



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0086752
 (43) 공개일자 2011년07월29일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 9/14</i> (2006.01) <i>A61K 9/19</i> (2006.01)
 <i>A61K 47/36</i> (2006.01) <i>A61K 38/18</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7014109</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년11월19일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년06월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/FR2009/001332</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/058106
 국제공개일자 2010년05월27일</p> <p>(30) 우선권주장
 0903803 2009년07월31일 프랑스(FR)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 아도시아
 프랑스 에프-69003 리옹 아브뤼 라카쎄느 115</p> <p>(72) 발명자
 술라, 제라르
 프랑스공화국, 69330 메이지외, 튀 녕계쎄, 33
 술라, 헤미
 프랑스공화국, 69001 리옹, 튀 뒤 봉 빠스띠르, 38
 술라, 올리비에
 프랑스공화국, 69330 메이지외, 아브뤼 뒤 까로, 115</p> <p>(74) 대리인
 특허법인오리진</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 골형성 단백질 복합체 투여의 신규한 형태

(57) 요약

본 발명은 폴리사카라이드와 골형성 단백질 사이의 하나 이상의 복합체 및 하나 이상의 불용성 칼슘 염을 포함하는 공침전물로 구성된 골형성 조성물에 관한 것이며, 상기 공침전물은 분리된 형태이다. 또한, 본 발명은 본 발명을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폴리사카라이드와 골형성 단백질 사이의 하나 이상의 복합체 및 하나 이상의 불용성 칼슘 염을 포함하는, 분리된 형태의 공침전물을 제조하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 공침전물을 포함하는 제제, 약학적 제제, 및 의료 장치에 관한 것이다.

(30) 우선권주장

61/116,144 2008년11월19일 미국(US)

61/213,939 2009년07월31일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

불용성화 형태의 음이온성 폴리사카라이드와 골형성 단백질 사이의 하나 이상의 복합체 및 하나 이상의 불용성 칼슘 염으로 이루어진 공침전물로서, 분리된 형태의 공침전물(coprecipitate).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 불용성 칼슘 염이 무수물 또는 수화된 형태의 칼슘 오르토포스페이트 단독 또는 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

옥살레이트 칼슘, 아스코르베이트 칼슘, 카보네이트 칼슘 및 셀페이트 칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 불용성 칼슘 염을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 불용성 칼슘 염은 양이온성 칼슘 이온과 일염기성, 이염기성 또는 삼염기성 포스페이트, 폴리사카라이드 카복실레이트, 카보네이트, 수산화물 및 염기에 의해 운반될 수 있는 음이온과 같은 음이온성 이온 사이에서 형성된 혼합 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

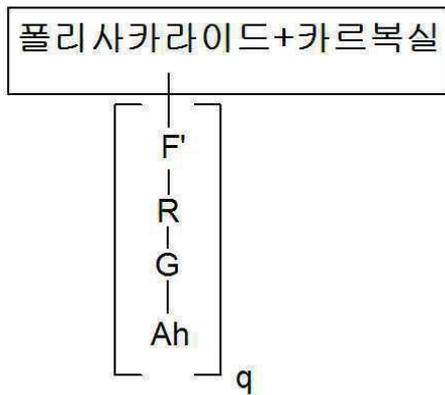
상기 음이온성 폴리사카라이드가 소수성 유도체로 관능화된 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 음이온성 폴리사카라이드가 하기 식 IX의, 소수성 알코올로 부분 치환된 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공침전물:

[식 IX]



상기 식 중,

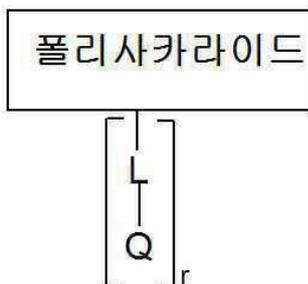
- q는 F'-R-G-Ah로 치환된 폴리사카라이드의 카르복실 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.01 내지 0.7이며,
- F'는 아마이드 관능기이며,
- G는 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 카보네이트 관능기 또는 카바메이트 관능기이며,
- R은 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, 선택적으로 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,
- Ah는 소수성 알코올의 히드록실 관능기와 R 기에 의해 운반되는 하나 이상의 친전자성 관능기 사이의 커플링(coupling)에 의해 생성되는, 소수성 알코올의 잔기이며,
- 폴리사카라이드의 카르복실 관능기가 F'-R-G-Ah로 치환되지 않은 경우, 폴리사카라이드의 카르복실 관능기는 양이온, 바람직하게는 Na^+ 또는 K^+ 와 같은 알칼리금속 양이온의 카르복실레이트이며,
- 상기 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드는 중성 pH에서 양친매성(amphiphilic)임.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드는, 카르복실 관능기를 천연적으로 포함하는 폴리사카라이드로부터 획득된 합성 폴리사카라이드이거나, 또는 하기 식 X의, 100개의 사카라이드 단위 당 15개 이상의 카르복실 관능기가 그래프트된 중성 폴리사카라이드로부터 획득된 합성 폴리사카라이드인 것을 특징으로 하는 공침전물:

[식 X]



상기 식 중,

- 천연 폴리사카라이드는 주로 (1,6) 및/또는 (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된 폴리사카라이드의 균으로부터 선택되며,
- L은 링커(linker) Q와 폴리사카라이드의 관능기 -OH 사이의 커플링으로부터 생성된 결합으로서, 에스테르 관

능기, 티오에스테르 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기 또는 에테르 관능기이며,

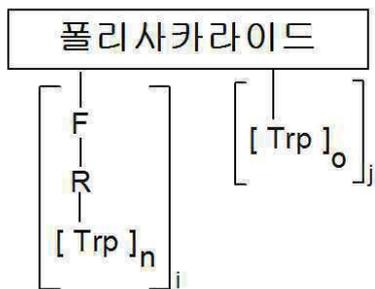
- r은 폴리사카라이드의 사카라이드 단위 당 치환체 L-Q의 몰분율을 나타내고,
- Q는 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 카르복실 관능기 $-CO_2H$ 를 포함하는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬임.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 음이온성 폴리사카라이드가 하기 식 I의, 하나 이상의 트립토판 유도체로 관능화된, (1,4), (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합을 주로 포함하는 음이온성 폴리사카라이드로 이루어진 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공침전물:

[식 I]



상기 식 중,

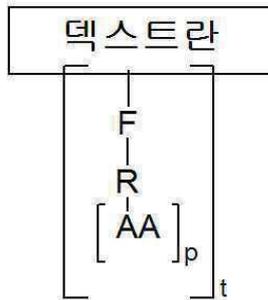
- 폴리사카라이드는 (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 주로 구성되며,
- F는 중성 또는 음이온성 폴리사카라이드의 관능기 $-OH$ 와 링커 R 사이의 커플링으로부터 생성된 것으로서, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 아마이드 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기, 에테르 관능기, 티오에테르 관능기 또는 아민 관능기이며,
- R은 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,
- Trp는 트립토판 유도체의 아민과 R 기에 의해 운반되는 하나 이상의 산 및/또는 음이온성 폴리사카라이드에 의해 운반되는 하나 이상의 산 사이의 커플링에 의해 생성되는, L- 또는 D-트립토판 유도체의 잔기이며,
- n은 Trp로 치환된 R 기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 0.7이며,
- o는 Trp로 치환된 폴리사카라이드의 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 0.7이며,
- i는 사카라이드 단위 당 R 기에 의해 운반되는 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0 내지 2이며,
- j는 사카라이드 단위 당 음이온성 폴리사카라이드에 의해 운반되는 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0 내지 1이며,
- (i + j)는 사카라이드 단위 당 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.1 내지 2이며,
- R이 Trp로 치환되지 않은 경우, R 기의 산은 양이온, 바람직하게는 Na 또는 K와 같은 알칼리금속의 양이온의 카복실레이트이며,
- 폴리사카라이드가 음이온성 폴리사카라이드인 경우, 폴리사카라이드의 하나 이상의 산 관능기가 Trp로 치환되지 않을 때, 이는 양이온, 바람직하게는 Na^+ 또는 K^+ 와 같은 알칼리금속 양이온으로 염화되며,
- 상기 폴리사카라이드는 중성 pH에서 양친매성임.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 음이온성 폴리사카라이드가 하기 식 III의 관능화된 음이온성 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공침전물:

[식 III]



상기 식 중,

- R은 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,
 - F는 중성 또는 음이온성 폴리사카라이드의 관능기 -OH와 링커 R 사이의 커플링으로부터 생성된 것으로서, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 아마이드 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기, 에테르 관능기, 티오에테르 관능기 또는 아민 관능기이며,
 - AA는 아미노산의 아민과 R 기에 의해 운반되는 산 사이의 커플링에 의해 생성된 L 또는 D의 소수성 아미노산 잔기이며,
- 상기 소수성 아미노산은 트립토판, 트립토판올, 트립토판아미드 및 2-인돌에틸아민, 및 이의 알칼리금속 양이온의 염과 같은 트립토판 유도체로부터 선택된 것이거나, 또는 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 발린, 및 이의 알코올, 아마이드 또는 탈카르복실화된 유도체로부터 선택된 것이며,
- t는 글리코시드 단위 당 F-R-[AA]_n 치환기의 몰분율을 나타내고, 0.1 내지 2이며,
 - p는 AA로 치환된 R 기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 1이며,
 - R이 AA로 치환되지 않은 경우, R 기의 산은 양이온, 바람직하게는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 알칼리금속 양이온의 카복실레이트임.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 골형성 단백질이 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5가 단독 또는 조합되어 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 12

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자가 PDGF인 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 13

제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

BMP-2 및 PDGF-BB를 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 14

제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

BMP-7 및 PDGF-BB를 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 15

제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

GDF-5 및 PDGF-BB를 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 16

제6항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 골형성 단백질이 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5가 단독 또는 조합되어 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자가 VEGF인 것을 특징으로 하는 공침전물.

청구항 17

적어도 하기를 포함하는, 골형성 임플란트를 제조하기 위한 키트:

- a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- b - 하나 이상의 폴리사카라이드를 포함하는 조성물,
- c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- d - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

하나 이상의 염기를 포함하는 부가적 조성물을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서,

조성물 b, c 또는 d에 첨가될 수 있는 제2의 염기를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 골형성 단백질을 포함하는 조성물은 복합체를 형성하기 위한 폴리사카라이드를 추가적으로 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 21

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 복합체를 포함하는 조성물은 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염 및/또는 염기를 추가적으로 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 22

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리사카라이드를 포함하는 조성물은 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염 및/또는 염기를 추가적으로 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 23

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물은 염기를 추가적으로 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 24

하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트:

- a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드, 하나 이상의 염기, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물.

청구항 25

하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트:

- a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.

청구항 26

제17항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

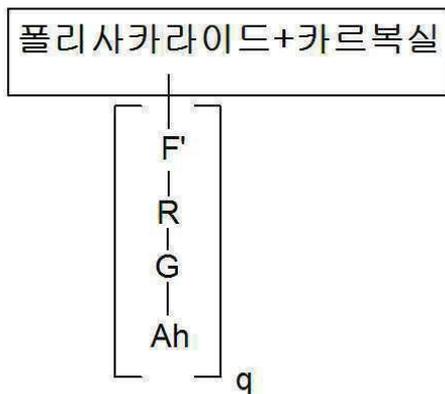
상기 음이온성 폴리사카라이드가 소수성 유도체로 관능화된 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 음이온성 폴리사카라이드가 하기 식 IX의, 소수성 알코올로 부분 치환된 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트:

[식 IX]



상기 식 중,

- q는 F-R-G-Ah로 치환된 폴리사카라이드의 카르복실 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.01 내지 0.7이며,
- F'는 아마이드 관능기이며,
- G는 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 카보네이트 관능기 또는 카바메이트 관능기이며,
- R은 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, 선택적으로 O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,

- Ah는 소수성 알코올의 히드록실 관능기와 R 기에 의해 운반되는 하나 이상의 친전자성 관능기 사이의 커플링에 의해 생성되는, 소수성 알코올의 잔기이며,
- 폴리사카라이드의 카르복실 관능기가 F'-R-G-Ah로 치환되지 않은 경우, 폴리사카라이드의 카르복실 관능기는 양이온, 바람직하게는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 알칼리금속 양이온의 카르복실레이트이며,
- 상기 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드는 중성 pH에서 양친매성임.

청구항 28

제26항에 있어서,

상기 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드는, 카르복실 관능기를 천연적으로 포함하는 폴리사카라이드로부터 획득된 합성 폴리사카라이드이거나, 또는 하기 식 X의, 100개의 사카라이드 단위 당 15개 이상의 카르복실 관능기가 그래프트된 중성 폴리사카라이드로부터 획득된 합성 폴리사카라이드인 것을 특징으로 하는 키트:

[식 X]



상기 식 중,

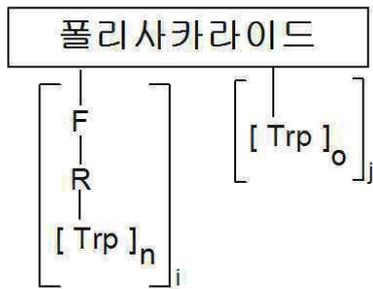
- 천연 폴리사카라이드는 주로 (1,6) 및/또는 (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된 폴리사카라이드의 군으로부터 선택되며,
- L은 링커 Q와 폴리사카라이드의 관능기 -OH 사이의 커플링으로부터 생성된 결합으로서, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기 또는 에테르 관능기이며,
- r은 폴리사카라이드의 사카라이드 단위 당 치환체 L-Q의 몰분율을 나타내고,
- Q는 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 카르복실 관능기 -CO₂H를 포함하는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬임.

청구항 29

제26항에 있어서,

상기 음이온성 폴리사카라이드가 하기 식 I의, 하나 이상의 트립토판 유도체로 관능화된, (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합을 주로 포함하는 음이온성 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트:

[식 I]



상기 식 중,

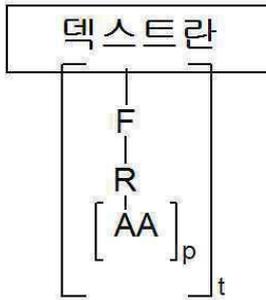
- 폴리사카라이드는 (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 주로 구성되며,
- F는 중성 또는 음이온성 폴리사카라이드의 관능기 -OH와 링커 R 사이의 커플링으로부터 생성된 것으로서, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 아마이드 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기, 에테르 관능기, 티오에테르 관능기 또는 아민 관능기이며,
- R은 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,
- Trp는 트립토판 유도체의 아민과 R 기에 의해 운반되는 하나 이상의 산 및/또는 음이온성 폴리사카라이드에 의해 운반되는 하나 이상의 산 사이의 커플링에 의해 생성되는, L- 또는 D-트립토판 유도체의 잔기이며,
- n은 Trp로 치환된 R 기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 0.7이며,
- o는 Trp로 치환된 폴리사카라이드의 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 0.7이며,
- i는 사카라이드 단위 당 R 기에 의해 운반되는 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0 내지 2이며,
- j는 사카라이드 단위 당 음이온성 폴리사카라이드에 의해 운반되는 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0 내지 1이며,
- (i + j)는 사카라이드 단위 당 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.1 내지 2이며,
- R이 Trp로 치환되지 않은 경우, R 기의 산은 양이온, 바람직하게는 Na 또는 K와 같은 알칼리금속의 양이온의 카복실레이트이며,
- 폴리사카라이드가 음이온성 폴리사카라이드인 경우, 폴리사카라이드의 하나 이상의 산 관능기가 Trp로 치환되지 않을 때, 이는 양이온, 바람직하게는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 알칼리금속 양이온으로 염화되며,
- 상기 폴리사카라이드는 중성 pH에서 양친매성임.

청구항 30

제26항에 있어서,

상기 음이온성 폴리사카라이드가 하기 식 III의 관능화된 음이온성 폴리사카라이드로 이루어진 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트:

[식 III]



상기 식 중,

- R은 1 내지 18개의 탄소를 포함하고, O, N 및/또는 S와 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,
 - F는 중성 또는 음이온성 폴리사카라이드의 관능기 -OH와 링커 R 사이의 커플링으로부터 생성된 것으로서, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 아마이드 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기, 에테르 관능기, 티오에테르 관능기 또는 아민 관능기이며,
 - AA는 아미노산의 아민과 R 기에 의해 운반되는 산 사이의 커플링에 의해 생성된 L 또는 D의 소수성 아미노산 잔기이며,
- 상기 소수성 아미노산은 트립토판, 트립토판올, 트립토판아미드 및 2-인돌에틸아민, 및 이의 알칼리금속 양이온의 염과 같은 트립토판 유도체로부터 선택된 것이거나, 또는 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 발린, 및 이의 알코올, 아마이드 또는 탈카르복실화된 유도체로부터 선택된 것이며,
- t는 글리코시드 단위 당 F-R-[AA]_n 치환기의 몰분율을 나타내고, 0.1 내지 2이며,
 - p는 AA로 치환된 R 기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 1이며,
 - R이 AA로 치환되지 않은 경우, R 기의 산은 양이온, 바람직하게는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 알칼리금속 양이온의 카복실레이트임.

청구항 31

제17항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 골형성 단백질이 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5가 단독 또는 조합되어 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 32

제17항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자가 PDGF인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 33

제17항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

BMP-2 및 PDGF-BB를 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 34

제17항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

BMP-7 및 PDGF-BB를 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 35

제17항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,
GDF-5 및 PDGF-BB를 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 36

제17항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 골형성 단백질이 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5가 단독 또는 조합되어 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자가 VEGF인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 37

제17항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 가용성 칼슘 염이 염화칼슘, D-글루코네이트 칼슘, 포르메이트 칼슘, D-사카레이트 칼슘, 아세테이트 칼슘, L-락테이트 칼슘, 글루타메이트 칼슘 및 아스파르테이트 칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 38

제17항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 가용성 칼슘 염이 염화칼슘인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 39

제17항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,
칼슘 이온과 침전물을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염이, 음이온이 인산 이온 PO_4^{3-} , 인산수소 이온 HPO_4^{2-} 및 인산이수소 이온 $H_2PO_4^{-}$ 를 포함하는 포스페이트 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되는 가용성 염인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 40

제17항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 염기가 미네랄 염기 및 유기 염기로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 41

제40항에 있어서,
상기 미네랄 염기가 수산화나트륨, 탄산수소나트륨 및 탄산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 42

제40항에 있어서,
상기 유기 염기가 아민 및 탈양성자화된 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 43

제40항에 있어서,
상기 유기 염기가 이미다졸 및 이의 유도체, 특히 히스티딘, 프롤린, 에탄올아민 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 44

제17항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 유기 매트릭스, 또는 미네랄 매트릭스, 또는 혼합된 매트릭스를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 45

제44항에 있어서,

매트릭스가 히드로겔로 이루어진 균으로부터 선택된 유기 매트릭스 및/또는 가교결합된 중합체에 기초한 매트릭스인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 46

제45항에 있어서,

상기 히드로겔이 중합체 사슬의 화학적 또는 물리적 가교결합에 의해 획득된 히드로겔인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 47

제45항에 있어서,

상기 가교결합된 중합체가 가교결합되고 멸균되고 정제된 천연 콜라겐인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 48

제46항에 있어서,

상기 히드로겔이 에틸렌 글리콜 및 락트산의 공중합체, 에틸렌 글리콜 및 글리콜산의 공중합체, 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리비닐산, 폴리아크릴아미드 및 폴리아크릴산을 포함하는 합성 중합체의 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 49

제45항에 있어서,

상기 히드로겔이 히알루론산, 케라탄, 플루란, 펙틴, 텍스트란, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 알긴산, 잔탄, 카라기닌, 키토산, 콘드로이틴, 콜라겐, 젤라틴, 폴리리신, 피브린, 및 이의 생물학적으로 허용가능한 염을 포함하는 천연 중합체의 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 50

제17항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 키트에 포함된 조성물이 수용액인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 51

제17항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 키트에 포함된 조성물이 동결건조물인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 52

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 공침전물의 제조 방법으로서,

하기에 의해 얻어지는 공침전 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 칼슘 이온 염의 용액을 첨가하여, 음이온성 중합체와 골형성 단백질 사이의 복합체를 침전시키는 단계,
- 특정 pH에서 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물을 첨가하여, 칼슘 이온을 침전시키는 단계,

음이온성 중합체와 골형성 단백질 사이의 복합체는 골형성 단백질 용액에 음이온성 폴리사카라이드 용액을 첨가

하여 수득됨.

