(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월18일
(11) 등록번호 10-1959571
(24) 등록일자 2019년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61K 47/24* (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7024694
(22) 출원일자(국제) 2011년02월22일
심사청구일자 2016년02월22일
(85) 번역문제출일자 2012년09월21일
(65) 공개번호 10-2013-0000397
(43) 공개일자 2013년01월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/025770
(87) 국제공개번호 WO 2011/103598
국제공개일자 2011년08월25일
(30) 우선권주장
61/306,938 2010년02월22일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Annals of Biomedical Engineering, Vol. 38, No. 2, February 2010 pp. 225-234

(73) 특허권자
바이오미메틱 세라퓨틱스, 인크.
미국 37067 테네시주 프랭클린 니콜 밀 레인 389
(72) 발명자
케스틀러, 한스, 케이.
미국 37027 테네시주 브렌트우드 파운틴브룩 300
라거-아기알, 딘, 제임스
미국 37174 테네시주 스프링 힐 그로우스 써클 3004
샤, 비베크
미국 37067 테네시주 프랭클린 아파트먼트 #1506 노쓰 로얄 오크스 불로바드 300
(74) 대리인
양영준

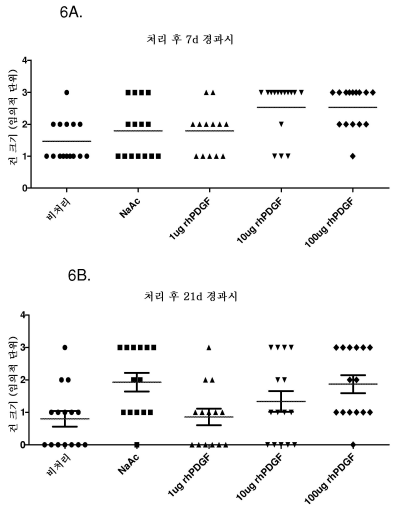
전체 청구항 수 : 총 22 항 심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 **건 질환의 치료를 위한 혈소판-유래 성장 인자 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본원에서는 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염 또는 "테니스 엘보," 내측 상과염 또는 "골퍼스 엘보," 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환을 비롯한, 건 질환, 예를 들어, 건활막염, 건병증 또는 건염의 치료를 위한 조성물 및 방법, 및 특히, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF)를 포함하는 조성물을 투여함으로써 건 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도6



(30) 우선권주장
61/311,284 2010년03월05일 미국(US)
61/428,809 2010년12월30일 미국(US)
61/429,428 2011년01월03일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

1 내지 2 ml의 용량당 75 ㎍ 내지 7,500 ㎍의 PDGF 및 완충제를 포함하고,

건 또는 골-건 접합부에 직접 주사로 투여되는, 건 질환(tendinopathy)의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 건 질환이 건병증, 건염, 또는 건활막염인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, PDGF가 PDGF-AA, PDGF-BB, 재조합 인간 (rh) PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 용량당 500 ㎍ 내지 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함하는 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 용량당 5,000 ㎍ 내지 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함하는 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 용량당 450 ㎍ 내지 3,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함하는 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 용량당 400 ㎍ 내지 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함하는 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 용량당 500 ㎍ 내지 900 ㎍의 PDGF-BB를 포함하는 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서, 용량당 600 ㎍ 내지 800 ㎍의 PDGF-BB를 포함하는 조성물.

청구항 10

제3항에 있어서, 용량당 650 ㎍ 내지 750 ㎍의 PDGF-BB를 포함하는 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물의 부피가 용량당 1.5 ml인 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 완충제가 포스페이트-완충 염수 ("PBS"), 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄 ("트리스"), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산 ("HEPES"), 3-(N-모르폴리노) 프로판술폰산 ("MOPS"), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 ("MES"), N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산 ("ADA"), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) ("PIPES"), 및 N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 ("ACES")으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 아세트산나트륨이 10 mM 내지 100 mM의 농도로 존재하는 것인 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물의 pH가 4.0 내지 7.0인 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 건 질환이 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염, 내측 상과염, 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물이 단일 용량으로 투여되는 것인 조성물.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물이 단일 주사로 투여되는 것인 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물이 4주 동안 주당 1회 초과로 투여되는 것인 조성물.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물이 투여 7일 이내에, 투여일의 건 강도와 비교하여 60% 이상의 건 강도 증가를 일으키는 것인 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 투여 7일 이내에 건이 투여 21일 후 측정되는 최종 강도의 80% 이상을 달성하도록 하는 조성물.

청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물이

(i) 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 또는 그 초과의 기간 동안 주 1회로 투여되거나,

(ii) 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 또는 그 초과의 기간 동안 월 2회로 투여되거나, 또는

(iii) 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 또는 그 초과의 기간 동안 매월 투여되는 것인,

조성물.

청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서, 조성물을 주사하기 위한 바늘을 건 또는 골-건 접합부에 삽입하고,

피부로부터 드러내지 않고서 바늘을 빼고, 재지정하고, 재삽입함으로써 다회에 걸쳐 소량 주사를 실시하는 것에 의해 투여되는 것인 조성물.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

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

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2010년 2월 22일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 61/306,938, 2010년 3월 5일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 61/311,284, 2010년 12월 30일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 61/428,809, 및 2011원 1월 3일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 61/429,428의 이점을 주장하며, 이들은 모두 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 발명은 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염 또는 "테니스 엘보," 내측 상과염 또는 "골퍼스 엘보," 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환을 비롯한, 건 질환, 예를 들어, 건활막염, 건병증 또는 건염의 치료를 위한 조성물 및 방법, 및 특히, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF)를 포함하는 조성물을 투여함으로써 건 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 건은 보통 근육을 골에 연결시켜 주는 섬유성 결합 조직인 질긴 띠이다. 건의 탄력적인 특성이 운동시 힘을 조절하며, 어떤 활동적인 일없이 추가로 안정화시켜 준다. 이는 또한 에너지를 보관하고 고효율로 회복시킨다. 정상의 건강한 건은 주로 함께 조밀하게 패킹된 평행 배열 방식의 I형 콜라겐 섬유로 구성되어 있지만, 이는 또한 소량의 엘라스틴과 소량의 프로테오글리칸을 포함한다. 건은 고도로 분화된 초미세구조를 가지며, 그의 혈관화 수준은 낮고, 콜라겐 전환이 느리기 때문에, 손상될 경우, 그의 치유 속도는 매우 느리고, 그의 원래의 강도로 회복되기는 좀처럼 힘들다. 부분적인 인열은 해체된 III형 콜라겐의 신속한 생산을 통해 치유되지만, 이는 정상의 건보다는 약하다. 건의 손상 부위에서 다시 손상이 재발하는 것은 흔한 일이다.

[0006] 건 질환은 과용 또는 노화로 인해 점차적으로 건에 마모가 일어나고, 인열이 일어남으로써 그로 인한 이화 대사 반응과 동화 대사 반응 사이의 불균형이 원인인 것으로 보여지는 건의 만성 장애 또는 손상이다. 이와 같은 불균형의 결과는 건 변성, 쇠약, 인열, 및 동통이다. 대조적으로, 급성 건 손상, 예를 들어, 건 파열 또는 골로부터의 분리는 매우 갑작스럽게 일어나는 것으로, 보통 파열을 수복시키거나, 건을 골에 재부착시키기 위해서는 수술이 이루어져야 한다. 어느 누구에서나 건 질환이 발병될 수 있지만, 직업상, 운동시, 또는 규칙적인 일상 활동에서 같은 동작을 반복해서 하는 경향이 있는 사람인 경우에 상기 질환이 발병될 가능성은 더 크다. 건 질환은 보통 환부에 동통, 경직, 및 강도 상실을 유발한다.

[0007] 건 질환이라는 용어는 건병증 및 건염이라는 2가지 유형의 건 손상을 의미한다. 상기 용어는 또한 특정 건, 예를 들어, 굴근 건 및 아킬레스 건에서 발병되는 건의 외측 내막의 건 질환인 건활막염도 포함한다.

[0008] 건병증은 보통은 과용으로 인해 유발되는 건내 및 건 주변 조직의 미소인열 형태인 건의 건내 변성으로서, 이로 인해 손상 부위 주변의 건 수복 세포의 개수가 증가하는 것을 특징으로 하는, 건에 대한 비염증성 손상이다. 건 변성은 건의 콜라겐 섬유, 세포, 및 혈관 성분에 대한 손상, 또는 그의 해체로 인해 유발되며, 이는 건의 인장 강도를 감소시킬 수 있고, 치료하지 않으면, 건 파열을 일으킬 수 있다. 콜라겐 조직화의 변화는 섬유의 분리/해리/주름, 평행 배향 상실, 섬유 직경 감소, 및 콜라겐의 총 밀도 감소를 특징으로 한다. 추가로, 주위에 적혈구, 피브린, 및 피브로넥틴 침착물이 있는 곳에서 콜라겐 미소인열 또한 발생할 수 있다. 다른 한편으로는, III형 (수복) 콜라겐이 증가한다. 이러한 기질 조직화 변화로 인해 편광 현미경법하에서 복굴절은 감소할 수 있다. 콜라겐 함량 및 조직화 이외에도, 건병증은 점액성 기저 물질 (프로테오글리칸)의 증가, 및 환부의 세포 밀도 변동도 특징으로 한다. 일부 부위는 프로테오글리칸 및 단백질의 생산 증가를 입증하는 둥근형 핵 및 초미세구조물과 함께 비정상적으로 풍부한 건 세포를 함유한다. 대조적으로, 이환된 건의 다른 부위는 작은 농축핵과 함께 정상인 것보다 더 적은 건 세포를 함유할 수 있다. 건병증의 또 다른 특색은 모세 혈관 및 세동맥의 증식이다. 건병증에서 건 변성의 여러 하위범위가 전자 현미경법을 통해 확인되었다: (1) 저산소성 변성, (2) 히알린 변성, (3) 점액성 또는 점액양 변성, (4) 피브리노이드 변성, (5) 리포이드 변성, (6) 석회화, 및 (7) 섬유연골성 및 골성 화생. 이러한 병리상태는 해부학상 부위, 및 상기 병상을 유발한 손상 (예를 들어, 저산소증 대 기계적 부하; 급성 대 만성 손상)의 성질에 따라 다양한 유병률로 공존할 수 있다. 예를 들어, 점액성 변성 부위는 광학 현미경법에 의해 큰 점액성 패취와 섬유 사이의 액포를 특징으로 한다. 그러나, 리포이드 변성은 콜라겐 섬유 구조를 파괴시키는 지질의 비정상적인 건내 축적을 특징으로 한다. 일부 경우에서, 건병증은 건의 국소 괴사 또는 석회화를 동반한다. 이것이 관절 주변의 만성 동통에 대한 매우 보편적인 이유이다. 건병증은 또한 초기에는 염증성 반응이 없는 것을 특징으로 한다. 염증성 세포는 수복 과정 중 조기 단계에서 매개 인자인 것으로 판단되며, 이러한 염증성 세포가 없을 경우, 건병증은 만성 상태가 될 수 있다.

[0009] 건병증과 관련된 특징으로서 수분 함량의 증가와 콜라겐 기질의 해체는 초음파 검사 또는 자기 공명 영상법에 의해 진단될 수 있다. 증상은 건의 국소 부위에서의 단순한 통증 및 경직에서부터 손상된 건 주변의 전체 관절 주위에서의 작열감에 이르기까지 다양할 수 있다. 많은 환자에서 동통은 빈번하게는 활동하는 동안 및 그 이후에 악화되고, 건 및 관절 부위는 팽윤이 건의 움직임에 영향을 주는 바, 그 다음날 더 경직될 수 있다.

[0010] 건염은 건병증에서 관찰되는 것과 같은 변성을 특징으로 하지만, 혈관 파괴 및 염증성 수복 반응을 동반하는 건염증도 동반하는 것인, 건에 대한 염증성 손상이다. 건염은 흔히 섬유모세포 및 근섬유모세포 증식 뿐만 아니라, 출혈 및 육아 조직 조직화를 동반한다. 일반적으로, 예를 들어, 외측 상과염 ("테니스 엘보"로서도 공지되어 있는 것으로서, 단요측 수근 신근 건을 이환시킨 것)과 같이, 특정한 예외가 존재하기도 하지만, 건염은 예를 들어, 아킬레스 건염 (아킬레스 건을 이환시킨 것), 또는 슬개건염 ("점퍼의 무릎"으로서도 공지되어 있는 것으로서, 슬개건을 이환시킨 것)과 같이, 연루되어 있는 신체 일부에 의해 지칭된다. 증상은 통증 또는 동통 및 국소 경직에서부터 염증이 생긴 건 주변의 전체 관절 주위의 작열감에 이르기까지 다양할 수 있다. 일부 경우에서, 건염은 때로는 발열 및 발적을 동반하는 팽윤을 특징으로 한다; 또한 관절 주변에 결절이 보일 수도 있다. 많은 환자의 경우, 보통 통증은 활동하는 동안 및 그 이후에 더 악화되고, 건의 이동으로부터 근육이 팽팽해짐에 따라 그 다음날 건 및 관절은 더욱 경직될 수 있다.

[0011] 현 치료는 사실상 주로 완화시키는 것으로서, 건병증이 염증성 반응과 관련이 없다는 경향을 지닌다는 사실에도 불구하고, 치료는 전통적으로 비스테로이드성 소염 약물 (NSAID), 스테로이드 주사, 및 물리적 요법을 이용하는 치료법을 비롯한, 소염적 조치에 중점을 두고 있다. 더욱 최근에는, 충격파 요법, 저수준 레이저 요법, 혈관경화 요법, 및 다른 실험적 치료법이 시험되었다. 대개는, 일부 치료법 (예를 들어, NSAID 및 코르티손 주사)을 통해 단기간 완화되는 반면, 현 치료법들의 장기간의 이점은 여전히 불명확하다. 따라서, 현 치료 방식과 비교하여 보다 장기간에 걸쳐 이점을 제공할 수 있는 개선된 건 질환 치료 방법이 요구된다.

[0012] PDGF는 혈소판의 알파-과립에 저장되고, 대식세포, 섬유모세포, 및 내피 세포를 비롯한, 국소적으로 활성화된 세포에 의해 조직 수복 동안에 분비된다. PDGF-BB는 급성 건 손상의 출혈 및 염증의 주요 생성물 중 하나이다. 혈소판-유래 성장 인자-BB (PDGF-BB)는 골 (골모세포) 및 건 (건 세포) 세포를 비롯한, 중간엽 기점의 세포에 대해 화학주성을 띠고 (세포 이동), 분열 촉진성을 띠는 (세포 증식) 것으로 알려져 있는 상처 치유 단백질이다. 추가로, PDGF-BB는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 상향 조절시킴으로써, 성공적인 재생 과정에서

는 필수적인 혈관형성 (재혈관화)을 증가시키는 것으로 나타났다.

[0013] 아킬레스 건은 인체가 높은 하중을 지탱할 수 있도록 해주는, 인체에서 가장 두껍고 가장 강한 건이다. 아킬레스 건이 그 기능을 발휘하는 기계적 부하 환경은 아킬레스 건이 파열되기 쉽게 만든다. 아킬레스 건 파열은 다양한 인자의 결과로서 발생할 수 있지만, 파열은 흔히 퇴행성 변화와 관련이 있다 (문헌 [Mafulli N, Wong J, Almekinders L. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clinics in Sports Medicine*. 2003;22:675-692]). 수복 과정 후, 파열된 아킬레스 건은 I형 콜라겐의 감소, 및 III형 콜라겐 양의 상대적인 증가를 보였다. 조성에 있어 상기와 같은 변화로 인해 가교 결합은 줄어들고, 인장 강도는 감소된다. 치유된 이후에도 파열된 아킬레스 건은 과세포성, 해체, 및 콜라겐 가교 결합의 감소로 인해 보다 약한 상태로 남게 된다 (문헌 [Maffulli N, Moller HD, Evans CH. Tendon Healing: Can it be Optimized? British Journal of Sports Medicine, 2002;36:315-316]). 보존적 (비-수술적) 및 외과적 요법, 둘 모두에 관한 찬반 양론과 함께, 아킬레스 건 파열을 위한 최적의 치료법에 관해서도 논란이 존재한다. 비-수술적인 치료법을 이용하면 재-파열률은 보다 높고, 강도는 감소하지만, 수술과 관련된 위험 및 비용 문제를 피할 수 있다 (문헌 ([Inglis AE, Scott WN, Sculco TP, et al. Ruptures of the tendo achillis: an objective assessment of surgical and non-surgical treatment. J Bone Joint Surg Am. 1976;58:990-993]; [Nistor L. Surgical and Nonsurgical treatment of Achilles tendon rupture: a prospective randomized trial. J Bone Joint Surg Am 1981 63(3):394-9]; [Chalmers J. Review Article: Treatment of Achilles tendon ruptures. Journal of Orthopaedic Surgery 2008(1):97-99])). 외과적 수복은 수술 및 마취의 위험을 동반하지만; 이를 통해 강도는 증가하게 되며, 재-파열률은 보다 낮고, 보다 빨리 운동 활동에 복귀할 수 있다 (문헌 [Nistor L. Surgical and Nonsurgical treatment of Achilles tendon rupture: a prospective randomized trial. J Bone Joint Surg Am 1981 63(3):394-9]; [Rettig A, Liotta FJ, Klootwyk TE, Porter DA, Mieling P. Potential Risk of Rerupture in Primary Achilles Tendon Repair in Athletes Younger than 30 years of Age. Am J of Sports Med 2005:33(1): 119-123])). 급성 아킬레스 건 파열 치료를 위한 의사의 선호도와는 상관없이, 외과적 수복은 계속해서 활성 환자 군집에서 상기와 같은 손상 치료를 위한 영역에서는 그의 입지를 굳히게 될 것이다. 생물학적 수복 과정의 증강과 그로 인한 건 치유의 개선을 통해 잠재적으로는 현 치료 방식과 비교해 볼 때 더 빠르게 활동으로 복귀할 수 있고, 임상 결과는 개선될 수 있다.

[0014] 건 치유를 생물학적으로 증가시키는 것에 관한 여러 생체내 및 시험관내 연구가 진행되어 왔다. 예를 들어, 문헌 ([Seeherman HJ, Archambault JM, Rodeo SA, et al. rhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(10):2206-2219]; [Chan BP, Fu SC, Qin L, et al. Supplementation-time dependence of growth factors in promoting tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;448:240-247]; [Uggen JC, Dines J, Uggen CW, et al. Tendon gene therapy modulates the local repair enviroment in the shoulder. *J Am Osteopath Assoc*. 2005;105(1):20-21]; [Gelberman R, Thomopoulos S, Sakiyama-Elbert S, et al. The early effects of sustained platelet-derived growth factor administration on the functional and structural properties of repaired intrasynovial flexor tendons: an in vivo biomechanic study at 3 weeks in canines. *J Hand Surg Am*. 2007;32(3):373-379]; [Thomopoulos S, Das R, Silva MJ, et al. Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. *J Orthop Res*. 2009;27(9): 1209-1215]; [Thomopoulos S, Zaegel M, Das R, et al. PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. *J Orthop Res*. 2007;25(10): 1358-1368]; [Dines J, Grande D, Dines D. Tissue Engineering and Rotator Cuff Tendon Healing. J Shoulder Elbow Surg, Sept/Oct 2007: 204S-206S])를 참조한다.

[0015] 적절한 시간 경과에 따라 충분한 용량으로 rhPDGF-BB를 수복 부위에 전달하는 것은 원하는 임상 효과를 달성하는 데 있어서 중요하다. 생물학적 물질로 코팅된 봉합사가 수개의 연구를 통해 기술된 바 있다. 예를 들어, 문헌 ([Rickert M, Jung M, Adiyaman M, Richter W, Wimank HG. Growth and differentiation factor 5 coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. Growth Factors 2001;19: 115-126]; [Weiler A, Forster C, Hunt P, Falk R, Jung T, Unterhauser FN, Bergmann V, Schmidmaier G, Haas NP. The Influence of Locally Applied Platelet-Derived Growth Factor-BB on Free Tendon Graft Remodeling After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. American Journal of Sports Medicine 2004; 32(4):881-891]; [Dines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder Elbow Surg 2007;16:215S-221S]; [Uggen C, Dines J, McGarry M, et al. The effect of Recombinant Human Platelet Derived growth Factor BB coated sutures on

Rotator cuff Healing in a Sheep Model. Arthroscopy: 2010:26(11): 1456-1462])를 참조한다.

[0016] 필요한 것은 예를 들어, 파열된 건, 예를 들어, 파열된 아킬레스 건의 수복을 위해 PDGF를 건에 전달하기 위한 개선된 봉합사이다.

발명의 내용

[0017] 요약

[0018] 한 측면에서, 본원에서는 PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물의 유효량을 환부에 투여하는 단계를 포함하는, 건 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건병증이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건염이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건활막염이다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, PDGF는 재조합 인간 (rh) PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 5,000 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 450 ㎍ 내지 약 3,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 400 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 900 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 600 ㎍ 내지 약 800 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 650 ㎍ 내지 약 750 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 700 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 부피는 용량당 약 1.0 내지 약 2.0 ml이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 부피는 용량당 약 1.5 ml이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 포스페이트-완충 염수 ("PBS"), 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄 ("트리스"), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산 ("HEPES"), 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산 ("MOPS"), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 ("MES"), N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산 ("ADA"), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) ("PIPES"), 및 N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 ("ACES")으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 완충제는 아세트산나트륨이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 10 mM 내지 약 100 mM이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 20 mM이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 약 4.0 내지 약 7.0이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 약 6이다. 일부 실시양태에서, 투여는 환부에의 직접 주사에 의해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 환부는 골-건 접합부이다. 일부 실시양태에서, 환부는 건이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염, 내측 상과염, 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 외측 상과염이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1회 초과의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 4주 동안 주 1회로 단일 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 60% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 65% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 70% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 80% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 85% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 90% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본원에서는 PDGF 및 완충제로 이루어진 조성물의 유효량을 환부에 투여하는 단계를 포함하는, 건 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건병증이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건염이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건활막염이다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, PDGF는 재조합 인간 (rh) PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 5,000 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 450 ㎍ 내지 약 3,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 400 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍의

PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 900 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 600 ㎍ 내지 약 800 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 650 ㎍ 내지 약 750 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 700 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 부피는 용량당 약 1.0 내지 약 2.0 ml이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 부피는 용량당 약 1.5 ml이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 포스페이트-완충 염수 ("PBS"), 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄 ("트리스"), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산 ("HEPES"), 3-(N-모르폴리노) 프로판술폰산 ("MOPS"), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 ("MES"), N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산 ("ADA"), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) ("PIPES"), 및 N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 ("ACES")으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 완충제는 아세트산나트륨이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 10 mM 내지 약 100 mM이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 20 mM이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 약 4.0 내지 약 7.0이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 약 6이다. 일부 실시양태에서, 투여는 환부에의 직접 주사에 의해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 환부는 골-건 접합부이다. 일부 실시양태에서, 환부는 건이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염, 내측 상과염, 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 외측 상과염이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일 용량으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1회 초과의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 4주 동안 주 1회로 단일 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 60% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 65% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 70% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 80% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 85% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 방법을 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 90% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 PDGF 및 완충제로 이루어진 조성물의 유효량을 환부에 투여하는 단계로 구성된다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본원에서는 유효량의 PDGF 및 완충제를 포함하는, 건 질환 치료에 사용하기 위한 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건병증이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건염이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건활막염이다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, PDGF는 재조합 인간 (rh) PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 5,000 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 450 ㎍ 내지 약 3,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 400 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 900 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 600 ㎍ 내지 약 800 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 650 ㎍ 내지 약 750 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 용량당 약 700 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 부피는 용량당 약 1.0 내지 약 2.0 ml이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 부피는 용량당 약 1.5 ml이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 포스페이트-완충 염수 ("PBS"), 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄 ("트리스"), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산 ("HEPES"), 3-(N-모르폴리노) 프로판술폰산 ("MOPS"), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 ("MES"), N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산 ("ADA"), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) ("PIPES"), 및 N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 ("ACES")으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 완충제는 아세트산나트륨이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 10 mM 내지 약 100 mM이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 20 mM이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 약 4.0 내지 약 7.0이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 약 6이다. 일부 실시양태에서, 치료는 조성물을 환자에 직접 주사하에 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 환부는 골-건 접합부이다. 일부 실시양태에서, 환부는 건이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염, 내측 상과염, 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

일부 실시양태에서, 건 질환은 외측 상과염이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일 용량으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1회 초과의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 4주 동안 주 1회로 단일 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 치료를 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 60% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 치료를 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 65% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 치료를 통해 건 강도는 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 70% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 본 치료를 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 80% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 치료를 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 85% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 본 치료를 통해 건은 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 90% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 투여 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 유효량의 PDGF 및 완충제로 이루어진다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본원에서는 달리 언급되지 않는 한, 구체적 문맥으로부터 명백해지는 바와 같이, 본 방법과 관련하여 본원에 기술된 PDGF 조성물의 용도를 제공한다. 본원에 기술된 PDGF 조성물은 또한 본원에 기술된 본 방법에서 사용하기 위한 의약 제조에 사용될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] **도 1**은 rhPDGF-BB 처리가 건 세포의 세포 이동에 미치는 효과를 보여주는 것이다.

도 2는 BrdU 혼입에 의해 측정된 바, rhPDGF-BB 처리가 건 세포의 세포 증식에 미치는 효과를 보여주는 것이다.

도 3은 우측 다리 건-종골 접합부에서의 주사 부위를 보여주는 것이다. 28.5G 바늘을 사용하여 인슐린 시린지로 주사하였다.

도 4는 생체기계적 시험을 위해 시험 동물을 프로세싱한 이후의, 래트 중족골-아킬레스-비복근 복합체를 나타낸 대표적인 영상을 보여주는 것이다.

도 5는 종골 (C) - 아킬레스 건 (T) 부착 부위의 측면 가장자리로부터의 시상 절편을 나타낸 대표적인 영상을 보여주는 것이다.

도 6A는 콜라게나제 유도성 래트 아킬레스 건 손상 모델에서 처리 후 7일째 재조합 인간 혈소판-유래 성장 인자, 이소형 BB ("rhPDGF-BB")의 건내 적용을 위한 육안 관찰상의 건 성장에 관한 용량 반응 연구 결과를 보여주는 것이다. 중간 용량 (10.2 ㎍) 또는 고용량 (102 ㎍)의 rhPDGF-BB를 단일 주사한 결과, rhPDGF-BB로 처리 후 7일째 건 크기는 유의하게 증가한 것으로 나타났다.

도 6B는 rhPDGF-BB 처리 후 21일째 같은 연구의 결과를 보여주는 것이다. 처리 후 21일째 고용량 (102 ㎍)의 rhPDGF-BB의 단일 주사가 건 크기에 미치는 효과는 아세트산나트륨 완충제를 단독으로 주사하였을 때의 효과와 유사하였다.

도 7은 도 6A 및 6B와 같은 데이터를 다른 방식으로 제시하는 것으로서, rhPDGF-BB 처리 후 7일 및 21일째 육안상의 건 크기를 보여주는 것이다 (0 = 비성장 내지 3 = 극도의 큰 성장).

도 8은 rhPDGF-BB 처리 후 7일 및 21일째 종골 삽입부의 건 폭 (㎛ ± SEM)을 보여주는 것이다.

도 9는 rhPDGF-BB 처리 후 7일 및 21일째 건체의 건 폭 (㎛ ± SEM)을 보여주는 것이다.

도 10은 rhPDGF-BB 처리 후 7일 및 21일째 rhPDGF-BB가 세포 증식률 (세포 계수 ± SEM)에 미치는 효과를 보여주는 것이다.

도 11은 rhPDGF-BB 처리 후 7일 및 21일째 아킬레스 건의 기계적 특성: 최대 파열 하중 (N ± SEM)을 보여주는 것이다.

도 12는 IV 투여 후의 평균 혈청 rhPDGF-BB 농도-시간 값을 보여주는 것이다.

도 13은 IT 투여 후의 평균 혈청 rhPDGF-BB 농도-시간 값을 보여주는 것이다.

도 14A는 4-0 바이크릴(Vicryl) 봉합사로부터 방출된 각 시점에서의 rhPDGF-BB의 방출량에 대한 시험관내 방출 프로파일을 보여주는 것이다.

도 14B는 4-0 바이크릴 봉합사로부터 방출된 48시간 동안에 걸친 rhPDGF-BB의 시험관내 누적 방출량을 보여주는

것이다 (평균 ± SEM).

도 14C는 추정되는 생체내 rhPDGF-BB 누적 용량 대 봉합사 코팅 용액 중 초기 rhPDGF-BB 농도를 보여주는 것이다.

