



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106029085 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201480076248.4

(22)申请日 2014.12.23

(30)优先权数据

13199588.8 2013.12.24 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/079194 2014.12.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/097233 EN 2015.07.02

(71)申请人 阿雷斯贸易股份有限公司

地址 瑞士欧博讷

(72)发明人 C·洛普莱斯蒂 D·布龙

C·迪斯潘萨

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 杨昀 陶家蓉

(51)Int.Cl.

A61K 38/18(2006.01)

A61L 27/52(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页  
序列表3页 附图11页

(54)发明名称

木糖葡聚糖凝胶中的FGF-18制剂

(57)摘要

本发明涉及药物制剂领域。更具体地,涉及包含成纤维细胞生长因子18(FGF-18)化合物的木糖葡聚糖的水凝胶,并涉及产生所述水凝胶的方法。一旦原位形成,本发明的水凝胶可用于治疗软骨疾病,例如,骨关节炎或软骨损伤。

1. 一种液体制剂,其包含FGF-18、木糖葡聚糖和缓冲剂,或由它们组成。
2. 如权利要求1所述的液体制剂,其中,所述木糖葡聚糖是部分去半乳糖化的。
3. 如权利要求2所述的液体制剂,其中,所述木糖葡聚糖的去半乳糖化程度是或约是44或45%。
4. 如前述权利要求中任一项所述的液体制剂,其中,所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂。
5. 如前述权利要求中任一项所述的液体制剂,其中,FGF-18选自下组:
  - a. 包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基28-207或由其组成的多肽,
  - b. 包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基28-196或由其组成的多肽,
  - c. 包含SEQ ID NO:2或由其组成的多肽。
6. 如前述权利要求中任一项所述的液体制剂,其中,所述木糖葡聚糖的浓度是3-4重量%,且所述缓冲剂的浓度是96或97重量%。
7. 如前述权利要求中任一项所述的液体制剂,其中,聚合物:FGF-18的比是9:1。
8. 如前述权利要求中任一项所述的液体制剂,其中,所述制剂在暴露于37°C或约37°C的温度时形成水凝胶。
9. 生成如权利要求8所述的水凝胶的方法,所述方法包括如下步骤:
  - a. 制备如权利要求1-7中任一项所述的液体制剂,
  - b. 使所述液体制剂暴露在37°C或约37°C的温度,以形成所述凝胶。
10. 如权利要求9所述的方法,其中,所述凝胶原位形成。
11. 通过权利要求9或10中任一项所述的方法获得的水凝胶。
12. 一种包含容器的制造制品,所述容器包含如权利要求1-8中任一项所述的液体制剂或由其组成。

## 木糖葡聚糖凝胶中的FGF-18制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物制剂领域。更具体地,其涉及木糖葡聚糖凝胶中的成纤维细胞生长因子18(FGF-18)蛋白质制剂,以及生成所述制剂的方法。

### 背景技术

[0002] 成纤维细胞生长因子18(FGF-18)是成纤维细胞生长因子(FGF)蛋白质家族的成员,其与FGF-8和FGF-17紧密相关。FGF家族成员的特征是:肝素结合结构域。对于FGF-18已经鉴定了该假定的肝素结合结构域。假设受体介导的信号转导在与细胞表面肝素硫酸蛋白聚糖复合的FGF配体的结合之后起始。

[0003] 已经显示,FGF-18是软骨细胞和成骨细胞的增殖剂(Ellsworth等,2002;Shimoaka等,2002)。已提出将FGF-18以单独(WO2008/023063)或联合透明质酸(WO2004/032849)的形式治疗软骨疾病,例如骨关节炎(OA)和软骨损伤(CI)。

[0004] 包含FGF多肽的药物组合物是本领域已知的。WO2012172072描述了包含FGF-18的冻干制剂,其中,该组合物包含FGF-18、缓冲剂、泊洛沙姆表面活性剂和糖作为稳定剂。所述FGF-18冻干制剂在治疗OA或CI方面显示具有前景的结果。采用所述冻干制剂的当前的给药方案是一周一次的注射治疗周期,持续3周。该治疗周期可被重复。

[0005] 在CI的情况中,现有制剂的主要缺点是,一旦关节内(i. a.)注射,滑液中FGF-18的存在可能会诱导健康区域中失控的软骨生长。当然,这可能会诱导不希望的作用,例如,关节活动性降低。在靶位点水平选择性地递送FGF-18能够仅促进受损区域中的软骨生长。具体而言,受损区域水平的FGF-18递送将高度有利于伴有微骨折术的CI治疗。微骨折术是关节软骨修复外科手术技术,其通过在基础骨骼中产生小骨折来发挥作用。这导致多潜能间充质干细胞从骨髓释放(Ringe J.等,2012)。用包含FGF-18的可注射凝胶填充软骨孔洞将对凝胶中的细胞起导向作用,该凝胶随后将同时作为供于细胞生长的机械支持物和药物储库。出于该原因,希望FGF-18不从凝胶释放,而是保留在基质中。

[0006] 组织工程改造中典型的方案是3D基质(即支架)中生长因子的限制,该3D基质可被植入或注射(取决于机械性质),以确保接纳位点的形状。所述支架的必备特点是生物相容性和可吸收性。此外,支架必需能够向细胞提供供于生长、增殖和使受损组织再形成的理想环境。理想上,该基质应近似于原始组织的相同机械性质,并且应具有对于宿主细胞可用的微孔性(具有充分尺寸的互连的孔)(Tessmar和Göpferich,2007)。

[0007] 水凝胶是能够吸收和保留大量的水的亲水性聚合物链的三维网络。其主要特征是能够膨胀或收缩,但不溶解于水性介质。因此,能够在其基质中捕获活性分子(活性药物成分,即API),所述分子随后被缓慢释放或保留,这取决于基质和API之间的特定相互作用的存在与否(Lo Presti等,2011)。采用可注射水凝胶治疗软骨疾病的好处是,能够通过软骨缺损中进行的关节镜检来注射该支架,无需利用固体支架的任何侵入性手术。

[0008] 在已知的多种水凝胶中,一些制剂基于这样的聚合物,所述聚合物能够响应具体物理或化学刺激而经历胶凝过程。这些以粘性可注射液体的形式存在,其一经注射即响应

注射位点处的环境刺激(例如温度、pH或离子强度变化)而转变为肉眼可见的凝胶。可调节制剂的组成,以获得具有不同特点,例如粘弹性性质、微孔性等的水凝胶(WO2008063418;Lo Presti等,2001;C.Dispenza等,2011)。

[0009] 天然聚合物(尤其是多糖)的水凝胶,因其独特优势已被广泛利用,所述优势例如无毒、生物相容性、生物可降解性,和丰度。包括胶原、明胶、葡糖氨基葡聚糖及其衍生物的天然聚合物通常对蛋白质具有较高亲和性。许多生物聚合物具有在温度或离子变化后自结构(self-structure)的性质。

[0010] 木糖葡聚糖是在高等植物的初生细胞壁中发现的主要的一类结构多糖。当木糖葡聚糖被部分去半乳糖化(Deg-XG)时,其变得具有温度-响应性(温度敏感):其能够随温度变化在水性溶液中形成物理、可逆的凝胶。木糖葡聚糖的去半乳糖化通过 $\beta$ -半乳糖苷酶来实现(Rilton等,2011)。去半乳糖化的木糖葡聚糖具有优于其它现有原位胶凝系统的一些优势:其胶凝不需要二价阳离子的存在,并且其不受药物带电性质的影响;该凝胶在数分钟内形成,取决于溶液中聚合物的浓度和温度(Shirakawa等,1998)。

[0011] 当制备包含生物活性蛋白质的药物组合物时,所述组合物必须以这种方式配制:所述蛋白质的活性保持合适的一段时间。蛋白质的活性/稳定性的损失可能是由该蛋白质的化学或物理不稳定性所致,主要归因于变性、聚集或氧化。因此,所得产物可能是药学上不可接受的。尽管已知赋形剂和/或水凝胶的应用能够增加给定蛋白质的稳定性,这些赋形剂的稳定作用高度依赖于凝胶中的聚合物、赋形剂的性质和生物活性蛋白质本身。

[0012] 仍需要包含FGF-18作为活性成分的新制剂,其中,所述制剂同时保持活性成分的生物活性且适用于注射,优选用于关节注射,允许减少治疗所需的注射次数。所述特点将允许降低感染风险,并能提高患者的便利性。所述制剂可用于在患者软骨疾病(例如,骨关节炎或软骨损伤)的治疗中给予。

## 发明内容

[0013] 本发明的一个目的是提供包含FGF-18蛋白的新型制剂。更具体地,所述制剂是包含FGF-18的水凝胶,其中,所述水凝胶优选是温度敏感水凝胶,且更优选是木糖葡聚糖凝胶。本发明还提供由液体制剂起始,制备本发明的水凝胶的方法。本文所述的包含FGF-18的水凝胶可用于在软骨疾病的治疗中给予,例如骨关节炎或软骨损伤。特别感兴趣的是木糖葡聚糖水凝胶,还包含FGF-18蛋白。注意,在注射之前或在经受胶凝温度之前,本发明的水凝胶是液体形式。

[0014] 在第一方面中,本发明提供包含或由木糖葡聚糖、缓冲剂和作为活性成分的FGF-18组成的液体制剂。该制剂以胶凝系统形式提供,其在5℃贮存时是液体形式,并且在37℃(即,一旦注射进入人体)变成凝胶(或水凝胶)。优选地,所述木糖葡聚糖是去半乳糖化的木糖葡聚糖,甚至更优选去半乳糖化程度是或约是44或45%的Deg-木糖葡聚糖,且所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂,例如PBS。在一个优选的实施方式中,木糖葡聚糖的浓度是或约是1-5重量%,优选是或约是3-4重量%,或甚至更优选是或约是4%,所述缓冲剂的浓度是或约是95-99重量%,优选是或约是96重量%。优选地,FGF-18选自下组:1)包含或由人FGF-18的成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18的成熟形式对应于包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(Ala)组成的序列,2)包含或由截短形式的人FGF-18组成的多肽,所述截短形式

的人FGF-18包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基196(Lys)组成,和3)包含或由SEQ ID NO:2组成的多肽。更优选地,FGF-18是斯普弗明(sprifermin),如后文所定义。

[0015] 在第二方面中,本发明提供制备FGF-18的水凝胶的方法,其包括如下步骤:

[0016] 1)制备一溶液,其包含或由FGF-18,以及木糖葡聚糖和缓冲剂组成,和

[0017] 2)使该凝胶暴露在37°C或约37°C的温度以形成凝胶,

[0018] 其中,所述木糖葡聚糖优选是去半乳糖化的木糖葡聚糖,甚至更优选去半乳糖化程度是或约是44或45%的Deg-木糖葡聚糖,且所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂,例如PBS。优选地,最终制剂的pH保持在是或约是5-8,更具体是或约是5.5-7.5,例如是或约是5.5、6、6.5、7、7.3或7.5,且甚至更优选是或约是5.5-6。在一个优选实施方式中,FGF-18选自下组:1)包含或由人FGF-18的成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18的成熟形式对应于包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(A1a)组成的序列,2)包含或由截短形式的人FGF-18组成的多肽,所述截短形式的人FGF-18包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基196(Lys)组成,和3)包含或由SEQ ID NO:2组成的多肽。更优选地,FGF-18是斯普弗明,如后文所定义。在一个优选的实施方式中,该凝胶在注射进入人体后(即原位)经历胶凝温度。

[0019] 在第三方面中,本发明提供水凝胶,其通过第二方面中所述的方法获得。

[0020] 在第四方面中,本发明提供一种药用或兽医用制造制品,其包含含有木糖葡聚糖、FGF-18蛋白和缓冲剂的容器,其中所述木糖葡聚糖优选是去半乳糖化的木糖葡聚糖,甚至更优选去半乳糖化程度是或约是44或45%的Deg-木糖葡聚糖,且所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂,例如PBS。优选地,FGF-18选自下组:1)包含或由人FGF-18的成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18的成熟形式对应于包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(A1a)组成的序列,2)包含或由截短形式的人FGF-18组成的多肽,所述截短形式的人FGF-18包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基196(Lys)组成,和3)包含或由SEQ ID NO:2组成的多肽。更优选地,FGF-18是斯普弗明,如后文所定义。

[0021] 定义

[0022] -本文中所述的术语“FGF-18蛋白”或“FGF-18”意指,保留了人FGF-18蛋白的至少一种生物活性的蛋白质。FGF-18可以是原始的(native),以其成熟形式,或其截短形式存在。人FGF-18蛋白的生物活性包括显著增加成骨细胞活性(参见W098/16644)或软骨形成(参见W02008/023063)。

[0023] 原始或野生型的人FGF-18是由关节软骨的软骨细胞表达的蛋白质。人FGF-18是首次指定的zFGF-5,并且其在W098/16644中有完整的介绍。SEQ ID NO:1对应于原始人FGF-18的氨基酸序列,其具有由氨基酸残基1(Met)至27(A1a)组成的信号肽。人FGF-18的成熟形式对应于SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(A1a)的氨基酸序列(180个氨基酸)。

[0024] 本发明中的FGF-18可通过重组方法产生,例如,如申请W02006/063362所教导的。视表达系统和条件而定,本发明中的FGF-18在重组宿主细胞中表达,具有起始甲硫氨酸(Met残基)或具有用于分泌的信号序列。当在原核宿主(例如,大肠杆菌)中表达时,FGF-18在其序列的N末端包含额外的Met残基。例如,当人FGF-18的氨基酸序列在大肠杆菌中表达时,以N末端(位置1)的Met残基起始,随后是SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(A1a)。

