



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년06월19일
 (11) 등록번호 10-1399677
 (24) 등록일자 2014년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 9/22 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
 A61K 9/06 (2006.01) A61L 24/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7029567(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년06월19일
 심사청구일자 2013년06월19일
- (85) 번역문제출일자 2011년12월09일
- (65) 공개번호 10-2011-0138302
- (43) 공개일자 2011년12월26일
- (62) 원출원 특허 10-2010-7001061
 원출원일자(국제) 2008년06월19일
 심사청구일자 2011년01월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/067562
- (87) 국제공개번호 WO 2008/157733
 국제공개일자 2008년12월24일
- (30) 우선권주장
 60/936,198 2007년06월19일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US RE39298E*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 박스터 헬스케어 에스에이
 스위스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우
 에르슈트라쎄 130
 박스터 인터내셔널 인코포레이티드
 미국 일리노이주 60015 디어필드 원 박스터 파크
 웨이
- (72) 발명자
 카텔라 이사벨트
 미국 60202 일리노이주 에반스톤 저드슨 애버뉴
 #1엔 932-1/2
 드와이어 조셉
 미국 60030 일리노이주 그레이슬레이크 브리타니
 스퀘어 #8 665
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 30 항

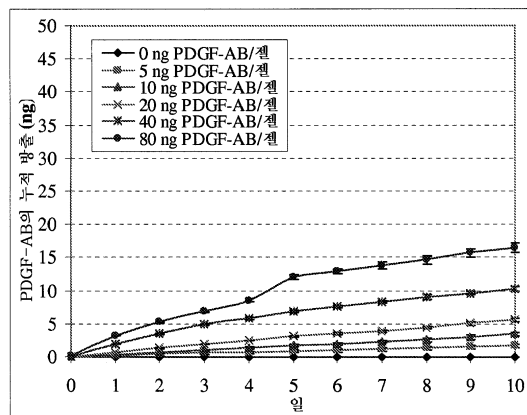
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 PDGF의 제어 방출을 위한 피브린 젤 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은, 일반적으로, 근골격 장애, 연조직 장애 및 혈관 질환을 포함하는 치료 용도를 위한, 원위치에서의 제어 방출을 위한 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)를 함유하는 피브린 실런트(sealant)에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

세이튼 완다

미국 60047 일리노이주 레이크 주리크 유니트 688
서라이즈 380

도노반 세인

미국 60625 일리노이주 시카고 웨스트 리랜드 애버
뉴 #3더블유 2513

헬거슨 샘 엘

미국 60069 일리노이주 링컨셔 시더 레인 50

특허청구의 범위

청구항 1

피브리노겐 복합체 (FC) 성분, 트롬빈 성분 및 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 성분의 혼합에 의해 생산된 피브린 실린트로부터의 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 이루어진 균으로부터 선택된 PDGF 단백질의 방출을 변형시키는 방법으로서,

a) 공지된 초기량의 PDGF 및 공지된 최종 농도의 FC를 갖는 제1 피브린 실린트(sealant)로부터 방출되는 PDGF의 양을 결정하는 단계, 및

b) 단계 (a)의 제1 피브린 실린트에서 사용된 FC의 공지된 최종 농도를 변형시켜 제2 피브린 실린트를 생성시키는 단계를 포함하고,

상기 단계 (b)에서, 제1 실린트 내의 FC의 공지된 최종 농도와 비교하여 제2 실린트 내의 FC의 농도를 증가시키는 것이 단계 (a)의 제1 실린트로부터의 PDGF 방출과 비교하여 제2 실린트로부터의 PDGF 방출 속도를 감소시키며, 제2 실린트에 단계 (a)에서의 제1 실린트와 동일한 초기량의 PDGF가 있거나,

제1 실린트 내의 FC의 공지된 최종 농도와 비교하여 제2 실린트 내의 FC의 농도를 감소시키는 것이 단계 (a)의 제1 실린트로부터의 PDGF 방출과 비교하여 제2 실린트로부터의 PDGF 방출 속도를 증가시키며, 제2 실린트에 단계 (a)에서의 제1 실린트와 동일한 초기량의 PDGF가 있고,

제1 또는 제2 피브린 실린트는 5 mg/ml 내지 75 mg/ml의 범위 내에서 최종 FC 농도를 가지는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 피브린 실린트 내의 최종 FC 농도가 제2 실린트 내의 최종 FC 농도와 1 mg/ml 내지 149 mg/ml만큼 상이한 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 피브린 실린트 내의 최종 FC 농도가 제2 실린트 내의 FC 농도와 5 mg/ml 내지 75 mg/ml만큼 상이한 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 제1 피브린 실린트 내의 최종 FC 농도가 제2 실린트 내의 FC 농도와 10 mg/ml 내지 60 mg/ml만큼 상이한 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 제1 실린트 또는 제2 실린트 내의 트롬빈 성분의 최종 농도가 1 IU/ml 내지 250 IU/ml의 범위 내인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, PDGF의 최종 농도가 1 ng/ml 내지 1 mg/ml의 범위 내인 방법.

청구항 7

혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)의 제어 방출을 필요로 하는 환자에 있어서, PDGF의 제어 방출을 위한 피브린 실린트로서, 상기 피브린 실린트는 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 이루어진 균으로부터 선택된 PDGF 단백질을 포함하고, 상기 피브린 실린트를 환자에게 투여한 후, PDGF의 25% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되고, 상기 피브린 실린트는 5 mg/ml 내지 75 mg/ml의 범위 내에서 최종 피브리노겐 복합체 (FC) 농도를 가지는 피브린 실린트.

청구항 8

제7항에 있어서, FC 성분 및 트롬빈 성분을 혼합하여 생산되는 피브린 실린트.

청구항 9

제8항에 있어서, FC 성분과 트롬빈 성분의 혼합 전에 FC 성분에 PDGF가 첨가된 피브린 실린트.

청구항 10

제7항 또는 제8항에 있어서, PDGF의 35% 내지 90% 이상이 3일 이상 동안 유지되는 피브린 실린트.

청구항 11

제7항 또는 제8항에 있어서, PDGF의 45% 내지 75% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되는 피브린 실린트.

청구항 12

제7항 또는 제8항에 있어서, PDGF의 60% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되는 피브린 실린트.

청구항 13

혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)의 제어 방출을 필요로 하는 환자에 있어서, PDGF의 제어 방출을 위한 피브린 실린트로서, 상기 피브린 실린트는 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 이루어진 균으로부터 선택된 PDGF 단백질을 포함하고, 상기 피브린 실린트를 환자에게 투여한 후, PDGF의 20% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되고, 상기 피브린 실린트는 5 mg/ml 내지 75 mg/ml의 범위 내에서 최종 피브리노겐 복합체 농도를 가지는 피브린 실린트.

청구항 14

제13항에 있어서, 피브리노겐 복합체 (FC) 성분 및 트롬빈 성분을 혼합하여 생산되는 피브린 실린트.

청구항 15

제14항에 있어서, FC 성분과 트롬빈 성분의 혼합 전에 FC 성분에 PDGF가 첨가된 피브린 실린트.

청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서, PDGF의 25% 내지 75% 이상이 10일 이상 동안 유지되는 피브린 실린트.

청구항 17

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 PDGF의 45% 내지 55% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되는 피브린 실린트.

청구항 18

제13항 또는 제14항에 있어서, 방출된 PDGF가 생물학적으로 활성인 피브린 실린트.

청구항 19

제8항 또는 제14항에 있어서, 실린트 내의 최종 트롬빈 농도가 1 IU/ml 내지 250 IU/ml의 범위 내인 피브린 실린트.

청구항 20

제8항 또는 제14항에 있어서, 최종 피브리노겐 복합체 농도가 40 mg/ml이고, 최종 트롬빈 농도가 2 IU/ml인 피브린 실린트.

청구항 21

제7항 또는 제13항에 있어서, 실린트 내의 최종 PDGF 농도가 1 ng/ml 내지 1 mg/ml인 피브린 실린트.

청구항 22

제7항 또는 제13항에 있어서, PDGF가 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 피브린 실런트.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 PDGF-AB의 60% 이상이 상기 피브린 실런트 내에서 3일 이상 동안 유지되고, 상기 PDGF-AB의 40% 이상이 상기 피브린 실런트 내에서 10일 이상 동안 유지되는 피브린 실런트.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 PDGF-BB의 55% 이상이 상기 피브린 실런트 내에서 3일 이상 동안 유지되고, 상기 PDGF-BB의 25% 이상이 상기 피브린 실런트 내에서 10일 이상 동안 유지되는 피브린 실런트.

청구항 25

제7항 또는 제13항에 있어서, 환자가 근골격 질환 또는 장애, 골 질환 또는 골 장애, 연조직 질환 또는 장애 및 심혈관 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 앓고 있는 피브린 실런트.

청구항 26

PDGF-AB 및 PDGF-BB로 이루어진 군으로부터 선택된 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 단백질을 포함하는 피브린 실런트를 제조하기 위한 키트로서,

a) 피브리노겐 복합체 성분을 함유하고, 바이알에 PDGF 성분을 포함할 수 있는 제1 바이알 또는 제1 보관 용기, 및 b) 트롬빈 성분이 있는 제2 바이알 또는 제2 보관 용기를 포함하고,

상기 제1 바이알 또는 제1 보관 용기가 PDGF 성분을 포함하지 않는 경우 PDGF 성분이 있는 제3 바이알 또는 제3 보관 용기를 포함할 수 있고, 키트의 사용 설명서를 추가로 함유하고,

상기 피브린 실런트를 환자에게 투여한 후, PDGF의 25% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실런트 내에서 유지되거나, PDGF의 20% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실런트 내에서 유지되고,

상기 피브린 실런트는 5 mg/ml 내지 75 mg/ml의 범위 내에서 최종 피브리노겐 복합체 농도를 가지는 키트.

청구항 27

PDGF-AB 및 PDGF-BB로 이루어진 군으로부터 선택된 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 단백질을 포함하는 피브린 실런트를 제조하기 위한 키트로서,

a) 피브리노겐 복합체 성분을 함유하는 제1 바이알 또는 제1 보관 용기, 및 b) 트롬빈 성분이 있고, 바이알에 PDGF 성분을 포함할 수 있는 제2 바이알 또는 제2 보관 용기를 포함하고,

상기 제2 바이알 또는 제2 보관 용기가 PDGF 성분을 포함하지 않는 경우 PDGF 성분이 있는 제3 바이알 또는 제3 보관 용기를 포함할 수 있고, 키트의 사용 설명서를 추가로 함유하고,

상기 피브린 실런트를 환자에게 투여한 후, PDGF의 25% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실런트 내에서 유지되거나, PDGF의 20% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실런트 내에서 유지되고,

상기 피브린 실런트는 5 mg/ml 내지 75 mg/ml의 범위 내에서 최종 피브리노겐 복합체 농도를 가지는 키트.

청구항 28

제27항에 있어서, 제2 바이알이 PDGF 성분을 포함하는 키트.

청구항 29

제27항에 있어서, 제2 바이알이 PDGF 성분을 포함하지 않고, 키트가 PDGF 성분이 있는 제3 바이알을 추가로 포함하는 키트.

청구항 30

혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 단백질의 제어 방출이 이로운 장애 또는 질환을 앓고 있는 환자의 치료를 위해

PDGF 단백질의 원위치 제어 방출에 사용하기 위한 조성물로서,

상기 조성물은 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 이루어진 군으로부터 선택된 PDGF 단백질을 포함하는 피브린 실린트를 포함하고,

상기 피브린 실린트를 환자에게 투여한 후, PDGF의 25% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되거나, PDGF의 20% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되고,

상기 피브린 실린트는 5 mg/ml 내지 75 mg/ml의 범위 내에서 최종 피브리노겐 복합체 농도를 가지는 조성물.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 미국 특허 가출원 번호 60/936,198 (2007년 6월 19일 출원)을 우선권으로 청구하고, 이는 전체적으로 거명에 의해 본원에 포함된다.

[0002] 본 발명은, 일반적으로, 근골격 및 혈관 질환을 포함하는 치료 용도를 위한, 원위치에서의(in situ) 가역적 결합을 통한 제어 방출을 위한 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)를 함유하는 피브린 실런트(sealant)에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 피브린 실린트는 인간 혈액-응고 단백질로부터 제조되고 출혈을 제어하기 위해 수술 동안 전형적으로 사용되는 일종의 수술용 "글루(glue)"이다. 이러한 실린트 내의 성분들이 적용 동안에 상호작용하여 혈액 단백질 피브린으로 구성되는 안정적인 응괴를 형성한다. 현재 피브린 실린트는 여러 상이한 목적으로 수술 동안에 사용된다: 외과 의사가 시술 중인 부위에서의 출혈 제어, 상처 치유의 촉진, 공동(空洞) 신체 기관의 밀봉 또는 표준 봉합에 의해 만들어진 구멍의 피복, 수술 동안 노출된 조직으로의 의약의 저속 방출 전달 제공.
- [0004] 피브린 실린트는 일반적으로 2개의 인간 혈장-유래 성분으로 구성된다: (a) 촉매량의 XIII 인자 및 플라스미노젠과 함께 피브리노젠 및 피브로넥틴으로 주로 구성된 고도로 농축된 피브리노젠 복합체 (FC), 및 (b) 고효능 트롬빈. 피브린 실린트는 아프로티닌을 또한 함유할 수 있다. 트롬빈의 작용에 의해, (가용성) 피브리노젠이 먼저 피브린 단량체로 전환되고, 이것이 자발적으로 응집되어 소위 피브린 응괴를 형성한다. 동시에, 용액 내에 존재하는 XIII 인자 (FXIII)가 칼슘 이온의 존재 하에 트롬빈에 의해 XIIIa 인자로 활성화된다. 응집된 피브린 단량체 및 존재할 수 있는 임의의 잔존하는 피브로넥틴이 가교되어, 새로운 펩티드 결합 형성에 의해 고분자 중합체를 형성한다. 이러한 가교 반응에 의해, 형성된 응괴의 강도가 실질적으로 증가된다. 일반적으로, 응괴는 상처 및 조직 표면에 잘 부착되고, 이는 접착 및 지혈 효과에 이른다 (미국 특허 7,241,603). 따라서 피브린 접착제는 피브리노젠 복합체(FC) 성분을 트롬빈 성분 (부가적으로 칼슘 이온을 함유함)과 함께 포함하는 2-성분 접착제로서 빈번하게 사용된다.
- [0005] 피브린 실린트의 특별한 장점은 접착제/젤이 그의 적용 부위에 이물질로서 잔존하지 않고, 천연 상처 치유에서와 같이 완전히 흡수되며, 새롭게 형성된 조직에 의해 교체된다는 것이다. 각종 세포, 예를 들어, 대식세포 및 이어서 섬유아세포가 젤 내로 이동하고, 젤 물질을 용해시키고 재흡수하여, 새로운 조직을 형성한다. 피브린 실린트는 원위치에서 피브린 젤을 형성시키는데 사용되었고, 이러한 피브린 젤은 세포 및 성장 인자의 전달을 위해 사용되었다 ([Cox et al., Tissue Eng 10:942-954, 2004]; [Wong et al., Thromb Haemost 89:573-582, 2003]).
- [0006] 조직 복원을 위해, 성장 인자 및 세포를 피브린 젤과 같은 매트릭스 내에 위치시키는 것이 바람직하다. 예를 들어, 피브린 젤이 소 태아 혈청, 산호 과립, 및 리포솜을 포함하는 다양한 복합 혼합물 내의 TGF- β 의 전달을 위해 사용되었다 ([Fortier et al., Am J Vet Res 58(1): 66-70, 1997]; [Arnaud et al., Chirurgie Plastique Esthetique 39(4): 491-498, 1994]; [Arnaud et al. Calcif Tissue Int 54: 493-498, 1994]; [Giannoni et al., Biotechnology and Bioengineering 83(1): 121-123, 2003]). 피브린 젤로부터 성장 인자를 전달하기 위한 별법적인 수단은 트랜스글루타미네이스(transglutaminase) 기질, 항체, 및 성장 인자에 결합된 VEGF 단편을 포함하는 접합체를 수반한다 (예를 들어, 전체적으로 거명에 의해 본원에 포함된 미국 특허 번호 6,506,365; 동 6,713,453 및 미국 특허 공개 2003/0012818 참조). 상처 치유를 강화하기 위한 약물 전달 매트릭스가 기술된 미국 특허 출원 20030012818을 또한 참조한다. 추가적으로, 피브린 젤은, 매트릭스 내의 FC 및 트롬빈의 농도에 따라, 세포 성장 (예를 들어, 인간 중간엽 줄기세포 (HMSC)) 및 증식, 뿐만 아니라 어느 정도까지의 골형성성 분화를 유도하는 것으로 나타났다 ([Catelas et al., Tissue Eng 12:2385-2396, 2006]).
- [0007] 성장 인자를 신체 내의 특정 부위로 전달하는 피브린 실린트의 능력이 이로울 수 있지만, 조직의 적합한 재성장은 적합한 치료가 보장되도록 특정 속도로 부위에 전달되는 성장 인자 또는 사이토카인의 연속적/지속적인 공급을 종종 필요로 한다. 이는 치료적 단백질의 생체 내 반감기가 짧은 경우에 특히 그러하다. 현재 사용되는 피브린 실린트는 시딩(seeding)된 약물 또는 작용제의 약간의 지연된 방출을 제공하지만, 실린트 내의 작용제의 수명을 연장시키는 능력은 생체 내에서 장기(長旗) 조직 복원을 개선시킬 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서, 각종 용태 및 장애의 치료를 위해 생체 내에서 성장 인자를 전달하기 위한 효과적인 수단을 개발하고, 피브린 젤로부터의 성장 인자의 제어 방출을 위한 개선된 방법을 개발하는 것이 당업계에서 여전히 요구된다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 시험관 내 및 생체 내에서 성장 인자의 가역적인 결합을 통한 제어 방출을 위한 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)를 포함하는 피브린 실린트의 조성물을 제공한다. 본 발명은 실린트를 형성하는데 사용되는 피브리노젠 복합체 (FC) 성분의 함량을 변형시킴으로써 피브린 실린트로부터의 PDGF 단백질의 방출을 변형시키는 방법 또한 제공한다. 용태 또는 장애의 치료를 위해, PDGF가, 일단 피브린 실린트로부터 방출되면, PDGF가 시험관

내에서 또는 생체 내에서 그의 예상되는 생물학적 활성을 매개할 수 있도록 그의 생물학적 활성을 보유하는 것이 고려된다.

