



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106232153 B

(45)授权公告日 2020.01.17

(21)申请号 201580020522.0

(22)申请日 2015.02.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106232153 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(30)优先权数据
14000599.2 2014.02.20 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/053639 2015.02.20

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/124735 EN 2015.08.27

(73)专利权人 默克专利有限公司
地址 德国达姆施塔特

(72)发明人 C·H·雷德尔 H·焦耳林
A·吉古特

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈文青 张静

(51)Int.Cl.
A61L 27/36(2006.01)

(56)对比文件
CN 101505787 A,2009.08.12,说明书第1-
7、14页、序列表第1-2页.

CN 101505787 A,2009.08.12,说明书第1-
7、14页、序列表第1-2页.

审查员 赵莉

权利要求书1页 说明书16页
序列表2页 附图7页

(54)发明名称

用于移植和组织工程手术的FGF-18

(57)摘要

本发明提供一种在诸如骨关节炎或软骨损伤的软骨疾病的治疗中施用FGF18的新的给药方案。具体提供了一种优选治疗方案,所述优选治疗方案包括在每个治疗周期中每3周、每4周或每5周施用FGF18化合物。所述新的给药方案可包括同时施用抗炎药。

1. 一种制备用于组织工程的可移植软骨材料的方法,其中所述方法包括以下步骤:以单层培养或3D培养的方式在包含FGF-18化合物的培养基中间歇性地培养软骨细胞,所述细胞在存在所述FGF-18化合物的情况下在所述培养基中每周培养24小时、48小时或72小时,每周剩余时间在没有FGF-18化合物的情况下培养,重复所述每周的培养,进行至少2周的培养。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中重复所述每周的培养,进行至少3周的培养。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中重复所述每周的培养,进行至少4周的培养。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述软骨细胞是源自成熟组织的软骨细胞或间充质干细胞。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述FGF-18化合物选自由以下组成的组:

a) 包括人FGF-18成熟形式或由人FGF-18成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18成熟形式包括SEQ ID NO:1的残基28-207,

b) 包括SEQ ID NO:1的残基28-196或由SEQ ID NO:1的残基28-196组成的多肽,或

c) 包括SEQ ID NO:2或由SEQ ID NO:2组成的多肽。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述软骨细胞在扩增或培养之前收集或分离自哺乳动物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述软骨细胞收集或分离自待治疗的所述哺乳动物或不同的哺乳动物。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

9. 根据权利要求1至8中的任一项所述的方法所得的可移植软骨材料在制备用于治疗软骨疾病的药物中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其中所述软骨疾病是骨关节炎、软骨损伤或骨软骨缺损。

用于移植和组织工程手术的FGF-18

技术领域

[0001] 本发明涉及再生医学,特别是用于治疗软骨疾病(例如骨关节炎、软骨损伤和骨软骨缺损)的再生医学。更具体地说,本发明涉及用于组织工程和移植手术(例如骨软骨或软骨移植,或自体软骨细胞移植(ACI))的FGF-18化合物。

背景技术

[0002] 一般来说,软骨疾病是指以结缔组织中的代谢异常的恶化为特征的疾病,其表现为受影响身体部分的疼痛、僵硬及活动受限。这些疾病可由病原体引起(例如,骨关节炎(OA))或者由创伤或损伤造成。骨软骨缺损(OCD,即关节中覆盖骨头末端的软骨的缺损)较常由创伤或损伤引起,但也可由病原体引起。OCD可导致OA。成熟软骨的自身修复能力有限,这主要是因为成熟软骨细胞几乎没有增殖的潜力,而且没有血管。损伤或疾病引起的受损软骨、特别是关节软骨的置换是医生的一大挑战,而现有的手术治疗程序被认为是不可预测的,并且只在有限的时间内有效。因此,大多数年轻病人不寻求治疗,或者被建议尽量推迟治疗。当必须进行手术时,标准程序是依年龄而定的,并且在全关节置换术、软骨块移植或骨髓刺激技术(例如微裂手术)之间也有所不同。微裂手术是一种涉及穿刺软骨下骨以通过骨髓干细胞刺激软骨沉积的经济且常见的程序。但是,这种技术已被证明不能充分修复软骨缺陷,并且形成的新软骨主要是纤维软骨,这导致功能不足或改变。事实上,纤维软骨不具备同样的耐久性,并且可能不能正确地粘附到周围的透明软骨。因此,新合成的纤维软骨可能更容易损坏(预计期限:5-10年)。

[0003] 对于骨关节炎患者来说,非手术治疗主要包括物理治疗、生活方式改变(如减少活动)、支持装置、口服或注射药物(如非类固醇抗炎药)和医学管理(虽然市场上还没有能够修复软骨损伤的疗法(见Lotz,2010))。一旦这些治疗失败,患者的主要选择就是手术,例如(部分或整体)关节置换术。这一选择可使症状减轻,但经常导致关节功能的减弱。胫骨或股骨截骨术(切开骨骼以使关节磨损重建平衡)可减轻症状,有助于维持积极的生活方式,延缓对全关节置换的需求。全关节置换可改善晚期骨关节炎症状,但一般需改变患者的生活方式和/或活动水平。

[0004] 目前的软骨修复手术包括全关节置换术、骨髓刺激(例如微裂手术),骨软骨异体移植或自体移植以及培养软骨植入术(如自体软骨细胞移植(ACI))。这些手术为患有有症状的软骨损伤的患者提供了治疗选择。骨软骨异体移植或自体移植是用于治疗局部关节缺损的常见手术。多种因素可能影响该手术的有效性,包括供体软骨的来源、缺损部位周围的软骨的健康程度、以及融入的质量。不幸的是,在许多情况下,骨软骨移植手术导致很差的融入。

[0005] 一般来说,在组织工程方法中,细胞在三维(3D)基质中生长,其中所述基质的每种成分都在组织再生中起关键作用。用于软骨形成的干细胞的主要类型是人MSC(hMSC)(Zhang等,2013)。但是,MSC的类型、骨架、以及其他因素在组织工程中是重要的。此外,确保均匀的透明软骨样结构的再生对高质量地融入缺损中是重要的。在关节软骨组织工程期间

建立和维持所述表型是复杂的,并可通过使用抑制肥大的因子来优化(Tang等,2012)。例如,虽然添加TGF-beta1促进了hMSC的聚集蛋白聚糖、II型胶原蛋白和Sox-9基因的表达,但新合成的软骨主要由纤维状的短暂组织而不是透明组织构成(Zhang等,2013)。

[0006] 另一种类型的组织工程手术是培养软骨植入术,例如自体软骨细胞移植(ACI),其中软骨取自待治疗的患者的关节表面的低负重区域;然后分离软骨细胞,并以单层培养或3D培养的方式进行体外培养;培养一段时间后,将所得的软骨细胞或3D结构植入到缺损中以填充所述缺损。不幸的是,已知软骨细胞的扩增(特别是单层培养)会诱导成纤维细胞样软骨细胞(Magill等,2011)。

[0007] 成纤维细胞生长因子18(FGF-18)是软骨细胞和成骨细胞的增殖剂(Ellsworth等,2002;Shimoaka等,2002)。其已被建议单独(WO2008/023063)或与透明质酸结合(WO2004/032849)用于治疗诸如骨关节炎和软骨损伤的软骨疾病。含有FGF-18的冻干制剂在关节内注射时显示出其有潜力用于治疗OA或CI。

[0008] 虽然诸如骨软骨移植和培养软骨植入术(例如ACI)的软骨修复手术是有前景的,但其所产生的软骨的融入速率和质量还有待提高。因此,需要一种改进的手术方法,以使得所产生的软骨具有良好的融入和良好的质量(即,主要为透明软骨)。实际上,所述透明软骨的产生在作为治疗剂和作为生物基质的成分两方面都是有价值的(Getgood等,2010)。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种制备用于组织工程或骨软骨/软骨移植的可移植软骨材料的方法,其中所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:在包含FGF-18化合物的培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨/软骨外植体,所述培养的时间足够长以允许可移植骨软骨/软骨材料的形成。可选地,在移植之前、移植的同时或移植之后,还可额外地在所得的骨软骨/软骨材料的移植部位注射所述FGF-18化合物。

[0010] 在另一个实施例中,本发明涉及一种使哺乳动物中由于软骨疾病而引起关节缺损(例如软骨缺损)的部位中的软骨再生的方法,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)在包含FGF-18化合物的培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨或软骨外植体,以及(b)对有需要的哺乳动物施用步骤(a)所得的培养的软骨细胞或培养的骨软骨/软骨外植体。可选地,在施用所述细胞/外植体之前、施用的同时或施用之后,还可额外地在施用了所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的部位注射所述FGF-18化合物。

[0011] 在另一个实施例中,本发明公开一种使哺乳动物中由于软骨疾病而引起关节缺损(例如软骨缺损)的部位中的软骨再生的方法,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)在培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨或软骨外植体,(b)对有需要的哺乳动物施用步骤(a)所得的培养的软骨细胞或培养的骨软骨/软骨外植体,以及(c)在施用了所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的部位注射FGF-18化合物。步骤(c)可在施用所述细胞/外植体之前、施用的同时或施用之后进行。

[0012] 在第三实施例中,本发明涉及一种用于治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法的FGF-18化合物,其中所述缺损是由软骨疾病引起的,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)使软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养,其中所述培养在包

含所述FGF-18化合物的细胞培养基中进行, (b) 可选地重复步骤(a) 以获得包含所述培养的软骨细胞或所述培养的骨软骨/软骨移植物的移植材料, 以及(c) 将步骤(b) 中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中, 其中在步骤(a) 和(b) 中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养。可选地, 在移植之前、移植的同时或移植之后, 还可额外地在移植部位注射所述FGF-18化合物。

[0013] 在另一个实施例中, 本发明公开一种用于治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法的FGF-18化合物, 其中所述缺损是由软骨疾病引起的, 所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成: (a) 使软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养, (b) 可选地重复步骤(a) 以获得包含所述培养的软骨细胞或所述培养的骨软骨/软骨外植体的移植材料, (c) 将步骤(b) 中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中, 其中在步骤(a) 和(b) 中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养, 以及(d) 在移植部位注射FGF-18化合物。步骤(d) 可在移植之前、移植的同时或移植之后进行。

[0014] 在第五实施例中, 本发明提供一种组合物, 其包含哺乳动物骨软骨/软骨外植体或培养的哺乳动物软骨细胞, 所述哺乳动物骨软骨/软骨外植体或培养的哺乳动物细胞在含有用于有需要的哺乳动物中的组织工程或骨软骨/软骨移植的FGF-18化合物的培养基中。