[0025] -本文中所述的术语“截短形式”的FGF-18指,包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至196(Lys)组成的蛋白质。优选,截短形式的FGF-18蛋白是标为“trFGF-18”(170个氨

基酸)的多肽,其以Met残基(在N末端)起始,随后是野生型人FGF-18的氨基酸残基28(Glu)-196(Lys)。trFGF-18的氨基酸序列示于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是重组截短形式的人FGF-18,由大肠杆菌生成(参见W02006/063362)。FGF-18的该具体形式的国际非专利药品名称(INN)是斯普弗明。已显示,斯普弗明具有与成熟人FGF-18类似的活性,例如,其增加软骨细胞增殖和软骨沉积,导致多种软骨组织的修复和重建(参见W02008/023063)。

[0026] -术语“活性分子”和“活性成分”指,活性药物成分,即API。本发明内容中优选的API是FGF-18。

[0027] -术语“凝胶”或“水凝胶”在本申请中可互换使用。它们指可作为药物制剂使用的3D基质或支架。

[0028] -本文中所述的术语“液体制剂”指的是注射前的水凝胶制剂,因为凝胶本身仅在一且给予进入人体的温度变化后形成。

[0029] -术语“木糖葡聚糖”指的是任何形式的木糖葡聚糖,即维管植物的初生细胞壁产生的半纤维素。其为熟知的胶凝剂,尤其是经历约37°C的温度时。可用于本发明内容中的一种优选的形式是去半乳糖化的形式,更优选去半乳糖化程度是或约是44或45%。去半乳糖化的木糖葡聚糖在本文中称为Deg-木糖葡聚糖、D-木糖葡聚糖或Deg-XG。

[0030] -本文中所述的术语“缓冲剂”指,化合物的溶液,其已知在药用或兽医用的制剂中是安全的,并且具有将制剂的pH维持或控制在所述制剂所需的pH范围内的作用。用于将pH控制在中等酸性pH至中等碱性pH的可接受的缓冲剂包括但不限于,磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、精氨酸、TRIS,和组氨酸缓冲剂。“TRIS”指2-氨基-2-羟甲基-1,3,-丙二醇,及其任何药学上可接受的盐。本发明的优选的缓冲剂是磷酸盐缓冲剂,例如PBS。

[0031] -本文中所述的术语“小瓶”或“容器”广泛地指,适于将制剂保留在液体形式的储库。本发明中所用的小瓶的示例包括,注射器、安瓶、药筒,或适于通过注射,优选通过关节内注射将FGF-18制剂递送至患者的其它此类储库。适用于包装关节内给予产品的小瓶是本领域熟知且公认的。

[0032] -本文中所述的术语“软骨疾病”涵盖由因创伤性损伤或软骨病疾病造成的损伤所致的疾病。可通过给予本文所述的FGF-18制剂来治疗的软骨疾病的示例包括但不限于,关节炎,例如,骨关节炎或类风湿性关节炎,和软骨损伤。

[0033] -所用术语“骨关节炎”意指关节炎的最常见形式。其可由软骨破损造成。少量的软骨可能会折断,从而造成骨与骨之间的关节中的疼痛和膨胀。随时间推移,该软骨可能会完全磨损,使得骨与骨在一起摩擦。骨关节炎可能会影响任何关节,但长见于手部和承重关节,例如,髌、膝盖、足部,和脊柱。在一个优选的示例中,骨关节炎可以是膝盖骨关节炎或髌骨关节炎。本领域技术人员完全知晓本领域中所用的骨关节炎分类,具体而言是OARSI评估系统(参见例如,Custers等,2007)。骨关节炎是可通过给予本发明的FGF-18制剂治疗的优选的软骨疾病之一。

[0034] -本文中所述的术语“软骨损伤”是主要由创伤造成的软骨疾病或软骨损伤。软骨损伤可能因创伤性机械破坏而发生,尤其是涉及事故或手术而发生。该定义中还考虑运动相关损伤或运动相关的关节组织磨损。

[0035] -术语“ $\mu\text{g}$ ”或“mcg”可互换使用并且指质量SI单位的划分。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明的主要目的是木糖葡聚糖凝胶制剂(或水凝胶),其包含或由木糖葡聚糖、FGF-18蛋白和缓冲剂组成。所述水凝胶在原位注射之前或暴露至胶凝温度之前是液体形式,本发明的另一个主要目的是木糖葡聚糖液体制剂,其包含或由木糖葡聚糖、FGF-18蛋白和缓冲剂组成。在一个优选的实施方式中,所述木糖葡聚糖是去半乳糖化的木糖葡聚糖,甚至更优选去半乳糖化程度是或约是44或45%的Deg-木糖葡聚糖,且所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂,例如PBS。

[0038] 所述液体制剂(或水凝胶)合适于软骨水平的注射。优选地,所述FGF-18蛋白选自下组:1)包含或由人FGF-18的成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18的成熟形式对应于包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(Ala)组成的序列,2)包含或由截短形式的人FGF-18组成的多肽,所述截短形式的人FGF-18包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基196(Lys)组成,和3)包含或由SEQ ID NO:2组成的多肽。更优选地,FGF-18是斯普弗明。

[0039] 应用可注射的水凝胶的优点在于,能够在软骨缺损中注射已包含FGF-18的支架(或所述支架的组分;所述支架在暴露至胶凝温度之前是液体形式),而无需利用固体支架的任何侵入性手术。优选地,注射通过关节镜检进行。

[0040] 最优选地,本发明的水凝胶在注射后原位形成。

[0041] 在一个优选实施方式中,本发明涉及液体聚合溶液(或液体制剂)的应用,其一经给予患者即能够经历胶凝过程,这归因于温度变化。

[0042] 注意,本发明内容中的液体制剂和水凝胶指的是相同制剂。然而,液体制剂具体指的是该制剂胶凝之前的形式,而水凝胶指的是该相同制剂但其已经历胶凝过程。因此,两种制剂的组分是相同的。

[0043] 液体制剂(或水凝胶)中的FGF-18浓度优选是或约是1ng/mL-600mcg/mL,优选是或约是0.001、0.006、0.01、0.1、1、5、6.5、10、20、30、40、50、54、60、70、80、90、100、150、200、250或300,540mcg/mL。更优选FGF-18的浓度是或约是0.1-100mcg/mL,甚至更优选是或约是0.1-54mcg/mL。

[0044] 液体制剂或水凝胶中的胶凝组分,即,木糖葡聚糖,的浓度是或约是1-5重量%,优选是或约是2-4重量%,甚至优选是或约是3或4重量%。优选地,所述木糖葡聚糖是去半乳糖化的木糖葡聚糖,且甚至更优选地,所述Deg-木糖葡聚糖的去半乳糖化程度是或约是44或45%。所述Deg-木糖葡聚糖的具体优势在于,在约37°C(即人体温度)发生溶液-凝胶转变,而凝胶-溶液转变在约70°C发生。因此,一旦凝胶在人体中形成,其保持在凝胶状态;其不存在变为可溶状态的风险。

[0045] 所述缓冲剂,例如PBS,是或约是95-99重量%,更优选是或约是96-97重量%。

[0046] 在一个优选的实施方式中,所述液体制剂或所述水凝胶(液体制剂一旦注射进入人体即形成水凝胶)包含或由是或约是0.1-100mcg/mL的FGF-18、3或4重量%的木糖葡聚糖,96或97重量%的缓冲剂组成。优选地,聚合物(即木糖葡聚糖)和FGF-18之间的比例是20:1-1:1,更优选是9:1。

[0047] 一旦混合在一起,各组分的终浓度优选如下:

[0048] -FGF-18:0.00001-0.6重量%,例如0.0054重量%;

[0049] -木糖葡聚糖:1-5重量%,例如3或4重量%;

[0050] -缓冲剂:95-99重量%,例如96或97重量%。

[0051] 在一个优选实施方式中,最终制剂的pH保持在是或约是5-8,更具体是或约是5.5-7,例如是或约是5.5、6、6.5、7、7.3或7.5,且甚至更优选是或约是5.5-6。

[0052] 本发明还提供制备FGF-18的水凝胶的方法,其包括如下步骤:

[0053] 1)制备液体制剂,其包含或由FGF-18,以及木糖葡聚糖和缓冲剂组成,和

[0054] 2)使该凝胶暴露在37°C或约37°C的温度以形成凝胶,

[0055] 其中,所述木糖葡聚糖优选是去半乳糖化的木糖葡聚糖,甚至更优选去半乳糖化程度是或约是44或45%的Deg-木糖葡聚糖,且所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂,例如PBS。优选地,最终制剂的pH保持在是或约是5-8,更具体是或约是5.5-7,例如是或约是5.5、6、6.5、7、7.3或7.5,且甚至更优选是或约是5.5-6。在一个优选实施方式中,FGF-18选自下组:1)包含或由人FGF-18的成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18的成熟形式对应于包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(A1a)组成的序列,2)包含或由截短形式的人FGF-18组成的多肽,所述截短形式的人FGF-18包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基196(Lys)组成,和3)包含或由SEQ ID NO:2组成的多肽。更优选地,FGF-18是斯普弗明,如后文所定义。在一个优选的实施方式中,该液体制剂在注射进入人体后(即原位)经历胶凝温度,由此形成凝胶(或水凝胶)。

[0056] 优选地,聚合物(即木糖葡聚糖)和FGF-18之间的比例是20:1-1:1,更优选是9:1。各化合物(即FGF-18、木糖葡聚糖和缓冲剂)可根据上述浓度、pH和/或比例中任何之一采用。

[0057] 在第三方面中,本发明提供药用或兽医用的制造制品,其包含含有或由本发明液体制剂组成的容器。所述液体制剂包含或由木糖葡聚糖、FGF-18蛋白和缓冲剂组成,其中所述木糖葡聚糖优选是去半乳糖化的木糖葡聚糖,甚至更优选去半乳糖化程度是或约是44或45%的Deg-木糖葡聚糖,且所述缓冲剂是磷酸盐缓冲剂,例如PBS。优选地,FGF-18选自下组:1)包含或由人FGF-18的成熟形式组成的多肽,所述人FGF-18的成熟形式对应于包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基207(A1a)组成的序列,2)包含或由截短形式的人FGF-18组成的多肽,所述截短形式的人FGF-18包含或由SEQ ID NO:1的残基28(Glu)至残基196(Lys)组成,和3)包含或由SEQ ID NO:2组成的多肽。更优选地,FGF-18是斯普弗明,如后文所定义。优选地,聚合物(即木糖葡聚糖)和FGF-18之间的比例是20:1-1:1,更优选是9:1。各化合物(即FGF-18、木糖葡聚糖和缓冲剂)可根据本文所述的浓度中任何之一采用。

[0058] 本发明还涉及根据上述方法获得的水凝胶。

[0059] 还描述了包装材料,该包装材料提供用于形成(优选原位形成)本发明水凝胶的说明书。

[0060] 能够形成本发明的水凝胶的液体制剂可贮存至少约12个月-约24个月。在优选的贮存条件下,在第一次应用之前,使所述制剂远离亮光(优选避光),并优选处于冷藏温度(是或约是2-8°C)下。

[0061] 本发明提供适于药用或兽医用的含FGF-18的液体制剂或水凝胶,尤其是单次应用。所述液体制剂或水凝胶(该液体制剂在暴露至胶凝温度时能够形成水凝胶)包含FGF-18,根据本发明,可用于给予以改善软骨修复或用于治疗软骨疾病,例如骨关节炎或软骨损伤。



[0062] 这些均质水凝胶适用于注射并且是替代性的递送系统。在特别优选的实施方式中,本发明的制剂用于关节内(i.a.)注射。其可通过直接注射进入缺损来给予,其中,所述凝胶优选原位形成。在本发明的一个优选实施方式中,i.a.给予在关节中进行,所述关节选自髋部、膝盖、肘部、腕部、踝部、脊柱、足部、手指、脚趾、手、肩部、肋骨、肩胛骨、大腿、胫部、脚踝和沿脊柱骨节处的关节。在另一个优选的实施方式中,i.a.给予在髋部或膝盖的关节中进行。

[0063] 提供以下实施例来进一步说明本发明的制剂和水凝胶的制备。本发明的范围不应仅限于如下实施例。

[0064] 附图描述:

[0065] 图1:(a)剪切粘度针对剪切速率,和(b)剪切速率针对剪切应力,对于水中制备的Deg-XG系统。

[0066] 图2:剪切粘度对比剪切速率,对于D-PBS中制备的Deg-XG系统。

[0067] 图3:对于(a)载有FGF-18的3重量% Deg-XG;(b)载有FGF-18的D-PBS中的4重量% Deg-XG,在25°C孵育不同时间后的剪切粘度检测。

[0068] 图4:在25°C和1Hz,对于D-PBS中载有54mcg/mL的FGF-18的Deg-XG 4.4重量%和Deg-XG 4重量%进行的时间扫描检测。

[0069] 图5:高压灭菌对于Deg-XG/水系统(4和5重量%)的剪切粘度的作用。

[0070] 图6:(a)高压灭菌对于Deg-XG/D-PBS系统(3.3,4.4,5.5重量%)的剪切粘度的作用;(b)Deg-XG/水(4和5重量%)与Deg-XG/D-PBS系统(4.4和5.5重量%,均经高压灭菌)的比较。

[0071] 图7:Deg-XG/水系统的应变扫描图,(a)37°C孵育5分钟之后,和(b)37°C孵育30分钟之后。

[0072] 图8:Deg-XG/D-PBS系统的应变扫描图,(a)3重量%,含或不含FGF-18;(b)4重量%,含或不含FGF-18;(c)5重量%,含或不含FGF-18。

[0073] 图9:Deg-XG/水系统的频率扫描图,(a)37°C孵育5分钟;(b)37°C孵育30分钟。

[0074] 图10:Deg-XG/D-PBS系统的频率扫描图,(a)3重量%,含或不含FGF-18,(b)4重量%,含或不含FGF-18,(c)5重量%,含或不含FGF-18。