- [0010] 한 양상에서, 본 발명은 a) 공지된 초기량의 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 및 공지된 최종 농도의 FC가 있는 제1 피브린 실린트로부터 방출되는 PDGF의 양을 결정하는 단계, 및 b) 단계 (a)의 제1 피브린 실린트에서 사용된 FC의 공지된 최종 농도를 변형시켜 제2 피브린 실린트를 생성시키고, 이때 제1 실린트 내의 FC의 공지된 최종 농도와 비교하여 제2 실린트 내의 FC의 농도를 증가시키는 것이 단계 (a)의 제1 실린트로부터의 PDGF 방출과 비교하여 제2 실린트로부터의 PDGF 방출 속도를 감소시키며, 제2 실린트에 단계 (a)에서의 제1 실린트와 동일한 초기량의 PDGF가 있는 단계를 포함하는, FC 성분, 트롬빈 성분 및 PDGF 성분의 혼합에 의해 생산된 피브린 실린트로부터의 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 PDGF 단백질의 방출을 변형시키는 방법을 제공한다.
- [0011] 관련된 양상에서, 본 발명은 a) 공지된 초기량의 PDGF 및 공지된 최종 농도의 FC가 있는 제1 피브린 실린트로부터 방출되는 PDGF의 양을 결정하는 단계, 및 b) 단계 (a)의 제1 피브린 실린트에서 사용된 FC의 공지된 최종 농도를 변형시켜 제2 피브린 실린트를 생성시키고, 이때 제1 실린트 내의 FC의 공지된 최종 농도와 비교하여 제2 실린트 내의 FC의 농도를 감소시키는 것이 단계 (a)의 제1 실린트로부터의 PDGF 방출과 비교하여 제2 실린트로부터의 PDGF 방출 속도를 증가시키며, 제2 실린트에 단계 (a)에서의 제1 실린트와 동일한 초기량의 PDGF가 있는 단계를 포함하는, FC 성분, 트롬빈 성분 및 PDGF 성분의 혼합에 의해 생산된 피브린 실린트로부터의 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 PDGF 단백질의 방출을 변형시키는 방법을 제공한다.
- [0012] 한 실시양태에서, 제1 실린트 또는 제2 실린트 내의 최종 FC 농도는 약 1 mg/ml 내지 약 150 mg/ml의 범위 내이다. 관련된 실시양태에서, 제1 실린트 또는 제2 실린트 내의 최종 FC 농도는 약 5 mg/ml 내지 약 75 mg/ml의 범위 내이다.
- [0013] 또다른 실시양태에서, 제1 피브린 실린트 내의 최종 FC 농도가 약 1 mg/ml 내지 약 149 mg/ml만큼 제2 피브린 실린트 내의 최종 FC 농도와 상이한 것이 고려된다. 추가적인 실시양태에서, 제1 피브린 실린트 내의 최종 FC 농도는 약 5 mg/ml 내지 약 75 mg/ml만큼 제2 피브린 실린트 내의 FC 농도와 상이하다. 또다른 실시양태에서, 제1 피브린 실린트 내의 최종 FC 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 60 mg/ml만큼 제2 피브린 실린트 내의 FC 농도와 상이하다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 제1 실린트 또는 제2 실린트 내의 트롬빈 성분의 최종 농도가 약 1 IU/ml 내지 250 IU/ml의 범위 내인 것이 고려된다. 또다른 실시양태에서, 제1 실린트 또는 제2 실린트 내의 PDGF의 최종 농도는 약 1 ng/ml 내지 약 1 mg/ml의 범위 내이다.
- [0015] 또다른 양상에서, 환자에게 PDGF를 포함하는 피브린 실린트를 투여하는 단계를 포함하고, 이때 PDGF의 25% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되는, PDGF 단백질의 제어 방출을 필요로 하는 환자에서 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 PDGF 단백질의 제어 방출을 위한 방법이 본 발명에서 고려된다.
- [0016] 관련된 양상에서, 본 발명은 환자에게 PDGF를 포함하는 피브린 실린트를 투여하는 단계를 포함하고, 이때 PDGF의 20% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지되는, PDGF 단백질의 제어 방출을 필요로 하는 환자에서 PDGF-AB 및 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 PDGF 단백질의 제어 방출을 위한 방법을 제공한다.
- [0017] 피브린 실린트로부터 방출된 PDGF가 생물학적으로 활성인 것이 고려된다.
- [0018] 일부 실시양태에서, PDGF의 적어도 35% 내지 90%가 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지된다. 관련된 실시양태에서, PDGF의 45% 내지 75% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지된다. 추가적인 실시양태에서, PDGF의 60% 이상이 3일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지된다.
- [0019] 또다른 실시양태에서, PDGF의 25% 내지 75% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지된다. 관련된 실시양태에서, 상기 PDGF의 45% 내지 55% 이상이 10일 이상 동안 피브린 실린트 내에서 유지된다.
- [0020] 관련된 실시양태에서, 피브린 실린트가 3일 또는 10일 중 하나 또는 양쪽 모두에 대해 상기 범위의 방출 동역학을 가질 수 있는 것이 고려된다.
- [0021] 한 실시양태에서, 혼합으로 FC 성분 및 트롬빈 성분을 조합시킴으로써 피브린 실린트가 생산된다. 또다른 실시양태에서, FC 성분과 트롬빈 성분의 혼합 전에 FC 성분에 PDGF가 첨가된다. 추가적인 실시양태에서, PDGF가 트롬빈 성분에 첨가된다.

- [0022] 관련된 실시양태에서, PDGF 방출이 매일 일정량만큼 감소될 수 있는 것이 고려된다. 예를 들어, 피브린 실린트 내의 PDGF 양이 하루에 약 1%만큼, 하루에 약 2%만큼, 하루에 약 3%만큼, 하루에 약 4%만큼, 하루에 약 5%만큼, 하루에 약 6%만큼, 하루에 약 7%만큼, 하루에 약 8%만큼, 하루에 약 9%만큼 또는 하루에 약 10%만큼 감소될 수 있거나, 또는 원하는 방출량이 피브린 실린트를 형성하는데 사용된 FC 농도 또는 트롬빈 농도를 기초로 조정될 수 있다.
- [0023] 실린트 내의 FC 성분의 최종 농도가 약 1 mg/ml 내지 약 150 mg/ml의 범위 내인 것이 본 발명에서 고려된다. 일부 실시양태에서, 실린트 내의 트롬빈 성분의 최종 농도가 약 1 IU/ml 내지 250 IU/ml의 범위 내인 것이 또한 고려된다. 한 실시양태에서, 최종 FC 농도는 약 5 mg/ml, 약 10 mg/ml, 약 20 mg/ml 또는 약 40 mg/ml이고, 최종 트롬빈 농도는 약 2 IU/ml이다.
- [0024] 한 실시양태에서, 실린트 내의 최종 PDGF 농도는 약 1 ng/ml 내지 약 1 mg/ml이다.
- [0025] 추가적인 실시양태에서, PDGF가 PDGF-AB인 것이 고려된다. 한 실시양태에서, 상기 PDGF-AB의 60% 이상이 상기 피브린 실린트 내에서 3일 이상 동안 유지되고, 상기 PDGF-AB의 40% 이상이 상기 피브린 실린트 내에서 10일 이상 동안 유지된다. 추가적인 실시양태에서, 상기 PDGF-AB의 80% 이상이 상기 피브린 실린트 내에서 3일 이상 동안 유지되고, 상기 PDGF-AB의 60% 이상이 상기 피브린 실린트 내에서 10일 이상 동안 유지된다.
- [0026] 관련된 실시양태에서, PDGF가 PDGF-BB인 것이 고려된다. 한 실시양태에서, 상기 PDGF-BB의 55% 이상이 상기 피브린 실린트 내에서 3일 이상 동안 유지되고, 상기 PDGF-BB의 25% 이상이 상기 피브린 실린트 내에서 10일 이상 동안 유지된다.
- [0027] 추가적인 양상에서, 환자에게 PDGF 단백질을 포함하는 피브린 실린트를 투여하는 단계를 포함하고, 이때 PDGF의 25% 이상이 피브린 실린트 내에서 3일 이상 동안 유지되는 PDGF의 제어 방출을 피브린 실린트가 제공하며, 상기 PDGF가 장애 또는 질환을 치료하는데 효과적인 속도로 방출되는, PDGF-AB 또는 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 PDGF 단백질의 원위치 제어 방출이 이로울 장애 또는 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이 본 발명에서 고려된다.
- [0028] 추가적인 양상에서, 환자에게 PDGF 단백질을 포함하는 피브린 실린트를 투여하는 단계를 포함하고, 이때 PDGF의 20% 이상이 피브린 실린트 내에서 10일 이상 동안 유지되는 PDGF의 제어 방출을 피브린 실린트가 제공하며, 상기 PDGF가 장애 또는 질환을 치료하는데 효과적인 속도로 방출되는, PDGF-AB 또는 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 생체활성 PDGF 단백질의 원위치 제어 방출이 이로울 장애 또는 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이 본 발명에서 고려된다.
- [0029] 본 발명은 PDGF 단백질의 원위치 제어 방출이 이로울 장애 또는 질환을 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 PDGF-AB 또는 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 PDGF 단백질을 포함하는 피브린 실린트의 용도로서, 피브린 실린트가 상기와 같은 PDGF의 제어 방출을 제공하는 용도를 또한 제공한다.
- [0030] 상기 기술된 방출 동역학이 PDGF 단백질의 원위치 제어 방출이 이로울 환자의 치료 방법에, 또는 상기 환자를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 피브린 실린트의 용도에 적용가능한 것이 본 발명에서 고려된다.
- [0031] 한 양상에서, 환자는 당업자에게 명백할 생체 내에서의 PDGF의 제어 방출이 이로울 질환을 앓고 있다. 한 실시양태에서, 질환 또는 장애는 근골격 질환 또는 장애, 연조직 질환 또는 장애 및 심혈관 질환으로 구성된 균으로부터 선택된다.
- [0032] 한 실시양태에서, 피브린 실린트가 당업계에 주지된 방법, 예컨대 주사, 분무, 내시경 투여 또는 미리 형성된 젤 (단독 또는 또다른 물질들과 조합됨), 또는 당업자에게 공지된 기타 방법을 사용하여 환자에게 투여된다.
- [0033] 본 발명은 a) FC 성분을 함유하고, PDGF 성분을 임의적으로 포함하는 제1 바이알 또는 제1 보관 용기, 및 b) 트롬빈 성분이 있는 제2 바이알 또는 제2 보관 용기를 포함하고, 상기 제1 바이알 또는 제1 보관 용기가 PDGF 성분을 포함하지 않는 경우 PDGF 성분이 있는 제3 바이알 또는 제3 보관 용기를 임의적으로 함유하며, 키트의 사용 설명서를 추가로 함유하는, PDGF-AB 또는 PDGF-BB로 구성된 균으로부터 선택된 생체활성 PDGF 단백질을 포함하고 원하는 PDGF 방출 속도를 갖는 피브린 실린트를 제조하기 위한 키트를 또한 제공한다. 키트는 시험관 내 또는 생체 내에서의 피브린 실린트의 사용 또는 투여를 위한 기구를 또한 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명은, 일반적으로, 근골격 장애, 연조직 장애 및 혈관 질환을 포함하는 치료 용도를 위한, 원위치에서의

제어 방출을 위한 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)를 함유하는 피브린 실런트(sealant)를 제공할 수 있다.

[0035] 본 발명의 기타 양상 및 장점들이 하기의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 특정 실시예는, 본 발명의 특정 실시양태를 지시하기는 하지만, 설명으로서만 제공되고, 이는 본 발명의 취지 및 범주 내의 다양한 변화 및 변형이 이러한 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문이라는 것을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 TISSEEL VH S/D 젤로부터의 PDGF-AB의 누적 방출에 대한 PDGF-AB 양의 효과를 나타낸다 ([FC] = 20 mg/ml 및 [트롬빈] = 2 IU/ml).

도 2는 TISSEEL VH S/D 젤로부터의 PDGF-BB의 누적 방출에 대한 PDGF-BB 양의 효과를 나타낸다 ([FC] = 20 mg/ml 및 [트롬빈] = 2 IU/ml).

도 3은 TISSEEL VH S/D 젤로부터의 PDGF-AB 1일 방출 (도 3a) 및 누적 방출 (도 3b)에 대한 FC 농도의 효과를 나타낸다 ([트롬빈] = 2 IU/ml).

도 4는 TISSEEL VH S/D 젤로부터의 PDGF-BB 1일 방출 (도 4a) 및 누적 방출 (도 4b)에 대한 FC 농도의 효과를 나타낸다 ([트롬빈] = 2 IU/ml).

도 5는 PDGF-AB 누적 방출에 대한 TISSEEL VH S/D 로트 번호의 효과를 나타낸다 ([FC] = 20 mg/ml, [트롬빈] = 2 IU/ml).

도 6은 PDGF-BB 누적 방출에 대한 TISSEEL VH S/D 로트 번호의 효과를 나타낸다 ([FC] = 20 mg/ml, [트롬빈] = 2 IU/ml).

도 7은 TISSEEL VH 젤로부터의 PDGF-BB의 누적 방출에 대한 PDGF-BB 양의 효과를 나타낸다 ([FC] = 20 mg/ml 및 [트롬빈] = 2 IU/ml).

도 8은 TISSEEL VH 젤로부터의 PDGF-BB 1일 방출 (도 8a) 및 누적 방출 (도 8b)에 대한 FC 농도의 효과를 나타낸다 ([트롬빈] = 2 IU/ml).

도 9는 PDGF-BB 누적 방출에 대한 TISSEEL VH 로트 번호의 효과를 나타낸다 ([FC] = 20 mg/ml, [트롬빈] = 2 IU/ml).

도 10은 7일까지 단층으로 배양된 HMSC 증식에 대한 TISSEEL VH S/D 젤로부터 방출된 PDGF-AB의 효과를 나타낸다.

도 11은 7일까지 단층으로 배양된 HMSC 증식에 대한 TISSEEL VH S/D 젤로부터 방출된 PDGF-BB의 효과를 나타낸다.

도 12는 ALP 활성에 대한 TISSEEL VH S/D 젤로부터 방출된 PDGF-AB의 효과를 나타낸다 (증식에 대해 표준화됨).

도 13은 ALP 활성에 대한 TISSEEL VH S/D 젤로부터 방출된 PDGF-BB의 효과를 나타낸다 (증식에 대해 표준화됨).

도 14는 TISSEEL VH S/D로부터의 FC와 상호작용하는 PDGF-AB (도 14A) 및 PDGF-BB (도 14B)의 센서그램을 묘사한다. 도 14C는 PDGF-AB과 TISSEEL VH S/D로부터의 FC의 상호작용에 대한 회합 및 해리 속도 상수의 그래프에 의한 결정을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명은 근골격 질환, 연조직 장애, 및 혈관 질환의 치료를 포함하는 치료 용도에서의 원위치에서의 가역적 결합을 통한 제어 방출을 위한 PDGF를 함유하는 피브린 젤을 제공한다. 시험관 내에서 또는 생체 내에서의 피브린 실런트로부터의 방출이 원하는 생물학적 활성을 조정하도록, 젤로부터 방출된 PDGF가 그의 생물학적 활성을 유지하는 것이 본 발명에서 고려된다. 본 발명은 원하는 PDGF 방출 동역학을 수득하도록 피브린 실런트를 형성하는데 유용한 FC 성분 또는 트롬빈 성분의 농도를 결정하는 방법을 또한 제공한다.

