

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-507142

(P2017-507142A)

(43) 公表日 平成29年3月16日(2017.3.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/196 (2006.01)	A 6 1 K 31/196	4 C 2 0 6
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-553284 (P2016-553284)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月20日 (2015.2.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月13日 (2016.10.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/053631
 (87) 国際公開番号 W02015/124731
 (87) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015.8.27)
 (31) 優先権主張番号 14000600.8
 (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)

(71) 出願人 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 beschrae
 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
 0, 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】 FGF-18化合物の投与計画

(57) 【要約】

本発明は、変形性関節症または軟骨損傷などの軟骨障害の治療においてFGF-18を投与するための、新たな投与計画を提供する。特に、FGF-18化合物を、1回の治療サイクルあたり2週間ごとに投与することを含む好ましい治療スキームを提供する。この新たな投与計画は、抗炎症薬を共投与することを含み得る。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

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、該FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回投与され、ここで、投与と投与の間は、約2週間離れている前記FGF-18化合物。

【請求項 2】

投与と投与の間は、2週間離れている、請求項 1 に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 3】

前記FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり少なくとも3回または少なくとも4回投与される、請求項 1 または 2 に記載の使用のためのFGF-18化合物。

10

【請求項 4】

治療サイクルは、2、3、4、5、または6月後に、繰り返される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 5】

1年あたり1、2、または3回の治療サイクルを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 6】

前記FGF-18化合物は、関節内投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 7】

20

前記FGF-18化合物は、1回の関節内投与あたり3~300mcg、または好ましくは10~200mcg、またはより好ましくは30~150mcg、または更により好ましくは30~120mcgの用量で投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 8】

前記FGF-18化合物は、1回の関節内投与あたり約3、10、20、30、40、50、60、90、100、120、150、180、200、240、または300mcgの用量で投与される、請求項 7 に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 9】

前記軟骨は、関節軟骨である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

30

【請求項 10】

前記軟骨障害は、変形性関節症である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 11】

前記軟骨障害は、軟骨損傷である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 12】

前記FGF-18化合物は、

a) 配列番号1の第28~207位残基を含むヒトFGF-18成熟型を含むかまたは該成熟型から成るポリペプチド、および

40

b) 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 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 13】

前記FGF-18化合物は、抗炎症薬と一緒に投与される、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 14】

前記抗炎症薬は、アナキンラまたはジクロフェナクである、請求項 13 に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項 15】

50

前記抗炎症薬は、単回投与あたり0.001~500mg、または好ましくは0.1~250mg、またはより好ましくは0.5~150mgの用量で投与される、請求項13または14に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項16】

前記抗炎症薬は、単回投与あたり0.03、0.1、0.25、0.3、0.5、1、1.5、2、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、または300mgの用量で投与される、請求項15に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項17】

前記FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり3回投与され、投与と投与の間は約2週間離れている、請求項1~16のいずれか1項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【請求項18】

前記FGF-18化合物は、2週間に1回で3回連続投与される、請求項1~17のいずれか1項に記載の使用のためのFGF-18化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、軟骨障害および軟骨・骨障害、変形性関節症、および軟骨損傷の治療に関する。本発明は、とりわけ、特定の治療計画による使用のためのFGF-18化合物に関する。具体的には、本発明は、1回の治療サイクルあたり、FGF-18化合物を2週間ごとに1回投与することを3回または4回行うことを含む治療スキームに関する。本投与計画は、更に、アナキンラまたはジクロフェナク等の、症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬を投与することも含み得る。

【背景技術】

【0002】

軟骨は、マトリックス（固いゲル状基質）内に分散されている軟骨細胞（間葉細胞に由来する細胞）から構成されている。軟骨マトリックスは、これらの細胞によって産生され、主にII型コラーゲン繊維（I型コラーゲン繊維も含有する線維軟骨を除く）、プロテオグリカン、およびエラスチン繊維を含んでなる。軟骨は、とりわけ、関節、胸郭、耳、鼻、喉、気管、および椎間板内で見られる。軟骨は主に3種類、硝子軟骨、弾性軟骨、および線維軟骨があり、これらにより組織形態に応じた顕著に異なる機能特性が付与される。例えば、関節軟骨は、骨の関節面を覆う粘弾性の特性を有する硝子軟骨である。関節軟骨の主な目的は、摩擦がほとんどない関節骨の動きを確実にするよう滑らかな表面を提供することである。

【0003】

軟骨障害は、軟骨の変性/崩壊および結合組織の異常により、炎症、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。成熟した軟骨は、自己修復能力が非常に限られている。これは、特に、軟骨に血管が存在しないことと関連し、栄養の供給が限られているために成熟した軟骨細胞の増殖能力が非常に低いからである。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、変形性関節症による病変を有さない若い患者において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、全関節置換または部分関節置換、軟骨片または軟骨細胞の移植、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、修復組織が短命であることが示されている。実際、線維軟骨の生体力学的特性は、硝子関節軟骨と同じではないので、周囲の軟骨に対し適切に結合しないことが多い。この理由のため、新たに形成

10

20

30

40

50

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）。

【0004】

変形性関節症（OA）を有する患者では、これら全ての軟骨修復技術が成功しない。他の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、体重減少）、支持デバイス、経口薬（例えば、非ステロイド性抗炎症薬）、薬物（例えば、ヒアルロン酸やコルチコイド）の注入、および食品サプリメントの使用などがある。しかし、これらの治療は全てOA疾患の進行を止めることができない。疼痛療法もうまくいかない場合、患者に残されている選択肢は、関節置換または膝関節のための高脛骨骨切り術などの手術である。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つ、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著しく変化させることが必要なこともある。

10

【0005】

現在利用可能な薬物治療は、主に疼痛緩和を目的とするものである。現時点では、軟骨傷害を修復する市販の治療薬は存在しない（Lotz, 2010を参照）。

【0006】

インターロイキン-1アルファ（IL-1 α ）およびインターロイキン-1ベータ（IL-1 β ）は、I型IL-1受容体（IL-1RA）の天然アゴニストである。IL-1などのプロ炎症性サイトカインの過剰発現は、関節リウマチ（RA）（Bingham, 2002）または変形性関節症（OA）（Lee et al., 2013）などの免疫炎症性疾患の発病に主要な役割を果たすことが示されている。拮抗作用を有するIL-1 α およびIL-1 β のRAにおける臨床応用について、ヒトIL-1raの組み換え非グリコシル化形態であるアナキンラ（Kineret（商標））を用いた研究がされている。この治療タンパク質の使用により、RA患者における関節損傷の頻度と重症度が低減し（Bresnihan, 2002；St. Clair, 2002）、そして疼痛が軽減された（Mertens et al., 2009）。この分子は、いくつかの種類のRAの治療に対し2001年に承認されている。IL-1はOAにも関与するものの、アナキンラ療法はプラセボと比較したOA症状の改善にはあまり関連しない。しかし、150mgのアナキンラを用いるとプラセボに対し疼痛が減少する傾向が見られた（Chevalier et al., 2009）。

20

【0007】

線維芽細胞成長因子18（FGF-18）は、線維芽細胞成長因子（FGF）タンパク質ファミリーのメンバーであり、FGF-8およびFGF-17と密接に関連する。FGF-18は、軟骨細胞および骨芽細胞の増殖因子であることが示されている（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（WO2008/023063）、又はヒアルロン酸との組み合わせ療法（WO2004/032849）が提案されている。

30

【0008】

FGF-18について様々な投与計画が示されている。例えば、Moore et al.（2005）には、週2回の投与を3週間の期間にわたって行うことが開示され、WO2008/023063には、週1回の投与を3週間の期間にわたって行うことが教示されている。この最新の投与計画は、臨床試験にて研究されている（詳細については、例えば、NCT01033994、NCT00911469、およびNCT01066871参照）。

