

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4879482号
(P4879482)

(45) 発行日 平成24年2月22日(2012.2.22)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011.12.9)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 38/17 (2006.01)

A 6 1 K 37/12

A 6 1 K 31/728 (2006.01)

A 6 1 K 31/728

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

A 6 1 L 27/00

F

A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/00

請求項の数 48 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-508234 (P2004-508234)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月12日 (2003.5.12)
 (65) 公表番号 特表2005-532335 (P2005-532335A)
 (43) 公表日 平成17年10月27日 (2005.10.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/014609
 (87) 国際公開番号 W02003/099992
 (87) 国際公開日 平成15年12月4日 (2003.12.4)
 審査請求日 平成17年3月23日 (2005.3.23)
 審判番号 不服2008-32925 (P2008-32925/J1)
 審判請求日 平成20年12月26日 (2008.12.26)
 (31) 優先権主張番号 60/381,590
 (32) 優先日 平成14年5月17日 (2002.5.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 309040701
 ワイス・エルエルシー
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
 7940. マジソン, ファイブ ジラルダ
 ファームズ
 (73) 特許権者 504423653
 フィディア アドバンスド バイオポリマ
 ーズ, エス. アール. エル.
 イタリア国 イー35031 アバノ テ
 ルメ, 3/ビー, ビア ポンテ デラ
 ファブリカ
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨原性タンパク質を送達するための注入可能な固体ヒアルロン酸キャリア

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

骨原性タンパク質およびヒアルロン酸エステルを含む、骨原性タンパク質の注入可能な送達のための組成物であって、該組成物は、中実状態で身体に骨内注入するのに適切な中実の円筒状の棒の形態であり、該骨原性タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13およびMP52、ならびにそれらの組み合わせおよびヘテロダイマーからなる群より選択される、組成物。

【請求項2】

ビスホスホネートである骨吸収阻害剤をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項3】

前記ヒアルロン酸エステルが、50%~100%のヒアルロン酸エステル化を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記ヒアルロン酸エステルが、H y a f f 1 1 p 6 5 (登録商標)である、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記ヒアルロン酸エステルが、H y a f f 1 1 p 6 5 (登録商標)であり、そして前記骨原性タンパク質がBMP-12、BMP-13、またはMP52である、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記ヒアルロン酸エステルが、架橋したヒアルロン酸である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記円筒状の棒の直径が、0.5 mm～1.5 mmの間である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記円筒状の棒の長さが、2 cmと 5 cmとの間である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

骨粗しょう症の骨を処置するための組成物であって、該組成物は、以下の工程：

(a) 骨原性タンパク質とヒアルロン酸エステルとを混合して、骨原性混合物を形成する工程であり、該骨原性タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13 および MP52、ならびにそれらの組み合わせおよびヘテロダイマーからなる群より選択される、工程；ならびに

(b) 中実状態で身体に骨内注入するのに適切な中実の円筒状の棒へと該骨原性混合物を形成し、乾燥する工程、を包含するプロセスによって調製される、組成物。

【請求項 10】

前記混合する工程が、前記骨原性タンパク質およびヒアルロン酸エステルとビスホスホネートである骨吸収阻害剤とを混合する工程を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記ヒアルロン酸エステルが、ヒアルロン酸ベンジルエステルの不溶性または部分的に可溶性の粒子、フィルム、繊維、不織パッド、またはスポンジを、水中、有機溶媒中、または水性緩衝液中で水和または可溶化することによって調製される、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記混合する工程が、前記骨原性タンパク質およびヒアルロン酸エステルと溶媒とを混合する工程を含み；ここで、該骨原性混合物を円筒状の棒に形成して乾燥する前記工程が、非溶媒中で該骨原性混合物を押し出す工程を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記溶媒が、N-メチルピロリドン (NMP) またはジメチルスルホキシド (DMSO) である、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

請求項 9 に記載の組成物であって、前記骨原性混合物を形成して乾燥する前記工程が、該骨原性混合物を非溶媒中に押し出す工程を含む、組成物。

【請求項 15】

前記非溶媒が、エタノールまたは水である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

請求項 9 に記載の組成物であって、前記骨原性混合物を形成して乾燥する前記工程が、該骨原性混合物を空気中に押し出し、乾燥する工程を含む、組成物。

【請求項 17】

前記円筒状の棒の直径が、0.5 mm～1.5 mmの間である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記円筒状の棒の長さが、2 cm～5 cmの間である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記円筒状の棒は、1000：1 から 1：1 までの高さ：直径の比率を有する、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 20】

前記骨原性タンパク質は、第 1 のモノマーと第 2 のモノマーとを含むヘテロダイマータンパク質であり、該第 1 のモノマーおよび該第 2 のモノマーは、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13 お

10

20

30

40

50

よびMP52からなる群より選択される異なるタンパク質である、請求項1～18のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項21】

前記骨原性タンパク質は、第1のモノマーと第2のモノマーとを含むヘテロダイマータンパク質であり、該第1のモノマーは、BMP-2およびBMP-4からなる群より選択され、該第2のモノマーは、BMP-5、BMP-6、BMP-7およびBMP-8からなる群より選択される、請求項1～18のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項22】

前記骨原性タンパク質は、BMP-2モノマーとBMP-6モノマーとを含むヘテロダイマータンパク質、またはBMP-2モノマーとBMP-7モノマーとを含むヘテロダイマーである、請求項1～18のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項23】

前記ヒアルロン酸エステルは、ヒアルロン酸と脂肪族アルコール、芳香族アルコール、芳香／脂肪族アルコール、脂環族アルコールまたはエテロ環式(etherocyclic)アルコールとのエステルであり、該ヒアルロン酸のすべてまたは一部のカルボキシル基がエステル化されたものである、請求項1～18のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項24】

前記ヒアルロン酸エステルは、ベンジル、エチル、プロピル、ペンチル、ヒドロコルチゾンおよびメチルプレドニゾンの部分からなる群より選択されるエステル部分のひとつまたは組み合わせを含み、該ヒアルロン酸のすべてまたは一部のカルボキシル基がエステル化されたものである、請求項1～18のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項25】

腱、損傷軟骨、靱帯、および／またはその骨への接着部位からなる群より選択される部位への投与において使用するための請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項26】

脊椎融合術、頭蓋顎顔面再建術、骨髓炎、肺泡隆起の増大、歯根欠損、または骨粗鬆症または骨減少症の骨において使用するための請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項27】

注入可能な棒状の徐放性組成物を調製する方法であって、該方法は、以下：

(a) 骨原性タンパク質と、ヒアルロン酸エステルとを混合して、1～50 (w/v) パーセントの量で該ヒアルロン酸エステルを含む骨原性混合物を形成する工程であって、該骨原性タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13およびMP52、ならびにそれらの組み合わせおよびヘテロダイマーからなる群より選択される、工程；

30

(b) 該骨原性混合物を形成して中実状態で身体に骨内注入するのに適切な中実の棒状製品を形成する工程；ならびに

(c) 工程(b)からの該棒状製品を乾燥させる工程、を包含する、方法。

【請求項28】

工程(a)が、前記骨原性タンパク質および前記ヒアルロン酸エステルと、ビホスホネートである骨吸収阻害剤とを混合する工程をさらに包含する、請求項27に記載の方法。

40

【請求項29】

工程(a)が、前記ヒアルロン酸エステルの有機溶媒への可溶化を包含する、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

前記有機溶媒が、N-メチルピロリドン(NMP)またはジメチルスルホキシド(DMSO)である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

工程(a)が、前記ヒアルロン酸エステルの水性緩衝液への水和を包含する、請求項27に記載の方法。

【請求項32】

50

工程（a）における前記ヒアルロン酸エステルが、10～25（w/v）パーセントの間である、請求項27に記載の方法。

【請求項33】

工程（b）における前記形成する工程が、非溶媒に前記骨原性混合物を押し出す工程を包含する、請求項27に記載の方法。

【請求項34】

工程（b）における前記形成する工程が、該骨原性混合物を空気中に押し出し、乾燥させる工程を包含する、請求項27に記載の方法。

【請求項35】

前記ヒアルロン酸エステルが、50%～100%のヒアルロン酸エステル化を含む、請求項27に記載の方法。

10

【請求項36】

注入可能な徐放性組成物を調製するための方法であって、該方法は、以下：

（a）混合物を形成するために、骨原性タンパク質とヒアルロン酸エステルとを混合する工程であって、該骨原性タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13およびMP52、ならびにそれらの組み合わせおよびヘテロダイマーからなる群より選択される、工程；

（b）濃縮骨原性混合物を形成するために、工程（a）からの該混合物を圧縮する工程；および

（c）工程（b）からの該濃縮骨原性混合物を、身体に骨内注入するのに適切な中実の円筒状の棒に形成する工程、を包含する、方法。

20

【請求項37】

工程（a）の混合する工程が、前記骨原性タンパク質およびヒアルロン酸エステルとビスホスホネートである骨吸収インヒビターとを混合する工程を包含する、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記工程（c）の形成する工程が、押し出し、圧縮、成形または切断する工程からなり、0.5～1.5mmの間の直径を有する円筒状の棒を形成する、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