[0038] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 사용된 다수의 용어의 일반적인 정의가 하기의 참고문헌들에서 당업자에게 제공된다: [Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

(2d ed. 1994)]; [THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988)]; [THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991)]; 및 [Hale and Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)].

- [0039] 본원에서 인용된 각각의 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참고문헌은 본 발명의 개시내용과 모순되지 않는 정도로 전체적으로 거명에 의해 포함된다.
- [0040] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된, 단수형의 정관사 및 부정관사 ("a", "an" 및 "the")는 문맥적으로 명확하게 달리 지시되지 않는 한 복수에 대한 언급을 포함한다는 것을 유념한다.
- [0041] 본원에서 사용된 하기의 용어들은 달리 특정되지 않는 한 이들에게 속하는 것으로 생각되는 의미를 갖는다.
- [0042] 본원에서 사용된 용어 "피브린 실린트", "피브린 젤", "피브린 접착제", "피브린 응괴" 또는 "피브린 매트릭스"는 상호교환가능하게 사용되고, 적어도 피브리노겐 복합체 (FC) 성분 및 트롬빈 성분을 포함하는 3차원 네트워크를 지칭하며, 이는 세포 성장 및 경시적인 생체활성 물질의 방출을 위한 스캐폴드(scaffold)로 작용할 수 있다.
- [0043] 본원에서 사용된 용어 "제어 방출" 및 "지연 방출"은 의미가 동일하고, 피브린 젤 내에서의 작용제 (예를 들어, 성장 인자)의 유지를 지칭한다. 제어 방출은 확산에 의한 또는 결합된 성장 인자의 젤로부터의 해리 및 이어지는 확산에 의한 느리고 지속적인 분비/방출에 기인할 뿐만 아니라, 매트릭스의 붕괴 및 효소적 절단에 또한 기인한다.
- [0044] 본원에서 사용된 "원위치 형성"은 생리학적 온도에서 및 신체 내의 주사 부위에서의 형성, 또는 적합한 시험관 내 조건에서의 피브린 실린트의 형성을 지칭한다. 이러한 용어는 투여 전 및 투여 시점에는 실질적으로 가교되지 않은, 피브린 실린트 내의 전구체 분자들 간의 공유 결합의 형성을 기술하는 것으로 전형적으로 사용된다.
- [0045] 본원에서 사용된 "피브리노겐 복합체 (FC) 성분"은 트롬빈과 혼합되어 응괴-유사 피브린 실린트를 초래하는 피브린/피브리노겐 용액을 지칭한다. FC는 피브리노겐 및 피브로넥틴으로 주로 구성되고, 촉매량의 FXIII 및 플라스미노겐을 또한 함유할 수 있다. FC 성분은 실러(Sealer) 단백질로 또한 지칭될 수 있다.
- [0046] 본원에서 사용된 "트롬빈 성분"은 응괴-유사 피브린 실린트를 초래하는 FC 성분과 혼합되는 트롬빈 용액을 지칭한다.
- [0047] 본원에서 사용된 "혈소판 유래 성장 인자 성분" 또는 "PDGF 성분"은 용액 내의 성장 인자를 액체 형태의 피브린 실린트에 첨가하는 것을 지칭한다. PDGF를 포함하는 피브린 실린트를 형성하도록 PDGF 성분, FC 복합체 성분 및 트롬빈 성분 각각이 따로따로 첨가될 수 있다. 임의적으로, PDGF 성분이 트롬빈 성분과의 혼합 전에 액체 FC 성분에, 또는 FC 성분과의 혼합 전에 트롬빈 성분에 첨가된다. PDGF 성분은 PDGF-AB 또는 PDGF-BB, 또는 PDGF-AB 및 PDGF-BB 양쪽 모두를 포함할 수 있다.
- [0048] 본원에서 사용된 "재조합 인간 PDGF"는 재조합 DNA 기술을 통해 수득된 재조합 인간 혈소판 유래 성장 인자 (rh PDGF)를 지칭한다. 이는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다.
- [0049] 본원에서 사용된 용어 "생체활성" 또는 "생물학적으로 활성인"은 용액 또는 피브린 실린트 내의 단백질, 예를 들어, PDGF 단백질이 천연 발현 단백질 (즉, 재조합적으로 또는 생체 내에서 발현된 경우)과 비교했을 때 동일하거나 유사한 생물학적 활성을 나타내는 경우의 생물학적 성질을 지칭한다.
- [0050] 본원에서 사용된 "검출가능한 모이어티(moiety)", "검출가능한 표지" 또는 "표지"는 분광학적, 광화학적, 생화학, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 유용한 표지에는 ³²P, ³⁵S, 형광 염료, 전자-고밀도(dense) 시약, 효소 (예를 들어, ELISA에서 통상적으로 사용되는 것), 비오틴-스트렙타비딘, 디옥시제닌, 항-혈청 또는 모노클로날 항체가 입수가 가능한 합텐 및 단백질, 또는 표적에 대해 상보적인 서열의 핵산 분자가 포함된다. 검출가능한 모이어티는 측정가능한 신호, 예컨대 방사성, 발색성 또는 형광 신호를 종종 생성시키고, 이를 사용하여 샘플 내의 결합된 검출가능한 모이어티의 양을 정량할 수 있다.
- [0051] **피브린 실린트**
- [0052] 다수의 형태의 피브린이 피브린 실린트로서 사용하기 위해 이용가능하다. 자가 혈장, 동결침전된 혈장 (예를 들어, 시판되는 피브린 글루 키트), 혈장으로부터 정제된 피브리노겐, 및 재조합 피브리노겐 및 XIIIa 인자로부터 피브린 젤이 합성될 수 있다. 이러한 물질들 각각은 기초적으로 유사한 매트릭스를 제공하고, 이때 생화학

적 조성에서 약간의 변동이 있다 ([Sierra DH, J Biomater Appl, 7, 309-352 (1993)]). 특이적인 효소적 생체 활성 및 일반적인 치유 응답 양쪽 모두에서 이러한 물질들 간의 유사성이 존재한다.

- [0053] 본 발명에서 유용한 피브린 젤은 2가지 주성분인 피브리노겐 복합체 (FC) 및 트롬빈으로 구성된 피브린 실린트로부터 형성된다. FC는 피브리노겐 및 피브로넥틴으로 주로 구성되고, 촉매량의 FXIII 및 플라스미노겐을 또한 함유할 수 있다. FC 및 트롬빈 성분은 일반적으로 인간 혈장으로부터 유래되지만, 재조합/유전자 조작 기술에 의해 또한 생산될 수 있다. 피브린 실린트의 예가 US 5,716,645; US 5,962,405; US 6,579,537에 기술되어 있고, 여기에는 TISSEEL VH 및 TISSEEL VH S/D (Baxter AG (Vienna, Austria))가 포함된다.
- [0054] 피브린 젤을 형성하기 위해, 먼저 FC가 재구성되거나, 해동되거나, 또는 패키지 설명서에 따라 제조되고, 필요하다면 희석 완충제를 사용하여 추가로 희석되고, 치료제가 액체 FC에 첨가된다. 별법적으로, 치료제가 트롬빈 성분에 첨가될 수 있다. 대부분의 시판되는 피브린 실린트는 젤 용해 억제제 예컨대 아프로티닌을 포함하고, 이는 사용자의 재량에 따라 FC에 첨가될 수 있다. 아프로티닌 및 기타 젤 용해 억제제의 설명이 WO 99/11301에서 제공된다. CaCl₂ 용액을 사용하여 트롬빈 성분이 액체 형태로 또한 재구성되고, 필요하다면 희석 완충제를 사용하여 추가로 희석된다. 트롬빈 성분이 PDGF를 추가로 포함하는 FC 성분과 혼합되어 피브린 젤을 형성하는 것이 고려된다. 아프로티닌 성분이 없는 피브린 실린트가 또한 디자인되었다 (EVICEL, Ethicon, Inc (New Jersey)).
- [0055] 조직 접착제로 사용될 수 있는 피브리노겐-함유 제제를 생산하기 위한 추가적인 방법에는 동결침전물로부터의 생산 (에탄올, 황산암모늄, 폴리에틸렌 글리콜, 글리신 또는 베타-알라닌으로의 추가적인 세정 및 침전 단계가 임의적으로 있음), 및 공지된 혈장 분획화 방법의 범주 내에서의 혈장으로부터의 생산이 각각 포함된다 (예를 들어, ["Methods of plasma protein fractionation", 1980, ed.: Curling, Academic Press, pp. 3-15, 33-36 & 57-74], 또는 [Blomb ck B. and M., "Purification of human and bovine fibrinogen", Arkiv Kemi 10, 1959, p. 415 f.] 참조). 환자 자신의 혈액 혈장을 사용하여 피브린 실린트를 또한 제조할 수 있다. 예를 들어, CRYOSEAL (Thermogenesis Corp. (Rancho Cordova, CA)) 또는 VIVOSTAT (Vivolution A/S (Denmark)) 피브린 실린트 시스템은 환자의 혈액 혈장으로부터의 자가 피브린 실린트 성분의 생산을 가능하게 한다. 피브린 실린트의 성분들은 동결건조물, 급속 냉동 액체, 또는 액체 형태로 이용가능하다.
- [0056] 피브린 젤의 성분들은 원하는 제어 방출 유형이 제공되도록 적합한 농도로 첨가된다. FC 성분은 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 150 mg/ml 이하 (젤에서의 최종 농도), 또는 필요에 따른 중간 농도를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 농도로 첨가될 수 있다. 추가로, FC 성분의 농도는 1 IU/ml, 2 IU/ml, 5 IU/ml, 7 IU/ml, 10 IU/ml, 15 IU/ml, 20 IU/ml, 25 IU/ml, 30 IU/ml, 35 IU/ml, 40 IU/ml, 50 IU/ml, 60 IU/ml, 70 IU/ml, 80 IU/ml, 90 IU/ml, 100 IU/ml, 125 IU/ml, 150 IU/ml, 175 IU/ml, 200 IU/ml, 225 IU/ml 및 250 IU/ml, 또는 필요에 따른 중간 농도를 포함하지만 이에 한정되지 않는 트롬빈 성분의 임의의 적합한 농도와 조합될 수 있다.
- [0057] 치료제에 대한 제어 방출 시스템을 만들기 위해 피브린 실린트 조성물에 PDGF와 같은 작용제가 첨가되는 것이 고려된다. PDGF는 1 ng/ml 내지 1 mg/ml의 PDGF 범위 내의, 적당한 지연 방출 제형을 제공하는 임의의 농도로 첨가될 수 있다. 피브린 실린트 내의 PDGF의 예시적인 농도에는 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml 및 1 mg/ml이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0058] 피브린 실린트에서 사용된 FC 또는 트롬빈의 농도가 피브린 젤 내에 첨가된 PDGF는 수일 내지 수주에 걸쳐 치료적 유효량으로 방출되도록 하는 것이 고려된다. 한 양상에서, PDGF가 피브린 젤로부터 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 또는 그 이상 동안 방출된다.
- [0059] PDGF가 지속된 기간에 걸쳐 원위치에서 이용가능하도록, 제어 또는 지연 방출 방식으로 PDGF가 피브린 실린트로부터 방출된다. PDGF 방출이 매일 일정량만큼 감소될 수 있는 것이 고려되고, 예를 들어, PDGF 수준이 하루에 약 1%만큼, 하루에 약 2%만큼, 하루에 약 3%만큼, 하루에 약 4%만큼, 하루에 약 5%만큼, 하루에 약 6%만큼, 하루에 약 7%만큼, 하루에 약 8%만큼, 하루에 약 9%만큼 또는 하루에 약 10%만큼, 또는 그 이상만큼 감소될 수 있다.
- [0060] 관련된 실시양태에서, PDGF의 25% 이상이 3일 이상 동안 피브린 젤 내에 유지되는 것이 고려된다. 추가적인 실시양태에서, 35% 내지 90% 이상, 45% 내지 75% 이상, 또는 60% 이상의 PDGF가 3일 이상 동안 피브린 젤

내에서 유지된다. PDGF의 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%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 또는 90% 이상이 3일 이상 동안 피브린 젤 내에서 유지되는 것이 추가로 고려된다.

[0061] 또다른 실시양태에서, PDGF의 20% 이상이 10일 이상 동안 피브린 젤 내에서 유지되는 것이 고려된다. 추가적인 실시양태에서, PDGF의 25% 내지 75% 또는 45% 내지 55% 이상이 10일 이상 동안 피브린 젤 내에서 유지된다. PDGF의 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%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% 또는 75% 이상이 10일 이상 동안 피브린 젤 내에서 유지되는 것이 추가로 고려된다.

[0062] 본 발명은 피브린 실린트의 성분들의 농도를 변형시킴으로써 원하는 방출 동역학을 갖는 피브린 실린트를 형성하는 방법을 제공한다. 한 양상에서, 공지된 초기량의 PDGF 및 공지된 최종 농도의 FC를 갖는 제1 피브린 실린트로부터 방출된 PDGF의 양을 결정하는 단계, 단계 (a)의 제1 피브린 실린트에서 사용된 FC의 공지된 최종 농도를 변형시켜 제2 피브린 실린트를 생성시키고, 이때 제1 실린트 내의 FC의 공지된 최종 농도와 비교하여 제2 실린트 내의 FC의 농도를 증가 또는 감소시키는 것이 단계 (a)의 제1 실린트로부터의 PDGF 방출과 비교하여 제2 실린트로부터의 PDGF 방출 속도를 조정하며, 제2 실린트에 단계 (a)에서의 제1 실린트와 동일한 초기량의 PDGF가 있는 단계가 상기 방법에서 고려된다.

[0063] 한 실시양태에서, 제1 실린트 또는 제2 실린트 내의 최종 FC 농도는 약 1 mg/ml 내지 약 150 mg/ml의 범위 내이다. 관련된 실시양태에서, 제1 피브린 실린트의 FC 농도는 제2 실린트 내의 최종 FC 농도와 약 1 mg/ml 내지 약 149 mg/ml만큼, 약 5 mg/ml 내지 약 75 mg/ml만큼, 또는 약 10 mg/ml 내지 약 60 mg/ml만큼 상이하다. 추가적인 실시양태에서, 제1 피브린 실린트의 최종 FC 농도는 제2 실린트 내의 최종 FC 농도와 약 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 또는 이러한 농도들 사이의 임의의 양, 약 149 mg/ml 이하만큼 상이하다.

[0064] 본 발명에서 유용한 피브린 실린트가 시험관내 또는 생체내 사용의 목적을 위해 추가적인 물질 또는 작용제와 조합될 수 있는 것이 고려된다. 이같은 작용제에는 성장 인자, 사이토카인, 케모카인, 혈액 응고 인자, 효소, 케모카인, 가용성 세포 표면 수용체, 세포 부착 분자, 항체, 호르몬, 세포골격 단백질, 매트릭스 단백질, 샤페론(chaperone) 단백질, 구조 단백질, 대사 단백질, 및 당업계에 공지된 기타 물질이 포함되지만 이에 한정되지 않는 추가적인 치료제가 포함된다 (예를 들어, [Physicians Desk Reference, 62nd Edition, 2008, Thomson Healthcare, Montvale, NJ] 참조).

[0065] 피브린 실린트에서 유용한 추가적인 물질에는 중합체, 산호, 세라믹, 유리, 금속, 골-유래 물질, 히드록시아파타이트, 합성 스캐폴드 물질, 이러한 물질들의 조합물, 및 당업계에 공지된 기타 물질들이 포함되지만 이에 한정되지 않는, 내력(load-bearing) 물질일 수 있는 근골격 질환용 실린트와 조합될 수 있는 물질들이 포함된다 (예를 들어, [Guehenec et al., European Cells and Materials, 8:1-11, 2004], 미국 특허 7,122,057 및 미국 특허 6,696,073 참조).

[0066] 한 실시양태에서, 피브린 젤은 가역적인 결합 후에, 그리고 FC 및 트롬빈의 농도를 조정하는 것에 의한 제어된 방식으로, 생물학적으로 활성인 PDGF를 전달하기 위한 캐리어(carrier) 시스템으로서 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명의 한 실시양태에서, 피브린 젤이 5 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도)을 사용하여 TISSEEL VH S/D (TISSEEL Vapor Heated Solvent/Detergent)로 제조된 경우, 3일 후, 첨가된 PDGF-BB (15 ng)의 약 65% 이상이 젤에서 유지된다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 피브린 젤이 40 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도)을 사용하여 TISSEEL VH S/D로 제조된 경우, 3일 후, 첨가된 PDGF-BB (15 ng)의 약 85% 이상이 젤에서 유지된다. 따라서, TISSEEL VH S/D로 제조된 피브린 젤을 사용하는 경우, FC 농도가 높을수록 PDGF-BB의 유지가 증가한다.

