



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96194435.8

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1133462C

[22] 申请日 1996.5.21 [21] 申请号 96194435.8
[30] 优先权
[32] 1995. 6. 5 [33] US [31] 08/462,497
[86] 国际申请 PCT/US96/07282 1996.5.21
[87] 国际公布 WO96/39169 英 1996.12.12
[85] 进入国家阶段日期 1997.12.4
[71] 专利权人 遗传学研究所有限责任公司
地址 美国马萨诸塞州
共同专利权人 纽约救济伤残人维持特殊外科医
院协会
[72] 发明人 J·M·沃兹尼 R·F·沃伦
S·A·罗德奥 J·A·汉纳芬
审查员 周 静

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用于修复和愈合连接组织附着的方法
和组合物

[57] 摘要

本发明提供了用于治疗包括骨和连结组织,如
腱或者韧带之间功能附着的疾病和缺损的方法和组
合物。优选的方法包括给予一种含有骨形态生成
蛋白和适合载体的组合物。该治疗方法导致连接
组织和骨之间的功能附着再生,进而在再生骨和连
接组织的接触面上形成微小的纤维组织或者颗粒组
织。这种方法和组合物可用于在重建手术中增加
组织移植。这种方法和组合物导致在早期骨与
连接组织接合更紧密和增加早期固定的强度。

1. 骨形态生成蛋白在制备用于再生腱或韧带与骨之间功能附着的药物的用途，其中所述药物在需要再生所述功能附着的部位给药，并且所述药物包含再生腱或韧带与骨之间功能附着有效量的骨形态生成蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于所述药物含有在合适载体中的重组人骨形态生成蛋白-2。

3. 根据权利要求 2 所述的用途，其特征在于所用载体包括一种胶原海绵。

4. 根据权利要求 2 所述的用途，其特征在于所用载体选自如下：

- a) 胶原海绵；
- b) 纤维粘性凝胶；和
- c) 多孔微粒聚合体和螯合剂。

5. 根据权利要求 4 所述的用途，其特征在于所用载体含有多孔微粒聚合物，以及螯合剂是选自纤维素质和自体固有的血。

6. 根据权利要求 5 所述的用途，其中所述纤维素质选自：甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和羧甲基纤维素。

7. 根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于所述药物含有在适当载体中的骨形态生成蛋白-2 和骨形态生成蛋白-12。

8. 根据权利要求 1 的用途，其中所述药物含有至少一种选自下组的骨形态生成蛋白：

- a) 骨形态生成蛋白-2；
- b) 骨形态生成蛋白-12；
- c) 骨形态生成蛋白-2 和骨形态生成蛋白-12 组成的异种二聚体。

9. 根据权利要求 1 的用途，其中所述骨形态生成蛋白是纯化的。

用于修复和愈合连结组织附着的方法和组合物

发明领域

本发明涉及组织修复的领域，尤其涉及连结组织，如腱、软骨或者韧带和骨之间功能附着的再生。这种功能附着可被创伤或者应力损伤，或者被变性疾病或者先天性疾病损坏。因此，本发明在骨和连结组织之间的功能附着再生的重建手术或者其它过程中也许是有用的。

发明背景

尽管几种重建手术过程依靠连结组织，特别是腱或韧带与骨牢固的附着或者愈合，但人们对骨与腱接触面上的愈合过程却几乎一无所知。因为在移植后的早期，移植物与骨的固定部位是最脆弱的地方，所以能改善早期移植物固定强度的方法有重要的临床应用价值。这在对膝盖、肩、臀、手、踝和肘的手术中尤其重要。

