

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6092091号
(P6092091)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	7/08	(2006.01)	C07K 7/08 ZNA
A61L	27/00	(2006.01)	A61L 27/00
A61K	38/00	(2006.01)	A61K 37/02
A61K	9/70	(2006.01)	A61K 9/70
A61K	9/06	(2006.01)	A61K 9/06

請求項の数 11 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-500091 (P2013-500091)
(86) (22) 出願日	平成23年3月10日 (2011.3.10)
(65) 公表番号	特表2013-522297 (P2013-522297A)
(43) 公表日	平成25年6月13日 (2013.6.13)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/027904
(87) 国際公開番号	W02011/115812
(87) 国際公開日	平成23年9月22日 (2011.9.22)
審査請求日	平成26年3月4日 (2014.3.4)
(31) 優先権主張番号	61/314, 239
(32) 優先日	平成22年3月16日 (2010.3.16)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	513069064 デビュイ・シンセス・プロダクツ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、02767-0350 マサチューセッツ州、レイナム、パラマウント・ドライブ 325 325 Paramount Drive , Raynham MA 02767-0350 United States of America
(74) 代理人	100088605 弁理士 加藤 公延
(74) 代理人	100130384 弁理士 大島 孝文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BMP-2 に対し親和性をもつペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

BMP-2 に対し親和性をもち、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 および配列番号 22 からなる群から選択される、ペプチド。

【請求項 2】

BMP-2 に対し親和性をもち、配列番号 33 および配列番号 34 からなる群から選択される、ペプチド。

【請求項 3】

生体適合性の生分解性ポリマーと、BMP-2 に対し親和性をもつ少なくとも 1 つのペプチドと、を含み、

前記親和性ペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 および配列番号 22 からなる群から選択される、

親和性バイオマトリックス。

【請求項 4】

10

20

生体適合性の生分解性ポリマーと、BMP-2に対し親和性をもつ少なくとも1つのペプチドと、を含み、

前記親和性ペプチドは、配列番号33および配列番号34からなる群から選択される、親和性バイオマトリックス。

【請求項5】

前記生体適合性の生分解性ポリマーが天然ポリマーである、請求項3または4に記載の親和性バイオマトリックス。

【請求項6】

前記天然ポリマーが、コラーゲン、エラスチン、ケラチン、絹、多糖、GAG及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項5に記載の親和性バイオマトリックス

10

【請求項7】

前記天然ポリマーがコラーゲンである、請求項6に記載の親和性バイオマトリックス。

【請求項8】

前記天然ポリマーが、皮膚、骨膜、軟骨膜、滑膜、筋膜、腸間膜、骨及び腱からなる群から選択される脱細胞化組織である、請求項5に記載の親和性バイオマトリックス。

【請求項9】

請求項3～8のいずれか1項に記載の親和性バイオマトリックスとBMP-2とを含む、制御放出デバイス。

【請求項10】

前記デバイスが、スポンジ、粒子、注射可能なゲル、注射可能な液体、膜、フィルム、繊維及び繊維系スカフォールドからなる群から選択される形態をしている、請求項9に記載の制御放出デバイス。

20

【請求項11】

請求項3～8のいずれか1項に記載の親和性バイオマトリックスとBMP-2とを含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、骨形成タンパク質-2(BMP-2)に対し特異的な親和性をもつペプチドに関する。加えて、本発明は、BMP-2に対する制御放出デバイスにおけるこれらの親和性ペプチドの使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

BMP-2は、トランスフォーミング増殖因子(TGF-)と呼ばれるスーパーファミリーに属するタンパク質である。BMP-2は、骨及び軟骨の形成を誘導することが知られている。例えば、BMP-2は、BMP-2をコラーゲンマトリックスと組み合わせて外科移植することによる、骨の修復の促進に使用されている。BMP-2は、水性懸濁液として吸収性コラーゲンスポンジの中に装填される。このBMP-2は、非特異的にコラーゲンと結合する。しかしながら、BMP-2に対するコラーゲン原繊維の低結合能力に起因して逆もまた同様であり、BMP-2は、コラーゲンマトリックスから漏出し得る。このコラーゲンスポンジからのBMP-2の漏出は、移植部位における又はその近くにおける望ましくない過剰な及び/又は異所性の骨形成を引き起こす。望ましくない骨増殖は、更なる合併症を引き起こし、患者に更なる矯正手術(一回又は複数回)を必要とさせることになる。

40

【0003】

したがって、望ましくない位置で骨形成を生じるという副作用を低減するために、BMP-2に対する制御放出デバイスが必要とされている。制御放出デバイスを作製するための標準的方法としては、典型的には、活性剤を封入するのに使用される微小球、桿体、シート又はペレットの形態での高分子マトリックスの使用が挙げられる。活性剤をポリマー

50

マトリックス中に組み込むことができる様々な技術が既知である。例としては、溶媒蒸発、スプレー乾燥、乳化、溶融ブレンド及び別個のサイズ若しくは形状の粒子の単純な物理的混合が挙げられる。これらの分子の繊細な性質に起因し、これらのアプローチはいずれもペプチド又はタンパク質をポリマーの中に組み込むのに適用され得ない。ペプチド及びタンパク質は、溶媒により、乳化により、熱により、特に最終滅菌により、変性しやすい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、BMP-2に対する制御放出デバイスを製造する方法であって、タンパク質を変性させないないしはタンパク質の活性を不活性化しない方法が必要とされている。タンパク質の局所的持続放出を提供し、ひいては望ましくない異所性の骨形成を防止する、BMP-2に対する制御放出デバイスも所望される。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書では、BMP-2に対し親和性を持つペプチドについて述べた。これらの親和性ペプチドは、BMP-2に対し特異的な親和性を有し、親和性バイオマトリックスを調製するのに有用である。親和性バイオマトリックス及びBMP-2から作製されるBMP-2に対する制御放出デバイスも記載される。

【図面の簡単な説明】

20

【0006】

【図1】直鎖でありかつジスルフィド結合で固定されたペプチドを含有し、BMP-2に対し特異的な親和性をもつ、アミノ酸配列（親和性ペプチド）。

【図2】親和性バイオマトリックス及びBMP-2を含む制御放出デバイスの図表現。

【図3】ファージ選別により生成されたファージ提示ペプチドがBMP-2と結合することを確認するBMP-2ファージELISAアッセイ。

【図4A】交差反応性が最小限であるファージバインダーを示すファージ/ウェルの数の増加に関しての、確認及び交差反応性ファージELISAアッセイ。

【図4B】交差反応性が高いファージバインダーを示すファージ/ウェルの数の増加に関しての、確認及び交差反応性ファージELISAアッセイ。

30

【図4C】高いファージ濃度（ 10^{10} ファージ/ウェル）で交差反応性であるファージバインダーを示すファージ/ウェルの数の増加に関しての、確認及び交差反応性ファージELISAアッセイ。

【図5A】ヒトIgGに対する交差反応性ファージELISAアッセイ。

【図5B】ヒト血清アルブミン（HSA）に対する交差反応性ファージELISAアッセイ。

【図6】増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ（ALPHA）を用いるBMP-2に対し親和性をもつペプチドの濃度依存結合。

【図7】BMP-2の存在下3日後のマウス（MCH 1/26）骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性の査定による、BMP-2レセプターに結合する親和性ペプチドの機能的干渉。

40

【図8A】配列番号6のペプチドをアセチル化N末端とリンカーとを含有するコラーゲンマトリックスに結合させる際に使用されるペプチドのアミノ酸配列（配列番号23）。

【図8B】配列番号23のペプチドを結合させた後のコラーゲン親和性バイオマトリックスの走査電子顕微鏡（SEM）画像。

【図9】コラーゲンバイオマトリックスディスク及びコラーゲン親和性バイオマトリックスディスクの中に装填されたBMP-2の組み込み率（%）。

【図10】36日間にわたるコラーゲンバイオマトリックスディスク及びコラーゲン親和性バイオマトリックスディスクから放出されるBMP-2の量を示すインビトロ放出試験。

50

【図11A】BMP-2に結合する配列番号3のフラグメントを示す変異体ファージELISA。

【図11B】BMP-2に結合する配列番号6のフラグメントを示す変異体ファージELISA。

【図12】BMP-2と、BMP-2に結合するフラグメントのアミノ酸配列と、に結合する配列番号3及び配列番号6のフラグメントを同定するために使用されるアミノ酸配列。