[0015] 在作为一个整体的本发明的上下文中, 所述软骨细胞或所述骨软骨/软骨外植体优选地在扩增或培养步骤之前收集或分离自哺乳动物。

[0016] 在作为一个整体的本发明的上下文中, 对软骨细胞3D培养或骨软骨/软骨外植体来说, 所述FGF-18化合物优选地每周约一天、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中, 每周重复所述一天、2天或3天的添加, 进行至少2周的培养、至少3周的培养或至少4周的培养。优选地, 所述FGF-18化合物每周一天、两天或三天间歇性地添加到所述培养基中, 每周重复所述一天、2天或3天的添加, 进行2周的培养、3周的培养或4周的培养。或者, 所述FGF-18化合物可每月约一天、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中, 每月重复所述一天、2天或3天的添加, 进行至少2个月的培养、至少3个月的培养或至少4个月的培养。优选地, 所述FGF-18化合物每月一天、两天或三天间歇性地添加到所述培养基中, 每月重复所述一天、2天或3天的添加, 进行2个月的培养、3个月的培养或4个月的培养。或者, FGF-18化合物可永久保持在所述培养基中。对以单层培养的软骨细胞, 优选地但非限制性地, 永久地添加所述FGF-18化合物。

[0017] 根据本发明的任一实施例, 所述软骨疾病优选为骨关节炎、软骨损伤或骨软骨缺损。

[0018] 在作为一个整体的本发明的上下文中, 所述FGF-18化合物优选地选自由以下组成的组: a) 包括人FGF-18成熟形式或由人FGF-18成熟形式组成的多肽, 所述人FGF-18成熟形式包括SEQ ID NO:1的残基28-207, b) 包括SEQ ID NO:1的残基28-196或由SEQ ID NO:1的残基28-196组成的多肽, 或c) 包括SEQ ID NO:2或由SEQ ID NO:2组成的多肽。

[0019] 此外, 在作为一个整体的本发明的上下文中, 所述外植体优选为软骨外植体, 所述软骨细胞优选为源自成熟组织的软骨细胞或间充质干细胞。根据需要, 所述软骨细胞或所述骨软骨/软骨外植体收集自待治疗的哺乳动物或不同的哺乳动物, 所述不同的哺乳动物优选地与待治疗的哺乳动物为同一物种。待治疗的哺乳动物优选为人, 但也可非限制性地为马、骆驼、绵羊、狗或较小的哺乳动物如猫、兔、大鼠或小鼠。

[0020] 定义

[0021] 本说明书所用的术语“FGF-18化合物”或“FGF-18”，意指保持人FGF-18蛋白的至少一种生物活性的蛋白质。FGF-18可以是天然的、以其成熟形式、重组形式或截短形式存在。人FGF-18蛋白的生物活性特别包括软骨细胞或成骨细胞增殖的增加(见W098/16644)或软骨形成的增加(见W02008/023063)。天然的即野生型人FGF-18是由关节软骨的软骨细胞表达的蛋白质。W098/16644将人FGF-18首次指定为zFGF-5并加以充分描述。SEQ ID NO:1对应于天然人FGF-18的氨基酸序列，其信号肽由氨基酸残基1 (Met) -27 (Ala) 组成。成熟形式的人FGF-18对应于SEQ ID NO:1的残基28 (Glu) -残基207 (Ala) 的氨基酸序列(180个氨基酸)。

[0022] 在本发明中，FGF-18可由重组方法产生，例如专利申请W02006/063362所教导的方法。根据表达系统和条件，在本发明中FGF-18在重组宿主细胞中表达并具有起始甲硫氨酸(Met) 残基或具有分泌信号序列。当在原核宿主(如大肠杆菌)中表达时，FGF-18在其序列的N-末端包含一个额外的Met残基。例如，在大肠杆菌中表达时，人FGF-18的氨基酸序列以N端(位置1)的Met残基开始，接着是SEQ ID NO:1的残基28 (Glu) -残基207 (Ala)。

[0023] 本说明书所用的术语“截短形式”的FGF-18，指的是包含或由SEQ ID NO:1的残基28 (Glu) -196 (Lys) 组成的蛋白质。优选地，FGF-18蛋白的截短形式是命名为“trFGF-18”的多肽(170个氨基酸；又称为rhFGF18或sprifermin)，它以Met残基开始(N-末端)，接着是野生型人FGF-18的氨基酸残基28 (Glu) -196 (Lys)。trFGF-18的氨基酸序列见于SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:2的氨基酸残基2-170对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基28-196)。trFGF-18是一种在大肠杆菌中产生的截短形式的重组人FGF-18(见W02006/063362)。已证明FGF-18显示与成熟人FGF-18类似的活性，例如，它增加软骨细胞的增殖和软骨的沉积，导致多种软骨组织的修复和重建(见W02008/023063)。

[0024] 本说明书所用的“软骨疾病”，包括由于诸如外伤的损伤、软骨病或关节炎造成的损害而引起的病症。这种疾病导致产生缺损，优选为软骨缺损。可以通过施用本说明书所描述的FGF-18制剂来治疗的软骨疾病的例子包括(但不限于)关节炎(如骨关节炎)、软骨损伤和骨软骨缺损。该术语也包括软骨或关节的退化性疾病/病症，例如软骨钙质沉着病、多软骨炎、复发性多软骨炎、强直性脊柱炎或肋软骨炎。国际软骨修复学会提议了一种评估软骨缺陷的严重程度的关节镜评级系统：0级：(正常) 健康软骨，1级：软骨有软点或水疱，2级：软骨中可见微小裂口，3级：损伤有深裂缝(超过软骨层的50%)，以及4级：软骨裂口暴露下层(软骨下) 骨头(见ICRS出版物http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf第13页)。

[0025] 本说明书所用的术语“关节炎”包括诸如以下的疾病：骨关节炎，类风湿性关节炎，幼年型类风湿性关节炎，感染性关节炎，牛皮癣关节炎，斯蒂尔病(幼年型类风湿性关节炎的发病)或剥脱性骨软骨炎，优选地包括软骨受损或与其下方骨头分离的疾病或病症。

[0026] 所用的术语“骨关节炎”或“OA”意指关节炎的最常见形式。术语“骨关节炎”是指包括原发性骨关节炎和次发性骨关节炎(例如，见The Merck Manual, 第17版, 第449页)的软骨疾病。骨关节炎可由软骨断裂而引起。软骨的小片可能折断并导致骨头之间的关节疼痛和肿胀。随着时间的推移，软骨可以完全磨损，骨头会相互摩擦。骨关节炎可累及任何关节，但通常涉及手、肩及负重关节，如髌、膝、脚和脊柱。在一个优选的实施例中，骨关节炎可以是膝骨关节炎或髌骨关节炎。该术语主要包括根据OARSI分类系统可分类为第1期至第4期

或第1级至第6级的骨关节炎形式。本领域技术人员熟知本领域中使用的骨关节炎分类,特别是所述OARSI评估系统(又称OOCHAS;例如,参阅Custers等,2007)。骨关节炎是可通过施用本发明的FGF-18化合物进行治疗的优选的软骨疾病之一。

[0027] 本说明书所用的术语“软骨损伤”主要是指由创伤引起的软骨疾病或软骨受损。软骨损伤主要可在创伤性机械破坏、特别是事故或手术(例如微裂手术)后发生。该术语“软骨损伤”还包括软骨或骨软骨骨折和半月板损伤。该定义还包括与运动有关的损伤或与运动有关的关节组织的磨损。该术语还包括微损伤或钝伤、软骨断裂、骨软骨断裂或半月板损伤。

[0028] “骨软骨缺损”(OCD)一词是指关节中软骨的缺损覆盖骨头末端的软骨疾病。这种缺损较常由创伤或损伤引起,但也可由病原体引起。OCD可导致OA。一般来说,OCD表示涉及部分骨头而不仅是软骨。如果只涉及软骨,我们优选使用“软骨损伤”一词(见上文)。

[0029] “组织工程”一词也包括自体软骨细胞移植(ACI)。其也称为再生医学。可以单层培养或3D培养的方式来培育细胞或组织。这种手术的目的是修复或替换部分或完整组织。

[0030] “移植”一词涉及移植或植入。该手术也是再生医学的一部分。它包括骨软骨或软骨(本文中也以骨软骨/软骨表示)移植/植入,例如骨软骨/软骨自体或骨软骨/软骨异体移植/植入。在移植的范围内,外植体收集自哺乳动物,即待治疗的哺乳动物(即自体移植)或优选为相同物种的另一个哺乳动物(异体移植)。通常取自健康的软骨区域或健康的骨软骨组织。这种移植优选地在软骨缺损的水平上进行。

[0031] 术语“可移植软骨材料”和“可移植材料”可互换使用。它们指制备来用于移植到有需要的哺乳动物中的软骨性的细胞(例如软骨细胞)或骨软骨/软骨外植体。这种可移植材料优选地在软骨缺损的水平上移植/植入。

[0032] 在本发明的上下文中,治疗的“疗效”可基于软骨厚度的变化来测量,例如关节的关节软骨的厚度。例如,可以通过X射线计算机断层扫描、磁共振成像(MRI)或超声波测量来测量该厚度。

[0033] “约24、48或72小时”或“约一天、2天或3天”中的“约”一词包括补充FGF-18化合物的24、48或72小时后培养基的变化,以及补充FGF-18化合物的24、48或72小时 \pm 数小时(例如, \pm 1、2、3或4小时)后培养基的变化。类似地,“约7天”、“约一周”、“约4周”或“约一个月”中的“约”一词分别包括7天、1周、4周(即28天)或一个月,也分别包括相隔7天 \pm 1或2天、一周 \pm 1或2天、4周 \pm 数天(例如 \pm 1、2、3、4天)或一个月 \pm 数天(例如 \pm 1、2、3、4天)的给药。实际上,应当理解的是,从实际的角度来看,培养基的更换或下一次补充FGF-18化合物不可能总是按准确的间隔进行,例如,在补充FGF-18化合物的正好24、48或72小时候更换培养基,或者在上一次补充的正好4周(28天)后(准确到天)。因此,在本发明的上下文中,例如,4周的意思可以是28天,但也可以是上一次给药的24、25、26、27、28、29、30、31或32天后。在本发明的上下文中,“4周”的意思与“1个月”类似,这两个词可互换使用(图1)。当提及“星期几”时,将优选地使用“4周”(例如,第一次补充在星期一进行,下一次补充在4周后的星期一进行),而当提及“日期”时,将优选地使用“月”(例如,第一次补充在8月1日进行,下一次补充在9月1日进行)。

[0034] “周期”一词是指补充的周期。在本发明的上下文中,每周一次的周期(或7天周期)的意思是约每周(或约每7天)中有一天向培养基补充FGF-18化合物。因此所述周期包括在

已补充的培养基中培养一天以及在未补充(即无FGF-18)的培养基中培养约6天。类似地,每4周一次的周期的意思是约每4周中有一天向培养基补充FGF-18化合物。因此所述周期包括在已补充的培养基中培养一天以及在未补充(即无FGF-18)的培养基中培养约4周。同样地,对每月一次的周期来说:每月一次的周期的意思是约每个月中有一天向培养基补充FGF-18化合物。因此所述周期包括在已补充的培养基中培养一天以及在未补充(即无FGF-18)的培养基中培养约一个月。周期可重复进行。

