



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118317781 A

(43) 申请公布日 2024.07.09

(21) 申请号 202280067429.5

(22) 申请日 2022.08.09

(30) 优先权数据

2021902450 2021.08.09 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2022/050866 2022.08.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/015341 EN 2023.02.16

(71) 申请人 古内什·波塔伊尔·拉詹

地址 瑞士乌德利根斯维尔

(72) 发明人 林李永 古内什·波塔伊尔·拉詹

利亚·蕾妮·贝宁顿

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理

有限公司 51258

专利代理师 卢兴旺

(51) Int.Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 47/18 (2017.01)

A61K 47/38 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

权利要求书2页 说明书54页 附图26页

(54) 发明名称

用于伤口愈合的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及包括成纤维细胞生长因子2的稳定组合物。本发明还涉及通过向有此需要的患者给药该组合物来治疗包括鼓膜穿孔的伤口的剂型和方法。

1. 一种组合物,包括:(1)成纤维细胞生长因子2 (FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合物,

其中,所述组合物进一步包括:

- (a) 氨基酸;
- (b) 血清白蛋白;或
- (c) 氨基酸和血清白蛋白。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述纤维素基聚合物是甲基纤维素(MC)。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的组合物,其中,所述组合物选自由以下组成的组:药物组合物;化妆品组合物;和兽药组合物。

4. 根据前述权利要求中任一项的组合物,其中,所述FGF-2的类似物或变体与人FGF-2具有选自由以下组成的组的氨基酸序列同源性:至少75%序列同源性;至少80%;至少85%;至少90%;至少95%;至少96%;至少97%;至少98%;和至少99%。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述氨基酸是丙氨酸。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述血清白蛋白是人血清白蛋白。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述FGF-2以选自由以下组成的组的浓度存在:1ng/ml至5mg/ml之间;10ng/ml至2mg/ml之间;100ng/ml至1mg/ml之间;200ng/ml至800ng/ml之间;

和770ng/ml。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述MC以选自由以下的浓度存在:0.01%至10%之间;0.01%至5%之间;0.01%至1%之间;和0.05%w/v。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述丙氨酸以选自由以下组成的组的浓度存在:1至500mM之间;和10至100mM之间。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述血清白蛋白以选自由以下组成的组的浓度存在:0.1至100mg/ml之间;0.5至50mg/ml之间;和1mg/ml至10mg/ml之间。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述组合物是水性溶液。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述组合物适合于伤口愈合。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述组合物适合于组织生长和修复。

14. 一种剂型,所述剂型包括权利要求1至13中任一项所述的组合物。

15. 一种用于治疗伤口的方法,所述方法包括向有此需要的患者给药治疗有效量的权利要求14所述的剂型。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述伤口选自由鼓膜穿孔和慢性鼓膜穿孔组成的组。

17. 一种装置,所述装置包括根据权利要求1至13中任一项所述的组合物和伤口愈合支架。

18. 根据权利要求17所述的装置,其中,所述伤口愈合支架包括藻酸钠。

19. 一种组合物在制备用于治疗伤口的药物中的用途,其中,所述组合物包括:

(1)成纤维细胞生长因子2 (FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合物,并且其中,所述组合物进一步包括:

- (a) 氨基酸;
- (b) 血清白蛋白;或
- (c) 氨基酸和血清白蛋白。

20. 一种用于稳定FGF-2的方法,所述方法包括制备根据权利要求1至13中任一项所述的组合物。

用于伤口愈合的组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及包括成纤维细胞生长因子2的稳定的组合物。本发明还涉及通过向有此需要的患者给药该组合物来治疗伤口(包括鼓膜穿孔)的剂型和方法。

背景技术

[0002] 以下对背景技术的讨论仅旨在促进对本发明的理解。该讨论并不确认或承认所提及的任何材料是或曾经是截至本申请的优先权日的公知常识的一部分。

[0003] A. 鼓膜穿孔

[0004] 据报道,在儿童中,慢性中耳感染是轻度至中度听力损伤的主要原因,其中鼓膜(TM)穿孔是感染的常见共病或后遗症。

[0005] TM是将外耳道与中耳分开的薄的锥形膜。它是一种独特的结构,悬挂在两个充满空气的空腔之间,其由两个独特的区域——松弛部(pars flaccida)和紧张部(pars tensa)组成。

[0006] TM穿孔是TM中的洞或撕裂。TM穿孔可根据位置、是否存在引流以及愈合时间进行分类。由于愈合过程的性质,急性创伤性穿孔最有可能自发愈合,据报告,高达90%的病例会在4周内完全闭合。相反,慢性TM穿孔示出的自发闭合率非常低,并且通常需要手术干预来实现闭合。

[0007] 膜的破裂可能是由感染或创伤引起的。中耳感染(中耳炎)是TM穿孔的最常见原因之一。感染介导的穿孔在儿童、发展中国家和发达国家的社会经济地位较低的人群中更为常见。由于感染,中耳渗出物积聚,对耳膜施加压力,引起其向外凸出。TM的中心区域可能会缺血,增加穿孔的风险。单纯性中耳炎引起的穿孔通常很小,并且在感染消退后表现出高自发愈合率,持续感染是穿孔未消退的最常见原因。

[0008] 创伤是TM穿孔的另一个常见原因。膜的创伤可能是由压力变化(气压性损伤)引起的,其中,中耳的气压和环境气压不平衡。这种类型的创伤通常是由于航空旅行、水肺潜水或头部直接打击而发生的。据报道,将异物诸如棉签或发夹型物等插入耳朵会引起TM穿孔,严重的头部创伤也会导致这种情况。头部严重损伤可能会导致中耳和内耳结构脱位或伤害,从而引起TM破裂。在极少数情况下,大声或爆炸(声创伤)也可能引起TM穿孔。30°C时,在195至199dB之间的音量下,TM可能会发生声穿孔,频率较低时需要较高的声压。

[0009] 鼓膜造孔术(咽鼓管)管的插入在TM中人为地产生孔。移除这些管后,由于穿孔边缘周围疤痕组织积累,TM可能不会自发愈合,并且穿孔可能会持续存在。热、腐蚀物、闪电和水上运动也可能诱导穿孔,这些原因表明自发闭合的发生率最低。据认为,这些穿孔不太可能自然愈合,因为热凝作用对膜的脉管系统造成了微观伤害,最终导致坏死。

[0010] 在大多数创伤性穿孔(>90%)中,TM通常在几周内自发愈合。自发愈合的过程始于穿孔边缘处渗出物的分泌。这可以保护受损组织免于脱水,并为新细胞的迁移提供支持。鳞状上皮细胞在几天内增殖并迁移至穿孔部位。固有层是恢复最慢的层。

[0011] 穿孔的闭合遵循TM上皮迁移的自然模式。这种愈合模式从穿孔边缘的中心部分开

始并持续到周边。穿孔后,整个紧张部的有丝分裂活动增加,特别是在鼓环(annulus)周围和锤骨的柄附近。此后不久,这种有丝分裂活动已被证明延伸至穿孔边缘。

[0012] 穿孔后的尺寸和时间是愈合时间的指标,因为穿孔存在的时间越长,其自然愈合的可能性越小,尽管已记录自发愈合晚至穿孔后10个月发生,较大穿孔与小穿孔相比,愈合时间更长。有人认为,穿孔的尺寸和形状也可能与愈合速度相关,研究发现,大的肾形穿孔在不进行手术干预的情况下最不可能愈合。众所周知,年龄、营养状况和免疫是皮肤伤口愈合的重要因素,并且因此,这些因素很可能也会影响TM伤口愈合。

[0013] 慢性TM穿孔通常以炎症为特征,炎症可以是局部的或扩散到整个固有层,并且与膜中存在的炎症细胞数量增加有关。还观察到慢性TM穿孔的细胞组织和组成的变化,特别是在穿孔的边界处,其中外部鳞状上皮延伸向穿孔边界的内表面或终止于穿孔边界处。由于角质形成细胞的正常迁移受到干扰,同一区域可能被一层较厚的角蛋白覆盖。这导致穿孔边缘变厚,与30-90 μm 的正常膜厚度相比,测量的平均厚度为114 μm 。人们认为,这种增厚和细胞紊乱可能是慢性TM穿孔无法自发愈合的促成因素。

[0014] 大的或慢性的TM穿孔目前通过侵入性手术干预诸如鼓膜成形术或鼓室成形术来处理。两种手术均使用自体、同源或异种移植材料诸如筋膜或脂肪来修复穿孔。鼓室成形术还包括听小骨(ossicle)的修复。尽管这些手术的成功率可能很高(高达94%),特别是对于小穿孔,但结果通常高度依赖于外科医生的技能。此外,这些手术需要患者进行全身麻醉,非常耗时,需要复杂且昂贵的手术设备和装置,通常需要额外的切口来收获移植材料,并且所得的膜通常在声学上不是最佳的并且容易再次穿孔。在某些情况下,需要采取多种干预措施以取得良好的结果。因此,迫切需要具有成本效益、侵入性较小且更可靠的治疗替代方案,特别是在澳大利亚,偏远原住民社区可能有大量TM穿孔未得到治疗。

[0015] B. 成纤维细胞生长因子(FGF-2)

[0016] 伤口愈合期间的组织形成需要细胞向伤口部位的协调运动。化学引诱物被定义为诱导细胞向自身迁移的化学剂。化学引诱物通常是生长因子、细胞因子和趋化因子家族的成员。细胞运动可以响应于化学引诱物的存在而通过趋化作用(chemotaxis)或化学促活作用(chemokinesis)而发生。趋化作用是细胞朝向或远离化学梯度的运动。被化学梯度吸引的细胞表现出正趋化作用,而被排斥的细胞则表现出负趋化作用。因此,趋化作用描述了细胞的定向运动。另一方面,化学促活作用用于描述细胞响应化学引诱物的存在而发生的随机运动。

[0017] 碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)是内源性18kDa肝素结合蛋白。它是由FGF2基因编码的生长因子和信号转导蛋白。它主要合成为155个氨基酸的多肽,产生18kDa的蛋白。它促进细胞增殖、迁移和分化,以及多种组织中的血管生成,包括皮肤、血管、肌肉、脂肪、肌腱/韧带、软骨、骨、牙齿和神经。此外,FGF-2促进一系列细胞类型(包括内皮细胞、上皮细胞、前脂细胞、成纤维细胞和干细胞)的增殖。这种特性在组织非均质的伤口愈合中有吸引力,诸如在由多种细胞类型组成的鼓膜(TM)中。

[0018] FGF-2受体的密度以及随后各种细胞和组织对外部FGF-2刺激的反应性可能决定伤口愈合的最佳FGF-2剂量。FGF-2在溶液中稳定性差可能阻碍了修复慢性TM穿孔的最佳FGF-2剂量的确定。调查FGF-2用于该适应症的大多数临床研究都要求原位制备FGF-2溶液,并且有报告称这些制剂中FGF-2的生物活性仅限于24-36h。高FGF-2剂量和膜愈合所需的重

复施加导致的副作用包括继发性中耳炎或膜的再穿孔。

[0019] 慢性伤口通常具有降低的生长因子(包括FGF-2)浓度,导致伤口的愈合和血运重建率降低。慢性伤口部位处的FGF-2浓度的降低连同FGF-2对伤口愈合的许多有利作用引发了对新生物材料的广泛研究和探究,以及FGF-2治疗慢性伤口的局部施加。尽管这些治疗在体外改善血管生成和组织愈合方面取得了一些成功,但这项研究到人体试验的转化仍然有限。FGF-2在储存期间和体内递送时迅速降解,使其难以掺入至药物产品中。

[0020] 溶液中FGF-2分子的热和肝素依赖性不稳定性对可接受的FGF-2医药产品的开发提出了重大挑战。在商业上,冻干被广泛用于延长治疗性蛋白的货架期,并且这已应用于FGF-2。使用冷冻保护剂(例如甘氨酸)冻干的FGF-2在4°C下可稳定储存长达12个月,并且在室温(<25°C)下可稳定储存长达3周。冻干有利于蛋白的储存、装运和运输,但在将其重构为溶液后,几乎无法减轻其固有的不稳定性。FGF-2与其内源性稳定剂——肝素的结合已被证明可以改善其稳定性,然而在大多数临床应用中包括肝素作为FGF-2稳定剂并不是期望的,因为抗凝剂几乎不符合作为惰性药物赋形剂。

[0021] 在-20°C下储存重构的FGF-2药物溶液在临床环境中不是实用的溶液。其他替代方案,例如仅在需要时重构冻干FGF-2,以及应用需要每日给药多剂量FGF-2以维持体内药理活性的治疗方案,只有高度依从性的患者才能实现。

[0022] 也不期望将不稳定的FGF-2溶液用于医药产品(例如组织工程化构建体)的制造,这是由于在制造过程期间蛋白功能性不可避免地快速下降。为了在最终产品中实现期望的FGF-2负载,初始FGF-2负载必须足够高,以补偿制造期间由于蛋白不稳定而导致的FGF-2功能性的损失。这种方法的相关成本和安全影响可能无法被制造商和监管机构接受。

[0023] 本领域需要有效稳定的FGF-2水性溶液和治疗伤口以及有效治疗和愈合鼓膜穿孔。本发明的目的是克服现有技术所预示的一个或多个问题。

发明内容

[0024] 本发明涉及稳定的FGF-2制剂以及该制剂在治疗伤口中的用途,特别是用于治愈鼓膜穿孔和相关疾患的用途。

[0025] 在第一方面,本发明广泛地涉及一种组合物,其包括:(1)成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合物,其中,所述组合物进一步包括:氨基酸或血清白蛋白,或者氨基酸和血清白蛋白。

[0026] 优选地,纤维素基聚合物是甲基纤维素(MC),氨基酸是丙氨酸并且血清白蛋白是人血清白蛋白。

[0027] 在第二方面,本发明提供了包括如本发明第一方面中描述的组合物的剂型。

[0028] 在第三方面,本发明提供了治疗伤口的方法,其中,所述方法包括向有此需要的患者给药治疗有效量的如本发明第二方面中所述的剂型。

[0029] 优选地,伤口选自自由鼓膜穿孔和慢性鼓膜穿孔组成的组。

[0030] 第四方面,本发明提供一种装置,其中,所述装置包括:(1)如本发明第一方面所述的组合物;和(2)伤口愈合支架(scaffold)。

[0031] 在第五方面,本发明提供了组合物在制备用于治疗伤口的药物中的用途,其中,所述组合物包括:(1)成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合

物,并且其中,所述组合物进一步包括:

[0032] a. 氨基酸;

[0033] b. 血清白蛋白;或者

[0034] c. 氨基酸和血清白蛋白。

[0035] 在第六方面,本发明提供了稳定FGF-2的方法,所述方法包括制备如本发明第一方面中所述的组合物。

[0036] 本发明的进一步特征在下面对其几个非限制性实施方式的描述中得到更充分的描述。该描述仅出于举例说明本发明的目的而包括在内。不应将其理解为对如上所述的本发明的概括概述、公开内容或描述的限制。

附图说明

[0037] 下面是图和附图的每一个的简要描述。

[0038] 图1. 用于确定冻干和重构FGF-2溶液的储存稳定性的方法的示意图。

[0039] 图2. 使用商业ELISA试剂盒生成的FGF-2标准曲线的再现性。

[0040] 图3. FGF-2在水中的温度稳定性。

[0041] 图4. 赋形剂对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在25°C温育2h的稳定性的影响。

[0042] 图5. 赋形剂对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在4°C温育5h、25°C温育5h、37°C温育2h的稳定性的影响。

[0043] 图6. 甲基纤维素(MC)浓度对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在4°C温育5h、25°C温育5h和37°C温育2h的稳定性的影响。

[0044] 图7. 赋形剂组合对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在4°C温育5h、25°C温育5h和37°C温育2h的稳定性的影响。

[0045] 图8. 赋形剂组合对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在37°C保存长达5天的稳定性的影响。

[0046] 图9. 赋形剂对暴露于加工应激原的FGF-2水性溶液(770ng/ml)的稳定性的影响。

[0047] 图10. FGF-2水性溶液(770ng/ml)在冻干和储存后的稳定性。

[0048] 图11. 赋形剂对重构的FGF-2水性溶液(770ng/ml)在24h内的稳定性的影响。

[0049] 图12. 赋形剂对重构FGF-2水性溶液(770ng/ml)在7天时间段内的稳定性的影响。

[0050] 图13示出用于趋化迁移测定的细胞透室(transwell)装置的组件的示意图。

[0051] 图14. 原代人真皮成纤维细胞对含有不同稳定剂的FGF-2水性溶液的剂量递增(0.0098-200ng/ml)的反应的细胞增殖曲线。

[0052] 图15. 稳定的FGF-2溶液的伤口愈合能力。

[0053] 图16. 暴露于空白负载体和FGF-2溶液的人真皮成纤维细胞单层中的模拟伤口的代表性光学显微照片。

[0054] 图17. 比较在以下项中的暴露于稳定化负载体(1-6)24h后经历趋化迁移的人真皮成纤维细胞的数量:在上室和下室两者中(A)或仅下室中(B);或在FGF-2溶液(F1-F6)于细胞透室装置的上室和下室两者中(C)或仅下室中(D)。

[0055] 图18. 经历趋化迁移至细胞透室膜的基底表面的人真皮成纤维细胞响应于FGF-2的代表性荧光显微照片。

- [0056] 图19.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的直径。
- [0057] 图20.使用不同负载体溶解藻酸钠制备的空白原型藻酸盐支架的厚度。
- [0058] 图21.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的重量。
- [0059] 图22.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的脆碎度。
- [0060] 图23.不同负载体对使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架材料的平衡水合 (hydration) 时间的影响。
- [0061] 图24.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的代表性SEM显微照片。
- [0062] 图25.使用不同负载体溶解藻酸钠制备的空白原型藻酸盐支架材料中观察到的孔结构分析。
- [0063] 图26.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的负载FGF-2 (1050ng) 的原型藻酸盐支架的直径。
- [0064] 图27.使用不同负载体溶解藻酸钠制备的负载FGF-2 (1050ng) 的原型藻酸盐支架的厚度。
- [0065] 图28.使用不同负载体溶解藻酸钠制备的负载FGF-2 (1050ng) 的原型藻酸盐支架的重量。
- [0066] 图29.使用不同负载体溶解藻酸钠制备的负载FGF-2 (1050ng) 的原型藻酸盐支架的脆碎度。
- [0067] 图30.FGF-2 (1050ng) 负载对使用不同负载体溶解藻酸盐制备的原型藻酸盐支架材料的平衡水合时间的影响。
- [0068] 图31.使用不同负载体溶解藻酸钠制备的负载FGF-2 (1050ng) 的原型藻酸盐支架的代表性SEM显微照片。
- [0069] 图32.使用不同负载体溶解藻酸钠制备的负载FGF-2 (1050ng) 的原型藻酸盐支架材料中观察到的孔结构分析。
- [0070] 图33.负载FGF-2的支架的功能测定示意图。
- [0071] 图34.比较响应于含有不同稳定剂的FGF-2水性溶液的递增剂量 (2.3-150ng/ml) 的细胞增殖曲线。
- [0072] 图35.FGF-2从支架材料中的累积释放。
- [0073] 图36.比较鼠 (A) 和人 (B) 成纤维细胞暴露于负载FGF-2 (1050ng) 的支架材料时产生的细胞增殖效应。
- [0074] 图37.鼠成纤维细胞和支架材料之间相互作用的活/死细胞的代表性染色图像。
- [0075] 图38.通过与支架材料相互作用的活细胞数量来测量支架材料的生物相容性。
- [0076] 图39.通过与支架材料相互作用的死细胞数量来测量支架材料的细胞毒性。

具体实施方式

[0077] 为了方便起见,以下部分总体概述了本文所使用的术语的各种含义。在该讨论之后,讨论了关于本发明的组合物、药物的用途和方法的一般方面,随后是证明本发明的各种实施方式的特性以及如何应用它们的具体实例。

[0078] 本领域技术人员将理解,本文描述的本发明易于进行除了具体描述的那些之外的

变化和修改。本发明包括所有此类变化和修改。本发明还包括说明书中单独或共同提及或指示的所有步骤、特征、制剂和化合物以及任何和所有组合或任何两个或更多个步骤或特征。

[0079] 本文中引用的每个文件、参考文献、专利申请或专利均通过援引明确地整体并入本文,这意味着读者应将其作为本文的一部分来阅读和考虑。本文中所引用的文献、参考文献、专利申请或专利在本文中不再重复仅仅是为了简洁的原因。然而,所引用的材料或该材料中包含的信息均不应被理解为公知常识。

[0080] 本文提及的任何产品或通过援引并入本文的任何文档中的制造商说明、描述、产品规格和产品表均通过援引并入本文,并且可用于本发明的实践。

[0081] 本发明的范围不限于本文描述的任何具体实施方式。这些实施方式仅用于示例的目的。功能等同的产品、制剂和方法显然在本文所述的本发明的范围内。

[0082] 1. 定义

[0083] 下面提供说明书、实例和所附权利要求中使用的某些术语和短语的含义。如果本领域术语的使用与本文提供的其定义之间存在明显差异,则以说明书中提供的定义为准。

[0084] 除了在操作实施例中或另外指出的情况外,本文使用的表达成分的量或反应条件的所有数字应当理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。当与百分比结合使用时,术语“约”可以意指 $\pm 1\%$ 。

[0085] 本文描述的发明可以包括值(例如尺寸、浓度等)的一个或多个范围。值的范围将被理解为包括该范围内的所有值,包括定义该范围的值,以及与该范围相邻的值,该相邻的值导致与直接与定义该范围边界的值相邻的值相同或基本相同的结果。例如,本领域技术人员将理解,范围的上限或下限的10%的变化可以是完全合适的并且被本发明涵盖。更具体地,范围的上限或下限的变化将是5%,或者如本领域中通常认识到的,以较大者为准。

[0086] 在本申请中,除非另有具体说明,否则单数的使用也包括复数。在本申请中,除非另有说明,否则使用“或”意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及其他形式,诸如“包括(includes)”和“被包括(included)”的使用不是限制性的。另外,除非另有具体说明,否则术语诸如“元素”或“组分”涵盖包括一种单元的元素和组分以及包括多于一种亚单元的元素和组分两者。另外,术语“部分”的使用可以包括部分的一部分或整体部分。

[0087] 贯穿本说明书,除非上下文另有要求,否则词语“包括(comprise)”或变体诸如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”将被理解为暗示包括指定的整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。

[0088] 针对于治疗方法,特别是药物剂量而言,本文所用的“治疗有效量”应意指对于在大量需要此类治疗的受试者中给药药物所提供特定药理学反应的剂量。需要强调的是,在特定情况下向特定受试者给药的“治疗有效量”并不总是有效治疗本文所述的疾病,即使这样的剂量被本领域技术人员认为是“治疗有效量”。还应当另外地理解,在特定情况下,药物剂量是作为口服剂量测量的,或者参考血液中测量的药物水平来测量的。对于这种用途有效的量将取决于:所需的治疗效果;生物活性物质的效力;所需的治疗持续时间;正在治疗的疾病的阶段和严重程度;患者的体重和总体健康状况;以及处方医生的判断。需要调整治疗剂量以优化安全性和疗效。本领域技术人员将理解,用于治疗的适当剂量水平因此将部分地取决于活性剂所用于的适应症、给药途径以及患者的尺寸(体重、体表面积或器官尺

寸)和情况(年龄和总体健康)。因此,临床医生可以滴定剂量并改变给药途径以获得最佳治疗效果。典型的剂量可以在约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至高达约100 mg/kg 或更多的范围内,这取决于上述因素。在其他实施方式中,剂量可以在以下范围:0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至高达约100 mg/kg ;或1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 mg/kg ;或5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至高达约100 mg/kg 。

[0089] 给药频率将取决于活性剂和所用制剂的药代动力学参数。通常,临床医生将给药组合物直至达到实现期望效果的剂量。因此,组合物可以作为单剂量、或作为两个或更多个剂量(其可以包含或不包含相同量的所需分子)随时间推移给药,或作为经由植入装置或导管的持续输注给药。适当剂量的进一步细化是由本领域普通技术人员常规进行的,并且在他们常规执行的任务范围内。适当的剂量可以通过使用适当的剂量反应数据来确定。

[0090] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的以下的任何一种和全部:溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体适用于局部给药至耳中。

[0091] 如本文所用,术语“受试者”一般包括哺乳动物,诸如:人;农场动物诸如绵羊、山羊、猪、牛、马、美洲驼;伴生动物诸如狗和猫;灵长类;鸟诸如鸡、鹅和鸭;鱼;和爬行动物。受试者优选是人。

[0092] 本文所使用的所选术语的其他定义可以在本发明的详细描述中找到并且适用于全文。除非另外定义,否则本文使用的所有科学术语和技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0093] 现将通过参考以下非限制性描述和实例来讨论本发明的特征。

[0094] 2.实施方式

[0095] 组合物

[0096] 本发明提供了一种组合物,其包括:(1)成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合物,其中,所述组合物进一步包括:氨基酸或血清白蛋白,或者氨基酸和血清白蛋白。

[0097] 例如,该组合物包括:(1)成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、其类似物或变体;(2)纤维素基聚合物,其中,所述组合物进一步包括:氨基酸。在替代的实例中,该组合物包括:(1)成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合物,其中,所述组合物进一步包括:血清白蛋白。在另一种替代的实例中,该组合物包括:(1)成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合物,其中,所述组合物进一步包括:氨基酸和血清白蛋白。

[0098] 在优选的实施方式中,纤维素基聚合物包含甲氧基基团。更优选地,纤维素基聚合物是甲基纤维素(MC)。在一种实例中,纤维素基聚合物不是羟丙基甲基纤维素(HMPC)。在另外的实例中,纤维素基聚合物不是羟丙基纤维素(HPC)。在还另外的实例中,纤维素基聚合物不是羧甲基纤维素(CMC)。

[0099] 在另外的优选实施方式中,组合物选自自由以下组成的组:治疗组合物;药物组合物;化妆品组合物;和兽药组合物。

[0100] 治疗组合物在本发明的范围内。优选地,组合物与药学上可接受的载体或稀释剂组合以产生药物组合物(其可以用于人或动物用途)。合适的载体和稀释剂包括等渗水性溶液,例如磷酸盐缓冲盐水。如本文所用,“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分

散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。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,否则考虑其在治疗组合物中的使用。补充活性成分也可掺入至组合物中。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (1995, Mack Publishing Co., Easton, Pa.), 其通过援引并入本文。

[0101] 药物组合物可以包含用于改变、维持或保存例如组合物的pH、渗量、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌度、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的制剂材料。合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);填充剂(诸如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(诸如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精)、填充剂;单糖、二糖;和其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(诸如钠);防腐剂(诸如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露醇或山梨糖醇);助悬剂;表面活性剂或润湿剂(诸如pluronic、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯诸如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapol));稳定性增强剂(蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(诸如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾)、递送负载体、稀释剂、赋形剂和/或药物佐剂。

[0102] 最佳药物组合物将由本领域技术人员根据例如预期的给药途径、递送形式和所需剂量来确定。此类组合物可以影响本发明的FGF-2的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。药物组合物的优选形式取决于预期的给药模式和治疗应用。

[0103] 药物组合物中的主要负载体或载体本质上是水性的。例如,合适的负载体或载体可以是注射用水、生理盐水溶液,可能补充有其他材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是另外的示例性负载体。其他示例性药物组合物包括约pH 7.0-8.5的Tris缓冲液或约pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,其还可包括山梨糖醇或其合适的替代品。在本发明的一种实施方式中,可以通过将具有所需纯度的所选组合物与任选的配制剂以水性溶液形式混合来制备用于储存的药物组合物。

[0104] 制剂组分以给药部位可接受的浓度存在。例如,缓冲剂用于将组合物维持在生理pH或稍低的pH,通常在约5至约8的pH范围内。

[0105] 额外的药物组合物对于本领域技术人员来说是显而易见的,包括持续或控制递送制剂中的本发明制剂。用于配制多种其他持续或受控递送手段诸如脂质体载体、生物可降解微粒或多孔珠粒和储库注射剂的技术也是本领域技术人员已知的。持续的持续释放制剂的额外的实例包括成形制品形式的半透性聚合物基质,例如膜或微胶囊。持续释放基质可包括聚酯、水凝胶、聚交酯(poly lactides)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、乙烯乙酸乙烯酯或聚-D(-)-3-羟基丁酸。持续释放组合物还可以包括脂质体,其可以通过本领域已知的几种方法中的任何一种来制备。

[0106] 用于体内给药的药物组合物通常必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜过滤来实

现。另外,通常将组合物放入具有无菌入口的容器中。一旦药物组合物被配制好,它可以作为溶液储存在无菌小瓶中。

[0107] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2选自由以下组成的组:人FGF-2;牛FGF-2;猪FGF-2;和鼠FGF-2。优选地,FGF-2是重组的。

[0108] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2的类似物或变体与人FGF-2具有选自由以下组成的组的氨基酸序列同源性:至少75%的序列同源性;至少80%;至少85%;至少90%;至少95%;至少96%;至少97%;至少98%;和至少99%。

[0109] 如本文所用的术语“序列同源性%”可以例如如下计算。使用CLUSTAL W算法将查询序列与靶序列进行比对(Thompson et al, Nucleic Acids Research, 22:4673-4680 (1994))。在对应于比对序列之一(例如最短序列)的窗口上进行比较。在一些情况下,窗口可以由靶序列定义。在其他情况下,窗口可以由查询序列来定义。比较每个位置的氨基酸残基,并将查询序列中与靶序列具有相同对应关系的位置的百分比报告为序列同源性%。

[0110] FGF-2的变体包括与FGF-2基本上同源的多肽,但其具有与FGF-2序列不同的氨基酸序列,因为一个或多个氨基酸已被化学修饰或被氨基酸类似物置换。优选地,除了氨基酸置换之外,为了产生FGF-2的变体而对FGF-2氨基酸序列进行的任何改变还可以包括氨基酸缺失和/或氨基酸添加。

[0111] 氨基酸置换优选为本领域技术人员已知的保守氨基酸置换。例如,本领域技术人员可以通过从与被鉴定用于置换的特定氨基酸共享的同一类氨基酸内选择氨基酸来进行氨基酸置换。合适的氨基酸置换的实例在下表1中给出。

[0112] 表1

[0113] 氨基酸	保守置换的实例
[0114] Ala(A)	Val、Leu、Ile
[0115] Arg(R)	Lys、Gln、Asn
[0116] Asn(N)	Gln
[0117] Asp(D)	Glu
[0118] Cys(C)	Ser、Ala
[0119] Gln(Q)	Asn
[0120] Glu(E)	Asp
[0121] Gly(G)	Pro、Ala
[0122] His(H)	Asn、Gln、Lys、Arg
[0123] Ile(I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸
[0124] Leu(L)	Ile、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸
[0125] Lys(K)	Arg、Gln、Asn
[0126] Met(M)	Leu、Ile、Phe
[0127] Phe(F)	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr
[0128] Pro(P)	Ala、Gly
[0129] Ser(S)	Thr、Ala、Cys
[0130] Trp(W)	Phe、Tyr
[0131] Thr(T)	Ser

- [0132] Tyr (Y) Trp、Phe、Thr、Ser
- [0133] Val (V) Ile Met、Leu、Phe、Ala、正亮氨酸
- [0134] 在还另外优选的实施方式中,氨基酸具有疏水性侧链。
- [0135] 在还另外优选的实施方式中,氨基酸不具有净电荷
- [0136] 优选地,所述氨基酸选自由以下组成的组:丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸。最优选地,氨基酸是丙氨酸。
- [0137] 在还另外优选的实施方式中,血清白蛋白选自由以下组成的组:牛血清白蛋白;和人血清白蛋白。优选地,血清白蛋白是人血清白蛋白。
- [0138] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2以选自由以下组成的组的浓度存在:1ng/ml至5mg/ml之间;10ng/ml至2mg/ml之间;100ng/ml至1mg/ml之间;200ng/ml至800ng/ml之间;和770ng/ml。
- [0139] 在还另外优选的实施方式中,MC以选自由以下组成的组的浓度存在:0.001%至10%之间;0.01%至10%之间;0.01%至5%之间;0.01%至1%之间和0.05%w/v。优选地,MC的浓度选自由以下组成的组:0.05%;0.072%;0.1%w/v;和0.5%w/v。
- [0140] 在还另外优选的实施方式中,丙氨酸以选自由以下组成的组的浓度存在:1至500mM之间;和10至100mM之间。优选地,丙氨酸的浓度选自由以下组成的组:20mM;28.902mM;50mM;和100mM。
- [0141] 在还另外优选的实施方式中,血清白蛋白的浓度选自由以下组成的组:0.1至100mg/ml之间;0.5至50mg/ml之间;和1mg/ml至10mg/ml之间。优选地,血清白蛋白的浓度选自由以下组成的组:1mg/ml、1.445mg/ml和10mg/ml。
- [0142] 在还另外优选的实施方式中,该组合物还包括水。
- [0143] 在还另外优选的实施方式中,组合物是液体,诸如水性溶液。
- [0144] 在还另外优选的实施方式中,组合物是冷冻干燥的组合物。
- [0145] 在还另外优选的实施方式中,组合物是由冷冻干燥的组合物重构的液体组合物。
- [0146] 在还另外优选的实施方式中,进一步包括药学上可接受的载体。
- [0147] 在还另外优选的实施方式中,该组合物适合于伤口愈合。优选地,该组合物适合于组织生长和修复。
- [0148] 在还另外优选的实施方式中,该组合物进一步包括选自由以下组成的组的组分:甘露醇;葡萄糖;麦芽糊精;HPMC;藻酸盐;甘氨酸;和NaCl。在替代的实施方式中,该组合物不包括选自由以下组成的组的组分:甘露醇;葡萄糖;麦芽糊精;HPMC;藻酸盐;甘氨酸;和NaCl。
- [0149] 在还另外优选的实施方式中,组合物是稳定的并保护FGF-2免受不稳定力的影响。在一种实施方式中,使用选自由以下组成的组的方法来评估组合物的稳定性:高效液相色谱定量;蛋白质印迹;ELISA定量;ELISA剂量反应测定、ELISA伤口愈合测定;趋化迁移测定;基于温度应激原的热稳定性研究;基于冷冻/解冻循环的加工稳定性研究;作为冻干干粉和重构后两者的储存稳定性;功能测定;和定量分析。
- [0150] 在还另外优选的实施方式中,该组合物保护FGF-2免受选自由以下组成的组的降解:物理降解;UV降解;热降解;化学降解;和酶促降解。优选地,该组合物保护FGF-2免受由选自由以下组成的组的工艺步骤引起的降解:冷冻/解冻循环;和冻干。优选地,组合物保护

FGF-2免受生物活性损失,并且通过ELISA测量的活性与基线值($t=0$)的差异不大于10%。优选地,组合物保护FGF-2免受FGF-2的量损失,如用ELISA测量的,与基线值($t=0$)的差异不大于10%。最优选地,组合物保护FGF-2免受生物活性损失,并且活性与基线值($t=0$)的差异不大于10%,其中,通过使用Boyden井室技术评估的成纤维细胞趋化迁移来测量生物活性。在替代的优选实施方式中,组合物保护FGF-2免受生物活性损失,并且活性与基线值($t=0$)的差异不大于10%,其中,通过用于评估FGF-2伤口愈合能力的成纤维细胞单层的模拟伤口来测量生物活性。在替代的优选实施方式中,组合物保护FGF-2免受生物活性损失,并且活性与基线值($t=0$)的差异不大于10%,其中,通过使用人真皮成纤维细胞的细胞增殖测定来测量生物活性。

