



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115837006 A

(43) 申请公布日 2023.03.24

(21) 申请号 202211350386.X *A61K 47/26* (2006.01)
(22) 申请日 2017.05.08 *A61K 47/14* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 47/28* (2006.01)
62/332664 2016.05.06 US *A61K 47/22* (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
(62) 分案原申请数据
201780038711.X 2017.05.08
(71) 申请人 布里格姆及妇女医院股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72) 发明人 J·卡普 N·乔希 何雪音
S·巴干达尼
(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204
专利代理师 郁旦蓉
(51) Int. Cl.
A61K 9/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书20页 附图9页

(54) 发明名称

用于向软骨中受控递送被囊封的药剂的二元自组装凝胶

(57) 摘要

本发明提供一种与软骨组织的粘附性增强的自组装凝胶组合物。阳离子试剂与普遍视为安全(generally regarded as safe,GRAS)的低分子量(<2,500Da)胶凝剂共同自组装,从而形成可以囊封一种或多种用于受控释放的治疗剂的均匀自支撑式凝胶。与仅来自单独胶凝剂的自组装凝胶相比,该组合物与结缔组织(例如软骨)粘附的程度更大并且时间更长。该组合物用于特异性靶向结缔组织并且递送一种或多种用于受控释放的治疗剂、预防剂或诊断剂以改善给药功效。

1. 一种与软骨组织粘附的凝胶组合物,其包含分子量小于2,500Da的两亲性胶凝剂和阳离子试剂,

其中所述胶凝剂和所述阳离子试剂共同自组装或缔合以在加热到溶解并冷却到室温之后形成粘稠均匀凝胶,其中所述粘稠均匀凝胶针对倒置稳定,并且

其中所述凝胶组合物与软骨组织粘附。

2. 根据权利要求1所述的凝胶组合物,其中所述阳离子试剂以大于10干重%的量存在于所述分子量小于2,500Da的两亲性胶凝剂和所述阳离子试剂的组合质量中。

3. 根据权利要求2所述的凝胶组合物,其中所述阳离子试剂是每毫升所述凝胶组合物至少0.08mg。

4. 根据权利要求1到3中任一权利要求所述的凝胶组合物,其中所述胶凝剂、所述阳离子试剂或两者的化合物由美国食品和药物管理局(U.S.Food and Drug Administration)认可为普遍认为安全(generally recognized as safe,GRAS)的化合物。

5. 根据权利要求1到4中任一权利要求所述的凝胶组合物,其中所述胶凝剂是选自由以下组成的群组的酶可裂解的普遍认为安全(GRAS)的化合物:烷酸抗坏血酸酯、脱水山梨糖醇烷酸酯、三甘油单烷酸酯、蔗糖烷酸酯、甘胆酸以及其组合。

6. 根据权利要求5所述的凝胶组合物,其中所述胶凝剂选自由以下组成的群组:棕榈酸抗坏血酸酯、三甘油单硬脂酸酯、蔗糖棕榈酸酯以及蔗糖硬脂酸酯。

7. 根据权利要求1到6中任一权利要求所述的凝胶组合物,其中与不具有所述阳离子试剂的对照凝胶组合物相比,所述阳离子试剂与一种或多种软骨组分静电相互作用或缔合以增强所述粘稠均匀凝胶与所述软骨的粘附性。

8. 根据权利要求1到7中任一权利要求所述的凝胶组合物,其中所述阳离子试剂选自由以下组成的群组:1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane, DOTAP)、1,2-二油基氧基-3-三甲基铵丙烷氯化物(1,2-dioleyloxy-3-trimethylammonium propane chloride, DOTMA)、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、N-酰基壳聚糖、烷基壳聚糖、羧基烷基(芳基)壳聚糖、0-羧基烷基壳聚糖、N-羧基酰基壳聚糖、硫酸化壳聚糖、阳离子型淀粉、阳离子型纤维素、阳离子型支链淀粉(amylose)、阳离子型半乳聚糖、阳离子型葡聚糖以及其与软骨结合的衍生物。

9. 根据权利要求1到8中任一权利要求所述的凝胶组合物,其进一步包含一种或多种治疗剂、预防剂或诊断剂。

10. 根据权利要求9所述的凝胶组合物,其中当在磷酸盐缓冲盐水中于37°C下培育七天时,所述一种或多种治疗剂、预防剂或诊断剂以少于10%、15%、20%、25%或30%自所述粘稠均匀凝胶进行释放。

用于向软骨中受控递送被囊封的药剂的二元自组装凝胶

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年5月6日提交的美国临时申请第62/332,664号的权益和优先权,该申请特此以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或研发的声明

[0004] 本发明是在政府支持下在由国防部 (Department of Defense) 授予的授权号 W81XWH-14-1-0229下进行的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 所公开的技术大体上处于受控药物递送的领域,并且更确切地说,涉及用于软骨修复的可注射粘附性水凝胶。

背景技术

[0006] 软骨(透明软骨或关节软骨)是包覆关节内骨表面以及形成其它润滑形强表面的3-5mm薄组织。其提供在理想情况下持续一生的极低摩擦力关节连接。软骨可能因急性伤害或随时间退化而受损伤。举例来说,骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是导致软骨薄化和进行性关节损伤的关节病症。接近40%超过45岁的美国人具有一定程度的膝OA,并且预期所述数目随着人口老化而增长。关节软骨的局部病变可能发展成更广泛的软骨破坏和致残性关节炎。关节软骨固有的愈合能力有限。出于这一原因,这些病变的骨科控制仍是骨科医生和患者的长期问题。由于仅在美国就有数百万人受到软骨损伤影响的事实,强调治疗软骨伤害的重要性 (Praemer A等人,《美国骨外科医师学会 (American Academy of Orthopaedic Surgeons)》1999第34-9页)。

[0007] 取决于软骨缺损的大小和位置,执行用于软骨修复的各种外科手术程序,包括清创术、磨损关节造形术、轻微骨折手术、骨软骨自体移植物移植、骨软骨同种异体移植物移植以及自体软骨细胞植入 (Browne J E等人,《临床骨科与相关研究 (Clinical Orthopaedics and Related Research)》2005;436:237-245;Magnussen RA等人,《临床骨科与相关研究》2008;466:952-96)。

[0008] 然而,修复正常软骨表面并改善其与周围正常关节软骨的整合具有高度挑战性。研究已经展示,向缺损中植入全功能性软骨(如骨软骨自体移植物和同种异体移植物)常常引起与周围软骨组织的整合不佳 (Hunziker EB.《骨关节炎与软骨 (Osteoarthritis Cartilage)》.2002;10:432-463)。先前的生物材料植入物未能成功用于临床和临床前研究,这是由于如在体内使用刚性材料时常发现的,整合不佳并且促进骨骼和纤维组织生长而非透明软骨生长 (Custers RJ等人,《美国骨与关节外科杂志 (J Bone Joint Surg Am)》.2009;91:900-910)。

[0009] 因此,本发明的一个目标是提供一种用于与软骨组织良好粘附和整合并且受控递送治疗剂的生物相容性凝胶组合物。

[0010] 本发明的另一个目标是提供一种治疗和预防软骨损伤的方法。

发明内容

[0011] 本发明提供一种与软骨组织的粘附性增强的自组装凝胶组合物。取决于用以形成凝胶的主要溶剂组分或在溶剂去除和/或纯化之后存在的主要溶剂组分,凝胶组合物可以是水凝胶或有机凝胶,优选地,自组装水凝胶由小于2,500Da的低分子量普遍认为安全(generally recognized as safe,GRAS)的两亲胶凝剂和赋予与结缔组织的粘附能力的阳离子试剂,在任选地囊封一种或多种治疗剂、预防剂和诊断剂的情况下,在水性或基本上水性的介质中共同自组装来进行制备。替代性地,阳离子试剂可以与GRAS两亲胶凝剂相互作用或缔合,或包覆由GRAS两亲胶凝剂形成的已组装凝胶,以赋予软骨粘附性和靶向能力。

[0012] 在第一实施例中,通过混合和任选地加热以确保完全溶解,将GRAS两亲胶凝剂、赋予软骨粘附能力的阳离子试剂以及任选地治疗剂、预防剂和/或诊断剂溶解于包括水(或水性缓冲液或盐溶液)和水可混溶性有机溶剂的共溶剂介质中。在第二实施例中,首先将GRAS两亲胶凝剂溶解于有机溶剂中以形成具有胶凝剂作为溶质的溶液(称为“胶凝剂溶液”)。也将赋予软骨粘附能力的阳离子试剂和任选地治疗剂、预防剂和/或诊断剂溶解于胶凝剂溶液中。接着将任选地含有治疗剂、预防剂和/或诊断剂的水溶液(如纯水或水性缓冲液或盐溶液)与胶凝剂溶液混合以形成液体凝胶溶液。在任一实施例中,将凝胶溶液加热到一定温度(一般低于所用液体溶剂中任一种的沸点)持续足够时间,后接冷却,得到在室温(约 $^{\circ}\text{C}$)或体温(约37度)下针对倒置稳定的粘稠均匀凝胶。

[0013] 组分的完全溶解对于形成自支撑式(例如尤其在倒置时阻流(flow resisting))的均匀凝胶而言是关键的,该自支撑式均匀凝胶不同于不均匀胶凝(例如凝胶在具有非胶凝部分的混合物中的凝块,或沉淀)。选择溶剂、pH值和/或盐以有效使组分溶解成均匀溶液。在形成凝胶后,去除过量溶剂以产生药学上可接受的水凝胶。

[0014] 合适的胶凝用两亲性化合物由美国食品和药物管理局(U.S.Food and Drug Administration)普遍认为安全(GRAS)。示例性胶凝剂是酶可裂解的普遍认为安全(GRAS)的化合物,如烷酸抗坏血酸酯、脱水山梨糖醇烷酸酯、三甘油单烷酸酯、蔗糖烷酸酯、甘胆酸以及其组合。为了形成均匀的自支撑式凝胶,GRAS两亲胶凝剂通常以大于3、4、5、6、7、8、9或10wt/vol%包括在用于胶凝的液体介质中。

[0015] 与不具有该阳离子试剂的对照凝胶相比,阳离子试剂一般与一种或多种软骨组分静电相互作用并且增强粘稠均匀凝胶与软骨的粘附性。阳离子试剂与胶凝剂共同自组装,即,形成均匀凝胶的薄层状、囊泡状或纳米纤维状微观结构。合适的阳离子试剂包括含胺的磷脂,如1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane, DOTAP)和1,2-二油基氧基-3-三甲基铵丙烷氯化物(1,2-dioleyloxy-3-trimethylammonium propane chloride, DOTMA);以及带正电的生物相容性分子,如壳聚糖、羧甲基壳聚糖和其它壳聚糖衍生物。为了赋予与结缔组织的粘附能力,阳离子试剂在含有GRAS两亲胶凝剂和阳离子试剂的组合质量中一般大于10、11、12、13、14、15、20或25重量%。阳离子试剂与GRAS两亲胶凝剂的质量比优选地是至少1:9或大于1:9,例如1.5:8.5、2:8、2.5:7.5、3:7或更大。

[0016] 自组装凝胶组合物与结缔组织(如软骨)粘附,并且可以充当润滑剂并用于受控递送治疗剂。当在液体介质中培育时,自组装凝胶组合物通常不突释(burst release)被囊封的药剂。举例来说,当在磷酸盐缓冲盐水中于 37°C 下培育至少1周、2周、3周、1个月、2个月或

更长时间时,少于总量10%、15%、20%、25%或30%的所负载药物自粘稠均匀凝胶进行释放。

[0017] 给予自组装凝胶组合物以治疗或预防一种或多种软骨损伤。给予的常用途径是经由局部注射、在关节镜下或在手术时给予。

附图说明

[0018] 图1的条形图展示软骨外植体在与负载有荧光染料的凝胶一起培育1小时后的荧光强度(任意单位,arbitrary unit,A.U.)。AP-DOTAP凝胶是指在棕榈酸抗坏血酸酯与1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷之间的共同自组装凝胶。AP凝胶是指自组装棕榈酸抗坏血酸酯凝胶。

[0019] 图2的线图展示,在磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline,PBS)中(连接圆形的线),在以1 μ g/mL含MMP-2的PBS中(连接三角形的线),或在以200U/mL含酯酶的PBS中(连接方形的线),CL-82198(一种针对基质金属肽酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)的抑制剂)随时间(天)从AP-DOTAP共同组装凝胶中释放的累积释放(%)。

[0020] 图3的线图展示,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中(连接圆形的线),在以1 μ g/mL含MMP-2的PBS中(连接三角形的线),或在以800U/mL含酯酶的PBS中(连接方形的线),L-006235(一种组织蛋白酶-k抑制剂)随时间(天)从AP-DOTAP共同组装凝胶中释放的累积释放(%)。

[0021] 图4的线图展示,在来自骨关节炎(OA)患者的滑液存在下(连接圆形的线),或在来自正常人类受试者的滑液存在下(连接方形的线),CL-82198随时间(天)从AP-DOTAP共同组装凝胶中释放的累积释放(%)。

