

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年8月14日 (14.08.2003)

PCT

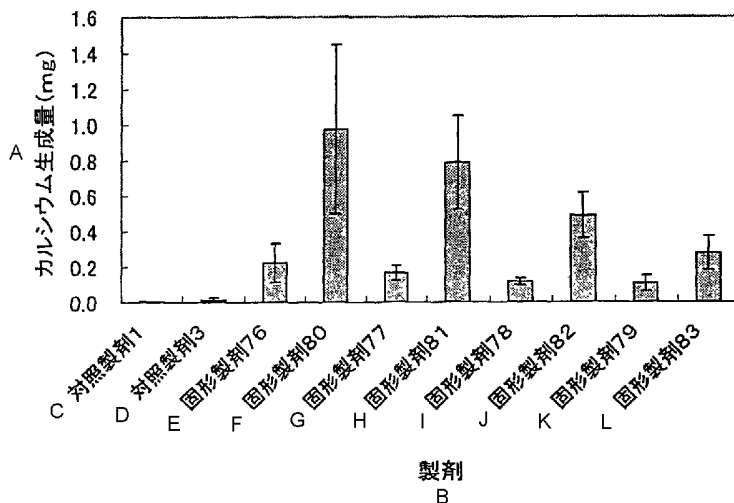
(10) 国際公開番号  
WO 03/066083 A1

- (51) 国際特許分類7: A61K 38/19, 38/22, 9/14, 47/18, 47/22, 47/26, 47/36, 47/42, A61P 19/00, 19/08, 19/10
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00966
- (22) 国際出願日: 2003年1月31日 (31.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 60/353,172 2002年2月4日 (04.02.2002) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町二丁目2番8号 Osaka (JP). ワイス (WYETH) [US/US]; 07940 ニュージャージー州、マディソン、ファイブギラルダファームス NJ (US). 株式会社高研 (KOKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒171-0031 東京都豊島区目白三丁目14-3 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 前田 弘雄 (MAEDA, Hiroo) [JP/JP]; 〒599-8246 大阪府堺市田園545 Osaka (JP). 佐野 明彦 (SANO, Akihiko) [JP/JP]; 〒560-0011 大阪府豊中市上野西一丁目7-22 Osaka (JP). エイチリーレベッカ (H. LI, Rebecca) [US/US]; 01730 マサチューセッツ州、ベッドフォード、シアーレーン 14 MA (US). ウォズニージョン エム (WOZNEY, John M.) [US/US]; 01749 マサチューセッツ州、ハドソン、オールドボルトンロード 59 MA (US). シーハーマン ハワード ジェイ (SEEHERMAN, Howard J.) [US/US]; 02138 マサチューセッツ州、ケンブリッジ、トロウブリッジストリート 46 ビー MA (US).
- (74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番31号 OMMビル5階私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: PREPARATIONS FOR TREATING BONE FRACTURE OR BONE LOSS OR ELEVATING BONE DENSITY

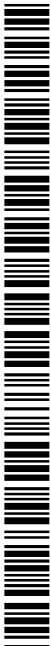
(54) 発明の名称: 骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤およびその使用



(57) Abstract: It is intended to provide preparations which are suitable for treating bone fracture or bone loss or preventing bone fracture, can be easily used and achieve a high therapeutic effect. Namely, preparations for treating bone fracture or bone loss or elevating bone density in the form of solid preparations which contain (a) a carrier made of collagen, (b) a bone morphogenetic protein (BMP) and (c) at least one compound selected from the group consisting of neutral amino acids, monosaccharides, disaccharides, organic acidic substances and polysaccharides and can be administered by injection; and a method of treating bone fracture or bone loss or elevating bone density which comprises administering such a preparation in an effective dose to an individual with a need for treating bone fracture or bone loss or elevating bone density.

- A...CALCIUM FORMED (mg)
- B...PREPARATION
- C...CONTROL PREPARATION 1
- D...CONTROL PREPARATION 3
- E...SOLID PREPARATION 76
- F...SOLID PREPARATION 80
- G...SOLID PREPARATION 77
- H...SOLID PREPARATION 81
- I...SOLID PREPARATION 78
- J...SOLID PREPARATION 82
- K...SOLID PREPARATION 79
- L...SOLID PREPARATION 83

[続葉有]



WO 03/066083 A1



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

骨折治療、骨欠損治療または骨折予防に適し、使いやすく、治療効果の高い製剤を提供すること。(a) コラーゲンからなる担体と(b) 骨形成タンパク質(BMP)と(c) 中性アミノ酸、単糖、二糖、有機酸性物質およびポリサッカライドからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物とを含有してなり、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤; 骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加を必要とする個体に、該製剤を有効量投与することを含む、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加方法。

## 明細書

骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤およびその使用

### 関連出願の参照

本出願は、2002年2月4日に提出された仮出願60/353,172の利益を享受する。

### 技術分野

本発明は、骨修復を必要とする症状の治療または予防のための手段に関する。詳細には、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤、および当該製剤を投与することによる、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加方法に関する。

### 背景技術

骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微小構造の破綻とによって特徴づけられる疾患であり、骨の脆弱性進行と骨折危険率の増大とに結びつく疾患である。前記「低骨量」とは、骨量または骨密度が低い状態をいう。前記骨粗鬆症においては、骨量または骨密度が低くなることにより、骨の微小構造が分断される等の破綻がもたらされ、骨の脆弱化が亢進、すなわち、力学的に弱くなって骨折しやすくなる。

骨粗鬆症の患者には、骨折の危険性が増しているが、まだ骨折を発症していない人と、すでに骨折を発症している人とが含まれる。

骨粗鬆症に関連して発症する骨折において、臨床的に発症頻度が高い骨折部位として、例えば、大腿骨頸部、橈骨末端、上腕骨近位端等が挙げられる。なかでも、大腿骨頸部骨折は、患者の日常活動性を著しく制限し、寝たきりにつながりやすいため、大腿骨頸部骨折を予防することが重要な課題となっている。

米国において、大腿骨頸部骨折は、年間250,000症例の発生があり、高齢者で最も一般的な骨折である[Praemer et al., Musculoskeletal Conditions in the United States, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, IL (1992)]。また、日本において、大腿骨頸部骨折は、1987年の全国調査では年間約53,000人、1992年では約76,600人、1997年では約92,400人（厚生省、骨粗鬆症予防のための危険因子に関する研究班）と急速に増加している。

したがって、骨粗鬆症における骨折を治療または予防することは、医療において重要であり、該骨粗鬆症における骨折の治療または予防のための有効な薬剤の開発はきわめて重要な課題である。

骨粗鬆症における骨折に関連して、活性物質として骨形成タンパク質（bone morphogenetic protein; BMP）と、担体としてコラーゲングルとを含有した注射可能な製剤、すなわち、BMPを保持したコラーゲングルを骨組織部位に投与することにより、骨折の重症度および／または発生率を低下できることが知られている〔国際公開第98/31788号パンフレット〕。

しかしながら、担体としてコラーゲングルを用いた場合、該コラーゲングルは流動性が高いため、BMPを保持したコラーゲングルを個体に投与した後に、該コラーゲングルを投与部位に確実に保持させておくことが困難である。このため、BMPを含有したコラーゲングルが、例えば、治療の目的とする投与部位以外の個所、例えば、筋肉内にこぼれ出た場合、その個所で異所性の骨を形成する場合がある。また、投与部位において、長期にBMPの作用を持続させることを目的として、コラーゲングルを担体として用いた場合、コラーゲングルは、投与部位に長期間留まることなく周辺に広く拡散、あるいは消失する性質を有する。したがって、前記コラーゲングルに含有されているBMPも短期に拡散する場合がある。すなわち、コラーゲングルを担体として用いた場合では、投与部位におい

てBMPを必要に応じて高濃度でとどめることは困難であると考えられる。

また、前記国際公開第98/31788号パンフレットには、架橋したコラーゲンの使用についても開示されている。しかしながら、架橋したコラーゲンを使用した場合、多少のBMPの滞留性を向上させることが期待されるものの、架橋度によりコラーゲンの流動性が変動し、コラーゲンからのBMPの放出性が変化するため、高度な品質管理が必要となる。

一方、有効成分を含有したコラーゲンを担体とした製剤で、酸性物質を含有することで有効成分の放出をコントロールすることを特徴とした製剤が知られている〔日本国特許2641755号特許掲載公報〕。前記日本国特許2641755号特許掲載公報には、有効成分として、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子をはじめとして、非常に広範な生物活性なタンパク質、ペプチド等に対する適用の可能性について開示されており、BMPについてもそのようなタンパク質の一例として例示されている。

しかしながら、前記製剤によれば、製剤からの有効成分の放出について、酸性物質により該有効成分の放出をコントロールできることが示されているものの、骨折治療または骨折予防についての有効性は不明である。さらに、治療または予防を目的とする部位に、有効成分を必要に応じて高濃度でとどめることによる治療効果、および投与部位近傍のみで骨形成反応を示すことにより異所性骨の発生を軽減し得るという効果は不明である。

したがって、骨粗鬆症における骨折治療または骨密度増加についての重要性が高まっており、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加に適し、使いやすく、治療効果の高い製剤が望まれている。

## 発明の開示

本発明は、

(1) BMPとコラーゲンとを含有した注射可能な固形製剤を、骨内に投与する

ことで、骨密度を増加させうる；

(2) 前記(1)に記載された固形製剤に、特定の有機酸性物質および／またはポリサッカライドを添加することにより生体内へのBMPの供給形態を変化させうる；

(3) 前記(1)に記載された固形製剤に、ポリサッカライドを添加することにより、生体内へのBMPの供給形態を変化させ、さらに、形状の優れた固形製剤を製造しうる、

(4) 前記(1)または(2)に記載された固形製剤に中性アミノ酸、単糖および二糖からなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物を添加することにより形状の優れた固形製剤を製造しうる；ならびに

(5) 卵巣を摘出した骨粗鬆症モデル動物で、BMPとコラーゲンとを含有した投与、特に注射可能な固形製剤により骨密度を増加させうる；

という本発明者らの検討により見出された驚くべき知見に基づく。

本発明の製剤としては、(a) コラーゲンからなる担体に、(b) BMPと、(c) 中性アミノ酸、単糖、二糖、有機酸性物質およびポリサッカライドとからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物〔以下、前記(c)成分を「中性アミノ酸等」と略称する場合がある〕とを含有し、かつ投与、特に注射可能な固形製剤(例えば、投与、特に注射可能な形状を有した固形製剤等)である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加に適した性質を有する製剤(すなわち、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤)が挙げられる。本発明の製剤は、BMPとコラーゲンとが均一に分散した固体であるため、該製剤によれば、コラーゲンゲルのように投与部位から流動することなく、投与した箇所にとどめることが可能となる。したがって、望ましくない異所性骨の形成を抑制することが可能である。また、本発明の製剤によれば、BMPとコラーゲンとが一体となって投与部位に留まるか、あるいは、投与部位近傍のみに拡散するため、狙った投与局所において、BMP濃度を高い濃度に維持することができる。このため、コラー

ゲンゲルに比較して、BMPの作用を長期間維持させることも可能である。本発明の製剤は、有機酸性物質またはポリサッカライドを含有するため、該製剤からのBMPの放出を制御する、すなわち、該製剤から生体へのBMPの供給を調整することができる製剤であり、該製剤に、中性アミノ酸、単糖類、二糖類、またはポリサッカライドをさらに含有させることにより、良好な形状を呈する固形製剤も含む。

本発明の他の態様は、(a) コラーゲンからなる担体に、(b) BMPと、(c) 中性アミノ酸等と、骨の形成に有効な成長因子である塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)とを含有し、かつ投与、特に注射可能な固形製剤である。骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤である。

本発明の他の態様は、前記製剤を骨内または骨近傍に投与することにより、投与部位周辺の骨密度を増加させる方法である。

すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 下記(a)～(c)：

(a) コラーゲンからなる担体、

(b) 骨形成タンパク質(BMP)、ならびに

(c) 中性アミノ酸、単糖、二糖、有機酸性物質およびポリサッカライドからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物

を含有してなり、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤、

〔2〕 形状が、円柱状である、前記〔1〕記載の製剤、

〔3〕 形状が、粒子状である、前記〔1〕記載の製剤、

〔4〕 該BMPが、BMP-2である、前記〔1〕記載の製剤、

〔5〕 該コラーゲンが、アテロコラーゲンである、前記〔1〕記載の製剤、

〔6〕 該BMPが、BMP-2であり、かつ該コラーゲンがアテロコラーゲンである、前記〔1〕記載の製剤、

〔7〕 中性アミノ酸、単糖および二糖からなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物と有機酸性物質とを含有してなる、前記〔1〕～〔6〕いずれか1項に記載の製剤、

〔8〕 塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）をさらに含有してなる、前記〔1〕～〔6〕いずれか1項に記載の製剤、

〔9〕 塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）をさらに含有してなる、前記〔7〕に記載の製剤、

〔10〕 多層構造を有する、前記〔8〕に記載の製剤、

〔11〕 多層構造を有する、前記〔9〕に記載の製剤、ならびに

〔12〕 骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加を必要とする個体に、前記〔1〕に記載の製剤を有効量投与することを含む、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加方法、  
に関する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、固形製剤1、固形製剤2、固形製剤3、固形製剤4、固形製剤5、固形製剤6および固形製剤7のin vitro放出挙動を示す。縦軸は、BMPの累積放出量を試験開始前の固形製剤中のBMP量に対する百分率（%）として示し、横軸は、試験時間（日）を示す。

第2図は、固形製剤8、固形製剤9および固形製剤10それぞれのin vitro放出挙動を示す。縦軸および横軸は、第1図と同様である。

第3図は、固形製剤12および固形製剤13それぞれのin vitro放出挙動を示す。縦軸および横軸は、第1図と同様である。

第4図は、固形製剤1、固形製剤2、固形製剤3、固形製剤4、固形製剤5、固形製剤6および固形製剤7それぞれのマウス皮下に投与後の固形製剤中のBMP量の経時的变化を示す。縦軸は、固形製剤に残存するBMP量を試験開始前の



固形製剤中のBMP量に対する百分率(%)として示し、横軸は、試験時間(日)を示す。

第5図は、固形製剤8、固形製剤9および固形製剤10それぞれのマウス皮下に投与後の固形製剤中のBMP量の経時的变化を示す。縦軸および横軸は、第4図と同様である。

第6図は、固形製剤12および固形製剤13それぞれのマウス皮下に投与後の固形製剤中のBMP量の経時的变化を示す。縦軸および横軸は、第4図と同様である。

第7図は、固形製剤52、固形製剤53、固形製剤54のマウス皮下に投与後の固形製剤中のBMP量の経時的变化を示す。縦軸および横軸は、第4図と同様である。

第8図は、対照製剤2および固形製剤6それぞれをマウス皮下に投与し、1ヶ月後の投与部位における異所性骨形成反応を示す図である。図中、パネルAは、対照製剤2、パネルBは、固形製剤6の図であり、それぞれの左パネル〔(a)〕は、投与部位周辺を示す図であり、それぞれの中央パネル〔(b)〕は、軟x線像を示す図であり、それぞれの右パネル〔(c)〕は、HE染色像を示す。

