



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104689460 B

(45)授权公告日 2018.03.13

(21)申请号 201410831740.X

(22)申请日 2005.12.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104689460 A

(43)申请公布日 2015.06.10

(30)优先权数据
60/640,749 2004.12.30 US

(62)分案原申请数据
200580045353.2 2005.12.20

(73)专利权人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 F·巴约尔

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.
A61M 31/00(2006.01)

(56)对比文件

Roy D. Altman.Efficacy and safety of single intra-articular injection of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA) in patients with osteoarthritis of the knee.《Osteoarthritis and Cartilage》.2004,第12卷(第8期),正文第642-649页.

审查员 赵泽

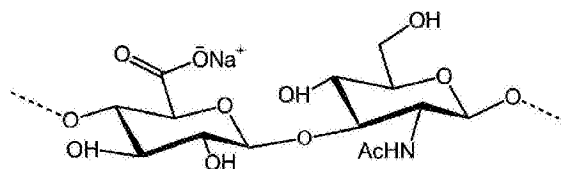
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

用于关节内粘弹性补充的方案

(57)摘要

本发明涉及用于关节内粘弹性补充的方案。具体地,本发明提供一种粘弹性补充装置,包括包含6、6.25、6.5、6.75、7、7.25、7.5、7.75、8、8.25、8.5、8.75、9、9.25、9.5、9.75或10ml的粘弹性补充剂的注射器,其中所述粘弹性补充剂是 hylan G-F 20。本发明利用较少次注射提供了高于多次注射明显的优点,包括避免了副作用、降低了成本和较好的患者顺应性。



1. 一种用于单次关节内注射的粘弹性补充装置,包括包含6ml的粘弹性补充剂的注射器,其中所述粘弹性补充剂是Hylan G-F 20。
2. 根据权利要求1所述的粘弹性补充装置,其为无菌的。
3. 根据权利要求1所述的粘弹性补充装置,其中所述粘弹性补充剂进一步包括选自下述的组分:非甾体抗炎药、麻醉剂、麻醉性镇痛剂、皮质类固醇、抗肿瘤剂、抗病毒剂和细胞。

用于关节内粘弹性补充的方案

[0001] 本申请是申请号为200580045353.2,申请日为2005年12月20日,发明名称为“用于关节内粘弹性补充的方案”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及风湿病学和整形外科。更具体而言,本发明涉及通过粘弹性补充(viscosupplementation)治疗软骨组织病症(例如骨关节炎)。

背景技术

[0003] 骨关节炎(OA)为渐进性退化性疾病,特征为关节内软骨破坏、关节连接中存在的滑液变质和伴有骨赘形成的软骨下骨质硬化。患有OA的患者通常表现出严重的疼痛,其影响了它们日常生活的许多方面。OA的流行随着年龄而增加,超过60%的60岁或更年长的那些人可能患有某些软骨异常(Bjelle (1982) Scand. J. Rheumatol. Suppl., 43:35-48)。OA已经成为关节炎中花费最高的形式,总计占西方国家国民生产总值达1-2.5% (Reginster (2002) Rheumatology, 41 (Suppl.1):3-6)。

[0004] 滑液润滑和保护关节内的关节面。该液体主要由高分子量的多糖透明质酸(HA,透明质酸的钠盐,也称为透明质酸钠)。在正常人滑膜关节液体中HA的浓度为约3mg/ml。HA由N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸钠的重复二糖单元组成(图1)。在正常的关节滑液中的HA包含12,500个二糖单元,总分子量(MW)为5MDa (Balazs等(1993) J. Rheumatol. Suppl., 39:3-9)。在OA患者中,滑液中HA的浓度和MW降低,导致保护软骨的液体的能力的减少。

[0005] 已经表明,关节内注射包含高分子量HA的弹粘性溶液可恢复患病关节的正常内环境稳定。这一过程,称为粘弹性补充,已证实可有效地减少疼痛和增加关节功能(参见,例如Balazs等(1993) J. Rheumatol. Suppl., 39:3-9;Wobig (1998) Clin. Ther., 20 (3):410-423)。

[0006] 许多基于HA粘弹性补充剂为市售的,且新产品正在研究中。粘弹性补充剂在许多特性方面不同,若有的话,包括,例如,HA的来源(动物-衍生的或细菌),HA的浓度和MW,使用的类型和化学交联度。通常,大部分粘弹性补充剂包含5-15mg/ml HA,一旦注射具有的存留半衰期为几小时至几天。将这样的粘弹性补充剂以2-3ml单位容积注射到膝中,每隔一周分别注射三至五次。在某些情况下,疼痛缓解可发生在几天内,连续持续几周,通常持续几个月,甚至达到一年。例如,已经证实,在每周给药,三次(每次2ml) Synvisc® (hylan G-F 20; Genzyme Corp., Cambridge, MA) 的膝粘弹性补充比在6个月内用非甾体抗炎药(NSAIDs)的连续口服加关节穿刺术的治疗(Adams等(1995) Osteoarthritis and Cartilage, 3:213-225)至少要好,或较好,且比生理盐水安慰剂或关节穿刺术对照更有效(Moreland (1993) Am. Coll. Rheumatol. (57th Ann. Sci. Meeting, Nov. 7-11, San Antonio, TX), 165;Wobig (1998) Clin. Ther., 20 (3):410-423)。

