



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0051695
 (43) 공개일자 2010년05월17일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 47/36</i> (2006.01) <i>A61K 38/18</i> (2006.01)
 <i>A61P 19/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7004494</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년07월25일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년02월26일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/059832</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/016131
 국제공개일자 2009년02월05일</p> <p>(30) 우선권주장
 07/05536 2007년07월27일 프랑스(FR)
 60/952,407 2007년07월27일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 아도시아
 프랑스 에프-69003 리옹 아브뤼 라카쎄느 115</p> <p>(72) 발명자
 솔라 제라르드
 프랑스 에프-69330 메이지유 튀 뉝세제르 33
 솔라 올리비에르
 프랑스 에프-69330 메이지유 아베뉴 뒤 카로 115
 솔라 레미
 프랑스 에프-69001 리옹 튀 뒤 봉 파스티르 38</p> <p>(74) 대리인
 유미특허법인</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 양쪽 친매성 폴리머와 BMP 패밀리의 골형성 단백질의 복합체

(57) 요약

본 발명은 물에서 물리적으로 및 화학적으로 안정한 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체에 관한 것으로, 상기 양쪽 친매성 폴리머는 소수성 치환기와 친수성 기로 관능화된 친수성 다당류 골격을 포함하며, 상기 BMP는 치료 활성 BMP(골 형성 단백질) 군으로부터 선택되며, 상기 폴리머/BMP의 질량비가 700 이하인 것을 특징으로 하는, 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 단백질을 변성시킬 수 유기 용매의 부재하에 수계 매질 중에서 폴리머/BMP 복합체를 제조하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체를 포함하는 치료 조성물에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

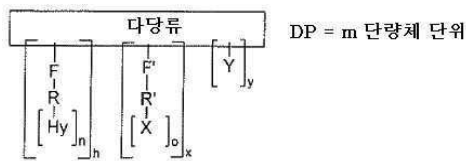
수 중에서 물리적 및 화학적으로 안정한 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체로서,

상기 양쪽 친매성 폴리머는 하기 일반식 I에 따른, 소수성 치환기와 친수성 기로 관능화된, 친수성 다당류 골격으로 구성되며,

상기 BMP는 치료 활성 BMP(골 형성 단백질) 군으로부터 선택되며,

폴리머/BMP의 중량비는 700 미만이거나 또는 700인 것을 특징으로 하는, 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체:

(일반식 I)



상기 식에서,

R, R'은 동일하거나 상이할 수 있으며, 결합이거나, 또는 선택적으로 분지형 및/또는 불포화형일 수 있으며 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, 탄소수 1 내지 18의 체인(chain)이고;

F, F'은 동일하거나 상이할 수 있으며, 에스테르, 티오에스테르, 아마이드, 카르보네이트, 카르바메이트, 에테르, 티오에테르 또는 아민이고;

X는 카르복실레이트, 설페이트, 설포네이트, 포스페이트 및 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 기이고;

Y는 설페이트, 설포네이트, 포스페이트 및 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 기이고;

Hy는 하기 군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 소수성 기이고:

- 불포화되거나 및/또는 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, 선형 또는 분지형의 C₈ - C₃₀ 알킬,

- 불포화되거나 및/또는 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, 선형 또는 분지형의 C₈ - C₁₈ 알킬아릴 또는 선형 또는 분지형의 C₈ - C₁₈ 아릴알킬,

- 불포화되거나 및/또는 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, C₈ - C₃₀ 폴리사이클,

- 벤질아민 제외되며;

n 및 o는 1 내지 3이고,

h는 0.01 내지 0.5의, 단량체 단위에 대한 소수성 패턴의 몰 분율이고,

x는 0 내지 2.0의, 단량체 단위에 대한 친수성 기의 몰 분율이고,

y는 0 내지 0.5의, 단량체 단위에 대한 친수성 기의 몰 분율이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다당류는 y가 0인 일반식 I의 다당류로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다당류는 X가 카르복실레이트인 일반식 I의 다당류로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 있어서, 상기 폴리머/BMP의 질량비는 600 이하인 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 있어서, 상기 폴리머/BMP의 질량비는 500 이하인 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한항에 있어서, 상기 BMP는 BMP-2(디보터민-알파), BMP-4, BMP-7(엠포터민-알파), BMP-14 및 GDF-5로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한항에 있어서, 상기 폴리머는 임의 방식으로 치환기가 분포된 폴리머들 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한항에 있어서, 상기 다당류는 히알루로난, 알기네이트, 키토산, 갈락투로난, 콘드로이틴 설페이트, 텍스트란 및 셀룰로스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한항에 있어서, 상기 셀룰로스의 군이 카르복시메틸 셀룰로스 및 산으로 관능화된 셀룰로스로 구성되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한항에 있어서, 상기 텍스트란의 군이 카르복시메틸 텍스트란 및 산으로 관능화된 텍스트란으로 구성되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한항에 있어서, 상기 다당류가 히알루로난, 알기네이트 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한항에 있어서, 상기 소수성 기인 Hy가 트립토판, 타이로신, 페닐알라닌, 루신 또는 이소루신으로부터 선택되는 천연 소수성 아미노산, 또는 이의 알코올, 에스테르, 탈카르복시화된 유도체 또는 아미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한항에 있어서, 상기 소수성 기인 Hy가 트립토판 또는 이의 에스테르 또는 아미드 유도체인 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한항에 있어서, 상기 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체의 형성은 가역적인 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한항에 있어서, 상기 BMP는 생리 pH에서 안정적인 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한항에 있어서, 상기 BMP가 37 °C 및 중성 pH에서 생리 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체.

청구항 17

단백질을 변성시킬 수 있는 유기 용매의 부재하에 수계 매질 중에서 폴리머/BMP 복합체를 제조하는 것을 특징으로 하는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한항에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체의 제조 방법.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한항에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체를 포함하는 치료 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 조성물은 약 1.5 mg/ml의 BMP의 투여를 가능하게 하는 것을 특징으로 하는 치료 조성물.

청구항 20

생체내에서 골 형성을 유도하는 치료 조성물의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제16항 중 어느 한항에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 양쪽 친매성 폴리머와 골 형태형성 단백질(BMP) 패밀리에 속하는 골형성 단백질의 오리지날 수용성 복합체의 형성에 관한 것으로, 복합체는 물리적으로 및 화학적으로 안정적이므로, 따라서 시험관내 및 생체내 BMP의 물리적 및 화학적 안정성을 개선시킨다.

배경기술

[0002] 골 형태형성 단백질(BMP)은 골형성 유도 메카니즘에 관여하는 성장 인자이다. BMP는 골형성 단백질(OP)로도 알려져 있으며, 1965년에 Urist에 의해 최초로 밝혀졌다(Urist MR. Science 1965; 150, 893). 골의 피질에서 분리된 이 단백질은 매우 다양한 동물들에서 골 형성을 유도할 수 있다(Urist MR. Science 1965; 150, 893).

