

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/51
C12N 15/12 A61K 38/17
C12P 21/02

[21] 申请号 96194702.0

[43]公开日 1998年7月15日

[11] 公开号 CN 1187824A

[22]申请日 96.4.19

[30]优先权

[32]95.4.19 [33]JP[31]93664/95

[32]95.11.17[33]JP[31]322403/95

[86]国际申请 PCT/JP96/01062 96.4.19

[87]国际公布 WO96/33215 日 96.10.24

[85]进入国家阶段日期 97.12.10

[71]申请人 赫司特药品和化学品有限公司

地址 日本东京都

[72]发明人 牧岛房夫 高松宏行 三木秀夫

河合伸治 木村道夫 松本智明

胜浦美枝子 榎本耕一 佐藤右典

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 杨丽琴

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 新型蛋白质及其制备方法

[57]摘要

一种蛋白质和它的二聚体蛋白质,该蛋白质具有序列表中序号1的氨基酸序列,来源于人MP52。上述的二聚体蛋白质可这样得到:构建一质粒,该质粒含有能编码序列表中序号1氨基酸序列的DNA,该DNA的5'末端有编码甲硫氨酸的密码子,用这种质粒转化大肠杆菌,培养大肠杆菌,溶化培养中得到的包涵体,从溶化液中提纯得到单体蛋白质,单体蛋白质复性得到二聚体蛋白质,再对此进行纯化。所得的二聚体蛋白质可用于软骨和骨疾病的治疗。

权 利 要 求 书

1. 一种具有序列表中序号 1 的氨基酸序列的蛋白质。
2. 一种由权利要求 1 的蛋白质二聚体构成的蛋白质。
3. 一种以权利要求 2 所述的蛋白质作为有效成分的治疗软骨和骨
5 疾病的药剂。
4. 权利要求 3 所述用于治疗软骨和骨疾病的药剂, 其中软骨和骨
疾病指骨质疏松症。
5. 权利要求 3 所述用于治疗软骨和骨疾病的药剂, 其中软骨和骨
疾病指变形性关节炎或骨关节炎。
- 10 6. 权利要求 3 所述用于治疗软骨和骨疾病的药剂, 其中软骨和骨
疾病指骨折和骨缺损。
7. 权利要求 3 所述用于治疗软骨和骨疾病的药剂, 其中软骨、骨
疾病指牙根和牙槽缺损。
8. 一种制备权利要求 1 中蛋白质的方法, 包括培养用含有能够表
15 达权利要求 1 中蛋白质的 DNA 序列的质粒转化的大肠杆菌。
9. 权利要求 8 的制备方法, 其特征在于它所构建的质粒含有能编
码序列表中序号 1 中氨基酸序列的 DNA, 并且该 DNA 的 5' 末端有编
码甲硫氨酸的密码子。
10. 权利要求 2 中蛋白质的制备方法, 其特征在于构建一质粒,
20 该质粒含有能编码序列表中序号 1 氨基酸序列的 DNA, 且 DNA 的 5'
末端有编码甲硫氨酸的密码子; 用这种质粒转化大肠杆菌, 培养大肠杆
菌; 溶解培养中得到的包涵体, 从溶解液中提纯得到单体蛋白质, 单体
蛋白质折叠得到二聚体蛋白质, 对此进行提纯。
11. 一种软骨和骨疾病的治疗方法, 包括施用权利要求 2 的蛋白
25 质。
12. 权利要求 11 的治疗方法, 其中软骨和骨疾病指骨质疏松症。
13. 权利要求 11 的治疗方法, 其中软骨和骨疾病指变形性关节炎
或骨关节炎。
14. 权利要求 11 的治疗方法, 其中软骨和骨疾病指骨折和骨缺
30 损。
15. 权利要求 11 的治疗方法, 其中软骨和骨疾病指牙根、牙槽缺
损。

说明书

新型蛋白质及其制备方法

技术领域

5 本发明涉及一种蛋白质，它来源于 MP52，具有序列表中序列号 1 的氨基酸序列。本发明还涉及该蛋白质的二聚体以及由这种二聚体蛋白质作活性成分形成的用于治疗软骨和骨疾病的药剂。本发明还涉及一种方法，就是用含有能表达上述蛋白质 DNA 序列的质粒转化大肠杆菌，然后用大肠杆菌制备大量、高纯度的上述蛋白质。另外，本发明涉及一种治疗方法，即施用二聚体蛋白质来治疗软骨、骨疾病。

技术背景

现在已知用于预防和治疗骨疾病的药剂有雌激素、降钙素、维生素 D₃ 及其衍生物，以及二磷酸盐的衍生物等。最近报道 TGF- β 基因超家族的骨形成因子（骨形态发生蛋白：以后称作 BMP），包括 BMP-2 到 BMP-9 等一系列蛋白质有骨形成作用。

另外也有报道一种叫做 MP52 的蛋白质（WO93/16099 及 WO95/04819）具有骨形成作用。人们认为成熟型 MP52 是 N 端有丙氨酸的 120 个残基形成的蛋白质，其氨基酸序列在这些申请中有所描述。

20 自然，Vol.368、p. 639 - 643（1994 年）及 WO94/15949 中也记载了一种叫做 GDF-5 的蛋白质，它来源于小鼠，氨基酸序列与 MP52 很相似。

但是，以工业规模制备这些蛋白质的纯品很不容易。

曾尝试应用哺乳动物细胞如 L - 细胞通过遗传工程技术来制备 MP52，但是不容易制备大量的纯品 MP52。

发明的公开

本发明者们尝试用大肠杆菌，通过遗传工程技术来大量制备 MP52。也就是把编码甲硫氨酸的密码子加到从丙氨酸开始编码 MP52 的 DNA 5' 末端，用这样的大肠杆菌来制备 MP52。产物不仅是 MP52，而是 MP52 的混合物，还包括 N 端为甲硫氨酸的 121 个残基形成的蛋白质，以及 N 端脱落丙氨酸而从脯氨酸开始的 119 个残基形成的蛋白质，

这很难从中分离出纯化 MP52。

5 本發明者發現把編碼甲硫氨酸的密碼子與編碼序列表中序列號 1 中氨基酸序列的 DNA 5' 末端結合，序列 1 的序列由 MP52 N 末端刪除丙氨酸後 119 個殘基形成，這樣來構建質粒，然後用導入了質粒的大腸桿菌來表達，這樣可選擇性地大量生產 N 末端從脯氨酸開始的序列表中序列號 1 的蛋白質。

