(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5683587号
(P5683587)

(45)発行日　平成27年3月11日(2015.3.11)　(24)登録日　平成27年1月23日(2015.1.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C08B 37/08	(2006.01)	C08B	37/08	Z
A61K 47/36	(2006.01)	A61K	47/36	
A61K 35/12	(2015.01)	A61K	35/12	
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00	101

請求項の数 49　(全 77 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-522921 (P2012-522921)
(86)(22)出願日　平成22年7月23日(2010.7.23)
(65)公表番号　特表2013-501091 (P2013-501091A)
(43)公表日　平成25年1月10日(2013.1.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/043108
(87)国際公開番号　WO2011/014432
(87)国際公開日　平成23年2月3日(2011.2.3)
審査請求日　平成25年5月14日(2013.5.14)
(31)優先権主張番号　61/311,953
(32)優先日　平成22年3月9日(2010.3.9)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/230,074
(32)優先日　平成21年7月30日(2009.7.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　512023339
カービラン　バイオサージェリー,　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０４,　パロ　アルト,　ポーター　ドライブ　３１８１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】修飾ヒアルロン酸ポリマー組成物および関連する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒアルロン酸であって、そのヒドロキシル基の１～１０％が、ジビニルスルホンとの反応によって誘導体化されている、ヒアルロン酸（「（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）１～１０％ヒアルロン酸」）と、２個～８個のチオール基を有するチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲル。
【請求項２】
前記ヒアルロン酸が、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％および１０％から選択される、ヒドロキシル基から２－（ビニルスルホニル）エトキシ基への変換の度合いを有する、請求項１に記載のヒドロゲル。
【請求項３】
前記ヒアルロン酸が、二糖反復単位１個当たり４～５％の、ヒドロキシル基から２－（ビニルスルホニル）エトキシ基への変換の度合いを有する、請求項２に記載のヒドロゲル。
【請求項４】
前記ヒアルロン酸が、７００ダルトン～３百万ダルトンの平均分子量を有する、請求項１から３のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項５】
前記チオール架橋剤が、２、３、４、５、６、７および８個から選択されるいくつかのチオール基を有する、請求項１から４のいずれか一項に記載のヒドロゲル。

【請求項６】
前記チオール架橋剤が、チオール官能化ポリエチレングリコールである、請求項５に記載のヒドロゲル。
【請求項７】
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、２５０～２０，０００ダルトンの分子量を有する、請求項６に記載のヒドロゲル。
【請求項８】
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、ポリエチレングリコールジチオール（ＰＥＧジチオール）である、請求項７に記載のヒドロゲル。
【請求項９】
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、グリセロール、３，３’－オキシジプロパン－１，２－ジオール、トリメチロールプロパン、ソルビトール、ペンタエリスリトール、およびヘキサグリセロールから選択されるポリオール核を有する、請求項６に記載のヒドロゲル。
【請求項１０】
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、４個の腕を有し、ペンタエリスリトール核を有する、請求項９に記載のヒドロゲル。
【請求項１１】
１０％未満の未反応チオールおよび１０％未満の未反応ビニルスルホン基を含む、請求項１から１０のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項１２】
水に対して０．５～５．０パーセントの範囲の重量（ｗｔ／ｗｔ）パーセンテージのポリマーを含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項１３】
生物活性剤を含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項１４】
ヒアルロン酸水溶液中に、請求項１から１２のいずれか一項に記載のヒドロゲルの粒子を含む組成物。
【請求項１５】
前記ヒドロゲル粒子が、０．１０～３．０ミリメートルの範囲の大きさを有する、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
水性スラリーの形態での、請求項１４または１５に記載の組成物。
【請求項１７】
前記水溶液が生理食塩水である、請求項１４から１６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８】
滅菌された、請求項１４から１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９】
生物活性剤をさらに含む、請求項１４から１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０】
前記生物活性剤がコルチコステロイドである、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記コルチコステロイドがトリアムシノロンの薬学的に許容される塩である、請求項２０に記載の組成物。
【請求項２２】
前記コルチコステロイドがトリアムシノロンアセトニドである、請求項２１に記載の組成物。
【請求項２３】
生細胞を含む、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２４】

シリンジにパッケージされた、請求項１４から２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５】
シリンジにパッケージされた、請求項１から１３のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
【請求項２６】
２１ゲージ針を介して押し出すことができる、請求項２４に記載の組成物または請求項２５に記載のヒドロゲル。
【請求項２７】
被験体の関節の関節内空間に投与するための、請求項１から１３のいずれか一項に記載のヒドロゲルを含む組成物。
【請求項２８】
被験体の関節の関節内空間に投与するための、請求項１４から２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９】
急性または慢性炎症を治療するための、請求項２７または請求項２８に記載の組成物。
【請求項３０】
前記急性または慢性炎症が、変形性関節症、関節リウマチ、他の炎症性関節炎、および反復使用に関連する、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
哺乳動物被験体の骨、歯、神経、軟骨、血管、軟組織または他の組織の上またはそれらの中に注射または移植するための、請求項１から１３のいずれか一項に記載のヒドロゲルを含む組成物。
【請求項３２】
哺乳動物被験体の骨、歯、神経、軟骨、血管、軟組織または他の組織の上またはそれらの中に注射または移植するための、請求項１４から２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３】
ヒアルロン酸をモル過剰のジビニルスルホンと、周囲温度で、３分未満の期間反応させて、該ヒアルロン酸の二糖反復単位上の１％～１０％のヒドロキシル基をジビニルスルホンと反応させるステップを含む、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸を調製する方法。
【請求項３４】
前記反応ステップが、水性塩基中で実施される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記反応ステップが、２０℃～２５℃の温度で実施される、請求項３３または３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記反応ステップが、１０秒～１２０秒間実施される、請求項３３から３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記水性塩基が、水酸化ナトリウム水溶液および水酸化カリウム水溶液から選択される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３８】
酸を添加することによって前記反応をクエンチするステップをさらに含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３９】
請求項３３～３８のいずれか一項に記載の方法により調製される（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸。
【請求項４０】
２個～８個のチオール基を有する架橋剤との反応によって軽度に架橋されたヒドロゲルを調製するための、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸の使用。

【請求項４１】
水溶液中、２０℃～４５℃の範囲の温度で、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1}$～１０％ヒアルロン酸を、２個～８個のチオール基を有するチオール架橋剤と反応させるステップを含む、軽度に架橋されたヒドロゲルを調製する方法。
【請求項４２】
前記反応させるステップが、生理的ｐＨで実施される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記チオール架橋剤が、前記反応させるステップの前に滅菌される、請求項４１または請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記反応させるステップの後に、得られた混合物が８～３６時間にわたって反応されて、それによりゲルの形成が起こる、請求項４２または請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記反応が、滅菌条件下で実施される、請求項４１～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記水溶液に活性剤を添加するステップをさらに含む、請求項４１～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記活性剤がコルチコステロイドである、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記コルチコステロイドが、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンヘキサセトニド、トリアムシノロンベネトニド、およびトリアムシノロンフレトニドから選択される、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記コルチコステロイドがトリアムシノロンアセトニドである、請求項４７に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
この出願は、２００９年７月３０日に出願された米国仮出願第６１／２３０，０７４号および２０１０年３月９日に出願された米国仮出願第６１／３１１，９５３号（これらの各々の内容は、その全体が参考として本明細書に援用される）への優先権の利益を主張する。
【０００２】
分野
本開示は、一般に、官能基で低レベルに修飾されているヒアルロン酸、かかる軽度に修飾されているヒアルロン酸と適切な二官能性または多官能性反応物との制御された反応によって形成された混合物、ならびに関係するヒドロゲルおよびヒドロゲル前駆体組成物に関する。本明細書に記載の組成物は、軽度に架橋されており、インビボ注射される場合に炎症促進性が低く、例えば、医療機器、生物医学的な接着剤および封止剤として使用することができ、他の使用の中でも生物活性剤（ｂｉｏａｃｔｉｖｅ　ａｇｅｎｔ）の局所送達のために使用することができる。
【背景技術】
【０００３】
背景
ヒアルロン酸は、天然に存在するアニオン性非硫酸化グリコサミノグリカンであり、結合組織、上皮組織および神経組織にわたって広く分布している。平均７０ｋｇ（１５４ポ

ンド）のヒトは、身体に約１５グラムのヒアルロン酸を有し、その３分の１が毎日代謝回転する（分解され、合成される）（非特許文献１）。ヒアルロン酸は、身体の多くの組織に自然に見出され、したがって生体適合性があるため、生物医学的適用に非常に適していると考えられている。実際、ヒアルロン酸（ヒアルロナンとも呼ばれる）、その誘導体化形態、およびそのコンジュゲートを含む多くのポリマー性材料は、注射可能な生体材料、ならびに医療機器および埋込み式材料として使用することができる。適用には、局所部位への治療用分子の送達、組織工学における接着剤または封止剤としての使用、関節内補充薬としての使用、および創傷治癒における使用が含まれる。ヒアルロン酸は、その天然に存在する形態で治療剤として投与され使用される場合、一般に身体から急速に除去され、頻繁な投与が必要となる。ポリマー性ゲルまたはゲル前駆体は、反応化学および反応条件、ゲル化の特徴、ならびに／または１つもしくは複数のインビトロモデルにおける治療効果に関して好ましい特性を示し得ることが多いが、特定の場合、かかる効果はインビボまたは臨床的な設定では有益な特性に置き換わらない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Ｓｔｅｒｎ　Ｒ．　Ｅｕｒ　Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ（２００４年）８３巻（７号）：３１７～２５頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００５】

第１の態様では、ジビニルスルホンとの反応によって、１０％以下の度合いまで修飾されたヒアルロン酸を提供する。具体的には、このヒアルロン酸は、ジビニルスルホンの付加反応によって誘導体化されたヒドロキシル基を１０％以下有する。

【０００６】

特定の一実施形態では、ヒアルロン酸は、２－（ビニルスルホニル）エトキシ基に誘導体化されたヒドロキシル基を１～１０％有する。ジビニルスルホンによって低レベルに活性化されて得られた活性化ヒアルロン酸を、本明細書では一般に（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸または「ＶＳ－ＨＡ」と呼ぶ。

【０００７】

さらに別の実施形態では、ヒアルロン酸は、そのヒドロキシル基が１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％および１０％から選択される度合いまで２－（ビニルスルホニル）エトキシ基に変換されている。

【０００８】

さらにより具体的な実施形態では、ヒアルロン酸は、そのヒドロキシル基が二糖反復単位１個当たり約４～５％の度合いまで２－（ビニルスルホニル）エトキシ基に変換されている。

【０００９】

さらに別の実施形態では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸は、約７００ダルトン～約３百万ダルトンの分子量を有する。

【００１０】

第２の態様では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸と、２つ以上のチオール基を有するチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲルを提供する。

【００１１】

関係する一実施形態では、チオール架橋剤は、２個～約８個のチオール基を有する。さらに別の実施形態では、チオール架橋剤は、２、３、４、５、６、７および８個から選択されるいくつかのチオール基を有する。

【００１２】

第２の態様を対象としたさらに別の実施形態では、チオール架橋剤は、チオール官能化

ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）（すなわちＰＥＧ－チオール）である。

【００１３】

前述のさらなる一実施形態では、ポリエチレングリコールチオールは、約２５０～約２０，０００ダルトンの分子量を有する。

【００１４】

関係する一実施形態では、チオール官能化ポリエチレングリコールは直鎖であり、各末端にチオール基を有し、すなわちポリエチレングリコールジチオール（ＰＥＧジチオール）である。

【００１５】

さらに別の実施形態では、チオール官能化ポリエチレングリコールは、４個の腕を有し、ペンタエリスリトール核（ｃｏｒｅ）を有する。

【００１６】

さらに別の実施形態では、チオール官能化ポリエチレングリコールは、グリセロール、３，３’－オキシジプロパン－１，２－ジオール（グリセロールダイマーともいう）、トリメチロールプロパン、ソルビトール、ペンタエリスリトール、およびヘキサグリセロールから選択されるポリオール核を有する。

【００１７】

さらなる一実施形態では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸とチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲルは、１０パーセント未満の未反応チオール基および１０％未満の未反応ビニルスルホン基を含有する。残りの未反応チオール基の量は、例えばエルマン（Ｅｌｌｍａｎ）の試験を使用して決定することができる。

【００１８】

またさらなる一実施形態では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸とチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲルは、水に対して約０．５～５．０パーセントの重量（ｗｔ／ｗｔ）パーセントのポリマーを含有する。得られたヒドロゲルについて、水に対するポリマーの例示的な重量パーセントは、１つまたは複数の実施形態では、０．５、１．０、１．５、２．０、２．５、３．０、３．５、４．０、４．５および５パーセントから選択される。

【００１９】

さらに別の実施形態では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸とチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲルは、約０．１０～３．０ミリメートルの大きさの粒子の形態である。

【００２０】

さらに別の実施形態では、前述のヒドロゲル粒子は、水性スラリーの形態である。

【００２１】

またさらなる一実施形態では、先の実施形態の任意の１つまたは複数に記載のヒドロゲルは、非修飾ヒアルロン酸の水溶液に分散している。

【００２２】

またさらなるより具体的な一実施形態では、ヒアルロン酸の生理食塩水溶液に架橋ヒドロゲル粒子を含む組成物が提供され、この場合、ヒドロゲル粒子は、ポリエチレングリコールジチオール（ＰＥＧ－ジチオール）と、２－（ビニルスルホニル）エトキシ基で誘導体化されたヒドロキシル基を１～１０％有するヒアルロン酸との反応によって形成される。

【００２３】

またさらなる一実施形態では、先の実施形態の任意の１つまたは複数に記載のヒドロゲルは、生物活性剤を含む。特定の一実施形態では、生物活性剤はコルチコステロイドである。またさらなる特定の一実施形態では、生物活性剤はトリアムシノロンアセトニドである。

【００２４】
さらなる代替の一実施形態では、先の実施形態の任意の１つまたは複数に記載のヒドロゲルは、生細胞を含む。
【００２５】
さらなる一実施形態では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０\%}$ヒアルロン酸と、二官能性またはそれ以上の官能性のチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲルは、ヤギの関節注射モデルにおいて低い炎症促進性を示す。
【００２６】
特定の一実施形態では、ヒドロゲルは、関連の滑液中の白血球の応答によって示される低い炎症促進性を示す。
【００２７】
さらに別の特定の実施形態では、ヒドロゲルは、ヤギの関節注射モデルにおいて、全体的観測採点法によって示される低い炎症促進性を示す。
【００２８】
またさらなる一実施形態では、ヒドロゲルは滅菌されている。
【００２９】
またさらなる一実施形態では、本明細書で提供されるヒドロゲルは、シリンジにパッケージされている。
【００３０】
またさらなる一実施形態では、本明細書に記載のヒドロゲル組成物のいずれかを、被験体の関節の関節内空間に投与する方法を提供する。
【００３１】
さらに第３の態様では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０\%}$ヒアルロン酸を調製する方法を提供する。この方法は、ヒアルロン酸の二糖反復単位に対して約１０％以下のヒドロキシル基をジビニルスルホンと反応させて（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０\%}$ヒアルロン酸を形成するのに有効な反応条件下で、ヒアルロン酸をジビニルスルホンと反応させるステップを含む。
【００３２】
関係する一実施形態では、反応は、ヒアルロン酸をモル過剰のジビニルスルホンと反応させるステップを含む。
【００３３】
さらなる一実施形態では、反応ステップは、周囲条件で実施される。
【００３４】
さらに別の実施形態では、反応ステップは、周囲条件で１０秒～約１２０秒間実施される。
【００３５】
さらに別の実施形態では、反応ステップは、水性塩基中で実施される。
【００３６】
さらなる一実施形態では、この方法は、酸を添加することによって反応をクエンチするステップをさらに含む。関係する一実施形態では、十分な酸を添加して、約４～６．５の範囲のｐＨに調節する。
【００３７】
本明細書の第４の態様では、ヒドロゲルの調製方法を記載する。この方法は、架橋ヒドロゲルを形成するのに有効な反応条件下で、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０\%}$ヒアルロン酸を、２つ以上のチオール基を有するチオール架橋剤と反応させるステップを含む。適切なチオール架橋剤には、チオール官能化ポリエチレングリコール、アルカン－ジチオール等が含まれる。
【００３８】
関係する一実施形態では、反応は、生理的ｐＨで実施される。
【００３９】

さらに別の実施形態では、反応は、重合開始剤なしに実施される。

【００４０】

さらに別の実施形態では、反応は、外部エネルギー供給源の適用なしに実施される。

【００４１】

さらに別の実施形態では、反応は、２０℃～４５℃の温度で実施される。

【００４２】

またさらなる一実施形態では、ヒドロゲルは、１０％以下の未反応ビニルスルホン基またはチオール基を含む。好ましくは、ヒドロゲルは、５％以下の未反応ビニルスルホン基またはチオール基を含む。特定の一実施形態では、ヒドロゲルは、検出可能な未反応ビニルスルホン基またはチオール基を本質的に含まない。

【００４３】

第５の態様では、シリンジを含むキットを提供し、このシリンジは、前述の通り（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０％}$ヒアルロン酸とチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲルを含む。

【００４４】

関係するさらに別の実施形態では、シリンジは、非修飾ヒアルロン酸の水溶液に分散している、先の実施形態の任意の１つまたは複数に記載のヒドロゲルを含む。関係する一実施形態では、水溶液は生理食塩水である。

【００４５】

関係する一実施形態では、シリンジは、１８～２１ゲージ針を使用してヒドロゲルを関節内注射するのに適した形態である。

【００４６】

関係するさらに別の実施形態では、シリンジは、生物活性剤をさらに含む、先の実施形態の任意の１つまたは複数に記載のヒドロゲルを含む。関係する一実施形態では、生物活性剤は、ステロイド、成長因子、抗増殖剤、および抗生物質からなる群から選択される。さらにより具体的な実施形態では、ヒドロゲルは、約０．０１重量％～約２０重量％の生物活性剤を含むが、これは当然のことながらその生物活性剤の効力に依存して決まる。すなわち強力でない薬剤は、一般に先の範囲の最高値に近い、例えば約１０～２０重量％でヒドロゲルに含まれ、強力な生物活性剤は、先の範囲の最低値に近い、例えば約０．０１～３重量％で含有されることになる。生物活性剤がトリアムシノロンアセトニドである特定の一実施形態では、ヒドロゲルは約０．１～１重量％の生物活性剤を含む。

【００４７】

さらに別の実施形態では、シリンジは、生細胞をさらに含む、先の実施形態の任意の１つまたは複数に記載のヒドロゲルを含む。例示的な生細胞には、幹細胞、実質（ｐａｒｅｎｃｈｉｍａｌ）幹細胞、血液由来の細胞、および骨髄細胞が含まれる。

【００４８】

第６の態様では、ヒドロゲルに分散している水溶性の低い生物活性剤を含む本明細書に記載のヒドロゲルを投与することによって、水溶性の低い生物活性剤を送達する方法を提供する。

【００４９】

第７の態様では、本明細書に記載の任意の１つまたは複数の態様または実施形態に従って、ヒドロゲルを対象の膝などの関節の関節内空間に注射することによって、変形性関節症、関節リウマチ、他の炎症性関節炎、および反復使用に関連する急性および慢性炎症を治療する方法を記載する。特定の一実施形態では、すなわちヒドロゲルがそれに組み込まれたコルチコステロイドを含む場合、その方法は、ヤギの関節注射モデルにおいて注射後２８日目の総Ｍａｎｋｉｎスコアによって特徴付けられる通り、ヒドロゲルに封入されない当量のコルチコステロイドの投与時に生じる軟骨損傷よりも、軟骨への損傷を低減するのに有効である。関係する一実施形態では、先の方法、すなわち関節の関節内空間へのヒドロゲルの注射は、対象となるヒドロゲルの注射の前に対象が経験していた疼痛と比較して、ある度合いの疼痛緩和を対象にもたらすのに有効である。一般に、疼痛緩和の開始は

、注射後約１時間～約１週間以内、より好ましくは注射後約１時間～約３日以内に対象によって経験される。すなわち疼痛緩和の開始は、一般に、注射後約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３もしくは２４時間以内に始まり、または最初の２４時間以内に始まらない場合には、注射後１、２、３、４、５、６もしくは７日以内に始まる。一般に、疼痛緩和の期間は約３～９カ月、すなわち３、４、５、６、７、８、９カ月間、またはそれ以上継続すると予測される。

【００５０】

第８の態様では、対象への投与の前、または投与時にコルチコステロイドを架橋ヒドロゲルに組み込むことによって、変形性関節症に罹患している被験体の関節の関節内空間へのコルチコステロイドの投与時に、軟骨への損傷を低減する方法を提供する。架橋ヒドロゲルは一般に、以下にさらに詳説のヒアルロン酸系ヒドロゲルである。例示的な架橋ヒドロゲルは、ジビニルスルホンと反応させ、その後２つ以上のチオール基を有するチオール架橋剤によって架橋することによって、１０％以下の度合いまで修飾されたヒアルロン酸であるヒドロゲルである。驚くべきことに、コルチコステロイドを架橋ヒドロゲルに組み込むことによって、ヒドロゲルに組み込まれない当用量のコルチコステロイドの投与時に生じるよりも、軟骨への損傷が低減される。

【００５１】

治療有効量のコルチコステロイドを被験体の関節の関節内空間に投与することによって変形性関節症を治療する方法における、前述に関係する本明細書の第９の態様では、コルチコステロイドを含む架橋ヒドロゲル組成物の形態でコルチコステロイドを投与するステップを含むことにより、ヒドロゲルに組み込まれない当量のコルチコステロイドの投与と比較して、軟骨への損傷が低減されるという改善を提供する。

【００５２】

第７、８および９の態様に関係する特定の一実施形態では、コルチコステロイドは、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバル酸チキソコルトール、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンベネトニド（ｂｅｎｅｔｏｎｉｄｅ）、トリアムシノロンフレトニド（ｆｕｒｅｔｏｎｉｄｅ）、トリアムシノロンヘキサセトニド、二酢酸トリアムシノロンなどのトリアムシノロン塩、トリアムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ハルシノニド、ベタメタゾン、リン酸ベタメタゾンナトリウム、デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、フルオコルトロン、ヒドロコルチゾン－１７－酪酸エステル、ヒドロコルチゾン－１７－吉草酸エステル、ジプロピオン酸アクロメタゾン（ａｃｌｏｍｅｔａｓｏｎｅ）、吉草酸ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、プレドニカルベート、クロベタゾン－１７－酪酸エステル、クロベタゾール－１７－プロピオン酸エステル、カプロン酸フルオコルトロン、ピバル酸フルオコルトロン、酢酸フルプレドニデン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン一水和物、フルニソリド、プロピオン酸フルチカゾン、フロ酸モメタゾン一水和物、およびフロ酸フルチカゾンからなる群から選択される。

【００５３】

さらにより具体的な一実施形態では、コルチコステロイドはトリアムシノロンアセトニドである。

【００５４】

第１０の態様では、本明細書に記載のヒドロゲルの３次元構造内に封入されたステロイドなどの水溶性の低い薬物を含む製剤を提供し、その後かかる製剤を関節の関節内空間に注射する。

【００５５】

前述に関係する一実施形態では、ヒドロゲルへのステロイド粒子の捕捉は、ステロイド粒子の大部分と関節組織との直接的な接触を予防するのに有効である。

【００５６】

関係するさらに別の実施形態では、ヒドロゲルへのステロイド粒子の捕捉は、関節内の局所的なステロイド濃度を最大限にすると同時に、その全身濃度を最小限に抑えるのに有効である。

【００５７】

またさらなる一実施形態では、ヒドロゲルへのステロイド粒子の封入は、ステロイド粒子が関節から早期にクリアランスされるのを保護するのに有効である。

【００５８】

またさらなる一実施形態では、ヒドロゲルにステロイドを封入することによって、ヒドロゲルへの封入なしに得られるよりも低い総用量でステロイドの治療効率が得られると同時に、望ましくない局所性および全身性副作用が最小限に抑えられる。

【００５９】

関係する一態様では、本明細書に記載のヒドロゲルを、哺乳動物被験体の骨、歯、神経、軟骨、血管、軟組織または他の組織の上またはそれらの中に注射または移植するために使用することを提供する。

【００６０】

組成物、方法、キット等のさらなる実施形態は、以下の説明、実施例および特許請求の範囲から明らかとなろう。先および以下の説明から明らかになる通り、本明細書に記載のそれぞれすべての特徴、ならびにかかる特徴の２つ以上のそれぞれすべての組合せは本開示の範囲に含まれ、ただしかかる組合せに含まれる特徴は、互いに矛盾しないものとする。さらに、任意の特徴または特徴の組合せは、本発明の任意の実施形態から具体的に排除することができる。本発明のさらなる態様および利点を、特に添付の実施例および図と共に考慮しながら以下の説明に記載する。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

（項目１）

ヒアルロン酸であって、そのヒドロキシル基の１０％以下が、ジビニルスルホンとの反応によって誘導体化されている、ヒアルロン酸。

（項目２）

２－（ビニルスルホニル）エトキシ基に誘導体化されたヒドロキシル基を１～１０％有する、項目１に記載のヒアルロン酸（「（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10}$％ヒアルロン酸」）。

（項目３）

ヒドロキシル基が、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％および１０％から選択される度合いまで２－（ビニルスルホニル）エトキシ基に変換されている、項目２に記載のヒアルロン酸。

（項目４）

ヒドロキシル基が二糖反復単位１個当たり約４～５％の度合いまで２－（ビニルスルホニル）エトキシ基に変換されている、項目２に記載のヒアルロン酸。

（項目５）

約７００ダルトン～約３百万ダルトンの平均分子量を有する、項目１から４のいずれか一項に記載のヒアルロン酸。

（項目６）

項目１から５のいずれか一項に記載のヒアルロン酸と、２つ以上のチオール基を有するチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲル。

（項目７）

前記チオール架橋剤が２個～８個のチオール基を有する、項目６に記載のヒドロゲル。

（項目８）

前記チオール架橋剤が、２、３、４、５、６、７および８個から選択されるいくつかのチオール基を有する、項目６に記載のヒドロゲル。

（項目９）

前記チオール架橋剤が、チオール官能化ポリエチレングリコールである、項目６に記載

のヒドロゲル。
（項目１０）
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、約２５０～約２０，０００ダルトンの分子量を有する、項目９に記載のヒドロゲル。
（項目１１）
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、ポリエチレングリコールジチオール（ＰＥＧジチオール）である、項目１０に記載のヒドロゲル。
（項目１２）
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、グリセロール、グリセロールダイマー（３，３’－オキシジプロパン－１，２－ジオール）トリメチロールプロパン、ソルビトール、ペンタエリスリトール、およびヘキサグリセロールから選択されるポリオール核を有する、項目９に記載のヒドロゲル。
（項目１３）
前記チオール官能化ポリエチレングリコールが、４個の腕を有し、ペンタエリスリトール核を有する、項目１２に記載のヒドロゲル。
（項目１４）
１０％未満の未反応チオールおよび１０％未満の未反応ビニルスルホン基を含む、項目６から１３のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
（項目１５）
水に対して約０．５～５．０パーセントの範囲の重量（ｗｔ／ｗｔ）パーセンテージのポリマーを含む、項目６から１４のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
（項目１６）
生物活性剤を含む、項目６から１５のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
（項目１７）
ヒアルロン酸水溶液中に、項目６から１５のいずれか一項に記載のヒドロゲルの粒子を含む組成物。
（項目１８）
前記ヒドロゲル粒子が、約０．１０～３．０ミリメートルの範囲の大きさを有する、項目１７に記載の組成物。
（項目１９）
水性スラリーの形態での、項目１７または１８に記載の組成物。
（項目２０）
前記水溶液が生理食塩水である、項目１７から１９のいずれか一項に記載の組成物。
（項目２１）
滅菌された、項目１７から２０のいずれか一項に記載の組成物。
（項目２２）
生物活性剤をさらに含む、項目１７から２１のいずれか一項に記載の組成物。
（項目２３）
前記生物活性剤がコルチコステロイドである、項目２２に記載の組成物。
（項目２４）
前記コルチコステロイドがトリアムシノロンアセトニドである、項目２３に記載の組成物。
（項目２５）
生細胞を含む、項目２２に記載の組成物。
（項目２６）
シリンジにパッケージされた、項目１７から２５のいずれか一項に記載の組成物。
（項目２７）
シリンジにパッケージされた、項目６から１６のいずれか一項に記載のヒドロゲル。
（項目２８）
２１ゲージ針を介して押し出すことができる、項目２６に記載の組成物または項目２７

