(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월09일
(11) 등록번호 10-1551681
(24) 등록일자 2015년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61L 27/52* (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
*C08B 37/00* (2006.01) *C08J 3/075* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7005345
(22) 출원일자(국제) 2010년07월23일
심사청구일자 2014년08월20일
(85) 번역문제출일자 2012년02월28일
(65) 공개번호 10-2012-0052371
(43) 공개일자 2012년05월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/043108
(87) 국제공개번호 WO 2011/014432
국제공개일자 2011년02월03일
(30) 우선권주장
61/230,074 2009년07월30일 미국(US)
61/311,953 2010년03월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2006056204 A1
WO2005066215 A1
WO2001060868 A1
EP0939086 A1

(73) 특허권자
**카르빌란 테라퓨틱스, 인코포레이티드**
미국 캘리포니아 94304 팔로알토 포르테르 드라이브 3181
(72) 발명자
**헤 핑그렌**
미국 캘리포니아 94807 서니베일 오크 포인트 테라스 1561
**그라벳 데이비드 엠.**
미국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 월넛 드라이브 1807
**다닐로프 조지 와이.**
미국 캘리포니아 94024 로스 알토스 토파 애비뉴 1431
(74) 대리인
**송봉식, 정삼영**

전체 청구항 수 : 총 49 항 심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 **변형된 히알루론산 폴리머 조성물 및 관련방법**

## (57) 요 약

본 발명은 낮은 수준의 관능기 변형을 가지는 히알루론산을 포함하는 조성물, 이러한 약하게 변형된 히알루론산과 적당한 2관능성 또는 다관능성 가교결합제의 제어된 반응에 의해 형성된 혼합물, 및 히드로겔 전구체 조성물 및 결과 히드로겔을 제공한다. 본 조성물은 약하게 가교결합되어 있고, 생체내에 주사될 때 낮은 염증유발 특성을 가지고, 예를 들어, 의료 장치, 생물의학 접착제 및 실란트로서, 그리고 그 중에서도 생물활성 약제의 국소화된 전달을 위해 사용될 수 있다.

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

2-(비닐술포닐)에톡시기로 치환된 1-10 mol%의 히드록실기를 가지는 히알루론산과 2 내지 8개의 티올기를 가지는 티올 가교결합제의 반응에 의해 형성된 히드로겔.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 히알루론산은 히드록실기에서 2-(비닐술포닐)에톡시 기로 1 mol%, 2 mol%, 3 mol%, 4 mol%, 5 mol%, 6 mol%, 7 mol%, 8 mol%, 9 mol% 및 10 mol%으로부터 선택되는 전환의 정도를 가지는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 히드록실기에서 2-(비닐술포닐)에톡시 기로 이당류 반복 단위 당 4 또는 5 mol%의 전환의 정도를 가지는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 히알루론산은 700 내지 3백만 달톤의 범위로 평균 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 티올 가교결합제는 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8로부터 선택되는 티올기의 수를 가지는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 티올 가교결합제는 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜은 250 내지 20,000 달톤의 범위로 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 디티올 (PEG 디티올)인 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 9**

제6항에 있어서, 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜은 글리세롤, 3,3'-옥시디프로판-1,2-디올, 트리메틸로프로판, 소르비톨, 펜타에리트리톨, 및 헥사글리세롤로부터 선택되는 폴리올 코어를 가지는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜은 4-암(4-armed)이고, 펜타에리트리톨 코어를 가지는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 10 mol% 미만의 미반응 티올 및 10 mol% 미만의 비닐 술폰기를 포함하는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 12**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 0.5 내지 5.0%의 범위로 물에 대한 폴리머의 중량%(wt/wt)를 포함

하는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 13**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 생리활성 약제를 포함하는 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 14**

히알루론산 수용액 내에 제1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 히드로겔의 입자를 포함하는 조성물.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 히드로겔 입자는 0.10 내지 3.0백만의 범위에서 크기를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 조성물은 수성 슬러리의 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 17**

제14항에 있어서, 수용액은 식염수인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 18**

제14항에 있어서, 조성물은 멸균 상태인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 19**

제14항에 있어서, 조성물은 생리활성 약제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 생리활성 약제는 코르티코스테로이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 코르티코스테로이드는 트리암시놀론의 약제학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 코르티코스테로이드는 트리암시놀론 아세토니드인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 23**

제19항에 있어서, 조성물은 살아있는 세포를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 24**

제14항에 있어서, 조성물은 주사기에 포장된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 25**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 히드로겔은 주사기에 포장된 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 26**

제24항에 있어서, 조성물은 21게이지 바늘을 통해 압출가능한 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 히드로겔은 21게이지 바늘을 통해 압출가능한 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 28**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 히드로겔은 피험자의 관절의 관절내 공간에 투여하기 위한 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 29**

제14항에 있어서, 조성물은 피험자의 관절의 관절내 공간에 투여하기 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 히드로겔은 급성 또는 만성 염증을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 조성물은 급성 또는 만성 염증을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 32**

제30항에 있어서, 급성 또는 만성 염증은 퇴행성관절염, 류마티스 관절염, 및 다른 염증성 관절염과 관련된 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 33**

제31항에 있어서, 급성 또는 만성 염증은 퇴행성관절염, 류마티스 관절염, 및 다른 염증성 관절염과 관련된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 34**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 히드로겔은 포유동물의 뼈, 치아, 신경, 연골, 혈관, 연부 조직 또는 다른 조직에 주사 또는 이식하기 위한 것을 특징으로 하는 히드로겔.

**청구항 35**

제14항에 있어서, 조성물은 포유동물의 뼈, 치아, 신경, 연골, 혈관, 연부 조직 또는 다른 조직에 주사 또는 이식하기 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 36**

변형된 히알루론산을 제조하는 방법으로서, 0 초과 3분 이하의 시간 기간 동안 히알루론산과 디비닐 술폰을 반응시키고, 그에 의해 히알루론산 이당류 반복 단위의 히드록실기의 1 mol% 내지 10 mol%가 디비닐 술폰과 반응하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 수성 염기 중에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 38**

제36항에 있어서, 반응 단계는 20℃ 내지 25℃ 범위의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 39**

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 반응 단계는 10초 내지 120초 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 40**

제37항에 있어서, 수성 염기는 수성 수산화나트륨 및 수성 수산화칼륨으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 41**

제37항에 있어서, 산의 첨가에 의해 반응을 퀀칭하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

20℃ 내지 45℃ 범위의 온도에서 수용액 중에서 변형된 히알루론산과 2 내지 8개의 티올기를 가지는 티올 가교결합제를 반응시키는 단계를 포함하는, 가교결합된 히드로겔의 제조방법으로서, 상기 변형된 히알루론산은 2-(비닐술포닐)에톡시기로 치환된 1-10 mol%의 히드록실기를 가지는 것을 특징으로 하는 가교결합된 히드로겔의 제조방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 반응은 생리적 pH에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 45**

제43항에 있어서, 티올 가교결합제는 반응 단계 전에 멸균되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 46**

제44항 또는 제45항에 있어서, 반응 혼합물이 8 내지 36시간의 기간 동안 반응되고, 그에 의해 겔의 형성을 초래하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 47**

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 멸균 조건하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 48**

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 수용액에 활성 약제를 부가하는 단계를 더 포함하고, 상기 활성 약제는 코르티코스테로이드인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 코르티코스테로이드는 트리암시놀론 아세토니드, 트리암시놀론 헥사아세토니드, 트리암시놀론 베네토니드 및 트리암시놀론 푸레토니드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 50**

제48항에 있어서, 코르티코스테로이드는 트리암시놀론 아세토니드인 것을 특징으로 하는 방법.

## *명 세 서*

### *기 술 분 야*

[0001] **관련 출원과의 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2009년 7월 30일 출원된 미국의 가특허 출원 No. 61/230,074, 2010년 3월 9일 출원된 미국의 가특허 출원 No. 61/311,953에 대해 우선권을 주장하며, 이것의 내용은 각각 그것 전체가 참고로써 본원에 포함된다.

[0003] 본 명세서는 일반적으로 낮은 수준의 관능기 변형을 가지는 히알루론산, 이러한 약하게 변형된 히알루론산과 적당한 2관능성 또는 다-관능성 시약의 제어된 반응에 의해 형성된 혼합물, 및 관련된 히드로겔 및 히드로겔 전구체 조성물에 관한 것이다. 본원에서 설명되는 조성물은 약하게 가교결합되어 있고, 생체내에 주입될 때 낮은 염증유발(pro-inflammatory) 특성을 가지며, 예를 들어 의료 장치, 생물의학 접착제 및 실란트로서, 그리고 용도들 중에서도 생물활성 약제의 국소화된 전달을 위해 사용될 수 있다.

### *배 경 기 술*

[0004] 히알루론산은 자연적으로 발생하는, 음이온성의 황산화되지 않은 글리코스아미노글리칸이며, 결합, 상피, 및 신경 조직을 통해 널리 분포된다. 평균 70 kg (154 lbs) 사람은 그/그녀의 신체에서 대략 15그램의 히알루론산을

가지는데, 이것의 1/3은 매일 전환된다(분해 및 합성)(Stern R. Eur J Cell Bio/ 83 (7): 317-25, (2004)). 히알루론산이 신체의 다수 조직에서 자연적으로 발견되고 따라서 생체에 적합하기 때문에, 그것은 생물의학 용도에 적합한 것으로 믿어진다. 게다가 히알루론산(또한 히알루로난으로서 언급됨), 그것의 유도체 형태, 및 그것의 콘쥬게이트를 포함하는 다수의 폴리머 재료는 주사가능한 생체재료뿐만 아니라 의료 장치 및 이식가능한 재료로서 사용될 수 있다.

[0005] 용도들은 조직공학에서 비스코 보충제(viscosupplement)로서 및 상처치유에서, 국소 자리에 치료 분자의 전달, 부착제 또는 실란트로서 사용을 포함한다. 히알루론산은 그것의 자연적으로 발생하는 형태가 치료제로서 투여되고 사용될 때, 신체로부터 빠르게 클리어런스되어 빈번한 투여가 필요하도록 만든다. 종종 폴리머 겔 또는 겔 전구체가 반응 화학 및 조건, 겔화 특징, 및/또는 하나 이상의 시험관내 모델에서 치료 효과에 대해서 선호되는 특성을 증명할 수 있지만, 특정 예에서, 이러한 효과는 생체내 또는 임상적 설정에서 유리한 특성으로 전환되지 못한다.

## *발명의 내용*

### *과제의 해결 수단*

[0006] 제1양태에서, 디비닐술폰과 반응에 의해 10% 이하의 정도로 변형된 히알루론산이 제공된다. 구체적으로, 히알루론산은 디비닐술폰과 첨가 반응에 의해 그것의 10% 이하의 유도체화된 히드록실기를 가진다.

[0007] 특정 구체예에서, 히알루론산은 그것의 1-10%의 히드록실기가 2-(비닐술포닐)에톡시 기로 유도체화된다. 낮은 수준의 디비닐 술폰 활성화를 가지는 결과 활성화된 히알루론산은 일반적으로 본원에서 (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산 또는 "VS-HA"로서 언급된다.

[0008] 또 다른 구체예에서, 히알루론산은 히드록실기에서 2-(비닐술포닐)에톡시 기로 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 및 10%로부터 선택되는 전환의 정도를 가진다.

[0009] 또한 더 구체적인 구체예에서, 히알루론산은 히드록실기에서 2-(비닐술포닐)에톡시 기로 이당류 반복 단위 당 약 4-5%의 전환의 정도를 가진다.

[0010] 또 다른 구체예에서, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산은 약 700 내지 약 3백만 달톤 범위로 분자량을 가진다.

[0011] 제2 양태에서, 2이상의 티올기를 가지는 티올 가교결합제와 (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산의 반응에 의해 형성된 히드로겔이 제공된다.

[0012] 관련 구체예에서, 티올 가교결합제는 2 내지 약 8개의 티올기를 가진다. 또 다른 구체예에서, 티올 가교결합제는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8로부터 선택되는 티올기의 수를 가진다.

[0013] 제2 양태로 지시되는 또 다른 구체예에서, 티올 가교결합제는 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) (즉, PEG-티올)이다.

[0014] 앞서 언급한 추가 구체예에서, 폴리에틸렌 글리콜 티올은 약 250 내지 약 20,000 달톤의 범위로 분자량을 가진다.

[0015] 관련 구체예에서, 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜은 선형이고, 각 말단에서 티올기를 가지며, 즉 폴리에틸렌 글리콜 디티올이다(PEG 디티올).

[0016] 또 다른 구체예에서, 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜은 4-암(4-armed)이고 펜타에리트리톨 코어를 가진다.

[0017] 또 다른 구체예에서, 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜은 글리세롤, 글리세롤 다이머 (3,3'-옥시디프로판-1,2-디올) 트리메틸롤프로판, 소르비톨, 펜타에리트리톨, 및 헥사글리세롤로부터 선택되는 폴리올 코어를 가진다.

[0018] 추가 구체예에서, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산과 티올 가교결합제의 반응에 의해 형성된 히드로겔은 10% 미만의 미반응 티올 및 10% 미만의 미반응 비닐 술폰기를 함유한다. 잔여, 미반응 티올기의 양은, 예를 들어 Ellman's test를 사용하여 결정될 수 있다.

[0019] 또한 추가 구체예에서, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산과 티올 가교결합제의 반응에 의해 형성된 히드로

겔은 약 0.5 내지 5.0%의 범위로 물에 대한 폴리머의 중량%(wt/wt)를 함유한다. 결과 히드로겔에 대해 예시적인 폴리머 대 물의 중량%는, 하나 이상의 구체예에서, 0.5, 1.0, 1,5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 및 5%로부터 선택된다.

[0020] 또 다른 구체예에서, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산과 티올 가교결합제의 반응에 의해 형성된 히드로겔은 약 0.10 내지 3.0 밀리미터 범위의 크기를 가지는 입자의 형태이다.

[0021] 또 다른 구체예에서, 앞서 언급한 히드로겔 입자는 수성 슬러리의 형태이다.

[0022] 또 다른 추가 구체예에서, 앞서 언급한 구체예 중 임의의 하나 이상에서 설명되는 히드로겔은 비변형된 히알루론산의 수용액 중에서 분산된다.

[0023] 또한 추가의 그리고 더 특정된 구체예에서, 식염수 중의 히알루론산의 용액 중에서 가교결합된 히드로겔 입자를 포함하는 조성물이 제공되며, 히드로겔 입자는 폴리에틸렌 글리콜 디티올 (PEG-디티올)과 2-(비닐술포닐)에톡시기로 유도체화된 그것의 히드록실기의 1-10%를 가지는 히알루론산의 반응에 의해 형성된다.

[0024] 또한 추가 구체예에서, 앞서 언급한 구체예 중 임의의 하나 이상에서 설명되는 히드로겔은 생리활성 약제를 포함한다. 특정 구체예에서, 생리활성 약제는 코르티코스테로이드이다. 또한 더 특정의 구체예에서, 생리활성 약제는 트리암시놀론 아세토니드이다.

[0025] 또한 다른 구체예에서, 앞서 언급한 구체예 중 임의의 하나 이상에서 설명되는 히드로겔은 살아있는 세포를 포함한다.

[0026] 추가 구체예에서, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산과 2관능성 또는 더 큰 티올 가교결합제의 반응에 의해 형성된 히드로겔은 염소 관절 주사 모델에서 낮은 염증유발(pro-imflammatory) 특성을 나타낸다.

[0027] 특정 구체예에서, 히드로겔은 관련 윤활액에서 백혈구 반응에 의해 나타나는 염증유발 특성을 나타낸다.

[0028] 또 다른 특정 구체예에서, 히드로겔은 총 관측 스코어링에 의해 나타나는 염소 관절 주사 모델에서 낮은 염증유발 특성을 나타낸다.

[0029] 또한 추가 구체예에서, 히드로겔은 멸균이다.

[0030] 또한 추가 구체예에서, 본원에서 제공되는 히드로겔은 주사기로 포장된다.

[0031] 또한 추가 구체예에서, 본원에서 설명되는 임의의 히드로겔 조성물을 피험자의 관절의 관절내 공간에 투여하는 방법이 제공된다.

[0032] 또한 제3 양태에서, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산을 제조하는 방법이 제공된다. 본 방법은 히알루론산 이당류 반복 단위에서 히드록실기의 약 10% 이하가 디비닐 술폰과 반응하기에 효과적인 반응 조건 하에서 히알루론산과 디비닐 술폰을 반응시켜 (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산을 형성하는 단계를 포함한다.

[0033] 관련 구체예에서, 반응은 히알루론산과 과량의 몰의 디비닐 술폰을 반응시키는 단계를 포함한다.

[0034] 추가 구체예에서, 반응 단계는 주변 조건하에서 수행된다.

[0035] 또한 다른 구체예에서, 반응 단계는 주변 조건하에서 10초 내지 약 120초 동안 수행된다.

[0036] 또한 다른 구체예에서, 반응 단계는 수성 염기 중에서 수행된다.

[0037] 추가 구체예에서, 본 방법은 산의 첨가에 의해 반응을 퀀칭하는 단계를 포함한다. 관련 구체예에서, 충분한 산이 첨가되어 약 4 내지 6.5 범위의 pH로 조절된다.

[0038] 제4 양태에서, 본원에서 히드로겔을 제조하는 방법이 설명된다. 본 방법은 가교결합된 히드로겔을 형성하기에 효과적인 반응 조건하에서 (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산을 하나 이상의 티올 기를 가지는 티올 가교결합제와 반응시키는 단계를 포함한다. 적당한 티올 가교결합제는 티올-관능화된 폴리에틸렌 글리콜, 알칸-디티올 등을 포함한다.

[0039] 관련 구체예에서, 반응은 생리적 pH에서 수행된다.

[0040] 또 다른 구체예에서, 반응은 폴리머화 개시자의 부재하에 수행된다.

[0041] 또 다른 구체예에서, 반응은 외부 에너지 공급원의 적용의 부재하에 수행된다.

[0042] 또 다른 구체예에서, 반응은 20℃ 내지 45℃ 범위의 온도에서 수행된다.

[0043] 또 추가 구체예에서, 히드로겔은 10% 이하의 미반응 비닐 술폰 또는 티올기를 포함한다. 바람직하게는, 히드로겔은 5% 이하의 미반응 술폰 또는 티올기를 포함한다. 특정 구체예에서, 히드로겔은 본질적으로 검출가능하지 않은 미반응 비닐 술폰 또는 티올기를 포함한다.

[0044] 제5 양태에서, 주사기를 포함하는 키트가 제공되며, 주사기는 상기 설명한 바와 같이 (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산과 티올 가교결합제의 반응에 의해 형성된 히드로겔을 포함한다.

[0045] 또 다른 관련 구체예에서, 주사기는 상기 구체예 중 임의의 하나 이상에서 설명되는 히드로겔을 포함하며, 히드로겔은 비변형된 히알루론산의 수용액 중에서 분산된다. 관련 구체예에서, 수용액은 식염수이다.

[0046] 관련 구체예에서, 주사기는 18-21게이지 바늘을 사용하는 히드로겔의 관절 내 주사에 적당한 형태이다.

[0047] 또 다른 관련 구체예에서, 주사기는 상기 구체예 중 임의의 하나 이상에서 설명되는 히드로겔을 포함하며, 히드로겔은 생리활성 약제를 추가로 포함한다. 관련 구체예에서, 생리활성 약제는 스테로이드, 성장인자, 항-증식성 약제, 및 항생제로 구성되는 군으로부터 선택된다. 또한 더 특정된 구체예에서, 히드로겔은 생리활성 약제의 효능 상의 과정에 의존하여, 약 0.01중량% 내지 약 20중량%의 생리활성 약제를 포함한다. 즉, 적은 효능의 약제는 전형적으로 앞서 언급한 범위, 예를 들어 약 10-20중량%의 상위 끝에서 히드로겔에 함유되는 한편, 효능있는 생리활성 약제는 예를 들어 약 0.01 내지 3중량%의 범위의 하위 끝에 있을 것이다. 생리활성 약제가 트리암시놀론 아세토니드인 특정 구체예에서, 히드로겔은 약 0.1 내지 1중량%의 생리활성 약제를 포함한다.

[0048] 또 다른 구체예에서, 주사기는 상기 구체예 중 임의의 하나 이상에서 설명되는 히드로겔을 포함하며, 히드로겔은 살아있는 세포를 추가로 포함한다. 대표적인 살아있는 세포는 줄기 세포, 실질(parenchimal) 줄기 세포, 혈액 유래 세포, 및 골수 세포를 포함한다.

[0049] 제6 양태에서, 히드로겔 중에서 분산된 불량한 수용성의 생리활성 약제를 포함하는 본원에서 설명되는 히드로겔을 투여하는 것에 의한 불량한 수용성의 생리활성 약제를 전달하는 방법이 제공된다.

[0050] 제7 양태에서, 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염, 다른 염증성 관절염과 관련된 급성 및 만성 염증을 치료하는 방법, 및 본원에서 설명되는 임의의 하나 이상의 양태 또는 구체예에 따라서 히드로겔을 피험자의 무릎과 같은 관절의 관절내 공간에 주사하는 것에 의한 반복적 사용이 설명된다. 특정 구체예에서, 즉, 히드로겔이 그것이 포함된 코르티코스테로이드를 포함할 때, 본 방법은 연골에 손상을 초래한 것에 효과적이며, 즉, 주사 28일 후에 전체 Mankin 스코어에 의한 염소 관절 주사 모델이 특징으로 하는 바와 같이, 코르티코스테로이드가 없는 히드로겔 포획과 동일한 양의 투여 시 일어나는 연골 손상을 줄인다. 관련 구체예에서, 앞서 언급한 방법, 즉 관절의 관절내 공간에 히드로겔의 주사는 대상 히드로겔의 주사 전 피험자에 의해 경험되는 통증에 대해 통증 경감의 정도를 제공하는 것에 효과적이다. 전형적으로, 통증 경감의 개시는 주사 후 약 1시간 내지 약 1주일 내에 언제든지, 더 바람직하게는 주사 후 약 1시간 내지 약 31일 내에 피험자에 의해 경험된다. 즉, 통증 경감의 개시는 주사 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 , 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 시간 내, 또는, 그렇지 않다면 주사 후 첫 번째 24시간 내, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 내 전형적으로 시작된다. 전형적으로, 통증 경감의 지속기간은 약 3 내지 9개월, 즉, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개월 또는 훨씬 더 장기간 지속될 것으로 예상된다.

[0051] 제8 양태에서, 피험자에 투여 전 또는 투여 시 코르티코스테로이드가 가교결합된 히드로겔에 포함되는 것에 의해 퇴행성 관절염에 걸린 피험자의 관절의 관절내 공간에 코르티코스테로이드의 투여시 연골 손상을 감소시키는 방법이 제공된다. 가교-결합된 히드로겔은 일반적으로 하기에서 더욱 상세하게 설명되는 히알루론산계 히드로겔이다. 대표적인 가교결합된 히드로겔은 디비닐 술폰과 반응에 의해 10% 이하의 정도로 변형된 다음 하나 이상의 티올기를 가지는 티올 가교결합제와 가교결합된다. 놀랍게도, 가교결합된 히드로겔에 코르티코스테로이드를 포함한 덕분에, 히드로겔 포함이 없는 동일한 용량의 코르티코스테로이드의 투여시 일어나는 것보다 더 적은 손상이 연골에서 일어난다.

[0052] 앞서 언급한 것과 관련된 제9 양태에서, 피험자의 관절의 관절내 공간에 치료적으로 유효한 양의 코르티코스테로이드를 투여함으로써 퇴행성관절염을 치료하는 방법으로, 본원에서 코르티코스테로이드를 포함하는 가교결합된 히드로겔 조성물의 형태로 코르티코스테로이드를 투여하는 단계를 포함하며, 이에 의해 동일한 양의 코르티

코스테로이드가 없는 히드로겔의 투여와 비교하여 연골에서 손상이 줄어드는 개선이 제공된다.

[0053] 제7, 제8 및 제9 양태와 관련된 특정 구체예에서, 코르티코스테로이드는 히드로코르티손, 히드로코르티손 아세테이트, 코르티손 아세테이트, 틱소코르톨 피발레이트, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론, 트리암시놀론 염, 예컨대 트리암시놀론 아세토니드, 트리암시놀론 베네토니드, 트리암시놀론 푸레토니드, 트리암시놀론 헥사세토니드, 트리암시놀론 디아세테이트, 트리암시놀론 알코올, 모메타손, 암시놀니드, 부데소니드, 데소니드, 플루오시노니드, 플루오시놀론 아세토니드, 할시노니드, 베타메타손, 베타메타손 소듐 포스페이트, 덱사메타손, 덱사메타손 소듐 포스페이트, 플루오코르톨론, 히드로코르티손-17-부티레이트, 히드로코르티손-17-발레레이트, 아클로메타손 디프로피오네이트, 베타메타손 발레레이트, 베타메타손 디프로피오네이트, 프레드니카르베이트, 클로베타손-17-부티레이트, 클로베타손-17-프로피오네이트, 플루오코르톨론 카프로에이트, 플루오코르톨론 피발레이트, 플루프레드니덴 아세테이트, 베클로메타손 디프로피오네이트 모노히드레이트, 플루니솔리드, 플루티카손 프로피오네이트, 모메타손 푸로에이트 모노히드레이트, 및 플루티카손 푸로에이트로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0054] 훨씬 더 특이적인 구체예에서, 코르티코스테로이드는 트리암시놀론 아세토니드이다.

[0055] 제10 양태에서, 본원에서 설명되는 히드로겔의 3-차원 구조에 포획된 스테로이드와 같은 불량한 수용성의 약물을 포함하는 조제물, 그 다음에 이러한 조제물을 관절의 관절내 공간에 주사하는 방법이 제공된다.

[0056] 앞서 언급한 것과 관련된 한 구체예에서, 히드로겔 내 스테로이드 입자의 트래핑(trapping)은 대다수의 스테로이드 입자와 관절 조직의 직접 접촉을 방지하는데 효과적이다.

[0057] 또 다른 관련 구체예에서, 히드로겔 내 스테로이드 입자의 트래핑은 관절 내 스테로이드의 편재된 농도를 최대화하는 한편, 그것의 전신 농도를 최소화하는 것에 효과적이다.

[0058] 또한 추가 구체예에서, 히드로겔 내 스테로이드 입자의 포획은 관절의 너무 빠른 클리어런스로부터 스테로이드 입자를 보호하는 것에 효과적이다.

[0059] 또한 추가 구체예에서, 히드로겔 내 스테로이드를 포획함으로써, 스테로이드의 치료 효능은 히드로겔 포획이 없이 달성된 것보다 더 낮은 총 용량에서 달성되는 한편 원치않는 국소 및 전신 부작용을 최소화한다.

[0060] 관련 양태에서, 포유동물 피험자의 뼈, 치아, 신경, 연골, 혈관, 연부 조직 또는 다른 조직에 본원에서 설명하는 히드로겔을 주사 또는 이식하기 위한 사용이 제공된다.

[0061] 조성물, 방법, 키트 등의 추가 구체예는 하기 설명, 실시예 및 특허청구범위로부터 명백할 것이다. 앞서 언급한 것과 하기의 설명으로부터 명백할 수 있기 때문에, 본원에서 설명되는 각각 및 모든 특징, 및 2이상의 이러한 특징의 각각 및 모든 조합은 제공되는 본 명세서의 범주 내에 포함되고, 이러한 조합에 포함되는 특징들은 상호간에 모순되지 않는다. 게다가, 임의의 특징 또는 특징들의 조합은 본 발명의 임의의 구체예로부터 구체적으로 제외될 수 있다. 본 발명의 추가 양태 및 이점은 특히 수반하는 실시예 및 도면과 함께 고려될 때 하기 상세한 설명에서 설명된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0062] 도 1은 실시예 1에서 설명하는 바와 같이 제조한 비닐-술폰 변형된 히알루론산(HA-VS)의 $^{1}H$ NMR 스펙트럼이다. NMR을 기준으로, 히알루론산은 이당류 당 대략 4%의 비닐 술폰 치환의 수준을 가지는 것으로 결정되었다.

도 2는 불량한 수용성 모델 약물, 트리암시놀론 아세토니드 대 실시예 16에서 설명하는 샘플링 번호의 방출%를 증명하는 플롯이다.

도 3은 실시예 16에서 설명하는 샘플링 시점마다 불량한 수용성 모델 약물, 트리암시놀론 아세토니드의 방출된 누적 질량을 증명하는 플롯이다.

도 4는 실시예 16에서 설명하는 바와 같은 샘플링 시점마다 방출된 트리암시놀론 아세토니드의 양을 증명하는 플롯이다.

도 5는 실시예 17에서 설명하는 바와 같이 1.5ml 주사 후 24시간에 평가한 시험 재료 1을 주사한 염소 무릎 대 시험 재료 처리군에서 윤활액 백혈구 수(입방체 밀리미터 당 올림) 그래프 도시이다. 시험 재료 1 = HA-VS / $PEG-(SH)_2$ 겔.

도 6은 실시예 17에서 설명하는 바와 같이 1.5ml 주사 후 24시간에 평가한 시험 재료 1을 주사한 염소 무릎 대 시험 재료 처리군에서 완전 윤활액 백혈구 수(완전 - 총 부피 x 윤활액 백혈구 수) 그래프 도시이다. 시험 재료 1 = HA-VS / PEG-$(SH)_2$ 겔.

도 7은 실시예 17에서 설명한 바와 같이 1.5ml 주사 후 24시간에 평가한 주사한 염소 무릎 대 시험 재료 처리군에 대한 윤활액 백혈구 분화 분포(그룹에 대한 평균) 그래프 표시를 제공한다. 각 시험 재료에 대해 다형핵 백혈구 (PMN), 림프구, 단핵구 및 호산구의 분포를 나타낸다.

도 8은 윤활액, 관절 조직, 및 합쳐진 윤활액에 대한 평균 전체 스코어 및 실시예 17에서 설명되는 각 대표적인 시험 재료에 대해 주사된 염소 무릎에 대한 관절 조직 스코어의 그래프 도시이다. 총 전체 스코어 = 윤활액 스코어 + 총 관절 스코어. 윤활액에 대한 최대 스코어 또는 총 관절 스코어는 8이며 0은 정상이고; 총 전체 스코어에 대한 최대 스코어는 16이며 0은 정상이다.

도 9는 주사 후 제14일에 실시예 34에서 상세하게 설명하는 시험 재료로 처리한 염소 관절로부터의 연골 샘플에 대한 사프라닌 O 염색 스코어를 예시한다. 시험 재료 1 : HA-VS-PEG-$(SH)_2$, 시험 재료 2: HA-VS-PEG-$(SH)_2$-TA.

도 10은 주사 후 제28일에 실시예 34에서 상세하게 설명하는 시험 재료로 처리한 염소 관절로부터의 연골 샘플에 대한 사프라닌 O 염색 스코어를 예시한다.

도 11은 처리 후 제28일에 실시예 34에서 상세하게 설명하는 시험 재료로 처리한 염소 관절로부터의 연골 샘플에 대한 Mankin 스코어링 시스템의 결과를 예시한다.

도 12 및 도 13은 실시예 34에서 설명하는 바와 같은, 각각 주사 후 제14일(도 12) 및 제28일(도 13)에 사프라닌-O으로 염색한 내측 대퇴상과(medial femoral condyle) 조직을 예시한다.

도 14는 모든 동물에 대한 평균 윤활액 백혈구 수(평균 + sd) 대 실시예 45에서 상세하게 설명하는 바와 같이 1.5ml 관절내 주사 후 24시간에 평가한 시험 재료 및 대조군 물질의 그래프 표시를 제공한다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0063] 본 발명은 이제 본원에서 이후에 더 완전하게 설명될 것이다. 그러나, 본 발명은 다수의 다른 형태로 포함되고 본원에서 설명되는 구체예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안되고; 오히려, 이 구체예들은 본 명세서를 철저하고 완전하게 할 것이고, 당업자에게 본 발명의 범주를 완전하게 전달하도록 제공된다.