前記ヒアルロン酸エステルが、50%～100%のヒアルロン酸エステル化を含むエステルである、請求項36に記載の方法。

30

【請求項40】

骨欠損を有する哺乳動物を処置するために骨内注入する医薬の調製のための、請求項1～18のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項41】

骨欠損を有する哺乳動物を処置するために骨内注入する医薬の調製のための、骨原性組成物の有効量を含む組成物の使用であって、ここで、該骨原性組成物が骨原性タンパク質およびヒアルロン酸エステルを含み、そして該組成物が中実状態で身体に骨内注入するのに適切な中実の円筒状の棒の形状であり、該骨原性タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13およびMP52、ならびにそれらの組み合わせおよびヘテロダイマーからなる群より選択される、使用。

40

【請求項42】

前記骨欠損が、骨粗鬆症または骨減少性の骨である、請求項41に記載の使用。

【請求項43】

前記ヒアルロン酸エステルが、50%～100%のヒアルロン酸エステル化を含むエステルである、請求項41に記載の使用。

【請求項44】

前記骨原性組成物が、ビスホスホネートである骨吸収阻害剤をさらに含む、請求項41に

50

記載の使用。

【請求項 4 5】

前記ヒアルロン酸エステルが、50%～100%のヒアルロン酸エステル化を含む、請求項 4 4 に記載の使用。

【請求項 4 6】

骨原性タンパク質およびヒアルロン酸エステルからなる、骨原性タンパク質の注入可能な送達のための組成物であって、中実状態で身体に骨内注入するのに適切な中実の円筒状の棒の形態であり、該骨原性タンパク質が、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12、BMP-13およびMP52、ならびにそれらの組み合わせおよびヘテロダイマーからなる群より選択される、組成物。

10

【請求項 4 7】

前記骨欠損が、骨粗鬆症または骨減少性の骨である、請求項 4 5 に記載の使用。

【請求項 4 8】

前記骨欠損が近位大腿骨、近位上腕骨、遠位橈骨および椎骨本体からなる群より選択される少なくとも1つの部位に存在する、請求項 4 1 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、骨原性タンパク質およびその薬学的処方物の分野に関する。より具体的には、本発明は、ヒアルロン酸誘導体および骨原性タンパク質を含む、注入可能なまたは移植可能な固体薬学的処方物を包含する。

20

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

特発性骨粗鬆症は、骨質量の進行性の喪失および脆弱性の増大によって特徴付けられ、結果として、骨折しやすさが顕著に増大する、未知の病因の疾患である。骨粗鬆症は、全ての筋骨格障害の最も一般的なものであり、45歳齢を超える女性の56%が罹患している。Praemerら, Musculoskeletal Conditions in the United States, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, IL (1992)。その発生率は、年齢および集団における中高年層の割合と共に増大するので、骨粗鬆症は、時間が経つにつれてより一般的になる。骨粗鬆症は、局所的に処置することが困難であり、現在では公知の治療法は存在しない。最終的に、そして最も重大なことには、骨粗鬆症は、実質的に、罹病率および死亡率と関連する。骨粗鬆症によって生じる最も重篤な骨折は、股関節領域における近位大腿骨の骨折である。年間発生率は、300,000を超えており、股関節骨折は、現在では、中高年層で最も一般的な骨折である。6人に1人の白人女性が、彼女らの寿命の間に股関節骨折を経験し(Cummingsら, Arch Intern Med 149:2455-2458 (1989))、90歳に達した女性に関しては、この数字は、3人に1人になる。

30

40

【0003】

一人暮らしの、かつ股関節骨折時に家で生活していた患者のうち、約20%は、骨折後少なくとも1年の間、長期間、介護施設に滞在することになる。傷害後の最初の一年の間、罹病率は、その年齢および性別が一致したコントロールより約15%高い。Praemerら(前出)。中高年層の患者において観察される近位大腿骨骨折の発生率の増加は、主に、彼らの大腿骨の骨密度の減少および増大した低下傾向に関連する。近位大腿骨における加齢性骨喪失と股関節骨折の危険性との間には、逆の関係が存在する。大腿頸部骨密度における1標準偏差(SD)の各減少は、股関節骨折の年齢補正した危険性を2.6倍増大させ(95% CI 1.9~3.6)、最低の四分位点における骨密度を有する女性は、最高の四分位点における女性よりも、股関節骨折の危険性が8.5倍高い。Cum

50

mingsら, The Lancet 341:72-75 (1993)。股関節骨密度と股関節骨折危険性との間のこの関係は、骨折の危険性において患者をスクリーニングし、同定することを可能にする。2標準偏差低いピーク寛骨質量である患者は、「骨折閾値」より下であった。

【0004】

現在の骨粗鬆症のための治療は、全身性である。これらは、フッ素、ビスホスホネート、カルシトニン、エストロゲンおよびプロゲスチン、テストステロン、ビタミンD代謝産物、および／またはカルシウムを含む。米国において、エストロゲンおよびビスホスホネートであるアレンドロネート (alendronate) のみが、閉経後の骨粗鬆症の女性において股関節骨折の予防のために示されている。これらの薬剤は各々、数年にわたる連続的な投与を必要とする。

10

【0005】

骨粗鬆症の骨を処置することに加えて、例えば、骨原性タンパク質の局所的投与によって骨粗鬆症関連骨折を処置または予防するための方法が必要である。この必要性に起因して、骨原性タンパク質を送達するためのキャリア材料は種々存在し、利用可能であるにも拘わらず、骨欠損の局所的処置のための、安全で、有効なかつ一般に利用可能なキャリアが、やはり必要である。従って、この分野においてかなりの試みがなされているにも拘わらず、骨粗鬆症の骨および骨減少骨の修復および／または処置の有効な方法、ならびに骨粗鬆症関連骨折の発生率およびその重篤度を最小にするかまたは軽減するための方法が、未だに必要である。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、骨原性タンパク質の骨内送達のための注入可能なまたは移植可能な固体の棒状型組成物を提供する。一実施形態において、この組成物は、骨原性タンパク質およびヒアルロン酸エステルを含む。別の実施形態において、この組成物は、骨吸収 (bone resorption) インヒビター (例えば、ビスホスホネート) をさらに含み得る。さらに別の実施形態において、この組成物は、1種以上の賦形剤 (例えば、薬学的に受容可能な塩、ポリサッカリド、ペプチド、タンパク質、アミノ酸、合成ポリマー、天然ポリマー、または界面活性剤) をさらに含み得る。本発明の固体の棒状の注入可能なまたは移植可能な組成物は、投与部位における骨誘導性薬剤の長期化した保持を提供する。

30

【0007】

本発明はさらに、骨質量および骨質を増大させるため、および骨粗鬆症関連骨折の発生率またはその重篤度を最小にするかまたは軽減するための、方法および組成物を提供する。従って、本発明は、骨粗鬆症の骨または骨減少骨の骨折の発生率を減少させるために有用な方法および組成物を提供する。特に、本発明は、骨粗鬆症を有するか、または骨粗鬆症の他の証拠もしくは骨減少状態を有する患者を処置する方法を包含する。本発明が特に有用であると示され得る好ましい実施形態は、骨幹端骨 (近位大腿骨 (股関節部)、近位上腕骨 (上腕)、遠位橈骨 (手根部) および椎骨本体 (脊柱)、特に椎骨本体が挙げられる) の処置を包含する。

40

【0008】

この方法は、骨減少骨もしくは骨粗鬆症の骨の部位、または低い骨質量もしくは骨密度の部位に、骨の成長を誘導し得るかまたは骨組織の形成を増大させ得るかまたはその部位での骨喪失を減少させ得る有効量の少なくとも1種の活性薬剤を含む、固体の棒状型組成物を投与する工程を包含する。骨質量は、一般に「骨鉱質含有量 (bone mineral content)」または「BMC」と示され、グラム単位で測定される。骨密度は、一般に「骨鉱質密度」または「BMD」と示され、単位面積あたりのグラム数または単位容積あたりのグラム数として表される。特定の実施形態において、投与様式は、骨内注入によってである。例示的な実施形態において、この活性薬剤は、トランスホーミング

50

増殖因子 β （「TGF- β 」）スーパーファミリーのタンパク質として公知のタンパク質の群から選択されるか、好ましくは、骨形成性タンパク質（「BMP」）、増殖因子および分化因子（「GDF」）、ならびに本明細書中でより十分に記載される他のタンパク質から選択される、1種以上のタンパク質である。本発明の方法および組成物は、これらが、全身性の処置ではなく、骨粗鬆症または骨減少骨のための限局的処置を提供するという点で有利である。本発明は、活性薬剤として骨原性タンパク質を利用するという点でさらに有利である。この骨原性タンパク質は、組換えDNA技術を介して生成され得、従って、潜在的に供給が限定されない。本発明の方法および組成物は、骨組織の再生が骨質量／骨密度を増大させ、骨の強度を増し、それによって骨粗鬆症の重篤度または骨粗鬆症病原の発生率を減少させ、最終的に骨折の発生率を低下させるという点でさらに有利である。

