

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6144049号
(P6144049)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00

請求項の数 21 (全 61 頁)

(21) 出願番号	特願2012-555082 (P2012-555082)	(73) 特許権者	513149654
(86) (22) 出願日	平成23年2月22日 (2011.2.22)		バイオメテック セラピューティクス
(65) 公表番号	特表2013-520505 (P2013-520505A)		, リミテッド ライアビリティ カンパニ
(43) 公表日	平成25年6月6日 (2013.6.6)		ー
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/025770		アメリカ合衆国 テネシー 37067
(87) 国際公開番号	W02011/103598		フランクリン ニコル ミル レーン 3
(87) 国際公開日	平成23年8月25日 (2011.8.25)		89
審査請求日	平成26年2月17日 (2014.2.17)	(74) 代理人	100100549
審査番号	不服2016-6696 (P2016-6696/J1)		弁理士 川口 嘉之
審査請求日	平成28年5月6日 (2016.5.6)	(74) 代理人	100126505
(31) 優先権主張番号	61/311, 284		弁理士 佐貫 伸一
(32) 優先日	平成22年3月5日 (2010.3.5)	(74) 代理人	100131392
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 丹羽 武司
(31) 優先権主張番号	61/306, 938		
(32) 優先日	平成22年2月22日 (2010.2.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腱障害を処置するための血小板由来成長因子組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腱障害の処置に使用するための、1 ~ 2 mL の 1 用量当たり 75 μ g ~ 7,500 μ g の PDGF 及びバッファーを含む組成物であって、前記組成物が腱又は骨 - 腱接合部への直接注射により投与される、組成物。

【請求項 2】

前記腱障害が腱症、腱炎、又は腱鞘炎である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 PDGF が、PDGF - AA、PDGF - BB、PDGF - AB、PDGF - CC、及び PDGF - DD からなる群から選択される、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 PDGF が PDGF - BB である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 PDGF が組換えヒト (rh) PDGF - BB である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記組成物が、1 ~ 2 mL の 1 用量当たり 500 ~ 1,000 μ g、5,000 ~ 7,500 μ g、450 ~ 3000 μ g、400 ~ 1000 μ g、500 ~ 900 μ g、600 ~ 800 μ g、650 ~ 750 μ g、又は 700 μ g の PDGF - BB を含む、請求項 4 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

【請求項 7】

前記組成物の体積が1用量当たり1.5 mLである、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記バッファーが、リン酸緩衝食塩水(「PBS」)、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン(「トリス」)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(「HEPES」)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(「MOPS」)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(「MES」)、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(「ADA」)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(「PIPES」)、及びN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(「ACES」)からなる群から選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記バッファーが酢酸ナトリウムである、請求項8に記載の組成物。

【請求項 10】

前記酢酸ナトリウムの濃度が10～100 mM、又は20 mMである、請求項9に記載の組成物。

【請求項 11】

前記組成物のpHが4.0～7.0、又は6である、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 12】

前記腱障害が、アキレス腱障害、膝蓋腱障害、外側上顆炎、内側上顆炎、足底筋膜炎、及び回旋腱板腱障害からなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記腱障害が外側上顆炎である、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記組成物が単回投与として投与される、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物が単回注射によって投与される、請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 16】

前記組成物が2回以上の投与で投与される、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記組成物が、週1回の単回注射によって4週間投与される、請求項1～13又は16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記組成物により、投与から7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも60%、少なくとも65%、又は少なくとも70%上昇する、請求項1～17のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 19】

前記組成物により、腱が、投与から7日以内に、投与の21日後に測定される最終強度の少なくとも80%、少なくとも85%、又は少なくとも90%に達する、請求項1～18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

(i) 1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、又はそれ以上にわたって週1回、

(ii) 1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、又はそれ以上にわたって月

50

2回、又は

(iii) 1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、又はそれ以上にわたって月1回投与される、請求項1～13の何れか一項に記載の組成物。

【請求項21】

患部に針を挿入した後、針を皮膚から出さずに引っ込めて方向を変え、再度挿入することによる複数回の少量注射によって投与される、請求項1～13の何れか一項に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

<関連出願の相互参照>

本願は、その全体を参照により本明細書に援用する、2010年2月22日付で提出された米国仮特許出願第61/306,938号、2010年3月5日付で提出された米国仮特許出願第61/311,284号、2010年12月30日付で提出された米国仮特許出願第61/428,809号、及び2011年1月3日付で提出された米国仮特許出願第61/429,428号の利益を主張する。

【0002】

技術分野

本発明は、アキレス腱障害、膝蓋腱障害、外側上顆炎又は「テニス肘」、内側上顆炎又は「ゴルフ肘」、足底筋膜炎、及び回旋腱板腱障害を含む腱鞘炎、腱症、又は腱炎等の腱障害を処置するための組成物及び方法に関し、特に、血小板由来成長因子(PDGF)を含む組成物を投与することにより腱障害を処置する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

腱は、通常筋肉を骨に連結する繊維性結合組織の強靱な帯である。腱の弾性特性により、歩行運動中の力が調節され、能動的な作業なしに安定性が向上する。また、腱はエネルギーを高い効率で貯蔵して取り出す。通常健康な腱は、密に詰まったI型コラーゲン繊維の平行な配列から主に構成されるが、少量のエラスチン及び少量のプロテオグリカンも含む。高度に特化した超微細構造、低レベルの血管新生、ゆっくりなコラーゲンの代謝回転のため、腱は、損傷すると治癒が非常に遅く、その本来の強度を取り戻すことはほとんどない。部分的な裂傷は、組織の乱れた(disorganized)III型コラーゲンの急速な産生により治るが、これは通常健康な腱よりも弱い。腱の損傷領域では損傷の再発がよく起こる。

【0004】

腱障害は、慢性的な腱の疾患又は損傷であり、酷使又は加齢による腱への徐々な消耗及び裂傷による異化反応と同化反応の不均衡によるものと考えられる。この不均衡の結果が、腱の変性、弱さ、裂傷、及び疼痛である。一方、例えば腱断裂又は骨からの剥離等の急性の腱損傷は、非常に突発的であり、通常、断裂を修復するか骨に腱を再接合するための手術が必要である。腱障害は誰でも起こり得るが、仕事、スポーツ、又は通常の日常的作業で同じ動きを何度も繰り返しがちな人で起こり易い。腱障害は通常、患部における疼痛、硬直(stiffness)、及び強度低下を引き起こす。

【0005】

腱障害という用語は、腱症及び腱炎の2種類の腱損傷を指す。この用語はまた、屈筋腱、アキレス腱等の特定の腱で起こる腱の外側の内層の腱障害である腱鞘炎も含む。

【0006】

腱症とは、酷使により生じる、通常は腱の内部及び周囲の組織における微小断裂(microtear)の形態である腱の腱内変性を特徴とする腱の非炎症性損傷であり、これにより損傷部分周辺の腱修復細胞の数が増える。腱の変性は、腱のコラーゲン繊維、細胞、及び血管構成要素へのダメージ又はこれらの組織崩壊(disorganization)により生じ、これは、処置されないと、腱の引張強度を低下させることがあり、腱断

10

20

30

40

50

裂を招くことがある。コラーゲン組織化の変化は、繊維の分離/弛緩/縮み(crimping)、平行な配向性の消失、繊維直径の縮小、及びコラーゲンの全体的密度の低下により特徴付けられる。更に、赤血球、フィブリン、及びフィブロネクチンの沈着物に囲まれたコラーゲンの微小断裂も起こり得る。一方、I I I型(修復性)コラーゲンは増加する。これらのマトリックス組成変化は、偏光顕微鏡下での複屈折の低下につながり得る。コラーゲンの含有量及び組織化に加え、腱症は更に、患部におけるムコイド間質物質(プロテオグリカン)の増加及び細胞密度の変化を特徴とする。一部の領域は、異常に多くの腱細胞を含み、これらは、核が丸くなっており、プロテオグリカン及びタンパク質の生産増大の超微細構造的証拠を示す。一方、腱の患部以外の領域は、濃縮された小さな核を有する、通常よりも少ない腱細胞を含み得る。腱症の別の特徴は、毛細血管及び細動脈の増殖である。腱症における腱変性の複数のサブカテゴリーが電子顕微鏡法により同定されている。すなわち、(1)低酸素性変性、(2)ヒアリン変性、(3)ムコイド変性又は粘液様変性、(4)フィブリノイド変性、(5)リポイド変性、(6)石灰化、及び(7)線維軟骨及び骨の化生である。これらの病変は、解剖学的な部位及びそれを引き起こした損傷の性質(例えば、低酸素対機械的負荷;急性損傷対慢性損傷)に応じて、様々な罹病率で同時に存在し得る。例えば、ムコイド変性領域は、光学顕微鏡で、大きなムコイドパッチ及び繊維間の空胞を特徴とする。しかし、リポイド変性は、コラーゲン繊維構造の破壊(disruption)を引き起こす腱内への脂質の異常な蓄積を特徴とする。場合によっては、腱症は、腱の巣状壊死又は石灰化を伴う。これは、関節周辺の慢性的な疼痛の非常によくみられる原因である。腱症はまた、初期炎症反応がないことを特徴とする。炎症細胞は、修復プロセスの初期段階のメディエーターであると考えられ、これが無いと腱症が慢性的な状態となる。

10

20

【0007】

腱症に伴うコラーゲンマトリックスの組織崩壊(disorganization)及び水分の特徴的な増加は、超音波検査又は磁気共鳴画像法によって診断することができる。症状は、腱の局所領域における単純な疼痛及び硬直から、損傷を受けた腱周辺の関節全体を囲む灼熱感まで様々であり得る。多くの患者で、疼痛は活動中及び活動後に悪化することが多く、翌日、腫れが腱の動きに影響し、腱及び関節領域がより硬くなること

。

【0008】

腱炎は、腱症で観察されるような変性を特徴とするが、血管破壊及び炎症修復反応を伴う腱の炎症を伴う、腱への炎症性の損傷である。腱炎は、しばしば、線維芽細胞及び筋線維芽細胞の増殖並びに出血及び組織化している肉芽組織を伴う。一般的に、腱炎は、アキレス腱炎(アキレス腱に発症する)又は膝蓋腱炎(膝蓋腱に発症する「ジャンパー膝」としても知られる)のように、関与する身体部分を用いて言及されるが、外側上顆炎(短橈側手根伸筋腱に発症する「テニス肘」としても知られる)等の例外もある。症状は、痛み又は疼痛及び局所的硬直から、炎症した腱周辺の関節全体を囲む灼熱感まで様々であり得る。場合によっては、腱炎は、腫れ(熱及び発赤を伴うこともある)を特徴とし、関節周囲における目に見える節(knot)があることもある。多くの患者で、疼痛は通常、活動中及び活動後に悪化し、翌日、腱の動きにより筋肉が固くなるため、腱及び関節領域がより硬くなる。

30

40

【0009】

現在の処置は主に対症的な性質であり、腱症は炎症反応を伴わない傾向があるにも関わらず、従来から、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、ステロイド注射、及び理学療法を用いた処置を含む抗炎症処置が処置の焦点となっている。より最近になって、衝撃波療法、低出力レーザー治療、硬化療法、及び他の実験的処置が試験された。多くの場合、いくつかの処置(例えばNSAID及びコルチゾン注射)は短期間の軽減をもたらすようであるが、現行の処置による長期間の効果は不明瞭なままである。したがって、既存の処置様式と比べて長期間の効果を提供する腱障害を処置するための改善された方法が必要とされている。

50

【 0 0 1 0 】

P D G F は、血小板の顆粒中に貯蔵され、マクロファージ、線維芽細胞、及び内皮細胞を含む局所的に活性化された細胞によって組織修復中に分泌される。P D G F - B B は、急性腱損傷の出血及び炎症の主な生成物の1つである。血小板由来成長因子 - B B (P D G F - B B) は、創傷治癒タンパク質であり、骨(骨芽細胞)及び腱(腱細胞)の細胞を含む間葉起源の細胞に走化性(細胞遊走)及び分裂促進性(細胞増殖)であることが知られている。更に、P D G F - B B は、血管内皮成長因子(V E G F) をアップレギュレートして血管形成(血管再生)を増加させることが示されており、これは再生プロセスの成功に必須である。

【 0 0 1 1 】

アキレス腱は、人体で最も太くて強い腱であり、大きな荷重を支えることを可能にする。アキレス腱が機能する機械的荷重環境は、アキレス腱を断裂し易くする。アキレス腱断裂は種々の要因によって起こり得るが、多くの場合、断裂は変性的変化に関連する(非特許文献1)。修復プロセス後、断裂したアキレス腱では、I型コラーゲンが減少し、I I I型コラーゲンの量が相対的に増加している。この組成変化により、交差結合が減り、引張強さが低下する。治癒した後でも、細胞過形成、組織崩壊、及びコラーゲン交差結合の減少のため、断裂したアキレス腱は弱いままである(非特許文献2)。アキレス腱断裂の最適な処置については論争があり、保存的(非手術的)及び外科的治療の両方に賛否両論がある。非手術的処置では、再断裂率が高くなり、強度が低下するが、手術に関連する費用及びリスクが避けられる(非特許文献3~5)。手術的修復には手術及び麻酔のリスクがあるが、強度が増大し、再断裂率がより低く、より早期に運動競技活動に復帰できる(非特許文献4及び6)。急性アキレス腱断裂の処置に対する医師の好みに関わらず、活動的な患者集団におけるこれらの損傷の様々な処置の中で手術的修復はその役割を有し続けるであろう。生物学的修復プロセスの増強により腱の治癒を向上させることにより、現行の処置様式と比べて、活動へのより速い復帰及び臨床的転帰の向上が実現され得る。

【 0 0 1 2 】

腱の治癒の生物学的増強に関する複数のインビボ及びインビトロでの研究がなされている。例えば非特許文献7~13を参照されたい。

【 0 0 1 3 】

十分な量の r h P D G F - B B を適切なタイムコースで修復部位に送達することが所望の臨床的効果を達成するために重要である。複数の研究が、生体物質でコーティングされた縫合糸を記載している。例えば、非特許文献14~17を参照されたい。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 4 】

【非特許文献1】 Mafulli N, Wong J, Almekinders L. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clinics in Sports Medicine*. 2003;22:675-692

【非特許文献2】 Maffulli N, Moller HD, Evans CH. Tendon Healing: Can it be Optimized? *British Journal of Sports Medicine*, 2002;36:315-316

【非特許文献3】 Inglis AE, Scott WN, Sculco TP, et al. Ruptures of the tendo achillis: an objective assessment of surgical and non-surgical treatment. *J Bone Joint Surg Am*. 1976;58:990-993

【非特許文献4】 Nistor L. Surgical and Nonsurgical treatment of Achilles tendon rupture: a prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 1981 63(3):394-9

【非特許文献5】 Chalmers J. Review Article: Treatment of Achilles tendon ruptures. *Journal of Orthopaedic Surgery* 200 8(1):97-99

【非特許文献6】 Rettig A, Liotta FJ, Klootwyk TE, Porter DA, Mielsing P. Potential Risk of Rerupture in Primary Achilles Tendon Repair in Athletes Younger than 30 years of Age. *Am J of Sports Med* 2005;33(1): 119-123

【非特許文献7】 Seeherman HJ, Archambault JM, Rodeo SA, et al. rhBMP-12 accelera

10

20

30

40

50

tes healing of rotator cuff repairs in a sheep model. J Bone Joint Surg Am. 2008 ;90(10):2206-2219

【非特許文献 8】Chan BP, Fu SC, Qin L, et al. Supplementation-time dependence of growth factors in promoting tendon healing. Clin Orthop Relat Res. 2006;448:240-247

【非特許文献 9】Uggen JC, Dines J, Uggen CW, et al. Tendon gene therapy modulates the local repair environment in the shoulder. J Am Osteopath Assoc. 2005;105(1):20-21

【非特許文献 10】Gelberman R, Thomopoulos S, Sakiyama-Elbert S, et al. The early effects of sustained platelet-derived growth factor administration on the functional and structural properties of repaired intrasynovial flexor tendons: an in vivo biomechanic study at 3 weeks in canines. J Hand Surg Am. 2007;32(3):373-379

【非特許文献 11】Thomopoulos S, Das R, Silva MJ, et al. Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. J Orthop Res. 2009;27(9): 1209-1215

【非特許文献 12】Thomopoulos S, Zaegel M, Das R, et al. PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. J Orthop Res. 2007;25(10): 1358-1368

【非特許文献 13】Dines J, Grande D, Dines D. Tissue Engineering and Rotator Cuff Tendon Healing. J Shoulder Elbow Surg, Sept/Oct 2007: 204S-206S

【非特許文献 14】Rickert M, Jung M, Adiyaman M, Richter W, Wimank HG. Growth and differentiation factor 5 coated suture stimulates tendon healing in an Achilles tendon model in rats. Growth Factors 2001;19: 115-126

【非特許文献 15】Weiler A, Forster C, Hunt P, Falk R, Jung T, Unterhauser FN, Bergmann V, Schmidmaier G, Haas NP. The Influence of Locally Applied Platelet-Derived Growth Factor-BB on Free Tendon Graft Remodeling After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. American Journal of Sports Medicine 2004; 32(4):881-891

【非特許文献 16】Dines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder Elbow Surg 2007;16:215S-221S

【非特許文献 17】Uggen C, Dines J, McGarry M, et al. The effect of Recombinant Human Platelet Derived growth Factor BB coated sutures on Rotator cuff Healing in a Sheep Model. Arthroscopy: 2010;26(11): 1456-1462

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

例えば断裂したアキレス腱等の断裂した腱の修復のための、PDGFを腱に送達するための改善された縫合糸が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0016】

一態様では、PDGF及びバッファーを含む有効量の組成物を患部に投与することを含む腱障害の処置方法を提供する。いくつかの実施形態では、腱障害は腱症である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱炎である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱鞘炎である。いくつかの実施形態では、PDGFは、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、及びPDGF-DDからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PDGFはPDGF-BBである。いくつかの実施形態では、PDGFは組換えヒト(rh)PDGF-BBである。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約75~約7,500µgのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約500~約1,000µgのPDGF-BBを含

10

20

30

40

50

む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約5,000~約7,500 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約450~約3000 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約400~約1000 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約500~約900 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約600~約800 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約650~約750 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約700 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、組成物の体積は1用量当たり約1.0~約2.0mlである。いくつかの実施形態では、組成物の体積は1用量当たり約1.5mlである。いくつかの実施形態では、バッファーは、リン酸緩衝食塩水(「PBS」)、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン(「トリス」)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(「HEPES」)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(「MOPS」)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(「MES」)、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(「ADA」)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(「PIPES」)、及びN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(「ACES」)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、バッファーは酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約10~約100mMである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約20mMである。いくつかの実施形態では、組成物のpHは約4.0~約7.0である。いくつかの実施形態では、組成物のpHは約6である。いくつかの実施形態では、投与は患部への直接注射による。いくつかの実施形態では、患部は骨-腱接合部である。いくつかの実施形態では、患部は腱である。いくつかの実施形態では、腱障害は、アキレス腱障害、膝蓋腱障害、外側上顆炎、内側上顆炎、足底筋膜炎、及び回旋腱板腱障害からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱障害は外側上顆炎である。いくつかの実施形態では、組成物は単回投与により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は単回注射により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は2回以上の投与により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、週1回の単回注射により4週間投与される。いくつかの実施形態では、本方法により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約60%上昇する。いくつかの実施形態では、本方法により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約65%上昇する。いくつかの実施形態では、本方法により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約70%上昇する。いくつかの実施形態では、本方法により、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約80%に達する。いくつかの実施形態では、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約85%に達する。いくつかの実施形態では、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約90%に達する。

【0017】

別の態様では、PDGF及びバッファーからなる有効量の組成物を患部に投与することを含む腱障害の処置方法を提供する。いくつかの実施形態では、腱障害は腱症である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱炎である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱鞘炎である。いくつかの実施形態では、PDGFは、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、及びPDGF-DDからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PDGFはPDGF-BBである。いくつかの実施形態では、PDGFは組換えヒト(rh)PDGF-BBである。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約75~約7,500 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約500~約1,000 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約5,000~約7

10

20

30

40

50

、500 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約450～約3000 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約400～約1000 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約500～約900 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約600～約800 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約650～約750 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約700 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、組成物の体積は1用量当たり約1.0～約2.0 mlである。いくつかの実施形態では、組成物の体積は1用量当たり約1.5 mlである。いくつかの実施形態では、バッファーは、リン酸緩衝食塩水(「PBS」)、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン(「トリス」)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(「HEPES」)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(「MOPS」)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(「MES」)、N-(2-アセトアミド)イミノニ酢酸(「ADA」)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(「PIPES」)、及びN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(「ACES」)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、バッファーは酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約10～約100 mMである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約20 mMである。いくつかの実施形態では、組成物のpHは約4.0～約7.0である。いくつかの実施形態では、組成物のpHは約6である。いくつかの実施形態では、投与は患部への直接注射による。いくつかの実施形態では、患部は骨-腱接合部である。いくつかの実施形態では、患部は腱である。いくつかの実施形態では、腱障害は、アキレス腱障害、膝蓋腱障害、外側上顆炎、内側上顆炎、足底筋膜炎、及び回旋腱板腱障害からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱障害は外側上顆炎である。いくつかの実施形態では、組成物は単回投与により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は単回注射により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は2回以上の投与により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、週1回の単回注射により4週間投与される。いくつかの実施形態では、本方法により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約60%上昇する。いくつかの実施形態では、本方法により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約65%上昇する。いくつかの実施形態では、本方法により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約70%上昇する。いくつかの実施形態では、本方法により、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約80%に達する。いくつかの実施形態では、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約85%に達する。いくつかの実施形態では、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約90%に達する。いくつかの実施形態では、方法は、PDGF及びバッファーからなる有効量の組成物を患部に投与することからなる。

【0018】

別の態様では、有効量のPDGF及びバッファーを含む、腱障害の処置に使用するための組成物を提供する。いくつかの実施形態では、腱障害は腱症である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱炎である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱鞘炎である。いくつかの実施形態では、PDGFは、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、及びPDGF-DDからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PDGFはPDGF-BBである。いくつかの実施形態では、PDGFは組換えヒト(rh)PDGF-BBである。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約75～約7,500 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約500～約1,000 μg のPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約5,000～約7,500 μg のPDGF-BBを含む

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約450～約3000 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約400～約1000 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約500～約900 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約600～約800 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約650～約750 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量は、1用量当たり約700 μ gのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、組成物の体積は1用量当たり約1.0～約2.0mlである。いくつかの実施形態では、組成物の体積は1用量当たり約1.5mlである。いくつかの実施形態では、バッファーは、リン酸緩衝食塩水(「PBS」)、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン(「トリス」)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(「HEPES」)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(「MOPS」)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(「MES」)、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(「ADA」)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(「PIPESS」)、及びN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(「ACES」)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、バッファーは酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約10～約100mMである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約20mMである。いくつかの実施形態では、組成物のpHは約4.0～約7.0である。いくつかの実施形態では、組成物のpHは約6である。いくつかの実施形態では、処置は、直接注射により組成物を患部に投与することを含む。いくつかの実施形態では、患部は骨-腱接合部である。いくつかの実施形態では、患部は腱である。いくつかの実施形態では、腱障害は、アキレス腱障害、膝蓋腱障害、外側上顆炎、内側上顆炎、足底筋膜炎、及び回旋腱板腱障害からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱障害は外側上顆炎である。いくつかの実施形態では、組成物は単回投与により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は単回注射により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は2回以上の投与により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、週1回の単回注射により4週間投与される。いくつかの実施形態では、処置により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約60%上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約65%上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、投与から約7日以内にベースラインと比べて腱強度が少なくとも約70%上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約80%に達する。いくつかの実施形態では、処置により、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約85%に達する。いくつかの実施形態では、処置により、腱は、投与から約7日以内に、投与の約21日後に測定される最終強度の少なくとも約90%に達する。いくつかの実施形態では、組成物は、有効量のPDGF及びバッファーからなる。