に記載のヒドロゲル。
（項目２９）
被験体の関節の関節内空間に投与するための、項目６から１６のいずれか一項に記載のヒドロゲルの使用。
（項目３０）
被験体の関節の関節内空間に投与するための、項目１７から２５のいずれか一項に記載の組成物の使用。
（項目３１）
急性または慢性炎症を治療するための、項目２９または項目３０に記載の使用。
（項目３２）
前記急性または慢性炎症が、変形性関節症、関節リウマチ、他の炎症性関節炎、および反復使用に関連する、項目３１に記載の使用。
（項目３３）
哺乳動物被験体の骨、歯、神経、軟骨、血管、軟組織または他の組織の上またはそれらの中に注射または移植するための、項目６から１６のいずれか一項に記載のヒドロゲルの使用。
（項目３４）
哺乳動物被験体の骨、歯、神経、軟骨、血管、軟組織または他の組織の上またはそれらの中に注射または移植するための、項目１７から２５のいずれか一項に記載の組成物の使用。
（項目３５）
ヒアルロン酸の二糖反復単位に対して約１０％以下のヒドロキシル基をジビニルスルホンと反応させて（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸を形成するのに有効な反応条件下で、ヒアルロン酸をジビニルスルホンと反応させるステップを含む、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸を調製する方法。
（項目３６）
ヒアルロン酸をモル過剰のジビニルスルホンと反応させるステップを含む、項目３５に記載の方法。
（項目３７）
前記反応ステップが、周囲条件で実施される、項目３５または項目３６に記載の方法。
（項目３８）
前記反応ステップが、１０秒～約１２０秒間実施される、項目３５から３７のいずれか一項に記載の方法。
（項目３９）
前記反応ステップが、水性塩基中で実施される、項目３５から３８のいずれか一項に記載の方法。
（項目４０）
酸を添加することによって前記反応をクエンチするステップをさらに含む、項目３９に記載の方法。
（項目４１）
架橋ヒドロゲルを形成するのに有効な反応条件下で、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1\sim10\%}$ヒアルロン酸を、２つ以上のチオール基を有するチオール架橋剤と反応させるステップを含む、項目６から１３のいずれか一項に記載のヒドロゲルを調製する方法。
（項目４２）
前記反応が、生理的ｐＨで実施される、項目４１に記載の方法。
（項目４３）
前記反応が、重合開始剤なしに実施される、項目４１または項目４２に記載の方法。
（項目４４）
前記反応が、外部エネルギー供給源の適用なしに実施される、項目４３に記載の方法。

（項目４５）
前記反応が、２０℃～４５℃の範囲の温度で実施される、項目４４に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【００６１】

【図１】図１は、実施例１に記載の通り調製したビニルスルホン修飾ヒアルロン酸（ＨＡ－ＶＳ）の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルである。ＮＭＲに基づいて、ヒアルロン酸が二糖１個当たり約４パーセントのレベルのビニルスルホン置換を有することを決定付けた。

【図２】図２は、実施例１６に記載の通り、水溶性の低いモデル薬物であるトリアムシノロンアセトニドの放出（パーセント）対サンプリング番号を示す図である。

【図３】図３は、実施例１６に記載の通り、サンプリング点１つ当たりの、水溶性の低いモデル薬物であるトリアムシノロンアセトニドの放出された蓄積質量を示す図である。

【図４】図４は、実施例１６に記載の通り、サンプリング点１つ当たりの、トリアムシノロンアセトニドの放出量を示す図である。

【図５】図５は、実施例１７に記載の通り、１．５ｍｌの注射の２４時間後に評価した、試験材料の治療群に対して試験材料１を注射したヤギの膝の滑液白血球数（立方ミリメートル当たりの細胞数）を示すグラフである。試験材料１＝ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_{2}$ゲル。

【図６】図６は、実施例１７に記載の通り、１．５ｍｌの注射の２４時間後に評価した、試験材料の治療群に対して試験材料１を注射したヤギの膝の絶対的滑液白血球数（絶対数＝総体積×滑液白血球数）を示すグラフである。試験材料１＝ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_{2}$ゲル。

【図７】図７は、実施例１７に記載の通り、１．５ｍｌの注射の２４時間後に評価した、試験材料の治療群に関する注射したヤギの膝の滑液白血球の特異的分布（各群当たりの平均）を表すグラフである。各試験材料について、多形核白血球（ＰＭＮ）、リンパ球、単球および好酸球（Ｅｏｓ）の分布を示す。

【図８】図８は、実施例１７に記載の通り、それぞれ代表的な試験材料について注射したヤギの膝の滑液の平均総スコア、関節組織の平均総スコア、ならびに滑液および関節組織の組合せのスコア（表６）を示すグラフであり、全体的総スコア＝滑液スコア＋関節の総スコアである。滑液または関節の総スコアの最大スコアは８であり、０は正常である。全体的総スコアの最大スコアは１６であり、０は正常である。

【図９】図９は、実施例３４に詳説の通り、試験材料で治療したヤギの関節注射後１４日目の軟骨試料に関するサフラニンＯ染色スコアを示す図である。試験材料１：ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_{2}$、試験材料２：ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_{2}$－ＴＡ。

【図１０】図１０は、実施例３４に詳説の通り、試験材料で治療したヤギの関節注射後２８日目の軟骨試料に関するサフラニンＯ染色スコアを示す図である。

【図１１】図１１は、実施例３４に詳説の通り、試験材料で治療したヤギの関節治療後２８日目の軟骨試料に関するＭａｎｋｉｎ採点システムの結果を示す図である。

【図１２】図１２は、実施例３４に詳説の通り、それぞれ注射後１４日目（図１２）および２８日目（図１３）のサフラニンＯ染色による代表的な大腿骨内側顆（ｍｅｄｉａｌ　ｆｅｍｏｒａｌ　ｃｏｎｄｙｌｅ）組織像（４０×）を示す図である。

【図１３】図１３は、実施例３４に詳説の通り、それぞれ注射後１４日目（図１２）および２８日目（図１３）のサフラニンＯ染色による代表的な大腿骨内側顆（ｍｅｄｉａｌ　ｆｅｍｏｒａｌ　ｃｏｎｄｙｌｅ）組織像（４０×）を示す図である。

【図１４】図１４は、実施例４５に詳説の通り、１．５ｍｌの関節内注射の２４時間後に評価した、試験材料および対照材料に関するすべての動物の平均滑液白血球数（平均＋ｓｄ）を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００６２】

詳細な説明

ここで、本発明を以下により完全に説明する。しかし本発明は、多くの様々な形態で具

体化することができ、本明細書に記載の実施形態に限定されると解釈されるべきではない。正確には、これらの実施形態は、本開示を詳細かつ完全なものとし、本開示によって本発明の範囲を当業者に完全に伝えるために提供される。

【００６３】

本明細書で先または以下に引用したあらゆる刊行物、特許文書および特許出願は、別段指定されない限りその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。参照によって本明細書に組み込まれる刊行物、特許文書または特許出願と本開示の両方において同じ用語が定義される場合には、本開示の定義が優先的定義となる。本発明の特定の種類の化合物、化学物質等の説明のために参照される刊行物、特許文書および特許出願について、かかる化合物、化学物質等に関する部分は、本文書の一部となり、参照によって本明細書に組み込まれる。

【００６４】

定義

本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、状況によって別段明示されない限り複数の指示対象を含むことに留意すべきである。したがって、例えば「あるポリマー」への言及は、単一のポリマー、ならびに同じまたは異なるポリマーの２つ以上を含む。

【００６５】

別段具体的に示されない限り、本明細書の用語の定義は、有機合成およびポリマーおよび薬学の分野で使用されている標準の定義である。

【００６６】

本発明の説明および特許請求において、以下の用語法は下記の定義に従って使用される。

【００６７】

「生体適合性ポリマー」は、生体組織と適合性があり、または有益な生物学的特性を有することができる分解産物を有するポリマーである。生体適合性ポリマーは、それ自体生体適合性であってよく、かつ／または生物活性剤と併用される場合に相乗的に生体適合性であってもよい。

【００６８】

用語「ヒアルロン酸ポリマー」は、ヒアルロナンの反復二糖サブユニットを含むポリマーを指し、この場合、反復単位は、二糖反復サブユニットのＤ－グルクロン酸および／またはＤ－Ｎ－アセチルグルコサミン単位の１つまたは複数の位置で誘導体化され得る。ヒアルロン酸ポリマーは、ヒアルロン酸（ヒアルロナンとも呼ばれる）、誘導体化ヒアルロン酸、塩の形態、ヒアルロン酸リンカー錯体、およびヒアルロン酸コンジュゲートを包含することを意味する。用語「ヒアルロン酸」は、非修飾または非誘導体化ヒアルロン酸を指すことを意味する。

【００６９】

用語「ヒアルロン酸誘導体」または「誘導体化ヒアルロン酸」または「修飾ヒアルロン酸」は、例えば、ジビニルスルホンなどの１つまたは複数の小さい化学的部分との反応によって誘導体化されているヒアルロン酸を指す。

【００７０】

チオール誘導体化ヒアルロン酸ポリマーは、３つ以上の二糖反復単位を有し、少なくとも１つのスルフヒドリル（チオール）基を含む前述のヒアルロン酸ポリマーを指す。

【００７１】

用語「反応性」は、容易に反応し、または有機合成の従来の条件下で実際的な速度で反応する官能基（例えばポリマー内に存在する）を指す。これは、反応しない基、または反応するために強い触媒もしくは実際的ではない反応条件を必要とする基（すなわち、「非反応性」または「不活性」基）とは対照的である。

【００７２】

「分子質量」または分子量は、本明細書でヒアルロン酸などの水溶性ポリマーの状況に

おいて使用される場合、多角度光散乱によって決定されるポリマーの名目上の平均分子質量を指す。分子量は、数平均分子量または重量平均分子量のいずれかで表すことができる。別段指定されない限り、本明細書の分子量へのあらゆる言及は、数平均分子量を指す。

【００７３】

用語「ヒドロゲル」は、水が連続相であり、含水量が５０％（ｗ／ｗ）を超える、水を含有する３次元親水性ポリマー網またはゲルを指す。本明細書に記載のヒドロゲルは、一般に、所望の架橋度を達成するための架橋開始剤または反応促進剤の組込みを必要としない。

【００７４】

「滅菌」組成物は、ＵＳＰ滅菌試験を使用して決定される、生存可能な微生物を含まない組成物である。「Ｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ」、第３０次改訂版、Ｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａｌ　Ｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎ：２００８年を参照のこと。

【００７５】

本明細書で使用される用語「軽度に架橋されている」または「低い架橋度を有する」は、利用可能な架橋部位の約４０％～約１００％が反応して最終的な架橋ゲルを生成し、ゲルを形成するために使用された修飾ヒアルロン酸出発材料が、活性化／誘導体化された形態のヒドロキシル基を１０％以下有し、したがって総体的に軽度に架橋されているとみなされるヒドロゲルを提供するように架橋反応が生じることを意味する。

【００７６】

ヤギの関節注射モデルにおいて低い炎症促進性を示すヒドロゲルは、本明細書に記載のヤギの関節注射モデルにおいて評価される場合に、注射の２４時間後に１立方ミリメートル当たり２０，０００個未満の滑液白血球細胞数、好ましくは注射の２４時間後に１立方ミリメートル当たり１５，０００個未満の滑液白血球細胞数を示すヒドロゲルであり、この数は、注射した個々の３匹の動物から得た平均数である。

【００７７】

対象となるヒドロゲルへの組込みなしに投与される当用量のコルチコステロイドよりも、「軟骨への損傷を低減する」または「軟骨損傷が少ない」コルチコステロイドを含有するヒドロゲルは、一般に、軟骨損傷を評価するための任意の適切なモデルによって特徴付けられるが、好ましくは本明細書で詳説するヤギの膝のインビボ注射モデルを使用して測定される。注射後のデータは、一般に、注射後少なくとも７日間、しかし２８日間以下にわたって収集される。好ましい測定標準は、総Ｍａｎｋｉｎスコアであり、既に記載の通り評価された、薬物単独よりも軟骨への損傷を低減する材料とは、当量で投与される場合にその薬物（すなわちコルチコステロイド）よりも平均スコアの改善を示す材料である。好ましくは、ヒドロゲルに組み込まれた薬物の総Ｍａｎｋｉｎスコアは、ヒドロゲルに封入されない形態で投与される場合の薬物の総Ｍａｎｋｉｎスコアよりも少なくとも１ポイント以上改善される。

【００７８】

用語「薬物」または「薬学的に活性な薬剤」または「生物活性剤」または「活性剤」は、交換可能に使用され、生理活性を有し、治療目的で採用または使用される任意の有機または無機化合物または物質を意味する。タンパク質、ホルモン、抗癌剤、小分子化合物および模倣薬、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ、ＲＮＡならびに遺伝子療法が、「薬物」のより広範な定義に含まれる。本明細書で使用される場合、薬物への言及、ならびに本明細書の他の化合物への言及は、適用できる場合には本明細書に記載の化合物のジアステレオマーおよび鏡像異性体などの異性体、塩、溶媒和物、および多形、特定の結晶形、ならびにラセミ混合物および純粋な異性体を含む、薬学的に許容される形態のいずれかの化合物を含むことを意味する。

【００７９】

用語「固体」は、本明細書で使用される場合、結晶形、それらの多形、非結晶性の非晶質物質、沈殿物および粒子等を含む、非流体の物質を意味する。これらの固体形態のそれ

ぞれは、大きさが約０．０１ミクロン～２０００ミクロン、例えば約０．０１ミクロン～１ミクロン、１ミクロン～１００ミクロン、１００ミクロン～１０００ミクロン、１０００ミクロン～２０００ミクロン、１１００ミクロン～１５００ミクロン、および１５００ミクロン～２０００ミクロンで変わり得る。

【００８０】

本明細書で言及される粒径は、粒子の直径を指し、一般にふるい分析によって決定される。記載の大きさまたは範囲は、一般に、ふるいまたはメッシュの目の大きさに相当する。大きさ（例えばｍｍ）を決定するために、特定のメッシュまたはふるい番号に対応する粒径変換チャートを参照することができる。例えば、実施例３９および４０を参照のこと。

【００８１】

「水不溶性薬物」または「水溶性の低い薬物」は、１０ｍｇ／ｍＬ未満の水溶性を有する薬物である。

【００８２】

本明細書で提供される組成物（またはヒドロゲルまたはポリマー）の、「有効量」または「薬学的に有効な量」または「治療有効量」という用語は、対象の疼痛を予防、低減または排除するなどの所望の応答を得るのに十分な、非毒性の組成物の量を指す。必要とされる正確な量は、種、年齢、および対象の全体的な状態、治療を受ける状態の重症度、使用される特定の１つまたは複数の薬物、組成物の特異性、投与方法等に応じて対象ごとに変わる。任意の個々の場合における適切な「有効」量は、日常的な実験方法を使用して当業者によって決定され得る。

【００８３】

急性または亜慢性疼痛の「治療」またはそれを「治療する」ことには、疼痛の阻害、すなわち疼痛の発症を停止させ、または疼痛から回復させ、または疼痛を緩和すること、すなわち対象が経験する疼痛の量を低減することが含まれる。

【００８４】

「任意選択の」または「任意選択により」は、後述の環境が生じても生じなくてもよいことを意味し、したがってこの説明は、その環境が生じる場合およびその環境が生じない場合を含む。

【００８５】

特定の特徴または実体に言及する用語「実質的に」は、その特徴または実体に著しい度合いまで、またはほぼ完全に（すなわち８５％以上の度合い）言及することを意味する。

【００８６】

用語「約」は、特に所与の量に言及する場合、プラスまたはマイナス５パーセントの偏差を包含することを意味する。

【００８７】

さらなる定義は、以下の部分に見出すこともできる。

【００８８】

概要

本願は、インビボ投与される場合に炎症促進性が極度に低いヒドロゲルについての本発明者らの発見に基づくものである。本開示に関係する研究の実施において、本発明者らは、有益な化学的、レオロジー的、および他の物理的特性を有するように見え、いくつかの生体適合性の許容されるインビトロおよびインビボモデルにおいて好ましく挙動する多くの生体適合性のヒドロゲルが、特に関節内注射する際に、炎症および疼痛を引き起こすおそれがあることを認めた。本明細書に記載の材料は、ヤギの関節注射モデルで調査した場合、類似のヒドロゲル組成物と比較して、炎症促進性が著しく低いことが発見された。例えば、実施例１７および図４～８を参照のこと。一般に、本発明のヒドロゲルは、関節の関節内空間に投与される場合（例えばヤギの関節注射モデルで調査した場合）、関節の関節内空間への当量の市販関節内補充薬の投与、または本明細書に記載のヒドロゲルに組み込まれない当量の活性剤の投与と比較して、軟骨への有害な、または望ましくない副作用

の低減を示した。

【００８９】

予想外に、本明細書に記載のものなどの架橋ヒドロゲルにコルチコステロイドを組み込むことによって、当用量またはそれを超える用量の、ヒドロゲルに封入されない形態のコルチコステロイドを投与する際に観測されるよりも、軟骨への損傷が実際に低減することも発見された。例えば、実施例３４および図９～１３を参照のこと。さらに本明細書では、本発明のヒドロゲルの関節内注射が、単独で（すなわち活性剤なし）投与される場合でも、トリアムシノロンアセトニドなどのコルチコステロイドと組み合わせて投与される場合でも、局所作用または全身作用をもたらさないことを示す結果を提供する。

【００９０】

本明細書に記載の優れたヒドロゲルは、一般に、十分に特徴付けられた低レベルの官能基の修飾を有するヒアルロン酸と、適切な二官能性または多官能性架橋剤との制御された反応によって形成される。得られたヒドロゲルは、開始剤もしくは反応促進剤または他の有害な添加剤を必要とすることなく、穏やかな条件下で形成される。得られたヒドロゲルは、最小数の未反応の反応基を有するように設計され、最小数の反応物および反応構成要素から形成される。ヒドロゲルは軽度に架橋されており、生物活性剤を封入し、経時的に一定の方式で、持続的に放出するのに有用であることも示されている。例えば、図２～３を参照のこと。

【００９１】

ここで組成物、方法およびキット等の特徴を、以下により詳細に論じる。

【００９２】

誘導体化ヒアルロン酸ポリマー

本発明のヒドロゲルは、様々なポリマー材料から形成することができる。１つまたは複数の反応性官能性を含有する、特定の程度まで修飾されている生分解性または生体吸収性ポリマーが好ましい。好ましくは、ポリマーはポリアニオン系多糖（ＰＡＳ）である。ポリアニオン系多糖の非排他的な例には、例えば、ヒアルロン酸（ＨＡ）、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、カルボキシメチルアミロース（ＣＭＡ）、コンドロイチン－４－硫酸、コンドロイチン－６－硫酸、デルマタン硫酸、デルマチン（ｄｅｒｍａｔｉｎ）－６－硫酸、ヘパリン硫酸、ヘパリン、ケラチン硫酸およびそれらの誘導体、ならびにその組合せが含まれる。かかるポリマーは当技術分野で公知であり、例えば米国特許第６，０５６，９７０号に記載されている。他の生分解性ポリマーには、フィブリン、フィブリノゲン、デンプン、ポリ（アミノ酸）、ペプチド、タンパク質、ゼラチンおよびコラーゲンが含まれる。

【００９３】

好ましいポリマーは、ヒアルロナンとも呼ばれるヒアルロン酸である。ヒアルロン酸は、交互に生じるβ１－＞３グルクロン酸結合とβ１－＞４グルコサミン結合によって結合しているＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミンとＤ－グルクロン酸の交互に生じる二糖単位から構成され、したがって反復単位が（１－＞４）－β－Ｄ－ＧｌｃＡ－（１－＞３）－β－Ｄ－ＧｌｃＮＡｃとなる、天然に存在する直鎖多糖である。対象となるヒドロゲルの１つまたは複数を調製するのに使用されるヒアルロン酸は、一般に、ビニルスルホン、アクリレート、メタクリレートなどの１つまたは複数の反応性部分で誘導体化されている。好ましくは、ヒアルロン酸は、単一の反応性部分で誘導体化されている。修飾または誘導体化の程度は、ポリマー内の反応性官能基が１％～１００％のいずれかまで修飾される範囲であってよいが、一般に、低レベルのポリマー修飾が好ましい。

【００９４】

ある例示的な修飾ヒアルロン酸は、そのヒドロキシル基とジビニルスルホンとの反応によって誘導体化されたヒアルロン酸である。ヒアルロン酸は、一般に、約１～約８０％の修飾度の反応性ヒドロキシル基を有する。すなわち、１％の修飾または置換の程度は、ヒアルロン酸の二糖単位の平均１％がビニルスルホン基を含有することを意味する。好ましくは、ヒアルロン酸は、約１～５０％の修飾度の反応性ヒドロキシル基を有する。さらに

好ましくは、ヒアルロン酸は、約１～約２５％の修飾度の反応性ヒドロキシル基を有する。特定の一実施形態では、ヒアルロン酸は、ジビニルスルホンとの反応によって１０％以下の度合いまで修飾されている。具体的には、好ましい一実施形態では、ヒアルロン酸は、ジビニルスルホンの付加反応によって誘導体化されたヒドロキシル基を１０％以下有する。ヒアルロン酸のヒドロキシル基は、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）基に変形する。得られた活性化ヒアルロン酸を、本明細書では一般に（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）ヒアルロン酸またはＶＳ－ＨＡと呼ぶ。特にヒアルロン酸は、以下の１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％および１０％から選択される、ヒドロキシル基から（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）基への変換度を有することができる。あるいはヒアルロン酸は、先のパーセンテージのいずれか２つの間の範囲、例えば１～１０％、２～１０％、３～１０％、４～１０％等、例えば２～７％、２～６％、３～８％、３～７％等の提供される整数のそれぞれすべての組合せについて、その範囲に含まれるヒドロキシル基の変換度を有することができる。さらにより具体的な一実施形態では、ヒアルロン酸は、二糖反復単位１個当たり約４～５％の、ヒドロキシル基から（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）基への変換度を有する。特定の場合、ヒアルロン酸官能基の修飾レベルは、架橋剤の濃度と共に他のパラメータを調節し最適化することによってその後の架橋反応を制御できるように、十分に特徴付けられる（すなわち決定される）。親ポリマーの置換／修飾度は、いくつかの適切な方法、例えばＮＭＲ、ＵＶもしくはＩＲ分析、または元素分析のいずれかによって決定することができる。ヒアルロン酸などのポリマーの置換パーセントを算出するための好ましい方法は、ＮＭＲ、例えばプロトンＮＭＲである。例えば、ヒアルロン酸の修飾度を、^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルにおいてヒアルロン酸のビニルスルホン基およびアセトアミドメチル基に対応する相対的ピーク面積比に基づいて決定した実施例１を参照のこと。

【００９５】

ポリマーはまた、ＰＣＴ／ＵＳ／２００４／０４０７２６（ＷＯ２００５／０５６６０８）に記載のヒドラジド反応基および／またはアミノオキシ反応基を含むことができ、かかるポリマーの誘導体化および得られたそれらのポリマー自体に関係する開示部分は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【００９６】

あるいはポリマーは、チオール誘導体化ヒアルロン酸などのチオールで誘導体化されているものであってよい。例示的なチオール誘導体化ヒアルロン酸ポリマーには、米国特許第６，８８４，７８８号、同第６，６２０，９２７号、同第６，５４８，０８１号、同第６，５３７，９７９号、同第６，０１３，６７９号、同第５，５０２，０８１号および同第５，３５６，８８３号に記載されているものが含まれ、かかるチオール誘導体化ポリマーに関係する部分は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【００９７】

ヒアルロン酸ポリマーのさらなる例には、それに限定されるものではないがＴ．　Ｊ．　Ｒｏｓｅｍａｎら、ＣＯＮＴＲＯＬＬＥＤ　ＲＥＬＥＡＳＥ　ＤＥＬＩＶＥＲＹ　ＳＹＳＴＥＭＳ、Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８３年）の「Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ　ｆｒｏｍ　Ｇｌｙｃｏｓａｍｉｎｏｇｌｙｃａｎ　Ｄｒｕｇ　Ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ」　Ｒ．　Ｖ．　Ｓｐａｒｅｒら、第６章、１０７～１１９頁に開示のポリマーを含む、システイン誘導体化ヒアルロン酸が含まれる。

【００９８】

さらなる好ましいポリマーの例には、ヒドロカルビル、アリール、置換ヒドロカルビルまたは置換アリール基を介してＮ－アシル尿素基に連結しているペンダントチオール基によって誘導体化されているヒアルロン酸が含まれる。本明細書で提供される組成物および方法において使用される例示的なポリマーには、Ｃａｒｂｙｌａｎ（商標）－Ｓが含まれる（国際公開ＷＯ２００５／０５６６０８に詳説）。

【００９９】

さらなる誘導体化ポリマーには、二官能性または多官能性アクリレート、アリルまたは

メタクリレート化合物などの反応性リンカーに共有結合しているヒアルロン酸が含まれる。ヒアルロン酸の修飾のための代表的なリンカーには、それに限定されるものではないが、ポリ（エチレングリコール）－ジアクリレート（ＰＥＧＤＡ）、ポリ（エチレングリコール）－ジメタクリレート（ＰＥＧＤＭ）、ポリ（エチレングリコール）－ジアクリルアミド（ＰＥＧＤＡＡ）およびポリ（エチレングリコール）－ジメタクリルアミド（ＰＥＧＤＭＡ）、ならびにその誘導体が含まれる。先のリンカーのＰＥＧ部分は、例えば、２～１００以上のサブユニットを含むオリゴマー性（ｏｌｉｏｇｏｍｅｒｉｃ）またはポリマー性のものであってよい。ヒアルロン酸などのポリマーの修飾／官能化に適したさらなるリンカーには、デキストランアクリレート、デキストランメタクリレート、デキストラングリシジルメタクリレート、メタクリレート官能化ヒアルロン酸、アクリレート官能化ヒアルロン酸、グリセロールジメタクリレート、グリセロール１，３－ジグリセロレートジアクリレート、ソルビトールアクリレートおよびその誘導体が含まれる。

【０１００】

誘導体化ヒアルロン酸または他のポリマーは、一般に、約７００～３，０００，０００ダルトンの平均分子量を有する。例示的な分子量範囲は、約１，０００～２，０００，０００ダルトン、または約５，０００～１，０００，０００ダルトンである。さらなる適切な分子量範囲には、約５０，０００ダルトン～約１，０００，０００ダルトン、または約１００，０００ダルトン～約１，２００，０００ダルトン、または約９０，０００ダルトン～約３００，０００ダルトンが含まれる。ヒアルロン酸の分子量は一般に、例えば多角度レーザー光散乱排除クロマトグラフィー（ＭＡＬＬＳ－ＳＥＣ）によって決定され得る平均分子質量値である。ヒアルロン酸は、その供給源により、最大約３、またはより好ましくは最大約２の多分散性（M_w/M_n）を有することができる。一般に、ヒアルロン酸出発材料は、約２．５未満、より好ましくは約２未満の値の、より狭い分子量分布を有する。ヒアルロン酸の例示的な多分散性は、約１．０２～約２．５であり、出発材料であるヒアルロン酸は、約１．０２、１．０５、１．１、１．２、１．３、１．３、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２，０、２．１、２．２、２．３、２．４もしくは２．５、またはそれを超える多分散性を有することができる。あるいは、誘導体化に適したヒアルロン酸出発材料は、特異的な水中濃度で、先に提示の平均分子量範囲の任意の１つまたは複数に相当する、一般にセンチポアズで表される粘度を有することができる。

【０１０１】

架橋剤

本明細書に記載の有利な特徴を有するヒドロゲルを形成するのに有効な架橋剤（ｃｒｏｓｓｌｌｉｎｋｅｒ）の例には、中心分子「Ｃ」上に位置する２つ以上の反応基を有する化合物が含まれる。中心分子は、直鎖または環式のアルカン、ＰＥＧオリゴマー（ｏｌｉｏｇｏｍｅｒ）もしくはポリマー、または他の任意のかかる適切な中心分子であってよい。ＰＥＧ系の架橋剤の場合、ＰＥＧは、直鎖、分岐（２個のポリマーの腕を有する）であってよく、または複数の腕を有することができる（例えば、３、４、５、６、７、８個またはそれ以上のポリマーの腕を有する）。したがってかかる場合には、中心分子は、一般に、直鎖ＰＥＧ、２個の腕を有する分岐ＰＥＧ、または中心核から生じるＰＥＧ腕を有する複数の腕のＰＥＧである。かかる複数の腕を有するポリマーの例示的な核には、エリスリトール、ペンタエリスリトール、トリメチロールプロパン、グリセロール、３，３’－オキシジプロパン－１，２－ジオール、グリセロールオリゴマー、ソルビトール、ヘキサグリセロール等が含まれる。

【０１０２】

例えば架橋剤は、チオール基またはアクリレート基を有する中心分子「Ｃ」であってよい。チオールを含有する架橋剤は、２つ以上のチオール基を含む。かかるチオール基は、ビニルスルホン誘導体化ヒアルロン酸などのビニルスルホンと反応する。例示的なチオール架橋剤には、ＰＥＧ－ジチオール（ＨＳ－ＰＥＧ－ＳＨ）、３個の腕を有するＰＥＧ－トリチオール（グリセリン核）、４個の腕を有するＰＥＧ－テトラチオール（ペンタエリ

スリトール核）、または８個の腕を有するＰＥＧ－オクタチオール（ヘキサグリセリン核）が含まれる。前述の複数の腕を有するＰＥＧ試薬は、すべてに満たない数の、チオールで官能化された腕を有することもできる。中心分子としてＰＥＧを有するさらなる適切なチオール試薬は、Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ（Ａｒａｂ、Ａｌａｂａｍａ）から利用可能なもの、ならびにＮａｎｏＳｃｉｅｎｃｅから利用可能なものなどの芳香族ジチオールである。他の適切なチオール架橋剤には、ジメルカプトコハク酸、２，３－ジメルカプト－１－プロパンスルホン酸、ジヒドロリポ酸、チオール官能化デキストラン、およびチオール官能化ヒアルロン酸が含まれる。中心分子上に位置する末端アクリレート基を有する架橋剤を使用することもできる。例えば、架橋剤としての使用に適したものは、チオール基がアクリレート（ａｃｙｌａｔｅ）基またはメタクリレート基で置き換えられている前述の中心分子である。架橋剤のさらなる例には、ＰＣＴ／ＵＳ／２００４／０４０７２６に記載のものが含まれる。