10

【0009】

他の実施形態において、この活性薬剤は、TGF- β スーパーファミリーのタンパク質から選択される1種以上のタンパク質に加えて、1種以上の補助タンパク質（例えば、Hedgehog、Noggin、Chordin、Frazzled、CerberusおよびFollistatin、可溶性BMPレセプター、または本明細書中でさらに記載される他のタンパク質もしくは薬剤）をさらに含む。

【0010】

本発明はさらに、少なくとも1種の骨原性タンパク質を含む注入可能な棒状組成物、および有効量の骨吸収インヒビターを含む第2の組成物を投与することによる、骨質量および骨質を増大させるため、ならびに骨粗鬆症関連骨折の発生率またはその重篤度を最小にするかまたは減少させるための方法を提供する。骨吸収インヒビターを含む第2の組成物は、骨原性組成物の前、骨原性組成物の後または骨原性組成物と実質的に同時に投与され得る。

20

【0011】

骨粗鬆症の骨の治癒に加えて、本発明の組成物は、骨欠損、軟骨欠損の処置および修復、軟骨分解の阻害、および軟骨修復の促進のための関節への注入のような使用のための、BMPの注入可能な処方物に有用であり得る。この処方物はまた、腱、靱帯および／またはそれらが骨に付着する部位に注入され得る。BMPの注入可能な処方物はまた、他の骨部位（例えば、骨嚢胞）、骨への移植、閉鎖骨折もしくは開放骨折および散乱性の骨形成に対する適用が見出され得る。

30

【0012】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、骨原性タンパク質とヒアルロン酸誘導体とを混合して、骨原性混合物を形成する工程を包含するプロセスによって調製される。次いで、この骨原性混合物は、例えば、骨原性混合物を空気中または非溶媒（例えば、エタノール）中に押しだし、乾燥することによって形成される。本発明の組成物は、骨吸収インヒビターおよび／または賦形剤（そのいずれかまたは両方が、混合工程において含まれ得る）をさらに含む得る。

【0013】

ヒアルロン酸誘導体は、天然ヒアルロン酸もしくは合成ヒアルロン酸またはその改変物であってもよい。ヒアルロン酸は、N-アセチル-D-グルコサミンと β 1-4結合で連結されたD-グルクロン酸のモノサッカリド単位と、 β 1-3グルコシド結合で連結されたジサッカリド単位を交互に含む、天然に存在するポリサッカリドである。これは、通常、ナトリウム塩として存在し、約50,000~ 8×10^6 の分子量範囲を有する。骨吸収インヒビターは、ビスホスホネート（例えば、アレンドロネート、シマドロネート（cimadronate）、クロドロネート（clodronate）、EB-1053、エチドロネート（etidronate）、イバンドロネート（ibandronate）、ネリドロネート（neridronate）、オルパドロネート（olpadronate）、パミドロネート（pamidronate）、リセドロネート（risedronate）、チルドロネート（tiludronate）、YH 529、ゾレドロネ

40

50

ート (zoledronate)) およびその薬学的に受容可能な塩、エステルおよびそれらの混合物であり得る。賦形剤は、活性成分の放出を安定化および／または調節する薬剤 (例えば、薬学的に受容可能な塩、ポリサッカリド、ペプチド、タンパク質、アミノ酸、合成ポリマー、天然ポリマー、および／または界面活性剤) であり得る。骨原性タンパク質は、固体または液体形態であり得、ヒアルロン酸誘導体および賦形剤は、固体形態であり得る。成形は、骨原性混合物を空气中または非溶媒 (例えば、エタノール) 中に押し出すことによって達成され得；乾燥は、風乾または凍結乾燥によって達成され得る。徐放性調製物は、骨吸収インヒビター (例えば、ビスホスホネート) をさらに含み得る。

【0014】

本発明はまた、注入可能な徐放性調製物を調製するための方法を提供し、この方法は、骨原性タンパク質と、ヒアルロン酸またはヒアルロンナベースの材料とを混合して、混合物を形成する工程、この混合物を圧縮して、密な骨原性混合物を形成する工程、次いで、この密な骨原性混合物を、身体への注入または移植に適した固体の円筒状の棒状に形成する工程を包含する。この形成工程は、押し出すか、圧縮するか、成形するか、穿孔する (boring) か、そして／または切断して、円筒状の棒を形成する工程によって行われ得る。この注入可能な徐放性調製物は、骨吸収インヒビター (例えば、ビスホスホネート) および1種以上の賦形剤 (例えば、上記のような賦形剤) をさらに含み得る。

【0015】

本発明の注入可能な固体の骨誘導性組成物は、約0.1～3.0mm、好ましくは、約0.5～1.5mmの直径を有し得る。この固体の棒状組成物の長さは、約1mmと約10cmとの間、具体的には、約2cmと約5cmとの間であり得る。本発明の組成物は、約1000:1～1:1の範囲内の高さ 対 直径の比を有し得る。この比は、約1000:1、500:1、250:1、100:1、50:1、25:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1または1:1であり得る。本発明の骨誘導性組成物は、従来の針またはシリンジへの装填、および骨内部位への注入に耐えるように剛性 (しかしもろくはない) である。骨誘導性組成物は、約0.5と100%の間の材料の密度、および好ましくは、約50%と90%の間の材料の密度を有する。この組成物は、低いマクロ孔質性および低水分含有量 (約0.1%と約10.0%との間の水分、および特に、0.1%と5%との間の水分) を有する。活性成分 対 キャリアの割合は、約0.01～0.90gの活性成分 対 約1gのキャリア、特に、0.1～0.3gの活性成分 対 約1gのキャリアであり得る。ヒアルロン酸誘導体は、約50%と約100%との間のヒアルロン酸エステル化を含む、部分的エステルまたは完全エステルであり得る。

【0016】

(実施形態の説明)

本発明に従って、骨粗鬆症、または骨減少症の状態 (骨粗鬆症の骨病巣を含む) の徴候を示す患者の処置のための、方法および組成物が提供される。このような患者の同定は、当該分野において周知である手順によって達成され得る。これらの手順としては、二重エネルギーX線吸光度法 (DEXA) (Kilgusら、J. Bone & Joint Surgery, 75-B: 279-287 (1992) ; Markelら、Acta Orthop. Scand. 61: 487-498 (1990)) ; および定量的コンピュータ連動断層撮影 (QCT) (Laval-Jeantetら、J. Comput. Assist. Tomogr. 17: 915-921 (1993) ; Markel., Calcif. Tissue Int. 49: 427-432 (1991) ; 単一光子吸光度法 (Markelら、Calcif. Tissue Int. 48: 392-399 (1991)) ; 超音波透過速度 (UTV) (Heaneyら、JAMA 261: 2986-2990 (1989) ; Langtonら、Clin. Phys. Physiol. Meas. 11: 243-249 (1990)) ; およびラジオグラフ評価 (Gluerら、J. Bone Min. Res. 9: 671-677 (1994)) を使用する、骨の質量／密度の測定が挙げられる。骨折の危険のある患者の同定の他の方法としては、年齢に関連する因子 (例えば、知識) および以前の骨粗鬆症関連骨折の発生の評価が挙げ

10

20

30

40

50

られる。Porterら、BMJ 301:638-641 (1990); Huiら、J. Clin. Invest. 81:1804-1809 (1988)。上記刊行物は、本明細書中に参考として援用される。

【0017】

上記方法は、骨粗鬆症または骨減少症の部位に、固体の棒状組成物を注入する工程を包含し、この組成物は、1つ以上の精製された骨原性タンパク質ならびにキャリアとしてのヒアルロン酸を含有し、このタンパク質は、骨の形成および／または維持を誘導するために有効である。既存の注射可能な処方物とは異なり、本発明の骨原性組成物は、固体形態で投与され、これによって、液体処方物または粘性処方物に固有の欠点を回避する。例えば、液体処方物またはゲル処方物を使用すると、骨促進効果が達成され得る前に、骨誘導剤が体液によって尚早に希釈され得る。本発明は、インビボでゆっくりと分解する固体キャリアを使用することによって、希釈効果を除き、これによって、活性成分の遅延された徐放を提供する。さらに、投与部位から移動し得る液体処方物または粘性処方物とは異なり、本発明の固体組成物は、所望の骨増殖の部位に打ち込まれ、そして持続し、骨増殖促進活性を生じる。代表的に、この組成物は、約7日～約6ヶ月にわたって、この部位に持続しなければならない。この組成物が尚早に分散される場合、所望の骨増殖促進効果は、起こらないか、または形成される骨が所望の強度を有さないかの、いずれかである。最後に、本発明の骨原性組成物は、固体として投与されるが、これは、円筒形の棒として形成され、これによって、身体内への注入または移植のいずれかのために適切である。さらに、骨内注入手順の間に塞栓症を誘導するという周知の外科的合併症は、固体の棒の使用を介して、（液体形態またはゲル形態に対して）かなり軽減される。大きい体積の液体キャリア／ゲルキャリアの圧力下での注入によって引き起こされる、骨内の骨フラグメント、脂肪または塞栓の潜在的な移動が、低下される。なぜなら、非常に濃縮された固体棒キャリアの注入される体積は、類似の用量が液体形態またはゲル形態で分散される場合に必要とされるよりずっと小さいからである。この組成物は、所望の骨増殖の部位に、任意の好都合な様式で（従来の皮下注射針または注射器を通しての導入によるものが挙げられる）、適用され得る。

