

(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2008-504850

(P2008-504850A)

(43) 公表日 平成20年2月21日(2008.2.21)

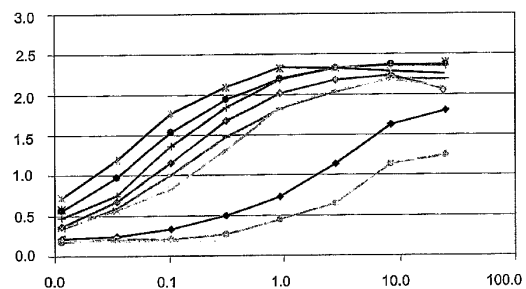
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| A 6 1 L 27/00 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 Z N A V | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 F 2/28 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 Y | 4 C 0 8 1 |
| A 6 1 F 2/02 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 W | 4 C 0 9 7 |
| C 0 7 K 14/00 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 H | 4 H 0 4 5 |
| C 0 7 K 5/09 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 G | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2007-516728 (P2007-516728) | (71) 出願人 | 506413605 |
| (86) (22) 出願日 | 平成17年6月15日 (2005.6.15) | | アフィナジー, インコーポレイテッド |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成19年2月7日 (2007.2.7) | | アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2005/021270 | | 709, リサーチ トライアングル パ |
| (87) 国際公開番号 | W02006/098744 | | ーク, デービス ドライブ 21 |
| (87) 国際公開日 | 平成18年9月21日 (2006.9.21) | (74) 代理人 | 100078282 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/580,019 | | 弁理士 山本 秀策 |
| (32) 優先日 | 平成16年6月16日 (2004.6.16) | (74) 代理人 | 100062409 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 安村 高明 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/651,338 | (74) 代理人 | 100113413 |
| (32) 優先日 | 平成17年2月9日 (2005.2.9) | | 弁理士 森下 夏樹 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (72) 発明者 | ハミルトン, ポール ティー, |
| (31) 優先権主張番号 | 60/651,747 | | アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27 |
| (32) 優先日 | 平成17年2月10日 (2005.2.10) | | 513, カリー, ムーア ウッズ ド |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | ライブ 205 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 整形外科インプラントの表面に対する標的分析物の特異的接着を促進するための I F B M

(57) 【要約】

本発明は、医療用インプラントの表面に対する改善されたコーティングを提供する。このコーティングは、少なくとも1つの界面バイオマテリアル (I F B M) を含み、それはインプラントまたはインプラント関連材料の表面に結合する少なくとも1つの結合モジュール (「インプラントモジュール」)、および標的分析物に選択的に結合するか、または望ましい効果を有するようデザインされた少なくとも1つの結合モジュール (「検体モジュール」) からなる。これらのモジュールはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態において、I F B Mコーティングは、標的分析物のデバイス表面に対する認識および接着を促進するよう作用する。I F B Mコーティングは、例えばインプラントの骨同化を促進することによって、移植された医療デバイスの性能を改善する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a . 少なくとも 1 つのインプラントモジュール ; および
- b . 少なくとも 1 つの検体モジュール

を含む I F B M であって、該インプラントモジュールは、配列番号 1 ~ 配列番号 8、配列番号 39 ~ 配列番号 43、配列番号 95 ~ 配列番号 96、または配列番号 97 ~ 配列番号 558 のいずれかに示される配列を含むペプチドを含む、I F B M。

【請求項 2】

前記インプラントモジュールが、以下 :

- a . ポリマー ;
- b . セラミック ;
- c . プラスチック ; および
- d . 金属

からなる群より選択される材料から作製されたインプラントに結合する、請求項 1 に記載の I F B M。

10

【請求項 3】

前記インプラントモジュールが、ポリ乳酸であるポリマーから作製されたインプラントに結合する、請求項 2 に記載の I F B M。

【請求項 4】

前記インプラントモジュールが、コラーゲンであるポリマーから作製されたインプラントに結合する、請求項 2 に記載の I F B M。

20

【請求項 5】

前記インプラントモジュールが、ポリテトラフルオロエチレンであるプラスチックから作製されたインプラントに結合する、請求項 2 に記載の I F B M。

【請求項 6】

前記インプラントモジュールが、チタン合金である金属から作製されたインプラントに結合する、請求項 2 に記載の I F B M。

【請求項 7】

前記インプラントモジュールが、酸化ジルコニウムであるセラミック材料から作製されたインプラントに結合する、請求項 2 に記載の I F B M。

30

【請求項 8】

前記検体モジュールが、以下 :

- a . 骨形成タンパク質 ;
- b . 血管内皮増殖因子 ;
- c . 血小板由来増殖因子 ;
- d . トランスフォーミング増殖因子 - ;
- e . インスリン様増殖因子 - 1 ;
- f . インスリン様増殖因子 - 2 ;
- g . 線維芽細胞増殖因子 ;
- h . 神経成長因子 ; および
- i . 胎盤増殖因子

からなる群より選択されるタンパク質に結合する、請求項 1 に記載の I F B M。

40

【請求項 9】

前記検体モジュールが骨形成タンパク質 - 2 に結合する、請求項 1 に記載の I F B M。

【請求項 10】

前記検体モジュールが細胞に結合する、請求項 1 に記載の I F B M。

【請求項 11】

前記検体モジュールが骨芽細胞に結合する、請求項 10 に記載の I F B M。

【請求項 12】

前記検体モジュールが、配列番号 11 ~ 配列番号 28、配列番号 44 ~ 配列番号 74、ま

50

たは配列番号 77 ~ 配列番号 94 のいずれかに示される配列を含むペプチドを含む、請求項 1 に記載の I F B M。

【請求項 13】

前記検体モジュールが、配列 R G D を含むペプチドを含む、請求項 1 に記載の I F B M。

【請求項 14】

前記検体モジュールが、配列 Y I G S R を含むペプチドを含む、請求項 1 に記載の I F B M。

【請求項 15】

前記検体モジュールが、配列 I K V A V を含むペプチドを含む、請求項 12 に記載の I F B M。

10

【請求項 16】

前記インプラントモジュールが、少なくとも 2 つの検体モジュールに連結される、請求項 1 に記載の I F B M。

【請求項 17】

前記検体モジュールが、増殖因子に結合する少なくとも 1 つの検体モジュール、および細胞に結合する少なくとも 1 つの検体モジュールを含む、請求項 16 に記載の I F B M。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の少なくとも 2 つの I F B M でコーティングされたインプラントであって、該少なくとも 2 つの I F B M のうちの少なくとも 2 つが互いに異なる、インプラント。

20

【請求項 19】

前記検体モジュールが、B M P R I および B M P R I I の各々に結合して B M P 活性を有する、請求項 1 に記載の I F B M。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、デバイス表面に対する標的分析物の特異的な認識および接着を促進する界面バイオマテリアルを用いて医療デバイスの表面をコーティングするための、材料および方法を提供する。

30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

ヒトおよび動物において、様々な関節置換術のため、および骨修復を促進するために、整形インプラントが使用される。医療業界アナリストによると、現在米国において毎年 800,000 件以上の股関節置換術および膝関節置換術がヒト患者において行われている。それに加えて、何十万人ものヒト患者が、例えば様々な型の骨折を治療するために、または重症の腰痛を軽減するために整形インプラントが使用される、外科的処置を受けている。

【0003】

これらの処置の全てにおいて、コントロールされた、指向性の、迅速な治癒の必要性が存在する。関節置換術を受けた個人は多くの場合、無併発性の治癒および機能の回復を経験する。残念ながら、「遅発性機能不全」が挙げられる、高率の合併症が存在する。ヒトの関節置換術の合計に関する修正手術率は 10% ~ 20% の間で変化する (非特許文献 1 ; 非特許文献 2 ; 非特許文献 3)。これら修正手術の大部分は、インプラント - 骨界面における機能不全のために必要とされる。

40

【0004】

整形インプラントは、比較的不活性な材料 (「アロプラスト性」材料)、代表的には金属材料、セラミック材料、またはプラスチック材料から作製される。整形移植手術の結果を改善するための以前のアプローチは、主に骨形成の増加を引き起こす、インプラント表面に対する物理的变化に焦点を当てていた。これらのアプローチは、骨の内殖を促進する

50

ために多孔性金属表面を有するインプラントを使用すること、およびインプラントをヒドロキシアパタイトプラズマでスプレーすることを含む。歯科インプラントを使用するアプローチも、組織分布を増強したチタン表面の使用を含んでおり、ここで表面の粗さはグリットブラスト、酸エッチング、または酸化のような方法によって付与される。これらの技術は整形移植手術の結果を改善したが、依然としてさらなる改善の余地がかなり存在する。

【0005】

アロプラスト性材料に対する組織の反応は、材料の表面に対する細胞の接着によって影響されることが公知であり、そして多くの研究がアロプラスト性材料に対する細胞接着を改善する方向に向けられた。インビボにおける細胞間の細胞接着は、主として、細胞外マトリックスの短い露出したタンパク質ドメインが細胞表面レセプターに結合することによってコントロールされることが公知である（非特許文献4；非特許文献5）。特に、インテグリンとして公知のレセプターのクラスが、インプラント表面に対する細胞接着に関係している。インテグリンおよびその標的リガンドは、骨芽細胞の接着および増殖ならびに骨形成を刺激することが示された（例えば、非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8を参照のこと）。インテグリンは、インプラントに対する細胞接着の標的化に有用であり得、そしてこの様式でインプラントが隣接する骨に同化することを改善し得る。

【0006】

他の研究は、成長因子およびサイトカインの局所的発現が、アロプラスト性インプラント表面における組織反応を増強し得ることを示した。例えば、Coleら（非特許文献9）は、成長因子がインプラントの隣接する骨への同化（「骨同化」）を促進し得ること、およびインプラント表面の隣の骨形成速度を増加させ得ることを示した。特許文献1も参照のこと。新規の骨産生を刺激する成長因子（「骨誘導タンパク質」）としては、血小板由来成長因子（PDGF）、インスリン様成長因子1および2（IGF-1およびIGF-2）、血管内皮増殖因子（VEGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF- β ）、骨形成タンパク質（BMP）、および関連するファミリーメンバーが挙げられるがこれらに限定されない。

【0007】

最も有効な骨誘導タンパク質は、骨形成タンパク質（BMP）である。BMPは、TGF- β スーパーファミリーのメンバーであり、そのメンバーは、保存された1組のシステイン残基および全体的に高レベルの配列同一性を共有する。15種以上の異なるBMPが同定され、そしてほとんどのBMPは新規の骨形成へと導く事象のカスケードを刺激する（特許文献2；特許文献3；特許文献4；および特許文献5を参照のこと；非特許文献10；非特許文献11；および非特許文献12によっても概説されている）。新規の骨形成へと導くこの事象のカスケードとしては、間葉系幹細胞の遊走、骨伝導性（osteoc onductive）マトリックスの沈着、骨芽前駆細胞の増殖、および前駆細胞の骨産生細胞への分化が挙げられる。多くの研究が、インプラントの骨同化を促進するために、インプラント上でかまたはインプラント付近でのBMPの使用に向けられた（例えば、非特許文献13；非特許文献14；非特許文献15を参照のこと）。しかし、未解決のまま残った重要な問題の1つは、活性なBMPまたは他の活性な生体分子を、インプラントの表面へ移植または固定化する方法である。

【0008】

BMPの提示がインプラントデバイスの隣で望ましい骨形成を生じるために重要であることが示された。インプラントを改善するためのアプローチは、骨形成の天然の過程を考慮して設計された。ヒト骨において、コラーゲンは骨形成の足場、およびBMPの天然担体の両方として作用する。鉱質除去された骨が、骨移植材料として首尾よく使用されている；鉱質除去した骨の主な成分は、コラーゲンおよびBMPである（特許文献6を参照のこと）。マトリックスが分解するにつれて成長因子および他の生物活性分子を安定に放出することによって骨形成を促進するよう設計された多くのマトリックスシステムが開発された。ポリマーマトリックスからのBMP放出効率は、BMPのマトリックスに対する親

10

20

30

40

50

和性、吸収速度、密度、および孔径のような、マトリックスの特徴に依存する。そのようなマトリックスシステムにおいて使用される材料としては、不活性なモノマーへと体内で容易に加水分解される有機ポリマーが挙げられる。そのような有機ポリマーとしては、ポリ乳酸、ポリグリコリド、ポリ無水物、ポリオルトエステルが挙げられる（特許文献 7；特許文献 8；および特許文献 9 を参照のこと）。BMP を含むマトリックスにおいて有用であると記載された他の材料としては、ポリ乳酸とポリグリコール酸とのコポリマー、アルギン酸塩、ポリ（エチレングリコール）、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマー、およびポリ（ビニルアルコール）が挙げられる（特許文献 10 を参照のこと）。BMP を骨領域に送達するために、天然マトリックスタンパク質も使用されている；これらの天然タンパク質としては、コラーゲン、グリコサミノグリカン、およびヒアルロン酸が挙げられ、これらは体内で酵素的に消化される（特許文献 11；特許文献 12；特許文献 13；特許文献 14；特許文献 15；および特許文献 16 を参照のこと）。

10

【0009】

修復部位に BMP を保持するポリマーマトリックスの使用にも関わらず、成長因子のマトリックスからの迅速な拡散のために、治癒を促進するためには超生理学的レベルの BMP が必要であることが見出された。例えば、コラーゲンスポンジ送達システムに関して、2 日後にはスポンジに添加した BMP の 50% しか保持されない（非特許文献 16）。必要な時間の間、生理学的レベルの BMP を維持するために必要な BMP の高い初期投与量は、BMP 治療をより高価なものにし、そして異所性の骨形成もしくはアレルギー反応、または中和抗体の形成のような、有害な副作用を引き起こし得る。

20

【0010】

腱および靭帯置換術、皮膚置換術、血管プロテアーゼ、心臓ペースメーカー、人工心臓弁、乳房インプラント、陰茎インプラント、ステント、カテーテル、シャント、神経成長ガイド、眼内レンズ、創傷包帯、および組織シーラントのような他のインプラントに関しても、同様の問題が存在する。整形インプラントと同様に、これらのインプラントに關与する手術は、多くの場合、遅い創傷の治癒、および所望される場合、インプラントの周囲組織への不適切な同化を含む、同様の問題を引き起こす。

【特許文献 1】米国特許第 5,344,654 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 5,013,649 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 5,635,373 号明細書

30

【特許文献 4】米国特許第 5,652,118 号

【特許文献 5】米国特許第 5,714,589 号明細書

【特許文献 6】米国特許第 5,236,456 号明細書

【特許文献 7】米国特許第 4,563,489 号明細書

【特許文献 8】米国特許第 5,629,009 号明細書

【特許文献 9】米国特許第 4,526,909 号明細書

【特許文献 10】米国特許第 5,597,897 号明細書

【特許文献 11】米国特許第 4,394,320 号明細書

【特許文献 12】米国特許第 4,472,840 号明細書

【特許文献 13】米国特許第 5,366,509 号明細書

40

【特許文献 14】米国特許第 5,606,019 号明細書

【特許文献 15】米国特許第 5,645,591 号明細書

【特許文献 16】米国特許第 5,683,459 号明細書

【非特許文献 1】Malchauら「Prognosis of total hip replacement: Update of results and risk-ratio analysis for revision and re-revision from the Swedish National Hip Arthroplasty Registry, 1979-2000」(2002)第 69 回 Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons、Dallas、Texas、2002 年 2 月 13