【０１０３】

架橋剤には、アクリレート、アリルまたはメタクリレート基を含む分子も含まれる。アクリレート、アリルまたはメタクリレート架橋剤は、小分子またはポリマー性の性質であってよい。一実施形態では、リンカーは、ポリ（エチレングリコール）－ジアクリレート（ＰＥＧＤＡ）、ポリ（エチレングリコール）－ジメタクリレート（ＰＥＧＤＭ）、ポリ（エチレングリコール）－ジアクリルアミド（ＰＥＧＤＡＡ）およびポリ（エチレングリコール）ジメタクリルアミド（ＰＥＧＤＭＡ）、デキストランアクリレート、デキストランメタクリレート、デキストラングリシジルメタクリレート、メタクリレート官能化ヒアルロン酸、アクリレート官能化ヒアルロン酸、グリセロールジメタクリレート、グリセロール１，３－ジグリセロレートジアクリレートソルビトールアクリレート、ならびにその誘導体を含む群から選択される。

【０１０４】

架橋剤の分子量は、一般に、修飾ヒアルロン酸または前述の他のポリマーの分子量未満である。一般に、架橋剤の分子量は、約２００～約２０，０００ダルトンである。架橋剤のさらなる例示的な分子量範囲は、約１，０００～約１０，０００ダルトン（例えば、約１ｋＤ、２ｋＤ、３ｋＤ、４ｋＤ、５ｋＤ、６ｋＤ、７ｋＤ、８ｋＤ、９ｋＤまたは１０ｋＤの分子量を有し、ｋＤはキロダルトンである）または約１，０００～５，０００ダルトンである。ＰＥＧジチオールなどの架橋剤または前述の他の適切な架橋剤のいずれかの例示的な分子量には、中でも約３３５０、３４００および５０００ダルトンが含まれる。

【０１０５】

生物活性剤

本明細書で提供されるヒドロゲル、ヒドロゲル前駆体、ならびに関係する組成物および／またはキットは、任意選択により生物活性剤を含むことができる。本明細書で提供される組成物および組合せに含まれ得る生物活性剤には、抗菌剤、抗生物質、鎮痛剤、抗生物質、抗増殖剤／有糸分裂阻害薬が含まれ、これらには、ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビノレルビン）、パクリタキセル、エピジポドフィロトキシン（例えば、エトポシド、テニポシド）、抗生物質（ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、ダウノルビシン、ドキソルビシンおよびイダルビシン）、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）およびマイトマイシン、酵素（Ｌ－アスパラギナーゼ）などの天然産物；ナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミドおよび類似体、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミンおよびメチルメラミン（ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ）、アルキルスルホネート－ブスルファン、ニトロソ尿素（カルムスチン（ＢＣＮＵ）および類似体、ストレプトゾシン）、トラゼン－ダカルバジニン（ｔｒａｚｅｎｅｓ－ｄａｃａｒｂａｚｉｎｉｎｅ）（ＤＴＩＣ）などの抗増殖剤／有糸分裂阻害性アルキル化剤；葉酸類似体（メトトレキサート）、ピリミジン類似体（フルオロウラシル、フロクスウリジンおよびシタラビン）、プリン類似体および関係する阻害剤（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチンおよび２－クロロデオキシアデノシン［クラドリビン］）などの抗

増殖剤／有糸分裂阻害性代謝拮抗剤；白金配位錯体（シスプラチン、カルボプラチン）、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン（例えば、エストロゲン）；抗凝固剤（ヘパリン、合成ヘパリン塩およびトロンビンの他の阻害剤）；血栓溶解剤（組織プラスミノゲン活性化因子、ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼなど）、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走（ａｎｔｉｍｉｇｒａｔｏｒｙ）剤；抗分泌剤（ブレフェルジンＡなど）；副腎皮質ステロイド（ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバル酸チキソコルトール、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンアセトニド（またはトリアムシノロンの他の任意の薬学的に許容される塩）、トリアムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ハルシノニド、ベタメタゾン、リン酸ベタメタゾンナトリウム、デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウムおよびフルオコルトロン、ヒドロコルチゾン－１７－酪酸エステル、ヒドロコルチゾン－１７－吉草酸エステル、ジプロピオン酸アルクロメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、プレドニカルベート、クロベタゾン－１７－酪酸エステル、クロベタゾール－１７－プロピオン酸エステル、カプロン酸フルオコルトロン、ピバル酸フルオコルトロン、および酢酸フルプレドニデン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン一水和物、フルニソリド、プロピオン酸フルチカゾン、フロ酸モメタゾン一水和物、トリアムシノロンアセトニド、フルチカゾン、フロ酸エステル、非ステロイド系薬剤（サリチル酸誘導体、例えばアスピリン）などの抗炎症剤；パラアミノフェノール誘導体、すなわちアセトアミノフェン（ａｃｅｔｏｍｉｎｏｐｈｅｎ）；インドールおよびインデン酢酸（インドメタシン、スリンダクおよびエトドラック）、ヘテロアリール酢酸（トルメチン、ジクロフェナクおよびケトロラク）、アリールプロピオン酸（イブプロフェンおよび誘導体）、アントラニル酸（メフェナム酸およびメクロフェナム酸）、エノール酸（ピロキシカム、テノキシカム、フェニルブタゾンおよびオキシフェンタトラゾン（ｏｘｙｐｈｅｎｔｈａｔｒａｚｏｎｅ））、ナブメトン、金化合物（オーラノフィン、オーロチオグルコース、金チオリンゴ酸ナトリウム）；免疫抑制剤（シクロスポリン、タクロリムス（ＦＫ－５０６）、シロリムス（ラパマイシン）、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル）；分裂促進性または形態形成性の成長因子タンパク質、ペプチドまたは模倣薬；血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）、ＴＧＦ－β類を含む形質転換成長因子－β（ＴＧＦ－β）スーパーファミリーのメンバーおよびＢＭＰ－２、３、４、５、６、７、８などの骨形態形成性のタンパク質（ＢＭＰ）；インスリンおよびインスリン様成長因子（ＩＧＦ）、肝細胞成長因子（ＨＧＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、ヘッジホッグタンパク質（ＳＨＨおよびＩＨＨ）、アクチビン、インヒビン、脱灰骨（ＤＢＭ）および血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、造血成長因子（Ｇ－ＣＳＦ、ＣＳＦ－１、ＧＭ－ＣＳＦ、エリスロポエチン、インターロイキンファミリー（ＩＬ－１～３４）を含むサイトカインおよびリンホカイン）、インターフェロン、神経成長因子（ＮＧＦ）、中和性アンタゴニストまたはアゴニスト抗体、成長因子受容体作動薬または拮抗薬、一酸化窒素供与体；アンチセンスオリゴヌクレオチド、転写因子、シグナル伝達カスケードメディエーター、ならびにその組合せが含まれる。

【０１０６】

抗生物質には、リンコマイシンファミリーの抗生物質（元々、ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｌｉｎｃｏｌｎｅｎｓｉｓから回収されたクラスの抗生物質剤を指す）；テトラサイクリンファミリーの抗生物質（元々、ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ａｕｒｅｏｆａｃｉｅｎｓから回収されたクラスの抗生物質剤を指す）；スルホンアミドなどの硫黄系抗生物質等が含まれる。リンコマイシンファミリーの例示的な抗生物質には、リンコマイシン自体（６，８－ジデオキシ－６－［［（１－メチル－４－プロピル－２－ピロリジニル）－カルボニル］アミノ］－１－チオ－Ｌ－トレオ－α－Ｄ－ガラクト－オクトピラノシド）、クリンダマイシン、リンコマイシンの７－デオキシ、７－クロロ誘導体（例えば、７－クロロ－６，７，８－トリデオキシ－６－［［（１－メチル－４－プロピル－２－ピロリジ

ニル）カルボニル］アミノ］－１－チオ－Ｌ－トレオ－α－Ｄ－ガラクト－オクトピラノシド）、ならびに薬理学的に許容されるその塩およびエステルが含まれる。テトラサイクリンファミリーの例示的な抗生物質には、テトラサイクリン自体（４－（ジメチルアミノ）－１，４，４α，５，５α，６，１１，１２α－オクタヒドロ－３，６，１２，１２α－ペンタヒドロキシ－６－メチル－１，１１－ジオキソ－２－ナフタセンカルボキサミド）、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、ロリテトラサイクリン、メタサイクリンおよびドキシサイクリン、ならびに薬学的に許容されるそれらの塩およびエステル、特に塩酸塩などの酸付加塩が含まれる。例示的な硫黄系抗生物質には、それに限定されるものではないが、スルホンアミド、スルファセタミド、スルファベンズアミド、スルファジアジン、スルファドキシン、スルファメラジン、スルファメタジン、スルファメチゾール、スルファメトキサゾール、ならびに薬理学的に許容されるその塩およびエステル、例えばスルファセタミドナトリウムが含まれる。抗菌剤および／または抗生物質には、エリスロマイシン、バシトラシン、ネオマイシン、ペニシリン、ポリミキシンＢ、テトラサイクリン、バイオマイシン、クロロマイセチンおよびストレプトマイシン、セファゾリン、アンピシリン、アザクタム、トブラマイシン、クリンダマイシンおよびゲンタマイシンなどの化合物がさらに含まれる。

【０１０７】

鎮痛剤には、リドカイン、ベンゾカインおよびマーカインなどの化合物が含まれる。

【０１０８】

本明細書で提供されるヒドロゲルは、生細胞を含むこともできる。例示的な生細胞には、幹細胞、実質幹細胞、血液由来の細胞および骨髄細胞が含まれる。

【０１０９】

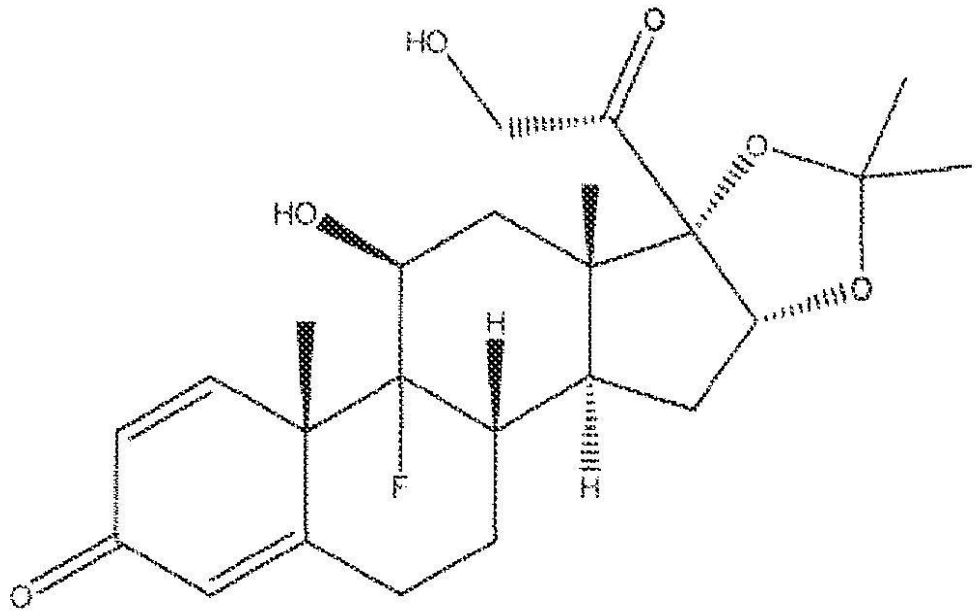
好ましい一実施形態では、ヒドロゲルは、コルチコステロイドを含む。適切なコルチコステロイドの例には、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバル酸チキソコルトール、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンベネトニド、トリアムシノロンフレトニド、トリアムシノロンヘキサセトニド、二酢酸トリアムシノロンなどのトリアムシノロン塩、トリアムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ハルシノニド、ベタメタゾン、リン酸ベタメタゾンナトリウム、デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、フルオコルトロン、ヒドロコルチゾン－１７－酪酸エステル、ヒドロコルチゾン－１７－吉草酸エステル、ジプロピオン酸アルクロメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、プレドニカルベート、クロベタゾン－１７－酪酸エステル、クロベタゾール－１７－プロピオン酸エステル、カプロン酸フルオコルトロン、ピバル酸フルオコルトロン、酢酸フルプレドニデン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン一水和物、フルニソリド、プロピオン酸フルチカゾン、フロ酸モメタゾン一水和物、およびフロ酸フルチカゾンが含まれる。

【０１１０】

本明細書で提供されるヒドロゲル製剤において使用するのに好ましい一化合物は、トリアムシノロン（１１β，１６α）－９－フルオロ－１１，１６，１７，２１－テトラヒドロキシプレグナ－１，４－ジエン－３，２０－ジオン）または薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物である。トリアムシノロンアセトニドの構造を以下に示す。

【０１１１】

【化１】



生物活性剤は、一般に、本明細書で提供されるヒドロゲルと混合され、それに懸濁され、または封入される。あるいは、生物活性剤はポリマーコンジュゲートの形態であってよく、またはヒドロゲルを調製するために使用される構成要素、例えば修飾ヒアルロン酸または架橋剤に、放出され得る形で共有結合していてもよい。

【０１１２】

ヒドロゲル

本明細書で提供されるヒドロゲルは、一般にゲルの形成に有効な条件下で、前述の修飾ヒアルロン酸または他の適切なポリマーを架橋剤（やはり前述の）と反応させることによって形成される。一般に、試薬および反応基の相対量は、反応条件と共に、最適な反応を提供するように調節される。ゲルの形成は、穏やかな制御条件下で実施される。好ましくは、得られたヒドロゲルは、修飾ヒアルロン酸および架橋剤の出発材料に含有される未反応官能基の組合せを２０パーセント未満、より好ましくは修飾ヒアルロン酸および架橋剤の出発材料に含有される未反応官能基を５パーセント未満含有し、または理想的には検出可能な量の未反応ビニルスルホン基もしくはチオール基などの未反応官能基を本質的に含まない。得られたゲル材料におけるかかる低レベルの未反応官能基は、例えば関節にインビボ投与される場合に炎症促進性が低いゲル材料を提供する観点から有益である。特定の一実施形態では、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０\%}$ヒアルロン酸とチオール架橋剤との反応によって形成されたヒドロゲルは、１０パーセント未満の未反応チオール基およびビニルスルホン基を含有する。未反応官能基の数は、反応条件の注意深いモニタリング、反応物の比の調節、およびヒアルロン酸出発材料の修飾度に関する知識によって制御される。

【０１１３】

こうして形成されたヒドロゲルは、一般に、水に対して約０．５～５．０パーセント、またはそれ以上の重量（ｗｔ／ｗｔ）パーセントのポリマーを含有する（ＰＯＬＹ／ＨＯＨ）。得られたヒドロゲルについて、水に対するポリマーの例示的な重量パーセントは、１つまたは複数の実施形態では、０．５、１．０、１．５、２．０、２．５、３．０、３．５、４．０、４．５および５パーセントから選択される。

【０１１４】

本明細書で提供される軽度に架橋されているヒドロゲルの形成は、修飾されたヒアルロン酸出発材料における低レベルの修飾に少なくとも部分的に起因する。例えば、ジビニルスルホンとの反応によるヒアルロン酸の修飾度は、実施例６に示す通り、反応時間を適切に調節することによって制御することができる。例えば、約２０％未満の修飾度を維持す

るために、周囲条件（例えば２０～２５℃）における反応時間を一般に約３分維持すると、２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1～20\%}$ヒアルロン酸が形成される。反応は、好ましくはモル過剰のジビニルスルホン、または二官能性もしくはそれ以上の官能性のアクリレートもしくはメタクリレート試薬などの他の適切な修飾反応物を使用して実施される。実施例６の結果から分かる通り、また予測され得る通り、反応時間が短いと、修飾度の低い出発ポリマー、例えばヒアルロン酸が得られる。例えば周囲条件で非常に短い、すなわち約数秒の反応時間では、約４％置換されたビニルスルホン基を有するビニルスルホン修飾ヒアルロン酸が得られ、１分の反応時間では、８％のビニルスルホン置換ヒアルロン酸が得られた。例示的な反応時間および反応条件、ならびに得られたポリマーの得られた置換の程度については、表１を参照のこと。一実施形態では、反応条件は、約１％～約１０％の置換を有するビニルスルホン置換ヒアルロン酸を得るように調節される。関係する一実施形態では、修飾反応は、周囲条件で約１０秒～約１２０秒間実施される。修飾反応、例えばヒアルロン酸とジビニルスルホンの反応は、塩基条件下で、例えば水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液などの水性塩基中で、または水溶性の他の任意の適切な塩基を使用して実施することができ、その後塩酸、硫酸、リン酸などの酸を添加することによって反応をクエンチする。一般に酸は、ｐＨを約４～６．５の範囲等に下方調節し、反応をクエンチするのに十分な時間および量で添加され、それによって親ポリマーの官能基の所望の修飾度が達成される。次いで生成物を、任意選択により、例えば透析によって精製することができ、任意選択により凍結乾燥などよって乾燥させることができる。

【０１１５】

次いでヒドロゲル前駆体組成物は、任意選択により、必要に応じて架橋剤の存在下で軽度に架橋される。例えば、前述のものなどの２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1～20\%}$ヒアルロン酸または２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{1～10\%}$ヒアルロン酸などのビニルスルホン修飾ヒアルロン酸を、架橋ヒドロゲルを形成するのに有効な反応条件下で、ＰＥＧ－ジチオールなどのチオール官能化ＰＥＧ試薬または前述の他の適切な架橋剤などの適切な架橋剤と反応させる。好ましい一実施形態では、架橋反応は、水溶液中、例えば生理条件下で実施される。一実施形態では、反応は、生理食塩水溶液中で実施される。例えば、実施例２、３、４および５を参照のこと。反応物の体積比は、得られるヒドロゲルの所望の特性に従って調節することができ、反応物の溶液の濃度、特定の分子量および反応物の構造等に応じて変わることになる。例えば、官能基と架橋剤の例示的な相対的モル比には、以下の約１～２．５、または約１．２５～２．０、または約１．３～約１．８が含まれ、例えば例示的な官能基は、ビニルスルホン修飾ヒアルロン酸に含有されるビニルスルホンであり、架橋剤の相対量は、ＰＥＧ－ジチオールなどの架橋剤分子に含有されるチオール基などの反応基の数ではなく、架橋剤自体、例えば架橋剤分子を指す。あるいは、架橋剤は、修飾ヒアルロン酸溶液に固体として添加することができる。滅菌製剤が望ましい場合には、架橋剤は、添加の前に例えば電子線処理によって滅菌される。架橋反応は、一般に穏やかな反応条件下で、例えば約２０℃～約４５℃の温度で、例えば以下の温度、２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、２５℃、２６℃、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１℃、３２℃、３３℃、３４℃、３５℃、３６℃、３７℃、３８℃、３９℃、４０℃、４１℃、４２℃、４３℃、４４℃または４５℃のいずれか１つで実施される。修飾ヒアルロン酸および架橋剤反応物、ならびに他の任意の任意選択の構成要素である反応物の混合または反応の後、得られた組成物を、一般にゲルを形成するのに適した時間にわたって、例えばインキュベーター内で反応させることができる。反応物は、反応温度に応じて、一般に約８～約３６時間、または約１０～約２４時間、または約１２～約１８時間にわたって反応させることができる。

【０１１６】

架橋反応は、滅菌ヒドロゲルを提供するために滅菌条件下で、すなわち添付の実施例に一般に記載の滅菌反応物を使用して滅菌条件下で実施することができる。例えば、溶液のすべての構成要素を、反応前に滅菌濾過することによって、滅菌組成物を形成することができる。

【０１１７】
軽度に架橋されているさらなる例示的なヒドロゲルは、例えばＣａｒｂ－Ｓ（商標）などのチオール修飾ヒアルロン酸材料を架橋することによって形成される。Ｃａｒｂ－Ｓ（商標）は、ヒアルロン酸のカルボキシメチル化の後、カップリング剤の存在下で３，３’ジチオビス（プロパン酸ジヒドラジド）、すなわちＤＴＰＨと反応させ、その後ジチオトレイトールなどの試薬を用いてジスルフィド基を還元することによって生成される。例えば、米国特許第ＵＳ２００８－００２５９５号を参照のこと。さらなるチオール修飾ヒアルロン酸材料は、米国特許第ＵＳ２００９－０１０５０９３号に記載されている。先の刊行物に記載の例示的な材料は、チオールを含有するヒドラジド反応物との反応によって誘導体化されたヒアルロン酸である。ヒドロゲルは、米国特許第６，８８４，７８８号に記載のチオール修飾ヒアルロン酸材料から形成することもできる。好ましい一実施形態では、前述のチオール修飾ヒアルロン酸材料は、ヒアルロン酸ヒドロキシル基の約２０％未満、またはさらにより好ましくは約１０％未満が化学修飾されるようにヒアルロン酸出発材料の修飾度を低くすることを除き、記載の合成手法を使用して調製される。かかるチオール誘導体化ヒアルロン酸材料は、チオールの自己反応能力に起因して、軽度に自己架橋され得る。あるいは、軽度に架橋されているヒドロゲルは、ＰＥＧ－アクリレートなどの架橋剤との反応によって形成することができる。

【０１１８】
１つまたは複数の特定の実施形態では、架橋ヒドロゲル組成物は、活性剤を含有する。好ましい種類の生物活性剤には、ステロイド、成長因子、抗増殖剤および抗生物質が含まれる。本発明のヒドロゲルへの組込みに特に有利な種類の活性剤は、コルチコステロイドである。例示的なコルチコステロイドには、それに限定されるものではないが、以下のトリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンヘキサセトニド、トリアムシノロンベネトニド、トリアムシノロンフレトニドおよび二酢酸トリアムシノロンなどのトリアムシノロン塩、ならびにメチルプレドニゾロンが含まれる。一般に、得られたヒドロゲルは、生物活性剤の効力に応じて約０．０１重量％～約２０重量％の生物活性剤を含有する。ヒドロゲルに含有される生物活性剤の例示的な量（総体的に湿潤ゲル重量に対する）は、例えば強力でない生物活性剤については約１０重量％～約２０重量％であり、例えばトリアムシノロンアセトニドなどのより強力な生物活性剤については、生物活性剤は約０．０１重量％～約１０重量％、または約０．０１％～約５％、または約０．０１％～約３％であり、または生物活性剤は約０．１～約２％、または約０．１～約１％である。特定の実施形態では、ヒドロゲルは、かかる生物活性剤をヒドロゲルに組み込むことによって、水溶性の低い生物活性剤を送達するために使用される。

【０１１９】
有利には、本発明のヒドロゲルは、穏やかな反応条件下で形成され、重合開始剤なしに形成することができる。さらに、外部エネルギー供給源の適用なしに、十分なゲル化が生じる。例えば、ゲル形成反応は、約２０℃～４５℃の温度で、開始剤および反応促進剤なしに実施することができる。さらにゲル化、すなわちヒドロゲルの形成は、任意の小分子の化学的副生成物の放出なしに生じる。したがって、本明細書で提供されるヒドロゲルは、インビボ投与される際に潜在的に炎症促進反応をもたらし得る最小数の添加剤または汚染物質を含有する。

【０１２０】
滅菌ヒドロゲルは、例えば修飾ヒアルロン酸および架橋剤のそれぞれの水溶液を滅菌シリンジおよびまたは遠心管に入れた後、十分に混合することによって、滅菌条件下で形成することができる。一般に、材料がゲルを形成するまで、混合反応物（すなわち、修飾ヒアルロン酸および架橋剤）を、適切な温度（例えば約２０℃～４５℃）に設定したインキュベーターに入れる。例えば、反応物の例示的な体積比を含むヒドロゲル製剤の代表的な調製に関する実施例２、１８、２１、２２、２３、２４、２５、２７、２８、２９および３０を参照のこと。

【０１２１】

一般に、水溶液または混合物の形態のさらなる非修飾ヒアルロン酸を、任意選択により、ゲル形成の前またはゲル形成の後にゲル前駆体製剤（例えばゲルスラリー）に添加して、ヒアルロン酸水溶液中に架橋ヒドロゲル粒子を含む組成物を提供することができる。例えば、実施例８を参照のこと。溶液中のヒアルロン酸（すなわち非修飾ヒアルロン酸）の平均分子量は、一般に、約７５０，０００～約１，２００，０００ダルトンまたはそれを超える範囲である。好ましい水溶液は、ヒアルロン酸の生理食塩水溶液であり、ヒドロゲルに添加されるヒアルロン酸の例示的な水溶液は、約０．３重量％～約４重量％、または約０．５重量％～約２重量％の濃度を有する。ある代表的な製剤は、以下の相対量の構成要素を含む。４ｍＬのゲルスラリー（（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０％}$ヒアルロン酸／ＰＥＧ－ジチオール）と２ｍＬのヒアルロン酸、濃度２０ｍｇ／ｍＬ。特に好ましい製剤は、４ｍＬのゲルスラリー（（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{４％}$ヒアルロン酸／ＰＥＧ－ジチオール）と２ｍＬのヒアルロン酸を濃度２０ｍｇ／ｍＬで含む。一般に、得られる膨潤ゲル内の最終的なヒアルロン酸含量は、約０．０５～５パーセント（０．５ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ）である。好ましくは、得られる膨潤ゲル内の最終的なヒアルロン酸含量は、約０．１～３パーセント、または約０．１～１パーセント、または約０．５～０．８％である。得られる膨潤ゲル内の例示的な最終的なヒアルロン酸含量は、例えば、以下のパーセンテージ、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、２．０、３．０、４．０および５．０のいずれかに相当し得る。例えば、得られる組成物中のヒアルロン酸と架橋（例えば、（２－（ビニルスルホニル）エトキシ）$_{１～１０％}$ヒアルロン酸／ＰＥＧ－ジチオール）ヒドロゲル粒子の代表的な相対量（重量比）は、一般に約１０：１、または約５：１、または約３：１、または約１：１の範囲に含まれる。得られる組成物は、任意選択により１つまたは複数の界面活性剤を含有することもできる。例示的な界面活性剤には、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリソルベート８０、Ｔｗｅｅｎ　８０、ポリエチレングリコール（例えばＰＥＧ３３５０）等が含まれる。

【０１２２】

所望に応じて、生物活性剤は、架橋前に反応混合物に添加することができ、または形成後の架橋ゲルに添加することもできる。実施例９～１６は、ヒドロゲルの形成、ならびに生物活性剤であるトリアムシノロンアセトニドの組込みおよび代表的なヒドロゲル組成物からのその後の持続的な放出を実証するものである。あるいは、幹細胞、実質幹細胞、血液由来細胞および骨髄細胞などの生細胞を、対象となるヒドロゲルに組み込むこともできる。

【０１２３】

生物活性剤を伴うまたは伴わない対象となるヒドロゲルについて、ヒドロゲルは、前述の１つまたは複数のポリアニオン系多糖（ＰＡＳ）溶液に分散することができる。ポリアニオン系多糖の非排他的な例には、例えば、ヒアルロン酸（ＨＡ）に加えてカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、カルボキシメチルアミロース（ＣＭＡ）、コンドロイチン－４－硫酸、コンドロイチン－６－硫酸、デルマタン硫酸、デルマチン－６－硫酸、ヘパリン硫酸、ヘパリン、ケラチン硫酸およびそれらの誘導体、ならびにその組合せが含まれる。かかるポリマーは当技術分野で公知であり、例えば米国特許第６，０５６，９７０号に記載されている。対象となるヒドロゲルが分散し得る他のポリマー溶液には、フィブリン、フィブリノゲン、デンプン、ポリ（アミノ酸）、ペプチド、タンパク質、ゼラチン、コラーゲンおよびポリ（エチレングリコール）が含まれる。先のポリマーの１つまたは複数の組合せを含有する溶液を使用して、対象となるヒドロゲル粒子を分散させることができる。ポリマー溶液は、少なくとも０．１ｍｇ／ｍＬから、水または０．９％生理食塩水に最大限に溶解するまでの濃度範囲で調製することができる。前述の通り、ある好ましいポリマーは、約１０ｍｇ／ｍＬ～約２５ｍｇ／ｍＬの濃度範囲の約５００，０００～３百万の分子量を有するヒアルロン酸である。ポリマー溶液とヒドロゲルの組合せは、パッケージされた最終的な組合せが滅菌されるように、無菌条件下で製造することができる。

【０１２４】

実施例８に記載の通り、対象となるヒドロゲルは、選択されたポリマー溶液と様々な比で混合することができる。混合される対象のヒドロゲルとポリマー溶液の体積比には、それに限定されるものではないが、約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、１０：１が含まれ得る。混合される対象のヒドロゲルとポリマー溶液の好ましい体積比は、約３：１、２：１および１：１である。

【０１２５】

対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液のｐＨは、緩衝液、酸および塩基の添加によって改変することができる。対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液の好ましいｐＨ範囲は、約５～８、より好ましくは約６～７．６である。

【０１２６】

対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液のイオン強度は、塩の添加によって改変することができる。対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液のイオン強度を改変するために使用される好ましい塩は、塩化ナトリウムである。対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液の好ましい最終的なイオン強度は、その対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液がおよそ等張になるように選択される。

【０１２７】

薬学的に許容される保存剤を、対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液に添加することもできる。これらには、安息香酸ナトリウムまたはベンジルアルコールなどの薬剤が含まれ得る。

