



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2007-0104579  
 (43) 공개일자 2007년10월26일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) Int. Cl.<br/> <i>A61K 31/728</i>(2006.01) <i>A61P 19/02</i>(2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2007-7017614</p> <p>(22) 출원일자 2007년07월30일<br/>             심사청구일자 없음<br/>             번역문제출일자 2007년07월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2005/046409<br/>             국제출원일자 2005년12월20일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2006/073835<br/>             국제공개일자 2006년07월13일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>             60/640,749 2004년12월30일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>젠자임 코포레이션</b><br/>             미국, 메사추세츠주 02142, 캠프리지, 500 켄돌 스트리트</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>베일레올, 프랭소와즈</b><br/>             프랑스 에프-75006 파리 튀 다'스사스 116</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>남상선</b></p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 35 항

**(54) 관절내 관절액보충요법을 위한 치료 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 HA 기재 관절보충액요법, 특히 3주 보다 짧은 관절내 체류 반감기를 지니는 관절액보충액을 이용하여 골관절염 및 관절 손상을 치료하는 관절액보충요법을 제공하는 것이다. 본 발명의 방법에 사용되는 관절액보충액은 20 mg/ml미만의 HA를 함유하는 것을 추가로 특징으로 하고, 이러한 HA의 5% (w/w) 이상은 젤 형태, 예를 들어 하일란 B이다. 예시적 구체예에서, 하일란 G-F 20 (Synvisc®)이 6 ± 2 ml의 1회의 관절내 무릎 주사로 투여된다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

4 ml 이상의 1회 관절내 투여로 구성되는, 피검체의 무릎 관절을 치료하기 위한 관절액보충요법 (viscosupplementation).

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 관절액보충액 (viscosupplement)이 20 mg/ml 미만의 HA를 함유함을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 3**

제 1항에 있어서, 피검체가 인간임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 1회 투여되는 관절액보충액의 전체 용량이  $6 \pm 2$  ml 이상임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 5**

제 4항에 있어서, 용량이 6 ml임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 관절액보충액이 관절 동통의 치료를 필요로 하는 피검체에 투여됨을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 7**

제 1항에 있어서, 관절액보충액의 1회 투여가 4개월 이상 치료적으로 유효함을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 8**

제 1항에 있어서, 관절액보충액이 하기중 하나 이상의 특징으로 특성화되는 관절액보충요법:

- (i) 관절액보충액이 3주 미만의 체류(residence) 반감기를 지님;
- (ii) 관절액보충액이 20 mg/ml 미만의 HA를 함유함;
- (iii) 관절액보충액 내의 HA의 5% (w/w) 이상이 젤 형태임.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 체류 반감기가 3일 이상임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 10**

제 1항에 있어서, 관절액보충액이  $8 \pm 2$  mg/ml의 HA를 함유함을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 11**

제 1항에 있어서, 관절액보충액 내의 HA가 동물로부터 기원됨을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 관절액보충액이 수탉 볏 (rooster comb)에서 생성됨을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 13**

제 1항에 있어서, 관절액보충액 내의 HA가 박테리아로부터 기원됨을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 14**

제 1항에 있어서, 관절액보충액의 일부 또는 전부가 가교되어 있음을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 15**

제 14항에 있어서, 가교제가 포름알데히드임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 16**

제 15항에 있어서, 관절액보충액이 하일란 (hylan) A를 포함함을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 17**

제 16항에 있어서, 하일란 A 내의 HA의 평균 분자량이 6,000 kDa임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 18**

제 14항에 있어서, 가교제가 디비닐 술폰임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 19**

제 18항에 있어서, 관절액보충액이 하일란 B를 포함함을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 20**

제 14항에 있어서, 관절액보충액이 하일란 A 및 하일란 B를 포함함을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 21**

제 20항에 있어서, 하일란 A/하일란 B의 비가 HA의 중량을 기준으로 9:1임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 22**

제 1항에 있어서, 관절액보충액이  $8 \pm 2$  mg/ml의 HA를 함유하고, 이의 중량의 10%가 젤 형태임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 23**

제 1항에 있어서, 관절액보충액이 신비스크® (Synvisc®)임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 24**

제 23항에 있어서, 관절액보충액이 비스테로이드성 항염증 약물, 마취제, 아편양진통제, 코르티코스테로이드, 항신생물제, 및 항바이러스제로 구성되는 군으로부터 선택된 성분을 추가로 포함함을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 25**

$6 \pm 2$  ml의 신비스크®의 1회 관절내 투여로 구성되는, 인간 피검체의 무릎 관절을 치료하기 위한 관절액보충요법.

**청구항 26**

제 25항에 있어서, 투여량이 6 ml임을 특징으로 하는 관절액보충요법.

**청구항 27**

제 1항의 관절액보충요법을 포함하여, 관절 병변을 치료하는 방법.

**청구항 28**

제 27항에 있어서, 관절 병변이 골관절염과 관련됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 29**

6 ± 2 ml의 신비스크®의 1회 관절내 주사액을 투여하는 것을 포함하여, 인간 피검체의 무릎 관절의 골관절염 동통을 치료하는 방법.

**청구항 30**

제 31항에 있어서, 용량이 6 ml임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 31**

4 ml 이상의 신비스크®를 함유하는 주사기를 포함하는 관절액보충요법 장치.

**청구항 32**

제 31항에 있어서, 멸균된 것임을 특징으로 하는 장치.

**청구항 33**

제 31항에 있어서, 주사기가 6 ± 2 ml의 신비스크®를 함유함을 특징으로 하는 장치.

**청구항 34**

제 31항에 있어서, 주사기 내의 신비스크®의 용량이 6 ml임을 특징으로 하는 장치.

**청구항 35**

제 31항에 있어서, 신비스크®이 비스테로이드성 항염증 약물, 마취제, 아편양진통제, 코르티코스테로이드, 항신생물제, 항바이러스제, 및 세포로 구성되는 군으로부터 선택된 성분을 추가로 포함함을 특징으로 하는 장치.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

<1> 발명의 분야

<2> 본 발명은 류마티스학 및 정형외과학에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 관절액보충요법에 의한 연골 병변 (예를들어, 골관절염)의 치료에 관한 것이다.

<3> 발명의 배경

<4> 골관절염(OA)은 관절 내의 연골의 파괴, 관절 내에 존재하는 윤활액의 악화, 및 골극 형성과 동반되는 연골밑 골경화증을 특징으로 하는 진행성 퇴행 장애이다. OA를 지닌 환자는 종종 이들의 일상 생활에 다양한 양상에 영향을 주는 중증 동통을 나타낸다. OA의 이환율은 연령에 따라 증가하고, 60세 이상의 연령의 60% 이상은 약간의 연골 이상을 지니는 것으로 보인다 (Bjelle (1982) Scand. J. Rheumatol. Suppl., 43:35-48). OA는 관절염의 가장 비용이 많이 드는 형태가 되었고, 이는 전체적으로 서구 국가의 국민총생산의 1-2.5%에 달한다 (Reginster (2002) Rheumatology, 41(Suppl. 1):3-6).