[0064] 앞에서든 뒤에서든 본원에서 인용되는 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 달리 표시되지 않는다면, 그것 전체가 참고로써 본원에 포함된다. 동일 용어가 본원에 포함되는 간행물, 특허, 또는 특허 출원과, 본 명세서 둘 다에 정의되는 경우, 본 명세서의 정의는 조절하는 정의를 나타낸다. 화합물, 화학 등의 특정 종류의 설명을 위해 참고로 되는 간행물, 특허, 및 특허 출원에 대해, 이러한 화합물이 속하는 부분, 화학 등은 참고로써 본원에 포함되는 문헌의 부분이다.

[0065] 정의

[0066] 본 명세서 사용되는 바와 같은 단수 형태는 달리 명확하게 표시되지 않는다면 복수의 형태를 포함하는 것임에 주의하여야 한다. 따라서, 예를 들어, "폴리머"에 대한 기준은 단수의 폴리머 뿐만 아니라 2이상의 동일 또는 다른 폴리머를 포함한다.

[0067] 달리 구체적으로 나타내지 않는다면, 본원의 용어 정의는 유기 합성, 및 폴리머 및 약제학적 과학의 분야에서 사용되는 표준 정의이다.

[0068] 본 발명을 설명하고 청구하는 것에서, 하기 전문용어는 하기 설명되는 정의에 따라서 사용될 것이다.

[0069] "생체에 적합한 폴리머"는 살아있는 조직과 양립될 수 있거나, 유리한 생물학적 특성을 가질 수 있는 분해 생성물을 가지는 폴리머이다. 생체에 적합한 폴리머는 그 자체로 생체에 적합할 수도 있고, 및/또는 생물학적으로 활성인 약제와 함께 사용될 때 상승작용에 의해 생체에 적합할 수도 있다.

[0070] 용어 "히알루론산 폴리머"는 히알루론산의 반복 이당류 서브유닛을 포함하는 폴리머를 말하며, 반복 단위는 이당류 반복 서브유닛의 D-글루쿠론산 및/또는 D-N-아세틸글루코사민 단위의 하나 이상의 위치에서 유도체화될 수 있다. 히알루론산 폴리머는 히알루론산(또한 히알루로난으로서 언급됨), 유도체화된 히알루론산, 염 형태, 히알루론산 링커 복합체, 및 히알루론산 콘쥬게이트를 포함하는 것을 의미한다. 용어 "히알루론산"은 변형된 또는

비-변형된 히알루론산을 말하는 것으로 의미된다.

[0071] 용어 "히알루론산 유도체" 또는 "유도체화된 히알루론산" 또는 "변형된 히알루론산"은, 예를 들어 하나 이상의 작은 화학 모이어티, 예컨대 디비닐술폰 등과 반응에 의해 유도체화된 히알루론산을 말한다.

[0072] 티올-유도체화된 히알루론산 폴리머는 3이상의 이당류 반복 단위를 가지고, 적어도 하나의 술프히드릴 (티올) 기를 포함하는 상기 설명한 바와 같은 히알루론산 폴리머를 말한다.

[0073] 용어 "반응성"은 유기 합성의 통상적인 조건하에서 용이하게 또는 실현가능한 속도로 반응하는 관능기(예를 들어, 폴리머에 존재)를 말한다. 이는 반응하기 위해 강한 촉매 또는 비현실적인 반응 조건을 필요로 하거나 반응하지 않는 기들에 대한 것이다(즉, "미반응성" 또는 "불활성" 기).

[0074] 히알루론산과 같은 수용성 폴리머에 대해 본원에서 사용되는 "분자질량" 또는 분자량은 다각광산란에 의해 결정되는 폴리머의 명목적인 평균 질량을 말한다. 분자량은 수-평균 분자량 또는 중량-평균 분자량 중 하나로서 표현될 수 있다. 달리 표시되지 않는다면, 본원의 분자량에 대한 모든 기준은 수평균 분자량을 말한다.

[0075] 용어 "히드로겔"은 물이 연속상에 있고 물 함량이 50% (w/w)보다 큰 물-함유 3차원 친수성 폴리머 네트워크를 말한다. 본원에서 설명되는 히드로겔은 가교결합의 원하는 정도를 달성하기 위해 전형적으로 가교-결합 개시자 및 촉진제의 포함을 필요로 하지 않는다.

[0076] "멸균" 조성물은 USP 멸균 시험을 사용하여 결정되는 바와 같이 살아있는 미생물이 없는 것이다. "The United States Pharmacopeia", 30th Revision, The United States Pharmacopeial Convention: 2008 참조.

[0077] 본원에서 사용되는 용어 "약하게 가교결합된" 또는 "낮은 정도의 가교결합을 가지는"은 약 40% 내지 약 100%의 이용가능한 가교결합 자리가 반응되어 최종 가교결합 겔을 만들도록 가교결합 반응이 일어나는 것을 의미하며, 겔을 형성하기 위해 사용된 변형된 히알루론산 출발 물질은 활성화된/유도체화된 형태로 10%이하의 그것의 히드록실기를 가지며, 전반적으로 약하게 가교결합되는 것으로 생각되는 히드로겔을 제공한다.

[0078] 염소 관절 주사 모델에서 낮은 염증유발 특성을 나타내는 히드로겔은 본원에서 설명되는 바와 같은 염소 관절 주사 모델에서 평가될 때 주사 후 24시간에 입방체 밀리미터 당 20,000개 미만의 세포의 윤활액 백혈구 수, 주사 후 24시간에 입방체 밀리미터 당 15,000개 미만의 세포의 윤활액 백혈구 수를 나타내며, 수는 3마리의 개개의 주사된 동물로부터 취한 평균 수이다.

[0079] 대상 히드로겔 포함이 없는 투여된 코르티코스테로이드의 동일한 용량보다 "연골 손상을 줄이는" 또는 "더 적은 연골 손상을 만드는" 코르티코스테로이드를 함유하는 히드로겔은 전형적으로 연골 손상을 평가하기 위한 임의의 적당한 모델을 특징으로 하지만, 바람직하게는 본원에서 더욱 상세하게 설명되는 생체내 염소 무릎 주사 모델을 사용하여 측정된다. 주사 후 데이터는 전형적으로 적어도 7일에 수집되지만 주사 후 28일에도 수집된다. 바람직한 측정 표준은 총 Mankin 스코어이며, 앞서 설명한 바와 같이 평가된 약물 단독으로 연골 손상을 감소시키는 재료를 동일한 양으로 투여할 때, 약물(즉, 코르티코스테로이드)에 따른 평균 스코어의 개선을 증명하는 것이다. 바람직하게는, 히드로겔-포함된 약물에 대한 총 Mankin 스코어는 비-히드로겔 포획 형태로 투여될 때 약물에 대해 총 Mankin 스코어에서 적어도 하나 이상의 포인트로써 개선된다.

[0080] 서로 바꾸어 사용되는 용어 "약물" 또는 "약제학적으로 활성인 약제" 또는 "생리활성 약제" 또는 "활성 약제"는 생리활성을 가지는 임의의 유기 또는 무기 화합물을 의미하고 치료 목적을 위해 적합하게 되거나 사용된다. 단백질, 호르몬, 항암제, 소분자 화학 화합물 및 모방체, 올리고뉴클레오티드, DNA, RNA 및 유전자 치료제는 "약물"의 더 넓은 정의 하에 포함된다. 본원에서 사용되는 약물에 대해서 뿐만 아니라 본원의 다른 화학적 화합물에 대해 부분입체이성질체 및 거울상체와 같은 이성질체, 염, 용매화합물, 및 다형체, 특히 결정질 형태뿐만 아니라 적용가능하다면, 본원에서 설명되는 화합물의 라세미 혼합물 및 순수한 이성질체를 포함하는 임의의 그것의 약제학적으로 허용가능한 형태로 화합물을 포함하는 것으로 의미된다.

[0081] 본원에서 사용되는 용어 "고체"는 결정질 형태, 그것의 다형체, 비-결정질 무정형 물질, 침전물, 및 입자 등을 포함하는 비-유동성 물질을 의미한다. 각각의 이 고체 형태는 약 0.01 미크론 내지 2,000 미크론, 예를 들어 약 0.01 미크론 내지 1 미크론, 1 미크론 내지 100 미크론, 100 미크론 내지 1,000 미크론, 1000 미크론 내지 2000 미크론, 1100 미크론 내지 1500 미크론, 및 1500 미크론 내지 2000 미크론의 크기로 다양할 수 있다.

[0082] 본원에서 언급되는 입차 크기는 입자 직경을 말하며, 전형적으로 시브 분석에 의해 결정된다. 전형적으로 설명되는 크기 또는 범위는 시브 또는 메시 열림 크기에 대응한다. 한 가지는 특정 메시 또는 스크린 수에 대응하는 크기를, 예를 들어 mm로 결정하기 위한 입자 크기 변환 차트에 관한 것일 수 있다. 예를 들어, 실시예 39 및 40

참조.

[0083] "수불용성 약물" 또는 "불량한 수용성 약물"은 10 mg/mL 이하의 수용성 용해도를 가지는 것이다.

[0084] 본원에서 제공되는 용어 조성물 (또는 히드로겔 또는 폴리머)의 "유효한 양" 또는 "약제학적으로 유효한 양" 또는 "치료적으로 유효한 양"은 비독성이지만 피험자에서 통증을 방지, 경감 또는 제거하는 것과 같은 원하는 반응을 제공하기 위한 조성물의 충분한 양을 말한다. 요구되는 정확한 양은 피험자의 종, 연령 및 일반적 상태, 치료되는 질환의 중증도, 사용되는 특정 약물 또는 약물들, 조성물의 특이성, 투여 방식 등에 의존하여 피험자에 따라서 다양할 것이다. 임의의 개체의 경우에서 적절한 "효과적인" 양은 통상적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0085] 급성 또는 아만성의 통성을 "치료" 또는 "치료하는"은 통증을 억제하는 것, 즉 통증의 발생을 잡는 것 또는 통증을 전환하는 것, 또는 통증을 경감하는 것, 즉 피험자에 의해 경험되는 통증의 양을 줄이는 것을 포함한다.

[0086] "선택적인" 또는 "선택적으로"는 이후에 설명되는 상황이 일어날 수도 있고 또는 일어나지 않을 수도 있는 것을 의미하며, 따라서 설명은 그 상황이 일어나는 예와 일어나지 않는 예를 포함한다.

[0087] 특정의 특징 또는 본질에 대해 용어 "실질적으로"는 특징 또는 본질에 대해 상당한 정도 또는 거의 완전함(즉, 85% 또는 그 이상의 정도)를 의미한다.

[0088] 용어 "약"은 특히 주어진 양에 대해, + 또는 - 5%의 변화를 포함하는 것을 의미한다.

[0089] 추가적인 정의는 또한 하기의 섹션에서 찾을 수 있다.

[0090] 개요

[0091] 본 명세서는 적어도 부분적으로 생체내에 투여될 때 극도로 낮은 염증 유발 특성을 가지는 히드로겔의 발명자의 발견을 기초로 한다. 본 명세서와 관련된 수행 연구에서, 본 발명자들은 겉보기에 유리한 화학적, 이론적 및 다른 물리적 특성을 가지는 다수의 생체에 적합한 히드로겔을 인식하는데, 이것은 다수의 생체에 적합하고 허용되는 시험관내 및 생체 내 모델에서 알맞게 거동하고, 특히 관절내 주사 시 염증 및 통증을 야기할 수 있다. 본원에서 설명되는 재료는 유사한 히드로겔 조성물과 비교하여 염소 관절 주사 모델에서 시험될 때 현저하게 낮은 염증유발 특성을 가지는 것으로 발견되었다. 예를 들어, 실시예 17 및 도 4-8 참조. 일반적으로 본 히드로겔은 관절의 관절내 공간에 투여될 때(예를 들어 염소 관절 주사 모델에서 시험될 때), 관절의 관절내 공간에 동일한 양의 상업적으로 이용가능한 비스코보충제 또는 본원에서 설명되는 히드로겔 포함이 없는 활성 약제의 동일한 양의 투여와 비교하여, 연골에서 감소된 부작용 또는 원치않는 부작용을 나타내었다.

[0092] 예상치 못하게, 본원에서 설명되는 것과 같은 가교결합된 히드로겔에 코르티코스테로이드의 포함은 실질적으로 비-히드로겔 포획 형태에서 동일한 또는 더 높은 용량의 코르티코스테로이드의 투여시 관찰된 것보다 더 적은 연골 손상을 초래한다는 것이 또한 발견되었다. 예를 들어, 실시예 34 및 도 9-13 참조.

[0093] 게다가, 본원에서 본 히드로겔의 관절내 주사는 단독으로 투여될 때 또는 트리암시놀론 아세토니드와 같은 코르티코스테로이드와 조합하여 투여될 때 국소적이지 않은 또는 전신의 효과를 만든다는 것을 나타내는 결과가 제공된다.

[0094] 본원에서 설명되는 우수한 히드로겔은 일반적으로 잘 특징화된 낮은 수준의 관능기 변형을 가지는 히알루론산과 적당한 2관능성 또는 다관능성 가교결합제의 제어된 반응에 의해 형성된다. 결과 히드로겔은 개시제 또는 촉진제 또는 다른 해로운 첨가제에 대한 필요 없이 온화한 조건하에서 형성된다. 결과 히드로겔은 미반응의, 반응기의 최소 수를 가지도록 설계되고, 최소수의 반응물 및 반응 성분으로부터 형성된다. 히드로겔은 단단하게 가교결합되고, 또한 시간에 걸쳐 지연된 그리고 꾸준한 방식으로 생리활성 약제를 포획 및 방출하는데 유용한 것으로 나타났다.

[0095] 본 조성물의 특징, 방법 및 키트 등은 이제 하기에서 더욱 상세하게 논의될 것이다.

[0096] 유도체화된 히알루론산 폴리머

[0097] 본 히드로겔은 다양한 폴리머 재료로부터 형성될 수 있다. 하나 이상의 반응성 관능기를 함유하는 특정의 정도로 변형된 생체 분해성 또는 생체 흡수성 폴리머가 바람직하다. 바람직하게는, 폴리머는, 다중 음이온성 다당류(PAS)이다. 다중 음이온성 다당류의 비-제한적 예는, 예를 들어, 히알루론산(HA), 카르복시메틸셀룰로오스(CMC), 카르복시메틸아밀로오스(CMA), 콘드로이틴-4-술페이트, 콘드로이틴-6-술페이트, 데르마탄 술페이트, 데

르마틴-6-술페이트, 헤파린 술페이트, 헤파린, 케라틴 술페이트 및 그것의 유도체 및 그것의 조합을 포함한다. 이러한 폴리머는, 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 No. 6,056,970에서 설명된다. 다른 생체분해성 폴리머는 피브린, 피브리노겐, 전분, 폴리(아미노산); 펩티드, 단백질, 젤라틴 및 콜라겐을 포함한다.

[0098] 바람직한 폴리머는 또한 히알루로난으로서 언급되는 히알루론산이다. 히알루론산은 대안의 β 1->3 글쿠쿠로니드 및 β 1->4 글루코사미니드 결합에 의해 결합되는 N-아세틸-D-글루코사민 및 D-글루쿠론산의 대안의 이당류 단위로 구성되는 자연적으로 발생되는 선형 다당류이고, 따라서 반복 단위는 (1->4)-β-D-GIcA-(I ->3)-β-D-GIcNAc이다. 하나 이상의 대상 히드로겔을 제조하는 것에 사용을 위한 히알루론산은 전형적으로 비닐 술폰, 아크릴레이트, 메타크릴레이트 등과 같은 하나 이상의 반응성 모이어티로 전형적으로 유도체화된다. 바람직하게는, 히알루론산은 단일의 반응성 모이어티로 유도체화된다. 변형 또는 유도체화의 정도는 일반적으로 낮은 수준의 폴리머 변형이 바람직하지만, 폴리머 내에서 반응성 관능기의 1% 내지 100% 변형의 범위로 있을 수 있다.

[0099] 한 대표적인 변형된 히알루론산은 그것의 히드록실기와 디비닐 술폰의 반응에 의해 유도체화된 히알루론산이다. 히알루론산은 전형적으로 약 1 내지 약 80%의 범위에서 반응성 히드록실기의 변형 정도를 가질 것이다. 즉, 1%의 변형 또는 치환의 정도는 평균 1%의 히알루론산 이당류 단위가 비닐 술폰기를 함유한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 히알루론산은 약 1-50%의 범위로 반응성 히드록실기의 변형의 정도를 가질 것이다. 더 바람직하게는, 히알루론산은 약 1 내지 약 25% 범위로 반응성 히드록실기의 변형의 정도를 가질 것이다. 특정 구체예에서, 히알루론산은 10% 이하의 정도로 디비닐 술폰과 반응에 의해 변형된다. 구체적으로, 바람직한 구체예에서, 히알루론산은 디비닐 술폰과 추가 반응에 의해 유도체화되는 10% 이하의 그것의 히드록실기를 가진다. 히알루론산 히드록실기는 (2-(비닐술포닐)에톡시)기로 전환된다. 결과 활성화된 히알루론산은 일반적으로 (2-(비닐술포닐)에톡시)히알루론산 또는 또는 VS-HA로서 본원에서 언급된다. 특히, 히알루론산은 히드록실 기의 (2-(비닐술포닐)에톡시)기로 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 및 10%로부터 선택되는 전환의 정도를 가질 수 있다. 대안으로, 히알루론산은 각각 및 모든 제공되는 정수의 조합, 예를 들어 2-7%, 2-6%, 3-8%, 3-7% 등에 대해, 앞서 언급한 백분율 중 임의의 2개 사이의 범위, 예를 들어 1-10%, 2-10%, 3-10%, 4-10% 등에 속하는 히드록실 기의 전환의 정도를 가질 수 있다. 또한 더욱 특이적인 구체예에서, 히알루론산은 히드록실기에서 (2-(비닐술포닐)에톡시)기로 이당류 반복 단위 당 약 4-5%의 전환의 정도를 가진다. 특정 예에서, 히알루론산 관능기 변형의 수준은 가교결합 농도의 조절 및 최적화를 허용하도록 잘 특징화되고(즉, 결정된다), 따라서 후속하는 가교결합 반응을 제어한다. 모 폴리머의 치환/변형의 정도는 적당한 방법, 예를 들어 NMR, UV, 또는 IR 분석, 또는 원소분석의 임의의 수에 의해 결정될 수 있다. 히알루론산과 같은 폴리머의 치환%를 계산하기 위한 바람직한 방법은 NMR, 예를 들어, 양성자 NMR이다. 예를 들어, 히알루론산 변형의 정도가 $^{1}H$ NMR에서 비닐 술폰 및 히알루론산의 아세트아미드 메틸기에 대응하는 상대적 피크 영역의 비율을 기준으로 결정되는 실시예 1을 참조.

[0100] 폴리머는 또한 PCT/US/2004/040726 (WO 2005/056608)에서 설명되는 바와 같은 히드라지드-반응성 기 및/또는 아미노옥시-반응성 기를 포함할 수 있고, 이러한 폴리머 및 결과 폴리머 그 자체의 유도체화에 관련된 개시의 적절한 부분은 그것 전체가 참고로써 본원에 포함된다.

[0101] 대안으로, 폴리머는 티올-유도체화된 히알루론산과 같이 티올-유도체화될 수 있다. 예시적인 티올-유도체화된 히알루론산 폴리머는 미국특허 6,884,788; 6,620,927; 6,548,081, 6,537,979; 6,013,679; U.S. 5,502,081; 및 5,356,883에서 설명되는 것을 포함하며, 이러한 티올-유도체화된 폴리머와 관련된 적절한 부분은 그것 전체가 참고로써 본원에 포함된다.

[0102] 히알루론산의 추가적인 예는 시스테인-유도체화된 히알루론산을 포함하며, 제한되는 것은 아니지만 "*Controlled Release from Glycosaminoglycan Drug Complexes*" R. V. Sparer et al.t Chapter 6, pages 107-119, in T. J. Roseman et al., CONTROLLED RELEASE DELIVERY SYSTEMS, Marcel Dekker, Inc., New York (1983)에서 개시되는 폴리머들을 포함한다.

[0103] 추가적인 바람직한 폴리머의 예는 히드로카르빌, 아릴, 치환된-히드로카르빌, 또는 치환된 아릴 기를 통해 N-아실 우레아기에 연결된 현수된 티올 기에 의해 유도체화되는 히알루론산을 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법에서 사용을 위한 예시적인 폴리머는 Carbylan™-S (International Patent Publication No. WO 2005/056608에서 상세하게 설명됨)를 포함한다.

[0104] 추가적인 유도체화된 폴리머는 2관능성 또는 다관능성 아크릴레이트, 알릴 또는 메타크릴레이트 화합물과 같은 반응성 링커에 공유적으로 부착된 히알루론산을 포함한다. 히알루론산의 변형을 위한 대표적인 링커는, 제한되

는 것은 아니지만, 폴리(에틸렌 글리콜)-디아크릴레이트 (PEGDA), 폴리(에틸렌 글리콜)-디메타크릴레이트 (PEGDM), 폴리(에틸렌 글리콜)-디아크렐아미드(PEGDAA) 및 폴리(에틸렌 글리콜)-디메타크릴아미드(PEGDMA), 및 그것의 유도체를 포함한다. 앞서 언급한 링커의 PEG-모이어티는, 예를 들어 2 내지 100개 또는 그 이상의 서브유닛을 포함하는 올리고머 또는 폴리머일 수 있다. 히알루론산과 같은 폴리머의 변형/관능화에 적당한 추가적인 링커는 덱스트란 아크릴레이트, 덱스트란 메타크릴레이트, 덱스트란 글리시딜 메타크릴레이트, 메타크릴레이트 관능화된 히알루론산, 아크릴레이트 관능화된 히알루론산, 글리세롤 디메타크릴레이트, 글리세롤 1,3-디글리세롤레이트 디아크릴레이트, 소르비톨 아크릴레이트 및 그것의 유도체를 포함한다.

[0105] 유도체화된 히알루론산 또는 다른 폴리머는 전형적으로 약 700 내지 3,000,000 달톤의 범위로 평균 분자량을 가질 것이다. 예시적인 분자량 범위는 약 1,000 내지 2,000,000 달톤, 또는 약 5,000 내지 1,000,000 달톤이다. 추가적인 적당한 분자량 범위는 약 50,000 달톤 내지 약 1,000,000 달톤, 또는 약 100,000 달톤 내지 약 1.200,000 달톤, 또는 약 90,000 달톤 내지 약 300,000 달톤을 포함한다. 히알루론산의 분자량은 일반적으로 평균 분자량 값이며, 예를 들어 다각광산란 배제 크로마토그래피(MALLS-SEC)에 의해 결정된다. 그것의 공급원에 의존하여, 히알루론산은 약 3이하, 또는 더 바람직하게는 약 2이하의 다분산성(Mw/Mn)을 가질 수 있다. 일반적으로, 히알루론산 출발 물질은 약 2.5미만, 더 바람직하게는 약 2미만의 값을 가지는 다소 좁은 분자량 분포를 가질 것이다. 히알루론산의 대표적인 다분산성은 약 1.02 내지 약 2.5의 범위에 있으며, 출발 히알루론산은 약 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 또는 2.5, 또는 훨씬 더 큰 다분산성을 가질 것이다. 대안으로, 유도체화를 위한 적당한 히알루론산 출발 물질은 물 중의 특정 농도에서 전형적으로 센티프와즈로, 상기 제공된 평균 분자량의 임의의 하나 이상과 대응하는 점성을 가질 것이다.

[0106] 가교결합제

[0107] 본원에서 설명되는 유리한 특징을 가지는 히드로겔을 형성하는데 효과적인 가교결합제의 예는 중심 분자 "C"에 위치된 2이상의 반응기를 가지는 화합물을 포함한다. 중심 분자는 선형 또는 고리형 알칸, PEG 올리고머 또는 폴리머, 또는 임의의 다른 이러한 적당한 중심 분자일 수 있다. PEG-계인 가교결합제의 경우에, PEG는 선형, 분지형(2개의 폴리머 암을 가진다) 또는 멀티-암(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 폴리머 암을 가진다)일 수 있다. 따라서, 이러한 예에서, 중심 분자는 전형적으로 선형 PEG, 2개의 암을 가지는 분지된 PEG, 또는 중심 코어로부터 나오는 PEG 암을 가지는 멀티-암일 수 있다. 이러한 멀티-암 폴리머에 대한 예시적인 코어는 에리트리톨, 펜타에리트리톨, 트리메틸롤프로판, 글리세롤, 글리세롤 다이머(3,3'-옥시디프로판-1,2-디올), 글리세롤 올리고머, 소르비톨, 헥사글리세롤 등을 포함한다.

[0108] 예를 들어, 가교결합제는 그것에 위치된 티올 또는 아크릴레이트 기를 가지는 중심 분자 "C"일 수 있다. 티올-함유 가교결합제는 2이상의 티올 기를 포함한다. 이러한 티올 기는 비닐-술폰 유도체화된 히알루론산 내에서와 같이 비닐 술폰과 반응할 것이다. 예시적인 티올 가교결합제는 PEG-디티올(HS-PEG-SH), 3-암 PEG-트리-티올 (글리세린 코어), 4-암 PEG-테트라티올(펜타에리트리톨 코어), 또는 8-암 PEG-옥타-티올 (헥사글리세린 코어)을 포함한다. 앞서언급한 멀티-암 PEG 시약은 또한 티올로 관능화된 모든 암 미만을 가질 수 있다. 중심 분자로서 PEG를 가지는 추가적인 적당한 티올 시약은 Laysan Bio (Arab, Alabama), 뿐만 아니라NanoScience로부터 이용가능한 것과 같은 방향족 디티올로부터 이용가능하다. 다른 적당한 티올 가교결합제는 디머캅토숙신산, 2,3-디머캅토-1-프로판술폰산, 디히드로리포산, 티올 관능화된 덱스트란, 및 티올-관능화된 히알루론산을 포함한다.

[0109] 중심 분자에 위치된 말단 아크릴레이트 기를 가지는 가교결합제가 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 설명된 바와 같은 중심분자가 가교결합제로서 사용에 적당하며, 티올기는 아크릴레이트 또는 메타크릴레이트 기로 치환된다. 가교결합제의 추가 예는 PCT/US/2004/040726에서 설명되는 것을 포함한다.

[0110] 가교결합제는 또한 아크릴레이트, 알릴 또는 메타크릴레이트 기를 포함하는 분자를 포함한다. 아크릴레이트, 알릴 또는 메타크릴레이트 가교결합제는 자연에서 소분자 또는 폴리머일 수 있다. 한 구체예에서, 링커는 폴리(에틸렌 글리콜)-디아크릴레이트 (PEGDA), 폴리(에틸렌 글리콜)-디메타크릴레이트 (PEGDM), 폴리(에틸렌 글리콜)-디아크릴아미드 (PEGDAA) 및 폴리(에틸렌 글리콜)-디메타크릴아미드 (PEGDMA), 덱스트란 아크릴레이트, 덱스트란 메타크릴레이트, 덱스트란 글리시딜 메타크릴레이트, 메타크릴레이트 관능화된 히알루론산, 아크릴레이트 관능화된 히알루론산, 글리세롤 디메타크릴레이트, 글리세롤 1,3-디글리세로레이트 디아크릴레이트 소르비톨 아크릴레이트 및 그것의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0111] 가교결합제의 분자량은 전형적으로 변형된 히알루론산 또는 상기 설명한 바와 같은 다른 폴리머의 분자량보다 적다. 일반적으로 가교결합제의 분자량은 약 200 내지 약 20,000 달톤의 범위에 있다. 가교결합제에 대한 추가적인 예시적 분자량 범위는 약 1,000 내지 약 10,000 달톤 (예를 들어, 약 1kD, 2kD, 3kD, 4kD, 5kD, 6kD,

7kD, 8kD, 9kD, 또는 10 kD의 분자량을 가지며, kD은 킬로달톤과 동일하다) 또는 약 1,000 내지 5,000 달톤이다. PEG 디티올과 같은 가교결합제, 또는 상기 설명한 다른 임의의 적당한 가교결합제에 대한 대표적인 분자량은 그중에서도 약 3350, 3400, 및 5000 달톤을 포함한다.

[0112] 생리활성 약제

[0113] 본원에서 제공되는 히드로겔, 히드로겔 전구체, 및 관련 조성물 및/또는 키트는 선택적으로 생리활성 약제를 포함할 수 있다. 본원에서 제공되는 조성물 및 조합에 포함될 수 있는 생리활성 약제는 항균제, 항생제, 진통제, 항생제, 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 및 빈오렐빈)와 같은 천연 생성물을 포함하는 항증식성/항유사분열 약제, 파클리탁셀, 에피디포도필로톡신(예를 들어, 에토포시드, 테티포시드), 항생제(닥티노마이신(악티노마이신 D) 다우노루비신, 독소루비신 및 이다루비신), 안트라싸이클린, 미톡산트론, 블레오마이신, 플리카마이신(미트라마이신) 및 미토마이신, 효소(L-아스파라기나아제); 질소 머스타드와 같은 항증식성/항유사분열 약제(메클로르에타민, 시클로포스파미드 및 유사체, 멜팔란, 클로람부실), 에틸렌이민 및 메틸멜라민(헥사메틸멜라민 및 티오테파), 알킬 술포네이트-부술판, 니트로소우레아(카르무스틴(BCNU) 및 유사체, 스트렙토조신), 트라젠-다카르바지닌(DTIC); 폴산 유사체와 같은 항증식성/항유사분열 약제(메토트렉세이트), 피리미딘 유사체(플루오로우라실, 플록수리딘, 및 시타라빈), 퓨린 유사체 및 관련 억제제(머캅토퓨린, 티오구아닌, 펜토스타틴 및 2-클로로데옥시아데노신[클라드리빈]); 백금 배위 착물(시스플라틴, 카르보플라틴), 프로카르바진, 히드록시우레아, 미토탄, 아미노글루테티미드; 호르몬(예를 들어 에스트로겐); 항응고제(헤파린, 합성 헤파린 염 및 트롬빈의 다른 억제제); 섬유소용해제(예컨대 조직 플라스미노겐 활성제, 스트렙토키나아제 및 유로키나아제), 아스피린, 디피리다몰, 티클로피딘, 클로피도그렐, 압식시맙; 항이동제; 항분비제(예컨대 브레펠딘 A); 항염증제, 예컨대 부신 피질 스테로이드(히드로코르티손, 히드로코르티손 아세테이트, 코르티손 아세테이트, 틱소코르톨 피발레이트, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론 아세토니드(또는 트리암시놀론의 임의의 다른 약제학적으로 허용가능한 염), 트리암시놀론 알코올, 모메타손, 암시노니드, 부데소니드, 데소니드, 플루오시노니드, 플루오시놀론 아세토니드, 할시노니드, 베타메타손, 베타메타손 소듐 포스페이트, 덱사메타손, 덱사메타손 소듐 포스페이트, 및 플루오코르톨론, 히드로코르티손-17-부티레이트, 히드로코르티손-17-발레레이트, 아클로메타손 디프로피오네이트, 베타메타손 발레레이트, 베타메타손 디프로피오네이트, 프레드니카르베이트, 클로베타손-17-부티레이트, 클로베타솔-17-프로피오네이트, 플루오로코르톨론 카프로에이트, 플루오로코르톨론 피발레이트, 및 플루프레드니덴 아세테이트를 포함한다. 베클로메타손 디프로피오네이트 모노히드레이트, 플루니솔리드, 플루티카손 프로피오네이트, 모메타손 푸로에이트 모노히드레이트, 트리암시놀론 아세토니드, 플루티카손, 푸로에이트, 비스테로이드성 약제 (살리실산 유도체, 예를 들어 아스피린); 파라-아미노페놀 유도체, 즉 아세토미노펜; 인돌 및 인덴 아세트산(인도메타신, 수린닥, 및 에토돌락), 헤테로아릴 아세트산(톨메틴, 디클로페낙, 및 케토로락), 아릴프로피온산(이부프로펜 및 유도체), 안트라닐산(메페남산 및 메클로페남산), 엔올산(피록시캄, 테녹시캄, 페닐부타존, 및 옥시펜타트라존), 나부메톤, 금 화합물(아우라노핀, 아우로티오글루코오스, 골드 소듐 티오말레이트); 면역억제(시클로스포린, 타크로리무스(FK-506), 시로리무스(라파마이신), 아자트토프린, 마이코페놀레이트 모페틸); 분열촉진인자 또는 형태형성 성장인자 단백질, 펩티드 또는 모방체; 혈관내피성장인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), TGF-β를 포함하는 형질전환 성장 인자-β (TGF-β) 상과 요소 및 BMP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8와 같은 뼈 형태형성 단백질(BMP's); 인슐린 및 인슐린-유사 성장 인자(IGF's), 간세포 성장 인자(HGF), 상피 성장 인자(EGF's), 헤지호그 단백질 (SHH 및 IHH), 액티빈, 인히빈, 탈염골(DBM) 및 혈소판-유래 성장 인자(PDGF's), 조혈 성장 인자(G-CSF, CSF-1 , GM-CSF, 에리트로포이에틴, 사이토카인 및 인터류킨 패밀리(IL-1 내지 34)를 포함하는 림포카인, 신경 성장 인자(NGFs), 중화, 길항 또는 작용 항체, 성장 인자 수용체 작용제 또는 길항제, 산화질소 도너; 안티센스 올리고뉴클레오티드, 전사 인자, 신호전달 케스케이드 매개자, 및 그것의 조합을 포함한다.

