



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109069692 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780018143.7

(22)申请日 2017.01.27

(30)优先权数据

2016-058396 2016.03.23 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/002925 2017.01.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/163603 JA 2017.09.28

(71)申请人 国立大学法人北海道大学

地址 日本北海道

申请人 持田制药株式会社

(72)发明人 须藤英毅 辻本武尊 岩崎伦政

清水贤 伊佐次三津子

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 郭煜 杨戩

(51)Int.Cl.

A61L 27/20(2006.01)

A61K 47/02(2006.01)

A61L 26/00(2006.01)

A61P 19/00(2006.01)

A61K 31/734(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页 附图9页

(54)发明名称

椎间盘治疗用组合物

(57)摘要

本发明提供椎间盘的髓核填补用组合物,其含有低内毒素藻酸的1价金属盐,应用于对象髓核部位,以应用后部分固化的方式使用,在应用于髓核部位时具有流动性。由此,提供能够促进椎间盘的髓核的再生的髓核填补用组合物。

1. 椎间盘的髓核填补用组合物,其含有低内毒素藻酸的1价金属盐,应用于对象髓核部位,以应用后部分固化的方式使用,在应用于髓核部位时具有流动性。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物的固化通过使所述组合物的表面中的至少一部分与交联剂接触而进行。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中,所述组合物对髓核部位的应用经由椎间盘表面的组合物的填充口而进行,所述组合物的部分固化通过使椎间盘表面的组合物的填充口与交联剂接触而进行。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的组合物,其中,所述组合物的部分固化通过下述方式表示:使用与向髓核部位的填充相同的交联剂的使用方法和使用比率,按照本说明书的实施例4,在体外向直径为6mm的试管填充低内毒素藻酸钠500 μ L和交联剂并静置1小时后,能够用带有21G的注射针抽吸试管内的组合物的容量的至少50%。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的组合物,其中,所述组合物对髓核部位的应用通过对去除髓核中的至少一部分而形成的髓核缺损部应用所述组合物而进行。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的组合物,其中,通过使用锥板型粘度计在20℃的条件下的测定,所述具有流动性的组合物的表观粘度为100mPa $\cdot$ s~30000mPa $\cdot$ s。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的组合物,其中,所述低内毒素藻酸的1价金属盐的通过GPC-MALS法而测定得到的重均分子量(绝对分子量)为8万以上。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的组合物,其中,所述组合物中,低内毒素藻酸的1价金属盐的浓度为0.5w/w%~5w/w%。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的组合物,其中,所述组合物不含在应用于所述对象髓核部位之前使所述组合物固化的量的交联剂。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的组合物,其中,所述具有流动性的组合物具有将组合物在20℃下静置1小时后能够用21G的注射针注入的流动性。

11. 根据权利要求1~10中任一项所述的组合物,其中,所述组合物不含细胞。

12. 根据权利要求2~11中任一项所述的组合物,其中,交联剂为2价以上的金属离子化合物。

13. 根据权利要求1~12中任一项所述的组合物,其中,所述组合物用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其中,所述椎间盘变性和/或椎间盘损伤是选自椎间盘突出、椎间盘症、脊椎退行性滑脱症、化脓性椎间盘炎、变形性脊椎症、椎管狭窄症、和椎间盘损伤中的至少1种。

15. 根据权利要求1~14中任一项所述的组合物,其中,所述组合物在应用于髓核部位之前为干燥状态或溶液状态。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中,所述干燥状态的低内毒素藻酸的1价金属盐为冻结干燥体。

17. 椎间盘的髓核填补用试剂盒,其至少包含权利要求1至16中任一项所述的组合物、和交联剂。

椎间盘治疗用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及椎间盘治疗用组合物、特别是椎间盘的髓核填补用组合物。

背景技术

[0002] 脊椎是连接椎骨的棒状的骨骼,支撑体干和头部。椎骨与椎骨通过位于椎骨间的椎间盘而连接。椎间盘是圆板状的无血管组织,是以髓核为中心在周围缠绕纤维环、进一步在上下配置有终板的结构。椎间盘的髓核由髓核细胞和其细胞外基质构成,是大量包含水分的凝胶状的富有弹力的结构物,发挥吸收对椎体间施加的压力的缓冲功能。纤维环由层状结构的纤维软骨和缠绕其的胶原的层形成,限制了椎体间的旋转运动。终板将透明软骨组织、椎间盘和椎体牢固地连接。

[0003] 位于椎间盘的中心部的髓核具有与纤维环、终板、此外与其他软骨组织相比更特征性的组成。即,具备的特征在于,髓核的细胞外基质的主要成分为水分(70~90%;伴随老龄而降低)、II型胶原(干燥重量的20%)、蛋白聚糖(干燥重量的50%),与终板、关节软骨等其他软骨组织相比,蛋白聚糖相对于胶原的比例高(非专利文献1)。另一方面,关节软骨等其他软骨组织的细胞外基质与蛋白聚糖相比胶原的比例更高。椎间盘的作为冲击吸收体的功能很大程度上由其丰富的水分含量而承担。这样丰富的水分主要通过蛋白聚糖的核心蛋白结合的糖胺聚糖带阴性荷电而吸引水分从而维持。此外,公开了存在于椎间盘中的蛋白聚糖的结构和大小与存在于关节软骨中的蛋白聚糖不同,特别是髓核的蛋白聚糖的差异显著(非专利文献2)。

[0004] 椎间盘的髓核、纤维环、和终板各自具有不同的结构和功能,各自通过具备不同表型的细胞组而维持。存在于髓核中的髓核细胞是圆形的,制作出蛋白聚糖丰富的基质。存在于纤维环中的细胞被胶原纤维基质包覆。近年来报告了这样的椎间盘内的细胞各自的表型不同,此外,即使与关节软骨细胞相比,也存在表型的差异(非专利文献1)。

[0005] 椎间盘因老龄、外伤、疾病等而发生变性、损伤。椎间盘的变性是椎间盘的细胞数、水分含量、细胞外基质(II型胶原、聚集蛋白聚糖(aggrecan)等)等降低的状态,如果继续进行,则无法发挥椎间盘的作为冲击吸收体的功能。椎间盘变性和椎间盘损伤具体而言,是椎间盘突出、椎间盘症、脊椎退行性滑脱症、化脓性椎间盘炎、变形性脊椎症、椎管狭窄症、因外伤等而导致的椎间盘损伤等。例如,椎间盘突出的情况中,覆盖髓核的纤维环产生变形或龟裂,由此形成突出而向椎间盘外突出,突出的髓核压迫脊髓神经,引起疼痛、麻痹等。

[0006] 对椎间盘突出的治疗之一有椎间盘髓核摘除(切除)术,确认了一定的效果。然而,椎间盘髓核摘除(切除)术的情况中,已知由于未对椎间盘髓核摘除术后的手术部位实施处置,因此有时椎间盘的变性变化继续进行。椎间盘髓核摘除术中移除髓核中的一部分时,在髓核部位形成空洞(本说明书中也称为“缺损部”)。髓核几乎不具有自我修复能力和再生能力,因此髓核的空洞在物理上也容易变得脆弱。此外,空洞部分中有时成纤维样细胞聚集而形成与本来的髓核在力学特性方面不同的组织。因此,椎间盘髓核摘除术后,突出的复发率高。椎间盘髓核摘除后的5年以内的复发率据称为4~15%左右,但根据最近的长期数据,已知

10年后过半数复发。如果突出复发则需要再手术,但脊髓神经埋没于第一次手术后形成的瘢痕组织中,难以确认脊髓神经的位置。即使能够确认脊髓神经的位置,瘢痕也变得厚且硬,因此将脊髓神经与周围的组织之间进行分离变得极为困难。再手术的情况中,要求极难的技术。因此,要求建立在椎间盘髓核摘除术后突出不会复发、不会瘢痕化的手术方法。

[0007] 作为对椎间盘疾病的治疗的尝试,提出了例如不去除髓核或纤维环而是向椎间盘的空间中导入高分子电解质材料(polyelectrolyte materials)的治疗方法,作为该高分子电解质的大量具体例之一,可以举出藻酸盐(专利文献1)。此外,提出了包括将糖胺聚糖等的软骨保护材料注入所需部位的提高椎间盘的功能的方法,作为该软骨保护材料的大量具体例之一,举出了藻酸钠的两亲性衍生物(专利文献2)。此外,公开了用于将抗酸剂注入椎间盘的设备(专利文献3)。除了注入抗酸剂之外,据信还可以任选地注入椎间盘的填料,作为填料的大量具体例之一,可以举出用钙或钡交联的藻酸盐(专利文献3)。但是,这些文献中,仅作为大量具体例之一而列举出这些,没有记载其具体的使用方法、使用例。

[0008] 此外,作为髓核填补材料,研究了藻酸盐等的水凝胶。将藻酸盐等的水凝胶用作髓核填补材料时,其机械强度被视为问题,在体内(in vivo)使用时推荐在一定期间内保持形状的材料,据信硬度越高越好(非专利文献3~9)。

[0009] 在此,提出了将藻酸盐用于关节、胸廓壁、椎间盘、半月板等的软骨的再生(专利文献4~5)。

[0010] 现有技术文献

专利文献

专利文献1:美国专利申请公开第2007/0150060号说明书

专利文献2:美国专利申请公开第2003/0069639号说明书

专利文献3:美国专利申请公开第2009/0082719号说明书

专利文献4:国际公开第2008/102855号

专利文献5:国际公开第2013/027854号

非专利文献

非专利文献1:Journal of Anatomy (2012) 221,第480-496页

非专利文献2:Journal of Orthopaedic Research (1989) 7,第146-151页

非专利文献3:Eur Spine J (2007) 16,第1892-1898页

非专利文献4:Osteoarthritis and Cartilage (2009) 17,第1377-1384页

非专利文献5:Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials (2014) 29,第56-67页

非专利文献6:Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials (2011) 4,第1196-1205页

非专利文献7:Acta Biomaterialia (2014) 10,第1646-1662页

非专利文献8:Spine J (2013) 13 (3),第243-262页

非专利文献9:Materials Science and Engineering 63 (2016),第198-210页。

发明内容

[0011] 发明要解决的课题

在上述情况下,本发明的课题在于,提供能够促进椎间盘的髓核的再生的髓核填补用组合物。此外,在于提供填充操作比较简便、且脊髓神经的压迫等并发症的风险少的髓核填补用组合物。

[0012] 用于解决问题的手段

本发明人等研究了利用生物体适应性材料进行髓核填补作为椎间盘变性、椎间盘损伤的治疗方法的可能性。以往,在该治疗领域中,特别是研究了使用藻酸盐等的水凝胶作为髓核填补材料的情况中,水凝胶的机械的强度被视为问题,在体内使用时推荐在一定期间内保持形状。但是,本发明人等反而发现,将包含低内毒素藻酸钠的组合物以溶胶状态注入髓核部位,为了防止漏出而使椎间盘的表面的组合物的填充口与交联剂接触从而使组合物中的一部分固化,由此抑制了椎间盘髓核的变性,使对于髓核再生而言优选的II型胶原阳性细胞的比例增加,促进了椎间盘髓核的再生。此外,发现了也抑制了还包括纤维环在内的椎间盘组织全体的变性。

[0013] 本发明人等基于这样的见解进一步反复研究,从而完成了本发明。

[0014] 即,本发明如下所述。

[0015] [1] 椎间盘的髓核填补用组合物,其含有低内毒素藻酸的1价金属盐,应用于对象髓核部位,以应用后部分固化的方式使用,在应用于髓核部位时具有流动性。

[0016] [1A] 椎间盘的髓核填补用组合物,其含有低内毒素藻酸的1价金属盐,在应用于髓核部位时具有流动性,以应用于对象髓核部位后部分固化的方式使用。

[0017] [2] 上述[1]或[1A]所述的组合物,其中,前述组合物的固化通过使前述组合物的表面中的至少一部分与交联剂接触而进行。

[0018] [3] 上述[1]~[2]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物对髓核部位的应用经由椎间盘表面的组合物的填充口而进行,前述组合物的部分固化通过使椎间盘表面的组合物的填充口与交联剂接触而进行。

[0019] [4] 上述[1]~[3]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物对髓核部位的应用通过对去除髓核中的至少一部分而形成的髓核缺损部应用前述组合物而进行。

[0020] [5] 上述[1]~[4]中任一项所述的组合物,其中,前述具有流动性的组合物的粘度为 $100\text{mPa}\cdot\text{s}\sim 30000\text{mPa}\cdot\text{s}$ 。

[0021] [5A] 上述[1]~[4]中任一项所述的组合物,其中,通过使用锥板型粘度计在 20°C 的条件下的测定,前述具有流动性的组合物的表观粘度为 $100\text{mPa}\cdot\text{s}\sim 30000\text{mPa}\cdot\text{s}$ 。

[0022] [6] 上述[1]~[5A]中任一项所述的组合物,其中,前述低内毒素藻酸的1价金属盐的通过GPC-MALS法而测定得到的重均分子量为8万以上。

[0023] [6A] 上述[1]~[5A]中任一项所述的组合物,其中,前述低内毒素藻酸的1价金属盐的通过GPC-MALS法而测定得到的重均分子量(绝对分子量)为8万以上。

[0024] [7] 上述[1]~[6A]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物中,低内毒素藻酸的1价金属盐的浓度为 $0.5\text{w}/\text{v}\%\sim 5\text{w}/\text{v}\%$ 。

[0025] [7A] 上述[1]~[6A]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物中,低内毒素藻酸的1价金属盐的浓度为 $0.5\text{w}/\text{w}\%\sim 5\text{w}/\text{w}\%$ 。

[0026] [8] 上述[1]~[7A]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物不含在应用于前述对象髓核部位之前使前述组合物固化的量的交联剂。

- [0027] [9] 上述[1]~[8]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物不含细胞。
- [0028] [10] 上述[2]~[9]中任一项所述的组合物,其中,交联剂为2价以上的金属离子化合物。
- [0029] [10A] 上述[10]所述的组合物,其中,2价以上的金属离子化合物是选自 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 中的至少1种的金属离子化合物。
- [0030] [11] 上述[1]~[10A]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制。
- [0031] [12] 上述[11]所述的组合物,其中,前述椎间盘变性和/或椎间盘损伤是选自椎间盘突出、椎间盘症、脊椎退行性滑脱症、化脓性椎间盘炎、变形性脊椎症、椎管狭窄症、和椎间盘损伤中的至少1种。
- [0032] [13] 上述[1]~[12]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物在应用于髓核部位之前为干燥状态。
- [0033] [13A] 上述[1]~[12]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物在应用于髓核部位之前为干燥状态或溶液状态。
- [0034] [14] 上述[13]或[13A]所述的组合物,其中,前述干燥状态的低内毒素藻酸的1价金属盐为冻结干燥体。
- [0035] [14A] 上述[1]~[14]中任一项所述的组合物,其中,前述组合物的部分固化通过下述方式表示:使用与向髓核部位的填充相同的交联剂的使用方法和使用比率,按照本说明书的实施例4,在体外向直径为6mm的试管填充低内毒素藻酸钠500 μL 和交联剂并静置1小时后,能够用带有21G的注射针抽吸试管内的组合物的容量的至少50%。
- [0036] [14B] 上述[1]~[14A]中任一项所述的组合物,其中,前述具有流动性的组合物具有将组合物在20℃下静置1小时后能够用21G的注射针注入的流动性。
- [0037] [15] 椎间盘的髓核填补用试剂盒,其至少包含上述[1]至[14B]中任一项所述的组合物、和交联剂。
- [0038] [16] 用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制的方法,其包括:
将含有低内毒素藻酸的1价金属盐且具有流动性的组合物应用于需要前述治疗、预防或复发抑制的对象椎间盘的髓核部位,
将所应用的前述组合物中的一部分固化。
- [0039] [17] 上述[16]所述的方法,其中,前述椎间盘变性和/或椎间盘损伤是选自椎间盘突出、椎间盘症、脊椎退行性滑脱症、化脓性椎间盘炎、变形性脊椎症、椎管狭窄症、和椎间盘损伤中的至少1种。
- [0040] [18] 低内毒素藻酸的1价金属盐在制造用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制的组合物中的用途,
前述组合物应用于对象髓核部位,以应用后部分固化的方式使用,在应用于髓核部位时具有流动性。
- [0041] [19] 上述[18]所述的用途,其中,前述椎间盘变性和/或椎间盘损伤是选自椎间盘突出、椎间盘症、脊椎退行性滑脱症、化脓性椎间盘炎、变形性脊椎症、椎管狭窄症、和椎间盘损伤中的至少1种。
- [0042] [20] 用于在椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制中使用的低内