[0035] 发明的详细说明

[0036] 虽然诸如骨软骨移植和培养软骨植入术(例如ACI)的软骨修复手术是有前景的,但其所产生的软骨的融入速率和质量还有待提高。因此,需要一种改进的手术方法,以使得所产生的软骨具有良好的融入和良好的质量(即,主要为透明软骨)。发明人意外地发现,当在再生医学(例如组织工程手术或移植手术)中使用FGF-18时,所产生的软骨的质量有所提升,并且细胞/外植体能更好地融入到缺损中。

[0037] 本发明的目的是提供一种制备用于组织工程或骨软骨/软骨移植的可移植软骨材料的方法,其中所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:在包含FGF-18化合物的培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨/软骨外植体,所述培养的时间足够长以允许可移植骨软骨/软骨材料的形成。所述可移植软骨材料可用于治疗软骨疾病,例如骨关节炎、软骨损伤(包括软骨缺损)或骨软骨缺损。优选地,所述软骨细胞或所述骨软骨/软骨外植体在扩增或培养步骤之前收集或分离自哺乳动物。因此,本发明的另一个目的是提供一种制备用于组织工程或骨软骨/软骨移植的可移植软骨材料的方法,其中所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)从哺乳动物收集或分离软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,以及(b)在包含FGF-18化合物的培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养所述软骨细胞,或者培养所述骨软骨或软骨外植体,所述培养的时间足够长以允许可移植软骨材料的形成。所述可移植软骨材料可用于治疗软骨疾病,例如骨关节炎、软骨损伤或骨软骨缺损。可选地,在移植之前、移植的同时或移植之后,还可额外地在所得的软骨材料或骨软骨/软骨外植体的移植部位注射所述FGF-18化合物。

[0038] 在另一个实施例中,本发明涉及一种使哺乳动物中由于软骨疾病而引起关节软骨缺损的部位中的软骨再生的方法,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)在包含FGF-18化合物的培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨或软骨外植体,以及(b)对有需要的哺乳动物施用步骤(a)所得的培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体。所述使软骨再生的方法可用于治疗软骨疾病,例如骨关节炎、软骨损伤或骨软骨缺损。优选地,所述软骨细胞或所述骨软骨/软骨外植体在培养步骤之前收集或分离自哺乳动物。因此,本发明的另一个目的是提供一种使哺乳动物中由于软骨疾病而引起关节软骨缺损的部位中的软骨再生的方法,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)从哺乳动物收集或分离软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,(b)在包含FGF-18化合物的培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨或软骨外植体,以及(c)对有需要的哺乳动物施用步骤(b)所得的培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体。所述使软骨再生的方法可用于治疗软骨疾病,例如骨关节炎、软骨损伤或骨软骨缺损。可选地,在施用所述细胞/外植体之前、施用的同时或施用之后,还可额外地在施用了所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的部位注射所述FGF-18化合物。

[0039] 在另一个实施例中,本发明公开一种使哺乳动物中由于软骨疾病而引起关节软骨缺损的部位中的软骨再生的方法,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)在培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨/软骨外植体,(b)对有需要的哺乳动物施用步骤(a)所得的培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,以及(c)在施用了所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的部位注射FGF-18化合物。步骤(c)可在施用所述细胞/外植体之前、施用的同时或施用之后进行。在另一个实施例中,本发明涉及一种使哺乳动物中由于软骨疾病而引起关节软骨缺损的部位中的软骨再生的方法,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)从哺乳动物收集或分离软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,(b)在培养基中,以单层培养或3D培养的方式培养软骨细胞,或者培养骨软骨/软骨外植体,(c)对有需要的哺乳动物施用步骤(b)所得的培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,以及(d)在施用了所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的部位注射FGF-18化合物。步骤(d)可在施用所述细胞/外植体之前、施用的同时或施用之后进行。

[0040] 在第四实施例中,本发明涉及一种用于治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法的FGF-18化合物,其中所述软骨缺损是由软骨疾病引起的,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)使软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养,其中所述培养在包含所述FGF-18化合物的细胞培养基中进行,(b)可选地重复步骤(a)以获得包含所述培养的软骨细胞或所述培养的骨软骨/软骨外植体的移植材料,以及(c)将步骤(b)中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中,其中在步骤(a)和(b)中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养。优选地,所述软骨细胞或骨软骨/软骨外植体在扩增或培养步骤之前收集或分离自哺乳动物。因此,本发明涉及一种用于治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法的FGF-18化合物,其中所述软骨缺损是由软骨疾病引起的,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)从哺乳动物分离软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,(b)使所述软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养,其中所述培养在包含所述FGF-18化合物的细胞培养基中进行,(c)可选地重复步骤(a)和(b)以获得包含所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的移植材料,以及(d)将步骤(c)中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中,其中在步骤(b)和(c)中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养。可选地,在移植之前、移植的同时或移植之后,还可额外地在移植部位注射所述FGF-18化合物。

[0041] 在另一个实施例中,本发明公开一种用于治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法的FGF-18化合物,其中所述软骨缺损是由软骨疾病引起的,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)使软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养,(b)可选地重复步骤(a)以获得包含所述培养的软骨细胞或所述培养的骨软骨/软骨外植体的移植材料,(c)将步骤(b)中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中,其中在步骤(a)和(b)中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养,以及(d)在移植部位注射FGF-18化合物。步骤(d)可在移植之前、移植的同时或移植之后进行。在另一个实施例中,本发明涉及一种用于治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法的FGF-18化合物,其中所述软骨缺损是由软骨疾病引起的,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)从哺乳动物分离软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,(b)使所述软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养,其中所述培养在包含所述FGF-18化合物的细胞培养基中进行,(c)可选

地重复步骤(a)和(b)以获得包含所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的移植材料, (d)将步骤(c)中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中,其中在步骤(b)和(c)中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养,以及(e)在移植部位注射FGF-18化合物。步骤(e)可在移植之前、移植的同时或移植之后进行。

[0042] 此外,本发明涉及一种治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法,其中所述软骨缺损是由软骨疾病引起的,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)从哺乳动物分离软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,(b)使所述软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养,其中所述培养在包含FGF-18化合物的细胞培养基中进行,(c)可选地重复步骤(a)和(b)以获得包含所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的移植材料,以及(d)将步骤(c)中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中,其中在步骤(b)和(c)中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养。可选地,在移植之前、移植的同时或移植之后,还可额外地在移植部位注射所述FGF-18化合物。

[0043] 在另一个实施例中,本发明公开一种治疗哺乳动物的软骨组织中的缺损的方法,其中所述软骨缺损是由软骨疾病引起的,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:(a)从哺乳动物分离软骨细胞或骨软骨/软骨外植体,(b)使所述软骨细胞或骨软骨/软骨外植体经受试管内或体外培养,其中所述培养在细胞培养基中进行,(c)可选地重复步骤(a)和(b)以获得包含所述培养的软骨细胞或骨软骨/软骨移植物的移植材料,(d)将步骤(c)中所得的移植材料移植到需要所述治疗的所述哺乳动物的所述缺损中,其中在步骤(b)和(c)中所述软骨细胞可以单层培养或3D培养的方式培养,以及(e)在移植部位注射FGF-18化合物。步骤(e)可在移植之前、移植的同时或移植之后进行。

[0044] 在第五实施例中,本发明提供一种组合物,其包含培养的哺乳动物骨软骨/软骨外植体或培养的哺乳动物软骨细胞,所述培养的哺乳动物骨软骨/软骨外植体或培养的哺乳动物细胞在含有用于有需要的哺乳动物中的再生医学(例如组织工程或骨软骨/软骨移植)的FGF-18化合物的培养基中。优选地,需要所述组合物的所述哺乳动物患有软骨疾病。优选地,所述软骨细胞或骨软骨/软骨外植体在扩增或培养步骤之前收集或分离自哺乳动物。

[0045] 在另一个实施例中,本发明描述一种用于治疗软骨疾病的FGF-18化合物,所述软骨疾病例如骨关节炎、软骨损伤(包括软骨缺损)或骨软骨缺损,其中,在软骨修复手术的范围内,所述FGF-18化合物在培养基中施用。此外,本发明公开一种用于治疗软骨疾病的方法,所述软骨疾病例如骨关节炎、软骨损伤(包括软骨缺损)或骨软骨缺损,其中,在软骨修复手术的范围内,在培养基中施用FGF-18化合物。具体地说,所述软骨修复手术选自自由以下组成的组:软骨组织工程、自体软骨细胞移植或骨软骨移植。

[0046] 应理解的是,根据第一实施例所得的可移植软骨材料或根据第二实施例所得的再生软骨用于治疗软骨疾病。

[0047] 在作为一个整体的本发明的上下文中,所述FGF-18化合物优选地选自自由以下组成的组:a)包括人FGF-18成熟形式或由人FGF-18成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18成熟形式包括SEQ ID NO:1的残基28-207,b)包括SEQ ID NO:1的残基28-196或由SEQ ID NO:1的残基28-196组成的多肽,或c)包括SEQ ID NO:2或由SEQ ID NO:2组成的多肽。具体地说,该化合物选自人野生型成熟FGF-18或trFGF-18。

[0048] 本发明描述一种FGF-18化合物,所述FGF-18化合物以每毫升(mL)培养基1纳克

(ng)至50微克(μg 或 mcg)、优选为5ng至5 μg 、或优选为5ng至1 μg 、或更优选为10ng至500 μg 、或更优选为10ng至100ng的浓度添加到培养基中。在一个优选实施例中,以每mL培养基约1、5、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、400、500或1000ng的浓度向所述培养基补充所述FGF-18化合物。优选的浓度包括每mL培养基10、20、30、40、50、100、150或200ng。

[0049] 在作为一个整体的本发明的上下文中,向培养软骨细胞或骨软骨/软骨外植体的培养基添加FGF-18。优选地,所述FGF-18化合物每周(约一周)约一天、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中,每周重复所述一天、2天或3天的添加,进行至少2周的培养、至少3周的培养或至少4周的培养。优选地,所述FGF-18化合物每周一天、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中,每周重复所述一天、2天或3天的添加,进行2周的培养、3周的培养或4周的培养。一天优选地理解为约24小时(即24小时 \pm 4小时),两天优选地理解为约48小时(即48小时 \pm 4小时),三天优选地理解为约72小时(即72小时 \pm 4小时)。在以补充培养基培养一天后,以不含FGF-18化合物的培养基继续培养6天,在以补充培养基培养2天后,以不含FGF-18化合物的培养基继续培养5天,而在以补充培养基培养3天后,以不含FGF-18化合物的培养基继续培养4天。所述方案对应于每周一次的周期。例如,对1天的培养来说,如果FGF-18化合物在星期二添加到培养基中,则在所述补充的一天后(即星期三)将其从所述培养基移除。然后,下一次补充将在第一次添加FGF-18之后的星期二进行。培养基的补充可根据相同的方案(即上一次补充的一周后)每周重复(例如每个星期二)。如果更方便的话,FGF-18化合物的补充也可在上一次补充的约一周(即一周(或7天) \pm 1或2天)后进行。例如,如果上一次补充在上星期二进行,则可在星期一或星期三进行补充。

