(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2009-541358
(P2009-541358A)
(43)公表日　平成21年11月26日(2009.11.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00	ZNA	4C081
A61L 27/00	(2006.01)	A61L	27/00	G	4H045
C07K 14/51	(2006.01)	A61L	27/00	J	
		C07K	14/51		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 30 頁）

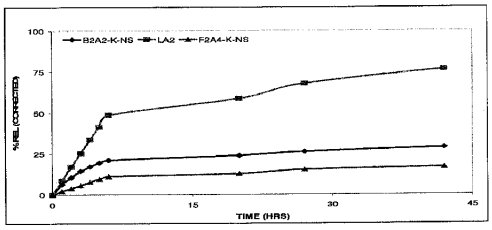
(21)出願番号　特願2009-516753 (P2009-516753)
(86)(22)出願日　平成19年6月22日 (2007.6.22)
(85)翻訳文提出日　平成21年2月3日 (2009.2.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/071946
(87)国際公開番号　WO2007/150053
(87)国際公開日　平成19年12月27日 (2007.12.27)
(31)優先権主張番号　60/805,594
(32)優先日　平成18年6月22日 (2006.6.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　503044709
バイオサーフェス　エンジニアリング　テクノロジーズ，インク．
アメリカ合衆国　メリーランド州　２０８５０，ロックビル，スイート　２２０，キー　ウェスト　アベニュー　９４３０
(74)代理人　110000659
特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(72)発明者　ザモラ，ポール
アメリカ合衆国　メリーランド州　２０８７９，ガイサーバーグ，ウインター　パーク　１８３２１

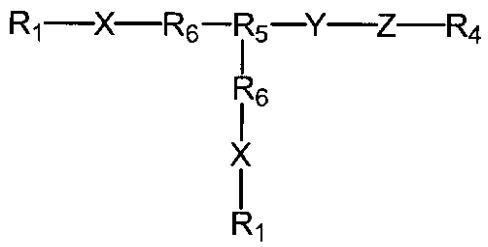
最終頁に続く

(54)【発明の名称】骨形成を強化するためにＢＭＰ－２増幅因子／共活性化因子を送達するための組成物および方法

(57)【要約】
非増殖因子のヘパリン結合領域、リンカー、および、細胞表面受容体に特異的に結合する配列を含む合成増殖因子アナログと、骨伝導性材料とを含み、合成増殖因子アナログが骨伝導性材料に結合され、骨伝導性材料から放出されることができ、かつ、骨誘導の増幅因子／共活性化因子である、組成物。
【選択図】図５



【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記式ＩＩの化合物：
【化１】



ただし、
式ＩＩの化合物は、骨形態形成タンパク質に対する応答を調節し；
Ｘは、（ｉ）少なくとも３個のアミノ酸残基を有し、（ｉｉ）最大で約５０個のアミノ酸残基を有し、かつ、（ｉｉｉ）細胞表面受容体に特異的に結合するペプチド鎖であり；
R_1は独立して、末端基がNH_2であるように水素、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはNH基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のC_1～C_{17}アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基であるか、あるいは、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはNH基を有するアミノ酸、ジペプチドまたはトリペプチドであり；
R_6は独立して、リンカーが１個以上の原子であるとき、R_3に共有結合により結合する０個～約１５個の骨格原子の鎖を含むリンカーであり；
R_5は三官能基のα－アミノ酸残基であり、この場合、ＸがR_3の側鎖を介して共有結合により結合し；
R_4は、末端基がカルボキシルであるようにＯＨ、NH_2、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはNH基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のC_1～C_{17}アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基、あるいは、$NH-R_1$であり；
Ｙは、R_5およびＺに共有結合により結合する０個～約５０個の骨格原子の鎖を含むリンカーであり；
Ｚは、（ｉ）少なくとも１個のヘパリン結合モチーフ、（ｉｉ）最大で約１０個のヘパリン結合モチーフ、および、（ｉｉｉ）最大で約３０個のアミノ酸を含むアミノ酸配列を含むヘパリン結合ドメインを含む非シグナリングペプチド鎖である。
【請求項２】
請求項１に記載の合成増殖因子アナログと、
無機材料、合成ポリマー、天然ポリマー、同種移植片骨またはそれらの組合せの一つ以上を含む骨伝導性材料と
を含み、
合成増殖因子アナログが骨伝導性材料に結合され、骨伝導性材料から放出されることができ、かつ、骨誘導の増幅因子／共活性化因子である、組成物。
【請求項３】
前記骨伝導性材料が、顆粒、パテ、粉末、ゲル、ブロックまたはそれらの組合せにされる、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
前記増殖因子アナログが、
ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫＫ（ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＬＤＲＩＡＲＮＨ$_2$
である、請求項２に記載の組成物。
【請求項５】

前記増殖因子アナログが、細胞増殖、走化性または細胞付着を増幅または共活性化することによって骨誘導環境を調節する、請求項２に記載の組成物。
【請求項６】
硫酸カルシウム塩を前記骨伝導性材料としてさらに含む、請求項２に記載の組成物。
【請求項７】
前記硫酸カルシウムが約３０重量％～８０重量％の間である、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
前記骨伝導性材料が約０重量％～１００重量％のヒドロキシアパタイトおよび約０重量％～１００重量％のリン酸三カルシウムを含有する、請求項２に記載の組成物。
【請求項９】
前記骨伝導性材料が約２０重量％のヒドロキシアパタイトおよび約８０重量％のリン酸三カルシウムを含有する、請求項２に記載の組成物。
【請求項１０】
前記骨伝導性材料が、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、コラーゲン、ヒアルロン酸、硫酸カルシウム、ポリグリコール酸繊維、ポリ乳酸－ｃｏ－グリコール酸、同種移植片またはそれらの任意の組合せから選択される、請求項２に記載の組成物。
【請求項１１】
配合が、骨誘導性マトリックスに対するペプチド結合を妨害しない賦形剤を含有する、請求項２に記載の組成物。
【請求項１２】
前記顆粒が、ヒドロキシアパタイト格子においてリン酸イオンの一部を置換するケイ酸をさらに含む、請求項２に記載の組成物。
【請求項１３】
請求項２に記載される骨伝導性材料を、増殖因子アナログが放出可能に結合される骨伝導性材料を作製するために、請求項１に記載される合成増殖因子アナログにより被覆することと；
被覆された骨伝導性材料を骨損傷部に埋め込むことと
を含む、骨損傷を処置するための方法。
【請求項１４】
外因性または組換えの骨増殖因子が加えられる、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記骨伝導性材料が、一つ以上の無機材料、コラーゲン、ヒアルロン酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、同種移植片またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
前記骨伝導性材料が、顆粒、ポリマー、粉末、ゲル、セメント、パテまたはそれらの任意の組合せから形成される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１７】
前記骨伝導性材料が、骨損傷を処置するための負荷支持デバイスとの組合せで使用される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１８】
前記負荷支持デバイスが、骨固定のためのケージ、くさび、ロッド、有茎ネジ、椎体置換体、椎間体固定デバイスまたはリングから選択される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記骨損傷の前記処置が脊椎固定をもたらす、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
宿主の骨チップまたは骨髄穿刺液を移植片材料とともに加えることをさらに含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項２１】

前記合成増殖因子アナログが、
ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫＫ（ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＬＤＲＩＡＲＮＨ$_2$
を含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項２２】
前記合成増殖因子アナログを放出することが、前記骨伝導性材料の組成、前記骨伝導性材料に結合する合成増殖因子アナログの濃度、または、前記骨伝導性材料の物理的特性によって速度制御される、請求項１３に記載の方法。
【請求項２３】
合成増殖因子アナログの、（賦形剤を伴うか、または、賦形剤を伴わない）凍結乾燥されたバイアルと、
骨伝導性材料の容器と
を含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、広範囲の骨修復適応にわたる強化された骨形成をもたらす組成物、および、そのような組成物を骨損傷の改善された修復のための送達ビヒクルにおいて使用する方法に関する。
【０００２】
（関連出願）
本特許出願は、米国仮特許出願第６０／８０５，５９４号（発明の名称「骨形成を強化するためにＢＭＰ－２の部分アゴニストを送達するための組成物および方法」、２００６年６月２２日出願）の出願の優先権および利益を主張し、同様にまた、米国特許出願第１１／７６７，３９１号（発明の名称「骨形成を強化するためにＢＭＰ－２増幅因子／共活性化因子を送達するための組成物および方法」、２００７年６月２２日出願）の優先権を主張する。これらの明細書および請求項は本明細書中に参照して組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
米国特許出願公開第２００５０１９６４２５号（Ｚａｍｏｒａら、発明の名称「ＢＭＰ－２の正の調節因子」）は、骨損傷を修復するために有用である骨形態形成タンパク質－２（ＢＭＰ－２）アナログを含む配合物、および、このような配合物が内因性のＢＭＰ－２活性または外部から加えられたＢＭＰ－２活性を増大させ得る方法を教示する。米国特許出願公開第２００５０１９６４２５号はさらに、ＢＭＰ－２調節因子配合物が改変し得る、骨伝導性である骨移植片代用物が多く市販されていることを教示する。このような骨伝導性材料には、多くのリン酸カルシウム含有複合材が含まれた。この配合物は骨マトリックスまたは骨移植片材料への添加物であるか、あるいは、とりわけ、薬物送達デバイスにより制御されるか、または、薬物送達デバイスと関連付けられる。しかしながら、米国特許出願公開第２００５０１９６４２５号は、骨伝導性組成物を操作すること、ペプチド組成物、ペプチド組成物に結合した化合物の濃度を操作すること、および／または、硫酸カルシウム濃度を操作することによる骨伝導性材料への効率的なペプチド結合、制御された示差的放出を可能にするペプチド配合物および骨伝導性配合物を開示していない。この特許出願については、ＢＭＰ－２の正の調節因子が共活性化因子／増幅因子と称される。
【０００４】
骨伝導は、骨性環境において孔に置かれる移植片材料の表面で骨を形成するプロセスとして記述することができる。大まかに言えば、骨伝導は、骨が表面で成長することを意味する。骨伝導は、細胞が移植片部位の中に移動し、骨を産生するための足場を必要とする。足場材料は、同種移植片骨、天然ポリマー（ヒアルロン酸、フィブリン、カルボキシメチルセルロース、キトサン、コラーゲンなど）、合成ポリマー（ポリ乳酸（ＰＬＡ）、ポリグリコール酸（ＰＧＡ））、および、無機材料（例えば、ヒドロキシアパタイト（ＨＡ

）、リン酸三カルシウム（ＴＣＰ）、硫酸カルシウム（ＣａＳ））の四つのタイプに分類することができる。数多くの合成された骨伝導性の骨移植片材料が、骨の孔を充填するために開発されている。しかしながら、これらの移植片材料は単に骨伝導性であるだけであり、また、新生血管系の内方成長および骨形成性前駆体細胞の移植片部位内への浸潤を含む成長可能な骨の治癒のための足場を提供するだけである。