50

～ 17 日における科学展示会

【非特許文献 2】Fitzpatrickら Health Technol. Assess. (1998) 2: 1 - 64

【非特許文献 3】Mahomedら J. Bone Joint Surg. Am. (2003) 85 - A: 27 - 32

【非特許文献 4】LeBaronおよび Athanasiou、Tissue Eng. (2000) 6: 85 - 103

【非特許文献 5】Yamada、Matrix Biol. (1997) 16: 137 - 141

【非特許文献 6】Kantlehnerら、ChemBioChem (2000) 1: 107 - 114 10

【非特許文献 7】Sarmientoら、J. Biomed. Mater. Res. (2004) 69A: 351 - 358

【非特許文献 8】Hayashibaraら、J. Bone Mineral Res. (2004) 19: 455 - 462

【非特許文献 9】Coleら、Clin. Orthop. (1997) 345: 219 - 228

【非特許文献 10】Reddiおよび Cunningham、J. Bone Miner. Res. (1993) 8 追補 2: S499 - S502

【非特許文献 11】Issackおよび DiCesare、Am. J. Orthop. (2003) 32: 429 - 436 20

【非特許文献 12】Sykarasおよび Opperman、J. Oral Sci. (2003) 45: 57 - 73

【非特許文献 13】Friedlanderら、J. Bone Joint Surg. Am. (2001) 83 - A 追補 1 (Pt. 2): S151 - 58

【非特許文献 14】Einhorn、J. Bone Joint Surg. Am. (2003) 85 - A 追補 3: 82 - 88

【非特許文献 15】Burkusら、J. Spinal Disord. Tech. (2002) 15 (5): 337 - 49

【非特許文献 16】Geigerら、Adv. Drug Del. Rev. (2003) 55: 1613 - 1629 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従って、術後の治癒、そして望ましい場合にはインプラントの、例えば隣接する骨のような周囲組織への統合を促進するために、インプラントとして、またはインプラントと組み合わせて使用される材料の表面に活性な生体分子を移植するための、費用効果の高い方法を開発する必要性が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

40

(本発明の概要)

本発明は、医療用インプラントの表面の改善されたコーティングを提供する。そのコーティングは、少なくとも 1 つの界面バイオマテリアル (IFBM) を含み、それはインプラントまたはインプラント関連材料の表面に結合する少なくとも 1 つの結合モジュール (「インプラントモジュール」)、および標的分析物に結合するか、または望ましい効果を有するよう設計された少なくとも 1 つの結合モジュール (「検体モジュール」) からなる。モジュールはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態において、IFBM コーティングは、デバイス表面に対する標的分析物の認識および接着を促進するよう作用する。IFBM コーティングは、インプラントの骨同化を促進すること、治癒を加速すること、および / または移植部位における炎症を抑制することによって、移植された医療デバ

50

イスの性能を改善する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ペプチド、タンパク質、薬剤、または細胞のデバイスへの接着を促進するために、医療用デバイスの表面に対して改善されたコーティングを提供する。そのコーティングは、連結した複数の結合モジュールを含む界面バイオマテリアル（IFBM）である。IFBMは、インプラントの表面に結合する少なくとも1つの結合モジュール（「インプラントモジュール」）、および標的分析物に結合するか、または望ましい効果を有する少なくとも1つの結合モジュール（「検体モジュール」）を含む。代表的な結合モジュールは、例えば配列表において提供されたペプチド配列（配列番号1 - 74および77 - 558）を含む。これらのモジュールはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態において、IFBMの結合モジュールのインプラント表面に対する結合は、非共有結合である。同様に、いくつかの実施形態において、検体モジュールの標的分析物に対する結合は、非共有結合である。1つの実施形態によって、インプラントモジュールおよび検体モジュールは、インプラントモジュールがインプラント材料に結合し、そして検体モジュールが成長因子または細胞に特異的に結合するように、2つの別々のペプチド分子を含む。いくつかの実施形態において、インプラントモジュールおよび検体モジュールを、中央の高分子によって連結する。これらの結合モジュールは、代表的にはそれぞれインプラント材料または標的分析物に非共有結合する。検体モジュールが標的分析物に結合せず、むしろ望ましい効果を有する実施形態において、その検体モジュールは、例えば細胞をインプラントの位置に呼び寄せる（リクルートする）よう作用することによって、成長因子の作用を刺激し得る。IFBMの選択方法および構造は、2002年11月20日に提出され、そして公開番号20030185870として2003年10月2日に公開された、米国特許出願第10/300,694において記載され、それは本明細書中で参考文献に組み込まれる。

10

20

【0014】

「特異的に結合する」または「特異的結合」によって、そのインプラントモジュールまたは検体モジュールが、選択されたインプラント材料または選択された分析物に結合することを意図する。いくつかの実施形態において、特定のインプラント材料または分析物に特異的に結合するモジュールは、そのモジュールが例えば移植に使用される異なる材料、移植に使用されない材料、またはウシ血清アルブミンのようなそのような目的のために代表的に使用されるタンパク質のような、適切なコントロールに結合するよりも、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、またはより高いパーセンテージでその材料または分析物に結合する。「分析物」によって、移植手術の後に、インプラントの骨同化を改善するかまたは周囲の組織の治癒を促進または加速させる、あらゆる物質または成分を意図する。検体モジュールの結合標的である適切な分析物は、骨形成タンパク質（例えばBMP-7およびBMP-2のようなBMP）、血管内皮増殖因子（VEGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子-（TGF-）、インスリン成長因子-1（IGF-1）、インスリン成長因子-2（IGF-2）、線維芽細胞成長因子（FGF）、神経成長因子（NGF）および胎盤成長因子のような成長因子が挙げられるがこれに限らない。適切な分析物はまた、ホルモン、酵素、サイトカイン、および本発明の目的を達成するのに；すなわち移植手術後にインプラントの骨同化を促進するために、および/または周囲組織の治癒を改善するために有用な、他の生物活性物質または成分も含む。適切な分析物としてはまた、細胞、例えば骨芽細胞、軟骨細胞、幹細胞、前駆細胞、血小板、および骨同化および治癒に役割を果たす他の細胞も挙げられる。いくつかの実施形態において、検体モジュールは、例えば当該分野において特定の生物学的活性を有することが公知であるペプチド配列RGD、YIGSR、およびIKVAVのような、細胞に結合するか、または細胞またはレセプターに対する結合によって生物活性

30

40

50

を有するペプチド配列を含み得る。例えばHerselら(2003)Biomaterials 24:4385-4415; Grantら(1990)Ann. N. Y. Acad. Sci. 588:61-72; Hosokawara(1999)Dev. Growth Differ. 41:207-216を参照のこと。いくつかの実施形態において、検体モジュールは、配列番号11-28、配列番号44-74、または配列番号77-94において述べた例示的な配列のような、BMP-2に結合するペプチド配列および/またはその効果を模倣するペプチド配列を含む。細胞に結合する検体モジュールは、多くの異なる細胞型に結合する一般的な細胞結合配列を含むペプチドを含み得るか、またはその分析モジュールは、骨芽細胞、軟骨細胞、骨芽前駆細胞、または幹細胞のような特定の細胞型に結合するペプチドを含み得る。

10

【0015】

「インプラント」という用語は一般的に、損傷した組織の機能を回復するために、または新しい機能を提供するために、ヒトまたは動物の体内に導入される構造を指す。インプラントデバイスは、あらゆる生体適合性の材料を用いて作製され得、それに対して結合薬剤が本明細書中で開示されたように特異的に結合し得る。代表的なインプラントとしては、股関節内部人工器官、人工関節、顎または顔面インプラント、腱および靭帯置換術、皮膚置換術、骨置換術および人工骨スクリュー、骨移植デバイス、血管プロテーゼ、心臓ペースメーカー、人工心臓弁、乳房インプラント、陰茎インプラント、ステント、カテーテル、シャント、神経成長ガイド、眼内レンズ、創傷包帯、および組織シーラントが挙げられるがこれに限らない。インプラントは、様々な材料から作られ、それら材料は当該分野で公知であり、そして例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリスチレン、ポリカーボネート、ナイロン、PVC、コラーゲン(例えば架橋コラーゲンのような加工コラーゲンを含む)、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、アルギン酸塩、シルク、フィブリン、セルロース、およびゴムを含む、ポリマーまたはポリマーの混合物; ポリエチレン(例えば高密度ポリエチレン(HDPE)を含む)、PEEK(ポリエーテルエーテルケトン)、およびポリテトラフルオロエチレンのようなプラスチック; チタン、チタン合金、ステンレス鋼、およびコバルトクロム合金のような金属; 金属酸化物; 非金属酸化物; シリコン; 生体活性ガラス; 例えば酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、およびリン酸カルシウムのようなセラミック材料; 鉱質除去した骨マトリックスのような他の適切な材料; ならびにそれらの組み合わせが挙げられるが、これに限らない。本明細書中で使用される「ポリマー」という用語は、何百万もの反復する連結した、それぞれは比較的単純な分子であるユニットから成る、通常高分子量の多くの天然および合成化合物の任意のものを指す。本明細書中で使用される「インプラント」という用語は、インプラントと会合し、そしてまたインプラントと組み合わせてヒトまたは動物の体内へ導入される、インプラント関連材料を含む。

20

30

【0016】

本発明の1つの実施形態において、IFBMは、成長因子のインプラント表面に対する接着を媒介する結合界面を作る。いくつかの実施形態において、本発明の方法によって調製されたインプラントは、インプラント表面に特異的に接着した成長因子を有する; 移植部位からの成長因子の拡散率は、問題の成長因子に対する検体モジュールの親和性に依存して変化し得、これによって異なる拡散速率の成長因子を用いてインプラントを調製し得る。成長因子のインプラント表面に対する接着を含む実施形態において、成長因子は、例えば治癒過程の加速、治癒に必要な成長因子の量の低減、および超生理的用量の成長因子を使用することによって引き起こされる副作用を最小限にすることのような、正の効果を有する。検体モジュール、または検体モジュールに結合する因子のいずれかとして特に興味のある成長因子としては、例えばBMP-2、BMP-7、PDGF、FGF、およびTGFが挙げられる。

40

【0017】

従って、本発明は、患者に外科的に置かれるインプラントを調製する方法を提供し、こ

50

ここでそのデバイスは少なくとも1つのIFBMを含む層でコーティングされる。いくつかの実施形態において、その方法は：(a) IFBMコーティングをインプラントに適用する工程、ここでIFBMはインプラントに特異的に結合するインプラントモジュールおよび成長因子に特異的に結合する検体モジュールを含む；(b) 成長因子を含む溶液をインプラントに浸漬するか、スプレーするか、またはブラシで塗ること(b r u s h i n g)によって、成長因子をインプラント表面に適用する工程；(c) 当業者に公知の適切な外科的技術を用いて、インプラントを患者に置く工程を含む。

【0018】

あるいは、移植されたデバイスが成長因子の接着を促進するようにインプラントをコーティングする方法は：(a) IFBMコーティングをインプラントに適用する工程、ここでIFBMは、インプラントに特異的に結合するインプラントモジュールと、移植部位において成長因子に特異的に結合する検体モジュールとを含む；ならびに(b) インプラントを患者の移植部位に置く工程を含み、これによって宿主によって産生された成長因子がIFBMによってインプラントに結合する。移植部位において成長因子の存在の増強は、隣接する組織の治癒および隣接する組織へのインプラントの同化を増強する。

10

【0019】

本発明の1つの実施形態において、IFBMはインプラント表面に対する細胞の接着を媒介する。細胞接着および組織同化を増強することによって、本発明のIFBMは治癒を加速し、そして移植されたデバイスの機能を改善し得る。従って、本発明によって、患者に外科的に置かれるインプラントを調製する方法は：(a) IFBMコーティングをインプラントに適用する工程、ここでIFBMはインプラントに特異的に結合する少なくとも1つのインプラントモジュール、および少なくとも1つの型の細胞に特異的に結合する少なくとも1つの検体モジュールを含む；ならびに(b) インプラントを患者の移植部位に配置する工程を含み得、これによって細胞がインプラント上のIFBMコーティングに結合する。

20

【0020】

いくつかの実施形態において、インプラントを調製する方法は：(a) IFBMコーティングをインプラントに適用する工程、ここでIFBMは、インプラントに特異的に結合する少なくとも1つのインプラントモジュール、および少なくとも1つの型の細胞に特異的に結合する少なくとも1つの検体モジュールを含む；ならびに(b) 例えば細胞を含む溶液にインプラントを浸漬するか、または細胞を含む溶液をインプラント上にブラシで塗ることによって、インプラント表面に細胞を適用する工程を含む。次いで、このインプラントを患者(すなわち、ヒト患者または動物患者)に配置し得る。本明細書中で使用される「患者」によって、ヒト患者または動物患者のいずれかが意図される。

30

【0021】

本発明の別の実施形態において、複数の機能性を有するコーティングを提供するために、インプラントを1つより多くの型のIFBMでコーティングする。例えば、インプラントコーティングは、細胞に結合する検体モジュールを有する第1のIFBM、および成長因子に結合する検体モジュールを有する第2のIFBMを含み得る。これらのIFBMを含むコーティングは、インプラント表面に細胞および成長因子をどちらも結合する。いくつかの実施形態において、これらのIFBMをコーティングで混ぜて、結合した成長因子が結合した細胞と近くなるようにする。1つの実施形態において、コーティングは、間葉系幹細胞に結合するIFBMと成長因子BMP-2に結合するIFBMとを含む；BMP-2は幹細胞の骨芽細胞への分化を惹起する。別の実施形態において、インプラントコーティングは、そのインプラントモジュールおよびその検体モジュールのいずれかまたは両方で異なる、少なくとも2つの異なるIFBMの混合物を含み得る。別の実施形態において、コーティングは、1つは細胞に結合し、そして1つは成長因子に結合する2つの検体モジュールを有する多機能IFBMを含む。

40

【0022】

結合モジュール(すなわち、インプラントモジュールおよび/または検体モジュール)