[0007] 连续多次注射被认为对于延长治疗骨关节炎疼痛的(六个月或一年)效果是必需的,主要是因为大部分粘弹性补充剂的存留半衰期短(Peyron (1993) J. Rheumatol., 20 (Suppl.39):10-15)。例如,如在兔子中测定时,1%具有平均MW为1.7-2.6MDa的HA的关节内

存留半衰期为11小时。当HA的MW增加时,存留半衰期也延长(例如,其中HA的平均MW为6MDa的1%hylan A具有的半衰期为 1.2 ± 1 天)。然而,即使是不溶性凝胶,例如包含0.4%HA的hylan B,具有 7.7 ± 1 天的相对短的存留半衰期。按照半衰期数据,对于减少OA疼痛而言,与二次2ml注射相比,将三次2ml的Synvisc®注射入OA膝中证实可显著地更有效(Scale等(1994) Curr. Ther. Res., 55 (3) :220-232)。

[0008] 对于用Synvisc®治疗患有髌部OA的患者,推荐剂量为一次2ml注射,如果没有感受到足够的疼痛缓解,可在一至三月内进行第二次任选的注射给药(Chevalier (2000) Am. Coll. Rheumatol. (64th Annual Scientific Meeting, Oct.30-Nov.3, Philadelphia, PA))。在髌部OA患者中,截止三个月(研究的持续时间)内,在大多数登记得患者中,以2ml单次关节内注射Synvisc®显示出即刻的和持续的症状疗效。还没有研究与多次注射2-3ml或单次注射2ml相比,用更少次注射较大体积的粘弹性补充剂例如Synvisc®(例如4、6ml或更多)是否可提供相等的或较好的功效。就目前已知的而言,使用较大体积可造成局部副作用例如疼痛、肿胀和渗出的危险。

[0009] Durolane™ (Q-Med AB, Uppsala, Sweden) 为被推荐以3ml注射一次的唯一粘弹性补充剂。其为环氧交联的粘弹性补充剂,具有较长报告的半衰期(4周)和较高的HA (20mg/ml)。延长的保留时间被认为使注射次数减少。然而,单次注射Durolane™没有证实高于安慰剂的统计学益处(Altman等(2004) Osteoarthritis and Cart., 12:642-649)。

[0010] 这样,在本发明之前,还不知道单次注射基于HA的粘弹性补充剂,尤其是一种具有短保留期的,是否可产生想要的长期治疗效果。

[0011] 利用较少次注射提供了高于多次注射明显的优点,包括避免了副作用、降低了成本和较好的患者顺应性。仍旧存在研究新的粘弹性补充剂的需要,其能提供对OA患者的有效缓解,而不需要多次注射。

发明内容

[0012] 本发明提供用于治疗关节病症和用于减少与此病症有关的疼痛和不适的方法 and 组合物。这种病症的实例包括骨关节炎和关节损伤。

[0013] 本发明是,至少部分是,基于发现了单次关节内注射较大体积的粘弹性补充剂可提供相当于小体积连续注射产生的长期治疗益处。在进行与本发明有关的研究中,一组膝OA患者接受如下标准顺序的治疗:在三周期间内,在膝部,注射Synvisc®三次,每次2ml;而另一组接受在同等条件下的6ml的单次注射。出人意外地是,如在治疗后26周评价,发现治疗效果在两组中是相当的。因此,单次注射较大体积的粘弹性补充剂例如Synvisc®可以和几次小体积注射同样有效,而保持了良好的安全特性。

[0014] 因此,本发明提供用基于HA的粘弹性补充剂用于关节内粘弹性补充的方案,所述粘弹性补充剂特别是具有关节内存留半衰期($T_{1/2}$)短于3周的粘弹性补充剂。在本发明中使用的粘弹性补充剂可进一步表征为:其中它们包含小于20mg/ml HA(衍生的和/或非衍生的),其中至少5%为凝胶形式,比如例如hylan B。在一个说明性的实施方案中,粘弹性补充

剂为hylan G-F 20 (Synvisc®), 其包含 $8 \pm 2 \text{ mg/ml}$ HA, 其中10%重量为凝胶形式。

[0015] 在某些实施方案中, 粘弹性补充剂以足量单次注射给药, 在注射后, 所述剂量提供了达6个月的治疗效果。在某些实施方案中, 大体积单次注射的治疗效果基本上与在治疗过程内三次注射给药 (每次大体积的1/3) 获得的相同。在一个说明性的实施方案中, 在三周期内, Synvisc®以6ml单次注射给药, 而不是三次2ml注射。

[0016] 也提供给药的方法、组合物和在本发明的方法中使用的装置。

[0017] 上述简述及其后的说明并不是限制要求保护的本发明。

附图说明

[0018] 图1图解了透明质烷 (透明质酸钠) 的结构。

具体实施方式

[0019] 定义

[0020] 术语“关节内半衰期”、“存留半衰期”和它们的同源词指如下时间, 其为适于将给定的粘弹性补充剂注射入关节内区域的任何时间中较大 (的时间): (a) 清除50%注射的HA凝胶组分需要的时间; (b) 清除50%注射的HA液体组分需要的时间; 和 (c) 清除50%HA需要的时间, 无论其是否为液体、凝胶或另一种形式。用于计算存留半衰期的目的, 除非另有说明, 注射被认为是给药进入成年人的膝关节的关节内区域。用于测定存留半衰期的方法是本领域已知的, 说明性的方法为在实施例描述的。

