(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7661222号
(P7661222)

(45)発行日　令和7年4月14日(2025.4.14)

(24)登録日　令和7年4月4日(2025.4.4)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　38/22　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	38/22		
Ａ６１Ｐ　19/08　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	19/08		
Ａ６１Ｐ　19/02　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｋ　47/42　(2017.01)	Ａ６１Ｋ	47/42		

請求項の数　12　（全48頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-526734(P2021-526734)
(86)(22)出願日　令和1年11月18日(2019.11.18)
(65)公表番号　特表2022-507614(P2022-507614A)
(43)公表日　令和4年1月18日(2022.1.18)
(86)国際出願番号　PCT/IB2019/059889
(87)国際公開番号　WO2020/104917
(87)国際公開日　令和2年5月28日(2020.5.28)
審査請求日　令和4年11月17日(2022.11.17)
(31)優先権主張番号　PCT/IB2018/059100
(32)優先日　平成30年11月19日(2018.11.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
国際事務局(IB)

(73)特許権者　521208712
４ムービング バイオテック
４MOVING BIOTECH
フランス共和国 リール ５９０００，リュ デュ プロフェスール カルメット １，キャンパス デ ランスティテュ パスツール デ リール
Campus de l’Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59000 Lille（FR）

(73)特許権者　518059934
ソルボンヌ・ユニヴェルシテ
SORBONNE UNIVERSITE
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　軟骨細胞増殖を調節し、軟骨マトリックス産生を増加させるための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

エキセナチド、リキシセナチド、アルビグルチド、デュラグルチド、セマグルチドおよびリラグルチドからなる群から選択されるグルカゴン様ペプチド－１類似体を含む、軟骨再生における使用のための医薬組成物。

【請求項２】

前記グルカゴン様ペプチド－１類似体が、リラグルチドである、請求項１に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項３】

前記グルカゴン様ペプチド－１類似体の濃度が、約０．１ｎＭ～６２５μＭである、請求項２に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項４】

組み合わせて使用される少なくとも５％以上の重量の薬学的に許容される配合物ビヒクルをさらに含む、請求項３に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項５】

前記薬学的に許容される配合物ビヒクルが、アルブミンおよびアルファ１酸糖タンパク質からなる群から選択される、請求項４に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項６】

前記薬学的に許容される配合物ビヒクルの濃度が、前記配合物の約０．１％～約１０％（ｗｔ／ｗｔ）である、請求項５に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項７】
前記薬学的に許容される配合物ビヒクルの濃度が、前記配合物の５％（ｗｔ／ｗｔ）である、請求項６に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項８】
前記薬学的に許容される配合物ビヒクルが、アルブミンである、請求項７に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項９】
前記薬学的に許容される配合物ビヒクルが、アルファ１酸糖タンパク質である、請求項７に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項１０】
軟骨損傷病変に対して関節内注射により投与される、請求項１から９のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項１１】
軟骨細胞増殖および／または軟骨細胞への幹細胞分化を含む、軟骨細胞の同化刺激を誘導する、請求項１から１０のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項１２】
治療有効量のグルカゴン様ペプチド－１類似体と、非イオン性界面活性剤、セルロース、ポリエーテル、グルカン、グリセロリン脂質、多糖類、タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリマーを含む賦形剤と、を含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、軟骨疾患の処置に使用するための、同化および異化サイトカイン調節を含む軟骨細胞再生の増加および軟骨変性の減少を誘導するＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１類似体を含む新規な医薬組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
変形性関節症（ＯＡ）は、最も一般的な慢性関節疾患である。ＯＡは、６５歳を超える人々のほぼ５０％が罹患し、若年者は関節損傷後に発症する。世界中で２億５０００万人がＯＡに罹患しており、この疾患は患者および医療システムに大きな経済的および社会的影響を及ぼす。ＯＡは、構造的分解、関節周囲骨、滑膜関節内層および隣接する支持結合組織要素を特徴とする、関節全体の疾患である。関節軟骨の破壊は、軟骨細胞が細胞外軟骨マトリックスの合成と分解との間のバランスを維持できなくなる結果である。マクロファージ、単球、滑膜細胞および軟骨細胞によって産生されるインターロイキン－１β（ＩＬ－１β）等の炎症促進性サイトカインは、疾患の発症において重要な役割を担う。
【０００３】
グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）は、プレプログルカゴン遺伝子の翻訳後産物である。膵臓β細胞に対するＧＬＰ－１の作用には、グルコーストランスポーター２発現の増加、グルコースレベルの増加に応答したインスリンの分泌が含まれる。さらに、ＧＬＰ－１は、インターロイキン－６、腫瘍壊死因子－αおよびインターフェロン－ｃ等の炎症促進性サイトカインの分泌を低減することが示されている。
【０００４】
ＧＬＰ－１類似体は、２型糖尿病の処置のために患者に処方される市販の薬物である。特許文献１は、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）のいくつかの誘導体および類似体、それらの調製、ならびにそれらの薬学的使用を開示している。この文献は、あらゆる形態の糖尿病の防止および処置に使用するためのＧＬＰ－１の特定の誘導体および類似体に関する。
【０００５】
当初、変形性関節症は関節軟骨の疾患であると考えられていたが、最近の試験では、そ

の症状が関節全体に及ぶことが示されている。

【０００６】

関節軟骨の喪失は一次的変化であると考えられてきたが、細胞変化および生体力学的ストレスの組み合わせが、軟骨下骨リモデリング、骨棘の形成、骨髄病変の発生、滑膜、関節包、靭帯および関節周囲の筋肉の変化、ならびに半月板断裂および押出しを含むいくつかの二次的変化を引き起こす。

【０００７】

軟骨成長の過程には２つのパターンがある。その１つは間質成長であり、軟骨細胞に分化し、軟骨マトリックスに囲まれた細胞が細胞分裂により増殖する。各軟骨細胞はマトリックスを分泌し、次いで軟骨組織が拡大される。もう１つの成長パターンは、軟骨膜によって引き起こされる付加成長である。軟骨組織は、関節軟骨の関節面を除いて軟骨膜で覆われている。強軟骨膜は線維芽細胞で構成されているが、内層の軟骨細胞と類似しており、線維芽細胞と軟骨細胞の違いは不明である。内層の軟骨膜細胞は、徐々に円形に変化しながら増殖し、そのような細胞はさらに軟骨マトリックスを分泌して外向きに成長する。

【０００８】

特許文献２は、変形性関節症の処置に使用するためのインクレチンホルモンまたはその類似体に関する。より具体的には、この特許は、変形性関節症の処置における使用のためのＧＬＰ－１およびＧＬＰ－１類似体、例えばリラグルチドの使用を開示している。特許文献２の特許に開示されているペプチドは、特に全身（非経口、静脈内等）、経口、直腸内、局所または皮下を含む任意の既知の投与経路を介して投与され得る。この特許は、軟骨分解におけるＧＬＰ－１の役割を開示しておらず、また軟骨細胞との関係も実証していない。

【０００９】

軟骨マトリックスの正常な代謝回転は軟骨細胞によって媒介され、軟骨細胞はこれらの成分およびそれらの分解に関与するタンパク質分解酵素を合成する。軟骨細胞は、ポリペプチド成長因子およびサイトカイン、構造的および物理的刺激、さらにはマトリックス自体の成分を含む多くの因子によって影響を受ける。

【００１０】

変形性関節症は、軟骨細胞がこれらの細胞外マトリックス成分の同化と異化との間の恒常性を維持できないことに起因する。軟骨の分解と修復との間の不均衡を開始させるものはよく知られていない。微小破壊を引き起こす外傷または酵素活性のわずかな増加を引き起こす炎症は、摩耗粒子の形成を可能にし得、次いでこれが常在マクロファージによって貪食され得る。ある時点で、これらの摩耗粒子の産生がそれらを排除する系の能力を上回り、それらは炎症のメディエーターとなり、軟骨細胞を刺激して分解酵素を放出させる。滑膜マクロファージによっても取り込まれるコラーゲンおよびプロテオグリカンの分解からの分子は、ＴＮＦα、ＩＬ－１およびＩＬ－６等の炎症促進性サイトカインの放出を引き起こす。サイトカイン発現とＯＡとの間には密接な関係がある。インターロイキン－１（ＩＬ－１）および腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－アルファ）は、滑膜細胞および軟骨細胞によるインターロイキン－６（ＩＬ－６）およびインターロイキン－８（ＩＬ－８）の産生を誘導し得る。しかし、全ての試験は、軟骨細胞ではなく滑膜組織に焦点を当てていた。

【００１１】

軟骨細胞の同化刺激は、プロテオグリカンおよびコラーゲンの合成の刺激によってインビトロで測定される。ＧＭ－ＣＳＦ、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（非特許文献１）、およびＣＸＣＬ１０／ＩＰ１０（非特許文献２）等のサイトカインが軟骨細胞の同化過程を刺激することが実証されている。

【００１２】

ＯＡにおける軟骨細胞増殖を含む軟骨細胞同化活性を増強し、軟骨マトリックス分解を含む軟骨細胞異化活性を減少させる必要がある。そのような改善された組成物および方法は、変形性関節症の処置における新しい治療戦略の開発において大きな関心事となるであ

ろう。
【００１３】
　また、軟骨再生を促進し、軟骨破壊を軽減するために、それぞれ軟骨細胞分化を含む軟骨細胞同化活性を増強する必要がある。そのような改善された組成物および方法は、変形性関節症の処置における新しい治療戦略の開発において大きな関心事となるであろう。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１４】
【文献】国際公開ＷＯ２０１７／１４９０７０号パンフレット
【文献】欧州特許ＥＰ２８９０３９０Ｂ１
【非特許文献】
【００１５】
【文献】Ｑｕｉｎｅｔｒｏら、２００８　ｃｙｔｏｋｉｎｅ　４４（３）：３６６－７２
【文献】Ｎｅｉｄｌｉｎら、２０１８、ａｎｎａｌｓ　ｏｆ　ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、ｖｏｌｕｍｅ　４６、ＩＳＳＵＥ　２　ｐｐ３４５～３５３
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１６】
　本発明は、軟骨疾患の処置における使用のための、軟骨細胞増殖を含む軟骨細胞同化過程の増強ならびに軟骨マトリックス損失および軟骨分解の減少を含む異化過程の減少を誘導する改善された医薬配合物を開示する。
【００１７】
　本発明はさらに、軟骨疾患の処置における使用のめの、軟骨再生のための軟骨細胞分化を含む軟骨細胞同化過程の増強、ならびに軟骨マトリックス損失および軟骨分解の減少を含む異化過程の減少を誘導する改善された医薬配合物および組成物を開示する。
【００１８】
　より具体的には、そのような組成物は、変形性関節症の処置、および関節刺激の緩和もしくは低減の防止、または既存の関節炎症の悪化の低減に有用である。
【課題を解決するための手段】
【００１９】
　本発明は、軟骨疾患の処置における使用のための、軟骨細胞増殖を含む軟骨細胞の同化刺激を誘導する、ならびに軟骨マトリックス損失および軟骨変性の減少を含む異化活性を減少させる医薬組成物に関する。
【００２０】
　特定の態様によれば、本発明は、軟骨疾患の処置における使用のための、軟骨細胞増殖および／または軟骨再生のための軟骨細胞への幹細胞分化を含む軟骨細胞の同化刺激を誘導する、ならびに軟骨マトリックス損失および軟骨変性の減少を含む異化活性を減少させる医薬組成物に関する。
【００２１】
　特定の態様によれば、本発明は、有効成分としてグルカゴン様ペプチド－１類似体を含む、軟骨疾患の処置における使用のための、軟骨細胞の同化刺激を誘導する医薬組成物に関する。
【００２２】
　本発明によれば、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）類似体は、キセナチド、リラグルチド、リキシセナチド、アルビグルチド、デュラグルチド、セマグルチドまたはリラグルチドからなる群から選択される。
【００２３】
　本発明の一態様によれば、有効成分としてグルカゴン様ペプチド－１類似体を含む、軟骨疾患の処置における使用のための、軟骨細胞増殖を含む軟骨細胞の同化刺激を誘導する、および／または軟骨マトリックス損失の減少を含む異化活性を減少させる医薬組成物が

提供される。
【００２４】
本発明の別の態様によれば、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）類似体は、リラグルチドである。
【００２５】
本発明のさらに別の態様によれば、リラグルチドの濃度は、１ｎｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌである。
【００２６】
本発明のさらに別の態様によれば、リラグルチドの濃度は、０．１～１０ｍｇ／ｍｌである。
【００２７】
以下に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、本発明の使用のための医薬組成物の配合物は、治療有効量のＧＬＰ－１類似体と、非イオン性界面活性剤、セルロース、ポリエーテル、グルカン、グリセロリン脂質、多糖類、タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリマーを含むゲルとを提供する。
【００２８】
以下に記載される本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、本発明の使用のための医薬組成物の配合物は、治療有効量のＧＬＰ－１類似体と、非イオン性界面活性剤、セルロース、ポリエーテル、グルカン、グリセロリン脂質、多糖類、タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリマーを含む賦形剤とを提供する。
【００２９】
本発明による医薬配合物はまた、１つ以上の薬学的に許容される担体／賦形剤を含有し得る。
【００３０】
本発明は、ゲル配合物に限定されず、局所投与に適した液体および半固体医薬形態、例えば液体、溶液、クリーム、ゲルまたは経皮パッチが好ましく、特に、関節内注射に適した形態、例えば液体、溶液、および経皮適用、例えばクリームまたはゲル等の半固体形態、および経皮パッチが好ましい。医薬形態はまた、成分の一部または全部が、使用前に水溶液または他の適切なビヒクルで再構成されるように、場合によっては凍結乾燥された乾燥形態である形態からなってもよい。
【００３１】
配合物は、結合剤、崩壊剤、充填剤、安定剤、希釈剤および着色剤等の既知の賦形剤を使用して、最新技術で周知の方法によって生成され得る。それらはまた、医薬技術において公知の適切なポリマーで作製された遅延放出形態または徐放形態を含み得る。
【００３２】
薬学的に許容される担体／賦形剤、例えば溶媒、保存剤、例えば酸化防止剤および／またはキレート剤および抗菌剤、等張性調節剤、ならびに緩衝系が、注射用途に適した液体形態の調製に好ましい。
【００３３】
溶媒として水が好ましく、場合により共溶媒、例えばグリコールまたはポリアルコール、例えばエチレングリコールを含む。
【００３４】
保存剤またはキレート剤（エデト酸ナトリウムおよびメタ重亜硫酸ナトリウムが好ましい）、ならびに抗菌剤（ベンジルアルコールが好ましい）も使用することができる。
【００３５】
等張性調節剤として、塩化ナトリウムまたはマンニトールが特に好ましい。
【００３６】
好ましい緩衝系は、リン酸緩衝液およびクエン酸緩衝液の塩の錯体、好ましくはナトリウム塩またはカリウム塩の形態であってもよい。

【００３７】
噴霧化に適した液体形態の調製では、薬学的に許容されるビヒクル／賦形剤が溶媒として好ましく、保存剤、例えば酸化防止剤および／またはキレート剤および抗菌剤、等張性調節剤ならびに緩衝系を含む。
【００３８】
医薬組成物の記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、ＧＬＰ－１類似体はリラグルチドであり、ゲルはアルブミンを含む。
【００３９】
医薬組成物の記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、ＧＬＰ－１類似体はリラグルチドであり、アルブミンを含む。
【００４０】
医薬組成物の記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、ＧＬＰ－１類似体はリラグルチドであり、アルファ１酸糖タンパク質（Ａ１ＡＧＰ）を含む。
【００４１】
本発明による使用のための医薬組成物の記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、アルブミン濃度は、配合物の約０．１％～約１０％（ｗｔ／ｗｔ）、好ましくは５％（ｗｔ／ｗｔ）である。
【００４２】
本発明による使用のための医薬組成物の記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、アルファ１酸糖タンパク質（Ａ１ＡＧＰ）濃度は、配合物の約０．１％～約１０％（ｗｔ／ｗｔ）、好ましくは５％（ｗｔ／ｗｔ）である。
【００４３】
記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、医薬組成物は、１ｎｇ／ｍｌおよび１０ｍｇ／ｍｌのリラグルチド、ならびに５％（ｗｔ／ｗｔ）のアルブミンを含む。
【００４４】
記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、医薬組成物は、６ｍｇ／ｍｌのリラグルチド、および５％（ｗｔ／ｗｔ）のアルブミンを含む。
【００４５】
本発明のさらに別の態様によれば、軟骨疾患は、外傷または外科的処置によって引き起こされる軟骨欠損、離断性骨軟骨炎、変形性関節症、先天性軟骨疾患および軟骨損傷からなる群から選択される。
【００４６】
本発明のさらに別の態様によれば、患者の軟骨細胞における同化サイトカイン分泌または産生を増加させる方法であって、本発明による組成物を患者に投与することを含む方法が提供される。
【００４７】
好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、同化サイトカインは、ＧＭＣＳＦおよび／またはＣＸＣＬ１０／ＩＰ１０である。
【００４８】
本発明のさらに別の態様によれば、患者の軟骨細胞における異化サイトカイン分泌または産生を減少させる方法であって、本発明による組成物を患者に投与することを含む方法が提供される。
【００４９】
好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、異化サイトカインは、ＭＭＰ３、ＭＭＰ１３、ＰＧＥ２、ＩＬ７、ＭＣＰ１からなる群から選択される。
【００５０】
本発明のさらに別の態様によれば、組成物は、関節内注射を介して対象に投与される。
【００５１】
本発明のさらなる態様によれば、同化サイトカイン分泌または産生を増加させ、軟骨細

