

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4566515号
(P4566515)

(45) 発行日 平成22年10月20日(2010.10.20)

(24) 登録日 平成22年8月13日(2010.8.13)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 38/43	(2006.01)	A 6 1 K	37/465
A 6 1 L 15/44	(2006.01)	A 6 1 L	15/03
A 6 1 K 38/48	(2006.01)	A 6 1 K	37/47
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/32
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 K	47/34

請求項の数 45 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-582995 (P2002-582995)
(86) (22) 出願日	平成14年4月25日(2002.4.25)
(65) 公表番号	特表2004-531534 (P2004-531534A)
(43) 公表日	平成16年10月14日(2004.10.14)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/004592
(87) 国際公開番号	W02002/085422
(87) 国際公開日	平成14年10月31日(2002.10.31)
審査請求日	平成17年3月3日(2005.3.3)
(31) 優先権主張番号	60/286,307
(32) 優先日	平成13年4月25日(2001.4.25)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	500466913
	アイトゲネシッシェ テヒニッシェ ホー
	ホシューレ チューリッヒ
	Eidgenoessische Tec
	hnische Hochschule
	Zuerich
	スイス国 チューリッヒ レーミシュトラ
	ーセ 101
	Raemistrasse 101, C
	H-8092 Zuerich, Swi
	tzerland

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷治癒を促進する薬物送達マトリックス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

互いに分離された少なくとも第一および第二の組成物を含んでなる創傷治癒系であって、上記第一または第二の組成物の少なくとも一方がシスチンノット増殖因子スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバーから選択される生物活性分子を含んでなり（ここで、該生物活性分子は、本来見られるものとしてその分子の一以上の部位でグリコシル化されているが、化学的または酵素的方法により、あるいはそれを非グリコシル化分子として製造することによって分子からグリコシル化が除去されている）、かつ、

上記第一および第二の組成物が該成分の重合が可能な条件下で混合した際に三次元ネットワークを形成する前駆体成分を含んでなり、該成分がフィブリンを形成できる、またはミカエル型付加反応を受けることができ、ここで、ミカエル型付加反応の場合、第一の組成物が n 個の求核基（ここで n は少なくとも 2 である）を有する少なくとも一種の前駆体成分を含んでなり、第二の組成物が m 個のコンジュゲート不飽和基（ここで m は少なくとも 2 であり、 $n + m$ は少なくとも 5 である）を有する少なくとも一種の前駆体成分を含んでなり、またフィブリンを形成する場合、第一の組成物がフィブリノーゲンを含み、かつ第二の組成物がトロロンピンを含んでなる、系。

【請求項 2】

第一または第二の組成物の少なくとも一方がカルシウム源をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の系。

【請求項 3】

10

20

第一の組成物がフィブリノーゲンおよびトロロンピンを含んでなり、第二の組成物がカルシウム源を含んでなる、請求項 1 に記載の系。

【請求項 4】

第一および第二の組成物の少なくとも一方が塩基をさらに含んでなる、請求項 3 に記載の系。

【請求項 5】

第一の組成物が n 個の求核基を有する少なくとも一種の成分および m 個のコンジュゲート不飽和基を有する少なくとも一種の成分を含んでなり（ここで、 m および n は少なくとも 2 であり、 $m + n$ は少なくとも 5 である）、第二の組成物が少なくとも一種の塩基を含んでなる、請求項 1 に記載の系。

10

【請求項 6】

求核基およびコンジュゲート不飽和基が塩基により触媒されるミカエル付加反応において互いに反応し得る、請求項 4 ~ 5 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 7】

求核基がチオールである、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 8】

コンジュゲート不飽和基がビニルスルホンおよびアクリレートからなる群から選択される、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 9】

求核基を含んでなる成分がポリエチレングリコール、酵素分解性ペプチドおよび酵素分解性タンパク質からなる群から選択される、請求項 4 ~ 8 のいずれか一項に記載の系。

20

【請求項 10】

コンジュゲート不飽和基を含んでなる成分が合成ポリマーから選択される、請求項 4 ~ 9 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 11】

合成ポリマーがポリエチレングリコールである、請求項 10 に記載の系。

【請求項 12】

生活性分子が TGF β スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバーである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 13】

生活性分子が骨形態形成タンパク質の脱グリコシル化メンバーである、請求項 12 に記載の系。

30

【請求項 14】

生活性分子が脱グリコシル化 rh-BMP2 である、請求項 13 に記載の系。

【請求項 15】

生活性分子が血小板由来増殖因子 (PDGF) である、請求項 12 に記載の系。

【請求項 16】

PDGF が PDGF-AB である、請求項 15 に記載の系。

【請求項 17】

上記成分が三次元マトリックスを形成する条件がヒトまたは動物の身体の生理条件である、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の系。

40

【請求項 18】

創傷治癒および組織再生のマトリックスとして用いられる三次元ネットワークの製造のための、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の系の使用。

【請求項 19】

創傷が骨の欠損である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 20】

創傷が皮膚の慢性創傷である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 21】

フィブリン、または、 n 個の求核基（ここで n は少なくとも 2）を有する少なくとも一

50

つの前駆体成分とm個のコンジュゲート不飽和基（ここでmは少なくとも2、n + mは少なくとも5）を有する少なくとも一つの前駆体成分のミカエル型付加反応によって形成される合成ポリマーを含む高分子マトリックス、および

高分子マトリックスに物理的に捕捉された生活性分子を含んでなり、生活性分子がシスチンノット増殖因子スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバーである（ここで、該生物活性分子は、本来見られるものとしてその分子の以上の部位でグリコシル化されているが、化学的または酵素的な方法により、あるいはそれを非グリコシル化分子として製造することによって分子からグリコシル化が除去されている）、創傷治癒用組成物。

【請求項 2 2】

生活性分子が T G F スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバーである、請求項 2 1 に記載の組成物。

10

【請求項 2 3】

生活性分子が脱グリコシル化骨形態形成タンパク質である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

生活性分子が脱グリコシル化 r h - B M P - 2 である、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

生活性分子が脱グリコシル化血小板由来増殖因子である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

上記分子が P D G F A B である、請求項 2 5 に記載の組成物。

20

【請求項 2 7】

マトリックスが合成ポリマーから形成される、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 8】

合成ポリマーがポリ（エチレンオキシド）（P E O）、ポリ（エチレングリコール）（P E G）、およびポリ（プロピレンオキシド）との共重合体（P E G - c o - P P G）、ポリ（ビニルアルコール）（P V A）、ポリ（ビニルピロリドン）（P V P）、ポリ（エチルオキサゾリン）（P E O X）、ポリアミノ酸、およびプソイドポリアミノ酸、ならびにこれらのポリマーの共重合体からなる群から選択される、請求項 2 7 に記載の組成物。

30

【請求項 2 9】

生活性分子をマトリックス内で沈殿させることにより物理的に捕捉する、請求項 2 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の系の第一および第二の組成物を体外または i n v i t r o で混合することを含んでなる、創傷治癒を改善するマトリックスを形成する方法。

【請求項 3 1】

マトリックスの形成中に生活性分子を沈殿させる、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

マトリックスの形成前に生活性分子を沈殿させる、請求項 3 0 記載の方法。

40

【請求項 3 3】

シスチンノット増殖因子スーパーファミリーのグリコシル化メンバーの、フィブリンおよびポリエチレングリコールからなる群から選択されるマトリックス中での溶解度を低下させる方法であって、増殖因子を脱グリコシル化型へと変換するステップを含んでなる、方法。

【請求項 3 4】

増殖因子が骨形態形成タンパク質および血小板由来増殖因子（P D G F）からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

50

増殖因子が r h B M P - 2 である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

増殖因子が P D G F A B である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

創傷治癒を改善する組成物を形成する方法であって、

生活性分子を高分子マトリックス内で沈殿させることを含んでなり、

生活性分子がシスチンノット増殖因子スーパーファミリーの非グリコシル化メンバーであり（ここで、該生物活性分子は、本来見られるものとしてその分子の一以上の部位でグリコシル化されているが、化学的または酵素的方法により、あるいはそれを非グリコシル化分子として製造することによって分子からグリコシル化が除去されている）、該高分子マトリックスがフィブリン、または、n 個の求核基（ここで n は少なくとも 2）を有する少なくとも一つの前駆体成分と m 個のコンジュゲート不飽和基（ここで m は少なくとも 2、n + m は少なくとも 5）を有する少なくとも一つの前駆体成分のミカエル型付加反応によって形成される合成ポリマーを含む、方法。

10

【請求項 3 8】

生活性分子が T G F スーパーファミリーの非グリコシル化メンバーである、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

生活性分子が骨形態形成タンパク質の非グリコシル化メンバーである、請求項 3 8 に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

骨形態形成タンパク質の非グリコシル化メンバーが r h - B M P - 2 である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

合成ポリマーがポリ（エチレンオキシド）（P E O）、ポリ（エチレングリコール）（P E G）および、ポリ（プロピレンオキシド）との共重合体（P E G - c o - P P G）、ポリ（ビニルアルコール）（P V A）、ポリ（ビニルピロリドン）（P V P）、ポリ（エチルオキサゾリン）（P E O X）、ポリアミノ酸、およびプソイドポリアミノ酸、ならびにこれらのポリマーの共重合体からなる群から選択される、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の系を含む装置。

【請求項 4 3】

装置がツーコンパートメントシリンジであり、第一のコンパートメントが第一の組成物を含み、第二のコンパートメントが第二の組成物を含み、これらの 2 つのコンパートメントが双方向コネクタで接続されている、請求項 4 2 に記載の装置。

【請求項 4 4】

2 つのコンパートメントが二部型であり、コンパートメント壁に対して垂直の調整パーティションによって仕切られる、請求項 4 3 に記載の装置。

【請求項 4 5】

創傷治癒用薬剤の製造のための、請求項 2 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0 0 0 1】

本発明は一般に薬物送達分野、より詳しくは創傷治癒を促進するフィブリンおよび合成マトリックスの領域にある。

【0 0 0 2】

フィブリンマトリックスは体内に本来存在し、創傷治癒の初期マトリックスとして働く。組織に損傷が生じると、血管が障害を受けて前駆分子フィブリノーゲンが創傷に押し寄

50

せる。このフィブリノーゲンが次に酵素切断され、自己触媒作用を受けてルーズなゲルを形成する。このゲルは次にトランスグルタミナーゼXIIIa因子の作用によって共有結合により架橋されて安定なマトリックスが生じる(Pisano, Finlayson and Peyton, Science, 160,892-893 (1968))。