毒素藻酸的1价的金属盐,所述治疗、预防或复发抑制中,将含有低内毒素藻酸的1价金属盐且具有流动性的组合物应用于需要椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制的对象椎间盘的髓核部位,将所应用的组合物中的一部分固化。

[0043] 发明的效果

本发明提供能够促进椎间盘的髓核的再生的髓核填补用组合物。根据本发明的组合物,不仅椎间盘髓核,还能够抑制还包括纤维环在内的椎间盘组织全体的变性变化。此外,本发明的组合物具有增加髓核中的II型胶原阳性的透明软骨样细胞的比例的效果。

[0044] 本发明的优选方式之一中,本发明的组合物能够在因椎间盘突出等椎间盘变性所涉及的疾病、或者外伤等而导致的椎间盘损伤等的预防、治疗、或复发抑制中,用作髓核填补材料。

[0045] 此外,本发明的优选方式的组合物能够以溶胶状态使用注射器等而植入髓核部位,此外,不仅在直视下,也能够经皮的髓核摘除术(约5mm的切开)、显微镜下(约3~4 cm的切开)和内窥镜下(约1~2cm的切开)填充,因此能够减轻患者的负担,手术技巧也比较简便。

[0046] 进一步,在将全体凝胶化的以往的髓核填补材料中,存在万一突出至椎管内时压迫脊髓神经而导致障碍的风险,但本发明的进一步优选方式的组合物仅将表面凝胶化,这样的并发症的担忧也少从而是安全的。

[0047] 本发明的特别优选方式的组合物能够防止椎间盘髓核摘除(切除)术后的突出的复发、瘢痕化。此外,本发明的优选方式之一中,通过对具有椎间盘变性和/或椎间盘损伤的椎间盘髓核应用本发明的组合物而治疗,还减轻了与所治疗的椎间盘相邻的椎间盘的负担,能够预防和/或减轻相邻的椎间盘的变性。

[0048] 本发明的组合物满足上述任一者以上的效果。

附图说明

[0049] 图1示出血清饥饿开始后6小时后、48小时后的活细胞率。A组:低内毒素藻酸钠;和B组:食品级藻酸钠。

[0050] 图2示出血清饥饿开始后6小时后、48小时后的凋亡细胞率。A组:低内毒素藻酸钠;和B组:食品级藻酸钠。

[0051] 图3是示出术后4周时根据Pfarrmann分类的椎间盘组织的评价结果的图。正常对照组、单独抽吸组、和治疗组(A-1组和A-2组)。

[0052] 图4是示出术后4周时根据MRI指数(MRI index)的椎间盘组织的评价结果的图。单独抽吸组、和治疗组(A-1组和A-2组)。

[0053] 图5是示出术后4周时椎间盘变性的重症度的组织学评价结果的图。正常对照组、单独抽吸组、和治疗组(A-1组和A-2组)。

[0054] 图6中,(A)示出术后4周的椎间盘组织标本的染色照片。正常对照组、单独抽吸组、和治疗组(A-2组)。(B)示出术后12周的椎间盘组织标本的染色照片。正常对照组、单独抽吸组、和治疗组(A-2组)。

[0055] 图7是示出术后4周和12周时椎间盘组织切片中相对于细胞数的抗II型胶原抗体阳性细胞率的图。正常对照组、单独抽吸组、和治疗组(A-2组)。

[0056] 图8是示出羊 术后4周时根据修改的Boos分类的评价结果的图。正常对照组、髓核摘除组、和治疗组。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 。

[0057] 图9是示出羊 术后4周时根据椎间盘高度指数的评价结果的图。正常对照组、髓核摘除组、和治疗组。 $*P<0.05$ 。

[0058] 图10是示出羊 术后4周时椎间盘组织切片中相对于细胞中的抗II型胶原抗体阳性细胞率的图。正常对照组、髓核摘除组、和治疗组。 $*P<0.05$ 。

[0059] 图11示出术后4周时的椎间盘髓核的硫酸化糖胺聚糖 (GAG) 相对于羟基脯氨酸 (HYP) 的比例。髓核摘除组、治疗组、正常对照组、和关节软骨。

具体实施方式

[0060] 以下,针对本发明详细说明。

[0061] 1.本发明的组合物

本发明涉及椎间盘的髓核填补中优选使用的组合物。

[0062] 本发明的组合物是椎间盘的髓核填补用组合物(本说明书中有时称为“本发明的组合物”),其含有低内毒素藻酸的1价金属盐应用于对象髓核部位,以应用后部分固化的方式使用,在应用于髓核部位时具有流动性。

[0063] “低内毒素”、“藻酸的1价金属盐”如后所述。

[0064] “椎间盘”是连接脊椎的存在于椎骨与椎骨之间的圆柱状组织。椎间盘是圆板状的无血管组织,是以髓核为中心在周围缠绕纤维环、进一步在上下配置有终板的结构。

[0065] “髓核”是存在于椎间盘的中心的凝胶状的组织,主要含有髓核细胞、主要由蛋白聚糖和II型胶原构成的细胞外基质、以及水。髓核据信几乎不具有自我修复能力・再生能力。

[0066] “髓核填补”是指填补因老龄、外伤、感染、和对其进行的外科手术(例如椎间盘髓核摘除(切除)术)等而变性、缩小、或去除的髓核的变性部分、缩小部分、或去除部分。应予说明,本说明书中,“髓核填充”这一词语以与“髓核填补”相同的含义而使用,本发明的“髓核填补用组合物”与“髓核填充用组合物”同义。

[0067] “髓核部位”是指髓核存在的部位、发生髓核的变性或缩小的部位、或通过去除髓核中的至少一部分而形成的髓核的缺损部,还包括髓核存在的部位的周边部。

[0068] “对象”是人、或除了人之外的生物、例如鸟和非人哺乳动物(例如牛、猴、猫、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、猪、狗、兔、羊、和马)。

[0069] “应用”是指将本发明的组合物以对于填埋椎间盘的髓核部位的变性部分、缩小部分、去除部分、缺损部分等而言充分的量填充于髓核部位。

[0070] “部分固化”如后所述。

[0071] “含有低内毒素藻酸的1价金属盐”是指本发明的组合物在所应用的髓核部位处含有对于再生髓核而言充分的量的低内毒素藻酸的1价金属盐。

[0072] “具有流动性”如后所述。

[0073] “椎间盘变性和/或椎间盘损伤”、“治疗、预防或复发抑制”如后所述。

[0074] 本发明的组合物可以使用溶剂而以溶液状态提供,也可以以冻结干燥体(特别是冻结干燥粉体)等干燥状态提供。作为干燥状态而提供时,本发明的组合物在应用时使用溶

剂,以溶液状等具有流动性的状态使用。溶剂只要是能够应用于生物体的溶剂则没有特别限定,可以举出例如注射用水、提纯水、蒸馏水、离子交换水(或脱离子化水)、MilliQ水、生理食盐水、磷酸缓冲生理食盐水(PBS)等。优选为能够用于人和动物的治疗的注射用水、蒸馏水、生理食盐水等。

[0075] 2.藻酸的1价金属盐

“藻酸的1价金属盐”是通过将藻酸的6位的羧酸的氢原子与 Na^+ 、 K^+ 等的1价金属离子进行离子交换而制作的水溶性的盐。作为藻酸的1价金属盐,具体而言,可以举出藻酸钠、藻酸钾等,特别优选能够通过市售品而获取的藻酸钠。藻酸的1价金属盐的溶液在与交联剂混合时形成凝胶。

[0076] 本发明中使用的“藻酸”是生物分解性的高分子多糖类,是D-甘露糖醛酸(M)和L-古洛糖醛酸(G)这2种糖醛酸聚合为直链状而得到的聚合物。更具体而言,是D-甘露糖醛酸的均聚物级分(MM级分)、L-古洛糖醛酸的均聚物级分(GG级分)、和D-甘露糖醛酸与L-古洛糖醛酸无规排列的级分(MG级分)任意结合而得到的嵌段共聚物。藻酸的D-甘露糖醛酸与L-古洛糖醛酸的构成比(M/G比)主要根据海藻等所来源的生物的种类而不同,此外,受到该生物的生育场所、季节的影响,遍及M/G比为约0.4的高G型至M/G比为约5的高M型的高范围。

[0077] 藻酸的1价金属盐为高分子多糖类,难以正确确定分子量,但如果分子量过低,则粘度变低,对所应用部位的周边组织的密合性有可能变弱,此外,分子量过高的物质制造困难,且溶解性降低,在制成溶液状时粘度过高而难以处理,产生在长期间的保存中难以维持物性等问题,因此一般而言,以重均分子量计为1万~1000万、优选为2万~800万、更优选为5万~500万的范围。本说明书只用,使用“~”表示的数值范围表示分别包括“~”的前后记载的数值作为最小值和最大值的范围。

[0078] 另一方面,源自天然物的高分子物质的分子量测定中,已知根据测定方法,有可能在值方面产生差异。例如,通过凝胶渗透色谱(GPC)或凝胶过滤色谱(它们也总称为尺寸排阻色谱)测定的重均分子量根据本发明的实施例所示的效果,优选为10万以上、更优选为50万以上,此外优选为500万以下、更优选为300万以下。其优选的范围为10万~500万、更优选为50万~350万。

[0079] 此外,例如根据组合凝胶渗透色谱(GPC)和多角度光散射检测器(Multi Angle Light Scattering:MALS)的GPC-MALS法,可以测定绝对重均分子量。通过GPC-MALS法测定得到的重均分子量(绝对分子量)根据本发明的实施例所示的效果,优选为1万以上、更优选为8万以上、进一步优选为9万以上,此外优选为100万以下、更优选为80万以下、进一步优选为70万以下、尤其优选为50万以下。其优选的范围为1万~100万、更优选为8万~80万、更进一步优选为9万~70万、尤其优选为9万~50万。

[0080] 通常,通过如上述那样的手段计算高分子多糖类的分子量时,可能产生10~20%以上的测定误差。例如,如果为40万则可能在32~48万左右的范围内、如果为50万则可能在40~60万左右的范围内、如果为100万则可能在80~120万左右的范围内发生值的变动。

[0081] 藻酸的1价金属盐的分子量的测定可以按照常规方法测定。

[0082] 分子量测定中使用凝胶渗透色谱时的代表性条件如本说明书的实施例中记载那样。柱可以使用例如GMPW-XL $\times$ 2+G2500PW-XL(7.8mm I.D. $\times$ 300mm),洗脱液可以为例如200mM硝酸钠水溶液,作为分子量标准,可以使用普鲁兰。

[0083] 分子量测定中使用GPC-MALS时的代表性条件如本说明书的实施例中记载那样。作为检测器,可以使用例如RI检测器和光散射检测器(MALS)。

[0084] 藻酸的1价金属盐在从褐藻类中提取当初,分子量大,粘度高,但通过利用热的干燥、提纯等过程,分子量变小,粘度降低。通过制造步骤的温度等条件管理、作为原料的褐藻类的选择、制造步骤中的分子量的分级等手段,可以制造分子量不同的藻酸的1价的金属盐。进一步,通过与具备不同分子量或者粘度的另一批次的藻酸的1价金属盐混合,也能够制成具有目标分子量的藻酸的1价金属盐。

[0085] 本发明中使用的藻酸的1价金属盐优选将藻酸的1价金属盐溶解于MilliQ水中而制成1w/w%浓度的溶液,使用锥板型粘度计在20℃的条件下进行粘度测定时的表观粘度期望的是优选为40mPa·s~800mPa·s、更优选为50mPa·s~600mPa·s。表观粘度的测定条件期望按照后述条件。应予说明,本说明书中,有时将“表观粘度”简称为“粘度”。

[0086] 本发明中使用的藻酸可以源自天然,也可以为合成物,优选源自天然。作为源自天然的藻酸,可以举出例如从褐藻类中提取的物质。含有藻酸的褐藻类在世界中的沿岸区域繁茂,但实际上用作藻酸原料的海藻有限,代表性的是南美的雷松藻、北美的巨藻、欧洲的昆布、泡叶藻、澳大利亚的从梗藻等。作为成为藻酸的原料的褐藻类,可以举出例如雷松藻(Lessonia)属、巨藻(Macrocytis)属、昆布(Laminaria)属(海带属)、泡叶藻(Ascophyllum)属、从梗藻(Durvillea)属、爱森藻(Eisenia)属、腔昆布(Ecklonia)属等。

[0087] 3. 低内毒素处理

本发明中使用的藻酸的1价金属盐为低内毒素的藻酸的1价金属盐。低内毒素是指内毒素水平低至实质上不会引起炎症或发热的程度。更优选地,期望为经低内毒素处理的藻酸的1价金属盐。

[0088] 低内毒素处理可以通过公知的方法或以其为标准的方法而进行。例如,可以通过提纯透明质酸钠的菅等人的方法(例如参照日本特开平9-324001号公报等)、提纯B1,3-葡聚糖的吉田等人的方法(例如参照日本特开平8-269102号公报等)、提纯藻酸盐、结冷胶等的生物体高分子盐のウチアム等人的方法(例如参照特表2002-530440号公报等)、提纯多糖のジェームス等人的方法(例如参照国际公开第93/13136号单行本等)、レイス等人的方法(例如参照美国专利第5589591号说明书等)、提纯藻酸盐のハーマンフランク等人的方法(例如参照Appl Microbiol Biotechnol (1994) 40:638-643等)等或以其为标准的方法来实施。本发明的低内毒素处理不限于此,可以通过清洗、利用过滤器(内毒素去除过滤器、带电的过滤器等)的过滤、超过滤、使用柱(内毒素吸附亲和柱、凝胶过滤柱、利用离子交换树脂的柱等)的提纯、疏水性物质、树脂或活性炭等上的吸附、有机溶剂处理(利用有机溶剂的萃取、利用添加有机溶剂的析出・沉降等)、表面活性剂处理(例如参照日本特开2005-036036号公报等)等公知的方法、或者将它们适当组合而实施。这些处理的步骤还可以与离心分离等公知的方法适当组合。期望与藻酸的种类等相应地进行适当选择。

[0089] 内毒素水平可以通过公知的方法来确定,例如可以通过利用鲎试剂(LAL)的方法、使用エントスピーシー(注册商标)ES-24S套件(生化学工业株式会社)的方法等来测定。

[0090] 本发明的组合物中含有的藻酸的1价金属盐的内毒素的处理方法没有特别限定,作为其结果,藻酸的1价金属盐的内毒素含量在进行利用鲎试剂(LAL)的内毒素测定时,优选为500内毒素单位(EU)/g以下、进一步优选为100EU/g以下、尤其优选为50EU/g以下、特别

是30EU/g以下。经低内毒素处理的藻酸钠可以通过例如Sea Matrix(注册商标)(持田制药株式会社)、PRONOVATMUP LVG(FMC BioPolymer)等市售品而获取。