第9図は、固形製剤14、固形製剤15、固形製剤16のそれぞれをマウス皮下に投与した後の投与部位における異所性骨形成反応を示す図である。図中、パネルAは、固形製剤14、パネルBは、固形製剤15、パネルCは、固形製剤16の図である。パネルA~Cのそれぞれにおいて、左パネル〔(a)〕は、投与部位周辺を示す図であり、右パネル〔(b)〕は、軟x線像を示す図である。

第10図は、BMP水溶液A(1500 $\mu$ g/ml)、BMP水溶液B(300 $\mu$ g/ml)およびBMP水溶液C(60 $\mu$ g/ml)のそれぞれをマウス皮下に投与した後の投与部位における異所性骨形成反応を示す図である。パネルAは、BMP水溶液Aの投与における図、パネルBは、BMP水溶液Bの投与における図、パネルCは、BMP水溶液Cの投与における図を示す。パネルA~Cの

各パネルにおいて、左パネル〔(a)〕は、投与部位周辺を示す図であり、右パネル〔(b)〕は、軟x線像を示す図である。

第11図は、固形製剤1、固形製剤12、固形製剤13、対照製剤1、対照製剤3のそれぞれをマウス皮下に投与し、3週間後の投与部位における異所性骨形成反応を示す図である。図中、パネルAは、固形製剤1、パネルBは、固形製剤12、パネルCは、固形製剤13、パネルDは、対照製剤1、パネルEは、対照製剤3の図である。パネルA～Eのそれぞれにおいて、左パネル〔(a)〕は、投与部位周辺を示す図であり、右パネル〔(b)〕は、軟x線像を示す図である。

第12図は、固形製剤9（パネルA）、固形製剤60（パネルB）、固形製剤61（パネルC）、固形製剤63（パネルD）、固形製剤74（パネルE）、固形製剤75（パネルF）、固形製剤77（パネルG）、固形製剤4（パネルH）、固形製剤54（パネルI）の切断前の固形製剤の形状を示す図である。

第13図は、表2に示す内容による正常な雄のカニクイザルへの固形製剤の骨内投与における投与後の各投与部位近傍の骨密度の時間的推移を示す。縦軸は、pQCTにより測定した骨密度の固形製剤投与前の骨密度に対する変化率（％）として示し、横軸は、試験時間（月）を示す。

第14図は、固形製剤11または対照製剤3を、卵巣を摘出後3年を経過したカニクイザル（骨粗鬆症モデル）の近位大腿骨に投与後、投与6ヵ月後の各組織像を示す図である。パネルAは、対照製剤3の投与における組織像を示し、パネルBは、固形製剤11の投与における組織像を示す。左パネル〔(a)〕は、転子組織を示し、中央パネル〔(b)〕は、頸部組織を示し、右パネル〔(c)〕は、頭部組織を示す。

第15図は、固形製剤76、固形製剤77、固形製剤78、固形製剤79、固形製剤80、固形製剤81、固形製剤82、固形製剤83、対照製剤1、対照製剤3の各製剤をマウス（BALB/c、雄）の背部皮下に投与後、3週間後に生

成したカルシウム量 (mg) を示す (平均値 ± S. D. ) 。

第 16 図は、製剤径の細い、固形製剤 84 a、固形製剤 84 b、固形製剤 85 a、固形製剤 85 b、固形製剤 86 a、固形製剤 86 b の各製剤をマウス (BALB/c、雄) の背部皮下に投与後、3 週間後に生成したカルシウム量を示す図である (平均値 ± S. D. ) 。

発明を実施するための最良の形態

本発明の製剤は、下記成分 (a) ~ (c) :

- (a) コラーゲンからなる担体、
- (b) BMP、ならびに
- (c) 中性アミノ酸等

を含有し、かつ投与、特に注射可能な固形製剤であり、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の固形製剤である製剤である。

本発明の製剤によれば、骨折治療、骨欠損治療または骨折予防の目的とする部位へ、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加に必要な BMP を送達することができ、また、投与局所において、BMP 濃度を高い濃度に維持することができるという優れた効果を発揮する。

本発明で用いられる骨形成タンパク質 [bone morphogenetic protein; BMP] は、未分化な間葉系細胞を、軟骨細胞や骨芽細胞へと分化誘導すること、または軟骨や骨芽細胞の前駆細胞 (osteoprogenitor) の分裂増殖を促進して、in vivo の局所において軟骨または骨の形成を促進すること等の生物活性を有する。

本発明に用いられる BMP としては、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13 が挙げられ、なかでも BMP-2 が好ましい。本発明の製剤中における BMP の量については、治療または予防対象である骨疾患によって、他の含有物質とともに設定す

るが、製剤の製造上の観点から、全製剤重量に占めるBMPの重量の割合として、80 w/w%以下、好ましくは50 w/w%以下、さらに好ましくは30 w/w%以下がよい。

なお、本発明の製剤において、前記生物活性を呈するものであれば、前記BMPは、複合体（または塩）を形成していてもよい。

本発明に用いられるコラーゲンは、可溶性コラーゲンまたは可溶化コラーゲンが望ましい。

「可溶性コラーゲン」としては、例えば、酸性あるいは中性の水または塩を含有した水に可溶であるコラーゲン等が挙げられる。「可溶化コラーゲン」としては、例えば、酵素により可溶化される酵素可溶化コラーゲン、アルカリにより可溶化されるアルカリ可溶化コラーゲン等が挙げられる。

これらのコラーゲンは、孔サイズが1マイクロメートルのメンブレンフィルターを通過できるものであることが望ましい。

本発明に用いられるコラーゲンは、例えば、好ましくは、3量体以下であり、より好ましくは2量体以下であることが望ましい。

コラーゲンの分子量は、例えば、好ましくは、約30万から約90万であり、より好ましくは、約30万から約60万であることが望ましい。

前記コラーゲンは、任意の動物種から抽出された天然のコラーゲンであってもよく、遺伝子工学的に生産されたコラーゲンであってもよい。前記コラーゲンとしては、好ましくは、脊椎動物から抽出された天然のコラーゲンまたは遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えコラーゲン、より好ましくは、哺乳動物、鳥類、魚類から抽出された天然のコラーゲンまたは遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えコラーゲンが望ましい。また、前記コラーゲンは、いかなるタイプであってもよく、天然のI～V型コラーゲン、遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えI～V型コラーゲン；および前記天然または遺伝子組換えI～V型コラーゲンの少なくとも2種の混合物が望ましい。

具体的には、例えば、哺乳動物の真皮から酸抽出したⅠ型コラーゲン；該Ⅰ型コラーゲンと哺乳動物の真皮から酸抽出したⅢ型コラーゲンとの混合物；遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えⅠ型コラーゲン；該遺伝子組換えⅠ型コラーゲンと遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えⅢ型コラーゲンとの混合物等が挙げられる。より好ましくは、例えば、仔牛の真皮から酸抽出したⅠ型コラーゲン；遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えⅠ型コラーゲン等が挙げられる。遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えⅠ型コラーゲンとしては、仔牛の真皮由来またはヒトの真皮由来のものが好ましい。

また、安全性の面から、抗原性の高いテロペプチドを除去したアテロコラーゲンまたは遺伝子工学的に生産された遺伝子組換えアテロコラーゲンが望ましく、好ましくは、1分子あたりチロシン残基が3以下であるアテロコラーゲンが望ましい。

前記テロペプチドは、コラーゲンの主要な抗原決定基である。また、前記アテロコラーゲンは、コラーゲンを酵素（例えば、ペプシン）処理等により、そのテロペプチドを除去することにより得られる物質であり、安全性上、抗原性が、ほとんど問題にならないレベルであるとされている。

本発明の製剤に用いられるコラーゲンは、例えば、コラーゲンを産生する初代培養細胞または株化細胞を培養し、得られた培養物（培養上清、培養細胞）から目的のコラーゲンを分離精製することにより得られる。また、遺伝子工学的手法により、コラーゲンをコードする核酸を適切なベクターに組み込み、これを適切な宿主に導入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から、目的とする組換えコラーゲンを得ることもできる。前記宿主細胞としては、例えば、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞が挙げられ、具体的には、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、植物細胞または動物細胞を用いることができる。

なお、本発明の製剤において、前記生物活性を呈するものであれば、前記コラーゲンは、複合体（または塩）を形成していてもよい。

本発明の製剤の形状は、注射可能な形状であればよく、該製剤の形状としては、例えば、柱状、針状、粒子状等が挙げられる。前記柱状としては、通常用いられている注射針を使用できることから、円柱状が好ましい。

本発明の製剤の大きさは、例えば、円柱状の製剤の場合、注射可能である範囲であればよく、直径0.3mm～2mm、好ましくは、0.5mm～1.2mmであり、長さは、3mm～30mm、好ましくは、5mm～15mmであることが望ましい。また、粒子状の製剤の場合、粒子径で最も大きな部分が、好ましくは、500 $\mu$ m以下であることが望ましく、注射用溶媒あるいは注射可能な油性溶液に懸濁し、通常の注射針を用いて投与することが有用である。

本発明の製剤は、公知の方法により投与されうる。本発明の製剤を骨の近傍または骨欠損部に投与する際、例えば、注射針と、この注射針を挿着するためのノズルを有するバレルと、このバレルに挿着される移動自在なプランジャとを含んだ固形製剤投与具（特公平5-86238号公報）を用いることができる。ここで、前記「骨の近傍」としては、骨から約5mm以内の部分が好ましい。骨内への投与については、斜めの先端を有する中空針とトロカールまたはスタイレットとを用いる。スタイレットを針の内部に挿入配置し、かつ針の斜めの先端から外に部分的に延在させて、ついで、この針とトロカールとの組み立て体を骨に押し通し、皮質を貫通させ、針とトロカールの先端を進める。次にトロカールを引き抜き、針の開口端を目的とする投与部に位置させ、針の生体外の部分から本発明の製剤を挿入し、押し込むことで投与することができる。さらに、骨内への投与については骨内注射針（特公平6-6162号公報）を用いることにより、本発明の製剤を容易に投与することもできる。

本発明の製剤を、骨内、骨近傍または骨欠損部に投与することにより、投与部位周辺の骨密度を増加または新生骨の形成を行なうことができることから、骨修復を必要とする症状に対する治療、あるいは骨修復を必要とする症状に対する予防を行なうことができる。

本発明の製剤により適用しうる症状として、骨折が挙げられ、治療しうる骨折としては、例えば、骨粗鬆症に伴う骨折、骨軟化症に伴う骨折、悪性腫瘍に伴う骨折、多発性骨髄腫に伴う骨折、先天性骨形成不全に伴う骨折、骨嚢胞症に伴う骨折、化膿性骨髄炎に伴う骨折、大理石病に伴う骨折、栄養障害に伴う骨折等の何らかの病気に伴う骨折や、外傷性骨折、疲労骨折が含まれる。本発明の製剤により治療しうる骨折として上記の骨折が挙げられ、本発明の製剤を、骨折部位の近傍または骨折部位間に投与することで治療を効果的に行なうことができる。

また、本発明の製剤により骨密度を増加させることで予防されうる骨折として、上記の何らかの病気に伴う骨折、すなわち、骨粗鬆症に伴う骨折、骨軟化症に伴う骨折、悪性腫瘍に伴う骨折、多発性骨髄腫に伴う骨折、先天性骨形成不全に伴う骨折、骨嚢胞症に伴う骨折、化膿性骨髄炎に伴う骨折、大理石病に伴う骨折、栄養障害に伴う骨折等が挙げられ、特に骨粗鬆症の個体における骨折の予防に有用である。

本発明の製剤を、骨折を予防しようとする部位の近傍または骨内に投与することにより骨密度を増加させ、それにより骨折を予防することができる。本発明の製剤を投与する部位として、脊椎、大腿骨頸部、橈骨末端、上腕骨近位端が挙げられる。特に、大腿骨頸部への投与は骨粗鬆症の個体における骨折に対して、予防する対象として重要な部位である。

なお、本明細書において、「骨折の予防」とは、骨折の重症度および／または発生率を低下させることを意味する。

さらに、本発明の製剤を、骨欠損部またはその近傍に投与することにより、骨形成を促進し、それにより骨欠損部の修復を行なうことができる。骨欠損には、腫瘍摘出に伴う欠損、外傷性の欠損、骨延長術における骨切片間隙等が挙げられる。

本発明の1つの態様は、コラーゲンからなる担体に、BMPと有機酸性物質とを含有し、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度

増加用の製剤である（固形製剤 a）。本発明の製剤に用いられる有機酸性物質は、その塩であってもよい。

本発明の製剤は、有機酸性物質またはその塩を含有するため、該製剤からの BMP の放出を制御することができる、すなわち、該製剤から生体への BMP の供給を調節することができるという優れた効果を発揮する。

本明細書において、前記有機酸性物質またはその塩を含有した製剤における BMP の放出制御は、該有機酸性物質またはその塩の添加により、BMP の溶解性および／または該製剤の崩壊を制御することによるものをも含む。

前記有機酸性物質とは、有機化合物であって、水に溶解したときの pH が 7 以下であり、かつ薬学上許容される化合物をいい、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸、クエン酸、酒石酸、コハク酸およびそれらの塩が挙げられる。

本発明の製剤中における前記有機酸性物質の含有量は、治療や予防の計画に対応して適宜設定することができるが、好ましくは、全製剤重量の 1～30 w/w %、より好ましくは、1～20 w/w % の範囲で含有量を設定することが望ましい。

なお、本発明の製剤において、前記生物活性を呈するものであれば、前記有機酸性物質は、複合体（または塩）を形成していてもよい。

本明細書において、「BMP の放出」とは、製剤から、BMP または BMP と添加剤との複合体が溶出し、遊離すること；製剤自体が崩壊、拡散や溶解することにより、BMP または BMP と添加剤との複合体が遊離することを意味する。すなわち、前記「BMP の放出」は、インビトロ放出試験においては、放出試験液への BMP の溶出または放出試験液への BMP と添加剤との複合体の溶出であり、動物への製剤の投与実験においては、製剤から生体への BMP の供給または製剤から生体への BMP と添加剤との複合体の供給を意味する。

本明細書における「添加剤」とは、製剤に添加されうる物質であって、BMP およびコラーゲン以外の物質をいい、例えば、前記中性アミノ酸等が挙げられる



。

本発明の1つの態様は、コラーゲンからなる担体に、BMPとポリサッカライドとを含有し、かつ投与、特に注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤である（固形製剤b）。本発明の製剤に用いられるポリサッカライドは、その塩であってもよい。

本発明の製剤は、ポリサッカライド（またはその塩）を含有するため、該製剤からのBMPの放出を制御することができる、すなわち、該製剤から生体へのBMPの供給を調節することができるという優れた効果を発揮する。

前記ポリサッカライドとは、数個以上の単糖が脱水縮合して生じた糖質をいう。ポリサッカライドは種々の方法で分類されており、例えば、単純多糖、複合多糖や、酸性多糖、中性多糖、従来ムコ多糖とよばれた一群の多糖等が挙げられる。前記ポリサッカライドのなかでも、特にコンドロイチン硫酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等が好ましい。ポリサッカライドを含有した製剤では生体への投与後、製剤自体が崩壊することが多く、かかる崩壊の速度および程度が、製剤からのBMPの放出に寄与する。また、BMPとコラーゲンとを含有した、投与、特に注射可能な形状を有した製剤にポリサッカライドまたはその塩を含有させることにより、上記のように該製剤からのBMPの放出を制御することができるだけでなく、さらに製剤の形状を良好にすることができるという優れた効果を発揮する。なお、前記有機酸性物質と前記ポリサッカライドとは、併用されてもよい。前記ポリサッカライドは、製剤からのBMPの放出を制御し、製剤の形状を良好にするものであれば、複合体（または塩）を形成していてもよい。

