

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 38/18

A61K 48/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99104920.9

[43]公开日 1999年12月1日

[11]公开号 CN 1236645A

[22]申请日 99.4.6 [21]申请号 99104920.9

[30]优先权

[32]98.4.8 [33]EP [31]98106404.1

[71]申请人 罗切诊断学有限公司

地址 联邦德国曼海姆

[72]发明人 H·布特彻 C·多尼 G·普罗茨尔

[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 周中琦

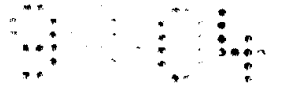
权利要求书2页 说明书9页 附图页数0页

[54]发明名称 含有骨诱导蛋白和背部化因子的药物组合物

[57]摘要

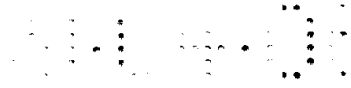
以10:1至1:10比例含有骨诱导蛋白和背部化因子的药物组合物是用于软骨发生的有用药物。

ISSN 1008-4274



权利要求书

1. 一种药物组合物，以10: 1至1: 10的比例包含骨诱导蛋白和背部化因子的组合。
2. 根据权利要求1所述的药物组合物，其中骨诱导蛋白是BMP - 2、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 7或刺猬蛋白。
3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物，其中背部化因子是头发生素、脊索素或卵泡抑制素。
4. 根据权利要求1至3所述的药物组合物，其中组合物包含生物相容的基质。
5. 根据权利要求1至4所述的药物组合物，其中生物相容的基质是透明质酸、藻酸盐或胶原。
6. 一种制备以10: 1至1: 10的比例包含骨诱导蛋白和背部化因子的药物组合物的方法，此方法通过使所述蛋白和所述背部化因子组合来实现。
7. 根据权利要求6所述的方法，其中骨诱导因子是BMP - 2、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 7或刺猬蛋白。
8. 根据权利要求6或7所述的方法，其中背部化因子是头发生素、脊索素或卵泡抑制素。
9. 根据权利要求6至8所述的方法，其中骨诱导蛋白和背部化因子与生物相容的基质结合。
10. 根据权利要求9所述的方法，其中生物相容的基质是透明质酸、藻酸盐或胶原。
11. 含有骨诱导蛋白和背部化因子的组合物的用途，用于治疗需要软骨修复的病人。
12. 一种药物组合物，包含表达骨诱导蛋白和背部化因子的载体或表达骨诱导蛋白的载体和表达背部化因子的载体的组合。
13. 一种制备用于治疗需要软骨修复的病人的药物组合物的方法，其特征在于使用能表达骨诱导蛋白和背部化因子的表达载体或能表



达骨诱导蛋白的载体和能表达背部化因子的载体的组合作为所述组合物的必需成分。

说明书

含有骨诱导蛋白和背部化因子的药物组合物

本发明涉及使用含有骨诱导蛋白和背部化因子(dorsalizing factor)的组合物从间充质干细胞诱导软骨细胞的方法和组合物。

骨诱导蛋白是诱导间充质干细胞向软骨细胞和骨细胞分化的蛋白质,例如刺猬蛋白[Sonic(Shh), Indian(Ihh), Desert(Dhh); Kinto等, 欧洲生物化学学会联合会快报, 404(1997) 319-323]或骨形态建成蛋白。

骨形态建成蛋白(BMP)是负责骨、软骨、腱和存在于骨中的其它组织形成的分子。这种蛋白独特的诱导活性与它们在骨中的存在一起表明它们是骨修复过程的重要调节剂并且可能参与骨组织的正常维持。已知许多这种蛋白,它们可以分成一些亚类[Reddi, A. H., 细胞因子和生长因子评论, 8(1997) 11-20]。这种BMP是例如BMP-2至BMP-14和GDF-1至GDF-14。

BMP是多效性调节剂,因此调节骨和软骨形成的多步骤顺序级联反应如趋化性、有丝分裂和分化。特别是BMP-2、BMP-4、BMP-5和BMP-7启动软骨发生和骨发生。

然而,BMP-2、BMP-4、BMP-5和BMP-7不能只诱导没有骨发生诱导伴随的软骨发生。因此,与软骨内骨发生有关的BMP-2、BMP-4、BMP-5和BMP-7的药物应用总会导致诱导软骨细胞和骨细胞。然而,关于软骨细胞的修复,获得没有骨发生诱导伴随的软骨发生的启动是有益的。