[0021] 术语“HA液体”、“HA液体相”、“HA液体组分”、“可溶性HA”和它们的同源词指具有小于20MDa的平均MW的非交联的或微交联的 (lightly crosslinked) 水溶性HA。

[0022] 术语“HA凝胶”、“HA凝胶相”、“HA凝胶组分”和它们的同源词指HA凝胶, 其为不包含可溶性HA或包含小于10% (w/w) 可溶性HA的基于HA的组合物水不溶性部分。典型地, 给定基于HA的组合物中凝胶的含量可以通过从HA液体中分离HA凝胶来测定, 所述组合物包含HA凝胶和HA液体的混合。分离可通过例如45 μ 过滤器过滤组合物来实现, 所述过滤器使可溶性HA穿过, 而保留不溶相。为了使更粘性组合物中的可溶性HA从HA凝胶中的释放达到最大, 需要在过滤前用几体积有或没有使其达到平衡的溶剂稀释组合物。而且, 通常, 基于它们的流变学性质, 纯凝胶可与纯液体区分, 所述流变学性质例如储能 (弹性的) 模量 (storage (elastic) modulus (G')) 和损耗 (粘性的) 模量 (loss (viscous) modulus (G'')), 其分别表示随着变形速率 (测试频率) 的改变, 物质可以回收 (弹性应答 (elastic response)) 或流动 (粘性应答 (viscous response)) 的相对程度。这两个模量都为频率的线性函数。它们已被证明是聚合物溶液和凝胶结构的灵敏的探针。 G' 和 G'' 随着频率的增加而增加, 但是一个比另一个增加的更快。在其中 $G' = G''$ 时, 该频率被称为交叉频率 (f_c)。交叉频率随着聚合物分子量或浓度的增加而降低。对于在低频率的聚合物溶液, 弹性应力松弛和粘应力占主导, 因此, 在频率低于 f_c 时, G'' 大于 G' 。相反, 对于凝胶, 不会存在 G' 和 G'' 交叉, 在频带中 G' 大于 G'' 。除非另有说明, 测试频率为0.04–7Hz。对于粘弹性材料的物理性能和测定这些性质的方法的综述, 参见, 例如“Polymers as Rheology Modifiers”, 由Schulz和Glass编辑, ACS Symposium Series 462, 1991; “An Introduction to Rheology”, H.A. Barnes, J.F. Hutton

和K.Walters,Elsevier,1989;和Bohlin Rheometer Application Notes MRK544-01, MRK556-01和MRK573-01。

[0023] 术语“HA”、“透明质酸盐”、“透明质烷”可交换使用,除非另有说明,指任意HA,而不考虑来源(细菌发酵的或动物衍生的)、分子量、其物理形式(例如凝胶或液体),或存在或不存在化学改性(例如交联的或其它衍生化的)或制备方法。

[0024] 方案

[0025] 本发明提供粘弹性补充方法和相关的方法。根据本发明,粘弹性补充方法包括在3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26周内单次关节内注射给药粘弹性补充剂,给药量足以在注射后提供达4、5或6个月的治疗效果。在某些实施方案中,大体积单次注射的治疗效果基本上与在治疗过程内三次注射给药(每次为大体积的1/3)获得的相同。在某些实施方案中,单次注射方案提供在注射后关节痛减少直至4、5或6个月。

[0026] 治疗效果可以通过任意适宜的方法(参见,例如,Altman等(1996) Osteoarth.Cart.,4:217-243)评价。例如,治疗效果可通过测定关节痛的减少来评价。关节痛的程度可以根据五点Likert分类(例如没有、轻度、中度、严重、非常严重),或者按如在实施例中描述的100mm直观类比尺(scale) (VAS) 分类。其它适宜的疼痛指数包括健康状态评估调查表(HAQ) (Fries等(1980) Arthritis Rheumatol.,23:137-145) 和关节炎影响检测尺(Arthritis Impact Measurement Scale) (AIMS) (Meenan等(1980) Arthritis Rheumatol.,23:146-154)。

[0027] 治疗效果也可通过测定功能缺损程度的改善来评价。功能缺损可使用分离有效的多维指数(segregated validated multidimensional index) (SMI),例如用于髌部和膝OA的Western Ontario和McMaster's大学(WOMAC™) OA指数(Bellamy等人(1988) J.Rheumatol.34:1833-1840;也参见实施例);或聚集的多维指数(aggregated multidimensional index) (AMI),例如用于髌部或膝的痛-函数指数(Algo-Functional Index) (AFI) (Lequesne等人(1987) Scand.J.Rheumatol.Suppl.,65:85-89)。

[0028] 治疗效果也可由患者或医师通过总体状况评估来评价。总体状况可利用Likert或VAS尺来评价,例如在实施例中描述的。

[0029] 治疗效果的其它标记可包括关节检查(参见,如Theiler等人(1994) Osteoarth.Cart.,2:1-24),基于性能测定(performance based measures) (参见,例如Rejeski等人(1995) Osteoarth.Cart.,3:157-168)等。