【０００５】

骨誘導は、骨形成が誘導されるプロセスであり、任意のタイプの骨治癒において通常的に見られるプロセスである。骨誘導は、未成熟な細胞の動員、および、前骨芽細胞に発達するようにこれらの細胞を刺激することを伴う。骨治癒環境において、大多数の骨治癒は骨誘導に依存している。このプロセスは、典型的には、骨治癒環境における骨増殖因子（主として、骨形態形成タンパク質）の存在に関連付けられる。

【０００６】

骨誘導は、数多くのタンパク質または増殖因子、成長または新しい血管（血管形成）によって影響を受け得る。これらのタンパク質は治癒中の骨に新生血管を形成させ、石灰化させ、機械的に機能させる。これらのタンパク質は、骨細胞に分化するように間葉由来細胞を誘導することができる。骨治癒を高めるタンパク質には、とりわけ、骨形態形成タンパク質、インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子、血小板由来増殖因子および線維芽細胞増殖因子が含まれる。これらのタンパク質のなかで最もよく知られているのが、骨細胞に分化するように間葉細胞を誘導するＢＭＰ類である。他のタンパク質は、異なる様式で骨治癒に影響を及ぼす。形質転換増殖因子および線維芽細胞増殖因子は血管形成を調節し、骨の形成および細胞外マトリックスの合成に影響を及ぼし得る。様々な細胞外マトリックス分子（例えば、オステオネクチン、フィブロネクチン、オステオネクチン、ラミニンおよびオステオカルシンなど）が、細胞の活性化、細胞の付着を促進し、細胞の遊走を容易にする。

【０００７】

治癒中の骨損傷部はどれも、骨誘導性の環境である一方で、必ずしもすべての骨誘導性環境（骨損傷部）が、十分または完全な治癒を受けることができるとは限らない。このことは、骨誘導を移植片材料において誘導し、それにより、成熟した骨細胞に分化するように幹細胞を誘導するために、組換え骨形態形成タンパク質の使用をもたらしている。

【０００８】

米国特許第７，０４１，６４１号（Ｒｕｅｇｅｒら）は、骨修復のために多くの足場（ＨＡおよびＴＣＰを含む）およびバインダーと組み合わされる様々な骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）および増殖因子を明らかにする。しかしながら、これらの移植片材料は高価であり、過増殖性または異所性の骨生成をもたらし得る。

【０００９】

米国特許第６，９４９，２５１号（Ｄａｌａｌら）は、骨修復のために多くのＢＭＰおよび／またはバインダー（ＣＭＣ、ヒアルロン酸など）を伴うβリン酸三カルシウム（βＴＣＰ）粒子を開示している。

【００１０】

米国特許第６，４２６，３３２号（Ｒｕｅｇｅｒら）は、一緒に組み合わされる多くの生物活性剤（例えば、ＢＭＰ－２）とともに骨伝導性材料としてのβＴＣＰを開示している。生物活性剤が、明確な表面を何ら有しない、生体適合性で、非剛体の非晶質キャリアに分散され、この場合、前記キャリアは、ポロキサマー、ゼラチン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、デキストランおよび植物油からなる群から選択される。

【００１１】

歯周骨修復のための市販の製造物であるＧＥＭ－２１Ｓ（商標）では、β－ＴＣＰの顆粒が、血小板由来増殖因子（「ＰＤＧＦ」）により被覆されて利用される。Ｓａｉｔｏら（ＪＢＭＲ、７７Ａ：７００－６（２００６））は、ＢＭＰ－２のｋｎｕｃｋｅｌエピトープの７３～９２に由来する７３～９２ペプチドを利用した。このペプチドがαＴＣＰ（ＯＣＴＣＰ）の円柱物に被覆され、長さ２０ｍｍの欠損部に埋め込まれた。Ｋｏｎｉｓｈ

ｉら（Ｊ．Ｓｐｉｎｅ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ＆Ｔｅｃｈ．）およびＭｉｎａｍｉｄｅら（Ｓｐｉｎｅ、２００１、２６（８）：９３３－９）は、腰椎固定のためにヒドロキシアパタイト顆粒と組み合わされたＢＭＰを明らかにした。

【００１２】

治療的適応のための小分子（例えば、ペプチドなど）の送達は通常、様々なカプセル化技術によって達成され、例えば、分子が、ペプチドを放出するために時間とともに分解する小胞に包まれるマイクロスフェアによって達成される。小分子は、生体材料の表面に対する十分な結合特性を提供する物理的特性を有することが稀であるので、医療デバイスの表面からの小分子の送達がこれまで検討されている。多くの場合、ペプチドは、急速な放出を防止しようとして表面に共有結合により結合される（Ｓａｉｔｏら、Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ、７０Ａ：１１５－１２１（２００４）；Ｓｅｏｌ Ｙ－Ｊら、Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ（Ａ）（２００６））（Ｖａｒｋｅｙら、Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．、２００４ Ｎｏｖ、１（１）：１９－３６、骨修復のための増殖因子送達、Ｖａｒｋｅｙら）。共有結合による架橋の一つの欠点は、分子が遊離し、周囲の骨伝導性環境に影響を及ぼすことができないことである。

【００１３】

ＢＭＰ－２増幅因子／共活性化因子を含む合成配合物の送達速度論および送達量を、選ばれた適応に合わせて具体的に調節してもよい。骨の損傷が生じた後において、ＢＭＰ－２の細胞産生をもたらす修復的応答が認められること、および、さらには、この産生が、アップレギュレーション期間、最終的にはその後、ダウンレギュレーションを伴う所与の時系列にわたって生じることを認識しなければならない。Ｎｉｉｋｕｒａら（２００６、ＯＲＳ、＃１６７３）は、ラットでの普通の骨折および癒着不能におけるＢＭＰ－２産生を経時的に測定し、癒着不能では、普通の骨折の場合よりも少ないＢＭＰ－２産生を明らかにし、また、２１日までの増大し続ける量のＢＭＰ－２、その後、２８日での発現における低下を明らかにした。ＢＭＰ－２の発現がヒトの骨折仮骨において検出されている（Ｋｌｏｅｎら、２００３、３６２－３７１）。さらには、Ｍｕｒｎａｇｈａｎら（ＪＯＲ、２００５、２３：６２５－６３１）は、０日目または４日目に骨折部に投与されたＢＭＰ－２が、８日目に導入されたＢＭＰ－２よりも大きい修復をもたらしたことをマウスの骨折試験において明らかにした。この場合には、ＢＭＰ－２が、骨に分化し得る幹細胞の産生に関して時期が合わせられ、内因性のＢＭＰ－２産生に関しては時期が合わせられていないことに留意しなければならない。

【００１４】

Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳとして特定された合成増殖因子が、Ｚａｍｏｒａらによって、米国特許出願第１１／０６４，０３９号（発明の名称、「骨形態形成タンパク質－２の正の調節因子」、２００５年２月２２日出願）において、様々な他のペプチドを開示することに加えて、初めて開示された。しかしながら、この合成増殖因子を、骨損傷を処置するための組成物として、骨伝導性材料と組み合わせることは開示されなかった。

【００１５】

従って、骨の孔充填材物質として作用することができる組成物で、骨誘導の増幅因子／共活性化因子として作用することができ、かつ、骨の修復プロセスおよび治癒プロセスを高めるために、骨伝導性材料への結合および骨伝導性材料からの放出が可能である合成増殖因子アナログから構成される組成物が求められている。

【００１６】

同様にまた、数多くの外科的手法が、骨修復を増大させることが特に有益である整形外科において（この場合には、脊椎および足関節の固定手法を含めて、様々な固定手法が含まれる）、外傷性傷害から生じる骨における孔を充填することにおいて、癒着不能の処置において、すべての骨格要素における骨折治癒において、体内金属製品（例えば、ロッド、プレートおよびネジなど）の固定において、脊椎ケージまたは椎体置換体との協調において、また、埋め込まれたくさび、有茎ネジまたはリングの増強において存在する。これらのタイプの手法および関連する金属製品は当業者には知られている。

【先行技術文献】
【特許文献】
【００１７】
【特許文献１】米国特許出願公開第２００５０１９６４２５号
【特許文献２】米国特許第７，０４１，６４１号
【特許文献３】米国特許第６，９４９，２５１号
【特許文献４】米国特許第６，４２６，３３２号
【特許文献５】米国特許出願第１１／０６４，０３９号
【非特許文献】
【００１８】
【非特許文献１】Ｓａｉｔｏら（ＪＢＭＲ、７７Ａ：７００－６（２００６））
【非特許文献２】Ｋｏｎｉｓｈｉら（Ｊ．Ｓｐｉｎｅ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ＆Ｔｅｃｈ．）
【非特許文献３】Ｍｉｎａｍｉｄｅら（Ｓｐｉｎｅ、２００１、２６（８）：９３３－９）
【非特許文献４】Ｓａｉｔｏら、Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ、７０Ａ：１１５－１２１（２００４）
【非特許文献５】Ｓｅｏｌ Ｙ－Ｊら、Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ（Ａ）（２００６）
【非特許文献６】Ｖａｒｋｅｙら、Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．、２００４（Ｎｏｖ）、１（１）：１９－３６、骨修復のための増殖因子送達、Ｖａｒｋｅｙら
【非特許文献７】Ｎｉｉｋｕｒａら（２００６、ＯＲＳ、＃１６７３）
【非特許文献８】Ｋｌｏｅｎら、２００３、３６２－３７１
【非特許文献９】Ｍｕｒｎａｇｈａｎら（ＪＯＲ、２００５、２３：６２５～６３１）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１９】
一つの態様によれば、本発明は、骨形成を広範囲の骨修復適応にわたって増強する組成物であって、骨伝導性材料に結合され、骨伝導性材料から放出される合成増殖因子アナログが骨誘導の増幅因子／共活性化因子として作用し、骨の修復プロセスおよび治癒プロセスを増強する組成物を記載している。代替として、合成増殖因子アナログは骨伝導性材料に固定されるが、放出されない。
【００２０】
別の態様によれば、本発明は、下記の構成成分を含む送達ビヒクルを提供する。すなわち、骨伝導性の足場および骨誘導の増幅因子／共活性化因子として作用する合成増殖因子アナログであって、該足場は好ましくは内因性ＢＭＰ－２の存在と一致する速度で、該合成増殖因子と結合し該合成増殖因子を放出することができる。
【００２１】
本発明の別の態様において、合成増殖因子アナログの正確な放出パラメーターは骨損傷のタイプに関連付けられ、また、骨形成を促進する。合成増殖因子アナログの送達速度論および送達量は、選ばれた適応に合わせて具体的に調節してもよい。例えば、合成増殖因子アナログが、内因性ＢＭＰ－２の活性を増大させることを意図されるならば、骨折修復における送達特性は、はるかにより長い期間にわたるはるかにより遅い送達が好ましいと考えられる脊椎固定と比較して、より迅速な送達を必要としなければならない。
【００２２】
その点に関して、骨の損傷が生じた後において、ＢＭＰ－２の細胞産生をもたらす修復的応答が認められること、および、さらには、この産生が所与の期間にわたって生じることを認識しなければならない。さらには、産生される内因性ＢＭＰ－２の量が、傷害を受けた骨組織の表面積、成長可能な骨芽細胞の数、修復速度などを含めて、多くの要因に依

