



등록특허 10-2410986



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월17일
(11) 등록번호 10-2410986
(24) 등록일자 2022년06월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61K 31/196* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1825 (2013.01)
A61K 31/196 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7025246
- (22) 출원일자(국제) 2015년02월20일
심사청구일자 2020년02월20일
- (85) 번역문제출일자 2016년09월12일
- (65) 공개번호 10-2016-0116001
- (43) 공개일자 2016년10월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/053631
- (87) 국제공개번호 WO 2015/124731
국제공개일자 2015년08월27일

(30) 우선권주장
14000600.8 2014년02월20일
유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090051100 A*
US20060009389 A1
Jonathon Power et al., JOURNAL OF ORTHOPAEDIC
RESEARCH, vol.32, no.5, pp.669-676(First
published : 16 January 2014)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 F G F – 1 8 화합물 투여 처방

(57) 요약

본 발명은 연골 장애, 예컨대 골관절염 또는 연골 손상의 치료에 있어서 FGF18의 투여를 위한 신규한 투여 처방을 제공한다. 구체적으로, 치료 사이클 당 FGF-18 화합물의 2주마다의 투여를 포함하는 바람직한 치료 계획이 제공된다. 신규한 투여 처방은 항-염증 약물의 공동-투여를 포함할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/2006 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

FGF-18 화합물이 치료 사이클 당 3회 투여되며, 상기 투여가 2주 분리되는 것인, 연골 장애의 치료에 사용하기 위한 FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물로서,

여기서 FGF-18 화합물이

a) 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1의 잔기 28 내지 207을 포함하는 인간 FGF-18 성숙 형태를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드, 또는

b) 서열식별번호: 2를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 치료 사이클이 2, 3, 4, 5 또는 6개월 후에 반복되는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 1년 당 1, 2, 또는 3 치료 사이클을 포함하는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, FGF-18 화합물이 관절내로 투여되는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, FGF-18 화합물이 단일 관절내 투여 당 3 내지 300 mcg의 용량으로 투여되는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, FGF-18 화합물이 FGF-18 화합물의 단일 관절내 투여 당 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 100, 120, 150, 180, 200, 240 또는 300 mcg의 용량으로 투여되는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 연골이 관절 연골인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 연골 장애가 골관절염인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 연골 장애가 연골 손상인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, FGF-18 화합물이 아나킨라 또는 디클로페낙인 항-염증 약물과 함께 투여되는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 항-염증 약물이 단일 투여 당 0.001 내지 500 mg의 용량으로 투여되는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 항-염증 약물이 단일 투여 당 0.03, 0.1, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 또는 300 mg의 용량으로 투여되는 것인, FGF-18 화합물을 포함하는 제약 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 연골 및 연골/골 장애, 특히 골관절염 및 연골 손상의 치료에 관한 것이다. 보다 특히, 이는 특정 치료 처방에 따라 사용하기 위한 FGF-18 화합물에 관한 것이다. 구체적으로, 이는 치료 사이클 당 FGF-18 화합물의 3 또는 4회에 대한 2주마다 1회의 투여를 포함하는 치료 계획에 관한 것이다. 투여 처방은 증상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙의 투여를 더 포함할 수 있다.

배경 기술

[0002]

연골은 매트릭스 (단단한 겔-유사 기저 물질)에 분산된 연골세포 (중간엽 세포로부터 유래된 세포)로 구성된다. 연골성 매트릭스는 이들 세포에 의해 생성되며, 주로 유형 II 콜라겐 섬유 (유형 I 콜라겐 섬유를 또한 함유하는 섬유연골 제외), 프로테오글리칸, 및 엘라스틴 섬유를 포함한다. 연골은 다른 장소 중에서도 관절, 흉곽, 귀, 코에서, 인후에서, 기관에서 및 추간판에서 발견된다. 3가지 주요 유형의 연골: 히알린, 탄성 및 섬유연골이 있으며, 이는 그의 조직학적 형태에 따라 현저히 상이한 기능적 특성을 제공한다. 관절 연골은 예를 들어 골의 관절 표면을 덮는 점탄성 특성을 갖는 히알린 연골이다. 관절 연골의 주요 목적은 관절화 골의 거의 마찰 없는 운동을 보장하기 위한 평활한 표면을 제공하는 것이다.

[0003]

연골 장애는 연골의 퇴행/붕괴 및 질환에 걸린 신체 부분의 염증, 통증, 경직 및 움직임의 제한이 나타나는 결합 조직의 비정상을 특징으로 하는 질환을 폭넓게 지칭한다. 이들 장애는 병리로 인한 것일 수 있거나, 외상 또는 손상의 결과일 수 있다. 특히 성숙 연골세포는 연골 중의 혈관의 부재와 관련된 영양분의 제한된 공급으로 인해 증식에 대한 적은 잠재성을 갖기 때문에, 성숙 연골은 매우 제한된 자가 복구 능력을 갖는다. 손상 또는 질환에 의해 유발된 손상된 연골, 특히 관절 연골의 대체는 의사에게 주요한 도전이며, 이용 가능한 수술적 치료 절차는 예측불가능하고, 골관절염 변화 없는 보다 어린 환자에서 단지 제한된 시간 동안 유효한 것으로 간주된다. 따라서, 대다수의 환자는 치료를 추구하지 않거나, 가능한 한 오랫동안 치료를 연기하도록 조언받는다. 치료가 요구되는 경우, 표준 절차는 연령 의존적이며, 전체적 또는 부분적 관절 대체, 연골 또는 연골세포의 조각의 이식 또는 골수 자극 기술 (예컨대 미세골절술) 사이에서 다양하다. 미세골절술은 골수 유래된 줄기 세포에 의해 연골 침착을 자극하는 연골하 골의 관통을 포함하는 저렴하며 통상적인 절차이다. 그러

나, 이 기술은 연골 결합을 충분히 복구하지 않으며, 형성된 새로운 연골은 주로 단수명 복구 조직을 초래하는 섬유연골인 것으로 나타났다. 사실, 섬유연골은 히알린 관절 연골과 동일한 생물기계적 특성을 갖지 않으며, 대개 주위의 연골 내로의 적절한 측면 통합이 결여된다. 이러한 이유로, 새롭게 합성된 섬유연골은 보다 쉽게 파손될 수 있다 (예상되는 기간: 5 내지 10년).

[0004] 콜관절염 (OA)을 갖는 환자에 대해, 모든 이들 연골 복구 기술은 실패한다. 나머지 비-수술적 치료는 특히 물리 요법, 생활방식 개선 (예를 들어 체중 감소), 지지 장치, 경구 약물 (예를 들어 비-스테로이드성 항-염증 약물), 약물의 주사 (예를 들어 히알루론산 및 코르티코이드), 및 식품 보충제로 이루어진다. 모든 이들 치료는 OA 질환 진행을 중단시킬 수 없다. 통증 요법이 또한 실패하는 경우, 수술, 예컨대 관절 대체 또는 무릎 관절에 대한 경골 고위 절골술이 환자를 위해 남아 있는 선택안이다. 경골 또는 대퇴 절골술 (관절 마모를 재균형화하기 위해 골을 커팅하는 것)은 증상을 감소시키고, 활동적인 생활방식을 유지하도록 돕고, 전체적 관절 대체에 대한 필요를 지연시킬 수 있다. 전체적 관절 대체는 진행된 골관절염의 증상에 대한 완화를 제공할 수 있지만, 일반적으로 환자의 생활방식 및/또는 활동 수준의 상당한 변화를 요구한다.

[0005] 현재 이용가능한 약물 치료는 주로 통증 완화에 관한 것이다. 현재, 연골 손상을 복원시키는 상업적으로 이용 가능한 치료는 없다 (문헌 [Lotz, 2010] 참조).

[0006] 인터루킨-1 알파 (IL-1 α) 및 인터루킨-1 베타 (IL-1 β)는 유형 I IL-1 수용체 (IL-1RA)의 천연 발생 효능제이다. 염증유발성 시토카인, 예컨대 IL-1의 과발현은 면역염증성 질환, 예컨대 류마티스성 관절염 (RA) (Bingham, 2002) 또는 골관절염 (OA) (Lee *et al.*, 2013)의 발병기전에 주요한 역할을 하는 것으로 나타났다. RA에서 IL-1 α 및 IL-1 β 를 길항하는 임상적 적용은 인간 IL-1ra의 재조합 비-글리코실화된 형태인 아나키네라 (키네레트 (Kineret)TM)로 조사되었다. 이 치료 단백질의 사용은 RA 환자에서 관절 손상의 빈도 및 중증도의 감소 (Bresnihan, 2002; St. Clair, 2002), 뿐만 아니라 통증 감소 (Mertens *et al.*, 2009)를 초래하였다. 이 분자는 2001년에 RA의 일부 유형의 치료에 있어서 승인되었다. IL-1은 또한 OA에 관여되지만, 아니킨라 요법은 아니킨라 150 mg 대 위약으로 통증 감소에 대한 경향이 주목되었지만, 위약에 비해 OA 증상의 개선과 유의하게 연관되지 않는다 (Chevalier *et al.*, 2009).

[0007] 섬유모세포 성장 인자 18 (FGF-18)은 FGF-8 및 FGF-17과 가깝게 관련된 단백질의 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 패밀리의 구성원이다. FGF-18은 연골세포 및 골모세포에 대한 중식체인 것으로 나타났다 (Ellsworth *et al.*, 2002; Shimoaka *et al.*, 2002). FGF-18은 연골 장애, 예컨대 골관절염 및 연골 손상의 치료에 단독으로 (WO2008/023063) 또는 히알루론산과 조합으로 (WO2004/032849) 제안되었다.

[0008] FGF18에 대해 다양한 투여 처방이 제안되었다. 예를 들어, 문헌 [Moore *et al.* (2005)]에는 3주 동안 매주 2회의 투여가 개시되어 있고, WO2008/023063에는 3주 동안 주 1회의 투여가 교시되어 있다. 이 마지막 투여 처방은 임상 시험에서 조사되었다 (보다 상세한 사항에 대해서는 예를 들어 NCT01033994, NCT00911469 및 NCT01066871 참조).

[0009] WO2008023063에 기재된 투여 처방은 관절 연골 복구에 있어서 양호한 결과를 제공하지만, 여전히 급성 윤활막염에 대한 위험이 있다. 이러한 이유로, 특히 연골세포 증식 및 후속의 연골 복구를 통해, 연골 장애의 치료에 대한 효능을 유지하면서, 치료 관련된 급성 윤활막염에 대한 위험을 감소시킬 뿐만 아니라 관절내 주사에 대한 환자 내성을 증가시키기 위한 방법의 필요가 있다. 이러한 방법은 가능하게는 윤활막염의 부재 하에서 관절 연골 복구를 허용할 뿐만 아니라, 양호한 특성을 갖는 새로운 연골 (즉, 주로 히알린 연골)의 재형성을 허용해야 한다. 사실, 상기 히알린 연골의 생성은 치료제로서 및 생물학적 매트릭스에 대한 성분으로서 둘 다 가치있다 (Getgood *et al.*, 2010). 또한, 연골 장애의 치료에 대한 효능을 유지하면서, 통증을 감소시키는/기능을 개선시키는 방법의 필요가 있다. 사실, 통증은 연골 장애와 매우 자주 연관될 뿐만 아니라, 이를 장애의 임상적 검출을 위한 선두적인 증상을 대표한다.

발명의 내용

발명의 요약

[0011] 본 발명의 목적은 FGF-18 화합물이 치료 사이클을 당 적어도 2회 투여되며, 상기 투여가 약 2주, 바람직하게는 2주 (격주 투여) 분리되는 것인, FGF-18 화합물의 투여를 포함하는 연골 장애를 갖는 환자의 치료 방법을 제공하는 것이다. 바람직한 실시양태에서, 상기 투여는 각각 약 2주의 규칙적인 간격으로 분리된다. 바람직하게는, FGF-18 화합물은 규칙적인 격주 간격으로 투여된다.