청구항 53

제52항에 있어서,

칼슘 염의 침전은 가용성 포스페이트 용액의 첨가에 의해 칼슘 포스페이트의 형태로 발생하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 골형성 제제, 특히 골 형태형성 단백질(BMP) 패밀리에 속하는 골형성 단백질의 제제의 분야에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 골 형태형성 단백질(BMP: bone morphogenetic protein)은 골유도 메카니즘에 관여하는 성장인자이다. 골형성 단백질(OP: osteogenic protein)이라고도 알려진 BMP는 1965년에 Urist에 의해 최초로 특징지어졌다(Urist MR. Science 1965; 150, 893). 피질골로부터 분리된 상기 단백질은 다수의 동물에서 골 형성을 유도하는 능력을 갖는다(Urist MR. Science 1965; 150, 893).

[0003] BMP는, 번역 후 성숙 이후에 104 내지 139개의 잔기의 길이를 갖는 프로펩티드들의 형태로 발현된다. 이들 사이의 서열 상동성은 크며, 이들은 유사한 삼차원 구조를 갖는다. 특히, 이들은 "시스테인 노트(cysteine knot)"를 형성하는 분자내 디설피드 다리에 관여하는 6개의 시스테인 잔기를 포함한다(Scheufler C. 2004 J. Mol. Biol. 1999; 287, 103; Schlunegger MP, J. Mol. Biol. 1993; 231, 445). 이들 중 일부는 또한 이량체 형성의 원인이 되는 분자간 디설피드 다리에 관여하는 제7의 시스테인을 포함한다(Scheufler C. 2004 J. Mol. Biol. 1999; 287:103).

[0004] 이들의 활성 형태에서, BMP는 Israel 등에 의해 문헌 [Israel DI, 성장인자s. 1996; 13(3-4), 291]에 기재된 바와 같이 동종이량체로 결집되거나 또는 이종이량체로 결집된다. 이량체성 BMP는 BMPR 유형의 막관통 수용체와 상호작용한다(Mundy et al. Growth Factors, 2004, 22 (4), 233). 이러한 인식은 특히 Smad 단백질을 포함하는 세포내 시그널 캐스캐이드의 원인이 되며, 이에 따라 표적 유전자의 활성화 또는 억제를 야기한다.

[0005] BMP 1 및 3을 제외한 BMP는 간엽세포의 분화에 대해 직접적 및 간접적 역할을 하며, 이는 골아세포로 분화되는 것을 야기한다(Cheng H., J. Bone and Joint Surgery, 2003, 85A 1544-1552). 이는 또한 주화성 성질을 가지며, 증식, 분화 및 혈관형성을 유도한다.

[0006] 일부 재조합 인간 BMP, 특히 rhBMP-2 및 rhBMP-7은 인간에서 생체내 골형성을 유도하는 능력을 분명하게 보여주었으며, 특정의 의료적 사용들에 대해 승인되었다. 따라서, 국제 일반명칭이 디보테르민 알파(diboterminalpha)인 재조합 인간 BMP-2는 미국에서 상표명 InFUSE[®]로, 유럽에서 상표명 InductOs[®]로 시판되는 제품으로 제형화된다. 상기 제품은 "유착불능(non-union)" 골절에 대해 경골 재생 및 요추골의 융합에 처방된다. 요추골의 융합을 위한 InFUSE[®]의 경우에, 수술 절차는 먼저 rhBMP-2의 용액으로 콜라겐 스폰지를 침지한 후, 척추골 사이에 이미 주입된 LT 케이지, 공동(hollow) 케이지에 상기 스폰지를 위치시키는 것으로 이루어진다.

[0007] 국제 일반명칭이 에프토테르민 알파(eptoterminalpha)인 재조합 인간 BMP-7은 BMP-2와 동일한 치료적 징후를 나타내며, 2개의 제품, 즉 경골의 개방골절용 OP-1 임플란트 및 요추골의 융합용 OP-1 퍼티(Putty)의 기초를 구성한다. OP-1 임플란트는 rhBMP-7 및 콜라겐을 함유하는 분말로 구성되며, 이는 0.9% 염류 용액에 포함된다. 그 후, 수득된 페이스트는 수술 과정 동안 골절에 적용된다. OP-1 퍼티(Putty)는 2개의 분말 형태, 즉 rhBMP-7 및 콜라겐을 함유하는 형태와 카르복시메틸셀룰로스(CMC)를 함유하는 형태가 있다. 수술하는 동안, CMC는 0.9% 염류 용액으로 재구성되며, rhBMP-7 및 콜라겐과 혼합된다. 이에 따라 생성된 페이스트는 치료될 부위에 적용된다.

[0008] 골형성 단백질의 투여는 골형성 단백질의 불안정성 및 골형성 단백질을 최소량으로 포함하는 골형성 제제를 수득할 필요성 때문에 주요한 문제가 된다. 이는 상기 단백질의 높은 농도에 의해 발생하는 부작용을 피하기 위함이고, 상기 단백질의 비용 때문이다.

- [0009] 다수의 제제들이 개발되어 오고 있고 현재 개발 중에 있으며, 예를 들어 Seeherman의 보고서 [Seeherman, H. et al., Spine 2002, 27 (16 Suppl. 1), S16-S23]에 인용되어 있으며, 여기에서 운반 시스템(delivery system)의 성질의 중요성이 강조된다.
- [0010] 사용되는 운반 시스템은 투여되는 부위에서 단백질의 보유 시간을 증가시킬 수 있어야 하며, 이에 따라 사용되는 단백질의 양의 전체 배출을 얻고, 투여되는 부위의 밖으로 확산되는 것을 야기할 수 있는 과도하게 급격한 배출을 피할 수 있어야 한다.
- [0011] 또한, 사용되는 운반 시스템은 처치되는 부위에서 골 성장을 위한 매트릭스로서 제공될 수 있어야 하며, 이와 동시에 처치되는 부위에서 상기 골 성장의 한계를 정할 수 있어야 한다.
- [0012] 요즈음 운반 시스템에는, 천연 중합체, 합성 중합체, 무기 물질, 및 이러한 물질들의 혼합물과 같은 4개의 유형의 물질이 사용된다.
- [0013] 그러나, 개발된 시스템들의 어느 것도 BMP의 용량을 유의적으로 감소시킬 수 없었다. 이는 제제 내 단백질의 불안정성과 연관되거나, 또는 지지체의 구조에 기인한 단백질의 낮은 생물학적 이용가능성과 연관된다.
- [0014] 천연 중합체와 관련하여, 콜라겐, 히알루로난, 피브린, 키토산, 알긴산염 및 기타 천연 폴리사카라이드들이 사용된다.
- [0015] 비록 재조합 콜라겐-기재 스폰지가 이러한 천연 중합체의 알려진 단점들의 대부분을 극복할 수 있을지라도, 스폰지 내로 골형성 단백질의 도입은 최근에 만족스럽지 않다.
- [0016] 히드로겔 형태의 기타 천연 폴리사카라이드들은 미리 겔 형태로 가교결합되지 않는다면 본질적으로 너무 빨리 재흡수되는 결함을 가지며, 이는 콜라겐 스폰지에 대해 이미 언급된 것과 동일한 단점들을 야기한다.
- [0017] 합성 중합체와 관련하여, 폴리락티드(PLA), 폴리글리콜리드(PLG) 및 이의 공중합체(PLGA)와 같은 폴리(α -히드록시산) 중합체들이 가장 흔하게 사용되는 것이다.
- [0018] 이러한 중합체들의 주요한 단점은 이들의 분해에 기인한 pH의 저하, 및 이들이 유발할 수 있는 염증 반응이다.
- [0019] 무기 물질과 관련하여, 칼슘 포스페이트를 골-유도 단백질과 조합한 운반 시스템이 개발되었다.
- [0020] 이 중에서, 칼슘 포스페이트-기재 세라믹, 예컨대 히드록시아파타이트(HAP) 및 트리칼슘 포스페이트(TCP), 및 "비-세라믹(non-ceramic)" 칼슘 포스페이트, 예컨대 칼슘 포스페이트-기재 시멘트(CPC)가 언급된다.
- [0021] 1970년대 이래로, 칼슘 포스페이트 세라믹은 M. Bohner의 문헌 [Bohner, M., Injury 2000, 31 Suppl. 4, 37-47]에 기재된 바와 같이 골 복원에 가치가 있을 수 있다고 알려져 왔다.
- [0022] 그러나, BMP-2의 유효량은 콜라겐 스폰지에서보다 세라믹에서 더 높은 것으로 인정된다. 인간의 후측방 융합의 임상연구(Boden, S. D. et al., Spine 2002, 27 (23), 2662-2673)에 따르면, BMP-2의 양(40 mg)은 칼슘 포스페이트를 포함하지 않는 콜라겐 스폰지(12 mg)에서보다 Medtronic Sofamor 회사에서 개발한 제품인 BCP 입체(60% HAP 및 40% TCP)에서 더 높은 것으로 보고되고 있다.
- [0023] 이러한 단점을 극복하기 위해, 매우 많은 수의 시스템들이 비-세라믹 칼슘 포스페이트, 특히 칼슘 포스페이트 시멘트에 기초하여 개발되어 왔다. 시멘트는 1980년대에 Brown 및 Chow에 의해 발견되었으며, 하기의 정의에 상응한다: "칼슘 포스페이트 시멘트는 수용액 및 하나 이상의 칼슘 포스페이트로 이루어진다. 함께 혼합될 때, 칼슘 포스페이트(들)은 용해되고, 덜 가용성인 칼슘 포스페이트 염으로서 침전된다. 침전되는 동안, 칼슘 포스페이트 결정은 확장되고 중첩되며, 이는 시멘트의 기계적 강도를 가져온다"(Bohner, M., Injury 2000, 31 Suppl. 4, 37-47).
- [0024] Kim의 문헌 [Kim, H. D. et al., Methods Mol Biol. 2004, 238, 49-64]에는, Etek 회사에서 개발된 시멘트인 알파-BSM의 BMP-2와의 용도에 대해 개시되어 있다. 이러한 신규한 제품은 실제로 매트릭스의 골-유도 활성을 야기한다.
- [0025] 그러나, 이러한 매트릭스로 도입된 BMP-2는 그의 활성의 대부분을 상실하며, 이는 혼입된 BMP-2의 양을 증가시켜야 되는 필요성을 가져온다. 따라서, 콜라겐 스폰지에서 사용되는 BMP-2의 20 μ g 대신에, BMP-2의 40 μ g의 양이 래트의 이소성 골의 형성 모델에 사용된다.
- [0026] 사실상, 시멘트는 두 가지 단점을 갖고 있다. 먼저, 그의 전구체인 칼슘 포스페이트(들)는 단백질에 부적합한

조건하에서 미리 합성되어야 한다. 따라서, 미국 특허 제5650176호에는 알파-BSM의 화합물 중 하나인 비정질 칼슘 포스페이트의 제조에 필요한 반응 조건이 개시되어 있다. 이러한 조건은 매우 많은 양의 수산화나트륨이 사용되기 때문에 단백질에 부적합하다. 또한, 이러한 제품은 질산칼슘과 같은 독성 화합물이 사용되기 때문에 격렬한 정제가 요구된다.

- [0027] Graftys 회사의 유럽 특허 제1891984 A1호에 기재된 것과 같은 시멘트의 다른 예들은 칼슘 포스페이트의 합성에 디클로로메탄이 사용되기 때문에, 단백질에 부적합한 조건하에서 획득된다. Lisopharm 회사의 미국 특허 제 2009/0155320호에 기재되어 있는 시멘트는 수산화칼슘의 존재하에서 획득되며, 이 또한 단백질에 부적합하다.
- [0028] 또한, 일반적으로 시멘트의 형성은 반응성이 되도록 400°C보다 높은 온도에서 처리된 고체 칼슘 포스페이트 염과 가용성 칼슘 포스페이트 염을 반응시킴으로써 획득된다. 상기 두 화합물 간의 반응은 제어되지 않고, 주로 발열성이며, 단백질을 벌크 형태로 격리시키는 일체식 구조의 시멘트를 야기한다.
- [0029] 미국 특허 제563461호에는, BMP-2의 화학적 안정성에 해로운지 여부에 대해서는 기재하지 않은 채, 고체에서 "반응성 구멍(reactive hole)"의 존재가 언급된다.
- [0030] 형성된 고체 덩어리에서 단백질의 손실을 감소시키기 위하여, 미국 특허 제5650176호에는 시멘트의 "일체식(monolithic)" 성질을 감소시킬 수 있는 비등성(effervescent) 화합물을 반응 혼합물에 첨가하는 것이 유리하다고 기재되어 있다.
- [0031] 이러한 개선점에도 불구하고, 이소성 래트의 모델에서 골 형성을 얻기 위해 요구되는 단백질의 양은 높은 채로 남아 있다는 것이 여전히 관찰된다.
- [0032] 혼합된 시스템과 관련하여, 이는 오늘에 이르기까지 상기 언급된 문제점들을 극복하도록 할 수 없었다.
- [0033] 요컨대, 합성 중합체, 천연 중합체 또는 무기 물질, 예컨대 칼슘 포스페이트 시멘트 또는 세라믹의 사용과 관련하여 선행기술에 기재되어 있는 시스템들은 골 회복에 적용하기 위해 부과되는 요구사항들을 완전히 충족시키지 못 한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0034] 본 출원인은 놀랍게도 골형성 단백질을 가용성 칼슘 염 및 가용성 포스페이트 염과 접촉하도록 위치시키는 것으로 이루어진 신규한 접근법을 개발하였으며, 이는 골 회복에 적용하기 위해 부과되는 요구사항들을 충족시킬 수 있다.
- [0035] 이러한 신규한 접근법은 한편으로는 존재하는 시약과의 접촉에 따른 임의의 화학적 분해를 피하면서 단백질을 침전시킬 수 있고, 다른 한편으로는 불용성 칼슘 염, 바람직하게는 칼슘 포스페이트와 함께 공침전시킬 수 있으며, 여기에서 상기 공침전은 분리된 상태에서 이루어지며, 이는 시멘트와 함께 관찰되는 고체 덩어리에서 손실을 매우 현저하게 제한한다.
- [0036] 따라서, 본 출원인은 하나 이상의 불용성 칼슘 염 및 골형성 단백질과 폴리사카라이드 사이의 하나 이상의 복합체를 포함하는 공침전물로 구성된, 신규한 골형성 조성물을 개발하였으며, 상기 공침전물은 분리된 형태이다.
- [0037] 이는 훨씬 더 적은 양의 단백질을 포함하는 매우 골형성성인 제제를 획득할 수 있게 한다.
- [0038] 따라서, 상기의 신규한 조성물은 환자에게 투여한 후에 부작용을 감소시키기 위하여 주요한 목적이 되는, 단백질을 더 적은 양으로 포함하는 이점을 갖는다.
- [0039] 또한, 상기 단백질은 매우 값비싸기 때문에, 단백질의 양을 감소시킴으로써 처리 비용의 감소를 가져올 수 있다.
- [0040] 본 출원인의 가특허출원 제61/129023호 및 제61/129617호는 공지되어 있으며, 여기에는 하나 이상의 골형성 단백질, 2가 양이온의 가용성 염 및 매트릭스를 포함하는 골형성 조성물이 기재되고 청구되어 있으며, 이의 전체 내용은 본 특허 출원에 참조로 삽입된다.
- [0041] 본 출원인의 가특허출원 제61/129011호 및 제61/129618호는 공지되어 있으며, 여기에는 하나 이상의 골형성 단백질, 하나 이상의 혈관형성 단백질, 2가 양이온의 가용성 염, 선택적으로 음이온성 폴리사카라이드 및 선택적으로 매트릭스를 포함하는 골형성 조성물이 기재되고 청구되어 있으며, 이의 전체 내용은 본 특허 출원에 참조

로 삽입된다.