人们对腱或者韧带附着骨的发育过程知之甚少。附着部位是通过连续不断地从腱入骨的胶原纤维介导的，这种纤维被称为“Sharpey 纤维”。Sharpey 纤维被认为是在骨骼发育过程中，通过生长发育骨的韧带或者骨膜的胶原纤维的进行性矿化形成的。研究表明，骨与腱的愈合是通过骨向内生长入纤维血管界面组织而完成的，这种纤维血管界面组织最初是在骨与腱之间形成的。界面组织进行性矿化后，骨向内生长进入外侧的腱。尽管有骨向胶原组织内生长证据，但骨向内生长的机理和附着的效率和强度的机理仍不确定。以前的一个有关腱与骨愈合的实验证明在腱和骨之间有一种纤维组织界面形成。Rodeo et al., 骨和关节外科杂志, 75-A: 1795-1803 (1993)。

因此，虽然在本领域中有了一些实质性的努力，但仍需要一种有效方法来修复连结组织，例如腱或者韧带与骨之间的功能附着。

发明内容

本发明提供了一些再生连结组织与骨之间功能附着的方法和组合物。尤其是，本发明包括了用来治疗骨与腱或者韧带的附着分离或者退化的病人的方法。一些实施例包括了对膝盖、肩、手、踝和肘的重建手术。本发明可证明有用的一些特别领域包括前十字形韧带（ACL）或者旋转套的重建。

本发明的方法和组合物的优点在于使用成骨蛋白，这种成骨蛋白可以通过重组 DNA 技术生产，因此，其供应有潜在的无限性。本发明的组合物和方法的更大的优点在于附着器官的再生可以加速或者具有更大的强度，连接组织与骨之间形成的附着在手术或者修复完成后不久就可达到一个功能强度。本发明的方法和组合物的更大的优点还在于他们诱导连接组织与骨之间的功能附着的再生，同时可减少或者避免纤维或者颗粒组织在组织之间界面上的形成。

本发明的方法特别适用于骨管内的圆形腱或者骨表面上的扁平腱的固定。有关的临床例子有好几个。一个普通的临床例子是前十字形韧带（ACL）的重建。重建可通过用中间第三髌骨腱连同所附着的胫骨和髌骨的骨块，或者用半腱和薄腱进行。使用髌骨腱的好处包括可使使侵犯性的手术后复原的骨马上固定和增加强度。不过，使用中间第三髌骨腱进行重建也有相关的不良后遗症，包括髌骨骨折、髌骨韧带破裂和髌股关节变性。使用半腱和薄腱进行重建的好处包括更易获得移植物、不破坏膝的伸肌机理、手术后一年四头肌力量较大和月国绳肌腱力量最小丧失。主要缺陷是与骨管内腱固定的强度和在固定部位有移植物失败的危险。这两种重建方法的主要差别在于移植物的固定。

应用 BMP 增强腱与骨的愈合可形成使用半腱和薄腱进行 ACL 重建的更好方法，这样避免了髌骨的损伤和伴行的髌骨韧带固有的伸肌机理的破坏。正如组织学和生物力学评价的那样，临床前评价显示重组人 BMP-2 可促进骨与腱移植物的早期愈合。腱与骨固定强度的增大将允许更早和更具侵犯性的复原，可以更早恢复正常的活动、工作或者运动。

本发明直接应用的其它常见临床例子包括：对肱骨大粗隆旋转套腱的修复、对肩胛骨颈关节盂缘的再附着、用通过骨管的腱移植物进行外侧踝关节韧带的重建、用固定在骨表面或者通过骨管的腱移植物进行肘或者膝内侧并行韧带的重建、用置入骨管中的腱移植物进行拇指尺侧的并行韧带的重建和指（趾）骨表面或者骨管中指（趾）的屈肌或者伸肌腱的修复。本发明广泛地用于与骨连接的或骨表面或骨内管道的附着的连接组织（腱、韧带、缘、筋膜或者关节囊）的任何情况。