40

【0009】

WO2008/023063に記載の投与計画は関節軟骨の修復に良好な結果をもたらすものの、急性滑膜炎のリスクが依然として存在する。このような理由から、軟骨細胞を大幅に増殖させて軟骨を修復することにより、軟骨障害に対する治療効果を維持しながら、治療に関連する急性滑膜炎のリスクを減少させ、かつ、関節内注射に対する患者の耐性を増強するための方法が必要である。かかる方法は、可能なら滑膜炎を起こさずに、関節軟骨の修復を可能にするだけでなく、良好な特性を有する新たな軟骨（すなわち、主に硝子軟骨）の再形成を可能にすべきである。実際に、硝子軟骨の生成は、治療のため、そして生体マトリ

50

ックスの成分としての両者に価値がある (Getgood et al., 2010)。軟骨障害を治療する効果を維持しつつ、疼痛を軽減 / 機能を改善させるための方法も必要である。実際に、疼痛は、軟骨障害に関連する場合が多く、臨床的に軟骨障害であると検出するための主な症状として現れる。

【発明の概要】

【0010】

本発明の目的は、軟骨障害を有する患者を治療するための方法であって、該方法はFGF-18化合物を投与することを含み、ここで、前記FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回投与され、投与と投与の間は、約2週間、好ましくは2週間（2週間に1回の投与）離れている前記方法を提供することである。好ましい実施形態では、投与と投与の間は、それぞれ約2週間の規則的な間隔で離れている。好ましくは、FGF-18化合物は、2週間に1回の規則的な間隔で投与される。

10

【0011】

本発明は、更に、軟骨障害を有する患者の治療における使用のためのFGF-18化合物であって、該FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回投与され、ここで、投与と投与の間は、約2週間、好ましくは2週間（2週間に1回の投与）離れている前記FGF-18化合物を提供する。好ましい実施形態では、投与と投与の間は、それぞれ約2週間の規則的な間隔で離れている。好ましくは、FGF-18化合物は、2週間に1回の規則的な間隔で投与される。

【0012】

好ましくは、投与されるFGF-18化合物は、本明細書でtrFGF-18（またはsprifermin）と称するFGF-18断片であり、その薬用量サイクル（posology cycle）は、関節内注射1回につき3～300 µgを2週間に1回投与することを3回連続で行う（治療サイクル1回分）。

20

【0013】

本発明の文脈では全体的に、FGF-18化合物を用いる任意の治療（または治療のための任意の方法）は、アナキンラまたはジクロフェナク等の、症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬を投与することを更に含み得る。好ましくは、かかる投与は、FGF-18化合物の投与と同時にされる。抗炎症薬が必要な場合、この抗炎症薬は、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回FGF-18化合物と同時に投与され、投与と投与の間は、約2週間、好ましくは約2週間（2週間に1回の投与）離れている。好ましくは、抗炎症薬は、アナキンラまたはジクロフェナクであり、薬用量サイクルは、投与1回につき0.01～500mgを2週間1回投与することを3回連続で行う（治療サイクル1回分）。

30

【0014】

好ましい実施形態では、かかる治療サイクル（すなわち、FGF-18化合物単独、または、症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬との組み合わせ）は、前回の治療サイクルにおける最後の注射後、例えば、2、4、6月後、あるいは1年後、数月繰り返される。

【0015】

本発明の好ましい実施形態では、治療対象の軟骨障害は、マイクロフラクチャー法のような外科的介入があるまたはない変形性関節症または軟骨損傷といった関節炎である。驚くことに、本発明の方法および使用は、軟骨の修復を著しく改善し、軟骨細胞の増殖を刺激し、さらに、関節内注射に対する患者の耐性を高めることが発見された。更に驚くことに、アナキンラまたはジクロフェナクをFGF-18と一緒に使用すると、FGF-18化合物の増殖活性を効率的に回復できることが発見された。本発明の別の利点は、滑膜炎が、他の計画で観察される場合よりも軽減されることである。

40

【0016】

定義

本明細書で使用する用語「FGF-18化合物」又は「FGF-18」は、ヒトFGF-18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。FGF-18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。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（W098 / 16644）、ある

50

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。

【 0 0 1 7 】

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。

10

【 0 0 1 8 】

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)。

20

【 0 0 1 9 】

本明細書で使用する用語「症状 (疼痛および機能) に対し効果のある抗炎症薬」または「抗炎症薬」は、例えば疼痛および機能といった治療すべき軟骨障害に関連する症状に効果を有する抗炎症薬を指す。本明細書に従って使用するのに好ましい「抗炎症薬」は、アナキンラおよびジクロフェナクである。アナキンラは、ヒトインターロイキン - 1受容体アンタゴニスト (IL - 1Ra) の組換え非グリコシル化形態である。これは、Kineret (登録商標) という名称で市販されている。その配列は、配列番号3に対応する。ジクロフェナク (すなわち2 - (2, 6 - ジクロロアニリノ) フェニル] 酢酸) は、炎症を軽減し、一定の条件下で疼痛を軽減する鎮痛剤として知られている薬剤である。様々な商品名で市販されている。

30

【 0 0 2 0 】

「約2週間」または「約2週間毎」の文脈で使用される用語「約」は、投与と投与の間が2週間 (14日) 離れているとき、その投与と投与の間が2週間 + / - 数日 (例えば、+ / - 1、2、3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、FGF-18化合物、例えばtrFGF-18の投与は、例えば、前回の投与から1日単位でちょうど2週間 (14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、2週間は、前回の投与から14日を意味するが、患者の都合のため、11、12、13、15、16、または17日であってもよい。本発明の文脈では、用語「2週間 (2 weeks)」は、用語「2週間ごと (every 2 weeks)」、「隔週 (every other week)」、または「2週間に1回 (biweekly)」に類似し、交換可能に使用できる (図1)。使用される用語「2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回目の注射が月曜日なら、次の注射は2週間後の月曜日) として使用されるべきであり、または「日付 (date)」について言及するもの (例えば、1回目の注射が8月1日なら、次の注射は8月15日) として使用されるべきである。

40

【 0 0 2 1 】

50

用語「治療サイクル」または「サイクル」は、FGF-18化合物が、2週間ごとに投与（連続投与）される期間に対応する。例えば、治療サイクルは、それぞれ2週間の間隔で3回注射することから成る場合がある。このような「治療サイクル」を繰り返してもよい。例えば、第2回の「治療サイクル」を、前回のサイクルの最後の注射から2、3、4、5、または6月後に行ってもよい。あるいは、第2回のサイクルを、第1回のサイクルの最初の注射から1年または2年後に行ってもよい。一例として、それぞれ2週間の間隔で3回注射することから成る第1の治療サイクルの後、当該サイクルの最後の注射から3月後に、それぞれ2週間の間隔で3回注射することから成る第2の治療サイクルを行ってもよい。

【0022】

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。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や軟骨損傷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）。

10

20

【0023】

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、ステイル病（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疾患または障害を含む。

【0024】

用語「変形性関節症」または「OA」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。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、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の形態を包含する。当業者は、当該技術分野で使用されている変形性関節症の分類、特にOARSI評価システムを良く認識している（OOCHAS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FGF-18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。

30

40

【0025】

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。

【0026】

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。

50

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、FGF-18化合物を用いた、変形性関節症および軟骨損傷などの様々な軟骨障害の治療のための投与スキームを提供する。好ましくは、前記FGF-18化合物は、上記で定義したようなtrFGF-18である。本発明の文脈で、FGF-18化合物は、本明細書に開示の方法および使用に従って投与されると、軟骨障害に対し、最適な疾患または症状軽減効果を奏することが示された。驚くことに、本発明の投与計画（すなわち、1回の治療サイクルあたり、週1回投与を3週間行うことよりも頻度が少ない投与計画）は、次の注入時に炎症（例えば、急性滑膜炎）が軽減された状態をもたらし、FGF-18化合物の活性が優れることが観察される。関節におけるFGF-18の半減期はかなり短い（24時間未満）ため、この知見は全く予想されなかった。

10

【0028】

本発明の文脈では全体的に、FGF-18化合物を用いる任意の治療（または治療のための任意の方法）は、アナキンラまたはジクロフェナク等の、症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬を投与することを更に含み得る。好ましくは、かかる投与（共投与）は、FGF-18化合物の投与と同時にされる（すなわち、同時投与）。

