

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>  
C12N 15/12  
C12N 15/62 C12N 5/10  
C07K 14/51 C07K 7/08  
A61K 38/18 A61K 31/70  
A61P 19/08



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 00803718.3

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 6 日 [11] 授权公告号 CN 1169959C

[22] 申请日 2000.1.27 [21] 申请号 00803718.3  
[30] 优先权  
[32] 1999. 2.13 [33] DE [31] 19906096.7  
[86] 国际申请 PCT/EP2000/000637 2000.1.27  
[87] 国际公布 WO2000/047736 德 2000.8.17  
[85] 进入国家阶段日期 2001.8.13  
[71] 专利权人 东方基因股份有限公司  
地址 德国维尔茨堡  
[72] 发明人 瓦尔特·西巴特  
审查员 陈 敏

[74] 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任  
公司  
代理人 卢 宏

权利要求书 4 页 说明书 25 页 附图 10 页

[54] 发明名称 高肝素结合力的多肽变异体  
[57] 摘要

本发明涉及具有高肝素结合力的多肽变异体。它是通过将一氨基酸序列 X1X2X3X4X5X6 (序列表中序列 1 或 2) 增加、插入和/或替代到原多肽中得到的。本发明提供的多肽变异体适用于刺激软骨生成、骨生成和伤口愈合。本发明也涉及编码所说的多肽变异体的氨基酸分子, 包含所说的核酸分子的宿主细胞以及制备多肽变异体的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种具有高肝素结合力的多肽变异体，其特征在于：

(1)将至少一个包含氨基酸序列  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  的寡肽加在低肝素结合力的多肽氨基酸序列中；和/或

(2)将至少一个包含氨基酸序列  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  的寡肽插入一个多肽的氨基酸序列中；和/或

(3)用一个包含氨基酸序列  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  的寡肽替换多肽的氨基酸序列中至少一个天然存在的寡肽序列

其中：

$X_1 = K, R$  或  $H$ ;

$X_2 = K, R$  或  $H$ ;

$X_3 = K, R, H$  或无氨基酸;

$X_4 =$ 非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸

$X_5 =$ 非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸，或无氨基酸

$X_6 =$ 非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸，或无氨基酸

或者：

$X_1 = K, R$  或  $H$ ;

$X_2 =$ 非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸

$X_3 = K, R$  或  $H$ ;

$X_4 =$ 非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸

$X_5 =$ 非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸或无氨基酸

$X_6 =$ 非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸或无氨基酸

多肽选自包括  $TGF-\beta$  超家族在内的 DVR 家族。

2、根据权利要求 1 所述多肽变异体，其特征在于所说的寡肽的 1 至 4 份拷

贝被插入到多肽的 1 至 4 个位点。

3、根据权利要求 1 所述多肽变异体，其特征在于所说的寡肽包含有氨基酸序列 RKRA 或 RKRAKHKQ。

4、根据权利要求 1 所述多肽变异体，其特征在于所说的寡肽被加入到 N 端区和/或插入到 N 端区，和/或替换 N 端区的一部分。

5、根据权利要求 1 所述多肽变异体，其特征在于所说的多肽变异体的氨基酸序列进一步包含一段序列，该序列与在 N 端的重组表达有关；所说的与重组表达相关的序列是 M 或 MZ，其中 M 代表蛋氨酸，而 Z 代表一个或多个氨基酸。

6、根据权利要求 1 所述的多肽变异体，其特征在于所说的多肽包含有一个组氨酸标记。

7、根据权利要求 1 所述的多肽变异体，其特征在于所说的多肽是经加入、替换、插入、转换和/或缺失变化的激素、细胞因子或生长因子；所说的被改变的多肽具有至少 10%原多肽生物学活性，和/或至少 50%的同源率。

8、根据权利要求 1 所述的多肽变异体，其特征在于所说的多肽是 BMP-2，BMP-4，BMP-5，BMP-6，BMP-7/OP-1 或 BMP-8/OP-2。

9、根据权利要求 8 所述的多肽变异体，其特征在于所说的多肽变异体的氨基酸序列为序列 5 或 6。

10、根据权利要求 1 所述的多肽变异体，其特征在于所说的寡肽插入半胱氨酸的上游。

11、根据权利要求 1 至 10 之一所述的多肽变异体，其特征在于所说的多肽变异体是上述权利要求中所说的多肽变异体的多聚体，寡聚体或二聚体。

12、一种编码权利要求 1 至 11 之一所述的多肽变异体的核酸分子。

13、根据权利要求 12 所述的核酸分子，其特征在于所说的核酸序列来源于基因组 DNA 或 cDNA，或是合成的 DNA。

14、根据权利要求 12 所述的核酸分子，其特征在于其中包含有适合于调控

表达的启动子，编码多肽变异体的核酸序列是在该启动子的调控之下的。

15、根据权利要求 12 或 13 或 14 所述的核酸分子，其特征在于所说的核酸分子至少包含一个载体的一部分。

16、包含有如权利要求 12 至 15 中之一所说的核酸分子的宿主细胞，该宿主细胞是适合于所说的核酸分子表达的原核细胞或真核细胞。

17、制备如权利要求 1 至 11 之一所述的具有高肝素结合力的多肽变异体的方法：

在多肽的氨基酸序列中增加至少一个寡肽，该寡肽含有从序列表中序列 1 或序列 2 选取的氨基酸序列；和/或

在多肽的氨基酸序列中插入至少一个寡肽，该寡肽含有从序列表中序列 1 或序列 2 选取的氨基酸序列；和/或

用一个寡肽替换多肽的氨基酸序列中至少一个天然存在的寡肽序列，该寡肽含有从序列表中序列 1 或序列 2 选取的氨基酸序列。

18、根据权利要求 17 所述的制备方法，其特征在于所说的方法包含化学的和/或酶学的方法的综合过程。

19、根据权利要求 17 所述的制备方法，其特征在于所说的方法包含基因工程方法。

20、根据权利要求 17 所述的制备方法，其特征在于所说的方法包括：

1) 编码一个多肽的核酸体外诱变如下：

(1) 在编码多肽的核酸中增加至少一个编码一个寡肽的核酸；在该寡肽中包含有一个从序列表中序列 1 或者序列表中序列 2 筛选的氨基酸的序列；和/或

(2) 在编码多肽的核酸中插入至少一个编码一个寡肽的核酸；在该寡肽中包含有一个从序列表中序列 1 或者序列表中序列 2 筛选的氨基酸的序列；和/或

(3) 在编码多肽的核酸的自然存在的序列中，至少一个核酸序列被一个编码

一个寡肽的核酸替代;该寡肽中包含有一个从序列表中序列 1 或者序列表中序列 2 筛选的氨基酸的序列;

- 2) 在合适的表达载体中克隆突变的核酸;
- 3) 用获得的表达载体转化/转染适合的宿主细胞;
- 4) 在合适的表达条件下培养转化/转染的宿主细胞;
- 5) 分离;
- 6) 可选择复性表达产物。

21、根据权利要求 17 至 20 之一所述的制备方法,其特征在於所说的制备方法是在原核宿主细胞中完成的。

22、根据权利要求 21 所述的制备方法,其特征在於所说的原核宿主细胞是大肠杆菌。

23、根据权利要求 17 至 20 之一所述的制备方法,其特征在於所说的制备方法是在真核宿主细胞中完成的。

24、根据权利要求 23 所述的制备方法,其特征在於所说的真核宿主细胞是酵母、植物或昆虫细胞、CHO 或 COS 细胞。

25、一种药物组合物,含有如权利要求 1 至 11 之一所述的多肽变异体和任意的生理学上合适的添加剂。

26、权利要求 1 至 11 之一所述的多肽变异体在制备刺激骨生成,或促进伤口愈合,或治疗炎症或癌症的药物中的应用。

27、用于骨诱导的组合物,含有权利要求 1 至 11 之一所述的多肽变异体和载体,该载体选自肝素、羟磷灰石、透明质酸、合成聚合物和胶原。

28、一种骨诱导基质,其特征在於含有或包被有肝素、羟磷灰石、透明质酸、合成聚合物或胶原物质,和权利要求 1 至 11 之一所述的多肽变异体,该多肽变异体被吸附在所说的肝素、羟磷灰石、透明质酸、合成聚合物或胶原上。

## 高肝素结合力的多肽变异体

### 技术领域

本发明涉及多肽变异体，它能增强与肝素的结合力。此外，它也与编码这些变异体的核酸分子，包含有这些核酸分子的宿主细胞，以及制备多肽变异体和重组的多肽变异体的方法有关。同时，本发明也涉及运用这些多肽变异体刺激软骨生成、骨生成、伤口愈合，治疗炎症和肿瘤。另外，该发明还涉及包含这些变异体的诱导骨生成的药物组合物。

### 技术背景

许多生物学因子影响人和动物的细胞、组织和器官的生长和再生。迄今，人们对其中许多因子知之甚少，对其调控过程不甚了解。骨生成过程就是其中一例，它可被区分为数个连续的单个过程，如趋化、有丝分裂和分化过程等。趋化在这里是指主要包含不溶性的 I 型胶原在内的不溶性的脱矿物质的骨基质释放的信号连接产生的化学梯度引起细胞的直接迁移。不溶性的 I 型胶原可与血浆纤维结合蛋白结合，后者结构中有与胶原，纤维蛋白和肝素结合的部位。

骨生成的调控主要包括两组生物学活性因子，即全身性活性因子和局部性活性因子。

全身性活性因子包括 PTH（甲状旁腺素）和 1、25-二羟维生素 D<sub>3</sub>。两者可调节内源性钙浓度。此外降钙素也参与成骨过程，它可抑制骨吸收。雌激素、雄激素、生长激素、胰岛素样生长因子（IGF）、甲状腺素和糖皮质激素均为全身性活性因子，参与成骨过程。

局部活性因子包括：

- （1）影响骨分解的细胞因子有 IL-1、肿瘤坏死因子（TNF）、IL-6、IL-11 和 ODF（破骨分化因子，TRANCE）；
- （2）抑制骨分解的细胞因子有：IL-4、IL-13、IL-18、OPG（OSTEOPROTEGERIN）、IFN（干扰素）和 IL-1ra（白介素-1 受体拮抗剂）

- (3) 集落刺激因子: M-CSF (巨噬系集落刺激因子) 和 GM-CSF (粒巨集落刺激因子);
- (4) 前列腺素、白三烯和一氧化氮;
- (5) 生长因子: IGF (胰岛素样生长因子), decapentaplegic-Vg-related(DVR) 家族中的蛋白, 包括 TGF- $\beta$  (转化生长因子 $\beta$ ) 超家族蛋白, 其包括活化/抑制剂家族的各种蛋白、MIS (苗勒抑制底物)、GDF (生长/分化因子)、nodal 和 dorsalin; FGF (纤维母细胞生长因子), PDGF (血小板衍化生长因子), 和 PTHrP (PTH 相关蛋白或者甲状旁腺素相关蛋白)