骨形态建成蛋白拮抗剂是抑制BMP成骨特性的物质,例如是头发生素、脊索素(chordin)或卵泡抑制素(follistatin)。

头发生素是例如在美国专利号5,670,481中描述的生长因子和骨形态建成蛋白(BMP)的拮抗剂。头发生素在施佩曼组织原中表达并且看来是施佩曼组织原作用即中胚层的神经诱导和背部化的介质。因为

头发生素在脊索和头的中胚层表达，所以它看上去影响神经板背-腹模式和前-后模式。因为头发生素在腮弓神经嵴表达，所以它看上去既影响神经嵴细胞沉积软骨，也影响随后的腮弓生长和重建。头发生素在尾鳍神经嵴表达，并且因为神经嵴是鳍生长所必须的，所以头发生素可能作为表皮和间充质的生长因子。

头发生素能以高亲和性结合BMP-4 [Piccollo等, 细胞, 86 (1996) 12141-12145] 并且是BMP的拮抗剂 [Re'em-Kalma等, 美国国家科学院院报, 92 (1995) 12141-12145; Sasai等, 自然, 376 (1995) 333-336; Fainsod等, 发育机制, 63 (1997) 39-50]。

脊索素是分泌的多肽并且是有效的背部化和神经诱导因子 [美国专利号5, 679, 783; Sasai等, 细胞, 79 (1994) 779-790]。脊索素在施佩曼组织原中表达。脊索素过量表达诱导脊索和神经组织，但不诱导中胚层。然而脊索素可以改变中胚层特化。脊索素的表达和头发生素重叠并且与头发生素作用相似。脊索素拮抗地对BMP-4作用 [Fainsod等, EMBO, 13 (1994) 5015-5025] 并且以高亲和性结合BMP-4 [Piccollo等, 细胞, 86 (1996) 589-598]。

卵泡抑制素是分泌的多肽并在施佩曼组织原中表达，并且作为背部化和神经诱导因子，该因子最初被描述为激活素结合蛋白并抑制激活素功能 [Nakamura等, 科学, 247 (1990) 836-838; Hemmati-Brivanlou等, 细胞, 79 (1994) 169-179]。卵泡抑制素也能结合BMP [Fainsod等, 发育机制, 63 (1997) 39-50]。

在软骨缺损的病例中，只获得了有限的成功。标准方法是刮除原纤维化关节软骨，清创术，海绵化作用 (spongiolaziation)，磨擦软骨成形术，切骨术，微骨折和软骨移植技术如软骨周自体移植、骨膜自体移植。仍旧缺少简单有效的治疗方法 [参见综述: Heath和Margari, 生物技术和生物工程, 50 (1996) 430-437]。新的治疗方法可能包括软骨细胞移植、生长因子治疗、细胞治疗 (美国专利号5, 486, 359)、基因治疗、新生物材料。目前，这些治疗还不实用。

本发明提供一种软骨修复的方法，其中使用含有成骨因子和骨形态建成蛋白拮抗剂的组合物。

令人惊奇地发现，骨诱导（成骨）蛋白，优选骨形态建成蛋白2、4、5和7或刺猬蛋白在体内以10: 1至1: 10（BMP: 头发生素）的比例存在时并未完全被BMP拮抗剂如头发生素、脊索素和卵泡抑制素抑制。在这种情况下，骨发生的起始受到极大程度的抑制而软骨发生的进程大部分未受影响。对于根据本发明所述的效果，BMP拮抗剂表现与BMP-2、BMP-4、BMP-5和BMP-7的高结合亲和性是必需的。

对于“骨诱导蛋白”，优选地理解为在间充质干细胞的基础上诱导BMP依赖型骨发生的成骨蛋白。BMP由此得到正调节，并且最终导致软骨细胞的形成。例如，通过BMP本身或通过诱导细胞中BMP表达的物质如刺猬蛋白可以获得这样的BMP依赖型骨发生的诱导。

物质诱导BMP依赖型骨发生的能力可以用简单的方法进行测试。为此目的，例如，在有或没有潜在骨诱导因子时，培养间充质细胞如C3H10T1/2细胞。测定对照和处理细胞的骨钙蛋白和碱性磷酸酶活性。骨钙蛋白可以通过例如购自DAKO公司的市售ELISA测定。碱性磷酸酶可以使用适当比色底物如P-硝基苯酚磷酸盐进行光度测定。骨钙蛋白和/或碱性磷酸酶活性的增长可记录为骨诱导。选择性地，骨钙蛋白和碱性磷酸酶的正调节可以使用与骨钙蛋白和碱性磷酸酶相适合的引物通过RT-PCR来测定。