[0068] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 피브린 젤이 20 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도)을 사용하여 여러 로트 번호의 TISSEEL VH로 제조된 경우, 10일 후, 제1 로트로부터의 젤에서 PDGF-BB의 약 70% 이상이 유지되고, 제2 로트로부터는 약 60% 이상, 제3 로트로부터는 약 40% 이상이 유지된다. 이러한 로트들 간

의 한가지 차이는 XIII 인자 함량 (각각 42.2 U/ml, 33.9 U/ml 및 < 1 U/ml)이다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 피브린 젤이 20 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도)을 사용하여 여러 로트 번호의 TISSEEL VH S/D로 제조된 경우, 10일 후, 모든 로트로부터의 젤에서 PDGF-BB의 약 60% 이상이 유지된다. PDGF-AB 방출에 대해, 약 75% 이상이 3개의 로트 중 2개에서 10일까지 유지되었고, 약 68% 성장 인자가 10일에 제3 로트에서 유지되었다.

[0069] 당업자는 상기 기재된 실시양태들이 시판되는 피브린 실린트로부터의 PDGF 방출의 예시적인 실시양태들이고, 어떠한 방식으로든 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다는 것을 이해할 것이다.

[0070] **PDGF 단백질**

[0071] 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF)는 상처 및 골절 치유의 초기 단계 동안 혈소판에 의해 분비된다. 이는 골모세포 및 중간엽 전구 세포의 이동을 자극하는 것으로 나타났지만 ([Mehrotra et al., J Cell Biochem 93:741-52, 2004]; [Fiedler et al., J Cell Biochem 93:990-98, 2004]), 골절 치유 및 골 복원에서의 그의 역할은 명확하게 정의되지 않았다. PDGF는, 그 자체가 골 성장 동안 또한 결정적인 혈관형성의 여러 양상을 또한 조절한다. PDGF는 혈관형성을 자극하는 것에서 또한 역할을 하고, 이는 조직의 정상적인 성장 및 발달에 필요한 기초적인 프로세스이고, 기존의 혈관으로부터의 새로운 모세혈관의 증식을 수반한다. 혈관형성의 속도를 증가시키는 것은 특정 장애 예컨대 감소된 조직 관류와 관련된 장애, 예컨대 몇몇 예를 들자면 관상 동맥 및 말초 혈관 질환에서 유용하다.

[0072] PDGF-A (Genbank 접속 번호 NP_002598) 및 PDGF-B ((Genbank 접속 번호 NP_002599)는 3가지 상이한 이소형 (isoform)인 PDGF-AA, PDGF-AB, 또는 PDGF-BB가 생산되도록 동종이량체화 또는 이종이량체화될 수 있다. PDGF-A는 PDGF α -수용체 (PDGFR- α/α 동종이량체가 포함되는 PDGFR- α)에만 결합할 수 있다. PDGF-B는 PDGFR- α 및 제2의 PDGF 수용체 (PDGFR- β) 양쪽 모두에 결합할 수 있다. 더욱 구체적으로, PDGF-B는 PDGFR- α/α 및 PDGFR- β/β 동종이량체, 뿐만 아니라 PDGFR- α/β 이종이량체에 결합할 수 있다.

[0073] PDGF-AA 및 -BB는 중간엽 기원의 세포에 대한 주요 분열촉진물질(mitogen) 및 화학유인제이지만, PDGFR- α 및 - β 양쪽 모두가 내피 세포 (EC) 상에서 발현됨에도 불구하고 내피 계통의 세포에 대해서는 효과가 없거나 거의 없다. PDGF-AB 및 PDGF-BB는 새롭게 형성된 혈관의 안정화/성숙에 수반되는 것으로 나타났다 ([Isner et al., Nature 415:234-9, 2002]; [Vale et al., J Interv Cardiol 14:511-28, 2001]; [Heldin et al., Physiol Rev 79:1283-1316, 1999]; [Betsholtz et al., Bioessays 23:494-507, 2001]). 그러나, 또다른 데이터는 PDGF-AA 및 PDGF-BB가 PDGFR- α 신호전달을 통해 생체 내에서 bFGF-유도 혈관형성을 억제하였음을 나타냈다. PDGF-AA는 중간엽 세포 이동 of 가장 강력한 자극 중 하나이지만, EC 이동은 자극하지 않거나, 최소한으로 자극한다. 특정 조건에서, PDGF-AA는 심지어 EC 이동을 억제한다 ([Thommen et al., J Cell Biochem. 64:403-13, 1997]; [De Marchis et al., Blood 99:2045-53, 2002]; [Cao et al., FASEB. J. 16:1575-83, 2002]). 또한, PDGFR- α 가 PDGFR- β 유도 SMC 이동을 길항하는 것으로 나타났고 ([Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 282:697-700, 2001]), PDGF-AA에 대한 중화 항체는 평활근 세포 (SMC) 이동을 강화시킨다 ([Palumbo, R., et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22:405-11, 2002]). 따라서, PDGF-A 및 -B의 혈관형성성/동맥형성성 활성화 (특히 PDGFR- α 를 통한 신호전달의 경우)이 논쟁의 여지가 있다.

[0074] PDGF-AA 및 -BB는 심혈관 및 신경 줄기/전구 세포 양쪽 모두의 증식 및 분화에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. PDGF-AA는 $\alpha v \beta 3$ 인테그린을 통해 회소돌기아교세포 전구체 증식을 자극한 한편 ([Baron, et al., Embo. J. 21:1957-66, 2002]), PDGF-BB는 Flk1+ 배아 줄기 세포의 혈관 벽세포(mural cell)로의 분화를 유도하였고 ([Carmeliet, P., Nature 408:43-45, 2000]; [Yamashita et al., Nature 408:92-6, 2000]), 신경구 (neurosphere)-유래 뉴런 생존을 강하게 증가시켰다 ([Caldwell et al., Nat Biotechnol. 19:475-479, 2001]).

[0075] PDGF 단백질은 피브린 젤의 형성에서 다양하게 성공적으로 사용되었다. Thomopoulos 등 ([J Orth Res 25:1358-68, 2007])은 피브리노겐, 트롬빈, 펩티드 성분 및 heparin을 포함하는 피브린 젤을 제조하였고, 다양한 농도의 PDGF-BB를 추가로 첨가하여, 성장 인자의 수동 방출 동역학을 결정하였다. 이 연구는 성장 인자의 방출이 피브린 젤 내의 heparin의 양에 의존적이었음을 나타냈다. 혈장 혈소판 T 제제를 포함하는 피브린 젤에서 PDGF가 또한 검출되었고 (예를 들어, [Yazawa et al., J Craniofac Surg 15:439-46, 2004] 참조), 피브린 스캐폴드 내의 배아 줄기 세포를 자극하는데 사용되었다 ([Willerth et al., Stem Cells. 25:2235-2244, 2007]).

[0076] 본 발명에 유용한 PDGF 분자에는 전장 단백질, 단백질의 전구체, 단백질의 서브유닛 또는 단편, 및 이들의 기능성 유도체가 포함된다. PDGF에 대한 언급은 천연-유래 단백질 체제를 포함하여, 모든 가능한 형태의 이같은 단

백질들을 포함하도록 의도된다.

[0077] 본 발명에 따르면, 용어 "제조합 PDGF"는 특정한 제한 하에 놓이지 않고, 제조합 DNA 기술을 통해 수득된, 임의의 이중성 또는 천연 발생 PDGF, 또는 그의 생물학적으로 활성인 유도체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이 용어는 단백질 및 핵산, 예를 들어, 유전자, 프리(pre)-mRNA, mRNA, 및 폴리펩티드, 다형성 변이체, 대립유전자, 돌연변이체, 및 중간 상동체를 포함하는데, 이들은 (1) 본원에 기술된 기준 핵산 또는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 PDGF-AB 또는 PDGF-BB 폴리펩티드에 대해, 적어도 약 25개, 50개, 100개, 150개, 200개, 또는 그 이상의 아미노산의 영역에 걸쳐, 아미노산 서열 동일성이 약 60%를 초과하거나, 아미노산 서열 동일성이 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상인 아미노산 서열을 갖거나; (2) 본원에 기술된 바와 같은 언급된 아미노산 서열을 포함하는 면역원, 그의 면역원성 단편 및 그의 보존적으로 변형된 변이체에 대해 발생된 항체, 예를 들어, 폴리클로날 항체에 특이적으로 결합하거나; (3) 본원에 기술된 바와 같은 언급된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 및 그의 보존적으로 변형된 변이체에 엄격한 혼성화 조건 하에 특이적으로 혼성화하거나; (4) 본원에 기술된 바와 같은 기준 핵산 서열에 대해, 적어도 약 25개, 50개, 100개, 150개, 200개, 250개, 500개, 1000개, 1500개, 2000개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 (성숙형 단백질의 뉴클레오티드의 전장 길이까지)의 영역에 걸쳐, 뉴클레오티드 서열 동일성이 약 95%를 초과하거나, 약 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상을 초과하는 핵산 서열을 갖는다.

[0078] 전형적으로, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 영장류, 예를 들어, 인간; 설치류, 예를 들어, 래트, 마우스, 햄스터; 소, 돼지, 말, 양, 또는 임의의 기타 포유동물을 포함하지만 이에 한정되지 않는 포유동물로부터의 것이다. 본 발명의 핵산 및 단백질은 제조합 분자 (예를 들어, 이중성이고 야생형 서열 또는 그의 변이체를 코딩하는 분자, 또는 비-천연 발생 분자)일 수 있다. 인간 PDGF의 구조에 대해서는, NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 의해 간수되는 Genbank 데이터베이스를 참조한다: 인간 PDGF-A (Genbank 접속 번호 NP_002598, NM_002607.4) 및 PDGF-B (Genbank 접속 번호 NP_002599, NM_002608). PDGF-AB 및 PDGF-BB는 PDGF-A 및 PDGF-B 서열의 동종이량체 또는 이종이량체이다.

[0079] PDGF의 생산은 (i) 예를 들어 RNA의 역전사 및/또는 DNA의 증폭을 통한, 유전자 조작에 의한 제조합 DNA의 생산, (ii) 예를 들어 전기천공 또는 미세주입을 통해, 형질감염에 의해 원핵생물 또는 진핵생물 세포 내로 제조합 DNA를 도입하는 것, (iii) 예를 들어, 연속 방식 또는 배치(batch) 방식으로, 상기 형질전환된 세포를 배양하는 것, (iv) 예를 들어, 구성적으로 또는 유도 시에, PDGF를 발현시키는 것, 및 (v) 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피를 통해, 정제된 PDGF를 수득하기 위해, 예를 들어 배양 배지로부터 또는 형질전환된 세포를 수확함으로써, 상기 PDGF를 단리하는 것에 대해 당업계에 공지된 임의의 방법을 포함할 수 있다,

[0080] 약리학적으로 허용가능한 PDGF 분자를 생산하는 것을 특징으로 하는 적절한 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 시스템에서의 발현에 의해 PDGF가 생산될 수 있다. 통상적으로 사용되는 숙주 세포에는 원핵생물 세포 예컨대 그람 (gram) 음성 또는 그람 양성 박테리아, 즉, 대장균, 바실루스(*Bacillus*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 살모넬라(*Salmonella*) 등의 임의의 균주가 포함된다. 진핵생물 세포의 예는 곤충 세포 예컨대 D. Mel-2, Sf4, Sf5, Sf9, 및 Sf21 및 High 5; 식물 세포 및 각종 효모 세포 예컨대 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 및 피치아(*Pichia*); 포유류 세포, 예컨대 CHO (차이니스 햄스터 난소) 세포; 베이비 햄스터 신장 (BHK) 세포; 인간 신장 293 세포; COS-7 세포, HEK 293, SK-Hep, 및 HepG2, 및 당업계에 공지된 기타 세포이다. 본 발명에 따라 PDGF를 생산 또는 단리하기 위해 사용되는 시약 또는 조건은 제한되지 않고, 당업계에 공지되었거나 시판되는 임의의 시스템이 사용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 당업계에 기술된 바와 같은 방법에 의해 PDGF가 수득된다.

[0081] 광범위한 벡터가 PDGF의 제조에 사용될 수 있고, 당업계에 주지된 진핵생물 및 원핵생물 발현 벡터로부터 선택될 수 있다. 원핵생물 발현을 위한 벡터의 예로는 플라스미드 예컨대 pRSET, pET, pBAD 등이 포함되지만 이에 한정되지 않고, 이때 원핵생물 발현 박터에서 사용되는 프로모터에는 lac, trc, trp, recA, araBAD 등이 포함된다. 진핵생물 발현을 위한 벡터의 예로는 (i) 효모에서의 발현을 위한, AOX1, GAP, GAL1, AUG1 등과 같은 프로모터를 사용하는 pAO, pPIC, pYES, pMET와 같은 벡터; (ii) 곤충 세포에서의 발현을 위한, PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh 등과 같은 프로모터를 사용하는 pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC 등과 같은 벡터, 및 (iii) 포유류 세포에서의 발현을 위한, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, 및 β-액틴과 같은 프로모터를 사용하는, pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV 등과 같은 벡터, 및 우두 바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스 등과 같은 바이러스 시스템으로부터 유래된 벡터가 포함되지만, 이에 한정되

지는 않는다.

[0082] 폴리펩티드-코딩 DNA 또는 RNA를 함유하는 숙주 세포가 세포의 성장 및 DNA 또는 RNA의 발현에 적합한 조건 하에 배양된다. 폴리펩티드를 발현하는 세포들을 공지된 방법을 사용하여 확인할 수 있고, 폴리펩티드 생산을 증폭시키면서 또는 증폭시키지 않으면서 재조합 단백질을 공지된 방법을 사용하여 단리 및 정제할 수 있다. 예를 들어, 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA의 존재를 가리키는 표현형을 나타내는 유전자 변형 포유류 세포의 스크리닝, 예컨대 PCR 스크리닝, 서던 블롯(Southern blot) 분석에 의한 스크리닝, 또는 단백질의 발현에 대한 스크리닝을 통해, 확인을 수행할 수 있다. DNA 구조체 내에 선별가능한 마커를 포함시키고, 선별가능한 마커 유전자를 함유하는 형질감염 또는 감염된 세포를 선별가능한 마커 유전자를 발현하는 세포만 생존하는 것에 대해 적합한 조건 하에 배양함으로써, 단백질-코딩 DNA가 혼입된 세포의 선별을 달성할 수 있다. 유전자 변형 세포를 증폭에 적합한 조건 하에 배양함으로써 (예를 들어, 증폭가능한 마커 유전자를 함유하는 유전자 변형 세포를 증폭가능한 마커 유전자의 다중 카피를 함유하는 세포만이 성장할 수 있는 농도의 약물의 존재 하에 배양함으로써), 도입된 DNA 구조체의 추가적인 증폭이 영향을 받을 수 있다.

[0083] 본 발명의 한 실시양태에서, 피브린 젤로부터 방출된 PDGF의 생물학적 활성을 테스트하였다. PDGF가 첨가된 젤로부터의 배지 상등액 (즉, 방출된 PDGF-BB를 함유하는 배지)에서의 단층 배양 후 더욱 신장된 형상으로의 인간 중간엽 줄기 세포 (HMSC) 형태학의 변화, 및 세포 증식을 증가시키는 경향은 방출된 성장 인자의 생물학적 활성을 지시하였다.

[0084] **샘플 내의 단백질 농도를 결정하는 방법**

[0085] 내인성으로 생산된 천연 발생 단백질에 대한 유사성으로 인해 치료적 단백질은 종종 혈청 샘플 내에서 검출하기가 어렵다. 그러나, 치료적 단백질이 원하는 특성 예컨대 더 큰 용해도 또는 안정성, 효소 소화에 대한 저항성, 개선된 생물학적 반감기 및 당업자에게 공지된 기타 특색들을 나타내는지 여부를 평가하기 위해 투여된 치료적 폴리펩티드, 그의 단편, 변이체 또는 유사체의 양을 결정하는 것이 종종 어렵다. 이 방법은 지적재산권에 의해 보호될 수 있는 치료적 단백질의 인가된 용도의 검출을 또한 허용한다.

[0086] PDGF를 함유하는 피브린 젤로부터의 PDGF의 방출을 검출하고 단백질의 방출 동역학을 결정하는 방법이 본 발명에서 사용된다. 다양한 농도의 FC 성분을 사용하여 이루어진 피브린 실린트로부터의 이러한 방출 동역학의 비교는 치료 목적을 위한 원하는 방출 속도를 결정하는 것을 돕는다. 경시적으로 피브린 실린트로부터 방출된 단백질의 양을 확인하는 능력은 반감기, 흡수, 안정성 등을 기초로 하는 최적의 치료제의 결정을 돕는다. 검출 분석법은 효소 결합 면역흡착 분석법 (ELISA), 방사선면역분석법 (RIA), 섬광 근접 분석법 (SPA), 표면 플라즈마 공명 (SPR), 또는 당업계에 공지된 기타 결합 분석법일 수 있다.