在本发明中, TGF- $\beta$  超家族非常重要。

到目前为止, 各种生物体中除尚未得到公认的 Orthologs 外, TGF- $\beta$  超家族包括 20 余种蛋白质, 除 TGF- $\beta$ s 外, 还包括 BMPs (骨形态生成蛋白), GDFs (生长分化因子) 的抑制素/活化素以及其它蛋白 (Kingsley, 1994) 均由两个亚单位构成。这两个亚单位是由两个完全相同的单体形成的同源二聚体, 由一个二硫共价键相连。

迄今发现 TGF- $\beta$  超家族蛋白结构中的一个显著特点是存在“TGF- $\beta$  /BMP 结构”, 它包含一个半胱氨酸结, 一个  $\alpha$  螺旋, 每个单体至少有 4 股  $\beta$  链, 在二聚体中构成一个单独特有的结构 (McDonald and Hendrickson, 1993)。氨基酸序列显著不同, 有时有最高可达 40% 的同源率。袢区和 N 端序列变化较大, 虽然如此, 在进化过程中, TGF- $\beta$  超家族的所有成员的结构和功能仍显示出令人惊讶的保守程度。它们均含有一个结构要素称作“半胱氨酸结”, 它由 3 个二硫共价键形成三环结构域, 在所有 TGF- $\beta$  超家族蛋白中此种结构得以保留并完全相同。除 TGF- $\beta$ s 外, 其它被深入研究的代表系 BMPs 中的成员, 如 BMP-2 和 BMP-7, 以及 GDFs 成员中的 GDF-5, 它们均可影响骨和软骨的发育和再生。如 BMP-2 在异位或常位植入中均显示诱导骨生成的特性。

TGF- $\beta$  超家族的蛋白质在细胞内合成, 由较大的蛋白前体水解后形成成熟的蛋白。通过对蛋白前体 Arg $\times\times$ Arg 序列的识别切除, 释放出 C 端大约 100 到 140 个氨基酸残基序列, 就是所谓的成熟蛋白。

在信号传导方面, TGF- $\beta$  超家族中的细胞因子与两种靶细胞膜受体的胞外肽段结合, 即可诱导的骨髓干细胞。2 型亚单位胞内肽段内包含一个蛋白丝氨酸激酶, 在与

I 型亚单位中的配体结合时可磷酸化丝氨酸残基,同时它也激活 1 型亚单位内的一个丝氨酸蛋白激酶,后者可磷酸化和激活胞内信号蛋白如 SMADS。有证据提示 1、2 型亚单位均以二聚体形式存在。最近,激活素受体 2 型亚单位 (Act-R II) 的胞外段功能域晶体状结构已得到确认。BMP-2 作为 TGF- $\beta$  家族中研究得最深入的蛋白,它通过半胱氨酸结中的第一个半胱氨酸下游的高度保守区域与受体亚单位结合。BMP-2 中半胱氨酸结的第一个胱氨酸上游的高度变异的 N 端序列并不直接与受体亚单位起反应。TGF- $\beta$  超家族的蛋白与 1、2 型受体亚单位的相互作用在一定程度上是随机的,缺乏特异性。目前对受体亚单位的通用程度或受体活化机理差异的程度研究均不明了,特别是目前文献尚未揭示究竟是此蛋白质的哪个结构域决定其特异性功能,如促骨生成活性。

除受体亚单位外,TGF- $\beta$  超家族成员还可与其它一系列蛋白相互作用来调节或抑制自身活性。Fetuin/ $\alpha$ 2-HS 糖蛋白和其衍生的多肽 (TRH1) 可与 BMP-2 和 TGF- $\beta$  结合,而与 BMP-2 的结合力更高,它可与受体竞争结合。哺乳类头蛋白 (NOGGIN PROTEIN) 与受体竞争结合 BMP-2,而它的结合力更高。有爪蟾卵母细胞显示 Chordin 是 BMP-4 的抑制剂。Follistatin 与激活素有高结合力,而 BMP-7 和 BMP-2 被证明可与肝素结合。

鉴于其生理学特性,TGF- $\beta$  超家族成员显然在治疗运用中很有潜力可挖,特别是那些重组蛋白,因为它们可大批量生产,而且,编码它的核酸在基因治疗中也是一项有力工具。

因此,所有 TGF- $\beta$  超家族成员及其生物学特性改变的变异体引起了人们的普遍重视。Kubleret 等 (1999) 描述了一个 BMP 的类似物 EHBMP-2 的一级结构,它与人类天然 BMP-2 的差异在于 BMP-2 的头 12 个氨基酸被人类 IL-2 的头 13 个氨基酸序列取代,而被取代的部位正是 BMP-2 与肝素的高亲和部位。这种基因突变的 BMP-2 类似物在大肠杆菌中重组并表达。例如体外研究发现,EHBMP-2 在不同细胞培养中显示出极低的肝素结合力和高度生物学活性。变异体的体内活性与天然 BMP-2 相比,在老鼠体内  $4\mu\text{M}$  浓度的 BMP-2 可使所用样本产生异位骨诱导生成,而 EHBMP-2 浓度须达到

40  $\mu$  M 才能产生同样效果。此外，在同样蛋白浓度条件下，BMP-2 诱导的新骨生成的最终程度显著地高于 EHBMP-2。

## 发明内容

本发明的目的在于提供在体内与野生型相同或更有效的多肽变异体。进一步的目标在于提供编码这些多肽变异体的核酸，以及含有这些核酸的载体和宿主细胞，更进一步的目标是提供制备多肽的方法。最后还可提供包含这些多肽变异体的药物组合物并在临床运用。

根据本发明，我们将通过构造一个高肝素结合力的多肽变异体来达到目的，具体描述如下：

<1>将至少一个包含氨基酸序列  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  的寡肽加在低肝素结合力的多肽氨基酸序列中；和/或

<2>将至少一个包含氨基酸序列  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  的寡肽插入一个多肽的氨基酸序列中；和/或

<3>用一个包含氨基酸序列  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  的寡肽替换多肽的氨基酸序列中至少一个天然存在的寡肽序列

其中：

$X_1 = K, R$  或  $H$ ;

$X_2 = K, R$  或  $H$ ;

$X_3 = K, R, H$  或无氨基酸;

$X_4 =$  非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸

$X_5 =$  非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸，或无氨基酸

$X_6 =$  非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸，或无氨基酸（序列表中序列 1）

或者：

$X_1 = K, R$  或  $H$ ;

$X_2 =$  非  $K, R, H$  的其它任何氨基酸

$X_3 = K, R$  或  $H$ ;

$X_4$  =非 K, R, H 的其它任何氨基酸

$X_5$  =非 K, R, H 的其它任何氨基酸或无氨基酸

$X_6$  =非 K, R, H 的其它任何氨基酸或无氨基酸 (序列表中序列 2)

下面将详细解释一些术语以便理解本申请的来龙去脉。

“多肽”是指包含 5 个或 5 个以上氨基酸的肽或蛋白,而且至少有一种生物学活性。该术语包括多肽的具有生物学活性的片段,其突变体和融合蛋白。

“高肝素结合力的多肽变异体”是指与未变异的多肽相比较,它具有与肝素有更高结合力的多肽变异体。通常与肝素的结合能力可被检测出来,如在肝素包被载体帮助下的血浆共振分析。具体的实验条件参见 Ruppert 等, 1996。

“体内效率”意味着靶部位预想效果的实现度。“体内效率”通过蛋白的生物学活性和靶部位的蛋白利用率来检测,通过最后的分析计算出靶部位的效果。这些方法均已建立。例如 BMP-2 变异体诱导异位骨生成的方法被公认为有用的,这些方法均已建立 (参见 Kubler & Urist, 1991 和 Kubler 等, 1999)。

“生长因子”指可调控细胞生长和/或分化的具有生物学活性的多肽。

有关特异性多肽,它们的氨基酸序列的参考文献均可获得。例如可通过下述网址进入公用数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) 获得。

“同源率”是指通过已知的计算机程序,例如“计算机辅助序列比较”,比较两个或更多多肽中氨基酸序列,而获得的他们之间的相关程度。(基本的局部校直搜索工具, S.F. Altschul 等, J.Mol.Biol. 215(1990), 403-410) 根据两个或两个以上序列中完全相同的区域所占的百分率来测定“同源率”,同时还须考虑差异或其它序列的独特性。通常我们运用带有运算规则的电脑系统来满足特定的需要。有关序列之间产生高度一致来判断同源率的更好的方法正在研究中。判断两个序列同源率的程序包括 GCG 程度包裹和其它一系列程序: GAP (Devereux. J 等. Nucleic Acids Research 12(12):387(1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLASTP, BLASTIN 和 FASTA (Altschul. S 等, J.Mol.Biol. 215:403-410) (1990) )。其中 BLASTX 程序可以从国家生物技术信息中心 (NCBI) 处

和其它途径 (BLAST Manna, Altschul, S 等, NCB NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S 等, Mol. Bio. 215:403-410(1990)) 获得。著名的 Smith-Waterman 演绎法可用于判断同源率。

比较氨基酸序列差异的相关参数包括:

Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-(1970)

Comparison matrix: Blosum 62 from Henikoff and Henikoff, PNAS USA 89(1992), 10915-10919)

Gap Penalty: 12

Gap length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

GAP 程序适合计算上述参数。当两端有裂隙并不减少同源率数值时, 上述指标是氨基酸序列比较时的预设指标。对于与对照序列有关的非常短的序列, 有必要增加预期值至 1, 000, 000, 而在某些情况下减少到 2。其它样本算法, 如间隙开放处罚 (gap opening penalties)、间隙延伸处罚 (gap extension penalties), 比较基质 (comparison matrices), 包括程序手册中所命名的 (Wisconsin package, 第 9 版, 1997 年 9 月) 均可运用。选择取决于所要做的比较, 根据两个序列之间的差异来选择, GAP 或 Best Fit 似乎更适用; 比较一段序列与延伸序列的资料库, FASTA 或 BLAST 更适用。

运用上述方法检测出 60% 的一致性, 在本申请中说明具有 60% 的同源率, 更高的同源率也根据此法。

“组氨酸标记”指通过适当克隆得到一段含有至少 6 个组氨酸氨基酸序列与一段可表达的序列融合, 使产生的融合蛋白在 NH<sub>2</sub> 端至少含有 6 个组氨酸, 它可通过与 Ni<sup>2+</sup> 柱形成配合物而容易被纯化提取。

