

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6495934号
(P6495934)

(45) 発行日 平成31年4月3日 (2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日 (2019.3.15)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 L 27/36 (2006.01)

A 6 1 L 27/36 1 2 O

A 6 1 L 27/38 (2006.01)

A 6 1 L 27/36 3 1 2

A 6 1 K 35/32 (2015.01)

A 6 1 L 27/38 1 1 2

A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/32

A 6 1 K 35/28 (2015.01)

A 6 1 P 19/00

請求項の数 9 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-553431 (P2016-553431)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月20日 (2015.2.20)
 (65) 公表番号 特表2017-508523 (P2017-508523A)
 (43) 公表日 平成29年3月30日 (2017.3.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/053639
 (87) 国際公開番号 W02015/124735
 (87) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015.8.27)
 審査請求日 平成30年1月10日 (2018.1.10)
 (31) 優先権主張番号 14000599.2
 (32) 優先日 平成26年2月20日 (2014.2.20)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591032596
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ
 ト ベシュレンクテル ハフツング
 Merck Patent Gesell
 schaft mit beschräe
 nkter Haftung
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
 ルムシュタット フランクフルター シュ
 トラーセ 250
 Frankfurter Str. 25
 O, D-64293 Darmstadt
 , Federal Republic o
 f Germany
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グラフト移植および組織工学的手順における FGF-18

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織工学用の移植可能な軟骨材料を製造する方法であって、

前記方法は、FGF-18化合物を含有する培養培地内で、移植可能な軟骨材料を形成するのに十分な時間、3D培養で、軟骨形成細胞を培養する工程を含み、

前記 FGF-18 化合物は培養培地に1週間あたり約1、2、または3日、間欠的に添加され、前記約1、2、または3日の添加は、少なくとも2週間の培養、少なくとも3週間の培養または少なくとも4週間の培養の間、各週ごとに繰り返される、前記方法。

【請求項 2】

組織工学用の移植可能な軟骨材料を製造する方法であって、

前記方法は、FGF-18化合物を含有する培養培地内で、移植可能な軟骨材料を形成するのに十分な時間、3D培養で、軟骨形成細胞を培養する工程を含み、

前記 FGF-18 化合物は培養培地に1月あたり約1、2、または3日、間欠的に添加され、前記約1、2、または3日の添加は、少なくとも2月間の培養、少なくとも3月間の培養、または少なくとも4月間の培養の間、各月ごとに繰り返される、前記方法。

【請求項 3】

前記 FGF-18 化合物は培養培地に1週間あたり1、2、または3日、間欠的に添加され、前記1、2、または3日の添加は、2週間の培養、3週間の培養または4週間の培養の間、各週ごとに繰り返される、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

前記 F G F - 1 8 化合物は培養培地に 1 月あたり 1、2、または 3 日、間欠的に添加され、前記 1、2、または 3 日の添加は、2 月間の培養、3 月間の培養、または 4 月間の培養の間、各月ごとに繰り返される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記軟骨形成細胞は、成熟組織に由来する軟骨細胞または間葉系幹細胞である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 F G F - 1 8 化合物は、

a) 配列番号 1 の第 2 8 ~ 2 0 7 位の残基を含むヒト F G F - 1 8 成熟型を含むまたは該成熟型から成るポリペプチド；

b) 配列番号 1 の第 2 8 ~ 1 9 6 位の残基を含むかまたは該残基から成るポリペプチド；および

c) 配列番号 2 を含むかまたは配列番号 2 から成るポリペプチド；
から成る群より選択される、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記軟骨形成細胞は、拡大または培養前に哺乳動物から採取または単離される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記軟骨形成細胞は、治療対象の哺乳動物または異なる哺乳動物から採取または単離される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

哺乳動物はヒトである、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、再生医療、特に、変形性関節症、軟骨損傷、および骨軟骨欠損といった軟骨障害の治療に関する。より具体的には、本発明は、骨軟骨もしくは軟骨の移植、または自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation: ACI) といった組織工学的手順およびグラフト手順に使用するための F G F - 1 8 化合物に関する。

【背景技術】

【0002】

軟骨障害は、結合組織における代謝異常による変性により、疼痛、こわばり、患部の動きの制限といった症状が現れるという特徴を有する広範な疾患を指す。これらの障害には、病理、例えば、変形性関節症 (OA) によるものや、あるいは外傷または損傷によるものがある。骨軟骨欠損 (OCD)、すなわち関節内の骨端を覆う軟骨の欠損は、外傷または損傷によることが多いが、病理によることもある。OCD は、OA を引き起こすことがある。成熟した軟骨は、自己修復能力が限られている。これは、特に、血管が存在しないことと、成熟した軟骨細胞の増殖能力が非常に低いことによる。損傷または疾患による傷害を有する軟骨、特に関節軟骨を置換するのは、医師にとって多大なる挑戦であり、かつ利用できる外科的手順が予測できず、限られた時間のみ有効であると考えられている。従って、殆どの若い患者は、治療を希望しない、あるいは、治療をできるだけ長く延ばすよう助言される。治療が必要な場合、標準的な手順は年齢により、全関節置換、軟骨片の移植、または骨髄刺激法 (例えば、マイクロフラクチャー法) など多岐に渡る。マイクロフラクチャー法は、骨髄由来幹細胞による軟骨の沈着を刺激するために軟骨下骨に孔を開ける安価で一般的な手順である。しかし、この技術では十分に軟骨欠損を修復できず、形成された新たな軟骨は主に線維軟骨なので、機能が不十分または変わってしまうことが示されている。実際、線維軟骨の耐久性は、硝子関節軟骨と同じではなく、周囲の硝子軟骨に対し適切に結合しないことがある。この理由のため、新たに形成された線維軟骨は、容易に破壊しやすい (予想寿命は 5 ~ 10 年)。

【0003】

変形性関節症（OA）を有する患者に対する非外科的治療法としては、特に、物理療法、生活習慣の改善（例えば、活動の減少）、支持デバイス、経口薬または注射薬（例えば、非ステロイド性抗炎症薬）、医学的管理（しかし、軟骨傷害を修復する市販の治療薬はない（Lotz, 2010参照））などがある。これらの治療がうまくいかない場合、患者に残されている主な選択肢は、関節置換術（全置換または部分置換術）などの手術である。このようなオプションにより、症状は軽減するが、関節機能の低下につながることが多い。脛骨または大腿骨骨切り術（関節摩擦部のバランスを再調整するために骨を切断する手術）は、症状を軽減し、活動的な生活習慣を維持するのに役立ち、そして関節全置換術の必要を遅延させることができる。関節全置換は、進行した変形性関節症の症状を軽減できるものの、一般に患者の生活習慣および/または活動レベルを変化させることが必要なこともある。

10

【0004】

現在の軟骨修復の手順として、関節全置換術、骨髄刺激（例えばマイクロフラクチャー術）、骨軟骨同種移植または自家移植、および培養軟骨移植（例えば、自家軟骨細胞移植（ACI））が挙げられる。これらの手順は、特に症候性軟骨損傷の患者に、治療の選択肢を与える。

【0005】

骨軟骨同種移植または自家移植は、焦点関節欠損の治療の一般的な手順である。ドナー軟骨源、欠陥部位周辺の軟骨の健康状態、およびインテグレーションの質を含む複数の要因が、この手順の有効性に影響しやすい。残念ながら、骨軟骨移植手順によるインテグレーション結果が良くない場合が多い。

20

【0006】

一般に、組織工学的アプローチでは、細胞を三次元（3D）マトリクス内で増殖させ、このマトリクスの各因子が、組織再生に重要な役割を果たす。軟骨形成に使用される幹細胞の主な種類は、ヒトMSC（hMSC）である（Zhang et al., 2013）。しかし、組織工学において、MSCの種類、足場、および他の要因が重要である。また、確実に均質な硝子軟骨様構造を再生することが、欠損部へ質の高いインテグレーションをするのに重要である。関節軟骨の組織工学におけるこのような形質を確実にしてそれを維持することは複雑であるが、肥大を阻害する因子を使用することによって好適化できる（Tang et al., 2012）。例えば、TGF- β 1の添加は、アグリカン、II型コラーゲン、およびhMSCのSox-9遺伝子発現を向上する。だが、新たに形成された軟骨は、硝子組織ではなく、主に繊維質の短時間しかもたない組織である（Zhang et al., 2013）。

30

【0007】

他の種類の組織工学的手順として自家軟骨細胞移植（ACI）などの軟骨移植術がある。ACIでは、軟骨が治療対象の患者の関節面の体重の負荷が低い領域から採取される。その後、軟骨細胞が単離され、単層培養または3D培養のいずれかで、インビトロで培養される。培養し一定時間が経過した後、得られた軟骨細胞または3D構築物を欠損部を埋めるように移植する。残念ながら、特に単層培養における軟骨細胞の拡大は、線維芽細胞様の軟骨細胞を誘導することが知られている（Magill et al., 2011）。

40

【0008】

線維芽細胞成長因子18（FGF-18）は、軟骨細胞および骨芽細胞の増殖因子である（Ellsworth et al., 2002; Shimoaka et al., 2002）。FGF-18は、軟骨障害、例えば、変形性関節症及び軟骨損傷等に対するFGF-18の単独療法（WO 2008/023063）、又はヒアルロン酸との組み合わせ療法（WO 2004/032849）が提案されている。FGF-18を含有する凍結乾燥製剤は、関節内注射によりOAまたはCIの治療に有望な結果を示している。

【0009】

このような骨軟骨グラフトおよび培養軟骨移植（例えばACI）などの軟骨修復手順が有望であるが、生成された軟骨のインテグレーション率や質を向上させなくてはならない

50

。従って、生成された軟骨の良好なインテグレーションと優れた質（すなわち主に硝子軟骨）を可能にする手順のため改良された方法が必要である。実際に、硝子軟骨の生成は、治療のため、そして生体マトリクスの成分としての両者に価値がある（Getgood et al., 2010）。

【発明の概要】

【0010】

本発明の目的は、組織工学用の移植可能な軟骨材料または骨軟骨／軟骨グラフトを製造する方法であって、F G F - 1 8 化合物を含有する培養培地内で、移植可能な骨軟骨／軟骨材料を形成するのに十分な時間、単層培養または3 D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨／軟骨外植片を培養する工程、を含むまたは上記工程からなる前記方法を提供することである。場合により、F G F - 1 8 化合物を、移植の前、同時、または後のいずれかに、得られた骨軟骨／軟骨材料の移植部位に更に注入することもある。