[0151] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2在选自由以下组成的组的时间段内保留其有效生物活性:大于24小时;大于36小时;和大于48小时。优选地,组合物在选自由以下组成的组的时间段内稳定:6个月、1年和2年。在一种实例中,该组合物在选自由以下组成的组的温度下是稳定的:-4°C、4°C、18°C和25°C。

[0152] 治疗组合物在本发明的范围内。

[0153] 剂型

[0154] 剂型在本发明的范围内。在优选的实施方式中,本发明提供了包括如本发明第一方面中描述的组合物的剂型。

[0155] 在另外优选的实施方式中,剂型包括选自由以下组成的组的FGF-2的剂量:1ng至5ng之间;1ng至10ng之间;1ng至100ng之间;200ng至800ng;770ng;1ng至5 μ g;10ng至2 μ g之间;100ng至1 μ g之间;1ng至5mg;10ng至2mg之间;100ng至1mg之间;5mg至150mg的FGF-2之间;10mg至100mg之间,20mg至75mg之间,25mg至50mg之间和30mg至40mg之间。

[0156] 优选地,剂型储存在密封且无菌的容器中。

[0157] 优选地,支架材料是生物相容的。优选地,使用选自由以下组成的组的方法来评价支架材料的生物相容性:活/死细胞毒性/生存力测定;和功能测定。

[0158] 治疗方法

[0159] 用于治疗伤口的方法在本发明的范围内。在优选的实施方式中,本发明提供了用于治疗伤口的方法,其中,所述方法包括向有此需要的患者给药治疗有效量的如本发明第二方面中所述的剂型。

[0160] 在还另外优选的实施方式中,剂型以至少部分修复伤口的量给药。

[0161] 在一种实施方式中,伤口是穿孔、烧伤、擦伤、割伤或溃疡,需要增加成纤维细胞增殖和/或迁移至伤口的部位以至少部分修复伤口。

[0162] 在另外优选的实施方式中,伤口选自由以下组成的组:鼓膜穿孔和慢性鼓膜穿孔。

[0163] 在还另外优选的实施方式中,向有此需要的患者施用的剂型包括选自由以下组成的组的FGF-2剂量:1ng至5ng之间;1ng至10ng之间;1ng至100ng之间;200ng至800ng之间;770ng;1ng至5 μ g;10ng至2 μ g之间;100ng至1 μ g之间;1ng至5mg;10ng至2mg之间;100ng至1mg之间;5mg至150mg之间;10mg至100mg之间,20mg至75mg之间,25mg至50mg之间,和30mg至40mg之间。

[0164] 在还另外优选的实施方式中,利用选自由以下组成的组的给药方案向受试者给药剂型:以修复伤口的频率;每小时两次;每小时;每六小时一次;每8小时一次;每12小时一

次;每日一次;每周两次;每周一次;每2周一次;每6周一次;每月一次;每2个月一次;每3个月一次;每6个月一次;每年一次。

[0165] 在还另外优选的实施方式中,向伤口部位局部给药剂型。

[0166] 在还另外优选的实施方式中,向伤口部位施用剂型连同伤口愈合支架。

[0167] 在一种优选的实施方式中,在施加剂型之前向伤口施加伤口愈合支架。

[0168] 在替代的优选实施方式中,在施加剂型的同时向伤口施加伤口愈合支架。在另外可选的优选实施方式中,在向伤口部位施加之前,将剂型施加于伤口愈合支架。

[0169] 在还另外优选的实施方式中,剂型经由涂药器给药。

[0170] 在还另外优选的实施方式中,与本领域的常规治疗方法相比,鼓膜穿孔的闭合率增加。

[0171] 优选地,在选自以下的时间段内使鼓膜穿孔闭合:治疗开始的1周内;治疗开始的2周内;治疗开始的3周内;治疗开始的4周内;治疗开始的5周内;治疗开始的6周内;治疗开始的7周内;治疗开始的8周内;治疗开始的3个月内;治疗开始的4个月内;治疗开始的5个月内;以及治疗开始的6个月内。

[0172] 可用本发明治疗的受试者将包括人以及其他哺乳动物和动物。

[0173] 给药的治疗组合物的效果可以通过标准诊断程序来监测。

[0174] 装置

[0175] 装置在本发明的范围内。在优选的实施方式中,本发明提供了一种装置,其中,该装置包括:(1)如本发明的第一方面所述的组合物;和(2)伤口愈合支架。

[0176] 在另外优选的实施方式中,组合物包含在伤口愈合支架内或嵌入至伤口愈合支架内。

[0177] 在还优选得实施方式中,伤口愈合支架具有选自由以下各项组成的组的特性:生物相容性;可生物降解的;机械稳定;低程度的细胞毒性;和作为3D组织再生的向导物。优选地,伤口愈合支架提供FGF-2的持续释放。优选地,伤口愈合支架促进细胞迁移、侵入和/或增殖。

[0178] 在还优选得实施方式中,伤口愈合支架是多孔的。优选地,伤口愈合支架是明胶海绵。替代地,明胶海绵是Gelfoam。

[0179] 在还另外优选的实施方式中,伤口愈合支架是基于藻酸盐的支架材料。优选地,伤口愈合支架包括藻酸钠。

[0180] 更优选地,藻酸钠以选自由以下组成的组的浓度存在:0.01%至20%之间;1至10%之间;2%至5%之间;和2%。更优选地,伤口愈合支架利用交联剂。最优选地,交联剂是CaCl₂。在一种实例中,CaCl₂以选自由以下组成的组的浓度存在:10至100mM之间;20至70mM之间;和50mM。

[0181] 在还另外优选的实施方式中,伤口愈合支架具有选自由以下组成的组的孔面积:10,000至30,000 μm^2 之间;15,000至25,000 μm^2 之间和20847.6 μm^2 。优选地,伤口愈合支架具有选自由以下组成的组的孔直径:1至500 μm 之间;90-160 μm 之间;50至150 μm 之间;115.4 μm ;和75.5 μm 。

[0182] 在还另外优选的实施方式中,伤口愈合支架具有选自由以下组成的组的孔隙率:10%至99%之间;60%至90%之间;25%至75%之间;54.3%和66.7%。

[0183] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2在选自由以下组成的组的时间段内保留其有效生物活性:大于24小时;大于36小时;大于48小时。

[0184] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2最初在前两天从伤口愈合支架释放,随后在额外的2-14天更缓慢释放。优选地,FGF-2的释放在第14天进入平稳期。优选地,FGF-2释放至少14天。

[0185] 在还另外优选的实施方式中,与从 **Gelfoam®** 支架释放相比,基于藻酸盐的支架材料产生更高的FGF-2持续释放曲线。优选地,与 **Gelfoam®** 支架相比,基于藻酸盐的支架材料具有更小的孔径、更低的孔隙率和更高的FGF-2与藻酸盐结合的潜力。

[0186] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2以选自由以下组成的组的浓度存在于伤口愈合支架中:在1ng/ml至5mg/ml之间;2.3-9.4ng/ml之间;10ng/ml至2mg/ml之间;在50ng/ml之间;75-150ng/ml之间; \geq 75ng/ml;9.4-37.5ng/ml;100ng/ml至1mg/ml;200ng/ml至800ng/ml之间;和770ng/ml。

[0187] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2以选自由以下组成的组的浓度存在于伤口愈合支架(干支架等效物)中:1ng/ml至5ng/ml之间;1ng/ml至10ng/ml之间;1ng/ml至100ng/ml之间;200ng/ml至800ng/ml之间;770ng/ml;1ng/ml至5 μ g/ml;10ng/ml至2 μ g/ml之间;100ng/ml至1 μ g/ml之间;1ng/ml至5mg/ml;10ng/ml至2mg/ml之间;100ng/ml至1mg/ml之间。

[0188] 在还优选的实施方式中,伤口愈合支架适合于接种和生长角质形成细胞。在还另外优选的实施方式中,伤口愈合支架适合于接种和生长成纤维细胞。在还另外优选的实施方式中,伤口愈合支架适合于接种和生长上皮细胞。

[0189] 组合物在制备药物中的用途

[0190] 用途在本发明的范围内。在优选的实施方式中,本发明提供了组合物在制备用于治疗伤口的药物中的用途,其中所述组合物包括:(1)成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、其类似物或变体;以及(2)纤维素基聚合物,并且其中,所述组合物进一步包括:

[0191] a. 氨基酸;

[0192] b. 血清白蛋白;或者

[0193] c. 氨基酸和血清白蛋白。

[0194] 用于稳定化的方法

[0195] 用于稳定FGF-2的方法在本发明的范围内。在优选的实施方式中,本发明提供了用于稳定FGF-2的方法,所述方法包括制备如本发明第一方面中所述的组合物。

[0196] 在还另外优选的实施方式中,所述方法保护FGF-2免受降解。

[0197] 在还另外优选的实施方式中,FGF-2在选自由以下组成的组的时间段内保留其有效生物活性:大于24小时;大于36小时;大于48小时。

[0198] 从安全角度来看,优选添加批准的赋形剂来稳定FGF-2溶液,因为更简单的方法可能产生变化较小的结果,并且赋形剂的选择可以限于通常被认为是安全(GRAS)状态的那些。用于稳定蛋白溶液的赋形剂基于其化学特性和作用机制可分为四大类:盐、糖、聚合物或蛋白/氨基酸。盐(例如氯化物、硝酸盐)通过离子相互作用屏蔽电荷,从而稳定蛋白的三级结构。糖(例如甘油、山梨糖醇、果糖、海藻糖)会增加溶液的表面张力和粘度,以防止蛋白聚集。同样,聚合物(例如聚乙二醇、纤维素衍生物)通过增加溶液的粘度来稳定蛋白的三级结构,以防止蛋白聚集以及蛋白中氨基酸之间的分子内和分子间静电相互作用。蛋白(例

如人血清白蛋白)能够通过离子、静电和疏水相互作用稳定其他蛋白的结构。同样,不带净电荷的小氨基酸,诸如丙氨酸和甘氨酸,通过形成弱静电相互作用来稳定蛋白。

[0199] 如上所述,本发明的药物可以包括一种或多种药学上可接受的载体。使用此类介质和试剂来制造药物是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与药学上可接受的材料不相容,否则考虑其在制造根据本发明的药物组合物中的用途。根据本发明的药学上可接受的载体可以包括以下实例中的一个或多个:

[0200] a. 表面活性剂和聚合物,包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、交聚维酮、聚乙烯吡咯烷酮-聚丙烯酸乙烯酯共聚物、纤维素衍生物、HPMC、羟丙基纤维素、羧甲基乙基纤维素、羟丙甲基纤维素邻苯二甲酸酯、聚丙烯酸酯和聚甲基丙烯酸酯、尿素、糖、多元醇及其聚合物、乳化剂、糖胶、淀粉、有机酸及其盐、乙烷基吡咯烷酮和乙酸乙烯酯;和/或

[0201] B. 粘结剂诸如各种纤维素和交联聚乙烯吡咯烷酮、微晶纤维素;和/或(3) 填充剂诸如一水合乳糖、无水乳糖、微晶纤维素和各种淀粉;和/或

[0202] c. 填充剂诸如一水合乳糖、无水乳糖、甘露醇、微晶纤维素和各种淀粉;和/或

[0203] d. 润滑剂,诸如作用于增加剂型从包装腔中喷出的能力的试剂,和/或

[0204] e. 甜味剂诸如任何天然或人造甜味剂,包括蔗糖、木糖醇、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜和乙酰磺胺酸钾;和/或

[0205] f. 调味剂;和/或

[0206] g. 防腐剂诸如山梨酸钾、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸及其盐、对羟基苯甲酸的其他酯诸如对羟基苯甲酸丁酯、醇诸如乙醇或苯甲醇、酚化学品诸如苯酚或季化合物诸如苯扎氯铵;和/或

[0207] h. 缓冲剂;和/或

[0208] i. 稀释剂诸如药学上可接受的惰性填充剂,诸如微晶纤维素、乳糖、磷酸氢钙、糖和/或任何前述物质的混合物;和/或

[0209] j. 吸收促进剂诸如三硝酸甘油酯;和/或

[0210] k. 其他药学上可接受的赋形剂。

[0211] 适用于动物、特别是人类的本发明药物通常必须是无菌的并且在制造和储存条件下稳定。

[0212] 2a. 鼓膜

[0213] TM是将外耳道与中耳分开的薄的锥形膜。TM呈卵形,水平轴(9-12mm)比垂直轴(8.5-9mm)更长。它具有广泛接受的三层结构,厚度在30-90 μm 之间变化,具有的外层包括角化鳞状上皮;中间纤维层(固有层)由胶原蛋白(I、II和III型)和成纤维细胞组成,其提供了机械强度和弹性;和内层黏膜上皮。膜厚度的变化是由于TM的两个不同区域(紧张部和松弛部)之间固有层的组成差异造成的。

[0214] 紧张部的外表面由表皮角化鳞状上皮的3-5个细胞层组成。该表皮层的细胞具有独特的横向迁移能力,为外耳道的自清洁功能提供了机制。此外,表皮细胞的基底层具有DNA合成和有丝分裂两者的能力。该基底层还包含半桥粒——一种与粘着斑相当的非常小的结构,存在于角质形成细胞中,其将基底细胞的底表面附着到基底膜上,对于TM来说,附着在固有层上。基底膜主要由胶原蛋白(IV型和VII型)、层粘连蛋白、纤连蛋白、硫酸肝素蛋

白聚糖、骨粘连蛋白和缙蛋白 (kalinin) 组成, 并且认为表皮-基底膜相互作用的破坏是由半桥粒介导的层之间的粘附丧失引起的。

[0215] TM的主要功能是将声音经由听小骨传送至内耳。声波会产生声压变化, 这些变化被耳廓(外耳)捕获并引导至TM。TM响应这些声压变化而振动, 振动通过中耳内的一系列听小骨传递并放大到充满流体的内耳(耳蜗)。耳蜗内流体的运动刺激听觉毛细胞中的机械感受器, 进而经由释放神经递质刺激听觉神经并感知声音。因此, TM在声音感知中发挥至关重要的作用。

[0216] 2b. *Gelfoam*®

[0217] *Gelfoam*®是由纯化的猪皮、明胶USP颗粒和注射用水制备的水不溶性、非弹性、多孔产品。明胶是从动物(主要是牛和猪)结缔组织中发现的胶原蛋白中提取的蛋白。明胶广泛用于药物产品, 并具有美国食品和药物管理局(USA Food and Drug Administration, FDA)公认的安全(GRAS)状态。明胶海绵产品是商购的, 目前因其止血特性而用于外科手术中。它可以在不磨损的情况下被切割, 并且能够在其间隙中吸收和容纳其重量数倍的血液或其他液体。近年来, 由于其能够在几个月内在体内完全吸收, 它也成为许多组织工程项目的靶生物材料。研究FGF-2治疗慢性TM穿孔疗效的早期临床探究利用*Gelfoam*®作为模型支架材料。在每项研究中, *Gelfoam*®都被切成适当的尺寸, 浸泡在FGF-2溶液中, 并立即置于穿孔中。这些*Gelfoam*®片中的FGF-2的生物活性可能仅限于24-36小时, 这不足以确保典型慢性TM穿孔的完全愈合。

[0218] 2c. 藻酸盐

[0219] 藻酸是主要源自海洋褐藻的天然存在的多糖。它是由两个单糖组成的嵌段共聚物, (1-4)连接的 β -D-甘露糖醛酸(M单元)和 α -L-古洛糖醛酸(guluronic acid)(G单元)可以以不同的序列共价连接在一起。其盐为藻酸钠(以下简称藻酸盐)。

[0220] 藻酸盐是亲水性的并且当溶解在水中时形成粘性溶液。在二价离子(最常见的是钙)存在下, 二价离子与G嵌段上的钠离子交换, 将相邻的聚合物链结合在一起, 形成具有“蛋盒”结构的水凝胶。这种离子交换凝胶过程通常称为交联, 并且甚至可以在非常温和的条件下发生, 使得该技术适用于掺入敏感的大分子, 诸如蛋白和细胞。

[0221] 藻酸盐水凝胶是可定制的, M/G比率的改变、藻酸盐的分子量或浓度、胶凝速率或交联溶液的组成和浓度, 所有这些都影响水凝胶的物理和机械特性。例如, 增加藻酸盐浓度、G含量、交联溶液强度或交联时间可能有助于生产由于结构内交联数量增加而机械强度增加的水凝胶。

[0222] 藻酸盐水凝胶通过水凝胶中的二价交联离子与周围环境中的单价离子的交换而降解。这个过程通常是不可预测的, 导致随着时间的推移机械强度和运载物(cargo)释放曲线发生变化, 然而藻酸盐水凝胶的降解可以通过改变交联密度来改变, 较高的交联度与较慢的水凝胶降解相关。

[0223] 现在将参考以下非限制性实施例来描述本发明。实施例的描述决不限本说明书的前述段落, 然而, 提供实施例的描述是为了举例说明本发明的方法和组合物。

[0224] 实施例

[0225] 对于研磨和药物领域的技术人员来说显而易见的是, 在不脱离基本发明概念的情

况下,可以对上述方法进行多种增强和修改。例如,在一些应用中,生物活性材料可以被预处理并以预处理的形式供应至过程。所有这些修改和增强都被认为在本发明的范围内,本发明的本质由前面的描述和所附权利要求来确定。此外,提供以下实施例仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的方法或组合物的范围。

[0226] 实施例1——重组人碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)对热和加工应激的稳定化

[0227] A.1研究目的

[0228] 鉴定碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)的稳定化负载体并评价这些稳定化负载体保护FGF-2免受药物加工中遇到的物理应激原的能力。

[0229] A.2材料和方法

[0230] A.2.1材料

[0231] 冻干的重组人FGF-2由Essex Bio-Pharmaceutical Co(中国珠海)友情提供。低粘度藻酸钠购自Buchi Labortechnik AG(瑞士弗拉维尔),氯化钠、甘氨酸和甘露醇购自Ajax Finechem(澳大利亚新南威尔士州),麦芽糊精M180来源于Grain Processing Corporation(美国爱荷华州),D-葡萄糖购自Chem-Supply(澳大利亚南澳大利亚),甲基纤维素USP 4000购自Professional Compounding Chemists of Australia(PCCA;澳大利亚新南威尔士州),以及人血清白蛋白、DL-丙氨酸和羟丙基甲基纤维素(HPMC)购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州)。整个过程中均使用去离子水,并由BOSS水系统(PSI Water Filters,澳大利亚塔斯马尼亚)提供。

[0232] A.2.2 FGF-2储备溶液的制备和定量

[0233] 将冻干的FGF-2粉末以1mg/ml(基于干粉末重量)在水中重构,并将储备溶液储存在-20°C(Westinghouse Freezer FJ302V-L,Westinghouse Electric Corporation,美国宾夕法尼亚州)以20至100 μ l的等分样品装入0.1ml的Eppendorf®管(Eppendorf,美国纽约)中。

[0234] 为了测定冻干粉末中的功能性FGF-2含量,将新鲜重构的FGF-2储备溶液在冰上稀释至100pg/ml(基于干粉末重量)并立即使用市售ELISA试剂盒(人FGF基础ELISA试剂盒,Thermo Fisher Scientific,美国马里兰州)进行分析。

[0235] A.2.3通过ELISA对FGF-2进行定量

[0236] 用水稀释样品以获得50至800pg/ml之间的FGF-2浓度并立即根据制造商的说明使用商业ELISA试剂盒进行测定。使用酶标仪(Polarstar Optima,BMG Labtech,澳大利亚维多利亚)获得稀释的FGF-2溶液在450nm处的吸光度,并使用标准曲线将其转化为FGF-2含量。标准曲线是根据标准FGF-2溶液(15.6-1000pg/ml)的吸光度读数绘制的,该溶液根据制造商的说明使用ELISA试剂盒中提供的FGF-2标准品制备。

[0237] A.2.4 FGF-2稳定性的初步探究

[0238] 为了评估FGF-2在水性溶液中的稳定性,将FGF-2储备溶液从-20°C的储存下取出并随后在4°C下解冻(Westinghouse冰箱RP372V-R,Westinghouse Electric Corporation,美国宾夕法尼亚州),之后用水连续稀释至1.7ng/ml(功能性FGF-2,通过ELISA测定)。然后将稀释的FGF-2储备溶液(11.1 μ l)添加至已在4°C、25°C(Memmert Incubator UF160,In Vitro Technologies,澳大利亚维多利亚)或37°C(Memmert培养箱UF160,In Vitro

Technologies, 澳大利亚维多利亚) 下与48.9 μ l水预温育2h的0.1ml Eppendorf®管中, 以得到315pg/ml的最终FGF-2浓度。所有样品均一式四份制备。将管返回到各自的温育条件, 并将在0至48h范围内的时间点取出的样品储存在-20°C下, 直到需要进行分析。将冷冻样品在4°C下解冻, 然后使用商业ELISA试剂盒测定剩余的FGF-2含量。如果用ELISA测量的FGF-2含量与基线值(t=0)的差异不大于10%, 则认为FGF-2水性溶液稳定。

[0239] A.2.5用于FGF-2溶液的潜在赋形剂稳定剂的调查研究

[0240] 用于所有后续研究的FGF-2储备溶液通过用水将冻干的FGF-2粉末重构至1mg/ml的浓度(基于干粉重量)来制备, 其中每个储备溶液的基线活性FGF-2浓度通过ELISA来测定。然后用水将每种FGF-2储备溶液稀释至2.5 μ g/ml的最终FGF-2储备浓度(基于溶液中存在的活性FGF-2, 通过ELISA确认), 之后再用于后续的稳定性的研究。

[0241] 评价各种赋形剂对水性溶液中FGF-2的稳定化作用。通过将所述赋形剂以如表2所示的浓度溶解在水中来制备每种潜在稳定化负载体的浓缩储备溶液。在0.1ml Eppendorf®管中, 用水或FGF-2储备溶液(2.5 μ g/ml)稀释每种在-4、4或18°C长达12个月的负载体储备, 得到表2中所示的最终赋形剂浓度。将用水稀释的负载体作为ELISA分析的空白, 而将用FGF-2储备溶液稀释的负载体处理作为测试样品。测试样品中FGF-2的最终浓度为770ng/ml, 其与商购的Beifushu™滴眼剂(Zhuhai Essex Bio-Pharmaceutical Co, 中国珠海)的标记FGF-2浓度相对应。Beifushu™产品被证明可有效治疗慢性TM穿孔(未发表的数据来自西澳大利亚珀斯的Gunesh Rajan教授领导的一项针对儿科患者的研究), 但需要在冷藏(2-8°C)温度下储存维持FGF-2活性。

[0242] 表2. 调查研究中使用的潜在FGF-2稳定化负载体的组成。

赋形剂	负载体储备中赋形剂的浓度	最终赋形剂浓度
藻酸钠	2.890% w/v	2% w/v
氯化钠(NaCl)	1.301% w/v	0.9% w/v
麦芽糊精	1.445% w/v	1% w/v
甘露醇	14.451% w/v	10% w/v
葡萄糖	7.225% w/v	5% w/v
[0243] 甲基纤维素(MC)	0.145% w/v	0.1% w/v
羟丙基甲基纤维素(HPMC)	0.723% w/v	0.5% w/v
人血清白蛋白(HSA)*	1.445 mg/ml	1 mg/ml
丙氨酸	14.451 mg/ml	10 mg/ml
甘氨酸	28.902 mM	20 mM
水(作为对照)	144.509 mM	100 mM
	28.902 mM	20 mM
	144.509 mM	100 mM
	N/A	N/A

[0244] *根据制造商的说明在使用前立即制备并保持在4°C。

[0245] 样品在25°C下储存长达2h。在指定的温育时间,取出一式三份的样品并储存在-20°C,直到需要进行分析。将纯的以及用水稀释至1比500和1比1000(理论FGF-2浓度分别为1.54ng/ml和770pg/ml)的冷冻样品在4°C下解冻并进行测定。如果用ELISA测量的FGF-2含量与基线值(t=0)的差异不大于10%,则认为FGF-2水性溶液稳定。

[0246] A.2.6 稳定化负载体的优化

[0247] 基于稳定性调查的结果,选择葡萄糖、甲基纤维素(MC)、人血清白蛋白(HSA)和丙氨酸单独地或组合地进行进一步探究,以确定它们稳定FGF-2以对抗生物医学应用中FGF-2加工期间遇到的热和其他应激原的能力。根据表3,通过将所述赋形剂溶解在水中来制备每种潜在稳定化负载体的浓缩储备溶液。在0.1ml Eppendorf®管中,用水或FGF-2储备溶液(2.5µg/ml)稀释每种负载体储备,以得到表3中所示的最终赋形剂浓度。将用水稀释的负载体作为ELISA分析的空白,而将用FGF-2储备溶液稀释的负载体处理作为测试样品。这些样品中FGF-2的最终浓度为770ng/ml。为了便于描述,通过表4中提供的特定ID来识别负载体,并通过表5中提供的特定ID来识别使用这些负载体制备的最终FGF-2溶液。

[0248] 为了确定负载体保护FGF-2免受热降解的能力,将样品在4°C储存5h、25°C储存5h、37°C储存2h和/或37°C储存5天。在指定的温育时间,取出一式三份的样品并储存在-20°C,直到用ELISA试剂盒来进行分析。如果溶液的FGF-2含量与基线值(t=0)的差异不大于10%,则认为溶液稳定。

[0249] 表3.潜在FGF-2稳定化负载体的组成。

[0250]	一种或多种赋形剂	负载体储备中赋形剂的浓度	最终赋形剂浓度
	葡萄糖	14.451% w/v	10% w/v
	甲基纤维素 (MC)	0.072% w/v	0.05%
		0.145% w/v	0.10% w/v
		0.723% w/v	0.50% w/v
	人血清白蛋白 (HSA)*	1.445 mg/ml	1 mg/ml
	丙氨酸	28.902 mM	20 mM
	MC 和丙氨酸	MC 0.072% w/v 和丙氨酸 28.902 mM	MC 0.05% w/v 和丙氨酸 20 mM
MC 和 HSA*	MC 0.720% w/v 和 HSA	MC 0.05% w/v 和 HSA 1	

[0251]		1.445 mg/ml	mg/ml
	MC、HSA 和丙氨酸*	MC 0.072% w/v、HSA 1.445 mg/ml 和丙氨酸 28.902 mM	MC 0.05% w/v、HSA 1 mg/ml 和丙氨酸 20 mM
	水(阴性对照)	N/A	N/A

[0252] *根据HSA制造商说明在使用前立即制备并保持在4°C。

[0253] 表4.FGF-2稳定化负载体的识别关键因素。

稳定化负载体 ID	负载体的组成
1	水(作为对照)
2	在水中的甲基纤维素(MC; 0.05% w/v)
3	在水中的丙氨酸(20 mM)
[0254] 4	在水中的人血清白蛋白(HSA; 1 mg/ml)
5	在水中的 MC(0.05% w/v)和丙氨酸(20 mM)
6	在水中的 MC(0.05% w/v)和 HSA(1 mg/ml)
7	在水中的 MC(0.05% w/v)、丙氨酸(20 mM)和 HSA (1 mg/ml)

[0255] 还通过将样品暴露于以下3个重复冷冻/解冻循环来探究稳定化负载体稳定FGF-2溶液以对抗加工应激原的能力:样品在-20°C下冷冻24h,然后在4°C下解冻30min,然后再次冷冻,再重复此过程另外的两次。将样品转移至-20°C储存直至需要分析。还研究了冻干的影响。将FGF-2溶液在-20°C下冷冻12h,然后冻干超过24h(Alpha 1-2LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, 德国),将冻干样品在-20°C下储存直至需要进行分析。在分析前立即将冻干样品从储备中取出并用水重构至其冻干前体积。将纯的以及用水稀释1比500和1比1000(别得到1.54ng/ml和770pg/ml的理论FGF-2浓度)的样品用ELISA试剂盒进行分析,并且在加工后FGF-2含量与基线值的差异不大于10%,则认为样品是稳定的。

[0256] 表5.FGF-2溶液的识别关键因素。

	FGF-2 溶液 ID	溶液的描述
[0257]	F1	FGF-2(770 ng/ml)在水中的溶液
	F2	FGF-2(770 ng/ml)和 MC (0.05% w/v)在水中的溶液
	F3	FGF-2(770 ng/ml)和丙氨酸(20 mM)在水中的溶液
[0258]	F4	FGF-2(770 ng/ml)和 HSA (1 mg/ml)在水中的溶液
	F5	FGF-2(770 ng/ml)、MC (0.05% w/v)和丙氨酸(20 mM)在水中的溶液
	F6	FGF-2(770 ng/ml)、MC (0.05% w/v)和 HSA (1 mg/ml)在水中的溶液
	F7	FGF-2 (770 ng/ml)、MC (0.05% w/v)、丙氨酸 (20 mM)和 HSA (1 mg/ml)在水中的溶液

[0259] A.2.7冻干和重构的FGF-2溶液的储存稳定性

[0260] 制备如表4中所述的F1、F5和F6溶液并分别等分(50 μ l)至0.1ml Eppendorf®管中。将一式三份的基线样品立即冷冻在-20 $^{\circ}$ C直至需要分析,而所有剩余样品在-20 $^{\circ}$ C冷冻24h,然后冻干24h。

[0261] 将一式三份的冻干样品储存在-4 $^{\circ}$ C(冰箱/冰柜GM-422FW, LG电子, 韩国釜山)、4 $^{\circ}$ C或18 $^{\circ}$ C(HR6WC30 Wine Fridge, 海信, 中国青岛)下长达至12个月。在研究期间每周使用内置温度计(SFL-10to+110, Brannan温度计和仪表, 英国克利特穆尔(Cleator Moor))监测温度。在限定的时间点(时间0、1周、2周、1、3、6、9和12个月),用50 μ l水重构一式三份冻干样品。重构后,立即将10 μ l所得溶液转移至-20 $^{\circ}$ C储存,直至需要进行分析。然后将剩余溶液(40 μ l)分成10 μ l等分样品,其在4 $^{\circ}$ C下储存24h和7天,或在18 $^{\circ}$ C下储存24h和7天(图1),然后将这些样品转移至-20 $^{\circ}$ C储存直到需要进行分析。使用商业ELISA试剂盒测定所有样品的剩余FGF-2含量。如果用ELISA测量的FGF-2含量与冻干前值的差异不大于10%,则认为样品稳定。请参见图1。

[0262] 图1.用于确定冻干和重构FGF-2溶液的储存稳定性的方法的示意图。冻干FGF-2样品(A)在-4 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C或18 $^{\circ}$ C下储存长达12个月。在限定的时间点,用50 μ l的水重构样品(B)。将重构的FGF-2溶液分成10 μ l等分样品(C-G),其中一份等分样品(C)立即转移至-20 $^{\circ}$ C储存,直至需要分析。将剩余的等分样品在4 $^{\circ}$ C下储存24h(D)或7天(E),或者在18 $^{\circ}$ C下储存24h(F)或7天(G),然后转移至-20 $^{\circ}$ C储存直至需要进行分析。

[0263] A.2.8数据分析

[0264] 结果表示为平均值 \pm SD。调查稳定化研究的数据通过单向ANOVA进行分析。除非另有说明,否则所有其他数据均通过具有应用于平均值配对比较的事后图基(Tukey)检验的双向ANOVA进行分析。所有统计分析均使用GraphPad Prism 8(美国加利福尼亚州)完成,并且P值 \leq 0.05被认为具有显著性。

[0265] A.3结果

[0266] A.3.1功能性FGF-2的定量

[0267] 水性溶液中固有不稳定的FGF-2的定量是重大的挑战。尽管据报道已通过高效液

相色谱 (HPLC) 或蛋白质印迹检测到 FGF-2, 但使用这些技术进行蛋白定量的局限性使得它们不适合本研究。FGF-2 必须保留正确的三级结构以维持其生物活性。经由蛋白质印迹进行的蛋白定量依赖于蛋白的变性, 以允许其在凝胶中移动, 并且因此, 使用该技术无法确定保留正确三级结构的总蛋白的比例。使用特殊的肝素亲和柱进行 HPLC 可以检测到保留了正确三级结构的 FGF-2, 然而该技术主要用于纯化 FGF-2, 并且因此依赖于浓缩的蛋白溶液 (高达 54mg/ml)。因此, 肝素亲和 HPLC 对于以低浓度存在于水性溶液中的 FGF-2 的定量不够灵敏。为了检测和定量 FGF-2 的生物学相关浓度 (pg- μ g/ml), ELISA 被认为是本研究的最合适选择。本研究选择的 ELISA 试剂盒要求 FGF-2 保留抗体结合的正确三级结构。因此, 该测定专门定量保留了活性构象的 FGF-2。

[0268] 每个储备溶液的 FGF-2 含量在根据商业 ELISA 试剂盒提供的方案制备后立即定量。使用试剂盒中提供的 FGF-2 标准品生成的标准曲线是线性的 (R^2 范围: 0.9989-0.9990) 并且在各个板和分析日之间一致 (图2), 在由整个项目 ($n=19$) 获得的回归线的斜率值 (多元线性回归分析; $P=0.1136$) 或截距值 ($P=0.3119$) 之间没有检测到统计显著差异。

[0269] 图2. 整个研究过程中每第四条标准曲线都会出现一次, 以证明从 ELISA 方案中获得的高度可重复的结果。每个数据点代表平均值 \pm SD ($n=3$)。

[0270] A.3.2 初步稳定性研究

[0271] 在初步研究中确定了暴露于温度应激原之前和之后 FGF-2 在水中的稳定性。如果用 ELISA 测量的 FGF-2 含量与基线值 770ng/ml ($t=0, 4^\circ\text{C}$) 的差异不大于 10%, 则认为溶液稳定。当暴露于所有 3 个温度时, 溶液中的 FGF-2 含量下降非常迅速, 样品暴露于 4°C 和 25°C 分别仅保持稳定 2h 和 30min。剩余 FGF-2 含量下降至 50% 基线水平的时间为 37°C 下 30min、 25°C 下 1h 和 4°C 下 8h (图3)。

[0272] 图3. FGF-2 在水中的温度稳定性。FGF-2 溶液 (315pg/ml) 暴露于 4°C 、 25°C 或 37°C 长达 48h。在特定时间点, 取出样品并使用 ELISA 试剂盒分析剩余的 FGF-2 含量。数据表示为基线 FGF-2 含量的百分比 (平均值 \pm SD, $n=4$)。

[0273] A.3.3 FGF-2 水性溶液的潜在稳定剂的鉴定

[0274] 探究了来自每一类已知蛋白稳定剂 (盐、糖、聚合物或蛋白/氨基酸) 的赋形剂稳定 FGF-2 水性溶液的能力。将赋形剂添加到 FGF-2 溶液中, 其浓度已在已发表的文献中报道, 可有效地使各自赋形剂稳定蛋白。然后将所得 FGF-2 溶液在 25°C 下储存 2h, 然后经由 ELISA 测定分析 FGF-2 含量。

[0275] 在蛋白/氨基酸类别中 (图4D)。HSA 1mg/ml、丙氨酸 20mM 和丙氨酸 100mM 能够在 25°C 下稳定 FGF-2 至少 2h, 保留的剩余 FGF-2 含量分别为 97.4%、92.7% 和 96.1%。将 HSA 浓度增加至 10mg/ml 并没有带来更大的稳定作用; 替代的, 该溶液仅保留了基线 FGF-2 的 10.3%, 与对照类似 (水中的 FGF-2, 单向 ANOVA, $P=0.2686$)。20mM 和 100mM 的甘氨酸也未能稳定 FGF-2 溶液, 暴露于 25°C 2h 后保留了基线 FGF-2 的 44.3% 和 45.9%。