【０１２８】

対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液は、特定の実施形態では、シリンジにパッケージされ得る。シリンジは、プラスチック（例えば、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン）もしくはガラス、または他の任意の薬学的に許容される材料から製造することができる。シリンジに含有される対象となるヒドロゲルおよび対象となるヒドロゲル／ポリマー溶液の分散液の体積は、０．５ｍＬ～２０ｍＬであってよく、好ましい体積は、１ｍＬ、２ｍＬ、３ｍＬ、４ｍＬ、５ｍＬ、６ｍＬおよび７ｍＬである。

【０１２９】

得られたヒドロゲル材料は、約０．１０～３．０ミリメートルの大きさの粒子に処理することができ（例えば、実施例３および４参照）、または水性ゲルスラリーの形態であってもよい。例えばゲル化材料は、細片に分割して生理食塩水と混合し、膨潤させることができる。次いで、適切な大きさの粒子を、所望のふるいの大きさ、例えば約０．１０～３．０ミリメートルを有するメッシュを介して押し出すことによって、ゲル材料から形成することができる。得られた粒子は、水性媒体に入れるとゲルスラリーを形成する。一実施形態では、ヒドロゲルを関節内空間に注射することができるように、ゲルを、１８～２１ゲージ針を伴う使用に適したシリンジにパッケージする。一般に、被験体の関節内空間に注射されるヒドロゲル組成物の体積は、約０．５～約８ｍＬ、好ましくは約３～６ｍＬ、または約４～６ｍＬである。

【０１３０】

添付の実施例に例示の通り、ヒドロゲルは、滅菌組成物として提供され得る。

【０１３１】

先および実施例に記載の通り、ヒドロゲルは、シリンジなどの封止容器（任意選択により通気口付きキャップでキャップすることができる）に入れて提供することができる。次いで、シリンジをホイル製の小袋などの容器に入れ、次いで封止することができる。小袋は、真空封止し、窒素もしくはアルゴンなどの不活性ガスの下で封止し、または１つもしくは複数の真空／再充填サイクル後に封止することができ、再充填ガスは、窒素またはアルゴンなどの不活性ガスである。１つまたは複数の真空／再充填サイクルの下で封止され

る小袋について、このサイクルは、小袋が最終的に真空または不活性ガスのいずれかで封止されるように調節することができる。小袋は、任意選択により乾燥剤（ｄｅｓｓｉｃａｎｔ）および／または脱酸素剤を含有することができる。

【０１３２】

使用

本明細書に記載のゲル組成物は、市販の関節内補充薬と比較して、有利には軟骨への望ましくない副作用の低減を示し、ヒドロゲルが生物活性剤をさらに含む実施形態では、ヒドロゲルに組み込まれない当量の活性剤の投与と比較して、軟骨への望ましくない副作用の低減を示す。本明細書で提供されるゲル組成物は、他の有益な特徴の中でも、実施例１７および図４～８に例示の通り、炎症促進性が極度に低い。

【０１３３】

本明細書に記載のヒアルロン酸ポリマー組成物は、例えば胚発生、組織構成（ｔｉｓｓｕｅ　ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ）、創傷治癒、血管新生および腫瘍発生に使用するための、注射可能なまたは埋込み式の製剤において使用することができる。Ｄ．　Ｄ．　ＡｌｌｉｓｏｎおよびＫ．　Ｊ．　Ｇｒａｎｄｅ－Ａｌｌｅｎ、Ｔｉｓｓｕｅ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、第１２巻、８番、２１３１～２１４０頁（２００６年）、Ｇ．　Ｄ．　Ｐｒｅｓｔｗｉｃｈ　ら、Ｔｉｓｓｕｅ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、第１２巻、８番、２１７１～２１８０頁（２００６年）、Ｇ．　Ｄ．　Ｐｒｅｓｔｗｉｃｈ　ら、Ｔｉｓｓｕｅ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、第１２巻、１２番、３４０５～３４１６頁（２００６年）を参照のこと。トリアムシノロンアセトニドなどのコルチコステロイドを含むヒドロゲル組成物は、対象が経験する疼痛を緩和するのに有用である。治療有効量のヒドロゲル組成物を、関節の関節内空間に注射することは、例えば対象が経験する関節痛を持続的に緩和するのに有効となり得る。理想的には、測定可能な度合いの疼痛緩和は、注射後約１時間～１週間以内に、またはより好ましくは注射後約１時間～１日以内に、対象によって最初に経験される。一般にヒドロゲルの注射は、注射後約３カ月～９カ月継続する疼痛の緩和度をもたらす。治療を受ける特定の対象および状態に応じて、ヒドロゲルの治療上有効な投与量体積は、一般に約０．５ｍＬ～２０ｍＬであり、例示的な体積には１ｍＬ、２ｍＬ、３ｍＬ、４ｍＬ、５ｍＬ、６ｍＬおよび７ｍＬが含まれる。

【０１３４】

例えば、任意選択により１つまたは複数の生物活性剤を含有する、本明細書で提供されるヒドロゲル組成物は、接着性組成物として、例えば、出血予防、開口した創傷の被覆、および他の生物医学的適用を含む様々な適用に使用できる組織接着剤および封止剤として使用することができる。これらの組成物は、例えば、外科的に切開されたまたは外傷により破裂した組織への対処（ａｐｐｏｓｉｎｇ）、創傷などからの流血の遅延、再狭窄または凝血の予防、薬物送達、熱傷の包帯、ならびに生存組織の修復および再生の援助において使用することができる。本明細書で提供されるヒアルロン酸系ポリマー組成物は、ヒトなどの哺乳動物被験体の損傷を受けた器官または組織を補充し、またはその再生を誘発するために使用することができる。組成物は、対象（例えば哺乳動物被験体）に埋め込まれ、または含有される場合に、対象に有害な影響を及ぼすことなく分解または吸収され、あるいは対象に残存する。

【０１３５】

対象となる組成物は、組織の充填剤、皮膚の充填剤、増量剤、および塞栓性薬剤、ならびに軟骨の欠損／傷害を修復するための薬剤、ならびに骨の修復および／または成長を強化するための薬剤として使用することができる。

【０１３６】

対象となる組成物は、変形性関節症もしくは関節リウマチ、または痛風もしくはピロリン酸カルシウム沈着症などの他の炎症性関節炎の治療（例えば、関節の関節内空間への注射によって）、または外科手技後に形成され得る癒着の低減もしくは予防に使用することもできる。対象となる組成物は、本明細書で提供されるヒドロゲル材料にコルチコステロイドを組み込むことによって、コルチコステロイドの注射の際の軟骨への損傷を低減する

のに有用であることが発見された。

【０１３７】

先の特定の一手段に関して、すなわちヒドロゲルが、それに組み込まれたコルチコステロイドを含み、該方法がヒドロゲルに封入されない当量のコルチコステロイドの投与時に生じる軟骨損傷よりも、軟骨損傷を低減するのに有効である場合、かかる軟骨損傷の低減は、ヤギの関節注射モデルにおいて注射後２８日目の総Ｍａｎｋｉｎスコアによって特徴付けられる。総Ｍａｎｋｉｎスコアの決定についての説明に関する実施例３４を参照のこと。軟骨への損傷の低減を評価するためのさらなる指標も利用可能であり、かかるパラメータおよび関連のデータも、実施例３４に提供する。

【０１３８】

いくつかの利点は、以下の１つまたは複数を含む、本明細書で提供されるヒドロゲルへのステロイド粒子の封入／組込みに関連するものである。例えば、本発明のヒドロゲルへのステロイド粒子の捕捉は、ステロイド粒子の大部分と関節組織との直接接触を予防するのに有効である。さらに、本発明のヒドロゲルへのステロイド粒子の封入は、関節内の局所的なステロイド濃度を最大限にすると同時に、その全身濃度を最小限に抑えるのに有効である。さらに、本発明のヒドロゲル製剤へのステロイド粒子の捕捉は、ステロイド粒子が関節から早期にクリアランスされるのを保護するのに有効である。最後に、ヒドロゲルへのステロイドの封入によって、ヒドロゲルへの封入なしに得られるよりも低い総用量でステロイドの治療効率が得られると同時に、望ましくない局所性および全身性副作用が最小限に抑えられる。例えば、例示的なヒドロゲル組成物からの薬物の、経時的に制御された持続的な線形方式による線形放出を実証する図２、３および４と共に実施例１４～１６を参照のこと。

【０１３９】

生物活性剤を含むヒドロゲル系組成物について、かかる組成物は、中でも変形性関節症、副鼻腔炎、アレルギー性鼻炎および慢性副鼻腔炎などの状態の治療のための送達系として使用することができる。かかる組成物は、皮膚の充填剤、軟骨の欠損／傷害を修復するための薬剤、ならびに骨の修復および／または成長を強化するための薬剤として使用することもできる。

【０１４０】

ここで、本願を特定の実施形態と共に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。それとは対照的に、本願は、すべての代替、修飾および等価物を特許請求の範囲に含まれるものとして包含する。したがって以下は、特定の実施形態を例示する目的で本願の実施を例示するものであり、その手順および概念的態様について有用であり、容易に理解される説明になると思われるものを提供するために提示される。

【実施例】

【０１４１】

以下の例は、本明細書で提供する化合物、組成物および方法の生成および評価方法を当業者に完全に開示し、説明するために記載するものであり、純粋に例示的なものであることを企図する。したがって実施例は、本発明者らが本発明としてみなす範囲を決して制限するものではない。反応条件、例えば構成要素の濃度、所望の溶媒、溶媒混合物、温度、圧力、ならびに純度、収率などの生成物の特徴を最適化するために使用され得る、他の反応パラメータおよび反応条件の数々の変動および組合せが存在する。それらは、本開示の範囲に含まれるとみなされる。

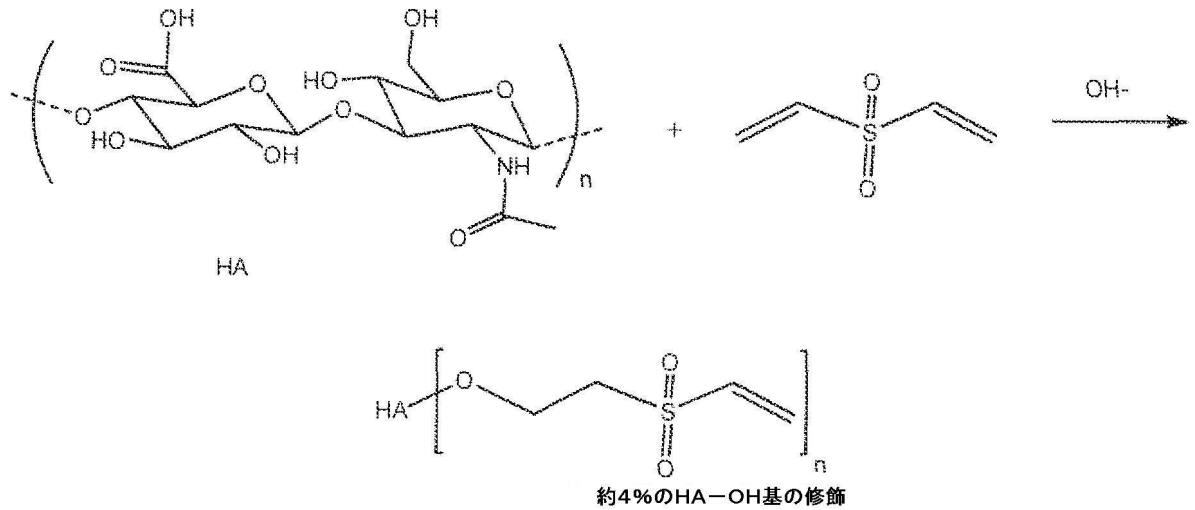
【０１４２】

（実施例１）

ビニルスルホン誘導体化ヒアルロン酸（ＨＡ－ＶＳ）の合成－低修飾度

【０１４３】

【化２】



ヒアルロン酸（ＨＡ）５ｇ［９．４×１０^{4}ｃｐｓ（水中３％）］を秤量して、１Ｌの丸底フラスコに入れた。滅菌濾過水５００ｍＬをＨＡに添加した。フラスコをロータリーエバポレーターに取り付け、２０～１００ｒｐｍで回転するように設定した。すべてのＨＡが溶解するまで（約１６～１８時間）、溶液を回転させた。次いでＨＡ溶液（１０ｍｇ／ｍＬ）を１Ｌのガラスビーカーに移した。オーバーヘッド撹拌機に接続した撹拌機用パドルを溶液に挿入し、溶液を効率的に撹拌することを確実にする撹拌速度に設定した。０．２５ＮのＮａＯＨ溶液３３３ｍＬ（１ＮのＮａＯＨ８３．２ｍＬを脱イオン水２４９．８ｍＬに添加した）を、撹拌しながらＨＡ溶液に添加した。約１分後、ジビニルスルホン溶液１５０ｍＬ（ジビニルスルホン１８ｍＬを脱イオン水１３２ｍＬに溶解した）を、撹拌溶液に急速に添加した。１５秒後（ジビニルスルホン溶液の添加が完了してから測定した）、６ＮのＨＣｌ約１４ｍＬを急速に添加することによって、溶液のｐＨを５～６に調節した。次いで、反応溶液を、タンジェンシャルフロー濾過システム（ｓｐｅｃｔｒａｐｏｒシステム、カートリッジＰ／Ｎ　Ｍ６－１００Ｓ－３０１－０１Ｐ）を使用して透析した。総体積は、元の溶液の体積の１１倍であった。精製ステップが完了したら、溶液を約１４～２０ｍｇ／ｍＬに濃縮した。ビニルスルホン官能化ＨＡ（ＨＡ－ＶＳ）を、ＴＦＦシステムから取り出し、プラスチック容器に入れ、次いでスクリュートップの蓋で閉じた。ＨＡ－ＶＳの試料を取り出し、－８０℃で凍結し、次いで凍結乾燥させた。乾燥させた試料を^{1}Ｈ－ＮＭＲ分析にかけた。

【０１４４】

ＨＡ－ＶＳのビニルスルホン置換パーセンテージの決定

乾燥させた試料約１５～１７ｍｇを秤量して、風袋引きした２ｍＬの試験管に入れた。試料を$Ｄ_{2}Ｏ$１．５ｍＬで再構成した。試料をＮＭＲ試験管に移した。試料の^{1}Ｈ－ＮＭＲを得（スキャン２５６回）、６．３～６．５ｐｐｍ（ビニルスルホン残基からの$２ＣＨ_{2}$＝プロトンの２つのピーク）および１．５～２．５ｐｐｍ（ＨＡのＮ－アセチル基からの$３ＣＨ_{3}$－プロトンの一重線）領域に特異的なピークを有するスペクトルを印刷し、積分した。修飾（パーセント）を以下の通り算出する。

【０１４５】

【化３】

$$\text{修飾\%} = 150 \times \frac{\text{ビニルスルホンの積分ピーク}}{\text{アセトアミドの積分ピーク}}$$

^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル（図１）によって、ヒアルロン酸のアセトアミドメチル基に対するビニルスルホンのピークの積分に基づくと、ＨＡが約４％のビニルスルホンの置換レベルを有することが示された。

【０１４６】
ＨＡ－ＶＳの試料を使用して乾燥重量を決定し、それを使用してＨＡ－ＶＳ溶液の特異的濃度を決定した。ＨＡ－ＶＳ濃度は１８ｍｇ／ｍＬであった。
【０１４７】
（実施例２）
ビニルスルホン修飾ヒアルロン酸（ＨＡ－ＶＳ）およびＰＥＧ３４００－ジチオールから調製されるゲルの合成
実施例１に記載の通り調製したＨＡ－ＶＳ溶液を、脱イオン水を使用して濃度１４ｍｇ／ｍＬに希釈した。ＨＡ－ＶＳ溶液１１ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れた。ＨＡ－ＶＳ溶液を、０．２μｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$４０．１ｍｇを脱イオン水０．８０２ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液［Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．、品番ＳＨ－ＰＥＧ－ＳＨ－３４００－１ｇ］を調製した。ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を１ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２μｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過した。滅菌濾過したＨＡ－ＶＳ１０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移した。０．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０μＬ（０．２μｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過した）を、ＨＡ－ＶＳ溶液に添加した。得られた溶液を十分に混合した。５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$滅菌溶液３８０μＬ［ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$１９ｍｇ］をＨＡ－ＶＳ溶液に添加した。得られた溶液を十分に混合した。先のステップを、バイオフード内で実施して滅菌性を維持した。次いで、ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を、３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れて、ゲルの形成を促進した。少なくとも１６時間後、ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液が架橋されて、ゲルが形成された。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出した。
【０１４８】
（実施例３）
ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの調製－単回押出し
実施例２のＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルを、ガラス棒を使用して物理的に細片に分割した。ゲルを６０ｍＬの滅菌シリンジに移し、シリンジキャップでキャップをした。０．９％の滅菌ＮａＣｌ４０ｍＬをゲルに添加した。プランジャーをシリンジバレルに挿入し、シリンジを逆にした。シリンジキャップを開口して任意の圧力を放出し、次いで閉じた。シリンジを数回逆にして、生理食塩水とゲルの細片が良好に混合するようにした。ゲルを終夜（少なくとも１６時間）膨潤させた。
【０１４９】
２３ｍｍのレザーパンチを使用して、直径２３ｍｍのポリエステルメッシュの円板（ＭｃＭａｓｔｅｒ　Ｃａｒｒ、カタログ番号９２１８Ｔ１３、メッシュの大きさ：２０．３×２０．３、四角形／矩形の大きさ：０．０３３１’’、ミクロン等級（ｒａｔｉｎｇ）：８４０ミクロン、開口面積パーセンテージ：４６、糸の直径：０．０１５７’’）を切り出した。この円板を２５ｍｍのシリンジフィルターホルダー（Ｃｏｌｅ　Ｐａｌｍｅｒ、カタログ番号ＥＷ－２９５５０－４２）に挿入し、フィルターホルダーを閉じた。メッシュを入れたフィルターホルダーをオートクレーブにかけた。シリンジのシリンジキャップを除去し、メッシュを入れたシリンジフィルターをシリンジと結合した。メッシュを介してゲルを押し出して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。遠心管を、スクリュートップの蓋でキャップをした。得られた生成物は、わずかに粘性の粒子のスラリーであり、実際に粒子は沈殿せず、概して懸濁したままである。先のステップを、バイオフード内で実施した。
【０１５０】
（実施例４）
ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの調製－二重押出し
実施例２のＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルを、ガラス棒を使用して物理的に細片に分割した。ゲルを６０ｍＬの滅菌シリンジに移し、シリンジキャップでキャップをした

。０．９％の滅菌ＮａＣｌ４０ｍＬをゲルに添加した。プランジャーをシリンジバレルに挿入し、シリンジを逆にした。シリンジキャップを開口して任意の圧力を放出し、次いで閉じた。シリンジを数回逆にして、生理食塩水とゲルの細片が良好に混合するようにした。ゲルを終夜（少なくとも１６時間）膨潤させた。

【０１５１】

２３ｍｍのレザーパンチを使用して、直径２３ｍｍのポリエステルメッシュの円板（ＭｃＭａｓｔｅｒ　Ｃａｒｒ、カタログ番号９２１８Ｔ１３、メッシュの大きさ：２０．３×２０．３、四角形／矩形の大きさ：０．０３３１’’、ミクロン等級：８４０ミクロン、開口面積パーセンテージ：４６、糸の直径：０．０１５７’’）を切り出した。この円板を２５ｍｍのシリンジフィルターホルダー（Ｃｏｌｅ　Ｐａｌｍｅｒ、カタログ番号ＥＷ－２９５５０－４２）に挿入し、フィルターホルダーを閉じた。メッシュを入れたフィルターホルダーをオートクレーブにかけた。シリンジのシリンジキャップを除去し、メッシュを入れたシリンジフィルターをシリンジと結合した。メッシュを介してゲルを押し出して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。次いで、押し出したゲルを６０ｍＬの滅菌シリンジに入れ、メッシュを入れたシリンジフィルターをシリンジと結合した。メッシュを介してゲルを押し出して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。遠心管を、スクリュートップの蓋でキャップをした。先のステップを、バイオフード内で実施した。

【０１５２】

（実施例５）

ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーを搭載したシリンジの調製

調製したＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリー（実施例３または実施例４から）５ｍＬを、適用するシリンジキャップを有する１０ｍＬの滅菌ガラスシリンジ（Ｂ＆Ｄ）に移した。滅菌ストッパーを、シリンジの最上部に挿入した。プランジャー棒をストッパーにねじ込んだ。シリンジを逆にし、ゲルスラリーがストッパーに達したら、シリンジキャップをわずかに緩め、シリンジ内の空気の大部分が除去されるまでプランジャーを押し下げた。シリンジキャップをきつく締めた。先のステップを、バイオフード内で実施した。

【０１５３】

（実施例６）

ビニルスルホン誘導体化ヒアルロン酸の合成

異なる置換の程度を有するＨＡ－ＶＳ組成物を、反応時間を延長したことを除き、実施例１に記載の方法を使用して調製した。反応時間を延長することによって、より高い置換の程度のビニルスルホンを得た。これらの反応の結果を、以下の表に示す。

【０１５４】

【表１】

表1

反応時間	VS修飾HAの置換の程度
15 秒	4%
1 分	8%
3 分	20%
5 分	26%
25 分	29%

（実施例７）

ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルの合成

様々なレベルのビニルスルホン置換を有するＨＡ－ＶＳ試料（実施例６）を使用して、実施例２に記載の方法および試薬比を用いてＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルを調製した。出発材料のそれぞれは、ＰＥＧ－ジチオールとの反応時にゲルを形成した。

【０１５５】

（実施例８）

ヒアルロン酸を伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの調製

ヒアルロン酸２ｇ［９．４×１０^{4}ｃｐｓ（水中３％）］を秤量して、２５０ｍＬの丸底フラスコに入れた。滅菌生理食塩水１００ｍＬを、フラスコに入れたヒアルロン酸に添加した。フラスコをロータリーエバポレーター（Ｂｕｃｈｉ）に結合し、５０ｒｐｍで少なくとも１６時間回転させて、２％ヒアルロン酸溶液を形成した。以下の一連のステップを、バイオフード内で実施した。ヒアルロン酸溶液を、０．２ｕｍの滅菌フィルターを介して濾過した。ＨＡＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）２ゲルスラリー（実施例３または４で調製した）を使用して、調製したＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）２ゲルスラリーをヒアルロン酸と混合した一連の製剤を調製した。これらの製剤を調製するために使用したヒアルロン酸溶液およびＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの体積を、以下の表に示す。

【０１５６】

【表２】

表2

製剤	ヒアルロン酸の体積 (ML)	HA－VS／PEG(SH)$_2$ゲルスラリーの体積(mL)
1	1	5（単回押出しのスラリー）
2	2	4（単回押出しのスラリー）
3	3	3（単回押出しのスラリー）
4	4	2（単回押出しのスラリー）
5	5	1（単回押出しのスラリー）
6	1	5（二重押出しのスラリー）
7	2	4（二重押出しのスラリー）
8	3	3（二重押出しのスラリー）
9	4	2（二重押出しのスラリー）
10	5	1（二重押出しのスラリー）

先の表で同定したヒアルロン酸溶液およびＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）２ゲルスラリーの指示体積を、１５ｍＬの滅菌遠心管に添加した。試験管にキャップし、構成要素が十分に混合するまで上下逆にした。次いで各製剤を、シリンジキャップを有する１０ｍＬのガラスシリンジに移し、その後プランジャーを挿入し、過剰の空気を排除した。次いでシリンジキャップをきつく締めた。

【０１５７】

（実施例９）

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルの合成

実施例１の通り調製したＨＡ－ＶＳ溶液を、脱イオン水を使用して濃度１４ｍｇ／ｍＬに希釈した。ＨＡ－ＶＳ溶液１１ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れた。ＨＡ－ＶＳ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。ＰＥＧ３４００－（ＳＨ）$_2$４０．１ｍｇを脱イオン水０．８０２ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を調製した。ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を、１ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過した。滅菌濾過したＨＡ－ＶＳ１０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移した。トリアムシノロンアセトニド（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｕ．Ｓ．Ｐグレード、微粉化）１００ｍｇを、ＨＡＶＳ溶液に添加した。遠心管にキャップし、トリアムシノロンアセトニドがＨＡ－ＶＳと均一に混合するまで、溶液を上下逆にした。滅菌濾過した（０．２ｕｍの滅菌フィルター）０．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０μＬを、ＨＡ－

ＶＳ溶液に添加した。得られた溶液を十分に混合した。５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$滅菌溶液３８０μＬを、ＨＡ－ＶＳ溶液に添加した。得られた溶液を十分に混合した。先のステップを、バイオフード内で実施した。次いでＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を、３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れた。この段階で、ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ（ＳＨ）$_2$溶液が架橋されて、ゲルが形成された。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出した。得られたゲルは、約０．２％のトリアムシノロンアセトニドを含有する。

【０１５８】

先の手順を、トリアムシノロンアセトニド（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｕ．Ｓ．Ｐグレード、微粉化）２０ｍｇをＨＡ－ＶＳ溶液に添加したことを除き、やはり前述の通り実施した。

【０１５９】

（実施例１０）

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの調製：単回押出し

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲル（実施例９）を、ガラス棒を使用して物理的に細片に分割した。ゲルを６０ｍＬの滅菌シリンジに移し、シリンジキャップでキャップをした。０．９％の滅菌ＮａＣｌ４０ｍＬをゲルに添加した。プランジャーをシリンジバレルに挿入し、シリンジを逆にした。シリンジキャップを開口して任意の圧力を放出し、次いで閉じた。シリンジを数回逆にして、生理食塩水とゲルの細片が良好に混合するようにした。ゲルを終夜（少なくとも１６時間）膨潤させた。

【０１６０】

２３ｍｍのレザーパンチを使用して、直径２３ｍｍのポリエステルメッシュの円板（ＭｃＭａｓｔｅｒ　Ｃａｒｒ、カタログ番号９２１８Ｔ１３、メッシュの大きさ：２０．３×２０．３、四角形／矩形の大きさ：０．０３３１’’、ミクロン等級：８４０ミクロン、開口面積パーセンテージ：４６、糸の直径：０．０１５７’’）を切り出した。この円板を２５ｍｍのシリンジフィルターホルダー（Ｃｏｌｅ　Ｐａｌｍｅｒ、カタログ番号ＥＷ－２９５５０－４２）に挿入し、フィルターホルダーを閉じた。メッシュを入れたフィルターホルダーをオートクレーブにかけた。シリンジのシリンジキャップを除去し、メッシュを入れたシリンジフィルターをシリンジと結合した。メッシュを介してゲルを押し出して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。遠心管を、スクリュートップの蓋でキャップをした。先のステップを、バイオフード内で実施した。

【０１６１】

（実施例１１）

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの調製：二重押出し

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲル（実施例９）を、ガラス棒を使用して物理的に細片に分割した。ゲルを６０ｍＬの滅菌シリンジに移し、シリンジキャップでキャップをした。０．９％の滅菌ＮａＣｌ４０ｍＬをゲルに添加した。プランジャーをシリンジバレルに挿入し、シリンジを逆にした。シリンジキャップを開口して任意の圧力を放出し、次いで閉じた。シリンジを数回逆にして、生理食塩水とゲルの細片が良好に混合するようにした。ゲルを終夜（少なくとも１６時間）膨潤させた。

【０１６２】

２３ｍｍのレザーパンチを使用して、直径２３ｍｍのポリエステルメッシュの円板（ＭｃＭａｓｔｅｒ　Ｃａｒｒ、カタログ番号９２１８Ｔ１３、メッシュの大きさ：２０．３×２０．３、四角形／矩形の大きさ：０．０３３１’’、ミクロン等級：８４０ミクロン、開口面積パーセンテージ：４６、糸の直径：０．０１５７’’）を切り出した。この円板を２５ｍｍのシリンジフィルターホルダー（Ｃｏｌｅ　Ｐａｌｍｅｒ、カタログ番号Ｅ

Ｗ－２９５５０－４２）に挿入し、フィルターホルダーを閉じた。メッシュを入れたフィルターホルダーをオートクレーブにかけた。シリンジのシリンジキャップを除去し、メッシュを入れたシリンジフィルターをシリンジと結合した。メッシュを介してゲルを押し出して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。次いで、押し出したゲルを６０ｍＬの滅菌シリンジに入れ、メッシュを入れたシリンジフィルターをシリンジと結合した。メッシュを介してゲルを押し出して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れた。遠心管を、スクリュートップの蓋でキャップをした。先のステップを、バイオフード内で実施した。

【０１６３】

（実施例１２）

トリアムシノロンアセトニドゲルスラリーを入れたシリンジの調製

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリー（実施例１０または実施例１１）５ｍＬを、適用するシリンジキャップを有する１０ｍＬの滅菌ガラスシリンジ（Ｂ＆Ｄ）に移した。滅菌ストッパーを、シリンジの最上部に挿入した。プランジャー棒をストッパーにねじ込んだ。シリンジを逆にし、ゲルスラリーがストッパーに達したら、シリンジキャップをわずかに緩め、シリンジ内の空気の大部分が除去されるまでプランジャーを押し下げた。シリンジキャップをきつく締めた。先のステップを、バイオフード内で実施した。