[0030] 在某些实施方案中,给药进入膝关节的粘弹性补充剂的量为 6 ± 2 ml或更高,例如4、4.25、4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75、6、6.25、6.5、6.75、7、7.25、7.5、7.75、8ml或更高。

[0031] 粘弹性补充剂

[0032] 在本发明的方法中使用的基于HA的粘弹性补充剂具有下述任一项、任两项或所有的特征:

[0033] (i) 粘弹性补充剂具有小于3周的存留半衰期。

[0034] (ii) 粘弹性补充剂包含小于20mg/ml HA;

[0035] (iii) 在粘弹性补充剂中5% (w/w) 或更高的HA为凝胶形式。

[0036] 在一个说明性的实施方案中,在本发明中使用的粘弹性补充剂为

Synvisc®。Synvisc®包含两种形式的 $8 \pm 2\text{mg/ml}$ HA:可溶性形式, hylan A (平均MW 6,000kDa)和在生理学可接受的溶液中的水合凝胶形式, hylan B。按HA的重量计,在Synvisc®中的hylan A/hylan B比例为9:1。Hylan A为通过用少量醛共价交联来化学改性的水溶性透明质烷,所述醛典型地为甲醛,而hylan B为用二乙烯砷进一步交联的hylan A。Hylan液体为水合的hylan A,用少量交联进行的改性形式的透明质烷,所述交联增加了其平均分子量和增加了其粘弹性性质。Hylan凝胶为hylan B的水合形式,其为使用二乙烯砷作为双功能的交联剂通过将hylan A交联成连续聚合的网状结构制备的。

[0037] 通常,在本发明提供的方案中使用的粘弹性补充剂包括具有关节内存留半衰期短于22天例如21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4和3天的基于HA的粘弹性补充剂。在某些实施方案中,粘弹性补充剂的存留半衰期大于2、3、4、5、6或7天。

[0038] 在本发明中使用的粘弹性补充剂可进一步表征为:其中它们包含小于 20mg/ml HA,例如在1-15、1-10、1-5、5-15、5-10、10-15、6-10和7-9 mg/ml 的范围。在给定组合物中的HA的含量可通过任意适宜的方法测定,如例如在实施例中描述的方法。

[0039] 在本发明中使用的粘弹性补充剂组合物可进一步表征为:其中在粘弹性补充剂中至少10%重量的HA为凝胶形式。例如,在某些实施方案中,粘弹性补充剂包含至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更高的HA凝胶。在某些实施方案中,粘弹性补充剂包含10-90%、10-75%、10-50%、10-40%、10-25%HA凝胶。在某些实施方案中,在粘弹性补充剂中HA凝胶/HA液体的比例包含1:50-10:1 (w/w),例如1:50、1:25、1:15、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1和10:1。

[0040] 在本发明的方法中使用的粘弹性补充剂可进一步在液体相中包含水溶性的HA,其具有HA的MW为500-20,000kDa,例如500-1,000;500-1,500;500-3,000;500-5,000;500-7,000;500-10,000;500-15,000;1,000-1,500;1,000-3,000;1,000-5,000;1,000-7,000;1,000-10,000;1,000-15,000;5,000-10,000;和10,000-15,000kDa。

[0041] HA可以是动物源的,例如来源于公鸡冠或脐带或非动物源,例如细菌发酵的。细菌发酵的HA可以如在例如Cooney等人(1999) Biotechnol. Prog., 15:898-910中描述的。细菌发酵的HA也可以为市售的(例如Shiseido, Japan; Sigma-Aldrich, USA)。

[0042] HA可以是衍生的(例如交联的或另外改性的或稳定的)或非衍生的。交联剂的实例包括醛、环氧化物、polyaziril、缩水甘油醚(例如1,4-丁二醇二缩水甘油醚)和二乙烯砷。

[0043] 在本发明的方法中使用的粘弹性补充剂的特定实例包括AdantTM、ArthreaseTM、ArthrumTM、FermathronTM、GoonTM、HyalartTM/HyalganTM、Hy-GAGTM、Hya-jectTM、HyalubrixTM、NeoViscTM、SupartzTM/ArtzTM、Synvisc®、OrthoviscTM、OstenilTM、SinovialTM、SuplasynTM和SynochromTM、ViscornealTM(参见,例如Physicians' Desk ReferenceTM, 2004)。其它适宜在本发明的方法中使用的产物包括在美国专利Nos. 5,143,724; 4,713,448; 5,099,013; 5,399,351; 6,521,223; 5,827,937; 美国专利申请No. 60/533,429中描述的粘弹性补充剂。

[0044] 包括hylan A和hylan B的hylans和粘弹性补充剂的制备为在例如美国专利Nos. 5,143,724; 4,713,448; 5,099,013和5,399,351中描述的。

[0045] 在某些实施方案中,粘弹性补充剂不包括DurolaneTM和/或其它的具有存留半衰期

比21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50天长的粘弹性补充剂。

[0046] 粘弹性补充剂也可包含另外的活性或无活性化合物,包括例如非甾体抗炎药(NSAIDs),例如IbuprofenTM、DiclofenacTM和PiroxicamTM;麻醉剂例如,LidocaineTM和BupivacaineTM;麻醉性镇痛剂,例如,可待因和吗啡;皮质类固醇,例如,地塞米松和泼尼松;抗肿瘤剂例如MethotrexateTM,5-氟尿嘧啶和PaclitaxelTM和抗病毒剂,例如,AcyclovirTM和VidarabineTM。粘弹性补充剂也可包含组分例如细胞(例如软骨细胞或间充质干细胞)、蛋白质、DNA、维生素或其它想要的生物学活性物质。