而且本發明證實序列表中序列號 1 中所述蛋白質的二聚體有軟骨和骨形成作用，由此完成了本發明。

10 本發明涉及一種蛋白質，它具有序列表中序列號 1 所示的氨基酸序列。該蛋白質由 119 個殘基組成，119 個殘基是從人 MP52 120 個殘基形成的成熟區的 N 末端去除丙氨酸後形成的。本發明的蛋白質溶於水，而且因為它來源於人類，所以自身的毒性很小。

15 另外，本發明涉及一種用於軟骨和（或）骨疾病治療的藥劑，它包括蛋白質的二聚體，而該蛋白質具有序列表中序列號 1 的氨基酸序列。更具體而言，由於本發明的蛋白質二聚體具有形成軟骨、骨的活性，所以本發明涉及用於預防及治療下列疾病的藥劑：骨質疏松症，先天性軟骨、骨疾病，變形性膝關節炎、變形性股關節症等變形性關節炎，骨關節炎，半月板損傷等軟骨損傷，外傷、腫瘤切除等造成的骨、軟骨缺損部分的再生，骨和軟骨的缺損，骨折，軟骨發育不良、軟骨發育不全，20 無軟骨形成、腭裂、骨形成不良等先天性軟骨和骨疾病，另外還有牙根、牙槽的缺損等。因為本發明的蛋白質具有形成軟骨、骨的活性，所以它可用於治療整容外科的骨移植。這些治療也包括獸醫外科領域的治療。

25 本發明涉及一種方法，它是用大腸桿菌來製備一種蛋白質，該蛋白質由序列表中序列號 1 所示，來源於人 MP52 的 119 個氨基酸殘基組成。

30 另外，本發明涉及質粒的構建，該質粒含有編碼序列表中序列號 1 所示來源於人 MP52 的 119 個氨基酸殘基序列的 DNA，其 5' 末端的編碼甲硫氨酸。用聚合酶鏈式反應（PCR 法）僅對人 MP52 cDNA 的成熟區域進行擴增，其中用含有 WO93/16099 中 cDNA 的質粒載體作模板 DNA。這裡所用的 PCR 法通常指用美國專利 4,683,195 中描述的方法來擴增 DNA 或 RNA 的微量片段。

为了生产本发明的蛋白质，有必要构建包含有编码该蛋白质 DNA 的合适表达载体，然后用遗传工程技术插入到所需大肠杆菌宿主中。为了大量生产本发明的蛋白质，实施了以下两个改良方法：1)提高目的蛋白生产能力的方法：M. Nobuhara 等(农业生物化学, 52 (6), 1331 ~ 1338, 1988) 提高翻译效率的方法，即提高起始密码子 ATG 周围 AT 含量的方法；2)提高质粒复制数目的方法，即复制起始点由 pBR 改变为 pUC 的方法。另外，把启动子区域与编码序列中序列号 1 氨基酸序列的 DNA 直接连结起来，以构建本发明的表达载体 (pKOT 245)。该载体于 1995 年 4 月 14 日保藏于通商产业省，工业科技院、国家生命科学人类技术研究所 (NIBH) (茨城县筑波郡谷田部町东，丁目 1 - 3 (日本) ，登记号为 FERM P-14895, 1996 年 4 月 10 日根据布达佩斯条约转移到国际保藏 (FERM BP-5499) 。

本发明涉及制备单体蛋白质的方法，其步骤是构建一质粒，该质粒含有能编码序列中序列号 1 氨基酸序列的 DNA ， DNA 的 5' 末端有编码甲硫氨酸的密码子，把构建的质粒导入到大肠杆菌进行转化，培养大肠杆菌，得到包涵体，对此进行溶解，纯化后可得到单体蛋白质；本发明还涉及用这种单体蛋白质，经复性、纯化形成序列中序号 1 蛋白质的二聚体蛋白质的制备方法，即大肠杆菌的包涵体经溶解之后经 SP-Sepharose 柱及 Sephacryl S-200 柱得到单一的磺酸化的 MP52 单体，然后经反相 HPLC 的 RESOURCE ， PRC 柱，得到蛋白质的纯化二聚体级分。通过分析本蛋白质的 N 末端氨基酸序列，氨基酸组成及其电泳来了解其物理化学性质。

本发明还涉及培养大肠杆菌的方法，经本发明的表达载体插入后的大肠杆菌的培养条件是培养液温度为 28 °C - 34 °C ， pH6 - 8 ，溶解的氧浓度为 20 - 50 % 。

本发明蛋白质二聚体的生物学活性这样确定，对异位软骨/骨的形成进行软 X 线放射照片分析、组织学分析及随时间变化的分析。另外，根据对膜内骨化的作用，对关节软骨再生的效果以及对骨折/骨缺损的治愈效果来判定本发明的蛋白质对软骨/骨的重建是否有效。

可通过静脉内、肌肉内及腹腔内施用来全身施用本发明的蛋白质二聚体，静脉内施用时除应用传统的静脉内注射外，可用其它的静脉内输注的方法。

作为注射用的制剂，例如可用注射用粉末制剂。此时可应用一种或两种以上的水溶性赋形剂如甘露醇、蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖等，在水中溶解后分装在小瓶或安瓿中，然后冷冻干燥密封保存。

局部施用，可将本发明的蛋白质覆盖在经胶原膏、纤维蛋白胶或其它粘附剂处理的软骨/骨或牙齿表面。骨移植时可应用天然骨，也可应用传统的人工骨。所谓的人工骨指用金属、陶瓷、玻璃等天然物质或人工无机物质制成的骨。优选的人工无机物质是羟基磷灰石，例如人工骨的内部用金属材料，外侧用羟基磷灰石。癌性骨组织移除后也可用本蛋白质促进骨重建，另外也可用于软骨移植。

施用的剂量要取决于影响本蛋白质作用的各种因素，例如要考虑到骨/软骨重建所形成的重量，骨/软骨损伤的部位以及病情，患者的年龄、性别、感染的严重程度，用药时间及其它临床因素，由临床医师确定其施用剂量。另外，要根据再构建时与本蛋白质一起应用的载体类型而改变其用量。通常情况下，当施用含有载体的组合物时，每份所希望的骨/软骨湿重所对应的剂量范围为 10^{-10} - 10^{-6} ng，局部及全身注射应用时，每人优选的剂量为 0.1 - 10^4 mg，频率为每周一次到每天 1 次。

期望与已知的生长因子，如用于骨/软骨再生的胰岛素样生长因子 - I (IGF-I) 一起应用能产生协同效果。

至今没有报道以工业规模、纯化形式制备本发明蛋白质的方法，因为本发明的蛋白质有形成软骨/骨的作用，所以可用作软骨、骨疾病的药剂。此外本发明的制备方法可用于制备上述 TGF- β 基因超家族的骨形成因子，目前为止只能用哺乳动物细胞系来制备。