[0022] 图5的线图展示,在来自骨关节炎(OA)患者的滑液存在下(连接圆形的线),或在来自正常人类受试者的滑液存在下(连接方形的线),L-006235随时间(天)从AP-DOTAP共同组装凝胶中释放的累积释放(%)。

[0023] 图6的条形图展示,在PBS中,在二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)中,在AP-DOTAP共同组装凝胶(凝胶)中,在负载有CL-82198的AP-DOTAP共同组装凝胶(凝胶+药物)中,或在CL-82198存在下(药物),来源于正常人类膝部的所培养软骨细胞的细胞代谢活性百分比。

[0024] 图7的条形图展示,在PBS中,在二甲亚砜(DMSO)中,在AP-DOTAP共同组装凝胶(凝胶)中,在负载有CL-82198的AP-DOTAP共同组装凝胶(凝胶+药物)中,或在CL-82198存在下(药物),来源于骨关节炎阳性人类膝部的所培养软骨细胞的细胞代谢活性百分比。

[0025] 图8的条形图比较不使用和使用负载有10mg/mL组织蛋白酶-K抑制剂(L-006235)的AP-DOTAP共同组装凝胶(10%w/w)的大鼠的内侧胫骨软骨退化得分。

[0026] 图9-11的条形图展示软骨外植体在与负载有或本身为荧光染料的样本一起培育1小时后的荧光强度(任意单位,arbitrary unit,A.U.)。

[0027] 图9比较三甘油单硬脂酸酯(triglycerol monostearate,TG18)-DOTAP共同组装凝胶与仅含TG18的凝胶。

[0028] 图10比较蔗糖棕榈酸酯(sucrose palmitate,SP)-DOTAP共同组装凝胶与仅含SP的凝胶。

[0029] 图11比较蔗糖硬脂酸酯(sucrose stearate,SS)-DOTAP共同组装凝胶与仅含SS的

凝胶。

[0030] 图12的线图展示,被囊封的L-006235随时间(天)从蔗糖棕榈酸酯水凝胶(SP,资料点展示为圆形)中或从来自蔗糖棕榈酸酯与DOTAP之间共同组装的水凝胶(SP-DOTAP,资料点以方形展示)中释放的累积释放(%)。

[0031] 图13的条形图展示软骨外植体在与负载有荧光染料的凝胶的不同组合物一起培育1小时后的荧光强度(任意单位,arbitrary unit,A.U.)。由以下物质在加热和冷却后自发组装来形成凝胶:(1)仅单独的蔗糖棕榈酸酯(SP),不添加DOTAP;(2)95%SP和5%DOTAP(重量百分比);(3)90%SP和10%DOTAP;(4)85%SP和15%DOTAP;(5)80%SP和20%DOTAP。

[0032] 图14的条形图展示软骨外植体在与不同样品一起培育24小时,后对接对剩余样品进行洗涤和表面去除之后的荧光强度(任意单位,arbitrary unit,A.U.)。样品包括(1)通过分别为85重量%和15重量%的SP和DOTAP共同自组装而形成的囊封荧光染料的水凝胶;(2)通过自组装SP形成的囊封荧光染料的水凝胶;以及(3)荧光染料。空白对照物是指软骨本身。

[0033] 图15的条形图展示软骨外植体在与以下物质一起培育1小时后的荧光强度(任意单位,arbitrary unit,A.U.):(1)通过分别为80重量%和20重量%的TG18和DOTMA共同自组装而形成的囊封荧光染料的水凝胶;(2)通过仅单独的TG18的自组装而形成的囊封荧光染料的水凝胶;或(3)荧光染料。

[0034] 图16的条形图展示软骨外植体在与以下物质一起培育1小时后的荧光强度(任意单位,arbitrary unit,A.U.):(1)通过分别为80重量%和20重量%的SP和DOTMA共同自组装而形成的囊封荧光染料的水凝胶;(2)通过仅单独的SP的自组装而形成的囊封荧光染料的水凝胶;或(3)荧光染料。

[0035] 图17的条形图展示软骨外植体在与以下物质一起培育1小时后的荧光强度(任意单位,arbitrary unit,A.U.):(1)由100mg SP在1mL每毫升含有0.8mg壳聚糖的液体介质中形成的囊封荧光染料的水凝胶;(2)由100mg SP在1mL每毫升含有0.4mg壳聚糖的液体介质中形成的囊封荧光染料的水凝胶;(3)由100mg SP在1mL每毫升含有0.08mg壳聚糖的液体介质中形成的囊封荧光染料的水凝胶;或(4)由100mg SP在不含壳聚糖的1mL液体介质中形成的水凝胶。

具体实施方式

[0036] I. 定义

[0037] 术语“胶凝剂”是指在一种或多种溶剂中可能通过非共价相互作用组装的分子,该等非共价相互作用如氢键结、范德华力相互作用(van der Waals interaction)、疏水性相互作用、离子相互作用、 π - π 叠加或其组合。胶凝剂可以通过由例如毛细管力使溶剂固定来形成凝胶。胶凝剂可以包括水胶凝剂(例如形成水凝胶的胶凝剂)和有机胶凝剂(例如形成有机凝胶的胶凝剂)。在一些实施例中,胶凝剂可以形成水凝胶和有机凝胶两者。胶凝剂包括低分子量($<2,500\text{Da}$)普遍认为安全的两亲性化合物,任选地包括酶可裂解的化合物,其可以独立地自组装以形成凝胶。与两亲胶凝剂共同组装以形成共同自组装凝胶的阳离子试剂也可以是共同胶凝剂。

[0038] 术语“自组装”是指分子在合适的环境中自发组装或组织以形成高度有序结构(如

水凝胶或有机凝胶)的能力。

[0039] 术语“水凝胶”是指共价(例如聚合性水凝胶)或非共价(例如自组装水凝胶)地保持在一起的分子三维(three-dimensional,3-D)网络,其中水是主要组分。凝胶经由胶凝剂的自组装或经由胶凝剂的化学交联而形成。

[0040] 术语“有机凝胶”是指共价(例如聚合性水凝胶)或非共价(例如自组装水凝胶)地保持在一起的分子3-D网络,其中有机溶剂是主要组分。凝胶可以经由胶凝剂的自组装或经由胶凝剂的化学交联而形成。

[0041] 术语“有机溶剂”是指呈液相时能够溶解固体物质的任何含碳物质。有机化学中常用的示例性有机溶剂包括甲苯、四氢呋喃、丙酮、二氯甲烷以及己烷。这一术语还包括聚乙二醇(PEG),其在1kDa MW时可以在37°C下融化并且有可能溶解极性化合物。

[0042] 术语“水可混溶”是指任何溶剂以所有比例与水混合以形成单一均匀液相。这包括如二甲亚砜(DMSO)、四氢呋喃、丙酮、乙醇、甲醇和二噁烷的溶剂,但一般不包括如己烷、油和乙醚的溶剂。其也不包括在水中具有一定但极有限的混溶性或溶解性的溶剂,如乙酸乙酯和二氯甲烷,其实际上视为不可混溶的。一般来说,使用介于约20体积%与50体积%之间的水可混溶性有机溶剂来制造水凝胶,其中其余部分是水或缓冲液。

[0043] 术语“粘附”是指凝胶组合物在接触或培育一段时间后粘到表面或物质上。温和洗涤溶液一般不从表面去除所粘附的凝胶组合物。这一温和洗涤溶液包括其中形成凝胶组合物的溶剂或介质。出于比较目的,软骨素酶处理将降低包括GRAS两亲胶凝剂和阳离子试剂的自组装凝胶与软骨的粘附性。

[0044] 术语“药学上可接受”是指在合理医学判断的范围内,根据如美国食品和药物管理局的机构的指南,化合物、材料、组合物和/或剂型适用于与人类和动物的组织接触,而无过量毒性、刺激、过敏反应或与合理效益/风险比相关的其它问题或并发症。

[0045] 如本文所用,术语“生物相容性”和“生物学上相容”一般是指材料连同其任何代谢物或降解产物一起一般对接受者无毒性并且不对接受者引起任何明显不良作用。生物相容性材料一般是在向患者给予时不会引发显著炎症反应或免疫反应的材料。

[0046] 如本文所用,除非另外指定,否则“分子量”一般是指本体聚合物的相对平均链长。在实践中,使用各种方法来估计或表征分子量,该等方法包括凝胶渗透色谱法(gel permeation chromatography,GPC)或毛细管粘度测定法。与数目平均分子量(Mn)相对,GPC分子量以重量平均分子量(Mw)形式进行报导。毛细管粘度测定法将分子量的估计值提供为使用一组特定浓度、温度和溶剂条件从稀聚合物溶液测定的固有粘度。

[0047] 如本文所用,术语“亲水性”是指与水亲和的特性。举例来说,亲水性聚合物(或亲水性聚合物链段)是主要可溶于水溶液中和/或倾向于吸收水的聚合物(或聚合物链段)。一般来说,聚合物的亲水性越大,该聚合物越倾向于溶解在水中,与水混合或可由水润湿。

[0048] 如本文所用,术语“疏水性”是指不与水亲和或排斥水的特性。举例来说,聚合物(或聚合物链段)的疏水性越大,该聚合物(或聚合物链段)越倾向于不溶解在水中,不与水混合或不可由水润湿。

[0049] 如本文所用,术语“表面活性剂”是指降低液体表面张力的试剂。

[0050] 术语“治疗剂”是指可以给予以预防或治疗疾病或病症的一种或多种症状的药剂。治疗剂可以是核酸或其类似物、小分子(mw小于2000道尔顿,更通常小于1000道尔顿)、肽模

拟物、蛋白质或肽、碳水化合物或糖、脂质或其组合。在一些实施例中,可以使用细胞或细胞材料作为治疗剂。

[0051] 术语“软骨细胞”可以意味着但不限于在软骨中发现的产生并维持软骨基质的细胞以及分化以形成软骨的细胞。从最少分化到终末分化,软骨细胞谱系(i)纤维母细胞集落形成单位(colony-forming unit-fibroblast,CFU-F);(ii)间充质干细胞/骨髓基质细胞(mesenchymal stem cell/marrow stromal cell,MSC);(3)软骨细胞。术语“软骨生成”是指由软骨形成细胞或软骨胜任细胞(chondrocompetent cell)形成新软骨。

[0052] 术语“治疗”或“预防”疾病、病症或病状在可能易患该疾病、病症和/或病状但尚未诊断为患有的动物中出现;抑制该疾病、病症或病状,例如阻碍其进展;以及缓解该疾病、病症或病状,例如引起疾病、病症或病状消退。治疗疾病或病状包括即使潜在病理生理学不受影响,仍减轻特定疾病或病状的至少一种症状;如通过给予镇痛剂来治疗受试者的疼痛,尽管这类药剂不治疗该疼痛的原因。

[0053] 术语“治疗有效量”是指当并入到自组装凝胶组合物中和/或自组装凝胶组合物上时,以可适用于任何治疗的合理效益/风险比产生一定所期望作用的治疗剂的量。有效量可以取决于以下因素而变化,如所治疗的疾病或病状、所给予的特定调配物、受试者的大小或疾病或病状的严重程度。

[0054] 术语“并入”和“囊封”是指不论用于并入药剂或其它材料的方式如何,将药剂并入、调配或以其它方式包括到组合物中和/或组合物上。

[0055] II.组合物

[0056] 1.GRAS两亲胶凝剂

[0057] 适合于自组装以形成凝胶的GRAS两亲性胶凝剂一般小于2,500Da,并且可以优选地是酶可裂解的。GRAS两亲胶凝剂可以基于微米/纳米结构(例如薄层状、胶束状、囊泡状或纤维状结构)而自组装成凝胶。

[0058] 在一些实施例中,GRAS两亲胶凝剂是烷酸抗坏血酸酯、脱水山梨糖醇烷酸酯、三甘油单烷酸酯、蔗糖烷酸酯、甘胆酸或其任何组合。

[0059] 烷酸酯可以包括经由不稳定键(例如酯键、氨基甲酸酯键、硫酯键和酰胺键)键结到抗坏血酸基、脱水山梨糖醇、三甘油或蔗糖分子的疏水性 C_1-C_{22} 烷基(例如乙酰基、乙基、丙基、丁基、戊基、辛酰基、羊脂基、月桂基、肉豆蔻基、软脂酰基、硬脂酰基、花生基或山萘基)。举例来说,烷酸抗坏血酸酯可以包括棕榈酸抗坏血酸酯、癸酸抗坏血酸酯、月桂酸抗坏血酸酯、辛酸抗坏血酸酯、肉豆蔻酸抗坏血酸酯、油酸抗坏血酸酯或其任何组合。脱水山梨糖醇烷酸酯可以包括脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇癸酸酯、脱水山梨糖醇月桂酸酯、脱水山梨糖醇辛酸酯、脱水山梨糖醇肉豆蔻酸酯、脱水山梨糖醇油酸酯或其任何组合。三甘油单烷酸酯可以包括三甘油单棕榈酸酯、三甘油单癸酸酯、三甘油单月桂酸酯、三甘油单辛酸酯、三甘油单肉豆蔻酸酯、三甘油单硬脂酸酯、三甘油单油酸酯或其任何组合。蔗糖烷酸酯可以包括蔗糖棕榈酸酯、蔗糖癸酸酯、蔗糖月桂酸酯、蔗糖辛酸酯、蔗糖肉豆蔻酸酯、蔗糖油酸酯或其任何组合。

