(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[7]
A61L 27/00

(45) 공고일자 2002년09월26일
(11) 등록번호 10-0329408
(24) 등록일자 2002년03월08일

(21) 출원번호	10-1996-0701202	(65) 공개번호	특1996-0704587
(22) 출원일자	1996년03월08일	(43) 공개일자	1996년10월09일
번역문제출일자	1996년03월08일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1994/09870	(87) 국제공개번호	WO 1995/07108
(86) 국제출원일자	1994년09월02일	(87) 국제공개일자	1995년03월16일
(81) 지정국	국내특허 : 기네 오스트레일리아 캐나다 일본 북한 대한민국 노르웨이 EP 유럽특허 : 핀랜드 OA OAPI특허 : 코트디브와르		

(30) 우선권주장 08/119772 1993년09월10일 미국(US)

(73) 특허권자 제네틱스 인스티튜트, 인코포레이티드
미국 매사츄세츠 02140 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 87

(72) 발명자 캘빈 더블유. 케이. 임
미합중국 메사츄세트 01845 노쓰 안도버 히든 코트 41
마이클 씨. 휴버티
미합중국 메사츄세트 01810 안도버 불핀치 드라이브#610 700
리챠드 피. 노티, 쥬니어
미합중국 메사츄세트 01938 잎스위치 라인브룩 로드 151
리챠드 에이. 켄리
미합중국 메사츄세트 01810 안도버 웨스트민스터 스트리트10
제이 에이. 쉬리어
미합중국 메사츄세트 01810 안도버 웨건 휠 로드 5
제니퍼 엘. 스미쓰
미합중국 메사츄세트 01867 리딩 덕 로드 30
존 제이. 스텍커트
미합중국 메사츄세트 01810 안도버 롱우드 드라이브 14
씨. 마이클 필브룩
미합중국 메사츄세트 02116 보스톤 말보로 스트리트 #301 199
패트릭 죠셉 데소우자
미합중국 메사츄세트 01810 안도버 브룩사이드 드라이브 450-엘

(74) 대리인 특허법인코리아나, 윤여범

심사관 : 김수미

(54) 골형성단백질전달용제제

요약

본 발명은 골형성 단백질; 다공성 입자 중합체 매트릭스; 골형성 단백질-격리양의 응혈; 및 황산칼슘 헤미히드레이트 - 함유 물질의 약학적으로 허용 가능한 부가 혼합물을 함유하는 조성물을 개시한다. 또한, 증진된 용해도 및/또는 안정성 특성을 갖는 뼈 형태발생 단백질의 제제가 개시된다.

명세서

발명의 배경

본 발명은 골형성 단백질 및 그의 약학적 제제의 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 단백질이 연골 및/또는 골 형성을 유도할 수 있는 충분한 시간을 위해 골형성 단백질을 그 자리에 격리되도록 고안된 약학적 제제를 포함한다.

골형성 단백질은 연골 및/또는 골 형성을 유도하거나, 또는 유도를 보조할 수 있는 단백질이다. 많은 골형성 단백질이 최근에 분리되어 특성화되어지고, 일부는 재조합 방법에 의해 생성되고 있다. 예를 들면, 소위 골 형태발생 단백질 (BMP)이 광물질 소실 골 조직으로 부터 분리되고 [Urist, 미합중국 특허 제 4,455,256 호]; 많은 BMP 단백질이 재조합 방법에 의해 생성되고 [Wang et al., 미합중국 특허 제 4,877,864호 및 Wang et al., 미합중국 특허 제 5,013,549 호]; 일련의 형질전환 성장 인자 (TGF-α 및 TGF-β) 가 골 질환 치료에 잠재적으로 유용한 것으로 밝혀지고 [Derynck et al., 유럽 특허 제 154,434

호]; Vgr-1 으로 명명된 단백질이 골 형성 세포에서 높은 수준으로 발현된다는 것이 알려지고 [Lyons et al., (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86, 4554-4558]; 및 OP-1, COP-5 및 COP-7으로 명명된 단백질은 골 유도 활성을 나타낸다고 알려져 있다[Oppermann, et al., 미합중국 특허 제 5,001,691 호].

골 형성을 유도하고자 하는 위치로 골형성 단백질을 전달하도록 고안된 제재를 개발하기 위해 많은 시도가 있어왔다. 예를 들면, 아크릴화 에스테르 중합체 [Urist, 미합중국 특허 제 4,526,909호] 및 락트산 중합체 [Urist, 미합중국 특허 제 4,563,489 호] 와 같은 특정 중합 매트릭스가 이용되어지고 있으나, 상기 제제는 골 형성을 적정하게 유도하기 위한 충분한 시간을 위해 골형성 단백질을 격리시키지 못하고, 또는 적정 골 형성을 위해서는 너무 느리게 부식되는 것으로 밝혀졌다.

OP로 명명된 골형성 단백질의 송달을 위해 다공 입자의 생분해 가능한 매트릭스가 미합중국 특허 제 5,108,753 호 (Kuberasampath) 에 개시되어졌다. 미합중국 특허 제 5,108,753호에는 OP 용 성공적인 담체는 단백질에 결합되어져, 서방성 송달 시스템으로서 작용하고, 골 발달중 세포성 반응의 각 단계에 적응하고, 비특이적 단백분해로 부터 단백질을 보호하여야 한다고 개시되어 있지만, 골 형성이 기대되어 지는 위치에서 OP를 특이적으로 격리시키는 성분을 함유하는 제제는 제안되어 있지 않다.

미합중국 특허 제 5,171,579 호 [Ron et al.] 에는 다공성 입자당 평균표면적이 골 형성을 적정화하기 위해 중요하다고 개시되어 있다.

미합중국 특허 제 4,652,441 호, 미합중국 특허 제 4,711,782 호, 미합중국 특허 제 4,917,893 호 및 미합중국 특허 제 5,061,492 호 [Okada et al.] 및 미합중국 특허 제 4,954,298 호 [Yamamoto et al.] 에는, 외부 오일층내 중합체 벽 물질로 둘러싸인 내부 수성층으로 캡슐화된 폴리펩티드 약제 및 약제-보유 물질을 함유하는 지속적인 방출 마이크로캡슐이 개시되어 있다. 골 형태발생 단백질이 상기의 형성 가능한 폴리펩티드로서 기재되어 있다 할 지라도, 골형성 단백질의 마이크로캡슐화가 적정 골 형성을 위해 충분한 상기 단백질의 제어 방출을 방해한다.

문헌 [Yamazaki et al., Clin. Orthop. and Related Reserach, 234 : 240 - 249 (1988)] 에, 뼈로 부터 정제된 골 형태발생 단백질 1 mg 및 소석고 5 mg을 함유하는 이식물의 용도가 개시되어 있다. 미합중국 특허 제 4,645,503 호에는 골 이식 물질로서 히드록시아파타이트 및 소석고의 합성물이 개시되어 있다.

콜라겐 매트릭스는 또한 골형성 단백질용 송달 매개제로서 사용되고 있지만 [Jeffries, 미합중국 특허 제 4,394,370 호], 콜라겐은 환자에게서 바람직하지 않은 항원반응을 자주 유발한다. 그러므로, 골 형성 유도가 기대되는 위치에서 안전하고, 효과적으로 상기 골 형성을 유도할 수 있는 충분한 시간 동안 골형성 단백질을 격리시킬 수 있는 약학적 제제의 필요성이 남아있다.