【図13】15日間にわたるコラーゲンバイオマトリックスディスク及びコラーゲン親和性バイオマトリックスディスクから放出されるBMP-2の量を示す、2%の熱不活性化ウシ胎児血清(FBS)を含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で行われる、インビトロ放出試験。

10

【図14】インビボケージ移植試験システムのために使用されるステンレス鋼チャンバーの画像。

【図15】7日間にわたるコラーゲンバイオマトリックスディスク及びコラーゲン親和性バイオマトリックスディスクから放出されるBMP-2の量を示すインビボ放出試験。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本明細書では、BMP-2に対し親和性をもつペプチドを説明する。一実施形態では、BMP-2は、ヒト組み換えBMP-2である。BMP-2に対し親和性をもつペプチドは、そのペプチドがBMP-2に対し特異的な結合親和性をもつことを示す。このペプチドは、直鎖であるか又はジスルフィド結合により固定されているかのいずれかであり得る。一実施形態では、BMP-2に対し親和性をもつペプチドは、図1に示す親和性ペプチドのうちの一つである。別の実施形態では、この親和性ペプチドは、図1に示す親和性ペプチドのうちの一つのフラグメントであり得る。この親和性ペプチドがBMP-2に対する特異的な親和性をもつ一方、この親和性ペプチドはBMP-2の生理活性に干渉しない。これらの親和性ペプチドは、BMP-2に対する制御放出デバイスの調製において有用である。

20

【0008】

図1に示すBMP-2に対し親和性をもつペプチドは、米国特許第6472147号に記載のp1Xファージディスプレイ技術を用いて、同定された。高複雑性(ライブラリー当たり 10^9 ペプチド配列)を有するプライマリーペプチドファージライブラリーを使用することで、BMP-2に対し親和性をもつペプチドを選別した。より具体的には、ピオチン化BMP-2は、ストレプトアビジンコーティングしたELISAプレート上で不動化させ、p1Xマイナーコートタンパク質上でペプチド配列を提示するファージを導入した。BMP-2に結合しなかったファージは洗い流し、BMP-2に結合したファージを単離し、増幅した。BMP-2に結合した単離ファージは、合計3ラウンドの上記手順に従う選別の第二ラウンド用のインプットに使用された。第三ラウンドの終わりに、BMP-2に結合したファージは、BMP-2への結合に機能するペプチドを決定するために、配列決定された。BMP-2に対し親和性をもつペプチドは、図1に列挙されている。

30

【0009】

BMP-2に対し親和性をもつペプチドは、親和性バイオマトリックスを調製するのに有用である。親和性バイオマトリックスは、上記のように、BMP-2に対し親和性をもつ少なくとも一つのペプチドを生体適合性生分解性ポリマーに共有結合させることにより調製される。更に、親和性バイオマトリックスは、BMP-2に対する制御放出デバイスとして有用である。代表的な実施形態は、図2に図示される。BMP-2に対する制御放出デバイスは、親和性バイオマトリックス及びBMP-2を含む。

40

【0010】

親和性バイオマトリックスを調製するために使用される生体適合性生分解性ポリマーは、天然ポリマー、合成ポリマー及びこれらの組み合わせであり得る。生分解性ポリマーは、湿った体内組織にさらされると、容易に分解して小さなセグメントになる。セグメント

50

は、次いで、体内に吸収されるか、又は体内を通過する。より具体的には、生分解されたセグメントは、永続的に追跡されないよう又はセグメントの残留物が体内に保持されないように、体内に吸収されるか又は体内を通過するため、永続的な慢性の異物反応を誘発しない。

【0011】

好適な天然ポリマーとしては、コラーゲン、エラスチン、ケラチン、絹、グルコサミノグリカン (GAG)、トロンピン、フィブロンectin、ゼラチン、フィブリン、トロポエラスチン、ポリペプチド、ラミニン、プロテオグリカン、フィブリン糊、フィブリン血餅、多血小板血漿 (PRP) 血餅、乏血小板血漿 (PPP) 血餅、自己組織化ペプチドハイドロゲル及びアテロコラーゲンなどのタンパク質；デンプン、ペクチン、セルロース、アルキルセルロース (例えば、メチルセルロース)、アルキルヒドロキシアルキルセルロース (例えば、エチルヒドロキシエチルセルロース)、ヒドロキシアルキルセルロース (例えば、ヒドロキシエチルセルロース)、硫酸セルロース、カルボキシメチルセルロースの塩、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロースの塩、キチンの塩、カルボキシメチルキチンの塩、ヒアルロン酸の塩、ヒアルロン酸の塩、アルギネート、架橋アルギネートアルギン酸、アルギン酸プロピレングリコール、グリコーゲン、デキストラン、硫酸デキストラン、カードラン、ペクチン、プルラン、キサントラン、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルキトサン、キトサン、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ヘパラン、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、カラギーナン、キトサン、デンプン、アミロース、アミロペクチン、ポリ-N-グルコサミン、ポリマンヌロン酸、ポリグルクロン酸、及び誘導体などの多糖；リボ核酸、デオキシリボ核酸などのポリヌクレオチド；並びにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0012】

一実施形態では、天然ポリマーは、コラーゲンである。別の実施形態では、天然ポリマーは、脱細胞化組織から入手され得る。脱細胞化組織は、自己移植組織、同種組織又は異種組織から入手され得る。好適な脱細胞化組織としては、皮膚、骨膜、軟骨膜、滑膜、筋膜、腸間膜、骨、腱及びこれらに類するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0013】

好適な合成ポリマーの例としては、脂肪族ポリエステル、ポリ(アミノ酸)、コポリ(エーテル-エステル)、ポリアルキレンオキサレート、ポリアミド、ポリ(イミノカーボネート)、ポリオルトエステル、ポリオキサエステル、ポリアミドエステル、アミン基含有ポリオキサエステル、ポリ(酸無水物)、ポリホスファゼン、これらの生体分子及びブレンドが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の目的上、脂肪族ポリエステルとしては、ラクチド(乳酸、d-、l-及びメソラクチドを含む)、グリコリド(グリコール酸を含む)、 ϵ -カプロラクトン、p-ジオキサノン(1,4-ジオキサン-2-オン)、炭酸トリメチレン(1,3-ジオキサン-2-オン)、炭酸トリメチレンのアルキル誘導体、 ϵ -バレロラクトン、 ϵ -ブチロラクトン、 ϵ -ブチロラクトン、 ϵ -デカラクトン、ヒドロキシブチラート(繰返し単位)、ヒドロキシバレラート(繰返し単位)、1,4-ジオキセパン-2-オン(その二量体1,5,8,12-テトラオキサシクロテトラデカン-7,14-ジオンを含む)、1,5-ジオキセパン-2-オン、6,6-ジメチル-1,4-ジオキサン-2-オン、2,5-ジケトモルホリン、ピバロラクトン、 ϵ -ジエチルプロピオラクトン、炭酸エチレン、シュウ酸エチレン、3-メチル-1,4-ジオキサン-2,5-ジオン、3,3-ジエチル-1,4-ジオキサン-2,5-ジオン、6,8-ジオキサピシクロオクタン-7-オンのホモポリマー及びコポリマー並びにこれらのポリマーブレンドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0014】

好適な脂肪族ポリエステルとしては、ラクチド(乳酸、D-、L-及びメソラクチドを含む)、グリコリド(グリコール酸を含む)、 ϵ -カプロラクトン、p-ジオキサノン(1,4-ジオキサン-2-オン)、炭酸トリメチレン(1,3-ジオキサン-2-オン)

10

20

30

40

50

、炭酸トリメチレンのアルキル誘導体、 ϵ -バレロラクトン、 ϵ -ブチロラクトン、 ϵ -
 プチロラクトン、 ϵ -デカラクトン、ヒドロキシブチラート（繰り返し単位）、ヒドロキ
 シバレラ-ト（繰り返し単位）、1,4-ジオキセパン-2-オン（その二量体1,5,
 8,12-テトラオキサシクロテトラデカン-7,14-ジオンを含む）、1,5-ジオ
 キセパン-2-オン、6,6-ジメチル-1,4-ジオキサン-2-オンのホモポリマー
 及びコポリマー並びにこれらのポリマーブレンドが挙げられるが、これらに限定されない
 。