[0050] 或者,所述FGF-18化合物可每月约一天、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中,每月重复所述一天、2天或3天的添加,进行至少2个月的培养、至少3个月的培养或至少4个月的培养。对软骨细胞3D培养来说,优选地,所述FGF-18化合物每月一天、两天或三天间歇性地添加到所述培养基中,每月重复所述一天、2天或3天的添加,进行2个月的培养、3个月的培养或4个月的培养。一天优选地理解为约24小时(即24小时 \pm 4小时)。在以补充培养基培养一天、2天或3天后,以不含FGF-18化合物的培养基继续培养1个月。所述方案对应于每月一次的周期。例如,对一天的添加来说,如果FGF-18化合物在8月1日添加到培养基中,则在所述补充的一天后(即8月2日)将其从所述培养基移除。下一次补充将在9月1日进行。培养基的补充可根据相同的方案(即上一次补充的一个月后)每月重复。如果更方便的话,FGF-18化合物的补充也可在上一次补充的约一个月(即一个月 \pm 1、2、3或4天)后进行。例如,如果上一次补充在8月1日进行,则可在8月31日或9月3日进行补充。

[0051] 如上文所定义的,“4周”与“每月”或“一个月”可互换使用。因此,根据本发明,所述FGF-18化合物可每4周一、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中,每4周重复所述一天、2天或3天的添加,进行至少2个周期的补充、至少3个周期的补充或至少4个周期的补充。优选地,所述FGF-18化合物每月一天、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中,每月重复所述一天、2天或3天的添加,进行2个月的培养、3个月的培养或4个月的培养。一天优选地理解为约24小时(即24小时 \pm 4小时)。在以补充培养基培养一天、2天或3天后,以不含FGF-18化合物的培养基继续培养4周。所述方案对应于每4周一、2天或3天的添加,进行至少2个周期的补充、至少3个周期的补充或至少4个周期的补充。优选地,所述FGF-18化合物每月一天、2天或3天间歇性地添加到所述培养基中,每月重复所述一天、2天或3天的添加,进行2个月的培养、3个月的培养或4个月的培养。一天优选地理解为约24小时(即24小时 \pm 4小时)。在以补充培养基培养一天、2天或3天后,以不含FGF-18化合物的培养基继续培养4周。所述方案对应于每4周一、2天或3天的添加,进行至少2个周期的补充、至少3个周期的补充或至少4个周期的补充。例如,对一天的添加来说,如果FGF-18化合物在星期二添加到培养基中,则在所述补充的一天后(即星期三)将其从所述培养基移除。下一次补充将在第一次添加的4周后的星期二进行。培养基的补充可根据相同

的方案(即上一次补充的一个月后)每4周重复。如果更方便的话,FGF-18化合物的补充也可在上一次补充的约4周(即4周+/-1、2、3或4天)后进行。例如,如果上一次补充在10月1日星期二进行,则可在10月28日星期一或10月31日星期四进行补充。

[0052] 对单层培养的软骨细胞或软骨性细胞来说,所述FGF-18化合物优选为永久地添加,但不是限制性的。相反,当软骨性细胞或软骨细胞以3D培养的方式培养时,或者对骨软骨/软骨外植体来说,所述FGF-18化合物优选为间歇性添加,但不是限制性的。

[0053] 本发明描述的FGF-化合物(例如trFGF-18)、包含FGF-18化合物的组合物(“FGF-18组合物”)、过程、用途和方法可用于治疗软骨疾病。具体地说,它们可用于治疗例如由年龄相关的表浅纤毛化导致的滑膜关节中的关节软骨缺损、由骨关节炎导致的软骨退化、以及由损伤或疾病导致的软骨或骨软骨缺损。它们还可用于治疗由剥脱性骨软骨炎引起的关节疾病和退行性关节疾病。在重建和整形外科领域中,根据本发明的FGF-18化合物、组合物、过程和方法可用于大面积组织缺损的重建中的自体或异体软骨扩增和转移。FGF-18组合物可与关节灌洗、骨髓刺激、磨削性关节成形术、软骨下钻孔术或软骨下骨的微裂手术结合,以用于修复软骨损伤。

[0054] 在一个优选实施例中,根据本发明的待治疗的软骨疾病是骨关节炎,例如膝关节炎或髋关节炎。待治疗的骨关节炎例如但不限于原发性骨关节炎或继发性骨关节炎,以及按照OARSI分类系统分类为第1期至第4期或第1级至第6级的骨关节炎。

[0055] 在作为一个整体的本发明的上下文中,在移植部位添加FGF-18化合物。所述添加可在移植之前、移植的同时或移植之后进行。当所述添加在移植之前或之后进行时,优选地在移植之前或之后的几个小时内(例如但不限于移植之前或之后的1、2、3或4个小时)进行。所述注射可在移植之前或之后的几天内(例如但不限于移植之前或之后的1、2、3或4天)进行。如果所述添加不是在移植的同时进行的,并不会对患者不利。实际上,FGF-18化合物的注射不需要进行手术或任何其他入侵性的程序。

[0056] 在另一个优选实施例中,根据本发明待治疗的软骨疾病是包括微裂手术或软骨缺损的软骨损伤,或骨软骨缺损。

[0057] 在作为一个整体的本发明的上下文中,所述外植体优选为软骨外植体,所述软骨细胞优选为源自成熟组织的软骨细胞或间充质干细胞。根据需要,所述软骨细胞或骨软骨/软骨外植体收集自待治疗(即需要所述治疗)的哺乳动物或不同的哺乳动物(优选为相同物种)。所述哺乳动物优选为人,但也可非限制性地为马、骆驼、狗或较小的哺乳动物如猫、兔、大鼠或小鼠。

附图说明

[0058] 图1:软骨缺损模型的制备:(A) 8mm软骨塞,(B) 形成中心4mm缺损,(C) 将软骨插入缺损,以及(D) 修复结构的长期培养。OD表示外直径,ID表示内直径。

[0059] 图2:(A-C) 经不同治疗的3D μ CT重建的横截面。(D) 修复缺损的融合强度,显示从对照组至1+30治疗组至1+6治疗组强度增加。(E) 外推式测试台的实验设置。误差棒为SEM。

[0060] 图3:软骨至软骨修复结构的 μ CT扫描。左:样本中有代表性的单个 μ CT扫描切片。中:三维重建。右:重建的截面。 μ CT扫描显示从对照组至1+30治疗组至1+6治疗组的融合增强。

[0061] 图4:以rhFGF18治疗CTA。

[0062] 图5:不使用rhFGF18 (CTR)、持续使用rhFGF18 (perm)、只在第一周使用rhFGF18 (1w)或每周使用rhFGF18 1天 (1d/w) 处理4周后根据DNA含量/CTA估计的细胞含量/CTA。以10或100ng/mL的浓度使用rhFGF18。N=4。*/**/**表示与对照组有显著差别,分别为 $p<0.05$ 和0.001。

[0063] 图6:不使用rhFGF18 (CTR)、持续使用rhFGF18 (perm)、只在第一周使用rhFGF18 (1w)或每周使用rhFGF18 1天 (1d/w) 处理4周后的GAG和HPro/CTA含量。以10或100ng/mL的浓度使用rhFGF18。N=4。*/**/**表示与对照组有显著差别,分别为 $p<0.05$ 、0.01和0.001。

[0064] 图7:不使用rhFGF18 (CTR)、持续使用rhFGF18 (perm)、只在第一周使用rhFGF18 (1w)或每周使用rhFGF18 1天 (1d/w) 培养4周后评估CTA中的胶原蛋白I型、II型和Sox9的表达以及胶原蛋白II/I比率。以10或100ng/mL的浓度使用rhFGF18。N=4。*/**/**表示与对照组有显著差别,分别为 $p<0.05$ 、0.01和0.001。

[0065] 图8:在不含rhFGF18 (CTR)或持续含有100ng/mL的rhFGF18的培养基中单层培养牛原生软骨细胞一或两周。确定细胞浓度,N=6。通过定量实时PCR测量胶原蛋白I型、II型和Sox9的表达,N=4。

[0066] 图9:不使用rhFGF18 (CTR)、持续使用rhFGF18 (perm)、每周使用rhFGF18 1天 (1d/w) 处理4周后根据DNA含量/CTA估计的细胞含量/CTA。*表示与对照组有显著差别, $p<0.05$ 。

[0067] 图10:不使用rhFGF18 (CTR)、持续使用rhFGF18 (perm)、每周使用rhFGF18 1天 (1d/w) 处理4周后的GAG含量。*表示与对照组有显著差别, $p<0.05$ 。

[0068] 图11:不使用rhFGF18 (CTR)、持续使用rhFGF18 (perm)、每周使用rhFGF18 1天 (1d/w) 处理4周后评估CTA中的胶原蛋白I型、II型和Sox9的表达以及胶原蛋白II/I比率。*表示与对照组有显著差别, $p<0.05$ 。

[0069] 序列描述:

[0070] SEQ ID NO.1:天然人FGF-18的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO.2:重组截短FGF-18 (trFGF-18)的氨基酸序列。

实施例

[0072] 材料

[0073] 以下实施例中的重组截短FGF-18 (rhrFGF-18) 根据专利申请W02006/063362中所描述的技术通过大肠杆菌中的表达来制备。在以下实施例中,trFGF-18、FGF-18和sprifermin可互换使用。

[0074] 实施例1

[0075] 方法:

[0076] 新鲜透明软骨收集自幼年牛膝盖 (3-6个月大) 的滑车沟。通过活检穿孔取出8mm的圆柱形外植体 (图1A), 并在完整培养基 (DMEM 4.5g/L D-葡萄糖和L-谷氨酰胺, 10% FBS, 1% PSF, 1% 两性霉素B (Fungizone), 1% MEM维生素, 25mM HEPES以及50 μ g/ml维生素C) 中培养过夜。样本去除骨头并构建缺损 (4mm直径) 以形成芯环修复结构 (图1B)。分别将内芯和外环培养24小时, 然后用原芯填充缺损。然后在完整培养基中培养样本, 或用Sprifermin (rhFGF18, 100ng/ml) 处理样本。处理过程包括施用rhFGF18 24小时, 每周施用一次 (并每周

