(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104349788 B
(45)授权公告日 2017.07.28

(21)申请号 201380028007.8
(22)申请日 2013.05.30
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104349788 A
(43)申请公布日 2015.02.11
(30)优先权数据
PD2012A000173 2012.05.31 IT
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.11.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2013/054477 2013.05.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/179258 EN 2013.12.05
(73)专利权人 菲迪亚制药股份公司
地址 意大利阿巴诺泰尔梅
(72)发明人 M·坎皮西 C·古丽瑟
D·雷尼尔
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 张朔 黄革生
(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)
A61K 47/36(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
(56)对比文件
EP 1589036 A1,2005.10.26,
WO 2006092233 A1,2006.09.08,
Borzacchiello et al..Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity.《JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH》.2010,第92A卷(第3期),
审查员 奚静
权利要求书2页 说明书13页 附图10页

(54)发明名称

新的疏水蛋白释放系统

(57)摘要

本发明的目的是包含与具有主要是疏水性质的治疗学和/或生物学活性蛋白质联合的特定透明质酸酰胺的新释放系统,用于随时间推移的持续缓慢释放,其提高了药物功效和患者顺从性。

CN 104349788 B

1.用于持续释放治疗学和/或生物学活性蛋白质的系统,包含:

a)具有主要是疏水性质的蛋白质,和

b)透明质酸(HA)酰胺

其中所述具有主要是疏水性质的蛋白质具有不低于-0.5的GRAVY指数并且选自胰岛素、hGH、sCT、IL-1Ra,并且所述HA酰胺选自:

• HA十六烷基酰胺:具有十六烷基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为8%至9%;

• HA辛基酰胺:具有辛胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为10%至11%;

• HA十二烷基酰胺:具有十二烷基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为10%至11%;

• HA叔丁基酰胺:具有叔丁基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为7%至8%;

• HA苄基酰胺:具有苄胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为8%至9%;并且其中用于制备酰胺的HA具有500至730KDa的重均分子量。

2.权利要求1所要求的系统,其中所述HA酰胺是十六烷基酰胺,并且用于制备所述酰胺的HA具有500至730KDa的重均分子量。

3.权利要求2所要求的系统,其中所述治疗学和/或生物学活性蛋白质是hGH或sCT,任选与稳定剂和赋形剂联合。

4.权利要求1所要求的系统,其中所述治疗学和/或生物学活性蛋白质是胰岛素,任选与稳定剂和赋形剂联合。

5.权利要求1-4任一项所要求的系统,用于在治疗由骨关节炎导致的关节损伤、治疗腱炎、修复心肌损伤、修复骨折/空腔或愈合皮肤溃疡/创伤/撕裂伤中用于注射、关节内或局部应用或用于口服施用。

6.权利要求3所要求的系统,用于在治疗骨关节炎、类风湿性或银屑病性关节炎和/或骨质疏松症中用于关节内应用。

7.权利要求1所要求的系统,用于在治疗由骨关节炎导致的关节损伤、治疗腱炎、修复心肌损伤、修复骨折/空腔或愈合皮肤溃疡/创伤/撕裂伤中用于注射、关节内或局部应用或用于口服施用。

8.透明质酸(HA)酰胺和具有主要是疏水性质的蛋白质在制备用于持续释放治疗学和/或生物学活性蛋白质的系统中的用途,其中所述具有主要是疏水性质的蛋白质具有不低于-0.5的GRAVY指数并且选自胰岛素、hGH、sCT、IL-1Ra,并且其中所述HA酰胺选自:

a)HA十六烷基酰胺:具有十六烷基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为8%至9%;

b)HA辛基酰胺:具有辛胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为10%至11%;

c)HA十二烷基酰胺:具有十二烷基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为10%至11%;

d)HA叔丁基酰胺:具有叔丁基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为7%至8%;

e)HA苄基酰胺:具有苄胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比为8%至9%;

其中用于制备酰胺的HA具有500至730KDa的重均分子量。

9.权利要求8所要求的用途,其中所述HA酰胺是十六烷基酰胺。

10.权利要求9所要求的用途,其中所述治疗学和/或生物学活性蛋白质是hGH或sCT,任选与稳定剂和赋形剂联合。

11.权利要求10所要求的用途,其中所述治疗学和/或生物学活性蛋白质是hGH,用于骨关节炎治疗的注射施用。

12.权利要求8所要求的用途，其中所述治疗学和/或生物学活性蛋白质是hGH，用于在治疗由骨关节炎导致的关节损伤中用于注射施用。

新的疏水蛋白释放系统

[0001] 本发明涉及包含与具有治疗学和/或生物学活性的具有主要是疏水性质的蛋白质联合的特定透明质酸酰胺的药物组合物，用于制备持续缓慢的蛋白质释放系统。

[0002] 发明背景

[0003] 通过将活(细菌)系统进行工程化而获得的第一个药物是胰岛素，其在1982年由食品药品管理局(FDA)批准。以前从尸体中提取的人生长激素也很快进行了工程化。在1986年，FDA批准了第一个重组人疫苗，其对抗乙型肝炎。采用活系统作为生物反应器进行药物的工业化生产从此变得普及，并且现在是很多药物的优选合成方法，尤其是由于其相对低的生产成本。

[0004] 通过生物工程技术生产了很多被设计用于治疗(和非治疗)用途的人蛋白质，包括红细胞生成素(用于治疗贫血)、白细胞介素2(用于治疗肾癌)、IL-1Ra(IL-1受体拮抗剂)、胰高血糖素、干扰素、人DNase酶、降钙素和很多其它蛋白质。

[0005] 所述药物主要具有蛋白质或多肽性质，通常经胃肠外施用，因为口服施用将引起活性成分快速降解。但是，胃肠外施用可引起患者顺从性的问题，因为需要重复施用以确保治疗效果。这些蛋白质通常具有非常短的半衰期；例如，生长激素hGH(通过基因生产)需要每天注射。因此，为了减少施用次数和增加患者顺从性，已经进行了很多实验来开发具有增加的半衰期的蛋白质/药物释放系统。

[0006] 所述释放系统必须保证药物的活性得以维持，因此必须确保蛋白质/药物的三维结构保持完整；然而，在其制备期间可发生的应激状态如有机溶剂的存在和/温度和pH的变化可引起蛋白质链的脱酰胺化或氧化，从而导致变性和治疗活性的丧失。

[0007] 例如，已知PLGA(聚乳酸/乙醇酸)微球的使用是用于小肽的释放系统，其具有优良的结果(Hutchinson F.G.,Biochem.Soc.Trans.,1985,13:520-523)；然而，将其用于配制hGH释放的贮库制剂是不可能的，因为该蛋白质的变性产生了炎性问题。

[0008] 对不具有毒性、但是所递送活性成分的功效未改变的蛋白质/药物释放系统所进行的持续寻找已经指向了使用用于配制的天然聚合物，其(由于它们与活性成分的联合)可以改变与它们所联合的药物的动力学。

[0009] 透明质酸(HA)是由D-葡糖醛酸和N-乙酰基-D-葡糖胺的交替残基组成的杂多糖。它是一种天然的直链聚合物，分子量范围根据其获得来源和所用的制备方法为50,000至$13x10^6$Da。

[0010] 它天然存在于细胞外凝胶中、存在于脊椎动物结缔组织的基质(其为其中的主要组分之一)中以及存在于关节滑液、玻璃体液和脐带中。

[0011] 因此，HA通过给很多组织如皮肤、腱、肌肉和软骨的细胞提供机械支持而在活生物体中发挥重要的生物学作用。

[0012] 由于其性质，透明质酸保护组织免受自由基损害、控制炎性过程和刺激血管生成，并且已经证明在创伤愈合的所有主要阶段的调控中特别有效(EP1196179)。

[0013] 在与透明质酸的简单联合或成盐中，使用所述多糖作为多种药物的载体是已知的，因为其生物相容性、生物降解性、无免疫原性、粘度和水合性的特性使得其特别适于用

作局部和全身水平的药物和分子释放系统(EP197718、EP445255)。还已经研究了所述多糖用于特定蛋白质的药物递送,所述蛋白质例如有IL-1Ra(US 6,096,728)、红细胞生成素(Hahn SK.等人,Int J Pharm.,2006,28,322:44-51)、胰岛素(Nomura M.等人,J Pharm Pharmacol,1994,46:768-770)、生长激素(Kim SJ.等人,Journal of Controlled Release,2005,104:323-335)、干扰素和促卵泡激素(US8,025,900)。

[0014] 在所有这些情况中,药物与所述多糖的联合已经导致了所载蛋白质的"缓慢"释放,但是不足以缓慢到减少药物施用次数。

[0015] HA是完全天然的多糖,其被体内存在的酶(透明质酸酶)迅速降解,相对迅速地释放出所联合的药物。由于这些原因,已经对HA的羧基和羟基进行了化学修饰以产生交联衍生物(US 4,582,865、US 4,713,448、US 5,676,964、US 4,957,74、US 5,827,937)或者用其它天然或合成聚合物或用具有不同大小和物理化学特性的分子进行了衍生化(US 4,851,521);然而,所述衍生物的制备方法往往损害所输送药理学物质的完整性。

[0016] 发明描述

[0017] 本发明的目的是包含与具有主要是疏水性质的治疗学和/或生物学活性蛋白质联合的特定透明质酸酰胺的新的释放系统,用于随时间推移持续缓慢释放,其提高了药物功效和患者顺从性。

[0018] 下文列出了本发明的具有主要是疏水性质的治疗学和/或生物学活性蛋白质的一些实例:

[0019] 胰岛素是具有合成代谢性质的蛋白质激素,由胰腺内的胰岛β细胞产生;它由两条通过两个硫桥连接的链组成。其最知名的功能是调控血糖水平。因此,该蛋白质用于治疗产生非常少胰岛素或不产生胰岛素的1型或2型糖尿病。该激素通过皮下注射施用(因为如果将其直接注射到血流中,则药物吸收过快,可能导致低血糖)。该治疗方法基于由患者进行的血糖测试的不同每日次数,随后施用校准剂量(3个或更多)的胰岛素。