[0075] 图11:对于Deg-XG/水系统,1Hz的G'和G''对比时间。

[0076] 图12:冻融对Deg-XG/D-PBS 4.4重量%系统的作用。

[0077] 图13:冻干并在D-PBS中重建的Deg-XG 4.4重量%(溶液和凝胶形式)。

[0078] 图14:新鲜和溶蚀的样品的频率扫描图:(a)Deg-XG 4重量%,载有540 $\mu$ m/ml的FGF-18;(b)Deg-XG 4重量%,载有54 $\mu$ m/ml的FGF-18;(c)Deg-XG 5重量%,载有540 $\mu$ m/ml的FGF-18;(d)Deg-XG 5重量%,载有54 $\mu$ m/ml的FGF-18。

[0079] 图15:通过Alamar Blue试剂进行的细胞增殖试验(X轴:孵育时间(天数)。Y轴:细胞活力)。显示细胞增殖的Alamar Blue试验(5000个软骨细胞/孔)结果,其中细胞增殖如下进行:采用培养在Deg-XG水凝胶(以3.3重量%)样品上的软骨细胞,所述水凝胶未加载(对照)或加载有三种不同浓度的FGF-18:54mcg/ml、6.7mcg/ml、6.7ng/ml。

[0080] 图16:在如下基质上培养12天的软骨细胞的吖啶橙染色:Deg-XG(左上);Deg-XG+6.7ng/ml的FGF-18(右上);Deg-XG+6.7ug/ml的FGF-18(左下);Deg-XG+54ug/ml的FGF-18

(右下)。

[0081] 图17:人FGF-18的序列,对应于SEQ ID NO:1(a),和斯普弗明的序列,对应于SEQ ID NO:2(b)。

[0082] 序列说明:

[0083] SEQ ID NO.1:原始的人FGF-18的氨基酸序列。

[0084] SEQ ID NO.2:重组截短的FGF-18(trFGF-18或斯普弗明)的氨基酸序列。

## 实施例

[0085] 材料

[0086] 本实施例的重组截短的FGF-18(trFGF-18或斯普弗明)已经根据申请W02006/063362中所述的技术,通过在大肠杆菌中表达而在内部制备。在下述实施例中,斯普弗明和FGF-18可互换使用。

[0087] 实施例中所用的其它主要物质如下:

[0088] -来自罗望子种子的木糖葡聚糖获自麦戈新国际公司(Megazyme International)(爱尔兰)。其根据Rilton等,2011报道的方案进行去半乳糖化。

[0089] -BSA、HSA和泊洛沙姆F68获自西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich)公司。

[0090] -盘尼西林链霉素(Pen-Strep)和达氏PBS 10x获自吉布可公司(Gibco)。

[0091] --壳聚糖75%DD HMW,西格玛奥德里奇公司419419,

[0092] --壳聚糖95%DD LMW,法拉瓦利(Faravelli)公司43000,

[0093] --壳聚糖95%DD HMW,海普医疗(Heppe Medical)公司24711,

[0094] 对木糖葡聚糖的去半乳糖化变体(Deg-XG)的溶液进行定性表征,以进行对于不同制剂的初始快速筛选。具体而言,这些表征是室温下进行的可注射性测试和37°C进行的倾斜性能测试。对于所选的系统,进行进一步表征和实验,合适时还在FGF-18的存在下进行所述表征和实验。

[0095] 为了在这一部分清楚区分胶凝过程之前和之后的制剂,分别将前者称为“液体溶液”,而后者称为“凝胶”。

[0096] 方法

[0097] FGF-18溶液的制备

[0098] 5.41mg/ml的FGF-18贮存于-80°C下的单独3ml小瓶中,并且,在室温下融解后,将其直接添加至聚合物溶液(以聚合物溶液和FGF-18之间9:1的比例)以获得540mcg/ml的目标终浓度,或用“蛋白质体”稀释以获得54mcg/ml的目标终浓度,然后添加至聚合物溶液。“蛋白质体(Protein bulk)”是pH 7.3的PBS溶液,其由Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(7mM)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1mM)和KCl(2.7mM)制备。该缓冲剂的离子强度是约25mM。

[0099] 聚合物的溶剂和释放介质(用模拟滑液改良)的制备:

[0100] I型(也称为D-PBS):达氏(Dulbecco)PBS 10x,用密理博水十倍稀释,0.1重量% Pen-Strep;pH 5.5。D-PBS 1x离子强度是约166mM,且其组成如下:CaCl<sub>2</sub>(0.9mM)、MgCl<sub>2</sub>(0.49mM)、KCl(2.66mM)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1.47mM)、NaCl(137.9mM)、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(8.06mM)。

[0101] II型:如同I型,具有0.1重量%BSA。

[0102] III型:如同“蛋白质体”,具有0.25g/L泊洛沙姆、1重量%Pen-Strep和1重量%

HSA;pH 7.3。

[0103] FGF-18加载方案

[0104] 对于Deg-XG溶液,其在I型溶剂(D-PBS)或PBS pH 7.3(制备为“蛋白质体”)中制备,聚合物浓度增加10%,从而在系统以重量比9:1载有FGF-18溶液时具有相同的聚合物终浓度。

[0105] 蛋白质溶液用注射器缓慢加载,用针头在样品中来回混搅以确保均一分布。加载凝胶始终贮存于5℃,过夜,使用前不搅拌。

[0106] 聚合物溶液:制备和贮存

[0107] Deg-XG溶液在密理博水和I型溶剂(pH 5.5)中制备。4.4重量%的Deg-XG溶液还在“蛋白质体”(pH 7.3)中制备。

[0108] 溶解过程如下:

[0109] • 将固体聚合物以所需浓度添加至冷水或冷PBS;

[0110] • 在5℃和13500rpm下均质化5小时;

[0111] • 120℃下高压灭菌20分钟;

[0112] • 5℃下贮存。

[0113] 在预配制工作中,壳聚糖与其它赋形剂混合,以获得具有i.a.注射可接受的渗透压度的水性溶液(目标:350mOsm/Kg)。然后,测试液体溶液的胶凝时间和温度。

[0114] 可注射性,剪切粘度和倾斜性能测试

[0115] 可注射性:可注射性在室温下通过将1ml注射通过带有G25针头的注射器来测试。评价注射时间和注射器中的剩余量。

[0116] 剪切粘度:剪切粘度检测在25℃采用流变计Ar 1000(TA仪器)进行。

[0117] 倾斜性能测试:2-3ml的溶液在37℃于透明柱形管中孵育,并在不同时间后观察。将管倾斜以评估材料是液体样的(“流动”)还是凝胶样的(“不流动”)。

[0118] 动态机械应力流变测量

[0119] Deg-XG凝胶的动态-机械性质通过小幅剪切实验(应力控制)来进行。测试采用具有聚丙烯酸酯胶片几何结构(直径4cm)和500μm的间隙的应力控制流变计Ar 1000(TA仪器公司)进行。

[0120] • 应变扫描测试以1Hz频率进行,而频率扫描测试以 $4 \cdot 10^{-3}$ 应力进行。应变扫描和频率扫描测试均在37℃孵育5和30分钟后进行。

[0121] • 37℃的胶凝动力学采用 $4 \cdot 10^{-3}$ 应力下的重复频率扫描测试研究。

[0122] • 25℃的胶凝动力学采用1Hz固定频率和 $4 \cdot 10^{-3}$ 应力下的时间扫描测试研究。

[0123] SEM显微镜

[0124] 表面形貌通过场致发射扫描电子显微镜(FESEM)系统(JEOL)以10kV的加速电压拍照。用于FESEM的样品在扫描之前通过JFC-1300金镀膜机(JEOL)以30mA处理50秒而被覆有金层。通过石墨粘附层,将冷冻干燥的样品固定在SEM铝蒂上。

[0125] 膨胀-溶蚀研究

[0126] 对于采用水中制备的Deg-XG凝胶的初步研究,将凝胶样品(每系统4-6个)置于预先称重的具有多孔底部(多孔性G0/G1烧结玻璃)的柱形玻璃小瓶,浸入大量过量的I型释放介质,并置于设置为37℃的恒温器中。对于载有FGF-18的Deg-XG凝胶,将凝胶样品置于预先

称重的多孔板的插入物,所述多孔板在底部上具有多孔膜(0.4 $\mu$ m),浸入II型释放介质并置于设置为37 $^{\circ}$ C的恒温器中。提供100rpm下的轨道振荡。释放介质每2-3天换一次。凝胶样品在孵育前和在37 $^{\circ}$ C孵育之后不同时间称重。 $W_s(t)$ 是膨胀的样品在时间t的重量,而 $W_s(0)$ 是该样品在时间=0的重量。

[0127] 溶蚀-释放研究

[0128] 对于pH 7.3的PBS(如“蛋白质体”)中制备的和载有FGF-18的4重量%Deg-XG的释放研究,将凝胶样品置于预先称重的多孔板的插入物,所述多孔板底部具有多孔膜(0.4 $\mu$ m),浸入III型释放介质并置入设置为37 $^{\circ}$ C的轨道振荡器。经历该测试(各4份样品)的系统:

[0129] • Deg-XG 4重量%;

[0130] • Deg-XG 4重量%,载有540 $\mu$ g/ml的FGF-18;

[0131] • Deg-XG 4重量%,载有54 $\mu$ g/ml的FGF-18。

[0132] 释放介质于24小时、48小时后更换,然后每3-4天更换一次。对在24小时、48小时和7天后收集的接受相进行Biacore和RP-HPLC分析。

[0133] 体外释放研究

[0134] 还分析用于膨胀测试的相同样品的体外释放测试。具体而言,收集的相通过HPLC分析。所选的样品还通过Biacore分析(数据未显示)。

[0135] 实施例1:基于DEG-XG的温度响应性胶凝系统

[0136] Deg-XG溶液在水中以1、2、3、4、5重量%制备。Deg-XG在D-PBS中以3.3重量%和4.4重量%制备,并且其还载有54 $\mu$ g/ml的FGF-18。所有系统在5 $^{\circ}$ C贮存过夜之后(时间=0)和进一步在37 $^{\circ}$ C孵育1、2和3小时之后进行可注射性测试。

[0137] 可注射性(表1和2)。注射给定体积(1ml)的聚合物溶液的时间随着聚合物浓度的增加而增加。在多至4重量%的浓度时注射器中的剩余量在5-8%之间,尽管其在5重量%时显著增加至约15%。FGF-18的存在不显著影响表征的两种系统(3和4重量%)的性能。在25 $^{\circ}$ C贮存后,对于3重量%系统,注射器中的剩余量仅在4小时之后增加,而对于4重量%系统,注射器中的剩余量随着25 $^{\circ}$ C的孵育时间更显著地增加,并且2小时后的注射时间几乎翻倍。这些结果表明对于两种系统,胶凝在25 $^{\circ}$ C发生,并且具有不同动力学(较高聚合物浓度的较快)。

[0138] 倾斜性能(表1)。尽管4和5Deg-XG重量%甚至在37 $^{\circ}$ C孵育5分钟之前变成凝胶,较低浓缩的溶液在孵育30分钟之前没有变成凝胶。对于1重量%,没有观察到肉眼可见的胶凝。

[0139] 剪切粘度检测(25 $^{\circ}$ C的流动性能)。在水中制备且高压灭菌的Deg-XG凝胶的结果示于图1(a-b)。剪切粘度随着聚合物浓度的增加而增加,并且非牛顿性能变得更加显著。

[0140] 已检验了Deg-XG/D-PBS系统(高压灭菌)的剪切粘度对于剪切速率(图2)。类似地,剪切粘度随着聚合物浓度的增加而增加,并且非牛顿性能变得更加显著。对于在25 $^{\circ}$ C孵育不同时间(1、2和4小时)后的存在FGF-18的3和4重量%进行重复检测(图3)。如同预期,低剪切速率范围内的剪切粘度随着25 $^{\circ}$ C的孵育时间的推移而逐渐增加,并且曲线的斜率也同样增加。这些结果支持了如下假设:材料已在25 $^{\circ}$ C发生趋向胶凝的逐渐改变。

[0141] 该性能进一步通过动力学研究来证实,所述动力学研究通过以1Hz的固定频率对4.4重量%和载有54 $\mu$ g/ml的FGF-18(4重量%)的Deg-XG/D-PBS进行时间扫描测试来进行

(图4)。

[0142] 高压灭菌处理的影响。水中制备的4和5重量%的Deg-XG凝胶在高压灭菌之前和之后经历剪切粘度检测。高压灭菌不显著影响5重量%溶液的粘度(在研究的剪切速率范围内),但其降低了4重量%低剪切速率下的剪切粘度(图5)。可假设,120°C的热处理有利于水中的聚合物溶解。

[0143] 对于D-PBS中制备的Deg-XG溶液,聚合物浓度增加10%,从而当这些系统载有FGF-18溶液(聚合物/FGF-18溶液重量比=9:1)时具有相同的聚合物终浓度。相对于未经高压灭菌的样品,高压灭菌的溶液显示略微泛黄。对于这些系统,高压灭菌处理的影响在较低浓度中更为显著(图6a)。D-PBS存在下的高压灭菌会诱导相对于水中制备的相似系统而言的剪切粘度的下降(参见图6b)。事实上,根据附图可见,表示10%更浓缩但在缓冲剂存在下经高压灭菌的系统的曲线,与具有较低浓缩聚合物但作为水溶液经高压灭菌的曲线重叠。

