



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118019520 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 10

(21) 申请号 202280065207.X

(22) 申请日 2022.07.27

(30) 优先权数据

17/390,809 2021.07.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2022/050788 2022.07.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/004456 EN 2023.02.02

(71) 申请人 组织修复有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

(72) 发明人 A·查拉拉 M·D·肖

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

专利代理师 杨巍 柴春玲

(51) Int.Cl.

A61K 8/9728 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 36/064 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

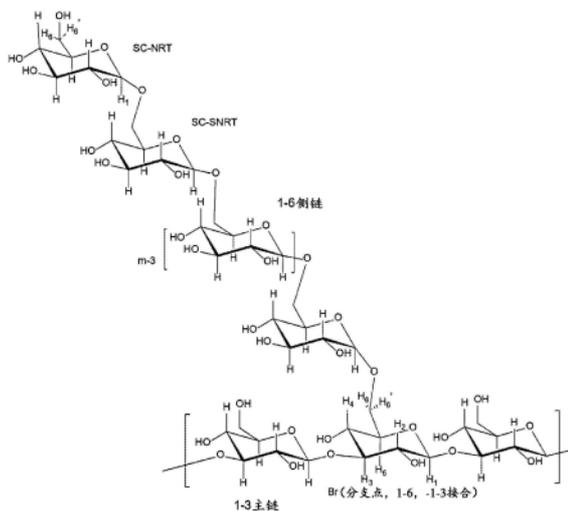
权利要求书3页 说明书26页 附图15页

(54) 发明名称

分离的多糖化合物及其使用和制备的方法

(57) 摘要

本发明描述了一种分离的生物多糖化合物。该生物多糖化合物的特征在于为被分离并具有：糖基连接，所述糖基连接包含65重量%至95重量%的1:3连接的吡喃葡萄糖基残基和5重量%至25重量%的1:6连接的吡喃葡萄糖基残基；和纯度为85%至100%的β-葡聚糖；以及0.5MDa至2.2MDa的分子量；以及在人类生物测定中的TNF-α细胞因子反应是在人类生物测定中的阴性对照TNF-α细胞因子反应的至少1.5倍；以及本质上不可溶于水溶液。在至少一个实施方案中，描述了通过将包含分离的生物多糖的载体局部施用至皮肤部位如伤口或烧伤来治疗皮肤的方法。还描述了一种制备方法。



1. 一种分离的生物多糖化合物,包含:
糖基连接,所述糖基连接包含65重量%至95重量%的1:3连接的吡喃葡萄糖基残基和5重量%至25重量%的1:6连接的吡喃葡萄糖基残基;和
纯度为85%至100%的 β -葡聚糖;以及
分子量为0.5MDa至2.2MDa;以及
人类生物测定中的TNF- α 细胞因子反应是人类生物测定中的阴性对照TNF- α 细胞因子反应的至少1.5倍;以及
本质上不可溶于水溶液。
2. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述分离的生物多糖化合物源自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)种的酵母细胞。
3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中所述分离的生物多糖化合物的特征还在于所述化合物包含选自以下一种或多种的额外侧链:
1:4连接的吡喃葡萄糖基残基;
3:4连接的吡喃葡萄糖基残基;
2:3连接的吡喃葡萄糖基残基;
3:6连接的吡喃葡萄糖基残基;
2:6和4:6连接的吡喃葡萄糖基残基;
3:4:6连接的吡喃葡萄糖基残基;和/或
末端连接的吡喃葡萄糖基残基。
4. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中所述分离的生物多糖化合物的特征还在于所述化合物包含额外侧链,所述额外侧链包含:
2%至6%的1:4连接的吡喃葡萄糖基残基;
0.01%至0.5%的3:4连接的吡喃葡萄糖基残基;
0.5%至4%的2:3连接的吡喃葡萄糖基残基;
3%至10%的3:6连接的吡喃葡萄糖基残基;
0.2%至1%的2:6和4:6连接的吡喃葡萄糖基残基;
0.01%至0.5%的3:4:6连接的吡喃葡萄糖基残基;和
2%至8%的末端连接的吡喃葡萄糖基残基。
5. 一种通过将载体局部施用至伤口部位来治疗有需要的患者的皮肤的方法,所述载体包含治疗有效量的如上述权利要求中任一项所述的分离的生物多糖化合物。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述载体是凝胶组合物。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述凝胶是水性凝胶,并且所述分离的生物多糖呈微粒形式并且悬浮在所述凝胶中。
8. 根据权利要求5至7中任一项所述的方法,其中所述载体包含0.05重量%至1.5重量%的分离的生物多糖化合物。
9. 根据权利要求5至8中任一项所述的方法,其中将所述载体局部施用于慢性伤口。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述慢性伤口是溃疡。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述溃疡是静脉性腿部溃疡。
12. 根据权利要求5至8中任一项所述的方法,其中所述载体局部用作美容性皮肤治疗。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述载体用于改善愈合的皮肤弹性和皱纹。
14. 根据权利要求5至8中任一项所述的方法,其中所述载体用于点阵消融皮肤表面重建和/或完全消融皮肤表面重建后的皮肤治疗。
15. 根据权利要求5至8中任一项所述的方法,其中所述载体用作辅助的术后局部施用凝胶以加速皮肤质量受益。
16. 一种制备根据权利要求1至5中任一项所述的分离的生物多糖化合物的方法,所述方法包括:
 - 选择酵母细胞;
 - 裂解所述细胞并收集细胞壁碎片;
 - 酸化加热的所述细胞壁碎片以去除甘露聚糖和甲壳质;
 - 用溶剂进行相分离以去除额外的甘露聚糖和额外的甲壳质以及蛋白质、糖原和脂质;
 - 通过煮沸和干燥分离溶剂和其他非多糖化合物;以及
 - 在裂解之后且在酸化之前进行至少一次水洗步骤。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述方法还包括在所述酸化之后且在所述相分离之前的至少一次水洗。
18. 根据权利要求16或17所述的方法,其中,在酸化之后且在所述相分离之前,改变pH并进行醇洗涤。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中将所述pH降低至4.0并进行所述醇洗涤,然后升高至pH9.0并进行所述醇洗涤,然后调节至pH7.0并进行所述醇洗涤。
20. 根据权利要求16至19中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:通过煮沸和干燥分离所述溶剂和所述其他非多糖化合物后,在最终产品再次干燥之前,通过至少一系列额外的溶剂洗、醇洗以及任选的进一步的水洗,以进一步纯化。
21. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中所使用的醇选自一种或多种低级醇。
22. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中所使用的醇选自甲醇、乙醇、丙醇、及其组合。
23. 根据权利要求16至22中任一项所述的方法,其中裂解通过碱处理或热处理或这两种处理进行。
24. 根据权利要求16至23中任一项所述的方法,其中所使用的溶剂是:有机溶剂;和非极性溶剂;且比重大于1.0。
25. 根据权利要求16至23中任一项所述的方法,其中所述溶剂选自:甲基氯仿、氯仿、二氯甲烷、四氯乙烷、四氯化碳、乙酸乙酯、及其组合。
26. 根据权利要求16至25中任一项所述的方法,其中用所述溶剂进行的所述相分离在室温和中性pH下完成。
27. 根据权利要求16至26中任一项所述的方法,其中,在通过煮沸和干燥分离所述溶剂和所述其他非多糖化合物后,在最终产品再次干燥之前,通过至少一系列额外的溶剂洗、醇洗和任选的至少一系列额外的水洗,以进一步纯化所产生的干燥多糖。
28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述至少一系列额外的所述溶剂洗和所述醇洗使用选自甲基氯仿、氯仿、二氯甲烷、四氯乙烷、四氯化碳、乙酸乙酯及其组合的溶剂以及选

自甲醇、乙醇、丙醇及其组合的醇来进行。

29. 根据权利要求27或28所述的方法, 其中使用温度高于50°C的水来完成所述至少一系列额外的所述水洗。

分离的多糖化合物及其使用和制备的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是来自于2021年7月30日提交的美国发明专利申请序列号17/390,809 (WIPO DAS码8235)的PCT专利申请,其说明书通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本文描述了一种分离的生物多糖化合物、其使用方法和制备方法。更具体地,所述多糖可以是高纯度形式的生物衍生多糖,并且使用方法可以与局部皮肤治疗相关。所述制备方法包括对现有技术方法的额外制备步骤,其似乎提供了出乎意料的临床有效的多糖化合物。

背景技术

[0004] 本文描述了多糖化合物和相关方面。为了便于描述,本文所述的多糖源自酵母,因此在下文中可互换地称为生物多糖、生物衍生多糖、葡聚糖或 β -葡聚糖。

[0005] 来自酵母的生物衍生多糖是由糖基连接构成的已知化合物。除其他用途外,它们在促进伤口修复的用途是已知的。非纤维素 β -葡聚糖被认为是有效的免疫激活剂。 β -葡聚糖通常是安全的,并且已知可降低术后感染率。

[0006] 现有技术描述了关于组织修复、皮肤护理和其他用途的发现,其中此类产品中的一种关键化合物是酵母细胞膜产品。现有技术描述了:酵母细胞产品用于治疗皮肤病症的用途;从酵母中制备 β -葡聚糖的工艺;来自酵母的皮肤细胞产品的治疗;使用局部施用的酵母来源的颗粒 β -葡聚糖来恢复皮肤活力;作为凝胶或霜剂的用于局部治疗烧伤的谷物来源的 β -葡聚糖;用冷冻干燥法制备小颗粒葡聚糖;用酶提取 β -葡聚糖的工艺;用载体中的羧甲基 β -葡聚糖治疗经激光或化学换肤治疗后的皮肤;局部施用微粒 β -葡聚糖治疗经激光或化学换肤治疗后的皮肤;具有仅1-3连接和有限的1-6侧链的纯化酵母提取物 β -葡聚糖的效果;和源自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的凝胶葡聚糖产品。

[0007] 他们对 β -葡聚糖结构和其效应谱(effect profile)之间的复杂关系的理解存在缺陷,并且临床转化方法存在异质性,提取和纯化这些剂的方法也存在差异。这些缺陷阻碍了对一种已在双盲随机安慰剂对照试验中成功达到了监管机构设定的临床可接受终点的分子的探索。

[0008] 迄今为止, β -葡聚糖尚未成功获得对于伤口愈合适应症的药物或生物学批准。尽管已有关于该分子用于伤口愈合的现有技术,但在静脉性腿部溃疡或其他慢性伤口的双盲安慰剂对照人体试验中,没有一种含 β -葡聚糖的制剂在监管规定的临床终点附近具有经证明的临床疗效。

[0009] 根据发明人的经验,现有技术没有解决或描述什么分子特征产生临床疗效的证据。例如,现有技术没有描述葡聚糖分支结构应该是什么;分子量应该是多少;理想的纯度和测量的免疫反应应该是什么等等;以在最终产品的一致性和在伤口愈合终点的实际证明的临床疗效两方面都获得监管机构的批准。

[0010] 尽管葡聚糖领域有大量现有技术,但迄今为止还没有葡聚糖被批准达到美国食品药品监督管理局 (FDA) 临床试验的有效终点。然而,仍然需要合法有效的皮肤治疗,并且有效的新治疗具有重要价值。值得注意的是,在过去的30年中,没有药物被批准用于治疗静脉性腿部溃疡,尽管该适应症有大量需求未满足。

[0011] 具体而言,发明人已经确定现有技术没有描述:

[0012] - β -葡聚糖化合物的准确表征和描述,证明其治疗静脉性腿部溃疡和慢性伤口方面具有监管机构设定的金标准伤口愈合终点的临床疗效;

[0013] -对不可溶的酵母(酿酒酵母)来源的 β -葡聚糖进行超出US

[0014] 6,242,594所述的额外加工;

[0015] -比US 6,242,594中描述的更高纯度的 β -葡聚糖化合物;

[0016] -微粒 β -葡聚糖;

[0017] -意想不到的经证实的在治疗美容性皮肤状况和慢性伤口方面的临床疗效;

[0018] -局部施用的微粒生物多糖化合物改善通过弹性和皱纹测量的皮肤质量的用途。

[0019] -生物多糖化合物提供在激光消融激光手术后加速皮肤质量受益的临床证据的用途;

[0020] -生物多糖化合物引发和促进静脉性溃疡愈合的用途;

[0021] -在人类双盲随机安慰剂对照试验中经证实的对伤口愈合的临床疗效;

[0022] -在人类双盲随机安慰剂对照试验中经证实的对通过临床分级的皮肤弹性和皱纹的改善来衡量的促进皮肤质量的临床疗效;

[0023] -该技术还避开了不可溶性生物多糖化合物或不可溶性 β -葡聚糖本身。事实上,该技术表明不可溶性是高度炎性的,并且不应当用于局部伤口/皮肤环境中,因为过度的炎症反应会造成伤害,并且事实上愈合效果更差;

[0024] -与现有技术化合物相比,对于伤口愈合的非常高的免疫反应产生了意想不到的积极效果的证据;

[0025] -一种生物多糖化合物,其在静脉性腿部溃疡适应症和美容方面取得了正面的IIB期数据,达到了FDA和其他监管机构授予治疗标签的可接受终点。

[0026] 从仅以示例方式给出的以下描述中,生物多糖化合物、其使用方法和制备方法的其他方面和优点将变得显而易见。

发明内容

[0027] 本文描述了高纯度形式的、分离的、不可溶的生物衍生多糖化合物。描述了该化合物的使用方法,说明了该化合物的疗效高于预期水平,特别是在局部皮肤治疗中。还描述了一种制备方法,说明了对现有技术方法的替代/额外制备步骤,其似乎提供了意想不到的有效多糖化合物。

[0028] 在第一方面,提供了一种分离的生物多糖化合物,其包含以下的一种或多种:

[0029] 糖基连接,所述糖基连接包含65重量%至95重量%的1:3连接的吡喃葡萄糖基残基和5重量%至25重量%的1:6连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0030] 纯度为85%至100%的 β -葡聚糖;

[0031] 分子量为0.5MDa至2.2MDa;

[0032] 人类生物测定中的TNF- α 细胞因子反应是人类生物测定中的阴性对照TNF- α 细胞因子反应的至少1.5倍；

[0033] 本质上不可溶于水溶液。

[0034] 在第二方面,提供了一种通过将载体(vehicle)局部施用至伤口部位来治疗有需要的患者的皮肤的方法,所述载体包含治疗有效量的基本上如本文所述的分离的生物多糖化合物。

[0035] 在第三方面,提供了基本上如本文所述的分离的生物多糖化合物在制备用于局部治疗有需要的患者的皮肤的药物中的用途。

[0036] 在第四方面,提供了一种制备基本上如上所述的分离的生物多糖化合物的方法,通过以下步骤:

[0037] 选择酵母细胞;

[0038] 裂解所述细胞并收集细胞壁碎片;

[0039] 酸化然后加热所述细胞壁碎片以去除甘露聚糖和甲壳质;

[0040] 用溶剂进行相分离以去除额外的甘露聚糖和额外的甲壳质以及蛋白质、糖原和脂质;

[0041] 通过煮沸和干燥分离溶剂和其他非多糖化合物;以及

[0042] 在裂解之后且在酸化之前进行至少一次水洗步骤。

[0043] 上述分离的生物多糖化合物、使用方法和制备方法可包含许多优点,一个优点是该化合物为局部治疗提供了意想不到的和最佳的免疫原性应答,而没有任何有害的炎症影响。

附图说明

[0044] 生物多糖化合物、其使用方法和制备方法的其他方面将从仅以示例方式并参考附图给出的以下描述中变得显而易见,其中:

[0045] 图1A和图1B示出了¹H NMR图和分子示意图,其中所述生物多糖是基于 β -葡聚糖的多糖,其通用结构为(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -葡聚糖。为简单起见,将主要残基标记为“BC”、“Br”和“SC”。其中BC代表主链残基,Br代表支化残基,SC代表侧链残基;

[0046] 图2示出了澳大利亚I期试验的结果,以确定本发明化合物的微粒形式的安全性和有效性。进行了一项包括6名患者的开放性、非对照试验。对于标准伤口治疗失败的患者,将在载体中的本发明化合物每2-3天局部施用一次,持续四周。未观察到或报告有与使用供试品相关的显著的不耐受或毒性。在所有6名患者中均观察到愈合反应,在56天内测量的伤口表面积减少了26%至82%;

[0047] 图3示出了第二个I/II期研究的结果,该研究是在单中心、随机、双盲、载体对照试验中对18名患有标准伤口管理疗法难治的CDVI溃疡的患者进行的,以确定本发明化合物的疗效。将本发明化合物与另一种形式的具有较低分子量范围和较小比例(1:6)- β -葡聚糖侧支化的葡聚糖(GlucodineTM)以及载体(对照)进行比较。通过测量伤口的表面积的面积测量法评估疗效。4周后的平均改善率在载体组中为4.4%,在本发明化合物组中为36.7%,在GlucodineTM组中为17.3%。结果表明,本发明化合物含有更有效的促进伤口愈合的活性剂;

[0048] 图4示出了第三个IIA期研究的结果,进行该研究的目的在于确定合适的制剂,以

构成当时最终监管III期研究的基础。这是一项双盲、随机、载体对照的2期研究,使用计算机生成的分配序列将患者随机分配到三个治疗组之一。在两个地点招募了58名患有慢性静脉性溃疡的患者,并随机将其分配至高剂量活性物(1.0%本发明化合物凝胶)组或低剂量活性物(0.1%本发明化合物凝胶)组或单独的凝胶基质(载体对照)组。该研究旨在提供本发明化合物对患有腿部慢性静脉功能不全溃疡患者的疗效和安全性的统计评估。来自II期研究的数据表明,本发明化合物促进了伤口愈合的速度,与经安慰剂治疗的溃疡相比,经本发明化合物治疗的溃疡以统计学上显著的改善速度愈合。相比于平均伤口面积减少了10%的安慰剂组,本发明化合物显示平均伤口面积减少了55%至59%;