50

は、ペプチド、抗体または抗体フラグメント、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、これらのいずれかを含む複合体、あるいは様々な分子および/または化合物であり得る。ペプチドである結合モジュールは、2002年11月20日に出願され、そして公開番号20030185870として2003年10月2日に公開された、係属中の米国特許出願第10/300,694号において記載されたように識別され得る。いくつかの実施形態において、結合モジュールは、チタン、ステンレス鋼、コバルト-クロム合金、ポリウレタン、ポリエチレンまたはシリコンのような生体適合性の材料(すなわち「バイオマテリアル」)を含む材料に対する結合に関して、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって同定され得る。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態において、検体モジュールは生物活性ペプチドであるか、または生物活性ペプチドに結合する。これらの生物活性ペプチドは、当該分野で周知であるように、天然タンパク質の生物学的効果を保持する、天然タンパク質の断片であり得る。例えば、TP508は、ヒトトロポニンのアミノ酸183-200を示すトロポニン由来の合成ペプチドであり、そして骨折の治癒を加速することが示された(例えば、Wangら(2002)Trans ORS 27:234を参照のこと)。TP508の機能は、細胞表面に存在するインテグリンに結合する、ペプチド中のRGD配列によって媒介されると考えられる(例えば、Tsopanoglouら(2004)Thromb Haemost. 92(4):846-57を参照のこと)。同様に、P-15は、コラーゲンの細胞結合ドメインを示すI型コラーゲン由来の15アミノ酸のペプチドである(例えば、Yangら(2004)Tissue Eng. 10(7-8):1148-59を参照のこと)。P-15は、新規の骨形成を増強することが示された(例えば、Scaranoら(2003)Implant Dent. 12(4):318-24を参照のこと)。生物活性ペプチドはまた、成長因子の断片であり得る。例えば、Saitoら(J Biomed Mater Res A. 2005 72A(1):77-82)は、BMP-2のアミノ酸73-92を示す合成ペプチドが、BMP-2レセプターへの結合、遺伝子発現の活性化および異所性の骨形成の誘導を含むBMP-2の生物学的活性を保持することを示した。

【0024】

望ましい活性が提供される限り、すなわちIFBMが適切なインプラントに特異的に結合し、そして検体モジュールによって与えられる適切な効果、すなわちBMP-2に結合する能力を有する限り、あらゆるインプラントモジュールを、あらゆる検体モジュールと組み合わせて、本発明のIFBMを作製し得る。当業者は、様々な型および様々な数のインプラントモジュールを、様々な型および様々な数の検体モジュールと組み合わせて、本発明のIFBMを作製し得ることを認識する。従って、例えば1つまたはそれ以上のインプラントモジュールを1つまたはそれ以上の検体モジュールと連結してIFBMを作り得る。当業者は、インプラントが作られる材料および検体モジュールによって与えられる望ましい活性に依存して、適切なインプラントモジュールと検体モジュールとを選択し得る。

【0025】

本明細書中で使用される「抗体」という用語は、単鎖抗体を含む。従って、結合モジュールとして有用な抗体は、単鎖可変フラグメント抗体(scFv)であり得る。単鎖抗体は、一続きのポリペプチドを形成するよう、直接的にかまたはペプチドリンカーによって一緒に結合された可変重鎖および可変軽鎖を含む抗体である。本明細書中で使用される「1本鎖抗体」という用語は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ハイブリッド抗体、突然変異誘発抗体、ヒト化抗体、および抗原結合部位を含む抗体フラグメント(例えば、F_a抗体フラグメントおよびF_v抗体フラグメント)を含むがこれに限らない、免疫グロブリンタンパク質またはその機能的部分を含む。

【0026】

ファージディスプレイ技術は当該分野で周知である。ファージディスプレイを用いて、

10

20

30

40

50

多様なペプチドのライブラリーを標的基質に提示し得、そして基質に特異的に結合するペプチドを、結合モジュールとして使用するために選択し得る。「パニング」と呼ばれる複数の連続したラウンドのセレクションを使用し得る。当該分野で公知であるように、様々なライブラリーおよびパニング方法のいずれか1つを採用して、本発明の方法において有用な結合モジュールを同定し得る。例えば、抗体または抗体フラグメントのライブラリーを使用して、特定の細胞集団またはウイルスに結合する抗体または断片を同定し得る（例えば、米国特許第6,174,708号；同第6,057,098号；同第5,922,254号；同第5,840,479号；同第5,780,225号；同第5,702,892号）；および同第5,667,988号を参照のこと）。パニング方法は、例えば、溶液相スクリーニング、固相スクリーニング、または細胞に基づくスクリーニングが挙げられ得る。候補結合モジュールが同定されたら、配列の指向性突然変異誘発または無作為の突然変異誘発を使用して、結合モジュールの結合性質を最適化し得る。「バクテリオファージ」および「ファージ」という用語は同義であり、そして本明細書中で交換可能に使用される。

【0027】

ライブラリーは、分子の無作為のコレクションを含み得る。あるいは、ライブラリーは特定の配列、構造、またはコンフォメーションに対する偏りを有する分子のコレクションを含み得る。例えば、米国特許第5,264,563号および同第5,824,483号を参照のこと。様々な型の分子の多様な集団を含むライブラリーを調製する方法は、当該分野で公知であり、そして多数のライブラリーが市販でも入手可能である。ファージライブラリーを調製する方法は、例えば、Kayら(1996) Phage Display of Peptides and Proteins (San Diego, Academic Press)；Barbas(2001) Phage Display: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)において見出し得る。

【0028】

ペプチドである結合モジュール（すなわち、インプラントモジュールまたは検体モジュール）は、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90、100、200、または300までのアミノ酸を含むペプチドである。結合モジュールとして有用なペプチドは、直線、分枝、または環状であり得、そして非ペプチド成分を含み得る。「ペプチド」という用語は、天然に存在するアミノ酸、合成アミノ酸、遺伝的にコードされたアミノ酸、遺伝的にコードされていないアミノ酸、およびその組み合わせを含むアミノ酸鎖を広く指す。ペプチドは、L型およびD型のアミノ酸をどちらも含み得る。

【0029】

結合モジュールとして有用なペプチドは、様々な変化、置換、挿入、および欠失を受け得、ここでこのような変化は、その使用におけるある利点を提供する。従って、「ペプチド」という用語は、例えばアミド、タンパク質との結合物、環状化(cyclone)ペプチド、ポリマー化ペプチド、保存的置換変異体、アナログ、断片、化学修飾されたペプチド、およびペプチド模倣物を含む、様々な形式のペプチド誘導体のいずれも含む。望ましい結合特徴を有するあらゆるペプチドを、本発明の実施において使用し得る。

【0030】

遺伝的にコードされていない代表的なアミノ酸としては、2-アミノアジピン酸；3-アミノアジピン酸；-アミノプロピオン酸；2-アミノ酪酸；4-アミノ酪酸（ピペリジン酸）；6-アミノカプロン酸；2-アミノヘブタン酸；2-アミノイソ酪酸；3-アミノイソ酪酸；2-アミノピメリン酸；2,4-ジアミノ酪酸；デスモシン；2,2'-ジアミノピメリン酸；2,3-ジアミノプロピオン酸；N-エチルグリシン；N-エチル

10

20

30

40

50

アスパラギン；ヒドロキシリシン；アロ - ヒドロキシリシン；3 - ヒドロキシプロリン；4 - ヒドロキシプロリン；イソデスモシン；アロ - イソロイシン；N - メチルグリシン（サルコシン）；N - メチルイソロイシン；N - メチルバリン；ノルバリン；ノルロイシン；およびオルニチンが挙げられるがこれに限らない。

【0031】

代表的な誘導体化アミノ酸は、例えば遊離のアミノ基が、塩酸アミン、p - トルエンシルホニル基、カルボベンゾキシ基、t - ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成するよう誘導体化された分子が挙げられる。遊離のカルボキシ基を、塩、メチルエステルおよびエチルエステルもしくは他の型のエステル、またはヒドラジドを形成するよう誘導体化し得る。遊離のヒドロキシ基を、O - アシル誘導体またはO - アルキル誘導体を形成するよう誘導体化し得る。ヒスチジンのイミダゾール窒素をN - i m - ベンジルヒスチジンを形成するよう誘導体化し得る。

【0032】

「保存的置換改変体」という用語は、参照ペプチドの配列と実質的に同じアミノ酸残基配列を有するペプチドを指し、ここで1つまたはそれ以上の残基が機能的に同様の残基で保存的置換されており、その結果、「保存的置換改変体」はその親と実質的に同じ親和性で同じ結合パートナーと結合し、そしてその親の結合を阻止する。1つの実施形態において、保存的置換改変体は、参照ペプチドと比較した場合に同様の結合特異性を示す。「保存的置換改変体」という語句はまた、残基が化学的に誘導体化された残基で置換されたペプチドも含む。

【0033】

保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンのような非極性（疎水性）残基の1つと別のものの置換；トリプトファン、チロシン、またはフェニルアラニンのような1つの芳香族残基と別のものの置換；アルギニンおよびリシン間、グルタミンおよびアスパラギン間、グリシン、アラニン、スレオニン、およびセリン間のような、1つの極性（親水性）残基と別のものの置換；リシン、アルギニン、またはヒスチジンのような1つの塩基性残基と別のものの置換；またはアスパラギン酸またはグルタミン酸のような1つの酸性残基と別のものの置換が挙げられる。

【0034】

本発明のIFBMで結合モジュールとして使用するための代表的なペプチド配列（例えば、配列表における配列番号1 - 74および配列番号77 - 558）が本明細書中で開示されるが、当業者は、それらの配列によって与えられた結合または他の性質が、その配列により構成されるアミノ酸のいくつかのみに起因し得ることを認識する。本発明の結合モジュールであるペプチドはまた、結合モジュールの望ましい結合性質が保持される限り、本明細書中で開示されたような典型的なペプチド配列の配列と比較して、1つまたはそれ以上の残基の置換、追加、および/または欠失を有するペプチドを含む。従って、本発明の結合モジュールは、本明細書中で開示された典型的な配列から約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸異なるが、特定の材料へ結合する、または検体モジュールとして作用する、対応する典型的配列の能力を保持するペプチドを含む。本明細書中で開示された典型的配列と異なる本発明の結合モジュールは、適切なアッセイを用いて測定した場合、本明細書中で開示された典型的配列全体を含む結合モジュールの、少なくとも25%、50%、75%、または100%の活性を保持する。

【0035】

すなわち、本発明の結合モジュールは、本明細書中で開示された典型的配列と、少なくとも70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性、またはそれ以上の配列同一性を共有するペプチドを含む。配列同一性を、手作業で計算し得るか、または数学的アルゴリズムのコンピューターによる実行、例えばWisconsin Genetics Software Pac

10

20

30

40

50

kage of Genetics Computer Group, Version 10 (Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, CA, 92121, USAから入手可能)のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTAを用いて計算し得る。Wisconsin Genetics Software PackageのVersion 10で使用するスコア付けマトリックスは、BLOSUM62である(HenikoffおよびHenikoff (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと)。これらのプログラムを用い、デフォルトパラメーターを用いて整列を行い得る。

【0036】

例えば末端NH₂アシル化(例えば、アセチル化、またはチオグリコール酸アミド化)によって、または末端カルボキシルアミド化(例えば、アンモニアまたはメチルアミンを用る)によってペプチドを改変し得る。末端の改変は、タンパク質分解酵素消化による感受性を抑制するために有用であり、従って溶液中、特にプロテアーゼが存在し得る生物学的液体中のペプチドの半減期を延長するために有用である。

【0037】

環化によって形成される安定な構造のために、およびそのような環状ペプチドで観察される生物学的活性を考慮して、ペプチドの環化も有用な改変である。ペプチドを環化する方法が、例えば、SchneiderおよびEberle (1993) Peptides, 1992: Proceedings of the Twenty-Second European Peptide Symposium, 1992年9月13-19日、Interlaken, Switzerland, Escom, Leiden, The Netherlandsによって記載される。

【0038】

必要に応じて、結合性モジュールペプチドは、リンカー分子への連結を促進するために、フッ素、臭素、またはヨウ素のような1つまたはそれ以上のハロゲンを含むよう改変された、1つ以上のアミノ酸を含み得る。本明細書中で使用される場合、「ペプチド」という用語はまた、1つまたはそれ以上のペプチド結合が、偽ペプチド結合(pseudopeptide bond)によって置き換えられたペプチドを含み、この結合としては、炭素(carba)結合(CH₂-CH₂)、デブシ結合(CO-O)、ヒドロキシエチレン結合(CHOH-CH₂)、ケトメチレン結合(CO-CH₂)、メチレン-オキシ結合(CH₂-O)、還元結合(CH₂-NH)、チオメチレン結合(CH₂-S)、N-修飾結合(-NRCO-)、およびチオペプチド結合(CS-NH)が挙げられるがこれに限らない。例えば、Garbay-Jaureguiberryら(1992) Int. J. Pept. Protein Res. 39:523-527; Tungら(1992) Pept. Res. 5:115-118; Urgeら(1992) Carbohydr. Res. 235:83-93; Corringeraら(1993) J. Med. Chem. 36:166-172; Pavoneら(1993) Int. J. Pept. Protein Res. 41:15-20を参照のこと。

【0039】

目的の表面(チタン、ステンレス鋼、コラーゲン、およびポリグリコール酸(PGA)が挙げられる)に特異的に結合し、そして従って本発明のIFBMにおいて結合モジュールとして使用するために適切である代表的なペプチドが、配列表に述べられ、そして本明細書中の下記でさらに記載される。典型的なペプチド配列が本明細書中で開示されるが、当業者は、それらの配列によって与えられる結合性質は、その配列によって含まれるアミノ酸のいくつかのみに起因し得ることを認識する。従って、本明細書中で開示された代表的配列の一部のみを含む配列が、全長の典型的な配列と実質的に同じ結合性質を有し得る。従って、特定の典型的な配列の3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、または12個のアミノ酸のみを含む配列も、結合モジュールとして有用であり、そしてそのようなアミノ酸は典型的な配列中で連続的または非連続的であり得る。そのようなアミノ酸は、典型的なペプチドのアミノ末端に集中し得る(例えば、ペプチドの最

10

20

30

40

50

初の5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、または12個のアミノ酸中、4個のアミノ酸に集まり得る)、またはそれらは典型的なペプチド全体に分散し得るが、それにもかかわらずペプチドの結合特性を担い得る。例えば、BMP-2に特異的に結合するペプチドは、実施例3で記載されたような、および配列番号27または28において述べられたような配列モチーフの全てまたは一部を含み得る。従って、BMP-2に特異的に結合するペプチドは、配列番号27または28で述べられたような配列モチーフのそれぞれの必要条件に一致する配列を有し得るか、またはそのペプチドは配列モチーフの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の必要条件に一致する配列を有し得る。配列番号27で述べられた配列モチーフを、位置1、4、6、および7において存在するアミノ酸を制限する4つの「必要条件」を有するとして記載し得る。BMP-2に特異的に結合するペプチドは、それらの必要条件のうち4つ全てに一致する配列番号11で述べられた配列を有し得るか、またはそれはそれらの4つの必要条件のうち3つに一致する配列番号21で述べられた配列を有し得る。これらの型の配列はどちらも、本発明によって提供される。