【0019】

別の態様では、特に断りのない限り又は特定の文脈から明らかであるように、本明細書に記載されている方法に関連する本明細書に記載されているPDGF組成物の使用を提供する。本明細書に記載されているPDGF組成物は、本明細書に記載されている方法で使用するための医薬の製造に使用することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】腱細胞の細胞遊走に対するrhPDGF-BB処置の影響を示す図である。

【図2】BrdUの取込みにより測定した、腱細胞の細胞増殖に対するrhPDGF-BB処置の影響を示す図である。

【図3】右脚(right leg)の腱-踵骨接合部の注射部位を示す図である。注射は28.5Gの針を付けたインスリン注射器で行った。

10

20

30

40

50

【図4】生化学検査用に試験動物を処理した後のラット中足 - アキレス - 腓腹筋複合体の代表的画像を示す図である。

【図5】踵骨 (C) - アキレス腱 (T) 結合部位の外側縁から得た矢状切片の代表的画像を示す図である。

【図6A】処置7日後のコラゲナーゼ誘発ラットアキレス腱損傷モデルにおいて組換えヒト血小板由来成長因子アイソフォームBB (「rhPDGF-BB」) を腱内に適用した場合の腱成長の肉眼的観察における用量反応研究の結果を示す図である。中用量 (10.2 μg) 又は高用量 (102 μg) の rhPDGF-BB の単回注射では、rhPDGF-BB 処置7日後に腱の大きさが有意に増加していた。

【図6B】同じ実験の rhPDGF-BB 処置21日後の結果を示す図である。腱のサイズに対する高用量 (102 μg) rhPDGF-BB 単回注射の影響は、酢酸ナトリウムバッファーだけを注射した場合の処置21日後の影響と同程度であった。

【図7】図6A及び6Bと同じデータを別の表し方で示したものであり、rhPDGF-BB 処置後7日目及び21日目の肉眼による腱の大きさを示している (0 = 成長なしから、3 = 著しい成長まで)。

【図8】rhPDGF-BB 処置後7日目及び21日目における踵骨付着点における腱の幅 (μm ± SEM) を示す図である。

【図9】rhPDGF-BB 処置後7日目及び21日目の腱本体の幅 (μm ± SEM) を示す図である。

【図10】rhPDGF-BB 処置後7日目及び21日目における細胞増殖 (細胞数 ± SEM) に対する rhPDGF-BB の影響を示す図である。

【図11】rhPDGF-BB 処置後7日目及び21日目におけるアキレス腱の力学的特性、すなわち断裂までの最大荷重 (N ± SEM) を示す図である。

【図12】静脈内 (IV) 投薬後の平均血清 rhPDGF-BB 濃度 - 時間を示す図である。

【図13】腱内 (IT) 投薬後の平均血清 rhPDGF-BB 濃度 - 時間を示す図である。

【図14】図14Aは、各時点で4-0バキクリル縫合糸から放出される rhPDGF-BB の量のインビトロ放出プロファイルを示す図である。図14Bは、4-0バキクリル縫合糸からの48時間にわたる rhPDGF-BB のインビトロ累積放出量 (平均 ± SEM) を示す図である。図14Cは、縫合糸コーティング溶液中の初期 rhPDGF-BB 濃度に対する、rhPDGF-BB の推定インビボ累積用量を示す図である。図14Dは、植え込まれた4-0バキクリル縫合糸の長さを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

限定されるものではないが特許、特許出願、及び科学文献を含む本明細書中に引用される全文献の全体を参照により本明細書に援用する。

【0022】

本発明の組成物及び方法により、驚くべきことに、腱障害の処置が改善される。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法により、腱の強度が上昇し、腱強度の回復速度が上昇する。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法により、腱の強度が上昇する。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法により、腱強度回復速度が上昇する。例えば、損傷後に腱が治る際に、腱の治癒プロセスとして腱の生体力学的強度が上昇する。本発明の組成物の投与により、腱の強度がより急速に上昇し得る。理論により限定されるものではないが、このより急速な強度上昇は、荷重負荷により腱損傷が更に増えなければ、腱の治癒促進に有用であり得、腱への荷重負荷は、一般的に組織のリモデリング及び再組織化 (reorganization) を向上させるので、腱の治癒反応を向上させる。(例えば本発明の組成物の投与により) 腱強度が初期により速く上昇することで、腱への荷重負荷をより迅速に始めることができ得、そのため腱の治癒反応が更に改善され得る。理論により限定されるものではないが、腱の強度の向上は、細胞増殖及び/若

10

20

30

40

50

しくは細胞外マトリックス産生の増加により、並びにノ又は組織構築の改善（例えば、細胞外マトリックスの組織化の改善）により起こり得る。

【0023】

更に、理論により限定されるものではないが、本発明者らは、驚くべきことに、本発明の組成物を腱に（例えば注射により）直接投与した時に、PDGFが投与部位（例えば注射部位）に局在し続けることを見出した。例えば、後述する実施例5に更に詳細に説明されるように、バッファ中に含まれるPDGFからなる組成物の投与によりPDGFが注射部位に局在したままになることは予想されていなかった。

【0024】

定義

本明細書において、「処置（treatment）」という用語は、処置される障害（例えば、腱症、腱炎、又は腱鞘炎等の腱障害）の臨床的病状の自然な課程を変化させるようにデザインされた臨床的介入を指す。処置の望ましい効果としては、例えば、患部関節若しくは手足の疼痛若しくは硬直の軽減、患部関節若しくは手足の可動性及び強度の上昇、腱障害進行速度の低下、炎症の軽減、腱の強度の上昇、腱の強度回復速度の向上、疾患状態の軽減若しくは緩和、及び寛解又は予後の改善の1若しくは複数が含まれる。例えば、腱障害に関連する1又は複数の症状が軽減されるか消失した場合、個体の「処置」は成功である。

【0025】

本明細書において、「有効量」という用語は、投薬量で、必要な期間にわたり、少なくとも所望の治療的又は予防的結果を達成するのに有効な量を指す。有効量は1又は複数回の投与によって提供されてよい。

【0026】

本明細書の値又はパラメーターで「約」という場合、その値又はパラメーター自体に関する実施形態も含まれる（及び説明されている）ものとする。

【0027】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において、文脈から明確に単数でない限り、単数形（a、an、及びthe）は複数形を含む。例えば、「PDGFホモダイマー」への言及は、1又は複数のPDGFホモダイマーへの言及であり、当業者に知られているその均等物等も含む。

【0028】

本明細書に記載されている本発明の全ての態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むと理解される。記載の要素「から本質的になる」方法又は組成物は、記載されたステップ又は材料及びそれらの方法及び組成物（例えば、PDGF及びバッファから本質的になる有効量の組成物を患部に投与すること又は有効量のPDGFを含む緩衝溶液から本質的になる組成物）の基本的及び新規な特徴に著しい影響を与えないものだけを含むと理解されるべきである。

【0029】

血小板由来成長因子及びその組成物

本明細書において、「血小板由来成長因子」又は「PDGF」という用語は、2つの異なる受容体を介して細胞応答を活性化する4つの異なるアイソフォームのPDGFのいずれかを指す。これらのアイソフォームには、A（PDGF-AAと呼ばれるホモダイマーとして及びPDGF-ABと呼ばれるBアイソフォームとのヘテロダイマーの一部として観察される）、B（PDGF-BBと呼ばれるホモダイマーとして及びPDGF-ABと呼ばれるAアイソフォームとのヘテロダイマーの一部として観察される）、C（PDGF-CCと呼ばれるホモダイマーとして観察される）、及びD（PDGF-DDと呼ばれるホモダイマーとして観察される）が含まれる。通常、本明細書中で、「PDGF」という用語は、公知のPDGFのホモダイマー及びヘテロダイマー（例えば、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、及びPDGF-DD）を全般的に指す。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

本発明は、個体の腱障害を処置する方法及びそれらの方法で使用する組成物を提供する。一般的に、処置方法は、腱障害を有する個体の患部にPDGFを含む組成物を投与することを含む。具体的には、処置方法は、PDGF及びバッファーを含む組成物を腱障害部位に投与することを含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGF及びバッファーを含む（例えば、PDGFの緩衝溶液）。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、組成物はPDGF及びバッファーを含む。いくつかの実施形態では、PDGFは、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、PDGF-DD、並びにその混合物及び誘導体からなる群から選択されるPDGFダイマーを含む。いくつかの実施形態では、PDGFダイマーはホモダイマーである。いくつかの実施形態では、PDGFホモダイマーは、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC、及びPDGF-DDからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PDGFホモダイマーはPDGF-BBである。いくつかの実施形態では、PDGFダイマーはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、PDGFヘテロダイマーはPDGF-ABである。

10

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、PDGFを天然源(natural source)から得てよい。いくつかの実施形態では、PDGFを組換えDNA技術によって生産してよい。いくつかの実施形態では、PDGF又はその断片は、固相ペプチド合成等の当業者に公知のペプチド合成技術を用いて作製され得る。

20

【 0 0 3 3 】

天然源から得られた場合、PDGFは生体液に由来し得る。いくつかの実施形態では、生体液には、血液等の、生きた生物に関連する任意の処置された又は処置されていない流体が含まれ得る。生体液は更に、血小板濃縮物、アフエーシスされた(apheresed)血小板、多血小板血漿、血漿、血清、新鮮凍結血漿等の血液成分を含み得る。生体液は、血漿から分離されて生理学的流体又はバッファーに再懸濁された血小板を含み得る。

【 0 0 3 4 】

組換えDNA技術により生産する場合、単一モノマー（例えばPDGFのB鎖又はA鎖）をコードするDNA配列を、培養している発現用の原核細胞又は真核細胞中に導入して、その後ホモダイマー（例えば、PDGF-BB又はPDGF-AA）を生産させてよい。いくつかの実施形態では、PDGFはPDGFホモダイマー（例えば、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC、又はPDGF-DD）を含む。いくつかの実施形態では、培養されている原核細胞又は真核細胞中にヘテロダイマーの両方のモノマー単位をコードするDNA配列を導入し、翻訳されたモノマー単位を細胞に処理させてヘテロダイマー（例えばPDGF-AB）を生産させることによりPDGFヘテロダイマーが作製され得る。いくつかの実施形態では、PDGFはPDGFヘテロダイマー（例えばPDGF-AB）を含む。市販の組換えヒトPDGF-BBは、限定されるものではないが、レインコ・テクノロジーズ社(Leinco Technologies, Inc.; ミズーリ州セントルイス)及びR&Dシステムズ社(R&D Systems, Inc.; ミネソタ州ミネアポリス)を含む種々の供給元から購入することができる。

30

40

【 0 0 3 5 】

本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、PDGFは組換えヒトPDGF(「rhPDGF」)を含む。いくつかの実施形態では、組換えヒトPDGF(「rhPDGF」)は、rhPDGF-AA、rhPDGF-BB、rhPDGF-AB、rhPDGF-CC、rhPDGF-DD、並びにその混合物及び誘導体からなる群から選択されるPDGFダイマーである。いくつかの実施形態では、組換えヒトPDGFはrhPDGFホモダイマーである。いくつかの実施形態では、組換えヒトPDGFホモダイマーは、rhPDGF-AA、rhPDGF-BB、rhPDGF-CC、及びrhPDGF-D

50

Dからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、組換えヒトPDGFホモダイマーはrhPDGF-BBである。いくつかの実施形態では、組換えヒトPDGFはrhPDGFヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、組換えヒトPDGFヘテロダイマーはrhPDGF-ABである。

【0036】

いくつかの実施形態では、PDGF-Bは、以下の断片の1又は複数を含む：全長ヒトB鎖のアミノ酸1~31、1~32、33~108、33~109、及び/又は1~108。ヒトPDGFのB鎖の完全アミノ酸配列（アミノ酸1~109）は米国特許第5,516,896号の図15に示されている。本発明のPDGF-BB組成物はインタクトなヒトPDGF-B（アミノ酸1~109）及びその断片の組合せを含み得ると理解されるべきである。米国特許第5,516,896号に開示されているようなPDGFのその他の断片も使用され得る。いくつかの実施形態では、PDGF-BBは全長ヒトPDGF-B（アミノ酸1~109）の少なくとも65%を含む。いくつかの実施形態では、PDGF-BBは全長ヒトPDGF-B（アミノ酸1~109）の少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%を含む。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、組成物は、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、及びPDGF-DDからなる群から選択されるPDGFダイマー（例えばrhPDGFダイマー）を含み、組成物は、PDGFダイマーを約0.01~約10.0mg/ml、約0.05~約5.0mg/ml、約0.1~約1.0mg/ml、又は約0.1~約2.0mg/ml、約0.1~約3.0mg/ml、約0.1~約4.0mg/ml、約0.1~約0.4mg/ml、約0.1~約5.0mg/ml、約0.9~約1.5mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGFダイマーを約3.4mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGFダイマーを約1.0mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGFダイマーを約0.34mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGFダイマーを以下の濃度のいずれかで含む：約0.05mg/ml；約0.1mg/ml；約0.15mg/ml；約0.2mg/ml；約0.25mg/ml；約0.3mg/ml；約0.35mg/ml；約0.4mg/ml；約0.45mg/ml；約0.5mg/ml、約0.55mg/ml、約0.6mg/ml、約0.65mg/ml、約0.7mg/ml；約0.75mg/ml；約0.8mg/ml；約0.85mg/ml；約0.9mg/ml；約0.95mg/ml；約1.0mg/ml；約1.5mg/ml；約2.0mg/ml；約2.5mg/ml；約3.0mg/ml；約3.5mg/ml；約4.0mg/ml；約4.5mg/ml；又は約5.0mg/ml。これらの濃度は単に特定の実施形態の例であり、PDGFダイマーの濃度は任意の上記濃度の範囲内であってよいと理解されるべきである。

20

30

【0038】

いくつかの実施形態では、PDGFダイマー（例えばrhPDGFダイマー）はPDGF-BBである。いくつかの実施形態では、組成物は、PDGF-BBを約0.01~約10.0mg/ml、約0.05~約5.0mg/ml、約0.1~約1.0mg/ml、又は約0.1~約2.0mg/ml、約0.1~約3.0mg/ml、約0.1~約4.0mg/ml、約0.1~約5.0mg/ml、約0.1~約0.4mg/ml、約0.9~約1.5mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGF-BBを約3.4mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGF-BBを約1.0mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGF-BBを約0.34mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態では、組成物はPDGF-BBを以下の濃度のいずれかで含む：約0.05mg/ml；約0.1mg/ml；約0.15mg/ml；約0.2mg/ml；約0.25mg/ml；約0.3mg/ml；約0.35mg/ml；約0.4mg/ml；約0.45mg/ml；約0.5mg/ml、約0.55mg/ml、約0.6mg/ml、約0.65mg/ml、約0.7m

40

50

g / m l ; 約 0 . 7 5 m g / m l ; 約 0 . 8 m g / m l ; 約 0 . 8 5 m g / m l ; 約 0 . 9 m g / m l ; 約 0 . 9 5 m g / m l ; 約 1 . 0 m g / m l ; 約 1 . 5 m g / m l ; 約 2 . 0 m g / m l ; 約 2 . 5 m g / m l ; 約 3 . 0 m g / m l ; 約 3 . 5 m g / m l ; 約 4 . 0 m g / m l ; 約 4 . 5 m g / m l ; 又は約 5 . 0 m g / m l 。これらの濃度は単に特定の実施形態の例であり、r h P D G F - B B の濃度は任意の上記濃度の範囲内であってよいと理解されるべきである。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態では、P D G F は、P D G F - A A 、 P D G F - B B 、 P D G F - A B 、 P D G F - C C 、 及び P D G F - D D からなる群から選択される。種々の量の P D G F が本発明の組成物中に用いられ得る。使用され得る P D G F の量としては、限定されるものではないが、以下の範囲の量が含まれる：約 1 μ g ~ 約 5 0 m g 、 約 1 0 μ g ~ 約 2 5 m g 、 約 1 0 0 μ g ~ 約 1 0 m g 、 約 2 5 0 μ g ~ 約 5 m g 、 及び約 4 5 0 μ g ~ 約 3 m g 。いくつかの実施形態では、P D G F は P D G F - B B である。種々の量の P D G F - B B が本発明の組成物中で用いられ得る。用いられ得る P D G F - B B の量としては、限定されるものではないが、以下の範囲の量が含まれる：約 1 μ g ~ 約 5 0 m g 、 約 1 0 μ g ~ 約 2 5 m g 、 約 1 0 0 μ g ~ 約 1 0 m g 、 約 2 5 0 μ g ~ 約 5 m g 、 及び約 4 5 0 μ g ~ 約 3 m g 。

【 0 0 4 0 】

本発明のいくつかの実施形態において、P D G F - A A 、 P D G F - B B 、 P D G F - A B 、 P D G F - C C 、 及び P D G F - D D を含む P D G F (例えば r h P D G F) の濃度は、例えば、米国特許第 6 , 2 2 1 , 6 2 5 号 ; 同第 5 , 7 4 7 , 2 7 3 号 ; 及び同第 5 , 2 9 0 , 7 0 8 号に記載されている酵素結合免疫測定法又は P D G F 濃度を決定するための当該技術分野で公知の任意の他のアッセイを用いて決定することができる。本明細書に記載される場合、r h P D G F のモル濃度は、P D G F ホモダイマーの分子量 (例えば、P D G F - B B 、 M W ~ 2 5 k D a) に基づいて決定されている。

【 0 0 4 1 】

本発明のいくつかの実施形態では、P D G F (例えば r h P D G F) は高度に精製された形態であり得る。本明細書において、精製 P D G F は、本発明の溶液中に含める前に、約 9 5 重量%を超える P D G F を含む組成物を含む。溶液は任意の薬学的に許容されるバッファー又は希釈剤を用いて調製され得る。いくつかの実施形態では、P D G F は実質的に精製されていてよい。本明細書において、実質的に精製された P D G F は、本発明の溶液中に含める前に、約 5 ~ 約 9 5 重量%の P D G F を含む組成物を含む。一実施形態では、実質的に精製された P D G F は、本発明の溶液中に含める前に、約 6 5 ~ 約 9 5 重量%の P D G F を含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、実質的に精製された P D G F は、本発明の溶液中に含める前に、約 7 0 ~ 約 9 5 重量%、約 7 5 ~ 約 9 5 重量%、約 8 0 ~ 約 9 5 重量%、約 8 5 ~ 約 9 5 重量%、又は約 9 0 ~ 約 9 5 重量%の P D G F を含む組成物を含む。精製された P D G F 及び実質的に精製された P D G F は組成物中に含まれ得る。

【 0 0 4 2 】

別の実施形態では、P D G F は一部精製されていてよい。本明細書において、一部精製された P D G F は、P D G F を生成するために回収及び分離が必要な多血小板血漿、新鮮凍結血漿、又は任意の他の血液製剤の文脈において、P D G F を含む組成物を含む。本発明の実施形態では、ホモダイマー及びヘテロダイマーを含む本明細書中に記載されている P D G F アイソフォームのいずれも精製又は一部精製されてよいと考えられる。P D G F 混合物を含む本発明の組成物は、P D G F アイソフォーム又は P D G F 断片を一部精製された部分として含み得る。いくつかの実施形態では、一部精製された P D G F 及び精製された P D G F を、米国特許出願第 1 1 / 1 5 9 , 5 3 3 号 (米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 8 4 6 0 2 (A 1) 号) に記載されているように調製することができる。

【 0 0 4 3 】

本明細書に記載されている実施形態のいずれかでは、高度に精製された又は一部精製さ

10

20

30

40

50

れたPDGFは、PDGF - AA、PDGF - BB、PDGF - AB、PDGF - CC、及びPDGF - DDからなる群から選択される。本明細書に記載されている実施形態のいずれかでは、高度に精製された又は一部精製されたPDGFはPDGF - BBである。

【0044】

バッファー

いくつかの実施形態では、組成物はPDGF及びバッファー、好ましくは薬学的に許容されるバッファーを含む。本発明のPDGF溶液における使用に適したバッファーには、限定されるものではないが、炭酸塩、リン酸塩（例えばリン酸緩衝食塩水）、食塩水、ヒスチジン、酢酸塩（例えば酢酸ナトリウム又は酢酸アンモニウム）、酸性バッファー、例えば酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、及びHCl、並びに有機バッファー、例えばリジン、トリスバッファー（例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン）、N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N' - 2 - エタンスルホン酸（HEPES）、3 - （N - モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）、2 - （N - モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）、N - （2 - アセトアミド）イミノニ酢酸（「ADA」）、ピペラジン - N, N' - ビス（2 - エタンスルホン酸）（PIPES）、及びN - （2 - アセトアミド） - 2 - アミノエタンスルホン酸（ACES）が含まれ得る。

【0045】

バッファーは、PDGFとの生体適合性及びバッファーが望ましくないタンパク質修飾を妨げる能力に基づいて選択することができる。バッファーは更に、宿主組織との適合性及び薬学的許容性（*pharmaceutical acceptability*）に基づいて選択することができる。いくつかの実施形態では、PDGF組成物は、酢酸ナトリウムバッファー中に含まれるPDGFを含む。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムバッファー中のPDGFは、PDGF - AA、PDGF - BB、PDGF - AB、PDGF - CC、及びPDGF - DDからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムバッファー中のPDGFはrhPDGF - BBである。

【0046】

バッファーは、種々のモル濃度、例えば約0.1 ~ 約100 mM、約1 ~ 約100 mM、約10 ~ 約100 mM、約1 ~ 約50 mM、約5 ~ 約40 mM、約10 ~ 約30 mM、若しくは約15 ~ 約25 mM、又はこれらの範囲内の任意のモル濃度で使用され得る。いくつかの実施形態では、酢酸バッファーを約20 mMのモル濃度で用いる。バッファーは、種々の濃度、例えば約0.01 ~ 約10 mg/ml、0.05 ~ 約5 mg/ml、約0.5 ~ 約5 mg/ml、0.1 ~ 約1 mg/ml、及び約0.5 ~ 約1 mg/ml、又はこれらの範囲内の任意の濃度で使用され得る。

【0047】

別の実施形態では、PDGFを含む溶液は、可溶化前に適切なバッファーからPDGFを凍結乾燥させた凍結乾燥PDGFを水中に可溶化することにより形成され得る。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態に係るPDGF及びバッファーを含む組成物のpHは約3.0 ~ 約8.0又は約4.0 ~ 約7.0であり得る。いくつかの実施形態では、PDGF及びバッファーを含む組成物のpHは約5.0 ~ 約8.0、より好ましくは約5.5 ~ 約7.0、最も好ましくは約5.5 ~ 約6.5、又はこれらの範囲内の任意の値である。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、PDGF組成物のpHは約4.0 ~ 約7.0である。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、PDGF組成物のpHは約5.0 ~ 約7.0である。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、PDGF組成物のpHは約4.0、約5.0、約6.0、又は約7.0である。いくつかの実施形態では、PDGF及びバッファーを含む組成物のpHは、PDGF又は任意のその他の所望の生物学的活性剤の長期間にわたる安定性及び有効性に適合するpHであり得る。PDGFは一般的に酸性環境中でより安定である。したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、PDGF組成物の酸性保存製剤を提供する。いくつかの実施形態では、PDGF及びバッファーを含む組成物のpHは好ましくは約3.0 ~ 約7.0、より好まし

10

20

30

40

50

くは約4.0～約6.5である。しかし、PDGFの生物学的活性は中性pH範囲の溶液中で最適化され得る。したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、PDGF及びバッファーを含む組成物の中性pHの製剤を提供する。この実施形態では、組成物のpHは好ましくは約5.0～約8.0、より好ましくは約5.5～約7.0、最も好ましくは約5.5～約6.5である。