[0276] 在聚合物赋形剂中, 只有 MC 能够成功地在 25°C 下稳定 FGF-2 至少 2h (图4C)。0.1% (w/v) 和 0.5% (w/v) 之间的 MC 溶液的稳定化作用没有差异 (单向 ANOVA, $P=0.1545$), 在 2h 时分别产生基线 FGF-2 的 94.8% 和 105.6%。使用 HPMC 0.5% w/v 负载体, 保留了基线 FGF-2 的 87.9%, 虽然在统计上与使用 MC 0.1% w/v 负载体观察到的剩余 FGF-2 含量相当 ($P=0.5806$), 但没有满足使 FGF-2 成功稳定化的标准。HPMC 2% w/v 和藻酸钠 2% w/v 也未能稳定

FGF-2,这些负载体在2h后分别仅保留基线FGF-2的10.3%和9.5%。

[0277] 在糖类中,只有葡萄糖10%w/v负载体能够成功地稳定FGF-2,在25°C温育2h后保留97.4%的FGF-2含量(图4B)。葡萄糖在5%w/v的较低浓度下无效(剩余FGF-2含量为11.9%)。1或10%w/v的麦芽糊精无法稳定FGF-2,各自的负载体在2h后仅保留基线FGF-2的24.3%和20.5%。类似地,5%或10%w/v的甘露醇在25°C下无法有效稳定FGF-2溶液,温育后FGF-2含量分别降至15.4%和19.2%。所有糖赋形剂对FGF-2产生的稳定化作用都比水更大(单向ANOVA, $P<0.0001$),然而,在25°C下暴露2h后,只有10%w/v葡萄糖溶液能够成功保留至少90%的平均剩余FGF-2含量。

[0278] 与单独使用水相比,盐类别中唯一的赋形剂,NaCl 0.9%w/v显著提高了FGF-2在25°C下的稳定性(学生t检验, $P<0.0001$,图4A)。然而,NaCl 0.9%w/v未能满足有效稳定剂的标准,在25°C下暴露2h后,溶液中仅保留基线FGF-2含量的15.5%。

[0279] 将在25°C温育2h后已成功稳定FGF-2水性溶液(保留 $\geq 90\%$ 基线FGF-2)的赋形剂选择作为潜在的FGF-2稳定化负载体用于另外的评价和优化实验。尽管HPMC 0.5%w/v并未严格满足FGF-2稳定化的标准,但平均剩余FGF-2含量在统计上与含有MC的溶液相当。在此基础上,HPMC 0.5%w/v也被纳入下一阶段的优化中。氯化钠(0.9%w/v)——本研究中唯一探究的盐,未能充分稳定FGF-2水溶液,不符合纳入另外研究的标准。因此,赋形剂仅来自糖(葡萄糖10%w/v)、聚合物(MC 0.1或0.5%w/v和HPMC 0.5%w/v)、蛋白(HSA 1mg/ml)和氨基酸(丙氨酸20和100mM)类将代表另外的研究参见图4。

[0280] 图4.赋形剂对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在25°C温育2h的稳定性的影响。使用选自四类蛋白稳定剂(A)盐(B)糖、(C)聚合物和(D)蛋白/氨基酸中的每一种的赋形剂来制备样品。将温育期后通过ELISA分析的FGF-2含量表示为基线FGF-2含量的百分比(平均值 \pm SD, $n=3$)。赋形剂描述已缩写如下;氯化钠,NaCl;甲基纤维素,MC;羟丙基甲基纤维素,HPMC;以及人血清白蛋白,HSA。

[0281] A.3.4 FGF-2溶液的稳定性负载体的优化

[0282] A.3.4.1 热稳定性

[0283] 基于在调查稳定性研究中获得的数据,对包含葡萄糖(10%w/v)、MC(0.1和0.5%w/v)、HPMC(0.5%w/v)、HSA(1mg/ml)或丙氨酸(20和100mM)的负载体对FGF-2溶液的稳定性在扩展的温度稳定性研究中进行了评价。使用MC 0.1%w/v观察到最大的稳定化作用(图5)。包含MC 0.1%w/v的FGF-2溶液是高度稳定的,在4°C和25°C两者下储存5h后仍保留100% FGF-2含量。与其他赋形剂相比,MC 0.1%w/v在37°C下也产生了优异的FGF-2稳定化作用($P<0.0001$),然而,在该温度下2h后未能成功将FGF-2含量保持高于90%。尽管观察到在所有三种储存条件下,MC 0.5%w/v、HSA 1mg/ml和丙氨酸20mM对FGF-2产生的稳定化作用显著优于单独的水($P<0.0001$),但没有其他赋形剂能够在指定的储存条件下有效稳定FGF-2溶液。参见图5。

[0284] 图5.赋形剂对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在4°C温育5h、25°C温育5h、37°C温育2h的稳定性的影响。通过ELISA测量在基线处的和根据指定温育期后的剩余FGF-2含量,并表示为基线浓度的百分比(平均值 \pm SD, $n=3$)。赋形剂描述已缩写如下;甲基纤维素,MC;羟丙基甲基纤维素,HPMC;以及人血清白蛋白,HSA。

[0285] 比较赋形剂类,观察到10%w/v的葡萄糖在25°C下将温育时间从2h延长至5h时不

能有效地稳定FGF-2。当FGF-2溶液在4°C温育5h或在37°C温育2h时,它也不是有效的稳定剂。聚合物在指定的条件下稳定FGF-2的有效性可以按降序排列:MC 0.1%w/v>HPMC 0.5%w/v>MC 0.5%w/w。在蛋白/氨基类中,对于在4°C或25°C下储存5h的溶液,HSA 1mg/ml是比丙氨酸20mM更有效的FGF-2稳定剂($P<0.0001$)。反过来,在所有3种储存条件下稳定FGF-2时,丙氨酸在20mM比在100mM更有效($P<0.0001$)。

[0286] 由于MC表现出浓度依赖性稳定化作用,其中0.1%w/v的较低浓度比0.5%w/v的较高浓度更有效(图5),因此假设MC的稳定化作用对通过进一步降低MC浓度可能会进一步改善FGF-2。图6示出,将MC浓度降低至0.05%w/v确实导致提高FGF-2在37°C下的稳定性($P<0.0001$)。将MC 0.1%和MC 0.5%w/v进行比较,在暴露于37°C 2h后,剩余FGF-2含量分别为36.9%和13.4%,在类似热暴露后,MC 0.05%w/v能够保留81%的基线FGF-2含量。

[0287] 图6. 甲基纤维素(MC)浓度对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在4°C温育5h、25°C温育5h和37°C温育2h的稳定性的影响。通过ELISA测量根据指定温育期后的剩余FGF-2含量,并表示为基线浓度的百分比(平均值 \pm SD, $n=3$)。

[0288] 此后,用于稳定FGF-2的负载体将通过其ID(表4)来识别以方便讨论。ID为(1)水,(2)MC 0.05%w/w,(3)丙氨酸20mM,(4)HSA 1mg/ml,(5)MC 0.05%w/v与20mM丙氨酸,(6)MC 0.05%w/v与1mg/ml HSA,以及(7)MC 0.05%w/v与20mM丙氨酸和1mg/ml HSA。包含各自稳定剂的相应FGF-2溶液通过具有F前缀的相同ID来标识,以表示溶液中FGF-2的存在(表5)。

[0289] 由于没有单一赋形剂能够稳定FGF-2以抵抗37°C的热降解,因此假设赋形剂的组合可能提供协同效应。为此,基于迄今为止获得的数据,F2是最好的稳定剂负载体,将其与丙氨酸20mM(F5)、HSA 1mg/ml(F6)或丙氨酸20mM和HSA1mg/ml(F7)两者组合,评价了这些组合对FGF-2溶液的稳定性作用。发现所有三种赋形剂组合均能有效稳定FGF-2溶液以对抗热降解,所有溶液中剩余的FGF-2含量在4°C温育5h、25°C温育5h和37°C温育2h的各自温育期后与基线水平相当(图7)。

[0290] 图7. 赋形剂组合对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在4°C温育5h、25°C温育5h和37°C温育2h的稳定性的影响。通过ELISA测量根据指定温育期后的剩余FGF-2含量,并表示为基线浓度的百分比(平均值 \pm SD, $n=3$)。FGF-2溶液缩写如下:F1,在水中的FGF-2;F2,在水中的FGF-2和0.05%w/v甲基纤维素(MC);F5,在水中的FGF-2、0.05%w/v MC和20mM丙氨酸;F6,在水中的FGF-2、0.05%w/v MC和1mg/ml人血清白蛋白(HSA);以及F7,在水中的FGF-2、0.05%w/v MC、20mM丙氨酸和1mg/ml HSA。

[0291] 进一步评价稳定剂组合在37°C下在延长的时间段储存时FGF-2的稳定性(图8)。F5(用MC和丙氨酸作为稳定剂)在8h的延长的时间温育中保留了比所有其他制剂更高的FGF-2含量,保留97%的FGF-2($P<0.0001$)。F6(MC与HSA)是第二最稳定的,在8h时保留49.5%的FGF-2。F7(MC、HSA和丙氨酸)与F1(单独的MC)具有相似的储存稳定性,在37°C下8h后,两种溶液示出的剩余FGF-2含量分别为30.9%和26.6%。暴露于37°C下超过16h后,FGF-2的降解速度显著减慢。在37°C下暴露120h时,F6比所有其他测试的FGF-2溶液保留了更高的FGF-2含量(28.8%)。

[0292] 图8. 赋形剂组合对FGF-2水性溶液(770ng/ml)在37°C保存长达5天的稳定性的影响。通过ELISA测量根据指定温育期后的剩余FGF-2含量,并表示为基线浓度的百分比(平均值 \pm SD, $n=3$)。FGF-2溶液缩写如下:F1,在水中的FGF-2;F2,在水中的FGF-2和0.05%w/v甲

基纤维素 (MC) ;F5, 在水中的FGF-2、0.05%w/v MC和20mM丙氨酸;F6, 在水中的FGF-2、0.05%w/v MC和1mg/ml人血清白蛋白 (HSA) ;以及F7, 在水中的FGF-2、0.05%w/v MC、20mM丙氨酸和1mg/ml HSA。

[0293] A.3.4.2加工稳定性

[0294] 探究了赋形剂稳定FGF-2溶液对抗加工应激原的能力。将溶液F1-F7暴露于三个重复的冷冻/解冻循环或冻干。如果加工后,用ELISA测量的剩余FGF-2含量与基线FGF-2水平差异不大于10%,则认为溶液稳定。

[0295] F2、F5、F6和F7对于重复的冷冻/解冻循环是稳定的,在第三轮加工之后在这些样品中测量到99.8%至100%的基线FGF-2 (图9)。

[0296] 图9.赋形剂对暴露于加工应激原的FGF-2水性溶液 (770ng/ml) 的稳定性的影响。将溶液在-20°C下冷冻24h,然后进行三个冷冻/解冻循环或冻干24h。通过ELISA测量根据指定加工程序后的剩余FGF-2含量,并表示为基线浓度的百分比 (平均值 \pm SD, n=3)。FGF-2溶液缩写如下:F1, 在水中的FGF-2;F2, 在水中的FGF-2和0.05%w/v甲基纤维素 (MC) ;F3, 在水中的FGF-2和20mM丙氨酸;F4, 在水中的FGF-2和人血清白蛋白 (HSA) ;F5, 在水中的FGF-2、0.05%w/v MC和20mM丙氨酸;F6, 在水中的FGF-2、0.05%w/v MC和1mg/ml HSA;以及F7, 在水中的FGF-2、0.05%w/v MC、20mM丙氨酸和1mg/ml HSA。

[0297] F3和F4都不能有效地对抗重复的冷冻/解冻循环进行稳定。F3并不比F1对照更好 (P=0.0929), 第三轮处理后仅保留基线FGF-2的13.5%。F4比F1更稳定 (保留32.5%) (P<0.0001), 然而剩余FGF-2含量远低于基线水平的至少90%的基准。

[0298] 尽管F2对于重复的冷冻/解冻循环是稳定的 (保留99.8%基线FGF-2), 但冻干后F2中功能性FGF含量显著损失。事实上,没有一种包含单一赋形剂的溶液对于冻干是稳定的,冻干和用水重构后,F2、F3和F4的剩余FGF-2含量分别为63.3%、7.3%和9.5%。其中,只有F2比F1对照更稳定 (P<0.0001)。

[0299] 当组合使用赋形剂以稳定用于冻干的FGF-2溶液时,观察到改善的结果。包含赋形剂组合的三种溶液对于冻干是稳定的 ($\geq 90\%$ 剩余FGF-2含量;图9);然而,F7的稳定性尽管显著但略低于F5和F6 (P=0.0410), 这表明与MC与丙氨酸或者与MC与HSA的双重组合相比,组合使用所有3种赋形剂并没有优势。

[0300] A.3.5冻干和重构的FGF-2溶液的储存稳定性

[0301] 另外研究冻干F5和F6的储存稳定性,作为冻干干粉末和将冻干粉末重构为溶液时,其中F1作为对照。冻干的FGF-2粉末在-4°C、4°C和18°C下储存长达12个月,并且如果用水重构粉末后用ELISA测量的FGF-2含量与基线 (预冻干溶液中的FGF含量) 差异不大于10%,则认为是稳定的。测量的F1、F5和F6溶液的平均基线FGF-2含量分别为768、769和771ng/ml,溶液之间的基线FGF-2含量没有显著差异 (单向ANOVA, P=0.2503)。

[0302] 立即冻干后,仅保留了F1的基线FGF-2含量的7.1%,代表FGF-2含量显著下降 (图10)。在限定的储存时间点 (由x轴表示),用水重构FGF-2粉末,并通过ELISA测定FGF-2含量。结果以冻干前FGF-2溶液中测定的基线FGF-2含量的百分比表示 (平均值 \pm SD, n=3)。

[0303] 图10.FGF-2水性溶液 (770ng/ml) 在冻干和储存后的稳定性。将FGF-2溶液F1 (仅以水作为负载体)、F5 (具有MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM的水) 和F6 (具有MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml的水) 冻干超过24h,然后在-4°C (A)、4°C (B) 或18°C (C) 下储存长达12个月。在限定的

储存时间点(由x轴表示),用水重构FGF-2粉末,并通过ELISA测定FGF-2含量。结果以冻干前FGF-2溶液中测定的基线FGF-2含量的百分比表示(平均值 \pm SD, n=3)。

[0304] 当冻干F1粉末在-4℃储存时,储存12个月后FGF-2含量没有显著变化(P=0.9367)。类似地,当储存温度升高至4℃时,在储存的前9个月内,FGF-2含量没有显著变化,然而,在4℃储存12个月下,冻干F1粉末中不再检测到蛋白。当在18℃储存时,冻干粉末中的FGF-2含量在3个月内下降至低于可检测限。与之相比,F5和F6不仅对冻干稳定,而且获得的干粉在-4℃、4℃和18℃下也能稳定储存长达12个月。在整个研究期间,所有冻干的F5和F6粉末的FGF-2含量保留大于基线的99%。

[0305] 将冻干的F5和F6粉末在-4℃、4℃或18℃储存指定时间点后用水重构并在4℃或18℃储存24h或7天。通过重构冻干F1粉末制备的溶液在4℃或18℃下储存24h时不稳定,FGF-2含量下降至低于ELISA测定的可检测限(数据未提供)。与之相比,重构的F5和F6溶液在两种储存温度下均可保持稳定24h(图11)和7天(图12),在整个研究期间保留>99%的基线FGF-2含量。

[0306] 图11. 赋形剂对重构的FGF-2水性溶液(770ng/ml)在24h内的稳定性的影响。将FGF-2溶液F5(具有甲基纤维素(MC)0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和F6(具有MC 0.05%w/v和人血清白蛋白1mg/ml的水)冻干24h,并将干燥粉末在-4℃(A和B)、4℃(C和D)或18℃(E和F)下储存长达12个月。在限定的储存时间点(由x轴表示),将FGF-2粉末用水重构以得到溶液,然后在4℃(A、C和E)或18℃(B、D和F)下储存24h。通过ELISA测定储存溶液中的FGF-2含量。结果以冻干前FGF-2溶液中测定的基线FGF-2含量的百分比表示(平均值 \pm SD, n=3)。

[0307] 图12. 赋形剂对重构FGF-2水性溶液(770ng/ml)在7天时间段内的稳定性的影响。将FGF-2溶液F5(具有甲基纤维素(MC)0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和F6(具有MC 0.05%w/v和人血清白蛋白1mg/ml的水)冻干24h,并将干燥粉末在-4℃(A和B)、4℃(C和D)或18℃(E和F)下储存长达12个月。在限定的储存时间点(由x轴表示),将FGF-2粉末用水重构以得到溶液,然后在4℃(A、C和E)或18℃(B、D和F)下储存7天。通过ELISA测定储存溶液中的FGF-2含量。结果以冻干前FGF-2溶液中测定的基线FGF-2含量的百分比表示(平均值 \pm SD, n=3)。

[0308] A.4讨论

[0309] 在MC与最优选丙氨酸或HSA的存在下,溶液中的FGF-2可以针对热应激原和加工应激原有效地稳定。

[0310] FGF-2在水性溶液中固有的不稳定性对包含FGF-2的医药产品的配制、储存和使用提出了重大挑战。除了热不稳定性之外,溶解的FGF-2极易聚集和沉淀,从而导致生物功能迅速丧失。因此,开发有效的FGF-2水性溶液的的稳定化策略仍然是持续研究的领域。

[0311] 制造商建议本研究中使用的冻干FGF-2用水重构。本研究中的数据表明,仅在水中重构的FGF-2(F1)会迅速丧失功能,特别是当暴露于升高的温度时。这些结果与已发表的数据一致,其中FGF-2溶液在25℃下仅46min后就丧失了50%的功能,报告的FGF-2功能半衰期分别缩短至37、33和10分钟,因为储存温度增至37℃、42℃和50℃。

[0312] 为了使FGF-2足够稳定以加工成可以运输和储存而无需-20℃储存的可接受的医药产品,评价了一系列赋形剂稳定FGF-2对抗热和加工相关应激原的能力。赋形剂稳定剂选自不同类别,每一类都预期经由不同的机制稳定FGF-2。

[0313] 与F1对照相比,NaCl没有稳定FGF-2以抵抗热降解,也没有显著降低FGF-2的稳定性。

[0314] 尽管已报道甘露醇成功地稳定了FGF-7(角质形成细胞生长因子),但其不能保护FGF-2免受热降解。

[0315] 随着热稳定性研究扩大到包括更宽的温度范围和更长的温育时间,很明显丙氨酸对于稳定FGF-2是有效的。HSA有效地稳定FGF-2溶液。

[0316] 冻干通常用于制造在水性溶液中不够稳定的蛋白产品。FGF-2固有的不稳定性是开发冻干FGF-2产品的驱动因素。众所周知,这些工艺通常会通过变性或聚集导致蛋白降解,因此重要的是要确定用热稳定性研究中鉴定的赋形剂稳定的FGF-2也能够承受这些应激原。用于本研究的FGF-2以冻干粉末形式提供,不含添加剂(制造商的建议)。在商业上,FGF-2通常在冷冻保护剂存在下冻干,以保留FGF-2功能。冷冻保护剂通常通过在冻干过程期间在水分子被取代时与蛋白形成氢键来防止结构损伤和由此导致的蛋白功能丧失。加工稳定性研究的结果支持了这一假设,水中的FGF-2在冻干后FGF-2的功能性损失了93%。

[0317] 冻干涉及两种应激原,冷冻和干燥,这两种过程都能够破坏蛋白结构。为了使其有效,稳定剂必须有效保护蛋白免受两种应激原的影响。许多研究表明,虽然稳定剂可能有效地保护蛋白免受冷冻,但它可能不是对抗蛋白冻干的有效稳定剂。在这项研究中,虽然MC可有效保护FGF-2免受多次冻干解冻循环的影响,但当作为单一稳定剂使用时,它无法有效保护FGF-2免受冻干影响。这可能是由于它无法保护FGF-2免受干燥,干燥通常会破坏蛋白结构,导致重构时出现不可逆的蛋白聚集。另外,蛋白针对冻干中的成功稳定化并不总是与提供储存稳定性的能力相关。研究发现,不含任何赋形剂的冻干弹性蛋白酶在冻干后立即保留了其基线活性,然而随后的2周储存期内,其活性损失了70%。

[0318] 在该研究中,FGF-2对抗冻干的有效稳定化需要MC与丙氨酸或MC与HSA的组合。对于FGF-2水性溶液,将MC的稳定化作用与丙氨酸和/或HSA的稳定化作用组合存在一个优点,其保护FGF-2免受冻干以及随后的冻干蛋白粉末的储存和重构。

[0319] 该研究清楚地证明了组合赋形剂以稳定化FGF-2对抗热和加工应激原的优点。开发药物产品时,希望使用尽可能少的数量和最低的浓度的赋形剂。因此,由于缺乏明显的益处、与使用F7相关的毒性增加的潜在风险以及增加的制造成本,因此优选更简单的F5和F6制剂。

[0320] B实施例2——稳定化的碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)水性溶液功效的体外评价

[0321] B.1研究目的

[0322] 旨在证明赋形剂稳定剂的添加不会否定FGF-2促进细胞增殖、伤口愈合和趋化迁移的固有能力和,并且稳定化的FGF溶液在产生这些生物效应方面优于非稳定化的FGF溶液。

[0323] B.2材料和方法

[0324] 实验是在中国桂林医科大学(Guilin Medical University,China)的交换项目期间进行的,并且使用由桂林医科大学的Jingxin Mo教授善意提供的原代人真皮成纤维细胞培养物来生成数据。

[0325] B.2.1材料

[0326] 磷酸盐缓冲盐水(PBS)、青霉素/链霉素100X(P/S)、4%甲醛和碘化丙啶(PI)购自

北京索拉生物科技有限公司(Beijing Solarbio Science and Technology Co.) (中国北京)。胎牛血清(FBS)购自Lonsera(中国上海),达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)购自Gibco(美国纽约)以及细胞计数试剂盒-8(CCK-8)购自Dojindo Molecular Technologies(中国上海)。人重组FGF-2购自Peprotech(中国苏州),以及人FGF-2ELISA试剂盒购自Thermo Fisher Scientific(美国马里兰州)。甲基纤维素USP 4000购自澳大利亚专业复合化学家(PCCA;澳大利亚新南威尔士州),以及人血清白蛋白、DL-丙氨酸和羟丙基甲基纤维素(HPMC)购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州)。整个过程中使用去离子水。

[0327] B.2.2样品制备和通过ELISA定量

[0328] 通过将冻干的FGF-2粉末以1mg/ml(基于干粉末重量)在水中重构来制备FGF-2储备溶液。用水稀释储备溶液以获得50至800pg/ml之间的FGF-2浓度并立即根据制造商的说明使用商业ELISA试剂盒进行测定。使用酶标仪(FilterMax F5多功能酶标仪, Molecular Devices, 美国加利福尼亚州)获得稀释的FGF-2溶液在450nm处的吸光度,并使用标准曲线将其转化为FGF-2含量。标准曲线是根据标准FGF-2溶液(15.6-1000pg/ml)的吸光度读数绘制的,该溶液根据制造商的说明使用ELISA试剂盒中提供的FGF-2标准品制备。然后将储备浓度调整至5.2µg/ml(活性FGF-2,通过ELISA测定)。

[0329] 将FGF-2稳定化负载体1-6制备为浓缩储备溶液。用水或FGF-2储备溶液稀释负载体储备液,以得到表2中所述的最终负载体组合物。将FGF-2储备溶液类似地用负载体1-6稀释至1600ng/ml(活性FGF-2通过ELISA测定),以制备本研究的储备溶液。这些储备溶液通过表11中描述的特定ID进行识别。将储备溶液等分样品(10-50µl)置于0.1ml Eppendorf®管中并冷冻直至需要进行进一步实验。通过解冻储存的溶液并用测试培养基(TCM:具有1% FBS和1% P/S的DMEM)连续稀释以获得所需的工作浓度来制备用于细胞培养实验的样品。空白负载体(表2)以类似方式等分、储存和稀释以用作对照。

[0330] 表6. 稳定化载体和FGF-2溶液的识别关键因素。通过将稳定化负载体(1-6)的浓缩储备液与FGF-2溶液(5.2µg/ml,活性FGF-2通过ELISA测定)组合来制备溶液,以得到1600ng/ml的最终FGF-2浓度和如下所述的最终赋形剂浓度。

稳定化载体 ID	负载体描述	稳定化溶液 ID	溶液的描述
1	水(作为对照)	F1	FGF-2(1600 ng/ml)在负载体 1 中的溶液(作为对照)
2	在水中的甲基纤维素(MC; 0.05% w/v)	F2	FGF-2(1600 ng/ml)在负载体 2 中的溶液
3	在水中的丙氨酸(20 mM)	F3	FGF-2(1600 ng/ml)在负载体 3 中的溶液
4	在水中的人血清白蛋白(HSA; 1 mg/ml)	F4	FGF-2(1600 ng/ml)在负载体 4 中的溶液
5	在水中的 MC (0.05% w/v)和丙氨酸(20 mM)	F5	FGF-2(1600 ng/ml)在负载体 5 中的溶液
6	在水中的 MC(0.05% w/v)和 HSA(1 mg/ml)	F6	FGF-2(1600 ng/ml)在负载体 6 中的溶液

[0332] B.2.3 细胞培养

[0333] 将从健康成年人皮肤分离的原代人真皮成纤维细胞以大约 2.2×10^6 个细胞的密度接种于在100mm培养皿(Eppendorf, 德国汉堡)的10ml的完全培养基(CCM:具有10% FBS和1% P/S的DMEM)中,并培养直至汇合,为未来的研究做准备。除非另有说明,否则细胞培养物在37°C、5% CO₂气氛下温育(Forma系列II水套CO₂培养箱,Thermo Scientific,美国马萨诸塞州)。

[0334] B.2.4 剂量反应测定

[0335] 将成纤维细胞(100 μ l的CCM中的 5×10^3 个细胞)添加到96孔培养板(Corning,美国纽约)的每个孔中。温育24h后,用测试培养基(TCM:具有1% FBS和1% P/S的DMEM)替换CCM,并将细胞培养另外的24h以阻止细胞生长。将FGF-2溶液和空白负载体以递增剂量(相当于0.0098-200ng/ml FGF-2)应用于成纤维细胞,一式三份并培养48h。取出样品并用100 μ l的已用TCM 1:10稀释的CCK-8替换。然后将板温育1h,然后用读板器在450nm处测量每个孔的吸光度。通过以下来确定剂量-反应曲线:从FGF-2样品的吸光度值中减去相应负载体样品的吸光度值,并用4参数逻辑拟合(GraphPad Prism 8,美国加利福尼亚)绘制针对FGF-2剂量的净值,以计算每种溶液的半最大有效浓度(EC₅₀)值。

[0336] B.2.5 伤口愈合测定

[0337] 经由伤口愈合划痕测定来探究FGF-2溶液的细胞再生能力。将成纤维细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度与1ml CCM一起接种在24孔培养板(Corning,美国纽约)中,并培养48h以达到汇合。将CCM替换为TCM,并将细胞培养另外的24h以实现生长停滞。用塑料一次性移液管尖端(200 μ l)在汇合的细胞单层上划痕,并用PBS洗涤培养物两次以去除非贴壁细胞。然后将细胞与1ml FGF-2溶液(50ng/ml,通过用TCM稀释FGF-2储备溶液F1-6制备)或稳定化负载体(1-6,类似地用TCM稀释)温育24h。在0、8和24h时拍摄细胞培养物的图像(显微镜:Nikon Eclipse Ti-S,相机:Nikon DS-Ri2,软件:NIS Elements v5.01,Nikon公司,日本东京)。使用ImageJ(美国马里兰州国立卫生研究院(National Institutes of Health))处理图像,并使用一种算法确定伤口区域,该算法基于局部纹理同质性的差异区分无细胞区域

和细胞密集区域。通过从0h时的基线伤口面积减去8h或24h时的剩余伤口面积,并将结果表示为基线伤口面积的百分比来计算伤口闭合百分比。该实验一式三份进行,并且伤口闭合百分比表示为平均值 \pm SD。

[0338] B.2.6 趋化迁移测定

[0339] 使用Boyden孔室(Boyden well chamber)技术评估成纤维细胞趋化迁移。将成纤维细胞以悬浮在200 μ l的TCM中的 5×10^4 个细胞接种到24-细胞透室培养板(8 μ m孔径; Corning, 纽约, 美国)的顶端室(apical chamber)中,并在基底外侧室(basolateral chamber)中与500 μ l的TCM一起温育过夜,以使细胞附着。添加FGF-2溶液(F1-6; 50ng/ml)和相应的稳定化负载体样品(1-6),以替换仅基底外侧室(500 μ l)中或者顶端和基底外侧室两者(分别为200 μ l和500 μ l;图13)中的TCM。将成纤维细胞接种到细胞透室膜的顶端表面上,向仅基底外侧室或者顶端和基底外侧室两者添加FGF-2溶液(F1-6)或稳定化负载体(1-6),然后通过24h时细胞透室膜基底表面上存在的细胞数量来测量细胞的趋化迁移。

[0340] 仅向基底外侧室添加样品在顶端室和基底外侧室之间产生浓度梯度,从而允许检测趋化迁移。与之相比,向基底外侧室和顶端室添加样品导致室之间没有浓度梯度,并控制化学促活(chemokinetic)迁移。将平板培养另外的24h,并用浸泡在PBS中的棉签去除残留在膜顶端表面上的细胞(非迁移性),从而仅对迁移并附着在膜底表面上的那些细胞进行计数。将细胞透室用PBS洗涤,去除未贴壁的细胞和残留的培养基,然后用4%甲醛浸泡30min以固定细胞。用PBS洗涤细胞,用10 μ M碘化丙啶染色20min,并通过荧光显微镜观察(激发535nm,发射615nm;Leica DM4 B;Leica Microsystems,德国韦茨拉尔)。拍摄照片(Leica DFC7000T相机,Leica Microsystems,德国韦茨拉尔)并进行处理(Leica Application Suite X,Leica Microsystems,德国韦茨拉尔)。

[0341] 使用ImageJ分析照片图像以确定已迁移至细胞透室膜的基底表面的细胞数量。每张膜获得七张图像,以确保覆盖基底膜的整个表面。每个图像的细胞计数由代表已迁移至该细胞透室的细胞的七个图像的这些细胞计数的总和确定。该实验一式三份进行,并且细胞计数表示为平均值 \pm SD。

[0342] B.2.7 数据分析

[0343] 结果表示为平均值 \pm SD。除非另有说明,否则数据均通过具有应用于平均值配对比较的事后图基检验(GraphPad Prism 8,美国加利福尼亚州)的双向ANOVA进行分析。P值 ≤ 0.05 被认为是显著的。

[0344] B.3 结果

[0345] B.3.1 剂量反应测定

[0346] 图14.原代人真皮成纤维细胞对含有不同稳定剂的FGF-2水性溶液的剂量递增(0.0098-200ng/ml)的反应的细胞增殖曲线。FGF-2溶液F1(仅以水作为负载体)、F2(具有甲基纤维素(MC) 0.05%w/v的水)、F3(具有丙氨酸20mM的水)、F4(具有人血清白蛋白(HSA) 1mg/ml的水)、F5(具有MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和F6(具有MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml的水)以递增剂量应用于成纤维细胞。经由CCK-8测定来测量细胞增殖效应并计算净吸光度(FGF溶液的培养孔的吸光度减去相应负载体的培养孔的吸光度)。每个点代表平均值 \pm SD(n=3)。

[0347] 向成纤维细胞添加逐渐增加剂量的稳定化FGF-2溶液(F2-F6)导致不同的增殖效

应(图14)。在0.0098ng/ml的最低施加的FGF-2剂量下,与F1对照相比,稳定化的FGF-2溶液均未显示出细胞增殖效应的显著差异(单向ANOVA, $P=0.1252$)。随着FGF-2剂量的增加,溶液之间细胞增殖效应的差异变得更加明显,虽然所有溶液在FGF-2剂量 ≥ 50 ng/ml时均表现出活性稳定,但各溶液所表现出的最大活性存在差异。在50-200ng/ml的高剂量下,F5和F6产生了相当的细胞增殖效应($P=0.8399$),且比其他FGF-2溶液的活性更强。两者中,F5在较低浓度下更有效,在更广泛的浓度范围(0.078-2.5ng/ml)内,其细胞增殖效应始终高于其他溶液(包括F6)。与之相比,F2在0.0098至2.5ng/ml之间的低剂量下与F6一样有效($P=0.4073$),但在更高剂量下,其作用低于F5和F6。以类似的方式,低剂量(0.039-0.078ng/ml)的F4产生与F5相当的细胞增殖效应,其活性大于其他FGF溶液的活性,但在剂量高于5ng/ml时,其活性低于F5、F6和F2。相比之下,F3在高剂量(≥ 50 ng/ml)下示出与F4相当的活性,但在低FGF剂量下与对照溶液的活性没有差异。当FGF-2剂量大于25ng/ml时,所有稳定化的FGF-2溶液在成纤维细胞中产生的增殖效应均高于对照(F1, $P<0.0001$)。在此基础上,FGF-2溶液对原代人真皮成纤维细胞的细胞增殖活性可按以下降序排列:F5>F6>F2>F4>F3>F1。从剂量-反应曲线确定的EC50值通常支持该排名,对照(F1)显示最大EC50(10.754ng/ml),随后是F3(10.191ng/ml)和F4(10.17ng/ml)的相当值,然后是F2(4.104ng/ml)、F6(1.145ng/ml)和F5(1.064ng/ml)。

[0348] 无论稳定化负载体如何,大于50ng/ml的FGF-2剂量与细胞增殖活性的显著增加不相关。考虑到50和200ng/ml的FGF-2剂量之间细胞增殖效应的微小差异,FGF-2溶液之间的充分分化以及预算和FGF-2可用性的限制,选择50ng/ml作为FGF-2最大细胞活性的阈值剂量,并进行本节的所有进一步研究。因此,从此时起,FGF-2溶液F1-F6将指用TCM稀释至最终浓度为50ng/ml FGF-2的FGF-2储备溶液(表2)。

[0349] B.3.2伤口愈合测定

[0350] 图15. 稳定化的FGF-2溶液的伤口愈合能力。使成纤维细胞生长至汇合,然后通过将移液管尖端沿单线划过每个孔的底部在细胞单层中产生伤口。暴露于稳定化负载体(A)或FGF-2溶液(B)后,细胞迁移以覆盖无细胞的模拟伤口区域。每种溶液均通过负载体组合物进行识别;负载体1(仅水)、负载体2(具有甲基纤维素(MC)0.05%w/v的水)、负载体3(具有丙氨酸20mM的水)、负载体4(具有人血清白蛋白(HSA)1mg/ml的水)、负载体5(具有MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和负载体6(具有MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml的水)。FGF-2溶液(F1-F6)在相应的负载体中包含50ng/ml FGF-2。在暴露8或24h后,将受伤伤口面积的闭合确定为相对于基线伤口面积的百分比,每个数据点代表平均值 \pm SD($n=3$)。