10

【0011】

別の実施形態では、本発明は、軟骨障害による関節欠損（例えば、軟骨欠損）部位の領域における哺乳動物の軟骨を再生する方法であって、（a）F G F - 1 8 化合物を含有する培養培地内で、単層培養または3 D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨または軟骨外植片を培養する工程；および（b）工程（a）から得られた培養軟骨形成細胞または培養骨軟骨／軟骨外植片をそれを必要とする哺乳動物に投与する工程；を含むまたは上記工程からなる前記方法に関する。場合により、F G F - 1 8 化合物を、細胞／外植片の投与の前、同時、または後のいずれかに、培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片が投与された部位に更に注入することもある。

20

【0012】

代替的な実施形態において本明細書に開示するのは、軟骨障害による関節欠損（例えば、軟骨欠損）の領域における哺乳動物の軟骨を再生する方法であって、（a）培養培地内で、単層培養または3 D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨／軟骨外植片を培養する工程；（b）工程（a）から得られた培養軟骨形成細胞または培養骨軟骨／軟骨外植片をそれを必要とする哺乳動物に投与する工程；並びに、（c）F G F - 1 8 化合物を、培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片が投与された部位に更に注入する工程；を含むまたは上記工程からなる前記方法に関する。工程（c）は、細胞／外植片の投与の前、同時、または後で行うこともある。

30

【0013】

第3の実施形態において、本発明は、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法に使用するためのF G F - 1 8 化合物であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、（a）軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片をインビトロまたはイクスピボで培養する工程、ここで前記培養は、F G F - 1 8 化合物を含む細胞培養培地内で行う；（b）場合により、工程（a）を繰り返して、培養軟骨形成細胞または培養骨軟骨／軟骨グラフトを含む移植材料を得る工程；並びに、（c）工程（b）の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、ここで、工程（a）および工程（b）の間、軟骨形成細胞は、単層培養または3 D培養のいずれで培養してもよい；を含むかまたは上記工程からなる、前記F G F - 1 8 化合物に関する。場合により、F G F - 1 8 化合物を、移植の前、同時、または後のいずれかに、移植部位に更に注入することもある。

40

【0014】

代替的な実施形態において本明細書に開示するのは、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法に使用するためのF G F - 1 8 化合物であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、（a）軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片をインビトロまたはイクスピボで培養する工程；（b）場合により、工程（a）を繰り返して、培養軟骨形成細胞または培養骨軟骨／軟骨外植片を含む移植材料を得る工程；（c）工程（b）の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、こ

50

で、工程 (a) および工程 (b) の間、軟骨形成細胞は、単層培養または 3 D 培養のいずれで培養してもよい；並びに、(d) F G F - 1 8 化合物を移植部位に注入する工程；を含むかまたは上記工程からなる、前記 F G F - 1 8 化合物である。工程 (d) は、移植の前、同時、または後のいずれかに行い得る。

【 0 0 1 5 】

第 5 の実施形態において本明細書で提供するのは、F G F - 1 8 化合物を含む培地中で培養された哺乳動物骨軟骨 / 軟骨外植片または哺乳動物の軟骨形成細胞を含む、それを必要とする哺乳動物における組織工学または骨軟骨 / 軟骨グラフトにおける使用のための組成物である。

【 0 0 1 6 】

本発明の文脈では全体として、軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片は、好ましくは、拡大または培養工程前に哺乳動物から採取または単離される。

【 0 0 1 7 】

本発明の文脈では全体として、軟骨細胞もしくは軟骨形成細胞の 3 D 培養物または骨軟骨 / 軟骨外植片のため、F G F - 1 8 化合物は、好ましくは培養培地に 1 週間あたり約 1、2、または 3 日、間欠的に添加され、前記約 1、2、または 3 日の添加は、少なくとも 2 週間の培養、少なくとも 3 週間の培養または少なくとも 4 週間の培養の間、各週ごとに繰り返される。好ましくは、F G F - 1 8 化合物は、培養培地に 1 週間あたり 1、2、または 3 日、間欠的に添加され、前記 1、2、または 3 日の添加は、2 週間の培養、3 週間の培養または 4 週間の培養の間、各週ごとに繰り返される。代替的に、F G F - 1 8 化合物は培養培地に 1 月あたり約 1、2、または 3 日、間欠的に添加され、前記 1、2、または 3 日の添加は、少なくとも 2 月間の培養、少なくとも 3 月間の培養、または少なくとも 4 月間の培養の間、各月ごとに繰り返される。好ましくは、F G F - 1 8 化合物は培養培地に 1 月あたり 1、2、または 3 日、間欠的に添加され、前記 1、2、または 3 日の添加は、2 月間の培養、3 月間の培養、または 4 月間の培養の間、各月ごとに繰り返される。代替的に、F G F - 1 8 化合物は培養培地に永続的に維持されることもある。軟骨細胞または軟骨形成細胞が単層で培養される場合、F G F - 1 8 化合物は好ましくは永続的に添加されるがこれに限定されない。

【 0 0 1 8 】

本発明の任意の一の実施形態では、軟骨障害は、変形性関節症、軟骨損傷、または骨軟骨欠損である。

【 0 0 1 9 】

本発明の文脈では全体として、F G F - 1 8 化合物は、好ましくは、： a) 配列番号 1 の第 2 8 ~ 2 0 7 位の残基を含むヒト F G F - 1 8 成熟型を含むまたは該成熟型から成るポリペプチド、b) 配列番号 1 の第 2 8 ~ 1 9 6 位の残基を含むかまたは該残基から成るポリペプチド、または c) 配列番号 2 を含むかまたは配列番号 2 から成るポリペプチド、から成る群より選択される。

【 0 0 2 0 】

更に、本発明の文脈では全体として、外植片は好ましくは軟骨外植片であり、軟骨形成細胞は好ましくは成熟組織に由来する軟骨細胞または間葉系幹細胞である。必要に応じて、軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片は、治療対象の哺乳動物または異なる哺乳動物、好ましくは治療対象の哺乳動物と同じ種、から採取または単離される。治療対象の哺乳動物は、好ましくはヒトであるが、代替的に、ウマ、ラクダ、ヒツジ、イヌ、あるいはネコ、ウサギ、ラットまたはマウスのような小さな哺乳動物であってもよいがこれらに限定されない。

【 0 0 2 1 】

定義

本明細書で使用する用語「F G F - 1 8 化合物」又は「F G F - 1 8」は、ヒト F G F - 1 8 タンパク質の生物学的活性を少なくとも 1 つを保持するタンパク質であるという意図である。F G F - 1 8 は、天然型、その成熟型、組換え型、又は切断型であってもよい

10

20

30

40

50

。ヒトFGF-18タンパク質の生物学的活性としては、特に軟骨細胞または骨芽細胞の活性増加(WO98/16644)、あるいは軟骨形成の増強(WO2008/023063)が挙げられる。天然又は野生型のヒトFGF-18は、関節軟骨の軟骨細胞によって発現されるタンパク質である。ヒトFGF-18は、当初zFGF-5と命名されWO98/16644に詳述されている。配列番号1は、天然のヒトFGF-18のアミノ酸配列に相当し、アミノ酸残基1(Met)~27(Ala)から成るシグナルペプチドを有する。ヒトFGF-18の成熟型は、配列番号1の残基28(Glu)~残基207(Ala)のアミノ酸配列(180個のアミノ酸)に相当する。

【0022】

本発明においてFGF-18は、例えば、WO2006/063362で教示される組み換え方法等によって産生することができる。本発明のFGF-18は、発現系や条件により、開始メチオニン(Met)残基または分泌のためのシグナル配列と共に、組み換え宿主細胞において発現される。原核生物の宿主、例えば、大腸菌(E. coli)等において発現される場合、FGF-18はその配列のN末端においてさらなるMet残基を含む。例えば、ヒトFGF-18のアミノ酸配列は、大腸菌(E. coli)で発現される場合、N末端(位置1)のMet残基で開始し、配列番号1の残基28(Glu)~残基207(Ala)がこれに続く。

【0023】

本明細書で使用する用語FGF-18の「切断型」は、配列番号1の残基28(Glu)~196(Lys)を含むかまたは該残基から成るタンパク質を指す。好ましくは、FGF-18タンパク質の切断型は、「trFGF-18」と命名されたポリペプチド(170個のアミノ酸、rhFGF-18またはspriferminとしても知られる)であり、Met残基(N末端)で開始し、野生型ヒトFGF-18のアミノ酸残基28(Glu)~196(Lys)がこれに続く。trFGF-18のアミノ酸配列は、配列番号2(配列番号2のアミノ酸残基2~170は、配列番号1のアミノ酸残基28~196に相当する)に示す。trFGF-18は、ヒトFGF-18の組み換え切断型であり、大腸菌(E. coli)で産生される(WO2006/063362)。trFGF-18は、成熟ヒトFGF-18と同様の活性を示し、例えば、様々な軟骨組織の修復及び再構築につながる軟骨細胞の増殖や軟骨の沈着を増強することが示されている(WO2008/023063)。

【0024】

本明細書で使用する用語「軟骨障害」とは、外傷などの損傷による傷害に起因する障害、軟骨疾患、および関節炎を包含する。そのような障害は、欠損、より好ましくは軟骨欠損をもたらすものである。本明細書に記載のFGF-18製剤の投与によって治療し得る軟骨障害の例としては、変形性関節症等の関節炎、軟骨損傷、および骨軟骨欠損などが挙げられるが、これらに限定されない。軟骨石灰化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、強直性脊椎炎、または肋軟骨炎などの軟骨または関節の変性疾患や障害もこの文言に包含される。国際軟骨修復学会(ICRS)は、軟骨欠損の重症度を評価するための関節鏡による評価システムを以下のように提案している。グレード：0(通常)健康な軟骨。グレード1：軟骨にソフトスポットや水疱を有する。グレード2：軟骨に目に見える小さな裂け目を有する。グレード3：病変に深い裂け目(軟骨層の50%超)を有する。グレード4：軟骨が裂け、下の骨(軟骨下骨)が露出している。(ICRS publication: http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf、page 13を参照のこと)。

【0025】

本明細書で使用する用語「関節炎」は、変形性関節症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、感染性関節炎、乾癬性関節炎、スティル病(若年性関節リウマチの発症)、または離断性骨軟骨炎等の障害を包含する。好ましくは、軟骨が傷害を受けているまたは下にある骨から剥離している疾患または障害を含む。