【0049】

いくつかの実施形態では、PDGFを含む溶液のpHは、本明細書中に記載されているバッファーによって調整され得る。種々のタンパク質でそれらが安定なpH範囲は異なる。タンパク質の安定性は主にタンパク質の等電点及び電荷に反映される。pH範囲は、タンパク質の構造及び/又は生物学的活性を変化させ得るタンパク質分解、加水分解、酸化、等のプロセスへのタンパク質の感受性並びにタンパク質の立体構造に影響を与え得る。

10

【0050】

いくつかの実施形態では、本明細書中に提供されるPDGF組成物は、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DD、及びPDGF-ABからなる群から選択されるPDGF並びにPBS、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、HEPES、MOPS、MES、ADA、PIPES、及びACESからなる群から選択されるバッファーを含む。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供されるPDGF組成物は、rhPDGF-BBと、PBS、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、HEPES、MOPS、MES、ADA、PIPES、及びACESからなる群から選択されるバッファーとを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びPBSを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及び酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及び酢酸アンモニウムを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及び酢酸を含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びクエン酸を含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びクエン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタンを含む。いくつかの実施形態では、rhPDGF組成物はPDGF-BB及びHEPESを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びMOPSを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びMESを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びADAを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びPIPESを含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF-BB及びACESを含む。

20

30

【0051】

本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は1～1000mMである。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は10～1000mMである。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は100～1000mMである。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は5～500mMである。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は50～500mMである。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は10～100mMである。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は20～200mMである。本明細書に記載されているいくつかの実施形態では、バッファーの濃度は10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、又は100mMである。

40

【0052】

いくつかの実施形態では、PDGF組成物は、rhPDGF-AA及び20mM酢酸ナトリウムをpH約6.0で含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物は、rhPD

50

GF - AB及び20mM酢酸ナトリウムをpH約6.0で含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF - BB及び20mM酢酸ナトリウムをpH約6.0で含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF - CC及び20mM酢酸ナトリウムをpH約6.0で含む。いくつかの実施形態では、PDGF組成物はrhPDGF - DD及び20mM酢酸ナトリウムをpH6.0で含む。

【0053】

用量及び投与計画

ラット腱モデルで特定されたPDGFの有効量から、腱の処置領域の相対的大きさに基づき、ヒト等の他の個体の有効量を推定することができる。例えば、ヒトアキレス腱の処置領域はラットアキレス腱の処置領域の約69倍大きいので、ヒト患者に対するPDGFの有効量は、ラット腱モデルで決定されたPDGFの有効量の約69倍となり得る。

10

【0054】

本明細書に記載されているPDGF組成物の投与により送達される例示的な有効量又は用量としては、限定されるものではないが、1用量当たり約450～約3,000 μ g、1用量当たり約1～約10,000 μ gが含まれ、例えば1用量当たり約1～約7,500 μ g、1用量当たり約1～約5,000 μ g、1用量当たり約1～約2,500 μ g、1用量当たり約1～約1,000 μ g、1用量当たり約1～約500 μ g、1用量当たり約1～約250 μ g、1用量当たり約1～約100 μ g、1用量当たり約10～約10,000 μ g、1用量当たり約10～約7,500 μ g、1用量当たり約10～約5,000 μ g、1用量当たり約10～約2,500 μ g、1用量当たり約10～約1,000 μ g、1用量当たり約10～約500 μ g、1用量当たり約10～約250 μ g、1用量当たり約10～約100 μ g、1用量当たり約25～約10,000 μ g、1用量当たり約25～約7,500 μ g、1用量当たり約25～約5,000 μ g、1用量当たり約25～約2,500 μ g、1用量当たり約25～約1,000 μ g、1用量当たり約25～約500 μ g、1用量当たり約25～約250 μ g、1用量当たり約25～約100 μ g、1用量当たり約50～約10,000 μ g、1用量当たり約50～約7,500 μ g、1用量当たり約50～約5,000 μ g、1用量当たり約50～約2,500 μ g、1用量当たり約50～約1,000 μ g、1用量当たり約50～約500 μ g、1用量当たり約50～約250 μ g、1用量当たり約50～約100 μ g、1用量当たり約75～約10,000 μ g、1用量当たり約75～約7,500 μ g、1用量当たり約75～約5,000 μ g、1用量当たり約75～約2,500 μ g、1用量当たり約75～約1,000 μ g、1用量当たり約75～約500 μ g、1用量当たり約75～約250 μ g、1用量当たり約75～約125 μ g、1用量当たり約100～約200 μ g、1用量当たり約200～約300 μ g、1用量当たり約300～約500 μ g、1用量当たり約500～約1,000 μ g、1用量当たり約1,000～約2,500 μ g、1用量当たり約1,000～約5,000 μ g、1用量当たり約1,000～約7,500 μ g、1用量当たり約1,000～約10,000 μ g、1用量当たり約2,500～約5,000 μ g、1用量当たり約2,500～約7,500 μ g、1用量当たり約5,000～約7,500 μ g、1用量当たり約10,000～約50,000 μ g、1用量当たり約50,000～約100,000 μ g、1用量当たり約100,000～約200,000 μ g、1用量当たり約200,000～約300,000 μ g、1用量当たり約300,000～約400,000 μ g、又は1用量当たり約400,000～約500,000 μ gのいずれかが含まれる。

20

30

40

【0055】

いくつかの実施形態では、PDGFを、1用量当たり約400～約1000 μ g、1用量当たり約500～約900 μ g、約600～約800 μ g、1用量当たり約650～約750 μ g、1用量当たり約700 μ gで投与する。

【0056】

いくつかの実施形態では、本明細書中で提供される用量は、50 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L、350 μ L、400 μ L、450 μ L

50

、500 μ L、550 μ L、600 μ L、650 μ L、700 μ L、750 μ L、800 μ L、850 μ L、900 μ L、950 μ L、1000 μ L、又はそれ以上の体積で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中で提供される用量は、100 μ L、200 μ L、300 μ L、400 μ L、500 μ L、600 μ L、700 μ L、800 μ L、900 μ L、1000 μ L、1100 μ L、1200 μ L、1300 μ L、1400 μ L、1500 μ L、1600 μ L、1700 μ L、1800 μ L、1900 μ L、2000 μ L、又はそれ以上の体積で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中で提供される用量は、約1000～約2000 μ L、約1250～約1750 μ L、約1300～約1600 μ L、又は約1500 μ Lの体積で投与される。

【0057】

本明細書中に記載されているPDGF組成物は、1日1回量(single daily dose)で投与されてもよく、例えば1日2回、3回、又は4回の分割した投与量で1日総量を投与してもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているPDGF組成物の1日1回量が、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、又はそれ以上にわたり1日1回投与され得る。PDGF組成物は、1日1回より少ない頻度で投与されてもよく、例えば、週6回、週5回、週4回、週3回、週2回、週1回、2週間に1回、3週間に1回、月1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、5ヶ月に1回、又は6ヶ月に1回で投与されてよい。

【0058】

いくつかの実施形態では、PDGF組成物は一定期間にわたり、間を置いて投与される。いくつかの実施形態では、PDGF組成物は、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、又はそれ以上にわたって週1回投与される。いくつかの実施形態では、PDGF組成物は、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、又はそれ以上にわたって月2回投与される。いくつかの実施形態では、PDGF組成物は、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、又はそれ以上にわたって月1回投与される。

【0059】

腱障害の処置方法

本明細書において、「腱障害(tendinopathy)」という用語は、腱症、腱炎、腱鞘炎等の慢性的な腱損傷を指す。例示的な腱障害としては、限定されるものではないが、アキレス腱障害、膝蓋腱障害、外側上顆炎又は「テニス肘」、内側上顆炎、足底筋膜炎、及び回旋腱板腱障害が含まれる。

【0060】

本明細書において、「腱症(tendinosis)」という用語は、損傷領域周辺の腱修復細胞の数を増加させる、酷使により生じる腱の内部及び周辺の組織の微小断裂の形態であることが一般的な腱の腱内変性(intratendinous degeneration)を特徴とする腱への非炎症性の損傷を指す。腱の変性は、腱のコラーゲン繊維、細胞、及び血管構成要素へのダメージ又はその組織崩壊により生じ、処置されないと、腱の引張強さが低下することがあり、腱断裂につながり得る。場合によっては、腱症は腱の巣状壊死又は石灰化を伴う。

【0061】

本明細書において、「腱炎」という用語は、腱症で観察されるような変性を特徴とするが、腱の炎症、血管の破壊、及び炎症修復反応を更に伴う、腱への炎症性の損傷を指す。腱炎は多くの場合、線維芽細胞及び筋線維芽細胞の増殖並びに出血及び組織化している肉芽組織を伴う。一般的に、腱炎は、例えばアキレス腱炎(アキレス腱に発症する)又は膝蓋腱炎(「ジャンパー膝」としても知られ、膝蓋腱に発症する)のように関わる身体の部分で呼ばれるが、外側上顆炎(「テニス肘」としても知られ、短橈側手根伸筋腱に発症する)等の例外もある。

【0062】

本発明の方法で処置され得る腱障害としては、ヒト又は哺乳動物の体の任意の腱の腱障

10

20

30

40

50

害が含まれる。いくつかの実施形態では、腱障害は腱症である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱炎である。いくつかの実施形態では、腱障害は腱鞘炎である。

【0063】

本発明の方法で処置され得る腱としては、ヒト又は哺乳動物の体の任意の腱が含まれ得る。腱の非限定的な例としては、膝蓋腱、前脛骨筋腱、アキレス腱、膝腱 (hamstring tendon)、半腱様筋腱、薄筋腱、外転筋腱、内転筋腱、棘上筋腱、棘下筋腱、肩甲下筋腱、小円筋腱、屈筋腱、大腿直筋腱、後脛骨筋腱、及び大腿四頭筋腱が含まれる。

【0064】

いくつかの実施形態では、腱は足 (foot) 又は足首の腱である。いくつかの実施形態では、足又は足首の腱は、長母趾伸筋、長母趾屈筋、長指伸筋、短指伸筋、長腓骨筋、短腓骨筋、短母趾屈筋、長指屈筋、後脛骨筋、アキレス腱、及び足底筋膜からなる群から選択される。

10

【0065】

いくつかの実施形態では、腱は脚 (leg) の腱である。いくつかの実施形態では、脚の腱は、膝蓋腱、前脛骨筋腱、アキレス腱、膝屈筋腱、半腱様筋腱、薄筋腱、外転筋腱、及び内転筋腱からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱は、屈筋腱、大腿直筋腱、後脛骨筋腱、及び大腿四頭筋腱からなる群から選択される。

【0066】

いくつかの実施形態では、腱は肩の腱である。いくつかの実施形態では、肩の腱は、棘上筋腱、棘下筋腱、甲下筋腱、及び小円筋腱 (回旋腱板複合体) からなる群から選択される。

20

【0067】

いくつかの実施形態では、腱は肘の腱である。いくつかの実施形態では、肘の腱は、二頭筋腱、三頭筋腱、短橈側手根伸筋、一般的な伸筋腱、指伸筋、小指伸筋、尺側手根伸筋、回外筋、一般的な屈筋腱、円回内筋、橈側手根屈筋、長掌筋、尺側手根屈筋、及び浅指筋 (digitorum superficialis) からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱は手首の腱である。いくつかの実施形態では、手首の腱は、二頭筋腱、三頭筋腱、短橈側手根伸筋、一般的な伸筋腱、指伸筋、小指伸筋、尺側手根伸筋、回外筋、一般的な屈筋腱、円回内筋、橈側手根屈筋、長掌筋、尺側手根屈筋、浅指筋、短母指屈筋、長母指屈筋、短母指外転筋、長母指外転筋、深指屈筋、浅指屈筋、短母指伸筋、及び長母指伸筋からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱は手の腱である。いくつかの実施形態では、手の腱は、短母指屈筋、長母指屈筋、短母指外転筋、長母指外転筋、深指屈筋、浅指屈筋、短母指伸筋、及び長母指伸筋からなる群から選択される。

30

【0068】

いくつかの実施形態では、腱障害は回旋腱板腱障害である。いくつかの実施形態では、回旋腱板腱障害は、棘上筋腱障害、棘下筋腱障害、肩甲下筋腱障害、及び小円筋腱障害からなる群から選択される。

【0069】

いくつかの実施形態では、腱障害は、主に短橈側手根伸筋 (ECRB) 腱における、上腕骨外側顆付着点の伸筋群起始点の外側上顆炎又は「テニス肘」である。いくつかの実施形態では、外側上顆炎を有する対象は、視覚的アナログスコア (VAS) で50の疼痛で示される、関連する疼痛を有する (例えば少なくとも約6ヶ月間)。いくつかの実施形態では、外側上顆炎を有する対象は、例えば少なくとも約6ヶ月間、外側上顆への圧力及び/又は抵抗を加えた手首の伸展 (resisted extension of the wrist) によって大きくなる、関連する疼痛を有する。いくつかの実施形態では、腱障害は、内側上腕骨顆の円回内筋と橈側手根屈筋起始点との間の接点における内側上顆炎又は「ゴルフ肘」である。

40

【0070】

50

いくつかの実施形態では、腱障害は膝蓋腱障害である。いくつかの実施形態では、腱障害はアキレス腱障害である。いくつかの実施形態では、腱障害は足底筋膜炎である。いくつかの実施形態では、腱障害は内側足底筋膜炎である。いくつかの実施形態では、腱障害は外側足底筋膜炎である。

【0071】

別の態様では、本発明は、PDGF及びバッファーを含む有効量の組成物を患部に投与することを含む、腱障害の処置方法を提供する。いくつかの実施形態では、PDGFは、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、及びPDGF-DDからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PDGFはPDGF-BBである。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約75~約7,500µgのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約500~約1,000µgのPDGF-BBを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約450~約3,000µgのPDGFを含む。いくつかの実施形態では、有効量の組成物は、1用量当たり約5,000~約7,500µgのPDGF-BBを含む。

10

【0072】

いくつかの実施形態では、バッファーは、リン酸緩衝食塩水(「PBS」)、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン(「トリス」)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(「HEPES」)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(「MOPS」)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(「MES」)、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(「ADA」)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(「PIPES」)、及びN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(「ACES」)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、バッファーは酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約10~約100mMである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約20mMである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムのpHは約4.0~約7.0である。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムのpHは約6である。

20

【0073】

いくつかの実施形態では、投与は、患部への直接注射によりなされる。いくつかの実施形態では、直接注射は、超音波ガイダンスを用いて又は用いずに、「ペッピング法(peppering technique)」を用いてなされる。「ペッピング法」とは、圧痛領域に針を挿入した後、針を皮膚から出さずに引っ込めて方向を変え、再度挿入することにより複数回の少量注射がなされる注射法である。

30

【0074】

いくつかの実施形態では、患部は骨-腱接合部である。いくつかの実施形態では、患部は腱である。いくつかの実施形態では、腱障害は、アキレス腱障害、膝蓋腱障害、外側上顆炎、内側上顆炎、足底筋膜炎、及び回旋腱板腱障害からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、組成物は単回注射により投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、単回注射により、週1回、4週間投与される。

40

【0075】

いくつかの実施形態では、腱障害は腱症である。いくつかの実施形態では、腱症は長母趾伸筋腱症、長母趾屈筋腱症、長指伸筋腱症、短指伸筋腱症、長腓骨筋腱症、短腓骨筋腱症、短母趾屈筋腱症、長指屈筋腱症、後脛骨筋腱症、アキレス腱症、及び足底筋膜炎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱症は、膝蓋腱症、前脛骨筋腱症、膝腱症、半腱様筋腱症、薄筋腱症、外転筋腱症、及び内転筋腱症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱症は、屈筋腱症、大腿直筋腱症、後脛骨筋腱症、及び大腿四頭筋腱症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱症は、棘上筋腱症、棘下筋腱症、肩甲下筋腱症、及び小円筋腱症からなる群から選択される。

【0076】

50

いくつかの実施形態では、腱症は、二頭筋腱症、三頭筋腱症、短橈側手根伸筋腱症、一般的な伸筋腱症、指伸筋腱症、小指伸筋腱症、尺側手根伸筋腱症、回外筋腱症、一般的な屈筋腱症、円回内筋腱症、橈側手根屈筋腱症、長掌筋腱症、尺側手根屈筋腱症、及び浅指筋腱症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱症は、二頭筋腱症、三頭筋腱症、短橈側手根伸筋腱症、一般的な伸筋腱症、指伸筋腱症、小指伸筋腱症、尺側手根伸筋腱症、回外筋腱症、一般的な屈筋腱症、円回内筋腱症、橈側手根屈筋腱症、長掌筋腱症、尺側手根屈筋腱症、浅指筋腱症、短母指屈筋腱症、長母指屈筋腱症、短母指外転筋腱症、長母指外転筋腱症、深指屈筋腱症、浅指屈筋腱症、短母指伸筋腱症、及び長母指伸筋腱症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱症は、短母指屈筋腱症、長母指屈筋腱症、短母指外転筋腱症、長母指外転筋腱症、深指屈筋腱症、浅指屈筋腱症、短母指伸筋腱症、及び長母指伸筋腱症からなる群から選択される。

10

【0077】

いくつかの実施形態では、腱障害は腱炎である。いくつかの実施形態では、腱炎は、長母趾伸筋腱炎、長母趾屈筋腱炎、長指伸筋腱炎、短指伸筋腱炎、長腓骨筋腱炎、短腓骨筋腱炎、短母趾屈筋腱炎、長指屈筋腱炎、後脛骨筋腱炎、アキレス腱炎、及び足底筋膜腱炎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱炎は、膝蓋腱炎、前脛骨腱炎、膝腱炎、半腱様筋腱炎、薄筋腱炎、外転筋腱炎、及び内転筋腱炎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱炎は、屈筋腱炎、大腿直筋腱炎、後脛骨筋腱炎、及び大腿四頭筋腱炎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱炎は、棘上筋腱炎、棘下筋腱炎、肩甲下筋腱炎、及び小円筋腱炎からなる群から選択される。

20

【0078】

いくつかの実施形態では、腱炎は、二頭筋腱炎、三頭筋腱炎、短橈側手根伸筋腱炎、一般的な伸筋腱炎、指伸筋腱炎、小指伸筋腱炎、尺側手根伸筋腱炎、回外筋腱炎、一般的な屈筋腱炎、円回内筋腱炎、橈側手根屈筋腱炎、長掌筋腱炎、尺側手根屈筋腱炎及び浅指筋腱炎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱炎は、二頭筋腱炎、三頭筋腱炎、短橈側手根伸筋腱炎、一般的な伸筋腱炎、指伸筋腱炎、小指伸筋腱炎、尺側手根伸筋腱炎、回外筋腱炎、一般的な屈筋腱炎、円回内筋腱炎、橈側手根屈筋腱炎、長掌筋腱炎、尺側手根屈筋腱炎、浅指筋腱炎、短母指屈筋腱炎、長母指屈筋腱炎、短母指外転筋腱炎、長母指外転筋腱炎、深指屈筋腱炎、浅指屈筋腱炎、短母指伸筋腱炎、及び長母指伸筋腱炎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腱炎は、短母指屈筋腱炎、長母指屈筋腱炎、短母指外転筋腱炎、長母指外転筋腱炎、深指屈筋腱炎、浅指屈筋腱炎、短母指伸筋腱炎、及び長母指伸筋腱炎からなる群から選択される。

30

【0079】

本発明の方法は、以下の1又は複数を改善し得る：患部関節又は手足の疼痛軽減、患部関節又は手足の硬直軽減、患部関節又は手足の可動性の上昇、患部関節又は手足の強度の上昇、腱障害の進行速度の低下、炎症の軽減、腱の強度の上昇、又は腱強度回復速度の改善。処置の有効性を測定する種々の方法としては、限定されるものではないが、上肢障害評価表(Disabilities of the Arm, shoulder and Hand Score: DASH)、視覚的アナログスコア(VAS)、及び握力検査が含まれる。いくつかの実施形態では、処置により、処置前のDASHスコアが少なくとも25%低下する。いくつかの実施形態では、処置により、処置前のVASスコアが少なくとも25%低下する。いくつかの実施形態では、処置により、圧力及び/又は関節屈曲による疼痛が低下する。いくつかの実施形態では、処置により、圧力及び/又は関節屈曲による疼痛が低下し、関節の可動性が上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、如何なる異常な骨形成も生じない。いくつかの実施形態では、処置により、如何なる異常な腱成長も生じない。いくつかの実施形態では、処置は安全であり、対象に耐えられる。いくつかの実施形態では、組成物の安全性及び忍容性(tolerability)は、身体検査、バイタルサイン測定、臨床検査、X線、及び/又はMRIイメージングの1又は複数により特定される有害事象又は異常の欠如によって評価される。

40

【0080】

50

いくつかの実施形態では、処置により腱の強度が上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、より急速に腱強度が回復する。いくつかの実施形態では、処置により、本発明の組成物の投与から約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又は21日以内に、ベースラインと比べて、腱強度が少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、本発明の組成物の投与から約7日以内に、ベースラインと比べて、腱強度が少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、本発明の組成物の投与から約7日以内に、ベースラインと比べて、腱強度が少なくとも約60%上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、本発明の組成物の投与から約7日以内に、ベースラインと比べて、腱強度が少なくとも約65%上昇する。いくつかの実施形態では、処置により、本発明の組成物の投与から約7日以内に、ベースラインと比べて、腱強度が少なくとも約70%上昇する。いくつかの実施形態では、本発明の組成物の投与から約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14日以内に、腱は、処置の約21日後に測定されるその最終強度の少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%に達する。いくつかの実施形態では、腱は、本発明の組成物の投与から約7日以内に、処置の約21日後に測定されるその最終強度の少なくとも約80%に達する。いくつかの実施形態では、腱は、本発明の組成物の投与から約7日以内に、処置の約21日後に測定されるその最終強度の少なくとも約85%に達する。いくつかの実施形態では、腱は、本発明の組成物の投与から約7日以内に、処置の約21日後に測定されるその最終強度の少なくとも約90%に達する。腱強度は、例えばモデル動物、例えばラットコラゲナーゼモデルにおいて測定することができ、腱強度は、断裂までに測定される荷重である。腱強度の測定例は実施例3に更に詳細に記載されている。

【0081】

キット

別の態様では、本発明は、PDGF及びバッファーを含む組成物を含む容器を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、凍結乾燥PDGFを含む第1の容器と凍結乾燥PDGFを可溶化するためのバッファーを含む第2の容器とを含む。いくつかの実施形態では、キットは、凍結乾燥PDGF及びバッファーを含む第1の容器と凍結乾燥PDGF及びバッファーを可溶化するための水を含む第2の容器とを含む。いくつかの実施形態では、バッファーは、リン酸緩衝食塩水(「PBS」)、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン(「トリス」)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(「HEPES」)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(「MOPS」)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(「MES」)、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(「ADA」)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(「PIPES」)、及びN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(「ACES」)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、バッファーは酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約10~約100mMである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムの濃度は約20mMである。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムのpHは約4.0~約7.0である。いくつかの実施形態では、酢酸ナトリウムのpHは約6である。

【0082】

いくつかの実施形態では、キットは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、注射器、使用のための説明が記載された添付文書等の、販売、治療、及び使用者の立場から望ましい他の材料及び資料を更に含む。本明細書において、「添付文書(packaging insert)」という用語は、医薬品の市販のパッケージに通常含まれ、適応についての情報を含み、医薬品の市販パッケージに通常含まれ、適応、使用方法、用量、投与、禁忌、パッケージ製品と組み合わせられる他の医薬品、及び/又はそのような医薬品の使用

