

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6920196号
(P6920196)

(45) 発行日 令和3年8月18日 (2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年7月28日 (2021.7.28)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/485	(2006.01)	A 6 1 K 31/485
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34

請求項の数 12 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-515009 (P2017-515009)
(86) (22) 出願日	平成27年5月28日 (2015.5.28)
(65) 公表番号	特表2017-518369 (P2017-518369A)
(43) 公表日	平成29年7月6日 (2017.7.6)
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/032820
(87) 国際公開番号	W02015/184059
(87) 国際公開日	平成27年12月3日 (2015.12.3)
審査請求日	平成30年5月24日 (2018.5.24)
審判番号	不服2020-2306 (P2020-2306/J1)
審判請求日	令和2年2月20日 (2020.2.20)
(31) 優先権主張番号	62/005,359
(32) 優先日	平成26年5月30日 (2014.5.30)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者	508095256
	ザ リサーチ ファウンデーション フォー ザ ステイト ユニバーシティ オブ ニューヨーク アメリカ合衆国 12207 ニューヨー ク州, アルバニー, ステイト ストリート 35
(74) 代理人	100127926
	弁理士 結田 純次
(74) 代理人	100140132
	弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨形成を促進するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

損傷部位または手術介入部位で骨形成を促進するまたは骨破壊を低減するための医薬組成物であって、骨形成を促進するまたは骨破壊を低減するのに有効な O G F R アンタゴニストを含み、ここで、O G F R アンタゴニストは、ナロキソン、ナルトレキソン、ナロルフィン、ナロキソナジン、レバロルファン、ナルメフェン、シプロジウム、シクロルファン、シクラゾシン、オキシロルファン、L Y 1 1 3 8 7 8、M R 2 2 6 6、ジプレノルフィン、W I N 4 4, 4 4 1 - 3、ナルトリンドールおよびノルピナルトルフィミン、それらの塩、またはそれらの組合せから選択されるオキシモルフォン誘導体であって、ここで、前記医薬組成物は損傷部位または手術介入部位に局所投与される、前記医薬組成物。

10

【請求項 2】

O G F R アンタゴニストは、ナロキソン、ナルトレキソン、それらの塩、またはそれらの組合せであって、担体と共に投与される、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記担体は、コラーゲンスポンジ、粉末状コラーゲン、またはコラーゲンベースのゼラチンハイドロゲルの形態のコラーゲンベースの担体である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

担体はアルブミンベースの担体である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

20

担体は親水性ハイドロゲルベースの担体である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

担体は手術用インプラントまたは手術用インプラント送達システムである、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

担体は β 型リン酸三カルシウム、セメント、または無機質除去した骨マトリックスで構成される、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

担体は P G A / P L G A 球体で構成される、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

O G F R アнтаゴニストは、ナロキソン、ナルトレキソン、それらの塩、またはそれらの組合せであって、骨の形成または成長を促進するための少なくとも 1 つの他の活性剤と組合せて投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

損傷は骨折を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記手術介入は、骨折の手術修復、脊椎癒合において骨を生成するための手術手順、および整形外科用インプラントまたはハードウェアと隣接骨の一体化を促進するための手術手順から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

O G F R アнтаゴニストは、ナロキソン、ナルトレキソン、それらの塩、またはそれらの組合せである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によってその全容が本明細書に組み入れられる 2014 年 5 月 30 日に
出願された米国仮出願第 62 / 005 , 359 号の優先権を主張するものである。

【0002】

配列表の参照による組み入れ

2015 年 5 月 11 日に作製され E F S - W e b 経由で米国特許商標庁に提出された、
2 K B の 3 0 8 7 8 _ S E Q . t x t という名称の A S C I I テキストファイル形式での
配列表は、参照によって本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

骨の形成と分解は、骨形成を担う骨芽細胞と骨再吸収を担う破骨細胞の間の、増殖因子
シグナル伝達によって厳密に制御される。骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による分解の
連動は、連動膨張因子として同定された増殖因子の一覧と共に近年高度な研究の主題とな
っている。骨形成と骨再吸収の連動には、その各々の先代細胞の動員と平行して骨芽細胞
と破骨細胞の動員が必要である。骨芽細胞は間葉系幹細胞 (M S C) に由来し、一方で破
骨細胞は骨髄系統の一部である単球に由来するが、しかしながら、どのようにして M S C
または単球が、それらの骨髄中ニッチから新骨形成部位に移動するかは依然知られていな
い。骨形成の空間的および時間的制御に関する現在の理解は、M S C はそれらの骨髄中ニ
ッチから骨内膜表面に移動し、そこで M S C が新骨を生成する骨芽細胞に分化すること
を示す。平行して、単球もそれらの骨髄中ニッチから骨内膜表面に移動し、そこでそれら
は、骨再吸収する破骨細胞に後に分化する。骨形成を制御することが知られている増殖因子
には、T G F β - 、B M P - 、および標準的 W n t - リガンドがある。単球系前駆細胞か
らの破骨細胞形成と骨再吸収は、M S C F 、O P G および R A N K - リガンドの発現を介
して制御される。平行して、破骨細胞活性も T G F β - 、B M P - 、および非標準的 W n
t - リガンドの発現によって制御される。しかしながら、T G F β - 、B M P - 、および

10

20

30

40

50

Wnt - リガンドを含めた組織パターン形成に関与する多くの発生増殖因子は、骨の形成と再吸収を促進する。健康な骨の維持には、骨が連続的に作られ破壊される一定した再形成が必要である。

【 0 0 0 4 】

骨へのインプラントの導入は、骨髄系統に由来し骨またはインプラント材料の分解に貢献できるマクロファージの活性によって部分的に仲介される炎症促進応答を誘導する、生化学的カスケード反応をもたらす。現在、インプラントおよびインプラント材料は、最適に骨伝導し最大の骨 - インプラント一体化を促進しながら、マクロファージ応答を最小にするように選択されている。あるいは、自己移植片とインプラントの導入または失活骨組織移植片（自己移植片）の使用が、骨一体化を増すための手段としてインプラントの材料性と共に利用されているが、しかしながら、これらの手法には問題があることが多かった。材料は自己編制的と自己構築的の両方であるように設計されることが理想的である。

10

【 0 0 0 5 】

整形外科的外傷手術手順中または通常の脊椎癒合手順中に利用されるアジュバント療法手法としての骨作製は、整形外科手術における継続的課題である。具体的には、これらのアジュバント骨作製療法は、骨の治癒時間の短縮と平行して、手術介入部位での健康な骨の成長を増進しようと努める。最近数十年で、骨形成タンパク質（BMP）を含めた骨形成能力がある様々な増殖因子を使用する幾つかの試みが行われている。残念ながら、骨作製を目的とするBMPベースの療法には、患者、特にX線照射療法を受けるまたは新生末検出腫瘍を有する可能性がある患者における腫瘍形成のリスクもある。さらに、BMPベースの療法は進行性腫瘍を有する患者では使用できず、これらの患者が手術介入中に骨形成を増進する療法から大いに恩恵を被る可能性があるため、このことは非常に残念である。

20

【 0 0 0 6 】

骨折障害治癒は、整形外科手術および骨治癒において重大な課題を示し続けている。5 ~ 20 %もの高い骨折後偽関節率が報告されている。偽関節を発症した患者の治療に関連する罹患とコストは相当なものになる可能性がある。毎年発生する620万の骨折の約10 %には治癒難点がある。骨治癒の促進を手助けするための様々な選択肢が存在するが、有効性は証明されていない。腸骨稜の移植骨片が依然としてゴールドスタンダードであると考えられているが、採取部位の同時罹患に関して重大な問題がある。血小板由来増殖因子（PDGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）および副甲状腺ホルモン（PTH）を含めた増殖因子ベースの療法は細胞培養試験において初期の成功を示しているが、しかしながら、それらの有効性は臨床用途において依然証明されていない。骨形成タンパク質 - 2（BMP2）およびBMP7などの他の選択肢が、骨幹骨折を伴う骨折治癒の促進において成功があったことが示されている。しかしながら、感染増加、腫瘍増殖のリスクの増大、および局所骨溶解のリスクの増大を含むBMPの使用に関連したリスクが存在する。BMPを含む治療剤に関連した多くのリスクは、他の病状を有する患者のためのBMPの使用も妨げる。

30

【 0 0 0 7 】

脊椎癒合、骨折治癒および骨折後偽関節の管理などの複雑な整形外科的問題を処理する場合、腫瘍増殖の可能性を増大させずに整形外科手術中のアジュバント療法として骨形成を増大する療法能力は現在、市販の生物学的製剤の限界である。

40

【 0 0 0 8 】

整形外科的外傷手術の分野では、特に大欠陥および偽関節がある開放骨折では、自己 / 同種異系移植骨片が主な治療の選択肢である。しかしながら、骨形成を達成するためのゴールドスタンダードとして使用される自己採取移植骨片には、感染およびドナー部位疼痛のリスクがある。他の同種異系移植骨片の代替物は、単独で使用したとき乏しい治癒を示している。これらの移植骨片の選択肢を使用して癒合を達成するとき、脊椎手術に関して同じ制約がある。

【 0 0 0 9 】

50

供給死体由来の皮質骨と海綿骨は、空間を充填するのに役立ち、重要な骨誘導能力を失わずに主として骨伝導性である。したがって、PDGF、VEGFおよびBMPなどの生物学的製剤は治癒または脊椎癒合の速度を増大させるために使用され、それらの適用は治療のコストに加算される。しかしながら、これらの生物学的製剤療法は、固有の容認できない腫瘍リスクを示す一定範囲の細胞表現型における発生中の増殖を刺激する。