【0026】

用語「変形性関節症」は、関節炎の最も一般的な形態を意図するのに使用される。用語「変形性関節症」は、原発性変形性関節症および二次性変形性関節症（例えば、The Merck Manual, 17th edition, page 449参照）のいずれも包含する軟骨障害であると考えられている。変形性関節症は、軟骨の破壊によって引き起こされることがある。軟骨が細かく破壊され骨間の関節に疼痛や腫れを引き起こすことがある。時間が経つにつれて、軟骨が完全に摩耗し、骨同士がぶつかってしまう。変形性関節症は、あらゆる関節に影響するが、通常は、手、肩、そして股関節、膝関節、脚、背骨といった体重を支える関節に関連する。好ましい例では、変形性関節症は、変形性膝関節症または変形性股関節症である。この用語は、特に、O A R S I 分類システムによりステージ 1 ～ステージ 4 またはグレード 1 ～グレード 6 に分類される変形性関節症の形態を包含する。当業者は、当該技術分野で 10
使用されている変形性関節症の分類、特に O A R S I 評価システムを良く認識している（O O C H A S とも称される；例えば、Custers et al., 2007 参照）。変形性関節症は、本発明の F G F - 1 8 化合物を投与することによって治療できる好ましい軟骨障害の一つである。

【0027】

本明細書で使用する用語「軟骨損傷」とは、特に外傷から生じる、軟骨の障害または軟骨の損傷である。軟骨損傷は、外傷による物理的な破壊の結果として、特に事故または手術（例えば、マイクロフラクチャー法による手術）後に生じることがある。用語「軟骨損傷」は、軟骨または骨軟骨骨折および半月板の損傷をも含む。関節組織のスポーツによる 20
損傷又はスポーツによる摩耗もまたこの用語の定義内と考えられる。また、この用語は、微小な障害または鈍的な外傷、軟骨骨折、骨軟骨骨折、または半月板損傷をも含む。

【0028】

用語「骨軟骨欠損（osteochondral defects：O C D）」は、軟骨の欠損が関節内の骨の端を覆う軟骨障害である。これらの欠損は、外傷または損傷に起因する 경우가多いが、病理に起因することもある。O C D は、O A を引き起こすことがある。O C D は、一般に、軟骨のみでなく、骨の一部も関与することを意味する。軟骨しか関与していない場合、用語「軟骨損傷」（上記参照）称することが好ましいだろう。

【0029】

用語「組織工学」は、自家軟骨細胞移植（A C I）をも包含する。また、用語「組織工学」は、再生医療としても知られている。細胞または組織は、単層培養または 3 D 培養のいずれかで培養することができる。このような手順の目的は、組織の一部または全体を修復または交換することである。 30

【0030】

用語「グラフト」は、移植（トランスプランテーションまたはインプランテーション）に関連する。この手順は、再生医療の一部でもある。この用語は、骨軟骨 / 軟骨の自家移植片または骨軟骨 / 軟骨の同種移植片の移植（トランスプランテーション / インプランテーション）などの骨軟骨または軟骨（また、本明細書では骨軟骨 / 軟骨とも称する）の移植（トランスプランテーション / インプランテーション）をも含む。グラフトでは、外植片は、治療対象の哺乳動物（すなわち自家移植）または別の哺乳動物（好ましくは同種、同種移植）から採取される。通常、そのような移植片は、健康な軟骨切片、または健康な 40
骨軟骨組織から採取される。このようなグラフトは、好ましくは、軟骨欠損のレベルで行われる。

【0031】

用語「移植可能な軟骨材料」または「移植可能な材料」は互換可能に使用される。これらは、軟骨細胞といった軟骨形成細胞、または、それを必要とする哺乳動物に移植（トランスプラントまたはインプラント）するために調製された骨軟骨 / 軟骨外植片を指す。このような移植可能な材料は、好ましくは、軟骨欠損のレベルで移植（トランスプラントまたはインプラント）される。

【0032】

本発明の文脈では、治療の「効果」は、軟骨の厚さ、例えば、関節部の関節軟骨の厚さ 50

の変化に基づいて測定できる。この厚さは、例えば、X線コンピュータ断層撮影法、磁気共鳴画像(MRI)、また超音波測定により評価できる。

【0033】

「約24、48、または72時間」または「約1日、2日または3日」の文脈で使用される用語「約」は、FGF-18化合物の補充後24、48、または72時間の間隔で培養培地を交換する、あるいはFGF-18化合物の補充後24、48、または72時間+/-数時間(例えば、+/-1、2、3または4時間)の変動をもって培養培地を交換することを包含する。同様に、「約7日」「約1週間」「約4週間」または「約1月」の文脈で使用される用語「約」は、添加と添加の間がそれぞれ7日、1週間、4週間(すなわち28日)または1月離れているとき、その添加と添加の間がそれぞれ7日+/-1または2日、1週間+/-1または2日、4週間+/-数日(例えば、+/-1、2、3、4日)または1月+/-数日(例えば、+/-1、2、3、4日)の変動をもって離れていることを包含する。実際、特に実用的な観点から、培養培地の交換またはFGF-18化合物の次の補充は、例えば、培養培地の交換がFGF-18化合物の補充からぴったり24、48、または72時間後、あるいは前回の補充から日単位でぴったり4週間(28日)といった、正確な間隔で行うことが常にできるわけではない、ということを理解すべきである。従って、本発明の文脈では、4週間は、前回の添加から28日を意味するが、24、25、26、27、28、29、30、31、または32日であってもよい。本発明の文脈では、用語「4週間」は、用語「1月」に類似し、交換可能に使用できる。使用される用語「4週間」は、好ましくは、「日数(days)」について言及するもの(例えば、1回目の補充が月曜日なら、次の補充は4週間後の月曜日)として使用されるべきであり、「月」は、好ましくは、「日付(date)」について言及するもの(例えば、1回目の補充が8月1日なら、次の補充は9月1日)として使用されるべきである。

【0034】

用語「サイクル」は、補充のサイクルを意味する。本発明の文脈では、1週間ごとのサイクル(または7日ごとのサイクル)は、約1週間(約7日)のうち1日の間、培養培地をFGF-18化合物で補充することを意味する。よって、前記サイクルは、補充された培地で1日培養し、補充されていない培地(すなわちFGF-18なし)で約6日培養することを含む。同様に4週間ごとのサイクルは、約4週間のうち1日の間、培養培地が、FGF-18化合物で補充されることを意味する。よって、前記サイクルは、補充された培地で1日培養し、補充されていない培地(すなわちFGF-18なし)で約4週間培養することを含む。同じことが、月ごとのサイクルでも当てはまる。つまり、月ごとのサイクルは、約1月のうち1日の間、培養培地をFGF-18化合物で補充することを意味する。よって、前記サイクルは、補充された培地で1日培養し、補充されていない培地(すなわちFGF-18なし)で約1月培養することを含む。サイクルは繰り返してもよい。

【0035】

骨軟骨/軟骨グラフト、および培養軟骨移植(例えばACI)などの軟骨修復手順が有望であるが、生成軟骨のインテグレーション率や質を向上させなくてはならない。従って、生成された軟骨の良好なインテグレーションと優れた質(すなわち主に硝子軟骨)を可能にする手順のため改良された方法が必要である。驚くことに、FGF-18を再生医療(組織工学手順またはグラフト手順等)において使用すると、生成された軟骨の質が向上し、細胞/外植片の欠損部に対するインテグレーションが良好になることが発見された。

【0036】

本発明の目的は、組織工学用の移植可能な軟骨材料または骨軟骨/軟骨グラフトを製造する方法であって、FGF-18化合物を含有する培養培地内で、移植可能な骨軟骨/軟骨材料を形成するのに十分な時間、単層培養または3D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨/軟骨外植片を培養する工程、を含むまたは上記工程からなる前記方法を提供することである。前記移植可能な軟骨材料は、変形性関節症、軟骨損傷(軟骨欠損を含む)または骨軟骨欠損といった軟骨障害の治療に有用であり得る。好ましくは、軟骨形成細胞または骨軟骨/軟骨外植片は、拡大または培養工程前に哺乳動物から採

10

20

30

40

50

取または単離される。従って、代替的に、本発明の目的は、組織工学用の移植可能な軟骨材料または骨軟骨／軟骨グラフトを製造する方法であって、(a)軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片を、哺乳動物から採取または単離する工程；および(b)FGF-18化合物を含有する培養培地内で、移植可能な骨軟骨／軟骨材料を形成するのに十分な時間、単層培養または3D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨／軟骨外植片を培養する工程、を含むまたは上記工程からなる前記方法を提供することである。前記移植可能な軟骨材料は、変形性関節症、軟骨損傷、または骨軟骨欠損といった軟骨障害の治療に有用であり得る。場合により、FGF-18化合物を、移植の前、同時、または後のいずれかに、得られた軟骨材料または骨軟骨／軟骨外植片の移植部位に更に注入することもある。

10

【0037】

別の実施形態では、本発明は、軟骨障害による関節軟骨の欠損領域における哺乳動物の軟骨を再生する方法であって、(a)FGF-18化合物を含有する培養培地内で、単層培養または3D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨／軟骨外植片を培養する工程；および(b)工程(a)から得られた培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片をそれを必要とする哺乳動物に投与する工程；を含むまたは上記工程からなる前記方法に関する。前記軟骨を再生する方法は、変形性関節症、軟骨損傷、または骨軟骨欠損といった軟骨障害の治療に有用であり得る。好ましくは、軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片は、培養工程前に哺乳動物から採取または単離される。従って、代替的に、本発明は、軟骨障害による関節軟骨の欠損領域における哺乳動物の軟骨を再生する方法であって、(a)軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片を、哺乳動物から採取または単離する工程；(b)FGF-18化合物を含有する培養培地内で、単層培養または3D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨／軟骨外植片を培養する工程；並びに、(c)工程(b)から得た培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片を、それを必要とする哺乳動物へ投与する工程；を含むまたは上記工程からなる前記方法に関する。前記方法は、変形性関節症、軟骨損傷、または骨軟骨欠損といった軟骨障害の治療に有用であり得る。場合により、FGF-18化合物を、細胞／外植片の投与の前、同時、または後のいずれかに、培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片が投与された部位に更に注入することもある。

