

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-501874

(P2005-501874A)

(43) 公表日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/352	A 6 1 K 31/352	4 C 0 6 2
A 6 1 K 9/06	A 6 1 K 9/06	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/12	A 6 1 K 9/12	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/70	A 6 1 K 9/70	
A 6 1 K 31/765	A 6 1 K 31/765	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-524354 (P2003-524354)	(71) 出願人	500185748 ユニバーシティ・オブ・サザン・カリフォルニア
(86) (22) 出願日	平成14年8月29日 (2002. 8. 29)		
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月1日 (2004. 3. 1)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/027677		アメリカ合衆国90007-4344カリフォルニア州ロサンゼルス、サウス・ホープ・ストリート3716番、スウィート313
(87) 国際公開番号	W02003/020031		
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003. 3. 13)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	60/316, 287	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001. 8. 31)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 椎間板及び他のコラーゲン性組織の耐疲労性を向上させ、且つ機械的劣化を低下させるための無毒性架橋試薬の使用

(57) 【要約】

本発明に従う、機械的劣化に対するコラーゲン性組織の耐性を向上させる方法は、コラーゲン性組織の少なくとも一部を、有効量の架橋試薬と接触させる段階を含んで成る。当該架橋試薬は、架橋剤、例えばゲニピン及びノ又はプロアンスロシアンジンを含む。更に、当該架橋試薬は、分散媒中の架橋剤を含むことがある。架橋試薬と接触されうるコラーゲン性組織は、好ましくは椎間板又は間接軟骨の一部である。前記組織と架橋試薬との接触は、注射針を用いた選択組織内への直接的な注射によって達成される。あるいは、前記組織と架橋試薬との接触は、持続放出送達系、例えばキャリアーゲル又は軟膏、あるいは処理済の膜又はパッチの、標的組織内又は標的組織上への直接的な配置によって達成される。接触は、例えば浸漬又は噴霧によって達成されうる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

機械的劣化に対するコラーゲン性組織の耐性を向上させる方法であって、コラーゲン性組織の少なくとも一部を、有効量の架橋試薬と接触させる段階を含んで成る方法。

【請求項 2】

架橋試薬がゲニピンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

架橋試薬がプロアンスロシアニジンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

架橋試薬が分散媒中の架橋剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 5】

架橋剤が、ゲニピン及びプロアンスロシアニジンから成る群から選択され、そして分散媒が緩衝生理食塩溶液である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

架橋剤がゲニピンであり、分散媒が緩衝生理食塩溶液であり、そして緩衝生理食塩溶液中のゲニピン濃度が 0.033% 超である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

コラーゲン性組織が椎間板である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

コラーゲン性組織が関節軟骨である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 9】

コラーゲン性組織と架橋試薬との接触が、注射針を用いたコラーゲン性組織の一部上への直接的な注射によって達成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

コラーゲン性組織と架橋試薬との接触が、コラーゲン性組織の一部内又はその上への持続放出送達系の直接的な配置によって達成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

持続放出送達系がゲル又は軟膏である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

持続放出送達系が処理された膜又はパッチである、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 13】

持続放出送達系が処理されたパッチである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

コラーゲン性組織と架橋試薬との接触が浸漬によって達成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

コラーゲン性組織の一部と有効量の架橋試薬とを定期的に再接触させる段階を更に含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

分散媒中に溶解された架橋剤を含んで成る架橋試薬であって、架橋剤がコラーゲン性組織の一部の疲労耐性を向上させるのに有効な量で存在し、且つ架橋剤及び分散媒が実質的に細胞毒性がない、架橋試薬。

40

【請求項 17】

架橋剤がゲニピン及びプロアンスロシアニジンから成る群から選択される、請求項 16 に記載の架橋試薬。

【請求項 18】

機械的劣化に対するコラーゲン性組織の耐性を向上させる方法であって：
分散媒中に架橋剤を溶解することによって架橋試薬を調製し；そして
コラーゲン性組織の少なくとも一部を有効量の架橋試薬と接触させる、
段階を含んで成る方法。

50

【請求項 19】

コラーゲン性組織と架橋試薬との接触が、注射針を用いたコラーゲン性組織の一部上への直接的な注射によって達成される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

コラーゲン性組織と架橋試薬との接触が、コラーゲン性組織の一部内又はその上への持続放出送達系の直接的な配置によって達成される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

コラーゲン性組織と架橋試薬との接触が浸漬によって達成される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

コラーゲン性組織と架橋試薬との接触が噴霧によって達成される、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 23】

コラーゲン性組織の一部と有効量の架橋試薬とを定期的に再接触させる段階を更に含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願のクロスリファレンス

本出願は、2001年8月31日に出願された米国仮特許出願第60/316,287号の利益を主張するものである。

20

【0002】

本発明の背景

本発明の分野

本発明は、有害な機械的負荷 (mechanical loading) 環境により組織の劣化がもたらされる組織、例えばコラーゲン性の組織の処理のための方法に関する。更に具体的には、本発明は、耐疲労性を向上させるための変性した椎間板の処理方法、及び有効な疲労阻害剤 (fatigue inhibitor) である無毒性架橋試薬、に関する。

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

背痛並びに、脊椎の変性及び不安定性に伴う障害は、西洋文明における非常に犠牲の大きく且つ最も一般的な健康問題の1つであり続けている。脊椎の不安定性及び腰痛のための現在の処理法、例えば脊椎固定法は、変性の進行を遅らせるのに概して有効でない。疫学的且つ形態学的研究は、反復的な負荷に耐える脊椎組織の能力が脊椎の変形性関節炎の進行における1つの非常に重要な因子であることを示してきた (Magora 1972, Kelsey 1975, Frymoyer 1983, Videman 1990)。

30

【0004】

椎間板内のコラーゲン及びプロテオグリカンの構成は、椎間板の生体機械的特性を決定するのに重要な役割を果たしている。輪状のマトリックス構造の生化学的変化は、椎間板の耐久性、すなわち、反復的な機械的負荷に耐えるその能力に影響を及ぼす。これまでの研究は、還元不可能なピリジノリン架橋が成体の軟骨、骨、及び椎間板において支配的であり、且つこれらのコラーゲン架橋が成体の結合組織の構造的完全性 (酵素的及び機械的なもの) に必須であると考えられることを証明してきた (Burgeson and Nimni, 1992, Eyre, 1998)。ペントシジン架橋は、関節の軟骨及び脊椎において年齢とともに増大することが証明されている (Bank 1998, Pokharna 1998)。

40

【0005】

変性している椎間板の安定化における天然の架橋の役割が示唆されている。Durance (1998) は、酵素に由来しない架橋のペントシジンが予想された加齢に伴う増大を示したのに対し、そのレベルが更に深刻に変性した試料中でより低かったことを指摘した。これは、加

50

齢に伴う組織変化、すなわち微小な損傷の蓄積が、不適当なレベルの架橋と組み合わせられて、これらの椎間板を機械的劣化に対してより脆弱にしていると考えられる。加齢に伴う架橋（ペントシジン）は、関節軟骨の強度及び硬度を増大させることが証明されているが（Chen 2001）、加齢に伴う微小な損傷の蓄積は、強度及び硬度を低下させる働きをし得る。粘弾性的特性に関して、Lee(1989)は、アルデヒド固定（架橋）がウシ心膜における応力緩和及びずれを低下させたことを発見したが、疲労の負荷は、我々の椎間板の予備試験においては応力緩和及びずれの増大をもたらした。

【0006】

架橋試薬は、コラーゲンベースの生体材料の引張り特性を改善することができる。Osborne等(1998)は、無細胞コラーゲンの機械的強度が、架橋剤の組み合わせを用いて最も改善されたことを発見した。他の研究者も、架橋処理がコラーゲン性組織の強度を増大させることを発見している(Wang 1994, Chachra 1996, Sung 1999, Zeeman 1999)。Sung(1999)は、天然の架橋剤であるゲニピンが、他の架橋剤と比較した場合に、より大きな最大引張り強度及び強靭性をもたらしたことを発見した。ゲニピンはまた、他のより一般的に使用されている架橋剤と比較して、有意により低い細胞毒性を示した。しかしながら、それはまた、ウシ心膜における組織の異方性を排除することに関して、ネガティブな意義を浮き彫りにした。複数の研究者が、コラーゲン性組織の架橋が当該組織をより疲労破壊しやすくしているという自己の予想を述べてきた(Bank 1998, Chen 2001, Kerin 2001)。しかしながら、架橋しているコラーゲン性組織が実質的には疲労耐性に利益をもたらすという反対意見は、医学文献において記録されていなかった。コラーゲンの架橋は、エネルギーを分散させ、且つ疲労耐性を向上させることによってコラーゲン性組織を保護するための犠牲的な結合として働き得ると考えられる。

【0007】

疲労は、反復的に適用された応力に起因する材料の弱化である。疲労破壊は単に、反復的な応力が材料を弱化させた結果、本来の最大限の応力レベル以下に低下するという破壊である。骨における2つの過程、生物学的修復と疲労は対立しており、そして修復が通常優勢である。椎間板において、後方線維輪(posterior annulus)の機械的劣化の流行(Osti 1992)は、疲労が優勢な過程であることを示唆している。活発な組織の反応(適合、修復)は、成熟した椎間板の輪状材料の場合に強力な役割を果たしていない。主に無血管の構造として、椎間板はその限られた数の生存細胞の栄養の拡散に依存している。加齢に伴う変化は、細胞の生存性及び生合成機能の低下におそらく寄与している拡散を妨害している。(Buckwalter et al. 1993, Buckwalter 1995)。細胞数及び細胞の機能性における加齢に伴う低下は、マトリックスに対する機械的損傷を修復する細胞の能力を含んで成る。酵素分解後の髄核におけるマトリックスの再生は達成されたが、一貫性のないこと(Deutman 1992)機能的な輪状材料の再生は尚も実現されていなかった。