10

20

30

40

50

に関する注意についての情報を含む説明書を指す。

【0083】

縫合糸

P D G Fでコーティングされた縫合糸及びそのような縫合糸の作製方法もまた、提供する。この縫合糸は、例えば、個体の腱の処置（例えば腱裂傷の処置）に使用され得る。好適な縫合糸としては、例えば、ラクチド及びグリコリドのコポリマーから作製されたもの（例えばバイクリル縫合糸（例えば4 - 0 バイクリル縫合糸））が含まれる。好適なコーティング方法としては、例えば、ディップコーティング法、例えばDines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder Elbow Surg 2007;16:215S-221S）に記載されている、ゼラチンが除去されるように変更されてもよいディップコーティング法が含まれる。本出願人は、驚くべきことに、高用量のP D G Fをゼラチンなしで特定の種類の縫合糸にコーティングできることを見出した。いくつかの実施形態では、縫合糸はゼラチンを含まない。いくつかの実施形態では、縫合糸コーティングはゼラチンを含まない。いくつかの実施形態では、縫合糸コーティングは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、又は乳酸 - グリコール酸コポリマーを含まない。いくつかの実施形態では、縫合糸のコーティング方法でゼラチンを使用しない。いくつかの実施形態では、縫合糸コーティングは、P D G Fから本質的になる。いくつかの実施形態では、縫合糸コーティングはP D G F及びバッファからなる。いくつかの実施形態では、縫合糸コーティングはP D G Fからなる。縫合糸は、個体、例えば哺乳動物を処置するために使用され得る。本発明の縫合糸を用いて処置され得る哺乳動物の非限定的な例としては、ヒト、ペット（例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター等）、実験動物（例えばマウス、ラット）、家畜（例えばウマ、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ等）が含まれる。

【0084】

いくつかの実施形態では、縫合糸に添加（load）されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり少なくとも約10 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり少なくとも約100 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり少なくとも約1000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり少なくとも約5000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり少なくとも約6000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり約10 ~ 約20,000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり約100 ~ 約10,000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり約500 ~ 約8,000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり約1000 ~ 約8,000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり約4000 ~ 約8,000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、縫合糸に添加されるP D G Fの量は、縫合糸1 cm当たり約6000 ~ 約7,000 ng P D G Fである。

【0085】

いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるP D G Fの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1 cm当たり少なくとも約10 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるP D G Fの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1 cm当たり少なくとも約100 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるP D G Fの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1 cm当たり少なくとも約1000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるP D G Fの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1 cm当たり少なくとも約5000 ng P D G Fである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から

10

20

30

40

50

放出されるPDGFの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1cm当たり少なくとも約6000ngPDGFである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるPDGFの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1cm当たり約10~約20,000ngPDGFである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるPDGFの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1cm当たり約100~約10,000ngPDGFである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるPDGFの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1cm当たり約500~約8,000ngPDGFである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるPDGFの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1cm当たり約1000~約8,000ngPDGFである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるPDGFの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1cm当たり約4000~約8,000ngPDGFである。いくつかの実施形態では、48時間で縫合糸から放出されるPDGFの累積量はインビトロでの測定で縫合糸1cm当たり約6000~約7,000ngPDGFである。インビトロでの累積PDGF放出量を測定する好適な方法としては、例えば実施例7に記載されている方法が含まれる。本発明のコーティングされた縫合糸は、好ましくは生体内での安定した投薬を可能にし得る。

10

【0086】

以下の実施例は例としてのみ提供するものであり、本発明の範囲を限定することは意図されない。

【実施例】

20

【0087】

<実施例1>

正常及び病気の初代ヒト腱細胞はrhPDGF-BBに応答して増殖する

本研究は、腱障害を有する患者に由来する初代腱細胞の増殖及び/又は走化性をrhPDGF-BBが直接活性化するかどうかを調べた。そのような発見は、腱障害におけるrhPDGF-BBの治療可能性を裏付け得る。

【0088】

患者及び方法

患者

アキレス腱障害患者5名及び後脛骨筋腱(PTT)の腱障害患者5名を含む腱障害患者10名を本研究に用いた。膝の完全な関節置換術を受けた患者5名を更に含めた。

30

【0089】

腱細胞の初代培養

臨床的兆候に対して行われた再腱外科手術中に正常な腱及び損傷した腱から、廃棄されるはずであった腱組織を得た。これらの組織には、アキレス腱又はPTT腱の腱障害部分並びに長指屈筋(FDL)腱組織、アキレス腱組織、及び膝蓋腱組織の健康(腱障害部分でない)部分が含まれていた。これらの組織から初代腱細胞外植片培養を得、3~5継代目に調べた。腱細胞の特定は、腱細胞特異的な遺伝子スクレラキシスの発現並びにコラーゲンa1(I)、a2(I)、及びa1(III)の遺伝子の発現について特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRアッセイで評価することで確認した。

40

【0090】

細胞増殖

腱細胞単層をトリプシン処理し、0.5%の透析されたウシ胎児血清を含むDMEM/F12培地に再懸濁し、一晚付着させた後、漸増濃度のrhPDGF-BBと一緒に24時間インキュベートした。市販のアッセイ(ロシュ・アプライド・サイエンス社、インディアナ州インディアナポリス)を用いてDNA合成中における細胞中へのBrdU取込みに基づいて、細胞増殖速度の変化を評価した。各用量のrhPDGF-BBについて各培養を3重(triplicate)で調べた。

【0091】

細胞遊走

50

腱細胞単層をトリプシン処理し、0.5%の透析されたウシ胎児血清を含むDMEM/F12培地に再懸濁し、96ウェルChemotax（登録商標）ディスプレイ細胞遊走システム（ニューロ・プローブ社（Neuro Probe）、メリーランド州ゲイサーズバーグ）の上側チャンパーに入れた。下側チャンパーには漸増濃度のrhPDGF-BBを入れた。チャンパーを隔てる膜を介して腱細胞を48時間遊走させた。次いで、96ウェルプレートをスピンし、3回凍結融解することで遊走した細胞を溶解させた。プロメガ社（ウィスコンシン州マディソン）から市販されているキットを用いて、細胞質の乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）に基づいて、遊走した生細胞の量を測定した。

【0092】

統計解析

rhPDGF-BBを用いた刺激が用量依存的に腱細胞の増殖に影響するかどうかについて、一元配置ANOVAを用いて決定した。

【0093】

結果

腱細胞培養だけがスクレラキシスmRNAを発現し、対照の肺線維芽細胞培養又は対照の一次T細胞培養はこれを発現しなかった。一方、腱細胞及び線維芽細胞はコラーゲン遺伝子mRNAを発現したが、リンパ球はこれを発現しなかった。

【0094】

全ての場合で、疾患プロセスに関わる又は関わらない腱組織由来の腱細胞は、BrdU取込みを加速させることでrhPDGF-BB刺激に应答した（ $p < 0.05$ 、一元配置ANOVA）。この应答は、用量依存的であり、10、50、及び150ng/mLのrhPDGF-BBで観察された。全ての細胞培養がrhPDGF-BB刺激に应答したが、rhPDGF-BB刺激後のBrdU取込みの大きさには患者間で大きなばらつきがあった。BrdU取込みは、対照の非刺激培養と比べて、最低 2.1 ± 0.2 倍から最大 10.7 ± 0.5 倍まで増加した。5名の患者の腱細胞は逆説的に应答し、高濃度（50及び150ng/mL）のrhPDGF-BBよりも低濃度（10ng/mL）のrhPDGF-BBでBrdU取込みがより大きく増加した。このような逆説的な应答は、これらの患者の腱障害組織及び正常組織のどちらに由来する腱細胞でも観察された。4名の患者の健康な腱に由来する腱細胞が、rhPDGF-BB刺激に应答して、疾患組織に由来する腱細胞の2倍のBrdUを取り込んだ。患者の1名では、疾患組織に由来する腱細胞が、rhPDGF刺激に应答して、疾患プロセスに関わらない組織に由来する腱細胞の4倍のBrdUを取り込んだ。図2は、健康腱細胞及び疾患腱細胞について、1日目、4日目、及び8日目に培養培地に0、10、50、及び150ng/mLのPDGFを添加した場合のBrdU取込み（y軸、吸収）を示す図である。吸収の増加は、増殖の増加と一致し、健康腱細胞及び疾患腱細胞はどちらも1日目にPDGFに应答した。

【0095】

全ての場合で、腱細胞は、50ng/mL及び150ng/mLのrhPDGF-BBに走化性の应答をした。走化性実験では、パイロット実験で应答が少なかったので、腱細胞を10ng/mLのrhPDGF-BBにはさらさなかった。ここでも、应答は用量依存的であり、50ng/mLよりも150ng/mLのrhPDGF-BBで走化性が強かった。しかし、5名の患者の腱細胞は、150ng/mLよりも50ng/mLのrhPDGF-BBにより強い走化性に应答し、遊走した細胞の数が有意に減少した（ $p < 0.05$ 、スチューデントの両側t検定）。rhPDGF-BBに対する最大走化性应答は、患者間でばらつきがあり、非刺激対照と比べて $1.4 \pm 0.1 \sim 4.0 \pm 0.5$ 倍であった。対応する腱障害の腱組織又は健康な腱組織に由来する腱細胞培養内では、rhPDGF-BBへの腱細胞の走化性には統計的有意差はなかった（ $p > 0.05$ ）。図1は、濃度0、50、又は150ng/mLのPDGFで培養した細胞の走化性を示す図である（y軸は上昇した光学濃度を示す）。遊走は、1250、2500、5000、及び10000個の初期細胞で評価した。

【0096】

10

20

30

40

50

結論

これらの実験の結果は、健康組織及び腱障害組織に由来する腱細胞が、増殖速度及び走化性速度を増大することにより r h P D G F - B B に応答することを示唆している。重要なことに、一部の患者に由来する腱細胞は P D G F に対して逆説的な応答を示し、低用量より高用量の方が影響が小さかった。同様に重要なことに、疾患腱に由来する腱細胞は、いくつかの場合で、P D G F に対して健康な腱に由来する腱細胞と示差的な応答をした。このことは、臨床状況において適切な投薬が最も重要となり得ることを示している。

【 0 0 9 7 】

< 実施例 2 >

r h P D G F - B B を用いた安全性の研究

10

局所注射試験

本研究の目的は、ラットにアキレス腱内送達した後の r h P D G F - B B の局所的毒性を決定することである。アキレス腱内投与は、診療所において外側上顆炎を処置するための r h P D G F - B B の投与経路を真似た。アキレス腱 - 踵骨接合部の注射部位は、短橋側手根伸筋腱及び外側上顆骨の付着部位を真似た。

【 0 0 9 8 】

本研究ではスプライングドローラーラットを用いた。動物は、研究期間中同じ研究施設に収容した。全ての収容 (h o u s i n g) 及び管理 (h u s b a n d r y) は動物保護法及び「実験動物の管理と使用に関する指針 (G u i d e f o r t h e C a r e a n d U s e o f L a b o r a t o r y A n i m a l s) 」に従った。標準的なプロトコールに従ってラットに餌及び水を与えた。麻酔等の適当な研究関連事象の際には食物及び水を控えた。研究前に動物を最低 5 日間施設に順化させた。この順化期間により、動物を研究用の部屋の環境に慣れさせる。

20

【 0 0 9 9 】

異なる濃度の無菌組換えヒト P D G F - B B の 3 つのバッチ、(1) 1 0 . 3 m g / m l の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0 ± 0 . 5) ; (2) 5 . 2 m g / m l の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0 ± 0 . 5) ; 及び (3) 1 . 7 m g / m l の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0 ± 0 . 5) を研究に用いた。ビヒクル対照サンプルは、無菌 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0 ± 0 . 5) とし、標準的なプロトコールに従って調製した。

30

【 0 1 0 0 】

試験物質及び対照物質の取扱いには標準的な研究室の安全手順 (s a f e t y p r o c e d u r e) を用いた。具体的には、用量の調製及び投与中、手袋、フェイスマスク、手術着 (g o w n) (又は白衣 (l a b c o a t)) 、及びアイプロテクション (e y e p r o t e c t i o n) を着用した。

【 0 1 0 1 】

1 群当たり n = 6 0 で各群が雄 3 0 頭及び雌 3 0 頭を含む 4 つの群に動物をランダム化した。各群の四頭筋の骨腱接合部に以下の化合物を単回腱内注射した：(1) 2 0 m M 酢酸ナトリウム；(2) 5 1 μ g の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム；(3) 1 5 6 μ g の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム；又は (4) 5 1 5 μ g の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム。注射は 2 8 . 5 G の針を付けたインスリン注射器を用いた行った。全ての動物は 1 日目に試験物質の単回アキレス腱内注射を受けた。第 1 群の動物は、酢酸ナトリウム (N a O A c) を受け、第 2 ~ 4 群は、それぞれ用量 3 6 . 6 9、1 1 2 . 2 3、及び 3 7 0 . 5 0 μ g / m m ² の r h P D G F - B B を受けた。

40

【 0 1 0 2 】

各群の三分の一を、r h P D G F - B B 注射後 1 日目、2 週目、及び 6 週目に屠殺した。生存中処置群の完了後、U S D A の動物保護法、実験動物の管理と使用に関する指針 (I L A R p u b l i c a t i o n , 1 9 9 6 , N a t i o n a l A c a d e m y P r e s s) 、及び H S S 獣医手技 (H S S v

50

eterinary procedure) に従い、動物を安楽死させ、組織を回収した。CO₂の過剰投与により動物を安楽死させた。反射(まばたき、引っ込み等)の欠如により死亡を確認した。

【0103】

評価基準には、臨床観察、身体評価、体重、及び食物消費量の測定、臨床病理、剖検、臓器重量、並びに腱毒性及び骨毒性の検査を含む注射された又は注射されていない後脚首の組織病理評価を含めた。

【0104】

血液学的評価、凝固試験、及び種々の臨床化学試験を動物に行った。血液学的評価には以下の測定が含まれる：白血球数(WBC)；赤血球数(RBC)；ヘモグロビン(Hb)の測定、平均赤血球血色素(MCH)レベル、ヘマトクリット(HCT)、及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)；血小板数；平均赤血球容積(MCV)の測定、及び白血球分類の評価、例えば好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、%好中球、%リンパ球、%単球、及び%好酸球)。凝固試験では活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)及びプロトロンビン時間(PT)を測定した。臨床化学試験には以下の分析が含まれる：アルカリホスファターゼ(ALP)、グルコース(GLU)、アルブミン(ALB)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、総ビリルビン(TBIL)、グロブリン(Glob)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、コレステロール(CHOL)、カリウム(K)、ガンマグルトミルトランスフェラーゼ(GGT)、トリグリセリド(TRIG)、塩化物(CI)、クレアチニン(CREAT)、血中尿素窒素(BUN)、ナトリウム(Na)、無機リン(PHOS)、カルシウム(Ca)、A/G比、及び総タンパク質(TPROT)。

【0105】

結果

用量36.69 µg/mm²、112.23 µg/mm²、370.50 µg/mm²のrhPDGF-BBをラットに単回アキレス腱内注射しても死亡率又は瀕死状態に対する影響はなかった。更に、臨床観察、体重への影響、又は食物消費量に、試験物質に関連する生物学的に有意な差はなかった。

【0106】

2日目では、対照(第1群)と比べた時、全ての処置ラット群で分析した血液学又は尿検査パラメーターのいずれにおいても、統計的又は生物学的に有意な差はなかった。白血球及び凝固パラメーターには変化が見られたが、これらの変化は異種タンパクの注射に対する微小な急性炎症反応と一致した。更に、複数の血清化学パラメーターにおいても微小変化が観察された。しかし、これらの変化は個々の動物の差異によるものと考えられ、生物学的に有意とは見なされず、如何なる臓器特異的毒性にも関連しなかった。

【0107】

16日目及び43日目では、対照(第1群)と比べた時、全ての処置ラット群で、分析した血液学、白血球、凝固、又は尿検査パラメーターのいずれにおいても生物学的に有意な差はなかった。

【0108】

試験物質に関連する巨視的観察結果(macroscopic observation)はなく、全ての巨視的観察結果は偶発的なものであると見なされた。

【0109】

2日目に対照及び処置ラット群で急性出血及び亜急性炎症が観察されたが、頻度及び重症度は処置ラット群で大きいようであった。16日目では、急性出血は鎮まり、亜急性炎症はほとんど起こらなくなった。処置ラット群は、浅屈筋腱及び踵骨腱の腱細胞の肥大及び過形成に加えて、上記腱の腱傍組織の線維増殖及び血管新生を示した。43日目までに、線維増殖及び血管新生の重症度は改善されたが、処置ラットの大部分で、依然として腱細胞は肥大及び過形成を示していた。

【0110】

10

20

30

40

50

第2の種の局所注射試験

本研究の目的は、イヌのアキレス腱内に送達した後の組換えヒト血小板由来成長因子 (rhPDGF-BB) の局所的毒性を決定することである。

【0111】

本研究ではビーグル犬を用いる。動物は、研究期間中同じ研究施設に収容する。全ての収容及び管理は動物保護法及び「実験動物の管理と使用に関する指針」に従う。標準的なプロトコールに従ってイヌに餌及び水を与える。麻酔等の適当な研究関連事象の際には食物及び水を控える。研究前に動物を最低5日間施設に順化させる。この順化期間により、動物を研究用の部屋の環境に慣れさせる。

【0112】

異なる濃度の無菌組換えヒトPDGF-BBの3つのバッチ、(1) 10 mg/mlのrhPDGF-BBを含む20 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0 ± 0.5); (2) 3 mg/mlのrhPDGF-BBを含む20 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0 ± 0.5); 及び(3) 1 mg/mlのrhPDGF-BBを含む20 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0 ± 0.5) を研究に用いた。ビヒクル対照サンプルは、無菌20 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0 ± 0.5) とし、標準的なプロトコールに従って調製する。

【0113】

試験物質及び対照物質の取扱いには標準的な研究室の安全手順を用いる。具体的には、用量の調製及び投与中、手袋、フェイスマスク、手術着 (又は白衣)、及びアイプロテクションを着用する。

【0114】

1群当たりn = 24で各群が雄12頭及び雌12頭を含む4群に動物をランダム化する。各群の四頭筋の骨腱接合部に以下の組成物を単回腱内注射する: (1) 20 mM酢酸ナトリウム; (2) 1.5 mgのrhPDGF-BBを含む20 mM酢酸ナトリウム; (3) 4.5 mgのrhPDGF-BBを含む20 mM酢酸ナトリウム; 又は(4) 15 mgのrhPDGF-BBを含む20 mM酢酸ナトリウム。注射は28.5 Gの針を備えたインスリン注射器を用いて一定の用量体積1.5 mLで行う。

【0115】

各群の三分の一を、rhPDGF-BB注射後1日目、2週目、及び6週目に屠殺する。生存中処置群の完了後、USDAの動物保護法、実験動物の管理と使用に関する指針 (ILAR publication, 1996, National Academy Press)、及びHSS獣医手技に従い、動物を安楽死させ、組織を回収する。ペントバルビタールナトリウム (Fatal-Plus (登録商標) 又は適切な代替物) による深い麻酔下で全採血により動物を安楽死させる。

【0116】

血液学的評価、凝固試験、及び種々の臨床化学試験を動物に行う。

【0117】

血液学的評価には以下の測定値が含まれる: 白血球数 (WBC); 赤血球数 (RBC); ヘモグロビン (Hb) の測定、平均赤血球血色素 (MCH) レベル、ヘマトクリット (HCT)、及び平均赤血球血色素濃度 (MCHC); 血小板数; 平均赤血球容積 (MCV) の測定、及び白血球分類の評価、例えば好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、%好中球、%リンパ球、%単球、及び%好酸球)。凝固試験では活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 及びプロトロンビン時間 (PT) を測定する。臨床化学試験には以下の分析が含まれる: アルカリホスファターゼ (ALP)、グルコース (GLU)、アルブミン (ALB)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、総ビリルビン (TBIL)、グロブリン (Glob)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、コレステロール (CHOL)、カリウム (K)、ガンマグルトタミルトランスフェラーゼ (GGT)、トリグリセリド (TRIG)、塩化物 (Cl)、クレアチニン (CREAT)、血中尿素窒素 (BUN)、ナトリウム (Na)、無機リン (PHOS)、カルシウム (Ca)、A/G比、及び総タンパク質 (TPROT)。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 8 】

腱毒性及び骨毒性の検査を含む局所組織の組織病理も評価する。

【 0 1 1 9 】

r h P D G F - B B はイヌに毒性ではない。

【 0 1 2 0 】

急性全身毒性

本研究の目的は、静脈内注射によって投与された r h P D G F - B B の全身毒性を決定することである。

【 0 1 2 1 】

本研究ではスプラーグドローラットを用いる。動物は、研究期間中同じ研究施設に収容する。全ての収容及び管理は動物保護法及び「実験動物の管理と使用に関する指針」に従う。標準的なプロトコールに従って動物に餌及び水を与える。麻酔等の適当な研究関連事象には食物及び水を控える。研究前に動物を最低5日間施設に順化させる。この順化期間により、動物を研究用の部屋の環境に慣れさせる。

10

【 0 1 2 2 】

無菌組換えヒト P D G F - B B を 3 . 0 m g / m l 及び 0 . 3 m g / m l で含む 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0 ± 0 . 5) を本研究に用いる。投薬の日、0 . 3 m g / m l の溶液の一部を 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファーで 1 : 1 0 希釈して 0 . 0 3 m g / m l の溶液を作製し、これも本研究で使用する。対照サンプルは無菌 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー (p H 6 . 0 ± 0 . 5) であり、標準的な手順に従って調製する。

20

【 0 1 2 3 】

試験物質及び対照物質の取扱いには標準的な研究室の安全手順を用いる。具体的には、用量の調製及び投与中、手袋、フェイスマスク、手術着 (又は白衣) 、及びアイプロテクションを着用する。

【 0 1 2 4 】

1 群当たり n = 4 0 (1 群当たり雄 2 0 頭及び雌 2 0 頭) の 4 群に動物をランダム化した。用量群 1 には、2 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 6 . 0 ± 0 . 5) を 1 k g 当たり 1 . 4 m l の体積で単回静脈内注射した。用量群 2 には、3 . 0 m g / m l の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 6 . 0 ± 0 . 5) を 1 k g 当たり 1 . 4 m l の体積で単回静脈内注射した。用量群 3 には、0 . 3 m g / m l の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 6 . 0 ± 0 . 5) を 1 k g 当たり 1 . 4 m l の体積で単回静脈内注射した。用量群 4 には、0 . 0 3 m g / m l の r h P D G F - B B を含む 2 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 6 . 0 ± 0 . 5) を 1 k g 当たり 1 . 4 m l の体積で単回静脈内注射した。

30

【 0 1 2 5 】

死亡及び他の重度な毒性の兆候について動物を評価する。研究期間中、生存率、臨床検査、体重、食物消費量、眼の検査、及び臨床病理について動物を観察する。2 日目及び 1 4 日目の剖検後 (雄 1 0 頭及び雌 1 0 頭 / 群 / 時点) 、血液学、凝固、血清化学、及び尿検査を含む動物の臨床病理を評価し、完全な剖検を行う。

40

【 0 1 2 6 】

< 実施例 3 >

コラゲナーゼ誘発ラットアキレス腱損傷モデルにおける r h P D G F - B B の腱内 (I T) 適用の用量反応

本研究の目的は、ラット腱コラゲナーゼモデルにおいて r h P D G F - B B の腱内適用の用量反応を決定してアキレス腱の損傷及びリモデリングに対する r h P D G F - B B の修復効果を検証することである。本発明者らは、r h P D G F - B B の腱内送達により、細胞増殖がアップレギュレートされ且つ腱の生体力学的強度が回復することによって、腱が修復されるという仮説を立てた。

【 0 1 2 7 】

50

組換えヒト血小板由来成長因子BB (rhPDGF-BB) は、骨芽細胞、腱細胞、軟骨細胞、間葉系幹細胞等の間葉起源細胞に分裂促進性及び走化性である。したがって、筋骨格系の損傷部位に導入されると、rhPDGF-BBは結合組織細胞及び前駆細胞を処置部位に引きつけ、その増殖を刺激することにより細胞の数を増やし、これがその後マトリックスを沈着させて損傷組織を再生する。更に、上記実施例1に示されるように、PDGF-BBにさらされた腱細胞はDNA合成及び走化性の増大を示した。