<5> 윤활액은 관절 표면을 윤활시키고 보호한다. 상기 윤활액은 주로 고분자량의 다당류인 히알루로난 (HA, 히알루론산의 나트륨염, 나트륨 히알루로네이트로도 공지되어 있음)으로 구성되어 있다. 정상적인 인간 관절 윤활액 내의 HA의 농도는 약 3 mg/ml이다. HA는 N-아세틸글루코사민 및 나트륨 글루쿠로네이트의 반복 이당류 단위로 구성된다 (도 1). 관절의 정상적인 윤활액 내의 HA는 5 MDa의 전체 분자량 (MW)을 지닌 12,500개의 이당류 단위를 함유한다 (Balazs et al. (1993) J. Rheumatol. Suppl., 39:3-9). OA 환자에서, 윤활액 내의 HA의 농도 및 MW는 감소하여, 연골을 보호하는 윤활액의 능력이 감소한다.

<6> 고분자량의 HA를 함유하는 점탄성(elastoviscous) 용액의 관절내 주사는 병든 관절의 정상적인 항상성을 회복시키는 것으로 나타났다. 관절액보충요법으로 공지된 이러한 방법은 동통을 감소시키고 관절 기능을 향상시키는 데 효과적인 것으로 입증되었다 (참조: Balazs et al. (1993) J. Rheumatol. Suppl., 39:3-9; Wobig (1998) Clin. Ther., 20(3):410-423).

<7> 다수의 HA 기재 관절액보충액 (viscosupplement)은 시장성이 있어, 신규한 제품이 개발되고 있다. 관절액보충

액은, 예를들어 HA의 공급원 (동물 유래 또는 박테리아 유래), HA의 농도 및 MW, 및 존재시 사용되는 화학적 가공의 유형 및 정도를 포함하는 다수의 특징에 따라 다양하다. 보통, 대부분의 관절액보충액은 5-15 mg/ml의 HA를 함유하고, 이는 주사후 수시간 내지 수일의 체류 (residence) 반감기를 지닌다. 이러한 관절액보충액은 1주일 간격으로 일련의 3회 내지 5회 주사로 2-3 ml 단위의 용량으로 무릎에 주사된다. 몇몇 경우, 동통 완화가 수일 내에 발생하고, 이는 수주에 걸쳐 지속적으로 진행되고, 종종 수개월 동안, 간혹 1년 동안 지속된다. 예를들어, 매주 2 ml로 3회 투여되는 신비스크® (Synvisc®) (hylan G-F 20; Genzyme Corp., Cambridge, MA)을 이용한 무릎 관절액보충요법이 비스테로이드성 항염증 약물 (NSAID)을 이용한 지속적 경구 치료법과 6개월의 기간에 걸친 관절천자와 최소한 동일하게 효능있거나 보다 낮고 (Adams et al. (1995) Osteoarthritis and Cartilage, 3:213-225), 염수 위약 또는 관절천자 대조군 보다 더욱 효과적 (Moreland (1993) Am. Coll. Rheumatol. (57th Ann. Sci. Meeting, Nov. 7-11, San Antonio, TX), 165; Wobig (1998) Clin. Ther., 20(3):410-423)인 것으로 입증되었다.

- <8> 주로 대부분의 관절액보충액의 짧은 체류 반감기로 인해 일련의 다수의 주사가 골관절염 동통에 대한 연장된 (6개월 내지 1년) 효과에 필수적인 것으로 간주되어 왔다 (Peyron (1993) J. Rheumatol., 20(Suppl. 39):10-15). 예를들어, 1.7-2.6 MDa의 평균 MW를 지니는 1% HA의 관절내 체류 반감기는 래빗에서 결정시 11시간이다. HA의 MW가 증가함에 따라, 체류 반감기도 증가한다 (예를들어, HA의 평균 MW가 6 MDa인 1% 하일란 A는 1.2 ± 1 일의 반감기를 지닌다). 그러나, 불용성 겔, 예를들어 0.4% HA를 함유하는 하일란 B조차도 7.7 ± 1일의 비교적 짧은 체류 반감기를 지닌다. 반감기 데이터와 일치하게, OA 무릎으로의 신비스크®의 3회의 2 ml 주사는 2회의 2 ml 주사 보다 OA 동통을 감소시키는데 있어서 현저하게 더욱 효과적인 것으로 입증되었다 (Scale et al. (1994) Curr. Ther. Res., 55(3):220-232).
- <9> 둔부의 OA를 지닌 환자에서의 신비스크®을 이용한 치료를 위해, 권고되는 투여량은 1회의 2 ml 주사이거나, 불충분한 동통 완화가 발생하는 경우 1 내지 3개월 사이에 2회로 추가 주사된다 (Chevalier (2000) Am. Coll. Rheumatol. (64th Annual Scientific Meeting, Oct. 30-Nov. 3, Philadelphia, PA)). 둔부의 OA 환자에서, 2 ml의 신비스크®의 1회의 관절내 주사는 3개월 (본 연구 기간) 이하 동안 대부분의 병적에 등록된 환자에서 매우 즉효적이고 지속적인 증후적 효과를 나타내었다. 보다 많은 용량의 관절액보충액, 예를들어 신비스크® (예를들어, 4, 6 ml 또는 이 이상)이 2-3 ml의 다수의 주사, 또는 2 ml의 1회 주사에 비해 보다 적은 주사로 동등하거나 보다 나은 효능을 제공할수 있는지의 여부가 연구되었다. 공지되어 있는 바와 같이, 보다 많은 용량의 사용은 국소적인 부작용, 예를들어 동통, 종창, 및 삼출(effusion)의 위험을 잠재적으로 부과한다.
- <10> 듀롤란 (Durolane™) (Q-Med AB, Uppsala, Sweden)은 3 ml로 1회 주사되는 것이 권고되는 유일한 관절액보충액이다. 이는 보다 긴 것으로 보고된 반감기 (4주) 및 보다 높은 농도의 HA (20 mg/ml)를 지니는 예폭시 가공된 관절액보충액이다. 연장된 체류 시간은 감소된 수의 주사를 가능케 하는 것으로 생각된다. 그럼에도 불구하고, 듀롤란™의 1회 주사는 위약에 비해 통계적 이점을 입증하지는 않는다 (Altman et al. (2004) Osteoarthritis and Cart., 12:642-649).
- <11> 따라서, 본 발명 이전에, HA 기재 관절액보충액의 1회 주사, 특히 짧은 체류 반감기를 지니는 단일한 주사가 요망되는 장기간의 치료 효과를 생성할 수 있는지의 여부는 공지되어 있지 않았다.
- <12> 보다 적은 주사의 사용은 종종 다수의 주사에 비해 부작용의 회피, 비용 감소, 및 보다 나은 환자의 순응을 포함하는 명백한 이점을 제공한다. 다수의 주사를 필요로 하지 않고 OA 환자에 효과적인 완화를 제공하는 신규한 관절액보충요법을 개발할 지속적인 필요가 존재한다.
- <13> **발명의 개요**
- <14> 본 발명은 관절 병변을 치료하고, 상기 병변과 관련된 동통 및 불쾌함을 감소시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 병변의 예는 골관절염 및 관절 손상을 포함한다.
- <15> 본 발명은 적어도 부분적으로는 보다 큰 용량의 관절액보충액의 1회의 관절내 주사가 보다 적은 용량의 일련의 주사에 의해 생성된 것에 비해 장기간의 치료 이점을 제공한다는 발견을 기재로 한다. 본 발명과 관련하여 수행된 연구에서, 하나의 그룹의 무릎 OA 환자는 3주의 기간에 걸쳐 무릎에 표준적인 일련의 3회의 2 ml 주사의 신비스크®를 투여한 반면, 또 다른 그룹은 동일한 조건하에서 6 ml의 1회 주사를 투여하였다. 놀랍게도, 치료 후 26주째에서 평가지 치료 효능은 둘 모두의 그룹에서 동등한 것으로 밝혀졌다. 따라서, 보다 큰 용량의 관절액보충액, 예를들어 신비스크®의 1회 주사는 바람직한 안전 프로파일을 유지하면서 보다 작은 용량의 다수의 주사와 같이 효과적일 수 있다.