“异源性基因”指结构基因的编码区, 它在同源启动子调控下不表达或在其来源的生物体内不表达, 或在非自身启动子调控下或非本身本源的生物体内表达。

“克隆”指所有现有技术中运用的克隆方法。这些方法均能运用于此。此处并未全

部详细描述。它是本领域普通技术人员常用的标准方法。

“适当宿主细胞内重组表达”指所有现有技术中已知的在已知的表达系统中的表达方法。这些方法均能运用于此，此处并未全部详细描述。

令人惊奇的是由于至少一个包含有本发明所指出的氨基酸序列的寡肽被增加或 / 和插入到多肽中，或 / 和取代了多肽中的一部分氨基酸，如本发明提供的多肽变异体与多肽原型相比具有更高的肝素结合力。它与肝素结合力较强，与其解离度较小。因为类肝素结构系骨结构的整合性成份，所以多肽变异体与骨结构结合的能力显著提高。这个特性对骨结构的再生过程来说显得很有意义。上述多肽变异体可参与骨的形态生成（成骨）。该发明产生的多肽变异体可提高 10 到 30 倍与肝素结合的能力。如图 8 所示，肝素结合力的增加导致体内效率的显著增加。

如上所述，多肽与可诱导的骨髓基质干细胞膜表面的受体共同参与成骨过程，由形态发生蛋白或脱矿质骨基质发出的诱导信号作用于基质干细胞使之分化形成骨细胞。研究表明高肝素结合力的多肽，特别是骨诱导的多肽可增加局部成骨部位附近各种成骨蛋白的浓度。然而，肝素可与细胞膜受体竞争结合多肽变异体。运用多肽变异体被认为可减少多肽特异性受体所需的多肽用量，并削弱其信号传导。

令人惊奇的是我们发现变异体多肽生物学利用率不受肝素自发性亲和力升高的影响，而是与特异性受体所需的多肽局部浓度的增高有关。

此外，多肽变异体诱生的体内骨生成，其质量优于未经改变的多肽。

优选方案中，本发明将氨基酸序列加入、插入或替换到成熟多肽的 N 端头 20 个氨基酸内，最好在头 5 个氨基酸序列内。

属于 TGF- $\beta$  超家族的多肽，比如 BMP-2 这样的成熟多肽可通过下述方法确认：

用关键词“BMP - 2”查寻“Swiss-Prot”数据库（当前网址 <http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/sprot-search-de>），在编号 P12643 下可找到人类 BMP-2 整个前蛋白的氨基酸序列，尔后可在“骨形态发生蛋白 2”下选出成熟蛋白的序列，即 283 至 396 位氨基酸残基。为鉴别 TGF- $\beta$  超家庭中其它蛋白，可将 283—396 位氨基酸序列提交至 EMBent-CH 的“BLAST2”（Lansanne, Switzerland），在

Swiss-Prot+TrEMBL+TrEMBL-New 数据库中用程序“blastp”查寻。运用对比基质 Blosum 62, 可获得该蛋白 250 个高度相关蛋白, 程序提供相应的“Swiss-Prot”数据库的序号, 可依此序号找出整个前蛋白的氨基酸序列。每个成熟蛋白的序列段均有提示。因为成熟蛋白是通过 RXXR 识别序列被正常切割的, 所以其序列均能从此获得。

(X 代表任何氨基酸)

如前所述, TGF- $\beta$  超家族中的多肽均包含“半胱氨酸结”的结构单位 (McDonald 和 Hendrickson, 1993) 对于超家族中的蛋白, 其半胱氨酸结的上游均为 N 端区域。本发明所插入的氨基酸序列最好在半胱氨酸结上游。

更具体地说, 包含氨基酸序列的寡肽在本发明中可 1 到 4 次通过加入、插入或替换的方式进入多肽中。该寡肽的复制物也可插入 1 个或多个多肽位点。

在特别优选方案中, 具体来说该寡肽包含 RKRA (序列表中序列 3) 或 RKRAKHKQ (序列表中序列 4) 序列。进而言之, 多肽变异体的 N 端包含一段 M 或 MZ 序列以便于重组表达, M 指蛋氨酸, Z 指一个或多个所需氨基酸。如 MZ 可代表普通技术人员已知的一段为信号序列, 表达许多原核或真核蛋白。它可为一段适合于所用表达系统的信号序列, 或“同源”信号序列, 即一个蛋白的自然附属物, 最后成为一个有插入蛋白水解酶切割位点的信号序列的复合物。

该多肽变异体优选包含有一个组氨酸标记, 多肽变异体 NH<sub>2</sub> 端的组氨酸标记有利于蛋白的纯化, 如前所述通过镍柱配合作用纯化提取蛋白。

多肽变异体具有生物学活性, 原则上来说, 当带有负电荷胞内和胞外结构的扩散限制了多肽的生物学活性时其生物学活性是重要的。因胞外基质包含有蛋白多糖和葡糖胺聚糖而使其结构带有负电荷, 如肝素、硫酸软骨素, 硫酸角质素和硫酸皮肤素。在优选的方案中, 生物学活性调控人或动物细胞、组织器官的发育和分化。

在此更重要的是多肽变异体可调控骨生成 (成骨活性)。成骨活性可测量, 如通过 <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> 标记的生长因子依赖的鸡胚肢芽的蛋白多糖结构可检测骨形态生成活性。选择 BMP 蛋白的敏感浓度范围可确定最大细胞反应和 EC<sub>50</sub> (50%最大反应的浓度)。检测所需条件参见 Ruppert 等 1996。

另外,小鼠成纤维细胞株C2C12可用于检测BMP依赖的碱性磷酸酶的诱生(katagiri等,1994),此法也能检测最大细胞反应和 $EC_{50}$ 。

优选方案是在激素、细胞因子和生长因子中选择多肽,其中特别优选的是:甲状旁腺素(PTH)、降钙素、生长激素,胰岛素样生长因子(IGF);影响溶骨的细胞因子,如IL-1,肿瘤坏死因子(TNF),IL-6,IL-11和ODF(破骨细胞分化因子,TRANCE);抑制骨分解的细胞因子,IL-4,IL-13,IL-18,IFN(干扰素),OPG(Osteoprotegerin)和IL-1ra(白介素-1受体拮抗剂);集落刺激因子有:M-CSF(巨噬系集落刺激因子)和GM-CSF(粒巨系集落刺激因子);生长因子有IGF(胰岛素样生长因子);DVR家族蛋白包括TGF- $\beta$ 超家族(转化生长因子 $\beta$ )的蛋白,它包括活化素/抑制素家族,MIS(苗勒抑制底物),GDF(生长/分化因子)家族,nodal和dorsalin;FGF(纤维母细胞生长因子);PDGF(血小板衍化生长因子)和PTHrP(甲状旁腺素相关蛋白)。

特别优选的多肽是TGF- $\beta$ 超家族成员中活化素/抑制素家族,MIS,GDF家族,nodal和dorsalin;BMP家族成员,尤其是BMP-2、BMP-4、BMP-5,BMP-6,BMP-7/OP-1,或BMP-8/OP-2,同样还有BMP-9,BMP-10,BMP-11,BMP-12,BMP-13,BMP-14和BMP-15。

根据此发明上述生长因子的选择尤为重要,因为它们在骨形态生成中的作用已清楚(Reddi,1998)。这些因子变异体的运用可提高其与肝素的结合力,并不影响其诱生骨特性。

若为TGF- $\beta$ 超家族中的多肽则包含上述“半胱氨酸结”结构,设计的氨基酸序列会插入在多肽序列中的半胱氨酸结的上游,如在BMP-2中,插入位置可选在成熟蛋白氨基酸残基第2至3,6-7,10-11,13-14位氨基酸间。因为TGF- $\beta$ 家族成员的同源率,特别是半胱氨酸的保守结构,操作者可熟练地判断上述蛋白的位置,并以此类推运用于TGF- $\beta$ 家族中其它成员。

所选用的多肽还可以是经添加、替换、插入、转换或缺失的激素,细胞因子或生长因子,同时可具有10%,优选50%,最好90%的生物活性。比如在骨形态生成中,骨形态生成多肽与原始多肽比较,其骨形态生成多肽的活性可达到上述指标。多肽生

物学活性的检测已有公认的生物学活性检测方法。

在附加的优选方案中，与原型多肽相比，经加入、替换、插入、转换或缺失获得的变异多肽可达 50%或 75%或 90%的同源率。在某些情况下至少 10%的生物活性与最小 50%、75%或 90%同源率相关。同样也适用于 50%或 90%最小生物学活性。

具有序列表中序列 5 (T3) 和序列表中序列 6 (T4) 的多肽变异体尤为适合。实验显示这些变异体可在稳定浓度下增强其效率及改善诱生骨的质量。这意味着增加骨基质的密度提高骨承受重力的生物机械能力。

该发明生产的多肽变异体可被修饰，包括将单体底物二聚化、寡聚化及多聚化。例如与双环己基碳化二亚胺交联，PEGYLATIN 或缔合（自我组装），所得二聚体、寡聚体和多聚体，可通过凝胶过滤分离。进一步的修饰包括侧链修饰，包括多肽变异体  $\epsilon$ -氨基-赖氨酸残基，氨基端或羧基端修饰，还包括翻译后水平修饰如蛋白的糖基化或部分 / 全部脱糖基化。

另外，这项发明也提供了核酸分子。这些核酸分子含有编码多肽变异体的核酸序列。

根据本发明，包含在核酸分子中的核酸序列可以是来源于基因组 DNA，cDNA 或者合成 DNA，而合成 DNA 包括修饰了核苷间键的合成 DNA。另外，核酸序列也可是 RNA 序列，但它可能需要经重组 RNA 载体系统后表达。

优选的核酸分子包含了编码一个多肽变异体 T3 或 T4 的一个核酸。这种核酸在序列表中的序列 7 (T3) 和序列 8 (T4) 中列举出来。所列举序列 7 或序列 8 中的氨基酸替换，人们可以使用基于基因编码突变的序列来解释，这是不言而喻的。在本发明中，理想的核酸序列是那些适合于宿主密码子使用的，能提供挑选的，并在宿主某一特定器官特定表达的一段序列。这发明也适用于与上面提到的序列互补的序列。

在优选方案中，适合于这项发明的核酸分子包括一个适于启动子参与核酸序列的表达的启动子。启动子的选择依赖于表达系统。总体来讲，可诱导的启动子如小分子金属结合蛋白启动子较好，但基本的启动子也可用。

更优选的方案中，核酸分子最少应包括部分载体，特别是调控区。载体可从噬菌

体中选择, 如 $\lambda$ -衍生体, 腺病毒, 牛痘病毒, 杆状病毒, SV40 病毒, 逆转录病毒, 质粒, 如肿块型土壤杆菌菌属 (*Agrobacterium tumefaciens*) T1 质粒, YAC 载体, BAC 载体。理想的载体为 PR<sup>TM</sup>PRC109 (Weigel 等, 1989) 和 pRBSIIPN<sub>25X/0</sub>。(Stueber, 1994)。