[0087] 일반적으로, 샘플 내의 PDGF의 존재를 검출하기 위해, PDGF가 PDGF 결합제, 예컨대 PDGF에 결합하는 항체, 가용성 수용체 또는 기타 단백질 또는 작용제에 결합된다.

[0088] 검출 단계 또는 생물학적 활성의 테스트를 위해, PDGF 단백질이 검출가능한 모이어티 또는 검출가능한 표지에 연결될 수 있다. 검출가능한 모이어티 또는 표지는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 조성물을 지칭한다. 검출가능한 모이어티는 측정가능한 신호, 예컨대 방사성, 발색성 또는 형광 신호를 종종 생성시키고, 이를 사용하여 샘플 내의 결합된 검출가능한 모이어티의 양을 정량할 수 있다. 검출가능한 모이어티는 공유결합에 의해 또는 이온 결합, 반데르발스 결합 또는 수소 결합을 통해 단백질 내로 혼입되거나 단백질에 부착될 수 있고, 예를 들어, 방사성 뉴클레오티드, 또는 스트렙타비딘에 의해 인식되는 비오티화 뉴클레오티드가 혼입된다. 검출가능한 모이어티는 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 간접적인 검출은 검출가능한 모이어티에 제2의 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 모이어티가 결합하는 것을 수반할 수 있다. 예를 들어, 검출가능한 모이어티는 결합 파트너의 리간드, 예컨대 스트렙타비딘의 결합 파트너인 비오티일 수 있다. 결합 파트너 자체가 직접적으로 검출가능할 수 있고, 예를 들어, 항체가 형광 분자로 표지될 수 있다. 신호 정량 방법의 선택은, 예를 들어, 섬광 계수, 음영측정법 또는 유동 세포측정법에 의해 달성된다.

[0089] 본 발명의 분석 방법에서 사용하기에 적절한 표지의 예로는 방사성 표지, 형광단, 전자-고밀도 시약, 효소 (예를 들어, ELISA에서 통상적으로 사용되는 것), 비오티, 디옥시제닌, 또는 검출가능하게 만들어질 수 있거나 (예를 들어, 합텐 또는 펩티드 내로의 방사성표지의 혼입에 의해), 또는 합텐 또는 펩티드와 특이적으로 반응성인 항체를 검출하는데 사용될 수 있는 합텐 및 단백질이 포함된다. 항-혈청 또는 모노클로날 항체가 입수가능한 단백질, 또는 표적에 상보적인 서열의 핵산 분자, 나노태그, 분자 질량 비드, 자기 작용제, 형광 염료를 함유하

는 나노- 또는 마이크로-비드, 양자 도트(dot), 양자 비드(bead), 형광 단백질, 형광 표지가 있는 덴드리머(dendrimer), 마이크로-트랜스폰더(micro-transponder), 전자 도너(donor) 분자 또는 분자 구조물, 또는 광-반사 입자가 또한 고려된다.

[0090] 본 발명에서 사용이 고려되는 추가적인 표지에는 형광 염료 (예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 텍사스 레드(Texas red), 로다민 등), 방사선표지 (예를 들어, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, 또는 ³²P), 효소 (예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시데이스(peroxidase), 및 ELISA에서 통상적으로 사용되는 기타 효소), 및 측정성 표지 예컨대 콜로이드성 금, 유색 유리 또는 플라스틱 비드 (예를 들어, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등), 및 발광성 또는 화학발광성 표지 (예를 들어, 유로퓸 (Eu), MSD 술폰-태그(Sulfo-Tag))가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0091] 당업계에 주지된 방법에 따라 분석법의 원하는 성분에 직접적으로 또는 간접적으로 표지가 커플링될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 활성 작용제의 접합을 위해 이소시아네이트 또는 N-히드록시숙신이미드 에스테르 시약을 사용하여 표지가 성분에 공유결합으로 결합된다. 본 발명의 한 양상에서, 활성 작용제가 부착되어 있지 않은 표지 생체중합체 접합체를 형성하도록 생체중합체에 표지를 접합시키는데 2관능성 이소시아네이트 시약이 사용된다. 이러한 표지 생체중합체 접합체는 본 발명에 따른 표지된 접합체의 합성을 위한 중간체로서 사용될 수 있거나, 또는 생체중합체 접합체를 검출하는데 사용될 수 있다. 상기 지시된 바와 같이, 광범위한 표지가 사용될 수 있고, 이때 표지의 선택은 요구되는 감도, 분석법의 원하는 성분과의 접합의 용이성, 안정성 요구사항, 이용가능한 수단, 및 폐기 규정에 좌우된다. 비-방사성 표지는 간접적인 수단에 의해 종종 부착된다. 일반적으로, 리간드 분자 (예를 들어, 비오틴)는 공유결합으로 분자에 결합된다. 그후, 검출가능한 효소, 형광 화합물 또는 화학발광성 화합물과 같은 신호 시스템에 공유결합으로 결합된 또는 본래 검출가능한 또다른 분자 (예를 들어, 스트렙타비딘)에 리간드가 결합한다.

[0092] 또한 본 발명의 방법에서 유용한 화합물은, 예를 들어, 효소 또는 형광단과의 접합에 의해, 신호-생성 화합물에 직접적으로 접합될 수 있다. 표지로서 사용하기에 적절한 효소에는 하이드롤레이스(hydrolase), 특히 포스파테이스(phosphatase), 에스테레이스(esterase) 및 글리코시데이스(glycosidase), 또는 옥시도테이스(oxidotase), 특히 퍼옥시데이스(peroxidase)가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 표지로서 사용하기에 적절한 형광 화합물에는 상기 열거된 것들, 뿐만 아니라 플루오레세인 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단질, 움벨리페론, 에오신, TRITC-아민, 퀴닌, 플루오레세인 W, 아크리딘 옐로우, 리사민 로다민, B 술폰닐 클로라이드 에리트르세인, 루테늄 (트리스, 비피리디늄), 유로퓸, 텍사스 레드, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드, 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 표지로서 사용하기에 적절한 화학발광성 화합물에는 MSD 술폰-TAG, 유로퓸 (Eu), 사마륨 (Sm), 루시페린 및 2,3-디히드로프탈라진디온, 예를 들어, 루미놀이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 다양한 표지 또는 신호 생성 시스템의 리뷰를 위해, 미국 특허 번호 4,391,904 참조.

[0093] 표지를 검출하기 위한 수단은 당업자에게 주지되어 있고, 검출될 표지의 유형에 의해 지시된다. 따라서, 예를 들어, 표지가 방사성인 경우, 검출 수단에는 섬광 계수기 (예를 들어, 방사선면역분석법, 섬광 근접 분석법) ([Pitas et al., Drug Metab Dispos. 34:906-12, 2006]) 또는 사진 필름 (예컨대 자가방사선술의 경우)이 포함된다. 표지가 형광 표지인 경우, 플루오로크롬을 적합한 파장의 빛으로 여기시키고 생성된 형광을 검출함으로써 형광 표지를 검출할 수 있다 (예를 들어, ELISA, 유동 세포측정법, 또는 당업계에 공지된 기타 방법). 전자 검출기 예컨대 전하 결합 소자 (CCD) 또는 광증폭기 등을 사용함으로써, 시각적으로 형광을 검출할 수 있다. 유사하게, 효소에 대한 적합한 기질을 제공하고 생성된 반응 산물을 검출함으로써 효소 표지를 검출할 수 있다. 표지와 관련된 색을 관찰함으로써 간단하게 측정성 또는 화학발광성 표지를 검출할 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용하기에 적절한 기타 표지 및 검출 시스템은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 이같은 표지된 조정인자 및 리간드를 질환 또는 건강 상태의 진단에서 사용할 수 있다.

[0094] 상기 방법은 결합된 PDGF 조성물이 결합되지 않은 폴리펩티드에 의해 야기되는 배경 측정을 감소시키기 위해 단백질 결합을 측정하기 전에 세정되는 1회 이상의 세정 단계를 임의적으로 포함한다. 폴리펩티드 조성물의 인큐베이션 후, 및 PDGF의 검출 전의 PDGF의 세정은 적합한 완충제 + 세제에서 수행된다. 적절한 세제에는 알킬디메틸아민 옥시드, 알킬 글루코시드, 알킬 말토시드, 알킬 술페이트 (예컨대 소듐 도데실 술페이트 (SDS)), NP-40, 알킬 티오글루코시드, 베타인, 담즙산, CHAP 시리즈, 디지토닌, 글루카미드, 레시틴/라이소레시틴, 비-이온성 폴리옥시에틸렌계 세제 (TRITON-X 포함), 폴리소르베이트, 예컨대 TWEEN® 20 및 TWEEN® 80, BRIJ®, GENAPOL® 및 THESIT®, 4차 암모늄 화합물 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. [Current Protocols in

Protein Science, Appendix 1B, Suppl. 11, 1998, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ]를 또한 참조한다. 일 상적인 실험을 통해 적절한 세제를 결정할 수 있다 ([Neugebauer, J., A Guide to the Properties and Use of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, Calif., 1988] 참조).

[0095] **피브린 실린트를 투여하는 방법**

[0096] 당업계에서 주지된 기술을 사용하여, 예를 들어 원하는 부위에서의 주사 또는 분무에 의해, 내시경에 의해, 스폰 지-유사 캐리어, 예비형성된 실린트 또는 당업계에 공지된 기타 방법을 사용하여, 본 발명에서 유용한 피브린 실린트가 대상에게 투여되는 것이 고려된다. 한 실시양태에서, 실린트가 주사 또는 분무되어, 원위치에서 젤을 형성하게 된다.

[0097] 하기에 기재된 용체들을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 당업자에게 명백할, 생체 내에서의 PDGF의 지연/제어 방출이 이로울 대상에게의 투여에 이러한 피브린 실린트들이 고려된다. 한 실시양태에서, 환자는 골 및 연골, 근육, 관련 인대 및 기타 결합 조직의 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 근골격 질환; 근육, 섬유 조직, 지방, 혈관 및 운할 조직에 영향을 미치는 장애를 포함하지만 이에 한정되지 않는 연조직 질환 또는 장애; 또는 혈관 질환을 앓고 있다.

[0098] 한 실시양태에서, 피브린 실린트는 골 이식에 대한 대체물로서 기능하고, 따라서 척추 유합술 케이지(cage), 불 유합 결합의 치유, 골 증대, 골절 복원 가속화, 골 조직 재구성, 및 치아 재생을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 동일한 적응증에서 적용될 수 있다. 추가적으로, 또다른 실시양태에서, 실린트가 임플란트 유착(integration)에서 사용될 수 있다. 임플란트 유착에서, 임플란트가 피브린 실린트로 코팅되어, 이웃 골 영역이 임플란트의 표면 내로 성장하도록 유도하고 느슨해짐(loosening) 및 다른 관련된 문제점들을 방지할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 성장 인자-강화 매트릭스가 피부에서의 만성 상처를 치유하기 위해 사용될 수 있다.

[0099] 추가적인 골 또는 연골 장애 또는 용태에는 골관절염, 골다공증, 골형성장애, 구루병, 골연화증, 맥쿤-알브라이트(McCune-Albright) 증후군, 알베르스-셴베르크병(Albers-Schonberg disease), 파제트병(Paget's disease), 류머티스성 관절염, 골관절염, 연골 손상, 인공삽입물 주위의 골용해, 불완전 골생성증, 전이성 골 질환, 골연골종, 골생성, 골수염, 골병증, 골석화증, 골경화증, 다발연골염, 관절 연골 손상, 연골석회화증, 연골이형성증, 슬개골 연골연화증, 연골육종, 늑연골염, 골내연골종, 엄지발가락 굽음증, 반달연골 손상, 관절 순 열상, 박리성 골연골염(ocd), 재발성 다발연골염, 또는 골 또는 연골 형성의 자극이 이로울 임의의 용태가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0100] PDGF 단백질을 포함하는 피브린 실린트는 허혈/재관류, 심근경색증, 울혈성 심장 기능상실, 죽상동맥경화증, 고혈압, 재협착, 심장 동맥 질환(CAD), 뇌졸중, 혈관 또는 심장 석회화, 혈전증, 말초 혈관 질환, 혈관벽 재형성, 심실 재형성, 빠른 심실 조율, 심장 미세색전증, 압력 과부하, 대동맥 굴곡, 심장 동맥 결찰, 심혈관 질환, 판막 질환(석회화에 의해 야기되는 판막 변성, 류머티스성 심장병, 심내막염, 또는 인공 판막의 합병증을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 협심증, 심장 기능상실, 고혈압, 심방 세동, 심장막 질환(심낭 삼출 및 심장막염을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 심장근육병증, 심장 비대 또는 심혈관 발달 장애를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 증가된 혈관형성 및 혈관 성장이 이로울 혈관 질환 또는 용태를 치료하는데 또한 유용하다.

[0101] **키트**

[0102] 본 발명의 범주 내에서 키트가 또한 고려된다. 전형적인 키트는 FC 및 트롬빈 성분을 포함하는 피브린 실린트를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 키트는 피브린 실린트 내로의 혼입을 위한 PDGF 단백질을 추가로 포함한다. 한 양상에서, 각각의 성분은 자신의 개별적인 보관 용기, 바이알(vial) 또는 통에 포함될 수 있다. 관련된 양상에서, PDGF가 FC 성분과의 혼합물 내에 있을 수 있고, 트롬빈 성분은 별도의 보관 용기 내에 있을 수 있다. 관련된 양상에서, PDGF가 트롬빈 성분과의 혼합물 내에 있을 수 있고, FC 성분은 별도의 보관 용기에 있을 수 있다. 관련된 실시양태에서, 보관 용기는 바이알, 병, 팩, 저장소, 튜브, 블리스터, 파우치, 패치 등이다. 제형의 구성성분들 중 하나 이상이 동결건조, 냉동-건조, 분무 냉동-건조될 수 있거나 또는 임의의 또다른 재구성 형태일 수 있다. 원한다면 다양한 재구성 매질이 추가로 제공될 수 있다.

[0103] 키트의 성분들은 동결 형태, 액체 형태 또는 동결건조 형태일 수 있다. 키트가 피브린 젤을 대상에게 투여하기 위한 적절한 장치들 함유하는 것이 추가로 고려된다. 추가적인 실시양태에서, 키트는 피브린 실린트의 제조 및 투여를 위한 설명서를 또한 함유한다.

[0104] 본 발명의 추가적인 양상 및 상세사항이 제한적이기보다는 설명적인 것으로 의도되는 하기의 실시예들로부터 명

백할 것이다.

[0105] **실시예**

[0106] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0107] 방출 동역학:

[0108] 방출 동역학에 대한 재조합 (rh)-PDGF (R&D Systems) 농도의 효과를 피브린 실린트 (TISSEEL VH S/D, S/D는 추가된 안정성을 제공하기 위한 추가된 바이러스 불활성화 단계임; Baxter AG (Vienna, Austria))의 단일 제형 ([FC] = 20 mg/ml 및 [트롬빈] = 2 IU/ml)을 사용하여 분석하였다. 상이한 양의 재조합 인간 PDGF-AB 또는 BB를 분석하였다 (0.3 ml 젤에 대해 5 ng, 10 ng, 20 ng, 40 ng, 및 80 ng). 젤 제조 시점에 FC 성분 내에 PDGF가 재현탁되었다.

[0109] 피브린의 FC 성분 내에 초기에 재현탁된 PDGF-AB 및 PDGF-BB (젤 0.3 ml 당 15 ng으로 고정됨)의 방출 동역학에 대한 FC 농도의 효과를 분석하였다. 피브린 젤 (TISSEEL VH S/D)의 4가지 상이한 제형을 5-40 mg/ml (젤에서의 최종 농도)의 상이한 농도의 FC 및 고정된 농도의 트롬빈 (2 IU/ml)을 사용하여 제조하였다.

[0110] PDGF-AB 및 BB (젤 0.3 ml 당 15 ng으로 고정됨, 즉, 젤 1 ml 당 50 ng)의 방출 동역학을 단일 젤 제형 ([FC] = 20 mg/ml 및 [트롬빈] = 2 IU/ml, 젤에서의 최종 농도)을 사용하여 TISSEEL VH S/D의 3가지 상이한 피브린 실린트 제품 로트에 대해 비교하여, 피브린 실린트 제품 로트에 좌우되는 방출 동역학에서의 임의의 변이성을 분석하였다.

[0111] TISSEEL VH로부터의 PDGF-BB의 방출 동역학 (PDGF-BB 농도의 효과, FC 농도의 효과, 및 피브린 실린트 제품 로트에 좌우되는 변이성)을 분석하여, TISSEEL VH 및 TISSEEL VH S/D를 사용할 때의 잠재적인 차이를 관찰하였다.