【０１６４】

（実施例１３）

ヒアルロン酸を伴うトリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの調製

ヒアルロン酸２ｇ［９．４×１０^{4}ｃｐｓ（水中３％）］を秤量して、２５０ｍＬの丸底フラスコに入れた。滅菌生理食塩水１００ｍＬを、フラスコに入れたヒアルロン酸に添加した。フラスコをＲｏｔａｖａｐ（Ｂｕｃｈｉ）に結合し、５０ｒｐｍで少なくとも１６時間回転させて、２％ヒアルロン酸溶液を形成した。トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリー（実施例１０または１１で調製した）を使用して、トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーをヒアルロン酸と混合した一連の製剤を調製した。これらの製剤を調製するために使用したヒアルロン酸溶液およびトリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの体積を、以下の表に示す。

【０１６５】

【表３】

表3

製剤	ヒアルロン酸の体積 (ML)	トリアムシノロンアセトニドを含有するHA－VS／PEG(SH)2ゲルスラリーの体積(mL)
1	1	5（単回押出しのスラリー）
2	2	4（単回押出しのスラリー）
3	3	3（単回押出しのスラリー）
4	4	2（単回押出しのスラリー）
5	5	1（単回押出しのスラリー）
6	1	5（二重押出しのスラリー）
7	2	4（二重押出しのスラリー）
8	3	3（二重押出しのスラリー）
9	4	2（二重押出しのスラリー）
10	5	1（二重押出しのスラリー）

先の表で同定したヒアルロン酸溶液およびトリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）^{2}ゲルスラリーの指示体積を、１５ｍＬの滅菌遠心管に添加した。試験管にキャップし、構成要素が十分に混合するまで上下逆にした。次いで各製剤を

、シリンジキャップを有する１０ｍＬのガラスシリンジに移し、その後プランジャーを挿入し、過剰の空気を排除した。次いでシリンジキャップをきつく締めた。先のステップを、バイオフード内で実施した。

【０１６６】

（実施例１４）

トリアムシノロンアセトニドの放出試験のための試料の調製

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲル（実施例１１に従って調製した）１．５ｍＬを、２０ｍＬのガラスシンチレーションバイアルに移した。ゲル化材料を入れたシンチレーションバイアルに、ＰＢＳ１５ｍＬ（ｐＨ７．４）をピペットで入れた。シンチレーションバイアルをスクリュー付きの蓋で閉じ、バイアルを、３７℃のオーブンに入れたロッキングシェーカー（Ｂａｒｎｓｔｅａｄ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｍｏｄｅｌ　Ｍ２６１２５）上に置いた。

【０１６７】

（実施例１５）

放出試験の緩衝液のサンプリング

トリアムシノロンアセトニドを搭載したゲルおよびＰＢＳ緩衝液（実施例１４に記載）を入れたシンチレーションバイアルを、様々な時点で３７℃のオーブンから取り出した。残りのゲルスラリーを、シンチレーションバイアルの底部に沈殿させた。スクリュー付きの蓋を除去し、セロロジカルピペットを使用してＰＢＳ緩衝液１３ｍＬを取り出し、５０ｍＬのプラスチック遠心管に移した。次いで、新しいＰＢＳ１３ｍｌ（ｐＨ７．４）を、ゲルを含有するシンチレーションバイアルにピペットで入れた。

【０１６８】

（実施例１６）

トリアムシノロンアセトニドを含有する放出媒体のＨＰＬＣ分析

緩衝液試料（実施例１５）１３ｍＬを、８０：２０のＭｅＯＨ：Ｈ２Ｏで４０ｍＬに希釈した。試料をボルテックスし、約１ｍＬをＨＰＬＣバイアルに移した。緩衝液試料のトリアムシノロンアセトニド含量を、以下のクロマトグラフィー条件を使用して決定した。

ＨＰＬＣ：Ａｇｉｌｅｎｔ　１１００シリーズ
カラム：Ｚｏｒｂａｘ　ＳＢ－Ｃ１８、５μ、４．６×１６０ｍｍ
カラム温度：３０℃
流速：１．０ｍＬ／分
検出：ＵＶ２３９ｎｍ
実施時間：８分
注射体積：５０μｌ
移動相：ＡＣＮ中０．０５％ＴＦＡ：Ｈ２Ｏ中０．０５％ＴＦＡ、５６：４４
ＴＡの保持時間：約３．３分　。

【０１６９】

緩衝液試料中のトリアムシノロンアセトニドの量を、ピーク面積をトリアムシノロンアセトニド濃度と相関させることによって較正曲線により定量化した。トリアムシノロンアセトニドの較正曲線用の試料を、メタノール中トリアムシノロンアセトニドの原液を用意し、次いでＡＣＮ中０．０５％ＴＦＡ：Ｈ$_2$Ｏ中０．０５％ＴＦＡ、５６：４４で連続希釈することによって調製した。先のクロマトグラフィー条件を使用してこれらの試料を分析し、得られたピーク面積を、トリアムシノロンアセトニド濃度に対してプロットした。放出（パーセント）を図２に示し、放出された蓄積質量を図３に示し、サンプリング点１つ当たりの放出量を図４に示す。

【０１７０】

試料を、月曜から金曜の２４時間毎に取り出し、土曜／日曜にはサンプリングを実施しなかった。

【０１７１】

【表４】

表4

サンプリング番号	サンプリング時間（日）
1	1
2	2
3	3
4	7
5	8
6	9
7	10
8	11
9	14
10	15

図２に示す通り、本質的にすべての薬物が、１２のサンプリング点によって放出された。薬物は、経時的に線形方式で制御された形で放出された。有利には、ゲル内に著しい量の残りの薬物が封入されずに、本質的にすべての薬物が放出された。さらに、最初に勢いよく薬物が放出されることなく、薬物が経時的にゆっくり持続方式で放出された。図３は同様に、複数のサンプリング点にわたって放出された薬物の蓄積（ミリグラム）を示す。図４に示す通り、ゲルから放出された薬物の量は、サンプリング点の間で本質的に一定であったが、このことは、薬物の経時的に制御された持続方式の線形放出を示すものである。

【０１７２】

（実施例１７）

例示的なＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの関節内注射

ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの試料（実施例５で調製した）を、参照点を提供するためのさらなる試験材料２～４と共に、骨が十分に成長した雌性ヤギの後膝関節（膝）に関節内注射した。使用したヤギモデルに関係するさらなる説明については、Ｄ．　Ｊａｃｋｓｏｎおよび Ｔ．　Ｓｉｍｏｎ、Ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ　ａｎｄ　Ｃａｒｔｉｌａｇｅ、第１４巻、１２版、１２４８～１２５頁も参照のこと。

試験材料１：ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲル（実施例５）

試験材料２：ビスチオール架橋剤で架橋したＰＥＧジアクリレート

試験材料３：ゲルを形成するために架橋した、４個の腕を有するリシン官能化ＰＥＧ

試験材料４：ＰＥＧジアクリレートから生成したゲル（材料をオートクレーブにかけた）。

【０１７３】

試験材料２～４の調製に関する実施例３１～３３を参照のこと。すべての注射を厳密な無菌状態で実施した。ジアゼパム（０．１～０．５ｍｇ／ｋｇ）およびケタミン（４．４～７．５ｍｇ／ｋｇ）の静脈内注射を実施して、動物を麻酔した。各膝を、引出し、運動範囲、腫れ、体温、捻髪音、膝蓋骨トラッキングおよび外反／内反異常について身体検査した。

【０１７４】

すべての注射を、通常の無菌技術を利用して実施した。左および右の後膝関節を、注射のためにその領域をクリップで止めて準備し、次いでその領域をクロルヘキシジン（ｃｈｌｏｒｏｈｅｘｉｄｉｎｅ）スクラブで清浄にした。動物を背臥位に置いた。右の後膝関節を、クロルヘキシジンスクラブと７０％イソプロピルアルコールで交互に３回清浄にし、ヨウ素溶液を塗布した。

【０１７５】

標準の技術を使用して、各後膝関節に注射した。２インチ２１ゲージの大きさの滅菌針

を、前内側進入路から関節内空間に導入した。大腿骨内側顆の外側顆間のＶ字壁を感じたら、針をわずかに戻した。ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ（ＳＨ）$_2$ゲルスラリー１．５ｍｌを、右関節に注射した。注射針を除去し、注射部位に圧力をかけて維持した。次いで、注射した後膝関節を、全運動範囲にわたって２０回回転させた。

【０１７６】

苦痛および不快感の徴候を示す任意の動物について注射後にチェックを実施し、必要に応じて追加の鎮痛剤を投与した。すべての治療を、適切な試験文書作成により記録した。

【０１７７】

注射した動物を、全身麻酔剤導入のためにジアゼパム０．２２ｍｇ／ｋｇおよびケタミン１０ｍｇ／ｋｇからなる静脈内注射を用いて、最初の注射の２４±１時間後に人道的に屠殺した。この後、心停止が確認されるまで、麻酔下の動物に過量の濃塩化カリウム（ＫＣｌ）をＩＶ投与した。

【０１７８】

膝関節の収集後、関節を開口し、表５に記載の通り、注射した後膝関節の全体的な評価を実施した。写真による文書作成は行わなかった。

【０１７９】

【表５】

表5:全体的な評価および試料収集

試料	全体的な評価	試料収集	スコア
滑液(左および右)	X	X	X
左および右の膝関節	X		X
左および右の滑膜	X		X

さらに、表６に概説の通り、関節の半定量的類別（ｇｒａｄｉｎｇ）を単一観測者によって実施した。

【０１８０】

【表６】

表6:全体的な関節評価の類別尺度

スコア	呈色	充血	浮腫
0	正常	なし	なし
1	わずかに黄色	わずか	わずか
2	黄色	中程度	中程度
3		著しい	著しい

関節の全体的な総評価スコアは、呈色、充血および浮腫のスコアの合計とした（０～８点）。図６を参照のこと。

【０１８１】

開口した関節から滑液を収集した後、総体積を記録した。体液を、粘度、透明性および色について全体的に評価し、表７の通り半定量的に類別した。血球計数器を用いて、総白血球を計数した。さらに、微分顕微鏡的分析のために滑液塗抹を生成した。個々にラベルを付した滑液（ｃｒｙｏｖｉａｌ）として、残りの滑液を－８０℃で凍結保存した。滑液塗抹を潜在的な将来分析のために保持した。

【０１８２】

【表７】

表7:滑液の説明およびスコア

スコア	色	透明性	糸引き性(String)
0	S=淡黄色	C=透明	N=正常
1	P=ピンク色	H=わずかに濁っている	A=異常
2	Y=黄色／R=赤色	D=濁っている	W=水っぽい
3	B=血液色	T=暗く濁っている	

滑液の総スコアは、色、透明性および糸引き性のスコアの合計とした（０～８点）。

【０１８３】

結果を図５～８のグラフに示す。図５から分かる通り、本明細書に記載の特徴を有する例示的なゲルは、試験材料２～４について観測された滑液白血球数よりも著しく少ない滑液白血球数を示した。実際、試験材料２～４の白血球数は、試験材料１について観測された数の約５倍、９倍および８倍を超えていた。試験材料２～４は、製薬上の使用へのそれらの適切性を表すインビトロ挙動（例えば、化学、ゲル特性、投与の容易性等）を示すが、これらの結果は、試験材料１およびそれに類似の材料が、ヤギモデルで調査した場合、比較できると思われる試験材料と比較して炎症促進性が著しく低い点に関して、明らかに優れていることを示すものである。驚くべきことに、すべての他の指標は、関節内補充療法および他の関係する使用への他の試験材料の適切性を提示した。

【０１８４】

注射したヤギの膝に関する絶対的滑液白血球数（絶対数＝総体積×滑液白血球数）を実証する図６は、前述のことをさらに支持している。すなわち例示的な試験材料１は、絶対的滑液白血球数に基づくと、ヤギモデルにおいて試験材料２～４よりも際立って低い炎症反応を示している。試験材料２～４の値は、試験材料１の約４倍、１２倍および９倍を超えており、これはヤギの膝において評価した場合、試験材料１が驚くほど著しく優れていることを示すものである。

【０１８５】

図７は、実施例１７に記載の通り、１．５ｍｌの注射の２４時間後に評価した、試験材料の治療群に関する注射したヤギの膝の滑液白血球の特異的分布（各群当たりの平均）を表すグラフである。各試験材料について、多形核白血球（ＰＭＮ）、リンパ球、単球および好酸球（Ｅｏｓ）の分布を示す。ＰＭＮおよびＥｏｓは、様々な急性慢性炎症に関与する重要な細胞である。試験材料１に関するＰＭＮのパーセンテージ（リンパ球（ｌｙｍｐｏｃｙｔｅ）、単球および好酸球に対する）は、他の試験材料よりも著しく低く（試験材料２～４が７０％以上であるのに対して約５０％）、このことは、調査した他の材料と比較して、例示的な試験材料１の有利に低い炎症促進性をさらに示すものである。

【０１８６】

最後に図８は、それぞれ代表的な試験材料について注射したヤギの膝の滑液の平均総スコア、関節組織の平均総スコア、ならびに滑液および関節組織の組合せのスコア（表６）を示す。

全体的総スコア＝滑液スコア＋関節の総スコア。

滑液または関節の総スコアの最大スコアは８であり、０は正常である。

全体的総スコアの最大スコアは１６であり、０は正常である。

【０１８７】

図８に示した通り、試験材料１について特筆すべき結果が示されている。実際、前述の通り視覚的な検査によって決定したすべてのスコアについて、試験材料１は、本質的に炎症反応を引き起こさないことが示され、滑液、関節組織およびその組合せのスコアは、正常であるか、またはほぼ正常であるとみなされる。それとは対照的に、代表的な試験材料２～４は、共に正常でない滑液および関節の視覚的特徴をもたらし、試験材料の投与によって生じる膝関節の炎症を示した。これらの結果は、インビボでの治療上の適用に対する適切性に関して、例示的な試験材料１の驚くべき有益な特性を実証するものである。

【０１８８】
（実施例１８）
ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_4$ゲルの合成
実施例１の通り調製したＨＡ－ＶＳ溶液を、脱イオン水を使用して濃度１２．６ｍｇ／ｍＬに希釈する。ＨＡ－ＶＳ溶液１８ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れる。ＨＡ－ＶＳ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れる。ＰＥＧ（ＳＨ）$_4$であるＣ（ＣＨ$_2$Ｏ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＳＨ）$_4$［Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．、Ｍｗ１０，０００、品番４ａｒｍＰＥＧ－ＳＨ－１０ｋＤ－１ｇ］（電子線処理済み）２００ｍｇを、滅菌濾過した１Ｍ生理食塩水中０．１７Ｍリン酸ナトリウム２ｍＬ（ｐＨ７．４）に添加する。溶解したら、ＰＥＧ－（ＳＨ）$_4$溶液をＨＡ－ＶＳ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。次いで、ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_4$溶液を室温でゲル化する。ゲル化材料を、実施例３および４に記載のものと同様にして、ゲルスラリーに変換することができる。ゲルを、実施例９、１０および１１に記載の手順と類似の手順を使用して、トリアムシノロンアセトニドの存在下で調製することができる。ヒアルロン酸を、実施例８に記載の手順と類似の手順で、ゲル製剤に添加することができる。ヒアルロン酸を、実施例１３に記載の手順と類似の手順で、トリアムシノロンアセトニドゲル製剤に添加することができる。
【０１８９】
（実施例１９）
カルボキシメチル－ヒアルロン酸（ＣＭ－ＨＡまたはＣＡＲＢＹＬＡＮ（商標））の合成
ＮａＯＨ水溶液（２００ｍｌ、４５％ｗ／ｖ）を５００ｍＬのビーカーに添加し、周囲温度で撹拌した（磁気撹拌機）。ヒアルロン酸粉末（２０ｇ）［Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ、ＭＷ０．８～１．０百万］を、５００ｍｌのビーカーに添加した。２時間静置した後、ヒアルロン酸混合物を、イソプロパノール１，５００ｍｌを入れテフロン（登録商標）でコーティングした磁気撹拌棒を備えた４Ｌのビーカーに移し、次いでクロロ酢酸２０ｇのイソプロパノール５００ｍｌ溶液を、磁気撹拌器を用いて添加した。周囲温度で１時間撹拌した後、撹拌を停止し、材料を約１０～２０分間かけて沈殿させた。できる限り多くの上清を、混合物から吸引した。蒸留水１，０００ｍｌを、得られた混合物に添加した。溶解したら、６．０ＮのＨＣｌ（ＨＣ１）を添加することによって、溶液のｐＨをｐＨ約７．０に調節した。次いで、ＤＩ水を使用して溶液を２Ｌにする。ＤＩ水１０Ｌを交換緩衝液として使用して、溶液をタンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）によって精製した。
【０１９０】
さらに、カルボキシメチルヒアルロン酸の構造、合成および特徴付けは、国際公開第２００５／０５６６０８号（図５および実施例３）に記載されており、その関係部分は、それら全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【０１９１】
（実施例２０）
カルボキシメチル－ヒアルロン酸－ジチオビス（プロパン酸ジヒドラジド（ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨまたはＣＡＲＢＹＬＡＮ（商標）－Ｓ）の合成
３，３’－ジチオビス（プロパン酸ジヒドラジド）（ＤＴＰ）を、過去に記載の通り合成した（Ｖｅｒｃｒｕｙｓｓｅ，Ｋ．Ｐ．；Ｍａｒｅｃａｋ，Ｄ．Ｍ．；Ｍａｒｅｃｅｋ，Ｊ．Ｆ．；Ｐｒｅｓｔｗｉｃｈ，Ｇ．Ｄ．「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｅｗ ｐｏｌｙｖａｌｅｎｔ ｈｙｄｒａｚｉｄｅ ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｅｄ ｈｙｄｒｏｇｅｌｓ ｏｆ ｈｙａｌｕｒｏｎｉｃ ａｃｉｄ．」Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．（１９９７年）８巻：６８６～６９４頁；Ｓｈｕ，Ｘ．Ｚ．；Ｌｉｕ，Ｙ．；Ｌｕｏ，Ｙ．；Ｒｏｂｅｒｔｓ，Ｍ．Ｃ．；Ｐｒｅｓｔｗｉｃｈ，Ｇ．Ｄ．「Ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ ｃｒｏｓｓｌｉｎｋｅｄ ｈｙａｌｕｒｏｎａｎ ｈｙｄｒｏｇｅｌｓ．」Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ（２００２年）３巻：１３０４～１３１１頁）。ＤＴＰ（１６

．７ｇ、０．０７ｍｏｌ）を、先で調製したＣａｒｂｙｌａｎ（商標）溶液に添加し、ＨＣｌまたはＮａＯＨ溶液のいずれかを添加することによって、溶液のｐＨを４．７５に調節した。次いで、１－エチル－３［３－（ジメチルアミノ）プロピル］カルボジイミド（ＥＤＣ）［Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ］０．３８４ｇを添加し、磁気撹拌器を持続的に用いて室温で６．０ＮのＨＣｌを添加することによって、溶液のｐＨをｐＨ４．７５に維持した。

【０１９２】

４時間後、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）［Ｂｉｏｖｅｃｔｒａ］５０ｇを添加し、濃ＮａＯＨ溶液を添加することによって、溶液のｐＨを８．５に調節した。次いで磁気撹拌器によって室温で１２～２４時間撹拌した後、６．０NのＨＣｌを添加することによって、反応混合物のｐＨをｐＨ３．０に調節した。酸性にした溶液を精製し、１ｍＭのＨＣｌ２０Ｌ、ｐＨ３．０を使用して、タンジェンシャル流体濾過（ＴＦＦ）によって濃縮した。次いで、溶液を約１Ｌに濃縮した。

【０１９３】

カルボキシメチル－ヒアルロン酸－ジチオビス（プロパン酸ジヒドラジド）の構造、合成および特徴付けは、国際公開第２００５／０５６６０８号（図５および実施例４）に記載されており、その関係部分は、それら全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１９４】

（実施例２１）

ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲルの合成

実施例２０で調製したＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨの溶液を、脱イオン水を使用して濃度１７．５ｍｇ／ｍＬに希釈する。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液３０ｍＬを、６０ｍＬの滅菌シリンジに入れる。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れる。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$６００ｍｇを０．２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液１５ｍＬ（ｐＨ７．４）に溶解することによって、４０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）２溶液［Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．、ＭＷ３４００、品番ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ３４００－１ｇ］を調製する。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を、２０ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過する。滅菌濾過したＣＭ－ＨＡＤＴＰＨ２０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移す。ＰＥＧ－（アクリレート）２溶液１０ｍＬを、ＣＭ－ＨＡＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。次いで、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を室温でゲル化する。

【０１９５】

（実施例２２）

ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲルスラリー

ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲル（実施例２１で調製した）を、それぞれ実施例３および４に記載の手順と類似の手順を使用して、ゲルスラリーに変換する。

【０１９６】

（実施例２３）

トリアムシノロンアセトニドを含有するＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲル

実施例２０で調製したＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨの溶液を、脱イオン水を使用して濃度１４ｍｇ／ｍＬに希釈する。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液１１ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れる。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れる。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$４０．１ｍｇを脱イオン水０．８０２ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液［Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．、ＭＷ３４００、品番ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ３４００－１ｇ］を調製する。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を、１ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過する。滅菌濾

過したＣＭ－ＨＡＤＴＰＨ１０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移す。トリアムシノロンアセトニド（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｕ．Ｓ．Ｐグレード、微粉化）２０ｍｇを、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加した。遠心管にキャップし、トリアムシノロンアセトニドがＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨと均一に混合するまで、溶液を上下逆にした。０．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０μＬを、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。滅菌した５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液３８０μＬ［ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$１９ｍｇ］を、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。次いで、トリアムシノロンアセトニドを含有するＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を、３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れる。この段階で、トリアムシノロンアセトニドを含有するＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液が架橋されて、ゲルが形成される。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出す。

【０１９７】

ゲルの合成を、それぞれトリアムシノロンアセトニド３３ｍｇ、５０ｍｇ、７５ｍｇ、１００ｍｇ、１２５ｍｇ、１５０ｍｇ、１７５ｍｇ、２００ｍｇ、２２５ｍｇ、２５０ｍｇ、３７５ｍｇ、４００ｍｇおよび５００ｍｇを使用して反復する。

【０１９８】

ゲルを、実施例３および４に記載の手順と類似の手順を使用して、ゲルスラリーに変換した。

【０１９９】

（実施例２４）

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーの合成

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルを、各ゲルを調製するためにそれぞれトリアムシノロンアセトニド３３ｍｇ、５０ｍｇ、７５ｍｇ、１００ｍｇ、１２５ｍｇ、１５０ｍｇ、１７５ｍｇ、２００ｍｇ、２２５ｍｇ、２５０ｍｇ、３７５ｍｇ、４００ｍｇおよび５００ｍｇを使用したことを除き、実施例９に記載の手順と類似の手順を使用して調製する。

【０２００】

ゲルを、実施例３および４に記載の手順と類似の手順を使用して、ゲルスラリーに変換した。

【０２０１】

（実施例２５）

ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$ゲルの合成

実施例２０で調製したＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨの溶液を、脱イオン水を使用して濃度１４ｍｇ／ｍＬに希釈する。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液１１ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れる。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れる。ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$４０．１ｍｇを脱イオン水０．８０２ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液［Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．、ＭＷ１０，０００、品番４ａｒｍ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ１０Ｋ－１ｇ］を調製する。ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液を、１ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過した。滅菌濾過したＣＭ－ＨＡＤＴＰＨ１０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移す。０．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０μＬを、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。滅菌した５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液５６０μＬ［ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$２８ｍｇ］を、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。次いで、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液を、３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れる。この段階で、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液が架橋されて、ゲルが形成される。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出す。ゲル化材料を、実施例３および４に

記載のものと同様にして、ゲルスラリーに変換することができる。ゲルを、実施例９、１０および１１に記載の手順と類似の手順を使用して、トリアムシノロンアセトニドの存在下で調製することができる。ヒアルロン酸を、実施例８に記載の手順と類似の手順で、ゲル製剤に添加することができる。ヒアルロン酸を、実施例１３に記載の手順と類似の手順で、トリアムシノロンアセトニドゲル製剤に添加することができる。

【０２０２】

（実施例２６）

ヒアルロン酸－ジチオビス（プロパン酸ジヒドラジド（ＨＡ－ＤＴＰＨ）の合成

３，３’－ジチオビス（プロパン酸ジヒドラジド）（ＤＴＰ）を、過去に記載の通り合成した（Ｖｅｒｃｒｕｙｓｓｅ，Ｋ．Ｐ．；Ｍａｒｅｃａｋ，Ｄ．Ｍ．；Ｍａｒｅｃｅｋ，Ｊ．Ｆ．；Ｐｒｅｓｔｗｉｃｈ，Ｇ．Ｄ．「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｅｗ ｐｏｌｙｖａｌｅｎｔ ｈｙｄｒａｚｉｄｅ ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｅｄ ｈｙｄｒｏｇｅｌｓ ｏｆ ｈｙａｌｕｒｏｎｉｃ ａｃｉｄ．」Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．（１９９７年）８巻：６８６～６９４頁；Ｓｈｕ，Ｘ．Ｚ．；Ｌｉｕ，Ｙ．；Ｌｕｏ，Ｙ．；Ｒｏｂｅｒｔｓ，Ｍ．Ｃ．；Ｐｒｅｓｔｗｉｃｈ，Ｇ．Ｄ．「Ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ ｃｒｏｓｓｌｉｎｋｅｄ ｈｙａｌｕｒｏｎａｎ ｈｙｄｒｏｇｅｌｓ．」Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ（２００２年）３巻：１３０４～１３１１頁）。ＤＴＰ（１６．７ｇ、０．０７ｍｏｌ）を、先で調製したヒアルロン酸（ＤＩ水１０００ｍＬに溶解したヒアルロン酸２０ｇ［Ｍｗ０．８～１．０百万］）溶液に添加し、ＨＣｌまたはＮａＯＨ溶液のいずれかを添加することによって、溶液のｐＨを４．７５に調節した。次いで、１－エチル－３［３－（ジメチルアミノ）プロピル］カルボジイミド（ＥＤＣ）［Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ］０．３８４ｇを添加し、磁気撹拌器を持続的に用いて室温で６．０ＮのＨＣｌを添加することによって、溶液のｐＨをｐＨ４．７５に維持した。４時間後、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）［Ｂｉｏｖｅｃｔｒａ］５０ｇを添加し、濃ＮａＯＨ溶液を添加することによって、溶液のｐＨを８．５に調節した。次いで磁気撹拌器によって室温で１２～２４時間撹拌した後、６．０ＮのＨＣｌを添加することによって、反応混合物のｐＨをｐＨ３．０に調節した。酸性にした溶液を精製し、１ｍＭのＨＣｌ２０Ｌ、ｐＨ３．０を使用して、タンジェンシャル流体濾過（ＴＦＦ）によって濃縮した。次いで、溶液を約１Ｌに濃縮した。

【０２０３】

（実施例２７）

ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲルの合成

実施例２６で調製したＨＡ－ＤＴＰＨの溶液を、脱イオン水を使用して濃度１４ｍｇ／ｍＬに希釈する。ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液１１ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れる。ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れる。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$４０．１ｍｇを脱イオン水０．８０２ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液［Ｌａｙｓａｎ Ｂｉｏ Ｉｎｃ．、ＭＷ３４００、品番ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ３４００－１ｇ］を調製する。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を、１ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過する。滅菌濾過したＨＡ－ＤＴＰＨ１０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移す。０．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０μＬを、ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。滅菌した５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液３８０μＬ［ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$１９ｍｇ］を、ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。次いで、ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を、３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れる。この段階で、ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液が架橋されて、ゲルが形成される。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出す。

【０２０４】

（実施例２８）

ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲルスラリー

ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲル（実施例２７で調製した）を、それぞれ実施例３および４に記載の手順と類似の手順を使用して、ゲルスラリーに変換する。

【０２０５】

（実施例２９）

トリアムシノロンアセトニドを含有するＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$ゲル

実施例２０で調製したＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨの溶液を、脱イオン水を使用して濃度１７．５ｍｇ／ｍＬに希釈する。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液３０ｍＬを、６０ｍＬの滅菌シリンジに入れる。ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れる。滅菌したトリアムシノロンアセトニド粉末１００ｍｇを添加し、得られた混合物を十分に混合する。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$６００ｍｇを０．２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液１５ｍＬ（ｐＨ７．４）に溶解することによって、４０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液［Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．、ＭＷ３４００、品番ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ３４００－１ｇ］を調製する。ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を、２０ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過する。滅菌濾過したＣＭ－ＨＡＤＴＰＨ２０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移す。１０ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。次いで、ＣＭ－ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_2$溶液を室温でゲル化する。

【０２０６】

ゲルの合成を、それぞれトリアムシノロンアセトニド３３ｍｇ、５０ｍｇ、７５ｍｇ、１２５ｍｇ、１５０ｍｇ、１７５ｍｇ、２００ｍｇ、２２５ｍｇ、２５０ｍｇ、３７５ｍｇ、４００ｍｇおよび５００ｍｇを使用して反復する。