[0020] 生长激素(GH)是垂体前叶的肽激素,由191个氨基酸组成,分子量为22,005Da。其主要功能是通过促进几乎所有身体组织的细胞的生长和有丝分裂来刺激人体(和很多其它脊椎动物的身体)发育(特别是其促进骨、软骨和结缔组织的生长)。

[0021] 在婴幼期,GH分泌不足引起垂体性侏儒症,而分泌过多则引起垂体性巨人症。如果分泌过多是在生长结束后开始(通常是由于肿瘤),则出现肢端肥大症,其中面部、手和足的骨头相当大程度地增大。

[0022] 因此,其被用于仍处于生长阶段的患者和患有垂体肿瘤的成人。

[0023] GH还用于治疗不是由GH缺乏引起的障碍,例如特纳综合征、慢性肾脏疾病、ISS(特发性身材矮小症)和多发性硬化,以及用于增加肥胖患者的体重减轻,用于纤维肌痛、节段性回肠炎和溃疡性结肠炎。

[0024] 在骨关节炎(OA)的治疗中,对hGH关节内施用进行的实验获得了极好的结果,这也证明了所述激素在修复由OA造成的软骨损伤中的功效(EP1153607;Kim SB等人,J Korean Med Sci.,2010,25:776-80)。

[0025] 降钙素(CT)是一种由32-氨基酸多肽组成的激素,其在人中由甲状腺滤泡旁细胞(也称为C细胞)产生。降钙素的主要功能是通过抵消甲状旁腺激素甲状旁腺素的作用而降低血液中的钙浓度。已经在鱼、爬行动物、鸟和哺乳动物中发现了这种钙调节机制。降钙素

激素也在肾脏水平发挥作用，刺激肾小管消除钙。sCT(鲑鱼CT)通常被用于治疗骨质疏松症、高钙血症、骨转移和佩吉特病。

[0026] 同样，最新实验数据已经证实了降钙素在骨关节炎治疗中的有效性：已经证明它的施用保护关节面免于OA引起的侵蚀(Manicourt DH等人，J Musculoskelet Neuronal Interact，2005，5(3)：285-293)。

[0027] IL1-Ra是细胞因子IL-1的受体拮抗剂，细胞因子IL-1是局部和全身炎性过程的强诱导剂。IL-1主要由B和T淋巴细胞以及巨噬细胞在细菌刺激或其它细胞因子刺激后产生；它也由肺泡巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞和平滑肌细胞、成纤维细胞、破骨细胞、滑膜细胞和很多其它细胞类型分泌。IL-1尤其牵涉在严重障碍如银屑病和败血症性休克中以及牵涉在某些类型肿瘤的发病机制中。IL-1与其它细胞因子组合地代表了炎性过程的主要介质之一，因此牵涉在多种障碍如骨质疏松症、类风湿性关节炎(RA)、银屑病性关节炎和骨关节炎(OA)中：实际上，已经在患有类风湿性关节炎和/或骨关节炎的患者的滑液中发现了大量IL-1。

[0028] IL-1的表达对于OA的发病机制是关键的，因为IL-1促进金属蛋白酶(MMP)的合成、分泌和活化，所述MMP是由软骨细胞产生的蛋白酶，其负责软骨基质的降解。

[0029] 所有有关OA过程的实验数据均有力地支持如下概念：IL-1和TNFα代表了参与关节组织破坏的主要代谢系统；实际上，已经证明，通过阻断IL-1的产生和/或活化能够阻止和/或减少关节基质的破坏(Caron J.P.等人，Arthritis Rheum，1996，39：1535-1544)。

[0030] 目前，含有受体拮抗剂IL-1Ra的新药物用于抵消这种细胞因子的影响，因为已经证明阻断该受体是治疗其中牵涉IL-1的障碍的有效方法(Burger D.等人，Cytokine Reference，Oppenheim JJ和Feldmann M，编辑，纽约，伦敦，Academic Press，2000，p.31-336；Jiang Y.等人，Arthritis Rheum，2000，43(5)：1001-9)。

[0031] IL-1Ra是作为所述白细胞介素的抑制剂的蛋白质；然而，含有IL-1Ra的药物(如基于阿那白滞素的***Kineret®***，阿那白滞素是人蛋白质IL-1Ra的重组非糖基化形式)具有非常短的半衰期，这往往损害临床结果。因此，重要的是，配制含有IL-1Ra的新药物组合物以便以持续缓慢的方式递送药物，保证了较长的半衰期，以确保加强的临床结果。

[0032] 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是174-180个氨基酸糖蛋白，其刺激骨髓产生粒细胞和干细胞，所述粒细胞和干细胞随后释放至血液中。已经证明这种生长因子具有神经营养蛋白活性，因此目前正被研究用于治疗大脑局部缺血和肌萎缩性侧索硬化症。它通常用于肿瘤患者，以消解与化疗相关的中性白细胞减少症；最后，最近实验研究已经证明，G-CSF静脉治疗促进了受损心脏细胞的再生。

[0033] 血小板衍生生长因子(PDGF)是一种由二聚物组成的生物活性蛋白质，所述二聚物由两个通过二硫桥连接的多肽(称为A和B)组成。其主要在巨核细胞中合成，在人中代表了间充质来源的细胞的主要血清有丝分裂剂。它被用于促进创伤/溃疡的愈合，因为它是基质结缔组织形成的介质，由于所有这些原因，其目前还被用于促进新骨组织的形成。

[0034] 转化生长因子β(TGF-β)是一种在调节免疫系统和在组织再生、细胞分化和胚胎发育中发挥关键作用的肽。其主要用作创伤愈合剂，因为它增强皮肤创伤/溃疡的愈合和促进骨折的闭合；出于这些原因，其也用于治疗骨质疏松症和OA。最后，实验数据证明：在心脏缺血损伤后，TGFβ还具有心脏保护性质。

[0035] 表皮生长因子(EGF)是在调节生长以及在细胞增殖和分化中发挥重要作用的生长因子。人EGF是6045道尔顿的蛋白质，由53个氨基酸残基和三个分子内二硫桥组成。它发现于血小板、巨噬细胞、尿液、唾液、乳汁和血浆中。

[0036] 其为用作胃保护剂的蛋白质，因为它刺激胃肠粘膜细胞的增殖；其用于促进皮肤组织再生，因为其在皮肤、静脉和其它类型的创伤/溃疡的处理中刺激新肉芽组织的形成。最后，EGF的局部应用已经在受损角膜组织的再生中得到了极好的结果，例如在角膜手术后或在退行性疾病如角膜炎的情况下。

[0037] 血管内皮生长因子(VEGF-B)是参与血管生成(即胚胎期循环系统的从头发生)、神经发生和血管形成的蛋白质生长因子。它也是一种保护神经元免受NMDA介导的缺血性损伤的神经保护剂。

[0038] 红细胞生成素(EPO)是在人中由肾脏以及在较小程度上由肝和脑产生的一种糖蛋白激素，其主要功能是调节红细胞生成(由骨髓生产血红细胞)。

[0039] 也已经在实验室中产生了EPO，并用作药物以治疗罹患肾脏疾病或血液疾病的患者的贫血或用于在给癌症患者施用化疗后加速恢复。在最近的研究中，已经观察到EPO作为抗炎剂发挥神经保护作用。

[0040] 红细胞生成素是一种分子量为约30000D的糖蛋白分子。最后，自1989年以来，EPO已经可作为药物获得，用于进行透析的贫血患者。随后，其应用也扩展到接受保守治疗的慢性肾功能衰竭患者，帮助改善他们的生活质量。通过重组DNA方法进行红细胞生成素的药物生产。

[0041] 神经生长因子(NGF)是下丘脑中由甲状腺和垂体分泌的蛋白质；它也由平滑肌细胞和成纤维细胞产生。其活性形式是26KDa的NGFβ，NGFβ是具有两个二硫桥连接两个118-氨基酸蛋白质链的同二聚体。其负责外周NS神经元和CNS胆碱能神经元的分化和功能。因此，其用于治疗神经变性疾病如痴呆；还已经证明NGF可用于治疗青光眼。

[0042] 转铁蛋白是血流中的主要铁转运蛋白。转铁蛋白由肝和单核细胞-巨噬细胞系统合成，其以非常稳定但可逆的方式结合在肠水平吸收的和源自红血细胞降解的铁，将其携带至使用部位(特别是骨髓)和储存部位(特别是肝脏)。

[0043] 从结构的观点来看，它是由分子量为约80KD的679-氨基酸多肽链形成的糖蛋白，具有两个对亚铁离子(Fe^{2+})没有亲合力的铁离子(Fe^{3+})结合位点；其半衰期为约8天。

[0044] 转铁蛋白主要由肝脏合成，其在血液中的参考值为200-360mg/dL。转铁蛋白水平在使用避孕药期间、妊娠期间、铁缺乏事件中增加。相反地，它们在肾病综合征、肝脏疾病、营养不良、慢性炎性疾病、肿瘤以及铁或可的松治疗的情况中下降。生理性减少可发生于新生儿或老年。

[0045] TIMP是抑制金属蛋白酶(即参与软骨基质降解的酶)的蛋白质；TIMP家族包括由软骨细胞、成纤维细胞、滑膜细胞、成骨细胞、神经元、巨噬细胞、平滑肌细胞、肝细胞及其它细胞生产的TIMP-2、TIMP-3和TIMP-4形式。

[0046] 因此，它们对软骨细胞和OA引起的软骨侵蚀发挥了保护作用。

[0047] 发明详述

[0048] 本发明涉及包含与具有治疗学和/或生物学活性的具有主要是疏水性质的蛋白质联合的特定透明质酸酰胺的新药物组合物，用于制备持续缓慢的蛋白质释放系统。

[0049] 本发明的系统导致了：

[0050] • 所述蛋白质的持续释放，持续很长时间(与“原样”施用的相同蛋白质相比)。这种连续释放增加了药物的治疗窗，因为紧接施用后的时间不会(如在施用“原样”药物的情况下通常的那样)大量释放所述蛋白质。作为与特定HA酰胺联合的释放系统的施用调节了药物的释放量(相对于时间)和释放期(因此获得了蛋白质释放量随时间推移逐渐增加，导致最终释放期超过当其“原样”施用时的释放期)；总之，蛋白质的动力学释放曲线被显著改变，如同其治疗功效特征那样。

