

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01815822.6

[51] Int. Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 100350971C

[22] 申请日 2001.7.18 [21] 申请号 01815822.6

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 19 [33] US [31] 60/219,300

[86] 国际申请 PCT/US2001/022641 2001.7.18

[87] 国际公布 WO2002/005836 英 2002.1.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.18

[73] 专利权人 奥索洛吉艾斯有限公司

地址 美国亚利桑那州

[72] 发明人 达芮尔·H·卡尼

罗杰·S·库劳泽尔

戴维·J·西蒙斯 杨金萍

威廉·R·雷丁

[56] 参考文献

WO8803151 1998.5.5

Thrombin peptide TP508 Induces differential geneexpression in fiborblasts through a nonproteolytic activationpathway. Sower L. E. et al. Exp. Cell. Res. ,Vol.247 No.2. 1999

审查员 吴文英

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 2 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

用凝血酶肽衍生物刺激骨生长

[57] 摘要

公开的是在需要骨诱导的患者中的位点中刺激骨生长的方法。该方法包括对该位点给予治疗有效量的非蛋白质水解激活的凝血酶受体的激动剂的步骤。

1. 包括氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5 的 23-氨基酸肽在制备在需要骨诱导的受试者中的位点中刺激骨生长的药品中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中所述的位点是需要骨移植的。
3. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中所述的位点是骨中的区段性裂隙, 在非联合的骨折中的骨空腔。
4. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中所述的多肽是药品中含有的可另外包括在可移植的, 可生物兼容的载体的药物组合物中的。
5. 根据权利要求 4 所述的应用, 其中所述的可植入的, 可生物兼容的载体是骨传导的基质。
6. 根据权利要求 4 所述的应用, 其中所述的载体包括聚乳酸/聚乙醇酸同聚物或共聚物。
7. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中所述的受试者是农场动物, 伴侣动物或实验室动物。
8. 一种药物组合物, 其包括可植入的, 可生物兼容的载体和 23 氨基酸肽, 该 23 氨基酸肽包括氨基酸序列 SEQ ID NO:5。
9. 根据权利要求 8 所述的药物组合物, 其中所述的载体是骨传导的。

10. 根据权利要求 8 所述的药物组合物，其中所述的载体是可注射的。
11. 根据权利要求 10 所述的药物组合物，其中所述的载体是聚(丙烯富马酸)溶液或磷酸钙陶瓷糊。
12. 根据权利要求 8 所述的药物组合物，其中所述的药物组合物是作为微球体给药的。
13. 根据权利要求 8 所述的药物组合物，其中所述的药物组合物是在应用到需要的骨诱导位点之前事先成形的。
14. 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:5 的 23-氨基酸肽在制备在受试者中需要骨移植的位点中刺激骨生长的药品中的应用。
15. 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:5 的 23-氨基酸肽在制备在受试者中，在区段性的骨裂隙，骨空腔或非联合的骨折中刺激骨生长的药品中的应用。

用凝血酶肽衍生物刺激骨生长

政府支持

本发明全部或部分是由国家健康研究院的 I R43 AR4550801 和 2 R44 AR45508-02 援助基金的资助。政府在本发明中有一定的权利。

相关的申请

本申请要求保护 2000 年 7 月 19 日递交的美国临时申请第 60/219,300 号的权益，其全部内容通过在此引证而合并于本文。

发明背景

哺乳动物骨组织具有明显的再生能力，从而修复损伤和其他缺陷处。例如，骨生长通常足以引起最简单的和细微的骨折完全恢复。但是，不幸的是，在许多损伤，缺陷或症状中，骨生长是不能恰如其分地获得可接受的结果的。例如，在大的空间，通常不发生骨再生。所以，骨折不能愈合，除非这些碎片是在近处。如果损伤的结果丢失了明显量的骨组织，愈合过程可能是不完全的，导致不如意的外观和/或机械的结果。这经常是非联合的骨折或来自大的创伤的骨损伤。组织生长通常在例如外科除去肿瘤或囊肿引起的骨中的空隙中也是不适当的。在其他情况中，可能需要刺激骨不正常的，即异位的生长。当两个或多个脊柱骨诱导融合时，脊柱融合释放更低的背部疼痛是一个需要的异位骨形成的例子。通常，裂隙和区段缺陷需要骨

移植来成功地修复或裂隙填充。开发有效的骨移植取代方法将消除在移植过程中从第二外科位点收获骨的需要，从而明显地减少患者经受的不舒服，和发生供体位点愈合综合症的危险。