进一步, 本发明提供含有核酸分子, 并表达该核酸分子的宿主细胞。在现有技术中有许多原核和真核的表达系统, 例如宿主细胞选自原核细胞, 如大肠杆菌 (*E. Coli*) 或枯草杆菌 (*B. subtilis*), 和选自真核细胞, 如酵母细胞, 植物细胞, 昆虫细胞和哺乳细胞, 如 CHO、COS 或 HeLa 细胞以及衍生物。从现有技术看, CHO 衍生细胞株的糖基化方式与 CHO 细胞本身糖基化方式不同。如果多肽有生物活性, 那么由宿主细胞通过充分糖基化或消减糖基化得到的多肽变异体, 较单纯糖基化的多肽变异体有更高的生物学活性, 因为前者的三维结构发生了改变。

本发明还提供制备高肝素结合力的多肽的方法。该方法包括如下步骤: 在多肽的氨基酸序列中加入最少一个包含从序列表中序列 1 或 2 中挑选出来的氨基酸序列的寡肽, 和/或插入最少一个包含从序列表中序列 1 或 2 中挑选出来的氨基酸序列的寡肽, 和/或用包含了从序列表中序列 1 或序列 2 中挑选出来的氨基酸序列的寡肽替换多肽氨基酸序列中自然存在的最少一个寡肽。

这个步骤可通过著名的 Menifield 合成或酶促合成来进行部分或全部化学合成的方式来完成。进而言之, 这过程也可通过基因技术, 如重组表达来完成。这项发明也可以通过化学/酶和基因技术组合的方式来完成。

在优选的方案中, 制备方法包括如下步骤:

1) 编码一个多肽的核酸体外诱变如下:

(1) 在编码多肽的核酸中增加至少一个编码一个寡肽的核酸; 在该寡肽中包含有一个从序列表中序列 1 或者序列表中序列 2 筛选的氨基酸的序列; 和/或

(2) 在编码多肽的核酸中插入至少一个编码一个寡肽的核酸; 在该寡肽中包含有一个从序列表中序列 1 或者序列表中序列 2 筛选的氨基酸的序列; 和/或

(3) 在编码多肽的核酸的天然存在的序列中, 至少一个核酸序列被一个编码一个

寡肽的核酸替换;该寡肽中包含有一个从序列表中序列 1 或者序列表中序列 2 筛选的氨基酸的序列;

- 2) 在合适的表达载体中克隆突变的核酸;
- 3) 用获得的表达载体转化/转染适合的宿主细胞;
- 4) 在合适的表达条件下培养转化/转染的宿主细胞;
- 5) 分离, 必要时复性表达产物。

众所周知, DNA 序列的表达方法很多(参看 Recombination Gene Expression Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 62 Humana Press Totowa, NEW JERSEY 1995)。表达过程是基本的, 用普通技术人员已知的诱导剂, 如 IPTG,  $Zn^{2+}$ , 均可诱导的。

编码有生物活性多肽所需的诱变的核酸序列可以通过标记的核酸探针, 在表达多肽的组织建立 cDNA 文库或基因组 DNA 文库中找到。阳性 cDNA 文库或基因组 DNA 文库的确立有一标准程序(参看 Maniatis 等, 分子克隆, 1989, 冷泉港实验室出版)。编码含有本发明氨基酸序列的多肽的核酸序列, 可以通过盒式诱变或重组 PCR 插入到双链 DNA 中, (相应方法参看 Wang 等, 1997; Ruppert 等, 1996)。然后将得到的突变双链 DNA 插入到表达载体中。

前已述及常用的载体和宿主细胞。如果在大肠杆菌中表达, 可通过盐酸胍盐从细胞不溶部分分离蛋白质(Ruppert 等, 1996), 然后通过层析法复性和纯化多肽。纯化 TGF- $\beta$  超家族蛋白的优选条件: PH=8, 高盐浓度(1M, NaCl), 低去污剂和氧化还原剂。

另一方面, 如果应用了一个合适的载体的话, 可使得有分泌信号序列的多肽变异体得到恰当表达, 这样, 就可从培养基中富集多肽变异体。

本发明还提供了包括至少一个多肽变异体和现有技术中已知的符合生理要求的添加剂的药物组合物。这种多肽变异体最好从具有生物活性的多肽转化而来。例如从细胞因子或生长因子, 特别推荐参与骨形成的激素、细胞因子和生长因子。多肽变异体和肝素结合能力增强, 可以减少治疗用活性多肽变异体从脱矿质的骨基质的肝素成

份中扩散损失，从而提高了局部治疗活性物的浓度。

细胞外基质和细胞表面结合能力增加也已经观察到了。这样具有治疗性的活性的多肽变异体就可以被用于预防和治疗累及与损害到细胞外基质和细胞表面引起的疾病。

如果多肽变异体属于于 DVR 家族，他们就适合于促进骨骼生长和修复。已经观察到 GDF-5 参与软骨的形成，且为韧带发育所必需。这样，从 GDF-5 衍生的多肽变异体适合于修复软骨和韧带。BMP-7/OP-1 抑制 GDF-5 的生成，两者可能代表了平衡软骨和韧带形成的机制。已证明 BMP-7 衍生的多肽变异体在骨和软骨形成中具有调节功能。

BMP-7 参与肾和眼的形成；BMP-6 参与皮肤形成；BMP-2 参与心脏的形成，这样根据本发明，从 BMP 衍生的多肽变异体可用于调节肾、眼、皮肤和心脏的发育。

另外，GDF-5 诱导血管形成，所以，从 GDF-5 衍生的多肽变异体可以在调节血管生成方面起重要作用。

如果制备多肽变异体的多肽属于 TGF- $\beta$  家族，则具有治疗性的多肽变异体适合于免疫抑制、抑制炎症、刺激骨和软骨的形成。因其可增加细胞外基质成份（如胶原、纤维结合蛋白、葡糖胺聚糖、蛋白聚糖）的沉积，它们在促进伤口愈合方面是有用的。

另外，以 TGF- $\beta$  家族为基础的多肽变异体用于预防视网膜剥离。它也能被用于由于肿瘤化疗导致的口腔黏膜炎症。因 TGF- $\beta$  有普遍抑制细胞生长效果，它们可被用于抑制癌细胞，如乳癌细胞等。

已经知道垂体激素、激活素、抑制素能调节女性的月经周期。激活素诱导垂体激素 FSH 和 LH 的合成，而抑制素则抑制其合成。建议依据本发明的多肽变异体调节月经周期。抑制素抑制性腺肿瘤的生长，所以由抑制素衍生的多肽变异体可用于预防和治疗性腺肿瘤。

激活素被认为参与伤口的愈合，因此本发明提供了应用激活素衍生的多肽变异体生产促伤口愈合的药物。

激活素可能参与了软骨到骨的生长和转变，这样，激活素衍生的多肽变异体将适

用于调节软骨和骨的生长。

激活素促进造血过程中原始细胞形成亚单位和集落形成亚单位的扩大,而抑制素抑制这些功能,所以这些蛋白衍生的多肽变异体被建议用于造血的调控。

MIS 和 GDNF (胶质细胞源神经营养因子) 参与胚胎发育,可在所制备多肽变异体中特别重要。

在另一具体应用中,本发明提供了一个包括至少一个多肽变异体和载体,可用于骨诱导的基质。故而,建议在体外的骨诱导过程中使用该基质。

现有技术提出了包含生长因子的骨诱导基质。例如 Integra Life Science 公司生产一种胶原基质,包含了重组人 BMP-2 (Hollinger 等, 1998)。Sofamor-Danek 公司正在开发包含重组 BMP-2 的钛盒。最后,有一种 Creative Biomolecules 公司制造的名为“NOVOSTM”的装置。它包含了骨诱导 1 型骨胶原和重组 OP-1 (BMP-7)。Stryker 公司正在对其进行改进。这种装置目前在美国用于三期临床。它的应用包括矫形损伤、上颌面的修复和无血管坏死。BMP-7 也被建议用于软骨损伤、肾衰、脑部、骨髓和心脏的损伤以及骨质疏松症。

通常,基质物含有骨诱导生长因子,然后通过外科手术将基质植入。在这种情况下,基质不仅仅是生长因子的载体,它还提供了一个稳定的物理环境,阻止软组织对骨骼损伤部位的侵入。加入生长因子可加速新骨对植入物的替换。

已知基质的一个重要问题就是基质所包含的蛋白质很快从植入部位流失。因为即使有生长因子的存在,骨骼修复也是一个相对缓慢的过程。所加入的蛋白的留置时间短的,限制了其作用的发挥。

既然骨诱导生长因子的生物效应是诱导多潜能间质细胞的迁移,从而形成软骨祖细胞和成骨祖细胞,并激发它们的活性,因此必需使生长因子局限在需修复部位。一方面,从修复部位扩散的生长因子可造成治疗的失败,另一方面有导致异位骨形成的危险。

根据本发明多肽变异体较原多肽具有增强的肝素结合力,这种特点可通过使用肝素或肝素样结构作为基质材料,或作为基质材料的一部分来利用,以防止多肽变异体

从载体过快地扩散的。这样，多肽变异体被保持在应用部位。在优选方案中，载体应由肝素、羟磷灰石、透明质酸、合成聚合物和胶原构成。载体物质可以重吸收或不被重吸收。

现有技术公开了制备药理上可接受的基质的方法。这些基质的例子已被 Wagner 等，(1996) 和 Fischgrund 等 (1997) 所描述。基质可采取块、胶、羊毛状物、球或粒的形态。

基质内多肽变异体的分配可以是或不是同质的，但最好是同质的。多肽变异体的分配可被以有利的方式确定，这依赖于伤口的大小和愈合的时间。载体内的多肽变异体的浓度范围为约  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ — $2\text{mg}/\text{cm}^3$ ，优选浓度为  $250 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ — $750 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ，更优选浓度  $450 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ — $550 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 。浓度  $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  作为常规应用。

根据本发明，骨诱导基质可用于矫形损伤、上颌面修复和无血管坏死。此外，它推荐用于软骨损伤、肾衰、脑、骨髓、心脏的损伤和骨质疏松症的预防和治疗。

根据本发明，如果在骨诱导基质中使用重组方法制备得到的多肽变异体，可使它免于污染。动物来源的生长因子中常常发现病毒污染。

根据本发明提供的骨诱导基质可用于体外使骨祖细胞和/或软骨细胞组织培养使其集落化富集成为可能。这种方法构建的骨诱导基质可通过外科手段，自体或异体植入 (Kubler 等，1997; Kubler 等，1998; Chen 等，1998)

以下图表和实施例的目的是为了解释本发明，向本领域技术人员揭示它的进一步应用，而不是仅局限于这些实施例。

#### 图面说明

图 1: 类似于肝素结构的典型葡糖胺聚糖的一些结构示意图;