对于根据本发明所述的“背部化因子”，理解为象骨形态建成蛋白拮抗剂一样抑制BMP，优选地抑制BMP-2或刺猬蛋白的骨诱导特征的物质，优选的是蛋白质。这样的抑制作用可以在例如骨髓基质细胞系分析[Zimmermann等，细胞86（1996）599-606]中得到测定。背部化因子具有促进非洲爪蟾背部结构形成的特性。背部化活性可以通过非洲爪蟾动物髓盖(cap)分析来测定。非洲爪蟾动物髓盖分析[Ruiz i Altaba, 基础发育生物学, 实用方法, IRL Press, 1993, 第147-152页; Lamb等, 科学, 262（1993）713-718]是用于测定神经诱导的。处理后，对动物髓盖染色以检测神经标记物如NCAM的存在和间充质标记物如肌肉肌动蛋白

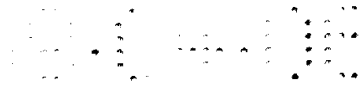
的缺乏。这些因子是例如头发生素、脊索素和卵泡抑制素[Fainsol等, 发育机制, 63 (1997) 39 - 50]。BMP拮抗剂例如在Re'em - Kalma等, 美国国家科学院院报, 92 (1995) 12141 - 12145; Sasai等, 自然, 376 (1995) 333 - 336; Fainsol等, 发育机制, 63 (1997) 39 - 50中得到描述。

在本发明的进一步优选的实施方案中, 成骨蛋白和背部化因子可以通过基因治疗导入细胞。对于此方法, 可以将编码成骨蛋白和背部化因子的基因导入优选地在相同启动子控制下的一个载体或分开的载体。因此, 本发明公开了制备用于治疗需要软骨修复的病人的药物组合物方法, 其特征在于使用能表达骨诱导蛋白和背部化因子的表达载体或能表达骨诱导蛋白的载体和能表达背部化因子的载体的组合作为该组合物的必需成分。

就成骨因子和背部化因子的有效表达而言, 必须在载体中使用强启动子。这样的启动子例如是PGK或CMV启动子。优选地, 表达载体包含这样的强启动子, 所选基因如BMP - 2、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 7、Shh、Ihh、Dhh、头发生素、脊索素或卵泡抑制素的全长mRNA, 人工内含子和多聚A位点。就应用而言, DNA或者冷冻干燥成胶原海绵, 或者与其它适当载体优选地透明质酸或藻酸盐一起使用。

根据本发明所述的药物配方也可包含例如用于支持和/或传递组合物和/或提供软骨形成表面的合适基质。基质可以使骨诱导蛋白和骨形态建成蛋白拮抗剂缓慢释放。优选地, 组合物包括生物相容和/或可生物降解的基质。用于组合物的可能的基质包括例如透明质酸、藻酸盐、硫酸钙、磷酸三钙、羟磷灰石、聚乳酸、聚酞或胶原。

剂量方案将由主治医师考虑改变本发明制剂作用的各种事实来确定。可能改变制剂作用的因素包括预期要形成的软骨数量, 施用部位, 损伤情况, 病人的年龄、性别和饮食, 任何感染的严重性, 给药时间和其它临床因素。剂量可以随着软骨重建时所用的基质类型变化而变化。



本发明的进一步目的是，通过以10: 1至1: 10的比例组合骨形态建成蛋白和骨形态建成蛋白拮抗剂来制备包含该蛋白质和该拮抗剂的药物组合物的方法和这种药物组合物的用途，即用于体内软骨发生，特别是用于治疗患软骨缺损从而需要软骨修复的病人。