附图简述

图 1 是实施例 1 (2) 中本发明蛋白质表达载体 (pKOT245) 的质粒图。

图 2 是实施例 4 (1) 中小鼠大腿肌肉中诱导形成的骨/软骨钙化组织的软 X 线片。

图 3 是实施例 4 (1) 中小鼠大腿肌肉中形成的骨/软骨钙化组织非脱钙切片组织染色的显微镜下观察的照片。

图 4 是实施例 4 (2) 组织染色的显微镜下的照片，它表示小鼠大腿肌肉内软骨/骨形成随时间的变化。

图 5 是实施例 4 (3) 中大鼠顶骨脱钙切片组织染色后显微镜下的照片。

图 6 是实施例 4 (4) 中家兔含关节软骨的股骨头部脱钙组织切片组织染色的显微镜照片。

5 图 7 是实施例 4 (5) 中股骨形成骨缺损的大鼠大腿部的软 X 线片。

本发明的最佳实施方案

下面举例来具体说明本发明的效果。但是这些实施例并不是对本发明进行限制。

实施例 1 载体的制备

(1) 变异型 MP52 成熟区的分离

以包含有 WO93/16099 中所述 cDNA 的质粒载体 (pSK52s) 作模板 DNA, 用聚合酶链式反应 (PCR) 来扩增人 MP52 cDNA 的成熟区。

依照增强目的基因生产能力的方法 {M. Nobuhara 等报道(农业生物化学, 52(6), 1331-1338, (1988)}, 替换成熟型 MP52 基因的部分 DNA, 以提高起始密码子 ATG 周围 AT 的含量。

20 替换经 PCR 法进行, 采用序列号 2 上游的 PCR 引物。所应用 PCR 引物的 DNA 序列是, 序列号 2 为上游引物, 序列号 3 为下游引物。

PCR 这样进行, 同一试管中加入模板 DNA (10ng)、上游及下游 PCR 引物各 50 皮摩尔、dNTP (0.2mmol) 及 MgCl₂ (1.5mmol), 同 Taq DNA 聚合酶 (5U) 一起加入。

25 PCR 进行 30 个循环, 每一循环均经过变性 (94 °C, 1 分钟)、引物退火 (55 °C, 1 分钟) 及引物延伸 (72 °C, 2 分钟) (以下的 PCR 均在这一条件下进行)。

所得 PCR 反应产物经 1.5 % 低融点琼脂 (FMC) 电泳进行分离, 分离出与序列号 1 的氨基酸相等约 360 bp 的 DNA (这为片段 1)。

(2) 本发明蛋白质的大肠杆菌表达载体的构建

30 为了增加质粒的复制数目, 把复制起始点由 pBR 系改为 pUC 系。用限制性内切酶 SspI 和 EcoRI 消化市场中买到的大肠杆菌表达载体 pKK223-3 (购自 Pharmacia Biotech), 分离到 tac 启动子区域, 经 Mung

菜豆核酸酶处理后，用 T₄ DNA 连接酶（宝酒造公司，目录号 2011A）连接到片段 1 的起始密码子侧，用限制性内切酶 SalI 和 SspI 消化 pKK223-3，分离到 rrnBT₁T₂ 终止区域，连接到经 SalI 消化了的片段 1 的终止密码子侧，然后连接到 pUC18 的 SmaI 部位，构成生产本发明蛋白质的表达载体 {pKOT245(登记号为微工研寄第 P-14895 号)}(图 1)。
5 pKOT245 的 DNA 长度为 3.7 kb。用 Pharmacia ALP DNA 测序仪分析本发明蛋白质的表达载体的碱基序列。

(3) 转化

10 依照 Kushner 等的氯化铷法（基因工程, p17, Elsevier (1978)）进行转化，即依照上述方法将 pKOT245 转化到宿主大肠杆菌 W3110M，形成制备本发明蛋白质的大肠杆菌。

实施例 2 培养

(1) 培养

15 在调整了的 SOC 培养基（Bacto 胰蛋白胨 20g/L，细菌培养用酵母提取物 5g/L，NaCl 0.5g/L，MgCl₂·6H₂O 2.03g/l，葡萄糖 3.6g/l）中预培养表达本发明蛋白质的大肠杆菌，把 100ml 细菌悬液加到 5L 生产培养基中（细菌培养用胰蛋白胨 5g/l，柠檬酸 4.3g/l，K₂HPO₄ 4.675g/l，KH₂PO₄ 1.275g/l，NaCl 0.865g/l，FeSO₄·7H₂O 100mg/l，CuSO₄·5H₂O 1mg/l，
20 MnSO₄·2H₂O 0.5mg/l，CaCl₂·2H₂O 2mg/l，Na₂B₄O₇·10H₂O 0.225mg/l，(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.1mg/l，ZnSO₄·7H₂O 2.25mg/l，CoCl₂·6H₂O 6mg/l，MgSO₄·7H₂O 2.2g/l，硫胺 HCl 5.0mg/l，葡萄糖 3g/l），在 10L 的培养罐中进行通气搅拌培养，在到达对数生长前期（OD₅₅₀ = 5.0）时，添加 1mM 的异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷，一直培养到 OD₅₅₀ 为 150。
25 培养过程中，温度为 32℃，加氨调 pH 值为 7.15，为了防止溶解的氧浓度降低，搅拌速度增加到使溶解的氧浓度达到空气饱和的 50%。为了获得高浓度的细菌，可以溶解氧浓度的急速上升为指标，添加 50% 的葡萄糖溶液，达到 0.2%。

(2) 大肠杆菌包涵体的制备

30 把由上述方法得到的培养液离心，收集菌体，然后悬浮到含 10mM 乙二胺四乙酸的 25mM Tris-HCl 缓冲液中（pH7.3），在云浆器中（Gaulin 公司），破坏细菌，再次离心，收集含有包涵体的沉淀。

实施例 3 纯化

(1) 大肠杆菌包涵体的溶化

在 1% Triton X-100 中洗涤 3 次后, 把大肠杆菌包涵体在 4℃、3000×g 离心 30 分钟, 所得沉淀在 20mM Tris-HCl 缓冲液: pH8.3, 8M 尿素, 10mM DTT, 1mM EDTA 中, 经超声波溶解。