按照本发明，所提供的方法和组合物可用于治疗需要用重建手术来修复

连接组织和骨之间功能附着的病人。这些方法和组合物的优点在于对修复或者改善整个附着器官是有效的，这些附着器官有：腱或者韧带、邻近骨以及功能附着。方法包括将包括一个或者多个纯化的且能有效再生连接组织与骨之间功能附着的成骨蛋白的一定量组合物应用于需要重建手术的部位、或者应用于骨与连接组织缺损、裂缝或者脱离的部位。方法可进一步包括用合适的载体给予需要再生连接组织和骨之间附着的部位一个含有纯化的或者重组的 0 成骨蛋白的组合物，使连接组织、骨和功能附着器官得到再生，同时在附着发生的部位减少纤维或者颗粒组织的形成。组合物优选与有效的载体联合给药。本发明的方法的主要优点之一是它允许以加速的方式使连接组织、骨和功能附着器官有控制的再生，与没有添加成骨蛋白进行的相似方法相比，它使附着早期即可获得较大的功能强度。

成骨蛋白优选来自一般称为骨形态生成蛋白 (BMPs) 的亚类，公开的资料显示它具有成骨活性和其它生长和分化类型活性。这些 BMPs 包括 BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12 和 BMP-13，还可包括 TGF- β 蛋白质超大家族的其它成员，例如生长和分化因子，或 GDFs 和 MP52。美国专利 4,877,864；5,108,922；5,013,649；5,116,738；5,106,748；5,187,076；5,141,905；和 PCT 申请 W091/18098；W093/00432；W094/26893 和 W094/26892 和 1994 年 12 月 22 日申请的系列号为 08/362,670 待批申请已公开了一些 BMP 蛋白的结构。W094/15965；W094/15949；W095/01801；W095/01802；W094/21681；W094/15966 已公开了一些 GDFs 的结构。W093/16099 公开了 MP52 的结构。上述公开的申请在此插入作为参考文献。BMP 优选的是 BMP-2，其序列公开在美国专利 5,013,649 中，该公开的专利此插入作为参考文献，本领域中其它已知 BMPs 也能应用。目前，最优选的是 BMP-2。

BMP 可通过重组的方法生产，或者从一个蛋白质组合物中纯化获得。BMP 可以和其它的 BMPs 形成同种二聚体或者异种二聚体（例如，由一个 BMPs-2 单体和一个 BMP-6 单体组成的异种二聚体）；或者 BMP 和 TGF- β 超大家族中其它成员（例如激活素、抑制素和 TGF- β 1）形成同种二聚体或者异种二聚体（例如，由一个 BMP 单体和一个相关的 TGF- β 超家族成员组成的异种二聚体）。这种异种二聚体蛋白质的实例在已出版的 PCT 专利申请

W093/09229 中有描述, 其说明书在这里插入参考文献合并。

成骨蛋白的使用量是能有效刺激增加渗入祖细胞的成骨活性的量, 它依赖于被处理的缺损的大小和性质以及所用的载体。一般地, 给予的蛋白量在大约 0.05 到 1.5mg 的范围之内。

在优选的具体方案中, 成骨蛋白是和有效量的能够诱导腱或者韧带样组织形成的蛋白一起给予。这些蛋白质包括 BMP-12、BMP-13、BMP-12 亚族的其它成员以及 MP52。这些蛋白质以及它们再生腱和韧带样组织的作用公开在 1994 年 12 月 22 日申请的系列号为 08/362, 670 的美国专利申请中, 该公开的专利在此插入作为参考文献。在另一个优选的具体方案中, 为了诱导连接组织与骨之间功能附着的形成, 按照下面所描述的方法给予一个异种二聚体, 这个二聚体中的一个单体单位是成骨蛋白例如 BMP-2, 另一个单体亚单位是腱诱导蛋白, 例如 BMP-12。