胞増殖の刺激による軟骨喪失および／または修復を低下させることによって軟骨疾患を処置するためのリラグルチドの使用が提供される。

【００５２】

本発明のさらなる態様によれば、同化サイトカイン分泌または産生を増加させ、軟骨細胞増殖の刺激による軟骨喪失および／または再生を低下させることによって軟骨疾患を処置するためのリラグルチドの使用が提供される。

【００５３】

本発明の特定の態様によれば、軟骨細胞同化機能を増加させることによって軟骨疾患を処置するための医薬の製造におけるリラグルチドの使用が提供される。

【００５４】

軟骨疾患は、外傷または外科的処置によって引き起こされる軟骨欠損、離断性骨軟骨炎、変形性関節症、先天性軟骨疾患および軟骨損傷からなる群から選択される。

【００５５】

本発明のさらなる態様によれば、異化サイトカイン分泌または産生を減少させ、軟骨細胞増殖の刺激により軟骨喪失および／または修復を低下させることによって軟骨疾患を処置するためのリラグルチドの使用が提供される。

【００５６】

本発明のさらなる態様によれば、異化サイトカイン分泌または産生を減少させ、軟骨細胞増殖の刺激により軟骨喪失および／または再生を低下させることによって軟骨疾患を処置するためのリラグルチドの使用が提供される。

【００５７】

軟骨疾患は、外傷または外科的処置によって引き起こされる軟骨欠損、離断性骨軟骨炎、変形性関節症、先天性軟骨疾患および軟骨損傷からなる群から選択される。

【００５８】

本発明のさらに別の態様によれば、少なくとも１つの軟骨細胞を本発明による組成物と接触させることを含む、軟骨細胞の増殖を促進する方法が提供される。好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、細胞は哺乳動物細胞である。好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、細胞はヒト細胞である。

【００５９】

本発明のさらに別の態様によれば、免疫炎症性障害と診断された、または免疫炎症性障害を発症するリスクがある患者を処置する方法であって、本発明による組成物を患者に投与することを含む方法が提供される。

【００６０】

本発明のさらに別の態様によれば、対象における炎症性病態を処置する方法であって、本発明による組成物を対象に投与するステップを含む方法が提供される。好ましい実施形態のさらなる特徴によれば、炎症性病態は、関節および関節腔で起こる炎症状態、ならびに軟骨マトリックスの変性および変形性関節症である。本発明による方法の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、組成物は、関節内注射を介して対象に投与される。

【００６１】

本発明のさらに別の態様によれば、組成物は、関節内注射を介して関節の脂肪体に投与される。

【００６２】

本発明のさらに別の態様によれば、対象における軟骨マトリックス修復を促進する方法であって、本発明による組成物を投与することを含む方法が提供される。

【００６３】

本発明のさらに別の態様によれば、対象における軟骨マトリックス再生を促進する方法であって、本発明による組成物を投与することを含む方法が提供される。

【００６４】

本発明のさらに別の態様によれば、対象における炎症促進性病態を改善する方法であって、本発明による組成物を投与することを含む方法が提供される。

【００６５】
本発明のさらに別の態様によれば、哺乳動物対象における関節刺激の緩和もしくは低減、または既存の関節炎症の悪化の低減のための医薬配合物の製造における有効成分としてのリラグルチドの使用が提供される。
【００６６】
本発明のさらに別の態様によれば、哺乳動物対象における関節刺激の緩和もしくは低減、または既存の関節炎症の悪化の低減のための方法における使用のための有効成分としてのリラグルチドの使用であって、配合物が関節の脂肪体への関節内注射を介して投与される使用が提供される。
【００６７】
本発明のさらに別の態様によれば、哺乳動物対象における関節刺激の緩和もしくは低減、または既存の関節炎症の悪化の低減のための注射用医薬配合物の製造における有効成分としてのリラグルチドの使用であって、リラグルチドが少なくとも第２の治療剤と一緒に配合され、第２の治療剤が抗炎症剤、酸化防止剤、ビタミン、ポリオールまたはそれらの組み合わせを含む使用が提供される。
【００６８】
本発明のさらに別の態様によれば、リラグルチドを有効成分として含む、間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させるための薬剤としての使用のための組成物が提供される。
【００６９】
本発明のさらに別の態様によれば、リラグルチドの濃度は、１ｎｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌである。
【００７０】
本発明のさらに別の態様によれば、間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させるための方法であって、
ａ）間葉系幹細胞を含む細胞培養培地に本発明による組成物を添加するステップと；
ｂ）間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させるステップとを含む方法が提供される。
本発明のさらに別の態様によれば、間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させるための方法であって、
ｃ）間葉系幹細胞を含む細胞培養培地にＧＬＰ－１類似体を添加するステップと；
ｄ）間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させるステップとを含む方法が提供される。
【００７１】
本発明の別の態様によれば、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）類似体は、リラグルチドである。
【００７２】
本発明のさらに別の態様によれば、リラグルチドの濃度は、０．１ｎＭ～６２５μＭである。
【００７３】
本発明のさらに別の態様によれば、細胞培養培地はさらに、ＭｅｓｅｎＰＲＯ　ＲＳ増殖補助物質および１％Ｌ－グルタミンを含有する。
【００７４】
本発明のさらに別の態様によれば、関節症の処置または防止のためのＳＯＸ９発現増強ペプチドを含む医薬の製造におけるＳＯＸ９発現増強ペプチドの使用であって、ＳＯＸ９発現増強ペプチドが、ＳＯＸ９遺伝子を選択的に標的とするＧＬＰ－１類似体である使用が提供される。本発明の別の態様によれば、ＧＬＰ－１類似体は、リラグルチドである。
【００７５】
本発明のさらに別の態様によれば、リラグルチドの濃度は、１ｎｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌである。
【００７６】
本発明のさらに別の態様によれば、炎症の処置または防止のためのＳＯＸ９発現増強ペプチドを含む医薬の製造におけるＳＯＸ９発現増強ペプチドの使用であって、ＳＯＸ９発

現増強ペプチドが、ＳＯＸ９遺伝子を選択的に標的とするＧＬＰ－１類似体である使用が提供される。本発明の別の態様によれば、ＧＬＰ－１類似体は、リラグルチドである。

【００７７】

本発明のさらに別の態様によれば、リラグルチドの濃度は、１ｎｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌである。

【００７８】

本発明のさらに別の態様によれば、関節症の処置または防止における使用のための医薬組成物であって、薬学的に許容される担体と、ＳＯＸ９発現増強ペプチドとを含み、ＳＯＸ９発現増強ペプチドが、ＳＯＸ９遺伝子を選択的に標的化するＧＬＰ－１類似体である医薬組成物が提供される。好ましい実施形態において、ＳＯＸ９発現増強ペプチドは、ＳＯＸ９遺伝子を選択的に標的とするリラグルチドである。本発明の別の好ましい実施形態において、リラグルチドの濃度は、１ｎｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌである。

【００７９】

本発明のさらに別の態様によれば、炎症の処置または防止における使用のための医薬組成物であって、薬学的に許容される担体と、ＳＯＸ９発現増強ペプチドとを含み、ＳＯＸ９発現増強ペプチドが、ＳＯＸ９遺伝子を選択的に標的化するＧＬＰ－１類似体である医薬組成物が提供される。好ましい実施形態において、ＳＯＸ９発現増強ペプチドは、ＳＯＸ９遺伝子を選択的に標的とするリラグルチドである。本発明の別の好ましい実施形態において、リラグルチドの濃度は、１ｎｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌである。

【００８０】

本発明のさらに別の態様によれば、関節症の処置または防止における使用のための医薬組成物であって、薬学的に許容される担体と、本発明によるＳＯＸ９発現増強ペプチドとを含む医薬組成物は、治療有効量のリラグルチドと、非イオン性界面活性剤、セルロース、ポリエーテル、グルカン、グリセロリン脂質、多糖類、タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリマーを含むゲルとを提供する。好ましい実施形態において、ゲルは、アルブミンを含み、アルブミン濃度は、配合物の約０．１％～約１０％（ｗｔ／ｗｔ）、好ましくは５％（ｗｔ／ｗｔ）である。

【００８１】

別の好ましい実施形態において、ゲルは、アルファ１酸糖タンパク質を含み、アルファ１酸糖タンパク質濃度は、配合物の約０．１％～約１０％（ｗｔ／ｗｔ）、好ましくは５％（ｗｔ／ｗｔ）である。

【００８２】

本発明のさらに別の態様によれば、炎症の処置または防止における使用のための医薬組成物であって、薬学的に許容される担体と、本発明によるＳＯＸ９発現増強ペプチドとを含む医薬組成物は、治療有効量のリラグルチドと、非イオン性界面活性剤、セルロース、ポリエーテル、グルカン、グリセロリン脂質、多糖類、タンパク質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリマーを含むゲルとを提供する。好ましい実施形態において、ゲルは、アルブミンを含み、アルブミン濃度は、配合物の約０．１％～約１０％（ｗｔ／ｗｔ）、好ましくは５％（ｗｔ／ｗｔ）である。

【００８３】

本発明の別の態様によれば、グルカゴン様ペプチド－１類似体を含む、軟骨再生における使用のための組成物が提供される。

【００８４】

軟骨再生における使用のための組成物の別の態様によれば、グルカゴン様ペプチド－１類似体は、キセナチド、リラグルチド、リキシセナチド、アルビグルチド、デュラグルチド、セマグルチドまたはリラグルチドからなる群から選択される。

【００８５】

軟骨再生における使用のための組成物の別の態様によれば、グルカゴン様ペプチド－１類似体は、リラグルチドである。

【００８６】

軟骨再生における使用のための組成物のさらに別の態様によれば、グルカゴン様ペプチド－１の濃度は、約０．１ｎＭ～６２５μＭである。

【００８７】

さらに別の態様によれば、軟骨再生における使用のための組成物は、組み合わせて使用される少なくとも５％以上の重量の薬学的に許容される配合物ビヒクルをさらに含む。

【００８８】

軟骨再生における使用のための組成物のさらに別の態様によれば、軟骨再生における使用のための組成物、薬学的に許容される配合物ビヒクルは、アルブミンまたはアルファ１酸糖タンパク質からなる群から選択される。

【００８９】

軟骨再生における使用のための組成物のさらに別の態様によれば、薬学的に許容される配合物ビヒクルの濃度は、配合物の約０．１％～約１０％（ｗｔ／ｗｔ）、好ましくは５％（ｗｔ／ｗｔ）である。

【００９０】

軟骨再生における使用のための組成物のさらに別の態様によれば、薬学的に許容される配合物ビヒクルの濃度は、配合物の５％（ｗｔ／ｗｔ）である。

【００９１】

【００９２】

軟骨再生における使用のための組成物のさらに別の態様によれば、薬学的に許容される配合物ビヒクルは、アルブミンである。

【００９３】

軟骨再生における使用のための組成物のさらに別の態様によれば、薬学的に許容される配合物ビヒクルは、アルファ１酸糖タンパク質である。

【００９４】

本発明のさらに別の態様によれば、軟骨再生における使用のための組成物は、経口、皮下、静脈内または関節内に投与されることが意図される。

【００９５】

本発明のさらに別の態様によれば、軟骨再生における使用のための組成物は、軟骨損傷に対する関節内注射によって投与される。

【００９６】

本発明のさらに別の態様によれば、軟骨再生における使用のための組成物は、軟骨細胞増殖および／または軟骨細胞への幹細胞分化を含む、軟骨細胞の同化刺激を誘導する。

【００９７】

本発明は、軟骨修復を含む、間葉系幹細胞からの軟骨細胞の増殖または成長または軟骨細胞形成の刺激が望ましいと見なされる場合に実用性を有する。

【００９８】

したがって、本発明は、軟骨修復および／または再生を含む、軟骨細胞の増殖または成長の刺激が望ましいと見なされる任意の用途において実用性を有する。

【００９９】

本出願人らは、ＯＡ患者の軟骨細胞に対するリラグルチドの有効濃度を増加させることが、軟骨細胞同化サイトカインを刺激し、異化サイトカインを減少させる効果を有することを見出した。

【０１００】

本発明者らは、医薬組成物配合物の関節内注射（急性または反復）およびリラグルチドの滑液中への徐放を使用すると、軟骨損傷後に誘導される線維化過程の減少および遅延、ならびに関節損傷後の関節の実際の機能的および組織学的改善が誘導されることを実証した。

【０１０１】

さらに、線維症を伴わずに軟骨細胞増殖をもたらすためには、特定の用量計画（すなわち、それぞれ１週間間隔の数回の注射）が必要であることが実証された。

【０１０２】
本発明によれば、再生という用語は、関節の機能的および組織学的改善をもたらす線維症の非存在下での軟骨における軟骨細胞同化機能／増殖を含む。
【０１０３】
化学的に誘導されたＯＡモデルを使用して、本発明者らは、医薬組成物配合物の関節内注射およびリラグルチドの滑液中への徐放を使用すると、ＳＯＸ９発現が誘導されることを実証した。
【０１０４】
その主要な態様によれば、広義に述べると、本発明は、グルカゴン様ペプチド－１類似体を有効成分として含む、外傷または外科的処置によって引き起こされる軟骨欠損、離断性骨軟骨炎、変形性関節症、先天性軟骨疾患および軟骨損傷からなる群から選択される軟骨疾患の処置における使用のための、軟骨細胞増殖の増強、軟骨修復の増加および軟骨マトリックスの減少を誘導する医薬組成物を提供する。
【０１０５】
別の主要な態様によれば、広義に述べると、本発明は、グルカゴン様ペプチド－１類似体を有効成分として含む、外傷または外科的処置によって引き起こされる軟骨欠損、離断性骨軟骨炎、変形性関節症、先天性軟骨疾患および軟骨損傷からなる群から選択される軟骨疾患の処置における使用のための、軟骨細胞増殖の増強、軟骨再生の増加および軟骨マトリックス損失の減少を誘導する医薬組成物を提供する。
【図面の簡単な説明】
【０１０６】
【図１】Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）のいくつかの用量による処置後のＯＡ患者の軟骨細胞における分泌サイトカインの計算された濃度平均の差次的発現レベルを示す図である。
【図２】配合物６、８、１４、１７、１９、２０の放出プロファイルを示す図である。
【図３】試験の間の外科手術誘発ＯＡにおけるパーセントでの重量負荷変化（Ｒ／Ｌ）を示す図である。
【図４】試験の間の外科手術誘発ＯＡにおける組織学的所見を示す図である。
【図５】終了時の膝測定に対する配合リラグルチドＩＡの用量応答を示す図である。
【図６】特にＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）皮下注射動物における、線維性滑膜慢性増殖および脛骨プレート線維症を示すヘマトキシリンおよびエオシンで染色された右膝切片の代表的な写真である。
【図７】配合リラグルチド注射動物における線維症および軟骨細胞巣の非存在を示す、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色された右膝切片の代表的な写真である。
【図８】ビヒクル動物と比較した、配合リラグルチド注射動物における軟骨マトリックス損失の長期減少を示す図である。
【図９】ビヒクル動物と比較した、配合リラグルチド注射動物における軟骨変性スコアの長期減少を示す図である。
【図１０】配合リラグルチド注射動物とビヒクル動物との間の滑膜肥厚の差を示す、トルイジンブルーで染色された右膝切片の代表的な写真である。
【図１１】内側関節嚢修復を示す図である。
【図１２】群８Ｍの軟骨細胞巣を示す、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色された右膝切片の代表的な写真である。
【図１３】軟骨細胞巣の総数および密度の評価を示す図である。
【図１４】間葉系幹細胞から形成された軟骨細胞の陽性アルシアンブルー染色を示す、球形成過程に対するリラグルチドの効果を示す図である。
【図１５】培養培地への軟骨細胞による乳酸デヒドロゲナーゼ分泌に対する様々な用量のリラグルチドの効果を示す図である。
【図１６】リラグルチドによって処置されたモノヨードアセテート注射マウスの膝関節構造に対するＳＯＸ９　ＲＴｑＰＣＲ分析を示す図である。
【図１７】Ａ１ＡＧＰビヒクルで処置された群５ＭおよびＡ１ＡＧＰ配合リラグルチドで