[0091] 4.藻酸的1价金属盐的溶液的制备

本发明的组合物可以使用藻酸的1价金属盐的溶液而制备。藻酸的1价金属盐的溶液可以通过公知的方法或以其为标准的方法来制备。即,本发明中使用的藻酸的1价金属盐可以使用前述褐藻类,通过酸法、钙法等公知的方法而制造。具体而言,例如从这些褐藻类中,使用碳酸钠水溶液等的碱水溶液而萃取后,添加酸(例如盐酸、硫酸等),由此可以得到藻酸,通过藻酸的离子交换,可以得到藻酸的盐。如前述那样进行低内毒素处理。藻酸的1价金属盐的溶剂只要是能够应用于生物体则的溶剂则没有特别限定,可以举出例如提纯水、蒸馏水、离子交换水、MilliQ水、生理食盐水、磷酸缓冲生理食盐水(PBS)等。它们优选进行了灭菌,优选进行了低内毒素处理。例如,可以对MilliQ水进行过滤灭菌而使用。

[0092] 本发明的组合物以冻结干燥体等干燥状态而提供时,也可以使用上述的溶剂而制备为具有流动性的溶液。

[0093] 此外,用于得到本发明的组合物的操作期望全部在内毒素水平和细菌水平低的环境下进行。例如,操作优选在超净台上使用灭菌器具来进行,可以通过市售的内毒素去除剂来处理所使用的器具。

[0094] 5.本发明的组合物的表观粘度

本发明的多个方式的组合物是具有流动性的液体状、即溶液状。本发明的组合物在应用于髓核部位时具有流动性。本发明的方式之一中,优选地,本发明的组合物具有将组合物在20℃下静置1小时后能够用21G的注射针注入的流动性。该方式的本发明的组合物的表观粘度只要得到本发明的效果则没有特别限定,如果粘度过低,则对所应用的部位的周边组织的密合性有可能变弱,因此优选为10mPa·s以上、更优选为100mPa·s以上、进一步优选为200mPa·s以上、尤其优选为500mPa·s以上。如果表观粘度过高,则处理性有可能变差,因此优选为50000mPa·s以下、更优选为20000mPa·s以下、进一步优选为10000mPa·s以下。表观粘度为20000mPa·s以下时,利用注射器等的应用可以更容易地进行。但是,即使表观粘度为20000mPa·s以上,也可以使用加压型、电动型的填充器具、其他手段而应用。本发明的组合物的优选的范围为10mPa·s~50000mPa·s、更优选为100mPa·s~30000mPa·s、进一步优选为200mPa·s~20000mPa·s、此外进一步优选为500mPa·s~20000mPa·s、尤其优选为700mPa·s~20000mPa·s。另一个优选方式中,可以为500mPa·s~10000mPa·s、或者2000mPa·s~10000mPa·s。本发明的多个方式的组合物具有也能够用注射器等应用于对象的粘度。

[0095] 含有藻酸类的水溶液等藻酸的1价金属盐的组合物的表观粘度的测定可以按照常规方法测定。例如,可以使用旋转粘度计法的共轴双重圆筒形旋转粘度计、单一圆筒形旋转粘度计(Brookfield型粘度计)、圆锥-平板形旋转粘度计(锥板型粘度计)等来测定。优选地,期望按照日本药典(第16版)的粘度测定法。本发明中,粘度测定期望在20℃的条件下进行。如后述那样,本发明的组合物含有细胞等不溶于溶剂的物质时,为了正确进行粘度测定,组合物的表观粘度优选设为不含细胞等的状态的表现粘度。

[0096] 本发明中,含有藻酸的1价金属盐的组合物的表观粘度的测定特别地更期望使用锥板型粘度计而测定。例如,期望在以下那样的测定条件下测定。试样溶液的制备使用MilliQ水来进行。测定温度为20℃。锥板型粘度计的转速在藻酸1价金属盐的1%溶液测定时

设为1rpm、2%溶液测定时设为0.5rpm,以其为标准来确定。读取时间在藻酸1价金属盐的1%溶液测定的情况中测定2分钟,设为开始1分钟至2分钟的平均值。2%溶液测定的情况中测定2.5分钟,设为开始0.5分钟至2.5分钟的平均值。试验值设为3次测定的平均值。

[0097] 本发明的组合物的表观粘度例如可以通过控制藻酸的1价金属盐的浓度、分子量、或M/G比等而调整。

[0098] 藻酸的1价金属盐的溶液的表观粘度在溶液中的藻酸1价金属盐浓度高的情况中粘度高,浓度低的情况中粘度低。此外,藻酸1价金属盐的分子量大的情况中粘度高,分子量小的情况中粘度低。

[0099] 藻酸的1价金属盐的溶液的表观粘度受到M/G比的影响,因此可以通过例如溶液的粘度等适当选择具有优选的M/G比的藻酸。本发明中使用的藻酸的M/G比为约0.1~5.0、优选为约0.1~4.0、更优选为约0.2~3.5。

[0100] 如前述那样,M/G比主要根据海藻的种类而决定等,因此用作原料的褐藻类的种类对藻酸的1价金属盐的溶液的粘度造成影响。作为本发明中使用的藻酸,优选源自雷松藻属、巨藻属、昆布属、泡叶藻属、从梗藻属的褐藻,更优选源自雷松藻属的褐藻,特别优选源自淡黑巨海藻(*Lessonia nigrescens*)。

[0101] 6. 本发明的组合物的制备

本发明的组合物的特征在于,含有低内毒素藻酸的1价金属盐作为有效成分。本发明人等首次发现,将低内毒素藻酸1价金属盐填充于生物体的髓核部位时,藻酸的1价金属盐本身发挥出髓核组织的再生或治疗效果。作为有效成分而含有是指以将低内毒素藻酸的1价金属盐应用于患部时能够发挥出髓核组织的再生或治疗效果的量含有即可,优选至少为组合物总体的0.1w/v%以上、更优选为0.5w/v%以上、进一步优选为1w/v%。本发明的组合物中的优选的藻酸的1价金属盐浓度受到分子量的影响,因此无法一概而论,优选为0.5w/v%~5w/v%、更优选为1w/v%~5w/v%、进一步优选为1w/v%~3w/v%、尤其优选为1.5w/v%~2.5w/v%。此外,另一个方式中,本发明的组合物中的藻酸的1价金属盐浓度可以优选为0.5w/w%~5w/w%、更优选为1w/w%~5w/w%、进一步优选为1w/w%~3w/w%、尤其优选为1.5w/w%~2.5w/w%。

[0102] 使用进行提纯直至示出优选的内毒素水平为止的藻酸的1价金属盐而如上述那样制作组合物时,组合物的内毒素含量通常为500EU/g以下、更优选为300EU/g以下、进一步优选为150EU/g以下、尤其优选为100EU/g以下。

[0103] 本发明的组合物优选不含细胞。

[0104] 本发明的另外的多个方式的组合物使用细胞。

[0105] 作为细胞,可以举出例如髓核细胞、干细胞、间质细胞、间充质干细胞、骨髓间质细胞等,来源没有特别限定,可以举出椎间盘髓核、骨髓、脂肪组织、脐带血等。此外,作为细胞,还可以举出ES细胞和iPS细胞。

[0106] “使用细胞”是指根据需要将由椎间盘髓核、骨髓、脂肪组织、脐带血等回收目标细胞并进行浓缩的处理、培养而增加量的处理而制备的细胞添加至本发明的组合物中。具体而言,是指本发明的组合物中含有例如 1×10^4 个/ml以上、或 1×10^5 个/ml以上、优选 1×10^4 个/ml~ 1×10^7 个/ml的细胞。细胞可以从市场获取而使用。

[0107] 本发明的组合物还可以包含促进细胞的生长的因子。作为这样的因子,可以举出例如BMP、FGF、VEGF、HGF、TGF- β 、IGF-1、PDGF、CDMP (cartilage-derived-morphogenetic

protein, 软骨衍生形态发生蛋白)、CSF、EPO、IL、PRP (Platelet Rich Plasma, 富含血小板血浆)、SOX和IF等。这些因子可以通过重组法制造, 或者可以由蛋白组合物提纯。应予说明, 本发明的多个方式的组合物不含这些生长因子。即使在不含生长因子的情况中, 髓核的再生也充分良好, 与积极促进细胞的生长的情况相比, 安全性也更高。

[0108] 本发明的组合物还可以包含抑制细胞凋亡的因子。作为引起细胞凋亡的因子, 可以举出例如Caspase (半胱天冬酶)、TNF α 等, 作为抑制这些的因子, 可以举出抗体、siRNA等。这些抑制细胞凋亡的因子可以通过重组法制造, 或者可以由蛋白组合物提纯。应予说明, 本发明的多个方式的组合物不含这些抑制细胞凋亡的因子。即使在不含抑制细胞凋亡的因子的情况中, 髓核的再生也充分良好, 与积极抑制细胞凋亡的情况相比, 安全性也更高。

[0109] 应予说明, 本发明的一个方式中, 本发明的组合物除了低内毒素藻酸的1价金属盐之外, 不含对椎间盘的髓核组织发挥药理作用的成分。即使在仅含有低内毒素藻酸的1价金属盐作为有效成分的组合物中, 也能够发挥充分的髓核的再生或治疗效果。

[0110] 本发明的多个方式中, 根据需要, 也可以在本发明的组合物中含有其他医药活性成分、惯用的稳定化剂、乳化剂、渗透压调节剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、无痛化剂、着色剂等常规药物中使用的成分。

[0111] 7. 本发明的组合物的固化

本发明的组合物以在应用于髓核部位后部分固化的方式使用。

[0112] “部分固化”是指具有流动性的本发明的组合物中的一部分与交联剂接触, 并非交联剂与接触的组合物全体而是部分凝胶化并凝固。优选地, 通过使具有流动性的本发明的组合物的表面中的至少一部分与交联剂接触而将本发明的组合物中的一部分固化。本发明的多个方式中, “将组合物应用于髓核部位后部分固化”是指使用与向髓核部位的填充相同的交联剂的使用方法和使用比率, 按照本说明书的实施例4, 在体外向直径为6mm的试管填充低内毒素藻酸钠500 μ L和交联剂并静置1小时后, 试管内的组合物的容量的至少50%未凝胶化, 未凝胶化的部分可以通过下述方式表示: 能够用带有21G的注射针的注射器抽吸试管内的组合物的容量的至少50%。可以认为, 组合物在填充于髓核部位后也示出这样的性状, 由此即使在填充后由椎间盘的头尾侧施加压缩力的情况中, 组合物也不会脱出。“组合物的表面中的至少一部分”是例如与髓核相连的椎间盘的表面的开口部, 优选为了在髓核部位应用组合物而使用的椎间盘的表面的开口部、即组合物的填充口。通过将组合物的表面中的至少一部分凝胶化而凝固, 能够有效地防止组合物从椎间盘漏出。椎间盘表面的组合物的填充口优选为例如在椎间盘的表面通过注射器的针、手术刀而制作的用于填充组合物的开口部、或者椎间盘突出摘除时通过手术刀等而制作的椎间盘表面的开口部。该方式中的椎间盘优选是指纤维环。

[0113] 本发明的组合物优选不含在应用于对象髓核部位前使组合物固化的量的交联剂。因此, 本发明的组合物中, 可以包含在经过一定时间后也不使组合物固化的量的交联剂。在此的一定时间没有特别限定, 优选是指30分钟~12小时左右。“不含使组合物固化的量的交联剂”可以通过下述表示: 例如将组合物在20 $^{\circ}$ C下静置1小时后, 能够用带有21G的注射针的注射器注入。本发明的多个方式的组合物中, 不含交联剂。

[0114] 作为交联剂, 只要可以通过将藻酸的1价金属盐的溶液交联而将其表面固定化, 则没有特别限制。作为交联剂, 可以举出例如Ca $^{2+}$ 、Mg $^{2+}$ 、Ba $^{2+}$ 、Sr $^{2+}$ 等2价以上的金属离子化合

物、在分子内具有2~4个氨基的交联性试剂等。更具体而言,作为2价以上的金属离子化合物,可以举出 CaCl_2 、 MgCl_2 、 CaSO_4 、 BaCl_2 等,作为在分子内具有2~4个氨基的交联性试剂,可以举出在氮原子上还任选具有赖氨酰基(lysyl) $(-\text{COCH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2)$ 的二氨基烷烃、即包括二氨基烷烃和其氨基被赖氨酰基取代而形成了赖氨酰基氨基的衍生物,具体而言,可以举出二氨基乙烷、二氨基丙烷、N-(赖氨酰基)-二氨基乙烷等,从获取容易性、凝胶的强度等理由出发,特别优选为 CaCl_2 溶液。

[0115] 本发明的多个方式之一中,使本发明的组合物的表面与交联剂接触的时机优选为将本发明的组合物应用于髓核部位后。作为使本发明的组合物中的一部分与交联剂(例如2价以上的金属离子)接触的方法,没有特别限定,可以举出例如通过注射器、喷射器(喷雾器)等将2价以上的金属离子的溶液施加于组合物表面的方法等。例如,交联剂可以缓慢地经过数秒~10数秒向形成于椎间盘上的组合物的填充口持续施加。其后,根据需要,可以施加去除残留于填充口附近的交联剂的处理。交联剂的去除可以为例如利用生理食盐水等对应应用部位进行清洗。

[0116] 交联剂的使用量期望考虑本发明的组合物的应用量、椎间盘表面的组合物的填充口的大小、椎间盘的髓核的应用部位尺寸等而适当调节。为了不使交联剂对组合物的填充口的周围组织造成强烈影响,进行调节以使得交联剂的使用量不会过剩。作为2价以上的金属离子的使用量,只要是能够将含有藻酸的1价金属盐的组合物的表面凝固的量,则没有特别限制。但是,例如使用100mM的 CaCl_2 溶液时,椎间盘的表面的填充口是直径为1mm左右的情况下, CaCl_2 溶液的使用量优选为0.3ml~5.0ml左右、更优选为0.5ml~3.0ml左右。椎间盘表面的填充口在椎间盘突出摘除时通过手术刀等而制作,边缘为5mm×10mm左右时,100mM的 CaCl_2 溶液的使用量优选为0.3ml~10ml左右、更优选为0.5ml~6.0ml左右。可以在观察应用部位处的本发明的组合物的状态的同时适当增减。

[0117] 交联剂中包含钙时,已知钙的浓度高的情况凝胶化快,此外能够形成更硬的凝胶。但是,钙具有细胞毒性,因此如果浓度过高,则还有可能对本发明的组合物的椎间盘的髓核再生作用造成负面影响。因此,为了将含有藻酸的1价金属盐的组合物的表面凝固,使用例如 CaCl_2 溶液时,期望的是优选为25mM~200mM、更优选为50mM~150mM的浓度。

[0118] 本发明中,期望的是,优选向组合物添加交联剂后,静置一定时间后,通过清洗等去除在所添加的部位残存的交联剂。静置的一定时间没有特别限定,期望的是,优选静置约1分钟以上、更优选约4分钟以上,使组合物的表面凝胶化。或者,优选静置约1分钟~约10分钟、更优选约4分钟~约10分钟、约4分钟~约7分钟、进一步优选约5分钟。该一定时间的过程中,期望达到组合物与交联剂接触的状态,可以适当追加交联剂以使得组合物的液面不会变干。

[0119] 例如,将藻酸钠溶液滴加至 CaCl_2 溶液中并凝胶化而制作的物质有藻酸珠。但是,藻酸珠需要挤压至应用部位而应用,需要制作与应用部位的大小匹配的物体,在实际的临床中使用存在技术上的困难。此外,将 CaCl_2 溶液用作交联剂时,珠表面的Ca离子与周围组织接触,因此还存在钙的细胞毒性的问题。与此相对地,本发明的组合物为溶液状,因此也能够容易地应用于任意形状的应用部位,能够用本组合物覆盖应用部位的全体,对周围组织的密合性也良好。本发明的组合物的与周围组织接触的部分能够将钙浓度保持为低,钙的细胞毒性的问题也少。本发明的组合物的与周围组织接触的的部分的交联剂的影响少,