- [0042] 본 출원인의 가특허출원 제61/129616호 및 제61/129012호에는 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체, 2가 이상의 양이온의 가용성 염 및 매트릭스를 포함하는 골형성 조성물이 기재되고 청구되어 있으며, 이의 전체 내용은 본 특허 출원에 참조로 삽입된다.
- [0043] 본 출원인의 미국 가특허출원 제61/193216호에는 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체, 2가 이상의 양이온의 가용성 염 및 히드로겔을 형성하는 중합체를 포함하는 골형성 조성물이 기재되고 청구되어 있으며, 이의 전체 내용은 본 특허 출원에 참조로 삽입된다.
- [0044] 2008년 11월 6일에 출원된 본 출원인의 미국 가특허출원 제61/193217호는 공지되어 있으며, 여기에는 하나 이상의 골형성 단백질, 2가 이상의 양이온의 가용성 염, 및 히드로겔을 형성하는 중합체를 포함하는 골형성 조성물이 기재되고 청구되어 있으며, 이의 전체 내용은 본 특허 출원에 참조로 삽입된다.
- [0045] 본 발명과 관련하여, 본 출원인은 또한 하나 이상의 불용성 칼슘 염 및 골형성 단백질과 폴리사카라이드 사이의 하나 이상의 복합체를 포함하는 분리된 형태의 공침전물의 제조방법을 개발하였다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 공침전물을 포함하는 제제, 약학적 제품, 및 의료 장치에 관한 것이다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 방법을 사용하기 위한 그리고 상기 공침전물을 수득하기 위한 조성물 및 키트에 관한 것이다.
- [0048] 공침전물은 하기에 의해 수득된다:
- [0049] - 칼슘 이온의 염의 용액의 첨가에 의해 음이온성 중합체와 골형성 단백질 사이의 복합체를 침전시키는 단계,
- [0050] - 특정 pH에서 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물의 첨가에 의해 칼슘 이온을 침전시키는 단계.
- [0051] 일구현예에서, 상기 공침전물은 동시의 침전으로부터 생성된다.
- [0052] 일구현예에서, 상기 공침전물은 순차적인 침전으로부터 생성된다.
- [0053] 음이온성 중합체와 골형성 단백질 사이의 복합체는 골형성 단백질 용액에 음이온성 폴리사카라이드 용액을 첨가함으로써 수득된다.
- [0054] 일구현예에서, 칼슘 염의 침전은 가용성 포스페이트 용액의 첨가에 의해 칼슘 포스페이트의 형태로 발생한다.
- [0055] 칼슘 포스페이트 염은 pH의 작용으로서 그리고 복합체를 구성하는 음이온성 폴리사카라이드 및 단백질의 작용으로서 다른 고체상을 가지기 때문에, 공침전물의 성질 및 형태는 접촉되는 용액의 pH의 작용에 따라 달라질 수 있다.
- [0056] 본 발명은 용해되지 않은 형태의 폴리사카라이드와 골형성 단백질 사이의 하나 이상의 복합체 및 하나 이상의 불용성 칼슘 염으로 이루어진 공침전물에 관한 것이며, 상기 공침전물은 분리된 형태이다.
- [0057] 일구현예에서, 이는 또한 화학주성(chemo-attracting) 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자를 포함한다.
- [0058] 일구현예에서, 불용성 칼슘 염은 무수물 또는 수화된 형태의 칼슘 오르토포스페이트 단독 또는 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0059] 일구현예에서, 상기 공침전물은 또한 옥살레이트 칼슘, 아스코르베이트 칼슘, 카보네이트 칼슘 및 셀페이트 칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 불용성 칼슘 염을 포함한다.
- [0060] 상기 불용성 칼슘 염은 양이온성 칼슘 이온과 음이온성 이온, 예컨대 일염기성, 이염기성 또는 삼염기성 포스페이트, 폴리사카라이드 카복실레이트, 카보네이트, 수산화물 및 염기에 의해 운반되는 가능한 음이온 사이에서 형성되는, 혼합된 염일 수 있다.
- [0061] 칼슘 오르토포스페이트는 칼슘 염에 의한 다양한 산도의 인산의 중화로부터 생성되는 염이며, 문헌에 따르면 pKa 값은 25°C에서 2.12 내지 12.67의 범위를 갖는다.
- [0062] 주요한 불용성 칼슘 오르토포스페이트는 디칼슘 포스페이트(DCP), 무수물 또는 이수화된, 옥타칼슘 포스페이트(OCP), 트리칼슘 포스페이트(TCP), 포스포칼슘(phosphocalcic) 히드록시아파타이트(HAP 또는 PCA), 및 테트라칼

슌 포스페이트(TTCP)이다.

- [0063] 음이온성 중합체/골형성 단백질 복합체는 본 출원인의 출원 PCT/EP2008/059832에 기재되어 있는 복합체로 구성된다.
- [0064] 이는 출원 FR 08 54621 및 61/129616에 기재된 것과 같은 가용성 칼슘 염의 첨가에 의해 불용성으로 된다.
- [0065] 원하는 효과의 작용으로서 이러한 공침전은 선택적으로는 pH를 미리 결정된 값으로 조절되도록 하는 염기의 존재하에서 수득된다.
- [0066] 이는 특히 조성물에 포함된 골형성 단백질의 운반을 제어할 수 있도록 하는, 분리된 형태의 고체 화학적 조성물을 수득할 수 있게 한다.
- [0067] 상기 분리된 형태의 고체 화학적 조성물은 실온 조건하에서 자발적으로 수득되며, 이의 분리된 상태는 생리학적인 시험관내 조건하에서 안정적이다.
- [0068] 일구현예에서, 본 발명은 적어도 하기를 포함하는 골형성 임플란트를 제조하기 위한 키트로 구성된다:
- [0069] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0070] b - 하나 이상의 폴리사카라이드를 포함하는 조성물,
- [0071] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0072] d - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물.
- [0073] 일구현예에서, 상기 키트는 또한 하나 이상의 염기를 포함하는 부가적 조성물을 포함한다.
- [0074] 일구현예에서, 제2의 염기가 조성물 b, c 또는 d에 첨가될 수 있다.
- [0075] 바이알(vial)의 개수를 감소시키기 위해, 상기 조성물들의 일부는 공침전물의 형성 이전에 혼합될 수 있다.
- [0076] 일구현예에서, 골형성 단백질을 포함하는 조성물은 복합체를 형성하기 위한 폴리사카라이드를 또한 포함할 수 있다.
- [0077] 골형성 단백질을 포함하는 조성물 또는 복합체를 포함하는 조성물은 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염 및/또는 염기를 포함할 수 있다.
- [0078] 일구현예에서, 폴리사카라이드를 포함하는 조성물은 또한 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염 및/또는 염기를 포함할 수 있다.
- [0079] 일구현예에서, 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물은 또한 염기를 포함할 수 있다.
- [0080] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0081] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0082] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- [0083] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0084] d - 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0085] 상기 구현예에서, 조성물 d의 염기와 동일하거나 상이할 수 있는 제2의 염기가 조성물 b 및 c에 첨가될 수 있다.
- [0086] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0087] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0088] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드를 포함하는 조성물,
- [0089] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물,
- [0090] d - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물.
- [0091] 상기 구현예에서, 조성물 c의 염기와 동일하거나 상이할 수 있는 제2의 염기가 조성물 b 및 d에 첨가될 수

있다.

- [0092] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0093] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0094] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물,
- [0095] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0096] d - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물.
- [0097] 상기 구현예에서, 조성물 b의 염기와 동일하거나 상이한 제2의 염기가 조성물 c 및 d에 첨가될 수 있다.
- [0098] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0099] a - 하나 이상의 골형성 단백질 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- [0100] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드를 포함하는 조성물,
- [0101] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0102] d - 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0103] 상기 구현예에서, 조성물 d의 염기와 동일하거나 상이할 수 있는 제2의 염기가 조성물 b 및 c에 첨가될 수 있다.
- [0104] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0105] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0106] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드를 포함하는 조성물,
- [0107] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0108] d - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0109] 상기 구현예에서, 조성물 d의 염기와 동일하거나 상이할 수 있는 제2의 염기가 조성물 b 및 c에 첨가될 수 있다.
- [0110] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0111] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0112] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- [0113] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0114] d - 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0115] 상기 구현예에서, 조성물 d의 염기와 동일하거나 상이할 수 있는 제2의 염기가 조성물 b 및 c에 첨가될 수 있다.
- [0116] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0117] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0118] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드, 하나 이상의 염기, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- [0119] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물.
- [0120] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0121] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이

온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물.

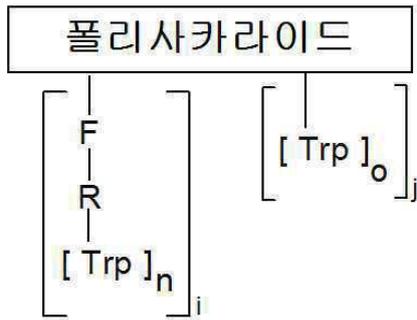
- [0122] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0123] c - 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0124] 상기 구현예에서, 조성물 c의 염기와 동일하거나 상이한 제2의 염기가 다른 조성물들에 첨가될 수 있다.
- [0125] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0126] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0127] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- [0128] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0129] 상기 구현예에서, 조성물 c의 염기와 동일하거나 상이한 제2의 염기가 조성물 b에 첨가될 수 있다.
- [0130] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0131] a - 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물,
- [0132] b - 하나 이상의 음이온성 폴리사카라이드, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- [0133] c - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물.
- [0134] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0135] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체를 포함하는 조성물,
- [0136] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물,
- [0137] c - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물.
- [0138] 상기 구현예에서, 조성물 b의 염기와 동일하거나 상이한 제2의 염기가 다른 조성물들에 첨가될 수 있다.
- [0139] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0140] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체를 포함하는 조성물,
- [0141] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0142] c - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물.
- [0143] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0144] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체를 포함하는 조성물,
- [0145] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물,
- [0146] c - 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염, 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0147] 상기 구현예에서, 조성물 c의 염기와 동일하거나 상이한 제2의 염기가 다른 조성물들에 첨가될 수 있다.
- [0148] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0149] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,
- [0150] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물.
- [0151] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0152] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체, 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염을 포함하는 조성물,

- [0153] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0154] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0155] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체, 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염, 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물,
- [0156] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염을 포함하는 조성물.
- [0157] 일구현예에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0158] a - 하나 이상의 골형성 단백질/음이온성 폴리사카라이드 복합체, 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 하나 이상의 가용성 염, 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물,
- [0159] b - 하나 이상의 가용성 칼슘 염 및 하나 이상의 염기를 포함하는 조성물.
- [0160] 일구현예에서, 하나 이상의 골형성 단백질을 포함하는 조성물은 또한 화학주성(chemo-attracting) 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자를 포함한다.
- [0161] 일구현예에서, 키트는 또한 하나 이상의 유기 매트릭스, 또는 미네랄 매트릭스, 또는 혼합된 매트릭스를 포함한다.
- [0162] 일구현예에서, 키트를 구성하는 조성물은 수용액이다.
- [0163] 일구현예에서, 키트를 구성하는 조성물은 동결건조물이다.
- [0164] 일구현예에서, 키트를 구성하는 조성물의 일부는 동결건조물이다.
- [0165] 상기 구현예에서, 상기 동결건조물은 물에 의해 또는 용액 중 다른 조성물의 하나에 의해 반응 전에 재수화된다.
- [0166] 따라서, 예를 들어 동결건조물 형태의 골형성 단백질을 포함하는 조성물은 음이온성 폴리사카라이드를 포함하는 용액에 의해, 또는 음이온성 폴리사카라이드 및 불용성 칼슘 염을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염 및/또는 염기를 포함하는 용액에 의해, 재수화될 수 있다.
- [0167] 일구현예에서, 상기 침전물을 포함하는 제제, 의료 장치 및 약학적 제품은 수성 현탁물이다.
- [0168] 일구현예에서, 상기 침전물을 포함하는 약학적 제제 및 제품은 동결건조물이다.
- [0169] 상기 구현예에서, 상기 동결건조물은 사용하기 전에 생리적 염류액 또는 혈액에 의해 재수화된다.
- [0170] "골형성 단백질"이라는 용어는 골형성 성장인자 또는 BMP, 단독 또는 치료적으로 활성인 BMP(골 형태형성 단백질)의 군으로부터 선택된 BMP와 조합된 것을 의미한다.
- [0171] 특히, 골형성 단백질은 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5가 단독 또는 조합되어 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0172] 사용되는 BMP는, 당업계의 통상의 기술자에게 공지된 기술에 따라 수득되거나 또는 Research Diagnostic Inc. (미국) 회사와 같은 공급자로부터 구입된 제조한 인간 BMP이다.
- [0173] "화학주성(chemo-attracting) 및 혈관형성 능력(angiogenic power)을 갖는 성장인자"라는 용어는 PDGF, 특히 PDGF-BB, VEGF 또는 FGF, 특히 FGF-2와 같은 단백질을 의미한다.
- [0174] 일구현예에서, 골형성 단백질은 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5로 이루어진 군으로부터 단독 또는 조합되어 선택되며, 화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자는 PDGF이다.
- [0175] 일구현예에서, 상기 조성물은 적어도 BMP-2 및 PDGF-BB를 포함한다.
- [0176] 일구현예에서, 상기 조성물은 적어도 BMP-7 및 PDGF-BB를 포함한다.
- [0177] 일구현예에서, 상기 조성물은 적어도 GDF-5 및 PDGF-BB를 포함한다.
- [0178] 일구현예에서, 골형성 단백질은 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5로 이루어진 군으로부터 단독 또는 조합되어 선택되며, 화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자는

VEGF이다.

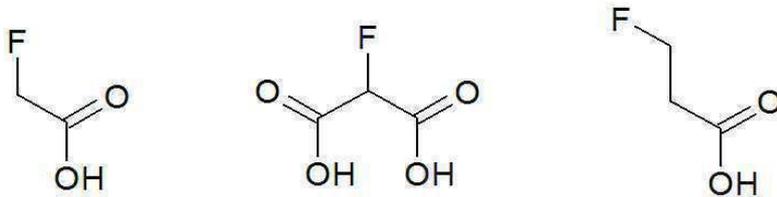
- [0179] 일구현예에서, 골형성 단백질은 BMP-2(디보테르민-알파), BMP-4, BMP-7(에프토테르민-알파), BMP-14 및 GDF-5로 이루어진 군으로부터 단독 또는 조합되어 선택되며, 화학주성 및 혈관형성 능력을 갖는 하나 이상의 성장인자는 FGF이다.
- [0180] 가용성 칼슘 염은 음이온이 클로라이드, D-글루코네이트, 포르메이트, D-사카레이트, 아세테이트, L-락테이트, 글루타메이트 및 아스파르테이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 칼슘 염이다.
- [0181] 일구현예에서, 가용성 칼슘 염은 염화칼슘이다.
- [0182] "칼슘 이온과 침전물을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염"이라는 용어는 음이온이 인산 이온 PO_4^{3-} , 인산수소 이온 HPO_4^{2-} 및 인산이수소 이온 $H_2PO_4^{-}$ 를 포함하는 포스페이트 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택되는 가용성 염이다.
- [0183] 일구현예에서, 옥살레이트, 아스코르베이트, 카보네이트 및 설페이트 음이온으로 이루어진 군으로부터 선택된 제2의 음이온이 포스페이트 음이온을 포함하는 조성물에 또한 첨가된다.
- [0184] 칼슘 이온과 침전물을 형성할 수 있는 음이온의 가용성 염은 인산나트륨, 옥살산나트륨, 아스코르브산나트륨, 탄산나트륨, 황산나트륨 및 탄산수소나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0185] "음이온성 폴리사카라이드"라는 용어는 소수성 유도체로 관능화된 폴리사카라이드의 군으로부터 선택된 폴리사카라이드를 의미한다.
- [0186] 일구현예에서, 상기 폴리사카라이드는 특허출원 FR 08/55567에 기재된 바와 같이 하나 이상의 트립토판 유도체로 관능화된, (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합을 주로 포함하는 폴리사카라이드 유도체의 군으로부터 선택된다.
- [0187] 상기 폴리사카라이드는 주로 (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다. 이는 중성, 즉 산 관능기를 운반하지 않는 것일 수 있으며, 또는 음이온성이고 산 관능기를 운반하는 것일 수 있다.
- [0188] 이는 Trp로 표시되는 하나 이상의 트립토판 유도체로 관능화된다:
- [0189] - 상기 트립토판 유도체는 산 관능기와 커플링(coupling)에 의해 폴리사카라이드에 그래프트되거나 연결되며, 상기 산 관능기는 관능기 F에 의해 폴리사카라이드에 연결된 링커(linker) R에 의해 운반되는 산 관능기 및/또는 음이온성 폴리사카라이드의 산 관능기일 수 있으며, 상기 관능기 F는 중성 또는 음이온성 폴리사카라이드의 관능기 -OH와 링커 R 사이의 커플링으로부터 생성된 것임,
- [0190] - F는 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 아마이드 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기, 에테르 관능기, 티오에테르 관능기 또는 아민 관능기임,
- [0191] - R은 탄소수 1 내지 18이고, 하나 이상의 헤테로원자, 예컨대 O, N 및/또는 S를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬임.
- [0192] - Trp는 트립토판의 아민과 R 기에 의해 운반되는 하나 이상의 산 및/또는 음이온성 폴리사카라이드에 의해 운반되는 하나 이상의 산 사이의 커플링에 의해 생성되는, L- 또는 D-트립토판 유도체의 잔기임.
- [0193] 본 발명에 따르면, 하나 이상의 트립토판 유도체로 관능화된, (1,4), (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합을 주로 포함하는 폴리사카라이드는 하기의 일반식 I에 해당할 수 있다:

[0194] [식 1]



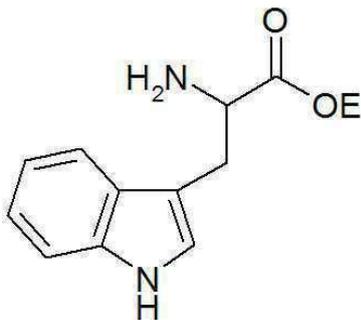
- [0195]
- [0196] 상기 식 중,
- [0197] 폴리사카라이드는 (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 주로 구성되며,
- [0198] · F는 중성 또는 음이온성 폴리사카라이드의 관능기 -OH와 링커 R 사이의 커플링으로부터 생성된 것이며, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 아마이드 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기, 에테르 관능기, 티오에테르 관능기 또는 아민 관능기이며,
- [0199] · R은 탄소수 1 내지 18이고, 하나 이상의 헤테로원자, 예컨대 O, N 및/또는 S를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,
- [0200] · Trp는 트립토판 유도체의 아민과 R 기에 의해 운반되는 하나 이상의 산 및/또는 음이온성 폴리사카라이드에 의해 운반되는 하나 이상의 산 사이의 커플링에 의해 생성되는, L- 또는 D-트립토판 유도체의 잔기이며,
- [0201] - n은 Trp로 치환된 R 기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 0.7이며,
- [0202] - o는 Trp로 치환된 폴리사카라이드의 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 0.7이며,
- [0203] - i는 사카라이드 단위 당 R 기에 의해 운반되는 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0 내지 2이며,
- [0204] - j는 사카라이드 단위 당 음이온성 폴리사카라이드에 의해 운반되는 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0 내지 1이며,
- [0205] - (i + j)는 사카라이드 단위 당 산 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.1 내지 2이며,
- [0206] - R이 Trp로 치환되지 않은 경우, R 기의 산(들)은 양이온 카복실레이트이고, 바람직하게는 Na 또는 K와 같은 알칼리금속의 양이온의 카복실레이트이며,
- [0207] - 폴리사카라이드가 음이온성 폴리사카라이드인 경우, 폴리사카라이드의 하나 이상의 산 관능기가 Trp로 치환되지 않을 때, 이는 양이온, 바람직하게는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 알칼리금속 양이온으로 염화되며,
- [0208] - 상기 폴리사카라이드는 중성 pH에서 양친매성(amphiphilic)임.
- [0209] 일구현예에서, F는 에스테르, 카보네이트, 카바메이트 또는 에테르이다.
- [0210] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,4) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0211] 일구현예에서, 주로 (1,4) 유형의 글리코시드 결합으로 구성되는 폴리사카라이드는 풀루란, 알기네이트, 히알루로난, 크실란, 갈락투로난 또는 수용성 셀룰로스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0212] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 풀루란이다.
- [0213] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 알기네이트이다.
- [0214] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 히알루로난이다.
- [0215] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 크실란(xylan)이다.
- [0216] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 갈락투로난(galacturonan)이다.