[0049] 图5示出了来自26名患者的IIA期试验的结果,该试验是在点阵美容激光(fractionated cosmetic laser)手术的受控烧伤后使用包含本发明化合物的凝胶。研究表明伤口愈合时间平均减少了30%。当本发明化合物(标记为GLYC-1010.1%和GLYC-1011.0%)组与安慰剂组相比时,伤口完全闭合时间的疗效结果更快(分别为 $p=0.0062$ 和 0.0331);

[0050] 图6、图7和图8示出了在使用本发明化合物完成的澳大利亚IIA期试验中患者静脉性溃疡伤口的伤口尺寸减小的非典型实例的照片;

[0051] 图9示出了在美国进行的82名患者的IIB期试验中,本发明化合物的载体组和活性物组之间完全闭合的原始发生率与现有技术产品Apiligraf™的III期数据及其III期结果的差异。Apiligraf™(参见www.apiligraf.com)可以说是静脉性腿部溃疡(VLU)闭合的金标准,每次施用的报销费用约为1200美元,使用Apiligraf™正常治疗VLU可能需要3至15次施用。本发明化合物在完全闭合发生率上实现了21%的调整差异,而Apiligraf™调整的完全闭合发生率为17%。记录了ITT组和PP组的有意义差异。考虑到试验设计(包括盲法)、纳入和排除标准的差异,结果不具有严格可比性,但提供了本发明化合物相对于金标准产品具有可比的或更优疗效的强烈信号;

[0052] 图10示出了82名患者的静脉性腿部溃疡IIB期试验的优势比(“OR”)输出。它表明,与安慰剂组相比,活性物组的OR实现了100%治愈。输出来自对已知会影响愈合的协变量进行调整的逻辑回归。对于OR的解释,举例来说,如果OR为1.4,则TR 987组的治愈几率比安慰剂组的治愈几率高1.4倍。大于1的值有利于治疗,而小于1的值有利于安慰剂。所有组的优势比都具有临床意义(超过2.0),并且都有利于本发明的化合物,这表明活性物组实现完全愈合的几率是安慰剂组的2倍;

[0053] 图11示出了完成IIA期和IIB期的试验的患者的平均伤口面积减少的比较。该数据证明本发明化合物产生了一致的疗效,如在两个分开的独立II期试验中通过伤口面积减少所测量的;

[0054] 图12示出了本发明化合物相对于Apiligraf™对于静脉性腿部溃疡治疗的疗效。它示出了与安慰剂相比的完全闭合发生率的差异。在该图中,本发明化合物被标记为TR-987。该图示出了活性物和安慰剂之间实现完全闭合的患者比例的差异。本发明化合物达到了21%的完全闭合发生率的调整差异,而Apiligraf™的调整后的完全闭合发生率为17%,说明本发明化合物相对于有争议的金标准产品具有更好的差异;

[0055] 图13示出了使用伤口面积减少的度量来进行的本发明化合物与Epifix™的疗效的比较,Epifix™是一种源自人胎盘并被批准作为人体组织愈合产品的产品(参见<https://>

mimedx.com/epifix/);

[0056] 图14、图15和图16示出了使用本发明化合物完成的IIB期82患者试验中静脉性溃疡伤口的患者伤口尺寸减小的非典型实例照片;

[0057] 图17示出了在微创美容手术(胸部CO₂点阵激光手术)后接受本发明化合物的患者的非典型实例和在IIB期激光消融试验(n=40)中发现的改善皮肤质量结果的非典型实例。与安慰剂凝胶+标准护理相比,在IIB期试验中使用本发明化合物的患者在在凝胶载体中的本发明化合物的第28天时所经历的通过弹性和皱纹测量的皮肤质量促进的发生率接近两倍(p<0.04,n=40);

[0058] 图18示出了本发明化合物组和载体组中每一组中在基线和第28天之间的皱纹评分改善≥1分的患者比例(Fitzpatrick-Goldman分类)。与安慰剂组(其中只有50%的响应者达到了1或更高的皱纹评分)相比,本发明化合物组85%的响应者达到1或更高的皱纹评分。使用卡方或费舍尔精确法,70%差异(variance),P<0.04;

[0059] 图19示出了本发明化合物组和载体组中每一组中在第28天时实现弹性评分改善≥3分的患者的比例(Fitzpatrick-Goldman分类)。使用未调整比例的卡方检验来确定以p值表示的显著性。在第28天时,活性物组75%的响应者在弹性方面取得了3分或更高的改善分数,而安慰剂组只有35%的响应者获得了3分或更高的改善分数(114%差异,P<0.011);以及

[0060] 图20示出了本发明化合物相对于被称为WoulganTM的进一步技术产品的疗效,该技术产品被发明人认为是与伤口愈合最相关的β-葡聚糖专利出版物。如通过测量从人类收集的巨噬细胞的TNFα反应的分析所测量的,WoulganTM产生的免疫反应是对照的8.9倍。相比之下,本发明化合物测定的本发明化合物(标记为TR-987)相对于相同载体对照的响应为25.4倍。这意味着本发明化合物的效力是WoulganTM凝胶的约3倍,疗效与现有技术化合物相比有非常高的提高。

具体实施方式

[0061] 如上所述,本文描述的是高纯度形式的、分离的、生物衍生多糖化合物。描述了该化合物的使用方法,说明了该化合物的意想不到的疗效,特别是在局部皮肤治疗中。还描述了一种制备方法,说明了现有技术方法的替代/额外制备步骤,其似乎提供了意想不到的有效多糖化合物。

[0062] 出于本说明书的目的,术语“约”或“近似”及其语法变体意指相对于参考的数量、水平、程度、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化了多达30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、程度、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。

[0063] 术语“基本上”或其语法变体是指至少约50%,例如75%、85%、95%或98%。

[0064] 术语“包含”及其语法变体应具有包容性含义——即,其将被理解为不仅包括其直接引用的所列出的组分,还包括其他未指定的组分或要素。

[0065] 本文所用的术语“多糖化合物”及其语法变体涵盖源自酵母的包含糖基连接的化合物。在下文中,术语“多糖化合物”可以与术语“生物多糖”、“生物衍生多糖”、“葡聚糖”或“β-葡聚糖”互换使用。除非另有说明,否则对一个术语的引用不应被视为对使用其他术语

的限制。

[0066] 本文使用了术语“ β -葡聚糖”或其语法变体。这包括 β -D-葡聚糖或者是 β -D-葡聚糖。

[0067] 一种分离的生物多糖化合物

[0068] 在第一方面,提供了一种分离的生物多糖化合物,其包含以下中的一种或多种:

[0069] 糖基连接,所述糖基连接包含65重量%至95重量%的1:3连接的吡喃葡萄糖基残基和5重量%至25重量%的1:6连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0070] 纯度为85%至100%的 β -葡聚糖;

[0071] 分子量为0.5MDa至2.2MDa;

[0072] 人类生物测定中的TNF- α 细胞因子反应是人类生物测定中的阴性对照TNF- α 细胞因子反应的至少1.5倍;

[0073] 本质上不可溶于水溶液。

[0074] 分离的在本说明书的上下文中,术语分离的是指从天然状态例如从细胞或细胞壁分离成纯化形式的生物多糖化合物。分离的具体方法可有所不同,但可包括洗涤和去除杂质(例如蛋白质和脂质)的多个步骤。

[0075] 分离的生物多糖化合物可以是基本上完整的。也就是说,分离过程最大限度地减少或避免了化合物中化学键的断裂,并保持了完整的生物多糖化合物的复杂性和大小。在这种情况下,复杂性可能具体与生物糖化合物的分支的1:3侧链与1:6侧链的比例相关。

[0076] 生物多糖化合物

[0077] 如上所述,本文描述了分离的生物多糖化合物。

[0078] 在至少一个实施方案中,所描述的生物多糖化合物源自酵母。生物多糖化合物可源自酵母细胞。酵母细胞可来自酿酒酵母种。

[0079] 所述生物多糖化合物可以是葡聚糖化合物。所述生物多糖化合物可以是 β -葡聚糖化合物。

[0080] 不可溶性

[0081] 所述生物多糖化合物不可溶于水溶液。

[0082] 溶解度可以定义为在给定温度和压力下可完全溶解在给定溶剂中的物质的最大浓度。物质的溶解度可用多种方式来描述。USP/NF通常以在指定温度下溶解1克药物所需的溶剂体积来表示溶解度。使用该量度,所述生物多糖化合物是几乎不可溶的,或不可溶且一份溶质所需的溶剂份数大于10,000。

[0083] 如从下面进一步描述的制备方法中可以理解的,本文描述的生物多糖化合物可在制备过程中经历多次水洗步骤以达到分离的形式。在制备过程中,任何可溶性化合物或残留物都将从不可溶性成品化合物中除去。

[0084] 生物多糖化合物

[0085] 生物多糖化合物的特征可在于特定的糖基化合物。糖基链可能是引起人类炎症反应的生物多糖化合物的一部分。发明人理解,所描述的分离的生物多糖化合物可含有许多糖基侧链,并且在糖基链中包含暴露的抗原区域。

[0086] 上述生物多糖化合物的独特之处在于其含有大量1:6连接的吡喃葡萄糖基残基。本领域 β -葡聚糖化合物通常去除该侧链(以及其他侧链)以留下非常高比例的1:3侧链。发

明人发现,保留1:6侧链(以及支链与非支链形式的其他侧链)对于实现所需疗效可能非常重要。

[0087] 此外,本发明人还发现,生物多糖化合物递送了最佳水平的免疫应答以实现疗效,而不会留下任何当放置在开放性伤口中时可能导致感染或不良影响的酵母细胞内的成分。

[0088] 侧链分析

[0089] 在至少一个实施方案中,所述生物多糖化合物包含仅所述1:3侧链和1:6侧链。

[0090] 在至少一个实施方案中,除了所述的1:3侧链和1:6侧链之外,还可存在另外的侧链。如果存在,所述额外侧链可包含以下侧链类型中的至少一种:

[0091] 1:4连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0092] 3:4连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0093] 2:3连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0094] 3:6连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0095] 2:6和4:6连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0096] 3:4:6连接的吡喃葡萄糖基残基;

[0097] 末端连接的吡喃葡萄糖基残基。

[0098] 这些额外侧链的量可以是可变的。在至少一个实施方案中,它们可以以以下近似浓度(重量%)存在(全部或一些或一种):

[0099] 2%至6%的1:4连接的吡喃葡萄糖基残基

[0100] 0.01%至0.5%的3:4连接的吡喃葡萄糖基残基

[0101] 0.5%至4%的2:3连接的吡喃葡萄糖基残基

[0102] 3%至10%的3:6连接的吡喃葡萄糖基残基

[0103] 0.2%至1%的2:6和4:6连接的吡喃葡萄糖基残基

[0104] 0.01%至0.5%的3:4:6连接的吡喃葡萄糖基残基

[0105] 2%至8%的末端连接的吡喃葡萄糖基残基

[0106] 在至少一个实施方案中,所述生物多糖化合物的特征可在于糖基化合物分析为约(重量%):

[0107] 67.7%的1:3连接的吡喃葡萄糖基残基

[0108] 12.7%的1:6连接的吡喃葡萄糖基残基

[0109] 4.4%的1:4连接的吡喃葡萄糖基残基

[0110] 0.3%的3:4连接的吡喃葡萄糖基残基

[0111] 2%的2:3连接的吡喃葡萄糖基残基

[0112] 6.3%的3:6连接的吡喃葡萄糖基残基

[0113] 0.6%的2:6和4:6连接的吡喃葡萄糖基残基

[0114] 0.2%的3:4:6连接的吡喃葡萄糖基残基

[0115] 5.8%的末端连接的吡喃葡萄糖基残基

[0116] 虽然不受理论的束缚,但发明人设想,特别是1:6侧链(以及可能提到的其他侧链)的存在对于实现所观察到的生物多糖化合物的强免疫原性反应可能是重要的,而不是如本领域中针对现有生物多糖化合物(例如 β -葡聚糖化合物)所注意到的潜在不受抑制的炎症级联反应。

[0117] 纯度

[0118] 上述生物多糖化合物的特征可以是极纯或超纯。在这种情况下,纯度是指从 β -葡聚糖中去除细胞成分,如蛋白质、酶、脂质、核物质以及提取过程中的所有残留物。

[0119] 如上所述,纯度可以为85%至100%(重量)的 β -葡聚糖。所述纯度也可以是90%至100%或95%至100%的 β -葡聚糖。

[0120] 纯度还可以根据蛋白质或脂质杂质含量来测量。

[0121] 在至少一个实施方案中,所述生物多糖化合物的特征可以是具有小于或等于3重量%、或2重量%、或1重量%、或1重量%、或0.5重量%的蛋白质含量。在至少一个实施方案中,所述生物多糖化合物中的残余蛋白质含量可小于0.3%。残余蛋白质含量可通过氨基酸分析来测量。

[0122] 此外,所述生物多糖化合物的特征可以是具有小于或等于3重量%、或2重量%、或1重量%或0.5%重量%的脂质含量。在至少一个实施方案中,所述生物多糖化合物中的残余脂质含量可以小于0.3%。残余脂质含量可通过萃取重量法来测量。

[0123] 在至少一个实施方案中,所述生物多糖化合物的特征可在于几乎没有来自其提取中使用的任何溶剂或化学品的残留物。

[0124] 所述纯度可能是优于现有技术的显著优势,因为它允许剂量和结果的一致性,并且可避免与变化的纯度和其他化合物的存在相关的副作用和疗效的变化。生物多糖化合物,特别是 β -葡聚糖化合物是天然状态下自然产生的化合物。至高纯度的分离克服了本领域中指出的包括疗效的变化、混淆的结果和可能的副作用或炎症级联反应的技术问题,特别是对于如本文所述的那些不可溶性生物多糖化合物。

[0125] 此外,为了能够获得对治疗性权利要求的监管批准,必须克服最终化合物的高度可变性,该可变性一直受到生物多糖化合物的先前提取的困扰,即在现有技术中无法确定实现生物多糖化合物的一致性,以能够要求保护具有一致的疗效水平和药物样特性,从而能够获得构成监管机构批准任何药物的关键组成部分的CMC配套的批准。

[0126] 分子量

[0127] 如上所述,生物多糖化合物可以是分子量为0.5MDa至2.2MDa的大化合物。在至少一个实施方案中,分子量可以是0.5MDa至2.2MDa、或0.6MDa至2.2MDa、或0.7MDa至2.2MDa、或0.8MDa至2.2MDa、或0.9MDa至2.2MDa、或1.0MDa至2.2MDa、或1.1MDa至2.2MDa、或1.2MDa至2.2MDa、或1.3MDa至2.2MDa、或1.4MDa至2.2MDa、或1.5MDa至2.2MDa。该分子量可以测量为分布或平均摩尔质量。

[0128] 分子量可以通过凝胶渗透色谱法来测量。

[0129] 生物测定

[0130] 所指的生物测定是对生物多糖化合物引起的炎性反应的测量,使用生物测定来测量,其中在人类收集的巨噬细胞中测试对化合物的TNF- α 反应。所使用的生物多糖化合物似乎不会引起失控的炎症级联反应,但似乎确实会启动炎症和愈合。本领域给出了一些实例,其中不可溶性生物多糖引起了严重的炎症反应,这不是发明人对上述化合物观察到的。

[0131] 无菌

[0132] 在至少一个实施方案中,生物多糖化合物的特征还可以在于具有非常低的生物负载。在至少一个实施方案中,该化合物可以是无菌的。在本说明书的上下文中,术语“极低生

物负载”或“无菌”是指 $<10\text{cfu/g}$ 的微生物计数加上没有病原体。

[0133] 在至少一个实施方案中,所述化合物满足USP51 (抗微生物有效性)和USP61 (微生物限度)标准。在至少一个实施方案中,所述生物多糖化合物可以满足USP71 (无菌)标准。

[0134] USP标准是监管机构强制执行的衡量无菌的标准。完成USP71测试的一种方法可以是进行生长促进测试并评估其他质量参数,以确认培养基可支持USP71无菌测试中规定的六种微生物的生长。然后使用封闭膜过滤法或直接接种法来接种培养基,然后将测试容器在适当的温度下培养至少14天,并测量任何微生物的生长。对于符合USP71要求的样品,在培养期结束时必须没有生长迹象,并且药品获得“无菌”结果,表明在测试条件下,被检测的样品中未发现污染微生物。

[0135] 为了进一步举例说明,所述生物多糖化合物的特征还可以在于具有以下无菌标准:

[0136]	TVAC	$<10\text{cfu/g}$
	酵母	$<10\text{cfu/g}$
	霉菌	$<10\text{cfu/g}$
	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	未检出/10g
	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	未检出/g
	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	未检出/10g
	沙门氏菌属 (<i>Salmonella spp.</i>)	$<10\text{cfu/g}$
	细菌内毒素	$<1\text{EU/mg}$

[0137] 微粒

[0138] 生物多糖化合物可以是微粒形式。粒度可以小于 $40\mu\text{m}$ 。这可以使用马尔文粒度测试方法来测量。

[0139] 将分离的生物多糖化合物呈现为微粒可用于增加表面积并暴露生物多糖化合物的更多抗原区域(主要是1-3糖基侧链和1-6糖基侧链)。

[0140] 外观

[0141] 分离的生物多糖化合物可以是白色至略带灰白色,并且在纯净形式下可以是粉末。

[0142] 残留溶剂

[0143] 分离 β -葡聚糖化合物/生物多糖化合物的技术方法可依赖于多种溶剂/试剂,实例包括但不限于水、氯仿、乙醇等。

[0144] 根据发明人的经验,本文所述的分离的生物多糖化合物中几乎测不到残留溶剂。

[0145] 稳定性

[0146] 该生物多糖复合物是高度稳定的。在发明人完成的试验中,分离的生物多糖化合物在环境温度下储存后可稳定保存至少1、或2、或3、或4、或5年。生物多糖化合物似乎也是热稳定的。在以发明人名义完成的一项试验中,完成了热重分析,表明该化合物即使在 220°C (对于稳定性而言非常高的温度)处理后仍保持稳定。