【0008】

この修復又は再生についての限定された潜在性との組み合わせの研究は、後方椎間板組織が、非傷害的な生理学的周期的負荷にかけられた場合の劣化及び疲労破壊に対して脆弱であることを証明してきた。従来の研究は、穏やかな生理学的周期的負荷(cyclic loading)にかけられた後方椎間板組織における弾塑性(Hedman 99)及び粘弾性(Hedman 00)材料の特性の劣化を証明してきた。最大引張り強度の30%の周期的負荷の規模は、2000サイクル程度で材料特性の有意な劣化をもたらした。Green(1993)は、マッチドペアの外側の線維輪の検体の最大引張り強度及び疲労寿命を研究した。彼等は、破壊疲労は、垂直の引張りの周期的なピークがマッチドペアのコントロールの最大引張り応力の45%を超えた場合に、10,000サイクル未満で起こり得ることを発見した。更に、Panjabi等(1996)は、膝の前十字靭帯に対する単一サイクルの破壊には至らない歪が、靭帯の弾性を変化させること(負荷変形)を発見した。Osti(1992)は、輪の裂け目及び割れ目が椎間板の後外側領域において支配的に見られたことを発見した。Adams(1982)は、若干変性した椎間板が、過屈曲した場合に後方に脱出することを証明し、そして疲労破壊が、外側の後方線維輪が垂直方向に伸びすぎ、同時に屈曲において深刻なほど負荷された場合に、腰椎版に

10

20

30

40

50

において起こり得ることを発見した。分析的研究において、層間剥離をもたらす得る層間剪断応力は、椎間板の後外側領域において最高であることが発見された(Goel 1995)。これらの従来のデータは、1) 後方の円板及び後縦靭帯が変性的な変化の危険性にあり、そして2) 変性の機構が屈曲疲労を伴うことがあることを示唆する。

【0009】

しかしながら、これまで、コラーゲン性組織に対する機械的劣化を低下させることが出来る処理は現時点で存在していない。事実、他のコラーゲン性組織の疲労阻害剤は提唱されていなかった。それ故に、疲労に対する体内のコラーゲン性組織の耐性を向上させ、且つ人コラーゲン性組織、特に椎間板の後方線維輪領域の機械的劣化を低下させるための方法についての必要が存在している。

10

【0010】

本発明の要約

本発明の1つの目的は、体内のコラーゲン性組織と架橋試薬とを接触させることによって機械的劣化に対する当該組織の耐性を向上させるための方法を提供することにある。

【0011】

本発明の別の目的は、コラーゲン架橋を増大させることにより加齢している椎間板を安定化させる身体自体の作用を増強することによって、椎間板組織の進行性の機械的劣化を抑制するための方法を提供することにある。

【0012】

本発明の別の目的は、一般的なアルデヒド固定剤と比較して実質的にほとんど細胞毒性のない架橋試薬を、生きているヒトの体内の組織に対するこれらの試薬の直接的な接触を容易にするために使用する方法を提供することにある。

20

【0013】

本発明の別の目的は、生きているヒトの椎間板組織を無毒性架橋試薬(又は架橋試薬の混合物)、例えばゲニピン(ゲニポシド)又はプロアンソロシアニジン(proanthrocyanidin)(バイオフラボノイド)の適当な濃縮物と直接的に接触させることによって、椎間板の線維輪組織の架橋を増大させることである。

【0014】

本発明の別の目的は、細胞毒性の無い架橋試薬の低侵襲的送達、例えば注射針を用いた選択組織内への直接的な注射又は、持続放出送達系、例えばキャリアーゲル又は軟膏、あるいは処理済の膜又はパッチの、標的組織内又は標的組織上への直接的な配置、のための処理方法を提供することにある。

30

【0015】

本発明の別の目的は、有効な疲労阻害剤として使用されうる無毒性架橋試薬から構成される組成物にある。

【0016】

本発明により、有害な機械的負荷環境により組織の劣化がもたらされる組織の処理方法が提供される。有害な機械的負荷環境は、正常な生理学的繰り返し負荷に属するものであり、他には疲労として知られている。本発明は、疲労耐性を向上させるための変性した椎間板の処理方法を提供する。本発明はまた、有効な疲労阻害剤である無毒性架橋組成物を提供する。

40

【0017】

本発明に従う、機械的劣化に対するコラーゲン性組織の耐性を向上させる方法は、コラーゲン性組織の少なくとも一部を、有効量の架橋試薬と接触させる段階を含んで成る。当該架橋試薬は、架橋剤、例えばゲニピン及び/又はプロアンソロシアニジンを含む。更に、当該架橋試薬は、分散媒(carrier medium)中の架橋剤を含むことがある。架橋試薬と接触されうるコラーゲン性組織は、好ましくは椎間板又は間接軟骨の一部である。前記組織と架橋試薬との接触は、注射針を用いた選択組織内への直接的な注射によって達成される。あるいは、前記組織と架橋試薬との接触は、持続放出送達系、例えばキャリアーゲル又は軟膏、あるいは処理済の膜又はパッチの、標的組織内又は標的組織上への直接的な配置に

50

よって達成される。接触は、例えば浸漬又は噴霧によって達成されうる。

【0018】

本発明の詳細な説明

本発明は、機械的劣化に対するヒトの体内のコラーゲン性組織の耐性を向上させるための方法であって、コラーゲン性組織の少なくとも一部と有効量の架橋試薬とを接触させる段階を含んで成る方法を提供する。本発明の方法はまた、コラーゲン架橋を増大させることにより加齢している椎間板を安定化させる身体自体の作用を増強することによって、椎間板組織の進行性の機械的劣化を抑制するための方法を提供する。この機械的劣化は、生理学的レベルの反復的負荷に応じるものであってもよい。

【0019】

本発明の架橋試薬は、特に限定されない。実質的に細胞毒性がなく、且つコラーゲン性材料の有効な架橋剤であると知られているあらゆる架橋試薬が使用されうる。当該架橋試薬は、生きているヒトの体内の組織に対する架橋剤の直接的な接触を容易にするために、実質的に細胞毒性がないことが要求される。好ましくは、架橋試薬は、一般的なアルデヒド固定剤と比較して実質的にほとんど細胞毒性を示さない。更に好ましくは、細胞毒性の無い架橋試薬が使用される。

10

【0020】

架橋試薬は、少なくとも1つの架橋剤を含む。本発明に従い選択される架橋剤は、コラーゲン性材料の有効な架橋剤である。架橋試薬中で使用される場合、有効な架橋剤は、当該架橋剤がコラーゲン性組織の一部と接触される場合にコラーゲン性組織における架橋の数を増大させるものである。有効な架橋剤は、処理した組織の疲労耐性を向上させ、反復的な生理学的負荷から生じる材料特性の劣化を低減し、又は疲労負荷による処理組織の粘弾性の増大を低下させる。同様に、有効な架橋剤は、処理組織の疲労負荷による弾塑性の減少を低下させうる。本発明の1つの態様における架橋剤は、無毒性の天然の架橋剤であるゲニピンである。ゲニピンは、その親化合物であるゲニポシドから単離され、これはクチナシの果実から単離されうる。ゲニピンは、Challenge Bioproducts Co., Ltd., 7 Alley 25, Lane 63, TzuChiang St. 404 Taichung Taiwan R. O. C., Tel 886-4-3600852 から商業的に購入できる。本発明の別の態様における架橋剤はバイオフラボノイドであり、より具体的には、バイオフラボノイドはプロアンスロシアニジンである。プロアンスロシアニジンを含む混合物は、Polyphenolics, Inc, 22004 Rd. 24, Medera, CA 93638, Tel 559-637-5961からMegaNatural(商標)Goldとして入手できる。複数の架橋剤も使用されうる。

20

30

【0021】

架橋試薬は、架橋剤に加え、分散媒を含むことがある。架橋剤は、架橋試薬を形成するために、分散媒中で溶解又は懸濁されうる。1つの態様において、架橋剤は、細胞毒性がなく、且つ生体適合性のある分散媒中に溶解される。分散媒は、生きているヒトの体内の組織に対して、当該組織又は周辺組織に対する実質的な損傷無しに架橋剤の接触を行うために、実質的に細胞毒性がないことが要求される。好ましくは、選択される分散媒は水であり、更に好ましくは、生理食塩溶液である。好ましくは、分散媒のpHは、組織環境と同一又は同程度に調節される。より更に好ましくは、分散媒は緩衝化される。本発明の1つの態様における分散媒は、リン酸緩衝生理食塩溶液(PBS)である。

40

【0022】

架橋剤が分散媒中で溶解される場合、分散媒中の架橋剤の濃度は特に制限されない。濃度は、組織の架橋を増大させるが、同時に実質的に細胞毒性のないままであるのに有効な任意の量のものであってもよい。架橋剤がゲニピンである場合、当該架橋剤の濃度は、好ましくは、PBS中で0.033%(wt%)超であり、更に好ましくはPBS中で約0.33%(wt%)である。

【0023】

本発明によると、架橋剤はコラーゲン性組織の一部と接触される。本明細書で使用する場合、コラーゲン性組織は相当量のコラーゲンを含んで成る体内の構造的な組織又は負荷を

50

支える組織であると定義される。例としては、椎間板、関節軟骨、靭帯、腱、骨、及び皮膚が含まれる。通常、架橋試薬と接触されるコラーゲン性組織の一部は、負荷をかけられる当該組織の一部である。更に、コラーゲン性組織の少なくともある程度の劣化が起こっている場合、架橋試薬と接触される当該組織の一部は、劣化している当該組織の少なくとも一部である。好ましくは、負荷をかけられる全部分又は劣化する全部分が、架橋試薬と接触される。更に、負荷をかけられるコラーゲン性組織の一部と隣接している組織も、架橋試薬と接触され得る。

【0024】

本発明に従う使用に特に感受性のあるコラーゲン性組織は、椎間板及び関節軟骨を含む。コラーゲン性組織が椎間板である場合、好ましくは架橋試薬と接触する椎間板の一部は、後方線維輪及び後外側線維輪である。

10

【0025】

コラーゲン性組織の選択部分は、有効量の無毒性架橋試薬と接触されなければならない。「有効量」は、処理される組織の一部に対して機械的作用を示すのに十分な架橋試薬の量である。具体的には、架橋試薬の「有効量」は、処理される組織の疲労耐性を向上させ、反復的生理学的負荷から生じる材料特性の劣化を低減し、又は疲労負荷による処理組織の粘弾性の増大を低下させ、又は疲労負荷による処理組織の弾塑性の減少を低下させるのに十分な量である。有効量は、実施例1及び2について本明細書に記載の粘弾性試験及び/又は弾塑性試験に従い決定されうる。