在实施本发明中, 能够用作载体的物质包括药学上可接受的具有粘性和极性的物质, 当把它们加到骨形态生成蛋白时, 形成一种适于操作的组合物(也就是组合物不会太粘而软以便能保留在缺损部位上), 用于连接组织和骨附着的重建部位。把载体加到骨形态生成蛋白中, 让蛋白在疾病或者损伤部位保留足够长时间, 以提高渗入哺乳动物祖代细胞的再生成骨活性的自然速率, 形成一个新组织能够生长并允许细胞向内生长的空间。载体也可使骨形态生成蛋白隔一段时间间隔从损伤或者缺损部位释放出来, 以便最好地提高祖代细胞再生成骨活性的速率。

最优选的载体家族包含胶原物质。优选的胶原物质包括 Collastat¹ 和 Helistat¹ 胶原海绵(Integra LifeSciences Corp, Plainsboro, N.J)。适用于本发明的其它胶原物质描述在美国专利 5,206,028; 美国专利 5,024,841; 美国专利 5,256,418 中。胶原载体优选海绵的形式。在给药前胶原海绵可在想要的蛋白的体积和浓度下浸泡一段合适的时间以吸入蛋白。胶原海绵优选吸入大约 10% 至 150% v/v (ml 蛋白/cc 干海绵) 范围内的蛋白, 更优选是在大约 10% 至大约 60% v/v 范围之内。另外, 胶原海绵可在蛋白产生期间吸收蛋白。在这种情况下, 骨形态生成蛋白优选在生成和冻干期间加入胶原海绵中以形成单元产品。蛋白优选以大约 10% 至 150% v/v 的比率加入, 更优选的是在大约 60% 至 80% v/v 的范围之内。在本发明中有用的其它

胶原的形式是胶原凝胶和交联聚合胶原。

另一个优选的骨形态生成蛋白的给药载体家族是多孔微粒聚合物，它详细描述在美国专利 5, 171, 579 中。它已整个公开在这里作为参考文献插入。优选的多孔微粒聚合物为多聚乳酸和多聚羟基乙酸的共聚合物。蛋白和聚合物优选用整合剂整合，例如自身的血。另一个本发明可选用的载体为成骨蛋白、多孔微粒聚合物和另一个整合剂(如纤维素性的物质)的配方。其它优选的整合剂包括透明质酸、藻酸钠、聚(乙二醇)、聚氧乙烯氧化物、羧基乙烯基聚合物和聚(乙烯醇)。在具体方案中最优选作为整合剂的是羧甲基纤维素。这些组合物描述在已出版的 PCT 申请 WO 93/00050 中，其整个已公开并被作为参考文献。纤维素性的蛋白整合剂优选以大约 1 ~ 10% (W/V 注入) 的浓度存在。多孔微粒多聚体/纤维整合剂可选择性地进一步与作为稀释剂的甘油溶液联用，优选浓度为 10 ~ 80%；整合剂/溶液与多孔微粒聚合物的比值优选为大约 0.1 ~ 0.9 (V/V)。或者，正如在 1994 年 9 月 19 日申请的系列号为 08/308, 787 待批的申请中描述的那样，多孔微粒聚合物可被形成一种融合海绵。其已公开并在此被作为参考文献。与多孔微粒多聚体一起使用成骨蛋白的量一般在每立方厘米组合物中含 0.01 ~ 1mg 蛋白，优选 0.05 ~ 0.6mg 蛋白的范围之内。

另一个优选的载体家族是纤维素物质例如烷基纤维素(包括羟烷基纤维素)，包括甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和羧甲基纤维素，最优选的为羧甲基纤维素(CMC)的阳离子盐。