存していることを認識しなければならない。重大でないサイズの欠損部は、外因性の生体材料を伴うことなく欠損を修復するための十分な修復細胞およびＢＭＰ－２を有する。さらには、小さい分節骨折は、欠損体積に対する、骨表面積がより小さい、より大きい欠損部よりもはるかに大量の宿主ＢＭＰ－２をもたらし得る。

【００２３】

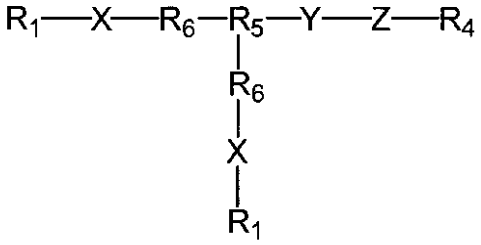
さらに別の態様によれば、本発明は、非増殖因子のヘパリン結合領域、リンカー、および、細胞表面受容体に特異的に結合する配列を含む合成増殖因子ペプチドアナログと、無機材料、合成ポリマー、天然ポリマー、同種移植片骨またはそれらの組合せの一つ以上を含む骨伝導性材料とを含み、合成増殖因子アナログが骨伝導性材料に結合され、骨伝導性材料から放出されることができ、かつ、骨誘導の増幅因子／共活性化因子である、組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【００２４】

合成増殖因子アナログが、下記の式ＩＩ：

【化１】



（式中、

Ｘは、（ｉ）少なくとも３個のアミノ酸残基を有し、（ｉｉ）最大で約５０個のアミノ酸残基を有し、かつ、（ｉｉｉ）細胞表面受容体に特異的に結合するペプチド鎖である；

R_1は独立して、末端基がNH_2であるように水素、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはＮＨ基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のC_1～C_{17}アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基であるか、あるいは、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはＮＨ基を有するアミノ酸、ジペプチドまたはトリペプチドであり；

R_6は独立して、リンカーが１個以上の原子であるとき、R_3に共有結合により結合する０個～約１５個の骨格原子の鎖を含むリンカーであり；

R_5は三官能基のα－アミノ酸残基であり、この場合、ＸがR_3の側鎖を介して共有結合により結合し；

R_4は、末端基がカルボキシルであるようにＯＨ、NH_2、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはＮＨ基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のC_1～C_{17}アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基、あるいは、$NH-R_1$であり；

Ｙは、R_5およびＺに共有結合により結合する０個～約５０個の骨格原子の鎖を含むリンカーであり；

Ｚは、（ｉ）少なくとも１個のヘパリン結合モチーフ、（ｉｉ）最大で約１０個のヘパリン結合モチーフ、および、（ｉｉｉ）最大で約３０個のアミノ酸を含むアミノ酸配列を含むヘパリン結合ドメインを含む非シグナリングペプチド鎖である）

であり、かつ、骨伝導性材料が、無機材料、合成ポリマー、天然ポリマー、同種移植片骨またはそれらの組合せの一つ以上を含む、請求項１の組成物。好ましい実施形態において、合成増殖因子アナログは骨伝導性材料に結合され、骨伝導性材料から放出されることができ、かつ、骨誘導の増幅因子／共活性化因子である。

【００２５】

本発明の別の態様において、骨伝導性材料に結合され、骨伝導性材料から放出される合

成増殖因子アナログはペプチドＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳである。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳはＢＭＰ－２の増幅因子／共活性化因子として作用し、また、そのプロセスを介して、骨誘導を増幅し、骨の修復プロセスおよび治癒プロセスを高める。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは下記の配列である：
ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫＫ（ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＬＤＲＩＡＲＮＨ$_2$。

【００２６】

Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは、１００％のヒドロキシアパタイト（ＨＡ）を含む無機顆粒、および、ＨＡの二相組成物に結合する。例えば、２０：８０（ＨＡ：ＴＣＰ）および６０：４０（ＨＡ：ＴＣＰ）、しかし、これらに限定されない。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳはまた、有機材料（例えば、コラーゲンスポンジ）に結合する。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳがいくつかの無機顆粒から異なる速度で放出される。ペプチド放出の大きさはペプチドの濃度および／またはペプチドのアミノ酸組成によって変化する。例えば、ペプチドにおける広範囲に分布する正荷電は、広範囲の正荷電分布を有しないペプチドよりも少ない放出をもたらす（例えば、より強固に結合したペプチド）。重要なことに、ウサギの脊椎固定研究では、２０：８０の（ＨＡ：ＴＣＰ）顆粒に結合し、この顆粒から放出されるＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳが、内因性のＢＭＰ－２活性を高める最適な放出特性をもたらし、この結果、骨形成および脊椎固定を増強したことが明らかにされた。

【００２７】

本発明の別の態様において、骨伝導性材料に結合され、骨伝導性材料から放出される合成増殖因子アナログは、生物学的プロセス（例えば、血管形成、炎症、細胞成長、細胞が骨伝導性の足場に結合すること、または、骨形成に関連付けられる走化性など）を共活性化し、または増幅し、または改変する。同様に、式Ｉおよび式ＩＩの他の実施形態には、Ｘ領域が、配列番号７～配列番号１９（しかし、これらに限定されない）の全体または一部、あるいは、配列番号７～配列番号１９（しかし、これらに限定されない）の全体または一部のホモログである実施形態が含まれる。

【００２８】

加えて、下記の合成増殖因子アナログも使用することができる：下記の配列を有するＢ７Ａ：
ＶＬＹＦＤＤＳＳＮＶＩＬＫＫＫ（ＶＬＹＦＤＤＳＳＮＶＩＬＫＫＫ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＫＬＥＲＩＡＲ－アミド
式中、Ｈｘはアミノヘキサン酸である。Ｂ７Ａは、ＢＭＰ－７およびＢＭＰ－２の活性を増大させることによってＢＭＰ－２の活性を高める。

【００２９】

細胞の接着および遊走を刺激するＬＡ－２もまた使用することができ、これは下記の配列を有する：
ＳＩＫＶＡＶＡＡＫ（Ｈ－ＳＩＫＶＡＶＡＡ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＫＬＥＲＩＡＲ－アミド。
骨伝導性の足場に結合する細胞の数を増大させることにより、内因性ＢＭＰ－２の活性が間接的に高まる。

【００３０】

同様にまた、血管の成長を誘導するＦ２Ａ４－Ｋ－ＮＳを、骨の形成を高めるために使用することができる。Ｆ２Ａは塩基性ＦＧＦのペプチド模倣体であり、Ｆ２Ａとも称される。そのようなペプチドおよびｂＦＧＦはともに、血管形成を高めることが以前に明らかにされている。血管形成を増大させることは、骨の形成を高めることが以前に明らかにされており、従って、ＢＭＰ－２の骨形成活性を協奏的に増大させることが予想される。Ｆ２Ａ４－Ｋ－ＮＳは下記の配列を有する：
ＹＲＳＲＫＹＳＳＷＹＶＡＬＫＲＫ（Ｈ－ＹＲＳＲＫＹＳＳＷＹＶＡＬＫＲ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＬＤＲＩＡＲ－アミド。

【００３１】

同様に、血管内皮細胞増殖因子の模倣体である合成増殖因子アナログＶＡ５も使用することができ、これは下記の配列を有する：
ＷＦＬＬＴＭＡＡＫ（ＷＦＬＬＴＭＡＡ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＫＬＥＲＩＡＲ－アミド。
【００３２】
同様にまた、ストロマ由来増殖因子－１の様々な態様を模倣する合成増殖因子アナログＳＤ－２を、循環している前駆細胞の、骨損傷部位への走化性および局在化を増大させるために使用することができる。ＳＤ－２は下記の配列を有する：
ＫＷＩＱＥＹＬＥＫＫ（ＫＷＩＱＥＹＬＥＫ）ＨｘＨｘＨｘＲＫＲＫＬＥＲＩＡＲ－アミド。
【００３３】
本発明はまた、細胞成長を増大させる、血管内皮細胞増殖因子に基づく他のヘパリン結合性増殖因子アナログを利用することができ、また、骨誘導を高め、骨修復を加速させるために本発明と一致して作用する血小板由来増殖因子または形質転換増殖因子－βなどに関連付けることができる。
【００３４】
同様に、一般には本明細書中に記載されるＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳと同様に、ＢＭＰ－２またはその受容体に直接結合する合成増殖因子アナログもまた、骨の形成を増大させる生物学的プロセスを増幅するために使用することができる。このようなペプチドの放出が、この関連した生物学的プロセスを最適化するように正しい時間にわたって生じる。
【００３５】
本発明の別の態様において、本発明の組成物は、外部から与えられる様々な骨誘導剤とともに使用することができる。これらの骨誘導剤には、同種移植片材料の脱灰された骨マトリックスまたは他の形態が含まれ得る。
【００３６】
本発明の別の態様において、本発明の組成物は、組換え技術に基づく外部から与えられる様々な骨誘導剤とともに使用することができる。これらの組換え骨誘導剤には、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－７（ＯＰ－１）、ＧＤＦ－５（ＭＰ－５２）、ＴＧＦ－β１、および、当業者に知られている他の骨誘導剤が含まれる。
【００３７】
本発明の別の態様において、本発明の組成物は、骨置換移植片とともに損傷部位において加えられる自家移植片骨または骨髄穿刺液と一緒に使用することができる。
【００３８】
本発明のさらなる目的および利点が、付随する図面と併せて読まれる下記の詳細な記載において明らかである。
【図面の簡単な説明】
【００３９】
【図１】本発明の一つの実施形態による無機顆粒からのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ放出のグラフを例示する。
【図２】異なる骨伝導性材料からのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ放出を例示するグラフである。
【図３】本発明の一つの実施形態による２８日にわたるＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ放出を例示するグラフである。
【図４】本発明の一つの実施形態による骨伝導性材料からのいくつかの濃度でのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ放出を例示するグラフである。
【図５】本発明の一つの実施形態による骨伝導性材料から放出される三つの異なるペプチドを例示するグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００４０】
定義：本明細書中および他のどこかで使用される場合、下記の用語はその与えられた意味を有する。
本明細書中で使用される用語「ａ」は一つ以上を意味する。