処置された群６Ｍからの動物の注射膝の総関節スコア（組織学）を示す図である。
【図１８】ビヒクルで処置された５Ｍ群（Ａ）およびＡ１ＡＧＰ配合リラグルチドで処置された６Ｍ群（Ｂ）からの動物のトルイジンブルーで染色された右膝切片の代表的な写真である。
【発明の詳細な説明】
【０１０７】
本発明の一実施形態は、軟骨疾患および変形性関節症の処置における使用のための、軟骨細胞分化および軟骨細胞増殖の増強ならびに軟骨マトリックス産生の増加を誘導するための特定の組成物を含む。そのような組成物は、好ましくは関節の閉鎖腔への直接注射（関節内注射）によって、罹患関節に直接投与され得る。
【０１０８】
本発明を詳細に説明する前に、特に明記しない限り、本発明は特定の材料または製造過程に限定されず、したがって変動し得ることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図していないことを理解されたい。
【０１０９】
冠詞「ａ」および「ａｎ」は、本明細書において、冠詞の文法的対象の１つまたは２つ以上（すなわち少なくとも１）を指すように使用される。例として、「要素」は、１つの要素もしくは１つより多い要素を意味し、または「タンパク質」は、１つより多いタンパク質を意味する。
【０１１０】
「約」という用語は、本明細書で使用される場合、近似的に、～の領域内、おおよそ、またはその周囲を意味する。「約」という用語が数値範囲と組み合わせて使用される場合、これは、記載された数値の上下の境界を拡張することによってその範囲を修飾する。一般に、「約」という用語は、本明細書において、記載された値の上下の数値を１０％の分散で修飾するために使用される。したがって、約５０％は、４５％～５５％の範囲内を意味する。本明細書において端点によって列挙される数値範囲は、その範囲内に包含されるすべての数および分数を含む（例えば、１～５は、１、１．５、２、２．７５、３、３．９０、４、および５を含む）。また、そのすべての数および分数は、「約」という用語によって修飾されると推定されることも理解されるべきである。
【０１１１】
「軟骨細胞」という用語は、軟骨から分離された細胞を指す。
【０１１２】
「軟骨」または「関節軟骨」または「軟骨マトリックス」という用語は、ヒトおよび他の種を含む哺乳動物の弾性の半透明結合組織を指す。軟骨は、主に軟骨細胞、ＩＩ型コラーゲン、少量の他のコラーゲン型、他の非コラーゲン性タンパク質、プロテオグリカンおよび水で構成され、通常、Ｉ型コラーゲンおよびＩＩ型コラーゲンならびに他のプロテオグリカンのマトリックス中の線維芽細胞で構成される軟骨膜によって取り囲まれている。ほとんどの軟骨は成熟すると骨になるが、一部の軟骨は鼻、耳、膝、および他の関節等の位置で元の形態のままである。軟骨は血液または神経供給を有さず、軟骨細胞はこの組織における唯一の細胞型である。
【０１１３】
「活性剤」、「活性賦形剤」、「活性成分」、「薬理学的に活性な賦形剤」という用語は、所望の薬理学的、生理学的効果を誘導する化学物質または化合物を指すように本明細書で互換的に使用され、治療上有効で防止上有効な薬剤を含む。これらの用語はまた、限定されないが、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、活性代謝産物、包接錯体、類似体等を含む、本明細書で具体的に言及される活性薬剤の薬学的に許容される薬理学的に活性な誘導体および類似体を包含する。
【０１１４】
薬理学的に活性な薬剤または活性な賦形剤の「有効量」または「治療有効量」という用

語は、所望の治療効果を提供するための非毒性であるが十分な量の薬剤または賦形剤を意味することを意図している。「有効」な量は、対象によって異なる。したがって、必ずしも正確な「有効量」を特定できるとは限らない。しかしながら、任意の個々の場合における適切な「有効」量は、日常的な実験を使用して当業者によって決定され得る。さらに、本発明の組成物または剤形に組み込まれる活性剤の正確な「有効」量は、治療有効範囲内にある量の活性剤を送達するために配合物の容易な適用を可能にするのに十分な範囲内の濃度である限り、重要ではない。

【０１１５】

好ましい投与経路は、ヒドロゲルもしくはコラーゲンマトリックスまたは人工足場（マトリックス）中の、好ましくは流体の形態の、損傷軟骨部位、または軟骨の、もしくは軟骨に近い（外科的）介入部位への局部を含む局所的または適用を含む。

【０１１６】

本発明はまた、本発明の化合物を含む医薬組成物に関する。より具体的には、そのような化合物は、当業者に公知の標準的な薬学的に許容される担体、充填剤、可溶化剤および安定剤を使用して医薬組成物として配合することができる。

【０１１７】

本発明は、本明細書に開示される疾患の処置に有用な化合物を有効成分として含む医薬組成物の調製および使用を包含する。そのような医薬組成物は、対象への投与に適した形態での有効成分単独からなってもよく、または医薬組成物は、有効成分と、１つ以上の薬学的に許容される担体、１つ以上の追加の成分、またはこれらの何らかの組み合わせとを含んでもよい。

【０１１８】

活性成分は、当技術分野で周知のように、例えば生理学的に許容されるカチオンまたはアニオンと組み合わせて、生理学的に許容されるエステルまたは塩の形態で医薬組成物中に存在し得る。

【０１１９】

本明細書で使用される場合、「生理学的に許容される」エステルまたは塩という用語は、医薬組成物の任意の他の成分と適合性であり、組成物が投与される対象に有害ではない活性成分のエステルまたは塩形態を意味する。

【０１２０】

本発明の医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される担体、および任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズ、および状態に応じて、さらに組成物が投与される経路に応じて変動する。

【０１２１】

例として、組成物は、０．１％～１００％（ｗ／ｗ）の活性成分を含み得る。活性成分に加えて、本発明の医薬組成物は、１つ以上の追加の薬学的活性剤をさらに含んでもよい。

【０１２２】

本明細書で使用される場合、「追加成分」には、限定されないが、以下の１つ以上が含まれる：賦形剤；界面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒および崩壊剤；結合剤；滑沢剤；甘味剤；香味剤；着色剤；保存剤；ゼラチン等の生理分解性組成物；水性ビヒクルおよび溶媒；油性ビヒクルおよび溶媒；懸濁化剤；分散剤または湿潤剤；乳化剤、粘滑剤；緩衝剤；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；酸化防止剤；抗生物質；抗真菌剤；安定剤；ならびに薬学的に許容されるポリマー材料または疎水性材料。

【０１２３】

組成物はまた、変形性関節症の処置に使用される１つ以上の物質、特に、好ましくはシタグリプチン、サキサグリプチン、ビルダグリプチン、アログリプチンおよびリナグリプチンからなる群から選択されるジペプチジルペプチダーゼＩＶ酵素の１つ以上の阻害剤、あるいは、鎮痛剤、非ステロイド性抗炎症剤、ステロイド性抗炎症剤および緩徐作用性抗関節炎剤、パラセタモールを含む鎮痛薬；アセチルサリチル酸、アセチルサリチル酸リジン、フェニルブタゾン、スリンダク、ジクロフェナクカリウムもしくはナトリウム、アセ

クロフェナク、チアプロフェン酸、イブプロフェン、ケトプロフェン、アルミノプロフェン、フェノプロフェン、ナプロキセン、フルルビプロフェン、インドメタシン、メフェナム酸、ニフルミン酸、テノキシカム、メロキシカム、ピロキシカム、ならびにセレコキシブおよびエトリコキシブ等の選択的シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤、ベタメタゾン、デキサメタゾン、プレドニゾロン、プレドニゾン、チキソコルトールもしくはトリアムシノロン；コンドロイチン、コンドロイチン硫酸（Ｓｔｒｕｃｔｕｍ、Ｃｈｏｎｄｒｏｓｕｌｆ）、グルコサミンもしくはグルコサミン硫酸、ジアセレイン（Ａｒｔ５０、Ｚｏｎｄａｒ）、またはアボカドおよび大豆の不けん化抽出物（ｐｉａｓｃｌｅｄｉｎｅ）等の他の物質を含んでもよい。

【０１２４】

本発明の医薬組成物に含まれ得る他の「追加成分」は、当技術分野で公知である。

【０１２５】

本明細書に記載の医薬組成物の配合物は、薬理学の分野で公知のまたは今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、そのような調製方法は、活性成分を担体または１つ以上の他の補助成分と会合させ、次いで、必要または望ましい場合、生成物を所望の単回または複数回投薬単位に成形または包装するステップを含む。

【０１２６】

そのような医薬組成物は、一般に、あらゆる種類の動物への投与に適していることが当業者によって理解されよう。好ましい実施形態において、処置される対象または患者は、動物、好ましくは哺乳動物である。一実施形態によれば、処置される対象は、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタおよび非ヒト霊長類からなる群から選択される動物である。

【０１２７】

好ましい一実施形態によれば、処置される対象は、ヒト、好ましくは成人、特に好ましくは５０歳を超える成人である。

【０１２８】

本発明による組成物は、特に全身（非経口、静脈内等）、経口、直腸内、局所または皮下を含む任意の既知の投与経路を介して投与され得る。１つの好ましい実施形態によれば、組成物はまた、関節内注射によって、好ましくは関節炎関節に投与され得る。この場合、ヒアルロン酸、アルブミン、アルファ－１糖タンパク質、鎮痛物質等の他の局所作用物質と組み合わせて投与され得る。

【０１２９】

化合物は、１日に数回の頻度で動物に投与されてもよく、またはより少ない頻度、例えば１日に１回、１週間に１回、２週間に１回、１ヶ月に１回、もしくはさらに少ない頻度、例えば数ヶ月に１回、もしくはさらに１年に１回以下で投与されてもよい。

【０１３０】

投薬の頻度は、当業者には容易に明らかであり、限定されないが、処置される状態または疾患の種類および重症度、動物の種類および年齢等の任意の数の要因に依存する。

【０１３１】

本発明の医薬組成物は、バルクで、単一単位用量として、または複数の単一単位用量として調製、包装、または販売され得る。

【０１３２】

「単位用量」という用語は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の個別量である。有効成分の量は、一般に、対象に投与されるであろう有効成分の投与量、またはそのような投与量の好都合な分割量、例えばそのような投与量の半分または１／３に等しい。

【０１３３】

本発明はまた、本発明の化合物を対象に投与する方法に関する。一実施形態において、本発明は、本発明の方法を用いて特定された化合物を投与することによって対象を処置する方法を提供する。

【０１３４】

本明細書で使用される場合、「処置」または「治療」という用語は、病的状態に関連す

る症状を軽減、抑制または遅延させることを可能にする任意の作用を指す。これは、疾患の治癒的処置および予防的処置の両方を含む。治癒的処置は、治癒をもたらす処置、または疾患の症状もしくはそれが引き起こす負担を軽減する、改善および／もしくは排除する、低減および／もしくは安定化する処置によって定義される。予防的処置は、疾患の防止をもたらす処置と、疾患の発生率またはそれが生じるリスクを低減および／または遅延させる処置との両方を含む。

【０１３５】

特に、本発明の文脈において、「処置」という用語は、より詳細には軟骨の関節炎破壊の阻害または抑制を指す。

【０１３６】

本明細書で使用される「治療有効用量」という用語は、変形性関節症に対する治療または防止活性が観察されるのに必要な量、特に関節炎軟骨破壊の阻害または抑制が観察されるのに必要な量を指す。投与されるペプチドの量および処置の期間は、処置される対象の生理学的状態、処置される関節の性質に従って当業者によって評価される。

【０１３７】

いくつかの実施形態において、本発明による組成物は、原発性変形性関節症（解剖学的もしくは外傷性の原因なし）または続発性変形性関節症の処置にも使用することができる。処置される変形性関節症は、任意の関節、特に股関節（変形性股関節症）、膝関節（変形性膝関節症）、足首、足、手、手首、肘、肩または脊柱の関節、好ましくは股関節、膝、手および脊柱の関節に影響を及ぼし得る。

【０１３８】

本発明はまた、哺乳動物対象における関節刺激の緩和もしくは低減または既存の関節炎症の悪化の低減のための医薬配合物の製造における有効成分としてのリラグルチドの使用に関する。

【０１３９】

本発明はまた、患者の軟骨細胞増殖を増加させる方法であって、１ｎｇ／ｍｌ～１０ｍｇ／ｍｌのリラグルチドおよび０．１％～１０％のアルブミンからなる組成物の治療有効用量を患者に投与することを含む方法に関する。

【０１４０】

一実施形態によれば、炎症性病態の処置を必要とする対象における炎症性病態を処置する方法が提供される。この方法は、少なくとも１つの本発明の化合物を含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。本発明の方法によって特定された化合物は、既知の化合物または他の医薬と共に投与されてもよい。

【０１４１】

本明細書で言及されるすべての参考文献は、参照として本出願に組み込まれる。本発明の他の特徴および利点は、非限定的な例示として提供される以下の実施例を読むと、より明確となるであろう。

【実施例】

【０１４２】

実施例１：ＯＡ患者の軟骨細胞におけるサイトカイン放出に対するＶＩＣＴＯＺＡ（登録商標）の効果

【０１４３】

この試験は、変形性関節症患者の軟骨から分離したＩＬ－１β刺激ヒト軟骨細胞からの炎症調節因子の放出に対するＧＬＰ－１類似体であるＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）の効果を評価することを目的とした。

【０１４４】

材料および方法

テスト物質：Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ）。

参照物質：注射用水。

細胞培養用材料：ＤＭＥＭ、ウシ胎児血清、ペニシリンストレプトマイシン、リン酸緩

衝生理食塩水、リベラーゼブレンザイム３、ＩＬ－１β。
テスト系：ＭＭＰ３　ＥＬＩＳＡキット、ＭＭＰ１３　ＥＬＩＳＡキット、ＰＧＥ２　ＥＬＩＳＡキット、サイトカイン３０－Ｐｌｅｘパネルアッセイ。ＥＬＩＳＡアッセイおよびマルチプレックスアッセイを製造者の説明に従って実施した。
テスト物質および参照物質の配合物の調製：Ｖｉｃｔｏｚａ原液は６ｍｇ／ｍｌである。分子量は３７５１．２０２ｇ／ｍｏｌである。
【０１４５】
各患者について、５、２５、５０、１２５および６２５ｎＭのＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）を含有する４ｍｌの培地を調製した。この目的のために、５、２５、５０、１２５および６２５μＭの溶液を以下のように調製した：
５μＭ（１８．７５６μｇ／ｍｌ）：６ｍｇ／ｍｌの原液１．５６μｌ、全体を５００μｌとするのに十分な量の滅菌水
２５μＭ（９３．７８μｇ／ｍｌ）：６ｍｇ／ｍｌの原液１．５６μｌ、全体を１００μｌとするのに十分な量の滅菌水
５０μＭ（１８７．５６μｇ／ｍｌ）：６ｍｇ／ｍｌの原液１．５６μｌ、全体を５０μｌとするのに十分な量の滅菌水
１２５μＭ（４６８．２μｇ／ｍｌ）：６ｍｇ／ｍｌの原液１．５６μｌ、全体を２０μｌとするのに十分な量の滅菌水
６２５μＭ（２３４４．５μｇ／ｍｌ）：６ｍｇ／ｍｌの原液１．９５μｌ、全体を５μｌとするのに十分な量の滅菌水。
【０１４６】
これらの溶液を各患者について調製し、培養培地（４ｍｌ中４μｌ）で１：１０００に希釈して最終濃度にした。ビヒクルは、４ｍｌの培養培地中の４μｌの滅菌水からなっていた。
【０１４７】
リベラーゼ溶液の配合：リベラーゼの２６Ｕ／ｍｌの原液を、１％Ｐ／Ｓおよび２％グルタミンを含有するＤＭＥＭ中で調製し、－２０℃で保存した。消化の２つの最初のステップでは、０．５２Ｕ／ｍｌの溶液をＤＭＥＭ中で即席で調製した。消化の最後のステップでは、０．５２Ｕ／ｍｌの溶液を１：４で希釈することによって０．１３Ｕ／ｍｌの溶液を調製した。
【０１４８】
細胞培養培地の配合：４．５ｇ／Ｌのグルコースを含むＤＭＥＭ中１５％ＦＢＳ、２％Ｌ－グルタミン、１％ペニシリン／ストレプトマイシン。
【０１４９】
実験の設計および条件
Ｓａｉｎｔ　Ａｎｔｏｉｎｅ病院で人工装具を実装した膝の手術を受けている変形性関節症の４人の患者から軟骨を分離した。軟骨細胞の分離、播種、培養および活性化ならびに試料調製を行った。その後、ＥＬＩＳＡおよび多重分析を行った。
【０１５０】
ヒト関節軟骨の分離日を「１日目」とし、試験終了を「１４日目」とした。
【０１５１】
ヒト軟骨からの軟骨細胞の分離：人工膝関節置換術を受けている変形性関節症患者から軟骨を分離した。１人の患者からの軟骨を一度に処理した。新たに分離した軟骨を直径２～３ｍｍの片に切断し、５０ｍｌチューブに入れ、ＰＢＳですすいだ。軟骨片をＤＭＥＭ中０．５２Ｕ／ｍｌの４０ｍｌのリベラーゼ中で４５分間インキュベートした。４５分後、リベラーゼを除去し、０．５２Ｕ／ｍｌ新たなリベラーゼ溶液を４５分間添加した。次いで、溶液を除去し、軟骨片を４０ｍｌのリベラーゼ（０．１３Ｕ／ｍｌ）中で一晩インキュベートした。
【０１５２】
軟骨細胞の播種：軟骨細胞分離から１６時間後、ピペットで溶液を上下に動かし、細胞

をホモジナイズした。その後、溶液を１００μｍセルストレーナで濾過した。濾過した溶液を室温で６分間、１６００ｒｐｍで遠心分離した。ペレットを１５ｍｌの完全培地（ＤＭＥＭ＋１５％ＦＢＳ＋２％グルタミン＋１％Ｐ／Ｓ）に再懸濁した。細胞を血球計算盤によって計数し、１２ウェル培養プレートに２００００～２５００００細胞／ウェルの密度で播種した。培養物を滅菌条件下でインキュベートした（３７℃、５％CO_2）。

【０１５３】

軟骨細胞の培養：播種から４８時間後、培地を新鮮な培地と交換した。その後、コンフルエンス（１２～１３日目）まで培地を２日ごとに更新した。処置の２４時間前のコンフルエンスで、培地をＦＢＳ不含０．１％ＢＳＡを含む培地と交換した。

【０１５４】

翌日、試験デザイン（表１）およびスケジュール（表２）に従って、軟骨細胞を５つの用量のＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）（５ｎＭ、２５ｎＭ、５０ｎＭ、１２５ｎＭ、６２５ｎＭ）またはビヒクルと２時間プレインキュベートし、次いで、ＩＬ－１β（５ｎｇ／ｍｌ）で２４時間刺激した。