[0060] 在一些实施例中,GRAS两亲胶凝剂包括棕榈酸抗坏血酸酯、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、三甘油单棕榈酸酯、蔗糖棕榈酸酯或甘胆酸。

[0061] 代表性低分子量GRAS两亲胶凝剂包括维生素前体,如棕榈酸抗坏血酸酯(维生素C

前体)、乙酸视黄酯(维生素A前体)和 α -生育酚乙酸酯(维生素E前体)。

[0062] 在一些形式中,GRAS两亲胶凝剂通过使一种或多种具有 C_1 到 C_{30} 基团的饱和或不饱和烃链与低分子量(一般亲水性)化合物通过酯化或氨基甲酸酯、酸酐和/或酰胺键合成地结合来形成。范围 C_1 到 C_{30} 包括 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 等到 C_{30} ,以及属于 C_1 到 C_{30} 内的范围,例如 C_1 到 C_{29} 、 C_2 到 C_{30} 、 C_3 到 C_{28} 等。

[0063] 在一些实施例中, α 生育酚乙酸酯、乙酸视黄酯、棕榈酸视黄酯或其组合可以与胶凝剂共同组装。

[0064] 凝胶可以独立地包括每一体积凝胶约3重量%到最大值30-40重量%、更优选地约4重量%到10重量%的胶凝剂。在高于30%-40%下,凝胶将开始从溶液中沉淀出或变得不太可注射。

[0065] 在一些形式中,自组装凝胶组合物包括分子量为2500或更小的酶可裂解的普遍认为安全(GRAS)的第一胶凝剂和本身也是GRAS药剂的非独立第二胶凝剂。非独立胶凝剂在与酶可裂解的GRAS胶凝剂组合时通常将形成自支撑式凝胶的浓度下不形成自支撑式凝胶。示例性非独立第二胶凝剂包括 α 生育酚乙酸酯、乙酸视黄酯和棕榈酸视黄酯。非独立胶凝剂与GRAS第一胶凝剂共同组装以形成自组装凝胶。

[0066] 2. 阳离子试剂

[0067] 包括一种或多种阳离子试剂以与GRAS两亲胶凝剂共同自组装或包覆GRAS两亲凝胶以赋予对软骨或结缔组织具有特异性的粘附能力。阳离子试剂一般增强凝胶与体内组织或细胞的结合或粘附性,由此提供凝胶在用于治疗剂受控释放的目标位点处的较长滞留时间和浓集积聚。自组装凝胶中的阳离子试剂主要通过4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、玻尿酸盐或其它多糖来增强与结缔组织(例如软骨)的结合和粘附性,如由在用软骨素酶处理组织后这类结合/粘附性特定降低所证实。

[0068] 一般包括阳离子试剂形成共同组装或经过涂布的凝胶时所处的质量浓度小于GRAS两亲胶凝剂质量浓度但高到足以赋予与软骨或结缔组织的粘附能力。举例来说,在GRAS两亲胶凝剂和阳离子试剂的组合量中,阳离子试剂处于大于5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、11重量%、12重量%、13重量%、14重量%或15重量%并且不超过40重量%、45重量%、50重量%或60重量%的浓度范围内。优选地,在阳离子试剂和GRAS两亲胶凝剂的组合量中,以大于10%并且不超过50%包括阳离子试剂,例如介于该范围之间的任何数量,如15%、20%、25%或30%(wt/wt)。阳离子试剂的量可以取决于所得凝胶的粘附特性、机械特性和载药量。

[0069] 在一些实施例中,合适的阳离子试剂是磷脂,其至少通过疏水性-亲水性相互作用与胶凝剂共同组装。在某些实施例中,胶凝剂和阳离子试剂可以都整合到凝胶的微米/纳米结构(例如薄层状、胶束状、囊泡状或纤维状结构)中。

[0070] 在其它实施例中,合适的阳离子试剂是带正电的多糖,其与由GRAS两亲胶凝剂形成的自组装凝胶相互作用、非共价缔合或包覆该自组装凝胶。

[0071] 赋予软骨粘附能力的示例性阳离子型多糖包括壳聚糖、N-酰基壳聚糖、四级铵化壳聚糖、烷基壳聚糖、羧基烷基(芳基)壳聚糖、O-羧基烷基壳聚糖、N-羧基酰基壳聚糖、硫酸化壳聚糖、壳聚糖的糖衍生物、阳离子型淀粉、阳离子型纤维素、阳离子型支链淀粉、阳离子型半乳聚糖、阳离子型葡聚糖以及其衍生物。

[0072] 赋予软骨粘附能力的示例性阳离子型磷脂包括1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、1,2-二油基氧基-3-三甲基铵丙烷氯化物(DOTMA)或两者。

[0073] 总体携有正电荷的磷脂的其它实例是乙基磷脂酰基胆碱的衍生物,尤其是乙基磷脂酰基胆碱与脂肪酸的二酯,如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine,乙基-DSPC或DSEPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholine,乙基-DPPC或DPEPC)。阴性相对离子优选地是卤素离子,尤其是氯或溴。带正电的脂质包括具有卤素相对离子(例如氯或溴)的烷基铵盐,其包含至少一个(C₁₀-C₂₀)烷基链,优选地(C₁₄-C₁₈)烷基链,例如,氯化单硬脂酰基铵或氯化二硬脂酰基铵、氯化单(十六烷基)铵或氯化二(十六烷基)铵、溴化二甲基二(十八烷基)铵(dimethyldioctadecylammonium bromide,DDAB)、溴化十六烷基三甲基铵(hexadecyltrimethylammonium bromide,CrAB)。带正电的脂质的其它实例是具有卤素相对离子(例如氯或溴)的叔或季铵盐,其包含一个或优选地两个(C₁₀-C₂₀)酰基链,优选地(C₁₄-C₁₈)酰基链通过(C₃-C₆)伸烷基桥连接到N原子,例如,1,2-二硬脂酰基-3-三甲基铵-丙烷(1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane,DSTAP)、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵-丙烷(1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane,DPTAP)、1,2-油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵-丙烷(1,2-distearoyl-3-dimethylammonium-propane,DSDAP)。

[0074] 在其它形式中,合适的阳离子试剂是含胺的聚合物。这些阳离子试剂与胶凝剂相互作用,并且至少插入在已组装的凝胶微米/纳米结构中。

[0075] 适合于与胶凝剂相互作用并且形成共同组装凝胶的示例性含胺的聚合物包括聚赖氨酸和羧甲基壳聚糖。一般来说,含胺的聚合物的分子量在约100与约10,000之间,在约300与约2,500之间,或在约500与约2,500之间。

[0076] 带正电的组分通常与对应的阴性相对离子缔合,该相对离子可以是单价(例如卤素)、二价(例如硫酸盐或甲硫酸盐)或三价(例如磷酸盐)。

[0077] 3. 治疗剂、预防剂和诊断活性剂

[0078] 凝胶组合物适合于向有需要的个体或受试者递送一种或多种治疗剂、预防剂或诊断剂,确切地说,在软骨素或其它多糖浓集的结缔组织(如软骨)处递送。治疗剂、预防剂和诊断剂可以是用以修复软骨或使软骨再生或治疗病症的蛋白质、肽、糖或多糖、脂质或脂蛋白或脂多糖、核酸(DNA、RNA、siRNA、miRNA、tRNA、piRNA等)或其类似物、或小分子(通常2,000D或更小,更通常1,000D或更小,有机、无机、天然或合成)

[0079] 在一些形式中,胶凝剂可以是水解或酶促降解并释放活性剂的前药。

[0080] 在其它形式中,治疗剂、预防剂或诊断剂可以以物理方式包埋、囊封,或与凝胶组合物的纳米纤维状结构非共价缔合。治疗剂、预防剂或诊断剂可以用一种或多种胶凝剂、一种或多种稳定剂共价修饰,或用作胶凝剂。替代性地,其并入凝胶组合物的已组装有序的薄层状、囊泡状和/或纳米纤维状结构中或定位于已组装结构的表面上。

[0081] 合适的活性剂包括免疫调节剂,包括类固醇、非类固醇消炎剂;化学治疗剂;镇痛剂;麻醉剂;关节润滑剂,如葡糖胺、软骨素和玻尿酸;解热剂;抗感染剂,如抗细菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂;组织和/或骨骼再生促进剂;维生素;抗氧化剂以及小干扰RNA。凝胶还可以包括聚合物,如聚(乙二醇)和聚(乙二醇)-二丙烯酸酯、聚(环氧乙烷)、羧甲基纤维素和

聚(甘油-共聚-癸二酸酯丙烯酸酯),其任何衍生物,和/或如壳聚糖的材料,其任何组合。

[0082] 在一些实施例中,自组装凝胶包括基因组编辑性核酸,其编码在靶细胞的基因组和任选地多核苷酸中诱导单链或双链断裂的一个或多个元件。示例性链断裂诱导性元件是CRISPR/Cas介导的基因组编辑性组合物。CRISPR是成簇的规律间隔的短回文重复(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)的首字母缩写;并且其常与编码执行与CRISPRs相关各种功能的蛋白质的基因(称为CRISPR相关(CRISPR-associated,“Cas”)基因)相关联。典型的CRISPR/Cas系统允许内源性CRISPR间隔子识别外源性基因元件并使其静默,该系统作为原核免疫系统或用作真核生物中的基因组编辑工具。(参见例如Cong,科学(Science),15:339(6121):819-823(2013)和Jinek等人,科学,337(6096):816-21(2012))。通过用包括cas基因和专门设计的CRISPR的所需元件转染细胞,生物体的基因组可以在任何所期望的位置进行切割和修饰。制备用于使用CRISPR/Cas系统的基因组编辑中的组合物的方法详细地描述于WO 2013/176772和WO 2014/018423中。

[0083] 在内源性CRISPR系统的情形下,形成CRISPR复合物(包括与一个靶序列杂交并与一个或多个Cas蛋白质复合的CRISPR向导序列)引起靶序列中或附近的一个或两个链裂解。在将外源性CRISPR系统引入到靶细胞中的情形下,一种或多种载体可以包括于自组装凝胶中以驱动CRISPR系统的一个或多个元件表现,以使得其在靶细胞中的一个或多个靶位点处形成CRISPR复合物。载体可以包括一个或多个插入位点(例如限制性核酸内切酶识别序列)、可操作地连接于编码CRISPR酶(Cas蛋白质)的酶编码性序列的调节元件、或一个或多个核定位序列。替代性地,载体编码相对于对应野生型酶突变的CRISPR酶,以使得经过突变的CRISPR酶缺乏使含有靶序列的靶多核苷酸的一个或两个链裂解的能力。

[0084] 资源可供用于帮助医师在鉴别出所期望的DNA靶序列时确定合适的靶位点。举例来说,多种公共资源可供用于辅助医师选择靶位点并设计相关sgRNA以实现在该位点处的切口或双链断裂,该等资源包括以生物信息法产生的约190,000个潜在sgRNA的清单,其靶向超过40%的人类外显子。另外,参见crispr.u-psud.fr/,这是被设计用于帮助科学家在众多物种中发现CRISPR靶向位点并产生适当crRNA序列的一种工具。举例来说,对使用CRISPR技术靶向DNA序列(使用多种可获得的线上工具中的一种加以鉴别)感兴趣的医师可以将含有靶序列的短DNA片段插入到向导RNA表达质粒中。检测原子核中的积聚可以通过任何合适的技术来执行,如可检测标记物与CRISPR酶的融合、鉴别蛋白质的免疫组织化学或酶活性分析。

[0085] 在一些实施例中,当自组装凝胶组合物包括两种或更多种药剂时,至少一种药剂增强其余一种或多种药剂的功效。

[0086] 在一些实施例中,自组装凝胶组合物包括用于连续递送以促进细胞迁移离开健康组织并进入受损软骨区域,由此使受伤软骨愈合的因子混合液。示例性因子包括以下中的一种或多种:骨形态发生蛋白(如BMP-7);转化生长因子 β ;纤维母细胞生长因子;基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor 1,SDF1);蛋白酶抑制剂,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)抑制剂、组织蛋白酶-K抑制剂和半胱氨酸蛋白酶抑制剂;以及富含血小板的血浆。

[0087] 适合于包括在自组装凝胶组合物中的示例性组织蛋白酶-K抑制剂包括巴利卡替(balicatib)(AAE581)、瑞拉卡替(relacatib)(SB-462795)、奥丹卡替(odanacatib)(MK-