【００４１】
用語「アルケン」には、一つ以上の炭素・炭素の二重結合を含有する不飽和炭化水素が含まれる。そのようなアルケン基の例には、エチレン、プロペンなどが含まれる。
【００４２】
用語「アルケニル」には、少なくとも一つの二重結合を含有する、炭素原子が２個～６個の直鎖の一価炭化水素基、または、炭素原子が３個～６個の分枝型の一価炭化水素基が含まれ、その例には、エテニル、２－プロペニルなどが含まれる。
【００４３】
本明細書中で指定される「アルキル」基には、直鎖形態または分枝型形態のいずれかでの、示された長さのそのようなアルキル基が含まれる。このようなアルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ｓｅｃ－ブチル、第三級ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、イソヘキシルなどが含まれる。
【００４４】
用語「アリール」には、環原子が６個～１２個で、場合により、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルキルチオ、ハロ、ニトロ、アシル、シアノ、アミノ、モノ置換アミノ、二置換アミノ、ヒドロキシ、カルボキシまたはアルコキシ－カルボニルから選択される一つ以上の置換基により独立して置換される一価または二環式の芳香族炭化水素基が含まれる。アリール基の例には、フェニル、ビフェニル、ナフチル、１－ナフチルおよび２－ナフチル、ならびに、それらの誘導体などが含まれる。
【００４５】
用語「アラルキル」には、基－$R^a R^b$（式中、R^aはアルキレン（二価アルキル）基であり、R^bは、上記で定義されるようなアリール基である）が含まれる。アラルキル基の例には、ベンジル、フェニルエチル、３－（３－クロロフェニル）－２－メチルペンチルなどが含まれる。用語「脂肪族」には、炭化水素鎖を有する化合物が含まれ、例えば、アルカン、アルケン、アルキンおよびそれらの誘導体が含まれる。
【００４６】
用語「アシル」には、基ＲＣＯ－（式中、Ｒは有機基である）が含まれる。一例がアセチル基CH_3CO－である。
【００４７】
ペプチド成分または脂肪族成分は、上記で定義されるようなアルキル基または置換されたアルキル基が一つ以上のカルボニル｛－（Ｃ＝Ｏ）－｝基を介して結合するとき、「アシル化」される。ペプチドは最も通常的にはＮ末端においてアシル化される。
【００４８】
「アミド」には、カルボニル基に結合する三価の窒素を有する化合物が含まれる（－ＣＯ．NH_2）。
【００４９】
「アミン」には、アミノ基（－NH_2）を含有する化合物が含まれる。
【００５０】
「ジアミンアミノ酸」は、二つの反応性アミノ基と、反応性カルボキシル基とを含有するアミノ酸または残基である。代表的な例には、２，３－ジアミノプロピオニルアミノ酸、２，４－ジアミノブチルアミノ酸、リシンまたはオルニチンが含まれる。
【００５１】
本明細書中で使用される用語「Ｈｘ」はアミノヘキサン酸を意味し、ときにはＡｈｘと略記されることもある。
【００５２】
本明細書中で使用される用語「相同的」は、配列がアラインメントされるとき、アミノ酸配列が一つ以上のアミノ酸位置において異なるペプチドを示す。例えば、二つの相同的なペプチドのアミノ酸配列は、５個～１０個のアミノ酸のアラインメントされたアミノ酸配列の内部において一つのアミノ酸残基によってのみ異なり得る。代替として、１０個～１５個のアミノ酸の二つの相同的なペプチドは、アラインメントされるとき、最大でも２

個のアミノ酸残基が異なり得る。別の代替において、１５個～２０個以上のアミノ酸の二つの相同的なペプチドは、アラインメントされるとき、３個までのアミノ酸残基が異なり得る。より長いペプチドについては、相同的なペプチドは、二つのペプチドホモログのアミノ酸配列がアラインメントされるとき、アミノ酸残基のおよそ５％、１０％、２０％、２５％までが異なり得る。

【００５３】

「三官能基のアミノ酸」は、三つの反応基を有するアミノ酸または残基である（一つがＮ末端のアミンであり、第二がＣ末端のカルボキシルであり、第３が側鎖のすべてまたは一部を構成する）。従って、三官能基のアミノ酸には、例としてのみではあるが、ジアミンアミノ酸、反応性スルフヒドリル基を側鎖に有するアミノ酸（例えば、メルカプトアミノ酸、これには、システイン、ペニシラミンまたは３－メルカプトフェニルアラニンが含まれる）、反応性基を有するアミノ酸が含まれる。

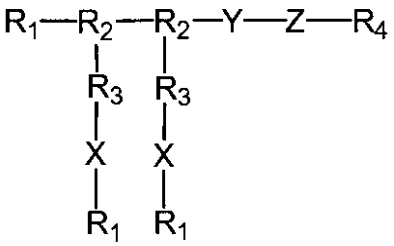
【００５４】

本明細書中で使用される用語「合成増殖因子アナログ」は式Ｉまたは式ＩＩを有し得る。本発明のそれぞれの合成増殖因子アナログは、細胞表面に位置し得る増殖因子受容体に結合するか、または、代替として、同族増殖因子のアナログではない増殖因子受容体に結合する特定の増殖因子のアナログであるＸにおいて、二つの実質的に類似する配列（ホモ二量体配列）を含有する。ホモ二量体配列は増殖因子の任意の部分に由来し得る。合成増殖因子アナログは、ホルモン、サイトカイン、リンホカイン、ケモカインまたはインターロイキンのアナログである場合があり、前記のいずれかに対する任意の増殖因子受容体に結合することができる。

【００５５】

本発明の一つの実施形態によれば、骨損傷を処置するための組成物は、内因性ＢＭＰ－２の増幅因子／共活性化因子として作用し、式Ｉまたは式ＩＩであり、骨伝導性材料に放出可能に結合される合成増殖因子アナログを含む。下記式Ｉの化合物：

【化２】



（式中、

Ｘは、（ｉ）少なくとも３個のアミノ酸残基を有し、（ｉｉ）最大で約５０個のアミノ酸残基を有し、かつ、（ｉｉｉ）細胞表面受容体に特異的に結合するペプチド鎖である；

R_1は独立して、末端基がNH_2であるように水素、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはNH基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のC_1～C_{17}アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基であるか、あるいは、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはNH基を有するアミノ酸、ジペプチドまたはトリペプチドである；

R_2は独立して、三官能基のα－アミノ酸残基であり、この場合、ＸがR_2の側鎖を介して共有結合により結合する；

R_3は独立して、R_3に共有結合により結合する０個～約１５個の骨格原子の鎖を含むリンカーである；

R_4は、末端基がカルボキシルであるようにＯＨ、NH_2、Ｎ末端のNH_2基、NH_3^+基またはNH基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のC_1～C_{17}アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基、あるいは、$NH-R_1$である；

Ｙは、Ｒ$_2$およびＺに共有結合により結合する０個～約５０個の骨格原子の鎖を含むリンカーである；および

Ｚは、（ｉ）少なくとも１個のヘパリン結合モチーフ、（ｉｉ）最大で約１０個のヘパリン結合モチーフ、および、（ｉｉｉ）最大で約３０個のアミノ酸を含むアミノ酸配列を含むヘパリン結合ドメインを含む非シグナリングペプチド鎖である）。

【００５６】

この化合物はさらに、（ｉ）疎水性であり、（ｉｉ）少なくとも約９個で、最大で約５０個の骨格原子の鎖を含み、かつ、（ｉｉｉ）骨形態形成タンパク質－２に見出されないリンカーを含むことができる。この化合物は、Ｒ$_2$において、Ｌ－ジアミンアミノ酸残基またはＤ－ジアミンアミノ酸残基を含有することができる。好ましい実施形態において、Ｌ－ジアミンアミノ酸残基またはＤ－ジアミンアミノ酸残基は、２，３－ジアミノプロピオニルアミノ酸、２，４－ジアミノブチルアミノ酸、リシンまたはオルニチンである。

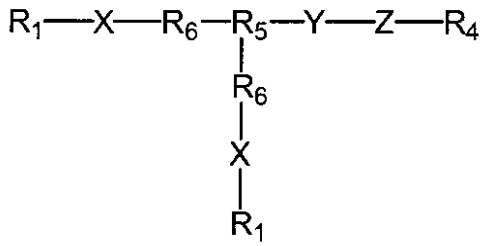
【００５７】

一実施形態において、ＸはＲ$_2$に共有結合により結合し、この場合、共有結合による結合は、アミド、ジスルフィド、チオエーテル、シッフ塩基、還元型シッフ塩基、イミド、第二級アミン、カルボニル、尿素、ヒドラゾンまたはオキシムによる結合を含む。好ましい実施形態において、Ｘは、Ｒ$_3$が１個以上の原子であるとき、Ｒ$_3$に共有結合により結合し、この場合、共有結合による結合は、アミド、ジスルフィド、チオエーテル、シッフ塩基、還元型シッフ塩基、イミド、第二級アミン、カルボニル、尿素、ヒドラゾンまたはオキシムによる結合を含む。Ｙは直鎖のアミノカルボン酸を含む。

【００５８】

下記式ＩＩの化合物：

【化３】



II

（式中、

Ｘは、（ｉ）少なくとも３個のアミノ酸残基を有し、（ｉｉ）最大で約５０個のアミノ酸残基を有し、かつ、（ｉｉｉ）細胞表面受容体に特異的に結合するペプチド鎖である；

Ｒ$_1$は独立して、末端基がＮＨ$_2$であるように水素、Ｎ末端のＮＨ$_2$基、ＮＨ$_3$$^+$基またはＮＨ基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のＣ$_1$～Ｃ$_{17}$アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基であるか、あるいは、Ｎ末端のＮＨ$_2$基、ＮＨ$_3$$^+$基またはＮＨ基を有するアミノ酸、ジペプチドまたはトリペプチドである；

Ｒ$_6$は独立して、リンカーが１個以上の原子であるとき、Ｒ$_3$に共有結合により結合する０個～約１５個の骨格原子の鎖を含むリンカーである；

Ｒ$_5$は、三官能基のα－アミノ酸残基であり、この場合、ＸがＲ$_3$の側鎖を介して共有結合により結合する；

Ｒ$_4$は、末端基がカルボキシルであるようにＯＨ、ＮＨ$_2$、Ｎ末端のＮＨ$_2$基、ＮＨ$_3$$^+$基またはＮＨ基または対応するアシル化誘導体を含む直鎖または分枝型のＣ$_1$～Ｃ$_{17}$アルキル鎖、アリール鎖、ヘテロアリール鎖、アルケン鎖、アルケニル鎖またはアラルキル鎖を有するアシル基、あるいは、ＮＨ－Ｒ$_1$である；

Ｙは、Ｒ$_5$およびＺに共有結合により結合する０個～約５０の骨格原子の鎖を含むリンカーである；および

Ｚは、（ｉ）少なくとも１個のヘパリン結合モチーフ、（ｉｉ）最大で約１０個のヘパ

リン結合モチーフ、および、（ｉｉｉ）最大で約３０個のアミノ酸を含むアミノ酸配列を含むヘパリン結合ドメインを含む非シグナリングペプチド鎖である）。

【００５９】

式Ｉまたは式ＩＩのいずれかについて、合成増殖因子アナログの領域Ｘおよび領域Ｚはアミノ酸残基を含み、また、場合により、領域Ｙはアミノ酸残基を含む。アミノ酸残基は－ＮＨＲＣＯ－（式中、Ｒは水素または任意の有機基であり得る）として定義される。アミノ酸はＤ－アミノ酸またはＬ－アミノ酸が可能である。加えて、アミノ酸は、アミノ酸の炭素鎖の長さに依存して、α－アミノ酸、β－アミノ酸、γ－アミノ酸またはδ－アミノ酸などが可能である。