【 0 0 0 3 】

in vivoにおいて最終的なフィブリンマトリックスはフィブリノーゲンの他、凝固プロセス中に存在する血清タンパク質、例えばフィブロネクチンおよび 2 - プラスミン阻害物質などの種々のタンパク質を含む。XIIIa因子はこれらのタンパク質をフィブリンマトリックスに共有結合により架橋することができ、次にこれはマトリックスに細胞のマトリックス浸透能および崩壊能を改変し得るさらなる生活性を付加し得る(Tamaki and Aoki, J Biol Chem, 257,14767-14772 (1982))。これらのマトリックスはまた、凝固中にマトリックス内部に捕捉された多数の血球も含み、これによりマトリックスの生化学的特徴がさらに改変される。一つの主要な細胞種が潜在的治療増殖因子の天然の供給源に富む細胞、血小板である。

【 0 0 0 4 】

フィブリンの一つの重要な利点は細胞を積極的に誘導してそれらを損傷部位に容易に浸潤させるマトリックスであることである。用いられるプロセスには二つの重要な特徴が含まれる。第一に、このマトリックスは接着部位を含み、これにより細胞をゲルに取り付け、ゲル中へ移動させる。さらにこのマトリックスは細胞由来のタンパク質分解活性の一端も担う。これによりマトリックスを局部的に崩壊させ、阻害されることなく、また、マトリックス全体を崩壊させずに細胞をマトリックス内に移動させる(Herbert, Bittner and Hubbell, J Compar Neuro, 365,380-391 (1996); Pittman and Buettner, Dev Neuro, 11,361-375 (1989))。従って天然マトリックスは、細胞が浸潤するまで損傷部位に留まり、その際にこのプロセス中で分解され再生組織をもたらす。

【 0 0 0 5 】

自然治癒のプロセスは、この一般的治癒応答が機能分化した組織の再生をもたらすことができない時など、不十分な場合がある。例えば、Robello GT and Aron DN, Semin Vet Med Surg (Small Anim), 7,98-104 (1992)参照。従って完全な機能再生組織、特に再生分化組織の形成をもたらす手段が必要となる。

【 0 0 0 6 】

組織再生に影響を及ぼし得る増殖因子、ペプチドおよびその他多様な分子を含む多くの生活性分子が見出されている(Schense and Hubbell, Bioconj Chem, 10,75-81 (1999))。これまでの研究では増殖因子はフィブリンマトリックス内に沈殿し得ることが示されている(MacPhee, Druhan et al., 76 (1995); MacFee, et alに対する米国特許第 6, 1 1 7, 4 2 5 号および同第 6, 1 9 7, 3 2 5 号)。しかしこれらの研究者らは非グリコシル化増殖因子、特にシステインノット増殖因子スーパーファミリーの非グリコシル化メンバー、特に TGF スーパーファミリーのものを用いて研究することの大きな利点を認識していない。

【 0 0 0 7 】

増殖因子は創傷治癒に重要な役割を果たし、しばしば損傷部位に自然に存在する。しかし、増殖因子を高濃度で身体に適用すると副作用が見られる可能性がある。例えばマトリックスにおける BMP の保持機構が最適化されなければ、すなわち BMP が最初の数時間のうちにマトリックスから単純拡散すれば、損傷部位で局部応答を生じさせるにはマトリックス中に高用量の BMP が必要となる。結果として大部分の BMP は体内を自由に循環し、異所骨形成が起こり得る。従って自由に循環する増殖因子の濃度をできる限り低く、そして局部的には損傷部位で所望の治療応答が誘導されるに十分高く維持する必要がある。例えばいくつかの増殖因子受容体は最大生物作用をもたらすのに少なくとも 1 2 時間かかることが知られている。従って、治癒応答のためには必要な部位近傍での少量でも一定した増殖因子流によってもたらされる長期接触が極めて好ましい。同じ一定放出速度では、マトリックス中に保持される増殖因子の初期濃度が高いほどマトリックスからの放出が

10

20

30

40

50

長くなる。

【0008】

よって本発明の目的はマトリックス中の生活性分子、特に増殖因子の保持濃度を高めることにある。

【0009】

さらなる目的はフィブリンからなる、または合成ポリマーからなるマトリックス中での増殖因子の溶解度を低下させる方法を提供することにある。

【0010】

特にこれは脱グリコシル化生活性分子、特にシスチンノット増殖因子 (cystine knot growth factor) スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバー、特に TGF スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバーによって解決される。

10

【0011】

本発明のなおさらなる目的は特に送達により創傷治癒を改善する組成物およびその製造方法を提供することにある。

【0012】

これらの目的は独立の特許請求の範囲に示される特徴によって解決される。

【0013】

特にそれらはシスチンノット増殖因子スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバー、特に TGF スーパーファミリーの非グリコシル化メンバーの送達によって解決される。

【発明の概要】

20

【0014】

生活性分子を治療的治癒用途のこれらの化合物の制御送達のためのマトリックス内に捕捉する。このマトリックスは天然または合成化合物から形成され得る。生活性分子の主要な捕捉方法は *in vitro* または *in vivo* いずれかでマトリックスの固化中に生活性分子を沈殿させることによる。生活性分子は、シスチンノット増殖因子スーパーファミリー、特に TGF スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバーなどのより、マトリックス中での有効溶解度を低下させマトリックス内により効果的に保持されるように改変してもよい。このマトリックスは、例えばヘパリン結合など、種々の生活性分子に対して結合親和性を有する部位を含むように改変することもできる。これらの種々の生活性分子をマトリックスに添加すると、それら生活性分子がマトリックス内に沈殿するとともにマトリックス内の部位に結合してマトリックスと結びつき、これにより患者への制御送達の向上がもたらされる。

30

【発明の具体的説明】

【0015】

I. 組成物

組成物は天然または合成マトリックスおよび創傷治癒を改善するために患者に投与し得る生活性分子、特に増殖因子から形成される。組成物はまた、その中に生活性分子が捕捉されるマトリックスの前駆材料とも考えられ、すなわち、それらは生活性分子が捕捉されたマトリックスを形成するのに必要または適切な少なくとも一つの成分を含み得る。この生活性化合物は制御された様式でマトリックスから放出される。生活性化合物はシスチンノット増殖因子スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバー、特に TGF スーパーファミリーの非グリコシル化メンバーである。

40

【0016】

本発明において、生活性因子は所定の pH および温度で生活性因子の濃度が個々のビヒクルに可溶性濃度限界を超えた場合に沈殿する。この定義が相応のものであれば、沈殿形成は生活性分子とマトリックスの何らかの物理的相互作用、すなわち吸着、静電気力、アフィニティー沈殿、共沈殿などによる保持も含み得る。捕捉、包摂および沈殿形成とは保持を達成する方法として本願を通じ同義語として用いられる。

【0017】

「マトリックス」とは細胞の内植のため、また、ある期間にわたっての生活性分子の骨

50

格として働き得る三次元ネットワークを意味する。

【0018】

「脱グリコシル化生活性分子」とは、本来見られるものとしてはその分子の一以上の部位でグリコシル化されているが、化学的または酵素的な方法により、あるいはそれを非グリコシル化分子として製造することによって分子からグリコシル化が除去されている生活性分子を意味する。「脱グリコシル化増殖因子」とは、真核細胞で発現される際にはグリコシル化可能であるが、その多糖配列またはグリコサミノグリカンが後に切除されているか、あるいは発現方法がその増殖因子がグリコシル化されないようなものである増殖因子である。後者は例えば増殖因子を原核細胞で発現させた場合に起こる。「脱グリコシル化」「非グリコシル化」および「グリコシル化されない」は本願を通じて同義語として用いられる。

10

【0019】

「保持」とは、生活性分子の初期適用濃度の少なくとも10%、好ましくは少なくとも60%、よりいっそう好ましくは少なくとも80%が10洗浄量後もマトリックス中になお存在していることを意味する。10洗浄量とは、37℃にて少なくとも12時間、リン酸緩衝生理食塩水(PBS 0.01M; pH 7.4)10部に対してマトリックス1部という容量比で生活性分子が捕捉されるマトリックスを維持するものと定義される。保持は例えば生活性分子を沈殿させることで達成することができる。「保持可能な濃度」とは、以上に示された定義に従って保持される初期濃度のパーセンテージを意味する。

【0020】

20

「制御された様式で放出」または「制御放出」および「長期放出」は同義であり、保持の結果を表す。制御放出は増殖因子の緩慢で安定した崩壊およびその後のマトリックスからの拡散によるだけでなく、マトリックスの崩壊および酵素的切断によるものでもある。

【0021】

「固化(gelation)」とは三次元ネットワークの形成、従って液体組成物から粘稠な組成物への遷移を意味する。「ゲル」および「マトリックス」は本願を通じ同義語として用いられる。ゲルまたはマトリックスのin situ形成は体内の適用部位における液体から固体状への遷移であると理解される。「ヒドロゲル」は水性媒体中で著しく膨潤するが、水には溶解しない高分子材料種を意味する。

【0022】

30

「ミカエル付加またはミカエル型付加反応」とは塩基性条件下でのコンジュゲート不飽和系への求核分子の1,4付加反応である。付加機構は単に極性的なものであるか、またはラジカル様中間体状態を経て進行し、ルイス塩基または適宜デザインした水素結合種が触媒として働き得る。コンジュゲーションとは炭素-炭素、炭素-ヘテロ原子またはヘテロ原子-ヘテロ原子多重結合を一重結合に変更すること、また合成ポリマーまたはタンパク質などの高分子に官能基を結合させることの双方をさし得る。CHまたはCH₂ユニットによって隔てられた二重結合はホモコンジュゲート二重結合と呼ばれる。コンジュゲート不飽和基に対するミカエル型付加は生理学的温度、特に体温で、またそれより低い温度でも高い温度でも実質的に定量的収量で起こり得る。それらは穏和な条件でアミン類およびチオール類のような多様な求核分子を用いて起こる。本発明で用いる反応は好ましくは自己選択型のものであり、これは反応の第一の前駆体成分がその反応部位にある混合物中に存在する他の化合物よりも反応の第二の前駆体成分とはるかに速く反応し、その第二の前駆体成分がその反応部位にある混合物中に存在する他の化合物よりも第一の前駆体成分とはるかに速く反応することを意味する。本明細書で用いる求核分子は他の生体化合物よりも優先的にコンジュゲート不飽和物と結合し、コンジュゲート不飽和基は他の生体化合物よりも優先的に求核分子と結合する。

40

【0023】

「高分子ネットワーク(polymeric network)」とは、実質的に総てのモノマー、オリゴマーまたはポリマーがそれらの利用可能な官能基を介して分子間共有結合によって結合して一つの巨大な分子となるプロセスの産物を意味する。

50

【 0 0 2 4 】

「in situ形成」とは、注入前および注入時には実質的に架橋していない前駆体成分の混合物が体内の注入部位において生理学的温度で互いに共有結合を形成する能力をさす。