[0351] 将原代真皮成纤维细胞单层的模拟伤口暴露于稳定化负载体(1-6)和FGF-2溶液(F1-F6,包含50ng/ml FGF-2)的每一种中以评估FGF-2的伤口愈合能力(图15)。所有负载体在24h时段内仅刺激最小的伤口闭合(5-9%),在溶液中观察到伤口闭合没有显著差异($P=0.9533$)。模拟伤口的代表性光学显微镜图像呈现于图16中。

[0352] 图16. 暴露于空白负载体和FGF-2溶液的人真皮成纤维细胞单层中的模拟伤口的代表性光学显微照片。通过用移液管尖端在每一个孔的底部绘制一条线来制造伤口,扰乱成纤维细胞单层。暴露于稳定化负载体(样品1-6)或FGF-2溶液(样品F1-F6)后,细胞迁移以覆盖无细胞的模拟伤口区域。每种样品均通过负载体组合物进行识别;负载体1(仅水)、负载体2(具有甲基纤维素(MC)0.05%w/v的水)、负载体3(具有丙氨酸20mM的水)、负载体4(具

有人血清白蛋白 (HSA) 1mg/ml的水)、负载体5 (具有MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和负载体6 (具有MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml的水)。FGF-2溶液 (F1-6) 额外包含50ng/ml FGF-2。在暴露于样品后0、8和24h时拍摄图像。所有图像均以100X放大倍率捕获,比例尺=500 μ m。

[0353] 通过比较,将伤口暴露于FGF-2溶液导致在8和24h时更大的伤口面积闭合。暴露后8h时,F1、F2、F5和F6显示出相当的伤口闭合活性,显著高于F3观察到的伤口闭合 (F1:P=0.0121;F2:P=0.0482;F5:P=0.0413和F6:P=0.0473)和F4样品 (F1:P=0.007;F2:P=0.0492;F5:P=0.0024和F6:P=0.0046)。然而,在暴露24h时,F1与F2、F3和F4没有差异 (分别为70.5%、75.7%、74.9%和73.2%),而F5和F6持续比所有其他溶液产生显著更好的伤口愈合 ($P<0.0001$),在24h时伤口面积分别减少92.5%和94.1%。

[0354] B.3.3趋化迁移测定

[0355] 通过在细胞透室装置中产生FGF-2的浓度梯度并应用稳定化负载体载体进行对照实验来研究成纤维细胞的趋化迁移。将稳定化负载体添加到仅下基底外侧室或者添加到细胞透室的上顶端和下基底外侧室两者的细胞透室均不会导致>20个细胞从膜的顶端迁移到基底表面 (图17)。

[0356] 图17.比较在以下项中的暴露于稳定化负载体 (1-6) 24h后经历趋化迁移的人真皮成纤维细胞的数量:在上室和下室两者中 (A) 或仅下室中 (B);或在FGF-2溶液 (F1-F6) 于细胞透室装置的上室和下室两者中 (C) 或仅下室中 (D)。

[0357] 每种样品均通过负载体组合物进行识别;负载体1 (仅水)、负载体2 (具有甲基纤维素 (MC) 0.05%w/v的水)、负载体3 (具有丙氨酸20mM的水)、负载体4 (具有人血清白蛋白 (HSA) 1mg/ml的水)、负载体5 (具有MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和负载体6 (具有MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml的水)。FGF-2溶液 (F1-F6) 额外包含50ng/ml FGF-2。结果表示为迁移细胞的平均数/孔 \pm SD ($n=3$)。

[0358] 与单独用相应的稳定化负载体获得的数据相比,向细胞透室的上室和下室两者中添加包含FGF-2 (50ng/ml) 的溶液也没有导致迁移到膜的基底表面的细胞数量显著不同 ($P=0.8265$)。

[0359] 相比之下,仅在下室中添加FGF-2溶液会导致细胞向细胞透室膜基底表面的高度迁移 (图18),与相应的负载体相比,迁移的细胞数量增加了10倍至30倍 ($P<0.0001$)。

[0360] 图18.经历趋化迁移至细胞透室膜的基底表面的人真皮成纤维细胞响应于FGF-2的代表性荧光显微照片。将接种在细胞透室膜的顶端表面上的细胞暴露于FGF-2溶液或者暴露于添加至细胞透室装置的基底外侧室中的相应稳定化负载体。每种样品均通过负载体组合物进行识别;负载体1 (仅水)、负载体2 (具有甲基纤维素 (MC) 0.05%w/v的水)、负载体3 (具有丙氨酸20mM的水)、负载体4 (具有人血清白蛋白 (HSA) 1mg/ml的水)、负载体5 (具有MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和负载体6 (具有MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml的水)。FGF-2溶液额外包含50ng/ml FGF-2。所有图像均以200X放大倍率捕获,比例尺=1mm。

[0361] F5和F6产生相当的化学引诱物作用,其在FGF-2溶液中最强,而F1、F2和F3产生相当的最低作用。与其他FGF溶液相比,F4产生了中等的化学吸引作用。化学吸引潜力的排序为:F5=F6>F4>F1=F2=F3。

[0362] B.4讨论

[0363] FGF-2的稳定化增强了FGF-2在体外模型中的效力,优选通过添加MC与丙氨酸或

HAS来使FGF-2稳定化。

[0364] 已知FGF-2在多种组织中发挥增殖、迁移和化学吸引作用。这些特性使FGF-2成为伤口愈合和组织工程构建中有吸引力的成分。然而,FGF-2在水性溶液中的快速降解显著阻碍了包含FGF-2的药物产品的开发。据推测,FGF-2在水性溶液中的稳定化将增强FGF-2的细胞增殖、细胞迁移和化学引诱物作用。本研究分别经由剂量反应、伤口愈合和趋化迁移测定生成体外基于细胞的数据来证实这些作用。

[0365] 文献中有充分记载,分散在水中的FGF-2热不稳定并且很快失活,当暴露于温度时半衰期为37min。因此,当将对照(F1) FGF-2溶液添加到细胞培养物中时,正如本研究中那样,预计FGF-2将迅速失活,并且只有当FGF-2剂量足够高时才能观察到明显的细胞增殖效应。这一假设通过剂量反应测定得到了证实,在研究中使用的所有包含FGF-2的溶液中,水中的FGF-2(F1)具有最高的EC50值(10.754ng/ml)和最低的最大增殖效应。基于先前研究实施例1的稳定性结果,还预期F5和F6溶液在37°C下具有最大的稳定性,并且然后表现出对成纤维细胞的最大的细胞增殖反应。事实上,F5和F6溶液在人真皮成纤维细胞中产生了最大的增殖反应,比F1的高,大约10倍,并且它们的EC50值(分别为1.064和1.145)是FGF-2溶液中最低的。F5和F6的这些作用与在FGF-2溶液中添加内源性稳定剂肝素后观察到的EC50值降低10分之一相似,表明F5和F6增强的细胞增殖效应是这些溶液中存在的稳定剂的组合的直接影响。

[0366] FGF-2受体的密度和随后各种细胞和组织对外部FGF-2刺激的反应性,以及FGF-2样品的纯度,可能决定对于特定临床应用的指定的最佳FGF-2剂量。因此,必须为人真皮成纤维细胞的这项研究建立FGF-2的阈值剂量。值得注意的是,不稳定的FGF-2对胎牛心脏上皮细胞的最大增殖效应发生在约100ng/ml的剂量下,这是本研究中确定的阈值剂量50ng/ml的两倍。

[0367] 尽管FGF-2能够非常快速地发挥生物效应,但由于蛋白聚集和降解,其在体外和体内很快失活。因此,由于FGF-2的快速失活,暴露于溶液F1后8h时观察到的早期伤口愈合反应很可能无法在研究期间维持。相比之下,在暴露于溶液F5和F6后8h时观察到的伤口愈合反应在24h的研究期间成功维持,从而导致更大的伤口面积闭合。这表明溶液F5和F6中的FGF-2足够稳定,使得FGF-2能够比F1更长时间地发挥其生物效应。

[0368] 预期空白稳定化负载体不会促进伤口愈合。在这项研究中,向人真皮成纤维细胞培养物中添加空白负载体仅导致最小程度的伤口愈合,并且在24h的过程内,许多样品开始表现出较低的细胞计数,这表明细胞窘迫,这可能是由于负载体和TCM培养基中缺乏营养。另外,稳定剂本身对细胞迁移没有显著影响。因此,对包含FGF-2的溶液获得的结果可直接归因于溶液中FGF-2的存在和相对稳定性。

[0369] 划伤伤口测定的主要限制是其无法区分响应于FGF-2的趋化细胞迁移和化学促活细胞迁移。趋化细胞迁移和化学促活细胞迁移之间的区分可以经由细胞透室系统实现,其中可以在顶端室和基底外侧室之间建立FGF-2浓度梯度。通过将测试样品添加到仅细胞透室装置的基底外侧室(在顶端和基底外侧之间创建浓度梯度)或者添加到顶端和基底外侧室两者(顶端和基底外侧之间没有浓度梯度),可以区分趋化迁移和化学促活迁移。将空白负载体(1-6)添加到仅细胞透室的基底外侧室或者添加到细胞透室的顶端室和基底外侧室,导致从细胞透室膜的顶端迁移到基底表面的细胞数量没有差异。这表明单独的稳定化

负载体不促进细胞迁移。相反,将包含FGF-2的溶液添加到仅细胞透室装置的基底外侧室中,导致细胞向细胞透室膜基底表面的迁移显著大于将包含FGF-2的溶液添加到系统的顶端和基底外侧室两者时观察到的迁移,这表明实际上涉及趋化作用而非化学促活作用。由于在成像之前未迁移的细胞已从细胞透室膜的顶端表面去除,因此很可能只有细胞培养物的亚群参与了研究期间向FGF-2的迁移。目前尚不清楚这是由于时间因素或细胞上FGF-2受体表达水平的差异所致。

[0370] FGF-2溶液的组成对观察到的细胞迁移程度发挥重要作用。F4表现出比F1、F2和F3更强的化学吸引作用,这可能归因于F4中HSA的存在。在暴露于FGF-2溶液之前,通过用TCM替代CCM来使人真皮成纤维细胞“饥饿”。通常将HSA,或更常见的是BSA添加到细胞培养基中以优化细胞生长。因此,F4中的HSA可能已经刺激了饥饿细胞向营养物迁移,导致比F1、F2和F3中观察到的更大的迁移效应。HSA也存在于F6中,但不存在于F5中,但两者均示出比F4更强的相当的趋化作用。这可能归因于F5和F6中FGF-2的稳定性增加,这将使FGF-2活性能够在更长时间内维持在更高浓度上。反过来,与所有其他FGF-2溶液相比,这可能使F5和F6对人类真皮成纤维细胞表现出增强的增殖、迁移和化学吸引作用。

[0371] 该研究的结果表明FGF-2的稳定化增强了体外模型中FGF-2的内源效应。

[0372] C实施例3:优化的基于藻酸盐的支架材料的开发和表征

[0373] C.1研究目的

[0374] 旨在确定基于藻酸盐的支架材料的制备条件,其将为负载FGF-2提供最佳特性,以用于治疗慢性TM穿孔。

[0375] C.2材料和方法

[0376] C.2.1材料

[0377] 氯化钙(CaCl₂)购自Chem-SupplyPtyLtd.(澳大利亚南澳大利亚)。

[0378] C.2.2原型支架材料的制备

[0379] 通过藻酸钠与钙离子交联获得的藻酸钙被选为原型支架材料,其基于其GRAS状态、之前在伤口愈合应用中的使用、生物相容性的证据以生产藻酸钙支架所需的相对简单/容易定制的方法。为了进行比较,还评价了商购的基于明胶的支架材料 **Gelfoam®** (Pfizer,美国纽约)。

[0380] C.2.2.1空白支架材料的制备

[0381] 将低粘度藻酸钠溶解在水中以产生1.5%、2%或3%w/v溶液,并将这些溶液以不同体积添加到12孔、24孔或96孔培养板(Corning,美国纽约)的每个孔中以获得不同直径和厚度的支架。将充满液体的板在-20°C (Westinghouse Freezer FJ302V-L, Westinghouse Electric Corporation,美国宾夕法尼亚州)冷冻16h,然后将等体积的CaCl₂溶液(25、50或100mM)添加到每个孔中并在环境温度下与解冻的藻酸钠溶液交联20min。将CaCl₂添加到冷冻藻酸钠溶液中,使得交联反应以受控方式在整个表面上发生,随着藻酸盐溶液解冻而深入渗透,并产生更均一交联的支架材料。通过将每个孔完全注满水来去除过量的CaCl₂,使支架浸泡2min,然后从孔中去除所有液体。洗涤过程重复三次,然后向每个孔中添加水以完全浸没支架,并将浸泡的支架在-20°C下冷冻16h,然后冻干(Alpha 1-2LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, 德国)24h。

[0382] 表7.用于制备用于支架优化实验的基于藻酸盐的原型支架材料的藻酸盐体积。体

积取决于用于制备支架材料的模具,并基于所得支架的预期厚度将每个模具尺寸分类为低、中或高。基于模具直径,预计低、中、高体积的每一种分别生产厚度为约1.5、3.0和5.0mm的支架。

模具说明 体积分类		藻酸钠溶液体积(ml)		
		12 孔培养板	24 孔培养板	96 孔培养板
[0383]	低	0.5	0.3	0.05
	中	1	0.5	0.1
	高	2	1	0.15

[0384] 表8. 用作藻酸盐支架生产的模具的培养板的特性。详细信息是根据制造商信息汇总的。

模具	模具直径 (mm)	最大体积 (mL)	材料	制造商
[0385] 12 孔培养板 (M12)	22.1	6.9	聚苯乙烯	Corning
24 孔培养板 (M24)	15.6	3.4	聚苯乙烯	Corning
96 孔培养板 (M96)	6.35	0.36	聚苯乙烯	Corning

[0386] C.2.2.2使用不同负载体溶解藻酸钠来制备空白支架材料

[0387] 在对所制备的支架进行表征实验之后,其中使用水作为负载体,将与50mM CaCl₂交联的中等体积的2%w/v藻酸钠确定为用于制备藻酸盐支架的最佳组合,无论模具尺寸。为了确定使用用于评价FGF-2稳定性的负载体替代水是否会影响藻酸盐支架的物理特性,制备了支架,不同的是使用每种稳定化负载体代替水作为溶解介质来制备藻酸盐溶液。

[0388] C.2.2.3负载FGF-2的支架材料的制备

[0389] 为了确定FGF-2的添加是否会影响藻酸盐支架的物理特性,用包含10.5μg/ml的FGF-2的2%w/v藻酸钠溶液来制备支架并使用稳定化负载体作为溶解介质。将藻酸钠溶解在每种稳定化负载体(1-6)中,并达到制备2%w/v藻酸钠溶液所需的最终体积的90%。剩余10%的体积由相应稳定化负载体(1-6)中的FGF-2组成。将FGF-2储备溶液(在水中185μg/ml,通过ELISA确认FGF-2含量)用稳定化负载体(1-6)稀释以制备105μg/ml溶液,并将这些溶液(100μl/ml)添加至相应的藻酸钠溶液中,得到10.5μg/ml的最终FGF-2浓度。将溶液涡旋2min以确保同质性,然后将100μl的每种溶液(包含1050ng FGF-2)添加至96孔培养板(Corning,美国纽约)的孔中。由于FGF-2的成本高昂,仅使用96孔板和与50mM CaCl₂交联的中等体积的藻酸盐溶液来制备单一支架尺寸。

[0390] C.2.3支架材料的特征

[0391] 探究藻酸盐支架的物理性质以确定生产具有临床用途所期望特性的一致产品所需的藻酸钠的最佳体积以及藻酸钠和CaCl₂浓度的组合。理想的支架应具有一致的尺寸和重量,在运输和处理过程中保持其结构完整性,并以受控的速率水合,以便在至少两周的时间内释放其负载的运载物。此外,支架材料应是多孔的,具有适当的结构以促进组织再生。

[0392] 并非所有慢性TM穿孔都具有相同的尺寸或形状。因此,预计支架材料可能需要切割或成型以用于临床环境中的个体化治疗。因此,使用12孔培养板制备的最大支架额外地使用4mm活检穿孔器切割成圆盘,以确定切割时支架的物理特性是否会改变。理想的支架材料即使在切割时也能保持其物理特性。根据Gunesh Rajan教授的推荐,为此目的选择了4mm活检穿孔器,因为根据他的手术经验,该仪器很容易获得,并且通常在临床环境中使用。

[0393] **Gelfoam®**海绵已在临床试验中成功地与FGF-2组合使用以促进慢性TM穿孔的愈合。因此,将**Gelfoam®**海绵用作评价藻酸盐支架材料的比较物(comparator)。为了便于本节中的讨论,将藻酸盐支架称为测试支架,以及将**Gelfoam®**支架称为对照支架。

[0394] C.2.3.1直径

[0395] 测量测试支架的直径以确定制备方法是否能够产生一致且尺寸均一的支架材料。将测试支架从模具中取出并放置在具有0.5mm标记的尺子上。另外使用4mm活检穿孔器(Kai Medical,日本岐阜县)将测试和对照支架切成圆盘。这些部分的直径以与全尺寸支架相同的方式测量。

[0396] C.2.3.2厚度

[0397] 测量测试支架材料的厚度以确定该制备方法是否能够生产厚度均一的支架材料。使用片卡尺(Mitutoyo 543-783B Absolute,Mitutoyo Corporation,日本神奈川县)来测量支架厚度。在支架测量之前,在中间位置对卡尺的臂和底板之间的距离进行校准。从模具中取出后以及使用活检穿孔器切割后,测量测试支架的厚度(以mm为单位)。还测量了对照支架的厚度(如所提供的和使用活检穿孔器切割后的)以进行比较。在12孔板和24孔板中制备的测试支架的直径大于卡尺,并在5个不同位置测量其厚度。同样,由于**Gelfoam®**支架(如所提供的)尺寸较大,因此在9个不同位置处测量了该支架的厚度。将这些测量的平均值视为支架的厚度。

[0398] C.2.3.3重量

[0399] 测量测试和对照支架材料(n=6)的平均重量(mg)(**Pioneer®**分析天平,0haus Corporation,美国新泽西州)以确定该制备方法是否能够生产重量均一的支架材料。

[0400] C.2.3.4脆碎度

[0401] 为了在临床上有用,支架必须在运输期间和插入TM穿孔期间保持其结构完整性。通过测量支架脆碎度来检查运输和处理对支架完整性的影响,总质量的损失小于5%视为可接受。对六个支架进行称重,将其放置在脆碎试验机(friabilator)(Vankel 45-2000脆碎度测试仪,瓦里安医疗系统,澳大利亚新南威尔士州)的室内,并在4min内翻滚100转。使用软毛刷去除支架表面上存在的任何可见碎片,然后记录脆碎度测试后6个支架的总重量。对于每种类型的支架以一式三份进行重复测试,并且结果表示为平均质量损失百分比±SD。

[0402] C.2.3.5水合

[0403] 假设达到平衡水合的时间将影响负载的运载物从支架材料的释放速率,因为预期药物释放主要经由水进入以溶解运载物后的扩散发生。尽管**Gelfoam®**已成功与FGF-2组合使用以促进慢性TM穿孔的愈合,但许多患者需要多次施加FGF-2,这表明FGF-2的作用并未持续足够长的时间以允许通过单次施加实现完全的组织再生。因此,为了延长负载运载

物的释放和随后的活性,理想情况下测试支架材料应该比 **Gelfoam®** 比较物具有更长的时间达到平衡水合。

[0404] 确定测试支架和对照支架两者的平衡水合时间。记录每个支架的重量,然后将其放入装有2ml的水的玻璃瓶中,并在室温下不加盖、不搅拌地储存长达21天。在限定的时间点(1h-21天),使用钳将支架从水中取出,用Kimwipes(Kimberly-Clark Professional,澳大利亚新南威尔士州)吸干表面水,并记录支架的湿重。将支架材料的平衡水合时间定义为支架材料的重量达到平衡的点(定义为3次连续测量中的重量差异<1%)。

[0405] 支架材料有可能在插入至TM穿孔内期间经历压缩。为了重复这种情况,在评估平衡水合时间之前,用片剂硬度测试仪(VK 200,瓦里安医疗系统,澳大利亚新南威尔士州)使用343N的力压缩额外的支架。

[0406] 对于预形成的对照支架,通过将支架浸泡在已知运载物浓度的溶液中来负载运载物。为了确定可以负载到支架中的最大液体体积,计算了支架的流体吸收能力。通过从完全水合的支架的重量中减去支架的初始重量(水合之前)来确定对照支架的流体吸收能力。将重量差视为支架的流体吸收能力。

[0407] C.2.3.6形态

[0408] 为了使支架材料促进细胞浸润、增殖和分化,其应包含具有适当多孔结构的均一尺寸的孔以促进组织再生。通过扫描电子显微术(SEM)观察测试和对照支架材料的表面形态和结构。所有支架均溅射涂覆有金,然后通过扫描电子显微镜(SU8100,日立,日本东京)使用3kV的加速电压,在30、100和300X放大倍率下进行可视化。使用ImageJ(美国马里兰州国立卫生研究院)处理图像,并使用内置的“分析颗粒”算法从10张SEM图像中确定每种支架材料的平均孔面积、孔直径和总体孔隙率。创建了遮罩,突出显示图像中可见的孔。然后,算法将这些孔视为“颗粒”,计算出由这些“颗粒”组成的图像区域的平均面积、直径和百分比。

[0409] C.2.3.7数据分析

[0410] 除了用于分析空白原型支架的三向ANOVA(其使用IBM SPSS(IBM Corporation,美国纽约)进行)之外,统计分析使用GraphPad Prism 8(美国加利福尼亚州)完成,所有结果都表示为平均值±SD。如结果所示,**Gelfoam®**数据通过学生t检验进行分析。

[0411] 使用三向ANOVA来分析藻酸钠体积、藻酸钠浓度、CaCl₂浓度和模具尺寸对空白原型支架的特征的影响的比较,除非另有说明,否则将藻酸钠体积和浓度浓缩为单个参数如下。探究了三种藻酸钠体积(低、中和高)和三种藻酸盐浓度(1.5、2和3%w/v)。通过为每个藻酸钠浓度指定数字标识符(1.5%w/v=1,2%w/v=2和3%w/v=3)并将每个藻酸盐体积指定为字母标识符(低=A,中=B和高=C),将这些参数浓缩为单一因素。然后可以将这些因素组合成具有9个水平的单个参数(藻酸盐的体积和浓度)。然后以藻酸钠浓度/体积、CaCl₂浓度和模具尺寸作为三个自变量,进行具有事后图基检验的三向ANOVA。

[0412] 表9.将藻酸盐体积和浓度浓缩为单个参数以进行数据统计分析的方案。

[0413]	[藻酸钠]	1.5% w/v 藻酸钠 (1)	2% w/v 藻酸钠 (2)	3% w/v 藻酸钠 (3)
	藻酸钠体积			
	低(A)	A1	A2	A3
	中(B)	B1	B2	B3
	高(C)	C1	C2	C3

[0414] 除非另外说明,否则负载体替代对空白原型支架的特征的影响的比较是通过进行具有应用于均值的配对比较的事后图基检验的双向ANOVA来完成的。该分析将所有模具尺寸的对照(水作为负载体)与其他负载体进行了比较。

[0415] 使用单向ANOVA进行均值的配对比较(除非另有说明),比较所有负载体的单个参数,来完成负载体替代对负载FGF-2的支架材料的特征的影响。除非另有说明,否则这些支架额外地经由具有应用于平均值配对比较的事后图基检验的双向ANOVA与其空白负载体对应物进行比较。对于所有统计检验,P值 ≤ 0.05 被认为是显著的。

[0416] C.3结果

[0417] C.3.1.1. 支架优化

[0418] 进行初步研究以确定藻酸钠和CaCl₂浓度的最佳组合,以产生具有最期望且变化最小的特征的支架。这些研究的结果列于表10。由2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联生成的支架在所有参数上均一致。对于测量的大多数参数,藻酸钠体积表现出没有任何显著影响,然而,无论模具尺寸如何,对于由中等体积藻酸钠生产的支架来说,支架的直径最具可再现性。基于这些结果,选择与50mM CaCl₂交联的2%w/v藻酸钠培养基作为要进行进一步评价的最佳制剂。该制剂满足了优化研究的所有目标,支架具有一致的尺寸和重量,脆碎度小于5%,并且比Gelfoam®比较物需要更多时间来达到平衡水合。

[0419] 表10. 所探究的支架表征参数以及产生最佳结果的配制条件的总结。

	参数	最佳制剂	理由
	宏观形态	2 或 3% w/v 藻酸钠、50 或 100 mM CaCl ₂ , 中等或高体积。	观察到非常一致的直观形态。支架紧凑,同时保持明显的多孔结构。支架边缘轮廓分明,表面外观均一。
[0420]	直径	2% w/v 藻酸钠, 50 mM CaCl ₂ , 中等体积	无论模具尺寸如何,该组合观察到的最可重复的结果
	厚度	2% w/v 藻酸钠, 50 mM CaCl ₂ , 所有体积	无论模具尺寸如何,这些组合观察到的最可重复的结果
	重量	N/A	观察到的结果变化非常小。没有任何组合表现出优于任何其他。
	脆碎度	2 或 3% w/v 藻酸钠, 50 mM CaCl ₂ , 所有体积	脆碎度<5%

[0421]	水合	1.5、2 或 3% 藻酸钠 50mM CaCl ₂ , 所有体积	支架在水合时保持其结构完整性, 比 Gelfoam® 更慢地达到水合平衡。
--------	----	---	---------------------------------------

[0422] C.3.2使用溶解藻酸钠的不同负载体制备的原型支架材料的表征

[0423] 由于FGF-2固有的不稳定性,在没有适当的蛋白稳定化的情况下,在将FGF-2掺入至藻酸盐支架内期间将不可避免地发生FGF-2活性的显著损失。鉴定并评价了本发明的几种FGF-2稳定化负载体,对其在针对负载FGF-2的藻酸盐支架材料的制造、储存和使用期间FGF-2可能暴露的各种热和加工应激原的稳定化作用方面。通过表征使用不同负载体溶解藻酸钠制备的空白原型藻酸盐支架材料,探究了将这些负载体掺入至制剂中的作用。每个支架通过制剂中的负载体(稳定化负载体2-6)来鉴定,用水制备的支架(负载体1)作为对照。

[0424] 基于上述优化数据,使用中等体积(M12、M24和M96模具分别为1、0.5或0.1ml)的2%w/v藻酸钠溶液并与50mM CaCl₂交联来制备这些支架。

[0425] C.3.2.1用不同稳定化负载体制备的原型支架一般描述

[0426] 用FGF-2稳定化负载体代替水表现出没有影响支架的直径、厚度或直观形态。正如对空白原型藻酸盐支架所观察到的,模具尺寸越大,所得到的支架材料的最终直径越大,并且对于使用相同模具尺寸制备的所有支架来说,直径显得一致。

[0427] 当使用活检穿孔器(P4)将较大的支架切成4mm的圆盘时,支架材料显得不太均一。经切割的支架的边缘不太清晰,可见更多松散的纤维,并且切割边缘处支架材料的压缩导致支架的边缘表现出比其中心更薄。

[0428] C.3.2.2直径

[0429] 如对空白藻酸盐支架所观察到的,用不同负载体制备的支架的直径主要由模具直径决定。无论制剂中存在何种负载体,M12支架的直径都相似,用负载体2-6制备的支架的平均直径(17.4±0.3mm)与对照(负载体1;17.3±0.5mm;P=0.8708)没有显著差异。同样,M24和M96支架的直径不受用不同负载体替代水的影响,用负载体2-6制备的支架的平均直径(分别为13.2±0.3和5.2±0.3mm)与对照(负载体1;M24=13.0±0.6mm;M96=5.2±0.4;分别为P=0.8923和P=0.9312)显著不同。P4支架最小,平均直径为3.4±0.3mm。正如对未切割支架所观察到的,使用负载体2-6制备的P4支架的直径与对照没有显著差异(3.7±0.5mm;P=0.8867)。

[0430] 图19.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的直径。通过将溶解在以下项中的中等体积的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用12孔、24孔或96孔培养板作为模具来制备支架,其中最大的支架随后使用4mm活检穿孔器切成小圆盘。所使用的藻酸钠的体积取决于模具尺寸,具有预计生产大约厚度为3.0mm的支架的中等体积。每个数据集代表平均支架直径±SD,n=6。

[0431] C.3.2.3厚度

[0432] 由于所有支架均使用中等体积的藻酸钠制备,因此M12、M24和M96模具中的支架厚

度是相当的。M12、M24和M96支架的平均厚度分别为 2.62 ± 0.05 、 2.50 ± 0.03 和 2.24 ± 0.06 mm。用负载体2-6制备的支架的平均厚度(2.45 ± 0.17 mm)与对照(负载体1; 2.47 ± 0.21 mm; $P=0.9313$)无显著差异,表明支架厚度不受负载体选择的影响。无论制剂中存在何种负载体,P4支架的平均厚度也非常一致(0.81 ± 0.02 mm),然而,由于切割期间的压缩,它们比未切割的对应物显著更薄(2.62 ± 0.05 mm,双向ANOVA, $P<0.0001$)。

[0433] 图20. 使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的厚度。通过将溶解在以下项中的中等体积的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的人血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用12孔、24孔或96孔培养板作为模具来制备支架,其中最大的支架随后使用4mm活检穿孔器切成小圆盘。所使用的藻酸钠的体积取决于模具尺寸,具有预计生产大约厚度为3.0mm的支架的中等体积。每个数据集代表平均支架厚度 \pm SD, $n=6$ 。

[0434] C.3.2.4重量

[0435] 无论制剂中存在何种负载体,M12支架的重量都相似,用负载体2-6制备的支架的平均重量(26.4 ± 0.1 mg)与对照(负载体1; 26.4 ± 0.4 mg; $P=0.9751$)没有显著差异。同样,M24和M96支架的重量不受用不同负载体替代水的影响,用负载体2-6制备的支架的平均重量(分别为 13.4 ± 0.1 和 3.5 ± 0.2 mg)与对照(负载体1;M24= 13.4 ± 0.3 mg;M96= 3.5 ± 0.1 ;分别为 $P=0.9282$ 和 $P=0.9280$)显著不同。使用负载体2-6制备的P4支架的平均重量(1.1 ± 0.1 mg)与对照(1.1 ± 0.2 mg; $P=0.9952$)也没有显著差异。

[0436] 图21. 使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的重量。通过将溶解在以下项中的中等体积的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的人血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用12孔、24孔或96孔培养板作为模具来制备支架,其中最大的支架随后使用4mm活检穿孔器切成小圆盘。所使用的藻酸钠的体积取决于模具尺寸,具有预计生产大约厚度为3.0mm的支架的中等体积。每个数据集代表平均支架重量 \pm SD, $n=6$ 。

[0437] C.3.2.5脆碎度

[0438] 支架脆碎度表现出不受负载体组合物的影响,所有支架都表现出类似的脆碎度,无论制剂中存在负载体或使用的模具尺寸如何。用负载体2-6制备的M12、M24和M96支架的平均脆碎度($3.5 \pm 0.2\%$ 质量损失)与对照(负载体1; $3.5 \pm 0.4\%$ 质量损失; $P=0.4629$)没有显著差异。此外,将M12支架划分为4mm圆盘不会影响材料的脆碎度,P4支架的平均脆碎度($3.6 \pm 0.2\%$ 质量损失)与M12($3.5 \pm 0.3\%$ 质量损失; $P=0.3499$)没有显著差异。

[0439] 图22. 使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的脆碎度。通过将溶解在以下项中的中等体积的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的人血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用12孔、24孔或96孔培养板作为模具来制备支架,其

中最大的支架随后使用4mm活检穿孔器切成小圆盘。所使用的藻酸钠的体积取决于模具尺寸,具有预计生产大约厚度为3.0mm的支架的中等体积。每个数据集代表翻滚后的平均质量损失%±SD,n=18。

[0440] C.3.2.6水合

[0441] M12、M24和M96藻酸盐支架需要9.8至11.7天之间达到平衡水合,无论是模具尺寸还是制剂中存在的负载体都不显著影响支架的水合时间($P=0.9961$)。另外,虽然切割M12支架来制备4mm圆盘会导致支架更薄,但4mm圆盘示出与预切割支架相当的水合时间。在用不同的负载体替换水时,藻酸盐支架的吸水时间曲线没有差异(数据未示出)。水的吸收是立即的,在前7h内吸收了总水量的25%,并随着时间的推移继续增加,在约24h时吸收了50%,在约3天吸收了75%,并在约11天达到平衡。

[0442] 图23.不同负载体对使用不同负载体溶解藻酸盐制备的空白原型藻酸盐支架的平衡水合时间的影响。通过将溶解在以下项中的中等体积的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用12孔、24孔或96孔培养板作为模具来制备支架,其中最大的支架随后使用4mm活检穿孔器切成小圆盘。将未压缩的支架(A)或以343N的力压缩的支架(B)置于2ml的水中,并测量达到平衡水合的时间。将圆盘完成水合的时间定义为在连续3次测量后圆盘重量变化不>1%的点。每个数据点代表平均值±SD,n=6。

[0443] 以343N的力压缩M96和P4支架大大减少了它们的水合时间。未压缩的支架需要平均10.8天达到平衡,而压缩的支架需要平均9.3小时完全水合。与非压缩支架一样,压缩支架的水合时间不受模具尺寸或用于制备支架的负载体的影响($P=0.5659$)。

[0444] C.3.2.7支架形态的SEM分析

[0445] 用各种负载体(1-6)生产的M96藻酸盐支架材料的表面形态和结构通过SEM可视化。由于样品分析的成本,仅通过SEM观察M96非压缩支架。每种支架材料的代表性SEM图像如图24所示,具有不同水平的放大倍率。支架的表面结构示出高度多孔的结构,具有互连的孔。图像分析表明,空白对照支架(负载体1)具有的平均孔面积为43507.6 μm^2 ,孔直径为118.3 μm 和孔隙率为84.6%。用负载体2-6替换负载体1在平均孔面积(范围:38926.4-42537.8 μm^2 , $P=0.4186$)、平均孔直径(范围:104.9-121.2 μm , $P=0.7608$)或孔隙率(范围:82.9-84.8%, $P=0.8220$)方面没有任何显著差异。

[0446] 图24.使用96孔培养板作为模具制备的藻酸盐支架的表面形态和结构通过SEM可视化。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。所有支架均溅射涂覆有金,然后通过扫描电子显微镜使用3kV的加速电压,在30、100和300X放大倍率下进行可视化。

[0447] 图25.通过使用ImageJ软件对SEM显微照片进行分析,来确定以使用96孔培养板作为模具制备的支架的平均孔面积(A)、孔直径(B)和孔隙率(C)。通过将溶解在以下项中的

0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的人血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。数据代表从10张SEM显微照片分析中获得的平均值±SD值。

[0448] C.3.3原型FGF-2负载藻酸盐支架材料的表征

[0449] 通过对负载有FGF-2的支架材料重复上述表征实验并使用负载体1-6作为溶解介质来探究将FGF-2掺入至藻酸盐支架制剂中的影响。本节未确定负载运载物的体外释放曲线,因为它构成了上述FGF-2支架材料功能分析的一部分。基于不同模具生产的支架具有相当的物理特性,并且考虑到FGF-2的昂贵成本,本研究仅使用M96制备了最小的支架。支架由包含1050ng FGF-2的0.1ml的2%w/v藻酸钠溶液并与50mM CaCl₂交联来制备。每个支架通过制剂中的负载体(稳定化负载体2-6)来鉴定,用水(负载体1)制备的支架作为对照(为了方便起见,在下面再次列出了表11)。