在那些通常无法发生骨生长的未经处理的位点中刺激或诱导骨生长的化合物是“骨诱导”性的。骨诱导化合物作为处理如上所述的症状的药物具有巨大的价值。许多骨诱导蛋白质已经利用重组技术鉴定，分离和表达。例子包括在 WO95/16035 中的美国专利号 5,902,705 中公开的骨形态蛋白质(BMP)。但是，利用重组蛋白质作为治疗试剂通常具有许多缺点，包括生产的耗价，体内生物降解和短的半衰期。随后，科学家连续地研究没有前面提到的缺点的新的骨诱导试剂。

发明的概述

已经发现，激活非蛋白质凝血酶受体的化合物是骨诱导的。例如，化合物 TP508，非蛋白质水解凝血酶受体的激动剂刺激雄性新西兰兔子的尺骨中产生的区段性关键大小的缺陷处(实施例 2)。正如 X 衍射所示，和组织学和机械测试证明，在与未处理的对照比较时，剂量 100ug 和 200ug 的 TP508 诱导的骨形成中有明显的增加。根据这些结果，本文公开了受试者中刺激骨的生长的新方法和新的可移植药物组合物。

本发明的一个实施方案是在需要骨诱导的受试者中的位点中刺激骨生长的方法。该方法包括对该位点给药治疗有效量的非蛋白质水解激活的凝血酶受体的激动剂的步骤。

本发明的另一个实施方案是含有可移植的，可生物兼容的载体和非蛋白质水解激活的凝血酶受体的激动剂的药物组合物。

本发明的方法涉及在受试者中刺激骨生长，并且可以用于不发生骨生长，没有用自身骨移植治疗或给药骨生长因子的位点。该方法包括给药非蛋白质水解的凝血酶受体的激动剂。这样的激动剂包括与人的前凝血酶的氨基酸 508 到 530 之间的区段有同源性的肽。这些肽并不昂贵，可以大量制备，并且在低剂量时也是骨诱导的。另外，它们的冻干形式当在 5℃ 和 60 % 的相对湿度下，至少在 30 个月中是稳定的。

本发明的详细说明

“骨诱导”指如果位点保持未处理，在很少或没有骨生长的受试者中的位点刺激骨生长。可以从骨生长的诱导得到治疗益处的位点认为是“需要骨诱导的”。例子包括非联合性的骨折或其他严重的或大面积的骨损伤。应该注意到，骨生长通常发生在骨损伤的时候，如简单的或细微的骨折和只有小裂隙的对抗很好的复合骨折，不需要其他治疗。这样的损伤不认为是“需要骨诱导的”。

简单的骨折修复似乎是与填充非联合性的骨折，区段性裂隙或除去骨肿瘤或囊引起的骨空腔需要的骨形成的诱导是非常不一样的。这些情况中需要骨的移植或新的骨生长的诱导，通常利用了一些类型的基质或支架作为骨生长的替代物。已诱导的骨生长也可以在受试者中的一些位点具有治疗优势，这些位点指“异位”位点，其中通常没有发现骨组织，如需要骨移植或骨融合的位点。融合通常用于治疗通过物理地结合一个或几个椎骨和它们的四周来治疗的较低背疼痛。这样的融合产生的骨定位于通常不是骨组织占据的位点。在这些异位位点的骨诱导可作为“移植取代物”，从而在脊柱之间诱导骨生长，取代移植体的位置，避免了二次手术收集移植过程中的骨。骨生长的诱导也是治疗后天的和先天的 craniofacial 和其他骨骼或牙齿

畸形所需要的(参见, 例如, Glowacki et al., Lancet 1:959(1981)); 进行牙齿和牙周的再构建, 其中需要失去的骨的替代或骨的增大如颌骨; 补充牙周疾病产生的牙周骨的损失, 推迟落牙(参见例如, Sigurdsson et al., 牙周杂志, 66: 511(1995))。