【 0 0 2 5 】

本明細書において「重合」および「架橋」とは、複数の前駆体成分分子が結合して実質的に分子量の増大をもたらすことを示す。「架橋」とはさらに、典型的にはポリマーネットワークをもたらす分枝も示す。

【 0 0 2 6 】

「官能基化する」とは、官能基または部分の結合が起こるような修飾を意味する。例えばその分子を強い求核分子またはコンジュゲート不飽和物とする分子を導入することで分子を官能基化してもよい。例えばPEGなどの分子を官能基化してチオール、アミン、アクリレートまたはキノンとすることが好ましい。

10

【 0 0 2 7 】

「官能価」とは、分子上の反応性部位の数を意味する。本明細書において強い求核分子およびコンジュゲート不飽和物の官能価は各々少なくとも2である。例えば各々官能価が2である強い求核分子とコンジュゲート不飽和物などの二成分を混合すると直鎖高分子生体材料が得られ、各々官能価が少なくとも2であり、一方の成分の官能価が2を超える二成分を混合すると架橋型の生体材料が得られる。

【 0 0 2 8 】

本明細書において「再生」とは、組織の一部または全部が元通りに増殖することを意味する。例えば本発明は外傷、腫瘍摘出、または脊椎固定術後の骨の再生方法、あるいは糖尿病性脚部潰瘍、圧痛および静脈不全の治癒の助けとなる皮膚の再生方法を特徴とする。再生し得る他の組織としては、限定されるものではないが、皮膚、骨、神経、血管および軟骨組織が挙げられる。

20

【 0 0 2 9 】

本明細書において「ペプチド」および「タンパク質」は当技術分野で通例の鎖の長さの定義に従ってそれらの鎖の長さによって区別される。好ましくは「ペプチド」は30アミノ酸まで、最も好ましくは約10~20アミノ酸のポリアミノ酸を意味し、一方タンパク質は好ましくは30を超えるアミノ酸のポリアミノ酸である。

A. マトリックス

30

【 0 0 3 0 】

マトリックスは生分解性または非分解性であってよい。マトリックスは合成または天然ポリマー、オリゴマーおよびモノマーからなるものであってよい。ポリマー、オリゴマーおよびモノマーとはこの用語の通常の意味で用いる。合成ポリマー、オリゴマーおよびモノマーとしては、ポリ(エチレンオキシド)(PEO)、ポリ(エチレングリコール)(PEG)およびポリ(プロピレンオキシド)との共重合体(PEG-co-PPG)、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリ(エチルオキサゾリン)(PEOX)、ポリアミノ酸、およびプソイドポリアミノ酸、ならびにこれらのポリマーの共重合体など、ポリアルキレンオキシド前駆体分子に由来するものが挙げられる(Sawhney AS, Pathak CP and Hubbell JA, Macromolecules, 26,581-587 (1993)). 共重合体はまた、そのコンジュゲートが水溶性である限り、他の水溶性ポリマーまたは水に不溶なポリマーを用いて形成してもよい。水溶性コンジュゲートの例としてはPI uronic (商標) 界面活性剤(BASF)として市販されているポリエチレングリコールとポリプロピレンオキシドのブロック共重合体がある。

40

【 0 0 3 1 】

天然ポリマー、オリゴマーおよびモノマーとしては、天然源から製造されたものであれ組換え源から製造されたものであれ、フィブリノーゲン、フィブリン、ゼラチン、コラーゲン、エラスチン、ゼインおよびアルブミンなどのタンパク質、ならびにアガロース、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デキストラン、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸、キトサン、ゲランガム、キサンタンガム、グアー

50

ガム、水溶性セルロース誘導体、およびカラギーナンなどの多糖類が挙げられる。これらのポリマーは単に使用できるマトリックス種の例であり、捕捉が可能なマトリックスを総てを挙げるものではない。

フィブリンマトリックス

【0032】

治癒および細胞浸潤誘導能におけるその本来の役割により、フィブリンはマトリックスを製造する好ましい選択肢となる。好ましい具体例では、マトリックスはフィブリンゲルであり、いずれのフィブリノーゲン源から作られたものでもよい。適量のトロンビン、カルシウムおよび生活性分子と混合すると、フィブリンゲルはヒトおよび動物で見出せるような条件を意味する生理条件で作製できる。しかしフィブリンゲルの形成はまた体外でもトロンビンおよびカルシウムの存在下、主として温度およびpHに依存して起こり得る。フィブリンゲルは体外で25 ~ 40 の範囲の温度、7 ~ 8の範囲のpHで形成され得る。これらの条件で生活性分子が不溶であれば、重合中に沈殿し、マトリックス内に捕捉されるようになる。

10

【0033】

さらなる特性としてフィブリンの多くの形態がマトリックスとしての使用に利用できる。フィブリンゲルは自己血漿、低温沈殿血漿（例えば市販されているフィブリン接着剤キット）、血漿から精製されたフィブリノーゲン、組換えフィブリノーゲンおよびXIIIa因子から合成することができる。これらの各材料は生化学的組成に若干の違いがあるものの基本的には同じマトリックスを提供する(Sierra DH, J Biomater Appl, 7,309-352 (1993))。これらの材料の類似性は特異的酵素の生活性および全般的な治癒応答の双方にある。

20

合成マトリックス

【0034】

組織再生および創傷治癒において合成マトリックスは公知のものである。これらにはポリ乳酸およびその共重合体などの分解性ポリマーの多孔質スポンジならびにPEGなどの水溶性ポリマーに基づくヒドロゲルマトリックスが含まれる。ある好ましい配合物では、PEGは酵素分解性マトリックスを得るための塩基前駆体材料として用いられる。PEGはアクリレート類、ビニルスルホン類およびアクリルアミド類をはじめ、ミカエル型付加反応のためのコンジュゲート不飽和結合の形態にあるアクセプター基などの化学反応基で官能基化する。PEGは平均分子量15 ~ 25000 kDの4アームPEGであるのが好ましい。これらの前駆体（溶液）を、2以上の還元型システイン残基（求核性チオール基）を含み、これらのシステイン部位間にプロテアーゼ基質が介在している第二の前駆体成分としてのペプチド（溶液）と混合する。塩基性条件下では、多重アクセプターの官能価（分子当たりのミカエルアクセプター基の数（m））と多重チオールの官能価（分子当たりのチオール基の数（n））の合計が5より大きければ、多重チオール成分（官能基化されたペプチド）と多重アクセプター成分（官能基化されたPEG）の間のミカエル型付加反応によりゲルが速やかに生じる。チオールとアクセプター基の間のミカエル付加は多様な温度でpH6.5から強塩基性条件まで働く。しかしこの前駆体成分をマトリックスのin situ形成を目的に体内に注入すると、pHは身体に適当なものでなければならないことから、好ましい具体例ではpHは7 ~ 8の間である。ゲルを体外で形成する場合には好ましい温度範囲は25 ~ 40の間である。体内ではゲルは体温で形成される。ペプチドをプラスミンまたはマトリックスメタロプロテイナーゼの基質となるように設計する場合、得られる合成ゲルは細胞の酵素マトリックス再構築作用に反応して崩壊する。多重チオール、すなわち求核性前駆体成分は必ずしもペプチドでなくともよい。例えばマトリックスが酵素分解性でなくともよいとすると、求核性前駆体成分、すなわち多重チオールも同様にPEGであってもよい。このゲルは、マトリックス中での細胞の内植および接着を助けるため、マトリックスに共有結合された例えばRGD配列のような細胞接着部位をさらに含んでもよい。この細胞接着部位もミカエル付加反応によってマトリックスへ結合させることができる。そのためRGDはコンジュゲート不飽和結合との反応のためにフリーなチオール/システイン基を含むように修飾する。

30

40

50

B . 生活性分子

【 0 0 3 5 】

これらマトリックスは受傷組織の再生を促進するため、開発から得られたものである場合が多いが、生活性分子を含めることでさらに修飾することができる(Pandit et al., J Biomater Appl, 14,229-42 (2000); Hildebrand et. al., Am J Sports Med, 26,549-54 (1998); Quirinia A, Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 32,9-18 (1998))。

【 0 0 3 6 】

捕捉される分子種は、増殖因子、ペプチド、酵素、プロテアーゼ阻害剤、抗生物質、合成ホモログおよびその他の多彩な分子をはじめ、可能性のある生活性分子の膨大なリストからのものであり得る。好ましい生活性分子は生理学的 pH で低い溶解度を有する。

10

増殖因子

【 0 0 3 7 】

増殖因子は、創傷治癒に重要な役割を果たすことが示されている十分特徴付けられた化学物質を提供することから特に有用であり、損傷部位に本来存在する場合が多い。さらに増殖因子は、多くの異なる細胞種を活性化させ、複雑な治癒応答を誘導する多能性分子である。

【 0 0 3 8 】

シスチンノット増殖因子スーパーファミリーメンバーの結晶構造は分子内ジスルフィド橋を含む特異な折りたたみを有するとして報告されている。増殖因子- 2、血小板由来増殖因子(P D G F)、神経増殖因子(N G F)およびヒト絨毛性ゴナドトロピン(h C G)を転換する際、6つの保存されたシステイン(配列順にI~IV)がノット様トポロジーに配置された3つのジスルフィド結合を形成する。システイン[II~V]および[III~VI]は残りのジスルフィド結合(C y s [I~IV])が貫通する8アミノ酸の環を形成する。このトポロジーはC y s [III-IV]がC Y S [I-IV]とC y s [II-V]により形成される大環を貫通しているシスチンノット様の阻害剤の構造種とは異なる。このようにシスチンノットは、増殖因子型と阻害剤様のシスチンノットの二つの構造種に分類される。シスチンノット増殖因子スーパーファミリーのメンバーとしては血小板由来増殖因子(P D G F)スーパーファミリー、形質転換増殖因子(T G F)スーパーファミリーおよび糖タンパク質ファミリーがある。個々の増殖因子の例としてはB M P、P D G F、T G Fがある。真核細胞によって発現された場合、総ての増殖因子がグリコシル化されるとは限らず、例えばT G F 1、2および3は用いる発現系に関わらずグリコシル化されない。

20

30

【 0 0 3 9 】

T G F スーパーファミリーの中で骨の再生に用いられる最も一般的な分子は骨形態形成タンパク質(B M P)ファミリーに由来するものである。初期にはB M Pは骨から精製された増殖因子のカクテルとして用いられていた(Urist et al., Proc Natl Acad Sci U. S.A., 76,1828-32 (1979))。これらの混合物をフィブリンマトリックスに捕捉し、それらの治療効果を測定した。これによりB M Pと混合したフィブリンの治療能の興味深い予見を得られた。しかし、マトリックス中に存在する種々の増殖因子の各々の作用は調べられなかった。