도 14D는 이식된 4-0 바이크릴 봉합사 길이를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 제한없이, 특허, 특허 출원, 및 과학 참고 문헌을 비롯한, 본원에서 인용되는 모든 참고 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0024] 놀랍게도 본 발명의 조성물 및 방법을 통해 건 질환 치료가 개선된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법을 통해 건 강도가 증가되고, 건 강도 회복 속도가 증가된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법을 통해 건 강도가 증가된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법을 통해 건 강도 회복 속도가 증가된다. 예를 들어, 손상 후 건이 치유되는 동안에, 건의 생체기계적 강도는 건 치유 과정이 진행됨에 따라 증가한다. 본 발명의 조성물을 투여하면 건 강도를 보다 신속하게 증가시킬 수 있다. 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 건 치유를 촉진시키는 데 있어서 상기와 같은 강도의 신속한 증가가 도움이 될 수 있으며; 하중 지지가 건 손상을 더 이상 증가시키지 않는다면, 일반적으로는 건 상의 하중 지지를 통해 조직 리모델링 및 재구성이 개선되는 바, 상기와 같은 하중 지지를 통해 건의 치유 반응은 개선될 것이다. (예를 들어, 본 발명의 조성물의 투여를 통해) 건 강도가 초기에 보다 빠르게 증가하게 되면 건 상의 하중 지지를 시작할 수 있는 능력을 얻을 수 있고, 이로써 추가로는 건 치유 반응은 개선될 수 있다. 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 건 강도 개선은 세포 증식 및/또는 세포외 기질 생산의 증가에 의해, 및/또는 조직의 조직화 개선 (예를 들어, 세포외 기질의 조직화 개선)에 의해 유발될 수 있다.

[0025] 추가로, 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 놀랍게도, 본 발명의 조성물이 (예를 들어, 주사에 의해) 건 내로 직접 투여된 경우에는 PDGF가 투여 부위 (예를 들어, 주사 부위)에 국소화된 상태로 남아 있다는 것을 본 발명자들은 발견하게 되었다. 예를 들어, 하기 실시예 5에서 추가로 상세히 설명하는 바와 같이, 완충제 중 PDGF로 이루어진 조성물을 투여하였을 때, PDGF가 주사 부위에 국소화된 상태로 남게 될 것이라는 것은 예상하지 못했다.

[0026] ***정의***

[0027] 본원에서 사용되는 바, "치료"라는 용어는 치료하려는 장애 (예를 들어, 건 질환, 예를 들어, 건병증, 건염, 또는 건활막염)의 임상 병리적 자연 경과를 변경시키도록 디자인된 임상적 개입을 의미한다. 치료의 바람직한 효과로는 예를 들어, 이환된 관절 또는 사지의 동통 또는 경직 감소, 이환된 관절 또는 사지의 운동성 및 강도 증가, 건 질환 진행 속도 감소, 염증 감소, 건 강도 증가, 건 강도 회복 속도 개선, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 차도가 있거나 또는 예후 개선 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, 건 질환과 관련된 하나 이상의 증상이 경감되거나, 소실되었다면, 개체는 성공적으로 "치료받고 있다"고 볼 수 있다.

[0028] 본원에서 사용되는 바, "유효량"이라는 용어는 적어도 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는 데 필요한 투여량 및 필요한 기간에 있어서 효과가 있는 양을 의미한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다.

[0029] 본원에서 값 또는 파라미터를 언급함에 있어 "약"이라는 것은 또한 그 값 또는 파라미터 자체에 대한 실시양태를 포함한다 (및 기술한다).

[0030] 본원 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 바, 단수 형태 ("하나" 및 "그"("a", "an", 및 "the"))는 문맥상 달리 명백하게 언급되지 않는 한, 언급 대상의 복수 형태를 포함한다. 예를 들어, "PDGF 동종이량체"에 대해 언급하는 것은 하나 또는 다수의 PDGF 동종이량체들을 언급하는 것이고, 이는 당업자에게 공지된, 그의 등가물들 등을 포함한다.

[0031] 본원에 기술된 본 발명의 모든 측면 및 실시양태가 측면 및 실시양태를 "포함하는," "그로 이루어지는," 및 "본질적으로 그로 이루어지는" 것을 포함한다는 것을 이해할 것이다. "본질적으로 인용된 요소로 이루어지는" 방법 또는 조성물은 오직 명시된 단계 또는 물질, 및 상기 방법 및 조성물 (예를 들어, 본질적으로 PDGF 및 완충제로 이루어진 조성물의 유효량을 환부에 투여하는 것, 또는 본질적으로 완충 처리된 용액 중의 유효량의 PDGF로 이루어진 조성물)의 기본적인 특징 및 신규한 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것만을 포함한다는 것을 이해하여야 한다.

[0032] ***혈소판-유래 성장 인자 및 그의 조성물***

[0033] 본원에서 사용되는 바, "혈소판-유래 성장 인자" 또는 "PDGF"라는 용어는 2개의 상이한 수용체를 통해 세포 반응을 활성화시키는 4가지의 상이한 PDGF 이소형 중 임의의 것을 의미한다. 상기 이소형은 (PDGF-AA로 지명되는 동종이량체로서 및 PDGF-AB로 지명되는 B 이소형과의 이종이량체의 일부로서 관찰되는) A, (PDGF-BB로 지명되는 동종이량체로서 및 PDGF-AB로 지명되는 A 이소형과의 이종이량체의 일부로서 관찰되는) B, (PDGF-CC로 지명되는 동종이량체로서 관찰되는) C, 및 (PDGF-DD로 지명되는 동종이량체로서 관찰되는) D를 포함한다. 본원에서는 일반적으로, "PDGF"라는 용어는 일반적으로 공지된 PDGF 동종 및 이종이량체 (예를 들어, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD)를 지칭한다.

[0034] 본원에서는 개체에서 건 질환을 치료하는 방법, 및 상기 법에서 사용하기 위한 조성물을 제공한다. 일반적으로, 본 치료 방법은 건 질환을 앓는 개체의 환부에 PDGF를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 구체적으로, 본 치료 방법은 건 질환 부위에 PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 PDGF 및 완충제 (예를 들어, 완충 처리된 PDGF 용액)를 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 조성물은 PDGF 및 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD, 및 그의 혼합물 및 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 PDGF 이량체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 이량체는 동종이량체이다. 일부 실시양태에서, PDGF 동종이량체는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDGF 동종이량체는 PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, PDGF 이량체는 이종이량체이다. 일부 실시양태에서, PDGF 이종이량체는 PDGF-AB이다.

[0036] 일부 실시양태에서, PDGF는 천연 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF는 재조합 DNA 기법에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF 또는 그의 단편은 당업자에게 공지된 펩티드 합성 기법, 예를 들어, 고체상 펩티드 합성법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0037] 천연 공급원으로부터 수득되는 경우, PDGF는 생물학적 유체로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 유체는 혈액을 비롯한 살아있는 유기체와 관련된 임의의 처리된 또는 비처리된 유체를 포함할 수 있다. 생물학적 유체는 또한 혈소판 농축물, 성분채집된(apheresed) 혈소판, 혈소판이 풍부한 혈장, 혈장, 혈청, 및 신선한 동결 혈장을 비롯한 혈액 성분을 포함할 수 있다. 생물학적 유체는 혈장으로부터 분리되고 생리학적 유체 또는 완충제 중에 재현탁된 혈소판을 포함할 수 있다.

[0038] 재조합 DNA 기법에 의해 제조되는 경우, 단일 단량체 (예를 들어, PDGF B-쇄 또는 A-쇄)를 코딩하는 DNA 서열은 발현을 위해 배양된 원핵 또는 진핵 세포에 삽입될 수 있으며, 이어서 동종이량체 (예를 들어, PDGF-BB 또는 PDGF-AA)가 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF 동종이량체 (예를 들어, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, 또는 PDGF-DD)를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 이종이량체는 이종이량체의 단량체 단위 둘 모두를 코딩하는 DNA 서열을 배양된 원핵 또는 진핵 세포에 삽입하고, 번역된 단량체 단위가 세포에 의해 프로세싱되어 이종이량체 (예를 들어, PDGF-AB)가 제조될 수 있도록 함으로써 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF 이종이량체 (예를 들어, PDGF-AB)를 포함한다. 상업적으로 이용가능한 재조합 인간 PDGF-BB는 레인코 테크놀로지스 인크.(Leinco Technologies, Inc.: 미국 미주리주 세인트루이스), 및 R&D 시스템즈, 인크.(R&D Systems, Inc.: 미국 미네소타주 미니애폴리스)를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다양한 공급업체로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0039] 본원에 기술된 일부 실시양태에서, PDGF는 재조합 인간 PDGF ("rhPDGF")를 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 인간 PDGF ("rhPDGF")는 rhPDGF-AA, rhPDGF-BB, rhPDGF-AB, rhPDGF-CC, rhPDGF-DD, 및 그의 혼합물 및 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 PDGF 이량체이다. 일부 실시양태에서, 재조합 인간 PDGF는 rhPDGF 동종이량체이다. 일부 실시양태에서, 재조합 인간 PDGF 동종이량체는 rhPDGF-AA, rhPDGF-BB, rhPDGF-CC, 및 rhPDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 재조합 인간 PDGF 동종이량체는 rhPDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, 재조합 인간 PDGF는 rhPDGF 이종이량체이다. 일부 실시양태에서, 재조합 인간 PDGF 이종이량체는 rhPDGF-AB이다.

[0040] 일부 실시양태에서, PDGF-B는 하기 단편 중 하나 이상을 포함한다: 전체 인간 B-쇄의 아미노산 1-31, 1-32, 33-108, 33-109, 및/또는 1-108. 인간 PDGF의 B-쇄의 완전한 아미노산 서열 (아미노산 1-109)은 미국 특허 번호 5,516,896의 도 15에 제시되어 있다. 본 발명의 PDGF-BB 조성물이 무손상 인간 PDGF-B (아미노산 1-109) 및 그의 단편의 조합을 포함할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. PDGF의 다른 단편, 예를 들어, 미국 특허 번호

5,516,896에 개시된 단편이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF-BB는 전장 인간 PDGF-B (아미노산 1-109)의 65% 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF-BB는 전장 인간 PDGF-B (아미노산 1-109)의 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 이상을 포함한다.

[0041] 일부 실시양태에서, 조성물은 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택되는 PDGF 이량체 (예를 들어, rhPDGF 이량체)를 포함하고, 조성물은 약 0.01 mg/ml 내지 약 10.0 mg/ml, 약 0.05 mg/ml 내지 약 5.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 또는 약 0.1 mg/ml 내지 약 2.0 mg/ml 범위, 약 0.1 mg/ml 내지 약 3.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 4.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 0.4 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 5.0 mg/ml, 약 0.9 mg/ml 내지 약 1.5 mg/ml 범위의 농도로 PDGF 이량체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 3.4 mg/ml의 농도로 PDGF 이량체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 1.0 mg/ml의 농도로 PDGF 이량체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 0.34 mg/ml의 농도로 PDGF 이량체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 하기 농도 중 어느 하나의 농도로 PDGF 이량체를 포함한다: 약 0.05 mg/ml; 약 0.1 mg/ml; 약 0.15 mg/ml; 약 0.2 mg/ml; 약 0.25 mg/ml; 약 0.3 mg/ml; 약 0.35 mg/ml; 약 0.4 mg/ml; 약 0.45 mg/ml; 약 0.5 mg/ml, 약 0.55 mg/ml, 약 0.6 mg/ml, 약 0.65 mg/ml, 약 0.7 mg/ml; 약 0.75 mg/ml; 약 0.8 mg/ml; 약 0.85 mg/ml; 약 0.9 mg/ml; 약 0.95 mg/ml; 약 1.0 mg/ml; 약 1.5 mg/ml; 약 2.0 mg/ml; 약 2.5 mg/ml; 약 3.0 mg/ml; 약 3.5 mg/ml; 약 4.0 mg/ml; 약 4.5 mg/ml; 또는 약 5.0 mg/ml. 이러한 농도는 단순히 특정 실시양태의 일례이며, PDGF 이량체의 농도는 상기 언급된 농도 범위 중 어느 범위내에 포함되는 어느 것일 수 있음을 이해하여야 한다.

[0042] 일부 실시양태에서, PDGF 이량체 (예를 들어, rhPDGF 이량체)는 PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 0.01 mg/ml 내지 약 10.0 mg/ml, 약 0.05 mg/ml 내지 약 5.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 또는 약 0.1 mg/ml 내지 약 2.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 3.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 4.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 5.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 0.4 mg/ml, 약 0.9 mg/ml 내지 약 1.5 mg/ml 범위의 농도로 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 3.4 mg/ml의 농도로 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 1.0 mg/ml의 농도로 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 0.34 mg/ml의 농도로 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 하기 농도 중 어느 하나의 농도로 PDGF-BB를 포함한다: 약 0.05 mg/ml; 약 0.1 mg/ml; 약 0.15 mg/ml; 약 0.2 mg/ml; 약 0.25 mg/ml; 약 0.3 mg/ml; 약 0.35 mg/ml; 약 0.4 mg/ml; 약 0.45 mg/ml; 약 0.5 mg/ml, 약 0.55 mg/ml, 약 0.6 mg/ml, 약 0.65 mg/ml, 약 0.7 mg/ml; 약 0.75 mg/ml; 약 0.8 mg/ml; 약 0.85 mg/ml; 약 0.9 mg/ml; 약 0.95 mg/ml; 약 1.0 mg/ml; 약 1.5 mg/ml; 약 2.0 mg/ml; 약 2.5 mg/ml; 약 3.0 mg/ml; 약 3.5 mg/ml; 약 4.0 mg/ml; 약 4.5 mg/ml; 또는 약 5.0 mg/ml. 이러한 농도는 단순히 특정 실시양태의 일례이며, rhPDGF-BB의 농도는 상기 언급된 농도 범위 중 어느 범위내에 포함되는 어느 것일 수 있음을 이해하여야 한다.

[0043] 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 양의 PDGF가 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 PDGF의 양으로는 하기 범위의 양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 약 1 ㎍ 내지 약 50 mg, 약 10 ㎍ 내지 약 25 mg, 약 100 ㎍ 내지 약 10 mg, 약 250 ㎍ 내지 약 5 mg, 내지 약 450 ㎍ 내지 약 3 mg. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-BB이다. 다양한 양의 PDGF-BB가 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 PDGF-BB의 양으로는 하기 범위의 양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 약 1 ㎍ 내지 약 50 mg, 약 10 ㎍ 내지 약 25 mg, 약 100 ㎍ 내지 약 10 mg, 약 250 ㎍ 내지 약 5 mg 내지 약 450 ㎍ 내지 약 3 mg.

[0044] 본 발명의 일부 실시양태에서, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD를 비롯한, PDGF (예를 들어, rhPDGF)의 농도는 미국 특허 번호 6,221,625; 5,747,273; 및 5,290,708에 기술되어 있는 바와 같은, 효소 결합 면역검정, 또는 당업계에 공지되어 있는, PDGF 농도 측정을 위한 임의의 다른 검정을 이용함으로써 측정될 수 있다. 본원에서 제공되는 경우, rhPDGF의 몰 농도는 PDGF 동종이량체의 분자량 (예를 들어, PDGF-BB, MW 약 25 kDa)에 기초하여 측정한다.

[0045] 본 발명의 일부 실시양태에서, PDGF (예를 들어, rhPDGF)는 고도로 정제된 형태로 존재할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 정제된 PDGF는 본 발명의 용액 중에의 혼입 이전에 약 95중량% 초과의 PDGF를 가진 조성을 포함한다. 용액은 임의의 제약상 허용되는 완충제 또는 희석제를 사용하여 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF는 실질적으로 정제된 것일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 실질적으로 정제된 PDGF는 본 발명의 용액 내로의 혼입 이전에 약 5중량% 내지 약 95중량% PDGF를 가진 조성을 포함한다. 한 실시양태에서, 실질적으로 정제된 PDGF는 본 발명의 용액 내로의 혼입 이전에 약 65중량% 내지 약 95중량% PDGF를 가진 조성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 실질적으로 정제된 PDGF는 본 발명의 용액 내로의 혼입 이전에 약 70중량% 내지 약 95중량

%, 약 75중량% 내지 약 95중량%, 약 80중량% 내지 약 95중량%, 약 85중량% 내지 약 95중량%, 또는 약 90중량% 내지 약 95중량% PDGF를 가진 조성을 포함한다. 정제된 PDGF 및 실질적으로 정제된 PDGF가 조성물 내로 혼입될 수 있다.

[0046] 추가의 실시양태에서, PDGF는 부분적으로 정제된 것일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 부분적으로 정제된 PDGF는 혈소판이 풍부한 혈장, 신선한 동결 혈장, 또는 PDGF 제조를 위해 수집 및 분리가 요구되는 임의의 다른 혈액 생성물과 관련하여 PDGF를 가진 조성물을 포함한다. 본 발명의 실시양태는 동종이량체 및 이종이량체를 비롯한, 본원에서 제공하는 PDGF 이소형 중 임의의 것은 정제된 것이거나, 또는 부분적으로 정제된 것일 수 있다는 것에 주시한다. PDGF 혼합물을 포함하는 본 발명의 조성물은 부분적으로 정제된 비율로 PDGF 이소형 또는 PDGF 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부분적으로 정제된 및 정제된 PDGF는 미국 출원 일련 번호 11/159,533 (미국 특허 공개 번호 2006/0084602 A1)에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0047] 본원에 기술된 실시양태 중 임의의 것에서, 고도로 정제된 또는 부분적으로 정제된 PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 기술된 실시양태 중 임의의 것에서, 고도로 정제된 또는 부분적으로 정제된 PDGF는 PDGF-BB이다.

[0048] ***완충제***

[0049] 일부 실시양태에서, 조성물은 PDGF 및 완충제, 바람직하게, 제약상 허용되는 완충제를 포함한다. 본 발명의 PDGF 용액에 사용하기에 적합한 완충제로는 카르보네이트, 포스페이트 (예를 들어, 포스페이트-완충 염수), 염수, 히스티딘, 아세테이트 (예를 들어, 아세트산나트륨 또는 아세트산암모늄), 산성 완충제, 예를 들어, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨 및 HCl, 및 유기 완충제, 예를 들어, 리신, 트리스 완충제 (예를 들어, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산 (HEPES), 3-(N-모르폴리노) 프로판술폰산 (MOPS), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES), N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산 ("ADA"), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) (PIPES), 및 N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 (ACES)을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 완충제는 PDGF와의 생체적합성, 및 원치 않는 단백질 변형을 억제시킬 수 있는 능력에 기초하여 선택될 수 있다. 추가로, 완충제는 숙주 조직과의 적합성 및 제약상 수용성을 기초로 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 아세트산나트륨 완충제 중 PDGF를 포함한다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨 완충제 중의 PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨 완충제 중의 PDGF는 rhPDGF-BB이다.

[0051] 완충제는 상이한 몰 농도, 예를 들어, 약 0.1 mM 내지 약 100 mM, 약 1 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 100 mM, 약 1 mM 내지 약 50 mM, 약 5 mM 내지 약 40 mM, 약 10 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 15 mM 내지 약 25 mM, 또는 이들 범위 내에 포함되어 있는 임의의 몰 농도로 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 아세트산염 완충제는 약 20 mM의 몰 농도로 사용된다. 완충제는 상이한 농도, 예를 들어, 약 0.01 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 0.05 mg/ml 내지 약 5 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 5 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 1 mg/ml, 및 약 0.5 mg/ml 내지 약 1 mg/ml, 또는 이들 범위 내에 포함되어 있는 임의의 농도로 사용될 수 있다.

[0052] 또 다른 실시양태에서, PDGF를 포함하는 용액은 동결건조된 PDGF를 물에 용해시킴으로써 형성될 수 있으며, 여기서, PDGF는 용해 이전에 적절한 완충제로부터 동결건조된다.

[0053] 본 발명의 일부 실시양태에 따라, PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물의 pH 범위는 약 3.0 내지 약 8.0 또는 약 4.0 내지 약 7.0일 수 있다. 일부 실시양태에서, PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물의 pH 범위는 약 5.0 내지 약 8.0, 더욱 바람직하게, 약 5.5 내지 약 7.0, 가장 바람직하게, 약 5.5 내지 약 6.5, 또는 이들 범위 내에 포함되어 있는 임의의 값이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, PDGF 조성물의 pH는 약 4.0 내지 약 7.0이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, PDGF 조성물의 pH는 약 5.0 내지 약 7.0이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, PDGF 조성물의 pH는 약 4.0, 약 5.0, 약 6.0, 또는 약 7.0이다. 일부 실시양태에서, PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물의 pH는 PDGF 또는 임의의 다른 원하는 생물학상 활성인 물질의 지속적인 안정성 및 효능에 적합한 것일 수 있다. PDGF는 일반적으로 산성 환경에서 안정성이 더 크다. 따라서, 일부 실시양태에 따라, 본원에서는 PDGF 조성물의 산성 저장 제형을 제공한다. 일부 실시양태에 따라, PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물의 pH는 바람직하게 약 3.0 내지 약 7.0, 및 더욱 바람직하게, 약 4.0 내지 약 6.5이다. 그러나, PDGF의 생물학적 활성은 중성 pH 범위를 가지는 용액 중에서 최적화될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에서는 PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물의 중성 pH 제형을 제공한다. 상기 실시양태에 따라, 조성물의 pH는 바람직

하게 약 5.0 내지 약 8.0, 더욱 바람직하게, 약 5.5 내지 약 7.0, 가장 바람직하게, 약 5.5 내지 약 6.5이다.

[0054] 일부 실시양태에서, PDGF를 포함하는 용액의 pH는 본원에서 인용된 완충제에 의해 조절될 수 있다. 다양한 단백질은 상이한 pH 범위에서 각각 안정하다는 것이 입증되어 있다. 단백질 안정성은 주로 단백질 상의 등전점 및 전하에 의해 반영된다. pH 범위는 단백질의 입체형태적 구조, 및 단백질의 구조 및/또는 생물학적 활성의 변형을 가져올 수 있는 단백질 분해, 가수분해, 산화 및 다른 프로세스에 대한 단백질의 감수성에 영향을 미칠 수 있다.

[0055] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 PDGF 조성물은 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD, 및 PDGF-AB로 이루어진 군으로부터 선택되는 PDGF, 및 PBS, 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄, HEPES, MOPS, MES, ADA, PIPES, 및 ACES로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 PBS, 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄, HEPES, MOPS, MES, ADA, PIPES, 및 ACES로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 PBS를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 아세트산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 아세트산암모늄을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 아세트산을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 시트르산을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 시트르산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 트리스(히드록시메틸)아미노에탄을 포함한다. 일부 실시양태에서, rhPDGF 조성물은 PDGF-BB 및 HEPES를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 MOPS를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 MES를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 ADA를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 PIPES를 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 rhPDGF-BB 및 ACES를 포함한다.

[0056] 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 1 mM 내지 1,000 mM이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 10 mM 내지 1,000 mM이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 100 mM 내지 1,000 mM이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 5 mM 내지 500 mM이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 50 mM 내지 500 mM이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 10 mM 내지 100 mM이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 20 mM 내지 200 mM이다. 본원에 기술된 일부 실시양태에서, 완충제의 농도는 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM 또는 100 mM이다.

[0057] 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 약 pH=6.0의 rhPDGF-AA 및 20 mM 아세트산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 약 pH=6.0의 rhPDGF-AB 및 20 mM 아세트산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 약 pH=6.0의 rhPDGF-BB 및 20 mM 아세트산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 약 pH=6.0의 rhPDGF-CC 및 20 mM 아세트산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 약 pH=6.0의 rhPDGF-DD 및 20 mM 아세트산나트륨을 포함한다

[0058] ***용량 및 투여 요법***

[0059] 래트 건 모델에서 확인된 PDGF의 유효량은 건 치료 부위의 상대적인 크기에 기초하여 다른 개체, 예를 들어, 인간에 대한 유효량으로 외삽할 수 있다. 예를 들어, 인간 아킬레스 건의 치료 부위는 래트 아킬레스 건의 치료 부위보다 대략 69배 더 크며, 따라서, 인간 환자에 대한 PDGF의 유효량 또는 유효 용량은 래트 건 모델에서 결정된 PDGF의 유효량 또는 유효 용량의 대략 69배일 수 있다.

[0060] 본원에서 제공하는 PDGF 조성물의 투여에 의해 전달되는 예시적인 유효량 또는 유효 용량으로는 예를 들어, 용량당 약 1 μg 내지 약 7,500 μg, 용량당 약 1 μg 내지 약 5,000 μg, 용량당 약 1 μg 내지 약 2,500 μg, 용량당 약 1 μg 내지 약 1,000 μg, 용량당 약 1 μg 내지 약 500 μg, 용량당 약 1 μg 내지 약 250 μg, 용량당 약 1 μg 내지 약 100 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 10,000 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 7,500 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 5,000 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 2,500 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 1,000 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 500 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 250 μg, 용량당 약 10 μg 내지 약 100 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 10,000 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 7,500 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 5,000 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 2,500 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 1,000 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 500 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 250 μg, 용량당 약 25 μg 내지 약 100 μg, 용량당 약 50 μg 내지 약 10,000 μg, 용량당 약 50 μg 내지 약 7,500 μg, 용량당 약 50 μg 내지 약 5,000 μg, 용량당 약 50 μg 내지 약 2,500 μg, 용량당 약 50 μg 내지 약 1,000

㎍, 용량당 약 50 ㎍ 내지 약 500 ㎍, 용량당 약 50 ㎍ 내지 약 250 ㎍, 용량당 약 50 ㎍ 내지 약 100 ㎍, 용량당 약 50 ㎍ 내지 약 100 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 10,000 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 5,000 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 2,500 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 500 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 250 ㎍, 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 125 ㎍, 용량당 약 100 ㎍ 내지 약 200 ㎍, 용량당 약 200 ㎍ 내지 약 300 ㎍, 용량당 약 300 ㎍ 내지 약 500 ㎍, 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍, 용량당 약 1,000 ㎍ 내지 약 2,500 ㎍, 용량당 약 1,000 ㎍ 내지 약 5,000 ㎍, 용량당 약 1,000 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍, 용량당 약 1,000 ㎍ 내지 약 10,000 ㎍, 용량당 약 2,500 ㎍ 내지 약 5,000 ㎍, 용량당 약 2,500 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍, 용량당 약 5,000 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍, 용량당 약 10,000 ㎍ 내지 약 50,000 ㎍, 용량당 약 50,000 ㎍ 내지 약 100,000 ㎍, 용량당 약 100,000 ㎍ 내지 약 200,000 ㎍, 용량당 약 200,000 ㎍ 내지 약 300,000 ㎍, 용량당 약 300,000 ㎍ 내지 약 400,000 ㎍, 또는 용량당 약 400,000 ㎍ 내지 약 500,000 ㎍ 중 어느 것을 비롯한, 용량당 약 1 ㎍ 내지 약 10,000 ㎍, 용량당 약 450 ㎍ 내지 약 3,000 ㎍을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0061] 일부 실시양태에서, PDGF는 용량당 약 400 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍, 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 900 ㎍, 용량당 약 600 ㎍ 내지 약 800 ㎍, 약 650 ㎍ 내지 약 750 ㎍, 용량당 약 700 ㎍으로 투여된다.

[0062] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 용량은 50 ㎕, 100 ㎕, 150 ㎕, 200 ㎕, 250 ㎕, 300 ㎕, 350 ㎕, 400 ㎕, 450 ㎕, 500 ㎕, 550 ㎕, 600 ㎕, 650 ㎕, 700 ㎕, 750 ㎕, 800 ㎕, 850 ㎕, 900 ㎕, 950 ㎕, 1,000 ㎕ 또는 그 초과의 부피로 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 용량은 100 ㎕, 200 ㎕, 300 ㎕, 400 ㎕, 500 ㎕, 600 ㎕, 700 ㎕, 800 ㎕, 900 ㎕, 1,000 ㎕, 1,100 ㎕, 1,200 ㎕, 1,300 ㎕, 1,400 ㎕, 1,500 ㎕, 1,600 ㎕, 1,700 ㎕, 1,800 ㎕, 1,900 ㎕, 2,000 ㎕ 또는 그 초과의 부피로 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 용량은 약 1,000 ㎕ 내지 약 2,000 ㎕, 약 1,250 ㎕ 내지 약 1,750 ㎕, 약 1,300 ㎕ 내지 약 1,600 ㎕, 또는 약 1,500 ㎕인 부피로 투여된다.

[0063] 본원에서 제공하는 PDGF 조성물은 단일 1일 용량으로 투여될 수 있거나, 총 1일 용량은 예를 들어, 1일 2, 3, 또는 4회에 걸쳐 투여되는 분할된 투여량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 PDGF 조성물의 단일 1일 용량은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 초과일 동안 1일 1회에 걸쳐 투여될 수 있다. PDGF 조성물은 또한 매일보다는 덜 빈번하게, 예를 들어, 주당 6회, 주당 5회, 주당 4회, 주당 3회, 주당 2회, 주당 1회, 매 2주마다 1회씩, 매 3주마다 1회씩, 월 1회, 매 2개월마다 1회씩, 매 3개월마다 1회씩, 매 4개월마다 1회씩, 매 5개월마다 1회씩, 또는 매 6개월마다 1회씩 투여될 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 일정 기간에 걸쳐 시간 간격을 두고 투여된다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 또는 그 초과의 기간 동안 주 1회로 투여된다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 또는 그 초과의 기간 동안 월 2회로 투여된다. 일부 실시양태에서, PDGF 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 또는 그 초과의 기간 동안 매월 투여된다.