- [0217] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 수용성 셀룰로스이다.
- [0218] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0219] 일구현예에서, 주로 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성되는 폴리사카라이드는 커들란(curdlan)이다.
- [0220] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0221] 일구현예에서, 주로 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성되는 폴리사카라이드는 이눌린(inulin)이다.
- [0222] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,4) 및 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0223] 일구현예에서, 주로 (1,4) 및 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성되는 폴리사카라이드는 글루칸(glucan)이다.
- [0224] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,4) 및 (1,3) 및 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0225] 일구현예에서, 주로 (1,4) 및 (1,3) 및 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성되는 폴리사카라이드는 만난(mannan)이다.
- [0226] 일구현예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 R 기가 하기의 군 또는 이의 알칼리금속 양이온의 염으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다:



- [0227]
- [0228] 일구현예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 트립토판 유도체가 트립토판, 트립토판올, 트립토판아미드 및 2-인돌에틸아민, 및 이의 알칼리금속 양이온의 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0229] 일구현예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 트립토판 유도체가 하기 식 II의 트립토판 에스테르로부터 선택되는 것을 특징으로 한다:

[0230] [식 II]

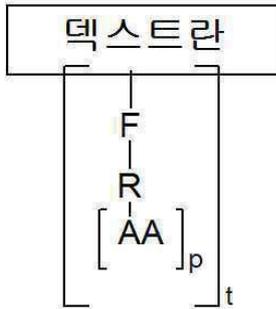


- [0231]
- [0232] 상기 식 중,
- [0233] E는 하기의 군으로부터 선택될 수 있음:
- [0234] - 선형 또는 분지형 C₁ 내지 C₈ 알킬;
 - [0235] - 선형 또는 분지형 C₆ 내지 C₂₀ 알킬아릴 또는 아릴알킬.
- [0236] 폴리사카라이드의 중합도 m은 10 내지 10000일 수 있다.
- [0237] 일구현예에서, 폴리사카라이드의 중합도 m은 10 내지 1000이다.
- [0238] 또다른 구현예에서, 폴리사카라이드의 중합도 m은 10 내지 500이다.

[0239] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 특허 출원 FR 07/02316에 기재된 바와 같이 트립토판 및 트립토판 유도체와 같은 소수성 아미노산으로 관능화된 텍스트란의 균으로부터 선택된다.

[0240] 본 발명에 따르면, 관능화된 텍스트란은 하기 일반식 III에 해당할 수 있다:

[0241] [식 III]



[0242]

[0243] 상기 식 중,

[0244] · R은 탄소수 1 내지 18이고, 하나 이상의 헤테로원자, 예컨대 O, N 및/또는 S를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,

[0245] · F는 중성 또는 음이온성 폴리사카라이드의 관능기 -OH와 링커 R 사이의 커플링으로부터 생성된 것이며, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 아마이드 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기, 에테르 관능기, 티오에테르 관능기 또는 아민 관능기이며,

[0246] · AA는 아미노산의 아민과 R 기에 의해 운반되는 산 사이의 커플링에 의해 생성된 소수성 L- 또는 D-아미노산 잔기이며,

[0247] - t는 글리코시드 단위 당 F-R-[AA]_p 치환기의 몰분율을 나타내고, 0.1 내지 2이며,

[0248] - p는 AA로 치환된 R 기의 몰분율을 나타내고, 0.05 내지 1이며,

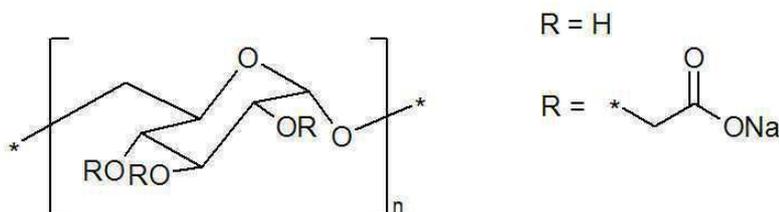
[0249] - R이 AA로 치환되지 않은 경우, R 기의 산(들)은 양이온, 바람직하게는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 알칼리금속 양이온의 카복실레이트이고, 상기 텍스트란은 중성 pH에서 양친매성임.

[0250] 일구현예에서, 알칼리금속 양이온은 Na⁺이다.

[0251] 일구현예에서, F는 에스테르, 카보네이트, 카바메이트 또는 에테르이다.

[0252] 일구현예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 하기 식 IV의 카르복시메틸 텍스트란 또는 이에 대응하는 산이다:

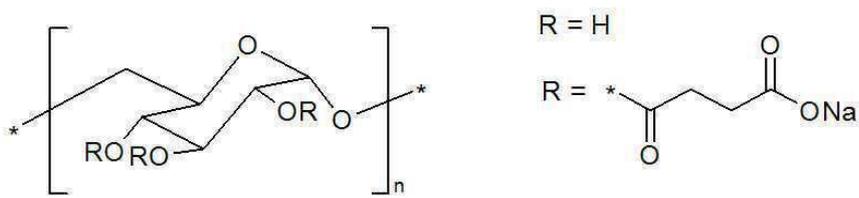
[0253] [식 IV]



[0254]

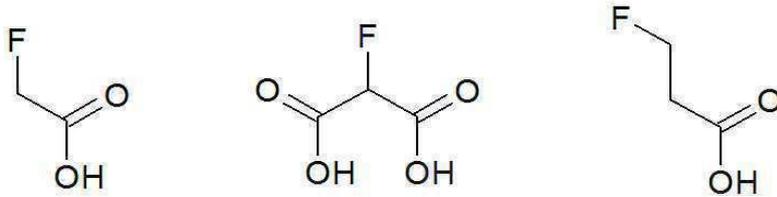
[0255] 일구현예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 하기 식 V의 텍스트란의 모노숙신산(monosuccinic) 에스테르 또는 이에 대응하는 산이다:

[0256] [식 V]



[0257]

[0258] 일구현예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 R 기가 하기의 군 또는 이의 알칼리금속 양이온 염으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다:



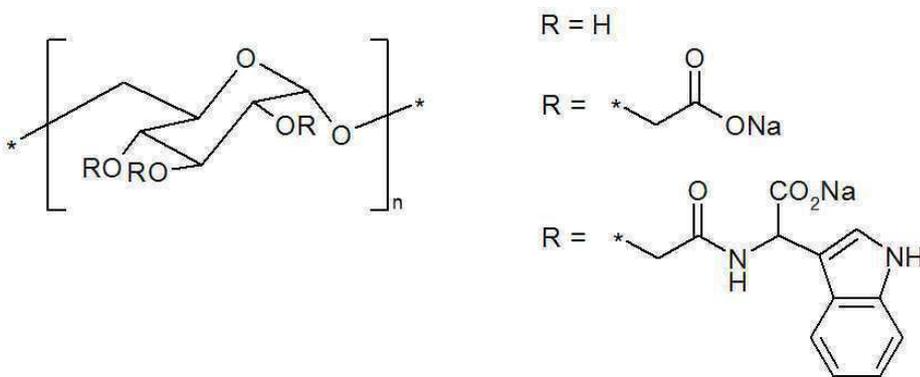
[0259]

[0260] 일구현예에서, 본 발명에 따른 텍스트란은 소수성 아미노산이 트립토판 유도체, 예컨대 트립토판, 트립토판올, 트립토판아미드 및 2-인돌에틸아민, 및 이의 알칼리금속 양이온 염으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0261] 일구현예에서, 본 발명에 따른 텍스트란은 트립토판 유도체가 상기 화학식 II의 트립토판 에스테르로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0262] 일구현예에서, 본 발명에 따른 텍스트란은 하기 식 VI의 트립토판으로 변형된 카르복시메틸 텍스트란이다:

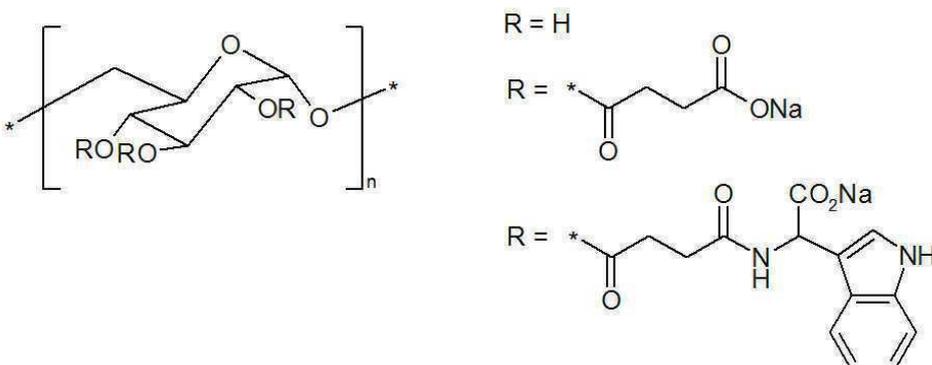
[0263] [식 VI]



[0264]

[0265] 일구현예에서, 본 발명에 따른 텍스트란은 하기 식 VII의 트립토판으로 변형된 텍스트란의 모노숙신산 (monosuccinic) 에스테르이다:

[0266] [식 VII]

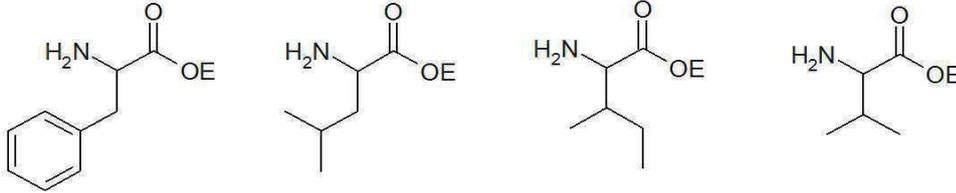


[0267]

[0268] 일구현예에서, 본 발명에 따른 텍스트란은 소수성 아미노산이 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 발린, 및 이의 알코올, 아마이드 또는 탈카르복실화된 유도체로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0269] 일구현예에서, 본 발명에 따른 텍스트란은 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 발린 유도체가 하기 식 VIII을 갖는, 상기 아미노산의 에스테르로부터 선택되는 것을 특징으로 한다:

[0270] [식 VIII]



[0271]

[0272] 식 중,

[0273] E는 상기 정의된 바와 같음.

[0274] 일구현예에서, 본 발명에 따른 텍스트란은 소수성 아미노산이 페닐알라닌, 또는 이의 알코올, 아마이드 또는 탈카르복실화된 유도체인 것을 특징으로 한다.

[0275] 텍스트란의 중합도 m은 10 내지 10000일 수 있다.

[0276] 일구현예에서, 텍스트란의 중합도 m은 10 내지 1000이다.

[0277] 또다른 구현예에서, 텍스트란의 중합도 m은 10 내지 500이다.

[0278] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 특허 출원 FR 08/05506에 기재된 것과 같은 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드의 군으로부터 선택되며, 이의 하나 이상은 Ah로 표시되는 소수성 알코올 유도체로 치환된다:

[0279] - 상기 소수성 알코올(Ah)은 커플링 암(coupling arm) R에 의해 음이온성 폴리사카라이드에 그래프트되거나 연결되며, 상기 커플링 암은 관능기 F'에 의해 음이온성 폴리사카라이드에 연결되며, 상기 관능기 F'은 링커(linker) R의 아민 관능기와 음이온성 폴리사카라이드의 카르복실 관능기 사이의 커플링으로부터 생성되며, 상기 커플링 암은 커플링 암의 카르복실, 이소시아네이트, 티오산 또는 알코올 관능기와 소수성 알코올의 관능기 사이의 커플링으로부터 생성되는 관능기 G에 의해 소수성 알코올에 결합되며, 비치환된 음이온성 폴리사카라이드의 카르복실 관능기는 양이온, 바람직하게는 Na^+ 또는 K^+ 와 같은 알칼리금속 양이온의 카복실레이트의 형태이고,

[0280] · F'는 아마이드 관능기이며,

[0281] · G는 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 카보네이트 관능기 또는 카바메이트 관능기이며,

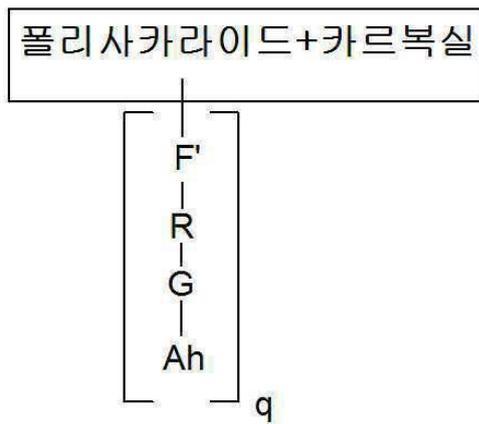
[0282] · R은 탄소수 1 내지 18이고, 선택적으로 하나 이상의 헤테로원자, 예컨대 O, N 및/또는 S를 포함하고, 하나 이상의 산 관능기를 갖는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬이며,

[0283] - Ah는 소수성 알코올의 히드록실 관능기와 R 기에 의해 운반되는 하나 이상의 친전자성 관능기 사이의 커플링에 의해 생성되는, 소수성 알코올의 잔기이며,

[0284] - 카르복실 관능기를 포함하는 상기 폴리사카라이드는 중성 pH에서 양친매성임.

[0285] 소수성 알코올로 부분 치환된 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드는 하기 일반식 IX의 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드로부터 선택된다:

[0286] [식 IX]



[0287]

[0288] 상기 식 중,

[0289] - q는 F'-R-G-Ah로 치환된 폴리사카라이드의 카르복실 관능기의 몰분율을 나타내고, 0.01 내지 0.7이며,

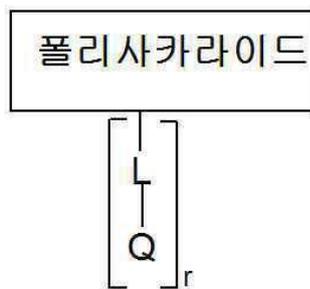
[0290] - F', R, G 및 Ah는 상기 기재된 정의에 대응하며,

[0291] - 폴리사카라이드의 카르복실 관능기가 F'-R-G-Ah로 치환되지 않은 경우, 폴리사카라이드의 카르복실 관능기(들)는 양이온, 바람직하게는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 알칼리금속 양이온의 카르복실레이트임.

[0292] 일구현예에서, 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드는 천연적으로 카르복실 관능기를 운반하는 폴리사카라이드이며, 알기네이트, 히알루로난 및 갈락투로난으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0293] 일구현예에서, 카르복실 관능기를 포함하는 폴리사카라이드는, 카르복실 관능기를 천연적으로 포함하는 폴리사카라이드로부터, 또는 하기 일반식 X의, 100개의 사카라이드 단위 당 15개 이상의 카르복실 관능기가 그래프트된 중성 폴리사카라이드로부터 획득되는 합성 폴리사카라이드이다:

[0294] [식 X]



[0295]

[0296] 상기 식 중,

[0297] - 천연 폴리사카라이드는 주로 (1,6) 및/또는 (1,4) 및/또는 (1,3) 및/또는 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성되는 폴리사카라이드의 군으로부터 선택되며,

[0298] - L은 링커(linker) Q와 폴리사카라이드의 관능기 -OH 사이의 커플링으로부터 생성되는 결합이고, 에스테르 관능기, 티오에스테르 관능기, 카보네이트 관능기, 카바메이트 관능기 또는 에테르 관능기이며,

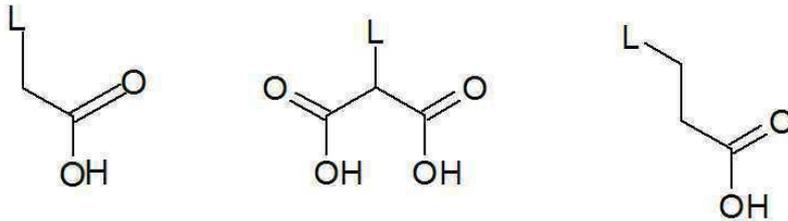
[0299] - r은 폴리사카라이드의 사카라이드 단위 당 치환체 L-Q의 몰분율을 나타내고,

[0300] - Q는 탄소수 1 내지 18이고, 하나 이상의 헤테로원자, 예컨대 O, N 및/또는 S를 포함하고, 하나 이상의 카르복실 관능기 -CO₂H를 포함하는, 선택적으로 분지형 및/또는 불포화인 사슬임.

[0301] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,6) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.

[0302] 일구현예에서, 주로 (1,6) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된 폴리사카라이드는 텍스트란이다.

- [0303] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,4) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0304] 일구현예에서, 주로 (1,4) 유형의 글리코시드 결합으로 구성되는 폴리사카라이드는 풀루란, 알기네이트, 히알루로난, 크실란, 갈락투로난 또는 수용성 셀룰로스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0305] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 풀루란이다.
- [0306] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 알기네이트이다.
- [0307] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 히알루로난이다.
- [0308] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 크실란이다.
- [0309] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 갈락투로난이다.
- [0310] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 수용성 셀룰로스이다.
- [0311] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0312] 일구현예에서, 주로 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된 폴리사카라이드는 커들란이다.
- [0313] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0314] 일구현예에서, 주로 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된 폴리사카라이드는 이놀린이다.
- [0315] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,4) 및 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0316] 일구현예에서, 주로 (1,4) 및 (1,3) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된 폴리사카라이드는 글루칸이다.
- [0317] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 주로 (1,4) 및 (1,3) 및 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된다.
- [0318] 일구현예에서, 주로 (1,4) 및 (1,3) 및 (1,2) 유형의 글리코시드 결합으로 구성된 폴리사카라이드는 만난이다.
- [0319] 일구현예에서, 본 발명에 따른 폴리사카라이드는 Q 기가 하기의 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다:



- [0320]
- [0321] 일구현예에서, r은 0.1 내지 2이다.
- [0322] 일구현예에서, r은 0.2 내지 1.5이다.
- [0323] 일구현예에서, 본 발명에 따른 R 기는 아미노산으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0324] 일구현예에서, 아미노산은 α -아미노산으로부터 선택된다.
- [0325] 일구현예에서, α -아미노산은 천연 α -아미노산으로부터 선택된다.
- [0326] 일구현예에서, 천연 α -아미노산은 류신, 알라닌, 이소류신, 글리신, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린으로부터 선택된다.
- [0327] 일구현예에서, 소수성 알코올은 지방 알코올로부터 선택된다.
- [0328] 일구현예에서, 소수성 알코올은 4 내지 18개의 탄소를 포함하는 포화 또는 불포화 알킬쇄로 이루어진 알코올로부터 선택된다.
- [0329] 일구현예에서, 지방 알코올은 미리스틸 알코올, 세틸 알코올, 스테아릴 알코올, 세테아릴 알코올, 부틸 알코올, 올레일 알코올 및 라놀린으로부터 선택된다.
- [0330] 일구현예에서, 소수성 알코올은 콜레스테롤 유도체로부터 선택된다.
- [0331] 일구현예에서, 콜레스테롤 유도체는 콜레스테롤이다.