[0147] 这可能是由于分离的生物多糖化合物具有高纯度和高无菌性,因此,当长期储存时,这些化合物表现出很少的降解(如果有的话)。

[0148] 治疗方法

[0149] 在第二方面,提供了一种通过将载体局部施用至伤口部位来治疗有需要的患者的皮肤的方法,所述载体包含治疗有效量的基本上如本文所述的分离的生物多糖化合物。

[0150] 下面将更详细地说明具体方法的进一步实例。

[0151] 用途

[0152] 在第三方面,提供了基本上如本文所述的分离的生物多糖化合物在制备用于局部治疗有需要的患者的皮肤的药物中的用途。

[0153] 下面将更详细地说明具体用途的进一步实例。

[0154] 疗效

[0155] 发明人发现,所述生物多糖化合物可以是可用于伤口愈合的最佳免疫原性分子。

[0156] 下面列出了2020年完成的两项最新的IIB期双盲随机临床试验的疗效的总结,并在实施例和附图中进一步说明。

[0157] 慢性伤口

[0158] 在一项82名患者的随机双盲随机安慰剂对照IIB期试验中,生物多糖化合物与载体凝胶相比表现出强烈的疗效信号,包括:

[0159] • 在每个方案组中,与安慰剂组相比,完全闭合发生率的调整差异为27% ($p=0.1$);

[0160] • 在ITT组中,与安慰剂组相比,完全闭合发生率的调整差异为22% ($p=0.12$);

[0161] 注意,完全闭合发生率的10%差异在本领域被认为具有临床意义。

[0162] 美容手术

[0163] 在一项40名患者的IIB期双盲安慰剂对照试验中,通过测量皮肤质量和愈合情况评估了所述生物多糖化合物在点阵激光手术后的疗效。生物多糖化合物表现出:

[0164] • 与安慰剂组相比,皱纹改善了70% ($P<0.04$);

[0165] • 弹性改善了114% ($P<0.13$),28天时弹性改善翻倍。

[0166] 可以修改免疫刺激作用机制以适应不同的适应症,从而允许多种应用。

[0167] 发明人理解,所鉴定的分离的生物多糖化合物通过模拟生物威胁(例如酵母感染)来刺激先天皮肤免疫系统,从而导致免疫系统通过激活巨噬细胞中的NF- κ B通路做出反应。

[0168] 巨噬细胞调整和调节伤口愈合反应。所述生物多糖化合物刺激简单的抗原反应机制,触发并加速伤口愈合反应的自然级联,但不会导致不受抑制的炎性反应。结果似乎在新组织再生和伤口闭合方面具有出乎意料的高疗效。

[0169] 分离的生物多糖化合物似乎激活人类进化过程中形成的免疫细胞上的模式识别受体,以抵御病原微生物。

[0170] 生物多糖化合物(例如,酵母葡聚糖)的抗原区域可被身体的巨噬细胞识别为所感知的威胁的诱饵,从而刺激伤口巨噬细胞上的toll样受体(TLR)2和dectin-1膜受体以及旨在对抗威胁的信号通路。然而,该诱饵不会造成可感知的损伤,但由此产生的巨噬细胞激活似乎可以以多种有益的方式刺激伤口愈合。

[0171] 发明人认为该方法刺激了伤口巨噬细胞活性,导致吞噬作用增加、伤口愈合细胞因子的分泌增加以及刺激血管生成和伤口修复。

[0172] 根据发明人的经验,该方法/用途没有可观察到的副作用,也没有可测量出的令人担忧的炎症,或者其与本领域对不可溶性生物多糖化合物的建议完全相反。

[0173] 载体

[0174] 在一个实施方案中,载体可以是包含分离的生物多糖化合物的凝胶组合物。载体可以是高粘性凝胶。例如,凝胶的粘度可以大于3000cps。凝胶可以不包含任何化学防腐剂例如石蜡,或传统化学防腐剂。这可能是为了避免对开放性伤口的任何干扰或有害影响。凝胶可以是水性凝胶。生物多糖化合物可以是微粒形式。如上所述,生物多糖化合物是不可溶的,因此生物多糖化合物可以作为微粒悬浮物悬浮在凝胶中。

[0175] 载体还可以采用其他药理学和生理学上可接受的形式。载体通常可以是水性的。载体可以起到将生物多糖化合物悬浮或保留为微粒悬浮物或基质上的颗粒的作用,直至局部施用。替代载体的实例可以是霜剂、软膏剂、敷料、用于治疗皮肤的医疗装置(例如治疗伤口和烧伤的装置)等。

[0176] 生物多糖化合物浓度/剂量

[0177] 在至少一个实施方案中,载体可包含小于或等于:0.05重量%、或0.06重量%、或0.07重量%、或0.08重量%、或0.09重量%、或0.1重量%、或0.2重量%、或0.3重量%、或0.4重量%、或0.5重量%、或0.6重量%、或0.7重量%、或0.8重量%、或0.9重量%、或1.0重量%、或1.1重量%、或1.2重量%、或1.3重量%、或1.4重量%、或1.5重量%的分离的生物多糖化合物。在至少一个实施方案中,载体包含0.05重量%至1.5重量%或0.1重量%至1.0重量%的分离的生物多糖化合物。

[0178] 该载体可以每天一次或每天两次局部施用于伤口部位。该载体可以施用数天或数周。施用方案可以根据载体中化合物的浓度、所进行的治疗、患者表现出的反应以及其他因素而改变。根据发明人的经验,治疗方案倾向于每天施用一次或两次,持续5至14天的时间,或者在治疗慢性伤口的情况下,每周施用一次或两次或3次,持续12至20周的治疗期。该时间段可以是可变的。

[0179] 患者可以在家中将载体施用于他们的皮肤部位。

[0180] 包含该化合物的载体可以以1mm至5mm厚的层施用于该部位。随着时间的推移,该层可能会被皮肤吸收。

[0181] 慢性伤口治疗

[0182] 该方法/用途可以用于治疗慢性伤口。慢性伤口可以是溃疡。溃疡可以是静脉性腿部溃疡。根据发明人的经验,与安慰剂相比,生物多糖化合物在治疗静脉性腿部溃疡方面提供了意想不到的协同作用。

[0183] 在至少一个实施方案中,发明人发现,当在一项67名患者的IIB期双盲随机安慰剂对照试验中用于治疗静脉性腿部溃疡时,与载体凝胶相比,所述生物多糖化合物用于治疗2-12cm²溃疡大小的慢性静脉性腿部溃疡时在完全伤口闭合的发生率上具有约27%的差异。这种疗效水平可以说优于目前批准的任何竞争产品。

[0184] 作者还发现,与安慰剂相比(46.6%),通过上述生物多糖化合物,慢性静脉性腿部溃疡的伤口面积减少百分比加倍(91%)。这些发现将在下面的实施例中进行进一步描述。

[0185] 美容治疗

[0186] 该方法/用途可以是美容皮肤治疗。在至少一个实施方案中,美容皮肤治疗的疗效可以根据美容皮肤质量来测量,并且具体地,通过皮肤弹性组织和皱纹来测量。根据发明人的经验,所述生物多糖化合物在美容皮肤治疗中具有意想不到的协同效应。

[0187] 在至少一个实施方案中,在IIB期42位患者双盲安慰剂对照试验中,在受控烧伤手术(胸部的CO₂点阵激光手术)后使用所述凝胶,所述生物多糖化合物使激光消融后的皮肤质量改善接近两倍、弹性75% (安慰剂35%) (p<0.01),皱纹85% (安慰剂50%) (p<0.04)。

[0188] 进一步或相关的作用

[0189] 上述生物多糖化合物可以具有进一步的组织修复和愈合作用,包括以下一种或多种:

[0190] 优化皮肤愈合和皮肤质量;

[0191] 减少美容手术后的皮肤皱纹;

[0192] 在愈合过程中增加皮肤弹性;

[0193] 点阵消融皮肤表面重建和/或完全消融皮肤表面重建后的皮肤治疗(已知的改善紫外线引起的光损伤、皱纹、色素沉着和不良肤质外观的治疗方案);

[0194] 辅助术后局部施用凝胶,以加速皮肤质量受益。

[0195] 当处于如上所述的凝胶形式时,生物多糖化合物可应用于涉及任何伤口愈合的任何美容手术,包括以下一种或多种治疗/手术的术后愈合:

[0196] 切口;

[0197] 针刺;

[0198] 擦伤;

[0199] 重度化学换肤;

[0200] 皮肤移植;

[0201] 侵入性和轻型激光手术。

[0202] 包含生物多糖化合物的凝胶的应用可以提高美容手术的临床效果,从而提供加速的皮肤质量和愈合受益。这被认为是由于所述生物多糖化合物刺激人体自身的组织再生和胶原蛋白生成过程,以响应由潜在美容手术引起的伤口,无论其是激光手术、化学换肤或切口还是任何其他形式的擦伤。

[0203] 生物多糖化合物的制备方法

[0204] 在第四方面,提供了一种制备基本上如上所述的分离的生物多糖化合物的方法,通过以下步骤:

[0205] 选择酵母细胞;

[0206] 裂解所述细胞并收集所述细胞壁碎片;

[0207] 酸化然后加热所述细胞壁碎片以去除甘露聚糖和甲壳质;

[0208] 用溶剂进行相分离以去除额外的甘露聚糖和额外的甲壳质以及蛋白质、糖原和脂质;

[0209] 通过煮沸和干燥分离溶剂和其他非多糖化合物;以及

[0210] 在裂解之后且在酸化之前进行至少一次水洗步骤。

[0211] 裂解

[0212] 在至少一个实施方案中,裂解可以通过碱处理或热处理或这两种处理来进行。裂解是一种常用技术,也可以使用其他方法,例如压力变化、声波破坏、均质器、酶和洗涤剂。

[0213] 水洗

[0214] 该方法还可以包括在所述酸化之后且在所述相分离之前的至少一次水洗。据认

为,额外的水洗可以完成额外的纯化,但其以温和的方式保留了多糖的糖基支化结构,而不像可能更苛刻并导致多糖结构变化的现有方法一样。

[0215] pH变化

[0216] 除了水洗之外,在酸化之后且在所述相分离之前,还可以对收集的混合物进行pH变化和醇洗涤。在至少一个实施方案中,可将pH降低至4.0并进行所述醇洗涤,然后升高至pH9.0并进行所述醇洗涤,然后调节至pH7.0并进行所述醇洗涤。相分离后也可进行醇洗和水洗。所使用的醇可选自一种或多种低级醇。醇的实例可包括甲醇、乙醇、丙醇及其组合。

[0217] 溶剂

[0218] 上述使用的溶剂可以是有机溶剂。所使用的溶剂可以是非极性溶剂。所使用的溶剂可以具有1.0或更大的比重。可以使用的潜在溶剂的实例包括以下一种或多种:甲基氯仿、氯仿、二氯甲烷、四氯化乙烷、四氯化碳、乙酸乙酯及其组合。该溶剂萃取步骤可在室温下完成。应当理解,使用这种性质的溶剂可从混合物中除去脂质并因此有助于纯化生物多糖化合物。

[0219] 用所述溶剂进行的相分离可在室温和中性pH下完成。根据发明人的经验,不需要特殊条件。

[0220] 煮沸和干燥

[0221] 在至少一个实施方案中,该方法还可包括,通过煮沸和干燥分离溶剂和其他非多糖化合物后,在将最终产品再次干燥之前,通过至少一系列额外的溶剂洗、醇洗以及任选的进一步的水洗,以进一步纯化。这些额外步骤中使用的溶剂可与上述相分离中使用的溶剂相同。这些额外步骤中使用的醇可以与上述用于醇洗涤的醇相同。在此类一个或多个额外步骤中的水洗可使用热水(>50°C)来完成。所述干燥可在一个步骤中完成或通过几个步骤并使用若干种干燥技术(例如喷雾干燥、烘箱干燥、冷冻干燥、真空干燥等)来完成。

[0222] 应当认识到,上述方法与最接近的技术例如US 6,242,594中所述的工艺完全不同。在US 6,242,594中,所述工艺是一种四步法,而上述方法需要许多额外的步骤,大致包括多种洗涤和溶剂步骤以及额外的纯化和干燥步骤。

[0223] 在试验或商业规模生产多糖方面,发明人添加了额外的水洗步骤以阻止大量盐晶体的积累。这些水洗步骤可具有去除非多糖材料并在工艺中提供早期纯化的额外益处。水洗过程对于分离支化分子和非支化分子也很重要,并因此在最终分离的产品中收集了更高比例的1-3:1-6化合物支链。

[0224] 不同结构

[0225] 如上所述,所述方法产生了与现有技术中所述化合物具有根本不同的结构(和疗效)的化合物。例如,本文所述的方法产生的分离的生物多糖化合物具有:

[0226] • 比现有技术显著更高的分子量(约为高的0.7MDa至2.2MDa,而US 6,242,594中所述的分子量为60kDa至250kDa(平均为140kDa));

[0227] • 由更大比例的支化1-6侧链组成的更大、更复杂的分子;

[0228] • US 6,242,594教导了制备包含96%至97%的1-3链和3%至4%的1-6链的化合物。本文所述方法分离的化合物具有比非支化的1-3和1-6侧链大得多的比例的支化的1-3和1-6连接;

[0229] • 通过本文所述方法产生的分离的化合物产生具有低于2%蛋白质或2%脂质的

超纯多糖,远高于现有技术(通常包括US 6,242,594)中所述的水平;

[0230] • 一种生物负荷极低的化合物,其中最终形式的化合物中几乎没有外来细胞物质。鉴于所述分离的化合物的一种用途可能是用于开放性伤口,这可能非常重要。

[0231] 如上所述,上述分离的生物多糖化合物、使用方法和制备方法可包括许多优势。一些优势的实例可包括以下一项或多项:

[0232] • 提供专为伤口愈合而设计的最佳免疫原性化合物,其具有最佳水平的免疫反应且没有任何有害的炎症影响;

[0233] • 经临床验证改善慢性伤口的愈合(双盲随机安慰剂对照试验)优于金标准疗法;

[0234] • 标准激光治疗后近2倍的皮肤质量改善(双盲安慰剂对照人体试验);

[0235] • 该制备方法似乎解决了现有的制备难题,能够产生适当表征的分子,该分子提供可测量的批次间一致水平的疗效;

[0236] • 术后瘙痒和紧绷症状减轻。

[0237] 上述实施方案还可以广义地说包括在本申请的说明书中单独或共同提及或指出的部分、要素和特征,以及任何两个或更多个所述部分、要素或特征的任何或所有组合。

[0238] 此外,当本文提及特定整体(integer)在实施方案相关领域中具有已知等同物时,此类已知等同物被视为并入本文,如同被单独阐述一样。

[0239] 操作实施例

[0240] 现在参考具体实施例来描述上述多糖化合物、其使用方法和制备方法。

[0241] 实施例1

[0242] 下表1显示了上述分离的生物多糖化合物的全部特征。

[0243] 表1-生物多糖化合物特征

[0244]

测试	测试方法	规格	测试结果
外观	目视检查	白色至略带灰白色粉末	符合
鉴定	H NMR APFP - 1023	与分离的生物多糖的标准 H NMR 谱相符	参见实施例 3
分析	总己糖 PTM26	>90%	
糖基连接分析	通过 Heiss et al. (2009) Carbohydr 所述的气相色谱-质谱 (GC-MS) 进行分析.	65%	参见实施例 2 67.7%的 1:3 连接的吡喃葡萄糖基残基 12.7%的 1:6 连接的吡喃葡萄糖基残基 4.4%的 1:4 连接的吡喃葡萄糖基残基 0.3%的 3:4 连接的吡喃葡萄糖基残基 2%的 2:3 连接的吡喃葡萄糖基残基 6.3%的 3:6 连接的吡喃葡萄糖基残基 0.6%的 2:6 和 4:6 连接的吡喃葡萄糖基残基 0.2%的 3:4:6 连接的吡喃葡萄糖基残基 5.8%的末端连接的吡喃葡萄糖基残基
分析-分子量	凝胶渗透色谱法	重均摩尔质量 Mw=0.5-2.2MDa	1MDa
平均分子量 (Mw)			1.2
水%	USP <921> 方法 1c	<15%	7.5%
粒度	Malvern 粒度仪-APFP-1035	<40µm	21µm
生物测定法	生物效价测定 (Lonza)		
		活性物结果	64pg/mL
		对照物结果	3pg/mL
	比率: 活性物响应 比对照物响应	TNF (α) 活性物 是对照物的 1.5 倍	21
残留溶剂			
所有溶剂	USP<467>	<5000ppm	<5000pm (约 160ppm)

[0245]

杂质检测			0.22%
蛋白质	氨基酸分析	<5%	0.3%
灼烧残渣	USP <281>	<1%	<20ppm
重金属	USP<231>	<20ppm	0.3%
脂质	萃取重量法	<5%	0.30%
细菌内毒素	Pyrogene 内毒素检测	<1 EU/mg	<0.1 EU/mg
无菌性	USP<71>	符合专题论文	符合
微生物学	仅适用于无菌性不合格的情况		符合
TVAC		<100 CFU/g	符合
酵母		<10 CFU/g	符合
霉菌		<10 CFU/g	符合
金黄色葡萄球菌		无 / 10g	符合
大肠杆菌		无 / 10g	符合
铜绿假单胞菌		无 / 10g	符合
沙门氏菌		无 / 10g	符合

[0246] 实施例2

[0247] 在该实施例中,描述了用于帮助表征本文所述的分离的生物多糖化合物的糖基连接分析的方法和结果。

[0248] 方法

[0249] 对于糖基连接分析,首先将样品(1.2mg)溶解在400 μ L DMSO中。然后对样品进行全甲基化、解聚、还原和乙酰化;并按照Heiss et al. (2009) Carbohydr. Res. 344:915的描述,通过气相色谱-质谱法(GC-MS)分析所得部分甲基化的糖醇乙酸酯(PMAA)。