발명의 요약

본 발명은 골형성 단백질의 약학적으로 허용 가능한 부가혼합물; 다공성 입자 중합체 매트릭스; 골형성 단백질 - 격리 양의 자가 이식 혈액; 및 허용량의 칼슘 술페이트 헤미히드레이트 -함유 물질 (CSHS)을 함유하는 조성물을 제공한다. 또 다른 구현예로는, 본 발명은 골형성 단백질의 약학적으로 허용 가능한 혼합물; 골형성 단백질 - 격리 양의 자가 이식 혈액; 및 허용량의 CSHS 을 함유한다. 반면 본 발명의 또 다른 구현예는 골형성 단백질 및 적정량의 CSHS 의 제제를 함유한다. 제제는 다른 단백질 격리제, 특히 셀룰로스성 물질을 임의로 포함할 수 있다.

출원인은 또한, 놀랍게도, 증진된 용해도 및 안정성 특징을 갖는, BHPs, 특히 BMP-2의 개량된 제제가 pH 6.0 이하에서 글리신, 수크로스, 및 글루탐산 히드로클로라이드의 조성물을 사용하여 달성될 수 있다는 것을 발견하였다. 발명의 바람직한 구현예로는, 상기 제제는 pH 약 4.5 에서, 약 2.5 % 글리신 (g/100 ㎖ (w/v)), 약 0.5 % 수크로스(w/v), 약 5 mM 글루탐산 히드로클로라이드 (약 0.1 % w/v), 및 약 0.01% (w/v) 폴리소르베이트 80 을 함유한다.

본 발명의 조성물은, 다른 용도중, 조직 손상 및 골절의 치유를 위한 연골 및/또는 골 형성을 촉진하기 위해 사용될 수 있는 골형성 단백질 제제의 제조에 유용하다.

발명의 상세한 설명

미합중국 특허 제 5,171,579 호에는, 다공성 입자화 중합체 매트릭스가 제제에 혼입된다면, 항섬유소 용해제를 사용하지 않고, 자가 이식 혈액을 사용하여 골 형성 유도 활성이 기대되는 위치에서 골형성 단백질이 격리될 수 있다는 것이 개시되었다. 제조 시간을 감소시키고 상기 제제의 조작 특성을 개량하기 위해서, 출원인은 놀랍게도 칼슘 술페이트 헤미히드레이트 - 함유 물질 (CSHS)을 첨가하는 것이 바람직하다는 것을 발견하였다. CSHS 는 소석고 (POP)로서 공지된, 정제 칼슘 술페이트 헤미히드레이트 ($CaSO_4 \cdot ½ H_2O$), 또는 POP 및 히드록시아파타이트(POP:HA)의 혼합물 중 어느 하나인 것이 바람직하다. CSHS의 첨가는 장치 시간을 감소시키고, 생성된 제제의 증진된 성형성(moldability) 및 농도를 제공한다.

본 발명의 실행에 있어서 유용한 골형성 단백질은 당 분야의 숙련가에게는 잘 공지되어 있고, 상기 설명된 것들에 포함된다. 본 사용을 위해 바람직한 골형성 단백질은 미합중국 특허 제 4,877,864 호; 미합중국 특허 제 5,013,649 호; WO 90/11366 (October 4, 1990 발행); WO 91/18098(November 28, 1991 발행); WO 93/00432 (January 7, 1993 발행) 및 미합중국 출원 시리즈 (May 12, 1993 출원) 에서 BMP-1 내지 BMP-10 으로서 명시된 BMP 류의 것들이다. 상기 공보의 개시는 참고로서 포함된다.

649 특허에 상세하게 기재된 전 길이의 cDNA 서열인, BMP-2가 가장 바람직하다. 물론, 2개 이상의 상기 골형성 단백질의 조합이 사용될 수 있고, 또한 골형성성을 나타내는 상기 단백질의 단편일 수 있다.

상기 골형성 단백질은 호모이량체 종인 것으로 공지되어 있으나, 또한 혼합된 헤테로이량체로서 활성을 나타낸다. 골형성 단백질의 헤테로이량체 형태는 또한 본 발명의 실행에 있어서 사용될 수 있다. BMP 헤테로이량체는 WO 93/09229에 기재되어 있고, 이의 개시는 참고로서 포함된다. 재조합 단백질은 천연 발생의 단리된 단백질에 대해서 바람직하다. 여기에서 사용되는 골형성 단백질의 양은 선구 세포를 침윤시키

는 증가된 골형성성을 자극하는 유효량이고, 이는 하기에 보다 상세하게 기재된 바와 같이 처리되는 결함의 크기 및 성질에 의존할 것이고, 상기 양은 사용된 다공성 입자화 중합체 매트릭스 보다 적은 규모순인, 일반적으로, 사용된 다공성 입자화 중합체 매트릭스 각 10 ㎎에 대해서 1 ~ 50 ㎍의 단백질의 범위이고, 보다 바람직하게는 사용된 중합체 매트릭스 (0.2 g/cc의 밀도로 추정)의 각 밀리그램에 대해서 0.5 ~ 10 ㎍의 범위이다.

골형성 단백질은 약학적으로 허용 가능한 용액의 형태 (동결건조된 형태로 부터 재조성을 포함)로 사용될 수 있다. 골형성 단백질을 약 1 ㎎/㎖ 이상, 바람직하게는 약2 ~ 8 ㎎/㎖ 의 농도로 용해시키는 것이 적정하므로, 약학적 유효량의 단백질은 과도한 부피의 담체를 필요로 하지 않고 전달될 수 있다. 어떠한 이용에 대해서는, 상기 2 ㎎/㎖ 이상의 농도가 바람직할 수 있다. 총 양성 전하를 갖는 아미노산 (예: 아르기닌, 히스티딘, 리신 및 글리신과 베타-알라닌의 에틸 에스테르와 같은 총 1+ 종류), 바람직하게는 총 2+ 전하 (예: 히스티딘의 에틸 에스테르, 리신 및 아르기닌의 메틸 에스테르, 및 아그마틴)를 갖는 아미노산이 상기 관점에 대해서는 유용하다. 화합물의 양성 전하가 음성 전하 (예: 감마-아미노부티르산, 베타-아미노 프로피온산, 및 글리신-글리신 디펩티드와 같은 총 중성 종류) 를 중화시키기에 충분히 떨어져 있다면 (적어도 2 ~ 3 개의 CH_2 단위체 만큼 떨어진), 총 제로 전하를 갖는 아미노산은 상기 관점에 관하여 유용하다. 여기에서 사용된 다른 용해제로는 폴리(소르베이트), 덱스트란 술페이트, 구아니딘, 헤파린, 염화나트륨, 글루탐산 히드로클로라이드, 아세트산 및 숙신산이 포함된다. BMP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 과 같은 이량체 BMP, 및 BMP-2/6 및 BMP-2/7과 같은 BMPs의 헤테로이량체의 용해에 사용하기 위해, 바람직한 용해제에는 아르기닌 및 히스티딘 (그의 에스테르 포함) 및 글루탐산 히드로클로라이드가 포함된다.

