

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年11月22日(22.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/157339 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01) C07K 17/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/057829
- (22) 国際出願日: 2012年3月26日(26.03.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-108650 2011年5月13日(13.05.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人北里研究所(SCHOOL JURIDICAL PERSON KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人香川大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KAGAWA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7608521 香川県高松市幸町1番1号 Kagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 内田 健太郎(UCHIDA Kentaro) [JP/JP]; 〒2520373 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内 Kanagawa (JP). 成瀬 康治(NARUSE Koji) [JP/JP]; 〒2520373 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内 Kanagawa (JP). 高相 晶士(TAKASO Masashi) [JP/JP]; 〒2520373 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内 Kanagawa (JP). 美間 健彦(MIMA Takehiko) [JP/JP]; 〒2520373 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内 Kanagawa (JP). 松下 治(MATSUSHITA Osamu) [JP/JP]; 〒2520373 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内 Kanagawa (JP). 原口 高志(HARAGUCHI Takashi) [JP/JP]; 〒2520373 神奈川県
- (74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町二丁目7番地 協販ビル 2階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: GROWTH FACTOR ANCHORING TYPE BONE GRAFT MATERIAL, METHOD FOR PRODUCING GROWTH FACTOR ANCHORING TYPE BONE GRAFT MATERIAL, KIT FOR PRODUCING GROWTH FACTOR ANCHORING TYPE BONE GRAFT MATERIAL, AND METHOD FOR FORMING BONE

(54) 発明の名称: 成長因子アンカーリング型骨移植材料、成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法、成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット、および骨形成方法

(57) Abstract: This growth factor anchoring type bone graft material is characterized in that growth factor containing collagen-binding sites, which contains growth factor receptor agonist peptides and collagen-binding peptides, is bonded to a bone graft substrate obtained by exposing at least collagen fibers. The growth factor containing collagen-binding sites, which contains growth factor receptor agonist peptides and collagen-binding peptides, can be mixed with the bone graft substrate for preparation purposes, and has excellent osteogenic potential.

(57) 要約: 成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子が少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に結合されたことを特徴とする、成長因子アンカーリング型骨移植材料である。骨移植基材に、成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を混合して調製でき、しかも骨形成能に優れる。



WO 2012/157339 A1

明 細 書

発明の名称：

成長因子アンカーリング型骨移植材料、成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法、成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット、および骨形成方法

技術分野

[0001] 本発明は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に成長因子を結合させた骨移植材料に関し、より詳細には、成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含有するコラーゲン結合部位含有成長因子を骨移植基材に結合させた成長因子アンカーリング型骨移植材料、成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法、成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット、および骨形成方法に関する。

背景技術

[0002] 関節リウマチや変形性関節症などの治療のために人工関節が装着され、長期使用によって人工関節と骨組織との間にゆるみが生じた場合に、新しい人工関節に入れ替える人工関節再置換術が行われている。この人工関節再置換術の際には、失われた骨の一部を補う目的で、患者本人に由来する自家骨等による骨移植が行われている。骨移植の特徴は、移植骨に含まれる骨タンパクが移植骨の吸収と自家組織への置換を促進することであり、人工物では再建しえない症例においても関節機能再建が可能となる利点がある。また、骨は再生能力に優れた組織であるため、骨折した場合には適切に整復および固定することで略元通りの形態に再生される可能性がある。

[0003] しかしながら、自家骨移植は、患者本人のある部分から自分の骨をブロックとして切り取り、ブロックのまま、あるいは顆粒状、粉体状に砕いた後、骨の足りない部分に移植する方法である。自分の骨を利用するため安全性が高い利点があるが、骨欠損部が大きい場合などは、骨の採取部分の痛みが激しく、骨移植のための外科手術後の回復期間も長く掛かり、骨移植のための

骨を供給する供与部の確保に多大の困難が伴う場合がある。このような不都合を回避するため、自家骨に代えてドナー由来の骨を使用する同種骨移植が行われ、更に、各種の骨移植材料も開発されている。

[0004] 例えば、関節固定術において骨形成を促進するために使用される、血小板由来成長因子の溶液とリン酸カルシウムなどの足場材料や多糖類を含む生体適合性マトリックスとの組成物がある(特許文献1)。実施例では、1000~2000 μ mの平均直径のリン酸カルシウムに1.0mg/mlの血小板由来成長因子を滴下して組成物を調製し、この組成物を関節の骨癒合部位に塗布している。その結果、上記組成物は、自家骨移植と同等の骨架橋及び関節癒合を示す、という。

[0005] また、RGDのアミノ酸配列を有する細胞付着誘導ペプチドや組織成長因子由来ペプチドが表面に固定された骨移植材もある(特許文献2)。組織再生効果を得ることが可能な組織成長因子と細胞外基質蛋白の活性部位ペプチドとが表面に付着する骨移植材料は、低濃度のペプチドを付着させた場合でも安定的かつ持続的な薬理効果を示す、という。実施例では、牛骨由来骨ミネラル粒子の表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランで処理してアミン残基を形成し、これに架橋剤1,4-ビス-マレイミドブタンを添加して結合させ、これに細胞付着誘導ペプチドを反応により結合させて骨移植材を調製している。ペプチドが固定されていない骨移植材と比較して優れた骨再生力を示す、という。

[0006] また、無細胞性組織基材の断片を脱ミネラル化骨材の断片と合わせて乾燥してなる骨移植片組成物もある(特許文献3)。上皮細胞などから採取したコラーゲンなどの無細胞性組織基材は、細胞認識および細胞結合ならびに細胞伸展、細胞増殖、細胞分化を支持する能力があり、脱ミネラル化骨材は、骨移植を成功させるために重要な天然の骨の生理学的特性を有する。得られた骨移植片組成物を水和した後に移植または埋め込み部に塗布すると、骨形成幹細胞を刺激することでレシピエントの骨組織中もしくは表面又は非骨組織中もしくは表面における新生骨形成を誘導することができる、という。

- [0007] 一方、PTH／PTHrP受容体アゴニストをコラーゲン由来のコラーゲン結合性ポリペプチド断片に融合した融合タンパクを含む組成物もある（特許文献4）。副甲状腺ホルモン（PTH）は、骨粗しょう症の同化療法に使用されるが、1日1回の投与が必要である。上記組成物は、コラーゲン結合性ポリペプチド断片によってコラーゲンとの安定的な結合が可能であり、体液循環から逃れて投与部位に長くとどまり、PTHより長い半減期を持つことができるため、PTHの投与と同等またはそれ以上の有効性を発揮するという。実施例では、腹腔内投与し、骨密度の上昇を観察している。
- [0008] なお、PTH／PTHrP受容体アゴニストに代えて塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）をコラーゲン結合性ポリペプチド断片に結合した融合タンパクも知られている（非特許文献1）。
- [0009] 更に、骨折などの治療では骨形成を促進する因子を用いることが有用であるとの知見から、フィブロネクチン由来のコラーゲン結合性ドメインを有するポリペプチドと骨形成促進蛋白質とが連結されてなる骨形成促進融合蛋白質もある（特許文献5）。骨形成促進蛋白質としてBMP (Bone Morphogenetic Proteins) サブファミリーに属する成長因子や、bFGF、甲状腺ホルモンなどが例示されている。実施例では、ヒト腎臓の細胞から抽出したmRNAをテンプレートとして前記ポリペプチドを調製し、骨形成促進蛋白質としてBMP2やBMP7を連結して骨形成促進融合蛋白質を製造している。これをマウス頭蓋冠由来の樹立細胞である骨芽細胞に懸濁したところ、当該骨形成促進融合蛋白質の投与は、前記ポリペプチドの投与と比較して骨芽細胞に対して濃度依存的にアルカリフォスファターゼ活性の亢進を示したという。
- [0010] また、硫酸カルシウムなどから構成され、少なくとも4つ湾曲した突起を有する造形粒子と懸濁液材料とからなる骨欠損を治療用の組成物がある（特許文献6）。複数の造形粒子の前記突起が相互に組合うことで欠損部への充填を安定化させることができ、懸濁液としてコラーゲン誘導体などのゲルを形成しうる結合剤や、骨形態形成タンパク質（BMP）であってもよい。

[0011] また、リン酸カルシウム、発泡剤、および生体適合性凝集剤を含み、生理的に許容される液体と混合される自己硬化性多孔性リン酸カルシウム組成物であって、前記発泡剤の気体成分の放出が前記組成物の水和により起こり、前記組成物に少なくとも5%の多孔度を与え、かつ、硬化した後、前記リン酸カルシウム組成物が1 MPa以上の圧縮強度を有する、前記組成物もある（特許文献7）。生体適合性凝集剤としてコラーゲンが開示され、前記組成物には、更にコラーゲン露出処理基質を含有しうる旨が記載されている。該発明は、発泡剤により多孔のリン酸カルシウム組成物を生成する点に特徴があり、実施例ではコラーゲン露出処理基質と、発泡剤として炭酸水素ナトリウムとリン酸カルシウムと、カルボキシメチルセルロースを凝集剤として混合し、自己硬化性ペーストを調製している。この自己硬化性ペーストをウサギの末端大腿顆に形成した欠損に充填したところ、完全に近い治癒を示したという。

[0012] 加えて、粒子状の線維状コラーゲン成分とリン酸カルシウム成分とからなり、更に、精製された骨成長因子、組換え骨成長因子、骨髄成分、脱塩骨及び自家骨から成るグループより選択される物質を含むを含む骨成長組成物もある（特許文献8）。コラーゲン成分は、架橋コラーゲンや多孔質粒状などの不溶性コラーゲンである。実施例では、複合コラーゲンにリン酸カルシウムゲル分散物を混練し、凍結乾燥および熱的脱水による架橋工程の後に、粒子状に加工し、血液を添加してペーストとし、分散骨に移植している。これにより、欠損部分を強固に固定しえた、という。

先行技術文献

特許文献

- [0013] 特許文献1：特表2010-508912号公報
特許文献2：特表2007-530099号公報
特許文献3：特表2009-534125号公報
特許文献4：特表2010-523671号公報
特許文献5：特開2002-58485号公報

特許文献6：特表2003-525696号公報

特許文献7：特表2009-519052号公報

特許文献8：特表2010-512967号公報

非特許文献

- [0014] 非特許文献1：Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain, Nozomu Nishi et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, pp7018 & #8211; 7023, June 1998, Medical Sciences

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0015] 人工関節再置換術や骨折治療時、悪性骨肉腫による骨欠損などで骨移植が行われるが、自家骨や同種骨に由来する移植骨を用いた場合でも、一部の症例では母床骨と移植骨との癒合不全や遷延癒合をきたすことが報告されている。このような癒合不全や遷延癒合は、治療期間の長期化を意味し、患者本人の経済的、肉体的、精神的負担となっている。更に、昨今の高齢化に伴って高齢者の骨折が多発している現状において、早期にリハビリが開始できるよう、一刻も早い骨癒合が望まれている。
- [0016] しかしながら、上記特許文献1記載の骨移植材料は、リン酸カルシウムなどを足場材料として使用するため入手が容易な点で優れるが、自家骨を越える骨増殖や早期癒合は困難である。また、特許文献2記載の骨移植材は、細胞付着誘導ペプチドや組織成長因子由来ペプチドが骨表面に固定されているため、投与部での残存率が高く、優れた骨再生力を発揮しうるが、骨表面にペプチドを固定するために架橋処理を必要とし、製造が容易でない。また、特許文献3は脱ミネラル化骨材を使用するが、脱ミネラル化は、0.6Nの塩酸で3~24時間抽出するというものであり、処理時間が長い。更に、特許文献3や特許文献4記載の骨移植材料は、骨増殖にかかる有効成分を利用する点で優れるが、これらの成分は体液循環によって投与部から離脱しやすく、投与部での高い残存率を維持できない場合がある。