0822)、MV061194、MV061748、MV061940、MV061645、MSX-081、LL-006235以及双环酮。

[0088] 适合于包括在自组装凝胶组合物中的示例性MMP抑制剂包括CL-82198、放线酰胺素(actinonin)、PD166793、CP 471474、WAY 170523以及海绵定碱A (ageladine A)。

[0089] 在一些实施例中,自组装凝胶组合物进一步包括疼痛控制剂。示例性疼痛缓解剂包括局部麻醉剂,如利多卡因(lidocaine)、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、狄布卡因(dibucaine)或其盐。

[0090] 在其它实施例中,在自组装凝胶组合物中包括诊断剂,包括顺磁性分子、荧光化合物、磁性分子以及放射性核素。合适的诊断剂包括但不限于x射线成像剂和造影剂。也可以使用放射性核素作为成像剂。其它合适的造影剂的实例包括气体或气体挥发性化合物,其是不透射线的。

[0091] 细胞

[0092] 细胞也适合于包括在用于向结缔组织递送的粘稠凝胶中。这些细胞可以是软骨细胞、祖细胞或干细胞,如间充质干细胞。自体软骨细胞是FDA批准的。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是能够分化成成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、成肌细胞和神经细胞谱系的多能性细胞。(Pittenger M F等人,科学1999;284:143-147)。从自成人获得的小骨髓穿刺液,可以分离出MSC,因其增殖能力而容易地使其扩增,且对其进行表征。(Friedenstein A等人,细胞与组织动力学(Cell Tissue Kinet)1987;20:263-72; Haynesworth S等人,细胞生理学杂志(JCell Physiol)1992;138:8-16)。自组装凝胶组合物中的同种异体MSC提供另一种用于软骨组织再生的方法。

[0093] 自组装凝胶也可以是用于细胞接种和体内植入的支架。凝胶可以被调配成具有一种或多种增强其中所接种细胞的存活、增殖和/或分化的生物活性分子。药剂可以共价键结到胶凝剂或阳离子试剂,或其可以非共价缔合。示例性生物活性剂是改善细胞识别和与凝胶的粘附性的聚氨基酸(例如,含有精氨酰基甘氨酰基天冬氨酸Arg-Gly-Asp的肽序列)。

[0094] 4. 溶剂

[0095] 取决于最终调配物中的主要溶剂,自组装凝胶组合物可以以水凝胶或有机凝胶形式进行制备。

[0096] 对于大部分体内应用,制备水凝胶。在添加水或盐的水溶液之前,可以使用一些有机溶剂,通常为GRAS有机溶剂或水可混溶性有机溶剂来促进胶凝剂、阳离子试剂和/或治疗剂的溶解和/或均匀混合。在加热均匀混合物并后续冷却后,获得自组装凝胶组合物。进一步纯化以去除有机溶剂,得到药学上可接受的水凝胶。有机溶剂的任何残余量一般处于由U.S.FDA规定的药学产品限度内,例如二氯甲烷低于600ppm,甲醇低于3,000ppm,氯仿低于60ppm;并且处于GMP或其它品质要求的限度内。

[0097] 在一些形式中,有机溶剂溶解胶凝剂、阳离子试剂和任选地一种或多种治疗剂。向有机溶液中添加水性介质(例如盐水)或水,后接加热并任选地搅拌、混合或涡流,得到均匀溶液。在冷却到低于胶凝剂的克拉夫特点(Krafft point),例如冷却到室温或体温之后,形成粘稠均匀凝胶,其针对倒置稳定(例如当容纳在倒置的小瓶中时将不流动)。

[0098] 在一些实施例中,经由透析、离心和/或过滤去除自组装凝胶中的有机溶剂,得到合适的水凝胶调配物。

[0099] 有机溶剂基于胶凝剂在其中的溶解性、其极性、疏水性、水混溶性和(在一些情况

下)酸性来加以选择。合适的有机溶剂包括水可混溶性溶剂或具有明显水溶性(例如每100g水中大于5g)的溶剂,例如DMSO、二丙二醇、丙二醇、丁酸己酯、甘油、丙酮、二甲基甲酰胺(dimethylformamide,DMF)、四氢呋喃、二噁烷、乙腈、醇(如乙醇、甲醇或异丙醇)以及低分子量聚乙二醇(例如在37℃下熔化的1kD PEG)。在其它形式中,自组装凝胶组合物可以包括极性或非极性溶剂,如水、苯、甲苯、四氯化碳、乙腈、甘油、1,4-二噁烷、二甲亚砜、乙二醇、甲醇、氯仿、己烷、丙酮、N,N'-二甲基甲酰胺、乙醇、异丙醇、丁醇、戊醇、四氢呋喃、二甲苯、均三甲苯和/或其任何组合。

[0100] 在其它形式中,自组装凝胶组合物可以包括极性或非极性溶剂,如水、苯、甲苯、四氯化碳、乙腈、甘油、1,4-二噁烷、二甲亚砜、乙二醇、甲醇、氯仿、己烷、丙酮、N,N'-二甲基甲酰胺、乙醇、异丙醇、丁醇、戊醇、四氢呋喃、二甲苯、均三甲苯和/或其任何组合。

[0101] 在其它形式中,使用油介质,例如花生油、液体石蜡或橄榄油。

[0102] 一般而言,有机溶剂的量与水溶液(例如水、水性缓冲液、盐的水溶液,其任选地含有治疗剂)体积相比不超过以体积计1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10。也就是说,对于粒子,如在形成具有高载药量的均匀凝胶中所用的液体总量中的有机溶剂体积量一般小于50%、33%、25%、20%、17%、14%、12.5%、11%、10%或9%,和明显更小,通常小于1%。

[0103] 胶凝剂和有机溶剂以适当的胶凝剂浓度和适当的水性-有机混合物溶剂系统体积和比率或两者加以选择,以形成自支撑式凝胶。在添加含有生物制剂或其它治疗剂的水溶液之前,胶凝剂溶液在37℃下不应凝固或沉淀。增加有机溶剂的量或降低有机溶剂中胶凝剂的浓度可以防止胶凝剂溶液凝固。当将胶凝剂溶液(在有机溶剂中)与含有生物制剂或其它治疗剂的水溶液混合时,形成针对倒置稳定的自支撑式凝胶(视需要在加热后),而不是可流动的块状物/聚集物。

[0104] 在形成自支撑式凝胶后,可以去除该凝胶中的有机溶剂以达到适合于药学应用的残余水平。可以使用一种或多种纯化技术,如透析、离心、过滤、干燥、溶剂交换或冻干。残余有机溶剂处于由美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)规定的药学产品限度内,或低于由美国药典公约,国际协调会议指南(U.S.Pharmacopeia Convention,International Conference on Harmonization guidance)所提供的验收标准。举例来说,二氯甲烷低于600ppm,甲醇低于3,000ppm,氯仿低于60ppm;并且处于GMP或其它品质要求的限度内。

[0105] 5. 特性

[0106] 水凝胶提供如在水性条件下能够水合和生物学相容性增强的优势,并且可以较适合生物学给予(例如植入湿式水凝胶)。自组装凝胶可以增加药剂(如被囊封的治疗剂和/或维生素)例如针对光/紫外光降解的稳定性,并且可以递送高浓度的维生素或GRAS药剂。

[0107] 表面电荷和粘附性

[0108] 一些实施例提供所具有的 ζ 电位介于约50mV与约-20mV之间、介于约30mV与约-10mV之间或总体带正电的自组装凝胶组合物。带正电的凝胶组合物可以与结缔组织中的蛋白聚糖或其它生物分子静电相互作用或以物理方式由其缠绕。

[0109] 含有阳离子试剂的自组装凝胶组合物与软骨组合物或结缔组织的粘附性比不具有该阳离子试剂的自组装凝胶组合物明显更强。

[0110] 机械特性和可注射性

[0111] 在一些实施例中,自组装凝胶组合物较滑,和/或具有可恢复的流变特性。在一些实施例中,自组装凝胶组合物的弹性模量为10到10,000帕斯卡,并且其粘性模量为10到10,000帕斯卡。

[0112] 使用自组装凝胶组合物,在将容器于室温下倒置持续至少10秒后未观察到重力流动,并且在一些情况下,倒置持续约1小时、3小时、1天、2天或更长时间内未观察到重力流动。不同于本身为胶凝区域(不可流动)与非胶凝液体区域(可流动)混合物的不均匀材料,自组装凝胶是均匀的并且针对倒置稳定。自组装凝胶也与脂质体或胶束悬浮液不同。脂质体或胶束悬浮液不是自支撑式的,并且在将容器倒置时可能流动。

[0113] 在优选实施例中,自组装凝胶组合物是适合于软骨愈合和修复的可注射或可植入粘附性水凝胶。归因于胶凝剂和阳离子试剂组装的非共价相互作用,块体凝胶可以在剪切力下变形和挤出(例如在注射期间),并且胶凝剂和阳离子试剂在剪切力中止后再次组装成自支撑式的针对倒置稳定的状态(例如,弹性模量 G' 大于粘性模量 G'')。替代性地,可以将自组装凝胶组合物加工成微米粒子或纳米粒子并且悬浮于可以悬浮液形式注射的药学上可接受的载剂中,或仅单独以含有纳米结构的干粉形式或以凝胶形式加以施用。

[0114] 微米和/或纳米结构

[0115] 药剂可以被囊封在纳米结构内或纳米结构之间,可以非共价键结到该等纳米结构,或两者。

[0116] 当两亲性分子在溶剂中自组装时,胶凝剂分子的疏水性部分和亲水性部分可以相互作用以形成胶凝剂分子的薄层。在一些实施例中,当凝胶是水凝胶时,胶凝剂的疏水性部分位于给定薄层的内区域中,并且亲水性部分位于薄层的外表面处。在一些实施例中,当凝胶是有机凝胶时,胶凝剂的疏水性部分位于给定薄层的外区域中,并且亲水性部分位于薄层的内表面处。薄层的宽度可以是约三纳米(例如约四纳米)到约五纳米(例如约四纳米),并且长度可以是数微米(例如一微米、两微米、三微米、四微米、五微米、十微米、二十微米或二十五微米)或更大。数十或数百个这类薄层可以捆绑在一起以形成纳米结构,如纤维和薄片状结构。在一些实施例中,纳米结构可以包括纳米粒子、胶束、脂质体囊泡、纤维和/或薄片。

[0117] 在一些实施例中,纳米结构的最小尺寸(例如厚度、宽度或直径)可以是2nm或更大(例如50nm或更大、100nm或更大、150nm或更大、200nm或更大、250nm或更大、300nm或更大、350nm或更大)和/或400nm或更小(例如350nm或更小、300nm或更小、250nm或更小、200nm或更小、150nm或更小、100nm或更小或500nm或更小)。在一些实施例中,纳米结构(例如纤维、薄片)的长度和/或宽度可以是数微米(例如一微米、两微米、三微米、四微米、五微米、十微米、二十微米或二十五微米)或更大。纳米结构可聚集成网络,和/或呈液晶、乳液、原纤状结构或带状形态的形式。当纳米结构呈纤维形式时,纤维的直径可以是约2nm或更大,并且其长度可以是数百纳米或更大。在一些实施例中,纤维的长度可以是数微米(例如,一微米、两微米、三微米、四微米、五微米、十微米、二十微米或二十五微米)或更大。

[0118] 降解

[0119] 在一些实施例中,凝胶组合物在存在于细胞、组织或器官的疾病病况中的条件下拆解,由此允许药剂在目标组织和/或器官处释放。

[0120] 在一个方面中,本发明的特征在于能够进行药剂受控释放的自组装凝胶组合物。自组装凝胶组合物包括分子量为2500或更小的酶可裂解的普遍认为安全 (GRAS) 的第一胶凝剂;和一种或多种药剂。

[0121] 举例来说,凝胶组合物可以包括在与酶接触时可裂解和/或可通过水解来裂解的可降解键,如酯键、酰胺键、酸酐键、硫酯键和氨基甲酸酯键。通常,键始终在两亲分子的亲水性部分与疏水性部分之间。在一些实施例中,基于磷酸酯的键可以由磷酸酶裂解。在一些实施例中,不稳定的键可氧化还原裂解,并且在还原或氧化后裂解(例如-S-S-)。在一些实施例中,可降解键对温度敏感,例如可在高温下裂解,例如可在37°C-100°C、40°C-100°C、45°C-100°C、50°C-100°C、60°C-100°C、70°C-100°C的温度范围内裂解。在一些实施例中,可降解键可以在生理温度(例如,36°C到40°C、约36°C、约37°C、约38°C、约39°C、约40°C)下裂解。举例来说,键可以通过温度增加来裂解。这可以允许使用较低剂量,这是因为药剂仅在所需位点处进行释放。另一个益处是降低对其它器官和组织的毒性。在某些实施例中,刺激可以是超声波、温度、pH值、金属离子、光、电刺激、电磁刺激以及其组合。

[0122] 降解(可裂解键)