本発明の1つの態様は、コラーゲンからなる担体に、BMPと「中性アミノ酸、単糖、二糖および糖アルコールからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物」とを含有し、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤である（固形製剤c）。本発明の製剤に用いられる「中性ア

ミノ酸、単糖、二糖および糖アルコールからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物」は、その塩であってもよい。本発明の製剤は、「中性アミノ酸、単糖、二糖および糖アルコールからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物」またはその塩を含有するため、該製剤の形状を良好にすることができるという優れた効果を発揮する。すなわち、注射に適した形状の製剤を提供することができる。

例えば、BMPとコラーゲンとのみからなる製剤の形状が良好でないのに比較して、「中性アミノ酸、単糖、二糖および糖アルコールからなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物」をさらに添加することにより、非常に良好な形状の製剤を提供することができるという驚くべき効果を発揮する。

なお、本明細書において、「良好な形状」とは、投与、特に注射に適した形状を意味する。

前記中性アミノ酸としては、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、システイン、シスチン、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、チロシン、トリプトファン、プロリンが挙げられる。前記中性アミノ酸は、製剤の成形性を発揮するものであれば、複合体（または塩）を形成してもよい。

また、前記単糖類としては、グルコース、果糖等が挙げられ、前記二糖類としては、ショ糖、乳糖、マルトース等が挙げられ、前記糖アルコールとしてはキシリトール、ソルビトール、マンニトール等が挙げられる。前記単糖類、二糖類および糖アルコールは、製剤の成形性を発揮するものであれば、複合体（または塩）を形成してもよい。

前記製剤、すなわち、コラーゲンからなる担体に、骨形成タンパク質（BMP）と有機酸性物質とを含有し、かつ投与、特に注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤（固形製剤a）に、中性アミノ酸、単糖類、二糖類および糖アルコールからなる群より選ばれた少なくとも1種の化

化合物を含有させることによって、製剤の形状を良好にすることができるという優れた効果を発揮する。前記固形製剤 a において、中性アミノ酸、単糖類、二糖類および糖アルコールからなる群より選ばれた少なくとも 1 種の化合物をさらに含有した製剤（固形製剤 d）も本発明の範囲に含まれる。

前記中性アミノ酸、単糖類、二糖類、および糖アルコール等から選ばれた化合物を、前記製剤、特に BMP とコラーゲンと有機酸性物質とを含有した固形製剤（固形製剤 a）に含有させることによって、該製剤からの BMP の放出を制御することができる、かつ形状が良好な製剤を提供することができる。

例えば、製剤の形状を改善し、医療上の使用に適した形状とする観点から、例えば、グルタミン酸塩酸塩 20 w/w% と BMP 5 w/w% とコラーゲンとを含有した円柱状の製剤において、最終含有量として、コラーゲンの含有量を、例えば、10 w/w% 分に替えて中性アミノ酸としてアラニンが 10 w/w% となるように含有させることにより、良好な形状の製剤が得られ、さらにアラニンの最終含有量を 20 w/w% とすることで、より良好な形状の製剤が得られる。本発明においては、単に BMP の放出速度をコントロールする方法だけでなく、製剤の形状を良くする方法を含む。

本発明によれば、本発明の製剤を、治療の対象とする骨疾患部、すなわち骨折部位、骨欠損部位またはそれらの近傍に投与すること、あるいは骨粗鬆症等における骨折のリスクの高い部位の骨内に投与することにより、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加、すなわち、骨折の予防が可能となる。

BMP とコラーゲンと適切な添加剤とを含有した、投与、特に注射可能な形状を有した製剤に、塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）をさらに含有させることによって、高い骨の形成の効果を発揮するため、骨修復、例えば、骨粗鬆症における骨折治療および／または骨折予防に非常に優れた効果を発揮する。すなわち、bFGF により間葉系細胞を増殖させ、BMP により骨芽細胞へと分化誘導することで効果的な骨形成の効果が得られる。

本発明の製剤の投与量および投与回数は、例えば、対照疾患、症状、年齢および体重によって異なるが、通常は、製剤1本あたり、BMPについて、例えば、0.1～100mg、bFGFを含有せしめる場合には、例えば、0.1～20mgを含有せしめることができる。かかる製剤を成人に対し、1日あたり1本または複数本（例えば、2～4本）投与することができる。

本発明の製剤の形態は、単一構造であっても、多重構造であってもよい。前記単一構造とは、製剤中に各構成成分が均一に分散した単一の層から構成される製剤の構造であり、前記多重構造とは、二つ以上のマトリックスから構成される成形体をいう。前記マトリックスとは、BMP、添加剤等のうち一種あるいはそれ以上がコラーゲン中に均一に分散されている系をいうが、コラーゲンのみからなる系も含まれる。したがって、多重構造をとる製剤とは、複数のマトリックスから構成されている製剤である。例えば、この多重構造をとる製剤の形態として、円柱状で、同心円の構造をとる製剤を例にすると、内側の層に有機酸性物質を含有したコラーゲンからなるマトリックスを成分として、外側の層に、BMPと中性アミノ酸等とを含有したコラーゲンからなるマトリックスを成分として構成される二重構造の製剤が挙げられる。もちろん内側の層の成分と外側の層の成分が反対でもよく、また、この二重構造のさらに外側に第三のコラーゲンのみからなる成分による層がある三重構造の製剤も一つの例として挙げられる。

本発明の製剤の製造方法は、限定されるものではないが、例えば、BMPとコラーゲンと有機酸性物質またはポリサッカライド等の添加剤とを含有した円柱状の製剤の場合、例えば、下記製造工程：

- ① BMPを含有した水溶液と、コラーゲンを含有した水溶液と、前記添加成分とを含有した水溶液を混合し、均一な混合溶液とする工程、
- ② 前記工程①で得られた混合溶液を、凍結乾燥またはスプレードライ等の方法により乾燥させる工程、
- ③ 前記工程②で得られた乾燥物に適量の水を加えて膨潤させ、十分練合して均

質な練合混合液とする工程、

④ 前記工程③で得られた練合混合液を、押出成形等により円柱状に成形する工程、

⑤ 前記工程④で得られた円柱状成形物を乾燥させる工程、および

⑥ 前記工程⑤で得られた乾燥した成形物を適切な長さに切断する工程

により、本発明の製剤を得ることができる。また、前記製造方法はフレキシブルに適宜選択され得、上記製造工程において、例えば、添加剤を水溶液とせず、粉体のまま、コラーゲンとBMPとを含有した混合溶液に添加してもよく、前記工程③において、粉体のまま添加し練合してもよい。

粒子状の製剤は、例えば、上記の円柱状の製剤を粉砕することで製造されうる。また、前記粒子状の製剤は、上記の円柱状の製剤の製造方法の例における工程②で得られた乾燥物を粉砕すること、または工程③で得られた練合混合液をそのまま乾燥させ、粉砕することにより製造されうる。また、得られた粒子状製剤を篩過することでその粒子の大きさを一定の範囲のものとすることができる。

多重構造を有する製剤についても、上記の円柱状の製剤の製造方法に準じて製造される。すなわち各層を構成する成分を含有している均質な練合混合液を上記の円柱状の製剤の場合と同様の方法で各々準備し、各層に対応する混合液を多重ノズルを使用して、押出成形し、乾燥させることで製造することができる。

bFGFを含有した本発明の製剤において、二重構造を有する製剤は、製造工程上、および放出制御上、非常に優れた特徴を有する。

前記bFGFを安定に維持し、かつ機能を十分に発揮させる観点から、例えば、BMPを含有したマトリックスとbFGFを含有したマトリックスとを別々に調製し、押出成形の工程で、上記の各々の成分を二重構造となるように押出成形することが有利である。ここで、bFGFを含有したマトリックスは、例えば、温度は、15℃以下、好ましくは10℃以下で扱い、用いられるコラーゲンは、pH4～pH7、好ましくはpH5～pH6で用いることが望ましい。

また、bFGFは、間葉系細胞を増殖させ、BMPは、その増殖した間葉系細胞を骨芽細胞へと分化させることから、二重構造の外層にbFGFを内層にBMPを含有させ、bFGFの放出を先に多くし、BMPの放出を後になるようにコントロールすることで、効果的な薬効を引き出すことができるという優れた効果を発揮する。また、二重構造の内層にbFGFを含有させ、外層にBMPをそれぞれ含有させることでbFGFとBMPとの放出をバランスよくコントロールすることも可能である。また、前記製剤において、ポリサッカライドや、有機酸性物質等の添加剤を含有させることで、例えば、崩壊性および分散性を内層と外層との間で調節することによりbFGFとBMPとの放出をコントロールすることも本発明では可能である。

本発明の製剤によれば、前記したように、骨粗鬆症等における骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加方法が提供されうる。具体的には、治療または予防を必要とする個体に、

- 1) コラーゲンからなる担体に、BMPと有機酸性物質とを含有し、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤（固形製剤a）、
- 2) コラーゲンからなる担体に、BMPとポリサッカライドとを含有し、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤（固形製剤b）、
- 3) コラーゲンからなる担体に、BMPと「中性アミノ酸、単糖および二糖からなる群より選ばれた化合物」とを含有し、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤（固形製剤c）、
- 4) コラーゲンからなる担体に、BMPと、有機酸性物質と、「中性アミノ酸、単糖および二糖からなる群より選ばれた化合物」とを含有し、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤（固形製剤d）、および

5) 前記1)～4)のいずれかにおいて、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)をさらに含有し、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤、  
からなる群より選ばれた1種の製剤を有効量投与することを特徴とする方法が挙げられる。

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1 (BMP 5w/w% 処方)

2.16 w/w% アテロコラーゲン水溶液 22.0 gに、水 43 mlを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.48 mg/ml BMP水溶液 10.1 mlを添加して、均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6 mm)から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径0.78 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤1 (BMP含有量: 4.7 w/w%)を得た。

#### 実施例2 (BMP 10w/w%処方)

2.16 w/w% アテロコラーゲン水溶液 20.8 gに、水 33.8 mlを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.45 mg/ml BMP水溶液 20.4 mlを添加して、均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6 mm)から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.84 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤2 (BMP含有量: 10.0 w/w%)を得た。

## 実施例 3 (BMP 20w/w%処方)

2. 16 w/w% アテロコラーゲン水溶液 18.5 g に、水 15.7 ml を添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.45 mg/ml BMP 水溶液 40.8 ml を添加して、均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.88 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 3 (BMP 含有量：20.5 w/w%) を得た。

## 実施例 4 (BMP 5w/w%, Ala 5w/w%処方)

2. 16 w/w% アテロコラーゲン水溶液 20.8 g に、水 40 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 3.57 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.45 mg/ml BMP 水溶液 10.2 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.76 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 4 (BMP 含有量：5.3 w/w%) を得た。

## 実施例 5 (BMP 5w/w%, Ala 10w/w% 処方)

2. 16 w/w% アテロコラーゲン水溶液 19.7 g に、水 35 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 10 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に 2.48 mg/ml BMP 水溶液 10.1 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（



内径1.6 mm)から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.91 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤5 (BMP含有量: 4.9 w/w%)を得た。

#### 実施例6 (BMP 5w/w%, Ala 20w/w% 処方)

2.16 w/w% アテロコラーゲン水溶液17.4 gに、水28 mlと5 mg/ml L-アラニン水溶液20 mlとを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.48 mg/ml BMP水溶液10.1 mlを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6 mm)から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.88 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤6 (BMP含有量: 4.6 w/w%)を得た。

#### 実施例7 (BMP 5w/w%, Glu 5w/w% 処方)

2.16 w/w% アテロコラーゲン水溶液20.8 gに、水39 mlと5 mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液5.0 mlとを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.48 mg/ml BMP水溶液10.1 mlを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6 mm)から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.77 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤7 (BMP含有量: 4.8 w/w%)を得た。

#### 実施例8 (BMP 5w/w%, クエン酸 10w/w% 処方)

2.12 w/w% アテロコラーゲン水溶液32.1 gに、水36 mlと5 m

g/m<sup>l</sup> クエン酸水溶液 16.0 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.47 mg/m<sup>l</sup> BMP 水溶液 16.2 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.78 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 8（BMP 含有量：5.0 w/w%）を得た。

#### 実施例 9（BMP 5w/w%, CS 20w/w% 処方）

2.12 w/w% アテロコラーゲン水溶液 28.3 g に、水 26 ml と 5 mg/m<sup>l</sup> コンドロイチン硫酸ナトリウム（CS）水溶液 32.0 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.83 mg/m<sup>l</sup> BMP 水溶液 14.1 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.84 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 9（BMP 含有量：4.6 w/w%）を得た。

#### 実施例 10 [BMP 5w/w%, CS 20w/w% (処方): 細径]

2.12 w/w% アテロコラーゲン水溶液 13.2 g に、水 7 ml と 5 mg/m<sup>l</sup> コンドロイチン硫酸ナトリウム水溶液 16.0 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に 2.83 mg/m<sup>l</sup> BMP 水溶液 14.1 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 0.9 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.57 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 10（BMP

含有量：8.9 w/w%)を得た。

#### 実施例 1 1 (BMP 20w/w%処方)

2. 12 w/w% アテロコラーゲン水溶液 56.6 gに、水 33 mlと 3.33 mg/ml BMP水溶液 90.1 mlとを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6 mm)から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.85 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤 1 1 (BMP含有量：17.5 w/w%)を得た。

#### 実施例 1 2 (BMP 5w/w%, Glu 20w/w%, Ala 20w/w% 処方)

2. 12 w/w% アテロコラーゲン水溶液 38.9 gに、5 mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液 60.0 mlと 5 mg/ml L-アラニン水溶液 60.0 mlとを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、3.33 mg/ml BMP水溶液 22.5 mlを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6 mm)から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径0.91 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤 1 2 (BMP含有量：4.3 w/w%)を得た。

#### 実施例 1 3 (BMP 5w/w%, Glu 10w/w%, Ala 20w/w% 処方)

2. 12 w/w% アテロコラーゲン水溶液 46.0 gに、水 21 mlと 5 mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液 30.0 mlと 5 mg/ml L-アラニン水溶液 60.0 mlとを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、

3. 33 mg/ml BMP水溶液 22.5 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.6 mm）から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径0.90 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤13（BMP含有量：4.4 w/w%）を得た。

#### 実施例14（BMP 5w/w%, Ala 20w/w% 処方）

1. 88 w/w% アテロコラーゲン水溶液 20.0 g に、水 26 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 20.0 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.86 mg/ml BMP水溶液 8.74 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.6 mm）から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径0.79 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤14（BMP含有量：5.5 w/w%）を得た。

#### 実施例15（BMP 1w/w%, Ala 20w/w% 処方）

1. 88 w/w% アテロコラーゲン水溶液 21.0 g に、水 32 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 20.0 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に 2.86 mg/ml BMP水溶液 1.75 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.6 mm）から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径0.81 mm、長さ10 mmの円柱状の固形製剤15（BMP含有量：0.77 w/w%）を得た。

