2) 均是聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP),其功能是使Axin-1和Axin-2蛋白聚ADP-核糖基化(parsylate)并使其不稳定,从而破坏所述 β -连环蛋白破坏复合物的稳定性。一旦所述破坏复合物的稳定性被破坏, β -连环蛋白便会去磷酸化,随后稳定下来,并在细胞质中积累并进入细胞核,在细胞核中其与Tcf/Lef家族成员相互作用。 β -连环蛋白通过招募共激活蛋白将Tcf蛋白转化为有效的转录激活因子,从而确保Wnt靶基因的有效激活。Wnt通路一旦被Wnt天然配体家族激活,便会上调TNK1和TNK2,从而帮助破坏所述破坏复合物的稳定性。研究表明,TNK1和

TNK2均是经典Wnt信号转导的关键调节因子。

[0010] XAV939是一种小分子,其通过TNK 1和TNK2抑制(在无细胞测定试验中 IC_{50} 为11nM/4nM),从而选择性抑制Wnt/ β -连环蛋白介导的转录,调节轴蛋白(axin)水平,并且不影响CRE、F- $\kappa\beta$ 、或TGF- β 。在小鼠耳穿孔试验中局部施用XAV939表明,XAV939可显著提高伤口闭合率,同时减少纤维化(疤痕形成)。然而,将XAV939溶于DMSO,由于其水溶性非常低($<1\mu\text{g/mL}$),因此仅用作“研究工具”化合物。此方法的问题在于,使用DMSO进行局部给药可能会产生不希望的药理活性或不良反应。实际及医疗用途需要适合人类的可溶形式的XAV939。

[0011] 包含氧化石墨烯(GO)和透明质酸(HA)的基质组分已被证明能够有效地为XAV939提供支持性基质并允许使用XAV939作为人类和动物伤口愈合的治疗剂。参见,例如US20210000959,其中GO-HA基质中的XAV939可显著提高伤口愈合的速度和质量;特别是可显著改善因组织限制遵循纤维化愈合通路的伤口愈合而导致的疤痕形成。此外,据报道,在C57B1/CJ小鼠的软骨区域中心制作2mm活检穿孔伤口,例如通过施用溶于DMSO的XAV939,急性损伤后软骨再生及愈合均有所增加(Bastakoty, D. et al. 2015, 29(12):4881-4892)。

[0012] 鉴于非胎儿哺乳动物中软骨的天然再生能力有限,施用治疗剂后的任何软骨再生均是有益的,本领域需要用于诱导、增强或增加急性损伤后软骨再生的改进组合物。

发明摘要

[0013] 一方面,本发明提供了刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法,其包含:任选地识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;任选地识别所述受到损伤的软骨的位置和范围;和使所述受到损伤的软骨与有效量的组合物接触,所述组合物包含:由氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA)组成的基质组分,其中所述GO与HA经由连接体共价连接;3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939);和水;任选地,其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。在一个实施方案,所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。在进一步的实施方案,所述受到损伤的软骨是弹性软骨。在另一实施方案,所述组合物进一步包含表面活性剂。在进一步的实施方案,所述表面活性剂是聚乙二醇(PEG)、或泊洛沙姆(poloxamer)。在进一步的实施方案,所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。在进一步的实施方案,所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。在另一实施方案,所述组合物进一步包含增稠剂。在进一步的实施方案,所述增稠剂包含羟丙基纤维素(HPC)。在另一实施方案,所述连接体包含2-25个碳原子。在进一步的实施方案,所述连接体包含一个或多个 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 单元。在另一实施方案,所述连接体包含 $-\text{R}_x-\text{R}_y-$,其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自由以下组成的组: $-\text{CO}-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CS}-$ 、 $-\text{S}-$ 、和 $-\text{O}-$,和其中 R_y 是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。在进一步的实施方案, R_x 和 R_y 各自为 $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 。在另一实施方案,XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。在另一实施方案,所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

[0014] 另一方面,本发明提供了刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法,其包含:任选地识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;任选地识别所述受到损伤的软骨的位置和范围;和每48小时一次使所述受到损伤的软骨与有效量的组合物接触,所述组合物包含:包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA)的基质组分,其中所述GO与HA经由连接体共价

连接;3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939);和水;任选地,其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。在一个实施方案,所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。在进一步的实施方案,所述受到损伤的软骨是弹性软骨。在另一实施方案,所述组合物进一步包含表面活性剂。在进一步的实施方案,所述表面活性剂是聚乙二醇(PEG)、或泊洛沙姆。在进一步的实施方案,所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。在进一步的实施方案,所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。在另一实施方案,所述组合物进一步包含增稠剂。在进一步的实施方案,所述增稠剂包含羟丙基纤维素(HPC)。在另一实施方案,所述连接体包含2-25个碳原子。在进一步的实施方案,所述连接体包含一个或多个-CH₂CH₂O-单元。在另一实施方案,所述连接体包含-R_x-R_s-R_y-,其中R_x和R_y各自独立地选自自由以下组成的组:-CO-、-COO-、-NH-、-NH-NH-、-NH-NH-CO-、-CS-、-S-、和-O-,和其中R_s是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。在进一步的实施方案,R_x和R_y各自为-NH-NH-CO-。在另一实施方案,XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。在另一实施方案,所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

[0015] 另一方面,本发明提供了组合物,其用于刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法,所述组合物包含:基质组分,其包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939);和水;任选地,其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%;和其中所述方法包含:任选地识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;任选地识别所述受到损伤的软骨的位置和范围;和使所述受到损伤的软骨与有效量的所述组合物接触。在一个实施方案,所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。在进一步的实施方案,所述受到损伤的软骨是弹性软骨。在另一实施方案,所述组合物进一步包含表面活性剂。在进一步的实施方案,所述表面活性剂是聚乙二醇(PEG)、或泊洛沙姆。在进一步的实施方案,所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。在进一步的实施方案,所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。在另一实施方案,所述组合物进一步包含增稠剂。在进一步的实施方案,所述增稠剂包含羟丙基纤维素(HPC)。在另一实施方案,所述连接体包含2-25个碳原子。在进一步的实施方案,所述连接体包含一个或多个-CH₂CH₂O-单元。在另一实施方案,所述连接体包含-R_x-R_s-R_y-,其中R_x和R_y各自独立地选自自由以下组成的组:-CO-、-COO-、-NH-、-NH-NH-、-NH-NH-CO-、-CS-、-S-、和-O-,和其中R_s是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。在进一步的实施方案,R_x和R_y各自为-NH-NH-CO-。在另一实施方案,XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。在另一实施方案,所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

[0016] 另一方面,本发明提供了组合物,其用于刺激哺乳动物受到损伤的软骨再生的方法,所述组合物包含:基质组分,其包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939);和水;其中XAV939占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%;和其中所述方法包含:识别正在经历软骨损伤的哺乳动物;识别所述受到损伤的软骨的位置和范围;和每48小时一次使所述受到损伤的软骨与有效量的所述组合物接触。在一个实施方案,所述受到损伤的软骨是受到急性损伤的软骨。在进一步的实施方案,所述受到损伤