- [0017] さらに、特許文献5記載の方法は、コラーゲン結合性ドメインとしてフィブロネクチン由来に限定するものであり、骨形成促進蛋白質としてbFGFの開示はあるが、実際の効果は不明である。更に、特許文献6は所定形状の造形粒子を使用する点に特徴があり、BMPを更に配合しうる旨の記載はあるが実際の評価はしておらず、たとえこれらの成分を添加しても、体液循環によって投与部から離脱しやすく、投与部での高い残存率を維持できないと推定される。また、特許文献7は多孔のリン酸カルシウムを形成し、これに生体適合性凝集剤としてコラーゲンを混合しうる旨が記載されているが、実際の評価は行っていない。更に、多孔リン酸カルシウムとコラーゲンは共有結合で固定されていないため、体液循環によって投与部から離脱しやすく効果持続は困難と推定される。更に、特許文献8は、架橋コラーゲンを粒子状に加工したものを使用するものであるが調製が容易でなく、骨成長因子を配合しうる旨が開示されているが実際の評価は行っていない。更に、たとえ架橋コラーゲんに骨成長因子を混合しても、骨成長因子は体液循環によって投与部から離脱しやすく、長期に亘る効果の維持は困難と推定される。
- [0018] 更に、人工関節再置換術では、大腿骨の半分を入れ替えるなど、解剖学的形状を有していない自家骨や人工骨では再建が困難な症例が多数存在する。この場合には、解剖学的形状が保持され、かつ力学的強度を有する同種骨を移植する以外に方法がない。同様に、難治性骨折治療でも力学的強度を有する皮質骨のプレートが用いられている。しかし、解剖学的形状を有する巨大な同種骨を移植すると、力学的強度や解剖学的形状を有しないコラーゲン露出骨材や粉碎骨と比較して母床骨との間で癒合不全や遷延癒合をきたす場合がある。
- [0019] 本発明は上記現状に鑑み、骨の解剖学的形状と力学的強度とを確保しつつ投与部での骨増殖因子の残存率を高く維持でき、早期の骨癒合を期待しうる骨移植材料を提供することを目的とする。
- [0020] また本発明は、力学的強度を有し、骨形成能に優れる骨移植材料、前記骨移植材料の製造方法、前記骨移植材料製造用キット、および前記骨移植材料

を用いた骨形成方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0021] 本発明は、成長因子をコラーゲン結合性ペプチド部に結合した融合タンパクを骨に結合させると優れた骨形成能が期待できること、前記融合タンパクは、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材と混合することで架橋反応などを行うことなく前記骨移植基材に容易に結合しうることを、得られた成長因子アンカーリング型骨移植材料は、投与部で骨形成能を長期に亘って発揮できるため迅速な骨癒合を期待できることを見出し、本発明を完成させた。
- [0022] すなわち本発明は、成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子 (Collagen-binding Growth factor;以下「CB-GF」とも称する。) が、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に結合されたことを特徴とする、成長因子アンカーリング型骨移植材料を提供するものである。
- [0023] また本発明は、前記コラーゲン結合部位含有成長因子が、成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とリンカー部とからなることを特徴とする、前記成長因子アンカーリング型骨移植材料を提供するものである。
- [0024] また本発明は、前記骨移植基材が、コラーゲン露出骨材、または高密度コラーゲン材である、前記成長因子アンカーリング型骨移植材料を提供するものである。
- [0025] また、前記成長因子受容体アゴニストペプチド部は、塩基性線維芽細胞増殖因子であることを特徴とする、前記成長因子アンカーリング型骨移植材料を提供するものである。
- [0026] また本発明は、前記骨移植基材に、前記CB-GFを混合することを特徴とする、成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法を提供するものである。
- [0027] また、前記骨移植基材は、骨を酸処理し、前記酸で溶解した無機鋳物成分

を除去したコラーゲン露出骨材である、上記成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法を提供するものである。

[0028] さらに本発明は、前記CB-GFを含有する溶液と、骨移植基材とからなる成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キットを提供するものである。

[0029] また、本発明は、前記CB-GFを含有する溶液と、コラーゲン露出骨材調製溶液とからなる成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キットを提供するものである。

[0030] 加えて、上記成長因子アンカーリング型骨移植材料を骨欠損部および／または偽関節部に移植することを特徴とする、骨形成方法を提供するものである。

[0031] 更に、本発明は、前記成長因子アンカーリング型骨移植材料が、骨を粉砕して酸で1～60分処理してコラーゲン露出骨材を調製し、このコラーゲン露出骨材に前記CB-GFを結合したものである、上記骨形成方法を提供するものである。

発明の効果

[0032] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に、コラーゲン結合性ペプチド部を介して成長因子受容体アゴニストペプチド部を結合したものであり、全てが生体成分由来であって生体との親和性や安全性に優れる。

[0033] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に、予め調製したCB-GFを混合するだけで結合させる事ができ、製造が容易である。

[0034] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材と成長因子による骨形成作用とを併用することができるため、母床骨と移植骨との癒合が困難な症例において、優れた癒合効果を発揮することができる。

[0035] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キットは、短時間で

コラーゲン露出骨材を調製できるため、自家骨移植の際に簡便に使用することができる。

図面の簡単な説明

[0036] [図1]実施例1の骨移植基材と、成長因子受容体アゴニストペプチド部としてEGFを結合したCB-GFであるEGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図であり、図1(a)は、骨端部を原料とし、コラーゲン露出処理前の骨材とEGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合能を評価する結果であり、図1(b)は、コラーゲン露出処理後の骨材とEGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図である。

[図2]図1の骨端部に代えて、骨幹部を使用した骨材とEGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図であり、図2(a)は、骨幹部のコラーゲン露出処理前の骨材とEGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合能を評価する結果であり、図2(b)は、コラーゲン露出処理後の骨幹部の骨材とEGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図である。

[図3]実施例2の骨移植基材と、成長因子受容体アゴニストペプチド部としてbFGFを結合したCB-GFであるbFGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図であり、図3(a)は、骨端部を原料とし、コラーゲン露出処理前の骨材とbFGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合能を評価する結果であり、図3(b)は、コラーゲン露出処理後の骨材とbFGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図である。

[図4]図3の骨端部に代えて、骨幹部を使用した骨移植基材とbFGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図であり、図4(a)は、骨幹部のコラーゲン露出処理前の骨材とbFGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合能を評価する結果であり、図4(b)は、コラーゲン露出処理後の骨幹部の骨材とbFGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合能の結果を示す図である。

[図5]実施例3の結果を示す図であり、図5(a)は、bFGF-PKD-C

B D融合タンパク質を結合させた骨移植基材群の結果を、図5 (b)は、骨端部の粉碎骨結合群の結果を示す。

[図6]実施例3における仮骨面積を示す図である。

[図7]実施例4の結果を示す図である。

[図8]実施例5における新生骨体積を示す図である。

[図9]実施例6における新生骨体積を示す図である。

[図10]実施例7における新生骨体積を示す図である。

[図11]実施例8における軟X線像の時系列変化を示す図である。

[図12]コラーゲン結合性ペプチド部 (C B D) を有する細菌性コラゲナーゼの種類と、C B Dを説明する図である。

発明を実施するための形態

[0037] 本発明の第一は、C B - G Fが、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に結合されたことを特徴とする、成長因子アンカーリング型骨移植材料である。

[0038] (1) 成長因子アンカーリング型骨移植材料

骨は、網目状に形成されたコラーゲン線維にヒドロキシアパタイトが沈着したものであり、骨の有機質の大部分はコラーゲンである。コラーゲン分子は、3本のポリペプチド鎖がラセン状に結合したものであり、生体内ではこの分子が多数会合して不溶性線維を形成している。骨を酸性溶液やキレート剤で処理して調製して無機質をほぼ完全に除去したコラーゲン露出処理マトリックス (D B M) は、含まれる活性物質が皮下組織や筋肉内に存在する未分化間葉細胞を骨芽細胞に分化させ骨形成を促進するため骨移植材料として使用されているが、ほぼ完全にミネラルを消失しているため、骨に本来備わっている力学的強度も失われる。本発明の「成長因子アンカーリング骨移植材料」は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材を使用するものであり、たとえば、骨に含まれる少なくとも一部の無機質を除去して骨表面にコラーゲン線維を露出させた骨移植基材を使用することができる。これにC B - G Fを結合させたものは、当該骨移植基材にミネラルが多量に残存し

ているため解剖学的形状が高度に維持され、かつ力学的に優れる。このような骨移植基材には、コラーゲン線維が分解されずに存在するため、骨移植基材に前記CB-GFを混合するだけで結合させることができ、製造が容易である。

[0039] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材が元来有する骨形成能に加え成長因子による相乗的な骨形成作用を期待することができる。しかも、成長因子は、骨移植基材に結合しているため移植部に長く留まり、継続的な骨形成を促すことができる。なお、骨移植基材が自家骨を原料とする場合には、免疫学的な拒絶反応を回避することができる点で有利である。

[0040] 本発明の成長因子アンカーリング骨移植材料において、骨移植基材に結合させるCB-GFの量に限定はないが、骨移植基材1mg（乾燥重量）にCB-GFを0.01~1nモル、好ましくは0.1~1nモル、より好ましくは0.5~1nモル結合したものであることが好ましい。1nモルを越えて前記CB-GFを結合しても、骨形成の増加率は更に向上せず、一方、0.01nモルを下回るとCB-GFを結合した効果が十分に期待できない場合がある。

[0041] 本発明の成長因子アンカーリング骨移植材料は、使用時に骨をコラーゲン露出処理して骨移植基材を調製し、ついでCB-GFを結合し、これを骨移植材料として使用してもよいが、あらかじめ骨移植基材にCB-GFを結合した成長因子アンカーリング骨移植材料を乾燥保存し、必要時に緩衝液に懸濁して骨移植材料として使用することもできる。なお、成長因子アンカーリング骨移植材料に含まれるコラーゲン結合性ペプチド部がその立体構造によってコラーゲン線維と結合する場合には、コラーゲン線維と結合する立体構造を確保しうる緩衝液に懸濁することが好ましい。このような緩衝液としては、pH7.4のリン酸緩衝液や、トリス緩衝液などがある。

[0042] 本発明の成長因子アンカーリング骨移植材料は、従来の自家骨移植材料などの骨移植材料と同様に、骨密度の増大、骨塩量の増大、新生骨の増大の目

的で局所投与を行うことができる。例えば、腫瘍搔爬や人工関節再置換術後に生じる骨欠損部や偽関節部への移植などにより投与することで骨形成を促進させることができる。特に、人工関節再置換術、難治性骨折治療など解剖学的形状、力学的強度が保たれた骨移植材料が必要とされる症例に好適に用いることができる。

[0043] (2) CB-GF

本発明で使用するCB-GFは、成長因子受容体アゴニストペプチド部(以下、「GF部」とも称する。)とコラーゲン結合性ペプチド部(以下、「CB部」とも称する。)を含むものであればその構造や製造方法に特に制限はなく、両ペプチド部が化学的に結合されたものであってもよく、GF部とCB部とを含む融合タンパクであってもよい。この際、たとえば、CB部が、直接またはポリペプチド断片からなるリンカー部を介して、GF部に連結されるものであってもよい。更に、GF部とCB部という二つのポリペプチドを、アミノ基を介してジスクシンイミドイルグルタレートやグルタルアルデヒドを含む試薬により架橋結合するものであってもよい。また、一つのポリペプチドをスクシンイミドイル-4-ヒドラジノニコチネート アセトンヒドラゾンにより、もう一方のポリペプチドをスクシンイミドイル-4-フォルミル ベンゾエートにより誘導化した後に、二つの誘導化されたポリペプチドを混合し、アミノ基を介して架橋結合してもよい。なお、本発明では、上記以外にGF部とCB部とを結合するために、ポリペプチド以外の架橋剤その他の化合物でこれらを連結してもよい。