(2) 单体的制备

溶解液在 4℃、20000×g 条件下离心 30 分钟, 收集上清液。把得上清液通过经 20mM Tris-HCl 缓冲液、pH8.3, 6M 尿素, 1mM EDTA 平衡过的 SP-Sepharose FF (Pharmacia 公司), 用相同的溶液洗涤, 用含有 0.5M 食盐的相同溶液进行洗脱。在洗脱液中添加 Na₂SO₃ 和 Na₂S₄O₆ 直到各自的终浓度达到 111mM、13mM, 在 4℃进行磺酸化 15 个小时。用 20mM Tris-HCl 缓冲液、pH8.3, 6M 尿素, 0.2M NaCl, 1mM EDTA 平衡过的 Sephacryl S-200 HR (Pharmacia 公司) 对磺酸化溶液进行凝胶过滤, 可得到本发明蛋白质单一磺酸化的单体。

(3) 再折叠

本发明蛋白质的磺酸化单体溶液中加入 9 倍的 pH9.8 的 50mM Na-甘氨酸缓冲液、0.2M NaCl、16mM CHAPS、5mM EDTA、2mM GSH (还原型谷胱甘肽)、1mM GSSG (氧化型谷胱甘肽) 后, 4℃搅拌进行再生 24 小时。

(4) 二聚体的制备

用纯净水将再折叠溶液进行 2 倍稀释, 加 6N 盐酸调 pH 为 7.4 进行等电点沉淀。3000×g 离心 20 分钟收集沉淀, 然后在 30% 乙腈、0.1% TFA 中溶解。用纯水将所得溶液进行 2 倍稀释, 然后在经 0.05% TFA、25% 乙腈平衡过的反相 HPLC 的 RESOURCE PRC 柱 (Pharmacia) 上加样, 然后用 0.05% TFA、25 - 45% 乙腈形成的梯度液进行洗脱。在吸光光度计的 280nm 波长处测定洗脱液的吸光度, 可得到纯化的蛋白质二聚体级分。用 Speed Vac Concentrator (Serrant 公司) 对此进行冷冻干燥。

(5) 测定本发明纯化蛋白质的物理化学性质

(A) N 末端氨基酸序列的分析

用 476A 型氨基酸测序仪 (Applied Biosystems 公司) 来分析上述纯化蛋白质的 N 末端氨基酸序列, 能证实序列表中序列号 1 从 N 末端

到第 30 个氨基酸的序列。

(B) 氨基酸组成的分析

用氨基酸分析仪[PICO TAG 系统 (Waters 公司)]来分析上述纯化蛋白质的氨基酸组成, 其结果如表 1 所示。表 1 所示的数目指每一单体蛋白质的氨基酸残基数。

表 1

氨基酸	实际值	期望值
Asx	11.5	12
Glx	10.9	11
Ser	8.4	9
Gly	4.3	4
His	4.0	4
Arg	7.7	7
Thr	5.4	6
Ala	7.3	7
Pro	10.2	10
Tyr	2.9	3
Val	5.7	7
Met	5.1	4
1/2Cys	2.6	7
Ile	4.9	6
Leu	10.0	10
Phe	4.0	4
Lys	5.9	6
Trp	-	2
序列长度		119

-: 未检出

10 (C) 电泳分析

非还原条件下经 SDS-PAGE 确定, 上述纯化蛋白质的分子量为 28KDa。



由上述 (A)、(B)、(C) 所显示的结果可知, 本发明的蛋白质是由从单个脯氨酸开始的 119 个氨基酸残基组成的蛋白质。

实施例 4 生物学活性的测定

5 (1) 异位软骨/骨组织形成的作用

把实施例 3 得到的 500 μ g 蛋白质溶解在 50 μ l 10mM 盐酸中, 用同一溶剂稀释, 制成浓度为 1 μ g/10 μ l, 10 μ g/10 μ l, 100 μ g/10 μ l 的溶液。每 10 μ l 与 150 μ l 来源于猪腱的 I 型胶原溶液 (高研, 0.5%, pH3, I-AC) 混和, 中和后冷冻干燥, 把所得混合物埋入 8 周龄 ICR 雄性小鼠的大腿肌肉内, 21 天后摘取大腿, 剥离皮肤, 根据软 X 线片检测骨/软骨钙化组织的发生率。结果如表 2 所示。用量为 1 μ g/部位以上时可发现部分钙化, 剂量为 10 μ g/部位以上时所有的小鼠均可出现钙化。

表 2

15

MP52 蛋白质的用量	骨/软骨钙化组织的发生率
对照 (只用 I 型胶型)	0/4
1 μ g/部位	3/4
10 μ g/部位	4/4
100 μ g/部位	4/4

*每组有 4 例, 根据对骨/软骨钙化组织的软 X 线片进行分析的结果来表示发生率

20 另外, 图 2 表明了各个用量时所诱导的骨/软骨钙化组织的典型软 X 线片。图 2 显示了把不同用量的 MP52 蛋白质埋入小鼠大腿肌肉内的结果, 其中 A 应用的 MP52 蛋白质为 1 μ g/部位, B 为 10 μ g/部位, C 为 100 μ g/部位。从这一结果可看出骨/软骨钙化组织呈剂量依赖性地增加。这些小鼠的大腿经固定后制成非脱钙切片, 各自进行了 Von Kossa 染色、Alcian blue 染色和 (苏木精伊红) 染色。

25 图 3 为蛋白质用量为 10 μ g/部位时与 I 型胶原一起埋入后所取标本组织染色的显微镜照片。图 3 中 A、B、C 分别表示 Von Kossa 染色、Alcian blue 染色及 (苏木精伊红) 染色。

图 3 (A) 中箭头 ct 部分表示钙化组织, cc 部分表示钙化的软骨细胞。图 3 (B) 中箭头 rc 部分表示残存的软骨组织。图 3 (C) 中箭头 ad 部分表示脂肪细胞, bm 部分为骨髓细胞, 1b 部分为板层骨, ob 部分为成骨细胞, wb 为网状骨。图 3 表明施用 MP52 蛋白质可生成成骨细胞, 骨髓细胞、钙化软骨细胞, 也可形成骨/软骨钙化组织。

实施例 4 的结果可证明本发明蛋白质的二聚体有诱导软骨/骨形成的作用。

(2) 异位骨化作用的时相分析

把从实施例 3 中所得的 3 μ g 蛋白质按实施例 4 (1) 中所述的同一方法进行制备, 把所得冷冻干燥物埋入 ICR 小鼠的大腿肌肉中, 3、7、10、14、21 及 28 日后取出组织, 用 10 % 的福尔马林进行固定, 之后对组织切片进行苏木精伊红染色 (HE) 及 Von Kossa 染色。图 4 表示染色切片的光学显微镜照片。