- [0012] 본 발명은 추가로 FGF-18 화합물이 치료 사이클 당 적어도 2회 투여되며, 상기 투여가 약 2주, 바람직하게는 2주 (격주 투여) 분리되는 것인, 연골 장애를 갖는 환자의 치료에 사용하기 위한 FGF-18 화합물을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 투여는 각각 약 2주의 규칙적인 간격으로 분리된다. 바람직하게는, FGF-18 화합물은 규칙적인 격주 간격으로 투여된다.
- [0013] 바람직하게는, 투여되는 FGF-18 화합물은 본원에서 trFGF-18 (또는 스프리페르민)로 지정되는 FGF-18 단편이며, 약량학 사이클(posology cycle)은 관절내 주사 당 3 내지 300 μg , 3회의 연속적인 투여 동안 2주마다 1회이다 (1 치료 사이클).
- [0014] 전체로서 본 발명의 내용에서, FGF-18 화합물로의 임의의 치료 (또는 임의의 치료 방법)는 증상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙의 투여를 더 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 투여는 FGF-18 화합물의 투여와 동시에 수행된다. 항-염증 약물이 필요할 경우, 이는 따라서 상기 항-염증 약물이 치료 사이클 당 적어도 2회 FGF-18 화합물과 수반하여 투여되며, 상기 투여는 약 2주, 바람직하게는 2주 분리되는 것(격주 투여)을 따를 것이다. 바람직하게는, 항-염증 약물은 아나킨라 또는 디클로페낙이고, 약량학 사이클은 투여 당 0.01 내지 500 mg, 3회의 연속적인 투여 동안 2주마다 1회이다 (1 치료 사이클).
- [0015] 바람직한 실시양태에서, 이러한 치료 사이클 (즉, FGF-18 화합물 단독으로 또는 증상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물과 조합으로)은 선행하는 치료 사이클의 마지막 주사 몇 개월 후, 예를 들어 2, 4 또는 6개월 후 또는 심지어 1년 후 반복될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 치료되는 연골 장애는 관절염, 예컨대 골관절염, 또는 수술적 개입, 예컨대 미세골절술이 있거나 없는 연골 손상이다. 놀랍게도, 본 발명의 방법 및 용도는 연골 복구를 현저하게 개선시키고, 연골세포의 증식을 자극하며, 그 동안에, 관절내 주사에 대한 환자 내성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 또한 놀랍게도, 아나킨라 또는 디클로페낙이 FGF18과 함께 사용되는 경우, FGF-18 화합물의 증식 활성을 효율적으로 복원시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 또다른 이점은 다른 처방으로 관찰되는 것에 비해 윤활막 염이 감소될 것이라는 점이다.
- [0017] 정의
- [0018] - 본원에 사용된 용어 "FGF-18 화합물" 또는 "FGF-18"은 인간 FGF-18 단백질의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 단백질인 것으로 의도된다. FGF-18은 천연, 그의 성숙 형태, 재조합 형태 또는 그의 말단절단된 형태일 수 있다. 인간 FGF-18 단백질의 생물학적 활성은 특히 연골세포 또는 골모세포 증식의 증가 (WO98/16644 참조) 또는 연골 형성의 증가 (WO2008/023063 참조)를 포함한다. 천연, 또는 야생형 인간 FGF-18은 관절 연골의 연골세포에 의해 발현되는 단백질이다. 인간 FGF-18은 처음에 zFGF-5로 지정되었으며, WO98/16644에 충분히 기재되어 있다. 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1은 아미노산 잔기 1(Met) 내지 27(Ala)로 이루어진 신호 펩티드를 갖는 천연 인간 FGF-18의 아미노산 서열에 상응한다. 인간 FGF-18의 성숙 형태는 서열식별번호: 1의 잔기 28(Glu) 내지 잔기 207(Ala)로부터의 아미노산 서열 (180개의 아미노산)에 상응한다.
- [0019] 본 발명에서의 FGF-18은 예컨대 출원 WO2006/063362에 의해 교시된 재조합 방법에 의해 생성될 수 있다. 발현 시스템 및 조건에 따라, 본 발명에서의 FGF-18은 출발 메티오닌 (Met) 잔기를 갖는 또는 분비를 위한 신호 서열을 갖는 재조합 숙주 세포에서 발현된다. 원핵생물 숙주에서, 예컨대 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 발현되는 경우, FGF-18은 그의 서열의 N-말단에 추가의 Met 잔기를 함유한다. 예를 들어, 인간 FGF-18의 아미노산 서열은, 이. 콜라이에서 발현되는 경우, N-말단의 Met 잔기 (위치 1)에서 시작하여, 서열식별번호: 1의 잔기 28 (Glu) 내지 잔기 207 (Ala)로 이어진다.
- [0020] - 본원에 사용된 용어 FGF18의 "말단절단된 형태"는 서열식별번호: 1의 잔기 28(Glu) 내지 196(Lys)을 포함하거나 이로 이루어진 단백질을 지칭한다. 바람직하게는, FGF-18 단백질의 말단절단된 형태는 Met 잔기 (N-말단에서)로 시작하여 야생형 인간 FGF-18의 아미노산 잔기 28 (Glu) 내지 196 (Lys)으로 이어지는 "trFGF-18" (170 개의 아미노산; rhFGF18 또는 스프리페르민으로도 공지됨)로 지정된 폴리펩티드이다. trFGF-18의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2로 나타내어진다 (서열식별번호: 2의 아미노산 잔기 2 내지 170은 서열식별번호: 1의 아미노산 잔기 28 내지 196에 상응함). trFGF-18은 이. 콜라이에서 생성되는 인간 FGF-18의 재조합 말단절단된 형태이다 (WO2006/063362 참조). trFGF-18은 성숙 인간 FGF-18과 유사한 활성을 나타내는 것으로 나타났으며, 예를 들어 이는 연골세포 증식 및 연골 침착을 증가시켜 다양한 연골성 조직에 대한 복구 및 재건을 초래한다 (WO2008/023063 참조).

[0021]

- 본원에 사용된 용어 "증상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물" 또는 "항-염증 약물"은 치료되는 연골 장애에 관련된 증상, 예컨대 통증 및 기능에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물을 지칭한다. 본 발명에 따라 사용되는 바람직한 "항-염증 약물"은 아나킨라 및 디클로페낙이다. 아나킨라는 인간 인터루킨-1 수용체 길항제 (IL-1Ra)의 재조합, 비글리코실화된 형태이다. 이는 명칭 키네레트® 하에 시판된다. 그의 서열은 서열식별번호: 3에 상응한다. 디클로페낙 (즉, 2-(2,6-디클로로아닐리노) 페닐아세트산)은 염증 감소에 대해 및 특정 조건에서 통증을 감소시키는 진통제로서 널리 공지된 약물이다. 이는 다양한 상표명 하에 시판된다.

[0022]

- "약 2주" 또는 "약 2주마다"에서 용어 "약"은 2주 (14일) 분리된 투여, 뿐만 아니라 2주 +/- 수 일 (예를 들어 +/- 1, 2, 3일(들)) 분리된 투여를 포함한다. 사실, 특히 실제적인 관점에서, FGF-18 화합물, 예를 들어 trFGF-18의 투여는 항상 정확한 간격으로, 예를 들어 이전의 투여 후 일 일로 정확하게 2주 (14일)로 수행될 수 없음이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명의 내용에서, 2주는 14일을 의미하지만, 또한 환자의 편의를 위해, 이전의 투여 후 11, 12, 13, 15, 16 또는 17일일 수 있다. 본 발명의 내용에서, 용어 "2주"는 용어 "2주마다", "격주마다" 또는 "격주로"와 유사하며, 이들은 호환적으로 사용될 수 있다 (도 1). "일"을 지칭하는 경우 (예를 들어 제1 주사가 월요일, 이후의 주사가 2주 후 월요일), 또는 "날짜"를 지칭하는 경우 (예를 들어 제1 주사가 8월 1일, 이후의 주사가 8월 15일), "2주"가 사용될 수 있다.

[0023]

- 용어 "치료 사이클" 또는 "사이클"은 FGF-18 화합물이 2주마다 주어지는 (연속적 투여) 기간에 상응한다. 예로서, 치료 사이클은 각각 2주 간격으로 3회의 주사로 이루어질 수 있다. 이러한 "치료 사이클"은 반복될 수 있다. 예를 들어, 제2 "치료 사이클"은 이전의 사이클의 마지막 주사 2, 3, 4, 5 또는 6개월 후에 수행될 수 있다. 대안적으로, 제2 사이클은 또한 제1 사이클의 제1 주사 1년 또는 2년 후에 수행될 수 있다. 예로서, 각각 2주 간격으로 3회의 주사로 이루어진 제1 치료 사이클에 이어, 상기 사이클의 마지막 주사 3개월 후, 각각 2주 간격으로 3회의 주사의 제2 치료 사이클이 이루어질 수 있다.

[0024]

- 본원에 사용된 용어 "연골 장애"는 손상, 예컨대 외상성 손상, 연골병증 또는 관절염으로 인한 손상으로부터 초래되는 장애를 포함한다. 본원에 기재된 FGF-18 제제의 투여에 의해 치료될 수 있는 연골 장애의 예로는 관절염, 예컨대 골관절염, 및 연골 손상을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 연골의 또는 관절의 퇴행성 질환/장애, 예컨대 연골석회증, 다발연골염, 재발성 다발연골염, 경직 척추염 또는 늑연골염이 또한 이 용어에 포함된다. 국제 연골 복구 협회 (The International Cartilage Repair Society)는 연골 결함의 중증도를 평가하기 위한 관절경 등급화 시스템을 제안하였다: 등급 0: (정상) 건강한 연골, 등급 1: 연골이 연한 반점 또는 블리스터를 가짐, 등급 2: 연골에서 볼 수 있는 사소한 째짐, 등급 3: 병변이 깊은 틈새를 가짐 (연골 총의 50 % 초과), 및 등급 4: 연골 째짐이 기저의 (연골하) 골을 노출시킴 (ICRS 공개: http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf, page 13 참조).

[0025]

- 본원에 사용된 용어 "관절염"은 골관절염, 류마티스성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 침엽성 관절염, 전선성 관절염, 스텔병 (소아 류마티스성 관절염의 개시) 또는 박리 골연골염과 같은 장애를 포함한다. 이는 바람직하게는 연골이 손상된 것인 질환 또는 장애를 포함한다.

[0026]

- 용어 "골관절염" 또는 "OA"는 관절염의 가장 통상적인 형태를 의도하기 위해 사용된다. 용어 "골관절염"은 일차 골관절염 및 이차 골관절염 둘 다를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [The Merck Manual, 17th edition, page 449] 참조). 골관절염은 연골의 파손에 의해 유발될 수 있다. 연골의 조각은 갈라지고, 통증 및 골 사이의 관절에서의 부기를 유발할 수 있다. 시간의 경과에 따라, 연골은 전체적으로 마모될 수 있으며, 골은 함께 마찰될 것이다. 골관절염은 임의의 관절에 영향을 줄 수 있지만, 통상적으로 손, 어깨 및 체중-부하 관절, 예컨대 둔부, 무릎, 발, 및 척추에 관련된다. 바람직한 예에서, 골관절염은 무릎 골관절염 또는 둔부 골관절염일 수 있다. 이 용어는 특히 OARSI 분류 시스템에 따라 단계 1 내지 단계 4 또는 등급 1 내지 등급 6으로 분류되는 골관절염의 형태를 포함한다. 통상의 기술자는 관련 기술분야에서 사용되는 골관절염 분류, 특히 상기 OARSI 평가 시스템 (OOCHAS로도 명명됨; 예를 들어 문헌 [Custers et al., 2007] 참조)을 충분히 숙지하고 있다. 골관절염은 본 발명에 따른 FGF-18 화합물을 투여함으로써 치료될 수 있는 바람직한 연골 장애 중 하나이다.