[0250] 通过用400 μ L氢氧化钠(15分钟)和100 μ L碘甲烷(45分钟)处理两轮进行全甲基化。添加2mL水以猝灭反应,并通过氮气流除去过量的碘甲烷。用二氯甲烷萃取、水洗(3 x)并除去溶剂后,使用2MTFA(400 μ L,在密封管中于121 $^{\circ}$ C进行2小时)对全甲基化材料进行水解,用NaBD₄还原,并使用乙酸酐/TFA(250 μ L+230 μ L,15分钟,50 $^{\circ}$ C)进行乙酰化。所得PMAA在连接至5975C MSD(质量选择检测器,电子轰击电离模式)上的Agilent 7890A GC上进行分析;在30mSupelco SP-2331键合相熔融石英毛细管柱上进行分离。

[0251] 结果

[0252] 从连接分析结果来看,葡萄糖最丰富的糖苷键是3-连接的吡喃葡萄糖基残基,多于6-连接的吡喃葡萄糖基残基。6-Glc与3,6-Glc之比约为2:1,表明平均侧链长度为3个Glc残基,3-Glc与3,6-Glc之比约为11:1,表明平均每十个主链Glc残基上有一个侧链。下面的表2显示了已鉴定的连接及其相对丰度。

[0253] 表2-糖基组成分析

峰	面积%*
末端吡喃甘露糖残基(t-Man)	0.1
末端吡喃葡萄糖基残基(t-Glc)	5.8
3-连接吡喃葡萄糖基残基(3-Glc)	67.7
6-连接吡喃葡萄糖基残基(6-Glc)	12.7
4-连接吡喃半乳糖残基(4-Gal)	4.4
3,4-连接吡喃葡萄糖基残基(3,4-Glc)	0.3
2,3-连接吡喃葡萄糖基残基(2,3-Glc)	2.0
3,6-连接吡喃葡萄糖基残基(3,6-Glc)	6.3
2,6-和4,6-连接吡喃葡萄糖基残基(2,6-和4,6-Glc)	0.6
3,4,6-连接吡喃葡萄糖基残基(3,4,6-Glc)	0.2

[0255] 实施例3

[0256] 在此实施例中,描述了用于帮助表征本文所述的分离的生物多糖化合物的NMR研究的方法和结果。

[0257] 通过将本发明化合物样品溶解在D₆M₂S₂O和D-TFA中来制备¹H NMR样品。使用400MHz NMR仪器对样品进行测试。测试结果如下表3和图1A所示。鉴定了主链和侧链的异头H1和H6质子信号。根据NMR数据计算1-3-Glc主链与1-6-Glc支链的比率。平均而言,侧链长度为约4个Glc残基。1-3-Glc与1-6-Glc之比为约10比1,表明平均每10个主链Glc残基上附接一个侧链。

[0258] 下面的表3显示了NMR汇总输出。

[0259] 表3-NMR汇总输出

H 类型	化学位移	积分	注释
H6SC	3.98	2.7	H6SC: H6 侧链 (SC-NRT 除外) & 分支点 H6
H1SC	4.24	2.0	H1SC: H1 侧链 (SC-NRT 除外)
H1BC	4.50	7.1	H1BC: 主链 H1

[0261] 然后该分子示意性表示为如图1B所示,其中本发明的生物多糖是一种基于 β -葡聚糖的糖,由3-连接和3,6-连接的葡萄糖残基单元组成。图1B显示了一种(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -葡聚糖的通用结构。为简单起见,主要残基标记为“BC”、“Br”和“SC”。BC代表主链残基,Br代表支化残基,SC代表侧链残基。

[0262] 实施例4

[0263] 在此实施例中,提供了申请人迄今为止完成的临床试验的总结。

[0264] 使用本发明化合物,在I期、IIA期和IIB期临床研究中超过200名患者进行了研究,其中大多数(超过150名受试者)参与了双盲、随机、安慰剂对照研究。大多数患者都在美国,其余的是在澳大利亚进行的研究。

[0265] 近年来,申请人已经完成了一项涉及慢性伤口治疗和美容皮肤学两种适应症的IIB期临床试验项目。

[0266] 随机、双盲和安慰剂对照的IIB期慢性伤口试验于2020年根据FDA批准的方案完成,结果显示药物疗效即使不优于金标准疗法,也可与金标准疗法相当。

[0267] 胸部CO₂点阵激光后美容皮肤学的IIB期随机双盲安慰剂对照试验,显示术后28天皮肤质量得到的改善接近安慰剂凝胶的两倍。

[0268] 所有II期试验均采用FDA批准的方案进行,随机试验受试者被分配到治疗组或对照组,并利用偶然因素减少选择和/或分配偏倚。

[0269] 双盲:参与者和管理人员都不知道他们正在接受的是安慰剂治疗还是试验性治疗。

[0270] 安慰剂对照:接受无效的“安慰剂”治疗的对照组,特别设计为没有实际效果以便再次对正在试验的治疗进行基准测试。

[0271] 下表4显示了迄今为止的临床验证总结。

[0272] 表4-已完成的临床验证工作总结

阶段	适应症	国家	患者	方案设计	结果
I/II 期	静脉性 腿部溃 瘍	AU	6	开放, 观察性	●与基线相比所有患者的伤口面积 减少了 35%
			18	双盲、随机、 安慰剂对照	●治疗 4 周后伤口表面积减少 36.7% (平均)
IIA 期	静脉性 腿部溃 瘍	AU	66	双盲、随机、 安慰剂对照	●在“完成者队列”中, 与基线相比, 治疗 85 天后伤口表面积减少 45%, 具有统计学显著性 ($p < 0.008$)
IIB 期	静脉性 腿部溃 瘍	US	82	双盲、随机、 安慰剂对照 FDA 批准	<ul style="list-style-type: none"> ●80 名患者随机分组 ●取得了强烈的疗效信号 ●在符合方案组中, 与安慰剂相比, TR-987 完全闭合发生率的调整 差异为 27%, $p = 0.1$ ●在 ITT 组中, 与安慰剂相比, TR-987 完全闭合发生率的调整 差异为 20.6% ($p = 0.12$) ●III 期疗效分析表明, 在 $n = 300-400$ 名患者中达到了统 计学显著性
IIA 期	面部激 光消融	AU	试点 - 13 主要 - 26	双盲、随机、 安慰剂对照	<ul style="list-style-type: none"> ●已确定安全性和可行性 ●与安慰剂相比, 完全伤口闭合的 时间在统计学上显著缩短 ($p < 0.0062$); 与安慰剂相比, 伤口闭合速度加快约 30% (平 均), 10.9 天 (GlycoPrime™ 0.1% 浓度) 相对于 16.3 天 (安 慰剂)
IIB 期	面部激 光消融	US	40	双盲、随机、 安慰剂对照 FDA 批准	<ul style="list-style-type: none"> ●与安慰剂组相比, 皱纹改善 70% ($P < 0.04$) ●弹性改善 114% ($P < 0.13$), 28 天时弹性改善翻倍

[0274] 实施例5

[0275] 在澳大利亚进行了I期试验,以确定上述分离的生物多糖化合物的安全性和有效性。进行了一项包括6名患者的开放的、非对照试验。对于标准伤口治疗失败的患者,每2至3天局部施用一次本发明化合物,持续四周。

[0276] 在治疗开始后第56天进行评估,通过面积测量法分析和确定伤口面积的减少,并与治疗前的伤口面积进行比较。此外还进行了安全性和毒理学分析。

[0277] 未观察到或报告有与使用供试品相关的显著不耐受或毒性。在56天的时间内,在所有6名患者中均观察到愈合反应,测量的伤口表面积减少了26%至82%不等。

[0278] 如图2所示,与治疗第1天相比,第56天时观察到伤口表面积的伤口大小平均减少

56%。

[0279] 总之,该I期研究证实了本发明化合物刺激慢性营养性溃疡愈合的能力。

[0280] 实施例6

[0281] 在此实施例中,描述了I/II期试验。

[0282] 进行了第二项I/II期研究,以确定本发明化合物的疗效,该研究在18名患有标准伤口处理疗法难治性CDVI溃疡的患者中进行了单中心、随机、双盲、载体对照试验。将本发明化合物与具有较低分子量范围和较小比例(1-6)- β -葡聚糖侧链支化的另一种形式的葡聚糖(GlucodineTM)以及载体(对照)进行比较。

[0283] 将两种类型的葡聚糖材料(本发明和GlucodineTM)悬浮在霜剂基质中(0.1%w/w;对羟基苯甲酸酯作为防腐剂)。

[0284] 患者被随机分配到三个治疗组(两个活性物组和一个载体对照组),每组6名患者。

[0285] 每周治疗3次,持续4周。

[0286] 没有观察到或报告有与使用活性测试品或载体对照物相关的不耐受性或毒性。

[0287] 通过面积测量法测量伤口的表面积来评估疗效。主要疗效参数是溃疡表面积从基线(第1次访视)到试验结束(第6次访视)的改善。4周内的平均改善率在载体组中为4.4%,在本发明化合物组中为36.7%,在GlucodineTM组中为17.3%。八周内的愈合程度如下表5和图3所示(注意本发明化合物在图3中被标记为“Glucoprime”)。

[0288] 表5-I/II期试验中临床验证本发明化合物的总结,4周内溃疡的平均改善率

[0289]	伤口表面积减少%
安慰剂化合物	4.4%
本发明化合物	36.7%
Glucodine TM	17.3%

[0290] 结果表明,本发明化合物作为伤口愈合剂明显更有效。

[0291] 实施例7

[0292] 在该实施例中,描述了使用本发明化合物来治疗慢性伤口(在该情况下为静脉性溃疡)的2A期试验。

[0293] 避免使用防腐剂例如对羟基苯甲酸酯(用于第二项临床研究)的战略决策推动了配方的改变,因为对羟基苯甲酸酯可能会抑制巨噬细胞。决定重新使用第一项临床研究中使用的甲醇防腐剂。然后进行配方研究,最终决定使用含有不同程度的防腐剂保存的凝胶基质。

[0294] 测试了含有0.1%和1.0%的活性物的制剂。

[0295] 这是一项双盲、随机、载体对照的2期研究,使用计算机生成的分配序列将患者随机分配到三个治疗组之一。在两个地点招募了58名患有慢性静脉性溃疡的患者(36名男性和22名女性),并将其随机分配至高剂量活性物(1.0%本发明化合物凝胶)或低剂量活性物(0.1%本发明化合物凝胶),或单独的凝胶基质(载体对照)。患者的年龄范围为34岁至93岁,三个治疗组的人口统计学特征相当。在标准伤口护理管理时,每周进行3次治疗,持续12周,在整个伤口表面上的治疗深度为约3mm。该研究旨在提供本发明化合物对患有腿部慢性静脉性功能不全溃疡患者的疗效和安全性的统计评估。

[0296] 作为研究的一部分,每周三次清洁、清创、使用测试产品并用压力绷带包扎伤口,

持续长达12周。每周追踪伤口边缘,并确定愈合速度和愈合程度。

[0297] 在试验期间,两个活性物组均未出现与药物相关的毒性。

[0298] II期研究的数据表明,本发明化合物促进了伤口愈合的速度,与安慰剂治疗的溃疡相比,本发明化合物治疗的溃疡愈合具有统计学显著性的改善率。研究中发现的伤口闭合速度如下表6所示。

[0299] 表6-研究中发现的伤口闭合速度

组别	伤口闭合速度	与安慰剂组相比	
		观察到的显著性水平 (P 值)	
[0300]			
安慰剂	5.4 mm ² /周		—
0.1%本发明化合物	20.4 mm ² /周		0.01
1.0%本发明化合物	15.4 mm ² /周		0.04

[0301] 通过溃疡表面积的减少测量的12周内的总体平均愈合水平如下表7所示。

[0302] 表7-通过溃疡表面积的减少来测量

组别	伤口表面积减少百分比
[0303]	
安慰剂	10%
0.1%本发明化合物	59%
1.0%本发明化合物	55%

[0304] 图4还显示了溃疡面积相对于基线的百分比变化中值,其中“高(1.0%)”指高剂量样品,“低(0.1%)”指低剂量样品。

[0305] 即使溃疡的大小存在很大差异,也观察到了这些结果,尽管患者被随机分组,但两个本发明化合物治疗组的平均溃疡大小显著大于安慰剂组。

[0306] 实施例8

[0307] IIA期试验的完整总结结果如下表8所示。

[0308] 表8-澳大利亚慢性静脉性溃疡2A期试验结果

[0309]

治疗组	天	统计数据汇总						相对于基线的变化						P值*	
		n	平均	SD	最小	最大	n	平均	SD	最小	中位	最大			
高 (1.0%)	第1天	14	2925.0	2957.69	50	2077.5	7470								
	第15天	13	2796.0	2743.47	0	2170.0	6940	13	-273.2	525.18	-1750	-100.0	330		
	第29天	14	2264.5	2388.88	0	1257.5	6380	14	-660.5	872.43	-2970	-265.0	110		
	第43天	14	2049.3	2209.04	0	1135.0	6110	14	-875.7	1246.02	-3810	-295.0	70		
	第57天	14	1906.1	2190.01	0	982.5	6600	14	-1019.0	1384.20	-4370	-420.0	550		
	第71天	14	1821.4	2354.15	0	900.0	7740	14	-1104.0	1783.44	-5800	-570.0	1690		
	第85天	14	1772.1	2298.19	10	910.0	7420	14	-1153.0	1952.62	-6090	-305.0	1370	0.0022**	
	低 (0.1%)	第1天	15	3122.7	8955.68	20	470.0	35290							
安慰剂	第15天	14	3098.6	8652.29	20	505.0	32980	14	-196.4	674.11	-2310	-30.0	540		
	第29天	15	2832.7	8646.40	0	300.0	33960	15	-290.0	504.83	-1550	-90.0	210		
	第43天	15	2580.7	7830.58	0	320.0	30760	15	-542.0	1183.33	-4530	-140.0	130		
	第57天	15	2045.0	5976.54	0	340.0	23470	15	-1078.0	3005.95	-11820	-190.0	30		
	第71天	15	1815.3	5368.46	0	320.0	21060	15	-1307.0	3616.45	-14230	-220.0	10		
	第85天	15	1694.7	4902.60	0	320.0	19230	15	-1428.0	4093.14	-16060	-200.0	90	0.008***	
	第1天	15	2138.2	4409.56	20	320.0	15640								
	第15天	15	2562.5	5380.42	0	250.0	17610	15	424.3	1164.90	-100	-20.0	4200		
第29天	15	3598.0	7604.69	0	130.0	23890	15	1459.8	3380.69	-190	-20.0	10800			
第43天	15	3752.0	9478.68	0	170.0	35900	15	1613.8	5252.51	-540	-53.0	20260			
第57天	15	3867.3	7931.36	0	120.0	29110	15	1529.1	3604.96	-200	-20.0	13470			
第71天	15	2944.0	6617.59	0	150.0	22960	15	805.8	2276.02	-1470	-50.0	7320			
第85天	15	3222.0	6890.09	0	90.0	24850	15	1083.8	2512.59	-290	-50.0	9210			

*正态近似的Wilcoxon秩和检验;**高 (1.0% MG-36) 与安慰剂相比;***低 (0.1% MG-36) 与安慰剂相比

[0310] 如以上结果所示,本发明化合物促进了伤口愈合的速度。与安慰剂治疗的溃疡相比,用本发明化合物治疗的溃疡以显著更快的速度 (mm²/天) 愈合。12周的总体平均治愈水平分别为10% (安慰剂)、59% (低剂量本发明化合物) 和55% (高剂量本发明化合物)。

[0311] 实施例9

[0312] 在该实施例中,描述了IIA期灼烧试验。在美国完成了一项双盲、随机、安慰剂对照的2期研究,旨在调查在接受了下眼睑的二氧化碳激光皮肤表面重建术 (LSR) 的患者中,与安慰剂相比,局部施用0.1%和1.0%的本发明化合物 (载体为凝胶) 的安全性和有效性。

[0313] 设计和终点: 该研究评估了与安慰剂 (凝胶基质) 相比,两种浓度的本发明化合物

凝胶(称为GLYC-101,0.1%浓度,和GLYC-101,1.0%浓度)在促进26名接受了用于美容目的(减少皱纹)的CO₂ LSR的受试者的下眼睑皮肤伤口愈合方面的安全性和有效性。将研究化合物局部施用于每个下眼睑的消融皮肤区域,使整个伤口表面覆盖有一层约0.5mm厚(不超过1mm)的试验品(安慰剂或GLYC-101)。每天施用试验品(距上次施用约24小时),共施用5天。总的来说,与安慰剂相比,用本发明化合物(GLYC-1011.0%或GLYC-1010.1%)治疗是安全的且耐受性良好。

[0314] 结果:研究药物似乎既没有增加任何现有安全问题的发生率或加剧任何现有安全问题,也没有减少与用于除皱的下眼睑区域CO₂ LSR消融的术后相关的安全事件的数量或降低其严重性。

[0315] 当考虑来自所有治疗组合的完整受试者数据集时,每个GLYC-101(现命名为TR-987的本发明化合物)与安慰剂在主要终点(完成伤口闭合的时间)的比较中显示出阳性结果。图5显示了2期试验激光数据的伤口闭合时间。伤口愈合时间平均减少了30%。更具体地,当本发明化合物(GLYC-1010.1%和GLYC-1011.0%)组与安慰剂组相比时,完成伤口闭合的时间的疗效结果更快(分别为 $p=0.0062$ 和 $p=0.0331$)。这些结果证明了本发明化合物的疗效。

[0316] 实施例10

[0317] 在该实施例中,IIA期试验结果参见图6、图7和图8。

[0318] 具体而言,在图6、图7和图8中,示出了在使用本发明化合物完成的试验中静脉性溃疡伤口的伤口尺寸减小的非典型实例。在完成者队列的58名患者中,接受本发明化合物的患者在12周内经证实有统计学显著的45%的减小($p<0.008$)。