[0003] BMP는 번역 후 성숙화된 후에 104 내지 139개의 잔기를 가지게 되는 프로펩타이드 형태로 발현된다. 이들의 서열은 매우 상동적이며, 유사한 3차 구조를 가진다. 특히, 이 단백질은 분자내 "시스테인 결합"을 형성하는 이황화 결합에 참여하는 6개의 시스테인 잔기를 가지고 있다(Scheufler C. 2004 J. Mol. Biol. 1999;287, 103; Schlunegger MP, Mol. Biol. 1993;231, 445). 이들 중 일부는 또한 분자간 이황화 결합에 참여하는 7번째 시스테인도 가지고 있는데, 이것은 이량체 형성을 유도한다((Scheufler C. 2004 J. Mol. Biol. 1999;287, 103).

[0004] BMP는 Israel *et al.*(Israel DI, Growth Factors, 1996, 13(3-4), 291)에 의해 언급된 바와 같이, 이의 활성 형태로서 동종이량체(homodimer)로 조합되며, 심지어 이종이량체(heterodimer)로도 조합된다. BMP 이량체는 BMPR 타입의 트랜스멤브레인 수용체와 상호작용한다(Mundy *et al.* Growth Factors, 2004, 22 (4), 233). 이러한 인지는 특히 Smad 단백질이 참여하는 세포내 신호전달(signalisation)의 캐스케이드를 촉발시켜, 타겟 유전자의 활성화 또는 억제를 초래한다.

[0005] BMP 1과 3 이외의 BMP는 간엽 세포(mesenchymatous cell)의 분화에 직접 및 간접적으로 작용하여, 골모세포로의 분화를 이행한다(Cheng H., J. Bone and Joint Surgery, 2003, 85A 1544-1552). 또한, 이는 주화성 특성이 있으며, 증식, 분화 및 신생혈관을 유도한다.

[0006] 일부 인간 재조합 BMP, 특히 rhBMP-2 및 rhBMP-7은 인간에서 생체내에서 골 형성을 유도하는 능력을 분명하게 보여주었고, 일부 의학 용도로 승인받았다. 따라서, 인간 재조합 BMP-2 또는 국제적인 일반명에 따른 디보터민 알파(diboterminalfa)는 미국에서는 상품명 InFuse[®]로, 유럽에서는 상품명 InductOs[®]로 판매되는 제품으로 제

형화되어 있다. 이 제품은 요추 유합과, 불유합 골절(non-union fracture)이라고도 하는 질병에서 경골의 골 재생용으로 처방되고 있다. 요추 유합용 InFuse[®]의 경우, 외과적 기술은 우선 콜라겐 스폰지를 rhBMP-2 용액에 적신 다음 이미 척추들 사이에 이식되어 있는 공동의 케이지(hollow cage)(LT 케이지)에 상기 스폰지를 두는 것이다.

[0007] 인간 재조합 BMP-7 또는 국제적인 일반명에 따른 엠평터민 알파(eptotermin alfa)는 BMP-2로서 동일한 치료학적 용도를 가지며, 2가지 제품, 즉 경골의 개방형 골절용 OP-1 임플란트와 요추 유합용 OP-1 Putty에 베이스를 이룬다. OP-1 임플란트는 rhBMP-7과 콜라겐을 포함하는 분말로 구성되며, 0.9% 식염수 중에 취해진다. 그런 후, 수득되는 페이스트는 외과 기술 중에 골절 부위에 적용된다. OP-1 Putty는 2가지 분말 형태로 존재하는데, 한 가지는 rhBMP-7과 콜라겐을 포함하며, 다른 한 가지는 카르복시메틸 셀룰로스(CMC)를 포함한다. 외과 기술 중에, CMC를 0.9% 식염수로 재구성한 후 rhBMP-7 및 콜라겐과 혼합한다. 이렇게 제조한 페이스트를 치료 부위에 적용한다.

[0008] 현재 판매되고 있는 모든 단백질들 중에서도, BMP는 높은 소수성과 생리 pH에서의 매우 낮은 용해성을 보이게 되는 응집력이 현저하다. BMP-2의 경우, 이러한 특성은 임상 개발 중인 BMP-2의 용도 연구들에서 입증되었다. 이것은 생리 환경에서는 거의 용해되지 않으며, 응집되는 경향이 있다(Schmoekel, 2004 J. Orthop. Res. 2004; 22(2), 376, Friess, W., Drug Delivery Systems Based on Collagen, Shaker Verlag, Thesis Aachen Germany 1999, Schwartz DH, Thesis Munehen Germany 2005). 그래서, Abbatieil- 및 Porter(Protein Sei. 1997, 6, Suppl 2 99)는, BMP-2가 이온 세기가 낮은 완충액에서 pH가 4.5 보다 높을 때 더욱 더 불용성이 된다는 것을 밝혔다. 또한, Friess (Friess, W., Drug Delivery Systems Based on Collagen, Shaker Verlag, Thesis Aachen Germany 1999)에 의해 입증된 바와 같이, 단백질의 침전은 pH 6.5 이상에서 관찰되며, 또한 클로라이드 이온 및 /또는 설페이트 이온(50 mM NaCl pH 5.8 및 5 mM Na₂SO₄ pH 5.5)의 존재 하에서는 그 보다 낮은 pH에서도 침전이 관찰된다. 따라서, BMP-2의 생리 환경에서의 제형화는 그 자체의 이유로 문제가 된다.

[0009] 이러한 BMP의 물리적 불안정성 문제에 대한 다른 예는, BMP-14의 서브클래스로부터 유래된 단백질로서, MP-52라고도 하는 성장 및 분화 인자인 GDF-5에 대한, 바이오팜의 특허 US 2004132653에 기술되어 있다. GDF-5의 특성은 BMP-2의 특성과 매우 비슷하며, 응축되는 경향이 있으며 용액의 재구성시에 완전하게 재용해시킬 수 없는 동결건조산물(lyophilisate)의 불안정성이 관찰되었다. 이러한 2가지 현상은 단백질의 비가역적 응집과 관련있다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 동결건조하기 전에 만니톨을 첨가하여, 고체 상태에서의 이러한 문제들을 방지할 수 있다. 그러나, 만니톨은 단순히 시험관내에서 낮은 수준의 안정성을 제공해 줄 뿐 생체내에서의 물리적 불안정성은 예방하지 못한다.

[0010] 이들 성장 인자의 물리적 특성으로 인한 이러한 제약을 고려하여, 제품 InFuse[®]는 rhBMP-2의 용해성과 물리적 안정성을 확보하기 위해 산성 pH(아세트산 완충액, pH 4) 및 계면활성제(폴리소르베이트 80)의 존재 하에 제형화된 것이다.

[0011] 치료 단백질계 약물의 제조시 단백질의 물리적 안정성 문제가 매우 많은 영향을 미친다. 실제, BMP 응집 형성은 다음과 같은 현상을 초래할 수 있다:

- [0012] - 생물학적 활성 종의 수 감소
- [0013] - 생활성 또는 흡수율의 변화
- [0014] - 상기 응집물에 대한 면역 반응 발생 가능성
- [0015] - 생성물의 유백광으로 인한 바람직하지 못한 외양
- [0016] - 여과 장치 및 주입 기구의 막힘

[0017] 원하는 치료 효과를 달성하기 위해서는, 생리 투여량 보다 10,000배 높게 BMP를 상당한 치료 용량으로 사용하여야 한다.