- <16> 따라서, 본 발명은 HA 기재 관절액보충액, 특히 3주 보다 짧은 관절내 체류 반감기 ( $T_{1/2}$ )를 지닌 관절액보충액을 이용한 관절내 관절액보충요법을 위한 치료법을 제공한다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 관절액보충액은 20 mg/ml 미만의 HA (유도체화되고/거나 유도체화되지 않음)를 함유하고, 이의 5% 이상은 젤 형태, 예를들어 하일란 B임을 추가로 특징으로 할 수 있다. 예시적 구체예에서, 관절액보충액은 하일란 G-F 20 (Synvisc®)이고, 이는  $8 \pm 2$  mg/ml의 HA를 함유하고, 이의 중량의 10%는 젤 형태이다.
- <17> 몇몇 구체예에서, 관절액보충액은 주사 후에 6개월 이하 동안 치료 효과를 제공하기에 충분한 양으로 1회 주사 투여된다. 몇몇 구체예에서, 보다 많은 용량의 1회 주사의 치료 효과는 치료 과정에 걸쳐 투여된 3회의 주사 (각각 보다 큰 용량의 1/3)에 의해 달성되는 것과 실질적으로 동일하다. 예시적 구체예에서, 신비스크®는 3주의 기간에 걸쳐 3회의 2 ml 주사가 아닌 6 ml의 1회 주사로 투여된다.
- <18> 본 발명의 방법에 사용되는 투여 방법, 조성물 및 장치가 또한 제공된다.
- <19> 전술한 요약 및 하기의 기술은 청구되는 본 발명을 제한하지 않는다.
- <20> **도면의 간단한 설명**
- <21> 도 1은 히알루로난 (나트륨 히알루로네이트)의 구조를 도시한다.
- <22> **본 발명의 상세한 설명**
- <23> **정의**
- <24> 용어 "관절내 반감기", "체류 반감기" 및 이들의 동족어는 하기의 관절내 공간으로 주사되는 제공된 관절액보충액에 적절한 시간중 어느 것 보다 큰 시간을 의미한다: (a) 주사된 HA 젤 성분의 50%의 제거에 필요한 시간; (b) 주사된 HA 액체 성분의 50%의 제거에 필요한 시간; 및 (c) 액체, 젤 또는 또 기타 형태와 관계없이 HA의 50%의 제거에 필요한 시간. 달리 언급되지 않는 경우, 체류 반감기 계산을 위해, 주사는 성인 인간의 무릎 관절의 관절내 공간으로 투여되는 것으로 간주된다. 체류 반감기를 결정하기 위한 방법은 당 업계에 공지되어 있고, 예시적 방법은 실시예에 기재되어 있다.
- <25> 용어 "HA 액체", "HA 액체상", "HA 액체 성분", "가용성 HA" 및 이들의 동족어는 20 MDa 미만의 평균 MW를 지닌 가교되지 않거나 약간 가교된 수용성 HA를 의미한다.
- <26> 용어 "HA 젤", "HA 젤상", "HA 젤 성분" 및 이들의 동족어는 가용성 HA를 함유하지 않거나 10% (w/w) 미만의 가용성 HA를 함유하는 HA 기재 조성물의 수-불용성 부분인 HA 젤을 의미한다. 통상적으로, HA 젤 및 HA 액체의 혼합물을 함유하는 제공된 HA 기재 조성물 내의 젤의 양은 HA 액체로부터 HA 젤을 분리시킴으로써 결정될 수 있다. 분리, 예를들어 가용성 HA를 통과시켜 불용성 상을 잔류시키는 45  $\mu$  필터를 통해 조성물을 여과시킴으로서 달성될 수 있다. 보다 점성인 조성물 내의 HA 젤로부터 가용성 HA의 방출을 최대화하기 위해, 조성물은 여과 전에 평형화시키거나 평형화시키지 않은 여러 용량의 용매로 희석되는 것이 필요할 수 있다. 더욱이, 일반적으로, 순수한 젤은 이들의 레올로지(rheology) 특성, 예를들어 물질이 변형 (시험 주파수) 변화의 속도에 따라 회수 (탄성 반응)되거나 유동 (점성 반응)할 수 있는 상대 정도를 각각 나타내는 보관 (탄성) 계수 ( $G'$ ) 및 손실 (점성) 계수 ( $G''$ )에 기초하여 순수한 액체로부터 분리될 수 있다. 둘 모두의 계수는 주파수의 선형 함수이다. 이들은 중합체 용액 및 젤의 구조의 민감한 프로브로 증명되었다.  $G'$  및  $G''$  둘 모두는 주파수가 증가함에 따라 증가하나, 하나는 나머지 하나보다 신속히 증가한다.  $G'=G''$ 인 지점에서, 이러한 주파수는 교차 주파수 ( $f_c$ )로 언급된다. 교차 주파수는 중합체 분자량 또는 농도가 증가함에 따라 감소한다. 낮은 주파수에서 중합체 용액은 탄성 스트레스가 완화되고, 점성 스트레스는 우세하게 되어, 결과로  $f_c$  이하의 주파수에서  $G''$ 는  $G'$ 보다 커진다. 대조적으로, 젤은  $G'$ 와  $G''$  사이의 교차가 존재하지 않고,  $G'$ 는 주파수 범위에 걸쳐  $G''$ 보다 크다. 달리 특정되지 않는 경우, 시험 주파수는 0.04 - 7 Hz이다. 점탄성 물질의 물리적 특성 및 이들 특성을 측정하기 위한 방법에 대한 개관은 문헌["Polymers as Rheology Modifiers", edited by Schulz and Glass, ACS Symposium Series 462, 1991; "An Introduction to Rheology," H.A. Barnes, J. F. Hutton and K. Walters, Elsevier, 1989; and Bohlin Rheometer Application Notes MRK544-01, MRK556-01, and MRK573-01을 참조하라.
- <27> 용어 "HA", "히알루로네이트" 및 "히알루로난"은 상호교환적으로 사용되고, 달리 언급되지 않는 경우 공급원 (박테리아적으로 발효되거나 동물 기원), 분자량, 이의 물리적 형태 (예를들어, 젤 또는 액체), 또는 화학적 변형 (예를들어, 가교되거나 달리 유도체화된 것)의 존재 또는 부재, 또는 생성 방법과 관계 없이 임의의 HA를 의미한다.

<28> 치료법

<29> 본 발명은 관절액보충요법 및 관련 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 관절액보충요법은 주사후 4, 5 또는 6 개월 이하 동안 치료 효과를 제공하기에 충분한 양의 관절액보충액의 1회 관절내 주사를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 및 26주 이내에 투여하는 것으로 구성된다. 몇몇 구체예에서, 보다 큰 용량의 1회 주사의 치료 효과는 치료 과정에 걸쳐 투여된 3회의 주사 (각각 보다 큰 용량의 1/3)에 의해 달성되는 것과 실질적으로 동일하다. 몇몇 구체예에서, 단일한 주사 치료법은 주사 후 4, 5 또는 6개월 이하 동안 관절 통증을 감소시킨다.