[0065] ***건 질환 치료 방법***

[0066] 본원에서 사용되는 바, "건 질환"이라는 용어는 만성 건 손상, 예를 들어, 건병증, 건염, 및 건활막염을 의미한다. 예시적인 건 질환으로는 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염, 또는 "테니스 엘보," 내측 상과염, 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0067] 본원에서 사용되는 바, "건병증"이라는 용어는 보통은 과용으로 인해 유발되는 건내 및 건 주변 조직의 미소인열 형태인 건의 건내 변성으로서, 이로 인해 손상 부위 주변의 건 수복 세포의 개수가 증가하는 것을 특징으로 하는, 건에 대한 비염증성 손상을 의미한다. 건의 변성은 건의 콜라겐 섬유, 세포, 및 혈관 성분에 대한 손상, 또는 그의 해체로 인해 유발되며, 이는 건의 인장 강도를 감소시킬 수 있고, 치료하지 않으면, 건 파열을 일으킬 수 있다. 일부 경우에, 건병증은 건의 국소 괴사 또는 석회화를 동반한다.

[0068] 본원에서 사용되는 바, "건염"이라는 용어는 건병증에서 관찰되는 것과 같은 변성을 특징으로 하지만, 건의 염증, 혈관 파괴 및 염증성 수복 반응도 동반하는 것인, 건에 대한 염증성 손상을 의미한다. 건염은 흔히 섬유모세포 및 근섬유모세포 증식 뿐만 아니라, 출혈 및 육아 조직 조직화와 관련이 있다. 일반적으로, 예를 들어, 외측 상과염 ("테니스 엘보"로서도 공지되어 있는 것으로서, 단요측 수근 신근 건을 이환시킨 것)과 같이, 특정한 예외가 존재하기도 하지만, 건염은 예를 들어, 아킬레스 건염 (아킬레스 건을 이환시킨 것), 또는 슬개건염 ("점퍼의 무릎"으로서도 공지되어 있는 것으로서, 슬개건을 이환시킨 것)과 같이, 연루되어 있는 신체 일부에 의해 지칭된다.

[0069] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 건 질환으로는 인간 또는 포유동물 신체 중 임의 건에서의 건 질환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건병증이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건염이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 건활막염이다.

[0070] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 건으로는 인간 또는 포유동물 신체 중 임의 건을 포함한다. 건의 비제한적인 일례로는 슬개건, 전경골근 건, 아킬레스 건, 슬건, 반건양근 건, 박근 건, 외전근 건, 내전근 건, 극상근 건, 극하근 건, 견갑하근 건, 소원근 건, 굴근 건, 대퇴직근 건, 후경골근 건, 및 대퇴사두근 건을 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 건은 발 또는 발목의 건이다. 일부 실시양태에서, 발 또는 발목의 건은 장모지신근, 장모지굴근, 장지신근, 단지신근, 장비골근, 단비골근, 단무지굴근, 장지굴근, 후경골근, 아킬레스 건, 및 족저 근막의 건으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0072] 일부 실시양태에서, 건은 다리의 건이다. 일부 실시양태에서, 다리의 건은 슬개건, 전경골근 건, 아킬레스 건, 슬건, 반건양근 건, 박근 건, 외전근 건, 및 내전근 건으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건은 굴근 건, 대퇴직근 건, 후경골근 건, 및 대퇴사두근 건으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0073] 일부 실시양태에서, 건은 어깨의 건이다. 일부 실시양태에서, 어깨의 건은 극상근 건, 극하근 건, 견갑하근 건, 및 소원근 건 (회전근개 복합체)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0074] 일부 실시양태에서, 건은 팔꿈치의 건이다. 일부 실시양태에서, 팔꿈치의 건은 이두근 건, 삼두근 건, 단요측 수근 신근, 공통 신근 건, 지신근, 소지신근, 척측 수근 신근, 회외근, 공통 굴근 건, 원회내근, 요측 수근 굴근, 장장근, 척측 수근 굴근 및 표재지근으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건은 손목의 건이다. 일부 실시양태에서, 손목의 건은 이두근 건, 삼두근 건, 단요측 수근 신근, 공통 신근 건, 지신근, 소지신근, 척측 수근 신근, 회외근, 공통 굴근 건, 원회내근, 요측 수근 굴근, 장장근, 척측 수근 굴근, 표재지근, 단모지굴근, 장모지굴근, 단모지 외전근, 장모지 외전근, 심지굴근, 표재지굴근, 단모지 신근, 및 장모지 신근으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건은 손의 건이다. 일부 실시양태에서, 손의 건은 단모지굴근, 장모지굴근, 단모지 외전근, 장모지 외전근, 심지굴근, 표재지굴근, 단모지 신근, 및 장모지 신근으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 일부 실시양태에서, 건 질환은 회전근개 건 질환이다. 일부 실시양태에서, 회전근개 건 질환은 극상근 건 질환, 극하근 건 질환, 견갑하근 건 질환, 및 소원근 건 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0076] 일부 실시양태에서, 건 질환은 상완골 외과 삽입부의 신근 근육군 기점의, 주로 단요측 수근 신근 (ECRB) 건에서의 외측 상과염 또는 "테니스 엘보"이다. 일부 실시양태에서, 시각적 상사 척도 (VAS: Visual Analog Score)가 50인 것으로 기록된 동통에 의해 입증되는 바, 외측 상과염을 앓는 대상체는 (예를 들어, 적어도 약 6개월 동안은) 관련된 동통을 느낀다. 일부 실시양태에서, 외측 상과염을 앓는 대상체는 예를 들어, 적어도 약 6개월 동안은 외측 상과에 가해지는 압력 및/또는 손목의 저항 신전이 증가함에 따라 증가하는, 관련된 동통을 느낀다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 내측 상완골과의 원회내근과 요측 수근 굴근 기점 사이의 경계면에서의 내측 상과염 또는 "골퍼스 엘보"이다.

[0077] 일부 실시양태에서, 건 질환은 슬개건 질환이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 아킬레스 건 질환이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 족저 근막염이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 내측 족저 근막염이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 외측 족저 근막염이다.

[0078] 또 다른 측면에서, 본원에서는 PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물의 유효량을 환부에 투여하는 단계를 포함하는, 건 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, 및 PDGF-DD로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDGF는 PDGF-BB이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 75 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 500 ㎍ 내지 약 1,000 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 450 ㎍ 내지 약 3,000 ㎍의 PDGF를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물의 유효량은 용량당 약 5,000 ㎍ 내지 약 7,500 ㎍의 PDGF-BB를 포함한다.

[0079] 일부 실시양태에서, 완충제는 포스페이트-완충 염수 ("PBS"), 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄 ("트리스"), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산 ("HEPES"), 3-(N-모르폴리노) 프로판술폰산 ("MOPS"), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 ("MES"), N-(2-아세트아

미도)이미노디아세트산 ("ADA"), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) ("PIPES"), 및 N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 ("ACES")으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 완충제는 아세트산나트륨이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 10 mM 내지 약 100 mM이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 20 mM이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 pH는 약 4.0 내지 약 7.0이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 pH는 약 pH 6이다.

[0080] 일부 실시양태에서, 투여는 환부에의 직접 주사에 의해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 직접 주사는 초음파 유도를 사용하거나, 사용하지 않고서 "페퍼링 기법(peppering technique)"을 사용함으로써 수행된다. "페퍼링 기법"이란 바늘을 연한 부위에 삽입한 후, 피부로부터 드러내지 않고서 바늘을 빼고, 재지정하고, 재삽입함으로써 다회에 걸쳐 소량 주사를 실시하는 주사 방법이다.

[0081] 일부 실시양태에서, 환부는 골-건 접합부이다. 일부 실시양태에서, 환부는 건이다. 일부 실시양태에서, 건 질환은 아킬레스 건 질환, 슬개건 질환, 외측 상과염, 내측 상과염, 족저 근막염, 및 회전근개 건 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 4주 동안 주 1회로 단일 주사에 의해 투여된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 건 질환은 건병증이다. 일부 실시양태에서, 건병증은 장모지신근 건병증, 장모지굴근 건병증, 장지신근 건병증, 단지신근 건병증, 장비골근 건병증, 단비골근 건병증, 단무지굴근 건병증, 장지굴근 건병증, 후경골근 건병증, 아킬레스 건 건병증, 및 족저 근막 건병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건병증은 슬개건병증, 전경골근 건병증, 슬건병증, 반건양근 건병증, 박근 건병증, 외전근 건병증, 및 내전근 건병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건병증은 굴근 건병증, 대퇴직근 건병증, 후경골근 건병증, 및 대퇴사두근 건병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건병증은 극상근 건병증, 극하근 건병증, 견갑하근 건병증, 및 소원근 건병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0083] 일부 실시양태에서, 건병증은 이두근 건병증, 삼두근 건병증, 단요측 수근 신근 건병증, 공통 신근 건병증, 지신근 건병증, 소지신근 건병증, 척측 수근 신근 건병증, 회외근 건병증, 공통 굴근 건병증, 원회내근 건병증, 요측 수근 굴근 건병증, 장장근 건병증, 척측 수근 굴근 건병증 및 표재지근 건병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건병증은 이두근 건병증, 삼두근 건병증, 단요측 수근 신근 건병증, 공통 신근 건병증, 지신근 건병증, 소지신근 건병증, 척측 수근 신근 건병증, 회외근 건병증, 공통 굴근 건병증, 원회내근 건병증, 요측 수근 굴근 건병증, 장장근 건병증, 척측 수근 굴근 건병증, 표재지근 건병증, 단모지굴근 건병증, 장모지굴근 건병증, 단모지 외전근 건병증, 장모지 외전근 건병증, 심지굴근 건병증, 표재지굴근 건병증, 단모지 신근 건병증, 및 장모지 신근 건병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건병증은 단모지굴근 건병증, 장모지굴근 건병증, 단모지 외전근 건병증, 장모지 외전근 건병증, 심지굴근 건병증, 표재지굴근 건병증, 단모지 신근 건병증, 및 장모지 신근 건병증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0084] 일부 실시양태에서, 건 질환은 건염이다. 일부 실시양태에서, 건염은 장모지신근 건염, 장모지굴근 건염, 장지신근 건염, 단지신근 건염, 장비골근 건염, 단비골근 건염, 단무지굴근 건염, 장지굴근 건염, 후경골근 건염, 아킬레스 건 건염, 및 족저 근막 건염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건염은 슬개건염, 전경골근 건염, 슬건염, 반건양근 건염, 박근 건염, 외전근 건염, 및 내전근 건염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건염은 굴근 건염, 대퇴직근 건염, 후경골근 건염, 및 대퇴사두근 건염은 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건염은 극상근 건염, 극하근 건염, 견갑하근 건염, 및 소원근 건염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0085] 일부 실시양태에서, 건염은 이두근 건염, 삼두근 건염, 단요측 수근 신근 건염, 공통 신근 건염, 지신근 건염, 소지신근 건염, 척측 수근 신근 건염, 회외근 건염, 공통 굴근 건염, 원회내근 건염, 요측 수근 굴근 건염, 장장근 건염, 척측 수근 굴근 건염 및 표재지근 건염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건염은 이두근 건염, 삼두근 건염, 단요측 수근 신근 건염, 공통 신근 건염, 지신근 건염, 소지신근 건염, 척측 수근 신근 건염, 회외근 건염, 공통 굴근 건염, 원회내근 건염, 요측 수근 굴근 건염, 장장근 건염, 척측 수근 굴근 건염, 표재지근 건염, 단모지굴근 건염, 장모지굴근 건염, 단모지 외전근 건염, 장모지 외전근 건염, 심지굴근 건염, 표재지굴근 건염, 단모지 신근 건염, 및 장모지 신근 건염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건염은 단모지굴근 건염, 장모지굴근 건염, 단모지 외전근 건염, 장모지 외전근 건염, 심지굴근 건염, 표재지굴근 건염, 단모지 신근 건염, 및 장모지 신근 건염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0086] 본 발명의 방법을 통해 하기: 이환된 관절 또는 사지의 동통 감소, 이환된 관절 또는 사지의 경직 감소, 이환된 관절 또는 사지의 운동성 증가, 이환된 관절 또는 사지의 감도 증가, 건 질환 진행 속도 감소, 염증 감소, 건

강도 증가, 또는 건 강도 회복 속도 개선 중 하나 이상이 개선될 수 있다. 치료의 유효성을 측정하는 각종 방법으로는 팔, 어깨 및 손 기능장애 점수 (DASH: Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand Score), 시각적 상사 척도 (VAS), 및 악력 검사를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 치료하면 DASH 점수는 치료 전 점수에 비하여 25% 이상 감소하게 된다. 일부 실시양태에서, 치료하면 VAS 점수는 치료 전 점수에 비하여 25% 이상 감소하게 된다. 일부 실시양태에서, 치료하면 가해지는 압력 및/또는 관절 굴곡에 대한 동통이 감소하게 된다. 일부 실시양태에서, 치료하면 가해지는 압력 및/또는 관절 굴곡에 대한 동통이 감소하게 되고, 관절 운동성은 증가하게 된다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해서 어떤 비정상적인 골 성장도 일어나지 않는다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해서 어떤 비정상적인 건 성장도 일어나지 않는다. 일부 실시양태에서, 치료는 안전한 것이고, 대상체에 의해 용인되는 것이다. 일부 실시양태에서, 조성물의 안전성 및 내약성은 유해 사례가 없는 것을 통해 평가되거나, 이상은 하기: 신체 검사, 활력 징후 측정, 실험실 검사, x선, 및/또는 MRI 촬영 중 하나 이상을 통해 확인된다.

[0087] 일부 실시양태에서, 치료에 의해 건 강도가 증가하게 된다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해 건 강도 회복 속도가 더욱 빨라진다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해 건 강도가 본 발명의 조성물 투여 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 21일 이내에 기준선과 비교하여 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해 건 강도가 본 발명의 조성물 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 투여 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해 건 강도가 본 발명의 조성물 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 60% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해 건 강도가 본 발명의 조성물 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 65% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 치료에 의해 건 강도가 본 발명의 조성물 투여 약 7일 이내에 기준선과 비교하여 약 70% 이상 증가한다. 일부 실시양태에서, 건은 본 발명의 조성물 투여 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 이내에 그의 최종 강도의 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 치료 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 건은 본 발명의 조성물 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 80% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 치료 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 건은 본 발명의 조성물 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 85% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 치료 후 약 21일째에 측정된다. 일부 실시양태에서, 건은 본 발명의 조성물 투여 약 7일 이내에 그의 최종 강도의 약 90% 이상에 도달하는데, 여기서, 최종 강도는 치료 후 약 21일째에 측정된다. 건 강도는 동물 모델, 예를 들어, 래트 콜라게나제 모델에서 측정될 수 있으며, 여기서, 건 강도는 파열 하중 측정치이다. 건 강도 측정의 예는 실시예 3에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0088] ***키트***

[0089] 또 다른 측면에서, 본원에서는 PDGF 및 완충제를 포함하는 조성물을 함유하는 용기를 포함하는 키트가 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 동결건조된 PDGF를 함유하는 제1 용기, 및 동결건조된 PDGF를 가용화시키기 위한 완충제를 함유하는 제2 용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 동결건조된 PDGF 및 완충제를 함유하는 제1 용기, 및 동결건조된 PDGF를 가용화시키기 위한 물 및 완충제를 함유하는 제2 용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 포스페이트-완충 염수 ("PBS"), 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 아세트산, 시트르산, 시트르산나트륨, 트리스(히드록시메틸)아미노에탄 ("트리스"), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산 ("HEPES"), 3-(N-모르폴리노) 프로판술폰산 ("MOPS"), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 ("MES"), N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산 ("ADA"), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산) ("PIPES"), 및 N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 ("ACES")으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 완충제는 아세트산나트륨이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 10 mM 내지 약 100 mM이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 농도는 약 20 mM이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 pH는 약 4.0 내지 약 7.0이다. 일부 실시양태에서, 아세트산나트륨의 pH는 약 6이다.

[0090] 일부 실시양태에서, 키트는 추가로 다른 완충제, 희석제, 충전제, 바늘, 시린지, 및 사용 설명서가 포함된 패키지 인서트를 비롯한, 상업적, 치료상의, 및 사용자 중심의 관점으로부터 바람직할 수 있는 다른 물질을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "패키지 인서트"라는 용어는 적응증, 용량, 투여량, 투여, 금기 사항, 패키지된 제품과 조합되는 다른 의약에 관한 정보, 및/또는 상기 의약 사용에 관한 경고를 포함하는, 시판용 의약 패키지에 통상 포함되는 설명서를 의미한다.

[0091] ***봉합사***

[0092] PDGF로 코팅된 봉합사, 및 상기 봉합사를 제조하는 방법 또한 제공한다. 봉합사는 예를 들어, 개체의 건 치료에 (예를 들어, 건 인열 치료에) 사용될 수 있다. 적합한 봉합사로는 예를 들어, 락티드 및 글리콜리드의 공중합체로 제조된 것 (예를 들어, 바이크릴 봉합사(예를 들어, 4-0 바이크릴 봉합사))을 포함한다. 적합한 코팅 방법으로는 예를 들어, 딥 코팅 방법을 포함하며, 그 예로는 문헌 [Dines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder Elbow Surg 2007;16:215S-221S]에 기술되어 있는 딥 코팅 방법을 포함하는데, 이는 임의로 젤라틴 제거를 위해 변경될 수 있다. 본 출원인들은 놀랍게도 젤라틴 부재하에서도 고용량의 PDGF가 특정 유형의 봉합사 상에 코팅될 수 있다는 것을 발견하게 되었다. 일부 실시양태에서, 봉합사는 젤라틴을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 봉합사 코팅물은 젤라틴을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 봉합사 코팅물은 폴리락트산, 폴리글리콜산, 또는 폴리(락트산-코-글리콜산)을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 봉합사 코팅 방법은 젤라틴 사용을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 봉합사 코팅물은 본질적으로 PDGF로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 봉합사 코팅물은 PDGF 및 완충제로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 봉합사 코팅물은 PDGF로 이루어진다. 봉합사는 개체, 예를 들어, 포유동물을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 봉합사를 사용하여 치료될 수 있는 포유동물의 비제한적인 예로는 인간, 애완 동물 (예를 들어, 개, 고양이, 토끼, 햄스터 등), 실험실용 동물 (예를 들어, 마우스, 래트), 농장 동물 (예를 들어, 말, 소, 양, 염소 등)을 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 10 ng 이상이다. 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 100 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 1,000 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 5,000 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 6,000 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 10 내지 약 20,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 100 내지 약 10,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 500 내지 약 8,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 1,000 내지 약 8,000 ng PDGF이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 약 4,000 내지 약 8,000 ng PDGF이다. 일부 실시양태에서, 봉합사 상의 PDGF 적재량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 6,000 내지 약 7,000 ng PDGF이다.

[0094] 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 10 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 100 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 1,000 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 5,000 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 6,000 ng 이상이다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 10 내지 약 20,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 100 내지 약 10,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 500 내지 약 8,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 1,000 내지 약 8,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 4,000 내지 약 8,000 ng이다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 측정된, 48시간 동안에 걸친 봉합사로부터의 PDGF의 누적 방출량은 봉합사 1 cm당 PDGF 약 6,000 내지 약 7,000 ng이다. PDGF의 시험관내 누적 방출량을 측정하는 적합한 방법은 예를 들어, 실시예 7에 기술된 방법을 포함한다. 이롭게는, 본 발명의 코팅된 봉합사를 통해 생체내에서 일관되게 투여할 수 있다.

[0095] 하기 실시예는 단지 예시적인 목적만을 위해 제공되는 것이며, 어느 방식으로든 본 발명의 범주를 제공하고자 하지 않는다.

[0096] **실시예**

[0097] **실시예 1: 정상 및 이환된 1차 인간 건 세포는 rhPDGF-BB에 대한 반응으로 증식한다.**

[0098] 본 연구를 통해 rhPDGF-BB가 건 질환 환자로부터 유래된 1차 건 세포의 증식 및/또는 화학주성을 직접적으로 활

성화시켰는지 여부를 측정하였다. 그러한 관찰 결과는 건 질환에서 rhPDGF-BB가 치료학상의 잠재능을 지니고 있다는 개념을 지지할 수 있다.

[0099] 환자 및 방법

[0100] *환자*

[0101] 건 질환 환자 10명이 본 연구에 포함되었는데, 5명은 아킬레스 건 질환 환자이고, 5명은 후경골근 건 (PTT)의 건 질환 환자였다. 완전한 무릎 관절 대체술을 받은 추가 환자 5명도 포함되었다.

[0102] *건 세포의 1차 배양물*

[0103] 다른 경우라면 폐기했을 건 조직을 임상 징후에 대해 수행된 재건 외과적 수술동안 정상 및 손상된 건으로부터 수득하였다. 이들 조직은 아킬레스 건 또는 PTT 건의 건 질환 부위 뿐만 아니라, 장지굴근 (FDL) 건 조직, 아킬레스 건 조직, 및 슬개건 조직의 건강한 (비-건 질환) 부위도 포함하였다. 상기 조직으로부터 1차 건 세포 체외이식편 배양물을 수득하고, 3 내지 5 계대에서 시험하였다. 특이적인 프라이머를 사용하는 실시간 PCR 검정으로 건 세포-특이 유전자 스클레락시스(scleraxis) 및 콜라겐 α1(I), α2(I), 및 α1(III)에 대한 유전자의 발현을 평가함으로써 건 세포 아이덴티티를 확인하였다.

[0104] *세포 증식*

[0105] 건 세포 단일층을 트립신으로 처리하고, 0.5%의 투석시킨 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM/F12 배지 중에 재현탁시키고, 밤새 부착시킨 후, 적정된 농도의 rhPDGF-BB와 함께 24 h 동안 인큐베이션시켰다. 상업적으로 이용가능한 검정(로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science: 미국 인디애나주 인디애나폴리스))을 이용하여 세포에서 DNA 합성 동안 BrdU 혼입에 기초하여 세포 증식률 변화를 평가하였다. 각각의 배양물을 각 용량의 rhPDGF-BB에 대해 3중으로 시험하였다.

[0106] *세포 이동*

[0107] 건 세포 단일층을 트립신으로 처리하고, 0.5%의 투석시킨 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM/F12 배지 중 재현탁시키고, 96-웰 ChemoTx® 일회용 세포 이동 시스템 (뉴로 프로브(Neuro Probe: 미국 매릴랜드주 게이터스버그))의 상부 챔버에 넣었다. 하부 챔버는 적정된 농도의 rhPDGF-BB를 함유하였다. 건 세포가 48 h 동안 챔버를 나누는 막을 가로질러 이동할 수 있도록 하였다. 이어서, 96-웰 플레이트를 원심분리하고, 이동된 세포를 용해시키기 위해 3회에 걸쳐 동결 해동시켰다. 생육가능한 이동된 세포의 양은 상업적으로 이용가능한 키트 (프로메가(Promega: 미국 위스콘신주 메디슨))를 이용하여 세포질 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 기초하여 측정하였다.

[0108] *통계학적 분석*

[0109] 일원 ANOVA를 이용하여, rhPDGF-BB를 사용한 자극이 용량-의존 방식으로 건 세포 증식에 영향을 미치는지 여부를 측정하였다.

[0110] 결과

[0111] 대조군 폐 섬유모세포 배양물 또는 대조군 1차 T 림프구 배양물을 제외한, 오직 건 세포 배양물만이 스클레락시스 mRNA를 발현한 반면, 림프구를 제외한 건 세포 및 섬유모세포는 콜라겐 유전자 mRNA를 발현하였다.

[0112] 모든 경우에, 질환 진행 과정에 포함되거나 포함되지 않는 건 조직으로부터의 건 세포는 BrdU 혼입을 가속화함으로써 rhPDGF-BB 자극에 대해 반응하였다 ($p<0.05$, 일원 ANOVA). 반응은 용량 의존적이었고, 10, 50 및 150 ng/mL의 rhPDGF-BB에서 관찰되었다. 비록 모든 세포 배양물이 rhPDGF-BB 자극에 대해 반응하기는 하였지만, rhPDGF-BB 자극 후 BrdU 혼입 정도에 있어서 환자들 간에 유의적인 변동성이 존재하였다. BrdU의 혼입은 자극을 받지 않은 대조군 배양물에 비해 최소 2.1±0.2배 내지 최대 10.7±0.5배 증가하였다. 환자 5명으로부터 얻은 건 세포는 역설적으로 반응하였는데, 여기서, BrdU 혼입은 보다 고농도 (50 및 150 ng/mL)의 rhPDGF-BB에서 보다 보다 저농도 (10 ng/mL)의 rhPDGF-BB에서 더 크게 증가하였다. 그러한 역설적인 반응은 이들 환자의 건 질환 조직 및 정상 조직, 둘 모두로부터 유래된 건 세포에서 관찰되었다. rhPDGF-BB 자극에 대한 반응으로 환자 4명의 건강한 건으로부터 유래된 건 세포는 이환 조직으로부터 유래된 건 세포보다 2배 더 많은 BrdU를 혼입하였다. 1명의 환자에서, rhPDGF 자극에 대한 반응으로 이환 조직으로부터의 건 세포는 질환 진행 과정에 포함되지 않은 조직으로부터의 건 세포보다 4배 더 많은 BrdU를 혼입하였다. 도 2는 건강한 건 세포 및 이환된 건 세포의, 1일째, 4일째, 및 8일째 배양 배지에 첨가된 0, 10, 50, 및 150 ng/ml의 PDGF에 대한 BrdU 혼입

(y-축, 흡광도)을 보여주는 것이다. 흡광도 증가가 증식 증가에 부합하는데, 1일째에는 건강한 건 세포 및 이환된 건 세포, 둘 모두가 PDGF에 대해 반응하였다.

[0113] 모든 경우에, 건 세포는 50 ng/mL 및 150 ng/mL에서 rhPDGF-BB에 대해 화학주성적 반응성을 띠었다. 파일럿 실험에서는 반응이 낮기 때문에 건 세포를 화학주성 실험에 대해서는 10 ng/mL rhPDGF-BB에 노출하지 않았다. 다시, 반응은 용량 의존적이었고, 여기서, 50 ng/mL의 rhPDGF-BB에 대한 것보다 150 ng/mL에 대한 화학주성이 더 컸다. 그러나, 환자 5명으로부터 얻은 건 세포는 150 ng/mL의 rhPDGF-BB에 대한 것보다 50 ng/mL에 대해 보다 큰 화학주성으로 반응하였고, 여기서, 이동 세포수는 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$, 양측 스튜던트 t-검정). rhPDGF-BB에 대한 최대 화학주성 반응에 있어서 환자들 간에 변동성이 존재하였으며, 자극을 받지 않은 대조군에 비해 1.4±0.1 내지 4.0±0.5배 증가가 존재하였다. 건 질환으로부터 또는 건강한 건 조직으로부터 유래된 매칭시킨 건 세포 배양물 내에서는 rhPDGF-BB에 대한 건 세포 화학주성에 있어서 통계학상 유의적인 차이는 없었다 ($p>0.05$). 도 1은 0, 50, 또는 150 ng/ml 농도의 PDGF에서 배양된 세포의 화학주성을 보여주는 것이다 (y-축은 최적 밀도 증가를 나타낸다). 초기 세포 1,250, 2,500, 5,000, 및 10,000개를 이용하여 이동을 평가하였다.

[0114] 결론

[0115] 본 실험의 결과는 건강한 조직 및 건 질환 조직으로부터 유래된 건 세포가 증식 및 화학주성 속도를 증가시킴으로써 rhPDGF-BB에 대해 반응한다는 것을 제안한다. 일부 환자로부터의 건 세포는 PDGF에 대해 역설적인 반응을 보였는데, 여기서는 보다 고용량이 보다 저용량보다 더 적은 효과를 일으켰다는 점이 중요하다. 동등하게 중요한 것은 일부 경우에 있어서 이환된 건으로부터의 건 세포가 건강한 건으로부터의 건 세포에 비해 PDGF에 대해 차별적인 반응성을 띠었다는 것인데, 이는 적절한 투여가 임상 상황에서 가장 중요할 수 있음을 시사한다.

[0116] **실시예 2: rhPDGF-BB를 사용한 안전성 연구**

[0117] *국소 주사 시험.*

[0118] 본 연구의 목적은 rhPDGF-BB를 아킬레스 건내로 래트에게 전달한 후, 그의 국소 독성을 측정하는 것이었다. 아킬레스 건내 투여는 외측 상과염 치료를 위해 병원에서 수행되는 rhPDGF-BB 투여 경로를 모방한 것이다. 아킬레스 건-종골 접합부에서의 주사 부위는 단요측 수근 신근 건 및 외측 상과 골의 삽입부를 모방한 것이다.