[0018] 이는, rhBMP-2를 수 mg으로 투여하기 때문에, InFUSE[®]와 같은 제품을 이용한 요추 유합 치료의 경우에 특히 그러하다. 투여할 다량의 BMP는 용액 중에 BMP를 증가된 농도, 약 1.5 mg/ml로 사용하는 것을 의미한다. 이 농도에서, BMP는 오히려 쉽게 응집되어, 물리적으로 불안정해진다. 제공되는 용액으로는 산성 완충액과 계면활성제를 사용한다. 그러나, 치료학적 적용과 관련하여, 산성이며 계면활성제를 포함하는 용액을 사용하는 것은

문제가 된다.

- [0019] 물리적 안정성 및 화학적 안정성 문제들을 해결하기 위해, 여러가지 방법들이 개발되고 있다.
- [0020] 첫번째로, 헤파린과 헤파란 설페이트는 내인성 안정화 분자인 다당류이기 때문에, BMP 등의 성장 인자를 안정화시키는 것으로 잘 알려져 있다(Ruppet *et al.* Eur. J. Biochem. 1996, 237, 295). 그러나, 헤파린과 헤파란 설페이트는 매우 현저한 항-응고제 및 항-보체 활성을 가지고 있어, 약학 조성물로 사용할 수 없다.
- [0021] Hubbell은 피브린-타입의 매트릭스에서 단백질을 안정화시키기 위해 단백질과 벡터(vector) 간에 화학적 결합을 형성하는 것을 포함하는, 단백질의 그래프팅 방법을 언급하였다. 이러한 결합은 효소로 절단가능한 융합 단백질에 의해 이루어진다. 이 방법은, Biotechno. Bioeng. 2005, 89, 3, 253에 보고된 것으로서, 실제 응집을 방지함으로써 단백질을 물리적으로 안정화시킬 수 있다. 그렇지만, 이 방법은 치료 효능 및 안전성이 이미 입증되지 않은 BMP-2의 유사체를 사용한다.
- [0022] 특허 US20050209145에서, Stupp 등은 성장인자의 벡토리세이션(vectorisation), 특허 BMP-2의 벡토리세이션을 위한 양쪽 친매성 펩타이드를 언급하고 있다. 이 양쪽 친매성 펩타이드는 말단 알킬 체인, 친수성 펩타이드 서열 및 BMP-2의 부착을 가능하게 하는 에피토프로 이루어져 있다. 상기 펩타이드는 용액 중에 정렬되어 막대형의 마크로분자 구조를 형성하며, 그 중심부에 소수성 기가 응집된다. 말단 아미노산은 수 혼화성(compatibility)과 단백질의 부착을 허용한다. 그러나, 상기 펩타이드는 이의 복잡한 일차 구조로 인한 면역학적 위험성이 있다.
- [0023] 특허 US6258382에서, Takaoka 등은 골 재생 적용에 있어 BMP의 벡토리세이션을 다루었다. 저자는 상기 단백질의 분비가 조절될 수 있도록 하는, 신규한 락트산 및/또는 글리콜산-계, p-디옥사논-계, 및 글리콜 폴리에틸렌-계 폴리머를 개발하였다. 그러나, 저자는 물리적 또는 화학적 안정성 측면에서 상기 성장 인자와 관련된 어떠한 문제들도 해결하지 못하였다. 또한, 상기 폴리머는 물에 용해되지 않고 물을 흡수하여 젤이 된다. 한편, 상기 폴리머는 유기 매질에 용해되며 아세톤에 가용화된다. 따라서, 폴리머-BMP-2 제형의 제조에는 단백질 변성 위험이 있는 유기 용매의 사용이 요구된다(Nature Biotechnology, 2001, 19, 332).
- [0024] 특허 US2005/0287135에서, Wyeth는 BMP의 벡토리세이션을 위한, 소수성 기(벤질 알코올)에 의해 변형된 히알루로난을 개시하였다. 이 폴리머에서, 소수성 기의 함량은 50 내지 100%이어서, 폴리머는 물에 용해되지 않고 물을 흡수할 수 있다. 이 경우, 상기 흡수성 폴리머는 단백질과 수용성 복합체를 형성할 수 없어, BMP의 안정성 문제가 해결된다. 이러한 타입의 제형은 또한 Fidia et Genetics Institute의 EP 1454640에 기술되어 있으나, 개시된 제형은 복합체를 형성하지 않으며, 예시된 다당류는 물에 용해되지 않고, 소수성 에스테르기를 50% 이상 포함한다.
- [0025] 특허 NZ530701에서, Brodbeck 등은 BMP의 벡토리세이션을 위해 PLAGA를 이용한다. 이 폴리머는 물에 용해되지 않아 단백질과의 수용성 복합체를 형성할 수 없다. 저자의 목적은 출원인과는 반대로 수계 매질 중에 BMP를 PLAGA로 형성된 고형물로 불용화하는 것이며, 여전히 단백질 변성 위험이 있는 유기 용매의 사용이 요구된다.
- [0026] 예로, "골모세포 증식 및 표현형 발현에 있어 성장 인자와 조합된 헤파린 유사 폴리머의 효과"(1998, J. Biomed. Mater. Res., vol 44, p. 63-72)라는 제목으로 공개된 Blanquaert 등 및 Barritault 등의 연구에는, 다양한 성장 인자와 상호작용하는 것으로 생각되는 벤질아민에 의해 변형된 텍스트란을 사용하는 것이 개시되어 있다. 이 폴리머는 치료 활성이 있는 것으로 기술되어 있다. 또한, 저자는 이들 텍스트란 중 일부, 특히 카르복시메틸(CM), 벤질아미드(B) 및 설포네이트(S) 기들로 치환된 텍스트란(CMDBS 화합물)이, 성장 인자의 첨가 없이도 골 재구성을 자극할 수 있다고 주장하고 있다(1999, Bone, 17, 6, 499-506).
- [0027] 유사한 방법으로, FR2794649에서 Blachant 등은 트리메틸 포스페이트를 이용한 폴리머 체인들의 가교에 의해 불용화된, 벤질아민 및 설페이트로 변형된 텍스트란을 개시하였다. 이 스폰지는 여기에 단백질을 보유할 수 있기 때문에, 수계 매질 중에서 BMP 저장소로서 작용한다. 가교 전에, 양쪽 친매성 폴리머는 겔 전기영동에 의한 상호작용 테스트에서 확인된 바와 같이, BMP-2와 복합체를 형성한다. 그러나, 사용되는 폴리머/BMP의 중량비가 매우 높아 5,000 이상이다. 이렇게 높은 비율로 사용되는 이유는, 폴리머/단백질의 상호작용이 매우 약해 용액 중에서 복합체의 해리를 유도하기 때문이다. 또한, BMP의 화학적 또는 물리적 안정화는 기술되어 있지 않다. 이러한 유형의 비율은 약학 제품의 개발에서는 용인되지 않는다.
- [0028] 또한, 벤질아민은 특별한 독성을 가질 수 있으며, 전술한 2종의 특허들에 기술된 폴리머의 생체친화성에 유해할 수도 있는 것으로 알려져 있다.