【００６０】

本発明の合成増殖因子アナログのＸ、ＹおよびＺの成分領域のアミノ酸には、タンパク質において天然に見出される２０個のアミノ酸のいずれか、すなわち、アラニン（Ａｌａ、Ａ）、アルギニン（Ａｒｇ、Ｒ）、アスパラギン（Ａｓｎ、Ｎ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ、Ｄ）、システイン（Ｃｙｓ、Ｃ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ、Ｅ）、グルタミン（Ｇｌｎ、Ｑ）、グリシン（Ｇｌｙ、Ｇ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ、Ｈ）、イソロイシン（Ｉｌｅ、Ｉ）、ロイシン（Ｌｅｕ、Ｌ）、リシン（Ｌｙｓ、Ｋ）、メチオニン（Ｍｅｔ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ、Ｆ）、プロリン（Ｐｒｏ、Ｐ）、セリン（Ｓｅｒ、Ｓ）、トレオニン（Ｔｈｒ、Ｔ）、トリプトファン（Ｔｒｐ、Ｗ）、チロシン（Ｔｙｒ、Ｙ）およびバリン（Ｖａｌ、Ｖ）が含まれ得る。

【００６１】

さらには、本発明の合成増殖因子アナログＸ、ＹおよびＺの成分領域のアミノ酸には、タンパク質において天然に見出されない天然に存在するアミノ酸のいずれか、例えば、β－アラニン、ベタイン（Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルグリシン）、ホモセリン、ホモシステイン、γ－アミノ酪酸、オルニチンおよびシトルリンが含まれ得る。

【００６２】

加えて、本発明の合成増殖因子アナログのＸ、ＹおよびＺの成分領域のアミノ酸には、非生物学的アミノ酸のいずれか、すなわち、生体系において通常の場合には見出されないアミノ酸、例えば、自然界に見出されない直鎖のアミノカルボン酸などが含まれ得る。直鎖のアミノカルボン酸の例には、６－アミノヘキサン酸、７－アミノヘプタン酸、９－アミノノナン酸などが含まれる。

【００６３】

例えば、Ｚは、下記のヘパリン結合配列の一つから選択することができる：ＢＢＢｘｘＢ（配列番号１）、ＢｘＢＢ（配列番号２０）、式中、それぞれのＢは独立して、リシン、アルギニン、オルニチンまたはヒスチジンであり、それぞれのｘは独立して、天然に存在するアミノ酸である。代替として、Ｚは、ＲＫＲＫＬＥＧＩＡＲ（配列番号２）、ＲＫＲＫＬＧＲＩＡＲ（配列番号３）、ＲＫＲＫＬＷＲＡＲＡ（配列番号４）、ＲＫＲＬＤＲＩＡＲ（配列番号５）、ＲＫＲＫＬＥＲＩＡＲＣ（配列番号６）であり得る。

【００６４】

本発明の一実施形態の合成増殖因子アナログは、式Ｉおよび式ＩＩの合成増殖因子アナログを含めて、Ｘ領域が、下記のアミノ酸配列のいずれかのすべてまたは一部、あるいは、下記のアミノ酸配列のいずれかのすべてまたは一部のホモログであることを規定する：ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬ（配列番号７）、ＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫＮＹ（配列番号８）、ＬＹＦＤＥＳＳＮＶＩＬＫＫ（配列番号９）、ＬＹＶＤＦＳＤＶＧＷＮＤＷ（配列番号１０）、ＥＫＶＶＬＫＮＹＱＤＭＶＶＥＧ（配列番号１１）、ＣＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬ（配列番号１２）、ＡＦＹＣＨＧＥＣＰＦＰＬＡＤＨＬ（配列番号１３）、ＰＦＰＬＡＤＨＬＮＳＴＮＨＡＩＶＱＴＬＶＮＳＶ（配列番号１４）、ＶＬＹＦＤＤＳＳＮＶＩＬＫＫＫ（配列番号１５）、ＳＩＫＶＡＶＡＡＫ（配列番号１６）、ＹＲＳＲＫＹＳＳＷＹＶＡＬＫＲＫ（配列番号１７）、ＷＦＬＬＴＭＡＡＫ（配列番号１８）またはＫＷＩＱＥＹＬＥＫＫ（配列番号１９）。好ましい実施形態において、Ｘ領域はアミノ酸配列ＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬＫＮＹ（配列番号８）である。より好ましく

は、Ｘ領域はアミノ酸配列ＬＹＦＤＥＳＳＮＶＩＬＫＫ（配列番号９）である。より好ましくはなおさらに、Ｘ領域はアミノ酸配列ＡＩＳＭＬＹＬＤＥＮＥＫＶＶＬ（配列番号７）である。

【００６５】

骨伝導性材料は、カルシウム塩、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、セラミックから選択される化合物の少なくとも一つを含み、同様にまた、脱灰された骨マトリックスまたは他の同種移植片材料を含む。

【００６６】

骨伝導性材料は、顆粒、ゲル、パテ、粉末、ブロックまたはそれらの組合せとして形成することができる。より好ましい実施形態において、合成ＢＭＰ－２化合物はＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳである。

【００６７】

別の実施形態において、骨伝導性材料の硫酸カルシウム（ＣａＳ）は材料の８０重量％未満である。好ましい実施形態において、ＣａＳは顆粒の約３０重量％～８０重量％の間である。

【００６８】

さらに別の実施形態において、骨伝導性材料は、約２０重量％～１００重量％のＨＡおよび約０重量％～７５重量％のＴＣＰからなる無機材料を含有する。さらに別の実施形態において、骨伝導性材料は、ＣａＳ、ＰＧＡ繊維およびＰＬＧを含む。ＰＧＡ、ＰＬＡおよびＰＬＧは合成ポリマーの例である。本発明のなおさらに別の実施形態において、骨伝導性材料は、ヒドロキシアパタイト格子においてリン酸イオンの一部を置換するケイ酸を含む。

【００６９】

別の実施形態において、骨伝導性材料は、コラーゲンのような天然ポリマーを含む。

【００７０】

別の実施形態において、骨伝導性材料は、同種移植片骨、天然ポリマーまたは合成ポリマーから選択される一つ以上の化合物を含む。

【００７１】

さらに別の実施形態において、骨伝導性材料は、顆粒、粉末、ゲル、パテまたはそれらの任意の組合せに形成される。

【００７２】

なおさらに別の実施形態において、骨伝導性材料は、骨損傷を処置するための負荷支持デバイスとの組合せで使用される。

【００７３】

さらなる実施形態において、負荷支持デバイスは、骨固定（例えば、脊椎固定）のためのケージ、くさび、ロッド、有茎ネジ、椎体置換体、椎間体固定デバイスまたはリングから選択される。

【００７４】

さらに別の実施形態において、本発明の方法はさらに、宿主の骨チップ（自家移植片）を骨伝導性材料との組合せで骨損傷部の近くに加えることを含む。自家移植片は、腸骨稜から、または、手術の「局所的」区域から得ることができる。例えば、腰部脊椎固定手術の期間中において、局所的骨を脊椎関節突起切除および／または椎弓切除のときに得ることができる。骨伝導性材料に被覆される組み合わされたヘパリン結合性増殖因子が自家移植片と一緒にされ、これを脊椎固定の部位に送達することができる。そのような部位は実際には頸部または腰部であり得る。さらには、外科的取り組みでは、ＰＬＦ（後側方固定）、ＰＬＩＦ（後方腰椎椎間体固定）、ＴＬＩＦ（経椎間孔腰椎椎間体固定）、または、当業者に知られている他の取り組みが含まれ得る。本発明の方法ではさらには、様々な後方固定デバイス、例えば、有茎ネジ／ロッド、および、当業者に知られている他のデバイスなどが伴い得る。

【００７５】

本発明の別の実施形態は、骨損傷を処置するための方法を含む。この方法は、内因性ＢＭＰ－２の増幅因子／共活性化因子である合成ＢＭＰ－２アナログペプチドを、合成ＢＭＰ－２アナログペプチドが被覆されるように、または、合成ＢＭＰ－２アナログペプチドが骨伝導性材料に結合させられるように骨伝導性材料に提供することを含む。骨伝導性材料および会合したアナログが骨損傷部に埋め込まれ、その後、骨伝導性材料からの放出が生じる。アナログペプチドの活性型が、骨損傷を処置するために内因性ＢＭＰ－２を増大させる。

【００７６】

なおさらに別の実施形態において、合成増殖因子アナログを骨伝導性材料から放出させることは、骨伝導性材料の組成を操作すること、アミノ酸組成を操作すること、骨伝導性材料に結合した合成ＢＭＰ－２ペプチドを濃縮すること、および／または、骨伝導性材料におけるカルシウム濃度を制御することによって速度制御される。

【００７７】

本発明のさらに別の実施形態はキットを含む。本発明のキットは合成増殖因子アナログの凍結乾燥バイアルのバイアルを含み、また、骨伝導性の無機顆粒の容器を別個に含む。本発明のキットは、アナログを生理食塩水または水により水和し、得られた溶液を顆粒と混合し、このとき、アナログが顆粒に結合させられることによって、埋め込み可能な材料を配合するために使用される。溶液を捨てた後、結合したアナログを有する顆粒が、その後、骨損傷部に送達される。

【００７８】

下記の表は、骨伝導性マトリックスに放出可能に結合されたときに骨の形成を促進させることができるヘパリン結合性の増殖因子アナログおよびそれらの生物学的活性を記載する。

【表１】

名称	関係づけられる宿主配列	配列番号	骨形成に関連する生物学的活性
F2A	塩基性FGF	配列番号17	血管形成
B7A	骨形態形成タンパク質－7	配列番号15	BMP－7受容体への結合；ヘテロ二量体としてのBMP－2との共活性化
B2A2-K-NS	骨形態形成タンパク質－2	配列番号7	BMP－2受容体への結合；内因性BMP－2の共活性化
SD-2	ストロマ由来因子－1	配列番号19	走化性
LA-2	ラミニン	配列番号16	細胞付着を増大させる、走化性および血管形成を促進させる
VA5	血管内皮細胞増殖因子	配列番号18	血管形成を増大させる

【００７９】

本発明の実施形態が下記の実施例によりさらに例示される。

【実施例１】

【００８０】

種々の供給源に由来する骨伝導性骨置換移植片に対するＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの比較結合

いくつかの市販されている骨伝導性骨置換移植片（ＢＲＧ）の評価を、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳとして知られているＢＭＰ－２増幅因子／共活性化因子のそれらの結合特性および放

出特性を明らかにするために行った。

【００８１】

最初に、材料を０．９％生理食塩水の中に置き、ｐＨを記録した。

【００８２】

次の段階は、このペプチドがこれらのＢＲＧに結合することができるかどうかを明らかにすることであった。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ（およそ２０ｕｇ／ｍｌ）を、０．１７グラムのＢＲＧと１５分間、１ｍｌの０．９％生理食塩水溶液においてインキュベーションした。ＥＬＩＳＡアッセイを、ＢＲＧを含まないペプチド溶液、および、ペプチド＋ＢＲＧからの上清の両方に対して行った。ペプチドのみの読取値と、ペプチド＋ＢＲＧからの上清との間における違いにより、結合したペプチドの量が得られた。