【0029】

一の実施形態では、本発明は、軟骨障害を有する患者を治療するための方法であって、該方法はFGF-18化合物を投与することを含み、ここで、前記FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回投与され、投与と投与の間は、約2週間、好ましくは2週間離れている（つまり、2週間ごと、隔週、または毎2週）前記方法を提供する。好ましいFGF-18化合物はtrFGF-18である。好ましい実施形態では、FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり2週間または約2週間の規則的な間隔で3回投与（つまり、1回の治療サイクルあたり2週間に1回または隔週という規則的な間隔で3回投与）されることもある。このような治療は、1年に1、2、または3回の治療サイクルを含んでもよい。アナキンラまたはジクロフェナクなどの抗炎症薬を、FGF-18化合物と同時に投与してもよい。

20

【0030】

本発明の別の態様では、軟骨障害を有する患者の治療における使用のためのFGF-18化合物であって、ここで、前記FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回投与され、投与と投与の間は、約2週間、好ましくは2週間離れている前記FGF-18化合物を提供する。好ましいFGF-18化合物はtrFGF-18である。好ましい実施形態では、FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり2週間または約2週間の規則的な間隔で3回投与される（すなわち、1回の治療サイクルあたり2週間に1回または隔週という規則的な間隔で3回投与される）。このような治療は、1年に1、2または3回の治療サイクルを含んでもよい。アナキンラまたはジクロフェナクなどの症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬を、FGF-18化合物と同時に投与してもよい。

30

【0031】

本発明によれば、FGF-18化合物は、単独投与、または、例えばアナキンラまたはジクロフェナクなどの抗炎症薬との組み合わせによる投与のいずれかであっても、規則的な間隔で投与される。しかし、+/-数日のわずかな差異（好ましくは3日より多くない）は許容される。例えば、投与が約2週間離れている場合、ある1回のサイクルにおける第1回の投与が火曜日にされたとき、第2回の投与を第1回の投与から2週間後の火曜日（規則的な間隔）に行ってもよく、またはその前後の数日内（例えば、火曜日の前の月曜日や後の木曜日）に行ってもよい。同様に、第1回の投与が8月1日（例えば月曜日）にされたとき、第2回の投与を第1回の投与から2週間後の8月15日（月曜日）（規則的な間隔）に行ってもよく、またはその前後の数日内（例えば、8月15日前の金曜日または土曜日、あるいは8月15日後の火曜日または水曜日）に行ってもよい。このように柔軟性をもたせることによって、投与計画は、患者にとってひどく制限的なものでなくより利便性をもたせることができる。

40

【0032】

50

好ましくは、投与は、規則的な間隔、例えば、2週間に1回、に基づいて行われる。一の好ましい実施形態では、投与と投与の間は、2週間離れている（すなわち2週間に1回の投与）。

【0033】

本発明の文脈では全体的に、FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回投与される。例えば、FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり、少なくとも3回または少なくとも4回投与されてもよい。好ましくは、FGF-18化合物は、1回の治療サイクルあたり、3回または4回投与される。

【0034】

好ましい実施形態では、FGF-18化合物は、単独で、または、抗炎症薬（例えばアナキンラまたはジクロフェナクなど）との組み合わせのいずれかで、1回の治療サイクルあたり少なくとも2回連続、少なくとも3回連続、または少なくとも4回連続で投与される。更に好ましい実施形態では、FGF-18化合物は、単独で、または、抗炎症薬（例えばアナキンラまたはジクロフェナクなど）との組み合わせのいずれかで、1回の治療サイクルあたり2回連続、3回連続、または4回連続で投与される。更により好ましい実施形態では、FGF-18化合物は、3回連続で投与される。

10

【0035】

本発明の文脈では全体的に、かかる治療は、1年あたり数回の治療サイクル、例えば、1年あたり1、2、または3回の治療サイクルを含んでもよい。一の好ましい実施形態では、かかる治療は、1年あたり2回の治療サイクルを含む。あるいは、治療は、1年あたり1回の治療サイクルを含み、第1回の治療サイクルの開始から1年または2年間繰り返される。一例として、治療が1回のサイクルを含む場合、この治療はそれぞれ2週間の間隔で3回注射することから成ってもよい。更なる例として、治療が少なくとも2回のサイクルを含む場合、それぞれ2週間の間隔で3回注射することから成る第1回の治療サイクルの後に、当該サイクルの最後の注射から数月後に、それぞれ2週間の間隔で3回注射することから成る第2回の治療サイクルを行ってもよい。

20

【0036】

本発明のFGF-18化合物は、好ましくは、a) 配列番号1の第28~207位残基を含むヒトFGF-18成熟型を含むかまたは該成熟型から成るポリペプチド、および、b) FGF-18 (170AA) (配列番号2) を含むかまたは該FGF-18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。上記化合物は、軟骨の沈着を増大させ軟骨の修復を可能にする。

30

【0037】

更に好ましい実施形態では、治療は、FGF-18化合物を、1回の関節内投与あたり3~600マイクログラム（ μg または mcg ）、好ましくは3~300 μg 、または好ましくは10~200 μg 、またはより好ましくは30~150 μg 、または更により好ましくは30~120 μg の用量で投与することを含む。好ましい実施形態では、治療は、FGF-18化合物を、1回の関節内投与あたり約3、10、20、30、40、50、60、90、100、120、150、180、200、240、または300 μg の用量で投与することを含む。好ましい用量としては、FGF-18化合物が1回の関節内投与あたり10、20、30、60、90、120、180、240、または300 μg であることが挙げられる。投与されるFGF-18化合物の用量は、治療対象の患者がヒトか非ヒト哺乳動物かによって変わることが理解されるべきである。例えば、好ましくは、イヌにとっての用量は、ヒトにとっての用量の5分の1程度であろう。例えば、ヒトの投与量が1回の関節内投与あたり30~120 μg の範囲である場合、イヌの投与量は1回の関節内投与あたり5~20 μg の範囲であり得る。ラットおよびウサギの用量の例を実施例に記載する。

40

【0038】

本発明の文脈では全体的に、FGF-18化合物を、症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬との組み合わせで使用できる。好ましい抗炎症薬は、アナキンラ（配列番号3参照）またはジクロフェナクである。アナキンラまたはジクロフェナクのいずれかが投与される場合、治療は、関節内投与（例えば、アナキンラに好ましい投与方法）または経口投

50

与（例えば、ジクロフェナクに好ましい投与法）のいずれかによる単回投与あたり0.01～500ミリグラム（mg）、好ましくは0.1～250mg、またはより好ましくは0.5～150mgの用量で投与することを含む。好ましい実施形態では、治療は、抗炎症薬を単回投与あたり約0.03、0.1、0.25、0.3、0.5、1、1.5、2、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、または300mgの用量で投与することを含む。好ましい用量としては、単回投与あたり0.5、1、5、1.5、10、50、100、および150mgであることが挙げられる。投与される抗炎症薬の用量は、治療対象の患者がヒトか非ヒト哺乳動物かによって変わることが理解されるべきである。例えば、好ましくは、イヌにとっての用量は、ヒトにとっての用量の6分の1程度であろう。例えば、ヒトのアナキンラ投与量が1回の関節内投与あたり150mgである場合、イヌの投与量は1回の関節内投与あたり25mgであり得る。当業者は、投与対象の患者および抗炎症薬に応じてケースバイケースで抗炎症薬の投与計画を変更するであろう。例えば、ジクロフェナクを経口投与する場合、投与計画は、1日あたり50 mgまたは75mgを2回または3回投与することがあり得る。