[0029] 골 재구성에 있어 이러한 타입의 단백질의 갈레노스식 제형화는 부형제의 안전성 요건을 필연적으로 충족시켜야 하는데, 이러한 조건들을 만족시키기 위해서는, 생체친화성인 화합물을 사용하여야 하지만 활성 성분과 관련하여 이의 함량을 제한할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0030] 즉, BMP-2(디보터민-알파), BMP-4, BMP-7(엠포터민-알파), BMP-14 및 GDF-5로 이루어진 군으로부터 선택되는 BMP와 같은, 골 형성 단백질의 가용화 및 안정화를 가능하게 하는 주사용 제형의 개발의 문제점은 만족할만한 방식으로 해결되지 않았다.

과제의 해결 수단

[0031] 본 발명은 골 형성 단백질과 생체친화적인 양쪽 친매성 폴리머 간에 폴리머/BMP 중량비가 700 미만인, 안정적인 수용성 복합체의 형성을 가능한다. 이 복합체에 의하면, 다음과 같은 점이 가능하다:

[0032] - 시험관내 및 생체내에서, 생리 pH에서의 소수성으로 인해 발생하는 BMP의 응집 방지

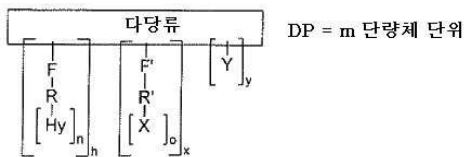
[0033] - 세포의 존재 하에 37 °C에서 BMP를 안정화시킴

[0034] 상기 수용성 복합체는 유기 용매의 사용 없이도 완벽한 수계 매질 중에서 형성된다.

[0035] 따라서, 본 발명은, 수용성이며 물리적으로 및 화학적으로 안정적인, 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체에 관한 것으로,

[0036] 상기 양쪽 친매성 폴리머는 하기 일반식 I에 따른, 소수성 치환기와 친수성 기로 관능화된, 친수성 다당류 골격으로 구성되며:

[0037] (일반식 I)



[0038]

[0039] 상기 식에서,

[0040] R, R'은 동일하거나 상이할 수 있으며, 결합이거나, 또는 선택적으로 분지형 및/또는 불포화형일 수 있으며 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, 탄소수 1 내지 18의 체인(chain)이고;

[0041] F, F'은 동일하거나 상이할 수 있으며, 에스테르, 티오에스테르, 아마이드, 카르보네이트, 카르바메이트, 에테르, 티오에테르 또는 아민이고;

[0042] X는 카르복실레이트, 설페이트, 설포네이트, 포스페이트 및 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 기이고,

[0043] Y는 설페이트, 설포네이트, 포스페이트 및 포스포네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 기이고;

[0044] Hy는 하기 군으로 이루어진 군으로부터 선택되는 소수성 기이고:

[0045] - 불포화되거나 및/또는 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, 선형 또는 분지형의 C₈ - C₃₀ 알킬.

[0046] - 불포화되거나 및/또는 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, 선형 또는 분지형의 C₈ - C₁₈ 알킬아릴 또는 선형 또는 분지형의 C₈ - C₁₈ 아릴알킬.

[0047] - 불포화되거나 및/또는 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 이종 원자를 포함할 수 있는, C₈ - C₃₀ 폴리사이클.

[0048] - 벤질아민 제외

[0049] n 및 o는 1 내지 3이고,

[0050] h는 0.01 내지 0.5의, 단량체 단위에 대한 소수성 패턴의 몰(mole) 분율이고,

[0051] x는 0 내지 2.0의, 단량체 단위에 대한 친수성 기의 몰 분율이고,

[0052] y는 0 내지 0.5의, 단량체 단위에 대한 친수성 기의 몰 분율이고,

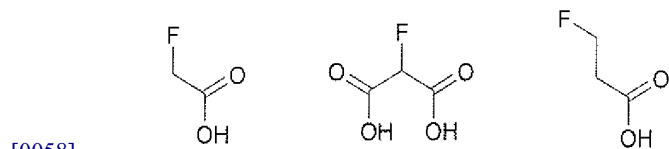
[0053] 상기 BMP는 치료 활성 BMP(골 형성 단백질) 군으로부터 선택되며.

[0054] 상기 폴리머/BMP 중량비는 700 미만 또는 700이다.

[0055] 일 예에서, 본 발명에 따른 복합체에서, 다당류는 전술한 바와 같이 정의되며 y가 0인, 일반식 I의 다당류로부터 선택된다.

[0056] 일 예에서, 본 발명에 따른 복합체에서, 다당류는 전술한 바와 같이 정의되며 X가 카르복실레이트인, 일반식 I의 다당류로부터 선택된다.

[0057] 일 예에서, 본 발명에 따른 복합체에서, 본 발명에 따른 다당류는 R기가 하기 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다:



[0059] 일 예에서, 본 발명은 폴리머/BMP 중량비가 600 미만 또는 600인 것을 특징으로 하는 복합체에 관한 것이다.

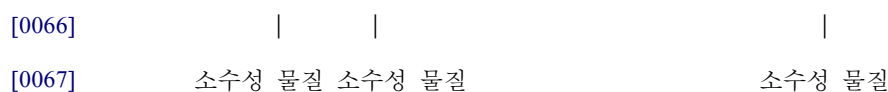
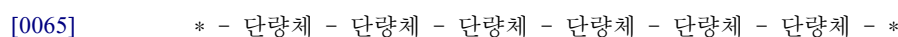
[0060] 일 예에서, 본 발명은 폴리머/BMP 중량비가 500 미만 또는 500인 것을 특징으로 하는 복합체에 관한 것이다.

[0061] BMP의 치료 용도로서의 농도는 용액 중에 약 1.5 mg/ml이다. 중량비가 700 보다 높으면, 양쪽 친매성 폴리머를 1.0 g/ml로 포함하는 조성물이 수득된다. 이러한 폴리머의 농도에서는, 제형은 약학적 적용시, 예컨대 점성 측면에서 더 이상 적합하지 않은 물리화학적 거동을 갖는다.

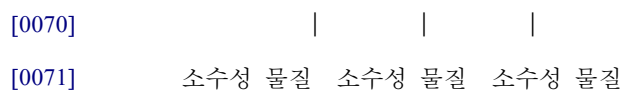
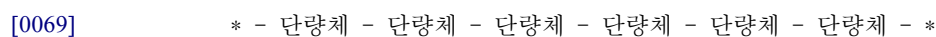
[0062] 본 발명은 BMP가 BMP-2(디보터민-알파), BMP-4, BMP-7(엠포터민-알파), BMP-14 및 GDF-5로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체에 관한 것이다.

[0063] 양쪽 친매성 폴리머의 치환기는 조절된 방식 또는 통계적 방식으로 분포된다. 블록 공중합체와 교대(alternating) 공중합체는 치환기가 조절된 방식으로 분포된 폴리머의 예이다.

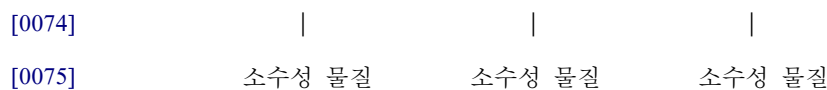
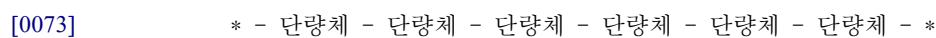
[0064] 랜덤 공중합체



[0068] 블록 공중합체



[0072] 교대 공중합체



[0076] 따라서, 일 예에서, 본 발명은 또한 치환기가 임의 방식으로 분포된 폴리머들로부터 폴리머를 선택하는 것을 특

징으로 하는, 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체에 관한 것이다.