#### 実施例 16 (BMP 0.2w/w%, Ala 20w/w% 処方)

1. 88 w/w% アテロコラーゲン水溶液 21.2 g に、水 33 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 20.0 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、2.86 mg/ml BMP 水溶液 0.35 ml を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径 0.88 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 16 (BMP 含有量：0.17 w/w%) を得た。

#### 実施例 17～75 添加剤の異なる種々のサンプル

以下の方法により種々のサンプルを作製した。ここでの仕込みは、表 1 の記載のように行なった。

表1

固形製剤	製剤処方			仕込み										製剤(測定値)	
	BMP (w/w%)	添加剤		アロコラーゲン 水溶液		BMP 水溶液		添加剤水溶液				BMP 含有量 (w/w%)	直径 (mm)		
		(w/w%)	(w/w%)	濃度 (%)	量 (g)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)				
17	5	-		2.08	3.65	2.48	1.61							4.7	0.80
18	5	アラニン	20	2.08	2.88	2.48	1.61		アラニン	5	3.20			4.7	0.84
19	5	スクロース	5	2.08	3.46	2.48	1.61		スクロース	5	0.80			4.6	0.72
20	5	スクロース	20	2.08	2.88	2.48	1.61		スクロース	5	3.20			4.5	0.71
21	5	グルコース	5	2.08	3.46	2.48	1.61		グルコース	5	0.80			4.6	0.73
22	5	グルコース	20	2.08	2.88	2.48	1.61		グルコース	5	3.20			4.7	0.70
23	5	PEG4000	5	2.08	3.46	2.48	1.61		PEG4000	5	0.80			4.6	0.77
24	5	PEG4000	20	2.08	2.88	2.48	1.61		PEG4000	5	3.20			4.6	0.93
25	5	ヒトアルブミン	20	2.08	2.88	2.50	1.60		ヒトアルブミン	5	3.20			4.8	0.75
26	5	クエン酸Na	5	2.08	3.46	2.50	1.60		クエン酸Na	5	0.80			4.6	0.78
27	5	CS	5	2.08	3.46	2.50	1.60		CS	5	0.80			5.2	0.74
28	5	Tween80	5	2.08	3.46	2.50	1.60		Tween80	5	0.80			3.9	0.77
29	5	EDTA	1	2.08	3.62	2.50	1.60		EDTA	5	0.16			4.7	0.71
30	5	リン酸水素Ca	1	2.08	3.62	2.50	1.60		リン酸水素Ca	5	0.16			4.4	0.77
31	5	アラニン	20	2.08	2.88	2.50	1.60		アラニン	5	3.20			4.6	0.56
32	5	アラニン	20	2.08	2.88	2.50	1.60		アラニン	5	3.20			4.9	1.05
33	5	クエン酸Na	20	2.08	2.88	2.50	1.60		クエン酸Na	5	3.20			4.2	1.08
34	5	CS	20	2.08	2.88	2.50	1.60		CS	5	3.20			3.9	0.86
35	5	クエン酸Na	5	2.08	3.27	2.50	1.60		クエン酸Na	5	0.80	CS		3.5	0.82
36	5	クエン酸Na	5	2.08	2.69	2.50	1.60		クエン酸Na	5	0.80	CS		3.3	0.87

CS: コンドロイチン硫酸Na  
 HPCD: ヒドロキシプロピルクロロゲキストリン  
 CMC: カルボキシメチルセルロース  
 HPC: ヒドロキシプロピルセルロース  
 (\*): 練合時に粉末として添加

表1 (続き)

固形製剤	製剤処方			仕込み										製剤(測定値)	
	BMP (w/w%)	添加剤 (w/w%)		アテロラーゲン水溶液		BMP水溶液		添加剤水溶液				BMP含有量 (w/w%)	直径 (mm)		
		濃度 (%)	量 (g)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)				
37	5	クエン酸Na 20	CS 20	2.08	2.12	2.50	1.60	クエン酸Na	5	3.20	CS	5	3.20	3.2	1.34
38	5	クエン酸Na 5	PEG4000 20	2.08	2.69	2.50	1.60	クエン酸Na	5	0.80	PEG4000	5	3.20	4.9	1.34
39	5	PLPGA(50:50) 5		2.08	3.46	2.50	1.60	PLPGA(50:50)	(*)	4mg				4.4	0.70
40	5	PLPGA(75:25) 5		2.08	3.46	2.50	1.60	PLPGA(75:25)	(*)	4mg				4.7	0.76
41	5	クエン酸 5		2.08	3.46	2.50	1.60	クエン酸Na	5	0.80				4.6	0.72
42	5	クエン酸 20		2.08	2.88	2.50	1.60	クエン酸Na	5	3.20				4.4	0.83
43	5	クエン酸 20	CS 20	2.08	2.12	2.50	1.60	クエン酸Na	5	3.20	CS	5	3.20	4.0	0.83
44	5	クエン酸 5	CS 5	2.08	3.27	2.50	1.60	クエン酸Na	5	0.80	CS	5	0.80	4.3	0.75
45	5	アラビアゴム 5		2.12	3.40	2.83	1.41	アラビアゴム	5	0.80				4.5	0.97
46	5	アラビアゴム 20		2.12	2.83	2.83	1.41	アラビアゴム	5	3.20				4.2	0.81
47	5	アラビアゴム 10	クエン酸 10	2.12	2.83	2.83	1.41	アラビアゴム	5	1.60	クエン酸	5	1.60	4.4	0.80
48	5	HPCD 20		2.12	2.83	2.83	1.41	HPCD	5	3.20				3.7	0.75
49	5	グルタミン酸HCl 20		2.12	2.83	2.83	1.41	グルタミン酸HCl	5	3.20				4.1	0.83
50	5	グルタミン酸HCl 10	アラビアゴム 10	2.12	2.83	2.83	1.41	グルタミン酸HCl	5	1.60	アラビアゴム	5	1.60	4.3	0.81
51	5	グルタミン酸HCl 10	グリシン 10	2.12	2.83	2.83	1.41	グルタミン酸HCl	5	1.60	グリシン	5	1.60	3.9	0.86
52	5	グルタミン酸HCl 5		2.12	3.40	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	0.80				4.0	0.78
53	5	グルタミン酸HCl 10		2.12	3.21	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	1.60				4.1	0.84
54	5	グルタミン酸HCl 20		2.12	2.83	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	3.20				4.1	0.91
55	5	グルタミン酸HCl 20	アラニン 10	2.12	2.45	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	3.20	アラニン	5	1.60	4.0	0.87
56	5	グルタミン酸HCl 20	グルコース 10	2.12	2.45	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	3.20	グルコース	5	1.60	4.0	0.85

CS: コントロイチン硫酸Na  
HPCD: ヒドロキシプロピルシクロデキストリン  
CMC: カルボキシメチルセルロース  
HPC: ヒドロキシプロピルセルロース  
(\*): 練合時に粉末として添加

表1(続き)

固形製剤	製剤処方				仕込み										製剤(測定値)		
	BMP (w/w%)	添加剤		(w/w%)	アロクラゲン水溶液		BMP水溶液		添加剤水溶液						BMP含有量 (w/w%)	直径 (mm)	
		添加剤	(w/w%)		濃度 (%)	量 (g)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)	濃度 (mg/ml)	量 (ml)			
57	5	グルタミン酸HCl	10	アラニン	10	2.12	2.83	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	1.60	アラニン	5	1.60	4.1	0.80
58	5	グルタミン酸HCl	10	グルコース	10	2.12	2.83	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	1.60	グルコース	5	1.60	4.3	0.77
59	5	グルタミン酸HCl	10	グルコース	20	2.12	2.45	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	1.60	グルコース	5	3.20	4.2	0.75
60	5	グルタミン酸HCl	20	アラニン	5	2.12	2.64	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	3.20	アラニン	5	0.80	3.8	0.84
61	5	グルタミン酸HCl	20	アラニン	10	2.12	2.45	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	3.20	アラニン	5	1.60	4.1	0.92
62	5	グルタミン酸HCl	20	アラニン	15	2.12	2.26	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	3.20	アラニン	5	2.40	3.8	0.94
63	5	グルタミン酸HCl	20	アラニン	20	2.12	2.08	2.86	1.40	グルタミン酸HCl	5	3.20	アラニン	5	3.20	4.3	0.87
64	5	アスコルビン酸	5			2.12	3.40	3.33	1.20	アスコルビン酸	5	0.80		5		2.7	0.99
65	5	アスコルビン酸	20			2.12	2.83	3.33	1.20	アスコルビン酸	5	3.20		5		3.0	0.92
66	5	アスコルビン酸	5	アラニン	20	2.12	2.64	3.33	1.20	アスコルビン酸	5	0.80	アラニン	5	3.20	2.8	0.89
67	5	アスコルビン酸	20	アラニン	20	2.12	2.08	3.33	1.20	アスコルビン酸	5	3.20	アラニン	5	3.20	3.4	0.80
68	5	コハク酸	5			2.12	3.40	3.33	1.20	コハク酸	5	0.80		5		4.5	1.00
69	5	コハク酸	20			2.12	2.83	3.33	1.20	コハク酸	5	3.20		5		4.5	1.00
70	5	コハク酸	5	アラニン	20	2.12	2.64	3.33	1.20	コハク酸	5	0.80	アラニン	5	3.20	4.6	0.90
71	5	コハク酸	20	アラニン	20	2.12	2.08	3.33	1.20	コハク酸	5	3.20	アラニン	5	3.20	4.3	0.92
72	5	CMC	20	アラニン	20	2.12	2.08	3.33	1.20	CMC	(*)	16mg	アラニン	5	3.20	4.3	0.94
73	5	HPC	20	アラニン	20	2.12	2.08	3.33	1.20	HPC	5	3.20	アラニン	5	3.20	4.9	0.90
74	5	HPC	20	アラニン	20	2.12	2.08	3.33	1.20	HPC	5	3.20	アラニン	5	3.20	4.6	0.92
75	5	HPC	20	アラニン スクロース	20 20	2.12	1.32	3.33	1.20	HPC	5	3.20	アラニン スクロース	5	3.20	5.4	0.81

CS: コントロイチン硫酸Na  
 HPCD: ビドロキシプロピルシクロデキストリン  
 CMC: カルボキシメチルセルロース  
 HPC: ビドロキシプロピルセルロース  
 (\*): 練合時に粉末として添加



アテロコラーゲン水溶液に、適量の水と表1に記載の添加剤水溶液とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、BMP水溶液を添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、シリンジ内で水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに装着したノズル（内径1.6mm）から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、BMPを含有した種々の円柱状の固形製剤17～固形製剤75を得た。

#### 実施例76（BMP 20w/w%処方）

1. 97w/w% アテロコラーゲン水溶液60.9gに、水65mlと5.52mg/ml BMP水溶液54.3mlとを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.6mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.87mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤76（BMP含有量：19.4w/w%）を得た。

#### 実施例77（BMP 5w/w% 処方）

1. 97w/w% アテロコラーゲン水溶液73.6gに、水94mlと5.52mg/ml BMP水溶液13.6mlとを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.6mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.88mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤77（BMP含有量：4.6w/w%）を得た。

#### 実施例78（BMP 0.5w/w% 処方）

1. 97 w/w% アテロコラーゲン水溶液 25.3 g に、水 34 ml と 5.52 mg/ml BMP 水溶液 0.453 ml とを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.90 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 78（BMP 含有量（理論値）：0.5 w/w%）を得た。

#### 実施例 79（BMP 0.05w/w%処方）

1. 97 w/w% アテロコラーゲン水溶液 25.4 g に、水 35 ml と 5.52 mg/ml BMP 水溶液 0.045 ml とを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.91 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 79（BMP 含有量（理論値）：0.05 w/w%）を得た。

#### 実施例 80（BMP 20w/w%, Glu 20w/w%, Ala 20w/w%処方）

1. 97 w/w% アテロコラーゲン水溶液 30.5 g に、5 mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液 60 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 60 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、5.52 mg/ml BMP 水溶液 54.3 ml とを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.85 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 80（BMP 含有量：17.9 w/w%）を得

た。

実施例 8 1 (BMP 5w/w%, Glu 20w/w%, Ala 20w/w%処方)

1. 97w/w% アテロコラーゲン水溶液 41.9gに、5mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液 60mlと5mg/ml L-アラニン水溶液 60mlとを添加して混合した。ついで、得られた混合物に水 5mlと5.52mg/ml BMP水溶液 13.6mlとを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6mm)から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.86mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤 8 1 (BMP含有量: 4.4w/w%)を得た。

実施例 8 2 (BMP 0.5w/w%, Glu 20w/w%, Ala 20w/w%処方)

1. 97w/w% アテロコラーゲン水溶液 15.1gに、5mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液 20mlと5mg/ml L-アラニン水溶液 20mlとを添加して混合した。ついで、得られた混合物に水 4mlと5.52mg/ml BMP水溶液 0.453mlとを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル(内径1.6mm)から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径1.03mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤 8 2 (BMP含有量(理論値): 0.5w/w%)を得た。

実施例 8 3 (BMP 0.05w/w%, Glu 20w/w%, Ala 20w/w%処方)

1. 97w/w% アテロコラーゲン水溶液 15.2gに、5mg/ml L

ーグルタミン酸塩酸塩水溶液 20 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 20 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に水 5 ml と 5.52 mg/ml BMP水溶液 0.045 ml とを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.6 mm）から押し出した。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 1.06 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 83（BMP含有量（理論値）：0.05 w/w%）を得た。

#### 実施例 84（BMP 5w/w% 処方：細径、極細径）

1. 97 w/w% アテロコラーゲン水溶液 24.1 g に水 30 ml と 5.52 mg/ml BMP水溶液 4.53 ml とを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径 1.1 mm）から混合溶液の半分を押し出した（細径）。残りの混合溶液は、シリンジのノズルを別のノズル（内径 0.68 mm）に付け替えた後、押し出した（極細径）。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径 0.64 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 84a（細径）および直径 0.45 mm、長さ 10 mm の円柱状の固形製剤 84b（極細径）を得た。

#### 実施例 85（BMP 5w/w%, Glu 10w/w%, Ala 20w/w% 処方：細径、極細径）

1. 97 w/w% アテロコラーゲン水溶液 16.5 g に、5 mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液 10 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 20 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物に水 8 ml と 5.52 mg/ml BMP水溶液 4.53 ml とを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混

合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.1mm）から混合溶液の半分量を押し出した（細径）。残りの混合溶液は、シリンジのノズルを別のノズル（内径0.68mm）に付け替えた後、押し出した（極細径）。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.70mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤85a（細径）および直径0.42mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤85b（極細径）を得た。

実施例86（BMP 5w/w%, Glu 20w/w%, Ala 20w/w% 処方：細径、極細径）

1. 97w/w% アテロコラーゲン水溶液14.0gに、5mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液20mlと5mg/ml L-アラニン水溶液20mlとを添加して混合した。ついで、得られた混合物に、5.52mg/ml BMP水溶液4.53mlを添加して均一に攪拌した。得られた混合物を、凍結乾燥し、得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.1mm）から混合溶液の半分量を押し出した（細径）。残りの混合溶液は、シリンジのノズルを別のノズル（内径0.68mm）に付け替えた後、押し出した（極細径）。得られた産物を、乾燥させ、切断することにより、直径0.62mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤86a（細径）および直径0.39mm、長さ10mmの円柱状の固形製剤86b（極細径）を得た。