[0114] 항생제는 린코마이신 패밀리의 항생제(본래 스트렙토마이세스 린콜넨시스로부터 회수된 항생제의 종류에 관한 것); 테트라사이클린 패밀리의 항생제(본래 스트렙토마이세스 아우레오파시엔스(*streptomyces aureofaciens*)로부터 회수된 항생제의 종류에 관한 것); 황계 항생제, 예컨대 술폰아미드 등을 포함한다. 린코마이신 패밀리의 대표적인 항생제는 린코마이신 그 자체(6,8-디데옥시-6-[[(1-메틸-4-프로필-2-피롤리디닐)-카르보닐]아미노-]-1-티오-L-트레오-1-D-갈락토-옥토피라노시드), 클린다마이신, 린코마이신의 7-데옥시, 7-클로로 유도체(예를 들어, 7-클로로-6,7,8-트리데옥시-6-[[(1-메틸-4-프로필-2-피롤리디닐)카르보닐]아미노]-1-티오-L-트레오-1-D-갈락토-옥토피라노시드), 및 그것의 약리학적으로 허용가능한 염 및 에스테르를 포함한다. 테트라사이클린 패밀리의 대표적인 항생제는 테트라사이클린 그 자체 4-(디메틸아미노)-1,4,4α,5,5α,6,11,12α-옥타히드로-3,6,12-12α-펜타히드록시-6-메틸-1,11-디옥소-2-나프타센카르복사미드), 클로르테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 데메클로사이클린, 롤리테트라사이클린, 메타사이클린 및 독시사이클린 및 그것의 약제학적으

로 허용가능한 염 및 에스테르, 특히 산 부가 염, 예컨대 히드로클로라이드 염 및 에스테르를 포함한다. 대표적인 황계 항생제는 제한되는 것은 아니지만, 술폰아미드 술파세타미드, 술파벤즈아미드, 술파디아진, 술파독신, 술파르네라진, 술파메타진, 술파메티졸, 술파메톡사졸, 및 그것의 약리학적으로 허용가능한 염 및 에스테르, 예를 들어 술파세타미드 나트륨을 포함한다. 항균제 및/또는 항생제는 추가로 에리트로마이신, 박시트라신, 네오마이신, 페니실린, 폴리믹신 B, 테트라사이클린, 비오마이신, 클로로미세틴 및 스트렙토마이신, 세파졸린, 암피실린, 아작탐, 토브라마이신, 클린다마이신 및 겐타마이신과 같은 화합물을 포함한다.

[0115] 진통제는 리도카인, 벤조카인 및 마르카인과 같은 화합물을 포함한다.

[0116] 본원에서 제공되는 히드로겔은 또한 살아있는 세포를 포함할 수 있다. 대표적인 살아있는 세포는 줄기 세포, 실질 줄기 세포, 혈액 유래 세포, 및 골수 세포를 포함한다.

[0117] 한 바람직한 구체예에서, 히드로겔은 코르티코스테로이드를 포함한다. 적당한 코르티코스테로이드의 예는 히드로코르티손, 히드로코르티손 아세테이트, 코르티손 아세테이트, 틱소코르톨 피발레이트, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론, 트리암시놀론 염, 예컨대 트리암시놀론 아세토니드, 트리암시놀론 베네토니드, 트리암시놀론 푸레토니드, 트리암시놀론 헥사아세토니드, 트리암시놀론 디아세테이트, 트리암시놀론 알코올, 모메타손, 암시노니드, 부데소니드, 데소니드, 플루오시노니드, 플루오시놀론 아세토니드, 할시노니드, 베타메타손, 베타메타손 소듐 포스페이트, 덱사메타손, 덱사메타손 소듐 포스페이트, 플루오로코르톨론, 히드로코르티손-17-부티레이트, 히드로코르티손-17-발레레이트, 아클로메타손 디프로피오네이트, 베타메타손 발레레이트, 베타메타손 디프로피오네이트, 프레드니카르베이트, 시오베타손-17-부티레이트, 클로베타솔-17-프로피오네이트, 플루오로코르톨론 카프로에이트, 플루오코톨론 피발레이트, 플루프레드니덴 아세테이트, 베클로메타손 디프로피오네이트 모노히드레이트, 플루니솔리드, 플루티카손 프로피오네이트, 모메타손 푸로에이트 모노히드레이트, 및 플루티카손 푸로에이트를 포함한다.

[0118] 본원에서 제공되는 히드로겔 조제물에서 사용을 위한 한 바람직한 화합물은 트리암시놀론 (11β,16α)-9-플루오로-11,16,17,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온), 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화합물이다. 트리암시놀론 아세토니드의 구조식을 하기에 나타낸다.

[0119] 생리활성 약제는 전형적으로 본원에서 제공되는 바와 같은 히드로겔에서 혼합, 현탁되거나, 또는 히드로겔 내에 포획될 것이다. 대안으로, 생리활성 약제는 폴리머 콘쥬게이트의 형태일 수 있고, 또는 히드로겔을 제조하기 위해 사용되는 성분, 예를 들어, 변형된 히알루론산 또는 가교결합제에 방출가능한 방식으로 공유적으로 부착된다.

[0120] 히드로겔

[0121] 본원에서 제공되는 히드로겔은 전형적으로 변형된 히알루론산 또는 상기 설명한 다른 적당한 폴리머와 가교결합제(또한 상기 설명)를 겔을 형성하기에 효과적인 조건하에서 반응시킴으로써 형성된다. 일반적으로, 반응 조건에 따라서 시약 및 반응기의 상대적 양은 조절되어 최적의 반응을 제공한다. 겔 형성은 온화하고 제어된 조건하에서 수행된다. 바람직하게는, 결과 히드로겔은 변형된 히알루론산 및 가교결합제 출발물질 내에 함유된 20% 미만의 조합된 미반응 관능기, 더 바람직하게는 변형된 히알루론산 및 가교결합제 출발물질 내에 함유된 5% 이하의 미반응 관능기를 함유하며, 또는 이상적으로는 미반응 비닐 술폰 또는 티올기와 같은 미반응 관능기의 양은 본질적으로 검출가능하지 않다. 결과 겔 물질에서 미반응 관능기의 이러한 낮은 수준은 생체내, 예를 들어 관절에 투여될 때 낮은 염증유발 특성을 가지는 겔 물질을 제공한다는 점에서 유리하다. 특정 구체예에서, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산과 티올 가교결합제의 반응에 의해 형성된 히드로겔은 10% 미만의 미반응 티올 및 비닐 술폰기를 함유한다. 미반응 관능기의 수는 반응 조건의 주의깊은 모니터링, 반응물 비율의 조절, 및 히알루론산 출발 물질의 변화 정도의 지식에 의해 조절된다.

[0122] 이렇게 형성된 히드로겔은 전형적으로 약 0.5 내지 5.0% 또는 그 이상의 범위로 폴리머 대 물(POLY/HOH)의 중량%를 함유한다. 결과 히드로겔에 대해 폴리머 대 물의 예시적인 중량%는, 하나 이상의 구체예에서 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2,5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 및 5%로부터 선택된다.

[0123] 본원에서 제공되는 약하게 가교결합된 히드로겔의 형성은 변형된 히알루론산 출발 물질에서 낮은 수준의 변형에 적어도 부분적으로 기인한다. 예를 들어, 디비닐 술폰과 반응에 의한 히알루론산의 변형의 정도는 실시예 6에서 나타내는 바와 같이 반응 시간의 적절한 조절에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 약 20% 이하의 변형의 정도를 유지하기 위해서, 주변 조건(예를 들어, 20-25℃)하에서 반응 시간은 일반적으로 약 3분 하에서 유지되어 2-(비

닐술포닐)에톡시)$_{1-20\%}$히알루론산을 형성한다. 반응은 바람직하게는 2관능성 또는 더 큰 아크릴레이트 또는 메타크릴레이트 시약과 같은 과량의 몰의 디비닐 술폰 또는 다른 적절한 변형 반응물을 사용하여 수행된다. 실시예 6의 결과로부터 알수 있고, 예상되는 바와 같이, 더 짧은 반응 시간은 출발 폴리머, 예를 들어 히알루론산의 더 낮은 정도의 변형을 초래한다. 예를 들어, 주변 조건하에서, 매우 짧은 반응 시간, 즉 대략 수초동안, 비닐 술폰기의 약 4% 치환을 가지는 비닐-술폰 변형된 히알루론산을 초래하는 한편, 1분의 반응 시간은 8% 비닐 술폰-치환된 히알루론산을 초래한다. 예시적인 반응 시간 및 조건 및 획득한 폴리머의 치환의 결과 정도에 대해 표 1을 참조한다. 한 구체예에서, 반응 조건은 조절되어 약 1% 내지 약 10% 치환을 가지는 비닐술폰-치환된 히알루론산을 초래한다. 관련 구체예에서, 변형 반응은 약 10초 내지 약 120초의 주변 조건 하에서 수행된다. 변형 반응, 예를 들어 히알루론산과 디비닐 술폰의 반응은 염기성 조건하에서, 예를 들어 수성 수산화나트륨, 수성 수산화칼륨과 같은 수성 염기에서 또는 물 중에서 가용성인 임의의 다른 적당한 염기를 사용한 다음, 히알루론산, 황산, 인산 등과 같은 산의 첨가에 의해 반응을 퀀칭하여 수행될 수 있다. 일반적으로, 산은 pH를 약 4 내지 6.5 의 범위로 낮추도록 조절하고, 또는 반응을 퀀칭하여 모 폴리머의 관능기 변형의 원하는 정도를 달성하기에 충분한 시간과 양으로 첨가된다. 이어서 생성물은 선택적으로, 예를 들어 투석에 의해 정제될 수 있고, 선택적으로 동결건조에 의해 건조될 수 있다.

[0124] 히드로겔 전구체 조성물은 이어서 선택적으로 필요하다면 가교결합제의 존재하에서, 약하게 가교 결합된다. 예를 들어, 상기 설명한 것과 같은 2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-20\%}$히알루론산, 또는 2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산과 같은 비닐-술폰 변형된 히알루론산은 티올-관능화된 PEG 시약, 예컨대 PEG-디티올 또는 가교결합된 히드로겔을 형성하기에 효과적인 반응 조건 하에서 상기 설명된 다른 적절한 가교결합제와 반응한다. 바람직한 구체예에서, 가교결합 반응은, 예를 들어 생리적 조건 하에서 수용액 중에서 수행된다. 한 구체예에서, 반응은 식염수 용액 중에서 수행된다. 예를 들어, 실시예 2, 3, 4, 및 5를 참조. 시약의 부피 비율은 결과 히드로겔의 원하는 특성에 따라서 조절될 수 있고, 반응물 용액의 농도, 특히 반응물의 분자량 및 구조 등에 의존할 것이다. 예를 들어, 관능기 대 가교결합제의 예시적인 상대적 몰 비율은 다음을 포함하며, 예를 들어, 예시적인 관능기는 비닐-술폰 변형된 히알루론산에 함유된 비닐 술폰이고, 가교결합제의 상대적 양은 가교결합제 그 자체, 예를 들어 PEG-디티올과 같은 가교결합제 분자에 함유된 티올기와 같은 반응기의 수보다 오히려 가교결합제 분자를 말한다: 약 1 내지 2.5, 또는 약 1.25 내지 2.0, 또는 약 1.3 내지 약 1.8.

[0125] 대안으로, 가교결합제는 변형된 히알루론산의 용액에 고체로서 첨가될 수 있다. 예를 들어, 멸균 조제물이 요망되는 경우, 가교결합제는 첨가 전에, 예를 들어 전자빔 처리에 의해 멸균된다. 가교결합 반응은 전형적으로 온화한 반응 조건, 예를 들어 약 20℃ 내지 약 45℃, 예를 들어 다음의 온도: 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℃, 또는 45℃ 중 임의의 하나의 범위에 있는 온도에서 수행된다. 변형된 히알루론산과 가교결합제 반응물, 및 임의의 다른 선택적 반응물 성분의 혼합 또는 반응 후, 결과 조성물은 전형적으로, 예를 들어 인규베이터 내에서 겔의 형성을 초래하기에 충분한 시간 기간 동안 반응된다. 반응 온도에 따라서, 반응물은 전형적으로 약 8 내지 약 36 시간, 또는 약 10 내지 약 24 시간, 또는 약 12 내지 약 18 시간의 기간 동안 반응된다.

[0126] 가교결합 반응은 멸균 조건 하에서, 즉, 멸균 반응물을 사용하여 및 일반적으로 수반되는 예에서 설명되는 바와 같은 멸균 조건 하에서 수행되어 멸균 히드로겔을 제공할 수 있다. 예를 들어, 모든 용액 성분은 반응 전 멸균 여과되어 멸균 조성물을 형성할 수 있다.

[0127] 추가적인 대표적인 약하게 가교결합된 히드로겔은, 예를 들어 Carb-S™와 같은 티올-변형된 히알루론산 재료의 가교결합에 의해 형성된다. Carb-S™은 히알루론산의 카로복시메틸화 다음에 커플링제의 존재하에서 3,3'디티오비스(프로파논 디히드라지드), DTPH와 반응된 다음, 디티오트레이톨과 같은 시약으로 디술파이드 기의 환원에 의해 만들어진다. 예를 들어, 미국 공개 특허 US2008-002595 참조. 추가적인 티올-변형된 히알루론산 물질은 미국 공개 특허 US2009-0105093에서 설명되며; 앞서 언급한 간행물에서 설명되는 예시적인 재료는 티올-함유 히드라지드 반응물과 반응에 의해 유도체화되는 히알루론산이다. 히드로겔은 또한 미국 특허 No. 6,884,788에서 설명되는 티올-변형된 히알루론산 재료로부터 형성될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 앞서 언급한 티올-변형된 히알루론산 재료는, 히알루론산 출발 물질의 변형의 정도가 약 20%로 낮고, 또는 훨씬 더 바람직하게는, 약 10%의 히알루론산 히드록실기가 화학적으로 변형된다는 것을 제외하고, 설명한 합성 접근을 사용하여 제조된다. 이러한 티올-유도체화된 히알루론산 물질은 티올의 능력에 기인하여 약하게 자기-가교결합되어 자기-반응될 수 있다. 대안으로, 약하게 가교-결합된 히드로겔은 PEG-아크릴레이트와 같은 가교-결합제와 반응에 의해 형성될 수 있다.

[0128] 하나 이상의 특정 구체예에서, 가교결합된 히드로겔 조성물은 활성 약제를 함유한다. 활성 약제의 바람직한 분류는 스테로이드, 성장인자, 항증식성 약제 및 항생제를 포함한다. 본 히드로겔에 포함을 위한 활성 약제의 한 가지의 특히 유리한 분류는 코르티코스테로이드이다. 예시적인 코르티코스테로이드는, 제한되는 것은 아니지만, 트리암시놀론, 트리암시놀론 염, 예컨대 트리암시놀론 아세토니드, 트리암시놀론 헥사아세토니드, 트리암시놀론 베네토니드, 트리암시놀론 푸레토니드, 및 트리암시놀론 디아세테이트 등, 및 메틸프레드니솔론을 포함한다. 일반적으로, 결과 히드로겔은 그것의 효능에 의존하여 약 0.01중량% 내지 약 20중량%의 생리활성을 함유한다. 히드로겔에 함유된 생리활성 약제의 예시적인 양(전반적인 습식 겔 중량을 기준으로)은 약 10중량% 내지 약 20중량%, 예를 들어, 더 적은 효능의 생리활성 약제에 대해 약 0.01중량% 내지 약 10중량%, 또는약 0.01% 내지 약 5%, 또는 약 0.01% 내지 약 3%, 또는 약 0.1 내지 약 2%의 생리활성 약제, 또는 예를 들어 트리암시놀론 아세토니드와 같은 더 큰 효능의 생리활성 약제에 대해 약 0.1 내지 약 1% 생리활성 약제이다. 특정 구체예에서, 히드로겔은 히드로겔에서 이러한 생리활성 약제를 포함함으로써 불량한 수용성 생리활성 약제를 전달하는데 사용된다.

[0129] 유리하게는, 본 히드로겔은 온화한 반응 조건 하에서 형성되고 중합 개시자의 부재하에서 형성될 수 있다. 게다가, 충분한 겔화는 외부 에너지 공급원의 적용의 부재하에 일어난다. 예를 들어, 겔-형성 반응은 약 20℃ 내지 45℃ 범위의 온도에서 개시제와 촉진제의 부재하에 수행될 수 있다. 추가적으로, 겔화, 즉, 히드로겔 형성은 임의의 소분자 화학물질 부산물의 방출 없이 일어난다. 따라서, 본원에서 제공되는 히드로겔은 생체내 투여시 염증유발 반응을 잠재적으로 유발할 수 있는 최소수의 첨가제 또는 오염물을 함유한다.

[0130] 멸균 히드로겔은 멸균 조건하에서, 예를 들어 각각의 변형된 히알루론산의 수용액 및 가교결합제를 멸균 주사기 및/또는 원심분리 튜브에 넣은 다음, 철저한 혼합에 의해 형성될 수 있다. 전형적으로 혼합된 반응물(즉, 변형된 히알루론산 및 가교결합제)은 재료가 겔을 형성할 때까지 적절한 온도(예를 들어, 약 20℃ 내지 45℃의 범위)의 인큐베이터 설정에 둔다. 예를 들어, 반응물의 부피 비율을 포함하는 히드로겔 조제물의 대표적인 제조를 위해 실시예 2, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29 및 30를 참조.

[0131] 전형적으로 수용액 또는 혼합물의 형태로 추가적인 비변형 히알루론산은 겔 형성 전, 또는 겔 형성 후(예를 들어, 겔 슬러리) 전구체 형성에 선택적으로 추가되어 히알루론산의 수용액 중에서 가교결합된 히드로겔 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 실시예 8을 참조. 용액 중에서 히알루론산(즉, 비변형 히알루론산)의 평균 분자량은 전형적으로 약 750,000 내지 약 1,200,000 달톤 또는 더 높은 범위에 있다. 바람직한 수용액은 히알루론산의 식염수 용액이며, 히드로겔에 첨가되는 히알루론산의 대표적인 수용액은 약 0.3중량% 내지 약 4중량%, 또는 약 0.5중량% 내지 약 2중량% 범위의 농도를 가진다. 하나의 대표적인 조제물은 다음의 성분의 상대적 양을 포함한다: 20 mg/mL의 농도에서 4 mL의 겔 슬러리 ((2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산/PEG-디티올)과 2 mL의 히알루론산. 특히 바람직한 조제물은 20 mg/mL의 농도에서 4 mL의 겔 슬러리((2-(비닐술포닐)에톡시)4%히알루론산/PEG-디티올)과 2 mL의 히알루론산을 포함한다. 전형적으로, 결과의 팽창된 겔에서 최종 히알루론산 함량은 약 0.05 내지 5% (0.5 mg/mL 내지 50 mg/mL)의 범위에 있다. 바람직하게는, 결과의 팽창된 겔에서 최종 히알루론산 함량은 약 0.1 내지 3%, 또는 약 0.1 내지 1%, 또는 약 0.5-0.8%이다. 결과의 팽창된 겔에서 예시적인 최종 히알루론산 함량은, 예를 들어, 다음 중 임의의 백분율 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, 및 5.0에 대응할 수 있다. 예를 들어, 결과 조성물에서 히알루론산 대 가교결합된(예를 들어, (2-(비닐술포닐)에톡시)$_{1-10\%}$히알루론산/PEG-디티올) 히드로겔 입자의 대표적인 상대적 양(중량비)은 전형적으로 약 10:1, 또는 약 5:1, 또는 약 3:1, 또는 약 1:1의 범위 내에 속한다. 결과 조성물은 또한 하나 이상의 계면활성제를 선택적으로 함유할 수 있다. 예시적인 계면활성제는 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, Tween 80, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, PEG 3350) 등을 포함한다.

[0132] 원한다면, 생리활성 약제는 가교결합 전에 반응 혼합물에 첨가될 수 있고, 또는 대안으로, 형성 후 가교결합된 겔에 첨가될 수 있다. 실시예 9-16은 히드로겔 형성뿐만 아니라 대표적인 히드로겔 조성물로부터 생리활성 약제, 트리암시놀론 아세토니드의 포함 및 이후의 지연된 방출을 증명한다. 대안으로, 줄기 세포, 실질 줄기 세포, 혈액 유래 세포 및 골수세포와 같은 살아있는 세포는 대상 히드로겔에 포함될 수 있다.

[0133] 생리활성 약제가 있는 또는 없는 대상 히드로겔에 대해, 히드로겔은 상기 설명한 바와 같은 하나 이상의 다중음이온성 다당류(PAS)의 용액 중에서 분산될 수 있다. 다중음이온성 다당류의 비-배타적 예는, 예를 들어 추가로 히알루론산(HA), 카르복시메틸셀룰로오스(CMC), 카르복시메틸아밀로오스(CMA), 콘드로이틴-4-술페이트, 콘드로이틴-6-술페이트, 데르마탄 술페이트, 데르마틴-6-술페이트, 헤파린 술페이트, 헤파린, 케라틴 술페이트 및 그것의 유도체 및 그것의 조합을 포함한다. 이러한 폴리머는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 No.

6,056,970에서 설명된다. 대상 히드로겔이 분산될 수 있는 폴리머의 다른 용액은 피브린, 피브리노겐, 전분, 폴리(아미노산); 펩티드, 단백질, 젤라틴, 콜라겐 및 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함한다. 상기 폴리머 중 하나 이상의 조합을 함유하는 용액은 대상 히드로겔 입자를 분산시키는데 사용될 수 있다. 폴리머 용액은 적어도 0.1 mg/mL 내지 최대 물 또는 0.9% 식염수 용해도 범위의 농도로 제조될 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 하나의 바람직한 폴리머는 약 10 mg/mL 내지 약 25 mg/mL의 농도 범위에서 약 500,000 내지 3백만의 분자량을 가지는 히알루론산이다. 폴리머 용액과 히드로겔의 조합은 최종 포장된 조합이 멸균인 멸균 조건하에서 제조될 수 있다.

[0134] 실시예 8에서 설명하는 바와 같이, 대상 히드로겔은 선택된 폴리머 용액과 다른 비율로 혼합될 수 있다. 대상 히드로겔과 폴리머 용액을 혼합하는 부피 비율은 제한되는 것은 아니지만, 약 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, 10:1을 포함할 수 있다. 대상 히드로겔과 폴리머 용액을 혼합하는 바람직한 부피 비율은 약 3:1, 2:1 및 1:1이다.

[0135] 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물의 pH는 완충제, 산 및 염기의 첨가에 의해 변형될 수 있다. 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물에 대한 바람직한 pH 범위는 약 5-8 및 더 바람직하게는 약 6-7.6이다.

[0136] 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물의 이온 강도는 염의 부가에 의해 변형될 수 있다. 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물의 이온 강도를 조절하기 위해 사용되는 하나의 바람직한 염은 염화나트륨이다. 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물의 바람직한 최종 이온 강도는 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물이 거의 등장성이되도록 선택된다.

[0137] 약제학적으로 허용가능한 보존제는 또한 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물에 첨가될 수 있다. 이것은 벤조산나트륨 또는 벤질 알코올과 같은 약제를 포함할 수 있다.

[0138] 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물은, 특정 구체예에서, 주사기에 포장될 수 있다. 주사기는 플라스틱(예를 들어, 폴리프로필렌, 폴리카르보네이트, 폴리스티렌) 또는 유리 또는 임의의 다른 약제학적으로 허용가능한 재료로 만들어질 수 있다. 주사기 내에 함유되는 대상 히드로겔 및 대상 히드로겔/폴리머 용액 분산물은 0.5 mL 내지 20 mL의 범위일 수 있고 바람직하게는 1 mL, 2mL, 3mL, 4mL, 5mL, 6 mL and 7 mL의 부피이다.

[0139] 결과 히드로겔 재료는 약 0.10 내지 3.0밀리미터의 범위의 크기를 가지는 입자로 처리될 수도 있고(예를 들어, 실시예 3 및 4 참조), 또는 수성 겔 슬러리의 형태일 수도 있다. 예를 들어, 겔화된 재료는 조각으로 쪼개지고, 식염수와 혼합되고, 팽창될 수 있다. 적절한 크기로 된 입자는 이어서 원하는 스크린 크기를 가지는, 예를 들어 약 0.10 내지 3.0 밀리미터의 메시를 통해 압출에 의해 겔 재료로부터 형성될 수 있다. 수중 매질 중에 있을 때, 결과 입자는 겔 슬러리를 형성한다. 한 구체예에서, 겔은 히드로겔이 관절내 공간에 주사될 수 있도록 18-21 게이지 바늘이 있는, 사용에 적당한 주사기에 포장된다. 일반적으로, 피험자의 관절내 공간에 주사된 히드로겔 조성물의 부피는 약 0.5 내지 약 8 mL, 바람직하게는 약 3 내지 6 mL, 또는 약 4-6 mL이다.

[0140] 수반하는 실시예에서 예시되는 바와 같이, 히드로겔은 멸균 조성물로서 제공될 수 있다.

[0141] 상기 및 실시예에서 설명한 바와 같이, 히드로겔은 주사기와 같은 밀봉된 용기로 제공될 수 있다(이것은 선택적으로 구멍이 있는 캡으로 캡핑될 수 있다). 이어서 주사기는 포일 파우치와 같은 용기 중에 위치된 다음 밀봉될 수 있다. 파우치는 진공 밀봉될 수 있고, 질소 또는 아르곤과 같은 불활성 기체 하에서 밀봉되거나 하나 이상의 진공/백필(back fill) 사이클에 따라서 밀봉되며, 이때 백필 기체는 질소 또는 아르곤과 같은 불활성 기체이다. 하나 이상의 진공/백필 사이클 하에서 밀봉된 파우치에 대해, 사이클은 파우치가 최종적으로 진공 또는 불활성 기체 하에서 밀봉되도록 조절될 수 있다. 파우치는 선택적으로 건조제 및/또는 산소 스캐빈저를 함유할 수 있다.

[0142] 사용

[0143] 본원에서 설명되는 겔 조성물은 유리하게는 상업적으로 이용가능한 비스코보충제와 비교하여 연골 상에서 원치않는 부작용이 감소되었음을 나타내며, 히드로겔은 생리활성 약제를 추가로 포함하는 구체예에서, 히드로겔 포함이 없는 활성 약제의 동일한 양의 투여와 비교할 때 연골상에서 원치않는 부작용이 감소되었음을 나타낸다. 다른 유리한 특징들 중에서도, 본원에서 제공되는 겔 조성물은 실시예 17 및 도 4-8에서 예시되는 극도로 낮은 염증유발 특성을 가진다.

[0144] 본원에서 설명되는 히알루론산 폴리머 조성물은 사용을 위해, 예를 들어 배발달, 조직 기관, 상처 치유, 신생혈관형성 및 종양형성을 위해 주사가능하거나 이식가능한 조제물 중에서 사용될 수 있다. D. D. Allison and K J Grande-Allen, *Tissue Engineering*, Vol. 12, Number 8, 2131-2140 (2006), G. D. Prestwich et al, *Tissue Engineering*, Vol 12, Number 8, 2171-2180 (2006), G. D. Prestwich et al, *Tissue Engineering*, Vol 12, Number 12, 3405-3416 (2006). 트리암시놀론 아세토니드와 같은 코르티코스테로이드를 포함하는 히드로겔 조성물은 피험자에 의해 경험되는 통증의 경감을 제공하는데 유용하다. 관절의 관절내 공간에 히드로겔 조성물의 치료적으로 유효한 양의 주사는 예를 들어, 피험자에 의해 경험되는 관절 통증의 지연된 경감을 제공하는데 효과적일 수 있다. 이상적으로, 통증 경감의 측정가능한 정도는 주사 후 약 1시간 내지 1일, 또는 더 바람직하게는 주사 후 약 1시간 내지 약1일 내에 피험자에 의해 처음으로 경험된다. 전형적으로, 히드로겔의 주사는 주사 후 약 3 내지 9개월 지속되는 통증의 경감의 정도를 초래한다. 치료되는 특정 피험자 및 조건에 의존하여, 히드로겔의 치료적으로 효과적인 투약 부피는 전형적으로 약 0.5 mL 내지 20 mL의 범위에 있고, 대표적인 범위는 1 mL, 2mL, 3mL, 4mL, 5mL, 6 mL 및 7 mL를 포함한다.

[0145] 예를 들어, 선택적으로 하나 이상의 생리활성 약제를 함유하는 본원에서 제공되는 히드로겔 조성물은 출혈을 방지하는 것, 개방창을 보호하는 것 및 다른 생물의학적 용도를 포함하는 다양한 용도에 대해 사용될 수 있는 부착제 조성물, 예를 들어 조직 부착제 및 실란트로서 사용될 수 있다. 이 조성물들은, 예를 들어 외과적으로 잘려지거나 외상으로 찢어진 조직을 덧붙이고, 상처로부터 혈류를 지연시키고, 재발협착증 또는 혈액응고를 방지하고, 약물을 전달하고; 화상을 드레싱하고, 살아있는 조직의 복구와 재성장에 도움을 주도록 사용될 수 있다. 본원에서 제공되는 히알루론산-계 폴리머 조성물은 인간과 같은 포유동물 피험자에서 손상된 기관 또는 조직을 보충 또는 유발 및 재생하는데 사용될 수 있다. 조성물은 분해 또는 흡수되고, 또는 다르게는, 그것에 함입 또는 함유될 때 피험자에 나쁜 영향을 미치지 않고 피험자(예를 들어 포유동물 피험자)에 남아있다.

[0146] 대상 조성물은 조직 충전제, 피부 충전제, 벌크화제, 및 색전증 약제뿐만 아니라 연골 결합/손상을 보수하는 약제 및 뼈 보수 및/또는 성장을 향상시키는 약제로서 사용될 수 있다.

[0147] 대상 조성물은 또한 퇴행성관절염 또는 류마티스 관절염의 치료, 또는 통풍 또는 칼슘 파이로포스페이트 석출질병과 같은 다른 염증성 관절염에 대해(예를 들어 관절의 관절내 공간에 주사에 의해), 또는 후속하는 외과적 처리를 형성할 수 있는 부착의 감소 또는 방지에서 사용될 수 있다. 대상 조성물은 본원에서 제공되는 히드로겔 재료에 코르티코스테로이드의 포함에 의한 코르티코스테로이드의 주입시 연골에서 손상을 감소시키는데 유용한 것으로 발견되었다.

[0148] 앞서 언급한 한 특정의 측정으로서, 즉 히드로겔이 그것에 포함된 코르티코스테로이드를 포함할 때, 본 방법은 연골 손상에 효과적인데, 즉 동일한 양의 코르티코스테로이드가 없는 히드로겔 포획의 투여시 일어나는 연골손상이 감소되며, 연골에서 이러한 감소된 손상은 주사 28일 후 총 Mankin 스코어에 의한 염소 관절 주사 모델을 특징으로 한다. 총 Mankin 스코어의 결정의 설명에 대해 실시예 34를 참고. 감소된 연골 손상을 평가하기 위한 추가적 지표가 또한 이용가능하며; 이러한 변수 및 관련 데이터는 또한 실시예 34에서 제공된다.