[0051] • 新的释放系统是无毒的，因为它是生物相容的和生物可降解的，并且其决定了所载蛋白质/药物的缓慢释放，保证了治疗活性得以维持；活性成分的三维结构未经过任何变性，因此其完整性得以确保。

[0052] • 本发明的释放系统未导致所载蛋白质发生任何化学改变，因为它是通过特定HA酰胺与所载蛋白质的联合而形成的，所述蛋白质与特定HA酰胺合并/混合。因此，在载体和药物之间没有建立共价化学键，由此保证了蛋白质/药物的结构完整性。

[0053] • 这些新特征极大地提高了患者顺从性，因为药物可以根据新的药代动力学和因此以不同剂量进行施用：施用之间的时间间隔更长，并且改变了药物的施用量，从而导致功效更强和副作用更少。

[0054] 形成本发明的目标的药理学和/或生物学活性蛋白质必须具有根据GRAVY(平均亲水性)指数测定主要是疏水的特性；肽或蛋白质的GRAVY值计算为蛋白质中存在的所有氨基酸的亲水值总和除以蛋白质序列中它们的残基数目。每个氨基酸具有给定的亲水指数，其范围是从异亮氨酸(具有由芳香烃基团形成的残基的氨基酸，该芳香烃基团赋予分子明确的非极性并因此是疏水性的)的4.5至精氨酸(具有带正电荷残基的氨基酸)的-4.5(Kyte J.等人，J.Mol.Biol.，1982，157:105-132)。该标尺表明，所分析氨基酸的亲水指数越高，则其疏水性就越强(图1)。为了容易地确定所分析蛋白质的GRAVY值，通常使用ProtParam(Gasteiger E.等人，Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server，JM Walker编辑，The Proteomics Protocols Handbook，Humana Press，2005，571-607)程序，其通过分析所研究蛋白质的序列提供了它们的各种理化性质；当输入所述氨基酸序列后，程序将计算其疏水性程度待测量的蛋白质的GRAVY值。

[0055] 根据本发明，“具有主要是疏水性质的蛋白质”指具有不低于-0.5至正值的GRAVY指数的那些蛋白质：同样，所分析蛋白质的GRAVY指数越高，则其疏水性越强。

[0056] 下文列出了本发明涉及的具有主要是疏水性质的蛋白质的一些实例：

[0057] • 胰岛素：GRAVY指数＝0.2

[0058] • 人生长激素，hGF：GRAVY指数＝-0.3

[0059] • 降钙素，sCT(鲑鱼CT)：GRAVY指数＝-0.5

[0060] • IL-1，IL-1Ra受体拮抗剂：GRAVY指数＝-0.4

[0061] • 粒细胞集落刺激因子，G-CSF：GRAVY指数＝0.2

[0062] • 血小板衍生生长因子，PDGF：GRAVY指数＝-0.5，PDGF-BB＝-0.1是优选的

[0063] • 转化生长因子TGF-β：GRAVY指数＝-0.3

[0064] • 表皮生长因子，EGF：GRAVY指数＝-0.5

[0065] • 血管内皮生长因子B，VEGF-B：GRAVY指数＝-0.2

[0066] • 红细胞生成素(人)或EPO:GRAVY指数＝-0.03

[0067] • 神经生长因子或NGFβ:GRAVY指数＝-0.3

[0068] • 转铁蛋白(人):GRAVY指数＝-0.2

[0069] • 金属蛋白酶-2(人)组织抑制剂,TIMP-2:GRAVY指数＝-0.2

[0070] • 金属蛋白酶-3(人)组织抑制剂,TIMP-3:GRAVY指数＝-0.3

[0071] • 金属蛋白酶-4(人)组织抑制剂,TIMP-4:GRAVY指数＝-0.18。

[0072] 本申请人已经证明下文列出的形成本发明目的的透明质酸酰胺形成了这样的释放系统:该释放系统决定了包含在其中的疏水性蛋白质的持续缓慢释放,而与相同酰胺联合的具有主要是亲水性质的蛋白质不形成适于随时间推移持续缓慢释放它们的释放系统。

[0073] 形成本发明目的的适于形成所述释放系统的HA酰胺有:

[0074] • HA十六烷基酰胺:具有十六烷基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比(通过1H-NMR测定)为7%至14%、优选8%至9%;

[0075] • HA辛基酰胺:具有辛胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比(通过1H-NMR测定)为10%至15%、优选10%至11%;

[0076] • HA十二烷基酰胺:具有十二烷基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比(通过1H-NMR测定)为10%至15%、优选10%至11%;

[0077] • HA叔丁基酰胺:具有叔丁基胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比(通过1H-NMR测定)为7%至12%、优选7%至8%;

[0078] • HA苄基酰胺:具有苄胺的HA酰胺,摩尔酰胺化百分比(通过1H-NMR测定)为7%至15%、优选8%至9%。

[0079] 本发明中用于制备所述酰胺的HA可以从任意来源获得,例如从鸡冠花(cockscombs)提取(EP138572)或发酵(例如来自马链球菌(Streptococcus equi),如本领域技术人员已知的那样)或者通过工艺方法(例如来自芽孢杆菌属(Bacillus),WO2012/032154),具有400至3x106Da、优选50至730KDa、750至1230KDa或1500至2500Kda、甚至更优选150至250KDa和/或500至730KDa的重均分子量(通过有限粘度值测定:Terbojevich等人,Carbohydrate Research,1986,149:363-377方法)。

[0080] 具有150至250KDa或500至730KDa的重均分子量的HA十六烷基酰胺是优选的。

[0081] 形成本发明目的的上文所列的HA酰胺可以如EP1095064中所述制备,EP1095064还描述了其不同的用途,包括形成用于药理活性物质的释放系统,但是对所用药物的化学类型和所选的酰胺类型没有做出任何区分,并且最重要的是没有描述所获得的效果。然而,现在已经发现:与具有治疗学和/或生物学活性的具有主要是疏水性质(和因此超过-0.5的GRAVY指数)的蛋白质联合的、具有特定酰胺化百分比和所选MW范围的特定HA酰胺如十六烷基酰胺、辛基酰胺、十二烷基酰胺、叔丁基酰胺和苄基酰胺可用于制备用于所述蛋白质的新的持续缓慢释放系统。

[0082] 以下蛋白质是优选的:

[0083] • 胰岛素

[0084] • hGH

[0085] • sCT

[0086] • IL-1Ra

[0087] • G-CSF

[0088] • PDGF，优选PDGF-BB

[0089] • TGF-β

[0090] • EGF

[0091] • VEGF-B

[0092] • EPO

[0093] • NGFβ

[0094] • 转铁蛋白

[0095] • TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4。

[0096] 所述蛋白质可通过重组DNA技术或通过从组织中提取而制备。

[0097] 本发明的另一目的是新的释放系统，其包含：

[0098] 1.HA十六烷基酰胺、辛基酰胺、十二烷基酰胺、叔丁基酰胺或苄基酰胺，与如下联合：

[0099] 2.胰岛素、hGH、sCT、IL-1Ra、G-CSF、PDGF、优选PDGF-BB、TGF-β、EGF、VEGF-B、EPO、NGFβ、转铁蛋白、TIMP-2、TIMP-3和TIMP-4，可能与稳定剂(当需要时)和赋形剂联合。

[0100] 特别地，本发明的目的是包含如下的系统：

[0101] 1.HA十六烷基酰胺，优选具有150至250KDa或500至730KDa的重均分子量的HA十六烷基酰胺；

[0102] 2.hGH或sCT，

[0103] 3.可能与稳定剂和赋形剂联合。

[0104] 该新系统可用于持续缓慢地释放它们所含的活性剂，因为它们改变了与它们联合的蛋白质/药物的治疗窗：因此，不同的剂量方案是可能的，导致了较好的患者顺从性。

[0105] 存在于释放系统中的蛋白质将决定系统的用途。例如，包含HA十六烷基酰胺与hGH或sCT的释放系统将优选通过关节内施用来治疗OA、类风湿性和银屑病关节炎以及骨质疏松症。

[0106] 本申请人已经证明：这种新释放系统决定了hGF在所治疗关节的滑液中持续释放，产生了更好的治疗效果，但是没有允许活性剂进入血浆中(由此降低其在关节中的浓度)，因而预防了药物的全身副作用。

[0107] 本发明的目的还有包含如下的系统：

[0108] • 如前文所列和所述的一种或多种HA酰胺，以及胰岛素；本申请人将这种新系统描述为缓慢释放胰岛素的新贮库制剂，其用于治疗需要较低药物施用的糖尿病。

[0109] 本发明的目的还有包含如下的系统：

[0110] • 如前文所列和所述的一种或多种HA酰胺，优选十六烷基酰胺，与蛋白质如PDGF(优选PDGF-BB)、TGF-β、EGF或VEGF-B联合，用于注射、关节内或局部应用或用于口服施用。

[0111] 上述蛋白质因子(PDGF、TGF-β、EGF和VEGF-B)是已知其存在的生长因子，特别集中于人的富血小板血浆(PRP)中。含有它们的新释放系统将优选可用于治疗由OA导致的关节损伤、腱炎中和用于修复心肌损伤、修复骨撕裂伤/骨折/空腔以促进新骨组织形成和最后可用于皮肤溃疡/创伤/撕裂伤愈合以促进新结缔组织形成。

[0112] 本发明的目的还有包含如下的系统：

[0113] • 如前文所列和所述的一种或多种HA酰胺，优选十六烷基酰胺，与金属蛋白酶抑制剂TIMP-2、TIMP-3或TIMP-4联合，用于注射应用、优选关节内应用。

[0114] 新释放系统将优选可用于治疗由OA引起的关节软骨损伤和修复骨软骨侵蚀。

[0115] 下文描述了新释放系统的制备实施例和申请人所进行的用于证明本发明的所述系统的功效的实验。

[0116] 实施例1：重均MW为500至730kDa的HA十六烷基酰胺衍生物Hyadd4的合成，具有8％至9％的摩尔酰胺化百分比

[0117] 将5.00g发酵来源的具有500至730KDa MW的透明质酸钠盐溶于250ml水中，将所得溶液通过玻璃柱渗滤，所述玻璃柱预填装有100ml四丁基铵形式的Dowex树脂。洗脱TBA盐形式的HA溶液，收集并冷冻干燥。