【００８３】

第３段階は、放出されたペプチドの量を、同じＥＬＩＳＡアッセイを使用して測定することであった。簡単に記載すると、ペプチド結合ＢＲＧを１ｍｌの０．９％生理食塩水に入れ、放出されたペプチドの量を７２時間の期間にわたって測定した。

【００８４】

データが下記の表にまとめられる。

【表２】

組成	pH	ペプチド結合のレベル	放出ペプチド？
100% HA	6.6	高	N/D
ケイ素置換を伴う100%HA	10.0	中間的	あり
75:25 (HA:TCP)	7.5	中間的	N/D
65:35 (HA:TCP)	7.3	非存在	N/A
60:40 (HA:TCP)	8.8	高	あり
60:40 (HA:TCP)	6.3	高	あり
20:80 (HA:TCP)	6.5	高	あり
100% b-TCP	7.0	非存在	N/A
三相：HA, TCP, CaS (1% w/w)	9.0	高	あり
三相：HA, TCP, CaS (10% w/w)	10.5	高	なし
PGA繊維 + ~9% CaS + PLG	3.7	高	なし

【００８５】

結合の定義は下記のように定義される。非存在は、検出可能な結合が全くないことである。高は、１ｃｃの移植片材料について２０ｕｇを越えるペプチドの結合である。中間的は１ｃｃの移植片材料について２０ｕｇ未満のペプチドであり、しかし、検出不能な結合を越える。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは、ＢＲＧに３．７～１０．５のｐＨ範囲で結合することが見出された。

【００８６】

Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは、ＨＡ、または、ヒドロキシアパタイトが１００％～２０％の範囲にあり、リン酸三カルシウムが８０％～２５％の範囲にあるＨＡ／ＴＣＰ含有ＢＲＧと

結合することが見出された。
Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは、硫酸カルシウムが０％～１０％の範囲にあるＨＡ／ＴＣＰ／ＣａＳのＢＲＧと結合することが見出された。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは、ポリグリコール酸およびポリ乳酸を硫酸カルシウムとの組合せで含有するＢＲＧと結合することが見出された。

【００８７】
驚くべき知見は、組成において類似する材料が、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳと結合するその能力において大きく異なることであった。６０：４０のＨＡ：ＴＣＰの二つのＢＲＧと、７５：２５のＨＡ：ＴＣＰの一つのＢＲＧとが、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳと結合することができたが、６５：３５のＨＡ：ＴＣＰの組成物はＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳと結合することができなかった。

【００８８】
ＨＡ：ＴＣＰの相対的量は、ペプチドが放出されるか否かを決定しなかった。例えば、６０：４０のＨＡ：ＴＣＰの一つのＢＲＧはペプチドを「大きい」速度で放出し、これに対して、６０：４０のＨＡ：ＴＣＰのそれ以外のＢＲＧはペプチドを「中間的」な速度で放出した。放出についてより重要なことは、顆粒におけるＣａＳの存在および量であった。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは約９％～１０％のＣａＳ量では、許容レベルで生体材料から遊離することができず、しかし、１％のＣａＳ濃度では遊離することができた。

【００８９】
Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳは、ヒドロキシアパタイトが７５％～２５％の範囲にあり、リン酸三カルシウムが８０％～２５％の範囲にある材料からは許容レベルで生体材料から遊離することができた。このペプチドは６．３～１０のｐＨ範囲で材料から遊離することができた。

【実施例２】
【００９０】
セラミック顆粒へのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの結合
方法。１．５ｃｃの顆粒を、０．９％生理食塩水の１．８ｍＬに、または、３５．９μｇ／ｍＬ、１１９．８μｇ／ｍＬ、３５９．３μｇ／ｍＬの濃度を有する０．９％生理食塩水におけるペプチド溶液の１．８ｍＬに加えた。顆粒－ペプチド溶液を２０分間にわたって５分毎に１５秒間激しくゆすった。ゆすった後、上清を除き、０．２２μｍのフィルター（低いタンパク質結合性のデュラポア（ＰＶＤＦ））でろ過し、ビシンコニン酸（ＢＣＡ）アッセイまたは微量ＢＣＡアッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｐｏｒｔ、ＩＬ）によってペプチド含有量についてアッセイした。粒子に結合したペプチドの量を減算法によって得た（総ペプチド－上清中に存在するペプチドが、粒子状材料表面に結合したペプチドの量に等しい）。この研究を２日離して行った。平均化された結果が下記に示される：

【表３】

顆粒	B2A2－K－NS濃度 (ug／ml)	結合 B2A2－K－NS(%)
60:40 (pH 8.8) (HA:TCP)	36	85
60:40 (pH 8.8) (HA:TCP)	120	90
60:40 (pH 8.8) (HA:TCP)	359	94
20:80 (HA:TCP)	36	67
20:80 (HA:TCP)	120	88
20:80 (HA:TCP)	359	95
100% HA＋ケイ素	359	73
100% HA	230	87

【００９１】

この研究は、高い割合のＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳペプチドが、１００％のヒドロキシアパタイトを含む材料の表面に、また、２０：８０および６０：４０（ＨＡ：ＴＣＰ）から構成される二相組成物を含む材料の表面に結合することを示す。

【実施例３】

【００９２】

セラミック顆粒からのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの放出

方法：ペプチドを実施例２において記載されるように顆粒に結合させた後、粒子状材料を含有するバイアルのそれぞれを１．８ｍＬの０．９％生理食塩水で再び満たし、揺動プラットホームに置いた。指定された時間間隔の後で、上清を４３時間の期間にわたって取り出し、ろ過し、集めた。上清に存在するペプチドの量に基づいて、粒子に結合したペプチドの量、または、粒子から放出されたペプチドの量を計算した。この研究を２日離して行った。プロットされた平均値は、時間に対する放出された累積ペプチドを示す（下記のグラフを参照のこと）（注意：ＨＡ＋ケイ素は高用量で行われたのみであった）。ＢＣＡアッセイを、ペプチド濃度を求めるために利用した。６０：４０の顆粒はｐＨ８．８であった。

【００９３】
次に、図１を参照すると、指定された材料の放出特性が試験された。４時間の期間にわたって放出されるペプチドのバーストが認められた（上清が最初の４時間については１時間毎に評価された）。高負荷用量（４３１ｕｇ／ｃｃ顆粒のペプチド）において、バースト期が、負荷されたペプチドの総量の１２％～２２％を占めた。中間的な負荷用量（１４４ｕｇ／ｃｃ顆粒のペプチド）については、バースト期が負荷総量の２５％～３５％を占めた。低い用量（４３ｕｇ／ｃｃ顆粒のペプチド）については、バースト期が負荷総量の４８％～５９％を占めた。バースト期の後、より遅い持続した放出期間が認められた。
【００９４】
図１は、１００％のヒドロキシアパタイトからなる顆粒と、２０：８０および６０：４０のＨＡ：ＴＣＰ（ｐＨ６．３）を含む二相組成物からなる顆粒とについて、類似した形状のＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳペプチド放出曲線を例示する。
【００９５】
次に図２を参照して、研究を、高Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ用量を使用して上記と類似する条件を使用して繰り返した。顆粒のサイズは、約０．５ｍｍであったＰｒｏ－Ｏｓｔｅｏｎを除いて、１ｍｍ～３ｍｍであった。ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）の標準曲線を、（ペプチド非含有）顆粒からの上清を使用して作製した。Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳのＢＣＡ値をＢＳＡ標準曲線に対して補正した。
【００９６】
図２は、１００％のヒドロキシアパタイトからなる顆粒（Ｐｒｏ－Ｏｓｔｅｏｎ）と、２０：８０および６０：４０のＨＡ：ＴＣＰを含む二相組成物からなる顆粒（ＭＢＣＰ）とについて、類似した形状のＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳペプチド放出曲線を例示する。
【００９７】
当業者には、これらの結果を再現するためには、上記で示された同じ体積の上清および同じ数の採取点が利用されなければならないことが認識されなければならない。上清の体積を増大すること、または、所与の期間にわたる上清採取の数を増大することは、放出されたペプチドの観測量を増大させる可能性がある。逆に、上清の体積を減らすこと、または、所与の期間にわたる上清採取の数を減らすことは、放出されるペプチドの観測量を低下させる可能性がある。加えて、０．９％生理食塩水から水または別の溶媒への上清溶液の変更は、放出される総量を変化させる可能性がある。上清のろ過を省くことは、ペプチドの回収量を増大させ、また、ゆする速度を増大することは、放出されるペプチドの量を増大させる場合がある。ＢＳＡ標準曲線を、顆粒から放出される上清とともに行うことは、観測されるペプチド量を低下させる場合がある。
【実施例４】
【００９８】
セラミック顆粒からのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの流出
実施例３に記載される実験を、１ｍｌの顆粒あたり３００ｕｇのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳにより被覆された２０：８０の顆粒を使用して繰り返した。３ｃｃの顆粒を使用した；３．６ｍｌの０．９％生理食塩水を、ペプチド放出を求めるために所定の時点で集めた。次に図３を参照して、２８日の期間にわたる長期の累積Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ放出が例示される。二つの曲線は、上清のろ過後（四角）またはろ過前（菱形）における放出されたペプチドの量を示す。０．２２ｕｍのフィルター（低いタンパク質結合性のデュラポア（ＰＶＤＦ））を利用した。
【実施例５】
【００９９】
顆粒からのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの放出を求めるために使用される方法
２０％ＨＡＰ／８０％ＴＣＰからのペプチド放出を、下記の方法を使用して求めた。１．５ｃｃの顆粒を、０．９％生理食塩水の１．８ｍＬに、あるいは、４３μｇ／ｃｃ顆粒、１４３μｇ／ｃｃ顆粒または４３１μｇ／ｃｃ顆粒のＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの濃度を有する０．９％生理食塩水におけるペプチド溶液の１．８ｍＬに加えた。顆粒－ペプチド溶液

を２０分間にわたって５分毎に１５秒間激しくゆすった。ゆすった後、上清を取り出し、ＢＣＡアッセイまたは微量ＢＣＡアッセイによってペプチド含有量についてアッセイした。

【０１００】

次に図４を参照して、類似した形状の放出曲線が、高用量（菱形）、中用量（四角）および低用量（三角）においてこの同じペプチドについて得られる。この曲線は、ペプチド被覆濃度が放出の大きさに影響を及ぼすことを例示する。

【実施例６】

【０１０１】

セラミック顆粒に対する合成増殖因子アナログの比較結合

ペプチドの結合および放出の物理的特性をより良く求めるために、数個のペプチドを一つだけの足場において比較した。試験された他のペプチドはＢＭＰ－２の共活性化因子ではなかったが、枝分かれしていること、類似したサイズであること、および、ヘパリン結合ドメインを含有することにおいて、類似する構造を共有する。

【０１０２】

一つだけの足場からのペプチド放出をアッセイするための方法は下記の通りである。１ｃｃの顆粒を、０．９％生理食塩水の１．２ｍＬに、あるいは、１００μｇ／ｃｃ顆粒のＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ、ＬＡ２またはＦ２Ａ４の濃度を有する０．９％生理食塩水におけるペプチド溶液の１．２ｍＬに加えた。顆粒－ペプチド溶液を２０分間にわたって５分毎に１５秒間激しくゆすった。ゆすった後、上清を取り出し、ＢＣＡアッセイまたは微量ＢＣＡアッセイによってペプチド含有量についてアッセイした。それぞれのペプチドについてのＢＣＡ値をＢＳＡ標準曲線に対して補正した。