[0149] 몇몇 이점은 본원에서 제공되는 바와 같이 히드로겔 내의 스테로이드 입자의 포획/포함과 관련되며, 하기 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어 본 히드로겔 내에서 스테로이드 입자의 트래핑은 관절 조직과 대다수의 스테로이드 입자의 직접적 접촉을 방지하는데 효과적이다. 게다가, 본 히드로겔 중의 스테로이드 입자의 트래핑은 관절내 스테로이드의 국소화된 농도를 최대화하는 한편, 그것의 전신 농도를 최소화하는데 효과적이다. 추가적으로, 본 히드로겔 조제물에서 스테로이드 입자의 포획은 관절의 조기 클리어런스로부터 스테로이드 입자를 보호하는데 효과적이다. 최종적으로, 히드로겔 중의 스테로이드를 포획함으로써, 스테로이드의 치료적 효능은 히드로겔 포획이 없이 달성된 것보다 더 낮은 총 용량으로 달성되는 한편, 원치않는 국소 및 전신 부작용을 최소화한다. 예를 들어, 시간에 걸쳐 제어 및 지연된 선형 방식으로 대표적인 히드로겔 조성물로부터 약물의 선형 방출을 증명하는 도 2, 3 및 4와 함께 실시예 14-16을 참조.

[0150] 생리활성 약제를 포함하는 히드로겔-계 조성물에 대해, 이러한 조성물은 그중에서도 퇴행성관절염, 부비강염, 알레르기 비염, 및 만성 부비동염과 같은 질환의 치료를 위한 전달 시스템으로서 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 또한 피부 충전제, 연골 결함/손상을 보수하기 위한 약제 및 뼈 보수 및/또는 성장을 향상시키기 위한 약제로서 사용될 수 있다.

[0151] 본 출원은 이제 특정 구체예와 함께 설명될 것이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 반대로, 본 출원은 특허청구범위의 범주 내에 포함되는 모든 대체물, 변형, 및 동등물을 포함한다. 따라서, 다음은 특정 구체예의 예시 목적을 위해 본 출원의 실행을 예시할 것이고, 본 과정 및 개념의 양태의 유용하고 용이하

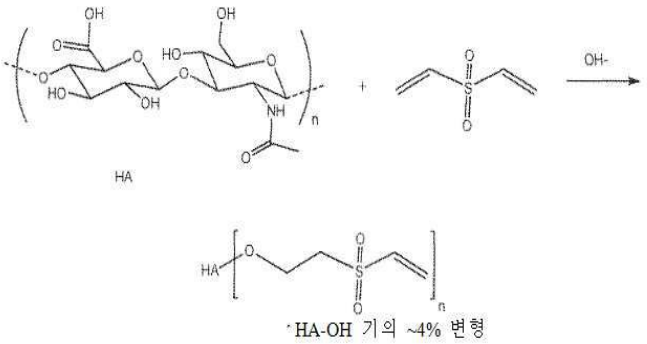
게 이해되는 설명이 되는 것으로 믿어지는 것을 제공할 것으로 나타난다.

[0152] **실시예**

[0153] 하기 실시예는 본원에서 제공되는 화합물, 조성물 및 방법이 만들어지고 평가되는 방법의 완전한 개시 및 설명과 함께 당업자에게 제공될 것으로 제안되며 순수하게 예시적으로 의도된다. 따라서, 예들은 발명자들이 본 발명으로서 간주하는 것의 범위를 제한하는 것으로 의도하는 방법이 아니다. 반응 조건의 수많은 변형 및 조합, 예를 들어 성분 농도, 원하는 용매, 용매 혼합물, 온도, 압력 및 순도, 수율 등과 같은 생성물 특징을 최적화하기 위해 사용될 수 있는 다른 반응 변수 및 조건이 있다. 이것도 마찬가지로 본 명세서의 범주 내에서 고려된다.

[0154] **실시예 1**

[0155] **비닐 술폰 유도체화된 히알루론산(HA-VS)의 합성-낮은 정도의 변형**




HA-OH 기의 ~4% 변형

[0156]

[0157] 5 g 히알루론산(HA) [ 9.4 x 10 cps (물 중에서 3%)]를 1L 둥근 바닥 플라스크에 칭량하였다. 500 mL 멸균 여과수를 HA에 첨가하였다. 플라스크를 20-100 rpm에서 회전하도록 설정된 회전 증발기에 두었다. 용액을 모든 HA가 용해될 때까지 회전시켰다(대략 16-18시간). HA 용액(10 mg/mL)을 이어서 1L 유리 비커에 옮겼다. 오버헤드 교반기와 접촉시킨 교반 패들을 용액에 삽입하였고 용액의 효율적인 교반을 보장하는 교반 속도로 설정하였다. 333 mL의 0.25 N NaOH 용액(249.8 mL 탈이온수에 첨가한 83.2 mL 1 N NaOH)을 교반 중인 HA용액에 첨가하였다. 1분 후, 150mL의 디비닐 술폰 용액(132 mL 탈아온수에 용해된 18 mL 디비닐 술폰)을 교반 용액에 빠르게 첨가하였다. 15초 후(디비닐 술폰 용액 첨가의 완료로부터 측정), 대략 14 mL 6N HCl을 빠르게 첨가하여 용액의 pH를 5 내지 6으로 조절하였다. 반응 용액을 이어서 접선 유동 여과(tangential flow filtration) 시스템(spectrapor system, cartridge P/N M6-100S-301-01P)을 사용하여 투석하였다. 총 부피는 본래 용액 부피의 11배였다. 일단 정제 단계가 완료되면, 용액을 대략 14-20 mg/mL로 농축하였다. 비닐 술폰관능화된 HA (HA-VS)를 TFF 시스템으로부터 제거하였고 플라스틱 용기에 넣은 다음 스크류 탑 Nd로 폐쇄하였다. HA-VS의 샘플을 제거하였고, -80℃에서 냉동시킨 후 동결건조하였다. 원하는 샘플을 $^{1}$H-NMR 분석으로 보냈다.

[0158] **HA-VS에 대한 비닐 술폰 치환 백분율의 결정**

[0159] 대략 15-17 mg의 원하는 샘플을 타르를 바른 2mL 튜브로 칭량하였다. 샘플을 1.5 mL $D_2O$ 중에서 원상태로 만들었다. 샘플을 NMR 튜브에 옮겼다. 샘플의 $^{1}$H-NMR (256 스캔)을 취하였고, 스펙트럼을 6.3-6.5 ppm (2 $CH_2$ = 비닐 술폰 잔기로부터의 양성자의 2개의 피크) 및 1.5 - 2.5 ppm (HA의 N-아세틸 기로부터 3 $CH_3$-양성자의 단일선)의 전체 영역에서 특이적인 피크로 인쇄하였다. 본 변형을 하기와 같이 계산하였다:

$$\% \text{ 변형} = 150 \times \frac{\text{전체 비닐 술폰 피크}}{\text{전체 아세트아미드 피크}}$$

[0160]

[0161] $^{1}$H-NMR 스펙트럼(도 1)은 히알루론산의 아세트아미드 메틸에 대한 전체 비닐 술폰 피크를 기준으로 HA가 대략 4%의 비닐 술폰 치환 수준을 가진다는 것을 나타내었다.

[0162] HA-VS의 샘플을 HA-VS 용액의 특이적 농도를 결정하는데 사용되는 건조 중량을 결정하기 위해 사용하였다. HA-

VS 농도는 18 mg/mL이었다.

[0163] **실시예 2**

[0164] **비닐 술폰 변형된 히알루론산(HA-VS)과 PEG3400-디티올로부터 제조된 겔의 합성**

[0165] 실시예 1에서 설명되는 바와 같이 제조된 HA-VS의 용액을 14 mg/mL의 농도로 탈이온수를 사용하여 희석하였다. 11 mL의 HA-VS 용액을 20mL 멸균 주사기에 넣었다. HA-VS 용액을 0.2 μm 멸균 주사기 필터를 통해 멸균 50 mL 원심분리 튜브로 여과하였다. 0.802 mL 탈이온수 중에서 40.1 mg PEG-$(SH)_2$를 용해시킴으로써 PEG-$(SH)_2$의 50 mg/mL 용액[Laysan Bio Inc, ltem# SH-PEG-SH-3400-1g]를 제조하였다. PEG-$(SH)_2$ 용액을 1 mL 멸균 주사기에 옮겼고 0.2 μm 멸균 주사기 필터를 통해 여과하였다. 10 mL의 멸균 여과된 HA-VS를 멸균 50 mL 원심분리 튜브에 옮겼다. 250 μL의 0.5 M 인산나트륨 용액(0.2 μm 멸균 주사기 필터를 통해 여과함)을 HA-VS 용액에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. 380 μL [19 mg PEG-$(SH)_2$]의 멸균 50mg/mL PEG-$(SH)_2$ 용액을 HA-VS 용액에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. 상기 단계를 바이오후드에서 수행하여 멸균 상태를 유지하였다. HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 용액을 이어서 적어도 16시간 동안 37℃ 인큐베이터에 두어서 겔 형성을 촉진하였다. 적어도 16시간 후, HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 용액을 가교결합하여 겔을 형성하였다. 겔화된 물질을 이어서 인큐베이터로부터 제거하였다.

[0166] **실시예 3**

[0167] **HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 제조 - 1회의 압출**

[0168] 실시예 2로부터 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔을 유리 막대를 사용하여 조각으로 물리적으로 부수었다. 겔을 주사기 캡으로 캡핑된 멸균 60mL 주사기로 옮겼다. 40 mL 0.9% 멸균 NaCl을 겔에 첨가하였다. 플런저를 주사기 배럴에 삽입하였고 주사기를 뒤집었다. 주사기 캡을 열어서 임의의 압력을 방출시킨 다음 폐쇄하였다. 주사기를 수회 뒤집어서 식염수와 겔 조각의 양호한 혼합을 보장하였다. 겔을 밤새(적어도 16시간) 팽창시켰다.

[0169] 23mm 직경 디스크의 폴리에스테르 메시(McMaster Carr, Cat # 9218T13, 메시 크기: 20.3 x 20.3, 정사각형/직사각형 크기: 0.0331", 미크론 등급: 840 미크론, 개방 영역의 백분율: 46, 실 직경: 0.0157")을 23mm 레더펀치를 사용하여 절단하였다. 디스크를 25 mm 주사기 필터 홀더(Cole Palmer, Cat # EW-29550-42)에 삽입하였고 필터 홀더를 폐쇄하였다. 메시를 함유한 필터 홀더를 고압멸균하였다. 주사기의 주사기 캡을 제거하였고 메시를 함유하는 주사기 필터를 주사기에 부착하였다. 겔을 메시를 통해서 멸균 50mL 원심분리 튜브로 압출하였다. 원심분리 튜브를 스크류 탑 리드로 캡핑하였다.

[0170] 결과 생성물은 약한 점성 슬러리의 입자이며, 입자들은 용이하게 침전되지는 않지만 전형적으로 현탁된 채로 남아있다. 상기 단계들을 바이오후드 내에서 수행하였다.

[0171] **실시예 4**

[0172] **HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 제조 - 2회 압출**

[0173] 실시예 2로부터 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔을 유리 막대를 사용하여 물리적으로 부수었다. 겔을 주사기 캡으로 캡핑한 멸균 60 mL 주사기에 옮겼고, 40 mL 0.9% 멸균 NaCl을 겔에 첨가하였다. 플런저를 주사기 배럴에 삽입하였고, 주사기를 뒤집었다. 주사기 캡을 열어서 임의의 압력을 방출시킨 다음 폐쇄하였다. 주사기를 수회 뒤집어서 식염수와 겔 조각의 양호한 혼합을 보장하였다. 겔을 밤새(적어도 16시간) 팽창시켰다.

[0174] 23mm 직경 디스크의 폴리에스테르 메시(McMaster Carr, Cat # 9218T13, 메시 크기: 20.3 x 20.3, 정사각형/직사각형 크기: 0.0331", 미크론 등급: 840 미크론, 개방 영역의 백분율: 46, 실 직경: 0.0157")를 23mm 레더펀치를 사용하여 절단하였다. 디스크를 25 mm 주사기 필터 홀더(Cole Palmer, Cat # EW-29550-42)에 삽입하였고 필터 홀더를 폐쇄하였다. 메시를 함유한 필터 홀더를 고압멸균하였다. 주사기의 주사기 캡을 제거하였고 메시를 함유하는 주사기 필터를 주사기에 부착하였다. 겔을 메시를 통해서 멸균 50mL 원심분리 튜브로 압출하였다. 그 다음에 압출한 겔을 멸균 60mL 주사기에 넣었고 메시를 함유한 주사기 필터를 주사기에 부착하였다. 겔을 메시를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 압출하였다. 원심분리 튜브를 스크류 탑 리드로 캡핑하였다. 상기 단계를 바이오후드 내에서 수행하였다.

[0175] **실시예 5**

[0176] **HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리로 장약한 주사기의 제조**

[0177] 5 mL의 제조한 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리(실시예 3 또는 실시예 4)를 적용된 주사기 캡이 있는 멸균 10mL 유리 주사기(B&D)에 옮겼다. 멸균 마개를 주사기의 상단에 삽입하였다. 플런저 막대를 마개에 나사로 조였다. 주사기를 뒤집었고, 일단 겔 슬러리를 마개에 도달시켰고, 주사기 캡을 약간 느슨하게 하였고, 플런저를 주사기 내 대부분의 공기가 제거될 때까지 압축하였다. 주사기 캡을 단단하게 조였다. 상기 단계를 바이오후드에서 수행하였다.

[0178] **실시예 6**

[0179] **비닐 술폰-유도체화된 히알루론산의 합성**

[0180] 다른 정도의 치환을 가지는 HA-VS 조성물을 반응 시간이 증가된 것을 제외하고, 실시예 1에서 설명되는 방법을 사용하여 제조하였다. 반응 시간을 증가시킴으로써, 비닐 술폰 치환의 더 큰 정도를 얻었다. 이 반응의 결과를 하기 표에 나타낸다:

*표 1*

[0181]

| 반응 시간 | VS변형된 HA에 대한 치환의 정도 |
|---|---|
| 15초 | 4% |
| 1분 | 8% |
| 3분 | 20% |
| 5분 | 26% |
| 25분 | 29% |

[0182] **실시예 7**

[0183] **HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔의 합성**

[0184] 다양한 수준의 비닐 술폰 치환을 가지는 HA-VS 샘플(실시예 6)을 실시예 2에서 설명한 방법 및 시약 비율을 사용하여 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔을 제조하기 위해 사용하였다. 각각의 출불 물질은 PEG-디티올과 반응 시 겔을 형성하였다.

[0185] **실시예 8**

[0186] **HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리와 히알루론산의 제조**

[0187] 2g 히알루론산[9.4 x 10 cps (물 중에서 3%)]을 250mL 둥근 바닥 플라스크로 칭량하였다. 100 mL 멸균 식염수를 플라스크 중의 히알루론산에 첨가하였다. 플라스크를 회전증발기(Buchi)에 부착하였고 적어도 16시간 동안 50rpm에서 회전시켜 2% 히알루론산 용액을 형성하였다. 다음의 일련의 단계를 바이오후드 중에서 수행하였다. 히알루론산 용액을 0.2 um 멸균 필터를 통해 여과하였다. HAVS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리(실시예 3 또는 4에서 제조한 바와 같음)를 사용하여, 일련의 조제물을 제조하였고, 이때 제조한 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리를 히알루론산과 혼합하였다. 이 조제물들을 제조하기 위해 사용한 히알루론산 용액 및 HA-VS/PEG$(SH)_2$ 겔 슬러리의 부피를 하기 표에 나타낸다:

*표 2*

[0188]

| 조제물 | 부피 히알루론산(ML) | 부피 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리(ML) |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 5(1회 압출 슬러리) |
| 2 | 2 | 4(1회 압출 슬러리) |
| 3 | 3 | 3(1회 압출 슬러리) |
| 4 | 4 | 2(1회 압출 슬러리) |
| 5 | 5 | 1(1회 압출 슬러리) |
| 6 | 1 | 5(2회 압출 슬러리) |
| 7 | 2 | 4(2회 압출 슬러리) |
| 8 | 3 | 3(2회 압출 슬러리) |
| 9 | 4 | 2(2회 압출 슬러리) |

| | | |
|---|---|---|
| 10 | 5 | 1(2회 압출 슬러리) |

[0189] 상기 표에서 확인되는 바와 같이 히알루론산 용액 및 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 표시된 부피를 15mL 멸균 원심분리 튜브에 첨가하였다. 캡을 튜브에 두었고, 튜브를 성분들이 잘 혼합될 때까지 앞뒤로 뒤집었다. 각 조제물을 이어서 주사기 캡이 있는 10mL 유리 주사기에 옮겼고, 플런저를 삽입하였고 과량의 공기를 배출하였다. 주사기 캡을 이어서 단단하게 조였다.

[0190] **실시예 9**

[0191] **HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔 함유 트리암시놀론 아세토니드의 합성**

[0192] 실시예 1에서 제조한 HA-VS의 용액을 탈이온수를 사용하여 14 mg/mL의 농도로 희석하였다. 11 mL HA-VS 용액을 20mL 멸균 주사기에 넣었다. HA-VS 용액을 0.2um 멸균 주사기 필터를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 여과하였다. PEG-$(SH)_2$의 50 mg/mL 용액을 0.802 mL 탈이온수 중에 40.1 mg PEG3400-$(SH)_2$를 용해하여 제조하였다. PEG-$(SH)_2$ 용액을 1mL 멸균 주사기에 옮겼고, 0.2 um 멸균 주사기 필터를 통해 여과하였다. 10 mL의 멸균 여과된 HA-VS를 멸균 50mL 원심분리 튜브에 옮겼다. 100 mg의 트리암시놀론 아세토니드 (Spectrum Chemicals, U.S. P grade, micronized)를 HAVS 용액에 첨가하였다. 원심분리 튜브의 캡을 튜브에 두었고, 트리암시놀론 아세토니드가 HA-VS와 균질하게 혼합될 때까지 용액을 앞뒤로 뒤집었다. 250 μL의 멸균 여과된(0.2 um 멸균 필터) 0.5 M 인산나트륨 용액을 HA-VS 용액에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. 380 μL의 멸균 50mg/mL PEG-$(SH)_2$ 용액을 HA-VS 용액에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. 상기 단계들을 바이오후드 내에서 수행하였다. HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 용액을 이어서 37℃ 인큐베이터에 적어도 16시간 동안 두었다. 이 단계에서 HA-VS/PEG$(SH)_2$ 용액을 가교결합하여 겔을 형성하였다. 이어서 겔화된 물질을 인큐베이터로부터 제거하였다. 결과의 겔은 대략 0.2% 트리암시놀론 아세토니드를 함유한다.

[0193] 상기 처리를 또한 20 mg의 트리암시놀론 아세토니드 (Spectrum Chemicals, U.S.P grade, micronized)를 HA-VS 용액에 첨가한 것을 제외하고 상기 설명한 바와 같이 수행하였다.

[0194] **실시예 10**

[0195] **트리암시놀론 아세토니드를 함유하는 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 제조: 1회 압출**

[0196] 트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS / PEG-$(SH)_2$ 겔(실시예 9)을 유리 막대를 사용하여 조각으로 물리적으로 부수었다. 겔을 주사기 캡으로 캡핑한 멸균 60mL 주사기에 옮겼다. 40 mL 0.9% 멸균 NaCl을 겔에 첨가하였다. 플런저를 주사기 배럴에 삽입하였고 주사기를 뒤집었다. 주사기 캡을 열어서 임의의 압력을 방출시킨 다음 폐쇄하였다. 주사기를 수회 뒤집어서 식염수와 겔 조각의 양호한 혼합을 보장하였다. 겔을 밤새(적어도 16시간) 팽창시켰다.

[0197] 23mm 직경 디스크의 폴리에스테르 메시(McMaster Carr, Cat # 9218T13, 메시 크기: 20.3 x 20.3, 정사각형/직사각형 크기: 0.0331", 미크론 등급: 840 미크론, 개방 영역의 백분율: 46, 실 직경: 0.0157")를 23mm 레더펀치를 사용하여 절단하였다. 디스크를 25 mm 주사기 필터 홀더(Cole Palmer, Cat # EW-29550-42)에 삽입하였고 필터 홀더를 폐쇄하였다. 메시를 함유한 필터 홀더를 고압멸균하였다. 주사기의 주사기 캡을 제거하였고 메시를 함유하는 주사기 필터를 주사기에 부착하였다. 겔을 메시를 통해서 멸균 50mL 원심분리 튜브로 압출하였다. 그 다음에 압출한 겔을 멸균 60mL 주사기에 넣었고 메시를 함유한 주사기 필터를 주사기에 부착하였다. 겔을 메시를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 압출하였다. 원심분리 튜브를 스크류 탑 리드로 캡핑하였다. 상기 단계를 바이오후드 내에서 수행하였다.

[0198] **실시예 11**

[0199] **트리암시놀론 아세토니드을 함유하는 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 제조: 2회 압출**

[0200] 트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS / PEG-$(SH)_2$ 겔(실시예 9)을 유리 막대를 사용하여 조각으로 물리적으로 부수었다. 겔을 주사기 캡으로 캡핑한 멸균 60mL 주사기에 옮겼다. 40 mL 0.9% 멸균 NaCl을 겔에 첨가하였다. 플런저를 주사기 배럴에 삽입하였고 주사기를 뒤집었다. 주사기 캡을 열어서 임의의 압력을 방출시킨 다음 폐쇄하였다. 주사기를 수회 뒤집어서 식염수와 겔 조각의 양호한 혼합을 보장하였다. 겔을 밤새(적어도 16시간) 팽

창시켰다.

[0201] 23mm 직경 디스크의 폴리에스테르 메시(McMaster Carr, Cat # 9218T13, 메시 크기: 20.3 x 20.3, 정사각형/직사각형 크기: 0.0331", 미크론 등급: 840 미크론, 개방 영역의 백분율: 46, 실 직경: 0.0157")를 23mm 레더펀치를 사용하여 절단하였다. 디스크를 25 mm 주사기 필터 홀더(Cole Palmer, Cat # EW-29550-42)에 삽입하였고 필터 홀더를 폐쇄하였다. 메시를 함유한 필터 홀더를 고압멸균하였다. 주사기의 주사기 캡을 제거하였고 메시를 함유하는 주사기 필터를 주사기에 부착하였다. 겔을 메시를 통해서 멸균 50mL 원심분리 튜브로 압출하였다. 그 다음에 압출한 겔을 멸균 60mL 주사기에 넣었고 메시를 함유한 주사기 필터를 주사기에 부착하였다. 겔을 메시를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 압출하였다. 원심분리 튜브를 스크류 탑 리드로 캡핑하였다. 상기 단계를 바이오후드 내에서 수행하였다.

[0202] **실시예 12**

[0203] **트리암시놀론 아세토니드 겔 슬러리를 함유하는 주사기의 제조**

[0204] 5 mL의 제조한 트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS/PEG(SH)$_2$ 겔 슬러리 (실시예 10 또는 실시예 11)를 적용된 주사기 캡을 가지는 멸균 10mL 유리 주사기(B&D)에 옮겼다. 멸균 마개를 주사기의 상단에 삽입하였다. 플런저 막대를 마개에 나사로 조였다. 주사기를 뒤집었고, 일단 겔 슬러리를 마개에 도달시켰고, 주사기 캡을 약간 느슨하게 하였고, 플런저를 주사기 내 대부분의 공기가 제거될 때까지 압축하였다. 주사기 캡을 단단하게 조였다. 상기 단계를 바이오후드에서 수행하였다.

[0205] **실시예 13**

[0206] **히알루론산과 함께 HA-VS/PEG-(SH)$_2$ 겔 슬러리를 함유하는 트리암시놀론 아세토니드의 제조**

[0207] 2g 히알루론산[ 9.4 x $10^4$ cps (물 중에서 3%)]을 250mL 둥근 바닥 플라스크로 칭량하였다. 100 mL 멸균 식염수를 플라스크 중의 히알루론산에 첨가하였다. 플라스크를 회전증발기(Buchi)에 부착하였고 적어도 16시간 동안 50rpm에서 회전시켜 2% 히알루론산 용액을 형성하였다. 트리암시놀론 아세토니드를 함유하는 HAVS/PEG-(SH)$_2$ 겔 슬러리(실시예 10 또는 11에서 제조한 바와 같음)를 사용하여, 일련의 조제물을 제조하였고, 이때 HA-VS/PEG-(SH)$_2$ 겔 슬러리를 함유하는 트리암시놀론 아세토니드를 히알루론산과 혼합하였다. 이 조제물들을 제조하기 위해 사용한 히알루론산 용액과 트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS/PEG(SH)$_2$ 겔 슬러리의 부피를 하기 표에 나타낸다:

*표 3*

[0208]

| 조제물 | 부피<br>히알루론산 (ML) | 부피<br>트리암시놀론 아세토니드 함유 HA-VS/PEG-(SH)$_2$ 겔 슬러리(ML) |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 5(1회 압출 슬러리) |
| 2 | 2 | 4(1회 압출 슬러리) |
| 3 | 3 | 3(1회 압출 슬러리) |
| 4 | 4 | 2(1회 압출 슬러리) |
| 5 | 5 | 1(1회 압출 슬러리) |
| 6 | 1 | 5(2회 압출 슬러리) |
| 7 | 2 | 4(2회 압출 슬러리) |
| 8 | 3 | 3(2회 압출 슬러리) |
| 9 | 4 | 2(2회 압출 슬러리) |
| 10 | 5 | 1(2회 압출 슬러리) |

[0209] 상기 표에서 확인되는 바와 같이 히알루론산 용액 및 트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS/PEG-(SH)$_2$ 겔 슬러리의 표시된 부피를 15mL 멸균 원심분리 튜브에 첨가하였다. 캡을 튜브에 두었고, 튜브를 성분들이 잘 혼합될 때까지 앞뒤로 뒤집었다. 각 조제물을 이어서 주사기 캡이 있는 10mL 유리 주사기에 옮겼고, 플런저를 삽입하였고 과량의 공기를 배출하였다. 주사기 캡을 이어서 단단하게 조였다. 상기 단계들을 바이오후드에서 수행하였다.

[0210] **실시예 14**

[0211] **트리암시놀론 아세토니드의 방출 연구를 위한 샘플의 제조**

[0212] 1.5 mL의 트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔(실시예 11에 따라서 제조됨)을 20mL 유리 신틸레이션 바이알에 옮겼다. 15 mL PBS (pH 7.4)를 겔화된 재료를 함유하는 신틸레이션 바이알에 피펫팅하였다. 신틸레이션 바이알을 스크류 리드로 닫았고, 바이알을 37℃ 오븐에서 락킹 진탕기 상에 두었다(Barnstead International, Model M26125).

[0213] **실시예 15**

[0214] **방출 연구 완충제의 샘플링**

[0215] 다양한 시점에, 트리암시놀론 아세토니드-장약된 겔 및 PBS 완충제를 함유한 신틸레이션 바이알(실시예 14에서 설명)을 37℃ 오븐에서 제거하였다. 잔여 겔 슬러리를 신틸레이션 바이알의 바닥에 두었다. 스크류 리드를 제거하였고 13mL의 PBS 완충제를 혈청학적 피펫을 사용하여 제거하였고, 50mL 플라스틱 원심분리 튜브에 옮겼다. 13 ml 신선한 PBS (pH 7.4)를 이어서 겔-함유 신틸레이션 바이알에 피펫팅하였다.

[0216] **실시예 16**

[0217] **트리암시놀론 아세토니드 함유 방출 배지의 HPLC 분석**

[0218] 13 mL 완충제 샘플(실시예 15)을 80:20 MeOH:H2O으로 40mL로 희석하였다. 샘플을 교반하였고 대략 1mL를 HPLC 바이알에 옮겼다. 완충제 샘플의 트리암시놀론 아세토니드 함량을 다음의 크로마토그래피 조건을 사용하여 결정하였다.

[0219] HPLC: Agilent 1100 시리즈

[0220] 컬럼: Zorbax SB-C18, 5 μ, 4.6 x 160mm

[0221] 컬럼 온도: 30℃

[0222] 유속: 1.0 mL/분

[0223] 검출: 239 nm에서 UV

[0224] 실행 시간: 8분

[0225] 주사 부피: 50 μl

[0226] 이동상: ACN 중의 0.05%TFA : $H_2O$ 중의 0.05%TFA, 56:44

[0227] TA의 체류 시간: ~ 3.3분

[0228] 완충제 샘플 중에서 트리암시놀론 아세토니드의 양을 교정 곡선을 통해 피크 영역 대 트리암시놀론 아세토니드 농도의 상관 관계를 나타냄으로써 정량화하였다. 트리암시놀론 아세토니드 교정 곡선을 위한 샘플을 메탄올 중에서 트리암시놀론 아세토니드의 저장 용액을 취함으로써 제조한 다음, ACN 중의 0.05% TFA : $H_2O$ 중의 0.05% TFA, 56:44로 저장 용액을 연속적으로 희석하였다. 이 샘플을 상기 크로마토그래피 조건을 사용하여 분석하였고, 얻은 피크 영역을 트리암시놀론 아세토니드 농도에 대해 플롯팅하였다. 방출 백분율을 도 2에서 예시하며; 방출된 누적 질량을 도 3에 나타내고; 샘플링 시점 당 방출량을 도 4에서 나타낸다.

[0229] 샘플을 매 24시간 월요일-금요일로 도시하였고; 샘플링을 토요일/일요일에는 수행하지 않았다.

[0230] *표 4*

| 샘플링 No. | 샘플링 시간(일) |
|---|---|
| 1 | 1 |
| 2 | 2 |
| 3 | 3 |
| 4 | 7 |
| 5 | 8 |
| 6 | 9 |
| 7 | 10 |
| 8 | 11 |

| | |
|---|---|
| 9 | 14 |
| 10 | 15 |

[0231] 도 2에서 나타내는 바와 같이, 본질적으로 모든 약물을 샘플링 시점 12로써 방출하였다. 약물을 시간에 따른 선형 방식, 및 제어된 방식으로 방출하였다. 유리하게는, 본질적으로 상당한 양의 겔 내에 포획된 남아있는 약물을 가지기 보다는 모든 약물을 방출하였다. 게다가 초기 버스트 방식으로 약물을 방출하기 보다는, 약물을 느린 및 지연된 방식으로 방출하였다. 도 3은 유사하게 샘플링 시점에 걸쳐 밀리그램으로 약물의 누적 방출을 예시한다. 도 4에서 예시하는 바와 같이, 겔로부터 방출된 약물의 양은 샘플링 시점 사이에 본질적으로 일정하며, 시간에 걸쳐 제어된 및 지연된 방식으로 약물의 선형 방출을 나타낸다.

[0232] **실시예 17**

[0233] **대표적인 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 관절내 주사**

[0234] HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 샘플(실시예 5에서와 같이 제조)을 추가적인 시험 재료 2-4에 따라서 골격적으로 성숙한 암컷 염소의 슬관절(무릎)에 관절내로 주사하여 기준 시점을 제공하였다. 또한 사용된 염소 모델에 관련된 추가적인 설명을 위해 D. Jackson and T. Simon, Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 14, Issue 12, p. 1248-125를 참조.

[0235] 시험 재료 1 : HA-VS / PEG-$(SH)_2$ 겔(실시예 5)

[0236] 시험 재료 2: 비스티올 가교결합제로 가교결합된 PEG 디아크릴레이트

[0237] 시험 재료 3: 겔을 형성하도록 가교결합된 4-암 리신 관능화된 PEG

[0238] 시험 재료 4: PEG 디아크릴레이트로 만들어진 겔(재료를 고압멸균하였다)

[0239] 시험 재료 2-4의 제조에 대해 실시예 31-33 참조. 모든 주사를 엄격한 무균상태 하에서 수행하였다. 동물을 디아제팜(0.1-0.5 mg/kg) 및 케타민 (4.4 - 7.5 mg/kg)의 정맥내 주사로 마취시켰다. 각각의 무릎을 전위, 움직임의 범위, 부종, 온도, 염발음, 슬개골 주행 및 외반족/내반슬 이상에 대해 신체적으로 시험하였다.

[0240] 모든 주사를 통상적인 무균 기술을 이용하여 수행하였다. 좌측 및 우측 슬관절을 영역을 클리핑함으로써 주사용으로 제조한 다음, 클로로헥시딘 스크럽으로 그것들을 깨끗하게 하였다. 동물을 앙와위(dorsal recumbency)로 둔다. 우측 슬관절을 클로로헥시딘 스크럽으로 깨끗하게 하였고, 대안으로 70% 이소프로필 알코올로 3회 깨끗하게 하고 요오드 용액을 발랐다.