<30> 치료 효과는 임의의 적절한 방법에 의해 측정될 수 있다 (참조: Altman et al. (1996) Osteoarth. Cart., 4:217-243). 예를들어, 치료 효과는 관절 통痛的 감소를 측정함으로써 평가될 수 있다. 관절 통痛的 정도는 5 개의 포인트의 리커트(Likert) 스케일 (예를들어, 없음, 경증, 중등중, 중증, 매우 중증) 또는 실시예에 기술된 100 mm 시각상사척도(visual analog scale, VAS)에 따라 분류될 수 있다. 기타 적절한 통통 지수는 건강 평가 질문서 (Health Assessment Questionnaire, HAQ) (Fries et al. (1980) Arthritis Rheumatol., 23:137-145) 및 관절염 영향 측정 스케일 (Arthritis Impact Measurement Scale, AIMS) (Meenan et al. (1980) Arthritis Rheumatol., 23:146-154)을 포함한다.

<31> 치료 효과는 또한 기능 손상의 정도에서의 개선을 측정함으로써 평가될 수 있다. 기능적 손상은 분리된 유효한 다차원 지수 (SMI), 예를들어 둔부 및 무릎 OA에 대한 웨스턴 온타리오 및 맥마스터스 유니버시티스 (Western Ontario and McMaster's Universities, WOMAC™) OA 지수 (Bellamy et al. (1988) J. Rheumatol. 34:1833-1840; 참조); 또는 집합 다차원 지수 (AMI), 예를들어 둔부 또는 무릎에 대한 알고-기능성 지수 (Algo-Functional Index, AFI) (Lequesne et al. (1987) Scand. J. Rheumatol. Suppl., 65:85-89)를 이용함으로써 측정될 수 있다.

<32> 치료 효과는 또한 환자 또는 의사에 의한 전체적인 상태 측정에 의해 평가될 수 있다. 전체적 상태는 리커트 또는 VAS 스케일, 예를들어 실시예에 기술된 것을 이용하여 평가될 수 있다.

<33> 치료 효과의 추가 표시는 관절 시험 (참조: Theiler et al. (1994) Osteoarth. Cart., 2:1-24), 동작 기재 측정 (참조: Rejeski et al. (1995) Osteoarth. Cart., 3:157-168) 등을 포함할 수 있다.

<34> 몇몇 구체예에서, 관절액보충액은 6 ± 2 ml 이상, 예를들어 4, 4.25, 4.5, 4.75, 5, 5.25, 5.5, 5.75, 6, 6.25, 6.5, 6.75, 7, 7.25, 7.5, 7.75, 8 ml 또는 이 이상의 양으로 무릎 관절에 투여된다.

<35> 관절액보충액

<36> 본 발명의 방법에 유용한 HA 기재 관절액보충액은 하기와 같은 특징중 임의의 하나, 임의의 두개, 또는 전부를 특징으로 한다:

- <37> (i) 관절액보충액이 3주 미만의 체류 반감기를 지님;
- <38> (ii) 관절액보충액이 20 mg/ml 미만의 HA를 함유함;
- <39> (iii) 관절액보충액 내의 HA의 5% (w/w) 이상이 젤 형태임.

<40> 한 예시적 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용된 관절액보충액은 신비스크®이다. 신비스크®는 생리학적으로 허용되는 용액 내에 가용성 형태인 하일란 A (평균 MW 6,000 kDa) 및 수화된 젤 형태인 하일란 B1의 두개의 형태의 8 ± 2 mg/ml의 HA를 함유한다. 신비스크® 내의 하일란 A/하일란 B의 비는 HA의 중량을 기준으로 9:1이다. 하일란 A는 작은 양의 알데히드, 통상적으로 포름알데히드와 공유적으로 가교되어 화학적으로 변형된 수용성 히알루로난인 반면, 하일란 B는 디비닐 술포에 의해 추가로 가교된 하일란 A이다. 하일란 액체는 이의 평균 분자량 및 이의 점탄성 특성을 증가시키는 작은 수의 가교를 지닌 히알루로난의 변형된 형태인 수화된 하일란 A이다. 하일란 젤은 하일란 B의 수화된 형태이고, 이작용성 가교제로서 디비닐 술포를 이용하여 연속적인 중합체 네트워크로 하일란 A를 가교시킴으로써 제조된다.

<41> 일반적으로, 본 발명에 의해 제공되는 치료법에 사용된 관절액보충액은 22일 미만, 예를들어 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 및 3 일의 관절내 체류 반감기를 지니는 HA 기재 관절액보충액을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 관절액보충액의 체류 반감기는 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 이상이다.

<42> 본 발명의 방법에 사용된 관절액보충액은 20 mg/ml 미만, 예를들어 1-15, 1-10, 1-5, 5-15, 5-10, 10-15, 6-10, 및 7-9 mg/ml의 범위의 HA를 함유하는 것을 추가로 특징으로 할 수 있다. 제공된 조성물 내의 HA의 양은,

예를들어 실시예에 기술된 바와 같은 임의의 적절한 방법에 의해 결정될 수 있다.