40

【 0 0 4 0 】

B M P - 2およびB M P - 7(O P - 1)はともにヘパリン結合親和性を有し、低pHで溶解し、骨治癒の強力なインデューサーである(Wozney JM, Prog Growth Factor Res, 1, 267-80 (1989); Wozney et al., J Cell Sci Suppl, 13,149-56 (1990))。r h - B M P - 2は最大の治療能を示し、異所で骨形成を誘導さえできる(Jin et. al., J Biomed Mat Res, 52,841 (2000))。生理条件でのr h - B M P - 2の溶解度は低いので、それはマトリックス内で沈殿することができる。よって、この分子は送達に必要な特性を満たす。

【 0 0 4 1 】

この増殖因子の沈殿、従ってその長期放出はグリコシル化されないことからフィブリンまたは合成マトリックス中で溶解度が低い組換え型のr h - B M P - 2を用いることで

50

らに改良された。また、グリコシル化型で発現する場合はそれを化学的または酵素的に脱グリコシル化することでこの増殖因子の沈殿形成を向上させることができる。BMPファミリーメンバー間の構造的相同性は高いので、rh-BMP-2で得られた結果はBMP-7(OP-1)をはじめとするその他のBMPでも得られると予測できる。

TGF スーパーファミリー

【0042】

BMPはそれら自体、形質転換増殖因子(TGF)スーパーファミリーのメンバーであり、TGFスーパーファミリーのメンバー間の構造的相同性も高い。BMP-2で得られた結果はそれ自体、TGFスーパーファミリーのその他のメンバーおよびシステンノット増殖因子スーパーファミリーのメンバーでも得られると予測できる。TGFスーパーファミリーのメンバーである増殖因子の沈殿形成およびそれらの長期放出はグリコシル化されないことから溶解度が低い組換え型を用いることでさらに改良される。

10

脱グリコシル化BMP

【0043】

BMPおよびその他の増殖因子の脱グリコシル型はいくつかの技術を用いて得られる。いくつかの脱グリコシル化法は化学および生物学双方の一般的実践で利用できる。ある化学法はフッ化水素を用いて行う。要するに、グリコシル化タンパク質をポリフッ化水素、ピリジンおよびスカベンジャーと混合する。これによりタンパク質自体の修飾なく、実質的に完全な脱グリコシル化がもたらされる。生物学的方法では酵素を用いてタンパク質からグリコサミノグリカンを切断するか、細菌で発現させることが中心となる。タンパク質の脱グリコシル化に使用できる二例がN-グリカナーゼ(Lin, Zhang et al. J Neurochem, 63,758-768 (1994))またはグリコペプチダーゼF(Chen and Gonatas Biochem Biophys Res Commun, 234,68-72 (1997))である。これらの例は単に真核生物ソース(すなわち、グリコシル化型)から脱グリコシル化タンパク質を作り出すために使用できる生物学および化学的方法を例示するものであって、可能な総ての方法を完全に網羅するものではない。これらの標準的な技術を用い、非グリコシル化rh-BMP-2の溶解度を模すようにグリコシル化rh-BMP-2の溶解度を作り出すことができる。さらにタンパク質の溶解度を低下させるための賦形剤、例えばタンパク質の正味の電荷を小さくすべく反対の電荷のポリマーを用いることができる。

20

II. マトリックス内に生活性分子を組み込む方法

30

【0044】

生活性因子を送達する二つの主要な方法として生化学的方法と物理的方法がある。生化学的方法では目的の生活性因子に対して化学的親和性を有するマトリックスを作製する。このマトリックスを生活性分子と混合すると、その分子の放出を遅延または排除できる。物理的方法はマトリックス内に生活性分子を保持するのに使用でき、沈殿、共沈殿、アフィニティー沈殿、および物理的捕捉が含まれる。例えばある具体例では、保持を向上させるため生活性分子をフィブリンマトリックス内で沈殿させる。沈殿分子を含むこのマトリックスは創傷治癒に関して大いに可能性を有する。

A. 沈殿形成およびマトリックスの化学修飾

【0045】

40

沈殿形成は創傷治癒を改善する生体材料を作り出すため他の保持方法と組み合わせることができる。一例として生活性分子に対する結合親和性を有する部位を含む修飾生体材料の使用がある。生活性分子をマトリックスに結合させると、マトリックス内の生活性分子の保持が高まる。例えばマトリックスをヘパリン親和性を有する結合部位を含むように修飾することができ、マトリックスと結合させるべくヘパリンを添加することができる。そして生活性分子がヘパリン結合親和性を有すれば、その生活性分子はヘパリンと結合するのでマトリックスに保持される。この方法はより緩慢な放出動態を目的に沈殿の使用と組み合わせ実施することができる。

【0046】

ある具体例では、修飾フィブリンマトリックスに結合されているヘパリンと結合させる

50

ことでrh-BMP-2の保持を増強する。このように脱グリコシル化rh-BMP-2は、その溶解性の低さのためにマトリックス内で沈殿し、そのヘパリン結合親和性のためにヘパリンと結合するのでマトリックス内に保持される。

III. 創傷治癒を促進するマトリックスの使用法

A. 組成物を必要とする患者のタイプ

【0047】

これらのマトリックスは広範囲の患者に骨欠損の治癒を目的とする治療法を提供する。ある具体例では修飾フィブリンまたは合成マトリックスを骨移植片の代わりに用い、よって、同適応の多くで適用できる。これらの適応としては、限定されるものではないが、脊椎固定ケージ、癒着不能欠損の治療、骨の増強、および歯の再生が挙げられる。さらに別の具体例では、これらのマトリックスはインプラントの組み込みに使用できる。インプラントの組み込みでは、インプラントを天然または合成いずれかの修飾マトリックスで被覆し、近傍の骨領域のインプラント表面での増殖を誘導し、弛緩その他の付随する問題を避けることができる。これらの例は単に例示であって、本明細書に記載のマトリックスが使用できる可能性のある適応の数を限定するものではない。別の具体例では、増殖因子富化マトリックスを皮膚の慢性創傷に使用できる。

10

B. 投与方法

【0048】

ある具体例では、材料をプレフォームマトリックスとして創傷領域に塗布する。第二の具体例では材料を体内においてin situ固化させる。これらの両具体例では、マトリックス材料は合成前駆体成分からでも、あるいは天然前駆体成分からでも作製できる。用いる前駆体成分の種類に関わらず、身体への混合物の適用前に成分を重合させる条件下で前駆体成分を合する、または互いに接触させることを避けるべきであることは言うまでもない。総合的な意味で、これは例えば互いに分離された少なくとも第一および第二の成分を含んでなる系によって達成され、ここで第一および第二の成分はそれら成分を重合させる条件下で混合すると三次元ネットワークを形成する成分を含んでなる。さらにこの系は少なくとも一つの組成物中に、シスチンノット増殖因子スーパーファミリーの脱グリコシル化メンバーから選択される生活性分子を含んでなる。前駆体成分およびそれらの濃度にもよるが固化は混合後ほぼ即時に起こるので、注射はほとんど不可能である(すなわち、注射針を通る固化材料がつぶれてしまう)。

20

30

【0049】

ある具体例では、マトリックスはフィブリノーゲンから形成される。フィブリノーゲンは適当な温度およびpHでトロンビンおよびカルシウム源と接触すると、種々の反応カスケードによって固化してマトリックスとなる。保存のためにはこの三つの成分を接触させないことが必要である。これら三つの部分のうち少なくとも一つが分離されている限り、三成分の他のどんな組合せも可能である。第一の具体例では、フィブリノーゲンは生理学的pH(pH6.5~8.0、好ましくはpH7.0~7.5の範囲)のバッファー液に溶解し(溶解度を高めるためにアプロチニンをさらに含んでもよい)、塩化カルシウムバッファー(40~50mMの濃度範囲)中のトロンビン溶液から分離して保存する。フィブリノーゲン用のバッファー液は好ましくは150mMの濃度のNaClまたはTRIS緩衝生理食塩水(好ましくは33mMの濃度)をさらに含んでなる、好ましくは50mMの濃度のヒスチジンバッファー液であってよい。生活性分子はフィブリノーゲン溶液またはトロンビン溶液のいずれかに存在すればよい。好ましい具体例では、フィブリノーゲン溶液が生活性分子を含有する。フィブリノーゲンおよびトロンビン溶液は保存安定性を高めるためにさらに凍結保存することができる。使用前にフィブリノーゲン部分とトロンビン部分を(必要があれば)解凍して混合する。別の系では、フィブリノーゲンとトロンビンをカルシウム源から分離して保存することができる。なお別の具体例では、トロンビンから分離したカルシウム源とともにフィブリノーゲンを保存することができる。

40

【0050】

もう一つの好ましい具体例では、フィブリノーゲンとトロンビンの両者を凍結乾燥形態

50

で分離保存する。この両者のいずれかが生活性分子を含み得る。使用前にトリスまたはヒスチジンバッファーをフィブリノーゲンに加えるが、このバッファーはさらにアプロチニンを含んでもよい。この凍結乾燥トロンピンを塩化カルシウム溶液に溶解する。次にフィブリノーゲンおよびトロンピン溶液を、ここでも好ましくは側面の一方にニードルを取り付けた双方向接続装置によってこれら溶液を含むコンテナ/バイアル/シリンジボディーを結びつける手段により混合する。バイアルがこのようにシリンジボディー壁に対して垂直の調整パーティションによって分離された二つのチャンバーを有する二部型のものであれば極めて便宜である。これらチャンバーの一方には凍結乾燥フィブリノーゲンを含み、他方のチャンバーには適当なバッファー液を含むことができる。シリンジボディーの一端に圧力をかければ、パーティションが移動してシリンジ壁の膨らみが解放し、バッファーがフィブリノーゲンチャンバー内に浮き上がり、フィブリノーゲンが溶解ようになる。同様にトロンピンの保存および溶解を目的とした二部型シリンジボディーも用いられる。フィブリノーゲンおよびトロンピンの双方を溶解する場合には、二部型シリンジボディーの両者を双方向接続装置に取り付け、その接続装置に取り付けた注入ニードルを通じてそれらを押しつぶすことにより内容物を混合する。この接続装置は内容物の混合を改善する静置ミキサーをさらに含んでなってもよい。