的软骨是弹性软骨。在另一实施方案,所述组合物进一步包含表面活性剂。在进一步的实施方案,所述表面活性剂是聚乙二醇(PEG)、或泊洛沙姆。在进一步的实施方案,所述PEG的分子量为约200至约400道尔顿。在进一步的实施方案,所述PEG的量为所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%。在另一实施方案,所述组合物进一步包含增稠剂。在进一步的实施方案,所述增稠剂包含羟丙基纤维素(HPC)。在另一实施方案,所述连接体包含2-25个碳原子。在进一步的实施方案,所述连接体包含一个或多个 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 单元。在另一实施方案,所述连接体包含 $-\text{R}_x-\text{R}_y-$,其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自由以下组成的组: $-\text{CO}-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CS}-$ 、 $-\text{S}-$ 、和 $-\text{O}-$,和其中 R_y 是具有2-20个主链碳的未取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。在进一步的实施方案, R_x 和 R_y 各自为 $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 。在另一实施方案,XAV939与GO-HA的重量比是从约1:2至约2:1。在另一实施方案,所述GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。

[0017] 在一些或任一前述实施方案,XAV939占XAV939、GO-HA和水的总量的约0.001wt%至约5wt%。

[0018] 在一些或任一前述实施方案,GO-HA占XAV939、GO-HA和水的总量的约0.001wt%至约5wt%。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图1示出了用盐水以及XAV939的DMSO溶液处理活检穿孔伤口30天与用GO-HA以及ELU42处理15天之间的小鼠相对的软骨端点之间的距离。

[0021] 图2示出了用XAV939的DMSO溶液处理活检穿孔伤口30天与用ELU42处理15天之间的小鼠相对的软骨端点之间的距离。

[0022] 图3示出了用GO-HA处理15天与用ELU42处理15天之间的小鼠相对的软骨端点之间的距离。

[0023] 图4示出了用盐水处理活检穿孔伤口21天与用ELU42处理21天之间的兔子相对的软骨端点之间的距离。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明提供了施用本发明组合物以诱导改善的软骨再生及愈合的新方法。

[0026] 应当理解,关于本发明所述的化合物、组合物、制剂和治疗方法的描述包括“包含”、“由……组成”和“基本上由……组成”的实施方案。在一些实施方案,对于本发明所述的所有组合物以及使用本发明所述组合物的所有方法,所述组合物可包含所列组分或步骤,或者可“基本上由所列组分或步骤组成”。当组合物被描述为“基本上由所列组分组成”时,所述组合物包含所列组分,并且可包含实质上不影响基本性质和新颖性质(在一些实施方案,正在治疗的病症)的其他组分,但除明确列出的那些组分外,所述组合物不包含实质上影响基本性质和新颖性质(在一些实施方案,正在治疗的病症)的任何其他组分;或者,如果所述组合物确实含有除列出的那些成分之外的实质上影响基本性质和新颖性质(在一些实施方案,正在治疗的病症)的额外组分,则所述组合物不包含足够浓度或足够量的实质上影响基本性质和新颖性质(在一些实施方案,正在治疗的病症)的所述额外组分。当方法被描述为“基本上由所列步骤组成”时,所述方法包含所列步骤,并且可包含实质上不影响基本性质和新颖性质(在一些实施例,正在治疗的病症)的其他步骤,但除了明确列出的那些步骤之外,所述方法不包含实质上影响基本性质和新颖性质(在一些实施方案,正

在治疗病症)的任何其他步骤。作为非限制性的具体实例,当组合物被描述为“基本上由组分组成”时,所述组合物可另外包含任何量的药学上可接受的载体、辅料、或稀释剂以及实质上不影响基本性质和新颖性质(在一些实施方案,正在治疗的病症)的其他此类组分。

[0027] 本发明使用的“烷基”是指直链或支链烃。烷基可以是直链、支链、环状、或其组合,并且可含有例如1至60个碳原子。烷基基团的实例包括但不限于乙基、丙基、异丙基、环丙基、丁基异构体类(例如,正丁基、异丁基、叔丁基等)、环丁基异构体类(例如,环丁基、甲基环丙基等)、戊基异构体类、环戊烷异构体类、己基异构体类、环己烷异构体类、及其类似物。

[0028] 本发明使用的术语“直链烷基”是指碳原子与氢原子的链(例如,乙烷、丙烷、丁烷、戊烷、己烷等)。

[0029] 本发明使用的术语“支链烷基”是指碳原子与氢原子的链,不具有双键或三键,其在链中包含叉、支链和/或分裂。“支化”是指碳链的分歧,而“取代”是指基团部分中存在非碳/非氢原子。

[0030] 本发明使用的术语“环烷基”是指完全饱和的单环或多环烃环体系。当由两个或更多个环组成时,所述这些环可以稠合、桥连或螺连接的方式连接在一起。环烷基基团可以是未取代的、取代的、支化的和/或未支化的。典型的环烷基基团包括但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、及其类似物。如果被取代,除非另有说明,所述取代基可以是烷基或选自以上关于烷基基团的取代所指出的那些基团。除非另有说明(例如,取代的环烷基基团、杂环基、环烷氧基基团、卤代环烷基、环烷基胺、硫代环烷基等),否则烷基基团仅含有碳原子和氢原子。

[0031] 本发明使用的术语“杂烷基”是指其中一个或多个碳原子独立地被一个或多个杂原子(例如,O、S、N、P、Si、或其组合)替代的烷基基团。包含非碳取代基的烷基基团可以是直链烷基、支链烷基、环烷基(例如,环杂烷基)、或其组合。非碳原子可位于末端位置(例如,2-己醇)或与烷基基团连接成一体(例如,二乙醚)。

[0032] 本发明使用的“烷氧基”,无论单独使用或组合使用时,俱是指基团-O-烷基。

[0033] 本发明使用的“烯基”,无论单独使用或组合使用时,俱是指具有至少2个碳原子的直链或支链烃,其含有至少一个碳-碳双键。

[0034] 本发明使用的“炔基”,无论单独使用或组合使用时,俱是指具有至少2个碳原子的直链或支链烃,其含有至少一个碳-碳三键。

[0035] 本发明使用的“胺”或“氨基”由式 $NA_1A_2A_3$ 表示,其中 A_1 、 A_2 和 A_3 可独立地为H或任选取代的烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、环炔基、芳基、或杂芳基基团,如本发明所述。在具体实施方案,胺是指 NH_2 、 NH (烷基)、 NH (芳基)、 N (烷基)₂、 N (烷基)(芳基)和 N (芳基)₂中的一个。

[0036] 本发明使用的“急性损伤”是指由诸如外伤性外力、化学毒性、热烧伤、冻伤、急性缺血和再灌注损伤等引起的损伤或伤口。示例性外伤性外力损伤尤其包括诸如外科手术和钝器外伤(例如,枪伤、刀伤等)等。可将所述组合物施用于受影响的组织上或注射入受影响的组织中以促进此类受损组织的血管形成、修复和再生。

[0037] 本发明使用的“再生”是指受破坏或失活的组织从残余组织中生长出来。此举是机体的修复尝试,在软骨的背景下,其表示软骨细胞的迁移或复制,或祖细胞向软骨细胞的转