【0026】

本発明の方法は、コラーゲン性組織の少なくとも一部と有効量の架橋試薬とを接触させることを含む。当該接触は、多数の経路で達成されうる。好ましくは、コラーゲン性組織の接触は、細胞毒性の無い架橋試薬の低侵襲的送達手段によって達成される。好ましくは、前記組織と架橋試薬との接触は、注射針を用いた選択組織内への直接的な注射によって達成される。好ましくは、前記組織と架橋試薬との接触は、単数又は最少数の注射位置からの注射によって達成される。好ましくは、一定量の架橋溶液が、注射針及び注射器を用いて標的組織内に直接注射される。好ましくは、処理されるコラーゲン性組織の一部が完全に覆われるように、十分な回数 of 注射が処理される組織の一部に沿って行われる。

20

【0027】

あるいは、前記組織と架橋試薬との接触は、標的組織内又は標的組織上への持続放出送達系の直接的な配置によって達成される。使用されうる、ある持続放出送達系は、処理された膜又はパッチである。試薬含有パッチは、筒のように丸められ、そしてカニューレを介して組織部位に経皮的に挿入され、広げられ、そして生物学的接着剤又は吸収性固定手段（縫合又は仮縫い）を用いて標的組織の周辺に付着されうる。

30

【0028】

使用されうる別の持続放出送達系は、ゲル又は軟膏である。ゲル又は軟膏は、標的組織の外側に塗布されうる分解性の粘性担体である。

【0029】

接触はまた、浸漬又は噴霧、例えば関節包内浸漬又は噴霧によって達成されることがあり、ここで、一定量の架橋溶液が関節包内又は滑膜間腔に注射され得る。

40

【0030】

本明細書で処理される方法及び組成物は、機械的劣化に対する人体内のコラーゲン性組織の耐性を恒久的に向上させるために要求されないことに注意すべきである。人が1日に2～20回立位体前屈を経験すると仮定すると、コラーゲン性組織と架橋試薬との接触に伴う疲労に対する耐性の増大は、時間につれて低下しうる。しかしながら、好ましくは、疲労に対する耐性の増大は、生理学的な機械的劣化無しに数ヶ月から数年の期間持続する。そのような環境下で、記載した処理は、疲労耐性に対する耐性の増大を維持するのに十分な期間反復され得る。上文で定義した過程を用いて、接触は、疲労に対する耐性の増大を維持するために定期的に反復され得る。幾つかの処理の場合、接触の間隔は、幾つかの個体にとって約1年に相当すると予想される。したがって、単回処理又は反復注射/処理の

50

いずれかを用いて、本発明の方法は、長期間に及ぶコラーゲン性組織の機械的劣化を最小化する。

【実施例】

【0031】

実施例1及び2

32の腰椎椎間関節が、10ヶ月齢のウシの脊柱から得られた。椎間関節は、任意に3つの群に分けられた：未処理のコントロール - 12検体、ゲニピン処理1 (G1) - 6検体、及びゲニピン処理 (G2) - 13検体。G1処理は、0.033%濃度のゲニピンを含むPBS中に全検体を72時間浸漬することを包含した。同様に、G2処理は、0.33%濃度のゲニピンを含むPBS中に全検体を72時間浸漬することを包含した。PBS中で0.33%のゲニピンは、50mlの10xPBS (リン酸緩衝生理食塩溶液) を蒸留水で10倍に希釈して500ml (500g) のPBSを作り、そして1.65gのゲニピンを混合して0.33% (wt%, g/g) 溶液を生成することによって生成した。心臓及び腱組織の試料を用いたこれまでの研究は、当該組織の架橋から生じる組織の膨張 (組織内への水の浸透圧による流入) の減少を証明した。いくつかのコントロールは、疲労試験の前に浸漬にかけられなかった。他のものは、72時間生理食塩溶液中で浸漬された。水量の損失実験は、ゲニピン浸漬コントロールと0.9%生理食塩溶液浸漬コントロールとの間の同等の外側の線維輪の水和を確立するために実施された。処理の選択は、脊柱とレベルによって無作為化された。前記検体の脊柱の末端が、機械的試験を容易にするためにポリウレタン容器に入れられた。

10

20

【0032】

押込み試験及び圧縮/屈曲疲労のサイクルが表1に提示する順序で実施された。

【表1】

表1. 実験のプロトコール

測定順序	測定	場所
1	応力緩和	後方線維輪の中央
2	硬度	後方線維輪の中央
3000回の圧縮/屈曲疲労サイクル		
3	応力緩和	中央の4mm側方
4	硬度	後方線維輪の中央
追加の3000回の圧縮/屈曲疲労サイクル		
5	応力緩和	中央の4mm側方 (反対側)
6	硬度	後方線維輪の中央

30

【0033】

前記負荷計画の規定の点において、押込み試験は、以下のように粘弾性を求めるために使用された。応力緩和データは、3mmの直径の半球状の圧子を10Nまでランプロードイング (ramp loading) し、そして次にその変位を60秒間維持し、同時に、応力緩和と称される、生じた応力の低下を記録することによって収集された。押込み試験はまた、ランプロードイングデータから硬度指数 (押込みに対する耐性) を算出することによって弾塑性を決定するためにも利用された。硬度の測定値を記録する前に、組織は10回反復して押込まれた (60秒/サイクル、最初の10Nの負荷における変位まで)。

40

【0034】

この試験のプロトコールは、2つの原理を基にした。第一に、粘弾性の作用は、反復の負荷によって漸近的に低下する。第二に、硬度の測定値は組織の負荷の履歴 (loading histo

50

ry)に敏感である。しかしながら、この作用は10回の負荷のサイクルの後は無視できるものとなる。これらの作用を最小化するために、粘弾性データ(応力緩和)は、これまでに押込みをされてない組織から回収された。あるいは、弾塑性データ(硬度)は、反復して負荷をかけられた組織(あらかじめ調整済み)から回収された。この場合、反復的な押込みは、硬度の測定値に対する、粘弾性の変化、すなわち再現性の欠如の不所望な作用を軽減することを意図した。これらの試験手順は、負荷の履歴及び位置の変化を用いて、測定値の再現性に対する複数の予備実験から導かれた。

【0035】

最初の押込み試験の後、検体は、0.25 Hzの割合で、3000サイクルの間200 Nでの屈曲-圧縮に反復的に荷重をかけられた。荷重は、横断面の検体の midpoint の40 mm前方にある横断面に対して垂直に適用された。続いて、第二組の押込み試験データが疲労循環の後に回収される。この手順は2回の疲労負荷サイクルのために行われた。全ての試験の間、検体はそれらの水分含量を維持するために生理食塩溶液で濡らされたガーゼで覆われた。疲労サイクル及び非破壊的押込み試験は、MTS 858.02の2軸の、テーブルトップの、10 kNの性能のサーボハイドロリックマテリアルテストステーション(MTS, Eden Prairie, MN)上で、MTS Test Starデータ収集システムを用いて実施された。複数の統計的測定が、その結果の有意性を評価するために算出された。入れ子型二元配置分散分析(ANOVA)が、疲労サイクルの処理及び回数に起因する作用を確認するために利用された。当該データのノンパラメトリックな性質により、マンホイットニーのノンパラメトリックな順位和検定が、当該処理が：1)当該組織の予備的な循環機械的パラメーター、又は2)疲労負荷による弾塑性及び粘弾性の機械的パラメーターの変化(低下)量に影響を及ぼさなかった帰無仮説を評価するために使用された。統計学的有意性についての信頼水準は $p < 0.05$ で設定された。

【0036】

入れ子型二元配置ANOVA解析は、粘弾性(緩和)及び弾塑性(硬度)の機械的パラメーターが共に独立して疲労サイクル及び処理の型に影響を受けたことを決定した。これらの統計学的結果を表2に示す。

【0037】

緩和試験結果は、図1に図示的に示す。架橋処理によって生じた緩和曲線の初期の低下が見られた。このことは、応力緩和が高いほど組織の劣化が深刻であるため(Lee 1989)、有益な作用を表していると思われる。G1及びG2処理群の初期の疲労前の緩和は、それぞれコントロールの疲労前の緩和よりも26%及び19%($p = 0.009$ 及び $p = 0.026$)低かった。6000回の非外傷性の負荷サイクルの後の緩和の変化によって示されたように、疲労耐性における劇的な向上も見られた。G2処理した椎間板についての、6000回の疲労サイクルに起因する緩和の変化は、コントロールの変化の1/3未満($p = 0.044$)であった。しかしながら、より低濃度のゲニピンは、疲労耐性の同一の向上をもたらさなかった。

【0038】

硬度試験の結果を図2に図示的に示す。G2架橋処理によって生じた硬度データの初期の上昇が見られる。これは、硬度の損失は当該組織における構造的完全性の損失の前兆となるので、有益な作用を表していると思われる。G2処理群の初期の疲労前の緩和は、コントロール群のものよりも17%高かった($p = 0.026$)。しかしながら、この有益な作用は、3000回の疲労サイクルの前に徐々に失われたようであり、そして3000サイクルと6000サイクルとの間の硬度の変化は、当該2つの群の場合本質的に同一である($G2 = -0.94$ 、コントロール = -1.01)。

【表2】

表2. 入れ子型二元配置ANOVA解析

材料特性	因子	F-値	確率
応力緩和	処理	16.060	1.085E-06
	疲労サイクル	9.676	2.500E-03
	相互作用	1.402	2.515E-01
硬度	処理	20.023	6.405E-08
	疲労サイクル	5.898	1.710E-02
	相互作用	4.228	1.760E-02

10

【0039】

上文で提示したデータは、反復的な非外傷性の負荷に起因する弾性及び粘弾性の機械的劣化を数値化する。これらの実験結果は、無毒性架橋剤が、コラーゲン性組織、すなわち椎間板の材料特性の疲労による劣化を軽減することを立証する。粘弾性の低下における3倍以上の低下は、0.33 g/mol濃度のゲニピン中でのウシ椎間板組織の浸漬によってもたらされた。試験した製剤は、3000回の試験サイクルに対する弾性の機械的特性（硬度）の向上を維持することはできなかった。