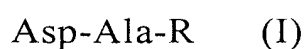
申请人已经发现, 刺激或激活非蛋白质水解激活的凝血酶受体的化合物(下文中称为“NPAR”)是骨诱导的。这样的化合物称为 NPAR 激动剂。NPAR 是大多数细胞表面上存在的高亲和力凝血酶受体。这一 NPAR 成分是负责凝血酶, 蛋白质水解激活的凝血酶和凝血酶派生的肽与细胞的高亲和力结合的。NPAR 似乎是介导不依赖它的蛋白质水解活性的凝血酶启动的许多细胞信号的。一个这样的信号的例子是膜联蛋白 V 和消减杂交鉴定的其他分子的上调(参见 Sower, et al., 实验细胞研究 247: 422(1999))。所以, NPAR 的特征是, 它在细胞表面与凝血酶有高亲和力反应, 并且它被凝血酶和如下所述的凝血酶派生的肽激动剂的蛋白质水解失活的衍生物激活。NPAR 激活可以根据当存在亚有丝分裂原浓度的凝血酶或激活蛋白质激酶 C 或与 ^{125}I 凝血酶高亲和力结合竞争凝血酶受体的分子时, 加到成纤维细胞中时刺激细胞的繁殖的能力来进行测试, 如美国专利号 5,352,664 和 5,500,412 和 Glenn et al., 肽研究杂志, 1: 65(1988)中所述。NPAR 是与其他凝血酶结合蛋白质和凝血酶的蛋白质水解激活受体的克隆家族, 包括 PAR1, PAR2, PAR3 和 PAR4 受体是有区别的。PAR1 具有特异的凝血酶裂解位点, 允许裂解凝血酶暴露新的氨基末端区, 作为在其自身回折诱导它的激活的黏连配体(参见, Vu et al., 细胞 64: 1057(1991))。PAR2 具有相似的激活机制, 但原则上是胰蛋白酶类似酶激活的(参见, Zhong, et al., 生物化学杂志, 267: 16975(1992))。PAR3 也具有相似的激活机制, 并且似乎是作为血小板中的第二个凝血酶受体起作用的(参见, Ishihara, et al., 自然 386: 502(1997))。PAR4

已经在小鼠巨核细胞中检测，研究表明，它也在人血小板中起作用(参见，Kahn, et al., 自然, 394: 690(1998))。与这些 PAR 受体相反，NPAR 的激活不需要蛋白质水解的裂解。

几个证据表明，NPAR 是与 PAR 受体不同的：

(1) 细胞的群体已经分离，完全表达了功能性 PAR1 受体，但由于在 NPAR 信号转导途径中有缺陷，所以对凝血酶没有应答(参见，Kim, et al., 细胞生理学, 160: 573(1994)); (2) 嗜中性粒细胞以高亲和力结合 ^{125}I 凝血酶，它们的趋化性是受蛋白质水解激活的凝血酶或 NPAR 激动剂刺激的(参见，Ramakrishnan 和 Carney, 细胞分子生物学 4: 1993(1993))，但是它们不表达 PAR1(参见 Jenkins, et al., 细胞科学杂志, 108: 3059(1995)); (3) IIC9 成纤维细胞过度表达 PAR1，但不以高亲和力结合凝血酶(参见，Kim, D. Ph. D. Dissertation. Galveston, Texas 大学医学分院, 1995; 和 Low et al., “癌症细胞 3/生长因子和转化”，冷泉港实验室，纽约); 和(4) NPAR 激动剂对来自 PAR 受体激动剂肽的那些的基因表达有明显的影响(参见，Sower, et al., 实验细胞研究 247: 422(1999))。

NPAR 激动剂的一个例子是凝血酶肽衍生物，即不超过约 50 个氨基酸，优选地不超过约 30 个氨基酸，与对应于前凝血酶氨基酸 508 - 530(SEQ ID NO:5)的人凝血酶具有足够的同一性能激活 NPAR 的多肽。本文所述的凝血酶肽衍生物优选地具有 12 - 23 个氨基酸，更优选地具有 19 - 23 个氨基酸，凝血酶肽衍生物的一个例子包括结构式(I)代表的成分：



R 是丝氨酸酯酶保守区域。丝氨酸酯酶，例如胰蛋白酶，凝血酶胰凝乳蛋白酶等等，具有高度保守的区域。“丝氨酸酯酶保守区域”指，具有一个这样的保守区域的氨基酸序列，并且足以与一个这样的保守区域同源，使凝血酶肽衍生物保留了 NPAR 激活能力的多肽。

在一个实施方案中，丝氨酸保守序列具有 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列(Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val)或具有 SEQ ID NO: 1 中的氨基酸序列的多肽的 C 末端截断的片段。但是，应该理解，在丝氨酸保守序列中的 0, 1, 2 或 3 个氨基酸可以与 SEQ ID NO: 1 的对应的氨基酸相区别。优选地，与对应的 SEQ ID NO: 1 中的氨基酸不同的丝氨酸保守序列中的氨基酸是保守的取代，并且更优选地是高度保守的取代。“C 末端截断的片段”指在从 C 末端除去一个氨基酸或氨基酸的组后剩余的一个片段，所述的片段至少具有 6 个，更优选地至少 9 个氨基酸。