- [0332] 일구현예에서, 소수성 알코올 Ah는 토코페롤로부터 선택된다.
- [0333] 일구현예에서, 토코페롤은 α -토코페롤이다.
- [0334] 일구현예에서, α -토코페롤은 α -토코페롤의 라세미체이다.
- [0335] 일구현예에서, 소수성 알코올은 아릴기를 포함하는 알코올로부터 선택된다.
- [0336] 일구현예에서, 아릴기를 포함하는 알코올은 벤질 알코올 및 펜에틸 알코올로부터 선택된다.
- [0337] 폴리사카라이드의 중합도 m은 10 내지 10000일 수 있다.
- [0338] 일구현예에서, 폴리사카라이드의 중합도 m은 10 내지 1000이다.
- [0339] 또다른 구현예에서, 폴리사카라이드의 중합도 m은 10 내지 500이다.
- [0340] 일구현예에서, 폴리사카라이드는 트립토판으로 관능화된 텍스트란, 옥탄올 페닐알라니네이트로 관능화된 텍스트란, 옥탄올 글리시네이트로 관능화된 텍스트란, 도데칸올 글리시네이트로 관능화된 텍스트란 또는 트립토판 에틸 에스테르로 관능화된 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0341] 혼합물 내 존재하는 산성 화합물을 중화시키기 위하여, 염기는 미네랄(mineral) 또는 유기 염기로부터 선택된다.
- [0342] 미네랄 염기로서, 수산화나트륨, 탄산수소나트륨 및 탄산나트륨이 언급될 수 있다.
- [0343] 유기 염기로서, 아민 및 탈양성자화된(deprotonated) 아미노산이 언급될 수 있다.
- [0344] 유기 염기로서, 이미다졸 및 이의 유도체, 특히 히스티딘, 프롤린, 에탄올아민 및 세린이 언급될 수 있다.
- [0345] 일구현예에서, 회복을 촉진시키기 위해 유기 매트릭스가 사용될 수 있으며, 이는 정제되고 멸균되고 가교결합된 천연 콜라겐에 기초한 매트릭스로부터 선택된다.
- [0346] 천연 중합체, 예컨대 콜라겐은 세포 부착, 이동 및 분화를 촉진하는 세포외 매트릭스의 성분이다. 이는 매우 생체적합성인 점에서 이점을 가지며, 효소 소화 메카니즘에 의해 분해된다. 콜라겐-기재 매트릭스는 소 또는 돼지의 힘줄 또는 뼈에서 추출된 유형 I 또는 IV의 섬유성 콜라겐으로부터 수득된다. 이러한 콜라겐은 가교결합되고 멸균되기 전에 먼저 정제된다.
- [0347] 이는 또한 자가 골의 산성 매질에서 재흡수에 의해 수득될 수 있으며, 이는 미네랄화된 성분의 대부분의 손실을 가져오지만 성장인자를 포함하는 콜라겐 단백질 또는 비콜라겐 단백질을 보존한다. 상기 탈회된 매트릭스는 또한 카오트로픽제(chaotropic agent)로 추출한 후에 불활성 형태에서 제조될 수 있다. 이러한 매트릭스는 본질적으로 유형 I의 불용성이고 가교결합된 콜라겐으로 구성된다.
- [0348] 혼합된 물질, 예를 들어 콜라겐과 무기 입자를 조합한 매트릭스가 또한 사용될 수 있다. 상기 물질은 강화된 기계적 성질을 갖는 조성물질의 형태이거나 또는 콜라겐이 결합제로서 작용하는 "퍼티(putty)"의 형태일 수 있다.
- [0349] 사용될 수 있는 무기 물질은 칼슘 포스페이트-기재 세라믹, 예컨대 히드록시아파타이트(HA), 트리칼슘 포스페이트(TCP), 이상성(biphasic) 칼슘 포스페이트(BCP) 또는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP)에 기초한 세라믹을 필수적으로 포함하며, 이의 주요 장점은 뼈의 조성과 매우 유사한 화학 조성을 갖는다는 것이다. 상기 물질은 기계적 성질이 우수하며, 면역학적으로 불활성이다. 상기 물질은 다양한 형태, 예컨대 분말, 과립 또는 블록의 형태일 수 있다. 상기 물질은 그의 조성에 따라 분해 속도가 매우 상이하며; 이에 따라 히드록시아파타이트는 매우 느리게(수 개월) 분해하는 반면, 트리칼슘 포스페이트는 매우 빠르게(수 주) 분해한다. 이상성 칼슘 포스페이트는 중간 정도의 재흡수 속도를 갖기 때문에, 이러한 목적을 위해 개발되었다. 상기 무기 물질은 주로 골전도성 인 것으로 알려져 있다.
- [0350] 일구현예에서, 유기 매트릭스는 가교결합된 히드로겔이다.
- [0351] 가교결합된 히드로겔은 중합체 사슬을 가교결합함으로써 획득된다. 사슬간의 공유결합은 유기 매트릭스를 한정한다. 유기 매트릭스를 구성하기 위해 사용될 수 있는 중합체는, 제목이 생물의학적 적용을 위한 히드로겔인 Hoffman의 문헌(Adv. Drug Deliv. Rev, 2002, 43, 3-12)에 기재되어 있다.
- [0352] 일구현예에서, 임플란트는 가교결합되지 않은 히드로겔을 포함할 수 있다.
- [0353] "가교결합되지 않은 히드로겔"이라는 용어는 다량의 물 또는 생물학적 유체를 흡착할 수 있는 친수성의 삼차원

중합체 망을 의미한다(Peppas et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000, 50, 27-46). 이러한 히드로겔은 물리적 상호작용으로 이루어지며, 따라서 중합체 사슬의 화학적 가교결합에 의해 수득되지 않는다.

- [0354] 히드로겔을 형성하는 중합체의 목록은 매우 길며, 제목이 생물의학적 적용을 위한 히드로겔인 Hoffman의 문헌 (Adv. Drug Deliv. Rev, 2002, 43, 3-12)에 크지만 완전하지 않은 목록이 기재되어 있다. 상기 중합체에는 합성 중합체 및 천연 중합체가 있다. 히드로겔을 형성하는 폴리사카라이드에 대한 또다른 문헌은 본 발명에 유용한 중합체를 선택할 수 있게 한다(Alhaique et al. J. Control. Release, 2007, 119, 5-24).
- [0355] 일구현예에서, 히드로겔을 형성하는 중합체는 에틸렌 글리콜 및 락트산의 공중합체, 에틸렌 글리콜 및 글리콜산의 공중합체, 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리비닐산, 폴리아크릴아미드 및 폴리아크릴산을 포함하는 합성 중합체의 군으로부터 선택된다.
- [0356] 일구현예에서, 히드로겔을 형성하는 중합체는 히알루론산, 케라탄, 풀루란, 펙틴, 텍스트란, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 알긴산, 잔탄, 카라기닌, 키토산, 콘드로이틴, 콜라겐, 젤라틴, 폴리리신, 피브린, 및 이의 생물학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 천연 중합체의 군으로부터 선택된다.
- [0357] 일구현예에서, 천연 중합체는 히알루론산, 알긴산, 텍스트란, 펙틴, 셀룰로스 및 이의 유도체, 풀루란, 잔탄, 카라기닌, 키토산, 콘드로이틴, 및 이의 생물학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 히드로겔을 형성하는 폴리사카라이드의 군으로부터 선택된다.
- [0358] 일구현예에서, 천연 중합체는 히알루론산, 알긴산, 및 이의 생물학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 히드로겔을 형성하는 폴리사카라이드의 군으로부터 선택된다.
- [0359] 일구현예에서, 히드로겔은 이식 또는 주입 직전에 제조될 수 있다.
- [0360] 일구현예에서, 히드로겔은 제조된 후 미리 제조된 주사기에 저장된 이후에 이식 또는 주입될 수 있다.
- [0361] 일구현예에서, 히드로겔은 이식 또는 주입 직전에 동결건조물의 재수화에 의해 제조될 수 있거나, 또는 탈수된 형태로 이식될 수 있다.
- [0362] 사용될 수 있는 다양한 매트릭스에는, 콜라겐 스폰지, 예컨대 Helistat[®](Integra LifeSciences, Plainsboro, New Jersey), DBM(탈회골 매트릭스) 단독, 또는 폴리사카라이드, 글리세롤 또는 젤라틴, 예컨대 Osteofil[®](Medtronic), Allomatrix[®](Wright), Grafton[®](Osteotech), DBX[®](MTF/Synthes), Bioset[®](Regeneration Technologies)과 같은 다른 유기 물질들과의 혼합물, Vitoss[®](Orthivista), Osteoset[®](Wright)과 같은 미네랄 상으로 구성된 매트릭스, 또는 혼합된 매트릭스, 예컨대 MasterGraft[®](Medtronic), Healos[®](Depuy Spine), CopiOs[®](Zimmer), Sunmax Collagen Bone Graft Matrix(Sunmax)가 예로서 언급될 수 있다.
- [0363] 공침전물의 형성 후의 시스템(system)은 두 개의 상, 즉 액체상 및 고체상으로 이루어진다.
- [0364] 본 명세서의 다른 부분에서, 부피의 개념이 사용될 때, 이는 두 개의 상을 포함하는 전체 부피를 나타낸다.
- [0365] 다양한 형태의 키트의 조성물과 함께 혼합한 후에 생성된 생성물에서 단위 부피 당 양은 하기에 주어지며, 이는 혼합된 매트릭스 또는 미네랄 매트릭스가 사용되는 경우 매트릭스로부터 유래된 칼슘 이온 또는 포스페이트 이온의 양을 포함하지 않는다.
- [0366] 일구현예에서, 단위 부피 당 다양한 단백질의 전체 양은, 수득된 현탁액(suspension)의 ml 당 0.01 mg 내지 2 mg, 바람직하게는 0.05 mg 내지 1.5 mg, 더 바람직하게는 0.1 mg 내지 1.5 mg이다.
- [0367] 단위 부피 당 포스페이트의 전체 양은 수득된 현탁액의 ml 당 0.02 mmol 내지 0.5 mmol, 바람직하게는 0.05 내지 0.25 mmol이다.
- [0368] 단위 부피 당 칼슘의 전체 양은 단위 부피 당 0.01 mmol 내지 1 mmol, 바람직하게는 0.05 내지 1 mmol, 더 바람직하게는 0.1 mmol 내지 0.5 mmol이다.
- [0369] 고체상 중 칼슘 이온의 백분율은 도입된 칼슘 이온의 60% 내지 95%이다.
- [0370] 단위 부피 당 폴리사카라이드의 전체 양은 수득된 현탁액의 ml 당 1 내지 100 mg, 바람직하게는 2 내지 40 mg이다. 고체상 중 폴리사카라이드의 백분율은 도입된 폴리사카라이드의 80%보다 더 높다.

- [0371] 사용되는 염기의 양은 포스페이트 이온에 의해 제공되는 양성자에 대해 약 0.1 내지 2 등가(equivalent)에 상응한다.
- [0372] 조성물의 수 및 사용되는 부피를 사용하여, 출발 조성물에서 사용되는 양을 계산에 의해 결정할 수 있다. 이는 키트의 다양한 구현예들을 위해 수행될 수 있다.
- [0373] 일구현예에서, 척추 임플란트에 대해, 골형성 성장인자의 용량은 0.01 mg 내지 20 mg, 바람직하게는 0.05 mg 내지 8 mg, 바람직하게는 0.1 mg 내지 4 mg, 더 바람직하게는 0.1 mg 내지 2 mg인 반면, 문헌에서 통상적으로 받아들여지는 용량은 8 내지 12 mg이다.
- [0374] 일구현예에서, 척추 임플란트에 대해, 혈관형성 성장인자의 용량은 0.05 mg 내지 8 mg, 바람직하게는 0.1 mg 내지 4 mg, 더 바람직하게는 0.1 mg 내지 2 mg가 될 것이다.
- [0375] 일구현예에서, 본 발명에 따른 공침전물을 포함하는 임플란트의 제제에 대해, 세 개의 바이알(vial)을 포함하는 키트가 제조되며, 상기 바이알은 하기를 포함한다:
- [0376] 첫째, 동결건조 형태의 골형성 단백질 2 내지 10 mg,
- [0377] 둘째, 10 내지 50 mg/ml의 농도의 폴리사카라이드 및 0.15 내지 0.50 M의 농도의 인산수소나트륨 Na_2HPO_4 와 인산이수소나트륨 NaH_2PO_4 의 등물 혼합물의 용액 2 내지 6 ml,
- [0378] 셋째, 0.25 내지 0.90 M의 농도의 염화칼슘 용액 2 내지 6 ml.
- [0379] 일구현예에서, 제2의 바이알은 또한 0.05 내지 0.8 M의 농도의 중탄산나트륨 용액을 포함한다.
- [0380] 일구현예에서, 제2 및 제3의 바이알은 또한 0.02 내지 0.2 M의 농도의 히스티딘 용액을 포함한다.
- [0381] 일구현예에서, 제3의 바이알은 또한 0.05 내지 0.3 M의 농도의 프롤린 용액을 포함한다.
- [0382] 상기 용액들은 이식 전에 동시에 또는 순차적으로 15 내지 30 ml의 부피를 갖는 콜라겐 스폰지에 첨가된다.
- [0383] 일구현예에서, 본 발명에 따른 공침전물을 포함하는 임플란트의 제제에 대해, 세 개의 용액이 함께 혼합되며, 이는 하기를 포함한다:
- [0384] 첫째, 0.33 내지 2 mg/ml의 농도의 골형성 단백질을 포함하는 1 내지 3 ml의 부피,
- [0385] 둘째, 5 내지 15 mg/ml의 농도의 폴리사카라이드 및 0.05 내지 0.15 M의 농도의 인산수소나트륨 Na_2HPO_4 와 인산이수소나트륨 NaH_2PO_4 의 등물 혼합물을 포함하는 1 내지 3 ml의 부피,
- [0386] 셋째, 0.25 내지 0.50 M의 농도의 염화칼슘을 포함하는 1 내지 3 ml의 부피.
- [0387] 일구현예에서, 0.20 내지 0.4 M의 농도의 중탄산나트륨 용액이 수득된 혼합물에 첨가된다.
- [0388] 일구현예에서, 0.02 내지 0.15 M의 농도의 히스티딘 용액이 수득된 혼합물에 첨가된다.
- [0389] 일구현예에서, 0.05 내지 0.3 M의 농도의 프롤린 용액이 수득된 혼합물에 첨가된다.
- [0390] 본 발명에 따른 공침전물을 포함하는 혼합물은 그 후 동결건조된다.
- [0391] 사용시에, 이는 최초 부피의 약 35%까지 주사가능 물 및/또는 혈액으로 재수화된다.
- [0392] 또한, 본 발명은 이식에 의한 본 발명의 조성물의 용도, 예를 들어 골 결손을 충전하기 위한 용도, 척추 융합 또는 악안면 회복을 수행하기 위한 용도, 또는 특히 가관절 유형의 골절을 치료하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0393] 또한, 본 발명은 골 결손, 특히 골다공증에 의해 야기된 것, 및 경피적으로 치료될 수 있는 임의의 다른 병적 측면을 치료하기 위한, 주사에 의한 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0394] 또한, 본 발명은 골 임플란트로서 본 발명에 따른 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0395] 일구현예에서, 상기 조성물은 척추 인공삽입물 또는 척추 융합 케이지(cage) 유형의 인공장치와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0396] 또한, 본 발명은 골 재건에서 상기 조성물을 사용하는 치료 및 수술 방법에 관한 것이다.
- [0397] 상기의 다양한 치료적 용도에 있어서, 매트릭스의 크기 및 골형성 성장인자의 양은 처치되는 부위의 부피에 의

존한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0398] 본 발명의 다양한 구현예들의 실시예가 하기에 주어진다.
- [0399] 키트의 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.
- [0400] **실시예 1: 5개의 바이알(vial)을 포함하는 키트의 제조**
- [0401] 키트 1: 5개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 중합체를 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 염기를 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0402] **실시예 2: 4개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0403] 키트 2: 4개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 중합체를 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0404] **실시예 3: 4개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0405] 키트 3: 4개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 중합체 및 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 염기를 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0406] **실시예 4: 4개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0407] 키트 4: 4개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 중합체를 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염 및 염기를 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0408] **실시예 5: 4개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0409] 키트 5: 4개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질과 중합체 사이의 복합체를 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 염기를 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0410] **실시예 6: 3개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0411] 키트 6: 3개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 중합체 및 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염 및 염기를 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0412] **실시예 7: 3개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0413] 키트 7: 3개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질을 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 중합체 및 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염을 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0414] **실시예 8: 3개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0415] 키트 8: 3개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질과 중합체 사이의 복합체를 포함하는 바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염 및 염기를 포함하는 바이알이 포함된다.
- [0416] **실시예 9: 3개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**
- [0417] 키트 9: 3개 바이알의 키트에는, 동결건조 또는 용액 형태의 골형성 단백질과 중합체 사이의 복합체를 포함하는

바이알, 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염을 포함하는 바이알이 포함된다.

[0418] **실시예 10: 2개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**

[0419] 키트 10: 2개 바이알의 키트에는, 골형성 단백질과 동결건조 중합체 사이의 복합체 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염을 포함하는 바이알이 포함된다.

[0420] **실시예 11: 2개의 바이알을 포함하는 키트의 제조**

[0421] 키트 11: 2개 바이알의 키트에는, 골형성 단백질과 동결건조 중합체 사이의 복합체 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 포스페이트 염을 포함하는 바이알, 및 동결건조 또는 용액 형태의 가용성 칼슘 염 및 염기를 포함하는 바이알이 포함된다.

[0422] 중합체 합성의 실시예들이 비제한적으로서 주어진다.

[0423] **실시예 12: 트립토판으로 관능화된 텍스트란의 제조**

[0424] 중합체 1은, 특허출원 FR 07/02316에 기재된 방법에 따라, 중량평균몰질량이 40 kg/mol인 텍스트란 (Pharmacosmos)으로부터 수득되는, L-트립토판의 나트륨 염으로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨 텍스트란이다. 트립토판으로 변형되거나 변형되지 않은 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 III의 t는 1.03이다. 트립토판으로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 III의 p는 0.36이다.