【０２０７】

ゲルを、実施例３および４に記載の手順と類似の手順を使用して、ゲルスラリーに変換する。

【０２０８】

（実施例３０）

ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$ゲルの合成

実施例２０で調製したＨＡ－ＤＴＰＨの溶液を、脱イオン水を使用して濃度１４ｍｇ／ｍＬに希釈する。ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液１１ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れる。ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、５０ｍＬの滅菌遠心管に入れる。ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$４０．１ｍｇを脱イオン水０．８０２ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液［Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ　Ｉｎｃ．、ＭＷ１０，０００、品番４ａｒｍ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ１０Ｋ－１ｇ］を調製する。ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液を、１ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過した。滅菌濾過したＨＡ－ＤＴＰＨ１０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移す。０．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０μＬを、ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。滅菌した５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液５６０μＬ［ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$２８ｍｇ］を、ＨＡ－ＤＴＰＨ溶液に添加する。得られた溶液を十分に混合する。次いで、ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液を、３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れる。この段階で、ＨＡ－ＤＴＰＨ／ＰＥＧ－（アクリレート）$_4$溶液が架橋されて、ゲルが形成される。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出す。ゲル化材料を、実施例３および４に記載のものと同様にして、ゲルスラリーに変換することができる。ゲルを、実施例９、１０および１１に記載の手順と類似の手順を使用して、トリアムシノロンアセトニドの存在下で調製することができる。ヒアルロン酸を、実施例８に記載の手順と類似の手順で、ゲル製剤に添加することができる。ヒアルロン酸を、実施例１３に記載の手順と類似の手順で、トリアムシノロンアセトニドゲル製剤に添加す

ることができる。

【０２０９】

（実施例３１）

ＰＥＧ－ジアクリレートゲル（試験材料４）の調製

ポリ（エチレングリコール）－ジアクリレート［ＰＥＧ－ＤＡ］（Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ、品番ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ－３４００－１ｇ）１．４６６ｇを秤量して、１２５ｍＬの滅菌ボトルに入れた。滅菌生理食塩水２２ｍＬをＰＥＧ－ＤＡに添加した。溶解したら、０．２ｕｍのシリンジフィルターを介してＰＥＧ－ＤＡ／ＮａＣｌを濾過して、消毒したエルレンマイヤーフラスコに入れた。０．１５０Ｍ炭酸塩緩衝液、ｐＨ８．２を、０．２ｕｍのシリンジフィルターを介して濾過し、この滅菌溶液１ｍＬをＰＥＧ－ＤＡ溶液に添加した。フラスコをゴムのセプタムでキャップし、窒素を１０分間発泡させることによって溶液を脱気した。０．２ｕｍフィルターをガスラインに結合して、空気が滅菌されるようにする。セプタムの蓋を備えた焼結（ｓｃｉｎｔｅｒｅｄ）ガラスバイアルにアスコルビン酸ナトリウム１．２ｇを添加することによって、４００ｍｇ／ｍＬのアスコルビン酸ナトリウム溶液を調製した。ＤＩ水３ｍＬをバイアルに添加した。溶解したら、溶液を、０．２ｕｍのシリンジフィルターを介して濾過して、１５ｍｌの滅菌遠心管に入れた。滅菌濾過した４００ｍｇ／ｍＬのアスコルビン酸ナトリウム０．８ｍＬを、ＰＥＧ－ＤＡ溶液に添加した。滅菌濾過した４００ｍｇ／ｍＬの過硫酸ナトリウム溶液０．８を、ＰＥＧ－ＤＡ溶液に添加した。溶液を旋回することによって混合した。フラスコに赤色ゴムセプタム（ｓｅｐｔａ）でキャップし、窒素を１５分間発泡させることによって溶液を脱気した。０．２ｕｍフィルターをガスラインに結合して、使用する窒素によって溶液が脱気されるようにした。溶液を３７℃で少なくとも１８時間置いて、ゲルを形成させた。ゲルを３０ｍＬのシリンジに移した。２３ｍｍのレザーパンチを使用して、２３ｍｍのメッシュの円板をメッシュシートから切り出した。メッシュの円板を、除去される支持ふるいを有する２５ｍｍのポリカーボネートシリンジフィルターに入れた。ゲルを、メッシュ（１ｍｍ×１ｍｍの目）を介して押し出して、２５０ｍＬのビーカーに入れた。滅菌生理食塩水１００ｍＬを、押し出したゲル２５ｍｌに添加した。４０分後に生理食塩水の上清を捨て、さらなる滅菌生理食塩水１２５ｍＬを添加した。これを３回反復した。最後の洗浄後、膨潤ゲル４５ｍｌを生理食塩水４５ｍＬに添加し、スラリーを穏やかに混合した。１ＮのＮａＯＨおよび１ＮのＨＣｌの組合せを使用して、得られた溶液のｐＨを７．０～７．４に調節した。このゲルスラリー１．５ｍＬを、５ｍＬのガラスシリンジに充填した。シリンジキャップを使用してシリンジを閉じた。次いで、シリンジを２５０℃で１５分間オートクレーブにかけた。

【０２１０】

（実施例３２）

ＰＥＧ－ジアクリレート／ビスチオールゲル（試験材料２）の調製

ポリ（エチレングリコール）－ジアクリレート［ＰＥＧ－ＤＡ］（Ｌａｙｓａｎ　Ｂｉｏ、品番ＡＣＲＬ－ＰＥＧ－ＡＣＲＬ－３４００－１ｇ）６３０ｍｇを秤量して、２０ｍＬのガラスシンチレーションバイアルに入れた。ＤＩ水６ｍＬを添加した。溶解したら、０．２ｕｍのシリンジフィルターを介して溶液を濾過した。Ｎ，Ｎ’－ビス（アクリロイル）シスタミン（Ｓｉｇｍａ、Ａ４９２９）４８ｍｇを、ガラスシンチレーションバイアルに入れたテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）６ｍＬに溶解した。溶解したら、この溶液をＰＥＧ－ＤＡ溶液と混合した。バイアルにセプタムのスクリューでキャップし、窒素を１０分間発泡させることによって溶液を脱気した。４００ｍｇ／ｍＬのアスコルビン酸ナトリウム溶液５０ｕＬ（ＤＩ水を使用して調製し、０．２ｕｍのシリンジフィルターを介して濾過した）をＰＥＧ－ＤＡ溶液に添加した。４００ｍｇ／ｍＬの過硫酸ナトリウム溶液５０ｕＬ（ＤＩ水を使用して調製し、０．２ｕｍのシリンジフィルターを介して濾過した）をＰＥＧ－ＤＡ溶液に添加した。セプタムで蓋をし、窒素を１０分間発泡させることによって溶液を脱気した。溶液を６０℃に設定したオーブンに入れた。溶液は１５分後にゲルに変化した。ゲルをオーブンから取り出し、室温に冷却した。ゲルを３０ｍＬのシリンジ

に移した。２３ｍｍのレザーパンチを使用して、２３ｍｍのメッシュの円板をメッシュシートから切り出した。メッシュの円板を、除去される支持ふるいを有する２５ｍｍのポリカーボネートシリンジフィルターに入れた。ゲルを、メッシュ（約０．８ｍｍ×約０．８ｍｍの目）を介して押し出して、４００ｍＬのビーカーに入れた。ＤＩ水２００ｍＬを、押し出したゲルに添加した。４５分後に上清を捨て、さらなるＤＩ水２００ｍＬを添加した。これを４回反復した。次いで、０．９％生理食塩水を使用して洗浄ステップを３回反復した。上清液体を除去し、メッシュを介して残りのゲルを再度押し出した（前述の通り）。このゲルスラリー１．５ｍＬを、５ｍＬのガラスシリンジに充填した。シリンジキャップを使用してシリンジを閉じた。次いで、シリンジを２５０℃で１５分間オートクレーブにかけた。

【０２１１】

（実施例３３）

ＰＥＧ－（ＬＹＳ）$_4$ゲル（試験材料３）の調製

ＰＥＧ－（ｌｙｓ）４［末端ヒドロキシル基がｇｕｔａｒｉｃｅ無水物で、次いでリシンで官能化されている、４個の腕を有するポリエチレングリコール（Ｍｗ１０，０００）］１．０ｇを秤量して、６０ｍＬのガラスボトルに入れた。ジクロロメタン３４ｍＬをＰＥＧ－（ｌｙｓ）４に添加した。ジイソプロピルカルボジイミド（Ｆｌｕｋａ、３８３７０）３３３ｕＬを、溶液に添加した。溶液は約３０分後にゲルに変化した。ゲル化を少なくとも１８時間継続させた。ゲルを３０ｍＬのシリンジに移した。２３ｍｍのレザーパンチを使用して、２３ｍｍのメッシュの円板をメッシュシートから切り出した。メッシュの円板を、除去される支持ふるいを有する２５ｍｍのポリカーボネートシリンジフィルターに入れた。ゲルを、メッシュ（約０．３８ｍｍ×約０．３８ｍｍの目）を介して押し出して、４００ｍＬのビーカーに入れた。ゲル３３ｍＬをアセトン３３０ｍＬで洗浄した。３０分後にアセトンを除去した。洗浄過程を４回反復した。次いで、ゲルを真空下で乾燥させた（真空下で約１８時間）。乾燥させたゲル７７１ｍｇを生理食塩水５２ｍＬに添加し、ゲルを5時間膨潤させた。次いで、ゲルをメッシュ（約０．３８ｍｍ×約０．３８ｍｍの目）にかけた。このゲルスラリー１．５ｍＬを、５ｍＬのガラスシリンジに充填した。シリンジキャップを使用してシリンジを閉じた。次いで、シリンジを２５０℃で１５分間オートクレーブにかけた。

【０２１２】

（実施例３４）

インビトロ試験：コルチコステロイドを含有する架橋ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ヒドロゲルの関節内注射

ビニルスルホン修飾ヒアルロン酸とＰＥＧ－ジチオール（ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$）との反応によって調製した、コルチコステロイドであるトリアムシノロンアセトニドを含有する軽度に架橋されているヒドロゲルを、雌性ヤギの後膝関節の関節内空間に注射した。形態学的、滑液および組織学的調査を実施して、かかる注射の局所性および全身性作用を評価した。試験の詳細を以下に示す。

【０２１３】

Ａ．試験材料

試験材料１．ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$（薬物なしの架橋ＨＡ系ヒドロゲル）を、以下の通り調製した。

【０２１４】

実施例１に記載の通り調製したＨＡ－ＶＳ溶液を、脱イオン水を使用して濃度１４ｍｇ／ｍＬに希釈した。ＨＡ－ＶＳ溶液１１ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れた。ＨＡ－ＶＳ溶液を、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れた。ＰＥＧ－（ＳＨ）２　４０．１ｍｇを脱イオン水０．８０２ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を調製した。ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を３ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２μｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過した。滅菌濾過したＨＡ－ＶＳ１０ｍＬを、５０ｍＬの滅菌遠心管に移した。０

．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０ｕＬを、ＨＡ－ＶＳ溶液に添加した。得られた溶液を十分に混合した。５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$滅菌溶液３８０ｍＬを、ＨＡ－ＶＳ溶液に添加した。得られた溶液を十分に混合した。次いで、ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を、３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れた。この段階で、ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液が架橋されて、ゲルが形成された。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出した。

【０２１５】

試験材料２．ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$－トリアムシノロンアセトニド（「ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ（ＳＨ）$_2$－ＴＡ」）を、以下の通り調製した。

【０２１６】

トリアムシノロンアセトニド１００．２ｍｇ（Ｓｉｃｏｒ、Ｕ．Ｓ．Ｐグレード、微粉化）を、２０ｍＬのシンチレーションバイアルに入れた脱イオン水２ｍＬと混合した。２０分間超音波処理した後、材料を２５０°Ｆで１５分間オートクレーブにかけた。実施例１の通り調製した濃度１８．３ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＶＳ溶液９ｍＬを、２０ｍＬの滅菌シリンジに入れた。ＨＡ－ＶＳ溶液を、０．２μｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過して、１０ｍＬの滅菌シリンジに入れた。ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$３５ｍｇを脱イオン水０．７ｍＬに溶解することによって、５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を調製した。ＰＥＧ（ＳＨ）$_2$溶液を３ｍＬの滅菌シリンジに移し、０．２ｕｍの滅菌シリンジフィルターを介して濾過した。滅菌濾過したＨＡ－ＶＳ７．６ｍＬを、トリアムシノロンアセトニド溶液に移した。脱イオン水３７０μｌおよび０．５Ｍリン酸ナトリウム溶液２５０ｕＬを、ＨＡ－ＶＳおよびトリアムシノロンアセトニドを入れたバイアルに添加した。得られた溶液を十分に混合した。滅菌した５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液３８０μＬを、ＨＡ－ＶＳ／トリアムシノロンアセトニド溶液に添加した。得られた溶液を十分に混合した。次いで、ＨＡＶＳ／トリアムシノロンアセトニド／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$溶液を３７℃のインキュベーターに少なくとも１６時間入れた。この段階で、ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$－ＴＡ溶液が架橋されて、ゲルが形成された。次いで、ゲル化材料をインキュベーターから取り出した。

【０２１７】

試験材料３．トリアムシノロンアセトニド、２ｍｇ／ｍｌ（Ｋｅｎａｌｏｇ－１０；１０ｍｇ／ｍＬのトリアムシノロンアセトニドを生理食塩水で２ｍｇ／ｍＬに希釈した）

試験材料４．トリアムシノロンアセトニド、８ｍｇ／ｍｌ（Ｋｅｎａｌｏｇ－４０；４０ｍｇ／ｍＬのトリアムシノロンアセトニドを生理食塩水で８ｍｇ／ｍＬに希釈した）

対照．生理食塩水、０．９％塩化ナトリウム

すべての試験材料を、使用前に室温で保存した。各試験材料または対照材料について、１．５ｍｌの投与量を、それぞれ個々の関節内注射のために調製した。

【０２１８】

Ｂ．動物

骨が十分に成長した合計２４匹の雌性ヤギを、この試験で使用した。ヤギは、承認されたＵＳＤＡの供給源から得た。動物は、試験の開始時に体重６３～９７ポンドであった。

【０２１９】

承認されたＵＳＤＡの供給源からヤギを得、ヤギは、この試験を行う前にヤギ関節炎脳炎（ＣＡＥ）であり、ヨーネ病の陰性であることが決定付けられた。各動物は、試験を行う前に資格を有する獣医によって全身的な健康状態の評価を与えられた（姿勢、呼吸の容易さ、ならびに下痢および鼻汁がないことを視覚的に観測した）。動物を、疾患または跛行の任意の証拠について調査した。試験における許容性は、疾患がなく臨床的に良好であり、後膝関節の優先的な使用による病歴がないことを条件とした。ヤギを、施設が決定した適切な期間に合わせて調整した。動物飼育条件は、実験棟物に関する関係法令に従った。ヤギを、注射後に大型の室内ラン（囲い）で維持した。ヤギは常に自由に活動することができた。

【０２２０】

すべての動物に、１日当たり小型反芻動物用の食餌約２ポンドと柔らかい干し草を与えた。水道水を自由に摂取させた。麻酔剤投与の約１２～２４時間前には食餌の提供を止め、注射の約１２時間前には水の提供を止めた。

【０２２１】

動物を、全身的な健康状態について試験過程を通して毎日観測した。動物が術後の合併症または疾患の他の徴候、疼痛またはストレスの任意の徴候を示した場合には、適切な措置を取った。また、動物が損傷し、罹患し、または瀕死になる予定外の事象が生じた場合には、現在の獣医学的業務に従ってケアを行った。

【０２２２】

Ｃ．治療

試験設計は以下の通りであった。

【０２２３】

【表８】

表8:群および治療の割当て

群	耳のタグ	右の後膝関節（1．5ml）	左の後膝関節（1．5ml）	右の後膝関節注射、左の後膝関節注射後の屠殺時
1	3171	試験材料 1	生理食塩水	14 日
1	3256	試験材料 1	生理食塩水	14 日
1	3831	試験材料 1	生理食塩水	14 日
2	3174	試験材料 2	生理食塩水	14 日
2	3596	試験材料 2	生理食塩水	14 日
2	3840	試験材料 2	生理食塩水	14 日
3	3133	試験材料 3	生理食塩水	14 日
3	3177	試験材料 3	生理食塩水	14 日
3	3833	試験材料 3	生理食塩水	14 日
4	3589	試験材料 4	生理食塩水	14 日
4	3593	試験材料 4	生理食塩水	14 日
4	3849	試験材料 4	生理食塩水	14 日
5	3267	試験材料 1	生理食塩水	28 日
5	3595	試験材料 1	生理食塩水	28 日
5	3837*	試験材料 1	生理食塩水	28 日 (24 日 *)
6	3173	試験材料 2	生理食塩水	28 日
6	3264	試験材料 2	生理食塩水	28 日
6	3587	試験材料 2	生理食塩水	28 日
7	3591	試験材料 3	生理食塩水	28 日
7	3592	試験材料 3	生理食塩水	28 日
7	3594	試験材料 3	生理食塩水	28 日
8	3162	試験材料 4	生理食塩水	28 日
8	3588*	試験材料 4	生理食塩水	28 日 (19 日 *)
8	3590	試験材料 4	生理食塩水	28 日

* 動物が早期に死亡（試験総日数）

体重、関節周縁および運動範囲の測定値を、各動物について注射の前（１日目）および

屠殺直前（１４日目または２８日目）にすべての動物から得た。

【０２２４】

基本的な注射手順は、全対象について同一とした。すべての注射を厳密な無菌状態で実施した。ジアゼパム（０．１～０．５ｍｇ／ｋｇ）およびケタミン（４．４～７．５ｍｇ／ｋｇ）の静脈内注射を実施して、動物を麻酔した。各膝を、引出し、運動範囲、腫れ、体温、捻髪音、膝蓋骨トラッキングおよび外反／内反異常について身体検査した。

【０２２５】

すべての注射を、通常の無菌技術を利用して実施した。左および右の後膝関節を、注射のためにその領域をクリップで止めて準備し、次いでその領域をクロルヘキシジンスクラブで清浄にした。動物を背臥位に置いた。右の後膝関節を、クロルヘキシジンスクラブと７０％イソプロピルアルコールで交互に３回清浄にし、ヨウ素溶液を塗布した。

【０２２６】

標準の技術を使用して、各後膝関節に注射した。２インチ２１ゲージの大きさの滅菌針を、前内側進入路から関節内空間に導入した。大腿骨内側顆の外側顆間のＶ字壁を感じたら、針をわずかに戻した。適切な試験材料１．５ｍｌを、右関節に注射した。注射針を除去し、注射部位に圧力をかけて維持した。次いで、注射した後膝関節を、全運動範囲にわたって２０回回転させた。この直後、左の後膝関節を、クロルヘキシジンスクラブと７０％イソプロピルアルコールで交互に３回清浄にし、ヨウ素溶液を塗布し、右の後膝関節について前述したものと同様にして、対照材料１．５ｍｌを左の後膝関節に注射した。注射針を除去し、注射部位に圧力をかけて維持した。次いで、注射した後膝関節を、全運動範囲にわたって２０回回転させた。

【０２２７】

苦痛および不快感の徴候を示す任意の動物について注射後にチェックを実施し、必要に応じて追加の鎮痛剤を投与した。すべての治療を、適切な試験文書作成により記録した。

【０２２８】

Ｄ．分析

採血：各動物から試験開始の直前、ならびに注射の５時間後および１、４、７、１４および２８日目に採血し、残りの動物のそれぞれから１、４、７、１４および２８日目に採血した。ＣＢＣおよび血液化学パネルを、各時点において実施した。

【０２２９】

剖検：動物を、全身麻酔剤導入のためにジアゼパム０．２２ｍｇ／ｋｇおよびケタミン１０ｍｇ／ｋｇからなる静脈内注射を用いて、最初の注射後１４日目または２８日目に人道的に屠殺した。この後、心停止が確認されるまで、麻酔下の動物に過量の濃塩化カリウム（ＫＣｌ）をＩＶ投与した。

【０２３０】

全体的な形態学的観測：膝関節の収集後、関節を開口し、表２に記載の通り、注射した後膝関節の全体的な評価を実施した。

【０２３１】

【表９】

表9:全体的な評価および試料収集

試料	全体的な評価	試料収集	写真およびスコア
滑液(左および右)	X	X	
左および右の膝関節	X		X
左および右の後滑膜嚢(posterior synovial pouch)	X	X	X
左および右の軟骨試料	X	X	X
左および右の膝窩リンパ節	X	X	X

さらに、表３に概説の通り、関節の半定量的類別を単一観測者によって実施した。

【０２３２】
【表１０】

表10:全体的な評価の類別尺度

スコア	呈色	充血		浮腫
0	正常	なし		なし
1	わずかに黄色	わずか		わずか
2	黄色	中程度		中程度
3		著しい		著しい

関節の全体的な総評価スコアは、呈色、充血および浮腫のスコアの合計とした（０～８点）。
【０２３３】
滑液の評価
開口した関節から滑液を収集した後、総体積を記録した。体液を、粘度、透明性および色について全体的に評価し、表１１の通り半定量的に類別した。血球計数器を用いて、総白血球を計数した。さらに、微分顕微鏡的分析のために滑液塗抹を生成した。個々にラベルを付した滑液として、任意の残りの滑液を－８０℃で凍結保存した。滑液塗抹を潜在的な将来分析のために保持した。
【０２３４】
【表１１】

表11:滑液の説明およびスコア

スコア	色	透明性	糸引き性
0	S=淡黄色	C=透明	N=正常
1	P=ピンク色	H=わずかに濁っている	A=異常
2	Y=黄色／R=赤色	D=濁っている	W=水っぽい
3	B=血液色	T=暗く濁っている	

滑液の総スコアは、色、透明性および糸引き性のスコアの合計である（０～８点）。
【０２３５】
組織学的評価
解剖およびその後の全体的な関節表面の評価の直後、大腿骨内側顆（ＭＦＣ）から各関節の矢状（ｓａｇｉｔａｌ）切片を切り取った。これらの切片を、１０％中和緩衝ホルマリンに個々に入れた。固定した組織を、処理のために翌日配達によりＰｒｅｍｉｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓに発送した。右および左のＭＦＣ切片を、標準の組織学的技術を使用して処理し、ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）ならびにサフラニンＯ（ＳＡＦ－Ｏ）と、ファストグリーンの対比染色で染色した。ＭＦＣ切片のスライドを、表１２に記載の通り、変形性関節症についてＭａｎｋｉｎ採点システムによって評価した。
【０２３６】

【表１２】

表12:改変型Mankin採点システム

構造	正常 [0]
	表面の異常 [1]
	パンヌスおよび表面の異常 [2]
	中間層の裂傷 [3]
	深層の裂傷 [4]
	石灰化層の裂傷 [5]
	完全な組織崩壊 [6]
細胞	正常 [0]
	びまん性細胞過形成 [1]
	クローン化 [2]
	低細胞性 [3]
サフラニンO染色	正常 [0]
	わずかな減少 [1]
	中程度の減少 [2]
	重度の減少 [3]
	色素確認なし [4]
タイドマークの完全性	無傷 [0]
	血管の侵入 [1]
最大スコア	14 (正常 = 0)

Ｅ．結果

様々な製剤で治療した関節の軟骨試料についてのＭａｎｋｉｎ採点システムの結果を、表１３ａ～ｈおよび図１１に示す。図９（治療後１４日目）および図１０（治療後２８日目）は、様々な製剤で治療した関節の軟骨試料について、それぞれ治療後１４日目および２８日目のサフラニンＯ染色スコアを示す。

【０２３７】

【表１３ａ】

表13a：大腿軟骨の14日目の評価によるMankinスコア、群1

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3256 RFC	HA-VSゲル	5	3	2	0	10
3171 RFC	HA-VSゲル	4	1	0	0	5
3831 RFC	HA-VSゲル	0	0	1	0	1
平均		3.0	1.3	1.0	0.0	5.3
SD		2.6	1.5	1.0	0.0	4.5
3256 LFC	0.9% NaCl	4	1	2	0	7
3171 LFC	0.9% NaCl	4	1	0	0	5
3831 LFC	0.9% NaCl	0	0	1	0	1
平均		2.7	0.7	1.0	0.0	4.3
SD		2.3	0.6	1.0	0.0	3.1

改変型Mankin採点システム

構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]

細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低細胞性 [3]

サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]

タイドマークの完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

【０２３８】

【表１３ｂ】

表13b：大腿軟骨の14日目の評価によるMankinスコア、群2

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3840 RFC	HA-VS/TAゲル	3.0	1.0	2.0	0.0	6.0
3596 RFC	HA-VS/TAゲル	0.0	0.0	3.0	0.0	3.0
3174 RFC	HA-VS/TAゲル	4.0	2.0	2.0	0.0	8.0
平均		2.3	1.0	2.3	0.0	5.7
SD		2.1	1.0	0.6	0.0	2.5
3840 LFC	0.9% NaCl	3.0	1.0	0.0	0.0	4.0
3596 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0
3174 LFC	0.9% NaCl	4.0	2.0	2.0	0.0	8.0
平均		2.3	1.0	1.0	0.0	4.3
SD		2.1	1.0	1.0	0.0	3.5

改変型Mankin採点システム

構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]

細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低細胞性 [3]

サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]

タイドマークの完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

【０２３９】

【表１３ｃ】

表13c:大腿軟骨の14日目の評価によるMankinスコア、群3

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3833 RFC	トリアムシノロンアセトニド 2mg/ml	4.0	1.0	3.0	0.0	8.0
3133 RFC	トリアムシノロンアセトニド 2mg/ml	0.0	0.0	4.0	0.0	4.0
3177 RFC	トリアムシノロンアセトニド 2mg/ml	4.0	1.0	2.0	0.0	7.0
平均		2.7	0.7	3.0	0.0	6.3
SD		2.3	0.6	1.0	0.0	2.1
3833 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0
3133 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	2.0	0.0	2.0
3177 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0
平均		0.0	0.0	1.3	0.0	1.3
SD		0.0	0.0	0.6	0.0	0.6

改変型Mankin採点システム
構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]
細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細 胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低 細胞性 [3]
サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]
タイドマーク
の完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

【０２４０】

【表１３ｄ】

表13d:大腿軟骨の14日目の評価によるMankinスコア、群4

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3593 RFC	トリアムシノロンアセトニド 8mg/ml	0.0	0.0	4.0	0.0	4.0
3849 RFC	トリアムシノロンアセトニド 8mg/ml	5.0	1.0	3.0	0.0	9.0
3589 RFC	トリアムシノロンアセトニド 8mg/ml	0.0	0.0	3.0	0.0	3.0
平均		1.7	0.3	3.3	0.0	5.3
SD		2.9	0.6	0.6	0.0	3.2
3593 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	2.0	0.0	2.0
3849 LFC	0.9% NaCl	1.0	1.0	2.0	0.0	4.0
3589 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	3.0	0.0	3.0
平均		0.3	0.3	2.3	0.0	3.0
SD		0.6	0.6	0.6	0.0	1.0

改変型Mankin採点システム
構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]
細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細 胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低 細胞性 [3]
サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]
タイドマーク
の完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

【０２４１】

【表１３ｅ】

表13e:大腿軟骨の28日目の評価によるMankinスコア、群5

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3267 RFC	HA-VSゲル	1	1	1	0	3
3837 RFC*	HA-VSゲル	3	1	3	0	7
3595 RFC	HA-VSゲル	1	1	1	0	3
平均		1.0	1.0	1.0	0.0	3.0
SD		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3267 LFC	0.9% NaCl	1	1	1	0	3
3837 LFC*	0.9% NaCl	3	1	3	0	7
3595 LFC	0.9% NaCl	1	1	2	0	4
平均		1.0	1.0	1.5	0.0	3.5
SD		0.0	0.0	0.7	0.0	0.7

* 動物が早期に死亡。データは記載したが、平均には含まず

改変型Mankin採点システム

構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]

細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低細胞性 [3]

サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]

タイドマークの完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

【０２４２】

【表１３ｆ】

表13f:大腿軟骨の28日目の評価によるMankinスコア、群6

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3264 RFC	HA-VS/TAゲル	0.0	0.0	3.0	0.0	3.0
3587 RFC	HA-VS/TAゲル	5.0	2.0	2.0	0.0	9.0
3173 RFC	HA-VS/TAゲル	0.0	0.0	2.0	0.0	2.0
平均		1.7	0.7	2.3	0.0	4.7
SD		2.9	1.2	0.6	0.0	3.8
3264 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3587 LFC	0.9% NaCl	5.0	2.0	1.0	0.0	8.0
3173 LFC	0.9% NaCl	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0
平均		1.7	0.7	0.7	0.0	3.0
SD		2.9	1.2	0.6	0.0	4.4

改変型Mankin採点システム

構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]

細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低細胞性 [3]

サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]

タイドマークの完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

【０２４３】

【表１３ｇ】

表13g:大腿軟骨の28日目の評価によるMankinスコア、群7

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3592 RFC	トリアムシノロンアセトニド 2mg/ml	4.0	3.0	3.0	0.0	10.0
3591 RFC	トリアムシノロンアセトニド 2mg/ml	0.0	2.0	4.0	0.0	6.0
3594 RFC	トリアムシノロンアセトニド 2mg/ml	4.0	2.0	3.0	0.0	9.0
平均		2.7	2.3	3.3	0.0	8.3
SD		2.3	0.6	0.6	0.0	2.1
3592 LFC	0.9% NaCl	4.0	1.0	1.0	0.0	6.0
3591 LFC	0.9% NaCl	1.0	1.0	1.0	0.0	3.0
3594 LFC	0.9% NaCl	2.0	1.0	1.0	0.0	4.0
平均		2.3	1.0	1.0	0.0	4.3
SD		1.5	0.0	0.0	0.0	1.5

改変型Mankin採点システム

構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]

細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低細胞性 [3]

サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]