第 3 天 (图 4A、HE) 可看到埋入的胶原纤维 (co) 与周围的肌肉组织 (m) 之间出现未分化的间质细胞 (mc), 它包含有形态学上结合的纤维细胞。从第 7 天 (图 4B, HE) 到第 10 天 (图 4C、HE) 可看到该部位的未分化间质细胞 (mc) 堆积、增殖, 并且这些细胞肥大化, 分化成前软骨样组织, 第 14 日 (图 4D、HE; 图 4E、Von Kossa) 可看到钙化的软骨组织 (箭头 cc) 及骨组织 (箭头 b)。第 21 日 (图 4F、HE; 图 4G、Von Kossa) 可看到骨髓细胞 (箭头 bm), 但根本看不到第 14 天所观察到的钙化软骨组织, 好象被骨组织 (箭头 b) 所取代。第 28 天 (图 4H、HE) 可看到广泛的骨髓细胞 (bm), 所形成的骨组织 (b) 好象处于吸收过程。

如用常规 BMPs 所证实的那样, 由此可以证明 rMP52 能在异位诱导软骨组织, 继而能引起软骨内骨形成。

(3) 对膜内骨化的影响

在含有 0.01 % 人血清白蛋白的生理磷酸盐缓冲液 (pH3.4) 中溶解实施例 3 中得到的蛋白质, 配成 0.01 μ g/20 μ l、0.1 μ g/20 μ l 及 1 μ g/20 μ l 的溶液, 每种溶液取 20 μ l, 用微量注射器注射到スプラダド-レ-系大鼠左右顶骨一侧的骨膜中, 从大鼠出生后第 1 天开始注射, 一天一次, 连续在同一部位注射 12 天。在对侧顶骨骨膜内注射等量的溶剂。给对照组大鼠的两侧顶骨骨膜内注射溶剂。最后一次施用后摘出左右顶

骨，固定，施用部位经脱钙后 HE 染色制作标本，测定显微镜照片上左右顶骨施用部位的厚度，计算同一个体施用本发明蛋白质部位的厚度与施用溶剂部位厚度的比例。结果如表 3 所示。图 5 是连续注射本发明蛋白质 0.1 μ g/20 μ l 时组织切片的光学显微镜照片，（图 5B）与对侧施用溶剂时的光学显微镜照片（图 5A）进行比较的实施例。施用本发明的蛋白质可诱导骨膜细胞（P）的活化及增殖，同时在顶骨和骨膜（P）的交界处可发现许多活化的成骨细胞，并且可证实施用部位顶骨（b）的厚度呈剂量依赖性地增厚。结果提示当局部少量注射时，本发明的蛋白质可促进膜骨化，有利于骨质疏松、骨折、牙槽、牙根缺损的治疗。

10

表 3

本发明蛋白质的用量 (μ g/部位/日)	施用部位的顶骨厚度(μ m)		厚度比 (B/A)
	施用溶剂(A)	施用本发明的蛋白质(B)	
0(溶媒)	128 \pm 7	141 \pm 20	1.10 \pm 0.16
0.01	134 \pm 9	167 \pm 30	1.27 \pm 0.33
0.1	119 \pm 19	190 \pm 29	1.60 \pm 0.10*
1	132 \pm 9	225 \pm 25	1.70 \pm 0.14**

顶骨厚度及其比值 4 例的均值 \pm 标准差

*p<0.05、** p<0.01 与左右顶骨施用溶剂组相比

15

(4) 对关节软骨再生的效果

把 6 只 12 周龄雄性家兔（新西兰白兔）的右侧膝部皮肤和关节囊切开，露出髌骨沟同时避免损伤腱，用牙科钻钻一直径 5mm 的骨髓腔，造成贯通的关节软骨/骨损伤。按实施例 4（1）描述的方法制备含有或不含有实施例 3 得到的 10 μ g 蛋白质的 I 型胶原冷冻干燥物，然后施用给造成缺损的部位，平均施用 3 例，缝合关节囊及皮肤。3 周后摘出大腿的股骨头，固定，然后脱钙制作组织切片，进行爱茜蓝染色。图 6 是 1 例典型的光学显微镜照片。只施用 I 型胶原冷冻干燥物时（图 A 和图 B）在缺损部位只见到纤维组织（f），而施用了含本发明实施例 3 蛋白质 10 μ g 的 I 型胶原蛋白后（图 C 和图 D）可看到在缺损部位伴随爱茜蓝染色阳性的细胞外基质有软骨细胞（ch）形成。并且它所形成

25



的组织与正常关节软骨组织观察到的细胞构成相似，由缺损部位从外到内为静止细胞层、增殖细胞层、肥大细胞层。这些结果在每只家兔中均可看到，这表明本发明的蛋白质对软骨再生，尤其是对变形性关节炎或骨关节炎引起的关节软骨变性组织恢复为正常组织有效。

5 (5) 对骨折/骨缺损的治愈效果

用 30 只スプラダド・レ 系雄性大鼠(约 15 周龄)做本实验把大腿部的皮肤组织切开，从周围的肌肉组织中把股骨暴露出来，用牙科钻在股骨骨干中央作成 5mm 的圆柱状骨缺损，然后用不锈钢制做的螺丝将残留的股骨两端固定在聚乙烯制成的板上。制做 I 型胶原的冷冻干燥物品，含有实施例 3 蛋白质的量为 0，1，10 或 100 μ g，然后埋入骨缺损部位，缝合皮肤组织。刚埋入后和埋入 12 周以后进行软 X 线照片，结果如图 7 所示。图 7A 为刚造成骨缺损时的照片。如图 B - E 所示，单独埋入 I 型胶原(图 7B)以及埋入含本发明蛋白质 1 μ g 的 I 型胶原(图 7C) 12 周后，在缺损部位的两端仅看到若干边缘的骨内膜(箭头 cs)形成而没有形成骨愈合。但是埋入含蛋白质 10 μ g 或 100 μ g 的 I 型胶原后(图 D 和图 E)可见到骨缺损部位全部形成骨痂(箭头 cs)，X 线片上可见到骨愈合。埋入 12 周后摘出股骨，移去聚乙二醇制做的板，根据二重 X 线吸收测量学(Aloka, DCS-600)在 1mm 宽的扫描状态下，沿着与含有骨缺损部股骨长轴方向垂直的方向连续扫描 15mm，测定骨缺损中央部位 3mm 处的骨矿物质含量，同时用树脂固定骨两端，装入骨强度测量仪(Malto, MZ-5000)，以 180°/分的速度旋转树脂，测定破坏股骨所必要的最大旋转力度(表 4)。结果显示，本发明的蛋白质埋入股骨缺损部位可剂量依赖性地增加该部位的骨矿物质含量并且可提高该部位的骨强度(旋转度)，同样这可以表明本发明的蛋白质对骨折的愈合及骨缺损的重建有效。