【0015】

一実施形態では、生体適合性生分解性ポリマー及びBMP-2に対し親和性をもつペプ
 チドは、好適な反応基と、このポリマーに親和性ペプチドを共有結合させるための対応す
 る官能基と、を有する。この反応基及び官能基は、ポリマー、親和性ペプチド及びこれら
 の組み合わせの上に存在し得る。好適な反応基としては、アリアルアジド、カルボジイミ
 ド、ヒドラジン、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、カル
 ボニル、マレイミド、NHS-エステル、PFPE-エステル、チオール、ピリジルジスル
 フィド及び/又はスルホン酸ビニル並びにこれらに類するものが挙げられるが、これらに
 限定されない。好適な官能基としては、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、エス
 テル、チオール、アミン、アルケン、アルキン、アルキルハライド、ヒドラジン及び/又
 はアジド官能基が挙げられるが、これらに限定されない。有機化学又はポリマー化学の業
 者であれば、親和性ペプチド及びポリマーを上記好適な反応基及び対応する官能基で官能
 化して、親和性ペプチドをポリマーに共有結合させることができよう。例えば、コラーゲ
 ンに示されるリジン残基上のアミン官能基は、単純なカルボジイミド化学物質を用いて、
 親和性ペプチドのC末端カルボキシル基とカップリングさせることができる。

【0016】

場合により、リンカー配列は、親和性ペプチドがBMP-2に結合する能力を向上させ
 るために、図1に示すペプチドに付加され得る。このリンカー配列は、(SGG)_n又は
 (XXX)_nであることができ、式中、Xは、セリン、グリシン、アラニン又はトレオニ
 ンのいずれかの組み合わせであり得る。一実施形態では、繰り返し単位の数nは、約1～
 約10である。別の実施形態では、繰り返し単位の数nは、約3～約5である。

【0017】

例えば、親和性バイオマトリックスは、可溶性及び/又は繊維状I型ウシコラーゲンから調製され得る。簡潔には、水に懸濁した、約10mg/mL～約100mg/mLの濃
 度を有するコラーゲン懸濁液を、成型型に流し込み、次いで凍結乾燥する。熱脱水工程後
 、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩(EDC)/
 N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(スルホ-NHS)カップリング化学を用いて、親
 水性ペプチドをコラーゲンに結合させた。この方法で調製されたコラーゲン親和性バイオ
 マトリックスは、多孔質三次元発泡スカフォールドの形状である。

【0018】

この親和性バイオマトリックスは、BMP-2に対する制御放出デバイスとして有用で
 ある。BMP-2に対する制御放出デバイスは、親和性バイオマトリックス及びBMP-
 2を含む。親和性バイオマトリックスに装填され得るBMP-2の量は、生体適合性生分
 解性ポリマーに結合した親和性ペプチドの量に依存する。生体適合性生分解性ポリマー上
 に存在する親和性ペプチドの量は、制御放出デバイス中のBMP-2の所望される量以上
 であり得る。したがって、送達されるBMP-2の1モルに対して少なくとも1モルの親
 和性ペプチドが存在し得る。当業者であれば、骨修復のために制御放出デバイス中にどれ
 だけの量のBMP-2が所望されるかを判定できるであろう。この制御放出デバイスは、
 スポンジ、粒子、注射可能ゲル又は液体、膜、フィルム、繊維、繊維系スカフォールド及
 びこれらに類するものの形状であり得る。

【0019】

一実施形態では、この制御放出デバイスは、注射可能ゲル又は液体の形状であり、ここ
 で、親和性バイオマトリックスは水溶液中にあり、BMP-2を含有する。好適な水溶液

10

20

30

40

50

の例としては、生理学的緩衝液、生理食塩水、水、緩衝生理食塩水、リン酸緩衝液、ハンクス平衡塩類溶液、PBS、トリス緩衝生理食塩水、Hepes緩衝生理食塩水、及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。注射可能なゲル又は液体デバイスを調製するために有用なポリマーは、上記の天然又は合成ポリマーから選択され得る。注射可能な液体又はゲルの場合、親和性バイオマトリックスは、水溶液中に約10mg/mL～約150mg/mLの量で存在し得る。

【0020】

場合により、合成骨無機質もまた、特定の用途のための機械的特性をしつらえるために、BMP-2に対する制御放出デバイスの中に組み込むことができる。例えば、バイオマトリックスの引張り強度を増強するために、生理活性無機物質を組み込むことができ、これには、ヒドロキシアパタイト、フルオロ-ヒドロキシアパタイト及び/又はケイ酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0021】

BMP-2制御放出デバイスは場合によりそこに組み込まれた細胞を有することもできる。好適な細胞タイプとしては、骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、幹細胞、多能性細胞、臍帯細胞、間葉系細胞、間葉系幹細胞、骨髄細胞、胚幹細胞、脂肪組織由来前駆細胞、末梢血前駆細胞、成体組織から単離された幹細胞、遺伝子的に形質転換された細胞、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

BMP-2に対する制御放出デバイスは、BMP-2の無菌親和性バイオマトリックス及び無菌凍結乾燥粉末を含有するキットとして販売され得る。キット内に含有された親和性バイオマトリックス及びBMP-2は、電子ビーム、ガンマ線照射及び無菌調製方法を挙げることができるがこれに限定されない従来の滅菌手順により、滅菌することができる。

20

【0023】

BMP-2に対する制御放出デバイスは、制御されたやり方で局所的にBMP-2を供給することを可能にする。この制御放出デバイスは、骨修復又は再生が所望される部位に移植又は注射され得る。この局所的供給は、現行の供給方法により引き起こされる過剰な及び/又は異所性の骨形成に関する望ましくない作用を除去するのを助ける。この異所性骨形成の低減は、今度は、これらの移植の失敗率を低め、それゆえに患者のクオリティ・オブ・ライフを高める。

30

【実施例】

【0024】

実施例1 - ファージディスプレイによるBMP-2親和性ペプチドの選別

高複雑性(ライブラリー当たり 10^9 ペプチド配列)を有するプライマリーペプチドファージライブラリーを使用することで、BMP-2に対し親和性をもつペプチドを選別した。より具体的には、ビオチン化BMP-2は、ストレプトアビジンコーティングしたELISAプレート上で不動化させ、p1Xマイナーコートタンパク質上でペプチド配列を提示するファージを導入した。BMP-2に結合しなかったファージは洗い流し、BMP-2に結合したファージを単離し、増幅した。BMP-2に結合した単離ファージは、合計3ラウンドの上記手順に従う選択の第二ラウンドのためのインプットに使用された。

40

【0025】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)プレートに5マイクログラム/mLのストレプトアビジンのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液を200マイクロリットル毎ウェルで装填し、4で一晚保持した。選別毎に2つのウェルをコーティングした。このストレプトアビジンコーティングしたELISAプレートを次に、96ウェルELISAプレート洗浄機を用いてTween 20を含有するトリス緩衝生理食塩水(TBST)で三回洗浄し、その後、ビオチン化BMP-2(R&D Systems(Minneapolis), MN)、製品番号355-BM/CF)をPBS中5マイクログラム/mLの濃度で装填した。このプレートを室温で30分にわたって維持した。一方、エッペンドルフチ

50

チューブ(1 mL容量)を、3%の脱水ミルクのTBS T溶液1 mLを用いてブロックした(ライブラリー当たり1つ)。このエッペンドルフチューブを室温にて30分にわたって混転した。37 °Cにて振盪器において、テトラサイクリンを添加した2 × YT培地で、二つのMC1061F'GII大腸菌培養を開始した。次にエッペンドルフチューブ中のブロック溶液を廃棄し、ペプチドライブラリー100マイクロリットル及びTBS T溶液(3%ミルク添加)300マイクロリットルで置き換えた。この溶液を室温にて1時間にわたって混転した。プライマリーペプチドファージライブラリーをブロッキングしながら、ストレプトアビジンでコーティングされたBMP-2装填ウェルをプレート洗浄機を用いてTBS Tで3回洗浄した。次に、このプレートを室温にて1時間にわたってTBS T溶液(3%ミルク)250マイクロリットルでブロッキングした。このブロッキング溶液を各ウェルから取り出し、廃棄し、ペプチドファージライブラリー溶液をそれぞれ対応するウェルにウェル当たり200マイクロリットルの容量で導入した。これを1時間にわたって室温に維持した。このライブラリー-ミルク溶液を各ウェルから取り出し、廃棄し、ウェルをTBS Tで手により3回洗浄した。200マイクロリットルのmid-logファージMC1061F'GII大腸菌を各ウェルに導入し、37 °Cにて30分にわたって培養した。感染した細菌を、テトラサイクリンを添加した2 × YT培地50 mLにおいて37 °Cにて4時間にわたって生育させた。次に、この細菌を遠心分離により分離し、PEG/NaCl溶液を用いてファージを沈殿させた。PEGで沈殿させたファージを第二ラウンドで使用し、上記プロセスを選別プロセスの計三回にわたって繰り返した。