为了帮助理解本发明，提供如下的实施例和参考文献，本发明的真实范围如所附的权利要求书所述。应当理解，在不偏离本发明精神的情况下，可以对所述的方法进行修改。

实施例1 微量小鼠肢分析

在无菌条件下，使用显微解剖剪和钟表镊从E11小鼠胚胎（NMRI）分离肢芽。在无钙无镁盐溶液中漂洗并培养，然后在1%胰蛋白酶溶液中于37℃培养20分钟，随后通过用1ml移液管重复抽吸进行解聚，从而得到细胞悬浮液。将细胞在哈姆氏培养基中调整为 2×10^7 /ml，并将5份10 μ l样品加入无菌培养皿中。培养2小时后，加入2ml单纯的哈姆氏（Ham's）培养基或含有待测化合物的哈姆氏培养基，其中以小于10ng/ml至约为100 μ g/ml的变化剂量含有待测化合物（a）单独的BMP拮抗剂头发生素、脊索素或卵泡抑制素，（b）BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-7或Shh和（c）BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-7或Shh和拮抗剂的组合物。培养基在5天的培养期中不更换。然后固定培养物并用爱尔新蓝（Alcian Blue）或结晶紫染色，在自来水中冲洗，然后干燥（Steele和Copping，哺乳动物胚胎后移植，应用方法，IRL Press，1990，229-232）。爱尔新蓝对软骨染色并且结晶紫对成纤维细胞样细胞染色后对分化进行评估。另外，对软骨（例如胶原蛋白II，MIA，胶原蛋白X）和骨标记物（例如骨钙蛋白，碱性磷酸酶，骨桥蛋白）的表达进行定量RT-PCR分析。

实施例2 软骨细胞培养

对于关节软骨细胞，从2月龄小鼠（NMRI）分离，从膝关节用外科手术取出胫骨坪并将关节组织小心地从污染的附着组织，包括面向滑液腔纤维软骨层中剥出。用外科刀切碎组织，在含0.25%胰蛋白酶和0.1%粗制胶原酶的混合物的Hank's缓冲盐溶液中温育16小时。细胞以单细

胞层或琼脂糖培养物（三维基质）在无血清的高葡萄糖Dulbecco改进的Eagle培养基（DMEM）中生长9天[d'Angelo和Pacific, J. Bone and Min. Res., 12(1997)1368-1377]。细胞用小于10ng/ml至约为100μg/ml的（a）单独的BMP拮抗剂、（b）单独的诱导或修饰因子和（c）诱导或修饰因子与BMP拮抗剂的组合物进行处理。处理9天后，对于早期增生的软骨标记物（例如胶原蛋白II和MIA）、晚期成熟的软骨标记物（例如胶原蛋白X）和纤维性组织标记物（例如胶原蛋白I）的表达进行定量RT-PCR分析。

实施例3 对软骨、骨、腱和韧带诱导进行小鼠生物分析

与Sampath和Reddi大鼠异位移植分析相似，使用2月龄的远系繁殖的NMRI小鼠或近亲繁殖的C3H小鼠进行小鼠异位移植分析[Sampath和Reddi, 美国国家科学院院报, 80(1983)6591-6595; 国际申请号W095/16035]。将（a）单独的BMP拮抗剂、（b）单独的诱导或修饰因子和（c）诱导或修饰因子与BMP拮抗剂的组合物放在适当缓冲液中冷冻干燥，例如对于BMP蛋白，使用0.01%三氟乙酸。对于因子组合物，缓冲液根据稳定性选择。可以根据生物相容性、生物降解性、稳定性和机械特性选用任何合适的载体，例如胶原蛋白I型基质、胶原蛋白-肝素混合物、白明胶囊、透明质酸或其它功能相当的装置。

将移植物肌内装入小鼠后肢肌肉内7天和14天。7天和14天后，用颈脱位法处死小鼠。使用标准组织学技术（参见组织学技术理论和应用，Bancroft和Stevens编辑，ChurchillLivingstone, 1996）分离和处理移植物。石蜡（8μm）或乙二醇甲基丙烯酸酯切片（1μm）用甲苯胺蓝、爱尔新蓝、vonKossa、Movat或苏木精/伊红染色使每一移植物中诱导的腱、韧带、软骨和骨组织显现出来并进行数量测定。将阳性（例如BMP-2, GDF-5）和阴性（例如模拟装置）移植物对照组与实验移植物比较。

为了评估诱导的软骨和/或骨的性质，可以通过软骨和骨标记物的RNA原位杂交和如上所述的定量RT-PCR来研究基因表达。

实施例4 全方位（Full thickness）缺损关节软骨修复模型

使用成年兔股腓关节的全方位缺损关节软骨缺损模型来评估BMP拮抗剂、诱导或修饰因子和载体的组合物影响软骨和骨修复的能力。麻醉成年兔并准备用于无菌外科手术。钻出从关节软骨到下面的软骨下骨的大到4x4mm的缺损。缺损或者空着，或者用适当的载体填充，或者用包含BMP拮抗剂和诱导或修饰因子、或单独的每一种因子的载体填充。允许动物自由运动4周。4周后，对动物处以人道的安乐死，并且对关节软骨/软骨下骨缺损部位修复的组织结构、数量和性质进行组织学评估。