[0027]

- 본원에 사용된 용어 "연골 손상"은 특히 외상으로부터 초래되는 연골 장애 또는 연골 손상이다. 연골 손상은 특히 외상성 기계적 파괴 후에, 특히 사고 또는 수술 (예를 들어 미세골절술 수술)에 추가로 발생할 수 있다. 이 용어 "연골 손상"은 또한 연골 또는 골연골 골절 및 반월에 대한 손상을 포함한다. 또한, 관절의 조직의 스포츠-관련된 손상 또는 스포츠-관련된 마모가 이 정의 내로 간주된다. 용어는 또한 미세손상 또는 둔상, 연골 골절, 골연골 골절 또는 반월에 대한 손상을 포함한다.

- [0028] - 본 발명의 내용에서, 치료의 "효능"은 연골의 두께, 예를 들어 관절의 관절 연골의 두께의 변화에 기초하여 측정될 수 있다. 이 두께는 예를 들어, X-선 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명 영상 (MRI) 또는 초음파 측정을 통해 평가될 수 있다.
- [0029] **발명의 상세한 설명**
- [0030] 본 발명은 FGF-18 화합물로의 다양한 연골 장애, 예컨대 골관절염 및 연골 손상의 치료를 위한 투여 계획을 제공한다. 바람직하게는, 상기 FGF-18 화합물은 상기 정의된 바와 같은 trFGF-18이다. 본 발명의 내용에서, FGF-18 화합물은 본원에 개시된 방법 및 용도에 따라 투여되는 경우 연골 장애에 대한 최적의 질환- 또는 증상-개선 효과를 갖는 것으로 나타났다. 놀랍게도, 본 발명의 투여 처방 (즉, 치료 사이클 당 3주 동안 주 1회보다 적은 빈도의 투여 스케줄)은 다음 주사 동안 감소된 염증 (예를 들어 급성 윤활막염) 상태를 유발하며, 따라서 FGF-18 화합물의 완전한 활성이 관찰될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이 발견은 관절에서의 FGF-18의 다소 짧은 반감기 (24시간 미만) 때문에 예상되지 않은 것이었다.
- [0031] 전체로서 본 발명의 내용에서, FGF-18 화합물로의 임의의 치료 (또는 임의의 치료 방법)는 증상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙의 투여를 더 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 투여 (또는 공동-투여)는 FGF-18 화합물의 투여와 동시에 (즉, 수반하여) 수행된다.
- [0032] 한 실시양태에서, 본 발명은 FGF-18 화합물이 치료 사이클 당 적어도 2회 투여되며, 상기 투여가 약 2주, 바람직하게는 2주 분리되는 것인 (즉, 2주마다, 격주마다 또는 격주로), FGF-18 화합물의 투여를 포함하는 연골 장애를 갖는 환자의 치료 방법을 제공한다. 바람직한 FGF-18 화합물은 trFGF-18이다. 바람직한 실시양태에서, FGF-18 화합물은 치료 사이클 당 3회, 2주 또는 약 2주의 규칙적인 간격으로 (즉, 치료 사이클 당 3회, 2주 또는 2주마다 1회의 규칙적인 간격으로) 투여될 수 있다. 이러한 치료는 1년 당 1, 2 또는 3 치료 사이클을 포함할 수 있다. 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙은 FGF-18 화합물과 동시에 투여될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 측면에서, FGF-18 화합물이 치료 사이클 당 적어도 2회 투여되며, 상기 투여가 약 2주, 바람직하게는 2주 분리되는 것인, 연골 장애를 갖는 환자의 치료에 사용하기 위한 FGF-18 화합물이 제공된다. 바람직한 FGF-18 화합물은 trFGF-18이다. 바람직한 실시양태에서, FGF-18 화합물은 치료 사이클 당 3회, 2주 또는 약 2주의 규칙적인 간격으로 (즉, 치료 사이클 당 3회, 2주 또는 2주마다 1회의 규칙적인 간격으로) 투여된다. 이러한 치료는 1년 당 1, 2 또는 3 치료 사이클을 포함할 수 있다. 증상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙은 FGF-18 화합물과 동시에 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 단독으로 또는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙과 조합으로의 FGF-18 화합물의 투여는 규칙적인 간격으로 수행되지만, +/- 수 일의 약간의 변경이 허가된다 (바람직하게는 3일 이하). 예를 들어, 투여가 약 2주 분리되는 경우, 사이클의 제1 투여가 화요일에 주어지면, 제2 투여는 제1 투여 2주 후의 화요일 (규칙적인 간격) 또는 수 일 후 또는 전 (예를 들어 전은 월요일 또는 후는 목요일)에 이루어질 수 있다. 유사하게, 제1 투여가 예를 들어 8월 1일 (예를 들어 월요일)에 주어지면, 제2 투여는 8월 15일 (월요일), 즉 제1 투여 2주 후 (규칙적인 간격) 또는 수 일 후 또는 전 (예를 들어 8월 15일 전은 금요일 또는 토요일, 또는 8월 15일 후는 화요일 또는 수요일)에 이루어질 수 있다. 이러한 유동성은 투여 처방이 특히 덜 제한적이고 환자에게 보다 편리하게 한다.
- [0035] 바람직하게는, 투여는 규칙적인 간격 기초로, 예를 들어 2주마다 수행된다. 한 바람직한 실시양태에서, 이는 2주 분리된다 (즉, 격주 주사).
- [0036] 전체로서 본 발명의 내용에서, FGF-18 화합물은 치료 사이클 당 적어도 2회 투여된다. 이는 또한 예를 들어 치료 사이클 당 적어도 3회 또는 적어도 4회 투여될 수 있다. 바람직하게는, 이는 치료 사이클 당 3회 또는 4회 동안 투여된다.
- [0037] 바람직한 실시양태에서, 단독으로 또는 항-염증 약물 (예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙)과 조합으로의 FGF-18 화합물은 치료 사이클 당 연속적인 적어도 2회, 연속적인 적어도 3회 또는 연속적인 적어도 4회 동안 투여된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 단독으로 또는 항-염증 약물 (예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙)과 조합으로의 FGF-18 화합물은 치료 사이클 당 연속적인 2회, 연속적인 3회 또는 연속적인 4회 동안 투여된다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 이는 연속적인 3회 동안 투여된다.
- [0038] 전체로서 본 발명의 내용에서, 이러한 치료는 1년 당 몇몇 치료 사이클, 예컨대 1년 당 1, 2 또는 3 치료 사이클을 포함할 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 이러한 치료는 1년 당 2 사이클을 포함한다. 대안으로서,

치료는 제1 치료 사이클의 시작 1년 또는 2년 후 반복되는 1년 당 1 사이클을 포함한다. 예로서, 치료가 1 사이클을 포함하는 경우, 상기 치료는 각각 2주 간격으로 3회의 주사로 이루어질 수 있다. 추가의 예로서, 치료가 적어도 2 사이클을 포함하는 경우, 각각 2주 간격으로 3회의 주사로 이루어진 제1 치료 사이클에 이어, 상기 사이클의 마지막 주사 몇 개월 후, 각각 2주 간격으로 3회의 주사의 제2 치료 사이클이 이어질 수 있다.

[0039] 본 발명의 FGF-18 화합물은 바람직하게는 a) 서열식별번호: 1의 잔기 28 내지 207을 포함하는 인간 FGF-18 성숙 형태를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드, 또는 b) FGF-18(170AA)(서열식별번호: 2)를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히, 이 화합물은 인간 야생형 성숙 FGF-18 또는 trFGF-18로부터 선택된다. 상기 화합물은 연골 침착을 증가시키고, 연골 복구를 허용한다.

[0040] 추가의 바람직한 실시양태에서, 치료는 단일 관절내 투여 당 3 내지 600 마이크로그램 (μg 또는 mcg), 바람직하게는 3 내지 300 μg , 또는 바람직하게는 10 내지 200 μg , 또는 보다 바람직하게는 30 내지 150 μg , 또는 보다 더욱 바람직하게는 30 내지 120 μg 의 용량으로의 FGF-18 화합물의 투여를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 치료는 FGF-18 화합물의 단일 관절내 투여 당 약 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 100, 120, 150, 180, 200, 240 또는 300 μg 의 용량으로의 투여를 포함한다. 바람직한 용량은 FGF-18 화합물의 단일 관절내 투여 당 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 또는 300 μg 을 포함한다. 치료되는 환자가 인간 또는 비-인간 포유동물인 경우, 투여되는 FGF-18 화합물의 용량은 상이할 것임이 이해되어야 한다. 예를 들어, 개에 대해, 용량은 인간에 대한 것보다 바람직하게는 5배 덜 중요할 것이다. 예로서, 인간 용량이 단일 관절내 투여 당 30 내지 120 μg 범위인 경우, 개에 대한 용량은 단일 관절내 투여 당 5 내지 20 μg 범위일 수 있다. 래트 및 토끼에 대한 투여의 예는 실시예 섹션에서 발견될 수 있다.

[0041] 전체로서 본 발명의 내용에서, FGF-18 화합물은 증상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물과 조합으로 사용될 수 있다. 바람직한 항-염증 약물은 아나킨라 (서열식별번호: 3 참조) 또는 디클로페낙이다. 아나킨라 또는 디클로페낙 중 어느 하나가 투여되는 경우, 치료는 관절내로 (예를 들어 아나킨라에 대해 바람직한 방식) 또는 경구로 (예를 들어 디클로페낙에 대해 바람직한 방식) 단일 투여 당 0.01 내지 500 밀리그램 (mg), 바람직하게는 0.1 내지 250 mg, 또는 보다 바람직하게는 0.5 내지 150 mg의 용량으로의 투여를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 치료는 항-염증 약물의 단일 투여 당 약 0.03, 0.1, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 또는 300 mg의 용량으로의 투여를 포함한다. 바람직한 용량은 단일 투여 당 0.5, 1, 5, 1.5, 10, 50, 100 및 150 mg을 포함한다. 치료되는 환자가 인간 또는 비-인간 포유동물인 경우, 투여되는 항-염증 약물의 용량은 상이할 것임이 이해되어야 한다. 예를 들어, 개에 대해, 용량은 인간에 대한 것보다 바람직하게는 6배 덜 중요할 것이다. 예로서, 아나킨라의 인간 용량이 단일 관절내 투여 당 150 mg인 경우, 개에 대한 용량은 단일 관절내 투여 당 25 mg일 수 있다. 의사는 환자에 따라 및 투여되는 항-염증 약물에 따라, 항-염증 약물에 대한 투여 처방을 사례별로 조정할 것이다. 예를 들어, 경구로 주어지는 디클로페낙에 대해, 투여 처방은 1일 2 또는 3회로 50 또는 75 mg일 수 있다.