因此本发明的组合物能够容易地与应用部位的细胞、组织接触。优选地,本发明的组合物在应用于髓核部位后,只要经过约4周,则在应用的部位处以无法识别的程度与生物体的组织融合,对生物体的亲和性也高。

[0120] 将本发明的组合物应用于髓核部位时,如果通过交联剂部分凝胶化,则本发明的组合物在患部部分固化,以密合于周围组织的状态而局部存在,能够防止从髓核部位中漏出。除此之外,通过使本发明的组合物与周围组织密合,更强有力地发挥出本发明的组合物的髓核再生效果。

[0121] 本发明的实施例中,作为比较例,使填充于髓核部位的填补材料全体凝胶化而固化时,如果对椎间盘从头尾侧施加压缩力,则发现固化凝胶从椎间盘表面的组合物填充口脱出现象。另一方面,将本发明的溶液状的组合物填充于髓核部位时,即使从头尾侧施加压缩力的情况中,也不会从椎间盘表面的填充口脱出。即,实际上通过本发明的组合物进行髓核填补时,对于来自相对于椎间盘的上下的压力,也可以说填补的组合物漏出的风险低。

[0122] 此外,将固化的凝胶填充于髓核部位时,固化的凝胶向椎管内突出,存在引发重大的神经障碍的危险性。另一方面,本发明的溶液状的组合物的这样的危险性低,并发症发病的危险低。

[0123] 8. 本发明的组合物的应用

本发明的组合物应用于人、或除了人之外的生物、例如鸟和非人哺乳动物(例如牛、猴、猫、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、猪、狗、兔、羊、和马)的椎间盘的髓核部位,用于促进髓核的再生。

[0124] 本发明的组合物的形态优选为具有流动性的液体状、即溶液状。本发明中,“具有流动性”是指具备其形态不规则地发生变化的性质,不需要具备如例如溶液那样一直流动的性质。优选地,期望例如将组合物封入注射器等中,并且具有能够注入椎间盘的髓核部位那样的流动性。此外,本发明的多个方式之一中,期望的是,具有将组合物在20℃下静置1小时后能够用带有14G~26G的注射针的注射器注入椎间盘的髓核部位那样的流动性,进一步优选期望能够用21G的注射针注入。本发明的组合物以冻结干燥体等的干燥状态提供时,在应用时可以使用溶剂等而制成上述那样具有流动性的组合物。

[0125] 溶液状的本发明的组合物可以容易地通过注射器、凝胶用滴管、专用注射器、专用注入器、填充器具等而应用于椎间盘的髓核部位。

[0126] 本发明的组合物的粘度高时,难以通过注射器进行应用,因此使用加压型、电动型等的注射器。即使不使用注射器等,也可以通过例如刮刀、棒等而应用于髓核部位的缺损部。通过注射器注入时,例如优选使用14G~27G或14G~26G的针。

[0127] 本发明的组合物向髓核部位的应用方法没有特别限定,优选地,可以通过公知的外科手段在直视下将患部露出后、或者在显微镜下或内窥镜下,使用注射器、填充器具等将本发明的组合物应用于髓核部位。优选方式之一中,可以例如从纤维环表面朝向髓核部位插入填充器具的针等,应用本发明的组合物。

[0128] 本发明的组合物为溶液状,因此也能够适合于髓核的缩小、髓核部位的空洞、缺损部等任意形状的髓核部位,还可以填充髓核的缩小、空洞或缺损部全体。髓核的缩小、髓核部位的空洞、缺损部可能因椎间盘的变性或损伤而产生,或者可能因在外科的手术上去除或抽吸髓核中的至少一部分而产生。优选地,期望对通过去除髓核中的至少一部分而形成

的髓核缺损部应用本发明的组合物。

[0129] 髓核中的至少一部分的去除了没有特别限定,可以为例如直视下、经皮的、显微镜观察下、或利用内窥镜而进行的椎间盘髓核摘除术等。此外,例如可以为在背上施加2cm~10cm的切开,将肌肉从椎弓这一脊椎的后方要素后面剥离,切除椎弓间的韧带,确认到神经与椎间盘突出,摘除压迫神经的突出的方法(Love法)。此外,也可以为对髓核照射激光而减少髓核的容量的方法。

[0130] 本发明的组合物应用于髓核部位后,如前述那样,可以通过交联剂而将组合物中的一部分固化。

[0131] 本发明的组合物的应用量根据所应用的对象髓核的应用部位的容积而决定即可,没有特别限定,例如为0.01ml~10ml、更优选为0.1ml~5ml、进一步优选为0.2ml~3ml。将本发明的组合物应用于髓核缺损部时,期望注入以使得充分填充髓核部位的缺损部容积。

[0132] 本发明的组合物的应用次数·频度可以根据症状和效果而增减。例如,可以仅为1次应用,也可以持续进行1个月~1年1次应用。

[0133] 藻酸是在动物的体内原本不存在的物质,因此动物不具有特异性分解藻酸的酶。藻酸在动物体内通过通常的水解而缓慢分解,但与透明质酸等聚合物相比体内的分解更慢,此外在髓核内不存在血管,因此填充于髓核内时,能够期待长时间的效果持续。

[0134] 即使在本发明的组合物未与如前述那样的细胞、生长因子一起提供的情况中,将本发明的组合物应用于髓核部位时,也可以组合使用前述细胞、生长因子、细胞凋亡抑制因子、后述其他药剂等。

[0135] 本发明的组合物通过应用于髓核部位,抑制了椎间盘组织全体和髓核的变性变化,发挥出促进再生的效果。因此,本发明的组合物优选被用作椎间盘的髓核填补用组合物。

[0136] 本发明的组合物的优选方式之一是用于抑制椎间盘的变性的组合物,更优选为用于抑制椎间盘髓核的变性的组合物。“椎间盘或髓核的变性”是指因老龄等而导致椎间盘的细胞数、水分含量、细胞外基质(II型胶原、聚集蛋白聚糖等)等降低而发生形态变化、造成功能降低的状态,如果继续进行,则无法发挥椎间盘的作为冲击吸收体的功能。本说明书中,“变性的抑制”是与未处置的情况相比抑制了变性变化即可,并不意味着必然达到未变性的状态。

[0137] 本发明的组合物的方式之一是用于髓核再生的组合物。髓核再生是指以防止成纤维样细胞的聚集、再生髓核细胞的比率高的髓核为目的,意图再生富含II型胶原、蛋白聚糖的髓核组织。该髓核再生的词语还包括了抑制髓核的变性。本发明的优选方式之一期望的是,应用本发明的组合物而再生的髓核的组成与天然的正常髓核的组成接近。

[0138] 此外,本发明的优选方式的组合物用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制。本说明书中,“治疗、预防或复发抑制”包括治疗、预防、复发抑制、减少、抑制、改善、去除、发病率的减少、发病时期的延迟、进行抑制、重症度的减轻、复发率的降低、复发时期的延迟、临床症状的缓解等。

[0139] 这些本发明的组合物的优选方式、组合物的使用方法等按照前述记载。

[0140] 椎间盘变性和/或椎间盘损伤是例如选自椎间盘突出、椎间盘症、脊椎退行性滑脱症、化脓性椎间盘炎、变形性脊椎症、椎管狭窄症、椎间盘损伤中的至少1种状态或疾病。

[0141] 9. 治疗方法

本发明提供使用前述本发明的组合物的用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制的方法。优选地,本发明的治疗方法是用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制的方法,其包括:将含有低内毒素藻酸的1价金属盐且具有流动性的组合物应用于需要前述治疗、预防或复发抑制的对象椎间盘的髓核部位,将所应用的前述组合物中的一部分固化。

[0142] 本发明的治疗方法可以在将本发明的组合物应用于髓核部位前,包括去除髓核中的至少一部分的步骤。

[0143] 前述椎间盘变性和/或椎间盘损伤是例如选自椎间盘突出、椎间盘症、脊椎退行性滑脱症、化脓性椎间盘炎、变形性脊椎症、椎管狭窄症、椎间盘损伤中的至少1种状态或疾病。本发明的多个方式的治疗方法中,前述椎间盘变性和/或椎间盘损伤是椎间盘突出、特别是腰椎间盘突出。

[0144] 此外,本发明的多个方式之一中,提供使用前述本发明的组合物的抑制椎间盘的变性变化的方法。此外,本发明的优选方式之一中,提供使用前述本发明的组合物的再生椎间盘的髓核的方法。

[0145] 这些方法包括:将含有内毒素藻酸的1价金属盐且具有流动性的组合物应用于需要椎间盘变性抑制或髓核再生的对象椎间盘的髓核部位,将所应用的组合物中的一部分固化。前述方法可以在将本发明的组合物应用于髓核部位前,包括去除髓核中的至少一部分的步骤。

[0146] 本发明的组合物的优选方式、具体的应用于椎间盘的髓核部位的方法、组合物的固化方法、术语的含义等如前述那样。也可以适当组合其他椎间盘的治疗方法、治疗药来进行本发明的治疗方法。

[0147] 此外,在向髓核部位应用本发明的组合物之前、或者同时、或者之后,可以填充链霉素、青霉素、妥布霉素、阿米卡星、庆大霉素、新霉素、和两性霉素B等抗生素、阿司匹林、非类固醇性解热镇痛剂(NSAIDs)、醋氨酚等消炎药、蛋白质分解酶、肾上腺皮质类固醇药、辛伐他汀、洛伐他汀等HMG-CoA还原酶抑制剂等组合使用药物。这些药剂可以混入本发明的组合物中使用。或者,可以以经口或者非经口的方式组合使用而给药。除此之外,也可以以经口或非经口的方式组合使用肌肉松弛药、阿片类镇痛药、神经性疼痛缓解药等而给药。

[0148] 此外,本发明的多个方式中,也可以与本发明的组合物一起,将前述细胞应用于髓核部位。或者,本发明的多个方式中,也可以与本发明的组合物一起,将前述促进细胞的生长的因子应用于髓核部位。应予说明,本发明的另一个方式中,还期望本发明的组合物不与前述细胞组合使用的方式。此外,还期望本发明的组合物不与促进细胞的生长的因子组合使用的方式。本发明的组合物即使在不使用这些细胞、因子的情况中,也能够促进髓核的再生。

[0149] 本发明还涉及低内毒素藻酸的1价金属盐在制造本发明的组合物中的用途。

[0150] 本发明的用途是低内毒素藻酸的1价金属盐在制造用于椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制的组合物中的用途,前述组合物应用于对象髓核部位,以在应用后部分固化的方式使用,在应用于髓核部位时具有流动性。

[0151] 本发明进一步提供用于在椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制

中使用的低内毒素藻酸的1价的金属盐,所述治疗、预防或复发抑制中,将含有低内毒素藻酸的1价金属盐且具有流动性的组合物应用于需要椎间盘变性和/或椎间盘损伤的治疗、预防或复发抑制的对象椎间盘的髓核部位,将所应用的组合物中的一部分固化。

[0152] 10. 冻结干燥制剂、试剂盒

本发明提供椎间盘的髓核填补用试剂盒。

[0153] 本发明的试剂盒中,可以包含本发明的组合物。本发明的试剂盒中包含的本发明的组合物为溶液状态或干燥状态,优选为干燥状态,更优选为冻结干燥体,特别优选为冻结干燥粉体。此外,本发明的组合物为干燥状态时期望包含溶解用的溶剂(例如注射用水)。

[0154] 本发明的试剂盒进一步可以包含交联剂。

[0155] 本发明的试剂盒进一步可以包含交联剂、注射器、注射针、凝胶用滴管、专用填充器、操作说明书等。

[0156] 作为适合作为试剂盒的具体例,可以制成将(1)封入了低内毒素藻酸钠的冻结干燥体的小瓶、(2)作为溶解液而封入了注射用水等的溶剂的安瓿、(3)作为交联剂而封入了氯化钙溶液等2价以上的金属离子化合物的安瓿等装入一个包装中而得到的试剂盒。此外,作为另一个例子,制成下述试剂盒,所述试剂盒一体成型而构成以使得在由被隔离壁区隔开的二个室形成的注射器的一个室中封入了藻酸的1价金属盐、且在另一个室中封入了作为溶解液的溶剂、或包含交联剂的溶液,从而在使用时容易能够打通两个室的隔离壁,在使用时能够将两者混合·溶解而使用。作为另外的例子,制成将藻酸的1价金属盐溶液封入预填充注射器中、在使用时不进行制备操作而能够直接填充的试剂盒。作为另外的例子,制成将藻酸溶液和交联剂封入各自的注射器中并在一个包装中配套的试剂盒。或者,也可以制成包含填充了藻酸的1价金属盐溶液的小瓶和封入了交联剂的安瓿等的试剂盒。针对“本发明的组合物”、“交联剂”、“注射器”等,如前述说明那样。

[0157] 本试剂盒能够用于例如本发明的治疗方法。

[0158] 应予说明,本说明书中记载的全部文献和出版物无论其目的如何均以参照的方式以其全体并入本说明书中。此外,本说明书包括本申请的优先权要求基础日本专利申请特愿2016-058396 (2016年3月23日提交)的权利要求书、说明书、和附图的公开内容。

实施例

[0159] 通过以下的实施例进一步详细描述本发明,但本发明不应当被理解为限定于这些实施例。

[0160] 实施例1:低内毒素藻酸钠对人椎间盘细胞的效果

1-(1) 未变性人椎间盘细胞的分离·培养

从人未变性椎间盘组织中取出髓核组织,在包含0.25%胶原酶(Wako)的DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium,杜氏改良的伊格尔培养基)培养基中在37℃下处理4小时,分离髓核细胞。将所得髓核细胞以包含1%青霉素/链霉素、1.25μg/ml两性霉素(fungizone,Invitrogen)、10%FBS(fetal bovine serum,胎牛血清)的DMEM作为培养液在37℃、5%CO₂、20%O₂的条件下进行培养,在实验中使用传代数为2的细胞。

[0161] 1-(2) 藻酸珠的制作、培养

分别使用下述表1所示的(A)经低内毒素处理的藻酸钠、和(B)食品级(commercial

grade)的藻酸钠(和光纯药工业(株)、199-09961)这2种藻酸钠(持田制药(株)),培养人髓核细胞,进行比较。

[0162] 使用MilliQ水,分别制作2w/v %浓度的藻酸钠溶液。将上述(1)中得到的人髓核细胞 4.0×10^6 个细胞分别悬浮于这些藻酸钠溶液1.0ml中。将该细胞悬浮液使用22G针滴加至102mM氯化钙水溶液中,放置10分钟,由此制作内包了含有髓核细胞的藻酸钠溶液的珠。

[0163] 所得珠用0.9%生理食盐水清洗2次后,加入至包含1%青霉素/链霉素、1.25 μ g/ml两性霉素、10%FBS的DMEM培养液中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、20%O₂的条件下进行三维(3D)培养。培养开始后48小时、7天、14天、和28天后回收细胞,使用以下的评价。

[0164] [表1]

表 1

	藻酸钠	粘度 mPa·s (1%浓度)	内毒素浓度 (EU/g)
A	低内毒素藻酸钠	300~600 ※1	低于50
B	食品级藻酸钠	500~600 ※2	75950

※1 利用旋转粘度计测定

※2 来自和光纯药工业主页

[0165] 1-(3) 活细胞率的评价

培养开始起48小时、7天、14天、和28天后回收珠,在4 $^{\circ}$ C的55mM柠檬酸钠水溶液中将珠浸渍20分钟,由此溶解珠,通过离心分离而回收细胞。通过5 μ M的Calcein AM(