[0425] **실시예 13: 옥탄올 페닐알라니네이트로 관능화된 텍스트란의 제조**

[0426] 중합체 2는, 특허출원 PCT/IB2009007054에 기재된 방법에 따라, 중량평균몰질량이 40 kg/mol인 텍스트란 (Pharmacosmos)으로부터 수득되는, L-페닐알라닌의 옥탄산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨 텍스트란이다. L-페닐알라닌의 옥탄산 에스테르로 변형되거나 변형되지 않은 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 X의 r은 1.11이다. L-페닐알라닌의 옥탄산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 IX의 q는 0.09이다.

[0427] 제조 결과 중합체 2의 용액은 30.45 mg/mL이다.

[0428] **실시예 14: 옥탄올 글리시네이트로 관능화된 텍스트란의 제조**

[0429] 중합체 3은, 특허출원 FR 08/05506에 기재된 방법에 따라, 중량평균몰질량이 40 kg/mol인 텍스트란 (Pharmacosmos)으로부터 수득되는, L-글리신의 옥탄산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨 텍스트란이다. L-글리신의 옥탄산 에스테르로 변형되거나 변형되지 않은 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 X의 r은 1.09이다. L-글리신의 옥탄산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 IX의 q는 0.22이다.

[0430] **실시예 15: 트립토판으로 관능화된 텍스트란의 제조**

[0431] 중합체 4는, 특허출원 FR 07/02316에 기재된 방법에 따라, 중량평균몰질량이 70 kg/mol인 텍스트란 (Pharmacosmos)으로부터 수득되는, L-트립토판의 나트륨 염으로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨 텍스트란이다. 트립토판으로 변형되거나 변형되지 않은 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 III의 t는 1.14이다. 트립토판으로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 III의 p는 0.41이다.

[0432] **실시예 16: 옥탄올 페닐알라니네이트로 관능화된 텍스트란의 제조**

[0433] 중합체 5는, 특허출원 FR 08/05506에 기재된 방법에 따라, 중량평균몰질량이 40 kg/mol인 텍스트란 (Pharmacosmos)으로부터 수득되는, L-페닐알라닌의 옥탄산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨 텍스트란이다. L-페닐알라닌의 옥탄산 에스테르로 변형되거나 변형되지 않은 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 X의 r은 1.12이다. L-페닐알라닌의 옥탄산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨의 몰분율, 즉 본 특허출원의 식 IX의 q는 0.22이다.

[0434] **실시예 17: 도데칸올 글리시네이트로 관능화된 텍스트란의 제조**

[0435] 중합체 6은, 특허출원 FR 08/05506에 기재된 방법에 따라, 중량평균몰질량이 40 kg/mol인 텍스트란

(Pharmacosmos)으로부터 수득되는, L-글리신의 도데칸산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨 텍스트란이다. L-페닐글리신의 도데칸산 에스테르로 변형되거나 변형되지 않은 메틸카복실레이트 나트륨의 물분율, 즉 본 특허출원의 식 X의 r은 1.04이다. L-글리신의 도데칸산 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨의 물분율, 즉 본 특허출원의 식 IX의 q는 0.13이다.

- [0436] **실시예 18: 트립토판의 에틸 에스테르로 관능화된 텍스트란의 제조**
- [0437] 중합체 7은, 특허출원 FR 07/02316에 기재된 방법에 따라, 중량평균몰질량이 40 kg/mol인 텍스트란 (Pharmacosmos)으로부터 수득되는, L-트립토판의 에틸 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨 텍스트란이다. 트립토판의 에틸 에스테르로 변형되거나 변형되지 않은 메틸카복실레이트 나트륨의 물분율, 즉 본 특허출원의 식 III의 t는 1.09이다. 트립토판의 에틸 에스테르로 변형된 메틸카복실레이트 나트륨의 물분율, 즉 본 특허출원의 식 III의 p는 0.47이다.
- [0438] **실시예 19: 트립토판으로 관능화된 텍스트란의 용액의 제조**
- [0439] 중합체 1의 농축 용액은 35.24 g의 물에 9.13 g의 중합체 1의 동결건조물(약 25%의 물함량)을 용해시킴으로써 제조된다. 상기 용액은 30분 동안 교반된다. 중합체 1의 농도는 162.9 mg/g이며, 이는 건조 추출물에서 결정된다. 밀도는 1.08이다. 따라서, 중합체 1의 농도는 175.9 mg/mL이다.
- [0440] **실시예 20: 옥탄올 페닐알라니네이트로 관능화된 텍스트란의 용액의 제조**
- [0441] 40 mg/g의 중합체 2의 용액은 64 g의 물에 3.12 g의 중합체 2의 동결건조물(14%의 물함량)을 용해시킴으로써 제조된다.
- [0442] **실시예 21: 옥탄올 글리시네이트로 관능화된 텍스트란의 용액의 제조**
- [0443] 38 mg/g의 중합체 3의 용액은 100 g의 물에 3.95 g의 중합체 3의 동결건조물(4%의 물함량)을 용해시킴으로써 제조된다.
- [0444] 골형성 단백질의 용액 또는 동결건조물의 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.
- [0445] **실시예 22: 1 mM HCl 완충액(buffer) 중 rhBMP-2의 용액**
- [0446] rhBMP-2의 0.15 mg/ml 용액의 10 mL는 1 mM HCl 용액 10 mL를 1.5 mg의 동결건조 rhBMP-2에 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0447] **실시예 23: Infuse 완충액 중 rhBMP-2의 용액**
- [0448] 1 L의 InFUSE 완충액은 800 mL의 물로 채워진 1 L 눈금 플라스크에 5 g의 수크로스, 25 g의 글리신, 3.72 g의 글루탐산, 0.11 g의 염화나트륨 및 0.11 g의 폴리소르베이트 80을 용해시킴으로써 제조된다. 그 후, 상기 용액의 pH는 16.8 mL의 1 N 수산화나트륨을 첨가함으로써 4.5까지 조절된다. 마지막으로, 상기 눈금 플라스크는 눈금선까지 채워져 Infuse 완충액이 수득된다. InFUSE 완충액 중 1.5 mg/ml의 rhBMP-2 용액 1 mL는 1 mL의 완충액을 1.5 mg의 동결건조 rhBMP-2에 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0449] 상기 용액은 또한 동결건조될 수 있다.
- [0450] **실시예 24: 10 mM HCl 완충액 중 rhBMP-7의 용액**
- [0451] 3.8 mg/ml의 rhBMP-7 용액은 1 mM HCl 용액 1 mL를 3.8 mg의 동결건조 rhBMP-7에 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액의 pH는 2.2이다. 상기 용액은 실온에서 15분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0452] **실시예 25: pH 3.5 5% 락토스 완충액 중 rhBMP-7의 용액**
- [0453] 3.8 mg/ml의 rhBMP-7 용액은, 1 M HCl을 첨가함으로써 pH가 3.5로 맞춰진 5% 락토스 용액 7.8 mL를 30.3 mg의 동결건조 rhBMP-7에 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액의 pH는 3.5이다. 상기 용액은 실온에서 15분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0454] **실시예 26: 10 mM HCl 완충액 중 rhGDF-5의 용액**
- [0455] 1.5 mg/ml의 rhGDF-5 용액 1 mL는 10 mM HCl 용액 1 mL를 1.5 mg의 동결건조 rhGDF-5에 첨가함으로써 제

조된다. 상기 용액은 4℃에서 2시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.

- [0456] 가용성 포스페이트 염의 용액 제조의 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.
- [0457] **실시예 27: 인산나트륨 용액**
- [0458] 1 M 인산나트륨 용액은 눈금 플라스크에서 무수물 인산수소나트륨 및 인산이수소나트륨의 등몰 혼합물(Sigma)로부터 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0459] 더 희석된 인산나트륨 용액은 상기 기재된 모액(stock solution)으로부터 제조된다.
- [0460] 가용성 칼슘 염의 용액 제조의 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.
- [0461] **실시예 28: 2 M 염화칼슘 용액**
- [0462] 용액 1: 2 M 염화칼슘 용액은 눈금 플라스크에서 무수물 또는 이수화된 염화칼슘(Sigma)으로부터 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0463] **실시예 29: 0.75 M 염화칼슘 용액**
- [0464] 용액 2: 0.75 M 염화칼슘 용액은 이전 실시예에 기재되어 있는 2 M 염화칼슘 용액을 희석함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0465] **실시예 30: 0.75 M 아세테이트 칼슘 용액**
- [0466] 용액 3: 0.75 M 아세테이트 칼슘 용액은 눈금 플라스크에서 아세테이트 칼슘(Sigma)으로부터 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0467] **실시예 31: 0.75 M 글루코네이트 칼슘 용액**
- [0468] 용액 4: 0.75 M 글루코네이트 칼슘 용액은 눈금 플라스크에서 글루코네이트 칼슘(Sigma)으로부터 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0469] 염기의 용액 제조의 실시예들이 비제한적으로 주어진다.
- [0470] **실시예 32: 1 M 히스티딘 용액**
- [0471] 용액 5: 1 M 히스티딘 용액은, 눈금선에 도달하는데 필요한 부피의 탈이온수에 155.2 g의 L-히스티딘(Sigma)을 용해함으로써 1 L 눈금 플라스크에서 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0472] **실시예 33: 2 M 프롤린 용액**
- [0473] 용액 6: 2 M 프롤린 용액은 1 L 눈금 플라스크에 230.2 g의 L-프롤린(Sigma), 200 mL의 10 N 수산화나트륨 및 눈금선에 도달하는데 필요한 부피의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0474] **실시예 34: 2 M 세린 용액**
- [0475] 용액 7: 2 M 세린 용액은 1 L 눈금 플라스크에 210.2 g의 L-세린(Sigma), 200 mL의 10 N 수산화나트륨 및 눈금선에 도달하는데 필요한 부피의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0476] **실시예 35: 2 M 글리신 용액**
- [0477] 용액 8: 2 M 글리신 용액은 1 L 눈금 플라스크에 150.1 g의 L-글리신(Sigma), 200 mL의 10 N 수산화나트륨 및 눈금선에 도달하는데 필요한 부피의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0478] **실시예 36: 2 M 알라닌 용액**

- [0479] 용액 9: 2 M 알라닌 용액은 1 L 눈금 플라스크에 178.2 g의 L-알라닌(Sigma), 200 mL의 10 N 수산화나트륨 및 눈금선에 도달하는데 필요한 부피의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0480] **실시예 37: 2 M 리신 용액**
- [0481] 용액 10: 2 M 리신 용액은 1 L 눈금 플라스크에 292.4 g의 L-리신(Sigma), 200 mL의 10 N 수산화나트륨 및 눈금선에 도달하는데 필요한 부피의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0482] 상기 다양한 염기의 더 낮은 농도의 용액은 물 또는 상기 기재된 칼슘 염의 용액으로 희석시킴으로써 수득된다.
- [0483] **실시예 38: 탄산수소나트륨 용액**
- [0484] 1.2 M 탄산수소나트륨 용액은 눈금 플라스크에서 무수물 탄산수소나트륨(Sigma)으로부터 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0485] 더 희석된 탄산수소나트륨 용액은 상기 기재된 모액으로부터 제조된다.
- [0486] **실시예 39: 트리스 용액**
- [0487] 트리스(히드록시메틸)아미노메탄의 0.5 M 용액은 눈금 플라스크에서 초고순도의 트리스(히드록시메틸)아미노메탄(Sigma)으로부터 제조되며, 1 M 염화수소산을 사용하여 pH 7.4까지 조절된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0488] 중합체 및 가용성 포스페이트 염을 포함하는 용액 제조의 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.
- [0489] **실시예 40: pH 6.5의 중합체 1 및 인산나트륨을 포함하는 용액**
- [0490] 용액 11: 40 mg/mL의 중합체 1 및 0.45 M 포스페이트를 포함하는 용액은 실시예 15에 기재되어 있는 175.9 mg/mL의 중합체 1의 용액 8.6 mL, 실시예 27에 기재되어 있는 인산나트륨의 1 M 용액 17 mL, 및 11.9 mL의 물을 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0491] **실시예 41: 중합체 1 및 인산나트륨을 포함하는 용액**
- [0492] 용액 12: 40 mg/mL의 중합체 1 및 0.23 M의 인산나트륨을 포함하는 용액은 실시예 15에 기재되어 있는 175.9 mg/g의 중합체 1의 용액 5.5 mL, 실시예 27에 기재되어 있는 인산나트륨의 1 M 용액 5.5 mL, 및 13.0 mL의 멸균수를 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0493] **실시예 42: pH 6.5의 중합체 2 및 인산나트륨을 포함하는 용액**
- [0494] 용액 13: 20 mg/mL의 중합체 2 및 0.45 M 포스페이트를 포함하는 용액은 실시예 20에 기재되어 있는 40 mg/g의 중합체 2의 용액 10 mL, 실시예 27에 기재되어 있는 인산나트륨의 1 M 용액 9 mL, 및 1 mL의 물을 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0495] **실시예 43: 중합체 1, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨을 포함하는 용액**
- [0496] 용액 14: 40 mg/mL의 중합체 1, 0.23 M 인산나트륨 및 0.31 M 탄산수소나트륨을 포함하는 용액은 실시예 15에 기재되어 있는 175.9 mg/g의 중합체 1의 용액 5.5 mL, 실시예 27에 기재되어 있는 인산나트륨의 1 M 용액 5.5 mL, 실시예 38에 기재되어 있는 모액을 희석하여 수득된 0.6 M 탄산수소나트륨 용액 12.4 mL, 및 0.6 mL의 멸균수를 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0497] **실시예 44: 중합체 1, 인산나트륨 및 히스티딘을 포함하는 용액**
- [0498] 용액 15: 40 mg/mL의 중합체 1, 0.23 M 인산나트륨 및 0.09 M 히스티딘을 포함하는 용액은 실시예 15에 기재되어 있는 175.9 mg/g의 중합체 1의 용액 5.5 mL, 실시예 27에 기재되어 있는 인산나트륨의 1 M 용액

5.5 mL, 실시예 32에 기재되어 있는 모액을 희석하여 수득된 0.2 M 히스티딘 용액 10.8 mL, 및 2.2 mL의 멸균수를 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0499] **실시예 45: 중합체 2, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨을 포함하는 용액**

[0500] 용액 16: 10 mg/mL의 중합체 2, 0.23 M 인산나트륨 및 0.31 M 탄산수소나트륨을 포함하는 용액은 실시예 13에 기재되어 있는 30.45 mg/mL의 중합체 2의 용액 3.45 mL, 실시예 27에서 수득된 인산나트륨의 1.2 M 용액 2.0 mL, 실시예 38에 기재되어 있는 1.2 M 탄산수소나트륨 용액 2.7 mL, 및 2.4 mL의 멸균수를 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0501] **실시예 46: 중합체 5, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨을 포함하는 용액**

[0502] 용액 17: 20 mg/mL의 중합체 5, 0.23 M 인산나트륨 및 0.31 M 탄산수소나트륨을 포함하는 용액은 실시예 16에 기재되어 있는 36.87 mg/mL의 중합체 5의 용액 1.3 mL, 실시예 27에서 수득된 인산나트륨의 1.2 M 용액 0.45 mL, 및 실시예 38에 기재되어 있는 1.2 M 탄산수소나트륨 용액 0.6 mL를 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0503] **실시예 47: 중합체 6, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨을 포함하는 용액**

[0504] 용액 18: 20 mg/mL의 중합체 6, 0.23 M 인산나트륨 및 0.31 M 탄산수소나트륨을 포함하는 용액은 실시예 17에 기재되어 있는 46.7 mg/mL의 중합체 6의 용액 1.0 mL, 실시예 27에서 수득된 인산나트륨의 1.2 M 용액 0.45 mL, 실시예 38에 기재되어 있는 1.2 M 탄산수소나트륨 용액 0.6 mL, 및 0.3 mL의 멸균수를 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0505] **실시예 48: 중합체 7, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨을 포함하는 용액**

[0506] 용액 19: 40 mg/mL의 중합체 7, 0.23 M 인산나트륨 및 0.31 M 탄산수소나트륨을 포함하는 용액은 실시예 18에 기재되어 있는 75.9 mg/mL의 중합체 7의 용액 1.26 mL, 실시예 27에서 수득된 인산나트륨의 1.2 M 용액 0.45 mL, 실시예 38에 기재되어 있는 1.2 M 탄산수소나트륨 용액 0.6 mL, 및 0.06 mL의 멸균수를 혼합함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0507] 골형성 단백질과 중합체 사이의 복합체 제조의 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.

[0508] **실시예 49: rhBMP-2/중합체 1 복합체의 제조**

[0509] 용액 20: 1.46 mg/ml의 rhBMP-2의 용액 22 μ l가 60.0 mg/ml의 중합체 1의 용액 267 μ l 및 351 μ l의 멸균수에 첨가된다. rhBMP-2 및 중합체 1의 상기 용액은 pH 7.4이다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0510] **실시예 50: rhBMP-7/중합체 1 복합체의 제조**

[0511] 용액 21: 1.5 mg/ml의 rhBMP-7의 용액 50 μ l가 60.6 mg/ml의 중합체 1의 용액 100 μ l와 혼합된다. rhBMP-7 및 중합체 1의 상기 용액은 pH 7.4이다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0512] **실시예 51: rhBMP-7/중합체 2 복합체의 제조**

[0513] 용액 22: 0.15 mg/ml의 rhBMP-7의 용액 50 μ l가 22.7 mg/ml의 중합체 2의 용액 100 μ l와 혼합된다. rhBMP-7 및 중합체 2의 상기 용액은 pH 7.4이다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0514] **실시예 52: rhGDF-5/중합체 2 복합체의 제조**

[0515] 용액 23: 1.5 mg/ml의 rhGDF-5의 용액 50 μ l가 22.7 mg/ml의 중합체 2의 용액 100 μ l와 혼합된다. rhGDF-5 및 중합체 2의 상기 용액은 pH 7.4이다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μ m 막에서 무균 여과된다.