化;产生所述软骨细胞的组织以形成透明软骨、弹性软骨或纤维软骨。

[0038] 本发明使用的“增稠剂”是增加液体黏度而基本上不改变所述液体的化学或生物学性质的物质。

[0039] 术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的辅料”包括在生物学上或其他方面并非不期望的任何及所有溶剂类、助溶剂类、络合剂类、分散介质、包衣类、抗菌剂类和抗真菌剂类、等渗剂类和吸收延迟剂类、及其类似物。药物活性物质的此类介质和试剂的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则亦涵盖其在治疗剂组合物中的使用。补充活性成分亦可掺入所述组合物中。此外,还可包括各种佐剂,例如本领域常用的佐剂。所述这些及其他此类化合物均记载于文献中,例如记载于默克索引(Merck&Company,Rahway,N.J.),其中记载了在药物组合物中包含各种组分的考虑因素(例如,Gilman et al.(Eds.),2010,Goodman and Gilman's:The Pharmacological Basis of Therapeutics,12th Ed.,The McGraw-Hill Companies)。

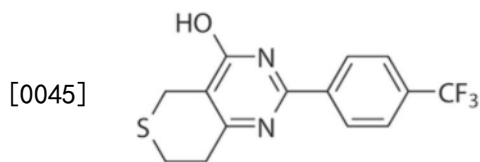
[0040] 术语“药学上可接受的盐”是指可保留本发明提供的化合物的生物学有效性和性质并且在生物学上或其他方面并非不期望的盐。在许多情况下,本发明提供的化合物能够凭借氨基和/或羧基基团或与其类似的基团的存在而形成酸和/或碱的盐。药学上可接受的酸加成盐可与无机酸和有机酸形成。可衍生盐的无机酸包括,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、及其类似物。可衍生盐的有机酸包括,例如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、及其类似物。药学上可接受的碱加成盐可与无机碱和有机碱形成。可衍生盐的无机碱包括,例如钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝、及其类似物;特别优选的是铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。可衍生盐的有机碱包括,例如伯胺类、仲胺类和叔胺类、取代胺类(包括天然存在的取代胺类)、环胺类、碱性离子交换树脂类、及其类似物,具体例如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、和乙醇胺。许多此类盐均是本领域已知的,如W0 87/05297中所述。

[0041] 本发明提供的化合物的“治疗有效量”或“药学有效量”是指足以实现所需效果的量,并且可根据疾病状况的性质和严重程度以及化合物的效力而变化。“治疗有效量”还旨在包括本发明的一种或多种组合物,以便在急性损伤后使得软骨再生增加。化合物和/或组合物的组合优选是协同组合。如本领域现有技术(例如,Chou,2010,Canc.Res.70(2):440-446)所述,当组合施用时化合物的效果大于作为单药药剂单独施用时化合物的相加效果时,则发生协同作用。一般而言,在所述这些化合物的次优浓度下,协同作用最为明显。应当理解,用于预防活性疾病的浓度可与用于治疗活性疾病的浓度不同。所述量还可取决于患者的身高、体重、性别、年龄和病史。

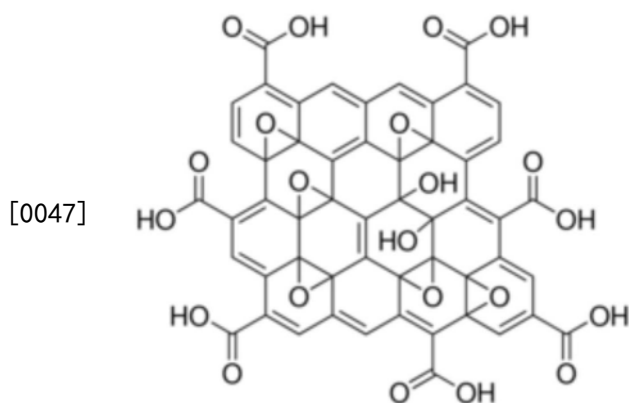
[0042] 术语“哺乳动物”以其通常的生物学意义使用。因此,所述哺乳动物具体包括人类、牛、马、犬和猫,但亦包括许多其他物种。

[0043] 一方面,本发明提供了用于治疗受到急性损伤的软骨的组合物,其包括:基质组分,其包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)的偶联物,其中GO与HA经由连接体共价连接;XAV939;和水。经共价连接的GO与HA在本发明中亦称为GO-HA偶联物或简称为GO-HA。

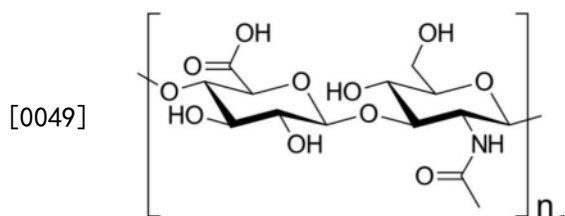
[0044] XAV939是一种有效的端锚聚合酶抑制剂,化学名称为3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-d]嘧啶-4-酮。XAV939的结构如下所示:



[0046] 本发明使用的氧化石墨烯 (GO) 是指氧化形式的石墨烯,其是单层形式的石墨。GO 可通过用强氧化剂处理石墨而得到。GO 含有不同量的碳、氧和氢,具体取决于其制作方式。GO 平面方向可有几百纳米,最高可达几微米,厚度为约 0.7-1.2nm。当使用硫酸 (例如 Hummers 方法) 制备时,GO 可包括各种含氧基团部分,例如环氧基团、羧酸 (-COOH)、苯酚等。GO 结构示例如下所示:



[0048] 透明质酸 (HA) 是一种阴离子、高亲水性、非硫酸化糖胺聚糖,天然存在于人体各处。其可以是数千个碳水化合物单位长度,可与水结合,形成坚硬粘稠质地的凝胶。HA 的结构示例提供如下:



[0050] 在本发明组合物中,所述 GO 与 HA 共价连接以形成基质组分 (或载体),其可用于溶解 XAV939 并同时为伤口愈合提供其他益处。所述共价连接可通过使用连接体 (或连接体基团部分) 来完成。在一些实施方案,所述连接体可包含 2-25 个碳原子。在一些实施方案,所述连接体是直链的。在其他实施方案,所述连接体是支链的。所述连接体可以是饱和或不饱和的。

[0051] 在一些实施方案,所述连接体可包含 C_2-C_{25} 亚烷基基团,其中所述亚烷基基团中的碳原子和氢原子均可被氧原子或其他原子或基团 (例如,羟基、羧基、氨基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、硝基等) 取代。在一些实施方案,所述连接体可包含一个或多个 $-CH_2CH_2O-$ 单元。

[0052] 在一些实施方案,所述连接体包含 $-R_x-R_s-R_y-$,其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自由以下组成的组: $-CO-$ 、 $-COO-$ 、 $-NH-$ 、 $-NH-NH-$ 、 $-NH-NH-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-S-$ 、和 $-O-$,其中 R_s (在本申请中亦称为间隔基团) 可以是具有 2-20 个主链碳的未取代或取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。在特定实施方案, R_x 和 R_y 均为 $*-HN-HN-CO-$ (*表示所述连接体远离 R_s 的末端)。

[0053] 在所述组合物的一些实施方案中,XAV939 与 GO-HA 的重量比可以从约 1:100 至

100:1,例如从约1:2至约2:1。在一些实施方案,在所述GO-HA偶联物中,GO:HA的重量比可以是约1:1至约1:20、或从约1:6至约1:10。

[0054] 亦可使用其他非离子亲水材料,例如PEG与PPG(聚丙二醇)的共聚物,例如泊洛沙姆类。在一个实施例,可使用Poloxamer-188(其平均分子量为约8400道尔顿)。