[0123] 因给药位点处或期望释放的位置(例如肿瘤或感染区域)处的特征所致,可以存在刺激唤起性释放(Stimuli evoking release)。这些可以是存在于血液或血清中的条件,或存在于细胞、组织或器官内部或外部的条件。这些的特征在于低pH值和存在降解酶。凝胶组合物可以被设计成仅在存在于细胞、组织或器官的疾病病况(例如发炎)中的条件下拆解,由此允许药剂在目标组织和/或器官处释放。这是凝胶溶蚀介导和被动扩散介导的药剂释放的替代方案或可以与其组合使用。

[0124] 此反应性释放是基于由可降解化学键(或官能团)和/或可调节的非共价缔合力(例如静电力、范德华力或氢键结力)形成的键。在一些实施例中,这些键是(1)在两亲胶凝剂的亲水性链段与疏水性链段之间的可降解共价键,(2)定位于在裂解后释放活性药物的前药型胶凝剂中,和/或(3)在胶凝剂与治疗剂之间的共价键非共价缔合力。这些键的裂解或解离引起(1)被囊封或包埋的药剂的释放比被动扩散介导的药剂释放更快速或更大;和/或(2)将前药胶凝剂转化成用于释放的活性药物。

[0125] 刺激唤起性释放包括体内固有环境和使用者的刺激,例如酶、pH值、氧化、温度、照射、超声波、金属离子、电刺激或电磁刺激。基于涉及酯、酰胺、酸酐、硫酯和/或氨基甲酸酯的化学键,典型的反应性键可通过酶和/或水解裂解。在一些实施例中,基于磷酸酯的键可以由磷酸酶或酯酶裂解。在一些实施例中,不稳定的键可氧化还原裂解,并且在还原或氧化后裂解(例如-S-S-)。在一些实施例中,可降解键对温度敏感,例如可在高温下裂解,例如可在37°C-100°C、40°C-100°C、45°C-100°C、50°C-100°C、60°C-100°C、70°C-100°C的温度范围内裂解。在一些实施例中,可降解键可以在生理温度(例如,36°C到40°C、约36°C、约37°C、约38°C、约39°C、约40°C)下裂解。举例来说,键可以通过温度增加来裂解。这可以允许使用较低剂量,这是因为药剂仅在所需位点处进行释放。另一个益处是降低对其它器官和组织的毒性。在某些实施例中,刺激可以是超声波、温度、pH值、金属离子、光、电刺激、电磁刺激以及其组合。

[0126] 凝胶组合物可以被设计成用于基于在给药位点处的条件,在位点处或在一段时间之后受控降解。与溶液中的游离药剂相比,被囊封的药剂从自组装凝胶中释放慢得多,例如

在前三天释放少于30%的被囊封的药剂并且在七天内释放少于70%。在刺激物(如酶)存在下,由胶凝剂形成的具有酶可降解的键的自组装凝胶比处于不具有酶的介质中的凝胶更快地释放药剂。

[0127] 在其它实施例中,自组装凝胶充当粘附支架,并且在结缔组织位点中维持至少3天、5天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月或更长时间,以用于通过允许内源性或外源性细胞在其中生长和增殖来使受伤的软骨愈合。降解可以与新组织(例如软骨)的生长相对应。自组装凝胶组合物降解的速率在初始形成阶段期间基本上维持结构支撑,并且还允许提供用于新软骨组织持续生长的空间。

[0128] 释放

[0129] 当应用于生物系统中时,自组装凝胶组合物可以提供药剂的受控释放。凝胶组合物可以被适配成可受控地进行拆解。

[0130] 因给药位点处或期望释放的位置处的特征所致,可以存在刺激唤起性释放。

[0131] 在一些实施例中,自组装凝胶组合物在给药后至少3天、5天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月或更长时间内在结缔组织中释放治疗剂。

[0132] 6. 调配物

[0133] 与结缔组织亲和的自组装凝胶组合物可以以干粉调配物或液体调配物形式进行制备。

[0134] 调配物一般是经过灭菌或无菌的。举例来说,无菌调配物可以通过以下来制备:首先对胶凝剂、阳离子试剂以及待囊封的药剂执行无菌过滤,后接在无菌环境中制造的方法。替代性地,所有加工步骤都可以在非无菌条件下执行,并且接着可以是对所形成的粒子或冻干产品应用终末灭菌(例如 γ 或E束照射)。

[0135] 干调配物含有冻干的自组装凝胶组合物,其中去除溶剂,得到干凝胶。干凝胶可以呈粉末形式,其可以适用于在储存期间维持药剂无菌性和活性并且适用于加工成所期望的形式。由于干凝胶无溶剂,故其存放期可以得到改善并且可以相对容易地进行运输和储存。为了使自组装凝胶冻干,可以在一段时间内对凝胶进行冷冻(例如在 -80°C 下)和真空干燥以提供干凝胶。

[0136] 替代性地,干调配物含有胶凝剂、阳离子试剂、一种或多种治疗剂的干粉组分,该等组分储存在单独容器中或以特定比率混合并储存。在一些实施例中,合适的水性和有机溶剂包括于额外容器中。在一些实施例中,干粉组分、一种或多种溶剂和关于混合并制备已组装纳米结构的程序的说明书包括于试剂盒中。

[0137] 液体调配物含有悬浮于液体药物载剂中的自组装凝胶组合物。在一些形式中,将自组装凝胶悬浮或再悬浮于水性介质中以易于给药和/或达到所期望的浓度使毒性减到最小。

[0138] 合适的液体载剂包括但不限于蒸馏水、去离子水、纯水或超纯水、盐水以及含有盐和/或缓冲剂的其它生理学上可接受的水溶液,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)、林格氏溶液(Ringer's solution)和等张氯化钠,或可接受用于向动物或人类给予的任何其它水溶液。液体配制物可以是相对于体液等张的并且具有大致相同的pH值,在约pH 4.0到约pH 8.0范围内,更优选地在约pH 6.0到pH 7.6范围内。液体药物载剂可以包括一种或多种生理学上相容的缓冲剂,如磷酸盐或碳酸氢盐缓冲剂。本领域的技术人员可以容易地确定适合于预

期给药途径的水溶液的合适盐水内含物和pH。

[0139] 液体调配物可以包括一种或多种悬浮剂,如纤维素衍生物、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶或卵磷脂。液体调配物一种或多种防腐剂,如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯。

[0140] III. 制造方法

[0141] 一般来说,制造自组装凝胶组合物的方法包括组合胶凝剂、阳离子试剂、治疗剂和溶剂以形成混合物;加热或超声处理该混合物;搅拌或振摇该混合物持续足以形成均匀溶液的时间;以及使该均匀溶液冷却持续足以使得能够形成自组装凝胶组合物的时间。

[0142] 取决于胶凝剂、阳离子试剂、和/或药剂在有机相中的溶解性,可以使用有机溶剂(例如DMSO、甲醇、异丙醇)来溶解和混合胶凝剂、阳离子试剂、和/或药剂。添加水或盐的水溶液以引入水组分。可以对混合物进行加热和/或超声处理和/或将其放置于浴液中以使胶凝剂、药物和任何其它固体成分完全溶解以形成均匀溶液,并且接着使溶液在受控条件(例如温度受控容器或水浴)下冷却和/或在不受干扰的位置静置。在给定时间段后,溶液可以转变成粘稠凝胶。当在将容器于室温下倒置持续至少10秒后未观察到重力流动,并且在一些情况下,倒置持续约1天、3天、1周、2周或更长时间内未观察到重力流动时,胶凝视为完全。不同于本身为胶凝区域(不可流动)与非胶凝液体区域(可流动)混合物的不均匀材料,自组装凝胶是均匀的并且针对倒置稳定。

[0143] 可以经由真空、冻干、离心、洗涤、透析等在一个或多个重复过程中基本上去除自组装水凝胶中的有机溶剂,以使有机溶剂的残余量减少到低于药品产品要求的规定限度。

[0144] 可以制备无菌可注射溶液。举例来说,无菌调配物可以通过以下来进行制备:首先对方法溶液(例如药物和胶凝剂溶液)执行无菌过滤,后接在无菌处理条件下进行凝胶制备、悬浮、纯化和冻干。替代性地,所有加工步骤都可以在非无菌条件下执行,并且接着可以是对冻干的水凝胶产品应用终末灭菌(例如 γ 或E束照射)。用于再悬浮的无菌溶液也可以使用相似方法来进行制备。

[0145] 在一些实施例中,将自组装凝胶进一步加工成易于给药或用于其它目的的粒子。可以将凝胶组合物悬浮于水溶液中,均匀化,分离或组合。在一些形式中,将块体凝胶悬浮于水和/或具有生理学盐浓度的磷酸盐缓冲盐水中,并且进行均匀化或超声处理以将块体凝胶粉碎成保留该块体凝胶中所形成纤维状纳米结构的粒子。

[0146] IV. 使用方法

[0147] 可以使用自组装凝胶组合物作为润滑以预防和/或修复软骨损伤。

[0148] 自组装凝胶组合物可以提供用于软骨细胞生长和增殖的生物相容性支架,由此促进受损软骨的愈合。

[0149] 自组装凝胶组合物可以在结缔组织处结合、粘附或优先积聚以用于治疗剂受控释放。结缔组织包括身体中的软骨、肌腱、韧带和其它无血管组织,以及其前体,如软骨细胞。应理解,组合物可以不仅施用到软骨和其它分化的无血管组织中,而且施用到将分化成或成熟为结缔组织的组织中。调配物还可以施用到调配物由于包括阳离子型化合物而类似地粘附的其它组织中。

[0150] 自组装凝胶组合物可以在自体软骨细胞植入程序中递送软骨细胞;递送用于软骨再生的干细胞并使其分化;或两者,任选地与递送活性剂混合液同时递送。

[0151] 一般来说,提供给软骨的可注射粘附性凝胶组合物可以补充或替换软骨修复用外科手术程序,该补充或替换通过改善治疗功效并减少与外科手术程序相关联的并发症或负面后遗症来进行。

[0152] 在一些形式中,自组装凝胶组合物用于在受试者中治疗和/或修复软骨组织,其通过以药学上可接受的形式向受试者给予有效量的该自组装凝胶组合物来进行,其中该自组装凝胶组合物有效用于支持、促进和/或增强软骨的生长、再生和/或修复。

[0153] 在一些形式中,自组装凝胶组合物用于在受试者中治疗和/或修复软骨组织的方法中,其通过向受试者给予有效量的该自组装凝胶组合物来进行,其中在给药之前或之后将软骨细胞、祖细胞或干细胞接种到该自组装凝胶组合物上。

[0154] 在一些形式中,提供一种治疗关节炎的方法,其通过向受试者给予有效量的有效用于缓解或减轻受试者关节炎症状的自组装凝胶组合物来进行,

[0155] 将通过参考以下非限制性实例进一步理解本发明。

[0156] 实例

[0157] 实例1:棕榈酸抗坏血酸酯(AP)和1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)共同自组装成纳米结构凝胶,该凝胶与软骨的粘附性增强并且反应性释放被囊封的药剂

[0158] 材料和方法

[0159] 将GRAS两亲物(80mg)(此处在这一实例中是棕榈酸抗坏血酸酯)和DOTAP(20mg)称量到闪烁瓶中。DOTAP是指硫酸甲酯N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵。在1mL水-DMSO(4:1体积比)存在下加热混合物,直到其溶解为止。使溶液在平坦并稳定的表面上冷却到室温。

[0160] 当在将小瓶倒置后未观察到重力流动时,胶凝完全。胶凝可能耗时介于15与45分钟之间。

[0161] 为了制备用于粘附性实验的凝胶,将荧光染料亲脂性羧花青DiOC18(7) (“DiR”)囊封在该凝胶内。具体来说,在凝胶制备方法期间添加40 μ l DiR于DMSO中的溶液(2.5mg/ml)。

[0162] 对于负载有DiR的水凝胶与软骨的粘附性分析,将50 μ L水凝胶施用到牛软骨外植体(直径为6mm)中,并且在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。在1小时之后,用PBS洗涤软骨外植体两次,并且使用体内成像系统(in vivo imaging system,IVIS)来进行成像。

[0163] 评估含有和不含DOTAP的水凝胶两者。使用与上文所描述相似的方法,在不使用DOTAP的情况下制备不含DOTAP的水凝胶,并且使用100mg GRAS两亲物。使用未经处理的软骨(空白对照物)和用游离染料处理的软骨作为对照物。

[0164] 结果

[0165] 由在棕榈酸抗坏血酸酯与DOTAP之间的共同组装制备凝胶;标示为AP-DOTAP凝胶。使用扫描电子显微镜检查(scanning electron microscopy,SEM)来表征凝胶形态,并且发现凝胶形态是纳米纤维。凝胶展示 ζ 电位值超过+45mV的高表面正电荷。