[0112] TISSEEL VH S/D를 사용하는 실험 모두에 대해서는 젤을 폴리프로필렌 에펜도르프 튜브에서 제조한 반면, TISSEEL VH를 사용하는 실험에 대해서는 젤을 24웰 폴리스티렌 배양 플레이트에서 제조하였다. 모든 경우에, 젤을 10일까지 표준 인간 MSC (HMSC) 성장 배지 (Lonza Walkersville Inc. (Walkersville, MD))와 함께 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 배양 배지를 매일 교환하였고, ELISA (R&D Systems (Minneapolis, MN))에 의해 PDGF의 양에 대해 테스트할 때까지 배양 배지 샘플을 동결시켰다. TISSEEL VH S/D를 사용하는 FC 농도의 효과 및 로트 대 로트 변동을 평가하는 실험에서, 완전 배지 내의 유로키네이스(urokinase) (1 U/ml)를 사용하여 10일 방출 후 젤들을 용해시켰다. 초기에 젤에 첨가된 성장 인자의 양의 충분한 회수를 증명하기 위해, 생성된 용액 내의 PDGF의 양을 테스트하였다.

[0113] 생물학적 활성:

[0114] HMSC 단층에 대한 방출된 PDGF의 효과:

[0115] TISSEEL VH S/D의 1개의 피브린 제형 (20 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml 트롬빈, 젤에서의 최종 농도)을 사용하여, 젤로부터의 방출된 PDGF의 생물학적 활성을 분석하였다 (120 ng의 PDGF-AB 및 60 ng의 PDGF-BB를 PDGF가 첨가된 젤에 대한 중합 전에 FC 성분에 첨가하였다). 제3일에 젤로부터 수집된 배지 상등액 (젤을 매일 교환하지 않음)을 HMSC 단층에 대한 배양 배지로 사용하였다. 먼저, HMSC를 12웰 배양 플레이트 1 cm² 당 2500개의 세포 (10,000개의 세포/웰)로 예비-시딩(pre-seeding)하고, 4 내지 5시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하여, 부착되도록 하였다. 그 후, 세포 배양 배지를 제거하고, 젤로부터의 배지 상등액으로 교체하였다. PDGF가 첨가된 젤로부터의 배지에서 관찰된 임의의 변화가 방출된 PDGF에 의해 실제로 유도되었고, 젤 자체로부터 방출되었을 수 있는 일부 다른 잠재적인 생체활성 성분에 의해서 유도되지 않았음을 확실히 하기 위해, 일부 젤은 대조군 샘플용으로 PDGF를 첨가하지 않고 제조하였다. 30 ng (15 ng/ml)의 rh-PDGF가 첨가된 신선하게 제조된 배지를 함유하는 웰이 양성 대조군으로 사용되었다. 양성 대조군에 대한 30 ng의 PDGF의 첨가는 실험에 사용된 제형에서 120 ng의 PDGF-AB 또는 60 ng의 PDGF-BB를 젤에 첨가한 경우에 제3일에 젤로부터 방출되는 것으로 발견된 PDGF의 대략적인 양을 기초로 하였고, 따라서, 방출된 PDGF-AB 또는 PDGF-BB를 함유하는 테스트된 조건, 즉 제3일의 젤로부터의 배지 상등액을 밀접하게 모방하여야 한다.

[0116] 세포 증식 및 세포 형태학에서의 변화의 분석: 세포 증식 및 형태학 변화를 제1일, 제4일 및 제7일에 분석하였다. 세포 배양 배지를 폐기하고, 칼세인(Calcein)-AM 및 에티듐 호모다이머(Ethidium Homodimer)-1을 함유하는 라이브/데드(Live/Dead) 염료 용액 (Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO))으로 세포를 염색하였다. 첨가된 PDGF를 함유하는 젤로부터의 배지 상등액과 함께 인큐베이션된 세포의 증식을 PDGF가 첨가되지 않은 젤로부터의

상등액과 함께 인큐베이션된 세포의 증식 및 30 ng의 PDGF가 첨가된 신선하게 제조된 배지와 함께 인큐베이션된 세포의 증식 (양성 대조군)과 비교하였다. 멀티-웰 플레이트 판독기 (Gemini, Molecular Devices (Sunnyvale, CA))를 사용하여 50분 염색 후 형광 강도를 측정함으로써 세포 증식을 모니터링하였다. 증식 판독 후, 플레이트를 기초 배지로 1회 세정하여 잔류 염색을 제거하고, 디지털 영상 획득 시스템 (영상 포착용 스팟(Spot) 소프트웨어 V.2.1.이 있는 스팟 디지털 카메라, Nikon)이 장착된 독립 형광 현미경 (Nikon Eclipse TE200, Nikon Instruments Inc. (Melville, NY))을 사용하여 세포 형태학 변화를 관찰하였다.

[0117] 세포 분화 (연골형성 및 골형성)의 분석: 피브린 젤로부터 방출된 PDGF의 존재 하에서의 잠재적인 HMSC 연골형성 또는 골형성 분화를 분석하기 위해, 세포를 배양 1일 후, 4일 후 및 7일 후에 알시안 블루(Alcian Blue) (연골형성용) 또는 알리자린 레드(Alizarin Red) (골형성용)로 염색하였다. PDGF가 첨가된 젤로부터의 배지와 함께 인큐베이션된 세포의 염색 강도를 PDGF가 첨가되지 않은 젤로부터의 배지와 함께 인큐베이션된 세포의 강도 및 30 ng의 PDGF가 첨가된 신선하게 제조된 배지와 함께 인큐베이션된 세포의 강도 (양성 대조군)와 비교하였다.

[0118] 알시안 블루 염색을 위해, 세포를 포스페이트 완충 용액 (PBS) (Invitrogen Corporation (San Diego, CA))으로 2회 세정하고, 파라포름알데히드 (Sigma Aldrich Inc.)로 10분 동안 고정하고, 0.1N HCl 내의 1% 알시안 블루 (Sigma Aldrich Inc.)로 30분 동안 염색하였다. 세포를 PBS로 5회 세정하고 (각각 2분), 디지털 영상 획득 시스템 (앞에서 기술된, 영상 포착용 스팟 소프트웨어 V.2.1.이 있는 스팟 디지털 카메라, Nikon)이 장착된 독립 광 현미경 (Nikon Eclipse TE200)에서 관찰하였다. 알리자린 레드 염색을 위해, 세포를 먼저 PBS로 2회 세정하고, 빙냉 70% 에탄올에서 10분 동안 고정하고, PBS 내의 2% 알리자린 레드 (Sigma Aldrich Inc.)로 30분 동안 염색하였다. 그 후, 세포를 PBS로 5회 세정하고 (각각 2분), 상기 기술된 독립 광 현미경을 사용하여 관찰하였다.

[0119] 알리자린 레드에 의한 염색에 더하여, 배양 1일 후, 4일 후 및 7일 후에 초기 골형성성 분화의 마커로서 알칼리성 포스파테이스 (ALP) 활성을 측정하였다. 12웰 배양 플레이트 내의 세포를 HBSS (Lonza Walkersville, Inc.)로 2회 세정하고, 수분 동안 트립신처리하여 이를 탈착시켰다. 그 후, 현탁 상태의 세포를 에펜도르프 튜브로 옮기고, 웰을 0.5 ml의 기초 배지로 세정한 후, 상응하는 에펜도르프 튜브로 옮겼다. 그 후, 세포를 5분 동안 원심분리하고, NaHCO₃를 함유하는 0.5 ml 타이로드(Tyrode) 염 용액 (Sigma Aldrich, Inc.)으로 1회 세정하였다. 상등액을 폐기하고, 세포 펠렛을 50 μl AMP-완충제 + MgCl₂ (Sigma Aldrich, Inc.)에 재현탁시키고, 96웰 플레이트 내로 옮겼다. 튜브를 25 μl AMP-완충제 + MgCl₂로 세정하고, 이를 96웰 플레이트의 상응하는 웰 내로 옮겼다. 75 μl의 AMP-완충제 + MgCl₂를 96웰 플레이트의 3개의 웰에 첨가하였고, 이는 블랭크(blank)로 기능하였다. 마지막으로, 75 μl의 p-NPP (p-니트로페닐 포스페이트, Sigma Aldrich, Inc.) 기질 모액을 각각의 웰에 첨가한 후, 플레이트를 30분 동안 37°C에 놓았다. 형성된 p-니트로페놀 생성물의 405 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 판독기 (Thermomax, Molecular Devices Corp.)를 사용하여 30분에 분석하였고, 이는 ALP 활성에 비례한다. 처음에 IU/L로서 측정된 결과를 증식에 대해 표준화하였다.

[0120] 피브린 젤 내로 시딩된 HMSC에 대한 PDGF-BB의 효과:

[0121] 피브린 젤 내로 시딩된 HMSC 및 젤 표면 상에 시딩된 인간 제대 혈관 내피 세포 (HUVEC, Lonza Walkersville, Inc.)의 행동에 대한 피브린 젤 내에 첨가된 PDGF-BB의 생물학적 효과를 분석하기 위해, 10 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도)를 함유하는 TISSEEL VH S/D 젤을 단일 배양 세포 (HMSC 또는 HUVEC) 또는 HMSC:HUVEC 비율이 4:1인 공동 배양 세포와 함께 제조하였다. PDGF-BB가 첨가된 젤 및 첨가되지 않은 젤에서의 세포 행동을 비교하기 위해, 젤 제조 시점에 공동 배양 젤의 절반 내의 FC에 PDGF-BB (젤 0.3 ml 당 60 ng)를 첨가하였다. 24웰 배양 플레이트에서 제조된 젤을 혈청 보충물을 함유하는 내피 세포 성장 배지 (1 ml/젤)을 사용하여 21일까지 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 세포 형태학 및 증식, 뿐만 아니라 골형성성 분화를 제1일, 제7일, 제14일 및 제21일에 분석하였다. 상호연결된 세포-세포 네트워크로 HUVEC가 재구성되는 것 (혈관형성성 분화의 초기 이벤트)을 포함하는 세포 형태학이 칼세인 염료로의 염색 후 형광 현미경검사에 의해 관찰되었다. 정제된 농축 소 트립신 용액에서의 젤 용해 후 세포 상등액의 전체적인 형광 강도를 측정함으로써 칼세인 염료로의 염색 후 세포 증식이 분석되었다. 마지막으로, 정제된 농축 소 트립신 용액에서 젤을 용해시키고 나서 세포의 재현탁 후 골형성성 분화의 초기 마커로서 ALP가 측정되었다 (상기 기술된 프로토콜).

[0122] 표면 플라즈몬 공명에 의한 PDGF의 결합:

[0123] 표면 플라즈몬 공명 (SPR)은 실시간으로 2분자 상호작용을 측정하는 기술이다. 이 분석은 특정 분석물이 고정

의 리간드에 결합하는지를 결정할 수 있고, 리간드에 결합하는 분석물의 결합 친화력 및 화학양론을 결정할 수 있다. 기본적인 실험 접근법은 먼저 도금 칩(chip)을 리간드와 커플링시키는 것이다. 이후, 완충제 내에 제조된 분석물 (이동상)을 유동 셀 내로 주입하고, 상기 셀에서 분석물이 코팅된 칩 상에 완충제의 흐름에 의해 운반된다. 분석물과 리간드 사이에 2분자 상호작용이 발생하면, 표면에서의 국소적인 질량 증가가 금속 표면 상에서의 굴절 지수 단위 (μRIU)의 증가를 초래한다. μRIU 에서의 변화를 시간의 함수로서 그래프화할 수 있다.

[0124] 본 연구에서, 재조합 인간 PDGF-AB 및 재조합 인간 PDGF-BB가 분석물로 사용되었고, TISSEEL VH S/D의 FC 성분이 리간드로 사용되었다. 포스페이트 완충 용액 (PBS, 즉 생리학적 염 조건의 용액)이 완충제로서 사용되었다. 상이한 농도의 각각의 PDGF 이소형들을 FC가 코팅된 센서 칩의 표면 상에 따로따로 통과시켰다. 각각의 실험 및 각각의 농도에 대해, 회합 및 해리 속도를 측정하였다.

[0125] 통계적 분석:

[0126] 방출 동역학을 삼중으로 수행하였다. 증식, ALP 활성, 알시안 블루 및 알리자린 염색에 대한 결과는 3셋트의 실험을 나타낸다. 증식 및 ALP 활성은 삼중으로, 염색 실험은 이중으로 수행하였다. 각각의 PDGF 농도에 대한 SPR 분석은 삼중으로 수행하였다. 통계학적 분석은 5%의 유의성 수준으로 ANOVA 테스트를 사용하여 수행되었다.

[0127] **실시예 2: TISSEEL VH S/D로부터의 PDGF의 방출 동역학에 대한 PDGF 농도의 효과**

[0128] 피브린 젤로부터의 PDGF의 방출 동역학에 대한 PDGF 농도의 효과를 TISSEEL VH S/D로 제조된 단일 피브린 젤 제형 (20 mg/ml의 FC 농도 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도))을 사용하여 분석하였다. 방출 동역학 연구는 PDGF-AB 및 BB 방출량이 TISSEEL VH S/D의 FC 성분에 초기에 첨가된 성장 인자의 양에 따라 증가하였음을 나타냈다 (도 1 및 2).

[0129] 전체적으로, 누적 방출 결과는 초기에 첨가된 PDGF-AB의 약 20% 내지 35%만이 10일 후에 방출되었음을 나타냈다 (도 1). 오직 3일 후의 PDGF-AB의 누적 방출을 고려하면, PDGF-AB의 누적 방출은 약 8-13%였다. 바꾸어 말하면, 이러한 결과는 제10일에 약 65-80%, 제3일에 약 87-92%의 유지를 나타냈다.

[0130] PDGF-BB로의 결과는 유사한 경향을 따랐지만, 10일 후에 약 45% 내지 70%가 방출되어 더 높은 전체적인 방출을 묘사하였다 (도 2). 오직 3일 후의 PDGF-BB의 누적 방출을 고려하면, 누적 방출은 약 20-35%였다.

[0131] 이러한 결과들은 PDGF-AB 및 BB 양쪽 모두와 피브린의 강한 결합 상호작용을 시사한다.

[0132] **실시예 3: TISSEEL VH S/D로부터의 PDGF 방출 동역학에 대한 FC 농도의 효과**

[0133] TISSEEL VH S/D 피브린 실린트를 사용하는 경우의 PDGF 방출 동역학에 대한 FC 농도의 효과를 결정하기 위해, 4가지 상이한 FC 농도 (5, 10, 20 및 40 mg/ml, 젤에서의 최종 농도)에 대해 트롬빈 농도 (2 IU/ml)는 고정된 TISSEEL VH S/D 젤을 사용하여 방출을 분석하였다.

[0134] ELISA 결과는 분석된 모든 FC 농도에 대해 제1일의 급격한 방출 및 제10일까지의 방출 감소를 나타냈다 (도 3a). 15 ng의 PDGF-AB를 젤에 첨가했을 때, FC 농도 (5 내지 40 mg/ml)가 방출 동역학에 유의하게 영향을 미치지 않았다. 누적 방출은 초기량 (15 ng)의 약 27% 내지 32%가 10일 후에 방출되었고 (도 3b), 10% 내지 20%만이 3일 후에 방출되었음을 나타냈다. 바꾸어 말하면, 10일 후에는 약 70%가 유지되었고, 오직 3일 후에는 80-90%까지 유지되었으며, FC 농도가 유지에 영향을 미치지 않았고, 이는 5 mg/ml의 FC가 15 ng의 PDGF-AB에 결합하는데 충분하였음을 시사하였다.

[0135] 그러나, PDGF-BB로의 결과는 전체적인 방출 백분율에 대한 FC 농도의 효과를 나타냈다 (도 4). 실제로, FC 농도가 낮을수록 제10일에 TISSEEL VH S/D로부터의 PDGF-BB 누적 방출이 더 높았다 (FC가 5 mg/ml인 경우 약 65% 및 40 mg/ml인 경우 25%). 제3일의 누적 방출의 분석 또한 FC 농도에 대한 의존성을 나타냈고, 이때 5 mg/ml의 FC로는 약 35%가 방출되었고, 40 mg/ml의 FC로는 10%가 방출되었다. 바꾸어 말하면, 이러한 결과는 10일 후 약 35%의 최소 유지 (5 mg/ml의 FC) 및 약 75%의 최대 유지 (40 mg/ml의 FC)를 나타냈고, 3일 후 약 65%의 최소 유지 및 약 90%의 최대 유지를 나타냈다. FC 농도에 대한 방출 동역학의 의존성은 FC 농도를 변화시키는 것에 의한 PDGF-BB 제어 방출의 가능성을 시사한다.

[0136] 젤을 용해시켜 젤 내에 잔존하는 PDGF-AB를 회수한 후, ELISA 결과는 PDGF-AB의 초기 첨가량의 85% 이상이 회수되었음을 나타냈다. 젤을 용해시켜 젤 내에 잔존하는 PDGF-BB를 회수한 후, ELISA 결과는 PDGF-BB의 초기 첨가량의 65% 내지 75%가 회수되었음을 나타냈다. PDGF-BB에 대해 회수가 완전하지 않았기 때문에, PDGF-BB의

방출 백분율은 약간 과소평가되었을 수 있다.