[0319] 基于澳大利亚静脉性溃疡试验显示了接受本发明化合物治疗的患者的实施例。如图所示,溃疡随着时间的推移而显著减少,在所示的三个实施例中,在8至12周内愈合或接近完全愈合。

[0320] 实施例11

[0321] 在该实施例中,描述了一项试验,该试验说明了来自IIb期试验的伤口闭合发现。

[0322] 完成了双盲安慰剂对照随机IIB期临床试验,IIB期研究评价了本发明化合物与安慰剂凝胶在治疗慢性静脉性溃疡中的比较。

[0323] 总体而言,82名受试者被随机分配接受治疗(42名本发明化合物受试者,38名安慰剂受试者)并提供至少一次溃疡面积基线后评估(ITT群体)。符合方案(perprotocol)的人群由主办方定义:如果受试者提前退出、存在重大方案偏差或连续感染,则不包括在PP群体内。

[0324] 试验的主要标准包括

[0325] • IIB期静脉性腿部溃疡试验;

[0326] • 该试验宏大且稳健;

[0327] • 双盲安慰剂对照;

[0328] • 有效IND下的FDA批准的方案;

[0329] • 用本发明化合物+标准护理(压迫绷带)治疗的VLU相比于用安慰剂凝胶和相同护理标准治疗的VLU;

[0330] • 安慰剂凝胶是真正的载体对照,在各方面均可与活性物区别;

- [0331] • 在10个美国地点和3个澳大利亚地点进行招募;
- [0332] • 治疗期12周;
- [0333] • 治疗 2cm^2 至 20cm^2 的溃疡,根据方案变化检查 2cm^2 至 20cm^2 溃疡;
- [0334] • 磨合期是纳入标准的一部分,因此表现出超过30%减少的快速愈合者被排除在随机分组之外,以确保只有愈合较差的溃疡被纳入试验;
- [0335] • 溃疡没有时间限制,一些入选的溃疡在随机分组前持续了约300周。
- [0336] 分析表明,尽管各组间的主要目标(愈合时间)没有差异,但关键次要目标(100%伤口愈合比例)显示出疗效的有力信号。伤口达到100%愈合的比例被认为是FDA伤口愈合终点的金标准。
- [0337] 总之,围绕活性物和安慰剂之间伤口闭合发生率和伤口面积减少的关键初步分析表明,该试验中存在:
- [0338] • 对于 2cm^2 至 20cm^2 的溃疡的ITT组($n=67$),完全闭合发生率的调整差异为20.6% ($p=0.12$);
- [0339] • 对于 2cm^2 至 20cm^2 的溃疡的符合方案组($n=69$),完全闭合发生率差异为27% ($p=0.1$);
- [0340] • 对于 2cm^2 至 20cm^2 的溃疡的符合方案组($p=0.035$)²,本发明化合物(91%)与安慰剂(46.6%)相比,慢性静脉性腿部溃疡(VLU)的伤口面积减少百分比增加了一倍。
- [0341] 与安慰剂相比,围绕伤口面积减少的其他目标也显示出强烈的效果信号和总体疼痛减轻(具有统计显著性),进一步显示出强烈的疗效信号。
- [0342] 图9显示了本发明化合物的载体组和活性物组之间完全闭合的原始发生率与ApiligrafTM III期标签的III期数据的差异。ApiligrafTM可以说是VLU闭合的金标准,每次施用可报销约1200美元,VLU的正常治疗可能需要3-15次施用。
- [0343] IIB期试验中的本发明化合物符合方案组是那些完成试验并在12周期间接受完整药物剂量的患者(发明人认为该组是对药物疗效的准确衡量)。
- [0344] 该ITT组包括所有随机分组的患者,包括所有提前退出的,没有接受完整的12周治疗的患者。
- [0345] 临床上有意义的差异通常被认为是绝对闭合的+10%差异。
- [0346] 如图9所示,本发明化合物在完全闭合发生率上实现了20.6%的调整差异,而ApiligrafTM完全闭合的调整的发生率为17%。记录了ITT组和PP组的有意义差异。
- [0347] 调整的数据基于逻辑回归(本发明化合物)和Cox回归(ApiligrafTM),控制已知影响组间愈合的因素(例如基线、溃疡大小等)。
- [0348] 考虑到试验设计(包括盲法)、纳入和排除标准的差异,结果不具有严格可比性,但提供了本发明化合物具有可比的或更优疗效的信号。
- [0349] 图10示出了记录的活性物组相对于安慰剂实现100%治愈的逻辑回归优势比(“OR”)。输出来自对已知会影响愈合的协变量进行调整的逻辑回归。对于OR的解释,举例来说,如果OR为1.4,则本发明化合物组的治愈几率比安慰剂组的治愈几率高1.4倍。大于1的值有利于治疗,小于1的值有利于安慰剂。
- [0350] 记录的OR均超过2,有利于治疗,表明活性物组的治愈几率是安慰剂组完全治愈几率的两倍以上。

[0351] 图10示出了每个显示的ITT组和PP组对于方案2cm²至20cm²和2cm²至12cm²中确定的两个尺寸组的完全愈合的OR。同时给出了置信区间的上限和下限。

[0352] 所有组的优势比都具有临床意义,并且都有利于治疗,随着“n”的增加(在III期试验中),假设呈现的置信区间将变窄以达到统计学显著性。结果表明,与载体或安慰剂组相比,本发明化合物组的患者实现100%闭合的可能性高出2倍以上。

[0353] 实施例12

[0354] 在该实施例中,参考图11描述了IIA期和IIB期试验中的平均伤口面积减少。该数据表明本发明化合物产生了一致的疗效,如在两个单独的独立II期试验中通过伤口面积减少所测量的。

[0355] 平均伤口面积减少被FDA认为是衡量愈合疗效的II期试验的可接受终点。它被认为是愈合的前兆或信号,因此仅被FDA接受为有效的II期终点。它不被接受为有效的III期终点。来自IIB期试验的符合方案组的本发明化合物结果显示了完成试验并接受完整药物剂量的那些患者的结果,以及IIA期试验中完成试验的那些患者的完成者队列的结果。

[0356] 图13示出了使用伤口面积减少的度量来进行的本发明与EpifixTM的疗效的比较。

[0357] 所用的EpifixTM数据来自一项已公布的赞助商资助的试验(未通过FDA),该试验不是双盲试验,即医生是非盲的。EpifixTM是一种类似于ApiligrafTM的生物贴剂,已被批准作为人体组织产品并实现了合理的商业化。EpifixTM每次施用的报销金额超过1000美元,需要多次施用才能闭合。关于EpifixTM的更多信息请参见<https://mimedx.com/epifix/>。

[0358] 如图13所示,与安慰剂的平均伤口面积减少差异相比(47%),本发明化合物(标记为TR-987)的平均伤口面积减少差异(91%)接近安慰剂的两倍,绝对差异为44%(p=0.035),而EpifixTM在发明化合物和安慰剂之间实现了25%的绝对差异(p<0.02)。

[0359] 实施例13

[0360] 在该实施例中,将本发明化合物与现有技术产品ApiligrafTM(参见www.apiligraf.com)进行治疗静脉性腿部溃疡(VLU)的比较。图12示出了本发明化合物的载体组和活性物组之间完全闭合的原始发生率与标记为ApiligrafTM的III期的III期数据的差异。ApiligrafTM可以说是VLU闭合的金标准,每次施用的报销费用约为1200美元,可能需要3-15次施用。

[0361] 来自IIB期试验的符合方案组的本发明化合物是那些完成试验并在12周期间接受完整药物剂量的患者(该组是对药物疗效的准确衡量)。

[0362] ITT组包括所有随机分组的患者,包括所有退出的患者。

[0363] 临床上有意义的差异通常被认为是100%伤口闭合的+10%差异。

[0364] 与安慰剂相比,本发明化合物在完全闭合发生率方面实现了21%的调整差异,而ApiligrafTM在完全闭合发生率方面实现了17%的调整差异,这表明在ITT组和PP组中,本发明化合物均优于金标准产品。

[0365] 本发明化合物(称为TR-987)研究的21%调整差异是在该试验中使用的TR-987和安慰剂之间观察到的完全愈合的绝对差异。

[0366] 调整的数据基于逻辑回归(本发明化合物)和Cox回归(ApiligrafTM),控制已知影响组间愈合的因素(例如基线、溃疡大小)。

[0367] 考虑到试验设计(包括盲法)、纳入和排除标准的差异,结果不具有严格可比性,但

提供了本发明化合物具有可比的疗效的强烈信号。

[0368] 实施例14

[0369] 在该实施例中,显示了比较本发明化合物和现有技术产品Epifix™的试验,比较了伤口面积的减少。图13示出了本发明化合物(标记为TR-987)与Epifix™的伤口面积减少百分比。

[0370] 平均伤口面积减少被FDA认为是II期试验的可接受终点,仅用于衡量疗效,而非III期试验或关键性试验的可接受终点。

[0371] 本发明化合物呈现了来自IIB期试验的符合方案组,即完成试验并接受完整药物剂量的患者(该组是对药物疗效的准确衡量)。

[0372] Epifix™数据是一项赞助商资助的试验(未通过FDA),该试验不是双盲试验,即医生的新活性物与治疗。

[0373] 本发明化合物在平均伤口面积减少方面实现了接近两倍安慰剂的差异(91% vs 47%),绝对差异为44% ($p=0.035$),而Epifix™实现了25%的绝对差异 ($p<0.02$)。

[0374] 本发明化合物在伤口面积减少方面与更早的IIA期试验数据55% vs 25% ($p<0.01$)一致。

[0375] Epifix™是一种类似于Apiligraf™的生物贴剂,已被批准作为人体组织产品,并取得了巨大的市场渗透率。Epifix™每次施用报销c+\$1000,需要多次施用才能闭合。

[0376] 考虑到试验设计、纳入和排除标准、患者和医生盲法水平的差异,结果不具有严格的可比性,但提供了本发明化合物具有可比的疗效的强烈信号。

[0377] 实施例15

[0378] 在该实施例中,参考图14和图15描述了IIB期试验结果,以说明在IIB期静脉性腿部溃疡试验($n=67$) (2cm^2 至 12cm^2)中用本发明化合物治愈的VLU伤口的典型实施例。

[0379] 图14和图15显示了试验中的另一个显示在12周内愈合的实施例,其中在随机分组时的溃疡大小为 7.53cm^2 ,由澳大利亚墨尔本Heidelberg Repatriation医院提供,该溃疡在入组前已开放超过4年。该溃疡在用TR-987治疗10周后愈合。

[0380] 实施例16

[0381] 申请人已经确定本发明化合物是有用的术后局部凝胶,其在28天时将皮肤质量和美容手术的临床效果提高了近两倍。

[0382] 图17示出了在微创美容手术(胸部 CO_2 点阵激光手术)后接受本发明化合物的患者的非典型实例,以及在IIB期激光消融试验中发现的非典型的皮肤质量改善结果($n=42$)。左图显示了点阵激光手术后的胸部。右图显示了术后28天并且使用本发明化合物每日治疗皮肤后的同一胸部。

[0383] 与使用安慰剂凝胶+标准护理相比,在IIB期试验中使用本发明化合物的患者在使用凝胶后的第28天经历了通过弹性和皱纹所测得的接近两倍的促进的皮肤质量的发生率 ($p<0.04, n=40$)。

[0384] 近年来,消融性点阵激光越来越多地用于改善紫外线引起的光损伤、皮肤皱纹(皱褶)和疤痕。术后皮肤护理对促进治疗后的伤口最佳愈合至关重要,但目前尚无金标准的术后护理剂。

[0385] 本发明化合物在IIB期试验中的发现表明,本发明化合物产生了额外的胶原蛋白

生成和纤维化,以加快的速度填充皱纹和细纹。

[0386] 完整的IIB期试验(CO₂点阵激光后)

[0387] 上文使用的临床试验方法(n=40)是模拟标准化烧伤伤口,通过在整个胸部区域进行点阵CO₂激光手术产生。双盲/安慰剂对照临床研究由第三方进行。

[0388] 皱纹

[0389] 图18详细说明了在基线和第28天之间,本发明化合物组和载体组中每一组中皱纹评分改善 ≥ 1 分的患者比例(Fitzpatrick-Goldman分类)。未调整比例的卡方检验用于确定以p值表示的显著性。

[0390] 与安慰剂组(其中只有50%的应答者达到1或更高的皱纹评分)相比,本发明化合物组有85%的应答者达到1或更高的皱纹评分(33%的改善)。

[0391] 70%差异,P<0.04(使用卡方或费舍尔精确法)。

[0392] 弹性

[0393] 在第28天,治疗组中有75%的应答者弹性评分达到3分或更高(33%的改善),而安慰剂组只有35%的应答者达到3分或更高(114%差异,P<0.011)。

[0394] 图19详细描述了在基线和第28天之间,本发明化合物组和载体组中每一组中弹性评分改善 ≥ 3 分的患者比例(Fitzpatrick-Goldman分类)。未调整比例的卡方检验用于确定以p值表示的显著性。

[0395] 实施例17

[0396] 在本实施例中,本发明化合物的疗效针对另一种作为WoulganTM上市并以US 9,956,245 B2公布的现有技术产品进行了测试,发明人认为US 9,956,245 B2是与伤口愈合最相关的 β -葡聚糖专利公布。

[0397] 如图20所示,通过测量从人类收集的巨噬细胞的TNF α 反应进行测定,WoulganTM产生的免疫反应是对照的8.9倍。这是对免疫反应或刺激的一种测量。相比之下,本发明化合物测定的本发明化合物(标记为TR-987)相对于相同载体对照的响应为25.4倍。这意味着本发明化合物的效力比WoulganTM凝胶强约3倍,疗效比现有技术化合物有非常高的提高。注意到WoulganTM的浓度为2%,本发明化合物的浓度为0.1%。本发明化合物的浓度为WoulganTM凝胶的1/20,但产生了3倍的免疫反应,这意味着本发明化合物分子产生免疫反应的效力是WoulganTM凝胶的60倍。