20

【0040】

一般的な人が、それらの椎間板上の擦り切れ及び割れ目の匹敵する程度を経験するのにかかるであろう時間の長さを正確に推定することは困難である。確実に、記載した試験によって課される機械的劣化に加えて、試験する環境に起因するこれらの死んだ組織の追加の「天然」の劣化が存在する。負荷を受けていないコントロールは、材料特性のこの天然の劣化が有意でないことを示した。前記検体を試験の間保湿し、そして負荷頻度を促進することによってこの天然の劣化を最小化する対策が採られた。同時に、負荷頻度は、組織の過熱を防ぐために生理学的な制限範囲内で維持された。これらの対策が死体の組織の *in vitro*での機械的試験にとって標準的なプロトコルを構成することに注意すべきである。人が1日に2~20回立位体前屈を経験すると仮定すると、これらのデータは、大まかに数ヶ月から数年の生理学的な機械的劣化に相当する。

30

【0041】

記載した処理は、この負荷の程度で、例えば3000回の疲労サイクルで表される期間反復され得る。上文で定義した仮説を用いると、このサイクル数は、いくらかの個体にとって約1年に相当すると推測され得る。従って、単回処理又は反復注射/処理のいずれかを用いて、個体は長期間に及ぶ彼等の椎間板の機械的劣化を最少化することができる。別の選択肢には、持続放出送達系、例えば直接的に適用されるパッチ、ゲル又は軟膏、が含まれる。

【0042】

本発明は、ある好ましい態様及び代わりの態様の観点で記載されており、これらは本発明の基本概念が実施されうる種々の経路のうちのごく一部の例示である。当業者が想到しうる基本概念の実施上でのある変更又は変形は、特許請求の範囲で限定されるような本発明及び同等物の範囲内である。

40

【表3】

引用文献一覧

Adams, MA, Green, TP, Dolan, P, The strength in anterior bending of lumbar intervertebral discs, *Spine*, 19:2197-2203, 1994.

Adams, MA, Hutton, WC, Prolapsed intervertebral disc - a hyperflexion injury, *Spine*, 7:184-191, 1982.

Bank, RA, Bayliss, MT, Lafeber, FPJG, Maroudas, A, Tekoppele, JM. Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage: The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage. *Biochem. J.*, 330:345-351, 1998. 10

Biering-Sorensen, F, A prospective study of low back pain in a general population. I. Occurrence, recurrence and aetiology, *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine*, 15:71-79, 1983

Buckwalter, JA, Aging and degeneration of the human intervertebral disc, *Spine*, 20:1307-1314, 1995. 20

Buckwalter, JA, Woo, SL-Y, Goldberg, VM, Hadley, EC, Booth, F, Oegema, TR, Eyre, DR, Current concepts review. Soft-tissue aging and musculoskeletal function, *Journal Bone Joint Surgery*, 75A:1533-1548, 1993.

Burgeson, RE, Nimni, ME, Collagen types. Molecular structure and tissue distribution.[Review], *Clinical Orthopaedics & Related Research*, (282):250-72, 1992

Chachra, D, Gratzner, PF, Pereira, CA, Lee, JM, Effect of applied uniaxial stress on rate and mechanical effects of cross-linking in tissue-derived biomaterials. *Biomaterials*, 17:1865-75, 1996 30

Chen, AC, Temple, MM, Ng, DM, Richardson, CD, DeGroot, J, Verzijl, N, teKoppele, JM, Sah, RL, Age-related cross linking alters tensile properties of articular cartilage, *Orthopaedic Research Society Transactions*, 26:0128. 2001.

Deutman, R, The case for chemonucleolysis in discogenic sciatica. A review.. *Acta Orthopaedica Scandinavia*, 63:571-575, 1992.

Duance, VC, Crean, JKG, Sims, TJ, Avory, N, Smith, S, Menage, J, Eisenstein, SM, Roberts, S, Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis, *Spine*, 23:2545-2551, 1998.

Eyre DR, Dickson IR, VanNess K, Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage, *Biochem J*, 252:495-500, 1988.

Farfan, HF, Huberdeau, RM, Dubow, HI, Lumbar intervertebral disc degeneration, *J. Bone Jt Surg.*, 54A:492-510, 1972. 10

Frymoyer, JW, Pope, MH, Clements, JH, Wilder, DG, MacPherson, B, Ashikaga, T, Risk factors in low-back pain, *Journal Bone and Joint Surgery*, 65A:213-218, 1983.

Glazier, R, Fry, J, Badley, E, Arthritis and rheumatism are neglected health priorities: A bibliometric study, *Journal of Rheumatology*, 28:706-711, 2001.

Goel, VK, Monroe, BT, Gilbertson, LG, Brinckmann, P, Interlaminar shear stresses and laminae separation in a disc, *Spine*, 20:689-698, 1995.

Green, TP, Adams, MA, Dolan, P, Tensile properties of the annulus fibrosus. II. Ultimate tensile strength and fatigue life, *European Spine Journal*, 2:209-214, 1993. 20

Hedman, TP, Fernie, GR, Mechanical response of the lumbar spine to seated postural loads, *Spine*, 22:734-743, 1997.

Hedman, TP, Liao, WL, Yu, J, Watkins, R, Liker, M, Strength reduction of the posterior intervertebral disc resulting from repetitive sub-failure loading, *Orthopaedic Research Society Transactions*, 24:1017, 1999.

Hedman, TP, Use of non-destructive materials testing techniques to assess the degradation of intervertebral discs subjected to non-traumatic repetitive loads, *Presented at the USC/GOS Annual Meeting, Los Angeles, California, June 22-23, 2000.* 30

Hirsch, C, Schajowicz, F, Studies on structural changes in the lumbar annulus fibrosus, *Acta Orthop. Scand.*, 22:184-231, 1953.

Kelsey, JL, An epidemiological study of acute herniated lumbar discs, *Rheumatology and Rehabilitation*, 14:144-159, 1975

Kerin, A, Hung, G, Verzijl, N, DeGroot, J, TeKoppele, J, Grodzinsky, A, The effect of non-enzymatic glycation on mechanical properties of articular cartilage, *Orthopaedic Research Society Transactions*, 26:0130, 2001. 40

【表 5】

Klein, BP, Jensen, RC, Sanderson, LM, Assessment of workers' compensation claims for back strains/sprains, *J Occup Med*, 26:443-448, 1984.

Lee, JM, Haberer, SA, Boughner, DR, The bovine pericardial xenograft: I. Effect of fixation in aldehydes without constraint on the tensile viscoelastic properties of bovine pericardium, *Journal of Biomedical Materials Research*, 23:457-475, 1989.

Magora, A, Investigation of the relation between low back pain and occupation: sitting, standing and weight lifting. *Industrial Medicine*. 41:5-9, 1972. 10

Osborne, CS, Barbenel, JC, Smith, D, Savakis, M, Grant, MH, Investigation into the tensile properties of collagen/chondroitin-6-sulphate gels: the effect of crosslinking agents and diamines, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 36:129-134, 1998.

Osti, OL, Vernon-Roberts, B, Moore, R, Fraser, RD, Annular tears and disc degeneration in the lumbar spine: a post-mortem study of 135 discs, *J. Bone Jt Surg.*, 74B:678-682, 1992.

Panjabi, MM, Yoldas, E, Oxland, TR, Crisco, JJ, Subfailure injury of the rabbit anterior cruciate ligament, *J. Orthop. Res.*, 14:216-222, 1996. 20

Pokhama, HK, Phillips, FM, Collagen crosslinks in human lumbar intervertebral disc aging, *Spine*, 23(15):1645-1648, 1998.

Sung, HW, Chang, Y, Chiu, CT, Chen, CN, Liang, HC, Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent, *Journal Biomed. Materials Res.*, 47:116-126, 1999.

Sung, HW, Huang, RN, Huang, LL, Tsai, CC, In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10:63-78, 1999. 30

Videman, T, Nurminen, M, Troup, JDG, Lumbar spinal pathology in cadaveric material in relation to history of back pain, occupation, and physical loading, *Spine*, 15:728-738, 1990.

Waddell, G, Low back pain: A twentieth century health care enigma. *Spine*, 21:2820-2825, 1996.

Wang, XD, Masilamani, NS, Mabrey, JD, Alder, ME, Agrawal, CM, Changes in the fracture toughness of bone may not be reflected in its mineral density, porosity, and tensile properties, *Bone*, 23:67-72, 1998. 40

Zeeman, R, Dijkstra, PJ, van Wachem, PB, van Luyn, MJ, Hendriks, M, Cahalan, PT, Feijen, J, Crosslinking and modification of dermal sheep collagen using 1, 4-butanediol diglycidyl ether, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46(3):424-33, 1999

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1は、後方椎間板の応力緩和に対するゲニピン架橋処理（G1 = 0.033 g/mol、G2 = 0.330.033 g/mol）の効果を示す、緩和（N）対サイクル数のグラフである。

【図2】図2は、貫通に対する後方椎間板の硬度又は耐性に対するゲニピン架橋処理（G1 = 0.033 g/mol、G2 = 0.330.033 g/mol）の効果を示す、Brinellの硬度指数対サイクル数のグラフである。