10

【0026】

20

第三ラウンドの終わりに、BMP-2に結合したファージは、BMP-2への結合に機能するペプチドを決定するために、配列決定された。MC1061F'GII大腸菌を有する上層寒天中の単プラークのために、ファージ感染した細菌を沈着させた。得られたプラークを使用して、ELISAを用いてBMP-2に結合しているファージを単離した。いったん単一のファージを同定してから、BMP-2に結合したファージを増幅し、PEG沈殿させ、配列解析を行った。BMP-2に対し親和性をもつペプチドは、図1に列挙されている。

【0027】

これらのファージを、実施例2に記載のファージ滴定並びに実施例3に記載の確認及び交差反応性ファージELISAアッセイに使用した。

30

【0028】

実施例2 - BMP-2選別で得たファージの滴定

実施例1に記載のBMP-2に結合したファージのPEG沈殿から生じたファージの濃度を判定するために、ファージ滴定を行った。

【0029】

37 °Cにて振盪器(180~250 rpm)において2~3時間にわたって、テトラサイクリンを添加した2 × YT培地で、大腸菌MC1061F'GIIを生育させた。PEG沈殿原液が 10^{12} ファージ/mLを含有しているものと仮定して、96ウェルプレートでファージ滴定を行った。簡潔には、100マイクロリットルの2 × YT培地を96ウェルプレートのウェルに導入した。カラム1には、10マイクロリットルの対応するファージ原液を導入した。連続10倍希釈をカラム12までプレートに対して行い、それぞれ 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 、 10^{-1} の濃度のファージを得た。各列は別のファージを含有する。ファージプラーク生育のために、それぞれ対応するファージ希釈系列1.5マイクロリットルをLB/テトラサイクリン/凝固した上層寒天でコーティングしたX-Gal寒天プレート/細菌懸濁液に導入した。プレートを上下逆にして37 °Cにて一晚培養した。一晚培養した後、ファージプラークが良好に分離され、計数され得る希釈液を選択した。以下の式を使用して、滴定濃度を計算した： $(\text{プラーク数}) (66.7) (10^{\text{滴定数}-1}) \times 100 = \text{ファージ/mL}$ 、式中、66.7は各ウェル中のファージの希釈係数であり、希釈数は、ファージプラークが計数され得るまでに行われた希釈の数である。100を乗じること

40

50

により、ファージ懸濁液原液中のファージ / mL の数が生じる。

【 0 0 3 0 】

計算されたファージ濃度を表 1 に示す。得られたファージ濃度を使用して、実施例 3 に記載の確認及び交差反応性ファージ E L I S A アッセイのための希釈を行った。

【表 1】

表 1

配列番号	ファージ/mL
1	1. 4007E+12
2	1. 334E+12
3	1. 0672E+12
4	1. 1339E+12
5	4. 669E+11
6	6. 67E+11
7	9. 338E+11
8	5. 336E+11
9	1. 4007E+12
10	1. 334E+12
11	4. 669E+11
12	1. 0005E+12
13	5. 336E+11
14	1. 334E+12
15	8. 671E+11
16	8. 004E+11
17	1. 334E+12
18	1. 6675E+12
19	8. 004E+11
20	7. 337E+11
21	2. 1344E+12
22	1. 1339E+12

10

20

30

【 0 0 3 1 】

実施例 3 - 確認及び交差反応性ファージ E L I S A アッセイ

この実験では、BMP - 2 に対する、実施例 1 で同定されたファージの結合を確認する。加えて、ファージがヒト血清アルブミン及び h I g G に結合を呈さないことも試験する。

【 0 0 3 2 】

96 ウェル黒色 E L I S A プレート、P B S 中 5 マイクログラム / mL の濃度のストレプトアビジン (列 A ~ D)、h I g G (列 E 及び F) 並びにヒト血清アルブミン (列 G 及び H) でコーティングした。プレートを 4 で一晩インキュベートした。プレートをプレート洗浄機を用いて T B S T で 3 回洗浄した。列 C 及び D のストレプトアビジンコーティングされたウェルに、ビオチン化 BMP - 2 (R & D Systems (Minneapolis, MN)、製品番号 355 - BM / CF) の 4 マイクログラム / mL 溶液を 100 マイクロリットル導入し、30 分にわたって室温で静置した。他のウェルすべてに 100 マイクロリットルの P B S を導入した。これらのプレートを再び、プレート洗浄機を用いて T B S T で 3 回洗浄した。これらのウェルを次に 3 % の脱水ミルクの T B S T 懸濁液 250 マイクロリットルでブロックし、最短でも 1 時間にわたって室温に静置した。ファージ滴定により判定したファージ濃度を用いて、ファージ原液の希釈を別個の 96 ウェ

40

50

ルプレートで行って、 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 及び 10^5 ファージ/ウェルのファージ濃度を得た。ブロッキング後、ELISAプレートをTBSTで3回洗浄し、100マイクロリットルのファージ希釈液を対応するELISAプレートに導入し、最短でも1時間にわたって室温にて静置した。このELISAプレートを再び、プレート洗浄機を用いてTBSTで3回洗浄し、100マイクロリットルのHRPが共役したAnti-M13 Phage Mab (PBS中に1:5000で希釈)を各ウェルに導入した。これらのプレートを1時間にわたって室温にて静置し、その後、このプレートをTBSTで3回洗浄した。次に、POD HRP基質を各ウェルに導入した。150のゲインに設定した照度計を用いて、発光を読み取った。

【0033】

図3、図4及び図5中のファージELISAデータは、相対ルミネッセンスを示し、2のN値を有する。図3中のデータは、BMP-2に対する単離ファージの結合を確認する。図4及び図5中のデータは、hIgG及びHSAの両方に結合する配列番号4のペプチドを除いて、hIgG及びHSAのそれぞれについてのファージの交差反応性は最小限であることを示す。

【0034】

実施例4 - 増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ (ALPHA)

ALPHAアッセイを用いて、親和性ペプチドに対するBMP-2の濃度依存性結合効率を評価した。

【0035】

3.3マイクログラム/mLのビオチン化BMP-2 (R&D Systems (Minneapolis, MN)、製品番号355-BM/CF)の希釈原液を2xアッセイ緩衝液 (PBS、0.01% Tween-80、0.05% BSA)を用い調製した。標準的な自動フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 固相ペプチド合成手順を用いて、配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号6を有する化学合成ペプチドを調製した。アッセイ用の各ペプチド溶液を100マイクログラム/mL原液から調製した。この原液をアッセイ緩衝液中に1/2 logステップで連続希釈して、100、33.3、11.1、3.70、1.23、0.41、0.14、0.046、0.015、0.0051、0.0017及び0.00056マイクログラム/mLのペプチド濃度を得た。続いて、連続希釈したペプチドを、ビオチン化BMP-2の3.3マイクログラム/mL溶液10マイクロリットルを含有する対応するウェルに添加した。ビオチン化BMP-2についての最終アッセイ試験濃度は、0.825マイクログラム/mLであった。最終ペプチド濃度は、25、8.3、2.8、0.93、0.31、0.10、0.03、0.01、0.003、0.001、0.0003及び0.0001マイクログラム/mLであった。次に、ニッケル (Ni) アクセプター及びストレプトアビジン (SA) ドナービーズ (Perkin Elmer (Waltham, MA)、製品番号6760619M)をアッセイ緩衝液中に1:100で希釈し、その後、各試験ウェルに20マイクロリットルを添加した。対照には、三種の異なる濃度でBMP-2単独を、並びに、ペプチド無しでSAビーズを、含有させた。プレートをアルミホイルでシールし光から保護し、室温にて卓上振盪器で45分にわたって振盪した。二波長蛍光計 (Perkin Elmer (Waltham, MA)のEnvision 2101 Multilabel Reader)を用いて、プレートの発光を読み取った。

【0036】

図6のALPHAデータは、ペプチド配列の分子量に基づいてモル濃度を標準化した。図6のデータは、BMP-2に対するペプチドの濃度依存結合を示す。ペプチド配列は、以下のように、BMP-2に対するこれらの濃度依存結合により等級付けされた：配列番号6 > 配列番号3 > 配列番号2 > 配列番号1。

【0037】

実施例5 - 表面プラズモン共鳴 (SPR)