图 2: 在大肠杆菌中表达和分离的 T3、T4 变异体经 SDS 聚丙烯酰胺电泳分离后，卡马斯亮蓝染色示意图; 同时包括氧化型 BMP-2 和 EHBMP-2 (上) 及还原型 BMP-2 和 EHBMP-2 (下)。左边是分子量标准 (15、20、30、35、68 和 94kD)。从左至右的上柱顺序是: 第 1—4 道分别为浓度为  $2 \mu\text{g}$  的 BMP-2、EHBMP-2, T3 (序列表中序列 5) 和

T4（序列表中序列6）；第5—8道分别为浓度为 $5\mu\text{g}$ 的BMP-2、EHBMP-2、T3、T4。

图3：用Pharmacia BIA2000系统记录的T3和T4（序列表中序列5和6）以及BMP-2变异体的肝素结合力的感应测定值示意图。

图4：用BIA2000系统记录的T3和T4（序列表中序列5和6）以及BMP-2变异体与受体BMPR-1A的胞外功能区的结合力的感应测定值示意图。

图5 在用 $^{35}\text{S}$ 标记的鸡胚胎芽细胞培养实验中BMP-2、T3变异体、T4变异体的量效曲线。

图6 应用C2C12细胞株进行碱性磷酸酶诱生实验中BMP-2、T3变异、T4变异的量效曲线

图7 7a、7b为BMP-2植入在小鼠诱生骨组织的组织学图象，由HE染色。表现为紫色区域环绕白色和暗紫色区域。暗紫色区域为骨髓，白色细胞为存在于正常骨髓中的脂肪组织。周围的肌肉组织为深红色。

图8 T3在小鼠上诱生骨组织的组织学图象，HE染色

图9 T3在小鼠上诱生骨组织的X线影象

图10 T3在小鼠上诱生骨组织的组织学图象

## 具体实施方式

### 方法

#### 肝素结合的测定：

为了检测肝素的结合力，用氨基生物素标记肝素6000(Mach等，1993)并固定到链亲和素包被的生物感应器CM5(Pharmacia Biosensor AB)上。多肽和本发明提供的多肽变异体对用肝素涂布的生物传感器的结合，由BIA2000仪器来测量。具体的实验条件已有报道(Ruppert等，1996)

#### 测定与受体EMPR-1A的结合：

BMPR-1A受体的外功能区由氨基生物素标记(Shen等，1996)，并固定于链亲和素包被的生物感应器CM5(Pharmacia Biosensor AB)上。多肽和本发明提供的多肽变异体对用肝素涂布的生物传感器的结合，由BIA2000仪器来测量。

测定诱导成骨生物活性:

如下的细胞培养体系用来测定生物学活性:

细胞从鸡胚胎体芽上分离,并用于测量用  $^{35}\text{SO}_4$  标记的 BMP 依赖的蛋白多糖 (Ruppert 等, 1996)。调节 BMP 蛋白的浓度,使达到最大的细胞应答及  $\text{EC}_{50}$  (达到最大掺入量 50%的浓度)。鼠的成肌细胞株 C2C12 被用来确定 BMP 依赖的碱性磷酸酶诱生 (Katagiri 等, 1994),并能确定最大细胞应答和  $\text{EC}_{50}$  的浓度。

实施例 1

T3 的表达和鉴定

编码成熟人类 BMP-2 的 cDNA (NIH 数据库 Entrez/Swiss-Prot NoP12643) 和 5' 末端的 ATGGCT (蛋氨酸-丙氨酸) 是主要的诱发突变部位 (Wang 等, 1997)。在 NcoI 和 Af/11 的单一切点之间插入如下的双链 DNA:

5' CATGGCTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCGCTCGTAAACGTC3'

序列表中序列 9

3' CGAGTTCGGTTTGTGTTTGTGCCTTTGCGCGAGCATTTGCAGAATT5'

序列表中序列 10

因此,精氨酸-赖氨酸-精氨酸-丙氨酸(序列表中序列。3)被插入到人蛋氨酸-丙氨酸-BMP-2 分子上第 8 位的谷氨酰胺和第九位的精氨酸之间。突变的 cDNA 已作为 NcoI/BamHI 片段被整合到 pRBSIIPN<sub>25X/0</sub> (Stueber 等, 1984) 表达载体上。此突变体经测序证实。

T3 变异体经表达和产物分离后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳证实,与预期的相同,此法制备的 T3 具有较 BMP-2 大的表观分子量。这与预计的相同。T3 在生物感应实验中与 BMP-2 受体 BMPR-IA 的胞外功能区可非特异性结合(解离常数  $K_d$  约为 200PM),而与肝素的结合能力比 BMP-2 略强,解离能力下降。

在不同的测试体系中其生物活性有所改变。鸡胚胎体芽细胞用硫酸盐标记方法测定的蛋白聚糖合成表明 T3 较 BMP-2 有更高的  $\text{EC}_{50}$ 。可最大掺入量不变。在 C2C12 细胞株中进行的碱性磷酸酶活性表明 T3 较 BMP-2 有更高的  $\text{EC}_{50}$  值。

## 实施例 2

### T4 的表达和鉴定

T4 的突变部位同 T3 基本相同，但在 BMP-2 的 cDNA 中插入的双链 DNA 序列有所不同，其插入序列如下：

5' CATGGCTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCCTAAGCATAAGCAACGTAAGCGTC3'

3' CGAGTTCGGTTTGTGTTTGTGCGCTTTGCGCGATTTCGTATTCGTTGCATTTCGCAGAATT5'

上一序列为序列表中序列 11，下一序列在序列表为序列表中序列 12。

因此，在 BMP-2 分子的第八位的谷氨酰胺和第九位的精氨酸之间插入序列为精氨酸-赖氨酸-精氨酸-丙氨酸-赖氨酸-组氨酸-赖氨酸-谷氨酰胺。

T4 变异体表达产物分离后经聚丙烯酰胺凝胶电泳证实其表观分子量较 T3 和 BMP-2 稍大。T4 与 BMP-2 受体 BMPR-IA 胞外功能区结合的解离常数约为 340pM，这和 BMP-2 与其受体的结合力相关 ( $K_d$ 320pM)。但是 T4 和肝素结合能力比 BMP-2 强，解离减慢。T4 从肝素上释放的速度比 T3 还慢。

相对 BMP-2 而言 T4 的生物学活性的变化表现为：在鸡胚胎芽细胞的蛋白聚糖合成期，硫酸盐掺入试验，T4 有高的  $EC_{50}$  值（甚至比 T3 还高）。同样，在 C2C12 细胞株中进行诱导碱性磷酸酶实验证实 T4 比 BMP-2 有较高的  $EC_{50}$  值

### 实施例 3：多肽变异体体内效率的研究

此处所选用的方法为在鼠的大腿肌肉中诱生异位骨组织。异位骨形成即在不与骨组织接触的其他组织中形成骨骼。这个实验的优点在于有很强的说服力。因为，不与任何骨组织接触，不会发生自然再生骨组织的过程。因此，可排除由于手术时骨损伤引起的假阳性结果。

在 ICR 小鼠诱生异位骨的方法已由 KUBLER 和 URIST 在 1991 年详细报道。

BMP-2 和 T3 变异体以不同的浓度混合溶于牛血清白蛋白中，植入到 ICR 小鼠的股四头肌中，三周后可由 X 线摄片或组织学检查检测到新生骨。

单纯牛血清白蛋白植入后不能观察到新骨形成。在 BMP-2 和 T3 组中均无炎症或其他损伤后副作用发生。图 7 表示 BMP-2 能诱生骨基质和骨髓形成；图 8 表示 T3 的

相应的处理结果。同 BMP-2 的作用相比，T3 诱生以骨基质为主。

图 9 表示 T3 植入后诱生小骨的 X 线影象。同样条件下，T3 诱生的小骨与常规的 BMP-2 诱生的小骨，在大小上无明显差异

图 10 显示 T3 诱生小骨的组织学图象。用 Masson-Trichrome 染色，这种染色方法可以区分不同分化阶段的骨组织。红色区域为完全分化的骨组织，蓝绿色区域为正在进行骨化的组织，在某些地方可在蓝染组织中发现白色圆形细胞，称为软骨形成细胞，因为 BMP-2 诱导成骨包括软骨内骨化（一时性软骨形成）。

图 7-10 的实验中重组人 BMP-2 或 T3（序列表中序列 5）的量为 10 μg。下表比较了 BMP-2 和重组 T3 的体内效率。

表 1：由 BMP-2 和 T3 诱导的骨形成比较

| rhBMP-2 (μg) | T3 (μg) | 骨形成   |
|--------------|---------|-------|
| -            | -       | 0/30  |
| 0.4          | -       | 0/3   |
| -            | 0.4     | 3/4   |
| 1            | -       | 0/9   |
| -            | 1       | 4/4   |
| 4            | -       | 3/3   |
| -            | 4       | 4/4   |
| 10           | -       | 10/11 |
| -            | 10      | 4/4   |

以上的比较说明低浓度的 T3 有着比 BMP-2 更高的骨诱生效率。1 μg 的 BMP-2 植入后，9 个实验对象均未观察到骨组织的形成；而相同量的 T3 植入后，4 个实验动物中全部可观察到骨组织的形成。即使 T3 的量仅为 0.4 μg，在 4 个实验动物中也有 3 个可观察到诱生骨的形成。

以上结果表明与高肝素结合力的多肽变异体能在体内诱导骨组织形成，且无炎症反应和其他耐受现象发生。与常规的 BMP-2 相比，T3 诱生的骨组织含有较高的骨基质。由于骨基质维持骨的机械稳定性，密度高的骨更牢固，承重功能更好。因此，T3 诱生的骨的质量优于 BMP-2 诱生骨。与 BMP-2 相比，低浓度的 T3 在体内即可发挥生物学作用，减少生长因子的必须使用量。这是多肽变异体具有令人满意的优点。

## 参 考 文 献

- Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410
- Altschul et al., BLAST manual, NCB NLM NIH Bethesda MD 20894
- Chen et al., Neurosurg. Focus 4 (1998) article 11
- Devereux et al., Nucleic Acid Res. 12 (1984), 387
- Fischgrund et al., J. Spinal Disorder 10 (1997), 467-472
- Henikoff & Henikoff, PNAS USA 89 (1992), 10915-10919
- Hollinger et al., J. Biomed. Mater. Res. 43 (1998), 356-364
- Katagiri et al., J. Cell. Biol. 127 (1994), 1755-66; erratum published in J. Cell. Biol. 128 (1995), 714
- Kingsley, Genes Dev. 8 (1994), 133-143
- Kübler et al., Dtsch. Zahnärztl. Z. 53 (1998), 834-843
- Kübler et al., Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie 1 (1997), 2-25
- Kübler et al., Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie 3 (Suppl. 1) (1999), 134-139
- Kübler & Urist, J. Craniomaxillofac. Surg. 19 (1991), 283-288
- Mach et al., Biochemistry 32, (1993), 5480-89
- Maniatis et al., Molecular Cloning (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press
- McDonald & Hendrickson, Cell 73 (1993), 421-24
- Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453
- Recombinant Gene Expression Protocols, ed. R. S. Tuan Methods in Molecular Biology 62 (1995), Humana Press, Totowa, New Jersey
- Reddi, Nature Biotechnol. 16 (1998), 247-52
- Ruppert et al., Eur. J. Biochem. 237 (1996), 295-302
- Shen et al., Eur. J. Biochem. 240 (1996), 252-261
- Stueber et al., EMBO J. 3 (1984), 3143-3148
- Wagner et al., J. Surg. Res. 66 (1996), 100-108
- Wang et al., PNAS 94 (1997), 1657-62
- Weigel et al., Eur. J. Biochem. 180 (1989), 295-300