[0137] **실시예 4: TISSEEL VH S/D의 상이한 제품 로트들을 사용하는 것의 효과**

[0138] 단일 젤 제형 (20 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도))으로 TISSEEL VH S/D로부터의 상이한 FC 제품 로트들을 사용하는 것의 효과를 조사했을 때, 결과는 분석된 모든 로트에 대해 제10일까지 일정한 방출을 나타냈다. 10일 후의 PDGF-AB의 누적 방출은 FC 로트에 따라 약 23% 내지 32% 범위였고 (도 5), 따라서 3개의 로트에 대해 유사하였다. 10일 후의 PDGF-BB의 누적 방출은 FC 로트에 따라 약 38% 내지 42% 범위였고 (도 6), 따라서 3개의 로트에 대해 또한 유사하였다.

[0139] 이러한 결과들은 피브린 로트들 간에 PDGF 방출에서의 유의한 차이가 없고, 따라서 방출 동역학에서의 로트 대 로트 변동을 걱정할 필요가 없음을 나타낸다.

[0140] 젤을 용해시켜 젤 내에 잔존하는 PDGF-AB를 회수한 후, ELISA 결과는 PDGF-AB의 초기 첨가량의 충분한 회수를 나타냈다. 젤을 용해시켜 젤 내에 잔존하는 PDGF-BB를 회수한 후, ELISA 결과는 PDGF-BB의 초기 첨가량의 약 65%가 회수되었음을 나타냈다. PDGF-BB에 대해 회수가 완전하지 않았기 때문에, PDGF-BB에 대한 방출 백분율은 약간 과소평가되었을 수 있다.

[0141] **실시예 5: TISSEEL VH로부터의 PDGF-BB의 방출 동역학**

[0142] TISSEEL VH로부터의 PDGF-BB의 방출 동역학을 분석하여, TISSEEL VH 및 TISSEEL VH S/D를 사용할 때의 잠재적인 차이를 관찰하였다.

[0143] TISSEEL VH로부터의 방출 동역학에 대한 PDGF-BB 농도의 효과를 측정하였다. 결과는 FC 성분에 초기에 첨가된 성장 인자의 양에 따라 방출량이 증가하였음을 나타냈다 (도 7). 전체적으로, 누적 방출 결과는 초기에 첨가된 PDGF-BB의 약 20% 내지 40%만이 10일 후에 방출되었음을, 즉 TISSEEL VH S/D를 사용했을 때 관찰된 방출보다 약 2배 더 낮음을 나타냈다. 오직 3일 후, 결과는 약 15-20%의 PDGF-BB의 누적 방출을 나타냈다. 그러나, TISSEEL VH로의 실험이 폴리스티렌 플레이트로 수행되었고 (TISSEEL VH S/D에 대한 폴리프로필렌 튜브와 대조적), PDGF가 폴리스티렌 플레이트에 비-특이적으로 결합할 수 있기 때문에, 이러한 값들이 과소평가되었을 수 있음을 주지하여야 한다. 10일 방출 실험의 말기에 젤 내에 잔존하는 성장 인자의 회수가 측정되지 않아, 이러한 잠재적인 과소평가가 입증되었다.

[0144] TISSEEL VH로부터의 1일 PDGF-BB 방출에 대한 FC 농도의 효과를 조사했을 때, ELISA 결과는 분석된 모든 농도에 대해 제1일의 급격한 방출 및 제10일까지의 방출 감소를 나타냈다 (도 8a). 15 ng의 PDGF-BB를 TISSEEL VH 젤에 첨가했을 때, FC 농도 (5 내지 40 mg/ml)가 방출 동역학에 영향을 미치지 않았음을 결과가 또한 나타냈고, 누적 방출은 초기 첨가량 (15 ng)의 약 30% 내지 35%가 10일 후에 방출되었음을 나타냈다 (도 8b). 이러한 결과는 TISSEEL VH로부터의 5 mg/ml의 FC가 15 ng의 PDGF-BB에 결합하는데 충분하였음을 시사한다. 그러나, PDGF-BB 농도의 효과에 대한 결과에 대한 것과는 같이, TISSEEL VH로의 이러한 값들이 폴리스티렌 플레이트의 사용으로 인해 과소평가되었을 수 있음을 주지하여야 한다.

[0145] 마지막으로, 단일 젤 제형 (20 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도))으로 TISSEEL VH로부터의 상이한 FC 제품 로트들을 사용하는 것의 효과를 조사했을 때, 결과는 분석된 모든 로트에 대해 제10일까지 일정한 방출을 나타냈다. 10일 후 PDGF-BB의 누적 방출은 약 30% 내지 60% 범위였고 (도 9), 따라서 FC 로트 번호에 의존적이었으며, 이는 TISSEEL VH S/D로 발견된 결과와 대조적이었다. 분석된 TISSEEL VH의 3개의 로트들 간의 차이 중 하나는 XIII 인자의 함량 (로트 1은 무시가능한 양, 로트 2는 33.9 U/ml 및 로트 3은 42.2 IU/ml)이었고, 이는 XIII 인자의 양과 TISSEEL VH로부터의 PDGF-BB의 방출 속도 간의 잠재적인 상관관계를 시사한다.

[0146] **실시예 6: 시험관 내에서의 HMSC 단층에 대한 방출된 PDGF의 생물학적 활성**

[0147] 인간 중간엽 줄기 세포 (HMSC)는 연골세포, 골모세포, 지방세포 및 근육세포를 포함하는 여러 특수 조직 세포 유형으로 분화될 수 있는 다능성(pluripotent) 전구 세포이다 ([Caplan AI, J Orthop Res 9: 641-650, 1991]). 이러한 세포의 수임(commitment) 및 분화는 세포 상호작용뿐만 아니라 특정 성장 인자를 포함하는 다양한 인자에 의해 조정된다. PDGF 패밀리 구성원들은 MSC 성숙의 조절인자로서 확인되었다.

[0148] HMSC에 대한 방출된 성장 인자의 효과를 측정하였다. 재료 및 방법 섹션에서 언급된 바와 같이, 배지 상등액을 피브린 젤 (120 ng의 PDGF-AB 및 60 ng의 PDGF-BB를 PDGF가 첨가된 젤에 대한 중합 전에 FC 성분에 첨가하였다)로부터 제3일 (젤을 매일 교환하지 않음)에 수집하였고, HMSC 단층에 대한 배양 배지로 사용하였다.

PDGF가 첨가된 젤로부터의 배지에서 관찰된 임의의 변화가 방출된 PDGF에 의해 실제로 유도되었고, 젤 자체로부터 방출되었을 수 있는 일부 다른 잠재적인 생체활성 성분에 의해서 유도되지 않았음을 확실히 하기 위해, 일부 젤은 대조군 샘플용으로 PDGF를 첨가하지 않고 제조하였다.

[0149] PDGF-AB 또는 PDGF-BB가 첨가된 TISSEEL VH S/D 젤 (20 mg/ml의 FC, 2 IU/ml의 트롬빈으로 초기에 젤이 제조됨)로부터의 배지 상등액, 즉 방출된 PDGF를 함유하는 배지와 함께 배양된 HMSC는 이미 제4일에 세포 형태학에서의 변화를 나타냈고, 제7일에는 더욱 더 명백하였다. 이들은 PDGF가 첨가되지 않은 젤로부터의 배지 상등액과 함께 배양된 것들보다 형상이 더 신장되었고, 신선하게 첨가된 PDGF를 함유하는 배지와 함께 배양된 것들과 더욱 유사하였다. 결과는 PDGF-BB의 경우에 더욱 더 명백하였다.

[0150] 제4일 및 제7일의 세포 증식을 제1일의 증식 (기준선)에 대해 표준화하였다. PDGF가 첨가된 TISSEEL VH S/D 젤로부터의 배지 상등액 (즉, 방출된 PDGF를 함유하는 배지)와 함께 7일 동안 배양되었을 때 HMSC 증식이 증가하는 경향이 있었지만, 차이가 유의하지 않았다 ($p>0.05$) (도 10 및 11). PDGF가 신선하게 첨가된 배지와 함께 배양된 세포의 증식은 유의하게 더 높았다.

[0151] PDGF가 첨가된 TISSEEL VH S/D 젤로부터의 상등액과 함께 배양된 HMSC에서의 알칼리성 포스파테이스 (ALP) 활성은 PDGF가 첨가되지 않은 TISSEEL VH S/D 젤로부터의 상등액 및 신선하게 첨가된 PDGF를 함유하는 배지와 함께 배양된 HMSC에서의 활성보다 유의하게 더 낮았다 (도 12 및 13).

[0152] 알시안 블루 (연골형성성 분화의 지표) 및 알리자린 레드 (후기 골형성성 분화의 지표) 양쪽 모두가 7일까지의 모든 시점에서 음성이었다.

[0153] 일반적으로, TISSEEL VH S/D 피브린 젤로부터 방출된 PDGF의 존재 하에서의 HMSC 행동에서의 모든 관찰된 변화는 PDGF-BB에서 더욱 명백하였다. 전체적으로, 결과는 TISSEEL VH S/D 피브린 젤로부터 방출된 PDGF가 여전히 생물학적으로 활성이어서, 주로 HMSC 형태학에서의 변화 및 ALP 활성의 억제를 유도하였음을 나타냈다.

[0154] **실시예 7: 피브린 젤 내부에 시딩된 HMSC 및 피브린 젤의 표면 상에 시딩된 HUVEC에 대한 PDGF-BB의 효과**

[0155] 피브린 젤 내로 시딩된 HMSC 및 젤 표면 상에 시딩된 인간 제대 혈관 내피 세포 (HUVEC, Lonza Walkersville, Inc.)의 행동에 대한 PDGF의 효과를 분석하기 위해, 이러한 세포를 포함하는 젤을 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 제조하였다.

[0156] 간략하게, 10 mg/ml의 FC 및 2 IU/ml의 트롬빈 (젤에서의 최종 농도)를 함유하는 젤을 단일 배양 세포 (HMSC 또는 HUVEC) 또는 HMSC:HUVEC 비율이 4:1인 공동 배양 세포와 함께 제조하였다. 젤 제조 시점에 공동 배양 젤의 절반 내의 FC에 재조합 PDGF-BB (젤 0.3 ml 당 60 ng)를 첨가하였다. 혈청 보충물을 함유하는 내피 세포 성장 배지 (Lonza Walkersville Inc.)를 사용하여 21일까지 37°C, 5% CO₂에서 젤을 인큐베이션하였다. 세포 형태학 및 증식, 뿐만 아니라 골형성성 분화를 제1일, 제7일, 제14일 및 제21일에 분석하였다.

[0157] 형광 현미경검사 분석은, 시간이 흐름에 따라, 단일 배양 젤 내에 시딩되었을 때 HMSC가 균일하게 확산되었고, 개수가 더 많았으며, 더욱 신장된 형상이었음을 나타냈다. 이들은 PDGF-BB가 첨가된 공동-배양 젤에서 또한 균일하게 분산되었고 신장된 반면, PDGF-BB가 첨가되지 않은 공동-배양 젤에서는 더 작았고, 개수가 더 적었으며, 젤의 바닥을 향해 이동하는 경향이 있었다. PDGF-BB가 첨가되지 않은 공동-배양 젤에 비교하여 단일 배양 젤 및 추가적인 PDGF-BB를 함유하는 공동-배양 젤에서, 상호연결된 세포-세포 네트워크 (혈관형성의 초기 이벤트) 내로의 HUVEC 재구성이 더 빨리 시작되었고, 더 큰 정도로 일어났다.

[0158] 세포 증식이 시간이 흐름에 따라 증가하였다. PDGF-BB가 첨가된 첨가된 젤과 첨가되지 않은 젤 간에 유의한 차이가 관찰되지 않았지만, 더 높은 증식에 대한 경향이 PDGF-BB를 함유하는 젤에서 제7일 및 제14일에 주목되었다. ALP 활성이 낮은 수준으로 유지되었고, 이는 젤 내에 첨가된 PDGF-BB가 젤 내에 시딩된 HMSC의 골형성성 분화를 유도하지 않았음을 가리킨다.

[0159] **실시예 8: 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의한 PDGF의 결합**

[0160] SPR을 사용하여, PDGF-AB 및 PDGF-BB와 TISSEEL VH S/D의 FC 성분 간의 상호작용을 특성화하였다. 상호작용의 센서그램이 도 14A-14B에서 제시된다. 비-선형 회귀 분석을 사용하여, 곡선의 회합 및 해리 부분을 각각 단일-상 지수형 회합 및 해리 곡선으로 플롯팅(plotting) 및 피팅(fitting)하였다 (도 14C). 도 14B가 가리키는 바와 같이, PDGF-BB에 대한 해리 곡선은 2상성이다. 이는 PDGF-BB와 TISSEEL VH S/D의 FC 성분 간의 상호작용에 대한 K_D 값이 정확하게 결정되도록 하지 않았다. 그러나, SPR이 PDGF-AB와 TISSEEL VH S/D의 FC 성분의 상호작용

용 (완충제 (PBS, pH 7.4)의 존재 하에서의)에 대한 K_D 값을 계산하는데 성공적으로 사용되었다. 센서그램의 회합 상의 분석은 분석물 농도에 대해 플롯팅된 속도 상수 (K_{obs})를 제공하였다 (도 14C). 이러한 플롯을 선형 회귀에 의해 분석하여 기울기 및 절편을 수득하였고, 이는 각각 회합 속도 (K_{on}) 및 해리 속도 (K_{off}) 상수에 상응한다. 해리 속도 상수를 회합 속도 상수로 나눠서 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다.

[0161] 결합 센서그램의 해리 상에 의존하는 보완적인 방법에 의해 평형 해리 상수 (K_D)를 또한 결정하였다. 이러한 방법에서, PDGF-AB에 대한 해리 속도 상수 (K_{off})를 센서그램의 해리 상의 비-선형 회귀 분석으로부터 계산하였다. 해리 속도 상수 (K_{off})를 회합 속도 상수 (K_{on}) (센서그램의 회합 상의 분석으로부터 수득됨)로 나눠서 해리 평형 상수 (K_D)를 계산하였다.

[0162] 양쪽 방법을 사용하여, PDGF-AB가 TISSEEL VH S/D의 FC 성분에 결합하는 것에 대한 K_D 값은 342 ± 41 nM였다.

[0163] **요약**

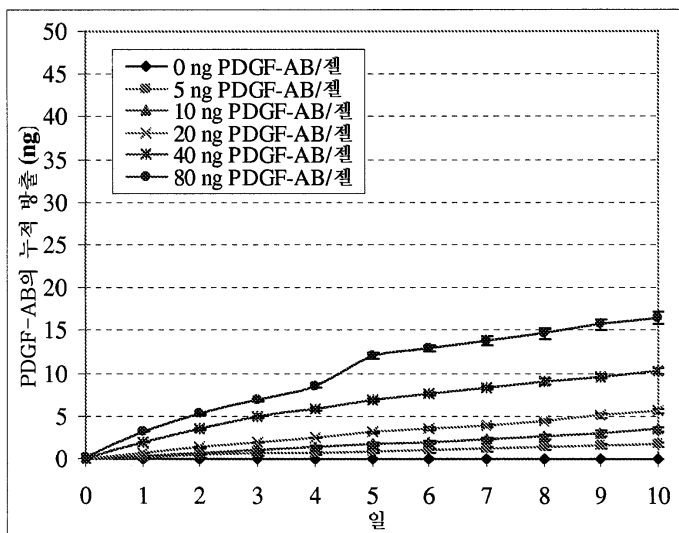
[0164] 상기 측정된 방출 동역학은 피브린 젤 내의 첨가된 재조합 PDGF가 젤로부터 점진적으로 방출된다는 것을 나타냈고, 이는 PDGF와 피브린(피브리노젠)의 결합 상호작용을 시사한다. 이러한 결합 상호작용이 PDGF의 초기 첨가량보다 낮은 10일 후의 누적 방출에 의해 추가로 입증되었다. PDGF-BB는 PDGF-AB보다 빠르게 방출되는 것으로 나타났고 (PDGF-BB의 유지가 더 낮음), FC 농도는 TISSEEL VH S/D 피브린 젤로부터의 PDGF-BB 방출 속도에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이는 FC 농도를 변화시키는 것이 PDGF-BB의 방출 속도를 제어하는데 사용될 수 있음을 시사한다. 전체적으로, 이러한 결과들은 이러한 2가지 형태의 PDGF, 특히 PDGF-AB와 피브린의 결합 상호작용을 시사한다. SPR을 사용했을 때, 결과는 PDGF-AB 및 PDGF-BB 양쪽 모두가 TISSEEL의 FC 성분에 결합하는 것을 나타냈다. 마지막으로, 생물학적 활성 결과는 방출된 PDGF가 여전히 생물학적으로 활성이어서, 주로 HMSC 형태학에서의 변화를 유도하였지만, 골형성 및/또는 연골형성 분화는 유도하지 않았음을 실연하였다.