[0055] 在一些实施方案,所述组合物进一步包含药用载体、辅料、除XAV939之外的化合物类、或使得所述组合物能够以可局部施用的半固体水性凝胶形式存在的材料。例如,羧甲基纤维素可用作凝胶形成剂。然而,其他纤维素衍生物(例如,微晶纤维素类)以及多糖类(例如,藻酸盐、琼脂糖、黄芪胶、瓜尔胶和黄原胶)亦均适合作为凝胶形成剂。若需要,可通过添加相对弹性的凝胶形成材料例如经交联的纤维蛋白(例如,与甲醛交联的明胶或胶原蛋白),使所述凝胶变得更厚和/或更硬。在一些实施方案,所述组合物可呈乳膏形式,其可包括适合于乳膏制剂的那些辅料,例如石蜡油、凡士林、蜡、有机酯类(例如,棕榈酸鲸蜡酯)等。

[0056] 在一些实施方案,本发明组合物进一步包含增稠剂,以提供用于皮肤递送的组合物所需的黏度。譬如,所述增稠剂可包括羟丙基纤维素(HPC)、或黄原胶。HPC可使组合物形成光滑的薄膜,以便于施用。HPC还可减少蒸发,使伤口保持湿润的时间更长,这一因素已被证明可改善愈合并减少疤痕形成。根据HPC水溶液的分子量或一定浓度的黏度,可提供不同等级的HPC。

[0057] 在所述组合物的一些实施方案中,XAV939可占所述组合物总量(包括水)的约0.001wt%至约5wt%。在一些实施方案,XAV939可占所述组合物总量的约0.01wt%至约2wt%、约0.02wt%至约1wt%、或约0.05wt%至约0.5wt%。在一些实施方案,GO-HA占所述组合物总量的约0.001wt%至约5wt%。在一些实施方案,GO-HA可占所述组合物总量的约0.01wt%至约2wt%、约0.02wt%至约1wt%、或约0.05wt%至约0.5wt%。在一些或任一前述实施方案,XAV939的所述wt%是基于XAV939、GO-HA和水的总量。在一些或任一前述实施方案,GO-HA的所述wt%是基于XAV939、GO-HA和水的总量。

[0058] XAV939均匀分散在粘稠悬浮液中,在室温下可稳定数月。在一些实施方案,所述组合物进一步包含表面活性剂,所述表面活性剂可增强疏水物质在水中的可混合性或溶解度。在一些实施例,所述表面活性剂可以是非离子亲水材料,例如聚乙二醇(PEG)。所述PEG的数均分子量可为约100至约10,000道尔顿,或约200至约4000道尔顿,例如约200至约1000道尔顿、约200至约800道尔顿、约200至约500道尔顿、约200至约400道尔顿、约300至约400道尔顿、约350至约450道尔顿、约200道尔顿、约250道尔顿、约300道尔顿、约350道尔顿、约400道尔顿、约450道尔顿、约500道尔顿、约550道尔顿、约600道尔顿、约650道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约850道尔顿、约900道尔顿、约950道尔顿、约1000道尔顿等。在一些实施方案,所述PEG可以所述组合物总量的约0.1wt%至约20wt%的量存在于所述组合物中。譬如,所述PEG可以是所述组合物总量的约0.2wt%至约10wt%,或约0.5wt%至约10wt%,或约1wt%至约10wt%。

[0059] 本发明提供了组合物,其中所述组合物是脂质体制剂。本发明提供了组合物,其中所述组合物包含基质组分,所述基质组分包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;XAV939;水;和丁二醇。在一些或任一实施方案,所述组合物包含基质组分,所述基质组分包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-

HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;XAV939;水;和聚山梨醇酯20。在一些或任一实施方案,所述组合物包含基质组分,所述基质组分包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;XAV939;水;和磷脂酰胆碱。在一些或任一实施方案,所述组合物包含基质组分,所述基质组分包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;XAV939;水;和乙醇。在一些或任一实施方案,所述组合物包含基质组分,所述基质组分包含氧化石墨烯(GO)与透明质酸(HA)偶联物(GO-HA),其中所述GO与HA经由连接体共价连接;XAV939;水;和羟丙基纤维素。本段前述实施方案中的任意实施方案可相互组合;具体而言,所述脂质体制剂包含XAV939、丁二醇、聚山梨醇酯20、磷脂酰胆碱、乙醇、GO-HA、水、和羟丙基纤维素。在一些或任一实施方案,所述脂质体制剂用于实践本发明所述的任一实施方案,包括权利要求书所述的那些。

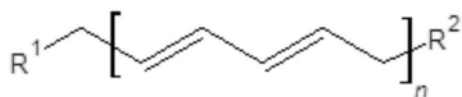
[0060] 在本发明所述组合物中,除XAV939之外,亦可包括其他药物化合物或治疗化合物。换言之,含XAV939的组合物还可用作基础分散介质,其中可分散有其他药物或治疗剂,尤其是疏水性的那些药物或治疗剂,例如用于局部施用于受到急性损伤的软骨。所述这些药物可包括抗纤维化化合物类(例如,吡非尼酮、常山酮、尼达尼布、托珠单抗、利纳西普等),抗癌剂类,抗炎剂类,镇痛剂类,抗生素类等。

[0061] 一方面,本发明提供了刺激受到急性损伤的软骨再生的方法,所述方法包含使所述软骨与有效量的本发明所述组合物接触。所述受到急性损伤的软骨预期包括但不限于,因外科手术创伤而引起的软骨损伤,所述外科手术创伤是由破坏所述软骨结构和功能的物理冲击(例如,刀、手术刀或其他锋利或钝器造成的撕裂、擦伤、割伤、划伤或刺伤)所致;或在非外科手术环境下因物理撞击而破坏所述软骨结构和功能(例如,如刀、子弹或其他锋利或钝器)而引起的软骨损伤。本发明涵盖软骨因过度(低或高)温度而受到的急性损伤,例如烧伤、电离辐射、化疗、或由事故或意外事故引起的非计划急性损伤。

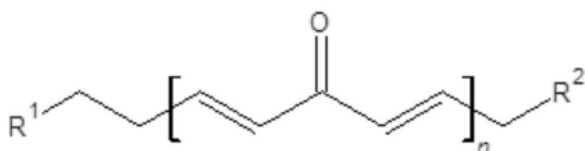
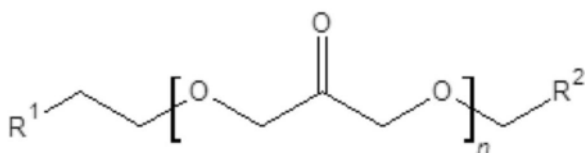
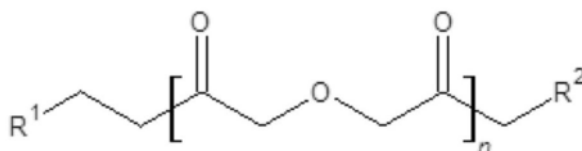
[0062] 在一些实施方案,治疗方法可包括向所述受到急性损伤的软骨递送第二药物或第二治疗剂,所述第二药物或第二治疗剂包含以下中的一种或多种:皮质类固醇、细胞毒性药物、抗生素、防腐剂、尼古丁、抗血小板药物、NSAID、秋水仙碱、抗凝剂、血管收缩药物或免疫抑制剂、生长因子、抗体、蛋白酶、蛋白酶抑制剂、抗菌肽、粘附肽、止血剂、活细胞类、蜂蜜、或一氧化氮。所述这些治疗剂可作为与本发明所述组合物分开的单独剂型进行递送,或者可作为本发明所述组合物的附加组分包含在内,并因此与XAV939一同递送。