比較例1 対照製剤1

19.7w/w% アテロコラーゲン水溶液50.76gに、水69mlを加え、攪拌し、得られた混合物を凍結乾燥した。得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル（内径1.6mm）から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径0.85mm、長さ10mmの円柱状の製剤（対照製剤1）を

得た。

#### 比較例 2 対照製剤 2 (Ala 20w/w%処方)

1. 88 w/w% アテロコラーゲン水溶液 14.2 g に、水 23 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 13.3 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物を、均一に攪拌し、凍結乾燥した。得られた産物に、水を添加して膨潤させ、練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル (内径 1.6 mm) から押し出した。得られた産物を乾燥させ、切断することにより、直径 0.89 mm、長さ 10 mm の円柱状の製剤 (対照製剤 2) を得た。

#### 比較例 3 対照製剤 3 (Glu 20w/w%, Ala 20w/w%処方)

21.2 w/w% アテロコラーゲン水溶液 28.3 g に、水 12 ml と 5 mg/ml L-アラニン水溶液 40 ml と 5 mg/ml L-グルタミン酸塩酸塩水溶液 40 ml とを添加して混合した。ついで、得られた混合物を均一に攪拌し、凍結乾燥した。得られた産物に、水を添加して膨潤し練合してゲル状の混合溶液を得た。この混合溶液をシリンジに充填し、ノズル (内径 1.6 mm) から押し出した後、乾燥させ、切断することにより、直径 0.89 mm、長さ 10 mm の円柱状の製剤 (対照製剤 3) を得た。

#### 試験例 1 in vitro 放出試験

固形製剤 1、固形製剤 2、固形製剤 3、固形製剤 4、固形製剤 5、固形製剤 6、固形製剤 7 の各製剤を、放出試験液であるポリエチレングリコール (分子量 400) を 5 w/w% 含有した 0.3 M リン酸バッファー (pH 6.3) 1 ml に入れ、37°C で静置した。試験開始後、1日、4日、7日に放出試験液を全量入れ替え、放出試験液中の BMP 量を高速液体クロマトグラフィーで測定すること

で各製剤のin vitro放出プロファイルを求めた。結果を第1図に示す。

第1図に示すように、BMPとコラーゲンを含有した固形製剤により、in vitro放出試験において、製剤からBMPを長期にわたり放出させることが可能であることが示された。

#### 試験例2 in vitro放出試験

固形製剤8、固形製剤9、固形製剤10の各製剤を、放出試験液であるポリエチレングリコール（分子量400）を5w/w%含有した0.3Mリン酸バッファ（pH6.3）1mlに入れ、37℃で静置した。試験開始後、1日、4日、7日に放出試験液を全量入れ替え、放出試験液中のBMP量を高速液体クロマトグラフィーで測定することで各製剤のin vitro放出プロファイルを求めた。結果を第2図に示す。なお、固形製剤9、固形製剤10の場合のBMPの測定は、放出試験液をコンドロイチナーゼにより処理した後に行なった。

第2図に示すように、有機酸性物質またはポリサッカライドとBMPとコラーゲンを含有した固形製剤により、in vitro放出試験において、BMPが製剤から種々の放出速度により放出させることが可能であることが示された。

#### 試験例3 in vitro放出試験

固形製剤12、固形製剤13の各製剤を、放出試験液であるポリエチレングリコール（分子量約400）を5w/w%含有した0.3Mリン酸バッファ（pH6.3）1mlに入れ、37℃で静置した。試験開始後、1日、4日、7日に放出試験液を全量入れ替え、放出試験液中のBMP量を高速液体クロマトグラフィーで測定することで各製剤のin vitro放出プロファイルを求めた。結果を第3図に示す。

第3図に示すように、有機酸性物質、中性アミノ酸とBMPとコラーゲンを含有した固形製剤により、in vitro放出試験において、有機酸性物質の添加量を

変化させることで、製剤から種々の放出速度によりBMPを放出させることが可能であることが示された。

#### 試験例4 マウス皮下に投与後の製剤中BMP量の経時的変化

固形製剤1、固形製剤2、固形製剤3、固形製剤4、固形製剤5、固形製剤6、固形製剤7の各製剤をマウス(BALB/c、雄)の背部皮下に、1匹あたり1本投与し、投与後3日後および7日後に回収した各々の製剤を溶解後、溶解液中のBMP量を高速液体クロマトグラフィーで測定することで、各製剤のマウス皮下に投与後の製剤中BMP量の経時的変化を調べ、in vivo 放出プロファイルを求めた。結果を第4図に示す。

第4図に示すように、BMPとコラーゲンを含有した固形製剤により、動物の体内における評価試験において、製剤からBMPを長期にわたり放出させる、すなわちBMPを長期にわたり生体に供給することが可能であることが示された。

#### 試験例5 マウス皮下に投与後の製剤中のBMP量の経時的変化

固形製剤8、固形製剤9、固形製剤10の各製剤をマウス(BALB/c、雄)の背部皮下に1匹につき1本を投与し、投与後3日後および7日後に回収した各々の製剤を溶解後、溶解液中のBMP量を高速液体クロマトグラフィーで測定することで、各製剤のマウス皮下に投与後の製剤中のBMP量の経時的変化を調べ、in vivo 放出プロファイルを求めた。なお、固形製剤9、固形製剤10の場合の溶解液中のBMPの測定は、溶解液をコンドロイチナーゼにより処理した後に行なった。結果を第5図に示す。

第5図に示すように、有機酸性物質またはポリサッカライドとBMPとコラーゲンを含有した固形製剤により、動物の体内における評価試験において、製剤から種々の放出速度によりBMPを放出させる、すなわちBMPを種々の速度で



生体に供給することが可能であることが示された。

#### 試験例 6 マウス皮下に投与後の製剤中のBMP量の経時的变化

固形製剤 1 2、固形製剤 1 3の各製剤をマウス（BALB/c、雄）の背部皮下に1匹につき1本を投与し、投与後3日後および7日後に回収した各々の製剤を溶解後、溶解液中のBMP量を高速液体クロマトグラフィーで測定することで、各製剤のマウス皮下に投与後の製剤中BMP量の経時的变化を調べin vivo 放出プロファイルを求めた。結果を第6図に示す。

第6図に示すように、有機酸性物質と中性アミノ酸とBMPとコラーゲンを含有した固形製剤により、動物の体内における評価試験において、有機酸性物質の添加量を変化させることで、製剤から種々の放出速度によりBMPを放出させる、すなわちBMPを種々の速度で生体に供給することが可能であることが示された。

#### 試験例 7 マウス皮下に投与後の製剤中BMP量の経時的变化

固形製剤 5 2、固形製剤 5 3、固形製剤 5 4の各製剤をマウス（BALB/c、雄）の背部皮下に1匹につき1本を投与し、投与後3日後および7日後に回収した各々の製剤を溶解後、溶解液中のBMP量を高速液体クロマトグラフィーで測定することで、各製剤のマウス皮下に投与後の製剤中BMP量の経時的变化を調べ、in vivo 放出プロファイルを求めた。結果を第7図に示す。

第7図に示すように、有機酸性物質とBMPとコラーゲンを含有した固形製剤により、動物の体内における評価試験において、製剤から種々の放出速度によりBMPを放出させる、すなわちBMPを種々の速度で生体に供給することが可能であることが示された。

#### 試験例 8 マウス皮下に投与後の投与部位での骨形成反応

固形製剤 6、対照製剤 2 の各製剤をマウス (BALB/c、雄) の背部皮下に 1 匹につき 1 本を投与した。投与 1 ヶ月後に投与部位周辺を撮影して、観察し、ついで、皮膚組織を回収した。得られた皮膚組織を、10%ホルマリンで固定し、ついで、該皮膚組織について、軟x線撮影を行なった。ついで、前記皮膚組織を脱灰し、パラフィン包埋した後、切片として、ヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色した。結果を第 8 図に示す。

第 8 図に示すように、BMP を含有しない対照製剤では骨形成反応が認められないのに対して、BMP を含有した固形製剤では、顕著な骨形成反応を示すことが確認された。

#### 試験例 9 マウス皮下に投与後の投与部位での骨形成反応

固形製剤 14、固形製剤 15、固形製剤 16 の各製剤をマウス (BALB/c、雄) の背部皮下に 1 匹につき 1 本を投与 (投与量: 固形製剤 14 =  $170 \mu\text{g}/\text{pellet}/\text{head}$ 、固形製剤 15 =  $25 \mu\text{g}/\text{pellet}/\text{head}$ 、固形製剤 16 =  $6.5 \mu\text{g}/\text{pellet}/\text{head}$ ) した。投与 1 ヶ月後に投与部位周辺を撮影し、ついで、皮膚組織を回収した。得られた皮膚組織を、10%ホルマリンで固定し、ついで、該皮膚組織について、軟x線撮影を行なった。結果を第 9 図に示す。

一方、BMP 水溶液 A ( $1500 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、BMP 水溶液 B ( $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、BMP 水溶液 C ( $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) のそれぞれを、マウス (BALB/c、雄) の背部皮下に 1 匹あたり  $100 \mu\text{l}$  を投与 (投与量; BMP 水溶液 A =  $150 \mu\text{g}/\text{head}$ 、BMP 水溶液 B =  $30 \mu\text{g}/\text{head}$ 、BMP 水溶液 C =  $6 \mu\text{g}/\text{head}$ ) した。投与 1 ヶ月後に投与部位周辺を撮影し、ついで、皮膚組織を回収した。得られた皮膚組織を、10%ホルマリンで固定し、該皮膚組織について、軟x線撮影を行なった。結果を第 10 図に示す。

第 9 図および第 10 図に示されるように、本発明の製剤により、動物で骨形成

反応が確かに起こることが確認され、また、それと同投与量のBMPの水溶液に比較してその反応が顕著であることが確認された。

#### 試験例 10 マウス皮下に投与後の投与部位での骨形成反応

固形製剤 1、固形製剤 12、固形製剤 13、対照製剤 1 および対照製剤 3 の各製剤をマウス (BALB/c、雄) の背部皮下に、1匹あたり1本投与した。3週間後、投与部位周辺を撮影し、ついで、皮膚組織を回収した。得られた皮膚組織を、10%ホルマリンで固定し、ついで、該皮膚組織について、軟x線撮影を行なった。結果を第11図に示す。

第11図に示されるように、酸性アミノ酸であるグルタミン酸を含有した製剤では、含有していない製剤に比較して、広範に骨形成反応が起こることが確認された。広範囲にわたる骨形成反応は、酸性アミノ酸によるBMPの放出促進効果、すなわち、BMPの溶解促進または製剤の崩壊のしやすさの向上によるBMPの放出促進効果に起因するものと考えられる。また、BMPを含有しないコラーゲンのみからなる対照製剤 1 では、投与3週間後でも、製剤の形状が保たれているが、グルタミン酸を含有した対照製剤 3 では、製剤の崩壊が確認された。このことにより、グルタミン酸の添加による崩壊のしやすさに対する効果が示された。

#### 試験例 11 成形性

固形製剤 9、固形製剤 60、固形製剤 61、固形製剤 63、固形製剤 74、固形製剤 75、固形製剤 77、固形製剤 4、固形製剤 49それぞれの切断前の製剤について、形状の比較を行なった。結果を第12図に示す。

BMPとコラーゲンとに加えて、中性アミノ酸を添加することにより、形状の優れた製剤が製造できることが示された (パネルGに対してパネルH)。

BMPとコラーゲンとに加えて、ポリサッカライドを添加することにより、形状の優れた製剤が製造できることが示された (パネルGに対してパネルA、E、

F)。

また、BMPとコラーゲンと有機酸性物質とに加えて、中性アミノ酸を添加することにより、その添加量に応じて形状の優れた製剤が製造できることが示された（パネルIに対してパネルB、C、D）。

#### 試験例12 正常サルへの骨内投与

正常な雄のカニクイザルに対して、固形製剤1、固形製剤2、固形製剤3および対照製剤1を、Kワイヤーおよび18ゲージの針を用いて骨内投与した。

表2

動物 番号	遠位大腿骨		近位脛骨	
	左(L)	右(R)	左(L)	右(R)
1	対照製剤1	固形製剤3 (1.72mg)		
2			固形製剤3 (1.72mg)	対照製剤1
3	固形製剤1 (0.31mg)	対照製剤1		
4			対照製剤1	固形製剤1 (0.31mg)
5			固形製剤2 (0.78mg)	対照製剤1

( )内は、各製剤のBMP含有量を表わす。

製剤投与後の各投与部位近傍の骨密度の時間的推移をpQCTにより調べた。表2に示す部位近傍の骨密度の時間的推移についての結果を第13図に示す。

第13図に示すように、BMPとコラーゲンを含有した固形製剤の正常なサルへの骨内投与において、骨密度の増加が確認された。

#### 試験例13 卵巣摘出サルでの評価

卵巣を摘出後3年を経過したカニクイザル（骨粗鬆症モデル）の近位大腿骨に固形製剤11または対照製剤3を骨内投与した。投与6ヵ月後に前記カニクイザルを屠殺し、投与部位周辺の組織学的評価をおこなった。結果を第14図に示す。

第14図に示すように、骨粗鬆症モデルに、本発明の製剤（固形製剤）を投与することにより、強力な骨密度増加効果が得られた。このことにより、本発明の製剤により、骨粗鬆症においても骨密度を増加させることが可能であることが示された。

#### 試験例14 マウス皮下に投与後のカルシウム生成量

固形製剤76、固形製剤77、固形製剤78、固形製剤79、固形製剤80、固形製剤81、固形製剤82、固形製剤83、対照製剤1、対照製剤3の各製剤をマウス（BALB/c、雄）の背部皮下に、1匹あたり1本投与し、投与後3週間後に各製剤を回収した。ついで、各製剤を0.6M塩酸に浸して室温で5日間静置した後、液中のカルシウム濃度を測定することで、カルシウム生成量を調べた（n=4）。結果を第15図に示す。

第15図に示すように、BMPを含有しない対照製剤では、カルシウムの生成が認められないのに対し、BMPを含有した製剤では、カルシウムの生成が認められた。また、BMPの含有量が同じである製剤間の比較において、グルタミン酸とアラニンとをさらに含有した製剤は、含有していない製剤に比較して、投与後3週間後のカルシウム生成量が多いことが示された。このことより、酸性アミノ酸によるBMPの放出促進による、骨形成、カルシウム沈着の促進効果が示された。

#### 試験例15 マウス皮下に投与後のカルシウム生成量

製剤径の細い固形製剤、すなわち、固形製剤84a、固形製剤84b、固形製

剤 8 5 a、固形製剤 8 5 b、固形製剤 8 6 a および固形製剤 8 6 b のそれぞれについても、試験例 1 4 と同様の方法によりカルシウム生成量を調べた (n = 8)。

第 1 6 図に示すように、製剤径が細い固形製剤においても酸性アミノ酸による BMP の放出促進による、骨形成、カルシウム沈着の促進効果が示された。

#### 均等物

本発明は、その精神または主要な特徴から逸脱することなく、他の種々の形で実施することができる。そのため、前述の実施例は、あらゆる点で単なる例示にすぎず、限定的に解釈してはならない。本発明の範囲は、特許請求の範囲によって示すものであり、明細書本文には、なんら拘束されない。さらに特許請求の範囲の均等範囲に属する変形や変更は、すべて本発明の範囲内である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明の製剤によれば、骨折治療、骨欠損治療または骨折予防の目的とする部位へ、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加に必要な BMP を送達することができる。また、投与局所において、BMP 濃度を高い濃度に維持することができる。また、本発明の骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加方法によれば、骨修復を必要とする症状に対する治療、あるいは骨修復を必要とする症状に対する予防を行なうことができる。