[0118] 将2g如此获得的产物溶于200ml二甲亚砜(DMSO)中，加入64μl甲磺酸；加入53mg1，1'-羰二咪唑，将混合物在缓慢搅拌下于室温放置1小时。然后加入998mg十六烷基胺，于42℃进行酰胺化反应24小时。

[0119] 加入5ml饱和NaCl水溶液停止该反应，30分钟后加入1.5倍体积的无水乙醇以分离所得衍生物。将沉淀物在乙醇/H_2O80:20中以及最后在无水乙醇中洗涤，然后在高真空下于40℃干燥。

[0120] 得到1.3g衍生物，通过1H-NMR测定了其酰胺化程度。

[0121] 实施例2：重均MW为500至730kDa的HA辛基酰胺衍生物Hyadd2的合成，具有10％至11％的摩尔酰胺化百分比

[0122] 将5.00g发酵来源的具有500至730KDa MW的透明质酸钠盐溶于250ml水中，将所得溶液通过玻璃柱渗滤，所述玻璃柱预填装有100ml四丁基铵形式的Dowex树脂。洗脱TBA盐形式的HA溶液，收集并冷冻干燥。

[0123] 将2g如此获得的产物溶于200ml二甲亚砜(DMSO)中，加入64μl甲磺酸；加入61.4mg1,1'-羰二咪唑，将混合物在缓慢搅拌下于室温放置1小时。然后加入330mg辛胺，于42℃进行酰胺化反应24小时。

[0124] 加入5ml饱和NaCl水溶液停止该反应，30分钟后加入1.5倍体积的无水乙醇以分离所得衍生物。将沉淀物在乙醇/H_2O80:20中以及最后在无水乙醇中洗涤，然后在高真空下于40℃干燥。

[0125] 得到1.2g衍生物，通过1H-NMR测定了其酰胺化程度。

[0126] 实施例3：重均MW为500至730kDa的HA十二烷基酰胺衍生物Hyadd3的合成，具有10％至11％的摩尔酰胺化百分比

[0127] 将5.00g发酵来源的具有500至730KDa MW的透明质酸钠盐溶于250ml水中，将所得溶液通过玻璃柱渗滤，所述玻璃柱预填装有100ml四丁基铵形式的Dowex树脂。洗脱TBA盐形式的HA溶液，收集并冷冻干燥。

[0128] 将2g如此获得的产物溶于200ml二甲亚砜(DMSO)中，加入64μl甲磺酸；加入54.2mg1,1'-羰二咪唑，将混合物在缓慢搅拌下于室温放置1小时。然后加入448mg十二烷基胺，于42℃进行酰胺化反应24小时。

[0129] 加入5ml饱和NaCl水溶液停止该反应，30分钟后加入1.5倍体积的无水乙醇以分离所得衍生物。将沉淀物在乙醇/H_2O80:20中以及最后在无水乙醇中洗涤，然后在高真空下于

40℃干燥。

[0130] 得到1.25g衍生物，通过1H-NMR测定了其酰胺化程度。

[0131] 实施例4：重均MW为500至730kDa的HA叔丁基酰胺衍生物Hyadd6的合成，具有7％至8％的摩尔酰胺化百分比

[0132] 将5.00g发酵来源的具有500至730KDa MW的透明质酸钠盐溶于250ml水中，将所得溶液通过玻璃柱渗滤，所述玻璃柱预填装有100ml四丁基铵形式的Dowex树脂。洗脱TBA盐形式的HA溶液，收集并冷冻干燥。

[0133] 将2g如此获得的产物溶于200ml二甲亚砜(DMSO)中，加入64μl甲磺酸；加入53mg1，1’-羰二咪唑，将混合物在缓慢搅拌下于室温放置1小时。然后加入178mg叔丁基胺，于42℃进行酰胺化反应24小时。

[0134] 加入5ml饱和NaCl水溶液停止该反应，30分钟后加入1.5倍体积的无水乙醇以分离所得衍生物。将沉淀物在乙醇/H_2O80:20中以及最后在无水乙醇中洗涤，然后在高真空下于40℃干燥。

[0135] 得到1.25g衍生物，通过1H-NMR测定了其酰胺化程度。

[0136] 实施例5：重均MW为500至730kDa的HA苄基酰胺衍生物Hyadd1的合成，具有8％至9％的摩尔酰胺化百分比

[0137] 将5.00g发酵来源的具有500至730KDa MW的透明质酸钠盐溶于250ml水中，将所得溶液通过玻璃柱渗滤，所述玻璃柱预填装有100ml四丁基铵形式的Dowex树脂。洗脱TBA盐形式的HA溶液，收集并冷冻干燥。

[0138] 将2g如此获得的产物溶于200ml二甲亚砜(DMSO)中，加入64μl甲磺酸；加入54.0mg1,1’-羰二咪唑，将混合物在缓慢搅拌下于室温放置1小时。然后加入260mg苄基胺，于42℃进行酰胺化反应24小时。

[0139] 加入5ml饱和NaCl水溶液停止该反应，30分钟后加入1.5倍体积的无水乙醇以分离所得衍生物。将沉淀物在乙醇/H_2O80:20中以及最后在无水乙醇中洗涤，然后在高真空下于40℃干燥。

[0140] 得到1.25g衍生物，通过1H-NMR测定了其酰胺化程度。

[0141] 实施例6：以10:1和20:1w/w的比例含有HA和hGF的制剂的制备

[0142] 将8mg发酵来源的具有150至250KDa(LMW)和500至730kDa(MMW)MW的透明质酸钠盐溶于1ml pH＝7.4的磷酸盐缓冲液中。完全溶解后，加入0.8mg hGH得到10:1的多糖/蛋白质重量比和加入0.4mg hGH得到20:1的多糖/蛋白质重量比。将两种成分适宜混合，使组合物均匀。如下计算装载量：将混合物以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了GH浓度值。

[0143] 实施例7：含有由10:1w/w比例的HA十六烷基酰胺和hGF形成的释放系统的制剂的制备

[0144] 将8mg如实施例1中所述制备的HA十六烷基酰胺衍生物Hyadd4溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中。完全溶解后，加入预溶于水溶液中的hGH0.8mg并适宜混合，以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了GH浓度值。

[0145] 实施例8：含有由10:1w/w比例的HA叔丁基酰胺和hGF形成的释放系统的制剂的制

备

[0146] 将8mg如实施例4中所述制备的Hyadd6溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中(8mg/ml)。完全溶解后，加入预溶于水溶液中的hGH0.8mg并适宜混合，以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了GH浓度值。

[0147] 实施例9：含有由10:1w/w比例的HA辛基酰胺和hGF形成的释放系统的制剂的制备

[0148] 将8mg如实施例2中所述制备的Hyadd2溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中(8mg/ml)。完全溶解后，加入预溶于水溶液中的hGH0.8mg并适宜混合，以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了GH浓度值。

[0149] 实施例10：含有由10:1w/w比例的HA十二烷基酰胺和hGF形成的释放系统的制剂的制备

[0150] 将8mg如实施例3中所述制备的Hyadd3溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中(8mg/ml)。完全溶解后，加入预溶于水溶液中的hGH0.8mg并适宜混合，以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了GH浓度值。

[0151] 实施例11：含有由10:1w/w比例的HA苄基酰胺和hGF形成的释放系统的制剂的制备

[0152] 将8mg如实施例5中所述制备的Hyadd1溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中(8mg/ml)。完全溶解后，加入预溶于水溶液中的hGH0.8mg并适宜混合，以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了GH浓度值。

[0153] 实施例12：含有由10:1w/w比例的HA十六烷基酰胺和sCT形成的释放系统的制剂的制备

[0154] 将8mg如实施例1中所述制备的Hyadd4溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中。完全溶解后，加入预溶于磷酸盐缓冲液中的鲑鱼降钙素(sCT)0.8mg以获得10:1的w/w比例，适宜混合以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了降钙素浓度值。

[0155] 实施例13：含有由10:1w/w比例的HA十六烷基酰胺和IL-1Ra形成的释放系统的制剂的制备

[0156] 将8mg如实施例1中所述制备的Hyadd4溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中。完全溶解后，加入预溶于水溶液中的IL-1Ra0.8mg，适宜混合以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了IL-1Ra浓度值。

[0157] 实施例14：基于10:1w/w的HA十六烷基酰胺和RNase的制剂的制备

[0158] 将8mg如实施例1中所述制备的Hyadd4溶于1ml pH＝6.9的磷酸盐缓冲液中。完全溶解后，加入预溶于磷酸盐缓冲液中的RNase0.8mg，适宜混合以便蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量：将其以1:10稀释于缓冲液中，在280nm处测定UV吸光度，所述吸收度通过使用校准曲线提供了RNase浓度值。

[0159] 实施例15:含有由10:1w/w比例的HA十六烷基酰胺和胰岛素形成的释放系统的制剂的制备

[0160] 将8mg如实施例1中所述制备的Hyadd4溶于1ml pH=6.9的磷酸盐缓冲液中。完全溶解后,加入预溶于磷酸盐缓冲液中的胰岛素0.8mg,适宜混合以便蛋白质被捕获入凝胶中。如下计算凝胶的装载量:将其以1:10稀释于缓冲液中,在280nm处测定UV吸光度,所述吸收度通过使用校准曲线提供了IL-1Ra浓度值。

[0161] 实施例16:用HA或HA酰胺配制的hGH的释放研究

[0162] 将如实施例6-11所述制备的制剂引入具有100kDa截留的透析管中,浸入温和搅拌的pH7磷酸盐缓冲液中,监测从供体隔室的释放。为了比较,将0.8mg hGH与1ml磷酸盐缓冲液(PBS)混合,将制剂引入透析管中。

[0163] 在所有实验中始终维持漏槽状态。在预设时间,从供体隔室取50μl等分试样并1:10稀释以确定随时间推移的蛋白质含量。通过在280nm的UV读数和220nm的RP-HPLC平行进行分析,以确定剩余蛋白质及其降解(如果有的话)的量。还进行了散射测量以研究所配制蛋白质的聚集。最后,从接收隔室取出样品以检查蛋白质的释放量对应于从供体隔室中消失的量,并且进行质谱测量(Esi-Tof)以证实所释放的GH未经历任何结构降解。通过显示随时间推移释放的蛋白质百分比构建了释放曲线。图2、3、4和5。