10

【0039】

FGF-18化合物は、医薬組成物として、すなわち、医薬的に許容される担体、賦形剤等と共に製剤化してもよい。「医薬的に許容される」の定義は、活性成分の生物学的活性の有効性を妨げず、かつ、投与対象の患者に毒性がない任意の担体、賦形剤等を含むことを意味する。例えば、非経口投与では、活性タンパク質を、生理食塩水、デキストロース溶液、血清アルブミン、およびリンガー溶液などのビヒクルを用いて注射用の単位剤形に製剤化してもよい。関節内に適用するための製剤は、他の注射製剤にも当てはまる大部分の要件に沿う、すなわち、滅菌されていてかつ適用部位（例えば、膝関節、関節液）における生理的な状態に適合する必要がある。また、関節内注射に使用される賦形剤は、他の注射製剤、例えば、筋肉内または皮下に適用する注射製剤内に存在するものでもよい。少なくとも一つの追加的な医薬的に許容される担体、賦形剤等を含むFGF-18化合物のかかる製剤を、本明細書では、「FGF-18組成物」または「FGF-18製剤」と呼ぶ。また、かかる「FGF-18組成物」または「FGF-18製剤」は、本発明の文脈において有用である。

20

【0040】

アナキンラまたはジクロフェナクなどの抗炎症薬をFGF-18化合物と一緒に使用する場合、アナキンラまたはジクロフェナクは、FGF-18化合物の製剤の投与前または同時投与のいずれかで投与しても良く、2つの異なる注射器/針を使用してもよいし、あるいは、患者の利便性を高めるために、2つの異なる注射器だが好ましくは同じ針を使用してもよい。あるいは、抗炎症薬を、経口投与または他の投与方法によって投与してもよい。

30

【0041】

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」）は、軟骨障害を治療するのに有用である。特に、例えば、表面の線維化（初期の変形性関節症）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ために有用であり得る。また、FGF-18化合物およびFGF-18組成物は、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するに有用であり得る。再建および整形手術の分野で、FGF-18化合物およびFGF-18組成物は、大規模な組織欠損を再建する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。アナキンラまたはジクロフェナクなどの、症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬と同時投与するというオプションにより、治療対象の軟骨障害に伴う疼痛が軽減するであろう。

40

【0042】

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、OARS1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、これらに限定され

50

ない。

【0043】

別の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、マイクロフラクチャーなどの外科的介入があるまたはない軟骨損傷である。従って、FGF-18組成物の投与（単独、またはアナキンラまたはジクロフェナクなどの抗炎症薬と一緒に投与される）による軟骨の成長後に、新たに形成された軟骨表面の輪郭に適切に沿うような外科的治療が必要なこともある。

【0044】

好ましい実施形態では、治療は、FGF-18化合物またはFGF-18組成物を単独で、または、例えばアナキンラまたはジクロフェナクなどの症状（疼痛および機能）に対し効果のある抗炎症薬と一緒に、関節内投与することを含む。FGF-18化合物またはFGF-18組成物は、単独で、または、例えばアナキンラまたはジクロフェナクなどの抗炎症薬と一緒に適用しても良く、関節の滑液への直接注入しても、欠損部へ直接注入してもよく、単独でも、タンパク質の持続放出（例えば、徐放製剤）または限定的な局所放出に好適な担体と組み合わせてもよい。好ましくは、単独でも、または、例えばアナキンラまたはジクロフェナクなどの抗炎症薬と一緒にでもよいFGF-18化合物の投与様式は、滑液膜周囲投与、滑液膜内投与、関節周囲投与、および関節内投与から成る群より選択される。好ましい実施形態では、本明細書に記載の使用のためのFGF-18化合物は、単独で、または、例えばアナキンラまたはジクロフェナクなどの抗炎症薬と一緒に、好ましくは関節内投与（関節の内部へ投与）される。抗炎症薬は、好ましくは関節内投与（例えば、アナキンラに好ましい投与方法）または経口投与（例えば、ジクロフェナクに好ましい投与方法）のいずれかで投与される。関節内投与は、股関節、膝関節、肘、手首、足首、脊椎、脚、指、つま先、手、肩、肋骨、肩甲骨、大腿、すね、かかとかから選択される関節の内部または脊椎の骨点（bony point）に沿いに行われる。さらに他の好ましい実施形態では、関節内投与は、股関節または膝関節において行われる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】図1は、治療スケジュールの概要を示す。図1 aは、1週間に1度の投与計画を示す。図1 bは、1月に1度（または4週間に1度）の投与計画を示す。図1 cは、1月に1度（または4週間に1度）に、患者の利便性のため許容される+/-数日のわずかな差異を含めた投与計画を示す。

【0046】

【図2】図2は、サフラニンO染色の定量化により示される、ラットOAモデルにおけるFGF-18化合物による用量依存性の関節マトリックス沈着を示す。

【0047】

【図3】図3は、大腿骨を除く全関節スコアを示す。

【0048】

【図4】図4は、全関節スコアを示す。

【0049】

【図5】図5は、脛骨軟骨変性の実質幅を示す。

【0050】

【図6】図6は、IL1 で刺激したまたは刺激しないブタ軟骨細胞の培養8日後の細胞濃度を示す。（A）は即時投与（N=4）、（B）は6時間後投与（N=6）を示す。それぞれ、100 ng/mLのrhFGF-18および/または100ng/mLのアナキンラを添加した。

【0051】

【図7】図7は、経時的な血清 2MGレベルを示す。

【0052】

【図8】図8は、対象の膝（OA関節）と反対側の膝（健康な膝）の関節の直径の差の経時的なAUC（曲線下面積）を示す。

【0053】

10

20

30

40

50

【図9】図9は、内側脛骨の軟骨の体積 (mm^3) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0054】

配列番号1：天然ヒトFGF-18のアミノ酸配列。

配列番号2：組み換え切断型FGF-18 (trFGF-18) のアミノ酸配列。

配列番号3：組み換えヒトIL-1受容体アンタゴニスト (アナキンラ) のアミノ酸配列

【実施例】

【0055】

材料：

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

【0056】

組換えヒトインターロイキン-1受容体アンタゴニスト (アナキンラ) は、Pharmaciaから取得した。

【0057】

関節のスコア付け：

屠殺後、右膝を取り出し、5%ギ酸で4~6日間脱灰し、前面で半分に切断し、パラフィンワックスに包埋した。3枚の切片を200 μm の厚さで切り出し、トルイジンブルーで染色し、ImagePro Plus (商標) ソフトウェア (Media Cybernetics) を用いて分析した。3枚の関節切片のスコア付けでは、各切片の2分1が損傷されている場合、軟骨損傷と決定し軟骨変性幅 (μm) とした。これは、軟骨細胞およびプロテオグリカン両者の損失が軟骨の厚さの50%以上である脛骨軟骨の病変領域を反映する。脛骨表面を横切る3つのゾーンのそれぞれにおいて病変の重症度が最大の領域を測定した。

【0058】

処置群の各スコアと測定値の平均 \pm SEを決定した。

【0059】

データは、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) またはクラスカル・ワリス検定 (ノンパラメトリック) を用いて、適切な多重比較事後検定に従い分析した。ノギスによる右膝の測定値をスチューデントt検定を用いて左膝と比較した。明示しない限り、Bolder BioPATH, Inc. が生 (未変換) データの統計解析を実施する。データの正規性および分散の均一性について一定の前提条件に基づいて統計的検定を行い、検定によりこれらの前提条件の違反が生じた場合にさらなる分析が必要になることがある。すべての検定において、有意差を $p < 0.05$ と設定した。各群とピヒクル対照群間の比較のみならず、各群間での比較も行った。

【0060】

実施例 1

方法：

10~15週齢の雄Lewisラットの内側半月板を切除し前十字靭帯を離断して (ACLT + tMx) 、不安定誘発性のOAモデルを作成した。簡単に言えば、イソフルランによる麻酔下で、各ラットの右膝の関節包を切開し、前十字靭帯と半月板固定靭帯を鋭く横に切断し、半月板を除去し、関節包、筋肉、および皮膚を縫合によって閉じた。動物は無作為に各群 $n = 10$ 匹ずつ10個の群に割り当てた。1回の関節内注射あたり0、0.3、1、3および10 μg の用量について検査した。第1~5群は、1週の間隔で3回の単回注射をする1サイクル、第6~10群は、1月の間隔で3回の単回注射をする1サイクルを行った。関節内の処置は手術から3週間後に開始した。この時点で病態生理学的変化は、例えば軟骨基質の損失として、既に現れていた。動物は手術から17週後に安楽死させ、関節を検査した。