[0063] 本发明所述的组合物可通过将所述组合物局部施用于所述受到急性损伤的软骨上来进行施用。如果所述组合物包含在本发明所述的医疗装置中,所述医疗装置包括基底例如贴片或衬垫,则可将所述医疗装置固定至急性损伤部位,使得所述组合物与所述软骨接触。

[0064] 在可用于本发明方法的组合物的制备方法中,所述间隔基团可以是具有2-20个主链碳的未取代或取代的、饱和或不饱和的直链亚烷基基团。出于说明性目的而非限制,用于衍生化HA的试剂可选自以下:



[0065]



[0066] 其中 R^1 和 R^2 可独立地为 $-COHNH_2$ 、 $-SH$ 、 $-H_2$ 、 $-OH$ 、或其他亲核试剂,和 n 是整数并且可以是例如1-20的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10等。在一些实施方案,用于衍生化HA的试剂可以是二酰肼,例如己二酸二酰肼。

[0067] 在一些实施方案,用于制备本发明组合物的方法包括:得到GO-HA(例如,通过上述方法得到),将所述GO-HA偶联物溶于水以得到GO-HA水溶液,以及将XAV939加至所述GO-HA水溶液以形成混合物。在一些实施例,这是通过首先将XAV939溶于非离子亲水性聚合物例如PEG-400(或PEG 400,具有约400的平均摩尔质量)中,然后将所得XAV939溶液加至所述GO-HA偶联物水溶液中来实现。

[0068] 本发明源于以下新颖且出乎意料的发现:哺乳动物急性损伤后软骨的再生在再生长的数量以及软骨再生和再生长的质量方面均显著增加。虽然本领域已知,施用Wnt抑制剂(例如,XAV939)后软骨的再生增加,以及在GO-HA基质中提供XAV939的益处;通过及时施用于包含GO-HA的基质中的XAV939,受损伤软骨的软骨再生显著增加,这既新颖又出乎意料。

[0069] 与施用溶于DMSO中的活性XAV939相比,降低的本发明组合物的施用速率显示在本领域公认的动物模型(提供降低的愈合速率)(参见,例如,Sullivan S.R.,2004,Plast.Reconstr.Surg.113:953-60)中急性软骨损伤后软骨再生增加,从而提供显著改善的软骨再生长数量以及显著改善的软骨生成质量;与XAV939的DMSO溶液相比,时间缩短一半。

[0070] 出于说明本发明所述的某些方面目的,提供了以下实施例,但不应被视为以任何方式限制本发明。

[0071] 实施例1:伤口处理组合物的制备

[0072] 制备所述组合物的程序披露于美国专利号US11,369,685B2中。简而言之,将氧化石墨烯(1.25g,250mL的5mg/mL GO去离子水分散体;供应商:Goographene Inc.)加至250mL超纯去离子水中,搅拌5分钟。在30分钟内,将氢氧化钠颗粒(3g(0.075摩尔;供应商:Sigma-Aldrich)以小份固体形式加至混合物中。添加完毕后,将混合物在室温下搅拌1小时。然后将溶液超声处理30分钟,然后在20分钟内以小份固体形式加入氯乙酸(3.54g,0.0375摩尔;供应商:Alfa Aesar)。然后将反应混合物在室温下搅拌18小时。反应混合物用盐酸(7mL,12N)酸化。然后将溶液转移至离心管中并以5,000rpm离心15分钟。然后倾泻出水层,将更多的超纯去离子水(~30mL)加至管中,然后重新离心。此过程重复3次。将甲醇(约30mL)加至离心管中剩余的沉淀改性氧化石墨烯中,并以5,000rpm离心15分钟。此过程重复3次。一旦倾泻出甲醇,将管在室温下真空放置48小时进行干燥。然后所得产物通过加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(52mg,0.00027摩尔,供应商:Alfa Aesar)进行衍生化,同时用0.1N盐酸维持pH,然后在室温下将其滴加至含有己二酸二酰肼(17mg,0.00027摩尔;供应商:Alfa Aesar)的5mL超纯去离子水溶液的单混合物中。添加完毕后,将所得混合物在室温下搅拌18小时。然后将溶液透析(MWC=3500)24小时,冻干,得到本发明进一步提及的GO-HA。

[0073] 将11mg GO-HA溶于11mL超纯水,形成1mg/mL的有效浓度。将溶液超声处理10分钟。将XAV939(11mg;供应商:APEBIO)加至PEG-400(0.5mL)中,并进行超声处理30分钟。将XAV939溶液滴加至GO-HA中并剧烈搅拌5分钟。然后将合并的溶液超声处理1小时,然后在室温下搅拌18小时。在室温下,在剧烈搅拌下分小份加入羟丙基纤维素(0.2g;供应商:Sigma-Aldrich)。添加完毕后,将溶液在室温下搅拌24小时以形成GO-HA/XAV939复合物的粘稠溶液。所得复合物在1.0mg/mL GO-HA和0.182g/mL羟丙基纤维素(ELU42)中的终浓度为1.0mg/mL XAV939。

[0074] 实施例2:施用本发明化合物后小鼠的软骨再生长

[0075] C57Bl/6J小鼠购自杰克逊实验室(Jackson Laboratory,美国缅因州巴港),由PPY饲养。使用桌面式实验动物麻醉系统(Tabletop Laboratory Animal Anesthesia System, VetEquip Inc.,普莱森顿,加利福尼亚州,美国)对C57Bl/6J小鼠(至少3月龄)进行3-5%异氟醚/O₂麻醉。如前所述(Rai,M.F.et al,2021,Arthritis Rheum.,64:2300-2310),使用一次性活检穿孔器(Acuderm Inc.,劳德代尔堡,佛罗里达州,美国)在每只耳朵的软骨区域中心制作2mm活检穿孔伤口。每天用5μL/耳的XAV939(Selleck Chemicals,S1180,休斯顿,德克萨斯州,美国)(将其溶解在二甲亚砜(DMSO)中至5μM)或DMSO对照溶液对耳朵进行局部治疗,持续30天,从而每日施用7.81μg XAV939。

[0076] 治疗30天后,使用Nikon Coolpix 8700数码相机(Nikon Corporation,日本)对耳朵进行成像。为了量化伤口的闭合情况,在处死小鼠后切除耳朵,将其固定并放置在显微镜载玻片上,通过固定在Micromaster倒置显微镜(Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)上的数码相机进行检查。通过浸入10%缓冲福尔马林中24小时进行固定,沿损伤处纵向切片,然后包埋在石蜡中进行切片。然后将组织切片用三色蓝(Trichrome blue)染色,通过奥林巴斯(Olympus)DP71显微镜相机(奥林巴斯美国,中心谷,宾夕法尼亚州,美国)进行成像和分析。