[0164] 结果

[0165] 图2显示了通过由Hyadd4和hGH形成的系统确定的hGH释放特性对比于通过在PBS中制备的相同蛋白质代表的对照。

[0166] 图3显示了与LMW-HA和MMW-HA联合配制的hGH蛋白质的释放特性:在两种情况下,测试了两种不同的HA和hGH重量比(10:1和20:1),因为申请人通过该实验旨在证实:对比于通过在PBS、即在水性溶剂中制备所获得的特性,具有疏水性质的蛋白质即使与大量具有不同MW的HA联合也不会使蛋白质的释放特性产生任何变化。

[0167] 图4将由本发明的酰胺和hGH形成的释放系统的hGH释放特性与由hGH在PBS中所代表的对照进行了比较。

[0168] 图5显示了由本发明的酰胺形成的释放系统的50%hGH释放时间,同样对比于如上文所述的对照。

[0169] 如果将图3与图2和4相比较,可以看出:对比于由在PBS中分析的蛋白质所代表的对照以及对比于在具有不同MW的HA中以不同重量比配制的蛋白质,由HA酰胺(如上文所述和所要求)与具有主要是疏水性质的蛋白质(在此情况中为hGH)形成的释放系统以显然显著的方式引起了蛋白质随时间推移持续缓慢释放。因此,决定所研究的疏水性蛋白质的释放特性改变的不是所述多糖的浓度和/或MW,而是该聚合物的化学性质。所有这些在图5中更清楚,图5比较了50%hGH释放时间:该图显示,对比于对照(在PBS中的hGH),本发明涉及的新释放系统使释放时间升高一直到3倍。

[0170] 实施例17:sCT、IL1-Ra和胰岛素的释放对比于亲水性蛋白质RNase A的释放特性的研究

[0171] 将如实施例12-15所述制备的制剂各自引入具有100kDa截留的透析管中,浸入温和搅拌的pH7磷酸盐缓冲液中。为了比较,将0.8mg降钙素、IL-1Ra、胰岛素或RNase与1ml磷酸盐缓冲液混合,将制剂引入透析管中,以监测其随时间推移从供体隔室的释放。

[0172] 在所有实验中始终维持漏槽状态。在预设时间，从供体隔室取10μl等分试样并1:10稀释以确定随时间推移的蛋白质含量。通过在280nm的UV读数平行进行分析，以确定剩余蛋白质的量。还进行了散射测量以研究所配制蛋白质的聚集。最后，从接收隔室取出样品以检查蛋白质的释放量对应于从供体隔室中消失的量。构建了释放曲线，对比于对照显示了随时间推移释放的蛋白质百分比。

[0173] 蛋白质RNase A的GRAVY指数＝-0.67，因此不能归类为主要为疏水性的蛋白质，而是亲水性蛋白质。下文进行了描述以将其释放特性与由联合有主要具有疏水性质的蛋白质的Hyadd释放系统所得到的特性相比较，从而证实存在差异。

[0174] 结果

[0175] 图6-8显示了所分析的三种具有主要是疏水性质的蛋白质的释放曲线：在所有三种情况中，由HA十六烷基酰胺联合所述蛋白质形成的系统决定其持续缓慢释放达到比对照长得多的时间。

[0176] 相反，图9证实：相同的十六烷基酰胺以相同重量比(10:1w/w)与蛋白质RNase(具有主要是亲水的性质且GRAVY指数＝-0.67)的联合决定了与由相同蛋白质在PBS中配制所产生的释放特性相同的释放特性。

[0177] 实施例18：hGH释放入源自骨关节炎患者的人滑液(LS)的研究

[0178] 首先，将激素hGH与荧光探针(Cy5.5)共价结合，从而可以在其它滑液蛋白质存在的情况下清楚地识别出激素hGH。为此目的，将1.5mg hGH溶于2ml pH8硼酸盐缓冲液中，向其中加入2mg预溶于60μl DMSO中的Cy5.5。在遮光和温和搅拌下进行标记反应18小时。然后通过针对磷酸盐缓冲液透析4天和针对MilliQ水透析1天进行纯化。然后通过凝胶过滤分析经标记的蛋白质，以验证其纯度。

[0179] 如实施例7所述以10:1重量比制备基于Hyadd4和hGH-Cy5.5的制剂。将两种成分适宜混合，以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。将如此获得的凝胶引入具有100kDa截留的透析管中，浸入由PBS和源自骨关节炎患者的滑液组成(v/v1:1)的介质中，维持在温和搅拌下。

[0180] 在预设时间测定随时间推移释放到接收隔室的蛋白质量。该分析通过具有荧光检测器的RP-HPLC进行，不仅确定hGH含量，而且还检查了该蛋白质未经历降解。构建释放曲线，显示了长达48小时的随时间推移释放的蛋白质的百分比。

[0181] 结果

[0182] 图10显示了所得结果：hGH从由Hyadd4联合所研究蛋白质形成的系统向LS中的释放证实，以前在图2中证实的持续缓慢释放保持不变。因此，可以说明：Hyadd系统中所包含的蛋白质/药物受到保护，并且在富含酶、蛋白质(有些具有未知性质)和促炎分子的释放介质如OA患者的滑液中未经受降解。

[0183] 实施例19：由Hyadd4和hGH形成的系统在关节内施用于大鼠后的药物动力学研究

[0184] 将8mg如实施例1中所述制备的Hyadd4溶于1ml pH＝6.9磷酸盐缓冲液中，于121℃湿热灭菌。随后，在无菌环境下加入0.8mghGH(预溶于水溶液中并通过0.2微米再生纤维素滤器进行过滤灭菌)并适宜混合，以便使组合物均匀并且蛋白质被捕获入凝胶中。

[0185] 对于体内研究，将等同于100μg蛋白质/动物的制剂量注射入大鼠膝盖中。在预定时间(0.15、1、2、3、4、5、6、7、8、24和48h)取血浆样品，进行ELISA测试以评估i.a.施用后穿

透到血浆中的hGH浓度。该实验一式三份进行。

[0186] 为比较目的，将一组动物用等量的游离hGH(100μg)同样通过关节内施用进行处理。通过将血浆中发现的hGH浓度(ng/ml)作为时间(一直到48h)的函数作图，获得了药物动力学曲线。

[0187] 结果

[0188] 如图11所示，在关节内注射后立即能在血浆中发现所注射的蛋白质。

[0189] 但是，由于Hyadd系统产生的蛋白质持续释放，其保留在原位、即关节腔中并且未穿透到血流中，从而其全部作用均发生在注射部位。

氨基酸亲水值量表:

Ile: 4.500

Val: 4.200

Leu: 3.800

Phe: 2.800

Cys: 2.500

Met: 1.900

Ala: 1.800

Gly: -0.400

Asn: -3.500

Thr: -0.700

Trp: -0.900

Ser: -0.800

Tyr: -1.300

Pro: -1.600

His: -3.200

Glu: -3.500

Asp: -3.500

Gln: -3.500

Lys: -3.900

Arg: -4.500

图1

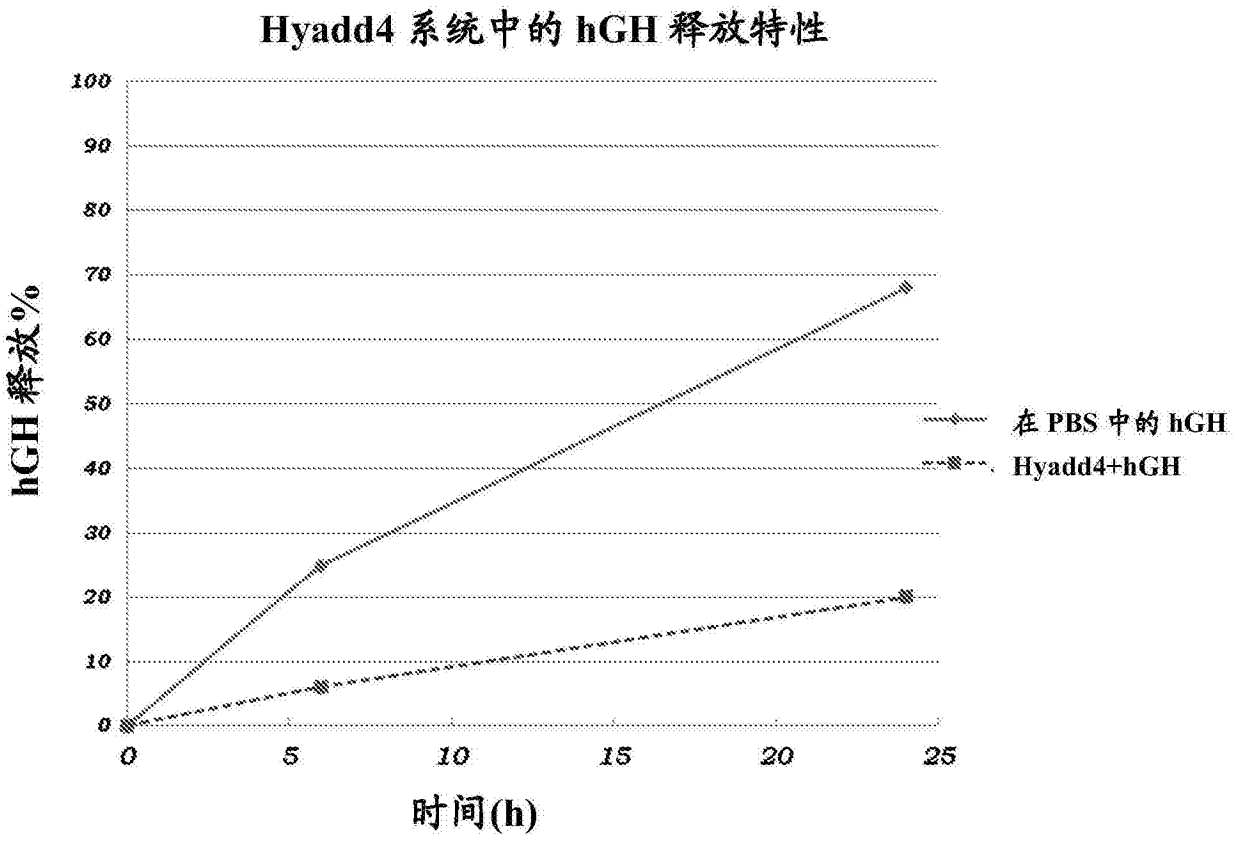

Hyadd4 系统中的 hGH 释放特性
hGH 释放%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
在 PBS 中的 hGH
Hyadd4+hGH