[0241] 표준 기술을 각 슬관절에 주사하기 위해 사용하였다. 2-인치 21게이지 크기의 멸균 바늘을 전내측(anteromedial) 접근을 통해 관절내 공간에 도입하였다. 내측 대퇴상과의 후방 과간절흔(intercondylar notch) 벽을 더듬었고, 바늘을 약간 뒤로 빼었다. 1.5 ml의 HA-VS/PEG$(SH)_2$ 겔 슬러리를 우측 관절에 주사하였다. 주사 바늘을 제거하였고, 압력을 주사 부위에서 유지하였다. 이어서 주사한 슬관절을 전체 움직임의 범위를 통해 20회 순환시켰다.

[0242] 고통 및 불편함의 징후를 나타내는 임의의 동물에 대해 주사 후 확인을 하였고, 필요하다면 추가적인 마취를 하였다. 모든 처리를 적절한 연구 문서로 기록하였다.

[0243] 주사개시 후 24 + 1 시간에 일반적 마취의 유발을 위해 디아제팜 0.22 mg/kg 및 케타민 10 mg/kg으로 구성되는 정맥내 주사로 주사한 동물을 인간적으로 희생시켰다. 이것 다음에, 마취시킨 동물을 심박정지가 확인될 때까지 IV 과용량의 진한 염화칼륨(KCl)을 제공하였다.

[0244] 무릎 관절의 수집 후, 관절을 개방하였고 주사한 멸균 관절의 표 5에서 설명한 총 평가를 수행하였다. 광기록을 만들지 않았다.

*표 5*

[0245]

| **총 평가 및 샘플 수집** | | | |
|---|---|---|---|
| **샘플** | **총 평가** | **샘플 수집** | **스코어** |
| 윤활액(좌측 및 우측) | X | X | X |
| 좌측 및 우측 무릎 관절 | X | | X |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 좌측 및 우측 활막 | X | | X |

[0246] 추가적으로 표 6에서 약술되는 바와 같이 1회 관찰자로써 관절의 반-정량적 등급을 수행하였다.

표 6

[0247]

| 총 관절 평가 등급 규모 | | | |
|---|---|---|---|
| 스코어 | 착색 | 충혈 | 부종 |
| 0 | 정상 | 없음 | 없음 |
| 1 | 약간 황색 | 약간 | 약간 |
| 2 | 황색 | 보통 | 보통 |
| 3 | | 현저함 | 현저함 |

[0248] 전체 관절 총 평가 스코어는 착색, 충혈, 및 부종 스코어의 합이었다(0-8 점). 도 6을 참조.

[0249] 개방된 관절로부터 윤활액의 수집 후, 총 부피를 기록하였다. 유액을 점성도, 투명도 및 색상에 대해 전체적으로 평가하였고 반정량적으로 표 7과 같이 등급화 하였다. 혈구계산기로, 총 백색 세포 계측을 행하였다. 추가적으로 윤활액 스미어(smear) 분화 현미경 분석을 위해 만들었다. 남은 윤활액을 -80℃에서 개별적으로 라벨이 붙은 냉동용기 중에서 냉동보존하였다. 윤활액 스미어를 잠재적인 미래의 분석을 위해 남겼다.

표 7

[0250]

| 활액 유체에 대한 설명 및 스코어 | | | |
|---|---|---|---|
| 스코어 | 색상 | 투명도 | 조건 |
| 0 | S=담황색 | C=투명 | N=정상 |
| 1 | P=분홍색 | H=흐림 | A=이상 |
| 2 | Y=황색/R=적색 | D=뿌염 | W=물기 |
| 3 | B=혈색 | T=탁함 | |

[0251] 전체 활액 유체 스코어는 색상, 투명도 및 조건 스코어의 합이었다(0-8점).

[0252] 결과를 도 5-8에서 그래프 방식으로 제공한다. 도 5에서 보이는 바와 같이, 본원에서 설명되는 특징을 가지는 대표적인 겔은 시험 재료 2-4에 대해 관찰한 것보다 상당히 더 낮은 윤활액 백혈구 수를 증명하였다. 게다가, 시험 재료 2-4에 대한 백혈구 수는 시험 재료 1에 대해 관찰한 것보다 5배, 9배 및 8배 더 컸다. 시험 재료 2-4가 약제학적 사용을 위한 그것의 적합함을 나타내는 시험관내 거동(예를 들어, 화학적, 겔 특성, 투여의 용이함 등)을 나타내는 반면, 이 결과들은 겉보기에 비교가능한 시험 재료와 비교하여 염소 모델에서 시험될 때 상당히 낮은 염증유발 특성을 가진다는 점에서 시험 재료 1 및 그것과 유사한 재료의 분명한 우수성을 예시한다. 놀랍게도, 모든 다른 지표들은 비스코보충제 및 다른 관련된 사용을 위한 다른 시험 재료의 적합성을 가리켰다.

[0253] 주사한 염소 관절에 대해 완전 윤활액 백혈구 수(완전 = 총 부피 x 윤활액 백혈구 수)를 증명하는 도 6은 추가로 상기를 지지한다. 즉, 대표적인 시험 재료 1은 완전 윤활액 백혈구 수를 기준으로 시험 재료 2-4보다 염소 모델에서 두드러지게 더 낮은 염증 반응을 증명한다. 시험 재료 2-4에 대한 값은 시험 재료 1보다 대략 4-배, 12-배 및 9-배 이상이며 - 염소 무릎에서 평가될 때 시험 재료 1의 놀랍고 주목할 만한 우수성을 나타낸다.

[0254] 도 7은 주사한 염소 무릎에 대해 윤활액 백혈구 분화 분포(그룹에 대한 평균) 대 실시예 17에서 설명한 바와 같이 1.5ml 주사 후 24시간에 평가한 시험 재료 처리군의 그래프 표시이다.

[0255] 각 시험 재료에 대해 다형핵 백혈구 (PMN), 림프구, 단핵구 및 호산구(Eos)의 분포를 나타낸다. PMN 및 Eos는 다양한 급성 및 만성 염증에서 중요한 세포 참가자이다. 시험 재료 1에 대한 PMN(림프구, 단핵구 및 호산구에 대해)의 백분율은 다른 시험 재료(시험 재료 2-4에 대해 50% 내지 70% 및 그 이상)- 또한 다른 시험 재료과 비교하여 대표적인 시험 재료 1의 유리하게 낮은 염증 유발 특성의 추가적인 지표에 대해서보다 상당히 더 낮았다.

[0256] 최종적으로, 도 8은 각각의 대표적인 시험 재료에 대해 주사한 염소 무릎에 대해서 윤활액, 조직 관절, 및 합한 윤활액에 대한 평균 총 스코어 및 조직 관절 스코어(표 6)를 예시한다.

[0257] 총 전체 스코어 = 윤활액 스코어 + 전체 관절 스코어.

[0258] 윤활액 또는 전체 관절 스코어에 대한 최대 스코어는 8이며, 0이 정상이고;

[0259] 총 전체 스코어에 대한 최대 스코어는 16이며 0이 정상이다.

[0260] 도 8에서 예시되는 바와 같이, 현저한 결과가 시험 재료 1에 대해 나타난다. 모든 스코어에 대해, 상기 설명한 바와 같은 시각적 점검에 의해 결정하였고, 시험 재료 1은 윤활액, 관절 조직 및 정상 또는 거의 정상이 되는 것으로 생각되는 조합과 본질적으로 염증유발 반응을 일으키지 않는 것으로 보였다. 대조적으로, 대표적인 시험 재료 2-4는 비-정상적인 윤활액과 관절 둘 다에서 시각적 특징을 초래하였고, 시험 재료의 투여로부터 초래되는 무릎 관절에서 염증을 나타내었다. 이 결과들은 생체 내 치료 용도에 대한 적합성의 면에서, 예시적인 시험 재료 1의 놀랍고 유리한 특성을 증명한다.

[0261] **실시예 18**

[0262] **HA-VS/PEG-$(SH)_4$ 겔의 합성**

[0263] 실시예 1에서 제조한 HA-VS의 용액을 12.6 mg/mL의 농도로 탈이온수를 사용하여 희석하였다. 18 mL HA-VS 용액을 20mL 멸균 주사기에 넣는다. HA-VS 용액을 0.2um 멸균 주사기를 통해 멸균 50 mL 원심분리 튜브로 여과한다. 200mg PEG$(SH)_4$, C$(CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2SH)_4$, [Laysan Bio Inc, Mw 10,000, Item# 4암PEG-SH-1 OkD-Ig] (e-beamed)를 1M 식염수 중에서 멸균 여과된 2 mL 0.17M 인산나트륨에 첨가한다(pH7.4). 일단 용해되면, PEG-$(SH)_4$ 용액을 HA-VS 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. HA-VS/PEG-$(SH)_4$ 용액을 이어서 실온에서 겔화하였다. 겔화된 재료를 실시예 3 및 4에서 설명한 것과 유사한 방식으로 겔 슬러리로 전환할 수 있다. 겔을 실시예 9, 10 및 11에서 설명한 것과 유사한 방식을 사용하여 트리암시놀론 아세토니드의 존재하에 제조할 수 있다. 히알루론산을 실시예 8에서 설명한 것과 유사한 과정으로 겔 형성을 위해 첨가할 수 있다.

[0264] 히알루론산을 실시예 13에서 설명한 것과 유사한 방식으로 트리암시놀론 아세토니드 겔 조제물에 첨가할 수 있다.

[0265] **실시예 19**

[0266] **카르복시메틸-히알루론산의 합성(CM-HA 또는 CARBYLAN™)**

[0267] 수성 NaOH 용액(200 ml, 45% w/v)을 500 mL 비커에 첨가하였고, 주변 온도에서 교반하였다(자기 교반기). 히알루론산 분말(20 g)[Novozymes, MW 0.8-1.0 million]을 500-ml 비커에 첨가하였다. 2시간 동안 방치한 후, 히알루론산 혼합물을 1,500 ml 이소프로판올 및 테플론-코팅된 자기 교반바가 있는 4L 비커에 옮긴 다음, 500 ml 이소프로판올 중에서 20 g의 클로로아세트산의 용액을 자기 교반하면서 첨가하였다. 주변 온도에서 1시간 동안 교반한 후, 교반을 중단하였고, 재료를 대략 10-20분 동안 두었다. 가능하다면 다량의 상청액을 혼합물로부터 흡입하였다. 1,000 ml의 증류수를 결과 혼합물에 첨가하였다. 일단 용해되면, 용액 pH를 6.0 N HCl을 첨가함으로써 대략 pH 7.0까지 조절하였다. 이후에 용액을 DI 수를 사용하여 2L로 만들었다. 용액을 교환 완충제로서 10L DI 수를 사용하여 접선 유동 여과(TFF)에 의해 정제하였다.

[0268] 추가적으로, 구조, 합성 및 카르복시메틸 히알루론산의 특징을 International Patent Publication No. 2005/056608 (도 5 및 실시예 3)에서 설명하였고, 그것의 관련 부분은 그것의 전체가 참고로써 본원에 포함된다.

[0269] **실시예 20**

[0270] **카르복시메틸-히알루론산-디티오비스(프로파논 디히드라지드(CM-HA-DTPH 또는 CARBYLAN™-S)의 합성**

[0271] 3,3'-디티오비스(프로파논 디히드라지드) (DTP)를 앞서 설명한 바와 같이 합성하였다. (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) 8:686-694; Shu, X. Z.; Liu, Y.; Luo, Y.; Roberts, M. C; Prestwich, G. D. "Disulfide crosslinked hyaluronan hydrogels." Biomacromolecules (2002) 3:1304-1311). DTP (16.7 g, 0.07 mol)를 상기 제조한 Carbylan™ 용액에 첨가하였고, 용액 pH를 HCl 또는 NaOH 용액 중 하나로 4.75로 조절하였다. 이어서, 0.384g 1-에틸-3[3-(디메틸아미노)프로필]카르보디이미드 (EDC) [Sigma-Aldrich]를 첨가하였고, 실온에서 연속적으로 자기 교반하면서 용액 pH를

6.0 N HCl을 첨가함으로써 4.75의 pH로 유지하였다.

[0272] 4시간 후, 50 g의 디티오트레이톨(DTT) [Biovectra]을 첨가하였고, 용액 pH를 진한 NaOH 용액을 첨가하으로써 8.5로 조절하였다. 이어서 실온에서 자기 교반하에 12-24시간 후, 반응 혼합물의 pH를 6.0 N HCl의 첨가에 의해 pH 3.0으로 조절하였다. 산성화된 용액을 정제하였고 20L 1 mM HC1, pH 3.0을 사용하여 접선 유동 여과(TFF)를 사용하여 정제하고 농축하였다. 용액을 이어서 대략 1L로 농축하였다.

[0273] 카그복시메틸-히알루론산-디티오비스(프로파논 디히드라지드)의 구조, 합성 및 특징화는 국제특허 공개 No. 2005/056608 (도 5 및 실시예 4)에서 설명됨)에서 설명되며, 이것의 관련 부분은 전체가 참고로써 포함된다.

[0274] **실시예 21**

[0275] **CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 겔의 합성**

[0276] 실시예 20에서 제조되는 CM-HA-DTPH1의 용액을 탈이온수를 사용하여 17.5 mg/mL의 농도로 희석하였다. 30 mL CM-HA-DTPH 용액을 60mL 멸균 주사기에 넣었다. CM-HA-DTPH 용액을 0.2um 멸균 주사기 필터를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 여과하였다. 40 mg/mL 용액의 PEG-(아크릴레이트)$_2$ [Laysan Bio Inc. MW 3400, ltem# ACRL-PEG-ACRL3400-1g]를 15 mL 0.2M 인산나트륨 완충제(pH 7.4) 중에서 600 mg PEG-(아크릴레이트)$_2$를 용해함으로써 제조하였다. PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 20mL 멸균 주사기로 옮기고 0.2 um 멸균 주사기 필터를 통해 여과한다. 20 mL의 멸균 여과된 CM-HADTPH를 멸균 50 mL 원심분리 튜브에 옮긴다. 10 mL의 PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 CM-HADTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 이어서 실온에서 겔화하였다.

[0277] **실시예 22**

[0278] **CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 겔 슬러리**

[0279] CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$겔(실시예 21에서 제조)을 각각 실시예 3 및 4에서 설명한 것과 유사한 과정을 사용하여 겔 슬러리로 전환한다.

[0280] **실시예 23**

[0281] **트리암시놀론 아세토니드-함유 CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 겔**

[0282] 실시예 20에서 제조한 바와 같이 CM-HA-DTPH의 용액을 14 mg/mL의 농도로 탈이온수를 사용하여 희석한다. 11 mL CM-HA-DTPH 용액을 20mL 멸균 주사기에 둔다. CM-HA-DTPH 용액을 멸균 50mL 원심분리 튜브에 0.2um 멸균 주사기 필터를 통해 여과한다. 50 mg/mL 용액의 PEG-(아크릴레이트)$_2$ [Laysan Bio Inc, MW 3400, ltem# ACRL-PEG-ACRL-3400-1g]를 0.802 mL 탈이온수 중에서 40.1 mg PEG-(아크릴레이트)$_2$를 용해함으로써 제조한다. PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 1mL 멸균 주사기에 옮기고, 0.2 um 멸균 주사기 필터를 통해 여과한다. 10 mL의 멸균 여과된 CM-HA-DTPH를 멸균 50mL 원심분리 튜브에 옮긴다. 20mg의 트리암시놀론 아세토니드 (Spectrum Chemicals, U. S. P grade, micronized)를 CM-HA-DTPH 용액에 첨가하였다. 원심분리 튜브의 캡을 튜브에 두었고, 용액을 트리암시놀론 아세토니드가 CM-HA-DTPH와 균질하게 혼합될 때까지 앞뒤로 뒤집었다. 250 μL의 0.5 M 인산나트륨 용액을 CM-HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. 380 μL [19 mg PEG-(아크릴레이트)$_2$]의 멸균 50mg/mL PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 CM-HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. 트리암시놀론 아세토니드를 함유한 CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 적어도 16시간 동안 37℃ 인큐베이터 중에 둔다. 이 단계에서, 트리암시놀론 아세토니드를 함유한 CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 가교결합하여 겔을 형성한다. 이어서 겔화된 재료를 인큐베이터로부터 제거한다.

[0283] 겔의 합성을 각각 33mg, 50mg, 75mg, 100mg, 125mg, 150mg, 175 mg, 200mg, 225mg, 250mg, 375 mg, 400 mg 및 500 mg 트리암시놀론 아세토니드를 사용하여 반복한다.

[0284] 겔을 실시예 3 및 4에서 설명한 유사한 과정을 사용하여 겔 슬러리로 전환하였다.

[0285] **실시예 24**

[0286] **트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 합성**

[0287] 트리암시놀론 아세토니드-함유 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔을 각각 33mg, 50mg, 75mg, 100mg, 125mg, 150mg, 175 mg, 200mg, 225mg, 250mg, 375 mg, 400 mg 및 500 mg 트리암시놀론 아세토니드을 각 겔을 제조하는데 사용한 점을 제외하고 실시예 9에서 설명한 것과 유사한 과정을 사용하여 제조한다.

[0288] 겔을 실시예 3 및 4에서 설명한 유사한 과정을 사용하여 겔 슬러리로 전환하였다.

[0289] **실시예 25**

[0290] **CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_4$ 겔의 합성**

[0291] 실시예 20에서 제조한 CM-HA-DTPH의 용액을 탈이온수를 사용하여 14 mg/mL의 농도로 희석한다. 11 mL CM-HA-DTPH 용액을 20mL 멸균 주사기에 둔다. CM-HA-DTPH 용액을 0.2um 멸균 필터를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 여과한다. 50 mg/mL 용액의 PEG-(아크릴레이트)$_4$ [Laysan Bio Inc, Mw 10,000, Item# 4arm-PEG-ACRL10K-1g]를 0.802 mL 탈이온수 중에서 40.1 mg PEG-(아크릴레이트)$_4$를 용해함으로써 제조하였다. PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 1mL 멸균 주사기로 옮기고, 0.2um 멸균 주사기 필터를 통해 여과하였다. 10 mL의 멸균 여과된 CM-HADTPH를 멸균 50mL 원심분리 튜브로 옮겼다. 250 μL의 0.5 M 인산나트륨 용액을 CM-HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. 560 μL [28 mg PEG-(아크릴레이트)4]의 멸균 50mg/mL PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 CM-HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 이어서 37℃ 인큐베이터에서 적어도 16시간 동안 둔다. 이 단계에서, CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 가교결합하여 겔을 형성한다. 겔화된 재료를 이어서 인큐베이터로부터 제거한다. 겔화된 재료를 실시예 3 및 4에서 설명한 것과 유사한 방식으로 겔 슬러리로 전환할 수 있다. 겔을 실시예 9, 10 및 11에서 설명한 유사한 과정을 사용하여 트리암시놀론 아세토니드의 존재 중에서 제조할 수 있다. 히알루론산을 실시예 8에서 설명한 것과 유사한 과정으로 겔 조제물에 첨가할 수 있다. 히알루론산을 실시예 13에서 설명한 것과 유사한 과정으로 트리암시놀론 아세토니드 겔 조제물에 첨가할 수 있다.

[0292] **실시예 26**

[0293] **히알루론산-디티오비스(프로파논 디히드라지드(HA-DTPH)의 합성**

[0294] 3,3'-디티오비스(프로파논 디히드라지드)(DTP)를 앞서 설명한 바와 같이 합성하였다(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." Bioconjugat β Chem. (1997) 8:686-694; Shu, X. Z.; Liu, Y.; Luo, Y.; Roberts, M. C; Prestwich, G. D. "Disulfide crosslinked hyaluronan hydrogels." Biomacromolecules (2002) 3:1304-1311). DTP(16.7 g, 0.07 mol)를 상기 제조한 히알루론산(1000mL DI 수 중에 용해된 20g 히알루론산 [Mw 0.8-1.0 x $10^6$]) 용액에 첨가하였고, 용액 pH를 HCl 또는 NaOH 용액 중 하나를 첨가함으로써 4.75로 조절하였다. 이어서, 0.384g 1-에틸-3-[3(디메틸아미노)프로필]카르보디이미드(EDC) [Sigma-Aidrich]를 첨가하였고, 실온에서 연속적인 자기 교반과 함께 6.0 N HCl을 첨가함으로써 용액 pH를 pH 4.75로 유지하였다. 4시간 후, 50 g의 디티오트레이톨(DTT) [Biovectra]을 첨가하였고, 용액 pH를 진한 NaOH 용액을 첨가함으로써 8.5로 조절하였다. 실온에서 자기 교반 하에 12-24시간 후, 반응 혼합물의 pH를 6.0 N HCl의 첨가에 의해 pH 3.0으로 조절하였다. 산성 용액을 정제하였고, 20L 1 mM HCl, pH 3.0을 사용하여 접선 유동 여과(TFF)를 사용하여 농축하였다. 이어서 용액을 대략 1L로 농축하였다.

[0295] **실시예 27**

[0296] **HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 겔의 합성**

[0297] 실시예 26에서 제조한 바와 같은 HA-DTPH의 용액을 탈이온수를 사용하여 14 mg/mL의 농도로 희석한다. 11 mL HA-DTPH 용액을 20mL 멸균 주사기에 둔다. HA-DTPH 용액을 0.2um 멸균 필터를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 여과한다. 50 mg/mL 용액의 PEG-(아크릴레이트)$_2$ [Laysan Bio Inc, MW 3400, Item# ACRL-PEG-ACRL-3400-1g]를 0.802 mL 탈이온수 중에서 40.1 mg PEG-(아크릴레이트)$_2$를 용해함으로써 제조하였다. PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 1mL 멸균 주사기로 옮기고, 0.2um 멸균 주사기 필터를 통해 여과하였다. 10 mL의 멸균 여과된 HA-DTPH를 멸균 50mL 원심분리 튜브로 옮겼다. 250 μL의 0.5 M 인산나트륨 용액을 HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을

완전히 혼합한다. 380 μL [19 mg PEG-(아크릴레이트)$_2$]의 멸균 50mg/mL PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 이어서 적어도 16시간 동안 37℃ 인큐베이터 중에 둔다. 이 단계에서 HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 가교결합하여 겔을 형성한다. 겔화된 재료를 이어서 인큐베이터로부터 제거한다.

[0298] **실시예 28**

[0299] **HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 겔 슬러리**

[0300] HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 겔(실시예 27에서 제조)을 실시예 3 및 4에서 각각 설명한 것과 유사한 과정을 사용하여 겔 슬러리로 전환한다.

[0301] **실시예 29**

[0302] **트리암시놀론 아세토니드 함유 HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 겔**

[0303] 실시예 20에서 제조한 바와 같은 CM-HA-DTPH의 용액을 탈이온수를 사용하여 17.5 mg/mL의 농도로 희석한다. 30 mL CM-HA-DTPH 용액을 60mL 멸균 주사기에 둔다. CM-HA-DTPH 용액을 0.2um 멸균 필터를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 여과한다. 100 mg 멸균 트리암시놀론 아세토니드 분말을 첨가하고, 결과 혼합물을 완전히 혼합한다. 40 mg/mL 용액의 PEG-(아크릴레이트)$_2$ [Laysan Bio Inc, MW 3400, Item# ACRL-PEG-ACRL3400-1g]를 15 mL 0.2M 인산 나트륨 완충제(pH 7.4) 중에서 600 mg PEG-(아크릴레이트)$_2$를 용해함으로써 제조한다. PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 20mL 멸균 주사기로 옮기고, 0.2 um 멸균 주사기 필터를 통해 여과한다. 20 mL의 멸균 여과된 CM-HADTPH를 멸균 50 mL 원심분리 튜브에 옮겼다. 10 mL의 PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 CM-HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. CM-HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_2$ 용액을 이어서 실온에서 겔화한다.

[0304] 겔의 합성을 각각 33mg, 50mg, 75mg, 125mg, 150mg, 175 mg, 200mg, 225mg, 250g, 375 mg, 400 mg 및 500 mg 트리암시놀론 아세토니드를 사용하여 반복한다.

[0305] 겔을 실시예 3 및 4에서 설명한 것과 유사한 과정을 사용하여 겔 슬러리로 전환한다.

[0306] **실시예 30**

[0307] **HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_4$ 겔의 합성**

[0308] 실시예 20에서 제조한 바와 같은 HA-DTPH의 용액을 탈이온수를 사용하여 14 mg/mL의 농도로 희석한다. 11 mL HA-DTPH 용액을 20mL 멸균 주사기에 둔다. HA-DTPH 용액을 0.2um 멸균 필터를 통해 멸균 50mL 원심분리 튜브로 여과한다. 50 mg/mL 용액의 PEG-(아크릴레이트)$_4$ [Laysan Bio fnc, Mw 10,000, Item# 4암-PEG-ACRL-10K-1g]를 0.802 mL 탈이온수 중에서 40.1 mg PEG-(아크릴레이트)$_4$를 용해함으로써 제조하였다. PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 1mL 멸균 주사기로 옮기고, 0.2um 멸균 주사기 필터를 통해 여과하였다. 10 mL의 멸균 여과된 HA-DTPH를 멸균 50mL 원심분리 튜브로 옮겼다. 250 μL의 0.5 M 인산나트륨 용액을 HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. 560μL[28mg PEG-(아크릴레이트)$_4$]의 멸균 50mg/mL PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 HA-DTPH 용액에 첨가한다. 결과 용액을 완전히 혼합한다. HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 이어서 적어도 16시간 동안 37℃ 인큐베이터 중에 둔다. 이 단계에서 HA-DTPH/PEG-(아크릴레이트)$_4$ 용액을 가교결합하여 겔을 형성한다. 겔화된 재료를 이어서 인큐베이터로부터 제거한다. 겔화된 재료를 실시예 3 및 4에서 설명한 바와 같은 유사한 방법으로 겔 슬러리로 전환할 수 있다. 겔을 실시예 9, 10 및 11에 설명한 것과 같은 유사한 과정을 사용하여 트리암시놀론 아세토니드의 존재하에서 제조할 수 있다. 히알루론산을 실시예 8에서 설명한 것과 유사한 과정으로 겔 조제물에 첨가할 수 있다. 히알루론산을 실시예 13에서 설명한 것과 유사한 과정으로 트리암시놀론 아세토니드 겔 조제물에 첨가할 수 있다.

[0309] **실시예 31**

[0310] **PEG-디아크릴레이트 겔의 제조(시험 재료 4)**

[0311] 1.466g의 폴리(에틸렌 글리콜)-디아크릴레이트 [PEG-DA] (Laysan Bio, ltem# ACRL-PEG-ACRL-3400-1g)을 멸균

125mL 보틀로 칭량하였다. 22mL의 멸균 식염수를 PEG-DA에 첨가하였다. 일단 용해되면, PEG-DA/NaCl을 0.2um 주사기 필터를 통해 위생적으로 만든 Erlenmeyer 플라스크로 여과하였다. 0.150M 탄산염 완충제, pH 8.2를 0.2um 주사기 필터를 통해 여과하였고, 1 mL의 이 멸균 용액을 PEG-DA 용액에 첨가하였다. 플라스크를 고무 마개로 캡핑하였고 용액을 10분 동안 질소로 버블링하면서 탈기하였다. 0.2um 필터를 가스선에 부착하여 공기가 멸균되도록 보장한다. 400mg/mL 아스코르브산 나트륨을 격막 리드로 소결 유리에 첨가함으로써 제조하였다. 3 mL DI 수를 바이알에 첨가하였다. 일단 용해되면, 용액을 0.2um 주사기 필터를 통해 15ml 멸균 원심분리 튜브로 여과하였다. 0.8mL의 멸균 여과된 400mg/mL 아스코르브산 나트륨을 PEG-DA 용액에 첨가하였다. 0.8의 멸균 여과된 400mg/mL 과황산나트륨 용액을 PEG-DA 용액에 첨가하였다. 용액을 교반함으로써 혼합하였다. 플라스크를 적색의 고무 마개로 캡핑하였고, 용액을 15분 동안 질소로 버블링하여 탈기하였다. 0.2um 필터를 가스선에 부착하여 질소가 용액을 탈기하는데 사용되도록 보장하였다. 용액을 적어도 18시간 동안 37℃에 두어 겔을 형성하였다. 겔을 30mL 주사기로 옮겼다. 23mm 원형 디스크의 메시를 23 mm 레더펀치를 사용하여 절단하였다. 메시 디스크를 지지체 스크린이 제거된 25 mm 폴리카르보네이트 주사기 필터에 두었다. 250mL 비커로 메시 (1 mm x 1mm 개방)를 통해 겔을 압출하였다. 100mL 멸균 식염수를 25ml의 압출된 겔에 첨가하였다. 40분 후, 식염수 상청액을 쏟았고, 추가 125mL 멸균 식염수를 첨가하였다. 이것을 3회 반복하였다. 최종 세척 후, 45 ml의 팽창된 겔을 45mL 식염수에 첨가하였고, 슬러리를 부드럽게 혼합하였다. 결과 용액의 pH를 1 N NaOH와 1 N HCl의 조합을 사용하여 7.0 내지 7.4로 조절하였다. 1.5 mL의 이 겔 슬러리를 5mL 유리 주사기에 채웠다. 주사기 캡을 사용하여 주사기를 폐쇄하였다. 주사기를 이어서 250℃에서 15분 동안 고압멸균하였다.

[0312] **실시예 32**

[0313] **PEG-디아크릴레이트/비스티올 겔의 제조(시험 재료 2)**

[0314] 630mg 폴리(에틸렌 글리콜)-디아크릴레이트 [PEG-DA] (Laysan Bio, ltem# ACRL-PEG-ACRL-3400-1g)을 20mL 유리 신틸레이션 바이알로 칭량하였다. 6 mL DI 수를 첨가하였다. 일단 용해되면,용액을 0.2um 주사기 필터를 통해 여과하였다. 48mg N,N'-비스(아크릴로일)시스타민(Sigma, A4929)을 유리 신틸레이션 바이알에서 6 mL 테트라히드로 푸란(THF) 중에 용해하였다. 일단 용해되면, 이 용액을 PEG-DA 용액과 혼합하였다. 마개 스크류 캡을 바이알에 두었고, 용액을 10분 동안 질소로 버블링함으로써 탈기하였다. 50 uL의 400mg/mL 용액의 아스코르베이트 나트륨(DI 수를 사용하여 제조하고 0.2 um 주사기 필터를 통해 여과하였다)을 PEG-DA 용액에 첨가하였다. 50 uL의 400mg/mL 용액의 과황산나트륨(DI 수를 사용하여 제조하고 0.2 um 주사기 필터를 통해 여과하였다)을 PEG-DA 용액에 첨가하였다. 마개 리드를 바꾸었고, 용액을 10분 동안 질소로 버블링함으로써 탈기하였다. 용액을 60℃로 설정한 오븐에 넣었다. 용액은 15분 후 겔로 바뀌었다. 겔을 오븐으로부터 제거하였고, 실온으로 냉각시켰다. 겔을 30mL 주사기에 옮겼다. 23mm 원형 디스크의 메시를 23 mm 레더펀치를 사용하여 메시의 시트로부터 절단하였다. 메시 디스크를 지지체 스크린이 제거된 25 mm 폴리카르보네이트 주사기 필터에 두었다. 400mL 비커로 메시 (~0.8 mm x ~0.8 mm 개방)를 통해 겔을 압출하였다. 200mL DI 수를 압출 성형된 겔에 첨가하였다. 45분 후, 상청액을 쏟았고, 추가 200mL DI 수를 첨가하였다. 이것을 4회 반복하였다. 세척 단계를 0.9% 식염수를 사용하여 3회 반복하였다. 상청액을 제거하였고, 남아 있는 겔을 다시 메시를 통해 압출하였다(상기 설명함). 1.5 mL의 이 겔 슬러리를 5mL 유리 주사기에 채웠다. 주사기 캡을 사용하여 주사기를 폐쇄하였다. 주사기를 이어서 250℃에서 15분 동안 고압멸균하였다.