【0128】

コラゲナーゼ誘発ラットアキレス腱損傷モデル

腱障害を評価するための良く確立された1つのモデルはない。しかし、コラゲナーゼ誘発ラットアキレス腱損傷モデルはアキレス腱損傷に広く使用されてきた。このモデルは、腱炎に相当すると考えられる変性的な腱応答を開始し、上り坂トレッドミル過剰使用モデル(4ヶ月)と比べて急速に腱炎損傷を発症する(3日以内)。したがって、これは、腱損傷に対するrhPDGF-BBの効果を短時間でスクリーニングするモデルとなる。したがって、このモデルは、rhPDGF-BBの治療効果の審査に、誘発期間が比較的短く、非常に好適であり、臨床的腱炎に相当する。

【0129】

合計165頭の雄のスプラーグドローラーラットを本研究に用いた。これらの動物の右アキレス腱にコラゲナーゼを注射し、その後、コラゲナーゼ注射の7日後に損傷部位にrhPDGF-BB又は対照(バッファーのみ)を単回注射処置した。コラゲナーゼ及びrhPDGF-BB又は対照(バッファーのみ)を、28.5Gの針を付けたインスリン注射器を用いてラットの骨-腱接合部近くの右アキレス腱に注射した。

【0130】

表1に概要を示すように、各群についてn=15で、動物を11群に分けた。このモデルを用いた文献で報告されている実験では、従来から、生体力学的試験は処置群当たり8~9頭の動物、組織学的分析には3~6頭の動物が使用されてきた。

【0131】

試験物質及び対照物質

研究対照群に、損傷した腱の自然な治癒応答を見積もるための対照として、rhPDGF-BBを用いないコラゲナーゼ処置ラットアキレス腱のラット腱の自然な修復応答を用いた。研究試験物質に、腱の再生を助ける注射用薬物としてrhPDGF-BBを用いた。組換えヒト血小板由来成長因子BB (rhPDGF-BB) は、骨芽細胞、腱細胞、軟骨細胞、間葉系幹細胞等の間葉起源細胞に分裂促進性及び走化性である。したがって、筋骨格系の損傷部位に導入されると、rhPDGF-BBは結合組織細胞及び前駆細胞を処置部位に引きつけ、その増殖を刺激することにより細胞の数を増やし、これがその後マトリックスを沈着させて損傷組織を再生する。更に、上記実施例1に示されるように、PDGF-BBにさらされた腱細胞はDNA合成及び走化性の増大を示した。

【0132】

異なる濃度の無菌組換えヒトPDGF-BBの2つのバッチ、(1)3.4mg/mlのrhPDGF-BBを含む20mM酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0±0.5)及び(2)0.34mg/mlのrhPDGF-BBを含む20mM酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0±0.5)を本研究に用いた。ピヒクル対照サンプルは、無菌20mM酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0±0.5)とし、標準的なプロトコールに従って調製した。用量には、1.02µg、10.2µg、及び102µgのrhPDGF-BBが含まれる。3.4mg/ml及び0.34mg/mlの2つの濃度のrhPDGF-BBを含むNaOAcバッファーを調製した。30µlで腱内に送達された時に、10.2µg及び10.2µgの用量レベルとなる。用量1.02µg用には、0.34mg/mlの溶液を20mMのNaOAcバッファーで1:10希釈した。コラゲナーゼは粉末の形態でシグマ-アルドリッチ社から購入し(カタログ番号C-6885;ミズーリ州セントルイス)、50mMのNaH₂PO₄及び150mMのNaClを含むPBS(pH7.4±0.5)中に所望の濃度(10mg/mL)で再構成した。

【0133】

研究開始時、 3.4 mg/ml のrhPDGF-BB、 0.34 mg/ml のrhPDGF-BB、及び 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー試験物質の少なくとも2つの未開封、未使用バイアルを、投薬、安定性、及び濃度の分析に用いるバイアルと同じ保存条件(4)下に保持した。UV/Vis分光測定及び逆相HPLC分析を用いて安定性及び用量の検証分析を行った。

【0134】

試験物質及びビヒクル対照物質の取扱いには標準的な研究室の安全手順を用いた。具体的には、用量の調製及び投与中、手袋、フェイスマスク、手術着(又は白衣)、及びアイプロテクションを着用した。

10

【0135】

試験系(動物及び動物管理)

165頭の雄のスプラグドローラット(チャールズ・リバー・ラボラトリーズInt'l社、マサチューセッツ州ウィルミントン)を本研究に用いた。研究に選択する前に、健康及び正常な歩行を確認する視覚検査により全動物をスクリーニングした。全ての動物を、体重に基づいて研究に選択した(コラゲナーゼ注射時におよそ 315 g)。各ラットは尾に書かれた固有の番号により識別した。体重に従ってラットをランダムに各群に割り当てた。

【0136】

ラットは研究期間中同じ研究施設に収容した。全ての収容及び管理は動物保護法及び「実験動物の管理と使用に関する指針」に従った。麻酔等の適当な研究関連事象の際には食物及び水を控えたが、それ以外では自由に摂取させた。研究前に動物を最低5日間施設に順化させた。この順化期間により、動物を研究用の部屋の環境に慣れさせた。

20

【0137】

実験デザイン

ケージ当たり4頭で収容した動物(1群当たり15頭)にイソフルランで麻酔し、踵関節領域を刈りとって注射のために消毒した。 28.5 G の針を付けたインスリン注射器を用いて、全ラットの骨-腱接合部近くの右アキレス腱にコラゲナーゼ(50 mM の NaH_2PO_4 及び 150 mM の NaCl を含む $\text{pH} 7.4$ のPBSに溶解した 10 mg/ml のもの $50 \mu\text{l}$)を注射した(図3)。コラゲナーゼ注射の7日後、 28.5 G の針を付けたインスリン注射器を用いて、ビヒクル又は $1.02 \mu\text{g}$ 、 $10.2 \mu\text{g}$ 、若しくは $102 \mu\text{g}$ のrhPDGF-BBを総体積 $30 \mu\text{l}$ で投与した。腱のダメージの組織病理学的評価及び生体力学のために7日目(ベースライン)、14日目、28日目に動物を殺した。15頭の各群について、6頭を組織病理学に用い、9頭の後脚(処置及び非処置後肢の両方)を取り、解剖し、その後の生体力学的評価のために凍結した。生体力学的評価は以下に説明する。

30

【0138】

【表 1】

表 1. 処置群

群	処置群	動物(n)	rhPDGF・BB	エンドポイント
1	コラゲナーゼ+非処置 終了日 7 (ベースライン)	15	0	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
2	コラゲナーゼ+非処置 終了日 14	15	0	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
3	コラゲナーゼ+非処置 終了日 28	15	0	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
4	コラゲナーゼ+酢酸ナト リウム 終了日 14	15	0	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
5	コラゲナーゼ+酢酸ナト リウム 終了日 28	15	0	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
6	コラゲナーゼ+rhPDGF・ BB 終了日 14	15	102µg	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
7	コラゲナーゼ+rhPDGF・ BB 終了日 28	15	102µg	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
8	コラゲナーゼ+rhPDGF・ BB 終了日 14	15	10.2µg	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
9	コラゲナーゼ+rhPDGF・ BB 終了日 28	15	10.2µg	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
10	コラゲナーゼ+rhPDGF・ BB 終了日 14	15	1.02µg	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)
11	コラゲナーゼ+rhPDGF・ BB 終了日 28	15	1.02µg	生体力学(n=9)/組織学 (n=6)

【 0 1 3 9 】

生存中の観察及び測定

屠殺するまで動物を少なくとも1日1回観察した。動物の処置はU S D Aの動物保護法(連邦規則集第9巻の第1部、第2部、及び第3部)に略述されている規則並びに実験動物の管理と使用に関する指針(ILAR publication, 1996, National Academy Press)及びH S S獣医手技に規定されている条件に従った。

【 0 1 4 0 】

コラゲナーゼ注射前及び屠殺前に体重を記録した。食物消費量は定性的であった。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 1 】

全動物を適切な研究エンドポイントで屠殺した。予定外の動物の死亡は観察されなかった。生存中処置群の完了後、U S D A の動物保護法、実験動物の管理と使用に関する指針 (ILAR publication, 1996, National Academy Press)、及びH S S 獣医手技に従い、動物を安楽死させ、組織を回収した。C O₂の過剰投与により動物を安楽死させた。反射 (まばたき、引っ込み等) の欠如により死亡を確認した。

【 0 1 4 2 】

肉眼的な腱の大きさ

剖検の直前に、以下のシステムに従って足首の太さをスコア化した：0 = 成長なし；1 = 軽度の成長；2 = 中程度の成長；3 = 重度の成長。

10

【 0 1 4 3 】

組織学

剖検では、皮膚を注意深く踵関節領域から外し、足全体を10%中性緩衝ホルマリン (N B F) に浸し、屈曲状態で固定した。10% N B F 中で最低12時間及び脱灰のための10%ギ酸中で4~5日の後、腱-骨接合部を特に強調して足首の内側及び外側で切り整え、約1/4インチ厚の組織ブロックを得 (腱が付着している足首の中央部)、ラベルした組織用カセットに入れた。切り整えた足首組織ブロックを矢状方向でパラフィン包埋に処理した。回転式マイクロームを用いて、骨-腱接合部が好適に視覚化されるまで、200ミクロン毎に代表的な4~6ミクロン厚の切片を取り、その後、これらの切片をヘマトキシリン・エオジン (H & E) 染色、マッソン三色染色し、増殖細胞核抗原 (P C N A) の免疫組織化学的検出に用いた。

20

【 0 1 4 4 】

血清を得るために、イソフルラン麻酔下で大動脈用のバキュテナを差し込むことにより、全動物を末端で出血させた (10mlの血液を採取した)。血液を1,800g、室温で10分間遠心して血清を得た。1mlまでの血清を2mlのエッペンドルフ (登録商標) チューブに入れた。分析前に血清を-70 で保存した。

【 0 1 4 5 】

組織病理学的評価を以下に記載するように行った。種々のパラメータの測定は、光学顕微鏡を用いて各組織学的検体 (スライド) から3つの等距離視野カラムを評価することによりなされた。

30

【 0 1 4 6 】

組織病理のために測定されたパラメーターには以下が含まれる。

【 0 1 4 7 】

(1) 炎症

H & E 染色により、炎症細胞の種類 (好中球、リンパ球、及びマクロファージ) を決定した。炎症を以下のようにスコア化した：(a) 0 = 炎症なし；(b) 1 = 微小炎症 (100%単核；好中球なし)；(c) 2 = 中程度の炎症 (好中球 = 19%；細胞の残りは単核)；及び(d) 3 = 顕著な炎症 (好中球 = 20%；細胞の残りは単核)。

【 0 1 4 8 】

(2) コラーゲン組織化

コラーゲン原線維の組織化をH & E 及びトリクロームによる染色により評価した。コラーゲンの組織化を以下のようにスコア化した：(a) 0 = コラーゲン原線維が完全に組織崩壊している；(b) 1 = コラーゲン原線維の一部は整列しているが、束の大部分が高度に組織崩壊している；(c) 2 = コラーゲン原線維が高度に整列しているが、束はまだ幾分組織崩壊している；及び(d) 3 = 組織中に存在するコラーゲン原線維が完全に整列しており、コラーゲン束の組織崩壊がない。

40

【 0 1 4 9 】

(3) コラーゲン繊維密度

修復組織中のコラーゲン繊維密度をH & E 及びトリクロームによる染色により評価した。コラーゲン繊維密度を以下のようにスコア化した：(a) 0 = 低密度コラーゲン束；(

50

b) 1 = 中密度コラーゲン束 ; 及び (c) 2 = 高密度コラーゲン束。

【 0 1 5 0 】

(4) 修復部位における腱の血管新生

修復組織における血管新生を H & E 及びトリクロームによる染色で評価した。血管新生を以下のようにスコア化した : (a) 0 = なし (血管新生なし) ; (b) 1 = 中程度 ; 及び (c) 2 = 豊富。

【 0 1 5 1 】

(5) 細胞増殖

PCNA (増殖細胞核抗原) の免疫組織化学 (IHC) を用いて細胞増殖を評価した。接眼マイクロメーターを用いて $39.4 \times 197 \mu\text{m}$ ($7762 \mu\text{m}^2$) の領域又はマイクロメーター上の 10×50 ユニットを描いた。各検体について、この寸法の 3 つの視野を計数した。これらの 3 つの等距離の視野から、増殖している細胞を計数した。

10

【 0 1 5 2 】

(6) 腱幅の測定

顕微鏡下で接眼マイクロメーターを用いて腱の 2 つの異なる部位を測定した。踵骨付着点 (付着部位の厚さを最もよく表すと考えられる非接線領域 (non - t a n g e n t i a l a r e a)) 及び腱自体 (増殖応答のある付着部位から遠い腱本体の最も厚い非接線領域) の測定値を取った。

【 0 1 5 3 】

マンホイットニーの U 検定又はクラスカル・ワリス検定 (ノンパラメトリック) を用いて半定量的組織病理データを分析した。1元配置分散分析 (1元配置 ANOVA) を適切な多重比較事後検定と共に用いて全群の適当なデータを分析した。

20

【 0 1 5 4 】

生体力学的試験

本研究のこの部分には 99 頭の動物を用いた。損傷を誘発した腱を、反対側のコラーゲナーゼ処置しなかった腱と共に評価した。合計 123 個の生体力学的検体を評価した。処置の割当ての概略を上記表 1 に示す。

【 0 1 5 5 】

脚 (l e g) を大腿部で切り離し、足中央部 (m i d - f o o t) まで切開 (d e - s l e e v e) した。メスを用いて、アキレス - 腓腹筋複合体を脛骨から切り離した。簡潔に述べると、踵骨付着点から開始して、メスを脛骨に沿って走らせて複合体を分離し、筋肉の大部分を腱に付けたままにして生体力学的試験で握持できるようにする。腱を分離した後、中足との接合部で脛骨を除き、生体力学的試験で遠位端を握持するために足は付けたままにする (図 4) 。生体力学的分析を行う前に、保存するために、中足 - アキレス - 腓腹筋全体の検体を、食塩水に浸したガーゼにくるみ、 -20 で凍結する。

30

【 0 1 5 6 】

力学的試験 (m e c h a n i c a l t e s t i n g) の前 4 時間以内に、プロテイナーゼ阻害剤を含む 4 の PBS 中でサンプルを解凍した。腱サンプルをパットドライし、余分な筋肉を除去してグリップにサンプルを取り付け易くした。骨をクリッパー (c l i p p e r) で切り整えて取り付け易くした。

40

【 0 1 5 7 】

すべての力学的試験はインストロン社製の試験フレーム (モデル 5566) 上で行い、PBS を含む浴に浸しながらサンプルを試験した。各検体に正確な変位制御を加え、荷重精度 $\pm 0.5\%$ の 100N ロードセルを用いて、荷重を測定した。全てのデータ取得及びデバイス制御はパソコンを用いて行われ、データは 10 Hz で取得される。

【 0 1 5 8 】

引張試験中に検体が滑らないように、油圧グリップ中で 2 つの粗くした定盤と紙やすりの間に検体を取り付けた。0.1 N を予め検体に負荷し、検体の長さを記録し、その後、0.1 N 及び 1 N の荷重間で 10 サイクル分、予めサイクルした。0.1 % / 秒の歪み速度で構造体に一軸引張変位を与え、その時の荷重を記録した。破壊が起こって測定される

50

荷重が 0.05 N 未満となるまで、サンプルを引っ張って破損するまで試験する。試験前に、検体の横断面積を測定した。特定可能な群の分類を一切示さず、盲検的に全ての検体を試験した。

【0159】

試験後、収集したデータを分析して、それぞれ荷重 - 変位曲線又は応力 - 歪み曲線の線形部分から、(1) 線形剛性及び(2) 弾性係数を決定した。荷重データから最大荷重及び極限引張強さも決定した。ピーク荷重までの力変位曲線下面積として定義される弾性靱性 (elastic toughness) をリーマン和法を用いて数値的に計算する。

【0160】

生体力学的データの分析には、交互作用項を用いる二元配置 ANOVA 及びフィッシャーの LSD 事後検定 ($p < 0.05$) を用いた。1 元配置分散分析 (1 元配置 ANOVA) を適切な多重比較事後検定と共に用いて、利用可能なデータを全群について分析した。

10

【0161】

応力とは、サンプルの横断面積に対して正規化された、検体への荷重である。歪みとは、元のサンプルの長さに対して正規化された、検体の長さの変化を表す。したがって、応力対歪み曲線は、荷重対変位曲線が正規化されたものである (検体の寸法のばらつきによる影響が除かれている)。例えば、より長い腱はより大きな総変位を有することになり、一方、より幅の広い腱は、より幅の狭い腱より大きな荷重に耐えることができる。検体間の寸法におけるこれらのわずかなばらつきは、それらが耐えられる荷重及び変位の大きさに有意な影響を与える。これらの変数を、応力及び歪みに対してそれらの寸法で正規化すると、分析は検体の大きさに依存しなくなる。荷重対変位曲線から直接抽出された全ての特性を構造的特性と呼ぶ。正規化された応力対歪み曲線から抽出された全ての特性を材料特性と呼ぶ。

20

【0162】

線形剛性 (Linear Stiffness) とは、荷重対変位曲線の線形部分の最小二乗法から決定される構造的特性である。これは検体の引張剛性を表す。

【0163】

弾性係数は、応力対歪み曲線の線形部分の最小二乗法から決定される材料特性である。これは腱材料の引張剛性を表す。

【0164】

最大荷重とは、引っ張り中に検体が耐えられる最大の荷重である。

30

【0165】

極限引張応力とは、検体の横断面積によって正規化された最大荷重である。

【0166】

靱性 (toughness) とは、折れる又は壊れるまでの材料の抵抗である。これは通常、エネルギーの単位で測定され、破損 (failure) までの荷重 - 変位曲線下面積として計算される。

【0167】

結果

肉眼的な足首の太さ (Gross Ankle thickness) への rhPDGF - BB の影響

40

rhPDGF - BB の単回腱内注射の 7 日後に肉眼的な足首の太さの用量依存的増加が観察され (図 6 A 及び図 7、Tx 後 7 日目)、中用量 ($10.2 \mu\text{g}$) 及び高用量 ($102 \mu\text{g}$) で注射 7 日後に腱の大きさが有意に増加していた。Tx 後 21 日目では、ビヒクル対照群 (酢酸ナトリウムバッファー) 以外の全群で肉眼的な足首の太さが減少していた。このことは、処置後 21 日目における組織のリモデリングを示唆している (図 6 B 及び図 7、Tx 後 21 日目)。図 6 A、6 B、及び 7 のデータは、rhPDGF - BB 処置後 7 日目及び 21 日目におけるアナログスケールに基づいている (0 = 成長なしから、3 = 重度の成長)。記載データは、1 群当たり $n = 6$ 頭の足首の太さの平均 (\pm SEM) である。

50

【 0 1 6 8 】

r h P D G F - B B の体重への影響

処置時の動物の平均体重は 3 1 4 . 4 8 グラムであった。処置後 7 日目及び 2 1 日目の平均体重はそれぞれ 3 9 6 . 4 及び 4 6 7 . 0 グラムであった。いずれの時点でも処置に関連する体重の変化はなかった。

【 0 1 6 9 】

r h P D G F - B B の骨への影響

異常な骨の成長及び再吸収のどちらも確認されなかった。

【 0 1 7 0 】

踵骨付着点 (付着部) における腱の幅への r h P D G F - B B の影響

10

図 8 は、処置後 7 日目及び 2 1 日目の踵骨付着点において測定した腱幅 ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) を示す図である。記載データは、1 群当たり $n = 6$ 頭の踵骨付着点における腱幅の平均 ($\pm \text{SEM}$) である (* ビヒクル対照群に対して $p = 0 . 0 1$)。腱幅は接眼マイクロメーターを用いた顕微鏡観察により測定した。

【 0 1 7 1 】

処置 7 日後 (T x 後 7 日目)、ビヒクルと比べて、 $3 2 . 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ r h P D G F - B B 用量群で踵骨付着点における腱幅の有意な増加 ($\sim 1 3 7 \%$ の増加) が観察された (図 8、T x 後 7 日目)。 $3 . 2 4$ 及び $3 2 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ の r h P D G F - B B で処置した動物は、腱幅の有意な増加を示さなかったが、ビヒクル対照より大きい傾向があった。処置後 2 1 日目では、r h P D G F - B B で処置した動物及び処置しなかった動物の腱幅に有意な差は測定されなかった (図 8、T x 後 2 1 日目)。処置後 2 1 日目 (図 8、T x 後 2 1 日目) までに、 $3 2 . 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ r h P D G F - B B 用量群は、処置後 7 日目と比べて 4 0 % の腱幅の減少を示した。このことは、腱がリモデリングされたことを示唆している (図 8)。

20

【 0 1 7 2 】

腱中央部分 (T e n d o n M i d - B o d y) の腱幅への r h P D G F - B B の影響

図 9 は、処置後 7 日目及び 2 1 日目において測定された腱中央部分の腱幅 ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$) を示す図である。記載データは、1 群当たり $n = 6$ 頭の腱本体の腱幅の平均 ($\pm \text{SEM}$) である (* ビヒクル群に対して $p < 0 . 0 5$)。腱幅は、接眼マイクロメーターを用いた顕微鏡観察により測定した。

30

【 0 1 7 3 】

処置後 7 日目に $3 2 . 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ r h P D G F - B B 用量群で、ビヒクル対照群に対して $\sim 9 7 \%$ の腱幅増加が観察された (図 9、T x 後 7 日目)。 $3 . 2 4$ 及び $3 2 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ 用量群では、ビヒクル群及び非処置 (T x) 群と比べて有意でない用量依存的増加が観察された。2 1 日目には、全群で腱幅の有意な差は観察されなかった (図 9、T x 後 2 1 日目)。しかし、2 1 日目に、 $3 2 . 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ の r h P D G F - B B 用量群は処置後 7 日目と比べて 1 1 6 % の腱幅減少を示した。これは腱がリモデリングされたことを示唆している。

【 0 1 7 4 】

細胞増殖への r h P D G F - B B の影響

40

細胞増殖の定量化は、免疫染色された P C N A 陽性細胞の細胞計数によりなされた (図 1 0)。記載データは、1 群当たり $n = 6$ 頭の細胞数の平均 ($\pm \text{SEM}$) である (* ビヒクルに対して $p < 0 . 0 5$)。各検体について、寸法の等しい 3 つの視野を数えた。

【 0 1 7 5 】

r h P D G F - B B 群において細胞密度の用量依存的な増加が観察された。細胞増殖の r h P D G F - B B 用量依存的増加が処置後 7 日目に観察された (図 1 0、T x 後 7 日目)。ビヒクル対照に対して $3 2 . 4$ 及び $3 2 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ 用量群では細胞増殖の有意な増加が観察され (図 1 0、T x 後 7 日目)、それぞれ $\sim 6 0 \%$ 及び $\sim 7 2 \%$ の増加であった。しかし、2 1 日目には、細胞増殖に有意な差は観察されなかった (図 1 0、T x 後 2 1 日目)。 $3 2 . 4$ 及び $3 2 4 \mu\text{g} / \text{kg}$ の r h P D G F - B B 用量群はビヒクル対照の増

50

殖レベルまで戻っていた。このことは、r h P D G F - B B の増殖反応が可逆的であることを示唆している（図10、Tx後21日目）。

【0176】

炎症へのr h P D G F - B B の影響

全群、全時点で、マクロファージ及び単核細胞からなる軽度から中程度の炎症が観察された（表2）。

【0177】

【表2】

表2：処置後7日目及び21日目におけるアナログスケール（0＝炎症なしから3＝重度の炎症まで）を用いた炎症へのr h P D G F - B B の影響

Tx 後7日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	2	1	1	1	2	2
2	2	1	2	2	2	1
3	2	1	1	2	2	2
4	2	1	1	2	2	1
5	2	1	1	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2
平均	2	1.167	1.333	1.833	2	1.667
SD	0	0.408	0.516	0.408	0	0.516
Tx 後21日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	2	1	1	1	1	1
2	2	1	2	1	1	1
3	2	1	2	1	1	2
4	2	1	1	1	1	2
5	2	2	1	1	1	2
6	2	1	1	1	1	2
平均	2	1.167	1.333	1	1	1.667
SD	0	0.408	0.516	0	0	0.516