[0044] (i) コラーゲン結合性ペプチド部

本発明で使用するCB-GFを構成する「コラーゲン結合性ペプチド部」は、骨移植基材に成長因子受容体アゴニストペプチド部を結合させるための結合部として機能する部位である。前記したように、成長因子は骨形成作用を示すが、静脈注射などによって全身投与すると局所残存率が低く、持続的な骨形成作用を期待することができない。本発明は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材を骨移植材料として使用し、かつ、予めGF

部とCB部とを含むCB-GFを調製し、これを骨移植基材と混合させることで成長因子受容体アゴニストを骨移植基材に結合させたものである。

[0045] 骨移植基材にGF部を結合する方法としては、例えば、特許文献2に示すように、コラーゲン露出骨材などのコラーゲン露出骨材と特定成分とを化学的架橋反応で結合する方法が知られている。しかしながら該方法は反応操作に手間がかかり、かつコラーゲン露出骨材に架橋剤が残存する場合がある。しかしながら、CB-GFを使用する本発明では、CB-GFに含まれるCB部を介して架橋剤その他の化学的成分を使用せずにコラーゲン露出骨材にGF部を結合させることができる。本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は調製が容易であり、かつ架橋剤を使用しないため安全性に優れる。更に、コラーゲン露出骨材の力学的強度や解剖学的形状の保持性に優れる。

[0046] なお、本発明において、「CB部」とは、コラーゲン線維の少なくとも一部と結合するものを広く対象とすることができる。コラーゲン線維と結合するポリペプチドとしては、例えば、コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合部位などを例示することができる。コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合部位の構造遺伝子の例としては、配列番号1に示す*Clostridium histolyticum*コラゲナーゼ（以下、「CoIH」と称する場合がある。）遺伝子（GenBankアクセッション番号D29981）の3001番目～3366番目の塩基配列を含むDNA断片がある。このDNA断片は、GenBankのアクセッション番号BAA06251で特定されるアミノ酸配列をコードするものである。図12に示すように、CDで示される触媒部位と、CBDで示されるコラーゲン結合部位とが含まれ、3001番目～3366番目の塩基配列はCBDに該当する。同様に、GenBankのアクセッション番号BAA77453で特定される*Clostridium histolyticum*コラゲナーゼ（以下、「CoIG」と称する場合がある。）、同アクセッション番号BAC57532で特定される*Clostridium limosum*コラゲナーゼ、同BAC57535で特定される*Clostridium septicum*コラゲナーゼ、同A3

6866で特定される*Clostridium perfringens* コラゲナーゼ、同BAC57545で特定される*Clostridium novyi* コラゲナーゼ、同BAC57541で特定される*Clostridium bifermentans* コラゲナーゼ、同BAC57550で特定される*Clostridium sordelli* コラゲナーゼ、同AAO37456で特定される*Clostridium tetani* コラゲナーゼ、同CBO1620で特定される*Clostridium botulinum* コラゲナーゼ、同BAC57538で特定される*Clostridium sporogenes* コラゲナーゼ、同NP__833262で特定される*Bacillus cereus* コラゲナーゼ、同NP__979836で特定される*Bacillus cereus* コラゲナーゼ、同NP__833262で特定される*Bacillus cereus* コラゲナーゼ、同NP__979836で特定される*Bacillus cereus* コラゲナーゼ、同NP__845854で特定される*Bacillus anthracis* コラゲナーゼ、同YP__037608で特定される*Bacillus thuringiensis* コラゲナーゼ、同NP__832902で特定される*Bacillus cereus* コラゲナーゼ、同NP__845590で特定される*Bacillus anthracis* コラゲナーゼ、同NP__830373で特定される*Bacillus cereus* コラゲナーゼ、同YP__034814で特定される*Bacillus thuringiensis* コラゲナーゼ、同NP__843090で特定される*Bacillus anthracis* コラゲナーゼ、同NP__976942で特定される*Bacillus cereus* コラゲナーゼ、その他の細菌性コラゲナーゼに由来するコラーゲン結合性ペプチド部も同様に使用することができる。なお、本発明で使用する「CB部」は、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材の前記コラーゲン線維に成長因子を保持しうる程度に結合できればよく、従って、コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合部位の全てのアミノ酸配列を含む必要はない。たとえば、前記コラーゲン結合性ペプ

チド部は、上記アミノ酸配列におけるCBDを構成する塩基配列と90%の相同性を有するものを好適に使用することができる。結合方法は問わず、例えば、コラーゲン露出骨材の表面から露出するコラーゲン線維の一部と親和性を有して結合するものであってもよい。

[0047] (ii) 成長因子受容体アゴニストペプチド部

本発明で使用するCB-GFを構成するGF部は、骨移植基材に結合して成長因子などの機能を発揮する部位である。成長因子としては、上皮成長因子(EGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、血小板由来成長因子(PDGF)などがあり、このような作用を発揮する成長因子受容体アゴニストを広く使用することができる。その他、TGF- β 、IGF-1、BMPなどの成長因子は、異所性の骨誘導能を示さないが骨形成作用を示し、骨折部に適用すると骨折の治癒を促進する。

[0048] このような成長因子受容体アゴニストの構造遺伝子として、特に、塩基性線維芽細胞増殖因子を使用することが好ましい。このような塩基性線維芽細胞増殖因子としては、配列番号2に示すHomo sapiens fibroblast growth factor 2(basic)遺伝子(NCBI Reference Sequenceアクセッション番号NM_002006.4)の468番目~932番目の塩基配列からなるDNA断片がある。また、上皮成長因子の構造遺伝子として、Rattus norvegicusのpreproEGF(GenBankアクセス番号U04842)のcDNA(配列番号3)もある。このDNAがコードするpreproEGFのアミノ酸配列を、配列番号4に記載する。

[0049] 本発明では、GF部として、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を好適に使用することができる。塩基性線維芽細胞増殖因子は骨形成能に優れており、CB-GFを構成する成長因子として塩基性線維芽細胞増殖因子が結合したもの(以下、「CB-bFGF」と称する。)を骨移植基材に結合すると、母床骨と移植骨との癒合性に優れるからである。なお、塩基性線維芽細胞増殖因子に代えて上皮成長因子(EGF)を結合したCB-GFをCB

—E G F と称する。

[0050] (i i i) リンカー部

C B — G F は、C B 部とG F 部とをリンカー部によって連結するものであってもよい。リンカー部を挿入することでC B 部とG F 部とを所定間隔に隔離することにより、各部位の機能を独立して十分に発揮させることができる。この結果、リンカー部を挿入することでリンカー部を有しないC B — G F を使用する場合よりも強くコラーゲン線維に結合させることができる。

[0051] このようなリンカー部としては、セリン、スレオニン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン等のアミノ酸からなる特定の三次元構造を持たないペプチド断片が例示できる。また、このようなリンカー部として、前記C o l H に由来するアミノ酸配列を好適に使用することができる。より具体的には、C o l H の多発性嚢胞腎 I (Polycystic kidney disease I ; 以下、「PKD」と称する。) ドメインを好適に使用することができる。その他、他の細菌コラゲナーゼに由来するPKDもリンカー部として好適に使用することができる。PKDの共存によりCBDのコラーゲン結合性が強化されるからである。このような細菌コラゲナーゼに由来するリンカー部は、図12のPKDとして記載されている。なお、このようなリンカー部は、生体循環液に含まれるペプチド水解酵素などに対する抵抗性を有することが好ましく、これによってG F 部の局所残存性を高め、継続的な骨形成を可能とすることができる。

[0052] (3) 骨移植基材

本発明で使用する「骨移植基材」とは、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材である。このような骨移植基材としては、コラーゲン露出骨材や高密度コラーゲン材などがある。

[0053] (i) コラーゲン露出骨材

コラーゲン露出骨材としては、たとえば、少なくとも骨を形成する無機鋇物成分の一部を除去した粉碎骨などの、コラーゲン露出骨材を好適に使用することができる。骨に含まれる無機鋇物成分の全てを除去した、いわゆる完全

脱灰骨に限定されるものではない。これにより骨の力学的強度を確保し、解剖学的形状を維持することができる。なお、一部の無機鈣物成分を除去することで骨に含まれるコラーゲン線維が骨表面に露出し、前記コラーゲン結合性ペプチド部を介してCB-GFを結合することができる。

[0054] 本発明で使用する「骨」は、自家骨、同種骨、異種骨を問わない。ヒト以外の異種骨の場合は、サル、ヒヒ、チンパンジーなどの霊長類、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、スナネズミ、ハムスター、ラット、またはマウスであってもよい。また、「コラーゲン露出骨材」には、コラーゲンの他に成長因子、様々のペプチドおよび小タンパク質が豊富に含まれ、骨形成能が保持されている。本発明では、コラーゲン露出骨材を使用することで、骨材に含まれる成長因子を効率的に結合させ、かつ骨の解剖学的形状、力学的強度、骨誘導能を有効に利用することができる。

[0055] 本発明で使用するコラーゲン露出骨材は、コラーゲン線維を露出するために骨を酸溶液に浸漬して調製することができる。なお、酸処理に先立ち、軟部組織の除去処理や、アルコールなどの有機溶媒による骨髓や血液、脂質の除去処理を行ってもよい。

[0056] 骨は、ブロック状に採取した骨を、骨欠損部の形状に沿わせて成形したものでもよいが、粉砕した骨を使用してもよい。骨を粉砕する場合、その形状が不規則であってもよく、サイズも不均一であってもよい。骨基材を好適な大きさの粒子にミル処理する工程は、コラーゲン露出処理の前に限定されずコラーゲン露出処理と同時にしてもよく、コラーゲン露出処理後に行ってもよい。粉砕処理は、通常、標準的な粉砕機または混合機を用いて行うことができ、湿った骨基材または乾燥した骨基材のどちらに対しても実施することができる。その粒子径は、例えば、最長寸法が50～5000 μm の範囲であり、好ましくは50～1000 μm 、より好ましくは50～2000 μm である。

[0057] 本発明で使用するコラーゲン露出骨材は、コラーゲン線維を骨表面に露

出させるために骨から少なくとも一部の無機鈣物成分を除去したものを好適に使用することができる。露出の程度は、コラーゲン線維が骨組織から露出することでCB-GFを結合できればよい。無機鈣物成分の一部除去の目安としては、カルシウムを指標としてカルシウム含有量を、コラーゲン露出処理前と比較して95~10%、好ましくは95~40%、より好ましくは95~60%、特に好ましくは95~80%に低減すればよい。この後にCB-GFを混合することでコラーゲン露出骨材に結合させることができる。従来は、骨移植基材として、可能な限りカルシウム分を除去した完全脱灰物を使用することが一般的であったが、本発明では、上記範囲で無機鈣物成分を除去すればよく、コラーゲン露出処理時間を短縮することができる。

[0058] このような骨に対するコラーゲン露出処理は、塩酸、酢酸、硝酸、硫酸、ギ酸などで無機鈣物成分を溶解して行うことができる。使用する酸によって濃度や処理条件を適宜選択することができる。例えば、0.6N塩酸を使用する場合は、温度0~10℃で30秒から18時間、好ましくは60秒から6時間、より好ましくは60秒から1時間、特に好ましくは60秒から2分である。従来、コラーゲン露出処理には、特許文献3に記載されるように、0.6Nの塩酸で3~24時間抽出するものであり、酸抽出の目安はカルシウム含有量を5%未満に減少することであった。しかしながら、本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、粉碎骨に含まれるコラーゲン線維にCB-GFが結合できればよく、更に抗原性が除去される程度に生細胞が死滅等すればよい。このため、コラーゲン露出処理方法を再検討したところ、例えば、骨を最長寸法が50~5000 μ mの範囲に粉碎し、ついで0.6N塩酸を上記範囲で処理することで、CB-GFを効率的に結合し、しかも力学的強度が保たれ、生細胞も死滅し同種骨を使用した場合でも抗原性が低減することが判明した。本発明で使用するコラーゲン露出骨材は、上記酸処理の後に、この酸溶液に含まれる無機鈣物成分を除去すればよい。無機鈣物成分の除去方法は、上澄みを除去し、水やリン酸緩衝液などで洗浄すればよく、キレート剤による洗浄を行ってもよい。