WO 00/47736

PCT/EP00/00637

## 序列表

&lt;110&gt; Sebal, Walter

<120> Polypeptidvarianten mit erhöhter  
Heparin-Bindungsfähigkeit

&lt;130&gt; PCT1126-01996

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; DE 199 06 096.7

&lt;151&gt; 1999-02-13

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MUTAGEN

&lt;222&gt; (1)

&lt;223&gt; K, R oder H

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MUTAGEN

&lt;222&gt; (2)

&lt;223&gt; K, R oder H

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MUTAGEN

&lt;222&gt; (3)

&lt;223&gt; K, R, H oder keine Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MUTAGEN

&lt;222&gt; (4)

&lt;223&gt; kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MUTAGEN

&lt;222&gt; (5)

<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine  
Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MUTAGEN

&lt;222&gt; (6)

<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine  
Aminosäure

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Künstliche  
Sequenz

WO 00/47736

PCT/EP00/00637

<400> 1  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Künstliche  
Sequenz

<220>  
<221> MUTAGEN  
<222> (1)  
<223> K, R oder H

<220>  
<221> MUTAGEN  
<222> (2)  
<223> kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure

<220>  
<221> MUTAGEN  
<222> (3)  
<223> K, R oder H

<220>  
<221> MUTAGEN  
<222> (4)  
<223> kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure

<220>  
<221> MUTAGEN  
<222> (5)  
<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine  
Aminosäure

<220>  
<221> MUTAGEN  
<222> (6)  
<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine  
Aminosäure

<400> 2  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

WO 00/47736

PCT/EP00/00637

## Heparin-Bindungssequenz

&lt;400&gt; 3

Arg Lys Arg Ala  
1

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Heparin-Bindungssequenz

&lt;400&gt; 4

Arg Lys Arg Ala Lys His Lys Gln  
1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: T3

&lt;400&gt; 5

Met Ala Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Ala Arg Lys Arg Leu  
1 5 10 15Lys Ser Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val  
20 25 30Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr  
35 40 45Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr  
50 55 60Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile  
65 70 75 80Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu  
85 90 95Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met  
100 105 110Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg  
115 120

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

WO 00/47736

PCT/EP00/00637

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:T4

&lt;400&gt; 6

Met Ala Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Ala Lys His Lys Gln  
 1 5 10 15

Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp  
 20 25 30

Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr  
 35 40 45

His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His  
 50 55 60

Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val  
 65 70 75 80

Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala  
 85 90 95

Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn  
 100 105 110

Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg  
 115 120

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 374

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:T3  
 (Nukleinsäuresequenz)

&lt;400&gt; 7

ccatggctca agccaaacac aaacagcgga aacgcgctcg taaacgtctt aagtccagct 60  
 gtaagagaca ccctttgtac gtggacttca gtgacgtggg gtggaatgac tggattgtgg 120  
 ctcccccggt gtatcacgcc ttttactgcc acggagaatg cccttttcct ctggctgac 180  
 atctgaactc cactaatcat gccattgttc agacgttggg caactctgtt aactctaaga 240  
 ttocctaaggc atgctgtgtc ccgacagaac tcagtgttat ctgatgctg taccttgacg 300  
 agaatgaaaa gggtgtatta aagaactatc aggacatggt tgtggagggt tgtgggtgtc 360  
 gctagtaagg atcc 374

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 386

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: T4  
 (Nukleinsäuresequenz)

&lt;400&gt; 8

ccatggctca agccaaacac aaacagcgga aacgcgctaa gcataagcaa cgtaagcgctc 60

WO 00/47736

PCT/EP00/00637

```

ttaagtccag ctgtaagaga caccctttgt acgtggactt cagtgaagtg gggtggaatg 120
actggattgt ggctcccccg gggatcacg cttttactg ccacggagaa tggccttttc 180
ctctggctga tcatctgaac tccactaatc atgccattgt tcagacgttg gtcaactctg 240
ttaactctaa gattcctaag gcatgctgtg tcccgacaga actcagtgt atctcgatgc 300
tgtaccttga cgagaatgaa aaggttgat taaagaacta tcaggacatg gttgtggagg 360
gttgtgggtg tcgctagtaa ggatcc 386

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

&lt;400&gt; 9

```

catggctcaa gccaaacaca aacagcggaa acgcgctcgt aaacgtc 47

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

&lt;400&gt; 10

```

ttaagacgtt tacgagcgcg tttccgctgt ttgtgtttgg cttgagc 47

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 59

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

&lt;400&gt; 11

```

catggctcaa gccaaacaca aacagcggaa acgcgctaag cataagcaac gtaagcgtc 59

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 59

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

&lt;400&gt; 12

```

ttaagacgct tacgttgctt atgcttagcg cgtttccgct gtttgtgttt ggcttgagc 59