[0450] 表11.FGF-2稳定化负载体的识别关键因素。

稳定化负载体 ID	负载体的组成
1	水(作为对照)
2	在水中的甲基纤维素(MC; 0.05% w/v)
3	在水中的丙氨酸(20 mM)
[0451] 4	在水中的血清白蛋白(HSA; 1 mg/ml)
5	在水中的 MC (0.05% w/v)和丙氨酸(20 mM)
6	在水中的 MC (0.05% w/v)和 HSA (1 mg/ml)
7	在水中的 MC (0.05% w/v)、丙氨酸(20 mM)和 HSA (1 mg/ml)

[0452] C.3.3.1总体描述

[0453] FGF-2的添加似乎产生了更致密的支架材料,其比其空白(无FGF-2)对应物更薄并且包括更小的孔。支架直径和表面外观表现出不受FGF-2掺入的影响,所有支架都具有均一的外观。

[0454] 通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。

[0455] C.3.3.2直径

[0456] 包含FGF-2的支架的直径是相似的,无论制剂中存在何种负载体(P=0.7693)。此外,负载FGF-2的M96支架的平均直径(范围:4.9-5.2±0.2-0.6mm)未发现与其各自的空白支架(范围:4.9-5.7±0.2-0.6mm P=0.7248)不同。

[0457] 图26.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的负载FGF-2(1050ng)的原型藻酸盐支架的直径。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的

人血清白蛋白 (HSA) 1mg/ml (负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM (负载体5) 或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml (负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。每个数据集代表平均支架直径 \pm SD, n=6。

[0458] C.3.3.3厚度

[0459] 由于所有负载FGF-2的M96藻酸盐支架都是使用0.1ml藻酸钠溶液制备的,因此它们具有相当的厚度。负载FGF-2的M96支架的平均厚度(范围:2.03-2.22 \pm 0.14-0.21mm)不受负载体选择的影响(P=0.5498),并且与其空白对应物的厚度(范围:2.19-2.27 \pm 0.14-0.21mm) (P=0.8939)相当。

[0460] 图27.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的负载FGF-2 (1050ng)的原型藻酸盐支架的厚度。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。每个数据集代表平均支架厚度 \pm SD, n=6。

[0461] C.3.3.4重量

[0462] 负载FGF-2的M96藻酸盐支架的支架重量相当(图28)。负载FGF-2的M96支架的平均重量不受负载体选择的影响(P=0.0801),并且将FGF-2掺入至制剂中对支架重量没有任何显著影响,遍及6种负载体的空白支架平均重量为3.6 \pm 0.1mg,并且遍及6种负载体的负载FGF-2的支架平均重量为3.5 \pm 0.2mg(P=0.4763)。

[0463] 图28.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的负载FGF-2 (1050ng)的原型藻酸盐支架的重量。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。每个数据集代表平均支架重量 \pm SD, n=6。

[0464] C.3.3.5脆碎度

[0465] 无论制剂中存在何种负载体,负载FGF-2的支架的脆碎度都是相似的(图29;P=0.9229),并且所有FGF-2支架的平均值(3.2 \pm 0.1%质量损失)与空白支架(3.4 \pm 0.2%质量损失;P=0.9759)是相当的。

[0466] 图29.使用不同负载体溶解藻酸盐制备的负载FGF-2 (1050ng)的原型藻酸盐支架的脆碎度。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。每个数据集代表翻滚后的平均质量损失% \pm SD, n=18。

[0467] C.3.3.6水合

[0468] 为了保存FGF-2,仅针对非压缩支架材料完成了该研究,因为这些材料需要更长的时间来达到水合。负载FGF-2的M96藻酸盐支架需要8.6至9.6天之间达到平衡水合(图30),

制剂中存在负载体不会显著影响支架的水合时间($P=0.8660$)。负载FGF-2的支架材料达到平衡水合的平均时间(9.1 ± 1.5 天)与空白支架(10.4 ± 1.5 天, $P=0.9624$)相当。此外,负载FGF-2的藻酸盐支架的吸水时间曲线表现出与空白M96支架的吸水时间曲线相似(数据未提供)。

[0469] 图30.FGF-2 (1050ng) 负载对使用不同负载体溶解藻酸盐制备的原型藻酸盐支架的平衡水合时间的影响。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。将支架置于2ml的水中并测量达到水合平衡的时间。将圆盘完成水合的时间定义为在连续3次测量后圆盘重量变化不 $>1\%$ 的点。每个数据点代表平均值 \pm SD, $n=6$ 。

[0470] C.3.3.7 支架形态的SEM分析

[0471] 用各种负载体(1-6)生产的负载FGF-2的M96藻酸盐支架材料的表面形态和结构通过SEM可视化。每种支架材料的代表性SEM图像如图31所示,具有不同水平的放大倍率。与空白支架材料类似,负载FGF-2的支架的表面示出高度多孔的结构,具有互连的孔。将FGF-2负载到藻酸盐支架中会产生更紧凑的结构,这通过图像分析得到证实(图32)。包含FGF-2的支架的平均孔面积在18698.3至19991.2 μm^2 范围内,而空白支架具有至少2倍高的平均孔面积,在39601.9至41693.3 μm^2 范围内($P<0.0001$)。类似地,包含FGF-2的支架的平均孔直径(范围:72.6至79.9 μm)小于空白藻酸盐支架的平均孔直径(范围:104.9至121.2 μm , $P<0.0001$),并且负载FGF-2支架的孔隙率(范围:65.3至67.8%)低于空白支架的孔隙率(范围:82.9至84.8%; $P<0.0001$)。

[0472] 图31.通过SEM观察负载FGF-2的支架的表面形态和结构。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。所有支架均溅射涂覆有金,然后通过扫描电子显微镜使用3kV的加速电压,在30、100和300X放大倍率下进行可视化。

[0473] 图32.使用ImageJ软件通过SEM显微照片分析来确定平均孔面积(A)、孔直径(B)和孔隙率(C)。通过将溶解在以下项中的0.1ml的2%w/v藻酸钠与50mM CaCl₂交联:水(负载体1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(负载体2)、在水中的丙氨酸20mM(负载体3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(负载体4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(负载体5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(负载体6),使用96孔培养板作为模具来制备支架。每个支架额外包含1050ng FGF-2。数据代表从10张SEM显微照片分析中获得的平均值 \pm SD值。

[0474] C.4 讨论

[0475] 再生和组织修复的过程由组织损伤开始后发生的一系列分子和细胞事件组成。在伤口愈合的早期止血和炎症阶段之后,新细胞迁移至伤口区域,在那里它们进行增殖以恢

复受损伤的组织。在大多数组织中,底层细胞结构为新细胞的进入和增殖提供支持。然而,由于TM悬浮在两个充气腔之间,明显缺乏支撑结构来促进细胞和营养物迁移至穿孔部位。因此,能够充分支持细胞进入和增殖的支架材料是优选的,以促进慢性TM穿孔的修复。

[0476] 将 **Gelfoam®** 用作评价基于藻酸盐的支架材料的比较物,假设该支架材料可以定制以通过添加各种赋形剂稳定剂来增强FGF-2功效,并提供FGF-2的持续释放。

[0477] 基于藻酸盐的支架材料的优化是通过选择制造参数来实现的,诸如模具尺寸、藻酸钠体积以及藻酸钠和CaCl₂浓度,并评估这些参数对所得支架的物理特征的影响。用于制备支架的模具尺寸和藻酸钠的体积两者对所得支架材料的尺寸和重量有直接影响。模具尺寸越大,生产所需厚度的支架材料所需的藻酸钠体积越大,并且所得支架的尺寸和重量也越大。

[0478] **Gelfoam®**在商业上作为多孔、海绵状材料的致密片供应,其外观非常均一。它很容易切割,可以修改支架的尺寸以适应特定的穿孔。尽管**Gelfoam®**已示出良好的临床效果,但将FGF-2负载到材料中却很困难。在临床试验中,通过将**Gelfoam®**浸泡在FGF-2水性溶液中,将FGF-2负载到**Gelfoam®**材料中。

[0479] 藻酸盐和**Gelfoam®**支架两者在压缩后经历更快速的水合。在支架压缩期间,通常占据孔空间的空气被排出。当将压缩的支架置于水中时,孔很快被水充满。相比之下,当将未压缩的支架置于水中时,水需要更长的时间分散到整个支架中,因为填充孔空间的空气首先必须被置换,并且这导致水合时间更慢。

[0480] 将50mM CaCl₂作为藻酸盐支架材料的理想交联溶液的选择主要是基于CaCl₂浓度对水合支架材料的结构完整性的影响。在水合期间,当藻酸盐未与钙离子充分交联时,水合支架的结构完整性会受到损害,使用25mM CaCl₂作为交联溶液制备的所有支架在研究期间都会发生部分崩解。类似地,使用100mM CaCl₂作为交联溶液制备的那些支架,尽管在结构上与未压缩的支架一样坚固,但在水合研究之前压缩时,发现它们在水合期间会崩解。随着交联程度的增加,藻酸盐支架变得更刚性,并且因此更脆。因此,使用100mM CaCl₂作为交联溶液制备的支架可能比用50mM CaCl₂交联的支架更脆,并且在压缩期间更容易损坏。与用50mM CaCl₂交联溶液制备的支架相比,用100mM CaCl₂制备的支架的脆性也反映在其更高的脆碎度上。用25mM CaCl₂制备的支架也更易碎,在这种情况下,低程度的藻酸盐交联不足以在受压时保持支架完整性,导致当支架在脆碎机中翻滚时纤维松散并随后发生质量损失。

[0481] 基于再现性选择用于制备优化支架材料的理想藻酸盐浓度和体积。由中等体积(M12、M24和M96分别为1、0.5和0.1ml)的2%w/v藻酸钠并与50mM CaCl₂交联来生产的支架表现出最一致的尺寸、外观和脆碎度,表明这些支架是最具可再现性的。在这项研究中,用不同的负载体代替水作为藻酸钠的溶解介质,并没有影响支架的特征,这表明FGF-2的赋形剂稳定剂不太可能干扰支架的生产。

[0482] 支架材料的孔隙率和形态是影响材料的生物相容性和伤口愈合潜力的重要因素。如果孔径太大,则细胞就不可能保留在伤口部位。相反,如果孔径太小,新细胞可能无法穿透支架。高多孔材料(60-90%孔隙率)有利于细胞浸润和组织进入,而90-160 μ m的孔径最有利于成纤维细胞迁移和增殖。此外,直径为5-500 μ m的孔径已被证明可以促进新脉管系统成

功侵入至支架内部中,否则会导致细胞死亡和组织坏死。

[0483] 优化的藻酸盐支架材料满足促进细胞迁移、侵入和增殖的所有要求,无论制剂中存在FGF-2稳定化负载体或支架材料负载FGF-2如何。将FGF-2掺入至支架材料中导致孔面积、孔直径和孔隙率降低。已知肝素结合蛋白诸如VEGF和FGF-2以与肝素类似的方式与藻酸盐结合,从而导致这些分子比许多其他蛋白和小分子从基于藻酸盐的支架材料中更持久地释放。FGF-2和藻酸盐之间的这种相互作用也可能是负载FGF-2的支架材料的较小的孔面积、孔直径和较低的孔隙率的原因。另一方面, **Gelfoam®**的孔隙率略低于推荐范围60-90%,然而孔直径满足促进成纤维细胞迁移和增殖的要求。因此,预计负载FGF-2的基于藻酸盐的支架将比负载FGF-2的**Gelfoam®**支架产生更持续的FGF-2释放,并为细胞相互作用提供更优化的环境。

[0484] D实施例4:负载FGF-2的基于藻酸盐的支架材料的功效的体外评价

[0485] D.1介绍

[0486] FGF-2与支架材料(例如明胶海绵、透明质酸或二层去端肽胶原-硅酮膜)的组合给药已示出比单独施加生长因子产生更快且更高的TM愈合速率。然而,文献表明,某些基于明胶的支架制剂中FGF-2的生物活性限于24-36小时。慢性TM穿孔通常需要治疗后长达2周愈合,固有纤维层的重塑需要另外的2-3周。因此,当TM穿孔在单次施加FGF-2后未能愈合时,可能是由于FGF-2的药理作用持续时间不足。因此,提供延长释放功能性FGF-2的支架在慢性TM穿孔的治疗中是高度期望的,因为仅将一个这样的支架插入至穿孔中就有可能使TM完全愈合,而无需进一步的医疗干预或患者参与,使其成为一种高度可获得、经济且可预测的治疗方式。

[0487] 然而,将FGF-2掺入至临床有用的支架材料中受到溶液中蛋白固有的较差稳定性的严重限制。FGF-2在水性介质中降解如此之快,以至于在制剂生产过程期间很难保留生物活性蛋白。上述稳定化研究示出,通过在FGF-2药用产品中使用稳定剂组合可以克服这一限制。

[0488] 理想的支架材料将通过促进细胞浸润、增殖和分化来模拟TM再生的自然环境。上述基于藻酸盐的支架材料的表征表明原型支架具有适当的结构来支持这些细胞过程。然而,为了使这些支架原型具有临床可转化性,有必要确定促进细胞增殖的阈值FGF-2负载剂量,并证明FGF-2在掺入至支架材料中后作为功能蛋白释放。这构成了本节中呈现的研究的第一个目标。第二个目的是证明通过用稳定化的FGF-2制备的藻酸盐支架产生的生物效应可以持续超过2周,并且优于由包含非稳定化的FGF-2的支架产生的生物效应。第三个目的是证明基于藻酸盐的支架材料是非细胞毒性的。

[0489] 在本节中,使用**Gelfoam®**作为用于评价基于藻酸盐的支架材料的比较物。

[0490] D.2材料和方法

[0491] D.2.1材料

[0492] 重组人FGF-2由Essex Bio-Pharmaceutical Co(中国珠海)友情提供。所有细胞培养材料,包括BALB/c 3T3鼠成纤维细胞,也由Essex Bio友情提供。原代人真皮成纤维细胞(PCS-201-012)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC;美国弗吉尼亚州)。Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI 1640)培养基、0.25%胰蛋白酶-EDTA、胎牛血清(FBS)和Eagle最低必需培养基(EMEM)购自Gibco(美国纽

约)。吐温20和无水碳酸钠购自Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology(中国上海)。牛血清白蛋白和用于ELISA的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物购自West Gene Biotech Inc.(中国上海)。二甲基亚砜(DMSO)和甲醇购自Guangzhou Chemical Reagent Factory(中国广州),以及磷酸盐缓冲盐水(PBS)片剂购自BBI Life Sciences(中国上海)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物(MTT)购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州)以及碳酸氢钠购自Macklin Biochemical(中国上海)。整个过程中使用去离子水。所有其他材料与上面列出的材料相同。

[0493] D.2.2细胞培养

[0494] 将鼠成纤维细胞和原代人真皮成纤维细胞以大约 2.2×10^6 个细胞的密度接种在10ml完全培养基中(CCM;用于BALB/c 3T3细胞的具有10% FBS的RPMI 1640,用于人真皮成纤维细胞的具有10% FBS的EMEM在T25培养瓶(Corning,美国纽约)中,并培养至汇合,为将来的研究做准备。细胞培养物在37°C、在5% CO₂的气氛下温育。根据需要每2-3天更换一次培养基。

[0495] D.2.3FGF-2负载剂量阈值的确定

[0496] 将MTT以5mg/ml的浓度溶解在PBS中,过滤灭菌,并储存在4°C直至需要使用。培养鼠成纤维细胞,之后将悬浮在100 μ l的CCM中的 8×10^3 个细胞添加至96孔培养板(Corning,美国纽约)的每个孔中。将板在5% CO₂的气氛下在37°C培养24h。将FGF-2储备溶液(185 μ g/ml)用稳定化负载体(1-6)稀释至600ng/ml,然后用测试培养基(TCM,具有0.2% FBS的RPMI 1640)连续稀释以获得FGF-2浓度范围为2.3至150ng/ml。将相应的空白稳定化负载体进行类似稀释并用作对照。将稀释的测试溶液和对照溶液以100 μ l/孔一式三份应用于鼠成纤维细胞。在5% CO₂在37°C培养48h后,通过MTT测定来确定细胞生存力。这涉及向每个孔中添加25 μ l的MTT溶液,并在37°C下将细胞温育额外的5h。去除所有液体,并在震荡下(多孔快速摇床QB-9002,Kylin-Bell Lab Instruments,中国江苏)向每个孔中添加120 μ l的裂解缓冲液(DMSO:乙醇,1:1)。使用读板器(iMark,Bio-Rad Laboratories,美国加利福尼亚州)在570nm(参考630nm)处测量孔的吸光度。通过以下来确定剂量-反应曲线:从FGF-2样品的吸光度值中减去相应负载体样品的吸光度值,并用自动计算每种溶液的EC₅₀值的4参数逻辑拟合(GraphPad Prism 8,美国加利福尼亚)绘制针对FGF-2剂量的净值。

[0497] 理想的支架将在至少14天的时间内释放FGF-2以促进TM愈合。为了确保将足够量的FGF-2负载到每种支架材料中,使其充当储库并在14天的时间内释放足够的FGF-2以刺激细胞增殖,FGF-2负载剂量计算如下:

[0498] 负载剂量=FGF-2阈值剂量(如通过剂量反应测定确定的) \times 14

[0499] D.2.4通过ELISA进行FGF-2定量

[0500] 对于本节中的实验,如前所述通过ELISA对FGF-2进行定量。

[0501] D.2.5负载FGF-2的支架材料的制备

[0502] 使用类似于上述那些的方法来制造负载FGF-2的藻酸盐支架。简而言之,将藻酸钠溶解在每种稳定化负载体(负载体1-6,参见上文)中,并达到制备2% w/v藻酸钠溶液所需的最终体积的90%。剩余10%的体积由相应稳定化负载体(1-6)中的FGF-2组成。将FGF-2储备溶液(在水中185 μ g/ml,通过ELISA确认FGF-2含量)用稳定化负载体(1-6)稀释以制备105 μ g/ml溶液,并将这些溶液(100 μ l/ml)添加至相应的藻酸钠溶液中,得到10.5 μ g/ml的最终

FGF-2浓度。将溶液涡旋2min以确保同质性,然后将100 μ l的每种溶液(包含1050ng FGF-2)添加至96孔培养板(Corning,美国纽约)的孔中。将板在-20 $^{\circ}$ C下冷冻16h,然后将100 μ l的50mM的CaCl₂溶液添加至每个孔中,并在室温下与解冻的藻酸盐交联20min。通过将孔完全充满水来洗涤所有支架,使支架浸泡2min,然后从孔中去除所有液体。重复此过程三次,然后将支架浸入足够的水中以覆盖支架表面,并在冻干24h前在-20 $^{\circ}$ C下冷冻16h(VerTis 25L Genesis SQ Super XL-70,SP Scientific,美国纽约)。在4 $^{\circ}$ C储存支架直至需要另外的研究。

[0503] 为了进行比较,还评价了商购的基于明胶的支架材料**Gelfoam**[®](Pfizer,美国纽约)。使用一次性活检穿孔器(Kai Medical,日本岐阜县)将**Gelfoam**[®]支架切成4mm圆盘。通过用水稀释185 μ g/ml FGF-2储备溶液来生产FGF-2负载溶液(52.5 μ g/ml),并将**Gelfoam**[®]圆盘添加至在0.1ml Eppendorf[®]管(德国汉堡)中的20 μ l的FGF-2负载溶液中。用无菌镊子轻轻挤压**Gelfoam**[®]圆盘,促进FGF-2负载溶液的完全吸收,并假设蛋白负载为每个**Gelfoam**[®]圆盘1050ng FGF-2。

[0504] 表12. 支架材料和溶液的识别关键因素。

[0505] 通过将各种藻酸盐溶液与CaCl₂交联来制备支架。使用溶解在稳定化负载体1-6中的藻酸盐来制备支架S1-6(A),以得到如下所述的最终支架组合物。使用包含FGF-2(通过ELISA测定为10.5 μ g/ml活性FGF-2;F1-6)的藻酸盐溶液来制备支架SF1-6(B),以得到如下所述的最终支架组合物。通过将4mm的**Gelfoam**[®]圆盘浸泡在20 μ l的TCM(测试培养基)或FGF-2浸泡在TCM(52.5 μ g/ml)中来制备支架G1和GF1(C),以得到如下所述的最终支架组合物。空白(TCM)和包含FGF-2(TCM-F)的溶液(D)分别作为阴性和阳性对照。

[0506] 表12-A

支架 ID	空白藻酸盐支架的描述
S1	通过将 2% w/v 藻酸钠在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的支架
S2	通过将 2% w/v 藻酸钠和 0.05% w/v 甲基纤维素(MC)在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的支架
[0507] S3	通过将 2% w/v 藻酸钠和 20 mM 丙氨酸在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的支架
S4	通过将 2% w/v 藻酸钠和 1 mg/ml 人血清白蛋白(HSA)在水中溶液与 50 mM CaCl ₂ 的交联来制备的支架
S5	通过将 2% w/v 藻酸钠、MC 0.05% w/v 和 20 mM 丙氨酸在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的支架
S6	通过将 2% w/v 藻酸钠、MC 0.05% w/v 和 1 mg/ml HSA 在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 的交联来制备的支架

[0508] 表12-B

支架 ID	负载 FGF-2 的藻酸盐支架的描述
[0509] SF1	通过将 2% w/v 藻酸钠在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的包含 FGF-2(1050 ng)的支架
[0509] SF2	通过将 2% w/v 藻酸钠和 0.05% w/v MC 在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的包含 FGF-2(1050 ng)的支架
[0509] SF3	通过将 2% w/v 藻酸钠和 20 mM 丙氨酸在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的包含 FGF-2(1050 ng)的支架
[0509] SF4	通过将 2% w/v 藻酸钠和 HSA 1 mg/ml 在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的包含 FGF-2(1050 ng)的支架

[0510] SF5	通过将 2% w/v 藻酸钠、MC 0.05% w/v 和 20 mM 丙氨酸在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的包含 FGF-2(1050 ng)的支架
[0510] SF6	通过将 2% w/v 藻酸钠、MC 0.05% w/v 和 HSA 1 mg/ml 在水中的溶液与 50 mM CaCl ₂ 交联来制备的包含 FGF-2(1050 ng)的支架

[0511] 表12-C

支架 ID	Gelfoam®支架的描述
[0512] G1	负载有 20 μl 水的 Gelfoam®圆盘(直径 4 mm)
[0512] GF1	负载有在 20 μl 水中的 1050 ng FGF-2 的 Gelfoam®圆盘(直径 4 mm)

[0513] 表12-D

溶液 ID	溶液的描述
[0514] TCM	测试培养基(BALB/c 3T3 细胞:具有 0.2% FBS 的 RPMI 1640; 人真皮成纤维细胞: 具有 0.2% FBS 的 EMEM)
[0514] TCM-F	FGF-2(21 μg/ml)在 TCM 中的溶液

[0515] D.2.6体外FGF-2释放曲线

[0516] 通过将负载FGF-2的支架置于细胞透室小室(transwell insert) (透明聚碳酸酯膜, 24孔, 8.0μm孔径, Corning, 美国纽约) 的顶端室中, 在基底外侧室(basolateral chamber)中使用0.5ml的FGF-2稀释缓冲液作为溶解介质, 来确定功能性FGF-2从支架材料的体外释放曲线。实验在4°C下进行, 以使FGF-2从支架释放到缓冲液中后失活的速率最小化。在限定的时间点(8h至16天)对下室的全部内容物进行取样并用新鲜缓冲液替换。如上所述, 通过ELISA对样品中的FGF-2含量进行定量。

[0517] D.2.7负载FGF-2的支架的功能测定

[0518] 通过确定共温育的鼠(BALB/c 3T3) 或人(ATCC PCS-201-012) 成纤维细胞的增殖程度来检查支架的生物效应。将鼠或人成纤维细胞以悬浮在500μl的CCM中的2x 10⁴个细胞接种至24孔培养板(Corning, 美国纽约) 的每个孔中。温育24h后, 用500μl的TCM(鼠成纤维细胞: 具有0.2%FBS的RPMI 1640; 人成纤维细胞; 具有0.2%FBS的EMEM) 替换培养基, 使细胞饥饿另外的24h。在将各自包含支架(SF1、SF5、SF6或GF1) 与50μl的TCM的细胞透室小室

(透明聚碳酸酯膜,24孔,8.0 μ m孔径,Corning,美国纽约)添加至孔中之前,对TCM进行更新(图33A)。细胞透室顶端室中的TCM是为了确保从支架释放的FGF-2能够自由地穿过细胞透室膜扩散到基底外侧室中的细胞。使用仅包含50 μ l的TCM(阴性对照)或50 μ l的新鲜制备的TCM-F(1050ng FGF-2/孔,阳性对照)的细胞透室进行平行实验。将样品培养72h,并取出细胞透室小室。如上所述,通过MTT测定来测量暴露于支架材料72h后的细胞增殖。将包含经使用的支架的小室置于包含500 μ l TCM(不含细胞)的新孔中,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂气氛下温育4-7天,无需任何另外的培养基更换(图33B)。如上所述,制备新的细胞板,并将包含经使用的支架的小室转移至包含500 μ l新更换的TCM中的细胞的新孔中(图33C)。将孔连同小室一起再次培养72h,之后取出细胞透室小室并通过MTT测定来测量细胞增殖。将包含经使用的支架的小室再一次置于包含500 μ l TCM(不含细胞)的新孔中,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂气氛下温育4-7天,无需任何另外的培养基更换,然后第三次重复该过程。通过每周制备新鲜细胞,可以检查每周前3天FGF-2释放的效果。该测定进行了长达3周。每个样品测试三个重复样品(n=3)。

[0519] 图33.将鼠(BALB/c 3T3)或人(ATCC PCS-201-012)成纤维细胞在细胞透室的基底外侧室中培养24h,之后再饥饿另外的24h。将每个含有支架(SF1、SF5、SF6或GF1)且具有在顶端室中的50 μ l的TCM的细胞透室小室添加至孔中(A)。将孔培养72h,之后将细胞透室小室取出并置于包含500 μ l TCM(不含细胞)的新孔中(B)。使用MTT测定对(A)中孔的基底外侧室中剩余的细胞进行细胞增殖测定。将(B)中的小室在37 $^{\circ}$ C在5% CO₂气氛下温育4-7天。在此期间,如前所述制备新细胞的板(C),并将(B)中的小室转移至包含500 μ l的新更换的TCM中的细胞的新孔(C)。将(C)中的孔连同小室一起培养72h,之后取出细胞透室小室并通过MTT测定来测量细胞增殖。重复步骤(B)和(C),以确定每周前3天FGF-2释放的效果,持续长达3周。

[0520] D.2.8细胞与支架材料的相互作用

[0521] 使用活/死细胞毒性/生存力测定来评价支架材料的生物相容性。培养鼠成纤维细胞,之后将悬浮在100 μ l的CCM中的2x 10⁴个细胞直接接种到位于24孔培养板(Corning,美国纽约)的孔中的支架材料上。使细胞在5%CO₂的气氛在37 $^{\circ}$ C贴壁1h。细胞贴壁后,将400 μ l的CCM添加至每个孔中,并继续温育额外的48h。还通过将悬浮在400 μ l的CCM中的2x 10⁴个细胞接种到24孔培养板的每个孔中并培养48h来制备阳性(活)和阴性(死)对照样品。根据制造商的建议,在去除所有培养基后,制备活/死细胞成像试剂盒(Invitrogen,美国俄勒冈州)试剂并将其添加至支架。在将成像试剂添加至对照样品之前,通过将细胞暴露于400 μ l的70%甲醇在水中的溶液30min以引起细胞死亡来制备阴性(死)对照。所有样品均通过荧光显微镜(X-Cite Series 120Q,Excelitas Technologies,美国马萨诸塞州;Axio Vert A1,Zeiss,Oberkochen,德国)观察,活细胞被染色成绿色(激发波长494nm,发射波长517nm),并且死细胞被染色成红色(激发波长517nm,发射波长617nm)。捕获细胞相互作用和对支架材料的吸引力的图像(MSX10,Micro-shot Technology,中国广州)并进行处理(MShot图像分析系统,Micro-shot Technology,中国广州)。使用ImageJ(美国马里兰州国立卫生研究院(National Institutes of Health))分析每个支架的图像,以确定视野内支架边缘的200 μ m内的细胞数量,以及支架材料边界内可见的细胞数量。每个孔拍摄四张图像(每个象限一张)以确保覆盖孔的整个表面。推测在添加活/死细胞成像试剂之前去除培养

基可以去除任何非贴壁细胞。因此,推测出现在支架材料边界内的细胞以某种方式与材料直接相互作用。然而,使用这种测定不可能确定是否有任何细胞进入。如果特定样品中观察到的死亡细胞小于10个,则认为细胞死亡程度极小。

[0522] D.2.9数据分析

[0523] 结果表示为平均值±SD。除非另有说明,否则数据均通过具有应用于平均值配对比较的事后图基检验(GraphPad Prism 8,美国加利福尼亚州)的双向ANOVA进行分析。P值≤0.05被认为是显著的。

[0524] D.3结果

[0525] D.3.1FGF-2剂量优化

[0526] 向BALB/c 3T3鼠成纤维细胞添加逐渐增加剂量的稳定化FGF-2溶液导致不同的增殖效应(图34)。在2.3ng/ml的最低施加的FGF-2剂量下,与对照相比,稳定化的FGF-2溶液均未显示出细胞增殖效应的显著差异(P>0.9999)。随着FGF-2剂量的增加,溶液之间细胞增殖效应的差异变得更加明显,并且虽然所有溶液在FGF剂量≥75ng/ml时均表现出活性的平稳期,但各溶液所表现出的最大活性存在差异。在75-150ng/ml的高剂量下,F5和F6产生了相当的细胞增殖效应(P>0.9999),且比其他FGF-2溶液的活性更强。两者中,F5在较低浓度下更有效,在更广泛的浓度范围(9.4-37.5ng/ml)内,其细胞增殖效应始终高于其他溶液(包括F6)。

[0527] 在低FGF-2剂量(2.3-9.4ng/ml,P=0.8655)下,F1、F2、F3和F4产生了相当的增殖效应,然而在高于18.8ng/ml的剂量下,F2和F4产生的细胞增殖效应优于F1和F3两者都,F2产生的增殖效应显著大于F4(P<0.001)。当FGF-2剂量大于37.5ng/ml时,所有稳定化的FGF-2溶液产生的增殖效应均高于对照(F1,P<0.0001)。在此基础上,FGF-2溶液的细胞增殖活性可以按以下降序排列:F5>F6>F2>F4>F3>F1。从剂量-反应曲线确定的EC50值通常支持该排名,对照(F1)显示最大EC50(57.88ng/ml),随后是F3(55.88ng/ml)和F4(51.34ng/ml)的相当值,然后是F2(22.09ng/ml)、F6(6.11ng/ml)和F5(5.61ng/ml)。

[0528] 无论稳定化负载体如何,大于75ng/ml的FGF-2剂量与细胞增殖活性的显著增加不相关。考虑到75和150ng/ml的FGF-2剂量之间的细胞增殖效应存在微小差异,并且75ng/ml的FGF-2溶液之间具有充分的差异,因此当考虑支架材料的FGF-2负荷剂量时,选择该浓度作为最大细胞活性的阈值FGF-2剂量。

[0529] 图34.FGF-2溶液标记为F1(仅以水作为负载体)、F2(具有甲基纤维素(MC)0.05%w/v的水)、F3(具有丙氨酸20mM的水)、F4(具有人血清白蛋白(HSA)1mg/ml的水)、F5(具有MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM的水)和F6(具有MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml的水)以递增剂量应用于BALB/c 3T3鼠成纤维细胞。经由MTT测定来测量细胞增殖效应并计算净吸光度(FGF溶液的培养孔的吸光度减去相应负载体的培养孔的吸光度)。每个点代表平均值±SD(n=3)。

[0530] D.3.2体外FGF-2释放曲线

[0531] FGF-2在4°C下从藻酸盐支架材料到溶解介质中的释放发生在两个阶段(图35)。FGF-2在前两天首次释放,随后在额外的2-14天内缓慢释放FGF-2。3天后,SF5和SF6分别释放了75.9和70.3ng的FGF-2,其显著多于其他藻酸盐支架(范围:62.7-65.4ng;P<0.0001)。第4天,SF5示出比SF6更高的FGF-2释放(分别为103.4ng和94.2ng,P<0.0001)。在同一时间段内,SF4中FGF-2的释放(85.2ng)也显著高于SF2和SF3中观察到的释放(分别为65.5和

72.3ng; $P < 0.0001$), 其反过来比SF1 (62.7ng) ($P < 0.0001$) 释放了显著更多的FGF-2。事实上, 从第3天起, SF1的功能性FGF-2的累积释放表现出稳定在62.7ng, 在研究的剩余时间内没有检测到进一步的FGF-2释放。到第14天, 其他支架的FGF-2释放也表现出趋于稳定。从第7-16天, 所有支架都显示出彼此显著不同的FGF-2释放曲线, 累积FGF-2释放的顺序为SF5>SF6>SF4>SF3>SF2>SF1。

[0532] 相比之下, FGF-2从GF1支架的释放发生得非常快, 在第一个24h内释放了197.3ng (相当于总累积释放的82.8%)的FGF-2。在所有支架中, 从GF1释放的FGF-2显现首先达到稳定。第2天, GF1的累积FGF-2释放为233.3ng, 在研究的剩余时间内没有检测到进一步的FGF-2释放。

[0533] 由于难以确保从支架材料完整地完全提取FGF-2负载, 因此无法可靠地确定每个支架中的实际FGF-2负载。因此, 累积释放百分比是基于1050ng的理论FGF-2负载来计算的。在此基础上, 在第16天研究结束时, 计算出GF1释放的FGF-2累积百分比为22.2%。相比之下, 第16天时从基于藻酸盐的支架中累积的FGF-2释放显著较低, SF5释放了FGF-2负载的15.9%, SF6释放了14.7%, SF4释放了11.8%, SF3释放了9%, SF2释放了7.5%, SF1仅释放了6.0% (单向ANOVA, $P < 0.0001$)。

[0534] 图35. FGF-2从支架材料中的累积释放。通过将以下项中的2% w/v藻酸钠和FGF-2的溶液与50mM CaCl₂交联来制备支架SF1-SF6: 水 (SF1)、在水中的甲基纤维素 (MC) 0.05% w/v (SF2)、在水中的丙氨酸20mM (SF3)、在水中的血清白蛋白 (HSA) 1mg/ml (SF4)、在水中的MC 0.05% w/v和丙氨酸20mM (SF5) 或在水中的MC 0.05% w/v和HSA 1mg/ml (SF6)。GF1支架是通过将4mm的Gelfoam®圆盘浸泡在FGF-2溶液中来制备的。每个支架包含的理论FGF-2负载为1050ng。通过ELISA对16天期间功能性FGF-2到稀释缓冲液中的累积释放进行定量, 每个数据点代表平均值±SD (n=3)。

[0535] D.3.3负载FGF-2的支架材料的功能测定

[0536] 与其他支架材料相比, 观察到SF5和SF6在17或18天的研究期间分别对鼠和人成纤维细胞产生显著更大的增殖效应 ($P = 0.0004$)。然而, 支架增强的增殖效应的时间却截然不同。对于鼠成纤维细胞, 所有FGF-2样品在暴露第一周都观察到最强的增殖效应, 其中负载FGF-2的藻酸盐支架SF5和SF6示出最强的效应。SF5和SF6支架在第一周产生的增殖效应比对照高86.5%和82.8%, 其显著高于其他所有样品 ($P = 0.0082$)。另一方面, 负载FGF-2的藻酸盐支架SF1、SF5和SF6) 在暴露的第一周呈现抑制人成纤维细胞的增殖, 尽管TCM-F和GF1在同一时期促进人成纤维细胞的增殖 (图36)。