[0059] 本発明で使用するコラーゲン露出骨材は、自家骨より調製してもよいが、同種骨移植を行う場合には、ドナー骨から上記によって調製されたコラーゲン露出骨材を緩衝液に保存し、または乾燥保存したものを使用してもよい。

[0060] (i i) 高密度コラーゲン材

本発明では、高密度コラーゲン材を骨移植基材として使用することができる。コラーゲン露出骨材を調製する場合のように酸によるコラーゲン露出処理の必要がないため、短時間で成長因子アンカーリング型骨移植材料を作成できる。

高密度コラーゲン材としては、コラーゲン線維の密度が $100\sim 800\text{ mg/cm}^3$ 、好ましくは $300\sim 800\text{ mg/cm}^3$ 、より好ましくは $400\sim 800\text{ mg/cm}^3$ である。この範囲で、力学的強度に優れるからである。なお、高密度コラーゲン材は、シート状、柱状、球状、多角状、その他の不定形であってもよい。これらの中でもシート状の高密度コラーゲン材は、骨の表面を被覆する際などに好適に使用することができる。なお、高密度コラーゲン材を構成するコラーゲン線維としては、特に限定されないが、コラーゲンI～X型のいずれであってもよい。好ましくはI型である。高密度コラーゲン材は、テロペプチドの一部または全部を除去したアテロコラーゲンから構成されることが好ましい。このような高密度コラーゲン材は、コラーゲン線維を含む溶液を凍結乾燥その他によって乾燥し、次いで上記密度に加圧することでシート状に成形して調製することができる。また、市販品を使用してもよい。

[0061] (4) 成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法

本発明で使用するCB-GFを構成するGF部とCB部とは、共にペプチドであるため融合タンパクとして調製することができる。CB-GFとして、成長因子受容体アゴニストが塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)であり、リンカー部およびCB部がC_oIHに由来するPKD-CBDである場合のCB-GFをbFGF-PKD-CBDと称すれば、bFGF-PKD-CBDの製造方法は、非特許文献1に開示されている。これにより、bF

GF-PKD-CBDを製造することができる。また、GF部として塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を使用し、CB部としてCoIGに由来するCBDを使用することで、これらが融合したbFGF-CBDを製造することもできる。また、bFGFの遺伝子配列に代えて上皮細胞成長因子(EGF)の遺伝子配列を使用することで、上記と同様にしてCB-EGFを製造することができる。更に、他の成長因子受容体アゴニストをコードする遺伝子配列を使用することで、CBに他の成長因子受容体アゴニストが結合したCB-GFを製造することができる。なお、前記したように架橋剤によってCB部とGF部とを架橋結合させてもよい。

[0062] 本発明では、前記した骨移植基材に、EGF-PKD-CBD、その他のCB-GFを混合することで、成長因子アンカーリング型骨移植材料を製造することができる。一般には、リン酸緩衝液に骨移植基材とCB-GFとを所定量添加し、温度0~10℃で60秒から60分、好ましくは5から30分、より好ましくは15から30分攪拌し、または静置することで骨移植基材にCB-GFを結合することができる。

[0063] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、予めCB-GFを調製しておけば、従来の自家骨移植の際に骨移植基材を調製し、ただちにCB-GFを添加して成長因子アンカーリング型骨移植材料を調製するだけで簡便に使用することができる。なお、同種骨移植の場合には、予め上記方法で骨移植基材を調製し、緩衝液などに保存したものを使用することができ、または、乾燥した骨移植基材を緩衝液に含浸させ、これにCB-GFを添加して成長因子アンカーリング型骨移植材料を調製し、移植用骨材として使用することができる。

[0064] (5) 成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット

本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キットには、前記したCB-GF溶液と骨移植基材とからなるキット(Ⅰ)と、CB-GF溶液とコラーゲン露出骨材調製溶液とからなるキット(Ⅱ)とがある。

[0065] (i) キット(Ⅰ)

キット（１）は、ＣＢ－ＧＦ溶液と骨移植基材とからなる。骨移植基材としては、ドナー骨に含まれる無機鈣物成分の少なくとも一部を除去してコラーゲン線維を露出し、緩衝液に保存したものや、乾燥保存したもの、高密度コラーゲン材などを例示することができる。

キット（１）を構成するＣＢ－ＧＦ溶液は、ＣＢ－ＧＦを緩衝液中に０．５～２．０ｍｇ／ｍｌの範囲で溶解した溶液である。緩衝液としては、ｐＨ７．０～８．０のリン酸緩衝液や、トリス緩衝液、生理食塩水を例示することができる。予め骨移植基材がセットされているため、移植時に骨移植基材にＣＢ－ＧＦ溶液を加えるだけで簡便に成長因子アンカーリング型骨移植材料を調製することができる。

[0066] (i i) キット（１１）

キット（１１）は、骨移植基材に換えて、コラーゲン露出骨材調製溶液をＣＢ－ＧＦ溶液に組み合わせたものである。たとえば、自家骨移植を行う際に、コラーゲン露出骨材調製溶液に自家骨を含浸させ、その後に洗浄するだけで、簡便にコラーゲン露出骨材を調製することができる。得られたコラーゲン露出骨材にＣＢ－ＧＦ溶液を添加して混和すれば、成長因子アンカーリング型骨移植材料を調製することができる。なお、０．６Ｎ塩酸溶液や酢酸などの酸溶液、更には、これらの酸液にキレート剤を含有したものをコラーゲン露出骨材調製溶液として使用することができる。キット（１１）は、自家骨移植を行う際に好適に使用することができる。

[0067] (6) 骨形成方法

本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、前記骨移植基材にＦＧＦ、ＴＧＦ－β、ＩＧＦ－１、ＰＤＧＦなどのＧＦ部とＣＢ部とを含むＣＢ－ＧＦを結合させたものである。骨移植基材による骨形成能と成長因子による骨形成の作用を期待することができる。従来から、腫瘍搔爬や人工関節再置換術後に生じる骨欠損部の治療や、偽関節部の治療には、自家骨を粉碎した移植骨や、同種骨を粉碎した移植骨が使用されてきた。従来の移植骨に代えて本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料を使用することで、成長

因子が移植部に長く留まるため継続的な骨形成を促すことができ、従来よりも早期に骨を形成させることができる。

[0068] 具体的には、腫瘍搔爬や人工関節再置換術後に生じる骨欠損部や偽関節部へ前記成長因子アンカーリング型骨移植材料を移植することで、骨形成を促進させることができる。

[0069] この際、例えば、自家骨移植を行う場合には、移植骨を採取し、最長寸法が50～5000 μ mの範囲に粉碎し、0.6Nの塩酸中で1分間攪拌することでコラーゲン露出処理を行えばよい。次いで、コラーゲン露出骨材を水洗し、リン酸緩衝液（pH7.0～8.0）で洗浄し、これにCB-GFを添加して約1～30分間混和すれば、成長因子アンカーリング型自家骨移植材料を調製することができる。これを腫瘍搔爬や人工関節再置換術後に生じる骨欠損部や偽関節部へ移植すれば、自家骨移植を行うことができる。しかも、本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、従前の自家骨と相違してCB-GFが結合しているためCB-GFの作用により、優れた骨形成を期待することができる。骨折などの際に患部の早期癒合により早期離床を可能とし、リハビリを早期に開始することができる。また、同種骨移植を行う際は、術前に成長因子アンカーリング型同種骨移植材料を調整することが可能であり、短い手術時間かつ低侵襲で効果的な同種骨移植を行うことができる。

[0070] コラーゲン露出骨材を調製する際に、前記成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット（11）のコラーゲン露出骨材調製溶液を使用し、CB-GFとしてキット（11）に含まれるCB-GF溶液を使用することができる。

実施例

[0071] 次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらの実施例は何ら本発明を制限するものではない。

[0072] 製造例1（EGF-PKD-CBD融合タンパク質の製造）

（1）C o I HのDNA（配列番号1）における塩基番号3001～33

66の領域は、コラーゲン結合ドメイン (CBD) をコードする遺伝子断片である。また、上記DNA (配列番号1) 中、塩基番号2719~3000の領域は、細菌性コラゲナーゼのPKDドメイン(PKD) をコードする遺伝子断片であり、リンカー部として使用することができる。そこで、これらの領域を含む上記DNA (配列番号1) の塩基番号2719番目~3391番目の領域をpGEX-4T-2プラスミドのSmaI部位に常法に従って挿入した。

[0073] (2) *Rattus norvegicus* のpreproEGF (GenBankアクセス番号U04842) のcDNA (配列番号3) 中、塩基番号3308~3448の塩基配列からなるDNA (配列番号5) を、5'末端側にBamHI部位、3'末端側に融合タンパク質の読み枠を整合させるための1ヌクレオチド (G残基) とEcoRI部位を持つよう、PCR法により増幅した。この断片を(1)の発現ベクターのBamHI-EcoRI部位に常法に従って挿入した。得られた発現プラスミドは、GST-EGF-PKD-CBD融合タンパク質 (配列番号6) をコードする読み枠 (配列番号7) を有している。

[0074] (3) 得られた(2)の発現プラスミドを大腸菌 (*Escherichia coli* BL21 Codon Plus RIL) にエレクトロポレーション法により導入した。

前記大腸菌を、50mLの50 μ g/mLアンピシリン及び30 μ g/mLクロラムフェニコール含有2 \times YT-G培地中で、一晩、前培養した。得られた前培養液10mLを前記培地500mLに加え、この菌液の濁度 (OD₆₀₀) が約0.7になるまで、37 $^{\circ}$ Cで振とう培養した。得られた菌液に、0.1M イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 水溶液5mLを添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間培養した。その後、0.1M フェニルメチルスルフォニルフルオライド (PMSF) のイソプロパノール溶液5mLを添加し、培養液を6,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心して形質転換体を集菌した。1mMPMSFを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS

) 7. 5 mLに菌体を懸濁し、フレンチ・プレスにて細胞破碎処理を行った。懸濁液の1/19容量の20% Triton X-100溶液を添加し、4°Cで30分間攪拌した。この溶菌液を15,000×g、4°Cで30分間遠心して得た上清を、再度同じ条件で遠心し、その上清を清澄溶菌液とした。グルタチオン-セファロース・ビーズ(2 mL)にこの清澄溶菌液を添加し4°Cで1時間攪拌してGST-EGF-PKD-CBD融合タンパク質をビーズに結合させた。このビーズをPBS 12 mLで5回洗浄したのち、少量のPBSに懸濁してカラムに充填した。50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mMグルタチオン溶液で融合タンパク質を溶出した。融合タンパク質1 mgあたり5 unitのトロンビンを添加して25°Cで10時間反応し、GSTタグを切断した。その後PBS 300 mLに対して4°Cで12時間の透析を4回繰り返した。PBSで洗浄した新しいグルタチオン-セファロース・ビーズ(2 mL)を充填したカラムに透析を完了した切断産物を添加してそのまま溶出することにより、GSTタグを除去してGSTタグを有しないEGF-PKD-CBD融合タンパク質(配列番号6の225~491)を得た。

[0075] 製造例2 (bFGF-PKD-CBD融合タンパク質の製造)