表面プラズモン共鳴測定により、BMP-2に対するペプチド結合親和性を配列番号3

10

20

30

40

50

及び配列番号6について評価した。CM4シリーズSセンサーチップを用いて、Biacore S51 (Biacore Life Sciences (Piscataway, NJ)) 装置で測定を行った。1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩(EDC)/N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)カップリング化学を用いてセンサーチップ上でrhBMP-2 (R&D Systems (Minneapolis, MN)、製品番号355-BM/CF)を不動化した。BMP-2不動化チップ上に5マイクロモルの濃度でBMP-2親和性ペプチドを流し、屈折率の変化を記録した。データは、Biacore Analysis Software (Biacore Life Sciences (Piscataway, NJ))を用いて、1:1 Langmuir結合モデルに適合させた。

10

【0038】

表2に示すデータは、N値3での平均平衡解離定数である。データは、300~400 nMの平均平衡解離定数を示す。

【表2】

表2

	$K_D(M)$
配列番号:6	$3.03 \times 10^{-7} M (\pm 1.77 \times 10^{-8})$
配列番号:3	$3.98 \times 10^{-7} M (\pm 5.94 \times 10^{-8})$

20

【0039】

実施例6 - アルカリホスファターゼ生理活性アッセイ

この実験では、マウス骨芽細胞を用い、親和性ペプチドが、BMP-2に結合している細胞表面レセプターと干渉するかどうかを判定した。親和性ペプチド有り及び無しで、BMP-2の存在下、アルカリホスファターゼ(ALP)生成をモニターした。

【0040】

継代させた二つのMCHT-1/26細胞(マウス骨芽細胞細胞株)を前夜に4500細胞/ウェルで96ウェルプレートに接着させた。3種類の希釈率、16、160及び800 nMで配列番号6のペプチドを存在させ又は存在させずに、0~1000 ng/mLの範囲で連続希釈したBMP-2により、細胞を刺激した。37℃にて3日にわたって培養した後、細胞を溶解緩衝液(250 mMのNaCl、25 mMのMgCl₂及び100 mMのトリス、pH=8.0)で37℃にて一晩溶解した。可溶化液の三分の一をp-ニトロフェニルホスフェートでのアルカリホスファターゼアッセイのために使用した。この反応を37℃で1~2時間にわたって行った。次に、このプレートを405 nmの波長にて吸光度プレートリーダーで読み取った。

30

【0041】

図7は、配列番号6のペプチドがマウス骨芽細胞のALP生成に最小の影響を有することを示す。このことは、配列番号6のペプチドがBMP-2の生理活性に干渉しないことを示す。

【0042】

40

実施例7 - コラーゲンバイオマトリックスフォームの調製

80%の繊維性I型コラーゲン(32 mg)と20%の溶解性I型コラーゲン(8 mg)の40 mg/mL水溶液を4℃にて一晩攪拌した。この懸濁液を次にブレンダー内で3サイクル(30秒~1分/サイクル)にわたってホモジナイズした。およそ5 mLを、5 cm x 5 cmの寸法及び0.5 cmの高さを有する成型型に移した。このコラーゲン混合物をスパチュラの平坦な端部により平らにして、コラーゲンの高さ分布の均一性を確保した。次に、このサンプルを脱気し、その後、表3に示すサイクルプロファイルを用いて凍結乾燥した(Virtis (Gardiner, NY))。次に、このサンプルを温度制御真空槽を用いて熱脱水した。次に、このコラーゲンバイオマトリックスフォームを生検パンチを用いて6 mmディスクに切り、使用可能になるまで乾燥室素下、室温にて保存し

50

た。

【表 3】

表 3

温度(°C)	時間(分)	圧力(Pa(mTorr))
-40	60	66.7(500)
-25	300	13.3(100)
-20	600	6.7(50)
-10	300	6.7(50)
-5	180	6.7(50)
0	120	6.7(50)
10	120	6.7(50)
20	120	6.7(50)

10

【0043】

実施例 8 - BMP - 2 に対し親和性をもつペプチドをコラーゲンフォームに結合させることによる、親和性バイオマトリックスの調製

ペプチドを結合させるために、実施例 7 に記載のように調製した 6 mm コラーゲン発泡ディスクをエッペンドルフチューブ内の 1.8 mL の 40% の EtOH / 50 mM の 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES) (pH 5.5) の中に配置し、室温にて 30 分にわたって混転した。このディスクを上記緩衝液から取り出し、0.5 mM の配列番号 23 の BMP - 2 親和性ペプチド (図 8 A に示す配列番号 6 の結合ペプチド) を含有する 1.8 mL の 40% の EtOH / 50 mM の MES、pH 5.5 の中に配置した。標準的な自動フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 固相ペプチド合成手順を用いて、ペプチドを調製した。このディスクを室温にて 1 時間にわたって混転させておいた。次に、0.5 M の EDC 原液 10 マイクロリットル及び 0.1 M のスルホ - NHS 原液 10 マイクロリットル (どちらも 40% EtOH / 50 mM MES (pH 5.5) 中) をエッペンドルフチューブの中に導入したところ、2.5 mM の EDC と 0.5 mM のスルホ - NHS が生じた (ペプチド、スルホ - NHS 及び EDC についてのモル当量はそれぞれ 1 : 1 : 5 であった)。このディスクを室温にて 4 時間にわたって混転させておいた。次に、このディスクを、10 mL の 1 × PBS 中で 30 分にわたって混転することにより、すすいだ。このすすぎを計三回のすすぎサイクルで繰り返した。最後に、ディスクを PBS から取り出し、真空下にて凍結乾燥機で一晩乾燥させた。三つの対照サンプルもまた上記手順で使用した。1 = コラーゲンスポンジ + 緩衝液、2 = コラーゲンスポンジ + ペプチド / 緩衝液、及び 3 = コラーゲンスポンジ + EDC / NHS / 緩衝液。

20

30

【0044】

ペプチドを結合させたコラーゲンフォームのミクロ構造を SEM を用いて分析した。代表的な画像を図 8 B に示す。この画像は、ペプチド共役コラーゲン発泡体とその多孔質ミクロ構造を保持すること示す。すべてのサンプルに対して、上清を凍結乾燥して乾燥粉末にし、RP - Analytical HPLC を用いて分析した。データは、およそ 40% の BMP - 2 親和性ペプチド (配列番号 23) が 6 mm コラーゲンディスクに共有結合していったことを示す。

40

【0045】

実施例 9 - BMP - 2 定着試験

凍結乾燥した rhBMP - 2 を 8.4 mL の滅菌水に溶解させ、rhBMP - 2 の 1.5 mg / mL 懸濁液を得た。荷重試験のために、実施例 7 及び実施例 8 で調製した直径 6 mm の親和性バイオマトリックスを、0.2 マイクロメートルの濾過エッペンドルフチューブ内に配置し、100 マイクロリットルの 0.4 mg / mL の rhBMP - 2 溶液 (250 mM のアルギニン、10 mM のヒスチジン、20 mM の CaCl₂ (pH 6.5) 緩衝液) 100 マイクロリットルを装填し、室温にて 45 分にわたって静置した。濾過工

50

ツペンドルフチューブ内の親和性バイオマトリックスを3000rpmで5分にわたって遠心処理し、上清を取り出した。生成物挿入における手順に従って、得られた上清の1:10000希釈物を用いて、rhBMP-2イムノアッセイELISA(R&D Systems(Minneapolis, MN)DBP200)を行った。BMP-2の初期装填濃度から上清中のrhBMP-2の量を減算することにより、rhBMP-2組み込み率(%)を判定した。対照として、親和性ペプチドを含まないEDC/NHS架橋済みコラーゲンの両方の直径6mmディスクを使用した。

【0046】

図9中のデータは、親和性バイオマトリックスは、およそ40重量%を装填する架橋済みコラーゲンディスクと比較して、BMP-2全体(40マイクログラム)のおよそ90重量%を装填する。

10

【0047】

実施例10 - コラーゲンディスクからのインビトロBMP-2放出

この実験では、模擬的な生理的条件下での親和性バイオマトリックスからのBMP-2のインビトロ制御放出を評価した。この放出実験のために、実施例7及び実施例8に記載の方法により調製されるような親和性バイオマトリックスの直径6mmのディスクを24ウェル細胞培養プレート内に配置した。このスポンジに1.5mg/mLのrhBMP-2溶液を40マイクロリットル装填し、室温にて15分にわたって静置した。実施例8で調製したEDC/NHS架橋済みコラーゲンの直径6mmのディスクを対照として使用した。装填したコラーゲンスポンジを次に、ヒト血清アルブミン(HSA)を1mg/mLの濃度で添加したPBSを1.5mL含有する24ウェル細胞培養プレートのウェルに移した。対応する時点にて、培地を取り出し、エペンドルフチューブに移し、-20にて凍結させた。コラーゲンディスクを含有するウェルに、新しい0.1%のHSAのPBS溶液を1.5mL補給した。生成物挿入における手順に従って、放出培地の1:1000希釈物を用いて、rhBMP-2イムノアッセイELISA(R&D Systems(Minneapolis, MN)DBP200)を各時点にて行った。標準曲線を用いることにより、対応するディスクからのrhBMP-2放出の量を判定した。