[0042] FGF-18 화합물은 제약 조성물로서, 즉 제약학적으로 허용되는 담체, 부형제 등과 함께 제제화될 수 있다. "제약학적으로 허용되는"의 정의는 활성 성분의 생물학적 활성의 유효성을 방해하지 않는, 즉 그것이 투여되는 환자에게 독성이 아닌 임의의 담체, 부형제 등을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 비경구 투여를 위해, 활성 단백질(들)은 비히클, 예컨대 염수, 텍스트로스 용액, 혈청 알부민 및 립기 용액 등의 주사를 위한 단위 투여 형태로 제제화될 수 있다. 관절내 적용을 위한 제제는 또한 다른 주사 제제에 적용되는 대부분의 요건을 따를 것이며, 즉, 이는 멸균성이며 적용 부위 (예를 들어, 무릎 관절, 윤활액)에서의 생리학적 조건과 혼화성일 필요가 있다. 관절내 주사에 사용되는 부형제는 또한 다른 주사 제제에, 예를 들어, 근육내 또는 피하 적용을 위해 존재할 수 있다. 적어도 1종의 추가의 제약학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하는 이러한 FGF-18 화합물의 제제는 본원에서 또한 "FGF-18 조성물" 또는 "FGF-18 제제"로 지칭된다. 상기 "FGF-18 조성물" 또는 "FGF-18 제제"는 또한 본 발명의 내용에서 유용하다.

[0043] 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙이 FGF-18 화합물과 함께 사용되는 경우, 이는 투여 전에 FGF-18 화합물 제제에 첨가될 수 있거나, 2개의 상이한 주사기/바늘을 사용하여, 또는 2개의 상이한 주사기를 사용하여, 그러나 바람직하게는 환자의 편의를 증가시키기 위해 동일한 바늘을 사용하여 공동-투여될 수 있다. 대안적으로, 항-염증 약물은 경구로 또는 임의의 다른 투여 방식에 의해 투여될 수 있다.

[0044] FGF-18 화합물, 예컨대 trFGF-18, 및 FGF-18 화합물을 함유하는 조성물 ("FGF-18 조성물")은 연골 장애의 치료에 유용할 것이다. 특히, 이는 예를 들어 표면 피브릴화 (초기 골관절염), 골관절염으로 인한 연골 퇴행, 및 손상 또는 질환으로 인한 연골 또는 골연골 결함에 기인하는 윤활 관절의 관절 연골 결함의 치료에 유용할 수

있다. FGF-18 화합물 및 조성물은 또한 박리 골연골염 및 퇴행성 관절 질환에 의해 유발되는 관절 질환의 치료에 유용할 수 있다. 재건 및 성형 수술의 분야에서, FGF-18 화합물 및 조성물은 광범위한 조직 결합의 재건을 위한 자가 또는 동종이형 연골 확대 및 이동에 유용할 것이다. FGF-18 조성물은 관절의 세척, 골수의 자극, 마모 관절성형술, 연골하 천공, 또는 연골하 골의 미세골절술과 공동으로 연골 손상을 복구하는 데 사용될 수 있다. 중상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙과 함께 최적의 공동-투여는 치료되는 연골 장애와 연관된 통증을 감소시킬 것이다.

[0045] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따라 치료되는 연골 장애는 골관절염, 예컨대 무릎 골관절염 또는 둔부 골관절염이다. 치료되는 골관절염은 예를 들어 일차 골관절염 또는 이차 골관절염, 뿐만 아니라 OARSI 분류 시스템에 따라 단계 1 내지 단계 4 또는 등급 1 내지 등급 6으로 분류되는 골관절염일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0046] 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따라 치료되는 연골 장애는 수술적 개입, 예컨대 미세골절술이 있거나 없는 연골 손상이다. 추가적으로, (단독으로 또는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙과 함께 투여되는) FGF-18 조성물의 투여로 인한 연골의 성장 후, 수술적 치료는 새롭게 형성된 연골 표면을 적합하게 윤곽화하기 위해 필요할 수 있다.

[0047] 바람직한 실시양태에서, 치료는 단독으로 또는 중상 (통증 및 기능)에 대한 효과를 갖는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙과 함께 FGF-18 화합물 또는 FGF-18 조성물의 관절내 투여를 포함한다. FGF-18 화합물 또는 FGF-18 조성물은 단독으로 또는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙과 함께, 관절의 윤활액 내로의 직접 주사에 의해 또는 결합 내로 직접적으로, 단독으로 또는 단백질의 확대된 방출 (예를 들어 지속-방출 제제) 또는 제한된 국소 방출에 적합한 담체와 복합체화되어 적용될 수 있다. 바람직하게는, 단독으로 또는 본원에 기재된 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙과 함께 FGF-18 화합물의 투여 방식은 윤활막주위 투여, 윤활막내 투여, 관절주위 투여 및 관절내 투여로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 FGF-18 화합물은 단독으로 또는 항-염증 약물, 예컨대 아나킨라 또는 디클로페낙과 함께, 바람직하게는 관절내로 (관절 내로의 투여) 투여된다. 항-염증 약물은 바람직하게는 관절내로 (아나킨라에 대해 바람직한 방식) 또는 경구로 (디클로페낙에 대해 바람직한 방식) 투여된다. 관절내 투여는 둔부, 무릎, 팔꿈치, 허리, 발목, 척추, 발, 손가락, 발가락, 손, 어깨, 늑골, 견갑골, 대퇴, 정강이, 뒤꿈치 및 척추의 골점과 관절로부터 선택되는 관절에서 수행된다. 더 또다른 바람직한 실시양태에서, 관절내 투여는 둔부 또는 무릎의 관절에서 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1: 치료 스케줄 개요. 도 1a: 매주 1회 투여 처방; 도 1b: 매월 (또는 4주마다) 1회 투여 처방; 도 1c: 매월 (또는 4주마다) 1회 투여 처방 +/- 환자의 편의를 위해 허용되는 수 일의 변경

도 2: FGF-18 화합물은 사프라닌 (Safranin)-O 염색의 정량화에 의해 예시된 래트 OA 모델에서 용량 의존적 관절 매트릭스 침착을 유발시킨다.

도 3: 대퇴골이 없는 총 관절 점수

도 4: 총 관절 점수

도 5: 실질적인 경골 연골 퇴행 폭

도 6: rhFGF18 100 ng/mL 및/또는 아나킨라 100 ng/mL로 배양 일 IL1α로 자극되거나 그렇지 않은 IL1로 자극되거나 그렇지 않은 돼지 연골세포의 배양 8일 후 (A) 또는 6시간 지연 후 (B)의 세포 농도. (A)에 대해 N=4 및 (B)에 대해 N=6.

도 7: 시간 경과에 따른 혈청 α2MG 수준

도 8: 시간 경과에 따른 표적 무릎 (OA 관절) 및 반대측 관절 (건강한 무릎) 사이의 관절 직경 차이의 AUC (곡선하 면적)

도 9: 내측 경골 상의 연골 부피 (mm^3)

서열의 설명:

서열식별번호: 1: 천연 인간 FGF-18의 아미노산 서열.

서열식별번호: 2: 재조합 말단절단된 FGF-18 (trFGF-18)의 아미노산 서열.

서열식별번호: 3: 재조합 인간 iIL-1 수용체 길항제 (아나킨라)의 아미노산 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 실시예

[0050] 물질

[0051] 본 실시예의 재조합 말단절단된 FGF-18 (trFGF-18)은 출원 WO2006/063362에 기재된 기술에 따라 이. 콜라이에서의 발현에 의해 제조되었다. 하기 실시예에서, trFGF-18 및 FGF-18은 호환적으로 사용된다.

[0052] 재조합 인간 인터루킨-1 수용체 길항제 (아나킨라)는 파마시아 (Pharmacia)를 통해 얻었다.

[0053] 관절의 점수화

[0054] 회생시킨 후, 우측 무릎을 제거하고, 5% 포름산에서 4 내지 6일 동안 석회질제거한 후, 정면 평면에서 반으로 커팅하고, 파라핀 액스에 끼웠다. 3개의 섹션을 200 μ m 단계로 커팅하고, 툴루이딘 블루로 염색하고, 이미지 프로 플러스 (ImagePro Plus)TM 소프트웨어 (미디어 사이버네틱스 (Media Cybernetics))를 사용하여 분석하였다. 관절의 3개의 섹션의 점수화에 있어서, 각각의 슬라이드 상의 2개의 반에 대한 최악의 경우를 연골 병변에 대해 연골 퇴행 폭 (μ m)으로서 측정하였다. 이는 연골세포 및 프로테오글리칸 둘 다가 소실되는 경골 연골 병변의 영역이 연골 두께의 50% 이상 확대하는 것을 반영한다. 측정은 경골 표면에 걸쳐 각각의 3개의 구역에서 최대 병변 중증도의 영역에 대해 취하였다.

[0055] 각각의 점수 및 측정에 대한 치료 군 평균 \pm SE를 측정하였다.

[0056] 데이터를 적절한 검정후 다중 비교와 함께 일원 분산 분석 (1-원 ANOVA) 또는 크루스칼-월리스 (Kruskal-Wallis) 검정 (비-모수)을 사용하여 분석하였다. 우측 무릎 캘리피스 측정을 스튜던트 t-검정을 사용하여 좌측과 비교하였다. 지시되지 않는다면, 불더 바이오패쓰, 인코포레이티드 (Bolder BioPATH, Inc.)는 단지 원 (비변형된) 데이터에 대한 통계학적 분석을 수행한다. 통계학적 시험은 데이터의 정규성 및 분산의 균일성에 관한 특정 가정을 하며, 시험이 이를 가정의 위배를 초래한 경우 추가의 분석이 요구될 수 있다. 모든 시험에 대한 유의성은 $p \leq 0.05$ 로 설정하였다. 각각의 군 및 비히클 대조군 사이, 뿐만 아니라 쌍 사이에 비교를 하였다.

[0057] 실시예 1

[0058] 방법: 불안정 유도된 OA의 내측 반월 (ACLT+tMx) 모델의 절제로 전방 십자 인대 횡절단을 10 내지 15주령 수컷 루이스 (Lewis) 래트에서 수행하였다. 간략하게, 이소플루란으로의 마취 하에서, 각각의 래트의 우측 무릎의 관절낭을 개방하고, 전방 십자 및 반월 고정 인대를 샤프하게 횡절단하고, 반월을 제거하고, 낭, 근육 및 피부를 봉합에 의해 닫았다. 동물을 무작위로 각각 n=10의 10개의 군으로 할당하였다. 투여 후 관절내 주사 당 0, 0.3, 1, 3 및 10 μ g으로 조사하였다. 군 1 내지 5는 매주 간격으로 3회의 단일 주사의 1 사이클을 받았고, 군 6 내지 10은 매월 간격으로 3회의 단일 주사를 받았다. 관절내 치료를 수술 3주 후에 시작하였다. 이 때, 병리생리학적 변화, 예를 들어 연골 매트릭스 소실이 이미 나타난다. 동물을 수술 17주 후에 안락사시키고, 관절을 조사하였다.

[0059] 결과: trFGF-18은 주사 처방에 독립적으로 1 μ g/관절로 측면 경골에서 유의해진 연골 조직의 용량-의존적 신생을 유도하였다 (도 2a 참조). trFGF-18은 1회의 매주 처방에 따른 1 μ g/관절로의 및 1회의 매월 처방에 따른 0.3 μ g/관절로의 내측 경골에서 유의해진 연골 조직의 용량-의존적 신생을 유도하였다 (도 2b 참조).

[0060] 실시예 2

[0061] 방법: 수컷 루이스 래트를 (이소플루란으로의 마취 하에서) 우측 무릎 관절에 내측 반월 파열을 유도하는 수술을 하였다. 동물에게 비히클 또는 FGF-18로 2개의 상이한 처방 중 하나에 대해 관절내 투여한 후 (하기 표 참조), 제105일에 종결하였다. 무릎에 기준선 및 제21일, 제42일, 제56일, 제84일, 및 제105일에 취해진 캘리피스 측정을 하였다. 혈청을 α 2마크로글로불린 수준에 대해 기준선에서 및 제21일, 및 제105일에, 뿐만 아니라 최종 용량 1주 후 (제42일 또는 제84일)에 평가하였다. 우측 무릎을 조직병리학 평가를 위해 수집하였다.