まず、配列番号1に示すC o 1 H遺伝子の2719番目~3391番目の塩基配列を含むDNA断片(PKD-CBD遺伝子)を、pGEX-4T-2プラスミド(GEヘルスケア・ジャパン社製)のSma I部位に、常法を用いて挿入した。他方、配列番号2に示すHomo sapiens fibroblast growth factor 2(basic)遺伝子(NCBI Reference Sequenceアクセッション番号NM_002006.4)の468番目~932番目の塩基配列からなるDNA断片(bFGF遺伝子)を、5'末端側にBgl II部位を有し、3'末端側に1ヌクレオチド(塩基G)およびEcoRI部位を有するように、PCR法により増幅した。増幅したDNA断片(bFGF遺伝子)を、前記DNA断片(PKD-CBD遺伝子)を挿入した前記プラスミドのBamHI

—E c o R I 部位に、常法を用いて挿入し、発現プラスミドを調製した。前記発現プラスミドは、G S T — b F G F — P K D — C B D 融合タンパク質（配列番号8）をコードするリーディングフレーム（配列番号9）を有している。前記 b F G F — P K D — C B D 融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号10に示し、前記 b F G F — P K D — C B D 融合タンパク質をコードする塩基配列を配列番号11に示す。配列番号10に示すアミノ酸配列において、N末端の2つのアミノ酸残基 G l y — S e r は、G S T タグ切断用酵素（トロンビンプロテアーゼ）の認識部位の一部である。電気ポレーション法を用いて、前記発現プラスミドを、大腸菌 B L 2 1 C o d o n P l u s R I L（Stratagene社製）に導入し、形質転換体を作製した。

[0076] 前記形質転換体を、50 mLの50 μ g/mLアンピシリン及び30 μ g/mLクロラムフェニコール含有2×YT-G培地中で、一晚、前培養した。得られた前培養液10 mLを前記培地500 mLに加え、この菌液の濁度（O. D. 600）が約0.7になるまで、37°Cで振とう培養した。得られた菌液に、0.1 M イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）水溶液5 mLを添加し、37°Cで2時間培養した。さらに、0.1 M フェニルメチルスルフォニルフルオライド（PMSF）含有イソプロパノール液5 mLを添加後、前記菌液を6000×g、4°Cで10分間遠心し、形質転換体を回収した。50 mM T r i s — H C l（pH7.5）、0.5 M N a C l、1 mM P M S F 7.5 mLに、前記形質転換体を懸濁し、フレンチ・プレスにより細胞を破壊した。この懸濁液19容量に対して、20% T r i t o n（登録商標）X-100 1容量を加え、4°Cで30分間攪拌した。得られた菌液を、15,000×g、4°Cで30分間遠心し、上清を回収した。この上清を、さらに15,000×g、4°Cで30分間遠心し、上清を回収した。この上清を、清澄溶菌液とした。グルタチオン-セファロースビーズ 2 mLに前記清澄溶菌液を添加し、4°Cで1時間攪拌した。前記ビーズを、50 mM T r i s — H C l（pH7.5）、0

、5 M NaCl 12 mLを用いて5回洗浄後、少量の50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaClに懸濁してカラムに充填し、溶出液(50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、10 mMグルタチオン)を用いて、前記GST-bFGF-PKD-CBD融合タンパク質を溶出した。この融合タンパク質1 mgあたり、5 unitのトロンピンを添加して、25°Cで10時間反応させた。得られた反応液を、ヘパリン-セファロースビーズ 1 mLに添加し、4°Cで3時間攪拌してbFGF-PKD-CBD融合タンパク質を本ビーズに結合させた。上清を静かに捨て50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 M NaCl 12 mLを用いて3回洗浄した。このビーズをカラムに充填し、0.5~2 M NaClの塩勾配を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.5)計10 mLを用いてタンパク質を溶出し、bFGF-PKD-CBD融合タンパク質(配列番号10)を得た。

[0077] 製造例3 (bFGF-CBD融合タンパク質の製造)

配列番号12に示すColG遺伝子の4011番目~4358番目の塩基配列からなるDNA断片を、5'末端側にSmaI部位を有し、3'末端側にXhoI部位を有するように、PCR法により増幅した。この断片をpGEX-4T-2プラスミドのSmaI部位とXhoI部位の間に常法に従って挿入した。他方、配列番号2に示すHomo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) 遺伝子(NCBI Reference Sequenceアクセッション番号NM_002006.4)の468番目~932番目の塩基配列からなるDNA断片(bFGF遺伝子)を、5'末端側にBglII部位を有し、3'末端側に1ヌクレオチド(塩基G)およびEcoRI部位を有するように、PCR法により増幅した。増幅したDNA断片(bFGF遺伝子)を、前記DNA断片(CBD遺伝子)を挿入した前記プラスミドのBamHI-EcoRI部位に、常法を用いて挿入し、発現プラスミドを調製した。前記発現プラスミドは、GST-bFGF-CBD融合タンパク質(配列番号13)をコー

ドするリーディングフレームを有している。前記 b F G F - C B D 融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 1 3 の塩基配列第 7 2 0 番目から 1 5 0 3 番目に対応するアミノ酸配列である。このアミノ酸配列において、N末端の2つのアミノ酸残基 G l y - S e r は、G S T タグ切断用酵素（トロンピンプロテアーゼ）の認識部位の一部である。エレクトロポレーション法を用いて、前記発現プラスミドを、大腸菌 B L 2 1 C o d o n P l u s R I L （S t r a t a g e n e 社製）に導入し、形質転換体を作製した。

この形質転換体を用いた以外は製造例 2 と同様に操作して、b F G F - C B D 融合タンパク質を製造した。

[0078] 実施例 1

生後 2 ヶ月齢オスの W i s t a r ラットから大腿骨を採取し、脱脂凍結乾燥を行った。

この骨組織を骨端部と骨幹部とに分け、それぞれを平均粒子径 5 0 ~ 3 0 0 μ m に粉碎した。各粉碎骨 4 0 m g に 0. 6 N の塩酸 1 m l を添加し、温度 4 $^{\circ}$ C で 1 8 時間、攪拌処理した。次いで、p H 7. 4 のリン酸緩衝液で 2 度洗浄し骨端部および骨幹部のコラーゲン露出骨材を調製した。

[0079] 骨端部の粉碎骨（コラーゲン露出処理前の骨材）5 m g、1 0 m g、2 0 m g、4 0 m g、8 0 m g、1 6 0 m g に、それぞれリン酸緩衝液 0. 2 m l と、製造例 1 で得た E G F - P K D - C B D 融合タンパク質を 1. 1 6 n モル添加し、3 0 分間混和した。混和後、上澄みを採取して上澄みに含まれる融合タンパク質の量を S D S - P A G E によって評価した。結果を図 1 （a）に示す。なお、図 1 （a）において、左から分子量マーカー（M a r k e r）、製造例 2 で得た E G F - P K D - C B D 融合タンパク質の原液（c o n）、コラーゲン（C P）5 m g、粉碎骨（B P）5 m g、粉碎骨（B P）1 0 m g、粉碎骨（B P）2 0 m g、粉碎骨（B P）4 0 m g、粉碎骨（B P）8 0 m g、粉碎骨（B P）1 6 0 m g を示す。

[0080] また、骨端部の粉碎骨（コラーゲン露出処理前の骨材）に代えて、上記した骨端部のコラーゲン露出骨材（D B P）を 5 m g、1 0 m g、2 0 m g、

40 mg、80 mgおよび160 mg（コラーゲン露出処理前重量）とり、それぞれにリン酸緩衝液0.2 mlと、製造例1で得たEGF-PKD-CBD融合タンパク質を1.16 nモル添加し、30分間混和した。混和後、上澄みを採取して上澄みに含まれる融合タンパク質の量をSDS-PAGEによって評価した。また、比較として、EGF-PKD-CBD融合タンパク質に代えてウシアルブミンを1.16 nモル添加して上記と同様に操作した。結果を図1（b）に示す。以下、図1～図4において、粉砕骨使用群をPre-decalcification（BP）と、コラーゲン露出骨材使用群をPost-decalcification（DBP）で示す。

[0081] 更に、骨端部の粉砕骨に代えて、骨幹部の粉砕骨を使用し、骨端部のコラーゲン露出骨材に代えて骨幹部のコラーゲン露出骨材を使用し、上記と同様に操作して、EGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合活性を評価した。結果をそれぞれ図2（a）、図2（b）に示す。

[0082] 図1（a）と図1（b）とを比較すると、図1（a）では、上澄み中の融合タンパク質の量は、粉砕骨の量にかかわらず一定であるが、図1（b）では、コラーゲン露出骨材量が増加するにつれて上澄み中の融合タンパク質の量が低下した。コラーゲン露出骨材と結合しなかったEGF-PKD-CBD融合タンパク質が上澄みに存在するため、コラーゲン露出骨材量を増加することで、より多くのEGF-PKD-CBD融合タンパク質がコラーゲン露出骨材と結合したと考えられる。なお、骨端部ではウシアルブミンでも、EGF-PKD-CBD融合タンパク質と同様に、コラーゲン露出骨材量に依存して上澄みへの残存量が減少し、コラーゲン露出処理によって、タンパク質の結合能が増加することが判明した。

[0083] また、図1（b）と図2（b）とを比較すると、コラーゲン露出骨材に対するEGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合量は、骨端部に由来するコラーゲン露出骨材と骨幹部に由来するコラーゲン露出骨材とでほぼ同じ結合量を示した。一方、図1（b）と図2（b）とを比較して明らかのように、上澄みにおけるBSA量は骨幹部の方が多い。このことは、アルブミンの

結合量は、使用する骨の部位によって異なることを意味する。本発明を用いることで、使用する骨の部位によらず、粉碎骨にEGF-PKD-CBD融合タンパク質をアンカーリング可能であると考えられた。

[0084] 実施例2

EGF-PKD-CBD融合タンパク質に代えて、製造例2で得たbFGF-PKD-CBD融合タンパク質を使用した以外は実施例1と同様に操作して、骨端部の粉碎骨とコラーゲン露出骨材、および骨幹部の粉碎骨とコラーゲン露出骨材に対するbFGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合活性を評価した。骨端部の粉碎骨とコラーゲン露出骨材とに対するbFGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合活性の結果を図3(a)、図3(b)に、骨幹部の粉碎骨とコラーゲン露出骨材とに対するbFGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合活性の結果を、図4(a)、図4(b)に示す。

[0085] 図3(a)と図3(b)とを比較すると、共に粉碎骨やコラーゲン露出骨材の量が増加するにつれて上澄み中の融合タンパク質の量が低下した。しかしながら粉碎骨よりもコラーゲン露出骨材の方が骨量に対する依存性が高く、コラーゲン露出処理によってbFGF-PKD-CBD融合タンパク質との結合性が向上することが判明した。

[0086] また、図3と図4とを比較すると、骨幹部に由来するコラーゲン露出骨材は、80mgの添加で、ほぼ上澄み中のbFGF-PKD-CBD融合タンパク質が消失したが、骨端部に由来するコラーゲン露出骨材は40mgの添加で上澄み中からほぼ消失しており、骨端部に由来するコラーゲン露出骨材の方が、骨幹部に由来するコラーゲン露出骨材よりもbFGF-PKD-CBD融合タンパク質の結合能が高いことが判明した。本発明により、使用する骨の部位、使用するCB-GFの種類によらず、コラーゲン露出処理骨剤にCB-GFをアンカーリングしうることが示された。

[0087] 実施例3

生後2ヶ月齢のオスのWistarラット6匹を3匹ずつの2群に分けた。両群のラットにおいて、ネブタール麻酔下に、大腿骨前方の骨膜上に、

実施例 1 と同様に調製したコラーゲン露出骨材 20 mg (コラーゲン露出処理前重量) に製造例 2 で調製した b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質を 20 mg 結合させたコラーゲン露出骨材 (成長因子アンカーリング型骨移植材料) を移植し、他の一群には、実施例 1 で調製した骨端部の粉碎骨を 20 mg 移植した。