【０１５５】

【表１】

表１：試験設計

群	処置	時間
1	ＩＬ－１βを含むビヒクル	２４Ｈ
2	ＩＬ－１βを含むＶｉｃｔｏｚａ　５ｎＭ	
3	ＩＬ－１βを含むＶｉｃｔｏｚａ　２５ｎＭ	
4	ＩＬ－１βを含むＶｉｃｔｏｚａ　５０ｎＭ	
5	ＩＬ－１βを含むＶｉｃｔｏｚａ　１２５ｎＭ	
6	ＩＬ－１βを含むＶｉｃｔｏｚａ　６２５ｎＭ	

【０１５６】

【表２】

表２：試験スケジュール

試験日*	手順
1	軟骨および軟骨細胞の分離
2	軟骨細胞の播種および培養
12	ＦＢＳ不含培地による置換
13	Ｖｉｃｔｏｚａによる前処理およびＩＬ－１βによる活性化
14	細胞上清の回収

【０１５７】

テストおよび評価：ＥＬＩＳＡアッセイおよびマルチプレックスアッセイ

【０１５８】

試料の調製：各試験の終了時に、培地を回収し、遠心分離し、上清を凍結した。試料は、テスト施設内でドライアイス中で輸送され、受領後分析まで－８０℃で保存された。

【０１５９】

検出アッセイ

ＰＧＥ２アッセイ：アッセイは、限られた量のＰＧＥ２モノクローナル抗体についての遊離ＰＧＥ２およびＰＧＥ２－アセチルコリンエステラーゼ結合体（ＰＧＥ２トレーサ）との間の競合に基づいていた。ＰＧＥ２トレーサの濃度は一定に保たれたが、遊離ＰＧＥ

２は各試料で変動した。モノクローナル抗体に結合したＰＧＥ２トレーサの量は、試料中の遊離ＰＧＥ２の量に反比例した。酵素反応にはアセチルコリンエステラーゼ基質が関与していたため、色はＰＧＥ２高濃度試料ではほとんど強くなく、ＰＧＥ２低濃度試料では非常に強かった。

【０１６０】

製造者の説明に従って、％Ｂ／Ｂ０の決定後に濃度を計算したが、Ｂ０は、ＰＧＥ２トレーサの最大量が結合しているウェルの読み取りから得られた吸光度（遊離ＰＧＥ２の非存在下）を表し、Ｂは、各標準または試料ウェルについて得られた吸光度を表す。正確な結果を得るために、テストを進める前に、ＩＬ－１β処理ウェルからの上清を１：１０００に希釈し、その他を１：５００に希釈した。ＰＧＥ２の測定範囲は、７．８～１０００ｐｇ／ｍｌであった。

【０１６１】

ＭＭＰ３アッセイ：アッセイは、比色ペルオキシダーゼ系検出と組み合わせた古典的なサンドイッチＥＬＩＳＡに基づいていた。正確な結果を得るために、テストを進める前に、ＩＬ－１β処理ウェルからの上清を１：１０００に希釈し、その他を１：５００に希釈した。ＭＭＰ３の測定範囲は、０．１５６～１０ｎｇ／ｍｌであった。

【０１６２】

ＭＭＰ１３アッセイ：アッセイは、比色ビオチン－ストレプトアビジン系検出と組み合わせた古典的なサンドイッチＥＬＩＳＡに基づいていた。正確な結果を得るために、テストを進める前に、ＩＬ－１β処理ウェルからの上清を１：１００に希釈し、その他を１：１０に希釈した。ＭＭＰ１３の測定範囲は、８．２３～６０００ｐｇ／ｍｌであった。

【０１６３】

マルチプレックスアッセイ：Ｌｕｍｉｎｅｘ技術は、ＥＬＩＳＡサンドイッチ技術と、検出用の固相を表す蛍光ポリスチレンビーズの混合物との結合に基づいている。各ビーズは、特異的抗体および異なる蛍光色素と結合される。このアッセイは、最小限の体積利用で同じ試料中の様々なサイトカインを定量することを可能にする。Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製のＨｕｍａｎ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｍａｇｎｅｔｉｃ ３０－ｐｌｅｘを使用して、ＥＧＦ、エオタキシン、ＦＧＦ塩基性、ＧＣＳＦ、ＧＭＣＳＦ、ＨＧＦ、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１ＲＡ、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－２Ｒ、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２（ｐ４０／ｐ ７０）、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＰ－１０、ＭＣＰ１、ＭＩＧ、ＭＩＰ１、ＭＩＰ１β、ＲＡＮＴＥＳ、ＴＮＦ－αおよびＶＥＧＦを定量した。

【０１６４】

試料を、製造者の説明に従って希釈せずにアッセイした。

【０１６５】

インキュベーションの終了時に、培養培地を回収し、遠心分離し、次いで、上清に対してＥＬＩＳＡ（ＭＭＰ３ ＥＬＩＳＡキット、ＭＭＰ１３ ＥＬＩＳＡキット、ＰＧＥ２ ＥＬＩＳＡキットおよびサイトカイン３０－Ｐｌｅｘパネルアッセイ）アッセイを行った。

【０１６６】

結果

各サイトカインの濃度を製造者の説明に従って計算した。

【０１６７】

各患者の基礎炎症プロファイルを、検出された各サイトカインについて計算された濃度平均を累積することによって評価した。

【０１６８】

結果は、基礎炎症プロファイルが、高濃度の炎症性サイトカインを有する２名の患者および低濃度のサイトカインを有する２名の患者を含めて非常に可変的であったことを示す。

【０１６９】

各患者のＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）応答炎症プロファイルを、Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）処置の前後の各サイトカイン計算濃度平均の比を比較することによって評価した。

一般的な結果は、患者ごとに異なる応答を示す。しかしながら、Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）に対する同等の応答が、ＩＬ－１βに関連してＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）で処置された４人の患者の軟骨細胞のうちの３つにおいて４つのサイトカインについて出現し；ＧＭＣＳＦおよびＣＸＣＬ１０／ＩＰ－１０（同化サイトカイン）の計算濃度平均は増加したが、ＩＬ７、ＭＣＰ１（異化サイトカイン）は減少した（図１）。

【０１７０】

結論

本発明者らは、試験した４人の患者の各々において異なる応答プロファイルを実証した。リラグルチドは、ＯＡ患者からの軟骨細胞におけるある程度の同化サイトカイン分泌を増加させ、ある程度の異化サイトカイン分泌を減少させる。

【０１７１】

実施例２：持続放出を伴うリラグルチドの関節内配合物の調製－放出プロファイルの決定

【０１７２】

本発明者らは、関節内注射用のリラグルチドを含む粘性ヒドロゲルの２０の異なる配合物をテストし、さらなるインビボ前臨床試験のための３つの最良の配合物を選択するために、各配合物の人工滑液中への放出プロファイルを決定した。

【０１７３】

材料および方法

試験材料：リラグルチド。

【０１７４】

ヒドロゲル配合物の材料

デキストラン７０ＥＰ（７０ｋＤａ）、

ポロキサマー４０７：Ｋｏｌｌｉｐｈｏｒ（登録商標）Ｐ４０７、オキシエチレン７１、５－７４、９％、

ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）３３５０

アルギン酸ナトリウム塩、

（ヒドロキシプロピル）メチルセルロース（ＨＰＭＣ）、粘度２，６００～５，６００ｃＰ、H_2O（２０℃）中２％（文献値）、

アルブミンウシ画分Ｖ、ｐＨ７．０、Ｍｒ６７．０００，００、

ポリソルベート８０：Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０

大豆由来のレシチン、

ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）４００、

キトサン９５／５００、高粘度、

ヒアルロン酸ナトリウム１．９ＭＤａ、

ＰＢＳ　ｐＨ７．４

【０１７５】

人工滑液配合物の材料

ヒアルロン酸ナトリウム１．９ＭＤａ、Ｗｅｌｌｃｏｓ－Ｍａｒｋｕｓ　Ｇｒａｕｅｌ

アルブミンウシ画分Ｖ、ｐＨ７．０、Ｍｒ６７．０００，００、ＳＥＲＶＡ

γ－グロブリンウシ、Ｍｒ１５０．０００，００、ＳＥＲＶＡ

ＰＢＳ　ｐＨ７．４、Ｐａｎｒｅａｃ　ＡｐｐｌｉＣｈｅｍ

【０１７６】

放出プロファイルを決定するためのテスト系

半透膜を使用した：透析チューブヴィスキング（ｖｉｓｋｉｎｇ）、セルロース、厚さ０．０２３ｍｍ、ＭＷＣＯ　１２～１４ｋＤａ

リラグルチド濃度測定用ＥＬＩＳＡキット

【０１７７】

人工滑液配合物：人工滑液を配合するために、３．５ｍｇのヒアルロン酸ナトリウム、９ｍｇのアルブミンおよび３．５ｍｇのγ－グロブリンを１ｍｌごとにＰＢＳ　ｐＨ７．４に再懸濁した。調製された人工滑液の体積は、各実験について１０ｍｌであった。

【０１７８】
人工滑液の組成は、多くの情報源、例えばＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ ｏｆ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ ｏｆ Ｂｉｏｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙ．第四版、Ｊｏｎａｔｈａｎ Ｂｌａｃｋ、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、２０ｇｒｕ２００５；Ｓｙｎｏｖｉａｌ Ｆｌｕｉｄ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ．Ｄｒ Ａｒｕｎ Ｐａｌ Ｓｉｎｇｈ、ｈｔｔｐ：／／ｂｏｎｅａｎｄｓｐｉｎｅ．ｃｏｍ／ｓｙｎｏｖｉａｌ－ｆｌｕｉｄ／；Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｙａｌｕｒｏｎｉｃ Ａｃｉｄ ｉｎ Ｓｙｎｏｖｉａｌ Ｆｌｕｉｄ．Ｂａｒｒｙ Ｄｅｃｋｅｒら、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ１９５９、５（５）：４６５～４６９に基づいて選択された。

【０１７９】
安定性試験のためのリラグルチド配合物：安定性試験のために、１．０２ｍｌのＰＢＳ中の１ｍｇのリラグルチドを１０ｍｌの人工滑液と混合した。

【０１８０】
テスト手順
放出プロファイルの決定：調製した各配合物について、放出プロファイルを決定した。０日目に、リラグルチドヒドロゲル配合物（１ｍｇ／ｍｌ－１．０２ｍｌ）を、１０ｍｌの人工滑液に浸した半透膜テスト系に入れた。放出された分子は、３７℃で膜を通過して人工滑液中に入った。この膜は、リラグルチドのモノマーの自由な拡散を可能にするはずであるが、リラグルチドのオリゴマーおよびヒドロゲル配合物の物理的障壁である。人工滑液の試料（それぞれ０．２ｍｌ）を１、２、４、７、１０および１４日後に収集した。採取した試料を新鮮な人工滑液と交換して、膜の外側に同じ体積の液を維持した。人工滑液の試料を、リラグルチド濃度を決定するためのさらなるＥＬＩＳＡ分析のために試験の終わりまで２～８℃で保存した。

【０１８１】
安定性試験：試験条件におけるリラグルチドの安定性を決定するために、リラグルチドの人工滑液中の溶液を適切な濃度で調製し、リラグルチドヒドロゲル配合物と同じ様式で処理した。

【０１８２】
ＥＬＩＳＡ手順：リラグルチド濃度の定量化をＥＬＩＳＡキットで行った。ＥＬＩＳＡ手順は、１つの例外を除いてキットの提供者の推奨に従って行った。使用された検量線の標準は、示唆されたよりも高い濃度を有し、０．９７７～１０００ｎｇ／ｍｌの範囲内であった。試料をＥＩＡ緩衝液で希釈した。標準および対照をリラグルチドの１つの原液から調製した。いくつかのＥＩＡプレートで分析を行った。すべてのプレートで、同じ標準溶液および対照溶液を使用した。希釈後の試料中のリラグルチドの予想濃度は、５～２２７ｎｇ／ｍｌの範囲内であった。試料の予想濃度範囲：１５、１００および２００ｎｇ／ｍｌをカバーする濃度で、３つの品質対照を使用した。各点は２回測定された。吸光度を９６ウェルプレートリーダーによって４５０ｎＭで測定した。

【０１８３】
実験の設計および条件
実験期間の長さ：配合物調製および膜負荷の日を「０日目」とみなし、試験終了を「１４日目」とみなした。

【０１８４】
群の設計および試験スケジュール：１ｍｇ／ｍｌのリラグルチドを含有する２０の異なるヒドロゲル配合物を、試験設計（表３）および試験スケジュール（表４）に従って試験した。３つのクラスの配合物を含めた：

【０１８５】
標準配合物（１、２、３、４、５、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６）、潜在的な活性賦形剤配合物（１７、１８、１９、２０）およびアルブミンベース配合物６、９）。

【０１８６】
【表３】

表３．試験設計

配合物番号	ヒドロゲル組成物（PBS pH7.4 中）*＋1mg/ml リラグルチド *配合物番号１７（キトサン）をｐＨ４に溶解し、次いで溶液を水酸化ナトリウムでｐＨ７．４に調整した。
1	デキストラン
2	ポロキサマー４０７
3	ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）３３５０
4	アルギネート
5	ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）
6	アルブミン
7	ＰＥＧ３３５０、ポリソルベート８０
8	ＨＰＭＣ、ポリソルベート８０
9	アルブミン、ポリソルベート８０
10	デキストラン、ポリソルベート８０
11	デキストラン、レシチン
12	ポロキサマー４０７、レシチン
13	ポロキサマー４０７、ポリソルベート８０
14	ポロキサマー４０７、ポリソルベート８０
15	ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）
16	ポロキサマー４０７、ＰＥＧ４００、ＨＰＭＣ
17	キトサン
18	ヒアルロン酸ナトリウム
19	ヒアルロン酸ナトリウム、ＰＥＧ３３５０
20	ヒアルロン酸ナトリウム、ポロキサマー４０７

【０１８７】

【表４】

表４．試験スケジュール

手順	試験日						
	0	1	2	4	7	10	14
配合物	√						
膜負荷	√						
人工滑液試料の収集		√	√	√	√	√	√
終了							√

【０１８８】

結果

【０１８９】

リラグルチドの分析を正確に行い、信頼できる結果を得た。検量線を含むＥＬＩＳＡ生データを付録ＩＩに示す。すべてのプレートにおいて、３つの品質対照のうち２つが合格基準を満たした、すなわち理論濃度の±２０％の範囲内に入った。合格基準は、ＥＭＡのＧｕｉｄｅｌｉｎｅ ｏｎ ｂｉｏａｎａｌｙｔｉｃａｌ ｍｅｔｈｏｄ ｖａｌｉｄａｔｉｏｎ（ＥＭＥＡ／ＣＨＭＰ／ＥＷＰ／１９２２１７／２００９Ｒｅｖ．１Ｃｏｒｒ．２＊＊）に倣って許容された。

【０１９０】

リラグルチド濃度：ＥＬＩＳＡ染色を進める前に、人工滑液からの試料を１：４００に希釈した。最初の５つの時点から収集した全ての試料を分析した。さらに、最後の時点からの８つの試料も、試験開始時の配合物の予想および一貫性に基づいて分析した。

【０１９１】

放出プロファイルの決定：全てのヒドロゲル配合物についての最大予想リラグルチド濃度のパーセンテージとしての結果を計算した。分析試料を用いた実験から得られたリラグルチドの量は計算に含めなかった。人工滑液中への予想リラグルチド濃度（すべてのリラグルチドが半透膜から放出された場合）は、９０．７４μｇ／ｍｌ（１００％に相当する）である。

【０１９２】

６つの最良の配合物の計算されたパーセンテージを以下に示す（表５）。

【０１９３】

【表５】

表５．

配合物番号	時点［日］					
	1	2	4	7	10	14
6	64%	59%	42%	28%	15%	不検出
8	23%	28%	24%	8%	6%	1%
14	69%	88%	75%	71%	47%	28%
17	74%	44%	41%	56%	68%	不検出
19	40%	32%	22%	2%	1%	不検出
20	6%	7%	11%	7%	1%	不検出

【０１９４】

リラグルチドを含有する２０の異なる配合物の放出プロファイルを決定することを目的として行った実験は、テストした配合物間の多様性を示した。元の２０のテスト配合物か

ら、６つは１０日後に１％を超えるリラグルチド濃度をもたらした。これらは、図２に示される放出プロファイルを有する配合物６、８、１４、１７、１９および２０である。

【０１９５】

実施例３：ラットの変形性関節症の外科的誘導モデルを利用した３つのリラグルチドベース配合物の有効性試験

【０１９６】

本試験の目的は、ラットの変形性関節症の外科的に誘発されたモデルを利用して、３つのリラグルチドベース配合物の有効性を評価することであった。

【０１９７】

材料および方法

【０１９８】

テスト物質：リラグルチド

ビヒクル：ＰＢＳ

リラグルチドの配合物：３つの粘性ヒドロゲル配合物をテストした：

配合物６：高放出

配合物８：中放出

配合物２０：低放出

【０１９９】

非配合リラグルチドは、ＰＢＳに溶解したリラグルチドに対応する。

【０２００】

配合物を、３サイクルの各々について処置の日に調製した。各配合物について、４ｍｇのリラグルチドを２ｍｌの配合物溶液またはＰＢＳ（非配合リラグルチドの場合）に溶解して、関節内注射用の２５μｌ中０．１８ｍｇ／ｋｇ用量レベルにした。平均ＢＷを２８０ｇと仮定すると、各ラットに投与された用量は５０μｇであった。リラグルチドを、調製後１時間以内に動物に投薬するために使用した。