【0010】

無機質除去した骨マトリックスおよびリン酸カルシウム代替物は骨治癒促進において高い有効性は示しておらず、さらに製造コストのためにそれに伴う相当なコストがある。

【0011】

組換えBMP2 (rhBMP2) は、小型 (15 mg / cm³ インプラントで4.2 mgのBMP2および2×コラーゲンスポンジ)、中型 (15 mg / cm³ インプラントで8.4 mgのBMP2および4×コラーゲンスポンジ)、大型 (15 mg / cm³ インプラントで12 mgのBMP2および6×コラーゲンスポンジ)、および大型-II (15 mg / cm³ インプラントで12 mgのBMP2および1×コラーゲンスポンジ) で流通販売されINFUSEとして知られる、Medtronicによって開発された市販のインプラントである。全サイズのINFUSEインプラントが脊椎および上顎顔面用途に認められており、一方で大型-IIインプラントのみが骨折用に認められている。INFUSEインプラントは、滅菌生理食塩水で粉末状BMP2を戻し、次いでBMP2-生理食塩水溶液をコラーゲンスポンジに加えることによって投与し、その後インプラントは手術介入中に局所に送達される。

【0012】

組換えBMP7 (rhBMP7またはOP1) は、OP1として知られ現在Olympusによって所有される、Strykerによって開発された市販のインプラントである。OP1インプラントは、OP1-パテ (粉末状ウシ軟骨および3.3 mgのBMP7を含有する20 mL) またはOP1-インプラント (1 gの粉末状ウシ軟骨および3.3 mgのBMP7) として流通販売されている。OP1-パテは脊椎癒合手術用に認められており、一方OP1-インプラントは骨折治療および骨折後偽関節手術用に認められている。OP1-パテまたはOP1-インプラントは、最初に滅菌生理食塩水で粉末状BMP7を戻し、次いでBMP7-生理食塩水溶液をコラーゲンインプラントに加えることによって投与し、その後インプラントは手術介入中に局所に送達される。

【0013】

オピオイド増殖因子受容体 (OGFRまたは ξ -オピオイド受容体) は、標準的 μ -、 κ -および δ -オピオイド受容体 (それぞれOPRM、OPRKおよびOPRD) と構造相同性を共有しておらず、標準的オピオイド受容体より低い効率で天然オピオイドリガンドと結合する、非標準的な核周囲のオピオイド受容体である。オピオイド増殖因子 (OGFまたはmet-5エンケファリン; met5) はOGFRの天然リガンドである。Met5はプロホルモンであるプロエンケファリン (PENK)、および低い程度でプロオピオメラノコルチン (POMC) に由来し、これらは最初にプロホルモン転換酵素 (PCSK1およびPCSK2) 次いでカルボキシペプチダーゼEまたはD (CPEまたはCPD、エンケファリン転換酵素) により還元されてmet5-エンケファリンの5コピーを形成する。以前の研究は骨芽細胞と先代骨細胞におけるmet5の発現を確認した (非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4)。さらに、Kuisらは末梢血および脾臓の単球におけるmet5を確認した (非特許文献5)。それにもかかわらず、これらの研究者達は、骨髄系統の間葉細胞におけるOGFRシグナル伝達に関する機能有意性を確認することはできなかった。非特許文献3は、骨および関節組織中のmet5の存在を開示する。しかしながら、met5と骨形成の間に実証可能な関係はない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Rosenら、Proc Natl Acad Sci 88 (9) : 3

10

20

30

40

50

705～9頁、1991年

【非特許文献2】Rosenら、J Bone Miner Res. 13(10): 1515～20頁、1998年

【非特許文献3】Elhassanら、J Bone and Miner Res. 13(1): 88～95頁、1998年

【非特許文献4】Chengら、Mol Biol Cell. 20(1) 319～27頁、2009年

【非特許文献5】Kuisら、J Clin Invest. 88(3) 817～24頁、1991年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

オピオイド増殖因子シグナル伝達の阻害は骨形成を促進するおよび/または骨破壊を低減することが、本明細書において確認されている。何らかの特定の理論によって縛られずに、オピオイド増殖因子受容体(OGFR)を介したオピオイド増殖因子シグナル伝達の阻害は、骨形成を促進するおよび/または骨破壊を低減するのに有効であると考えられる。骨形成が望まれる部位に直接オピオイド増殖因子(OGFR)シグナル伝達経路の阻害剤を局所投与することにより、オピオイド増殖因子シグナル伝達の阻害が動物中の骨形成を促進することが、本明細書において実証されている。骨形成が望まれる部位へのオピオイド増殖因子シグナル伝達経路の阻害剤の直接投与が、骨芽細胞になるためのMSCの分化を促進し単球の破骨細胞への分化を妨げるのに必要とされ、これが骨損傷部位または手術部位で無機質化の増大と骨形成の増大をもたらすことも実証されている。

【課題を解決するための手段】

【0016】

したがって本発明は、骨形成が望まれる部位に骨形成を促進するおよび/または骨破壊を低減するのに有効な量のオピオイド増殖因子受容体のアンタゴニストを直接、それを必要とする動物に投与することによって、骨形成を促進または骨破壊を低減するための方法を対象とする。

【0017】

一態様では、本発明の方法中で利用するOGFRアンタゴニストは、OGFRとオピオイド増殖因子の結合を遮断する。

【0018】

幾つかの実施形態では、OGFRとオピオイド増殖因子(met5)の結合を遮断するOGFRアンタゴニストは、ナロキソンまたはその機能性誘導体、ナルトレキソンまたはその機能性誘導体、またはこれらの組合せである。

【0019】

他の実施形態では、OGFRアンタゴニストはオキシモルフォンに由来しOGFRと結合し、ナロキソン、ナルトレキソン、ナロルフィン、ナロキソナジン、レバロルファン、ナルメフェン、シプロジム、シクロルファン、シクラゾシン、オキシロルファン、LY113878、MR2266、ジブレノルフィン、WIN44,441-3、ナルトリンドールまたはノルビナルトルフィミンを含む。

【0020】

さらに他の実施形態では、OGFRアンタゴニストは、トランス-3,4-ジメチル-4-フェニルピペリジンに由来しOGFRと結合し、LY99335、LY25506、LY117413、またはLY255582を含む。

【0021】

幾つかの実施形態では、OGFRアンタゴニストは、met5-エンケファリンまたはleu-エンケファリンペプチドに由来しOGFRと結合し、OGFRを標的化するための手段として以下のアミノ酸配列、met5-エンケファリン由来の配列に関してTyr-Gly-Gly-Phe-Met(配列番号1)、またはleu-エンケファリンペプ

10

20

30

40

50

チド由来の配列に関してTyr - Gly - Gly - Phe - Leu (配列番号2)を少なくとも含む。

【0022】

さらに他の実施形態では、OGFRアンタゴニストは、ペプチドアンタゴニストICI 174864 (N, N - ジアリル - Tyr - Aib - Aib - Phe - Leu - OH、配列番号3、Aib = アミノイソ酪酸)、またはソマトスタチンアナログCTP (D - Phe - Cys - Tyr - D - Trp - Lys - Thr - Pen - Thr - NH₂、配列番号4)に由来する。

【0023】

別の態様では、本発明の方法中で利用するOGFRアンタゴニストは、OGFR内に見られる核局在配列、251QSALDYFMFAVRCRHQRRLVHFAWEHFRPRCKFVWGPQDKLRRFKPSSL (配列番号5)を妨害する分子である。

【0024】

さらに別の態様では、本発明の方法中で利用するOGFRアンタゴニストは、OGFR遺伝子を対象としOGFR遺伝子発現を妨害する際に有効な低分子ヘアピン(sh) - RNAまたは低分子干渉(si) - RNAである。

【0025】

別の態様では、本開示は、骨中の局所損傷部位または手術介入部位への間葉系幹細胞(MSC)の動員を促進して、破骨細胞誘導型骨分解(または再吸収)を阻害しながら治癒を促進するための方法を提供する。この方法は、骨分解を阻害しながら骨形成を促進するための、一定量のOGFRアンタゴニストの投与に基づく。損傷は例えば骨折、または手術介入である可能性がある。幾つかの実施形態では、損傷部位または手術介入部位にOGFRアンタゴニストを局所投与する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1 - 1】図1A ~ 1Iは、(A)骨形成誘導培地への1 μ M ~ 1 mMの間のナロキシソンの添加が、骨芽細胞になるよう誘導したMSC培養物において無機質蓄積を大幅に増大したことを示す図である(赤色染色)。骨形成誘導培地への1 μ m ~ 1 mmの間のナルトレキシソンの添加も、ナロキシソンより低い程度ではあったが無機質を増大させた。(B) δ オピオイド受容体(OPRD)遺伝子発現は、骨芽細胞(* = p < 0.001)と破骨細胞(* = p < 0.0084)において大幅に低下したが、一方で(C)一方オピオイド増殖因子受容体(OGFR)遺伝子発現は、骨芽細胞(* = p < 0.02)と破骨細胞(* = p < 0.0001)において有意に増大したことを示す図である。(D)OGFR - リガンド、met5 - エンケファリン(met5)が、プロエンケファリン(PENK)として知られる高分子前駆体タンパク質に由来することを示す図である。5 μ Mまたは50 μ Mのmet5の添加が培養物中の無機質形成に影響を与えることはなかった。(E)重要なことに、骨形成誘導培地への5 μ Mのmet5(PENK)への添加は無機質蓄積に影響を与えることはなかったが、一方50 μ mのmet5は無機質蓄積を若干減少させたことを示す図である。しかしながら、1 mMのナロキシソンを5 μ Mまたは50 μ Mのmet5と共に骨形成誘導培地に加えると、ナロキシソン治療剤はmet5の抗骨形成効果をなくすことができた。(F)骨形成誘導培地への添加が、対照培養物と比較して無機質形成をもたらしたことを示す図である。BMP2は対照と比較して無機質形成を増大させ、一方ナロキシソン(1 mM)の1回治療(1回投薬)およびナロキシソンの2回治療(2回投薬)は無機質形成を増大させた(赤色染色)。各培地交換時のナロキシソンを用いた治療(連続投薬)は無機質形成を抑制した。(G)MSC培養物へのナロキシソンの添加は、72時間と120時間で細胞数を減少させたことを示す図である(* = p < 0.017)。(H)単球培養物へのナロキシソンの添加も細胞数を有意に減らしたことを示す図である(* = p < 0.0001)。(I)破骨細胞になるよう培養した単球は、対照破骨細胞培養物と比較して、met5を用いた治療によって影響を受けなかったことを示す図である(TRAP染色は紫色で示す)。1 μ Mのナロキシソンまたは1 μ Mのナルトレキシソンの添加によ