[0144] 实施例2:基于DEG-XG的温度响应性胶凝系统的动态机械性能。

[0145] 37°C孵育不同时间的凝胶的动态机械性能通过应力和频率扫描测试研究。

[0146] 对于基于水的凝胶系统,37°C孵育5和30分钟后,以1Hz频率进行应变扫描的G'曲线示于图7。G'随浓度增加而显著地增加,尽管材料变得越具弹性样,其在丧失完整性(通过G'突然减小所检测的条件)之前能够承受的应变越低。37°C条件下30分钟后的应变扫描测试显示储存模量的一般的进一步增加,并显示4和5重量%Deg-XG/水系统之间的差异。类似的测试在载有540和54 $\mu$ g/ml GF的D-PBS凝胶和“安慰剂”系统(不含GF的D-PBS凝胶)上进行(图8a-c)。

[0147] 稀释和添加FGF-18的合并效应朝着G'减小的方向。十倍更浓缩的GF仅诱导G'的进一步略微减小,因此,观察到的G'的减小似乎主要归因于稀释。

[0148] 在37°C对于所有系统进行频率扫描测试。在图9中,显示针对37°C孵育5分钟或30分钟后的Deg-XG/水系统的G'、G''作图。除了1重量%,所有系统的G'>G''和G'几乎不随频率变化。仅较高浓度的G''变得不随频率变化。G'和G''曲线均随聚合物浓度而增加。

[0149] 还对载有540和54 $\mu$ g/mL的FGF-18的D-PBS凝胶和“安慰剂”系统(D-PBS凝胶,不含FGF-18)进行频率扫描测试(图10a-c)。

[0150] 这些结果证实了已经观察到的当系统经稀释以载有GF的G'的下降,且FGF-18浓度的增加没有明显影响。

[0151] 实施例3:胶凝动力学研究

[0152] 胶凝动力学研究通过在给定时间间隔对37°C下的Deg-XG/水系统重复频率扫描来进行。绘制1Hz下的储存模量和损耗模量值与时间的关系图(图11)。

[0153] 尽管1重量%Deg-XG系统显示G'和G''随时间的稳定增加,其先增大再减小,所有其它系统显示研究的时间范围内两种复杂模量的组分的几乎恒定的值。这些结果与采用倾斜测试进行的流动性能的定性初步研究相一致。

[0154] 鉴于观察到的D-PBS和水系统之间的相似性,我们可假设这两种类型的凝胶具有相同的定性性能。

[0155] 实施例4:冻融和冻干作用

[0156] 为了收集一些关于Deg-XG凝胶的可能的贮存条件的信息,对于以4.4重量%在D-PBS中制备的系统,研究了冻融循环对于动态力学谱的作用。出于相同目的,评价了冻干和

重建的作用。在该最后情况中,材料从溶液(5°C的贮存温度)和凝胶状态(37°C条件下持续之后)(图12和13)冷冻干燥。

[0157]  $G'$ 和 $G''$ 在冻融后均增加,而5°C过夜(无搅拌)的D-PBS中的冻干和重建的趋向于 $G'$ 和 $G''$ 均减小的方向,无关材料的起始状态。这些结果均证明,有利于Deg-XG溶解的处理导致更强的凝胶,而有利于Deg-XG聚集的处理会降低凝胶强度。水性介质中的Deg-XG溶解是在37°C形成的网络的的质量的关键参数。

[0158] 实施例5:冷冻干燥的凝胶的扫描电子显微镜检。

[0159] 水中制备Deg-XG凝胶,通过将其浸入液氮(小瓶内)快速冷冻,并冷冻干燥,通过扫描电子显微镜分析(数据未显示)。所有系统均显示不规则的多孔性,其具有数十微米的较大空腔和仅数微米的较小空洞。增加聚合物的浓度,一般的效果是减小了较大空腔的尺寸。但无关该固有异质性,样品形貌十分均一。

[0160] 实施例6:膨胀-溶蚀研究

[0161] 对于4重量%和5重量%的Deg-XG/水凝胶的膨胀-溶蚀性能的初步研究在60天的时间标尺上进行。在37°C孵育之前和过程中对凝胶样品称重。 $W_s(t)$ 是时间 $t$ 时膨胀的样品的重量,而 $W_s(0)$ 是时间 $t=0$ 时样品的重量(表3)。60天之后,测试因霉菌生长而停止。对于两种系统, $W_s(t)/W_s(0)$ [%]随时间推移而缓慢减小。在经液氮速冻和冷冻干燥之后,对于溶蚀的凝胶进行SEM显微镜检(数据未显示)。溶蚀后,凝胶结构未崩塌,且多孔性变得更加均匀。此外,相比5重量%系统,4重量%系统的多孔性似乎更加开放且联通。

[0162] 对于载有540 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的FGF-18的4和5重量%Deg-XG/D-PBS凝胶重复膨胀-溶蚀实验(表4)。对于各系统, $W_s(t)/W_s(0)$ [%]随时间推移而缓慢减小,并且对于水中生成的系统而言相对越来越快速。这可能是PBS盐的直接作用,或者更可能是PBS影响高压灭菌后的聚合物分子结构的间接作用。释放介质中置放22天之后,对溶蚀的凝胶进行频率扫描测试,以评价其机械性质(图14a-d)。

[0163] 浸入释放介质22天后,剩余凝胶一般显示较高的储存模量 $G'$ 和损耗模量 $G''$ 值,因此表明网络趋向于更强结构的重排,这伴随着材料的较少交联的部分的溶蚀。仅载有54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的FGF-18的5重量%Deg-XG显示相反趋势。

[0164] 实施例7:凝胶溶蚀/蛋白质释放的研究

[0165] 该研究对于pH 7.3的PBS中制备的4重量%Deg-XG进行。对在24小时、48小时和7天后收集的接受相进行Biacore和RP-HPLC分析(数据未显示)。RP-HPLC分析未显示归因于FGF-18突释的明显的色谱峰。还对相同接受相进行Biacore分析。类似地,没有检测到FGF-18。这表明,在观察阶段,蛋白质被捕获于凝胶基质中。

[0166] 实施例8:细胞增殖试验

[0167] 8.1.细胞增殖的Alamar Blue试验

[0168] 如下进行细胞增殖的Alamar Blue试验(5000个软骨细胞/孔):采用培养在Deg-XG水凝胶(以3.3重量%)上的软骨细胞,所述水凝胶未加载(对照)或加载有三种不同浓度的FGF-18:54 $\text{mcg}/\text{ml}$ 、6.7 $\text{mcg}/\text{ml}$ 、6.7 $\text{ng}/\text{ml}$ 。包括对照系统(Deg-XG凝胶,不含FGF-18)在内的全部系统显示随时间推移的显著细胞增殖(参见图15)。生长因子的存在不影响前8天中的增殖率,而对于延长的孵育时间,其使增殖率稍有提高。在研究的生长因子浓度范围内没有观察到FGF-18浓度的影响。

[0169] 8.2.用于凋亡评价的吖啶橙染色

[0170] 对在加载和未加载FGF-18的Deg-XG水凝胶上培养12天的细胞(用吖啶橙染色后)进行共聚焦显微镜分析。吖啶橙是细胞穿透性核酸结合染料,其在结合至双链DNA时发出绿色荧光,且在结合至单链DNA或RNA时发出红色荧光。该染色区分活的(绿核)和凋亡(红核)细胞。如图16所示,圆形核周围的绿色指示,在FGF-18存在或不存在的条件下,细胞均未经历DNA破坏。

[0171] 8.3.光学显微镜研究与孵育时间和FGF-18加载含量的关系

[0172] 对加载和未加载FGF-18的Deg-XG凝胶上的软骨细胞增殖进行时间长度为7天的光学镜检。生长因子的加载含量在6.7ng/mL-54ug/ml范围。观察到,在所有系统中,软骨细胞开始成簇。当凝胶载有较低浓度(6.7ng/ml和6.7mcg/ml)的FGF-18时,软骨细胞在孵育48小时之后移动离开簇,定殖在支架的其它部分上(数据未显示)。

[0173] 8.4.通过共聚焦显微镜进行细胞侵入研究。

[0174] 对于孵育4天后的Deg-Xg+FGF 6.7mcg系统,对取自水凝胶样品(总体厚度约2mm)的210 $\mu$ m厚的层的不同部分进行共聚焦显微镜分析。细胞用溴化乙锭(红色)染色。结果显示软骨细胞贯穿材料的厚度而存在。由于细胞的接种是在水凝胶表面上进行的,细胞在贯穿厚度的不同位置的存在表明增殖的细胞可到达凝胶的内层(数据未显示)。

[0175] 实施例9:壳聚糖凝胶的制备

[0176] 9.1.概述

[0177] 对于壳聚糖制剂的筛选,聚合物液体溶液的制备采用三种不同壳聚糖:高分子量(HMW)的95%脱乙酰度(DD),低MW(LMW)的95%DD,和高MW(HMW)的75%DD。聚合物液体溶液通过如下方式制备:在5 $^{\circ}$ C或25 $^{\circ}$ C,在剧烈搅拌下,向0.1N的乙酸溶液逐渐添加壳聚糖。计算聚合物的量,其具有聚合物液体溶液中的1重量%、1.5重量%或2重量%的终聚合物浓度。一旦壳聚糖完全溶解,即在搅拌下添加milliQ水中浓度为10mM、100mM或500mM的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液,以具有聚合物液体溶液中的1mM、10mM或50mM的终浓度。最终,添加浓度为milliQ水中20重量%的 $\beta$ -甘油磷酸盐( $\beta$ -GP)溶液,以调节最终液体溶液的pH至6.0、6.5或7.0的值。对于接受的制剂,聚合物液体溶液中的 $\beta$ -GP的终浓度是0.5重量%-7重量%。并非总是能够达到所需的pH值,因为需要过高的量的 $\beta$ -GP,超过了350mOsm/Kg的目标渗透压度值或已在室温下获得了凝胶。可用时,使聚合物液体溶液在37 $^{\circ}$ C孵育直至凝胶形成。检测筛选的全部制剂的渗透压度,弃去渗透压度高于350mOsm/Kg的制剂,即,终 $\beta$ -GP浓度高于2.5重量%的制剂。

[0178] 9.2.安慰剂制剂的初步筛选(参见表5):

[0179] 报告壳聚糖能够随温度变化经历溶液-凝胶转变,但该过程受聚合物分子量(MW)、其脱乙酰度(DD)、溶液中的聚合物浓度、温度、时间和聚合物溶解过程中的混合速度、溶液的终pH和其它赋形剂的存在的高度影响。

[0180] 因此,需要对于不同可能的组合进行彻底筛选。应注意,壳聚糖仅可冗余酸性pH的水中。升高的pH会导致其聚集和沉淀。克服该问题的一种方式是采用 $\beta$ -GP,以增加pH同时维持溶液中的壳聚糖。

[0181] 本研究先着重于75%DD的HMW壳聚糖。在0.1N盐酸中制备若干聚合物液体溶液,终壳聚糖浓度从1重量%-2.5重量%不等,终 $\beta$ -GP浓度为1.6重量%-50重量%(1.6、5、5.6、8、30、50%)、不同赋形剂,即胶质、葡萄糖胺、透明质酸、羟基-乙基纤维素、羧基-甲基纤维素、

海藻糖,和从6.0到7.0的不同终pH值。据报道,这些赋形剂在诱导凝胶形成中起作用(Cheng等,2010;Schuetz等,2008;Yan等,2010)。

[0182] 筛选的制剂中仅一种能够在37℃孵育5分钟之后形成凝胶,但β-GP的量高于8重量%,其在文献中报道为上限,高于其的浓度记录为具有细胞毒性(Ahmadi等,2008)。因此,如下制剂全部在考虑该限制的情况下制备。所述筛选持续移向具有较高DD值的壳聚糖。第一试验基于95%DD的LMW壳聚糖。聚合物溶液均在0.1N盐酸中制备,在剧烈搅拌下于5℃或25℃溶解聚合物。

[0183] 聚合物完全溶解之后,添加其它赋形剂,仅在结束时添加β-GP。β-GP负责增加pH值,然后促进胶凝过程。第一试验着重于仅基于具有不同组合的相对浓度的壳聚糖和β-GP的配方。观察到,采用高浓度的壳聚糖(2%或3重量%)和高浓度的β-GP(8重量%),已经在室温下出现凝胶,并且在一些情况中,于5℃下也如此。

[0184] 降低组分的浓度,制剂在37℃下长期孵育后仍残余液体。仅在一例中,记录到凝胶的形成,但在37℃孵育2小时之后,对于该研究的目的而言时间过长。因此,必需添加赋形剂来改善该制剂。选择羟基-乙基纤维素(HEC)作为最合适的赋形剂,并进行进一步筛选。在该评价过程中,壳聚糖浓度为1.5重量%-2重量%,且起始HEC浓度为0.5重量%,但在这些条件中,聚合物溶液甚至能在室温下于添加β-GP过程中变为凝胶,如果其浓度高于1.8重量%。能够在37℃孵育13分钟之后变为凝胶的液体溶液可采用如下组成获得:1.5重量%的壳聚糖、0.5重量%的HEC和1.7重量%的β-GP。

[0185] 9.3. 制剂的优化(参见表5)

[0186] 为了改善该制剂,进行如下试验,将β-GP的浓度几乎恒定地保持在1.65-1.7重量%的值,壳聚糖浓度从1.5重量%到1.8重量%不等,且HEC的量逐渐降低至多至0.1重量%。

[0187] 采用该策略选择若干候选制剂。然而,该研究并没有在这一方向上继续,因为发现HEC赋形剂可能包含污染物(据报道具有细胞毒性),并且,另一方面,造成壳聚糖存在下的胶凝过程的调节(Hoemann等,2007)。先前实验中测试的其它赋形剂,例如胶质或葡萄糖胺,未产生积极结果。