## 請求の範囲

1. 下記 (a) ~ (c) :

(a) コラーゲンからなる担体、

(b) 骨形成タンパク質 (BMP)、ならびに

(c) 中性アミノ酸、単糖、二糖、有機酸性物質およびポリサッカライドからなる群より選ばれた少なくとも 1 種の化合物

を含有してなり、かつ注射可能な固形製剤である、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加用の製剤。

2. 形状が、円柱状である、請求項 1 記載の製剤。

3. 形状が、粒子状である、請求項 1 記載の製剤。

4. 該 BMP が、BMP-2 である、請求項 1 記載の製剤。

5. 該コラーゲンが、アテロコラーゲンである、請求項 1 記載の製剤。

6. 該 BMP が、BMP-2 であり、かつ該コラーゲンがアテロコラーゲンである、請求項 1 記載の製剤。

7. 中性アミノ酸、単糖および二糖からなる群より選ばれた少なくとも 1 種の化合物と有機酸性物質とを含有してなる、請求項 1 ~ 6 いずれか 1 項に記載の製剤。

8. 塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) をさらに含有してなる、請求項 1

～6いずれか1項に記載の製剤。

9. 塩基性繊維芽細胞成長因子（b F G F）をさらに含有してなる、請求項7  
記載の製剤。

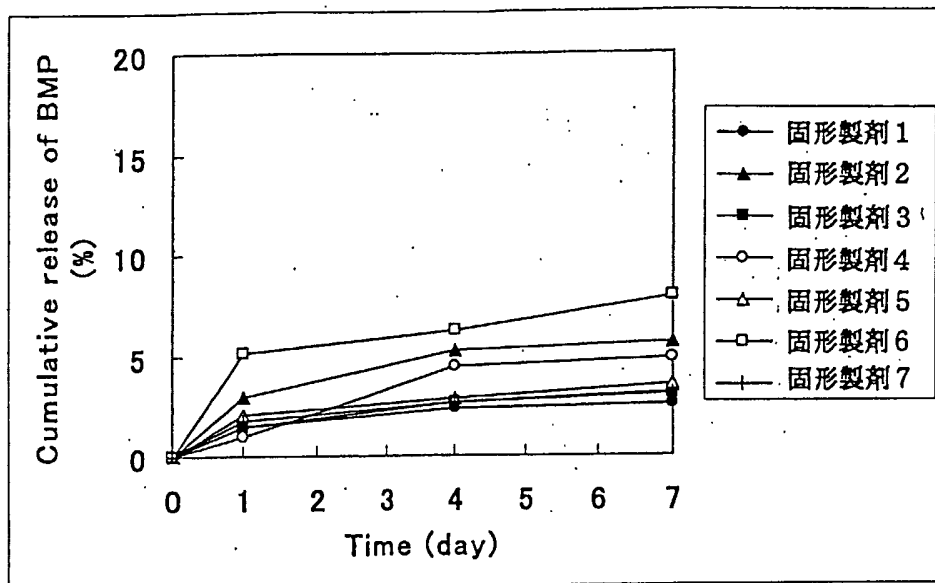
10. 多層構造を有する、請求項8記載の製剤。

11. 多層構造を有する、請求項9記載の製剤。

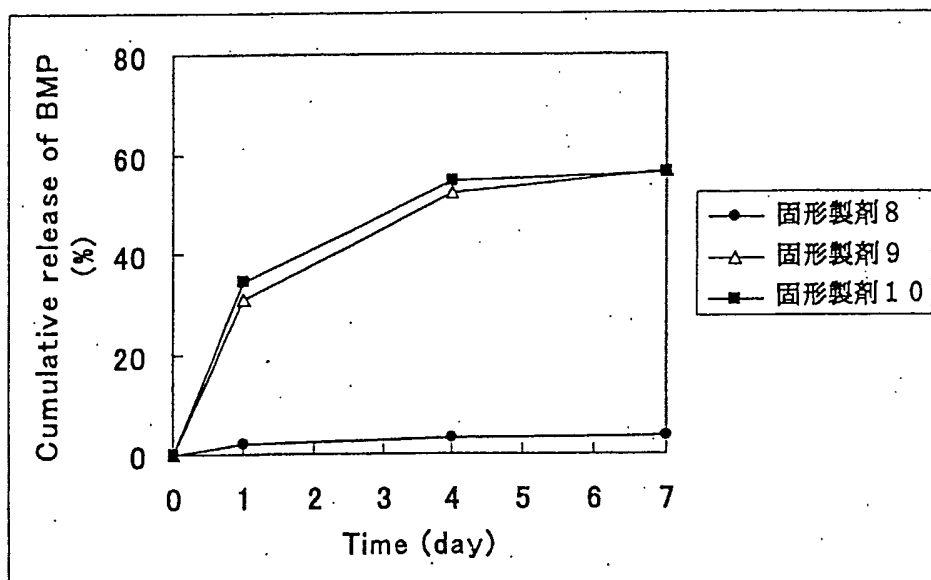
12. 骨折治療、骨欠損治療または骨密度増加を必要とする個体に、請求項1  
記載の製剤を有効量投与することを含む、骨折治療、骨欠損治療または骨密度増  
加方法。