[0398] 仅通过实施例的方式描述了多糖化合物、其使用方法和制备方法的多个方面,并且应当理解,在不背离本文权利要求的范围的情况下,可以对其进行修改和添加。

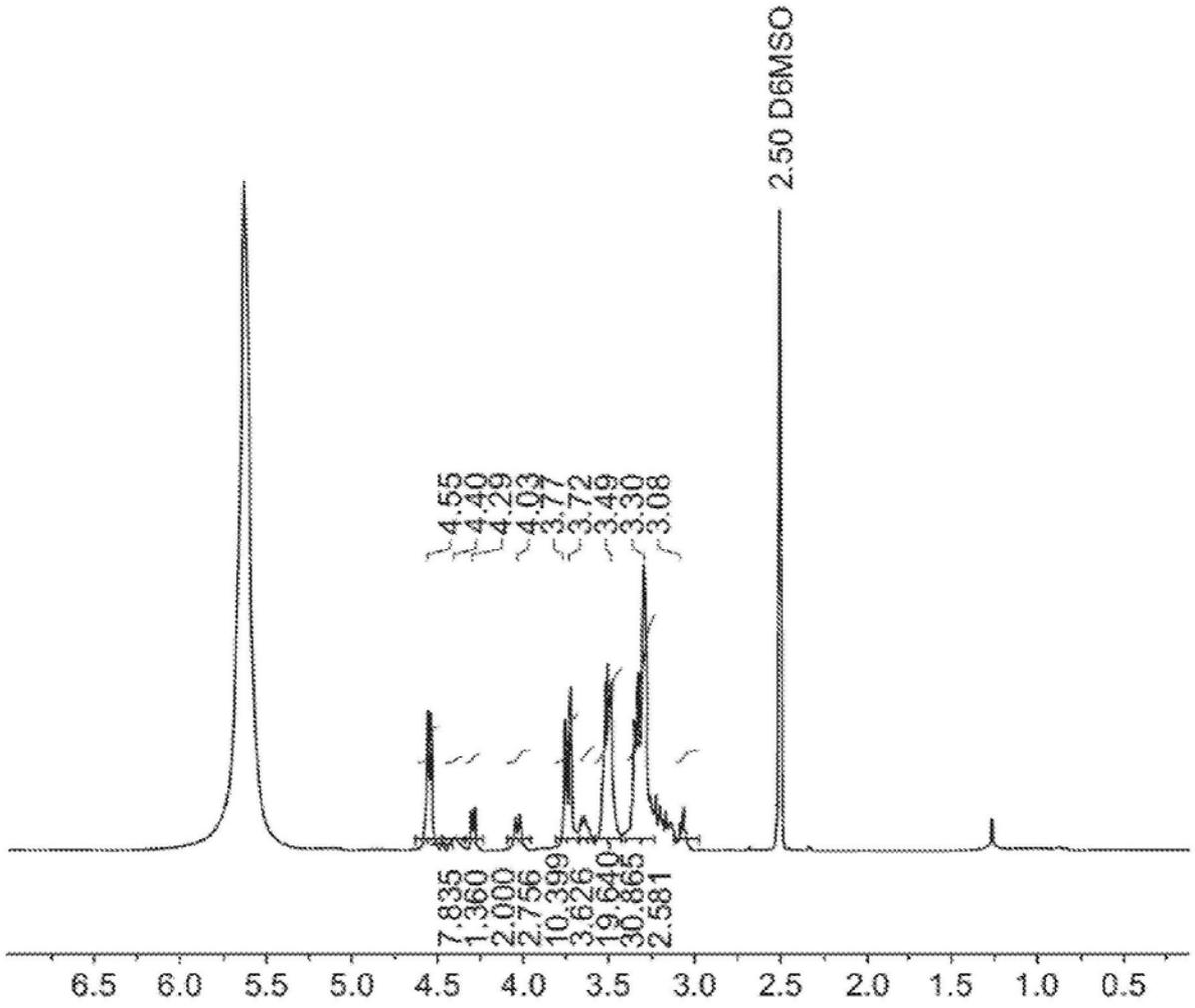


图1A

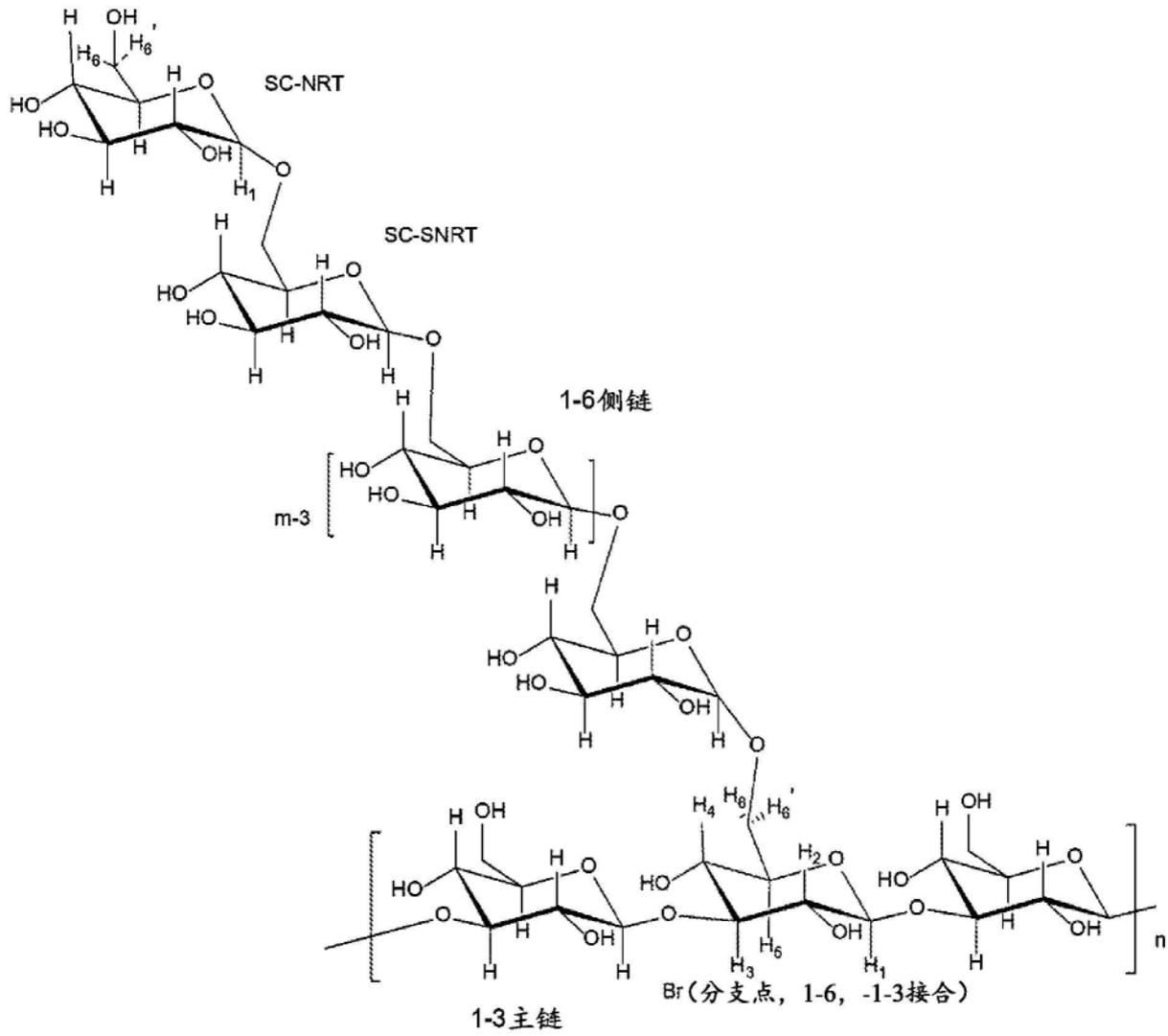


图1B

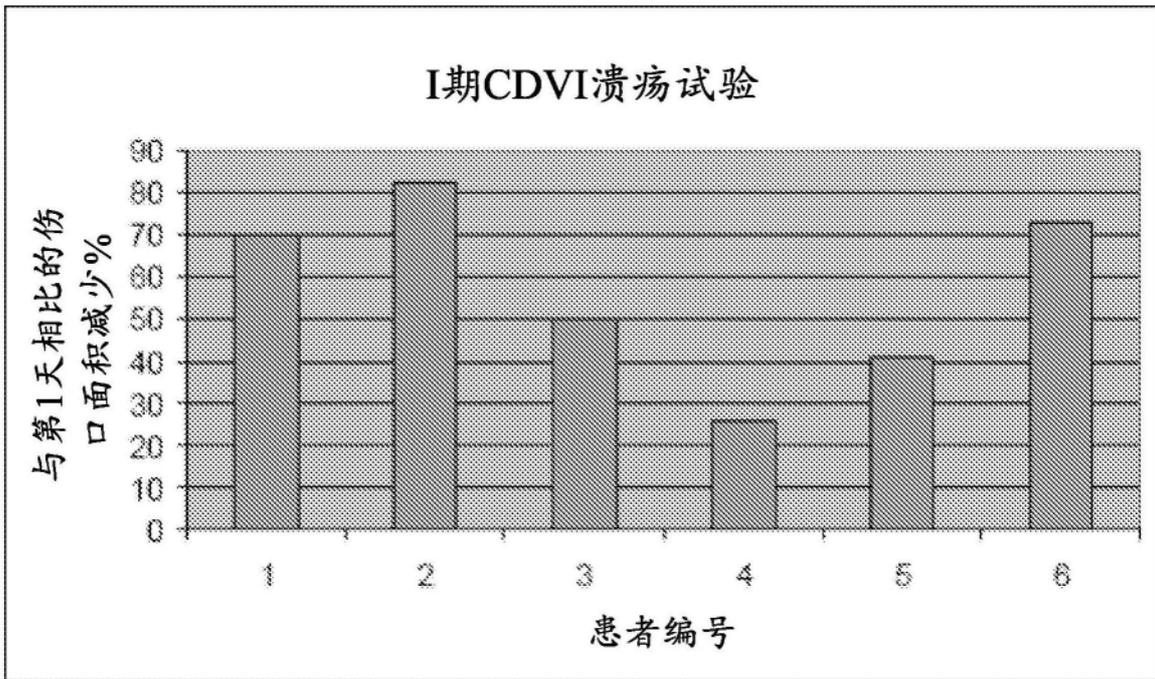


图2

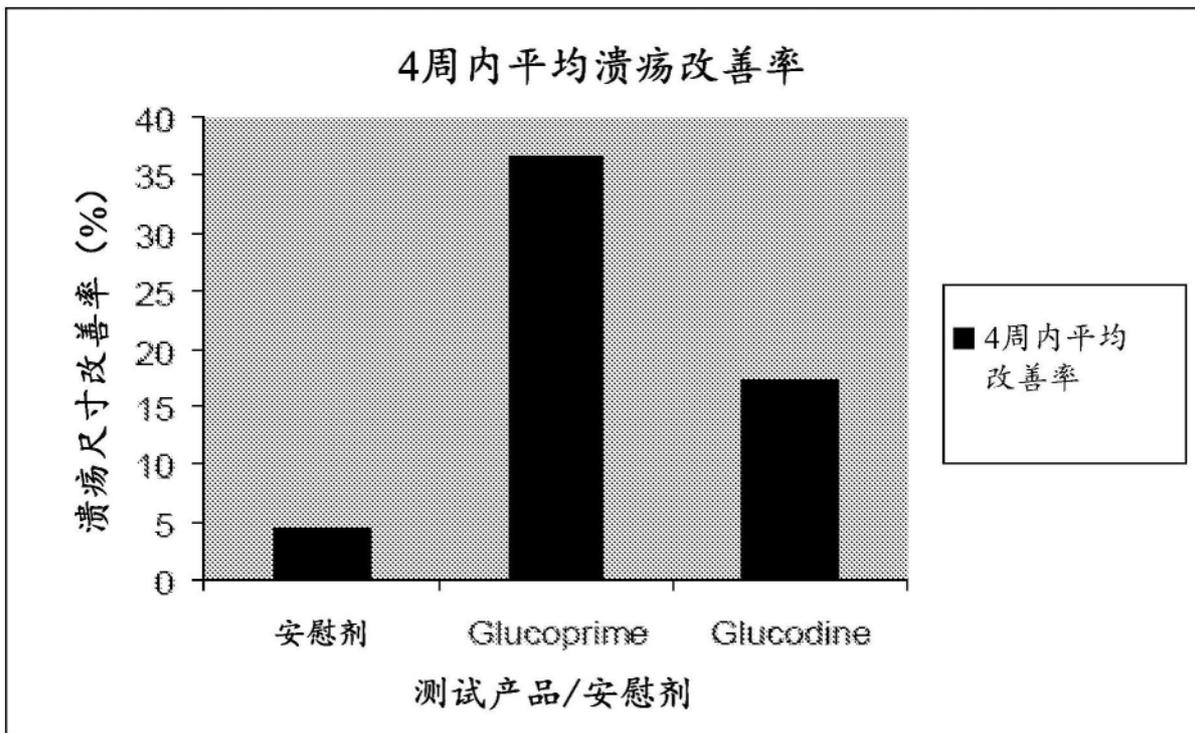


图3

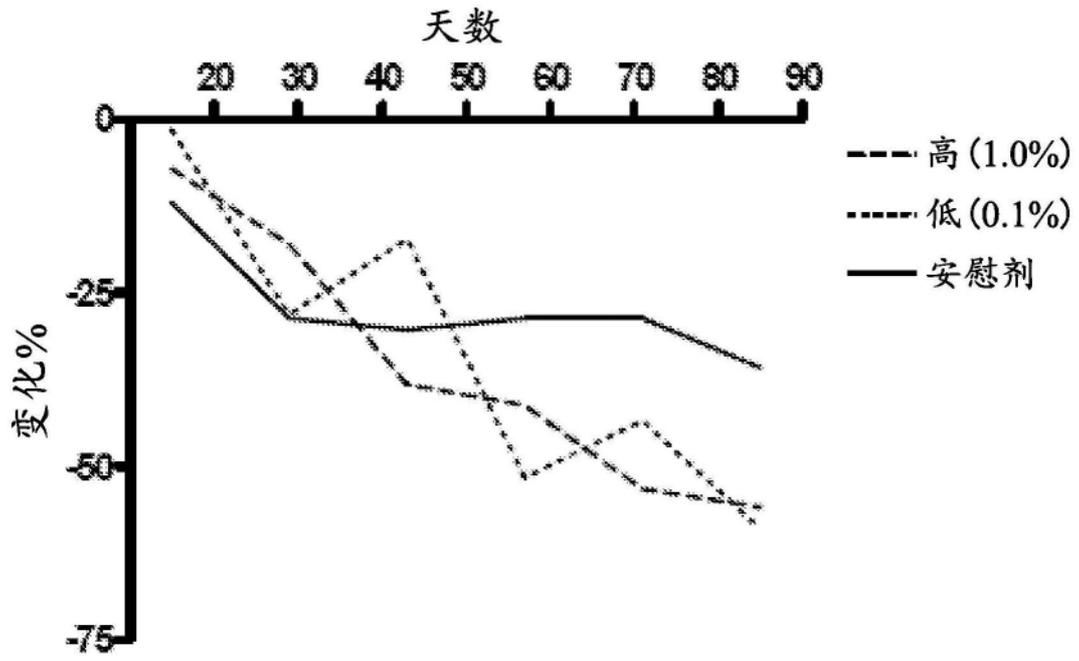


图4

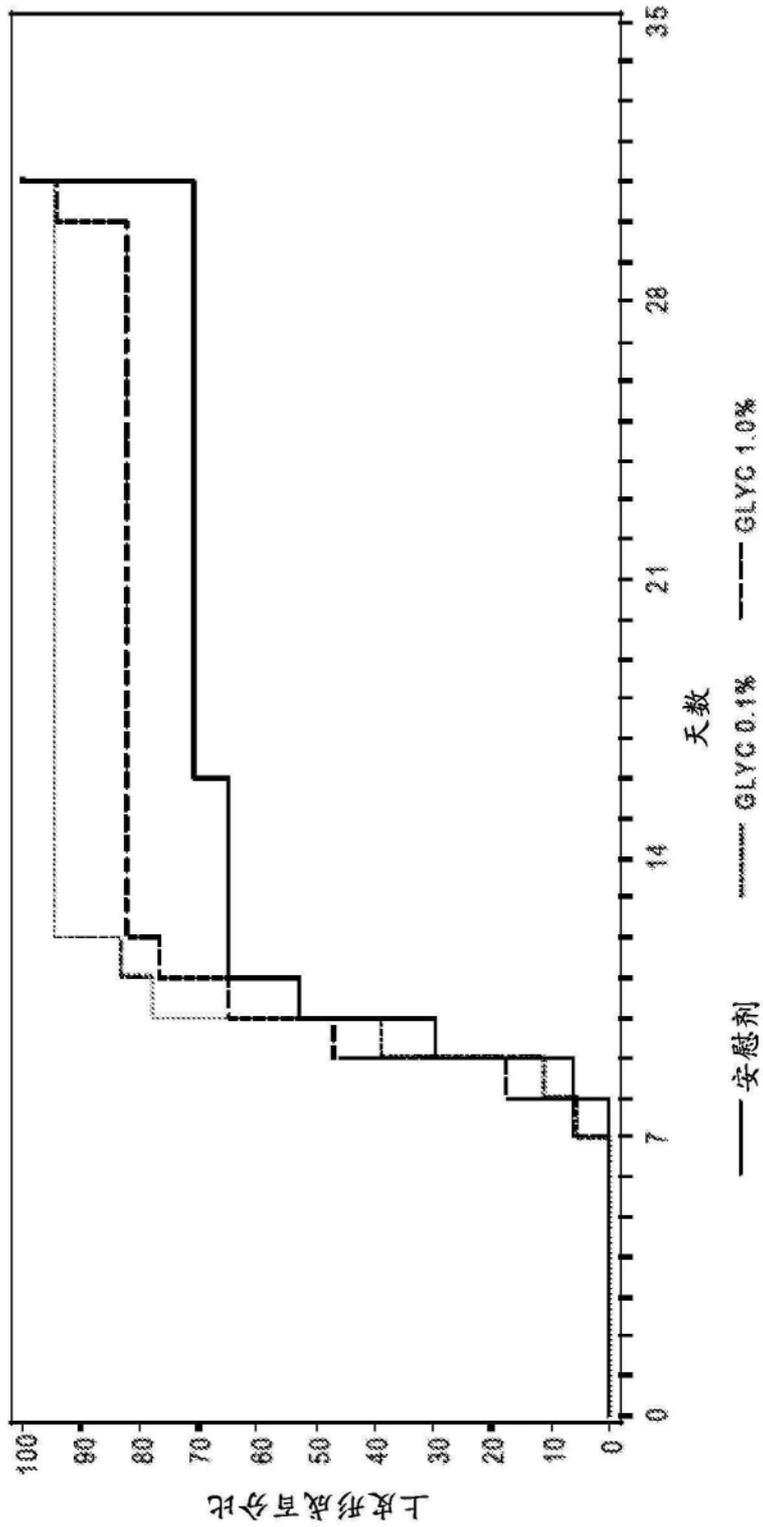


图5

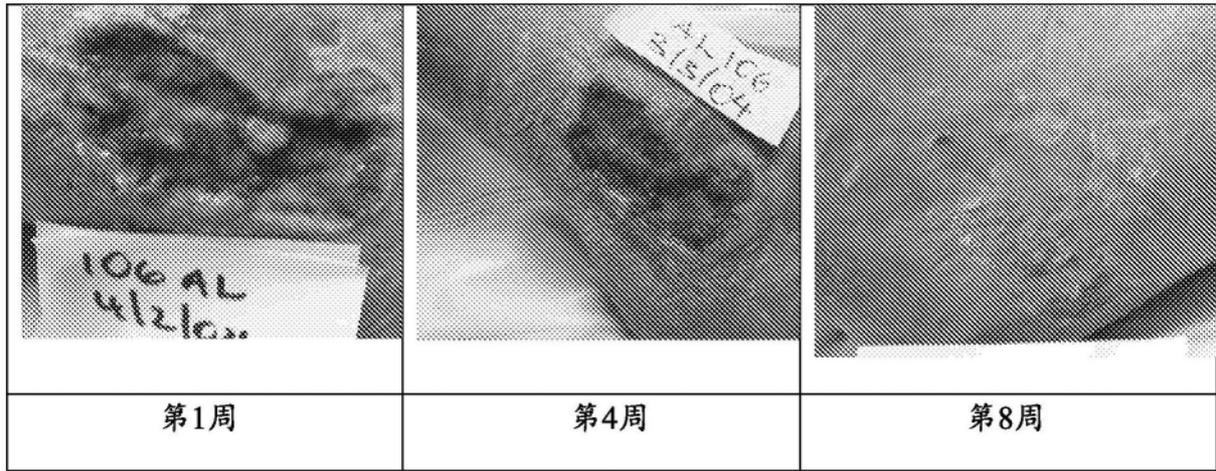


图6

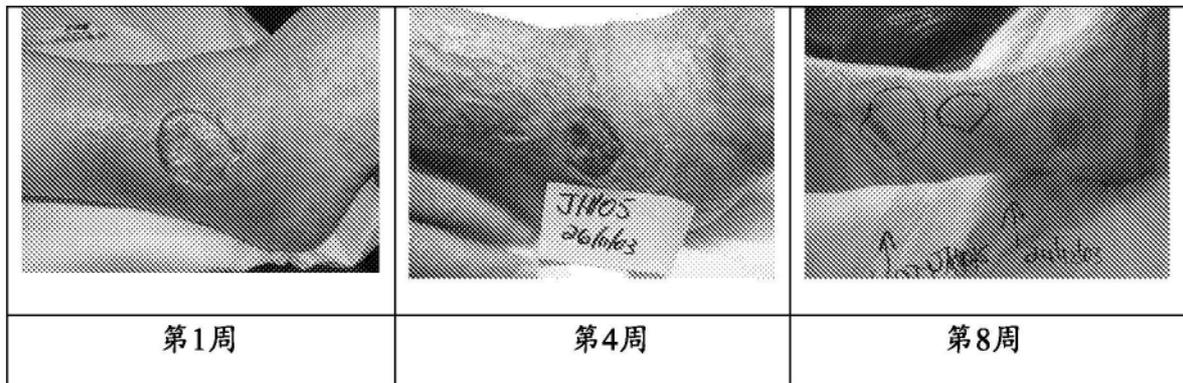


图7