[0537] 图36. 比较当鼠 (A) 和人 (B) 成纤维细胞暴露于负载FGF-2 (1050ng) 的支架材料时产生的细胞增殖效应。在17天 (鼠成纤维细胞) 或18天 (人成纤维细胞) 期间, 使用MTT测定来间歇性检查支架的细胞增殖效应。负载FGF-2 (1050ng) 的藻酸盐支架SF1、SF5和SF6的每一种均通过将在以下项中的2% w/v藻酸钠和FGF-2与50mM CaCl₂交联来制备: 水 (SF1)、在水中的甲基纤维素 (MC) 0.05% w/v和丙氨酸20mM (SF5) 或者在水中的MC 0.05% w/v和血清白蛋白1mg/ml (SF6)。GF1支架是通过以下来制备的: 将4mm的Gelfoam®圆盘浸泡在FGF-2溶液中, 以得到1050ng的FGF-2负载。将空白测试培养基 (TCM) 和TCM中的游离FGF-2 (1050ng) (TCM-F) 作为对照。每个结果代表平均值±SD (n=3)。

[0538] 在鼠细胞中, 对于所有测试样品, 存在随着暴露时间的增加而增殖效应降低的趋

势,其中支架SF5和SF6的增殖效应在研究期间下降了20.2%和21.1%。尽管如此,这两个支架始终比所有其他样品产生更大的增殖效应。SF1、SF5和SF6产生的增殖效应中的最大下降发生在研究期间的第3天和第10天之间(分别为24.1%、18.9%和19.5%)。在第10天和第17天之间,观察到所有三种支架的增殖效应进一步降低,然而这种降低并不显著($P=0.9150$),这表明尽管低于第3天,但增殖效应仍然持续。

[0539] 在第10天观察到由TCM-F产生的增殖效应降低了40.5%,在第10天或第17天观察到TCM-F和TCM样品之间没有差异($P=0.8846$)。GF1样品在第10天时具有的增殖效应比空白TCM高34.1% ($P<0.0001$),但到研究终点时由GF1产生的增殖效应不大于空白TCM的增殖效应($P=0.6783$)。这些结果表明,虽然Gelfoam®材料能够在本研究的最初10天内维持FGF-2的增殖效应,但TCM-F和GF1在17天的整个研究期间内都无法产生持续的增殖效应。

[0540] 人成纤维细胞的TCM-F和GF1样品产生相似的增殖反应趋势。TCM-F和GF1样品在第3天产生的增殖效应比对照高71.5%和32.1%。然而,从第14天起,TCM-F和TCM样品之间没有观察到细胞增殖效应的差异($P>0.9999$)。在第14天时,GF1的细胞增殖效应仍然比TCM高22.3%,然而,这种情况并没有维持到研究终点,到第18天,GF1和TCM的细胞增殖效应没有显著差异($P>0.9999$)。

[0541] 通过比较,SF5和SF6的增殖效应呈现随着人成纤维细胞的暴露时间而增加,与TCM-F、SF1和GF1相比,两种支架在第14天和第18天都产生显著更大的细胞增殖反应($P<0.0001$)。SF1的增殖效应在第3天到第14天之间也增加了120% ($P<0.0001$),但其效应在第14天到第18天之间保持在相当的水平($P>0.9999$)。

[0542] D.3.4 细胞与支架材料的相互作用

[0543] 使用活/死细胞成像试剂盒观察鼠成纤维细胞与支架材料的相互作用,并且当细胞能够以最小的细胞死亡与支架材料相互作用时,则认为支架材料是生物相容的(图37)。除了阴性对照之外,没有任何样品与显著的细胞死亡相关。基于藻酸盐和基于明胶的支架材料两者显示小于每个样品10个死细胞(图39),表明这些材料和鼠成纤维细胞之间具有生物相容性。然而,细胞与支架材料之间存在不同程度的相互作用,取决于FGF-2是否存在以及支架材料的组成。包含FGF-2的支架的视野内的细胞总数比空白支架材料更大(图38A)。SF1和GF1两者均由在水中的FGF-2制备,与其相关的视野内的活细胞数量(分别为182和139)显著多于相应的空白S1和G1支架(范围:57-83;单向ANOVA, $P<0.001$)。然而,FGF-2对总细胞数的影响对于支架SF5和SF6更为明显,这两个支架分别是用稳定化的FGF-2溶液F5和F6制备的。SF5和SF6的视野内活细胞总数(分别为526和483)比其他支架材料显著更高($P<0.001$)。

[0544] 发现与SF1和GF1相互作用的相当数量的细胞(分别为34个和26个细胞),并且这些数量与在相应的空白支架上发现的细胞数量相比更高($P<0.02$)。与SF1和GF1相比,SF5和SF6还具有与支架材料直接相互作用的活细胞的更大的平均数量(分别为86和84)(单向ANOVA, $P<0.001$)。SF5和SF6在支架边缘的200 μm 内额外地具有相当数量的活细胞(分别为46和44个细胞),并且这些活细胞数量显著高于其他支架材料观察到的数量($P<0.01$)。SF1是另一种基于藻酸盐的支架,在其周边也有21个活细胞的显著聚集,而GF1在其附近平均只有14个活细胞,这与在空白支架附近观察到的活细胞平均数量没有不同($P=0.8082$)。

[0545] 图37. 鼠成纤维细胞和支架材料之间相互作用的活/死细胞的代表性染色图像。支

架材料接种 2×10^4 个细胞,温育48h,然后将活细胞/死细胞进行洗涤并染色。通过将溶解在以下项中的2%w/v藻酸钠的溶液与50mM CaCl₂交联来制备支架S1-6和SF1-6:水(S1,SF1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(S2,SF2)、在水中的丙氨酸20mM(S3,SF3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(S4,SF4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(S5,SF5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(S6,SF6)。支架SF1-6额外包含1050ng FGF-2。支架G1和GF1通过以下制备:将4mm的Gelfoam®圆盘浸泡在水(G1)或FGF-2溶液中(1050ng的GF1、FGF-2负载)。阳性(活)和阴性(死)对照与样品一起可视化,以确保测定的特异性。通过荧光显微术观察细胞,活细胞被染色成绿色,死细胞被染色成红色。支架材料边界内的漫反射绿色着色是支架与培养板壁相接近而产生的伪影。所有图像均以200X放大倍率捕获,比例尺=100 μ m。

[0546] 图38.通过与支架材料相互作用的活细胞数量来测量支架材料的生物相容性。支架材料接种 2×10^4 个细胞,温育48h,然后将活细胞/死细胞进行洗涤并染色。使用活/死细胞成像试剂盒选择性地观察活细胞,并使用ImageJ分析每个支架的4个图像,以确定视野内(A)、支架材料边界内(B)或距支架边缘的200 μ m以内(C)的细胞总数量。通过将溶解在以下项中的2%w/v藻酸钠的溶液与50mM CaCl₂交联来制备支架S1-6和SF1-6:水(S1,SF1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(S2,SF2)、在水中的丙氨酸20mM(S3,SF3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(S4,SF4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(S5,SF5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(S6,SF6)。支架SF1-6额外包含1050ng FGF-2。支架G1和GF1通过以下制备:将4mm的Gelfoam®圆盘浸泡在水(G1)或FGF-2溶液中(1050ng的GF1、FGF-2负载)。每个数据点代表存在的活细胞的平均数量 \pm SD(n=4)。

[0547] 图39.通过与支架材料相互作用的死细胞数量来测量支架材料的细胞毒性。支架材料接种 2×10^4 个细胞,温育48h,然后将活细胞/死细胞进行洗涤并染色。使用活/死细胞成像试剂盒来鉴定死细胞,并使用ImageJ分析每个支架的4个图像,以确定视野内(A)、支架材料的边界内(B)或距支架边缘的200 μ m以内(C)的细胞总数量。通过将溶解在以下项中的2%w/v藻酸钠的溶液与50mM CaCl₂交联来制备支架S1-6和SF1-6:水(S1,SF1)、在水中的甲基纤维素(MC)0.05%w/v(S2,SF2)、在水中的丙氨酸20mM(S3,SF3)、在水中的血清白蛋白(HSA)1mg/ml(S4,SF4)、在水中的MC 0.05%w/v和丙氨酸20mM(S5,SF5)或在水中的MC 0.05%w/v和HSA 1mg/ml(S6,SF6)。支架SF1-6额外包含1050ng FGF-2。支架G1和GF1通过以下制备:将4mm的Gelfoam®圆盘浸泡在水(G1)或FGF-2溶液中(1050ng的GF1、FGF-2负载)。每个数据点代表存在的死细胞平均数 \pm SD(n=4)。

[0548] D.4讨论

[0549] 负载FGF-2的支架材料成功调节伤口愈合的能力取决于许多因素,包括生物活性水平、该活性的时间安排和制剂的生物相容性。FGF-2的生物活性又取决于所施用的有效剂量。本研究使用的FGF-2当分散在水中时会迅速失活,表明其半衰期很短,在37 $^{\circ}$ C下仅为30分钟,这一值与文献报道的37min半衰期相似。因此,本研究中当将F1(在水中的FGF-2)添加至鼠成纤维细胞中时,FGF-2会迅速失活,并且只有当施加的FGF-2剂量足够高时才能观察到其明显的细胞增殖效应,我们研究中的阈值是75ng/ml。相反,通过在F5和F6中施加双重稳定剂来使FGF-2溶液的有效稳定化,导致即使当FGF-2以低于20ng/ml的剂量施加时,细胞增殖效应也是可测量的。

[0550] 将用于促进原代人真皮成纤维细胞增殖的FGF-2阈值剂量确定为50ng/ml,并且在9.8pg/ml的最低施加FGF-2剂量下,细胞增殖效应是可测量的。阈值剂量的这些差异可能归因于实验中使用的不同细胞培养物和FGF-2蛋白。FGF-2还因根据细胞类型而产生不同的细胞增殖效应而闻名,一项研究示出,与啮齿动物来源的细胞相比,人的间充质来源的祖细胞响应于较低剂量的FGF-2。在这两项研究中,稳定化负载体对FGF-2产生了类似的细胞增殖增强效应。

[0551] 在本节中,对于人和鼠成纤维细胞两者,还观察到F5和F6溶液产生对应于最低EC50值的最高最大增殖反应,这些溶液的增殖效应是相比于F1的大约10倍高。F5和F6(两者均包含双重稳定剂)增强的细胞增殖效应表明FGF-2在37°C下的稳定性增强。

[0552] 在该研究中,在支架制造的同时将FGF-2掺入藻酸盐支架中。我们研究的体外FGF-2释放数据表明,功能性FGF-2成功从藻酸盐支架材料中释放,并且这种释放持续,在溶解介质中可检测到功能性FGF-2长达14天。相比之下,功能性FGF-2从**Gelfoam®**支架,GF1的释放发生得很快,并且限于2天。

[0553] 尽管在我们的研究中FGF-2从所有基于藻酸盐的支架的体外释放呈现在14天后显示平稳期,有可能FGF-2从支架中的释放已经持续超过该点,但释放到溶解介质中的FGF-2水平低于本研究使用的ELISA方法的检测限,并且因此无法进行定量。从用溶液SF5和SF6制备的支架观察到较高的FGF-2释放可能是由于FGF-2在其释放到溶液中后稳定性增加。

[0554] 对于伤口愈合应用,任何截留的FGF-2可能有利于产生延长的趋化作用、将细胞吸引向支架边缘并促进细胞侵入至支架材料中。细胞侵入不仅有助于闭合伤口,还可能导致支架材料的重塑,从而使剩余的FGF-2在整个伤口愈合过程中变得可接近。这种趋化作用在生物相容性实验期间很明显。直接与负载FGF-2的支架材料(SF1、SF5、SF6和GF1)相互作用并围绕其的活细胞密度较高,很可能是由于FGF-2的趋化作用,它沿着一定浓度梯度将细胞吸引向支架材料。

[0555] SF5和SF6的持续释放曲线和相对较高的FGF-2释放速率显现与当鼠或人成纤维细胞暴露于这些支架3周的期间观察到的增加的增殖效应相关。这种效应的持续性质进一步表明,这些负载FGF-2的支架材料比以前的FGF-2支架制剂有所改进,其中生物活性限于24-36小时。此外,这些结果证实了上面提出的假设,即负载FGF-2的基于藻酸盐的支架会比**Gelfoam®**支架产生更持久的FGF-2释放,因为更小的孔径、更低的孔隙率以及FGF-2与藻酸盐结合的潜力。

[0556] 使用活/死细胞成像测定探究了支架材料的生物相容性。细胞与支架材料的相互作用以及最小的细胞死亡表明所有支架都是生物相容的。尽管所有支架都与最小的细胞死亡相关,但是细胞与支架材料相互作用的程度显现为依据于FGF-2的存在和不存在以及支架材料的组成两者而不同。在这方面,SF5和SF6再次优于空白支架和其他负载FGF-2的支架(SF1和GF1),在支架附近示出高数量的活细胞,并与支架材料直接相互作用基于对支架形态的评估,预计细胞与负载FGF-2的藻酸盐支架的相互作用会增加,这表明与空白和**Gelfoam®**支架相比,负载FGF-2的支架材料的孔面积、孔直径和更低的孔隙率将更大程度地促进细胞相互作用。