[0062] <표 1>

[0063]

치료 군

군	래트의 수	치료 (50 µl 중 10 µg)
1	10	정상+비히클 d21,35,49
2	10	수술+비히클 d21,35,49
3	10	수술+FGF-18 d21,28,35 (매주 치료)
4	10	수술+FGF-18 d21,35,49 (격주)
5	10	수술+FGF-18 d21,49,77 (매월 치료)
6	10	수술+FGF18 d21,35
7	10	수술+ FGF18 d21,77

[0064]

결과 및 결론:

[0065]

모든 동물은 수술 직후 마취로부터 회복 시 체중 부하를 재개하였다. 모든 동물은 연구의 과정에 걸쳐 체중이 증가되었으며, 군 사이에 체중 변화의 유의한 차이는 없었다.

[0066]

캘리퍼스 측정에 의해 측정된 무릎 직경 및 a2MG의 혈청 수준은 FGF-18 주사 후 증가하였지만, 하나의 특정 치료 처방의 또다른 것에 대한 명백한 유익은 이들 파라미터를 사용한 이 연구에서 입증되지 않았다. 대조적으로, 구조적 유익은 매월 주사 계획에서 가장 높았다 (도 3, 4, 5). 격주 주사 계획은 또한 유망하며, 흥미로운 구조적 유익을 제공한다.

[0067]

전체적으로, 이 연구의 결과는 FGF-18로의 치료는 처방에 무관하게 제1 주사 후 치료된 무릎에서 부기를 유의하게 증가시켰음을 지시한다. 조직병리학 평가는 치료가 일반적으로 특히 콜라겐 손상의 관점에서 그의 중증도를 감소시키면서 경골 표면에 걸친 손상의 정도를 증가시켰음을 지시하였다. 이 효과는 2회보다 3회의 용량을 받은 치료 군에서, 및 최근 시점 (제77일)에 그의 최종 용량을 받은 군에서 가장 명백하였다. 연골 비대, 윤활막 염, 및 윤활막 섬유화를 비롯한 치료의 몇몇 다른 부작용이 나타났다. 이들 변화는 신속한 연속으로 3회의 용량을 받은 동물 (군 3 및 4)에서 가장 명백하고 심각한 반면, 2회의 용량만을 받은 동물 (군 6 및 7) 또는 보다 긴 기간에 걸쳐 그의 용량을 받은 동물 (군 5)은 약간 덜 심각한 변화를 가졌다.

[0068]

가장 양호한 전체적 형태를 초래한 치료 처방은 매월 1회 3회의 주사였으며 (군 4; 제21일, 제49일, 및 제77일에 주사), 이는 용량 사이에서 일부 회복 시간이 유익하였음을 지시한다. 대안적으로, 2주마다 1회의 3회 주사의 치료 처방 (군 5; 제21일, 제35일 및 제49일에 주사)는 양호한 전체적 형태를 초래하였다.

[0069]

실시예 3

[0070]

방법:

[0071]

60마리의 성인 수컷 순수한 뉴질랜드 화이트 (New Zealand White) 토끼를 이 연구에 사용하였다. 동물은 연골 결합 우측 무릎의 생성을 겪은 대략 3 내지 4월령 토끼였다. 2 mm × 6 mm 전두께 결함을 활차 고랑의 관절 연골에 만들었다. 미세골절을 18 게이지 바늘을 사용하여 생성하고, 2개의 3 mm 깊이 미세골절을 결합의 기부에서 연골하 골을 통해, 하나는 근위에서 하나는 원위에서 만들었다. 각각의 미세골절 구멍은 직경이 대략 1.5 mm이고, 구멍은 2 mm 이격되었다.

[0072]

실험은 총 60마리의 토끼에 대해 각각의 군에 10마리의 동물을 갖는 하기 6개의 치료 군으로 이루어졌다 (표 2). 군 3, 4, 5 및 6의 토끼를 rhFGF18 100 µg의 3회의 매주 주사의 1 사이클 (군 3 및 5) 또는 rhFGF18 100 µg의 3회의 매월 주사의 1 사이클 (군 4 및 6)로 관절내 rhFGF18로 치료하였다. 모든 동물을 수술 6개월 후에 안락사시키고, 부검하였다.

[0073]

<표 2>

[0075]

치료 군

군 번호 (n=10)	연골 결합	미세골절 술	시험 물품 및 치료 스케줄	용량 μg/주사 (trFGF-18)	trFGF-18 농도 (μg/ml)	부피 (ml/ 관절)	투여일
1	있음	없음	없음	0	NA	NA	NA
2	있음	있음	없음	0	NA	NA	NA
3	있음	없음	rhFGF18 (3주 동안 1x/주)	100	500	0.2	제7일, 제14일, 제21일
4	있음	없음	3개월 동안 1x/개월)	100	500	0.2	제28일, 제56일, 제84일
5	있음	있음	rhFGF18 (3주 동안 1x/주)	100	500	0.2	제7일, 제14일, 제21일
6	있음	있음	3개월 동안 1x/개월)	100	500	0.2	제28일, 제56일, 제84일

[0076]

결과:

[0077]

부검 결과 (표 3): ICRS 육안적 연골 점수는 군 5 동물에 대해 $1.9+/-0.3$ SE이고, 군 6 동물에 대해 $2.4+/-0.2$ SE이었으며, 이는 매월 주사 계획이 매주 것에 비해 우수하였음을 지시한다. 군 6 동물에서, 융기사이 고랑은 미세하게 과립 내지 과립 연골을 갖는 3/10 동물에서 충전되었고, 나머지 7/10 동물은 과립 내지 조질의 과립 연골로 50% 채워진 내지 거의 완전히 충전된 고랑을 가졌다. 요약하면, 단일 매주 또는 매월 주사로서 투여된 단독으로 또는 미세골절술과 조합으로의 rhFGF18의 주사는 대퇴골 관절융기 영역의 두꺼워짐 또는 확대 및 융기사이 고랑 병변에서의 거친 또는 조질의 과립 연골의 증식 및 내측 및 측면 활차 능선 상의 골돌기체의 자극, 때때로 경골 고원 골돌기체 형성, 또는 윤활 지방체에서의 슬개골 상의 또는 슬개골에 인접한 비정상적 연골 성장을 초래하였다.

[0079]

미세골절술이 없는 경우 형태 병리학: 3개월 동안 매월 rhFGF18로 치료된 동물로부터의 우측 대퇴골 병변 섹션은 결합 충전 점수에서 유의한 49% 증가를 초래하는 유의하게 증가된 결합 충전 퍼센트 (48%)를 가졌다. 다른 점수는 유의하지 않게 20 내지 23% 증가되었다. 고랑 병변의 총 폭은 유의하지 않게 36% 증가된 반면, 생육가능한 연골을 갖지 않는 병변의 폭은 유의하게 94% 감소되었다. 모든 섹션은 최소 내지 중증 범위의 퇴행을 가졌으며, 일반적으로 초점성이고, 전형적으로 섬유연골과 함께 나타났다. 중심 MFC 두께는 유의하게 120% 증가되었다.

[0080]

미세골절술의 경우 형태 병리학: 미세골절술로 비치료된 대조군으로부터의 연골 병변 영역의 섹션은 전체적으로 골연골 접합의 중간 재구성, 중간으로 감소된 매트릭스 염색, 및 결합의 50% 충전을 가졌다. 세포 형태는 대부분 섬유연골이었다.

[0081]

3주 동안 매주 rhFGF18로 치료된 동물로부터의 병변 영역 섹션은 모든 점수화된 파라미터 뿐만 아니라 결합 충전 퍼센트에서 유의한 44 내지 69% 증가 (정상을 향해)를 가졌다. 합한 점수는 유의하게 53% 증가되었다. 고랑 병변의 총 폭은 약간 5% 증가된 반면, 생육가능한 연골을 갖지 않는 병변의 폭은 59% (유의하지 않게) 감소되었다. 모든 섹션은 연골 비대를 가졌다. 이들 섹션에서의 중심 MFC 두께는 유의하게 112% 증가되었다.

[0082]

3개월 동안 매월 rhFGF18로 치료된 동물로부터의 병변 영역 섹션은 모든 점수화된 파라미터 뿐만 아니라 결합 충전 퍼센트에서 유의한 61 내지 97% 증가 (정상을 향해)를 가졌다. 합한 점수는 유의하게 76% 증가되었다. 고랑 병변의 총 폭 및 생육가능한 연골을 갖지 않는 병변의 폭은 각각 유의하지 않게 19% 및 69% 감소되었다. 모든 섹션은 연골 비대를 가졌다. 이들 섹션에서의 중심 MFC 두께는 유의하게 106% 증가되었다.

[0083]

결론:

[0084]

비정상적인 임상적 징후는 온건하며, 무릎 수술 후 및/또는 반복적 샘플 수집의 결과로서 토끼에서 전형적으로 나타나는 것인, 측면 귀 정맥으로부터 수집된 혈액 또는 무릎 관절로부터 수집된 윤활액과 일치한다. 군 1 및 군 2의 동물의 관절융기내 고랑 치유의 비교는 육안적으로 연골인 것으로 보이는 것을 갖는 고랑의 양호한 자발

적 충전을 나타내었다. 군 2에서 9/10 동물이 군 1에서 7/10 동물에 비해 연골로의 고랑의 충전을 갖지만, 이 차이는 경미하기 때문에, 미세골절술은 고랑에서 연골 재성장을 항상시킬 수 있다는 암시가 있다.

[0085] 유사하게, 2개의 군 사이의 ICRS 또는 골돌기체 점수 사이에 차이가 없으므로, 연골 치유의 질이 양호하였고, 각각의 군에서 골돌기체 형성의 자극이 거의 없었다. rhFGF18로 치료된 나머지 군 중에서, 군 4 (용기사이 고랑 및 rhFGF18 100 μg 의 3회의 매월 관절내 주사)는 육안적 외관에서 거의 정상 내지 약간 거칠어지거나 과립인 것으로 보인 연골로 충전된 용기사이 고랑을 갖는 6/9 동물을 갖는 가장 양호한 반응을 나타내었다. 또한, 군 4는 rhFGF18로 치료된 4개의 군 중 최저 다음의 ICRS 연골 점수 ($2.1 +/ - 0.3$)를 가졌으며, 이 군은 임의의 rhFGF18 군 중 가장 낮은 골돌기체 점수 ($3.8 +/ - 0.8$)를 가졌다. 대조적으로, 군 6 (미세골절을 갖는 용기사이 고랑 및 rhFGF18 100 μg 의 3회의 매월 관절내 주사)은 단지 3/10 동물에서 용기사이 고랑 충전을 가졌으며, ICRS 점수는 임의의 군 중 가장 높았고 ($2.4 +/ - 0.2$), 골돌기체 점수는 임의의 rhFGF18 치료된 군 중 두번째로 높았다 ($5.1 +/ - 0.7$). 유사하게, 군 5 (미세골절을 갖는 용기사이 고랑 및 rhFGF18 100 μg 의 3회의 매주 관절내 주사)는 임의의 군 중 가장 높은 골돌기체 점수를 가졌다 ($5.7 +/ - 0.7$).

[0086] 치료가 연장된 기간에 걸쳐 주어진 경우, 유익한 효과는 보다 커졌으며, 미세골절술을 하지 않은 토끼에서보다 미세골절술을 한 토끼에서 효과는 보다 명백하였다.