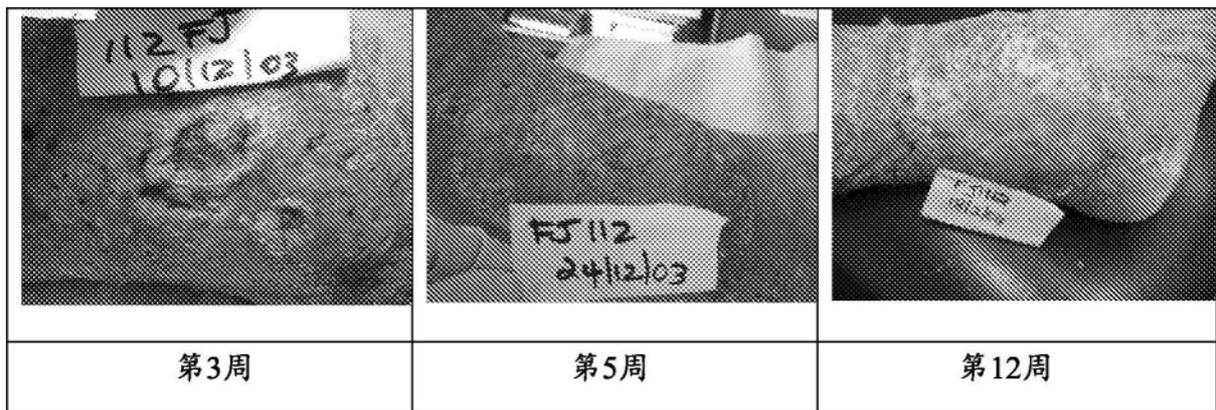


图8

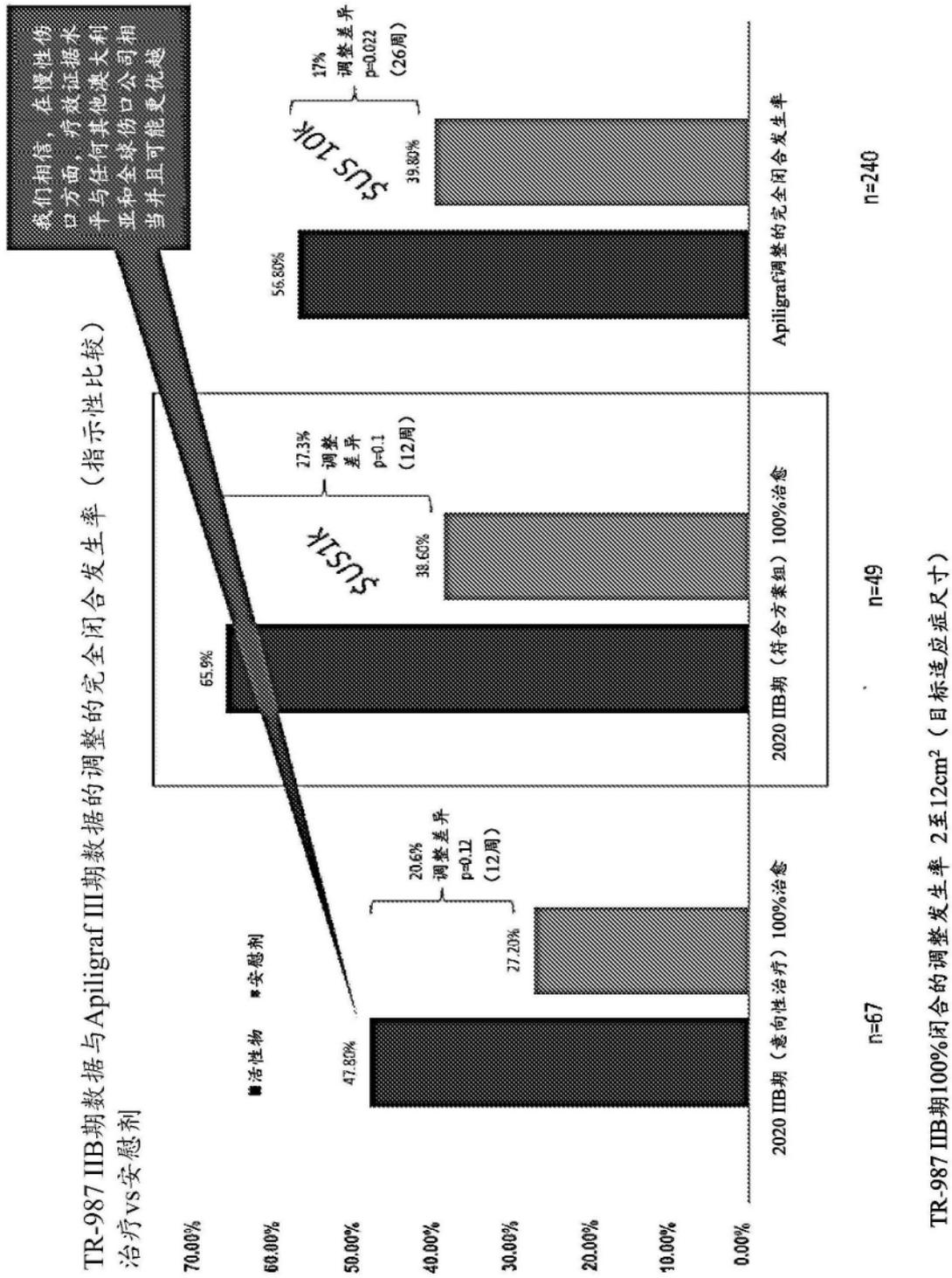


图9

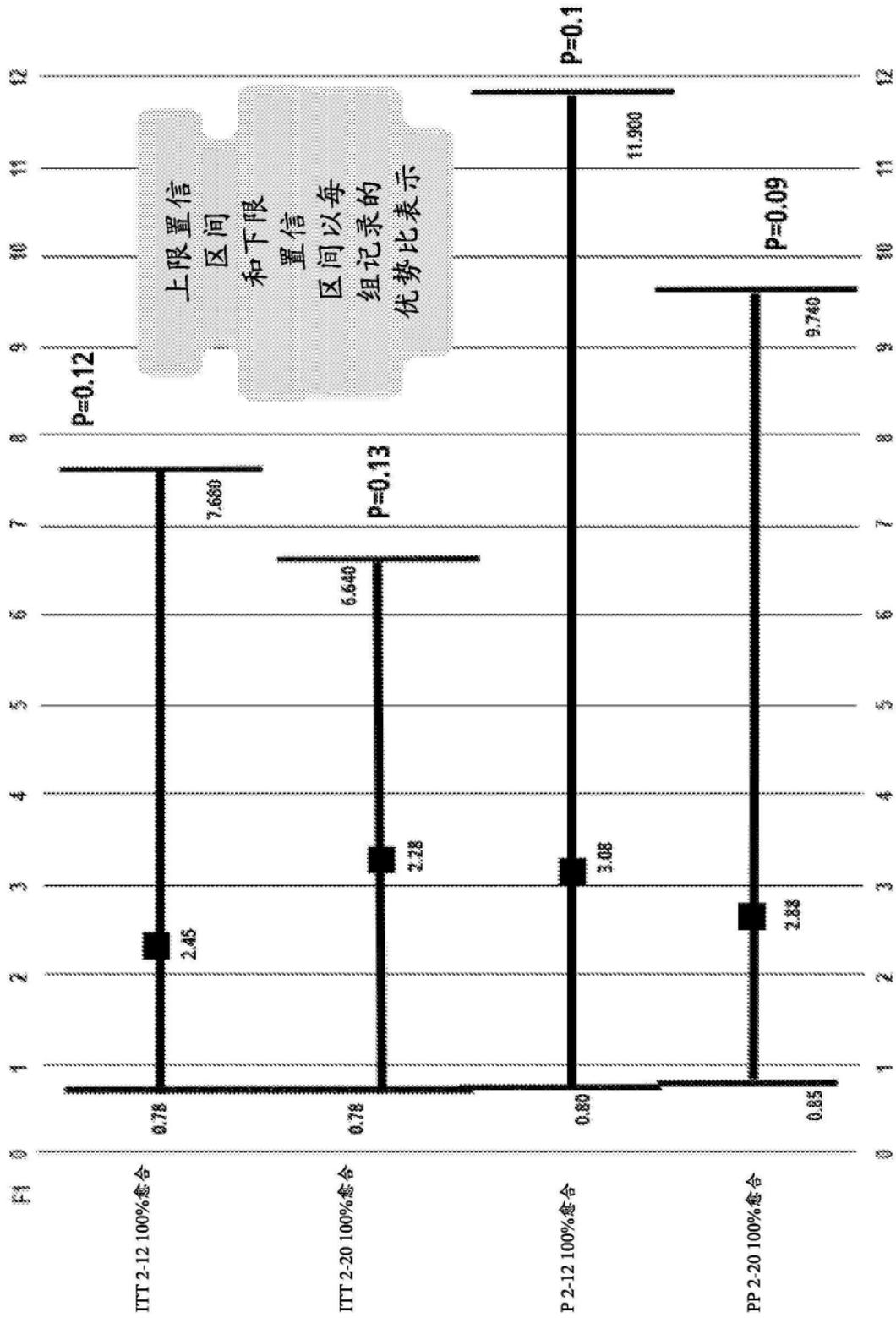


图10

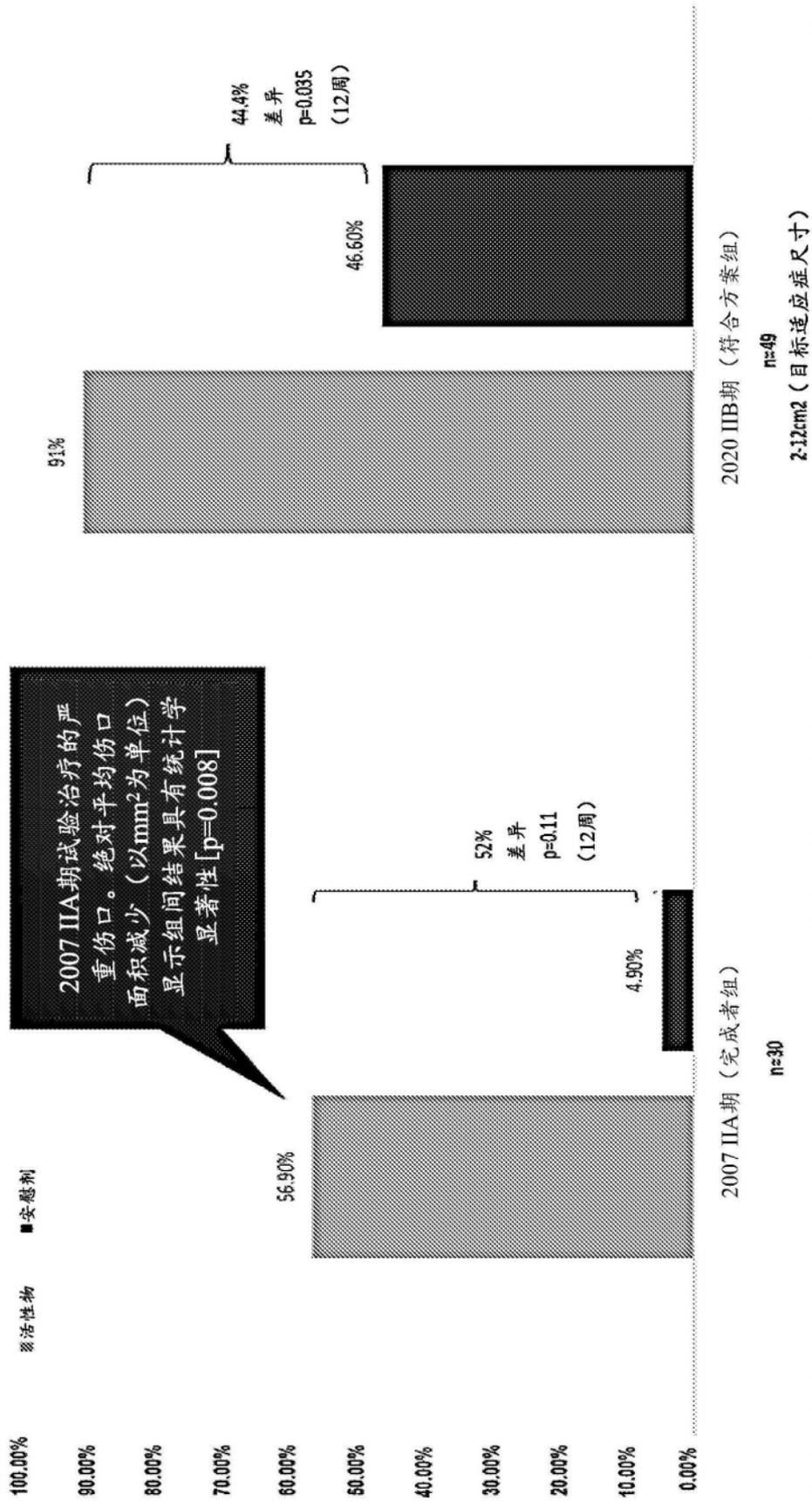


图11

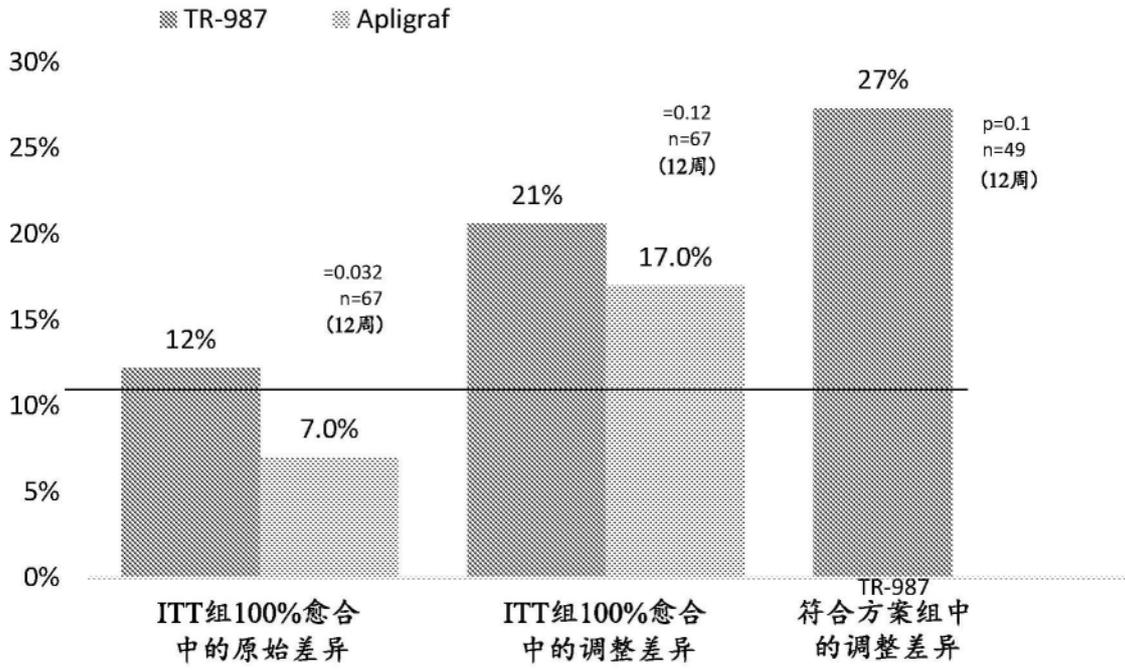


图12

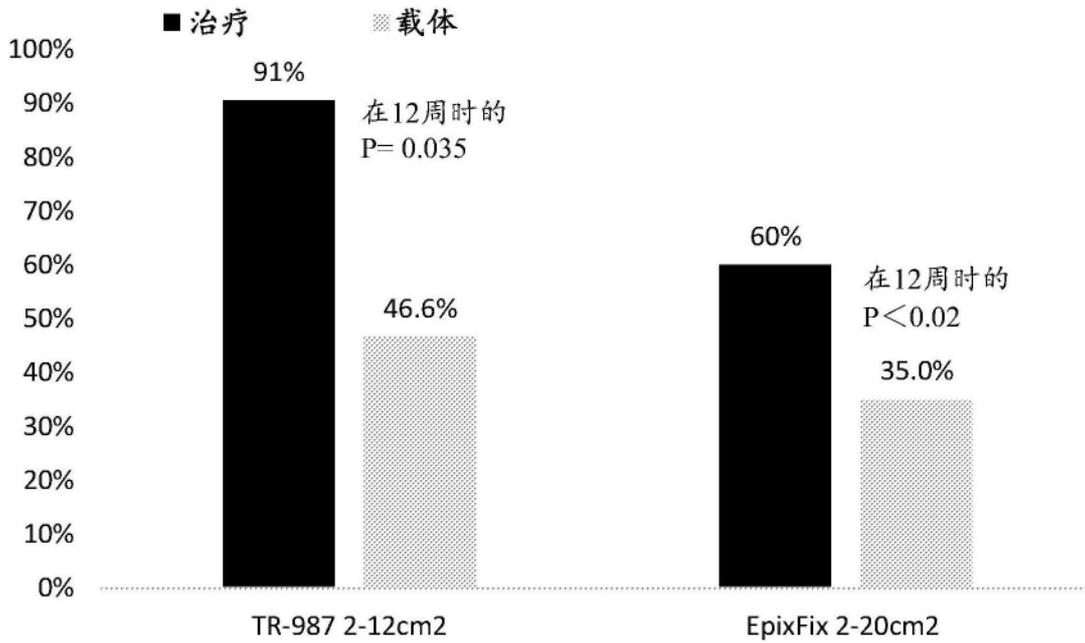


图13

总面积		7.53 cm ²
长度		3.11cm
宽度		3.53cm
周长		12.74cm
总隧道		0cm
总侵蚀		0cm
最大深度		0.3cm
红色组织	6.23 cm ²	84%
黑色组织	0.01 cm ²	0%
黄色组织	0.05 cm ²	1%
其他组织	0.01 cm ²	0%
粉色组织	1.14 cm ²	15%