[0315] **실시예 33**

[0316] **PEG-$(LYS)_4$ 겔(시험 재료 3)의 제조**

[0317] 1.0 g의 PEG-(리신)$_4$ [글루타레이트 무수물 및 이어서 리신으로 관능화된 말단의 히드록실기가 있는 4-암 폴리에틸렌 글리콜 (Mw 10,000)]를 60mL 유리 보틀로 칭량하였다. 34 mL 디클로로메탄을 PEG-(리신)$_4$에 첨가하였다. 333 uL의 디이소프로필카르보디이미드(Ruka, 38370)를 용액에 첨가하였다. 약 30분 후 용액은 겔로 변하였다. 겔화는 적어도 18시간 동안 지속되었다. 겔을 30mL 주사기에 옮겼다. 23mm 원형 디스크의 메시를 23 mm 레더펀치를 사용하여 메시의 시트로부터 절단하였다. 메시 디스크를 지지체 스크린이 제거된 25 mm 폴리카르보네이트 주사기 필터에 두었다. 400mL 비커로 메시 (~0.38 mm x ~0.38 mm 개방)를 통해 겔을 압출하였다. 33mL의 겔을 330 mL 아세톤으로 세척하였다. 30분 후,,아세톤을 제거하였다. 세척 과정을 4회 반복하였다. 이어서 겔을 진공하에서 건조시켰다(대략 18시간 진공하에). 771 mg의 건조겔을 52mL 식염수에 첨가하였고, 겔을 5시간 동안 팽창시켰다. 겔을 이어서 메시(~0.38 mm x ~0.38 mm 개방)를 통해 메싱하였다. 1.5 mL의 이 겔 슬러리를 5mL 유리 주사기에 채웠다. 주사기 캡을 사용하여 주사기를 폐쇄하였다. 주사기를 이어서 250℃에서 15분 동안 고압멸균

하였다.

[0318] **실시예 34**

[0319] **생체내 연구: 코르티코스테로이드를 함유하는 가교결합된 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 히드로겔의 관절내 주사**

[0320] 코르티코스테로이드, 트리암시놀론 아세토니드를 함유하는 PEG-디티올 (HA-VS-PEG-$(SH)_2$)와 비닐-술폰-변형된 히알루론산의 반응에 의해 제조한 약하게 가교결합된 히드로겔을 암컷 염소 슬관절의 관절내 공간에 주사하였다. 형태학적 윤활액 및 조직학적 시험을 이러한 주사의 국소 및 전신 효과를 평가하기 위해 수행하였다. 연구의 상세한 설명을 하기에 제공한다.

[0321] A. 시험 재료

[0322] 시험 재료 1. HA-VS-PEG-$(SH)_2$ (가교 결합된 HA-계 약물이 없는 히드로겔)을 하기와 같이 제조하였다.

[0323] 실시예 1에서 제조한 HA-VS의 용액을 탈이온수를 사용하여 14 mg/mL의 농도로 희석하였다. 11 mL HA-VS 용액을 20mL 멸균 주사기에 두었다. HA-VS 용액을 0.2um 멸균 주사기를 통해 멸균 20 mL 주사기로 여과하였다. 50 mg/mL 용액의 PEG$(SH)_2$를 0.802 mL 탈이온 수 중에서 40.1 mg PEG-$(SH)_2$를 용해함으로써 제조하였다. PEG-$(SH)_2$ 용액을 3 mL 멸균 주사기에 옮겼고, 0.2 μm 멸균 주사기 필터를 통해 여과하였다. 10 mL의 멸균 여과된 HA-VS를 멸균 50mL 원심분리 튜브에 옮겼다. 250 uL의 0.5 M 인산나트륨 용액을 HA-VS 용액에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. 380 mL의 멸균 50mg/mL PEG-$(SH)_2$ 용액을 HA-VS 용액에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 용액을 이어서 적어도 16시간 동안 37℃ 인큐베이터에 두었다. 이 단계에서, HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 용액을 가교결합하여 겔을 형성하였다. 겔화된 재료를 이어서 인큐베이터로부터 제거하였다.

[0324] 시험 재료 2. HA-VS-PEG-$(SH)_2$트리암시놀론 아세토니드 ("HA-VS-PEG$(SH)_2$-TA")을 다음과 같이 제조하였다.

[0325] 100.2 mg의 트리암시놀론 아세토니드 (Sicor, U. S. P grade, micronized)를 20mL 신틸레이션 바이알에서 2 mL 탈이온수와 혼합하였다. 20분 동안 초음파처리한 후, 재료를 250°F에서 15분 동안 고압멸균하였다. 18.3 mg/mL의 농도에서 실시예 1에서 제조한 바와 같은 9 mL의 HA-VS 용액을 20mL 멸균 주사기에 넣었다. HA-VS 용액을 0.2μm 멸균 주사기 필터를 통해 멸균 10 mL 주사기로 여과하였다. 50 mg/mL 용액의 PEG-$(SH)_2$를 0.7 mL 탈이온수 중에서 35 mg PEG-$(SH)_2$를 용해함으로써 제조하였다. PEG$(SH)_2$ 용액을 3 mL 멸균 주사기로 옮겼고, 0.2um 멸균 주사기 필터를 통해 여과하였다. 7.6 mL의 멸균 여과된 HA-VS를 트리암시놀론 아세토니드 용액에 옮겼다. 370 μl 탈이온수 및 250 uL의 0.5 M 인산나트륨 용액을 HA-VS 및 트리암시놀론 아세토니드를 함유하는 바이알에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. 380 μL의 멸균 50mglmL PEG-$(SH)_2$ 용액을 HA-VS/트리암시놀론 아세토니드 용액에 첨가하였다. 결과 용액을 완전히 혼합하였다. HAVS/트리암시놀론 아세토니드/PEG-$(SH)_2$ 용액을 이어서 적어도 16시간 동안 37℃ 인큐베이터에 넣었다. 이 단계에서, HA-VS-PEG-$(SH)_2$-TA 용액을 가교결합하여 겔을 형성하였다. 그 다음에 겔화된 재료를 인큐베이터로부터 제거하였다.

[0326] 시험 재료 3. 트리암시놀론 아세토니드, 2 mg/ml (Kenalog-10; 10 mg/mL 트리암시놀론 아세토니드를 식염수로 2 mg/mL까지 희석)

[0327] 시험 재료 4. 트리암시놀론 아세토니드, 8 mg/ml (Kenalog-40; 40 mg/mL 트리암시놀론 아세토니드를 식염수로 8 mg/mL까지 희석)

[0328] 대조군 식염수, 0.9% 염화 나트륨.

[0329] 모든 시험 재료를 사용 전에 실온에서 저장하였다. 각 시험 또는 대조군 재료에 대해, 1.5 ml 투약량을 각 개개의 관절내 주사에 대해 제조하였다.

[0330] **B. 동물**

[0331] 총 24마리의 골격적으로 성숙한 암컷 염소를 이 연구를 위해 사용하였다. 그것들을 USDA 공급원으로부터 얻었다. 동물을 연구의 시작시 63 내지 97 Ibs로 칭량하였다.

[0332] 염소를 USDA 공급원으로부터 획득하였고, 이 연구 전에 염소 관절염 뇌염(CAE) 및 Johne's 음성이 되도록 결정하였다. 각 동물을 연구 전 적임의 수의사에 의해 일반적 건강 평가(태도, 호흡의 용이함, 및 설사 및 콧물이

없다는 것에 대한 시각적 관찰을 받음)를 제공하였다. 동물을 질병 또는 불구의 어떤 증거에 대해 시험하였다. 연구의 용인가능성은 슬관절의 사용전 질병이 없음, 임상적 소리, 및 이전의 병력이 없음의 여부였다. 염소를 협회에 의해 결정된 적절한 시간 기간 동안 건강상태를 유지하였다. 동물 우리 조건을 실험실 동물에 관한 적용 가능한 법 및 규제로 수행하였다. 염소를 주사 후 넓은 실내 실행(우리)으로 유지하였다. 염소는 모든 시간에 제한되지 않은 활동을 하였다.

[0333] 모든 동물은 1일당 대략 2 Ibs의 소량의 반추동물 음식물뿐 아니라 묶지 않은 건초를 받았다. 수돗물을 자유롭게 제공하였다. 먹이를 주는 것은 마취전 대략 12-24시간에 제한하였고, 물은 주사 전 대략 12시간에 제한하였다.

[0334] 연구 과정을 통해 동물의 일반적 건강상태를 매일 관찰하였다. 동물이 수술후 합병증의 어떤 증상 또는 다른 질병, 통증 또는 스트레스의 증상을 나타낸다면, 적절한 행동을 취한다. 또한 동물이 다치거나, 아프거나 또는 빈사상태인 경우에, 현행 수의학 의료 실행에 따라서 치료를 수행한다.

[0335] **C. 처리**

[0336] 연구 설계는 다음과 같았다.

*표 8*

[0337]

| 그룹 | 귀 태그 | 우측 슬관즐(1.5ml) | 좌측 슬관절(1.5ml) | 우측 슬관절 주사, 좌측 슬관절 주사 후 희생 시간 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 3171 | 시험재료 1 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 1 | 3256 | 시험재료 1 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 1 | 3831 | 시험재료 1 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 2 | 3174 | 시험재료 2 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 2 | 3596 | 시험재료 2 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 2 | 3840 | 시험재료 2 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 3 | 3133 | 시험재료 3 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 3 | 3177 | 시험재료 3 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 3 | 3833 | 시험재료 3 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 4 | 3589 | 시험재료 4 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 4 | 3593 | 시험재료 4 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 4 | 3849 | 시험재료 4 | 보통의 식염수 | 14일 |
| 5 | 3267 | 시험재료 1 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 5 | 3595 | 시험재료 1 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 5 | 3837* | 시험재료 1 | 보통의 식염수 | 28일(24일*) |
| 6 | 3173 | 시험재료 2 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 6 | 3264 | 시험재료 2 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 6 | 3587 | 시험재료 2 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 7 | 3591 | 시험재료 3 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 7 | 3592 | 시험재료 3 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 7 | 3594 | 시험재료 3 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 8 | 3162 | 시험재료 4 | 보통의 식염수 | 28일 |
| 8 | 3588* | 시험재료 4 | 보통의 식염수 | 28일(19일*) |
| 8 | 3590 | 시험재료 4 | 보통의 식염수 | 28일 |
| * 조기에 식이조절된 동물; (총 연구 일수) | | | | |

[0338] 각 동물에 대해 체중, 관절 둘레 및 움직임 측정의 범위를 주사(제1일) 전 및 희생(제14일 또는 제28일) 바로 전에 모든 동물로부터 취하였다.

[0339] 주사를 위한 기본적 과정은 모든 피험자에 대해 동일하였다. 모든 주사를 엄격한 멸균하에서 수행하였다. 동물을 디아제팜(0.1-0.5 mg/kg) 및 케타민(4.4 - 7.5 mg/kg)의 정맥내 주사로 마취시켰다. 각각의 무릎을 전위, 움직임의 범위, 부종, 온도, 염발음, 슬개골 주행 및 외반족/내반슬 이상에 대해 신체적으로 시험하였다.

[0340] 모든 주사를 통상적인 멸균 기술을 이용하여 수행하였다. 좌측 및 우측 슬관절을 주사를 위해 영역을 클리핑함으로써 제조한 다음 클로로헥시딘 스크럽으로 그것들을 깨끗하게 하였다. 동물을 앙와위(dorsal recumbency)로

둔다. 우측 슬관절을 클로로헥시딘 스크럽으로 깨끗하게 하였고, 대안으로 70% 이소프로필 알코올로 3회 깨끗하게 하고 요오드 용액을 발랐다.

[0341] 표준 기술을 각 슬관절에 주사하기 위해 사용하였다. 2-인치 21게이지 크기의 멸균 바늘을 전내측(anteromedial) 접근을 통해 관절내 공간에 도입하였다. 내측 대퇴상과의 후방 과간절흔(intercondylar notch) 벽을 더듬었고, 바늘을 약간 뒤로 빼었다. 1.5 ml의 적절한 시험 재료를 우측 관절에 주사하였다. 주사 바늘을 제거하였고, 주사 부위에 압력을 유지하였다. 이어서 주사한 슬관절을 전체 움직임의 범위를 통해 20회 순환시켰다. 이 후에 즉시, 좌측 슬관절을 클로로헥시딘 스크럽으로 깨끗하게 하였고, 대안으로 70% 이소프로필 알코올로 3회 깨끗하게 하고 요오드 용액을 발랐고, 1.5ml의 대조군 재료를 우측 슬관절에 대해 상기 설명한 것과 유사한 방식으로 좌측 슬관절에 주사하였다. 주사 바늘을 제거하였고 주사 부위에 압력을 유지하였다. 이어서 주사한 슬관절을 전체 움직임의 범위를 통해 20회 순환시켰다.

[0342] 고통 및 불편함의 징후를 나타내는 임의의 동물에 대해 주사 후 확인을 하였고, 필요하다면 추가적인 마취를 하였다. 모든 처리를 적절한 연구 문서로 기록하였다.

[0343] **D. 분석**

[0344] 혈액 수집: 각 동물로부터 혈액을 연구의 시작 바로 전, 및 각각의 남아있는 동물들로부터 주사 후 5시간 및 제1일, 제4일, 제7일, 제14일 및 제28일에 수집하였다. CBC 및 혈액 화학 패널을 각 시점에 실행하였다.

[0345] 해부: 주사 개시 후 제14일 또는 제28일에 일반적 마취의 유발을 위해 디아제팜 0.22 mg/kg 및 케타민 10 mg/kg로 구성되는 정맥내 주사로 동물을 인간적으로 희생시켰다. 이것 다음에, 마취시킨 동물을 심박정지가 확인될 때까지 IV 과용량의 진한 염화칼륨(KCl)을 제공하였다.

[0346] 총 형태학적 관찰: 무릎 관절의 수집 후, 관절을 개방하였고 주사한 멸균 관절의 표 2에서 설명한 총 평가를 수행하였다.

*표 9*

[0347]

| 총 평가 및 샘플 수집 | | | |
|---|---|---|---|
| 샘플 | 총 평가 | 샘플 수집 | 광그래프 및 스코어 |
| 윤활액(좌측 및 우측) | X | X | |
| 좌측 및 우측 무릎 관절 | X | | X |
| 좌측 및 우측 후방 활액낭 | X | X | X |
| 좌측 및 우측 연골 샘플 | X | X | X |
| 좌측 및 우측 슬와 림프절 | X | X | X |

[0348] 추가적으로, 표 3에서 약술한 바와 같이 1명의 관찰자에 의한 관절의 반정량적 등급화를 수행하였다.

*표 10*

[0349]

| 총 평가 등급화 규모 | | | |
|---|---|---|---|
| 스코어 | 착색 | 충혈 | 부종 |
| 0 | 정상 | 없음 | 없음 |
| 1 | 약간 황색 | 약간 | 약간 |
| 2 | 황색 | 보통 | 보통 |
| 3 | | 현저함 | 현저함 |

[0350] 전체 관절 총 평가 스코어는 착색, 충혈, 및 부종 스코어의 합이다(0-8 점).

[0351] 윤활액 평가

[0352] 개방된 관절로부터 윤활액의 수집 후, 총 부피를 기록하였다. 유액을 점성도, 투명도 및 색상에 대해 전체적으로 평가하였고 반정량적으로 표 11과 같이 등급화 하였다. 혈구계산기로, 총 백색 세포 계측을 행하였다. 추가적으로 윤활액 스미어(smear) 분화 현미경 분석을 위해 만들었다. 임의의 남은 윤활액을 -80℃에서 개별적으로 라벨이 붙은 냉동용기 중에서 냉동보존하였다. 윤활액 스미어를 잠재적인 미래의 분석을 위해 남겼다.

표 11

[0353]

| 활액 유체에 대한 설명 및 스코어 | | | |
|---|---|---|---|
| 스코어 | 색상 | 투명도 | 조건 |
| 0 | S=담황색 | C=투명 | N=정상 |
| 1 | P=분홍색 | H=흐림 | A=이상 |
| 2 | Y=황색/R=적색 | D=뿌염 | W=물기 |
| 3 | B=혈색 | T=탁함 | |

[0354] 전체 활액 유체 스코어는 색상, 투명도 및 조건 스코어의 합이었다(0-8점).

[0355] 조직학적 평가:

[0356] 절개 후 즉시 및 총 관절 표면 평가 후, 각 관절의 시상면을 대퇴골 내측(MFC)을 통해 절단하였다. 이 섹션을 10% 중성 완충 포르말린 중에서 개별적으로 두었다. 처리를 위해 Premier Laboratories에 고정시킨 조직을 밤새 수송선에 의해 보내었다. 좌측 및 우측 MFC 섹션을 표준 조직학적 기술을 사용하여 처리하였고 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 및 사프라닌-O(SAF-O)에 의해 패스트 그린 카운터 염색으로 염색하였다. 표 12에서 설명한 바와 같이 퇴행성관절염에 대해 MFC 섹션으로부터 슬라이드를 Mankin Scoring System에 의해 평가하였다.

표 12

[0357]

| 변형된 Mankin 스코어링 시스템 | |
|---|---|
| 구조 | 정상[0] |
| | 표면 불균일[1] |
| | 판누스 및 표면 불균일[2] |
| | 이행부위에서 클레프트[3] |
| | 방사부위에서 클레프트[4] |
| | 석회화된 부위에서 클레프트[5] |
| | 완전 분열[6] |
| | |
| 세포 | 정상[0] |
| | 분산된 과세포성[1] |
| | 클로닝[2] |
| | 과세포성[3] |
| | |
| 사프라닌-O 염색 | 정상[0] |
| | 약간 감소[1] |
| | 보통 감소[2] |
| | 중증의 감소[3] |
| | 염료가 관찰되지 않음[4] |
| | |
| 최고선의 완전성 | 무결함[0] |
| | 혈관과 교차됨[1] |
| | |
| 최대 스코어 | 14(정상=0) |

[0358] E. 결과

[0359] 다양한 조제물로 처리된 관절에 대한 연골 샘플에 대해 Mankin 스코어링 시스템의 결과를 표 13a-h에서 나타내고, 도 11에서 나타낸다. 도 9(처리 후 제14일) 및 도 10(처리 후 제28일)은 각각 처리 후 제14일 및 제28일에 다양한 조제물로 처리한 관절에 대한 연골 샘플에 애해 사프라닌 O 염색을 보여준다.

[0360] (표 13a)

**제14일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 1**

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3256 RFC | HA-VS 겔 | 5 | 3 | 2 | 0 | 10 |
| 3171 RFC | HA-VS 겔 | 4 | 1 | 0 | 0 | 5 |
| 3831 RFC | HA-VS 겔 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| **평균** | | **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 |
| **평균** | | **2.7** | **0.7** | **1.0** | **0.0** | **4.3** |
| **SD** | | **2.3** | **0.6** | **1.0** | **0.0** | **3.1** |

**변형된 MANKIN 스코어링 시스템**

| 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 |
|---|---|---|---|
| 정상 [0] | 정상 [0] | 정상 [0] | 무결함[0] |
| 표면 불균일 [1] | 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[1] | 약간 감소 [1] | 혈관에 의해 교차됨 [1] |
| 더 넓게 퍼짐 | 클로닝과 함께 | 보통 감소 [2] | |
| 표면 불균일 [2] | 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[2] | 심한 감소 [3] | |
| 이행부위에서 클레프트 [3] | | | |
| 방사부위에서 클레프트[4] | 과세포성을 분산시키기 위해 관찰된 염료 없음 [4] | | |
| 석회화된 부위에서 클레프트[5] | 병소적으로 광범위 [3] | | |
| 완전 분열[6] | | | |

[0361]

[0362] (표 13b)

**제14일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 2**

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3840 RFC | HA-VS/TA 겔 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 0.0 | 6.0 |
| 3596 RFC | HA-VS/TA 겔 | 0.0 | 0.0 | 3.0 | 0.0 | 3.0 |
| 3174 RFC | HA-VS/TA 겔 | 4.0 | 2.0 | 2.0 | 0.0 | 8.0 |
| **평균** | | **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 |
| **평균** | | **2.3** | **1.0** | **1.0** | **0.0** | **4.3** |
| **SD** | | **2.1** | **1.0** | **1.0** | **0.0** | **3.5** |

**변형된 MANKIN 스코어링 시스템**

| 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 |
|---|---|---|---|
| 정상 [0] | 정상 [0] | 정상 [0] | 무결함[0] |
| 표면 불균일 [1] | 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[1] | 약간 감소 [1] | 혈관에 의해 교차됨 [1] |
| 더 넓게 퍼짐 | 클로닝과 함께 | 보통 감소 [2] | |
| 표면 불균일 [2] | 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[2] | 심한 감소 [3] | |
| 이행부위에서 클레프트 [3] | | | |
| 방사부위에서 클레프트[4] | 과세포성을 분산시키기 위해 관찰된 염료 없음 [4] | | |
| 석회화된 부위에서 클레프트[5] | 병소적으로 광범위 [3] | | |
| 완전 분열[6] | | | |

[0363]

[0364] (표 13c)

**제14일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 3**

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3833 RFC | 트리암시놀론 아세트니드 2mg/ml | 4.0 | 1.0 | 3.0 | 0.0 | 8.0 |
| 3133 RFC | 트리암시놀론 아세트니드 2mg/ml | 0.0 | 0.0 | 4.0 | 0.0 | 4.0 |
| 3177 RFC | 트리암시놀론 아세트니드 2mg/ml | 4.0 | 1.0 | 2.0 | 0.0 | 7.0 |
| MEAN | | 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 |
| MEAN | | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 1.3 |
| SD | | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.6 |

**변형된 MANKIN 스코어링 시스템**

**구조**
**정상** [0]
**표면 불균일** [1]
**더 넓게 퍼진 표면 불균일** [2]
**이행부위에서 클레프트** [3]
**방사부위에서 클레프트** [4]
**석회화된 부위에서 클레프트** [4]
**완전 분열** [6]

**세포**
**정상** [0]
**온화한 병소 내지 다병소 과세포성** [1]
**클로닝과 함께 온화한 병소 내지 다병소 과세포성** [2]
**과세포성을 분산시키기 위해 병소적으로 광범위** [3]

**사프라닌-O 염색**
**정상** [0]
**약간 감소** [1]
**보통 감소** [2]
**심한 감소** [3]
**관찰된 염료 없음** [4]

**최고선 완전성**
**무결함** [0]
**혈관에 의해 교차됨** [1]

[0365]

[0366] (표 13d)

**제14일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 4**

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3593 RFC | 트리암시놀론 아세트니드 8mg/ml | 0.0 | 0.0 | 4.0 | 0.0 | 4.0 |
| 3849 RFC | 트리암시놀론 아세트니드 8mg/ml | 5.0 | 1.0 | 3.0 | 0.0 | 9.0 |
| 3589 RFC | 트리암시놀론 아세트니드 8mg/ml | 0.0 | 0.0 | 3.0 | 0.0 | 3.0 |
| MEAN | | 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 |
| MEAN | | 0.3 | 0.3 | 2.3 | 0.0 | 3.0 |
| SD | | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.0 | 1.0 |

**변형된 MANKIN 스코어링 시스템**

| 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 |
|---|---|---|---|
| 정상 [0] | 정상 [0] | 정상 [0] | 무결함 [0] |
| 표면 불균일 [1] | 온화한 병소 내지 다병소 과세포성 [1] | 약간 감소 [1] | 혈관에 의해 교차됨 [1] |
| 더 넓게 퍼진 표면 불균일 [2] | 클로닝과 함께 온화한 병소 내지 다병소 과세포성 [2] | 보통 감소 [2] | |
| 이행부위에서 클레프트 [3] | 과세포성을 분산시키기 위해 병소적으로 광범위 [3] | 심한 감소 [3] | |
| 방사부위에서 클레프트 [4] | | 관찰된 염료 없음 [4] | |
| 석회화된 부위에서 클레프트 [4] | | | |
| 완전 분열 [5] | | | |

[0367]

[0368] (표 13e)

제28일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 5

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3267 RFC | HA-VS 겔 | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| 3837 RFC* | HA-VS 겔 | 3 | 1 | 3 | 0 | 7 |
| 3595 RFC | HA-VS 겔 | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| 평균 | | 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 |
| 평균 | | 1.0 | 1.0 | 1.5 | 0.0 | 3.5 |
| SD | | 0.0 | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.7 |

* 동물은 조기에 식이조절됨.

데이터를 기록하였지만 평균으로 포함되지 않는다.

구조
정상 [0]
표면 불균일 [1]
더 넓게 퍼진
표면 불균일 [2]
이행부위에서 클레프트 [3]
방사부위에서 클레프트 [4]
석회화된 부위에서 클레프트 [5]
완전 분열 [6]

세포
정상 [0]
온화한 병소 내지 다병소 과세포성 [1]
클로닝과 함께 온화한 병소 내지 다병소 과세포성 [2]
과세포성을 분산시키기 위해 병소적으로 광범위 [3]

사프라닌-O 염색
정상 [0]
약간 감소 [1]
보통 감소 [2]
심한 감소 [3]
관찰된 영료 없음 [4]

최고선 완전성
무결함 [0]
혈관에 의해 교차됨 [1]

[0369]

[0370] (표 13f)

제28일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 6

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3264 RFC | HA-VS/TA 겔 | 0.0 | 0.0 | 3.0 | 0.0 | 3.0 |
| 3587 RFC | HA-VS/TA 겔 | 5.0 | 2.0 | 2.0 | 0.0 | 9.0 |
| 3173 RFC | HA-VS/TA 겔 | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 0.0 | 2.0 |
| 평균 | | 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 |
| 평균 | | 1.7 | 0.7 | 0.7 | 0.0 | 3.0 |
| SD | | 2.9 | 1.2 | 0.6 | 0.0 | 4.4 |

변형된 MANKIN 스코어링 시스템

구조
정상 [0]
표면 불균일 [1]
더 넓게 퍼진
표면 불균일 [2]
이행부위에서 클레프트 [3]
방사부위에서 클레프트 [4]
석회화된 부위에서 클레프트 [5]
완전 분열 [6]

세포
정상 [0]
온화한 병소 내지 다병소 과세포성 [1]
클로닝과 함께 온화한 병소 내지 다병소 과세포성 [2]
과세포성을 분산시키기 위해 병소적으로 광범위 [3]

사프라닌-O 염색
정상 [0]
약간 감소 [1]
보통 감소 [2]
심한 감소 [3]
관찰된 영료 없음 [4]

최고선 완전성
무결함 [0]
혈관에 의해 교차됨 [1]

[0371]

[0372] (표 13g)

제28일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 7

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3592 RFC | 트리암시놀론 아세토니드 2mg/ml | 4.0 | 3.0 | 3.0 | 0.0 | 10.0 |
| 3591 RFC | 트리암시놀론 아세토니드 2mg/ml | 0.0 | 2.0 | 4.0 | 0.0 | 6.0 |
| 3594 RFC | 트리암시놀론 아세토니드 2mg/ml | 4.0 | 2.0 | 3.0 | 0.0 | 9.0 |
| 평균 | | 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 |
| 평균 | | 2.3 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | 4.3 |
| SD | | 1.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.5 |

변형된 MANKIN 스코어링 시스템

| 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 |
|---|---|---|---|
| 정상 [0] | 정상 [0] | 정상 [0] | 무결함[0] |
| 표면 불균일 [1] | 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[1] | 약간 감소 [1] | 혈관에 의해 교차됨 [1] |
| 더 넓게 퍼진 표면 불균일[2] | 클로닝과 함께 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[2] | 보통 감소 [2] | |
| 이행부위에서 클레프트 [3] | 과세포성을 분산시키기 위해 병소적으로 광범위 [3] | 심한 감소 [3] | |
| 방사부위에서 클레프트[4] | | 관찰된 염료 없음[4] | |
| 석회화된 부위에서 클레프트[5] | | | |
| 완전 분열[6] | | | |

[0373]

[0374] (표 13h)

제28일 평가에서 대퇴연골의 Mankin 스코어, 그룹 8

| 샘플 | 처리 | 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 | 총 Mankin 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3588 RFC* | 트리암시놀론 아세토니드 8mg/ml | 4.0 | 3.0 | 3.0 | 0.0 | 10.0 |
| | | | | | | |
| 3590 RFC | 트리암시놀론 아세토니드 | 5.0 | 3.0 | 4.0 | 0.0 | 12.0 |
| | 8mg/ml | | | | | |
| | | | | | | |
| 3162 RFC | 트리암시놀론 아세토니드 | 1.0 | 1.0 | 4.0 | 0.0 | 6.0 |
| | 8mg/ml | | | | | |
| **평균** | | **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 |
| **평균** | | **3.0** | **1.0** | **2.0** | **0.0** | **6.0** |
| **SD** | | **0.0** | **0.0** | **0.0** | **0.0** | **0.0** |

*** 동물은 조기에 식이조절됨.**

**데이터를 기록하였지만 평균으로 포함되지 않는다.**

**변형된 MANKIN 스코어링 시스템**

| 구조 | 세포 | 사프라닌-O 염색 | 최고선 완전성 |
|---|---|---|---|
| 정상 [0] | 정상 [0] | 정상 [0] | 무결함[0] |
| 표면 불균일 [1] | 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[1] | 약간 감소 [1] | 혈관에 의해 교차됨 [1] |
| 더 넓게 퍼진 표면 불균일[2] | 클로닝과 함께 온화한 병소 내지 다병소 과세포성[2] | 보통 감소 [2] | |
| 이행부위에서 클레프트 [3] | | 심한 감소 [3] | |
| 방사부위에서 클레프트[4] | 과세포성을 분산시키기 위해 병소적으로 광범위 [3] | 관찰된 염료 없음[4] | |
| 석회화된 부위에서 클레프트[5] | | | |
| 완전 분열[6] | | | |

[0375]

[0376] 제28일에 연골에서, HIA-VS-PEG-$(SH)_2$에 대해 그것의 대조군과 비교하여 변형된 Mankin 스코어의 차이가 없었다. 그룹 5 또는 6과 비교하여 그룹 7 및 8에 대해 변형된 Mankin 스코어의 사프라닌 O의 손실의 완만한 증가가 있었다. 제14일로부터 제28일에, 트리암시놀론 아세토니드-단독-처리군(그룹 7 및 8) 둘 다의 변형된 Mankin 스코어의 증가가 있었다. 시간에 따른 이러한 스코어의 증가는 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔-처리 그룹 5 또는 HA-VS-PEG-$(SH)_2$-TA 겔 처리 그룹 6에 대해 관찰되지 않았다.

[0377] 이 연구 결과는 1.5 ml의 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 단독 또는 2mg/ml의 트리암시놀론 아세토니드, HA-VS-PEG-$(SH)_2$-TA과 조합하여 염소의 무릎 관절에 관절 내 주사 후 제28일에 국소 또는 전신 효과가 없다는 것을 나타낸다. HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔에 트리암시놀론 아세토니드 첨가의 연골 상의 효과는 동등한 용량 또는 더 높은 용량의 트리암시놀론 아세토니드 단독을 주사하는 효과보다 더 적었다.

[0378] 사프라닌-O로 글리코사미노글리칸 특이적 염색은 연골에서 HA-VS-PEG-$(SH)_2$ 겔로 조제될 때 2 mg/mL (3mg)에서 트리암시놀론 아세토니드의 효과는 제14일 및 제28일 시점에 트리암시놀론 아세토니드의 2 mg/mL (3 mg) 및 8 mg/mL (12 mg) 볼루스 용량보다 더 낮았다는 것을 증명하였다.

[0379] 도 12 및 13은 주사 후 제14일(도 12) 및 제28일(도 13일)에 사프라닌-O 염색(40X)에 의한 대표적인 내측 대퇴 상과 조직을 예시한다. 도면은 관절에 직접 주사된(즉, 히드로겔에 포함되지 않음) 동등한 용량의 트리암시놀론 아세토니드로 처리한 연골 샘플에 대해서보다 히드로겔에 포함된 트리암시놀론 아세토니드로 처리한 관절의 연골 샘플에 대해 더 많은 사프라닌-O 염색이 있다는 것을 나타낸다.