钙黄绿素AM)和1.5 μ M的propidium iodide(PI,碘化丙啶),对所得细胞极性染色,用共聚焦激光显微镜(オリンパス,FV300)进行观察。以Calcein AM阳性细胞作为活细胞、PI阳性细胞作为死细胞,使用ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA),计算确定活细胞率。在回收细胞的各时点,n=5。

[0166] 本说明书的实施例中的统计分析的结果以平均值 $\pm$ 标准偏差(mean $\pm$ SD)表示。2组间比较使用Student's t-test(学生t检验),多组间比较使用Steel-Dwass-test(Steel-Dwass检验)。将p<0.05作为统计学显著。

[0167] 其结果是,A组(低内毒素藻酸钠)和B组(食品级藻酸钠)在培养开始48小时后、7天、14天、和28天后任意时点,活细胞率均为约90%左右,没有观察到在两组间存在活细胞率方面的差异。

[0168] 1-(4) 凋亡细胞的评价

与1-(3)同样地,从培养开始起48小时、7天、14天、和28天后,分别回收珠,将珠用PBS清洗2次后回收细胞,将 3.6×10^5 个的细胞通过膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-fluorescein isothiocyanate)(FITC)凋亡检测试剂盒II(Apoptosis Detection Kit II)(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)进行标记,使用流式细胞仪(FACS Cant; BD biosciences, CA, USA)测量凋亡细胞。将FITC+/PI-作为早期凋亡细胞、FITC+/PI+作为晚期凋亡细胞,将其总计作为凋亡细胞。此外,将FITC-/PI-作为活细胞,评价活细胞相对于全部细胞的比率、和凋亡细胞相对于全部细胞的比率。在回收细胞的各时点,n=5。

[0169] 其结果是,A组(低内毒素藻酸钠)和B组(食品级藻酸钠)在培养开始48小时后、7天、14天、和28天后任意时点,活细胞率均为约90%左右,凋亡细胞的比率均为约10%左右,在两组间没有观察到差异。

[0170] 1-(5) 血清饥饿诱导下的细胞的评价

人椎间盘内为无血管区域且处于低营养的环境下,因此在预想椎间盘内的环境的血清饥饿下实施细胞培养试验,进行评价。

[0171] 在1-(2)的3D培养第7天回收珠,使用PBS将珠清洗2次。向不含血清的DMEM、1%青霉素/链霉素、1.25 μ g/ml 两性霉素培养基中添加珠,在37℃、5%CO₂、20%O₂的条件下进行温育,诱导血清饥饿。血清饥饿开始后6小时后、48小时后,分别回收细胞。与前述同样地,进行使用共聚焦激光显微镜的评价、和使用流式细胞仪的评价。

[0172] 其结果是,血清饥饿条件下的使用共聚焦激光显微镜的评价中,A组(低内毒素藻酸钠)和B组(食品级藻酸钠)中的活细胞率在6小时后、48小时后均没有在两组间观察到显著差异,但在48小时后,A组(低内毒素藻酸钠)与B组(食品级藻酸钠)相比,观察到活细胞率更高的倾向。

[0173] 此外,使用流式细胞仪的评价中,6小时后的样品在两组间没有观察到差异,但在48小时后,A组(低内毒素藻酸钠)与B组(食品级藻酸钠)相比活细胞率显著更高,且凋亡细胞率显著更低(图1和图2)。

[0174] 本试验的血清饥饿的诱导是预想无血管从而处于低营养的环境下的人椎间盘髓核的环境的试验。暗示了使用低内毒素藻酸钠的髓核细胞的培养与使用食品级藻酸钠的情况相比,对血清饥饿诱导下的凋亡的耐受性高。即,暗示了低内毒素藻酸钠与食品级藻酸钠相比,在填充于椎间盘的髓核部位时,未诱导髓核细胞的凋亡,保持了细胞生存率。

[0175] 实施例2:兔椎间盘髓核缺损模型中的低内毒素藻酸钠溶液的应用

对兔椎间盘髓核缺损模型,分别填充2种低内毒素藻酸钠溶液,评价效果。

[0176] 2-(1) 兔椎间盘髓核缺损模型的制作

对体重为3.2~3.5kg的日本白色家兔,进行利用戊巴比妥的静脉麻醉和1%利多卡因的局部麻醉,使用18G针抽吸椎间盘的髓核组织,制作椎间盘髓核缺损模型。对L2/3、和L4/5椎间盘髓核进行抽吸,制成椎间盘缺损模型,L3/4不进行抽吸,为正常椎间盘(正常对照组)。

[0177] 2-(2) 低内毒素藻酸钠溶液的填充

低内毒素藻酸钠使用下述2种。内毒素含量均低于50g/EU。各低内毒素藻酸钠的表观粘度和重均分子量如表2所述。藻酸钠的表观粘度测定按照日本药典(第16版)的粘度测定法,使用旋转粘度计法(锥板型旋转粘度计)而测定。具体的测定条件如以下所述。试样溶液的制备使用MilliQ水来进行。测定仪器使用锥板型旋转粘度计(粘度粘弹性测定装置レオストレスRS600(Thermo Haake GmbH)传感器:35/1)。转速在1w/w%藻酸钠溶液测定时设为1rpm,2w/w%藻酸钠溶液测定时设为0.5rpm。读取时间在1w/w%溶液测定时测定2分钟,设为开始1分钟至2分钟的平均值,2w/w%溶液测定时测定2.5分钟,设为开始0.5分钟至2.5分钟的平均值。将3次测定的平均值记作测定值。测定温度设为20℃。

[0178] 此外,各藻酸钠的重均分子量通过凝胶渗透色谱(GPC)和GPC-MALS这2种测定方法而测定。测定条件如以下所述。

[0179] [前处理方法]

向试样添加洗脱液而溶解后,进行0.45 μ m膜过滤器过滤,将所得溶液作为测定溶液。

[0180] (1) 凝胶渗透色谱 (GPC) 测定

[测定条件 (相对分子量分布测定)]

柱:TSKge1 GMPW-XL $\times$ 2+G2500PW-XL (7.8mm I.D. $\times$ 300mm $\times$ 3根)

洗脱液:200mM硝酸钠水溶液

流量:1.0mL/分钟

浓度:0.05%

检测器:RI检测器

柱温度:40 $^{\circ}$ C

注入量:200 μ L

分子量标准:标准普鲁兰、葡萄糖。

[0181] (2) GPC-MALS测定

[折射率增长率 (dn/dc) 测定 (测定条件)]

示差折射率计:Optilab T-rEX

测定波长:658nm

测定温度:40 $^{\circ}$ C

溶剂:200mM硝酸钠水溶液

试样浓度:0.5~2.5mg/mL (5个浓度)。

[0182] [测定条件 (绝对分子量分布测定)]

柱:TSKge1 GMPW-XL $\times$ 2+G2500PW-XL (7.8mm I.D. $\times$ 300mm $\times$ 3根)

洗脱液:200mM硝酸钠水溶液

流量:1.0mL/分钟

浓度:0.05%

检测器:RI检测器、光散射检测器 (MALS)

柱温度:40 $^{\circ}$ C

注入量:200 μ L。

[0183] [表2]

	表观粘度 (mPa·s)		重均分子量		M/G比
	1 w/w%	2 w/w%	GPC	GPC-MALS	
A-1	50~150	500~1200	700,000~ 1,000,000	100,000~200,000	0.6~1.8
A-2	300~600	3000~6000	1,100,000~ 1,700,000	200,000~400,000	

[0184] 将各低内毒素藻酸钠用MilliQ水溶解,从而制备2w/v%溶液。

[0185] 从椎间盘的侧面向髓核插入注射针,将低内毒素藻酸钠溶液20 μ L注入髓核缺损部。向拔出注射针的椎间盘的侧面,耗费数秒施加102mM氯化钙水溶液 (分别称为A-1组、A-2组,将其总称为治疗组)。

[0186] 仅进行了髓核抽吸的组记作单独抽吸组 (单独抽吸组)。

[0187] 术后4周过量填充戊巴比妥而安乐死,切除腰椎,回收椎间盘组织。A-2组针对术后

12周也进行评价。各组各实施8例。

[0188] 2-(3) 利用MRI, Pfirrmann分类的椎间盘组织的评价

通过7.0-Tesla MR scanner (Unity Inova, Varian), 拍摄椎间盘的T2加权矢状断层像。通过椎间盘的T2加权MRI图像, 能够确认因椎间盘的变性而导致的变化。为了评价椎间盘变性的重症度, 使用Pfirrmann分类而评分化。本分类是将MRI中的椎间盘变性按照5个阶段进行评价的指标(1级: 正常~5级: 高度变性)。椎间盘变性的评价基准示于表3 (Spine (Phila Pa 1976). 2001; 26 (17) 1873-8)。

[0189] [表3]

表 3

等级	结构	髓核与纤维环的界限	信号强度	椎间盘的高度
1	均质、亮白色	清楚	相对于脑脊髓液为高信号、相等信号	正常
2	伴有水平的带、或者不伴有而不均质	清楚	相对于脑脊髓液为高信号、相等信号	正常
3	不均质、灰色	不清楚	中等强度	正常至略微降低
4	不均质、灰色至黑色	消失	中等强度至低信号	正常至中等程度降低
5	不均质、黑色	消失	低信号	椎间盘空间破损

[0190] 其结果是, 在将椎间盘变性的重症度进行评分化的Pfirrmann分类中, 在术后4周, 单独抽吸组和治疗组(A-1组和A-2组)与正常对照组相比, 评分显著地为高值, 是表示椎间盘变性的结果。此外, A-1组与单独抽吸组相比, 评分显著地低, 抑制了变性。A-2组和单独抽吸组中, 评分没有观察到显著差异, 但A-2组与单独抽吸组相比, 观察到评分为低值的倾向(图3)。

[0191] 针对A-2组的术后12周的评价中, A-2组的评分与单独抽吸组相比, 示出显著的低值。

[0192] 2-(4) 利用MRI指数的椎间盘组织的评价

使用Analyze 10.0软件 (AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA), 测定矢状断层中的MRI指数(髓核的平均信号强度与髓核面积之积), 定量评价。通过将正常对照组的椎间盘的MRI指数记作100时各组中的MRI指数的比例来进行评价(参照Spine (Phila Pa 1976). 2005 Jan 1; 30 (1): 15-24.)。

[0193] 其结果是, 术后4周, 治疗组(A-1组和A-2组)的MRI指数与单独抽吸组相比为显著的高值, 抑制了变性变化(图4)。

[0194] 针对A-2组的术后12周的评价中, A-2组的MRI指数也与单独抽吸组相比为显著的高值。

[0195] 2-(5) 组织学的评价

MRI拍摄后, 制作椎间盘的组织标本。用10%甲醛固定样品, 用10%EDTA (pH7.5) 进行脱灰处理, 包埋于石蜡中。将矢状断层5 μ m厚的石蜡切片通过二甲苯进行脱石蜡, 进行醇处理、水洗后, 实施HE染色、番红-O染色。使用纤维环中的变性变化的分类、即Nishimura等人的分类

(Spine (Phila Pa 1976) . 1998;23(14):1531-8),将椎间盘组织全体中的变性度进行评分分化。Nishimura等人的分类如以下所述。

1级:伴随破裂而低度弯曲(mildly serpentine with rupture)

2级:伴随破裂而中等程度弯曲(moderately serpentine with rupture)

3级:伴随低度扭转而高度弯曲(severely serpentine with mildly reversed)

4级:高度扭转的形状(severely reversed contour)

5级:不清楚(indistinct)。

[0196] 组织学评价椎间盘变性的重症度的结果是,在术后4周的时点,单独抽吸组和治疗组(A-1组和A-2组)与正常对照组相比,利用Nishimura等人的分类的评分示出显著的高值,是暗示变性的结果。但是,治疗组(A-1组和A-2组)与单独抽吸组相比,评分显著地低,抑制了变性(图5)。

[0197] 针对A-2组的术后12周的评价中,A-2组也与单独抽吸组相比,评分显著地低。示出正常对照组、单独抽吸组、以及A-2组的术后4周和12周的组织标本的照片(图6)。

[0198] 2-(6)免疫组织学的评价

对2-(5)中制作的组织标本,使用抗I型胶原抗体和抗II型胶原抗体进行免疫组织学染色,在椎间盘髓核中随机选择的5个视野中,测量阳性细胞数。

[0199] 其结果是,相对于切片中的细胞数的抗I型胶原抗体阳性细胞率在术后4周的时点,正常对照组、单独抽吸组、和治疗组(A-1组和A-2组)之间没有观察到差异。

[0200] 另一方面,抗II型胶原抗体阳性细胞率在术后4周的时点,与正常对照组相比,单独抽吸组和治疗组(A-1组和A-2组)均示出显著的低值,正常椎间盘组织中观察到的细胞外基质产生降低。但是,治疗组(A-1组和A-2组)与单独抽吸组相比,抗II型胶原抗体阳性细胞率为显著的高值。

[0201] 针对A-2组的术后12周的评价中,A-2组的抗II型胶原抗体阳性细胞率与单独抽吸组相比显著地高,且没有观察到与正常对照组的差别。术后4周和12周时正常对照组、单独抽吸组、和A-2组的相对于椎间盘髓核组织切片中的细胞数的抗II型胶原抗体阳性细胞率的图示于图7。II型胶原抗体阳性细胞示出透明软骨样细胞的存在。示出通过使用低内毒素藻酸钠溶液,兔椎间盘髓核中的透明软骨样细胞的比例在术后12周时点恢复至与正常对照组相当的程度。

[0202] 根据以上可知,低内毒素藻酸钠溶液通过填充于髓核缺损部,抑制了椎间盘组织全体和髓核的变性变化,促进再生。此外,低内毒素藻酸钠的A-1和A-2中,确认到了相同程度的椎间盘变性抑制和再生效果。

[0203] 从处理性的观点出发,A-2的2%溶液与A-1的2%溶液相比粘度高,因此具有填充于髓核部位时难以从填充部逆流、容易与体液区分等优点。可知A-2的2%溶液对于填充而言粘度适度且处理性优异。

[0204] 实施例3:低内毒素藻酸钠溶液的注入方法的研究

3-(1)低内毒素藻酸钠溶液的注入方法的研究

通过下述2种注入方法(i)(ii),将低内毒素藻酸钠溶液注入羊尸体(Cadaver)腰椎,进行评价。

[0205] (i)按照实施例2的记载,将实施例2中记载的A-2的低内毒素藻酸钠2%溶液注入椎

间盘髓核部分摘除部后,在椎间盘表面的注射针的孔附近接触100mM氯化钙溶液的方法(藻酸钠与氯化钙溶液接触部分固化)。

[0206] (ii) 同时将A-2的低内毒素藻酸钠2%溶液和100mM氯化钙溶液以1:1填充至椎间盘髓核部分摘除部的手段(向髓核部位注入的藻酸钠全体固化)。

[0207] (ii) 中,将低内毒素藻酸钠溶液和氯化钙溶液分别装入单独的注射器,通过用22G针同时注入椎间盘髓核的缺损部而实施。

[0208] 其结果是,(i)的手段在羊尸体的椎间盘中实施时,注入的手术技巧没有困难性。另一方面,可以认为(ii)的手段对于使低内毒素藻酸钠溶液和氯化钙溶液的混合比例达到均匀的重现性低。此外,填充的过程中部分凝胶化的情况中,残留的空间也不确定是否能够不留空隙地填充凝胶。进一步,通过(ii)的手段向椎间盘髓核部位填充固化凝胶后,对椎间盘从头尾侧施加压缩力时,观察到固化的凝胶从注入了凝胶的椎间盘侧面的孔脱出的现象。(i)的手段中,没有观察到向椎间盘外的脱出。