重复) (1+6), 或者处理24小时后在完整培养基中培养1个月(1+30天)。培养4周后收集样本。使用定制测试台(图2E, 【3】) 进行外推式机械测试($n=4-6$) (Instron 5848, Instron, Norwood, MA)。通过将峰值力除以融入面积来计算融入强度。为实现3D可视化, 将样本($n=6$) 在改性卢戈氏溶液(dH_2O 中的2.5% I_2 和5% KI) 中浸泡24小时, 并通过 μCT 以55kV的能量水平和145 μA 的强度进行扫描, 体素尺寸为6 μm 和10.5 μm (μCT 35及vivaCT 40, SCANCO Medical, Wayne, PA)。使用制造商的软件分析并重建扫描, 使用横截面来评估缺损融入。其他样本($n=3$) 在4% PFA中固定过夜, 并对界面处的细胞和基质沉积进行组织学分析。

[0077] 结果:

[0078] 对照样本的融合强度(图2D) 是最低的($2.5 \pm 1.4 \text{ kPa}$), 经过1+30(每月一次的周期) ($5.0 \pm 2.4 \text{ kPa}$) 和1+6(每周一次的周期) ($10.2 \pm 3.7 \text{ kPa}$) 的治疗后性能逐步改善。虽然当对照组与治疗组相比时结果是明显的, 但由于本研究的重复数量, 并未达到统计学上的显著性。对照结构(图3, 左上) 的 μCT 分析显示明显的黑圈, 说明外环与内芯之间的分离, 即融合很差。1+30治疗组(图3, 左中) 显示较不明显的圈, 说明缝隙较小, 融合较好; 而1+6治疗组(图3, 左下) 显示跨界面的非常均匀的 μCT 信号, 说明融合程度最高。在所有样本的垂直和横向截面中, 这种融合改善的证据都是明显的。

[0079] 成功的软骨修复要求修复材料(人工改造的或天然的) 良好地融合到周围的软骨中以确保界面上的连续负重转移(以及避免压力聚集)。在本研究中, 我们以已知的体外(外植体) 软骨修复模型研究了使用Sprifermin来促进软骨融合的可能性。已知Sprifermin具有促进软骨细胞的增殖的效果(Elthworth等, 2002), 其中与该生物试剂的短暂(24小时) 接触可引发最显著的反应。我们的结果清楚地显示, Sprifermin改善界面处的融合强度和基质沉积(对比增强 μCT 显示由于含GAG的蛋白聚糖的增加而更均匀地减薄)。在本研究中, 持续4周、每周一次24小时的给药的结果整体上比每月一次24小时的治疗好。虽然没有每周一次的治疗方案那么好, 但后一种治疗方案也是有用的, 因为它与对照结构(即无sprifermin治疗) 相比意外地有所改善。本研究首次证实, 在临床相关修复模型中, 生物试剂(具体来说是sprifermin) 改善了软骨表面的融合。

[0080] 结论:

[0081] 本研究证实, 在软骨修复模型中, Sprifermin能够改善软骨表面的融合。这些结果显示Sprifermin有可能用于诸如OATS的外科手术以及组织工程方法中, 在这些手术与方法中, 软骨类的生物材料需要成功地与原生软骨融合以取得临床上的成功。

[0082] 实施例2

[0083] 方法:

[0084] 从进行全关节置换术的患者处分离原生骨关节炎软骨细胞。在开始治疗之前, 先以单层培养的方式培养细胞数天, 然后以无骨架3D培养的方式培养一周。所述治疗包括以rhFGF-18【100ng/mL】持续培育或每周一天培育共四周。结果与不含sprifermin的对照培养基比较。使用生物化学测定、定量PCR(qPCR) 和组织学来表征三维结构。

[0085] 结果(数据未示出):

[0086] 为确保维持表型, 使用3D无骨架培养基来测试sprifermin对hOA软骨细胞的效果。在这种设定下, 已证实rhFGF-18【每周1天】对细胞含量及显著增加3D结构的尺寸和基质含量(GAG和HPro含量) 具有有益效果。另外还发现, 与未治疗细胞相比, rhFGF18减少了胶原蛋

白I的表达。

[0087] 结论:

[0088] 如同之前的对牛和猪软骨细胞进行的研究中观察到的一样,sprifermin在h0A软骨细胞中具有合成代谢活性。这些结果显示sprifermin有可能用于组织工程方法中,在这些方法中,软骨类的生物材料需要成功地与原生软骨融合以取得临床上的成功。

[0089] 实施例3

[0090] 方法:

[0091] 从猪臀部的股骨头软骨分离猪软骨细胞。关节解剖后,收集软骨并用胶原酶0.25%消化45分钟。将松弛的细胞丢弃,并将软骨用胶原酶0.1%进一步消化过夜以提取软骨细胞。第一周悬浮培养猪软骨细胞作为CTA(软骨组织类似物)而不进行任何治疗,随后进行以下治疗中的一种:1)在持续含有10或100ng/mL rhFGF18的培养基中培养四周,2)在含有10或100ng/mL rhFGF18的培养基中培养一周,随后在不含rhFGF18的培养基中培养三周,3)在每周1天添加10或100ng/mL rhFGF18的培养基(即:接触24小时,随后在不含rhFGF18的培养基中培养6天)中培养三周,或4)在不含rhFGF18的培养基中培养四周,以作为对照组(图4)。在培养期结束时,收集CTA并分析其GAG、羟脯氨酸和细胞含量。评估胶原蛋白I、II和Sox9的基因表达,并进行藏红O、胶原蛋白I型和II型的组织学分析。

[0092] 结果-持续或间歇性接触rhFGF18对CTA中的细胞生长的影响

[0093] 裂解每种培养条件下所得的CTA,并评估DNA含量以计算细胞数量/CTA(图5)。在对照培养组(不含rhFGF18)中未见增殖,因为细胞数量(120万)与接种密度(1百万细胞/CTA)相近。但是,与预计相同,rhFGF18的持续存在增加了软骨细胞的增殖(10和100ng/mL的rhFGF18分别导致220万和249万细胞/CTA)。当只施用rhFGF18一周并继续在不含rhFGF18的培养基中培养软骨细胞3周(1w)时,与对照组相比,未见增殖增加。相反地,当每周施用rhFGF18一天(1d/w)时,与对照组相比以及与持续接触相比,rhFGF18均刺激了增殖。每周施用100ng/mL的rhFGF18一天使得细胞含量/CTA达到了4百万细胞/CTA,相比之下,不施用rhFGF18的为120万,而持续施用100ng/mL的rhFGF18的为249万。

[0094] 结果-持续或间歇性接触rhFGF18对CTA中的基质生成的影响

[0095] 用蛋白酶K消化每种培养条件下所得的CTA,并评估GAG和羟脯氨酸含量(图6)。GAG反映蛋白多糖含量,而羟脯氨酸反映CTA的胶原蛋白含量。如同之前观察到的一样,rhFGF18的持续存在降低了GAG含量/CTA(与对照组相比GAG减少了2.6倍)以及羟脯氨酸含量/CTA(与对照组相比羟脯氨酸减少了2.1倍)。相反地,当间歇性地施用rhFGF18(1周或每周1天)时,GAG和羟脯氨酸的含量都有所增加。例如,当每周施用100ng/mL的rhFGF18一天时,与对照组相比,GAG含量增加了2.67倍,羟脯氨酸含量增加了2.13倍。

[0096] 结果-持续或间歇性接触rhFGF18对CTA中的软骨细胞表型的影响

[0097] 从每种培养条件下所得的CTA分离RNA,并通过定量PCR分析胶原蛋白I型、II型、X型和Sox9的表达(图7)。高Sox9和胶原蛋白II型表达是软骨细胞表型的标志物,而胶原蛋白I型是去分化的标志物,胶原蛋白X型则是软骨细胞肥大的标志物。另外还计算了胶原蛋白II/I比率。该比率通常用于显示培养中的软骨细胞的表型维持(高比率)或表型丧失(低比率)。在所有含有rhFGF18的培养条件下,不管是持续接触还是间歇性接触,10ng/mL还是100ng/mL,胶原蛋白I型的表达都减少了。这种减少在每周施用浓度为100ng/mL的rhFGF18

一天时最为强烈。例如,与对照组相比,持续施用100ng/mL的rhFGF18使得胶原蛋白I型的表达减少了4倍,而每周施用100ng/mL的rhFGF18一天使得胶原蛋白I型的表达减少了123倍。在持续存在rhFGF18时,胶原蛋白II型有所减少,但当施用rhFGF18一周(1w)或每周施用rhFGF18一天(1d/w)时基本不变。Sox9的表达未见重大变化,仅在施用10ng/mL的rhFGF18一周(1w)时有显著的增加(x2.2)。最后,持续施用rhFGF18对胶原蛋白II/I比率没有影响,但当每周施用10ng/mL和100ng/mL的rhFGF18一天时,与对照组相比,该比率分别增加19倍和138倍。此外还评估了胶原蛋白X型以作为软骨细胞肥大的标志物,并发现其未受培养条件中的rhFGF18的影响。

[0098] 结果-持续或间歇性接触rhFGF18对CTA的形态和胶原蛋白II和I含量的影响(数据未示出)

[0099] 对以不同的方案接触rhFGF18并治疗4周后的CTA进行组织学分析,结果表明,与其他条件相比,持续施用rhFGF18的CTA较薄且番红O染色较浅。此外,在持续施用rhFGF18的结构的外周可见一个细胞密度较高且无细胞外基质的增值区。另一方面可见的是,与对照组相比,间歇性接触rhFGF18使结构变厚。在所有条件下,均未检测到胶原蛋白I型(未示出),而所有CTA的胶原蛋白II型染色均呈强阳性。

[0100] 结论:

[0101] 持续接触rhFGF18刺激了软骨增殖,但减少了CTA的基质含量(GAG和羟脯氨酸减少)。类似地,与对照组相比,胶原蛋白I型和II型的表达均减少了。持续接触10ng/mL或100ng/mL的rhFGF18并治疗4周后未见对Sox9有显著影响。组织学分析显示,CTA变小了,且在CTA的外周出现不含ECM的增值区。所有这些结果表明,持续施用rhFGF18有利于增殖而抑制了基质生成。

[0102] 当以10ng/mL或100ng/mL的rhFGF18培养CTA一周、然后以不含rhFGF18的培养基培养3周时,与持续接触rhFGF18相反,未见刺激增殖。但与对照组相比,GAG和羟脯氨酸的含量增加了。与对照组相比,胶原蛋白I的表达减少,而胶原蛋白II型的表达不变甚至轻微增加(rhFGF18 10ng/mL)。因此,胶原蛋白II/I比率增加,显示表型维持较好。类似地,与对照组相比,Sox9也轻微增加(仅rhFGF18 10ng/mL有显著性)。组织学分析显示,与对照组CTA相似,CTA由番红O和胶原蛋白II型阳性的基质构成。与对照组相比,这些CTA亦较厚,这与较高的GAG和羟脯氨酸含量一致。