【0061】

結果：

外側脛骨では、trFGF-18による用量依存性の軟骨組織の新形成は、注射の投与計画にはよらず、関節あたり1 μ gを投与すると、有意であった（図2a参照）。内側脛骨では、trFGF-18による用量依存性の軟骨組織の新形成は、1週に1度の投与計画では関節あたり1 μ gを投与すると、1月に1度の投与計画では関節あたり0.3 μ gを投与すると有意であった（図2b参照）。

【0062】

実施例2

方法：

雄Lewisラットに外科手術を施し（イソフルランによる麻酔下で）、右膝関節に内側半月板涙を誘発した。動物は、2つの異なる投与計画（下の表参照）でビヒクルまたはFGF-18を関節内投与し、105日目に終了した。膝は、ベースラインおよび21、42、56、84、105日目にノギスで測定した。血清は、21および105日目、および最終投与（42または84日目）から1週間後に2マクログロブリンレベルについて評価した。右膝は、組織病理学的评价のために採取した。

【0063】

【表1】

処置群

群	ラット数	処置 (50 μ l中に10 μ g)
1	10	正常+ビヒクル 21、35、49日目
2	10	外科手術+ビヒクル 21、35、49日目
3	10	外科手術+FGF-18 21、28、35日目（毎週の処置）
4	10	外科手術+FGF-18 21、35、49日目（2週間毎の処置）
5	10	外科手術+FGF-18 21、49、77日目（毎月の処置）
6	10	外科手術+FGF-18 21、35日目
7	10	外科手術+FGF-18 21、77日目

【0064】

結果および結論：

全ての動物は、手術後麻酔からの回復に伴いすぐに体重が増加した。全ての動物は、研究の過程にわたって体重が増え、群間の体重変化について有意差はなかった。

【0065】

ノギス測定による膝の直径およびa2MGの血清レベルはFGF-18の注射後に増加したが、これらのパラメータを用いる本研究では、特定の治療計画の他の治療計画に対する明確な利点の実証されなかった。対照的に、構造的な利点は、1月に1回の投与スキームで最も高かった（図3、図4、図5）。2週間に1回の投与スキームも有望で、興味深く構造的な利点をもたらす。

【0066】

全体的に、本研究の結果により、FGF-18による治療では、その投与計画によらず、第1回目の注射の後に膝の腫れが有意に増すことが示唆される。組織病理学的评价により、治療は一般に、その重症度は低減させるものの、特にコラーゲンの損傷の観点で脛骨表面

の損傷の程度を増すことを示した。この効果は2回よりも3回の用量を受けた処置群、および、最も遅い時点（77日目）で最終投与を行った群で最も顕著であった。治療により見られた他のいくつかの副作用は、軟骨の肥大、滑膜炎、滑膜線維症等であった。これらの変化は、短期に連続して3回の投与を受けた動物で最も明白であり重症であった（第3群および第4群）。一方、2回の投与のみを受けた動物（第6群および第7群）またはより長期にわたって投与を受けた動物（第5群）では重症な変化がやや少なかった。

【0067】

全体的な形態が最も良好であった治療計画は、月1回ごとに3回注射した群であった（第4群、21、49、および77日目に注射）。このことより、投与の間にある程度の回復期間が有益であったことが示唆される。また、2週間ごとに1回の注射を3回行う治療計画（第5群、21、35、および49日目に注射）の全体的な形態の結果も良好であった。

10

【0068】

実施例3

方法：

60羽の雄天然ニュージーランド白ウサギを本研究に使用した。動物は、右膝に軟骨欠損を作成した約3～4月齢のウサギであった。2mm×6mm（全厚）の欠損を滑車溝の関節軟骨に作成した。18ゲージの針を用いてマイクロフラクチャー術により、欠損基部の軟骨下骨に2つの3mm深の微小孔を、1つは近位もう1つは遠位に作成した。各微小孔は直径が約1.5mmであり、それぞれの孔は2mm離れていた。

20

【0069】

実験は、各群10羽ずつのウサギを合計60匹用いて以下の6つの処置群から構成した（表2）。第3、4、5、および6群のウサギは、rhFGF-18を関節内投与した。1サイクルで100μgのrhFGF-18を1週に1回投与することを3週間行うか（第3群および第5群）、または1サイクルで100μgのrhFGF-18を1月に1回投与することを3月行った（第4群および第6群）。全ての動物は安楽死させ、手術から6月後に剖検した。

【0070】

【表2】

処置群

30

群番号 (n=10)	軟骨 欠損	微小孔	検査物質および治療計画	注射1回あたりの 用量(μg) (trFGF-18)	trFGF-18濃度 (μg/ml)	体積 (ml/関節)	投与日
1	有り	無し	無し	0	NA	NA	NA
2	有り	有り	無し	0	NA	NA	NA
3	有り	無し	rhFGF-18 (1週に1回の投与を3週間)	100	500	0.2	7、14、21日目
4	有り	無し	rhFGF-18 (1月に1回の投与を3月)	100	500	0.2	28、56、84日目
5	有り	有り	rhFGF-18 (1週に1回の投与を3週間)	100	500	0.2	7、14、21日目
6	有り	有り	rhFGF-18 (1月に1回の投与を3月)	100	500	0.2	28、56、84日目

40

【0071】

結果：

剖検所見（表3）：

ICRS総軟骨スコアは、第5群では1.9+ / - 0.3SEであり、第6群では2.4+ / - 0.2SEであったことより、1月に1回の投与スキームは1週に1回の投与スキームに比べて優れていることが示唆される。第6群では、10羽中3羽の動物で、顆間溝が粒状～細かい粒状の軟骨で充

50

填され、10羽中残りの7羽の動物では、顆間溝の50%が粒状～粗い粒状の軟骨で充填されていた。要約すると、rhFGF-18を単独で、またはマイクロフラクチャー法と組み合わせて、1週に1回または1月に1回の注射により投与すると、大腿顆領域の肥厚または拡大、および、顆間溝病変において非常に粗いかまたは粗い粒状の軟骨が増え、内側および外側滑車尾根における骨棘の刺激、時々脛骨プラトー骨棘形成、または滑膜脂肪パッド内の膝蓋骨上または隣接部における異常な軟骨の成長が起こった。

【0072】

マイクロフラクチャー法を用いない場合の形態学的病理：

rhFGF-18を1月に1回、3月にわたり投与した動物から得た右大腿骨病変の切片は、欠陥充填の割合が有意に増加し(48%)、欠陥充填スコアが有意に49%増加した。他のスコアは有意ではないが20~23%増加した。溝の病変の幅の合計は有意でないが36%増加し、一方、非生存(no viable)軟骨を有する病変の幅は有意に94%減少した。変性は、一般的に軽度から重度までの範囲内にある全ての切片で集中的であり、典型的には、線維軟骨に関連して見られた。中央のMFCの厚みが有意に120%増加した。

10

【0073】

マイクロフラクチャー法を用いた場合の形態学的病理：

マイクロフラクチャー法を用い未投与の対照から得た軟骨病変領域の切片は、全体的に骨軟骨接合部の再構成が中程度、マトリックス染色が中程度に減少し、そして欠陥の充填度が50%であった。細胞の形態は、殆ど線維軟骨であった。

20

【0074】

rhFGF-18を1週間に1回、3週間にわたり投与した動物から得た病変領域の切片は、スコアしたパラメータの全ておよび欠陥充填の割合が有意に44~69%増加した(正常に近づく)。合計スコアが有意に53%増加した。溝の病変の幅の合計はわずかに5%増加し、一方、非生存軟骨を有する病変の幅は(有意ではないが)59%減少した。全ての切片で軟骨肥大が見られた。これらの切片における中央のMFCの厚みが有意に112%増加した。