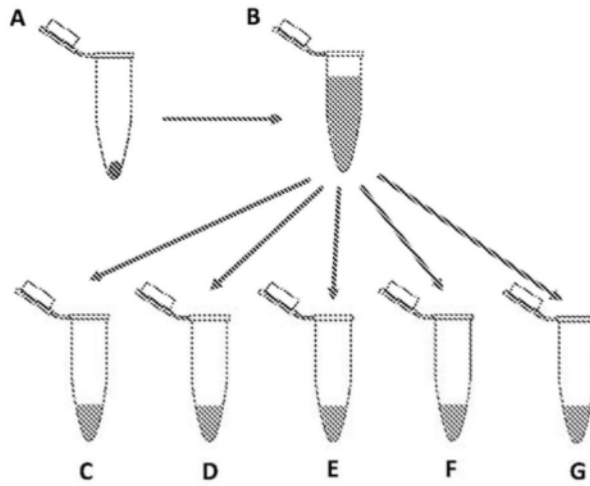


图1

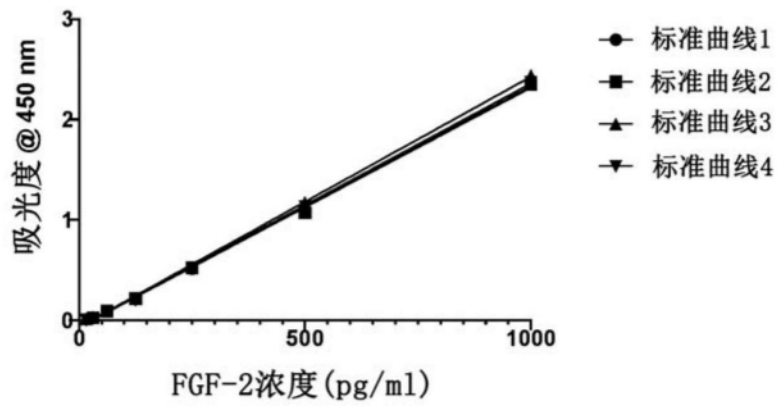


图2

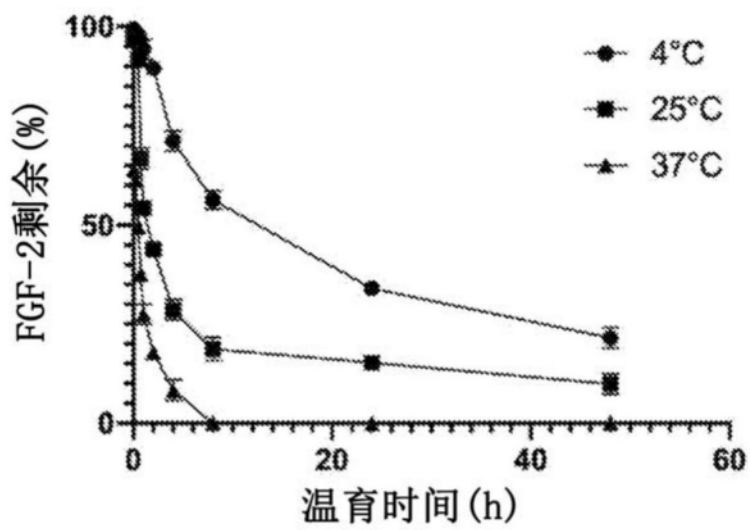


图3

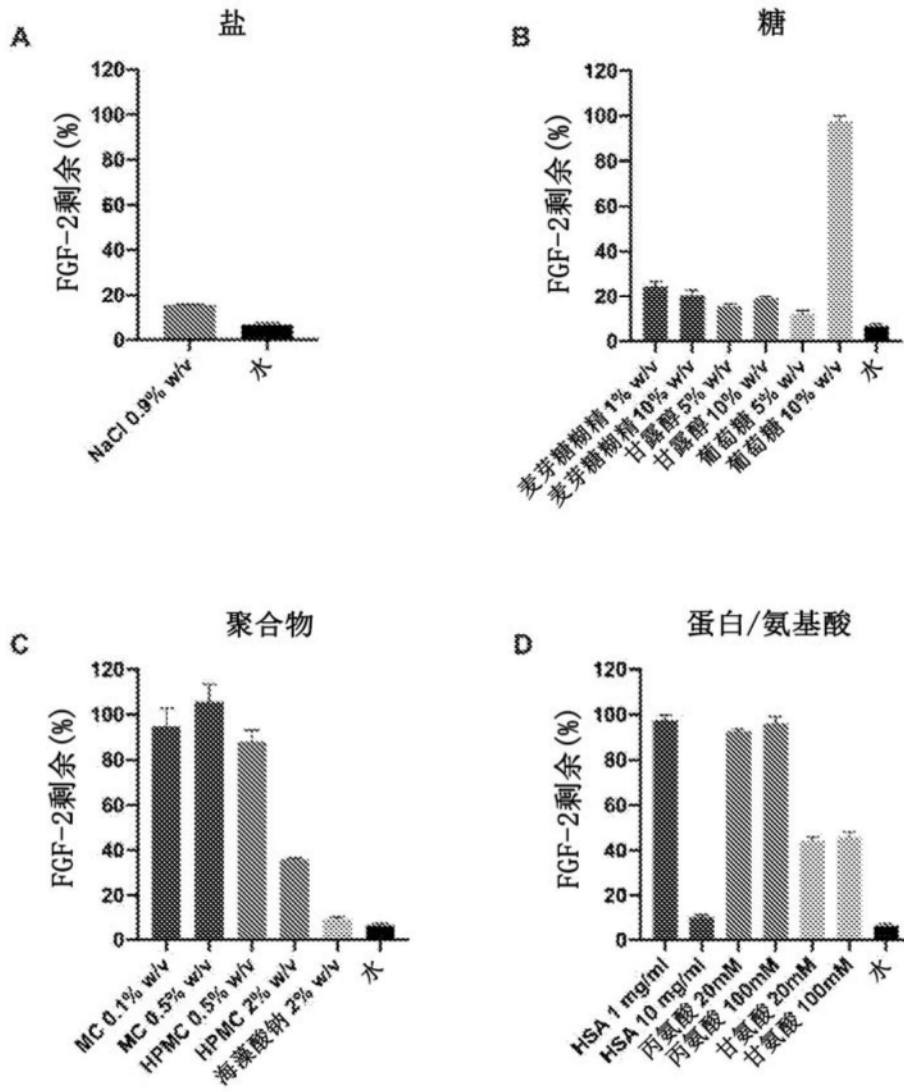


图4

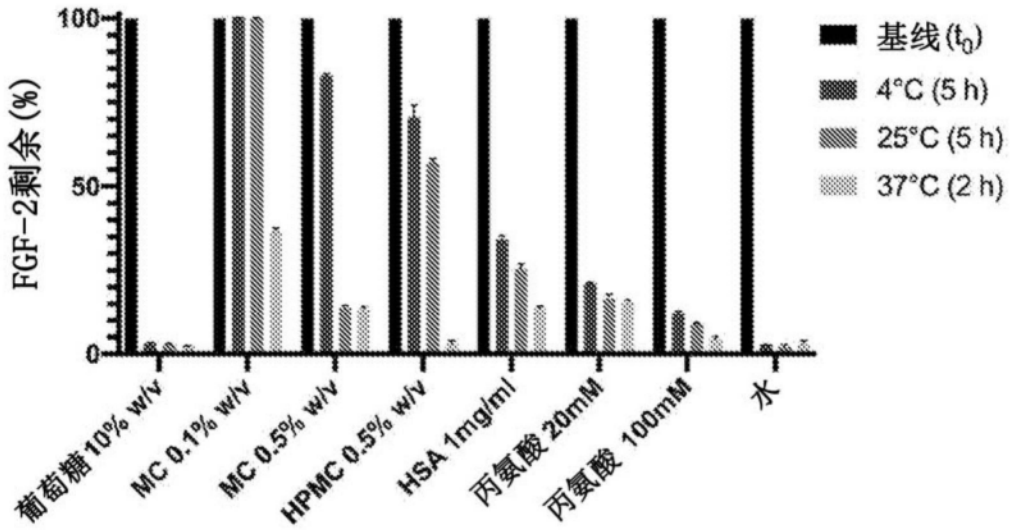


图5

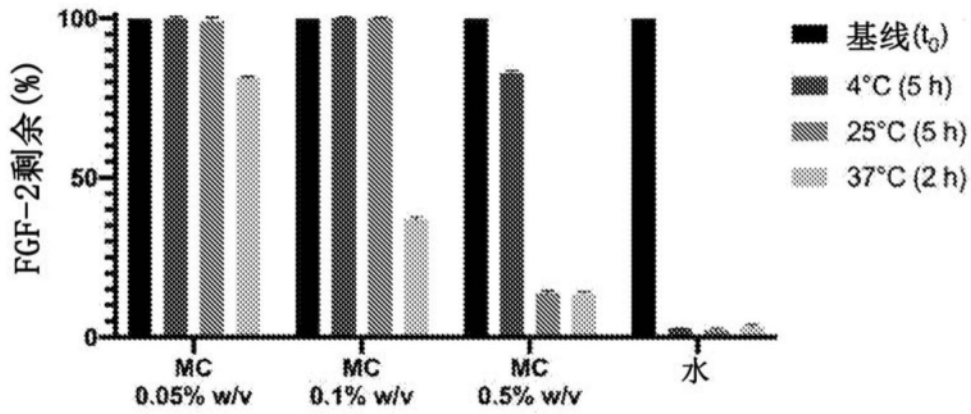


图6

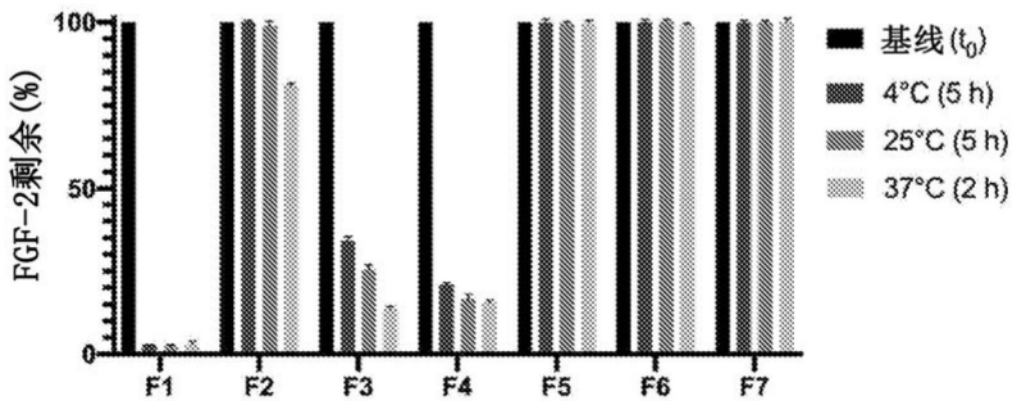


图7

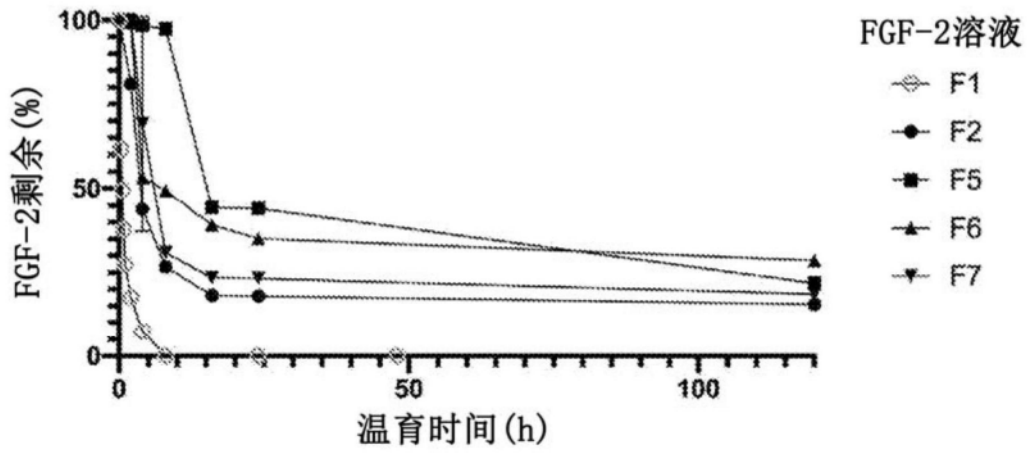


图8

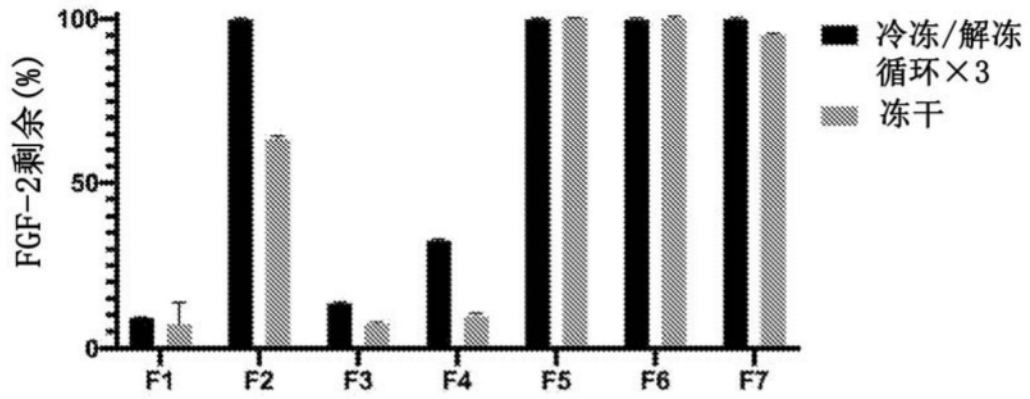


图9

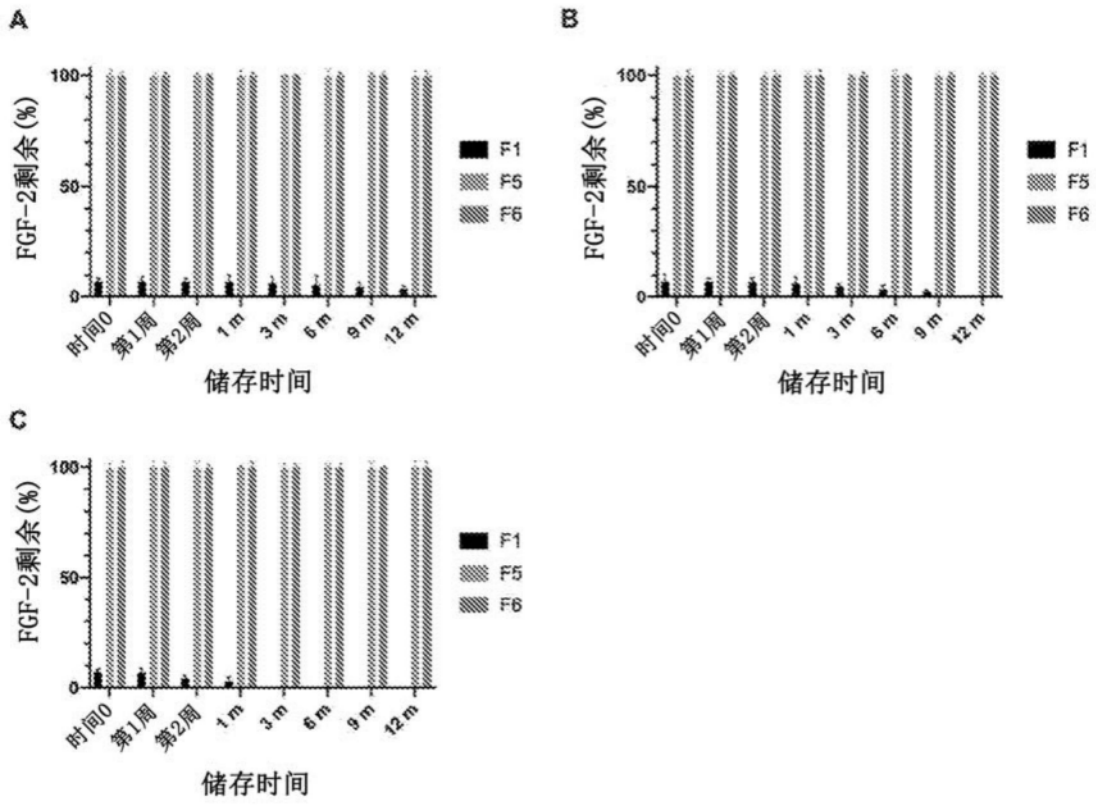


图10

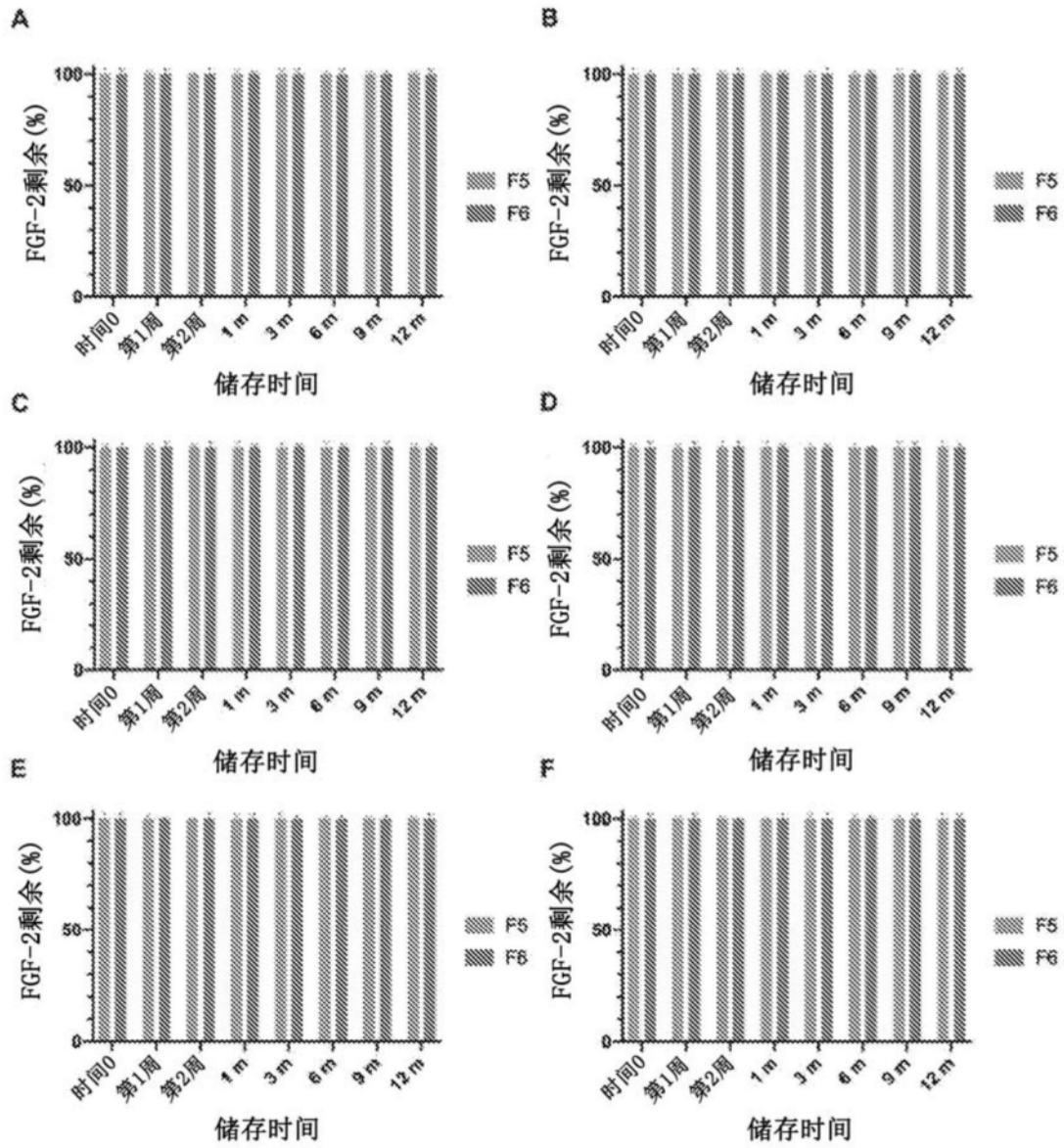


图11

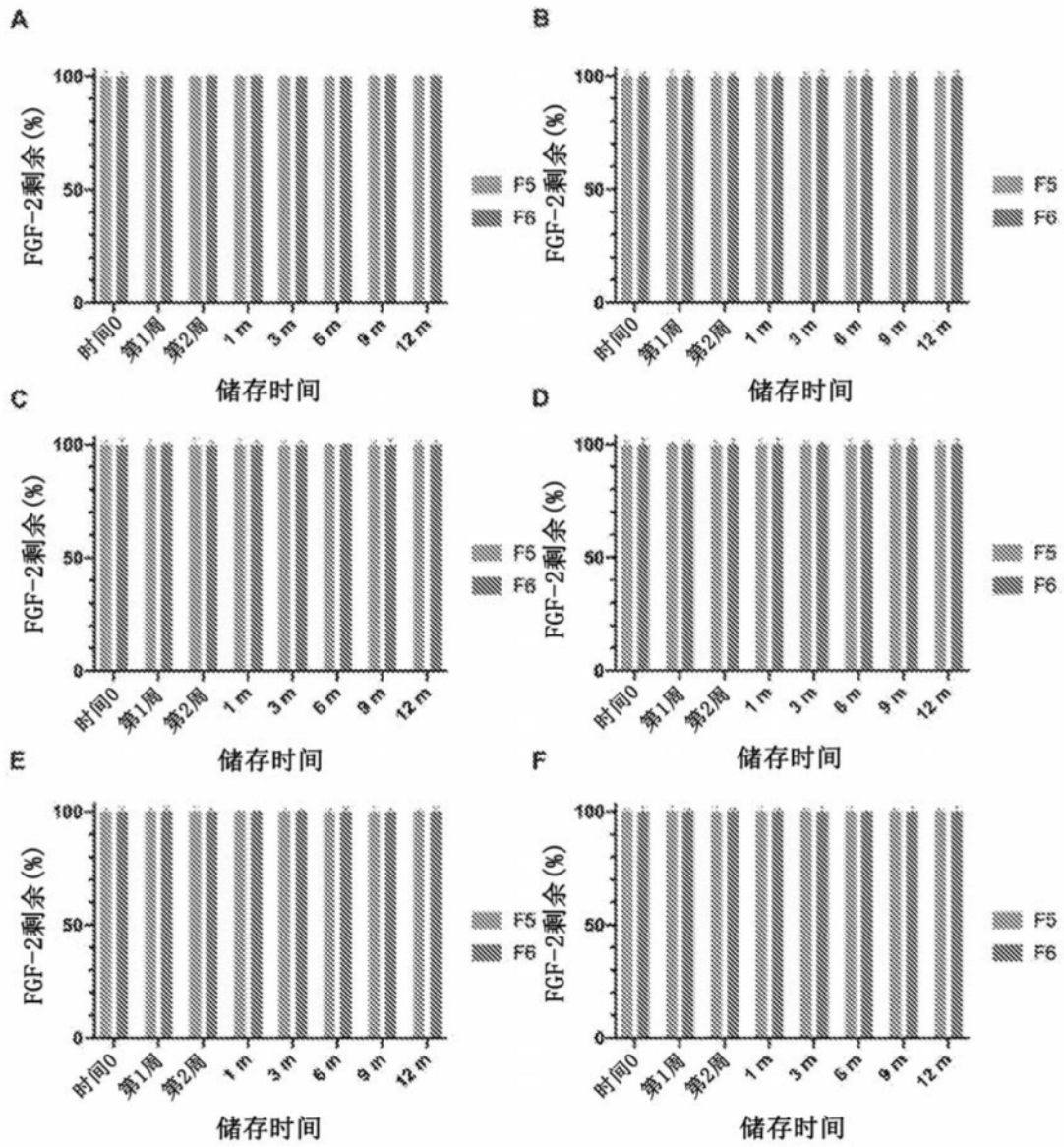


图12

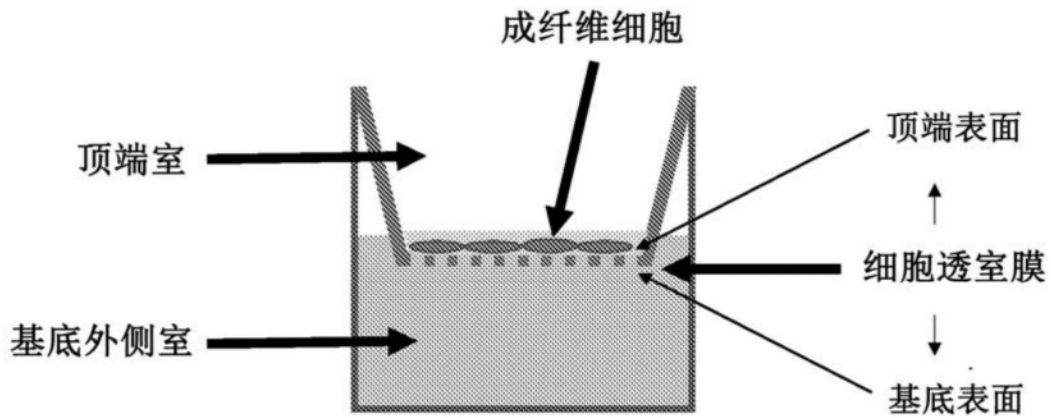


图13

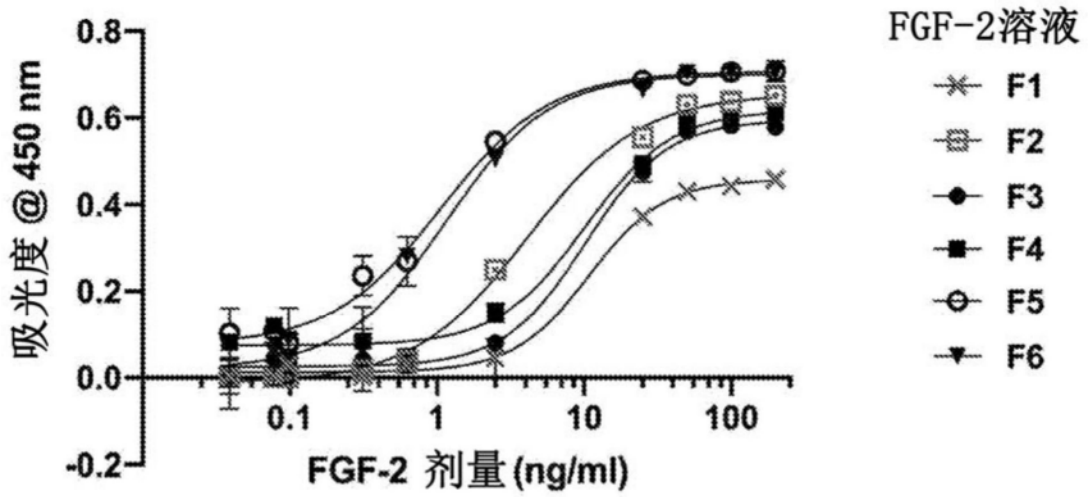


图14

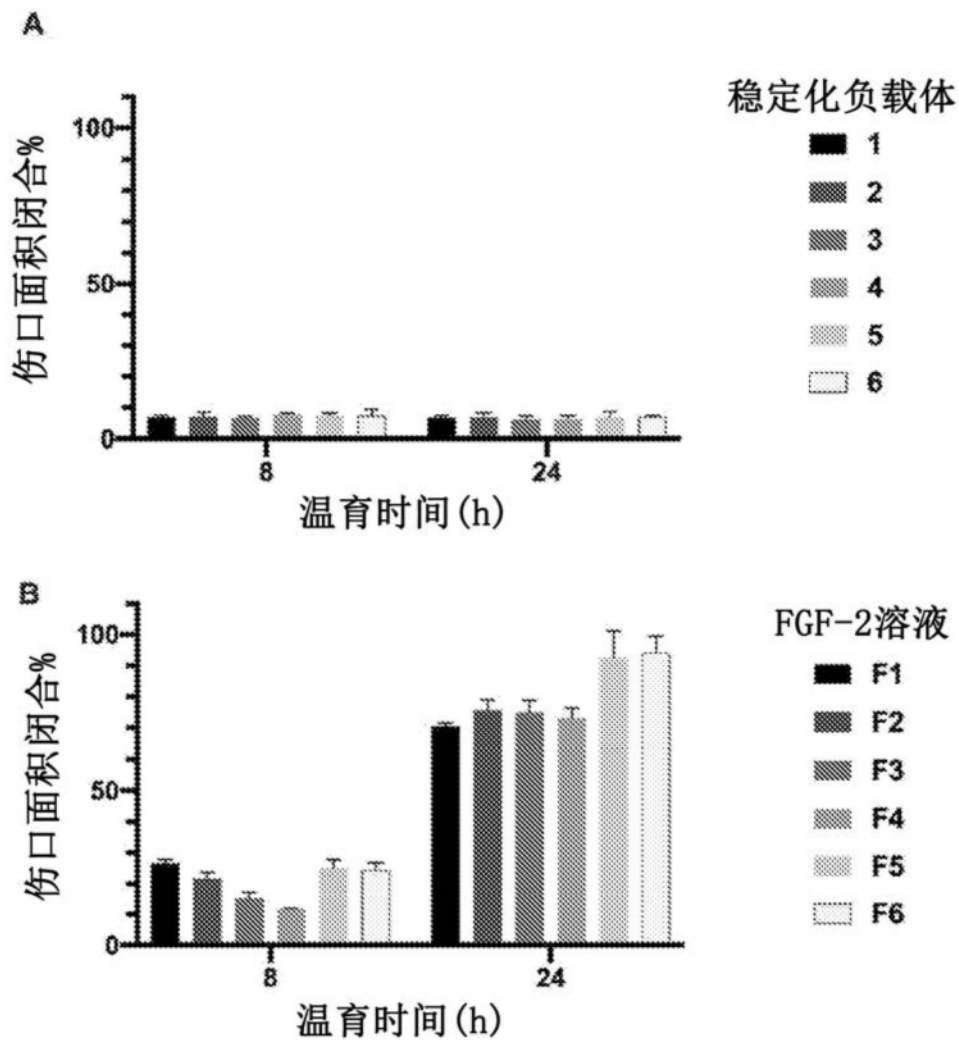
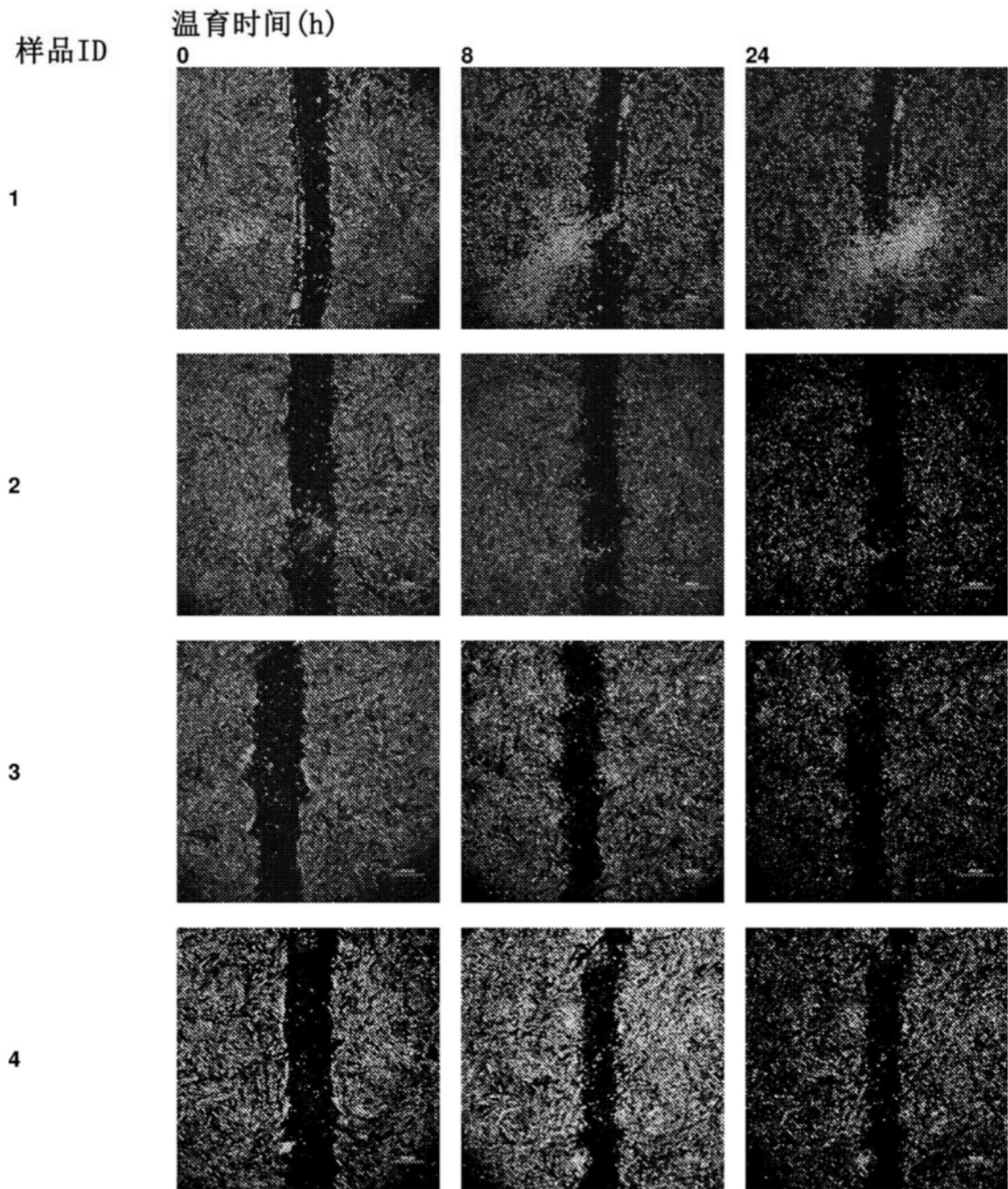
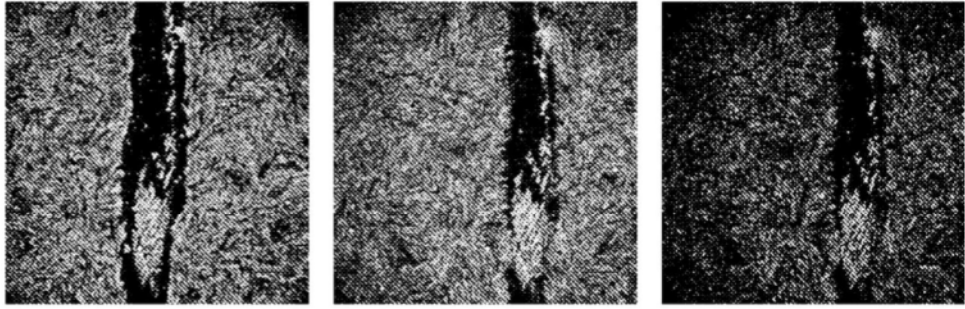


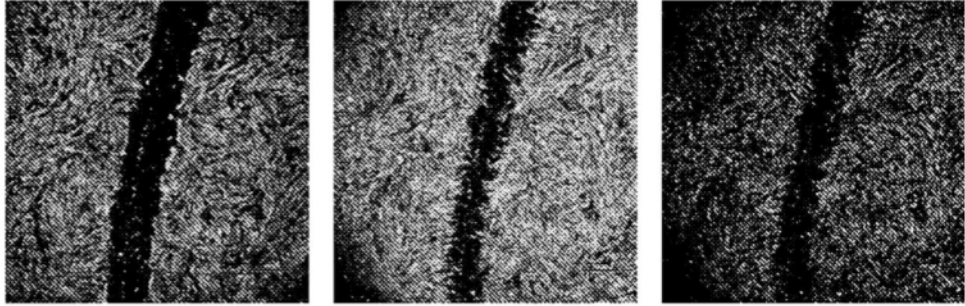
图15



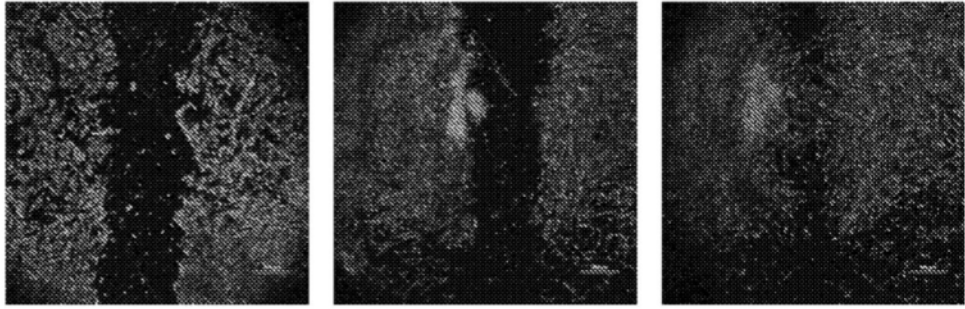
5



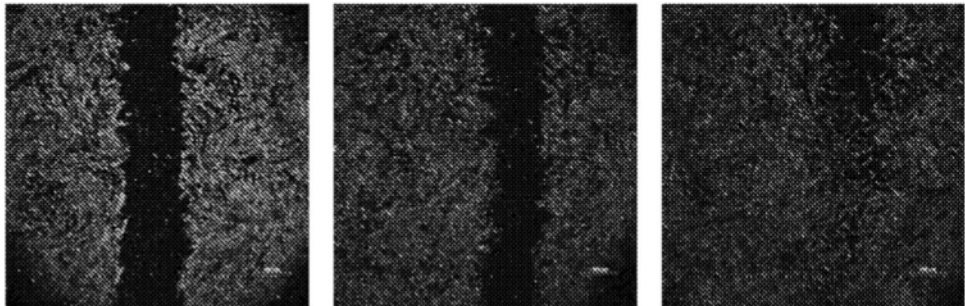
6



F1



F2



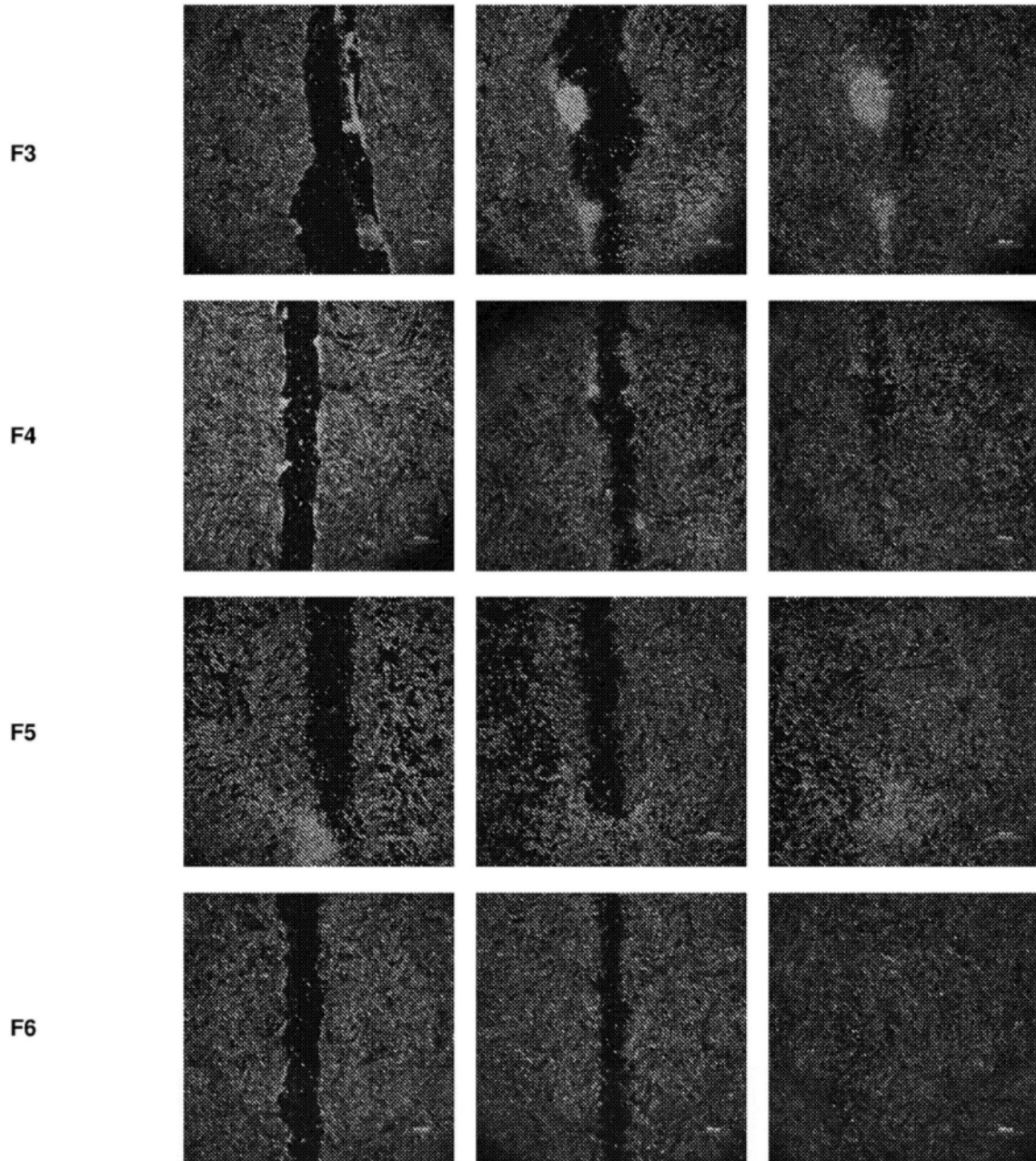


图16

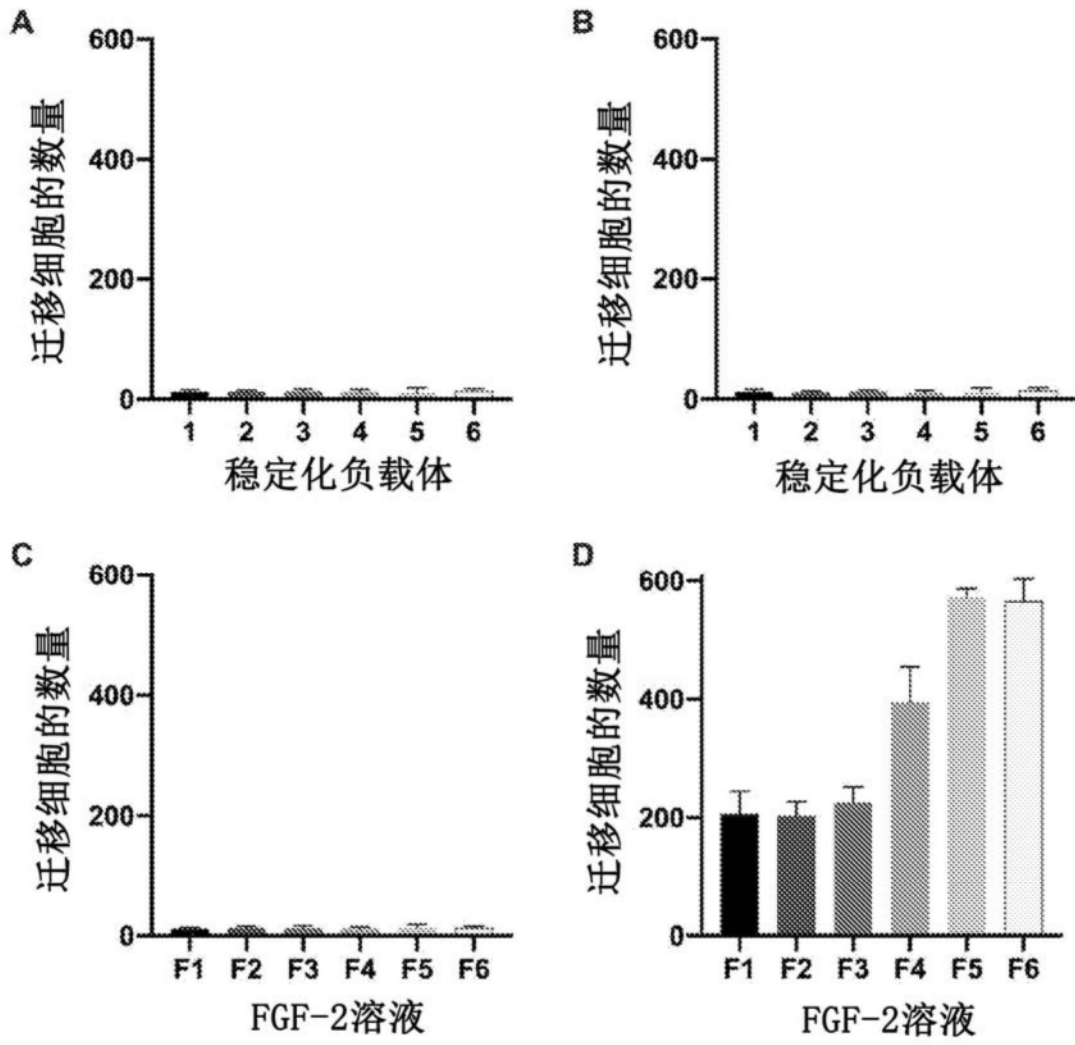
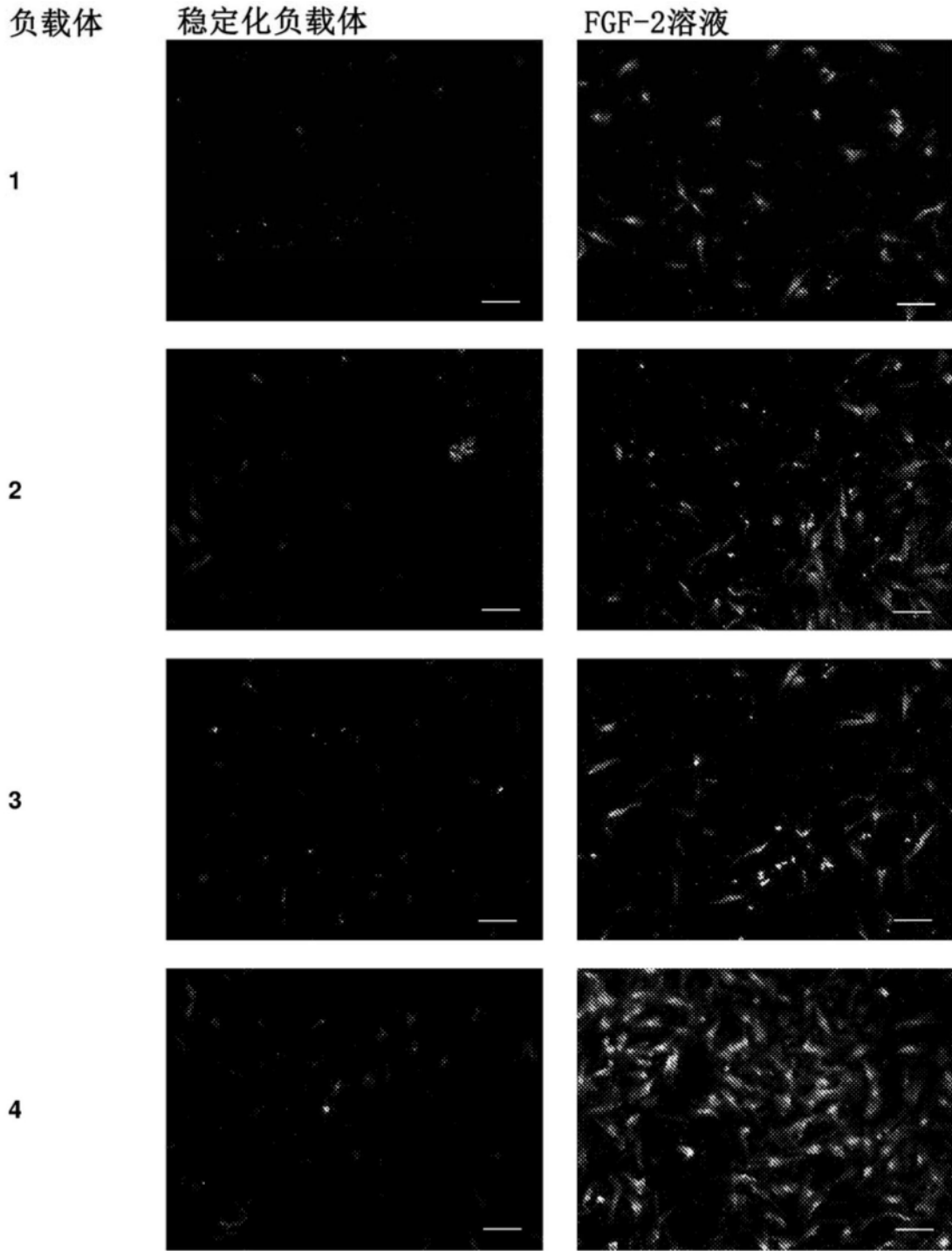