【図1】

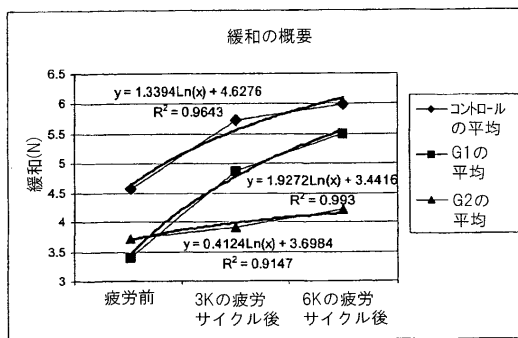


FIGURE 1

【図2】

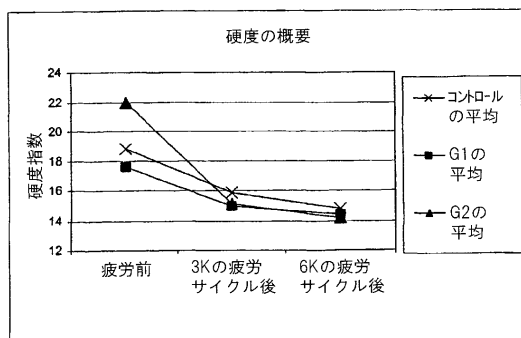


FIGURE 2

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020031 A1

- (51) International Patent Classification: A01N 43/04, A61K 31/70
- (21) International Application Number: PCT/US02/27677
- (22) International Filing Date: 29 August 2002 (29.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/316,287 31 August 2001 (31.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA [US/US]; 3716 South Hope Street, Suite 513, Los Angeles, CA 90007-4344 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): HEDMAN, Thomas, P. [US/US]; 25665 Frost Lane, Stevenson Ranch, CA 91381 (US).
- (74) Agents: MCCLURE, Lawrence, J. et al.; Hogan & Hartson L.L.P., Biltmore Tower, 500 South Grand Avenue, Suite 1900, Los Angeles, CA 90071 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/020031 A1

(54) Title: USE OF NON-TOXIC CROSSLINKING REAGENTS TO IMPROVE FATIGUE RESISTANCE AND REDUCE MECHANICAL DEGRADATION OF INTERVERTEBRAL DISC AND OTHER COLLAGENOUS TISSUES

(57) Abstract: A method of improving the resistance of collagenous tissue to mechanical degradation in accordance with the present invention comprises the step of contacting at least a portion of a collagenous tissue with an effective amount of a crosslinking reagent. The crosslinking reagent includes a crosslinking agent such as genipin and/or psoralen/mecyranin. Further, the crosslinking reagent may include a crosslinking agent in a carrier medium. The collagenous tissue to be contacted with the crosslinking reagent is preferably a portion of an intervertebral disc or articular cartilage. The contact between the tissue and the crosslinking reagent is effected by injections directly into the select tissue using a needle. Alternatively, contact between the tissue and the crosslinking reagent is effected by placement of a time-release delivery system such as a gel or ointment, or a treated membrane or patch directly into or onto the target tissue. Contact may also be effected by, for instance, soaking.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

USE OF NON-TOXIC CROSSLINKING REAGENTS TO IMPROVE FATIGUE
RESISTANCE AND REDUCE MECHANICAL DEGRADATION OF
INTERVERTEBRAL DISC AND OTHER COLLAGENOUS TISSUES

5 Cross-Reference to Related Application

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No.
60/316,287, filed August 31, 2001.

Background of the Invention

10 Field of the Invention

The present invention relates to a method for treatment of tissue, for
example, collagenous tissue, where a deleterious mechanical loading environment
contributes to the degradation of the tissue. More specifically, the present invention
relates to a method for treatment of degenerated intervertebral discs to improve
15 fatigue resistance, and to non-toxic crosslinking reagents that are effective fatigue
inhibitors.

Description of the Related Art

Back pain and disability associated with spinal degeneration and
instability continue to be one of the costliest and most prevalent health problems in
20 western civilization. Current treatments for spinal instability and low-back pain,
including spinal fusion, are generally ineffective in slowing the progression of
degeneration. Epidemiological and morphological studies have shown that the
capacity of spinal tissue to withstand repetitive loading is one critically important
factor in the progression of spinal osteoarthritis (Magora 1972, Kelsey 1975,
25 Frymoyer 1983, Videman 1990).

The organization of collagen and proteoglycans within the
intervertebral disc plays an important role in determining the biomechanical
properties of the disc. Biochemical alterations in the structure of the annular

WO 03/020031

PCT/US02/27677

matrix affect the disc's durability, that is, its ability to withstand repetitive mechanical loading. Previous studies have shown that nonreducible pyridinoline cross links are predominant in adult cartilage, bone, and intervertebral discs and these collagen crosslinks are thought to be critical for the structural integrity (enzymatic and mechanical) of adult connective tissue (Burgeson and Nimni, 1992, Eyre, 1988). Pentosidine crosslinking has been shown to increase with age in articular cartilage and intervertebral discs (Bank 1998, Pokharna 1998).

A role for naturally occurring crosslinks in stabilizing degenerating discs has been suggested. Duance (1998) noted that while the nonenzymic derived crosslink pentosidine showed an expected age related increase, its level was lower in the more severely degenerated samples. It may be that age related tissue changes -- i.e. micro-damage accumulation -- combined with inadequate levels of crosslinks made these discs more vulnerable to mechanical degradation. Age related crosslinks (pentosidine) have been shown to increase the strength and stiffness of articular cartilage (Chen 2001) while age related microdamage accumulation would act to decrease strength and stiffness. With regard to viscoelastic properties, Lee (1989) found that aldehyde fixation (crosslinking) reduced stress-relaxation and creep in bovine pericardium, while fatigue loading produced an increase in stress-relaxation and creep in our preliminary testing of intervertebral discs.

Crosslinking reagents are capable of improving the tensile properties of collagen-based biomaterials. Osborne et al (1998) found mechanical strength of acellular collagen gels was most improved using a combination of crosslinking agents. Other researchers have also found that crosslinking treatments can increase the strength of collagenous tissues (Wang 1994, Chachra 1996, Sung 1999, Zeeman 1999). Sung (1999) found that a naturally occurring cross linking agent, genipin, provided greater ultimate tensile strength and toughness when compared with other crosslinking reagents. Genipin also demonstrated significantly less cytotoxicity compared to other more commonly used crosslinking agents. However

WO 03/020031

PCT/US02/27677

it also stood out in a negative sense with regard to eliminating tissue anisotropy in bovine pericardium. Several researchers have stated their expectation that crosslinking of collagenous tissue may make the tissue more prone to fatigue failure (Bank 1998, Chen 2001, Kerin 2001). However, it is believed that the opposing
5 view—that crosslinking collagenous tissue may actually benefit fatigue resistance—has not been recorded in the medical literature. It is believed that collagen crosslinks may act as sacrificial bonds to protect collagenous tissues by dissipating energy and improving fatigue resistance.

Fatigue is a weakening of a material due to repetitive applied stress.
10 Fatigue failure is simply a failure where repetitive stresses have *weakened* a material such that it fails below the original ultimate stress level. In bone, two processes -- biological repair and fatigue -- are in opposition, and repair generally dominates. In the intervertebral disc, the prevalence of mechanical degradation of the posterior annulus (Osti 1992) suggests that fatigue is the dominant process.
15 Active tissue response (adaptation, repair) does not play a strong role in the case of mature intervertebral disc annular material. As a principally avascular structure, the disc relies on diffusion for nutrition of its limited number of viable cells. Age related changes interfere with diffusion presumably contributing to declining cell viability and biosynthetic function (Buckwalter et al. 1993, Buckwalter 1995). Age
20 related decline in numbers of cells and cell functionality compromises the ability of the cells to repair mechanical damage to the matrix. While regeneration of the matrix in the nucleus following enzymatic degradation has been accomplished, albeit inconsistently (Deutman 1992), regeneration of functional annular material has not yet been realized.
25 Combined with this limited potential for repair or regeneration, studies have shown that posterior intervertebral disc tissue is vulnerable to degradation and fatigue failure when subjected to non-traumatic, physiologic cyclic loads. Prior work has shown deterioration in elastic-plastic (Hedman 99) and viscoelastic (Hedman 00) material properties in posterior intervertebral disc tissue

WO 03/020031

PCT/US02/27677

subjected to moderate physiological cyclic loading. Cyclic load magnitudes of 30% of ultimate tensile strength produced significant deterioration of material properties with as little as 2000 cycles. Green (1993) investigated the ultimate tensile strength and fatigue life of matched pairs of outer annulus specimens. They found that fatigue failure could occur in less than 10,000 cycles when the vertical tensile cyclic peak exceeded 45% of the ultimate tensile stress of the matched pair control. In addition, Panjabi et al (1996) found that single cycle sub-failure strains to anterior cruciate ligaments of the knee alter the elastic characteristics (load-deformation) of the ligament. Osti (1992) found that annular tears and fissures were predominantly found in the posterolateral regions of the discs. Adams (1982) demonstrated the propensity of slightly degenerated discs to prolapse posteriorly when hyperflexed and showed that fatigue failure might occur in lumbar discs as the outer posterior annulus is overstretched in the vertical direction while severely loaded in flexion. In an analytical study, interlaminar shear stresses, which can produce delaminations, have been found to be highest in the posterolateral regions of the disc (Goel 1995). These prior data indicate: 1) the posterior disc and posterior longitudinal ligament are at risk of degenerative changes, and that 2) the mechanism of degeneration can involve flexion fatigue.

To date, however, no treatments capable of reducing mechanical degradation to collagenous tissues currently exist. In fact, no other collagenous tissue fatigue inhibitors have been proposed. A need therefore exists for a method for improving the resistance of collagenous tissues in the human body to fatigue and for reducing the mechanical degradation of human collagenous tissues, in particular, the posterior annulus region of the intervertebral disc.

25

Summary of the Invention

It is one object of the present invention to provide a method of improving the resistance of collagenous tissues in the human body to mechanical degradation by contacting the tissue with crosslinking reagents.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

It is another object of the present invention to provide a method of curtailing the progressive mechanical degradation of intervertebral disc tissue by enhancing the body's own efforts to stabilize aging discs by increasing collagen crosslinks.

5 It is another object of the present invention to provide a method that uses crosslinking reagents with substantially less cytotoxicity compared to common aldehyde fixation agents in order to facilitate direct contact of these reagents to tissues in the living human body.

10 It is another object of the present invention to increase the crosslinking of disc annular tissue by directly contacting living human disc tissue with appropriate concentrations of a non-toxic crosslinking reagent (or a mixture of crosslinking reagents) such as genipin (a geniposide) or proanthocyanidin (a bioflavonoid).

15 It is another object of the present invention to provide a treatment method for minimally invasive delivery of the non-cytotoxic crosslinking reagent such as injections directly into the select tissue using a needle or placement of a time-release delivery system such as a carrier gel or ointment, or a treated membrane or patch directly into or onto the target tissue.

20 It is another object of the present invention to a composition composed of non-toxic crosslinking reagents that can be used as effective fatigue inhibitors.