글루탐산 히드로클로라이드 (HCl)는 바람직한 용해제이다. 약 1 ~ 약 20 mM (약 0.02 ~ 약 0.37 % w/v), 바람직하게는 약 5 ~ 약 10 mM (약 0.1 ~ 약 1.8 % w/v) 의 농도, 및 약 6.0 이하, 바람직하게는 약 3.5 ~ 약 5.25, 바람직하게는 약 4.5의 pH에서 사용된다. 조성물은 또한 약 0.1 ~ 약 5.0 % (w/v), 바람직하게는 약 0.5 ~ 약 2.5 %의 당; 가장 바람직하게는 약 0.5 %의 수크로스; 및 약 0.5 ~ 약 10.0 % (w/v), 바람직하게는 약 2.0 ~ 약 2.5 %의 글리신을 포함한다. 입자의 형성을 방지하기 위해서, 글루탐산 히드로클로라이드 조성물은, 예를 들어, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 또는 플루로닉 F-68인, 폴리옥시에스테르와 같은, 약 0.01 ~ 약 0.1 % (w/v)의 비이온성 계면활성제를 임의로 포함할 수 있다. 수크로스/글리신의 비를 다양하게 하여 조성물에 대한 습기 함량 및 크기 특성을 제공할 수 있다. 다른 성분은 본 발명의 조성물에서 대체될 수 있다. 예를 들면, 글루탐산 대신에, 4.5에 가까운 pKa를 갖는 아세트산과 같은 모노-산이 사용될 수 있다. 숙신산과 같은 디-산은 낮은 농도 (약 5 mM 이하, 바람직하게는 약 1 mM) 에서 사용될 수 있다. 글루탐산 히드로클로라이드가 사용되는 경우, 글루탐산/히드로클로라이드 또는 글루탐산 및 HCl의 혼합물중 어느 하나가 사용될 수 있다. 글루탐산 히드로클로라이드는 또한 글루탐산 히드로클로라이드 모노히드레이트와 같은, 수화물 형태로 사용될 수 있다. 적은 변형으로서, 예를 들어, 글루탐산 나트륨과 같은, 글루탐산 또는 글루탐산염이 글루탐산 히드로클로라이드 대신에 사용될 수 있다. 글리신은 유사한 전하를 갖는 다른 아미노산에 의해 전체 또는 부분적으로 대체될 수 있다. 또한, 알부민, 글리세롤, 만니톨 및 다른 당과 같은 다른 선택적인 성분이 첨가될 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 기재된 바와같이, 예를 들어, 글루탐산 히드로클로라이드 대신에 글루탐산 또는 글루탐산 나트륨을 사용하는 조성물인, 대체 성분을 사용하는 조성물을 포함한다. 다른 변형은 당 분야의 숙련자에게 자명할 것이고, 또한 본 발명에 포함된다.

상기 제제는 저장, 운반 및 안정성에 있어서 유리하다면, 동결건조되고 물로 재조성될 수 있다. 본 발명의 동결건조된 제제는 하기의 조성 : 약 3.12 중량 % ~ 약 24.38 중량 %의 BMP; 약 0.52 % ~ 약 10.27 %, 바람직하게는 약 1.84 % ~ 5.27 % (w/w)인 글루탐산 히드로클로라이드; 약 38.4 중량 % ~ 약 75.7 중량 %인 글리신; 약 14.28 중량 % ~ 47.15 중량 % 인 수크로스; 및 선택적으로 약 0.15 중량 % ~ 2.94 중량 %인 폴리소르베이트 80 으로 이루어질 수 있다. 예를 들면, 동결 건조된 두가지 바람직한 조성물을 하기의 표 1에 기재한다 :

표 1

a. 4.0 ㎎/㎖ 의 제제			
BMP-2	4.0	㎎/㎖	(11.42 중량 %)
글루탐산 HCl	0.918	㎎/㎖	(2.62 중량 %)
글리신	25	㎎/㎖	(71.39 중량 %)
수크로스	5	㎎/㎖	(14.28 중량 %)
폴리소르베이트 80	0.1	㎎/㎖	(0.29 중량 %)
b. 2.0 ㎎/㎖ 의 제제			
BMP-2	2.0	㎎/㎖	(6.06 중량 %)
글루탐산 HCl	0.918	㎎/㎖	(2.78 중량 %)
글리신	25	㎎/㎖	(75.72 중량 %)
수크로스	5	㎎/㎖	(15.14 중량 %)
폴르소르베이트 80	0.1	㎎/㎖	(0.30 중량 %)

상기 제제는 40 시간 미만 후 잘 조절된 수준의 습기를 가지며, 재생 가능하게 동결 건조될 수 있다. 제제는 다양한 온도에서 우수한 저장 안정성을 제공한다. 상기 제제는 또한 BMP의 더 높은 투여량이 투여될 수 있도록, BMP의 더 높은 용해도를 제공하고, 상기 기재된 장치와의 우수한 상용성을 나타낸다. 본 발명 내에서 최소한 변형 및 개량된다면, 상기 제제는 약4 ㎎/㎖ 이상의 더 높은 농도의 BMP-2 또는 다른 BMPs의 용액을 제조하는데 사용될 수 있다.

여기에서의 용도를 위해 골형성 단백질 및 용해제를 혼합하는 방법으로는, 초여과법, 투석, 겔 여과법, 및 소수성 반응 크로마토그래피법 등의 각종 잘 공지된 방법이 사용될 수 있으나, 여기에 국한되지는 않는다.

본 발명의 실행에 있어서 유용한 다공성 입자 중합체 매트릭스 성분은 하기 기재되는 바와 같이 그 자체가 골형성 단백질을 위한 비계 재료(scaffolding)를 제공하는 다공성 입자로 형성될 수 있는 중합성 물질이면서, 새로운 골 성장에 의해 대체될 수 있도록 하는 생분해성을 갖는다. 예로는 아미노산, 오르토에스테르, 무수화물, 프로필렌-공-푸마르산염의 중합체, 또는 하나 이상의 α-히드록시 카르복실산 단량체의 중합체이다(예: α-히드록시 아세트산 (글리콜산) 및/또는 α-히드록시 프로피온산 (락트산)). 후자는 그의 d-또는 1-형으로, 또는 라세미 혼합물로서 사용될 수 있고, 라세미 혼합물이 바람직하다. 락트산 및 글리콜산의 공중합체(PLGA)가 사용되는 경우, 단량체의 몰비는 임상적 지표가 나타내는 바에 따른 목적 생부식 수명 (bioerosion lifetime) 에 따라 1:99 ~ 99:1의 범위일 수 있고, 이때 50 % 이상인 단량체 중 어느 하나가 더 오랜 생부식 수명을 나타낸다 (더 느린 생분해). 중합체의 분자량은 약 1,000 ~ 100,000 ($CHCl_3$ 중 폴리스티렌 기준)의 범위일 수 있고, 50 : 50의 공중합체가 사용되는 경우 30,000 ~ 50,000가 바람직하다. 일반적으로, 분자량이 커질 수록, 생분해는 더 느려진다.

본 발명의 중합성 매트릭스 성분은 속이 빈 입자 (표면 다공질인)의 매우 다공성인 형태로 사용되고, 이하 총체적으로 '다공성 입자'로 칭한다. 상기 다공성 입자는 일반적으로 150 ~ 850 마이크론, 바람직하게는 150 ~ 500 마이크론, 가장 바람직하게는 150 ~ 300 마이크론의 직경을 갖는 구형이다. 상기 입자 크기는 포유류 골형성 선구 세포가 여과될 수 있고 골형성 단백질에 의해 양성의 영향 (골형성성/골 성장 속도의 증가에 의해 증명)을 받도록 입자사이에 충분한 공간을 생성한다.