[0516] **실시예 53: 인산나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 1 복합체의 제조**

- [0517] 용액 24: 7.85 mg의 rhBMP-2만을 포함하는 InFUSE 완충액 중 184.0 mg의 rhBMP-2 동결건조물이 실시예 41에 기재되어 있는 용액 19 mL에 부가된다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트된다. 수득된 용액은 맑으며, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0518] **실시예 54: 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 1 복합체의 제조**
- [0519] 용액 25: 6.95 mg의 rhBMP-2만을 포함하는 InFUSE 완충액 중 165.5 mg의 rhBMP-2 동결건조물이 실시예 43에 기재되어 있는 용액 17.1 mL에 부가된다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트된다. 수득된 용액은 맑으며, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0520] **실시예 55: 인산나트륨 및 히스티딘의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 1 복합체의 제조**
- [0521] 용액 26: 6.95 mg의 rhBMP-2만을 포함하는 InFUSE 완충액 중 165.5 mg의 rhBMP-2 동결건조물이 실시예 44에 기재되어 있는 용액 17.1 mL에 부가된다. 상기 용액은 4°C에서 2시간 동안 인큐베이트된다. 수득된 용액은 맑으며, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0522] **실시예 56: 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 1 복합체의 제조**
- [0523] 용액 27: InFUSE 완충액 중 1.55 mg/mL의 rhBMP-2 용액 1.98 mL가 174.7 mg/g의 중합체 1의 용액 3.5 mL에 첨가된다. 다음으로, 0.74 M의 인산나트륨 및 1.2 M의 탄산수소나트륨을 포함하는 9.6 mL의 용액 및 0.28 mL의 멸균수가 또한 첨가된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다. 상기 혼합물의 조성은 0.2 mg/mL의 rhBMP-2, 40 mg/mL의 중합체 1, 0.45 M의 인산나트륨 및 0.75 M의 탄산수소나트륨이다.
- [0524] **실시예 57: 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-7/중합체 1 복합체의 제조**
- [0525] 용액 28: 10 mM HCl 완충액 중 3.69 mg/mL의 rhBMP-7 용액 1.71 mL가 실시예 15에 기재되어 있는 175.9 mg/g의 중합체 1의 용액 3.4 mL에 첨가된다. 다음으로, 실시예 27에 기재되어 있는 1 M의 인산나트륨 용액 3.3 mL, 실시예 38에 기재되어 있는 모액을 희석하여 수득된 0.6 M의 탄산수소나트륨 용액 7.5 mL, 및 14.1 mL의 멸균수가 첨가된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다. 상기 혼합물의 조성은 0.2 mg/mL의 rhBMP-7, 20 mg/mL의 중합체 1, 0.11 M의 인산나트륨 및 0.15 M의 탄산수소나트륨이다.
- [0526] **실시예 58: 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 2 복합체의 제조**
- [0527] 용액 29: InFuse 완충액 중 rhBMP-2의 동결건조물 65.2 mg이 10.5 mL의 용액 16에 첨가된다. 상기 용액은 실온에서 1시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다. 상기 혼합물의 조성은 0.4 mg/mL의 rhBMP-2, 10 mg/mL의 중합체 2, 0.23 M의 인산나트륨 및 0.31 M의 탄산수소나트륨이다.
- [0528] **실시예 59: 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 5 복합체의 제조**
- [0529] 용액 30: InFuse 완충액 중 rhBMP-2의 동결건조물 25.7 mg이 2.4 mL의 용액 17에 첨가된다. 상기 용액은 실온에서 1시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다. 상기 혼합물의 조성은 1.5 mg/mL의 rhBMP-2, 20 mg/mL의 중합체 5, 0.23 M의 인산나트륨 및 0.31 M의 탄산수소나트륨이다.
- [0530] **실시예 60: 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 6 복합체의 제조**
- [0531] 용액 31: InFuse 완충액 중 rhBMP-2의 동결건조물 24.8 mg이 2.4 mL의 용액 18에 첨가된다. 상기 용액은 실온에서 1시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다. 상기 혼합물의 조성은 1.5 mg/mL의 rhBMP-2, 20 mg/mL의 중합체 6, 0.23 M의 인산나트륨 및 0.31 M의 탄산수소나트륨이다.
- [0532] **실시예 61: 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 7 복합체의 제조**
- [0533] 용액 32: InFuse 완충액 중 rhBMP-2의 동결건조물 25.6 mg이 2.4 mL의 용액 19에 첨가된다. 상기 용액은 실온에서 1시간 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다. 상기 혼합물의 조성은 1.5 mg/mL의 rhBMP-2, 40 mg/mL의 중합체 7, 0.23 M의 인산나트륨 및 0.31 M의 탄산수소나트륨이다.
- [0534] 가용성 칼슘 염 및 염기를 포함하는 용액 제조의 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.

- [0535] **실시예 62: 염화칼슘 및 히스티딘의 용액**
- [0536] 용액 33: 0.75 M 염화칼슘 및 0.4 M 히스티딘을 포함하는 용액은 112.5 mL의 2 M 염화칼슘 용액, 120 mL의 1 M 히스티딘 용액 및 67.5 mL의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0537] **실시예 63: 염화칼슘 및 프롤린의 용액**
- [0538] 용액 34: 0.75 M 염화칼슘 및 0.75 M 프롤린을 포함하는 용액은 112.5 mL의 2 M 염화칼슘 용액, 112.5 mL의 2 M 프롤린 용액 및 75 mL의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0539] **실시예 64: 염화칼슘 및 글리신의 용액**
- [0540] 용액 35: 0.75 M 염화칼슘 및 0.75 M 글리신을 포함하는 용액은 112.5 mL의 2 M 염화칼슘 용액, 112.5 mL의 2 M 글리신 용액 및 75 mL의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0541] **실시예 65: 염화칼슘 및 알라닌의 용액**
- [0542] 용액 36: 0.75 M 염화칼슘 및 0.75 M 알라닌을 포함하는 용액은 112.5 mL의 2 M 염화칼슘 용액, 112.5 mL의 2 M 알라닌 용액 및 75 mL의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0543] **실시예 66: 염화칼슘 및 리신의 용액**
- [0544] 용액 37: 0.75 M 염화칼슘 및 0.75 M 리신을 포함하는 용액은 112.5 mL의 2 M 염화칼슘 용액, 112.5 mL의 2 M 리신 용액 및 75 mL의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0545] **실시예 67: 염화칼슘 및 세린의 용액**
- [0546] 용액 38: 0.75 M 염화칼슘 및 0.75 M 세린을 포함하는 용액은 112.5 mL의 2 M 염화칼슘 용액, 112.5 mL의 2 M 세린 용액 및 75 mL의 탈이온수를 첨가함으로써 제조된다. 상기 용액은 실온에서 30분 동안 인큐베이트되고, 0.22 μm 막에서 무균 여과된다.
- [0547] BMP, 중합체, 가용성 칼슘 염, 가용성 포스페이트 염 및/또는 염기를 포함하는 주사가능 현탁액의 제조에 대한 실시예들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.
- [0548] **실시예 68: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 2 복합체의 주사가능 현탁액의 제조**
- [0549] rhBMP-2/중합체 2 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 현탁액은 0.4 mg/mL의 rhBMP-2, 즉 160 μg 의 rhBMP-2, 10 mg/mL의 중합체 2, 즉 4 mg의 중합체 2, 0.23 M 인산나트륨, 즉 92 μmol , 및 0.31 M 탄산수소나트륨, 즉 124 μmol 을 포함하는 용액 29의 400 μl 와 0.38 M 염화칼슘 용액, 즉 153 μmol 의 400 μl 를 혼합함으로써 수득되었다. 수득된 현탁액은 주사 전에 실온에서 15분 동안 저장된다. 상기 현탁액은 27-게이지 니들에 의해 주사가능하다.
- [0550] **실시예 69: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 1 복합체의 주사가능 현탁액의 제조**
- [0551] BMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 현탁액은 0.52 mg/mL의 BMP-2, 즉 650 μg 의 BMP-2, 20 mg/mL의 중합체 1, 즉 25 mg의 중합체 1, 0.23 M 인산나트륨, 즉 288 μmol , 및 0.31 M 탄산수소나트륨, 즉 388 μmol 을 포함하는 용액의 1250 μl 와 0.38 M 염화칼슘 용액, 즉 477 μmol 의 1250 μl 를 혼합함으로써 수득되었다. 수득된 현탁액은 주사 전에 실온에서 15분 동안 저장된다. 상기 현탁액은 27-게이지 니들에 의해 주사가능하다.
- [0552] BMP, 중합체, 가용성 칼슘 염, 가용성 포스페이트 염 및/또는 염기를 포함하는 임플란트의 제조에 대한 실시예

들이 비제한적인 가이드로서 주어진다.

- [0553] 하기의 실시예에 기재되어 있는 임플란트들은 Helistat(Integra LifeSciences, Plainsboro, New Jersey)와 같은 멸균 가교결합된 유형 I의 콜라겐 스폰지에 의해 제조된다. 상기 스폰지의 부피는 적용에 따라 달라지며, 래트의 이소성 부위 적용을 위해 200 μ l, 토끼의 척추 융합 적용을 위해 4.5 mL이다.
- [0554] **실시예 70: 동결건조 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0555] 임플란트 1: 40 μ l의 용액 20이 멸균 200 mm³ 가교결합된 콜라겐 스폰지로 주입된다. 상기 용액은 콜라겐 스폰지에서 30분 동안 인큐베이트된 후, 농도 1.64 M의 염화칼슘 용액 10 μ l가 첨가된다. 마지막으로, 80 μ l의 인산나트륨(22.5 mg/mL)과 10 μ l의 1 N 염화수소산을 혼합하여 수득된, 농도 0.053 M에서 중화된 인산나트륨 용액 90 μ l가 상기 스폰지에 첨가된다. 그 후, 상기 스폰지는 동결되고, 무균 동결건조된다. 스폰지 내 rhBMP-2의 용량은 2 μ g이다.
- [0556] **실시예 71: 동결건조 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0557] 임플란트 2: 40 μ l의 용액 20이 멸균 200 mm³ 가교결합된 콜라겐 스폰지로 주입된다. 상기 용액은 콜라겐 스폰지에서 30분 동안 인큐베이트된 후, 농도 6.85 M의 염화칼슘 용액 10 μ l가 첨가된다. 마지막으로, 80 μ l의 인산나트륨(93.8 mg/mL)과 10 μ l의 1 N 염화수소산을 혼합하여 수득된, 농도 0.22 M의 중화된 인산나트륨 용액 90 μ l가 상기 스폰지에 첨가된다. 그 후, 상기 스폰지는 동결되고, 무균 동결건조된다. rhBMP-2의 용량은 2 μ g이다.
- [0558] **실시예 72: 동결건조 염화칼슘 및 아스코르브산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/BMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0559] 임플란트 3: 40 μ l의 용액 20이 멸균 200 mm³ 가교결합된 콜라겐 스폰지로 주입된다. 상기 용액은 콜라겐 스폰지에서 30분 동안 인큐베이트된 후, 농도 1.64 mg/ml의 염화칼슘 용액 10 μ l가 첨가된다. 마지막으로, 농도 0.41 M의 아스코르브산나트륨 용액 80 μ l가 상기 스폰지에 첨가된다. 그 후, 상기 스폰지는 동결되고, 무균 동결건조된다. rhBMP-2의 용량은 2 μ g이다.
- [0560] **실시예 73: 동결건조 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0561] 임플란트 4: rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 5.02 \times 2.54 \times 0.35 cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.325 mg/mL 용액 2 mL, 즉 650 μ g의 rhBMP-2, 64.5 mg/mL의 중합체 1, 즉 129 mg의 중합체 1, 및 pH 7.4의 0.18 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 그 후 500 μ l의 1.2 M 염화칼슘 용액, 즉 600 μ mol의 염화칼슘이 첨가되며, 마지막으로 500 μ l의 0.54 M 수산화나트륨 용액, 즉 270 μ mol의 수산화나트륨이 첨가된다. 그 후, 상기 임플란트는 -80°C에서 동결되고, 동결건조된다. 각각의 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 1 mL의 자가 혈액으로 침지된다.
- [0562] **실시예 74: 동결건조 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0563] 임플란트 5: rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 5.02 \times 2.54 \times 0.35 cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.163 mg/mL 용액 2 mL, 즉 326 μ g의 rhBMP-2, 32.5 mg/mL의 중합체 1, 즉 65 mg의 중합체 1, 및 pH 7.4의 0.18 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 그 후 500 μ l의 1.2 M 염화칼슘 용액, 즉 600 μ mol이 첨가되며, 마지막으로 500 μ l의 0.54 M 수산화나트륨 용액, 즉 270 μ mol의 수산화나트륨이 첨가된다. 그 후, 상기 임플란트는 -80°C에서 동결되고, 동결건조된다. 각각의 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 1 mL의 자가 혈액으로 침지된다.
- [0564] **실시예 75: 동결건조 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0565] 임플란트 6: rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기

가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 취득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.081 mg/mL 용액 2 mL, 즉 162 μ g의 rhBMP-2, 16.3 mg/mL의 중합체 1, 즉 32.5 mg, 및 pH 7.4의 0.18 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 그 후 500 μ l의 1.2 M 염화칼슘 용액, 즉 600 μ mol이 첨가되며, 마지막으로 500 μ l의 0.54 M 수산화나트륨 용액, 즉 270 μ mol의 수산화나트륨이 첨가된다. 그 후, 상기 임플란트는 -80°C에서 동결되고, 동결건조된다. 각각의 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 1 mL의 자가 혈액으로 침지된다.

[0566] 실시예 76: 동결건조 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 4 복합체 임플란트의 제조

[0567] 임플란트 7: rhBMP-2/중합체 4 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 취득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.040 mg/mL 용액 2 mL, 즉 80 μ g의 rhBMP-2, 8 mg/mL의 중합체 4, 즉 16 mg, 및 pH 7.4의 0.18 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 그 후 500 μ l의 1.2 M 염화칼슘 용액, 즉 600 μ mol이 첨가되며, 마지막으로 500 μ l의 0.54 M 수산화나트륨 용액, 즉 270 μ mol의 수산화나트륨이 첨가된다. 그 후, 상기 임플란트는 -80°C에서 동결되고, 동결건조된다. 각각의 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 1 mL의 자가 혈액으로 침지된다.

[0568] 실시예 77: 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 4 복합체 임플란트의 제조

[0569] 임플란트 8: rhBMP-2/중합체 4 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 취득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.311 mg/mL 용액 1060 μ l, 즉 330 μ g의 rhBMP-2, 62.3 mg/mL의 중합체 4, 즉 66 mg, 및 pH 7.4의 0.34 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 그 후 270 μ l의 3.4 M 염화칼슘 용액, 즉 920 μ mol이 첨가되며, 마지막으로 270 μ l의 1.37 M 수산화나트륨 용액, 즉 370 μ mol의 수산화나트륨이 첨가된다.

[0570] 실시예 78: 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 4 복합체 임플란트의 제조

[0571] 임플란트 9: rhBMP-2/중합체 4 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 취득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.151 mg/mL 용액 1060 μ l, 즉 160 μ g의 rhBMP-2, 30.2 mg/mL의 중합체 4, 즉 32 mg, 및 pH 7.4의 0.34 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 그 후 270 μ l의 3.4 M 염화칼슘 용액, 즉 920 μ mol이 첨가되며, 마지막으로 270 μ l의 1.37 M 수산화나트륨 용액, 즉 370 μ mol의 수산화나트륨이 첨가된다.

[0572] 실시예 79: 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 4 복합체 임플란트의 제조

[0573] 임플란트 10: rhBMP-2/중합체 4 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 취득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.311 mg/mL 용액 1060 μ l, 즉 330 μ g의 rhBMP-2, 62.3 mg/mL의 중합체 4, 즉 66 mg, 및 pH 7.4의 0.34 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 마지막으로 540 μ l의 1.7 M 염화칼슘 용액, 즉 920 μ mol이 첨가된다.

[0574] 실시예 80: 동결건조 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조

[0575] 임플란트 11: rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 취득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.107 mg/mL 용액 1500 μ l, 즉 160 μ g의 rhBMP-2, 21.3 mg/mL의 중합체 1, 즉 32 mg이 첨가되고, 그 후 500 μ l의 1.2 M 염화칼슘 용액, 즉 600 μ mol이 첨가되고, 그 후 pH 7.4의 0.72 M의 인산나트륨 용액 500 μ l, 즉 360 μ mol이 첨가되고, 마지막으로 500 μ l의 0.54 M 수산화나트륨 용액, 즉 270 μ mol의 수산화나트륨이 첨가된다. 그 후, 상기 임플란트는 -80°C에서 동결되고, 동결건조된다. 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 1 mL의 자가 혈액으로 침지된다.

[0576] 실시예 81: 염화칼슘, 인산나트륨 및 히스티딘의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 4 복합체 임플란트의 제조

- [0577] 임플란트 12: rhBMP-2/중합체 4 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.413 mg/mL 용액 800 μ l, 즉 330 μ g의 rhBMP-2, 20.65 mg/mL의 중합체 4, 즉 16.5 mg, 및 pH 7.4의 0.115 M의 인산나트륨, 즉 92 μ mol이 첨가되고, 마지막으로 800 μ l의 0.3 M 염화칼슘 용액, 즉 240 μ mol, 및 0.2 M의 히스티딘, 즉 160 μ mol이 첨가된다.
- [0578] **실시예 82: 염화칼슘, 인산나트륨 및 히스티딘의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 4 복합체 임플란트의 제조**
- [0579] 임플란트 13: rhBMP-2/중합체 4 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.413 mg/mL 용액 800 μ l, 즉 330 μ g의 rhBMP-2, 20.65 mg/mL의 중합체 4, 즉 16.5 mg, 및 pH 7.4의 0.24 M의 인산나트륨, 즉 192 μ mol이 첨가되고, 마지막으로 800 μ l의 0.4 M 염화칼슘 용액, 즉 320 μ mol, 및 0.4 M의 히스티딘, 즉 320 μ mol이 첨가된다.
- [0580] **실시예 83: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0581] 임플란트 14: rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 rhBMP-2의 0.2 mg/mL 용액 800 μ l, 즉 160 μ g의 rhBMP-2, 40 mg/mL의 중합체 1, 즉 32 mg, pH 7.4의 0.45 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol, 및 0.75 M의 탄산수소나트륨, 즉 600 μ mol이 첨가되고, 마지막으로 800 μ l의 0.75 M 염화칼슘 용액, 즉 600 μ mol이 첨가된다.
- [0582] **실시예 84: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0583] 임플란트 15: rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 0.2 mg/mL로 BMP-2를 포함하는 용액 800 μ l, 즉 160 μ g의 rhBMP-2, 8 mg/mL의 중합체 1, 즉 6.4 mg, 0.45 M의 인산나트륨, 즉 360 μ mol, 및 0.75 M의 탄산수소나트륨, 즉 600 μ mol이 첨가되고, 마지막으로 800 μ l의 0.75 M 염화칼슘 용액, 즉 600 μ mol이 첨가된다.
- [0584] **실시예 85: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0585] 임플란트 16: rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 크기가 $5.02 \times 2.54 \times 0.35$ cm인 가교결합된 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 0.2 mg/mL로 BMP-2를 포함하는 용액 800 μ l, 즉 160 μ g의 rhBMP-2, 20.6 mg/mL의 중합체 1, 즉 16.5 mg, 0.24 M의 인산나트륨, 즉 192 μ mol, 및 0.75 M의 탄산수소나트륨, 즉 600 μ mol이 첨가되고, 마지막으로 800 μ l의 0.4 M 염화칼슘 용액, 즉 320 μ mol이 첨가된다.
- [0586] **실시예 86: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-7/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0587] 임플란트 17: BMP-7/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는, 0.071 mg/mL의 BMP-7 용액 70 μ l, 즉 5 μ g의 BMP-7, 31.3 mg/mL의 중합체 1, 즉 1.5 mg의 중합체 1, pH 7.4의 0.24 M의 인산나트륨, 즉 16.8 μ mol, 및 0.4 M의 탄산수소나트륨, 즉 28 μ mol, 그 후 0.4 M의 염화칼슘 용액 70 ml, 즉 28 mmol을 198 μ l의 실린더형의 가교결합된 유형 I 콜라겐 스폰지에 연속적으로 함침한 후에 수득되었다. 그 후, 상기 임플란트는 -80°C 에서 동결되고, 동결건조된다. 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 45 μ l의 자가 혈액으로 침지된다.
- [0588] **실시예 87: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-2/중합체 2 복합체 임플란트의 제조**
- [0589] 임플란트 18: rhBMP-2/ 중합체 2 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는 스폰지 부피가 2.25 mL인 가교결합된 콜라겐 스폰지로부터 수득되었다. 상기 스폰지에 0.4 mg/mL의 rhBMP-2를 포함하는 용액 29의 400 μ l, 즉 160 μ g의 rhBMP-2, 10 mg/mL의 중합체 2, 즉 4 mg, 0.23 M의 인산나트륨, 즉

92 μmol , 및 0.31 M의 탄산수소나트륨, 즉 124 μmol 이 첨가되고, 마지막으로 0.38 M 염화칼슘 용액 400 μl , 즉 153 μmol 이 첨가된다. 각각의 용액은 첨가 후에 15분 동안 스폰지와 접촉된 상태로 남아있다. 상기 함침 시간 이후에, 스폰지는 이식할 준비가 된다.