10

20

30

40

50

【0040】

いくつかの実施形態において、IFBMはタンパク質成長因子の生物学的効果を模倣するように構築された。これらの実施形態において、検体モジュールは、BMPレセプターBMPRIに結合するアミノ酸配列を含み、そしてBMPレセプターBMPRIIに結合するアミノ酸配列も含むペプチドを含む(例えば実施例6を参照のこと)。これらのレセプターは、当該分野で周知であり、そして市販でも入手可能である(例えばR&D Systems、Minneapolis、MC、カタログ番号315-BRおよび811-BR)。これらの実施形態において、検体モジュールは、例えば当該分野で公知であり、そして実施例6で記載される技術によって測定されるようなBMP活性を有する。本発明は、いかなる特定の操作のメカニズムにも拘束されないが、BMPRIおよびBMPRIIのそれぞれに結合することによって、検体モジュールはこれらのレセプターのヘテロダイマー化を促進し、それによってBMP-SMAD経路によるシグナル伝達を惹起すると考えられる。この方式において、BMPそれ自身を加えることなくBMP-SMAD経路によるシグナル伝達を惹起するように、IFBMを構築し、そしてインプラントの表面をコートするために使用し得る。一般的に、天然のBMP-SMAD経路において、BMP I型レセプターおよびBMP II型レセプターのヘテロダイマー化が、シグナル伝達に必要である(例えば、Chenら(2004) Growth Factors 22:233-241を参照のこと)。ダイマー化は、I型およびII型レセプターの細胞質ドメインを近付け、構成的に活性なII型レセプターキナーゼがI型レセプターをリン酸化することを可能にする。I型レセプターの細胞質ドメインのリン酸化は、その潜在性のキナーゼ活性を活性化し、それが今度はSmadタンパク質を活性化する。レセプターから放出された後、リン酸化Smadタンパク質は、Smad4と結合し、そしてこの複合体は核に移動して、他のタンパク質と共に転写因子として機能し、そして応答性遺伝子を調節する(Chenら(2004) Growth Factors 22:233-241)。まとめると、このことは、下流のSmadまたはBMP-SMADのシグナル伝達経路、およびそれによって活性化される遺伝子と呼ぶことができる。SmadまたはBMP-SMAD経路の活性化の結果として産生されるタンパク質を、Smad活性化下流タンパク質産物と呼ぶことができる。

【0041】

ペプチドである本発明の結合モジュールを、ペプチド合成の当業者に公知であるあらゆる技術によって合成し得る。代表的な技術を、例えばStewartおよびYoung(1969) Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, California); Merrifield(1969) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 32:221-296; FieldsおよびNoble(1990) Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214; およびBodanszky(1993

Principles of Peptide Synthesis、第2改訂版(Springer-Verlag、Berlin)において見出し得る。代表的な固相合成技術を、Anderssonら(2000)Biopolymers 55:227-250、そこで引用された参考文献、および米国特許第6,015,561号;同第6,015,881号;同第6,031,071号;および同第4,244,946号において見出し得る。溶液中のペプチド合成が、SchroderおよびLubke(1965)The Peptides(Academic Press、New York、New York)において記載されている。ペプチド合成に有用な、適切な保護基が、上記のテキストおよびMcOmie(1973)Protective Groups in Organic Chemistry(Plenum Press、London)において記載されている。遺伝的にコードされていないアミノ酸を含むペプチドを含むペプチドをまた、Shimizuら(2001)Nat Biotechnol. 19:751-755によって記載された系のような、無細胞翻訳系において産生し得る。それに加えて、明記されたアミノ酸配列を有するペプチドを、市販の供給源(例えば、San Diego、CaliforniaのBiopeptide Co., LLC、およびLivermore、CaliforniaのPeptidogenics)から購入し得る。
【0042】

結合モジュールを、少なくとも1つのリンカーで連結して本発明のIFBMを形成する。いくつかの実施形態において、ペプチドである結合モジュールから成るIFBMを、単一の連続的なペプチドとして合成する;これらの実施形態において、リンカーは単にペプチド中の結合の1つである。本発明の他の実施形態において、リンカーは、合成ポリマーまたは天然ポリマーを含むポリマーを含み得る。リンカーとして有用な、代表的な合成ポリマーとしては、ポリエーテル(例えば、ポリエチレングリコール;PEG)、ポリエステル(例えば、ポリ乳酸(PLA)およびポリグリコール酸(PGA))、ポリアミド(例えば、ナイロン)、ポリアミン、ポリアクリル酸、ポリウレタン、ポリスチレン、および約200ダルトンから約1000キロダルトンの分子量を有する他の合成ポリマーが挙げられるがこれに限らない。リンカーとして有用な、代表的な天然ポリマーとしては、ヒアルロン酸、アルギン酸塩、コンドロイチン硫酸、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、アルブミン、コラーゲン、および約200ダルトンから約20,000キロダルトンの分子量を有する他の天然ポリマーが挙げられるがこれに限らない。ポリマー性リンカーは、ジブロックポリマー、マルチブロックコポリマー、櫛型ポリマー、星型ポリマー、樹状ポリマー、ハイブリッド直鎖状-樹状ポリマー、またはランダムコポリマーを含み得る。
【0043】

リンカーはまた、メルカプト(アミド)カルボン酸、アクリルアミドカルボン酸、アクリルアミド-アミドトリエチレングリコール酸、およびその誘導体を含み得る。例えば、米国特許第6,280,760号を参照のこと。リンカーがペプチドを含む場合、そのペプチドは、YGDおよびGSRのような、特定の生物学的機能を有することが公知である配列を含み得る。
【0044】

リンカー分子を結合ドメインに連結する方法は、各分子に存在する反応基によって変化する。反応基および分子を用いて連結するプロトコールは、当業者に公知である。例えば、Goldmanら(1997)Cancer Res. 57:1447-1451;Cheng(1996)Hum. Gene Therapy 7:275-282;Neriら(1997)Nat. Biotechnol. 19:958-961;Nabel(1997)Current Protocols in Human Genetics、CD-ROMの巻(John Wiley & Sons、New York);Parkら(1997)Adv. Pharmacol. 40:399-435;Pasqualiniら(1997)Nat. Biotechnol. 15:542-546;BaumingerおよびWilchek(1980)Meth. Enzymol. 70:151-159;米国特許第6,280,760号および同6,071,890号;および欧州

10

20

30

40

50

特許第0439095号および同0712621号を参照のこと。

【0045】

医療用デバイスの表面を、例えばIFBMをデバイスに浸漬するか、スプレーするか、またはブラシで塗ることによって、あらゆる適切な方法によってコーティングする。例えば空気乾燥または凍結乾燥によって、コーティングを安定化し得る。しかし、これらの処理は独占的ではなく、そして他のコーティングおよび安定化方法を採用し得る。適切な方法は当該分野で公知である。例えばHarrisら(2004)Biomaterials 25:4135-4148および2003年8月19日に出願され、そして公開番号第20040087505で2004年5月6日に公開された、米国特許出願第10/644,703号を参照のこと。

10

【0046】

明細書中で言及された全ての出版物および特許出願は、本発明が属する当業者のレベルを示す。全ての出版物および特許出願は、個々の出版物または特許出願がそれぞれ明確におよび個々に参考文献に組み込まれると示されたのと同じ程度、本明細書中で参考文献に組み込まれる。

【0047】

前述の説明および付随する図において示された教示の利点を有する、本明細書中で述べられた本発明の多くの変更および他の実施形態が、これらの発明が属する当業者に考えられる。従って、本発明は、開示された特定の実施形態に制限されないこと、および変更および他の実施形態が、添付の請求の範囲内に含まれるよう意図されることが理解される。特定の用語が本明細書中で採用されるが、それらは一般的および説明的な意味でのみ使用され、制限の目的のためではない。

20

【実施例】

【0048】

(実験)

(実施例1:チタンに結合するペプチドの単離)

10個の異なるファージディスプレイライブラリーを、チタンビーズへの結合に関してスクリーニングした。直径約5/32インチのチタン($\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$)ビーズを、70%エタノール、40%硝酸、蒸留水、70%エタノールおよびアセトンで洗浄して、あらゆる表面の混入物を除去した。96穴ポリプロピレンプレート(Nunc)の1つのウェルあたり1つのチタンビーズを置いた。

30

【0049】

チタンおよびポリプロピレンの表面の非特異的結合部位を、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri、カタログ番号P-3813)中1%のウシ血清アルブミン(BSA)でブロックした。プレートを50rpmで振とうしながら、室温で1時間インキュベートした。次いでウェルを300 μl のPBSで5回洗浄した。各ライブラリーをPBS+1%BSA中で希釈し、そして250 μl の最終容量で、 10^{10} pfu/mlの濃度で加えた。室温で3時間および50rpmで振とうしながらインキュベートした後、結合していないファージを、300 μl のリン酸緩衝化生理食塩水-TweenTM 20(PBS-T; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri、カタログ番号P-3563)で3回洗浄することによって除去した。チタンビーズに結合したファージを回収するために、50mMのグリシン、pH2で10分間処理し、その後100mMのエタノールアミン、pH12で10分間処理することによって、結合したファージを放出した。溶出されたファージをプールし、200 μl の200mM NaPO_4 pH7で中和した。溶出したファージおよびビーズを、2xYT培地中のE. coli DH5 F'細胞に直接加えた。その混合物を37、210rpmの振とう器で一晩インキュベートした。次いで8500xgで10分間遠心した後ファージ上清を回収した。200 μl のPBS+1%BSAで希釈したインプットとして、前の回からの増幅したファージの50 μl を用いて、2回目および3回目のセレクションを、1回目と同様の方法で行った。

40

50

4 回目のセレクションを同様の方式で行った；しかし、洗浄を変更した。4 時間の結合反応の後、ビーズを P B S - T (S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s , M i s s o u r i 、カタログ番号 P - 3 5 6 3) で 5 回洗浄し、ビーズを 2 m l のウェルを有する清潔なポリプロピレンプレートに移し、1 m l の P B S + 1 % B S A を各ウェルに加え、そして洗浄液を 5 0 r p m で振とうしながら室温で一晩インキュベートした。次の朝、ファージを溶出し、そして 1 - 3 回目に記載した同じ方法で増幅した。次いで個々のクローンファージを単離し、そしてファージのプールの希釈液をプレートする (p l a t i n g o u t) ことによって試験して単一のブランクを得た。

【 0 0 5 0 】

チタンに特異的に結合するファージを検出するために、H R P に結合した抗 M 1 3 ファージ抗体を用いて、続いて色素生産性薬剤 A B T S を加えて、通常の E L I S A を行った。ファージの相対的結合力を、E L I S A において、チタンに対する結合に関してファージの系列希釈を試験することによって決定した。

【 0 0 5 1 】

チタンに特異的に結合するペプチドをコードする D N A 配列を決定した。ペプチド挿入断片をコードする配列は、ファージゲノムに位置し、そして翻訳されてファージ表面に提示された対応するアミノ酸配列を生じた。

【 0 0 5 2 】

チタンに特異的に結合する代表的なペプチドを表 1 に列挙し、そして配列番号第 1 - 8 番として述べる。これらのペプチドを提示するファージのチタンビーズに対する結合を図 1 に示す。

【 0 0 5 3 】

【 表 1 】

表1:チタン結合ペプチド

| クローン番号 | 合成ペプチド番号 | 提示されるペプチド | 配列番号 |
|---------|----------|------------------------|------|
| AP06-22 | AFF-6002 | SSHKHPVTPRFFVVESR | 1 |
| AP06-23 | AFF-6003 | SSCNCYVTPNLLKHKCYKICSR | 2 |
| AP06-24 | AFF-6004 | SSCSHNHHKLTAKHQVAHKCSR | 3 |
| AP06-25 | AFF-6005 | SSCDQNDIFYTSKKSHKSHCSR | 4 |
| AP06-26 | AFF-6006 | SSSDVYLVSHKHHLTRHNSSR | 5 |
| AP06-27 | AFF-6007 | SSSDKCHKHWYCYESKYGGSSR | 6 |
| AP06-28 | | HHKLKHQMLHLNGG | 7 |
| AP06-29 | | GHHHKDQLPQLGG | 8 |

次いで提示されたペプチドを、C 末端ビオチン残基と共に合成し、そしてチタンに対する結合に関して試験した。結果を図 2 に示す。簡単には、粉末を 1 0 0 % D M S O に溶解して 1 m M のペプチド溶液を作成することによって、ペプチドストック溶液を作製した。P B S - T でペプチドの系列希釈を作製した。P B S 中 1 % の脱脂粉乳でブロックしたチタンビーズを、様々な濃度のペプチドと、振とうしながら室温で 1 時間インキュベートした。ビーズを P B S - T で 3 回洗浄した。U S B のストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ (S A - A P) (U n i t e d S t a t e s B i o c h e m i c a l 、カタログ番号 1 1 6 8 7) を加え (P B S - T 中 1 : 1 0 0 0) 、そして振とうしながら室温で 1 時間インキュベートした。ビーズを P B S - T で 3 回洗浄し、そして P N P P (S i g m a - A l d r i c h , I n c . , S i g m a F a s t タブレット、カタログ番号 N 1 8 9 1) を加え、そして約 1 0 分間発色させることによって、ペプチド : S A - A P の量を決定した。溶液を透明なマイクロタイタープレートに移し、そして M o l e c u l a r

Dynamics Plate Readerで405nmにおける吸光度を読み取ることによって、定量を行った。ペプチド「9003」は当該分野で公知である。このペプチドを酵素ヘキソキナーゼに結合したファージディスプレイによって同定した；これはこの実験のネガティブコントロールとして役立つ（例えば、Hyde - DeRuysscheら（2000）Chem. Biol. 7: 17 - 25を参照のこと）。

【0054】

（実施例2：チタン結合ペプチド6007におけるシステイン残基の役割）

ペプチド6007のチタンに対する結合における、システイン残基およびジスルフィド形成の役割を探索するために、ペプチドAFF6010を合成し（表2）、ここでチタン結合ペプチドAFF6007において存在するシステイン残基をセリン残基に変化させた。ペプチドAFF6010の配列（SSSDKSHKHWYSYESKYGGSGSGK）は配列番号9に示され、一方ペプチドAFF6007の配列（SSSDKCHKHWYCYESKYGGSGSGK）は配列番号10に示される。次いで、これらのペプチドAFF6007およびAFF6010をビオチンに結合させ、そして以下のようにチタンビーズに対する結合に関して比較した。

【0055】

チタンビーズをPBS中1%のBSAで、室温で30分間ブロックした。ペプチドAFF6007およびAFF6010のストック溶液を、1 - 2mgのペプチドを水に溶解することによって調製した。各ペプチドの最終濃度を、280nmにおける吸光度および各ペプチドの吸光係数を用いて決定した。AFF6007およびAFF6010を200μMで調製した。次いで系列希釈を、各ペプチドサンプルに関して調製した。各ペプチドを、PBS中1%のBSA中で3倍希釈させた。

【0056】

これらのペプチドをチタンビーズと室温で1時間インキュベートした。次いでビーズをPBS/TweenTM20で2回洗浄した。次いでストレプトアビジン - アルカリホスファターゼを、1:500で、室温で30分間ビーズに加えた。ビーズをPBS/TweenTM20で2回洗浄した。アッセイを発色させるためにPNPPを使用し、そして405nmにおける吸光度を記録した。