[0166] 图1展示带正电的凝胶(AP-DOTAP凝胶)优先并快速地与软骨外植体粘附,这展示用于将被囊封的药剂在其关节内给药后特异性递送到软骨中的可能性。AP-DOTAP凝胶展示与软骨的粘附性比仅含AP的凝胶高,这指示由于添加DOTAP和与DOTAP共同组装,对软骨的特异性改善。用软骨素酶ABC对软骨进行预处理持续24小时以降低葡糖胺聚糖(glycosaminoglycan,GAG)的百分比引起AP-DOTAP凝胶的粘附性降低,指示AP-DOTAP凝胶

对软骨的特异性由其与软骨中GAG的相互作用介导。

[0167] 图2和3展示在类似正常生理学的条件下(在磷酸盐缓冲盐水, PBS中), AP-DOTAP凝胶分别稳定囊封CL-82198(一种MMP-13抑制剂)和LL-006235(一种组织蛋白酶-k抑制剂)持续至少30天。这一带正电的AP-DOTAP水凝胶展示被囊封的治疗剂响应于在关节发炎期间上调的酶(包括酯酶和MMP)而释放(图2和3)。

[0168] 图4和5展示与响应于来自正常人类(正常)的滑液的释放相比,在响应于来自骨关节炎(OA)患者的滑液的情况下,AP-DOTAP凝胶对分别被囊封的CL-82198和L-006235的释放明显较高。

[0169] 图6和7展示AP-DOTAP凝胶分别与来自正常供体的软骨细胞和来自OA阳性供体的软骨细胞具有细胞相容性,这被认为展示该凝胶的关节内给药将不引起对健康或患病软骨的不利作用。这些所测试的软骨细胞来源于来自相应人类受试者的膝部的软骨。

[0170] 实例2: 负载有组织蛋白酶-k抑制剂的AP-DOTAP共同组装凝胶在大鼠骨关节炎模型中预防软骨退化

[0171] 方法

[0172] 在于路易斯大鼠中研发的骨关节炎内侧半月板撕裂模型中评估负载有L-006235的AP-DOTAP水凝胶的治疗功效。在第0天,在所有大鼠的右膝部执行内侧半月板撕裂手术。在手术后七天时,将大鼠随机分入两组,即,第1组:用负载有Cat-K抑制剂(L-006235)的水凝胶处理,和第2组:未经处理的疾病对照组。在关节内以10mg/mL注射两个剂量的负载有Cat-K抑制剂(L-006235)的AP-DOTAP凝胶(10%w/w),一次在第7天并且一次在第14天。在第21天杀死动物用于组织学分析。

[0173] 结果

[0174] 图8展示在内侧半月板撕裂后第21天,与疾病对照组中的大鼠相比,用递送组织蛋白酶-k抑制剂的AP-DOTAP凝胶进行给药的大鼠中的退化低得多。

[0175] 实例3: 与仅含单独GRAS两亲物的凝胶相比,在其它GRAS两亲物(除棕榈酸抗坏血酸酯以外)与DOTAP之间共同组装的凝胶增强与软骨的粘附性

[0176] 材料和方法

[0177] 在这一实例中的GRAS两亲物包括三甘油单硬脂酸酯(TG18)、蔗糖棕榈酸酯(SP)和蔗糖硬脂酸酯(SS)。这些两亲物个别地与DOTAP共同组装,分别形成TG18-DOTAP凝胶、SP-DOTAP凝胶和SS-DOTAP凝胶。每种组分的量如实例1中所描述。因此,80mg两亲胶凝剂和20mg DOTAP,因此20% (w/w) DOTAP处于固体组分的组合量中;在1mL液体介质中形成凝胶,因此100mg固体质量在1mL液体介质中产生10w/v%凝胶。

[0178] 对于粘附性分析,制备负载有荧光染料(DiR)的10% (w/v)凝胶。将50 μ l水凝胶施用到每一牛软骨外植体(直径为6mm)中,并且在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。在1小时之后,用PBS洗涤软骨外植体,并且使用体内成像系统(IVIS)来进行成像(n=3)。制备不含DOTAP的水凝胶,其中使用100mg GRAS两亲物而不使用DOTAP。使用未经处理的软骨(空白对照物)和用游离染料处理的软骨作为对照物。

[0179] 结果

[0180] 图9展示,与仅含单独三甘油单硬脂酸酯(TG18)的凝胶相比,DOTAP与TG18的共同自组装引起与软骨的粘附性明显增加。

[0181] 图10展示与仅含单独蔗糖棕榈酸酯 (SP) 的凝胶相比, DOTAP与SP的共同自组装引起与软骨的粘附性显著增加。

[0182] 图11展示DOTAP与蔗糖硬脂酸酯 (SS) 的共同自组装引起与软骨的粘附性明显增加。

[0183] 表1概述在实例1和这一实例中的资料, SP-DOTAP凝胶在四种类型的凝胶当中展示最大软骨粘附性: 该四种类型的凝胶即, AP-DOTAP、TG18-DOTAP、SS-DOTAP和SP-DOTAP。在使用SP-DOTAP的情况下所见的较高粘附性可以归因于SP比其它GRAS两亲物更具亲水性。

[0184] 表1. 在与GRAS两亲物与DOTAP之间的共同自组装凝胶一起培育之后, 比较GRAS两亲物的亲水性和软骨表面的平均辐射强度

| [0185] | GRAS两亲物 | LogP | 软骨表面的平均辐射强度 ($\times 10^{10}$) |
|--------|---------|-------|----------------------------------|
| | SP | 0.64 | 3.05 |
| | SS | 1.416 | 0.61 |
| | TG18 | 3.899 | 0.57 |
| | AP | 4.62 | 0.39 |

[0186] (log P是分子在水相与亲脂相(通常为辛醇与水)之间的分配系数;常用作化合物亲脂性的度量。)

[0187] 实例4: 并入DOTAP并不影响被囊封的药物在自组装水凝胶中的稳定性

[0188] 方法

[0189] 分析SP-DOTAP凝胶保留以10% (w/w) 负载的被囊封的组织蛋白酶-K抑制剂L-006235的能力。在PBS中于37°C下评估L-006235从仅含SP的水凝胶和SP-DOTAP水凝胶中的体外释放。将进一步悬浮于PBS (800 μ l) 中的负载有药物的水凝胶 (200 μ L, 每毫升10mg药物) 放置在透析管 (8-10kD分子量截止值, 仕必纯公司 (Spectrum Labs)) 中。将用含有水凝胶的悬浮液介质填充的透析袋放置在40mL槽介质 (PBS) 中, 并且在37°C下以150rpm振摇速度培育。在每一时间点, 从槽介质中取出等分试样 (1ml), 并且用相同体积的新鲜PBS补充以确保恒定槽条件。将等分试样冻干并溶解于250 μ L甲醇中, 后对接药物量进行高效液相色谱法 (HPLC) 分析。

[0190] 结果

[0191] 在PBS中于37°C下的体外释放研究展示, 在7天内, 组织蛋白酶-K抑制剂 (L-006235) 的累积释放少于10%。L-006235是改善疾病的骨关节炎药物 (disease modifying osteoarthritis drug, DMOAD)。

[0192] 图12展示, 在30天研究中, SP和SP-DOTAP凝胶展示L-006235累积释放少于20%并且释放动力学相似, 其指示将DOTAP并入到水凝胶中不影响被囊封的药物的稳定性。

[0193] 实例5: DOTAP相对于两亲物胶凝剂的相对量对DOTAP-蔗糖棕榈酸酯共同自组装凝胶的软骨粘附能力以及进入软骨的渗透性的影响

[0194] 方法

[0195] 如实例3中所描述, 使用不同DOTAP浓度制备负载有DiR的SP-DOTAP水凝胶。具体来说, 胶凝剂混合物 (即, DOTAP和SP的组合) 中的DOTAP浓度在5%-20% (w/w) 之间变化。使用负载有DiR的使用100mg SP制备的SP水凝胶作为对照物。也使用未经处理的软骨 (空白对照物) 和用游离染料处理的软骨作为对照物。使用如实例1和3中所描述的方法测试粘附性。

[0196] 为了确定凝胶进入软骨中的渗透性,分析其中以胶凝剂混合物(即, DOTAP和SP的组合)的15% (w/w) 包括DOTAP的SP-DOTAP凝胶。将50 μ L仅含SP的水凝胶或SP-DOTAP水凝胶施用到牛软骨外植体(直径为6mm)中,并且在37 $^{\circ}$ C下培育24小时。在24小时之后,用PBS洗涤软骨外植体两次,并且使用刷子刮去软骨表面以去除表面粘附的水凝胶。使用体内成像系统 (IVIS) 使软骨外植体成像。使用未经处理的软骨(空白对照物) 和用游离染料处理的软骨作为对照物。

[0197] 结果

[0198] 图13展示,达成软骨粘附性需要胶凝剂混合物中的DOTAP大于10% (w/w), 即, DOTAP与蔗糖棕榈酸酯的质量比大于1:9。

[0199] 图14展示,与仅含SP的水凝胶相比,向SP水凝胶中添加DOTAP引起软骨渗透性明显增加。

[0200] 实例6: DOTMA与GRAS两亲物共同自组装以制备靶向软骨的水凝胶

[0201] (DOTMA:1,2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(氯化物盐))

[0202] 方法

[0203] 将GRAS两亲物(80mg) 和DOTAP(20mg) 称量到闪烁瓶中。在这一实例中的GRAS两亲物包括三甘油单硬脂酸酯(TG18) 或蔗糖棕榈酸酯(SP)。在1ml水-DMSO(4:1体积比)存在下加热混合物,直到其溶解为止。使溶液在平坦并稳定的表面上冷却到室温。当在将小瓶倒置后未观察到重力流动时,胶凝完全。对于所有GRAS两亲物-DOTMA组合和所需15-45分钟,都观察到胶凝。为了制备用于粘附性实验的凝胶,将荧光染料DiR囊封在该凝胶内。具体来说,在凝胶制备方法期间添加40 μ l DiR于DMSO中的溶液(2.5mg/ml)。

[0204] 对于粘附性分析,将50 μ l水凝胶施用到牛软骨外植体(直径为6mm)中,并且在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。在1小时之后,用PBS洗涤软骨外植体两次,并且使用体内成像系统(IVIS)来进行成像。评估含有或不含DOTMA的水凝胶。使用相似方法,使用100mg GRAS两亲物而不使用DOTMA来制备不含DOTMA的水凝胶。使用未经处理的软骨(空白对照物) 和用游离染料处理的软骨作为对照物。

[0205] 结果

[0206] 图15展示,与仅含TG18的水凝胶相比, DOTMA与TG18共同自组装引起与软骨的粘附性显著增加。

[0207] 图16展示,与仅含SP的水凝胶相比, DOTMA与SP的共同自组装引起与软骨的粘附性显著增加。

[0208] SP-DOTMA展示软骨粘附性比TG18-DOTMA更高(表2)。在SP-DOTMA中所见的与软骨的粘附性比TG18-DOTMA更高可能是由于SP的亲水性比TG18更大。如实例3中所示,使用包括DOTAP的凝胶观察到相似倾向。

[0209] 表2. 在与GRAS两亲物与DOTMA之间的共同自组装凝胶一起培育之后,比较GRAS两亲物的亲水性和软骨表面的平均辐射强度

[0210]

| GRAS两亲物 | LogP | 软骨表面的平均辐射强度($\times 10^{10}$) |
|---------|-------|---------------------------------|
| SP | 0.64 | 2.34 |
| TG18 | 3.899 | 0.69 |

[0211] 实例7. 在蔗糖棕榈酸酯凝胶上包覆低分子量壳聚糖(一种阳离子多糖)赋予与软

骨的粘附能力

[0212] 方法

[0213] 将100mg蔗糖棕榈酸酯(SP)称量到闪烁瓶中。壳聚糖溶解于含有1%乙酸的水中。制备含有不同浓度壳聚糖(1mg/ml、0.5mg/ml和0.1mg/ml)的溶液。在1mL壳聚糖溶液-DMSO(4:1体积比)存在下加热SP,直到溶解为止;由此形成最终/总体壳聚糖浓度分别为0.8mg/mL、0.4mg/mL和0.08mg/mL。使溶液在平坦并稳定的表面上冷却到室温。

[0214] 当在将小瓶倒置后未观察到重力流动时,胶凝完全,并且一般需要15-45分钟。

[0215] 为了制备用于粘附性实验的凝胶,将荧光染料DiR囊封在该凝胶内。具体来说,在凝胶制备方法期间添加40 μ l DiR于DMSO中的溶液(2.5mg/ml)。

[0216] 使用不同壳聚糖溶液的凝胶称为:SP-壳聚糖(0.8mg/ml)、SP-壳聚糖(0.4mg/ml)和SP-壳聚糖(0.08mg/ml)。该浓度是指壳聚糖在凝胶中的最终浓度。

[0217] 对于粘附性分析,将50 μ l SP凝胶或SP-壳聚糖凝胶施用到牛软骨外植体(直径为6mm)中,并且在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。在1小时之后,用PBS洗涤软骨外植体两次,并且使用体内成像系统(IVIS)来进行成像。评估含有或不含壳聚糖的水凝胶。使用未经处理的软骨(空白对照物)和用游离染料处理的软骨作为对照物。