更优选地，丝氨酸酯酶保守序列具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列(Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val; X₁ 是 Glu 或 Gln, X₂ 是 Phe, Met, Leu, His 或 Val)，或其 C 末端截断的片段至少具有 6 个氨基酸，优选地至少具有 9 个氨基酸。

在优选的实施方案中，凝血酶肽衍生物包括一个丝氨酸酯酶保守序列和一个具有特异凝血酶氨基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala(SEQ ID NO:3)的多肽。这一类型的凝血酶肽衍生物的一个例子包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val(SEQ ID NO:4)。X₁ 和 X₂ 如上定义。当凝血酶肽衍生物包括 SEQ ID NO: 4 时，优选地它具有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列(Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val)，或其 N 末端截断的片段，

假设凝血酶肽衍生物位置 1-9 中的 0, 1, 2 或 3 个氨基酸与 SEQ ID NO: 5 的对应的位置的氨基酸不同。优选地, 与 SEQ ID NO: 5 中的对应的氨基酸不同的凝血酶肽的衍生物中的氨基酸是保守取代, 更优选地是高度保守的取代。“N 末端截断的片段”指在从 N 末端除去一个氨基酸或氨基酸的组后剩余的片段, 优选地是不超过 6 个氨基酸的组, 更优选地是不超过 3 个氨基酸的组。

TP508 是凝血酶肽衍生物的例子, 并且具有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。

“保守取代”是用具有相同的静电荷和大约同样大小和形状的另一氨基酸取代。当在它们的侧链中的碳数目和杂合原子的区别不超过约 4 个, 具有脂肪族或取代脂肪族氨基酸侧链的氨基酸具有大约相同的大小。当它们的侧链中的分支的数目的区别不超过一个时, 它们约具有相同的形状。在它们的侧链中的具有酚或取代酚基团的氨基酸认为约具有相同的大小和形状。下面列出的是 5 个氨基酸组。用来自相同组的另一个氨基酸取代多肽中的一个氨基酸产生了保守取代:

组 1: 甘氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 异亮氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 半胱氨酸, 和具有 $C_1 - C_4$ 脂肪族的或 $C_1 - C_4$ 羟基取代的脂肪族侧链(直链或单分支)的非天然存在的氨基酸。

组 2: 谷氨酸, 天冬氨酸和具有羧基取代 $C_1 - C_4$ 脂肪族侧链(未分支或一个分支点)的非天然存在的氨基酸。

组 III: 赖氨酸, 鸟氨酸, 精氨酸和具有胺或胍基取代 $C_1 - C_4$ 脂肪族侧链(未分支或一个分支点)的非天然存在的氨基酸。

组 IV: 谷氨酸, 天冬氨酸和具有酰胺取代的 $C_1 - C_4$ 脂肪族侧链(未分支或一个分支点)的非天然存在的氨基酸。

组 V: 苯丙氨酸, 苯基甘氨酸, 酪氨酸和色氨酸。

“高度保守的取代”是用在侧链中的和大小和形状接近的相同功能的基团的另一个氨基酸取代。有脂肪族或取代脂肪族氨基酸侧链的氨基酸当侧链中的碳和杂合原子的总数的差别不超过两个时, 它们的大小几乎相同。当在它们的侧链中, 它们具有相同数目的分支时, 它们具有相近的形状。高度保守的取代的例子包括, 缬氨酸取代亮氨酸, 苏氨酸取代丝氨酸, 天冬氨酸取代谷氨酸, 苯丙甘氨酸取代苯丙氨酸。不高度保守的取代的例子包括丙氨酸取代缬氨酸, 丙氨酸取代丝氨酸和天冬氨酸取代丝氨酸。

其他 NPAR 激动剂包括结合和激活 NPAR 的小的有机分子。这一类型的激动剂通常可以用高流量筛选, 例如, 评估当存在亚有丝分裂原浓度的凝血酶或激活蛋白质激酶 C 的分子时, 加到成纤维细胞中时分子刺激细胞繁殖的能力的实验来鉴定, 如美国专利号, 5,352,664 和 5,500,412 中所公开的。美国专利号 5,352,664 和 5,500,412 的全部内容都通过在此引述而合并于本文。

术语“NPAR 激动剂”也包括已知激活 NPAR 的化合物和化合物的结合体。例子公开在美国专利号, 5,352,664 和 5,500,412 中, 包括 DIP - α 凝血酶与乙酸肉豆蔻佛波醇的结合体。

用于本文所述的药物组合物的可移植生物兼容载体可作为 NPAR 激动剂的适当的递送或支持系统。生物兼容载体应该非毒性的, 非炎性的, 非免疫原性的, 在移植位点可避免不需要