【０１０３】

次に図５を参照して、放出曲線の形状が三つのペプチドのすべてについて類似しており（Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ（菱形）、ＬＡ２（四角）およびＦ２Ａ４－Ｋ－ＮＳ（三角））、しかしながら、放出の大きさは顕著に異なっている。

下記の表はそれぞれのペプチドのアミノ酸組成を示す。

【表４】

ペプチド	＋電荷（NH_2を含む）	－電荷	疎水性（Ahxを含む）	芳香族	ペプチドの長さ	MW
LA2	10	1	18	0	30	3272
B2A2-K-NS	11	7	20	2	45	5344
F2A4	17	1	12	8	43	5540

【０１０４】

それぞれのペプチドについての正荷電アミノ酸、負荷電アミノ酸または疎水性アミノ酸の数が類似していた。これらの数は、観測された放出速度における大きな違いを説明していないようである。それぞれのペプチドの電荷分布が図６に例示される。

【０１０５】

アミノ酸末端における電荷分布はすべてのペプチドにおいて類似しており、従って、この領域が放出速度における違いに寄与することは考えられない。なぜＦ２Ａ４が容易に遊離しないかについての一つの考えられる理由は、負に荷電したヒドロキシアパタイト／Ｔ

ＣＰ表面と相互作用し得る正荷電アミノ酸の広い分布である。芳香族アミノ酸は、正の電荷をペプチドのより大きい領域にわたって分布させることを助けることができる。正電荷の数はどの負荷電によっても遮られない。対照的に、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳはより少ない正荷電基を有しており、正電荷が負荷電基によって遮られる。最も迅速に放出されるペプチドのＬＡ２は二つのアミノ酸をまさにカルボキシ末端に有するだけであり、これらのアミノ酸が非芳香族の疎水性残基によって一方の側で隣接する。Ｆ２Ａ４またはＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳのいずれもそのような広範囲の疎水性領域を有しないので、ペプチドの枝分かれ区域に位置する非芳香族の疎水性ドメインの長い領域もまた、容易な脱離を促進させることができる。

【実施例７】

【０１０６】

セラミック顆粒から放出されるＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの生物活性

方法：（Ａ）ペプチドを、（実施例３において記載されるように）２０：８０からの放出後の６時間の期間にわたって集めた。すべての時点からの上清を混合し、凍結し、４８時間にわたって凍結乾燥した。ペプチドペレットを１．５ｍｌの生理食塩水において再構成し、ＢＣＡアッセイを行って、ペプチド濃度を求めた。

【０１０７】

（Ｂ）アルカリホスファターゼアッセイを、マウスの多能性細胞株$C2C_12$を使用して行った。細胞を、１５％のＦＢＳ、１％のＬ－ｇｌｎ、１％のＮａＰｙｒおよび１％のゲンタマイシンを含有するＤＭＥＭ／Ｆ－１２ハムにおいて９６ウエルプレートに置床し（$1x10^4$個／ウエル）、２４時間、３７℃、５％CO_2、９０％湿度で付着させた。その後、培地を吸引し、ＢＭＰ－２（１００ｎｇ／ｍｌ）の添加を伴って、または伴うことなく、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳを１．２５μｇ／ｍｌから１０μｇ／ｍｌに及ぶ様々な濃度で含有する低血清（５％ＦＢＳ）培地により置き換えた。１日後、ＡＬＰ活性を求めた。

【０１０８】

結果および結論：２０：８０から放出されたＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳペプチドはＢＭＰ－２活性を増大させた。このことは、２０：８０の顆粒からの放出後におけるＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの活性を明らかにした。

【実施例８】

【０１０９】

コラーゲンへのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの結合

ＤＨＴにより架橋され、凍結乾燥されたＩ型のウシ由来皮膚コラーゲンのシートを、０．９％生理食塩水溶液において１，０７２ｕｇ／ｍｌコラーゲンシートのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳとインキュベートした。結合効率は６１％であり、これは、高いＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ被覆濃度でのCa^{2+}含有顆粒における結合効率（実施例２に記載されるように８７％～９５％）よりもはるかに低かった。低下した結合効率は、顆粒の表面積と比較して、低下した表面積に起因すると考えられ得る。

【０１１０】

放出を開始させるために、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳにより被覆されたコラーゲンを含有するバイアルを２ｍＬの０．９％生理食塩水で再び満たし、揺動プラットホームに置いた。指定された時間間隔の後で、上清を取り出し、ろ過し、集めた。ＢＣＡアッセイを利用して、ペプチド濃度を求めた。０．９％生理食塩水における１時間毎の採取は、放出されたペプチドの累積量が、１時間後、２時間後、３時間後および４時間後でそれぞれ、１１％、１９％、２３％および２８％であったことを明らかにした。ＢＳＡ標準曲線を、ＢＳＡを（ペプチド非含有）コラーゲンスポンジからの上清に入れることによって作製した。コラーゲンからの放出速度は、匹敵する条件を使用した、２０：８０からの放出速度よりも速かった。

【実施例９】

【０１１１】

ウサギにおける後側方脊椎固定を増強するためのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／セラミック顆粒

の使用

すべての手順が施設内動物管理使用委員会によって承認された。体重が４．５ｋｇ～５．５ｋｇである、骨格が成熟したニュージランド白ウサギを１匹ずつケージに入れ、痛みおよび不快の徴候について毎日モニターした。すべての手術手順が、吸入麻酔技術および無菌技術を使用して手術室で行われた。２６ｍｇ／Ｋｇの塩酸ケタミン、０．１５ｍｇ／Ｋｇのマレイン酸アセプロマジンおよび０．７８ｍｇ／Ｋｇの塩酸キシラジンの前麻酔用量がＩＭ投与された。ウサギにはマスクをかぶせ、１．５％～２．５％のイソフルランをＯ２中で送達した。

【０１１２】

１レベルの後側方腰椎横突間固定（ＰＬＦ）を、６０匹のウサギにおいて、腸骨稜からの自家骨移植片および種々の用量のＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳを用いてＬ４～Ｌ５での両側で行った。ウサギを手術台にうつ伏せに置き、７０％のベタジン溶液により手術準備した。背側正中切開を、およそ１５センチメートルの長さで、Ｌ１から仙骨まで行い、横突起（ＴＰ）の上に重なる軟組織を切開した。その後、ＴＰを高速度ドリルにより皮質除去した。

【０１１３】

この研究は、傍脊椎の支持組織において横突起の間に置かれた下記の材料（３ｍｌ／片側）からなった（処置あたり１０匹の動物）：細片化された海綿骨移植片からなる自家移植片群；オープン群（移植片材料なし）；顆粒のみの群（Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ被覆濃度なし）（Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ　０ｕｇ）；低被覆濃度処理顆粒の群（Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ　５０ｕｇ）、中被覆濃度処理顆粒の群（Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ　１００ｕｇ）、および、高被覆濃度処理顆粒の群（Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ　３００ｕｇ）。顆粒により処置されたすべての動物が体積比でおよそ５０％の自家移植片を含有した。使用された顆粒は２０：８０（ＨＡ：ＴＣＰ）であった。

【０１１４】

筋膜および皮膚を３－０のバイクリルにより閉じ、その後、皮膚をステープルで留めた。セファロチン（１３ｍｇ／Ｋｇ）を、手術前、および、手術後５日間にわたって１日に２回投与した。動物が確実に苦しまないように、鎮痛剤をＰＩの観察結果に基づいて投与した。ブトルファノール（１ｍｇ／ｋｇ～７．５ｍｇ／ｋｇ、ＩＭ、ｑ４）およびフラニキシンメグルミン（１．１ｍｇ／ｋｇ、ＩＭ、ｑ１２）を手術後４８時間にわたって毎日与えた。安楽死を６週間で行い、その後、固定を明らかにするために、Ｘ線写真を撮り、また、３名の知らされていない検査員による手触診を行った。片側が、３名中２名の検査員によって固定されたと見なされたならば、その脊椎は固定されたと決定した。すべての外科医にもまた、手術時において、処置が知らされなかった。固定は、Ｘ線撮影の単純フィルムを調べることによってもまた評価された。

【表５】

処置	手触診での固定率(%)	X線撮影での固定率(%)
オープン	0	0
自家移植片－陽性コントロール	63	55
B2A2-K-NS /G 0	33	66
B2A2-K-NS /G 50	78	88
B2A2-K-NS /G 100	89	89
B2A2-K-NS /G 300	80	80

【０１１５】
それぞれのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ用量により増強された移植片材料についての固定率は、自家移植片の固定率よりも明らかに大きかった。
【０１１６】
結果は、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの送達速度論および送達量が、宿主ＢＭＰ－２の量と一致するように、また、その活性をこの骨修復適応において高めるように最適化されることを明瞭に明らかにしている。
【実施例１０】
【０１１７】
増量剤としてペプチドに添加される賦形剤
様々な賦形剤を、非特異的な結合などを防止するために、増量剤、安定剤としてペプチドに加えた。顆粒へのペプチド結合を妨害しなかったこれらの賦形剤には、下記が含まれる：
（１）０．９％生理食塩水（賦形剤なし）
（２）５．５％デキストロース
（３）５．５％デキストロース＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０
（４）２％マンニトール＋０．１％デキストロース＋０．０５％ポリソルベート８０
（５）５．５％デキストロース
（６）４％マンニトール＋１０ｍＭグリシン
【０１１８】
得られた配合物を、６０：４０（ＨＡ：ＴＣＰ）顆粒（ｐＨ８．８）および２０：８０（ＨＡ：ＴＣＰ）顆粒に結合させた。すべての賦形剤含有配合物は、ＨＰＬＣまたは比色測定技術によってモニターされたとき、賦形剤を含まなかった配合物と比較して、両方の材料に対する改善されたペプチド結合をもたらした。
【実施例１１】
【０１１９】
ヒツジにおいて行われた椎体間脊椎固定を増強するためのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／セラミック顆粒の使用
１：１（ｖ／ｖ）の細片化された腸骨稜を伴うか、または伴わないＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ

／セラミック顆粒（Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ）を、Ｔｅｔｒｉｓ（登録商標）ＰＥＥＫケージ（Ｓｉｇｎｕｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ，ＬＬＣ）においてＬ２～Ｌ３およびＬ４～Ｌ５でヒツジの腰椎に手術により埋め込んだ。１００％の細片化された海綿状腸骨自家移植片を陽性コントロール材料として使用した。実験的処置のために、５０％の適切な処置デバイスおよび５０％の細片化された海綿状腸骨自家移植片が埋め込まれた。処置を、事前に規定されたランダム化表に従って、また、デバイス埋め込みのためのケージ製造者の推奨法に厳密に従って行った。細片化された海綿状腸骨稜をすべての自家移植片処置（陽性コントロール）のために使用した。以前に埋め込まれたケージのＸ線透視確認の後、二つの手術レベル（Ｌ２～Ｌ３およびＬ４～Ｌ５）を、その後、ペディクル調製およびネジ設置のための標準的技術を使用して、Ｓｉｌｈｏｕｅｔｔｅ（商標）の多軸有茎ネジおよびロッドのシステム（Ｚｉｍｍｅｒ　Ｓｐｉｎｅ，Ｉｎｃ．）により行った。創傷閉鎖のために、筋肉、皮下層および皮膚を１－０のバイクリルによる連続縫合および断続縫合により接合し、皮膚をステープルにより閉じた。