【0057】

図3に示す結果は、ペプチドAFF6007およびAFF6010はどちらもチタンに結合することを示す。ペプチドのチタンに対する相対的親和性の推定を、最大シグナルの1/2を示すペプチド濃度を決定することによって行い得る（表2）。AFF6007におけるシステイン残基の完全な除去は、ペプチドのチタンに対する親和性を約10倍減少させるが、それを無くすことはない（表2）。従って、システイン残基は、チタンに対する結合に必要なではないが、ペプチドのチタンに対する親和性を増加させる。

【0058】

【表2】

表2:チタン結合ペプチドの相対的親和性

| サンプル | [ペプチド] 1/2 最大シグナル |
|---------|----------------------|
| AFF6007 | 0.35 μM |
| AFF6010 | 3 μM |

（実施例3：骨形成タンパク質2（「BMP-2」）に特異的に結合するペプチド）

（ペプチドの単離および分析）

10個の異なるファージディスプレイライブラリーを、BMP-2に対する結合に関してスクリーニングした。BMP-2（Medtronic）をNHS - ビオチン（Pierce）でビオチン化して、タンパク質分子あたり平均1つのビオチンを有する標識タンパク質を作製した。このタンパク質をストレプトアビジン（SA）でコーティングしたプレートに固定化し、そしてファージディスプレイの標的として使用した。タンパク質を提

示する第2の方法として、BMP-2をまた、製造業者の指示に従って、NHS-スクシニミド化学反応を用いてセファロースビーズに連結し(Amersham-Pharmacia、参照番号18-1022-29、表題「Coupling through the Primary Amine of a Ligand to NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow」、105-108頁)、そしてそのビーズを固相として使用して未結合のファージからの遊離のものを分離した。3回のセレクションの後、各フォーマットからの個々のクローンを、HRPに結合した抗M13ファージ抗体を用い、従来のELISAを利用し、続いて発色剤ABTSを加えることによって、SAでコートしたプレート上でBMP-2に対する結合に関して試験した。

【0059】

BMP-2に特異的に結合するペプチドをコードするDNA配列を決定した。ペプチド挿入断片をコードする配列は、ファージゲノム中に位置し、そして翻訳されてファージ表面に提示される対応するアミノ酸配列を生成した。BMP-2に特異的に結合する代表的なペプチドを表3に列挙し、そして配列番号11-26として記載する。いくつかの実施形態において、本発明の代表的な結合モジュールは、大文字で示された配列の部分のみを含む。

【0060】

【表3】

表3: BMP-3に特異的に結合するペプチド

| クローン番号 | 合成ペプチド番号 | 配列 | 配列番号 |
|---------|----------|-------------------------|------|
| AP02-45 | AFF-2011 | ssDWGVVASAWDAFEALDAsr | 11 |
| AP02-46 | | ssGADFGYGSWVSEFALSAsr | 12 |
| AP02-47 | | srGEASGWEAFSALEAAVVsr | 13 |
| AP02-48 | AFF-2006 | srSSDSAESEFSALEGSVVsr | 14 |
| AP02-49 | | srDGAGAAAWGAFSALASEsr | 15 |
| AP02-50 | AFF-2007 | srGGEAAAGAWVSEFSALESsr | 16 |
| AP02-51 | | srVSGVAWEAFAGLSVSSsr | 17 |
| AP02-52 | AFF-2010 | srDGGSEFSAFSSLVWAADSsr | 18 |
| AP02-53 | | ssVAGDVGSWAAAFASLAAsr | 19 |
| AP02-54 | AFF-2008 | ssWEVEFSSLESGSVGAGAGsr | 20 |
| AP02-55 | | ssSSGAVSSFEFSLSGSVVSSsr | 21 |
| AP02-56 | | srEGVAWEAFGALSSFAADSsr | 22 |
| AP02-57 | | ssWGLASEASFFSFALSsr | 23 |
| AP02-58 | | srEGAAWDSFFALSGGSAAsr | 24 |
| AP02-59 | AFF-2012 | ssSVDLYFPLKGDVVsr | 25 |
| AP02-60 | AFF-2009 | ssFEPLRFPLKGVPSsr | 26 |

同定されたペプチドは、2つの異なる「配列クラスター」に分かれる。各配列クラスターは、共通の配列モチーフを含む。BMP-結合ペプチドの第一の配列クラスターに関して、共通のモチーフ(「モチーフ1」と呼ばれ、そして配列番号27に記載される)は、芳香族のもの-X-X-Phe-X-「小さいもの」-Leu(芳香族のもの=Trp、Phe、またはTyr; X=任意のアミノ酸; 「小さいもの」=Ser、Thr、Ala、またはGly)である。モチーフ1は、上記の表3において示されるように、配列番号11-24において少なくとも部分的に見出される。第二の配列クラスターモチーフ(また、配列番号28に記載される)は、配列(LeuまたはVal)-X-Phe-Pro-Leu-(LysまたはArg)-Glyを含む。モチーフ2と呼ばれるこのモチーフ

は、上記の表 3 において示されるように、配列番号 25 および 26 において見出される。代表的な結合モジュールはまた、本明細書中で同定されるこの配列モチーフまたは他の配列モチーフの必要条件を満たす配列を含む（すなわち、それらモジュールはこれらのモチーフ内に含まれる配列を含む）。

【0061】

BMP-2 に結合する配列のさらなる特徴を決定するために、さらなる実験を行った。具体的には、これらのモチーフを囲むさらなる好ましいアミノ酸が存在するかどうかを決定するために、さらなるスクリーニングを行った。下記でさらに議論するように、集束ライブラリー（*focused library*）を設計し、そして mA EK フェージディスプレイベクターにクローニングし、そして得られたフェージを、BMP-2 に対する結合に関してスクリーニングした。以下の配列を含むペプチドを発現するよう、モチーフ 1 の集束ライブラリーを設計した：X - X - X - X - X - (W / L / C / Y / F / S) - X - X - (W / L / C / Y / F / S) - X - (A / G / N / S / T) - (L / F / I / M / V) - X - X - X - X - X、ここで X は 20 個の天然に存在するアミノ酸のいずれかを示し、そしてカッコ内の位置はカッコ内に列挙されたアミノ酸に限定する。これらのペプチドは、配列：

【0062】

【化 1】

5'- GATCCTCGAGNNKNNKNNKNNKNNKNTBNBNKNNKNTBNBNKRSYNTKNN
KNNKNNKNNKNNKTCTAGAGCGCTACG 3'

（ここで「N」は 4 つのヌクレオチド A、G、C、または T のいずれかである；「K」は G または T である；「R」は A または G である；「S」は C または G である；「B」は C、G、または T である；および「Y」は C または T である）を含むオリゴヌクレオチドによってコードされた。モチーフ 2 の集束ライブラリーを、以下の配列を含むペプチドを発現するよう設計した：X - X - X - (L / F / I / M / V) - X - (W / L / C / Y / F / S) - (P / S / T / A) - (L / F / I / M / V) - (I / M / T / N / K / S / R) - X - X - X - X - X - X - X - X。これらのペプチドは、配列：

【0063】

【化 2】

5'- GATCCTCGANNKNNKNNKNTKNNKNTBNCKNTKANKNNKNNKNNKNNK
NNKNNKNNKNNKTCTAGAGCGCTACG 3'

を含むオリゴヌクレオチドによってコードされた。

【0064】

モチーフ 1 集束ライブラリーの代表的なライブラリー構築スキームとして、以下を提供する。当業者によって認識されるように、他のライブラリーに関して、同様の戦略を使用し得る。モチーフ 1 の集束ライブラリーを作製するため、適切な制限酵素部位には含まれた上記の配列を含むオリゴヌクレオチドを合成した。このオリゴヌクレオチドは、配列：

【0065】

【化 3】

5'- GATCCTCGAGNNKNNKNNKNNKNNKNTBNBNKNNKNTBNBNKRSYNTKNNKNN
KNNKNNKNNKTCTAGAGCGCTACG-3'

を含んでいた。この配列において、下線を引いた配列 CTCGAG および TCTAGA は、ライブラリーをフェージベクターにクローニングするために使用する、XhoI 制限酵素部位および XbaI 制限酵素部位を示す。短いプライマーをオリゴヌクレオチドにアニーリングさせ、そして DNA ポリメラーゼを使用して相補鎖を合成する。得られた 2 本鎖 DNA 分子を、XhoI および XbaI で消化し、そしてフェージディスプレイベクターにクローニングする。ライゲーションした DNA を適切な細菌宿主へ形質転換し、そして

増幅してファージライブラリーを形成する。

【0066】

モチーフ1およびモチーフ2の集束ライブラリーを、上記で記載されたように、ストレプトアビジンをコートしたプレートに固定化されたビオチン化BMP-2を用いて、BMP-2に対する結合に関してスクリーニングした。BMP-2に対する2回のセレクトの後、BMP-2に結合するペプチドを提示するファージについてライブラリーを富化した。富化したファージのプールを、細菌細胞の菌叢にプレートし、個々のファージを単離した。個々のファージクロンを、ELISA型のアッセイおよびHRPに結合した抗M13ファージ抗体(Amersham Biosciences #27-9421-01)を用いて、続いて発色剤ABTS(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, カタログ番号A3219)を加えて、BMP-2に対する結合に関して試験した。

10

【0067】

BMP-2に特異的に結合するペプチドをコードするDNA配列を決定した。ペプチド挿入断片をコードする配列は、ファージゲノムに位置し、そして翻訳されてファージ表面に提示された対応するアミノ酸配列を生成した。

【0068】

BMP-2に特異的に結合するモチーフに基づく集束ライブラリー由来の代表的なペプチドを、表4および5に列挙し、そして配列番号44-71および配列番号77-92として記載する。いくつかの実施形態において、本発明の代表的な結合モジュールは、大文字で示された配列の一部のみを含むか、またはこれらの配列に基づいて同定されたモチーフまたはコンセンサス配列内に含まれる配列のみを含む(すなわち、モチーフ1、モチーフ1a、またはモチーフ2の範囲内に含まれる配列を含むか、または配列番号72、74、または93に識別されるコンセンサス配列を含む)。

20

【0069】

【表 4】

表4:モチーフ1集束ライブラリー由来のBMP結合ペプチド

| クローン番号 | 配列 | 配列番号 |
|---------|------------------------|------|
| AP02-01 | ssAPLTESEAWRGESKLEVsr | 44 |
| AP02-02 | ssSMPVGWDSWRGLEWSDRsr | 45 |
| AP02-03 | ssEGRGGWNSWEAFRELVVsr | 46 |
| AP02-04 | ssGGGGAWESWRGLSGVELsr | 47 |
| AP02-05 | srNVEGSWESFAGLSHVRESr | 48 |
| AP02-06 | srEDGGRWESFLGLSAVEVsr | 49 |
| AP02-07 | ssVEGSAWSAFKSLISSEGVsr | 50 |
| AP02-08 | srVEGGAWQALAGLTVERVsr | 51 |
| AP02-09 | ssPPKHAWGSFDALGGQVVsr | 52 |
| AP02-10 | ssERGVGWEVELAMEGARMsr | 53 |
| AP02-11 | ssSSSGTWQAFTGLSGERVsr | 54 |
| AP02-12 | ssSPGGGSGGWDAFYSLVGsr | 55 |
| AP02-13 | ssCGGGGGEGESSLSGNRsr | 56 |
| AP02-14 | ssTGGGSWEFEKAMTPSWTsr | 57 |
| AP02-15 | ssEGSGLWDSFSSLSVHEVsr | 58 |
| AP02-16 | ssGVTQESASWSSERTLAVsr | 59 |
| AP02-17 | ssSKVAPSGEWRSEATLEVsr | 60 |
| AP02-18 | ssEAGRGWEGFKALEGYQVsr | 61 |
| AP02-19 | ssLGQTGWAEFESLSGTRGsr | 62 |
| AP02-20 | ssVAWDAFTVFESLEGVATsr | 63 |
| AP02-21 | ssEVVEPWENWVALERAGGsr | 64 |
| AP02-22 | srVAAVSWEFEGSLSSAGVsr | 65 |
| AP02-23 | ssADLGVSGSWEGFALMRGsr | 66 |
| AP02-24 | ssVGQMGWEAEFESLSGTGGsr | 67 |
| AP02-25 | ssGQGETWEWEAGMRGSVAAsr | 68 |
| | | 69 |
| AP02-26 | ssYEDVFSMTGTTRAAGSWsr | |
| AP02-27 | ssAYSVFSSLRADNSGGAVsr | 70 |
| AP02-44 | ssGGIASLKYDVVKTWESr | 71 |

10

20

30

40

50

BMP-2に結合し、そしてモチーフ1を含む、表3および6由来の全てのペプチド配列の分析の結果を作成し、そして図7に示す。モチーフ1を含む40個のBMP結合配列の整列から、コンセンサス配列を得ることができ(Gly-Gly-Gly-Ala-Trp-Glu-Ala-Phe-Ser-Ser-Leu-Ser-Gly-Ser-Arg-Val; 配列番号72)、それは全てのペプチドを整列させた後に各位置において見出される優勢なアミノ酸を示す。40個の配列のうち、最も保存されたアミノ酸が、コア結合モチーフを形成し、それはモチーフ1を含む全ての配列のサブセットを示す。「モチーフ1a」と呼ばれるこのモチーフは、配列Trp-X-X-Phe-X-X-Leu(配列番号73)を有する。本発明はいかなる特定の作用メカニズムに拘束されないが、このモチーフにおいて、ペプチドのTrp、Phe、およびLeu残基がBMP-2タンパク質との特異的相互作用に関与し、それがペプチドのBMPに対する結合の原因であると考えられる。これに基づいて、このコア結合モチーフを含む他のペプチドも、BMPに結合するという仮説を立てた。

【0070】

この考えを試験するために、ペプチド配列の並びの中にこのコア結合モチーフ1aを含むペプチドを発現するオリゴヌクレオチドカセットを設計した。この配列はまた、その配列中に同定された他の位置に対するコンセンサス残基(これもまたコア結合モチーフを含まない)を含んでいた(図8; 配列番号74を参照のこと)。偶発的に、ファージディスプレイ

レイによって以前に単離されたBMP結合ペプチドのどれも、実際この正確な配列を含まない(例えば表4を参照のこと)。このオリゴヌクレオチドカセットを、mA EKファージディスプレイベクターにクローニングし、そして得られたファージ(AP02-61と呼ばれる)をBMP-2への結合に関して試験し、そして他のファージディスプレイBMP結合ペプチドと比較した(いくつかのファージの結果を図9に示す)。少なくとも1つの試験したファージ(AP02-37と呼ばれる)が、ディスプレイベクターmA EKのものと同様またはそれより下のレベルで結合を示した。いくつかの実施形態において、本発明の代表的な結合モジュールは、大文字で示された配列の部分のみを含む。