실시예 4

방법:

[0089] 돼지 연골세포를 돼지 둔부의 대퇴 머리의 연골로부터 단리하였다 (돼지는 대략 1연령이었음). 관절의 박리 후, 연골을 수확하고, 실온에서 콜라게나제 0.25% (HAM's F12 중 콜라게나제 NBG4 2.5%의 1/10 희석)로 45분 소화시켰다. 느슨해진 세포를 버리고, 연골을 37°C에서 콜라게나제 0.1% (HAM's F12 중 콜라게나제 NBG4 2.5%의 1/25 희석)로 밤새 더 소화시켜 연골세포를 추출하였다. 이 연구를 위해, 연골세포를 단층으로 배양하였다.

[0090] 일차 관절 돼지 연골세포를 10 ng/mL IL1 α 로 자극하거나, 자극하지 않고, 즉시 또는 6시간 후 아나킨라 100 ng/mL 및/또는 trFGF-18 100 ng/mL로 처리하였다. 각각의 조건은 4 또는 6-별로 수행하였다. 대조군으로서, 세포를 또한 아나킨라 단독, trFGF-18 단독 또는 임의의 처리의 부재 하에서 (배지) 배양하였다.

[0091] 예비-배양: 세포 단리 후, 돼지 연골세포를 20 000 세포/cm²로 접종하고, 완전 HAM's F12에서 1주 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 아쿠타제로 수확하고, 카운팅하고, 하기 기재된 바와 같이 사용하였다.

[0092] 아나킨라로 직접 처리된 모든 세포에 대해: 연골세포를 24-웰 플레이트에 완전 HAM's F12 0.5 mL 중 15 000 세포/웰로 접종하였다. 그 후, trFGF-18 400 ng/mL 0.25 mL 및/또는 아나킨라 400 ng/mL 0.25 mL를 세포에 첨가하였다. 시험접종된 샘플에서, 1 000 ng/mL의 IL1 α 10 μL 을 또한 세포에 첨가하였다. trFGF-18, 아나킨라 및 IL1 α 는 모두 완전 HAM's F12에 희석하였다. 배양 웰 중의 최종 부피를 완전 HAM's F12로 1 mL로 조정하였다. 최종 농도는 10 ng/mL IL1 α , 100 ng/mL trFGF-18 및 100 ng/mL 아나킨라이고, 총 배양 시간은 8일이었다. 완전 배지 변경을 4일 후에 수행하였다. N=4.

[0093] IL1 α 시험접종 6시간 후 아나킨라 및 trFGF-18로 처리된 세포에 대해: 연골세포를 24-웰 플레이트에 IL1 α 10 ng/mL를 함유하거나 함유하지 않는 완전 HAM's F12 1 mL 중 15 000 세포/웰로 접종하였다. 6시간 후, 배지를 제거하고, trFGF-18 400 ng/mL 0.25 mL 및/또는 아나킨라 400 ng/mL 0.25 mL로 대체하였다. 시험접종된 샘플에서, 40 ng/mL의 IL1 α 0.25 mL를 또한 세포에 첨가하였다. trFGF-18, 아나킨라 및 IL1 α 는 모두 완전 HAM's F12에 희석하였다. 배양 웰 중의 최종 부피를 완전 HAM's F12로 1 mL로 조정하였다. 최종 농도는 10 ng/mL IL1 α , 100 ng/mL trFGF-18 및 100 ng/mL 아나킨라이고, 총 배양 시간은 8일이었다. 완전 배지 변경을 4일 후에 수행하였다. N=6.

[0094] 배양 8일 후, 세포를 아쿠타제로 수확하고, 생성된 세포 혼탁액을 세포 농도 및 세포 생존력에 대해 바이셀 (ViCell)TM 세포 분석기 (베크만 코울터 (Beckman Coulter)로부터)로 분석하였다. 통계학적 분석은 1-원 ANOVA 후에 두네트 (Dunnett) 사후 분석으로 이루어졌다.

결과 및 결론:

[0096] 예상된 바와 같이, rhFGF18은 IL1 α 의 부재 하에서 돼지 연골세포 증식을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 대조군 (배지, IL1 α 없음)과 비교한 둘 다의 실험에서, 배양 8일 후 rhFGF18 100 ng/mL의 존재 하에서 세포 수의 11.25배 및 7.75배 증가가 관찰되었다 (도 6). 그러나, IL1 α 10 ng/mL의 존재 하에서, rhFGF18에 의한 증식

의 자극은 둘 다의 실험에 대해 대조군 (배지, IL1 α , 10 ng/mL)에 비해 각각 단지 2.38배 및 2.44배였다. 아나킨라 100 ng/mL은 직접 및 지연된 처리 둘 다에 대해 rhFGF18 활성을 완전히 복원시키는 것으로 나타났다. rhFGF18로 및 IL1 α 없이 배양된 또는 IL1 α 로 시험접종되지만 아나킨라로 처리된 세포에 대한 세포 밀도는 통계학적으로 상이하지 않은 것으로 밝혀졌다. 마지막으로, 아나킨라 단독은 연골세포 증식에 대한 효과를 갖지 않았다.

[0097] 본 연구에서, 아나킨라 100 ng/mL는 rhFGF18의 증식 활성에 대한 IL1 α 의 억제 효과를 완전히 차단하는 것으로 나타났다. 이는 아나킨라가 IL1에 의해 촉발되는 염증 신호전달을 차단하는 IL1 수용체 길항제라는 사실에 따른 것이다. 본 발명에서 아나킨라가 IL1 α 로 시험접종된 돼지 연골세포에서 rhFGF18의 증식 효과를 복원시키는 것이 입증되었다.

실시예 5

방법:

[0100] 수컷 루이스 래트에게 우측 무릎 관절에서 내측 반월 파열을 유도하는 수술을 하였다. 동물에게 제21일, 제28일, 및 제35일에 FGF-18 (10 μ g/관절)을 관절내 투여하고, 제21일 내지 제23일, 제28일 내지 제30일, 및 제35일 내지 제37일에 디클로페낙 (각각 1 mg/kg 또는 3 mg/kg) 또는 비히클을 경구 투여한 후, 제42일 또는 제63일에 종결하였다. 혈청을 수집하고, 제-3일, 제21일, 제42일, 및 제63일에 알파 2 마크로글로불린 (α 2MG) 수준에 대해 평가하였다. α 2MG는 염증 혈청 바이오마커이다. α 2MG 및 염증 사이의 관련은 이미 나타났다 (Kuribayashi et al., 2013).

결과

[0102] FGF-18+비히클 대조군은 제24일에 온건 내지 중간 부기를 가졌으며, 이는 제36일까지 증가하였지만, 과행은 관찰되지 않았다. 무릎 부기는 제44일에 시작하여 현저한 중증도로 약간 감소하였다. 캘리퍼스 측정은 이를 관찰을 뒷받침하며, 제21일 및 나중의 시점에서 우측 및 좌측 무릎 사이에 유의한 차이가 있지만, 기준선에서는 그렇지 않았다. 디클로페낙 3 mg/kg이 주어진 동물은 비히클 대조군에 비해 제24일 내지 제29일, 제31일, 및 제36일 내지 제43일에 유의하게 감소된 부기 점수를 가졌다. 무릎 캘리퍼스 측정은 제42일에 유의하게 감소되었지만, 임의의 다른 시점에서는 유의하게 영향을 받지 않았다. 디클로페낙 1 mg/kg이 주어진 동물은 비히클 대조군에 비해 제24일 내지 제29일, 제31일, 및 제36일 내지 제43일에 유의하게 감소된 부기 점수를 가졌다. 무릎 캘리퍼스 측정은 제42일에 유의하게 감소되었지만, 임의의 다른 시점에서는 유의하게 영향을 받지 않았다 (데이터는 나타내지 않음).

[0103] α 2MG 수준은 수술-후 제21일에서보다 제-3일 (수술-전)에서 더 높았다. 디클로페낙 3 mg/kg이 주어진 동물에서의 수준은 수술-전 시점에서의 비히클 대조군의 것에 비해 약간, 그러나 유의하게 감소되었다. 치료 전 제21일에서의 수준은 모든 군에 대해 본질적으로 동일하였다. 제42일에, 질환 대조군은 현저하게 상승된 α 2MG 수준 (제21일 수준의 대략 4배)을 가졌으며, 이는 2개의 디클로페낙 군과 유의한 차이였다. 제63일에, 모든 군에 대한 수준은 다시 유사하였다 (도 7).

결론:

[0105] 전체적으로, 이 연구의 결과는 또한 FGF-18이 주어진 내측 반월 파열을 갖는 래트에서 디클로페낙 1 또는 3 mg/kg의 투여는 임상적 관찰 및 캘리퍼스 측정 둘 다에 기초하여 무릎 부기를 유의하게 감소시켰음을 나타낸다. 이를 효과는 디클로페낙의 최종 투여 후 대략 1주에 대해 명백하였다. α 2MG의 혈청 수준은 제-3일, 제21일, 및 제63일에 비히클 대조군을 뒤쫓았지만, 대조군 수준에서의 거대한 급등의 결과로서 제42일에 샤프한 감소가 나타났다.

실시예 6

방법:

[0108] 본 연구의 목적은 OA의 래트 모델에서 연골 부피에 대한 스프리페르민의 동일한 총 투여량 (3x 1 μ g)의 상이한 사이클내 투여 빈도의 효과를 평가하는 것이었다. 내측 반월의 절제 (tMx)를 갖는 전방 십자 인대 횡절단 (ACLT)을 실시예 1에 개시된 바와 같이 수행하였다. 수컷 리스터 후디드 래트 (Lister Hooded Rat) (200 내지 260 g, 찰스 리버 (Charles River))로부터의 관절을 이 연구에 사용하였다. 동물을 수술 후 18주에 안락사시켰다.

[0109] 관절의 변화는 OA에서의 임상적 평가 (연골 소실, 골돌기체, 연골하 경화증)와 관련된다. 염수 중 스프리페르민 $1 \mu\text{g}$ 을 각각 매주, 2주마다, 3주마다, 4주마다 또는 5주마다 3회 주사하고, 적절한 비히를 군과 비교하였다. 체중, 관절 직경 및 임상적 건강 점수를 매주 조사하였다.

[0110] 결과

[0111] 관절내 주사가 체중 증가에 대한 영향이 없었음을 나타낸 결과: 생전 파라미터에 대해 유의한 약물 또는 치료 처방 효과는 나타나지 않았다. 그러나, 2주마다 염수로 주사된 군 ($n=4$)은 경향적으로 가장 높은 체중 증가를 가졌다 (데이터는 나타내지 않음).

[0112] 제3주, 제4주, 제5주에서의 주사에서, 관절 직경은 제3주, 제8주 및 제13주에서의 주사 후보다 유의하게 높았다 (도 8 참조). 2주마다, 3주마다 또는 4주마다의 주사 사이에 유의한 차이는 나타나지 않았다. 단지 5주마다 주사된 경우, 관절 직경의 AUC는 염수 주사와 동일하였다. 따라서, 경향적으로, 관절 직경 AUC는 보다 낮은 주사 빈도로 감소한다.

[0113] 입체학을 통한 정량적 조직학적 분석은 질환에 걸린 관절에서 심각한 OA-유사 변화를 드러내었다. rhFGF18은 다소 완전한 연골 박괴를 방지하였다. 3주마다 1회 주어진 $1 \mu\text{g}/\text{관절}$ 및 주사 (총 3회 주사)는 염수에 비해 약물학적으로 의미있고 통계학적으로 유의한 차이를 초래하였다 (종점: 내측 경골 상의 연골 부피, 도 9 참조).