10

20

30

40

50

って破骨細胞数が有意に減少することはなかったが、一方 1 mM のナロキソンまたは 1 mM のナルトレキシソンの添加によって破骨細胞数は大幅に減少した。

【図 1 - 2】図 1 - 1 の続き。

【図 1 - 3】図 1 - 2 の続き。

【図 2】図 2 A ~ 2 E は、(A) O G F R s h R N A でトランスフェクトした M S C は有意に低い O G F R 遺伝子発現を示し (* = p < 0 . 0 0 8 5)、これは核および細胞質タンパク質溶解物における O G F R の減少 (B) で立証されたことを示す図である。(C) さらに、O G F R 欠損 M S C では、S M A D 1 遺伝子発現が対照 M S C および G F P トランスフェクト対照培養物ではより有意に増大したことを示す図である (* = p < 0 . 0 0 0 8)。(D) I D 1 遺伝子発現も、対照 M S C および G F P トランスフェクト対照培養物と比較して、O G F R 欠損 M S C において増大したことを示す図である (* = p < 0 . 0 2 1 7)。(E) 骨芽細胞特異的タンパク質オステオカルシン (O C N) も、対照培養物および G F P トランスフェクト対照と比較して、骨芽細胞になるよう誘導した O G F R 欠損 M S C において有意に増大したことを示す図である (* = p < 0 . 0 2 1 5)。

【図 3 - 1】図 3 A ~ 3 G は、(A) 1 mM のナロキソン治療剤の添加によって、対照 P B S または m e t 5 治療欠陥と比較して、片側皮質欠陥において 1 . 5 3 倍骨塊 (B v / T v) が増大したことを示す図である (* = p < 0 . 0 0 1)。(B) 対照、ナロキソンまたは m e t 5 治療群欠陥の μ C T イメージの図である。(C) 骨塊 (B v / T v) の増加と小柱数 (T b N) の 1 . 2 倍の増大が平行したことを示す図である (* = p < 0 . 0 4 7)。(D) 手術対照群 (S $\times$ 対照) における片側皮質欠陥の手術時投与は、対照非手術群と比較して (全体積によって補正した骨体積) B v / T v を増大させ、これは欠陥内に蓄積した骨塊に相当することを示す図である (* = p < 0 . 0 3 4)。ウシコラーゲンインプラントと P B S または m e t 5 で治療した欠陥は手術対照と違わなかった。しかしながら、P B S 治療群 (* = p < 0 . 0 0 2 1) と m e t 5 治療群 (* = p < 0 . 0 0 0 9) の両方が非手術対照群と比較して有意に増大した。B M P 2、ナルトレキシソンまたはナロキソンで治療した欠陥は非手術対照群と比較していずれも増大した (* = p < 0 . 0 0 0 1)。B M P 2、ナルトレキシソンおよびナロキソン治療群は、手術対照群 (X = p < 0 . 0 0 0 5)、P B S 治療群 (# = p < 0 . 0 1 2 4) および m e t 5 治療群 (+ = p < 0 . 0 1 1) と比較したとき有意に増大した。B M P 2 治療群の B v / T v はナルトレキシソン治療群と異ならず、一方ナロキソン治療群の B v / T v は有意に増大した (0 = p < 0 . 0 3 5)。(E) 小柱の厚さ (T b T h) は手術対照 (S $\times$ 対照) 群、m e t 5 治療群、B M P 2 治療群、ナルトレキシソン治療群およびナロキソン治療群において増大したことを示す図である (* = p < 0 . 0 4)。ナロキソン治療群における T b T h のみが、B M P 2 治療群またはナルトレキシソン治療群より大きかった (* * = p < 0 . 0 0 0 2)。(F) コラーゲンインプラントが、S H A M 手術対照と比較して腰椎脊柱における骨形成を増大させたことを示す図である。しかしながら、B M P 2 + コラーゲンまたはナロキソン + コラーゲンインプラントは、コラーゲンインプラント単独より骨形成を増大させた。(G) コラーゲンインプラントおよびナロキソン + コラーゲンインプラントに関する腰椎骨癒合塊の μ C T イメージの図である。

【図 3 - 2】図 3 - 1 の続き。

【図 3 - 3】図 3 - 2 の続き。

【図 4】図 4 A ~ 4 D は、(A) O G F R 遺伝子発現が、骨芽細胞 (* = p < 0 . 0 1 8)、骨腫瘍細胞の R D E S ユーイング肉腫 (* = p < 0 . 0 0 1 4)、骨腫瘍細胞の H s 8 2 2 t ユーイング肉腫 (* = p < 0 . 0 0 0 1)、骨腫瘍細胞の H s 8 6 3 t ユーイング肉腫 (* = p < 0 . 0 3 9) および S a O S 2 骨肉腫腫瘍細胞 (* = p < 0 . 0 5) において確認されたことを示す図である。(B) 1 mM のナロキソンまたは 1 mM のナルトレキシソンのいずれかの添加後 7 2 時間で、S a O S 2 骨肉腫細胞の数が対照培養物と比較して有意に減少したことを示す図である (* = p < 0 . 0 0 0 1)。O G F R リガンド、m e t 5 が細胞数に対して影響を与えることはなかった。(C) H s 8 2 2 t ユーイング肉腫の骨腫瘍細胞系が培養中接着した状態であることを示す図である。1 mM 用量のナル

トレキシソンの添加後 72 時間で、Hs 822 t ユーイング肉腫の骨腫瘍細胞の数は対照培養物と比較して減少した ($* = p < 0.0025$)。ナロキシソンが Hs 822 t 腫瘍細胞の数に対して影響を与えることはなかった。対照的に、50 mM の met 5 の添加は Hs 822 t 腫瘍細胞数の有意な増大をもたらした ($X = p < 0.03$)。(D) RDES ユーイング肉腫の骨腫瘍細胞が培養中緩く接着した状態であることを示す図である。1 mM 用量のナロキシソンまたは 1 mM 用量のナルトレキシソンのいずれかの添加後 72 時間で、RDES ユーイング肉腫の骨腫瘍細胞の数は対照培養物と比較して有意に減少した ($* = p < 0.0005$)。met 5 の添加が RDES 腫瘍細胞の数に対して影響を与えることはなかった。

【発明を実施するための形態】

10

【0027】

ナロキシソンまたはナルトレキシソンは破骨細胞数を減らしながら骨形成を増大することが、本明細書において実証されている。骨形成の増大は、ウシコラーゲン担体有りまたは無しでの片側皮質欠陥の手術誘導後、またはウシコラーゲン担体を使用した後外側方脊椎骨突起の癒合後にマイクロ-CT を使用し測定され、培養および骨形成中に観察される無機質形成によってサポートされる。手術モデルは多量のアルブミンを含有する損傷をもたらす、これによりナロキシソンとナルトレキシソンを封鎖し、それによってこれら OGF R アンタゴニストの長期利用をサポートすることができる。

【0028】

一態様では、本発明は、骨形成を促進するおよび/または骨破壊を低減するための方法を提供する。この方法は、骨中の損傷部位または手術介入部位に一定量の OGF R アンタゴニストを投与する工程を含む。

20

【0029】

本明細書で使用する「手術介入」は、骨折を修復するための手術手順、背骨癒合（例えば脊椎癒合）のために使用される手術手順、または例えば全身関節形成術中のインプラントの一体化、骨折修復中に使用される骨用スクリュー、腱または靱帯を固定するために使用される骨用スクリュー、または整形外科手術部位を機械的に安定させるよう設計された任意の整形外科用ハードウェアを含めた手術手順を含む。

【0030】

OGF R アンタゴニスト

30

「OGF R アンタゴニスト」によって、少なくとも 1 つの OGF R 仲介生物活性を阻害する、抑制する、またはその中断を引き起こす任意の分子を意味する。

【0031】

幾つかの実施形態では、OGF R アンタゴニストは、OGF R 結合アンタゴニスト、すなわち OGF R と met 5 - リガンド (OGF) の相互作用または結合に干渉する、それを遮断する、または他の場合それを妨げる分子である。OGF R 結合アンタゴニストは 2 形式で働くことができる。第一に OGF R アンタゴニストは、OGF R と met 5 - リガンドの結合により他で誘導される可能性がある下流シグナル伝達を誘発せずに、核膜の表面上での OGF R との結合に関して met 5 - リガンドと競合し、それによって OGF R と met 5 - リガンドの結合に干渉する、それを遮断する、または他の場合それを妨げることができる。あるいは、OGF R 結合アンタゴニストは、十分なアフィニティーと特異性で PENK もしくは met 5 - リガンドと結合、またはそれを封鎖し、OGF R と met 5 - リガンドの結合に実質的に干渉する、それを遮断する、または他の場合それを妨げ、それによって少なくとも 1 つの OGF R 仲介生物活性を阻害する、抑制する、またはその中断を引き起こすことができる。一般的に言うと、OGF R 結合アンタゴニストは高分子（例えば抗体）または低分子（例えば、15 kD、12 kD、10 kD もしくはさらに 8 kD 未満の分子量の化合物）であってよく、ポリペプチド、核酸、または合成低分子化合物であってよい。OGF R 結合アンタゴニストは、当業者によって容易に選択される任意の in vitro アッセイにより確認することができる。例えば OGF R アンタゴニストは、米国特許第 5,882,944 号、米国特許第 6,007,986 号、または米