[0077] 对于ELU42施用,使用STZ诱导的I型糖尿病C57B1/6J小鼠。将8至12周龄、血清葡萄糖水平在270-478mg/dL之间的糖尿病小鼠纳入此项研究。使用桌面式实验动物麻醉系统(VetEquip Inc.,普莱森顿,加利福尼亚州,美国)对小鼠进行3-5%异氟醚/ O_2 麻醉。使用一次性活检穿孔器(AcudermInc.,劳德代尔堡,佛罗里达州,美国)在每只耳朵的软骨区域中心制作2mm的活检穿孔伤口,如前所述(Rai,M.F.et al,2021,Arthritis Rheum.,64:2300-2310)。每隔一天用50 μ L如实施例1所述制备的ELU42(含有1mg/mL XAV939($n=6$))或G0-HA对照溶液对耳朵进行局部处理,持续15天。为了量化伤口闭合,在处死小鼠后切除耳朵,将其放置在显微镜载玻片(Denville Scientific,南部平原镇,新泽西州,美国)上并使用固定在Micromaster倒置显微镜(Thermo Fisher Scientific,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)上的Nikon Coolpix8700进行成像。将切除的耳朵在10%缓冲福尔马林中固定24小时,沿损伤处纵向切片并包埋在石蜡块中。包埋组织的切片用三色蓝(Trichrome blue)染色,使用奥林巴斯(Olympus)DP71显微镜相机(奥林巴斯美国,中心谷,宾夕法尼亚州,美国)进行成像和分析。

[0078] 在处理活检穿孔伤口后,在四个不同的动物组中测定相对的软骨终板之间的距离:每天施用XAV939的DMSO溶液,持续30天;每天施用DMSO(作为对照),持续30天;每隔一天施用ELU42,持续15天;和每隔一天施用G0-HA(作为对照),持续15天。图1示出了用XAV939的DMSO溶液处理活检穿孔伤口30天、用G0-HA处理活检穿孔伤口15天、用盐水处理活检穿孔伤口30天、和用ELU42处理活检穿孔伤口15天之间的相对的软骨端点之间的距离;其中,与施用较少剂量的活性成分XAV939相比,施用ELU42在软骨再生长方面提供了显著定量改善(ANOVA* $p<0.05$,非配对t检验,** $p<0.001$),且时间缩短一半,并且在ELU42和DMSO之间观察到显著差异(ANOVA** $p<0.0001$)。与G0-HA相比,观察到ELU42显著改善软骨再生(未配对t检验* $p<0.05$)。此外,与DMSO对照组和G0-HA对照组相比,在XAV939的DMSO溶液组和ELU42组中观察到伤口中软骨再生长的性质和特征分别得到改善。图2示出了用XAV939的DMSO溶液处理活检穿孔伤口30天与用ELU42处理15天之间的相对的软骨端点之间距离的直接比较。图3示出了用G0-HA处理活检穿孔伤口15天和用ELU42处理15天之间的相对的软骨端点之间距离的直接比较。

[0079] 实施例3:施用本发明化合物后兔耳中的软骨再生长

[0080] 为了测试本发明组合物在兔软骨受到损伤后软骨再生的增加情况,将本发明示例性组合物作为磷脂的一部分进行配制,如下。

[0081] 将XAV939(0.09wt.%)悬浮于2mL(4.6wt.%)丁二醇和2mL(4.6wt.%)聚山梨醇酯20中,混合物在搅拌下加热至60 $^{\circ}$ C,保持10分钟。然后将混合物置于超声浴中并超声处理30分钟。将磷脂酰胆碱(1.2wt.%)缓慢溶于2mL(4.6wt.%)乙醇。一旦溶解,向所得溶液中加入XAV939/丁二醇/聚山梨醇酯20混合物,混合物在室温下搅拌5分钟,然后进行超声处理30分钟。30分钟后,将所得溶液加至先前制备的G0-HA(0.09wt.%)水(84%)溶液中,将所得新溶液超声处理30分钟。超声处理后,将羟丙基纤维素(0.75wt.%)加至混合物中,在使用前将混合物在室温下搅拌24小时,得到ELU42的脂质体制剂。

[0082] 新西兰白兔(New Zealand White rabbit)购自西俄勒冈兔子公司(Western Oregon Rabbit Company)。通过吸入异氟醚(1-5%异氟醚/2.0L O_2)或肌肉施用氯胺酮/Zylazine混合物来麻醉动物,持续尽可能短的时间以完成本发明所述的活检程序。手术前,

用剃刀或其他适当方法(例如脱毛剂)彻底去除每只耳朵腹侧的毛发,并用氯己定(Clorhexidine)和酒精对活检部位进行手术擦洗。使用一次性活检穿孔器,通过打孔活检产生6mm大小的伤口,伤口延伸至整个耳朵。每只动物总共产生多达8处伤口,并丢弃切除的组织。伤口形成后,如有必要,用无菌盐水和/或纱布清洁创面床,以除去任何异物/松散的组织碎片。

[0083] 每隔一天向伤口施用0.3mL盐水或0.3mL 1mg/mL ELU42脂质体制剂,持续21天。在每个给药日,使用无菌材料(即,盐水润湿的无菌纱布)清洁伤口表面,以去除任何血凝块、过量渗出物、敷料碎片、受试品残留物、或创面床上积聚的组织,但要小心避免干扰伤口表面。使用无菌敷贴器,将受试品以薄层均匀地直接施用于指定的伤口部位。每次给药后,根据研究方案或主治兽医的建议包覆/包扎伤口部位。在对伤口彻底清洁后的每个给药日以及在给药日给药前拍摄图像。每张图像均是直接在伤口前面拍摄,以确保量测准确,并包括带有适当标识符的尺子。

[0084] 图4示出了兔耳活检穿孔伤口的21天治疗之间,亦即,用盐水处理与用ELU42脂质体制剂处理之间的相对的软骨端点之间距离的直接比较。可以看出,与盐水相比,ELU42对软骨再生的改善具有统计学显著性(ANOVA* $p < 0.05$,未配对t检验)。

[0085] 虽然上文已描述了本发明的特定实施方案,但应当理解,在本发明范围内可能存在于其他实施方案,并旨在包括在本发明中。本领域技术人员将清楚的是,在不脱离通过示例性实施方案所展示的本发明精神的情况下,可对本发明进行修改和调整(未示出)。因此,本发明应视为仅由所附权利要求书的范围限制。