미합중국 특히 제 5,171,579 호에는, 다공성 입자당 평균 표면적이 골 형성을 적정화하는데 중요하다는 것이 개시되어 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 골 형성에 유용한 다공성 입자는 약 0.02 ~ 4 ㎡/g의 평균 표면적을 가져야 한다. WO 93/06872 에는, 또한 다공성 입자를 생성하기 위해 사용되는 용액에 '포로시겐 (porosigen)' (입자 표면적을 증가시킴으로써 다공성을 부여할 수 있는 조성물)을 도입시킴으로써 목적 표면적을 갖는 다공성 입자를 생성하는 것이 가능하다고 개시되어 있다. 상기 공보의 개시는 여기에서 참고로서 포함된다. 다공성 입자를 γ-방사선을 조사하여 멸균시킴으로써 생부식 속도를 또한 조절하는 것이 가능하다. γ-방사량이 많을 수록, 생부식이 더 빨라진다. 여기에서 사용되는 입자는 상응하는 크기의 비-다공성 입자에 비해 입자의 표면적이 약 2 ~ 250 배로 증가하도록 하는 다공성을 갖는다.

발명에서 사용되는 다공성 입자의 바람직한 생성방법은, 일반적으로 말하자면, 중합체를 용해 (예: CH_2Cl_2 중) 시키고, 고체 및/또는 액체 형태인 NaCl, 만니톨 또는 수크로스와 같은 포로시겐을 첨가하는 것으로 이루어지는 용매 증발 방법이다. 포로시겐을 고형으로 첨가하는 경우, 매트릭스-포로시겐 용액은 현탁액의 형태이다.

발명에서 사용되는 다공성 입자의 또 다른 바람직한 생성 방법은 용매 추출법으로, 균질화시킴과 동시에 포로시겐을 액체 형태로 첨가한다. 균질화시킴과 동시에 포로시겐을 액체 형태로 첨가하는 경우, 매트릭스 포로시겐 용액은 유액의 형태이다. 둘중 하나의 방법으로, 매트릭스-포로시겐 유액을 조절된 교반 및 온도에서, 폴리(비닐 알콜)과 같은 계면활성제를 함유하는 과량의 수용액에 첨가한다. 생성된 다공성 입

자는 잔류 용매를 추출 또는 증발시키고, 건조시키므로서 경화된다. 포로시겐으로서 50 % NaCl을 사용하여 제조된, 본 발명에 사용된 PLGA 입자는 약 0.2 ~ 0.6 ㎡/g의 표면적으로 가지며; 포로시겐으로서 수크로스를 사용하여 제조된 입자는 약 0.04 ~ 0.09 ㎡/g의 표면적을 갖는다. 균질화와 동시에 액체 포로시겐을 사용하여 제조된, 본 발명에서 사용된 PLGA 입자는 약 0.02 ~ 4 ㎡/g의 표면적을 갖는다.

본 발명에서 사용되는 입자의 다공성은 단백질 흡착에 충분한 표면적을 생성하고 생분해를 증가시키는데, 이의 바람직한 정도는 임상적 지표가 나타내는 것에 의존한다. 표면적은 통상적인 방법으로 측정될 수 있다. 예를 들면, BET 표면적 분석은 마이크로매리틱스 ASAP 2000 시스템을 사용하여 수행될 수 있고, 이는 표면에서의 크립톤(Krypton)가스의 흡착 및 분리를 기준으로 하여 고형 시료의 구멍내에서 표면적을 측정하는 것이다. 단위체는 하기와 같이 계산되어 표면적을 나타낸다:

$$\frac{1}{VA[(P_0/P)-1]} = \frac{C-1}{V_mC}(P/P_0) + \frac{1}{V_mC}$$

V = 압력 P 에서의 흡수 부피　　P_0 = 포화 압력

P/P_0 = 상대 압력　　P = 압력

C = 상수　　A = 기체 단면적

Vm = 단층 용량

$\frac{1}{VA[(P_0/P)-1]}$ 대 P/P_0 를 도식하여, 기울기는 $\frac{C-1}{V_mC}$ 이고,

절편은 $\frac{1}{V_mC}$ 이고, 표면적 $S_t = \frac{V_mNA}{V}$ [식중, N = 아보가드로수 및

V = 몰부피] 이다.

특정 결함의 치료에 사용되는 다공성 입자의 양은, 물론, 치료될 결함의 크기, 및 골형성 단백질의 흡착에 필요한 유효량에 의존할 것이다.

본 발명의 실행에 사용되는 단백질 격리 물질은 약학적으로 허용 가능한 사람 혈액이고, 바람직하게는 자가 이식 혈액이다. 골형성 단백질/다공성 입자 혼합물에 첨가되는 경우, 응혈은 가단성 합성물을 형성하고 그경우 흡착 단백질은 충분한 시간 동안 매트릭스내에 격리되어 단백질이 이와는 다른 포유류 선구 세포에 스며드는 골형성성의 천연 속도를 증가시킬 수 있다. 상기 응혈이 없는 경우, 골형성 단백질은 단백질의 골형성 유도 효과가 임상적으로 중요하지 않은 속도로 그 자리에서 PLGA 입자로 부터 분리된다. 여기에서 사용되는 다공성 입자에 대한 혈액의 비는 1 : 0.5 ~ 1 : 10 (v:v)이고, 바람직하게는 1 : 5 (v:v)이고, 보다 바람직하게는 1 : 2 (v:v)이며, 이 비율은 중합체 매트릭스로 부터 분리되는 것을 방지하기 위해 필요한 양을 나타내지만, 선구 세포가 매트릭스로 스며드는 것을 방지할 만큼 많지는 않고, 그에 의해 선구 세포의 골형성성을 보조하는 기회를 단백질에 제공한다. 각1 ㎖의 결함에 대해서, 필요한 혈액의 양은 일반적으로 약 0.5 ~ 1.0 ㎖일 것이다. 많은 양의 골형성 단백질이 사용되는 경우에, 트롬빈과 같은 응집 촉진제가 골형성 단백질의 희석 효과를 상쇄하기 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 다른 단백질 - 격리제를 선택적으로 포함할 수 있다. 상기 단백질 -격리제는 바람직하게는 골형성 또는 골전도성을 갖는다. 적합한 제제로는 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 히드록시프로필-메틸셀룰로스, 및 카르복시메틸셀룰로스와 같은, 알킬셀룰로스 (히드록시알킬셀룰로스를 포함) 와 같은 셀룰로스성 물질이 포함된다. 다른 격리제로는 히알루론산, 알긴산 나트륨 또는 알긴산 칼슘과 같은 알긴산염, 폴리(에틸렌 글리콜), 산화 폴리옥시에틸렌, 카르복시비닐 중합체, 및 폴리(비닐 알콜)이 포함된다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 셀룰로스성 단백질 격리제는 희석제로서 수용성 글리세롤을 사용하여 희석될 수 있다. 상기 구현을 위해 바람직한 격리제로는 카르복시메틸셀룰로스가 포함된다. 셀룰로스성 단백질 격리제는 약 2 ~ 약 10 % (w/v), 바람직하게는 약 2.75 ~ 5.5 % (w/v)의 농도로 존재하는 것이 바람직하고; 수용성 글리세롤은 약 20 ~약 80 % (w/v), 바람직하게는 악 60 ~ 80 % (w/v) 의 농도로 존재하며; 다공성 마이크로중합체 입자에 대한 격리제 액화 용액의 비 (v/v) 는 약 0.1 ~ 약 0.9, 바람직하게는 약 0.2 ~ 0.5 이다.