【0075】

rhFGF-18を1月に1回、3月にわたり投与した動物から得た病変領域の切片は、スコアしたパラメータの全ておよび欠陥充填の割合が有意に61~97%増加した(正常に近づく)。合計スコアが有意に76%増加した。溝の病変の幅の合計および非生存軟骨を有する病変の幅は、有意ではないが、それぞれ19%と69%減少した。全ての切片で軟骨肥大が見られた。これらの切片における中央のMFCの厚みが有意に106%増加した。

30

【0076】

結論：

臨床徴候の異常は軽度で、側耳静脈から収集した血液または膝関節から収集した滑液のいずれにおいても、膝の手術後のウサギで典型的に見られるもの、および/または試料収集の繰り返しにより見られるものと一致していた。第1群と第2群の動物の間顆状溝の治癒を比較すると、溝の自発的で良好な充填が示されており、軟骨状のものも伴っていた。軟骨の溝が充填されていた動物は、第2群では10羽のうち9羽であったが、第1群では10羽のうち7羽であったことより、マイクロフラクチャー法が溝における軟骨の再成長を増強し得るという示唆がされるが、この差はわずかといえる。

40

【0077】

同様に、2つの群間のICRSまたは骨棘のスコアに差異はないので、いずれの群においても軟骨の治癒の質は良好で骨棘形成の刺激はわずかであった。rhFGF-18で治療した残りの群の中でも、第4群(顆間溝、100 μ gのrhFGF-18による3月毎の関節内注射)では、9羽中6羽の顆間溝で軟骨が充填されたという最高の応答を示し、これは、全体的にやや粗いまたは粒状のように見えた。また、第4群はrhFGF-18で治療した4つの群のICRS軟骨スコアが2番目に最低であり(2.1+ / - 0.3)、この群はどのrhFGF-18群よりも骨棘スコアが最低であった(3.8+ / - 0.8)。対照的に、第6群(マイクロフラクチャー法を用いた顆間溝、100 μ gのrhFGF-18の3月毎の関節内注射)では、10羽のうちたったの3羽の顆間溝で軟骨が充填され、ICRS軟骨スコアがどの群よりも高く(2.4+ / - 0.2)、rhFGF-18群内で骨棘ス

50

コアが2番目に高かった(5.1+ / - 0.7)。同様に、第5群(マイクロフラクチャー法を用いた顆間溝、100 µgのrhFGF-18の3月毎の関節内注射)では、群内で骨棘スコアが最も高かった(5.7+ / - 0.7)。

【0078】

治療は長時間にわたって施したほうがより有益な効果が得られ、そして、この効果は、マイクロフラクチャー法を用いないウサギに比べてマイクロフラクチャー法を用いたウサギにおいてより明白であった。

【0079】

実施例 4

方法：

ブタ軟骨細胞を、ブタ股関節(約1年齢のブタ)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(2.5%のコラゲナーゼNBG4を含むHAM's F12の1/25希釈液)を用いて37度で一晩更に消化し、軟骨細胞を抽出した。本研究では、軟骨細胞を単層で培養した。

【0080】

初代関節ブタ軟骨細胞を10ng/mLのIL1 で刺激しまたは刺激せず、即時または6時間後に100ng/mLのアナキンラおよび/または100ng/mLのtrFGF-18で処理した。各条件は、4重または6重に行った。対照として、アナキンラ単独、trFGF-18単独、またはいかなる処置も施さない(培地)細胞培養も行った。

【0081】

前培養：

細胞単離後に、ブタ軟骨細胞を20000個の細胞/cm²で接種し、完全HAM's F12内で1週間培養した。細胞は、その後、以下に記載するように、ACCUTASEで回収し、計数し、使用した。

【0082】

アナキンラで即時に処置した細胞：

軟骨細胞を、24ウェルプレートに、0.5mLの完全HAM's F12を含むウエルあたり15000個の細胞を接種した。その後、0.25mLの400ng/mLのtrFGF-18および/または0.25mLの400ng/mLのアナキンラを細胞に添加した。チャレンジサンプルでは、10 µLのIL1 を1000ng/mLで細胞に添加した。trFGF-18、アナキンラ、およびIL1 は全て完全HAM's F12で希釈した。培養ウエルにおける最終的な体積を完全HAM's F12で1mLに調整した。最終的な濃度は、IL1 は10ng/mL、trFGF-18は100ng/mL、アナキンラは100ng/mLであり、合計培養時間は8日であった。完全培地は、4日後に置換した。N=4。

【0083】

IL1 チャレンジの6時間後にアナキンラとtrFGF-18で処置した細胞：

軟骨細胞を、24ウェルプレートに、10ng/mLのIL1 を含むまたは含まない1mLの完全HAM's F12を含むウエルあたり15000個の細胞を接種した。6時間後、培地を取り除き、0.25mLの400ng/mLのtrFGF-18および/または0.25mLの400ng/mLのアナキンラに置換した。チャレンジサンプルでは、0.25mLのIL1 を40ng/mLで細胞に添加した。trFGF-18、アナキンラ、およびIL1 は全て完全HAM's F12で希釈した。培養ウエルにおける最終的な体積を完全HAM's F12で1mLに調整した。最終的な濃度は、IL1 は10ng/mL、trFGF-18は100ng/mL、アナキンラは100ng/mLであり、合計培養時間は8日であった。完全培地は、4日後に置換した。N=6。

【0084】

培養から8日後に、細胞をACCUTASEで回収し、得られた細胞懸濁液を、ViCellTM Cell analyzer (Beckman Coulter)で細胞濃度および細胞生存率について分析した。統計分析は、one-way ANOVA、続いてダネット事後解析を行った。

【0085】

結果および結論：

10

20

30

40

50

予想通り、IL1 の非存在下では、rhFGF-18がブタ軟骨細胞増殖を増強することがわかった。100ng/mLのrhFGF-18の存在下では、培養から8日後、対照（培地、IL1 なし）と比較して、いずれの実験でも、細胞数がそれぞれ11.25倍および7.75倍の増加が見られた（図6）。しかし、10ng/mLのIL1 の存在下では、rhFGF-18による増殖の刺激は、対照（培地、IL1 なし）と比較して、いずれの実験でも、それぞれわずか2.38倍および2.44倍であった。即時および遅延処置のいずれでも、100ng/mLのアナキンラを投与すると、rhFGF-18活性が完全に回復することが示された。rhFGF-18とともに培養し、IL1 無し、またはIL1 でチャレンジし、アナキンラを投与した細胞の細胞密度は、統計学的な差異が無いことが判明した。最後に、アナキンラ単独だと、軟骨細胞の増殖に影響がなかった。

【0086】

本研究により、100ng/mLのアナキンラは、rhFGF-18の増殖活性に対するIL1 の阻害効果を完全にブロックすることが示された。これは、アナキンラが、IL1によって誘発される炎症性シグナル伝達をブロックするIL1受容体アンタゴニストであるという事実と一致する。アナキンラは、IL1 でチャレンジしたブタ軟骨細胞におけるrhFGF18の増殖効果を回復することが実証された。

【0087】

実施例 5

方法：

雄Lewisラットに外科手術を施し、右膝関節に内側半月板涙を誘発した。動物は、21、28、および35日目にFGF-18を関節内投与（関節あたり10 μ g）し、21~23、28~30、および35~37日目にジクロフェナク（1mg/kgまたは3mg/kgのいずれか）あるいはビヒクルを経口投与し、42日目または63日目に終了した。血清は、-3、21、42、および63日目に採取し、2マクログロブリン（2MG）レベルについて評価した。2MGは、炎症血清バイオマーカーである。2MGと炎症との関連性は、既に示されている（Kuribayashi et al., 2013）。

【0088】

結果：

FGF-18 + ビヒクル対照は、24日目に中程度の腫れがあり、36日目までには重度になったが、跛行（limping）は見られなかった。44日目から膝の腫れの重症度がやや減少した。21日目以降では右膝と左膝の有意差があったがベースラインでは有意差がなかった。ノギス測定により、これらの観察事項が裏付けられる。3mg/kgのジクロフェナクを投与した動物は、ビヒクル対照と比較して、24~29、31、および36~43日目の腫れスコアが有意に低かった。膝のノギス測定値は、42日目では有意に低かったが、他の時点では有意な影響はなかった。1mg/kgのジクロフェナクを投与した動物は、ビヒクル対照と比較して、24~29、31、および36~43日目の腫れスコアが有意に低かった。膝のノギス測定値は、42日目に有意に低かったが、他の時点では有意な影響はなかった（データは示さず）。