20

【0038】

代替的な実施形態において本明細書に開示するのは、軟骨障害による関節軟骨の欠損領域における哺乳動物の軟骨を再生する方法であって、(a)培養培地内で、単層培養または3D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨／軟骨外植片を培養する工程；(b)工程(a)から得た培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片を、これを必要とする哺乳動物へ投与する工程；並びに、(c)FGF-18化合物を、培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片が投与された部位に注入する工程、を含むまたは上記工程からなる前記方法である。工程(c)は、細胞／外植片の投与の前、同時、または後で行うこともある。別の実施形態では、本発明は、軟骨障害による関節軟骨の欠損領域における哺乳動物の軟骨を再生する方法であって、(a)軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片を、哺乳動物から採取または単離する工程；(b)培養培地内で、単層培養または3D培養のいずれかで軟骨形成細胞を培養する、あるいは骨軟骨／軟骨外植片を培養する工程；(c)工程(b)から得た培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片を、それを必要とする哺乳動物へ投与する工程；並びに、(d)FGF-18化合物を、培養軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片が投与された部位に注入する工程；を含むまたは上記工程からなる前記方法に関する。工程(d)は、細胞／外植片の投与の前、同時、または後のいずれかにに行い得る。

30

40

【0039】

第4の実施形態において、本発明は、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法に使用するためのFGF-18化合物であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、(a)軟骨形成細胞または骨軟骨／軟骨外植片をインビトロまた

50

はイクスビボで培養する工程、ここで前記培養は、F G F - 1 8 化合物を含む細胞培養培地で行われる；(b) 場合により、工程 (a) を繰り返して、培養軟骨形成細胞または培養骨軟骨 / 軟骨外植片を含む移植材料を得る工程；並びに、(c) 工程 (b) の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、ここで、工程 (a) および工程 (b) の間、軟骨形成細胞は、単層培養または 3 D 培養のいずれで培養してもよい；を含むかまたは上記工程からなる、前記 F G F - 1 8 化合物に関する。好ましくは、軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片は、拡大または培養工程前に哺乳動物から採取または単離される。従って、代替的に、本発明は、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法に使用するための F G F - 1 8 化合物であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、(a) 軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片を、哺乳動物から単離する工程；(b) 前記軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片をインビトロまたはイクスビボで培養する工程、ここで前記培養は、F G F - 1 8 化合物を含む細胞培養培地で行われる；(c) 場合により、工程 (a) および (b) を繰り返して、培養軟骨形成細胞または培養骨軟骨 / 軟骨外植片を含む移植材料を得る工程；並びに、(d) 工程 (c) の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、ここで、工程 (b) および工程 (c) の間、軟骨形成細胞は、単層培養または 3 D 培養のいずれで培養してもよい；を含むかまたは上記工程からなる、前記 F G F - 1 8 化合物に関する。場合により、F G F - 1 8 化合物を、移植の前、同時、または後のいずれかに、移植部位に更に注入することもある。

【 0 0 4 0 】

代替的な実施形態において本明細書に開示するのは、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法に使用するための F G F - 1 8 化合物であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、(a) 軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片をインビトロまたはイクスビボで培養する工程；(b) 場合により、工程 (a) を繰り返して、培養軟骨形成細胞または培養骨軟骨 / 軟骨外植片を含む移植材料を得る工程；(c) 工程 (b) の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、ここで、工程 (a) および工程 (b) の間、軟骨形成細胞は、単層培養または 3 D 培養のいずれで培養してもよい；並びに、(d) F G F - 1 8 化合物を移植部位に注入する工程；を含むかまたは上記工程からなる、前記 F G F - 1 8 化合物である。工程 (d) は、移植の前、同時、または後のいずれかにに行い得る。更なる代替では、本発明は、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法に使用するための F G F - 1 8 化合物であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、(a) 軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片を、哺乳動物から単離する工程；(b) 前記軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片をインビトロまたはイクスビボで培養する工程、ここで前記培養は、F G F - 1 8 化合物を含む細胞培養培地で行われる；(c) 場合により、工程 (a) および (b) を繰り返して、培養軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片を含む移植材料を得る工程；(d) 工程 (c) の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、ここで、工程 (b) および工程 (c) の間、軟骨形成細胞は、単層培養または 3 D 培養のいずれで培養してもよい；並びに、(e) F G F - 1 8 化合物を移植部位に注入する工程；を含むかまたは上記工程からなる、前記 F G F - 1 8 化合物に関する。工程 (e) は、移植の前、同時、または後のいずれかにに行い得る。

【 0 0 4 1 】

代替的に、本発明は、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、(a) 軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片を、哺乳動物から単離する工程；(b) 前記軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片をインビトロまたはイクスビボで培養する工程、ここで前記培養は、F G F - 1 8 化合物を含む細胞培養培地で行われる；(c) 場合により、工程 (a) および (b) を繰り返して、培養軟骨形成細胞または骨軟骨 / 軟骨外植片を含む移植材料を得る工程；並びに、(d) 工程 (c) の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、ここで、工程 (b) および工程 (c) の間、軟骨形成細胞は、単層培養また

は3D培養のいずれで培養してもよい；を含むかまたは上記工程からなる、前記方法に関する。場合により、FGF-18化合物を、移植の前、同時、または後のいずれかに、移植部位に更に注入することもある。

【0042】

代替的な実施形態において本明細書に開示するのは、哺乳動物の軟骨組織における欠損を治療する方法であって、ここで、前記軟骨欠損は軟骨障害によるものであり、該方法は、(a)軟骨形成細胞または骨軟骨/軟骨外植片を、哺乳動物から単離する工程；(b)前記軟骨形成細胞または骨軟骨/軟骨外植片をインビトロまたはイクスビボで培養する工程、ここで前記培養は、細胞培養培地で行われる；(c)場合により、工程(a)および(b)を繰り返して、培養軟骨形成細胞または骨軟骨/軟骨グラフトを含む移植材料を得る工程；(d)工程(c)の移植材料を、前記治療を必要とする哺乳動物の欠損部へ移植する工程、ここで、工程(b)および工程(c)の間、軟骨形成細胞は、単層培養または3D培養のいずれで培養してもよい；並びに、(e)FGF-18化合物を移植部位に注入する工程；を含むかまたは上記工程からなる、前記方法である。工程(e)は、移植の前、同時、または後のいずれかに行い得る。

10

【0043】

第5の実施形態において本明細書で提供するのは、FGF-18化合物を含む培地中で培養された哺乳動物骨軟骨/軟骨外植片または哺乳動物の軟骨形成細胞を含む、それを必要とする哺乳動物における組織工学または骨軟骨/軟骨グラフトといった再生医療における使用のための組成物である。好ましくは、それを必要とする哺乳動物は、軟骨障害を有する。好ましくは、軟骨形成細胞または骨軟骨/軟骨外植片は、好ましくは、拡大または培養工程前に哺乳動物から採取または単離される。

20

【0044】

別の実施形態において本明細書で開示するのは、変形性関節症や軟骨損傷(軟骨欠損を含む)または骨軟骨欠損といった軟骨障害の治療における使用のためのFGF-18化合物であって、軟骨修復手順の枠組みにおいて培養培地に投与される上記FGF-18化合物である。代替的に本明細書で開示するのは、変形性関節症や軟骨損傷(軟骨欠損を含む)または骨軟骨欠損といった軟骨障害の治療方法であって、FGF-18化合物が、軟骨修復手順の枠組みにおいて培養培地に投与される上記方法である。特に、前記軟骨修復手順は、軟骨組織工学、自家軟骨細胞移植、または骨軟骨グラフトから成る群より選択される。

30

【0045】

第1の実施形態により得られた移植可能な軟骨材料または第2の実施形態により再生された軟骨は、軟骨障害の治療に使用するためのものであることが理解されるべきである。

【0046】

本発明の文脈では全体として、FGF-18化合物は、好ましくは、：a)配列番号1の第28~207位の残基を含むヒトFGF-18成熟型を含むまたは該成熟型から成るポリペプチド、b)配列番号1の第28~196位の残基を含むかまたは該残基から成るポリペプチド、またはc)配列番号2を含むかまたは配列番号2から成るポリペプチドから成る群より選択される。特に、本化合物は、ヒト野生型成熟FGF-18またはtrFGF-18より選択される。

40

【0047】

本明細書に開示するのは、1ミリリットル(mL)の培養培地あたり、1ナノグラム(ng)~50マイクログラム(μgまたはmcg)、好ましくは5ng~5μg、または好ましくは5ng~1μg、またはより好ましくは10ng~500μg、または更により好ましくは10ng~100ngの濃度で培養培地に添加(すなわち培地補充)されるFGF-18化合物である。好ましい実施形態では、培地は、1mLの培養培地あたり、約1、5、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、400、500または1000ngの濃度でFGF-18化合物が補充される。好ましい濃度は、1mLの培養培地あたり、10、20、30、40、50、100、150また

50

は 200 ng である。

【0048】

本発明の文脈では全体として、FGF-18を、軟骨形成細胞または骨軟骨/軟骨外植片が培養される培地に添加する。好ましくは、前記FGF-18化合物は、培養培地に1週間(約1週間)あたり約1、2、または3日、間欠的に添加され、前記約1、2、または3日の添加は、少なくとも2週間の培養、少なくとも3週間の培養または少なくとも4週間の培養の間、各週ごとに繰り返される。好ましくは、前記FGF-18化合物は、培養培地に1週間あたり1、2、または3日、間欠的に添加され、前記1、2、または3日の添加は、2週間の培養、3週間の培養または4週間の培養の間、各週ごとに繰り返される。1日は好ましくは約24時間(すなわち24時間+/-4時間)であると理解され、2日は好ましくは約48時間(すなわち48時間+/-4時間)であると理解され、3日は好ましくは約72時間(すなわち72時間+/-4時間)であると理解される。補充された培地で1日培養した後、その後、FGF-18化合物なしで6日間培養を行い、補充された培地で2日培養した後、その後、FGF-18化合物なしで5日間培養を行い、そして補充された培地で3日培養した後、その後、FGF-18化合物なしで4日間培養を行うということである。前記スキームは1週間ごとのサイクルに対応する。例えば、1日の培養の場合、FGF-18化合物を培養培地に火曜日に添加する場合、前記培養培地は、前記補充から1日後、すなわち水曜日に前記培養培地から除去される。その後、次の補充は、第1回目のFGF-18化合物の添加の次の火曜日に行う。同じスキーム(すなわち、前回の補充から1週間後)の場合、培養補充は毎週(例えば毎週火曜日)繰り返すことができる。より利便性を高めるために、FGF-18化合物の補充は、前回の補充から約1週間後、すなわち1週間(または7日)+/-1または2日後であってもよい。例えば前回の補充が前の火曜日に行われた場合、次の補充は、月曜日または水曜日に行ってもよい。