상처 부위에서 제제의 골전도성 및 제제의 보유력을 증진시키고, 제제의 장치 시간을 감소시키고 조작 특성을 개선하기 위해서, 황산칼슘 헤미히드레이트 함유 물질 (CSHS)을 제제에 첨가한다. 장치의 증진된 형성성 및 조작과 더불어, CSHS의 첨가는 장치에 필요한 제조 시간을 감소시켰다. 또한, 불량하거나 또는 느린 천액 응집을 갖는 환자에게 있어서 우수한 조작성 및 형성성을 갖는 장치를 제조할 수 있다. 바람직한 CSHS는 또한 소석고로서 공지된 정제 황산칼슘 헤미히드레이트 및 소석고와 히드록시아파타이트의 35 : 65 혼합물을 포함한다. rhBMP-2/응혈/BEP 장치 중 2 ㎖ 의 다공성 입자당 약 0.2 ~ 2.0 g 이상, 바람하게는 약 0.8 ~ 2.0 g 이상의 CSHS 를 첨가하는 것이 바람직할 수 있다.

본 발명의 또 다른 구현예에서, 제제는 다공성 중합성 입자 없이, 골형성 단백질, 자가 이식 혈액 및 황산칼슘 헤미히드레이트 함유 물질(CSHS)을 함유한다. 상기 제제의 바람직한 조성물은 약 0.5 ㎖의 골형성 단백질, 약 5.5 ㎖의 자가 이식 혈액 및 약 1 ~ 10 g의 CSHS의 상대적인 양인 성분들을 함유한다. 상기 구현에서, CSHS는 구조 매트릭스 기능, 골전도성 매트릭스, 및 단백질 격리 기능, 더불어 자가 이식혈액의 것도 제공한다. 적정 제제는 혈액 및 골형성 단백질의 혼합물에 대해 1 g 증가에 있어서 CSHS의 양을 다양화시켜 첨가함으로써 결정된다. 하기의 제조 이후 즉시 및 제조 이후 1 ~ 2시간 후 장치를

관찰한다. 제조 이후 즉시 및 1 ~ 2시간 후 모두 최상의 조작성을 제공하는 CSHS의 양이 적정할 것이다.

본 발명의 또 다른 구현예에서, 제제는 골형성 단백질 및 황산칼슘 헤미히드레이트 함유 물질의 적절한 혼합물을 함유한다. 상기 제제의 바람직한 조성물은 약 3 ㎖의 물중에 10 ~ 20 그램, 바람직하게는 12 그램의 CSHS 당 약 0.5 ~ 2 그램, 바람직하게는 1 그램의 골형성 단백질을 함유한다. 예를 들면, 골형성 단백질은 2 mg/㎖ BMP-2 용액 중 0.5 ㎖, 또는 4 mg/㎖ BMP-2 용액 중 0.25 ㎖을 사용하여 송달될 수 있다. 상기 구현에서, CSHS는 구조 매트릭스 기능, 골전도성 매트릭스, 및 단백질 격리 기능을 제공한다.

상기 제제는 상기 기재된 바와 같이, 단백질 -격리제를 선택적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 실행에서 사용되는 부가적인 선택적 성분들로는, 예를 들어, 만니톨, 수크로스, 락토스, 글루코스, 또는 글리신과 같은 (동결 건조중 분해로 부터 제제를 보호하기 위한)저온에 적합한 보호제, 메틸 및 프로필 파라벤 및 벤질 알콜과 같은 항미생물 보존제, EDTA, 시트르산염, 및 BHT (부틸화 히드록시톨루엔)과 같은 항산화제, 및 폴리(소르베이트) 및 폴리(옥시에틸렌) 과 같은 계면활성제 등이 포함된다. 물론, 약학적으로 허용 가능한 형태인 제제의 통상적인 제조 (예: 피로겐무, 적절한 pH 및 등장성, 멸균성 등) 는 당분야에서 잘 알려져 있고 본 발명의 제제에 이용될 수 있다.

골형성 단백질 및 제제의 다공성 입자는 용액 또는 동결 건조된 형태중 하나 로서, 단일 바이알 제제로서 임상에 제공될 수 있고, 또는 제제는 다성분 키트로서 제공될 수 있는데, 예를 들어, 골형성 단백질이 하나의 바이알로 제공되고, 다공성 입자 및 황산칼슘 헤미히드레이트 함유 물질이 각각 별개의 바이알로 제공된다. 제제에 사용되는 혈액은 응집될 수 있도록 사용되기 전, 일반적으로 사용하기 I5 ~ 180 분전에 충분히 혼합되어, 장치의 형성성을 촉진화시키는 CSHS의 활성 뿐아니라, 응집시 공지된 환자-대-환자 다양성을 설명한다.

본 발명의 제제는 치료학적 유효량의 골형성 단백질이 연골 핀/또는 골 형성이 요구되는 상처 부위로 송달될 수 있도록 하는 가단성 이식물을 제공한다. 상기 이식물은 신선한 비결합 골절, 척추 융합, 및 정형외과 분야의 골 손상 치유에 있어서; 두개/상악골안면 재구성에 있어서; 자가이식 골 이식편을 위해; 특히 인공삽입물로 도포된 히드록시아파타이트와 같은 보철 이식물의 고정을 증진시키기 위한 표면 피복으로서 인공삽입물 융합을 위해; 골수염에 있어서 골 재생을 위해; 및 치과에서 치조 융선및 치주위 질병의 첨가물 및 발치 소케트로서의 치환물로서 사용될 수 있다. 골수염의 치료 또는 골 손상에 감염을 최소화하여 사용되는 경우, 골형성 단백질은 수용성 글리세롤을 사용하여 희석된, 알긴산염, 셀룰로스, 특히 카르복시메틸셀룰로스와 같은 단백질 격리제를 첨가하면서, 다공성 미세인자 및 항생제와 혼합되어 사용될 수 있다. 항생제는 골 형성에 대한 최소한의 역효과를 가지며 감염을 감소시키는 성능을 위해 선택된다. 본 발명의 장치에서 사용하기 위한 바람직한 항생제로는 반코마이신 및 젠타마이신이 포함된다. 항생제는 반코마이신 HCl 또는 젠타마이신 황산염과 같은, 임의의 약학적으로 허용 가능한 형태일 수 있다. 항생제는 약 0.1 mg/㎖ ~약 10.0 mg/㎖의 농도로 존재하는 것이 바람직하다.

점도가 더 낮은 제제는 또한 근접한 골절의 치료를 촉진시키기 위한 경피 주사제로서 사용될 수 있다. 상기 용도중 어떤 경우에 있어서, 본 발명의 조성물은 폴리(프로필렌-공-푸마르산염) 및 특정 히드록시아파타이트 접착제와 같은 부식 가능한 골 접착제를 포함하는, 각종 골 접착제와 결합되어 사용될 수 있다. 또한, 상기의 어떠한 용도는 부식 가능한 플레이트, 스크류 등과 같은 생부식될 수 있는 하드웨어를 이용할 것이다. 상기에서 나타난 바와 같이, 투여량은 다양한 환자 유형 (예: 체중, 연령, 성별) 및 임상적 표현 (예: 상처 정도, 상처 부위 등)뿐만 아니라, 나타난 임상적 지표에 의해서 결정될 것이다. 일반적으로, 골형성 단백질의 투여량은 약 10 ~ 1000 ㎍, 바람직하게는 약 10 ~ 100 ㎍의 범위일 것이다.

하기의 실시예에서 본 발명을 설명하고 있고, 이에 국한되는 것은 아니다. 변형, 다양화 및 최소 증진이 시도되며 본 발명에 속한다.

실시예 1

글루탐산 HCl 을 사용한 BMP 의 제조

재조합으로 생성된 BMP-2 를 2.5 % (w/v) 글리신, 0.5 % (w/v) 수크로스, 0.01 % (w/v) 폴리소르베이트 80 및 5 mM (약 0.092 % w/v) 글루탐산 HCl 의 pH=4.5 인 조성물중에 용해시킨다 (2 mg/㎖).