[0047] 用途和给药

[0048] 本发明提供用于治疗患有关节病症的患者和用于减少与这种病症有关的疼痛和不适的方法和组合物。这种病症的实例包括骨关节炎(原发性(自发性)或继发性)、类风湿性关节炎、关节损伤(例如重复性的运动损伤)、软骨组织病症(软骨软化)和关节炎前状况。本发明进一步提供减少与这种病症有关的疼痛的方法。该方法可在需要用于关节病症治疗的人类中或在非人类患者中实施。

[0049] 给药部位的实例包括膝的、肩膀的、颞下颌的和腕掌的关节、肘、髌部、腕、踝和在脊柱中腰椎关节突(小平面)的关节。注射到任一个这些关节中的体积将至少为用于那些关节的目前推荐剂量的双倍。

[0050] 本发明进一步提供粘弹性补充装置,包括前灌注的、单次使用的注射器,其包含6±2ml的单次单元剂量的Synvisc®,例如4、4.25、4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75、6、6.25、6.5、6.75、7、7.25、7.5、7.75、8、8.25、8.5、8.75、9、9.25、9.5、9.75、10ml或更多。尽管其优选地提供使用本文中提供的单次注射器的单次给药剂量,但是需要的剂量可以由两个或多个注射器提供。例如,单次给药6ml可以使用每个包含2ml的3个注射器完成。

[0051] 下述实施例提供说明性的实施方案。所述实施例不以任何方式限制本发明。本领域普通技术人员将认识到在本发明的范围内可进行多种修饰和改变。因此,这样的修饰和改变包括在本发明内。

[0052] 实施例

[0053] 实施例1:在患有OA的患者中Synvisc®的关节内注射

[0054] 进行预期的、开放标记的研究用于评价在患有有症状的胫腿节OA(在研究的膝中的总体OA疼痛,在100mm VAS尺上为50-80)的非卧床病人中进行关节内注射4ml或6ml Synvisc®的安全和功效(包括作用的持续时间),所述关节内注射4ml或6ml Synvisc®与目前三次关节内注射2ml Synvisc®的配药方案相反。包含的其它条件为:年龄在40岁以上;最近的3个月内通过X射线测定的Kellgren-Lawrence等级为II-III;没有压力渗出液(tense effusion)、机能损耗(mechanical deficit)或最近(<2年)的创伤。将100名患者(从59到66岁,平均年龄61年,55%女性)随机分为五组:

[0055] 第1组:一次注射6ml;

[0056] 第2组:一次注射4ml;

[0057] 第3组:隔两周注射4ml两次;

[0058] 第4组:隔一周注射4ml三次;和

[0059] 第5组:标准方案:隔一周注射2ml三次

[0060] 然后,随访患者6个月(在第2、3、8、16和24周)。使用的第一和第二评价点为如下所述的:

[0061] A.OA疼痛的患者自我评价

[0062] 该研究的基本功效点用于评价在患有膝OA的患者中用Synvisc®粘弹性补充对研究膝OA疼痛缓解的功效。这点可在过去的48小时内患者自我评价的100mm VAS上测定,没有疼痛的点(0mm)至极度疼痛(100mm);在第一次注射后的24周进行。

[0063] B.患者总体自我评价

[0064] 患者在100-mm VAS上估计它们的靶标膝的整体状况,100-mmVAS其从很好(0mm)至很差(100mm),考虑48小时内所有相关的体征和症状。呈给患者的准确说明为下述的:“请利用下面的垂直线指出你的(研究)膝在这次探访时的整体一般状况左侧或‘0’分表示‘非常好’,而‘100’分表示‘非常差’”。

[0065] C.WOMAC™

[0066] 患者完成了WOMAC™的VAS模型(version),如在Bellamy等的(1988)J.Rheumatol., 15(12):1833-40中描述的。该尺为三维的、疾病特异性、自己管理的、健康状态测定方法。其探查疼痛区域内、四肢强直和躯体功能总共24个问题的临床重要的患者相关的症状。将WOMAC™以当地语言提供给患者,通常在小于5分钟内完成。WOMAC™的分部为下述的。

[0067] WOMAC™部分A包括有关活动期间疼痛水平的询问,用没有疼痛(0mm)至极疼痛(100mm)的VAS对回答评分(由患者)。疼痛的评价采用下述方案:

[0068] 1.在平面上行走?[走]

[0069] 2.上楼或下楼?[爬楼梯]

[0070] 3.在晚上在躺床上时?[夜间的]

[0071] 4.坐着或躺着?[静止]

[0072] 5.站直?[负重]

[0073] WOMAC部分A的平均得分是基于每人对部分A问题的回答。

[0074] WOMAC™部分B(四肢强直评分)包括有关活动期间强直严重性的询问,用没有四肢强直(0mm)至极端四肢强直(100mm)的VAS对回答评分(由患者)。四肢强直的评价采用下述方案:

[0075] 1.在早晨苏醒后?[早晨四肢强直]