【0049】

代替的に、FGF-18化合物は培養培地に1月あたり1、2、または3日、間欠的に添加され、前記1、2、または3日の添加は、少なくとも2月間の培養、少なくとも3月間の培養、または少なくとも4月間の培養の間、各月ごとに繰り返されるものでもよい。軟骨形成細胞の3D培養の場合、好ましくは、前記FGF-18化合物は培養培地に1月あたり1、2、または3日、間欠的に添加され、前記1、2、または3日の添加は、2月間の培養、3月間の培養、または4月間の培養の間、各月ごとに繰り返される。1日は好ましくは約24時間(すなわち24時間+/-4時間)であると理解される。補充された培地で1、2、または3日培養した後、FGF-18化合物なしで1月間培養を行う。前記スキームは1月ごとのサイクルに対応する。例えば、1日の培養の場合、FGF-18化合物を培養培地に8月1日に添加する場合、前記培養培地は、前記補充から1日後、すなわち8月2日に前記培養培地から除去される。その後、次の補充は、9月1日に行う。同じスキーム(すなわち、前回の補充から1月後)の場合、培養補充は毎月繰り返すことができる。より利便性を高めるために、FGF-18化合物の補充は、前回の補充から約1月後、すなわち1月+/-1、2、3または4日後であってもよい。例えば前回の補充が8月1日に行われた場合、次の補充は、8月31日または9月3日に行ってもよい。

【0050】

上記で定義したように、「4週間」および「月ごと」または「1月」は交換可能である。従って、本発明によれば、FGF-18化合物は培養または培地に約4週間ごとに1、2、または3日、間欠的に添加され、前記1、2、または3日の添加は、少なくとも2サイクルの補充、少なくとも3サイクルの補充、または少なくとも4サイクルの補充で、4週間ごとに繰り返されるものでもよい。好ましくは、前記FGF-18化合物は培養または培地に1月あたり1、2、または3日、間欠的に添加され、前記1、2、または3日の添加は、2月間の培養、3月間の培養、または4月間の培養の間、各月ごとに繰り返される。1日は好ましくは約24時間(すなわち24時間+/-4時間)であると理解される。補充された培地で1、2、または3日培養した後、FGF-18化合物なしで4週間培

養を行う。前記スキームは4週間ごとのサイクルに対応する。例えば、1日の培養の場合、FGF-18化合物を培養培地に火曜日に添加する場合、前記培養培地は、前記補充から1日後、すなわち水曜日に前記培養培地から除去される。その後、次の補充は、第1回目の添加から4週間後の火曜日に行う。同じスキーム（すなわち、前回の補充から1ヶ月後）の場合、培養補充は4週間ごとに繰り返すことができる。より利便性を高めるために、FGF-18化合物の補充は、前回の補充から約4週間後、すなわち4週間+/-1、2、3または4日後であってもよい。例えば前回の補充が10月1日の火曜日に行われた場合、次の補充は、10月28日の月曜日または10月31日の木曜日に行ってもよい。

【0051】

軟骨細胞または軟骨形成細胞が単層で培養される場合FGF-18化合物は好ましくは永続的に添加されるがこれに限定されない。反対に、軟骨細胞または軟骨形成細胞が3D培養で培養される場合、または骨軟骨/軟骨外植片の場合、FGF-18化合物は好ましくは間欠的に添加されるがこれに限定されない。

【0052】

本願に記載の、trFGF-18のようなFGF-18化合物、及びFGF-18化合物を含有する組成物（「FGF-18組成物」）、プロセス、使用、および方法は、軟骨障害を治療するのに有用である。特に、例えば、加齢による表面の線維化による滑膜関節における関節軟骨の欠損、変形性関節症による軟骨変性、そして損傷または疾患による軟骨または骨軟骨の欠損を治療するのに有用であり得る。また、これらは、離断性骨軟骨症および変性関節疾患による関節疾患の治療をするに有用であり得る。再建および整形手術の分野で、本発明にかかるFGF-18化合物、FGF-18組成物、プロセス、および方法は、大規模な組織欠損再建のための自家または同種軟骨拡大および移植に有用であろう。FGF-18組成物は、関節の洗浄、骨髄の刺激、摩耗した関節の形成術、軟骨下穿孔、または軟骨下骨のマイクロフラクチャー術に関連する軟骨損傷を修復するために使用できる。

【0053】

好ましい実施形態では、本発明による治療対象の軟骨障害は、変形性膝関節症または変形性股関節症などの変形性関節症である。治療対象の変形性関節症は、例えば、一次性変形性関節症または二次性変形性関節症、OARSI分類システムによりステージ1～ステージ4またはグレード1～グレード6に分類される変形性関節症であり得るが、これらに

【0054】

本発明の文脈では全体として、FGF-18化合物を移植部位に添加する場合、該添加は、移植の前、同時、または後のいずれかに行い得る。添加を移植の前または後に行う場合、好ましくは移植の数時間前または数時間後以内（例えば、前後1、2、3または4時間だがそれらに限定されない）に行う。前記注入は、移植の数日前または数日後以内（例えば、前後1、2、3または4日だがそれらに限定されない）に行い得る。かかる添加が移植と同時に行為なれなくても患者に有害ではない。実際、FGF-18化合物の注射は、外科手術、または他の非侵襲的手順を必要としない。

【0055】

別の好ましい実施形態では、本発明の治療対象の軟骨障害は、微小骨折または軟骨欠損、または骨軟骨欠損を含む軟骨損傷である。

【0056】

本発明の文脈では全体として、外植片は好ましくは軟骨外植片であり、軟骨形成細胞は好ましくは軟骨細胞、成熟組織に由来する軟骨細胞または間葉系幹細胞である。必要に応じて、軟骨形成細胞または骨軟骨/軟骨外植片は、治療対象の哺乳動物（すなわち治療を必要とする哺乳動物）または異なる哺乳動物（好ましくは同じ種）から採取される。前記哺乳動物は、好ましくはヒトであるが、代替的に、ウマ、ラクダ、ヒツジ、イヌ、あるいはネコ、ウサギ、ラットまたはマウスのような小さな哺乳動物であってもよいがこれらに

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】図1は、軟骨欠損修復モデルの調製を示す：(A) 8mmの軟骨プラグ、(B) 中央の4mmの欠損部の作成、(C) 欠陥部への軟骨の挿入、および(D) 修復構造体の長期培養。ODは外径を意味し、そしてIDは内径を意味する。

【0058】

【図2】図2A - Cは、異なる処理による3D μ CT再構成の横断面を示す。図2Dは、対照から1 + 30処理および1 + 6処理へと頻度が上昇するに伴う、修復された欠損部のインテグレーション強度を示す。図2Eは、押し出し試験リグの実験設定を示す。エラーバーはSEMである。

10

【0059】

【図3】図3は、軟骨 - 軟骨修復構造体の μ CTスキャンを示す。左側：代表的なサンプルの第一の μ CTスキャン切片。中央：三次元再構成。右側：再構成の断面。 μ CTスキャンにより、対照から1 + 30、1 + 6処理へとインテグレーションが増強することが実証される。

【0060】

【図4】図4は、rhFGF18によるCTAの処理を示す。

【0061】

【図5】図5は、rhFGF18なしでの(CTR)、rhFGF18の永続的な存在下で(perm)、rhFGF18による、最初の週のみ(1w)又は1週間に1日(1d/w)で、4週間処理を行った後のDNA含有量/CTAから推定される細胞含有量/CTAを示す。rhFGF18は、10又は100 ng/mlで使用した。N = 4。* / * * * は、それぞれ、対照に対し $p < 0.05$ 及び 0.001 での有意な差異を意味する。

20

【0062】

【図6】図6は、rhFGF18なしでの(CTR)、rhFGF18の永続的な存在下で(perm)、rhFGF18による、最初の週のみ(1w)又は1週間に1日(1d/w)で、4週間処理を行った後のGAG/CTA及びHPro/CTA含有量を示す。rhFGF18は、10又は100 ng/mlで使用した。N = 4。* / * * / * * * / は、それぞれ、対照に対し $p < 0.05$ 、 0.01 及び 0.001 での有意な差異を意味する。

30

【0063】

【図7】図7は、rhFGF18なしでの(CTR)、rhFGF18の永続的な存在下で(perm)、rhFGF18による、最初の週のみ(1w)又は1週間に1日(1d/w)で、4週間処理を行った後のCTAで評価された、I型コラーゲン、II型コラーゲン、及びSox9発現、並びにコラーゲンII/I比率を示す。rhFGF18は、10又は100 ng/mlで使用した。N = 4。* / * * / * * * / は、それぞれ、対照に対し $p < 0.05$ 、 0.01 及び 0.001 での有意な差異を意味する。

【0064】

【図8】図8は、rhFGF18(100 ng/ml)不在下(CTR)又は永続的な存在下における単層で1又は2週間培養されたウシ初代軟骨細胞を示す。細胞濃度は、N = 6で決定された。I型コラーゲン、II型コラーゲン、及びSox9発現(N = 4)は、定量的リアルタイムPCRにより測定された。

40

【0065】

【図9】図9は、rhFGF18なしでの(CTR)、rhFGF18の永続的な存在下で(perm)、rhFGF18による、最初の週のみ(1w)又は1週間に1日(1d/w)で、4週間処理を行った後のDNA含有量/CTAから推定された細胞含有量/CTAを示す。* は、対照に対し $p < 0.05$ での有意な差異を意味する。

【0066】

【図10】図10は、rhFGF18なしでの(CTR)、rhFGF18の永続的な存在下で(perm)、rhFGF18による、最初の週のみ(1w)又は1週間に1日(

50

1 d / w) で、4 週間処理を行った後の G A G 含有量を示す。* は、対照に対し $p < 0.05$ の有意な差異を意味する。

【0067】

【図11】図11は、rhFGF18なしでの(CTR)、rhFGF18の永続的な存在下で(perm)、rhFGF18による、最初の週のみ(1w)又は1週間に1日(1d/w)で、4週間処理を行った後のCTAで評価した、Iコラーゲン、II型コラーゲン、及びSox9発現、並びにコラーゲンII/I比率を示す。* は、対照に対し $p < 0.05$ の有意な差異を意味する。