【0089】

2MGレベルは、21日目（手術後）よりも-3日目（手術前）の方が高かった。3mg/kgのジクロフェナクを投与した動物のレベルは、手術前の時点でのビヒクル対照と比較して、わずかだが有意に低かった。21日目の時点でのレベルは、全ての群で同等であった。42日目では、疾患対照は、2MGレベルが有意に上昇し（21日目のレベルの約4倍）、これは、2つのジクロフェナク群と比べ有意であった。63日目には、すべての群のレベルが再び類似した（図7）。

【0090】

結論：

全体的に、本研究の結果は、1または3mg/kgのジクロフェナクおよびFGF-18を、内側半月板涙を有するラットに投与すると、臨床観察とノギス測定の両方において膝の腫れが有意に減少したことを示している。これらの効果は、ジクロフェナクの最終投与から約1週間にわたり明白であった。-3、21、および63日目における2MGの血清レベルはビヒクル対照と同等であったが、対照レベルでは大きな棘骨があったため42日目では非常に低かつ

10

20

30

40

50

た。

【 0 0 9 1 】

実施例 6

方法：

本研究の目的は、OAのラットモデルにおける軟骨体積に対するspriferminの総用量（ $3 \times 1 \mu\text{g}$ ）が同じで、サイクルの投与頻度が異なる場合の効果を評価することであった。実施例 1 に記載のように内側半月板（tMx）の切除と前十字靭帯離断（ACLT）を行った。本研究では、雄Lister Hooded ラット（200-260g, Charles River）の関節を使用した。動物は、手術から18週後に安楽死させた。

【 0 0 9 2 】

関節の変化は、OAの臨床評価（軟骨の損失、骨棘、軟骨下硬化症）と関連する。1 μg の spriferminを含む生理食塩水を、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、または5週間に1回毎に3回注射し、適切なピヒクル群と比較した。体重、関節の直径、および臨床的健康スコアを、毎週調べた。

【 0 0 9 3 】

結果：

結果は、関節内注射が体重増加に影響を及ぼさなかったことを示した。薬剤または治療計画の効果は生存パラメータ（in-life parameter）に有意には見られなかった。しかし、生理食塩水を2週間に1回注射した群（ $n=4$ ）は、最も高い体重増加を有する傾向があった（データは示さず）。

【 0 0 9 4 】

第3週、4週、および5週目に注射した場合、第3週、8週、および13週目に注射をした場合よりも関節の直径が有意に大きかった（図 8 参照）。2週、3週、および4週に1回注射した群間での有意差は見られなかった。5週間毎に注射した場合の関節直径のAUCのみが、生理食塩水による注射と同じであった。従って、関節の直径のAUCは、注射の頻度が低くなるにつれ減少する傾向がある。

【 0 0 9 5 】

立体学による組織学的定量分析により、影響を受けた関節では重度のOA様の変化があったこと明らかになった。rhFGF-18は、ほぼ完全な軟骨侵食を防いだ。3週間に1回、関節あたり1 μg を注射した場合（合計3回の注射）、注射生理食塩水に比べ薬理的に意味のある統計的有意差が得られた（エンドポイント：内側脛骨上の軟骨体積、図 9 を参照）。

【 0 0 9 6 】

結論：

3週間にわたって週1回よりも低い頻度で注射すると、注入後の関節の腫れからの回復がより良好になるようだ。rhFGF-18で処置した全ての群は、プラセボと比較して高い軟骨体積値によって示されるように構造的な利点を示した。しかし、時間を固定し（すべての動物に対し同じ試験期間）で用量も固定した場合、3週間に1回という注射の回数が、最も有益な構造的な結果をもたらした。rhFGF-18の注入の間隔が長いほうが、1週に1回の注射を3週間にわたり行う投与計画に比べて、軟骨細胞増殖がより良好に細胞外マトリックス産生へつながり、より有益なのではと推測できる。

【 0 0 9 7 】

取得したベル形曲線は、成長因子の効果の読み出しについて一般的な観察事項である。

【 0 0 9 8 】

参考文献

1. Ellsworth et al., 2002, Osteoarthritis and Cartilage, 10: 308-320
2. Shimoaka et al., 2002, JBC 277(9)7493-7500
3. WO2008023063号
4. WO2004032849号
5. WO98/16644号
6. WO2006/063362号

10

20

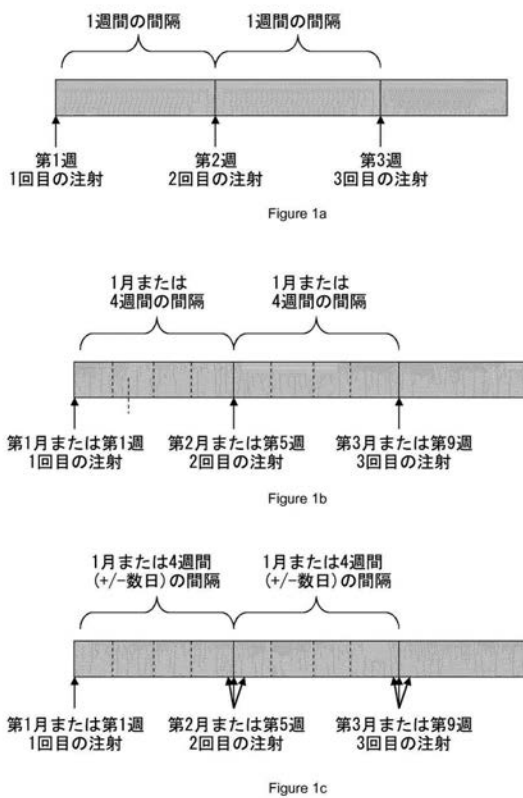
30

40

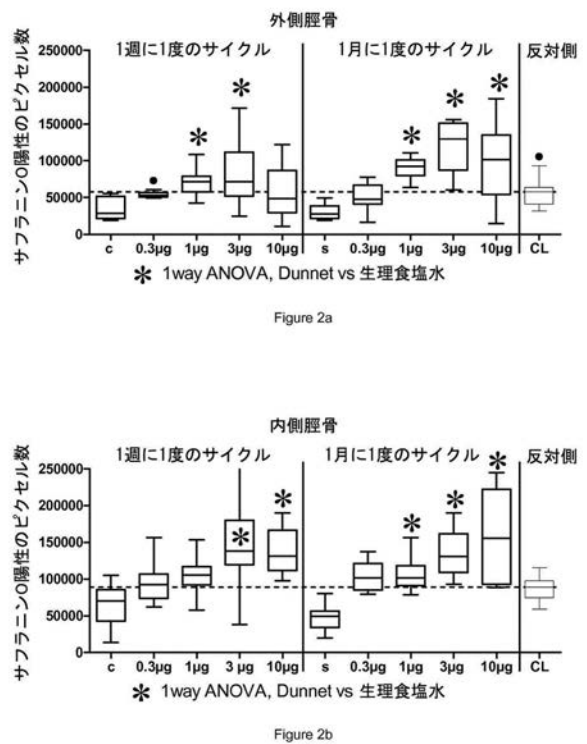
50

7. Custers et al., 2007, Osteoarthritis and Cartilage, 15:1241-1248
8. Lotz, 2010, Arthritis research therapy, 12:211
9. Moore et al., 2005, Osteoarthritis and Cartilage, 13:623-631.
10. Arnaud-Dabernat et al., 2008, Journal of Cellular Physiology, 216:261-268.
11. The Merck manual, 17th edition, 1999
12. Getgood et al., 2010, P116, ICRS Meeting 2010, Barcelona.
13. ICRS publication http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf, page 13
14. Bingham, 2002, J. Rheumatol. 29: 3-9.
15. Lee et al., 2013, Gene, 527:440-447.
16. Bresnihan, 2002, Ann. Rheum. 61:iii74-iii77
17. St. Clair, 2002, J. Rheumatol. 29:22-26,
18. Mertens et al., 2009,, J. Rheumatol., 36(6):1118-1125
19. Chevalier et al., 2009, Arthritis & Rheumatism, 61(3) : 344-352
20. Kuribayashi et al., 2013, Inflammation, 36(6): 1448-52