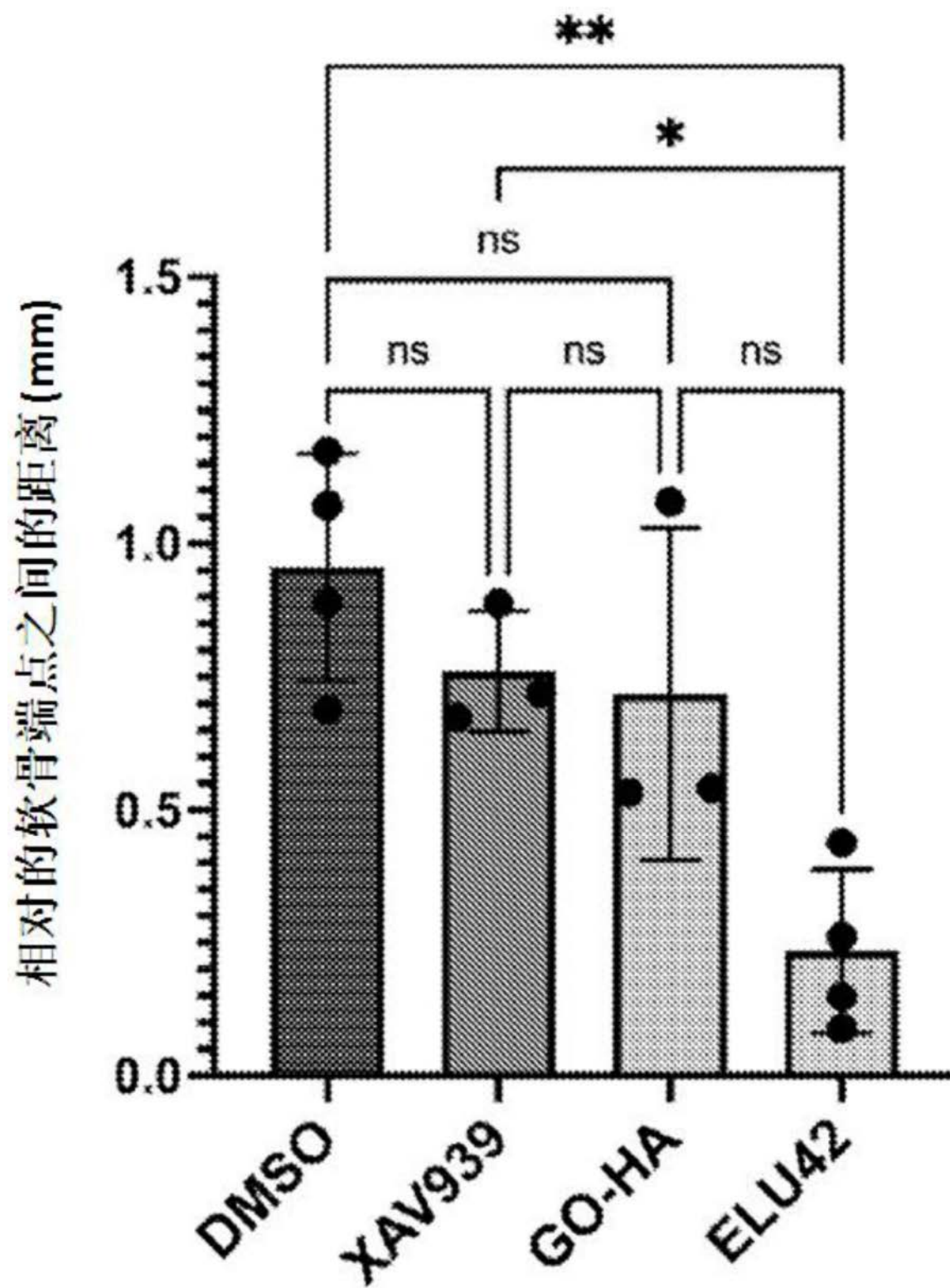


图1

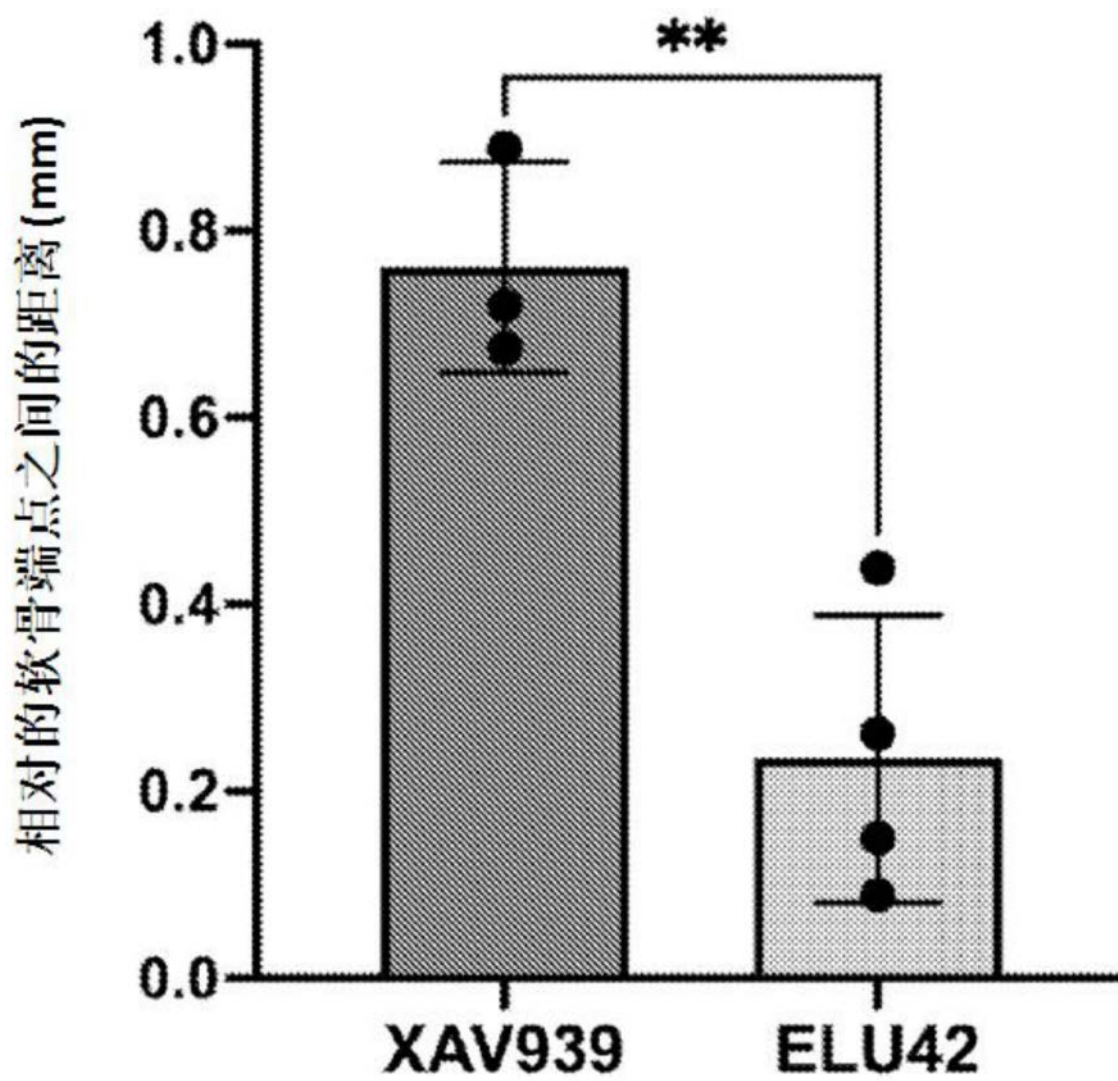


图2