[0103] 当每周施用100ng/mL的rhFGF18 1天时增殖和基质含量的结果最好。该条件下的胶原蛋白I型也是最低的,而胶原蛋白II/I比率是最高的。但是,与对照组相比,胶原蛋白II型和Sox9的表达保持不变。CTA为番红O和胶原蛋白II型阳性。同样的情况也出现在治疗一周的组中,与对照组相比,该组中的CTA也较厚,这也与较高的GAG和羟脯氨酸含量一致。

[0104] 总结而言,间歇性的接触增强rhFGF18的效果,并使得增殖和ECM生成增加且有利于在培养中维持软骨细胞表型,其效果为每周1天>1周>对照组>持续接触。这些结果支持循环施用rhFGF18以治疗OA。

[0105] 实施例4

[0106] 方法:

[0107] 以与实施例2和3中相同的方法获取牛软骨细胞。以持续含有100ng/mL rhFGF18的培养基1或2周(FGF18),或以不含FGF18的培养基培养以作为对照组(CTR)。在培养结束时,

收集细胞并计数,或裂解细胞以分离RNA并分析基因表达。通过定量PCR评估Sox9、胶原蛋白I和II的表达。

[0108] 结果:

[0109] 在持续含有FGF18的培养基中培养两周后,细胞浓度高于对照组。有rhFGF18时胶原蛋白I型的表达被严重抑制,而胶原蛋白II型和Sox9的表达增加(图8)。

[0110] 结论:

[0111] 当单层培养软骨细胞时,持续接触100ng/mL的rhFGF18使得细胞增殖增加,并使得表型维持更好(胶原蛋白II和Sox9的表达增加而胶原蛋白I的表达减少)。

[0112] 实施例5

[0113] 方法:

[0114] 使用来自两个进行了全关节置换术的OA患者的软骨。以实施例3中描述的方法分离软骨细胞,并首先以高密度单层培养3-4天。然后,收集软骨细胞,以 1×10^6 细胞/200 μ L在96孔板中接种,并使其积聚一周而不进行任何治疗,以形成CTA。然后按照以下治疗方案在不含或含有100ng/mL的rhFGF18的培养基中培养四周:1) 在不含rhFGF18的培养基中培养4周(对照组),2) 在持续含有rhFGF18的培养基中培养四周(perm),以及3) 培养四周,每周1天施用rhFGF18(即:接触rhFGF18 24小时,随后在不含rhFGF18的培养基中培养6天)(1d/w)(见图4)。在培养期结束时,收集CTA并分析其GAG和细胞含量。对取自患者2的CTA评估胶原蛋白I型、II型和Sox9的基因表达,并进行番红O、胶原蛋白I型和II型组织学分析。

[0115] 结果-细胞增殖:

[0116] 100ng/mL的rhFGF18增加了3D培养中的人骨关节炎软骨细胞的增殖(见图9)。对取自患者1的软骨细胞,对照组中的细胞数量/CTA低于起始细胞数量(接种密度为1百万细胞/CTA),显示许多细胞死亡。但是,在持续或每周1天施用rhFGF18的组中可见150万细胞/CTA,显示这些细胞没有死亡,反而增殖了。对取自患者2的软骨细胞,在未经治疗的CTA中可见细胞数量轻微增加(从100至130万/CTA),而在持续施用rhFGF18的组中进一步增加(从100至190万细胞/CTA)。

[0117] 结果-基质生成:

[0118] 100ng/mL的rhFGF18增加了3D培养中的人骨关节炎软骨细胞的GAG生成(见图10)。在持续施用rhFGF18和每周1天施用rhFGF18的患者1中,以及在持续施用FGF18的患者2中,CTA中的GAG均显著增加。

[0119] 结果-基因表达:

[0120] 软骨细胞表型的特征是低或无胶原蛋白I型表达,以及Sox9和胶原蛋白II表达增加。这种表达模式在骨关节炎软骨细胞中被改变(见图11)。实际上,未经治疗的CTA中的胶原蛋白I型的表达高于胶原蛋白II型的表达(相对丰度分别为0.67和0.04)。rhFGF18能够减少胶原蛋白I的表达而增加胶原蛋白II的表达。因此,在存在rhFGF18时,胶原蛋白II/I比率增加了11至13倍。此外,rhFGF18增加了Sox9的表达,其是软骨细胞表型的标志物。

[0121] 结果-组织学(数据未示出):

[0122] 与对照组相比,每周以rhFGF18培养1天或持续以rhFGF18培养的CTA显示番红O染色增强,表明这些CTA所含有的GAG增加。这与图10中示出的结果一致。rhFGF18治疗的细胞的胶原蛋白I染色减弱,这也良好对应于图11中的基因表达结果。对照组中未见胶原蛋白II

染色,显示这些人骨关节炎(hOA)软骨细胞不能产生软骨样基质。但是,每周施用rhFGF18 1天或持续施用rhFGF18均能够恢复hOA软骨细胞产生胶原蛋白II的能力。

[0123] 结论:

[0124] 分离自人骨关节炎软骨的软骨细胞的结果表明,rhFGF18能够促进细胞生长、增加透明软骨基质的生成以及有利于软骨细胞表型。在本实验中,持续施用rhFGF18和每周施用rhFGF18一天在数个参数上的表现相同。但是,在基质生成方面,每周施用一天rhFGF18的表现略好一些(增加了患者1中的GAG累积,增加了患者2中的胶原蛋白II的表达)。

[0125] 参考文献

[0126] 1.Magill等,2011,J.orthopaedic Surg.19(1):93-98

[0127] 2.Zhang等,2013,Expert Opin.Biol.Ther.13(4):527-540

[0128] 3.Tang等,2012,Expert Opin.Biol.Ther.,12(10):1361-1382

[0129] 4.Ellsworth等,2002,Osteoarthritis and Cartilage,10:308-320

[0130] 5.Shimoaka等,2002,JBC 277(9):7493-7500

[0131] 6.WO2008023063

[0132] 7.WO2004032849

[0133] 8.WO9816644

[0134] 9.WO2006063362

[0135] 10.Custers等,2007,Osteoarthritis and Cartilage,15:1241-1248

[0136] 11.Lotz,2010,Arthritis research therapy,12:211

[0137] 12.The Merck manual,第17th版,1999

[0138] 13.Getgood等,2010,P116,ICRS Meeting 2010,Barcelona.

[0139] 14.ICRS出版物:

[0140] http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf,第13页

[0141] 15.Bian等,2010,Am.J.Sports.Med,38(1):78-85.

[0142] 16.Gennero等,2013,Cell Biochem Funct 31(3)214-227

[0143] 17.Mauck等,2006,Osteoarthritis and Cartilage,14(2):179-189

[0144] 18.Bian等,2008J.Biomech.,41(6):1153-1159

序列表

<110> 默克专利有限公司 (Merck Patent GmbH)

<120> 用于移植和组织工程手术的FGF-18

<130> P14/015

<150> EP14000599.2

<151> 20.02.2014

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人FGF-18

<400> 1

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
1 5 10 15Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
20 25 30Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
35 40 45Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
50 55 60His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
65 70 75 80Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
85 90 95Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
100 105 110Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
115 120 125Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
130 135 140Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
145 150 155 160Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
165 170 175Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
180 185 190Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
195 200 205

<210> 2

<211> 170

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组截短FGF-18(trFGF-18)

<400> 2

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg
1 5 10 15

[0001]

[0002]

Ala	Arg	Asp	Asp	Val	Ser	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Leu	Tyr	Gln	Leu	Tyr
		20						25					30		
Ser	Arg	Thr	Ser	Gly	Lys	His	Ile	Gln	Val	Leu	Gly	Arg	Arg	Ile	Ser
		35					40					45			
Ala	Arg	Gly	Glu	Asp	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala	Gln	Leu	Leu	Val	Glu	Thr
		50				55					60				
Asp	Thr	Phe	Gly	Ser	Gln	Val	Arg	Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe
65					70					75					80
Tyr	Leu	Cys	Met	Asn	Arg	Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Lys	Pro	Asp	Gly
				85					90					95	
Thr	Ser	Lys	Glu	Cys	Val	Phe	Ile	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Tyr
			100					105					110		
Thr	Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Lys	Tyr	Ser	Gly	Trp	Tyr	Val	Gly	Phe	Thr
		115					120					125			
Lys	Lys	Gly	Arg	Pro	Arg	Lys	Gly	Pro	Lys	Thr	Arg	Glu	Asn	Gln	Gln
		130				135					140				
Asp	Val	His	Phe	Met	Lys	Arg	Tyr	Pro	Lys	Gly	Gln	Pro	Glu	Leu	Gln
145					150					155					160
Lys	Pro	Phe	Lys	Tyr	Thr	Thr	Val	Thr	Lys						
				165					170						