【０２０１】

実験モデル

動物種／系統：ラット／Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ（ＳＤ）

性別／数／体重平均：雄／６０／試験開始時６～８週齢

食餌：動物には市販のげっ歯類用飼料を自由に与えた。

【０２０２】

実験の設計および条件

ラットを体重に従って５つの層別化試験群のうちの１つに割り当てた。

【０２０３】

内側靭帯切断（ＭＬＴ）手順とそれに続く内側半月板（ＭＭｘ）の切除によるＯＡ誘導

吸入麻酔（イソフルラン４．０％）を使用するチャンバ誘導技術によって各ラットに麻酔を誘導した。手術中、動物をイソフルランで１．５～２．５％のレベルに維持し、酸素流量を１～２リットル／分とした。眼軟膏を眼に適用して、麻酔期間中の組織の乾燥を防止した。麻酔の誘導後、電動の動物用バリカンを用いて右脚皮膚表面の毛を刈り取った。膝関節を剃毛した後、皮膚をヨウ素で消毒し、関節の内側に傍膝蓋皮膚切開を行った。関節腔の内側を切開した。内側靭帯を切断し、内側半月板を顕微鏡手術用ナイフを用いて切除した。ｖｉｃｒｙｌ５／０編組吸収性縫合糸で創傷を閉じた。手術手順は全て手術顕微鏡を用いて行った。群の割り当てを表６に示し、試験タイムラインを表７に示す。

【０２０４】

【表６】

表６．群の割り当て

群	処置	ＯＡ誘導	用量レベル(mg/kg)	用量体積(μｌ)	投与経路
１Ｍ（１、３、４、２１、２２、２３、２４、４１、４２、４３、４４）	ビヒクル（ＰＢＳ）	√	該当なし	25	ＩＡ
２Ｍ（５、６、７、８、２５、２６、２７、２８、４５、４６、４７、４８）	リラグルチド非配合	√	0.18	25	ＩＡ
３Ｍ（９、１０、１１、１２、２９、３０、３１、３２、４９、５０、５１、５２）	リラグルチド（配合物６）	√	0.18	25	ＩＡ
４Ｍ（１３、１４、１５、１６、３３、３４、３５、３６、５３、５４、５５、５６）	リラグルチド（配合物８）	√	0.18	25	ＩＡ
５Ｍ（１７、１８、１９、２０、３７、３８、３９、４０、５７、５８、５９、６０）	リラグルチド（配合物 20）	√	0.18	25	ＩＡ

【０２０５】

【表７】

表７．試験タイムライン

試験日／週	手順	備考
１週間に１回	体重	
１日目	ＯＡ誘導	
７日目	リラグルチドによる処置	単回ＩＡ投与
１、１４、２８および３５日目	Ｖｏｎ　Ｆｒｅｙテスト	
１、１４、２８および３５日目	重量負荷テスト	
３６日目	終了	右膝の採取および固定 左膝の採取および固定

【０２０６】

テストおよび評価

ＯＡラットの重量負荷変化を、無能力性テスタを用いて測定した。四肢の疼痛閾値および重量分布の変化を示すことが報告されている姿勢不均衡が減少する。各後足が無能力性装置上の別個のフォースプレート上に載置されるように各ラットを置き、各後足が支える重量を５秒間測定した。左後肢に対する右後肢の負荷重量の比を算出する。各ラットの５回の連続測定の平均値を記録した。重量負荷機能（無能力性テスト）を、ベースライン（１日目）、１４日目、２８日目および３５日目に合計４回行った。実験者は、群に関して知識を有さなかった。

【０２０７】

３６日目にラットをCO_2窒息により　　殺した。膝関節構造をさらなる組織学的分析のために４％緩衝ホルマリン溶液中で固定した。反対側（非損傷）の膝も４％緩衝ホルマリン溶液で固定した。

【０２０８】

数値結果は、平均±ＳＤとして与えられた。α＝５％でのＧｒｕｂｂｓの検定分析後に外れ値データ点（アスタリスクでマークされている）を特定し、群平均計算には含めなかった。該当する場合、統計分析は、二元配置ＡＮＯＶＡ（続いてボンフェローニ事後検定）または一元配置ＡＮＯＶＡ（続いてダネットの多重比較事後検定）を用いて行った。５％（ｐ≦０．０５）の確率を有意とみなした。図中、群間の統計学的有意差の程度は、＊ｐ≦０．０５、＊＊ｐ＜０．０１および＊＊＊ｐ＜０．００１として示された。

【０２０９】

結果

重量負荷テスト

ＯＡを有するラットの重量負荷変化を、動物が各後足に分配する重量を独立して測定する無能力性メータを使用して評価した。ＯＡ誘導前の全ての動物は、重量を両後足に等しく分配した。１４日目に、重量負荷差（Ｒ／Ｌ重量パーセント）の有意な増加が対照群と群３Ｍとの間で観察され、リラグルチドの長期放出を伴った（図３）。

【０２１０】

組織学的評価

スライドを、処置群について知識を有さない１名の病理学者が調べた。以下のパラメータについて、膝の断面を評価した。

軟骨マトリックス損失幅（０％軟骨は無傷、１００％は最高到達点、５０％は中間領域）

軟骨変性スコア（スコア０～５、セクション９．１を参照されたい）。

全軟骨変性幅（０％軟骨は無傷、１００％は最高到達点、５０％は中間領域）。これには、すべての可能な変性変化が含まれる。

有意な軟骨変性幅。厚さの５０％超の測定は、著しく損なわれている（＋／－）。

病変の帯状深度比（ミクロン）。
骨棘（スコア０～４、セクション９．２を参照されたい）。
石灰化軟骨および軟骨下骨損傷スコア（スコア０～５、セクション９．３を参照されたい）。
滑液反応（スコア０～４、セクション９．４を参照されたい）。
内側関節嚢修復（μｍでの測定）
１０．板厚の増大（μｍ単位の測定）
【０２１１】
軟骨マトリックス損失幅（％）は、ビヒクル処置対照群１Ｍ（４３．６％）と比較して、群３Ｍ（３５．８％）で最も低かった。全軟骨変性幅（％）：これもまた、ビヒクル処置対照群１Ｍ（４３．２％）と比較して、群３Ｍ（３７．５％）で最も低かった。二元配置ＡＮＯＶＡに続くボンフェローニ事後比較により、図４に示されるように、対照動物群とリラグルチド処置動物群３Ｍとの間の軟骨変性における統計学的に有意な差が明らかになった（＊Ｐ＜０．０５）。平均＋／－ＳＤ、ｎ＝１１～１２。
【０２１２】
結論
試験目的は、ラットの変形性関節症の外科的誘発モデルを利用して、３つのリラグルチドベース配合物の有効性を評価することであった。
【０２１３】
この試験の結果は、リラグルチドの高放出に対応する配合物６中のリラグルチド（群３Ｍ）が、ＯＡ誘導後１４日目に、動物のビヒクル処置対照群と比較して、無能力性メータによる重量負荷測定においてＯＡ損傷の統計学的に有意な減少を誘導したことを示している。Ｖｏｎ　Ｆｒｅｙテストでは、全ての動物群間の統計学的有意差が明らかとならなかった。軟骨変性もまた、対照および他の配合物と比較して、配合物６群で処置したリラグルチドにおいて減少した。重量負荷試験および組織学評価は、明らかに、ＯＡラットモデルにおける新しい治療的処置のテストに対して感受性であった。
【０２１４】
配合物６に配合されたリラグルチドは、他の配合物または非配合リラグルチドと比較して、インビボで軟骨保護効果を有する。
【０２１５】
実施例４：ラットの変形性関節症の外科的誘導モデルを利用したリラグルチドのアルブミンベース配合物を使用した用量応答試験
【０２１６】
テストの原理は、ラットＯＡモデルにおける疾患パラメータ測定に対するアルブミン配合リラグルチドの評価に基づいていた。
【０２１７】
材料および方法
【０２１８】
テスト物質はリラグルチドであり、陽性対照はデキサメタゾン（およびＮｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ製の非配合リラグルチドＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）（６ｍｇ／ｍｌの注射液））である。
【０２１９】
配合物
ビヒクル（配合物賦形剤）は、群１Ｍおよび群７Ｍ群への関節内注射用のリン酸緩衝生理食塩水（２５μｌ）に再懸濁したアルブミンからなっていた。
【０２２０】
リラグルチドのアルブミンベース配合物（高用量、中用量および低用量）を以下のように調製した：
【０２２１】
リラグルチド（粉末として供給）を適切な体積のビヒクルに溶解して、関節内注射用に

２５μｌ中０．１８ｍｇ／ｋｇ（群２Ｍおよび群８Ｍ）、０．０６ｍｇ／ｋｇ（群３Ｍ）または０．０２ｍｇ／ｋｇ（群４Ｍ）の用量レベルにした。配合物を、３サイクルの各々について処置の日に調製した。

【０２２２】

群５Ｍに使用した陽性対照はデキサメタゾンである。膝処置のためのヒト臨床用量は４ｍｇ／注射であり、これはラットの０．４ｍｇ／ｋｇに相当する。デキサメタゾン注射液は、４ｍｇ／ｍｌの濃度で「すぐに使用できる」状態で供給された。ラットに投与した体積は、各処置日のラット平均ＢＷに応じて２５～５０μｌであった。

【０２２３】

非配合のリラグルチド（Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標））は、６ｍｇ／ｍｌの原液として供給された。糖尿病患者のヒト臨床「開始」用量は０．６ｍｇ／日（反復ＳＣ注射として供給される）であり、これはラットの０．０６ｍｇ／ｋｇに相当する。Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）（登録商標）の原液を、群６ＭへのＳＣ注射用に０．００６ｍｇ／ｍｌの最終濃度となるように注射用生理食塩水で１０００倍希釈した（１０ｍｌ／ｋｇ）。

【０２２４】

実験モデル

動物：ラット／系統：ＳＤ

性別：雄／数：７２／年齢：試験開始時に６～８週齢

供給元：Ｊａｎｖｉｅｒ　Ｌａｂｓ、フランス

初期体重：試験開始時（１日目）の平均体重は２６０ｇであった。各群で記録された最小および最大重量は、群平均の±２０％の範囲内であった。

食餌：動物には、市販のげっ歯類用飼料（Ｓａｆｅ　ｒｅｆ＃Ａ０４）を自由に与えた。動物は、濾過された飲用浸透水に自由にアクセスできた。

汚染物質：このテストの結果に影響を及ぼす可能性のある汚染物質は、食品および給水にはなかった。

【０２２５】

実験の設計および条件

試験開始および終了の定義：ＯＡ誘導日を「１日目」と定義した。本試験では、試験終了は「３６日目」と設定した。サテライト群を用いた試験では、試験終了は「５７日目」とした。

【０２２６】

処置群への割り当て：ラットを体重に応じて８つの群のうちの１つに無作為に割り当てた。

【０２２７】

試験設計およびタイムライン：試験は、試験設計については表１、試験タイムラインについては表２に従って３サイクルで行った。

【０２２８】

内側靭帯切断（ＭＬＴ）手順とそれに続く内側半月板の切除によるＯＡ誘導

吸入麻酔（イソフルラン５．０％）を使用するチャンバ誘導技術によって麻酔を誘導した。手術中、動物をイソフルラン下１．５～３．５％のレベルに維持し、空気流量を１～２リットル／分とした。眼軟膏を眼に適用して、麻酔期間中の組織の乾燥を防止した。麻酔の誘導後、電動の動物用バリカンを用いて右脚皮膚表面の毛を刈り取った。膝関節を剃毛した後、皮膚をヨウ素で消毒し、関節の内側に傍膝蓋皮膚切開を行った。膝蓋腱の内側の切開は、露出された関節へのアクセスを提供する。内側靭帯を切断し、顕微手術用ナイフを用いて内側半月板を切除した。ｖｉｃｒｙｌ５－０縫合糸で創傷を閉じた。手術手順は全て手術顕微鏡を用いて行った。群の割り当てを表８に示し、試験タイムラインを表９に示す。

【０２２９】

【表８】

表８．群の割り当て

群	動物ＩＤ	処置	ＯＡ誘導	用量レベル (mg/kg)	用量体積	ROA
1M (n=10)	1,4,9,10,26,31,35,42,53,57	ビヒクル (配合物賦形剤－アルブミン)	√	-	25μl	ＩＡ
2M (n=10)	2,5,12,16,25,32,45,48,50,52	アルブミン配合リラグルチド 高用量	√	0.18	25μl	ＩＡ
3M (n=10)	3,6,17,18,28,33,38,46,54,55	アルブミン配合リラグルチド 中用量	√	0.06	25μl	ＩＡ
4M (n=10)	8,11,13,20,27,39,40,43,49,51	アルブミン配合リラグルチド 低用量	√	0.02	25μl	ＩＡ
5M (n=10)	7,15,19,21,29,34,36,47,56,58	陽性対照 (デキサメタゾン 4mg/ml)	√	0.40	25-50μl*	ＩＡ
6M (n=10)	14,22,23,24,30,37,41,44,59,60	非配合リラグルチド (Victoza(登録商標))	√	0.06	10 ml/kg	ＳＣ
7M (n=6)	61,62,63,64,65,66	ビヒクル (配合物賦形剤－アルブミン)	√	-	25μl	ＩＡ
8M (n=6)	67,68,69,70,71,72	アルブミン配合リラグルチド 高用量	√	0.18	25μl	ＩＡ

【０２３０】

【表９】

表９．試験タイムライン

試験日／週	手順	備考
１週間に１回	体重	
１週間に１回	膝の直径の測定	ならびに手術の前日および手術の翌日の測定（群７Ｍ～８Ｍについてはなし）
１日目	処置開始	５週間にわたる１週間に１回の反復ＩＡ投与（群１Ｍ～５Ｍ、７Ｍ～８Ｍ）または２週間にわたる週５日のＳＣ注射（群６Ｍ）
１日目	ＯＡ誘導	
１、１４、２８および３５日目	重量負荷テスト	群７Ｍ～８Ｍではなし
７および２１日目	Von Frey テスト	群７Ｍ～８Ｍではなし
３６日目	群 1M-6M の終了	出血および血漿分離 右膝（疾患）の採取および固定 左膝（健常）の採取および固定
５７日目	群 7M-8M の終了	右膝（疾患）の採取および固定 左膝（健常）の採取および固定

【０２３１】

テストおよび評価

関節腫脹：膝の直径の測定を行い、関節腫脹を炎症の指標として推論した。両膝の直径

の測定は、ラットの麻酔時にデジタルキャリパを用いて行った。測定は、手術の前日（ベースラインのため）、手術の翌日、次いで試験終了まで週に１回行った。実験者は、群に関して知識を有さなかった。

【０２３２】

重量負荷テスト：ＯＡ誘導後のラットの重量負荷変化を、無能力性テスト系を用いて監視した。四肢の疼痛閾値および重量分布の変化を示すことが報告されている姿勢不均衡を追跡した。各後足が無能力性装置上の別個のフォースプレート上に載置されるように各ラットを置き、各後足が支える重量を５秒間測定した。左後肢に対する右後肢の負荷重量の比を算出した。各ラットの３回の連続測定の平均値を記録した。動物に対して、重量負荷機能（無能力性テスト）を、ベースライン（１日目）、１４日目、２８日目および３５日目に合計４回行った。実験者は、群に関して知識を有さなかった。

【０２３３】

動物の　　殺および組織固定：３６日目（群１Ｍ～６Ｍの終了日）に、全ての動物を出血させた。ラットを致死量のＥｕｔｈａｓｏｌ　ｖｅｔによって安楽死させた。膝関節構造を採取し、さらなる組織学的分析のために４％緩衝ホルマリン溶液中で固定した。反対側（非損傷）の膝も４％緩衝ホルマリン溶液で固定した。５７日目（サテライト群７Ｍ～８Ｍの終了日）に、ラットを安楽死させた。膝関節構造を採取し、さらなる組織学的分析のために４％緩衝ホルマリン溶液中で固定した。反対側（非損傷）の膝も４％緩衝ホルマリン溶液で固定した。

【０２３４】

組織学的分析：組織学的分析を行った。膝関節切片をヘマトキシリン－エオシンまたはトルイジンブルー染色で染色して、病理学的病変の程度を評価した。スライドを、Ｎ．Ｇｅｒｗｉｎら、Ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ　ａｎｄ　Ｃａｒｔｉｌａｇｅ１８（２０１０）Ｓ２４－Ｓ３４のようにスコア化した。

【０２３５】

組織学的分析を以下に対して行った：

右膝（罹患）：３６日目に採取した全ての群、１０匹／群。試料数：ｎ＝６０

左膝（健常対照）：ビヒクル群１Ｍ、５匹／群。試料数：ｎ＝５

右膝（罹患）：５７日目に採取した群７Ｍ～８Ｍの全ての動物、６匹／群。試料数：ｎ＝１２

全試料数：ｎ＝７７

統計分析：数値結果は、平均±標準偏差（ＳＤ）として示された。外れ値または除外データ点（＄でマーク）は、群平均計算に含まれなかった。該当する場合には、二元配置または一元配置ＡＮＯＶＡ（それに続くＤｕｎｎｅｔｔの多重比較事後検定）を使用して統計分析を行った。５％（ｐ≦０．０５）の確率を有意とみなした。図中、結果は平均±ＳＥＭとして示され、群間の統計学的有意差の程度は、＊ｐ≦０．０５、＊＊ｐ＜０．０１および＊＊＊ｐ＜０．００１として示された。