[0188] 然后开始最终的筛选工作,采用三种壳聚糖聚合物,其在分子量和DD上有差异:75%DD的HMW壳聚糖,95%DD的HMW壳聚糖和95%DD的LMW壳聚糖。计划采用85%DD的LMW壳聚糖进行该研究,但该物质并没有在研究结束之前获得。在该研究中,以三种固定浓度1、1.5和2重量%测试了各壳聚糖,并且制备聚合物溶液以具有6.0、6.5和7.0的终pH值。为了减少所用β-GP的量以增加溶液的pH值,将聚合物溶解于0.1N乙酸,而不是先前实验所用的0.1N HCl。还监测最终溶液的渗透压度并保持在低于约350mOsm/kg的值。因此,弃去需要过高量的β-GP以达到所需pH值并且还导致过高的渗透压度值的制剂。在这些筛选测试中,还研究了离子强度的贡献,因为据报道,盐的存在可能会对胶凝过程有积极贡献(Filion等,2007)。

[0189] 由于必须避免钠盐以避免其与蛋白质可能的相互作用,选择KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>并添加至聚合物溶液至终浓度为1mM、10mM或50mM。75%DD的壳聚糖没有产生积极结果,因此完全弃之。95%DD的HMW壳聚糖产生积极结果:高于1重量%的壳聚糖浓度需要过高量的β-GP以达到固定的pH值,超过了目标渗透压度值,和1重量%的制剂无法在37℃形成凝胶。采用具有95%



DD的LMW壳聚糖选择了两种候选制剂,因为其在37°C经历溶液-凝胶转变,但这些聚合物溶液的制备是完全不可再现的。事实上,观察到获得凝胶所需的时间和聚合物液体溶液的物理宏观特点显著变化,取决于溶解聚合物花费的时间、聚合物溶解过程中和赋形剂混合过程中混合的速度,和,最后基于温度和制备的溶液的体积。

[0190] 结果中的这一高可变性导致决定中断对于该聚合物的研究。

[0191] 表1:Deg-XG/水系统的可注射性和倾斜性能测试数据

[0192]

浓缩 (重量%)	可注射性		倾斜性能			
	注射时间 (秒/mL)	注射器中的 剩余量 (%)	5分钟	30分钟	60分钟	24小时
1	3.5	6.8	流动	流动	流动	流动
2	5.5	5.1	流动	不流动	不流动	不流动
3	9.4	5.5	流动	不流动	不流动	不流动
4	14.7	7.9	不流动	不流动	不流动	不流动
5	15.2	15.6	不流动	不流动	不流动	不流动

[0193] 表2:载有54mcg/mL的FGF-18的3重量%和4重量%Deg-XG的可注射性数据

[0194]

系统	25°C的孵育时间 (小时)	注射时间(秒 /mL)	注射器中的剩 余量(%)
Deg-XG 3重量% + FGF-18	0	11.6	5.5

[0195]

(54 mcg/mL)	1	10.7	7.2
	2	13.0	7.3
	4	11.1	8.1
Deg-XG 4重量% + FGF-18 (54 mcg/mL)	0	13.2	6.4
	1	10.9	6.6
	2	19.5	9.7
	4	18.7	12.3

[0196] 表3:水中制备的Deg-XG系统的膨胀溶蚀数据

[0197]

系统	Ws(t)/Ws0(%)					
	1天	19天	27天	34天	45天	59天
Deg-XG 4重量 % H <sub>2</sub> O	106.6	90.1	80.7	78.8	75.8	71
Deg-XG 5重量 % H <sub>2</sub> O	96.4	86	78.5	75.8	69.8	66.2

[0198] 表4:载有54mcg/mL的FGF-18的Deg-XG系统(高压灭菌的)膨胀溶蚀数据

[0199]

系统	Ws(t)/Ws0(%)					
	5天	9天	14天	16天	19天	22天
Deg-XG 4重 量% + FGF18 540 mcg/mL	85.2	80.5	79.2	75.7	75	71.6
Deg-XG 5重 量% + FGF18 540 mcg/mL	84.8	81.3	80.5	78.1	75.1	74.8
Deg-XG 4重 量% + FGF18 54 mcg/mL	79.7	78.3	76.3	73.3	72.5	70.3
Deg-XG 5重 量% + FGF18	84.3	78.5	78.5	77	76.6	74.7

[0200]

54 mcg/mL						
-----------	--	--	--	--	--	--

[0201] 表5:选择的基于壳聚糖的制剂在37℃的胶凝时间

[0202]

制剂	壳聚糖 MW和 DD	壳聚糖 (重量 %)	B-GP (重量 %)	HEC (重量 %)	KH2P O4 (mM)	pH	渗透压 度 (mOsm/ kg)	胶凝时 间
I	HMW 75%	1.8	50	/	/	/	/	5分钟
II	HMW 75%	2	6.9	/	/	7.2	/	2小时
III	HMW 75%	2	1.2	0.5	/	6.1	/	25分钟
IV	HMW 75%	1.5	1.7	0.5	/	6.1	/	13分钟
V	HMW 75%	1.5	1.6	0.25	/	6.2	/	19分钟
VI	HMW 75%	1.6	1.6	0.25	/	6.3	/	30分钟
VII	HMW 75%	1.8	1.5	0.5	/	6.3	/	12分钟
VIII	HMW 75%	1.8	1.7	0.1	/	6.4	/	50分钟
IX	HMW 95%	1.0	2.5	/	0	6.8	384	24小时
X	LMW 75%	2.0	2.1	/	10	7.0	346	3小时
XI	LMW 75%	2.0	2.5	/	10	6.9	379	2小时

[0203] 参考文献

[0204] 1.Ellsworth等,2002,Osteoarthritis and Cartilage,10:308-320.

[0205] 2.Shimoaka等,2002,JBC 277(9):7493-7500

[0206] 3.W02008023063

- [0207] 4.W02004032849
- [0208] 5.W02012172072
- [0209] 6.Ringe,J.等(2012)风湿疾病再生医学-组织工程进展(Regenerative medicine in rheumatic disease-progress in tissue engineering),Nature Reviews Rheumatology,8(8):493-498.
- [0210] 7.J.K.Tessmar,A.M. Göpferich,2007,“组织工程中用于蛋白质递送的基质和支架(Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering)”,Adv Drug Delivery Rev.59:274-291.
- [0211] 8.C.Lo Presti等,2011,采用辐照交联的多肽水凝胶递送装置的搏动蛋白质释放和保护(Pulsatile protein release and protection using radiation-crosslinked polypeptide hydrogel delivery devices)Reactive&Functional Polymers,71:155-167.
- [0212] 9.W02008063418
- [0213] 10.C.Dispenza等,2011,“用于“原位”包封挥发性疏水化合物的微乳液-负载聚(N-乙烯基-2-吡咯烷酮)水凝胶的E束辐照和紫外光学交联(E-beam irradiation and UV photocrosslinking of microemulsion-laden poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)hydrogels for “in situ”encapsulation of volatile hydrophobic compounds)”,Polym.Chem.,2:192.
- [0214] 11.Rilton等,2011,“木糖葡聚糖的去半乳糖化:对于聚集和构造的影响,通过时间依赖性静态光散射HPSEC-MALLS和粘度测量法测定(Degalactosylation of xyloglucan: effect on aggregation and conformation,as determined by time dependant static light scattering HPSEC-MALLS and viscosimetry)”.Carbohydrate Polymers 83.
- [0215] 12.Shirakawa等,1998,“采用酶对木糖葡聚糖的性质进行调节(Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme)”Food Hydrocolloids 12.
- [0216] 13.W098/16644
- [0217] 14.W02006/063362
- [0218] 15.Custers等,2007,Osteoarthritis and Cartilage,15:1241-1248.
- [0219] 16.Cheng等,2010,Tissue Engineering 16A:695-703
- [0220] 17.Schuetz等,2008,Eur.J.Pharm.Biopharm.68:19-25
- [0221] 18.Yan等,2010,J.Biomater.Appl.24:625-637
- [0222] 19.Ahmadi等,2008,J.Biomed.Mater.Res.86A:824-832.
- [0223] 20.Hoemann等,2007,J.Biomed.Mater Res.83A:521-529
- [0224] 21.Filion等2007,Biomacromol.8:3224-3234

## 序列表

<110> 阿雷斯贸易股份有限公司(ARES TRADING S. A.)

<120> 木糖葡聚糖凝胶中的 FGF-18 制剂

<130> P 13/240

<150> EP 13199588.8

<151> 2013-12-24

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 人 FGF-18

[0001]

<400> 1

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp  
20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser  
35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys  
50 55 60

His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly  
65 70 75 80

Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln  
85 90 95

Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg  
100 105 110

Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val  
 115 120 125

Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala  
 130 135 140

Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg  
 145 150 155 160

Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys  
 165 170 175

Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr  
 180 185 190

Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala  
 195 200 205

<210> 2

<211> 170

<212> PRT

[0002]

<213> 人工

<220>

<223> 重组截短的 FGF-18(斯普弗明)

<400> 2

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

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
[0003]	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
	Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys		
	165	170	