- <43> 본 발명의 방법에 사용된 관절액보충액 조성물은 관절액보충액 내의 HA의 중량의 10% 이상이 젤 형태임을 추가로 특징으로 할 수 있다. 예를들어, 몇몇 구체예에서, 관절액보충액은 5% 이상, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 이 이상의 HA 젤을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 관절액보충액은 10-90%, 10-75%, 10-50%, 10-40%, 10-25%의 HA 젤을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 관절액보충액 내의 HA 젤/HA 액체의 비는 1:50-10:1 (w/w), 예를들어 1:50, 1:25, 1:15, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2; 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 및 10:1의 범위를 포함한다.
- <44> 본 발명의 방법에 사용하기 위한 관절액보충액은 500-20,000 kDa, 예를들어 500-1,000; 500-1,500; 500-3,000; 500-5,000; 500-7,000; 500-10,000; 500-15,000; 1,000-1,500; 1,000-3,000; 1,000-5,000; 1,000-7,000; 1,000-10,000; 1,000-15,000; 5,000-10,000; 및 10,000-15,000 kDa 범위의 HA의 MW를 지니는, 액체상 내의 수용성 HA를 추가로 함유할 수 있다.
- <45> HA는 동물 기원, 예를들어 수탉 뱃 또는 뱃줄로부터 유래되거나, 비동물 기원, 예를들어 박테리아 발효된 것일 수 있다. 박테리아 발효된 HA는, 예를들어 문헌[Cooney et al. (1999) Biotechnol. Prog., 15:898-910]에 기술된 바와 같이 생성될 수 있다. 박테리아 발효된 HA는 또한 시판된다 (참조: Shiseido, Japan; Sigma-Aldrich, USA).
- <46> HA는 유도체화 (예를들어, 가교되거나 달리 변형되거나 안정화된 것)되거나 유도체화되지 않을 수 있다. 가교제의 예는 알데히드, 에폭시드, 폴리아지릴, 글리시딜 에테르 (예를들어, 1,4-부탄디올 디글리시딜에테르), 및 디비닐 술포를 포함한다.
- <47> 본 발명의 방법에 유용한 관절액보충액의 특정 예는 아단트 (Adant™), 아르트레아제 (Arthrease™), 아르트룸 (Arthrum™), 퍼마트론 (Fermathron™), 군 (Goon™), 히알라트 (Hyalart™)/히알간 (Hyalgan™), Hy-GAG™, 히아-젝트 (Hya-ject™), 히알루브릭스 (Hyalubrix™), 네오비스크 (NeoVisc™), 수파르츠 (Supartz™)/아르츠 (Artz™), 신비스크®, 오르토비스크 (Orthovisc™), 오스테닐 (Ostenil™), 시노비알 (Sinovial™), 수플라신 (Suplasyn™), 및 시노크롬 (Synochrom™), 비스코닐 (Viscorneal™) (참조: Physicians' Desk Reference™, 2004)를 포함한다. 본 발명의 방법에 적절한 기타 생성물은 미국 특허 제5,143,724호; 제4,713,448호; 제5,099,013호; 제5,399,351호; 제6,521,223호; 제5,827,937호; 미국 특허 출원 제60/533,429호에 기술된 관절액보충액을 포함한다.
- <48> 하일란 및 하일란 A와 하일란 B를 포함하는 관절액보충액의 제법은, 예를들어 미국 특허 제5,143,724호; 제4,713,448호; 제5,099,013호; 및 제5,399,351호에 기술되어 있다.
- <49> 몇몇 구체예에서, 관절액보충액은 듀롤란 (Durolane™) 및/또는 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50일 보다 긴 체류 반감기를 지닌 기타 관절액 보충액은 제외된다.
- <50> 관절액보충액은 또한, 예를들어 비스테로이드성 항염증 약물 (NSAID), 예를들어 이부프로펜 (Ibuprofen™), 디클로페낙 (Diclofenac™), 및 피록시캠 (Piroxicam™); 마취제, 예를들어 리도카인 (Lidocaine™) 및 부피바카인 (Bupivacaine™); 아편양진통제, 예를들어 코데인 및 모르핀; 코르티코스테로이드, 예를들어 텍사메타손 및 프레드니손; 항신생물제, 예를들어 메토티렉세이트 (Methotrexate™), 5-플루오로우라실 및 파클리탁셀 (Paclitaxel™); 및 항바이러스제, 예를들어 아시클로비어 (Acyclovir™) 및 비다라빈 (Vidarabine™)을 포함하는 추가의 활성 또는 비활성 성분을 함유할 수 있다. 관절액보충액은 또한 특정 성분, 예를들어 세포 (예를들어, 연골세포 또는 중간엽 줄기 세포), 단백질, DNA, 비타민 또는 기타 바람직한 생물학적 활성 물질을 함유할 수 있다.
- <51> 용도 및 투여
- <52> 본 발명은 관절 병변을 지닌 피검체를 치료하고, 상기 병변과 관련된 동통 및 불쾌함을 감소시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 병변의 예는 골관절염 (원발성 (특발성) 또는 속발성), 류마티스 관절염, 관절 손상 (예를들어, 반복 동작 손상(repetitive motion injury)), 연골 병변 (연골연화증), 및 관절염전 상태를 포함한다. 본 발명은 상기 병변과 관련된 동통을 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 이러한 방법은 관절 병변의 치료가 요구되는 인간 또는 비인간 피검체에서 실시될 수 있다.
- <53> 투여 부위의 예는 무릎, 어깨, 턱관절 및 수근중수골 관절, 팔꿈치, 둔부, 손목, 발목, 및 등뼈 내의 허리 추간

관절 (후관절)을 포함한다. 임의의 이들 관절로 주사되는 용량은 이러한 관절에 대해 현재 권고되는 용량의 두 배 이상일 수 있다.

<54> 본 발명은 6 ± 2 ml, 예를들어 4, 4.25, 4.5, 4.75, 5, 5.25, 5.5, 5.75, 6, 6.25, 6.5, 6.75, 7, 7.25, 7.5, 7.75, 8, 8.25, 8.5, 8.75, 9, 9.25, 9.5, 9.75, 10 ml 또는 이 이상의 신비스크®의 1회 단위 투여량을 지니는 미리 충전된 1회용 주사기를 포함하는 관절액보충요법 장치를 추가로 제공한다. 본원에 제공된 단일한 주사기를 사용하여 1회 투여 용량을 제공하는 것이 바람직하나, 필요량은 두개 이상의 주사기로 제공될 수 있다. 예를들어, 6 ml의 1회 투여는 각각 2 ml를 함유하는 3개의 주사기를 이용하여 달성될 수 있다.

<55> 하기의 실시예는 예시적 구체예를 제공한다. 실시예는 본 발명을 어떠한 방식으로든 제한하지 않는다. 당업자는 본 발명의 범위 내에서 수행될 수 있는 다수의 변형 및 변화를 인지할 것이다. 따라서, 이러한 변형 및 변화는 본 발명에 포함된다.

<56> **실시예**

<57> **실시예 1: OA를 지니는 환자에서의 신비스크®의 관절내 주사**

<58> 증후성 경대퇴골 OA (100 mm VAS 스코어에서 50-80의 범위의 연구 무릎에서의 전체 OA 동통)를 지니는 외래 환자에서의 2 ml의 신비스크®의 3회의 관절내 주사의 현재 투여 요법에 대한 4 ml 또는 6 ml의 신비스크®의 관절내 주사의 안정성 및 효능 (작용 지속기간을 포함함)을 평가하기 위해 전향성 개방형 연구를 수행하였다. 포함물 (inclusion)에 대한 기타 기준은 40세 이상의 연령; 최근의 3개월 이내에 X-선에 의한 켈그렌-로렌스 (Kellgren-Lawrence) 등급 II-III; 긴장성 삼출물, 기계적 걸림, 또는 최근 (< 2년)의 외상의 부재이다. 100명 (59 내지 66의 범위의 평균 61세, 55% 여성)의 환자를 하기의 5개의 그룹으로 무작위화하였다:

<59> 그룹 1 - 6 ml의 1회의 주사;

<60> 그룹 2 - 4 ml의 1회의 주사;

<61> 그룹 3 - 2주 간격의 4 ml의 2회의 주사;

<62> 그룹 4 - 1주 간격의 4 ml의 3회의 주사; 및

<63> 그룹 5 - 1주 간격의 표준 치료법의 2 ml의 3회의 주사.

<64> 이후, 환자를 6개월 이하 동안 추적하였다 (2, 3, 8, 16 및 24주). 사용된 1차 및 2차 평가 종점을 하기에 기술하였다.

<65> **A. OA 동통의 환자 자가 평가**

<66> 본 연구의 1차 효능 종점은 연구 무릎 OA 동통 완화의 연구와 관련하여 무릎에 OA를 지닌 환자에서 신비스크®을 이용한 관절액보충요법의 효능을 평가하는 것이다. 이는 첫번째 주사 후의 24주째에 수행된, 지난 48시간 이내에 무동통 (0 mm) 내지 극심한 동통 (100 mm)의 종점으로 환자에 의해 자가 평가된 100-mm VAS로 측정된다.

<67> **B. 환자의 전체적인 자가 평가**

<68> 환자를 이전의 48시간에 걸친 모든 관련 증후 및 증상을 고려한 매우 양호 (0 mm) 내지 매우 불량 (100 mm)의 범위에 걸친 100-mm VAS으로 환자의 표적 무릎의 전체 상태를 평가하였다. 환자에게 제공된 정확한 지침은 다음과 같다: "본 왕진의 시점에서 당신(연구 대상)의 무릎의 전체적인 일반적 상태를 하기에 수직선을 이용하여 표시하십시오. 좌측 또는 '0'의 스코어는 '매우 양호함'을 나타내는 반면, '100'의 스코어는 '매우 심각함'을 나타냅니다".