【発明を実施するための形態】

【0068】

配列番号1：天然ヒトFGF-18のアミノ酸配列。

【0069】

配列番号2：組み換え切断型FGF-18(trFGF-18)のアミノ酸配列。

【実施例】

【0070】

材料：

本実施例の組み換え切断型FGF-18(rhrFGF18)は、WO2006/063362に記載される技術に従い大腸菌における発現により調製した。以下の実施例において、rhrFGF18、FGF-18、及びspriferminは、互換的に使用される。

【0071】

実施例1：

方法：

新鮮な硝子軟骨を若いウシ膝(生後3~6ヶ月)の滑車溝から採取した。8mmの円筒状外植片(図1A)を、生検パンチにより取り出し、完全培地(DMEM 4.5g/L、D-グルコース及びL-グルタミン、10%FBS、1%PSF、1%ファンギゾン、1%MEM ビタミン、25mM HEPES及び50µg/mlのビタミンC)において一晩、培養した。試料は、骨をトリミングし、欠損部(4mmの直径)を作成し、コア及び環状修復構造体(図1B)を形成した。内部コア及び外環の両者を24時間、別々に培養し、その後、欠損部に、元のコアを充填した。次に、試料を完全培地において培養するか、又はSprifermin(rhFGF18、100ng/ml)により処理した。処理は、週に1回rhFGF18を24時間添加するか(1+6)(毎週繰り返す)、又は24時間の処理を1回行った後、完全培地において1ヶ月培養した(1+30日)。試料を、4週間の培養の後、採取した。押出し機械的試験($n = 4 \sim 6$)を、カスタム試験リグ(図2E、[3])を用いて実施した(Instron 5848, Instron, Norwood, MA)。ピークの力をインテグレーション領域で除算することによりインテグレーション強度を計算した。3D可視化のために、試料($n = 6$)を、改変ルゴール溶液(蒸留水中、2.5% I_2 及び5%KI)に24時間浸し[4]、55kVのエネルギーレベル及び145µAの強度で、6µm及び10.5µmのボクセルサイズのµCT(µCT 35及びvivaCT 40、SCANCO Medical, Wayne, PA)によりスキャンした。スキャンを、製造業者のソフトウェアを用いて、分析し、再構成し、そして断面を用いて、欠損部のインテグレーションを評価した。追加試料($n = 3$)を、4%PFAにおいて一晩固定し、細胞及びその界面でのマトリクス沈着について、組織学的分析した。

【0072】

結果：

対照試料のインテグレーション強度(図2D)は最も低く(2.5 ± 1.4 kPa)、1+30(毎月のサイクル)(5.0 ± 2.4 kPa)及び1+6(毎週のサイクル)(10.2 ± 3.7 kPa)処理の順で、次第に上昇した。その結果は、研究において可能な再生数で対照及び処理群を比較すると顕著であったが、統計学的有意性はなかった。対照構造体のµCT分析(図3、上部左側)は、明確な暗色の円状部を示し、外環と内部コ

10

20

30

40

50

ア間の分離、つまり、インテグレーションが不良であることが示唆される。1 + 30 処理（図3、中央左側）は、あまり明確でない円状部を示し、分離度が小さく、インテグレーションが高いことを示唆し、そして1 + 6 処理（図3、底部左側）は、界面を通して非常に均質な μ CTシグナルを示し、インテグレーションの度合いが最高であることが示す。インテグレーションがこのように向上するという証拠は、試料全体の垂直断面及び横断面の両者で明らかであった。

【0073】

軟骨修復の成功には、（人工又は天然の）修復材料が、周囲の軟骨にうまくインテグレーションされ、負荷が確実に界面を通して連続的に伝達されること（そして応力が集中しないこと）が必要である。この研究において、本発明者は、良好に形成されたエキスピボ（外植）軟骨修復モデルにおいて軟骨のインテグレーションを増強するSpriferminの能力を調べた。Spriferminは、軟骨細胞で前増殖性効果を有することが確立され、この生物学的薬剤への一時的（24時間）な暴露が非常に優れた反応をもたらす（Elthworth et al., 2002）。本発明の知見により、Spriferminが界面でのインテグレーション強度及びマトリクス沈着を改善する（GAG含有プロテオグリカンの上昇により、より均等な減衰を示す造影 μ CTにより明らか）ことが実証される。この研究において、1週間に1回24時間添加することを4週間行うことは、1ヶ月のあいだ24時間処理を1回しかしない場合よりも全体的に良好な結果を招く。また、この添加計画は、1週間に1回のサイクルの添加計画ほど良好ではないが、対照構造体（すなわち、Sprifermin処理の不在下）に比べ、驚くべき改善性を提供するので、有用である。この研究は、生物学的薬剤（及び特に、sprifermin）が、臨床学的に関連する修復モデルにおいて軟骨表面のインテグレーションを改善したことを始めて実証する。

【0074】

結論：

この研究は、Spriferminが、軟骨修復モデルにおいて軟骨表面のインテグレーションを改善可能であることを実証する。この発見は、軟骨様の生体材料が、臨床学的な好結果を達成するために、天然の軟骨と正常にインテグレーションする必要があるような例えばOATSといった手術手順、及び組織工学アプローチにおいて、有用性がある可能性を示す。

【0075】

実施例2：

方法：

初代変形性関節症の軟骨細胞を、膝関節全置換術を受けた患者の軟骨から単離した。処置前に、細胞を、まず、単層培養下で数日間培養し、そして次に、足場のない3D培養下で1週間培養した。処理は、合計4週間にわたり、永続的に又は1日/週、rhFGF18 [100 ng/ml]を用いたインキュベーションをおこなった。結果を、Spriferminを含まない対照培地と比較した。生化学的アッセイ、定量的PCR (qPCR) 及び組織学的アッセイを用いて、3D構造体を特徴づけた。

【0076】

結果（データは示さず）：

確実に表現型を維持するために、3D足場のない培養を用いて、hCA軟骨細胞に対する効果を試験した。この設定においては、rhFGF18 [1日/週]が、細胞含有量に対して有益な効果を有し、そして3D構造体のサイズ及びマトリクス含有量（GAG及びHPro含有量）を非常に高めることが見出された。また、rhFGF18は、未処理の細胞に比べて、I型コラーゲンの発現が低減することも見出された。

【0077】

結論：

ウシ及びブタ軟骨細胞に関してのこれまでの研究において見られるように、spriferminがhOA軟骨細胞において同化活性を有することが見出された。この発見は、軟骨様の生体材料が、臨床学的な好結果を達成するために、天然の軟骨と正常にインテグ

レーションする必要がある組織工学アプローチにおいて有用性がある可能性を示す。

【0078】

実施例3：

方法：

ブタ軟骨細胞を、ブタ股関節の大腿骨頭の軟骨から単離した。関節の切断後、軟骨を採取し、0.25%のコラゲナーゼ(2.5%のコラゲナーゼNBG4を含むHAM's F12の1/10希釈液)を用いて室温で45分消化した。分離した細胞を廃棄し、軟骨を0.1%のコラゲナーゼを用いて一晩更に消化し、軟骨細胞を抽出した。ブタ軟骨細胞を、CTA(軟骨組織類似体)として懸濁液内で培養した。培養は、第1週は何れの処理もなしに、続いて次の処理の1つを行った：1)10又は100ng/mlのrhFGF18の永続的な存在下での4週の培養、2)10又は100ng/mlのrhFGF18の存在下での1週間の培養に続いて、rhFGF18なしでの3週間の培養、3)1週間に1日、10又は100ng/mlのrhFGF18の添加(すなわち24時間の暴露に続きrhFGF18なしでの6日の培養)による3週間の培養に続いて、rhFGF18なしでの1週間の培養、又は4)対照としてのrhFGF18の非存在下での4週間の培養(図4)。培養期間の最後にCTAを採取し、それらのGAG、ヒドロキシプロリン及び細胞含有量について分析した。I型及びII型コラーゲン及びSox9についての遺伝子発現を評価し、そしてサフラニンO、I型及びII型コラーゲンについての組織学的検査も実施した。

10

【0079】

20

結果：CTAにおける細胞増殖に対する、rhFGF18の永続的な又は間欠的な暴露の効果：

各培養条件で、CTAを溶解し、そしてDNA含有量を評価し、CTA当たりの細胞数を計算した(図5)。対照培養(rhFGF18なし)においては、細胞数(120万個)は摂取密度(100万個の細胞/CTA)と同様で、増殖は観察されなかった。しかしながら、予想通り、rhFGF18の永続的な存在により、軟骨細胞の増殖が増加した(それぞれ10及び100ng/mlのrhFGF18によりそれぞれ220万個の細胞/CTA及び249万個の細胞/CTA)。rhFGF18が1週のみ添加され、軟骨細胞がさらにrhFGF18なしで3週間培養される場合(1w)、対照に比べて増殖の増加は、観察されなかった。逆に、rhFGF18が1週間に1日添加される場合(1d/w)、rhFGF18は、対照と比べて増殖を刺激し、永続的な暴露に比べても増殖を刺激した。CTA当たりの細胞含有量は、100ng/mlのrhFGF18の1日/週添加により、400万個の細胞/CTAに達した。これに比べて、rhFGF18の不在下では120万個の細胞/CTA、又は100ng/mlのrhFGF18の永続的な存在下では249万個の細胞/CTAであった。

30

【0080】

結果：CTAにおけるマトリクス生成に対する、rhFGF18の永続的な又は間欠的な暴露の効果：

各培養条件で、CTAをプロティナーゼKにより消化し、そしてGAG及びヒドロキシプロリン含有量を評価した(図6)。GAGはプロテオグリカン含有量を反映し、ヒドロキシプロリンはCTAのコラーゲン含有量を反映する。前に観察されたように、rhFGF18の永続的な存在は、GAG含有量/CTAを低減し(対照に比較して、2.6倍低い)、またヒドロキシプロリン含有量/CTAも低減した(対照に比較して、2.1倍低い)。逆に、rhFGF18を間欠的に(1/週または1日/週)添加する場合、GAG及びヒドロキシプロリン含有量は増加した。例えば、100ng/mlのrhFGF18を1週間あたり1日添加する場合、対照に比較して、GAG含有率は2.67倍高く、ヒドロキシプロリン含有量は2.13倍高かった。