실시예 2

용해제로서 글루탐산 HCl 을 사용하는 BMP 제제의 용해성 및 안정성

실시예 1의 상기 조성물을 동결건조시켜 -80, 4, 30 및 40 ℃에 저장한다. 동결건조된 시료는 재구성에 앞서 외형을 세밀하게 검사한다. 모두 양호한 백색 케이크로서 나타나고 시간 또는 온도에 따라 변화하지 않는다.

조성물은 동결건조후 2 주, 1 개월, 3 개월 및 4.5 개월째 재구성되어, 재구성 시간, 입자 형성, 재구성후 pH, 습기 함량 %, 재구성후 BMP-2의 농축, 응집 형성 % 및 BMP 활성에 대한 W-20 생물화학적 검정에서의 특이성에 관하여 연구한다.

상기 조성물들은 4.5 개월 보관 후에도 약 10 ~ 30초 내에 재구성된다. 재구성에 대해서, 조성물은 가시적 입자 없이, 습기 함량에 어떠한 변화도 없고, 단백질의 손실도 없으며, 낮은 수준의 응집을 나타내고, W20 생물화학적 검정에서 활성을 갖는다.

실시예 3

황산칼슘 헤미히드레이트 함유 장치

0.8, 1.2, 1.6 및 2.0 g 의 황산칼슘 헤미히드레이트 [Calset?, Lifecore Biomedical 사 제], 또는 35 : 65인 황산칼슘 헤미히드레이트 : 히드록시아파타이트 [Hapset?, Lifecore Biomedical 사 제] 의 혼합물중 어느 하나를 2 ㎖의 rhBMP-2/자가 이식 혈액/다공성 미세입자 혼합물에 첨가한다. 제조시 점도에 대해서 제제를 관찰하고, 제조 5 분후 특성을 다루기 위해 10 포인트 스코어 규모 (5의 스코어가 적정하다)로 측

정한다.

표 2 는 상기 측정의 결과를 나타낸다. 단지 2 ㎖의 혼합물을 사용하였기 때문에, 제제는 10 ㎖ 크기로 사용된 실제 이식물 보다 더 빠르게 건조되는 경향이 있다.

표 2

첨가된 CSHS 의 그램양	소석고		35 : 65 인 소석고 : 히드록시아파타이트	
	제조시 점도	15 분시 조작	제조시 점도	15 분시 조작
0.0	1	4	1	4
0.8	1	5	6	6
1.2	1	3	4	6
1.6	2	5	4	6
2.0	3	5	5	7

주 : 0 = 액체 (물과 같은)

1 = 유동적이고; 정형되거나 분할될 수 없는 장치.

2 = 단지 유동적이고; 정형되거나 분할될 수 없는 장치.

3 = 비유동적 장치; 부분 적정한 정형 및 분할 장치; 정형된 장치는 유연하다.

4 = 비유동적 장치; 부분 적정한 정형 및 분할 장치; 정형된 장치는 유연하다.

5 = 단일화된 장치 형성; 장치는 성형 가능 및 재정형 가능하고; 정형된 장치는 가단성이다.

6 = 단일화된 장치 형성; 부분 적정한 정형 및 분할 장치; 정형된 장치는 깨지기 쉽지만, 절단된 파편이 점착성이 있다.

7 = 단일화된 장치 형성; 부분 적정한 정형 및 분할 장치; 정형된 장치는 깨지기 쉽지만, 절단된 파편이 점착성이 없다.

8 = 비단일화된 장치 형성; 장치는 절단되고 정형될 수 없고; 대형 총체.

9 = 비단일화된 장치 형성; 장치는 절단되고 정형될 수 없고; 소형 총체.

10 = 비단일화된 장치 형성; 장치는 절단되고 정형될 수 없고; 분말.

실시예 4

황산칼슘 헤미히드레이트 함유 물질을 사용한 이식물의 제조

30 ~ 40 kD의 평균 분자량, 약 20 kD의 수평균 분자량 (폴리스티렌 표준 기준, 겔 투과 크로마토그래피에 의함) 및 0.35 ~ 0.45 ㎗/g의 고유 점도를 갖는 락트산 및 글리콜산 (PLGA)의 50 : 50 랜덤 공중합체를 CH_2Cl_2 (15 % w/v)중에 용해시키고, 10 g의 포로시겐 (7.5 % w/v)을 상기 용액에 현탁시킨다. 생성된 용액을 과량의 폴리(비닐 알콜)수용액 (0.1 % w/v)에 첨가한다. 몇 시간의 부분 진공 (24 인치 Hg)하 교반 후, 입자를 과량의 냉 에탄올 (95 %) 중에서 경화시킨다. 생성된 입자를 주사용수로 세척하고, 진공하 건조시켜 비-유동성생 성물을 수득한다. BET 표면적 분석은 상기 기재된 바와 같이 마이크로미터 ASAP 2000 시스템을 사용하여 수행되고, 입자는 약0.2 ~ 1.0 ㎡/g의 표면적을 갖는다 : 포로시겐으로서 수크로스를 사용하여 제조된 입자는 약 0.04 ~ 0.09 ㎡/g의 표면적을 갖는다. 다공성 입자는 사용전에 γ-조사에 의해 멸균된다. 사람에게 사용되는 이식물 각각에 대해서, 10 ㎖의 다공성 입자를 멸균 컵에 둔다. 목적량 (4 ~ 10 g)의 황산칼슘 헤미히드레이트 함유 물질을 멸균 컵중 다공성 입자에 첨가하고, 컵을 흔들어 혼합한다.

동결 건조된 재조합 사람 BMP-2 (rhBMP-2) (완충용액중 2 mg) 을 1 ㎖의 멸균된 주사용수 (WFI)로 재구성한다 0.5 ㎖의 rhBMP-2 용액 (1 mg) 을 22 g 바늘을 사용하는 3 ㎖ 주사기로 빨아들인 다음 제거시킨다.

5.5 ㎖의 환자의 정맥 혈액을 10 ㎖ 주사기로 (헤파린화 라인을 통하지 않고) 빨아들여, 그의 바늘을 제거한다. 혈액이 컵중 다공성 입자/황산칼슘 혼합물상에 균일하게 나타난다. rhBMP-2 용액을 멸균 컵중 성분에 첨가한다. 필요에 따라, 혼합물 전체를 스테인레스 스틸 스패튤라로 부드럽게 교반시켜 균일한 점도를 달성한다. 컵에 덮개를 하여 실온에서 약 15 분간 방치시킨다. 이식 혼합물은 이후 2 시간내에 사용해야 한다.

가단성 이식물의 목적한 점도가 수득되는 경우, 상처 부위에서의 외과 절개에 의해 골 손상을 노출시킨다. 다공성 입자/CSHS/rhBMP-2/응혈의 가단성 합성물을 외과의사에 의해 치료하고자 하는 골 손상을 둘러싸도록 성형시킴으로써 이식물이 사용된다. 이어서 통상적인 방법을 사용하여 절개를 밀봉시킨다. 치료는 손상 부위의 X-선 분석에 의해 확인한다.