<69> **C. WOMAC™**

<70> 환자는 문헌[Bellamy et al. (1988) J. Rheumatol., 15(12): 1833-40]에 기술된 WOMAC™의 VAS 버전을 수행하였다. 이 스케일은 삼차원의 질병 특이적 자가 수행의 건강 상태 측정법이다. 이는 전체 24개의 질문으로 동통 부위, 경직 및 물리적 기능에서의 임상적으로 중요한 환자 관련 증상을 조사한다. WOMAC™은 그 지방의 언어로 환자에게 제공되고, 보통 5분 미만에 완료된다. WOMAC™ 하위 섹션은 하기와 같다.

<71> WOMAC™ 섹션 A는 활동 동안의 동통의 수준에 대한 질문으로 구성되고, 반응은 무동통 (0 mm) 내지 극심한 동통 (100 mm)의 범위의 VAS로 (환자에 의해) 스코어링된다. 동통의 평가는 하기의 시나리오로 구성된다:

<72> 1. 편평한 표면에서의 보행의 경우? [보행]

- <73> 2. 계단을 오르거나 내려가는 경우? [계단 등반]
- <74> 3. 밤에 침대에 눕는 경우? [야간]
- <75> 4. 앉거나 눕는 경우? [휴식]
- <76> 5. 바로 일어서는 경우? [체중 수반]
- <77> WOMAC 섹션 A에 대한 평균 하위 스코어는 섹션 A의 구성 요소의 각각에 대한 반응에 기초한다.
- <78> WOMAC™ 파트 B (경직 스코어)는 활동 동안의 경직 증증도에 관한 질문으로 구성되고, 반응은 무경직 (0 mm) 내지 극심한 경직 (100 mm)의 범위의 VAS로 (환자에 의해) 스코어링된다. 경직의 평가는 하기의 시나리오로 구성된다:
- <79> 1. 오전의 보행 후의 경우? [오전 경직]
- <80> 2. 일과 후의 휴식 동안의 경우? [일과 후에 발생하는 경직]
- <81> 섹션 B에 대한 평균 하위 스코어는 섹션 B의 구성요소의 각각에 대한 반응을 기초로 한다.
- <82> WOMAC™ 섹션 C는 활동 동안의 기능 손상에 관한 질문으로 구성되고, 반응은 어려움이 없음 (0 mm) 내지 극심한 어려움 (100 mm)의 범위의 VAS로 (환자에 의해) 스코어링된다. 기능 손상의 평가는 하기의 시나리오로 구성된다:
- <83> 1. 계단을 내려가는 경우? [오전 경직]
- <84> 2. 계단을 올라가는 경우? [일과 후에 발생하는 경직]
- <85> 3. 앉았다가 일어나는 경우? [착석에서의 기립]
- <86> 4. 일어나는 경우? [기립]
- <87> 5. 표면으로 구부리는 경우? [굽음]
- <88> 6. 편평한 표면에서 보행하는 경우? [편평한 곳에서의 보행]
- <89> 7. 승차 및 하차하는 경우? [차]
- <90> 8. 쇼핑하는 경우? [쇼핑]
- <91> 9. 양말/스타킹을 신는 경우? [양말/스타킹을 벗는 경우]
- <92> 10. 침대에 눕는 경우? [침대에 눕는 경우]
- <93> 11. 욕조에 들어가거나 나오는 경우? [욕조 출입]
- <94> 12. 앉는 경우? [앉음]
- <95> 13. 화장실에 들어가거나 나오는 경우? [화장실 출입]
- <96> 14. 과중한 가사의 경우? [과중한 가사]
- <97> 15. 가벼운 가사의 경우? [가벼운 가사]
- <98> 섹션 C에 대한 평균 하위 스코어는 섹션 C의 구성 요소의 각각에 대한 반응을 기초로 한다.
- <99> 첫번째 주사 후의 모든 시점에서의 3개의 WOMAC™ 섹션 (A, B 및 C)으로부터 유래된 전체 WOMAC™ 스코어의 기준선으로부터의 변화는 두번째 중점에 따라 분석된다.
- <100> **D. 의사의 OA의 전체적 평가**
- <101> 환자가 전체적 평가 및 WOMAC™을 완료한 후, 연구자는 왕진 시에 매우 양호 (0 mm)에서부터 매우 심각함 (100 mm)의 범위의 100-mm VAS로 환자의 무릎의 전체적인 상태를 평가하였다. 이러한 평가는 환자의 질병 증후, 기능적 능력 및 물리적 시험을 기초로 하였다. 의사에게 "매우 양호"를 나타내는 기준선의 좌측 끝 ("0")과 "매우 심각함"을 나타내는 우측 끝 ("100")을 나타내는 기준선을 이용하여, 왕진 시에 환자의 무릎의 전체적인 일반적인 상태를 나타내도록 지시하였다.

**E. 결과**

기준선과 비교하여 첫번째 주사 후 24주 후의 동통의 감소를 나타내는 결과 (VAS; 지난 48시간 이내에 무동통에 해당하는 0 및 극심한 동통에 해당하는 100)를 표 1에 나타내었다. 동통은 최고를 스코어링한 3 x 2 ml 그룹에서의 36.7 mm에 비해 1 x 6 ml 그룹에서 34.9 mm로 감소하였다. 1 x 4 또는 2 x 4 ml로 치료된 그룹에서, 이러한 감소는 덜 극적이었다 (24 mm만 감소).

표 1. OA 동통의 환자 자가 평가 (기준선으로부터의 변화)

그룹	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
평균	-34.9	-24.3	-24.0	-32.6	-36.7
Std. Dev.	16.4	28.3	22.9	25.3	26.9
95% CI	-42.5, -27.2	-37.2, -11.5	-35.0, -13.0	-44.4, -20.8	-49.2, -24.1

웨스턴 온타리오 및 맥마스터 유니버시티스 골관절염 지수 (WOMAC™) (WOMAC™ A에 대해서는 표 2), 환자 (표 3) 및 의사 (표 4)의 전체적 무릎 OA 평가에 의해 측정된 동통, 경직 및 기능 손상에서의 개선을 포함하는 이차 효능 중점은 동일한 경향을 나타내었다. 치료 그룹을 효능의 순서로 등급을 매기고, 결과를 표 5에 나타내었다. 그룹 1에서 관찰된 효능의 연장된 기간은 놀라웠다. 안정성에 대해서는, 각각의 그룹 (1 x 6 ml 및 3 x 2 ml)의 환자의 10%가 최소 또는 경증의 강도의 관련 국소 무릎 부작용 (동통, 종창 또는 삼출)을 나타내었다.