20

【0048】

図10中のデータは、親和性バイオマトリックス制御放出デバイスが、36日の時点でおよそ25重量%のrhBMP-2の累積放出を有する一方で、EDC/NHS架橋済みコラーゲンスポンジがおよそ90重量%を放出することを示す。親和性バイオマトリックス制御放出デバイスからのrhBMP-2の初期の爆発的放出は、EDC/NHS架橋済みコラーゲンスポンジと比較して、有意に低減される。

30

【0049】

実施例11 - 変異体ファージELISA

配列番号3及び配列番号6の親和性ペプチドにそれぞれ部位特異的突然変異誘発を行って、BMP-2への結合にとって重要であるアミノ酸についての理解を得た。野生型の残基がセリンで置換されるセリンスキャンを行うことにより、配列番号3及び配列番号6の変異体を構築した。図12は、BMP-2に対する特異的な親和性に関し機能するより具体的なアミノ酸配列を同定するために試験された変異体配列を示す。配列番号24~配列番号28は、配列番号3の変異体である。配列番号29~配列番号32は、配列番号6の変異体である。

40

【0050】

対応するカスタムオリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologiesから入手した。標準プロトコルを用いて、これらのオリゴヌクレオチド(oligonucleotides)をpIX遺伝子の中に挿入した。まず、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、これらのオリゴヌクレオチドをリン酸化した。次に、このリン酸化オリゴヌクレオチドをssDNAテンプレートにアニーリングした。Kunkel法を用いて、このアニーリングしたDNAを、T4DNAリガーゼ及びT7DNAポリメラーゼを用いて連結した。得られたDNAを、イソプロパノール沈殿を用いて単離し、ゲルを反応の

50

確認にかけた。最後に、電気的な形質転換受容能のある大腸菌を精製DNAで形質転換し、2 x Y T / T e t / X g a l 寒天プレート上に蒔き、一晚増殖させて、単一コロニーを単離した。50 mLの2 x Y T / t e t 培地中で振盪しながら、形質転換した細胞のアリコートをして37℃で一晩増殖させた。このファージを次に実施例1の手順に従ってPEG沈殿させた。ファージ滴定を行って、実施例2に記載のように、ELISAアッセイのためにファージ濃度を判定した。実施例3の手順に従って、ELISAアッセイを行った。

【0051】

変異体ファージELISAアッセイデータ(図11A及び図11B)は、配列番号3のフラグメント及び配列番号6のフラグメントがBMP-2に結合する根拠を示す。より具体的には、配列番号3のフラグメントである配列番号33と、配列番号6のフラグメントである配列番号34とが、BMP-2への結合に重要であり、図12に示されている。

10

【0052】

実施例12 - コラーゲンディスクからのインビトロBMP-2放出

この実験では、実施例10に記載のように、しかしながらPBS単独の代わりに熱不活性化ウシ胎児血清(FBS)を添加したPBSを使用して、模擬的な生理的条件下での親和性バイオマトリックスからのBMP-2のインビトロ制御放出を評価した。この放出実験のために、実施例7及び実施例8に記載の方法により調製されるような親和性バイオマトリックスの直径6 mmのディスクを24ウェル細胞培養プレートのウェル内に配置した。このスポンジに1.5 mg/mLのrhBMP-2溶液を40マイクロリットル装填し、室温にて15分にわたって静置した。市販のコラーゲンディスクを対照として使用した。装填したコラーゲンスポンジを次に、熱不活性化ウシ胎児血清(FBS)を添加したPBSを1.5 mL含有する24ウェル細胞培養プレートのウェルに移した。対応する時点にて、培地を取り出し、エペンドルフチューブに移し、-20℃にて凍結させた。コラーゲンディスクを含有するウェルに、新しい2%のFBSのPBS溶液を1.5 mL補給した。生成物挿入における手順に従って、放出培地の1:1000希釈物を用いて、rhBMP-2イムノアッセイELISA(R&D Systems (Minneapolis, MN) DBP200)を各時点にて行った。標準曲線を用いることにより、対応するディスクからのrhBMP-2放出の量を判定した。

20

【0053】

図13中のデータは、親和性バイオマトリックス制御放出デバイスが、15日の時点でおおよそ15重量%のrhBMP-2の累積放出を有する一方で、市販のコラーゲンスポンジがおおよそ95重量%を放出することを示す。親和性バイオマトリックス制御放出デバイスからのrhBMP-2の初期の爆発的放出は、市販のコラーゲンスポンジと比較して、有意に低減される。

30

【0054】

実施例13 - コラーゲンディスクからのインビボBMP-2放出

ケージ移植試験システムを使用して、親和性バイオマトリックスからのBMP-2のインビボ放出を評価した。インビボ環境での生理活性剤の制御放出を調査するためにケージ移植システムを用いる例は、Paula S. Leppert and Joseph A. Fix, Subcutaneous Tissue Cages for Examination of Slow Release of Materials from Long Term Implants, Biomaterials, Volume 11, 1990, p. 46~49に記載されている。これらの方法を適合させて、親和性バイオマトリックスからのBMP-2のインビボ放出を測定した。

40

【0055】

このインビボ実験は、実験用動物の取り扱い及び使用を管理するすべての適用され得る規制を遵守した。この実験についての動物福祉は、米国農務省(USDA)動物福祉法(連邦規則9巻パート1、2及び3)(the United States Department of Agriculture's (USDA) Animal Welfare Act (9 CFR Parts 1,2 and 3))を遵守した。実験動物の管理と使用に関する指針(The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (In

50

stitute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, Washington, D.C., 1996)にも従った。具体的には商品名SPRAGUE DAWLEY (Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN))種のCr1:CDで販売されているアルビノラットの異系交配多目的品種である、7~8週齢のオスのラットをこのインビゴ実験に使用した。直接接触床を有するポリボックスに動物を個々に収容した。一日当たりおよそ12時間にわたって蛍光灯を照射した。温度及び湿度をモニターし、毎日記録し、それぞれ64~79及び30%~70%の可能な最大限の範囲において維持した。ラットの基礎飼料は、適宜供給される特定のげっ歯類用試料から構成された。自動水システムを介して水道水を適宜供給した。実験デザインの簡潔な説明は、表4に見出すことができる。

10

【表4】

表4

群	ラットの頭数	バイオマトリックス	投与及び説明
1	5	コラーゲンディスク	+PBS
2	5	コラーゲンディスク	+BMP-2
3	5	配列番号23の変性コラーゲンディスク	+BMP-2

【0056】

20

316ゲージ、46メッシュ(0.140mm(0.0055インチ)ワイヤ直径)ステンレス鋼(Newark Wire Cloth Company (Clifton, New Jersey))を用いて、ケージ移植片(長さ=25ミリメートル、直径=10ミリメートル)を手で構築した。0.1Mの水酸化ナトリウムを用いてケージ移植片から発熱物質除去し、水で十分に洗浄した。予めドリル切削したポリテトラフルオロエチレン(PTFE)ブロックを用いてチャンバー端部周りのシリコンエラストマー(MED6215, NuSil Technology, LLC (Toms River, NJ))キャップをキャストすることにより、ケージ移植片の一端を閉じた。対応するバイオマトリックスを添加した後、カスタムモデルのシリコンエラストマーストッパー(Wacker LR3003/40, Albright Technologies Inc. (Leominster, MA))キャップを使用して、ケージの開いた端部を閉じた。ケージにディスクを装填するのに先立って、キャップ及びケージをオートクレーブ処理した。

30

【0057】

実施例7の手順に従って無菌条件下でコラーゲンディスクを調製した。次に、電子線照射(25kGy)を用いて、直径6mmのディスクを滅菌した。実施例8に記載の方法を用いて無菌条件下で親和性バイオマトリックスを調製した。次に、表3に示した凍結乾燥方法を用いて、これらのサンプルを滅菌チャンバで凍結乾燥した。親和性ペプチドを含まない市販のコラーゲンの直径6mmのディスクを対照として使用した。