[0218] 结果

[0219] 图17展示,与仅含SP的水凝胶相比,向SP水凝胶中添加壳聚糖引起与软骨的粘附性明显增加。软骨靶向需要蔗糖棕榈酸酯凝胶中的壳聚糖大于0.08mg/ml。

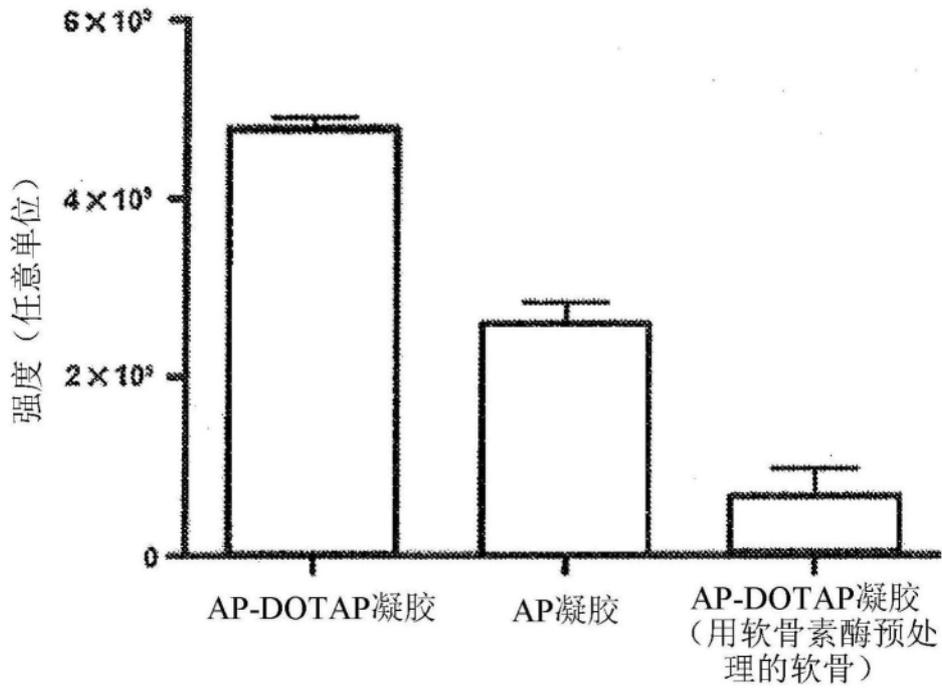


图1

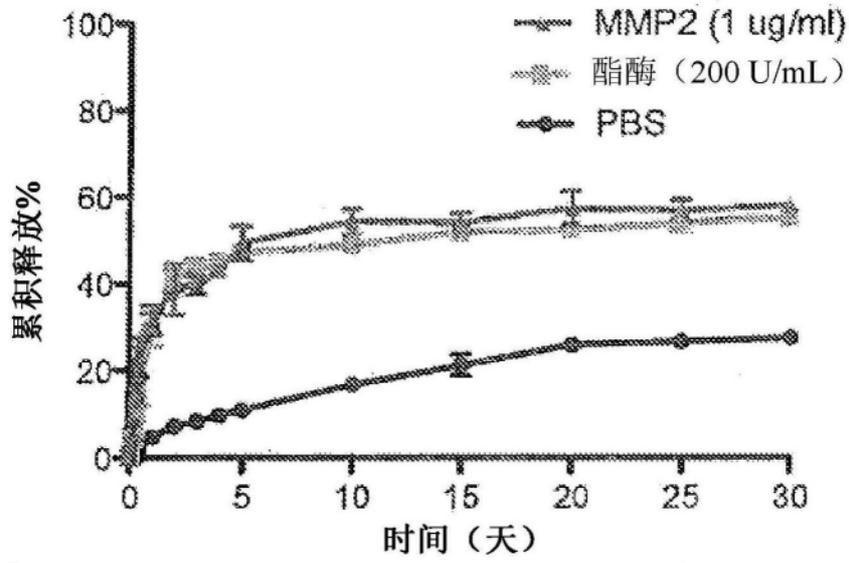


图2

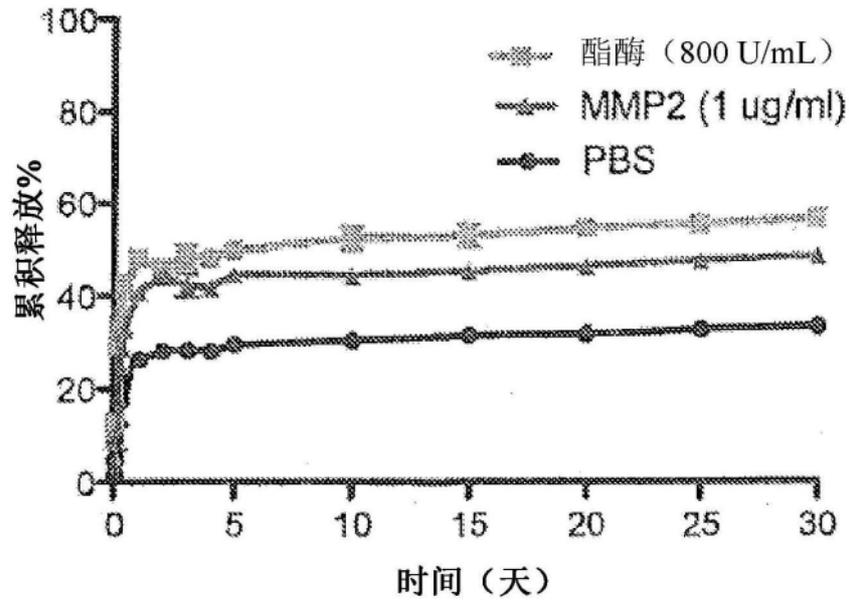


图3

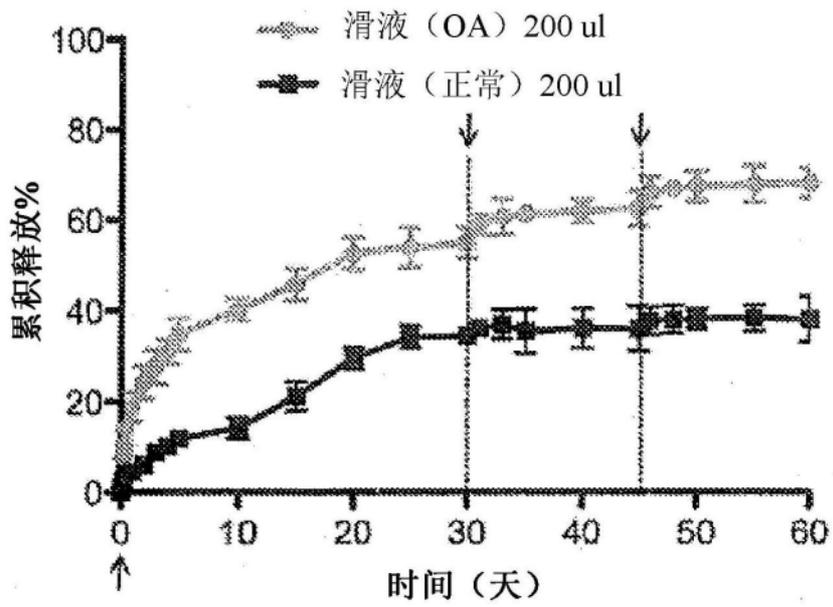


图4

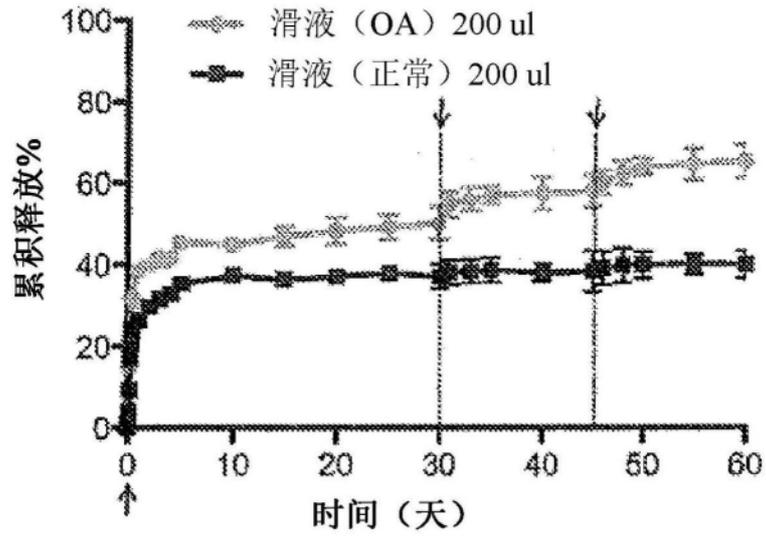


图5

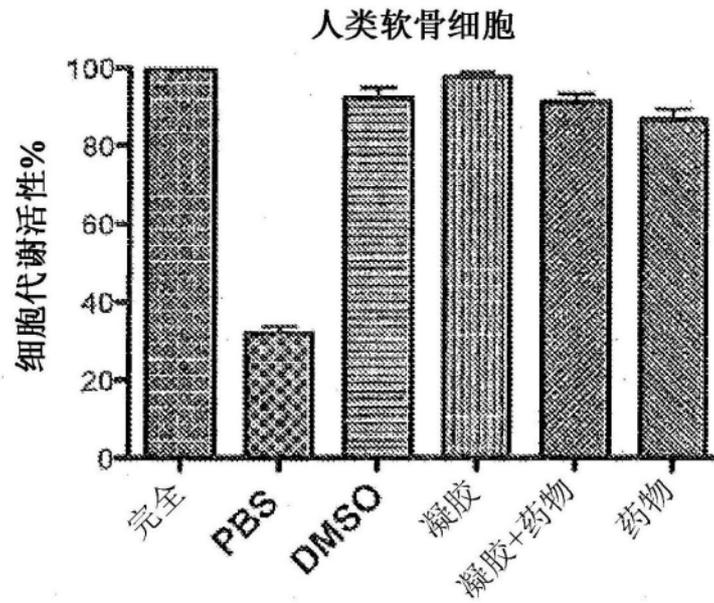


图6

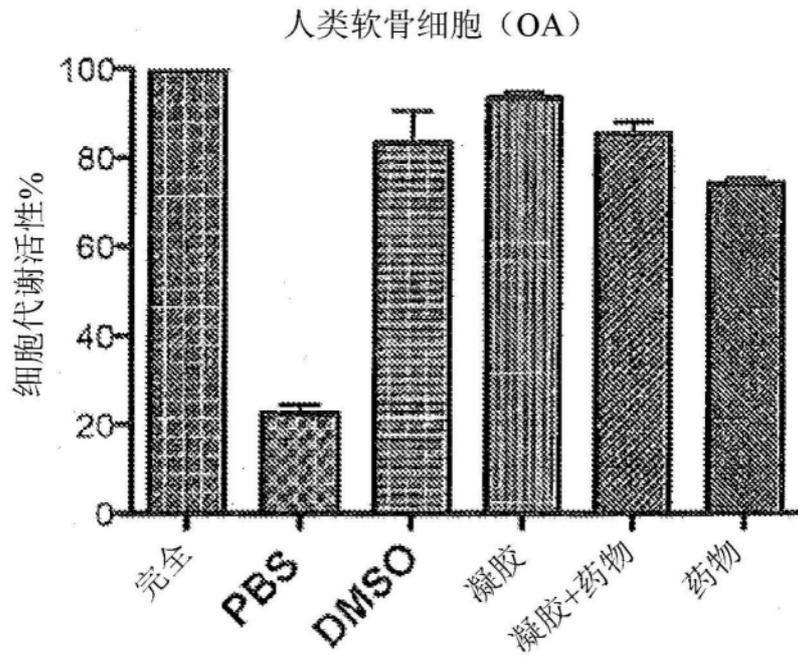


图7

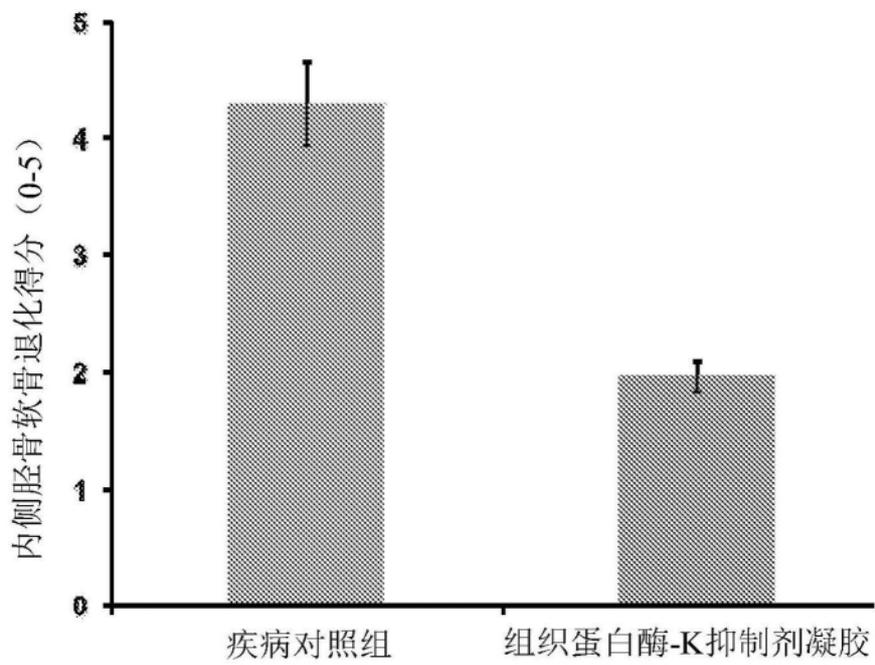