[0119] 본 연구에서는 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 래트를 사용하였다. 연구 기간 동안 동물을 같은 실험실 시설에서 하우징하였다. 모든 하우징 및 축산은 동물 복지법(Animal Welfare Act) 및 "실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)"에 따라 이루어졌다. 표준 프로토콜에 따라 래트에게 먹이와 물을 제공하였다. 연구와 관련된 적절한 사건, 예를 들어, 마취를 위해서는 먹이와 물을 주지 않았다. 연구 이전에 최소 5일 동안 동물을 시설에 순응시켰다. 이러한 순응 기간 동안 동물은 연구실 환경에 익숙해졌다.

[0120] 본 연구에서는 3가지 상이한 농도의 멸균 재조합 인간 PDGF-BB 배취가 사용되었다: (1) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 10.3 mg/ml rhPDGF-BB; (2) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 5.2 mg/ml rhPDGF-BB; 및 (3) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 1.7 mg/ml rhPDGF-BB. 비히클 대조군 샘플은 멸균 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5)이었고, 이는 표준 방법에 따라 제조되었다.

[0121] 시험 품목 및 대조군 품목 취급을 위해 표준 실험실 안전 수칙을 사용하였다. 구체적으로, 용량을 제조하고 투여하는 동안에는 장갑, 얼굴 마스크, 가운 (또는 실험실 가운) 및 눈 보호 장치를 착용하였다.

[0122] 동물을 각 군당 수컷 30마리 및 암컷 30마리로 n=60마리씩 4개의 군으로 무작위화하였다. 각 군에는 하기 화합물: (1) 20 mM 아세트산나트륨; (2) 20 mM 아세트산나트륨 중 51 ㎍의 rhPDGF-BB; (3) 20 mM 아세트산나트륨 중 156 ㎍의 rhPDGF-BB; 또는 (4) 20 mM 아세트산나트륨 중 515 ㎍의 rhPDGF-BB가 사두근 골건 접합부의 건내로 단일 주사되었다. 28.5G 바늘이 장착된 인슐린 시린지를 사용하여 주사하였다. 모든 동물은 1일째에 단일의 아킬레스 건내 주사를 통해 시험 품목을 투여받았다. 1군의 동물은 아세트산나트륨 (NaOAc)을 투여받았고, 2-4군의 동물은 각각 36.69, 112.23, 및 370.50 ㎍/㎟의 용량 수준으로 rhPDGF-BB를 투여받았다.

[0123] rhPDGF-BB 주사 후 1일째, 2주째, 및 6주째에 각 군의 ⅓을 희생시켰다. 생활(in-life) 처리군의 완료시, 동물을 안락사시키고, USDA 동물 복지법, 실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침(문헌 [ILAR publication, 1996, National Academy Press]), 및 HSS 수의학적 수술에 따라 조직을 수거하였다. CO_2를 과량으로 투여하여 동물을 안락사시켰다. 반사 반응 (눈깜박, 움츠림 등)이 없다는 것을 통해 사망하였음을 확인하였다.

[0124] 평가 기준으로는 임상 관찰, 신체 평가, 체중 및 먹이 섭취량 측정, 임상 병리학적 특성, 부검, 기관의 중량, 및 주사된 및 주사되지 않은 뒷다리 발목에 대한 조직병리학적 평가 (건 독성 및 골 독성 검사 포함)를 포함하였다.

[0125] 동물에 대해 혈액학상의 평가, 응집 연구 및 다양한 임상 화학 연구를 수행하였다. 혈액학상의 평가는 하기 측정을 포함하였다: 백혈구 수 (WBC); 적혈구 수 (RBC); 헤모글로빈 (Hb) 측정, 평균 적혈구 혈색소 (MCH) 수준, 헤마토크릿 (HCT), 및 평균 적혈구 Hb 농도 (MCHC); 혈소판 수; 평균 적혈구 용적 (MCV) 측정, 및 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구, 호중구(%), 림프구(%), 단핵구(%), 및 호산구(%)를 비롯한 백혈구 감별 평가. 응집 연구는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 (APTT) 및 프로트롬빈 시간 (PT)을 측정하였다. 임상 화학 연구는 하기: 알칼리성 포스파타제 (ALP), 글루코스 (GLU), 알부민 (ALB), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 총 빌리루빈 (TBIL), 글로불린 (Glob), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 콜레스테롤 (CHOL), 칼륨 (K), 감마 글루타밀트랜스퍼라제 (GGT), 트리글리세리드 (TRIG), 클로라이드 (Cl), 크레아티닌 (CREAT), 혈중 요소 질소 (BUN), 나트륨 (Na), 무기 인 (PHOS), 칼슘 (Ca), A/G 비, 및 총 단백질 (TPROT)을 측정하는 것을 포함하였다.

[0126] 결과

[0127] 36.69 ㎍/㎟, 112.23 ㎍/㎟, 370.50 ㎍/㎟ 용량 수준의 rhPDGF-BB를 아킬레스 건내로 래트에게 단일 주사하였을 때, 사망률 또는 빈사 상태에는 어떤 효과도 없었다. 추가로, 임상 관찰 결과, 체중에 미치는 효과, 또는 먹이 섭취량에 있어서도 시험 품목과 관련된 생물학상의 유의적인 차이는 없었다.

[0128] 2일째, 대조군 (1군)과 비교하여, 치료를 받은 래트로 이루어진 군 중 어느 것에 대해 분석된 혈액학적 특성 또는 요분석 파라미터 중 어느 것에 있어서 통계학상의 또는 생물학상의 유의적인 차이는 없었다. 백혈구 및 응집 파라미터 상에는 변화가 있는 것으로 관찰되었지만, 이러한 변화는 외래 단백질 주사에 대한 최소의 급성 염증성 반응에 부합하는 것이었다. 추가로, 여러 혈청 화학상의 파라미터에서도 또한 최소의 변화가 있는 것으로 관찰되었다. 그러나, 이러한 변화는 개체 동물 간의 차이에 따른 결과로 간주되었고, 생물학상의 유의적인 것으로는 간주되지 않았으며, 어떤 기관 특이 독성과도 관련이 없었다.

[0129] 16일 및 43일째, 대조군 (1군)과 비교하여, 치료를 받은 래트로 이루어진 군 중 어느 것에 대해 분석된 혈액학적 성질, 백혈구, 응집, 또는 요분석 파라미터 중 어느 것에 있어서도 생물학상의 유의적인 차이는 없었다.

[0130] 육안 관찰 결과, 시험 품목과 관련되는 것은 없었으며; 모든 육안 관찰 결과는 부수적으로 따르는 중요하지 않은 것으로 간주되었다.

[0131] 비록 치료를 받은 래트로 이루어진 군에서 그 빈도와 중증도가 더 크게 나타나기는 했지만, 2일째 대조군 및 치료를 받은 래트로 이루어진 군에서 급성 출혈 및 아급성 염증이 관찰되었다. 16일째, 급성 출혈은 진정되었고, 아급성 염증의 빈도는 줄었다. 치료를 받은 래트로 이루어진 군에서는 상기 언급된 건을 이루는 건 세포의 비대증 및 증식증 이외에도 표재 굴근 건 및 종골 건의 건 주위 조직의 섬유증식증 및 신생혈관형성이 나타났다. 43일째까지, 섬유증식증 및 신생혈관형성의 중증도는 호전되었고; 치료를 받은 래트 중 대다수에서 건 세포는 여전히 비대증 및 증식증을 보였다.

[0132] *제2 종 국소 주사 시험*

[0133] 본 연구의 목적은 재조합 인간 혈소판-유래 성장 인자 (rhPDGF-BB)를 개에게 아킬레스 건내로 전달한 후 그의 국소 독성을 측정하고자 하는 것이다.

[0134] 본 연구에서는 비글(Beagle) 개를 사용하였다. 연구 기간 동안 동물을 같은 실험실 시설에서 하우징하였다. 모든 하우징 및 축산은 동물 복지법 및 "실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침"에 따라 이루어졌다. 표준 프로토콜에 따라 개에게 먹이와 물을 제공하였다. 연구와 관련된 적절한 사건, 예를 들어, 마취를 위해서는 먹이와 물을 주지 않았다. 연구 이전에 최소 5일 동안 동물을 시설에 순응시켰다. 이러한 순응 기간 동안 동물은 연구실 환경에 익숙해졌다.

[0135] 본 연구에서는 3가지 상이한 농도의 멸균 재조합 인간 PDGF-BB 배취가 사용되었다: (1) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 10 mg/ml rhPDGF-BB; (2) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 3 mg/ml rhPDGF-BB; 및 (3) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 1 mg/ml rhPDGF-BB. 비히클 대조군 샘플은 멸균 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5)이었고, 이는 표준 방법에 따라 제조되었다.

[0136] 시험 품목 및 대조군 품목 취급을 위해 표준 실험실 안전 수칙을 사용하였다. 구체적으로, 용량을 제조하고 투

여하는 동안에는 장갑, 얼굴 마스크, 가운 (또는 실험실 가운) 및 눈 보호 장치를 착용하였다.

[0137] 동물을 각 군당 수컷 12마리 및 암컷 12마리로 n=24마리씩 4개의 군으로 무작위화하였다. 각 군에는 하기 조성물: (1) 20 mM 아세트산나트륨; (2) 20 mM 아세트산나트륨 중 1.5 mg rhPDGF-BB; (3) 20 mM 아세트산나트륨 중 4.5 mg rhPDGF-BB; 또는 (4) 20 mM 아세트산나트륨 중 15 mg rhPDGF-BB가 사두근 골건 접합부의 건내로 단일 주사되었다. 28.5G 바늘이 장착된 인슐린 시린지를 사용하여 고정 용량의 부피 1.5 ml를 주사하였다.

[0138] rhPDGF-BB 주사 후 1일째, 2주째, 및 6주째에 각 군의 ⅓을 희생시켰다. 생활 처리군의 완료시, 동물을 안락사시키고, USDA 동물 복지법, 실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침 (문헌 [ILAR publication, 1996, National Academy Press]), 및 HSS 수의학적 수술에 따라 조직을 수거하였다. 펜토바르비탈 나트륨 (페이틀-플러스(Fatal-Plus)® 또는 적절한 대체물)으로 유도된 깊은 마취 상태하에서 방혈시켜 동물을 안락사시켰다.

[0139] 동물은 혈액학상의 평가, 응집 연구 및 다양한 임상 화학 연구를 받았다.

[0140] 혈액학상의 평가는 하기 측정을 포함하였다: 백혈구 수 (WBC); 적혈구 수 (RBC); 헤모글로빈 (Hb) 측정, 평균 적혈구 혈색소 (MCH) 수준, 헤마토크릿 (HCT), 및 평균 적혈구 Hb 농도 (MCHC); 혈소판 수; 평균 적혈구 용적 (MCV) 측정, 및 호중구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구, 호중구(%), 림프구(%), 단핵구(%), 및 호산구(%)를 비롯한 백혈구 감별 평가. 응집 연구는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 (APTT) 및 프로트롬빈 시간 (PT)을 측정하였다. 임상 화학 연구는 하기: 알칼리성 포스파타제 (ALP), 글루코스 (GLU), 알부민 (ALB), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 총 빌리루빈 (TBIL), 글로불린 (Glob), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 콜레스테롤 (CHOL), 칼륨 (K), 감마 글루타밀트랜스퍼라제 (GGT), 트리글리세리드 (TRIG), 클로라이드 (Cl), 크레아티닌 (CREAT), 혈중 요소 질소 (BUN), 나트륨 (Na), 무기 인 (PHOS), 칼슘 (Ca), A/G 비, 및 총 단백질 (TPROT)을 측정하는 것을 포함하였다.

[0141] 건 독성 및 골 독성 검사를 비롯한, 국소 조직 조직병리학적 성질도 평가하였다.

[0142] rhPDGF-BB는 개에게 독성을 띠지 않았다.

[0143] *급성 전신 독성.* 본 연구의 목적은 정맥내 주사에 의해 투여된 rhPDGF-BB의 전신 독성을 측정하고자 하는 것이었다.

[0144] 본 연구에서는 스프라그 돌리 래트를 사용하였다. 연구 기간 동안 동물을 같은 실험실 시설에서 하우징하였다. 모든 하우징 및 축산은 동물 복지법 및 "실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침"에 따라 이루어졌다. 표준 프로토콜에 따라 동물에게 먹이와 물을 제공하였다. 연구와 관련된 적절한 사건, 예를 들어, 마취를 위해서는 먹이와 물을 주지 않았다. 연구 이전에 최소 5일 동안 동물을 시설에 순응시켰다. 이러한 순응 기간 동안 동물은 연구실 환경에 익숙해졌다.

[0145] 본 연구에서는 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 3.0 mg/ml 및 0.3 mg/ml의 멸균 재조합 인간 PDGF-BB가 사용되었다. 투여 당일, 0.3 mg/mL 용액 중 일부를 20 mM 아세트산나트륨 완충제 중에서 1:10으로 희석하여 0.03 mg/ml 용액을 제조하고, 이를 또한 본 연구에 사용하였다. 대조군 샘플은 멸균 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5)이었고, 이는 표준 방법에 따라 제조되었다.

[0146] 시험 품목 및 대조군 품목 취급을 위해 표준 실험실 안전 수칙을 사용하였다. 구체적으로, 용량을 제조하고 투여하는 동안에는 장갑, 얼굴 마스크, 가운 (또는 실험실 가운) 및 눈 보호 장치를 착용하였다.

[0147] 동물을 각 군당 (군당 수컷 20마리 및 암컷 20마리로) n=40마리씩 4개의 군으로 무작위화하였다. 투여군 1에는 1.4 ml/kg의 부피로 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5)가 정맥내로 단일 주사되고; 투여군 2에는 1.4 ml/kg의 부피로 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 3.0 mg/ml rhPDGF-BB가 정맥내로 단일 주사되고; 투여군 3에는 1.4 ml/kg의 부피로 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 0.3 mg/ml rhPDGF-BB가 정맥내로 단일 주사되고; 투여군 4에는 1.4 ml/kg의 부피로 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 0.03 mg/ml rhPDGF-BB가 정맥내로 단일 주사되었다.

[0148] 사망 및 중증 독성을 나타내는 것인 다른 징후에 대해 동물을 평가하였다. 연구 기간 동안, 생존력, 임상 검사, 체중, 먹이 섭취량, 안과 검사, 및 임상 병리학적 특성에 대해 동물을 관찰하였다. 2일째 및 14일째 부검시 (각 시점마다 각 군당 수컷 10마리 및 암컷 10마리), 동물은 전체 부검 뿐만 아니라, 혈액학상의 평가, 응집 평가, 혈청 화학상의 평가를 비롯한, 임상 병리학적 특성 평가를 받았다.

[0149] **실시예 3: 콜라게나제 유도성 래트 아킬레스 건 손상 모델에서 rhPDGF-BB의 건내 (IT) 적용의 용량 반응**

[0150] 본 연구의 목적은 래트 건 콜라게나제 모델에서 rhPDGF-BB의 건내 적용의 용량-반응을 측정함으로써 rhPDGF-BB가 아킬레스 건 손상 및 리모델링에 미치는 수복 효과를 입증하고자 하는 것이었다. 본 발명자들은 rhPDGF-BB를 건내로 전달하면 세포 증식이 상향조절되고, 생체기계적 건 강도가 회복됨으로써 건이 수복될 것이라고 가정하였다.

[0151] 재조합 인간 혈소판-유래 성장 인자 BB (rhPDGF-BB)는 중간엽 기원의 세포, 예를 들어, 골모세포, 건 세포, 연골세포 및 중간엽 줄기 세포에 대해 분열 촉진성 및 화학주성을 띤다. 따라서, rhPDGF-BB는 근골격 손상 부위 내로 도입되었을 때에, 결합 조직 세포 및 선조체의 증식을 자극시키면서 그를 치료 부위로 유인함으로써 세포 개수를 증가시키고, 이어서 기질을 침작시켜 손상된 조직(들)을 재생시킨다. 추가로, 상기 실시예 1에서 제시된 바와 같이, 건 세포가 PDGF-BB에 노출된 경우, DNA 합성 및 화학주성이 증가한 것으로 나타났다.

[0152] *콜라게나제 유도성 래트 아킬레스 건 손상 모델*

[0153] 건 질환 평가를 위한 잘 확립된 단일의 모델은 없었다. 그러나, 콜라게나제 유도성 래트 아킬레스 건 손상 모델이 아킬레스 건 손상에 대해 광범위하게 사용되어 왔다. 이 모델은 건염과 등가인 것으로 간주되는 퇴행성 건 반응을 개시하고, 오르막 트레드밀 과용 모델 (4개월)인 것과 비교하여 빠르게 (3일 이내) 건염 손상을 발생시킨다. 따라서, rhPDGF-BB가 건 손상에 미치는 효과를 스크리닝하는 데 빠른 모델이다. 따라서, 상기 모델은 상대적으로 빠른 기간 유도 기간을 향유하며, rhPDGF-BB의 치료학상의 효과에 대한 스크린으로서 고도로 적합하고, 대표적인 임상 건염이다.

[0154] 본 연구에서는 수컷 스프라그 돌리 래트 총 백 예순 다섯 마리 (165)를 사용하였다. 래트의 우측 아킬레스 건에 콜라게나제 주사를 투여한 후, 콜라게나제 주사 후 7일째 rhPDGF-BB 또는 대조군 (완충제 단독)을 손상 부위에 단일 주사 처리하였다. 28.5G 바늘을 사용하여 인슐린 시린지로 콜라게나제 및 rhPDGF-BB 또는 대조군 (완충제 단독)을 골-건 접합부에 가까운 래트의 우측 아킬레스 건내로 주사하였다.

[0155] 하기 표 1에 개략적으로 나타낸 바와 같이, 동물을 각 군당 n=15마리씩 11개의 군으로 나누었다. 상기 모델을 사용하는, 문헌상에 보고되어 있는 연구는 역사적으로 생체기계적 시험을 위해 각 처리군당 8-9마리의 동물, 및 조직학적 분석을 위해 3-6마리의 동물을 사용하여 왔다.

[0156] *시험 품목 및 대조군 품목*

[0157] 본 연구의 대조군은 손상된 것의 자연적인 치유 반응에 가까운 대조군으로서 rhPDGF-BB의 사용없이, 콜라게나제로 처리된 래트 아킬레스 건에서 래트 건의 자연적인 수복 반응을 사용하였다. 본 연구의 시험 품목은 건 재생에 도움이 되는 주사가능 약물로서 rhPDGF-BB를 사용하였다. 재조합 인간 혈소판-유래 성장 인자 BB (rhPDGF-BB)는 중간엽 기원의 세포, 예를 들어, 골모세포, 건 세포, 연골세포 및 중간엽 줄기 세포에 대해 분열 촉진성 및 화학주성을 띤다. 따라서, rhPDGF-BB는 근골격 손상 부위 내로 도입되었을 때에, 결합 조직 세포 및 선조체의 증식을 자극시키면서 그를 치료 부위로 유인함으로써 세포 개수를 증가시키고, 이어서 기질을 침작시켜 손상된 조직(들)을 재생시킨다. 추가로, 상기 실시예 1에서 제시된 바와 같이, 건 세포가 PDGF-BB에 노출된 경우, DNA 합성 및 화학주성이 증가하는 것으로 나타났다.

[0158] 본 연구에서는 2가지 상이한 농도의 멸균 재조합 인간 PDGF-BB 배취가 사용되었다: (1) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 3.4 mg/ml rhPDGF-BB; 및 (2) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5) 중 0.34 mg/ml rhPDGF-BB. 비히클 대조군 샘플은 멸균 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5)이었고, 이는 표준 방법에 따라 제조되었다. 용량은 1.02 ㎍, 10.2 ㎍ 및 102 ㎍ rhPDGF-BB를 포함하였다. rhPDGF-BB를 NaOAc 완충제 중에 2가지 농도로 제조하였다: 3.4 mg/ml 및 0.34 mg/ml. 30 ㎕씩 건내로 전달하였을 때, 102 ㎍ 및 10.2 ㎍ 용량 수준에 도달하였다. 용량이 1.02 ㎍인 경우, 20 mM NaOAc 완충제를 사용하여 0.34 mg/mL 용액을 1:10으로 희석하였다. 분말 형태의 콜라게나제를 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) (카탈로그 번호 C-6885; 미국 미주리주 세인트루이스)로부터 입수하고, 이를 50 mM NaH_2PO_4 및 150 mM NaCl을 함유하는 PBS (pH 7.4±0.5) 중에서 원하는 농도 (10 mg/mL)로 재구성하였다.

[0159] 연구 개시 시점에서, 투여, 안정성, 및 농도 분석을 위해서 사용되는 바이알로서 3.4 mg/ml rhPDGF-BB, 0.34 mg/ml rhPDGF-BB, 및 20 mM 아세트산나트륨 완충제 시험 품목의 미개봉, 미사용 바이알 2개 이상을 같은 보관 조건 (4℃) 하에서 유지시켰다. UV/Vis 분광광도법 및 역상 HPLC 분석을 사용하여 안정성 및 용량 확인 분석을 수행하였다.

[0160] 시험 품목 및 비히클 대조군 품목 취급을 위해 표준 실험실 안전 수칙을 사용하였다. 구체적으로, 용량을 제조

하고 투여하는 동안에는 장갑, 얼굴 마스크, 가운 (또는 실험복) 및 눈 보호 장치를 착용하였다.

[0161] *시험 시스템 (동물 및 동물 보호)*

[0162] 본 연구에서는 수컷 스프라그 돌리 래트 (찰스 리버 레보라토리즈 인터내셔날(Charles River Laboratories, Int'l: 미국 매사추세츠주 윌밍턴)) 백 예순 다섯 마리 (165)를 사용하였다. 연구를 선택하기 전, 모든 동물을 육안 검사를 통해 스크리닝함으로써 건강 상태와 정상적인 보행 상태를 확인하였다. 체중 (콜라게나제 주사 시점에 대략 315 g)에 기초하여 본 연구를 위해 동물을 선택하였다. 각 래트는 그의 꼬리상에 적힌 고유 번호로 확인되었다. 래트를 그의 체중에 따라 각 군으로 무작위로 지정하였다.

[0163] 연구 기간 동안 래트를 같은 실험실 시설에서 하우징하였다. 모든 하우징 및 축산은 동물 복지법 및 "실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침"에 따라 이루어졌다. 연구와 관련된 적절한 사건, 예를 들어, 마취를 위해서는 먹이와 물을 주지 않았지만, 그렇지 않은 경우에는 무제한으로 제공하였다. 연구 이전에 최소 5일 동안 동물을 시설에 순응시켰다. 이러한 순응 기간 동안 동물은 연구실 환경에 익숙해졌다.

[0164] *실험 디자인*

[0165] 케이지당 4마리씩 하우징된 동물 (각 군당 15마리)을 이소플루란으로 마취시키고, 과관절 부위를 클립핑하고, 주사를 위해 세정하였다. 28.5G 바늘을 사용하여 인슐린 시린지로 콜라게나제 (50 mM NaH_2PO_4 및 150 mM NaCl을 함유하는 PBS (pH 7.4) 중에 용해된 10 mg/ml의 50 ㎕)를 모든 래트의 골-건 접합부에 가까운 우측 아킬레스건내로 주사하였다 (도 3). 콜라게나제 주사 후 7일째, 28.5G 바늘을 사용하여 인슐린 시린지로 총 부피 30 ㎕ 중 비히클, 또는 1.02 ㎍, 10.2 ㎍ 또는 102 ㎍의 rhPDGF-BB를 투여 처리하였다. 건 손상 및 생체기계적 성질에 관한 조직병리학적 평가를 위해 동물을 7일째 (기준선), 14일째, 및 28일째 종결시켰다. 15마리의 동물로 구성된 각 군에서, 6마리의 동물은 조직병리학적 성질에 대해 사용하고, 9마리의 동물의 뒷다리 (처리 및 비처리된 후부 다리, 둘 모두)를 제취하여, 절개하고, 추후 생체기계적 평가를 위해 동결시켰다.

[0166] 생체기계적 평가에 관한 설명은 하기에서 제공한다.

표 1

[0167]

처리군				
군 번호	**처리군**	**동물 마리수 (n)**	**rhPDGF-BB**	**종점**
1	콜라게나제+비처리 종결일 7일째 (기준선)	15	0	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
2	콜라게나제+비처리 종결일 14일째	15	0	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
3	콜라게나제+비처리 종결일 28일째	15	0	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
4	콜라게나제+ 아세트산나트륨 종결일 14일째	15	0	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
5	콜라게나제+ 아세트산나트륨 종결일 28일째	15	0	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
6	콜라게나제+ rhPDGF-BB 종결일 14일째	15	102 ㎍	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
7	콜라게나제+ rhPDGF-BB 종결일 28일째	15	102 ㎍	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
8	콜라게나제+ rhPDGF-BB 종결일 14일째	15	10.2 ㎍	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)

9	콜라게나제+ rhPDGF-BB 종결일 28일째	15	10.2 ㎍	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
10	콜라게나제+ rhPDGF-BB 종결일 14일째	15	1.02 ㎍	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)
11	콜라게나제+ rhPDGF-BB 종결일 28일째	15	1.02 ㎍	생체기계적 분석을 위한 것 (N=9)/ 조직학적 분석을 위한 것 (N=6)

[0168] *생활 관찰 및 측정*

[0169] 희생시킬 때까지 동물을 적어도 매일 관찰하였다. USDA 동물 복지법 (문헌 [9 CFR, Parts 1, 2, and 3])에 개략적으로 설명된 규정 및 실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침(문헌 [ILAR publication, 1996, National Academy Press])에서 언급된 조건, 및 HSS 수의학적 절차에 따라 동물을 처리하였다.

[0170] 콜라게나제 주사 이전, 및 희생 이전에 체중을 기록하였다. 먹이 섭취량은 정질적이었다.

[0171] 적절한 연구 종결 시점에 모든 동물을 희생시켰다. 예정에 없던 동물의 사망은 관찰되지 않았다. 생활 처리군의 완료시, 동물을 안락사시키고, USDA 동물 복지법, 실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침(문헌 [ILAR publication, 1996, National Academy Press]), 및 HSS 수의학적 수술에 따라 조직을 수거하였다. CO_2를 과량으로 투여하여 동물을 안락사시켰다. 반사 반응 (눈깜박, 움츠림 등)이 없다는 것을 통해 사망하였음을 확인하였다.

[0172] *육안상 건 크기*

[0173] 부검 직전에, 하기 체계에 따라 발목 두께에 대해 점수화하였다: 0 = 비성장; 1 = 경미한 성장; 2 = 중간 정도의 성장; 3 = 극도의 큰 성장.

[0174] *조직학적 성질*

[0175] 부검시, 10% 중성 완충처리된 포르말린 (NBF) 중에 침지되고, 구부린 상태로 고정된 양발과 함께 과관절로부터 피부를 주의하여 제거하였다. 10% NBF 중에서 최소 12시간, 및 10% 포름산 중에서 4-5일을 거쳐 석회질을 제거한 후, 발목, 특별히 건-골 접합부를 중점적으로 하여 내측 및 외측, 양측 모두를 정돈함으로써 두께가 대략 ¼ 인치가 되는 조직 블록 (건이 부착되어 있는 발목의 중앙부)을 수득하고, 표지된 조직 카세트에 놓았다. 시상 방향으로 파라핀에 포매시키기 위해 정돈된 발목 조직 블록을 프로세싱하였다. 회전식 마이크로톰을 사용하여, 골-건 접합부가 적합하게 시각화될 때까지 200 ㎛ 단계적 절편에서 간격을 두고 4-6 ㎛ 두께의 대표적 절편을 취한 후, 상기 절편을 헤마톡실린 및 에오신 (H&E), 마손 트리크롬(Masson's Trichrome)으로 염색하고, 증식 세포 핵 항원 (PCNA)의 면역조직화학적 (IHC) 검출을 위해 염색하였다.

[0176] 이소플루란으로 마취시킨 상태하에서, 혈청을 위해 말단의 하행 대동맥 진공채혈관에 의해 모든 동물로부터 채혈하였다 (10 ml의 혈액을 수집하였다). 실온에서 10분 동안 1,800 g으로 혈액을 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 2 ml 에펜도르프(Eppendorf)® 튜브 중에 최대 1 ml의 혈청을 얻었다. 분석하기 전에 혈청을 -70℃에서 보관하였다.

[0177] 하기 기술하는 바와 같이, 조직병리학적 평가를 수행하였다. 광학 현미경을 사용하여 각 조직 표본 (슬라이드)으로부터의 3개의 등거리 필드 칼럼을 평가함으로써 상이한 파라미터에 관해 측정하였다.

[0178] 조직병리학적 성질에 관해 측정된 파라미터로는 하기를 포함하였다:

[0179] (1) *염증*. H&E 염색에 의해 염증성 세포 유형 (호중구, 림프구, 및 대식세포)을 측정하였다. 염증을 하기와 같이 점수화하였다: (a) 0 = 염증 없음; (b) 1 = 미세 염증 (100% 단핵구; 호중구 없음); (c) 2 = 중간 정도의 염증 (호중구 =19%; 그 나머지 세포는 단핵구); 및 (d) 3 = 뚜렷한 염증 (호중구 = 20%; 그 나머지 세포는 단핵구).