```

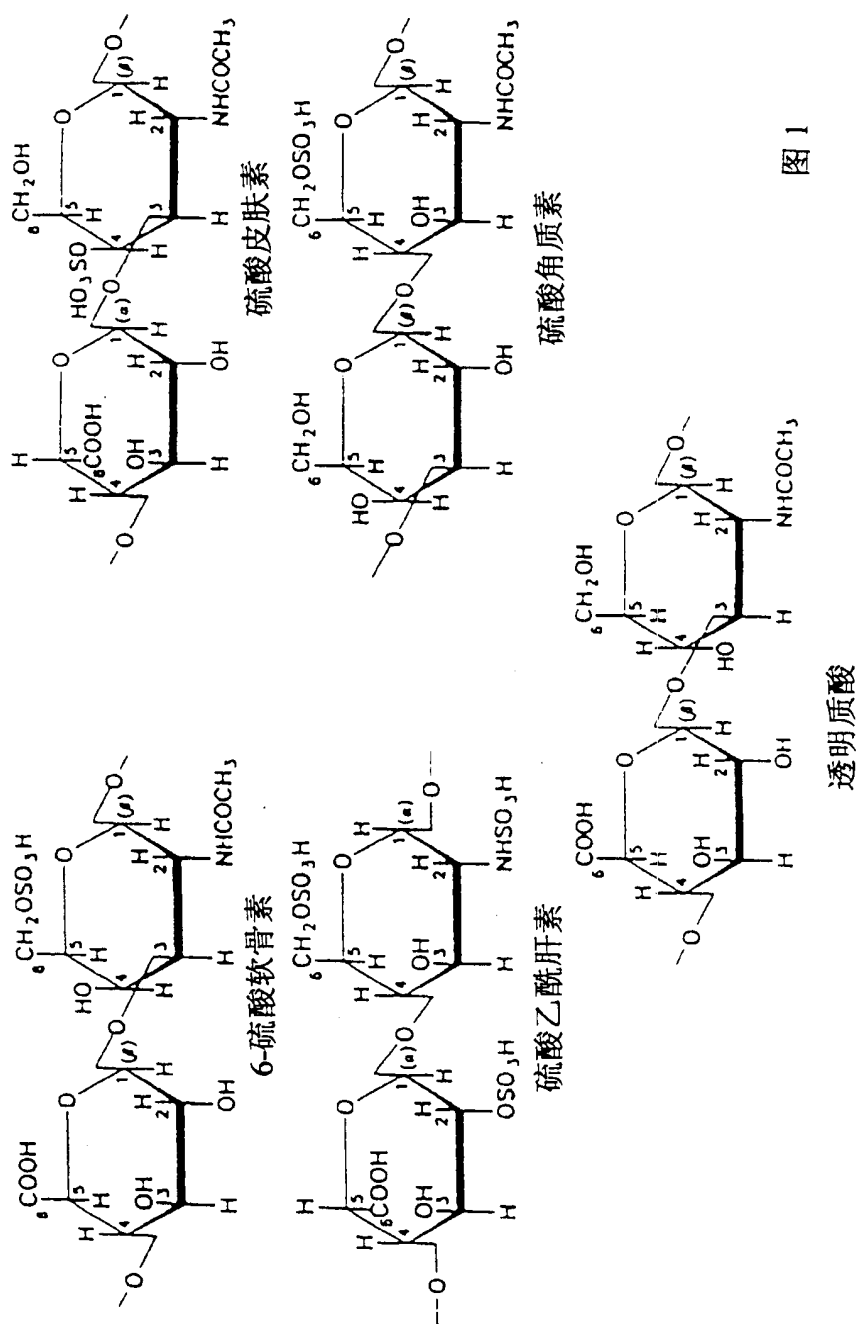


图 1

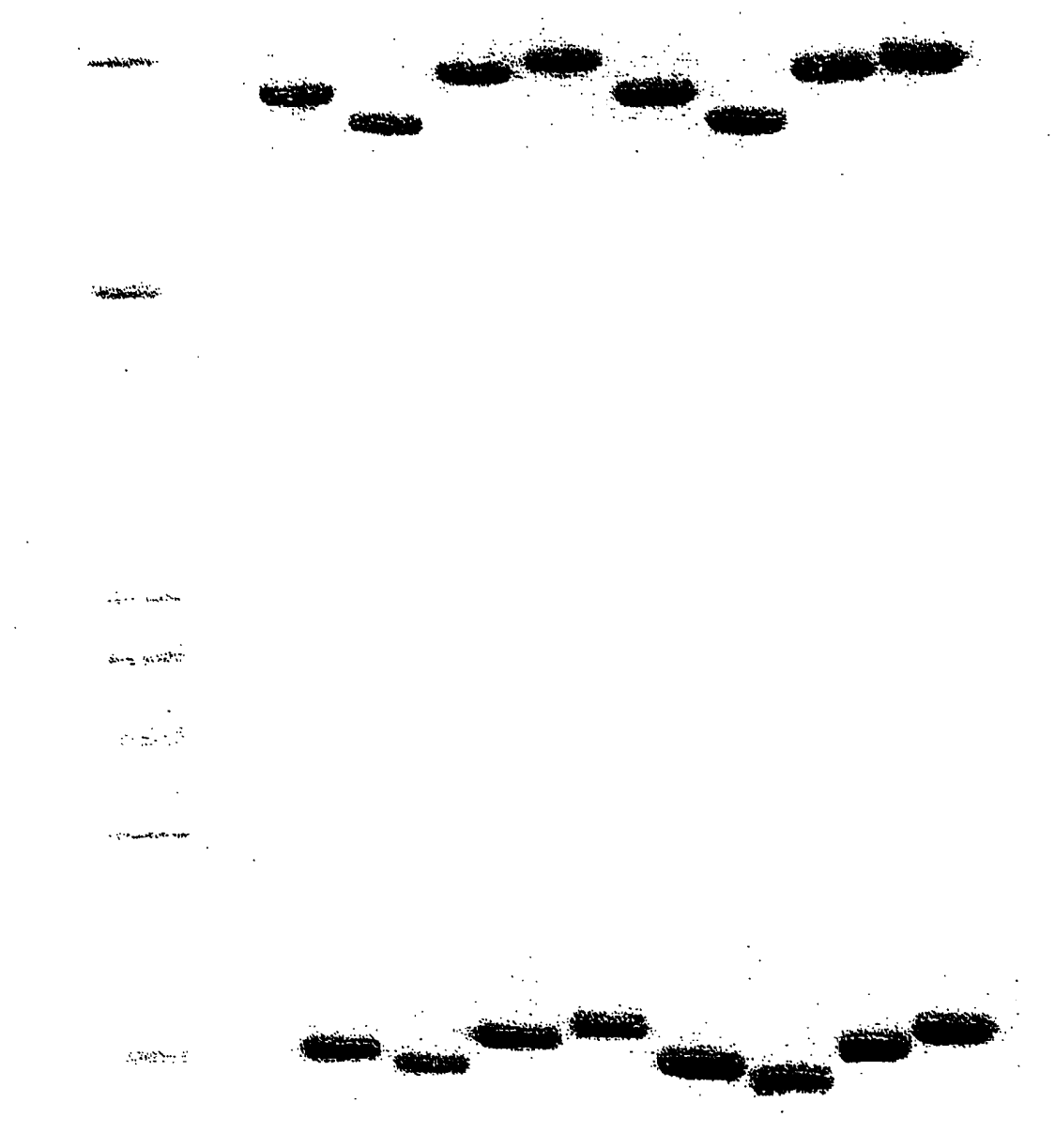


图 2

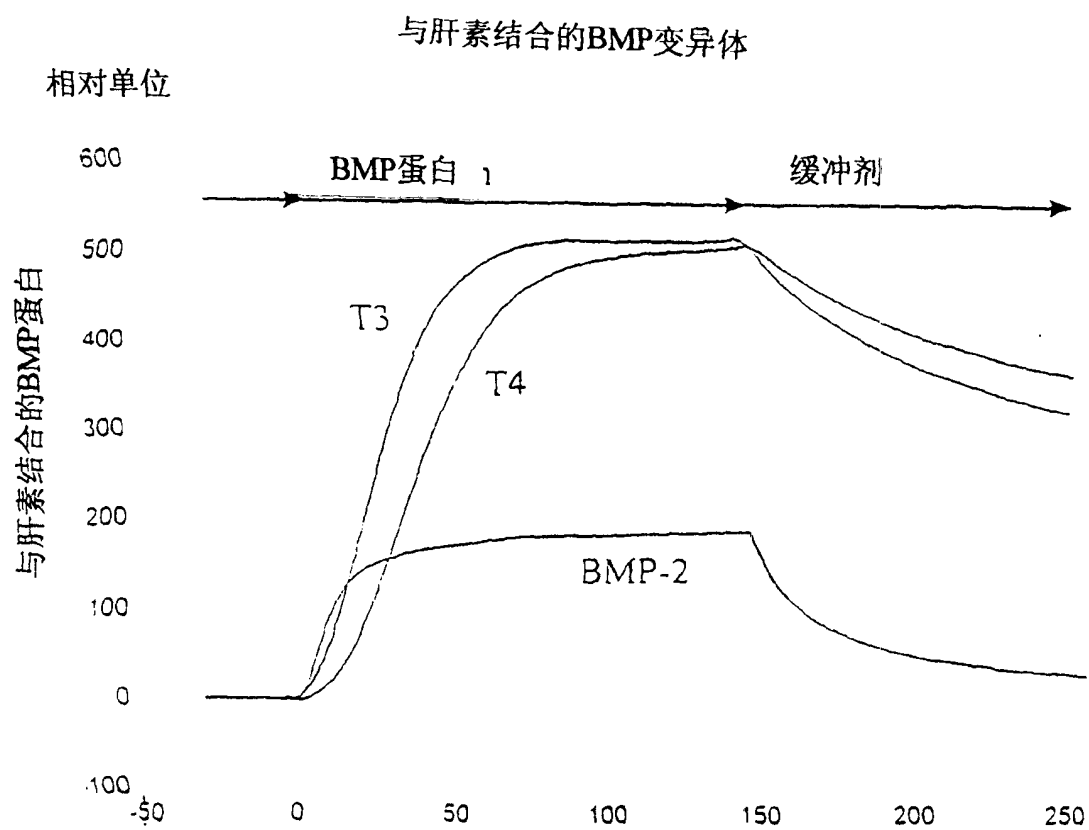


图 3

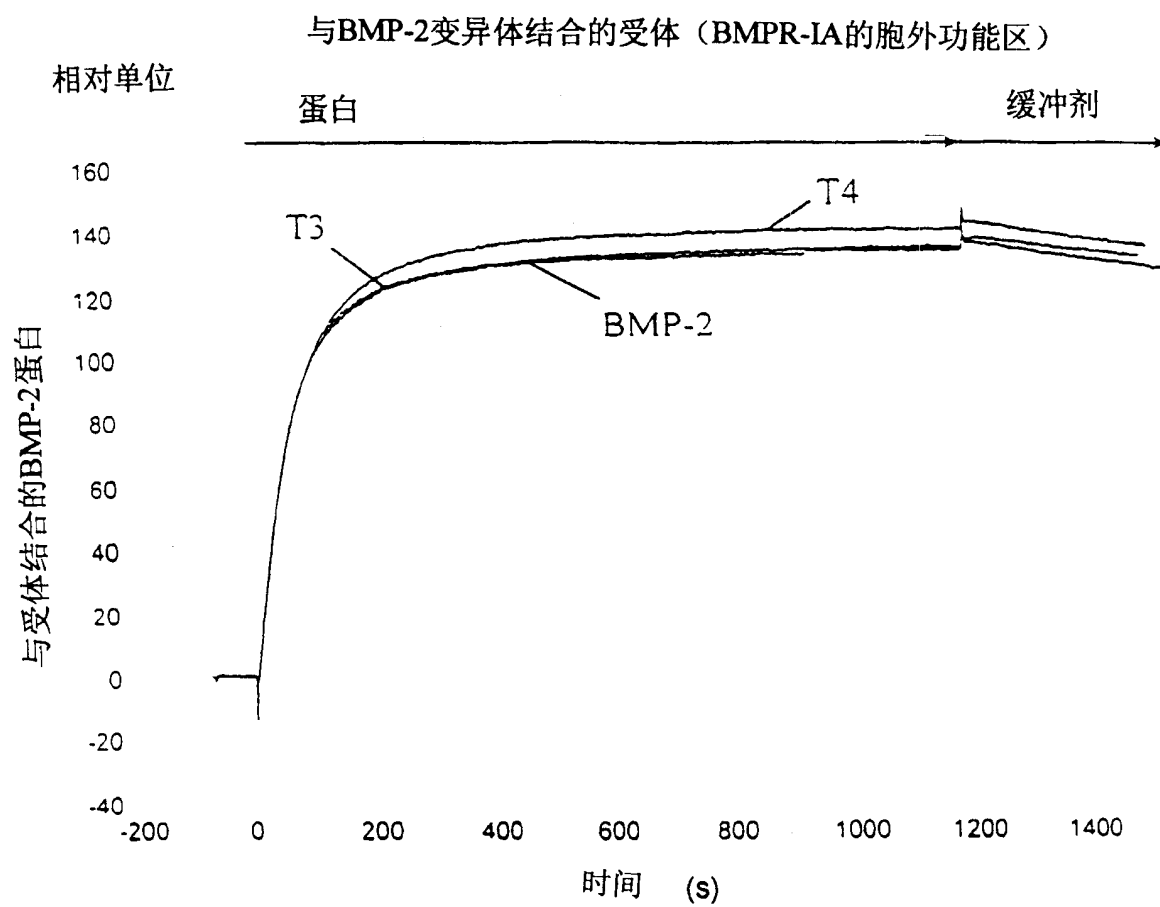
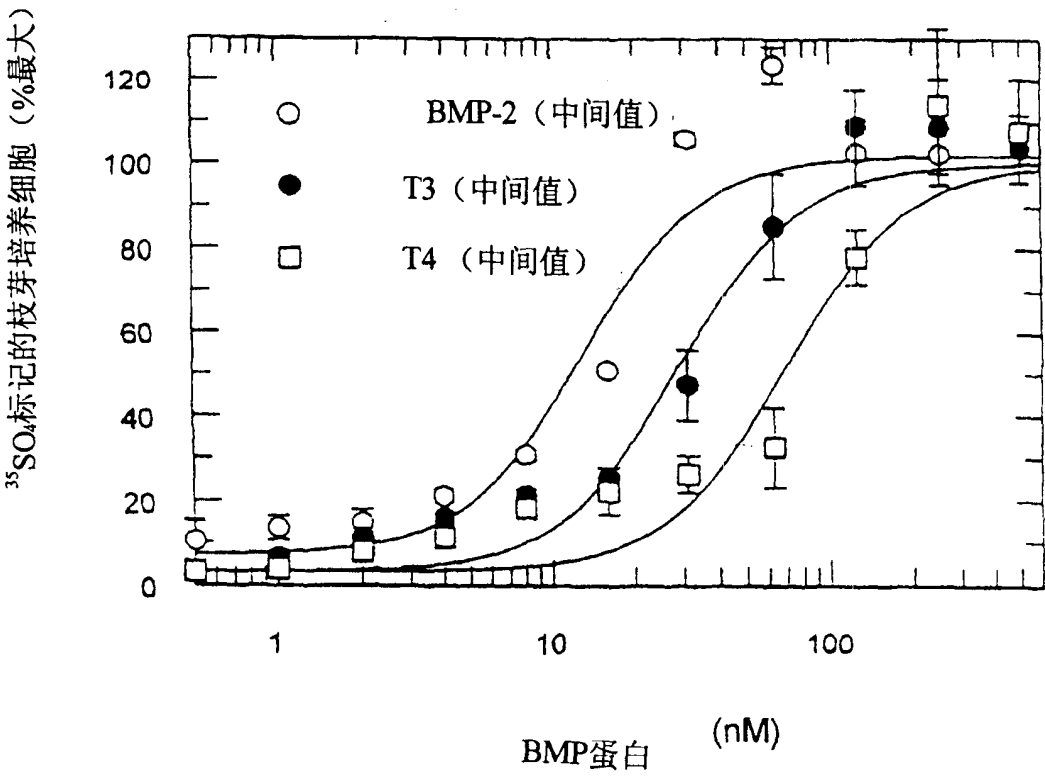
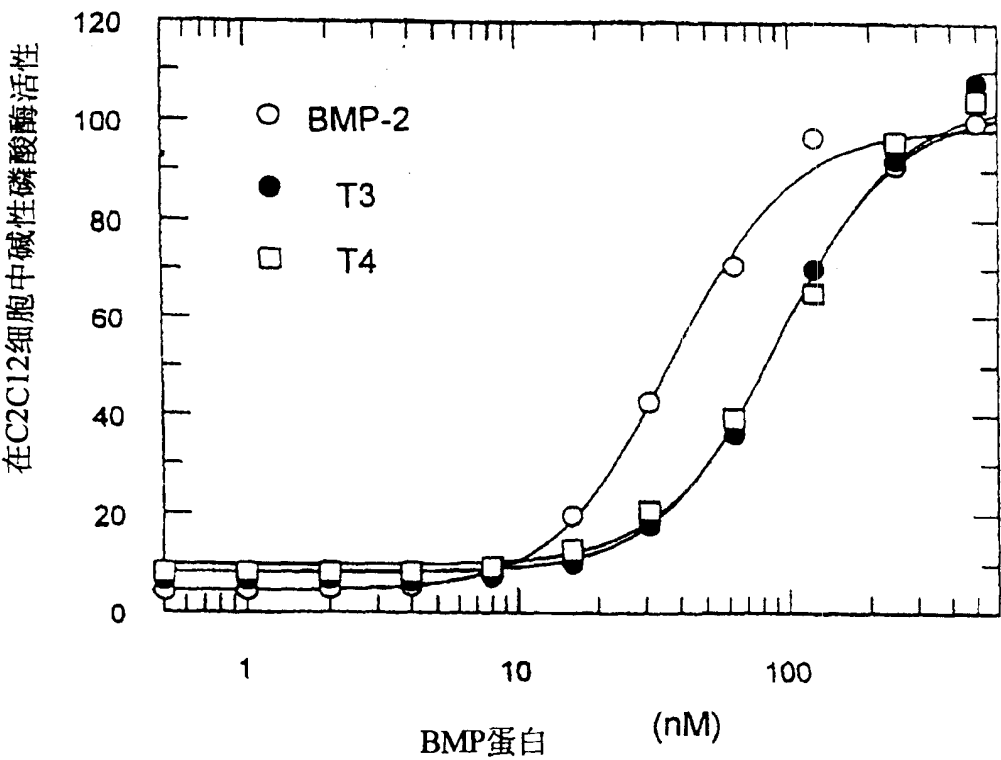