10

【0051】

好ましい具体例では、混合前にフィブリノーゲンを8倍希釈し、トロンピンを20倍希釈する。この比率では固化時間はおよそ1分となる。

【0052】

もう一つの好ましい具体例では、ミカエル付加反応を受け得る合成前駆体成分からマトリックスを形成させる。求核性前駆体成分(多重チオール)は塩基性pHで多重アクセプター成分(コンジュゲート不飽和基)とのみ反応し、混合前に分離されている三成分は塩基、求核成分および多重アクセプター成分である。この多重アクセプター成分および多重チオール成分はいずれもバッファー溶液として保存する。これらの成分はいずれも細胞接着部位、さらに生活性分子を含み得る。このようにこの系の第一の組成物は例えば求核成分の溶液を含んでなり、系の第二の組成物は多重アクセプター成分の溶液を含んでなり得る。この二つの組成物のいずれが塩基を含んでもよいし、あるいは塩基はこの両組成物の双方に存在してもよい。もう一つの具体例では、多重アクセプターおよび多重チオールは第一の組成物中に溶液として含まれていてよく、第二の組成物が塩基を含んでもよい。接続および混合はフィブリノーゲンに関して既に記載したものと同様にして行う。さらに二部型シリンジボディーも同様に合成前駆体成分に適している。フィブリノーゲンおよびトロンピンの代わりに多重アクセプターおよび多重チオール成分を一方のチャンバーに微粉状で保存し、他方のチャンバーに塩基性バッファーを含む。

20

30

C. 用量**【0053】**

これらのマトリックスは典型的には用量0.01~5mg/mLの生活性分子を含有する。この用量範囲は他の臨床試験に用いる活性タンパク質のレベルに準じたものである。しかし、これらのマトリックスが提供する送達の向上によりさらに低用量も使用できる。例えば非グリコシル化rh-BMP-2をラットの癒着不能頭蓋欠損の治癒に用いたところ、1~10μg/mLといった極めて低用量が効果的であった。それ自体、沈殿した増殖因子、特に非グリコシル化型などの有利な形態を用いた場合、用量の著しい軽減が可能である。従って同じ結果を得るのにより少ないタンパク質しか必要とされない。

40

【0054】

生活性分子の送達は投与して数週間内に起こる。2~4週間内におそらく最初のマトリックスが完全に再構築され、総ての生活性分子が放出される。

【0055】

本発明は以下の実施例を参照すればさらに理解できるが、それらに限定するものではない。

【実施例】

50

【 0 0 5 6 】

実施例 1：フィブリンゲルへの組み込みの測定

凝固酵素、XIIIa因子の本来の酵素活性を測定する試験を行った。この試験は二つの異なるソースからのフィブリンゲルが凝固プロセス中に合成基質を共有結合的に組み込む能力を測定することにより行った。一つのフィブリンゲルソースはフィブリン接着剤キットに由来するものであり、もう一つのソースは精製フィブリンゲルに由来するものである。

2 - プラスミン阻害剤に由来するペプチドはXIIIa因子の作用によりフィブリンゲルに共有結合的に組み込まれ得る。よって、フィブリンゲルまたはその希釈物における酵素活性を調べる一つの方法は異なるフィブリンソースがこの同じペプチドを組み込む能力を調べることを含む。これらのゲルは種々の量の蛍光標識ペプチドを用いて合成し、PBS (0.03 M、pH 7.4) で洗浄し、マトリックスから遊離のペプチドを除去した。次にこれらのゲルを必要最少量のプラスミンで分解し、サイズ排除クロマトグラフィーで分析した。種々の希釈率のフィブリン接着剤キットまたは精製フィブリンゲルを用いた場合、マトリックスに結合した蛍光シグナル(すなわちペプチド)の量を測定した。この結果をマトリックスに存在する架橋活性の量と相関させた。

10

【 0 0 5 7 】

図 1 A および 1 B はこの試験の結果を示している。試験結果は同等の濃度のフィブリンを試験した場合、組み込みレベルは同等であることを示した。例えばフィブリン接着剤キットの生化学酵素活性(図 1 A)は精製フィブリンゲルの場合(図 1 B)と同等であることが分かった。しかし、タンパク質(およびXIIIa因子)濃度が高いほど、より高い組み込みレベルがもたらされた。

20

実施例 2：異なるソースからのフィブリンゲルの in vivo における比較

【 0 0 5 8 】

原核細胞(大腸菌(E. coli))から調製した非グリコシル化組換え型の骨形態形成タンパク質(rh-BMP-2)を種々のフィブリンゲルに混合し、そのゲルをラット大腿骨欠損において試験した。このタンパク質は原核生物系で発現させたものであるのでグリコシル化されていない。フィブリンゲルは種々のソースから合成した。Sigma Chemicalおよび血液バンクから入手した精製フィブリノーゲンならびに数段階の希釈率のフィブリン接着剤(Baxter)を用いた。これらのゲルにrh-BMP-2を添加し、臨界サイズ(全層5mm)の大腿骨欠損中に配置した。用いた全てのフィブリン接着剤希釈物およびSigmaのフィブリンは同等の治癒応答を示し、総ての臨界サイズ欠損において架橋が生じているのが認められた。血液バンクからのフィブリンは全体的に応答が低く、これはおそらくrh-BMP-2の保持というよりも細胞浸潤特性によるものであると思われる(未発表データ)。従って治癒率が多様である一方で、種々のマトリックスのrh-BMP-2保持能は使用したフィブリンマトリックスそのものには依存しなかった。

30

実施例 3：フィブリンマトリックス中における可溶性および不溶性生活性分子の保持の比較

【 0 0 5 9 】

このin vitroアッセイは捕捉された非グリコシル化rh-BMP-2の放出速度と、生理的pHで高い溶解度を示すこと知られている分子の放出速度の比較に関するものである。8 mg/mLの精製フィブリノーゲン(Sigma)および2 U/mLのトロンピンを用いてpH 7.4でフィブリンゲルを重合させた。カルシウムは固化速度を増大させるため、最終濃度2.5 mMとなるように加えた。

40

【 0 0 6 0 】

これらのゲルは凝固プロセス中に存在した生活性分子を伴って合成されたものであるが、このフィブリンマトリックス中の分子の保持時間を測定した。ゲルを洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS 0.01 M、pH 7.4)中37℃で保存し、洗浄液は12時間毎に交換した。良く洗浄した後0.05ユニットのプラスミンでゲルを分解した。洗浄液中、および分解されたマトリックス中に存在するそれぞれの生活性分子の量を測定した。

【 0 0 6 1 】

50

最初の試験では、溶解度の高い分子であるFITC標識ヘパリンの保持を検討した。洗浄液中および分解されたゲル中の蛍光量を蛍光分光測定法を用いて分析し、各洗浄量中に放出されたヘパリンの割合%を求めた。フィブリンゲルは天然ヘパリン結合配列を含み、このためマトリックス中にヘパリンがいくらかは保持されることが予想される。蛍光分光測定法により、マトリックスからのヘパリンの放出は拡散・制御放出に比べて遅いことが示された(図2参照)。この遅延はフィブリン中のヘパリン結合部位に起因する。しかし、ヘパリンの多くはマトリックス外に拡散し、実質的に総てのヘパリンがマトリックスから放出された(図2参照)。

【0062】

第2の試験においては、pH7.4での溶解度が低い分子である非グリコシル化rh-BMP-2を重合中にマトリックスの内部に捕捉した。rh-BMP-2の放出プロファイルは、rh-BMP-2のマトリックスからの放出速度はFITC標識ヘパリンのそれよりもより遅いことを示している。さらに試験終了時には初期用量の約80%がマトリックス中に沈殿して残存していた(図2参照)。

【0063】

初期非グリコシル化rh-BMP-2濃度範囲としては10~200 μ g/mLを試験した。50洗浄量の後でさえ、60および80%の間のrh-BMP-2がゲル中に残留していたことが分かる(図3A)。rh-BMP-2の保持に関しては顕著な濃度依存性はなく、用いた関連濃度総てで、高レベルが保持された。従って明らかに、この沈殿作用は増殖因子の多くの濃度で働く。

【0064】

この結果はpH7.4における非グリコシル化rh-BMP-2の低い溶解度によるものであり、マトリックス内でかなりの量のrh-BMP-2の沈殿が起こる。このように、フィブリンマトリックス内に生活性分子を捕捉するため、沈殿のような物理的メカニズムを使用し得る。

【0065】

非グリコシル化rh-BMP-2の高い保持のためのメカニズムを試験する目的で、より溶解度の高い種のrh-BMP-2の保持を検討した。rh-BMP-2の溶解度を高める一つの可能性のある方法として、溶解度の高い多糖類と連結させるものがある。これはこれまでにヘパリンで立証されており、静電的にヘパリンと結合させれば溶液中のタンパク質の安定性が高まることが示されている(Pineda-Lucena, Jimenez et al. J Mol Biol, 64,162-178 (1996))。あるいは、多糖類は天然グリコシル化分子種(Rajan, Tsarbopoulos et al. Biochem Biophys Res Commun, 206,694702 (1995))または合成グリコシル化分子種(Tams, Vind et al. Biochem Biophys Acta, 1432,214-221 (1999))を用いてタンパク質に直接去有結合させることもできる。もしrh-BMP-2の溶解度の低さがその高い保持能の原因であれば、これら双方の製剤は相応して低い保持を示すはずである。ヘパリンをrh-BMP-2と1:1のモル比で予め混合した場合、rh-BMP-2の保持はより低くなり、フィブリンマトリックス中にわずかに20%が保持されたのみである($p < 0.05$)ことが示された。このことをCHO細胞由来のグリコシル化rh-BMP-2の放出を測定することによりさらに検討した。このrh-BMP-2の保持を評価したところ、その放出は非常に高く、わずかに30%がゲルに残存したのみであり(図3B)、その量は原核細胞由来のrh-BMP-2とヘパリンの混合物を用いて得られた結果と統計学的には変わらなかった(図3A)。これらの結果に基づいて、原核細胞由来のrh-BMP-2がそのような高いレベルで保持されるメカニズムは、マトリックス中での沈殿によるものと思われる。このように、これらの結果はフィブリンマトリックスのようなマトリックス中での非グリコシル化rh-BMP-2の治癒促進における有利な特性を示している。

【0066】

実施例3の結果はフィブリンマトリックス中での骨再生における非グリコシル化rh-BMP-2の非常に有利な用法を示した。フィブリン以外のマトリックスにおいても非グ

10

20

30

40

50

リコシル化 rh - BMP - 2 は骨ならびに他の組織の再生に関して同様に有利であろう。さらに、この実施例の結果は BMP ファミリーの他のメンバーとの構造上の類似性、および TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3 含む TGF β スーパーファミリーのその他のメンバー、ならびに多数の他の TGF β スーパーファミリーメンバーにより拡張される。さらに、これらの結果はまた、糖尿病における慢性創傷の治癒、静脈性不全の患者および床ずれを含む他の創傷治癒の場にも拡張できる。増殖因子の促進作用下での治癒および再生の促進において、これらおよび実質的に総ての場で、再生マトリックス中に増殖因子が長期にわたり存在することが望ましい。TGF β スーパーファミリーの非グリコシル化メンバーはそれ自体創傷治癒および組織再生の促進において広く有用である。