【0071】

【表5】

10

表5:モチーフ2集束ライブラリー由来のBMP結合ペプチド

| クローン番号 | 配列 | 配列番号 |
|---------|------------------------|------|
| AP02-28 | ssEGVGGFPLKGIPQEAAsr | 77 |
| AP02-29 | ssPSGVVFPLRGELLGVXKsr | 78 |
| AP02-30 | ssGGFVDFPLRGVWDGVHsr | 79 |
| AP02-31 | ssEGSIISFPLKGQVYSGWGsr | 80 |
| AP02-32 | ssGKPIEFPLRGTLAEPVsr | 81 |
| AP02-33 | srGEALGFPLTGQLEAAEsr | 82 |
| AP02-34 | ssMWDVGFPLKGRWIDGADsr | 83 |
| AP02-35 | ssSNSLWFPLRGSTVEVGAsr | 84 |
| AP02-36 | ssGPALRLPLRGTVVSDVPsr | 85 |
| AP02-37 | ssADRVAVPLKGAPVWVKEsr | 86 |
| AP02-38 | ssGLALGLEIKGWTVSGKDs | 87 |
| AP02-39 | ssGYTLGFPLSGQTIKDWPs | 88 |
| AP02-40 | ssEGWVHFPLKGDVMGGPFsr | 89 |
| AP02-41 | ssGRYVSLPLKGEVVPQTAsr | 90 |
| AP02-42 | ssEGGVGFPLKGIPQEAAsr | 91 |
| AP02-43 | srVDSVNFPLRGETVTSMVsr | 92 |

20

30

モチーフ2を含む、表3および7由来のペプチドの整列から、コンセンサス配列を得ることができ(Gly-Gly-Ala-Leu-Gly-Phe-Pro-Leu-Lys-Gly-Glu-Val-Val-Glu-Gly-Trp-Ala; 配列番号93; 図10を参照のこと)、それは全てのペプチドを整列させた後に各位置において見出される優勢なアミノ酸を示す。試験した配列のうち、最も保存されたアミノ酸は、「モチーフ2a」と呼ばれるコア結合モチーフを形成し、それは配列Leu-X-Phe-Pro-Leu-Lys-Gly(配列番号94)を有する。

【0072】

モチーフ2は、モチーフ1よりも配列においてより制限されているようであり、ここでモチーフ2は6つの位置において必要条件を課すが、一方モチーフ1は3つの位置においてのみ必要条件を課す。全てのモチーフ2を含むBMP結合ペプチドがコア結合モチーフにおいて見出されるPro残基およびGly残基を含むので、モチーフ2のPro残基およびGly残基は、結合に必要なようである。モチーフ2のコンセンサス配列情報を用いて、モチーフ2コア結合モチーフをペプチド配列に組み込むことによって、BMP結合ペプチドを設計し得る。

40

【0073】

(合成ペプチドの作製およびBMP-2結合アッセイ)

次いで、提示されるペプチドの代表的なセットを、C末端ビオチン残基と共に合成し、そしてBMP-2に対する結合に関して試験した。結果を図4に示す。簡単には、粉末を100%のDMSOに溶解して10mMのペプチド溶液を作製することによってペプチド

50

ストック溶液を作製し、次いで10%のDMSO中1mMのペプチドの最終ストック濃度に水を加えた。ペプチドの系列希釈をPBS-Tで作製した。100nmから0.1nmまでの範囲の濃度を有するBMP-2の希釈系列を、マイクロタイタープレート(Dynex Technologies、Chantilly、VirginiaのImmulon-4(登録商標)HBX)のウェルに固定化し、そして1%のBSAでブロックした。これらのプレートを様々な濃度のペプチドと共に、振とうしながら室温で1時間インキュベートした。ビーズをPBS-Tで3回洗浄した。USBのストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ(SA-AP)(United States Biochemical、カタログ番号11687)を加え(PBS-T中1:1000)、そして振とうしながら室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで3回洗浄し、そしてペ

プチド:SA-APの量を、PNPP(Sigma-Aldrich, Inc., SigmaFastタブレット、カタログ番号N1891)を加えて、そして約10分間発色させることによって決定した。Molecular Dynamics Plate Readerにおいて、405nmにおける吸光度を読むことによって、定量を行った。結果を図4にまとめる。

10

20

30

40

50

【0074】

これらのBMP結合結果を確認するために、ペプチドを第2のアッセイ形式においても試験し、ここでペプチドおよびBMP2を溶液中で結合させ、そして次いでアッセイした。簡単には、ペプチドのC末端におけるリシン残基のアミノ基に結合したビオチン基を有するペプチドを合成した。ビオチン化ペプチド(0-12pmol)を、溶液中でBMP

P-2(0-25pmol)と混合し、そしてポリプロピレンプレートにおいて37で30分間インキュベートさせた。この溶液をストレプトアビジンでコーティングしたプレートに移し、そして37で1時間インキュベートしてビオチン化ペプチドを捕獲した。プレートをTBSTweenTM20で洗浄し、そして次いで抗BMP抗体(1:1000希釈; R&D systems)と室温で1時間インキュベートした。洗浄の後、次いでアルカリホスファターゼで標識した2次抗体をプレートに加え、そして室温で30分間インキュベートした。プレートをTBSTweenTM20で洗浄し、そして色素生産性AP基質pNPPを用いて抗体の結合を検出した。代表的な結果を図11に示す。このデータから、各BMP結合ペプチドのBMP-2に対する親和性を計算した(表6)。

【0075】

【表6】

表6:BMP結合ペプチドのBMP-2に対する推定親和性

| ペプチド | 推定親和性(nM) |
|------|-----------|
| 2012 | 9 |
| 2009 | 10 |
| 2006 | 21 |
| 2011 | 55 |
| 2007 | 79 |
| 2008 | 99 |

(BMP-2結合ペプチドは、他のBMPタンパク質に結合する)

骨形成タンパク質(BMP)は、BMP、トランスフォーミング成長因子-(TGF-)および成長/分化因子(GDF)を含むTGF-スーパーファミリーのメンバーである。TGF-スーパーファミリーのタンパク質は、構造的に非常に類似している。タンパク質骨格の折り畳まれた構造は、ファミリーの全てのメンバーの間でほとんど同一

である。BMP間の構造における類似性に基づいて、本発明者らは、いくつかのBMP-2結合ペプチドがBMP-4およびBMP-7に結合する能力を試験した。ビオチン化ペプチド2007および2011を、上記で記載したように、BMP-2、BMP-4、およびBMP-7に対する結合に関して試験した。2007および2011はどちらも、3つのBMP全てに結合し、一方無関係な標的に結合するペプチド(AFF-9001)は、どのBMPにも結合しなかった(図12)。

【0076】

(実施例4：BMP-2をコラーゲン上に固定化するIFBMの作製)

コラーゲン結合特性およびBMP-2結合特性を有する分子を設計するために、コラーゲンに結合するペプチドおよびBMP-2に結合するペプチドを含むIFBMを作製した。この「ハイブリッドペプチド」IFBMの例を、表7に示す。

10

【0077】

【表7】

表7:コラーゲンおよびBMP-2に結合するIFBM

| IFBM 番号 | ペプチド | ペプチド配列 | 配列番号 |
|-------------|---------------|---|------|
| AFF 7005 | 2009- 0016 | SSFEPLRFPLKGVPSRGSSGKDVNSIWMSRVIEWTYDS-NH2 | 29 |
| AFF 7006 | 0016- 2009 | DVNSIWMSRVIEWTYDSGSSGKSSFEPLRFPLKGVPSR-NH2 | 30 |
| AFF 7007 | 2006- 0016 | SRSSDSAFSSFSALEGSVVSRGSSGKDVNSIWMSRVIEWTYDS-NH2 | 31 |
| AFF 7008 | 0016- 2006 | DVNSIWMSRVIEWTYDSGSSGKSRSSDSAFSSFSALEGSVVS-NH2 | 32 |
| AFF 7009 | 2012- 0016 | SSSVDLYFPLKGDVVSRGSSGKDVNSIWMSRVIEWTYDS-NH2 | 33 |
| AFF 7010 | 0016- 2012 | DVNSIWMSRVIEWTYDSGSSGKSSSVDLYFPLKGDVVS-NH2 | 34 |
| AFF 7014 | 2007- 0016 | SRGGEAAAGAWVSFSALESSRGSSGKDVNSIWMSRVIEWTYDS-NH2 | 35 |
| AFF 7015 | 0016- 2007 | DVNSIWMSRVIEWTYDSGSSGKSRGGEAAAGAWVSFSALESS-NH2 | 36 |
| AFF 7016 | 2011- 0016 | SSDWGVVASAWDAFEALDASRGSSGKDVNSIWMSRVIEWTYDS-NH2 | 37 |
| AFF 7017 | 0016- 2011 | DVNSIWMSRVIEWTYDSGSSGKSSDWGVVASAWDAFEALDAS-NH2 | 38 |

20

30

表7で示すように、各IFBMは短いリンカー配列が続くAFF0016由来のコラーゲン結合ドメインを含み、それは次いで「ハイブリッドペプチド」において上記の実施例由来のBMP結合配列に連結される。これらの分子を両方の方向で合成して、IFBMがコラーゲンまたはBMP-2に結合する能力に対するN末端位置またはC末端位置の効果を評価した。

40

【0078】

これらのIFBMがコラーゲンスポンジによって保持されるBMPの量を増加させたかどうかを決定するために、本発明者らは、IFBMとBMPを混合し、この混合物をスポンジに加え、1.5時間それらを結合させ、スポンジを洗浄し、そして抗BMP抗体を用いて結合したBMPを検出した。簡単には、1-2mgのペプチドを量り、そして水に溶解することによって、ストックIFBM溶液を調製した。280nmにおけるペプチドの吸光度および吸光係数を分析することによって、最終ペプチド濃度を決定した。各列に関して、20μLのペプチドを、ポリプロピレンマイクロタイタープレートの各ウェルに加えた。次いでBMPを、32μMのBMPから始まる3倍の希釈系列でこれらのウェルのそれぞれに加えた。IFBMおよびBMPを室温で30分間混合させた。

50

【 0 0 7 9 】

各ウェルに、直径 2 / 1 6 " のコラーゲンスポンジ (M e d t r o n i c) を加えた。このコラーゲンとペプチドとの溶液を、室温で 1 . 5 時間インキュベートさせた。次いでスポンジを 2 0 0 μ L の M e d t r o n i c 緩衝液で、2 2 0 0 r p m で 1 分間、3 回すすいだ。各スポンジに対して、BMP に対する 1 次抗体 (1 : 1 0 0 0 に希釈 ; R & D S y s t e m s # M A B 3 5 5 2) を、室温で 1 時間加えた。次いでアルカリホスファターゼに結合した 2 次抗体 (1 : 5 0 0 0) を、その系において室温で 0 . 5 時間インキュベートした。その系を発色させるために P N P P を使用し、4 0 5 n m における吸光度を読み取った。結果を図 5 に示す。

【 0 0 8 0 】

図 5 に示した結果は、I F B M A F F 7 0 1 0 が、I F B M なしのスポンジより、多くの BMP をスポンジに保持することを示す。I F B M A F F 7 0 0 8 および A F F 7 0 1 7 は、I F B M なしと比較した場合にスポンジにおける BMP の量を増加させるが、A F F 7 0 1 0 より少ない程度である。BMP のスポンジへの保持の増加は、コラーゲン結合配列を含まない BMP 結合ペプチドである A F F 2 0 0 6 の添加によっては認められない。

【 0 0 8 1 】

この効果が、スポンジに加えた BMP の量だけでなく、存在する I F B M の量に対しても用量依存性であることを示すために、I F B M および BMP 両方の濃度が変動させて、一連の 2 次元用量反応性曲線を得た。これらの結果を図 6 A - 6 D で示し、そして BMP のコラーゲンスポンジに対する結合は、BMP 濃度および I F B M 濃度の両方に依存性であることを示す。I F B M (A F F 7 0 0 5 、 A F F 7 0 0 6 、 A F F 7 0 0 9 、または A F F 7 0 1 0) の濃度を増加させることは、より多くの量の BMP - 2 がコラーゲンに保持されることを引き起こす。

【 0 0 8 2 】

(実施例 5 : ステンレス鋼に結合するペプチド)

チタンビーズの代わりに 5 / 3 2 インチのステンレス鋼ビーズを使用した以外は、チタン結合ペプチドに関して上記で記載されたように、ステンレス鋼結合ペプチドのセクションを行った。単離されたステンレス鋼結合ペプチドを表 8 に示す。いくつかの実施形態において、本発明の代表的な結合モジュールは、大文字で示された配列部分のみを含む。

【 0 0 8 3 】

【 表 8 】

表 8 : ステンレス鋼結合ペプチド

| ファージ名 | ペプチド配列 | 配列番号 |
|---------|--------------------------|------|
| AP08-03 | ssSSYFNLGLVKHNVHRHDSsr | 39 |
| AP08-02 | ssCHDHSNKYLKSWKHQQNCsr | 40 |
| AP08-01 | ssSCKHDSEFIKKHVHAVKKCSr | 41 |
| AP08-04 | ssSCHHLKHNTTHKESKMHHECSr | 42 |
| AP08-06 | ssVNKMNRLWEPLsr | 43 |

(実施例 6 : テフロン (登録商標) に結合するペプチド)

チタンビーズの代わりに G o r e T e x 布の断片を使用した以外は、チタン結合ペプチドに関して上記で記載されたように、テフロン (登録商標) (G o r e T e x (登録商標) ; ポリテトラフルオロエチレン (P T F E)) 結合ペプチドのセクションを行った。単離されたテフロン (登録商標) 結合ペプチドを表 9 に示す。いくつかの実施形態において、本発明の代表的な結合モジュールは、大文字で示された配列部分のみを含む。

【 0 0 8 4 】

【表 9】

表9:テフロン結合ペプチド

| クローン番号 | ペプチド配列 | 配列番号 |
|---------|------------------------|------|
| AP16-01 | ssCWSRFRLFMLFCMFYLVSSr | 95 |
| AP16-02 | srCIKYPFLYCCLLSLFLFSsr | 96 |

(実施例 7 : B M P R I および / または B M P R I I に特異的に結合するペプチドの単離)

B M P R I および / または B M P R I I に結合するペプチドの同定 : 骨形成タンパク質レセプター I (B M P R I A) および / または骨形成タンパク質レセプター I I (「 B M P R I I 」) に特異的に結合するペプチドを同定するために、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングして、各レセプターの細胞外ドメインに結合するペプチドをコードするファージを同定する。これらのレセプターの細胞外ドメインは当該分野で公知である (R o s e n w e i g ら (1 9 9 5) P r o c . N a t ' l . A c a d . S c i . U S A 9 2 : 7 6 3 2 - 7 6 3 6 ; T e n D i j k e ら (1 9 9 4) J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 1 6 9 8 5 - 1 6 9 8 8) 。様々なファージライブラリーをスクリーニングする。適切な場合、特定のアミノ酸モチーフを中心として設計された、または特定の