【０１２０】

Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ：自家移植片群については４ヶ月で、また、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ非存在自家移植片群については６ヶ月で、動物を屠殺し、下記の分析を行った。非破壊的な生体機械的検査により、運動分節の融合が評価され、ＣＴにより、ケージ内および二つの終板の間における固定が評価された。加えて、（ストレスから保護され得る）ＶＢＲの内部に形成された骨の量を破壊的な生体機械的検査によって評価した。

【０１２１】

固定についての下記の定義を利用した：

・ＣＴ＝ＣＴ画像における少なくとも二つの矢状スライス断面により、Ｘ線透過性部分の徴候を伴うことなく、終板から終板までの連続する骨の証拠を明らかにされた。３名中２名の、知らされていない検査員が固定状態について同意しなければならなかった。

・非破壊的な生体機械的検査＝屈曲－伸展における３°未満の運動

【０１２２】

下記の結果は、４ヶ月後の、自家移植片と１：１混合されたＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇについてである。

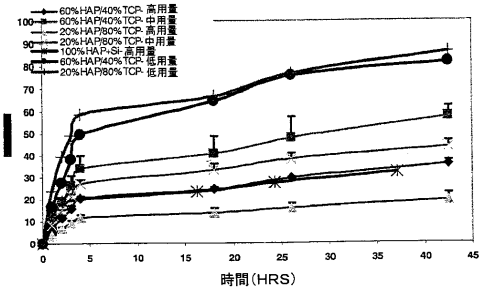
【表６】

処置	CTによる固定率(%)	非破壊的生体機械的検査による固定率
自家移植片	100	88
B2A2-K-NS /G 0 ug	63	88
B2A2-K-NS /G 50 ug	88	88
B2A2-K-NS /G 100 ug	88	100
B2A2-K-NS /G 300 ug	88	75
B2A2-K-NS /G 600 ug	75	88

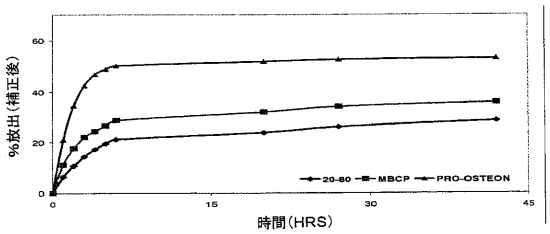
破壊検査は、試験されたすべての処置（自家移植片、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ（０ｕｇ）、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ（５０ｕｇ）およびＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ（１００ｕｇ））の中で、統計学的に匹敵する結果を明らかにした。このことは、すべての群の中で、匹敵する骨量を示していた。自家移植片を６ヶ月後において含有しなかったＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／Ｇ（１００ｕｇ）については、固定率がＣＴによって８６％であり、非破壊的生体機械的検査によって１００％であった。

【０１２３】
Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ　２－Ｋ－ＮＳ用量（５０～３００）により増強された移植片材料についての固定率は自家移植片の固定率に匹敵し、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ被覆を伴わない移植片材料よりも大きかった。結果は、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳの送達速度論および送達量が、宿主ＢＭＰ－２の量と一致するように、また、その活性をこの骨修復適応において高めるように最適化されることを明瞭に明らかにしている。
【実施例１２】
【０１２４】
異所性骨を誘導するための外因性組換えＢＭＰ－２とのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ／顆粒の使用
無菌のセラミック顆粒（Ｂｅｒｋｅｌｅｙ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，Ｉｎｃ．；６０：４０（ＨＡ：ＴＣＰ））を、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ（０μｇ／ｍｌ、２．５μｇ／ｍｌ、１０μｇ／ｍｌ、２５μｇ／ｍｌ）を含有する溶液に３０分間浸けることによって被覆した。その後、溶液を吸引によって除き、顆粒を風乾させた。その後、被覆された顆粒を無菌のゼラチンカプセルに入れた。ラットにおける皮下埋め込みの直前に、カプセルを、１μｇの組換えＢＭＰ－２を含有するコラーゲン型ビーズ（ＧＦＲ－Ｍａｔｒｉｇｅｌ）とともに注入した。カプセルを、事前に準備された嚢において脇腹で若い成体ラットの皮下に置き、手術部位を外科用クリップにより閉じた。３０日後、インプラントを手術により取り出し、重量測定し、触診して、硬さを評価した。その後、外植片を７０％エタノールへの多数回の交換により固定処理した。２５μｇのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳにより被覆された外植片は、コントロール（ＢＭＰ－２非存在、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳ非存在）よりも著しく大きい重量を有し、また、ＢＭＰ－２を含有し、しかし、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳを含有しなかった外植片よりも大きい重量を有する傾向があった（ｐ＝０．１１）。２５μｇのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳにより被覆されたすべてのインプラントが、触診により硬くなったと判断され（４／４）、これに対して、ＢＭＰ－２を含有し、しかし、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳを含有しなかったインプラントは、硬化しているのがそれよりも少なかった（１／４）。２．５μｇまたは１０μｇのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳにより被覆されたインプラントは中間的であった（３／４）。ヘマトキシリンおよびエオシンによる染色の後でのインプラントの組織学的検査では、触診の結果と一致する新しい骨形成が明らかにされた。２５μｇのＢ２Ａ２－Ｋ－ＮＳにより被覆されたすべてのインプラントが、組織学的に特定可能な新しい骨を有し（４／４）、これに対して、ＢＭＰ－２を含有し、しかし、Ｂ２Ａ２－Ｋ－ＮＳを含有しなかったインプラントはそれほどではなかった（１／４）。
【０１２５】
本発明が好ましい実施形態に関して記載されている。しかしながら、様々な改変および改善が、本発明の範囲から逸脱することなく、記載された実施形態に対して行われ得ることが理解される。本発明の様々な変化および改変が当業者には自明であり、また、添付された請求項において、すべてのそのような改変および均等物を包含することが意図される。上記で引用されたすべての参考文献、特許出願、特許および刊行物の開示全体が本明細書により参考として組み込まれる。

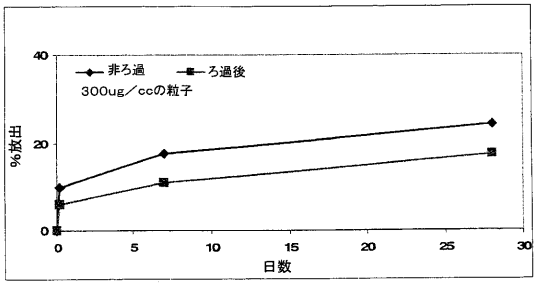
【図１】


60%HAP/40%TCP- 高用量
60%HAP/40%TCP- 中用量
20%HAP/80%TCP- 高用量
20%HAP/80%TCP- 中用量
100%HAP+Si- 高用量
60%HAP/40%TCP- 低用量
20%HAP/80%TCP- 低用量
時間(HRS)

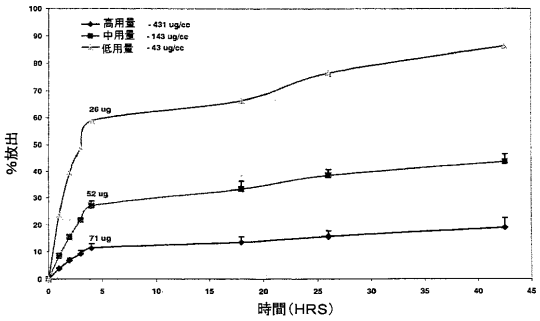
【図２】


%放出(補正後)
20-80
MBCP
PRO-OSTEON
時間(HRS)

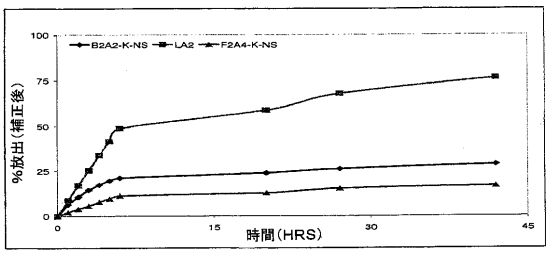
【図３】


非ろ過
ろ過後
300ug／ccの粒子
%放出
日数

【図４】


高用量 - 431 ug/cc
中用量 - 143 ug/cc
低用量 - 43 ug/cc
26 ug
52 ug
71 ug
%放出
時間(HRS)

【図５】


B2A2-K-NS
LA2
F2A4-K-NS
%放出(補正後)
時間(HRS)

【配列表】
2009541358000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 07/71946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 35/34, C12N 5/00 (2007.10)
USPC - 424/548, 435/325
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 35/34, C12N 5/00 (2007.10)
USPC - 424/548, 435/325

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 435/366, 977/906, 514/12, 514/44, 514/263.37, 514/263.4, 544/276, 544/277

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB); DialogPRO (Chemistry); Google Scholar: Synthetic, factor, analog, heparin, binding, linker, sequence, surface, receptor, osteoconductive,inorganic, polymer, natural, allograft, bone, amplifier, activator, putty, powder, gel, chemotaxis, calcium, sulfate, hydroxyapatite, lesion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2004/0087505 A1 (Pena) 6 May 2004 (06.05.2004); entire document, esp. para [0003], [0018], [0021], [0022], [0044], [0046], [0055], [0118], [0129], [0134], [0156] and claim 55	1, 2, 5 and 6 --- 3, 4 and 7-24
Y	US 2001/0014662 A1 (Rueger) 16 Aug 2001 (16.08.2001); entire document, esp. para [0012], [0013], [0019], [0025], [0026], [0032], [0033], [0047], [0051], [0076], [0078] and [0256]	3, 9, 10 and 12-24
Y	US 2005/0196425 A1 (Zamora) 8 Sep 2005 (08.09.2005); para [0065]	4 and 22
Y	US 6,846,853 B2 (Shimp) 25 Jan 2005 (25.01.2005); claims 7 and 15	7, 8 and 11
Y	US 6,863,899 B2 (Koblish) 8 Mar 2005 (08.03.2005); col 5, ln 67 and col 1, ln 50-63	19
A	US 5,108,436 A (Chu) 28 Apr 1992 (28.04.1992)	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 November 2007 (08.11.2007)	06 DEC 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アトキンソン，ブレント リー
アメリカ合衆国 メリーランド州 ２１７０４，フレドリック，スプリッグ ストリート ノース ３７０７

Ｆターム(参考) 4C081 AB04 BA12 BA13 BA16 BB06 CA171 CD081 CD111 CD121 CD28
CD34 CF021 CF022 CF031 CF111 CF131 DA01 DA11 DA12 DA14
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 EA20 FA10 FA72 FA74