【0178】

血管新生へのr h P D G F - B B の影響

全群、全時点で、血管新生の有意な変化は観察されなかった（表3）。

【0179】

10

20

30

40

【表 3】

表 3 : 処置後 7 日目及び 2 1 日目におけるアナログスケール (0 = なしから 2 = 重度まで) を用いた血管新生への r h P D G F - B B の影響

Tx 後 7 日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	1	2	2	1	2	2
2	0	2	2	2	2	1
3	2	1	1	2	2	2
4	2	1	1	2	2	2
5	1	2	1	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2
平均	1.333	1.667	1.5	1.833	2	1.833
SD	0.816	0.516	0.548	0.408	0	0.408
Tx 後 2 1 日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	1	1	1	0	1	2
2	0	1	2	1	1	1
3	2	1	2	1	2	2
4	2	1	1	2	1	2
5	1	2	1	2	1	1
6	2	1	1	1	2	1
平均	1.333	1.167	1.333	1.167	1.333	1.5
SD	0.816	0.408	0.516	0.753	0.516	0.548

【 0 1 8 0 】

コラーゲン密度への r h P D G F - B B の影響

全群、全時点で、コラーゲン密度の有意な変化は観察されなかった (表 4)。

【 0 1 8 1 】

10

20

30

40

【表4】

表4：処置後7日目及び21日目におけるアナログスケール（0＝なしから2＝重度まで）を用いたコラーゲン密度へのrhPDGF-BBの影響

Tx 後 7 日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	1	1	2	2	1	1
2	1	1	1	1	1	2
3	1	1	2	1	1	1
4	1	1	2	1	1	2
5	2	1	2	1	1	2
6	1	1	1	1	1	2
平均	1.167	1	1.667	1.167	1	1.667
SD	0.408	0	0.516	0.408	0	0.516
Tx 後 2 1 日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	1	2	2	2	2	2
2	1	2	1	2	2	2
3	1	2	1	2	2	1
4	1	2	2	2	2	1
5	2	2	2	2	2	2
6	1	2	2	2	2	2
平均	1.167	2	1.667	2	2	1.667
SD	0.408	0	0.516	0	0	0.516

【0182】

コラーゲン組織化へのrhPDGF-BBの影響

全群、全時点で、コラーゲン組織化の有意な変化は観察されなかった（表5）。

【0183】

10

20

30

40

【表 5】

表 5 : 処置後 7 日目及び 2 1 日目におけるアナログスケール (0 = なしから 3 = 高度に組織化まで) を用いたコラーゲン組織化への r h P D G F - B B の影響

Tx 後 7 日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	1	2	3	3	2	2
2	1	2	2	2	2	3
3	1	2	3	2	2	2
4	2	2	3	2	2	3
5	3	2	3	2	2	2
6	1	2	2	2	2	3
平均	1.5	2	2.667	2.167	2	2.5
SD	0.837	0	0.516	0.408	0	0.548
Tx 後 2 1 日目						
動物番号	群					
	ベースライン	Tx なし	ビヒクル	3.24 µg/kg	32.4 µg/kg	324 µg/kg
1	1	3	3	3	3	3
2	1	3	2	3	3	3
3	1	3	2	3	2	2
4	2	3	3	2	3	2
5	3	2	3	2	3	3
6	1	3	3	3	2	3
平均	1.5	2.833	2.667	2.667	2.667	2.667
SD	0.837	0.408	0.516	0.516	0.516	0.516

【 0 1 8 4 】

生体力学 : 断裂までの最大荷重への r h P D G F - B B の影響

このモデルにおいて、断裂までの最大荷重値によれば、非処置群は時間と共に自然修復した (図 1 1)。処置後 7 日目における断裂までの平均最大荷重値は、ビヒクル対照群及び非処置群と比べて 3 2 . 4 µ g / k g 用量群で有意に上昇していた (それぞれ ~ 4 3 % 及び 2 7 %) (図 1 1、Tx 後 7 日目)。処置後 2 1 日目でも、断裂までの最大荷重はビヒクル対照と比べて依然として有意に上昇していた (図 1 1、Tx 後 2 1 日目)。処置後 2 1 日目では、3 2 . 4 µ g / k g 用量群及び非処置群の平均最大荷重はほぼ同じであり、このことは、r h P D G F - B B 処置により、非処置の場合より修復速度が上がったことを示している。しかし、ビヒクル群及び 3 2 4 µ g / k g r h P D G F - B B 群では、投薬後 2 1 日目に 3 2 . 4 µ g / k g 用量群及び非処置群よりも断裂までの最大荷重値が有意に下がっていた。記載データは 1 群当たり n = 9 頭の断裂までの最大荷重の平均 (± S E M) である (+ 「ビヒクル」群に対して p < 0 . 0 5 ; * 「非処置」群に対して p < 0 . 0 5) 。

【 0 1 8 5 】

10

20

30

40

50

表 6 に、反対側の無傷の腱並びに r h P D G F - B B で処置された腱及び処置されていない腱の力学的強度を示す。

【 0 1 8 6 】

【表 6】

表 6 : コラゲナーゼ注射後 7、14、及び 28 日目におけるアキレス腱の断裂までの最大荷重値 (N±SEM)

	断裂までの最大荷重 (N±SEM)			
	7 日目 ベースライン	14 日目 (Tx 後 7 日目)	28 日目 (Tx 後 21 日目)	デルタ Δ (ビヒクルとの比較)
無傷 (反対側の脚、コラゲナーゼ注射なし)	17.36 (2.18)	19.03 (0.67)	27.98 (1.43)	0.31(Tx 後 7 日目) 5.96(Tx 後 21 日目)
非処置 (コラゲナーゼ注射あり、ビヒクル又は rhPDGF-BB なし)	15.68 (1.84)	21.06 (1.02)	30.86 (1.71)	2.34(Tx 後 7 日目) 12.14(Tx 後 21 日目)
ビヒクル (コラゲナーゼ注射あり、20 mM 酢酸ナトリウムで処置)	15.68 (1.84)	18.72 (1.92)	22.02 (1.75)	- -
3.24 µg/kg rhPDGF-BB (コラゲナーゼ注射あり、3.24 µg/kg rhPDGF-BB で処置)	15.68 (1.84)	22.65 (1.89)	23.67 (1.89)	
32.4 µg/kg rhPDGF-BB (コラゲナーゼ注射あり、32.4 µg/kg rhPDGF-BB で処置)	15.68 (1.84)	26.8 (1.98)	28.61 (1.45)	8.08(Tx 後 7 日目) 6.59(Tx 後 21 日目)
324 µg/kg rhPDGF-BB (コラゲナーゼ注射あり、324 µg/kg rhPDGF-BB で処置)	15.68 (1.84)	17.13 (1.89)	20.98 (1.89)	

記載データは、1 群当たり n = 9 の断裂までの最大荷重の平均 (±SEM) である。

【 0 1 8 7 】

コラゲナーゼ注射後 14 日目における 32.4 µg / kg r h P D G F - B B 群の断裂までの平均最大荷重値 (26.8 N) は、コラゲナーゼ注射後 14 日目における無傷の腱 (19.03 N) より 41% 増加していた。これは、32.4 µg / kg r h P D G F - B B 群の生体力学的特性が、通常の発達をしている腱より速く成熟したことを示唆している。更に、コラゲナーゼ注射後 14 日目における 32.4 µg / kg r h P D G F - B B 群の断裂までの平均最大荷重 (26.8 N) は、コラゲナーゼ注射後 28 日目における無傷の腱のもの (27.98 N) に近づいていた。7、14、及び 28 日目の無傷群及び非処置 (コラゲナーゼ注射) 群における断裂までの最大荷重値はほぼ同じであった。14 日目 (Tx 後 7 日目)、32.4 µg / kg r h P D G F - B B 群は、ビヒクル群

10

20

30

40

50

、無傷群、及び非処置群より断裂までの最大荷重値が高く、それぞれ43%、41%、及び27%増加していた。しかし、28日目(Tx後21日目)では、無傷群、非処置群、及び32.4 µg/kg rhPDGF-BB群の断裂までの最大荷重はほぼ同じであった(表6)。

【0188】

結論

生存中パラメーター

足首の太さの結果から、rhPDGF-BB処置後7日目には腱の大きさが用量依存的に増加するが、21日目までには成長が止まり、組織がリモデリングされて腱の大きさが小さくなることが示された。

【0189】

全群、全時点で、体重に有意な差はなかった。

【0190】

顕微鏡評価

rhPDGF-BBは細胞増殖、特に線維芽細胞増殖を増加させた。細胞増殖及び顕微鏡的腱幅の増加は可逆的であり、これは組織のリモデリングの潜在的適応期を示している。

【0191】

本研究の条件下で、単回腱内送達後3週間にわたり、rhPDGF-BBによる局所的有害作用は観察されなかった。異常な骨又は腱の成長及び骨吸収は特定されなかった。炎症は単核性であった。細胞のモルホロジーは線維芽細胞的であった。

【0192】

生体力学

断裂までの生体力学的荷重データから、非rhPDGF-BB処置コホートと比べた時、rhPDGF-BBが腱の力学的強度のより速い修復反応を開始させることが示された。処置後21日目までに細胞増殖及び腱幅はベースラインに戻ったが、これによって生体力学的な腱の強度は消失しなかった。

【0193】

概要

本研究の生物学的及び生体力学的結果により、腱内に注射されたrhPDGF-BBの局所的な安全性が確認された。rhPDGF-BB1回注射後、21日間で弱まる腱成長の初期段階があった。本研究では、接眼マイクロメーターを用いて顕微鏡下で腱幅を測定し、PCNA免疫染色を用いて細胞増殖を測定した。それらの測定の結果、32.4 µg/kgのrhPDGF-BBで処置された動物で、処置後7日目に顕微鏡的腱幅及び細胞増殖が増加することが示された。しかし、処置後21日目までに、腱幅及び増殖は対照レベルに戻った。腱へのrhPDGF-BB注射後21日間にわたり、異所性の又は異常な骨、及び異常な腱の成長は観察されなかった。

【0194】

顕微鏡的な腱幅及び細胞増殖の初期の増加は、腱の力学的強度の上昇に対応していた。細胞増殖及び腱幅は処置後21日目までにベースラインに戻ったが、これによって腱の生体力学的強度は消失せず、腱の生体力学的向上は維持された。

【0195】

本研究の結果は、外側上顆炎患者を処置する診療所で特に注目されるであろう。外側上顆炎では、疼痛並びに関与する腕及び手の荷重に耐える機能の低下を呈する短橈側手根伸筋(ECRB)腱の変性変化がある。本研究に記載されているラットアキレス腱障害モデルで示されたrhPDGF-BB治療による腱の生体力学的強度の上昇及び構造的変化は、臨床的に、外側上顆炎に罹患している患者にとっての疼痛の抑止及び機能の回復を意味すると予想される。

【0196】

<実施例4>

10

20

30

40

50

組換えヒト血小板由来成長因子 - BB (r h P D G F - B B) 静脈内投与後のスプラーグドローラーラットにおける r h P D G F - B B の薬物動態

本研究の目的は、雄のスプラーグドローラーラットに単回静脈内投与された r h P D G F - B B の薬物動態を評価することである。本研究は、静脈内投与後の体液（血清）に由来するナイーブ r h P D G F - B B のクリアランスを評価するようにデザインした。r h P D G F - B B の薬物動態学的性質及び薬力学的性質をより深く理解するために、静脈内曝露後の全身クリアランスを決定した。本発明者らは、r h P D G F - B B の静脈内投与後のクリアランス速度は速いという仮説を立てた。

【 0 1 9 7 】

研究デザイン

10

ラットモデル

ラットは、種々のクラスの化学物質の薬物動態及び毒性を評価するために一般的に使用されている齧歯類モデルであり、ラットには大きな過去のデータベースが存在する。合計 48 頭の雄のスプラーグドローラーラットを本研究に用いた。6 頭 / 群 / 時点で動物を 2 群に分けた（表 7）。本研究は、本研究の目的、本発明者らの科学的ニーズ、及び現代の科学的標準を満たす、可能な限り少ない数の動物を用いるようにデザインされた。このデザインはデータの有意義な分析を可能にするのに十分な大きさの群を提供する。r h P D G F - B B は、インスリン注射器（28.5 G）を用いて側尾静脈に静脈内送達により投与した。

【 0 1 9 8 】

20

試験物質及び対照物質

試験物質は 0.4 mg / ml の r h P D G F - B B を含む 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー（pH 6.0 ± 0.5）である。対照物質は 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー（pH 6.0 ± 0.5）である。

【 0 1 9 9 】

研究開始時、0.4 mg / ml r h P D G F - B B 及び 20 mM 酢酸ナトリウム（アセタート）バッファーの試験物質の少なくとも 2 つの未開封、未使用バイアルを、投薬、安定性、及び濃度分析に用いるバイアルと同じ保存条件（4℃）下に保持した。UV / Vis 分光測定及び逆相 HPLC 分析からなる安定性及び用量の検証分析を行った（付属書類 I I）。

30

【 0 2 0 0 】

試験物質及び対照物質の取扱いには標準的な研究室の安全手順を用いた。具体的には、用量の調製及び投与中、手袋、フェイスマスク、手術着（又は白衣）、及びアイプロテクションを着用した。

【 0 2 0 1 】

試験系

本研究には 48 頭の雄のスプラーグドローラーラットを用いた。本研究で使用したラットはその重量に基づいて選択した。処置時点における平均重量は約 227 グラムであった。各ラットは永久マーカー（permanent marker）で書かれた固有の尾番号により識別した。麻酔等の適当な研究関連事象の際には食物及び水を控えたが、それ以外では自由に摂取させた。研究選択前に、視覚的検査によりすべての動物をスクリーニングした。

40

【 0 2 0 2 】

試験物質の投与

血清中で r h P D G F - B B の 100% のバイオアベイラビリティ及び薬物動態特性が達成されるように静脈内送達を選択した。用量は、ラット腱コラゲナーゼモデルにおける r h P D G F - B B 腱内適用の用量反応の有効性に関する先の研究（実施例 3 参照）に基づいて選択した。本研究で使用される最大用量濃度は、ラットの重量が 0.227 kg であったことに基づき、100 µg、すなわち 0.44 mg / kg である。

【 0 2 0 3 】

50

ラット48頭の重量を測定し、24ラット/群で2群にランダムに分けた。ラットは体重に基づいて各群にランダムに割り当てた。

【0204】

投薬前に体重を記録した。第1群の動物には、標的用量体積1.1mL/kg、0.44mg/kg(440µg/kg)でrhPDGF-BBを単回静脈内投与した。第2群の動物は、標的用量体積1.1mL/kgでビヒクル対照(NaOAcバッファー)を受けた。静脈内注射は、インスリン注射器(28.5G)を用いて側尾静脈アプローチによりなされた。約300µlの血清を回収した。

【0205】

【表7】

表7. 処置群

群番号	処置群	送達経路	動物(n)	rhPDGF-BB (mg/kg)	標的体積 (mL/kg)	採血時間*
1	rhPDGF-BB	静脈内 (IV)	24	0.44	1.1	1,5,10,20,60分、4,8,24,72,96及び168時間
2	NaOAc	静脈内 (IV)	24	---	1.1	1,5,10,20,60分、4,8,24,72,96及び168時間

*採血時間：

全群の動物1~6=ベースライン、1分、1時間、48時間

全群の動物7~12=ベースライン、5分、4時間、72時間

全群の動物13~18=ベースライン、10分、8時間、96時間

全群の動物19~24=ベースライン、20分、24時間、168時間

【0206】

臨床観察

屠殺するまで動物を少なくとも1日1回観察した。rhPDGF-BB注射前及び屠殺前に体重を記録した。食物消費量は定性的であった。

【0207】

適切な研究エンドポイントで全動物を屠殺した。生存中処置群の完了後、CO₂過剰投与により動物を安楽死させた。反射(まばたき、引っ込み等)の欠如により死亡を確認した。本研究中、肉眼的又は組織病理学的観察は行わなかった。予定外の動物の死亡は記録されなかった。

【0208】

血清の採取

約600µlの血液を血清チューブに取り、1,800g、室温で10分間遠心して血清を得た。約300µlの血清を2mlのエピペンドルフチューブに入れた。分析前に血清を-70℃で保存した。

【0209】

血清分析

各時点でrhPDGF-BB血清濃度を測定した。R&Dシステムズ社のQuantikine ELISAキットを用いてrhPDGF-BBを定量化した

【0210】

薬物動態分析

WinNonlinの非コンパートメントモデルを用いて以下のパラメーターを計算した：最終半減期(t_{1/2})、T_{max}、C_{max}、AUC_{0-last}、及びCL。分

10

20

30

40

50

析は、Quantikine ELISAキットアッセイを用いて血清中で決定される種々の時点で存在するrhPDGF-BBの量を用いて行われた。

【0211】

統計

統計分析は、必要に応じて、平均、標準偏差、変動係数等の記述的パラメーターに限定した。

【0212】

結果

処置時の全動物の平均体重は227グラムであった。動物は平均用量440.53 µg/kgのrhPDGF-BBを受けた。

【0213】

平均血清rhPDGF-BB濃度-時間値を図12に示す。投薬後1分でCmax(6161.2 ng/mL)に達した。その後、5分~1時間間にrhPDGF-BB濃度は低下した。rhPDGF-BB濃度は1~168時間まで、定量レベルより低かった(<0.156 ng/mL)。

【0214】

表8に、雄のスプラーグドローラットにおいてIV投与されたrhPDGF-BBの薬物動態学的体内動態(pharmacokinetic disposition)を示す。送達された平均用量は440 µg/kgであった。0.0167時間(1分)でTmaxが観察され、Cmaxは6161.2 ng/mLであった。AUC0-lastは375.64 hr*ng/mLであり、クリアランス(CL)は17.5 mL/min/kgであった。

【0215】

【表8】

表8：IV投薬の薬物動態学的データ分析

経路	用量 (µg/kg)	Cmax (ng/mL)	Tmax (時間)	AUC0-last (hr*ng/mL)	CL (mL/min/kg)
IV	440	6161.2	0.0167	375.64	17.5

【0216】

結論

rhPDGF-BBの静脈内(IV)投与では、初期に全身曝露量が高くなった。これは、投薬後の最初の10分間に血液から迅速に排除される中間的クリアランス分子である。

【0217】

<実施例5>

rhPDGF-BBの腱内投与後のスプラーグドローラットにおけるrhPDGF-BBの薬物動態

本研究の目的は、雄のスプラーグドローラットに単回腱内投与されたrhPDGF-BBの薬物動態を評価することである。本研究は、腱内送達後のrhPDGF-BBの全身曝露量及びクリアランスを評価するようにデザインされた。

【0218】

研究デザイン

ラットモデル

ラットは、種々のクラスの化学物質の薬物動態及び毒性を評価するために一般的に使用されている齧歯類モデルであり、ラットには大きな過去のデータベースが存在する。合計32頭の雄のスプラーグドローラットを本研究に用いた。8頭/群で動物をランダムに4群に分けた(表9)。本研究は、本研究の目的、本発明者らの科学的ニーズ、及び現代の科学的標準を満たす、可能な限り少ない数の動物を用いるようにデザインされた。この

10

20

30

40

50

デザインはデータの有意義な分析を可能にするのに十分な群サイズを提供する。

【0219】

試験物質及び対照物質

試験物質は、(1) 3.4 mg/ml の rhPDGF-BB を含む 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0 ± 0.5) 及び (2) 0.34 mg/ml の rhPDGF-BB を含む 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH = 6.0 ± 0.5) である。対照物質は 20 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.0 ± 0.5) である。

【0220】

研究開始時、3.4 mg/ml 及び 0.34 mg/ml の rhPDGF-BB 試験物質並びに 20 mM 酢酸ナトリウム (酢酸塩) バッファー対照物質の少なくとも 2 つの未開封、未使用バイアルを、投薬、安定性、及び濃度分析に用いるバイアルと同じ保存条件 (4) 下に保持した。UV/Vis 分光測定及び逆相 HPLC 分析からなる安定性及び用量の検証分析を行った (付属書類 II)。

10

【0221】

本研究で用いる用量には 1.02、10.2、及び 102 µg の rhPDGF-BB が含まれる。用量 102 µg 及び 10.2 µg は、それぞれ 3.4 mg/ml 及び 0.34 mg/ml の 30 µl 注射によってなされた。用量 1.02 µg には、0.34 mg/ml を NaOAc バッファーで 1:10 希釈した。

【0222】

試験物質及び対照物質の取扱いには標準的な研究室の安全手順を用いた。具体的には、用量の調製及び投与中、手袋、フェイスマスク、手術着 (又は白衣)、及びアイプロテクションを着用した。

20

【0223】

試験系

32頭の雄のスプラーグドローラーラットを本研究に用い、重量に基づいて選択した (注射時に約 294 グラム)。ラットを体重に基づいてランダムに各群に割り当てた。

【0224】

各ラットは尾に書かれた固有の番号により識別した。麻酔等の適当な研究関連事象の際には食物及び水を控えたが、それ以外では自由に摂取させた。研究選択前に全動物を視覚的検査によりスクリーニングした。

30

【0225】

動物の処置は、USDA の動物保護法 (連邦規則集第 9 巻の第 1 部、第 2 部、及び第 3 部) に記載されている規則及び実験動物の管理と使用に関する指針 (ILAR publication, 1996, National Academy Press) に規定されている条件に準拠した FIMR の CCP 標準手順に従った。

【0226】

試験物質の投与

アキレス腱内投与は、診療所における rhPDGF-BB の投与を真似たものである。腱-踵骨接合部の注射部位は、腱及び骨の付着点部位を真似たものである。

【0227】

用量は、ラット腱コラゲナーゼモデルにおける rhPDGF-BB 腱内適用の用量反応の有効性に関する先の研究 (実施例 3 参照) に基づいて選択した。本研究で使用される最大用量濃度は、ラットの重量が 0.294 kg であったことに基づき、102 µg、すなわち 0.347 mg/kg である。

40

【0228】

平均重量が 294 グラムの 32 頭の雄スプラーグドローラーラットを 8 頭/群の 4 群にランダムに分けた。第 1 群、第 2 群、及び第 3 群はそれぞれ、骨腱接合部近くの右アキレス腱に 1 頭当たり 30 µl (0.102 mL/kg) の標的送達体積で、平均用量 347 µg/kg、34.7 µg/kg、及び 3.47 µg/kg の rhPDGF-BB を単回腱内ボラス投与された。第 4 群は、1 頭当たりの標的送達体積 30 µl で、20 mM 酢酸

50

ナトリウムバッファの単回腱内注射を受けた。処置は、インスリン注射器(28.5G)を用いて骨腱接合部近くの右アキレス腱中に注射された。血清用の空の1cc注射器(26G)を用いて、以下の出血時間で動物の尾静脈から出血させた(全血~400 μ l、血清~200 μ l)。Quantikine ELISAを用いて血清中のrhPDGF-BBを測定した。

【0229】

【表9】

表9. 処置群

群番号	処置群	動物(n)	rhPDGF-BB (μ g/kg)	標的体積 (mL/kg)	採血時間*
1	rhPDGF-BB	8	347	0.102	1, 5, 10, 20 分, 4, 8, 24, 48, 72, 96 及び 168 時間
2	rhPDGF-BB	8	34.7	0.102	1, 5, 10, 20 分, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 及び 168 時間
3	rhPDGF-BB	8	3.47	0.102	1, 5, 10, 20 分, 4, 8, 24, 48, 72, 96 及び 168 時間
4	NaOAc (20mM 酢酸ナトリウム)	8	---	0.102	1, 5, 10, 20 分, 4, 8, 24, 48, 72, 96 及び 168 時間