[0114] 결론:

[0115] 3주에 걸쳐 매주 1회보다 낮은 주사 빈도는 주사 후 관절 부기로부터 보다 양호한 회복을 허용하는 것으로 보인다. rhFGF18로 치료된 모든 군은 위약에 비해 보다 높은 연골 부피 값에 의해 예시되는 구조적 유익을 나타내었다. 그러나, 시간-고정 연구 (모든 동물에 대해 동일한 연구 기간) 및 고정된 용량의 환경 하에서, 3주마다 1회의 주사 빈도는 가장 유익한 구조적 결과를 초래하였다. rhFGF18의 주사 사이의 보다 긴 휴지는 3주에 걸쳐 매주 1회 주사 처방에 비해 연골세포 증식의 세포외 매트릭스 생성으로의 보다 양호한 변환 때문에 보다 유익한 것으로 추측될 수 있다.

[0116] 생성된 벨 형상 곡선은 성장 인자의 효능 판독에 대한 통상적인 관찰이다.

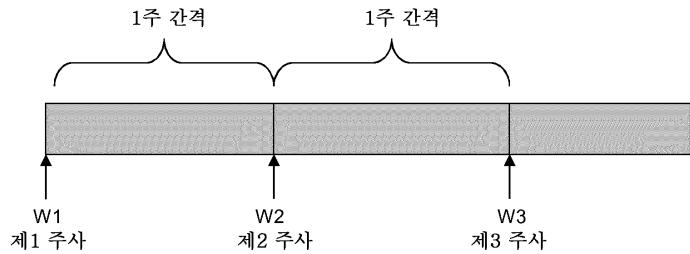
[0117] 참고문헌

1. Ellsworth *et al.*, 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320
2. Shimoaka *et al.*, 2002 , JBC 277(9):7493-7500
3. WO2008023063
4. WO2004032849
5. WO9816644
6. WO2006063362
7. Custers *et al.*, 2007, Osteoarthritis and Cartilage, 15:1241-1248
8. Lotz, 2010, Arthritis research therapy, 12:211
9. Moore *et al.*, 2005, Osteoarthritis and Cartilage, 13:623-631.
10. Arnaud-Dabernat *et al.*, 2008, Journal of Cellular Physiology, 216:261-268.
11. The Merck manual, 17th edition, 1999
12. Getgood *et al.*, 2010, P116, ICRS Meeting 2010, Barcelona.
13. ICRS publication: http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf,
page 13
14. Bingham, 2002, J. Rheumatol. 29: 3-9.
15. Lee *et al.*, 2013, Gene, 527:440-447.
16. Bresnihan, 2002, Ann. Rheum. 61:ii74-ii77
17. St. Clair, 2002, J. Rheumatol. 29:22-26,
18. Mertens *et al.*, 2009., J. Rheumatol., 36(6):1118-1125
19. Chevalier *et al.*, 2009, Arthritis & Rheumatism, 61(3) : 344-352
20. Kurabayashi *et al.*, 2013, Inflammation, 36(6): 1448-52

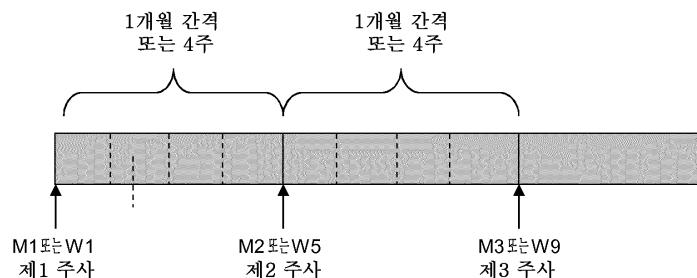
[0118]

도면

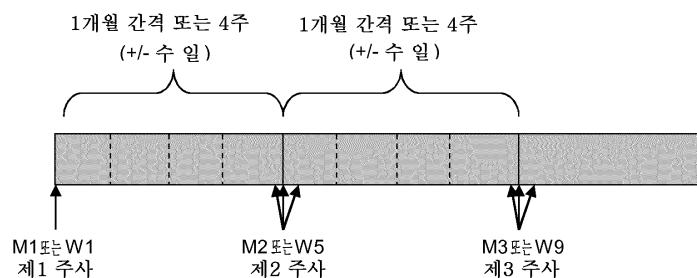
도면1



도 1a

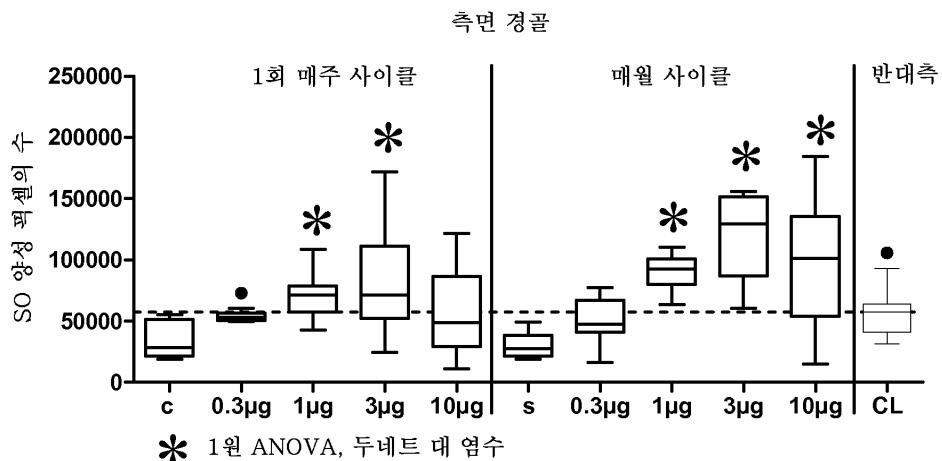


도 1b



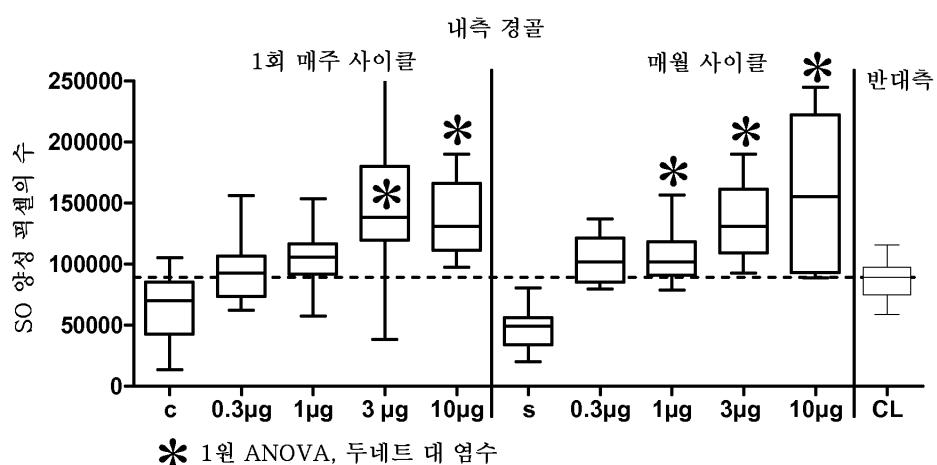
도 1c

도면2



[관심의 점의 문서 또는 요약으로부터 따옴표를 침. 위치시킬 수 있음]

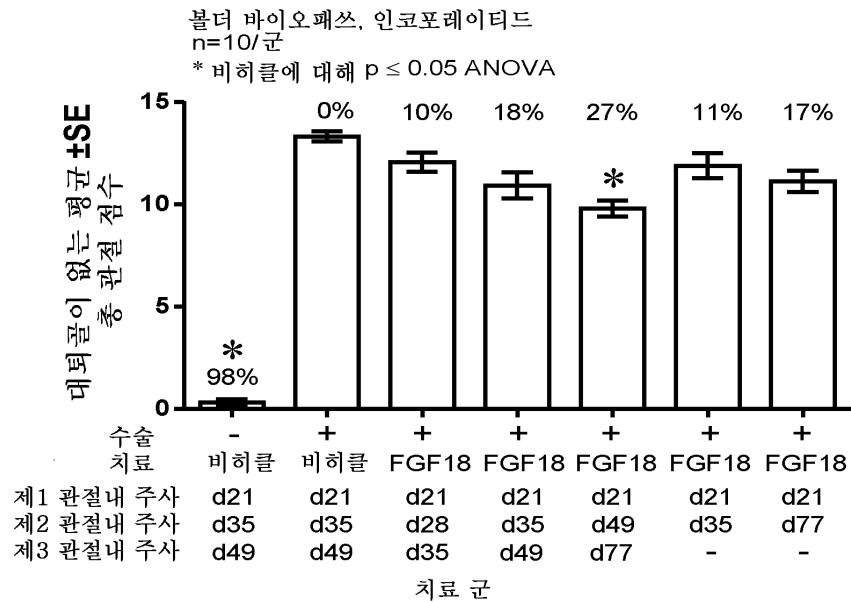
도 2a



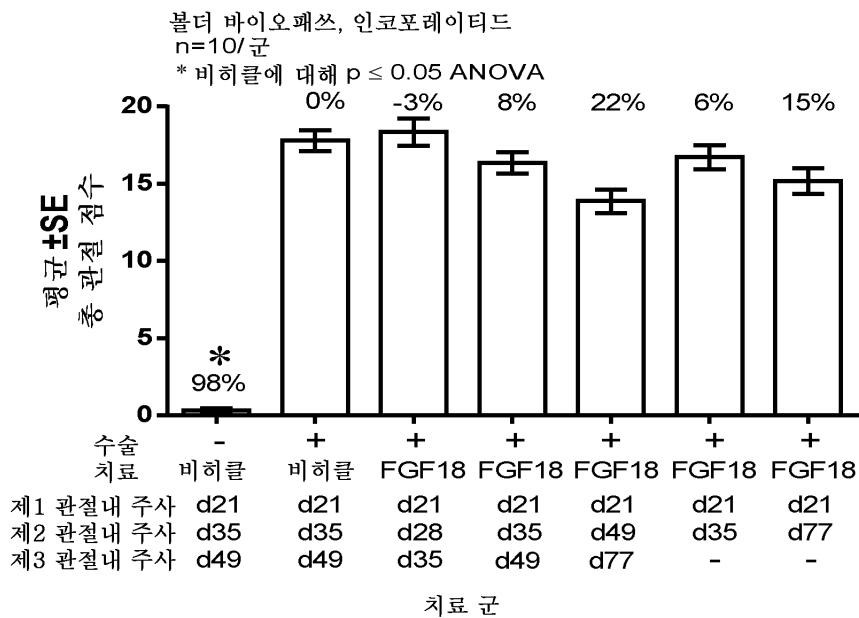
[관심의 점의 문서 또는 요약으로부터 따옴표를 침. 위치시킬 수 있음]