40

【0081】

結果：CTAにおける軟骨細胞表現型に対する、rhFGF18の永続的な又は間欠的な暴露の効果：

50

各培養条件で、RNAをCTAから単離し、そしてI型、II型、X型コラーゲン、及びSox9発現を、定量的PCRにより分析した(図7)。Sox9及びII型コラーゲンの高発現は、軟骨細胞表現型のマーカーであり、I型コラーゲンは、脱分化のマーカーであり、そしてX型コラーゲンは、軟骨細胞肥大のマーカーである。コラーゲンII/Iの比率も計算した。この比率は通常、培養における軟骨細胞の表現型の維持(高い比率)又は表現型の損失(低い比率)を示すために使用される。rhFGF18を用いたすべての条件において、10又は100 ng/mlでの永続的な又は間欠的な暴露により、I型コラーゲンは低減した。この低減は、rhFGF18が100 ng/mlの濃度で、1週間に1日添加される場合に最も強かった。例として、I型コラーゲンの発現は、対照に比較して、100 ng/mlのrhFGF18を永続的に添加する場合は4倍、100 ng/mlのrhFGF18を1週間に1日添加する場合は123倍低減した。II型コラーゲンは、rhFGF18の永続的な存在下で低減することが発見されたが、1週(1w)又は1週間に1日(1d/w)添加されるrhFGF18の存在下ではほとんど不変であった。Sox9発現においては重大な変化は観察されなかった。Sox9発現は、10 ng/mlのrhFGF18を1週間(1w)添加する場合のみ、有意に増加した(2.2倍)。最終的に、rhFGF18の永続的な投与は、コラーゲンII/Iの比率に対しては効果がないことが見出されたが、しかしrhFGF18が1週間に1日添加される場合、この比率は、対照に比較して、それぞれ10及び100 ng/mlのrhFGF18により19倍及び138倍増加した。また、X型コラーゲンも軟骨細胞肥大のマーカーとして評価され、本培養条件下でrhFGF18により影響されないことが見出された。

【0082】

結果：CTAの形態及びI型、II型コラーゲンの含有量に対する、rhFGF18の永続的な又は間欠的な暴露の効果：

様々なrhFGF18暴露による4週間の処理の後、CTAの組織学的分析により、rhFGF18が永続的に存在すると、他の条件に比較して、CTAはより薄くなり、サフラニンO染色は薄くなることが示された。さらに、rhFGF18の永続的な存在下で、細胞密度が高く細胞外マトリクスがない増殖ゾーンが、その構造体の周囲で観察されることがある。一方、rhFGF18を間欠的に暴露すると、対照に比較して、構造体の厚さが増すことも観察され得る。すべての条件下で、I型コラーゲンは検出できなかったが(示さず)、すべてのCTAでII型コラーゲンの染色が強かった。

【0083】

結論：

rhFGF18の永続的な暴露は軟骨細胞の増殖を刺激したが、CTA中のマトリクス含有量は低減した(GAG及びヒドロキシプロリンの低減)。同様に、I及びII型コラーゲンの両者の発現も対照に比較して低減した。10又は100 ng/mlのrhFGF18への永続的な暴露の有意な効果は、4週の処理の後のSox9では観察されなかった。この組織学的分析により、CTAが小さいことが明らかになり、そしてCTAの周囲でECMを欠いた増殖ゾーンが示された。すべてのそれらの結果をまとめると、rhFGF18が永続的に存在すると、マトリクス産生よりも増殖のようが有利になることが示唆される。

【0084】

永続的な暴露とは異なり、10又は100 ng/mlのrhFGF18を用いて1週間、続いて、rhFGF18なしで3週間CTAを培養した場合、増殖の刺激は観察されなかった。しかしながら、GAG及びヒドロキシプロリン含有量は、対照よりも高いことが見出された。I型コラーゲンの発現は低減したが、II型コラーゲンの発現は対照に比べて変化しなかったか、又は、わずかに増加した(10 ng/mlのrhFGF18について)。結果、コラーゲンII/Iの比率は増加し、表現型の維持がより良好であることが示唆される。同様に、Sox9も、対照に比べてわずかに増加した(10 ng/mlのrhFGF18のみについて有意)。組織学的分析により、CTAが、対照CTAと同様に、サフラニンO及びII型コラーゲン陽性マトリクスから構成されることが示された。対

照と比較して、G A G及びヒドロキシプロリンの含有量が高くなるにつれ、C T Aの厚さは大きくなった。

【0085】

100 ng / ml の r h F G F を1週間に1日添加する場合に、増殖及びマトリクス含有量に関し最良の結果が得られた。この条件で、I型コラーゲンは最も低く、そしてコラーゲン I I / I の比率は最も高かった。しかしながら、I I型コラーゲン及びS o x 9発現は、対照に比較して変化がなかった。C T Aは、サフラニンO及びI I型コラーゲン陽性であった。同様に、1週間の処理に関し、対照に比較してC T Aが厚く、G A G及びヒドロキシプロリンの含有量が高いことが示される。

【0086】

結論として、間欠的な暴露により、r h F G F 18の効果を増強し、そして増殖およびE C M産生の増加の達成を可能にし、そして1日 / 週 > 1週 > 対照 > 永続的な暴露の順に、培養下で軟骨細胞表現型が促進される。それらの結果は、O A治療に対するr h F G F 18の周期的な投与の裏付けとなる。

【0087】

実施例4：

方法：

ウシ軟骨細胞を、実施例2及び3に記載するように入手した。それらを、永続的に存在する、100 ng / ml の r h F G F 18と共に(F G F 18)、又は対照としてF G F 18の不在下(C T R)で、1又は2週間、培養した。培養後、細胞を採取し、計数し、溶解してR N A単離及び遺伝子発現を解析した。S o x 9、I型、I I型コラーゲン発現を、定量的P C Rにより評価した。

【0088】

結果：

永続的なF G F 18を用いた2週間の培養の後、細胞濃度は対照群よりも高かった。I型コラーゲンの発現はr h F G F 18の存在下で強く抑制されたが、I I型コラーゲン及びS o x 9の発現は増加した(図8)。

【0089】

結論：

軟骨細胞が単層で培養される場合、100 ng / ml の r h F G F 18の永続的な暴露により、細胞増殖の増加が可能になり、良好な表現型の維持も可能になる(I I型コラーゲン及びS o x 9の発現が高まり、そしてI型コラーゲンの発現は低下した)。

【0090】

実施例5：

方法：

膝関節全置換術を受けた2人のO A患者から得た軟骨を使用した。軟骨細胞を、実施例3に記載のようにして単離し、そしてまず、単層下で高密度で3~4日間、培養した。続いて、軟骨細胞を採取し、そして96ウェルプレートに、 1×10^6 個の細胞 / 200 μ lで接種し、何れの処理もせず1週間、凝集させC T Aを形成させた。続いて、100 ng / ml の r h F G F 18の不在又は存在下の以下の処理の1つを行い、さらに4週間培養した：1) r h F G F 18の不在下での4週間の培養(対照)、2) r h F G F 18の永続的な存在下での4週間の培養(p e r m)、及び3) 1週間に1日r h F G F 18の添加(すなわち、24時間の暴露に続きr h F G F 18なしでの6日の培養)による4週間の培養(1 d / w)(図4)。培養期間の後にC T Aを採取し、それらのG A G、ヒドロキシプロリン及び細胞含有量について分析した。患者2から入手されたC T Aに関しては、I型及びI I型コラーゲン及びS o x 9についての遺伝子発現を評価し、そしてサフラニンO、I型及びI I型コラーゲンについての組織学的検査も実施した。

【0091】

結果：

細胞増殖：

100 ng/ml の rhFGF18 により、3D 培養でヒト変形性関節症の軟骨細胞の増殖が増大した(図9を参照)。患者1から得た軟骨細胞については、対照のCTA当たりの細胞数は、初期細胞数よりも少なく(接種密度は100万個の細胞/CTAであった)、このことは、多くの細胞が死滅したことを示唆する。しかしながら、永続的又は1日/週のrhFGF18の存在下では、150万個の細胞/CTAが見られ、このことは、細胞が死滅しないで増殖したことを示唆する。患者2から得た軟骨細胞においては、細胞数のわずかな増加(CTA当たり100万~130万個の細胞)が、未処理のCTAにおいて観察され得る。さらに、永続的なrhFGF18の存在下で細胞数が増加した(CTA当たり、100万~190万個の細胞)。

【0092】

結果：

マトリクス産生：

100 ng/ml の rhFGF18 により、3D 培養でヒト変形性関節症の軟骨細胞によるGAG産生が増大した(図10を参照)。永続的な及び1日/週のrhFGF18を受けた患者1、ならびに永続的なFGF18を受けた患者2においては、有意に多くのGAGがCTAに存在した。

【0093】

結果：

遺伝子発現：

軟骨細胞表現型は、I型コラーゲン発現の低減又は不存在、そしてSox9及びII型コラーゲン発現の増加という特徴を有する。この発現パターンは、変形性関節症の軟骨細胞において異なっていた(図11を参照)。実際、未処理のCTAにおいて、I型コラーゲンの発現はII型コラーゲンの発現よりも高かった(それぞれ、0.67及び0.04の相対存在量)。rhFGF18はI型コラーゲンの発現を低減し、II型コラーゲンの発現を増加できた。結果として、コラーゲンII/Iの比率は、rhFGF18の存在下で、1.1~1.3倍に上昇した。さらに、rhFGF18は、Sox9、すなわち軟骨細胞表現型のマーカーの発現を増加した。

【0094】

結果：

組織学的検査(データは示さず)：

対照と比較して、1日/週又は永続的なrhFGF18を用いて培養したCTAは、サフランO染色の増強を示し、このことは、それらがよりGAGを含むことを示唆する。これは、図10に提供される結果と一致する。I型コラーゲン染色はrhFGF18処理された細胞において低減し、これは図11の遺伝子発現結果に良好に一致する。II型コラーゲン染色は対照培養物において見られず、このことはヒト変形性関節症(hOA)軟骨細胞が軟骨様マトリクスを生成できないことを示唆する。しかしながら、1日/週及び永続的なrhFGF18は両者とも、II型コラーゲンを産生するhOA軟骨細胞の能力を回復できた。

【0095】

結論：

ヒト変形性関節症の軟骨から単離された軟骨細胞により得られた結果により、rhFGF18が細胞増殖を促進でき、硝子様軟骨マトリクス産生を増強でき、そして軟骨細胞の表現型に好適であることが示された。この実験において、永続的及び1日/週でのrhFGF18は、いくつかのパラメーターに関しては同等であった。しかし、マトリクス産生に関して、1日/週でのrhFGF18のほうがやや良好であった(患者1においてはGAG蓄積が増大し、患者2においては、コラーゲンIIの発現が増大した)。