图2

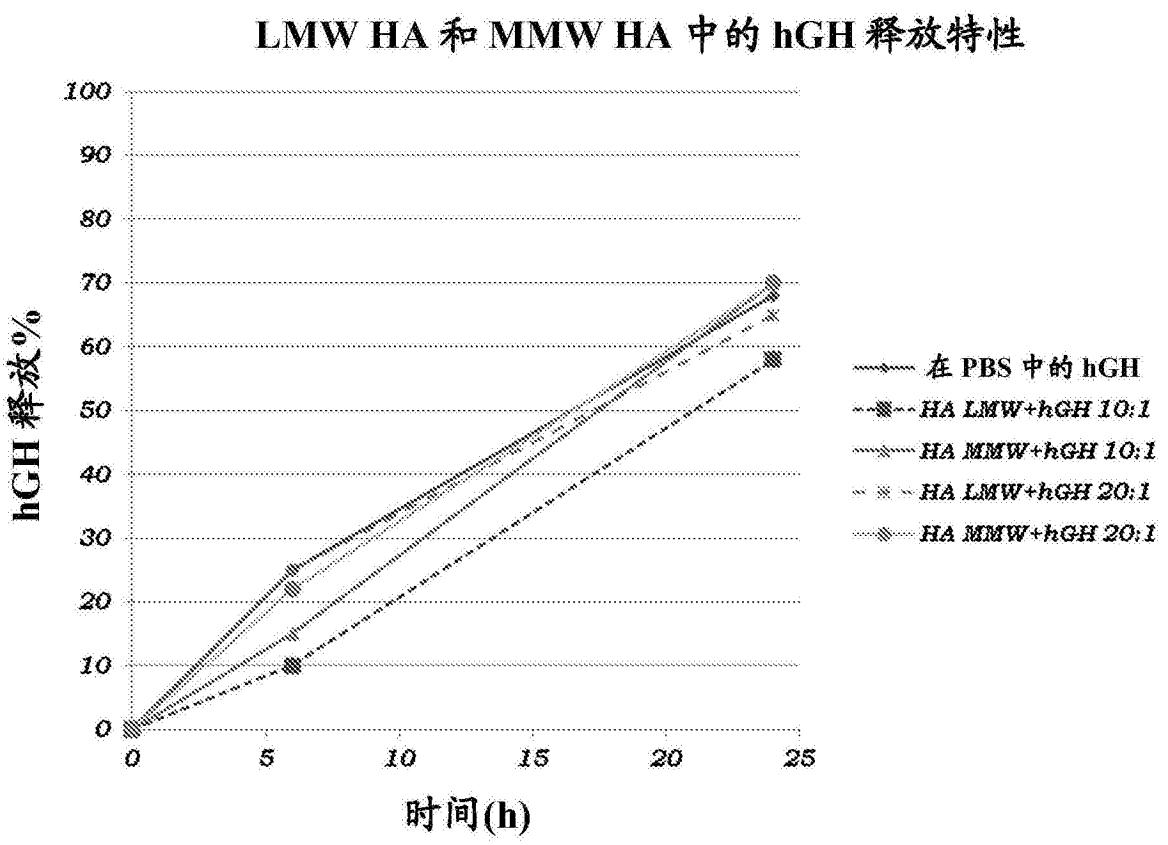

LMW HA 和 MMW HA 中的 hGH 释放特性
hGH 释放%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
在 PBS 中的 hGH
HA LMW+hGH 10:1
HA MMW+hGH 10:1
HA LMW+hGH 20:1
HA MMW+hGH 20:1

图3

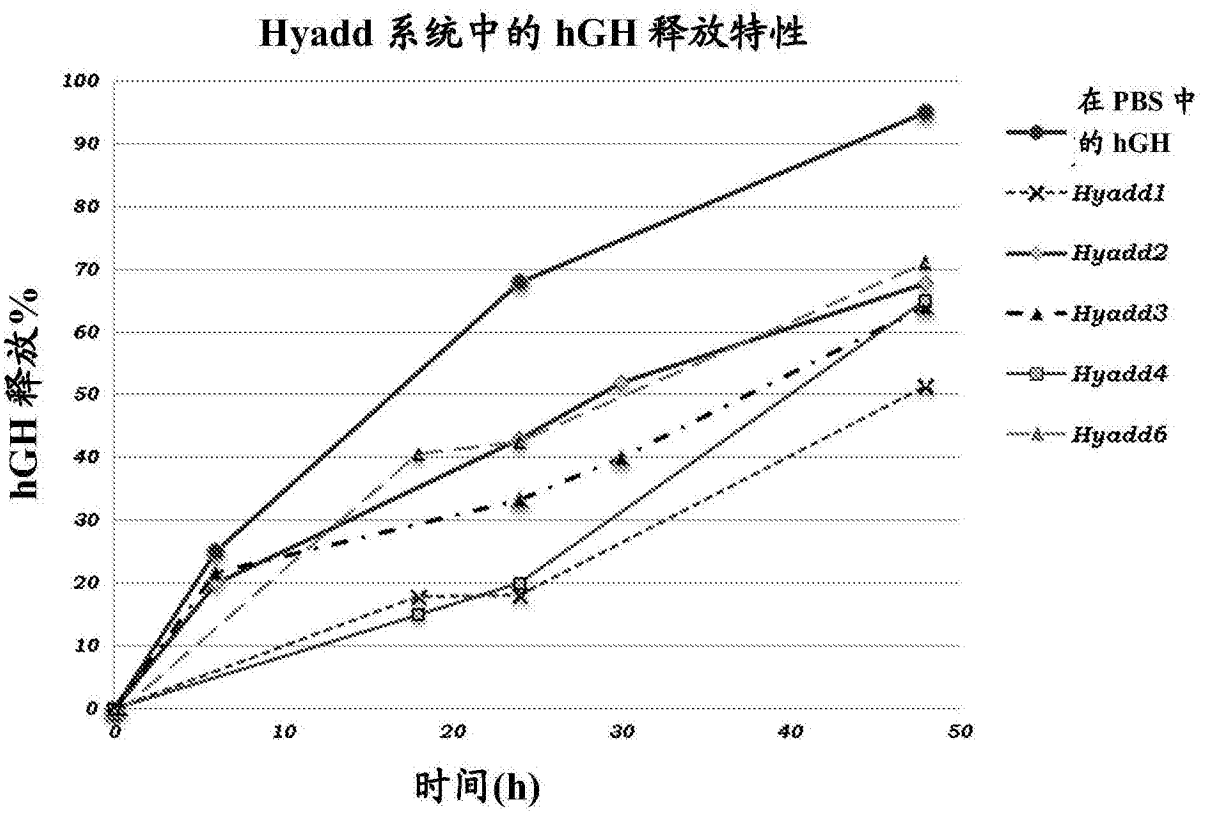

Hyadd 系统中的 hGH 释放特性
hGH 释放%
时间(h)
在 PBS 中的 hGH
Hyadd1
Hyadd2
Hyadd3
Hyadd4
Hyadd6
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

图4

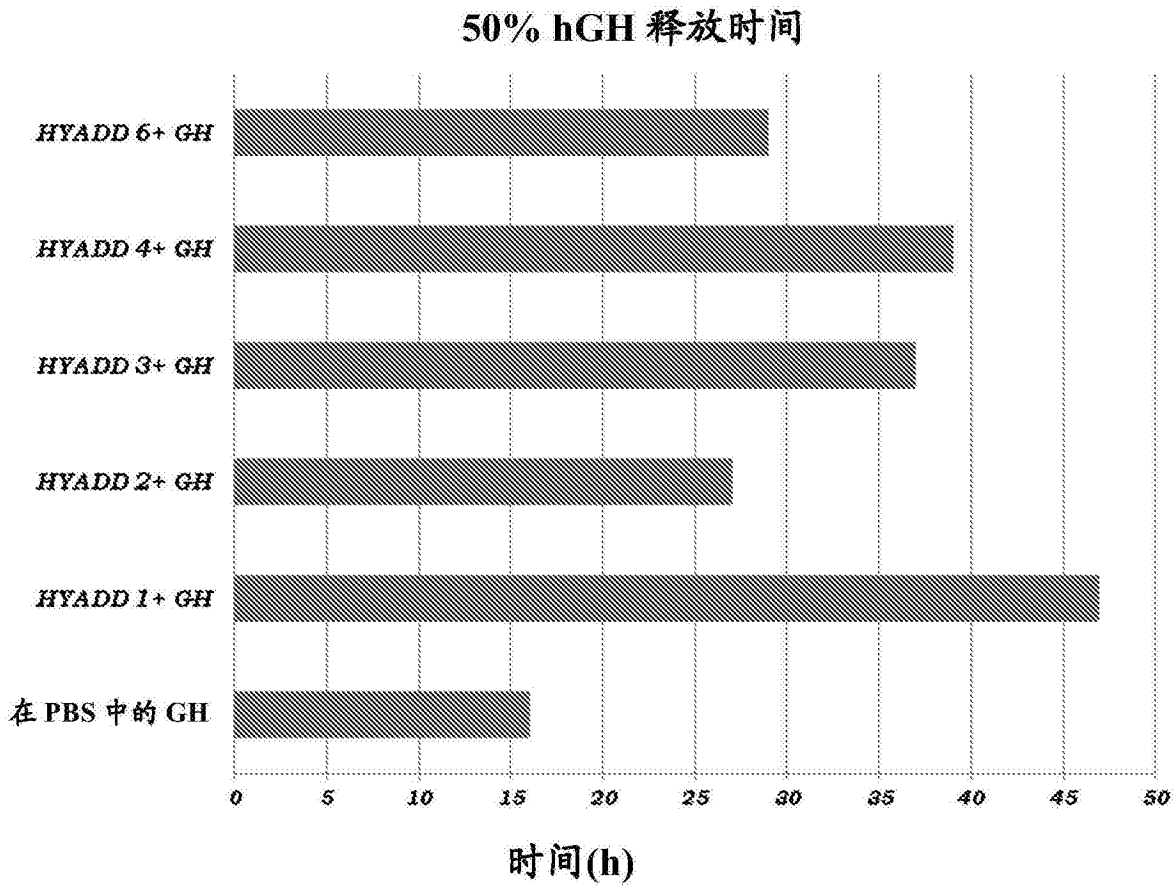

50% hGH 释放时间
HYADD 6+ GH
HYADD 4+ GH
HYADD 3+ GH
HYADD 2+ GH
HYADD 1+ GH
在 PBS 中的 GH
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
时间(h)