[0088] 一週間毎に、軟 X 線撮影を行い、骨形成を経時的に観察した。b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質を結合させたコラーゲン露出骨材を移植した結果を図 5 (a) に、骨端部の粉碎骨を移植した結果を図 5 (b) に示す。

[0089] 図 5 (a) に示すように、大腿骨前方の骨膜上に成長因子アンカーリング型骨移植材料を移植すると、約 1 週間後に移植した成長因子アンカーリング型骨移植材料の近傍に骨組織が観察 (矢印) され、約 2 週間後には、より広範囲に骨組織が厚みをもって観察された。これに対し、粉碎骨を移植したコントロール群では、移植 2 週間後でも、粉碎骨の近傍に骨組織を観察することはできなかった。また、新生した骨組織 (仮骨) の面積を図 6 に示す。黒カラムがコントロール群であり、白カラムが b F G F - P K D - C B D 融合タンパク質結合群である。

[0090] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、従来の同種骨移植と比較して、迅速に骨組織を形成しうることが判明した。

[0091] 実施例 4

生後 2 ヶ月齢のオスの W i s t a r ラットから大腿骨を採取し、脱脂凍結乾燥を行った。

この骨組織の骨幹部を平均粒子径 50 ~ 300 μ m に粉碎した。粉碎骨を 40 mg (コラーゲン露出処理前重量) ずつに 3 分割し、その 1 を非コラーゲン露出処理粉碎骨 (B P) とし、その 2, その 3 をコラーゲン露出処理粉碎骨 (D B P) 群とした。コラーゲン露出処理粉碎骨 (D B P) 群は、0.6 N の塩酸 1 ml を添加し、温度 4 $^{\circ}$ C で 1 分または 18 時間、攪拌処理した。次いで、pH 7.4 のリン酸緩衝液で 2 度洗浄し骨幹部の骨移植基材とした。

[0092] ついで、骨幹部の粉碎骨（BP）40mg、コラーゲン露出処理1分群、コラーゲン露出処理18時間群とにそれぞれリン酸緩衝液0.2mlと、製造例2で得たbFGF-PKD-CBD融合タンパク質を1.16nモル添加し、30分間混和した。混和後、上澄みを採取して上澄みに含まれる融合タンパク質の量をSDS-PAGEによって評価した。結果を図7に示す。なお、コラーゲン露出処理1分群のカルシウム含有量は、90質量%、コラーゲン露出処理18時間群のカルシウム含有量は、10質量%であった。

[0093] なお、図7において、左から分子量マーカー（Marker）、原液（con）、粉碎骨（BP）、コラーゲン露出処理1分の粉碎骨（DBP）、コラーゲン露出処理18時間の粉碎骨（DBP）を示す。

[0094] 図7に示すように、粉碎骨（BP）では、上澄み液に融合タンパク質が観察されるのに対し、コラーゲン露出処理1分の粉碎骨（DBP）、コラーゲン露出処理18時間の粉碎骨（DBP）では共に上澄み液に融合タンパク質が観察されておらず、短時間のコラーゲン露出処理でも骨移植基材にCBGFを結合可能であることが分かる。

[0095] 実施例5

生後10週齢のオスのWistarラット64匹を16匹ずつの4群に分けた。実施例1と同様に調製した骨幹部の脱ミネラル化骨材20mg（コラーゲン露出処理前重量）と1.16nモルのbFGF、0.29nモルのbFGF-PKD-CBD融合タンパク質、1.16nモルのbFGF-PKD-CBD融合タンパク質とを反応させて成長因子アンカーリング型骨移植材料を調製し、これを大腿骨骨幹部前方の骨膜上に移植した。

移植1週間後、および2週間後に各群の8匹のラットの大腿骨を採取し、マイクロCTを用いて新生骨体積を測定した。なお、リン酸緩衝液（PBS）とコラーゲン露出骨材を反応させた後に移植した群をコントロールとした。結果を図8に示す。

白カラムがコントロール群であり、灰色カラムが1.16nモルbFGF群、黒カラムが0.29nモルbFGF-PKD-CBD融合タンパク質群

、グラデーションカラムが1.16 nモルbFGF-PKD-CBD融合タンパク質群である。aはコントロール群との有意差、bは1.16 nモルbFGF群との有意差を示す。

[0096] 図8より、1.16 nモルbFGF-PKD-CBD融合タンパク質群の1週後の新生骨量は1.16 nモルbFGF群に比べ有意に多かった。また、2週後の新生骨量は、0.29 nモル、1.16 nモルbFGF-PKD-CBD融合タンパク質群共に、bFGF群に比べ有意に多かった。本発明によりコラーゲン露出骨材とbFGF-PKD-CBD融合タンパク質を用いることによって低用量で長期に渡って骨形成を促進できることが示された。

[0097] 実施例6

生後10週齢のオスのWistarラット32匹を16匹ずつの2群に分けた。実施例1と同様に調製した骨幹部のコラーゲン露出骨材20mg（コラーゲン露出処理前重量）とbFGF-PKD-CBD、製造例3で得たbFGF-CBD融合タンパク質を反応後、大腿骨骨幹部前方の骨膜上に移植した。反応量は両群共に0.58 nモルとした。

移植1週間後、および2週間後に各群の8匹のラットの大腿骨を採取し、マイクロCTを用いて新生骨体積を測定した。結果を図9に示す。移植後2週後の新生骨量はbFGF-CBD融合タンパク質群で多い傾向にあった。本発明によりコラーゲン結合ドメインを変化させることによって、徐放期間や骨形成量をコントロールできることが示された。

[0098] 実施例7

生後10週齢のオスのWistarラット80匹を20匹ずつの4群に分けた。シート状の高密度コラーゲン材（コラーゲン線維の密度640mg/cm³、5mm×5mm×100μm）と0.58 nモルbFGF、0.58 nモルbFGF-CBD融合タンパク質、0.58 nモルbFGF-PKD-CBD融合タンパク質とをそれぞれ反応させた骨移植材料を大腿骨骨幹部前方の骨膜上に移植した。リン酸緩衝液（PBS）と高密度コラーゲン材を

反応させた後に移植した群をコントロールとした。

移植1週間後、および2週間後に各群の10匹のラットの大腿骨を採取し、マイクロCTを用いて新生骨体積を測定した。結果を図10に示す。移植1週後の新生骨量はbFGF群、bFGF-CBD(I)融合タンパク質、bFGF-PKD-CBD(II)融合タンパク質群で同等であったが、移植2週後はbFGF-PKD-CBD(II)融合タンパク質で有意に高かった。本発明により高い強度を有する高密度コラーゲン材を用いることで長期的に骨形成を促進する移植骨代替材料を提供できることが示された。

[0099] 実施例8

生後10週齢オスのC57BL/6Jマウス6匹を2群に分けた。腫瘍掻爬や外傷後の広範囲骨欠損に対する再建を模擬してマウス大腿骨骨幹部に5mmの骨欠損を作成後、同部位に骨移植を行った。骨移植後、実施例7と同様に調製したbFGF-PKD-CBD融合タンパク質をシート状の高密度コラーゲン材(コラーゲン線維の密度 $640\text{mg}/\text{cm}^3$ 、 $5\text{mm}\times 5\text{mm}\times 100\mu\text{m}$)と反応させて得た骨移植材料で被覆した。なお、リン酸緩衝液(PBS)とシート状の高密度コラーゲン材を反応させた後に被覆した群をコントロールとした。

各群の1匹のラットの経時変化を結果を図11に示す。移植3週後、骨移植材料で被覆した群では移植骨周囲に旺盛な新生骨形成が認められ、移植骨と母床骨の癒合が認められた。これによりこの骨移植材料は、力学的強度が要求される同種皮質骨プレートの代替材料として有用であることが示された。

[0100] 本発明は2011年5月13日に出願された日本国特許出願2011-108650号に基づく。本明細書中に日本国特許出願2011-108650号の明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする。

産業上の利用可能性

[0101] 本発明の成長因子アンカーリング型骨移植材料は、簡便に製造することが

でき、かつ従来の骨移植材料と同様に使用することができる。しかも、成長因子が付加されているため、母床骨と移植骨との癒合性に優れ、有用である

。

請求の範囲

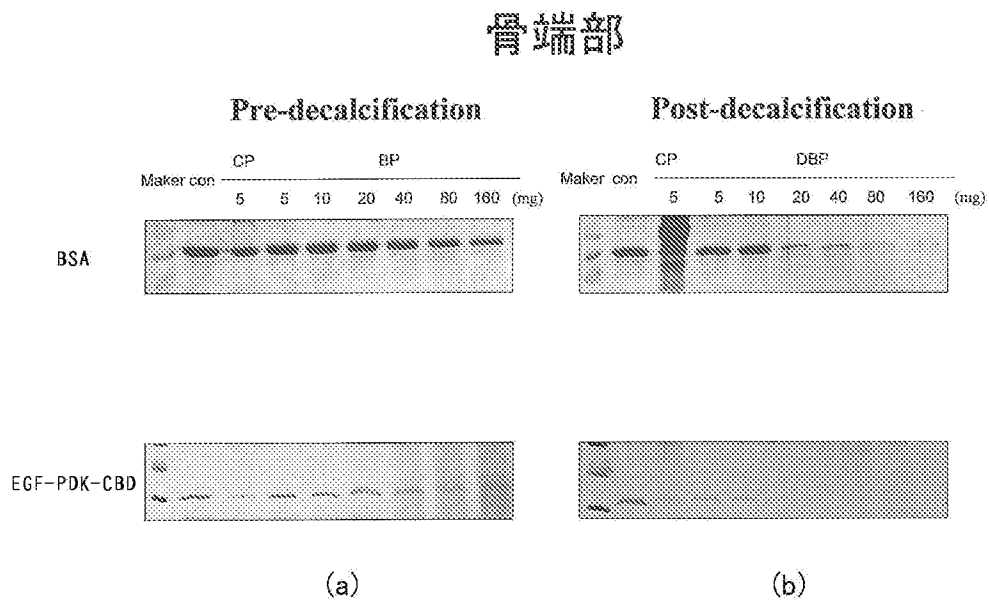
- [請求項1] 成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子が、少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に結合されたことを特徴とする、成長因子アンカーリング型骨移植材料。
- [請求項2] 前記コラーゲン結合部位含有成長因子は、成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とリンカー部とからなることを特徴とする、請求項1記載の成長因子アンカーリング型骨移植材料。
- [請求項3] 前記骨移植基材は、コラーゲン露出骨材、または高密度コラーゲン材である、請求項1または2記載の成長因子アンカーリング型骨移植材料。
- [請求項4] 前記成長因子受容体アゴニストペプチド部は、塩基性線維芽細胞増殖因子であることを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の成長因子アンカーリング型骨移植材料。
- [請求項5] 少なくともコラーゲン線維が露出してなる骨移植基材に、成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を混合することを特徴とする、成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法。
- [請求項6] 前記骨移植基材は、骨を酸処理し、前記酸で溶解した無機鉱物成分を除去したコラーゲン露出骨材である、請求項5記載の成長因子アンカーリング型骨移植材料の製造方法。
- [請求項7] 成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を含有する溶液と、骨移植基材とからなる成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット。
- [請求項8] 成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を含有する溶液と、コラ