*採血時間は以下の通り。

全群の動物1~4=ベースライン、1分、10分、20分、4時間、24時間、及び72時間

全群の動物5~8=ベースライン、5分、8時間、48時間、96時間、及び168時間

【0230】

血液約400 μ lを血清チューブに回収し、1,800g、室温で10分間遠心して血清を得た。血清約200 μ lを2mLのエピンドルフチューブに入れた。保存した血清サンプルでrhPDGF-BBの量を測定するための分析の前に血清を-70で保存した。

【0231】

臨床観察

屠殺するまで動物を少なくとも1日1回観察した。rhPDGF-BB注射前に体重を記録した。食物消費量は定性的であった。予定外の動物の死亡は記録されなかった。

【0232】

適切な研究エンドポイントで全動物を屠殺した。生存中処置群の完了後、CO₂過剰投与により動物を安楽死させた。反射(まばたき、引っ込み等)の欠如により死亡を確認した。本研究では肉眼的及び組織病理学的観察は行わなかった。

【0233】

血清分析

各時点でrhPDGF-BB血清濃度を測定した。R&Dシステムズ社(ミネソタ州ミネアポリス)のQuantikine(登録商標) Human PDGF-BB Immunoassay for the Quantitative Determination of Human Platelet Derived Growth Factor-BB Concentrations ELISA

キットを用いて以下のように r h P D G F - B B を定量化した。

【 0 2 3 4 】

最初に、キット中の全ての試薬を使用前に室温にした。次に、試験サンプルに用いるのと同じロットの r h P D G F - B B を用いて r h P D G F - B B の標準曲線を作製した。キットに付属の希釈バッファーを用いて r h P D G F - B B を 10 ng/ml に希釈した。次いで、その溶液を濃度 0.15625 ng/ml まで 1 : 2 で段階希釈した。試験されるサンプルを同じ希釈バッファーで希釈して、濃度の値が $0.15625 \sim 10 \text{ ng/ml}$ の r h P D G F - B B 標準曲線に十分収まるようにした。

【 0 2 3 5 】

全サンプルを 2 重 (d u p l i c a t e) でアッセイするのに必要なウェルの数を決定し、マイクロタイタープレート上の各 8 ウェルストリップに適宜番号を振った。1 ウェル当たり $100 \mu\text{l}$ の A s s a y d i l u e n t R D 1 X を各ウェルに添加した後、 $100 \mu\text{l}$ の標準及びサンプルを添加した。次いで、プレートを接着性のカバーで覆い、オービタルシェーカー ($50 \sim 70$ 回転 / 分に設定) 上で室温にて約 2 時間インキュベートした。各ウェルを吸引し、 $300 \mu\text{l}$ の W a s h B u f f e r で洗浄した。4 回繰り返す。次いで、 $200 \mu\text{l}$ の抗 r h P D G F - B B C o n j u g a t e (R & D 社製キットに付属。希釈不要) を各ウェルに添加した。新しい接着性カバーでプレートを多し、 $50 \sim 70$ 回転 / 分に設定したオービタルシェーカー上で約 1 . 5 時間室温でインキュベートした。吸引及び洗浄ステップを繰り返した後、 $200 \mu\text{l}$ の S u b s t r a t e 溶液 (R & D 社製キットに付属。希釈不要) を各ウェルに添加した。次いで、サンプルを室温、暗黒下、オービタルシェーカー上で約 30 分間インキュベートした。 $50 \mu\text{l}$ の S t o p 溶液 (R & D 社製キットに付属。希釈不要) を各ウェルに添加し、色の展開が不均一であった場合には、8 チャンネルのマルチチャンネルピペットを用いて上下に 2 ~ 4 回ピペッティングすることにより溶液を混合した。 450 nm (540 nm の波長補正を使用) に設定したマイクロプレートリーダー中で、S t o p 溶液の添加から 30 分以内に各ウェルの光学濃度を決定した。光学濃度の読取値をマイクロソフトエクセルにエクスポートして分析した。

【 0 2 3 6 】

サンプルそれぞれの平均値を計算した。各プレートの標準曲線を用いて、各試験サンプルについて r h P D G F - B B 濃度を計算した。r h P D G F - B B 濃度及び各サンプルの総体積を用いて、各サンプル中に存在するタンパク質の総量を計算した。

【 0 2 3 7 】

薬物動態分析

W i n N o n l i n の非コンパートメントモデルを用いて以下のパラメーターを計算した：最終半減期 ($t_{1/2}$)、最高濃度到達時間 (T_{max})、 T_{max} で起こる最高濃度 (C_{max})、 $t = 0$ 時間から $t =$ 最終観察時点までの薬物濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{0-last})、及びバイオアベイラビリティ (% F)。分析は、Q u a n t i k i n e E L I S A キットアッセイを用いて血清中で決定された種々の時点で存在する r h P D G F - B B の量を用いて行った。

【 0 2 3 8 】

最終観察濃度 (AUC_{inf})、静脈内投与の全身クリアランス (C L)、腱内投与の全身クリアランス (C L / F) に基づいて、時間 = 0 から無限大まで外挿した薬物濃度 - 時間曲線下面積等の他のパラメーターを計算することができる。

【 0 2 3 9 】

統計

統計分析は、必要に応じて平均値、標準偏差、変動係数等の記述的パラメーターに限定した。

【 0 2 4 0 】

結果

処置時点の全動物の平均体重は 294 g であった。平均用量 $347 \mu\text{g/kg}$ (1

10

20

30

40

50

0.2 μg)、34.7 μg/kg (10.2 μg) 又は 3.47 μg/kg (1.02 μg) の rhPDGF-BB を動物に投与した。

【0241】

34.7 μg/kg 用量群の平均 rhPDGF-BB 血清濃度 - 時間値を図 13 に示す。5分～8時間に rhPDGF-BB 血清濃度の低下が観察された。8～168時間では、rhPDGF-BB の血清濃度は ELISA の定量レベルより低かった (< 0.156 ng/mL)。34.7 μg/kg 及び 3.47 μg/kg 用量群の rhPDGF-BB 血清濃度は、全時点で定量レベルより低かった (< 0.156 ng/mL)。

【0242】

表 10 に、雄のスプラーグドローラーラットにおける 34.7 μg/kg 用量群の rhPDGF-BB 腱内 (IT) 投与及び実施例 4 に記載した 440 μg/kg 用量群の静脈内 (IV) 投与のパラメーターの薬物動態分析を示す。Tmax は 0.083 時間 (4.98 分) に見られ、Cmax 濃度は 16.3 ng/mL であった。AUC0-last は 12.58 ng*hr/mL であり、バイオアベイラビリティは 3.34% であった。34.7 μg/kg 及び 3.47 μg/kg 用量群の rhPDGF-BB 血清濃度は全ての時点で定量レベルより低かった (< 0.156 ng/mL) ので、薬物動態パラメーターは計算されなかった。

10

【0243】

【表 10】

表 10: IT 投薬 (34.7 μg/kg 用量群) 及び IV 投薬 (440 μg/kg 用量群) の薬物動態データ分析

20

経路	用量 (μg/kg)	Cmax (ng/mL)	Tmax (hours)	AUC0-last (ng*hr/mL)	%F
IT	347	16.3	0.0833	12.58	3.34
IV	440	6161.2	0.0167	375.64	-

【0244】

結論

rhPDGF-BB の腱内 (IT) 投与では、初期に速くて低い全身曝露量が見られた。34.7 μg/kg の rhPDGF-BB より低い用量では、検出可能な血清濃度の rhPDGF-BB は観察されなかった。

30

【0245】

34.7 μg/kg の rhPDGF-BB の IT 投薬では、投与された用量の約 3.34% が全身循環に達したが、Cmax の値は、IV 投薬後に見られた値のたった 0.26% であった。したがって、腱内投与後の rhPDGF-BB は、血清への吸収後に迅速にクリアランスされる。腱内投与後の rhPDGF-BB のバイオアベイラビリティが低い (~3.34%) ことから、驚くべきことに、rhPDGF-BB が作用部位に保持されることが予測される。

40

【0246】

< 実施例 6 >

外側上顆炎への rhPDGF-BB 注射の影響に関する第 II 相ランダム化単回投与用量漸増二重盲検プラセボ対照多施設研究

本研究の目的は、「テニス肘」としても知られる外側上顆炎の処置としての rhPDGF-BB 注射の有効性を評価することである。

【0247】

研究場所 / 研究群

研究は最大 6ヶ所の臨床現場で行う。研究集団は、1群当たり対象 25名で 4群にランダム化された対象 100名である。各コホートにはプラセボ患者 5名及び実薬処置患者 2

50

0名が含まれる。

【0248】

研究集団：3ヶ月の保存療法に失敗した外側上顆炎の臨床診断を有する対象

【0249】

研究デザイン

本研究は、第II相ランダム化単回投与漸増用量二重盲検プラセボ対照多施設研究である。研究登録の選択基準を満たす適格な対象者を、研究参加のためのインフォームド・コンセントを得た後に登録する。対象は処置後24週間フォローされる。研究登録後のランダム化により、1:1:1:1:1の計画で以下の処置群の1つに対象を割り当てる：(1)用量A：バッファのみ - 対照群；(2)用量B：バッファ+0.45mg r h P D G F - B B；(3)用量C：バッファ+0.75mg r h P D G F - B B；(4)用量D：バッファ+1.5mg r h P D G F - B B；及び(5)用量E：バッファ+3.0mg r h P D G F - B B。全ての用量で、総体積は、1用量当たりr h P D G F - B B溶液1.5mLである(それぞれ、0.3mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL、及び2.0mg/mLのr h P D G F - B B処置群に相当し、それぞれ70kgのヒトで6.4、10.7、21.4、及び42.9µgのr h P D G F - B Bに相当する)。バッファは20mM酢酸ナトリウム(pH6.0)である。

【0250】

段階的漸増アプローチを用いてランダム化を行う。最初のランダム化は、以下のパターンを用いて対象を処置群に割り当てる統計的に検出される漸増法に従う：予め定められた統計的に検出される数の対象が用量A(バッファのみ - 対照群)又は用量B(バッファ+0.3mg/mL r h P D G F - B B)のいずれかにランダム化される。この最初の用量耐性(用量B)のための予め定められた数に達した後、2段目のランダム化で、予め定められた統計的に検出される数の対象を加え、用量A、用量B、又は更なる用量C(バッファ+0.5mg/mL r h P D G F - B B)のいずれかにランダム化する。この同じパターン、すなわち統計的に検出される数の対象を各段のランダム化スキーム内で加えることが、用量D(バッファ+1.0mg/mL r h P D G F - B B)及び用量E(バッファ+2.0mg/mL r h P D G F - B B)がランダム化スキームに組み込まれて研究登録目標に達するまで繰り返される。

【0251】

割り当てた用量の単回注射を、「ペッピング法(peppering technique)」を用いて腱に投与する。「ペッピング法」とは、圧痛領域に針を挿入した後、針を皮膚から出さずに引っ込めて方向を変え、再度挿入することにより複数回の少量注射がなされる注射法である。

【0252】

注射部位に対する局所的反応(赤み、腫れ、かゆみ、疼痛)、慢性的損傷領域への疼痛の増加、及びアレルギー反応の兆候について対象を評価する。対象が上記の症状の発生を報告した場合、対象の評価及び研究者による決定後に重症度及び試験薬との関連を決定し、指定のeCRFに記録する。症状の重症度及び関連がr h P D G F - B B処置に関係すると決定された場合、情報はすぐにスポンサー及び適切な規制機関に報告される。次いで、その時点で、登録を続けるか対象の登録を停止するかを決定する。

【0253】

手順前の前後(AP)及び側面のX線写真を、手順前4週間以内にベースラインのイメージングのために得る。研究プロトコルに従って手順後24週間の時点で更なるAP及び側面X線写真を得る。全対象の24週間にわたる追跡調査のための来診が完了した時に安全性の最終評価を行う。

【0254】

選択基準

本研究に含まれる対象は、抵抗を加えた回外運動又は手首の背屈により症状が再現可能であり、外側上顆炎の臨床診断を受けている、21歳以上の対象である。

10

20

30

40

50

【0255】

除外基準

本研究から除外される対象は、過去3ヶ月以内にコルチコステロイド注射療法を受けたことがある又は外側上顆炎を処置するための外科的処置を受けた対象；酵母由来産物に対するアレルギーを有する対象；手根管症候群の病歴がある対象；頸部神経根症の病歴がある対象；及び処置の6ヶ月以内に患部の肘に外傷を有した対象である。

【0256】

研究期間

登録は約9ヶ月である。追跡調査のための来診には、手順後24週間までの握力検査及び四肢の身体検査が含まれる。安全性のエンドポイントは24週間目の最後の来診まで監視された。

10

【0257】

主要評価項目

(1)安全性。有害事象の発生を評価することによりrhPDGF-BBの安全性及び忍容性を評価した。rhPDGF-BBは安全であり、患者に耐えられた。

【0258】

副次的評価項目

研究手順前の2回目の来診及び研究手順後の4、8、12、及び24週目の来診で以下の評価を完了する：(1)上肢障害評価表のスコア(DASH)、(2)視覚的アナログスコア(VAS)、(3)握力検査により測定される努力の誠実さ。rhPDGF-BBを用いた処置は、処置前のスコアからの向上(DASH及びVAS)、圧力及び/若しくは手首の屈曲による疼痛の軽減、患部四肢の可動性の向上、並びに/又は握力の上昇等の腱の臨床的転帰の1又は複数の有益な変化をもたらす。

20

【0259】

<実施例7>

ラットモデルにおける腱治癒に対するrhPDGF-BBコーティング縫合糸の影響：組織学的及び生体力学的研究

要約

序論

アキレス腱の裂傷は、外科的修復が必要となることが多い一般的な損傷である。本研究の目的は2つあり、(1)rhPDGF-BBでコーティングされた縫合糸を用いて修復部位に適切な量の因子を送達することができるかどうかを決定すること及び(2)生体力学及び組織学に基づいてrhPDGF-BBでコーティングされた縫合糸がラットアキレス腱モデルにおける治癒を改善するかどうかを決定することである。

30

【0260】

方法

以前に記載されているディップコーティングプロセスを用いて種々の濃度のrhPDGF(0、0.3、1.0、及び10.0mg/ml)で4-0バキクリル縫合糸をコーティングした。0 rhPDGF群を対照とした。ELISAを用いて、種々のディップコーティング溶液中でコーティングされた後の縫合糸上のrhPDGFの濃度を決定した。

40

【0261】

ラットアキレス腱を横切し、4種類の縫合糸のいずれかを用いてすぐに修復した。手術後4週目に腱を回収した。各検体からの組織切片をコラーゲン組織化及び血管形成についてスコア化した。荷重及び伸張データが得られた各検体の一軸引張生体力学的分析を行った。各検体のヤング率、極限引張強さ、及び弾性靱性(Elastic toughness)について生データを分析した。

【0262】

結果

rhPDGFで縫合糸をコーティングすることに成功した。ディップコート濃度が高いほど、縫合糸上のrhPDGFの量が多くなった。組織学的分析により、対照群とPDG

50

F群の間でコラーゲンスコア又は血管形成に有意な差がないことが示された。生体力学的結果から、対照(1.0 ± 0.2 MPa)と高用量PDGF群(1.9 ± 0.5 MPa及び2.1 ± 0.5 MPa)との間に極限引張応力の有意な差が示された。引張ヤング率は、PDGF 10 mg/ml群(7.22、SD 3.79)で他の全ての群より有意に高かった。これにより、PDGFコーティング縫合系の正の用量反応及び強度改善が示された。

【0263】

結論

本研究は、修復された腱の材料特性がrhPDGFコーティング縫合系によって正の用量依存的に改善され得るといふ本発明者らの仮説を証明した。

10

【0264】

序論

本研究で、本発明者らは、再現可能な量のrhPDGF-BBで4-0バイクリル縫合系をコーティングでき、rhPDGF-BBコーティング縫合系を用いたラットアキレス腱修復の増強により、生体力学的及び組織学的な評価で修復が用量依存的に改善されると仮説を立てた。

【0265】

材料及び方法

本研究は2つのパートに分けて行った。1)インビトロでの縫合系のコーティング及び分析並びに2)ラットモデルにおけるインビボでのアキレス腱修復。手順はIUCACによる承認を受けた。

20

【0266】

パート1:

縫合系コーティング:

4群の4-0バイクリル縫合系(エチコン社(Ethicon)、ニュージャージー州サマービル)を、以前に記載されているようにディップコーティングプロセスを用いて(Dines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder Elbow Surg 2007;16:215S-221S)、(1)20 mM酢酸ナトリウムバッファー(キャリア対照)、(2)0.3 mg/ml rhPDGF-BBを含むバッファー、(3)1.0 mg/ml rhPDGF-BBを含むバッファー、及び(4)10.0 mg/ml rhPDGF-BBを含むバッファーでコーティングした。簡潔に述べると、70%エタノールで処置した後、(針の付いた)縫合系を、rhPDGF-BB(0、0.3、1.0、及び10.0 mg/ml)を含む又は含まない酢酸ナトリウムバッファー中に30分間浸漬し、その後、風乾した。Dines et al.に記載されているプロセスと異なり、コーティング溶液中にゼラチンは使用しなかった。生体内での研究に使用するために縫合系を長さ15 cmに切り揃えた。切り揃えた縫合系の残った長さの部分インビトロ分析に用いた。

30

【0267】

インビトロでのrhPDGF-BB放出

酢酸バッファー(第1群)又はrhPDGF-BB(第2~4群)の溶液でコーティングされた縫合系(n=5/群)を溶出バッファー(2%のウシ胎児血清、1%のペニシリン-ストレプトマイシン、1%のL-グルタミン、及び1%のHEPESバッファーを含む最小必須培地)の中に入れ、振盪機(rocking platform)の上で37でインキュベートした。溶出バッファーは1、6、24、及び48時間の時点で完全に交換した。PDGF-BB ELISA(human PDGF-BB DuoSet、R&Dシステムズ社、ミネソタ州ミネアポリス)を用いて、各時点で放出された全rhPDGF-BBを決定した。

40

【0268】

パート2

研究デザイン

50

48頭のスプラグドローラット(350~400グラム)を、盲検的に4つの処置群のいずれかにランダム化した(各群につきn=12)。群は4つの異なる濃度のrhPDGF-BBを含む上記ディップコーティング溶液、すなわち対照群(0mg/ml rhPDGF-BB)及び3つの実験群(0.3、1.0、及び10.0mg/ml rhPDGF-BB初期コーティング濃度)からなる。

【0269】

外科的手技

全ての手術は無菌状態で行われた。アキレス腱の上の皮膚を1.5cm切開した。ブラントジセクションを用いてアキレス腱を露出させた。この時点で、メスを用いて踵骨の付着点近くで腱を横切した。すぐに、4つの群のいずれかの縫合糸を用いた1種類のmodified Mason-Allen縫合及び1種類の単純結節縫合を用いて腱を修復した。いずれの縫合の実施においてもラットアキレス腱が小さいことによる困難はなかった。コーティングされていない結節バイクリル縫合糸を用いて皮膚を閉じた。外科的修復後、動物は普通に歩き回れるようにした。4週間後、ラットを屠殺し、踵骨の骨片及び近位の腓腹筋-ヒラメ筋複合体を含む腱を回収した。検体を生体力学的分析(n=8/群、新鮮凍結)又は組織学的分析(n=4/群、ホルマリン固定)にランダムに割り当てた。

【0270】

生体力学

荷重精度 $\pm 0.5\%$ の100Nのロードセルを取り付けたインストロン社製のシステム(モデル番号5566)を用いて各検体に生体力学的一軸引張分析を行った。サンプルを、プロテアーゼ阻害剤を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)中で4で最大4時間解凍した後、解剖して余分な筋肉を除去し、踵骨及び腓腹筋-ヒラメ筋末端を220グリットのサンドペーパーで包んだ。検体を空気圧グリップの間に固定し、PBS浴に浸漬した。サンプルを引っ張って予荷重(1N)を負荷し、サンプルの寸法を測定した。次いで、腱を歪み速度0.25%/秒で引張伸張にさらした。検体が破損するまで引っ張り、パソコンで荷重及び伸張データを収集した。データは10Hzで取得した。試験後、収集したデータを分析して、それぞれ荷重-変位又は応力-歪み曲線の線形部分から(1)線形剛性及び(2)弾性係数を決定した。荷重曲線から最大荷重及び極限引張強さも計算された。

【0271】

組織学

腱検体をアキレス腱付着部位で踵骨から分離し、修復されたアキレス腱を処理してパラフィン中に包埋した。各検体の矢状切片をマロリー3色染色又はシリウスレッド染色により染色した。スライドは画像化され、以前に記載されているように(Dines J, Weber L, Razzano P, et al. The Effect of Growth Differentiation Factor-5-Coated Sutures on Tendon Repair in a Rat Model. J Shoulder Elbow Surg 2007;16:215S-221S)コラーゲン組織化及び血管形成の程度についてのスコア化シートを用いて3人の盲検観察者によりスコア化された。処置群について知らされていない3人の独立した観察者が各スライドを評価した。各処置群の合計スコアを計算し、統計的有意性があるかどうか比較した。

【0272】

統計解析

時間を反復測定として反復測定ANOVAを用いて、インビトロで放出されたrhPDGF-BBの量を分析した。初期コーティング濃度に対する放出されたrhPDGF-BBの累積量及び送達された総用量は非線形(log-logスケール)最小二乗法に一致していた。一元配置ANOVAをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、群間における生体力学的パラメーターの差を決定した。クラスカル・ワリス検定をダンの多重比較事後検定と共に用いて組織学的分類スコアの統計解析を行った。生体力学データを平均値 $\pm SEM$ で表し、組織学スコアを中央値(範囲)で表す。有意性は $p < 0.05$ で決定した。

【0273】

結果

インビトロ r h P D G F - B B 放出

インビトロ放出データは、放出された r h P D G F - B B の量として表されており、縫合糸の長さで正規化されている (n g / c m) (図 1 4 A 及び 1 4 B)。インビトロ放出は、他の群にとってのベースライン測定値と見なされる第 1 群 (0 m g / m l) (累積放出量 : 1 . 3 ± 0 . 1 n g / c m) を含む全ての群で測定された。インキュベーションの最初の 1 時間後に、縫合糸からの r h P D G F - B B のポーラス放出が観察された (第 2 群 : 6 . 2 9 ± 3 . 0 n g / c m ; 第 3 群 : 6 8 . 8 1 ± 9 . 3 n g / c m ; 及び第 4 群 : 5 8 0 9 . 4 2 ± 5 4 1 . 6 n g / c m) (図 1 4 A)。最初のポーラス放出に続いて、4 8 時間の時点まで、更に r h P D G F - B B が連続的にゆっくりと放出された。4 8 時間のインキュベーション中に放出された r h P D G F - B B の累積量は用量依存的であり、