[0209] (i)的方法与(ii)的方法相比,具有能够减少椎间盘内的钙浓度、能够减轻细胞毒性的优点。此外,(ii)的方法中,存在如果固化的凝胶突出至椎管内则引起重大神经障碍的危险性,但(i)的方法中这样的危险性低。

[0210] 根据以上,(i)的方法、即将低内毒素藻酸钠溶液注入椎间盘髓核部位后对椎间盘表面施加氯化钙溶液的手段被认为是适合于使用低内毒素藻酸钠的髓核填补的方法。

[0211] 3-(2) 使用羊尸体的力学试验

3-(1)中,针对通过(i)的手段制作的羊尸体的椎间盘(将A-2的低内毒素藻酸钠2%溶液注入椎间盘髓核部分摘除部后,使椎间盘表面的注射针的孔附近与100mM氯化钙溶液接触),从填充起约1小时后,使用Instron5943(インストロン公司),向椎间盘从头尾侧以-300N~300N的轴压缩·拉伸力反复施加1000次压缩力和拉伸力,观察是否存在从注入藻酸钠溶液的孔中脱出。此时,藻酸钠溶液为了提高目视辨认性而用0.05%甲苯胺蓝显色使用。

[0212] 其结果是,没有观察到藻酸钠溶液从注入口向椎间盘外脱出。据此暗示了,将藻酸钠溶液注入椎间盘髓核后使椎间盘表面的注入口附近用交联剂固化的手段是也能够耐受填充藻酸钠溶液后的因体位的变更、步行等而导致的对椎间盘的压缩力、拉伸力的填充方法。

[0213] 实施例4:低内毒素藻酸钠溶液注入后的性状的研究

向椎间盘髓核注入低内毒素藻酸钠溶液后,使椎间盘表面的藻酸钠溶液注入口附近与氯化钙溶液接触,使该接触部固化时,为了预测所注入的低内毒素藻酸钠溶液在椎间盘髓核内为怎样的性状,在体外进行下述研究。

[0214] 4-(1) 试验方法

通过下述的X、Y、Z的3种方法,向微型试管(直径为6mm,高度为25mm)中分别加入藻酸钠溶液,将试管横向静置,1小时后、24小时后、48小时后、1周后,评价试管内的受试物质的性状。实施例5的羊椎间盘髓核摘除模型中,以5mm×3mm切除纤维环而进行了髓核摘除,因此选择尺寸较为接近该体内试验、且作为能够进行试管内的操作的尺寸的直径为6mm的微型试管。将实施例2的A-2的低内毒素藻酸钠用生理食盐水溶解,制成2w/v%溶液而使用。试验在室温20℃下进行。

[0215] [表4]

表 4

	方法
X	将2w/v%藻酸钠溶液500 μ L装入试管，向藻酸钠溶液的表面滴加100mM氯化钙溶液50 μ L，静置5分钟。其后，将表面的氯化钙溶液用生理食盐水清洗3次。
Y	将2w/v%藻酸钠溶液与25mM氯化钙溶液各200 μ L分别装入试管，搅拌。
Z	将2w/v%藻酸钠溶液与100mM氯化钙溶液各200 μ L分别装入试管，搅拌。

[0216] 4-(2) 结果

试验中使用的2w/v%藻酸钠溶液与生理食盐水相比粘度高，如果倾斜小瓶则液面缓慢移动，能够用带有21G的注射针的注射器耗费时间吸取。

[0217] X组的性状从1小时后至1周后几乎相同。即，试管内的藻酸钠溶液的表面部分2~3mm左右为凝胶状，但除了表面之外没有观察到凝固，为溶胶状。溶胶状的部分大部分能够用带有21G的注射针的注射器抽吸，但与2w/v%藻酸钠溶液相比粘度更高，抽吸需要更多的时间。

[0218] Y组的性状从1小时后至1周后几乎相同。即，试管内的大部分凝胶化为胶冻状，仅极少部分观察到如水那样的液体。推测为凝胶收缩而液体分离渗出的“脱浆”现象。凝胶化的部分无法用带有21G的注射针的注射器抽吸。

[0219] Z组的性状从1小时后至1周后几乎相同。即，形成直径为5mm左右的白浊的凝胶化块，其他部分形成如水那样的液体。这也推测为脱浆现象。凝胶化的部分无法用带有21G的注射针的注射器抽吸。

[0220] 以上，X组的方法是模拟本发明的实施例中进行的向椎间盘髓核的注入方法的方法，预测将藻酸钠溶液注入椎间盘髓核时藻酸钠溶液也以溶胶状存在。另一方面，Y组和Z组均以凝胶状存在，如本发明的实施例3中确认到那样，向椎间盘髓核填充凝胶后，从头尾侧施加压缩力时，存在固化的凝胶有可能从注入了凝胶的椎间盘的侧面脱出的担忧。

[0221] 实施例5：羊椎间盘髓核缺损模型中的低内毒素藻酸钠溶液的应用

对羊椎间盘髓核缺损模型，填充低内毒素藻酸钠溶液，评价效果。使用7只体重为40kg~60kg的羊（雄性，萨福克种）的椎间盘L1/2、L2/3、L3/4、和L4/5，进行以下的评价。

[0222] 5-(1) 羊椎间盘髓核缺损模型的制作

对羊进行麻醉，使用电刀将椎间盘露出。以5mm×3mm切除、去除椎间盘的纤维环，从该孔中插入镊子而去除0.10g的髓核，制作椎间盘髓核缺损模型。在此，纤维环的切除的大小和髓核摘除量在事前进行利用羊椎间盘髓核摘除的椎间盘变性试验而决定。纤维环的切除的大小在5mm×3mm和10mm×3mm下进行研究，根据髓核摘除量而选择确认到椎间盘变性的进行的5mm×3mm。髓核摘除量以0.02g、0.05g、0.1g、和0.2g的4种进行研究。羊髓核摘除量0.1g换算为人时为1.2g，最接近人临床中的髓核摘除量，因此髓核摘除量选择0.1g。

[0223] 5-(2) 低内毒素藻酸钠溶液的填充

将实施例2的A-2的低内毒素藻酸钠用MilliQ水制备为2w/v%溶液，将其0.10ml用注射器注入5-(1)中制作的羊椎间盘髓核缺损部。在所注入的藻酸钠溶液的表面上，耗费数秒施

加102mM氯化钙水溶液。放置约5分钟后,将施加氯化钙溶液的部位用生理食盐水清洗,缝合。将其记作治疗组(n=11)。此外,5-(1)中仅进行椎间盘髓核摘除并进行缝合的组记作髓核摘除组(n=10)。无处置的羊椎间盘记作正常对照组(n=7)。

[0224] 术后4周时,过量给药戊巴比妥而安乐死,切除腰椎,回收椎间盘组织。

[0225] 5-(3)组织学的评价

按照前述2-(5)的记载,实施HE染色、番红0染色,制作椎间盘的组织标本。使用基于Boos分类而修改的分类(Eur Spine J. 2014 Jan; 23(1):19-26. Spine 2002 第27卷,第23期第2631-2644页),评价椎间盘的变性度。分类示于表5。椎间盘的项目以最大20分,椎体终板的项目以最大16分,总计最大为36分进行评价。

[0226] [表5]

表5

椎间盘 (最大20分)	椎体终板 (最大16分)
细胞(软骨细胞的增殖) 0 = 无增殖 1 = 细胞密度上升 2 = 2个软骨细胞连接 3 = 小尺寸的克隆(3~7个细胞) 4 = 中等程度尺寸的克隆(8~15个细胞) 5 = 巨大的克隆(16个细胞以上)	丛状细胞数 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在
嗜酸性不规则颗粒的变化 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在	软骨结构的不规则性 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在
血管新生 0 = 无 1 = 存在	软骨的龟裂 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在
纤维环的龟裂(边缘的龟裂) 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在	微小骨折 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在
纤维环的龟裂(同心圆状的龟裂) 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在	血管新生 0 = 无 1 = 存在
纤维环断裂 0 = 无 1 = 极少存在 2 = 以中等程度的量存在 3 = 丰富地存在	骨新生 0 = 无 1 = 存在
瘢痕形成 0 = 无 1 = 存在	瘢痕形成 0 = 无 1 = 存在
组织缺损 0 = 无 1 = 存在	组织缺损 0 = 无 1 = 存在

[0227] 组织学评价椎间盘变性的重症度的结果是,在术后4周的时点,髓核摘除组和治疗组与正常对照组相比,利用表5的评分示出显著的高值,是暗示变性的结果。但是,治疗组与髓核摘除组相比评分显著地低,抑制了变性(图8)。

[0228] 此外,通过椎间盘高度指数(Disc height index:DHI),评价椎间盘的高度。椎间盘高度指数是将椎间盘高度(前部、中央部和后部的椎间盘的高度的平均值)除以椎间盘前后的直径而得到的值(Eur Spine J. 2014, 23(1):19-26.)。

[0229] 其结果是,髓核摘除组的椎间盘高度指数与正常对照组相比显著降低。另一方面,治疗组的椎间盘高度指数与正常对照组相比没有观察到显著差异。据此可知,通过低内毒素藻酸钠溶液向髓核的填充,抑制了因髓核摘除而导致的椎间盘高度的降低(图9)。

[0230] 5-(4) 免疫组织学的评价

对前述5-(3)中制作的组织标本,使用抗I型胶原抗体和抗II型胶原抗体进行免疫组织学染色,在椎间盘髓核中随机选择的5个视野中,测量阳性细胞数。

[0231] 其结果是,在术后4周的时点,抗I型胶原抗体阳性细胞相对于切片中的细胞数的比例在正常对照组中为10%以下,与此相对地,髓核摘除组和治疗组中示出显著的高值。但是,治疗组中,与髓核摘除组相比,抗I型胶原抗体阳性细胞的比例显著地低。

[0232] 此外,在术后4周的时点,抗II型胶原抗体阳性细胞相对于切片中的细胞数的比例在正常对照组和治疗组中均示出约60%左右,没有观察到差异。另一方面,髓核摘除组中示出约40%左右,与正常对照组相比,此外与治疗组相比,分别观察到显著的差异(图10)。仅髓核摘除的情况下,抗II型胶原抗体阳性细胞的比例与正常相比示出降低,但通过填充低内毒素藻酸钠溶液,示出在术后4周时恢复至与正常对照组相当的程度。

[0233] 由以上的结果,示出低内毒素藻酸钠溶液向髓核的应用抑制椎间盘髓核的变性,促进再生。如果与实施例3的力学试验的结果结合考虑,则本发明的组合物可以特别优选用于椎间盘髓核摘除术后的髓核的填补。此外,治疗组中抑制了因髓核摘除而导致的椎间盘高度指数的降低等,因此针对与所治疗的椎间盘相邻的椎间盘,也暗示了预防和/或减轻其变性的可能性。

[0234] 实施例6:羊椎间盘髓核的组成的研究

椎间盘的髓核的细胞外基质的主要成分为水分、II型胶原、蛋白聚糖,据称与椎间盘终板、关节软骨等其他软骨组织相比,蛋白聚糖相对于胶原的比例高。存在通过硫酸化糖胺聚糖(sulfated glycosaminoglycans: GAG)相对于相对于羟基脯氨酸(Hydroxyproline: HYP)的比来观察该蛋白聚糖相对于胶原的比的文献(European Cells and Materials 第8卷. 2004 第58-64页)。

[0235] 对羊椎间盘髓核缺损模型,填充低内毒素藻酸钠溶液,术后4周时,按照上述文献进行髓核组织的生物化学分析,进行评价。

[0236] 6-(1) 方法

试验中使用2只体重为35kg~60kg的羊(雄性,萨福克种)的椎间盘的L1/2、L2/3、L3/4、和L4/5。按照实施例5,制作羊椎间盘髓核缺损模型,填充2w/v%低内毒素藻酸钠溶液,记作治疗组(n=4)。按照实施例5,仅进行椎间盘髓核摘除并进行缝合的组记作髓核摘除组(n=4)。无处置的羊椎间盘(T12/L1、L5/6)记作正常对照组(n=4)。术后4周时,回收椎间盘髓核和无处置的大腿骨左右的软骨组织(关节软骨),进行样本的前处理后,进行硫酸化糖胺聚

糖 (GAG) 和羟基脯氨酸 (HYP) 的测定。

[0237] 样本的前处理中,将样本冻结干燥,测定干燥重量后,向经干燥的样本添加以1mg/mL的浓度包含1mL的链霉菌蛋白酶液(链霉菌蛋白酶(Calbiochem公司)的20mM HEPES缓冲液(pH7.5)),每隔1小时进行搅拌并在60℃下消化3小时。在8,000×g下进行10分钟离心分离,将所得上清液作为测定用试样原液。至测定时冷藏保存。

[0238] 硫酸化糖胺聚糖 (GAG) 的测定使用Wieslab (注册商标) sGAG定量试剂盒(Euro Diagnostica,型号:GAG201RU0),按照操作说明书测定GAG量。将测定用试样原液用精制水稀释100倍,将所得稀释液作为测定用试样。空白试样设为链霉菌蛋白酶液的100倍稀释。测定波长设为620nm,使用以测定试剂盒中的硫酸软骨素-6 (CS-6) 作为标准而制作的标准曲线,算出样本中的GAG量。

[0239] 羟基脯氨酸 (HYP) 的测定如以下那样实施。将测定用试样原液用精制水稀释100倍,将所得稀释液作为测定用试样。空白试样设为链霉菌蛋白酶液的100倍稀释。将50μL的测定用试样采集至水解用小瓶中,添加等量的浓盐酸,密闭后,在120℃下进行16小时水解。每1个样本制作3份水解试样。将20μL的水解试样、100μL的HYP标准溶液采集至孔板中,在40℃下减压15小时进行干燥固化。向经干燥的试样添加100μL的精制水,按照以下的Woessner的方法(Woessner JF Jr, Arch Biochem Biophys, 93, (1961) 第440-447页)进行显色,测定557nm的吸光度。水解和显色时的测定用试样的稀释率为10倍,因此总稀释率达到1000倍。使用基于标准HYP溶液的结果制作的标准曲线,算出样本中的HYP量。

[0240] 6-(2) 结果

得到平均样本干燥重量的GAG量和HYP量(μg/mg干重量),求出GAG相对于HYP的比(GAG/HYP)。针对各组n=4,求出平均值和标准偏差(表6)。此外,各组的散点图示于图11。

[0241] [表6]

表 6

	GAG/HYP	
	平均值	标准偏差
髓核摘除组 (n=4)	8.9	1.7
治疗组 (n=4)	10.0	2.3
正常对照组 (n=4)	17.8	4.4
关节软骨 (n=4)	3.1	0.6

[0242] 其结果是,正常对照组(椎间盘髓核)的GAG/HYP的平均值为17.8,与无处置的关节软骨的3.1相比示出高值。术后4周时,髓核摘除组和治疗组的GAG/HYP的平均值与正常对照组的该值相比降低。治疗组与髓核摘除组相比,GAG/HYP的平均值观察到略高的倾向。根据以上,暗示了椎间盘髓核与关节软骨相比,硫酸化糖胺聚糖 (GAG) /羟基脯氨酸 (HYP) 的值高,即,构成组织的成分比不同,在椎间盘髓核和关节软骨中组织的特性也不同。本发明的组合物可以认为具有恢复这样的髓核特有的组成的可能性。