ーゲン露出骨材調製溶液とからなる成長因子アンカーリング型骨移植材料製造用キット。

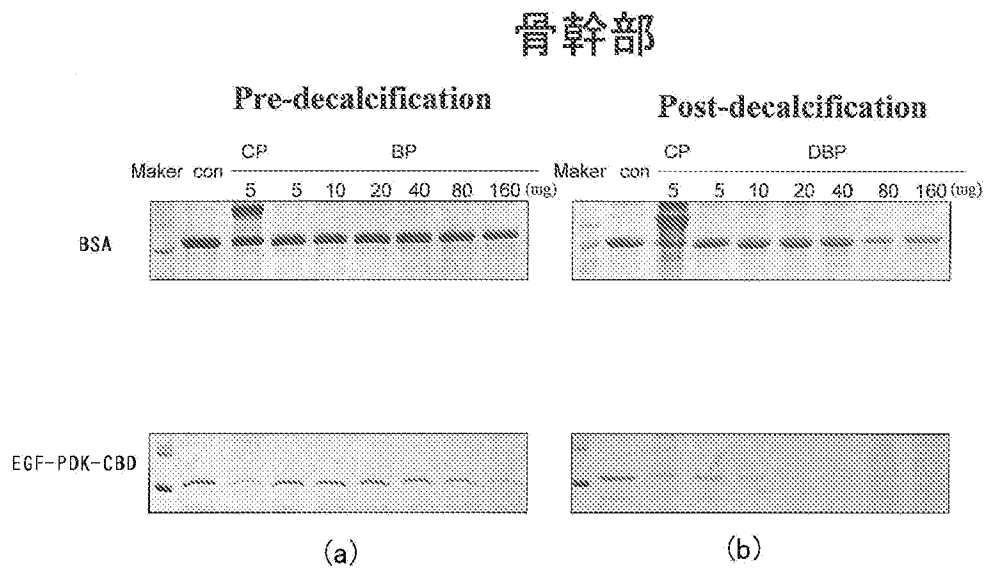
[請求項9] 請求項1～4のいずれかに記載の成長因子アンカーリング型骨移植材料を骨欠損部および／または偽関節部に移植することを特徴とする、骨形成方法。

[請求項10] 前記成長因子アンカーリング型骨移植材料が、骨を粉砕して酸で1～60分処理してコラーゲン露出骨材を調製し、このコラーゲン露出骨材に成長因子受容体アゴニストペプチド部とコラーゲン結合性ペプチド部とを含むコラーゲン結合部位含有成長因子を結合したものである、請求項9記載の骨形成方法。

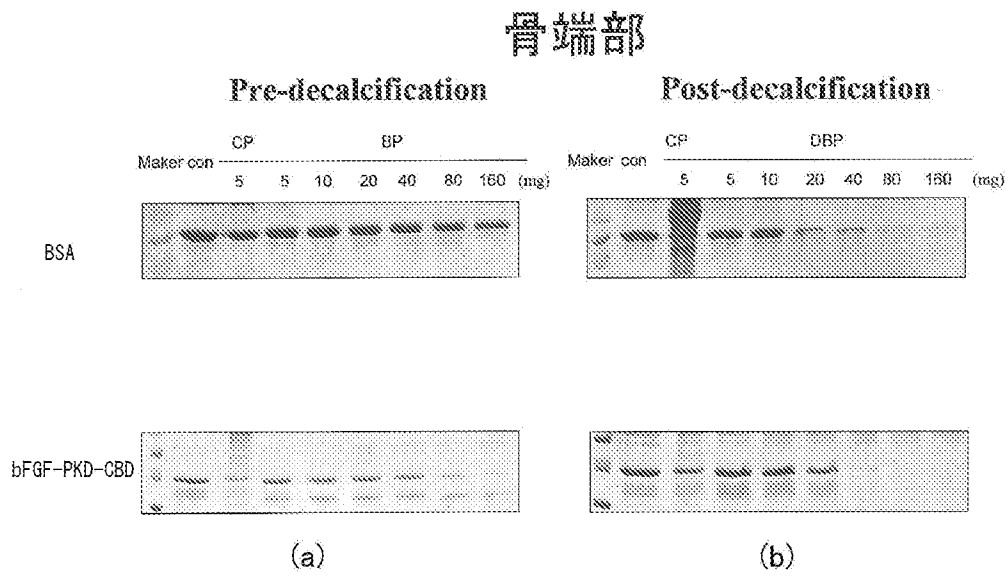
[図1]



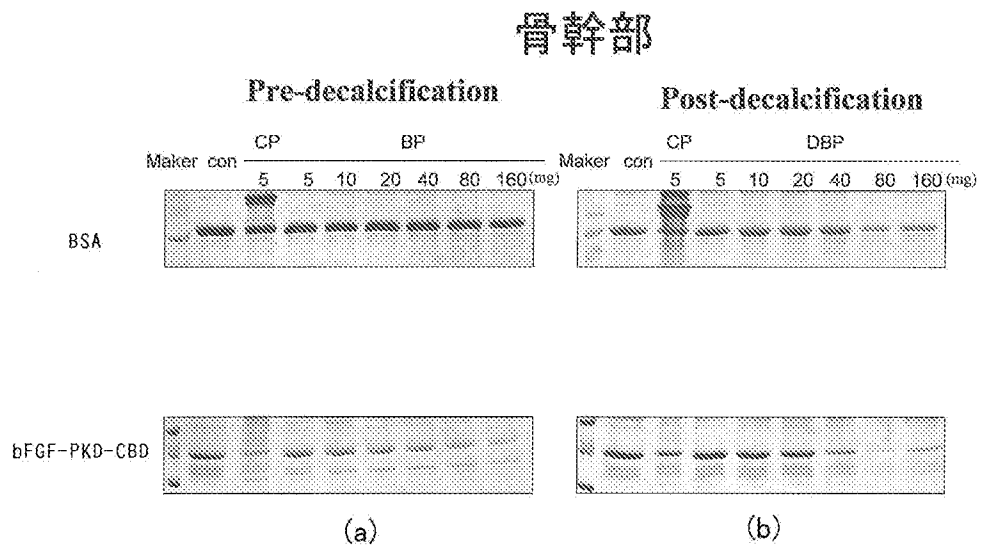
[図2]



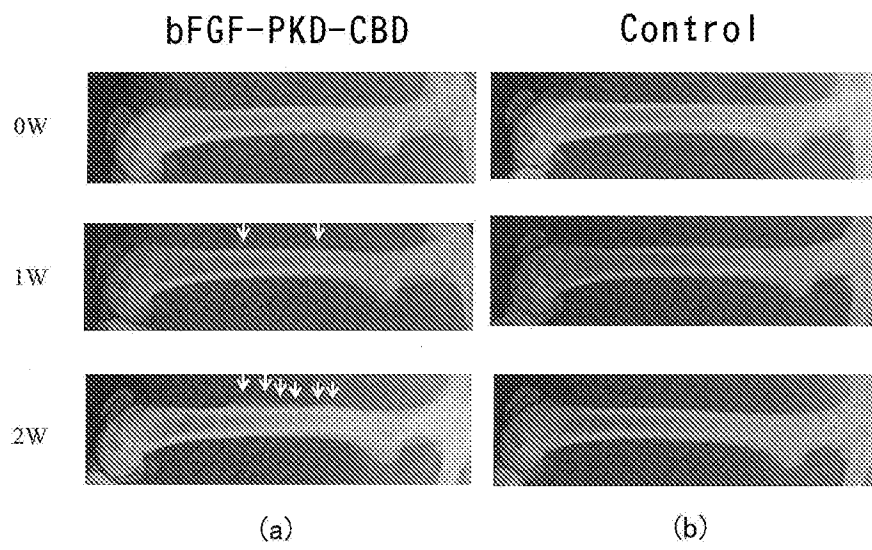
[図3]



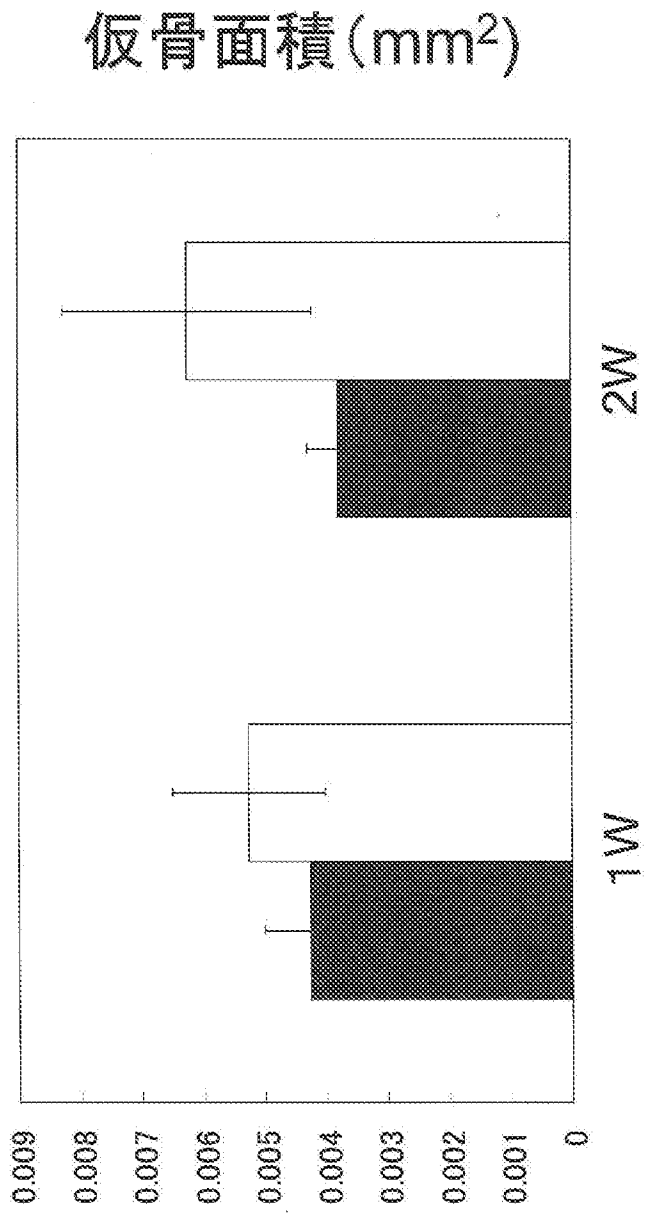
[図4]



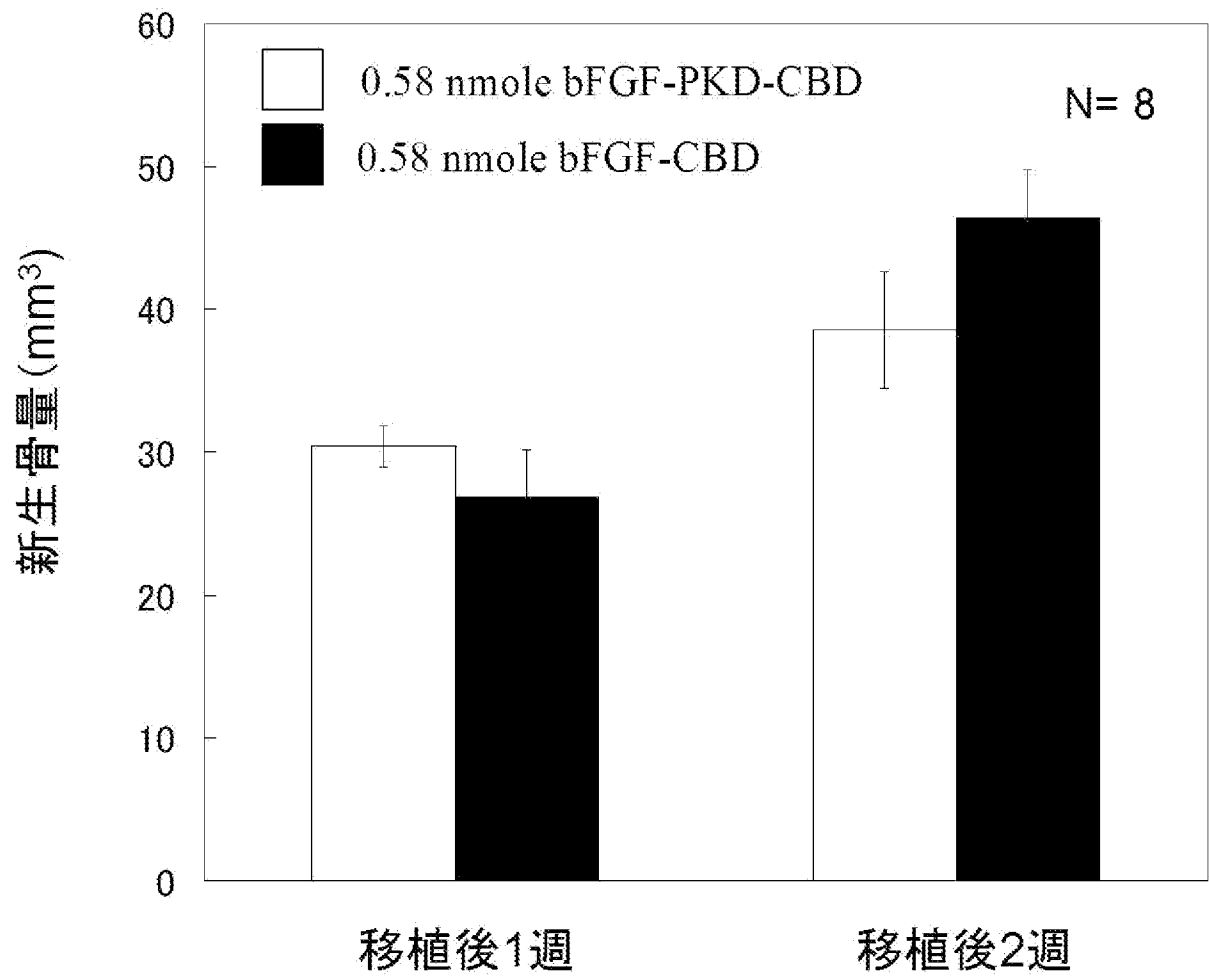
[図5]