【0096】

References

1. Magill et al., 2011, J. orthopaedic Surg. 19(1):93-98
2. Zhang et al., 2013, Expert Opin. Biol. Ther. 13(4):527-540

10

20

30

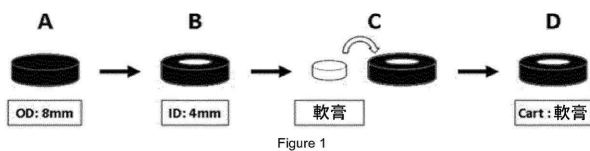
40

50

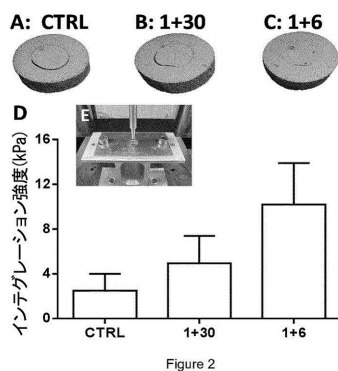
3. Tang et al., 2012, Expert Opin. Biol. Ther., 12(10):1361-1382
4. Ellsworth et al., 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320
5. Shimoaka et al., 2002, JBC 277(9):7493-7500
6. WO2008023063
7. WO2004032849
8. WO9816644
9. WO2006063362
10. Custers et al., 2007, Osteoarthritis and Cartilage, 15:1241-1248
11. Lotz, 2010, Arthritis research therapy, 12:211
12. The Merck manual, 17th edition, 1999
13. Getgood et al., 2010, P116, ICRS Meeting 2010, Barcelona.
14. ICRS publication: http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf, page 13
15. Bian et al., 2010, Am. J. Sports. Med, 38(1):78-85.
16. Gennero et al., 2013, Cell Biochem Funct 31 (3) 214-227
17. M auck et al., 2006, Osteoarthritis and Cartilage, 14(2):179-189
18. Bian et al., 2008 J.Biomech., 41(6) :1153-1159

10

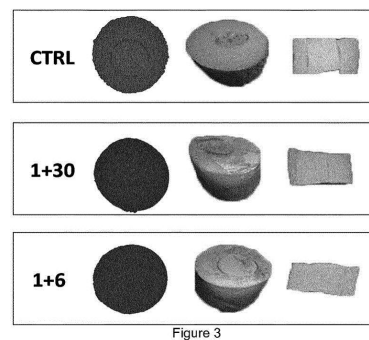
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

| 前培養 | 第1週 | 第2週 | 第3週 | 第4週 | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| rhFGF18なし | rhFGF18なし | | | | CTR |
| | rhFGF18 | | | | perm |
| | rhFGF18 | | | | 1w |
| | rhFGF18なし | rhFGF18なし | rhFGF18なし | rhFGF18なし | 1d/w |

Figure 4

【図 5】

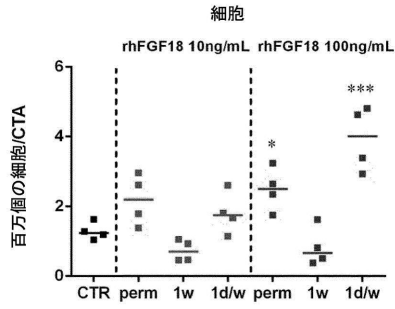
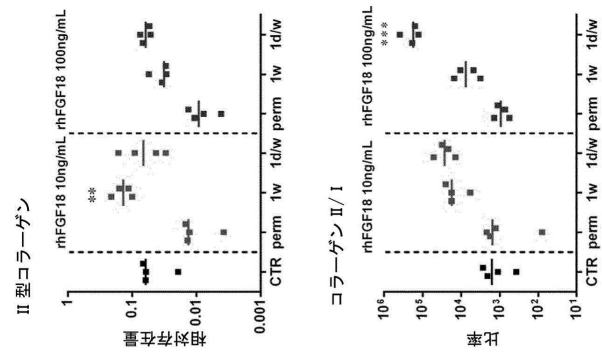


Figure 5

【図 7】



【図 6】

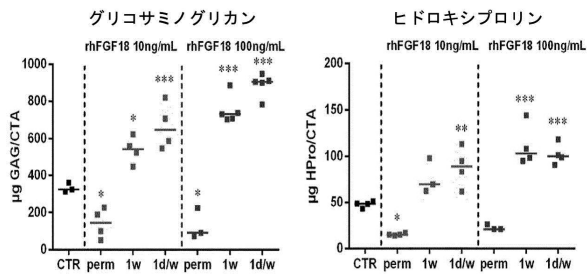


Figure 6

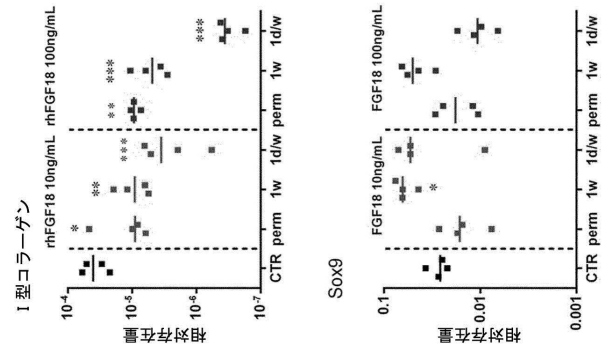


Figure 7

【図 8】

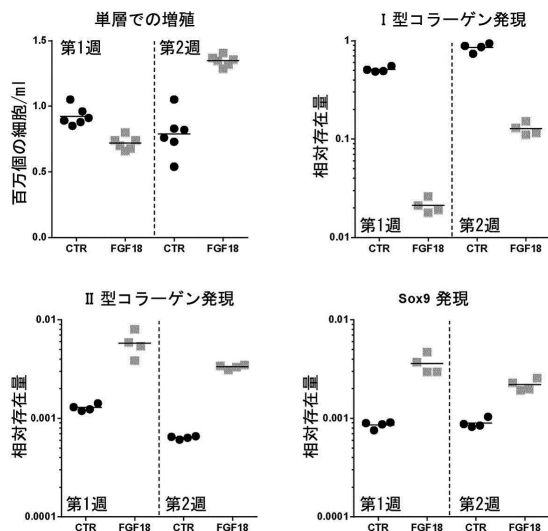


Figure 8

【図 9】

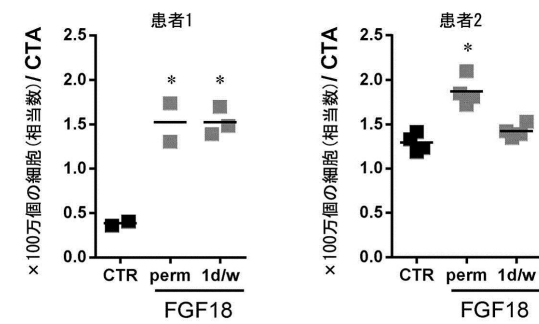


Figure 9

【図 10】

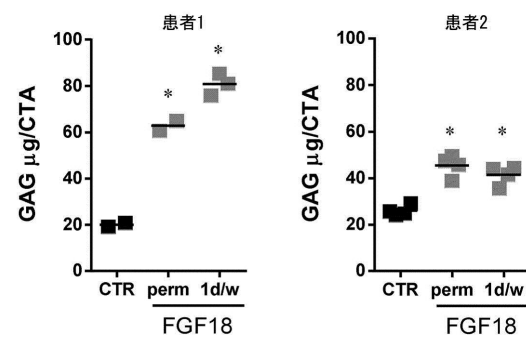


Figure 10

【図 11】

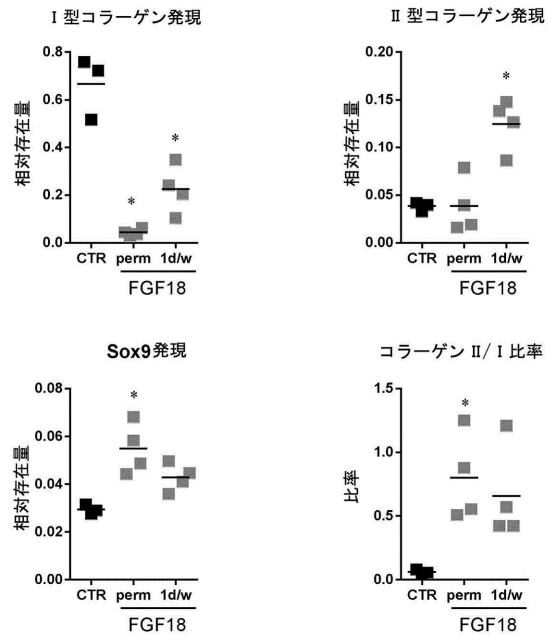


Figure 11

【配列表】

[0006495934000001.app](#)

フロントページの続き

| | | | |
|-------------|-------|-----------|---------------------|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| C 0 7 K | 14/50 | (2006.01) | A 6 1 K 35/28 |
| A 6 1 F | 2/28 | (2006.01) | C 0 7 K 14/50 |
| C 1 2 N | 5/077 | (2010.01) | A 6 1 F 2/28 |
| | | | C 1 2 N 5/077 Z N A |

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72)発明者 クリストフ ハー . ラーデル

ドイツ連邦共和国, 6 4 2 9 1 ダルムシュタット, マイゼンバーク 3

(72)発明者 ハンス ゲーリング

ドイツ連邦共和国, 6 5 3 4 3 エルトフィレ, ガルテンシュトラッセ 1デー

(72)発明者 アンネ ギゴウト

ドイツ連邦共和国, 6 4 2 8 9 ダルムシュタット, リープフラウエンシュトラッセ 1 1 2

審査官 常見 優

(56)参考文献 特表2010-501531(JP,A)

特表2006-508078(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 3 3 / 1 8

A 6 1 F 2 / 0 0 - 4 / 0 0

A 6 1 F 1 3 / 0 0 - 1 3 / 8 4

A 6 1 F 1 5 / 0 0 - 1 7 / 0 0

A 6 1 B 1 3 / 0 0 - 1 8 / 2 8

A 6 1 M 2 5 / 0 0 - 9 9 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 5 0

C 1 2 N 5 / 0 7 7

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)