【0018】

本発明の組成物は、骨原性タンパク質、ヒアルロン酸キャリア、および任意の賦形剤を混合して、ヒアルロン酸出発物質に依存して、粘性の液体／ゲルまたはペーストのいずれかを形成することによって、調製される。次いで、引き続き質量が円筒形の棒に形成され、そして乾燥される。この形成は、多数の公知の技術（例えば、成型、プレス、ボーリング、および／または切断による）のうちのいずれか1つを使用して、達成され得る。好ましい実施形態において、骨原性混合物は、皮下注射針に充填され、そしてこの針のハブ端部を通して押出される。この材料は、連続的に円筒形状の棒として押出され、室温で乾燥され、そして小さい、注射可能な棒に分割される。

【0019】

ヒアルロン酸出発物質がヒアルロン酸固体（例えば、Hya ff-11（登録商標））である場合、このヒアルロン酸は、最初に、有機溶媒中に可溶化されて、溶液を形成する。この有機溶媒は、任意の薬学的に受容可能な溶媒（例えば、N-メチルピロリドン（NMP）またはジメチルスルホキシド（DMSO））であり得、好ましくは、NMPである。この溶液は、約1%（w/v）と約50%（w/v）との間のヒアルロン酸、好ましくは、約5%（w/v）と20%（w/v）との間のヒアルロン酸、そして最も好ましくは、約10%（w/v）のヒアルロン酸を含有し得る。乾燥粉末状の骨原性タンパク質が、このヒアルロン酸溶液に、約1%（w/w）と約50%（w/w）との間の濃度、好ましくは、約20%（w/w）の濃度で分散され、そして任意の賦形剤（例えば、アミノ酸、糖、塩、界面活性剤、ポリマーなど）が、約1%（w/w）と約50%（w/w）との間の濃度、好ましくは、約20%（w/w）と約40%（w/w）との間の濃度で添加される。本発明の組成物は、骨再吸収インヒビターをさらに含有し得、このインヒビターは、混合する工程において、乾燥粉末または溶液の形態で、個々にかまたは骨原性タンパク質

成分と組み合わせて含有され得る。

【0020】

ヒアルロン酸出発物質が親水性形態（例えば、H y a f f - 1 1 p 6 5（登録商標））である場合、このヒアルロン酸は、任意の賦形剤を含有する水性緩衝液と、質量がペースト様のコンシステンシーを呈するまでブレンドされ得る。このペースト様の物質は、約1%（w/v）と約40%（w/v）との間のヒアルロン酸、好ましくは、約5%（w/v）と30%（w/v）との間のヒアルロン酸、そしてより好ましくは、約15%（w/v）と20%（w/v）との間のヒアルロン酸を含有し得る。例示的な実施形態において、このペースト様の物質は、18.75%（w/v）のヒアルロン酸を含有する。次いで、乾燥粉末の骨形成タンパク質が、ヒアルロン酸ペーストに混合され、その後、成形される。あるいは、任意の賦形剤を含有する水性緩衝液とブレンドするよりむしろ、ヒアルロン酸出発物質は、任意の賦形剤を含む可溶性骨原性タンパク質を含有する水性緩衝液と、質量がペースト様のコンシステンシーまたは粘性の液体もしくはゲルの外観を呈するまで、ブレンドされ得る。この組成物は、骨再吸収インヒビターをさらに含有し得、このインヒビターは、混合する工程において、乾燥粉末または溶液の形態で、個々にかまたは骨原性タンパク質成分と組み合わせて、含有され得る。

10

【0021】

一旦、この成分が組み合わされ、そしてペーストまたは粘性の液体またはゲルにブレンドされると、骨原性材料は、円筒形の鑄型（空気または気体透過性のチュービング（例えば、シラスチックまたはT e f l o n（登録商標）／F E P））、あるいは押し出し型の装置（例えば、注射器）に充填される。形成する工程のために注射器が使用される場合、この注射器のプランジャーは、挿入され、そして水溶性ヒアルロン酸の場合には、連続した長さのペーストを乾燥表面に押し出す為に十分な量の圧力が付与される。水不溶性ヒアルロン酸の場合には、ゲルの連続した長さが、非溶媒浴中に押し出され、この材料の沈澱を可能にする。次いで、切断道具（例えば、カミソリ、小刀、ナイフなど）を使用して、セクションが切断され、注射可能な棒状の組成物を形成する。切断後、棒状の組成物は、例えば、風乾または凍結乾燥によって、乾燥される。

20

【0022】

本発明はまた、注射可能な徐放調製物を調製するための方法を提供し、この方法は、骨原性タンパク質、ヒアルロン酸またはヒアルロナンベースの材料、および任意の賦形剤を混合して、濃厚な骨原性混合物を形成する工程、次いで、この濃厚な骨原性混合物を、身体内への注入または移植に適切な固体の円筒形の棒に成形する工程を包含する。

30

【0023】

活性剤は、タンパク質の形質転換増殖因子-β（T G F - β）スーパーファミリーとして公知のタンパク質のファミリーから選択され得、この活性剤としては、アクチビン、インヒビン、および骨形成タンパク質（BMP）が挙げられる。特に、活性剤としては、BMPとして一般に公知であるタンパク質のサブクラスから選択される少なくとも1つのタンパク質が挙げられ、BMPは、骨形成活性、ならびに他の増殖型活性および分化型活性を有すると開示されている。これらのBMPとしては、BMPタンパク質BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6およびBMP-7（例えば、米国特許第5,108,922号；同第5,013,649号；同第5,116,738号；同第5,106,748号；同第5,187,076号；および同第5,141,905号に開示される）；BMP-8（PCT公開WO91/18098に開示される）；ならびにBMP-9（PCT公開WO93/00432に開示される）、BMP-10（PCT出願WO94/26893に開示される）；BMP-11（PCT出願WO94/26892に開示される）；またはBMP-12もしくはBMP-13（PCT出願WO95/16035に開示される）；BMP-15（米国特許第5,635,732号に開示される）；あるいはBMP-16（米国特許第6,331,612号に開示される）が挙げられる。本発明の活性剤として有用であり得る、他のTGF-βタンパク質としては、V g r - 2（J o n e sら、M o l . E n d o c r i n o l . 6 : 1 9 6 1 - 1 9 6 8（1992

40

50

）、ならびに任意の増殖因子および分化因子（GDF）（PCT出願WO94/15965；WO94/15949；WO95/01801；WO95/01802；WO94/21681；WO94/15966；WO95/10539；WO96/01845；WO96/02559などに記載されるものが挙げられる）が挙げられる。本発明においてまた、BIP（WO94/01577に開示される）；HP00269（日本国特許出願公開番号7-250688に開示される）；およびMP52（PCT出願WO93/16099に開示される）が有用であり得る。上記出願の全ての開示は、本明細書中に参考として援用される。本発明において使用するために現在好ましいBMPのサブセットとしては、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-10、BMP-12およびBMP-13が挙げられる。例示的な実施形態において、活性剤は、BMP-2であり、これの配列は、米国特許第5,013,649号に開示されており、この米国特許の開示は、本明細書中に参考として援用される。当該分野において公知の他のBMPおよびTGF- β タンパク質もまた、使用され得る。

【0024】

活性剤は、組換え的に産生され得るか、またはタンパク質組成物から精製され得る。活性剤は、TGF- β （例えば、BMP）または他の二量体タンパク質である場合、ホモダイマーであっても、他のBMP（例えば、BMP-2およびBMP-6の各々の1つのモノマーからなるヘテロダイマー）またはTGF- β スーパーファミリーの他のメンバー（例えば、アクチビン、インヒビン、およびTGF- β 1）とのヘテロダイマー（例えば、BMPおよびTGF- β スーパーファミリーの関連するメンバーの各々の1つのモノマーからなるヘテロダイマー）であってもよい。このようなヘテロダイマータンパク質の例は、例えば、公開されたPCT国際出願WO93/09229に記載されており、この明細書は、本明細書中に参考として援用される。