图5

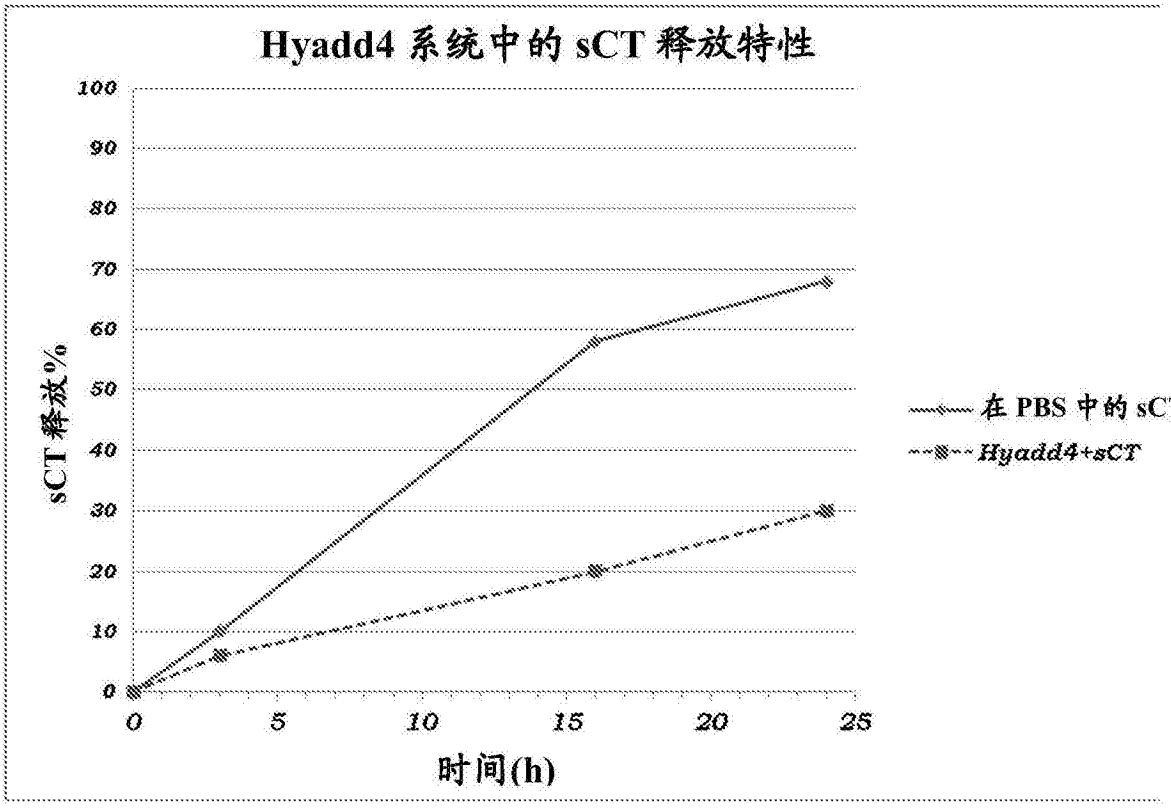

Hyadd4 系统中的 sCT 释放特性
sCT 释放%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
在 PBS 中的 sCT
Hyadd4+sCT

图6

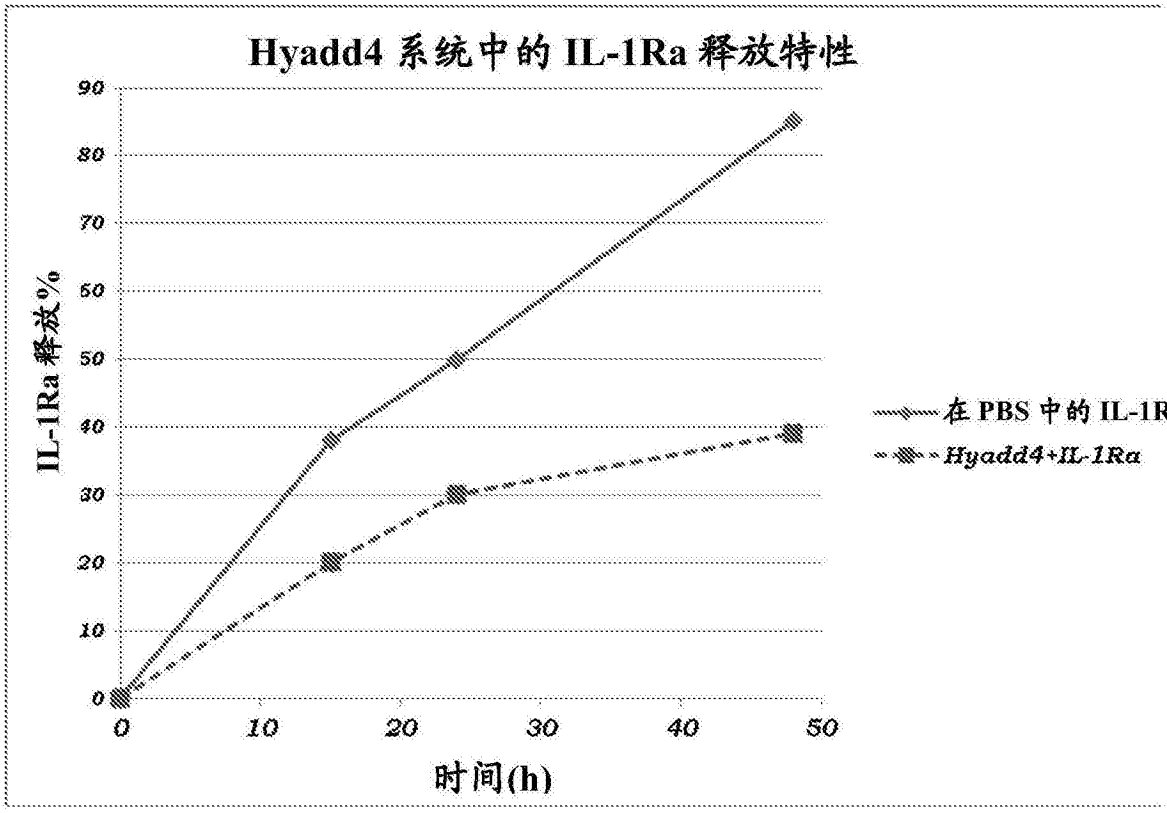

Hyadd4 系统中的 IL-1Ra 释放特性
IL-1Ra 释放%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
时间(h)
在 PBS 中的 IL-1Ra
Hyadd4+IL-1Ra

图7

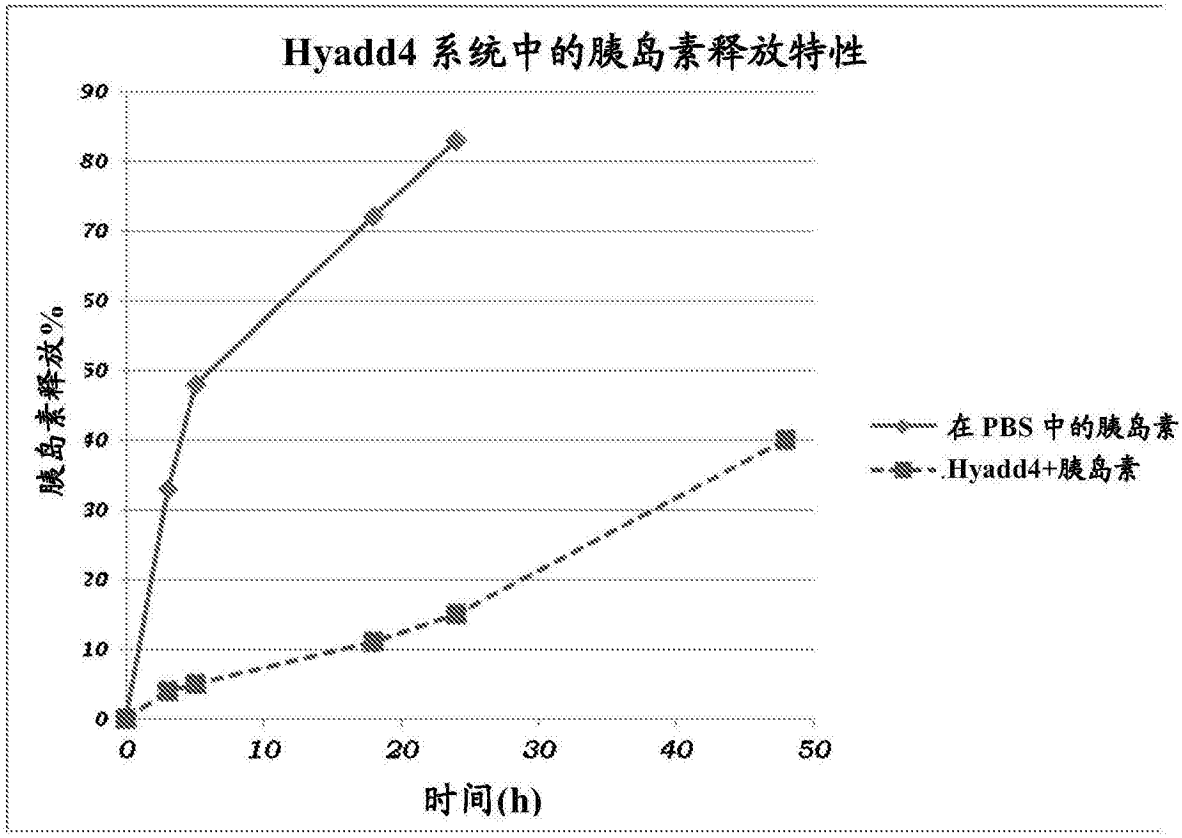

Hyadd4 系统中的胰岛素释放特性
胰岛素释放%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
时间(h)
在 PBS 中的胰岛素
Hyadd4+胰岛素