表 4

本发明蛋白质的 用量 (μg/部位)	大鼠股骨骨缺损部位 的矿物质含量(mg)	最大耐力 (kgf·cm)	例数
只用胶原	120.2±24.5	2.92±0.09	6
1	176.9±36.4	6.24±1.00	8
10	277.4±63.9	9.35±3.14	8
100	374.8±67.1*	40.34±7.64*	8

以均值±标准误表示

*p<0.05 与只用胶原组相比

5

产业上利用的可能性

由含有序列表序号 1 中氨基酸序列的蛋白质的二聚体构成的蛋白质具有形成软骨/骨活性，有利于作为软骨/骨疾病的治疗药剂。此外，改变本发明蛋白质的表达载体，用它转化的大肠杆菌，通过基因工程的方法利用这种大肠杆菌可以工业规模制备纯化形式的蛋白质。

10

15

20

25



序列特征: MP52 成熟型的下游 PCR 引物

序列:

CGTCGACTAC CTGCAGCCAC ACGACT 26

5

说明书附图

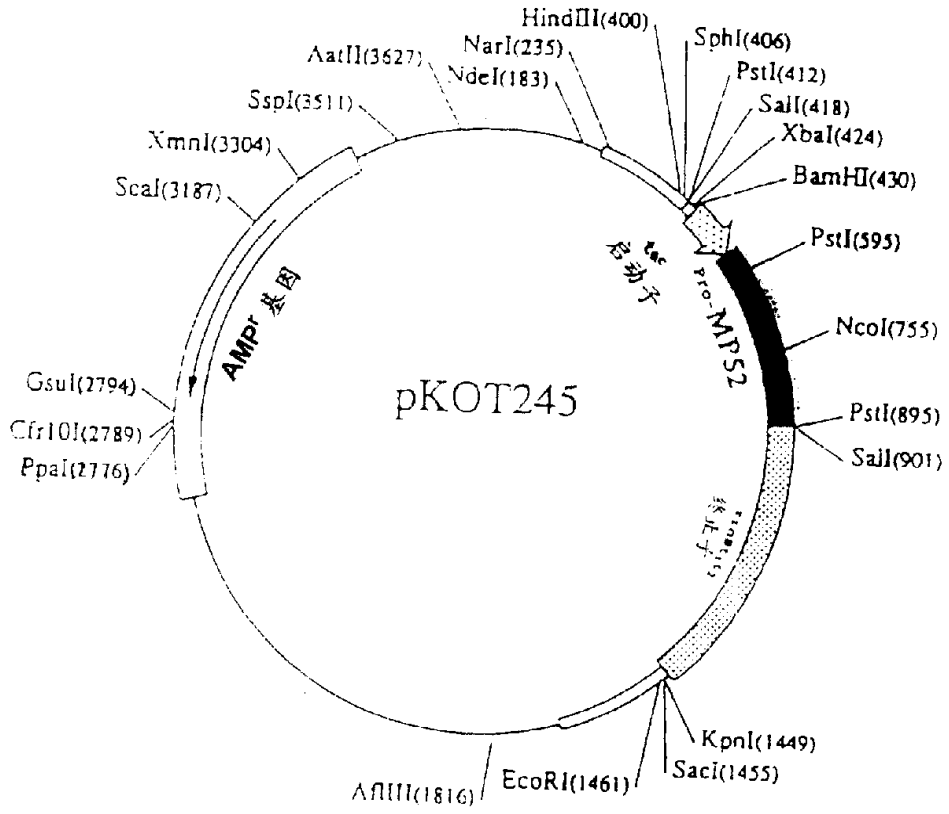


图 1