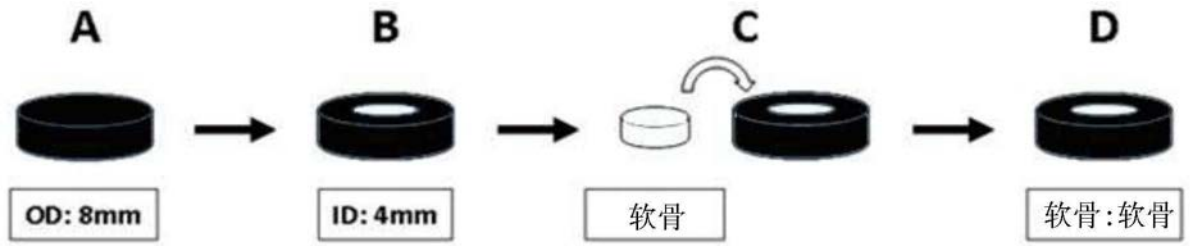


图1

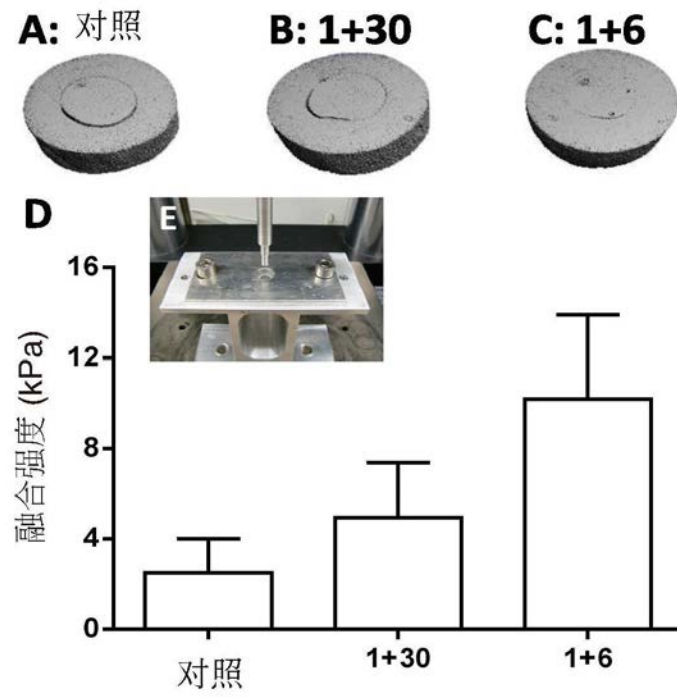


图2

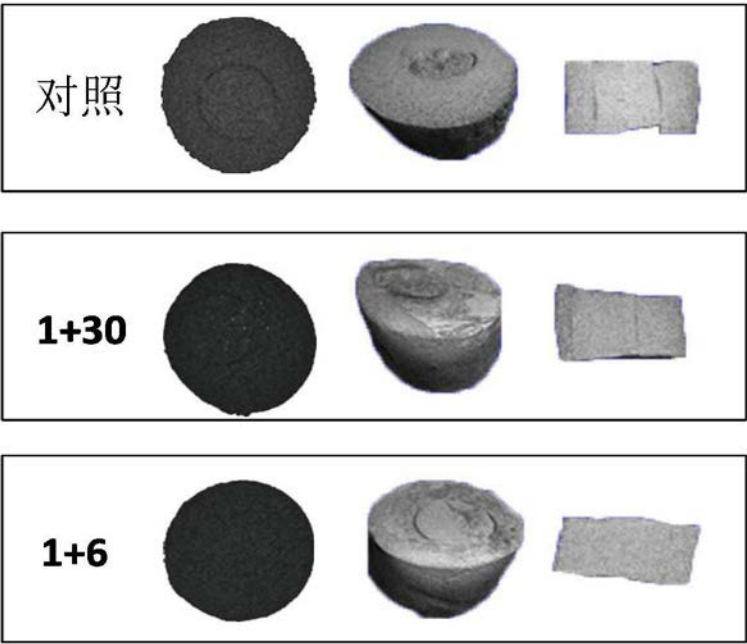


图3

预培养	第1周	第2周	第3周	第4周	
无 rhFGF18	无 rhFGF18				CTR
	rhFGF18				perm
	rhFGF18	无 rhFGF18			1w
	无 rhFGF18	无 rhFGF18	无 rhFGF18		1d/w