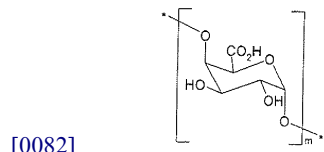
[0077] 일 예에서, 다당류는 히알루로난, 알기네이트, 키토산, 갈락투로난, 콘드로이틴 설페이트, 텍스트란 및 셀룰로스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0078] 셀룰로스의 군은 카르복시메틸 셀룰로스와 같이 산으로 관능화된 셀룰로스로 구성된다.

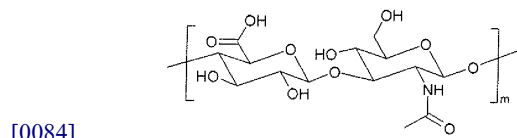
[0079] 텍스트란의 군은 카르복시메틸 텍스트란과 같이 산으로 관능화된 텍스트란으로 구성된다.

[0080] 일 예에서, 다당류는 히알루로난, 알기네이트 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0081] 이러한 다양한 다당류는 하기와 같이 나타낼 수 있다.



[0083] 갈락투로난

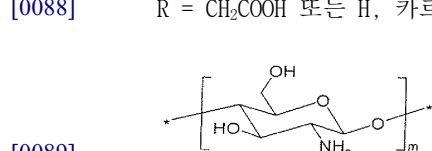


[0085] 히알루로난

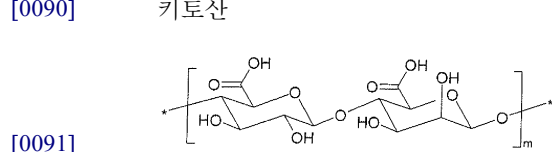


[0087] R = H, 텍스트란

[0088] R = CH₂COOH 또는 H, 카르복시메틸 텍스트란



[0090] 키토산



[0092] 알기네이트

[0093] 다당류는 평균 중합도 m이 10 내지 10,000이다.

[0094] 일 예에서, 이의 평균 중합도 m은 10 내지 1,000이다.

[0095] 다른 예에서, 이의 평균 중합도 m은 10 내지 500이다.

[0096] 일 예에서, 소수성 기인 Hy가 트립토판, 타이로신, 페닐알라닌, 루신 또는 이소루신으로부터 선택되는 천연 소수성 아미노산, 또는 이의 알코올, 에스테르, 탈카르복시화된 유도체 또는 아마이드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체에 관한 것이다.

[0097] 일 예에서, 본 발명은 또한 소수성 기인 Hy가 트립토판 또는 이의 에스테르 또는 아마이드 유도체인 것을 특징으로 하는, 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체에 관한 것이다.

[0098] 트립토판올, 트립토판아미드 및 2-인돌에틸아민은 트립토판의 예들이다.

[0099] 일 예로, 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체는 가역적이다.

- [0100] 사용되는 폴리머는 당해 분야의 당업자들에게 공지된 방법에 따라 합성하거나, 또는 Sigma-Aldrich, NOF Corp. 또는 CarboMer Inc.와 같은 제조사로부터 구입한다.
- [0101] BMP는 당해 분야의 당업자들에게 공지된 방법에 따라 수득한 인간 재조합 BMP 중에서 선택하거나, 또는 Research Diagnostic Inc.(USA)와 같은 제조사로부터 구입한다.
- [0102] BMP는 소수성이 높은 성장 인자이다. 이 단백질의 소수성은 생리적 pH에서 응집을 유도하며 침전된다. 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체는 생리적 pH에서 용액 중에 상기 단백질의 물리적인 안정화를 수행할 수 있다.
- [0103] 물리적 또는 화학적 변성은 단백질의 생리 활성 감소로 이어지는, 단백질분해와 같은 화학적 현상이나 응집과 같은 임의의 물리적 현상을 의미한다.
- [0104] 동시에, 단백질의 물리적 또는 화합물 안정화는 단백질의 생리 활성 유지 작용을 의미한다.
- [0105] 복합체의 안정성은 BMP의 안정성을 측정함으로써 모니터링한다.
- [0106] 양쪽 친매성 폴리머에 의한 단백질의 안정화는 특히 하기 테스트를 통해 입증할 수 있다:
- [0107] - 겔 공동-전기영동 수단에 의해 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체를 확인하기 위한 테스트
- [0108] - 37 °C의 중성 pH에서 수행되는, 양쪽 친매성 BMP 폴리머 복합체에서의 세포 존재 하의 BMP의 열 안정성 테스트
- [0109] - 중성 pH에서 상기 복합체에서 BMP의 물리적 안정성 테스트
- [0110] 공동-전기영동 수단에 의해 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체를 확인하기 위한 테스트는 전기장을 이용한 이온 이동을 근간으로 한다. 음이온성 복합체는 음극쪽으로 이동하고, 양이온성 복합체는 양극으로 이동한다. 이동한 후, 단백질은 PVDF 막으로 모세관 현상에 의해 이동되며, 페록시다제가 커플링된 2차 항체에 의해 인지되는 단백질의 특이 항체에 의해 드러나게 된다. 단백질은 단독으로는 이동하지 않으며, 양쪽 친매성 폴리머가 결합된 단백질은 복합체의 총 전하에 따라 음극 또는 양극쪽으로 이동한다.
- [0111] 세포의 존재하의 BMP의 열 안정성 테스트는 중성 pH에서 37 °C에서 수행되며, C2C12 근모세포를 함유하는 배양 배지에 BMP 용액을 넣는 단계를 포함한다. 용액내 BMP의 농도는 넣은(2일) 후, 그리고 배양 5일째(5일)에 ELISA 분석에 의해 측정한다. BMP의 생물 활성은 근모세포가 골모세포로 분화되는 동안에 2일에서 7일 사이에 형성되는 포스포타제 알카리의 활성을 분석하여 평가한다.
- [0112] 생리 pH에서의 BMP의 물리적 안정화 테스트는, 단백질의 오리지날 완충액을 일반적으로 산성 pH에서 pH7.4의 PBS 용액으로 교체함으로써 단백질 용액을 생리 pH로 만드는 것을 기본으로 한다. 교체 종료시에 BMP를 일정한 농도로 유지시키면서 3번의 교체를 수행한다. 과정 종료시 용액내 BMP의 농도는 원심분리한 다음 ELISA로 측정한다. 또한, 이러한 테스트는 pH 7.4로 고정된 완충액으로 BMP-2 농축 용액을 희석함으로써 수행할 수도 있다.
- [0113] 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체는 단백질을 변성시킬 수 있는 어떠한 유기 용매도 없는 생리 pH의 수용액에 BMP와 양쪽 친매성 폴리머를 투입함으로써 생성된다. 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체의 형성은 자발적이며, BMP와 양쪽 친매성 폴리머 사이에 공유 결합은 이루어지지 않는다. 이러한 조합은 실질적으로 소수성 및 이온성 상호작용인 약한 결합에 의해 이루어진다. 복합체 형성에는 유기 용매가 필요하지 않다.
- [0114] 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체가 형성된다는 증거를 강화하기 위해, 선택적으로 다른 테스트들을 수행할 수 있다.
- [0115] - 원편광 이색성(circular dichroism)에 의해 결정된 BMP의 3차 구조 유지 테스트
- [0116] - 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체에서 스트레스 없는 생리 pH 조건에서의 BMP의 안정성 테스트. 스트레스는 특별한 교반법, 염 등의 존재일 수 있다.
- [0117] - 서몰리신과 같은 단백질분해 효소에 대한 내성 테스트
- [0118] 본 발명에 의해 해결되는 문제들 중 한가지는 단백질의 안정성 개선이며, 그로 인해 시험관내 및 생체내에서 생물 활성이 유지된다. 상기 생물 활성은 근모세포를 골모세포로 분화시키는 BMP의 능력을 보는, 분화 테스트에 의해 평가할 수 있다. 상기 분화는 하기의 수단으로 측정할 수 있다:

- [0119] - 세포 배양에서 생산되는 알카리 포스파타제의 활성 분석
- [0120] - 알카리 포스파타제를 생산하는 세포의 염색
- [0121] - 세포 배양에서 생산되는 오스테오칼신의 RNA에 대한 RT-PCR
- [0122] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 치료 조성물에 관한 것이다.
- [0123] 치료 조성물은 인간이나 수의학 동물의 약제로 사용할 수 있는 조성물을 의미한다.
- [0124] 본 발명에 따른 약학 조성물은 바람직하게는 국소 적용되는 조성물이며, 이는 용질, 겔, 크림, 동결건조물, 분말 또는 페이스트의 형태로 제시될 수 있다.
- [0125] 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체와 함께 제형화될 수 있는 부형제의 특성은 생약자(galenist)의 상식으로 투약 형태에 맞게 선택된다.
- [0126] 따라서, 본 발명에 따른 조성물이 페이스트 형태인 경우, 이 페이스트는 예컨대 카르복시메틸 셀룰로스(CMC), 트리칼슘 포스페이트 및 콜라겐과 같은 산물로부터 수득된다.
- [0127] 본 발명에서는 제형의 파라미터를 조정하기 위해 그의 부형제, pH를 조정하기 위한 완충제, 등장성을 조정할 수 있는 제제, 메틸 파라하이드록시벤조에이트, 프로필 파라하이드록시벤조에이트, m-크레졸 또는 페놀과 같은 보존제, 또는 심지어 L-라이신 하이드로클로라이드와 같은 향산화제를 사용할 수 있다.
- [0128] 본 발명에서, 치료 조성물은 BMP 약 1.5 mg/ml을 투여 가능한 것을 특징으로 한다.
- [0129] 또한, 본 발명은 생체내 골 형성 유도용 치료 조성물 제조에 있어서의 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체의 용도에 관한 것이다.
- [0130] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 양쪽 친매성-BMP 폴리머 복합체를 포함하는 치료 조성물을 치료 부위에 적용하는 것을 포함하는, 인간 또는 수의학 동물에 대한 치료학적 처리 방법에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0131] **양쪽 친매성 폴리머의 합성**
- [0132] **실시예 1: 트립토판 에틸 에스테르에 의해 변형된 카르복시메틸 텍스트란(AP1)**
- [0133] 이 양쪽 친매성 폴리머는 카르복시메틸 텍스트란으로부터 당(saccharide) 유닛 당 카르복시메틸 치환율 1.0 및 평균 몰 질량 60 kg/mol로 합성하였다. 트립토판 에틸 에스테르를, 에틸 클로로포르메이트와 N-메틸모르폴린을 이용하여 유기 용매 중에서 통상적인 커플링 방법에 따라 상기 폴리머의 산에 융합시켰다. 물로 반응 매질을 희석하고, NaOH 1N을 첨가하여 pH를 7로 조절한 다음, 폴리머를 한외여과로 정제하였다. 최종 폴리머는 하기와 같은 특징을 가진다:
 - [0134] - D₂O/NaOD 중에서 RMN ¹H로 측정된, 당 유닛 당 TrpOEt 치환율이 0.45이고
 - [0135] - 전위차 분석에 의해 측정된, 당 유닛 당 카르복실레이트(메틸 카르복실레이트)의 치환율은 0.55임.
- [0136] **실시예 2: 트립토판, 소듐 염에 의해 변형된 카르복시메틸 텍스트란(AP 2)**
- [0137] 이 양쪽 친매성 폴리머는 AP1의 염기성 가수분해에 의해 수득하였다. Soda 1N (3.79 ml)을 양쪽 친매성 폴리머 I(64 ml에 31 mg/ml) 수용액에 첨가하여, pH 12.7을 만들었다. 수득되는 용액을 주변 온도로 하룻밤 동안 교반하였다. 폴리머를 물(NaCl 0.9 % 및 H₂O)에 대해 투석하여 정제하였다. 최종 폴리머는 하기 특징을 가진다:
 - [0138] - D₂O/NaOD 중에서 RMN ¹H로 측정된, 당 유닛 당 TrpONa 치환율이 0.45이고
 - [0139] - 전위차 분석에 의해 측정된, 당 유닛 당 카르복실레이트(메틸 카르복실레이트, 트립토판 카르복실레이트)의 치환율은 1.0임.
- [0140] **실시예 3: 페닐알라닌 에틸 에스테르로 변형된 카르복시메틸 텍스트란(AP 3)**
- [0141] 이 양쪽 친매성 폴리머는 실시예 1에 따라 카르복시메틸 텍스트란으로부터 당 유닛 당 카르복시메틸 치환율 1.0

및 평균 몰 질량 60 kg/mol로 합성하였다. 최종 폴리머는 하기와 같은 특징을 가진다:

[0142] - D₂O/NaOD 중에서 RMN ¹H로 측정된, 당 유닛 당 PheOEt 치환율이 0.45이고

[0143] - 전위차 분석에 의해 측정된, 당 유닛 당 카르복실레이트(메틸 카르복실레이트)의 치환율은 0.55임.

[0144] **실시예 4: 타이로신 메틸 에스테르로 변형된 카르복시메틸 텍스트란(AP 4)**

[0145] 이 양쪽 친매성 폴리머는 실시예 1에 따라 카르복시메틸 텍스트란으로부터 당 유닛 당 카르복시메틸 치환율 1.0 및 평균 몰 질량 60 kg/mol로 합성하였다. 최종 폴리머는 하기와 같은 특징을 가진다:

[0146] - D₂O/NaOD 중에서 RMN ¹H로 측정된, 당 유닛 당 TyrOMe 치환율이 0.45이고

[0147] - 전위차 분석에 의해 측정된, 당 유닛 당 카르복실레이트(메틸 카르복실레이트)의 치환율은 0.55임.