실시예 5

W-20 생물화학적 검정

A. W-20 세포의 설명

표식 세포라인으로서 W-20 골수 기질 세포의 사용은 BMP 단백질로 치료후 상기 세포를 골아세포-유사 세포로 전환시키는 것을 바탕으로 한다 [Thies et al, Journal of Bone and Mineral Research, 5 : 305 (1990); and Thies et al, Endocrinology, 130 : 1118 (1992)]. 구체적으로, W-20 세포는 연구실 [Dr D. Nathan, Children's Hospital, Boston, MA] 의 연구원들에 의해 성인쥐로 부터 유래된 클론성 골수 기질 세포라인이다. 특정 BMP 단백질을 갖는 W-20 세포의 처리는, (1) 알칼린 포스파타제의 생성 증가, (2) PTU 유도된 cAMP의 유도, 및 (3) 세포에 의한 오스테오칼신 합성의 유도를 일으킨다. (1) 및 (2)는 골아세포 표현형과 연관된 특성을 나타내는 반면, 오스테오칼신을 합성하는 능력은 단지 성숙 골아세포에 의해서 나타나는 표현성 성질이다. 더구나, 지금까지는 BMPs 처리에 대해서만 W-20 기질 세포의 골아세포-유사 세포로의 전환이 관찰되었다. 상기 방법에 있어서, BMP-처리된 W-20 세포에 의해 나타나는 시험관내 활성은 BMPs로 공지된 체내 골 형성성과 상호관련된다.

공지된 BMPs의 활성을 갖는 BMPs 제제의 BMP 활성의 비교에 유용한 2가지의 시험관내 분석법을 하기에 기재한다.

B. W-20 알칼린 포스파타제 분석 방법

W-20 세포를 96 홈 조직 배양 플레이트에 200 ㎕ 의 배지 [10 % 가열 불활성화된 소 태아 혈청을 갖는 DME, 2 mM 글루타민 및 100 유니트/㎖ 페니실린 + 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신] 중 10,000 세포의 농도로 플레이트한다. 세포를 37℃ 에서 95 % 공기, 5 % CO_2 인 항온배양기에서 하룻밤동안 부착시킨다.

200 ㎕의 배지를 각 홈으로 부터 멀티채널 피펫으로 제거하고 10 % 가열 불활성화된 소 태아 혈청, 2 mM 글루탐산 및 1 % 페니실린-스트렙토마이신을 갖는 DME로 전달된 동 부피의 시험 시료로 대체시킨다. 시험 물질을 3 차례에 걸쳐 분석한다.

시험 시료 및 표준 시료를 W-20 표식 세포와 함께 24 시간 항온배양 시킨다. 24 시간 후, 플레이트를 37 ℃ 항온배양기로 부터 제거하고 시험 배지를 세포로 부터 제거한다.

W-20 세포층을 홈당 200 ㎕의 칼슘/마그네슘이 없는 인산염 완충식염수로 3회 세척하고, 상기 세척액을 버린다.

50 ㎕의 글래스 멸균수를 각 홈에 첨가한 다음, 분석 플레이트를 신속한 동결을 위해 드라이 아이스/에탄올 욕상에 위치시킨다. 일단 동결되면, 분석 플레이트를 드라이 아이스/에탄올 욕으로 부터 제거하고, 37 ℃에서 해빙시킨다. 상기 단계를 2회 더 반복하여, 총 3회 동결-해빙과정을 거친다. 일단 완료되면, 막결합된 알칼린 포스파타제를 측정에 이용할 수 있다.

50 ㎕의 분석 믹스 (50 mM 글리신, 0.05 % 트리톤 X-100, 4 mM $MgCl_2$, 5 mM p-니트로페놀 포스페이트, pH=10.3) 을 각 분석 홈에 첨가한 다음 분석 플레이트를 분당 60 진동되는 진탕 수욕에서 30 분간 37 ℃로 항온 배양시킨다.

30 분의 항온 배양후, 각 홈에 100 ㎕의 0.2 N NaOH를 첨가하고 얼음위에 분석 플레이트를 위치시켜 반응을 중단시킨다.

각 홈에 대한 분광 광도 흡수를 405 나노미터의 파장에서 판독한다. 이어서 상기 수치를 공지된 표준과 비교하여 각 시료에서의 알칼린포스파타제의 활성의 측정을 수득한다. 예를 들면, 공지된 양의 p-니트로페놀 포스페이트를 사용하여, 흡수치를 수득한다. 상기를 표 3에 명시한다.

표 3

P-니트로페놀 포스페이트의 공지된 표준에 대한 흡수치

P-니트로페놀 포스페이트 ㎛mol	평균 흡수치 (405 nm)
0.000	0
0.006	0.261 +/- .024
0.012	0.521 +/- .031
0.018	0.797 +/- .063
0.024	1.074 +/- .061
0.030	1.305 +/- .083

공지된 양의 BMPs에 대한 흡수치를 측정하여 표 4에 나타난 바와 같이 단위 시간당 절단된 p-니트로페놀 포스페이트의 ㎛mol로 환산할 수 있다.

표 4

BMP-2 로 처리되는 W-20 세포에 대한 알칼린 포스파타제 수치

BMP-2 농도 ng/㎖	판독 흡수치 405 ㎚	시간당 기질 μmol
0	0.645	0.024
1.56	0.696	0.026
3.12	0.765	0.029
6.25	0.923	0.036
12.50	1.121	0.044
25.0	1.457	0.058
50.0	1.662	0.067
100.0	1 977	0.080

상기 수치는 이어서 공지된 양의 신규 BMP제제의 활성을 공지된 활성 BMP 제제와 비교하는데 사용한다.

C. 오스테오칼신 RIA 방법

W-20 세포를 10 % 가열 불활성화된 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민을 함유하는 DME의 2 ㎖중 24 홈 멀티홈 조직 배양 접시의 홈당 10^6 세포가 되도록 플레이트한다. 세포가 37 ℃에서 95 % 공기 5 % CO_2의 대기하에서 하룻밤동안 부착되도록 한다.

다음날 배지를 총 부피가 2 ㎖인 10 % 소 태아 혈청, 2 mM 글루타민 및 시험 물질을 함유하는 DME 로 교환한다. 각 시험 물질을, 홈이 3 배 되도록 투여한다. 시험 물질을 48 시간 되었을 때 동일 시험 배지로 교환하고 총 96 시간 동안 W-20 세포와 항온배양시킨다.

96 시간후, 50 ㎕의 시험 배지를 각 홈으로 부터 제거하고, 쥐 오스테오칼신에 대한 방사능면역분석법을 사용하여 오스테오칼신 생성을 분석한다. 분석의 상세한 것은 키트 [Biomedical Technologies Inc. 사제; 378 Page Street, Stoughton, MA 02072]에 기재되어 있다. 분석용 시약은 BT-431 (쥐 오스테오칼신 표준), BT-432 (염소 항-쥐 오스테오칼신), BT-431R (요오드화 쥐 오스테오칼신), BT-415 (정상 염소 혈청) 및 BT-414 (당나귀 항-염소 IgG) 와 같이 제품 번호로 나타낸다. BMP 처리에 대한 반응으로써, W-20 세포에 의해 합성된 오스테오칼신에 대한 RIA를, 제조자에 의해 제공된 설명서에 기재되어 있는 바와 같이 수행한다.

실시예 6

항생제를 포함하는 장치의 이식

0.55 g의 카르복시메틸셀룰로스 (CMC) 건조 분말을 반코마이신 HCl 또는 젠타마이신 황산염 항생제의 표 5에 나타낸 양과 함께 20 ㎖의 글리세롤/H_2O (75 : 25 v/v) (또는 60 : 40 v/v) 에 첨가한다.