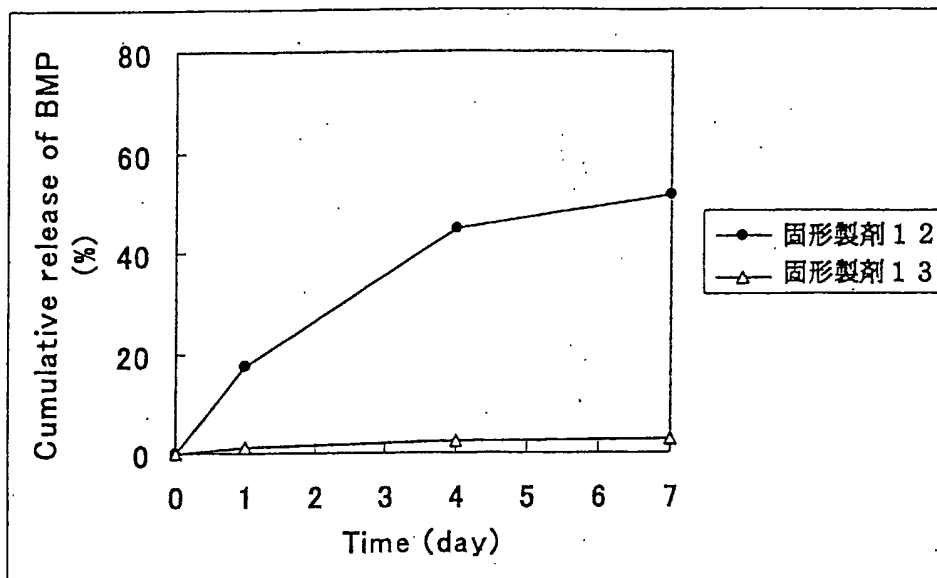
第 1 図



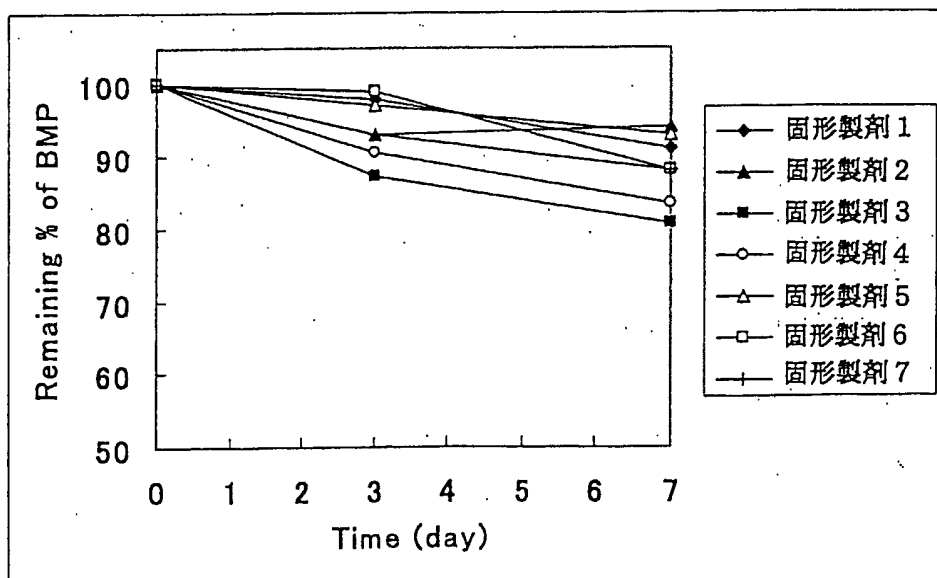
第 2 図



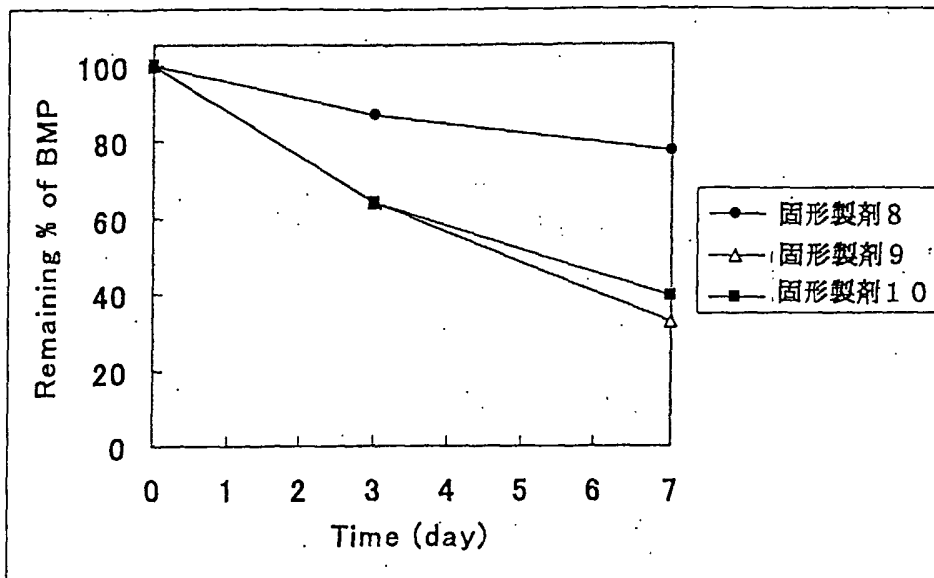
第 3 図



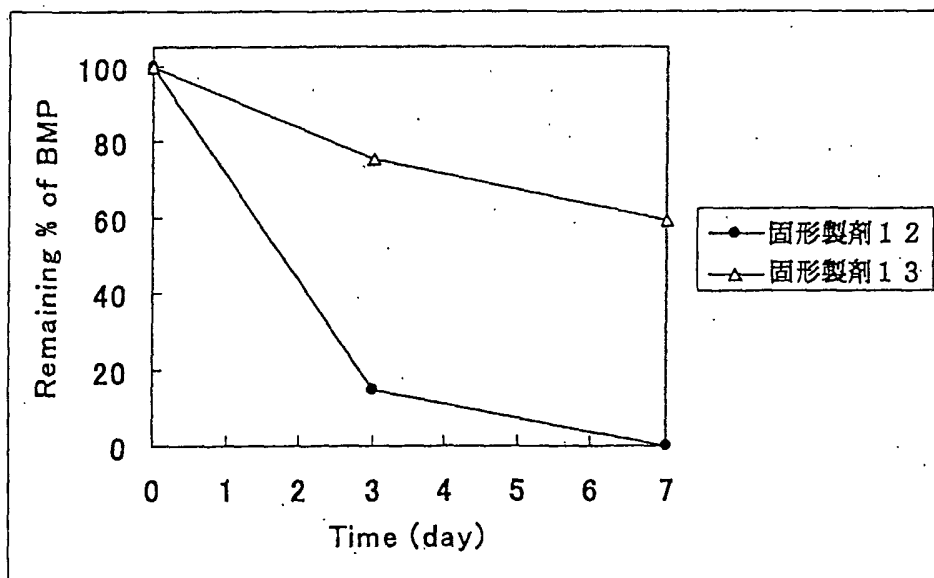
第 4 図



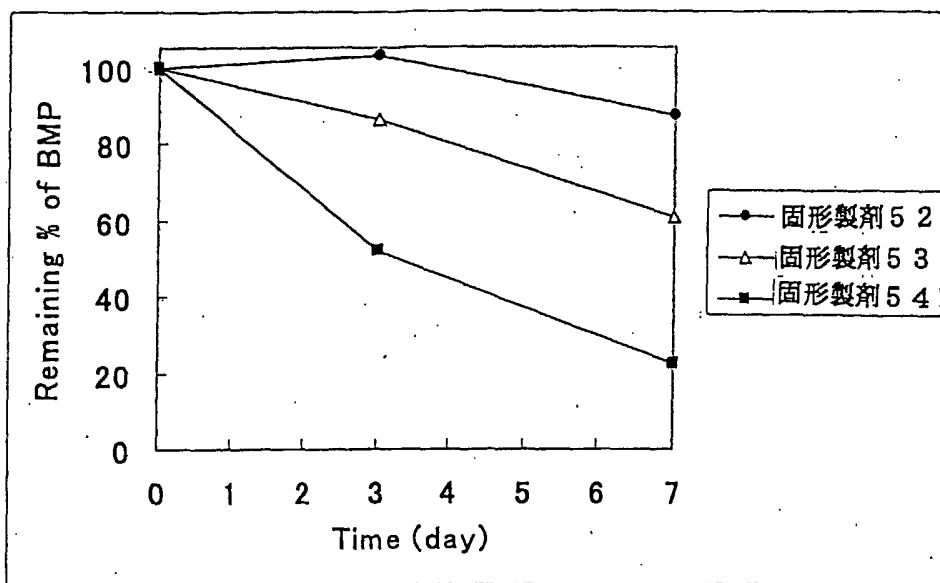
第 5 図



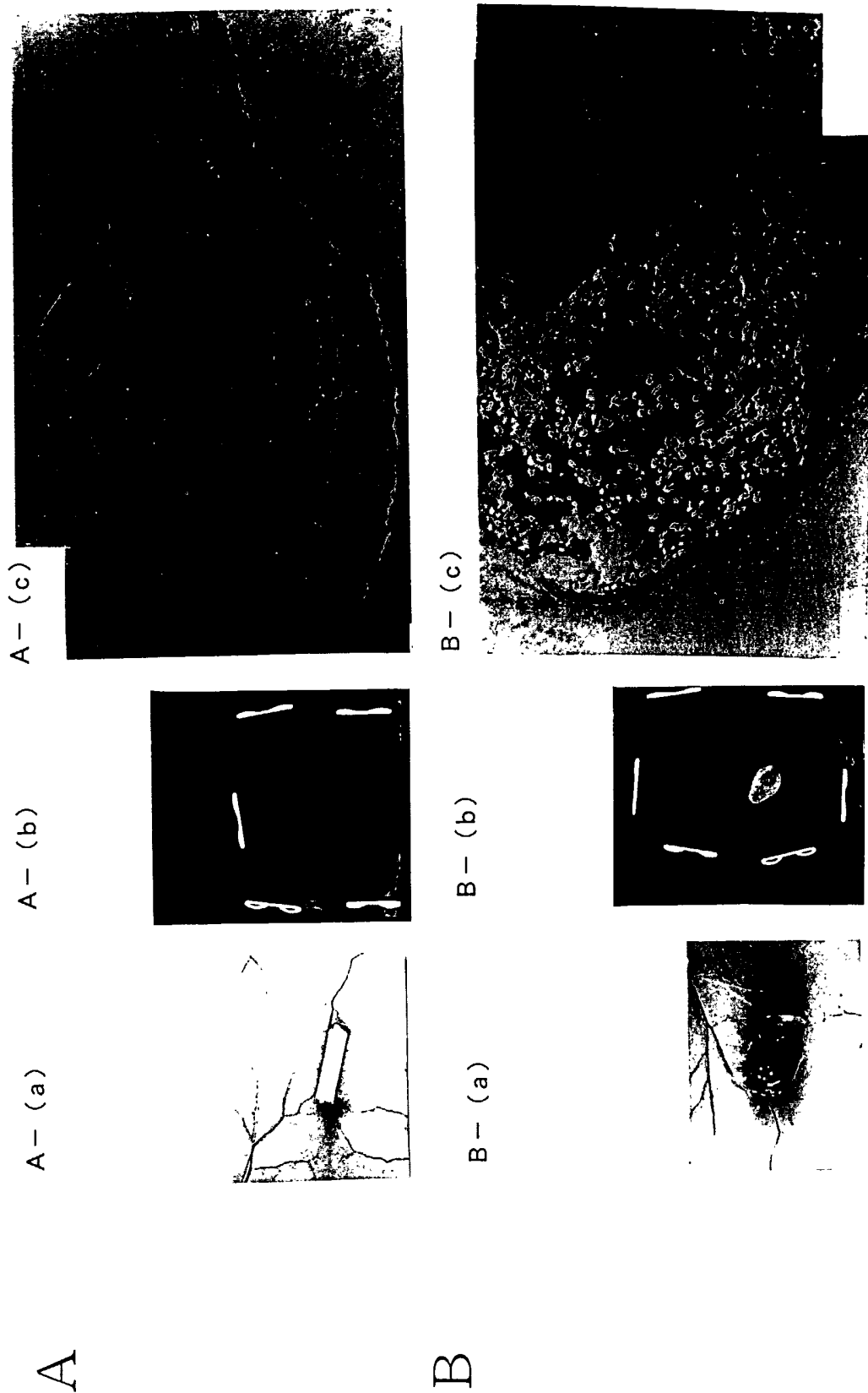
第 6 図



第 7 図



第 8 図



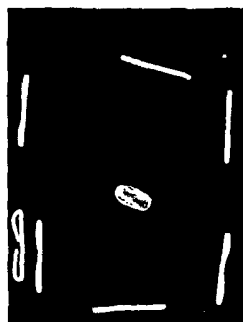
第 9 図

**A**

A - (a)



A - (b)



**B**

B - (a)



B - (b)

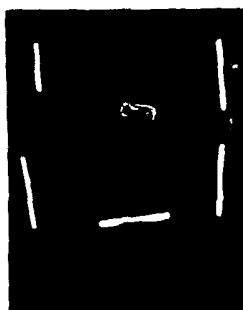


**C**

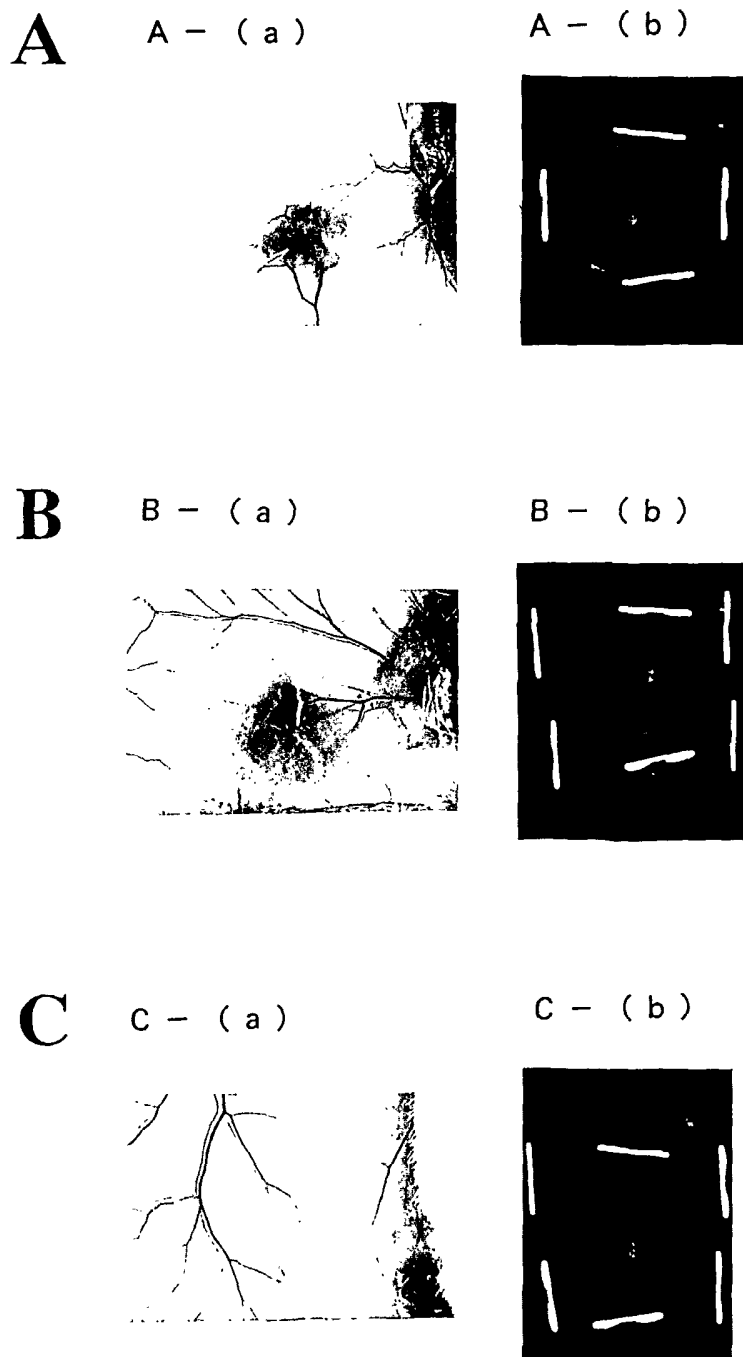
C - (a)



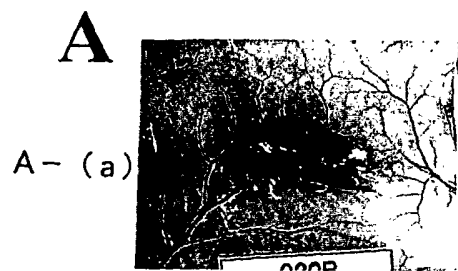
C - (b)



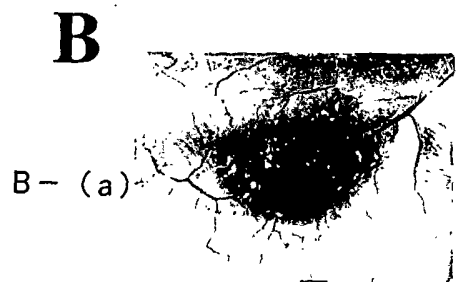
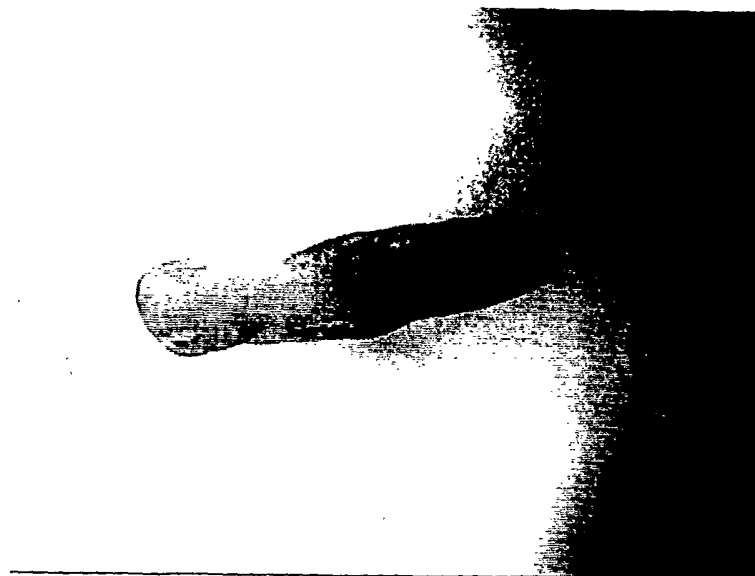
第 1 0 図



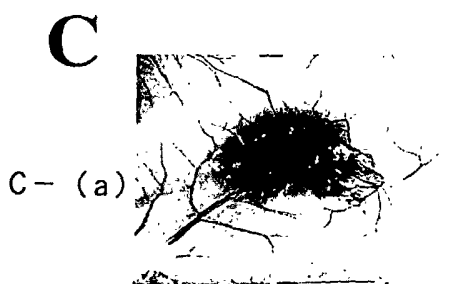
第 1 1 図



A- (b)



B- (b)

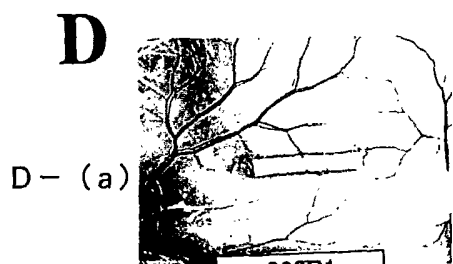


C- (b)

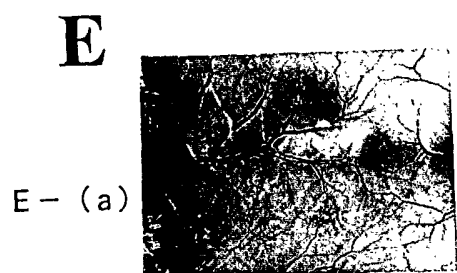




第 1 1 図 ( 続 き )



D - ( b )

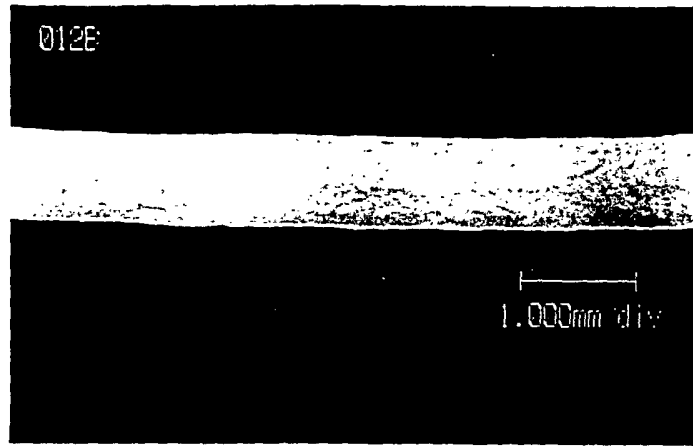


E - ( b )

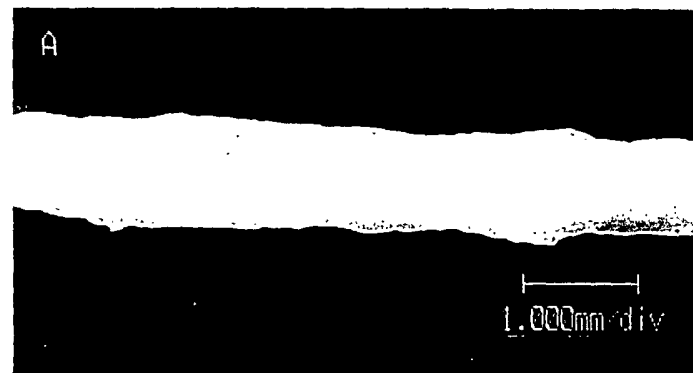


第 1 2 図

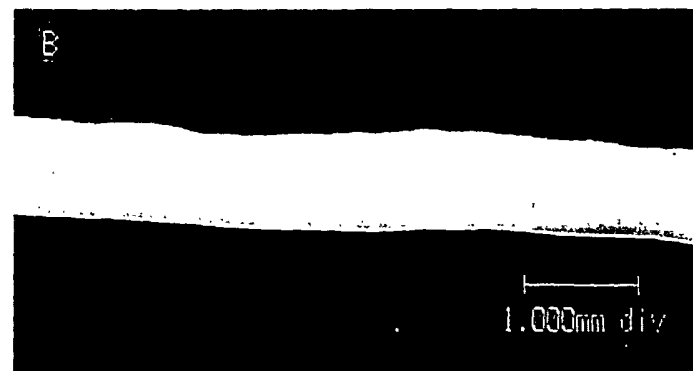
A



B

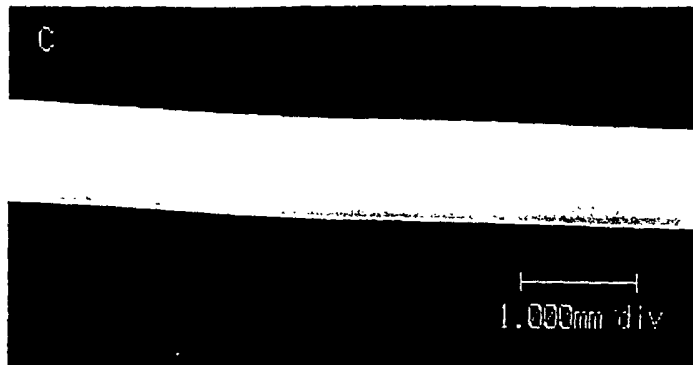


C

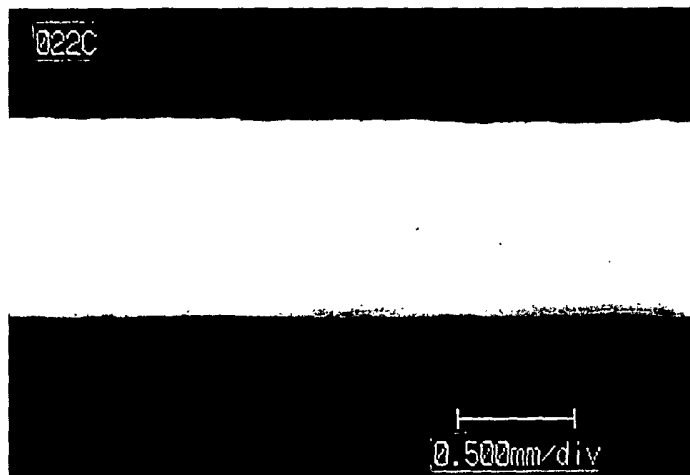


第 1 2 図 ( 続 き )