的反应的。适当的载体用于释放活性成分，优选地是在移植位点慢慢地，持续的释放。

适当的载体包括多孔的基质，其中骨祖先细胞可以迁移。成骨细胞经常可以附着于这样的多孔基质，然后可以作为骨和组织生长的支架。在一些申请中，载体应该具有足够的机械强度以维持它的三维结构，和辅助正在联合或移植到一起的骨的部分的固定。提供组织生长的支架的多孔基质可以加速骨的生长速度，可以说是“骨诱导性的”。骨传导载体用于本文所述的药物组合物中是非常优选的。

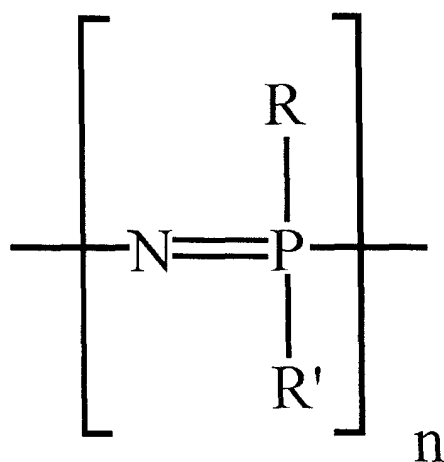
适当的骨传导载体的例子包括胶原(例如，小牛皮胶原)，纤维蛋白，磷酸钙神经酰胺(例如，羟磷灰石和磷酸三钙)，硫酸钙，胍萃取的异种骨和其联合。许多适当的载体是可以购买得到的，如 COLLOGRAFT(Collagen Corporation, Palo Alto, CA)，是羟磷灰石，磷酸三钙和原纤维胶原的混合物，和 INTERPORE(Interpore International, Irvine CA)，是羟磷灰石生物基质(是海洋核心碳酸钙转化成结晶的羟磷灰石而形成的)。

许多合成的生物降解多聚物可以作为骨传导的载体，具有持续释放的特征。这些多聚物的说明可以在 Behravesch et al., Clinical Orthopaedics 367:S118(1999)，和 Lichun et al., “将来的控制药物递送的设计技术”中的骨生长因子的多聚体递送载体，Park and Mrsny 编辑，美国化学协会，华盛顿，DC(2000)中找到。这些参考文献的全部内容都通过在此引述而合并于本文。这些多聚物的例子包括聚 α 羟基酯，如聚乳酸/聚乙醇酸同聚物和共聚物，PPHOS，聚酸酐和聚(丙烯富马酸)。

聚乳酸/聚乙醇酸(PLGA)同聚物和共聚物是本领域已知的持续释放的载体。释放的速度可以通过技术人员改变聚乳酸与聚

乙醇酸的比例和多聚物的分子量来调整(参见, Anderson, et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 28:5(1997), 其全部内容都通过在此引述而合并于本文)。将聚(乙二醇)作为混合体掺入多聚物形成微型颗粒载体另外允许改变活性成分的释放方案(参见, Cleek et al., 控制释放杂志, 48: 259(1997), 其全部内容都通过在此引述而合并于本文)。陶瓷, 如磷酸钙和羟磷灰石也可以掺入配方提高机械质量。

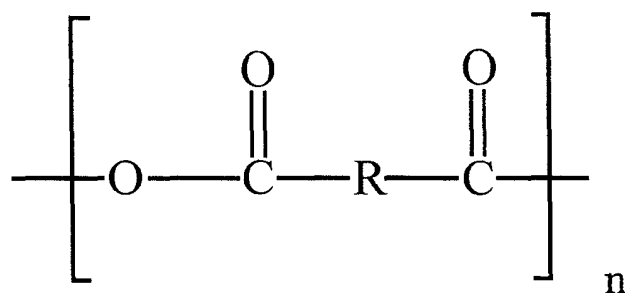
PPHOS 多聚物在多聚物骨架中含有替代的氮和没有碳的磷, 如下面的结构式(II)所示:



(II)

多聚物的特性可以通过适当改变与多聚物骨架结合的侧链基团 R 和 R' 来调整。例如, 通过 PPHOS 降解和释放药物可以通过改变对水解不稳定的侧链基团的量来控制。咪唑基和乙二醇取代的 PPHOS 的更多的掺入后, 可以观察到降解速度的增加(参见 Laurencin et al., J Biomed Mater. Res. 27: 963(1993), 其全部内容都通过在此引述而合并于本文), 从而增加了药物释放的速度。