[0180] (2) *콜라겐 조직화*. H&E 및 트리크롬 염색법에 의해 콜라겐 피브릴의 조직화를 평가하였다. 콜라겐 조직화를 하기와 같이 점수화하였다: (a) 0 = 콜라겐 피브릴이 완전하게 해체되어 있는 상태; (b) 1 = 콜라겐 피브릴 중 일부는 정렬되어 있지만, 다발 대다수는 고도로 해체되어 있는 상태; (c) 2 = 콜라겐 피브릴이 고도로 정렬되어

있기는 하지만, 다발이 여전히 다소 해체되어 있는 상태; 및 (d) 3 = 조직내 존재하는 콜라겐 피브릴이 완전하게 정렬되어 있고, 콜라겐 다발은 해체되어 있지 않은 상태.

[0181] (3) *콜라겐 섬유 밀도.* H&E 및 트리크롬 염색법에 의해 수복 조직 중의 콜라겐 섬유 밀도를 평가하였다. 콜라겐 섬유 밀도를 하기와 같이 점수화하였다: (a) 0 = 저밀도 콜라겐 다발; (b) 1 = 중간 밀도 콜라겐 다발; 및 (c) 2 = 고밀도 콜라겐 다발.

[0182] (4) *수복 부위에서의 건 혈관화.* H&E 및 트리크롬 염색법에 의해 수복 조직 중의 혈관화를 측정하였다. 혈관화를 하기와 같이 점수화하였다: (a) 0 = 없음 (어떤 혈관화도 존재하지 않는 상태); (b) 1 = 중간 정도; 및 (c) 2 = 풍부.

[0183] (5) *세포 증식.* PCNA (증식 세포 핵 항원)에 대한 면역조직화학법 (IHC)을 사용하여 세포 증식을 평가하였다. 마이크로미터 상의 39.4 x 197 ㎛ (7,762 μm^2), 또는 10 x 50 유닛인 부위를 묘사하기 위해 접안 마이크로미터를 사용하였다. 각 표본에 대해 치수가 상기와 같은 3개의 필드를 계수하였다. 상기 3개의 등가 필드로부터 증식 세포를 계산하였다.

[0184] (6) *건 폭 측정.* 현미경 하에 접안 마이크로미터를 사용하여 상이한 두 위치 상의 건을 측정하였다. 종골 부착 지점 (비접선 부위가 부착 부위의 두께를 가장 잘 나타내는 것으로 판단되었다) 및 건 그 자체 (증식 반응과 관련된 부착 부위로부터 멀리 떨어진 건체 중 가장 두꺼운 비접선 부위)를 측정하였다.

[0185] 만-휘트니 U 검정(Mann-Whitney U test) 또는 크러스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)(비-모수적)을 사용하여 조직병리학적 성질에 관한 반정량적 데이터를 분석하였다. 적절한 다중 비교 사후 검정과 함께 일원 분산 분석 (일원 ANOVA)을 사용하여 모든 군 간에 걸쳐 적용가능한 데이터를 분석하였다.

[0186] *생체기계적 시험*

[0187] 본 연구 중 상기 부분을 위해 99마리의 동물을 사용하였다. 반대쪽의 비-콜라게나제 처리 건 이외에도 손상이 유도된 건을 평가하였다. 총 123개의 생체기계적 표본을 평가하였다. 처리 할당에 관해서는 상기 표 1에 개략적으로 설명되어 있다.

[0188] 다리를 대퇴골로부터 분리하고, 발의 중간 위치로 끝단을 제거하였다(de-sleeved). 수술용 메스를 사용하여 경골로부터 아킬레스-비복근 복합체를 분리하였다. 간략하면, 종골 삽입부에서 출발하여 수술용 메스를 경골을 따라 이동시켜 상기 복합체를 분리해 내고, 생체기계적 시험을 위한 그립을 허용하도록 근육 대부분은 건에 부착된 상태 그대로 남겨두었다. 건 분리 후, 중족골과 함께 경골을 접합부에서 제거하고, 생체기계적 시험을 위한 그립을 위해 발은 말단부에 부착된 상태로 남겨 두었다 (도 4). 생체기계적 분석을 수행하기 전에 전체 중족골-아킬레스-비복근 표본을 염수에 적신 거즈로 랩핑하고, -20℃에서 동결시켜 보관하였다.

[0189] 기계적 시험을 수행하기 최대 4시간 전에 4℃에서 샘플을 프로테이나제 억제제를 함유하는 PBS 중에서 해동시켰다. 건 샘플을 가볍게 두드려 건조시키고, 과도한 근육은 제거하여 그립에 샘플이 잘 탑재될 수 있도록 하였다. 클리퍼로 골을 정돈시켜 잘 탑재될 수 있도록 하였다.

[0190] PBS를 함유하는 조 중에 침지시킨 상태에서 샘플을 시험하는 인스트론(Instron) 시험 프레임 (모델 5566)에서 모든 기계적 시험을 수행하였다. 정확한 변위 대조군을 각 표본에 적용시키고, 하중 정확도가 ± 0.5%인 100 N 로드 셀을 사용하여 생성된 하중을 측정하였다. 모든 데이터 수집 및 장치 제어는 개인용 컴퓨터를 통해 이루어졌고, 여기서, 데이터는 10 Hz에서 수집되는 것으로 하였다.

[0191] 견인 시험 동안 샘플의 미끄럼 방지를 위해 2개의 조면화된 표면 플레이트와 사포 사이의 유압 그립에 표본을 탑재하였다. 0.1 N의 사전 하중을 표본에 적용시키고, 표본의 길이를 기록한 후, 하중 0.1 내지 1 N으로 10회 사이클 동안 프리사이클링시켰다. 초당 0.1%의 변형 속도로 구축물에 단축 인장 변위를 가하고, 그 결과로서 하중을 기록하였다. 골절에 이르기까지 장력 부전에 대해 샘플을 시험하였으며, 하중 측정치는 < 0.05 N인 것으로 관찰되었다. 시험 이전에 표본의 단면적을 측정하였다. 모든 표본은 확인가능한 군 부류를 나타내지 않은 상태에서 맹검 시험하였다.

[0192] 시험 후, 수집된 데이터를 분석하여 하중-변위 또는 응력-변형 곡선의 선형 부분으로부터 (1) 선형 경직도 및 (2) 탄성 계수를 각각 측정하였다. 로딩된 데이터로부터 최대 하중 및 극한 인장 강도 또한 측정하였다. 리만 (Reimann) 합 방법을 사용하여 최대 부하점까지의 외력 변위 곡선하 면적으로서 정의되는 탄성 인성을 수치로 계산하였다.

[0193] 생체기계적 데이터 분석을 위해 상호 작용 및 피셔(Fisher's) LSD 사후 검정과 함께 이원 ANOVA ($p<0.05$)를 사용하였다. 적절한 다중 비교 사후 검정과 함께 일원 분산 분석 (일원 ANOVA)을 사용하여 모든 군 간에 걸쳐 적용가능한 데이터를 분석하였다.

[0194] 응력은 샘플의 단면적으로 정규화된 표본 상의 하중이다. 변형은 샘플의 원래의 길이로 정규화된 표본의 길이 변화를 나타낸다. 결과적으로, 응력 대 변형 곡선은 정규화된 버전의 하중 대 변위 곡선 (표본 크기의 차이에 따른 효과가 소거된 것)이다. 예를 들어, 건의 길이가 길수록 총 변위는 더 커질 것이다. 한편, 폭가 좁은 건보다는 폭가 넓은 건이 더 큰 하중을 억누를 수 있다. 표본들 간의 그 크기에 있어서 이러한 미세한 차이가 표본이 견뎌낼 수 있는 하중 및 변위 크기에 유의적인 영향을 미친다. 이러한 변수를 그의 크기에 의해서 응력 및 변형에 대해 정규화하였을 때, 분석은 더 이상 표본의 크기에 따라 달라지지 않았다. 하중 대 변위 곡선으로부터 직접 도출된 모든 특성을 구조적 특성이라고 지칭하였다. 정규화된 응력 대 변형 곡선으로부터 도출된 특성은 물질적 특성이라고 지칭하였다.

[0195] 선형 경직도는 하중 대 변위 곡선의 선형 부분에 대한 최소 제곱법으로부터 측정된 구조적 특성이다. 이는 표본의 인장 경직도를 나타낸다.

[0196] 탄성 계수는 응력 대 변형 곡선의 선형 부분에 대한 최소 제곱법으로부터 측정된 물질적 특성이다. 이는 건 물질의 인장 경직도를 나타낸다.

[0197] 최대 하중은 견인 동안에 표본이 견뎌낼 수 있는 가장 큰 하중이다.

[0198] 극한 인장 응력은 표본의 단면적에 의해 정규화된 최대 하중이다.

[0199] 인성은 골절 또는 파괴에 대한 물질의 저항이다. 이는 보통 에너지 단위로 측정되며, 골절시까지의 하중-변위 곡선하 면적으로서 계산된다.

[0200] 결과

[0201] *rhPDGF-BB가 육안상의 발목 두께에 미치는 효과*

[0202] rhPDGF-BB를 건내로 단일 주사한 후 7일째, 육안상의 발목 두께는 용량 의존적 방식으로 증가한 것으로 관찰되었는데 (도 6A 및 도 7, 처리 후 7일 경과시), 주사 후 7일째 중간 용량 (10.2 μg) 및 고용량 (102 μg)은 건 크기를 유의하게 증가시켰다. 처리 후 21일째, 비히클 대조군 (아세트산나트륨 완충제)을 제외한 모든 군에서 육안상의 발목 두께는 감소한 것으로 나타났는데, 이는 처리 후 21일째에서의 조직 리모델링을 시사한다 (도 6B 및 도 7, 처리 후 21일 경과시). 도 6A, 6B, 및 7에서의 데이터는 rhPDGF-BB 처리 후 7일째 및 21일째의 상사척도를 기준으로 하였다 (0 = 비성장 내지 3 = 극도의 큰 성장). 기록된 데이터는 각 군당 n=6마리씩인 동물의 평균 발목 두께 (±SEM)이다.

[0203] *rhPDGF-BB가 체중에 미치는 효과*

[0204] 처리 시점에서 동물의 평균 체중은 314.48 g이었다. 처리 후 7일째 및 21일째, 평균 체중은 각각 396.4 g 및 467.0 g이었다. 어느 시점에서도 처리와 관련된 체중 변화는 없었다.

[0205] *rhPDGF-BB가 골에 미치는 효과*

[0206] 비정상적인 골 성장이나 재흡수가 확인되지 않았다.

[0207] *rhPDGF-BB가 종골 부착점의 건 폭에 미치는 효과*

[0208] 도 8은 처리 후 7일째 및 21일째 종골 삽입부의 평균 건 폭 (㎛ ± SEM)을 보여주는 것이다. 기록된 데이터는 각 군당 n=6마리씩인 동물의 종골 삽입부의 평균 건 폭 (±SEM)이다; * 비히클 대조군에 대해 $p=0.01$. 건 폭은 접안 마이크로미터를 사용하여 현미경법에 의해 측정하였다.

[0209] 처리 후 7일째 (처리 후 7일 경과시), 비히클과 비교하여 32.4 μg/kg의 rhPDGF-BB 투여군에서 종골 삽입부의 평균 건 폭이 유의하게 증가 (약 137% 증가)한 것이 관찰되었다 (도 8, 처리 후 7일 경과시). 3.24 및 324 μg/kg의 rhPDGF-BB로 처리된 동물에서는 건 폭의 유의적인 증가가 보이지 않았지만, 비히클 대조군과 비교하였을 때, 그보다는 높은 경향이 있는 것으로 나타났다. 처리 후 21일째 (도 8, 처리 후 21일 경과시), rhPDGF-BB로 처리된 동물의 건 폭 또는 rhPDGF-BB로 처리받지 못한 동물의 건 폭 사이에는 어떤 유의적인 차이도 측정되지 않았다. 처리 후 21일째까지는 (도 8, 처리 후 21일 경과시), 32.4 μg/kg의 rhPDGF-BB 투여군의 건 폭은 처리 후 7일째의 것과 비교하여 40% 감소한 것으로 나타났으며, 이는 건이 리모델링된 것을 시사한다 (도 8).

[0210] *rhPDGF-BB가 건 중앙체의 건 폭에 미치는 효과*

[0211] 도 9는 처리 후 7일째 및 21일째 건 중앙체의 평균 건 폭 (㎛ ± SEM)을 나타내는 것이다. 기록된 데이터는 각 군당 n=6마리씩인 동물의 건체의 평균 건 폭 (±SEM)이다; * 비히클 대조군에 대해 $p< 0.05$. 건 폭은 접안 마이크로미터를 사용하여 현미경법에 의해 측정하였다.

[0212] 처리 후 7일째, 비히클 대조군과 비교하여 32.4 ㎍/kg의 rhPDGF-BB 투여군에서 건 폭이 약 97% 증가한 것이 관찰되었다 (도 9, 처리 후 7일 경과시). 비히클 및 비-처리군 (Tx)과 비교하여 3.24 및 324 ㎍/kg의 rhPDGF-BB로 처리된 동물에서는 용량 의존적 방식의 유의하지 않은 증가가 관찰되었다. 21일째까지는 군들 간에 건 폭에 있어서 어떤 유의적인 차이도 관찰되지 않았다 (도 9, 처리 후 21일 경과시). 그러나, 21일째, 처리 후 7일째의 것과 비교하여 32.4 ㎍/kg의 rhPDGF-BB 투여군의 건 폭은 116% 감소한 것으로 나타났으며, 이는 건이 리모델링된 것을 시사한다.

[0213] *rhPDGF-BB가 세포 증식에 미치는 효과*

[0214] 양성 PCNA 면역염색된 세포의 세포 계수에 의해 세포 증식의 정량화를 수행하였다 (도 10). 기록된 데이터는 각 군당 n=6마리씩인 동물의 평균 세포 계수 (±SEM)이다; * 비히클에 대해 $p< 0.05$. 각 표본당 치수가 같은 3개의 필드를 계수하였다.

[0215] rhPDGF-BB 군에서 세포 밀도가 용량 의존적 방식으로 증가한 것으로 관찰되었다. 처리 후 7일째, 세포 증식이 rhPDGF-BB 용량 의존적 방식으로 증가한 것으로 관찰되었다 (도 10, 처리 후 7일 경과시); 비히클 대조군과 비교하여 32.4 및 324 ㎍/kg 투여군에서 세포 증식이 유의하게 증가한 것으로 관찰되었는데 (도 10, 처리 후 7일 경과시), 이는 각각 약 60% 및 약 72% 증가한 것으로 나타났다. 그러나, 21일째까지는 세포 증식에 있어서 어떤 유의적인 차이도 관찰되지 않았다 (도 10, 처리 후 21일 경과시). 32.4 및 324 ㎍/kg rhPDGF-BB 투여군의 경우, 비히클 대조군 증식 수준으로 복귀되는 것이 관찰되었는데, 이는 rhPDGF-BB의 증식 반응이 가역성이라는 것을 시사한다 (도 10, 처리 후 21일 경과시).

[0216] *rhPDGF-BB가 염증에 미치는 효과*

[0217] 모든 군들 간에 모든 시점에서 대식세포 및 단핵구 세포로 구성된 경미한 정도 내지 중간 정도의 염증이 관찰되었다 (표 2).

표 2

처리 후 7일째 및 21일째의, 상사 척도 (0 = 염증 없음 내지 3 = 중증의 염증 상태)를 사용하여 나타낸 rhPDGF-BB가 염증에 미치는 효과

처리 후 7일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	2	1	1	1	2	2
2	2	1	2	2	2	1
3	2	1	1	2	2	2
4	2	1	1	2	2	1
5	2	1	1	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2
평균	2	1.167	1.333	1.833	2	1.667
SD	0	0.408	0.516	0.408	0	0.516
처리 후 21일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	2	1	1	1	1	1
2	2	1	2	1	1	1
3	2	1	2	1	1	2
4	2	1	1	1	1	2
5	2	2	1	1	1	2
6	2	1	1	1	1	2
평균	2	1.167	1.333	1	1	1.667
SD	0	0.408	0.516	0	0	0.516

[0218]

[0219] *rhPDGF-BB가 혈관화에 미치는 효과*

[0220] 모든 군들 간에 모든 시점에서 혈관화에 있어서는 어떤 유의적인 변화도 관찰되지 않았다 (표 3).

표 3

처리 후 7일째 및 21일째의, 상사 척도 (0 = 없음 내지 2 = 심한 상태)를 사용하여 나타낸 rhPDGF-BB가 혈관화에 미치는 효과

처리 후 7일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	1	2	2	1	2	2
2	0	2	2	2	2	1
3	2	1	1	2	2	2
4	2	1	1	2	2	2
5	1	2	1	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2
평균	1.333	1.667	1.5	1.833	2	1.833
SD	0.816	0.516	0.548	0.408	0	0.408
처리 후 21일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	1	1	1	0	1	2
2	0	1	2	1	1	1
3	2	1	2	1	2	2
4	2	1	1	2	1	2
5	1	2	1	2	1	1
6	2	1	1	1	2	1
평균	1.333	1.167	1.333	1.167	1.333	1.5
SD	0.816	0.408	0.516	0.753	0.516	0.548

[0221]

[0222] *rhPDGF-BB가 콜라겐 밀도에 미치는 효과*

[0223] 모든 군들 간에 모든 시점에서 콜라겐 밀도에 있어서는 어떤 유의적인 변화도 관찰되지 않았다 (표 4).

표 4

처리 후 7일째 및 21일째의, 상사 척도 (0 = 없음 내지 2 = 극도로 조밀한 상태)를 사용하여 나타낸 rhPDGF-BB가 콜라겐 밀도에 미치는 효과

처리 후 7일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	1	1	2	2	1	1
2	1	1	1	1	1	2
3	1	1	2	1	1	1
4	1	1	2	1	1	2
5	2	1	2	1	1	2
6	1	1	1	1	1	2
평균	1.167	1	1.667	1.167	1	1.667
SD	0.408	0	0.516	0.408	0	0.516
처리 후 21일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	1	2	2	2	2	2
2	1	2	1	2	2	2
3	1	2	1	2	2	1
4	1	2	2	2	2	1
5	2	2	2	2	2	2
6	1	2	2	2	2	2
평균	1.167	2	1.667	2	2	1.667
SD	0.408	0	0.516	0	0	0.516

[0224]

[0225] *rhPDGF-BB가 콜라겐 조직화에 미치는 효과*

[0226] 모든 군들 간에 모든 시점에서 콜라겐 조직화에 있어서는 어떤 유의적인 변화도 관찰되지 않았다 (표 5).

표 5

처리 후 7일째 및 21일째의, 상사 척도 (0 = 없음 내지 3 = 고도로 조직화된 상태)를 사용하여 나타낸 rhPDGF-BB가 콜라겐 조직화에 미치는 효과

처리 후 7일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	1	2	3	3	2	2
2	1	2	2	2	2	3
3	1	2	3	2	2	2
4	2	2	3	2	2	3
5	3	2	3	2	2	2
6	1	2	2	2	2	3
평균	1.5	2	2.667	2.167	2	2.5
SD	0.837	0	0.516	0.408	0	0.548
처리 후 21일 경과시						
동물 마리수	군					
	기준선	비처리	비히클	3.24 μg/kg	32.4 μg/kg	324 μg/kg
1	1	3	3	3	3	3
2	1	3	2	3	3	3
3	1	3	2	3	2	2
4	2	3	3	2	3	2
5	3	2	3	2	3	3
6	1	3	3	3	2	3
평균	1.5	2.833	2.667	2.667	2.667	2.667
SD	0.837	0.408	0.516	0.516	0.516	0.516

[0227]

[0228] *기계적 특성: rhPDGF-BB가 최대 파열 하중에 미치는 효과*

[0229] 상기 모델에서, 비-처리군은 최대 파열 하중 값에 기초하여 시간에 대한 함수로서 자발적으로 수복되었다 (도 11). 처리 후 7일째의 평균 최대 파열 하중 값은 비히클 대조군 및 비-처리군과 비교하여 32.4 μg/kg 투여군에서 유의하게 증가하였다 (각각 약 43% 및 27%) (도 11, 처리 후 7일 경과시). 처리 후 21일째까지, 최대 파열 하중은 비히클 대조군에 비하여 여전히 유의하게 증가하였다 (도 11, 처리 후 21일 경과시). 처리 후 21일째, 32.4 μg/kg 투여군과 비-처리군에 대한 평균 최대 하중은 유사하였고, 이는 rhPDGF-BB 처리를 통해서 수복률이 비-처리에 비해 증가하였다는 것을 시사한다. 그러나, 투여 후 21일째 최대 파열 하중 값은 32.4 μg/kg 투여군 및 비-처리군보다 비히클 군 및 324 μg/kg rhPDGF-BB 군에서 유의하게 더 낮았다. 기록된 데이터는 각 군당 n=9마리씩인 동물의 평균 최대 파열 하중 (±SEM)이다; +"비히클" 군에 대해 $p<0.05$, **"비-처리"군에 대해 $p<0.05$.

[0230] 하기 표 6은 손상되지 않은 반대쪽 건 및 rhPDGF-BB로 처리된 건 및 비-처리된 건의 기계적 강도를 보여주는 것이다.

표 6

[0231]

콜라게나제 주사 후 7일째, 14일째, 및 28일째의 아킬레스 건에 대한 최대 파열 하중 값 (N ± SEM)				
	최대 파열 하중 (N ± SEM)			
	7일째 기준선	**14일째 (처리 후 7일 경과시)**	**28일째 (처리 후 21일 경과시)**	**델타Δ (비히클에 대한 상대치)**
손상되지 않은 건 (콜라게나제 주사를 맞지 않은 반대쪽 다리)	17.36 (2.18)	19.03 (0.67)	27.98 (1.43)	0.31(처리 후 7일 경과시) 5.96(처리 후 21일 경과시)
비처리된 것 (비히클이나 rhPDGF-BB도 처리하지 않은 콜라게나제 주사)	15.68 (1.84)	21.06 (1.02)	30.86 (1.71)	2.34(처리 후 7일 경과시) 12.14(처리 후 21일 경과시)

비히클 (콜라게나제 주사 + 20 mM 아세트산나트륨 처리)	15.68 (1.84)	18.72 (1.92)	22.02 (1.75)	- -
3.24 μg/kg rhPDGF-BB (콜라게나제 주사 + 3.24 μg/kg rhPDGF-BB 처리)	15.68 (1.84)	22.65 (1.89)	23.67 (1.89)	
32.4 μg/kg rhPDGF-BB (콜라게나제 주사 + 32.4 μg/kg rhPDGF-BB 처리)	15.68 (1.84)	26.8 (1.98)	28.61 (1.45)	8.08(처리 후 7일 경과시) 6.59(처리 후 21일 경과시)
324 μg/kg rhPDGF-BB (콜라게나제 주사 + 324 μg/kg rhPDGF-BB 처리)	15.68 (1.84)	17.13 (1.89)	20.98 (1.89)	
기록된 데이터는 각 군당 n=9마리씩인 동물의 평균 최대 파열 하중 (±SEM)이다.				

[0232] 콜라게나제 주사 후 14일째 32.4 μg/kg rhPDGF-BB 군에서의 평균 최대 파열 하중 값 (26.8 N)은 콜라게나제 주사 후 14일째 손상되지 않은 건의 값 (19.03 N)에 비해 41% 만큼 증가한 것으로 나타났다. 이는 건을 발생시킴과 동시에 32.4 μg/kg rhPDGF-BB 군에서의 생체기계적 특성이 정상인 것보다 더 빠르게 성숙화된다는 것을 제안한다. 추가로, 콜라게나제 주사 후 14일째 32.4 μg/kg rhPDGF-BB 군의 평균 최대 파열 하중 (26.8 N)은 콜라게나제 주사 후 28일째 손상되지 않은 건의 값 (27.98 N)에 도달하였다. 손상되지 않은 군 및 (콜라게나제 주사를 맞은) 비-처리군에서 7일째, 14일째, 및 28일째의 최대 파열 하중 값은 유사하였다. 14일째 (처리 후 7일 경과시), 최대 파열 하중 값은 비히클 군, 손상되지 않은 군 및 비-처리군보다 32.4 μg/kg rhPDGF-BB 군에서 더 높았는데, 이는 각각 43%, 41%, 및 27% 증가된 것이었다. 그러나, 28일째 (처리 후 21일 경과시), 손상되지 않은 군, 비-처리 군 및 32.4 μg/kg rhPDGF-BB 군에서의 최대 파열 하중은 유사하였다 (표 6).

[0233] 결론

[0234] *생활 파라미터*

[0235] 이러한 발목 두께 결과는, rhPDGF-BB 처리 후 7일째 건 크기는 용량 의존적 방식으로 증가하지만, 21일째까지는 그러한 성장은 저지되고, 조직은 감소된 크기로 리모델링된다는 것을 입증하였다.

[0236] 군들 간에 시점에서 체중에 있어서는 어떤 유의적인 차이도 없었다.

[0237] *현미경적 평가*

[0238] rhPDGF-BB는 세포 증식을, 구체적으로는 사실상 섬유모세포의 증식을 증가시켰다. 세포 증식 및 현미경적 건 폭의 증가는 가역적인데, 이는 조직을 리모델링할 수 있는 가능한 적응기를 시사한다.

[0239] 본 연구 조건하에서 3주간의 기간 동안에 걸쳐 건내로의 1회 전달 이후 rhPDGF-BB로부터 유발된 어떤 국소적인 부작용도 관찰되지 않았다. 비정상적인 골 또는 건 성장도 없었고, 골 재흡수도 확인되지 않았다. 염증은 사실상 단핵구였다. 세포 형태는 사실상 섬유모세포였다.

[0240] *생체기계적 성질*

[0241] 파열 하중에 관한 생체기계적 데이터는 rhPDGF-BB 비-처리 코호트와 비교하였을 때, rhPDGF-BB가 기계적 건 강도에 있어서 더욱 빠른 수복 반응을 개시시켰다는 것을 시사하였다. 비록 처리 후 21일째까지 세포 증식 및 건 폭은 기준선으로 복귀하였지만, 생체기계적으로 건 강도는 상실하지 않았다.

[0242] 요약

[0243] 본 연구에서 생물학적 및 생체기계적 결과를 통해 건 내로 주사된 rhPDGF-BB의 국소 안전성이 입증되었다. rhPDGF-BB의 1회 주사 후, 초기 단계에는 21일이라는 기간에 걸쳐 건 성장이 약화되었다. 본 연구에서는 접안 마이크로미터를 사용하여 현미경하에 건 폭을 측정하고, PCNA 면역염색법을 사용하여 세포 증식을 측정하였다. 상기 측정으로부터, 32.4 μg/kg rhPDGF-BB로 처리된 동물의 경우, 처리 후 7일째 현미경적으로 볼 때, 건 폭 및 세포 증식이 증가하였다는 결과가 나왔다. 그러나, 처리 후 21일째까지 건 폭 및 증식은 대조군 수준으로 복귀하였다. rhPDGF-BB를 건 내로 주사한 후 21일이라는 기간에 걸쳐서는 이소성 또는 비정상적인 골 성장도, 건의 이상 성장도 관찰되지 않았다.

[0244] 현미경적으로 볼 때, 조기에 건 폭 및 세포 증식이 증가하는 것은 기계적으로 건 강도의 증가에 상응하는 것이

었다. 비록 처리 후 21일째까지 세포 증식 및 건 폭은 기준선으로 복귀하였지만, 생체기계적으로 건 강도는 상실하지 않았으며, 오히려 건의 생체기계적 성질 개선이 지속되었다.

[0245] 본 연구로부터 얻은 결과가 특별히 병원에서 외측 상과염 환자를 치료하도록 강요할 수도 있다. 외측 상과염에서는 동통, 및 관여하는 팔 및 손의 하중을 견뎌내는 기능의 감소로서 나타나는 단요측 수근 신근 (ECRB) 건 변성성 변화가 있다. 본 연구에서 래트 아킬레스 건 질환 모델에서 제시되었던 rhPDGF-BB 요법의 결과로서 건의 생체기계적 강도 증가 및 구조상의 변형이 임상적으로는 외측 상과염을 앓는 환자에서의 동통 폐기 및 기능 수복으로 해석될 것으로 기대된다.

[0246] **실시예 4. 재조합 인간 혈소판-유래 성장 인자-BB (rhPDGF-BB)의 정맥내 투여 후, 스프라그 돌리 래트에서의 rhPDGF-BB의 약동학**

[0247] 본 연구의 목적은 수컷 스프라그 돌리 래트에게 단일 용량으로 정맥내로 투여된 rhPDGF-BB의 약동학을 평가하는 것이었다. 본 연구는 정맥내 투여 후 체액 (혈청)으로부터의 순수한(naive) rhPDGF-BB의 제거를 평가할 수 있도록 디자인되었다. rhPDGF-BB의 약동학적 성질 및 약력학적 성질을 보다 잘 이해할 수 있도록 하기 위해, 정맥내 노출 후 전신 제거를 측정하였다. 본 발명자들은 rhPDGF-BB가 정맥내 투여 후 빠른 제거 속도를 나타낼 것이라고 가정하였다.