40

50

国特許第 6, 270, 979 号中に記載された方法を使用して確認することができる。

【0032】

一実施形態では、OGFR 結合アンタゴニストは、ナロキソンまたはその機能性誘導体、ナルトレキソンまたはその機能性誘導体、またはそれらの組合せである。

【0033】

本明細書で使用する「機能性誘導体」は、原型分子と構造的および機能的に類似した（例えば、OGFR アンタゴニストとしてナルトレキソンもしくはナロキシンの機能を維持する）誘導体またはアナログを指す。ナロキソンおよびナルトレキソンアナログは、March J、Advanced Organic Chemistry、第 3 版（1985）中に記載された手順などの標準的合成手順を使用して合成することができる。ナルトレキソンおよびナロキソン機能性誘導体の例には塩型、例えばナロキソン塩酸塩二水和物またはナルトレキソン塩酸塩がある。本発明の方法中で使用するのに適したナルトレキソンおよびナロキソン機能性誘導体の他の例には、例えば米国特許出願公開第 2007/0197573 号 A1、米国特許第 6, 713, 488 号中に開示されたナルトレキソンおよびナロキソンアナログがある。

10

【0034】

別の実施形態では、OGFR 結合アンタゴニストはオキシモルフォンに由来し OGFR と結合し、ナロキソン、ナルトレキソン、ナロルフィン、ナロキシナジン、レバロルファン、ナルメフェン、シプロジム、シクロルファン、シクラゾシン、オキシロルファン、LY113878、MR2266、ジブレノルフィン、WIN44, 441-3、ナルトリンドールまたはノルピナルトルフィミンを含む。

20

【0035】

さらに別の実施形態では、OGFR 結合アンタゴニストはトランス-3, 4-ジメチル-4-フェニルピペリジンに由来し OGFR と結合し、LY99335、LY25506、LY117413、または LY255582 を含む。

【0036】

別の実施形態では、OGFR 結合アンタゴニストは met5-エンケファリンまたは leu-エンケファリンペプチドに由来し OGFR と結合し、OGFR を標的化するための手段として以下のアミノ酸配列、met5-エンケファリン由来の配列に関して Tyr-Gly-Gly-Phe-Met（配列番号 1）、または leu-エンケファリン由来の配列に関して Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu（配列番号 2）を少なくとも含む。

30

【0037】

さらに別の実施形態では、OGFR 結合アンタゴニストはペプチドアンタゴニスト IC1174864（N, N-ジアリル-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu-OH、配列番号 3、Aib = アミノイソ酪酸）、またはソマトスタチンアナログ CTP（D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-NH₂、配列番号 4）に由来する。

【0038】

他の実施形態では、OGFR 結合アンタゴニストの代わりに OGFR アンタゴニストが、OGFR 内に見られる核局在配列、251QSALDYFMFAVRCRHQRRLVHFAWEHFRPRCKFVWGPQDKLRRFKPSSL（配列番号 5）を妨害する分子である。

40

【0039】

さらに他の実施形態では、本発明の方法中で利用する OGFR アンタゴニストは、OGFR 遺伝子を対象とし OGFR 遺伝子発現を妨害する際に有効な低分子ヘアピン（sh）-RNA または低分子干渉（si）-RNA である。

【0040】

本明細書に記載される OGFR アンタゴニストは個別または組合せで投与することができる。適切な組合せには、例えばナロキソンとナルトレキソン、別の OGFR 結合アンタ

50

ゴニストまたは別の O G F R アンタゴニストと組合せたナロキソンおよび / またはナルトレキソンがある。

【 0 0 4 1 】

O G F R アンタゴニストと他の活性剤の組合せ

本明細書に記載される O G F R アンタゴニストは、S M A D シグナル伝達を介して骨の形成または成長を促進し O G F R アンタゴニストと相乗作用することができる、1 つまたはそれ以上の他の活性剤と組合せて投与することができる。このような活性剤の例には、S M A D 1 / 5 / 8 シグナル伝達を制御することができる B M P 分子 (例えば、B M P - 2、B M P - 4、B M P 6 および B M P - 7) があるが、これらだけには限られない。M S C プールを拡大することができ、したがって O G F R アンタゴニストにより制御される可能性のある T G F β 分子。T G F β シグナル伝達を低減する L Y 2 1 0 9 7 6 1 を含めた T G F β 阻害剤は、阻害剤 S M A D (S M A D 6 および S M A D 7) のシグナル伝達を減少させ、したがって B M P シグナル伝達をアンタゴナイズし骨形成を低減する。例えば、コラーゲンインプラントに、本発明の方法中で使用するのに望ましい B M P 分子、T G F β 分子または T G F β 阻害剤分子、および O G F R アンタゴニストを注入することができる。

10

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載される O G F R アンタゴニストは、骨の形成または成長を促進する 1 つまたはそれ以上の他の活性剤と組合せて投与することができる。このような活性剤の例には、E G F、V E G F、P D G F、I G F、F G F、T G F α 、およびサイトカインなどの 1 つまたはそれ以上の増殖因子、間葉系幹細胞、軟骨細胞、および骨髄細胞などの細胞があるが、これらだけには限られない。例えば、コラーゲンインプラントに、本発明の方法中で使用するのに望ましい V E G F 分子などの増殖因子と O G F R アンタゴニストの両方を注入することができる。O G F R アンタゴニストを癌患者の治療において化学療法剤と組合せて投与し、その患者における骨の形成または成長を促進することもできる。

20

【 0 0 4 3 】

送達システム / 担体

本明細書に記載される O G F R アンタゴニストを、担体有りまたは無しで局所に投与して、骨折修復を加速するまたは脊椎骨の癒合を促進することができる。幾つかの実施形態では、O G F R アンタゴニストを投与用の担体と組合せる、またはその中に封入する。

30

【 0 0 4 4 】

適切な担体はビーズ、ミクロスフェアまたはナノ粒子の型であってよく、天然および / または合成生体適合性ポリマーで構成されていてよい。適切な生体適合性ポリマーの例には、ヒアルロン酸、コラーゲン、リン酸三カルシウム、コンドロイチン硫酸、ポリブチレート、ポリラクチド、ポリグリコリド、およびラクチド / グリコリドコポリマー、およびこれらの混合物またはコポリマーがある。適切な担体は、非ポリマー系、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、アミノ酸、ステロールなどの脂質など、ハイドロゲル徐放系、シリステイック系、ペプチドベース系、インプラントなども含む。

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、担体は吸湿性のコラーゲンベースの担体 (例えば、コラーゲンスポンジ、コラーゲン足場、粉末状コラーゲン、またはコラーゲンベースのゼラチンハイドロゲル) である。

40

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、担体は、親水性ハイドロゲルベースの担体 (例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸) であり、これは、その中に注入された O G F R アンタゴニスト (例えば、ナロキソンまたはナルトレキソンまたはそれらの機能性誘導体) を所定期間にわたり放出することを可能にする。

【 0 0 4 7 】

さらに別の実施形態では、担体は、I A ドメインと I I A ドメインの間の界面に位置するナロキソン / モルフィン結合部位を維持する、および / またはナロキソンまたはナルト

50

レキソンまたはそれらの機能性誘導体などのOGFRアンタゴニストと結合しOGFRアンタゴニストの徐放を可能にするトリプトファン (Trp) - 214 周辺のナロキソン結合部位を維持する、アルブミン、アルブミンの誘導体または断片である。

【0048】

さらに別の実施形態では、例えば、ナロキソンまたはナルトレキソンまたはそれらの機能性誘導体などのOGFRアンタゴニストと結合しOGFRアンタゴニストの徐放を可能にする、メチルセルロース、インサートゲル。

【0049】

さらなる実施形態では、担体はウシコラーゲンインプラントである。OGFRアンタゴニスト、例えばナロキソンまたはナルトレキソンまたはそれらの機能性誘導体を、ウシコラーゲンスポンジ、粉末状ウシコラーゲン、またはコラーゲンベースのゼラチン構築物と共に供給されるINFUSE (BMP2) またはOP1 - パテまたはOP1 - インプラントと同様の形式で、ウシコラーゲンインプラントと組合せることができる。ナロキソン、ナルトレキソンまたはそれらの機能性誘導体の投与は、滅菌生理食塩水で粉末状ナロキソンまたはナルトレキソンまたはそれらの機能性誘導体を戻し、次いでOGFRアンタゴニスト - 生理食塩水溶液をコラーゲンインプラントに加えることによって行うことができ、その後インプラントは手術介入部位に局所送達することができる。

【0050】

さらに別の実施形態では、担体は、例えば、ケージ、スクリュー、ロッド、プレート、拡張型ケージ、アンカー (金属ベース、合成または生分解性アンカー) から選択される手術用インプラント、または手術用インプラント送達システムである。

【0051】

さらなる実施形態では、担体は、チップまたは粉末の形態のβ型リン酸三カルシウム、セメント (ポリメチルメタクリレートまたは「PMPMA」)、または例えばパテ、ペースト、ポート、もしくは注射用製剤の形態の無機質除去した骨マトリックス足場で構成される。

【0052】

別の実施形態では、担体はPGA (ポリグリコール酸) - PLGA (ポリ乳酸グリコール酸) 球体で構成され、これはOGFRアンタゴニストを封入し即時型、遅延型または持続型放出をもたらすことができる。