【０２３６】

結果

本試験では、１日目から３６日目に６つの群（１Ｍ～６Ｍ、群当たりｎ＝９～１０）を追跡した。

【０２３７】

組織学的分析により右膝関節の病変がないことが明らかであったため、群２Ｍからの動物２を試験全体から除外した。

【０２３８】

膝の測定（ＫＭ）：膝の測定は、手術前、手術の翌日およびその後週に１回記録した。各群について、２次元における左右の膝の直径の平均を計算した。

【０２３９】

終了時に、高用量のリラグルチドでＩＡ処置された群２Ｍからのラット（幅および厚さ）、中用量のリラグルチドでＩＡ処置された群３Ｍからのラット（厚さ）において、用量

応答が観察される。図５に示すように、Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）でＳＣ処置された群６Ｍからのラット（厚さ）もまた、ビヒクル処置群１Ｍと比較して膝の測定値が有意に減少した。

【０２４０】

重量負荷テスト：ＯＡを有するラットの重量負荷変化を、動物が各後足に分配する重量を測定する無能力性メータを使用して評価した。無能力性テストを１日目（ベースライン）ならびに１４、２８および３５日目に行った。１４日目にＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）で処置した群６Ｍについて、％でのＲ／Ｌ比の有意な増加が観察された。この結果は、有意ではないが、他の測定期間中（２８日目および３５日目）にも観察することができた。対照動物と、中用量（ＯＡ誘導後１４日目および３５日目）または高用量（３５日目）を用いたリラグルチドＩＡ処置動物との間で、重量負荷差のわずかな有意でない傾向が観察された。

【０２４１】

組織学的分析

左後肢（動物１Ｍ１、１Ｍ９、１Ｍ２６、１Ｍ３１および１Ｍ５７から）を対照として提供した。予想通り、膝関節は病変を示さなかった。

【０２４２】

全ての群において、観察された病変は、顕著なものから重度のものまでである。典型的に観察されたパターンは、一般に内側脛骨プレート全体を含む軟骨の局所的に広範な断裂であった。

【０２４３】

潰瘍化の縁は、一般に、軟骨の細動および／またはプロテオグリカンマトリックスの完全な喪失を伴う壊死によって特徴付けられた。軟骨下骨は、一般に、大きな線維性コラーゲン性束（線維症）と交絡していた。摩擦領域を超える領域を含む骨軟骨界面（最高到達点）において、軟骨下骨は壊死を示した（周囲のフィブリンを伴う好酸球過多、核崩壊、核濃縮を示す細胞）。

【０２４４】

デキサメタゾンＩＡ処置群（５Ｍ群）およびＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）ＳＣ処置群（６Ｍ群）は、より低い軟骨喪失を示す傾向がある。しかしながら、一部の個体では、図６に示すように、内側半月板残存物、大腿軟骨および滑膜の間に癒着を形成する線維性組織による脛骨プレートのほぼ完全な置換が見られた。

【０２４５】

観察された修復変化は、滑膜嚢内の線維性コラーゲン性束を特徴とし、これは、デキサメタゾンＩＡ処置群（５Ｍ）およびＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）（登録商標）ＳＣ処置群（６Ｍ）では、大きな繊維性の乳頭状の高度に血管新生した突起を示し、他の構造（内側半月板残存物、関節軟骨、靭帯残存物）との全ての関節内に癒着を形成することがあった。リラグルチドＩＡ処置群では、線維症は観察されず、病変差は観察されなかった。リラグルチドＩＡ処理群では軟骨内に軟骨細胞巣が用量応答パターンを伴って観察された（図７）：高用量群では３匹／９匹、中用量群では２匹／８匹および低用量群では１匹／９匹。Ｖｉｃｔｏｚａ（登録商標）ＳＣ処置群では、７匹から１匹の動物のみが軟骨細胞巣の増殖を示したが、ビヒクル処置群では示されなかった（０匹／１０匹）。

【０２４６】

これらの観察された軟骨細胞増殖は、軟骨再生の試みを示唆している。

【０２４７】

サテライト群試験

サテライト群を用いた試験では、１日目から５７日目まで２つの群（７Ｍ～８Ｍ、群当たりｎ＝６）を追跡した。組織学的パラメータは、本試験において以前のように測定した。処置停止から３週間後の回復パーセンテージの評価を、リラグルチド高用量ＩＡ処置群およびビヒクル群を比較して分析した。

【０２４８】

【表１０】

表１０．サテライト群試験

		1M	7M	回収ビヒクルの%	2M	8M	回収リラグルチドIAの%
軟骨マトリックス損失幅	表面	1996,80	1433,60	72%	2016,33	856,33	42%
	中間領域	1450,40	973,20	67%	1837,67	525,17	29%
	最高到達点	1497,00	771,80	52%	1693,67	1007,83	60%
軟骨変性比スコア	Z1	4,00	2,00	50%	4,56	1,67	37%
	Z2	4,70	4,00	85%	4,89	4,17	85%
	Z3	3,70	2,40	65%	4,44	1,50	34%
	合計	12,40	8,20	66%	14,00	7,33	52%
全軟骨変性幅		2311,60	1493,40	65%	2136,67	1809,17	85%
有意な軟骨変性	病変の厚さ	157,90	119,60	76%	247,67	134,17	54%
Z1	軟骨の厚さ	306,60	493,80	161%	382,67	423,67	111%
	病変の厚さ	369,90	402,60	109%	425,56	347,83	82%
Z2	軟骨の厚さ	534,30	516,40	97%	382,11	505,33	132%
	病変の厚さ	164,50	149,40	91%	352,22	151,33	47%
Z3	軟骨の厚さ	449,50	577,80	129%	350,89	521,83	149%
骨棘	長さ	3,22	2,80	87%	4,00	3,00	75%
石灰化軟骨および軟骨下骨損傷スコア	スコア(0-5)	4,80	4,20	88%	4,44	3,67	83%
滑膜炎症	スコア(0-4)	3,50	3,00	86%	3,11	3,17	102%
内側関節嚢修復		476,60	424,80	89%	316,13	721,50	228%

【０２４９】

全体として、観察された病変は、両方の群について顕著である。本試験中に観察されたように、典型的に観察されたパターンは、内側脛骨プレートの大部分を含む軟骨の局所的に広範な裂傷であった。潰瘍化の周縁部は、軟骨の細動および／またはプロテオグリカンマトリックスの完全な喪失を伴う壊死によって特徴付けられた。

【０２５０】

高用量のリラグルチドでＩＡ処置された動物（群８Ｍ）は、ビヒクル処置動物（群７Ｍ）と比較してより低いマトリックス損失、ならびにリラグルチドＩＡ処置群における試験の経過を通して損失の減少を示す傾向がある（図８）。

【０２５１】

変性スコアおよび全変性幅に差は観察されなかった。しかしながら、処置の停止後の試験の経過を通して、変性スコアは、Ｚ１およびＺ３においてリラグルチドＩＡ処置群ではより低かった（図９）。

【０２５２】

２つの群間で骨棘形成に有意差はなかった。しかしながら、処置の停止後の試験の経過を通して、骨棘のパーセンテージは、リラグルチドＩＡ処置群では傾向がより低かった。

【０２５３】

高用量処置群は、対照群と比較して、膜肥厚によって観察されるより重要な滑膜修復を示した（図１０および図１１）。

【０２５４】

巣の図の例を図１２に示す。図１３で評価されるように、ビヒクル群（２匹／５匹；８．１±４．１個の巣／μm^2）と比較して、高用量テスト物質処置群（５匹／６匹；３０．６±７．０個の巣／μm^2）内で有意により多くの軟骨細胞巣が観察された。

【０２５５】

結論

本試験中に以前に観察されたように、軟骨、軟骨下骨および滑膜に関する各群の顕著な組織学的変化が観察された。

【０２５６】

滑膜修復変化は、ビヒクル群と比較して、高用量リラグルチドを用いたＩＡ処置群においてより強い。さらに、軟骨変性変化は、ビヒクル群と比較してリラグルチド処置群ではあまり顕著ではなかったが、統計学的に差はなかった。

【０２５７】

特に、リラグルチドＩＡ処置群ではより多くの軟骨細胞巣が観察され、軟骨内での再生の試みが実証されている。

【０２５８】

試験条件下では、デキサメタゾンＩＡおよびＶｉｃｔｏｚａ（登録商標）（登録商標）ＳＣ処置は、いくつかのＯＡ関連欠損（膝関節腫脹、無能力性、軟骨喪失に関連する組織学的所見）を軽減することができたが、修復はＩＡ処置群では観察されなかった線維症を伴った。

【０２５９】

興味深いことに、組織学的分析は、リラグルチドで処置した群について軟骨内の軟骨細胞巣を示した。

【０２６０】

それらの図は、軟骨修復の試みを実証する軟骨細胞増殖を示す。本試験（３６日目）では、ＩＡリラグルチド処置群において、巣の存在は滑膜修復の変化と関連しなかった。しかしながら、サテライト群試験（５７日目）では、高用量のリラグルチドでＩＡ処置した動物群で見られた軟骨細胞巣は、より顕著な滑膜修復変化（肥厚）に関連していた。

【０２６１】

全体的な試験結果は、リラグルチドがＯＡに関連する炎症および再生過程に関連する関連機構を標的とすることを示している。

【０２６２】

実施例５：ヒト間葉系幹細胞のインビトロ分化モデルにおける軟骨形成に対するリラグルチドの効果

【０２６３】

本発明者らは、ヒト間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）のインビトロ分化モデルにおいて軟骨形成に対するリラグルチドの効果をテストし、リラグルチドが軟骨形成を促進するかどうかを評価した。

【０２６４】

材料および方法

試験材料：リラグルチド。

テスト系：ヒト間葉系幹細胞（ＳｔｅｍＰｒｏ　ＢＭ、Ｃａｔ　Ａ１５６５２、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。

基礎培地：ＭｅｓｅｎＰＲＯ　ＲＳ成長補助剤、Ｌ－グルタミン（１％）およびゲンタマイシン（１０ｍｇ／ｍｌ、培地１００ｍｌに対して５０μｌ）を補充したＭｅｓｅｎＰＲＯ　ＲＳ基礎培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。

分化培地（陽性対照として使用）：ＳｔｅｍＰＲＯ軟骨形成分化補助剤およびゲンタマイシン（１０ｍｇ／ｍｌ、培地１００　ｍｌに対して５０μｌ）を補充したＳｔｅｍＰＲＯ軟骨形成分化培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）

【０２６５】

手順

６０～８０％のコンフルエンスの間の間葉系幹細胞を使用した。細胞をそれらの支持体から剥離し、基礎培地（ＭｅｓｅｎＰＲＯ　ＲＳ基礎培地＋補助剤）中１．６×１０７細胞／ミリリットルの細胞懸濁液を調製した。

【０２６６】

この懸濁液５μｌを２４ウェルプレートのウェル中央に入れた。プレートを３７℃、高

湿度のインキュベータ内で２時間インキュベートした。２時間後、試験設計については表１１、試験タイムラインについては表１２に従って、各ウェルに（陰性対照）なしまたはテスト物質ありの基礎培地１ｍｌを添加した。陽性対照として、分化培地（ＳｔｅｍＰＲＯ軟骨細胞分化基礎培地＋補助剤）１ｍｌを使用した。プレートを３７℃＋５％CO_2のインキュベータに７、１４または２１日間戻した。分化期の間、培地を３～４日ごとに交換した。

【０２６７】

【表１１】

表１１：試験設計

群	処置	時間
1	基礎培地中のビヒクル（ＰＢＳ）	７、１４、２１日間の分化
2	基礎培地中１０ｎＭのリラグルチド	
3	基礎培地中１００ｎＭのリラグルチド	
4	分化培地（陽性対照）中のビヒクル（ＰＢＳ）	

【０２６８】

【表１２】

表１２．試験スケジュール

手順	試験日									
	1	4	8	9	10	15	16	17	22	23
軟骨細胞への分化のためのＭＳＣのプレーティングおよび処置	√									
培地交換		√			√			√		
アルシアンブルー染色の試験終了			√			√			√	

【０２６９】

各試験時間（８、１５または２２）の終了時に、アルシアンブルー染色および顕微鏡分析のためにプレートを回収した。培地を除去し、１ｍｌのＰＢＳを添加して細胞を穏やかにすすいだ。ＰＢＳを除去し、１ｍｌのホルムアルデヒド４％を室温で３０分間添加した。

【０２７０】

次いで、４％ホルムアルデヒドを除去し、固定した細胞を１ｍｌの蒸留水で２回穏やかにすすいだ。蒸留水を除去し、１ｍｌのアルシアンブルー１％（０．１Ｎ　ＨＣｌ中で調製）を室温で２時間添加し、光から保護した。染色溶液を除去し、細胞を１ｍｌの０．１Ｎ　ＨＣｌで２回または３回洗浄した。塩酸溶液を除去し、蒸留水１ｍｌを各ウェルに添加した。細胞を顕微鏡下で観察し、写真を撮影した。

【０２７１】

結果

球形成に対するリラグルチドの効果を、週に５日、顕微鏡観察によって評価した。さらに、３つの時点（例えば、処置から７、１４および２１日後）でアルシアンブルー染色を行った。この色素取り込みは、硫酸化グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）の存在を反映し、軟骨細胞球状体の形成を裏付ける。

【０２７２】

【表１３】

表１３．実験中異なる条件における球形成を有するウェルの％を示す要約表

アルシアンブルー陽性軟骨細胞球状体を有するウェルの％	日	以下を含む基礎培地			分化培地（陽性対照）
		ビヒクル（PBS）	リラグルチド 10nM	リラグルチド 100nM	
	7	0 (0/18)	33 (6/18)	33 (6/18)	39 (7/18)
	14	0 (0/12)	67 (8/12)	58 (7/12)	67 (8/12)
	21	0 (0/6)	67 (4/6)	100 (6/6)	83 (5/6)

【０２７３】
表１３に示されるように、試験の間、基礎培地中のビヒクル処理細胞について球形成は観察されなかった。２つのテスト用量のリラグルチドについて、用量反応を伴って球形成が観察された。実際、１０ｎＭおよび１００ｎＭのリラグルチドで処理された細胞では、２２日目に処置されたウェルのそれぞれ６７％および１００％で球形成が観察された。分化培地は、軟骨形成経路に拘束されて軟骨細胞を生成するようにｈＭＳＣを誘導するために必要なすべての試薬を含有する。予想通り、この培地中でビヒクル処置細胞について球形成が観察された（２２日目に処置ウェルの８３％）。アルシアンブルーの着色により、リラグルチド誘導球が軟骨細胞球状体であることが確認された。この結果は、リラグルチド単独がｈＭＳＣの軟骨細胞への分化を誘導し得ることを示す。球形成過程および陽性アルシアンブルー染色の例を図１４に示す。

【０２７４】
結論
この試験では、軟骨形成のためのインビトロアッセイを使用して、この過程に対するリラグルチドの効果を試験した。

【０２７５】
我々は、基礎培地の存在下で、リラグルチドが用量応答を伴って球の形成を誘導したが、ビヒクル処置細胞では球は観察されなかったことを実証した。軟骨細胞球の形成が、アルシアンブルー陽性着色（軟骨マトリックス合成のマーカー）によって確認された。

【０２７６】
試験条件下で、我々のデータは、リラグルチド単独が、ｈＭＳＣを軟骨形成経路に拘束されるように誘導し、軟骨細胞を生成させることを示している。このリラグルチド同化機能は、関節領域における常在幹細胞集団を標的化して軟骨細胞分化を介して軟骨修復を刺激することを可能にし、これはＯＡ処置のための有望なアプローチと考えられている。

【０２７７】
実施例６：マウス初代軟骨細胞生存能に対するリラグルチドの効果

【０２７８】
この試験の目的は、マウス初代軟骨細胞を使用して細胞生存率に対するリラグルチドの効果を評価することであった。

【０２７９】
材料および方法
試験材料：リラグルチド
テスト系：マウス初代軟骨細胞
細胞培養用培地の配合
２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含むＤＭＥＭ、１％ペニシリン／ストレプトマイシンを１日目から７日目まで細胞培養に使用した。７日目に、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含むＤＭＥＭおよび１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｐ／Ｓ）を使用して、ＦＢＳ非含有条件で作用させた。