【0025】

活性剤は、さらなる薬剤（例えば、Hedgehog、Frazzled）、Chordin、Noggin、Cerberus、Follistatinタンパク質）をさらに含有し得る。これらのファミリーのタンパク質は、一般に、Sasaiら、Cell, 79:779-790（1994）（Chordin）；PCT特許公開WO94/05800（Noggin）；およびFukuiら、Dev. Biol. 159:131-139（1993）（Follistatin）に記載されている。Hedgehogタンパク質は、WO96/16668；WO96/17924；およびWO95/18856に記載されている。Frazzledファミリーのタンパク質は、Frizzledとして公知のレセプタータンパク質ファミリーの細胞外結合ドメインに対して高い相同性を有する、比較的最近発見されたファミリーのタンパク質である。Frizzledファミリーの遺伝子およびタンパク質は、Wangら、J. Biol. Chem. 271:4468-4476（1996）に記載されている。活性剤としてはまた、他の可溶性レセプター（例えば、PCT特許公開WO95/07982に開示されるような、短縮された可溶性レセプター）が挙げられ得る。WO95/07982の教示から、当業者は、短縮された可溶性レセプターが、多数の他のレセプタータンパク質について調製され得ることを認識する。このようなものはまた、本発明の範囲に含まれる。上記刊行物は、本明細書中に参考として援用される。

【0026】

本明細書中で有用な活性剤の量は、現在の細胞または浸潤する前駆細胞または他の細胞の、増加した骨形成活性を刺激するために有効な量であり、そして処置される欠損の大きさおよび性質に依存する。一般に、送達されるべきタンパク質の量は、必要とされる材料1立方センチメートルあたり、約0.1mg～約500mg、特に、約10mg～約300mg、そしてより特に、約150mg～約250mgの範囲である。

【0027】

本発明を実施する際にキャリアとして有用であり得る材料としては、剛性を有する薬学的に受容可能な材料が挙げられる。剛性である結果、骨形成タンパク質と混合および乾燥

10

20

30

40

50

される場合、骨粗鬆症または骨減少症の骨の部位への注射可能な適用または移植可能な適用のための適切な取り扱い特性を保有する、組成物を形成する。骨形態タンパク質を固体キャリアに組みこむことによって、哺乳動物の前駆細胞または他の細胞を浸潤する、再生骨形成活性の他の点では自然の速度を、タンパク質が増加させることを可能にするため、および新たな組織が増殖し得、そして細胞の内部成長を可能にする空間を形成するために十分な時間にわたって、このタンパク質が、疾患部位または病巣部位に残ることが可能である。キャリアはまた、骨形成タンパク質が、疾患部位または病巣部位から、前駆細胞の再生骨原性活性の速度を最適に増加させるために適切な間隔にわたって、放出されることを可能にし得る。キャリアはまた、枠組みを供給し得、ここに、重篤に骨粗鬆症の骨における新たな形成を誘導する。

10

【0028】

例示的な実施形態において、このファミリーのキャリアは、ヒアルロン酸エステルまたはヒアルロナンベースの材料を含む。本明細書中で使用される場合、用語「ヒアルロン酸」、「ヒアルロナンベースの材料」および「ヒアルロン酸誘導体」は、交換可能に使用されて、ヒアルロン酸（以下に定義されるような）およびその塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩など）を意味する。成形および乾燥の後、このヒアルロン酸キャリアは、以下に詳細に記載される注射または移植に適した形態（例えば、円筒形の棒）になる。このような棒は、従来の皮下針または皮下注射器への充填、および骨内空間への注射に耐えるのに十分剛性である。剛性であるが、ヒアルロナンベースのキャリア材料は、高い引っ張り強さおよび低い脆弱性を有する。本発明の固体棒状組成物は、好ましくは、比較的高い材料密度（30～100%）、低いマクロ多孔性（macroporosity）、および低い含水量を有する。

20

【0029】

ヒアルロン酸は、種々の組織（滑液、硝子体液、ヒト臍帯および鶏頭を含む）において天然に存在する。ヒアルロン酸は、結合組織（例えば、皮膚、腱、筋肉および軟骨）の細胞内マトリクスの主成分である。これらの組織の細胞に機械的支持を提供することに加えて、ヒアルロン酸はまた、他の重要な生物学的機能（水和、潤滑、細胞移動および分化を含む）を促進する（例えば、Balazsら, *Cosmetics & Toiletries* 5（84）：8－17を参照のこと）。ヒアルロン酸は、天然の組織（例えば、鶏頭）から抽出され得るか、または組換え法によって生成され得る。抽出によって得られるヒアルロン酸の分子量は、一般に、800万～1300万の範囲である。ポリサッカリドは不安定であり、かつ種々の物理的（機械的、放射線）および化学的な因子によって容易に分解される。結果として、従来の精製プロセスは、一般に、低分子量のヒアルロン酸の水和されたフラクションを生成する（Balazsら、前出を参照のこと）。

30

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語「ヒアルロン酸」とは、分子量に関わらず、D-グルクロン酸およびN-アセチル-D-グルコサミン残基を含む、種々の分子量のフラクションおよびその誘導体の混合物を含む酸性ポリサッカリドをいう。ヒアルロン酸の誘導体としては、例えば、エステル化、架橋、硫酸化などにより化学的に修飾されたヒアルロン酸が挙げられる。ヒアルロン酸は、例えば、Jeanlozら, *J. Biol. Chem.* 186：495－511（1950）；Jagerら, *J. Bacteriology* 1065－1067；*Biochem. J.* 167：711－716（1977）；Jeanlozら, *J. Biol. Chem.* 194：141－150（1952）；またはJeanlozら, *Helvetica Chimica Acta* 35：262－271（1952）に記載されるように、ヒアルロン酸のメチルエステルのようなエステルであり得る。

40

【0031】

例示的な実施形態において、ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸と、脂肪族アルコール、芳香族アルコール、芳香／脂肪族アルコール、脂環式アルコールまたはエテロ環式（etherocyclic）アルコールとのエステルであり、ここでこの酸のカルボン酸基の全

50

てまたは一部は、エステル化されている（例えば、米国特許第5,336,767号（その全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されるヒアルロン酸誘導体）。ヒアルロン酸出発物質は、同時係属中の米国出願番号09/687,283（2000年10月13日出願、その全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されるとおりであり得る。特に、ヒアルロナンベースの出発物質は、不織パッド、フェルト、シート、粉末、スポンジおよびマイクロスフェア（商品名Hya f f（登録商標）としてFidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italyから販売）のような固体である。Hya f f（登録商標）材料は、例えば、米国特許第4,851,521号；同第4,965,353号；および同第5,202,431号；ならびにEP0216453（これらの全てはその全体が本明細書中で参考として援用される）に記載される。このHya f f（登録商標）材料は、エステル部分（例えば、ベンジル、エチル、プロピル、ペンチル、または巨大分子（例えば、ヒドロコルチゾンまたはメチルプレドニゾン））の1つまたは組合せ、および種々のエステル化度（すなわち、部分エステルまたは完全エステル）を有するヒアルロン酸のエステルである。Hya f f（登録商標）材料の部分エステルは、50～99%の範囲のエステル化%によって特定され（例えば、Hya f f-11p65（登録商標）およびHya f f-11p80（登録商標））、一方、完全エステルは、ヒアルロン酸の100%エステルである（例えば、Hya f f-11（登録商標））。本発明の組成物の所望の取扱特性を提供することに加えて、Hya f f（登録商標）材料はまた、活性成分のバイオアベイラビリティおよび吸収動力学を操作するための手段を提供する（例えば、米国特許第6,339,074号；同第6,232,303号；および同第6,066,340号（これら全てはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【0032】

別の例示的な実施形態において、ヒアルロナンベースの出発物質は、ヒアルロン酸エステルと、天然ポリマー、天然ポリマーの半合成誘導体および／または合成ポリマーとの繊維の混合物を含む不織繊維である。この混合物は、約1～約100%のヒアルロン酸を含み得る。本発明で有用な天然ポリマーとしては、限定されることなく、コラーゲン、もしくはコラーゲンとグリコサミノグリカンとの共沈殿物；セルロース、ポリサッカリド、例えば、キチン、キトサン、ペクチンもしくはペクチン酸、寒天、アガロース、キサンタンゴム、ゲラン（gel lan）、アルギニン酸もしくはアルギネート、ポリマンナンもしくはポリグリカン、デンプンおよび天然ゴムが挙げられる。本発明で有用な天然ポリマーの半合成誘導体としては、例えば、天然ポリマー、例えば、物質（例えば、アルデヒドもしくはアルデヒド前駆体、ジカルボン酸もしくはそのハロゲン化物、ジアミン、セルロースの誘導体、アルギニン酸、デンプン、ヒアルロン酸、キチンまたはキトサン、ゲラン、キサンタン、ペクチンもしくはペクチン酸、ポリグリカン、ポリマンナン、寒天、アガロース、天然ゴムおよびグリコサミノグリカン）と架橋されたコラーゲンが挙げられる。合成ポリマーとしては、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリジオキサン、ポリホスファゼン（polyphosphazene）、ポリスルホン樹脂、ポリウレタン樹脂、ならびにそれらのコポリマーおよび誘導体が挙げられる。本発明で有用な例示的な不織繊維材料は、これらの材料を作製する方法を含めて、米国特許第5,520,916号（1996年5月28日発行、これはその全体が本明細書中で参考として援用される）に記載される。