【0067】

10

実施例 4 および 5 には脱グリコシル化 rh - BMP - 2 の沈殿の生活性を検討した *in vivo* 試験について記載する。この *in vivo* アッセイはラットの臨界サイズ骨欠損における rh - BMP - 2 を捕捉したマトリックスの使用を含む。これらの欠損はそれ自体では自然に治癒することはない。従ってバックグラウンドの治癒が極めて低いのでこれらのモデルにより特定の治療の骨形成能を測定できる (Schmitz JP, Clin Orthop 1986, 205, 299-308)。ここで長骨モデル (5 mm 全分節大腿骨欠損) (実施例 4) および頭蓋モデル (8 mm 欠損) (実施例 5) の両方を用いた。それぞれのモデルにおいて、rh - BMP - 2 が捕捉されたフィブリンマトリックスの治癒能を rh - BMP - 2 を含まないフィブリンマトリックスと比較した。

実施例 4: ラットにおける臨界大腿骨欠損の *in vivo* 治癒

20

【0068】

8 mg / mL の精製フィブリノーゲン (Sigma) および 2 U / mL のトロンピンを用いて pH 7.4 でフィブリンゲルを重合させた。原核細胞由来の rh - BMP - 2 を含む数種のゲルを、固化の前に溶液中に混合した。固化速度を増大させるためカルシウムを加えた。

【0069】

ラット大腿骨に全層 5 mm の欠損を作り、フィブリンマトリックスを充填した。マトリックスには脱グリコシル化 rh - BMP - 2 を含むものと含まないものがあった。rh - BMP - 2 を含むマトリックスに関しては、3 種類の異なる量の rh - BMP - 2 (2 μ g、5 μ g、および 10 μ g) を試験した。骨再生における沈殿 rh - BMP - 2 の効果を判定するため、欠損部中の再生された骨量を 4 週間目に測定し、rh - BMP - 2 を含まないフィブリンゲルの結果と比較した。

30

【0070】

4 週間目に rh - BMP - 2 を含まないフィブリンゲルを体外に取り出して試験したところ、欠損部辺縁における新しく石灰化した骨のレベルは非常に低かった。その代わりに欠損部は繊維組織で架橋されており、非機能的治癒が起こっていた。完治を示す基底マトリックスで満たされた欠損部はなかった。

【0071】

4 週間目に 2、5 または 10 μ g いずれかの rh - BMP - 2 を重合混合物に加えたフィブリンゲルを体外に取り出して試験した。5 または 10 μ g の rh - BMP - 2 を欠損部に施した動物は総て完治を示し、最初の欠損部は石灰化骨および骨髄で満たされ、間隙は全部石灰化組織で架橋されていた。欠損部に 2 μ g の rh - BMP - 2 を含む材料を施した動物も同様に良好な治癒を示し、最初の欠損部領域の 69% が成熟した繊維性骨で満たされていた。石灰化骨で満たされた骨欠損領域の平均パーセンテージを表 1 に示す。いずれの被験体においても、治癒部位における炎症または癒痕化の徴候はなかった。

40

【0072】

【表 1】

表 1 治癒した大腿骨欠損における石灰化組織の割合%

処置	再生した骨 (%)
フィブリン	7
フィブリン+2 μ g rh-BMP-2	69
フィブリン+5 μ g rh-BMP-2	100
フィブリン+10 μ g rh-BMP-2	100

実施例 5 : in vivo 臨界頭蓋欠損における治癒

10

フィブリンマトリックスを用いた in vivo 実験

【0073】

8 mg/mL の精製フィブリノーゲン (Sigma) および 2 U/mL のトロンピンを用いて pH 7.4 でフィブリンゲルを重合させた。原核細胞由来の rh-BMP-2 を含む種類のゲルを、固化の前に溶液中に混合した。固化速度を増大させるためにカルシウムを加えた。

【0074】

ラット頭蓋に 8 mm の欠損部を作り、フィブリンゲルまたは rh-BMP-2 が内部に沈殿しているフィブリンゲルのいずれかを充填した。脱グリコシル化 rh-BMP-2 を含むマトリックスに関しては、3 種類の異なる量の rh-BMP-2 (1 μ g、5 μ g、および 20 μ g) を試験した。骨再生における沈殿 rh-BMP-2 の効果を判定し、フィブリンゲルが rh-BMP-2 不在で合成された場合の結果と比較する目的で、欠損部中で再生された骨量を 3 週間目に測定した。

20

【0075】

3 週間目において rh-BMP-2 を含まないフィブリンゲルを体外に取り出して試験した。欠損部辺縁の新しい繊維性骨のレベルは極めて低かった。欠損部における新しい繊維性の骨量は最初の欠損領域の約 13% であると測定された。欠損部の完治をもたらしたマトリックスはなく、欠損の大部分は依然として繊維組織で満たされていた。

【0076】

脱グリコシル化 rh-BMP-2 を含むフィブリンゲルは、1、5 または 20 μ g の rh-BMP-2 のいずれかを重合混合物に加えて含んだ。3 週間目にこれらの材料を体外に取り出して試験した。20 μ g の沈殿 rh-BMP-2 で処置した欠損部は総て、繊維性骨および骨髄で完全に満たされていた。5 μ g の rh-BMP-2 (III) で処置した欠損部はほぼ完治し、最初の欠損領域の 90% が石灰化組織で満たされていた。1 μ g の rh-BMP-2 (I) で処置した欠損部も同様に極めて良好な治癒を示し、欠損部領域の 73% が新しい繊維性骨で満たされていた。石灰化組織で満たされた欠損部領域の平均量を表 2 および図 4A に示す。表 2 から沈殿 rh-BMP-2 濃度が高いほどより良い治癒結果をもたらされるという用量依存的応答が示されている。結局、総ての被験体において治癒部位または硬膜上に炎症または癒痕化の徴候はなかった。

30

【0077】

40

【表 2】

表 2 治癒した頭蓋欠損における石灰化組織の割合%

処置	再生した骨 (%)
フィブリン	13
フィブリン+1 μ g rh-BMP-2	73
フィブリン+5 μ g rh-BMP-2	90
フィブリン+20 μ g rh-BMP-2	100

【0078】

50

より溶解性の高い2形態のrh-BMP-2を同様に試験したところ、これらの治癒応答は有意に低かった。1 µgの非グリコシル化rh-BMP-2を等モル量のヘパリン(VII)と予め混合し、フィブリンゲルの重合前に加えたところ、治癒レベルは50%に下がり、1 µgのrh-BMP-2単独による同等の治癒よりも統計学的に低かった(II; 73%) ($p < 0.05$)。マトリックスに予めヘパリンを混合したフィブリンはフィブリン単独の場合と同様の治癒応答をもたらすため、この結果はヘパリン単独の作用によるものとする事はできない(図4Bの最初の2カラム(IおよびV)を参照)。同様に、グリコシル化rh-BMP-2を用いた場合、治癒応答はより低かった(VIII)。グリコシル化rh-BMP-2は、より良好な折りたたみ、より良好な二量化およびその他の多くの要因により、非グリコシル化rh-BMP-2よりも比活性がより高い。しかし、等モル量(1 µg)のグリコシル化rh-BMP-2を用いた場合では、治癒応答は欠損部のうち石灰化組織で満たされたのは非グリコシル化rh-BMP-2を用いて得られた73%に比較してわずかに44%であった(図4B参照)。

10

【0079】

予想されたように、臨界サイズの欠損の治療にいずれの生活性分子も存在しない単純なフィブリンマトリックスを用いると、極めて低い治癒応答しか得られず、大腿骨または頭蓋モデルいずれにおいても石灰化組織はほとんど認められなかった。このように対照マトリックスのバックグラウンドの治癒が極めて低いことから、rh-BMP-2をマトリックス中で沈殿させた結果得られる強い治癒応答が、骨組織中での強力な治療学的治癒能を表すものであることが証明される。従って、特に非グリコシル化TGFスーパーファミリー増殖因子の使用により、沈殿のような物理的プロセスが創傷治癒のための治療用マトリックスの開発に重要な手段となる。

20

合成マトリックスを用いたin vivo実験

【0080】

上記のフィブリンマトリックスとして酵素分解性合成マトリックスを同様の頭蓋欠損モデルにおいて試験した。平均分子量20000Dの4アームPEG-ビニルスルホンを多重システインを含む架橋直鎖ペプチド(例えばGCRPQGIWQDRC)とpH7.5で反応させることにより合成ゲルを形成させた。10%(w/w)溶液となるようPEGをTEOAバッファー(0.3M、pH8.0)に溶解させた。ペプチドも同じバッファーに溶解させた。存在するチオレートは不飽和部分と反応し、末端架橋ヒドロゲルを形成する。2つのシステイン間にプラスミンまたはコラゲナーゼのいずれかに対し特異的感受性のある分解配列を組み込むことにより、フィブリンおよびコラーゲン(それぞれ)の合成基質を作製することができる。接着シグナル、通常はRGDペプチドを加えることにより、これらのゲルは細胞浸潤マトリックスおよび生活性分子のための送達マトリックスとして働き得る。

30

【0081】

上記の合成ゲルはマトリックス中に沈殿させた5 µgの脱グリコシル化rh-BMP-2を用いて作製し、8mmの臨界サイズのラット頭蓋欠損中に配置した。1、3および5週間後にそれらを体外に取り出した。炎症または癒痕組織の徴候は認められなかった。さらに、5週間後の治癒率は80%であり、これらの合成マトリックスはrh-BMP-2の沈殿のために好適なマトリックスとして役立ち、治療用マトリックスとして作用することを示している。

40

コラーゲンマトリックスを用いたin vivo実験

【0082】

臨床で使用可能な吸収性コラーゲンスポンジ(Integra Lifesciences)を入手し、ラット臨界サイズ頭蓋欠損用として適当な形に切断した。それらの移植に備え、次いでこれらのスポンジを5 µgの非グリコシル化BMP-2を含む溶液中に浸した。

【0083】

ラット頭蓋に8mmの欠損を作り、rh-BMP-2を捕捉したコラーゲンスポンジを欠損内部に配置した。骨再生における沈殿rh-BMP-2の効果を判定する目的で、3

50

および5週目に欠損部中で再生された骨量をX線写真を用いて測定した。

【0084】

5 μ g の rh - BMP - 2 を含有するコラーゲンスポンジを体外に取り出した際に、移植した材料に対する有害な応答の兆候は認められなかった。総ての被験体において治癒部位または硬膜上に炎症または瘢痕化の徴候はなかった。3週間の時点で3例、5週間の時点で4例の、全7例の被験体を試験した。3週間目に被験体からスポンジを取り出した際、各欠損部は完全に石灰化組織で満たされていた。5週間後にも同様の結果が認められ、X線写真では94%の欠損が繊維性骨で満たされていた。従って明らかにコラーゲンマトリックス中に非グリコシル化 BMP - 2 を加えると優れた治癒がもたらされた。このことは非グリコシル化型を用いたマトリックス中への BMP - 2 の保持はまた、コラーゲンスポンジ中でも機能することを示している。