[0076] 2.在白天剩余的后来时间(duing rest later in the day)?[在白天晚些存在的四肢强直]

[0077] 部分B的平均得分是基于每人对部分B问题的回答。

[0078] WOMCC™部分C包括有关活动期间功能缺损的询问,用没有困难(0mm)至极困难(100mm)的VAS对回答评分(由患者)。功能缺损的评价采用下述方案:

[0079] 1.下楼梯?[早晨四肢强直]

[0080] 2.上楼梯?[在白天晚些存在的四肢强直]

[0081] 3.从坐着站立?[起立]

[0082] 4.站?[站]

[0083] 5.弯向地板?[弯曲]

[0084] 6.在平面上行走?[平走]

[0085] 7.上下车?[汽车]

[0086] 8.上街?[购物]

[0087] 9.穿短袜/长袜[脱短袜/长袜]

[0088] 10.卧床[卧床]

[0089] 11.进入/出浴池[进/出浴池]

[0090] 12.坐[坐]

[0091] 13.上/下洗手间[上/下洗手间]

[0092] 14.重的家庭工作[重的家务]

[0093] 15.轻的家庭工作[轻的家务]

[0094] 部分C的平均得分是基于每人对部分C问题的回答。

[0095] 从总WOMAC™得分基线上的改变来自分析在第一次注射后作为第二端点的所有时间点的3个WOMAC™部分(A、B和C)。

[0096] D.医师OA总体评价

[0097] 在患者完成总体评价和WOMAC™后,研究者用从很好(0mm)至很差(100mm)的100-mm VAS评价探访时患者膝的整体状况。这一评价是基于患者的病征、功能能力和身体检查。医师被要求指出在这次探访时患者膝的整体一般状况,利用具有如下特征呈现的线(line): 线的左侧(“0”)端指“很好”,右端(“100”)指“非常差”。

[0098] E.结果

[0099] 在第一次注射后24周,与基线相比表现出疼痛减少的结果(在过去48小时内的VAS;0相当于没有疼痛,100相当于极疼)显示在表1中。与在3x2ml组中的36.7mm相比,在1x6ml组中疼痛按34.9mm减少,其得分是最好的。在用1x4或2x4ml治疗组中,这一减少相当少(仅24mm减少)。

[0100] 表1.OA疼痛的患者自我评价(自基线的变化)

[0101]

组	1 1x6ml	2 1x4ml	3 2x4ml	4 3x 4ml	5 3x 2ml
平均值	-34.9	-24.3	-24.0	-32.6	-36.7
标准偏差	16.4	28.3	22.9	25.3	26.9
95%CI	-42.5, -27.2	-37.2, -11.5	-35.0, -13.0	-44.4, -20.8	-42.9, -24.1

[0102] 包括疼痛、四肢强直和功能缺损改善的第二功效点,如通过Western Ontario和McMaster Universities Osteoarthritis指数(WOMAC™)(表2为WOMAC™ A)、患者(表3)和医师(表4)总体膝OA评价测定的,显示出相同的趋势。按照功效和结果排序的处理组显示在表5中。在第1组中观察的效果的延长持续时间是令人惊奇的。依据安全性,在每个组(1x6ml和3x2ml)中10%的患者报

[0103] 告了最少强度或中等强度的相关局部膝副作用(adverse events)(疼痛、

[0104] 肿胀或渗出)。

[0105] 表2.WOMAC™ A疼痛得分(自基线的变化)

[0106]

组	1 1x6ml	2 1x4ml	3 2x4ml	4 3x 4ml	5 3x 2ml
平均值	-25.8	-14.7	-16.6	-27.7	-25.6
标准偏差	22.5	24.2	24.8	27.2	24.6
95%CI	-36.3, -15.3	-25.7, -3.7	-28.5, -4.6	-40.5, -14.9	-37.1, -14.1

[0107] 表3.患者总体评价(自基线的变化)

[0108]

组	1 1x6ml	2 1x4ml	3 2x4ml	4 3x 4ml	5 3x 2ml
平均值	-31.3	-14.3	-19.8	-35.9	-24.4
标准偏差	26	31	24	32.9	32.3
95%CI	-43.3,-19.1	-28.4,-0.2	-31.2,-8.2	-41.3,-10.5	-39.5,-9.3

[0109] 表4.医师总体评价(自基线的变化)

[0110]

组	1 1x6ml	2 1x4ml	3 2x4ml	4 3x 4ml	5 3x 2ml
平均值	-30.7	-16.8	-22.9	-25.9	-27.7
标准偏差	18.3	24.8	26.9	25.0	29.6
95%CI	-39.5,-21.9	-28.1,-5.5	-35.8,-10.0	-37.5,-14.2	-41.6,-13.8

[0111] 表5:处理组排列

[0112]

组	1 1x6ml	2 1x4ml	3 2x4ml	4 3x 4ml	5 3x 2ml
Pt.疼痛	2	4	5	3	1
Pt.总体	1	5	4	2	3
Phy.总体	1	5	4	3	2
WOMAC™ A	2	5	4	1	3
WOMAC™ B	4	5	3	2	1
WOMAC™ C	2	4	5	1	3

[0113] 关于安全性,在处理组之间没有观察到大的差异,一般而言,仅仅第1组(1x6ml)具有最小副作用。这些结果也建议比2ml大的Synvisc®体积可安全地给药,以减少患有膝骨关节炎的患者的疼痛。