In accordance with the present invention, there is provided a method for treatment of tissues where a deleterious mechanical loading environment contributes to the degradation of the tissue. The deleterious mechanical loading environment may consist of normal physiological repetitive loading, otherwise known as fatigue. The present invention provides a method for treatment of 25 degenerated intervertebral discs to improve fatigue resistance. The present invention also provides non-toxic crosslinking compositions that are effective fatigue inhibitors.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

A method of improving the resistance of collagenous tissue to mechanical degradation in accordance with the present invention comprises the step of contacting at least a portion of a collagenous tissue with an effective amount of a crosslinking reagent. The crosslinking reagent includes a crosslinking agent such as genipin and/or proanthocyanidin. Further, the crosslinking reagent may include a crosslinking agent in a carrier medium. The collagenous tissue to be contacted with the crosslinking reagent is preferably a portion of an intervertebral disc or articular cartilage. The contact between the tissue and the crosslinking reagent is effected by injections directly into the select tissue using a needle.

Alternatively, contact between the tissue and the crosslinking reagent is effected by placement of a time-release delivery system such as a gel or ointment, or a treated membrane or patch directly into or onto the target tissue. Contact may also be effected by, for instance, soaking or spraying.

15 Description of the Figures

FIGURE 1 is a graph of relaxation (N) v. numbers of cycles showing the effect of genipin crosslinking treatments (G1=0.033 g/mol, G2=0.33 g/mol) on posterior intervertebral disc stress relaxation.

FIGURE 2 is a graph of Brinnell's hardness index v. numbers of cycles showing the effect of genipin crosslinking treatments (G1=0.033 g/mol, G2=0.33 g/mol) on posterior intervertebral disc hardness or resistance to penetration.

Detailed Description of the Invention

The present invention provides a method of improving the resistance of collagenous tissues in the human body to mechanical degradation comprising the step of contacting at least a portion of a collagenous tissue with an effective amount of a crosslinking reagent. The method of the present invention also provides a method of curtailing the progressive mechanical degradation of intervertebral disc

WO 03/020031

PCT/US02/27677

tissue by enhancing the body's own efforts to stabilize aging discs by increasing collagen crosslinks. This mechanical degradation may be in response to physiologic levels of repetitive loading.

The crosslinking reagent of the present invention is not particularly limited.

5 Any crosslinking reagent known to be substantially non-cytotoxic and to be an effective cross-linker of collagenous material may be used. The crosslinking reagent is required to be substantially non-cytotoxic in order to facilitate direct contact of the crosslinking agent to tissues in the living human body. Preferably, the crosslinking reagent exhibits substantially less cytotoxicity compared to common
10 aldehyde fixation agents. More preferably, a non-cytotoxic crosslinking reagent is used.

The crosslinking reagent includes at least one crosslinking agent. The crosslinking agent chosen in accordance with the present invention is an effective cross-linker of collagenous material. When used in a cross-linking reagent, an
15 effective crosslinker is one that increases the number of crosslinks in the collagenous tissue when the crosslinker is brought into contact with a portion of the collagenous tissue. An effective crosslinker improves the fatigue resistance of the treated tissue, reduces material property degradation resulting from repetitive physiologic loading, or reduces the increase of viscoelastic properties of the treated
20 tissue due to fatigue loading. Likewise, an effective crosslinker may reduce the decrease in elastic-plastic properties due to fatigue loading of the treated tissue. In one embodiment of the present invention, the crosslinking agent is Genipin, a non-toxic, naturally occurring crosslinking agent. Genipin is obtained from its parent compound, geniposide, which may be isolated from the fruits of *Gardenia*
25 *jasmnoides*. Genipin may be obtained commercially from Challenge Bioproducts Co., Ltd., 7 Alley 25, Lane 63, TzuChiang St. 404 Taichung Taiwan R.O.C., Tel 886-4-3600852. In another embodiment of the present invention, the crosslinking agent is a bioflavonoid, and more specifically, the bioflavonoid is proanthocyanidin. A mixture containing proanthocyanidin can be obtained as MegaNatural™ Gold

WO 03/020031

PCT/US02/27677

from Polyphenolics, Inc, 22004 Rd. 24, Medera, CA 93638, Tel 559-637-5961. More than one crosslinking agent may be used.

5 The crosslinking reagent may include a carrier medium in addition to the crosslinking agent. The crosslinking agent may be dissolved or suspended in the carrier medium to form the crosslinking reagent. In one embodiment, a crosslinking agent is dissolved in a non-cytotoxic and biocompatible carrier medium. The carrier medium is required to be substantially non-cytotoxic in order to mediate the contact of the crosslinking agent to tissues in the living human body without substantial damage to the tissue or surrounding tissue. Preferably, the carrier
10 medium chosen is water, and more preferably, a saline solution. Preferably, the pH of the carrier medium is adjusted to be the same or similar to the tissue environment. Even more preferably, the carrier medium is buffered. In one embodiment of the present invention, the carrier medium is a phosphate buffered saline (PBS).

15 When the crosslinking agent is dissolved in a carrier medium, the concentration of the crosslinking agent in the carrier medium is not particularly limited. The concentration may be in any amount effective to increase the crosslinking of the tissue while at the same time remaining substantially noncytotoxic. When the crosslinking agent is genipin, the concentration of the
20 crosslinking agent is preferably greater than 0.033% in PBS (wt %), and more preferably, about 0.33% in PBS (wt %).

In accordance with the present invention, the crosslinking reagent is brought into contact with a portion of a collagenous tissue. As used herein, collagenous tissue is defined to be a structural or load supporting tissue in the body comprised
25 of a substantial amount of collagen. Examples would include intervertebral disc, articular cartilage, ligament, tendon, bone, and skin. In general, the portion of the collagenous tissue to be brought into contact with the crosslinking reagent is the portion of the tissue that is subject to loading. Further, where at least some degradation of the collagenous tissue has occurred, the portion of the tissue to be

WO 03/020031

PCT/US02/27677

contacted with the crosslinking reagent is at least the portion of the tissue that has been degraded. Preferably, the entire portion that is subject to loading or the entire portion that is degraded is contacted with the crosslinking reagent. Further, the tissue adjacent the portion of collagenous tissue subject to the loading may also be contacted with the crosslinking reagent.

5 The collagenous tissues that are particularly susceptible for use in accordance with the present invention include intervertebral discs and articular cartilage. Where the collagenous tissue is an intervertebral disc, the portion of the intervertebral disc that is preferably contacted by the crosslinking reagent is the posterior and posterolateral annulus fibrosis.

10 The selected portion of the collagenous tissue must be contacted with an effective amount of the non-toxic crosslinking reagent. An "effective amount" is an amount of crosslinking reagent sufficient to have a mechanical effect on the portion of the tissue treated. Specifically, an "effective amount" of the crosslinking reagent is an amount sufficient to improve the fatigue resistance of the treated tissue, reduce material property degradation resulting from repetitive physiologic loading, or reduce the increase of viscoelastic properties of the treated tissue due to fatigue loading, or reduce the decrease of elastic-plastic properties of the treated tissue due to fatigue loading. An effective amount may be determined in accordance with the viscoelastic testing and/or the elastic-plastic testing described herein with respect to Examples 1 and 2.

20 The method of the present invention includes contacting at least a portion of the collagenous tissue with an effective amount of the crosslinking reagent. The contact may be effected in a number of ways. Preferably, the contacting of collagenous tissue is effected by a means for minimally invasive delivery of the non-cytotoxic crosslinking reagent. Preferably, the contact between the tissue and the crosslinking reagent is effected by injections directly into the select tissue using a needle. Preferably, the contact between the tissue and the crosslinking reagent is effected by injections from a single or minimum number of injection locations.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

Preferably, an amount of crosslinking solution is injected directly into the targeted tissue using a needle and a syringe. Preferably, a sufficient number of injections are made along the portion of the tissue to be treated so that complete coverage of the portion of the collagenous tissue to be treated is achieved.

5 Alternatively, contact between the tissue and the crosslinking reagent is effected by placement of a time-release delivery system directly into or onto the target tissue. One time-released delivery system that may be used is a treated membrane or patch. A reagent-containing patch may be rolled into a cylinder and inserted percutaneously through a cannula to the tissue sight, unrolled and using a
10 biological adhesive or resorbable fixation device (sutures or tacks) be attached to the periphery of the targeted tissue.

Another time-released delivery system that may be used is a gel or ointment. A gel or ointment is a degradable, viscous carrier that may be applied to the exterior of the targeted tissue.

15 Contact also may be effected by soaking or spraying, such as intra-capsular soaking or spraying, in which an amount of crosslinking solutions could be injected into a capsular or synovial pouch.

It should be noted that the methods and compositions treated herein are not required to permanently improve the resistance of collagenous tissues in the human
20 body to mechanical degradation. Assuming that a person experiences 2 to 20 upright, forward flexion bends per day, the increased resistance to fatigue associated with contact of the collagenous tissue with the crosslinking reagent, may, over the course of time, decrease. Preferably, however, the increased resistance to fatigue lasts for a period of several months to several years without physiologic
25 mechanical degradation. Under such circumstance, the described treatment can be repeated at the time periods sufficient to maintain an increased resistance to fatigue resistance. Using the assumption identified above, the contacting may be repeated periodically to maintain the increased resistance to fatigue. For some treatment, the time between contacting is estimated to correspond to approximately

WO 03/020031

PCT/US02/27677

1 year for some individuals. Therefore, with either a single treatment or with repeated injections/treatments, the method of the present invention minimizes mechanical degradation of the collagenous tissue over an extended period of time.