图4

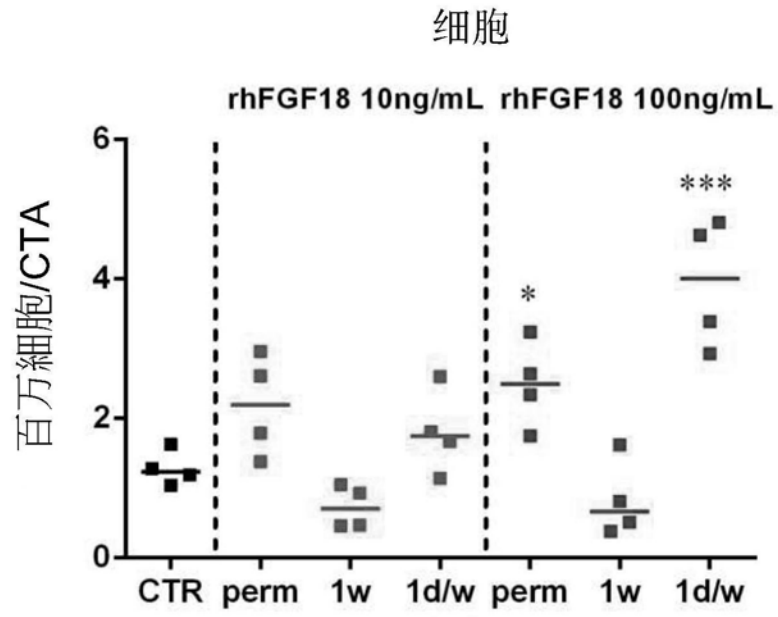


图5

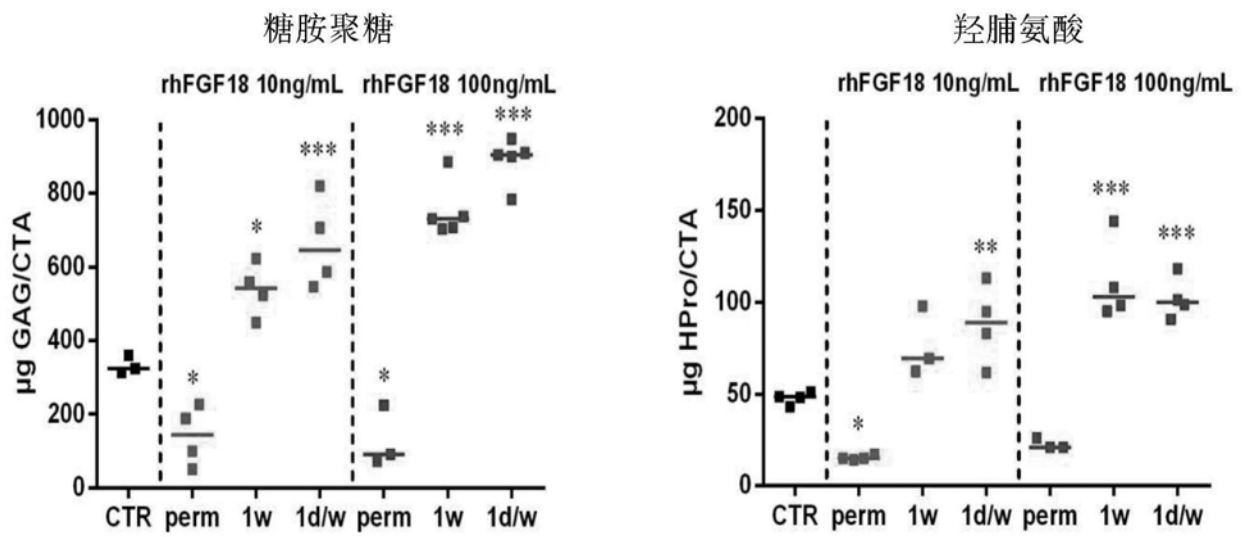


图6

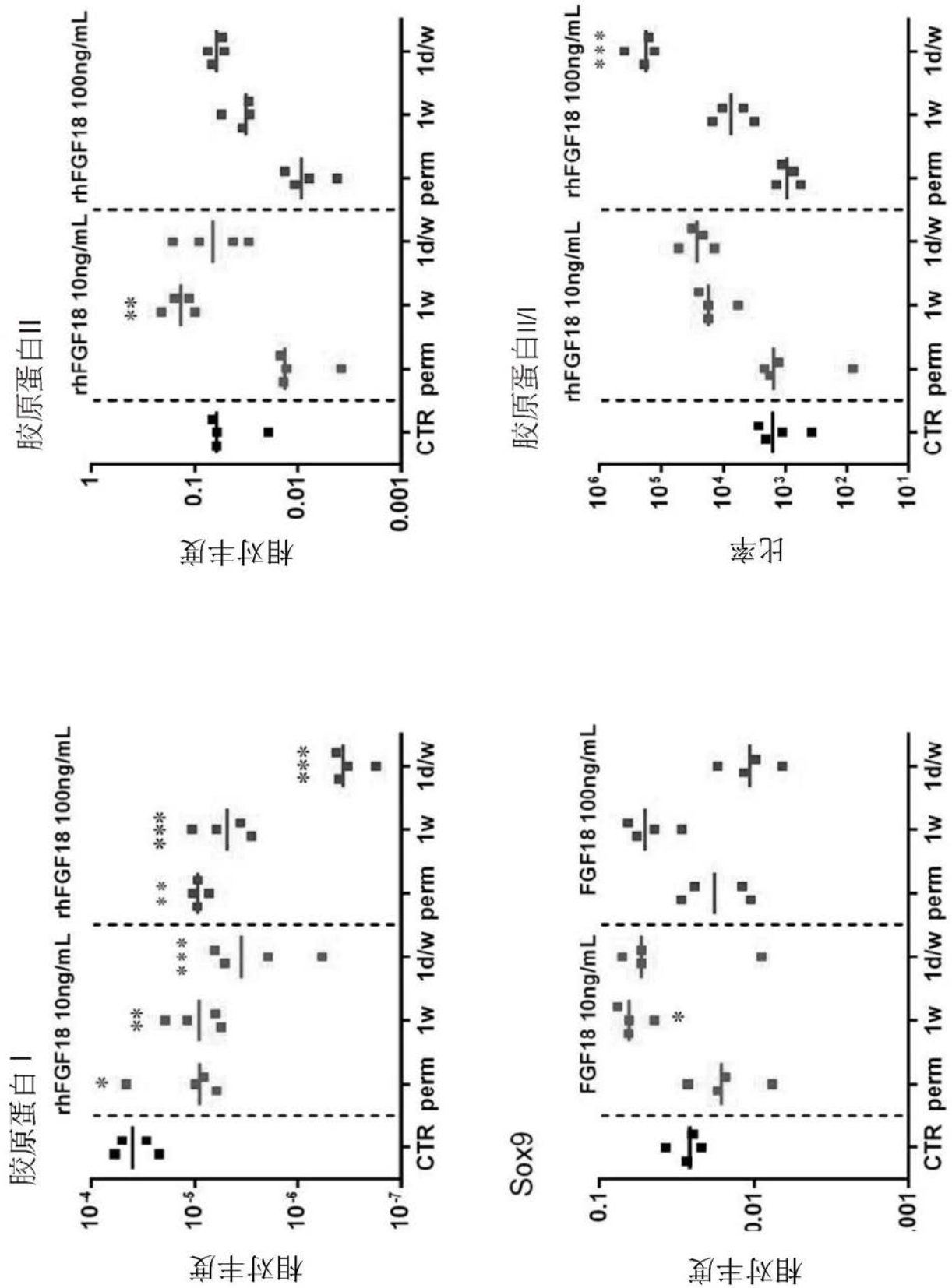


图7

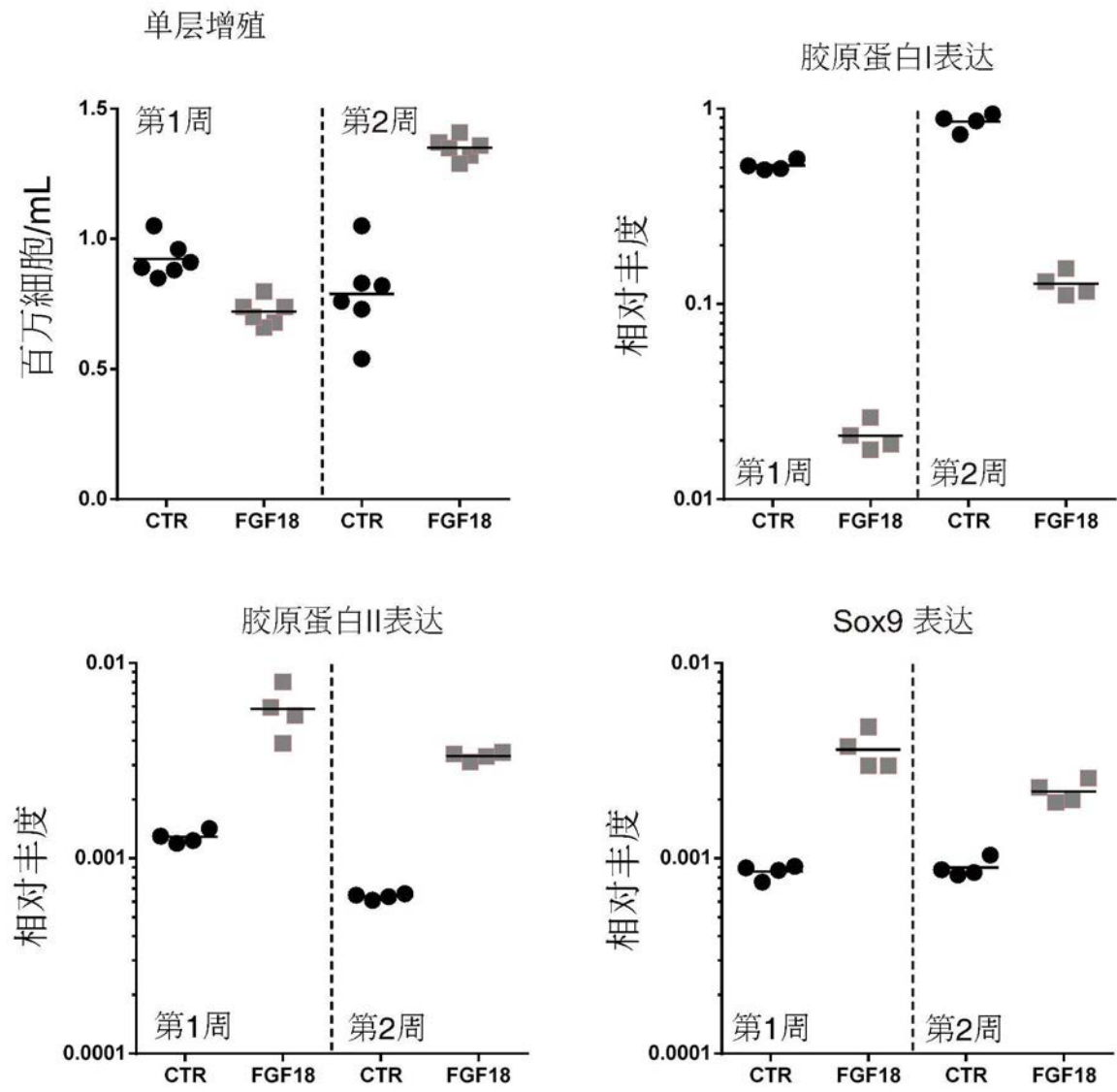


图8

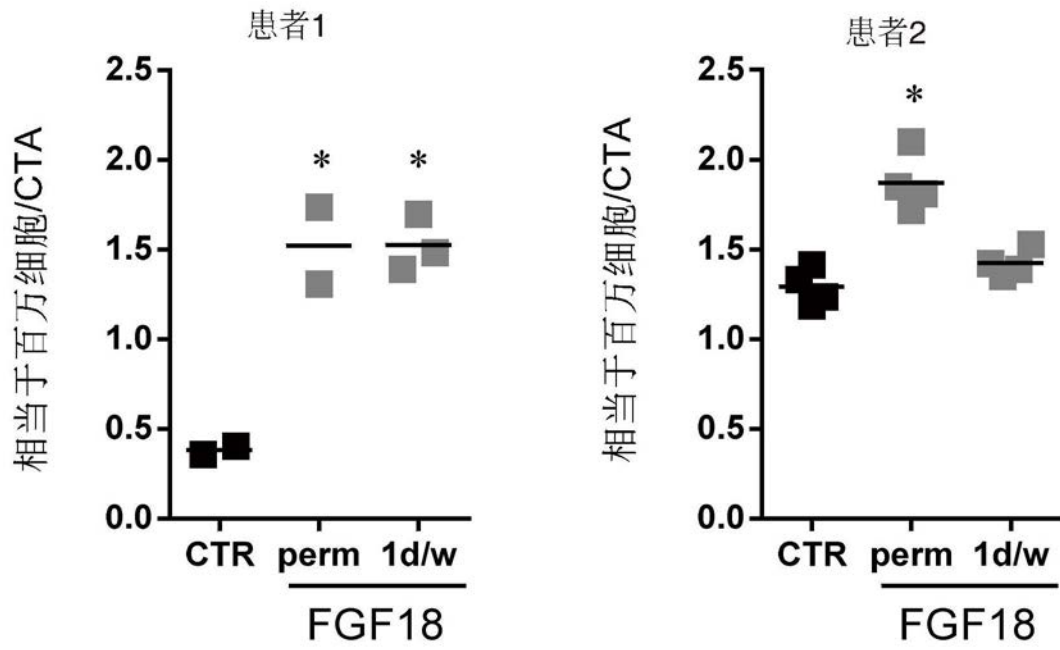


图9

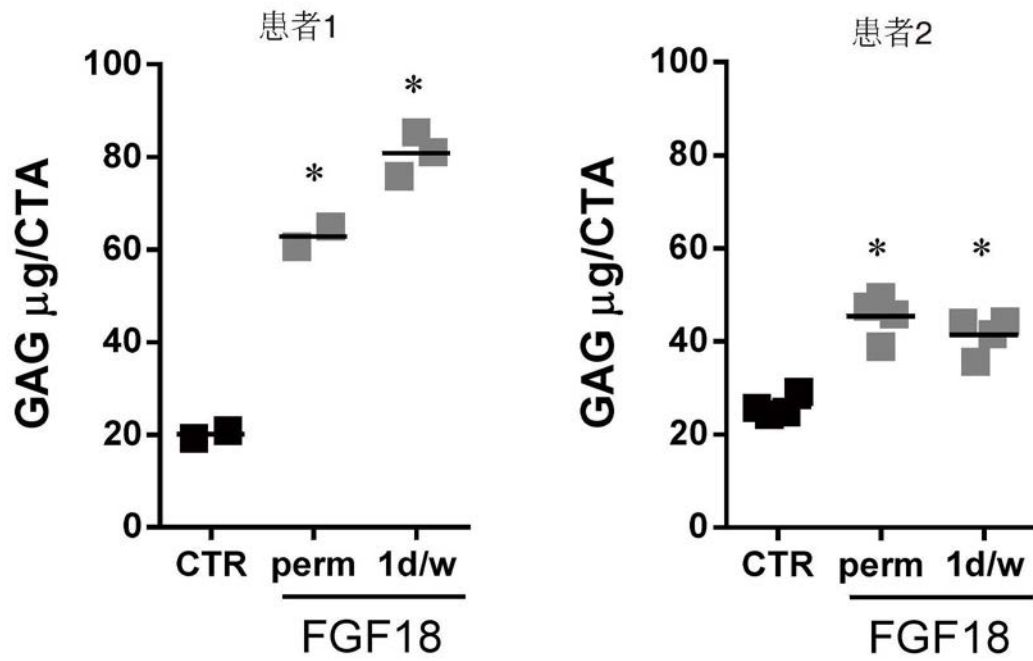


图10

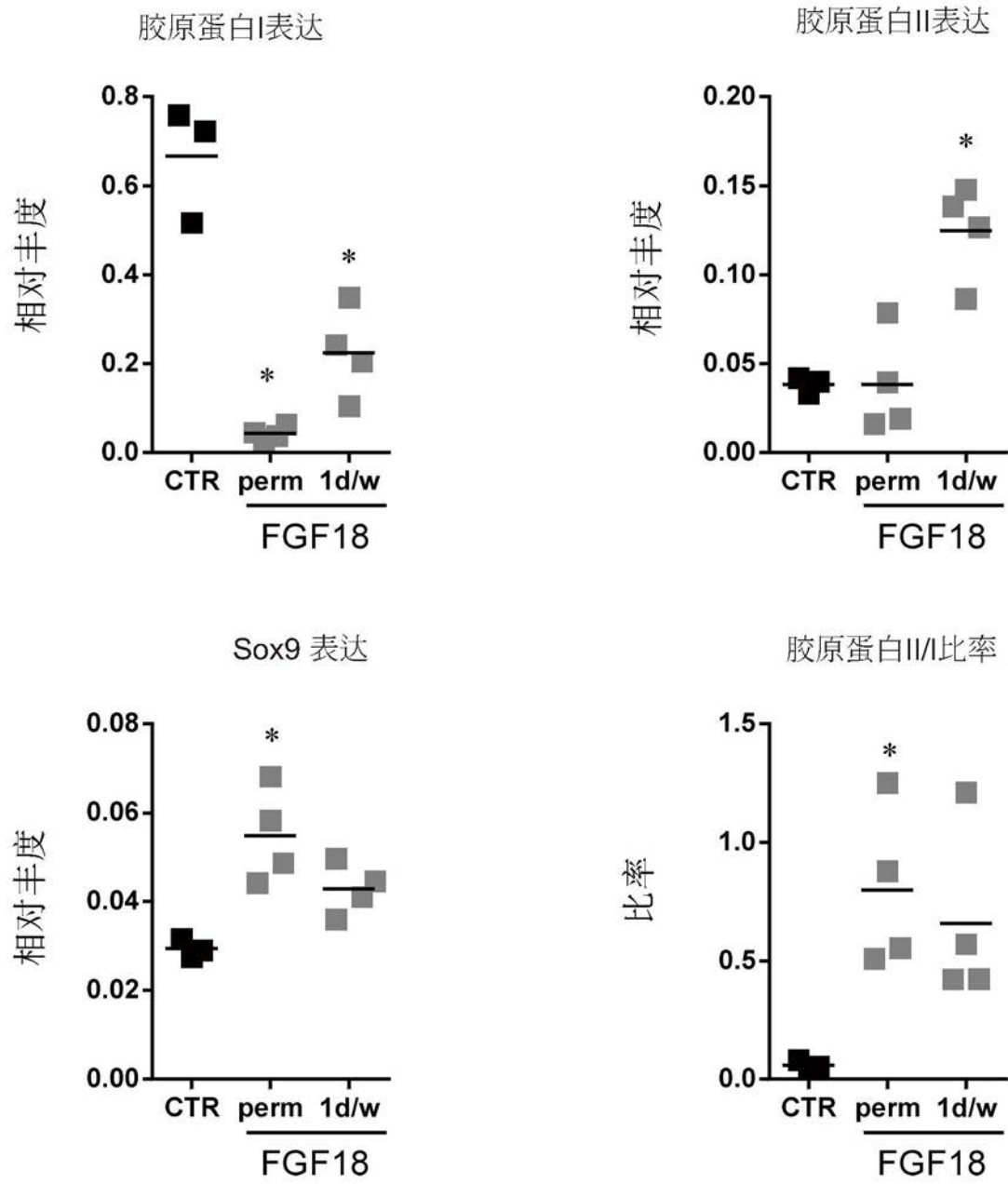


图11