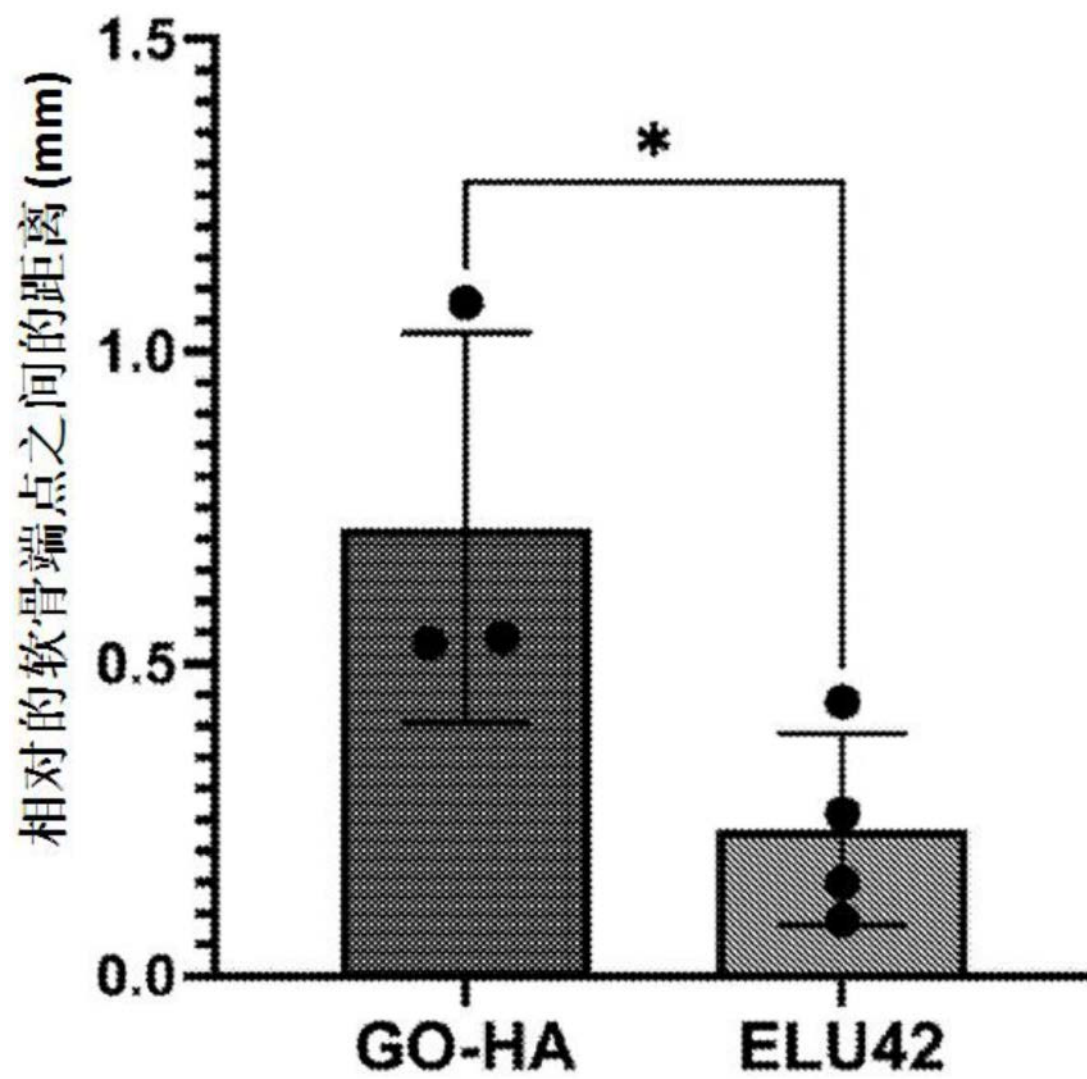


图3

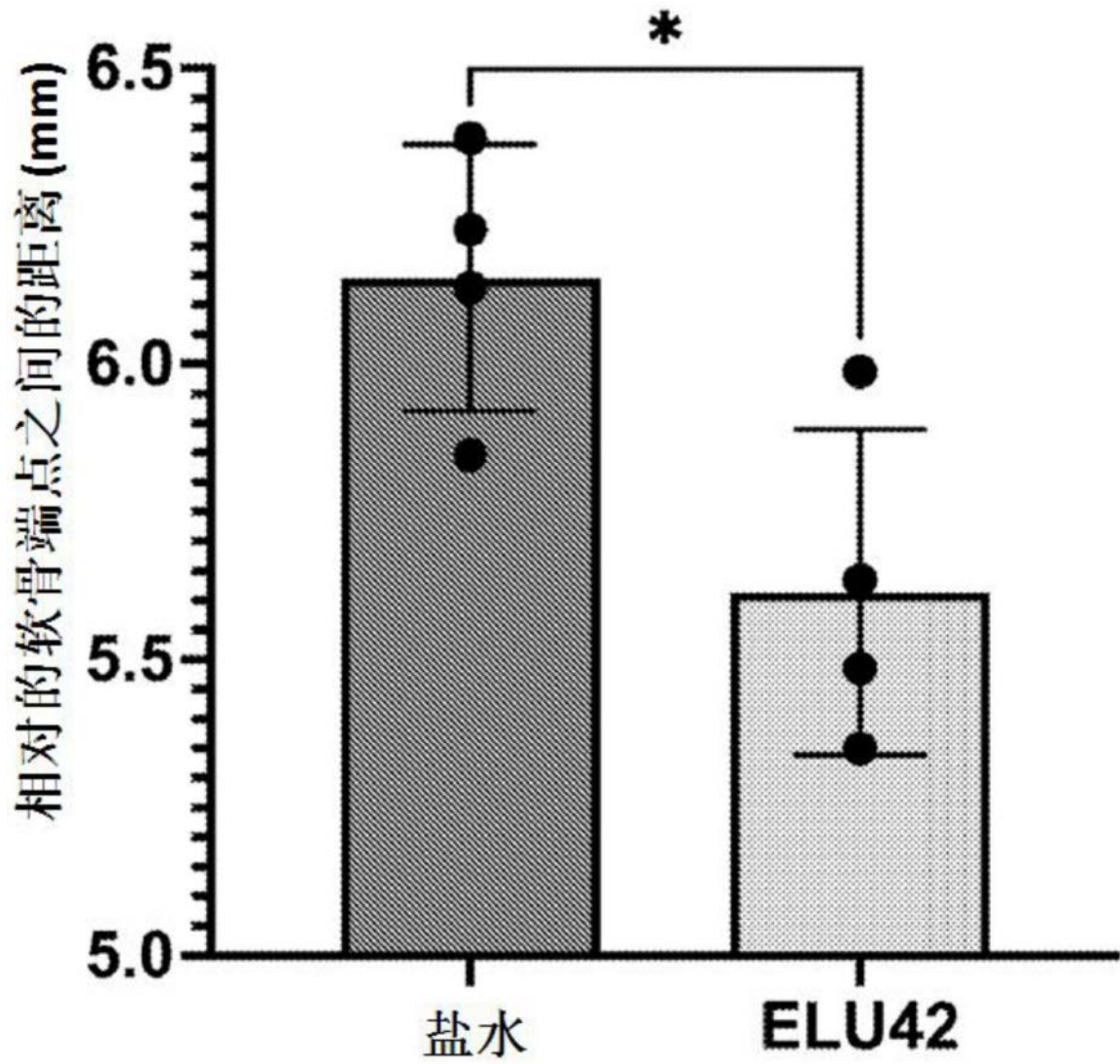


图4