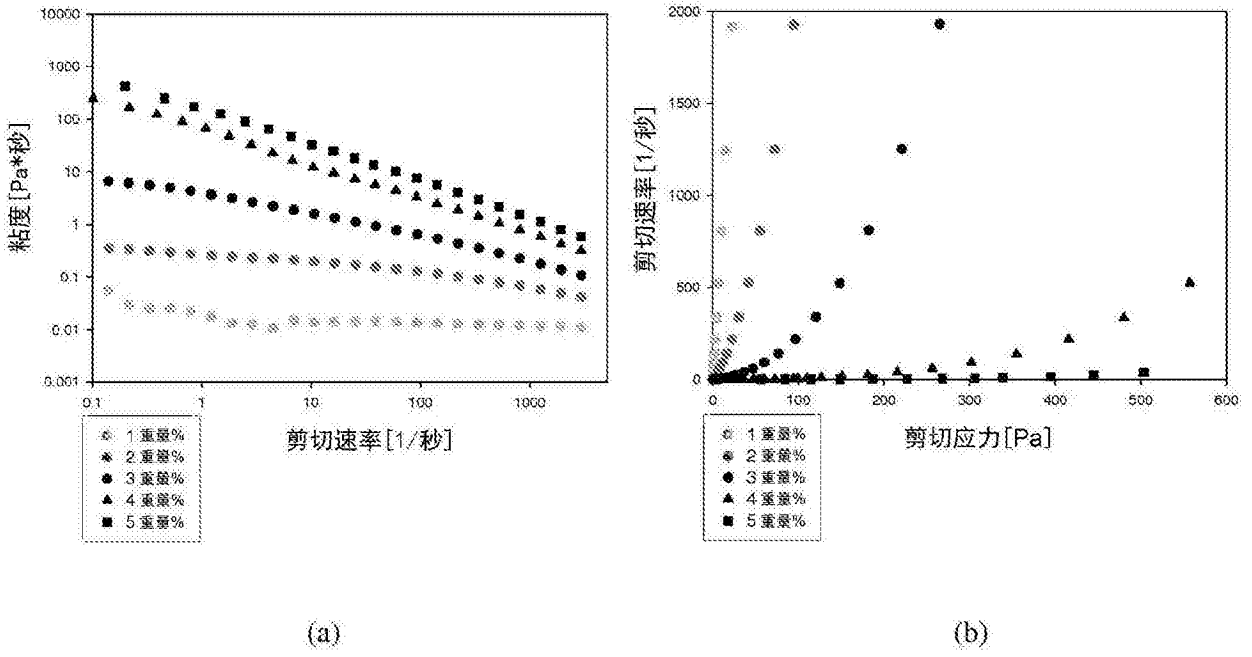


图1

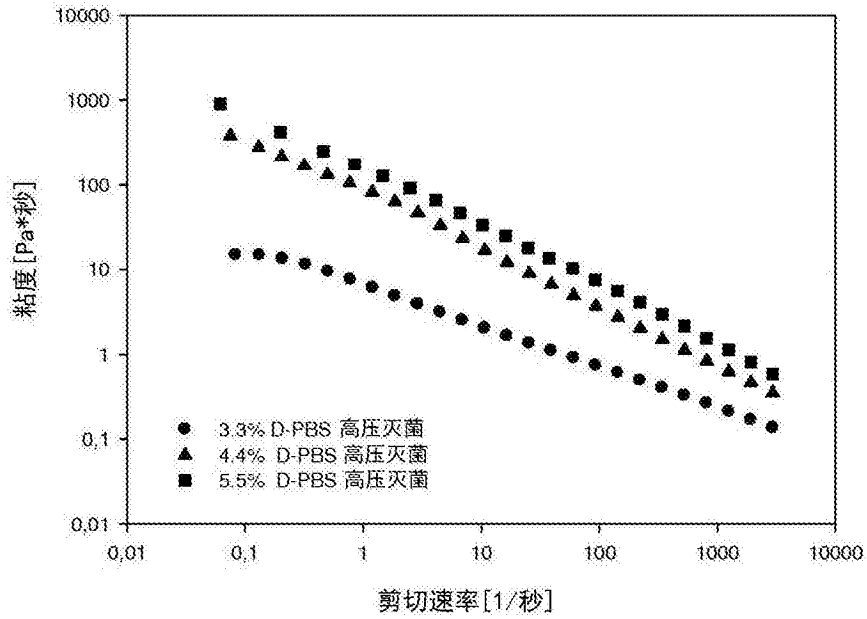


图2



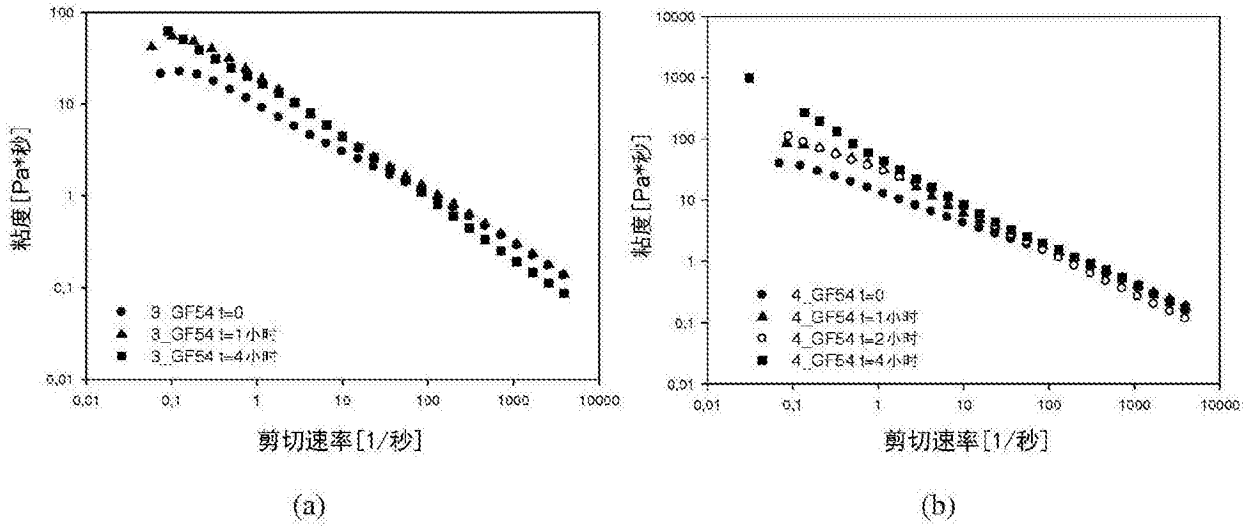


图3

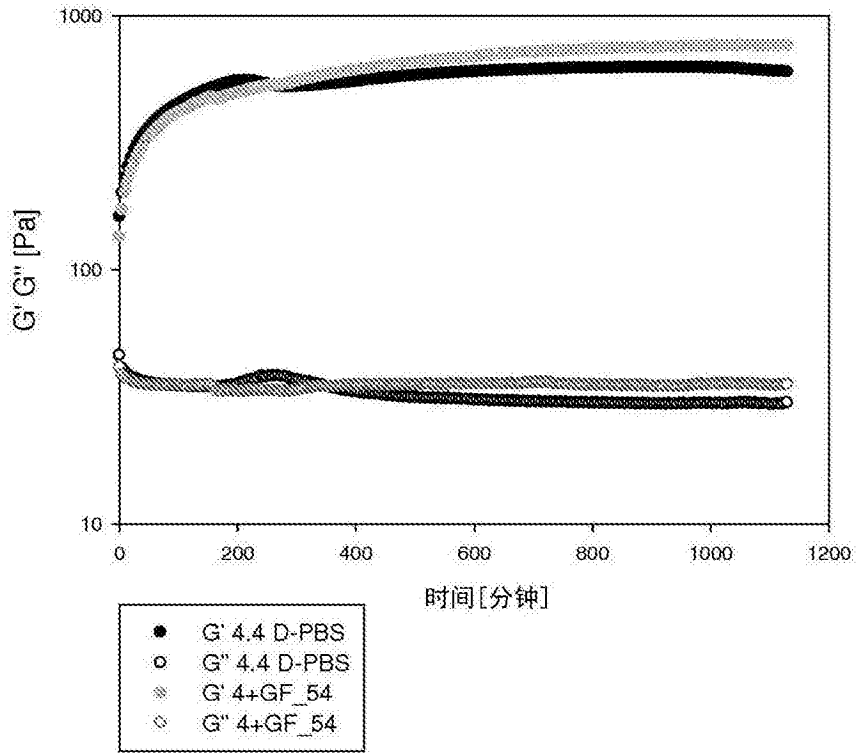


图4

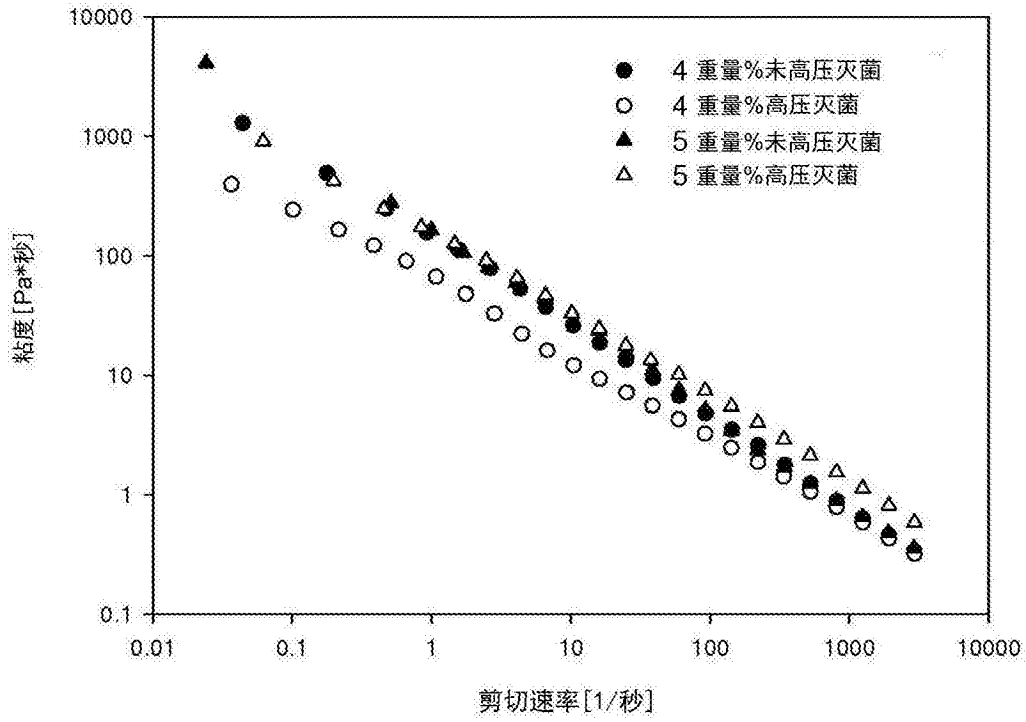


图5

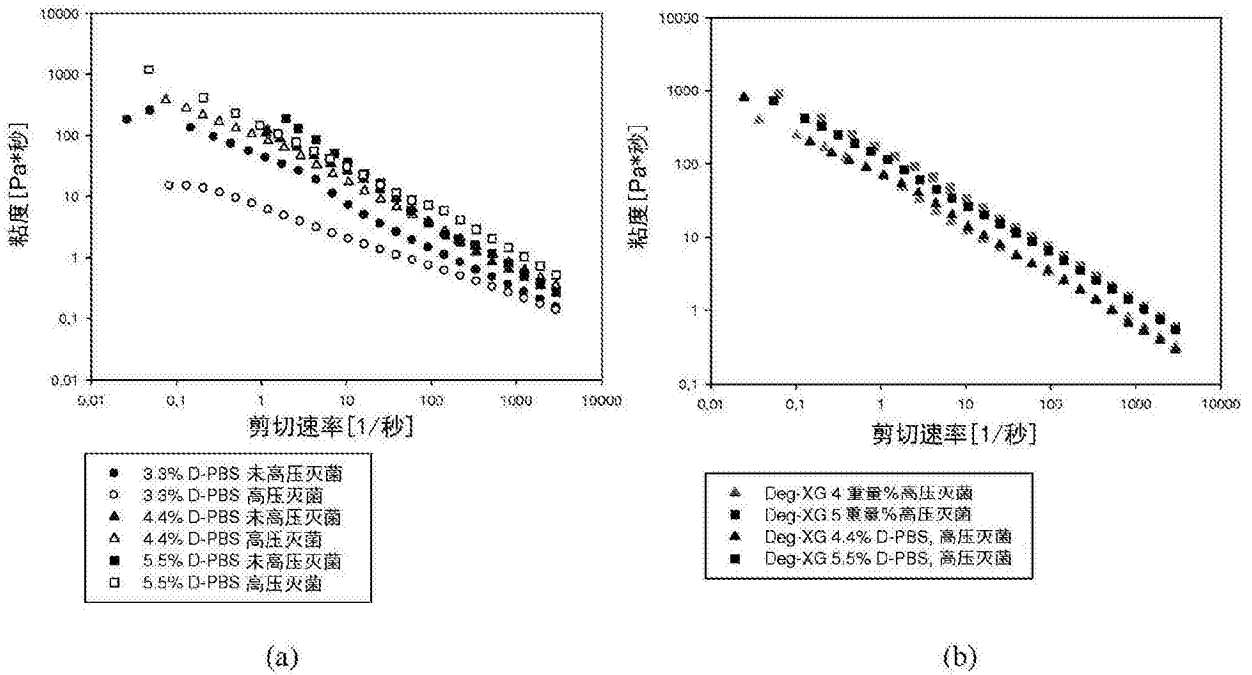


图6

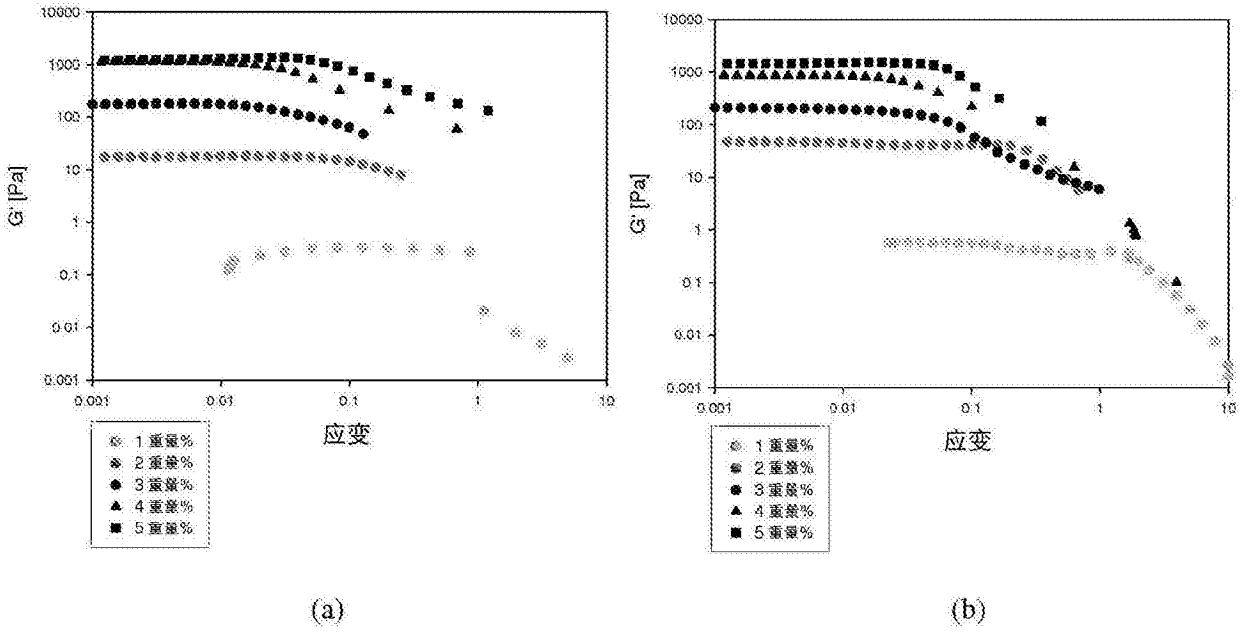


图7

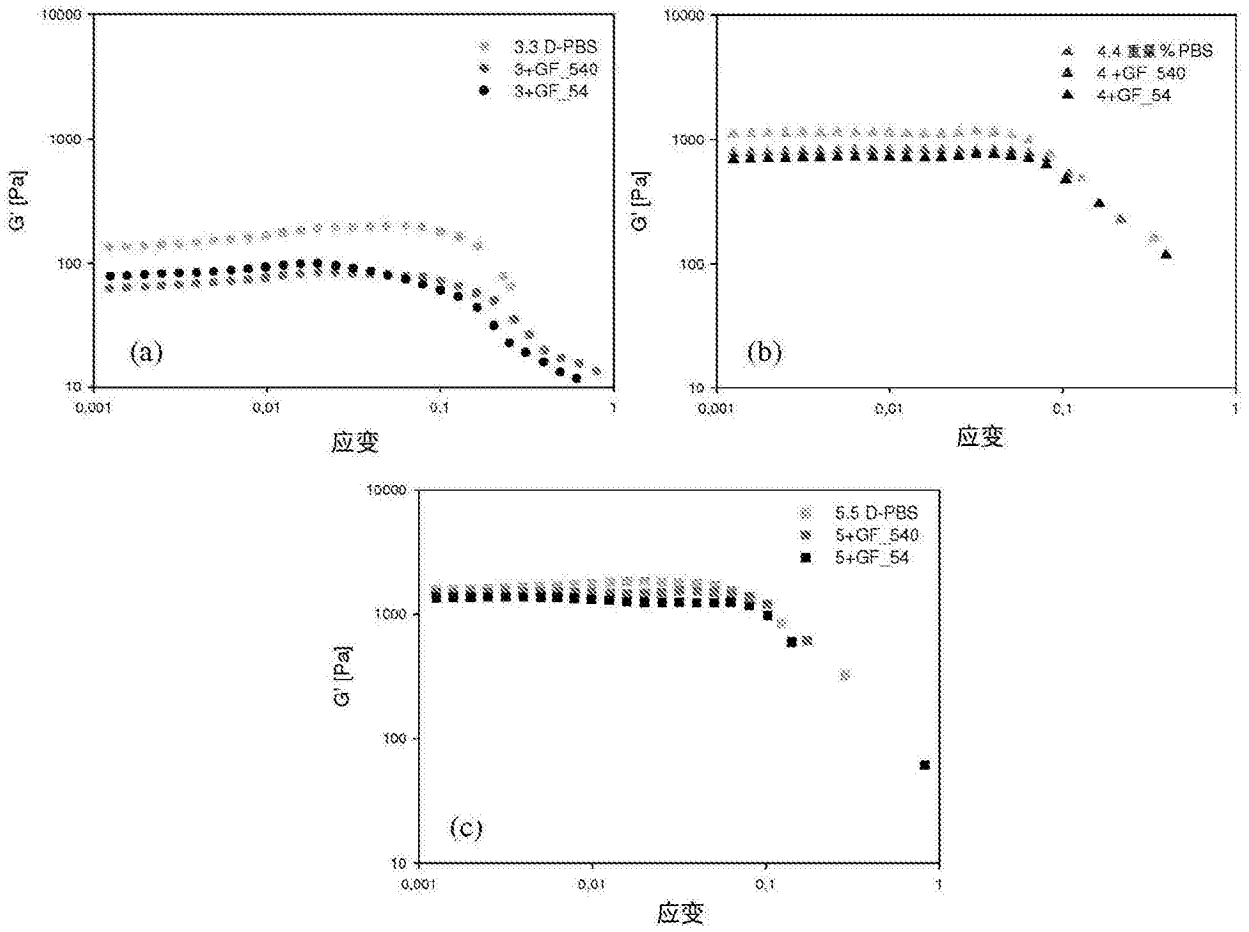


图8

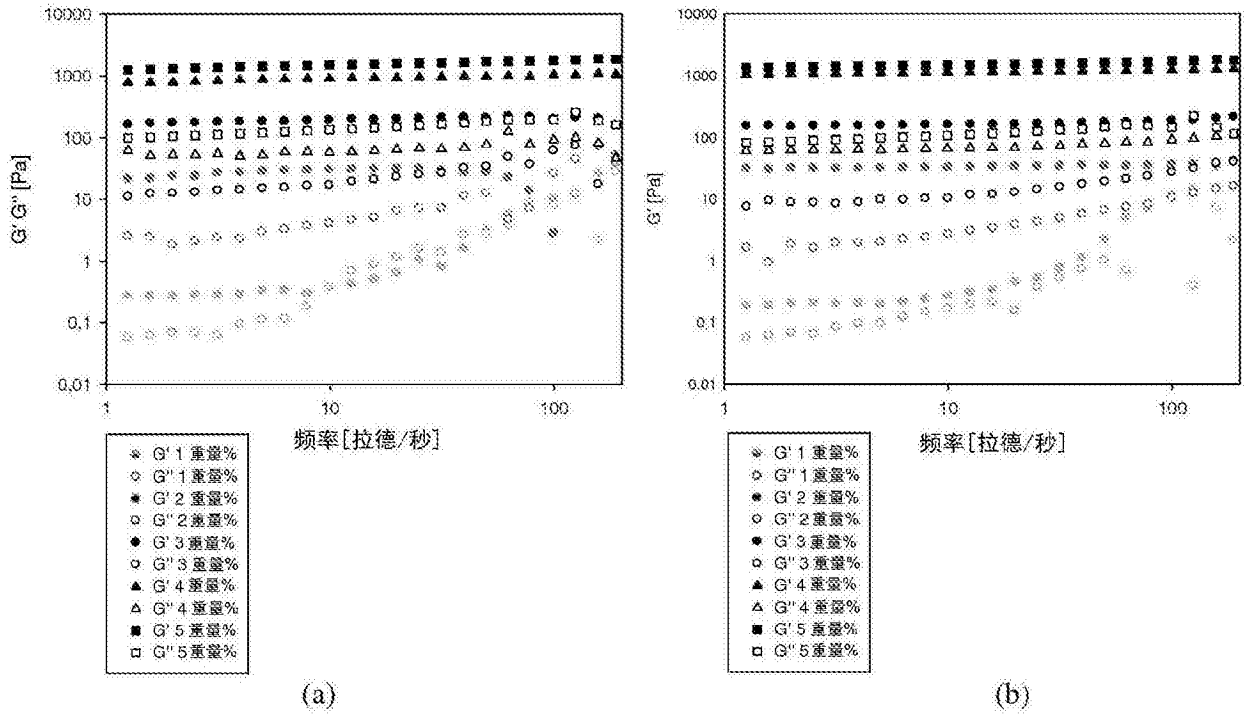


图9