【0058】

40

移植に先立って、乾燥したバイオマトリックスをチャンバーの中に配置し、非吸収性縫合糸で適所で縫合した。次に、これらのディスクに、ディスク当たり30マイクログラムの投与量でBMP-2の無菌溶液100マイクロリットルを装填した。吸入麻酔(イソフルラン)を用いて各ラットに麻酔誘引した。眼科用軟膏を目に塗布し、麻酔時間中の組織の乾燥を予防した。各動物に、痛みのためのブプレノルフィン塩酸塩(0.05mg/kg、皮下投与)及び液体恒常性のための乳酸リンゲル液(LRS、1~5mL)を投与した。麻酔導入後、真空システムを備えた電気動物クリッパーを用いることにより、体毛を含ませずに、背側頸部領域から背側腰部領域までの動物の手術部位をクリップした。手術部位の周りの領域をクワトロヘキシジン二酢酸で洗浄し、アルコールですすぎ、乾燥させ、1%濃度のヨウ素のヨードフォル水溶液を塗布した。麻酔にかけた動物を手術台に運び、

50

無菌処理をした領域に滅菌外科用ドレープを適用した。手術中、動物には排気システム下でマスクによりイソフルラン麻酔を維持した。

【 0 0 5 9 】

BMP - 2 を装填したディスクを含有する滅菌ケージ移植片を各ラットの皮下スペースの中に移植した。左胸郭において皮膚切開を行った。鈍器切開により、ラットの背部上に創傷チャンバーを収容するのにちょうど十分な大きさの皮下ポケットを作製した。ケージ移植片を皮下ポケットに配置し、間隙皮下スペースを最小化した。サンプルを含有する端部がシリコン末端キャップに最も近く、シリコンストッパーに最も遠く、切開部位に最も近くなるように、ケージ移植片を挿入した。ケージの近位端は、炎症を避けるために、切開ラインから最低 1 c m の距離で挿入した。このケージ移植片を下に位置する筋肉に非吸収性縫合糸で縫合し、非吸収性縫合糸を用いて切開を閉じた。

10

【 0 0 6 0 】

創傷滲出物を移植後 1、3、5 及び 7 日目に採取した。流体採取に先立って、二酸化炭素 / 酸素及びイソフルランを用いて動物に穏やかに麻酔をかけた。簡潔には、21 G 針を切開部位から最も遠いシリコンストッパーの中程に挿入した。ラットを直立位置に保持して、流体が注射器の中に流れるようにした。300 マイクロリットルの最終容積が達成されるまで、注射器でゆっくりと吸引した。r h B M P - 2 イムノアッセイ E L I S A を用いる分析までの間、サンプルを - 8 0 で凍結した。実験完了時に、予め装填した二酸化炭素チャンバーに動物を配置し、100% 二酸化炭素を吸入させることにより安楽死させた。呼吸の視覚的徴候についての観察及び心臓の触診により、安楽死を確認した。

20

【 0 0 6 1 】

図 1 3 中のデータは、親和性バイオマトリックス制御放出デバイスが七日間にわたって B M P - 2 を常に放出することを示す。5 日目及び 7 日目時点で、親和性バイオマトリックスは、対照コラーゲンディスクと比較して、ディスクから放出される B M P - 2 に関し統計的な有意差を有する。

【 0 0 6 2 】

〔実施の態様〕

(1) B M P - 2 に対し親和性をもち、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22 及びこれらのフラグメントからなる群から選択される、ペプチド。

30

(2) 生体適合性の生分解性ポリマーと、BMP - 2 に対し親和性をもち少なくとも 1 つのペプチドと、を含む、親和性バイオマトリックス。

(3) 前記親和性ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 及び配列番号 22 からなる群から選択される、実施態様 2 に記載の親和性バイオマトリックス。

(4) 前記生体適合性の生分解性ポリマーが天然ポリマーである、実施態様 2 に記載の親和性バイオマトリックス。

40

(5) 前記天然ポリマーが、コラーゲン、エラスチン、ケラチン、絹、多糖、G A G 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、実施態様 4 に記載の親和性バイオマトリックス。

(6) 前記天然ポリマーがコラーゲンである、実施態様 5 に記載の親和性バイオマトリックス。

(7) 前記天然ポリマーが、皮膚、骨膜、軟骨膜、滑膜、筋膜、腸間膜 (mesenter)、骨及び腱からなる群から選択される脱細胞化組織である、実施態様 6 に記載の親和性バイオマトリックス。

(8) 親和性バイオマトリックスと B M P - 2 とを含む、制御放出デバイス。

50

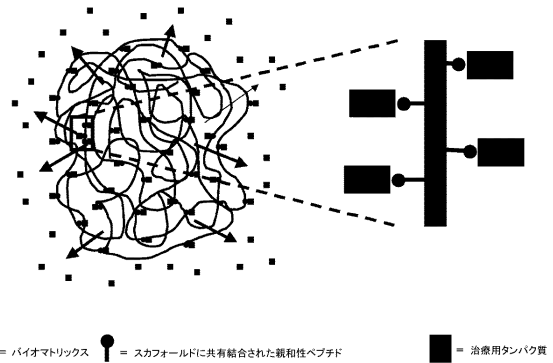
(9) 前記デバイスが、スポンジ、粒子、注射可能なゲル、注射可能な液体、膜、フィルム、繊維及び繊維系スカフォールドからなる群から選択される形態をしている、実施態様 8 に記載の制御放出デバイス。

(10) 親和性バイオマトリックスと BMP - 2 とを含む、キット。

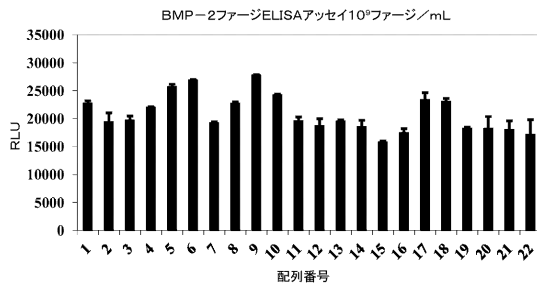
【 図 1 】

- 配列番号: 1 AGLPLQSMSRSLSYDSLS
- 配列番号: 2 AGPPGPYIAASAFALK
- 配列番号: 3 AGYTSFALLKSAESTLP
- 配列番号: 4 AGFRWWHTQPAHTLSYT
- 配列番号: 5 AGYRRPIQPGPEAVSLL
- 配列番号: 6 AGRDSFNLLTSSPLPST
- 配列番号: 7 AGYRCSELPPLYCST
- 配列番号: 8 AGSWCTHPAIGCLS
- 配列番号: 9 AGSPCSPGQLPLCPA
- 配列番号: 10 AGLQCSPPLPLYCEP
- 配列番号: 11 AGPRCPPMHFSVCLS
- 配列番号: 12 AGASCSPGLHPLCPG
- 配列番号: 13 AGSTCIPSMTPLCPS
- 配列番号: 14 AGRECLPQFGLPLCPD
- 配列番号: 15 AGSVCLAQYSATPLCPH
- 配列番号: 16 AGPDCRLSPLQPAVCVW
- 配列番号: 17 AGAHCLRDMGLTSCIP
- 配列番号: 18 AGRCHATVDGVAVGCLT
- 配列番号: 19 AGTVCPPDLTGLTAACY
- 配列番号: 20 AGTLCGVDDYTGLTGCLA
- 配列番号: 21 AGIRCPVDAIGLTANCSY
- 配列番号: 22 AGRSCYREPSTMLYACTA