도 2b

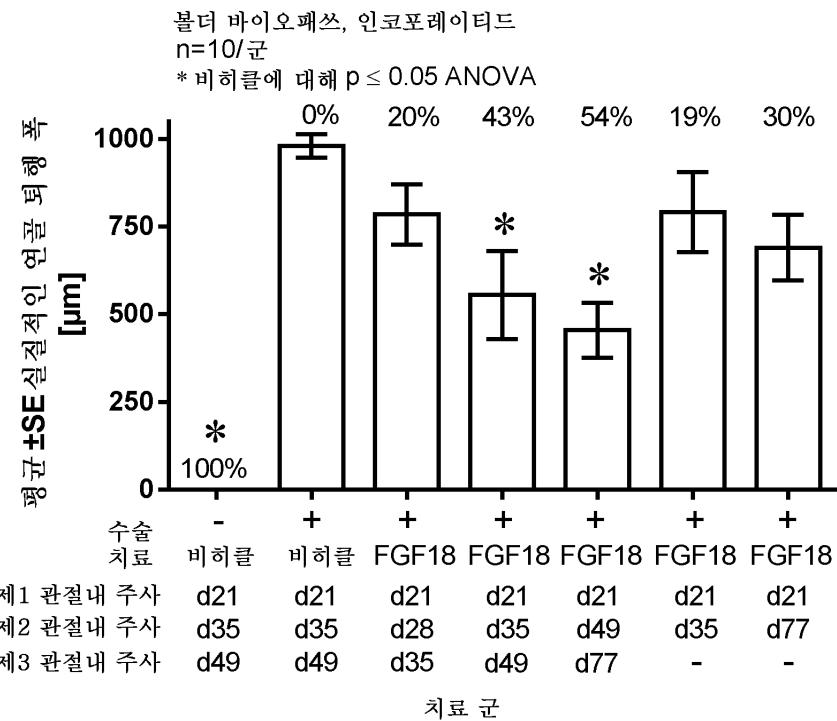
도면3



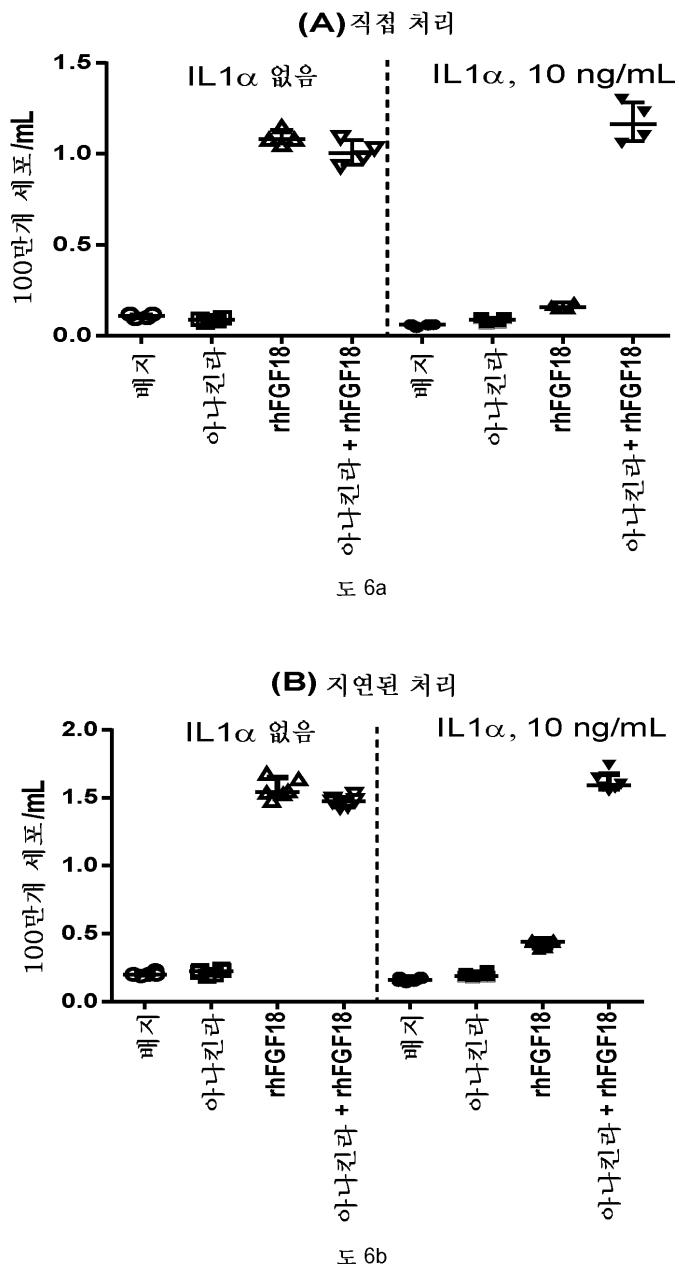
도면4



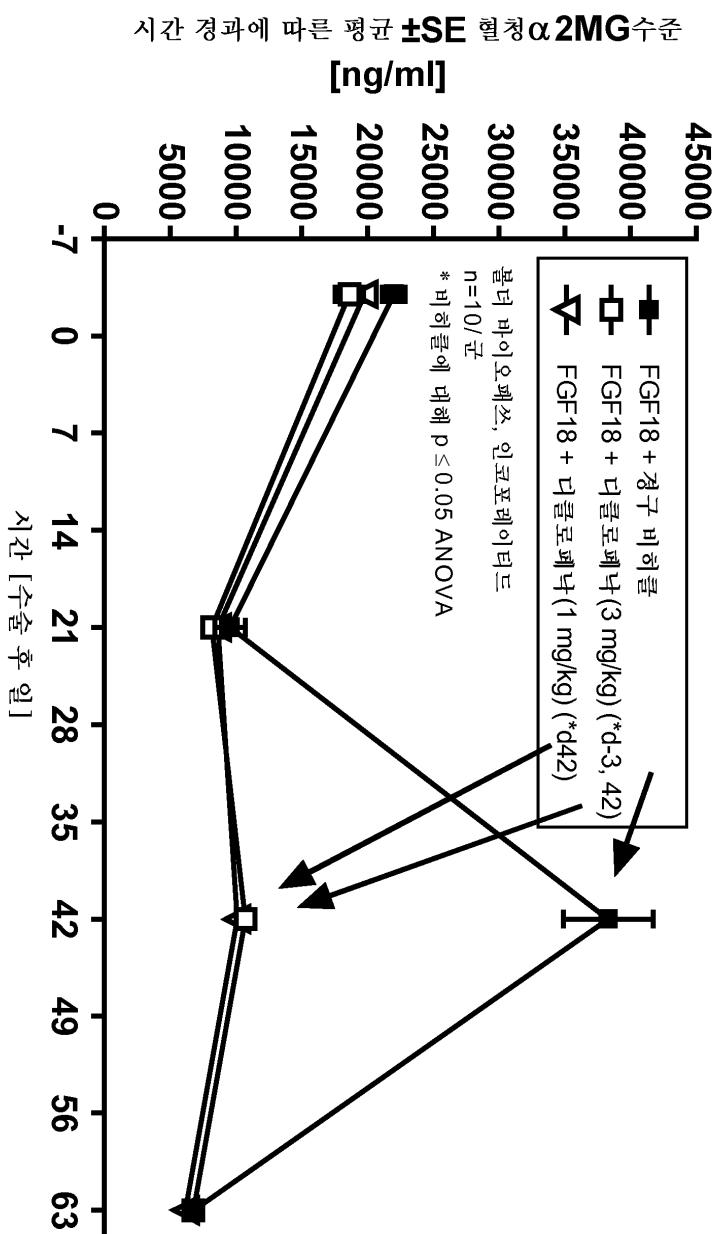
도면5



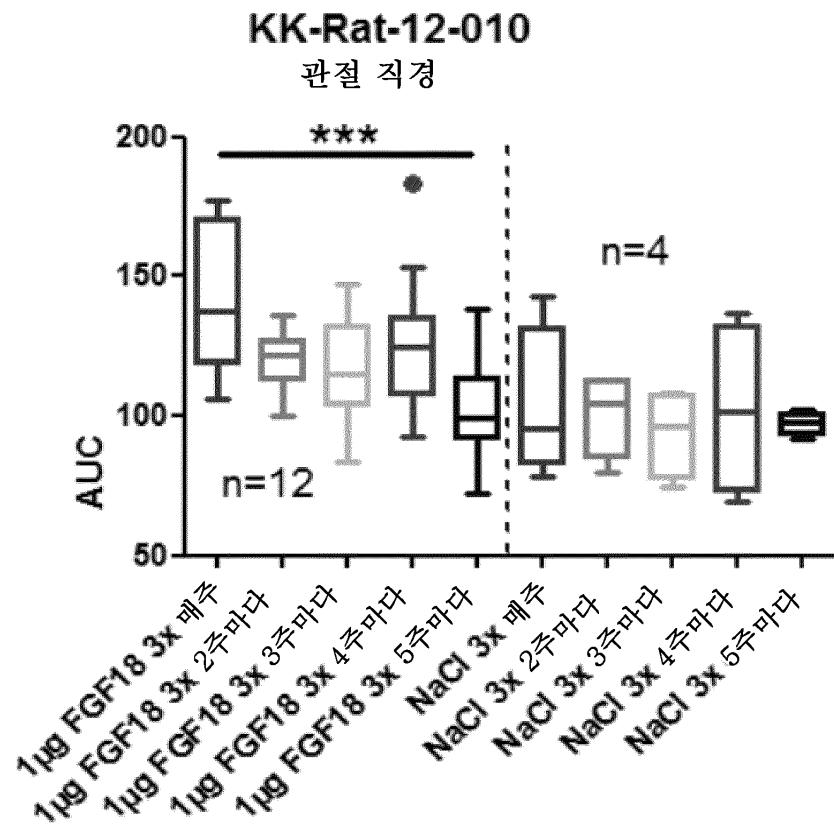
도면6



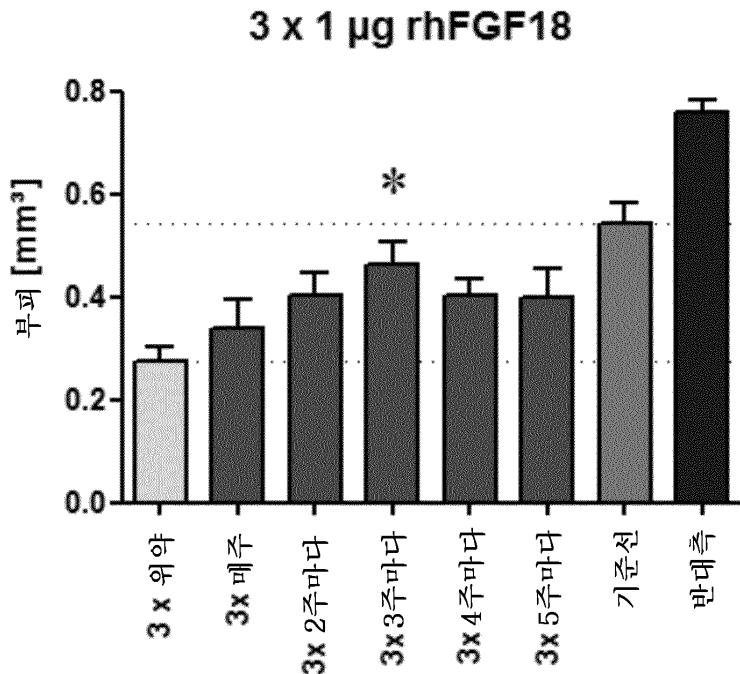
도면7



도면8



도면9



* 1원 ANOVA; 두네트 대 위약

평균 및 SEM; N = 12 내지 20/위약을 제외한 군(N=20)

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Merck Patent GmbH
- <120> FGF-18 compound dosing regimen
- <130> P 14/014
- <150> EP14000600.8
- <151> 20.02.2014
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 207
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220><223> human FGF-18

<400> 1

Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
 20 25 30

Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
 35 40 45

Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
 50 55 60

His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
 65 70 75 80
 Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
 85 90 95

Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
 100 105 110

Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
 115 120 125

Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
 130 135 140

Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160

Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
 165 170 175

Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
 180 185 190

Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala

195 200 205

<210> 2

<211> 170

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Recombinant truncated FGF-18(trFGF-18)

<400> 2

Met Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg

1 5 10 15
Ala Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr20 25 30
Ser Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser35 40 45
Ala Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr50 55 60
Asp Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe65 70 75 80
Tyr Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly85 90 95
Thr Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr100 105 110
Thr Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr115 120 125
Lys Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln130 135 140
Asp Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln145 150 155 160
Lys Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys165 170
<210> 3

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (anakinra)

<400> 3

Met Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile

1 5 10 15

Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val
 20 25 30
 Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp
 35 40 45
 Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly
 50 55 60
 Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln
 65 70 75 80

 Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp
 85 90 95
 Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe
 100 105 110
 Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala
 115 120 125
 Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val
 130 135 140

 Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
 145 150