[0114] 实施例2:Synvisc®存留半衰期的测定

[0115] A.将¹⁴C-乙酸酯加入到公鸡冠的器官培养物的透明质烷中

[0116] 用颈脱位法处死幼公鸡(3-6个月龄)。用(80%)乙醇彻底地清洗鸡冠,然后,利用解剖刀在基部切除。将过量的血从鸡冠中挤出,将其放置于无菌盐溶液中,转移到层流净化罩中,用另外体积的无菌盐溶液清洗三次。然后,沿着血管中线解剖鸡冠,切除长方形的粉红色皮组织部分。用解剖刀将鸡冠组织部分切成切片,放置在Ventrex培养基HL-1(Ventrex Labs)中:5mg/ml丙酸睾酮(Belmar Laboratories, Inwood, NY)、20 μ Ci/ml的 ^{14} C-醋酸(ICN Radiochemicals, Irvine, CA 1mCi/ml)、0.1mg/ml青霉素、0.1mg/ml链霉素和0.1mg/ml两性霉素B(Hazleton, Lenexa, KS)。将单独培养物置入60mm塑料培养皿中,其包含约1.5g的鸡冠组织和15ml的培养基。在5%CO₂环境中培养培养物72小时,之后,通过在10,000g离心10分钟将组织从培养基中分离。将组织片冷冻在30mm培养皿中。典型地,在继续制备hylan的过程前,将冷冻的鸡冠组织保存在冰箱中1-72小时。

[0117] B. 放射标记的hylan液体的制备

[0118] Hylan A纤维为如下制备的。将冷冻的放射标记的鸡冠组织的切片以0.75g组织每1g反应培养基的比例放置在反应培养基中,所述反应培养基包含丙酮、福尔马林(37%甲醛溶液)、氯仿和醋酸钠。允许反应进行18-20小时,之后采集组织切片,在丙酮中洗涤三次,然后在层流净化罩中干燥。然后,将四体积的蒸馏水加入到干的组织切片中,以便提取放射标记的hylan。该水溶液提取在4-6℃下进行,之后,除去水提取物,加入同样体积的水,进行第二次提取。将固体醋酸钠溶解在含水提取物中至浓度为1%,通过缓慢加入四体积的95%乙醇沉淀hylan纤维。在丙酮中洗涤放射标记的hylan纤维两次,将其储存在冷的丙酮下。

[0119] 集中放射标记的hylan A纤维(40.3mg),通过在4℃缓慢的翻滚式混合(end-over-end mixing)3天,将其溶解在3.0ml无菌、无热原的磷酸盐缓冲盐水溶液(Biotrics Inc., Ridgefield, NJ, lot 122-1)中。在完成溶解后,用未标记的hylan液体稀释放射性hylan液体五倍。将混合物在4℃以翻滚式混合保存另外5天。

[0120] C. 放射标记的凝胶的制备

[0121] 将氟化水(New England Nuclear, 100mCi/ml)混入用于将hylan液体(hylan A)交联成hylan凝胶(hylan B)的反应混合物中。按如下进行交联反应。将Hylan A纤维在氟化水中膨胀约三小时。加入浓缩氢氧化钠,强力搅拌混合物直到溶液为均相的(约15分钟)。在水中,将二乙烯砷稀释至50%的浓度,在强力搅拌下,将其加入反应混合物中。将反应混合物保存在室温下(22℃)另外55分钟,期间,通过二乙烯砷将多糖链交联成连续聚合的凝胶(hylan凝胶)。通过在氟化水中进行该反应,氟共价附着在二乙烯基磺酰基交联内的碳上。通过加入十体积的无菌无热原的盐溶液以降低pH低于12来终止该反应。生理盐水洗涤也引起hylan凝胶肿胀至其饱和水合(equilibrium hydration)。用生理盐水洗涤hylan凝胶以除去未反应的二乙烯砷、未反应的氟及其它反应产物,并使pH降至7。通过过滤从凝胶中分离过量的生理盐水,之后,使凝胶穿过25g针5次,使固体凝胶分裂成易于可注射的形式。在这种形式中,用无菌无热原的生理盐水彻底地渗析氟化的凝胶以除去任意非共价结合的氟。

[0122] D. hylan凝胶-hylan液体混合物的制备

[0123] 将氟化的hylan凝胶(3.04g)直接加入到11.63g的 ^{14} C-hylan液体中,将混合物置于Glen粉碎混合机中48小时。然后,使混合物连续穿过18g、21g和25g针10次,以确保均匀性和易于注射。

[0124] E.HA浓度和放射性标记量的测定

[0125] 混合物的凝胶和液体组分中hylan多糖的浓度为通过用于试验其重复葡萄糖醛酸单体(3)的自动化卡唑法来测定,并乘以(2.07)以计算多糖链的其余部分的浓度。在葡萄糖醛酸测定之前,通过在紧密密封的顶部有罗纹的管中(tightly capped screw top tubes)将称重的0.1g凝胶样品加入到0.2ml 1N H₂SO₄中水解hylan凝胶,在100℃进行酸性水解2小时。在通过用卡唑法分析HA之前,用0.2ml的1N NaOH中和在该过程中完全地溶解的样品。