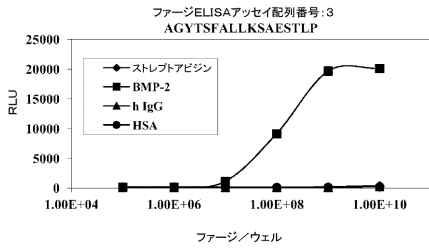
【 図 2 】



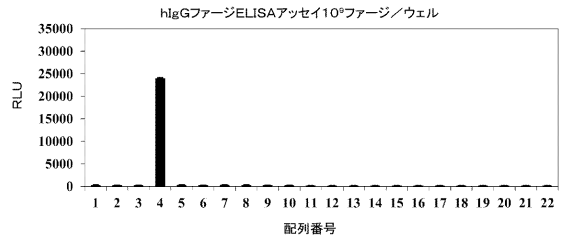
【 図 3 】



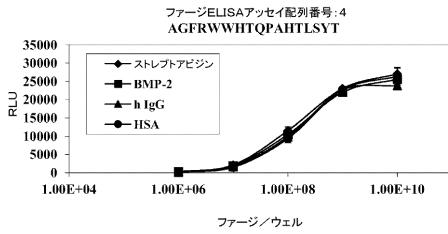
【 図 4 A 】



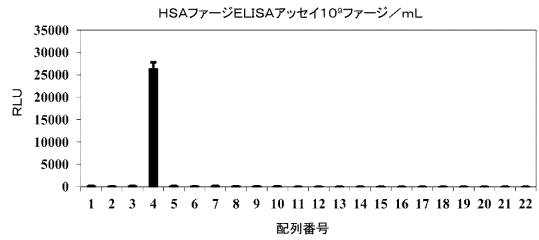
【 図 5 A 】



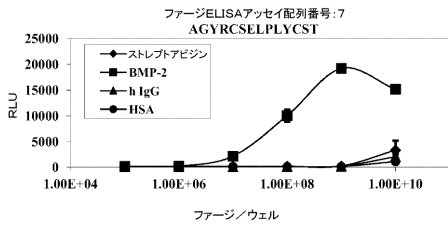
【 図 4 B 】



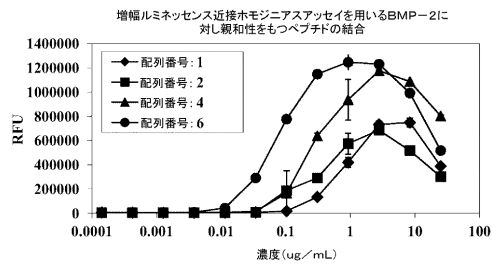
【 図 5 B 】



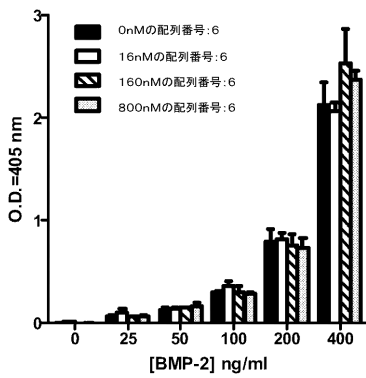
【 図 4 C 】



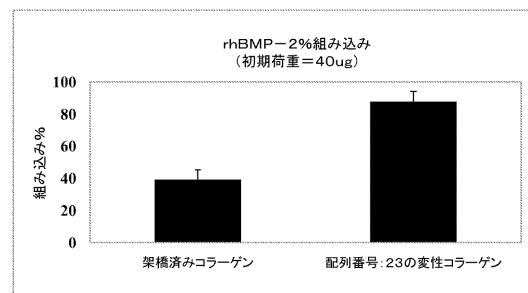
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 9 】

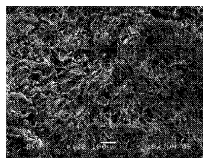


【 図 8 A 】

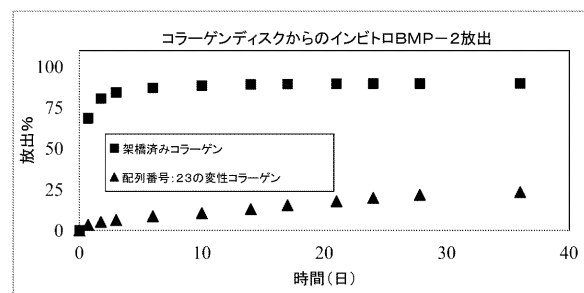
配列番号: 23 Ac-AG-RDSFNLLTSSPLPST-SGGSGGSGG-OH

【 図 8 B 】

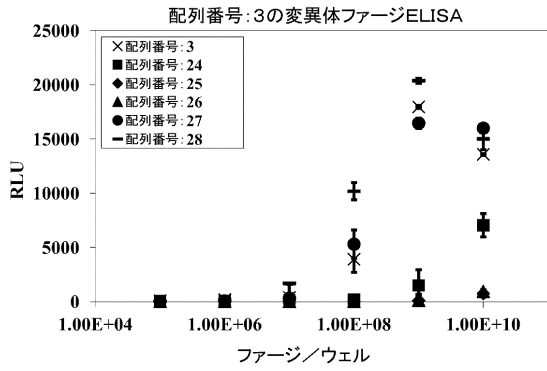
FIG. 8B.



【 図 10 】



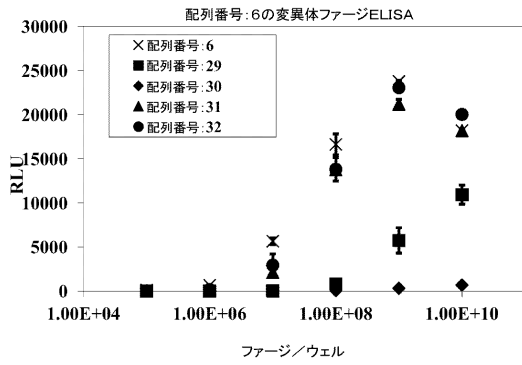
【 図 1 1 A 】



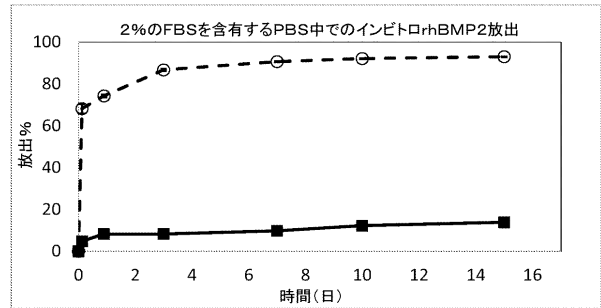
【 図 1 2 】

- 配列番号: 24 AGSSSFALLKSAESTLP
- 配列番号: 25 AGSSSFALLKSAESTLP
- 配列番号: 26 AGYTSFALSSSAESTLP
- 配列番号: 27 AGYTSFALLKSAESSSS
- 配列番号: 28 AGYTSFALLKSAESSSS
- 配列番号: 29 AGSSSFNLLTSSPLPST
- 配列番号: 30 AGRDSFNLSSTSSPLPST
- 配列番号: 31 AGRDSFNLLTSSSPST
- 配列番号: 32 AGRDSFNLLTSSPLSSS
- 配列番号: 33 AGYTSFALLKS
- 配列番号: 34 AGRDSFNLLTS

【 図 1 1 B 】

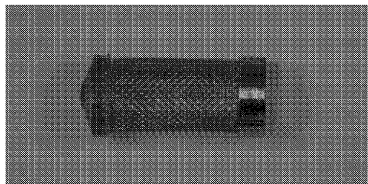


【 図 1 3 】

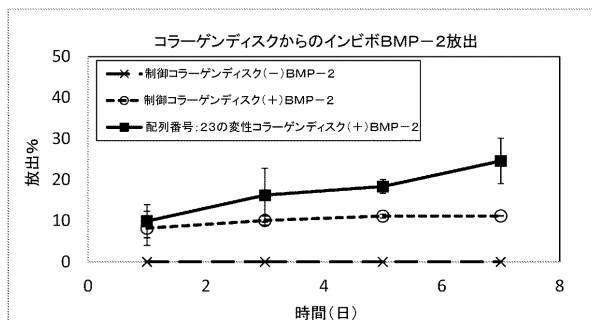


【 図 1 4 】

FIG.14.



【 図 1 5 】



【配列表】

0006092091000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/50	(2017.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 K 47/42	(2017.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 19/08
C 0 7 K 14/51	(2006.01)	C 0 7 K 14/51

- (72)発明者 ケホー・ジョン
アメリカ合衆国、19087 ペンシルベニア州、ウェイン、イーグル・ロード 409
- (72)発明者 サリック・ダフネ・エイ
アメリカ合衆国、08648 ニュージャージー州、ローレンスビル、シダー・ドライブ 22101
- (72)発明者 ファン・キャリー・エイチ
アメリカ合衆国、08867 ニュージャージー州、ピッツタウン、オーク・グローブ・ロード 164
- (72)発明者 ヤン・チュンリン
アメリカ合衆国、08502 ニュージャージー州、ベル・ミード、マシューズ・ファーム・ロード 93
- (72)発明者 クリージー・アブラ
アメリカ合衆国、07960 ニュージャージー州、モリスタウン、ピピンズ・ウェイ 25

審査官 上村 直子

- (56)参考文献 特表平06-507378(JP,A)
特表2008-504850(JP,A)
国際公開第2008/134329(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)