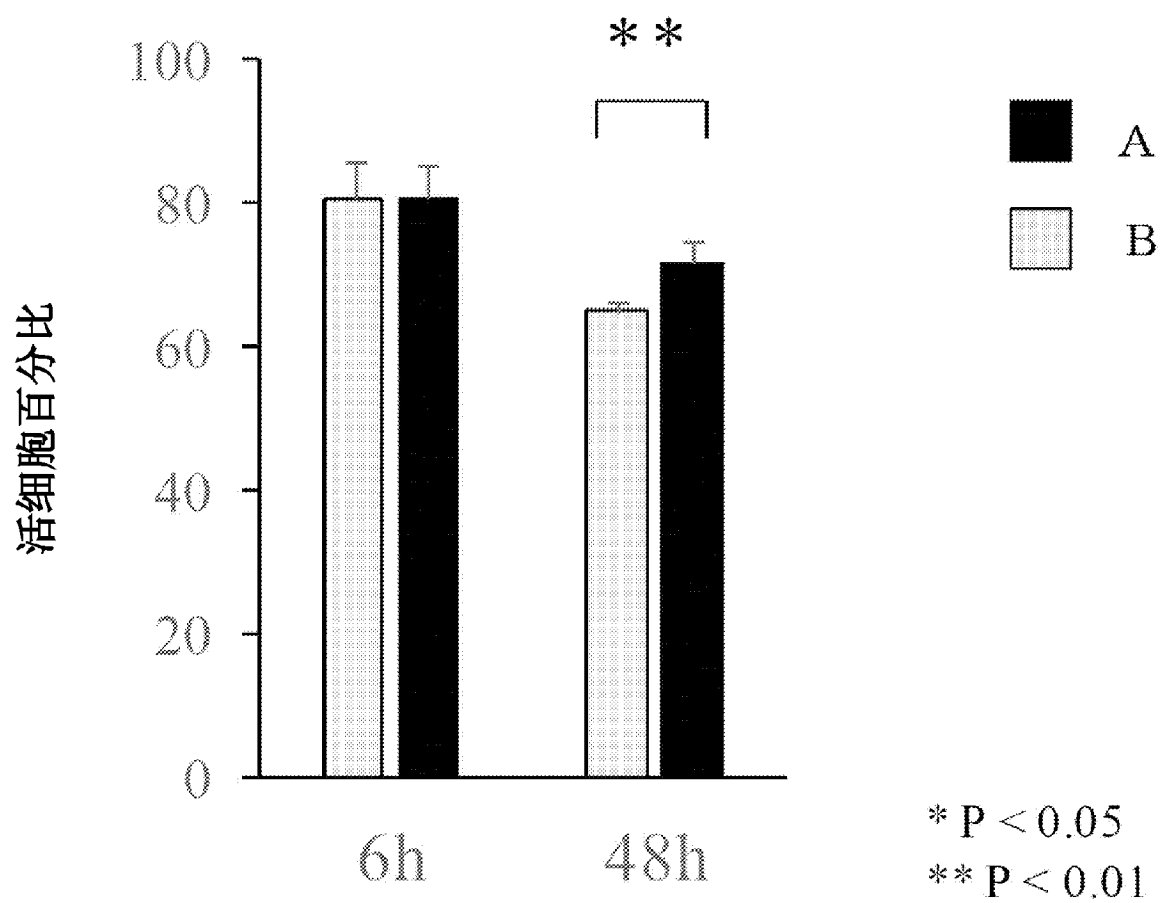


图 1

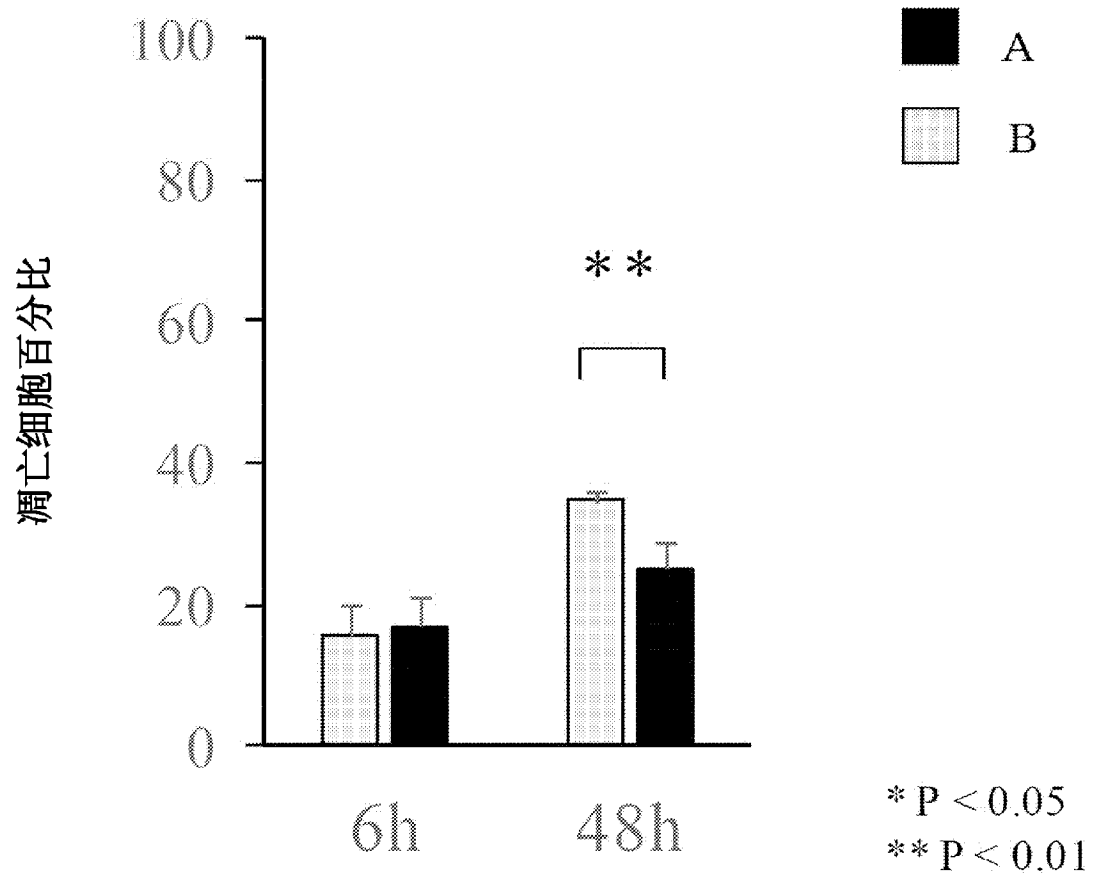


图 2

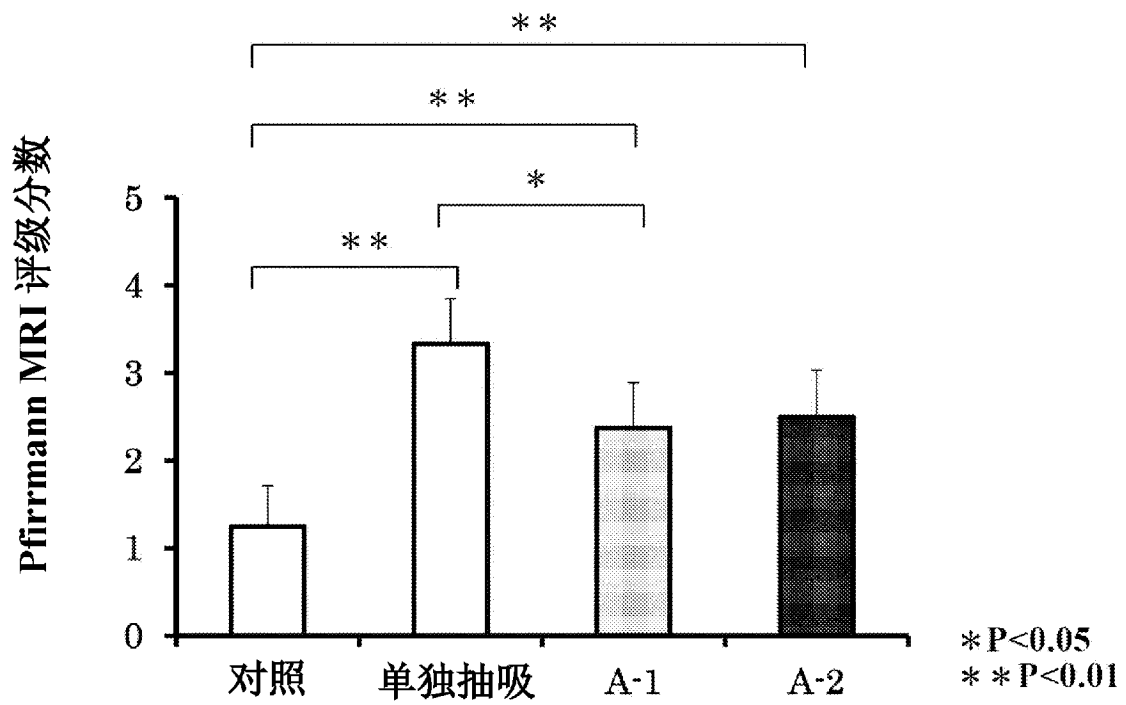


图 3

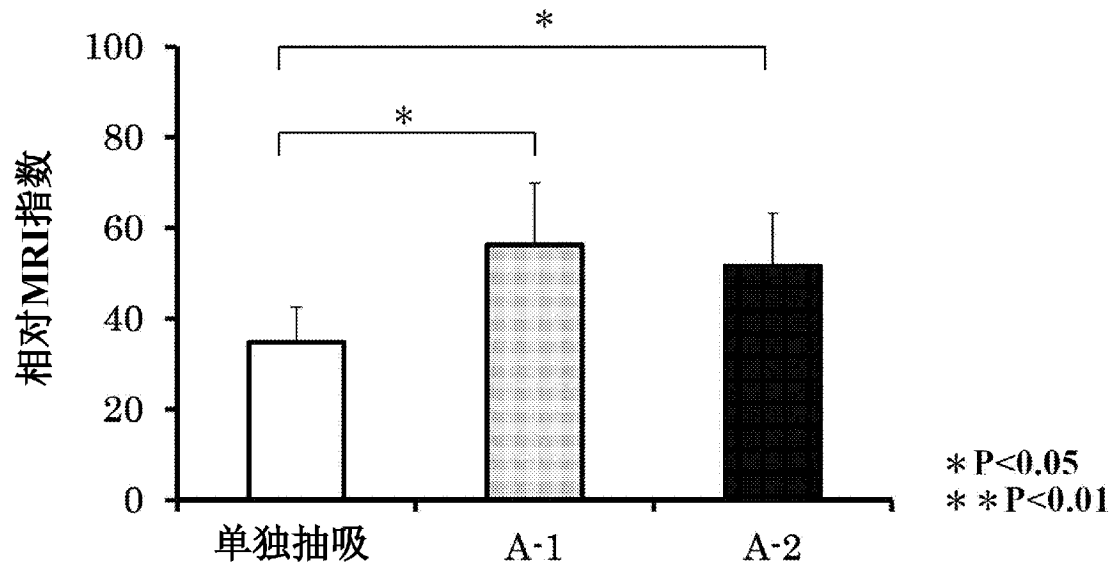


图 4

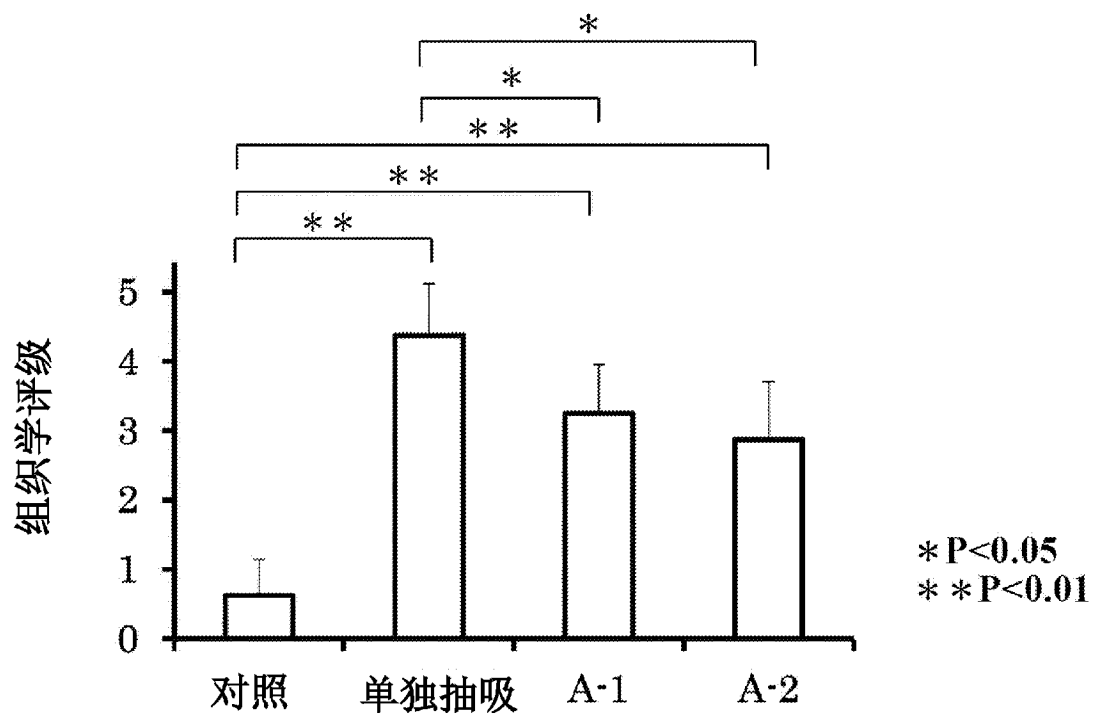


图 5

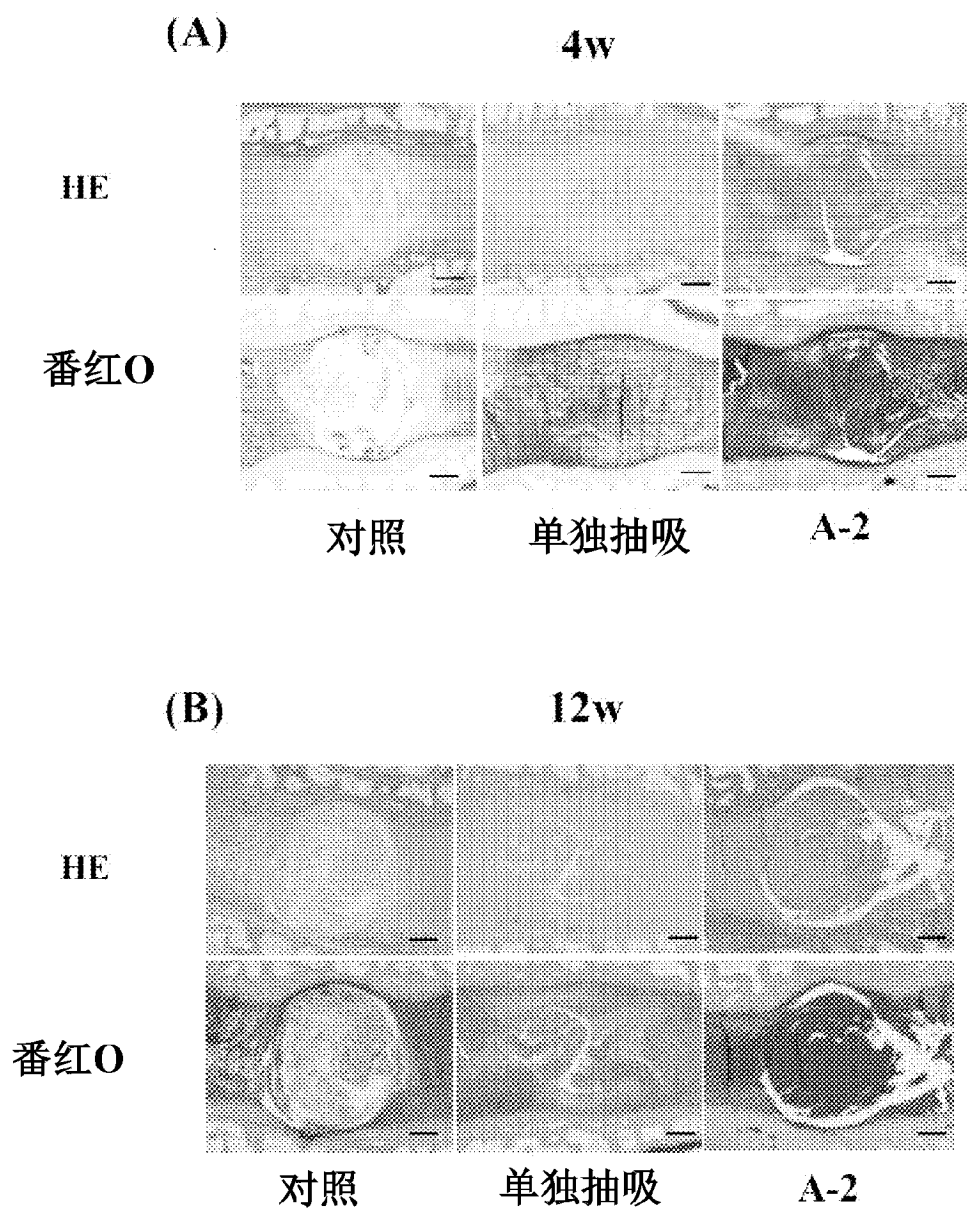