[0165] 결론적으로, 본 연구는 피브린 젤이 생체활성 PDGF를 전달하기 위한 잠재적인 캐리어 시스템을 시사하고, PDGF-AB 및 BB에 결합하는 TISSEEL 피브린 실린트의 FC 성분의 고유의 성질을 실연하였다.

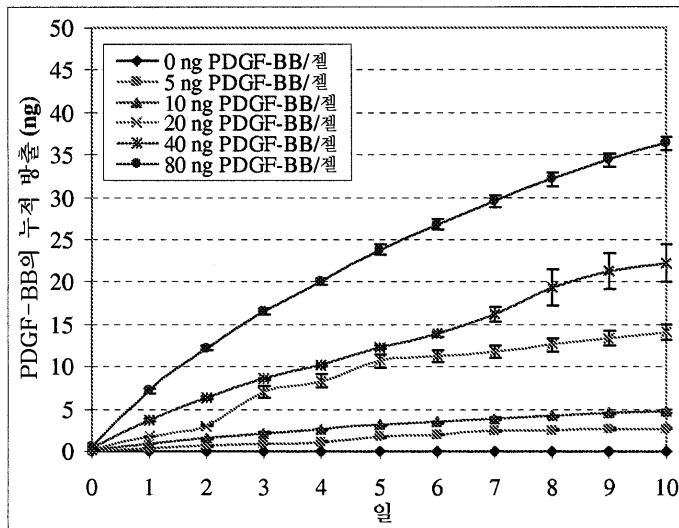
[0166] 상기 설명적인 예들에 기재된 바와 같은 본 발명의 다수의 변형 및 변동이 당업자에게 일어날 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구항에 나타난 바와 같이만 제한되어야 한다.

도면

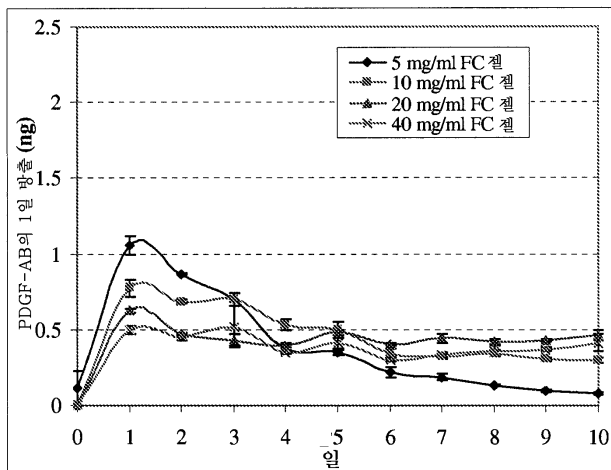
도면1



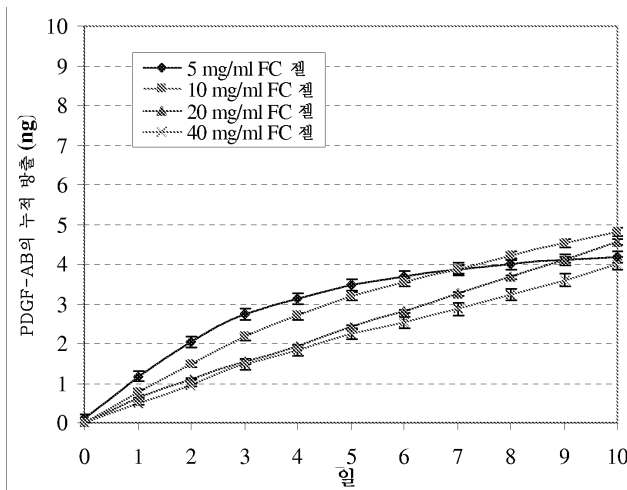
도면2



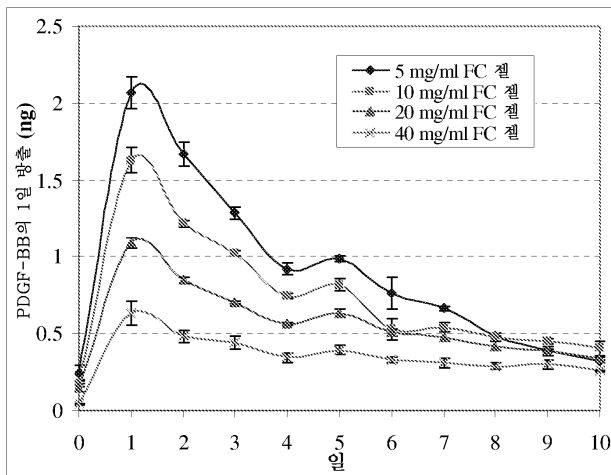
도면3a



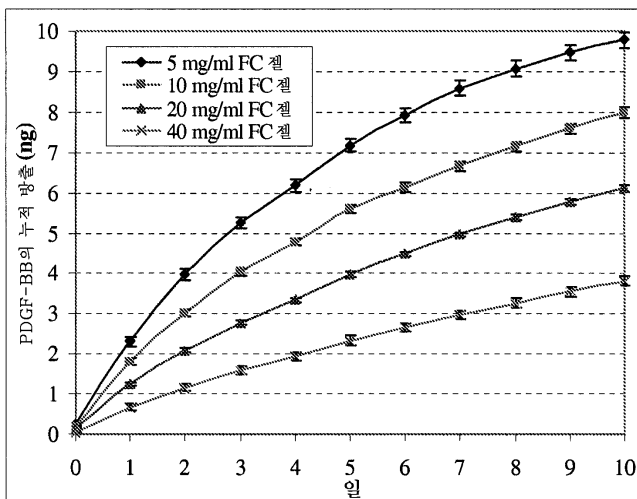
도면3b



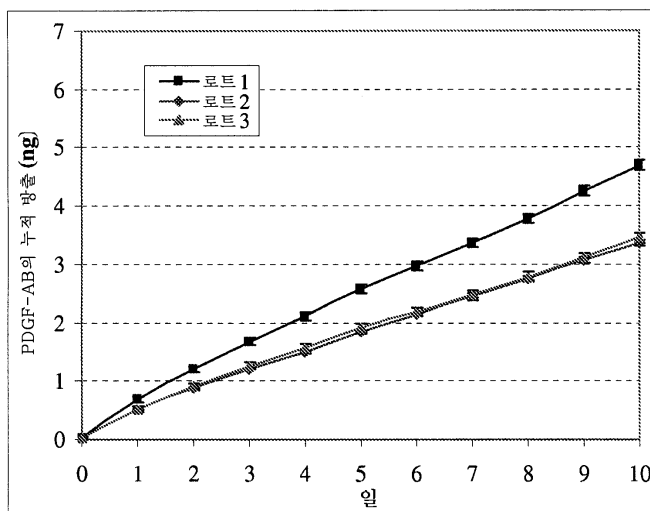
도면4a



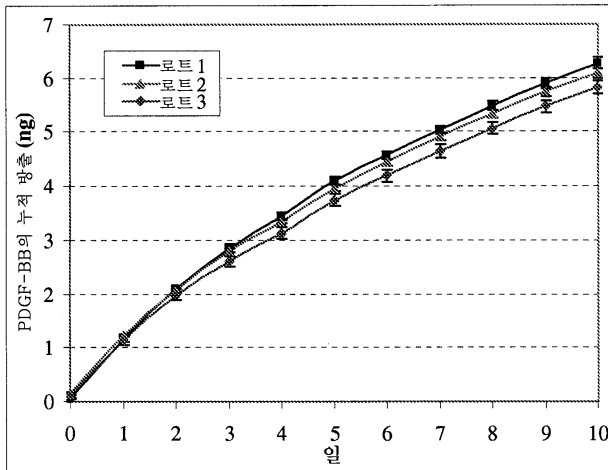
도면4b



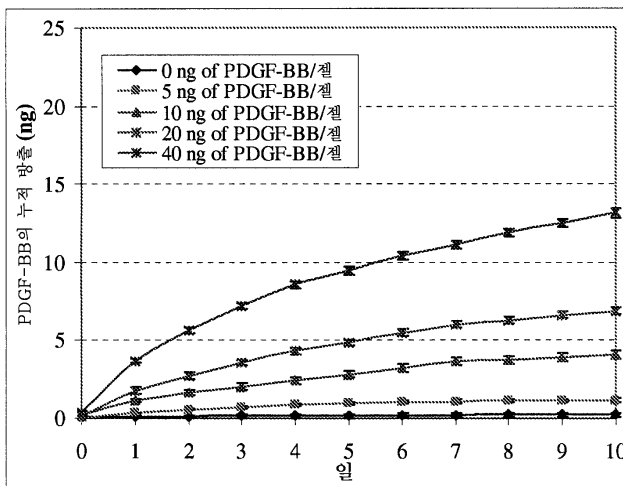
도면5



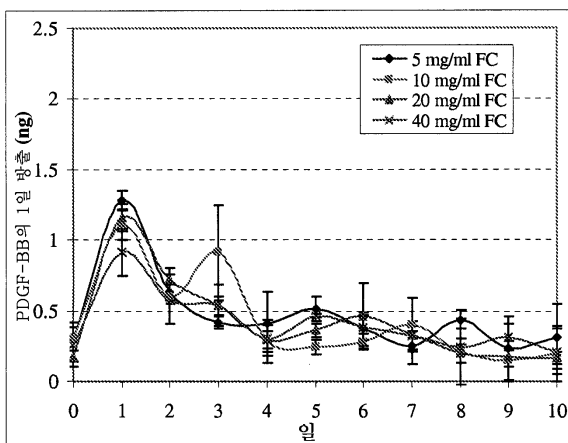
도면6



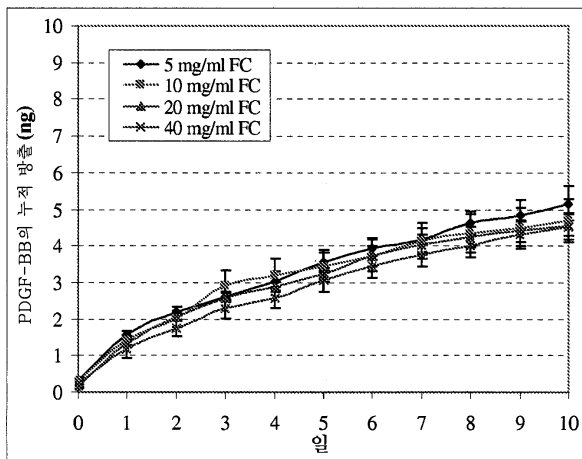
도면7



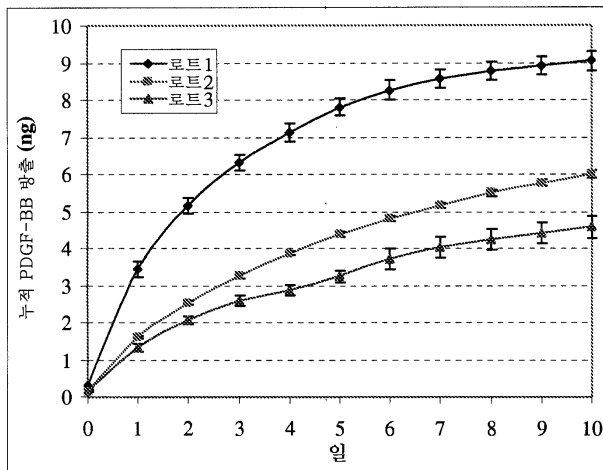
도면8a



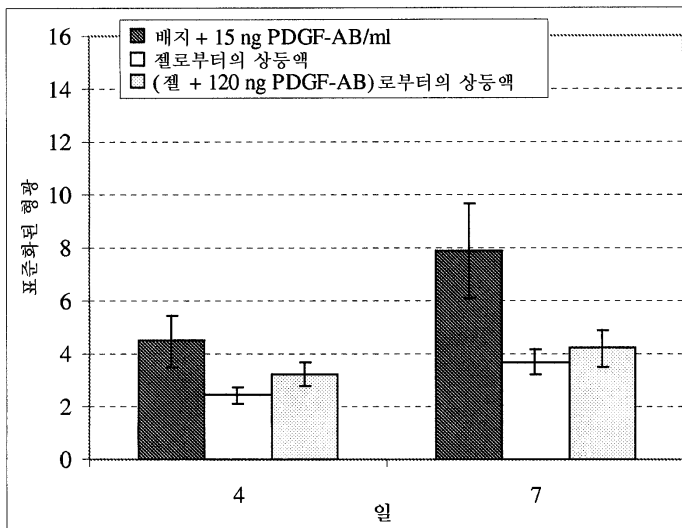
도면8b



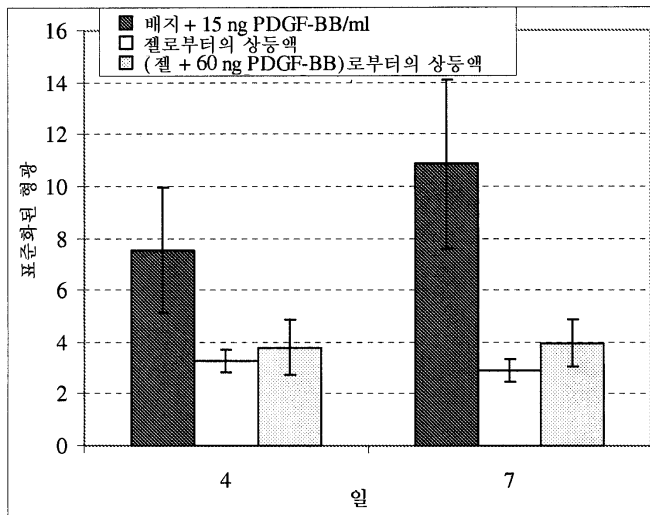
도면9



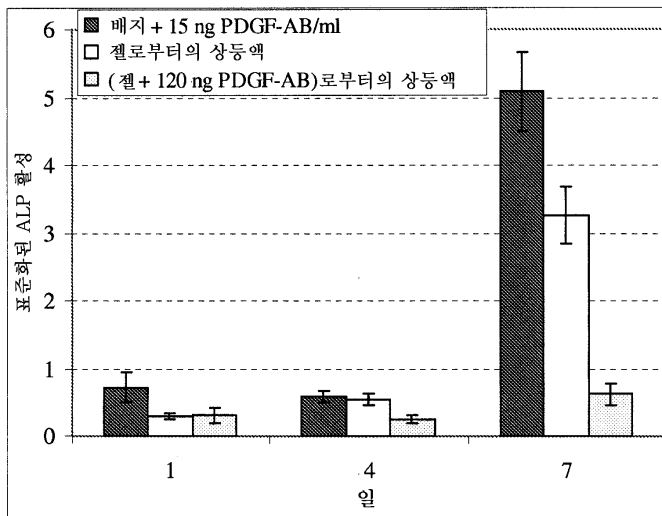
도면10



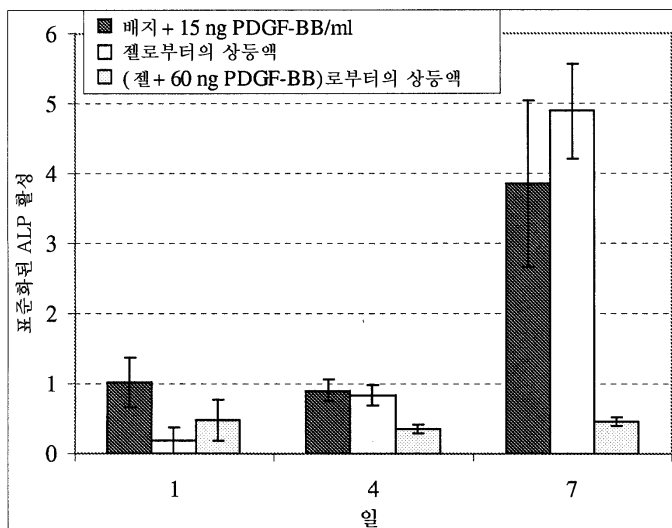
도면11



도면12

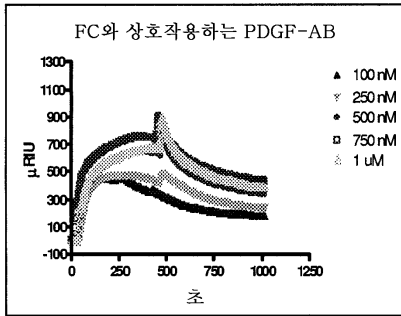


도면13

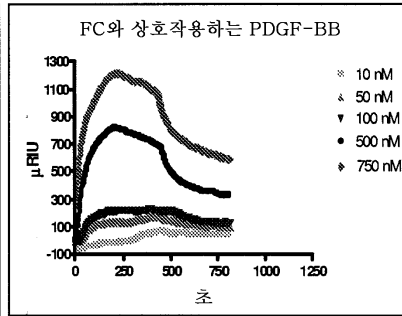


도면14

A.



B.



C.