【0033】

TGF- β タンパク質の骨原性ポテンシャルについて多くのことが知られているが、最近の報告によって、特定の骨誘導剤（例えば、BMP-2）の局所投与が、投与部位における一過的な骨形成活性を刺激することが示される。BMPによって誘導される新たな骨の形成を進行させるこの反応は、「一過性吸収現象」と呼ばれた。

【0034】

骨吸収を阻害することが知られている因子は、その後の骨形成を阻害することなく、BMPの局所投与に関連する初期の骨吸収の遅延または減少において有用な役割を果たし得

る。臨床的に、ビスホスホネート治療は、骨のターンオーバー指数を劇的に低下させ、骨のミネラル密度を増大し、そして骨減少症の女性において、股関節および脊椎の骨折の危険性を低下させることが示されている（例えば、Fleisch, H., *Biophosphonates In Bone Disease, From The Laboratory To The Patient*, 第3版, Parthenon Publishing (1997)（これはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。従って、一実施形態において、骨吸収インヒビター（例えば、ビスホスホネート）が、骨誘導剤と共に同時投与されて、BMPの骨内送達に関連する初期の骨吸収が予防または最小化される。ビスホスホネートの同時投与は、骨増強効果をなお生じさせつつ、この所望しない吸収段階をブロックする。

10

【0035】

それらの治療効果にも関わらず、ビスホスホネートは、経口摂取された場合、胃腸管でほとんど吸収されない。この乏しいバイオアベイラビリティの問題を解決するために、静脈内投与が使用されてきた；しかし、この様式は、投薬の持続時間および頻度に起因して、費用がかかりかつ不便であると考えられる。本発明は、ビスホスホネートをキャリア中に組み込み、これを所望の作用部位に直接局所的に送達することによって、この欠陥を克服する。

【0036】

本発明の一実施形態において、骨吸収インヒビターは、第2の活性成分として注射可能骨誘導組成物に組み込まれる。この骨吸収インヒビターは、成形工程および乾燥工程の前に、骨原性タンパク質、ヒアルロン酸キャリア、および／または任意の賦形剤と混合され得る。次いで、最終混合物が、例えば、非溶媒または空気中への押し出しによって成形される。

20

【0037】

本発明の別の実施形態において、骨吸収インヒビターは、骨原性組成物に続いてまたは骨原性組成物と共に投与される。この実施形態によると、骨原性組成物は、骨の成長または修復が必要な特定の領域に、別個の送達ビヒクル中の骨吸収インヒビターと同時の投与または逐次投与のいずれかで、局所的に投与され得る。従って、骨吸収インヒビターは、例えば、徐放性キャリアの状態での注射または外科的移植によって、処置されるべき部位に直接注射または移植され得る。このキャリアは、任意の薬学的に受容可能なキャリアであり得、これらの多くは、当該分野で公知であり、かつ容易に入手可能である（例えば、Martin, E. W., *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., 最新版)（これはその全体が本明細書中出参考として援用される）を参照のこと）。このキャリアは、好ましくは、徐放性キャリアであり、最も好ましくは上記のヒアルロン酸エステルまたはヒアルロナンベースの材料である。現在好ましいキャリアは、本明細書中の他の場所に記載されるように、固体の棒に形成される。

30

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「骨吸収の阻害」とは、骨の減少の予防、特に、破骨細胞形成または破骨細胞活性の直接的または間接的な変更による現存の骨の除去の阻害をいう。従って、本明細書中で使用される場合、用語「骨吸収インヒビター」とは、破骨細胞の形成または活性の直接的または間接的な変更によって、骨減少を予防または阻害する因子をいう。

40

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「ビスホスホネート」とは、関連の二リン酸および塩、ならびに種々の結晶形態およびアモルファス形態のビスホスホネートをいう。特定の実施形態において、このビスホスホネートは、アレンドロネート (alendronate)、シマドロネート (cimidronate)、クロドロネート (clodronate)、EB-1053、エチドロネート、イバンドロネート (ibandronate)、ネリドロネート (neridronate)、オルパドロネート (olpadron

50

ate)、パミドロネート (pamidronate)、リゼドロネート (risedronate)、チルドロネート (tiludronate)、YH 529、ゾレンドロネート (zoledronate)、ならびにそれらの薬学的に受容可能な塩、エステル、酸および混合物からなる群から選択される。

【0040】

本明細書中で有用な骨吸収インヒビターの量は、破骨細胞の形成または活性の直接的または間接的な変更によって、初期の骨減少（代表的には、BMPの局所投与に関連する）を予防または阻害するのに有効な量である。必要とされる正確な投薬量は、処置される欠損のサイズおよび性質、ならびに送達される骨原性薬剤の量に依存する。一般に、送達されるホスホネートの量は、材料1立方センチメートルあたり、約1～約300mg、具体的には約10～約100mg、そして例示的には約100～約500mgの範囲である。適用部位は、好ましくは、局所（骨内）であるが、全身送達のための筋肉内または皮下のような他の非経口部位であり得る。

【0041】

本発明の組成物において有用であり得るさらなる添加剤または賦形剤としては、限定されることなく、薬学的に受容可能な塩、ポリサッカリド、ペプチド、タンパク質、アミノ酸、合成ポリマー、天然ポリマーおよび／または界面活性剤が挙げられる。このような賦形剤は、活性成分の放出を安定化および／または調整する処方物の分野において周知である。有用なポリマーとしては、例えば、米国特許第5,171,579号（この開示全体は本明細書中で参考として援用される）に記載されるものが挙げられる。合成ポリマーまたは界面活性剤としては、限定されることなく、プルロニック (pluronic)（例えば、逆熱ゲル化の特有の特性を示す水溶性ABA型ブロック界面活性コポリマーのクラスである、Poloxamer 407ゲル）が挙げられる。他の有用な合成ポリマーとしては、ポリラクチドおよびポリエチレングリコール（ポリ（ラクチド）／ポリ（エチレングリコール）、ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリ（エチレングリコール）、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ（ビニルアルコール）を含む）が挙げられる。天然ポリマーとしては、限定されることなく、アルギニン酸ナトリウム、キトサン、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロナン、およびセルロース性物質（例えば、ヒドロキシセルロース）が挙げられる。他の有用な賦形剤としては、ペプチド、タンパク質およびアミノ酸が挙げられる。

【0042】

本発明の1つの実施形態において、賦形剤は、粉末形態で存在し、これは、次いで、有機溶媒中の溶解したHyaff-11（登録商標）内に活性成分とともに混合され、そしてエタノール（非溶媒）中に押し出されて、棒を形成し、次いでこれをリンスおよび乾燥する。最終組成物は、1つまたは組合せの賦形剤、好ましくは、塩、糖（例えば、スクロース）、および／またはアミノ酸（例えば、グリシンおよび／またはグルタミン酸）を含み得る。本発明の組成物は、約1～約60%（w/w）のアミノ酸、約1～約60%（w/w）の糖、および約1～約60%（w/w）の合成ポリマーを含み得る。本発明の別の実施形態において、処方物は、約20～50%（w/w）のアミノ酸、および／または約5～約50%（w/w）の糖、および／または約20～50%（w/w）の合成ポリマーを含む。

【0043】

本発明の注射可能組成物は、任意の臨床的に受容可能な注射の様式で投与され得る。多くの市販のシリンジは、本発明における使用のため、および本発明の組成物の投与のために適切であり得る。例えば、適切なシリンジは、入手可能であり、Calasept（登録商標）シリンジ（JS Dental Manufacturing, Ridgefield CT）は、非吸引または改変吸引カートリッジシリンジ中、等張性生理食塩水溶液中の滅菌水酸化カルシウムペーストを含み；Henke-Ject（登録商標）吸引シリンジおよびHypo（登録商標）歯科用シリンジ／針 [Smith & Nephew MPL, Franklin Park, IL; MPL, Inc., Chicago I

Lからの骨内針；ならびにLuer-Lok（登録商標）Syringes [Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ] は、全て、本発明における使用のための適切なシリンジであり得る。注射可能棒を保持および送達し得、そして／またはオブズレーター（obdurator）とともに押し出しを可能にし得る任意のシリンジが、使用について適切である。

【0044】

本発明の1つの実施形態において、固体棒状組成物は、選択された解剖学的位置内に経皮的または外科的に予め配置された適切なサイズおよびタイプの皮下針を使用して、骨内に送達される。皮下針の経皮的配置は、視覚的配置のための蛍光透視鏡を使用してまたは使用することなく、既知の解剖学的標識の手動触診を使用して達成され得る。蛍光透視鏡はまた、皮下針の配置の前および／または同時に外科移植と組み合わせて使用され得る。