10 ㎕ 의 8 mg/㎖ rhBMP-2 제제 (상기 6-7 페이지에서 2.0 mg/㎖으로서 기재된 것과 같은 완충용액중) 또는 10 ㎕ 의 대조 (BMP-2 가 없는 완충용액) 을 37.2 mg (0.200 ㎖) 50 : 50 PLGA 다공성 입자를 함유하는 멸균된 에펜도르프 튜브에 첨가한다.

110 ㎕ 의 CMC/항생제/글리세롤/H_2O 혼합물을 다공성 입자/rhBMP-2 혼합물상에 분산시킨다. 균일한 혼합물이 형성될 때까지 혼합물을 교반한다. 결과는 40 ㎍/100 ㎕ rhBMP-2 를 함유하는 200 ㎕ 장치이다. 이어서, 하기의 실시예 7에 기재되어 있는 쥐 전위성 연구에 있어서 분석용 10개 군으로 나눈 50 마리의 쥐에 각각 장치를 이식한다.

표 5

시험군		평균 뼈 지수
음성 대조	(BMP 무)	0
양성 대조	BMP (10 ㎍/100 ㎕)	2.75
V마이신 10.0 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	4
V마이신 5.0 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	4.8
V마이신 1.0 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	3.5
V마이신 0.1 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	4.2
G마이신 10.0 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	3.4
G마이신 5.0 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	3.1
G마이신 1.0 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	4.1
G마이신 0.1 ㎎/100 ㎕	BMP (40 ㎍/100 ㎕)	3.8

골 조직학 지수 코드 :

0 = 뼈 무

1 = 10 ~ 20 % 의 단편중 뼈

2 = 20 ~ 40 % 의 단편중 뼈

3 = 40 ~ 60 % 의 단편중 뼈

4 = 60 ~ 80 % 의 단편중 뼈

5 = 80 ~ 100 % 의 단편중 뼈

대조는 항생제를 무함유

V마이신 = 반코마이신 HCl

G마이신 = 젠타마이신 황산염

BMP = 재조합 사람 BMP-2

실시예 7

본 발명의 장치의 효과는 하기의 분석법으로 평가될 수 있다.

개 두개골 손상 이식 분석

2 마리의 수컷 및 2 마리의 암컷 개를 일반적으로 마취시키고, 각 두개골에 아크라-컷트 DG II 두개골용 드릴을 사용하여 각각 약 12 ㎜의 4 개 천공 구멍을 낸다. rhBMP-2, PLGA 다공성 입자, 황산칼슘 헤미히드레이트 - 함유 물질, 및 응집되어 성형가능 이식물을 형성할 수 있는 자가이식 혈액으로 각 구멍을 충전시킨다. rhBMP-2 의 투여량은 각 이식물에 대해 약 200 ㎍/㎖이다. 수컷 1 마리 및 암컷 1 마리의 동물은 4 주만에 희생되고, 나머지 동물들은 외과시술후 8 주만에 희생되었다.

희생후, 각 동물의 왼쪽 문측 및 오른쪽 하방 두개골 부위를 생체역학 시험에 사용하고, 오른쪽 문측 및 왼쪽 하방 두개골 부위는 조직병리학에 사용한다.

쥐 전위성 연구

24 마리의 롱-에반스 쥐를 6 개 시험군으로 나눈다. 각각은 투여량이 0 또는 20 ㎍/100 ㎕ 중 어느 하나인 rhBMP-2/PLGA 다공성 입자/응혈 및 황산칼슘 헤미히드레이트 - 함유 물질이 없는; 200 ㎎ 칼셋 (POP); 또는 200 ㎎ 하프셋 (35 : 65 POP : HA)를 갖는, 200 ㎕의 크기의 피하이식을 받았다.

14 일 후, 쥐를 희생시켜 각 동물을 골 형성에 대해 평가한다.

쥐 대퇴골 손상 이식 분석

미리-천공된 폴리에틸렌 플레이트를 대퇴골의 전방부에 부착시키고 카바이드 치과용 드릴로 골 절편을 절단시킴으로써, 56 마리의 각 수컷 롱에반스 퇴화 번식 쥐 (450 ~ 550 그램)의 좌측 대퇴골의 중심-골간에 결정적 크기의 손상 (5 ㎜)을 외과적으로 낸다. rhBMP-2 (다양한 양으로), PLGA 다공성 입자, 황산칼슘 헤미히드레이트 - 함유 물질 및 쥐 정맥혈액을 혼합하고, 혈액을 응집시켜, 성형가능한 이식물을 제조함으로써 생분해 가능한 이식물을 제조한다. 각 7 마리의 동물로 된 8 개 군에 하기와 같이 이식한다 : 0 ㎍ rhBMP-2; 0.93 ㎍ rhBMP-2; 3.1 ㎍ rhBMP-2; 및 9.3 ㎍ rhBMP-2.

0 일 및 3 주, 6 주 및 9 주에 동물을 방사선촬영한다. 동물을 9 주에 희생시켜, 조직학적 조사를 위해 폴리에틸렌 플레이트 주위의 조직을 제거하고, 이식되고 대측성 비-이식된 대퇴골을 수확한다. 각 군에서 2 개의 대퇴골을 조직학적으로 조사하고, 남아있는 대퇴부는 생물역학적 시험을 위해 사용한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

골형성 단백질, 0.1 ~ 5.0 % (w/v)의 당, 1.0 ~ 10.0 % (w/v)의 글리신, 및 1 ~ 20 mM의 글루탐산 히드로클로라이드를 함유하고, 3.5 내지 6.0의 pH 를 갖는 제제인 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 0.01 ~ 0.1 % (w/v)의 비이온성 계면활성제를 더 함유하는 제제인 조성물.

청구항 3

골형성 단백질, 1 ~ 10% (w/v)의 글리신, 0.1 ~ 5.0 % (w/v) 의 수크로스, 0.01 ~ 0.1 % (w/v) 의 비이온성 계면활성제 및 5 ~ 10 mM 의 글루탐산 히드로클로라이드를 함유하고, 3.5 내지 6 의 pH를 갖는 제제인 조성물.

청구항 4

골형성 단백질, 2.0 ~ 2.5 % (w/v) 의 글리신, 0.5 ~ 2.5 % (w/v) 의 수크로스, 5 ~ 7.5 mM 의 글루탐산 히드로클로라이드, 및 0.01 ~ 0.05 % (w/v)의 폴리소르베이트 80을 함유하고, 3.5 ~ 5.25의 pH 를 갖는 제제인 조성물.

청구항 5

3.12 % ~ 24.38 % (w/w) 의 BMP; 0.52 % ~ 10.27 % (w/w) 의 글루탐산 히드로클로라이드; 38.4 % ~ 75.7 % (w/w) 의 글리신; 14.28 ~ 47.15 % (w/w)의 수크로스, 및 선택적으로 0.15 % ~ 2.94 % (w/w)의 폴리소르베이트 80를 함유한 동결건조 제제를 함유하는 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 제제가 약 4.0 mg/㎖의 BMP-2; 약 0.918 mg/㎖의 글루탐산 히드로클로라이드; 약 25 mg/㎖의 글리신; 약 5 mg/㎖의 수크로스; 및 선택적으로 약 0.1 mg/㎖의 폴리소르베이트 80의 상대적인 양을 함유하는 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 제제가 약 2.0 mg/㎖의 BMP-2; 약 0.918 mg/㎖의 글루탐산 히드로클로라이드; 약 25 mg/㎖의 글리신; 약 5 mg/㎖의 수크로스; 및 선택적으로 약 0.1 mg/㎖의 폴리소르베이트 80의 상대적인 양을 함유하는 조성물.