【0053】

別の実施形態では、担体は、皮質海綿質同種移植片、皮質用チップおよび構造同種移植片などの同種移植片である。

【0054】

別の態様では、本開示は、骨中の局所損傷部位または手術介入部位への間葉系幹細胞 (MSC) の動員を促進して、破骨細胞誘導型骨分解 (または再吸収) を阻害しながら治癒を促進するための方法を提供する。この方法は、骨分解を阻害しながら骨形成を促進するための、一定量の本明細書に記載するOGFRアンタゴニスト (例えば、ナロキソンまたはナルトレキソンまたはそれらの機能性誘導体) の投与に基づく。

【0055】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書に記載するOGFRアンタゴニスト (例えば、ナロキソンまたはナルトレキソンまたはそれらの機能性誘導体) の投与に基づき骨壊死または放射線骨壊死を治療する方法を提供する。

【0056】

幾つかの実施形態では、本開示は適切な用量範囲を提供し、その用量範囲で、ナロキソン (400 ng/mL (1 μM) ~ 400 μg/mL (1 mM)) および/またはナルトレキソン (378 ng/mL (1 μM) ~ 378 μg/mL (1 mM)) を、1 μM ~ 1 mMの間の範囲で破骨細胞形成の低減によって骨形成を増大するおよび/または骨分解を低減するのに有効な用量で投与する。ナロキシソンの具体的な用量は、これらの用量が1 μM ~ 1 mMの間の範囲である限り、例えば400 ng/mL、800 ng/mL、1 μg

10

20

30

40

50

/mL、10 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL、400 µg/mL、または前述用量のいずれかの間の量であってよい。これらの用量は1回投与または複数回投与で送達することができる。有効である正確なナロキソンの合計量は、損傷の程度または手術用途および使用する担体に依存する。例えば、400 µg/mL ナロキソン - 生理食塩水溶液、または400 µg/cm³ ナロキソン - 生理食塩水溶液に等しい任意の同等用量が、寸法2 cm × 2 cm × 0.25 cmの寸法または1 cm³のナロキソンまたはその機能性誘導体（例えば、1 mMのナロキソン - 生理食塩水溶液を注入したコラーゲン）を有する各コラーゲンインプラントに関して勧められ、それを損傷部位または局所手術部位に投与して手術領域内の相当な骨形成および破骨細胞数の抑制をもたらすことができる。ナルトレキシソンの具体的な用量は、例えば378 ng/mL、756 ng/mL、1 µg/mL、10 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL、378 µg/mL、または前述用量のいずれかの間の量であってよい。有効である正確なナルトレキシソンの合計量は、損傷の程度または手術用途および使用する担体に依存する。例えば、378 µg/mL ナルトレキシソン - 生理食塩水溶液、または378 µg/cm³ ナルトレキシソン - 生理食塩水溶液に等しい任意の同等用量が、寸法2 cm × 2 cm × 0.25 cmの寸法または1 cm³のナルトレキシソンまたはその機能性誘導体（例えば、1 mMのナルトレキシソン - 生理食塩水溶液を注入したコラーゲン）を有する各コラーゲンインプラントに関して必要とされ、それを損傷部位または局所手術部位に投与して手術領域内の相当な骨形成および破骨細胞数の抑制をもたらすことができる。

10

【0057】

20

本明細書の記載事項を以下の実施例によってさらに例示し、これらは決して限定的なものとして解釈すべきではない。（本出願全体を通じて引用した参考文献、交付特許、および公開特許出願を含む）引用した全ての参考文献の内容は、参照によって本明細書に明確に組み入れられる。

【実施例1】

【0058】

オピオイドアンタゴニストは骨の形成と再吸収を制御する

方法：ヒト骨髄を、IRB認証試験の一部として、選択的主要近位大腿全周臀部関節形成術または選択的主要遠位大腿全周膝部関節形成術のいずれかを施した承認済み成人患者から回収した（n = 6、平均年齢65才）。ヒトMSCは回収した各完全骨髄吸引物由来の細胞の接着性分画に由来し、一方で単球集団は骨髄の非接着性分画から回収した。単球分画は、100 ng/mLの組換えヒトマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF；W y e t h）と共に継代培養によって富化させた。以下に記載した平行実験では、3週齢（n = 10）および16週齢（n = 20）のオスのマウスから大腿骨を回収し、次いで以下の事項に従い大腿骨から骨髄を取り出した。近位端および遠位端大腿骨の除去後21ゲージニードルを大腿骨髄腔中に挿入した。次いで媒体を近位端大腿骨に注意深く通し、それによって骨から骨髄を押し出した。最後に、18ゲージニードルを使用して骨髄ペレットを機械的に解離させ、次いで70 µmメッシュフィルターに通した。これらの完全骨髄吸引物を使用して破骨細胞を作製した。細胞は10%ウシ胎児血清（v/v）および1%ペニシリン - ストレプトマイシン - グルタミンを含有するダルベッコ改変イーグル培地（D MEM）（P S G；C e l l g r o、M e d i a t e c h）中に維持した。組換えヒトネトリン - リガンド（NTN1およびNTN4）をP B S（R a n d D S y s t e m s）中に希釈した。管轄I A C U C 委員会はこの実験中に記載した全ての動物実験を承認した。

30

40

【0059】

遺伝子発現解析：ヒト骨髄由来のMSC、骨芽細胞および脂肪細胞を遺伝子発現の変化に関してアッセイした。平行して、ヒト単球由来の破骨細胞も骨髄遺伝子発現の変化に関してアッセイした。遺伝子データは、少なくとも3患者から回収した、2つの独立に作製したサンプルから誘導した。mRNAはR N e a s y P l u s ミニカラム（Q i a g e n）を使用して精製し、cDNAはi S c r i p t c D N A 合成キット（B i o - R a

50

d) を使用して合成した。遺伝子発現は、Fast Plus EvaGreen マスター混合物 (BioTium) と混合した 100 ng の cDNA を使用して、定量 PCR (qPCR) を使用し解析した。それぞれの実験では、GAPDH を対照として用いて、陰性対照は鋳型を含有せず、化学合成した GAPDH 配列 (0、1、10 および 100 フェトグラム; Integrated DNA Technologies) の連続希釈を使用して標準曲線を作製した。遺伝子発現は、ソフトウェア LinRegPCR (v2013.0) を使用して蛍光 - 交差閾値曲線の線形部分から各プライマーの有効性 (E) と開始遺伝子産物濃度 (N_0) を計算する、Pfaffl の方法を使用して評価した。対照遺伝子 GAPDH が標準曲線の範囲内にありプライマー有効性 (E) が $E \geq 1.8$ であると計算したとき、実験は有効であると考えた。融解曲線解析を使用して一遺伝子産物の存在を確認し、産物の大きさは遺伝子産物ゲル電気泳動を使用して確認した。

10

【0060】

ウエスタンブロット解析によるタンパク質発現: ヒト MSC、骨芽細胞および破骨細胞を、2 mM のヨードアセトアミド、2 mM のベンズアミジン塩酸塩、0.1 mM のエチルマレイミド、1% の PMSF および Halt プロテアーゼ阻害剤カクテル (Pierce Thermo Scientific) を含有する氷冷 RIPA バッファー (Pierce Thermo Scientific) で溶かした。タンパク質溶解物は、3 患者サンプルから作製した少なくとも 2 つの複製から解析した。全てのタンパク質は、製造者の説明書に従い BCA タンパク質アッセイキット (Thermo) を使用してアッセイした。サンプルは Page Ruler Pre-stained NIR タンパク質ラダー (Bio-Rad) を含む 10 ~ 20% Mini-Protean Tris-Tricine Precast ゲル (Bio-Rad) 上に載せ (20 μ g / ウエル)、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に移した。5% ノンファットミルクおよび OGF R 一次抗体 (Santa Cruz Biotechnologies) を使用しブロッキングした膜上で OGF R を確認した。アクチン (1:500) および δ -チューブリンを充填対照として用いた。Clarity Western ECL 基質 (Bio-Rad) と共に HRP 結合マイクロポリマー結合二次抗体 (ImmPress キット、Vector Labs) を使用して、抗体を検出した。マウス脳タンパク質溶解物 (mB) は陽性発現対照として使用した。

20

【0061】

30

骨形成: MSC における骨形成能力を、化学的に誘導した無機質形成によりアッセイした。少なくとも 3 人のヒト患者由来の MSC をウエルあたり 5×10^3 細胞で接種し、放置し融合状態にして骨形成誘導培地への添加前に組み込んだ。骨形成誘導培地は、25 μ g / mL のアスコルビン酸 - 2 - リン酸 (Sigma)、100 nM のデキサメタゾン (Sigma) を補充した 20% FCS (v/v) および 1% PSG を含有する DMEM からなっており、 β -グリセロホスフェート (BGP; Sigma): 5 mM の BGP で 1 回培地交換、10 mM の BGP で 1 回培地交換および 20 mM の BGP で 1 回培地交換の以下の用量レジメンであった。Met5 - リガンド (0、[5 μ M] 2.87、または [50 μ M] 28.7 μ g; Sigma)、ナロキソン (0、400 fg、400 pg、400 ng、400 μ g; Sigma)、ナルトレキソン (0、378 fg、378 pg、378 ng、378 μ g; Sigma) を、以下のように 1) 1 回、骨形成誘導培地への第 1 回添加、2) 2 回、骨形成誘導培地への第 1 回および第 2 回添加、および 3) それぞれの誘導後培地の交換で加える。陽性対照ウエルは、骨形成誘導培地への第 1 回添加で、25 ng の組換えヒト BMP2 / BMP7 - リガンド (Rand D Systems) を用いて処理した。無機質結節の出現後、細胞を 70% 氷冷 EtOH (Sigma) で固定し、次いで 40 mM のアリザリンレッド - S (pH 4.2、Sigma) を使用して染色した。骨形成実験は各患者に関して少なくとも 2 回繰り返した。