10

実施例6：イヌ全手根関節固定術における治癒

【0085】

得られる最終濃度がフィブリノーゲン 8 mg / ml、Ca⁺⁺ 2.5 mM、トロンピン 10 NIHユニット/ml および非グリコシル化 rh - BMP - 2 600 μ g / ml ゲルとなるようゲル用の成分を調製した。混合および成分の骨折部位への注入後に固化が始まった。固化時間は30～60秒であり、創傷中の少量の血液成分の混入は固化特性に影響しなかった。

【0086】

外傷のため全手根関節固定術が必要なクライアント所有のイヌの一連の10症例をベルン大学小動物クリニックで手術した。背部平板固定法という標準的な手法を総てのイヌに適用した。関節の軟骨を開孔した後、AO法を用いて適当なサイズのプレートをビスで固定した。次に手術領域を生理食塩水で洗い流し、フィブリン / ng - rh - BMP - 2 溶液を骨の隙間に注入した(10～40 μ g ng l y - rh - BMP - 2 / kg 体重)。固化が完了するまでには30～60秒かかった。創傷は吸収性の縫合材を用いて常法にて縫合した。

20

【0087】

1匹のイヌ(イヌ10)は転落のため両側性の手根骨損傷を負っていた。同じ日に同じ盲検の外科医により両方の手根に全関節固定術を施し、処置の最後に海綿質の自己移植またはフィブリン / rh - BMP - 2 を施す手根を無作為に選択した。この症例は両側性の損傷のため、統計学的分析には含めることはできなかったが、自己移植片とフィブリン / rh - BMP - 2 間の直接的内部比較を行った。

30

【0088】

術後のX線写真撮影後、保護用の添え木をあてがった。6週間自由に走ることのないようにし、週1回の包帯管理を推奨し、対照群でも同様にした。標準対照X線写真を術後4、8および12週間目に撮影した。同じ時点でこれらのイヌを臨床学的に検査し、歩行も評価した。X線写真での骨の治癒は、第三者の有資格X線技師(GS)により採点法を用いて判定し、その結果を同手法で手術したが海綿質自己移植片を用いた17頭の対照群と比較した。

【0089】

採点法：0 = 隙間に無機化組織が見られない、1 = 隙間に無機化組織が見られる、2 = 隙間の骨の架橋、3 = 肋軟骨下板を欠く骨の架橋の再構築

40

【0090】

局所および全身性の薬物副作用徴候を示したイヌはなく、術傷は一貫して順調に治癒した。

【0091】

何匹かの被験体に添え木に関連する軽微な合併症(小さな圧迫創傷)が起こったが、これは包帯を交換して炎症を起こした皮膚を清浄することにより処置した。

【0092】

平均X線治療スコアは全ての時点(4、8、12週間目)において非グリコシル化(n

50

g l y) - r h - B M P - 2 群が海綿質群を上回っていた (P_{4 週間} = 0 . 0 0 6 3 , P_{8 週間} = 0 . 1 1 5 , P_{1 2 週間} = 0 . 2 6 8) (図 5) 。

【 0 0 9 3 】

術後 1 2 週間では、海綿質群の 5 9 % が全ての接合部において 2 以上の得点に達したのに対し (標準レベルは臨床学的治癒を示す)、n g l y - r h - B M P - 2 群の 8 7 . 5 % がその得点に達した。

【 0 0 9 4 】

両側の全手根関節固定術を行ったイヌ 1 0 は、術後の合併症はなかった。4 週間後の最初の対照 X 線写真では 2 つの関節固定術の骨治癒において目に見える差異はなかった (全ての接合部の得点は 1)。しかし 8 週間後では海綿質で処置した手根に改善は認められず (得点 1)、一方 n g l y - r h - B M P - 2 で処置した手根は得点 2 まで改善した。1 2 週間後には海綿質で処置した肢の得点は 2、n g l y - r h - B M P - 2 投与関節固定の得点は 2 . 3 3 であった。

【 0 0 9 5 】

さらに後の時点で撮影した X 線写真は、目的領域の外側に骨が形成されることなく関節固定のさらなる治癒および再構築を示し、誘導された骨の分解または再吸収は認められず、術後 1 4 ヶ月まで手術した動物において臨床学的な問題は生じなかった。

実施例 7 : ネコの長骨癒着不能における治癒

【 0 0 9 6 】

得られる最終濃度がフィブリノーゲン 8 m g / m l、C a⁺⁺ 2 . 5 m M、トロンビン 1 0 N I H ユニット / m l および非グリコシル化 r h - B M P - 2 6 0 0 μ g / m l ゲルとなるようゲル用の成分を調製した。混合および成分の骨折部位への注入後に固化が起こった。固化時間は 3 0 ~ 6 0 秒であり、創傷中の少量の血液成分の混入は固化特性に影響しなかった。

【 0 0 9 7 】

クライアント所有のオス 3 匹、メス 2 匹、平均齢 3 . 4 才 (2 ~ 1 0 才) のショートヘアキャットにおける骨折癒着不能の一連の 5 症例をベルン大学獣医科教育病院 (the Veterinary Teaching Hospital) において処置した。それぞれの被験体は萎縮性癒着不能であり、r h - B M P - 2 による処置前最低 3 ヶ月間は治癒の進行を示していなかった。1 ~ 4 番のネコは創外固定器、5 番のネコはピン固定により骨折の初期固定を行った。1 ~ 3 および 5 番のネコの初期固定は不安定であり、安定化をはかるためにプレートを適用した。同手術の際に骨折部位に r h - B M P - 2 を挿入した。4 番のネコでは、創外固定器は緩んでいなかったため、骨折で生じた間隙に穿刺切開により r h - B M R - 2 を挿入した (表 3)。r h - B M P - 2 適用の 2 ヶ月後に転落のため 3 番のネコのプレートが緩んだ。このプレートは除去し、骨折部位に 2 度目のフィブリン中 3 0 0 μ g の r h - B M P - 2 を挿入した。ギプス包帯を施し、6 週間後に安定化をはかるため固定ピンを挿入した。5 番のネコには、無傷の第 2 中手骨とともに骨折部位を安定化させるため第 5 中手骨の側面に小型プレートを配置した。小さな進入路 (small approach) を通して第 3 および第 4 中手骨の骨折部に 3 0 0 μ g の r h - B M P - 2 を含むフィブリンを注入した。

【 0 0 9 8 】

フィブリンおよび r h - B M P - 2 処置後数ヶ月間、総ての症例の対照 X 線写真を数枚撮影した。

【 0 0 9 9 】

局所または全身性の薬物副作用徴候を示したネコはなく、術傷も順調に治癒した。

【 0 1 0 0 】

10

20

30

40

【表 3】

表 3 ネコ癒着不能骨折の治癒

ネコ	骨折	時間	処置	結果
1	R/U prox.	3ヶ月	プレート、1×BMP	治癒
2	R/U dist.	12ヶ月	プレート、1×BMP	治癒
3	頸骨	12ヶ月	プレート、1×BMP ギブス、1×BMP ピン固定	治癒
4	頸骨	4ヶ月	1×BMP (創外固定)	治癒
5	第3、4、5中足骨	5ヶ月	プレート、1×BMP	治癒せず

10

【0101】

1番のネコは処置後4週間で骨折部分のX線写真に新しい石灰化組織が認められた。rh-BMP-2適用後4ヶ月で骨折は治癒し、歩行難は認められなかった。

【0102】

2番のネコでは、小型Tプレート配置後の骨折ギャップは小さく、rh-BMP-2による処置の6週間後には骨折部が架橋され、肢の機能は良好となった。

20

【0103】

3番のネコは重度の脛骨粉碎骨折を負い、創外固定器で固定した。脛骨は重症の骨欠損を伴う萎縮性癒着不能を起こしていた。脛骨のギャップを小さくするために腓骨を短くして2.7mmのプレートを適用した。腓骨由来の骨を細かく砕き、フィブリン中でrh-BMP-2と混合して骨折部位に生存細胞を提供した。追跡検査のX線写真には新しい骨形成および脛骨全体に新しい皮層の構築が認められた。外傷のため、ねじの先端部を引き抜いた後、プレートを除去し、2度目のフィブリン中300μgのrh-BMP-2の適用を行った。骨は増加し続け、最初のrh-BMP-2処置後6ヶ月には骨折は治癒していた。

【0104】

4番のネコは開放腓骨骨折を負っており、創外固定器で固定した。軽度の一過性骨髄炎の後、症状は安定していたにも関わらず脛骨は萎縮し始めた。穿刺切開でフィブリン/rh-BMP-2を骨折ギャップに適用した。4週間後のX線写真では骨反応は認められなかったが、7週間後には骨折ギャップは縮小し、処置後4ヶ月には骨が架橋された。

30

【0105】

5番のネコはピン固定による粉碎骨折の固定後に第3、4および5中足骨が極度に萎縮した。4および7週間後の対照X線写真はrh-BMP-2の効果を示さなかった。飼主がさらなる治療を拒否したため、それ以上の追跡検査はできなかった。

実施例8：フィブリンおよび合成マトリックスにおける非グリコシル化rhPDGF-ABの保持

40

【0106】

このin vitroアッセイではフィブリンおよび合成マトリックスにおける非グリコシル化rhPDGF-ABの保持を評価する。PDGF-ABはA鎖上にN-グリコシル化部位を含むことが知られており、真核細胞がこのタンパク質を発現する際に用いられると考えられている。非グリコシル化型であると考えられる大腸菌で発現したrhPDGF-ABを本試験に使用した。これは生理的pHで0.2mg/mLまで可溶である(Hoppe, J. et al, Biochemistry, 28,2956-60 (1989); Hoppe, J. et al. Eur J Biochem, 187,207-14 (1990))。

【0107】

非グリコシル化PDGF-ABをゲル50μLあたり2μgの濃度で試験した。フィブ

50

リングルをTissucol (Baxter)の改変製剤を用いて重合させ、この合成ゲルは2アームPEGチオールと架橋した4アームPEGアクリレートであった。このゲルを緩衝生理食塩水(PBS 0.01M、pH7.4、0.1%BSAを含む)で洗浄し、洗浄液は12時間後に交換した。次に洗浄液中に放出された治療分子の量をELISA法により定量した。