タイドマークの完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

【０２４４】

【表１３ｈ】

表13h：大腿軟骨の28日目の評価によるMankinスコア、群8

試料	治療	構造	細胞	サフラニンO染色	タイドマークの完全性	総Mankinスコア
3588 RFC*	トリアムシノロンアセトニド 8mg/ml	4.0	3.0	3.0	0.0	10.0
	トリアムシノロン					
3590 RFC	アセトニド	5.0	3.0	4.0	0.0	12.0
	8mg/ml					
	トリアムシノロン					
3162 RFC	アセトニド	1.0	1.0	4.0	0.0	6.0
	8mg/ml					
平均		3.0	2.0	4.0	0.0	9.0
SD		2.8	1.4	0.0	0.0	4.2
3588 LFC*	0.9% NaCl	4.0	3.0	3.0	0.0	10.0
3590 LFC	0.9% NaCl	3.0	1.0	2.0	0.0	6.0
3162 LFC	0.9% NaCl	3.0	1.0	2.0	0.0	6.0
平均		3.0	1.0	2.0	0.0	6.0
SD		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

* 動物が早期に死亡。データのみ記載し、平均には含まず

改変型Mankin採点システム

構造
正常 [0]
表面の異常 [1]
より広範な表面の異常 [2]
中間層の裂傷 [3]
深層の裂傷 [4]
石灰化層の裂傷 [5]
完全な組織崩壊 [6]

細胞
正常 [0]
軽度の限局性から多病巣性の低細胞性 [1]
クローン化を伴う軽度の限局性から多病巣性の低細胞性[1]
限局的に広範囲に及ぶものからびまん性の低細胞性 [3]

サフラニンO染色
正常 [0]
わずかな減少 [1]
中程度の減少 [2]
重度の減少 [3]
色素確認なし [4]

タイドマークの完全性
無傷 [0]
血管の侵入 [1]

２８日目の軟骨では、ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルの改変型Ｍａｎｋｉｎスコアは、その対照と比較して差異がなかった。群５または６と比較して、群７および８の改変型ＭａｎｋｉｎスコアのサフラニンＯ染色度部分の減少率はわずかに増大した。１４日目～２８日目では、トリアムシノロンアセトニド単独で治療した群の両方（群７および８）の改変型Ｍａｎｋｉｎスコアが増加した。これらのスコアのかかる経時的な増加は、ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルで治療した群５またはＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$－ＴＡゲルで治療した群６については観測されない。

【０２４５】

この試験の結果は、ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$１．５ｍｌを単独で、または２ｍｇ／ｍｌのトリアムシノロンアセトニドと組み合わせてＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$－ＴＡとしてヤギの膝関節に関節内注射した２８日後に、局所性または全身性作用が生じ

ていないことを示している。ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルへのトリアムシノロンアセトニドの添加の軟骨に対する効果は、当用量またはそれを超える用量のトリアムシノロンアセトニド単独の注射の効果には満たなかった。

【０２４６】

サフラニンＯによるグリコサミノグリカンに特異的な染色は、１４日目および２８日目の時点で、ＨＡ－ＶＳ－ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$中２ｍｇ／ｍＬ（３ｍｇ）で製剤化したトリアムシノロンアセトニドの軟骨に対する効果が、２ｍｇ／ｍＬ（３ｍｇ）および８ｍｇ／ｍＬ（１２ｍｇ）の両方のボーラス用量のトリアムシノロンアセトニドよりも低いことを実証した。

【０２４７】

図１２および１３は、注射後１４日目（図１２）および２８日目（図１３）のサフラニンＯ染色による代表的な大腿骨内側顆組織像（４０×）を示す。図は、ヒドロゲルに組み込まれたトリアムシノロンアセトニドで治療した関節の軟骨試料について、関節に直接注射した（すなわち、ヒドロゲルに組み込まない）当用量のトリアムシノロンアセトニドで治療した軟骨試料よりも多くのサフラニンＯ染色が見られることを示す。

【０２４８】

（実施例３５）

押出し力の測定

ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$／ＨＡ生成物（実施例５、実施例４１）およびトリアムシノロンアセトニドを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$／ＨＡ（実施例３８）を押し出すのに必要な力を、Ｃｈａｔｉｌｌｏｎ電動式フォース試験器（Ｃｈａｔｉｌｌｏｎ ＤＦＥ－０２５デジタルフォースゲージを備えたＣｈａｔｉｌｌｏｎ ＬＴＣＭ－６電動式試験器、Ａｍｅｔｅｃ ＴＣＩ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ）を使用して測定した。１０ｍＬのシリンジを保持した固定具を、電動式試験器のベースプレートに結合して、フォースゲージがシリンジのプランジャー棒の真上に位置するようにした。フォース試験器のスイッチを入れ、回転速度制御ダイアルを「３」に調節することによって、移動速度を１分当たり３インチに設定した。電動式試験器のアームを、その最上点に移動させた。試験する製剤を入れた１０ｍＬのガラスシリンジの端部キャップを除去し、キャップを外したその端部の先端に２１ゲージ針を結合した。シリンジをシリンジホルダーに入れ、フォースゲージがシリンジプランジャー棒に軽く触れるまで、電動式試験器のアームをゆっくり下げた。１６ｍＬの試験管を、２１ゲージ針の端部の下に置いた。最大力を記録するようにフォースゲージを設定した。フォースゲージを０に設定した。次いで、電動式試験器のトグルスイッチを押して、シリンジのプランジャーを押し下げ、２１ゲージ針を介してシリンジの内容物を押し出した。シリンジストッパーがシリンジの底部に達する直前に、電動式試験器を停止させた。フォースゲージスクリーンに表示された最大押出し力を記録した。試験した様々な製剤の結果を、以下に示す。

【０２４９】

【表１４】

表14

サンプル番号	押出し力（ポンド）		
	HA を伴う HA-VS / PEG-$(SH)_2$ (Lot NB30:16)	HA を伴う HA-VS / PEG-$(SH)_2$ (Lot M0229)	HA を伴う HA-VS / PEG-$(SH)_2$ / TA (Lot M0231)
1	6.9	10.52	6.06
2	7.9	10.21	7.78
3	6.1	10.36	8.14
4	7.2		
5	6.9		
6	7.3		
平均	7.1	10.36	7.33
STD	0.6	0.16	1.11

（実施例３６）

ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$の押出し力の経時的安定性

ＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$／ＨＡ生成物（実施例５）を押し出すのに必要な力を、Ｃｈａｔｉｌｌｏｎ電動式フォース試験器（Ｃｈａｔｉｌｌｏｎ　ＤＦＥ－０２５デジタルフォースゲージを備えたＣｈａｔｉｌｌｏｎ　ＬＴＣＭ－６電動式試験器、Ａｍｅｔｅｃ　ＴＣＩ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ）を使用して、時間関数として測定した。生成物を生成した後と、次いで最初のその測定の１カ月後および３カ月後に、押出し力を測定した。試料は、３カ月間室温で保存した。押出し力を、以下の通り各試料について測定した。１０ｍＬのシリンジを保持した固定具を、電動式試験器のベースプレートに結合して、フォースゲージがシリンジのプランジャー棒の真上に位置するようにした。フォース試験器のスイッチを入れ、回転速度制御ダイアルを「３」に調節することによって、移動速度を１分当たり３インチに設定した。電動式試験器のアームを、その最上点に移動させた。試験する製剤を入れた１０ｍＬのガラスシリンジの端部キャップを除去し、キャップを外したその端部の先端に２１ゲージ針を結合した。シリンジをシリンジホルダーに入れ、フォースゲージがシリンジプランジャー棒に軽く触れるまで、電動式試験器のアームをゆっくり下げた。１６ｍＬの試験管を、２１ゲージ針の端部の下に置いた。最大力を記録するようにフォースゲージを設定した。フォースゲージを０に設定した。次いで、電動式試験器のトグルスイッチを押して、シリンジのプランジャーを押し下げ、２１ゲージ針を介してシリンジの内容物を押し出した。シリンジストッパーがシリンジの底部に達する直前に、電動式試験器を停止させた。フォースゲージスクリーンに表示された最大押出し力を記録した。Ｌｏｔ　ＮＢ３０：１６の結果を以下に示す。これらの結果は、２１ゲージ針を介して生成物を押し出すのに必要な力に、３カ月にわたって実質的な変化がないことを示す。

【０２５０】

【表１５】

表15

サンプル番号	押出し力(ポンド)		
	T＝0	T＝1カ月	T＝3カ月
1	10.31	6.87	9.46
2	8.7	7.62	7.14
3	8.72	10.55	11.57
4	9.47	7.53	7.36
5	10.43	8.25	7.65
6	9.63	8.3	8.95
平均	***9.54***	***8.19***	***8.69***
STD	***0.75***	***1.27***	***1.69***

（実施例３７）

ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）２／ＴＡゲルの調製

滅菌トリアムシノロンアセトニド１７０．８ｍｇ、３４１．３ｍｇ、５１１．７ｍｇおよび６８２．７ｍｇを秤量して、別個の１２５ｍＬの滅菌プラスチックボトル４本に入れ、それらにそれぞれＴＡ１０ｍｇ、ＴＡ２０ｍｇ、ＴＡ３０ｍｇおよびＴＡ４０ｍｇのラベルを付した。ＴＡを入れた各ボトルを秤の上で風袋引きし、滅菌濾過した水中１４ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＶＳ（０．２ｕｍ滅菌フィルター、ＰＶＤＦ膜を介して濾過した）１４．９８ｇ、１４．９９ｇ、１４．９９ｇおよび１５．０１ｇを、４本のボトルのそれぞれにＴＡ１０ｍｇから４０ｍｇの順で添加した。得られた溶液が視覚的に均一になるまで、ＴＡ粉末およびＨＡ－ＶＳ溶液を混合した。滅菌濾過した１Ｍリン酸ナトリウム（０．２ｕｍ滅菌フィルターによる）０．３７５ｍＬ、ｐＨ７．４を、ボトルのそれぞれに添加し、得られた混合物を十分に混合した。５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ－ジチオール３３５０［$PEG(SH)_2$］（０．２ｕｍ滅菌フィルターを介して滅菌濾過した）０．５４３ｍＬを各容器に添加し、十分に混合した。先のステップを、バイオフード内で実施した。混合物を、３７℃のオーブンに入れて終夜置いた。製剤をオーブンから取り出し、容器の外部を７０／３０のＩＰＡ／水で拭き、次いでバイオフード内に移した。各ゲルを滅菌したヘラを使用して粉砕した。０．９％生理食塩水中７．８３ｍｇ／ｍＬのＨＡ（０．２ｕｍ滅菌フィルター、ＰＶＤＦ膜を介して濾過した）８６．２３ｇ、８６．２５ｇ、８６．４０ｇおよび８６．２３ｇを、それぞれＴＡ１０ｍｇ、２０ｍｇ、３０ｍｇおよび４０ｍｇのラベルを付した容器に添加した。各混合物を、室温で３時間膨潤させた。次いで、各混合物を、フィルターの筐体に入れた０．８５ｕｍのメッシュに通過させた［２３ｍｍのレザーパンチを使用して、直径２３ｍｍのポリエステルメッシュの円板（ＭｃＭａｓｔｅｒ　Ｃａｒｒ、カタログ番号９２１８Ｔ１３、メッシュの大きさ：２０．３×２０．３、四角形／矩形の大きさ：０．０３３１’’、ミクロン等級：８４０ミクロン、開口面積パーセンテージ：４６、糸の直径：０．０１５７’’）を切り出した。円板を２５ｍｍのシリンジフィルターホルダー（Ｃｏｌｅ　Ｐａｌｍｅｒ、カタログ番号ＥＷ－２９５５０－４２）に挿入し、フィルターホルダーを閉じた。メッシュを入れたフィルターホルダーを、オートクレーブにかけた］。次いで、メッシュにかけた収集した混合物を、０．８５ｕｍのメッシュに再度通過させた。次いで、収集した混合物をプラスチック容器内で保存した。

【０２５１】

（実施例３８）

ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$／ＴＡゲルのパッケージング

次いで、実施例３７の各製剤の一定分量６ｍＬを、シリンジキャップを有する１０ｍＬのガラスシリンジ（ＢＤ　Ｈｙｐａｋガラスシリンジ、Ｐ／Ｎ４７２６２１１９）に入れた。プランジャー棒を滅菌ストッパー（ＢＤ、Ｐ／Ｎ４７３１８３１９）の後部にねじ込んだ後、ストッパー／プランジャーをシリンジの首部に挿入した。シリンジを逆にして、シリンジキャップをわずかに開口した。過剰の空気が排除されるまでプランジャーを押し

下げた。次いでシリンジキャップをきつく締めた。先のステップを、バイオフード内で実施した。すべての生成物をパッケージするまで、この過程を反復した。

【０２５２】

（実施例３９）

粒径の決定－脱イオン水による洗浄

２．３６ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号８）、１．４ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１４）、１ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１８）、０．８５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号２０）、０．６ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号３０）、０．４２５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号４０）、０．２５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号６０）および０．１５０ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１００）の鋼製ふるいを、ＤＩ水で洗浄し、Ｋｉｍｗｉｐｅｓを使用して水を拭き取った。各ふるいの重量を測定した後、これらのふるいを、底部に最小（１００番）を置き、最上部に最大（８番）を並べて重ねた。ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$／ＴＡ製剤（実施例３７）１００ｍＬを、最上部のふるいにゆっくり注いだ。試料の液体構成要素の大部分が最上部のふるいを通過したら、最上部のふるいに脱イオン水約５０ｍＬをゆっくり添加して、そのふるいに保持されたゲル構成要素をすすいだ。液体構成要素がふるいを通過したら、そのふるいを積み重ねたふるいから除去した。各ふるいを洗浄し、積み重ねたふるいから除去するまで、この過程を反復した。各ふるいに残った過剰の水滴を、紙タオルを使用して拭き取った。各ふるいの総重量（ふるいと収集されたゲル）を測定した。各ふるいに収集されたゲル粒子の重量を、ふるいの総重量から最初のふるいの重量を引くことによって算出した。各ふるいに収集されたゲルのパーセンテージを、特定のふるいに収集されたゲルの重量を測定し、次いですべてのふるいに収集されたゲルの総重量で割ることによって算出した。

【０２５３】

【表１６】

表16

ふるいの大きさ #	ふるいの大きさ (mm)	各ふるいに収集されたゲル (%)			
		TA 10	TA 20	TA 30	TA 40
8	2.36	0.1	0.3	0.5	0.0
14	1.40	11.4	14.7	19.4	7.6
18	1.00	44.9	48.0	34.2	35.2
20	0.85	29.4	23.1	22.0	28.0
30	0.60	7.4	7.8	14.7	14.7
40	0.425	3.7	2.7	4.4	7.8
60	0.25	1.5	1.7	2.9	4.2
100	0.15	1.7	1.7	2.0	2.6

（実施例４０）

粒径の決定－生理食塩水による洗浄

２．３６ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号８）、１．４ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１４）、１ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１８）、０．８５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号２０）、０．６ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号３０）、０．４２５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号４０）、０．２５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号６０）および０．１５０ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１００）の鋼製ふるいを、Ｄ

Ｉ水で洗浄し、Ｋｉｍｗｉｐｅｓを使用して水を拭き取った。各ふるいの重量を測定した後、これらのふるいを、底部に最小（１００番）を置き、最上部に最大（８番）を並べて重ねた。ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$／ＴＡ（ＴＡ１０）製剤（実施例３７）１００ｍＬを、最上部のふるいにゆっくり注いだ。試料の液体構成要素の大部分が最上部のふるいを通過したら、最上部のふるいに０．９％生理食塩水約５０ｍＬをゆっくり添加して、そのふるいに保持されたゲル構成要素をすすいだ。液体構成要素がふるいを通過したら、そのふるいを積み重ねたふるいから除去した。各ふるいを洗浄し、積み重ねたふるいから除去するまで、この過程を反復した。各ふるいに残った過剰の生理食塩水の水滴を、紙タオルを使用して拭き取った。各ふるいの総重量（ふるいと収集されたゲル）を測定した。各ふるいに収集されたゲル粒子の重量を、ふるいの総重量から最初のふるいの重量を引くことによって算出した。各ふるいに収集されたゲルのパーセンテージを、特定のふるいに収集されたゲルの重量を測定し、次いですべてのふるいに収集されたゲルの総重量で割ることによって算出した。

【０２５４】

【表１７】

表17

ふるいの大きさ #	ふるいの大きさ (mm)	各ふるいに収集されたゲル (%)				
		実施 -1	実施 -2	実施 -3	平均	SD
8	2.36	0.0	0.4	0.7	0.4	0.3
14	1.40	9.0	3.4	10.5	7.6	3.8
18	1.00	50.6	50.1	48.8	49.9	0.9
20	0.85	20.5	23.2	18.6	20.8	2.3
30	0.60	10.9	12.8	10.9	11.6	1.1
40	0.425	4.8	5.2	5.7	5.3	0.4
60	0.25	2.7	3.5	3.1	3.1	0.4
100	0.15	1.3	1.1	1.7	1.4	0.3

（実施例４１）

ヒアルロン酸を伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）２ゲルスラリー－ＨＡ膨潤

１２５ｍＬの滅菌ボトル３本を秤の上で別個に風袋引きし、水中１４ｍｇ／ｍＬのＨＡ－ＶＳ（０．２ｕｍ滅菌フィルター、ＰＶＤＦ膜を介して濾過した）１４．９７ｇ、１４．９５ｇおよび１５．００ｇを、３本のボトルのそれぞれに添加した。滅菌濾過した１Ｍリン酸ナトリウム（０．２ｕｍ滅菌フィルターを介して滅菌濾過した）０．３７５ｍＬ、ｐＨ７．４を、ボトルのそれぞれに添加し、十分に混合した。５０ｍｇ／ｍＬのＰＥＧ（ＳＨ）２（０．２ｕｍ滅菌フィルターを介して滅菌濾過した）０．５４３ｍＬを各容器に添加し、十分に混合した。先のステップを、バイオフード内で実施した。混合物を、３７℃のオーブンに入れて終夜置いた。製剤をオーブンから取り出し、容器の外部を７０／３０のＩＰＡ／水で拭き、次いでバイオフード内に移した。各ゲルを滅菌したヘラを使用して粉砕した。次いで、０．９％生理食塩水中７．８３ｍｇ／ｍＬのＨＡ（０．２ｕｍ滅菌フィルター、ＰＶＤＦ膜を介して濾過した）８６．４０ｇ、８６．２１ｇおよび８６．３１ｇを、容器に添加した。ゲルを、室温で３時間膨潤させた。次いで、各混合物を、フィルターの筐体に入れた０．８５ｕｍのメッシュに通過させた［２３ｍｍのレザーパンチを使用して、直径２３ｍｍのポリエステルメッシュの円板（ＭｃＭａｓｔｅｒ　Ｃａｒｒ、

カタログ番号９２１８Ｔ１３、メッシュの大きさ：２０．３×２０．３、四角形／矩形の大きさ：０．０３３１’’、ミクロン等級：８４０ミクロン、開口面積パーセンテージ：４６、糸の直径：０．０１５７’’）を切り出した。円板を２５ｍｍのシリンジフィルターホルダー（Ｃｏｌｅ　Ｐａｌｍｅｒ、カタログ番号ＥＷ－２９５５０－４２）に挿入し、フィルターホルダーを閉じた。メッシュを入れたフィルターホルダーを、オートクレーブにかけた］。次いで、メッシュにかけた収集した混合物を、０．８５ｕｍのメッシュに再度通過させた。次いで、収集した混合物をプラスチック容器内で保存した。

【０２５５】

（実施例４２）

ヒアルロン酸を伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリーのパッケージング

次いで、実施例４１の各製剤の一定分量６ｍＬを、シリンジキャップを有する１０ｍＬのガラスシリンジ（ＢＤ　Ｈｙｐａｋガラスシリンジ、Ｐ／Ｎ４７２６２１１９）に入れた。プランジャー棒を滅菌ストッパー（ＢＤ、Ｐ／Ｎ４７３１８３１９）の後部にねじ込んだ後、ストッパー／プランジャーをシリンジの首部に挿入した。シリンジを逆にして、シリンジキャップをわずかに開口した。過剰の空気が排除されるまでプランジャーを押し下げた。次いでシリンジキャップをきつく締めた。先のステップを、バイオフード内で実施した。すべての生成物をパッケージするまで、この過程を反復した。

【０２５６】

（実施例４３）

粒径の決定－生理食塩水による洗浄

２．３６ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号８）、１．４ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１４）、１ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１８）、０．８５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号２０）、０．６ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号３０）、０．４２５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号４０）、０．２５ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号６０）および０．１５０ｍｍ（ＵＳＡ標準試験用ふるい番号１００）の鋼製ふるいを、ＤＩ水で洗浄し、Ｋｉｍｗｉｐｅｓを使用して水を拭き取った。各ふるいの重量を測定した後、これらのふるいを、底部に最小（１００番）を置き、最上部に最大（８番）を並べて重ねた。ヒアルロン酸を伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲルスラリー製剤（実施例４１）１００ｍＬを、最上部のふるいにゆっくり注いだ。試料の液体構成要素の大部分が最上部のふるいを通過したら、最上部のふるいに０．９％生理食塩水約５０ｍＬをゆっくり添加して、そのふるいに保持されたゲル構成要素をすすいだ。液体構成要素がふるいを通過したら、そのふるいを積み重ねたふるいから除去した。各ふるいを洗浄し、積み重ねたふるいから除去するまで、この過程を反復した。各ふるいに残った過剰の生理食塩水の水滴を、紙タオルを使用して拭き取った。各ふるいの総重量（ふるいと収集されたゲル）を測定した。各ふるいに収集されたゲル粒子の重量を、ふるいの総重量から最初のふるいの重量を引くことによって算出した。各ふるいに収集されたゲルのパーセンテージを、特定のふるいに収集されたゲルの重量を測定し、次いですべてのふるいに収集されたゲルの総重量で割ることによって算出した。

【０２５７】

【表１８】

表18

ふるいの大きさ#	ふるいの大きさ (mm)	各ふるいに収集されたゲル (%)				
		実施 -1	実施 -2	実施 -3	平均	SD
8	2.36	2.2	2.5	2.0	**2.3**	0.3
14	1.40	9.7	9.8	9.2	**9.6**	0.3
18	1.00	33.2	29.1	27.2	**29.8**	3.1
20	0.85	25.4	22.1	24.9	**24.1**	1.8
30	0.60	14.4	19.1	19.1	**17.5**	2.7
40	0.425	10.0	8.5	10.3	**9.6**	1.0
60	0.25	3.4	5.7	5.1	**4.7**	1.2
100	0.15	1.8	3.1	2.3	**2.4**	0.7

（実施例４４）

滅菌性およびエンドトキシン試験

ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$ゲル（実施例４２、実施例５）およびＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$／ＴＡゲル（実施例３７、ＴＡ１０）を、滅菌性およびエンドトキシンについて、ＷｕＸｉ　ＡｐｐＴｅｃによってそれぞれプロトコル番号ＢＳ２１０ＣＢＹ．２０３およびＢＥ２１５ＣＢＹ．２０３を使用して試験した。すべての試料が滅菌されており、＜０．５ＥＵ／ｍＬのエンドトキシンレベルを有していた。

【０２５８】

（実施例４５）

ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$のインビボ生体適合性試験

以下のインビボ試験を実施して、試験材料のインビボ生体適合性を、市販で利用可能な関節内補充薬生成物に対してヤギにおいて調査した。

【０２５９】

試験に使用した材料：

試験材料：Ｈｙｄｒｏｓ－ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$［Ｌｏｔ　ＮＢ５１：１１９］

対照材料：Ｓｙｎｖｉｓｃ－市販の関節内補充薬生成物　。

【０２６０】

骨が十分に成長した合計６匹の雌性ヤギを、この試験で使用した。ヤギは、承認されたＵＳＤＡの供給源から得た。動物は、試験の開始時に体重６５～９９ポンドであった。ヤギは、この試験を行う前にヤギ関節炎脳炎（ＣＡＥ）であり、ヨーネ病の陰性であることが決定付けられた。各動物は、試験を行う前に資格を有する獣医によって全身的な健康状態の評価を与えられた（姿勢、呼吸の容易さ、ならびに下痢および鼻汁がないことを視覚的に観測した）。動物を、疾患または跛行の任意の証拠について調査した。試験における許容性は、疾患がなく臨床的に良好であり、後膝関節の優先的な使用による病歴がないことを条件とした。ヤギを、施設が決定した適切な期間に合わせて調整した。動物飼育条件は、実験棟物に関する関係法令、すなわち動物保護法、公法９９～１９８で改正された公法８９～５４４、連邦官報５２：１６、米国農務省－動植物検疫所（ＵＳＤＡ－ＡＰＨＩＳ）、１９８５年、およびＰｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ　Ｐｏｌｉｃｙ　ｏｎ　Ｈｕｍａｎｅ　Ｃａｒｅ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌｓ、Ｏｆ

ｆｉｃｅ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ Ａｇａｉｎｓｔ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｒｉｓｋｓ／Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ （ＯＰＲＲ／ＮＩＨ）、１９８６年９月に従った。ヤギを、注射後に大型の室内ラン（囲い）で維持した。ヤギは常に自由に活動することができた。すべての動物に、１日当たり小型反芻動物用の食餌約２ポンドと柔らかい干し草を与えた。水道水を自由に摂取させた。麻酔剤投与の約１２～２４時間前には食餌の提供を止め、注射の約１２時間前には水の提供を止めた。固有の耳のタグによって、各動物を同定した。

【０２６１】

治療

試験を以下の通り設計した。

【０２６２】

【表１９】

表19：群および治療の割当て

群	耳のタグ	右の後膝関節 (1.5 ml)	左の後膝関節 (1.5 ml)	R／Lの注射後の屠殺時
1A	3750	試験材料 Hydros試験材料	対照材料Synvisc	24 ± 1 時間
1A	3751	試験材料 Hydros試験材料	対照材料Synvisc	24 ± 1 時間
1A	3752	試験材料 Hydros試験材料	対照材料Synvisc	24 ± 1 時間
1B	3597	対照材料Synvisc	試験材料 Hydros試験材料	24 ± 1 時間
1B	3753	対照材料Synvisc	試験材料 Hydros試験材料	24 ± 1 時間
1B	3754	対照材料Synvisc	試験材料 Hydros試験材料	24 ± 1 時間
合計	6			

基本的な注射手順は、全対象について同一とした。すべての注射を厳密な無菌状態で実施した。動物に、ジアゼパム（０．１～０．５ｍｇ／ｋｇ）およびケタミン（４．４～７．５ｍｇ／ｋｇ）の静脈内注射を実施して麻酔した。各膝を、引出し、運動範囲、腫れ、体温、捻髪音、膝蓋骨トラッキングおよび外反／内反異常について身体検査した。すべての注射を、通常の無菌技術を利用して実施した。左および右の後膝関節を、注射のためにその領域をクリップで止めて準備し、次いでその領域をクロルヘキシジンスクラブで清浄にした。動物を背臥位に置いた。右の後膝関節を、クロルヘキシジンスクラブと７０％イソプロピルアルコールで交互に３回清浄にし、ヨウ素溶液を塗布した。

【０２６３】

標準の技術を使用して、各後膝関節に注射した。２インチ２１ゲージの大きさの滅菌針を、前内側進入路から関節内空間に導入した。大腿骨内側顆の外側顆間のＶ字壁を感じたら、針をわずかに戻した。試験材料１．５ｍｌを群１Ａの右関節に、または対照材料１．５ｍｌを群１Ｂの右関節に注射した。注射針を除去し、注射部位に圧力をかけて維持した。次いで、注射した後膝関節を、全運動範囲にわたって２０回回転させた。この直後、左の後膝関節を、クロルヘキシジンスクラブと７０％イソプロピルアルコールで交互に３回清浄にし、ヨウ素溶液を塗布し、右の後膝関節について前述したものと同様にして、対照材料１．５ｍｌを群１Ａの左の後膝関節に、または試験材料１．５ｍｌを群１Ｂの左の後膝関節に注射した。注射針を除去し、注射部位に圧力をかけて維持した。次いで、注射した後膝関節を、全運動範囲にわたって２０回回転させた。

【０２６４】

苦痛および不快感の徴候を示す任意の動物について注射後にチェックを実施し、必要に応じて追加の鎮痛剤を投与した。すべての治療を、適切な試験文書作成により記録した。

【０２６５】

動物を、全身麻酔剤導入のためにジアゼパム０．２２ｍｇ／ｋｇおよびケタミン１０ｍｇ／ｋｇからなる静脈内注射を用いて、最初の注射の２４±１時間後に人道的に屠殺した。この後、心停止が確認されるまで、麻酔下の動物に過量の濃塩化カリウム（ＫＣｌ）をＩＶ投与した。

【０２６６】

分析

全体的な形態学的観測

膝関節の収集後、関節を開口し、表２０に記載の通り、注射した後膝関節の全体的な評価を実施した。写真による文書作成を実施した。変形性の関節変化は評価しなかった。

【０２６７】

【表２０】

表20:全体的な評価および試料収集

試料	全体的な評価	試料収集	写真および／またはスコア
滑液(左および右)	X	X	
左および右の膝関節	X		X
左および右の滑膜	X		X

さらに、表２１に概説の通り、関節の半定量的類別を単一観測者によって実施した。

【０２６８】

【表２１】

表21:全体的な関節評価の類別尺度

スコア	呈色	充血	浮腫
0	正常	なし	なし
1	わずかに黄色	わずか	わずか
2	黄色	中程度	中程度
3		著しい	著しい

関節の全体的な総評価スコアは、呈色、充血および浮腫のスコアの合計とした（０～８点）。

【０２６９】

滑液の評価

開口した関節から滑液を収集した後、総体積を記録した。体液を、粘度、透明性および色について全体的に評価し、表２２の通り半定量的に類別した。血球計数器を用いて、総白血球を計数した。さらに、微分顕微鏡的分析のために滑液塗抹を生成した。個々にラベルを付した滑液として、残りの滑液を－８０℃で凍結保存した。滑液塗抹を潜在的な将来分析のために保持した。