如果用纤维素性的载体和胶原凝胶，所用载体优选水合纤维素性的粘胶。可用机械方法增加粘性，例如高速搅拌一段合适的时间后，再经过高压灭菌或者化学处理。BMP 和纤维素性的载体优选在合适的缓冲溶液中。优选的缓冲液为组合物，除成骨蛋白外，其包括大约 0.1 ~ 10.0% (w/v) 的甘氨酸，大约 0.1 ~ 5.0% (w/v) 的糖，优选蔗糖，大约 1 ~ 20mM 盐酸谷氨酸和选择性的大约 0.01 ~ 0.1% 的非离子表面活性剂，例如聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯 80。优选溶液为大约 1% 至 20% w/v 的纤维素性的载体/缓冲液。如果需要，可加入一种盐。优选的粘性凝胶载体在下面的实施例 2 中描述。和粘性凝胶载体一起使用成骨蛋白的量一般在每立方厘米注入物质中有大

约 0.05 至 1.5mg, 优选 0.1 至 1.0mg 的范围之内。

在本发明的方法和组合物中可适用作为 BMPs 的其它载体物质包括透明质酸、外科手术筛孔或者缝线、聚乙二醇(Polyglyconate)、热敏感性聚合物、脱矿质骨、无机物和陶瓷, 例如磷酸钙、羟基磷灰石等, 以及上面所描述物质的组合。

然而, 在本发明一个优选具体方案中, 没有使用载体。本发明的蛋白溶入一种合适的缓冲液(例如上面所描述)直接用于需要组织修复的部位。例如, 蛋白可用刷子或者其它合适的涂药器给予, 例如用注射器注射。或者, 蛋白可直接地应用于需要组织修复的部位。

具体实施方式

下面的实施例进一步描述了本发明中用胶原海绵作 BMP-2 载体的具体实践。这些实施例是非限制性的, 它能被本领域中熟练技术人员理解, 并可按照上面的说明而改变。

实施例 1: BMP-2 和胶原海绵聚合物载体: 用于外科手术造成的骨髓脱离缺损。

实验用 20 只成年杂种狗。把两个膝关节的长趾伸肌腱从它们的股骨附着上剥离下来, 通过一个钻孔移植到近胫骨的干骺端。把两只后腿膝关节的长趾伸肌腱从它的肌腱附着上剥离下来, 通过骨管移植到近胫骨的干骺端。重组人 BMP-2(rhBMP-2)用 I 型胶原海绵作载体, 用于一只腿的骨髓界面(图 1)。其对侧的腿给予不含 rhBMP-2 的胶原海绵(对照)。

在手术过程中动物处于麻醉状态。通过一个旁侧副髌骨切口接近膝关节; 找到长趾伸肌腱, 然后用锋利的刀将它从旁侧股髌的附着上剥离下来。切开前胫骨肌上的筋膜后肌肉向侧旁回缩。以与骨长轴成 45°角度在近胫骨干骺端钻一直径为 4.8mm 的小孔。Helistat[®] 胶原海绵中填充重组人 BMP-2(rhBMP-2), 然后用它包裹剥离下的腱。用手把腱的自由端通过钻孔拉直后, 用简单的 4-0 不锈钢间断缝术固定在近胫骨干骺端的中间部位。把腱调节合适入骨管中, 与骨管的整个长度接触。关节囊、筋膜和皮下组织用 3-0 铬肠线进行间断缝术封闭, 皮肤用 3-0 不锈钢进行间断缝术封闭。在对侧膝上进行同样的操作。狗的四肢可以动, 允许动物单个作一些室内活动。

在第 2 周和第 4 周时处死 8 只狗; 在第 8 周时处死 4 只狗。拍高分辨率

的放射照片，然后在光学和偏振光学显微镜下观察骨髓界面的显微切片。在荧光显微镜下观察四环素标记的切片。在 MTS 材料检测机上以 50.8mm/秒的应力速率对第 2 和第 4 周的样品进行极限负荷的生物力学测试。极限负荷用平均值表示，接受 rhBMP-2 组与对照组之间用 Student 成对 t 检验比较。