[0248] 연구 디자인

[0249] *래트 모델*

[0250] 래트는 다양한 부류의 화학물질의 약동학 및 독성을 평가하는 데 보편적으로 사용되는 설치류 모델이고, 래트에 대한 역사상의 큰 데이터베이스가 존재한다. 본 연구에서는 총 마흔 여덟마리 (48마리)의 수컷 스프라그 돌리 래트가 사용되었다. 동물을 각 시점에 각 군당 6마리씩의 동물로 2개의 군으로 나누었다 (표 7). 본 연구는 본 발명의 목적, 본 발명자들의 과학상의 필요성, 및 현대의 과학적 표준과 일관되도록, 가능한 가장 적은 수의 동물을 사용하도록 디자인되었다. 본 디자인은 데이터의 의미 있는 분석을 허용할 정도의 충분한 군 크기를 제공하였다. 인슐린 시린지 (28.5 G)로 rhPDGF-BB를 정맥내 전달을 통해 외측 꼬리 정맥 내로 투여하였다.

[0251] *시험 품목 및 대조군 품목*

[0252] 시험 품목은 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH: 6.0 ± 0.5) 중의 0.4 mg/ml rhPDGF-BB였다. 대조군 품목은 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH 6.0±0.5)이었다.

[0253] 연구 개시 시점에서, 투여, 안정성, 및 농도 분석을 위해서 사용되는 바이알로서 0.4 mg/ml rhPDGF-BB 및 20 mM 아세트산나트륨 (아세테이트) 완충제 시험 품목의 미개봉, 미사용 바이알 2개 이상을 같은 보관 조건 (4℃) 하에서 유지시켰다. UV/Vis 분광광도법 및 역상 HPLC 분석으로 구성된 안정성 및 용량 확인 분석을 수행하였다 (부록 II).

[0254] 시험 품목 및 비히클 대조군 품목 취급을 위해 표준 실험실 안전 수칙을 사용하였다. 구체적으로, 용량을 제조하고 투여하는 동안에는 장갑, 얼굴 마스크, 가운 (또는 실험복) 및 눈 보호 장치를 착용하였다.

[0255] *시험 시스템*

[0256] 본 연구에서는 마흔 여덟 마리 (48마리)의 수컷 스프라그 돌리 래트를 사용하였다. 본 연구에서 사용되는 래트는 그의 체중에 기초하여 선별되었다. 평균 체중은 처리시에 대략 227 g이었다. 각 래트는 영구 마커로 적힌 고유 꼬리 번호를 통해 확인되었다. 연구와 관련된 적절한 사건, 예를 들어, 마취를 위해서는 먹이와 물을 주지 않았지만, 그렇지 않은 경우에는 무제한으로 제공하였다. 연구를 선택하기 전, 모든 동물을 육안 검사를 통해 스크리닝하였다.

[0257] *시험 품목 투여*

[0258] 혈청 중 rhPDGF-BB의 100% 생체이용률 및 약동학적 특성을 달성하기 위해 정맥내 전달을 선택하였다. 용량 수준은 이전의 래트 건 콜라게나제 모델에서의 rhPDGF-BB의 건내 적용에 관한 용량-반응 효능 연구를 기초로 하여 선택되었다 (실시예 3 참조). 본 연구에서 사용된 최대 용량 농도는 체중이 0.227 kg인 래트를 기준으로 하여 100 ㎍ 또는 0.44 mg/kg이었다.

[0259] 래트 마흔 여덟 마리의 체중을 측정하고, 군당 24마리씩 래트를 2개의 군으로 무작위로 분배하였다. 래트를 그의 체중에 따라 각 군으로 무작위로 지정하였다.

[0260] 투여 이전에 체중을 기록하였다. 1군의 동물은 1.1 mL/kg의 목표 용량 부피로 0.44 mg/kg (440 ㎍/kg)의 rhPDGF-BB를 정맥내로 단일 투여받았다. 2군 동물은 1.1 mL/kg의 목표 용량 부피로 비히클 대조군 (NaOAc 완충제)을 받았다. 인슐린 시린지 (28.5 G)를 사용하여 외측 꼬리 정맥 접근법에 의해 정맥 주사를 수행하였다. 대략 300 ㎕의 혈청을 수집하였다.

표 7

[0261]

처리군						
군 번호	처리군	전달 경로	동물 마리수 (n)	rhPDGF-BB (mg/kg)	목표 부피 (mL/kg)	혈액 수집 시점*
1	rhPDGF-BB	정맥내 (IV)	24	0.44	1.1	1, 5, 10, 20, 60분째, 4, 8, 24, 48, 72, 96 및 168시간째
2	NaOAc	정맥내 (IV)	24	--	1.1	1, 5, 10, 20, 60분째, 4, 8, 24, 48, 72, 96 및 168시간째

*혈액 수집 시점은 하기와 같았다:
모든 군에서 동물 1-6 = 기준선, 1 min, 1 hr, 48 hr째
모든 군에서 동물 7-12 = 기준선, 5 min, 4 hr, 72 hr째
모든 군에서 동물 13-18 = 기준선, 10 min, 8 hr, 96 hr째
모든 군에서 동물 19-24 = 기준선, 20 min, 24 hr, 168 hr째

[0262] *임상적 관찰*

[0263] 희생시킬 때까지 동물을 적어도 매일 관찰하였다. rhPDGF-BB 주사 전 및 희생시키기 전에 체중을 기록하였다. 먹이 섭취량은 정질적이었다.

[0264] 적절한 연구 종결 시점에 모든 동물을 희생시켰다. 생활 처리군의 완료시, CO_2를 과량으로 투여하여 동물을 안락사시켰다. 반사 반응 (눈깜박, 움츠림 등)이 없다는 것을 통해 사망하였음을 확인하였다. 본 연구에서는 어떤 육안적 또는 조직병리학적인 것도 수행하지 않았다. 예정에 없던 동물 사망에 관해서는 보고된 바 없었다.

[0265] *혈청 수집*

[0266] 대략 600 ㎕의 혈액을 혈청 튜브에 수집하고, 실온에서 10분 동안 1,800 g으로 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 2 ml 에펜도르프 튜브 중에 대략 300 ㎕의 혈청을 얻었다. 분석하기 전에 혈청을 -70℃에서 보관하였다.

[0267] *혈청 분석*

[0268] 각 시점에 rhPDGF-BB 혈청 농도를 측정하였다. R&D 시스템즈로부터 입수한 콴터카인(Quantikine) ELISA 키트를 사용하여 rhPDGF-BB를 정량하였다.

[0269] *약동학 분석*

[0270] 윈논린(WinNonlin)의 비-구획적 모듈을 사용하여 하기 파라미터를 계산하였다: 최종 반감기 (t½), Tmax, Cmax, AUC0-최종 및 CL. 콴터카인 ELISA 키트 검정을 사용하여 혈청에서 측정된 바와 같이, 상이한 시점에서의 rhPDGF-BB 존재량을 사용하여 분석을 수행하였다.

[0271] *통계학*

[0272] 통계학적 분석은 적절히 기술적 파라미터, 예를 들어, 평균, 표준 편차, 및 변동 계수로 제한되었다.

[0273] 결과

[0274] 처리 시점에 동물 모두에 대한 평균 체중은 227 g이었다. 동물은 평균 용량 440.53 ㎍/kg의 rhPDGF-BB를 받았다.

[0275] 평균 혈청 rhPDGF-BB 농도-시간 값은 도 12에 도시되어 있다. 투여 후 1분째에 Cmax (6,161.2 ng/mL)에 도달하였다. 이후, 5분째부터 1시간째 사이에 rhPDGF-BB 농도는 감소하였다. 1시간째부터 168시간째 사이에 rhPDGF-BB 농도는 정량 수준보다 낮았다 (<0.156 ng/mL).

[0276] 하기 표 8은 수컷 스프라그 돌리 래트에서의 IV 투여된 rhPDGF-BB의 약동학적 성향을 나타내는 것이다. 평균

전달 용량은 440 ㎍/kg이었다. Tmax는 0.0167시간 (1분)이었고, Cmax는 6,161.2 ng/mL였다. AUC0-최종은 375.64 hr*ng/mL이고, 제거율 (CL)은 17.5 mL/min/kg이었다.

표 8

[0277]

IV 투여에 관한 약동학적 데이터 분석					
경로	용량 (㎍/kg)	Cmax (ng/mL)	Tmax (시간)	AUC0-최종 (hr*ng/mL)	CL (mL/min/kg)
IV	440	6,161.2	0.0167	375.64	17.5

[0278] 결론

[0279] rhPDGF-BB의 정맥내 (IV) 투여를 통해 초기에는 고도로 전신 노출되었다. 이는 투여 후 처음 10분 동안에 걸쳐 혈액으로부터 빠르게 제거되는 중간 제거 분자이다.

[0280] **실시예 5. rhPDGF-BB의 건내 투여 후, 스프라그 돌리 래트에서의 rhPDGF-BB의 약동학**

[0281] 본 연구의 목적은 수컷 스프라그 돌리 래트에게 단일 용량으로 건내로 투여된 rhPDGF-BB의 약동학을 평가하는 것이었다. 본 연구는 건내로의 전달 후 rhPDGF-BB 전신 노출 및 제거를 평가할 수 있도록 디자인되었다.

[0282] 연구 디자인

[0283] *래트 모델*

[0284] 래트는 다양한 부류의 화학물질의 약동학 및 독성을 평가하는 데 보편적으로 사용되는 설치류 모델이고, 래트에 대한 역사상의 큰 데이터베이스가 존재한다. 본 연구에서는 총 서른 두마리 (32마리)의 수컷 스프라그 돌리 래트가 사용되었다. 동물을 각 군당 8마리씩의 동물로 4개의 군으로 무작위로 나누었다 (표 9). 본 연구는 본 발명의 목적, 본 발명자들의 과학상의 필요성, 및 현대의 과학적 표준과 일관되도록, 가능한 가장 적은 수의 동물을 사용하도록 디자인되었다. 본 디자인은 데이터의 의미 있는 분석을 허용할 정도의 충분한 군 크기를 제공하였다.

[0285] *시험 품목 및 대조군 품목*

[0286] 시험 품목은 하기와 같았다: (1) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH: 6.0 ± 0.5) 중 3.4 mg/ml rhPDGF-BB; 및 (2) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH: 6.0 ± 0.5) 중 0.34 mg/ml rhPDGF-BB. 대조군 품목은 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (pH: 6.0 ± 0.5)이었다.

[0287] 연구 개시 시점에서, 투여, 안정성, 및 농도 분석을 위해서 사용되는 바이알로서 3.4 및 0.34 mg/ml rhPDGF-BB 및 20 mM 아세트산나트륨 (아세테이트) 완충제 시험 품목 및 대조군 품목의 미개봉, 미사용 바이알 2개 이상을 같은 보관 조건 (4℃) 하에서 유지시켰다. UV/Vis 분광광도법 및 역상 HPLC 분석으로 구성된 안정성 및 용량 확인 분석을 수행하였다.

[0288] 본 연구에 포함된 용량은 1.02, 10.2 및 102 ㎍ rhPDGF-BB였다. 각각 3.4 mg/ml 및 0.34 mg/ml로 30 ㎕씩 주사함으로써 102 및 10.2 ㎍ 용량에 도달하였었다. 1.02 ㎍ 용량의 경우, NaOAc 완충제를 사용하여 0.34 mg/ml를 1:10으로 희석시켰다.

[0289] 시험 품목 및 비히클 대조군 품목 취급을 위해 표준 실험실 안전 수칙을 사용하였다. 구체적으로, 용량을 제조하고 투여하는 동안에는 장갑, 얼굴 마스크, 가운 (또는 실험복) 및 눈 보호 장치를 착용하였다.

[0290] *시험 시스템*

[0291] 본 연구에서는 서른 두마리(32마리)의 수컷 스프라그 돌리 래트를 사용하였고, 그의 체중 (주사시 대략 294 g)에 기초하여 선별되었다. 래트를 그의 체중에 따라 각 군으로 무작위로 지정하였다.

[0292] 각 래트는 그의 꼬리상에 적힌 고유 번호로 확인되었다. 연구와 관련된 적절한 사건, 예를 들어, 마취를 위해서는 먹이와 물을 주지 않았지만, 그렇지 않은 경우에는 무제한으로 제공하였다. 연구를 선택하기 전, 모든 동물을 육안 검사를 통해 스크리닝하였다.

[0293] USDA 동물 복지법 (문헌 [9 CFR, Parts 1, 2, and 3])에 개략적으로 설명된 규정 및 실험 동물의 보호 및 이용을 위한 지침(문헌 [ILAR publication, 1996, National Academy Press])에서 언급된 조건을 준수하는 FIMR's

CCP 표준 절차에 따라 동물을 처리하였다.

[0294] *시험 품목 투여*

[0295] 아킬레스 건내 투여는 병원에서 수행되는 rhPDGF-BB 투여를 모방한 것이다. 건-종골 접합부에서의 주사 부위는 건 및 골의 삽입부를 모방한 것이다.

[0296] 용량 수준은 이전의 래트 건 콜라게나제 모델에서의 rhPDGF-BB의 건내 적용에 관한 용량-반응 효능 연구를 기초로 하여 선택되었다 (실시예 3 참조). 본 연구에서 사용된 최대 용량 농도는 체중이 0.294 kg인 래트를 기준으로 하여 102 ㎍ 또는 0.347 mg/kg이었다.

[0297] 평균 체중이 294 g인 수컷 스프라그 돌리 래트 서른 두마리를 군당 8마리씩의 동물로 4개의 군으로 무작위로 분배하였다. 1, 2, 및 3군은 동물당 30 ㎕의 표적 전달 부피로 (0.102 mL/kg) 각각 347 ㎍/kg, 34.7 ㎍/kg 및 3.47 ㎍/kg rhPDGF-BB의 평균 볼루스 용량을 골건 접합부에 가까운 우측 아킬레스 건에 건내로 단일 투여받았다. 4군은 동물당 30 ㎕의 표적 전달 부피로 20 mM 아세트산나트륨 완충제를 건내로 단일 주사 맞았다. 인슐린 시린지 (28.5 G)를 사용하여 골건 접합부에 가까운 우측 아킬레스 건내로 주사하여 처리하였다. 하기 열거된 출혈 시점에 혈청을 위해 비어있는 1 cc 시린지 (26G)를 사용하여 꼬리 정맥을 통해 동물로부터 채혈하였다 (약 400 ㎕ 전혈, 약 200 ㎕ 혈청). 콴터카인 ELISA를 사용하여 혈청 중 rhPDGF-BB를 측정하였다.

표 9

[0298]

처리군					
군 번호	**처리군**	**동물 마리수 (n)**	**rhPDGF-BB (㎍/kg)**	**목표 부피 (mL/kg)**	**혈액 수집 시점***
1	rhPDGF-BB	8	347	0.102	1, 5, 10, 20분째, 4, 8, 24, 48, 72, 96 및 168시간째
2	rhPDGF-BB	8	34.7	0.102	1, 5, 10, 20분째, 4, 8, 24, 48, 72, 96 및 168시간째
3	rhPDGF-BB	8	3.47	0.102	1, 5, 10, 20분째, 4, 8, 24, 48, 72, 96 및 168시간째
4	NaOAc (20 mM 아세트산나트륨)	8	--	0.102	1, 5, 10, 20분째, 4, 8, 24, 48, 72, 96 및 168시간째
*혈액 수집 시점은 하기와 같았다: 모든 군에서 동물 1-4 = 기준선, 1 min, 10 min, 20 min, 4 hr, 24 hr 및 72 hr째 모든 군에서 동물 5-8 = 기준선, 5 min, 8 hr, 48 hr, 96 hr 및 168시간째					

[0299] 대략 400 ㎕의 혈액을 혈청 튜브에 수집하고, 실온에서 10분 동안 1,800 g으로 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 2 ml 에펜도르프 튜브 중에 대략 200 ㎕의 혈청을 얻었다. 보관된 혈청 샘플 상에서 rhPDGF-BB의 양을 측정하는 분석을 수행하기 전에 혈청을 -70℃에서 보관하였다.

[0300] *임상적 관찰*

[0301] 희생시킬 때까지 동물을 적어도 매일 관찰하였다. rhPDGF-BB 주사 전에 체중을 기록하였다. 먹이 섭취량은 정질적이었다. 예정에 없던 동물 사망에 관해서는 보고된 바 없었다.

[0302] 적절한 연구 종결 시점에 모든 동물을 희생시켰다. 생활 처리군의 완료시, CO_2를 과량으로 투여하여 동물을 안락사시켰다. 반사 반응 (눈깜박, 움츠림 등)이 없다는 것을 통해 사망하였음을 확인하였다. 본 연구에서는 어떤 육안적 또는 조직병리학적인 것도 수행하지 않았다.

[0303] *혈청 분석*

[0304] 각 시점에 rhPDGF-BB 혈청 농도를 측정하였다. 하기와 같이 R&D 시스템즈(미국 미네소타주 미니애폴리스)로부터 입수한 인간 혈소판 유래 성장 인자-BB 농도의 정량적 측정을 위한 ELISA 키트용의 콴터카인® 휴먼 PDGF-BB 이뮤노어세이(Quantikine® PDGF-BB Immunoassay)를 사용하여 rhPDGF-BB를 정량하였다.

[0305] 먼저, 키트내 모든 시약을 사용 전에 실온으로 옮겨 놓았다. 이어서, 시험 샘플에서 사용된 같은 rhPDGF-BB 로트를 사용하여 rhPDGF-BB의 표준 곡선을 작성하였다. 키트와 함께 제공된 희석 완충제를 사용하여 rhPDGF-BB를

10 ng/ml로 희석하였다. 이어서, 상기 용액을 0.15625 ng/ml의 농도로 1:2로 일련의 단계로 희석하였다. 농도 값이 0.15625 ng/ml 내지 10 ng/ml의 rhPDGF-BB 표준 곡선 범위내 포함되도록 하기 위해 같은 희석제 완충제를 사용하여 시험하고자 하는 샘플을 희석시켰다.

[0306] 모든 샘플을 이중으로 검정하는 데 필요한 웰 개수를 결정하고, 마이크로타이터 플레이트 상의 각 8-웰 스트립에 적절히 번호 매김하였다. 검정용 희석제 RD1X를 웰당 100 ㎕씩 각 웰에 첨가한 후, 표준 및 샘플 100 ㎕씩을 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 접착식 커버로 덮고, (50-70회 회전/분으로 설정된) 궤도 진탕기 상에서 실온하에 대략 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 각 웰을 흡인시키고, 300 ㎕의 세척 완충제로 세척하였다. 4회에 걸쳐 반복하였다. 이어서, (R & D 키트와 함께 제공된 것으로서, 희석할 필요가 없는) 항-rhPDGF-BB 컨쥬게이트 200 ㎕를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 새 접착식 커버로 덮고, 50-70회 회전/분으로 설정된 궤도 진탕기 상에서 실온하에 대략 1.5시간 동안 인큐베이션시켰다. 흡인 및 세척 단계를 반복하고, (R & D 키트와 함께 제공된 것으로서, 희석할 필요가 없는) 기질 용액 200 ㎕를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, 샘플을 궤도 진탕기 상에서 실온하에 대략 30분 동안 암실에서 인큐베이션시켰다. (R & D 키트와 함께 제공된 것으로서, 희석할 필요가 없는) 정지 용액 50 ㎕를 각 웰에 첨가하고, 고르지 않게 발색되었다면, 8-채널의 다중-채널 피펫을 사용하여 2-4회에 걸쳐 상하로 피펫팅함으로써 용액을 혼합시켰다. 정지 용액 첨가 후 30분 이내에 (파장이 540 nm으로 보정되고) 450 nm으로 설정된 마이크로플레이트 판독기에서 각 웰의 광학 밀도를 측정하였다. 광학 밀도 판독값을 분석용 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel)로 반출하였다.

[0307] 각 샘플에 대한 평균 값을 계산하였다. 각 플레이트 상의 표준 곡선을 사용하여 각 시험 샘플에 대한 rhPDGF-BB 농도를 계산하였다. 각 샘플의 rhPDGF-BB 농도 및 총 부피를 사용하여 각 샘플 중에 존재하는 단백질의 총량을 계산하였다.

[0308] *약동학 분석*

[0309] 윈논린의 비-구획적 모듈을 사용하여 하기 파라미터를 계산하였다: 최종 반감기 ($t_{½}$), 최대 농도가 관찰된 시간 (T_{max}), T_{max}에 존재하는 관찰된 최대 농도 (C_{max}), t=0 시간에서부터 t=최종 관찰 시점까지의 약물 농도 대 시간 곡선하 면적 ($AUC_{0-최종}$) 및 생체이용률 (%F). 콴터카인 ELISA 키트 검정을 사용하여 혈청에서 측정된 바와 같이, 상이한 시점에서의 rhPDGF-BB 존재량을 사용하여 분석을 수행하였다.

[0310] 다른 파라미터, 예를 들어, 시간=0에서부터, 관찰된 최종 농도에 기초하여 무한대로 외삽된 시점까지의 약물 농도 대 시간 곡선하 면적 ($AUC_{무한대}$), 정맥내 투여한 경우의 체내 총 제거율 (CL), 및 건내 투여한 경우의 체내 총 제거율 (CL/F)도 계산할 수 있었다.

[0311] *통계학*

[0312] 통계학적 분석은 적절히 기술적 파라미터, 예를 들어, 평균, 표준 편차, 및 변동 계수로 제한되었다.

[0313] 결과

[0314] 처리 시점에 동물 모두에 대한 평균 체중은 294 g이었다. 동물은 평균 용량 347 ㎍/kg (102 ㎍), 34.7 ㎍/kg (10.2 ㎍) 또는 3.47 ㎍/kg (1.02 g)의 rhPDGF-BB를 받았다.

[0315] 347 ㎍/kg 투여군에 대한 평균 혈청 rhPDGF-BB 농도-시간 값은 도 13에 도시되어 있다. 5분째부터 8시간째 사이에 혈청내 rhPDGF-BB 농도는 감소한 것으로 관찰되었다. 8시간째부터 168시간째 사이에 혈청내 rhPDGF-BB 농도는 ELISA에 대한 정량 수준보다 낮았다 (<0.156 ng/mL). 34.7 ㎍/kg 및 3.47 ㎍/kg 투여군에 대한 혈청내 rhPDGF-BB 농도는 모든 시점에서 정량 수준보다 낮았다 (<0.156 ng/mL).

[0316] 하기 표 10은 347 ㎍/kg 투여군에 대한 수컷 스프라그 돌리 래트에서의 건내 (IT) 투여된 rhPDGF-BB, 및 실시예 4에 기술된 440 ㎍/kg 투여군에 대한 정맥내 (IV) 투여된 rhPDGF-BB의 파라미터에 관한 약동학적 성질 분석을 나타내는 것이다. Tmax는 0.083 시간 (4.98분)인 것으로 관찰되었고, Cmax 농도는 16.3 ng/mL였다. AUC0-최종은 12.58 ng*hr/mL이고, 생체이용률은 3.34%였다. 34.7 ㎍/kg 및 3.47 ㎍/kg 투여군에 대한 혈청내 rhPDGF-BB 농도는 모든 시점에서 정량 수준보다 낮은 것 (<0.156 ng/mL)으로 나타났는 바, 이에 약동학적 파라미터는 계산하지 않았다.

표 10

[0317]

IT 투여 (347 ㎍/kg 투여군) 및 IV 투여 (440 ㎍/kg 투여군)에 관한 약동학적 데이터 분석					
경로	**용량 (㎍/kg)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (시간)**	**$AUC_{0-최종}$ (ng*hr/mL)**	**%F**
IT	347	16.3	0.0833	12.58	3.34
IV	440	6,161.2	0.0167	375.64	-

[0318] 결론

[0319] rhPDGF-BB의 건내 (IT) 투여를 통해 초기에는 낮게 전신 노출되었다. rhPDGF-BB의 용량이 347 ㎍/kg보다 낮을 경우에는 rhPDGF-BB의 어떤 검출가능한 농도도 관찰되지 않았다.

[0320] 347 ㎍/kg rhPDGF-BB를 IT 투여하였을 때, 투여된 용량의 대략 3.34%가 전신 순환에 도달하였으며, Cmax 값은 IV 투여 후 관찰되는 값의 0.26%에 불과하였다. 따라서, 건내 투여 후 rhPDGF-BB는 혈청 내로 흡수된 후 빠르게 제거된다. 건내 투여 후 rhPDGF-BB의 낮은 생체이용률 (약 3.34%)을 고려해 볼 때, 놀랍게도 rhPDGF-BB가 작용 부위에 보유된다고 예측할 수 있다.

[0321] **실시예 6: rhPDGF-BB 주사가 외측 상과염에 미치는 효과에 관한 2상 무작위 단일 상승 용량 이중 맹검 위약 대조군 다중 센터 연구.**

[0322] 본 연구의 목적은 "테니스 엘보"로도 알려져 있는 외측 상과염에 대한 치료법으로서 rhPDGF-BB 주사가 가진 유효성을 평가하고자 하는 것이었다.

[0323] *연구 부위/연구군.* 본 연구는 최대 6곳의 임상 장소에서 수행하였다. 본 연구 군집은 백 (100)명의 대상체로서, 각 군당 스물 다섯명 (25명)씩 4개의 군으로 무작위화되었다. 각 코호트는 5명의 위약 환자와 20명의 활성 처리 환자를 포함하였다.

[0324] *연구 군집:* 삼개월 (3개월) 동안 보존적 치료를 통해서는 실패한, 외측 상과염이라는 임상적 진단을 받은 대상체.

[0325] *연구 디자인.* 본 연구는 2상 무작위 단일 상승 용량 이중 맹검 위약 대조군 다중 센터 연구였다. 연구 등록을 위한 포함 기준을 충족시키는 자격이 있는 대상체는 연구 참여를 위한 사전 동의를 구한 후에 등록하였다. 절차 후 24주 동안 대상체는 추적되었다. 연구 등록 후 무작위화를 통해 피험체를 1:1:1:1:1 개요에 따라 하기 처리군 중 하나로 지정하였다: (1) 용량 A: 완충제 단독 - 대조군; (2) 용량 B: 완충제 + 0.45 mg rhPDGF-BB; (3) 용량 C: 완충제 + 0.75 mg rhPDGF-BB; (4) 용량 D: 완충제 + 1.5 mg rhPDGF-BB; 및 (5) 용량 E: 완충제 + 3.0 mg rhPDGF-BB. 모든 용량에 대한 총 부피는 용량당 rhPDGF-BB 용액 1.5 ml였다 (이는 각각 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 및 2.0 mg/ml의 rhPDGF-BB의 처리군에 상응하고, 각각 70 kg인 인간을 기준으로 하여 6.4, 10.7, 21.4, 및 42.9 ㎍의 rhPDGF-BB/kg에 상응한다). 완충제는 20 mM 아세트산나트륨 (pH=6.0)이었다.

[0326] 계층형의 단계식 확대 접근법을 사용하여 무작위화를 수행하였다. 초기의 무작위화는 하기 패턴을 사용하여 대상체를 처리군으로 지정하는 것인, 통계학적으로 작동하는 단계식 확대 방식에 따라 진행되었다: 사전 결정된 통계학적으로 검증된 명수의 대상체를 용량 A (완충제 단독 - 대조군) 또는 용량 B (완충제 + 0.3 mg/ml rhPDGF-BB)로 무작위화하였다. 일단 사전 결정된 명수가 상기의 초기 용량 관용 (용량 B)에 도달하게 되면, 무작위화시키고자 하는 사전 결정된 통계학적으로 검증된 명수의 대상체를 2^{nd} 계층형의 무작위화를 통해 용량 A, 용량 B 또는 용량 C (완충제 + 0.5 mg/ml rhPDGF-BB)의 추가 옵션에 추가하였다. 용량 D (완충제 + 1.0 mg/ml rhPDGF-BB) 및 용량 E (완충제 + 2.0 mg/ml rhPDGF-BB)가 무작위화 방식에 도입되고, 연구 등록 목적에 도달할 때까지 무작위화 방식의 각 계층내의 통계학적으로 검증된 명수의 대상체를 추가하는 것인, 상기와 동일한 패턴을 반복하였다.

[0327] 지정된 용량의 단일 주사는 "페퍼링 기법"을 사용하여 건에 투여하였다. "페퍼링 기법"이란 바늘을 연한 부위에 삽입한 후, 피부로부터 드러내지 않고서 바늘을 빼고, 재지정하고, 재삽입함으로써 다회에 걸쳐 소량 주사를 실시하는 주사 방법이다.