표 2. WOMAC™ A 동통 스코어 (기준선으로부터의 변화)

그룹	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
평균	-25.8	-14.7	-16.6	-27.7	-25.6
Std. Dev.	22.5	24.2	24.8	27.2	24.6
95% CI	-36.3, -15.3	-25.7, -3.7	-28.5, -4.6	-40.5, -14.9	-37.1, -14.1

표 3. 환자의 전체적 평가 (기준선으로부터의 변화)

그룹	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
평균	-31.3	-14.3	-19.8	-25.9	-24.4
Std. Dev.	26	31	24	32.9	32.3
95% CI	-43.4, -19.1	-28.4, -0.2	-31.2, -8.2	-41.3, -10.5	-39.5, -9.3

표 4. 의사의 전체적 평가 (기준선으로부터의 변화)

그룹	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
평균	-30.7	-16.8	-22.9	-25.9	-27.7
Std. Dev.	18.3	24.8	26.9	25.0	29.6
95% CI	-39.5, -21.9	-28.1, -5.5	-35.8, -10.0	-37.5, -14.2	-41.6, -13.8

<113> 표 5. 치료 그룹 랭킹

그룹	1 1 x 6 ml	2 1 x 4 ml	3 2 x 4 ml	4 3 x 4 ml	5 3 x 2 ml
환자의 동통 평가	2	4	5	3	1
환자의 전체적 평가	1	5	4	2	3
의사의 전체적 평가	1	5	4	3	2
WOMAC™ A	2	5	4	1	3
WOMAC™ B	4	5	3	2	1
WOMAC™ C	2	4	5	1	3

<114>

<115> 그룹 1 (1 x 6 ml)이 일반적으로 최소한의 부작용을 지니는 것만을 제외하고, 안정성과 관련하여 치료 그룹 사이에서 큰 차이가 관찰되지 않았다. 이들 결과는 또한 2 ml 보다 많은 신비스크®의 용량이 무릎에 골관절염을 지닌 환자의 동통을 감소시키기 위해 안전하게 투여될 수 있다는 것을 암시한다.

<116> 실시예 2: 신비스크® 체류 반감기의 결정

<117> A. 수탉 벗 기관 배양물의 히알루로난으로의 <sup>14</sup>C-아세테이트의 혼입

<118> 어린 수탉 (3-6 개월령)을 경부 탈구로 희생시켰다. 이들의 벗을 에탄올 (80%)으로 충분히 세척한 후, 외과용 메스를 이용하여 기부에서 절제하였다. 과량의 혈액을 벗으로부터 얻고, 이를 멸균 염수에 두고, 기류식 무균 후드로 옮기고, 3배의 추가 용량의 멸균 염수로 행구었다. 이후, 벗을 관 중선을 따라 절개하고, 분홍색의 진피 조직의 직각 단편을 절제하였다. 벗 조직 단편을 외과용 메스로 얇게 베어, 5 mg/ml의 테스토스테론 프로피오네이트 (Belmar Laboratories, Inwood, NY), 20 µCi/ml의 <sup>14</sup>C-아세트산 (ICN Radiochemicals, Irvine, CA, 1 mCi/ml), 0.1 mg/ml의 페니실린, 0.1 mg/ml의 스트렙토마이신 및 0.1 mg/ml의 펀지존(fungizone, Hazelton, Lenexa, KS)을 함유하는 벤트렉스 (Ventrex) 배지 HL-1 (Ventrex Labs)에 두었다. 개별적 배양을 약 1.5 g의 벗 조직 및 15 ml의 배지를 함유하는 60 mm의 플라스틱 페트리 접시에서 수행하였다. 배양물을 5%의 CO<sub>2</sub> 환경에서 72시간 동안 인큐베이션시킨 후, 10분 동안 10,000 g로 원심분리하여 배지로부터 조직을 분리시켰다. 조직 펠레트를 30 mm 페트리 접시에서 동결시켰다. 동결된 방사선 표지된 벗 조직은 통상적으로 하일란을 제조하기 위한 연속 방법 전에 1-72시간 동안 냉동장치에서 보관된다.

<119> B. 방사선 표지된 하일란 액체의 제조

<120> 하일란 A 섬유를 하기와 같이 제조하였다. 동결된 방사선 표지된 벗 조직의 조각을 반응 배지 1 g당 조직 0.75 g의 비로 아세톤, 포르말린 (37% 포름알데히드 용액), 클로로포름, 및 아세트산 나트륨을 함유하는 반응 배지에 두었다. 반응을 18-20시간 동안 진행되도록 한 후, 조직 조각을 수거하고, 아세톤으로 3회 세척한 후, 기류식 무균 후드에서 건조시켰다. 이후, 4배 용량의 멸균수를 건조 조직 조각에 첨가하여 방사선 표지된 하일란을 추출하였다. 이러한 수성 추출을 4-6°C에서 수행한 후, 수성 추출물을 분리시키고, 동일한 부피의 물을 두번째 추출물에 다시 첨가하였다. 고흡 아세트산 나트륨을 1%의 농도로 수성 추출물에 용해시키고, 4배 용량의 95%의 에탄올에 천천히 첨가하여 하일란 섬유를 침전시켰다. 방사선 표지된 하일란 섬유를 아세톤으로 2회 세척하고, 아세톤 하에서 저온으로 보관하였다.

<121> 방사선 표지된 하일란 A 섬유 (40.3 mg)를 풀링 (pooling)시키고, 4°C에서 3일 동안 천천히 엔드-오버-엔드 (end-over-end) 혼합시킴으로써 3.0 ml의 멸균된 발열원이 제거된 인산염 완충 식염수 (Biotrics Inc., Ridgefield, NJ, lot 122-1)에 용해시켰다. 용해를 완료시킨 후, 방사성 하일란 액체를 비표지된 하일란 액체로 5배 희석시켰다. 혼합물을 4°C에서 엔드-오버-엔드 혼합으로 5일 동안 추가로 유지시켰다.

<122> C. 방사선 표지된 젤의 제조

<123> 하일란 액체 (하일란 A)를 하일란 젤 (하일란 B)로 가교시키기 위해 사용되는 반응 혼합물에 삼중수 (New England Nuclear, 100 mCi/ml)를 혼합시켰다. 가교 반응을 하기와 같이 수행하였다. 하일란 A 섬유를 약 3시간 동안 삼중수에서 팽창시켰다. 농축된 수산화나트륨을 첨가하고, 용액이 균질화될때까지 (약 15분) 혼합물을 강하게 교반시켰다. 디비닐 술폰을 물중 50%의 농도로 희석시키고, 강한 교반과 함께 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 추가의 55분 동안 실온 (22°C)에 유지시켜, 다당류 사슬이 디비닐 술폰에 의해 연속적 중합

젤 (하일란 젤)에 가교시켰다. 삼중수에서 이러한 반응을 수행함으로써, 트리튬이 디비닐 술폰닐 가교 내의 탄소에 공유적으로 결합되었다. 10배 용량의 멸균된 발열원이 제거된 염수를 첨가하여 pH를 12 미만으로 낮춤으로써 반응을 종결시켰다. 염수 세척은 또한 하일란 젤의 팽창을 평형 수화 상태로 만들었다. 하일란 젤을 염수로 세척하여 반응되지 않은 디비닐 술폰, 반응되지 않은 트리튬, 및 기타 반응 생성물을 제거하고, pH를 7로 낮추었다. 여과에 의해 젤로부터 과량이 염수를 분리시킨 후, 젤을 25 g 니들 (needle)을 통해 5회 통과시켜, 고형 젤을 용이하게 주사가 가능한 형태로 분해시켰다. 이러한 형태에서, 삼중화된 젤을 멸균된 발열원이 제거된 염수에 대해 철저히 투석시켜 임의의 비공유적 결합 트리튬을 제거하였다.

<124> **D. 하일란 젤-하일란 액체 혼합물의 제조**

<125> 삼중화된 하일란 젤 (3.04 g)을 11.63 g의 <sup>14</sup>C-하일란 액체에 직접 첨가하고, 혼합물을 48시간 동안 글렌 밀스 (Glen Mills) 혼합기에 두었다. 이후, 혼합물을 18 g, 21 g 및 25 g의 니들에 연속적으로 10회 통과시켜, 균질성 및 주사 용이성을 보장하였다.