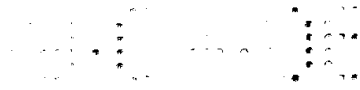
实施例5 部分缺损关节软骨修复模型

使用成年兔股腓关节的部分缺损关节软骨缺损模型来评估BMP拮抗剂、诱导或修饰因子和载体的组合物影响软骨和骨修复的能力。麻醉成年兔并准备用于无菌外科手术。钻出从关节软骨到膝关节的腓骨沟的大到4x4mm的孔，并使下面的软骨下骨保持完整。缺损或者空着，或者用适当的载体填充，或者用包含BMP拮抗剂和诱导或修饰因子、或单独的每一种因子的载体填充。允许动物自由运动4周。4周后，对动物处以人道的安乐死，并且对关节软骨缺损部位修复的组织结构、数量和性质进行组织学评估。

实施例6 用DNA对软骨、骨、腱和韧带诱导进行小鼠生物分析

与Sampath和Reddi大鼠异位移植分析相似，使用2月龄的远系繁殖的NMRI小鼠或近亲繁殖的C3H小鼠进行小鼠异位移植分析[Sampath和Reddi, 美国国家科学院院报, 80(1983)6591-6595; 国际申请号W095/16035]。将(a)单独的背部化因子、(b)单独的骨诱导因子和(c)两者的组合物放在适当缓冲液，例如TE缓冲液[Fang等, 美国国家科学院院报, 93(1996)5753-5758]中冷冻干燥。可以根据生物相容性、生物降解性、稳定性和机械特性选用任何合适的载体，例如胶原蛋白I型基质、胶原蛋白-肝素混合物、白明胶囊、透明质酸或其它功能相当的装置。

将移植物肌内装入小鼠后肢肌肉内7天和14天。7天和14天后，用颈脱位法处死小鼠。使用标准组织学技术(参见组织学技术理论和应



用, Bancroft和Stevens编辑, ChurchillLivingstone, 1996) 分离和处理移植物。石蜡(8 μ m)或乙二醇甲基丙烯酸酯切片(1 μ m)用甲苯胺蓝、爱尔新蓝、vonKossa、Movat或苏木精/伊红染色使每一移植物中诱导的腱、韧带、软骨或骨组织显现出来并进行数量测定。将阳性(例如BMP-2, GDF-5)和阴性(例如模拟装置)移植物对照组与实验移植物比较。为了评估诱导的软骨和/或骨的性质, 可以通过软骨和骨标记物的RNA原位杂交和如上所述的定量RT-PCR来研究基因表达。

参考文献目录

- d'Angelo和Pacific, J. Bone和Min. Res. , 12(1997) 1368 - 1377
- Fainsod等, 欧洲分子生物学组织, 13(1994) 5015 - 5025
- Fainsod等, 发育机制, 63(1997) 39 - 50
- Fang等, 美国国家科学院院报, 93(1996) 5753 - 5758
- Heath和Margari, 生物技术和生物工程, 50(1996) 430 - 437
- Hemmati - Brivanlou等, 细胞, 79(1994) 169 - 179
- Kinto等, 欧洲生物化学学会联合会快报, 404(1997) 319 - 323
- Lamb等, 科学, 262(1993) 713 - 718
- Nakamura等, 科学, 247(1990) 836 - 838
- Piccollo等, 细胞, 86(1996) 12141 - 12145
- Piccollo等, 细胞, 86(1996) 589-598
- Re'em - Kalma等, 美国国家科学院院报, 92(1995) 12141 - 12145
- Reddi, A. H., 细胞因子和生长因子评论, 8(1997) 11 - 20
- Ruiz i Altaba, 基础发育生物学, 实用方法, IRL Press, 1993, 第147 - 152页
- Sampath和Reddi, 美国国家科学院院报, 80(1983) 6591 - 6595
- Sasai等, 细胞, 79(1994) 779 - 790
- Sasai等, 自然, 376(1995) 333 - 336
- Steele和Copping, 哺乳动物胚胎后移植, 实用方法, IRL Press, 1990, 229 - 232



组织学技术理论和实践, Bancroft和Steven编辑, Churchill
Livingstone, 1996

美国专利号5, 486, 359

美国专利号5, 670, 481

美国专利号5, 679, 783

国际申请号W0 95/16035

Zimmermann等, 细胞, 86 (1996) 599 - 606