アミノ酸に偏って作製されたファージライブラリーをセクションし得る。B M P R I A および B M P R I I (R & D S y s t e m s 、カタログ番号 3 1 5 - B R / C F および 8 1 1 - B R) を、炭酸塩コーティング緩衝液 (1 0 0 m M の N a H C O ₃ 、p H 9 . 6) に溶解し ; 1 0 0 μ l のこの溶液を、9 6 穴 I m m u l o n (登録商標) - 4 マイクロタイタープレート (D y n e x T e c h n o l o g i e s 、C h a n t i l l y 、V i r g i n i a) のウェルに加える。プレートを 4 で一晩インキュベートし、そして次いでポリスチレン表面の非特異的結合部位を、炭酸塩コーティング緩衝液中 1 % のウシ血清アルブミン (B S A) でブロックする。次いでプレートを、5 0 r p m で振とうしながら、室温で 1 時間インキュベートする。次いでウェルを 3 0 0 μ l の P B S - T (S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s , M i s s o u r i 、カタログ番号 P - 3 5 6 3) で 5 回洗浄する。各ライブラリーを P B S - T で希釈し、そして 1 0 0 μ l の全量で、1 0 ¹⁰ p f u / m l の濃度で加える。次いでプレートを 5 0 r p m で振とうしながら室温で 3 時間インキュベートする ; 次いで結合しなかったファージを P B S - T で 5 回洗浄して除去する。0 . 1 M のグリシン緩衝液 p H 2 . 2 で変性することによって、結合したファージを回収する (P h a g e D i s p l a y o f P e p t i d e s a n d P r o t e i n s : A L a b o r a t o r y M a n u a l 、1 9 9 6 、K a y ら編 (A c a d e m i c P r e s s 、S a n D i e g o 、C A) を参照のこと) 。溶出したファージを、リン酸緩衝液で中和化し、そして次いで 2 × Y T 培地中の E . c o l i D H 5 細胞に加える。この混合物を、2 1 0 r p m の振とう機で、3 7 で一晩インキュベートする。8 5 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離することによって、ファージの上清を回収する。2 回目および 3 回目のセクションを、インプットファージとして前の回のセクション由来のファージを使用して、1 回目のセクションと同様に行う。ファージディスプレイ技術は、例えば P h a g e D i s p l a y o f P e p t i d e s a n d P r o t e i n s : A L a b o r a t o r y M a n u a l 、K a y ら編 (A c a d e m i c P r e s s 、S a n D i e g o 、C A) 中の S p a r k s ら (1 9 9 6) 「 S c r e e n i n g p h a g e - d i s p l a y e d r a n d o m p e p t i d e l i b r a r i e s 」、2 2 7 - 2 5 3 頁において記載されるように、当該分野で周知である。

【 0 0 8 5 】

B M P R I A または B M P R I I に特異的に結合するファージを同定するために、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) に結合した抗 M 1 3 ファージ抗体を用いて、続いて色素生産性薬剤 A B T S (S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s 、M

10

20

30

40

50

i s s o u r i、カタログ番号 A 3 2 1 9) を加えて、通常の E L I S A を行う。ファージの相対的結合強度を、E L I S A において、B M P レセプターへの結合に関して、ファージ段階希釈を試験することによって決定する。選択されたペプチドそれぞれをコードする D N A を単離し、そして配列決定して選択されたペプチドのアミノ酸配列を決定する。
【 0 0 8 6 】

次いでこれらのペプチドを共に連結して検体モジュールを作成し、それが B M P R I および B M P R I I のそれぞれに結合して、シグナル伝達を誘導するようにこれら 2 つのレセプターのヘテロダイマーを形成する。候補ペプチドを合成およびビオチン化し、そしてその B M P レセプターへの結合を確認する。簡単には、ビオチン化ペプチドを、B M P レセプター結合配列および結合したビオチン部分の間のリンカーと共に合成した。このリンカーは、アミノ酸配列 G S S G K を有し、それはビオチン部分をペプチドのレセプター結合部分から分離するよう作用し、そしてそれは柔軟性がある。標準的な F m o c 化学を用いて、R a i n i n S y m p h o n y P e p t i d e S y n t h e s i z e r (R a i n i n I n s t r u m e n t C o . , E m e r y v i l l e , C a l i f o r n i a) で、固相ペプチド合成技術を用いてペプチドを合成する。N - - F m o c - アミノ酸 (直交性側鎖保護基) を、N o v a b i o c h e m (C a l b i o c h e m - N o v a b i o c h e m , L a u f e l f i n g e n , S w i t z e r l a n d) から購入し得る。全ての残基が結合した後、トリフルオロ酢酸 (T F A) カクテルの処理によって、切断および側鎖の脱保護を同時に達成する。粗製ペプチドを、冷ジエチルエーテルで沈殿させ、そして V y d a c C 1 8 シリカカラム (分取用 1 0 μ m、2 5 0 m m \times 2 2 m m ; G r a c e V y d a c C o . , H e s p e r i a , C a l i f o r n i a) で、S h i m a d z u A n a l y t i c a l / S e m i - p r e p a r a t i v e H P L C ユニットにおける高速液体クロマトグラフィーによって、0 . 1 % の T F A を含む直線的な水 / アセトニトリルの勾配を用いて精製する。合成ペプチドの均一性を、分析的 R P - H P L C (V y d a c C 1 8 シリカカラム、1 0 μ m、2 5 0 m m \times 4 . 6 m m) によって評価し、そして例えば U N C - C H P r o t e o m i c s C o r e F a c i l i t y で商業的に行われるように、ペプチドの正体を M A L D I - T O F - M S で確認する。

【 0 0 8 7 】

B M P R I および / または B M P R I I に高親和性で結合するペプチドの作製 : B M P R I および / または B M P R I I に結合するとして最初に同定されたペプチドは、例えば中程度 ~ 低い μ M の範囲の低い結合親和性を有し得、一方 I F B M において使用するためのペプチドは、例えば n M の範囲のより高い結合親和性を有することが好ましくあり得る。そのようなペプチドを同定するために、最初に同定されたペプチドの改変体ライブラリーを構築し、そして B M P R I および / または B M P R I I に対する親和性セクションによってスクリーニングする。

【 0 0 8 8 】

結合親和性の決定を、当該分野で公知の手順を用いて評価する。例えば、B M P R I、B M P R I I、および適切なコントロールタンパク質を、炭酸塩コーティング緩衝液 (1 0 0 m M の N a H C O ₃、p H 9 . 6) に溶解し、そして 9 6 穴ポリプロピレンプレートのウェルに加える。4 で一晩インキュベートした後、ウェルを P B S - T 中 1 % の B S A でブロックする。各レセプターおよびコントロールを、滅菌 P B S (p H 7 . 2) 中の 0 μ M ~ 2 0 0 μ M のペプチド濃度の範囲にわたって、結合に関して試験する。次いでウェルを洗浄して結合していないペプチドを除去し、そして U S B のストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ結合溶液 (S A - A P) (U n i t e d S t a t e s B i o c h e m i c a l # 1 1 6 8 7) を各ウェルに加えて、結合したペプチドの量を定量する。発色試薬 p - ニトロフェニルリン酸塩試薬 (S i g m a - A l d r i c h , I n c . , S i g m a F a s t タブレット、カタログ番号 N 1 8 9 1) を用いて、そして 4 0 5 n m における吸光度を測定して、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ活性を測定する。結合曲線およびおよその K_D を決定するために、吸光度を各ペプチドの濃度の関数と

してプロットする。例えば pH、温度、塩濃度、緩衝液の構成成分、およびインキュベーション時間のような、結合に対する他の因子の影響を評価し得る。

【0089】

BMPRI および / または BMPRII に高親和性で結合するペプチドを作製および同定するために、BMPRI および / または BMPRII に結合するとして単離された最初のペプチドの中で同定されたアミノ酸モチーフに基づいてファージライブラリーを作製し、そして改善した結合性質を有するペプチドに関してさらにスクリーニングする。そのような技術は、当該分野で公知である（例えば、Hyde - DeRuysscherら（2000）Chem. Biol. 7: 17 - 25; Dalbyら（2000）Protein Sci. 9: 2366 - 2376を参照のこと）。

10

【0090】

BMPRI 結合ペプチドおよび BMPRII 結合ペプチドを含むハイブリッドペプチドのアゴニスト活性の特徴づけ：柔軟なリンカー（例えば、配列 GSSGSSG を有するリンカー）に連結した BMPRI 結合ペプチドおよび BMPRII 結合ペプチドの両方を含む合成ペプチドを、化学合成する。あるいは、2つのレセプター結合ペプチドを、リシンのアミノ基とアミノ基とで連結し得る（例えば、Cwirllaら（1997）Science 276: 1696 - 1699 または Wrightonら（1997）Nat. Biotechnol. 15: 1261 - 1265のとおり）。これらのペプチドは、長さが約40アミノ酸であり、そして容易に合成および精製される。

20

【0091】

次いでこれらのペプチドを、当該分野で公知であるように、そして例えば Chengら（2003）J. Bone Joint Surg. Am. 85 - A: 1544 - 1552 および Ruppertら（1996）Eur. J. Biochem. 237: 295 - 302 によって記載されているように、例えばマウス間葉系 C3H10T1/2 細胞におけるアルカリホスファターゼ活性の誘導のような、BMP 活性に関してアッセイする。簡単には、C3H10T1/2 細胞を、10% FBS および適切な抗生物質および抗真菌剤を含む Gibco（登録商標）MEM/EBSS 培地（Invitrogen Corp.、Carlsbad、California、カタログ番号 11095 - 080）中で、96穴プレートに加える（容量 200 μ l 中、ウェルあたり 3×10^4 個の細胞）。細胞を、5%のCO₂ 雰囲気中で、37 でインキュベートすることによって、少なくとも3時間プレートに接着させる。次いで培地を無菌的に吸引し、そして BMP - 2 またはペプチドを、高グルコース Gibco（登録商標）DMEM（Invitrogen Corp.、Carlsbad、California、カタログ番号 11965 - 092）+ 2% FBS 中に種々の濃度で加える。細胞を試験する化合物と3日間インキュベートし、その時に培地を吸引し、そして細胞を 300 μ l の PBS（Gibco（登録商標）PBS、カタログ番号 14190 - 144、Invitrogen Corp.、Carlsbad、California）で3回洗浄する。H₂O 中 100 μ l の pNPP（p - ニトロフェニルリン酸塩、Sigma Fast Tablet Set カatalog 番号 N - 1891）を各ウェルに加え、そして 37 で18時間まで色素を発色させ、その後、405 nm における吸光度を読み取る。

30

40

【0092】

次いで当該分野で公知の方法を用いて、EC₅₀ 値を決定する。このアッセイの BMP - 2 に関する代表的な EC₅₀ 値は、1 μ g / ml および 10 μ g / ml の間の範囲である（例えば、Wiemannら（2002）J. Biomed. Mater. Res. 62: 119 - 127を参照のこと）。異なる供給源から単離された BMP - 2 は、異なるレベルの活性を示し得ることが当該分野で公知であり、そして当業者は、望ましい結果を達成するために、これらの違いを考慮してそのように手順を調整し得る。例えば、CHO 細胞を用いて調製された組み換えヒト BMP - 2（「rhBMP - 2」）は、E. coli を用いて調製された組み換えヒト BMP - 2 の活性とは 5 ~ 10 倍異なる活性を有することが、当該分野で公知である（例えば、Advances in Skeletal

50

Reconstruction Using Bone Morphogenic Proteins、T. S. Lindholm編における、ZhaoおよびChen(2002)「Expression of rhBMP-2 in Escherichia coli and Its Activity in Inducing Bone Formation」を参照のこと。

【0093】

ハイブリッドペプチドのコラーゲンへの固定化：BMP活性を示すハイブリッドペプチドを、コラーゲンに結合するペプチドに合成的に連結する。簡単には、Fmoc-Lys(Dde)-OHのような、モジュール間のリンカーのアミノ酸に直交性の保護基を有する、コラーゲン結合モジュールおよびBMPRI結合モジュールを含むペプチドを合成する。リシン側鎖のアミノ基のDde保護基を、選択的に除去し得、そしてBMPRII結合ペプチドを、アミノ基に結合させる。あるいは、コラーゲン結合モジュール、BMPRI結合モジュール、およびBMPRII結合モジュールを含む、直線状のペプチドを合成し得る。

10

【0094】

次いでコラーゲンに結合したハイブリッドペプチドを、そのBMP活性に関して試験する。例えばこのハイブリッドペプチドがコラーゲンマトリックスに結合している間のマウス間葉系C3H10T1/2細胞におけるアルカリホスファターゼ活性を誘導することについてアッセイすることによる。簡単には、5mmのコラーゲンのディスクをPBSで洗浄し、これを細胞に基づいたBMP活性アッセイに加える。

20

【0095】

(実施例8：IFBMでコーティングした表面の滅菌)

IFBMでコーティングした表面を、電子ビーム滅菌手順および線滅菌手順で処理した。コーティングした表面の結合性能を、滅菌手順の前および後に評価した。アッセイを、ポリスチレン表面およびチタン表面に対して行った。ポリスチレンアッセイに関して、結合モジュール(「AFF-0002-PS」)をビオチン化し、そして結合モジュールをストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼに曝すことによって、相対的結合を評価した。この結果は、ポリスチレン表面に結合したビオチン化ペプチドの量が、滅菌手順の前および後で実質的に同一であったことを示した。チタンに対する結合モジュール(「AFF-0006-Ti」)のアッセイに関して同様の結果を得た；このアッセイにおいて、滅菌前のコーティングした表面の性能は、滅菌後のその性能とおよそ同じであった。

30

【0096】

(実施例9：予備的な毒性試験)

ペグ化ポリスチレン結合ペプチドを、様々なポリスチレン表面上にコーティングし、そして細胞毒性、溶血、および凝固を含む副作用に関して、以下のように試験した。この手順を、Albino Swiss Mice(Mus musculus)において実施した。下記でさらに議論するように、試験したIFBMのいずれも、毒性の徴候を全く示さなかった。

【0097】

急性全身性毒性をアッセイするために、ポリスチレンの四角形(各四角4×4cm；全部で60cm²)を、20mLの2つの媒体：0.9%のUSP通常生理食塩水または綿実油(National Formulary)のうち1つにおいて、37で70～74時間インキュベートした。5匹のマウスにそれぞれ、ビヒクルまたはビヒクル-抽出物のいずれかを、体重1kgあたり50mLの抽出物の投与割合で全身性に注射した。注射直後、および注射の4、24、48、および72時間後に、マウスを毒性の徴候に関して観察した。ビヒクル-抽出物を注射された動物のうち、ビヒクル単独を投与されたものより大きな生物学的反応を示したものはなかった。

40

【0098】

コーティングされた表面を、ISO手順10993-4(International Organization for Standardization, Geneva

50

、Switzerland)に従って、部分的 тромбоプラスチン時間 (partial thromboplastin time) に関してアッセイした。簡単には、新鮮なヒト全血を、クエン酸ナトリウムを含むバキューター (vacutainer) チューブに取り、そして遠心沈殿して血漿を単離し、それを使用まで氷上に保存した。次いでコーティングしたポリスチレンの四角形 (上記で記載したとおり) を、ポリプロピレンチューブにおいて、その血漿中で、1 mL あたり 4 cm^2 の割合で、37 で15分間インキュベートし、そして60 rpmで攪拌した。次いで血漿抽出物を分離し、氷上に置き、そしてCascade (登録商標) M-4 手動止血分析器 (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) で試験した。凝固時間は、純粋血漿または標準的な参照コントロールで観察されるものと有意に異なっていなかった。