<126> **E. HA 농도 및 방사선표지량의 측정**

<127> 혼합물의 젤 및 액체 성분의 하일란 다당류의 농도를 반복 글루쿠론산 단량체 (3)를 분석하고, 다당류 사슬의 나머지를 결정하기 위해 (2.07)이 곱해지는 자동화된 카르바졸 방법에 의해 결정하였다. 칭량된 0.1 g의 샘플의 젤을 단단히 캡핑된 스크류 탑 튜브 중의 0.2 ml의 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 첨가함으로써 글루쿠론산을 결정하기 전에 하일란 젤을 가수분해시키고, 100°C에서 2시간 동안 산 가수분해가 진행되도록 두었다. 상기 방법에 의해 완전히 용해된 샘플을 카르바졸 방법에 의해 HA를 분석하기 전에 0.2 ml의 1N NaOH로 중화시켰다.

<128> 카르바졸 방법은 샘플 내의 핵수론산 (글루쿠론산)의 양을 측정하는 것을 포함한다. 비색 방법에 의해 핵수론산 농도를 결정하는 방법은 문헌[Dische et al. (1947) J. Biol. Chem., 167:189-198]에 보고되어 있다. 이러한 방법은 핵수론산과 황산 및 카르바졸의 발색 반응을 기초로 한다. 핵수론산의 결정을 위한 첨단 자동화된 방법은 문헌[Balazs et al. (1965) Anal. Biochem., 12:547-558]에 보고되어 있다. 샘플을 황산/보레이트 배지에서 가열시키고, 카르바졸과 반응시켰다. 카르바졸을 핵수론산과 반응시켜 530 nm에서 최대 흡광도를 지니는 분홍색의 착물을 형성시켰다. 자동화된 방법에 대해, 샘플 및 표준을 연동 펌프를 이용하여 지속성 유동분석기를 통해 흡출시켰다. 시약 (산 및 카르바졸)을 첨가하고, 반응 챔버에서 가열시키고, 530 nm에서 지속성 유동비색계로 흡광도를 판독하였다.

<129> 시험 품목의 방사선 함량을 신틸런트(scintillant)로 신티버스 바이오 (Scintiverse Bio) HP (Fisher Scientific)를 이용하여 ISOCAP 300 액체 신틸레이션 계수기 (Nuclear Chicago)에서의 신틸레이션 계수에 의해 결정하였다. 가공되지 않은 CPM 데이터를 트리튬 액체 신틸레이션 켄치 표준 (Tritium Liquid Scintillation Quench Standard), 또는 탄소-14 액체 신틸레이션 켄치 표준 (Amergham, Arlington Heights, II)에 대한 표준화를 지닌 ISOCAP 300의 외부 표준 비 프로그램을 이용하여 DPM으로 전환시켰다.

<130> **F. 신비스크® 체류 반감기의 결정**

<131> 무릎 관절로부터의 신비스크® 및 이의 젤 및 액체 성분의 제거를 2.5 내지 3.5 kg로 칭량된 뉴질랜드 화이트 (New Zealand White) 래빗에서 결정하였다. 래빗을 각각 24시간, 3일, 7일 및 28일에 희생시켰다. 본질적으로 상기 기술된 바와 같이 제조된 방사선 물질을 0.3 ml (체중 kg당 0.086 ml)의 관절내 주사로 투여하였다. 이러한 용량 수준은 70 kg의 인간으로의 신비스크®의 1회의 6 ml 투여와 동등한 것으로 예상된다. 기타 동물에 투여되는 상응하는 양은 동물의 체중에 직접적으로 비례하여 결정된다.

<132> 상기 개요된 각각의 조직에 대해 DPM을 획득하고, 적절한 경우에 DPM/mg을 직접 계산하였다. 회수된 전체 DPM 및 각각의 관절 조직에 대한 DPM 및 DPM/mg 둘 모두를 각각의 동물에 대해 각각 계산하였다. 이후, 이들 값을 각각의 시점에서 평균을 구하고, 평균 ± 평균의 표준 오차로 표현하였다. 계산된 평균은 상기 값이 작고 동물 대 동물 변동이 큰 경우에서도, 두개의 유의한 디지털(digit)이 최소인 것으로 보고되었다. 각각의 시점에서의 관절로부터 획득된 전체 평균 DPM을 전체의 개별적 동물에서 평균을 구함으로써 계산하였다.

<133> 각각의 시점에 대한 평균을 지수함수에 적합화시킴으로써 반감기를 결정하였다 ( $Y=Ae^{-kx}$ ). 평가의 표준 오차를 곡선 적합도로부터 획득하고, A로 나누어 예상 오차 퍼센트를 획득하였다. 이를 반감기로 곱하여 반감기의 예상 오차를 획득하였다.

<134> **G. 결과**

- <135> 신비스크®의 젤 성분 (하일란 B)는 보다 긴 반감기 부분이다. 방사선 물질의 제거를 기초로 하여, 젤 성분의 체류 반감기는 7.7-8.8일인 것으로 결정되었다. 따라서, 30일까지, 95% 이상의 젤이 제거될 것이다. 실험적으로 결정된 젤의 반감기를 기초로 한 이론적 계산을 수행하여 1회의 6 ml의 주사 후에 인간 관절에 존재하는 것으로 예상되는 젤의 양을 추정하였다. 약 6 mg의 젤을 인간 피검체의 무릎에 주사하고, 주사 후 21일후에 잔류하는 젤의 양은 약 0.9 mg일 것으로 추정된다.
- <136> 신비스크®의 액체 성분 (하일란 A)은 젤 성분보다 신속하게 제거된다. 액체 성분의 반감기는 1.2-1.5일인 것으로 결정되었다. 7일 후에, 주사된 물질의 99%가 래빗 무릎 관절에서 제거되었다.
- <137> 래빗 근육 이식 연구를 또한 수행하였다. 이식후 7 및 30일 후의 현미경 시험은 임의의 체류하는 시험 물질을 검출하지 않았고, 이는 관절내 제거 연구와 일치한다.
- <138> 본 명세서에서 본 명세서 내에 인용된 참조의 교시 내용에 비추어 전적으로 이해된다. 본 명세서 내의 구체예는 본 발명의 구체예의 예시를 제공하나, 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 간주되어선 안된다. 많은 다수의 기타 구체예가 본 발명에 포함될 수 있음을 당업자는 용이하게 인지한다. 본 기재에 인용된 모든 간행물 및 특허는 이들의 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된다. 참조에 포함된 물질이 모순되거나 본 명세서와 일치하지 않는 경우, 본 명세서가 상기의 임의의 물질을 대체한다. 본원에서의 임의의 참조의 인용은 이러한 참조가 본원 발명에 우선하는 것을 허용하는 것이 아니다.
- <139> 달리 지시하지 않는 경우, 청구의 범위를 포함하는 본 명세서에 기술된 성분의 양을 나타내는 모든 수, 세포 배양물 및 치료 조건은 용어 "약"에 의해 모든 경우에 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 지시하지 않는 경우, 수치적 파라미터는 근사치이고, 본 발명에 의해 수득되려고 하는 요망되는 특성에 따라 다양할 수 있다. 달리 지시하지 않는 경우, 일련의 구성요소에 선행하는 용어 "이상"은 일련의 모든 구성요소를 언급하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 단지 통상적인 실험 뿐만 아니라, 본원에 기술된 본 발명의 특정 구체예와 동등한 다수의 실험을 이용할 수 있음을 이해하거나 인지할 것이다. 이러한 동등한 실험은 학기의 청구의 범위에 포함된다.

**도면**

**도면1**