10

【0045】

例示的な実施形態において、ガイドワイヤ（一般的に、「k-ワイヤ」と呼ばれる）は、最初に、皮下針のためのガイドとして役立つように、所望の解剖学的位置内に経皮的に挿入される。皮下針は、ガイドワイヤ上で挿入され、このガイドワイヤは、次いで、皮下針のみを適所に残すように取り出される。次いで、固体棒状組成物は、皮下針のハブ端部に挿入される。この組成物の装填に続いて、第2のガイドワイヤが、針内に挿入され、これは、固体組成物を針の先端に進めるために使用される。次いで、針は、組成物を骨内の所望の位置に固着させるために、ガイドワイヤを残して除去される。最後に、ガイドワイヤは、固体組成物を適所に残して除去される。別の実施形態において、本発明の固体棒状組成物は、針バレル内に予め配置される。所望の解剖学的位置内に配置した後に、シリンジのプランジャーは、デバイスが引き出される場合に、針バレル内に進み、固体棒状組成物を所望の位置に残す。

20

【0046】

本発明の1つの実施形態において、骨形成タンパク質は、骨粗鬆症を処置するための骨誘導性剤として使用される。このような処置から利益を得る患者は、二重エネルギーX線吸光光度法（DEXA）、定量コンピュータ断層撮影法（QCT）、単一光子吸光光度法、超音波伝達速度（UTV）、および／またはラジオグラフ評価を使用する骨質量／密度の測定を含む、種々の標準的手順のいずれか1つ以上を使用して同定され得る。このような手順は、臨床医に、骨粗鬆症性または骨減少性の骨損傷の位置および重篤度についての情報を提供する。処置される損傷を位置付けることに加えて、臨床医は、この情報を使用して、患者に適切な投与の様式および骨誘導性剤の用量を選択し得る。

30

【0047】

本発明の別の実施形態において、骨形成タンパク質は、伸延性骨形成として公知のプロセスにおいて骨誘導性剤として使用される。このプロセスは、移植された骨誘導性剤に回答した断片骨再生に対する代替である。従来の断片骨修復において、骨誘導性剤およびキャリアは、親の骨の末端間に作製される欠損内に配置される。骨形成が生じるために、骨誘導性剤は、新たな骨形成を支持するために、十分な数の骨形成細胞の分化を刺激するのに十分な滞留時間を欠損内で有しなければならない。伸延性骨形成のプロセスは、高度に脈管性である伸延した親骨端部間に再生構築物を作製し、そして骨形成細胞になるようになっている大きな集団の間葉幹細胞を含む。結果として、再生構築物は、rhBMP-2のような細胞分化増殖因子が、断片欠損内の骨の誘導に対して迅速な骨誘導を刺激するのにかなりより理想的な環境を表す。

40

【0048】

伸延性骨形成のプロセスは、初期の潜在期間で開始し、これは、線維性結合が、伸延される骨末端間で形成されることを可能にする。潜在期間に続いて、骨末端は、ヒトの臨床の場合、1日当たり1mmまでの制御された速度でゆっくり伸延される。一旦、再生物が形成され、骨末端が、適切な長さまで伸延すると、再生物が骨を形成し得るために長期の硬化期間が必要とされる。4～6ヶ月のオーダーであり得るこの長期の硬化期間は、かなりの罹患率と関連する。頻繁な合併症は、ピン軌跡感染を生じ、これは、伸延を生成させ

50

るために使用される外部固定装置が適所に残らなければならない延長した時間の長さから生じる。さらに、長期間外部固定装置を装着することに関連するかなりの心理的影響およびライフスタイルの変化が存在する。外部固定装置に関連する合併症に加えて、再生物が、適切に形成されず、遅延した癒合が生じるかまたは癒合が生じない多くの患者が存在する。再生物が応答細胞集団を含み、そして最初の伸延相に続いて既に高度に脈管性であるので、骨形成タンパク質の使用は、伸展骨形成の通常の長期の硬化期間の間、骨形成の速度を迅速に加速し得る。伸展相の加速は、骨に関係する軟部組織の伸長によって制限される。伸延骨形成を使用して作製される細胞はまた、骨形成のためにプライムされる細胞の供給源を提供するために収集され得る。これらの細胞は、不死化された細胞株を調製するために培養され得る。所望である場合、これらの細胞はまた、C T L A 4 レセプター [米 10
国特許第 5, 4 3 4, 1 3 1 号] または C T L A 4 リガンドまたは B 7 モノクローナル抗体 [W O 9 6 / 4 0 9 1 5] のような因子を使用して免疫寛容され得る。このような免疫寛容のための方法および材料は、上記参考文献に開示され、そしてこれらの因子での同時トランスフェクションまたは処置を含む。これらの参考文献の開示は、本明細書によって、本明細書中で参考として援用される。

【0049】

骨粗鬆症および閉鎖骨折を処置することに加えて、本発明の棒状組成物はまた、骨嚢胞および欠損のような他の骨部位に対する適用を見出し得る。注射可能固体組成物はまた、非骨部位（例えば、腱、損傷した軟骨組織、靱帯、および／またはそれらの骨への結合部位）に投与され得る。 20

【0050】

上記議論は、単一の骨誘導性組成物の投与に関連するが、本発明は、別々の処方物での複数の活性成分（例えば、上記のビスホスホネート組成物）の同時投与を明確に企図する。複数の活性成分は、同時にまたは別々の送達ビヒクルで別々に、そして個々にまたは組み合わせて送達され得る。

【0051】

投薬レジメンは、取り組まれるべき臨床的徴候によって、ならびに種々の患者の変数（例えば、体重、年齢、性別）および臨床的症状（例えば、損傷の程度、損傷の部位など）によって決定される。

【0052】

本発明の組成物は、治療的有效量の骨誘導性タンパク質が、軟骨および／または骨形成が所望される損傷部位に送達されることを可能にする。処方物は、新鮮かつ非癒合性の骨折、脊椎固定、および整形外科分野における骨欠損修復における自己骨移植片に対する代替として；頭蓋／顎顔面再構築において；骨再生についての骨髄炎において；ならびに顎堤および歯周欠損の増強、および抜歯ソケットについての歯科分野において使用され得る。骨髄炎を処置するためまたは最小の感染での骨修復のために使用される場合、骨形成タンパク質は、抗生物質とともに使用され得る。抗生物質は、骨形成に対して最小の有害な影響を有しながら、感染を減少させる能力のために選択される。本発明の組成物における使用のために好ましい抗生物質としては、バンコマイシンおよびゲンタマイシンが挙げられる。抗生物質は、任意の薬学的に受容可能な形態（例えば、バンコマイシン H C l または 40
ゲンタマイシンスルフェート）で存在し得る。抗生物質は、好ましくは、約 0. 1 m g / m L ~ 約 1 0. 0 m g / m L の濃度で存在する。薬学的に受容可能な形態の処方物（すなわち、発熱物質を含まない、適切な p H、および等張性、滅菌性など）の従来の調製は、十分に当該分野の技術範囲内であり、本発明の処方に適用可能である。

【0053】

本発明の固体棒状組成物はまた、他の薬物、増殖因子、ペプチド、タンパク質、サイトカイン、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、DNA、およびポリマーと組み合わせて利用され得る。これらの化合物は、それらをヒアルロン酸キャリアと混合させることによって、またはキャリアに共有結合させることによって、添加され得る。ヒアルロン酸組成物はまた、B M P をコードする DNA、および B M P をコードする遺伝 50

子を形質導入またはトランスフェクトされた細胞とともに使用され得る。

【0054】

以下の実施例は、本発明の例示であり、そしていかなる様式でも制限しない。改変、変更、および小さな向上が企図され、本発明の範囲内である。

【実施例】

【0055】

(実施例1：Hyaff-11棒の処方)

注射可能100%エステル化Hyaff-11棒状処方物(1mmの直径)を調製し、そして組換えヒト骨形成タンパク質-2(rhBMP-2)の保持および骨形成効力について評価した。棒状組成物は、キャリアとしてのHyaff-11(登録商標)ヒアルロナンベースの材料、活性成分としての2用量(表1を参照のこと)のrhBMP-2、および放出動力学の調節のための種々の量の賦形剤から構成された。この実施例において使用される賦形剤は、グルタミン酸または緩衝塩のいずれかの乾燥粉末形態からなった。緩衝塩は、0.5%スクロース、2.5%グリシン、5mM L-グルタミン酸、5mM NaCl、および0.01%ポリソルベート80を含んだ。Hyaff-11(登録商標)ベースの組成物は、相反転プロセスを使用して棒状に形成した。簡単に述べると、rhBMP-2および賦形剤(グルタメートおよび緩衝塩)を、有機溶媒N-メチルピロリドン(NMP)中に予め溶解したHyaff-11(登録商標)粒子(10%w/v)に混合し、シリンジおよびカテーテル(例えば、16-ゲージ)を使用して過剰のエタノール(非溶媒)中に押し出し、1時間相反転させ、リンスし、そして乾燥した。乾燥工程は、24時間の空気乾燥、続く、24時間の凍結乾燥工程からなった。計量シリンジポンプを使用して、好ましくは、0.2mL/分の注入速度を使用して押し出しを行った。以下のHyaff-11(登録商標)ベースの組成物を調製した：Hyaff-11(登録商標)、20%(w/w) rhBMP-2、および40%(w/w) グルタメート(すなわち、40/40/20(w/w) Hyaff-11(登録商標)/グルタメート/rhBMP-2)；Hyaff-11(登録商標)、60%(w/w) rhBMP-2/緩衝塩(すなわち、40/60(w/w) Hyaff-11(登録商標)/rhBMP-2)；およびHyaff-11(登録商標)、20%(w/w) rhBMP-2、および20%(w/w) 緩衝塩(すなわち、60/20/20(w/w) Hyaff-11(登録商標)/緩衝塩/rhBMP-2)。高いrhBMP-2用量を、Hyaff-11と組み合わせる前に、タンパク質処方物を脱塩することによって得た。乾燥棒を、代表的に、さらなる評価のために1または2cmのセグメントに切断した。この棒の理論的用量は、表1に列挙される。