10

ディップコーティング溶液の濃度が高いほど多くの r h P D G F - B B が放出され、第 4 群 (1 0 m g / m l ; 6 4 9 5 . 9 ± 5 5 2 . 6 n g / c m) で、第 2 群 (0 . 3 m g / m l ; 1 4 . 0 ± 5 . 7 n g / c m) 及び第 3 群 (1 . 0 m g / m l ; 1 2 6 . 8 ± 1 8 . 8 n g / c m) と比べて有意に増加していた (p < 0 . 0 0 1) (図 1 4 B)。第 2 群と第 3 群で放出された r h P D G F - B B の累積量に有意な差はなかった (p > 0 . 0 5)。放出された r h P D G F - B B の累積量 (Y、n g / c m) は以下の式により初期コーティング濃度 (X、m g / m l) に対数比例していた (R² = 0 . 9 5 7 5)。

$$Y = 10^{(1.711 \cdot \log(X) + 2.102)}$$

【 0 2 7 4 】

外科的観察及び肉眼的観察

全ての動物は手術に好ましい反応を示したが、例外として (組織学的検査に割り当てられた) 第 3 群の 1 頭は麻酔による合併症により手術後一晩で死亡した。修復に使用された縫合糸の長さは群の間で一致していた (第 1 群 : 4 . 8 ± 0 . 1 c m ; 第 2 群 : 4 . 7 ± 0 . 2 c m ; 第 3 群 : 4 . 8 ± 0 . 1 c m ; 及び第 4 群 : 4 . 8 ± 0 . 1 c m ; p = 0 . 9 4) (図 1 4 D)。インビトロで放出された r h P D G F - B B 平均量及び縫合糸の長さに基づいて、各群のインビボでの用量 (平均 ± S E M) は以下のように計算された : 第 1 群 : 0 n g ; 第 2 群 : 6 6 . 0 ± 6 1 . 2 n g ; 第 3 群 : 6 0 2 . 5 ± 1 9 0 . 9 n g ; 及び第 4 群 : 3 1 , 3 4 2 . 6 ± 6 7 7 4 . 5 n g。放出された r h P D G F - B B の累積量同様、インビボで送達される用量 (Y、n g) は、以下の式で初期コーティング濃度 (X、m g / m l) に対数比例した (R² = 0 . 9 8 5 9) (図 1 4 C)。

20

$$Y = 10^{(1.732 \cdot \log(X) + 2.757)}$$

30

【 0 2 7 5 】

生体力学

5 つの検体は、その試験日にインストロン社製試験機でエラーが生じたため、生体力学的分析に使用することができなかった。生体力学的分析に得られた検体の数は n = 7 (第 1 群、第 2 群、及び第 3 群) 及び n = 6 (第 4 群) であった。

【 0 2 7 6 】

修復された腱の構造的特性 (極限荷重及び剛性) に有意な差は観察されなかった (p > 0 . 1 6) が、極限荷重の平均値 (第 1 群 : 2 2 . 1 ± 1 . 8 N ; 第 2 群 : 3 1 . 6 ± 3 . 5 N ; 第 3 群 : 2 8 . 0 ± 3 . 7 N ; 第 4 群 : 2 7 . 6 ± 1 . 8 N)、及び剛性の平均値 (第 1 群 : 6 . 7 ± 0 . 4 N / m m ; 第 2 群 : 8 . 9 ± 0 . 8 N / m m ; 第 3 群 : 8 . 0 ± 1 . 0 N / m m ; 第 4 群 : 7 . 9 ± 0 . 7 N / m m) は、対照群 (第 1 群) よりも r h P D G F - B B 群で常に大きかった。

40

【 0 2 7 7 】

横断面積 (C S A) の有意な減少 (p < 0 . 0 5) が、第 1 群 (0 . 2 1 ± 0 . 0 3 c m²) 及び第 2 群 (0 . 2 3 ± 0 . 0 4 c m²) と比べて第 4 群 (0 . 1 4 ± 0 . 0 5 c m²) で観察された。C S A は、第 3 群 (0 . 1 7 ± 0 . 0 2 c m²) でも第 2 群と比べて有意に減少していた (p < 0 . 0 5)。C S A の減少により、修復された腱の材料特性 (極限引張強さ及び弾性係数) に有意な差が生じた。極限引張強さの有意な増加 (p < 0 . 0 5) が、0 m g / m l (1 . 0 ± 0 . 1 M P a) 及び 0 . 3 m g / m l (1 . 4 ± 0 . 1

50

MPa) rhPDGF-BB群と比べた10.0mg/ml rhPDGF-BB群(2.1±0.2MPa)並びに0mg/ml群と比べた1.0mg/ml(1.9±0.2MPa)rhPDGF-BB群で見られた。弾性係数は、10.0mg/ml(7.22±1.5MPa)rhPDGF-BB群で他のすべての群(0mg/ml:3.5±0.4MPa;0.3mg/ml:4.4±0.4MPa;1.0mg/ml rhPDGF-BB:4.9±0.7MPa)と比べて有意に増加していることが観察された(p<0.05)。0、0.3、及び1.0mg/ml rhPDGF-BB群には互いに統計的な差はなかった。

【0278】

組織学

各群の動物4頭の組織学的検査を行った(第3群はn=3)。各切片を3人の採点者がスコア化し、平均スコアを求めた。平均スコアは中央値(範囲)で表される。組織学的分析は、群間でコラーゲン組織化又は血管形成のスコアの有意な差を示さなかった。しかし、対照群と比べてrhPDGF-BB群で、特にコラーゲン組織化のスコアで、より正常な外観が観察される傾向があった。

【0279】

考察

本研究で、本発明者らは、rhPDGF-BBをバイクリル縫合系にコーティングでき、インビトロで縫合系から放出されるrhPDGF-BBの量が初期コーティング濃度に依存することを実証した。構造的機械的特性(極限荷重及び剛性)又は組織学的試験で有意な差は観察されなかったが、rhPDGF-BB処置群でこれらの特性の改善傾向が見られた。材料の力学的特性(極限引張応力及び弾性係数)の増加に示されるように、材料の生体力学的特性について、rhPDGF-BBコーティング縫合系に対する用量依存的反応が観察された。

【0280】

生体力学的に、極限強度及び弾性係数について最大用量のrhPDGF-BBで有意な差が観察された。極限強度(極限引張強さ又は極限引張応力ともいう)及び弾性係数(ヤング率ともいう)は、腱の寸法特性(変位及びCSA)で正規化された構造的特性(極限荷重及び剛性)を表し、組織の質の尺度となる。本研究では、rhPDGF-BBの用量を増やすとCSAが減少したことから、材料特性の増加が説明される。CSAの減少は、より組織化された腱を示唆するものである。rhPDGF-BBによりコラーゲン組織化が改善される傾向が組織学的に観察されたものの、おそらく組織学に割り当てたサンプルサイズが小さかったため、このスコアはCSAで見られたような統計的有意性には達しなかった。しかし、コラーゲン組織化の改善傾向は、CSAの減少と合わせて、最大用量のrhPDGF-BBにより対照縫合系と比べてより質の高い腱組織(極限強度及び弾性係数の増大)が促進されたことを示唆している。

【0281】

縫合系コーティングプロセスの効率及び腱治癒への用量依存的影響を評価するために、適用されたrhPDGF-BBの用量の定量化が必須である。インビトロ分析により、最大コーティング濃度(10mg/ml)で、放出されるrhPDGF-BBの量の有意な増加が示されたが、より低い2つのコーティング濃度(0.3及び1.0mg/ml)では、放出されたrhPDGF-BBの平均累積量が9倍違っても(それぞれ14.0±5.7ng/cm対126.8±18.8ng/cm)、有意な差が見られなかった。これは、この2つの低用量群の間で極限強度及び弾性係数に有意な差がなかったという観察結果と一致していた。

【0282】

本研究は、rhPDGF-BBの送達によりラットアキレス腱の生物学的修復を増強できることを示した。本研究の制限事項は、本研究に用いられているサンプルサイズによりこれらの結果の解釈がどのように影響を受けるかということである。本研究は、生体力学に8頭/群及び組織学に4頭/群でデザインされた。力学的試験日の1日でインストロン

10

20

30

40

50

社の試験デバイスにエラーが生じたため、5つの検体が分析に含まれず、統計的検出力が低下した。その結果、極限荷重、剛性等の特性が対照群と比べて平均的に増加しているように見えたにも関わらず、これらの特性のより小さな差は実験群で有意と見なされなかった。

【0283】

結果が用量依存的事であることが多い成長因子の応用では、動物のサイズが大きくなると、より大きな用量の送達が必要となり得る。予備調査(データ示さず)から、送達される用量が初期コーティング濃度及び縫合糸の表面積の両方に依存することが示された。このことは、より大きな動物用に用量を変更することが可能であることを示唆している。

【0284】

示された結果は、臨床用途において、患者の腱の治癒改善及び機能向上にrhPDGF-BBコーティング縫合糸を使用できる可能性を示唆している。

【0285】

文献

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

【0286】

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

【0287】

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

【0288】

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

【0289】

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

【0290】

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

【0291】

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

【0292】

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

【0293】

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

10

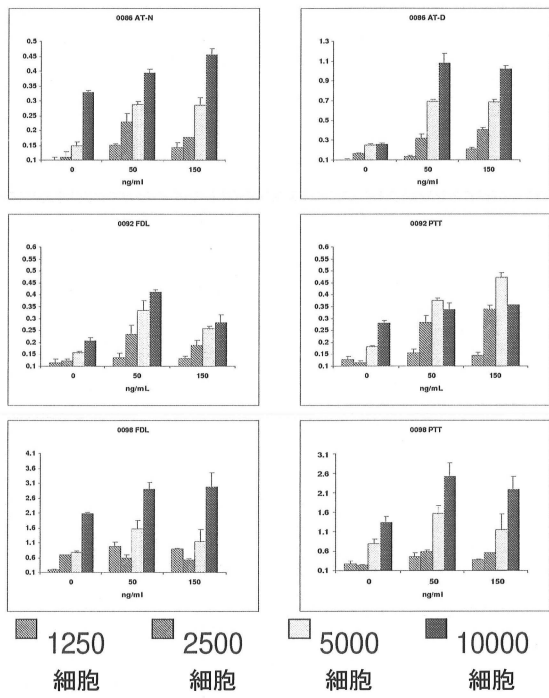
20

30

40

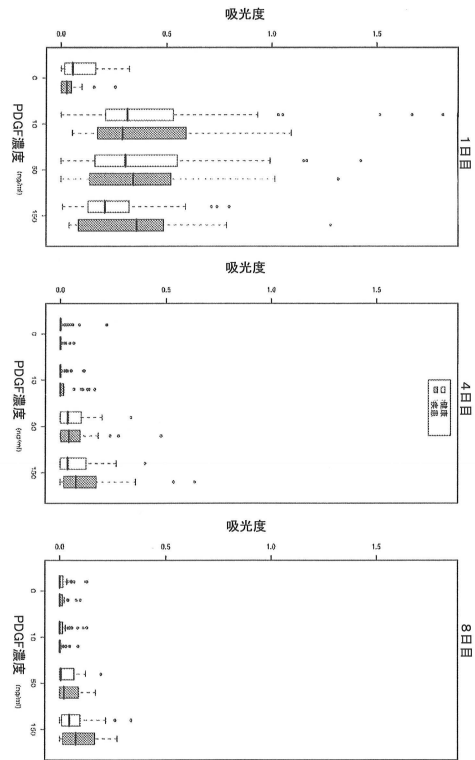
【図1】

細胞遊走

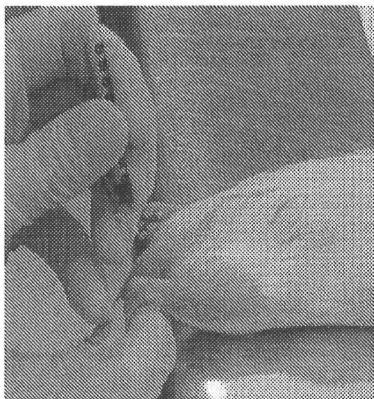


【図2】

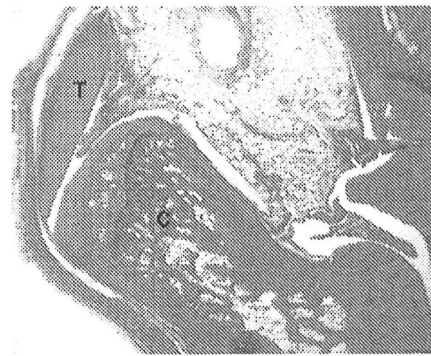
細胞増殖



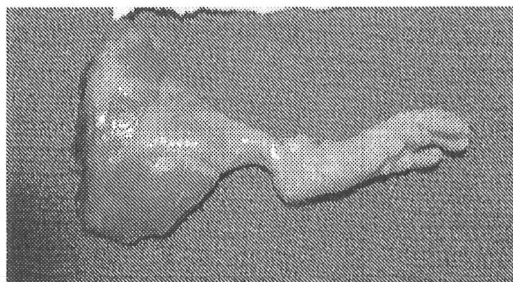
【図3】



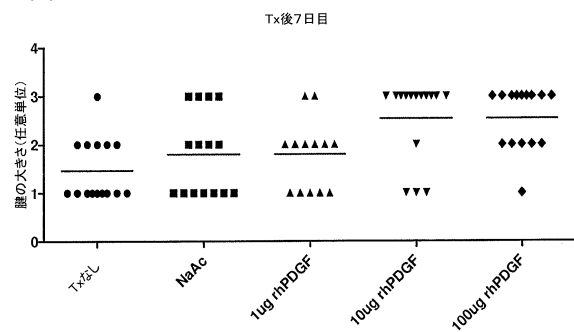
【図5】



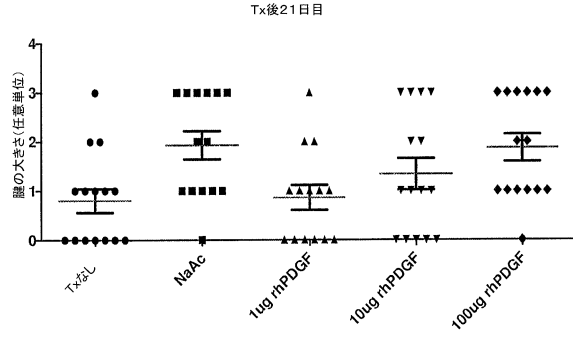
【図4】



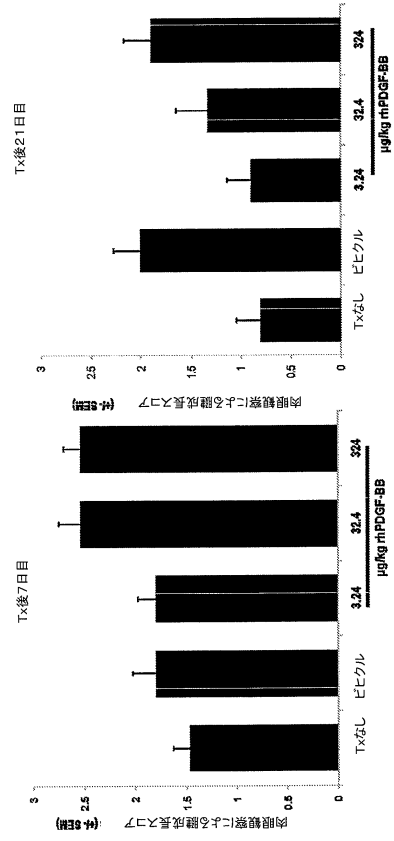
【図6A】



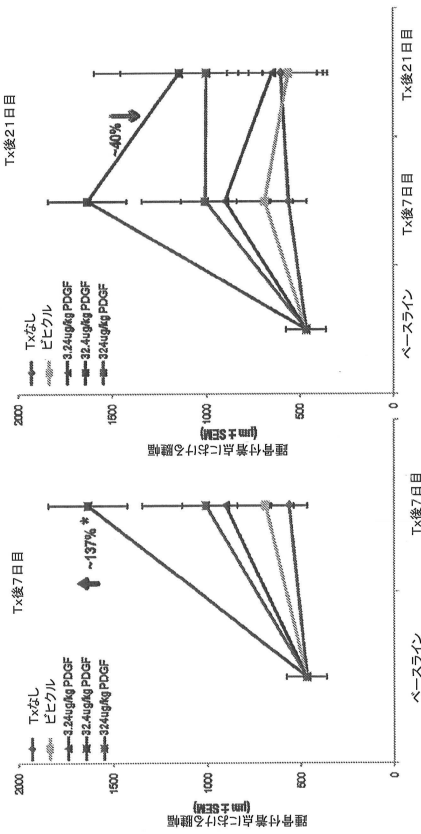
【 図 6 B 】



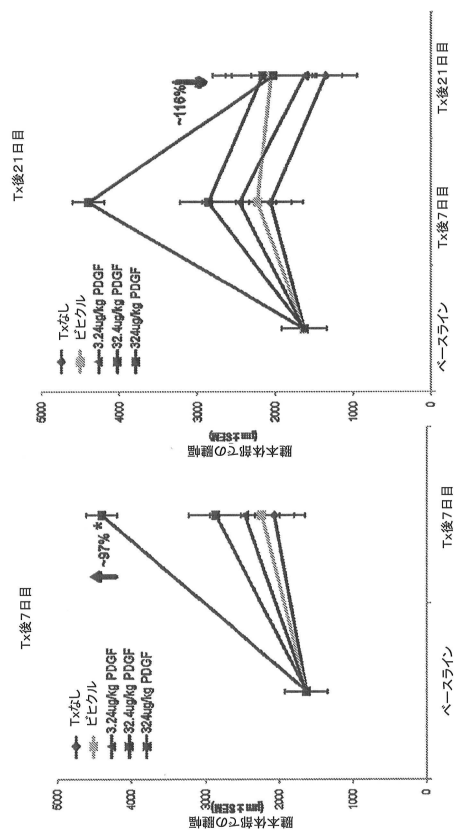
【 図 7 】



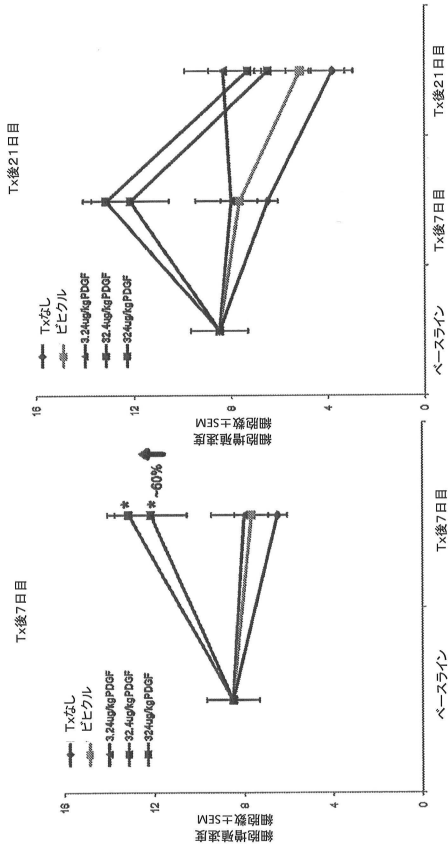
【 図 8 】



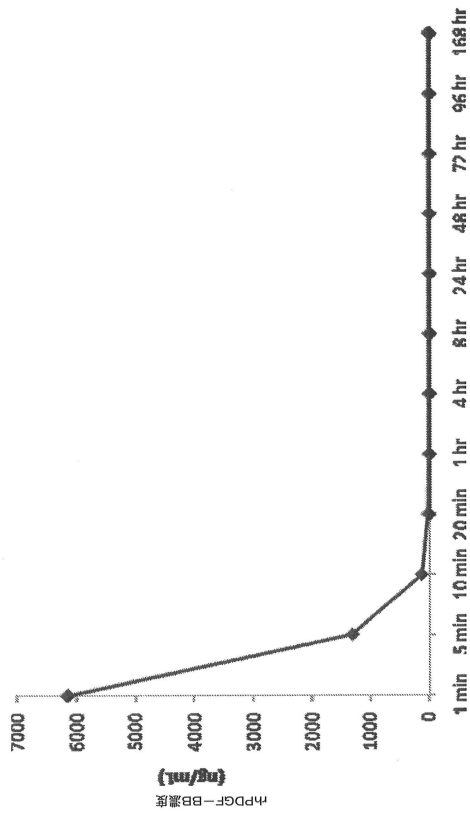
【 図 9 】



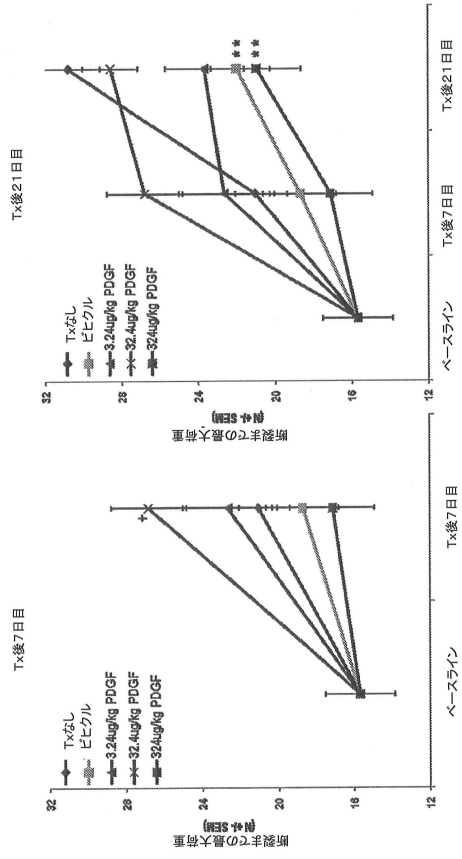
【図 1 0】



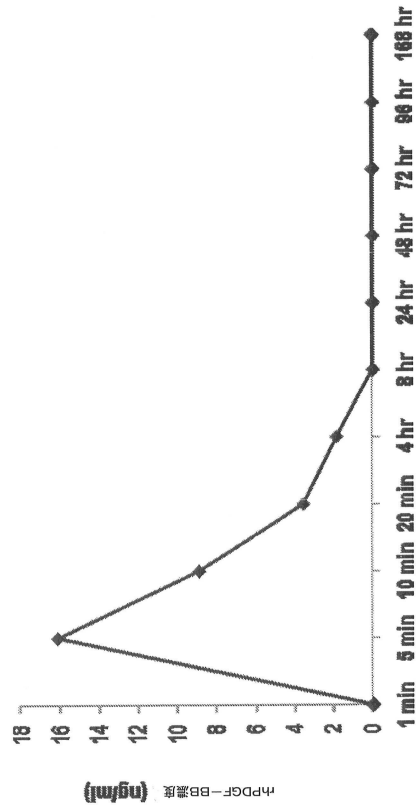
【図 1 2】



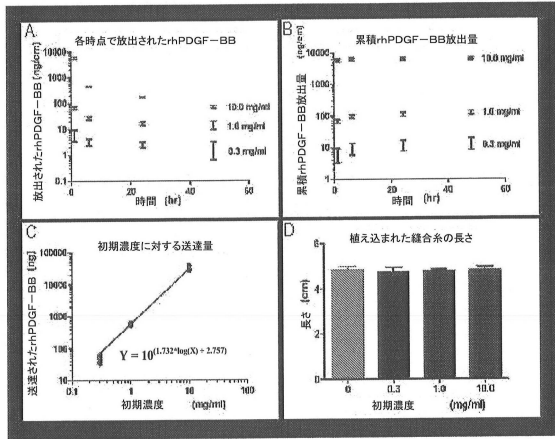
【図 1 1】



【図 1 3】



【 14 】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/428,809
(32)優先日 平成22年12月30日(2010.12.30)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/429,428
(32)優先日 平成23年1月3日(2011.1.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (72)発明者 ケスラー, ハンズ ケー .
アメリカ合衆国 テネシー 37027 プレントウッド ファウンテンブルック 300
- (72)発明者 ラガー - アグイア, ディーン ジェイムス
アメリカ合衆国 テネシー 37174 スプリング ヒル グラウス サークル 3004
- (72)発明者 シャー, ビベック
アメリカ合衆国 テネシー 37067 フランクリン アpartment ナンバー1506 ノ
ース ロイヤル オークス ブールバード 300

合議体

審判長 福井 美穂
審判官 關 政立
審判官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 特表2009-542681(JP,A)
Ann. Biomed. Eng., 2010.02, Vol.38, No.2, p
p.225-234, published online 2009.11.24
J. Orthop. Res., 2009, Vol.27, No.9, pp.120
9-1215
Clin. Orthop. Relat. Res., 2006, No.448, pp
.240-247
東日本震災会誌, 2005, Vol.17, pp.48-51
東日本震災会誌, 2004, Vol.16, No.3, p.410

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K38/00-38/58

A61K41/00-45/08

A61K48/00

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/EMBASE/WPIDS (STN)