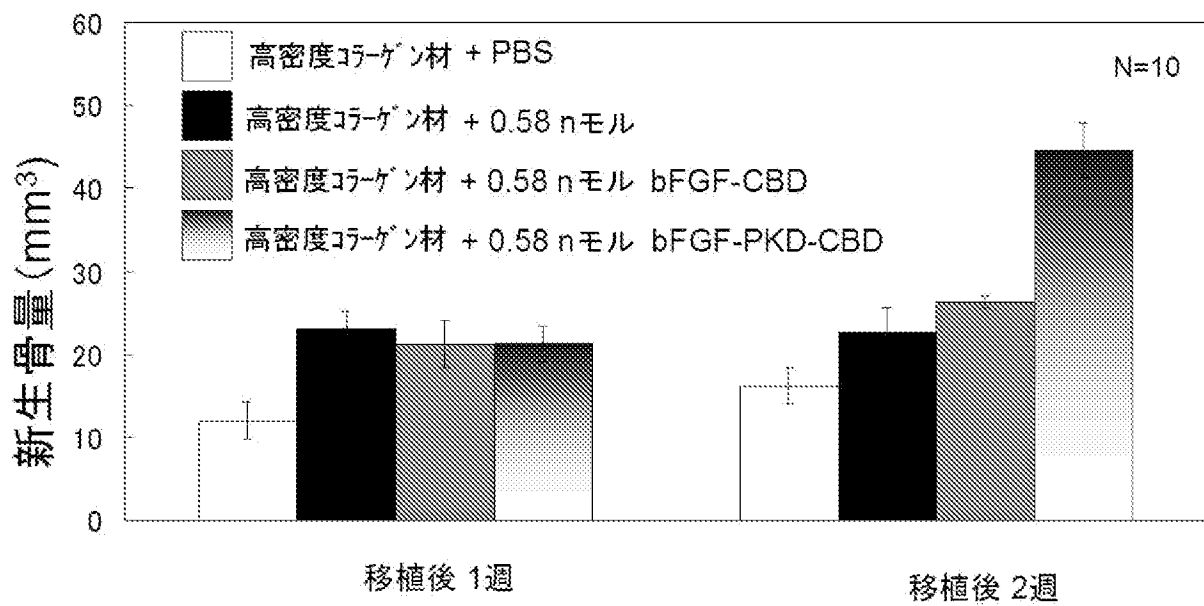
[図6]



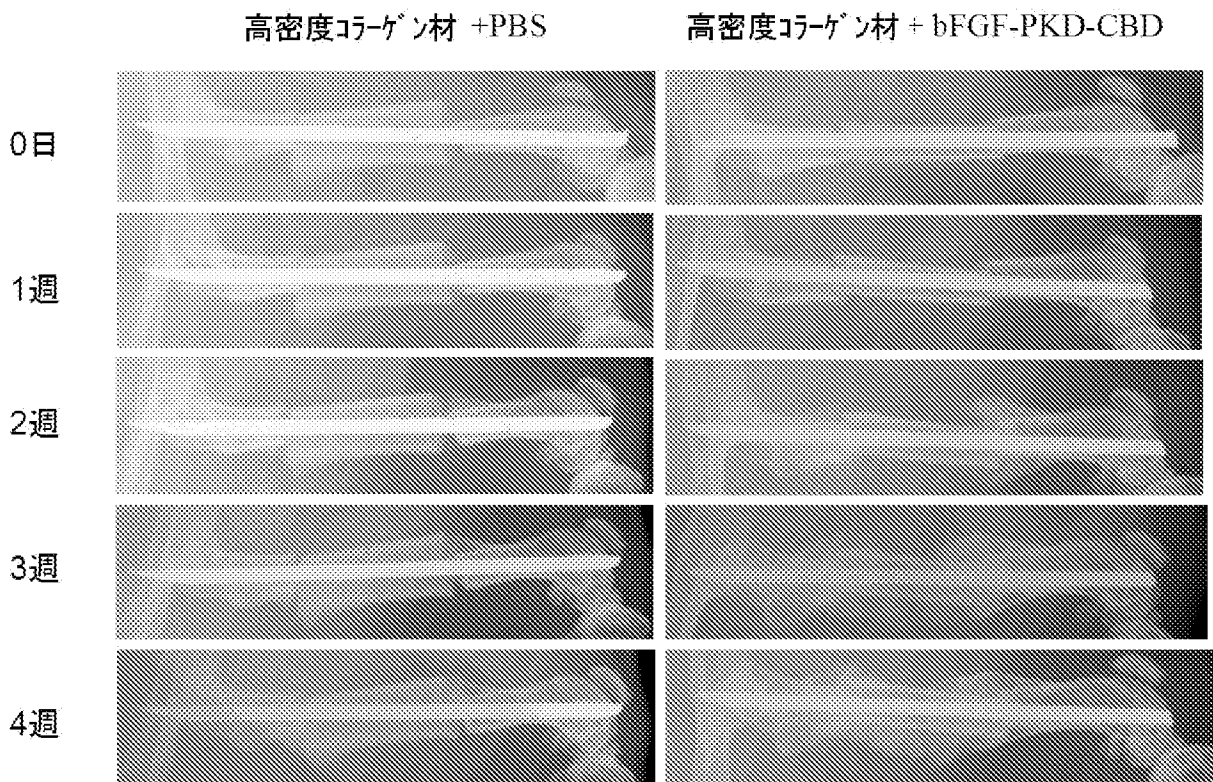
[図9]



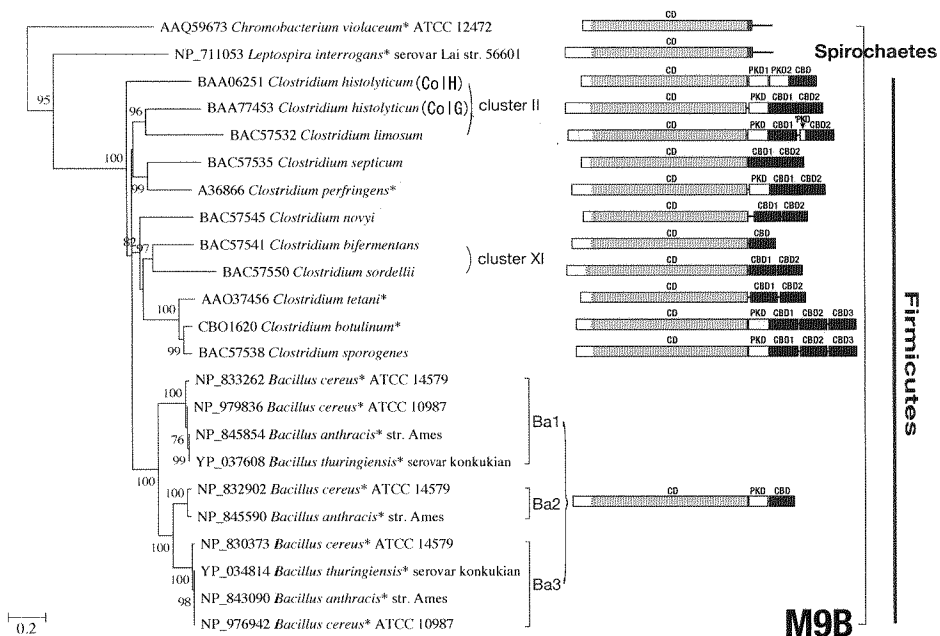
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/057829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00(2006.01) i, C07K17/02(2006.01) i

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)

A61L27/00, C07K17/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	VISSER R. et al., The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo, Biomaterials, 2009, Vol.30, p.2032-2037	1-3, 5-7/4
Y	NISHI N. et al., Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol.95, p.7018-7023	4
X	JP 2010-523671 A (Board of Trustees of the University of Arkansas), 15 July 2010 (15.07.2010), claims; paragraphs [0054], [0064] & US 2010/0129341 A1 & EP 2155874 A & WO 2008/124166 A2 & CA 2683862 A	8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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 application or patent 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)

"O" 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 April, 2012 (20.04.12)Date of mailing of the international search report
01 May, 2012 (01.05.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/057829

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/087397 A1 (The Kitasato Institute), 05 August 2010 (05.08.2010), & JP 2010-172247 A	1-8
A	SHIN C.et al., Regeneration of full-thickness abdominal wall defects in rats using collagenscaffolds loaded with collagen-binding basic fibroblast growth factor, Biomaterials, Vol.32, 2011.01, p.753-759	1-8
A	IMEN EH.et al., Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: Epidermalgrowth factor with collagen binding and cell adhesive activities, Journal of Biotechnology, 2009, Vol.139, p.19-25	1-8
P,A	WO 2011/142425 A1 (Kagawa University), 17 November 2011 (17.11.2011), (Family: none)	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/057829

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 and 10 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, C07K17/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00, C07K17/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	VISSER R. et al., The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo, Biomaterials, 2009, Vol.30, p.2032-2037	1-3, 5-7 /4
Y	NISHI N. et al., Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol.95, p.7018-7023	4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.04.2012

国際調査報告の発送日

01.05.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

9217

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2010-523671 A (ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ アーカンソー) 2010.07.15, 特許請求の範囲、【0054】、【0064】 & US 2010/0129341 A1 & EP 2155874 A & WO 2008/124166 A2 & CA 2683862 A	8
A	WO 2010/087397 A1 (学校法人北里研究所) 2010.08.05, & JP 2010-172247 A	1-8
A	SHIN C. et al., Regeneration of full-thickness abdominal wall defects in rats using collagenscaffolds loaded with collagen-binding basic fibroblast growth factor, Biomaterials, Vol.32, 2011.01, p.753-759	1-8
A	IMEN EH. et al., Construction of multifunctional proteins for tissue engineering: Epidermalgrowth factor with collagen binding and cell adhesive activities, Journal of Biotechnology, 2009, Vol.139, p.19-25	1-8
PA	WO 2011/142425 A1 (国立大学法人香川大学) 2011.11.17, (ファミリーなし)	1-8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 9, 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項9、10は、人の身体の手術又は治療による処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。