[0126] 卡唑法包括测定样品中己糖醛酸(葡萄糖醛酸)的含量。Dische等人(1947),在J.Biol.Chem.,167:189-198中报道了通过比色法测定己糖醛酸浓度的方法。该方法是基于用硫酸和卡唑对己糖醛酸进行显色反应。Balazs等人(1965)Anal.Biochem.,12:547-558中报道了用于测定己糖醛酸的最新的自动化方法。在硫酸/硼酸酯介质中加热样品,并与卡唑反应。卡唑与己糖醛酸反应形成具有在530nm有最大吸光率的粉红色复合物。对于自动化方法,通过使用蠕动泵抽吸样品和标准品穿过连续流量分析器。将试剂(酸和卡唑)加入反应室并加热,通过连续流量比色计在530nm读取吸光率。

[0127] 试验产品的放射性含量可在ISOCAP 300液体闪烁计数器(Nuclear Chicago)中使用Scintiverse Bio HP(Fisher Scientific)作为闪烁剂通过闪烁计数来测定。使用ISOCAP 300的外标比例程序将原始CPM数据转化成DPM,所述程序相对于氚液体闪烁淬灭标准(Tritium Liquid Scintillation Quench Standards)或碳-14液体闪烁淬灭标准(Carbon-14 Liquid Scintillation Quench Standards)(Amergham,Arlington Heights,II)进行标准化。

[0128] F.Synvisc®存留半衰期的测定

[0129] 在称重为2.5至3.5kg的新西兰白兔中测定来自膝关节的Synvisc®和其凝胶和液体组分的清除。将兔子分别在24小时、3、7和28天处死。给药基本上如上所述制备的放射性物质,如关节内注射0.3ml(0.086ml/kg体重)。该剂量水平预期相当于单次6ml给药Synvisc®至70kg的人。同样地,在其它动物中给药的相应量与动物的重量成正比。

[0130] DPMs为如上述的每个组织中获得的,当适宜时,直接计算DPM/mg。分别对每种动物计算每个关节组织回收的总DPMs以及和DPMs和DPM/mg。然后,在每个时间点,平均这些值,表示为平均值±平均标准误差。计算的平均数以至少二位有效数字来报道,即使在其中值很小并且动物与动物差别很大的情况下。通过均分独立的动物总数计算在每个时间点关节恢复的总的平均DPM。

[0131] 通过将每次的平均数拟合成指数函数($Y=Ae^{kx}$)进行半衰期的确定。估计的标准误差是从曲线拟合获得的,除以A以获得预期的误差百分数。其可乘以半衰期获得半衰期的预计误差。

[0132] G.结果

[0133] Synvisc®的凝胶组分(hylan B)为具有较长半衰期的部分。根据放射性物质的清除率,测定凝胶组分的存留半衰期为7.7-8.8天。这样,在30天,超过95%的凝胶将被清除。根据实验测定的凝胶的半衰期,进行理论计算以估计预期在单次6ml注射后人类关节中的凝胶含量。假设将约6mg的凝胶注入人类患者的膝中,在注射后第21天,剩余凝胶的含量将为约0.9mg。

[0134] Synvisc®的液体组分(hylan A)比凝胶组分清除的更快。液体组分的半衰期确定为1.2-1.5天。在第7天,99%注射的物质从兔子的膝关节中清除。

[0135] 也进行兔子肌肉植入物研究。在植入后第7和30天的显微镜检查没有检测出任意剩余试验材料,其与关节内清除率的研究一致。

[0136] 根据在说明书内引用的参考的教导,说明书可被最彻底地理解。在说明书内的实施方案提供了本发明实施方案的说明,其将不会被解释为限制本发明的范围。本领域技术人员易于认识到许多其它的实施方案包括在本发明内。在该公开的内容中引用的所有出版物和专利以其全部引入作为参考。至此,通过参考被人本申请的材料与本说明书矛盾或不一致时,以本说明书内容为准。在本文中任意参考的引证都是允许的,这样的参考都是本发明的现有技术。

[0137] 除非另有说明,在包括权利要求的说明中使用的所有的表示分量、细胞培养和处理条件等的数字应当理解为在所有条件下可通过术语“约”来修改。因此,除非另有相反说明,数字参数为近似值,可根据寻求通过本发明获得想要的性质进行改变。除非另有说明,在一组成分前的术语“至少”应当理解为指组中的每个成分。本领域技术人员将认识到或能仅仅使用常规实验来确定,许多本文中描述的本发明特定实施方案的同等方案。这样的同等方案指下述权利要求书包括的。

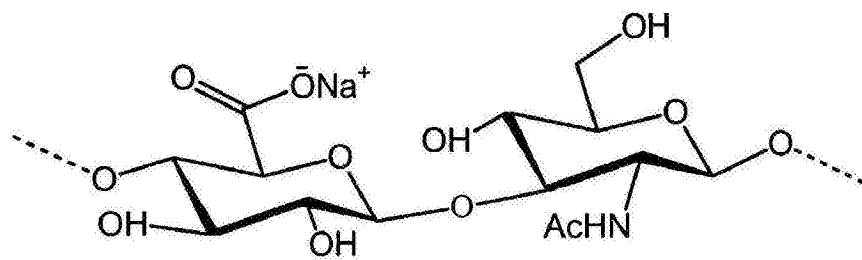


图1