【０２８０】

実験の設計および条件
試験開始の定義
ウェルに細胞をプレーティングした日を「１日目」とみなし、試験終了を「９日目」とみなした。
【０２８１】
手順
マウス関節軟骨の分離
未成熟マウス軟骨細胞は新産仔マウス（５～６日齢のＣ５７Ｂｌ／６）に由来した。この作業は無菌フローフード内で行った。ハサミで頭を切断することによってマウスを安楽死させた後、動物を伏臥位で固定し、前脚を針で固定した。ハサミとペンチを用いて後肢の皮膚を除去した。後肢を脊椎に沿って切断した。四肢から皮膚および筋肉の残りを取り除いた。足を湾曲鉗子で平坦にして、大腿骨頭に対応する小さな半透明で硬い球体を解放した。球を分離したとき、それを３０ｍｌの１×ＰＢＳに入れた足の残りの部分から筋肉および他の組織を取り除いた。骨は赤褐色に見え、軟骨は白色に見えた。骨を白い部分の両側で切断したが、これが関節である（２つの球を形成する）。メスで関節から周囲の組織を除去した後、半分に切断して２つの球体を分離し、再び半分に切断した。これにより、より容易な消化が可能になる。大腿骨顆および脛骨プラトーも３０ｍｌの１×ＰＢＳに入れた。
【０２８２】
未成熟マウス軟骨細胞の分離
軟骨片を、ペトリ皿１００mm内で、１０ｍｌの消化溶液（ＤＭＥＭ、２mM　Ｌ－グルタミン＋１％Ｐ／Ｓ＋コラゲナーゼ３ｍｇ／ｍｌ）中、３７℃、５％CO_2のインキュベータにおいて４５分間、２回インキュベートした。２回の消化の間に、軟骨片を２５ｍｌピペットを用いて回収し、新しいペトリ皿に入れた。２回の消化後、２５ｍｌピペットを用いて凝集体の分散液を作製した。軟骨片を、１０ｍｌのＤＭＥＭ、２mM　Ｌ－グルタミン＋１％Ｐ／Ｓ、および０．５ｍｇ／ｍｌ（１／６に希釈）のコラゲナーゼＤ溶液中、３７℃、５％CO_2のインキュベータにおいて一晩インキュベートした。
【０２８３】
軟骨細胞の播種
一晩の消化後、１０ｍｌのＤＭＥＭ、２mM　Ｌ－グルタミン＋１０％ＦＢＳを各ペトリ皿に添加して、コラゲナーゼＤの作用を停止させた。培地および残留軟骨を回収し、５０ｍｌファルコンチューブに入れた。縮小したサイズのピペットを使用して凝集体の分散を行い、分離細胞の懸濁液を得て、これを無菌７０μmセルストレーナで濾過した。次いで、細胞を２０℃、４００ｇで１０分間遠心分離した。培地を除去し、ペレットを５ｍｌのＰＢＳに再懸濁して細胞を洗浄した。細胞を２０℃、４００ｇで１０分間遠心分離し、ＰＢＳを除去し、ＤＭＥＭ２mM　Ｌ－グルタミン＋１０％ＦＢＳ＋１％Ｐ／Ｓ１５ｍｌを添加した。軟骨細胞をＮｅｕｂａｕｅｒ血球計算盤で計数し、抽出した細胞の生存率を評価するために観察した。軟骨細胞を、１２ウェルプレート内の２ｍｌのＤＭＥＭ２mM Ｌ－グルタミン＋１０％ＦＢＳ＋１％Ｐ／Ｓ／ウェル中に40×10^3細胞の密度で播種した。培養物を、３７℃、５％CO_2のインキュベータ内に無機条件下で維持した。
【０２８４】
軟骨細胞の培養
未成熟マウス関節軟骨細胞は、６～７日後にコンフルエントになった。培養３日後に培地を交換した。７日目に、１０％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭ培地を除去し、ウェルを１ｍｌのＰＢＳおよび１ｍｌのＤＭＥＭで２回すすぎ、２mM　Ｌ－グルタミン＋１％Ｐ／Ｓ＋０．１％ＢＳＡを添加した。８日目に、培地を除去し、ウェル当たり５００μｌのＤＭＥＭ、２mM　Ｌ－グルタミン＋１％Ｐ／Ｓ＋０．１％ＢＳＡ中の１２の異なる濃度のリラグルチドでの処置を行った（表１４）。プレートを３７℃＋５％CO_2で２４時間インキュベートした。試験タイムラインを表１５に示す。
【０２８５】

【表１４】

表１４．試験設計

群	処置	時間
1	ビヒクル（ＰＢＳ）	２４時間
2	リラグルチド１．７ｎＭ	
3	リラグルチド５．１ｎＭ	
4	リラグルチド１５．２ｎＭ	
5	リラグルチド４５．６ｎＭ	
6	リラグルチド１３６．７ｎＭ	
7	リラグルチド４１０ｎＭ	
8	リラグルチド１．２μＭ	
9	リラグルチド３．７μＭ	
10	リラグルチド１１．１μＭ	
11	リラグルチド３３．３μＭ	
12	リラグルチド１００μＭ	
13	リラグルチド３００μＭ	
14	細胞のみ（ブランク）	

【０２８６】

各条件の処置を３回行った。

【表１５】

表１５．試験スケジュール

手順	試験日					
	試験前	1	4	7	8	9
マウス関節軟骨の分離	√					
未成熟マウス軟骨細胞の分離	√					
未成熟マウス軟骨細胞のプレーティング		√				
培地交換			√			
ＢＳＡを含む変更培地				√		
リラグルチドによる２４時間の処置					√	
上清の回収						√
ＬＤＨアッセイ						√

【０２８７】

テストおよび評価

試験終了時（９日目）に、各ウェルの培養培地（±５００μｌ）を１．５ｍｌチューブ（ウェル当たり１チューブ）に収集し、室温で１０分間４０００ｒｐｍで遠心分離し、上清を新しい１．５ｍｌチューブに入れた。投薬を行うまで試料を－７０℃で凍結した。

【０２８８】

ＬＤＨアッセイ

培養培地への乳酸デヒドロゲナーゼ分泌をＬＤＨアッセイ（Ａｂｃａｍ）によって測定した。１００μｌの上清を、損傷細胞によって分泌される乳酸デヒドロゲナーゼレベルの測定に使用した。ＬＤＨアッセイを、特定のＬＤＨアッセイキットについての説明に詳述されている手順に従って行い、Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（９６ウェル）（Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）によって分析した。吸光度を測定するための波長は４５０ｎＭであった。読取りブランクウェルの平均光学密度（ＯＤ）を各読取り値から差し引いた。

【０２８９】
結果
乳酸デヒドロゲナーゼは、すべての細胞型に存在し、原形質膜の損傷時に細胞培養培地に迅速に放出される安定な酵素である。ＬＤＨ酵素は、酵素カップリング反応を使用して検出され、マイクロプレートリーダ用のＳｋａｎＩｔソフトウェア、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒによって測定された。ＬＤＨはラクテートを酸化してＮＡＤＨを生成し、次いでＷＳＴ基質と反応して黄色い色を生成する。着色の強度は、溶解した細胞数と直接相関する。ＬＤＨ活性を分光光度計によってＯＤ４５０ｎＭで定量した。１２用量のリラグルチド（１．７ｎＭ～３００μＭ）との２４時間のインキュベーション後に、ＬＤＨ活性を測定した。陽性対照を使用し、５μｌのＬＤＨ酵素をウェルに直接入れた。細胞傷害性の％を、式（（テスト試料－低対照）／（高対照－低対照））×１００によって計算した。
図１５に示されるように、最低のテスト用量のリラグルチド（１１．１μＭまで）の存在は、培地中の少量の乳酸デヒドロゲナーゼの放出を誘導した。しかしながら、ビヒクル処置細胞と比較して有意差はなかった。最高のテスト用量のリラグルチド（＞３０μＭ）の存在下では、検出された乳酸デヒドロゲナーゼ酵素のレベルは、ビヒクルと比較して有意に増加し、用量応答があった。実際、計算された死亡率％は以下の通りであった：ビヒクル：０．０％±０．００８およびリラグルチド３３．３μＭ：８．５％±０．００６；リラグルチド１００μＭ：１１．１％±０．０５１およびリラグルチド３００μＭ：１１．５％±０．０６９、ｐ＜０．００１）。陽性対照（黄色でマーク）の使用により、キットの全ての試薬が適切に機能していることが確認された。
【０２９０】
結論
この試験は、テストしたリラグルチド用量に応じて、軟骨細胞に対する２４時間のインキュベーション後に死亡率が観察され得ることを示す。
【０２９１】
実施例６：リラグルチドのアルブミンベース配合物の関節内投与後のモノヨードアセテート注射マウスの膝関節におけるＳＯＸ９発現
【０２９２】
ＳＯＸ９は、発達中および成体軟骨における極めて重要な転写因子である。その遺伝子は、多分化能骨格前駆細胞段階から発現され、軟骨細胞分化全体にわたって活性である。これは、軟骨成長板の肥大軟骨細胞では抑制されるが、健康な関節軟骨の永久軟骨細胞では生涯を通じて発現され続ける。ＳＯＸ９は軟骨形成に必要である：軟骨細胞系統の拘束性を確保し、細胞生存を促進し、多くの軟骨特異的構造成分および調節因子の遺伝子を転写的に活性化する。
【０２９３】
この試験の目的は、リラグルチドのアルブミンベース配合物の関節内投与後のモノヨードアセテート（ＭＩＡ）注射マウスの膝関節におけるＳＯＸ９発現を試験することであった。
【０２９４】
材料および方法
配合物
モノヨードアセテート（ＭＩＡ）：
粉末としてのＭＩＡを注射用生理食塩水に再懸濁して、群２Ｍ、３Ｍ、４Ｍ、５Ｍに対してマウス当たり５μｌ中０．７５ｍｇを膝関節に注射した。
処置用配合物質：
－ビヒクル（配合物賦形剤）は、群１Ｍおよび２Ｍへの関節内注射（５μｌ）のためにリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に再懸濁したアルブミンヒト５％からなっていた。
－リラグルチドのアルブミンベース配合物：
リラグルチド（粉末として供給される）を適切な体積のビヒクルに溶解して、群３Ｍ、４Ｍおよび５Ｍに対してそれぞれマウス当たり５μｌ中１０μｇ、２０μｇまたは３０μ

ｇを膝関節に注射した。
【０２９５】
実験モデル
　動物種／系統
　マウス／Ｃ５７Ｂｌ／６
　性別／年齢
　雄／１日目で１２週齢
　供給元
　Ｊａｎｖｉｅｒ　Ｌａｂｓ、フランス
【０２９６】
食餌
　動物には、市販のげっ歯類用飼料（Ｓａｆｅ　ｒｅｆ＃Ａ０４）を自由に与えた。動物は、濾過された飲用浸透水に自由にアクセスできた。
【０２９７】
実験の設計および条件
試験開始の定義
　この試験では、ＭＩＡ誘導日を「１日目」と定義し、試験終了を「１１日目」と定義した。
【０２９８】
ＭＩＡの関節内（ＩＡ）注射によるＯＡ誘導
　吸入麻酔（イソフルラン５％）を使用するチャンバ誘導技術によって動物を麻酔した。手順の間、動物をイソフルラン下１．５～３％のレベルに維持し、空気流量を１～２リットル／分とした。膝関節周囲の領域をアルコールで拭いた。ＭＩＡを、０．７５ｍｇを含有する５μｌで膝蓋腱を通して関節内（ＩＡ）注射した。カニューレ挿入チューブを取り付けた３０ゲージの０．５インチの針を使用して、２～３mmの針のみが関節を穿刺できるようにした。注射後、溶液の均一な分布を確実にするために膝をマッサージした。動物に１日目に１回注射した（群２Ｍ、３Ｍ、４Ｍ、５Ｍ）。群１Ｍ（偽対照）については、５μｌの注射用生理食塩水を膝関節に注射した。
【０２９９】
試験設計およびタイムライン
　試験は、試験設計については表１６、試験タイムラインについては表１７に従って３サイクルで行った。
【表１６】

表１６．群の割り当て

群	N=	MIA 誘導 (5μl 中 0.75mg)	処置	用量 レベル	用量 体積	ROA	用量 計画
1M	6	-	ビヒクル （配合物賦形剤－アルブミン５％）	-	5μl	IA	３日目に１回
2M	6	√	ビヒクル （配合物賦形剤－アルブミン５％）	-			
3M	6	√	アルブミン配合リラグルチド	10μg			
4M	6	√		20μg			
5M	6	√		30μg			

【０３００】
１日目に偽マウスを群１Ｍに無作為に割り当てた。ＭＩＡ注射マウスについては、マウスＢＷに基づいて３日目に群割り当てを行った。
【表１７】

表１７．試験タイムライン

試験日／週	手順	備考
週２回	体重	
D1	ＭＩＡ注射、５μｌ中０．７５ｍｇ、ＩＡ	群１Ｍ（偽対照）を除いて、５μｌの注射用生理食塩水、ＩＡ
D3	処置（ビヒクルまたはリラグルチド）	ＩＡ単回注射、５μｌ
D11	終了	ＳＯＸ９　ＲＴｑＰＣＲ分析のための右膝（罹患）採取

【０３０１】
テストおよび評価
動物の　　殺および組織採取
１１日目（終了日）に、マウスを安楽死させた。膝関節構造（滑膜を含む）を採取し、液体窒素中で急速凍結した。ＲＮＡ抽出は、ＳＶ全ＲＮＡ分離システムキット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を製造者の推奨に従って使用して行った。ＳＯＸ９マーカーについてＲＴ－ｑ－ＰＣＲ分析を行った。ＳＯＸ９は、軟骨細胞の分化および軟骨形成に不可欠な第１の転写因子として特定されている。
【０３０２】
結果
膝関節構造に対するＳＯＸ９ＲＴｑＰＣＲ分析
図１６に示されるように、１日目に０．７５ｍｇのＭＩＡを膝関節に投与されたビヒクルマウス（群２Ｍ）は、ビヒクル偽対照（群１Ｍ）と比較して、１１日目にＳＯＸ９相対発現の４０％の減少を示した。ＭＩＡ注射マウスが３日目にアルブミン配合リラグルチドの関節内注射を受けた場合、ＳＯＸ９の発現は回復し、群３Ｍ（リラグルチド１０μｇ）および群４Ｍ（リラグルチド２０μｇ）については偽対照群１Ｍと同様である。リラグルチド３０μｇが投与された群５Ｍでは、偽対照群１Ｍと比較してＳＯＸ９の相対発現が５５％増加している。
【０３０３】
結論
試験目的は、配合されたリラグルチドの関節内投与後のモノヨードアセテート注射マウスの膝関節内へのＳＯＸ９のＲＴｑＰＣＲを行うことであった。
【０３０４】
モノヨードアセテート（ＭＩＡ）モデルは、ラットおよびマウスの両方において変形性関節症（ＯＡ）における関節破壊をモデル化するための標準となっている。このモデルでは、ＭＩＡの単回注射を膝関節に送達し、グリセルアルデヒド－３－ホスファターゼデヒドロゲナーゼを阻害することによって軟骨細胞の解糖を妨害し、特に軟骨細胞死を誘導する。間葉系幹細胞の凝縮後に分化する軟骨細胞は、コラーゲンおよびプロテオグリカン等の細胞外マトリックス分子の分泌を担う。転写因子ＳＯＸ９は、軟骨細胞の分化および機能にとって重要である。ＯＡのこの動物モデルを使用して、我々は、偽健常対照と比較して、配合されたリラグルチドの関節内注射がＳＯＸ９相対発現を回復または増加させた一方で、ＭＩＡ注射後にＳＯＸ９発現が減少することを示した。
【０３０５】
したがって、この試験は、局所投与されたアルブミン配合リラグルチドが、マウスにお

けるＭＩＡ誘発ＯＡおよび炎症性疼痛モデルにおける同化に関連する関連機構を標的とすることを示している。

【０３０６】

実施例７：ラットにおけるＩＩ型コラゲナーゼ誘導変形性関節症モデルを利用したリラグルチドアルファ１酸糖タンパク質ベース配合物の有効性試験

【０３０７】

この試験の目的は、ラットにおける変形性関節症のコラゲナーゼ誘導モデルを利用し、リラグルチドのアルファ１酸糖タンパク質ベース配合物を使用して有効性試験を行うことであった。

【０３０８】

材料および方法

配合物

ＩＩ型コラゲナーゼ：

ＩＩ型コラゲナーゼをＰＢＳに２００００Ｕ／ｍｌの濃度で溶解して、２５μｌ中５００Ｕを送達した。

処置用配合物質：

－アルファ１－酸糖タンパク質（Ａ１ＡＧＰ）ビヒクルは、関節内注射用のＰＢＳ（２５μｌ）に再懸濁したアルファ１－酸糖タンパク質５％からなっていた。

－リラグルチドのアルファ１酸糖タンパク質ベースの配合物：

リラグルチド（粉末として供給）を適切な体積のアルファ１酸糖タンパク質ビヒクルに溶解して、関節内注射用に２５μｌ中０．１８ｍｇ／ｋｇ用量レベルにした。

【０３０９】

実験モデル

種／系統

ラット／ＳＤ

性別／数／年齢

雄／２０／試験開始時６～７週齢

供給元

Ｊａｎｖｉｅｒ　Ｌａｂｓ、フランス

【０３１０】

動物管理ハウジング

動物の取り扱いは、Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎｓ（ＦＥＬＡＳＡ）のガイドラインに従って行った。動物を、ペレット食品およびプラスチックボトルに入れた飲料水を容易にするステンレス鋼トップグリルを備えたプラスチックケージ（ケージ当たり２～３）に収容した。寝床：蒸気洗浄したもみ殻（Ｓａｆｅ）を使用し、寝床材料はケージと共に少なくとも週に１回交換した。

【０３１１】

食餌

動物には、市販のげっ歯類用飼料（Ｓａｆｅ　ｒｅｆ＃Ａ０４）を自由に与えた。動物は、濾過された飲用浸透水に自由にアクセスできた。

【０３１２】

実験の設計および条件

試験開始の定義

この試験では、ＯＡ誘導日を「１日目」と定義し、試験終了を「４３日目」と定義した。

【０３１３】

ＩＩ型コラゲナーゼの関節内（ＩＡ）注射によるＯＡ誘導

吸入麻酔（イソフルラン５％）を使用するチャンバ誘導技術によって動物を麻酔した。手順の間、動物をイソフルラン下、１．５～３％のレベルに維持し、空気流量を１～２リットル／分とした。ＩＩ型コラゲナーゼを、５００Ｕを含有する２５μｌで関節内（ＩＡ