图8

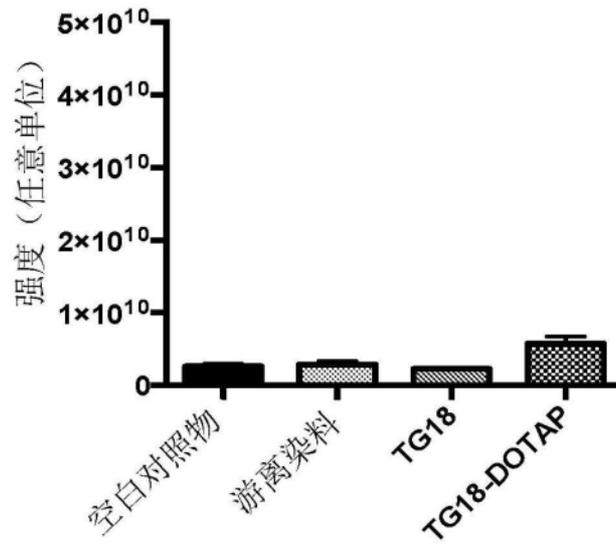


图9

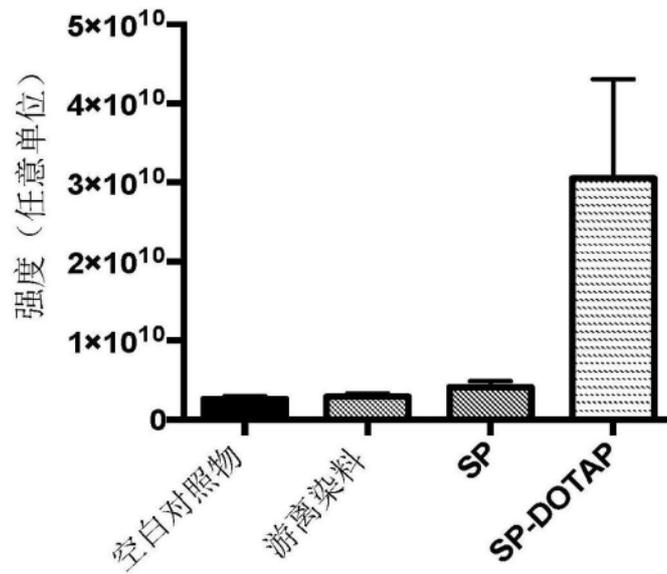


图10

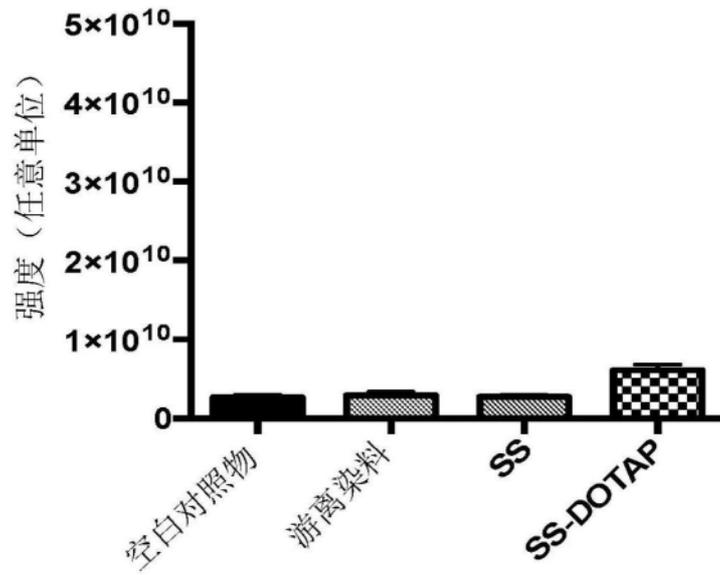


图11

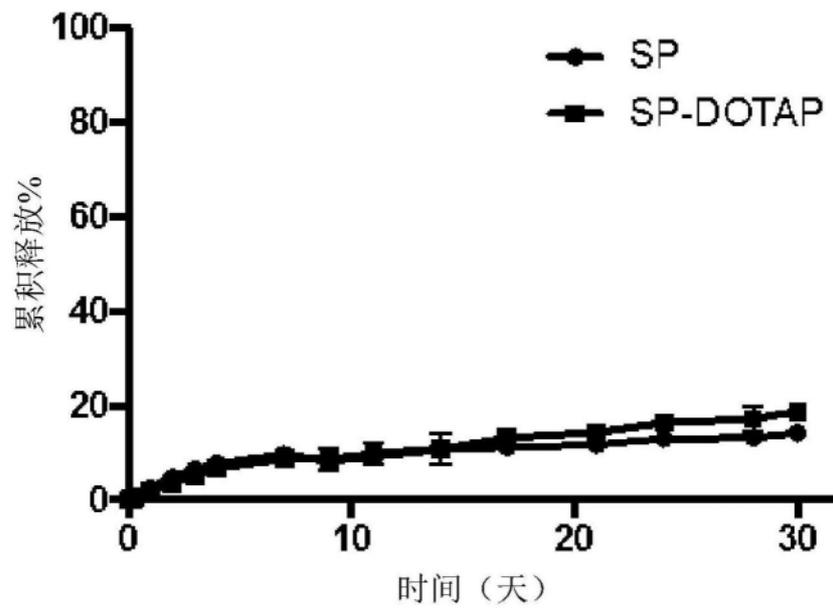


图12

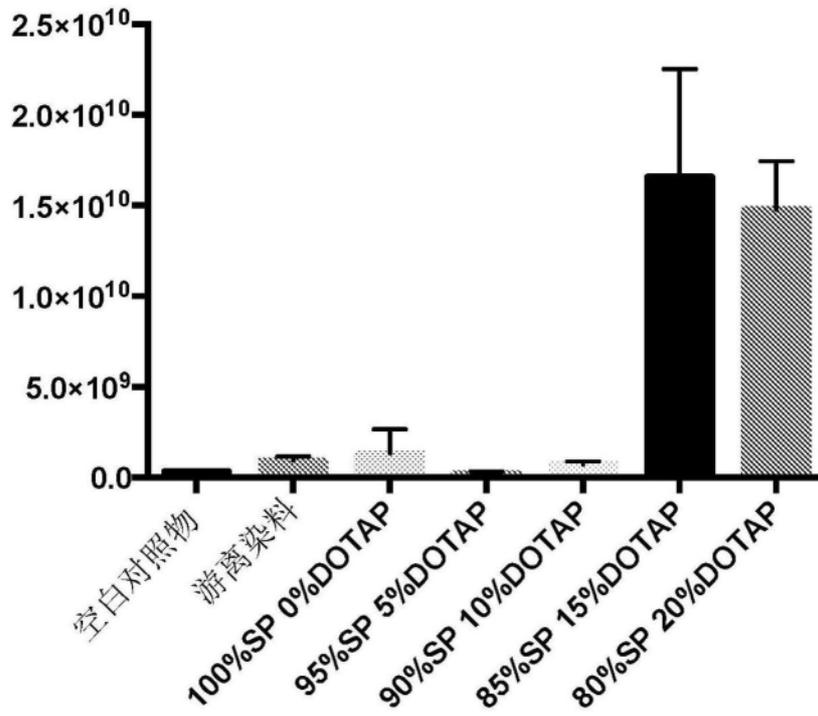


图13

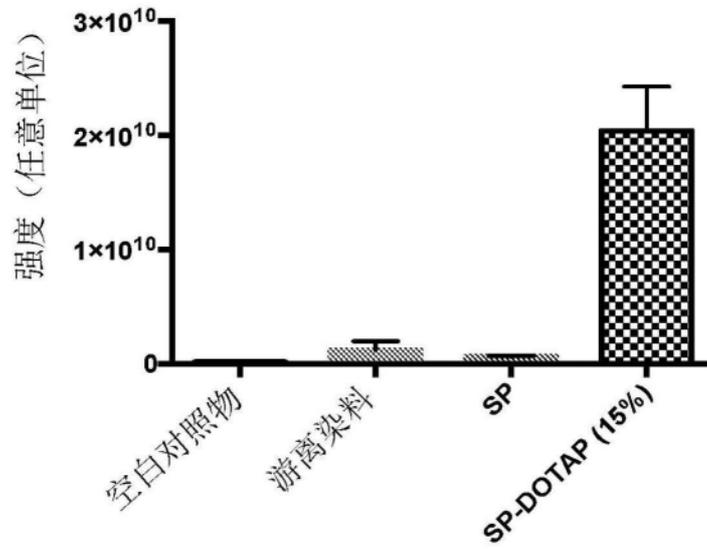


图14

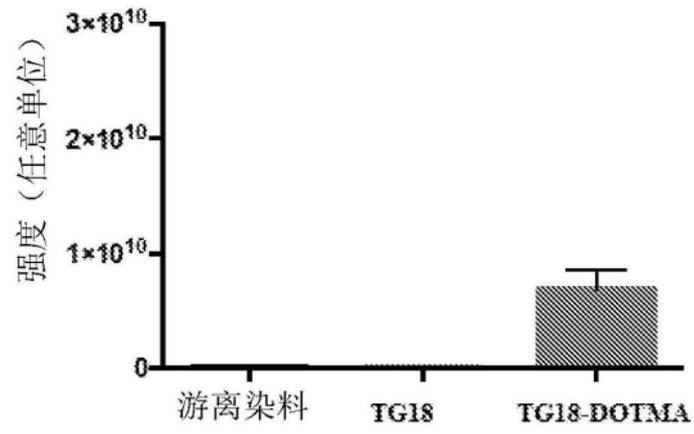


图15

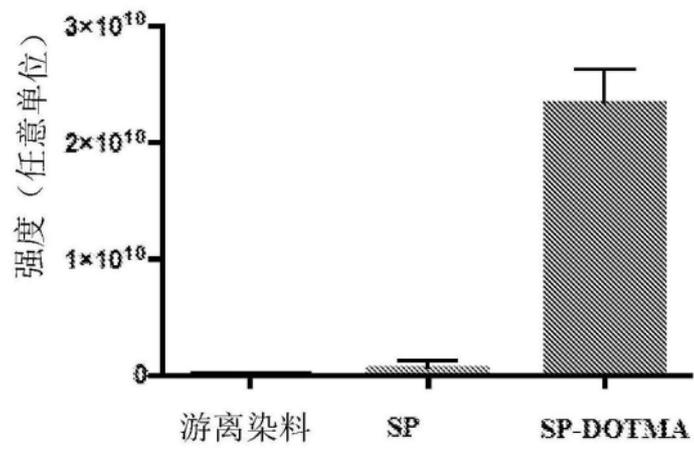


图16

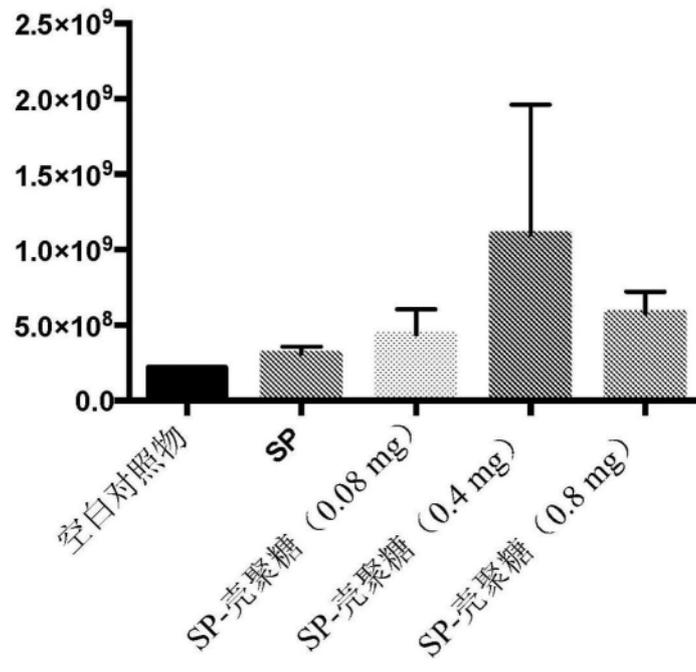


图17