筛查时为7.53cm²
 墨尔本Heidelberg Repatriation医院
 溃疡存在了208周（入组前4年）
 患者年龄72岁，腿部溃疡从57岁开始出现

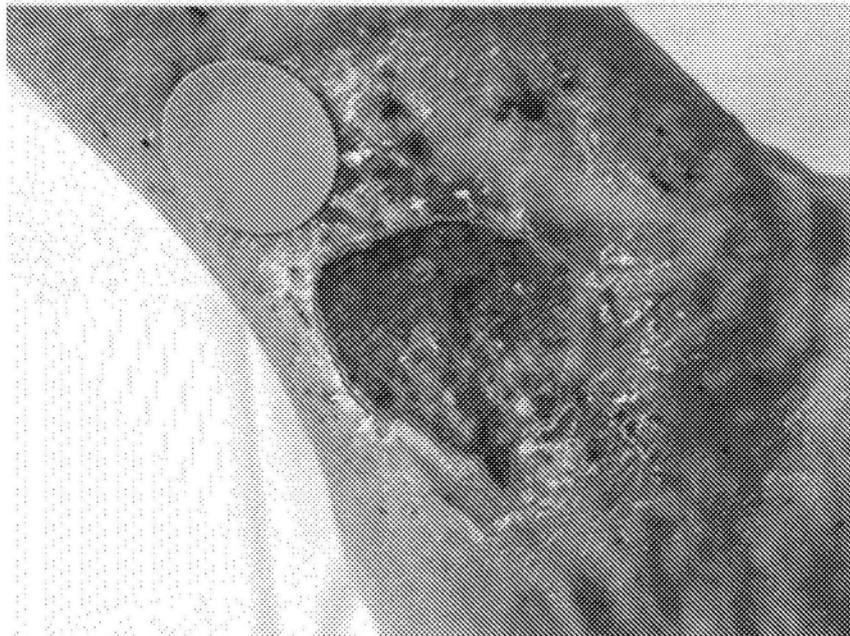


图14

总面积				愈合
长度	0.01cm2			93.85%
宽度	0.11cm			62.93%
周长	0.06cm			80.63%
总隧道	0.3cm			70.67%
总侵蚀	0cm			0%
最大深度	0cm			0%
红色组织		0.01cm2		75%
黑色组织				0%
黄色组织				0%
其他组织				0%
拾色组织		0.01cm2		25%

10周内愈合

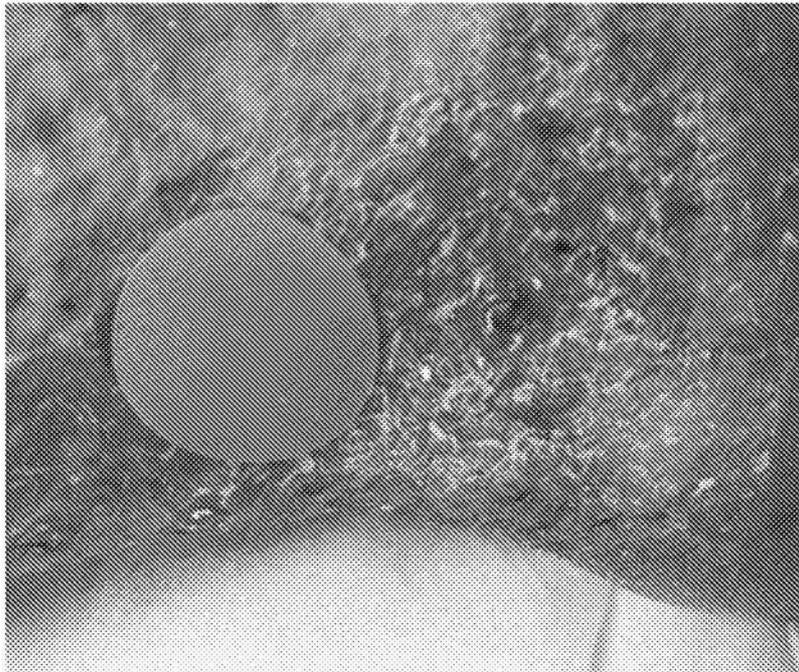


图15

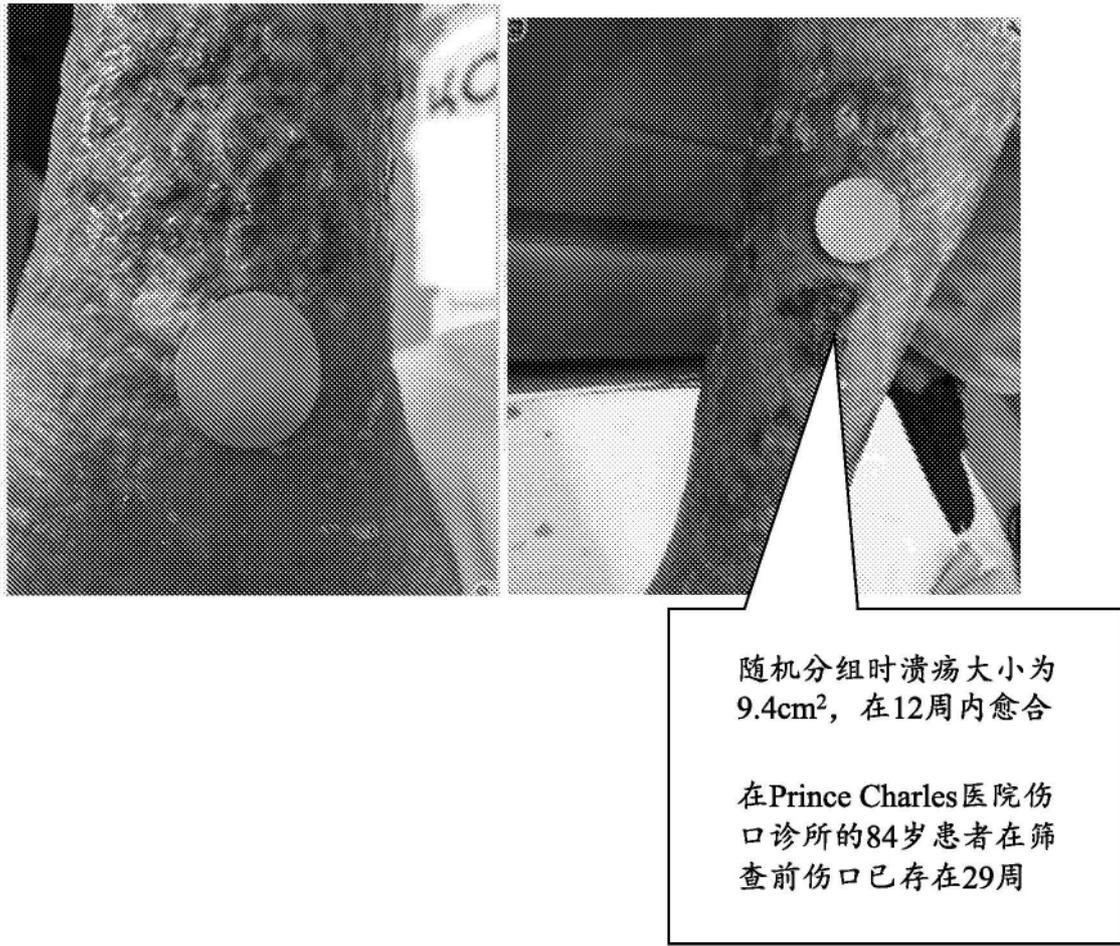


图16

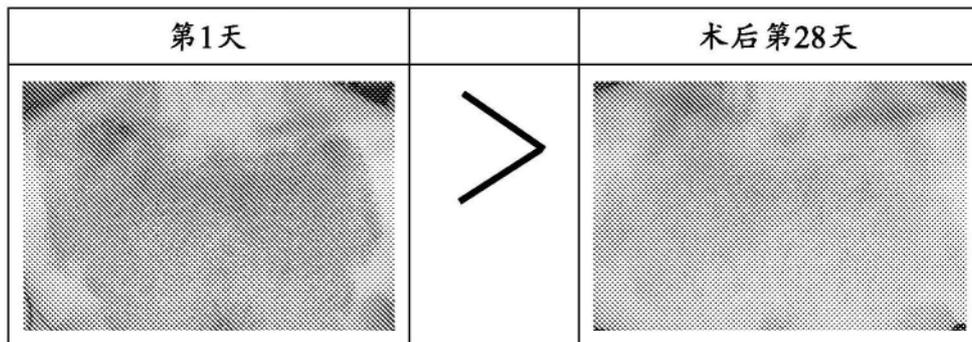


图17

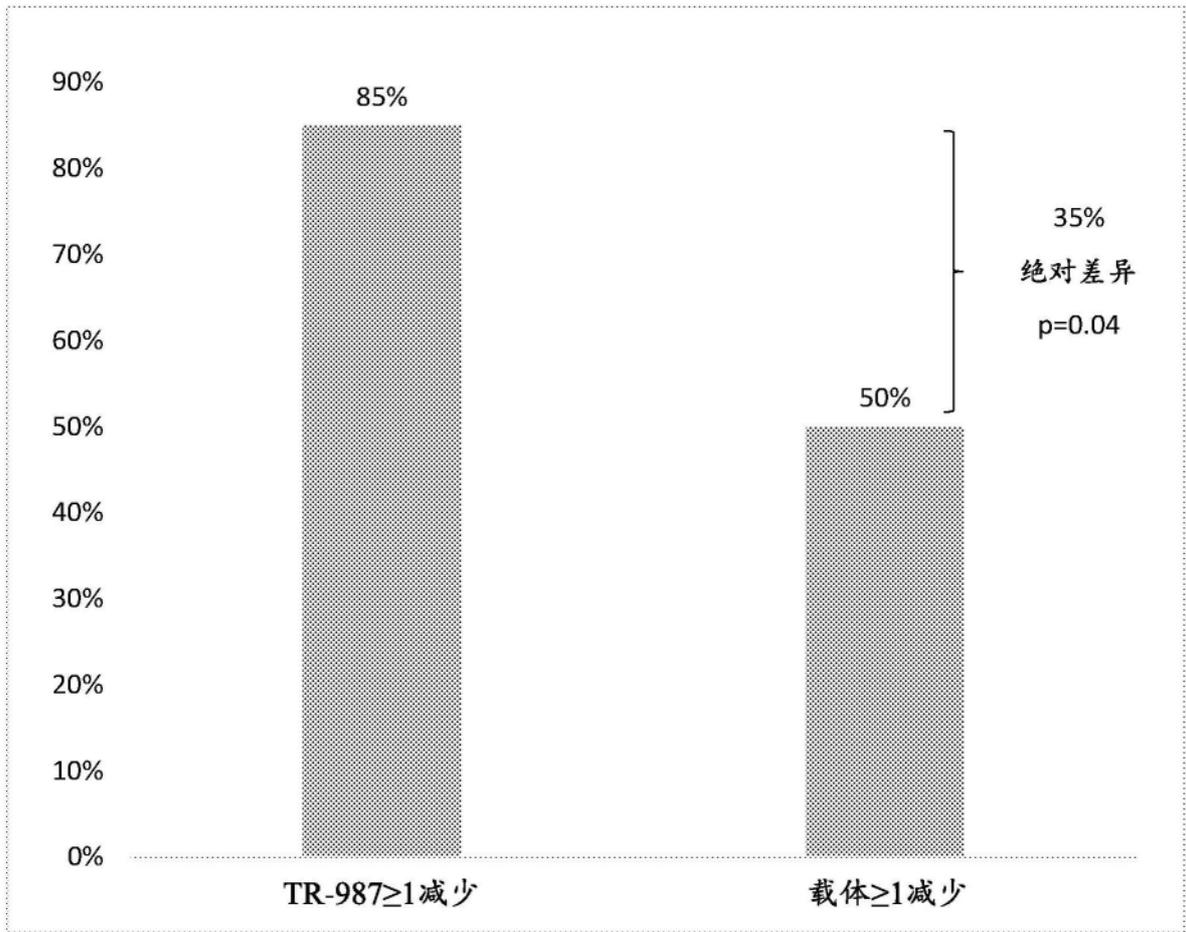


图18

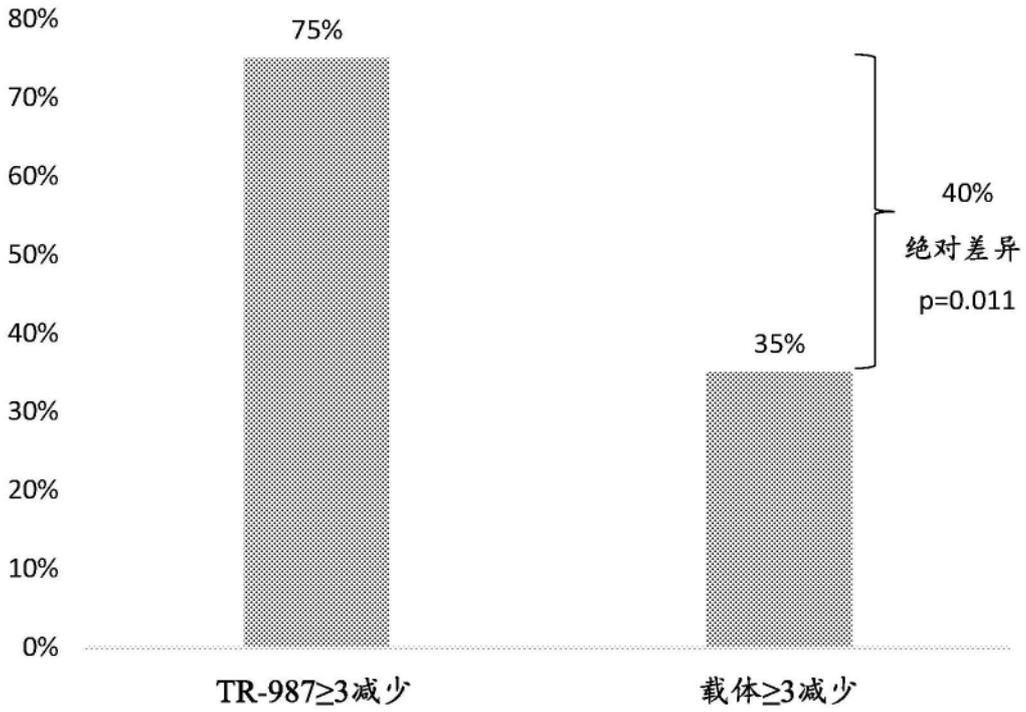


图19

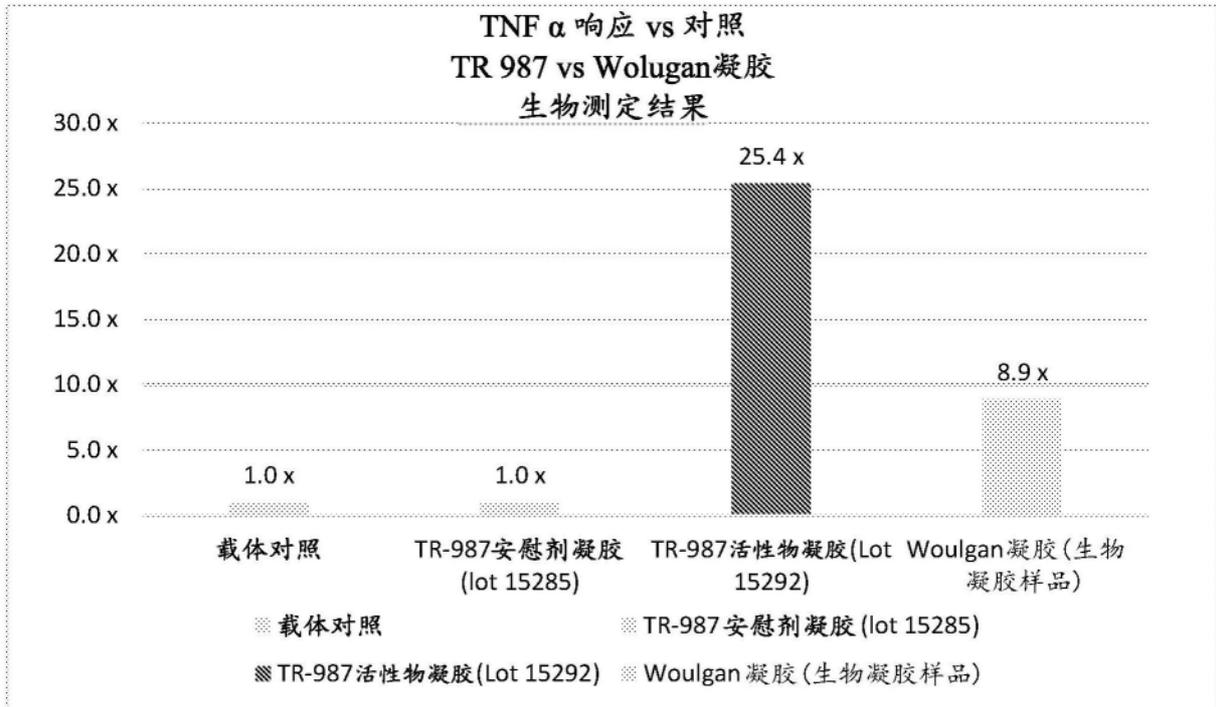


图20