图 6

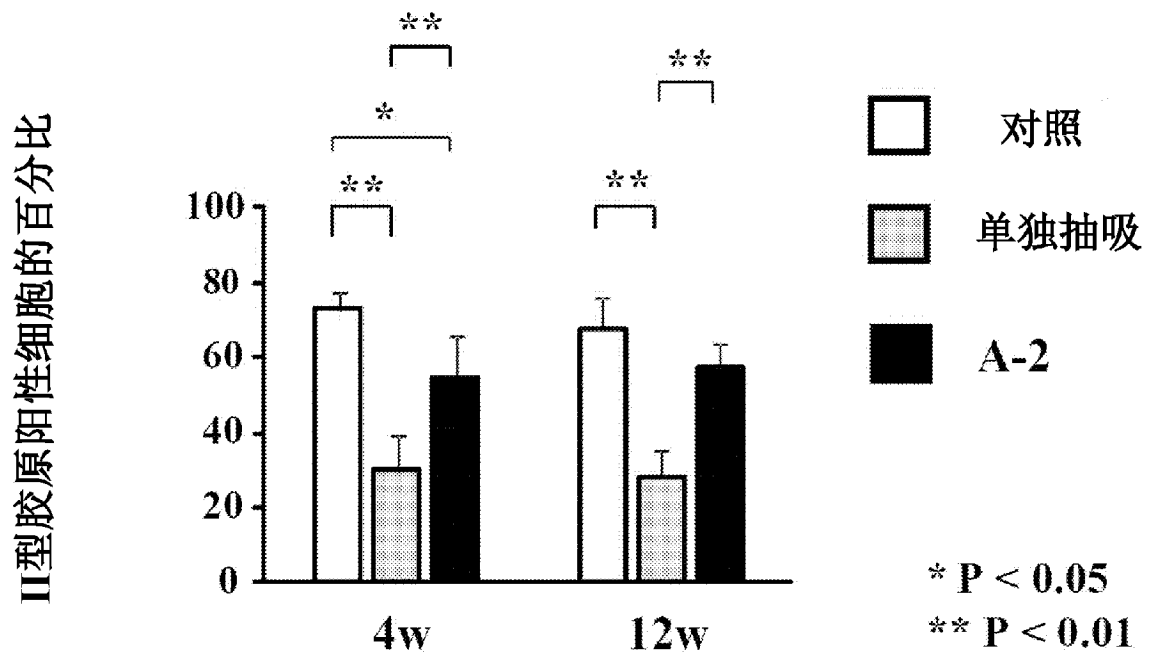


图 7

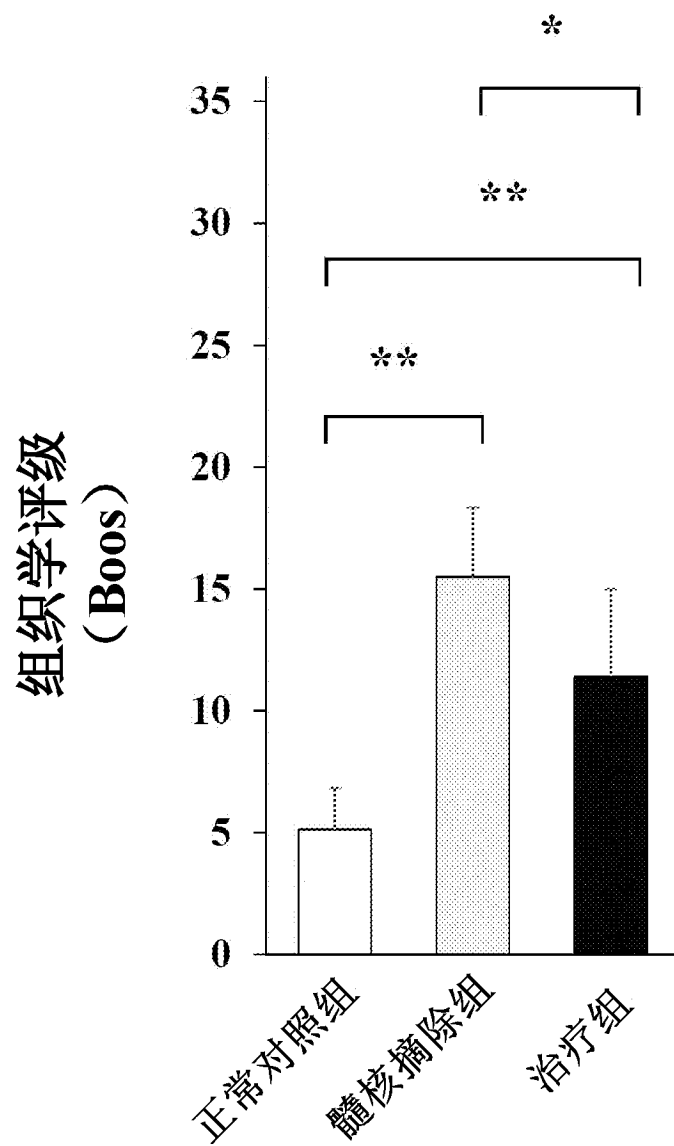


图 8

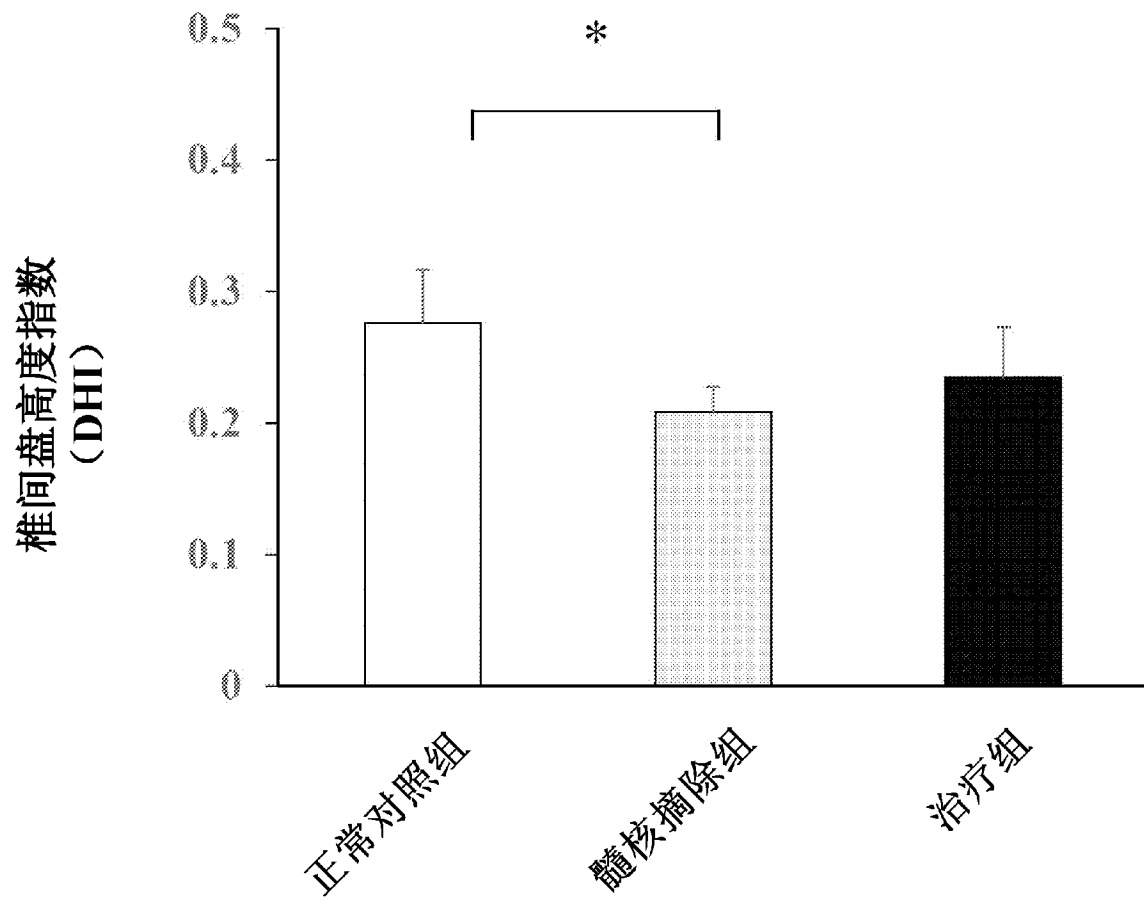


图 9

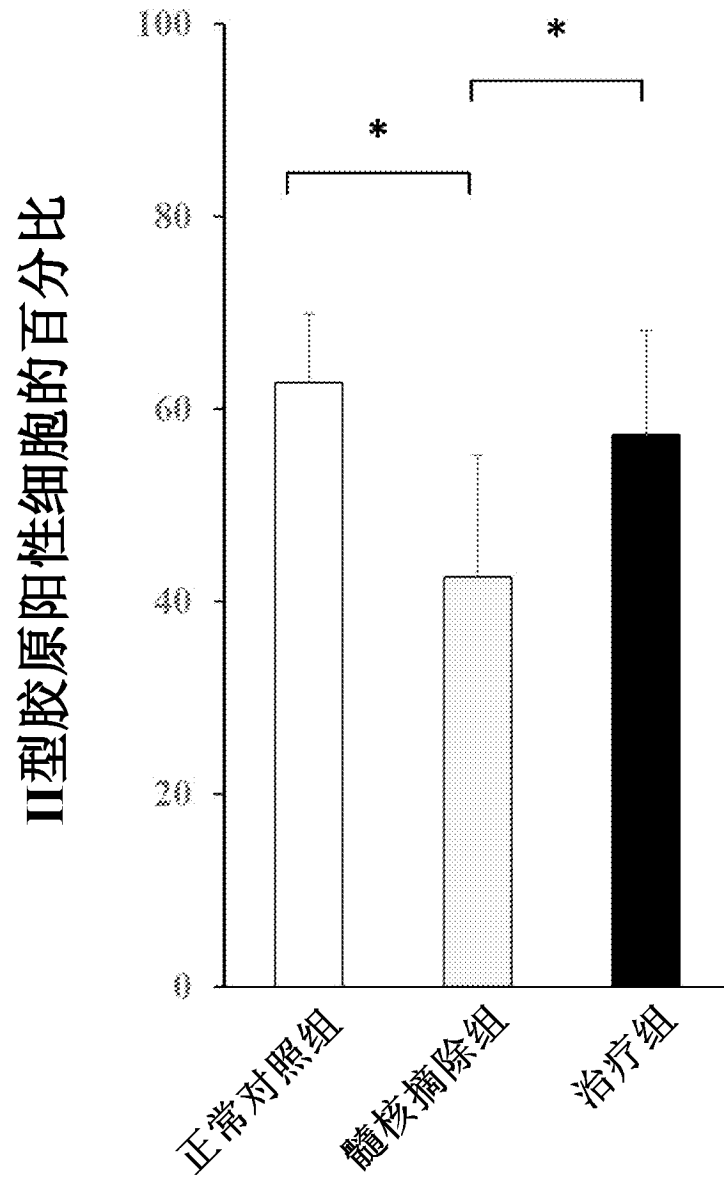


图 10

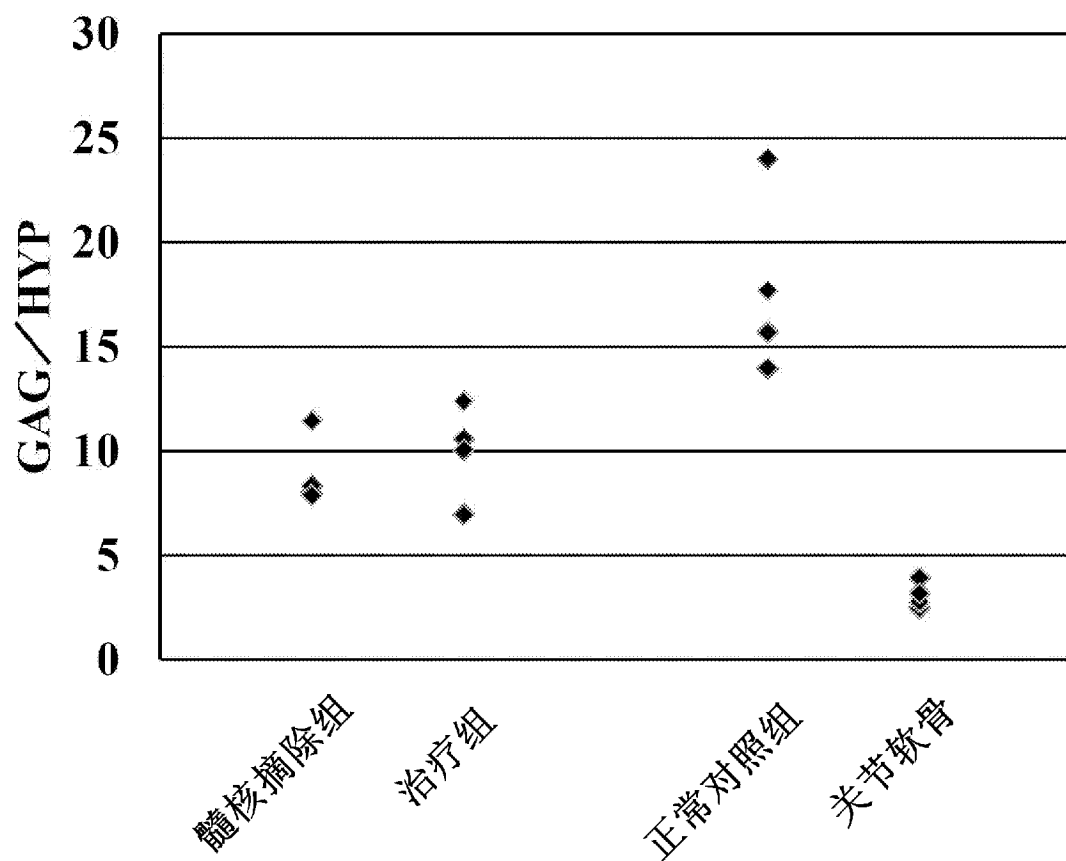


图 11