结果：一系列组织学分析显示，与只接受胶原载体的腿相比较，接受 rhBMP-2 处理的腿在腱与骨的界面上存在成纤维细胞、鼓起的成骨细胞样细胞和新的骨小梁的广泛增生。随着愈合的进展，接受 rhBMP-2 处理的腿上骨与腱界面上骨小梁成熟，与腱更接近，而在没有接受 rhBMP-2 处理的腿中存在一个将腱和骨管分离开的纤维或者颗粒组织的区域。Von Kossa 染色的切片和荧光色素标记样品的荧光显微观察证明在腱与骨界面上有新形成骨的进行性矿化。高分辨率的放射照片证明在骨诱导过程中，以前存在的层状骨被吸收，而在 4 周和 8 周的接受 rhBMP-2 处理的样品中可观察到新骨进行性矿化。没有对胶原植入物存在宿主免疫反应的证据。

极限衰竭强度(N)的成对比较证明接受 rhBMP-2 处理的腿在 2 周样品 ($P=0.035$) 和 4 周样品 ($P=0.05$) 时显著强健。在接受 rhBMP-2 处理的腿 ($P=0.02$) 和作对照的腿 ($P=0.005$) 中，从 2 到 4 周其强度有统计学上的显著增加。

讨论：骨形态生成蛋白可增强骨管中腱移植物的愈合。以前的骨与腱愈合的实验证明在腱与骨之间存在一个纤维组织界面。在本实验中，rhBMP-2 诱导新骨在这个界面组织中的广泛沉积，导致在更早时间骨与腱对合更紧密，在接受 rhBMP-2 处理的腿中，腱与骨之间的 Sharpey 纤维建立更有规律。增强的固定强度与在接受 rhBMP-2 处理的腿中观察到骨内生长的组织学程度相互关联。

图1

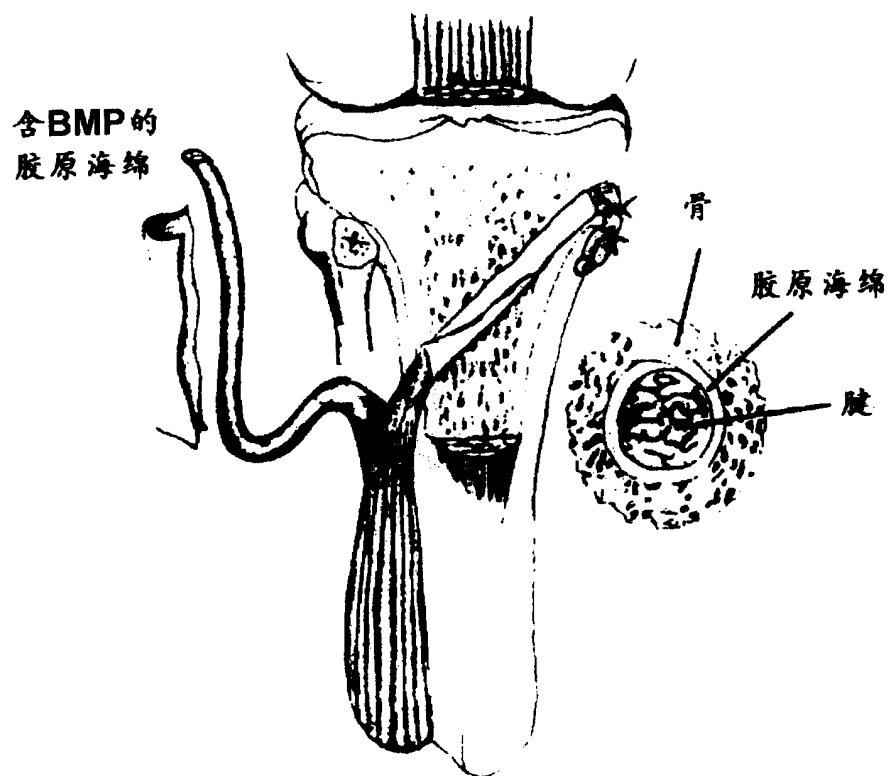


图2