40

【0062】

細胞数のアッセイ: 1 mM のナロキソンまたは 1 mM のナルトレキシソンの添加後、生存細胞数を MTT アッセイで決定した。72 時間後と 120 時間後に、MTT (5 mg / m

50

1 (w/v)、Sigma)を各ウエルに加え、2時間インキュベートし、その後細胞は500 μ lのDMSO (Sigma)で溶かした。MTTは570 nmで測定し、細胞増殖に対する療法の影響は、未処置ウエルからの平均値に対して処置ウエルを標準化することにより決定した。細胞数の変化倍率 = $100 \times [\text{処置細胞の光学濃度} / \text{平均対照の光学濃度}]$ 。

【0063】

TRAP染色および破骨細胞数のアッセイ：破骨細胞はヒト単球の富化集団、またはマウスの非富化完全骨髄吸引物のいずれかに由来した。3つのヒト患者骨髄サンプルを、3週齢 (n = 10) のマウス骨髄から回収したサンプルと平行してアッセイした。単球分画を刺激し、met5 - リガンド ([5 μ M] 2.87、または [50 μ M] 28.7 μ g ; Sigma)、ナロキソン (400 ngもしくは400 μ g ; Sigma) またはナルトレキソン (378 ngもしくは378 μ g ; Sigma) の存在下で、25 ng/mLのMCSFおよび25 ng/mLの組換えヒトまたはマウスRANK - リガンド (R and D Systems) と共に 1×10^6 個の細胞を培養することにより破骨細胞状態にした。破骨細胞は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP ; Sigma、白血球酸性ホスファターゼキット387 - A) で染色し、細胞がTRAP陽性染色され少なくとも3個の核を有していたとき計数した。破骨細胞数の推定値は、Cavalieriサンプリングおよびフラクショネーター技法の変形によって得た。

【0064】

OGF受容体のshRNAノックダウン：OGF受容体の活性を、市販のネオゲニンshRNAレンチウイルスを使用し、または対照としてGFPレンチウイルス (Santa Cruz Biotechnologies) を用いてMSCをトランスフェクトすることにより阻害した。次いでMSCを誘導して骨芽細胞状態にし、その後BMP標的遺伝子 (ID1、ID2、SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD5、SMAD6、SMAD7、SMAD8/9およびオステオカルシン (OCN)) に関してアッセイした。

【0065】

片側皮質欠陥モデル：オスの3週齢C57BL/6マウス (治療群あたりn = 5) に、片側皮質欠陥の作製後、met5、ナロキソンまたはナルトレキソンを注射した。簡単に言うと、小さな切れ目 (約3 mm) を、脛骨隆線上の脛骨粗面直下、脛骨の内側に位置する膝関節の直下に作製した。若年動物では、骨端板をはっきりと見ることができ、錐先はこの地点の約1 mm下に置いた。この錐先によって、直径300 μ m $\times$ 深さ1 mmの寸法を有する片側皮質欠陥が生じた。33ゲージブラントチップニードルを有するHamilton Neuros RN10 μ Lシリンジを使用して、1秒あたり約0.1 μ Lより早くない速度で片側皮質欠陥に直接、生理食塩水に再懸濁した2 μ Lのmet5 (28.7 μ g)、ナロキソン (400 μ g) またはナルトレキソン (378 μ g) を注入した。左脚脛骨は対側性手術対照として用いて、試験中動物には片側皮質欠陥を施し、2 μ Lの生理食塩水を注入した。マウスは手術後5日で安楽死させ、後脚を回収し、脛骨は免疫蛍光、TRAP染色およびOTC関連骨成長用に固定した。

【0066】

片側皮質欠陥モデルへのオピオイドアンタゴニスト含有コラーゲンインプラントの移植：オスの5週齢C57BL/6マウス (合計25匹の全動物に関して治療群あたりn = 5) をこの試験において使用した。治療群は、以下の1) PBS + コラーゲンスポンジ、2) met5 + コラーゲンスポンジ、3) BMP2 + コラーゲンスポンジ、4) ナルトレキソン + コラーゲンスポンジ、5) ナロキソン + コラーゲンスポンジからなっていた。脛骨隆線上の脛骨粗面直下、脛骨の内側に位置する膝関節の直下に作製した小さな切れ目 (約3 mm) によって、片側皮質欠陥を手術により施した。5週齢のオスのマウスでは、骨端板をはっきりと見ることができ、錐先はこの地点の約1 mm下に置いた。この錐先によって、直径300 μ m $\times$ 深さ1 mmの寸法を有する片側皮質欠陥が生じた。ウシコラーゲンスポンジインプラント (Duraform) を調製し (約1 mm $\times$ 1 mm)、次いでPB

S、50 μ M (28.7 μ g、10 μ L中)、met-5 エンケファリン (met 5)、25 ngのBMP2、1mMのナルトレキソン (378 μ g、10 μ L中) または1mMのナロキソン (400 μ g、10 μ L中) に浸した (各治療群に関してn = 5、合計25匹の動物)。片側皮質欠陥を、コラーゲンスポンジインプラントを与えなかった別群のマウスに施した (n = 5; 片側皮質欠陥の手術対照)。平行して、別群の動物を非手術対照として用いた。マウスは手術後7日で安楽死させ、後脚を回収し、脛骨はマイクロ-CT (μ CT) 解析用に調製した。

【0067】

ラットのL5 - L6脊椎の後外側方脊椎癒合: 20匹の、オスの1ヶ月齢の骨格的に成熟したSprague-Dawleyラットに、L5 - L6脊椎で両側腰椎後外側方脊椎癒合を施した。治療群は、以下の1) 擬似手術対照、2) コラーゲンスポンジインプラント、3) BMP2 + コラーゲンスポンジインプラント、4) ナロキソン + コラーゲンスポンジインプラントからなっていた。滅菌条件下で、L5 - L6脊椎を中心に2cm長の後方正中線の切れ目を入れた。筋肉分離手法を小関節の後方に使用して、特定脊椎の横突起を露出させた。高速1mm回転切削器具を使用しL5 - L6脊椎の横突起を剥皮した。インプラントを調製し、脊椎周辺筋肉床の両側、横突起の間に移植した。ウシコラーゲンスポンジインプラントを調製し (約1cm $\times$ 1cm)、次いでPBS、25 ngのBMP2、1mMのナロキソン (400 μ g、10 μ L中) に浸した。動物は2ヶ月で安楽死させ (合計n = 20ラットに関して治療群あたり時間地点あたりn = 5ラット)、脊椎はマイクロ-CT (μ CT) 解析用に回収し調製した。

【0068】

片側皮質欠陥のマイクロCT解析: 脛骨の高解像度画像を μ CT画像システム (μ CT 40; Scanco Medical) を用いて得た。脛骨は45 keVおよび12 μ mの等方性ボクセルサイズでスキャンした。解析領域は軸部分から選択して、骨内膜皮質壁によって境界付けられた片側皮質欠陥全体を含めた。体積補正骨体積 (骨体積 / 全体積; Bv / Tv)、小柱の数 (TbN) および小柱の厚さ (TbTh) を、Scancoソフトウェアを使用して計算した。

【0069】

統計解析: Prism統計ソフトウェア (Graphpad) を使用してデータを解析した。平均および標準偏差を計算した。p < 0.05に設定した有意性で多重比較のHolm-Sidak事後比較を使用し、一元配置分散分析法によりデータを解析した。

【0070】

結果:

ナロキソンおよびナルトレキソンは、破骨細胞数を減らしながら骨芽細胞へのMSCの分化および無機質形成を増大した: 骨形成誘導培地への1 μ M ~ 1mMの間のナロキシソンの添加は、骨芽細胞になるよう誘導したMSC培養物において無機質蓄積を大幅に増大した (赤色染色) (図1A)。骨形成誘導培地への1 μ m ~ 1mmの間のナルトレキシソンの添加も、ナロキソンより低い程度ではあったが無機質を増大させた (図1A)。 δ オピオイド受容体 (OPRD) 遺伝子発現はMSCにおいて最大であり、骨芽細胞 (p < 0.0074) と破骨細胞 (p < 0.0084) において有意に低下した (図1B)。OGFR 遺伝子発現は、MSC培養物と比較して骨芽細胞 (p < 0.011) と破骨細胞 (p < 0.0001) において増大した (図1C)。Met 5 (PENK) 遺伝子発現はMSCと骨芽細胞の間で違わなかったが、しかしながら、PENK遺伝子発現は破骨細胞では有意に低下した (p < 0.0018) (図1D)。骨形成誘導培地への5 μ Mのmet 5 (PENK) への添加が無機質蓄積に影響を与えることはなかったが、一方50 μ mのmet 5は無機質蓄積を若干減少させた (図1E)。しかしながら、1mMのナロキシソンを5 μ Mまたは50 μ Mのmet 5と共に骨形成誘導培地に加えると、ナロキシソン治療剤はmet 5の抗骨形成効果をなくすことができた (図1E)。 μ -オピオイド受容体、 κ -オピオイド受容体、met 5前駆体POMCおよびCPA1酵素遺伝子発現は決して観察されなかった。PCSK1、PCSK2、CPDおよびCPE遺伝子発現はMSC、骨芽細胞