）注射した。動物には２回注射した：１日目に１回の注射および４日目に２回目の注射。

【０３１４】

試験設計およびタイムライン

試験は、試験設計については表１８、試験タイムラインについては表１９に従って行った。

【０３１５】

【表１８】

表１８．群の割り当て

群	N＝	処置	ＯＡ誘導	用量レベル (mg/kg)	用量体積	[C] (mg/ml)	ROA	用量計画	週当たりの等価ヒト用量
5M	10	アルファ１酸糖タンパク質ビヒクル（アルファ１酸糖タンパク質５％）	√	-	25µl	-	IA	５週間にわたって１週間に１回 (5 IA)	-
6M	9-10	アルファ１酸糖タンパク質配合リラグルチド	√	0.18	25µl	2.3-3.3*	IA		1.8 mg

*注射日の平均ラットＢＷの関数に適合させた

【０３１６】

【表１９】

表１９．試験タイムライン

試験日／週	手順	備考
１週間に１回	体重	
１日目	処置開始	５週間にわたる１週間に１回の反復ＩＡ投与
Ｄ１、Ｄ４	コラゲナーゼ注射	２５µｌ中５００Ｕ、ＩＡ
４３日目	終了	右膝（疾患）の採取および固定 左膝（健常）の採取および固定

【０３１７】

テストおよび評価

体重

到着時、試験開始前およびその後週に１回体重を記録した。

【０３１８】

動物の　　殺および組織固定

４３日目（終了日）に、全ての動物を出血させた。ラットを安楽死させた。膝関節構造を採取し、さらなる組織学的分析のために４％緩衝ホルマリン溶液中で固定した。反対側（非損傷）の膝も４％緩衝ホルマリン溶液で固定した。

【０３１９】
組織学的分析
緩衝３．７％ホルマリンに浸漬したラット膝を組織学分析のために下請業者に配達した。組織学的分析は、分析手順全体の間、群の処置およびプロトコルを知らされていない獣医（ＤＶＭ、ＤＥＳＶ解剖学的病理）によって行われた。膝関節切片を、Ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｃａｒｔｉｌａｇｅ．２０１０Ｏｃｔ；１８Ｓｕｐｐｌ３：Ｓ２４－３４に従ってスコア化した。
【０３２０】
統計解析
数値結果は、平均±標準偏差（ＳＤ）として示された。該当する場合には、二元配置または一元配置ＡＮＯＶＡ（それに続くＤｕｎｎｅｔｔの多重比較事後検定）またはｔ検定を使用して統計分析を行った。５％（ｐ≦０．０５）の確率を有意とみなした。図中、結果は平均±ＳＥＭとして示され、群間の統計学的有意差の程度は、＊ｐ≦０．０５、＊＊ｐ＜０．０１および＊＊＊ｐ＜０．００１として示された。
【０３２１】
結果
結果は、群６Ｍ（Ａ１ＡＧＰビヒクル中のリラグルチドの関節内投与）が群５Ｍ（Ａ１ＡＧＰビヒクル）よりも少ない軟骨病変を示す明確な傾向を示した。これを支持して、総関節スコアを以下のサブセクション（ｄｅ Ｖｉｓｓｅｒら、ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１８Ａｐｒ２３；１３（４）：ｅ０１９６３０８）の合計に基づいて計算した：軟骨マトリックス損失幅（０～２）、軟骨変性（０～５）、軟骨変性幅（０～４）、骨棘（０～４）、石灰化軟骨および軟骨下骨損傷（０～５）ならびに滑膜炎症（０～４）。図１７は、ビヒクル群５Ｍに対する群６Ｍの総関節スコアの有意な減少を示した。
【０３２２】
群５Ｍおよび群６Ｍの動物の右膝切片の代表的な写真を図１８に示す。
【０３２３】
結論
組織学的所見は、リラグルチドＩＡがビヒクルと比較してより少ない軟骨喪失を誘導し、総関節スコアを有意に減少させる傾向があることを示し、リラグルチドの局所投与による軟骨保護を示唆した。
【０３２４】
全体的な試験結果は、局所投与した場合リラグルチドが十分に忍容され、ラットのこのコラゲナーゼ誘導ＯＡモデルにおける軟骨保護に関連する関連機構を標的化したことを示している。

【図面】

【図１】

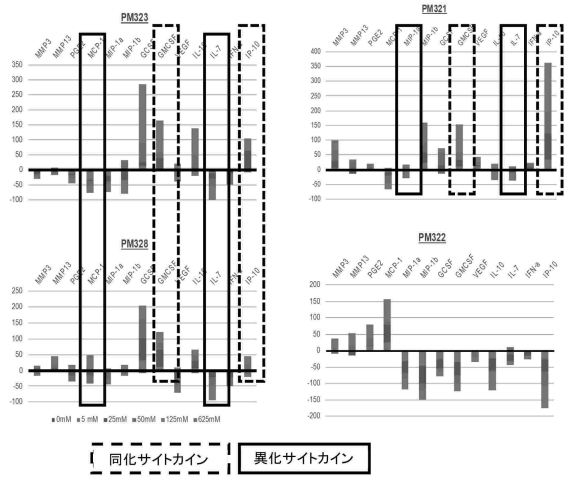


Figure 1

【図２】

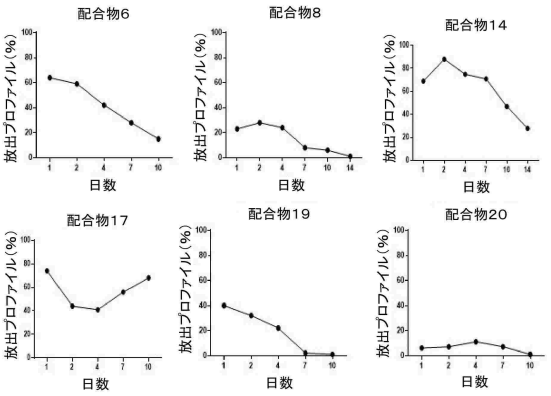
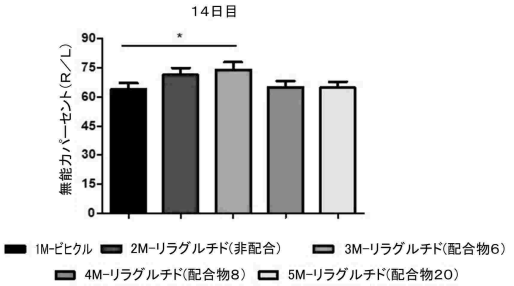


Figure 2

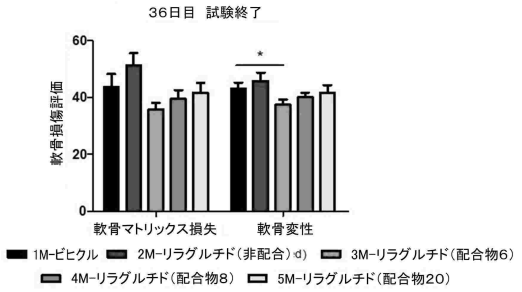
【図３】



(*p<0.05)。平均+/−SD、n=11～12

Figure 3

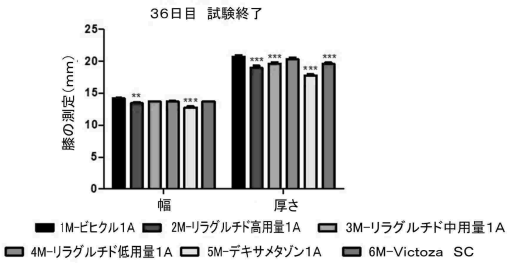
【図４】



(*p<0.05)、平均+/−SD、n=11～12

Figure 4

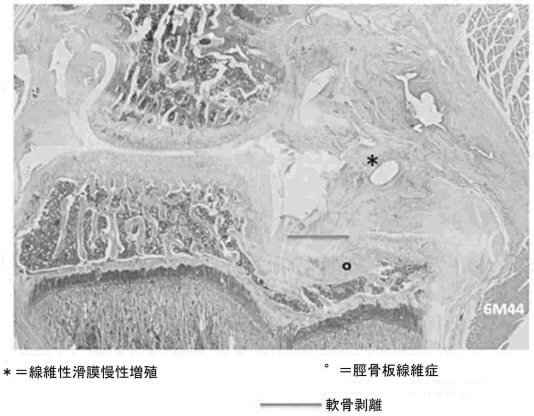
【図５】



平均+/−SEM、群当たりn=9～10、*p<0.05、**p<0.01;***p<0.001。

Figure 5

【図６】



＊＝線維性滑膜慢性増殖　　°＝脛骨板線維症

軟骨剥離

Figure 6

【図７】

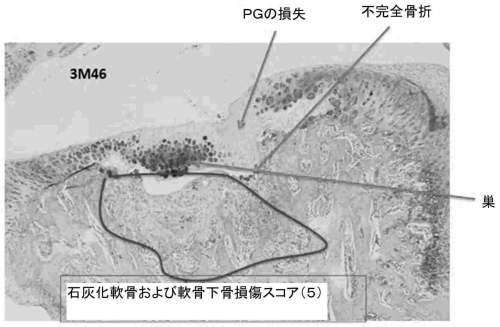


Figure 7

【図８】

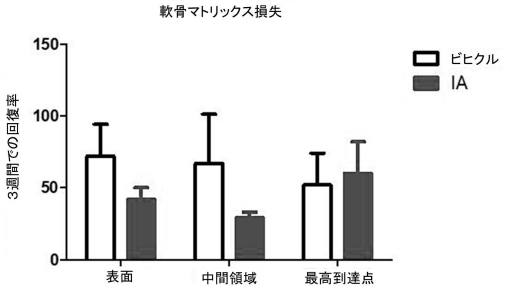


Figure 8

【図９】

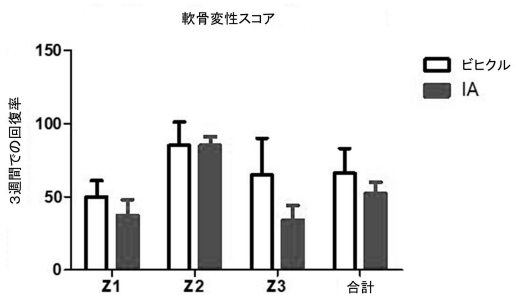


Figure 9

【図１０】

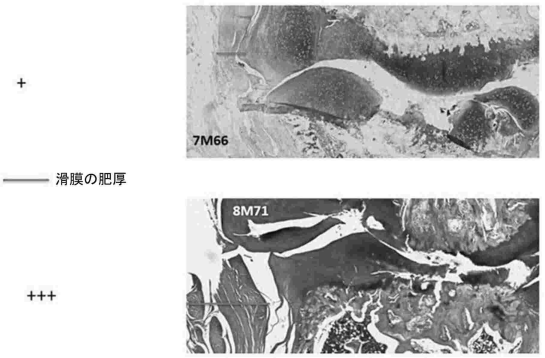
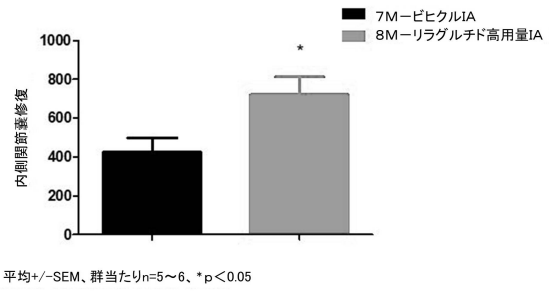


Figure 10

【図１１】



平均+/−SEM、群当たりn=5～6、*p＜0.05

Figure 11

【図１２】

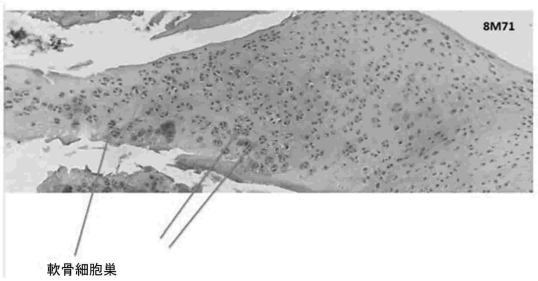


Figure 12

【図１３】

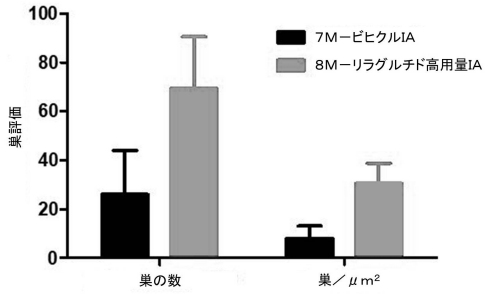


Figure 13

【図１４】

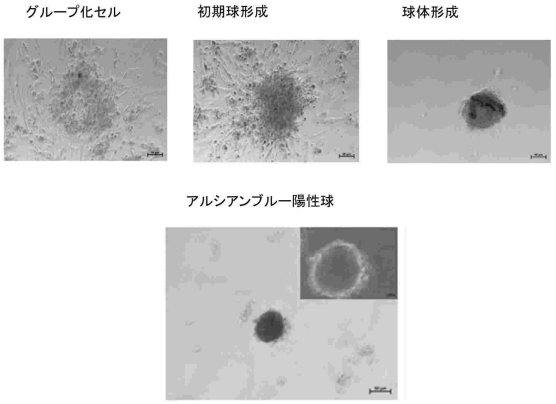


Figure 14

【図１５】

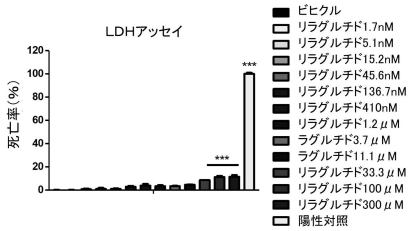


Figure 15

【図１６】

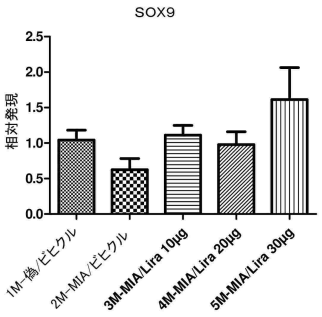


Figure 16

【図１７】

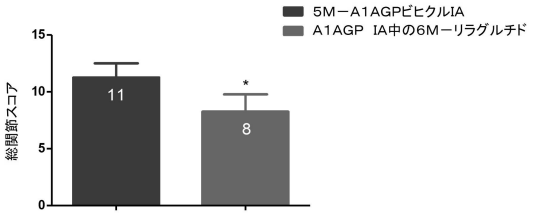
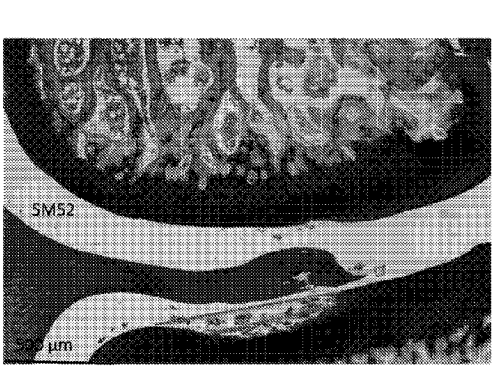
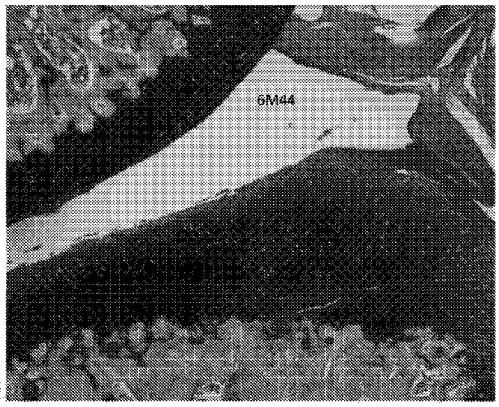


Figure 17

【図１８Ａ】



【図１８Ｂ】



フロントページの続き

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ	***47/38***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/38
Ａ６１Ｋ	***47/10***	***(2017.01)***	Ａ６１Ｋ	47/10
Ａ６１Ｋ	***47/36***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/36
Ａ６１Ｋ	***47/24***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/24

フランス国、７５００６ パリ、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥシーヌ ２１
(73)特許権者 507139834
アシスタンス ピュブリック－オピト ドゥ パリ
フランス・７５０１２・パリ・ブールヴァール・ディドゥロ・５５
(73)特許権者 591100596
アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル
フランス国、エフ－７５０１３ パリ、リュ・ドゥ・トルビアック １０１
(74)代理人 110000659
弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所
(72)発明者 ベレンバウム，フランシス
フランス共和国 ジフ シュル イヴェット ９１１９０，アレ ド シャンテレーヌ ７
(72)発明者 ラッテンバッハ，リバイタル
フランス共和国 パリ ７５００４，リュ デ エクフ １
(72)発明者 マルティン，セリーヌ
フランス共和国 リール ５９０００，リュ デュ プロフェッスール カルメット １
(72)発明者 ムロ，コラリー
フランス共和国 リール ５９０００，リュ デュ プロフェッスール カルメット １

審査官 春田 由香

(56)参考文献

特表２０１５－５２８４６０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１３－５００２７８（ＪＰ，Ａ）
Chen, J. et al.，Glucagon-like peptide-1 receptor regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and the associated inflammatory response in chondrocytes and the progression of osteoarthritis in rat，Cell Death & Disease，2018年02月12日，Vol.9, No.2，212，doi:10.1038/s41419-017-0217-y

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

Ａ６１Ｋ ３８／００－３８／５８
Ａ６１Ｋ ９／００－ ９／７２
Ａ６１Ｋ ４７／００－４７／６９
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