[0590] 실시예 88: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhBMP-7/중합체 3 복합체 임플란트의 제조

[0591] 임플란트 19: BMP-7/중합체 3 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는, 0.41 mg/mL의 BMP-7을 포함하는 용액 800 μl , 즉 330 μg 의 BMP-7, 17.5 mg/mL의 중합체 3, 즉 14 mg의 중합체 3, 0.45 M 인산나트륨, 즉 360 μmol , 그 후 0.4 M의 염화칼슘, 즉 648 μmol 및 0.61 M의 프롤린, 즉 488 μmol 을 포함하는 용액 800 μl 를 부피가 4520 μl 인 가교결합된 유형 I 콜라겐 스폰지에 연속적으로 함침한 후에 수득되었다. 각각의 용액은 첨가 후에 15분 동안 스폰지와 접촉된 상태로 남아있다. 상기 함침 시간 이후에, 스폰지는 이식할 준비가 된다.

[0592] 실시예 89: 동결건조 염화칼슘, 인산나트륨 및 히스티딘의 존재하에서 콜라겐 스폰지/rhGDF-5/중합체 2 복합체 임플란트의 제조

[0593] 임플란트 20: GDF-5/중합체 2 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는, 0.5 mg/mL의 GDF-5를 포함하는 용액 1500 μl , 즉 750 μg 의 GDF-5, 20 mg/mL의 중합체 2, 즉 30 mg의 중합체 2, 그 후 0.8 M의 염화칼슘, 즉 600 μmol 및 0.38 M의 히스티딘, 즉 285 μmol 을 포함하는 용액 750 μl , 마지막으로 0.48 M의 인산나트륨을 포함하는 용액, 즉 360 μmol 을 부피가 4520 μl 인 가교결합된 유형 I 콜라겐 스폰지에 연속적으로 함침한 후에 수득되었다. 각각의 용액은 첨가 후에 15분 동안 스폰지와 접촉된 상태로 남아있다. 상기 함침 시간 이후에, 스폰지는 -80°C 에서 동결되고, 동결건조된다. 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 1.5 mL의 자가 혈액으로 침지된다.

[0594] 상기 실시예에 기재되어 있는 임플란트들은 Compressive-Resistant Matrix(CRM)에 의해 제조된다. 상기 물질은 MasterGraft Matrix라는 이름으로 Medtronic에서 판매되는, 15% 히드록시아파타이트 및 85% 베타-트리칼슘 포스페이트로 구성된 칼슘 포스페이트 미네랄 상과 유형 I 소 콜라겐으로 이루어진 혼합된 매트릭스이다. 상기 매트릭스의 부피는 적용에 따라 달라지며, 래트의 이소성 부위 적용을 위해 140 μl , 토끼의 척추 융합 적용을 위해 5 mL이다.

[0595] 실시예 90: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 rhBMP-2/중합체 2 복합체를 포함하는 CRM을 둘러싼 콜라겐 스폰지 임플란트의 제조

[0596] 임플란트 21: 임플란트 16은 토끼에게 이식하기 전에 부피가 5.0 mL(5.0 * 1.0 * 1.0 cm)인 건조 CRM 주위로 롤업(roll up)된다.

[0597] 실시예 91: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 CRM/rhBMP-2/중합체 2 복합체 임플란트의 제조

[0598] 임플란트 22: BMP-2/중합체 2 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는, 0.14 mg/mL의 BMP-2 용액 35 μl , 즉 5 μg 의 BMP-2, 14 mg/mL의 중합체 2, 즉 0.5 mg의 중합체 2, 0.23 M의 인산나트륨, 즉 8 μmol , 및 0.31 M의 탄산수소나트륨, 즉 11 μmol 을 15분 동안, 그 후 0.38 M의 염화칼슘 용액 35 μl , 즉 13 μmol 을 15분 동안 부피가 140 μl 인 CRM에 연속적으로 함침한 후에 수득되었다. CRM은 이식할 준비가 된다.

[0599] 실시예 92: 동결건조 염화칼슘, 인산나트륨 및 히스티딘의 존재하에서 CRM/rhGDF-5/중합체 2 복합체 임플란트의 제조

[0600] 임플란트 23: GDF-5/중합체 2 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는, 0.86 mg/mL의 GDF-5 용액 35 μl , 즉 30 μg 의 GDF-5, 14 mg/mL의 중합체 2, 즉 0.5 mg의 중합체 2, 0.23 M의 인산나트륨, 즉 8 μmol 을 15분 동안, 그 후 0.34 M의 히스티딘 용액 17.5 μl , 즉 6 μmol 을 15분 동안, 마지막으로 0.74 M의 염화칼슘 용액 17.5 μl , 즉 13 μmol 을 부피가 140 μl 인 CRM에 연속적으로 함침한 후에 수득되었다. 그 후, CRM은 -80°C 에서 동결되고, 동결건조된다. 동결건조 CRM은 이식하기 30분 전에 45 μl 의 자가 혈액으로 침지된다.

- [0601] **실시예 93: 염화칼슘, 인산나트륨 및 탄산수소나트륨의 존재하에서 CRM/rhBMP-2/중합체 1 복합체 임플란트의 제조**
- [0602] 임플란트 24: BMP-2/중합체 1 복합체 및 칼슘 포스페이트 입자의 공침전에 기초한 골형성 임플란트는, 0.52 mg/mL의 BMP-2 용액 1250 μ l, 즉 650 μ g의 BMP-2, 20 mg/mL의 중합체 1, 즉 25 mg의 중합체 1, 0.23 M의 인산나트륨, 즉 288 μ mol, 및 0.31 M의 탄산수소나트륨, 즉 388 μ mol을 15분 동안, 그 후 0.38 M의 염화칼슘 용액 1250 μ l, 즉 477 μ mol을 15분 동안 부피가 5.0 mL인 CRM에 연속적으로 함침한 후에 수득되었다. CRM은 이식할 준비가 된다.
- [0603] **반례 1: 20 μ g의 rhBMP-2를 포함하는 콜라겐 스폰지 임플란트의 제조**
- [0604] 임플란트 25: Infuse 유형의 완충액 중 rhBMP-2의 0.5 mg/ml 용액 40 μ l가 멸균 200 mm³ 가교결합된 콜라겐 스폰지로 주입된다. 상기 용액은 이식 전에 30분 동안 콜라겐 스폰지 내에 남아있다.
- [0605] 임플란트 25 내 rhBMP-2의 용량은 20 μ g이다.
- [0606] **반례 2: 2 μ g의 rhBMP-2를 포함하는 콜라겐 스폰지 임플란트의 제조**
- [0607] 임플란트 26: Infuse 유형의 완충액 중 rhBMP-2의 0.05 mg/ml 용액 40 μ l가 Helistat 유형(Integra LifeSciences, Plainsboro, New Jersey)의 멸균 200 mm³ 가교결합된 콜라겐 스폰지로 무균 주입된다. 상기 용액은 이식 전에 30분 동안 콜라겐 스폰지 내에 남아있다.
- [0608] 임플란트 26 내 rhBMP-2의 용량은 2 μ g이다.
- [0609] **반례 3: 5 μ g의 rhBMP-7을 포함하는 콜라겐 스폰지 임플란트의 제조**
- [0610] 임플란트 27: BMP-7에 기초한 동결건조 골형성 임플란트는, 0.036 mg/mL의 BMP-7 용액 140 μ l, 즉 5 μ g을 198 μ l의 실린더형의 가교결합된 유형 I 콜라겐 스폰지에 함침한 후에 수득되었다. 그 후, 임플란트는 -80°C에서 동결되고, 동결건조된다. 동결건조 스폰지는 이식하기 30분 전에 45 μ l의 자가 혈액으로 침지된다.
- [0611] **반례 4: 2.3 mg의 rhBMP-2를 포함하는 콜라겐 스폰지 임플란트의 제조**
- [0612] 임플란트 28: 골형성 임플란트는 크기가 5.02 \times 2.54 \times 0.35 cm인 가교결합된 유형 I 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지를 1.45 mg/mL의 rhBMP-2 용액 1600 μ l, 즉 2.3 mg으로 함침함으로써 수득되었다. 상기 용액은 이식 전에 30분 동안 콜라겐 스폰지 내에 남아있다.
- [0613] **반례 5: 1.3 mg의 rhBMP-2를 포함하는 콜라겐 스폰지 임플란트의 제조**
- [0614] 임플란트 29: 골형성 임플란트는 크기가 5.02 \times 2.54 \times 0.35 cm인 가교결합된 유형 I 콜라겐 스폰지, 즉 부피가 4.52 mL인 스폰지를 0.80 mg/mL의 rhBMP-2 용액 1600 μ l, 즉 1.3 mg으로 함침함으로써 수득되었다. 상기 용액은 이식 전에 30분 동안 콜라겐 스폰지 내에 남아있다.
- [0615] **실시예 94: 다양한 제제들의 골-유도 능력의 평가**
- [0616] 본 연구의 목적은 래트의 이소성 골 형성 모델에서 다양한 제제들의 골-유도 능력을 입증하기 위한 것이다. 중량이 150 내지 250 g인 수컷 래트(Sprague Dawley OFA - SD, Charles River Laboratories France, B.P. 109, 69592 l'Arbresle)가 본 연구에 사용된다.
- [0617] 진통제 처치(buprenorphine, Temgesic[®], Pfizer, France)가 수술 개입 전에 투여된다. 래트는 O₂ 및 이소플루란(1-4%)의 혼합물의 흡입에 의해 마취된다. 넓은 등 부위에 걸쳐 털이 면도에 의해 제거된다. 상기 등 부위의 피부는 포비돈 요오드 용액(Vetedine[®] 용액, Vetoquinol, France)으로 소독된다.
- [0618] 우측 및 좌측의 척추주위 등 근육을 노출시키기 위해, 약 1 cm의 척추주위 절개가 수행된다. 근육에 대한 접근은 경안면 절개에 의해 이루어진다. 각각의 임플란트에 대해 어떠한 압착도 가해질 수 없도록 하기 위하여, 임플란트들은 주머니 안에 놓아둔다. 래트 당 4개의 임플란트가 이식된다(부위 당 2개의 임플란트). 그 후, 임플란트의 틈은 폴리프로필렌 실(Prolene 4/0, Ethicon, France)을 사용하여 봉합된다. 피부는 비흡수성 봉합을 사용하여 폐쇄된다. 그 후, 래트는 각각의 케이지로 되돌려졌으며, 회복하는 동안 관찰을 유지하였다.
- [0619] 21일째에, 상기 동물은 틸레타민-졸라제팜(ZOLETIL[®] 25-50 mg/kg, IM, VIRBAC, France)의 주사에 의해 마취된다.

[0620] 그 후, 상기 동물은 일회분의 펜토바르비탈(DOLETHAL[®], VETOQUINOL, France)의 주사에 의해 희생된다. 그 후, 각 부위는 육안으로 관찰되며, 국부적 불내성의 임의의 신호(염증, 괴사, 출혈) 및 골 및/또는 연골 조직의 존재가 기록되고 다음의 등급에 따라 평가된다: 0: 부재, 1: 약함, 2: 중간, 3: 뚜렷함, 4: 매우 큼.

[0621] 각각의 외식편들은 이식의 부위로부터 제거되고, 육안적 사진이 촬영된다. 이어서, 외식편들의 크기 및 중량이 결정된다. 그 후, 각 외식편은 완충된 10% 포름알데히드 용액 내에 저장된다.

[0622] 결과:

[0623] 생체내 실험에서 이는 래트의 등 근육에 위치한 rhBMP-2의 골-유도 효과를 측정할 수 있도록 한다. 상기 비-골(non-bony) 부위는 이소성(ectopic)이라고 일컬어진다. 다양한 실험들의 결과가 하기 표 1에 기재되어 있다.

표 1

	골 조직의 존재	외식편의 중량(mg)
임플란트 25	3.6	38
임플란트 26	-	-
임플란트 1	3.4	100
임플란트 2	3.1	132
임플란트 3	3.5	124

[0625] 콜라겐 스폰지 내 rhBMP-2의 20 μg의 용량(임플란트 25, 반례 1)은 21일 후에 평균 중량이 38 mg인 골화된 외식편의 획득을 가져온다.

[0626] 콜라겐 스폰지 내 rhBMP-2의 2 μg의 용량(임플란트 26, 반례 2)은 21일 후에 콜라겐 임플란트가 발견될 수 있기에 충분한 골-유도 능력을 갖지 않는다.

[0627] rhBMP-2/중합체 1 복합체, 염화칼슘 및 인산나트륨의 존재하에서, 콜라겐 스폰지 내 동결건조된 rhBMP-2의 2 μg의 용량(임플란트 1, 실시예 70 및 임플란트 2, 실시예 71)은 골화된 외식편을 생성시킬 수 있으며, 이는 동일한 용량의 rhBMP-2 단독과는 대조적이다. 또한, 상기 외식편들은 rhBMP-2 단독에 의한 외식편들에 상당하는 골 스코어보다 4배 더 큰 중량을 갖는다. 따라서, 상기 제제는 rhBMP-2의 골형성 활성을 개선시킬 수 있도록 한다.

[0628] 이에 대응하는 방식으로, rhBMP-2/중합체 1 복합체 및 염화칼슘을 포함하는 콜라겐 스폰지에 아스코르브산나트륨의 첨가(임플란트 3, 실시예 72)는 또한 rhBMP-2 단독에 의한 것에 상당하는 골 스코어보다 중량이 4배 더 큰 골화된 외식편을 수득할 수 있도록 한다. 상기 제제도 또한 rhBMP-2의 골형성 활성을 개선시킬 수 있도록 한다.

[0629] 실시예 95: 후측방 융합에서 다양한 제제들의 골-유도 능력의 평가

[0630] 본 연구의 목적은 토끼의 후측방 융합 모델에서 다양한 제제들의 골-유도 능력을 입증하기 위한 것이다. 본 연구는 J.P. Lawrence의 문헌 [Lawrence, J. P. et al., Spine 2007, 32 (11), 1206-1213]에 기재되어 있는 실험 프로토콜에 따라 수행되며, 다만 니코틴의 처치는 제외되는데, 그 이유는 가관절의 유도를 원하지 않기 때문이다.

[0631] 척추골의 융합은 외식된 척추의 수동 촉진(palpation)에 의해 평가된다. 척추골 사이에서 유동성의 부재는 융합과 같은 뜻을 갖는다. 또한, 척추골에서 골의 존재를 평가하기 위해 척추는 12주째에 마이크로-CT로 분석된다. 다양한 임플란트에 대해 얻어진 결과들이 하기 표 2에 요약되어 있다.

표 2

	단백질	BMP-2의 용량(mg)	융합
임플란트 28	BMP-2	2.3	2/2
임플란트 29	BMP-2	1.3	7/8

임플란트 5	BMP-2	0.33	3/3
임플란트 14	BMP-2	0.16	5/5
임플란트 15	BMP-2	0.16	6/6
임플란트 16	BMP-2	0.16	6/6
임플란트 19	BMP-7	0.33	2/2
임플란트 20	GDF-5	0.75	5/5

[0633] 상기의 토끼 후측방 융합 연구에 따르면, 칼슘 포스페이트 염과 공침전된 BMP-2/중합체 2 복합체는 BMP-2 단독 1.3 mg(이는 등가의 융합 결과를 갖기 위한 문헌에 따른 본 모델의 유효량임)에서 BMP-2 단독에 대해 4 내지 8 배 만큼 BMP-2의 용량을 감소시킬 수 있는 것으로 나타난다. BMP-2의 0.16 mg 용량에서조차도, 칼슘 포스페이트 염으로 공침전된 BMP-2/중합체 복합체의 경우에 모든 토끼에게서 후측방 융합이 관찰된다.

[0634] 또한, 칼슘 포스페이트 염과 공침전된 BMP-7/공중합체 복합체를 포함하는 임플란트는 BMP-7의 낮은 용량, 임플란트 당 0.33 mg의 BMP-7에 대해 척추 융합을 발생시킨다. 문헌의 결과에 따르면, 100%의 토끼에서 척추 융합이 3.5 mg 용량의 BMP-7에서도 달성되지 않는다는 점이 입증되어 있으며, 이러한 용량은 상기 연구된 것보다 훨씬 높은 것이다(Yao, G. et al., Spine 2008, 33 (18), 1935-1942.).

[0635] 또한, 칼슘 포스페이트 염과 공침전된 GDF-5/중합체 복합체를 포함하는 임플란트는 GDF-5의 낮은 용량, 임플란트 당 750 μg의 GDF-5에 대해 100%의 척추 융합을 발생시킨다. 문헌의 결과에 따르면, 100%의 토끼에서 척추 융합이 2.5 mg 용량의 GDF-5에서도 달성되지 않는다는 점이 입증되어 있으며, 이러한 용량은 상기 연구된 것보다 훨씬 높은 것이다(Magit, David P. et al., Spine 2006, 31 (19), 2180-2188.).