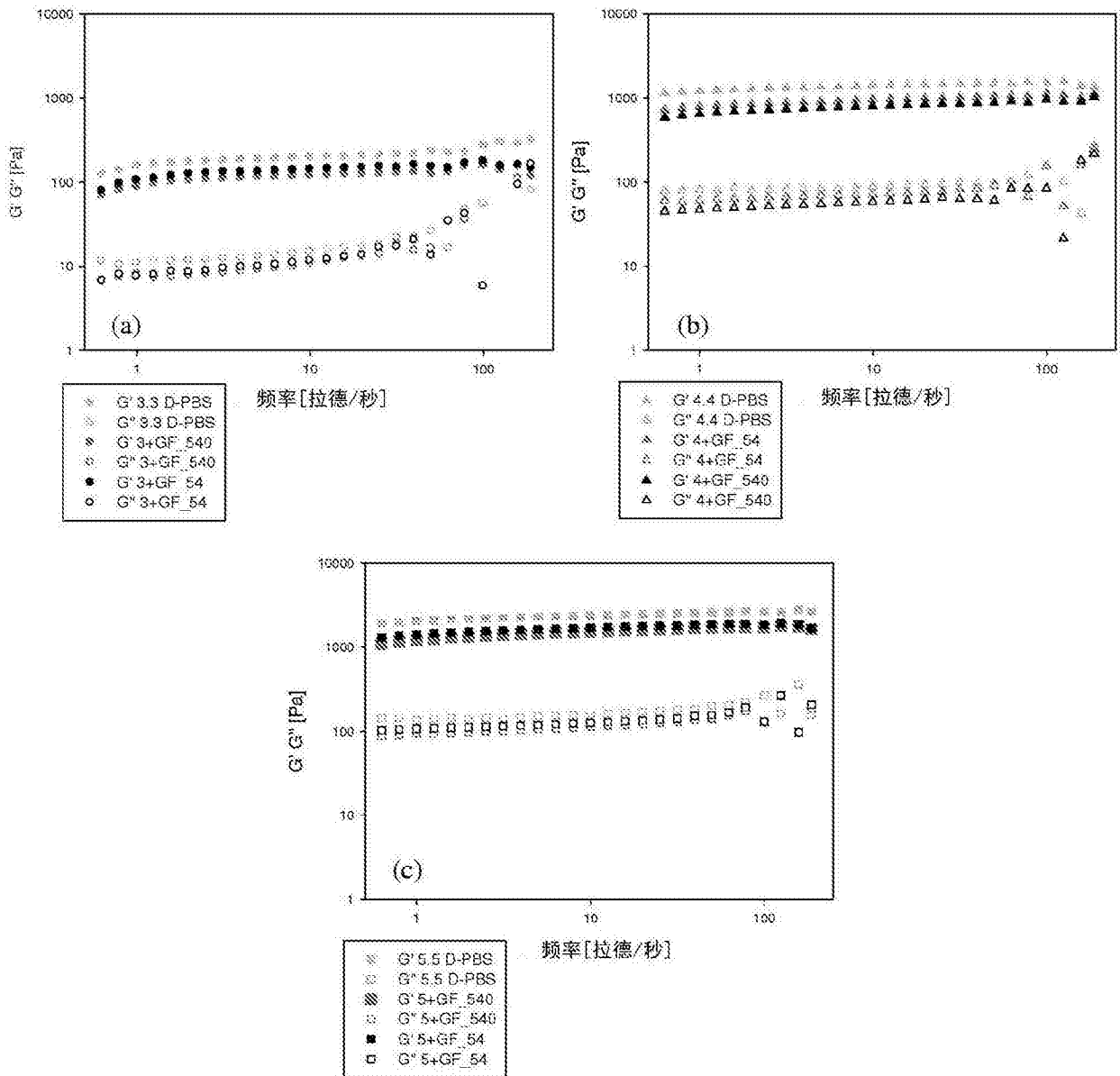


图10

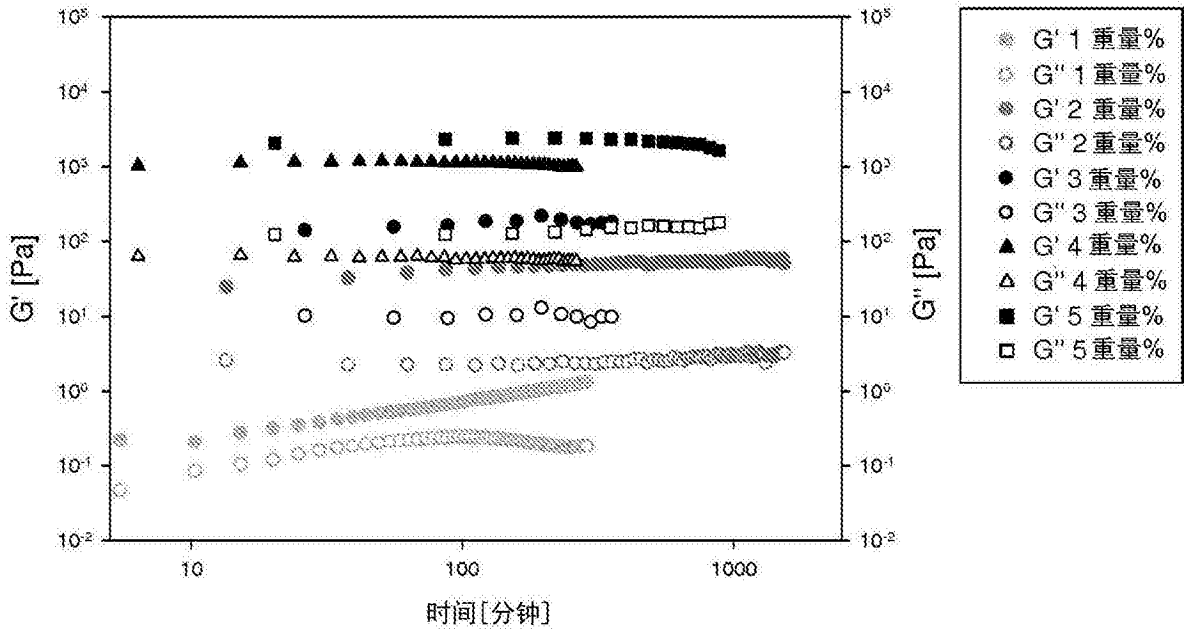


图11

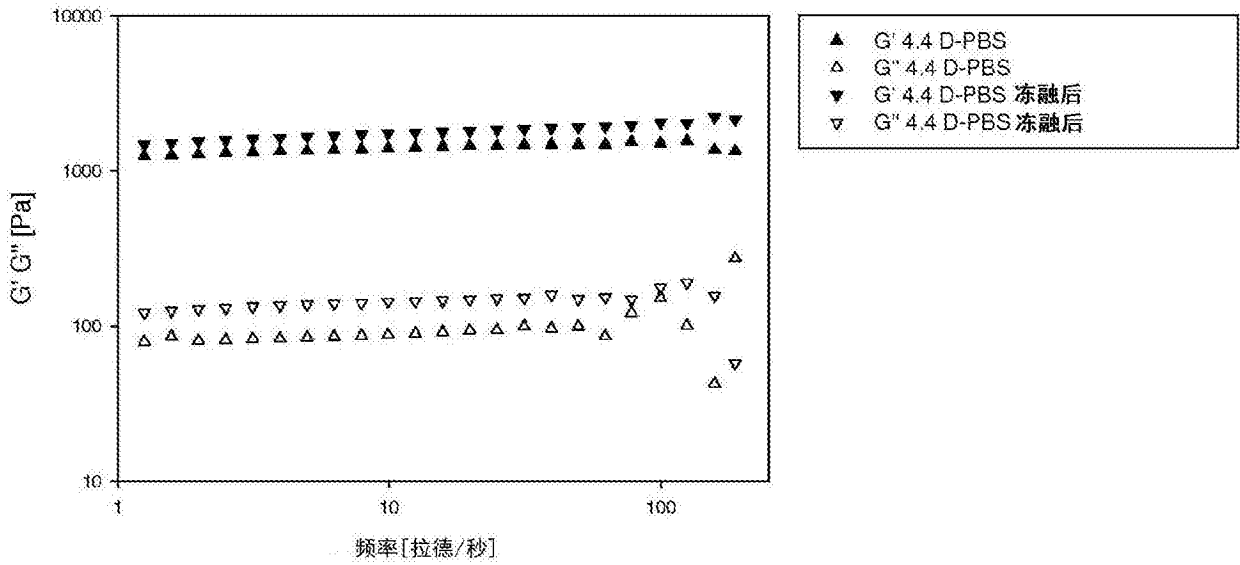


图12

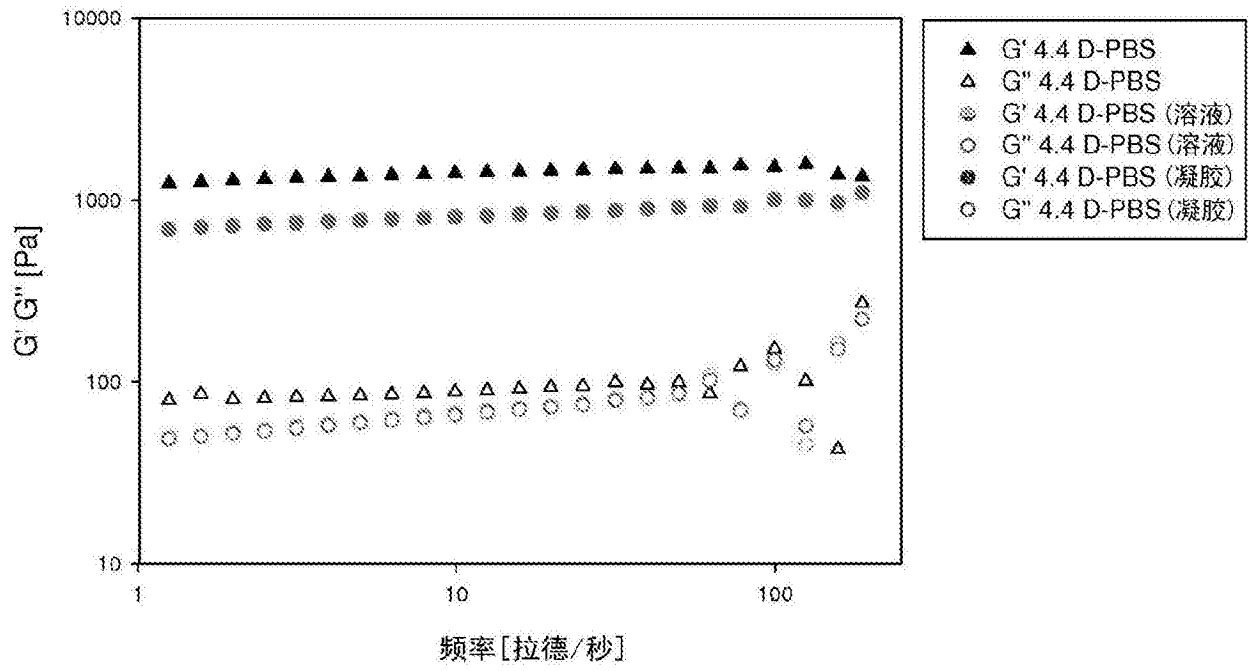
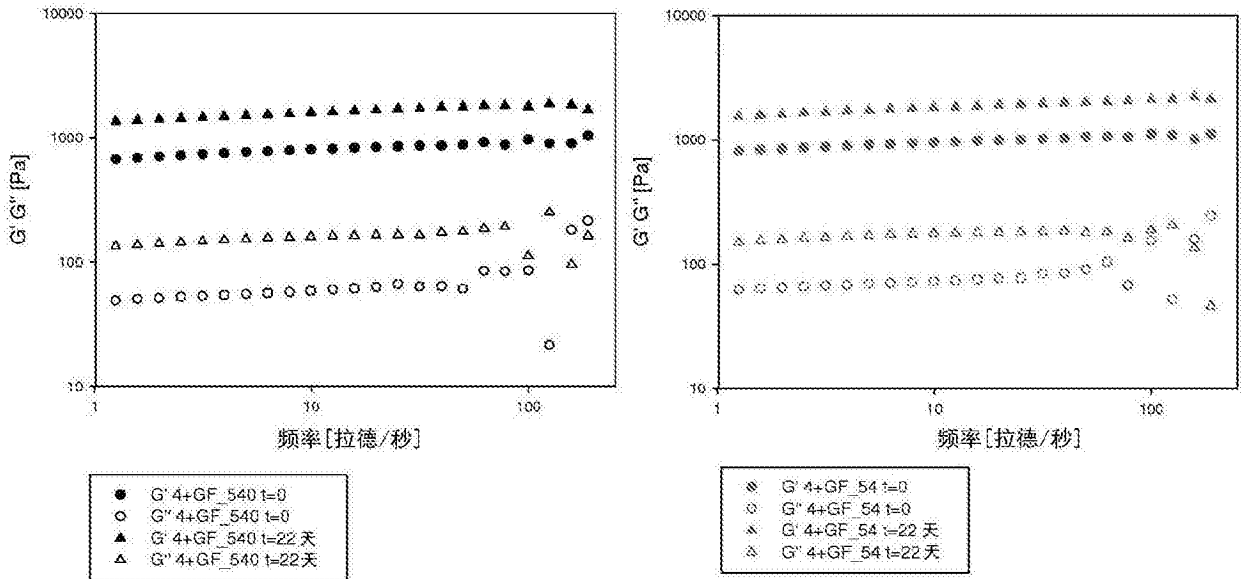
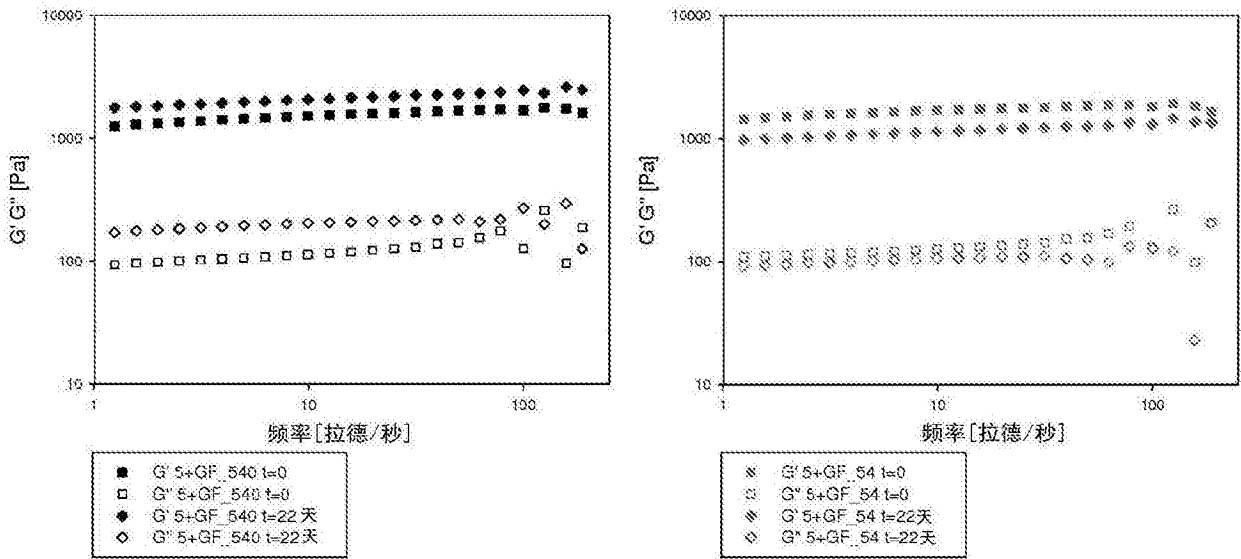


图13



(a)

(b)



(c)

(d)

图14



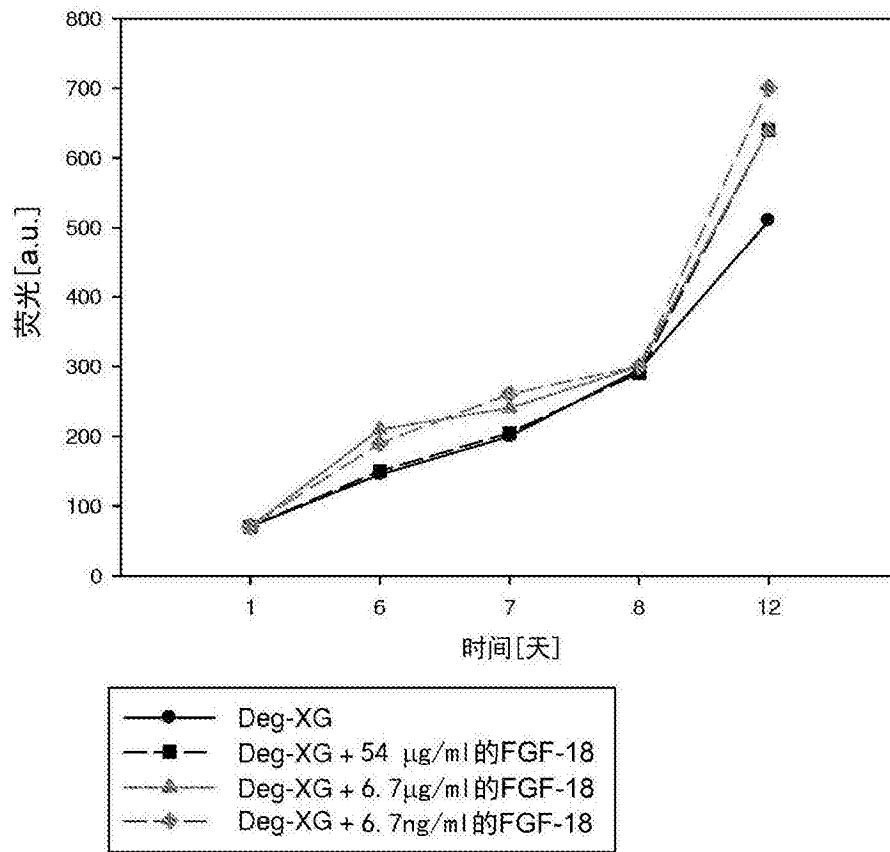


图15

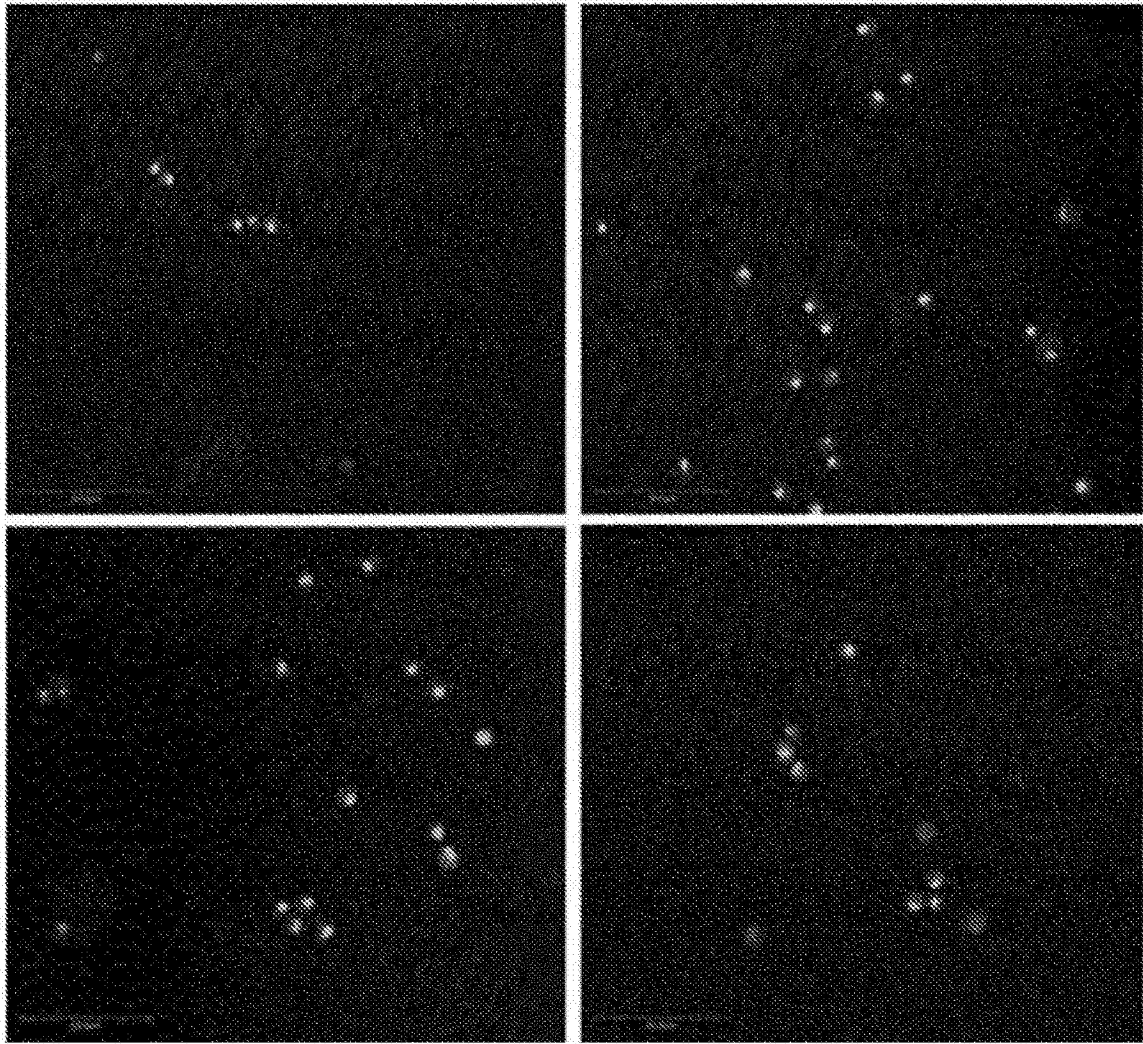


图16

**SEQ ID NO:1 (人 FGF-18)**

```

MYSAPSACTCLCLHFLLLCFQVQVLVAEENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRI SARGEDGDK
YAQLLVETDTEFGSQVRIKGGKETEYFLCMNRKGLVGGKPDGTSKECVFIEKVLNNY TALMSAKYSGWYVGF TKGGRPRKGFK
TRENQDVFHFMKRYPKGQPELQKPFKYITVTKRSRRIRPThPA

```

图17a

**SEQ ID NO:2 (斯普弗明)**

```

MEENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRI SARGEDGDKYAQLLVETDTEFGSQVRIKGGKETEYFL
CMNRKGLVGGKPDGTSKECVFIEKVLNNY TALMSAKYSGWYVGF TKGGRPRKGPKTRENQDVFHFMKRYPKGQPELQKPFK
YITVTK

```

图17b