结构通式(III)所示的聚酸酐具有已经确定的降解和释放特性，可以通过改变疏水或亲水单体如癸二酸和 1,3-双(p-羧氧苯氧基)丙烷(参见 Leong et al., J.Biomed. Mater. Res. 19:941(1985)，其全部内容引入作为参考)。为了改变机械强度，酸酐经常与酰胺共聚化形成聚酸酐共酰胺。适用于外科应用的聚酸酐共酰胺的例子是聚(苯三亚氨-甘氨酸-共-1,6-双(羧氧苯氧基)己烷和焦苯三亚氨丙氨酸: 1,6-双(p-羧氧苯氧基)己烷共聚物。



(III)

聚丙烷富马酸(PPF)是非常需要的生物兼容可移植载体，因为它们是可注射的，原位可聚合的，可生物降解的物质。“可注射”指物质可以通过针筒，通过用于注射糊和凝胶的标准的标准的针来注射。PPF，结合了乙烯基单体(N-乙烯吡咯烷酮)和起始物(苄甲酰过氧化物)，形成了可以原位聚合的可注射溶液。特别适于填充多种大小和形状的骨骼缺陷(参见 Suggs et al., 大分子 30: 4318(1997), Peter et al., J.Biomater. Sci. Poly .Ed. 10: 363(1999)和 Yaszemski et al., Tissue Eng. 1:41(1995)，其全部内容都通过在此引述而合并于本文)。

本发明的药物组合物可以通过在需要骨诱导的位点移植给药。“移植”或“在一个位点给药”指，当 NPAR 激动剂从药物组合物中释放时，在需要治疗的位点的足够的附近从而使发生骨诱导(例如，在存在 NPAR 激动剂时有骨生长，没有时少而没有生长)。

药物组合物可以如需要在外科手术的参与下构型，或由外科手术过程中的技术人员构型。优选地，将基质构型成跨越组织缺陷处，和采取需要的新的组织的形式。例如，在非联合缺陷的骨的修复的情况中，利用跨越非联合缺陷的维向是需要的。在骨形成过程中，物质是通过人体慢慢吸收的，并且是由非常接近移植体形状的骨来替代的。或者，药物组合物可以在该位点中以微颗粒或微球体的形式给药。微颗粒可以通过外科暴露该位点与需要骨诱导的位点接触或放置在该位点的附近，和将微颗粒通过涂抹，喷洒，注射等等施加到该位点上或其附近。微颗粒也可以通过内部手术或剖开术递送到位点。PLGA 微颗粒的制备和它们刺激骨生长的用途在实施例 1 和 2 中有叙述。

仍然在另一个或选方案中，药物组合物可以部分地内限在支持性的物理结构中，如网，线基质，不锈钢笼中，线的内体融合笼等等，然后在对需要骨诱导的位点给药。

应用本发明的药物组合物的另一个或选方法是注射。可注射的组合物包括如上所述的聚(丙烯富马酸)共聚物的溶液和磷酸钙陶瓷的糊(参见 Schmitz et al., J.Oral Maxillofacial Surgery 57:1122(1999)，其全部内容都通过在此引述而合并于本文)。可注射的组合物可以直接注射到需要骨诱导的位点，并且可以常规地用于填充空隙和融合骨，而不需要侵入性的外科。

NPAR 激动剂也可以通过移植的方法给药，例如将包含可接受的药物载体中的 NPAR 激动剂的溶液直接应用到位点或其附近。溶液的给药可以常规地通过针筒，通过外科打开或通过肠胃外给药到需要的位点来完成。可以利用标准的药物配方技术如 Remington 药物科学中所述的，Mack 出版社，Easton, PA。适当的肠胃外给药的药物载体包括例如，无菌水，生理盐水，

无菌盐水(含有约 0.9%mg/ml 的苄甲醇的盐水),磷酸缓冲盐,Hank 溶液, Ringer 乳酸盐等等。

“治疗有效量”是导致骨生长的 NPAR 激动剂的量,其中在没有激动剂时只有少的或没有骨的生长。通常,给药激动剂足够的时期,达到需要的治疗或外观效果,即,足够的骨生长。给药的量将依赖于需要的骨生长的量,受试者的健康,大小,体重,年龄和性别,和药物配方的释放特征。通常,通过连续释放或直接应用到需要骨生长的位点给药约 1ug/day 到约 1mg/day NPAR 激动剂之间(优选地约 5ug/day 和约 100ug/day)。

NPAR 激动剂或本发明的可移植的药物组合物可以用于与可移植的假器官装置结合使用。例如,治疗有效量的药物组合物可以放置于假器官移植体上,它们放置在可植入的表面区上,与需要骨诱导的位点邻接。或者,构建假器官装置,使其能够以预定的速度连续地释放可移植的药物组合物或 NPAR 激动剂。修复可以通过包含金属或陶瓷的物质来进行。修复装置的例子包括髌骨装置,螺旋,杆和钛的笼,可用于脊柱的融合。