图8

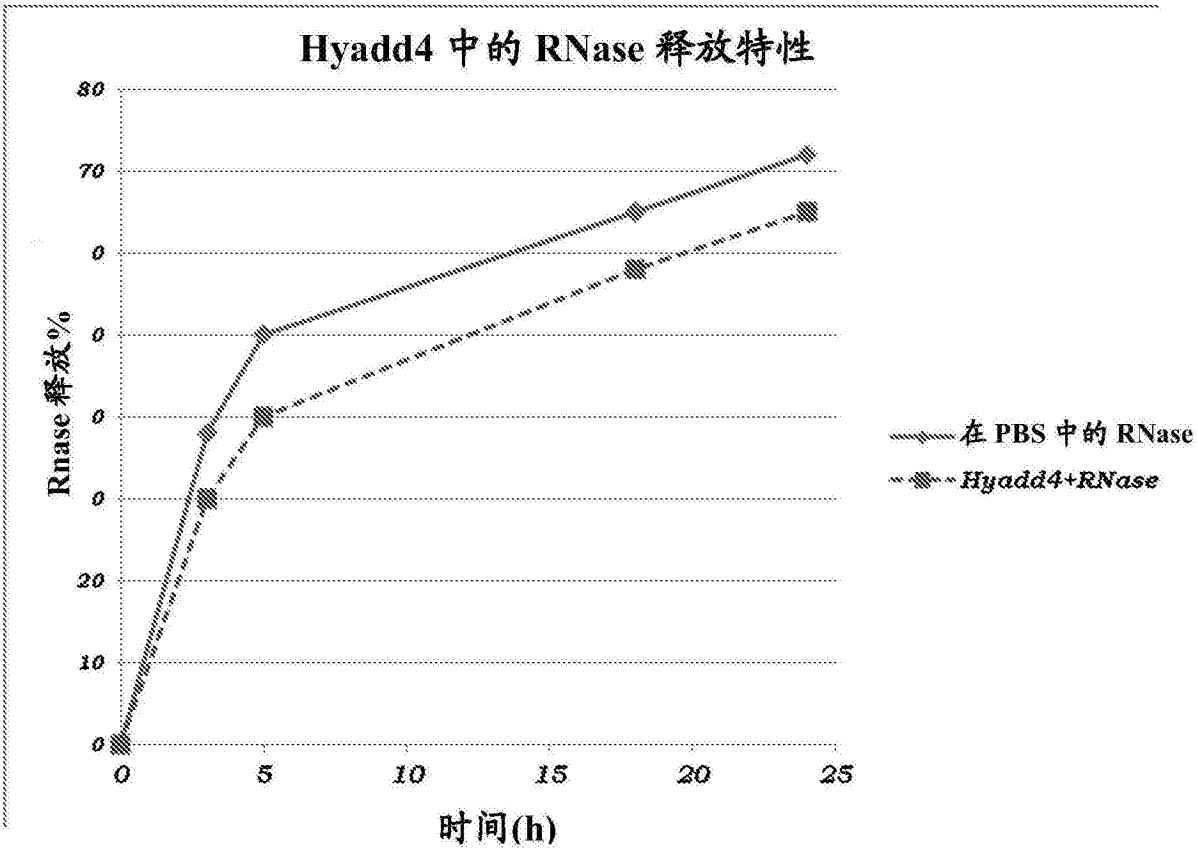

Hyadd4 中的 RNase 释放特性
Rnase 释放%
80
70
0
0
0
0
20
10
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
在 PBS 中的 RNase
Hyadd4+RNase

图9

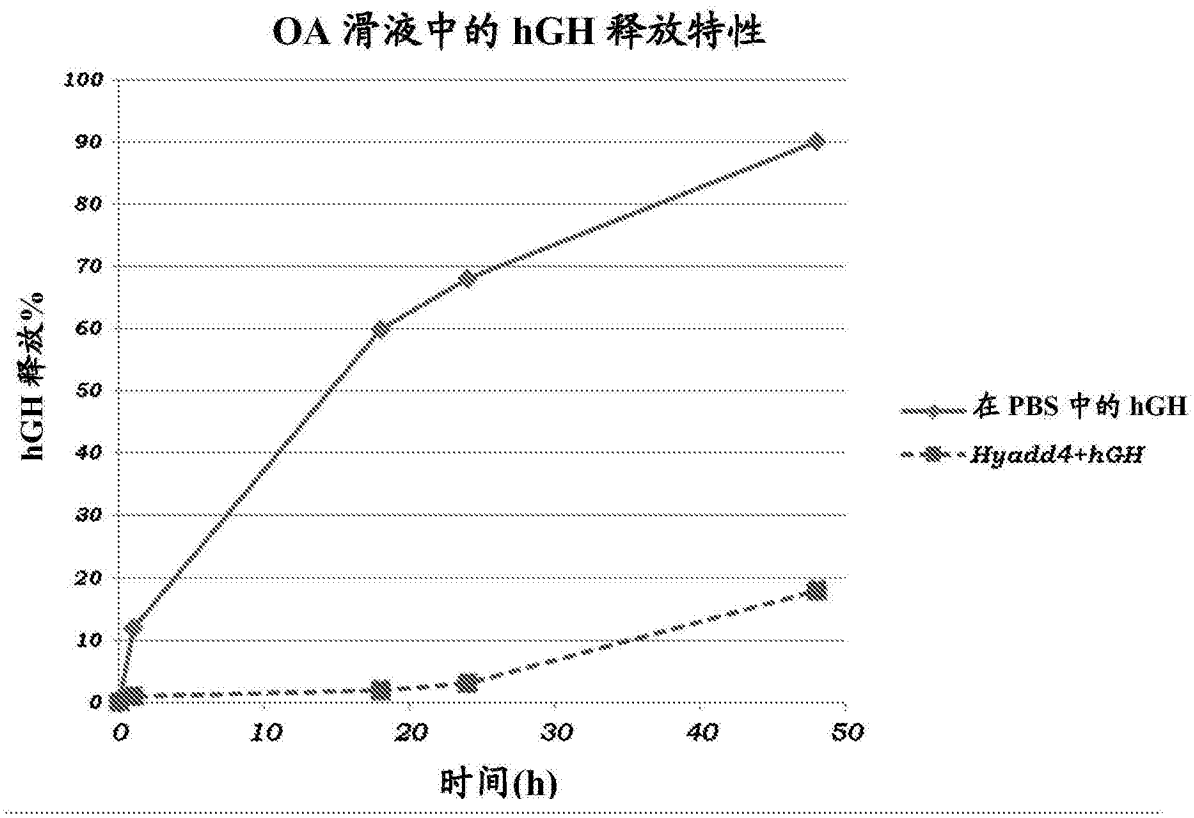

OA 滑液中的 hGH 释放特性
hGH 释放%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
时间(h)
在 PBS 中的 hGH
Hyadd4+hGH

图10

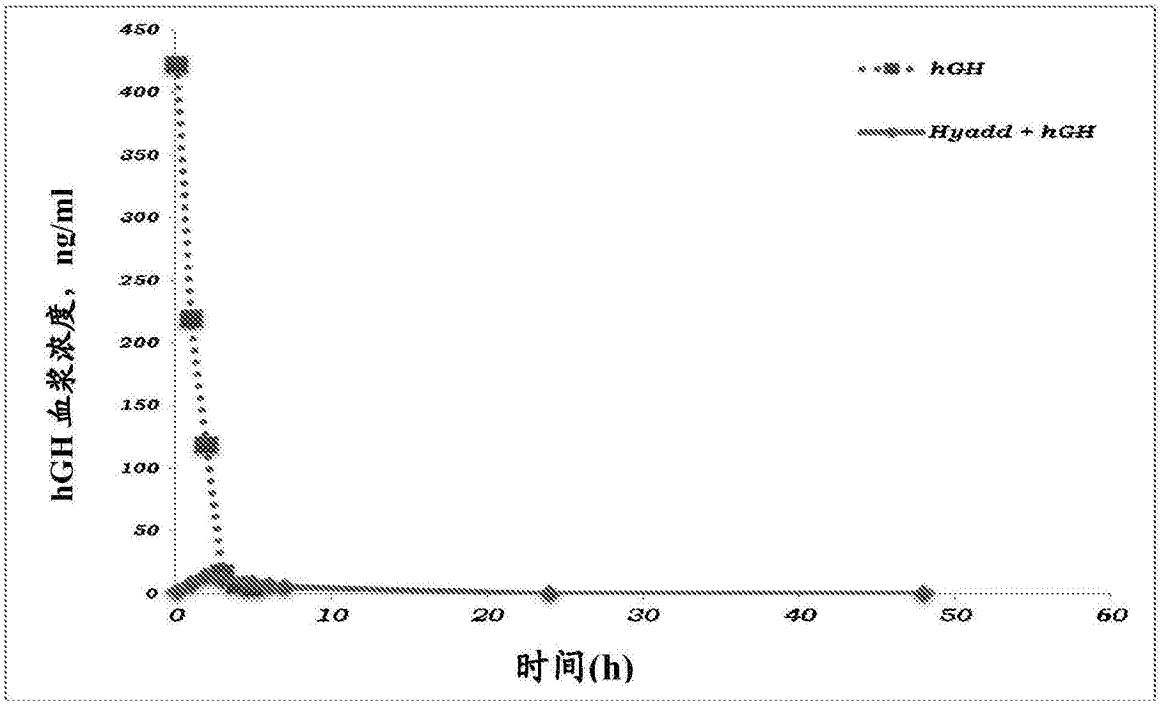

hGH 血浆浓度，ng/ml
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
时间(h)
hGH
Hyadd + hGH

图11