10

【0099】

ISO 10993-5で明細に述べられたように、L-929マウス線維芽細胞において細胞毒性をアッセイした。簡単には、 60.8 cm^2 のポリスチレンコーティング四角形を、20.3 mLのイーグル最小必須培地+5%のFBS中で、37 で24時間抽出した。陽性、陰性および中間の細胞株試験ディッシュを、加湿した5% CO_2 雰囲気下で37 でインキュベートした。培養物を、24時間、48時間、および72時間の時点で、顕微鏡による観察によって細胞毒性効果に関して評価した。ポジティブコントロールは、強力な細胞毒性反応スコアの「4」を示し、一方試験細胞は全ての時点にわたって健康な(「0」スコア)の様相を維持した(「0」のスコア)。中間のコントロール細胞は、全ての時点にわたって「2」のスコアであった。

20

【0100】

溶血試験は、材料または材料抽出物が赤血球の破壊を引き起こす能力を測定する。行った試験は、ASTM F-756 Direct Contact Methodであった。浸出性物質を抽出するために生理食塩水を使用した。コーティングしたポリスチレン表面を抽出し、そして次いでクエン酸添加ウサギ血液(3.2%、PBSで希釈して10 mg/mLの血中総ヘモグロビン濃度を得る)に加えた。0.4%のスコアが観察され、それは0~2%の透過分類 (passing category) に含まれる。ネガティブコントロールは0.1%のスコアを返し、そしてポジティブコントロールは12.2%のスコアを返した。

【図面の簡単な説明】

30

【0101】

【図1】図1は、代表的なチタン結合性ペプチドを提示するファージの、チタンビーズに対する結合の比較を示す(実施例1を参照のこと)。チタンビーズに対する結合に関するアッセイのシグナル(縦軸)を、様々なファージ(横軸)に対して示す。

【図2】図2は、C-末端ピオチン残基を有するペプチドのチタンに対する結合の比較を示す(実施例1を参照のこと)。吸光度(縦軸)を、ペプチド濃度(μM 、横軸)の関数として示す。

【図3】図3は、2つのペプチドのチタンへの結合の比較を示す(実施例2を参照のこと)。A405 nmのシグナル(縦軸)を、ペプチド濃度(μM 、横軸)の関数として示す。グラフで示した線は、上から下へ、それぞれペプチドAFF6007およびAFF6010のデータ点を結ぶ。

40

【図4】図4は、様々なペプチドのBMP-2に対する結合の比較を示す(実施例3を参照のこと)。シグナル(AP比)を、様々なペプチド(横軸で識別される)に関して示す。

【図5】図5は、コラーゲンスポンジへのIFBMの結合に対するBMPの効果を示す(実施例4を参照のこと)。シグナル(縦軸)を、nMのBMP濃度(横軸)の関数として示す。

【図6】図6A、6B、6C、および6Dは、実施例4で記載した実験の結果を示し、それはIFBMを介したコラーゲンへのBMPの結合は、スポンジに加えたBMPの量、および存在するIFBMの量にも依存することを示す。吸光度(縦軸)を、BMP濃度(横

50

軸)の関数として示す。

【図7】図7は、BMP-2に結合し、そしてモチーフ1を含む、表3および表4由来のペプチド配列全ての分析結果を示す(実施例3を参照のこと)。この図は、分析したペプチド配列において、分析した位置のそれぞれに関して、各アミノ酸がその位置で見出された回数を示す；例えば、位置1における「G2」は、その位置でグリシンが2回見出されたことを意味する。

【図8】図8は、ペプチド配列に関してコア結合モチーフ1aを含むペプチド(配列番号74)を発現するよう設計されたオリゴヌクレオチドカセットを示し、それはまたその配列中の他の位置で同定されたコンセンサス残基も含んでいた(実施例3を参照のこと)。図に示したヌクレオチド配列はまた、配列番号75および配列番号76においても記載される。

【図9】図9は、BMP結合ペプチドの相対的親和性を評価するために行った、通常のELISAの結果を示す(実施例3を参照のこと)。ELISAからのシグナル(A405nmでの読み取り)を、横軸におけるファージのマイクロリットルの関数として縦軸に示す。0.10マイクロリットルのファージに対応するデータポイントにおいて、グラフで示す線は上から下へ、それぞれAPO2-61、APO2-40、APO2-41、APO2-26、APO2-35、APO2-59、APO2-44、mA EK、およびファージなしのコントロールのデータポイントを結ぶ。

【図10】図10は、BMP-2に結合し、そしてモチーフ2を含む表3および5のペプチド配列全ての分析結果を示す。この図は、分析したペプチド配列において、分析した位置のそれぞれに関して、各アミノ酸がその位置で見出された回数を示す；例えば、位置1における「G7」は、その位置でグリシンが7回見出されたことを意味する。モチーフ2を含む表3および7のペプチドの整列から導かれたコンセンサス配列も示す(配列番号93)。この配列は、全てのペプチドを整列させた後に、各位置において見出される主なアミノ酸を示す。調査した配列の中で、最も保存されたアミノ酸は、「モチーフ2a」と呼ばれるコア結合モチーフを形成する(配列番号94)。

【図11】図11は、BMP結合活性に関する代替のアッセイの代表的な結果を示し、ここで結合は溶液相で起こる(実施例3を参照のこと)。405nmにおける吸光度(縦軸)を、BMPのピコモルの関数として示す(横軸)。これらの結果を使用して、各BMP結合ペプチドのBMP-2に対する親和性を計算した(表6を参照のこと)。1ピコモルのBMPに対応するデータポイントにおいて、グラフで示された線は上から下へ、それぞれ2006、2007、2008、2009、2011、および2012のデータ点を結ぶ。

【図12】図12は、いくつかのペプチドを、それらがBMP-2、BMP-4、およびBMP-7に結合する能力に関して試験したアッセイからの結果を示す(実施例3を参照のこと)。2007ペプチドおよび2011ペプチドは、もともとBMP-2結合ペプチドとして同定され、一方9001ペプチドはもともと無関係の標的に結合すると同定された。

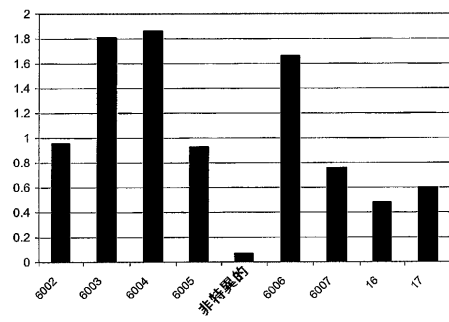
10

20

30

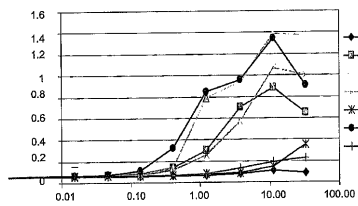
【 図 1 】

Figure 1



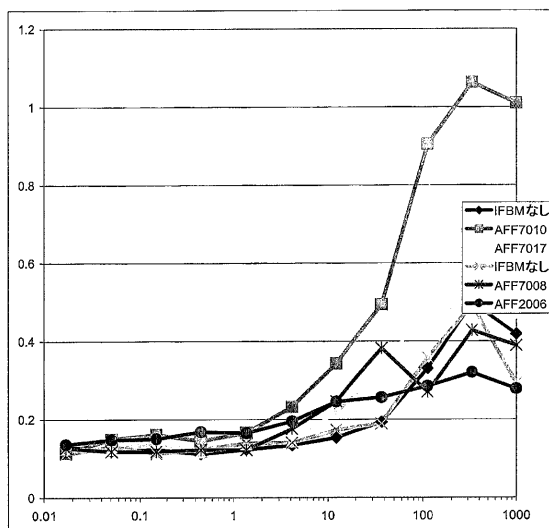
【 図 2 】

Figure 2

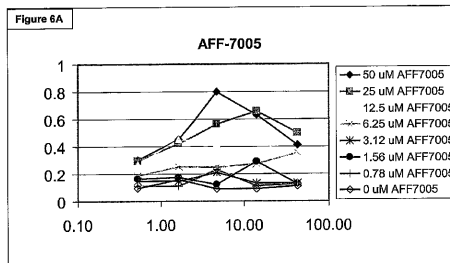


【 図 5 】

Figure 5

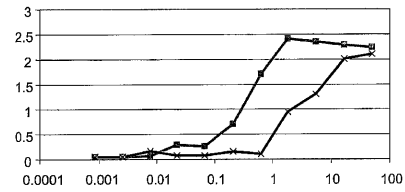


【 図 6 A 】



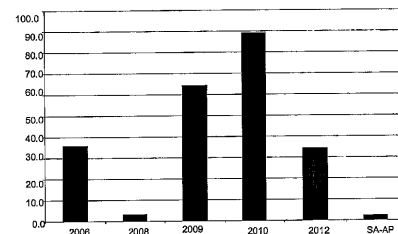
【 図 3 】

Figure 3

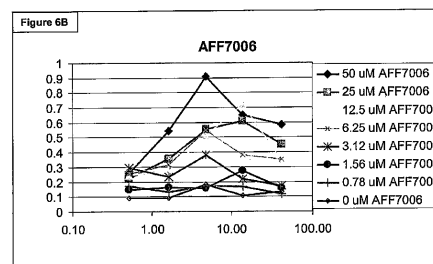


【 図 4 】

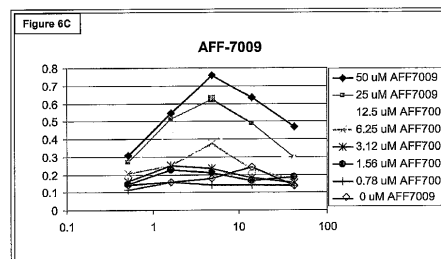
Figure 4



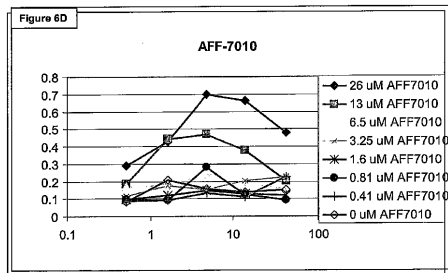
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



【 圖 7 】

Figure 7

[illegible]

モチーフ 1a: W-X-X-F-X-X-L
コンセンサス: G-G-G-A-W-E-A-F-S-S-L-S-G-S-R-V

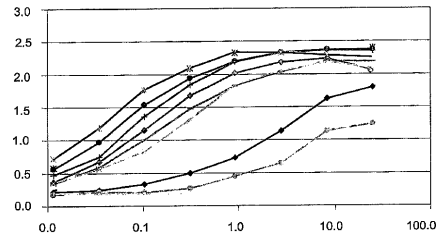
【 図 8 】

Figure 8

| -Xho I- | | | | | | | | | | | | -Xba I- | | | |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|----|--|
| S | S | G | A | W | E | S | F | S | S | L | S | G | S | S | |
| TCG | AGT | GGT | GCT | TGG | GAG | TCT | TTT | TCG | TCA | CTG | AGT | GGA | T | | |
| | CA | CCA | CGA | ACC | CTC | AGA | AAA | AGC | AGT | GAC | TCA | CCT | AGA | TC | |

【 図 9 】

Figure 9



【 図 1 0 】

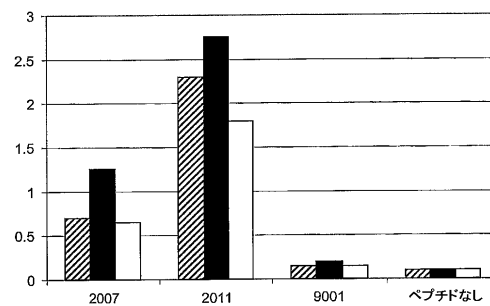
Figure 10

[illegible]

モチーフ: (L/V)-X-F-P-L-(K/R)-G
コンセンサス: G-G-A-L-G-F-P-L-K-G-E-V-V-E-G-W-A

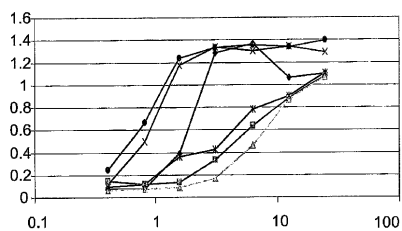
【 図 1 2 】

Figure 12



【 図 1 1 】

Figure 11



【配列表】

2008504850000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/021270

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61L27/22 A61L27/34 G01N33/543 | | |
|---|---|--|
| 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) A61L G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC, EMBASE, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 03/072542 A (DUKE UNIVERSITY; GRINSTAFF, MARK, W; KENAN, DANIEL, J; WALSH, ELISABET) 4 September 2003 (2003-09-04) cited in the application page 60, line 9 - page 62, line 20 claims ----- | 1-19 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * 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 document 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) "C" 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. "G" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 24 August 2006 | | Date of mailing of the international search report 05/09/2006 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Thornton, S |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/021270

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 03072542 | A | 04-09-2003 | AU 2002367566 A1 | 09-09-2003 |
| | | | CA 2467836 A1 | 04-09-2003 |
| | | | EP 1527341 A2 | 04-05-2005 |
| | | | JP 2005518442 T | 23-06-2005 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|---------------|---------------|
| C 0 7 K 7/00 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 | L |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 | M |
| | A 6 1 F 2/28 | |
| | A 6 1 F 2/02 | |
| | C 0 7 K 14/00 | |
| | C 0 7 K 5/09 | |
| | C 0 7 K 7/00 | |
| | C 1 2 N 15/00 | A |

(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,MC,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,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,L T,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 グリンスタッフ, マーク ダブリュー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6, ブルックライン, ビールズ ストリート
4 9 ナンバー 1

(72)発明者 ケナン, ダニエル ジェイ.

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 1 4, チャペル ヒル, ブルーストーン コート
3 5 2 2

(72)発明者 クリステンセン, デール ジェイ.

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 1 9, カリー, パークウィンド コート 1 0 6

(72)発明者 バイヤー, ウェイン エフエル. ジュニア

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 0 3, パハマ, ベッキー ドライブ 2 0 1 2

(72)発明者 ハイド - ドロイシャー, ロビン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 1 6, チャペル ヒル, ポーツミス ブレイス
2 0 5

(72)発明者 ベンソン, レイ エドワード

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 7 1 3 - 9 4 9 4, ダラム, ファレン オーク コ
ート 4

F ターム (参考) 4B024 AA01 CA04 EA03 EA04 HA01

4C081 AB02 BA12 BA13 BA16 BB06 BB07 BB08 CA131 CA171 CD112

CD121 CD26 CD27 CD28 CD29 CD34 CE02 CE03 CF121 CG01

CG03 DA01 DB07 DC03

4C097 AA01 BB01 CC03 DD02 DD06 DD07 DD09 DD10 EE02 EE06

EE07 EE17 EE18 EE19

4H045 AA30 BA12 BA13 BA17 EA34