【0056】

投与の好ましい様式は、骨内部位内への固体棒を注射するためのオブズレーターを備える16-ゲージ皮下針である。

【0057】

表1

(注射可能Hyaff(登録商標)棒処方物のためのrhBMP-2用量)

【0058】

【表1】

処方物	理論用量	
	($\mu\text{g BMP-2/mg 棒}$)	(mg BMP-2/cm 棒)
40/40/20 (w/w) Hyaff-11®/グルタメート /rhBMP-2	200	1.5
40/60 (w/w) Hyaff-11®/rhBMP-2	71	0.5
60/20/20 (w/w) Hyaff-11®/ 緩衝塩 /rhBMP-2	200	1.3
80/20 (w/w) Hyaff-11p65®/rhBMP-2	200	1.2
60/40 (w/w) Hyaff-11p65®/rhBMP-2	400	2.4

10

20

30

40

50

【0059】

(実施例2: Hyaff-11p65 (登録商標) 棒の配合)

注入可能な65%エステル化Hyaff-11p65棒状組成物(直径1mm)を調製し、rhBMP-2保持効率および骨原性効率について評価した。この棒状組成物は、Hyaff-11p65 (登録商標) ヒアルロナンベースの材料をキャリアとして、2つの用量(表1を参照のこと)のrhBMP-2を活性成分として含んだ。20(w/w) rhBMP-2 (すなわち、80/20(w/w) Hyaff-11p65 (登録商標) / rhBMP-2) または40%(w/w) rhBMP-2 (すなわち、60/40(w/w) Hyaff-11p65 (登録商標) / rhBMP-2) を含む、Hyaff-11p65 (登録商標) ベースの組成物を、脱塩したrhBMP-2とHyaff-11p65 (登録商標) 不織パッドとを乾燥形態で混合し、続いて、不織パッドの重量の18.755%(w/v)まで水和し、白色のペースト様粘度まで混合し、シリンジに移し、カテーテル(例えば、16ゲージ)を通して押し出し、乾燥することによって調製した。この方法のバリエーションは、ペーストをカテーテルから棒形態へと押し出す工程、棒を凍結させる(-80℃または液体窒素で)工程、わずかに大きい直径のチューブ(例えば、14ゲージのカテーテル)に挿入する工程、および乾燥する工程からなる。この乾燥工程は、24時間の風乾工程、その後の24時間の凍結乾燥工程からなる。棒調製物の代替の方法は、1.5mmの内径のシリコン(silastic)チューブまたはTeflon (登録商標) / FePチューブにHyaff-11p65 (登録商標) ペーストを形作る工程、その後の乾燥工程を含む。投与の好ましい様式は、固形棒を骨内部位に押し進めるためのオブジュレーター(obdurator)を備える、16ゲージの皮下針である。

【0060】

(実施例3: インビトロでの特徴づけ)

全ての棒状組成物は、剛性で、直線的で、処理可能であり、かつ、16ゲージ針を通して注入可能であった。Hyaff-11 (登録商標) 棒組成物の走査電子顕微鏡写真(SEM)は、代表的に、固形で、密で、かつ滑らかであったが、Hyaff-11p65 (登録商標) 棒組成物の走査電子顕微鏡写真は、天然の不織繊維の短い繊維性セグメントで密に充填されていた。棒状組成物におけるrhBMP-2の生物活性を、組成物からrhBMP-2を抽出し、マウスW-20-17間質細胞においてアルカリホスファターゼ(骨マーカー)発現を誘導するそれらの能力を試験した後に得た。Hyaff-11 (登録商標) 棒組成物およびHyaff-11p65 (登録商標) 棒組成物からのrhBMP-2は、生物活性であった。

【0061】

(実施例4: インビボでの局所生体分布)

インビボでのrhBMP-2保持プロファイルの範囲を、Hyaff-11 (登録商標) 棒組成物およびHyaff-11p65 (登録商標) 棒組成物を使用して得た。1cmの棒状組成物(実施例1および2に記載されるように調製した)におけるrhBMP-2の局所保持時間を、¹²⁵I-rhBMP-2およびγシンチグラフィーを使用して、ウサギ遠位大腿骨内モデルにおいて評価した(図1)。Hyaff-11 (登録商標) (Hyaff-11p65 (登録商標) ではない)を含む処方物は、BMP-2の用量または賦形剤に関わらず、rhBMP-2の遅延性で持続性の放出を提供した。エチレンオキシドによるグルタミン酸賦形剤の滅菌は、γ線滅菌したグルタミン酸と比較して、初めの3日間でわずかにより突発した放出を提供した。80/20(w/w) Hyaff-11p65 (登録商標) / rhBMP-2組成物は、rhBMP-2の最も速い放出速度論を提供した。

【0062】

(実施例5: 有効性および生体適合性)

上記のように調製された、Hyaff-11 (登録商標) ベースの組成物(Hyaff-11p65 (登録商標) ではない)を、ラットの皮下(腹側の胸郭)および骨内(遠位大腿)投与の2週間後に、生体適合性および骨形成に対する効果を評価した。棒状組成物

を骨内投与および皮下投与のためにそれぞれ2 mmおよび10 mmの長さにした。皮下の投与部位のX線分析および組織学的分析は、rhBMP-2を含む棒状組成物に隣接した骨形成を示した。このことは、rhBMP-2/Hyaff-11（登録商標）棒が、骨誘導性であったことを示唆する（データは示さず）。皮下および骨内の両方の投与部位は、最小限の炎症性応答を示し、このことは、ヒアルロン酸/BMP-2組成物の良好な生体適合性を示唆する。Hyaff-11（登録商標）棒状組成物およびHyaff-11 p65（登録商標）棒状組成物をさらに、ウサギの遠位大腿に注入し、7週間後、骨内空間においてかなりのデノボ骨形成が特に、80/20（w/w）Hyaff-11 p65（登録商標）/rhBMP-2処方物および40/40/20（w/w）Hyaff-11（登録商標）/グルタミン酸/rhBMP-2処方物において、組織学により観察された（データは示さず）。卵巣摘出したヒトの遠位橈骨へ80/20（w/w）Hyaff-11 p65（登録商標）/rhBMP-2処方物を注入すると、組織学的に未処理のコントロールと比較して、柱状骨容積の30%の相対的な増加を生じた（データは示さず）。

10

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1は、ウサギ遠位大腿骨（骨内）モデルにおける種々のヒアルロン酸/rhBMP-2組成物についてのBMP-2の局所保持時間を示すグラフである。

【図1】

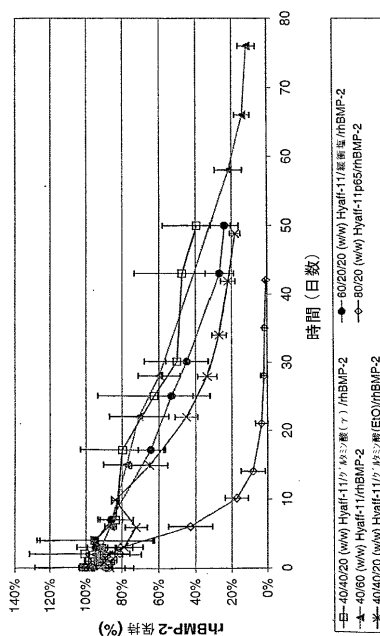


Figure 1

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 19/10 (2006.01) A 6 1 P 19/10

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 リ, レベッカ エイチ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01730, ベッドフォード, シャー レイン 14

(72)発明者 キム, ヒュン ディー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01921, ボックスフォード, ワシントン ストリート 262

合議体

審判長 星野 紹英

審判官 渕野 留香

審判官 平井 裕彰

(56)参考文献 国際公開第01/28602 (WO, A1)

国際公開第00/37124 (WO, A1)

国際公開第00/16818 (WO, A1)

国際公開第97/45532 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K38/00-45/08

A61L27/00-27/60

CA(STN)