所以,本发明也提供了在受试者的需要骨诱导的位点植入假器官装置来刺激骨生长的方法。假器官至少是部分地用可植入的如本文所述的药物组合物包衣,并且可植入在需要骨诱导的位点,和在该位点维持足够的时期,允许刺激骨的生长。

“受试者”优选地是人,但也可以是需要治疗的动物,如伴侣动物(例如,狗,猫等等),农场动物(例如,牛,猪,马等等),和实验室动物(例如,大鼠,小鼠,豚鼠等等)。

凝血酶肽衍生物可以通过固相肽合成方法(例如,BOC 或 FMOC),通过液相合成,或其他适当的技术包括前面提到的方

法的结合来合成。BOC 和 FMOC 方法是已确立和广泛使用的，在下面的文献中有叙述，Merrifield, J.Am.Chem.Soc. 88:2149(1963); Meienhofer, 激素蛋白质和肽，C.H.Li, Ed., 学术出版社, 1983, 48 - 267 页; 和 Barany and Merrifield, 肽，E.Gross 和 J. Meienhofer, Eds., 学术出版社，纽约，1980, 3 - 285。固相肽合成的方法在下面的文献中有叙述：Merrifield, R.B., 科学, 232: 341(1986); Carpino, L.A. and Han, G.Y., J. Org. Chem., 37: 3404(1972); 和 Gauspohl, H. et al., 合成, 5: 315(1992)。这六篇文章的全部内容都通过在此引述而合并于本文。

本发明通过下面的实施例进一步说明，但不以任何方式来加以限制。

实施例

实施例 1 - 制备 TP508 的聚乳酸/聚乙醇酸共聚物微球体

利用双乳化技术制备含有 TP508 的聚乳酸/聚乙醇酸共聚物的微球体(PLGA)。简要地说，在二氯甲烷中溶解基质成分，在水中溶解 TP508。当涡旋形成油中水(W/O)乳液时，将两者逐步混合在一起。聚乙烯醇(水中 3%)加入到乳液中，进一步涡旋形成二次乳液(O/W)，从而形成双乳液：PLGA 小滴组成的和在那些小滴内组成的 O/W，第二分散相包括水中的 TP508。在相分离的基础上，PLGA 小滴形成形成含有持有 TP508 的腔的分散的微球体。为了引起微球体的相分离，加入 2% 的异丙醇溶液。通过离心收集颗粒，然后冻干除去残留的水分。可以改变基质的组成形成不同释放动力学的微球体(表 1)。

表 1: 不同的微球体配方的组合物

配方	PLA: PGA	多聚物	% TP508	% 聚乙二醇
A	50: 50	46,700	5	0
B	50: 50	7,200	5	0
C	50: 50	46,700	5	5
D	50: 50	46,700	5	0
E	75: 25	120,000	5	0

在 Coulter 计数器中测量微球体的平均直径, 通过在 276nm 的光谱测试测量药物的陷入效率, 接着在二氯甲烷中溶解已称重的微球体样品, 和在水中萃取释放的药物(表 2)。

表 2: 配方直径和药物包陷效率

配方	直径, UM	TP508 包埋, %
A	26.0	53.8
B	16.2	27.1
C	17.6	58.9
D	23.9	42.6
E	25.8	36.2

为了测量从不同的 PLGA 基质中释放 TP508, 将 20mg 微球体放置于在 1.5ml 的聚丙烯微型离心管中的 1.0ml 的 PBS 中。在 37°C 温育试管和在 60rpm 振摇。在各个时间, 离心试管, 并且除去含有释放的 TP508 的上清液, 冷冻, 随后分析。在微球体中加入新鲜的 PBS, 和连续地温育。在 276nm 处观察吸光值

测量上清液中的 TP508。对于每个配方，进行四分的释放测定。在 37℃，38 天的温育过程中，配方 B 和 D 没有显示可检测的药物释放。虽然在所有的情况中，药物释放的量在 3-4 天内落在可检测的限制范围以外(<1ug/mg 基质/天)，但剩余的配方都释放了可检测的 TP508 的量。配方 A 和 C 显示，更大的 TP508 的释放，在 3-4 天内释放了 60-80% 的包陷的药物。选择更快释放动力学的配方 C 进一步在体内研究中进行测试。