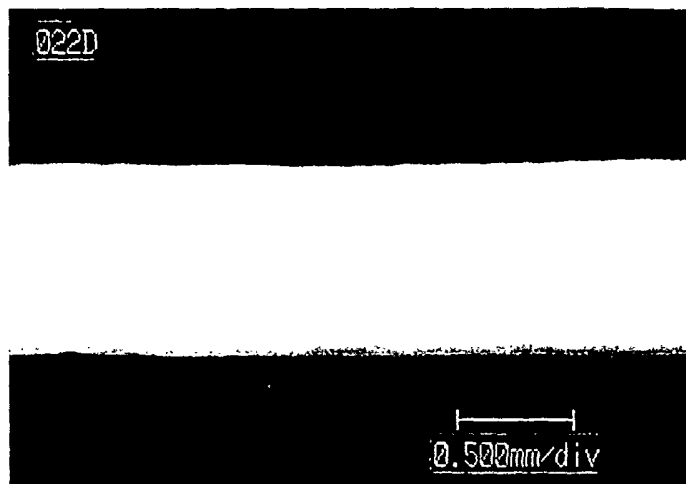
D



E

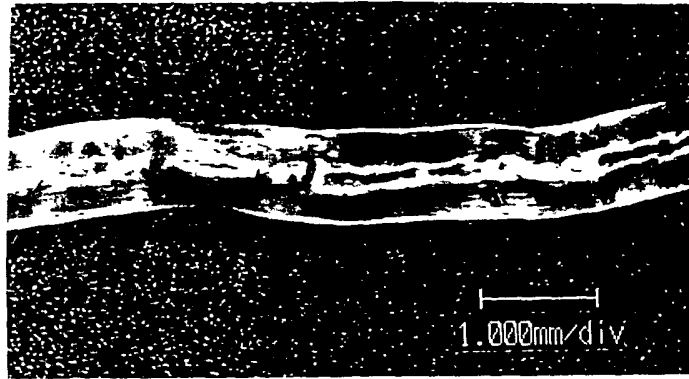


F

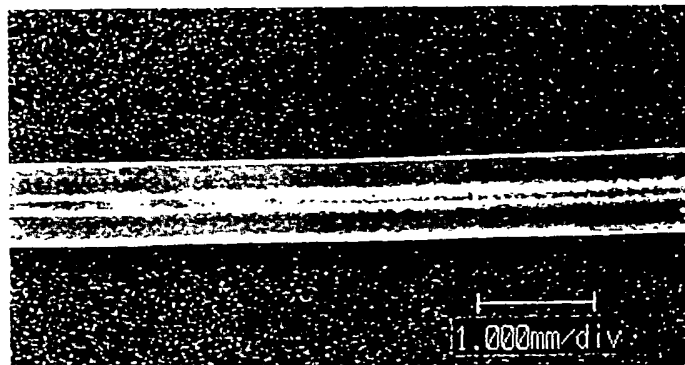


第 1 2 図 ( 続 き )

G



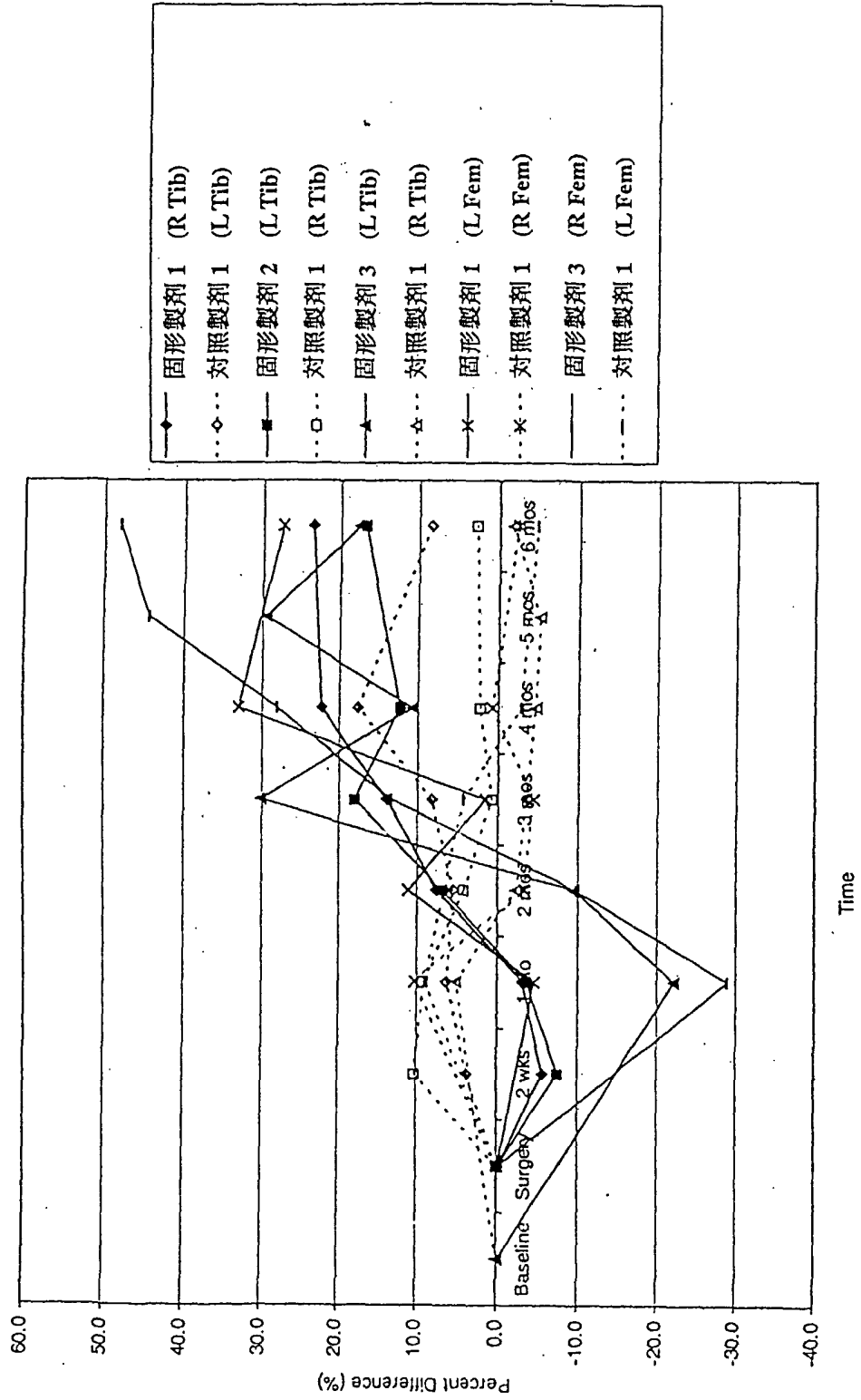
H



I



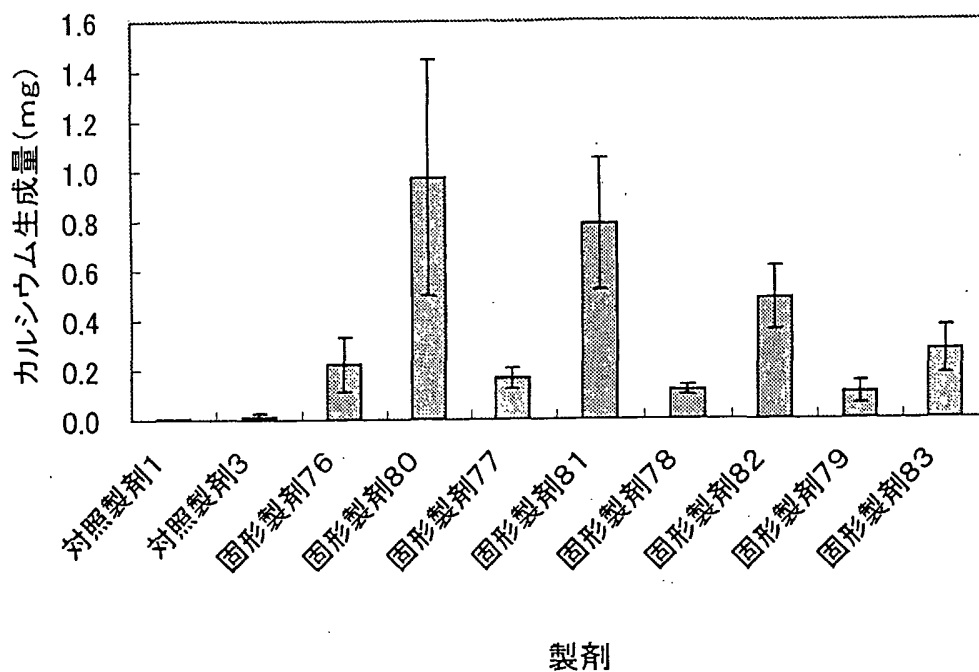
第 1 3 図



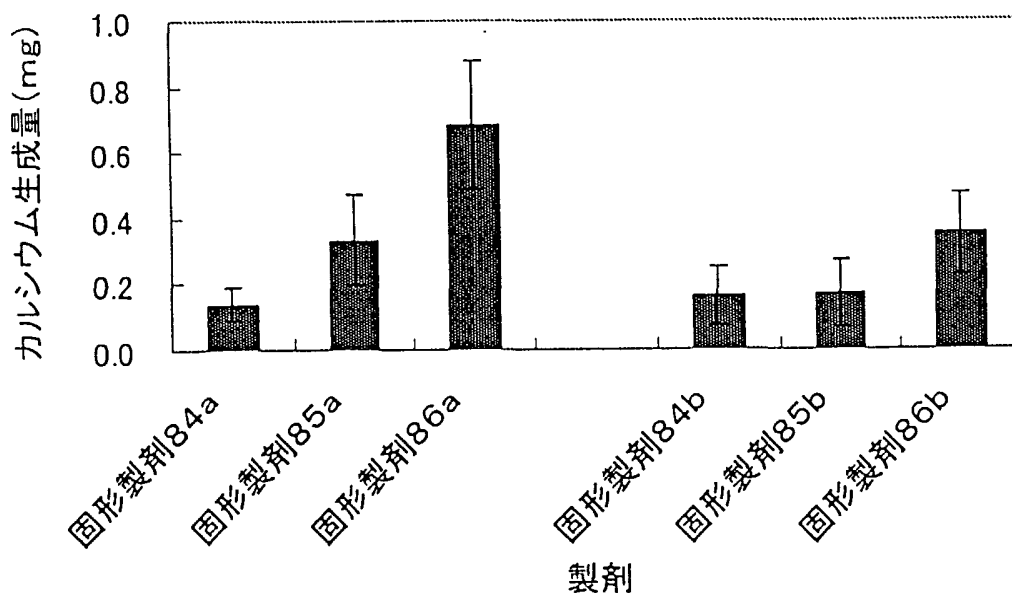
第 1 4 図



第 1 5 図



第 1 6 図



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP03/00966

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 9/14, 47/18, 47/22, 47/26, 47/36, 47/42, A61P19/00, 19/08, 19/10</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																													
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00-58, 9/00-72, 47/00-48, A61F2/00-4/00, A61L15/00-33/00, A61P19/00, 19/08, 19/10</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table border="1"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2003</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2003</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2003</td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)</p>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003																			
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003																										
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003																										
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>WO 00/44401 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 03 August, 2000 (03.08.00), Full text; particularly, example 5; page 6, lines 17 to 23 &amp; JP 2002-537229 A</td> <td>1-6 7-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 62-135431 A (Koken Co., Ltd.), 18 June, 1987 (18.06.87), Full text; particularly, Claims 1 to 5; page 2, lower left column, line 17 to right column, line 1 (Family: none)</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.    <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p> <table border="1"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <td>Date of the actual completion of the international search 10 April, 2003 (10.04.03)</td> <td>Date of mailing of the international search report 22 April, 2003 (22.04.03)</td> </tr> <tr> <td>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</td> <td>Authorized officer</td> </tr> <tr> <td>Facsimile No.</td> <td>Telephone No.</td> </tr> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X Y	WO 00/44401 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 03 August, 2000 (03.08.00), Full text; particularly, example 5; page 6, lines 17 to 23 & JP 2002-537229 A	1-6 7-11	Y	JP 62-135431 A (Koken Co., Ltd.), 18 June, 1987 (18.06.87), Full text; particularly, Claims 1 to 5; page 2, lower left column, line 17 to right column, line 1 (Family: none)	1-11	* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		Date of the actual completion of the international search 10 April, 2003 (10.04.03)	Date of mailing of the international search report 22 April, 2003 (22.04.03)	Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	Facsimile No.	Telephone No.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																											
X Y	WO 00/44401 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 03 August, 2000 (03.08.00), Full text; particularly, example 5; page 6, lines 17 to 23 & JP 2002-537229 A	1-6 7-11																											
Y	JP 62-135431 A (Koken Co., Ltd.), 18 June, 1987 (18.06.87), Full text; particularly, Claims 1 to 5; page 2, lower left column, line 17 to right column, line 1 (Family: none)	1-11																											
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																												
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																												
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																												
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family																												
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																													
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																													
Date of the actual completion of the international search 10 April, 2003 (10.04.03)	Date of mailing of the international search report 22 April, 2003 (22.04.03)																												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer																												
Facsimile No.	Telephone No.																												



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00966

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 326151 A2 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.), 02 August, 1989 (02.08.89), Full text; particularly, Claims 1 to 4, 12; column 1, lines 1 to 5; column 2, lines 31 to 46; column 5, line 29; column 8, lines 2 to 4, 23 to 29 & JP 2-710 A	1-11
Y	EP 838219 A1 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.), 29 April, 1998 (29.04.98), Full text; particularly, Claims 1 to 9; page 2, lines 1 to 11; page 5, line 44; page 6, lines 5, 6; page 6, lines 14 to 16 & JP 10-167987 A	1-11
Y	EP 493737 A1 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 08 July, 1992 (08.07.92), Full text; particularly, Claim 1 & JP 5-124975 A	8-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00966

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.


2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/19, 38/22, 9/14, 47/18, 47/22, 47/26, 47/36, 47/42, A61P19/00, 19/08, 19/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/00-58, 9/00-72, 47/00-48, A61F2/00-4/00, A61L15/00-33/00, A61P19/00, 19/08, 19/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報	1922-1996年	
日本国公開実用新案公報	1971-2003年	
日本国登録実用新案公報	1994-2003年	
日本国実用新案登録公報	1996-2003年	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN) REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/44401 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2000. 08. 03, 全文, 特に	1-6
Y	Exmple5, 第6頁第17-23行 & JP 2002-537229 A	7-11
Y	JP 62-135431 A (株式会社高研) 1987. 06. 18, 全文, 特に請求項1-5, 第2頁左下欄第17行-右欄第1行 (ファミリーなし)	1-11
Y	EP 326151 A2 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) 1989. 08. 02, 全文, 特に請求項1-4, 12, 第1欄第1-5行, 第2欄第31- 46行第5欄第29行, 第8欄第2-4行, 第8欄第23-29行 & JP 2-710 A	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日	10. 04. 03	国際調査報告の発送日 22.04.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JJP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 浜田 麻子	4C 2938 
		電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 838219 A1 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) 1998. 04. 29, 全文, 特に請求項1-9, 第2頁第1-11行, 第5頁第44行, 第6頁第5, 6行, 第6頁第14-16行 & JP 10-167987 A	1-11
Y	EP 493737 A1 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 1992. 07. 08, 全文, 特に請求項1 & JP 5-124975 A	8-11

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲12は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。