图 4



|           |       |    |    |
|-----------|-------|----|----|
|           | BMP-2 | T3 | T4 |
| EC50 (nM) | 13    | 29 | 69 |

图 5



|           |       |    |    |
|-----------|-------|----|----|
|           | BMP-2 | T3 | T4 |
| EC50 (nM) | 38    | 91 | 95 |

图 6



a

图 7



b



图 8

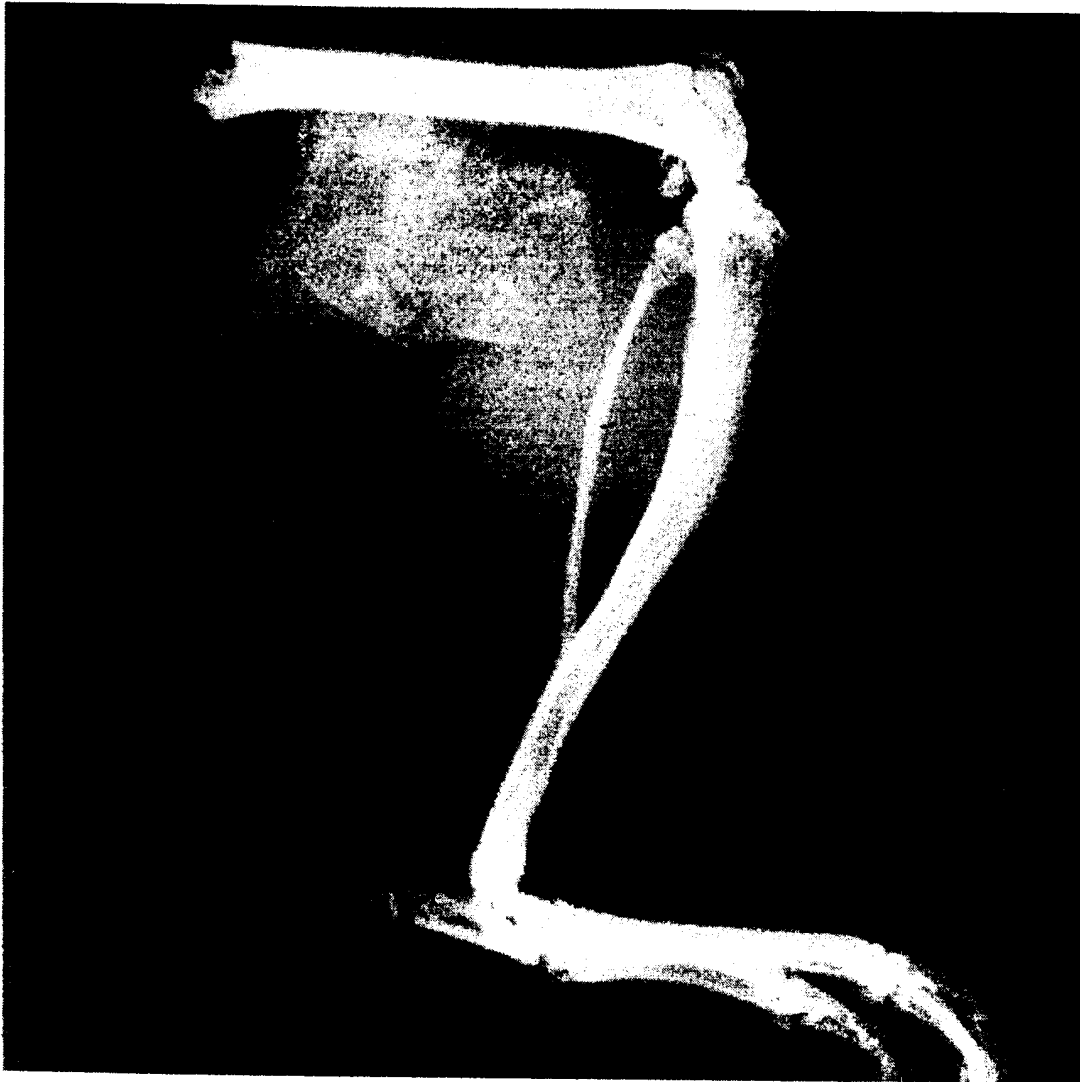


图 9

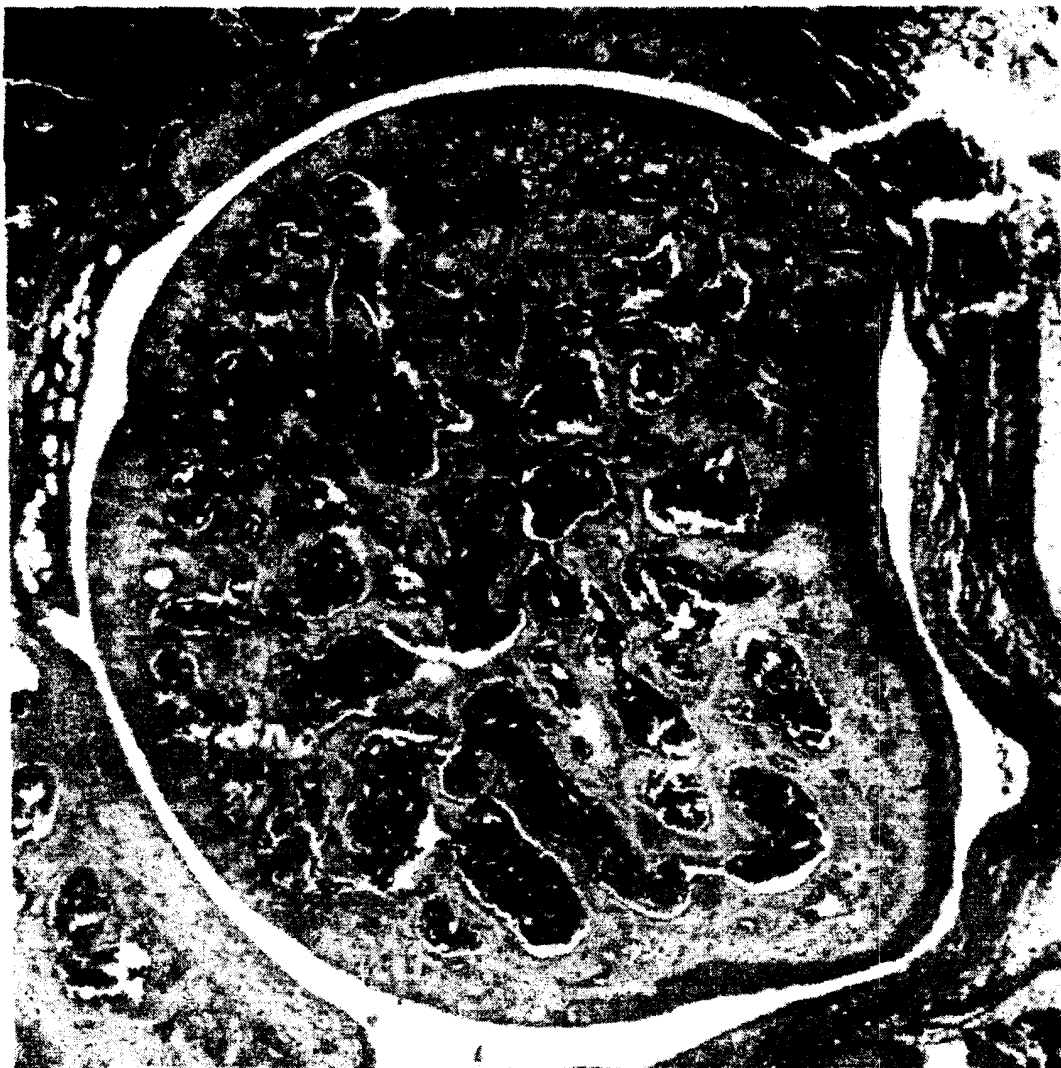


图 10