[0148] **실시예 5: 트립토판 에틸 에스테르로 변형된 텍스트란 숙신산(AP 5)**

[0149] 이 양쪽 친매성 폴리머는 텍스트란 숙신산으로부터 논문(Sanchez-Chaves, Manuel et. al., *polymer* 1998, 39 (13), 2751-2757)에 따라 실시하여 측정되는 당 유닛 당 숙신산 치환율 1.0 및 평균 몰 질량 70 kg/mol로 합성하였다. 트립토판 에틸 에스테르를, 에틸 클로로포르메이트와 N-메틸모르폴린을 이용하여 유기 용매 중에서 통상적인 커플링 방법에 따라 상기 폴리머의 산에 융합시켰다. 물에서 반응 매질을 희석하고, NaOH 1N을 첨가하여 pH를 7로 조절한 다음, 폴리머를 한외여과로 정제하였다. 최종 폴리머는 하기와 같은 특징을 가진다:

[0150] - D₂O/NaOD 중에서 RMN ¹H로 측정된, 당 유닛 당 TrpOEt 치환율이 0.45이고

[0151] - 전위차 분석에 의해 측정된, 당 유닛 당 카르복실레이트(숙신 카르복실레이트)의 치환율은 0.55임.

[0152] **비교예 1: 도데실아민에 의해 변형된 카르복시메틸 텍스트란(AP 6)**

[0153] 이 양쪽 친매성 폴리머는 실시예 1에 따라 카르복시메틸 텍스트란으로부터 당 유닛 당 카르복시메틸 치환율 1.0 및 평균 몰 질량 60 kg/mol로 합성하였다. 최종 폴리머는 하기와 같은 특징을 가진다:

[0154] - D₂O/NaOD 중에서 RMN ¹H로 측정된, 당 유닛 당 도데실아민의 치환율은 0.10이고

[0155] - 전위차 분석에 의해 측정된, 당 유닛 당 카르복실레이트(메틸 카르복실레이트)의 치환율은 0.90임.

[0156] **비교예 2: 벤질아민에 의해 변형된 카르복시메틸 텍스트란(AP 7)**

[0157] 이 양쪽 친매성 폴리머는 특허 FR2794649A에 기술되어 있으며, 하기와 같은 특징을 가진다:

[0158] - 당 유닛 당 벤질아민의 치환율은 0.45이고

[0159] - 당 유닛 당 카르복실레이트(메틸 카르복실레이트)의 치환율은 0.55임.

[0160] **공-전기영동에 의한 양쪽 친매성 폴리머에 대한 BMP-2의 친화성**

[0161] BMP-2/양쪽 친매성 폴리머 복합체의 제조

[0162] H₂O/AcN/TFA(64.9 / 35 / 0.1 %) 완충액 중의 0.28 mg/ml BMP-2 용액 5 μl, pH7.4의 완충화된 100 mg/ml AP 용액 7 μl에 첨가하였다. 이 용액은 0.9% NaCl 용액으로 14 μl로 만들었다. 이 용액의 BMP-2의 농도는 0.1 mg/ml이고, BMP-2/AP의 비는 1:500이다. 이 용액을 주변 온도에서 30분간 약하게 교반하였다.

[0163] BMP-2/양쪽 친매성 폴리머 복합체의 입증

[0164] BMP-2/AP 용액을 영동 완충액(트리스-아세테이트 용액, pH 7)에서 20배 희석하였다. 희석 용액 2 μl를 물 8 μl 및 로딩 완충액(수 중의, 글리세롤, 트리스-아세테이트 및 브로모페놀 블루) 7 μl에 첨가하였다. BMP-2 10 ng 및 AP 5 μl이 함유된 이 용액 17 μl, 0.8% 아가로스 겔의 웰에 넣었다. 전기영동 챔버를 닫은 후 전압기를 30V로 설정하였다. 1시간 동안 영동시켰다.

[0165] 영동 후, 겔을 전기장(20분, 15V, Trans-Blot SD, BioRad) 하에 음극에 위치시킨 PVDF 막에 이동시켰다. 이 막을 주변 온도에서 1시간 동안 탈지유로 포화한 다음, BMP-2 일차 항체와 (4 °C에서 하룻밤) 인큐베이션한 후, 마지막으로 2차 항체, 토끼 항 염소 HRP과 (주변 온도에서 1시간) 인큐베이션하였다. HRP를 Opti-4CN 상에서

반응시켜 현상시켰다. 반응 산물은 가시적으로 흡수하기 때문에, 염색이 충분히 이루어졌을 때 현상을 중지시켰다.

- [0166] BMP-2가 AP와 복합체를 이루었을 때, 복합체는 주입부(deposit)로부터 (음극쪽으로 이동한) 0.7 cm 거리에서 단일 스팟 형성으로 검출된다. BMP-2가 단독이거나 또는 AP와 복합체를 형성하지 않은 경우에는, 주입부 위치에서 검출되며 이동하지 않는다.
- [0167] 5종의 폴리머에 대한 결과는 하기 표에 나타낸다.

표 1

양쪽 친매성 폴리머	이동
무	X
AP 1	0
AP 2	0
AP 3	0
AP 4	0
AP 5	0
AP 6	X
AP 7	X

양쪽 친매성 폴리머의 존재하에 생리 pH에서의 BMP-2의 안정성

[0170] BMP-2/양쪽 친매성 폴리머 복합체의 제조

[0171] H₂O/AcN/TFA(64.9 / 35 / 0.1 %) 완충액 중의 0.28 mg/ml BMP-2 용액으로부터, 여러가지 용액을 제조하였다:

[0172] 1. 물에서 희석하여 수득한 0.084 mg/ml의 BMP-2 용액

[0173] 2. BMP-2를 14 mg/ml의 AP 용액에 희석하여 수득한, 0.084 / 9.8 mg/ml BMP-2/양쪽 친매성 폴리머 용액

[0174] 그런 후, 각 용액을 pH 7.4의 10 mM PBS 및 300 mOsm으로 1:10으로 희석한 다음, 마이크로콘 셀 원심분리(YM10, 10 kD, 500 μl) 방법에 의해 재농축하였다. 이러한 조작을 2번 반복하였다. 이를 3번 행균 후, 각 용액을 원심분리하고, 상층액 중의 BMP-2의 농도를 ELISA 분석으로 측정하였다.

[0175] 대조군으로 사용하기 위해, 0.084 mg/ml의 BMP-2 용액 일부는 전혀 행구지 않았다. 0.084 mg/ml BMP-2 용액의 나머지 일부는 1 mM HCl 용액(pH 3)으로 3회 행균 단계를 실시하였다. 이 완충액은 BMP-2를 안정화시키는 것으로 알려져 있지만, 약학적 응용에는 적합하지 않다.

[0176] 어떠한 행균 단계를 실시하지 않은 BMP-2 용액의 ELISA 분석에서, BMP-2의 농도는 83.4 μl이었다. 이 수치는 100% BMP-2에 해당된다. PBS로 3번 행균 나머지 용액의 ELISA로 측정된 농도를 행구지 않은 BMP-2의 농도 값과 더하였다. 산출된 BMP-2 백분율은 하기 표에 나타내었다.

표 2

용액	BMP-2 존재율%
BMP-2	2
BMP-2/AP 1	68
BMP-2/AP 2	90
BMP-2/AP 3	68
BMP-2/AP 4	51
BMP-2/AP 6	0

[0178] BMP-2와 복합체를 형성할 수 있는 AP는 생리 pH에서 BMP-2에게 안정성을 부여하였다. BMP-2는, AP 부재시에는 생리 pH의 용액에 더이상 존재하지 않았다. 이와 같이, BMP-2와 복합체를 형성하지 않는 AP가 존재하는 경우에도, BMP-2 단백질은 더이상 용액에 존재하지 않았다.