【0108】

20洗浄量の後に、フィブリンマトリックスの洗浄バッファー中に0.7μgのタンパク質が検出され、結果としてフィブリンマトリックスに添加した総タンパク質の65%が保持されていた。合成マトリックスでは20洗浄量の後に放出されたのは4ng未満であり、このアッセイの感度範囲内ではタンパク質は検出されなかったことより、添加したタンパク質が完全に保持されたことが示唆される。アッセイ中のマトリックスの干渉またはタンパク質の分解に対する対照として、スパイクサンプルを試験し、その結果20洗浄量の後に有意な量のタンパク質が検出できた。

10

【0109】

これらの結果に基づき、原核生物由来のrhPDGF-ABは治療適用の促進に用いられるフィブリンおよび合成PEGゲルのようなマトリックス中に保持可能であることが示された。

【0110】

開示した本発明は本明細書に記載される特定の方法、プロトコールおよび試薬に限定されるものではないと考えられる。さらに本明細書で用いた用語は特定の具体例を示すことを目的とするものでなく、本発明の範囲を限定するものでもない。

20

【0111】

当業者ならば本明細書に記載される本発明の具体例と同等な多くのものが分かるであろうし、通常の実験法のみを用いてそれを確認することができる。このような同等物も添付のクレームに含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】XIIIa因子基質ペプチドのフィブリンへの組み込みを測定したグラフである。フィブリンゲルは予め希釈したTissucol(商標)キット(Baxter)から8mg/mLで合成した(図1A)。2倍希釈(黒四角)、10倍希釈()、または予備重合混合物に外からXIIIa因子1U/mLを添加した()または添加しない(黒四角)精製フィブリノーゲンから合成したもの(図1B)。

30

【図2】洗浄後のフィブリンマトリックス内の生活性分子の保持を測定したグラフである。水に可溶性分子ヘパリン()と生理学的pHで溶解度の低い組換えヒト骨形態形成タンパク質(rh-BMP-2)()の二つの異なる生活性分子を重合中のフィブリンに添加し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で繰り返し洗浄した。

【図3】フィブリンゲルにおけるrh-BMP-2の保持を示す。図3Aではゲルの重合中、10()、20()、100()および200(O)μg/mLの非グリコシル化rh-BMP-2の存在下でフィブリンゲルを重合し、ゲル中に残留するrh-BMP-2のパーセンテージをPBS中10、20、30、40および50洗浄量の後に測定した。図3Bでは20μg/mLの原核生物rh-BMP-2()、20mg/mLのCHO細胞由来グリコシル化rh-BMP-2()および等モルのヘパリンを予め混合した20μg/mLのrh-BMP-2()を含むフィブリンゲルにおける保持を同様に分析した。各図では平均値と標準偏差を示している。

40

【図4】危険な大きさのラット頭蓋冠欠損の治療レベルを示す。ゲルに種々のグリコシル化および非グリコシル化rh-BMP-2製剤を混合したフィブリンゲルの治療効果を測定した。図4Aでは非グリコシル化rh-BMP-2を0(I)、1(II)、5(III)、および20(IV)μg/mLの濃度でフィブリンゲルに混合した。さらに図4Bではフィブリンゲル(I)、1μg/mL非グリコシル化rh-BMP-2を含むフィブリンゲル(II)、等モル量のヘパリンを予め混合した1μg/mL非グリコシル化rh-BMP

50

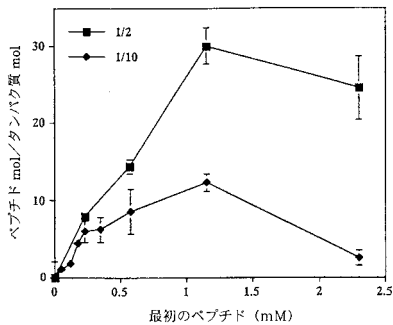
- 2を含むフィブリンゲル(VII)、同レベルのヘパリンを混合したフィブリンゲル(V)、フィブリンゲルに共有結合させるためのトランスグルタミナーゼドメインを含む1.0 μg/mLグリコシル化rh-BMP-2を含むフィブリンゲル(VI)(例えば米国特許第6,331,422号に記載)、および1 μg/mLグリコシル化rh-BMP-2を含むフィブリンゲル(VIII)を試験した。これらの図では治癒21日後、石灰化した組織で満たされた欠損部の平均面積が標準偏差とともに示されている。

【図5】イヌ全手根関節固定術の放射線治療を示す。この欠損においてフィブリンマトリックスで非グリコシル化BMP-2を用いる効果を調べ、癌自己移植の臨床標準と比較した。自己移植片を脱グリコシル化rhBMP-2/フィブリンゲルに置き換えた9匹のイヌの3つの手根関節列の治療スコアの平均値を4、8および12週間目に算出した。治癒の程度を判定するため標準化法を確立し、無機が見られない場合を0、ある程度の無機化が見られる場合を1、欠損が完全に無機化されている場合を2、欠損が治癒し再構成されている場合を3とした。脱グリコシル化rhBMP-2/フィブリンで処置したイヌは自己移植片で処置した対照群に比べて高い放射線治療スコアを示した。

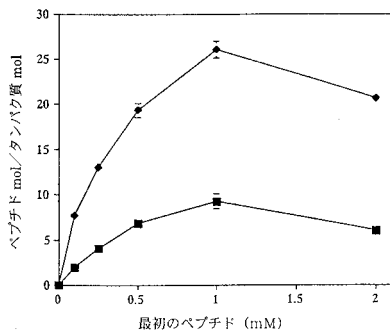
10

【図1】

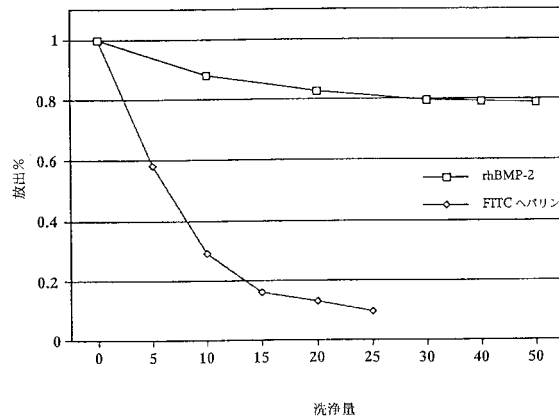
A



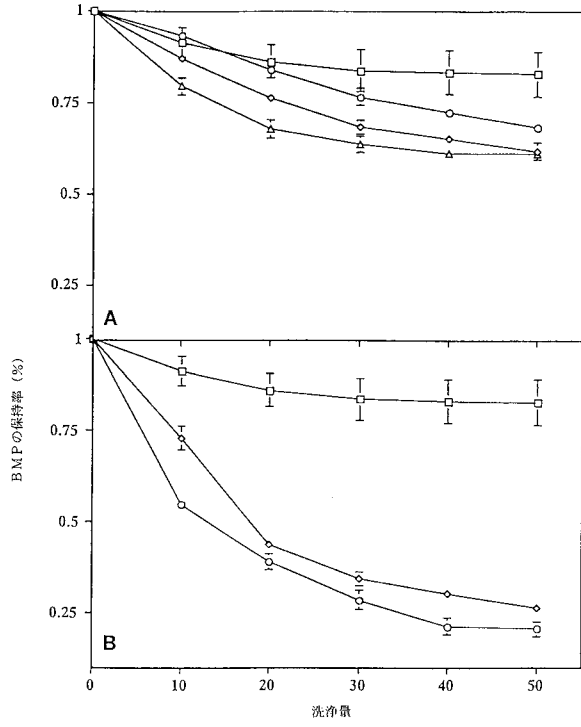
B



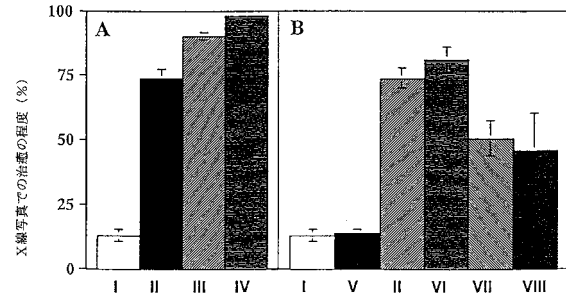
【図2】



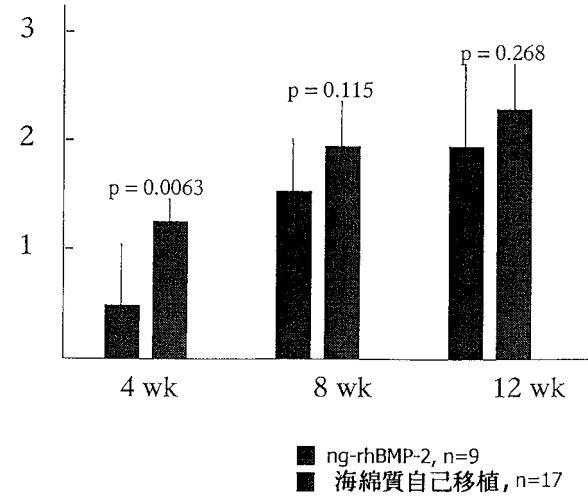
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



■ ng-rhBMP-2, n=9
▨ 海綿質自己移植, n=17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 L	27/00 (2006.01)	A 6 1 L	27/00 G
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 K	9/70 (2006.01)	A 6 1 K	9/70

(73)特許権者 501410078

ユニベルジテート、チューリッヒ
 UNIVERSITAET ZUERICH
 スイス国チューリッヒ、レーミシュトラーセ、7 1

(74)代理人 100075812

弁理士 吉武 賢次

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(72)発明者 フーゴー、シュメーケル

スイス国チューリッヒ、ベルクアッケルシュトラーセ、2 2

(72)発明者 フランツ、ベーパー

スイス国チューリッヒ、バインベルクシュトラーセ、9 1

(72)発明者 ジェyson、シー・シェンス

スイス国チューリッヒ、アロサシュトラーセ、1 2

(72)発明者 ジェフリー、アラン、ハベル

スイス国チューリッヒ、クラウシウスシュトラーセ、3 5

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 特表平06-505258(JP,A)

国際公開第00/044808(WO,A1)

特開平07-088174(JP,A)

特開平07-101874(JP,A)

特開平03-500655(JP,A)

PERKA, C. et al., Journal of Biomedical Materials Research, 2000年, Vol.52, No.3, pp.543-552

WOZNEY, J.M. et al., Progress in Growth Factor Research, 1989年, Vol.1, pp.267-280

TABATA, Y. et al., Pharmaceutical Science & Technology Today, 2000年, Vol.3, No.3, pp.80-89

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00-58

A61K 47/00-48

A61L 15/44

A61L 27/00

A61P 17/00

A61P 19/00