5 Examples 1 and 2

Thirty-three lumbar intervertebral joints were obtained from ten four-month-old calf spines. The intervertebral joints were arbitrarily divided into 3 groups: untreated controls-12 specimens, Genipin treatment 1 (G1)-6 specimens, and Genipin treatment 2 (G2)-13 specimens. The G1 treatment involved 72 hours of soaking the whole specimen in PBS with a 0.033% concentration of Genipin. Similarly the G2 treatment involved 72 hours of soaking whole specimens in PBS with 0.33% concentration of Genipin. 0.33% Genipin in PBS is produced by dilution of 50 ml of 10x PBS (Phosphate Buffered Saline) with distilled water by a factor of 10 to give 500 ml (500 gm) of PBS and mixing in 1.65 grams of genipin to produce the 0.33 % (wt%, gm/gm) solution. Previous testing with pericardium and tendon tissue samples demonstrated the reduction of tissue swelling (osmotic influx of water into the tissue) resulting from crosslinking the tissue. Some controls were not subjected to soaking prior to fatigue testing. Others were soaked in a saline solution for 72 hours. Water mass loss experiments were conducted to establish the equivalency of outer annulus hydration between the genipin soaked and 0.9 % saline soaked controls. The selection of treatments was randomized by spine and level. The vertebral ends of the specimens were then potted in polyurethane to facilitate mechanical testing.

Indentation testing and compression/flexion fatigue cycling were carried out in the sequence presented in Table 1.

Table 1. Experimental protocol

Measurement Sequence	Measurement	Location

WO 03/020031

PCT/US02/27677

1	Stress Relaxation	Center of the Posterior Annulus
2	Hardness	Center of the Posterior Annulus
3000 Compression/Flexion Fatigue Cycles		
3	Stress Relaxation	4 mm Lateral to Center
4	Hardness	Center of the Posterior Annulus
Additional 3000 Compression/Flexion Fatigue Cycles		
5	Stress Relaxation	4 mm Lateral to Center (Opposite Side)
6	Hardness	Center of the Posterior Annulus

At the prescribed points in the loading regimen, indentation testing was used to find viscoelastic properties as follows. Stress relaxation data was gathered by ramp loading the 3 mm diameter hemi-spherical indenter to 10 N and subsequently holding that displacement for 60 s, while recording the resulting decrease in stress, referred to as the stress relaxation. Indentation testing was also utilized to determine elastic-plastic properties by calculating a hardness index (resistance to indentation) from ramp loading data. Prior to recording hardness measurements, the tissue is repeatedly indented 10 times (60 s/cycle, to the displacement at an initial 10 N load).

This test protocol is based on two principles. First, viscoelastic effects asymptotically decrease with repeated loading. Secondly, hardness measurements are sensitive to the loading history of the tissue. However this effect becomes negligible following 10 loading cycles. In order to minimize these effects, viscoelastic data (stress relaxation) was collected from tissue that had not previously been indented. Alternately, elastic-plastic data (hardness) was collected from tissue that had been repeatedly loaded (preconditioned). In this case, repetitive indentation was intended to reduce the undesired effects of the changing viscoelastic properties, namely lack of repeatability, on hardness measurements. These testing procedures were derived from several preliminary experiments on the repeatability of the measurements with variations of loading history and location.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

Following initial indentation testing, the specimen was loaded repetitively in flexion-compression at 200 N for 3000 cycles at a rate of 0.25 Hz. The load was applied perpendicularly to the transverse plane, 40 mm anterior to the mid-point of the specimen in the transverse plane. A second set of indentation testing data is then collected following fatigue cycling. This procedure was followed for two fatigue loading cycles. During all testing, the specimens were wrapped in saline wetted gauze to maintain their moisture content. Fatigue cycling and non-destructive indentation testing were carried out on an MTS 858.02 biaxial, table-top, 10kN capacity servo-hydraulic materials test station (MTS, Eden Prairie, MN), with the MTS Test Star data acquisition system. Several statistical measures were calculated to evaluate the significance of the results. A nested two-way analysis of variance (ANOVA) was utilized to confirm effects due to treatment and number of fatigue cycles. Due to the non-parametric nature of the data, the Mann-Whitney non-parametric rank-sum test was used to assess the null hypotheses that the treatment did not affect: 1) the pre-cycling mechanical parameters of the tissue, or 2) the amount of change (degradation) in elastic-plastic and viscoelastic mechanical parameters due to fatigue loading. The confidence level for statistical significance was set at $p < 0.05$.

Nested two-way ANOVA analysis determined that both viscoelastic (relaxation) and elastic-plastic (hardness) mechanical parameters were independently affected by fatigue cycling and by treatment type. These statistical results are presented in Table 2.

The relaxation test results are presented graphically in Figure 1. There was an initial shift downward of the relaxation curve caused by the crosslinking treatment. This would represent a beneficial effect as higher stress relaxation would be associated with more severely degraded tissue (Lee 1989). The initial pre-fatigue relaxation of the G1 and G2 treatment groups were 26% and 19% less than ($p=0.009$ and $p=0.026$) the pre-fatigue relaxation of the controls respectively. There was also dramatic improvement in fatigue resistance as

WO 03/020031

PCT/US02/27677

demonstrated by the change in relaxation after 6000 non-traumatic loading cycles. The change in relaxation due to 6000 fatigue cycles for the G2 treated discs was less than a third of the change in the controls (p=0.044). However, the lesser concentration of Genepin did not bring about the same improvement in fatigue resistance.

The hardness test results are presented graphically in Figure 2. There is an initial shift upward of the hardness data caused by the G2 crosslinking treatment. This would represent a beneficial effect as loss of hardness would signal a loss of structural integrity in the tissue. The initial pre-fatigue hardness of the G2 treatment group was 17% greater than that of the control group (p=0.026). However this beneficial effect appears to have eroded prior to 3000 fatigue cycles and the change in hardness between 3000 and 6000 cycles is essentially the same for the two groups (G2= -0.94, Control= -1.01).

Table 2. Results of nested two-way ANOVA analysis

Material Property	Factor	F-Value	Probability
Stress Relaxation	Treatment	16.060	1.085E-06
	Fatigue Cycling	9.676	2.500E-03
	Interaction	1.402	2.515E-01
Hardness	Treatment	20.023	6.405E-08
	Fatigue Cycling	5.898	1.710E-02
	Interaction	4.228	1.760E-02

The data presented above quantifies the elastic and viscoelastic mechanical degradation of intervertebral disc tissue due to repetitive, non-traumatic loading. The results of these experiments establish that non-toxic crosslinking reagents reduce the fatigue-related degradation of material properties in a collagenous tissue -- namely the intervertebral disc. More than a three-fold reduction in viscoelastic degradation was brought about by soaking the calf disc tissue in 0.33 g/mol concentration of genipin. The tested formulation was unable to

WO 03/020031

PCT/US02/27677

sustain an improvement in the elastic mechanical properties (hardness) to 3000 test cycles.

5 Accurately estimating the length of time it would take an average person to experience a comparable amount of wear and tear on their spinal discs is difficult. Certainly, in addition to the mechanical degradation imposed by the described testing, there is the added -- "natural" -- degradation of these dead tissues due to the testing environment. The non-loaded controls showed this "natural" degradation of material properties to be insignificant. Measures were taken to minimize this natural degradation by keeping the specimens moist throughout the testing and by accelerating the loading frequency. At the same time, loading frequency was kept within physiologic limits to prevent tissue overheating. It should be noted that these measures constitute standard protocol for in vitro mechanical testing of cadaveric tissues. Assuming that a person experiences 2 to 20 upright, forward flexion bends per day, these data roughly correspond to several months to several years of physiologic mechanical degradation.

10 The described treatment could be repeated at the time periods represented by, for instance, 3000 fatigue cycles at this load magnitude. Using the assumption identified above, this number of cycles may be estimated to correspond to approximately 1 year for some individuals. Therefore, with either a single treatment or with repeated injections/treatments, an individual may be able to minimize mechanical degradation of their intervertebral discs over an extended period of time. Another option would involve a time-release delivery system such as a directly applied treated patch, a gel or ointment.

15 The invention has been described in terms of certain preferred and alternate embodiments which are representative of only some of the various ways in which the basic concepts of the invention may be implemented. Certain modification or variations on the implementation of the inventive concepts which may occur to those of ordinary skill in the art are within the scope of the invention and equivalents, as defined by the accompanying claims.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

List of References

- Adams, MA, Green, TP, Dolan, P, The strength in anterior bending of lumbar intervertebral discs, *Spine*, 19:2197-2203, 1994.
- 5 Adams, MA, Hutton, WC, Prolapsed intervertebral disc - a hyperflexion injury, *Spine*, 7:184-191, 1982.
- Bank, RA, Bayliss, MT, Lafeber, FPIG, Maroudas, A, Tekoppele, JM, Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage: The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage, *Biochem. J.*, 330:345-351, 1998.
- 10 Biering-Sorensen, F, A prospective study of low back pain in a general population. I. Occurrence, recurrence and aetiology, *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine*, 15:71-79, 1983.
- Buckwalter, JA, Aging and degeneration of the human intervertebral disc, *Spine*, 15 20:1307-1314, 1995.
- Buckwalter, JA, Woo, SL-Y, Goldberg, VM, Hadley, EC, Booth, F, Oegema, TR, Eyre, DR, Current concepts review. Soft-tissue aging and musculoskeletal function, *Journal Bone Joint Surgery*, 75A:1533-1548, 1993.
- Burgeson, RE, Nimmi, ME, Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. [Review], *Clinical Orthopaedics & Related Research*, (282):250-72, 1992
- 20 Chachra, D, Gratzner, PF, Pereira, CA, Lee, JM, Effect of applied uniaxial stress on rate and mechanical effects of cross-linking in tissue-derived biomaterials, *Biomaterials*, 17:1865-75, 1996
- Chen, AC, Temple, MM, Ng, DM, Richardson, CD, DeGroot, J, Verzijl, N, teKoppele, JM, Sah, RL, Age-related cross linking alters tensile properties of articular cartilage, *Orthopaedic Research Society Transactions*, 26:0128, 2001.
- 25 Deutman, R, The case for chemonucleolysis in discogenic sciatica. A review., *Acta Orthopaedica Scandinavia*, 63:571-575, 1992.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