[0380] **실시예 35**

[0381] **압출력의 측정**

[0382] HA-VS/PEG-$(SH)_2$/HA 생성물(실시예 5, 실시예 41) 및 트리암시놀론 아세토니드가 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$/HA(실시예 38)를 압출하기 위해 필요로 되는 힘을 Chatillon 모터라이즈드(motorized) 힘 테스터를 사용하여 측정하였다(Chatillon DFE-025 디지털 힘 게이지가 있는 Chatillon LTCM-6 모터라이즈드 테스터, Ametec TCI Division). 힘 게이지가 주사기의 플런저 막대에 직접 걸치도록 10 mL 주사기를 고정하기 위한 고정장치를 모터라이즈드 테스터의 기본 플레이트에 부착하였다. 힘 테스터를 작동시켰고, 회전 속도 제어 다이얼을 "3"으로 조절하여 주행속도를 분 당 3인치로 설정하였다. 모터라이즈드 테스터 암을 그것의 최 상단 지점으로 이동시켰다. 시험된 조제물에 함유된 10 mL 유리 주사기의 말단-캡을 제거하였고, 21 게이지 주사를 캡핑되지 않은 루어 말단 팁에 부착하였다. 주사기 홀더 및 모터라이즈드 테스터 암에 위치된 주사기를 힘 게이지가 주사기 플런저 막대를 가볍게 터치할 때까지 서서히 아래쪽으로 이동시켰다. 16mL 테스트 튜브를 21 게이지 바늘의 말단 하에 두었다. 힘 게이지를 최대 힘을 기록하도록 설정하였다. 힘 게이지는 0이었다. 그 다음에 주사기의 플런저를 눌렀고, 주사기의 내용물을 21 게이지 바늘을 통해 압출되도록 모터라이즈드 테스터의 토글 스위치에 압력을 가하였다. 주사기 마개가 주사기의 바닥에 도달하기 바로 전에 모터라이즈드 테스터를 멈추었다. 힘 게이지 스크린에 표시된 최대 압출력을 기록하였다. 시험한 다양한 조제물로부터의 결과는 하기에 나타낸다:

*표 14*

| 샘플 # | 압출력 (lbs) | | |
|---|---|---|---|
| | HA이 있는 HA-VS / PEG-$(SH)_2$ (Lot NB30:16) | HA이 있는 HA-VS / PEG-$(SH)_2$ (Lot M0229) | HA이 있는 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 | | |
| 평균 | 7.1 | 10.36 | 7.33 |
| STD | 0.6 | 0.16 | 1.11 |

[0383]

[0384] **실시예 36**

[0385] **HA이 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 압출력의 시간에 따른 안정성**

[0386] Chatillon 모터라이즈드 힘 테스터(Chatillon DFE-025 디지털 힘 게이지가 있는 Chatillon LTCM-6 모터라이즈드 테스터, Ametec TCI Division)를 사용하여 시간의 작용으로서 HA-VS/PEG-$(SH)_2$/HA 생성물(실시예 5)을 압출하는데 필요한 힘을 측정하였다. 생성물이 만들어진 후, 이후에 최초 측정의 1개월 및 3개월 후 압출력을 측정하였다. 샘플을 3개월의 시간 기간에 걸쳐 실온에 저장하였다. 압출력을 다음과 같이 각 샘플에 대해 측정하였다: 힘 게이지가 주사기의 플런저 막대에 직접 걸치도록 10 mL 주사기를 고정하기 위한 고정장치를 모터라이즈드 테스터의 기본 플레이트에 부착하였다. 힘 테스터를 작동시켰고, 회전 속도 제어 다이얼을 "3"으로 조절하여 주행속도를 분 당 3인치로 설정하였다. 모터라이즈드 테스터 암을 그것의 최상단 지점으로 이동시켰다. 시험된 조제물에 함유된 10 mL 유리 주사기의 말단-캡을 제거하였고, 21 게이지 주사를 캡핑되지 않은 루어 말단 팁에 부착하였다. 주사기 홀더 및 모터라이즈드 테스터 암에 위치된 주사기를 힘 게이지가 주사기 플런저 막대를 가볍게 터치할 때까지 서서히 아래쪽으로 이동시켰다. 16mL 테스트 튜브를 21 게이지 바늘의 말단 하에 두었다. 힘 게이지를 최대 힘을 기록하도록 설정하였다. 힘 게이지는 0이었다. 그 다음에 주사기의 플런저를 눌렀고, 주사기의 내용물을 21 게이지 바늘을 통해 압출되도록 모터라이즈드 테스터의 토글 스위치에 압력을 가하였다. 주사기 마개가 주사기의 바닥에 도달하기 바로 전에 모터라이즈드 테스터를 멈추었다. 힘 게이지 스크린에 표시된 최대 압출력을 기록하였다. Lot NB30:16에 대한 결과는 하기에 나타내며, 3개월에 걸쳐 21 게이지 바늘을 통해 생성물을 압출하기 위해 필요한 힘에 실질적인 변화가 없다는 것을 나타낸다.

*표 15*

| 샘플 # | 압출력 (lbs) | | |
|---|---|---|---|
| | T = 0 | T = 1 개월 | T = 3 개월 |
| 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 |
| 평균 | 9.54 | 8.19 | 8.69 |
| STD | 0.75 | 1.27 | 1.69 |

[0387]

[0388] **실시예 37**

[0389] **HA이 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$/TA 겔의 제조**

[0390] 170.8 mg, 341.3 mg, 511.7mg, 및 682.7 mg 멸균 트리암시놀론 아세토니드를 4개의 개별 멸균 125 ml 플라스틱 보틀로 칭량하였고, 각각 TA 10 mg, TA 20 mg, TA 30 mg, 및 TA 40 mg로 라벨을 붙였다. TA를 함유하는 각 보틀을 균형있게 무게를 달았고, 물 중에서 멸균 여과된(0.2 um 멸균 여과, PVDF 막을 통해 여과) 14.98 g, 14.99 g, 14.99 g, 및 15.01 g을 TA 10 mg 내지 40 mg의 순서로 각각 4개의 보틀에 첨가하였다. TA 분말 및 HA-VS 용액을 결과 용액이 시각적으로 균질하게 나타날때까지 교반에 의해 혼합하였다. 0.375 mL의 멸균여과된(0.2 um 멸균 필터를 통해) 1M 인산나트륨, pH 7.4를 각각의 보틀에 첨가하였고, 결과 혼합물을 잘 혼합하였다. 0.543 mL의 50 mg/mL의 PEG-디티올 3350 [PEG$(SH)_2$] (0.2 um 멸균 필터를 통해 멸균여과됨)를 각 용기에 첨가하였고 완전히 혼합하였다. 상기 단계들을 바이오후드에서 수행하였다. 혼합물을 37℃ 오븐에서 밤새 두었다. 조제물을 오븐으로부터 제거하였고, 용기의 외부를 70/30 IPA/물로 닦은 다음 바이오후드에 옮겼다. 각 겔을 멸균 스파출러를 사용하여 부수었다. 0.9% 식염수 중에서 86.23 g, 86.25 g, 86.40 g, 및 86.23 g의 7.83 mg/mL HA(0.2 um 멸균 필터를 통해 여과, PVDF 막)를 각각 TA 10 mg, 20 mg, 30 mg, 및 40 mg의 라벨을 붙인 용기에 첨가하였다. 각 혼합물을 3시간 동안 실온에서 팽창시켰다. 각 혼합물을 이어서 필터 덮개로 0.85 um 메시[폴리에스테르 메시의 23mm 직경 디스크(McMaster Carr, Cat # 9218T13, 메시 크기: 20.3 x 20.3, 정사각형/직사각형 크기: 0.0331", 미크론 등급: 840 미크론, 개방 영역의 백분율: 46, 실 직경: 0.0157")를 통해 통과시켰고, 23mm 레더펀치를 사용하여 절단하였다. 디스크를 25mm 주사기 필터 홀터에 삽입하였고, 필터 홀더(Cole Palmer, Cat # EW-29550-42)에 삽입하였고, 필터 홀더를 폐쇄하였다. 메시를 함유한 필터 홀더를 고압멸균하였다]. 수집한 메시 혼합물을 이어서 잠깐의 시간 동안 0.85 um 메시를 통해 통과시켰다. 수집한 혼합물을 이어서 플라스틱 용기에 저장하였다.

[0391] **실시예 38**

[0392] **HA가 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$/TA 겔의 포장**

[0393] 실시예 37로부터 6 mL의 각 조제물을 주사기 캡이 있는 10mL 유리 주사기(BD Hypak 유리 주사기, P/N 47262119)에 알리쿼팅하였다. 마개/플런저를 주사기의 목에 삽입한 후 플런저 막대를 멸균 마개(BD, P/N 47318319)의 뒤쪽에 나사를 죄었다. 주사기를 뒤집었고, 주사기 캡을 약간 열었다. 플런저를 과량의 공기가 배출될 때까지 탈기하였다. 이어서 주사기 캡을 조였다. 상기 단계를 바이오후드에서 수행하였다. 모든 생성물이 포장될 때까지 과정을 반복하였다.

[0394] **실시예 39**

[0395] **입자크기의 결정-탈이온수 세척**

[0396] 2.36 mm (USA 표준 시험 시브 #8), 1.4 mm (USA 표준 시험 시브 #14), 1 mm (USA 표준 시험 시브 #18), 0.85 mm (USA 표준 시험 시브 #20), 0.6 mm (USA 표준 시험 시브 #30), 0.425 mm (USA 표준 시험 시브 #40), 0.25 mm (USA 표준 시험 시브 #60), 및 0.150 mm (USA 표준 시험 시브 #100)의 스테인리스 스틸 시브를 DI 수로 세척하였고, Kimwipes를 사용하여 건조하게 닦았다. 각 시브의 중량을 측정한 후, 바닥의 가장 작은 크기(#100)로부터 상단의 가장 큰 크기(#8)로 다르게 진행하는 것의 상단에 시브를 두었다. 100 mL의 HA-VS/PEG-$(SH)_2$/HA가 있는 TA 조제물(실시예 37)을 상단 시브에 서서히 부었다. 일단 대부분의 액체 성분 샘플을 상단 시브를 통해

통과시키면, 대략 50 mL 탈이온수를 상단 시브에 서서히 첨가하여 그 시브에 의해 보유된 겔 성분을 헹구었다. 일단 액체 성분이 시브를 통해 통과하면, 시브를 스택으로부터 제거하였다. 이 과정을 각 시브를 세척하고 스택으로부터 제거할 때까지 반복하였다. 각 시브에 남겨진 과량의 물방울을 종이타월을 사용하여 닦았다. 각 시브의 총 중량(시브+수집된 겔)을 측정하였다. 각 시브에 수집된 겔 입자의 중량을 총 시브 중량으로부터 처음 시브를 차감함으로써 계산하였다. 각 시브에 의해 수집한 겔 백분율을 특정 시브에서 수집한 겔의 중량을 취하고, 이어서 모든 시브로부터 수집한 겔의 총 중량으로 나누어서 계산하였다.

*표 16*

| 시브 크기 # | 시브 크기 (mm) | 각 시브에 수집된 겔 (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 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 |

[0397]

[0398] **실시예 40**

[0399] **입자 크기 결정-식염수 세척**

[0400] 2.36 mm (USA 표준 시험 시브 #8), 1.4 mm (USA 표준 시험 시브 #14), 1 mm (USA 표준 시험 시브 #18), 0.85 mm (USA 표준 시험 시브 #20), 0.6 mm (USA 표준 시험 시브 #30), 0.425 mm (USA 표준 시험 시브 #40), 0.25 mm (USA 표준 시험 시브 #60), 및 0.150 mm (USA 표준 시험 시브 #100)의 스테인리스 스틸 시브를 DI 수로 세척하였고, Kimwipes를 사용하여 건조하게 닦았다. 각 시브의 중량을 측정한 후, 바닥의 가장 작은 크기(#100)로부터 상단의 가장 큰 크기(#8)로 다르게 진행하는 것의 상단에 시브를 두었다. 100 mL의 HA-VS/PEG-$(SH)_2$/HA가 있는 TA 조제물(실시예 37)을 상단 시브에 서서히 부었다. 일단 대부분의 액체 성분 샘플을 상단 시브를 통해 통과시키면, 대략 50 mL 0.9% 식염수를 상단 시브에 서서히 첨가하여 그 시브에 의해 보유된 겔 성분을 헹구었다. 일단 액체 성분이 시브를 통해 통과하면, 시브를 스택으로부터 제거하였다. 이 과정을 각 시브를 세척하고 스택으로부터 제거할 때까지 반복하였다. 각 시브에 남겨진 과량의 물방울을 종이타월을 사용하여 닦았다. 각 시브의 총 중량(시브+수집된 겔)을 측정하였다. 각 시브에 수집된 겔 입자의 중량을 총 시브 중량으로부터 처음 시브를 차감함으로써 계산하였다. 각 시브에 의해 수집한 겔 백분율을 특정 시브에서 수집한 겔의 중량을 취하고, 이어서 모든 시브로부터 수집한 겔의 총 중량으로 나누어서 계산하였다.

표 17

| 시브 크기# | 시브 크기 (mm) | 각 시브에 수집된 겔 (%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 실행-1 | 실행-2 | 실행-3 | 평균 | 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 |

[0401]

[0402] **실시예 41**

[0403] **히알루론산이 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리 - HA 팽창**

[0404] 3개의 멸균 125 mL 보틀을 개개를 균형있게 칭량하였고, 물 중에서 14.97 g, 14.95 g, 및 15.00 g의 14 mg/mL HA-VS(0.2 um 멸균 필터, PVDF 막을 통해 여과)를 각각 3개의 보틀에 첨가하였다. 0.375 mL의 1M 인산 나트륨, pH 7.4 (0.2 um 멸균 필터를 통해 멸균 여과됨)를 각각의 보틀에 첨가하였고, 잘 혼합하였다. 0.543 mL의 50 mg/mL의 PEG$(SH)_2$ (0.2 um 멸균 필터를 통해 멸균 여과)를 각 용기에 첨가하였고, 완전히 혼합하였다. 상기 단계를 바이오후드 중에서 수행하였다. 혼합물을 37℃ 오븐에서 밤새 두었다. 조제물을 오븐으로부터 제거하였고, 용기의 외부를 70/30 IPA/물로 닦은 다음 바이오후드로 옮겼다. 각 겔을 멸균 스파출러를 사용하여 부수었다. 0.9% 식염수 중에서 86.40 g, 86.21 g, 및 86,31 g의 7.83 mg/mL HA(0.2 um 멸균 필터를 통해 여과, PVDF 막)를 용기에 첨가하였다. 각 혼합물을 3시간 동안 실온에서 팽창시켰다. 각 혼합물을 이어서 필터 덮개로 0.85 um 메시[폴리에스테르 메시의 23mm 직경 디스크(McMaster Carr, Cat # 9218T13, 메시 크기: 20.3 x 20.3, 정사각형/직사각형 크기: 0.0331", 미크론 등급: 840 미크론, 개방 영역의 백분율: 46, 실 직경: 0.0157")를 통해 통과시켰고, 23mm 레더펀치를 사용하여 절단하였다. 디스크를 25mm 주사기 필터 홀터에 삽입하였고, 필터 홀더(Cole Palmer, Cat # EW-29550-42)에 삽입하였고, 필터 홀더를 폐쇄하였다. 메시를 함유한 필터 홀더를 고압멸균하였다]. 수집한 메시 혼합물을 이어서 잠깐의 시간 동안 0.85 um 메시를 통해 통과시켰다. 수집한 혼합물을 이어서 플라스틱 용기에 저장하였다.

[0405] **실시예 42**

[0406] **히알루론산이 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 슬러리의 포장**

[0407] 실시예 41로부터 6 mL의 각 조제물을 이어서 주사기 캡이 있는 10mL 유리 주사기(BD Hypak 유리 주사기, P/N 47262119)로 알리퀴트하였다. 마개/플런저를 주사기의 목에 삽입한 후, 플런저 막대를 멸균 마개(BD, P/N 47318319)의 뒤쪽에 나사로 조였다. 주사기를 뒤집었고, 주사기 캡을 살짝 열었다. 과량의 공기가 배출될 때까지 플런저를 눌렀다. 그 다음에 주사기 캡을 단단하게 조였다. 상기 단계들을 바이오후드에서 수행하였다. 모든 생성물이 포장될 때까지 과정을 반복하였다.

[0408] **실시예 43**

[0409] **입자 크기의 결정-식염수 세척**

[0410] 2.36 mm (USA 표준 시험 시브 #8), 1.4 mm (USA 표준 시험 시브 #14), 1 mm (USA 표준 시험 시브 #18), 0.85 mm (USA 표준 시험 시브 #20), 0.6 mm (USA 표준 시험 시브 #30), 0.425 mm (USA 표준 시험 시브 #40), 0.25 mm (USA 표준 시험 시브 #60), 및 0.150 mm (USA 표준 시험 시브 #100)의 스테인리스 스틸 시브를 DI 수로 세척하였고, Kimwipes를 사용하여 건조하게 닦았다. 각 시브의 중량을 측정한 후, 바닥의 가장 작은 크기(#100)로부터 상단의 가장 큰 크기(#8)로 다르게 진행하는 것의 상단에 시브를 두었다. 100 mL의 히알루론산이 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 조제물(실시예 41)을 상단 시브에 서서히 부었다. 일단 대부분의 액체 성분 샘플을 상단 시브를

통해 통과시키면, 대략 50 mL 0.9% 식염수를 상단 시브에 서서히 첨가하여 그 시브에 의해 보유된 겔 성분을 헹구었다. 일단 액체 성분이 시브를 통해 통과하면, 시브를 스택으로부터 제거하였다. 이 과정을 각 시브를 세척하고 스택으로부터 제거할 때까지 반복하였다. 각 시브에 남겨진 과량의 물방울을 종이타월을 사용하여 닦았다. 각 시브의 총 중량(시브+수집된 겔)을 측정하였다. 각 시브에 수집된 겔 입자의 중량을 총 시브 중량으로부터 처음 시브를 차감함으로써 계산하였다. 각 시브에 의해 수집한 겔 백분율을 특정 시브에서 수집한 겔의 중량을 취하고, 이어서 모든 시브로부터 수집한 겔의 총 중량으로 나누어서 계산하였다.

*표 18*

[0411]

| 시브 크기 # | 시브 크기 (mm) | 각 시브에 수집된 겔 (%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 실행-1 | 실행-2 | 실행-3 | 평균 | 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 |

[0412] 실시예 44

[0413] 멸균 및 내독소 시험

[0414] HA (실시예 42, 실시예 5)가 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$ 겔 및 HA (실시예 37, TA10)가 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$/TA 겔을 각각 프로토콜 # BS210C8Y.203 및 BE215C8Y.203을 사용하여 WuXi AppTec에 의해 멸균 및 내독소에 대해 시험하였다. 모든 샘플은 멸균이었고, < 0.5 EU/mL 수준의 내독소를 가진다.

[0415] **실시예 45**

[0416] **HA가 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$의 생체내 생체적합성 시험**

[0417] 시험 재료의 생체내 생체적합성 대 염소에서 상업적으로 이용가능한 비스코보충제 생성물을 시험하기 위해 하기 생체내 연구를 착수하였다.

[0418] 연구에 사용된 재료:

[0419] 시험 재료: 히드로스 - HA가 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$[Lot NB51 :119]

[0420] 대조군 재료: Synvisc - 상업적으로 이용가능한 비스코보충제 생성물

[0421] 총 6개의 골격적으로 성숙한 암컷 염소를 이 연구를 위해 사용하였다. 그것들을 USDA 공급원으로부터 얻었다. 동물을 연구의 시작시 65 내지 99 Ibs로 칭량하였다. 염소를 이 연구 전에 염소 관절염 뇌염(CAE) 및 Johne's 음성이 되도록 결정하였다. 각 동물을 연구 전 적임의 수의사에 의해 일반적 건강 평가(태도, 호흡의 용이함, 및 설사 및 콧물이 없다는 것에 대한 시각적 관찰을 받음)를 제공하였다. 동물을 질병 또는 불구의 어떤 증거에 대해 시험하였다. 연구의 용인가능성은 슬관절의 사용전 질병이 없음, 임상적 소리, 및 이전의 병력이 없음의 여부였다. 염소를 협회에 의해 결정된 적절한 시간 기간 동안 건강상태를 유지하였다. 동물 우리 조건을 실험실 동물에 관한 적용가능한 법 및 규제, 즉, Animal Welfare Act, Public Law 99-198로 개정된 Public Law 89-544, Federal Register 52:16, United States Department of Agriculture - Animal and Plant Inspection Service (USDA-APHIS), 1985 및 Public Health Service Policy on Humane Care of Laboratory Animals, Office for Protection Against Research Risks/National Institutes of Health (OPRR/NIH), September, 1986로 수행하였다. 염소를 주사 후 넓은 실내 실행(우리)으로 유지하였다. 염소는 모든 시간에 제한되지 않은 활동을 하였다. 모든 동물은 1일당 대략 2 Ibs의 소량의 반추동물 음식물뿐 아니라 묶지 않은 건초를 받았다. 수돗

물을 자유롭게 제공하였다. 먹이를 주는 것을 마취전 대략 12-24시간에 제한하였고, 물을 주사 전 대략 12시간에 제한하였다. 각 동물에서 독특한 귀 태그를 확인하였다.

[0422] 처리

[0423] 연구를 다음와 같이 설계하였다.

표 19

그룹 및 처리 배정

| 그룹 | 귀 태그 | 우측 슬관절 (1.5 ml) | 좌측 슬관절 (1.5 ml) | R/L 주사 후 희생 시간 |
|---|---|---|---|---|
| 1A | 3750 | 시험 재료 히드로스 시험 재료 | 대조군 재료 Synvisc | 24 ± 1 시간 |
| 1A | 3751 | 시험 재료 히드로스 시험 재료 | 대조군 재료 Synvisc | 24 ± 1 시간 |
| 1A | 3752 | 시험 재료 히드로스 시험 재료 | 대조군 재료 Synvisc | 24 ± 1 시간 |
| 1B | 3597 | 대조군 재료 Synvisc | 시험 재료 히드로스 시험 재료 | 24 ± 1 시간 |
| 1B | 3753 | 대조군 재료 Synvisc | 시험 재료 히드로스 시험 재료 | 24 ± 1 시간 |
| 1B | 3754 | 대조군 재료 Synvisc | 시험 재료 히드로스 시험 재료 | 24 ± 1 시간 |
| 총 | 6 | | | |

[0424]

[0425] 기본 주사 과정은 모든 피험자에 대해 동일하였다. 모든 주사를 엄격한 멸균하에서 수행하였다. 동물을 디아제팜(0.1-0.5 mg/kg) 및 케타민(4.4 - 7.5 mg/kg)의 정맥내 주사로 마취시켰다. 각각의 무릎을 전위, 움직임의 범위, 부종, 온도, 염발음, 슬개골 주행 및 외반족/내반슬 이상에 대해 신체적으로 시험하였다. 모든 주사를 통상적인 멸균 기술을 이용하여 수행하였다. 좌측 및 우측 슬관절을 주사를 위해 영역을 클리핑함으로써 제조한 다음, 클로로헥시딘 스크럽으로 그것들을 깨끗하게 하였다. 동물을 앙와위로 둔다. 우측 슬관절을 클로로헥시딘 스크럽으로 깨끗하게 하였고, 대안으로 70% 이소프로필 알코올로 3회 깨끗하게 하고 요오드 용액을 발랐다.

[0426] 표준 기술을 각 슬관절에 주사하기 위해 사용하였다. 2-인치 21게이지 크기의 멸균 바늘을 전내측(anteromedial) 접근을 통해 관절내 공간에 도입하였다. 내측 대퇴상과의 후방 과간절흔(intercondylar notch) 벽을 더듬었고, 바늘을 약간 뒤로 빼었다. 1.5 ml의 시험 재료를 그룹 1A에 대해 우측 관절에 또는 1.5 ml의 대조군 재료를 그룹 1B에 대해 주사하였다. 주사 바늘을 제거하였고, 압력을 주사 부위에서 유지하였다. 이어서 주사한 슬관절을 전체 움직임의 범위를 통해 20회 순환시켰다. 이 후에 즉시, 좌측 슬관절을 클로로헥시딘 스크럽으로 깨끗하게 하였고, 대안으로 70% 이소프로필 알코올로 3회 깨끗하게 하고 요오드 용액을 발랐고, 1.5 ml의 대조군 재료를 그룹 1A에 대해 또는 1.5 ml의 시험 재료를 그룹 1B에 대해 우측 슬관절에 대해 상기 설명한 것과 유사한 방식으로 좌측 슬관절에 주사하였다. 주사 바늘을 제거하였고, 주사 부위에 압력을 유지하였다. 이어서 주사한 슬관절을 전체 움직임의 범위를 통해 20회 순환시켰다.

[0427] 고통 및 불편함의 징후를 나타내는 임의의 동물에 대해 주사 후 확인을 하였고, 필요하다면 추가적인 마취를 하였다. 모든 처리를 적절한 연구 문서로 기록하였다.

[0428] 주사개시 후 24 ± 1 시간에 일반적 마취의 유발을 위해 디아제팜 0.22 mg/kg 및 케타민 10 mg/kg으로 구성되는 정맥내 주사로 주사한 동물을 인간적으로 희생시켰다. 이것 다음에, 마취시킨 동물을 심박정지가 확인될 때까지 IV 과용량의 진한 염화칼륨(KCl)을 제공하였다.

[0429] 분석

[0430] 총 형태학적 관찰

[0431] 무릎 관절의 수집 후, 관절을 개방하였고 주사한 멸균 관절의 표 20에서 설명한 총 평가를 행하였다. 광기록을 수행하였다. 관절 변화를 평가하였다.

표 20

[0432]

| 총 평가 및 샘플 수집 | | | |
|---|---|---|---|
| 샘플 | 총 평가 | 샘플 수집 | 스코어 |
| 윤활액(좌측 및 우측) | X | X | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 좌측 및 우측 무릎 관절 | X | | X |
| 좌측 및 우측 활막 | X | | X |

[0433] 추가적으로, 표 21에서 약술한 바와 같은 1인의 관찰자에 의한 관절의 반-정량적 등급화를 수행하였다.

표 21

[0434]

| 총 관절 평가 등급 규모 | | | |
|---|---|---|---|
| 스코어 | 착색 | 충혈 | 부종 |
| 0 | 보통 | 없음 | 없음 |
| 1 | 약간 황색 | 약간 | 약간 |
| 2 | 황색 | 보통 | 보통 |
| 3 | | 현저함 | 현저함 |

[0435] 전체 관절 총 평가 스코어는 착색, 충혈, 및 부종 스코어의 합이었다(0-8점).

[0436] 윤활액 평가

[0437] 개방된 관절로부터 윤활액의 수집 후, 전체 부피를 기록하였다. 유액을 점성도, 투명도 및 색상에 대해 전체적으로 평가하였고 반정량적으로 표 22과 같이 등급화 하였다. 혈구계산기로, 전체 백색 세포 계측을 행하였다. 추가적으로 윤활액 스미어(smear) 분화 현미경 분석을 위해 만들었다. 남은 윤활액을 -80℃에서 개별적으로 라벨이 붙은 냉동용기 중에서 냉동보존하였다. 윤활액 스미어를 잠재적인 미래의 분석을 위해 남겼다.

표 22

[0438]

| 활액 유체에 대한 설명 및 스코어 | | | |
|---|---|---|---|
| 스코어 | 색상 | 투명도 | 조건 |
| 0 | S=담황색 | C=투명 | N=정상 |
| 1 | P=분홍색 | H=흐림 | A=이상 |
| 2 | Y=황색/R=적색 | D=뿌염 | W=물기 |
| 3 | B=혈색 | T=탁함 | |

[0439] 전체 활액 유체 스코어는 색상, 투명도 및 조건 스코어의 합이었다(0-8점).

[0440] 도 14에 따라서 하기 표는 HA가 있는 HA-VS/PEG-$(SH)_2$가 염소 모델에서 24시간에 관절에서 생체에 적합하다는 것을 나타낸다.

표 23

**윤활액 및 관절 총 스코어 평가**

**(시험 물질(TM) 및 대조군 재료에 대해 정렬)**

| 귀 태그 | 그룹 | 시험항목 | 전체 관절 스코어 | 부피 | 색상; 투명도; 조건 | 전체 윤활액 스코어 | 총계 스코어 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |
| **평균** | | | **0.0** | **1.1** | | **1.2** | **1.2** |
| **sd** | | | **0.0** | **0.4** | | **0.4** | **0.4** |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 3597 | 1B | **대조군** | 0 | 2.2 | SHN | 1 | 1 |
| 3753 | 1B | **대조군** | 0 | 1.9 | PHN | 2 | 2 |
| 3754 | 1B | **대조군** | 0 | 1.5 | SHN | 1 | 1 |
| 3750 | 1A | **대조군** | 0 | 1.3 | SHN | 1 | 1 |
| 3751 | 1A | **대조군** | 0 | 0.8 | SHN | 1 | 1 |
| 3752 | 1A | **대조군** | 1 | 1.85 | SHN | 1 | 2 |
| **평균** | | | **0.2** | **1.6** | | **1.2** | **1.3** |
| **sd** | | | **0.4** | **0.5** | | **0.4** | **0.5** |

**색상** : S = **담황색** (0), Y = **황색** (2), P = **분홍색** (1), R = **적색** (2), B = **혈색** (3)

**투명도**: C = **투명** (0), H = **흐림** (1), D = **부염** (2)

**조건(점성도)**: N = **정상** (0), A = **이상** (1), W = **물기** (2)

TM = **시험 재료**

[0441]

표 24

윤활액 세포 분화 및 백혈구(WBC) 수

| 귀마그 | 그룹 | 시험 재료 | WBC/mm³ | 윤활액 중의 세포 % | | | | | TM 존재 | 표면세포가 있는 TM | TM의거대/단핵 식균작용 | 원전 WBC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | % PMN | % 림프구 | % 단핵구 | % 호산구 | % 호염기성세포 | | | | |
| 3750 | 1A | TM | 23,890 | 82 | 0 | 18 | 0 | 0 | + | + 매우 적음 | + | 38,224,000 |
| 3751 | 1A | TM | 7,210 | 90 | 0 | 10 | 0 | 0 | + | + 매우 적음 | + | 10,094,000 |
| 3752 | 1A | TM | 7,127 | 89 | 2 | 9 | 0 | 0 | + | + 매우 적음 | + | 7,127,000 |
| 3697 | 1B | TM | 6,922 | 77 | 4 | 19 | 0 | 0 | + | + 매우 적음 | + | 7,614,200 |
| 3753 | 1B | TM | 3,789 | 74 | 3 | 23 | 0 | 0 | + | + 매우 적음 | + | 2,841,750 |
| 3754 | 1B | TM | 2,200 | 63 | 3 | 34 | 0 | 0 | + | + 매우 적음 | + | 990,000 |
| **평균** | | | **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 | 대조군 | 22,409 | 71 | 7 | 22 | 0 | 0 | + | + 보통 | + | 29,131,700 |
| 3751 | 1A | 대조군 | 7,830 | 87 | 5 | 8 | 0 | 0 | + | + 다수 | + | 6,264,000 |
| 3752 | 1A | 대조군 | 26,700 | 72 | 2 | 26 | 0 | 0 | + | + 다수 | + | 49,395,000 |
| 3697 | 1B | 대조군 | 6,130 | 74 | 2 | 24 | 0 | 0 | + | + 보통 | + | 13,486,000 |
| 3753 | 1B | 대조군 | 6,467 | 53 | 5 | 41 | 1 | 0 | + | + 다수 | + | 10,387,300 |
| 3754 | 1B | 대조군 | 8,100 | 53 | 2 | 45 | 0 | 0 | + | + 다수 | + | 12,150,000 |
| **평균** | | | **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** |

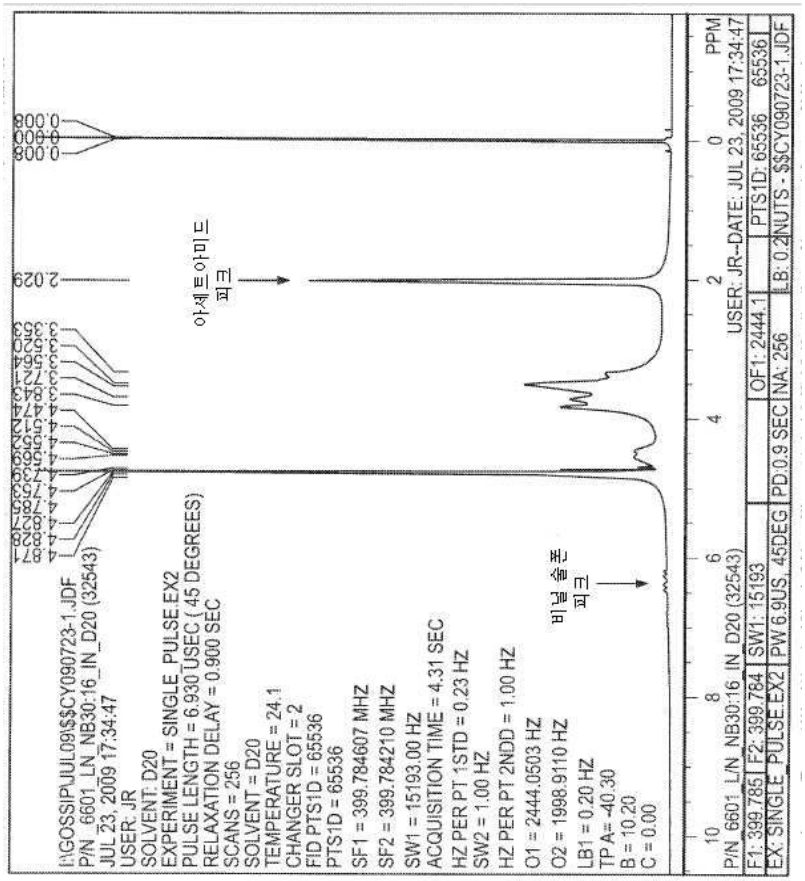
( 시험 재료(TM) 및 대조군 재료에 대해 정렬 )
PMN = 다핵
WBC = 백혈구
TM = 시험 재료

[0442]

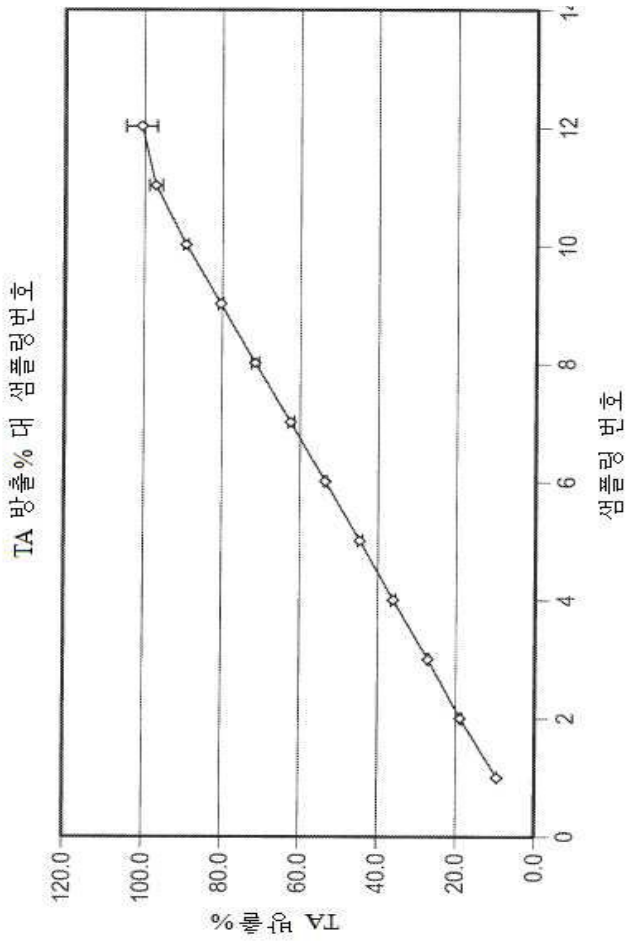
[0443] 상기 설명된 구체예로 만들어지는 변화는 그것의 넓은 발명의 개념으로부터 벗어나지 않고 당업자에 의해 인식될 것이다. 따라서, 본 발명은 개시되는 특정 구체예로 제한되지는 않지만, 후술하는 특허청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 정신과 범주 내에서 변형을 포함하는 것으로 이해된다. 모든 가능한 그것의 변형에서 상기 설명한 구성요소의 임의의 조합은 본원에서 달리 표시되지 않거나 달리 명확하게 문맥에 의해 모순되지 않는다면, 본 발명에 의해 포함된다.