および破骨細胞において観察されたが、互いに有意に異なることはなかった。(例えば各培地交換時の)連続ナロキソン投薬を若干減らしながらの、単一「パルス」用量のナロキソン(1 mM)または初回「パルス」投薬72時間後の二重「パルス」用量のナロキソン(1 mM)の添加は無機質形成の相当な増大をもたらした(図1F)。さらに本発明者らは、1 mMのナロキソンの添加は、72時間($p < 0.0177$)と120時間($p < 0.0001$)でMSC増殖を抑制したが、停止させることはなかったことを発見した(図1G)。同様にナロキソンは単球培養物の増殖を減らした($p < 0.0001$)(図1H)。破骨細胞になるよう培養した単球は、対照破骨細胞培養物と比較して、met5を用いた治療によって影響を受けなかった(TRAP染色は紫色で示す)(図1I)。1 μ Mのナロキソンまたは1 μ Mのナルトレキシソンの添加によって破骨細胞数が有意に減少することはなかったが、一方1 mMのナロキソンまたは1 mMのナルトレキシソンの添加によって破骨細胞数は大幅に減少した(図1I)。

10

【0071】

OGFR発現の消失は、オステオカルシン発現の増大と平行して、骨形成に必須の転写制御因子の発現の増大をもたらした。OGFR shRNAでトランスフェクトしたMSCは有意に低いOGFR遺伝子発現を示し($p < 0.0085$)(図2A)、これは核および細胞質タンパク質溶解物におけるOGFRの減少で立証された(図2B)。さらに、OGFR欠損MSCでは、SMAD1遺伝子発現が対照MSCおよびGFPトランスフェクト対照培養物ではより有意に増大した($p < 0.0008$)(図2C)。ID1遺伝子発現も、対照MSCおよびGFPトランスフェクト対照培養物と比較して、OGFR欠損MSCにおいて増大した($p < 0.0217$)(図2D)。骨芽細胞特異的タンパク質オステオカルシン(OCN)も、対照培養物およびGFPトランスフェクト対照と比較して、骨芽細胞になるよう誘導したOGFR欠損MSCにおいて有意に増大した($p < 0.0215$)(図2E)。

20

【0072】

ナロキソンまたはナルトレキシソンを用いた治療は動物モデルにおける手術欠陥での骨形成を増大させた。片側皮質欠陥をマウス脛骨に手術により施し、次いでそれらをナロキソン(1 mM)またはmet5(50 μ M)で治療した。ナロキソンは骨治癒を増大したが、一方met5は無影響であった(図3Aおよび3B)。ナロキソン治療は1.53倍骨塊(Bv/Tv)を増大した($p < 0.001$)(図3A)。本発明者らが測定した骨塊の増加は、小柱数(TbN)の1.2倍の増大によって誘導された($p < 0.047$)(図3C)。手術適用後7日で、Bv/Tvにより測定した片側皮質欠陥の骨折治癒は、非手術対照と比較し手術対照群(S×対照)において25.6%増大した($p < 0.034$)(図3D)。コラーゲンインプラントと組合せてPBSまたはmet5で治療した欠陥は、骨折治癒に関して手術対照群と有意に違わなかった。しかしながら、コラーゲンインプラントと組合せたPBSまたはmet5治療は非手術対照群より約37%の増大をもたらし、手術対照群と非手術対照群の間で観察された違いと一致した($p < 0.003$)(図3D)。BMP2およびコラーゲンインプラントでの欠陥の治療はPBS治療群と比較して32.4%のBv/Tv増大をもたらし、手術対照群と比較して55.6%の増大をもたらした(それぞれ $p < 0.0124$ と $p < 0.005$)(図3D)。BMP2治療群とナルトレキシソン治療群の間に有意な差はなかった。ナルトレキシソンおよびコラーゲンインプラントでの欠陥の治療はPBS治療群と比較して39.2%のBv/Tv増大をもたらし、手術対照群と比較して63.5%の増大をもたらした(それぞれ $p < 0.0043$ と $p < 0.0001$)(図3D)。最後に、ナロキソンおよびコラーゲンインプラントで治療した欠陥ではPBS治療欠陥と比較して56.5%のBv/Tv増大があり、手術対照群と比較して83.8%の増大があった($p < 0.0001$)(図3D)。さらに、ナロキソン治療によりBMP2治療群と比較して欠陥のBv/Tvが18.2%増大した($p < 0.035$)(図3D)。小柱の厚さはBv/Tvと関係がある構造パラメーターであり、これは対象領域内の骨塊と関係がある。小柱の厚さは、対照非手術群と比較して、手術対照($p < 0.032$)、met5($p < 0.039$)、BMP2($p < 0.025$)

30

40

50

）、ナルトレキソン（ $p < 0.025$ ）およびナロキソン（ $p < 0.001$ ）群では欠陥内で有意に増大した（図3E）。ナロキソンを用いた欠陥の治療によって、他の全ての治療群と比較して約37%小柱の厚さが増大した（ $p < 0.001$ ）（図3E）。さらに、欠陥のナロキソン治療で観察したBv/Tvの増大は、主に小柱の厚さの増大によって誘導されたようであり、一方BMP2またはナルトレキソンでの治療は小柱の数と小柱の厚さの両方によってBv/Tvが増大した。後外側方腰椎脊柱へのナロキソン注入コラーゲンインプラントの添加は、コラーゲン移植脊椎または対照擬似手術群と比較してBv/Tvの相当な増大をもたらした（図3Fおよび3G）。

【実施例2】

【0073】

肉腫細胞におけるOGFR遺伝子発現にもかかわらず、OGFRアンタゴニストが肉腫腫瘍の増殖を刺激することはない

方法：ヒト骨髄を、IRB認証試験の一部として、選択的主要近位大腿全周臀部関節形成術または選択的主要遠位大腿全周膝部関節形成術のいずれかを施した承認済み成人患者から回収した（ $n = 6$ 、平均年齢65才）。ヒトMSCは完全骨髄吸引物の接着性分画に由来した。ユーイング肉腫腫瘍細胞（RDES、Hs822およびHs863）ならびにSaOS2骨肉腫腫瘍細胞はATCCから得た。細胞は10%ウシ胎児血清（v/v）および1%ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミンを含有するダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（PSG；Cellgro、Mediatech）中に維持した。

【0074】

遺伝子発現解析：ヒト骨髄由来のMSC、骨芽細胞および脂肪細胞を遺伝子発現の変化に関してアッセイした。平行して、ヒト単球由来の破骨細胞も骨髄遺伝子発現の変化に関してアッセイした。遺伝子データは、少なくとも3患者から回収した、2つの独立に作製したサンプルから誘導した。mRNAはRNeasy Plusミニカラム（Qiagen）を使用して精製し、cDNAはiScript cDNA合成キット（Bio-Rad）を使用して合成した。遺伝子発現は、Fast Plus EvaGreenマスター混合物（Biotium）と混合した100ngのcDNAを使用して、定量PCR（qPCR）を使用し解析した。それぞれの実験では、GAPDHを対照として用いて、陰性対照は鋳型を含有せず、化学合成したGAPDH配列（0、1、10および100フェムトグラム；Integrated DNA Technologies）の連続希釈を使用して標準曲線を作製した。遺伝子発現は、ソフトウェアLinRegPCR（v2.0.13.0）を使用して蛍光-交差閾値曲線の線形部分から各プライマーの有効性（E）と開始遺伝子産物濃度（ N_0 ）を計算する、Pfafflの方法を使用して評価した。対照遺伝子GAPDHが標準曲線の範囲内にありプライマー有効性（E）が $E \geq 1.8$ であると計算したとき、実験は有効であると考えた。融解曲線解析を使用して一遺伝子産物の存在を確認し、産物の大きさは遺伝子産物ゲル電気泳動を使用して確認した。

【0075】

細胞数のアッセイ：1mMのナロキソンまたは1mMのナルトレキシソンの添加後、生存細胞数をMTTアッセイで決定した。72時間後と120時間後に、MTT（5mg/ml（w/v）、Sigma）を各ウェルに加え、2時間インキュベートし、その後細胞は500μlのDMSO（Sigma）で溶かした。MTTは570nmで測定し、細胞増殖に対する療法の影響は、未処置ウェルからの平均値に対して処置ウェルを標準化することにより決定した。細胞数の変化倍率 = $100 \times$ [処置細胞の光学濃度 / 平均対照の光学濃度]。

【0076】

統計解析：Prism統計ソフトウェア（Graphpad）を使用してデータを解析した。平均および標準偏差を計算した。 $p < 0.05$ に設定した有意性で多重比較のHolm-Sidak事後比較を使用し、一元または二元配置分散分析法によりデータを解析した。

【0077】

10

20

30

40

50

結果：

骨肉腫およびユーイング肉腫腫瘍細胞はOGFRを発現し、ナロキソンおよびナルトレキソンは腫瘍増殖を阻害する。OGFR遺伝子発現が、骨芽細胞 ($p < 0.018$)、骨腫瘍細胞のRDESユーイング肉腫 ($p < 0.0014$)、骨腫瘍細胞のHs822tユーイング肉腫 ($p < 0.0001$)、骨腫瘍細胞のHs863tユーイング肉腫 ($p < 0.039$) およびSaOS2骨肉腫腫瘍細胞 ($p < 0.05$) において観察された (図4A)。1 mMのナロキソンまたは1 mMのナルトレキシンのいずれかの添加後72時間で、SaOS2骨肉腫細胞の数が対照培養物と比較して有意に減少した ($p < 0.0001$)。OGFRリガンド、met5が細胞数に対して影響を与えることはなかった (図4B)。Hs822tユーイング肉腫の骨腫瘍細胞系は培養中接着した状態であった。1 mM用量のナルトレキシンの添加後72時間で、Hs822tユーイング肉腫の骨腫瘍細胞の数は対照培養物と比較して減少した ($p < 0.0025$)。ナロキソンがHs822t腫瘍細胞の数に対して影響を与えることはなかった。対照的に、50 μ Mのmet5の添加はHs822t腫瘍細胞数の有意な増大をもたらした ($p < 0.03$) (図4C)。RDESユーイング肉腫の骨腫瘍細胞は培養中緩く接着した状態であった。1 mM用量のナロキソンまたは1 mM用量のナルトレキシンのいずれかの添加後72時間で、RDESユーイング肉腫の骨腫瘍細胞の数は対照培養物と比較して有意に減少した ($p < 0.0005$)。met5の添加がRDES腫瘍細胞の数に対して影響を与えることはなかった (図4D)。