배양 배지에 양쪽 친매성 폴리머의 존재 시, 37 °C 및 생리 pH에서의, BMP-2의 안정성 및 생리 활성

[0180] 0일에, C2C12 세포(마우스의 근육세포)를 10% FVS 및 1% TBA가 함유된 DMEM을 넣은 96웰 배양 플레이트에 접종 (웰 당 7,000개의 세포)한 다음, 오븐에 24시간 두었다. 1일에, 세포 유착 후, 배지를 2% FVS 및 1% TBA가 함유된 DMEM으로 24시간 교체하였다. 2일에, 배지를 BMP-2 단독 용액(0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 BMP-2/AP 1 복합체 (0.3/150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 비 1:500) 용액이 첨가된 2% FVS 및 1% TBA가 함유된 DMEM으로 교체하였다. BMP-2와 AP를 각각 2% FVS 및 1% TBA가 함유된 DMEM으로 희석하여, 복합체를 제조하였다. 단백질/AP 1 혼합물은 침전(deposit)되기 전 1시간 동안 두었다.

[0181] 7일에, 즉 침전 후 5일째에, ELISA로 잔류하는 BMP-2를 분석하기 위해 상층액으로부터 샘플을 취하였다.

표 3

	상층액 중의 BMP-2 %	
	침전	침전 + 5일
BMP-2 단독	100	2
BMP-2/AP 1	100	41

[0183] 세포와 접촉시킨 지 5일째에, BMP-2는 단독시에는 5% 미만으로 잔류하였지만, AP 1과 혼합하였을 때에는 40% 이상의 BMP-2가 잔류하였다.

[0184] 동일 실험의 7일째에, 세포를 PBS로 2번 행구고, 세포용혈 완충액 50 μl 으로 세포용혈한 다음, 3번의 동결(-80 $^{\circ}\text{C}$)/해동(37 $^{\circ}\text{C}$) 주기를 수행하였다. 세포용혈물의 알카리 포스파타제 효소 활성을 405 nm에서 흡광하는 기질 p-니트로페닐 포스페이트로 측정하였다. 이러한 활성은 microBCA에 의해 측정되는 단백질의 양을 감소시키므로, nmol pnP/min. μg (단백질)으로 표시한다.

표 4

	ALP 활성(nmol pnP/ μg 단백질.min)
BMP-2 단독	0.9 \pm 0.12
BMP-2/AP 1	1.7 \pm 0.05

[0186] BMP-2는 5일 보다 장기간 존재 환경(living condition)에서 복합체 의해 안정화되었지만, 그 자체는 이러한 기간 동안 안정적이지 않았다.

[0187] BMP-2의 활성은 세포 분화의 느린 진행으로 확인하였으며, BMP-2 복합체는 BMP-2 단독의 경우 보다 시험관내에서의 활성이 더 우수하였다.

[0188] **효소적 분해에 대한 BMP-2 폴리머의 보호**

[0189] **BMP-2/폴리머 복합체의 제조**

[0190] TFA 아세트니트릴 완충액 중의 0.315 mg/ml BMP-2 용액 19 μl 를, 66 mg/ml 폴리머(PA 2) 용액 4.6 μl , pH 7.5 의 50 mM 트리스 50 μl , 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 서몰리신 60 μl , 및 H₂O 366.4 μl 에 첨가하였다. 임의의 폴리머를 포함하지 않는 동일 용액을 대조군으로 제조하였다. 이 2가지 용액에서, 서몰리신은 단백질의 25%(중량/중량)이다.

[0191] **분해 속도:**

[0192] BMP-2 단독 용액과 서몰리신을 포함하는 복합체 용액을 6시간 동안 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 샘플 20 μl 를 T = 0.20 분, 1시간, 2시간 및 6시간째에 취하였다. 각각의 샘플을 취하였을 때, 효소 반응을 저해하기 위해 즉시 250 mM EDTA 5 μl , 즉 최종 농도 50 mM로 첨가하였다. 그런 후, 샘플은 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 동결시켰다.

[0193] **현상:**

[0194] 현상은 15% SDS-PAGE 겔로부터 수득한 웨스턴 블롯을 이용하여 실시하였다. 각각의 샘플(BMP-2 65 ng 포함) 7 μl 를 SDS를 함유하는 Laemmli 주입 완충액 7 μl 와 혼합하였다. 그런 다음, 샘플을 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 변성시킨 후, 15% SDS-PAGE 겔에 위치시켰다. 대조군으로서, 당량의 BMP-2(65 ng)와 서몰라이신(16.25 ng)도 겔에 위치시켰다. 전기영동 챔버를 닫고, 전력을 125 V로 설정하였다. 영동은 1시간 15분간 실시하였다.

[0195] 영동 후, 겔을 1시간 동안 100V로 BioRad 트랜스퍼 시스템을 이용하여 PVDF 막에 이동시켰다. 이 막을 주변 온

도에서 1시간 동안 탈지유로 포화한 다음, BMP-2 일차 항체와 (4 °C에서 하룻밤) 인큐베이션한 후, 마지막으로 HRP가 커플링된 2차 항체와 (주변 온도에서 1시간) 인큐베이션하였다. HRP를 Opti-4CN 상에서 반응시켜 현상시켰다. 반응 산물은 가시적으로 흡수하기 때문에, 염색이 충분히 이루어졌을 때 현상을 중지시켰다.

- [0196] BMP-2가 단독인 경우, 20분 후에 분자량이 더 작은 밴드가 관찰되었는데, 이 밴드는 서몰리신에 의한 단백질 분해물인 것으로 판단되었다. 폴리머의 존재시, 이 밴드는 나타나지 않아, 폴리머가 단백질 분해로부터 보호되었음을 시사한다.
- [0197] 폴리머가 서몰리신의 작용을 저해하는지를 확인하여 수득한 결과는, 폴리머 PA 2가 BMP-2를 효소 분해로부터 효과적으로 보호함을 보여주는 것으로 결론내릴 수 있다.
- [0198] **생리학적 pH에서 복합체 형태의 BMP-2의 수용성**
- [0199] 생리 pH에서의 BMP-2의 용해도
- [0200] BMP-2의 등전점은 8.5이며, 이는 생리 pH에서 BMP-2가 최소 용해도에 가깝다는 것을 의미한다. 이는, BMP-2를 이용하여 산 용액을 중화시키기 위한 실험을 통해 확인할 수 있다.
- [0201] 생리 pH에서의 BMP-2/PA 2 복합체의 용해도
- [0202] 맑은 1.5 mg/mL BMP-2 용액을 산성 완충액(주입 완충액, pH 4.5) 중에서 준비하였다. 이 용액에 동결건조된 PA 2를 첨가하여, PA 2 농도를 75 mg/mL로 만들었다. 이 BMP-2/PA 2 복합체 용액은, pH 7.4로 만들기 위해, 포스페이트 완충액을 첨가하여 중화시켰다(BMP-2의 최종 농도 1.2 mg/mL 및 PA 2의 최종 농도 60 ng/mL). pH 7.4에서, BMP-2를 완전하게 용해시킬 수 있었으며, 응집물은 보이지 않았다. BMP-2/PA 2 복합체 형태일 때 BMP-2는 생리 pH에서의 용해도가 크게 증가되었다.