【０２７０】

【表２２】

表22:滑液の説明およびスコア

スコア	色	透明性	糸引き性
0	S=淡黄色	C=透明	N=正常
1	P=ピンク色	H=わずかに濁っている	A=異常
2	Y=黄色／R=赤色	D=濁っている	W=水っぽい
3	B=血液色	T=暗く濁っている	

滑液の総スコアは、色、透明性および糸引き性のスコアの合計である（０～８点）。

【０２７１】

結果

以下の表は、図１４と共に、ＨＡを伴うＨＡ－ＶＳ／ＰＥＧ－（ＳＨ）$_2$が、ヤギモデルにおいて２４時間後の関節と生体適合性があることを示している。

【０２７２】

【表２３】

表23：滑液および関節の全体的スコアの評価（試験材料（TM）および対照材料に関して分類）

耳のタグ	群	試験物品	関節の総スコア	体積	色；透明性；糸引き性	滑液の総スコア	総計スコア
3750	1A	TM	0	1.6	SHN	1	1
3751	1A	TM	0	1.4	SHN	1	1
3752	1A	TM	0	1	SHN	1	1
3597	1B	TM	0	1.1	SHN	1	1
3753	1B	TM	0	0.75	PHN	2	2
3754	1B	TM	0	0.45	SHN	1	1
平均			**0.0**	**1.1**		**1.2**	**1.2**
sd			**0.0**	**0.4**		**0.4**	**0.4**
3597	1B	**対照**	0	2.2	SHN	1	1
3753	1B	**対照**	0	1.9	PHN	2	2
3754	1B	**対照**	0	1.5	SHN	1	1
3750	1A	**対照**	0	1.3	SHN	1	1
3751	1A	**対照**	0	0.8	SHN	1	1
3752	1A	**対照**	1	1.85	SHN	1	2
平均			**0.2**	**1.6**		**1.2**	**1.3**
sd			**0.4**	**0.5**		**0.4**	**0.5**

色：Ｓ＝淡黄色（０）、Ｙ＝黄色（２）、Ｐ＝ピンク色（１）、Ｒ＝赤色（２）、Ｂ＝血液色（３）

透明性：Ｃ＝透明（０）、Ｈ＝わずかに濁っている（１）、Ｄ＝濁っている（２）

糸引き性（粘度）：Ｎ＝正常（０）、Ａ＝異常（１）、Ｗ＝水っぽい（２）

ＴＭ＝試験材料　。

【０２７３】

表24：滑液の細胞別割合および白血球（WBC）数

耳のタグ	群	試験材料	WBC/mm^3	滑液内の細胞%					TMの存在	表面細胞を有するTM	TMのマクロファージ／単球の貪食	WBC絶対数
				% PMN	% リンパ球	% 単球	% 好酸球	% 好塩基球				
3750	1A	TM	23,890	82	0	18	0	0	+	+ 極めてわずか	+	38,224,000
3751	1A	TM	7,210	90	0	10	0	0	+	+ 極めてわずか	+	10,094,000
3752	1A	TM	7,127	89	2	9	0	0	+	+ 極めてわずか	+	7,127,000
3597	1B	TM	6,922	77	4	19	0	0	+	+ 極めてわずか	+	7,614,200
3753	1B	TM	3,789	74	3	23	0	0	+	+ 極めてわずか	+	2,841,750
3754	1B	TM	2,200	63	3	34	0	0	+	+ 極めてわずか	+	990,000
平均			**8,523**	**79.2**	**2.0**	**18.8**	**0.0**	**0.0**				**11,148,492**
sd			**7,807**	**10.1**	**1.7**	**9.2**	**0.0**	**0.0**				**13,675,201**
3750	1A	**対照**	22,409	71	7	22	0	0	+	+ 中程度	+	29,131,700
3751	1A	**対照**	7,830	87	5	8	0	0	+	+ 多数	+	6,264,000
3752	1A	**対照**	26,700	72	2	26	0	0	+	+ 多数	+	49,395,000
3597	1B	**対照**	6,130	74	2	24	0	0	+	+ 中程度	+	13,486,000
3753	1B	**対照**	5,467	53	5	41	1	0	+	+ 多数	+	10,387,300
3754	1B	**対照**	8,100	53	2	45	0	0	+	+ 多数	+	12,150,000
平均			**12,773**	**68.3**	**3.8**	**27.7**	**0.2**	**0.0**				**20,135,667**
sd			**9,280**	**13.2**	**2.1**	**13.5**	**0.4**	**0.0**				**16,324,705**

（試験材料（TM）および対照材料に関して分類）

PMN = **多形核白血球**

WBC = **白血球**

TM = **試験材料**

前述の実施形態に対して本発明の広範な概念から逸脱することなく変更を加え得ること

を当業者は理解されよう。したがって本発明は、開示の特定の実施形態に限定されないが、添付の特許請求の範囲に記載の本発明の精神および範囲に含まれる改変を包含することを企図すると理解されたい。前述の要素の、あらゆる可能なその変形形態としての任意の組合せは、本明細書で別段指定されない限り、または状況と明らかに矛盾しない限り、本発明に包含される。

【図１】

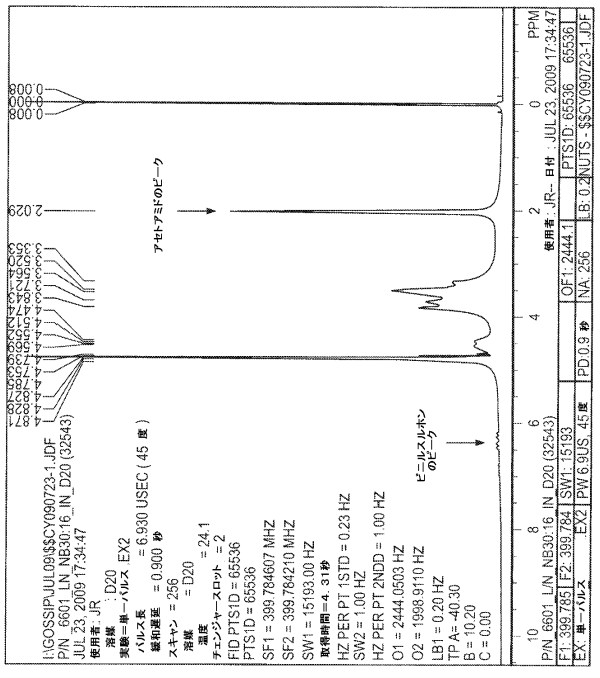


FIG. 1

【図２】

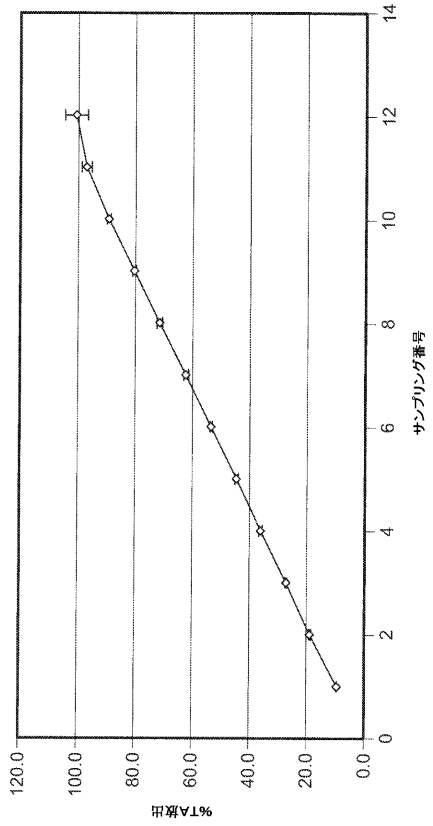


FIG. 2

【図３】

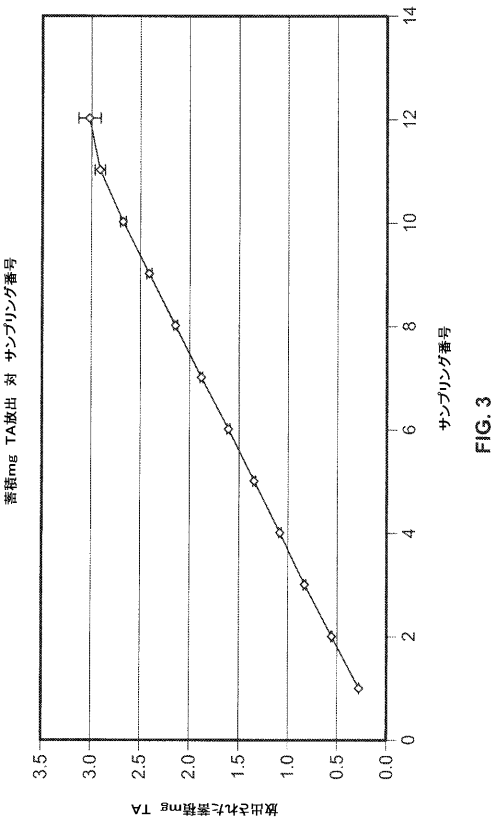


FIG. 3

【図４】

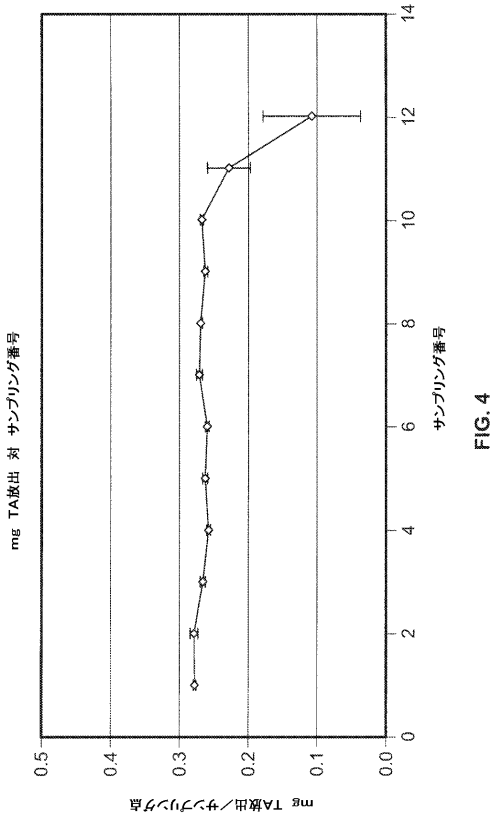


FIG. 4

【図５】

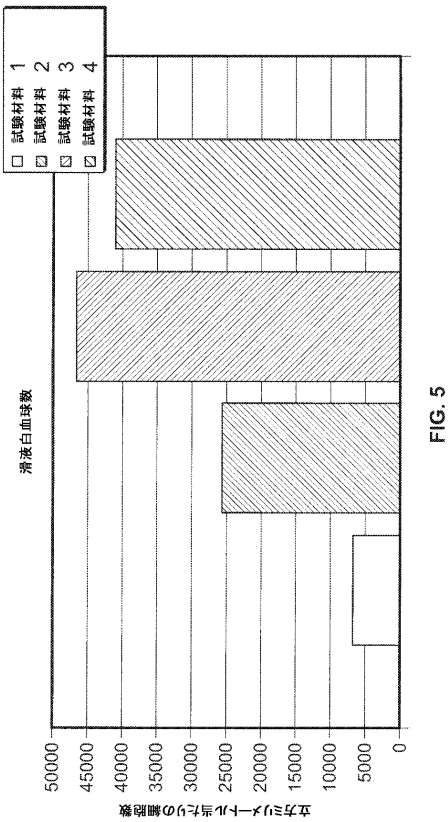


FIG. 5

【図６】

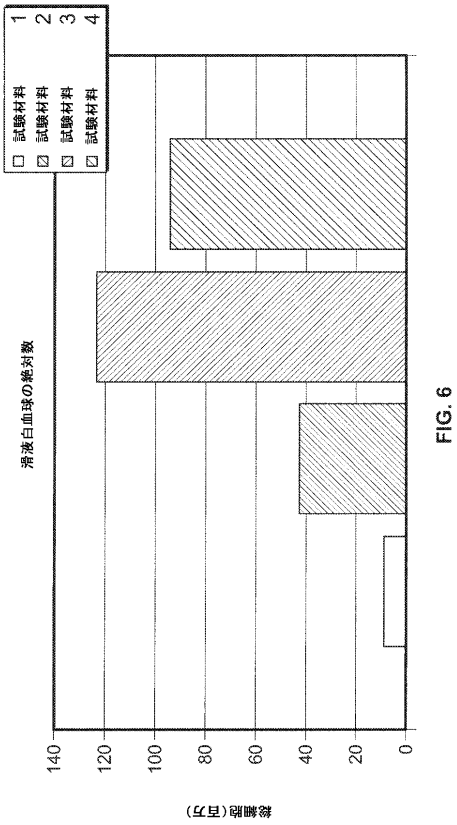


FIG. 6

【図７】

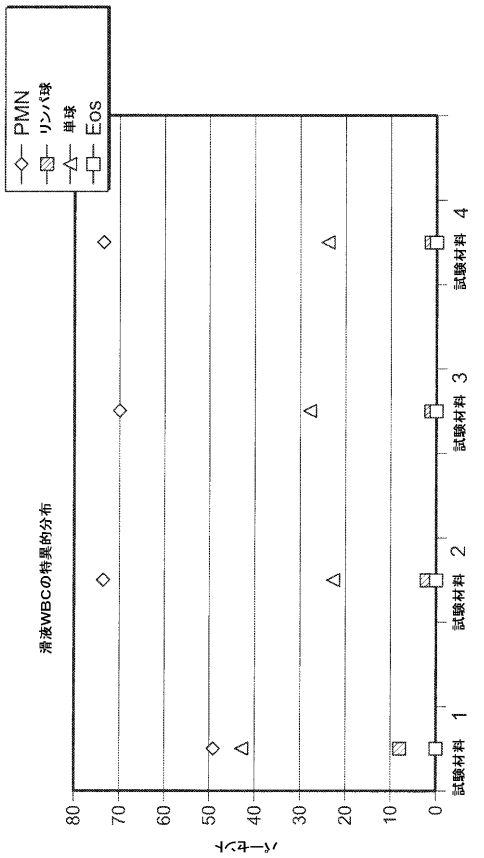


FIG. 7

【図８】

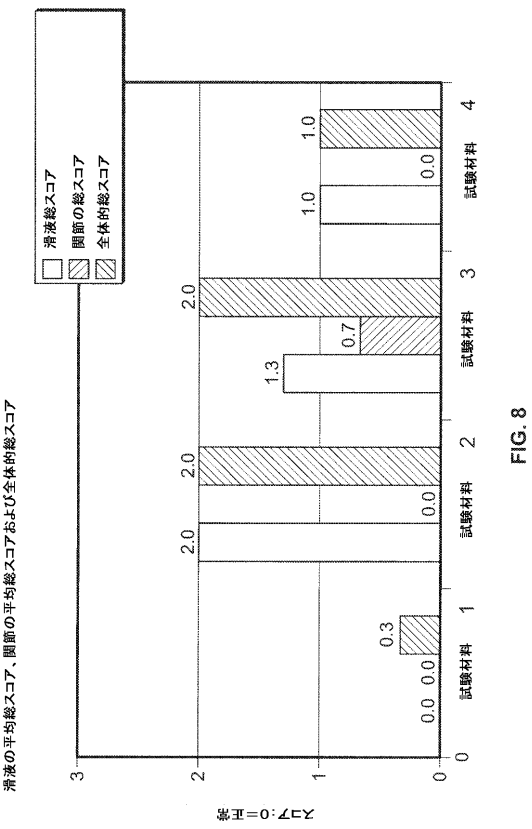


FIG. 8

【図９】

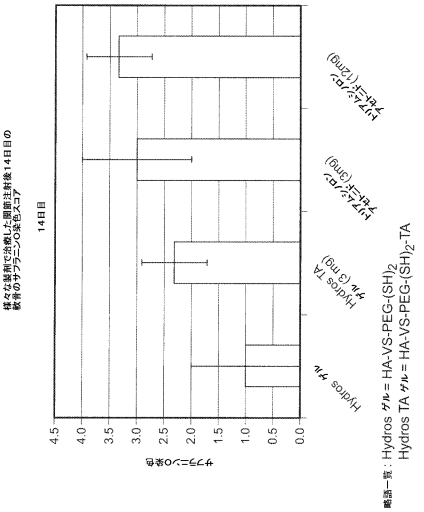


FIG. 9

【図１０】

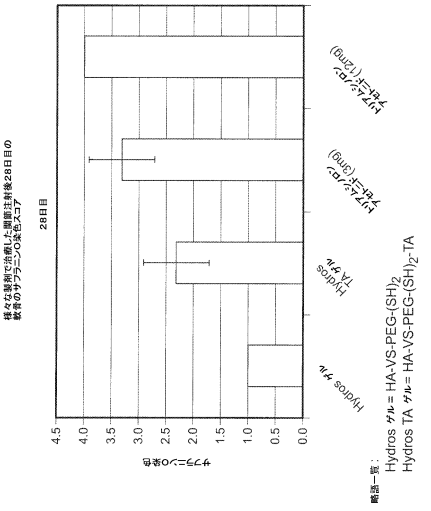


FIG. 10

【図１１】

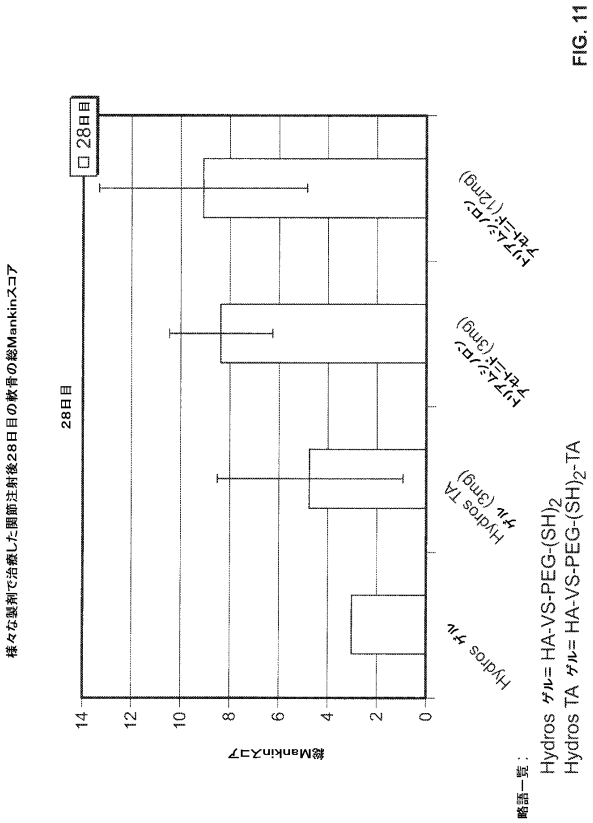


FIG. 11

【図１４】

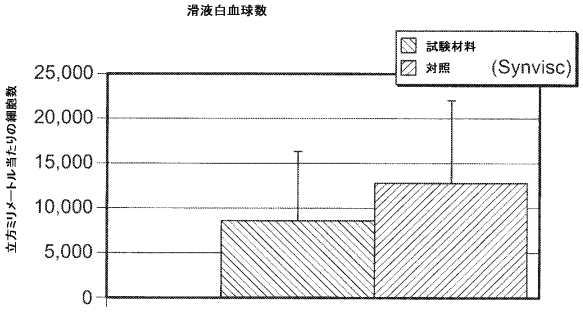


FIG. 14

【図１２】

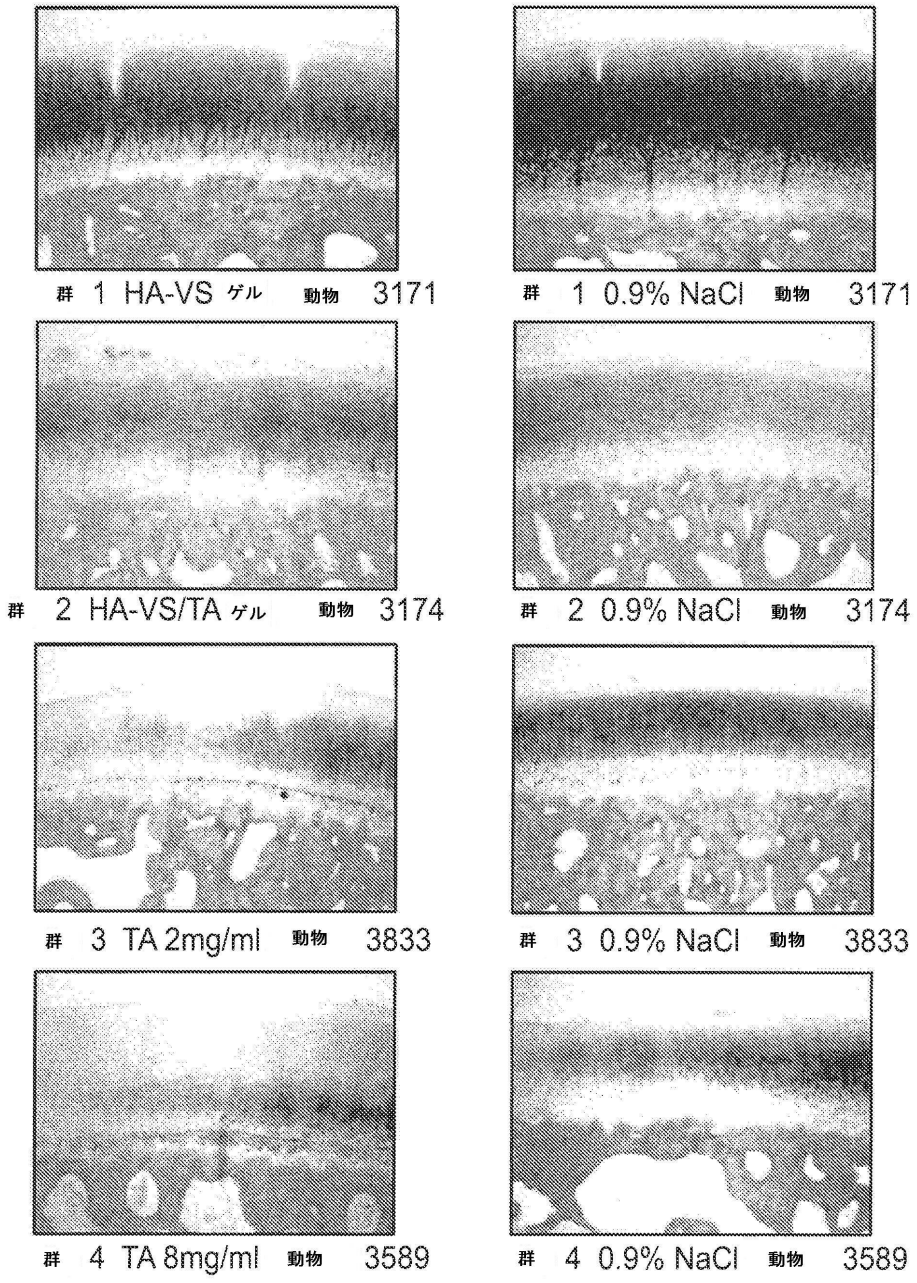

群 1 HA-VS ゲル 動物 3171
群 1 0.9% NaCl 動物 3171
群 2 HA-VS/TA ゲル 動物 3174
群 2 0.9% NaCl 動物 3174
群 3 TA 2mg/ml 動物 3833
群 3 0.9% NaCl 動物 3833
群 4 TA 8mg/ml 動物 3589
群 4 0.9% NaCl 動物 3589

FIG. 12

【図１３】

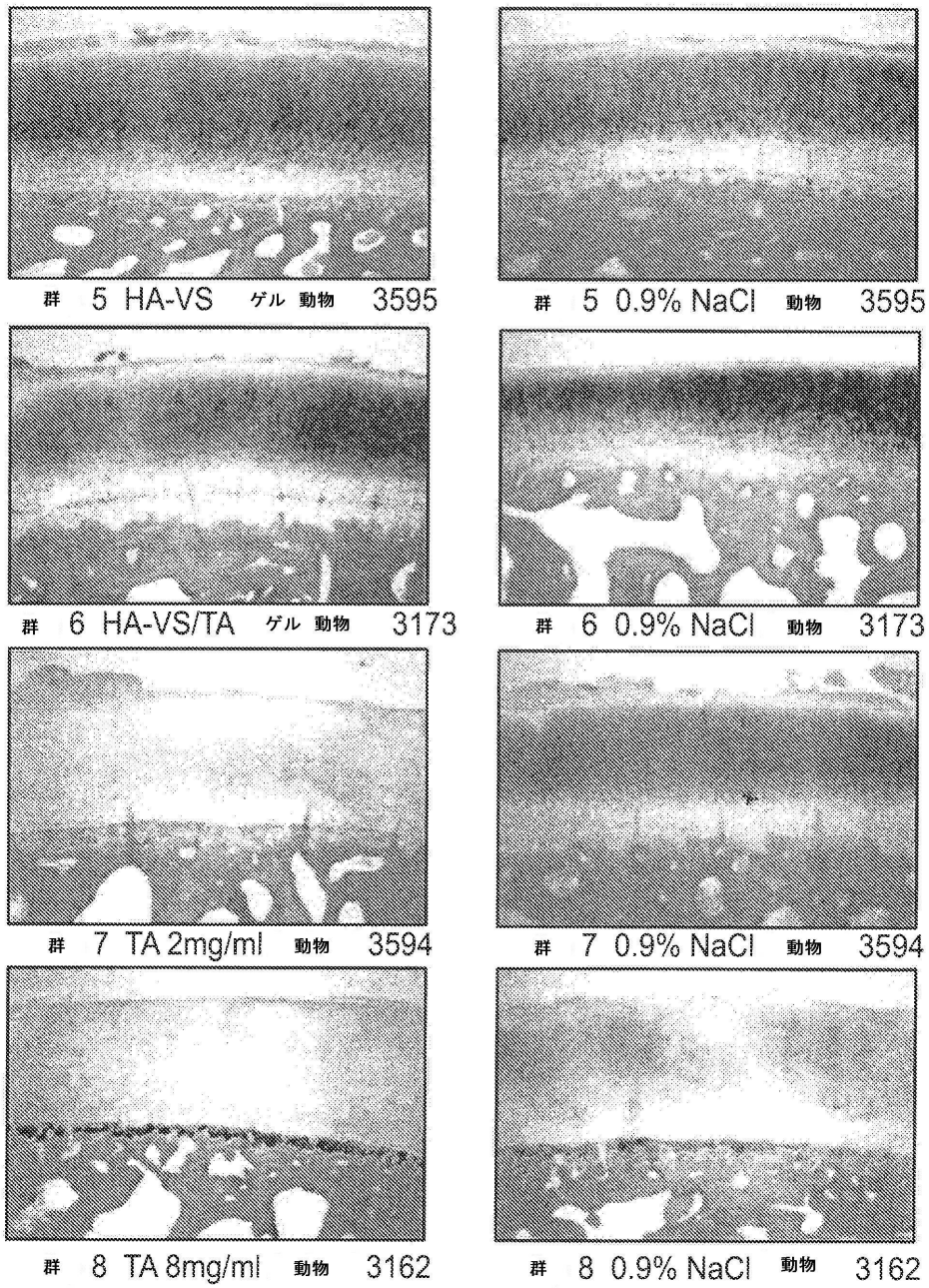

群 5 HA-VS ゲル 動物 3595
群 5 0.9% NaCl 動物 3595
群 6 HA-VS/TA ゲル 動物 3173
群 6 0.9% NaCl 動物 3173
群 7 TA 2mg/ml 動物 3594
群 7 0.9% NaCl 動物 3594
群 8 TA 8mg/ml 動物 3162
群 8 0.9% NaCl 動物 3162

FIG. 13

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
Ａ６１Ｐ	*19/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ	*19/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/04	
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｌ	*27/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｋ	*31/58*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/00	Ｖ
Ａ６１Ｋ	*9/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/00	Ｑ
Ａ６１Ｋ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｌ	27/00	Ｇ
			Ａ６１Ｋ	31/58	
			Ａ６１Ｋ	9/06	
			Ａ６１Ｋ	9/10	

(72)発明者　グラベット，　デイビッド　エム.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０４０，　マウンテン　ビュー，　ウォルナット　ドライブ　１８０７
(72)発明者　ダニロフ，　ジョージ　ワイ.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２４，　ロス　アルトス，　トパー　アベニュー　１４３１
(72)発明者　ヒ，　ピンレン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８７，　サニーベール，　オーク　ポイント　テラス　１５６１

審査官　土橋　敬介

(56)参考文献　国際公開第２００６／０５１９５０（WO，Ａ１）
国際公開第２００６／０５６２０４（WO，Ａ１）
特表２００３－５２３２３７（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５１９７７９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０２／０６８３８３（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２００５／０２８２７４７（ＵＳ，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０８Ｂ　３７／０８
Ａ６１Ｋ　９／０６
Ａ６１Ｋ　９／１０
Ａ６１Ｋ　３１／５８
Ａ６１Ｋ　３５／１２
Ａ６１Ｋ　４５／００
Ａ６１Ｋ　４７／３６
Ａ６１Ｌ　２７／００
Ａ６１Ｐ　９／００
Ａ６１Ｐ　１９／０２
Ａ６１Ｐ　１９／０４
Ａ６１Ｐ　２５／００
Ａ６１Ｐ　２９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）