实施例 2 - 含有 TP508 的 PLGA 微球体诱导兔子 尺骨中的大的缺陷(1.5cm)中的骨形成配方

在 20 个雄性新西兰兔子的每个尺骨中产生 1.5cm 的区段性缺陷。这些双侧的尺骨术准确地产生相同的大小是通过利用小的金属尺指导丁字锯子的切割刀片来进行的。每个兔子可作为自身的对照；所以用不含有 TP508 的微球体填充左侧的缺陷处，而用含有 100 或 200ug TP508 的微球体填充右侧缺陷处(10 个动物/组)。如实施例 1 所述制备微球体。将给予双侧尺骨术的兔子任意分成两组。第一组在右侧的肢体中接受 100ug 的微球体(30mg)中的 TP508，左侧的肢体中只接受微球体。同样处理第二组，但接受了 200ug 的 TP508。以不同的比例混合含有 TP508 和没有 TP508 的微球体获得不同的剂量。以两星期的间隔，在第 3 个星期开始，将动物进行 X 衍射，在第 9 个星期时杀死动物。

在外科手术后的 3 和 5 个星期时，在缺陷处，100ug 的 TP508 刺激矿质化。在第 7 和 9 个星期时的 X 衍射似乎是和第 5 个星期时得到的那些是一样的。在外科手术后第 9 个星期，杀死动物，除去尺桡骨，并且拍照。在大多数情况中，在对照的肢体中的尺骨中大的缺陷仍然是可见的。相反在 TP508 处理的肢体中，大多数缺陷已经成功地关闭。

在外科手术后第 9 个星期时杀死动物后，通过扭转测试测量修复的强度(利用了 MTS - 858Minibionix 机器)。结果表示在表 3 和 4。

表 3: 用 100ug TP508 处理的区段性缺陷处的扭转测试

参数	对照	SEM	TP508, 100ug	SEM
最终的转矩	0.107	0.034	0.255+	0.041
失败的转矩	0.103	0.032	0.239+	0.042
最终的能量	0.815	0.365	1.916^	0.398
失败的能量	0.940	0.436	2.604^	0.421
坚硬系数	0.013	0.004	0.028^	0.006

^p<0.05, +p<0/01

表 4: 用 200ug 的 TP508 处理的区段性缺陷处的扭转测试

参数	对照	SEM	TP508, 200ug	SEM
最终的转矩	0.095	0.042	0.322*	0.046
失败的转矩	0.093	0.041	0.306*	0.046
最终的能量	0.534	0.355	2.947*	0.543
失败的能量	0.641	0.374	3.433*	0.701
坚硬系数	0.016	0.006	0.033^	0.004

在 100ug 的组中，如所有测试的参数测量的，TP508 使愈合的缺陷处的机械强度增加了双倍以上(表 3)。在 200ug 的组中注意到了甚至更强的修复(表 4)，大多数参数大约比低剂量处理的组中看到的高约 50%。

概要地说，用含有 NPAR 激动剂 TP508 的微球体处理尺骨骨手术表明有骨矿质化和生长的证据，而在大多数接受骨传导的微球体的对照骨手术中，没有骨生长和/或没有填充空缺的区域。对机械强度和坚硬度的机械测试证明了在这一模型中 TP508 对骨形成的明显效果。因为 TP508 诱导了这些位点中没有 TP508 时不发生的骨形成，这一骨诱导的发现是与前面的研究不同的，其中 TP508 加快了没有 TP508 时也愈合的骨折或小的裂隙缺陷处的正常的骨折愈合的速度。

本发明已经根据优选的实施方案被描述和显示了，本领域技术人员应该理解，在不脱离权利要求界定的本发明范围的情况下，可以有各种形式和细节中的变化。

序 列 表

<110> 德克萨斯系统大学董事会

达芮尔·H·卡尼

罗杰·S·库劳泽尔

戴维·J·西蒙斯

杨金萍

威廉·R·雷丁

<120> 用凝血酶肽衍生物刺激骨生长

<130> 3033.1002003

<140> PCT/US01/22641

<141> 2001-07-18

<150> US 60/219,300

<151> 2000-07-19

<160> 5

<170> FastSEQ 的 Windows 4.0 版

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类凝血素片段

<400> 1

Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类凝血素片段

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = Glu or Gln

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Phe, Met, Leu, His or Val

<400> 2

Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val

1 5 10

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类凝血素片段

<400> 3

Arg Gly Asp Ala

1

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类凝血素片段

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Glu or Gln

<221> VARIANT

<222> 13

<223> Xaa = Phe, Met, Leu, His or
Val

<400> 4

Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val

1 5 10

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类凝血素片段

<400> 5

Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys

1 5 10

Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val

15 20