[0328] 주사 부위에의 국소 반응 (발적, 팽윤, 가려움, 동통), 만성 손상 부위에의 임의의 동통 증가, 및 알레르기 반응을 나타내는 임의의 징후에 대해 대상체를 평가하였다. 대상체가 상기 증상들이 발생하였다고 보고하였다면,

조사자가 대상체를 평가하고 측정한 후에 중증도 및 본 연구 약물과의 관계를 측정하고, 지정된 연구 eCRF에 기록하였다. 증상의 중증도 및 연관성이 rhPDGF-BB 치료와 관련이 있는 것으로 측정되었다면, 스폰서 뿐만 아니라, 적절한 규제 기관에 즉시 통보하였다. 이어서, 그 시점에서 등록을 계속하게 할지 또는 대상체가 등록하는 것을 중단하게 할지 여부를 결정하였다.

[0329] 기준선 영상화를 위해 절차 전 전방-후방 (AP) 및 외측 x선을 수득하였는데, 이는 절차를 수행하기 최대 사주 (4주) 전에 수행하였다. 추가의 AP 및 외측 x선은 절차 후 이십사주 (24주)째에 매 연구 프로토콜마다 수득하였다. 안전성에 관한 최종 평가는 모든 대상체가 이십 사주 (24주)째의 추가 조사 방문을 마친 후에 수행하였다.

[0330] *포함 기준.* 본 연구에 포함된 대상체는 그 증상이 저항 회외 또는 손목의 손등 굽힘과 함께 재현될 수 있고, 외측 상과염이라는 임상적 진단을 받고, 연령이 ≥21세인 대상체이다.

[0331] *배제 기준.* 본 연구로부터 배제되는 대상체는 지난 삼개월 (3개월) 이내에 사전 코르티코스테로이드 주사 요법을 받은 적이 있거나, 외측 상과염 치료를 위해 외과적 개입을 받은 적인 있는 대상체; 효모 유래 제품에 대해 알레르기가 있는 대상체; 수근관 증후군의 병력이 있는 대상체; 경추 신경근증의 병력이 있는 대상체; 및 치료 육개월 (6개월) 이내에 이환된 팔꿈치에 외상을 입은 적인 있는 대상체이다.

[0332] *연구 지속 기간.* 등록은 대략 9개월이었다. 추가 조사 방문은 절차 후 최대 이십사주 (24주) 동안 사지의 악력 검사 및 신체 검사를 포함하였다. 이십사주 (24주)째의 최종 방문시까지 안정성 종점을 모니터링하였다.

[0333] 1차 결과 측정 기준. (1) 안전성. 유해 발생에 대해 평가함으로써 rhPDGF-BB의 안전성 및 내약성을 평가하였다. rhPDGF-BB는 안전한 것이고, 대상체가 내약성을 띠는 것이다.

[0334] *2차 결과 측정 기준.* 하기 평가는 본 연구 절차를 수행하기 2 전 방문시에 및 절차 후 사주(4주), 팔주(8주), 십이주(12주), 및 이십사주(24주)째 방문시에 완료하였다: (1) 팔, 어깨 및 손 기능장애 점수 (DASH). (2) 시각적 상사 척도 (VAS). (3) 악력 검사에 의해 측정되는 노력의 성실도. rhPDGF-BB로 치료하면 건에 대한 임상적 결과에 있어서 하나 이상의 유익한 변화가 일어나게 되는데, 그 예로 치료 전 점수 (DASH 및 VAS)로부터 개선된 변화가 일어나고/거나, 가해지는 압력 및/또는 손목 굴곡에 대한 동통이 감소하게 되고/거나, 이환된 사지의 운동성은 증가하게 되고/거나, 악력은 증가하게 된다.

[0335] **실시예 7: 래트 모델에서 rhPDGF-BB로 코팅된 봉합사가 건 치유에 미치는 효과: 조직학적 및 생체기계적 연구.**

[0336] **요약**

[0337] *도입.* 아킬레스 건 인열은 흔히 외과적 수복이 필요한 통상의 손상이다. 본 연구의 목적은 이중적이었다: (1) rhPDGF-BB로 코팅된 봉합사가 적절한 양의 인자를 수복 부위에 성공적으로 전달할 수 있는지 여부를 측정하는 것, 및 (2) rhPDGF-BB로 코팅된 봉합사가 생체기계적 및 조직학적 성질에 기초하여 래트 아킬레스 건 모델에서 치유를 개선시키는지 여부를 측정하는 것.

[0338] *방법.* 앞서 기술된 딥 코팅 방법을 사용하여 다양한 농도의 rhPDGF (0, 0.3, 1.0, 및 10.0 mg/ml)로 4-0 바이크릴 봉합사를 코팅하였다. 0 rhPDGF 군이 대조군으로서의 역할을 하였다. 다양한 딥코트 용액 중에서 코팅한 후, ELISA를 사용하여 봉합사 상의 생성된 rhPDGF의 농도를 측정하였다.

[0339] 래트 아킬레스 건을 가로로 절단하고, 4가지 유형의 봉합사 중 하나를 이용하여 급성으로 수복시켰다. 수술 후 4주째 건을 수거하였다. 각 표본으로부터의 조직학적 절편을 콜라겐 조직화 및 혈관형성에 관해 점수화하였다. 각 표본상에서 단축 인장 생체기계적 분석을 수행함으로써 하중 및 신전 데이터를 제공하였다. 각 표본의 영률 (Young's Modulus), 극한 인장 강도 및 탄성 인성에 대해 미가공 데이터를 분석하였다.

[0340] *결과.* 딥-코트 농도가 보다 고농도인 rhPDGF로 봉합사를 성공적으로 코팅시킴으로써 봉합사 상에 보다 다량의 rhPDGF가 있는 것을 얻을 수 있었다. 콜라겐 점수 또는 혈관형성에 있어서 대조군과 PDGF 군 사이에는 어떤 유의적인 차이도 없다는 것이 조직학적 분석을 통해 입증되었다. 극한 인장 응력에 있어서는 대조군 (1.0 ± 0.2 MPa)과 고용량의 PDGF 군 (1.9 ± 0.5 MPa 및 2.1 ± 0.5 MPa) 사이에 유의적인 차이가 있다는 것이 생체기계적 결과를 통해 입증되었다. 인장 영률은 모든 다른 군들보다 PDGF 10 mg/ml 군 (7.22, SD 3.79)에서 유의하게 더 높았다. 이로써 PDGF로 코팅된 봉합사를 이용하면 양성 용량 반응을 일으키고, 강도는 개선된다는 것이 입증되었다.

[0341] *결론.* 본 연구는 rhPDGF로 코팅된 봉합사가 양성의 용량 의존적 방식으로 수복된 건의 물질적 특성을 개선시킬

수 있을 것이라는 본 발명자들의 가설을 입증하였다.

[0342] **도입**

[0343] 현 연구에서, 4-0 바이크릴 봉합사를 재생가능한 양의 rhPDGF-BB로 성공적으로 코팅할 수 있으며, 생체기계적 및 조직학적으로 평가하는 바, rhPDGF-BB로 코팅된 봉합사를 이용한 래트 아킬레스 건 수복의 증가가 용량 의존적 방식으로 수복을 증진시킬 수 있을 것이라고 본 발명자들은 가정하였다.

[0344] **물질 및 방법**

[0345] 본 연구는 2부로 수행하였다: 1) 시험관내 봉합사 코팅 및 분석 및 2) 래트 모델에서의 생체내 아킬레스 건 수복. 본 방법은 IUCAC의 승인을 받은 것이었다.

[0346] ***I부*: *봉합사 코팅***: 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 [Dines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder Elbow Surg 2007;16:215S-221S]), 딥-코팅 방법을 사용하여 4가지 군의 4-0 바이크릴 봉합사 (에티콘(Ethicon: 미국 뉴저지주 서머빌))를 (1) 20 mM 아세트산나트륨 완충제 (담체 대조군), (2) 완충제 중 0.3 mg/ml rhPDGF-BB, (3) 완충제 중 1.0 mg/ml rhPDGF-BB, 및 (4) 완충제 중 10.0 mg/ml rhPDGF-BB로 코팅하였다. 간략하면, 70% 에탄올로 처리한 후, rhPDGF-BB를 함유하거나 함유하지 않는 (0, 0.3, 1.0, 및 10.0 mg/ml) 아세트산나트륨 완충제 중에 (바늘과 함께) 봉합사를 30분 동안 침지시킨 후, 대기 건조시켰다. 문헌 [Dines et al.]에 기술된 방법과 달리, 코팅 용액 중에는 어떤 젤라틴도 사용되지 않았다. 생체내 연구에 사용하기 위해 봉합사를 15 cm 길이로 잘랐다. 자르고 남은 길이의 봉합사는 시험관내 분석을 위해 사용하였다.

[0347] ***시험관내 rhPDGF-BB 방출***: 아세테이트 완충제 (1군) 또는 rhPDGF-BB (2-4군) 용액 중에서 코팅된 봉합사 (n=5/군)를 용리 완충제 (2% 소 태아 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민 및 1% HEPES 완충제를 함유하는 최소 필수 배지) 중에 놓고, 로킹 플랫폼 상에서 37℃하에 인큐베이션시켰다. 1, 6, 24, 및 48시간째인 시점에 용리 완충제를 완전히 교체하였다. PDGF-BB ELISA (휴먼 PDGF-B 듀오세트(Human PDGF-BB DuoSet)(R&D 시스템즈: 미국 미네소타주 미니애폴리스))를 사용하여 각 시점에서 rhPDGF-BB의 총 방출량을 측정하였다.

[0348] ***II부***: 연구 디자인: 48마리의 스프라그 돌리 래트 (350-400 g)를 맹검 방식으로 4개의 처리군 중 하나로 무작위화시켰다 (각 군당 n=12마리). 군은 상기 기술된 딥-코팅 용액 중 4가지 상이한 농도의 rhPDGF-BB (대조군 (0 mg/ml rhPDGF-BB) 및 3가지 실험군 (0.3, 1.0, 및 10.0 mg/ml rhPDGF-BB 초기 코팅 농도))로 구성되어 있었다.

[0349] ***외과적 수술***: 모든 수술은 멸균 조건하에서 수행하였다. 아킬레스 건 상에서 피부를 1.5 cm 절개하였다. 비절개 박리를 사용하여 아킬레스 건을 노출시켰다. 이 지점에서 종골 상의 수술용 메스 삽입부에 가까운 쪽의 수술용 메스 칼날을 사용하여 건을 가로로 절단하였다. 4가지 군 중 하나로부터의 것인 봉합사를 사용한 단순 단속 봉합법 및 변형 메이슨-알렌(Mason-Allen) 봉합법을 사용하여 건을 즉시 수복시켰다. 래트 아킬레스 건의 크기가 작기 때문에 어느 봉합법을 수행하든 그 차이는 없었다. 코팅되지 않은 단속 바이크릴 봉합사로 피부를 닫았다. 외과적 수복 후에 동물에 정상적으로 보행할 수 있도록 하였다. 4주 경과 후, 래트를 희생시키고, 종골 및 근위 장딴지근-가자미근 근육 복합체로부터의 골 블록을 비롯한 건을 수거하였다. 표본을 생체기계적 분석을 위한 것 (n=8마리/군, 신선한-동결) 또는 조직학적 분석을 위한 것 (n=4마리/군, 포르말린 고정)으로 무작위적으로 지정하였다.

[0350] ***생체기계적 성질***: 하중 정확도가 ± 0.5%인 100 N 로드 셀로 피팅된 인스트론 시스템 (모델 번호 5566번)을 사용하여 각 표본에 대한 단축 인장 생체기계적 분석을 수행하였다. 프로테아제 억제제를 함유하는 포스페이트-완충 염수 (PBS) 중에서 4℃하에 최대 4시간 동안 해동시킨 후, 샘플을 절개하여 과량의 근육은 제거하고, 종골 및 장딴지근-가자미근 말단을 220 그릿의 사포로 랩핑하였다. 표본을 공압식 그립 사이에 고정시키고, PBS 배취 중에 침지시켰다. 샘플에 대해 사전에 장력을 부하하고 (1 N), 샘플 크기를 측정하였다. 이어서, 0.25%/sec 변형률로 건을 인장 신전시켰다. 기능을 상실할 때까지 표본을 잡아 당기고, 생성된 하중 및 신전 데이터는 개인용 컴퓨터를 통해 수집하였고, 여기서, 데이터 수집은 10 Hz에서 이루어졌다. 시험 후, 수집된 데이터를 분석하여 하중-변위 또는 응력-변형 곡선의 선형 부분으로부터 (1) 선형 경직도 및 (2) 탄성 계수를 각각 측정하였다. 로딩된 곡선로부터 최대 하중 및 극한 인장 강도 또한 계산하였다.

[0351] ***조직학***: 아킬레스 건 삽입부의 종골로부터 건 표본을 분리하고, 수복된 아킬레스 건을 프로세싱하고, 파라핀 중에 포매시켰다. 각 표본으로부터 얻은 말로리(Mallory) 트리크롬 또는 시리우스 레드(Sirius red)로 염색하였다. 슬라이드를 영상화하고, 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 [Dines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder

Elbow Surg 2007;16:215S-221S]), 콜라겐 조직화 및 혈관형성 정도에 관한 점수화 체계를 사용함으로써 맹검화된 3명의 관찰자를 통해 점수화하였다. 처리군에 대해 맹검화된 3명의 독립적인 관찰자가 각각의 슬라이드를 평가하였다. 각 처리군에 대한 총 점수를 산출하고, 통계학적 유의도를 위해 비교하였다.

[0352] ***통계학적 분석***: 반복 측정 횟수와 함께 반복 측정 ANOVA를 사용하여 시험관내에서 방출된 rhPDGF-BB의 양을 분석하였다. rhPDGF-BB의 누적 방출량 및 총 전달 용량 대 초기 코팅 농도를 비선형 (로그-로그 스케일) 최소 제곱법으로 피팅하였다. 본페로니(Bonferroni) 다중 비교 검정과 함께 일원 ANOVA를 사용하여 생체기계적 파라미터에 관한 군들 간의 차이를 측정하였다. 던 다중 비교 사후 검정(Dunn's multiple comparison post-hoc test)과 함께 크러스칼-왈리스 검정을 사용하여 조직학적 등급 점수에 관한 통계학적 분석을 수행하였다. 생체기계적 데이터는 평균 ± SEM으로 제시하고, 조직학적 점수는 중앙값 (범위)으로 제시하였다. 유의도는 $p<0.05$로 결정되었다.

[0353] **결과**

[0354] **시험관내 rhPDGF-BB 방출**: 시험관내 방출에 관한 데이터는 봉합사의 길이에 의해 정규화된, rhPDGF-BB의 방출량 (ng/cm)으로 제시되었다 (도 14A 및 14B). 시험관내 방출은 다른 군에 대한 기준선 측정값 (누적 방출량: 1.3 ± 0.1 ng/cm)으로서 간주되는 1군 (0 mg/ml)을 비롯한 모든 군에서 측정하였다. 처음 1시간 동안 인큐베이션 시킨 후, 봉합사로부터 rhPDGF-BB의 볼루스 방출이 관찰되었다 (2군: 6.29 ± 3.0 ng/cm; 3군: 68.81 ± 9.3 ng/cm; 및 4군: 5,809.42 ± 541.6 ng/cm) (도 14A). 초기의 볼루스 방출에 이어서, 48-시간 시점에 걸쳐 추가의 rhPDGF-BB가 연속하여 점진적으로 방출되었다. 48-시간 동안 진행된 인큐베이션 기간에 걸쳐 방출된 rhPDGF-BB의 누적 방출량은 용량 의존적이었고, 딥-코팅 용액이 고농도일수록 rhPDGF-BB의 방출량은 증가하였다; 4군 (10 mg/ml; 6,495.9 ± 552.6 ng/cm)은 2군 (0.3 mg/ml; 14.0 ± 5.7 ng/cm) 및 3군 (1.0 mg/ml; 126.8 ± 18.8 ng/cm)에 비하여 유의하게 증가하였다 ($p<0.001$) (도 14B). 2군과 3군 사이에는 rhPDGF-BB의 누적 방출량에 있어서 어떤 유의적인 차이도 없었다 ($p>0.05$). rhPDGF-BB의 누적 방출량 (Y, ng/cm)은 하기 방정식에 따라 초기 코팅 농도 (X, mg/ml)에 대수적으로 비례하였다 ($R^2=0.9575$):

[0355] $$Y = 10^{(1.711*\log(x) + 2.102)}.$$

[0356] ***외과적 및 육안 관찰***: 동물 모두 수술에 대해 우수한 반응을 보였는데, 단, 예외적으로 (조직학적 분석을 위한 것으로 지정된) 3군 중의 한 동물은 마취로 인한 합병증에 따라 부수적으로 수술 후 밤사이에 사망하였다. 수복에 사용된 봉합사의 길이는 군들 간에 일치하였다 (1군: 4.8 ± 0.1 cm; 2군: 4.7 ± 0.2 cm; 3군: 4.8 ± 0.1 cm; 및 4군: 4.8 ± 0.1 cm; $p=0.94$) (도 14D). rhPDGF-BB의 시험관내 평균 방출량 및 봉합사의 길이에 기초한 바, 각 군에 대한 생체내 용량 (평균 ± SD)은 1군: 0 ng; 2군: 66.0 ± 61.2 ng; 3군: 602.5 ± 190.9 ng; 및 4군: 31,342.6 ± 6,774.5 ng인 것으로 계산되었다. rhPDGF-BB의 누적 방출량과 유사하게, 생체내 전달 용량 (Y, ng)은 하기 방정식에 따라 초기 코팅 농도 (X, mg/ml)에 대수적으로 비례하였다 ($R^2=0.9859$) (도 14C):

[0357] $$Y = 10^{(1.732*\log(x) + 2.757)}.$$

[0358] ***생체기계적 성질***: 시험 당일 인스트론 시험 기계상에 발생된 오류로 인해 5개의 표본을 생체기계적 분석에 사용할 수 없었다. 생체기계적 분석을 위한 생성된 표본의 개수는 n=7 (1, 2, 및 3군) 및 n=6 (4군)이었다.

[0359] 수복된 건의 구조적 특성 (극한 하중 및 경직도)에서 있어서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나 ($p>0.16$), 극한 하중에 대한 평균 값 (1군 : 22.1 ± 1.8 N; 2군: 31.6 ± 3.5 N; 3군: 28.0 ± 3.7 N; 4군: 27.6 ± 1.8 N) 및 경직도에 대한 평균 값 (1군: 6.7 ± 0.4 N/mm; 2군: 8.9 ± 0.8 N/mm; 3군: 8.0 ± 1.0 N/mm; 4군: 7.9 ± 0.7 N/mm)은 일관되게 대조군 (1군)에 비하여 rhPDGF-BB를 받은 군에서 더 높았다.

[0360] 단면적 (CSA)에 있어서는 1군 (0.21 ± 0.03 ㎠) 및 2군 (0.23 ± 0.04 ㎠)과 비교하였을 때, 4군 (0.14 ± 0.05 ㎠)에서 유의하게 감소한 것이 관찰되었다 ($p<0.05$). CSA는 또한 2군에 비하여 3군 (0.17 ± 0.02 ㎠)에서도 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$). CSA의 감소로 인해 수복된 건의 물질적 특성 (극한 인장 강도 및 탄성 계수)에도 유의적인 차이가 있었다. 0 mg/ml (1.0 ± 0.1 MPa) 및 0.3 mg/ml (1.4 ± 0.1 MPa) rhPDGF-BB 군에 비하여 10.0 mg/ml rhPDGF-BB 군 (2.1 ±0.2 MPa)에서, 및 0 mg/ml 군과 비교하였을 때, 1.0 mg/ml (1.9 ± 0.2 MPa) rhPDGF-BB 군에서 극한 인장 강도는 유의하게 증가하였다 ($p<0.05$). 모든 다른 군과 비교하였을 때 (0 mg/ml: 3.5 ± 0.4 MPa; 0.3 mg/ml: 4.4 ± 0.4 MPa; 1.0 mg/ml rhPDGF-BB: 4.9 ± 0.7 MPa), 10.0 mg/ml (7.22 ± 1.5 MPa) rhPDGF-BB 군에서 탄성 계수가 유의하게 증가한 것이 관찰되었다 ($p<0.05$). 0, 0.3, 및

1.0 mg/ml rhPDGF-BB 군들 간에는 서로 통계학상 차이는 없었다.

[0361] **조직학**: 각 군으로부터 4마리의 동물 (3군의 경우, n=3마리)에 대해 조직학적 분석을 수행하였다. 3명의 등급 판정인을 통해 각 절편을 점수화하고, 평균 점수를 측정하였다. 평균 점수는 중앙값 (범위)으로 제시하였다. 콜라겐 조직화 또는 혈관형성 점수에 있어서 군들 간에는 어떤 유의적인 차이도 없다는 것이 조직학적 분석을 통해 입증되었다. 그러나, 특히 콜라겐 조직화 점수에 있어서는 대조군과 비교하였을 때, rhPDGF-BB 군에서 보다 정상적인 외관을 띠는 경향이 있는 것으로 관찰되었다.

[0362] **논의**

[0363] 본 연구에서, rhPDGF-BB가 바이크릴 봉합사 상에 성공적으로 코팅될 수 있고, 시험관내에서 봉합사로부터의 rhPDGF-BB의 방출량은 초기 코팅 농도에 의존한다는 것을 본 발명자들은 입증하였다. 비록 rhPDGF-BB 처리군에서는 구조적인 기계적 특성 (극한 하중 및 경직도) 또는 조직학적 성질에서 개선된 경향을 보였지만, 이러한 특성에 있어서는 어떤 유의적인 차이도 관찰되지 않았다. 물질적인 기계적 특성 (극한 인장 응력 및 탄성 계수) 증가를 통해 제시된 바와 같이, rhPDGF-BB로 코팅된 봉합사에 대한 용량 의존적 방식의 반응은 물질적인 기계적 특성에 대해 관찰되었다.

[0364] 최고 용량의 rhPDGF-BB를 사용한 경우, 극한 강도 및 탄성 계수에 있어서 생체기계적으로 유의적인 차이가 관찰되었다. (극한 인장 강도 또는 극한 인장 응력으로 지칭되는) 극한 강도 및 (영률로서도 지칭되는) 탄성 계수는 건의 크기상의 특성 (변위 및 CSA)에 의해 정규화된 구조적인 특성 (극한 하중 및 경직도)을 나타내며, 이는 조직의 정질을 나타내는 척도이다. 본 연구에서, rhPDGF-BB의 용량이 증가함에 따라 CSA가 감소한 것은 물질적인 특성이 감소하였기 때문이다. CSA가 감소하였다는 것은 건이 더욱 조직화되었음을 암시한다. 비록 rhPDGF-BB를 사용하였을 때에 콜라겐 조직화가 개선되는 쪽의 경향이 있는 것으로 조직학상 관찰되기는 하였지만, 잠재적으로는 조직학적 성질에 대해 할당되는 샘플의 크기가 작기 때문에, 상기 점수는 CSA에 대해 관찰되는 것과 같은 통계학적 유의도에는 도달하지 못했다. 그와는 상관없이, CSA 감소와 조합된, 콜라겐 조직화 개선 경향은 대조군 봉합사에 비하여 최고 용량의 rhPDGF-BB가 보다 더 우수한 정질의 건 조직 (극한 강도 및 탄성 계수 증가)을 촉진시켰다는 것을 제안한다.

[0365] 봉합사 코팅 방법의 효능 및 용량 의존적 방식으로 건 치유에 미치는 효과를 평가하기 위해서는 rhPDGF-BB의 적용된 용량을 정량화할 필요가 있다. 최고 코팅 농도 (10 mg/ml)로부터 방출되는 rhPDGF-BB의 양에 있어서는 유의적인 증가가 있었지만, 비록 rhPDGF-BB의 평균 누적 방출량에서 있어서 9배의 차이 (각각 14.0 ± 5.7 ng/cm 대 126.8 ± 18.8 ng/cm)가 나기는 하였어도, 보다 저농도의 두 코팅 농도 (0.3 및 1.0 mg/ml)에서 주목되는 유의적인 차이는 없다는 것인 시험관내 분석을 통해 입증되었다. 이는 상기의 두 저농도 투여군 사이에는 극한 강도 및 탄성 계수에 있어서 어떤 유의적인 차이도 없다는 관찰 결과와 일치하였다.

[0366] 본 연구를 통해 rhPDGF-BB 전달이 래트 아킬레스 건의 생물학적 수복을 증가시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 본 연구의 한계는 이들 결과가 본 연구에서 사용된 샘플 크기에 의해 어떻게 영향을 받는지 해석하는 방법이다. 본 연구에서는 생체기계적 분석을 위해 각 군당 동물 8마리, 및 조직학적 분석을 위해 각 군당 동물 4마리를 사용하여 디자인하였다. 기계적 시험 당일 인스트론 시험 장치상에 발생된 오류로 인해 5개의 표본을 분석에 포함시키지 않았으며, 이로써 통계적 검증력은 감소하였다. 그 결과, 평균적으로 대조군에 비하여 증가한 것으로 나타난 경우일지라도, 특성, 예를 들어, 극한 하중 및 경직도에 있어서 보다 더 작은 차이는 실험군에 있어서 유의적인 것으로 간주될 수는 없었다.

[0367] 결과가 흔히 용량 의존적 것으로 나타나는 성장 인자를 적용함에 있어서, 동물의 크기가 증가한 경우에는 더 많은 용량을 전달하여야 할 필요가 있을 수 있다. 예비 조사 (데이터는 나타내지 않음)를 통해 전달 용량은 초기 코팅 농도 및 봉합사의 표면적, 둘 모두에 의존하는 것으로 나타났으며, 이는 보다 큰 동물에 대해 용량의 크기를 조절할 수 있다는 것을 제안한다.

[0368] 입증된 본 결과는 임상 적용에서 rhPDGF-BB로 코팅된 봉합사를 사용하는 것이 건 치유를 개선시키고 환자에 대한 작용을 증가시킬 수 있는 잠재능을 가질 수 있다는 것을 제안한다.

[0369] **참조 문헌**

Hess G. Achilles Tendon Rupture: A review of etiology, population, anatomy, risk factors, and injury prevention. Foot Ankle Spec. 2010 Feb;3(1):29-32

Sode J, Obel H, Hallas H, et al. Use of Flouroquinolones and risk of Achilles tendon rupture, a population based cohort study. European Journal of Clinical Pharmacology. 63(5):499-503.

Clain, M. Baxter, D.E. Achilles tendinitis. Foot Ankle Int 1992;13(8): 482-7.

Giddings VL, Beaupré GS, Whalen RT, Carter DR. (2000). Calcaneal loading during walking and running. Med Sci Sports Exerc. 32(3):627-34.

[0370] Costa MA, Wu C, Pham BV, Chong AK, Pham HM, Chang J. Tissue Engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. Tissue Eng 2006;12:1937-1943.

Kobayashi M, Itoi E, Minagawa H, et al. Expression of growth factors in early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits. J Shoulder Elbow Surg 2006;15:371-377.

Ignotz RA, Massague J, Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation in the extracellular matrix. J Biol Chem 1986; 261:4337-45.

Millette E, Rauch Bh, Kenagy D, Daum G, Clowes AW. Platelet derived growth factor-BB transactivates the fibroblast growth factorreceptor to induce proliferation in human smooth muscles cells. Trends Cardiov Med 2006;16:25-28.

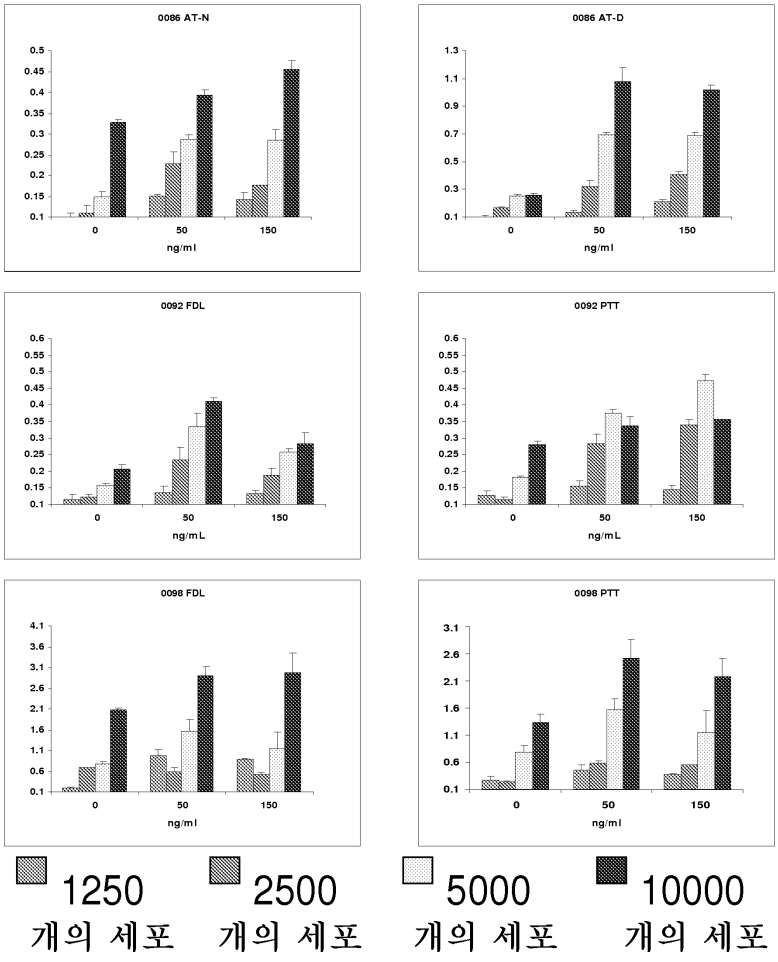
Erikson A, Nister M, Leveen P, Westermark B, Heldin CH, Claesson-Welsh L. Induction of platelelt-derived growth factor alpha and beta-receptor mRNA and protein by platelet derived growth factor BB. J Biol Chem 1991;266:21138-21144.