- Duance, VC, Crean, JKG, Sims, TJ, Avery, N, Smith, S, Menage, J, Eisenstein, SM, Roberts, S, Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis, *Spine*, 23:2545-2551, 1998.
- 5 Eyre DR, Dickson IR, VanNess K, Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage, *Biochem J*, 252:495-500, 1988.
- Farfan, HF, Huberdeau, RM, Dubow, HI, Lumbar intervertebral disc degeneration, *J Bone Jt Surg.*, 54A:492-510, 1972.
- Frymoyer, JW, Pope, MH, Clements, JH, Wilder, DG, MacPherson, B, Ashikaga, T, Risk factors in low-back pain, *Journal Bone and Joint Surgery*, 65A:213-218, 1983.
- 10 Glazier, R, Fry, J, Badley, E, Arthritis and rheumatism are neglected health priorities: A bibliometric study, *Journal of Rheumatology*, 28:706-711, 2001.
- Goel, VK, Monroe, BT, Gilbertson, LG, Brinckmann, P, Interlaminar shear stresses and laminae separation in a disc, *Spine*, 20:689-698, 1995.
- Green, TP, Adams, MA, Dolan, P, Tensile properties of the annulus fibrosus. II. Ultimate tensile strength and fatigue life, *European Spine Journal*, 2:209-214, 1993.
- 15 Hedman, TP, Fernie, GR, Mechanical response of the lumbar spine to seated postural loads, *Spine*, 22:734-743, 1997.
- Hedman, TP, Liao, WL, Yu, J, Watkins, R, Liker, M, Strength reduction of the posterior intervertebral disc resulting from repetitive sub-failure loading, *Orthopaedic Research Society Transactions*, 24:1017, 1999.
- 20 Hedman, TP, Use of non-destructive materials testing techniques to assess the degradation of intervertebral discs subjected to non-traumatic repetitive loads, *Presented at the USC/GOS Annual Meeting, Los Angeles, California, June 22-23, 2000.*
- Hirsch, C, Schajowicz, F, Studies on structural changes in the lumbar annulus fibrosus, 25 *Acta Orthop. Scand.*, 22:184-231, 1953.
- Kelsey, JL, An epidemiological study of acute herniated lumbar discs, *Rheumatology and Rehabilitation*, 14:144-159, 1975.
- Kerin, A, Hung, G, Verzijl, N, DeGroot, J, TeKoppele, J, Grodzinsky, A, The effect of non-enzymatic glycation on mechanical properties of articular cartilage, *Orthopaedic Research Society Transactions*, 26:0130, 2001.
- 30

WO 03/020031

PCT/US02/27677

- Klein, BP, Jensen, RC, Sanderson, LM, Assessment of workers' compensation claims for back strains/sprains, *J Occup Med*, 26:443-448, 1984.
- Lee, JM, Haberer, SA, Boughner, DR, The bovine pericardial xenograft: I. Effect of fixation in aldehydes without constraint on the tensile viscoelastic properties of bovine pericardium, *Journal of Biomedical Materials Research*, 23:457-475, 1989.
- 5 Magora, A, Investigation of the relation between low back pain and occupation: sitting, standing and weight lifting, *Industrial Medicine*, 41:5-9, 1972.
- Osborne, CS, Barbenel, JC, Smith, D, Savakis, M, Grant, MH, Investigation into the tensile properties of collagen/chondroitin-6-sulphate gels: the effect of crosslinking agents and diamines, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 36:129-134, 1998.
- 10 Osti, OL, Vernon-Roberts, B, Moore, R, Fraser, RD, Annular tears and disc degeneration in the lumbar spine: a post-mortem study of 135 discs, *J. Bone Jt Surg.*, 74B:678-682, 1992.
- Panjabi, MM, Yoldas, E, Oxland, TR, Crisco, JJ, Subfailure injury of the rabbit anterior cruciate ligament, *J. Orthop. Res.*, 14:216-222, 1996.
- 15 Pokharna, HK, Phillips, FM, Collagen crosslinks in human lumbar intervertebral disc aging, *Spine*, 23(15):1645-1648, 1998.
- Sung, HW, Chang, Y, Chiu, CT, Chen, CN, Liang, HC, Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent, *Journal Biomed. Materials Res.*, 47:116-126, 1999.
- 20 Sung, HW, Huang, RN, Huang, LL, Tsai, CC, In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10:63-78, 1999.
- Videman, T, Nurminen, M, Troup, JDG, Lumbar spinal pathology in cadaveric material in relation to history of back pain, occupation, and physical loading, *Spine*, 15:728-738, 1990.
- 25 Waddell, G, Low back pain: A twentieth century health care enigma, *Spine*, 21:2820-2825, 1996.
- Wang, XD, Masilamani, NS, Mabrey, JD, Alder, ME, Agrawal, CM, Changes in the fracture toughness of bone may not be reflected in its mineral density, porosity, and tensile properties, *Bone*, 23:67-72, 1998.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

Zeeman, R, Dijkstra, PJ, van Wachem, PB, van Luyn, MJ, Hendriks, M, Cahalan, PT, Feijen, J, Crosslinking and modification of dermal sheep collagen using 1, 4-butanediol diglycidyl ether, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46(3):424-33, 1999

5

WO 03/020031

PCT/US02/27677

I CLAIM:

1. A method of improving the resistance of collagenous tissue to mechanical degradation comprising the steps of:
contacting at least a portion of a collagenous tissue with an effective amount
5 of a crosslinking reagent.
2. The method of claim 1, wherein the crosslinking reagent includes genipin.
3. The method of claim 1, wherein the crosslinking reagent includes
10 proanthrocyanidin.
4. The method of claim 1, wherein the crosslinking reagent includes a crosslinking agent in a carrier medium.
- 15 5. The method of claim 4, wherein the crosslinking agent is selected from the group consisting of genipin and proanthrocyanidin and the carrier medium is a buffered saline solution.
6. The method of claim 4, wherein the crosslinking agent is genipin, the
20 carrier medium is a buffered saline solution, and a concentration of the genipin in the buffered saline solution is greater than 0.033%.
7. The method of claim 1, wherein the collagenous tissue is an
intervertebral disc.
25
8. The method of claim 1, wherein the collagenous tissue is articular cartilage.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

9. The method of claim 1, wherein the contact between the collagenous
30 tissue and the crosslinking reagent is effected by injections directly into the portion
of the collagenous tissue with a needle.

10. The method of claim 1, wherein the contact between the collagenous
tissue and the crosslinking reagent is effected by placement of a time-release
35 delivery system directly into or onto the portion of the collagenous tissue.

11. The method of claim 10, wherein the time-release delivery system is a
gel or ointment.

40 12. The method of claim 10, wherein the time-release delivery system is a
treated membrane or patch.

13. The method of claim 10, wherein the time-release delivery system is a
treated patch.

45 14. The method of claim 1, wherein the contact between the collagenous
tissue and the crosslinking reagent is effected by soaking.

15. The method of claim 1, further comprising the step of:
50 periodically re-contacting the portion of the collagenous tissue with an
effective amount of a crosslinking reagent.

16. A crosslinking reagent comprising a crosslinking agent dissolved in a
carrier medium wherein the crosslinking agent is present in an amount effective to
55 improve the fatigue resistance of a portion of a collagenous tissue and wherein the
crosslinking agent and the carrier medium are substantially non-cytotoxic.

WO 03/020031

PCT/US02/27677

17. The crosslinking reagent according to claim 16, wherein the crosslinking agent is selected from the group consisting of genipin and
60 proanthocyanidin.
18. A method of improving the resistance of collagenous tissue to mechanical degradation comprising the steps of:
preparing a crosslinking reagent by dissolving a crosslinking agent in a
65 carrier medium; and
contacting at least a portion of a collagenous tissue with an effective amount of the crosslinking reagent .
19. The method of claim 18, wherein the contact between the collagenous
70 tissue and the crosslinking reagent is effected by injections directly into the portion of the collagenous tissue with a needle.
20. The method of claim 18, wherein the contact between the collagenous tissue and the crosslinking reagent is effected by placement of a time-release
75 delivery system directly into or onto the portion of the collagenous tissue.
21. The method of claim 18, wherein the contact between the collagenous tissue and the crosslinking reagent is effected by soaking.
- 80 22. The method of claim 18, wherein the contact between the collagenous tissue and the crosslinking reagent is effected by spraying.
23. The method of claim 1, further comprising the step of:
periodically re-contacting the portion of the collagenous tissue with an
85 effective amount of a crosslinking reagent.

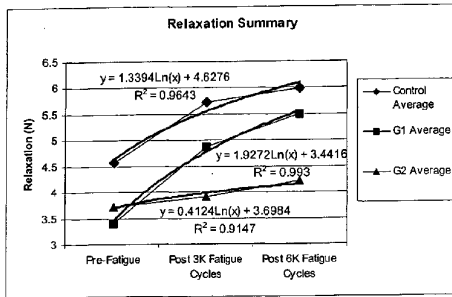


FIGURE 1

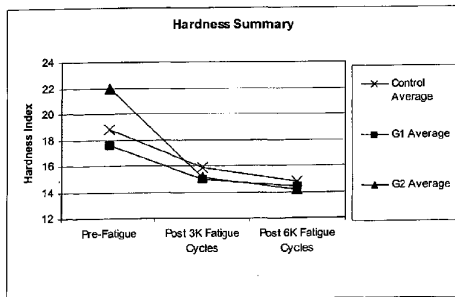


FIGURE 2

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/27677
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 43/04; A61K 31/70 US CL : 514/27 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/27 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, CAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,270,446 A (KYOGOKU et al) 14 December 1993 (14.12.1993), column 2, lines 16-40, claim 1, see entire document.	1, 2, 17
Y	WO 98/19718 A1 (CHALLENGE BIOPRODUCTS CO. LTD.) 14 May 1998 (14.05.1998), see entire document, page 3, lines 5-12; page 4, lines 25-30; page 6, line 5-33; claims 1-3 and 5-8.	1, 2, 17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later documents published after the international filing date or priority date and not to conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 September 2002 (27.09.2002)	Date of mailing of the international search report 24 DEC 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. 703/305-3230	Authorized officer Chandrababu Krishnan Valery Bell-Harris for Telephone No. 703-308-1235	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
C 0 7 D 311/02	C 0 7 D 311/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 ヘッドマン, トーマス ピー .

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 1 3 8 1 , スティーブンソン ランチ, フロスト レーン
2 5 6 6 5

F ターム(参考) 4C062 KK03

4C076 AA06 AA08 AA11 AA24 AA71 BB15 BB31 CC26

4C086 AA01 AA02 BA08 FA02 MA01 MA04 MA16 MA28 MA63 MA66

NA14 ZA94