图 2

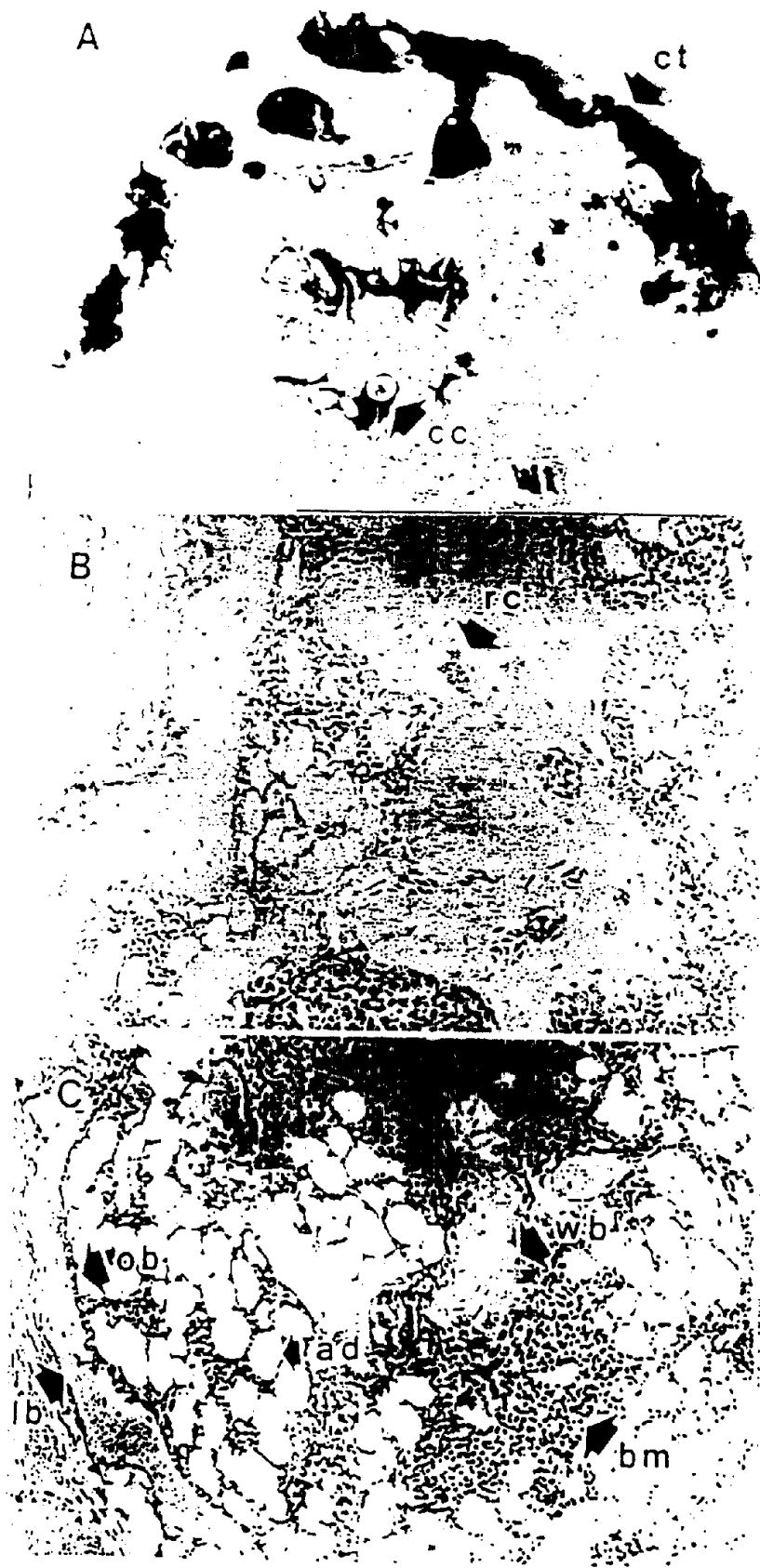


图 3

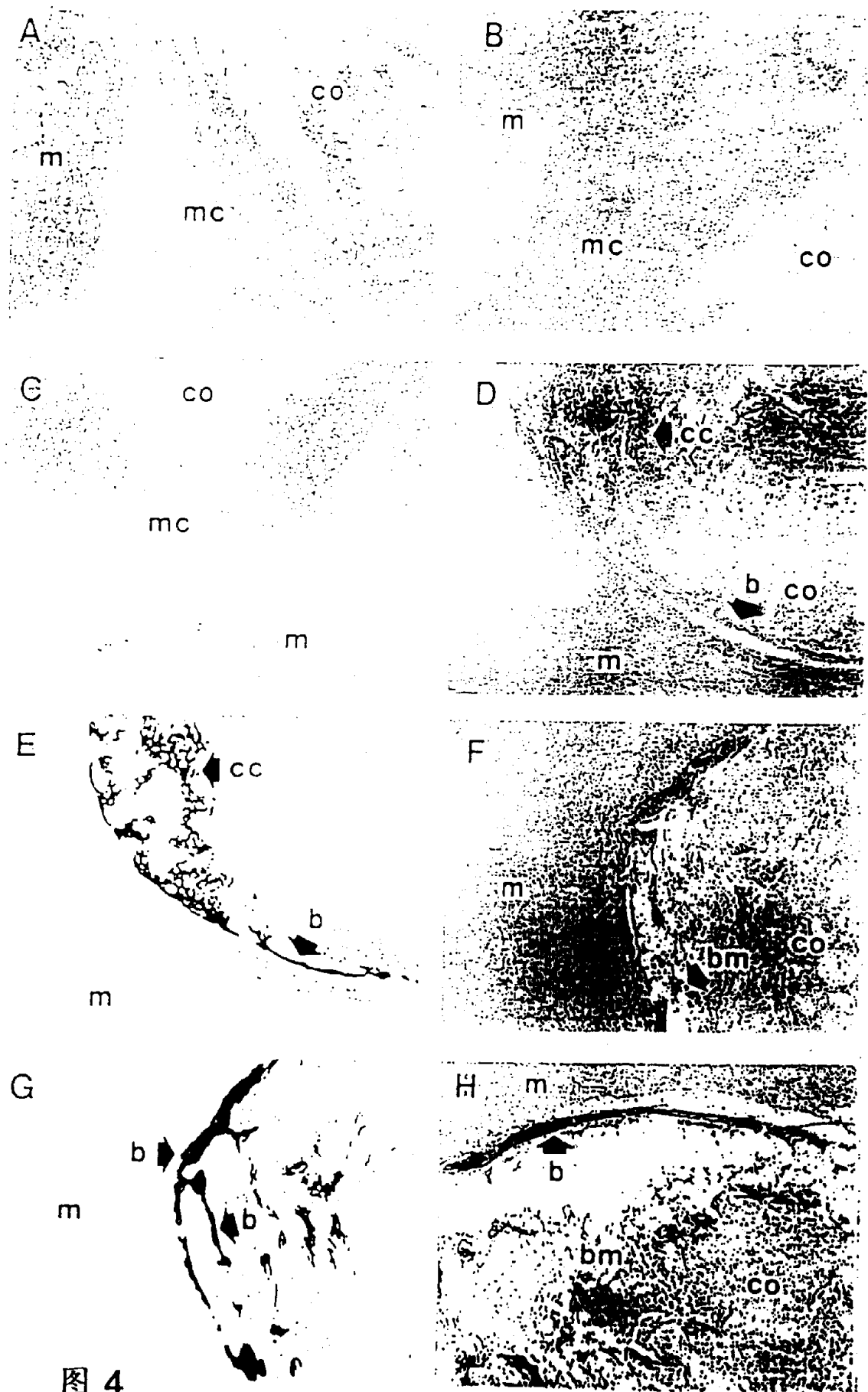


图 4

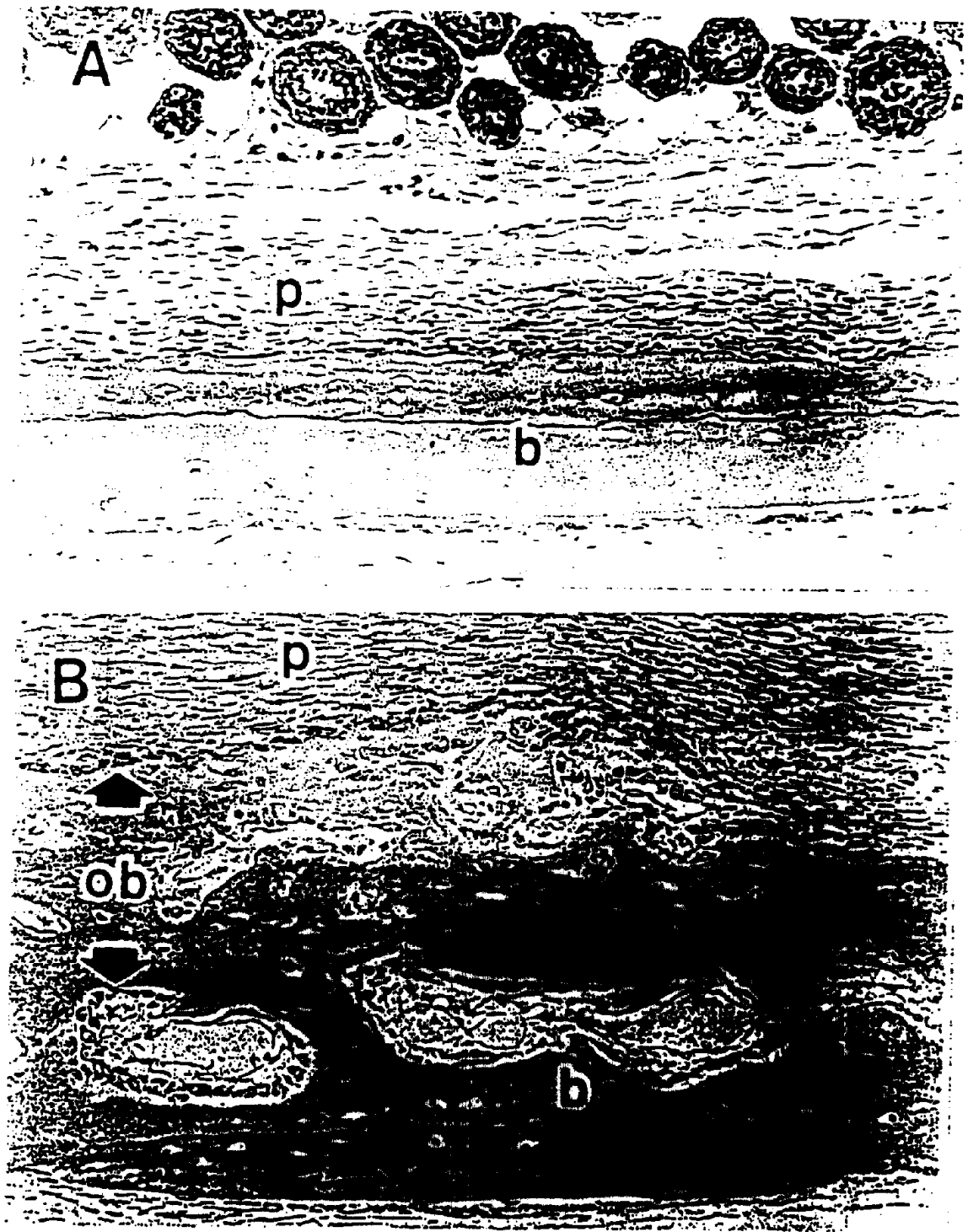


图 5

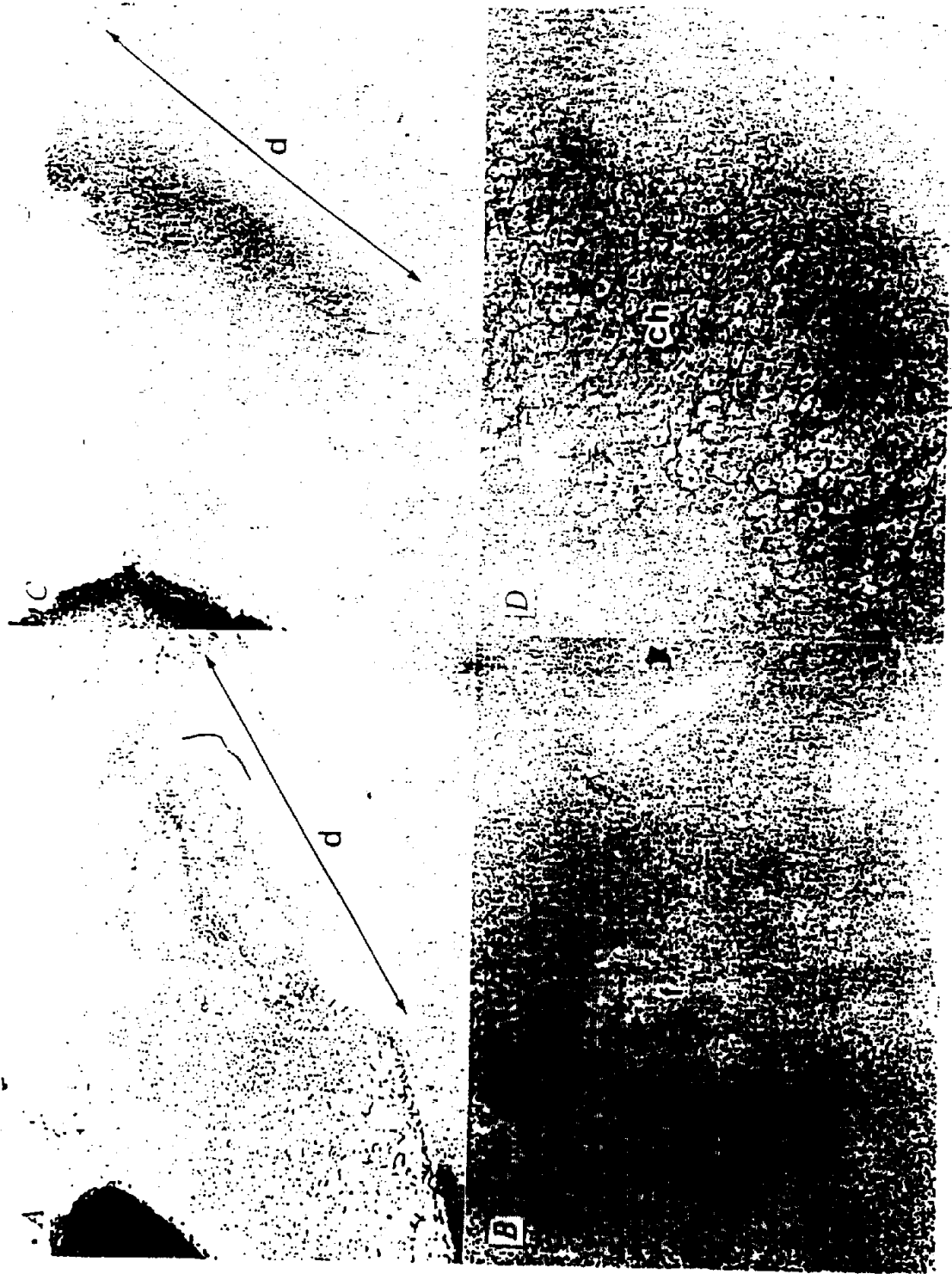


图 6

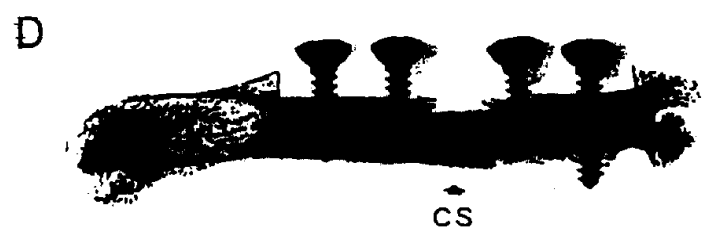


图 7