[0371]

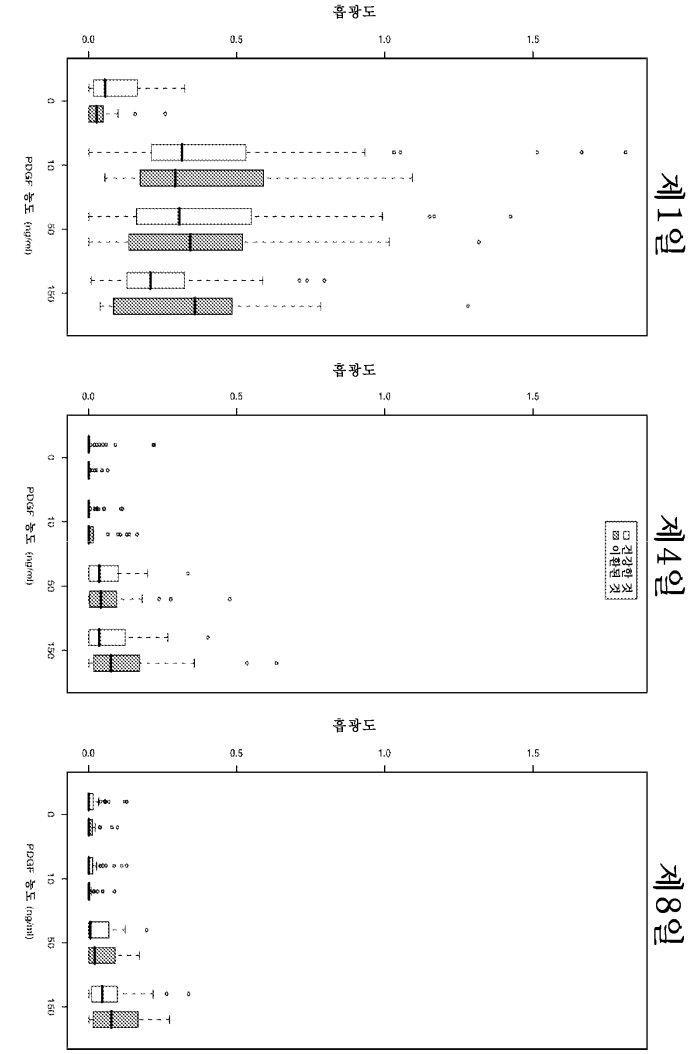
도면

도면1

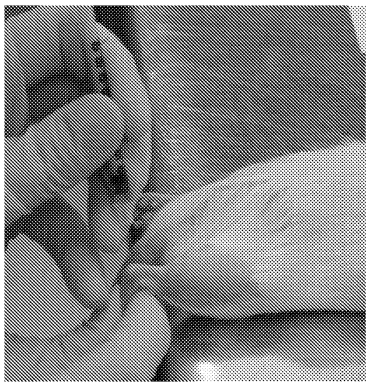
세포 이동


0086 AT-N
0086 AT-D
0092 FDL
0092 PTT
0098 FDL
0098 PTT
ng/ml
ng/mL
1250 개의 세포
2500 개의 세포
5000 개의 세포
10000 개의 세포

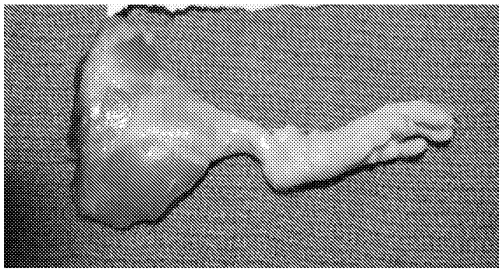
도면2



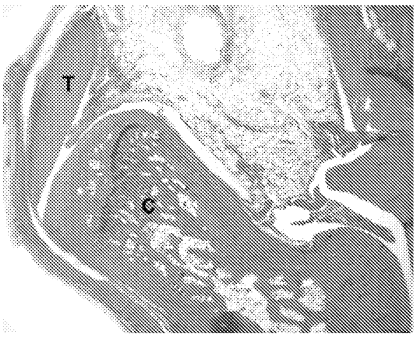
도면3



도면4

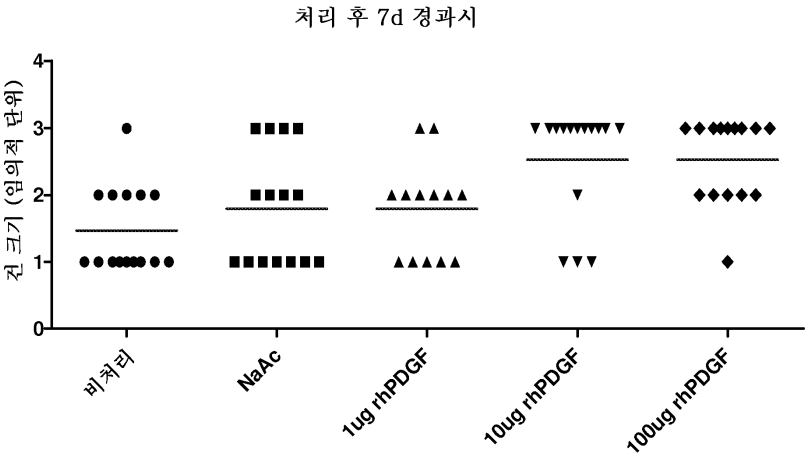


도면5

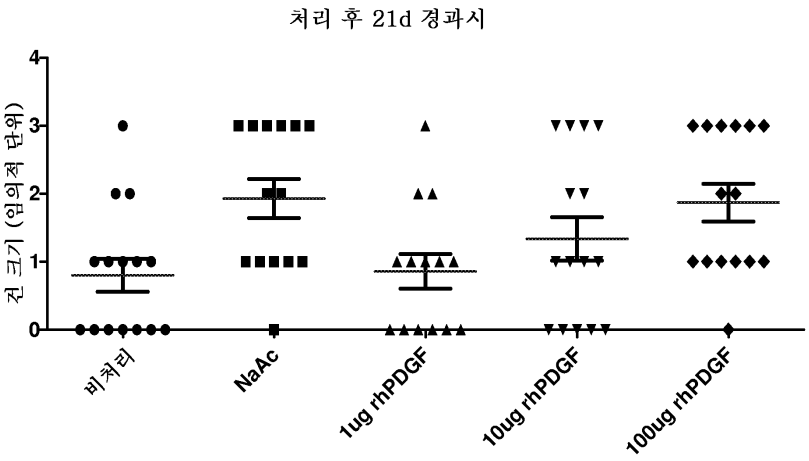


도면6

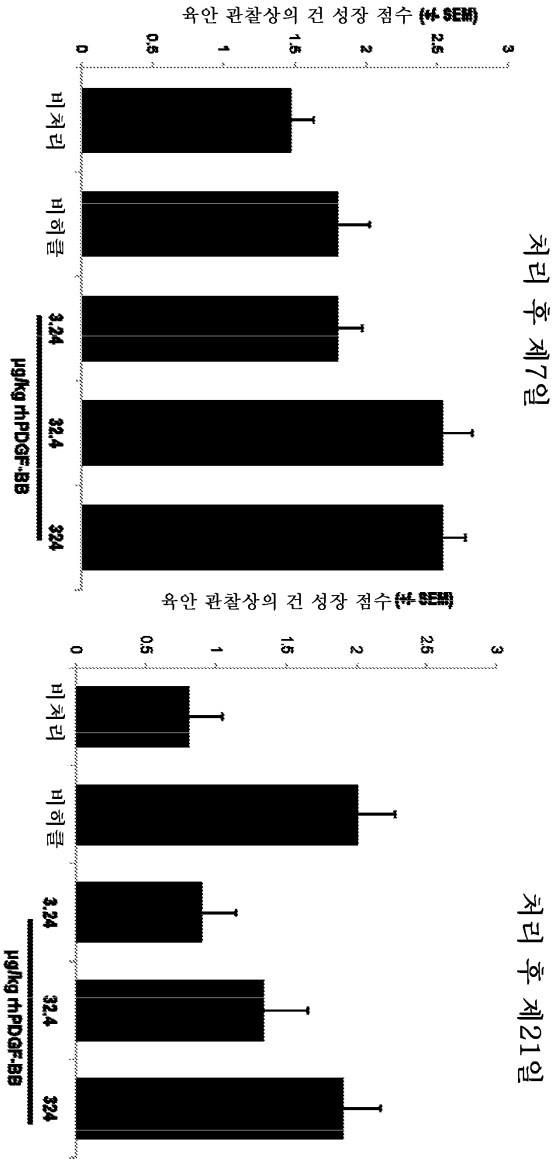
6A.


처리 후 7d 경과시
건 크기 (임의적 단위)
0
1
2
3
4
비처리
NaAc
1ug rhPDGF
10ug rhPDGF
100ug rhPDGF

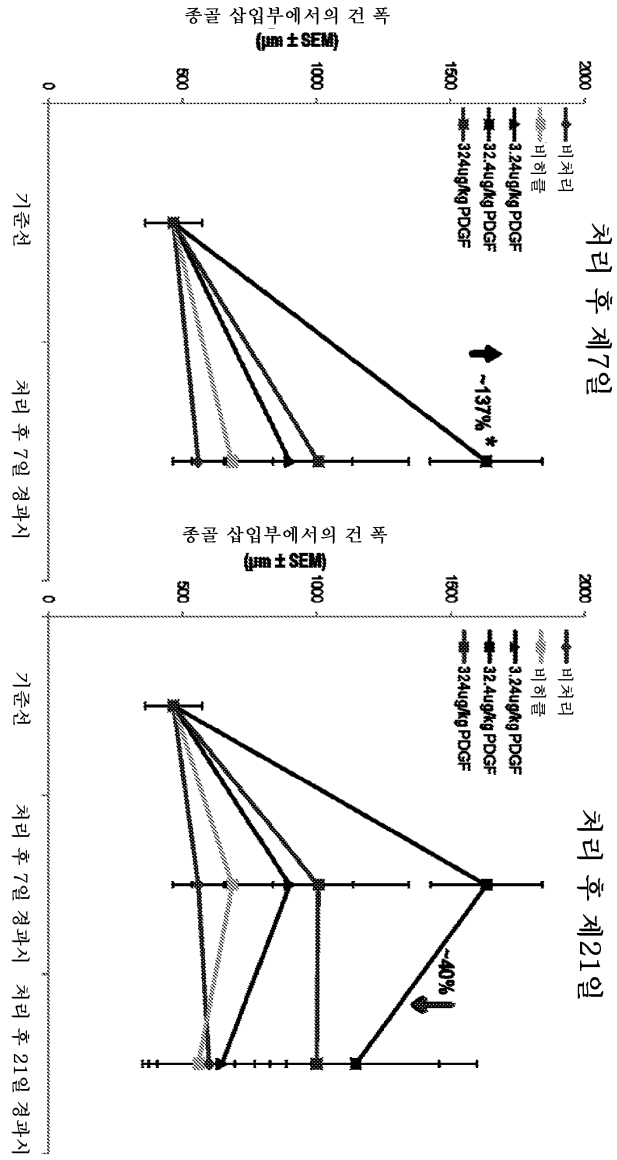
6B.


처리 후 21d 경과시
건 크기 (임의적 단위)
0
1
2
3
4
비처리
NaAc
1ug rhPDGF
10ug rhPDGF
100ug rhPDGF

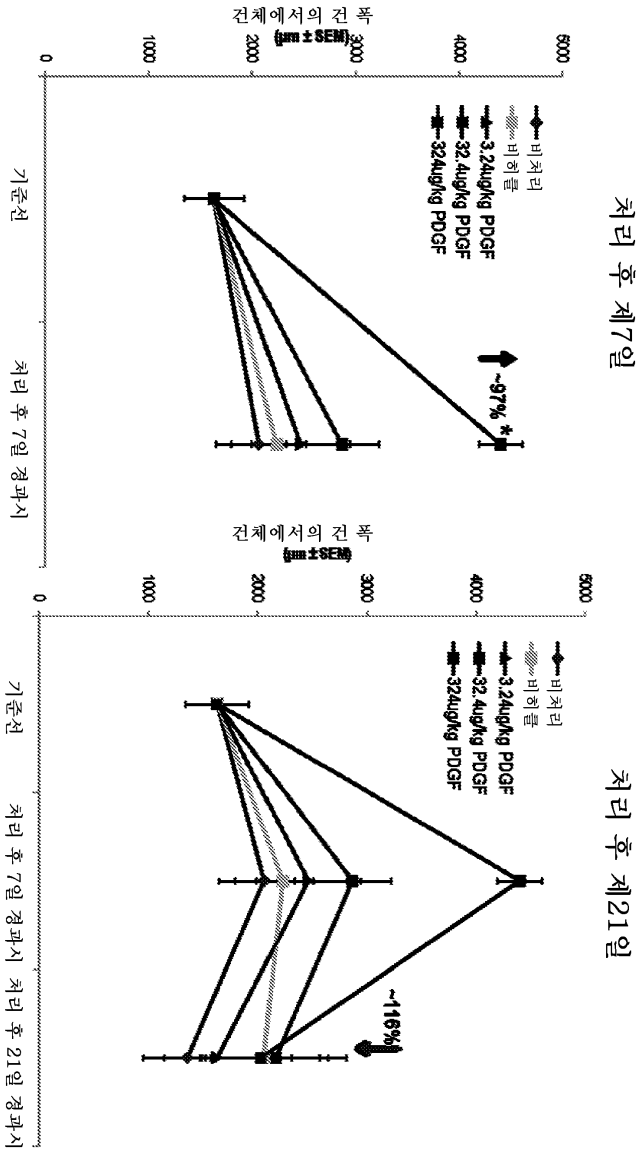
도면7


육안 관찰상의 건 성장 점수 (+/- SEM)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
비처리
비히클
3.24
32.4
324
μg/kg rhPDGF-BB
처리 후 제7일
육안 관찰상의 건 성장 점수 (+/- SEM)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
비처리
비히클
3.24
32.4
324
μg/kg rhPDGF-BB
처리 후 제21일

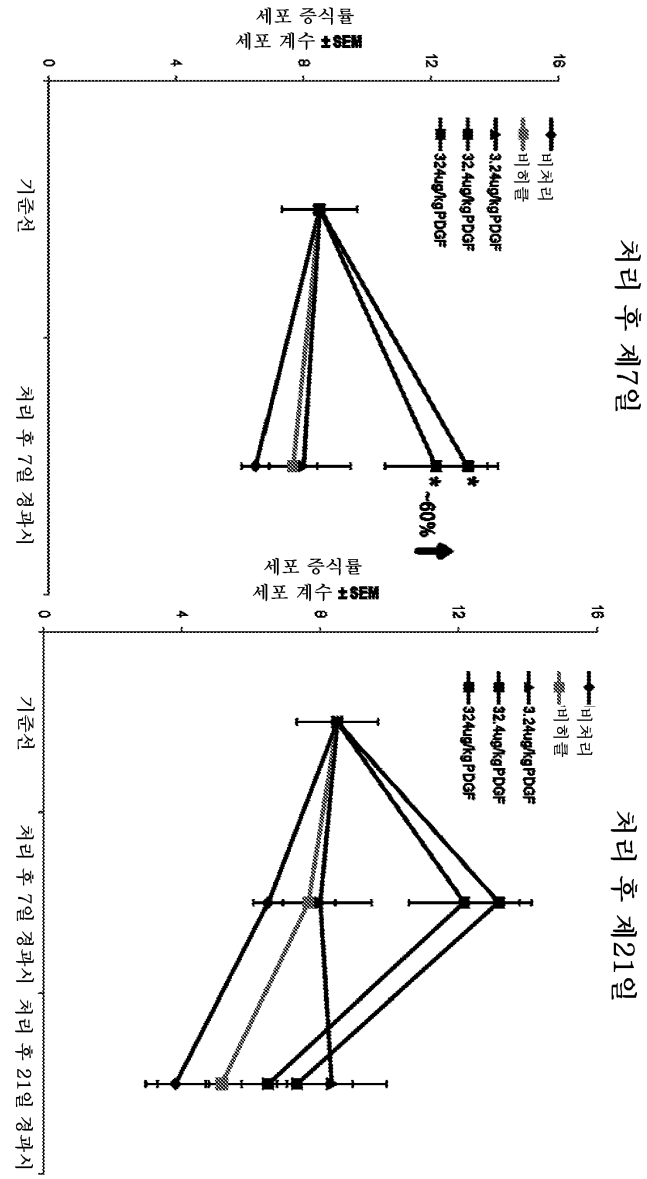
도면8


종골 삽입부에서의 건 폭
(μm ± SEM)
2000
1500
1000
500
0
비처리
비히클
3.24ug/kg PDGF
32.4ug/kg PDGF
324ug/kg PDGF
~137% *
기준선
처리 후 7일 경과시
처리 후 제7일
종골 삽입부에서의 건 폭
(μm ± SEM)
2000
1500
1000
500
0
비처리
비히클
3.24ug/kg PDGF
32.4ug/kg PDGF
324ug/kg PDGF
~40%
기준선
처리 후 7일 경과시
처리 후 21일 경과시
처리 후 제21일

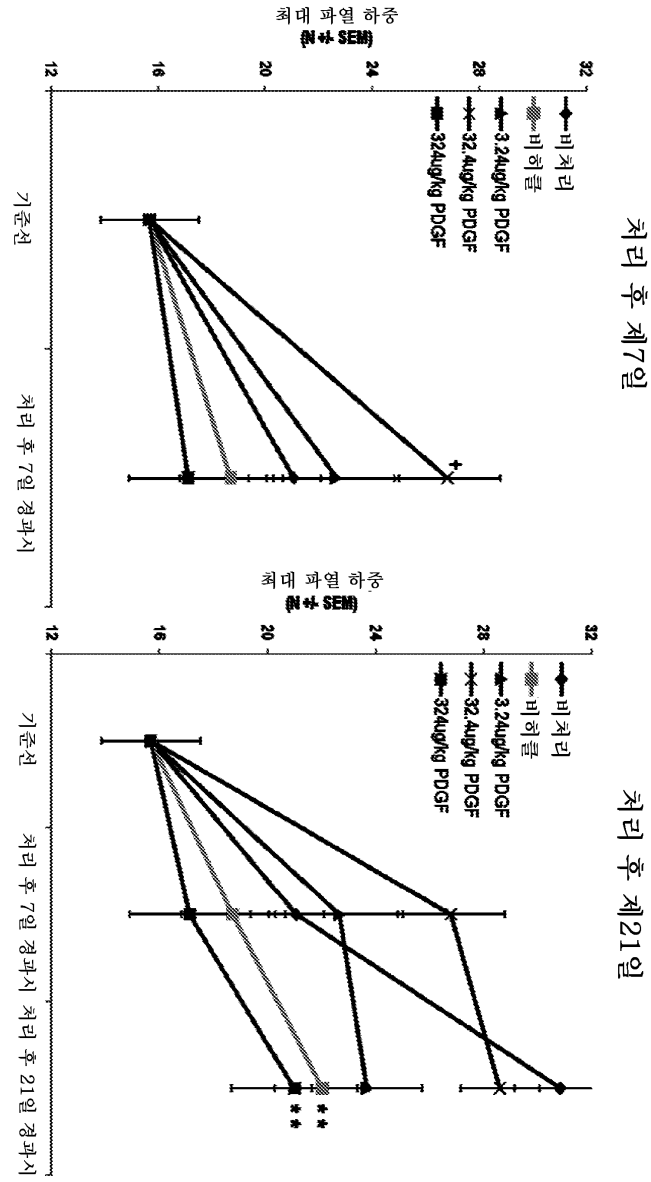
도면9


처리 후 제7일
건체에서의 건 폭
(μm ± SEM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
비처리
비 히 클
3.24ug/kg PDGF
32.4ug/kg PDGF
324ug/kg PDGF
-97% *
기준선
처리 후 7일 경과시
처리 후 제21일
건체에서의 건 폭
(μm ± SEM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
비처리
비 히 클
3.24ug/kg PDGF
32.4ug/kg PDGF
324ug/kg PDGF
-116%
기준선
처리 후 7일 경과시
처리 후 21일 경과시

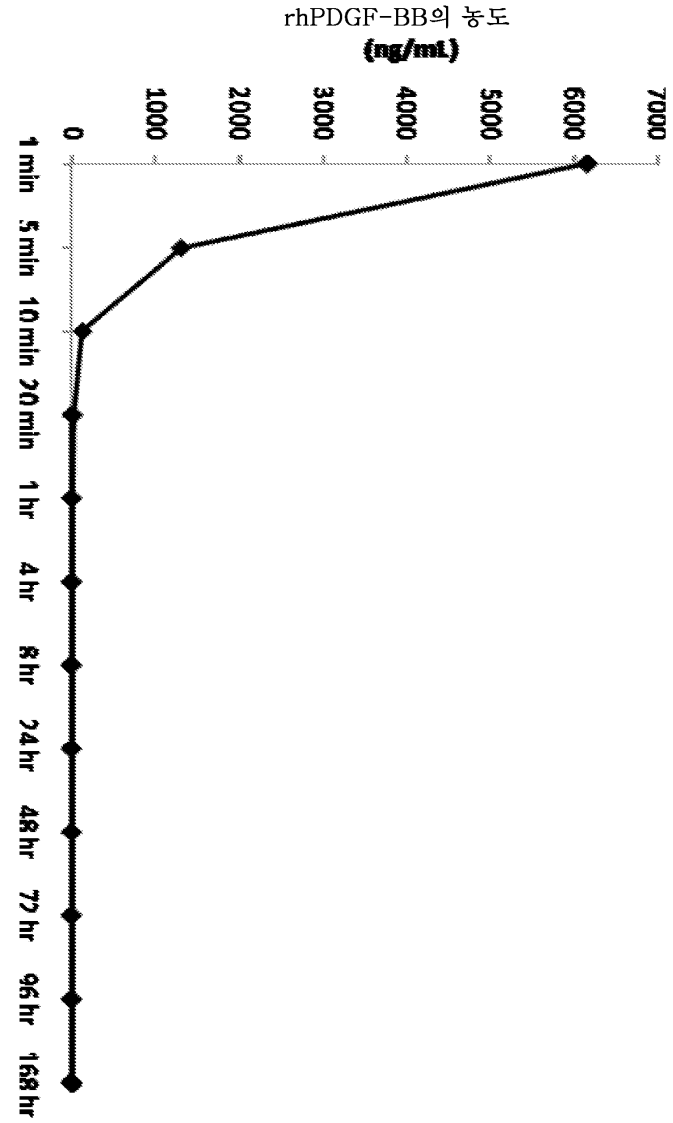
도면10


처리 후 제7일
세포 증식률
세포 계수 ±SEM
0
4
8
12
16
비처리
비히클
3.24ug/kgPDGF
32.4ug/kgPDGF
324ug/kgPDGF
*
*
~60%
기준선
처리 후 7일 경과시
처리 후 제21일
세포 증식률
세포 계수 ±SEM
비처리
비히클
3.24ug/kgPDGF
32.4ug/kgPDGF
324ug/kgPDGF
기준선
처리 후 7일 경과시
처리 후 21일 경과시

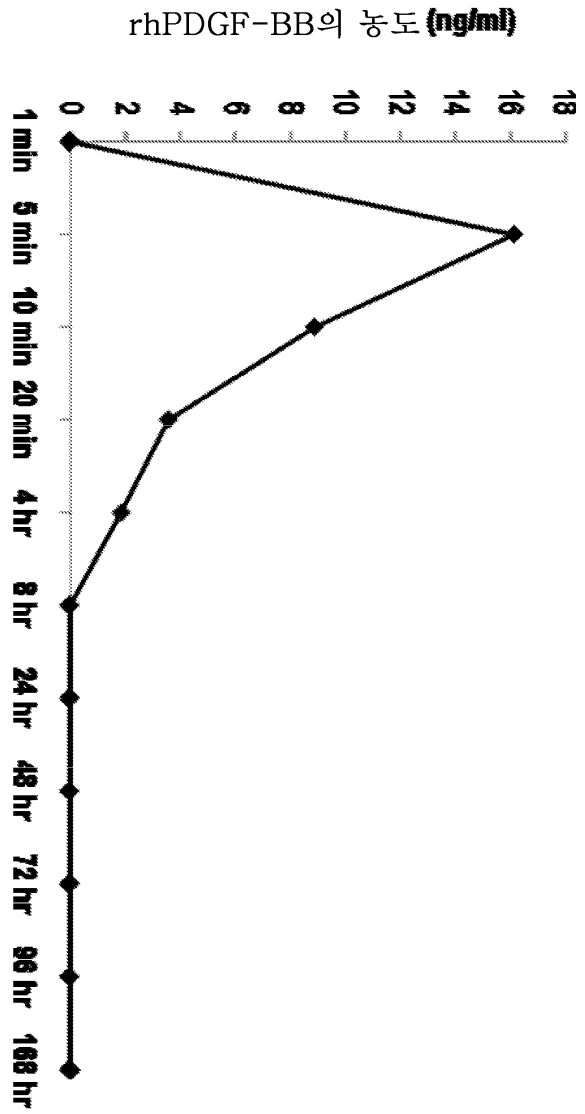
도면11


처리 후 제7일
처리 후 제21일
최대 파열 하중
(N +/- SEM)
12
16
20
24
28
32
비처리
비 히클
3.24ug/kg PDGF
32.4ug/kg PDGF
324ug/kg PDGF
기준선
처리 후 7일 경과시
처리 후 21일 경과시
**
**

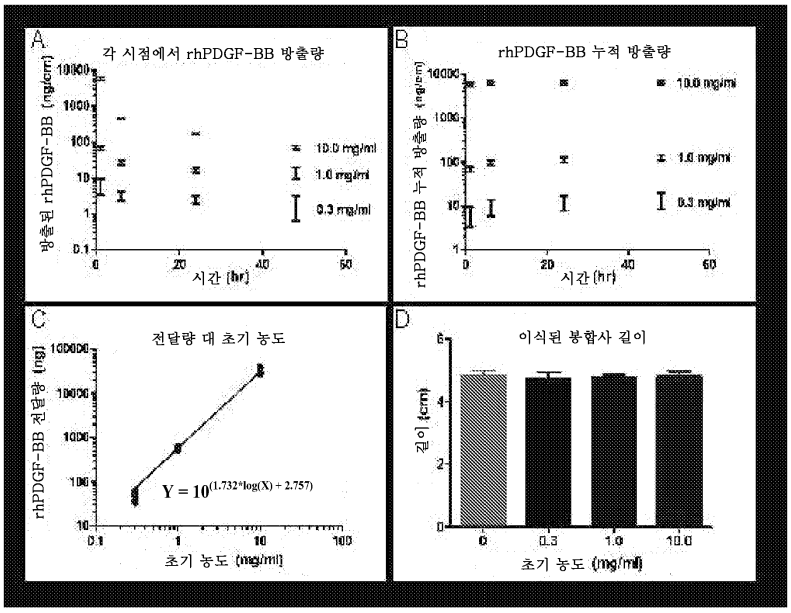
도면12


rhPDGF-BB의 농도
(ng/mL)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
1 min
5 min
10 min
20 min
1 hr
4 hr
8 hr
24 hr
48 hr
72 hr
96 hr
168 hr

도면13


rhPDGF-BB의 농도 (ng/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
1 min
5 min
10 min
20 min
4 hr
8 hr
24 hr
48 hr
72 hr
96 hr
168 hr

도면14


A
각 시점에서 rhPDGF-BB 방출량
방출된 rhPDGF-BB (ng/cm)
시간 (hr)
10.0 mg/ml
1.0 mg/ml
0.3 mg/ml
B
rhPDGF-BB 누적 방출량
rhPDGF-BB 누적 방출량 (ng/cm)
시간 (hr)
10.0 mg/ml
1.0 mg/ml
0.3 mg/ml
C
전달량 대 초기 농도
rhPDGF-BB 전달량 (ng)
Y = 10^(1.732*log(X) + 2.757)
초기 농도 (mg/ml)
D
이식된 봉합사 길이
길이 (cm)
초기 농도 (mg/ml)