【0078】

実施例1および2からの結果の要約：

ナロキソンおよびナルトレキソンは、破骨細胞数の減少を介して骨形成を増大し骨再吸収 (破壊) を低減する。

【0079】

ナロキソンまたはナルトレキソン注入コラーゲンインプラントは、片側皮質欠陥または癒合腰椎脊椎骨において骨形成を増大させた。

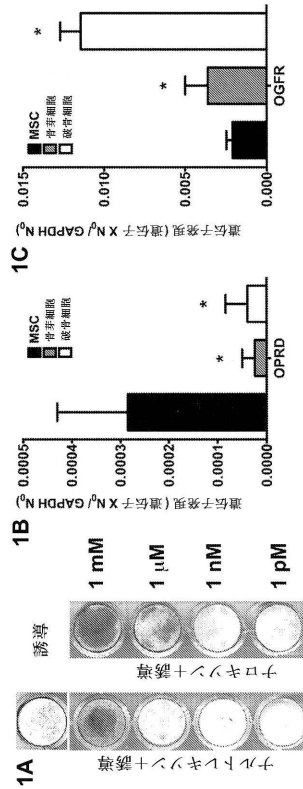
【0080】

OGFRの存在下にもかかわらず、ナロキソンまたはナルトレキソンが肉腫腫瘍細胞増殖を増大させることはなかった。

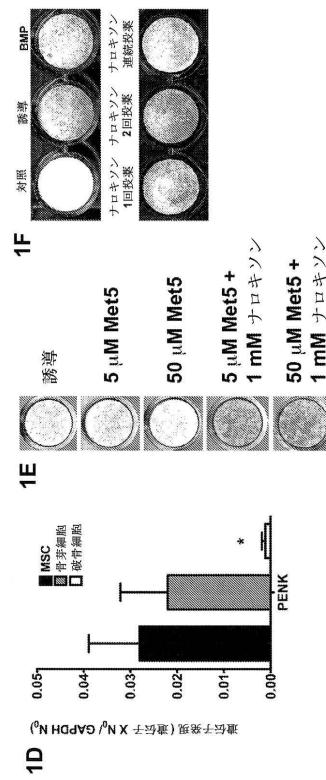
10

20

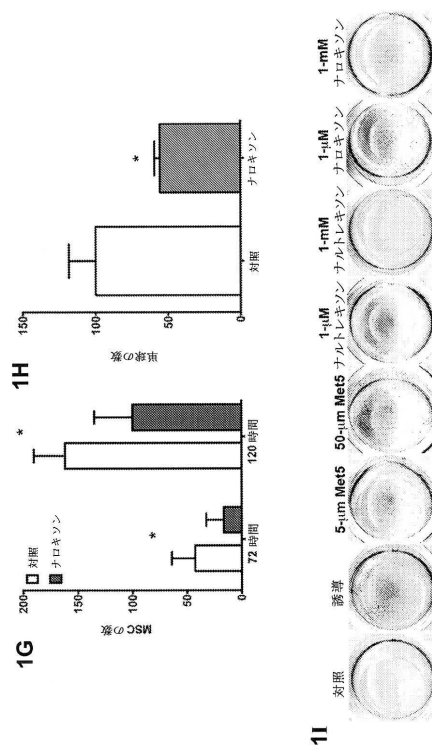
【図 1 - 1】



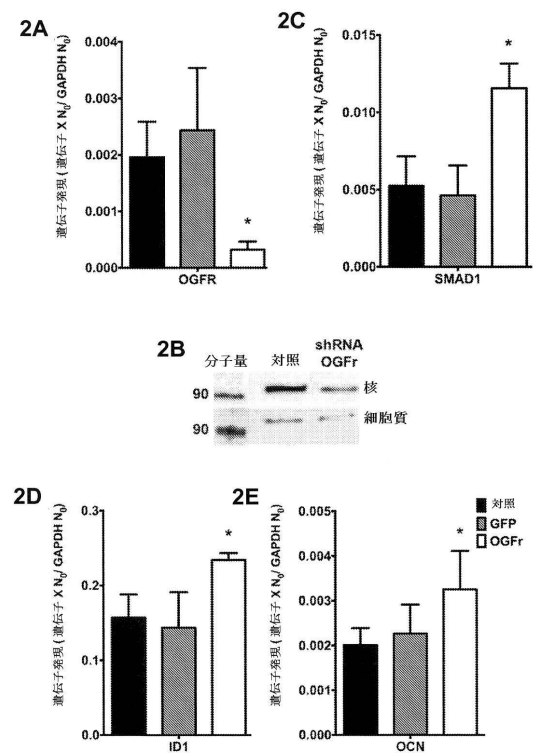
【図 1 - 2】



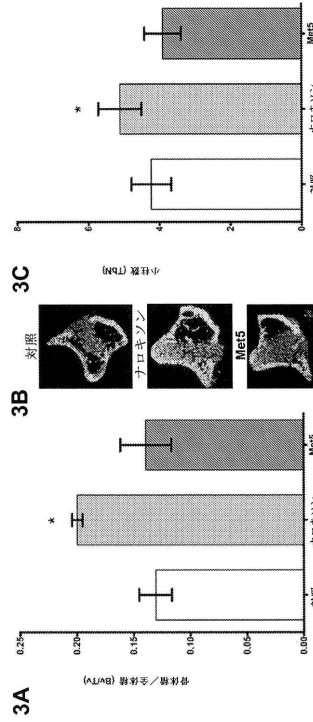
【図 1 - 3】



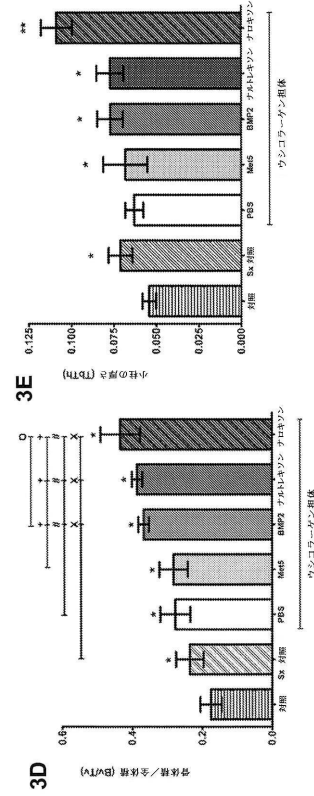
【図 2】



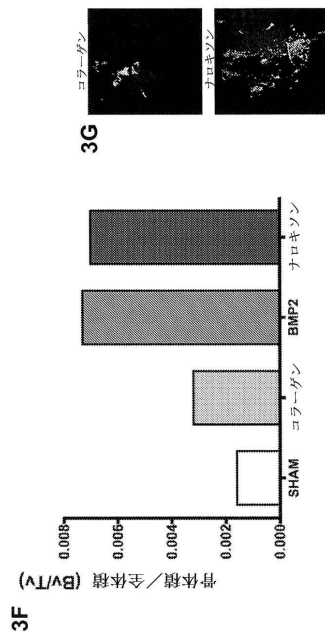
【図 3 - 1】



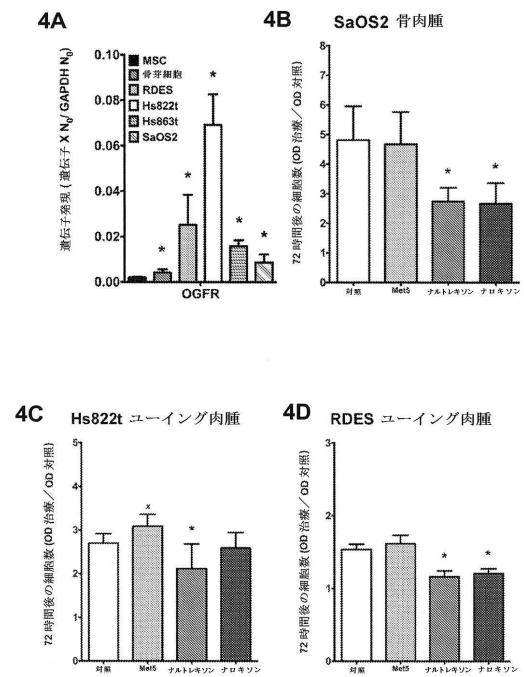
【図 3 - 2】



【図 3 - 3】



【図 4】



【配列表】

0006920196000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 L	27/24	(2006.01)	A 6 1 L	27/24	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/00	
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/113	

- (72)発明者 ニキル・エー・タークル
 アメリカ合衆国ニューヨーク州13057・イーストシラキウス・スイート100・フライロード6620・ザ・アップステイト・ボーン・アンド・ジョイント・センター
- (72)発明者 ブライアン・エス・マルグリース
 アメリカ合衆国ニューヨーク州13210・シラキウス・イーストアダムスストリート750・インスティテュート・フォー・ヒューマン・パフォーマンス3113・スーニー・アップステイト・メディカル・ユニヴァーシティ

合議体

審判長 滝口 尚良
 審判官 鳥居 福代
 審判官 淵野 留香

- (56)参考文献 BMC Musculoskeletal Disorders, 2007年, Vol. 8: 43, p. 1 - 9
 Brain Research, 1989年, Vol. 482, p. 297 - 305

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A61K45/00, A61K31/485
 CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)
 JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)