图17



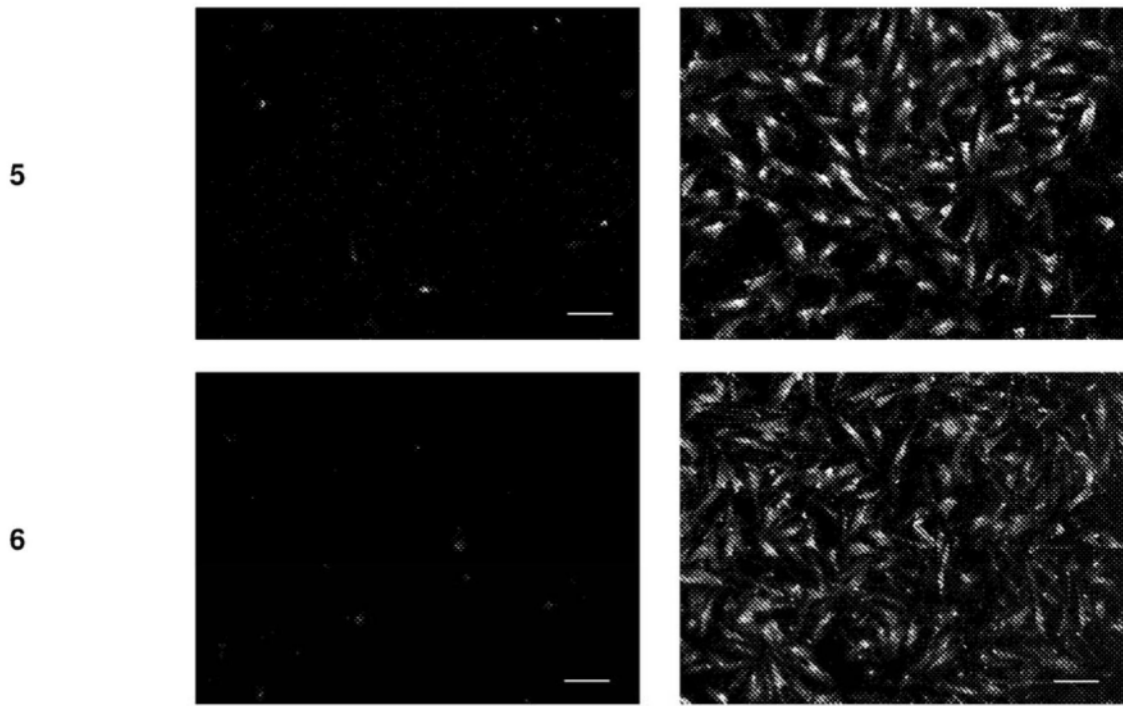


图18

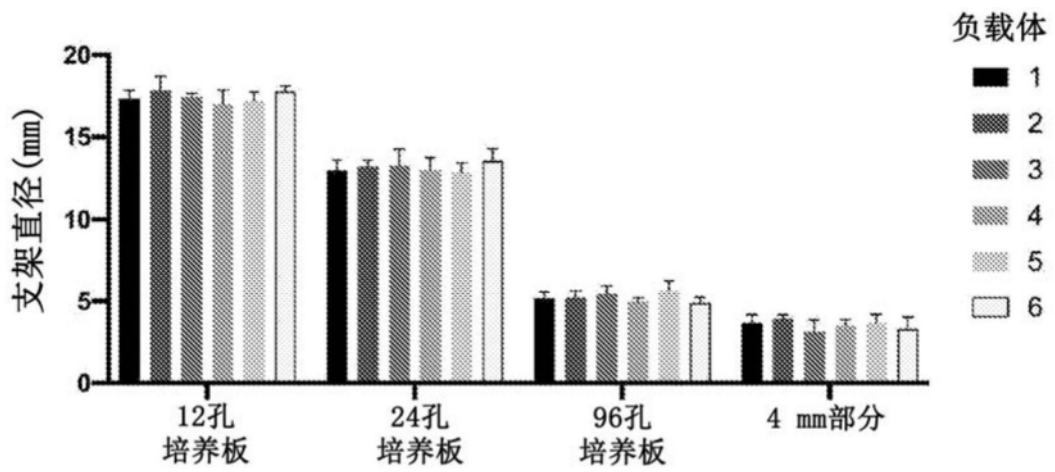


图19

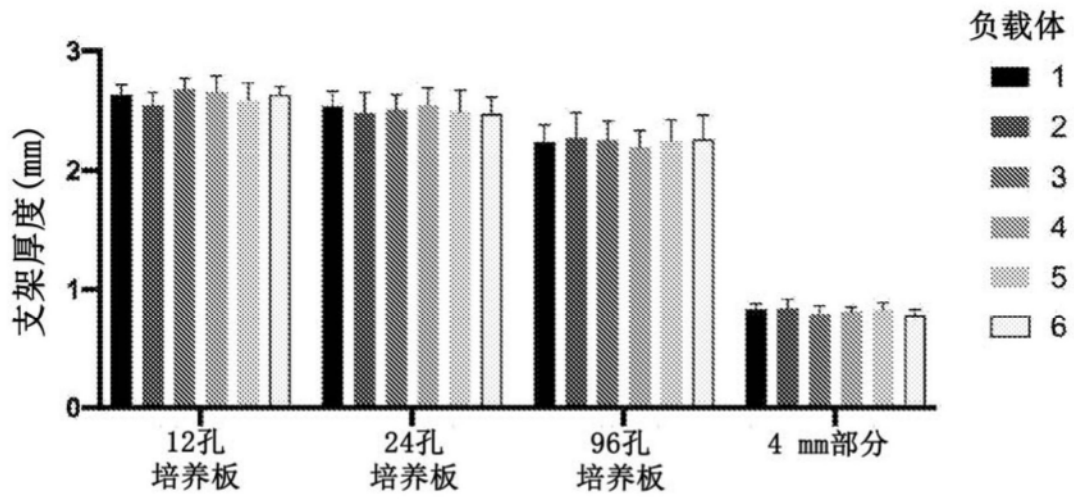


图20

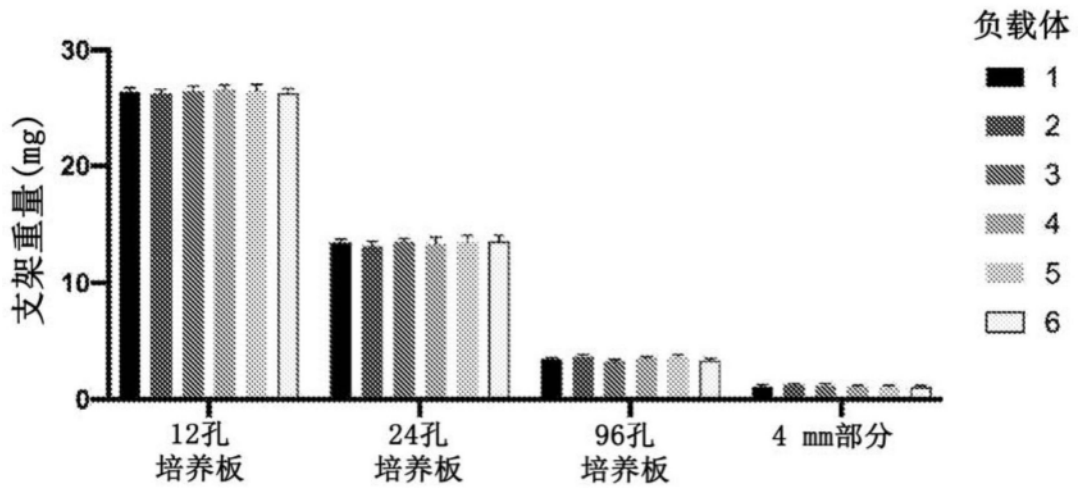


图21

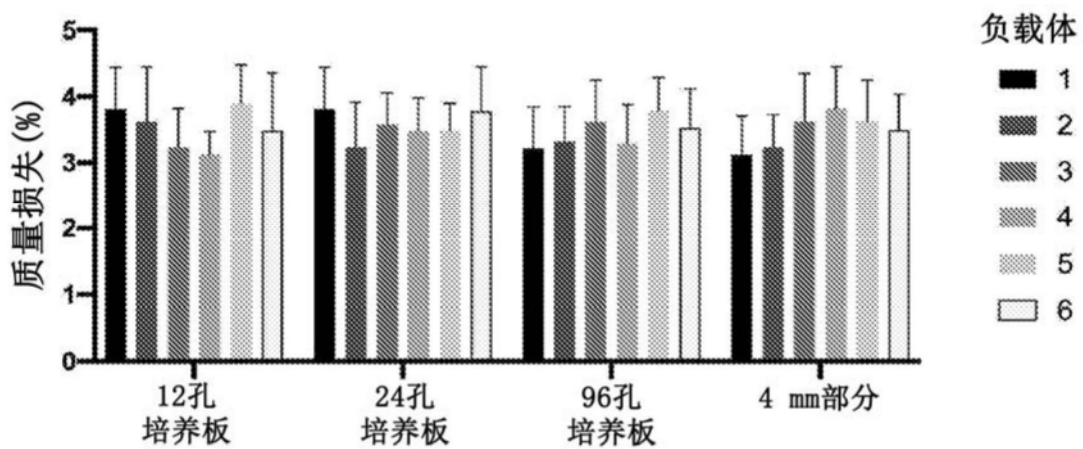


图22

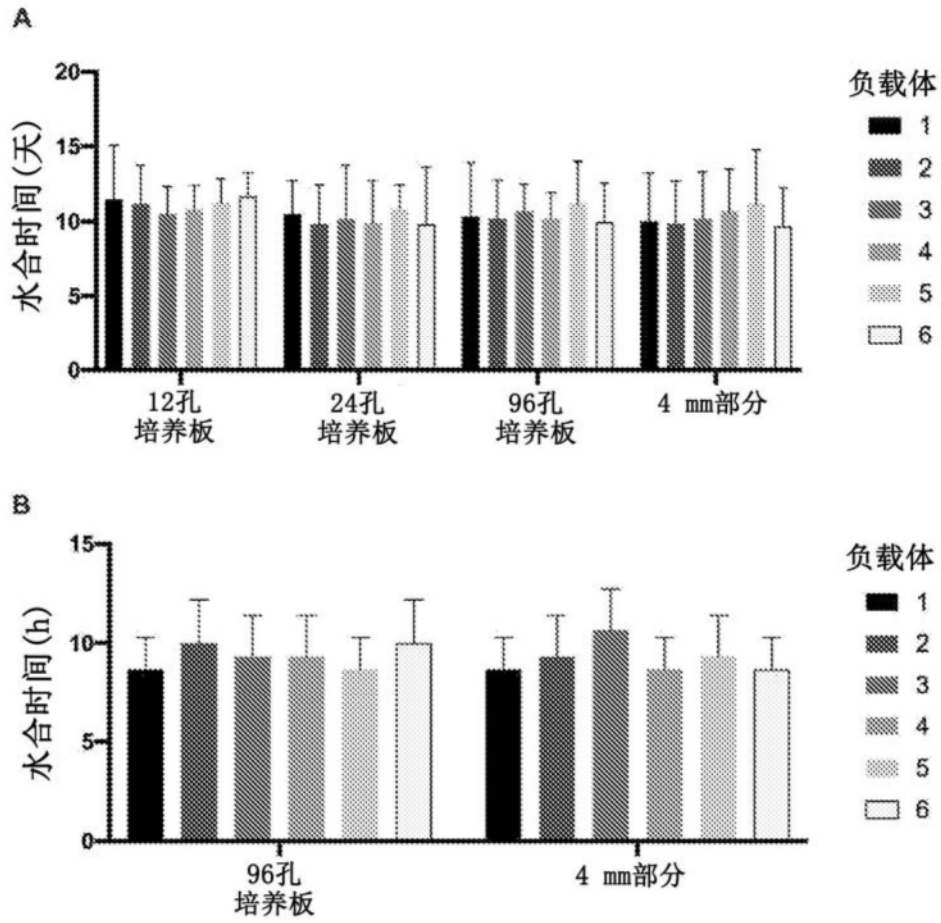


图23

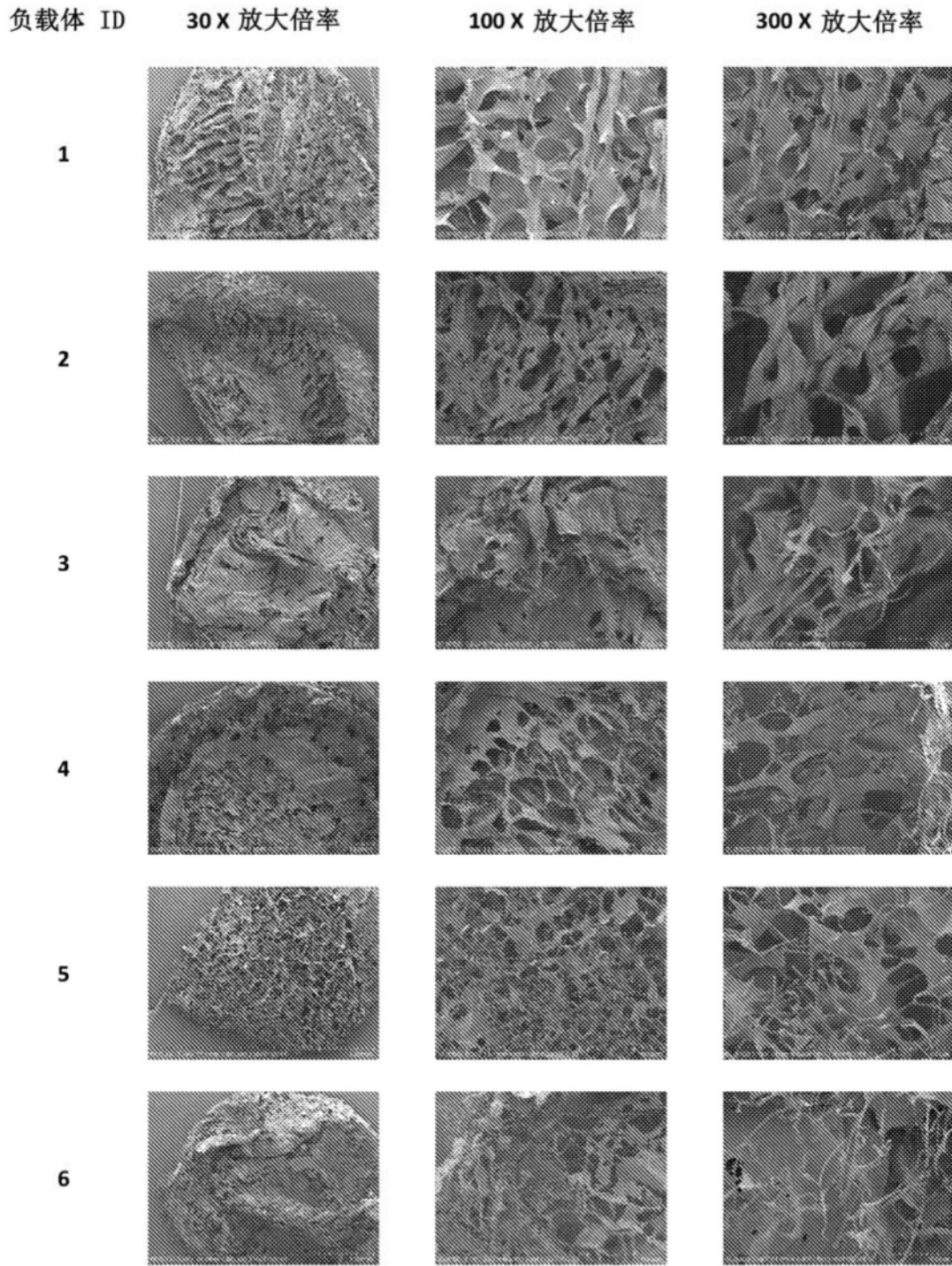


图24

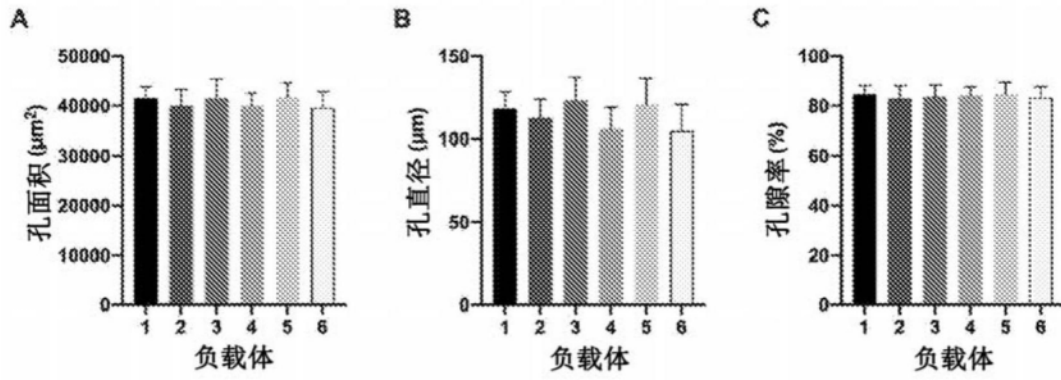


图25

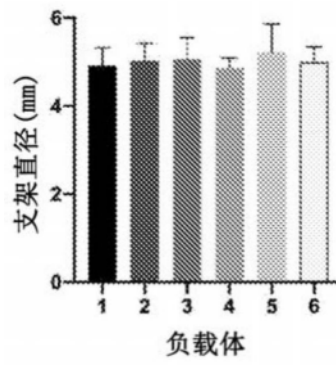


图26

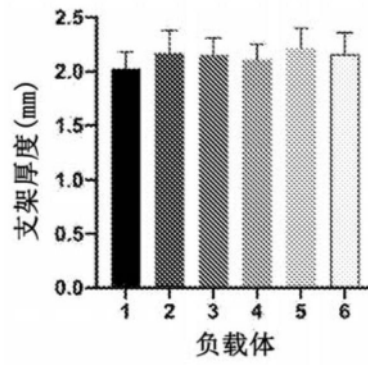


图27

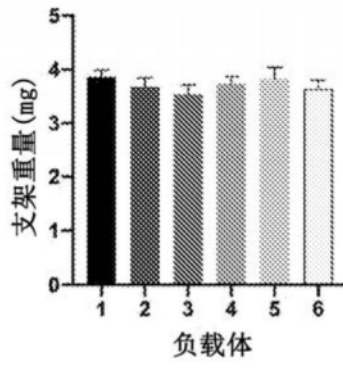


图28

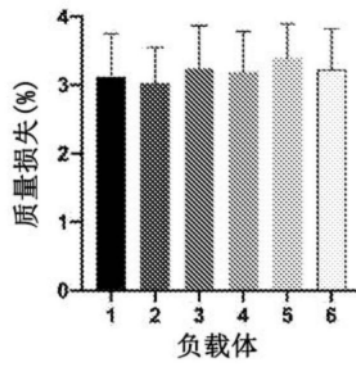


图29

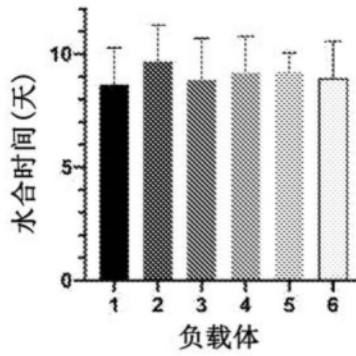


图30

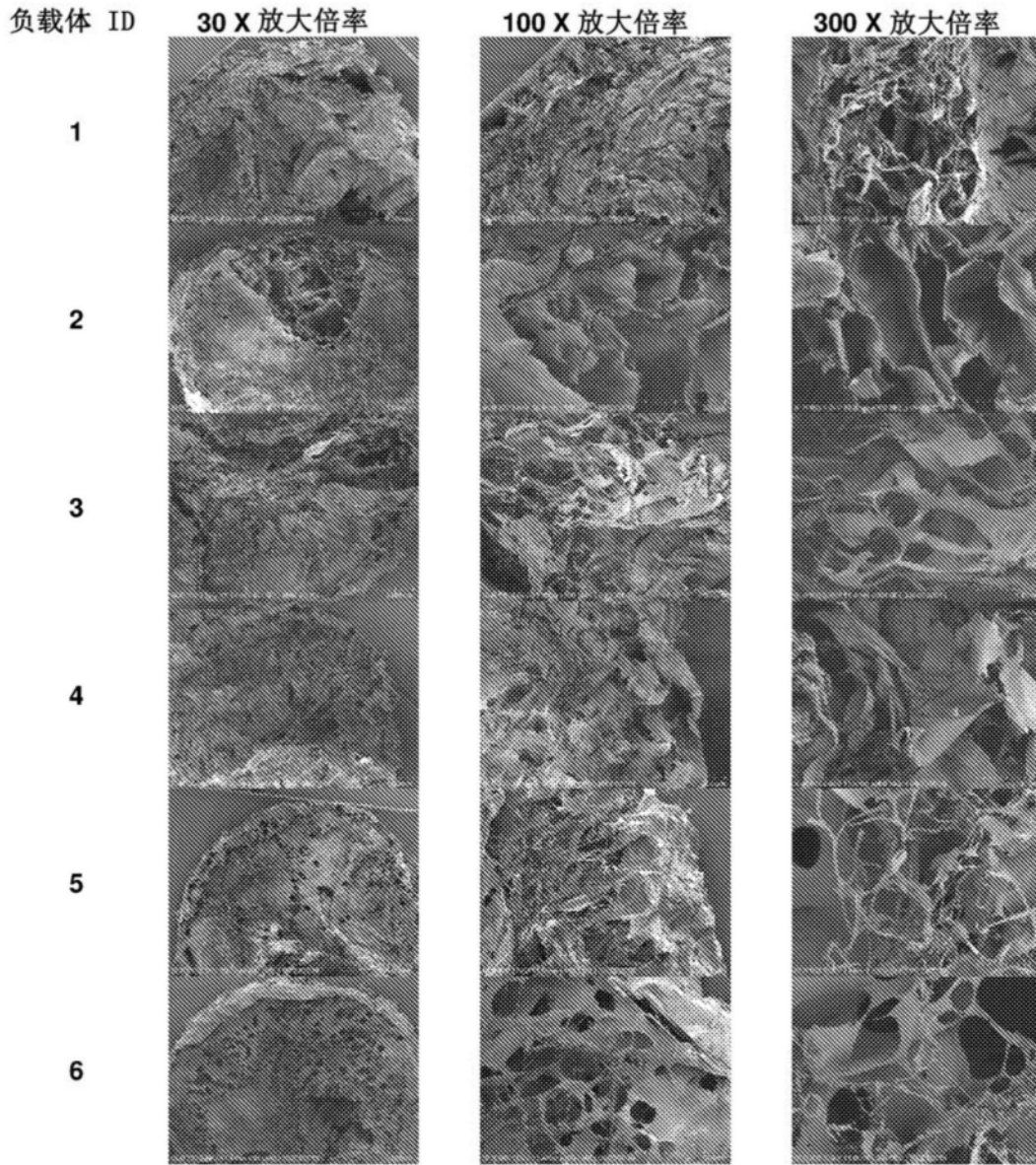


图31

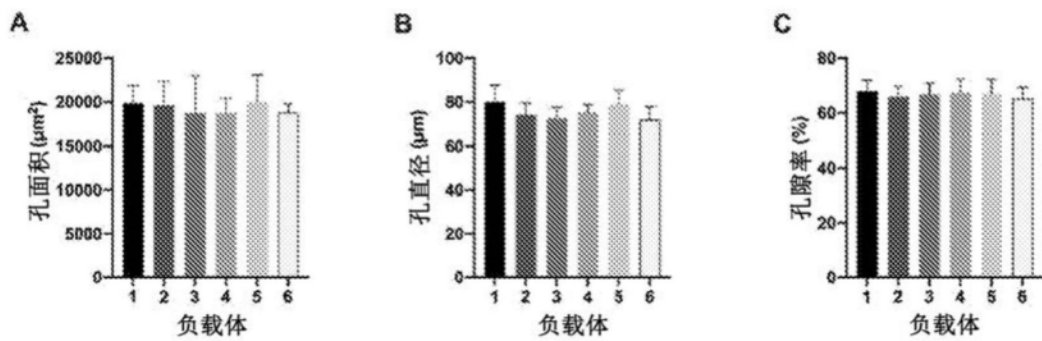


图32

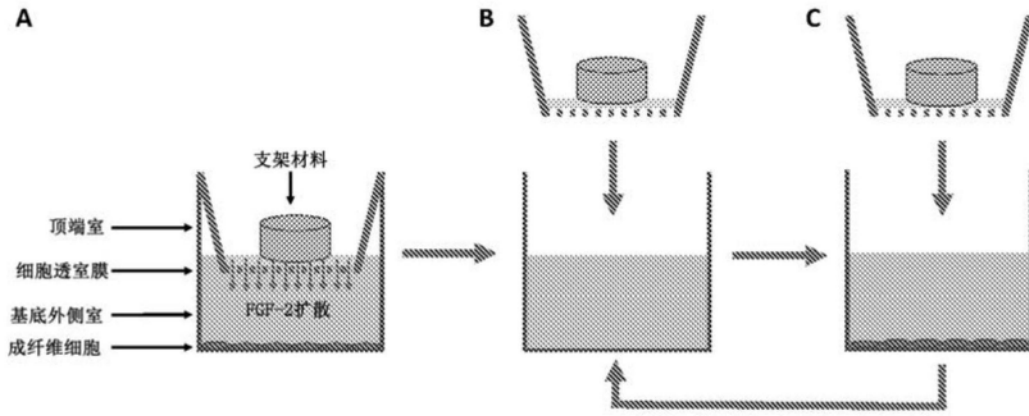


图33

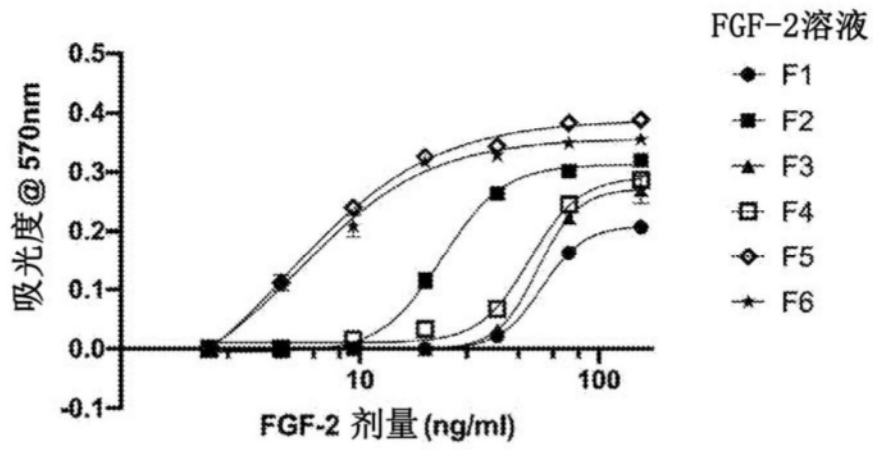


图34

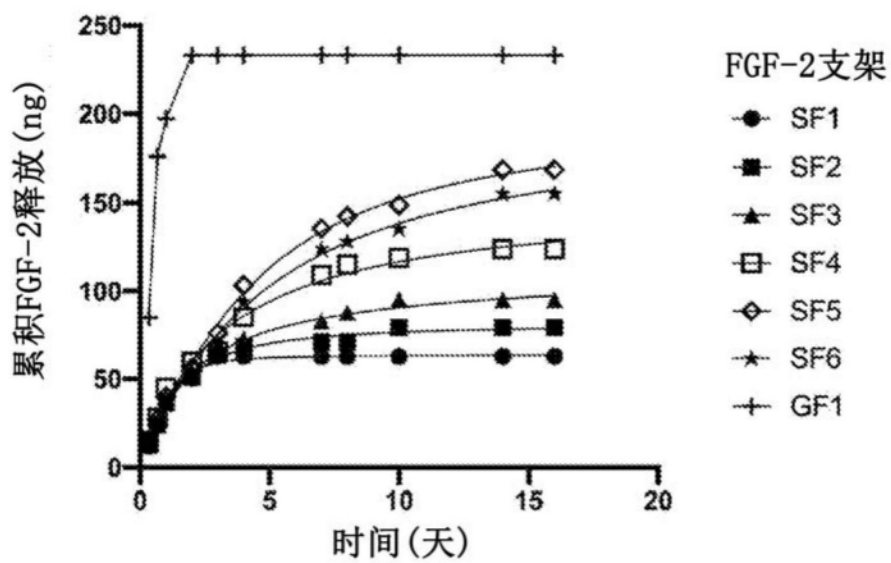


图35

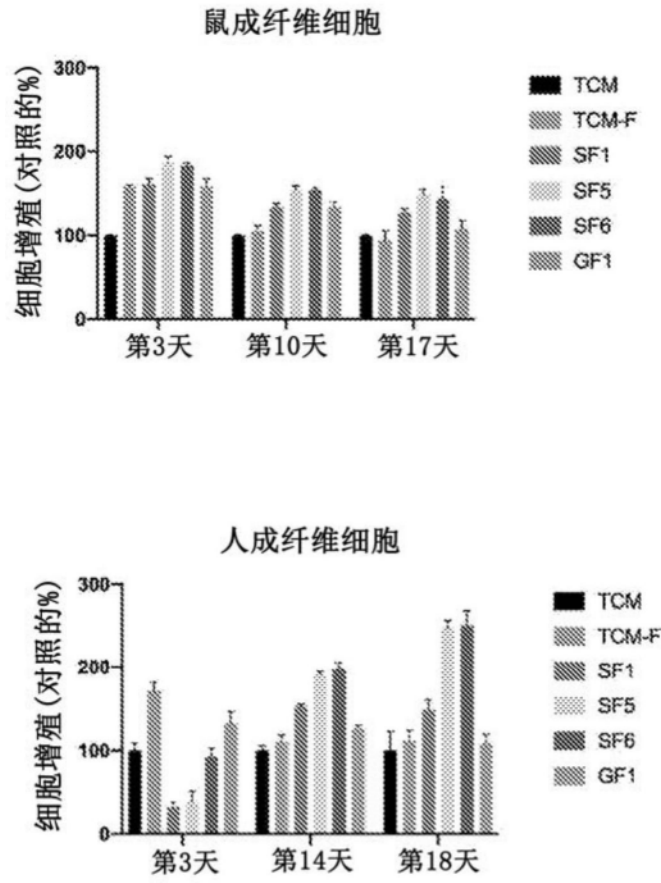
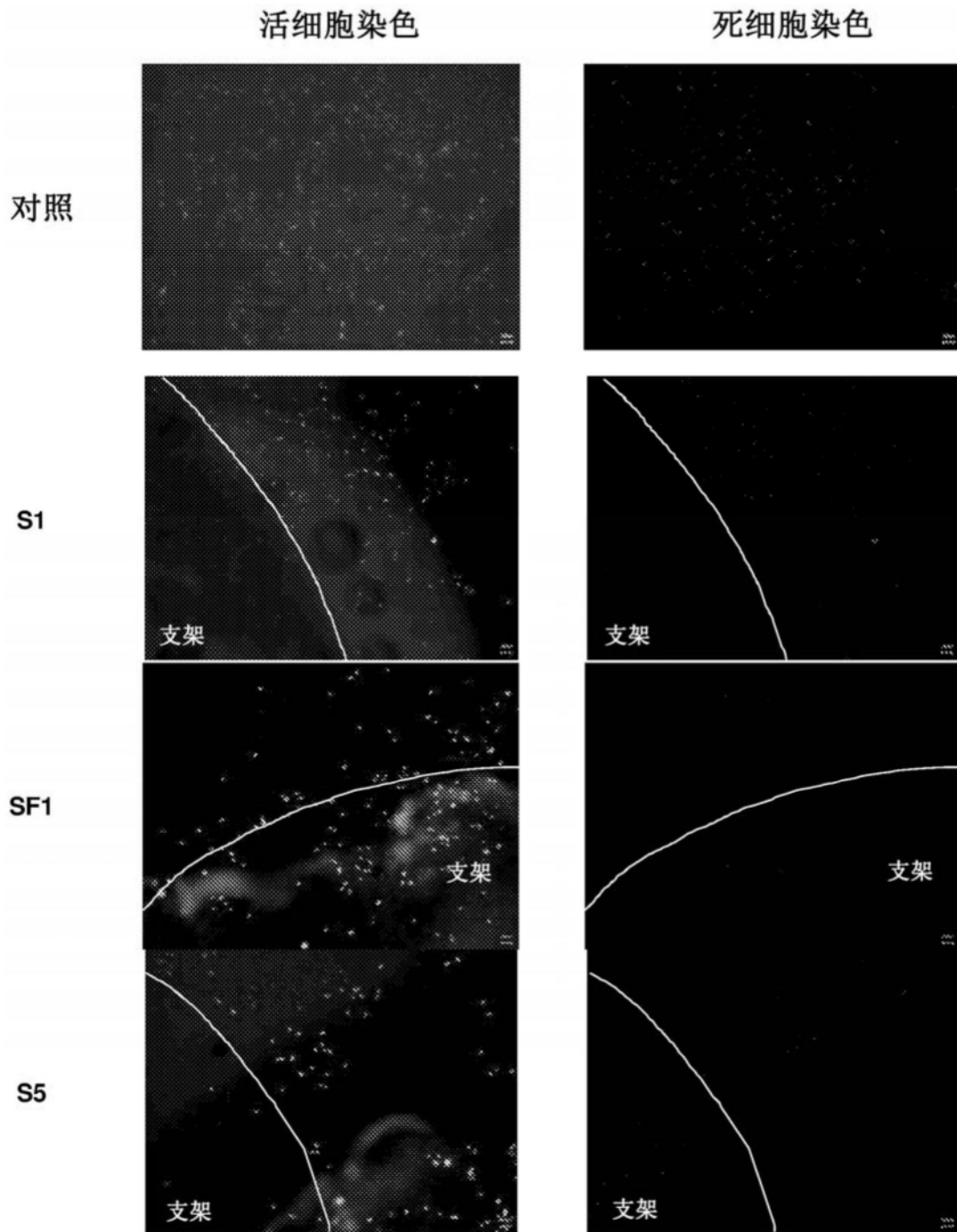


图36



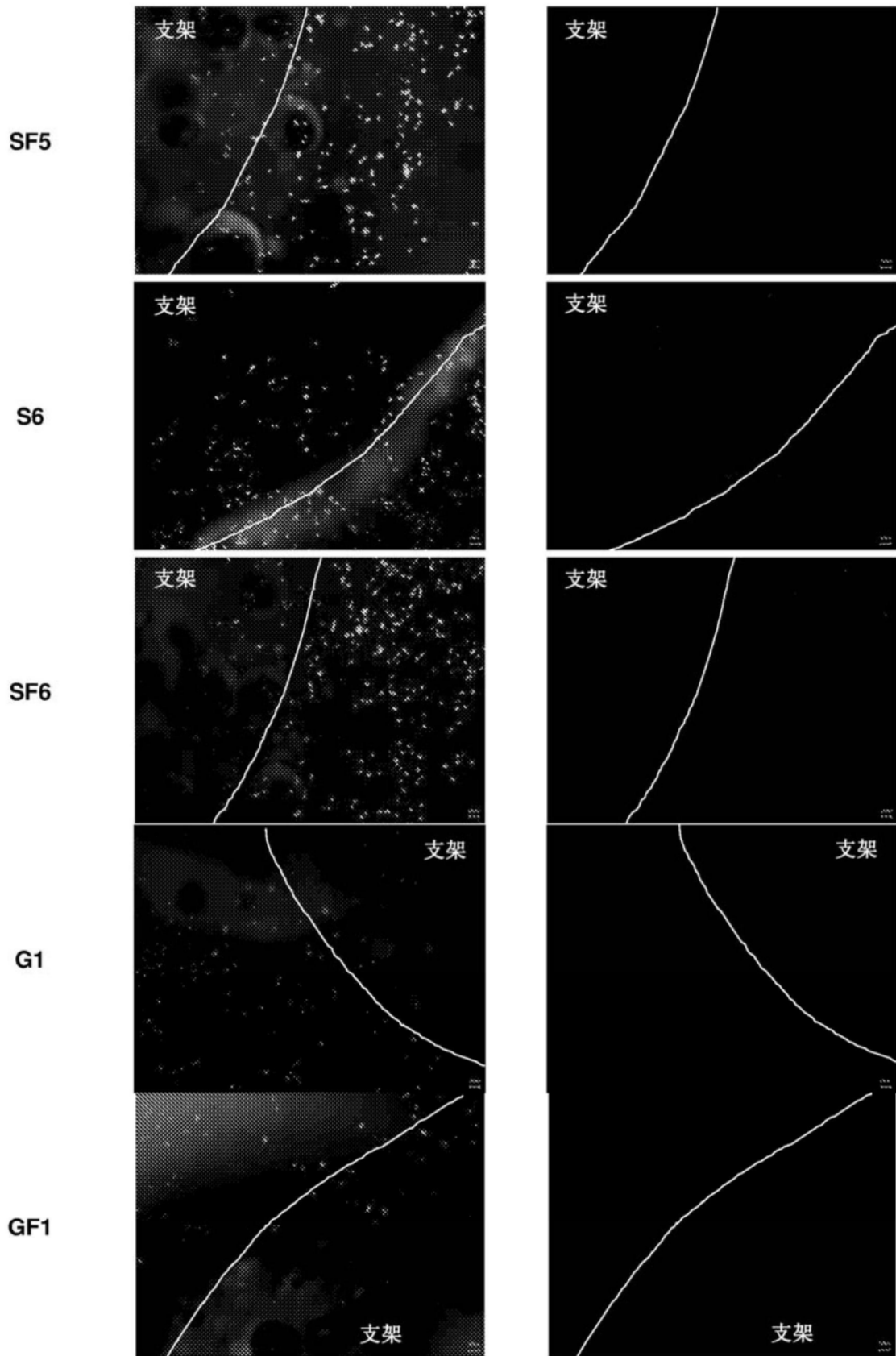


图37

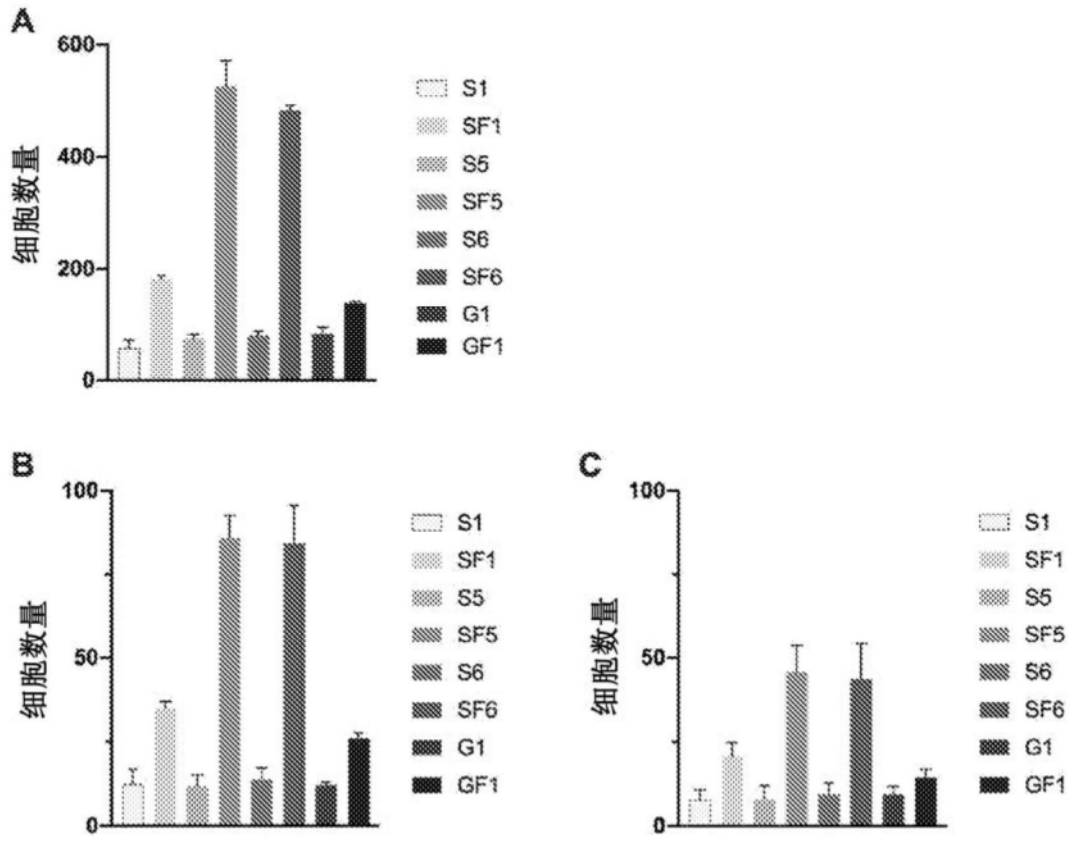


图38

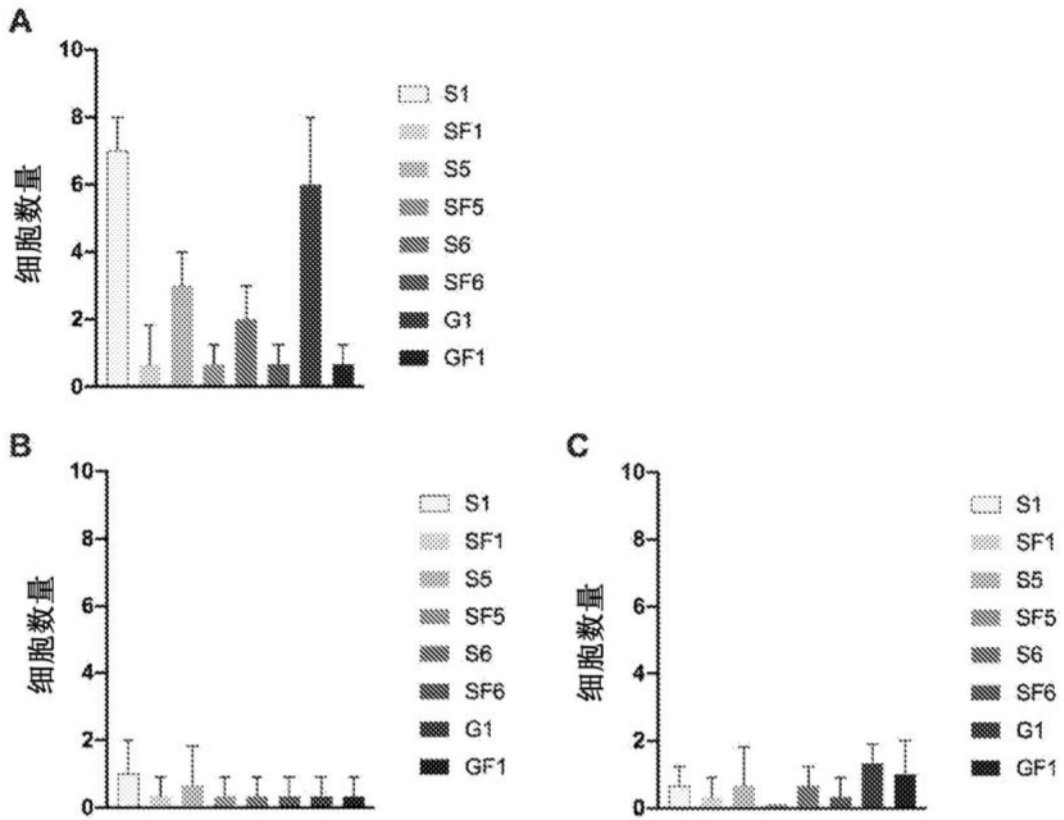


图39