## 도면

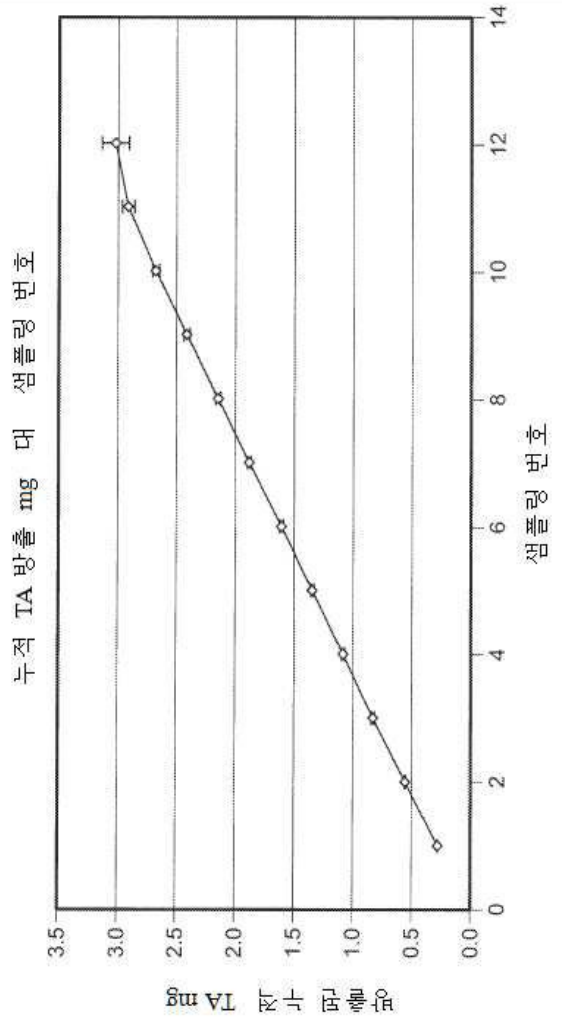
### 도면1


I:\GOSSIP\JUL09\$$CY090723-1.JDF
P/N 6601 LN NB30:16 IN D20 (32543)
JUL 23, 2009 17:34:47
USER: JR
SOLVENT: D20
EXPERIMENT = SINGLE_PULSE.EX2
PULSE LENGTH = 6.930 USEC ( 45 DEGREES)
RELAXATION DELAY = 0.900 SEC
SCANS = 256
SOLVENT = D20
TEMPERATURE = 24.1
CHANGER SLOT = 2
FID PTS1D = 65536
PTS1D = 65536
SF1 = 399.784607 MHZ
SF2 = 399.784210 MHZ
SW1 = 15193.00 HZ
ACQUISITION TIME = 4.31 SEC
HZ PER PT 1STD = 0.23 HZ
SW2 = 1.00 HZ
HZ PER PT 2NDD = 1.00 HZ
O1 = 2444.0503 HZ
O2 = 1998.9110 HZ
LB1 = 0.20 HZ
TP A= -40.30
B = 10.20
C = 0.00
아세트아미드
피크
비닐 술폰
피크
2.029
0.008
0.000
0.008
PPM
USER: JR--DATE: JUL 23, 2009 17:34:47
F1: 399.785 F2: 399.784 SW1: 15193 OF1: 2444.1 PTS1D: 65536 65536
EX: SINGLE_PULSE.EX2 PW 6.9US, 45DEG PD:0.9 SEC NA: 256 LB: 0.2NUTS - $$CY090723-1.JDF

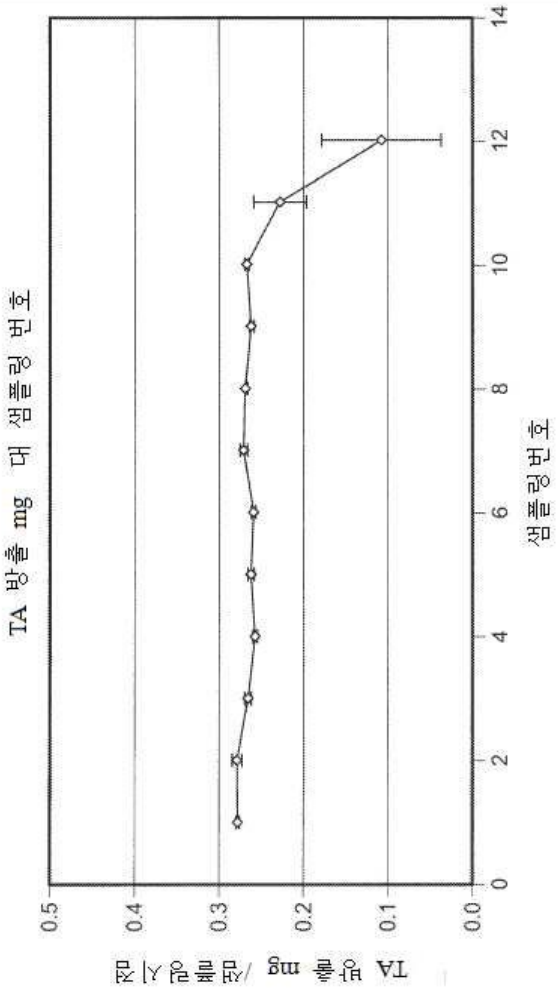
도면2


TA 방출% 대 샘플링번호
TA 방출%
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
2
4
6
8
10
12
샘플링 번호

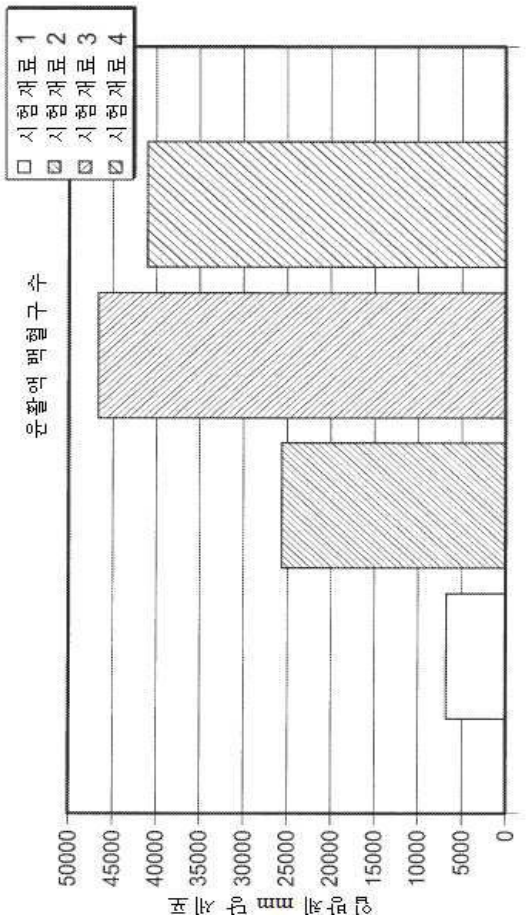
도면3


누적 TA 방출 mg 대 샘플링 번호
샘플링 번호
방출된 누적 TA mg
0
2
4
6
8
10
12
14
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5

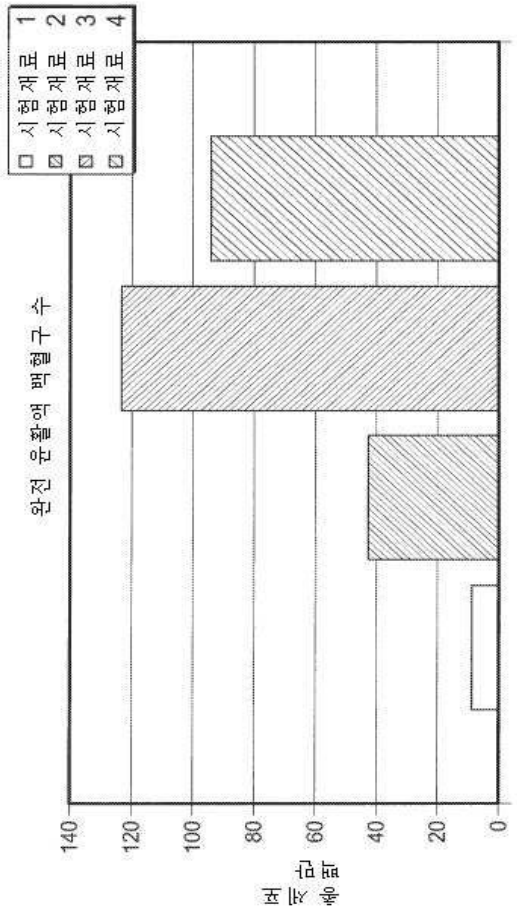
도면4


TA 방출 mg 대 샘플링 번호
TA 방출 mg /샘플링 지점
샘플링 번호
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
2
4
6
8
10
12
14

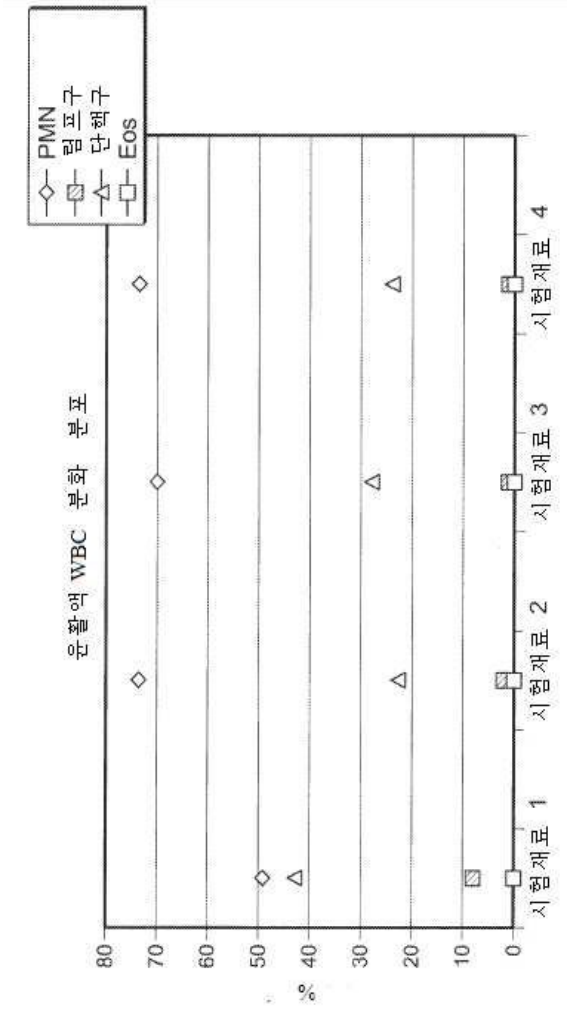
도면5


□ 시험재료 1
▨ 시험재료 2
▨ 시험재료 3
▨ 시험재료 4
용혈액 백혈구 수
입방체 mm 당 세포
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0

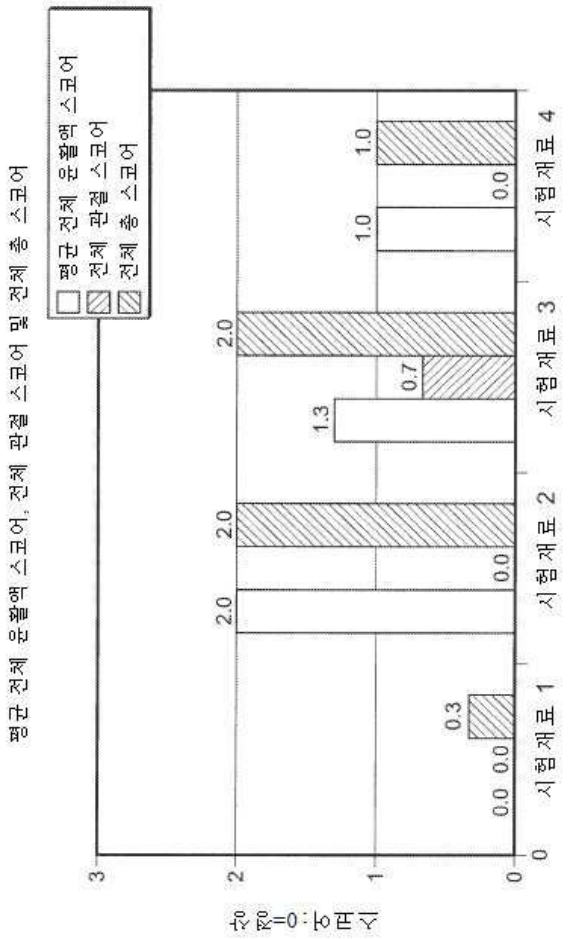
도면6


1 시험재료
2 시험재료
3 시험재료
4 시험재료
완전 융활액 백혈구 수
총 세포
백만
140
120
100
80
60
40
20
0

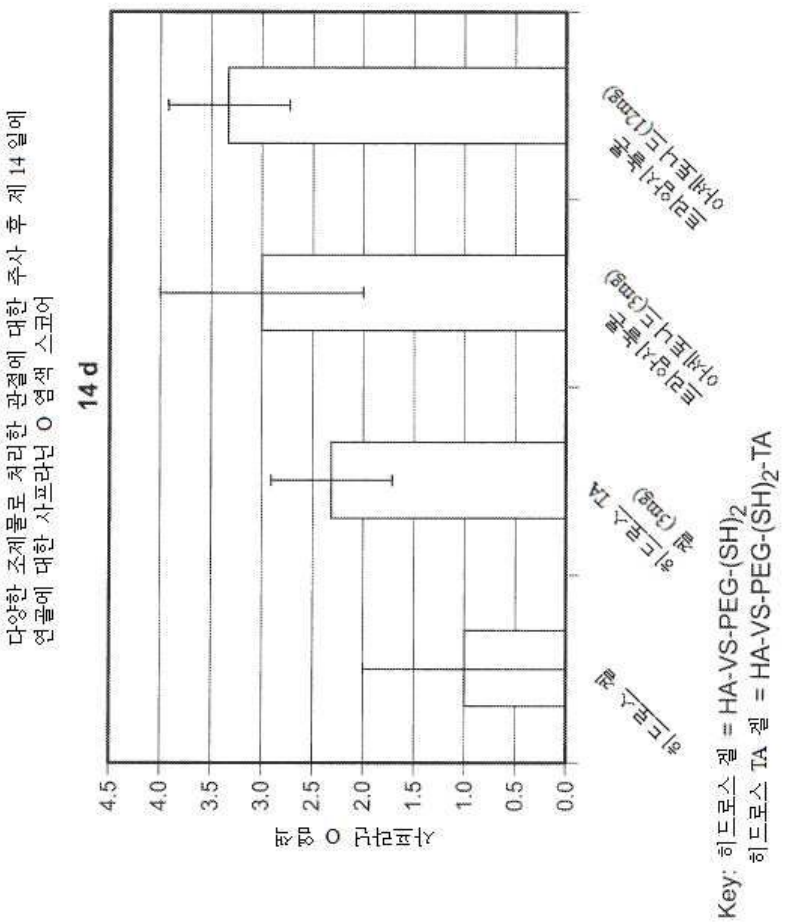
도면7


PMN
림프구
단핵구
Eos
윤활액 WBC 분화 분포
%
80
70
60
50
40
30
20
10
0
시험재료 1
시험재료 2
시험재료 3
시험재료 4

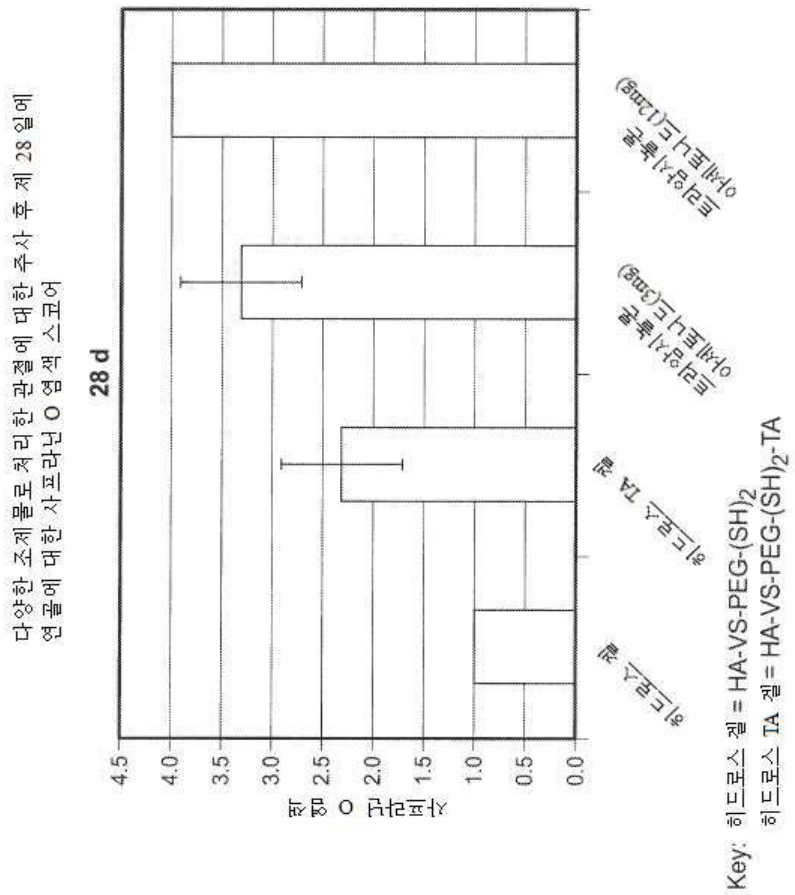
도면8


평균 전체 운활액 스코어, 전체 관절 스코어 및 전체 층 스코어
평균 전체 운활액 스코어
전체 관절 스코어
전체 층 스코어
시험 재료 1
시험 재료 2
시험 재료 3
시험 재료 4
0.0
0.0
0.3
2.0
0.0
2.0
1.3
0.7
2.0
1.0
1.0
0.0
0
1
2
3

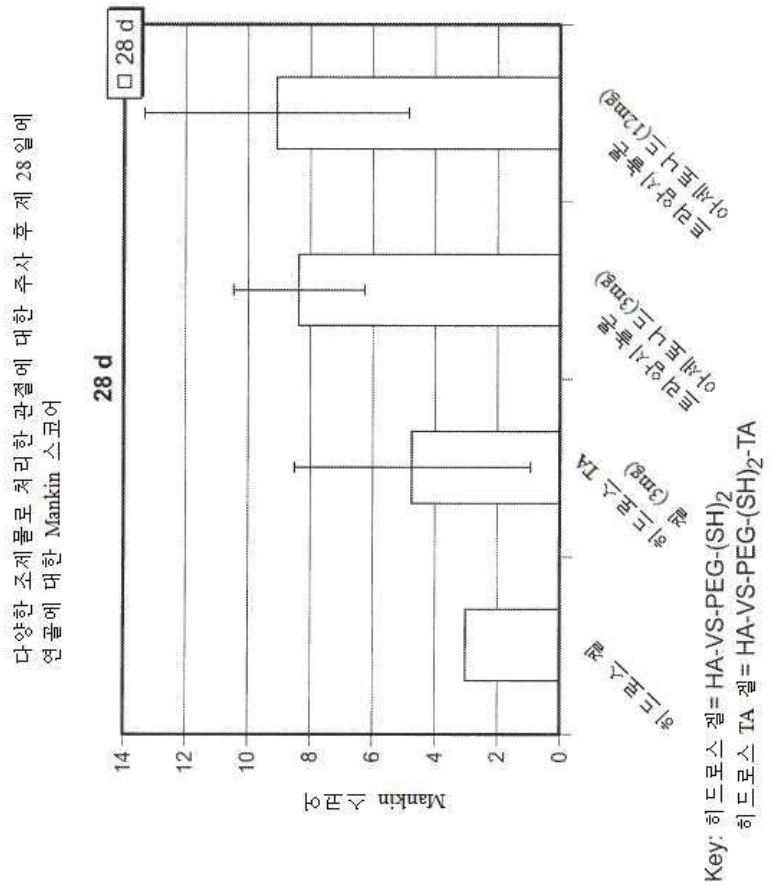
도면9


다양한 조제물로 처리한 관절에 대한 주사 후 제 14 일에
연골에 대한 사프라닌 O 염색 스코어
14 d
사프라닌 O 염색
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
히드로스 겔
히드로스 TA 겔
(3mg) 글루타르알데히드 가교결합 콜로니겐
(6mg) 글루타르알데히드 가교결합 콜로니겐
Key: 히드로스 겔 = HA-VS-PEG-(SH)2
히드로스 TA 겔 = HA-VS-PEG-(SH)2-TA

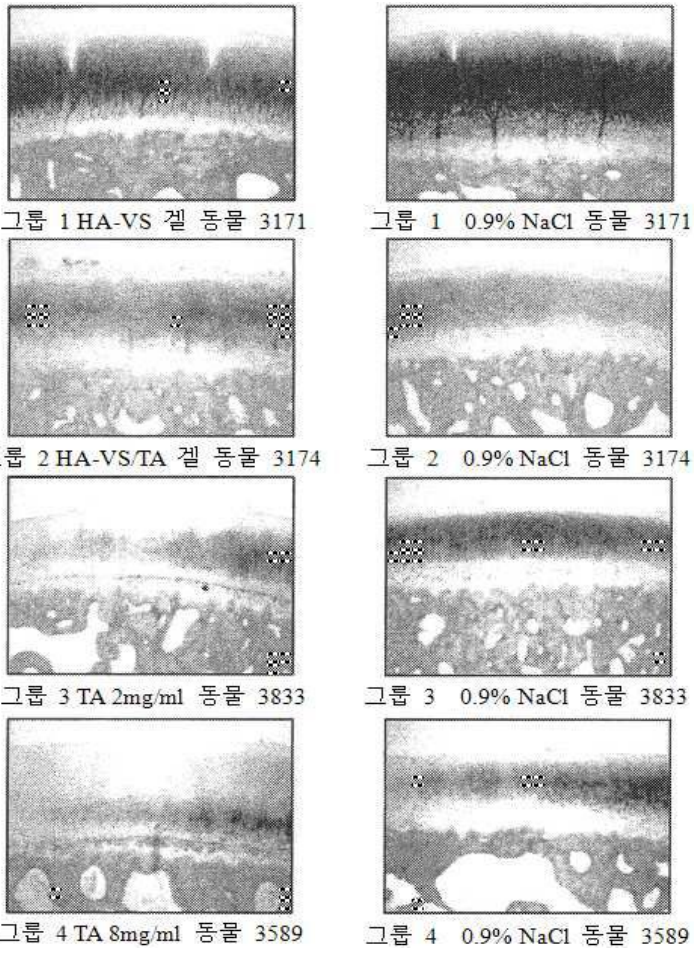
도면10


다양한 조제물로 처리한 관절에 대한 주사 후 제 28 일에
연골에 대한 사프라닌 O 염색 스코어
28 d
사프라닌 O 염색
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
히드로스 겔
히드로스 TA 겔
글루타민산염(Sur1)
글루타민산염(Sur2)
Key: 히드로스 겔 = HA-VS-PEG-(SH)2
히드로스 TA 겔 = HA-VS-PEG-(SH)2-TA

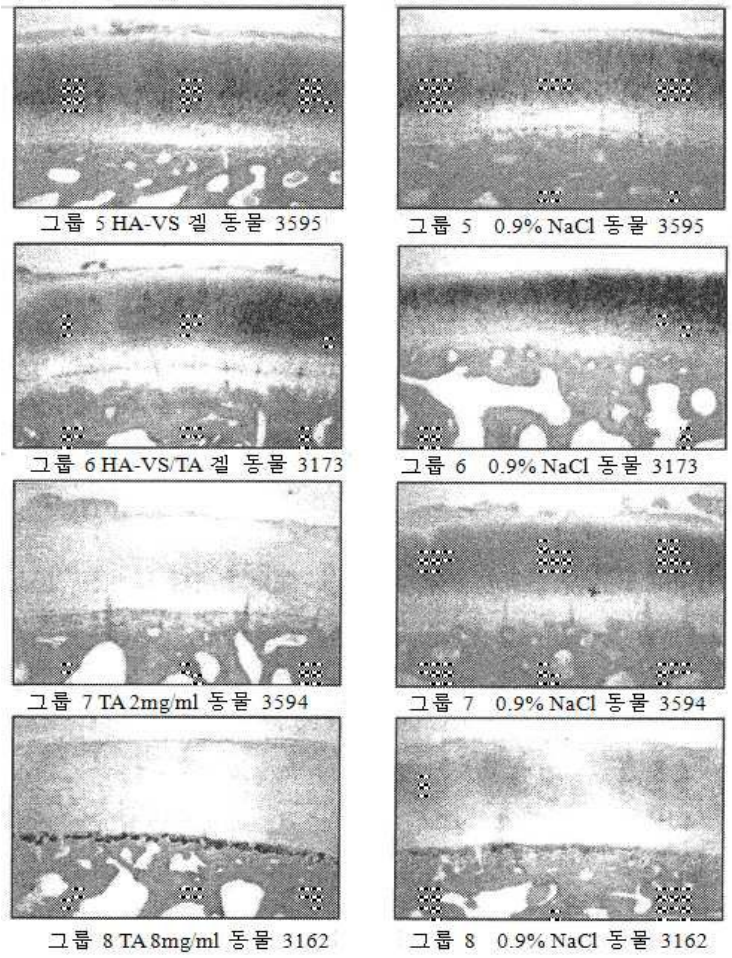
도면11


다양한 조제물로 처리한 관절에 대한 주사 후 제 28 일에
연골에 대한 Mankin 스코어
28 d
□ 28 d
Mankin 스코어
0
2
4
6
8
10
12
14
히드로스 겔 (3mg)
히드로스 TA 겔 (3mg)
트리암시놀론 아세토니드(3mg)
트리암시놀론 아세토니드(12mg)
Key: 히드로스 겔= HA-VS-PEG-(SH)2
히드로스 TA 겔= HA-VS-PEG-(SH)2-TA

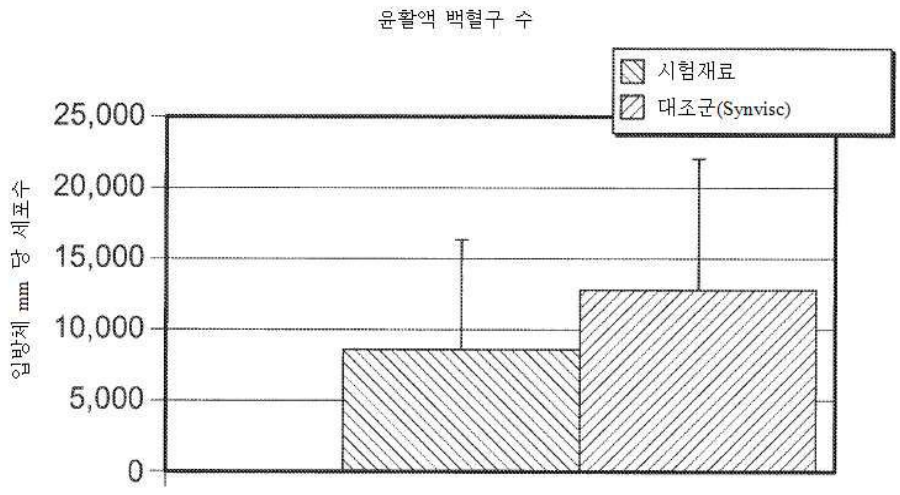
도면12


그룹 1 HA-VS 겔 동물 3171
그룹 1 0.9% NaCl 동물 3171
그룹 2 HA-VS/TA 겔 동물 3174
그룹 2 0.9% NaCl 동물 3174
그룹 3 TA 2mg/ml 동물 3833
그룹 3 0.9% NaCl 동물 3833
그룹 4 TA 8mg/ml 동물 3589
그룹 4 0.9% NaCl 동물 3589

도면13


그룹 5 HA-VS 겔 동물 3595
그룹 5 0.9% NaCl 동물 3595
그룹 6 HA-VS/TA 겔 동물 3173
그룹 6 0.9% NaCl 동물 3173
그룹 7 TA 2mg/ml 동물 3594
그룹 7 0.9% NaCl 동물 3594
그룹 8 TA 8mg/ml 동물 3162
그룹 8 0.9% NaCl 동물 3162

도면14


윤활액 백혈구 수
시험재료
대조군(Synvisc)
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
입방체 mm 당 세포수