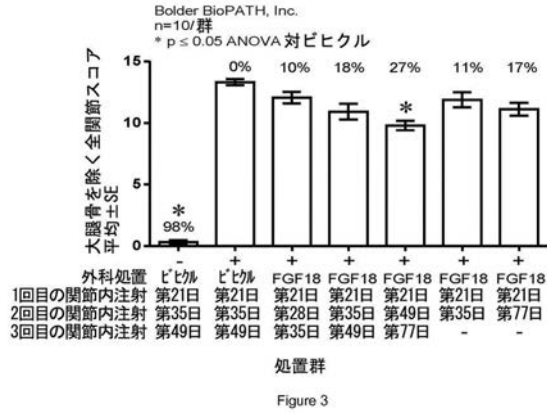
【 図 1 】



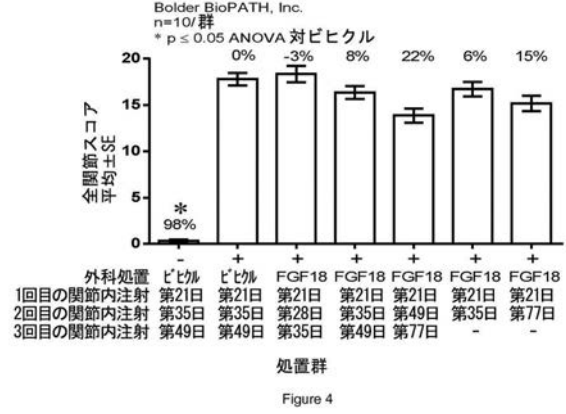
【 図 2 】



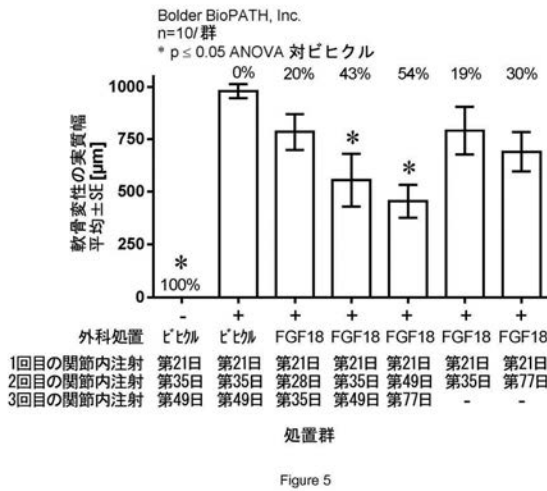
【 図 3 】



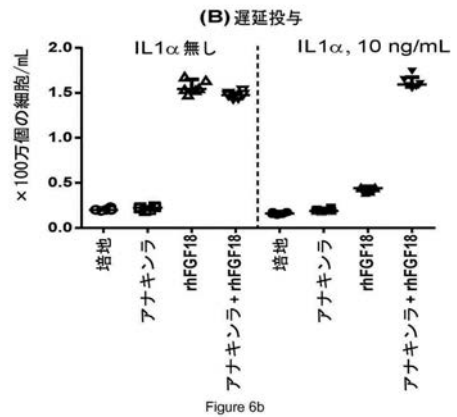
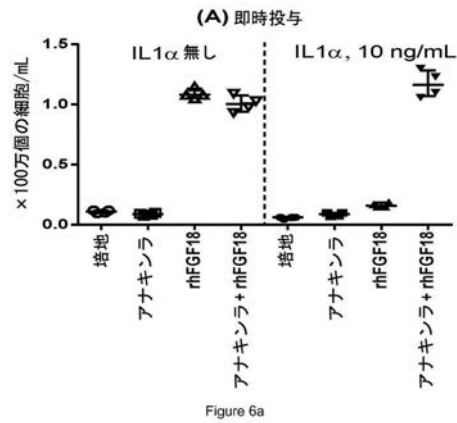
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

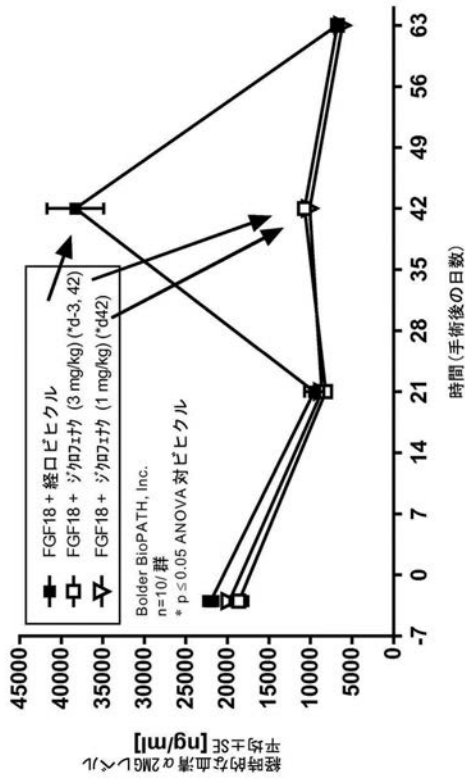


Figure 7

【 図 8 】

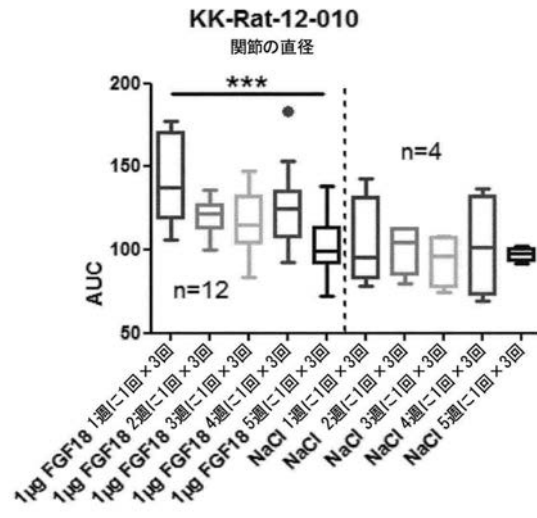
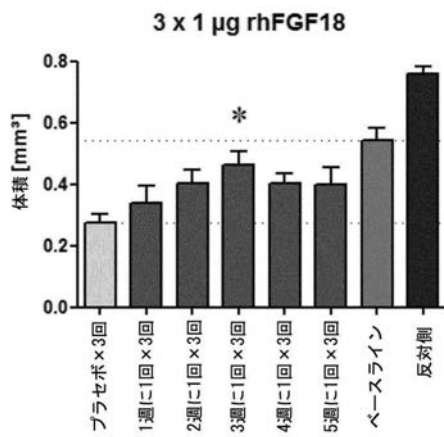


Figure 8

【 図 9 】



* 1 Way ANOVA; Dunnett vs プラセボ
 平均±SEM: N=12-20/群 (プラセボを除く) (N=20)

Figure 9

【配列表】

2017507142000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/053631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/18 A61P19/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/023063 A2 (ARES TRADING SA [CH]; GIMONA ALBERTO [CH]; LADEL CHRISTOPH H [IT]; VOM) 28 February 2008 (2008-02-28) cited in the application claims 1-17	1-18
A	----- POWER JONATHON ET AL: "Intra-articular injection of rhFGF-18 improves the healing in microfracture treated chondral defects in an ovine model.", 16 January 2014 (2014-01-16), JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH : OFFICIAL PUBLICATION OF THE ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY MAY 2014, VOL. 32, NR. 5, PAGE(S) 669 - 676, XP002734751, ISSN: 1554-527X page 670, column 2, paragraph 2 ----- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 April 2015		24/04/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schnack, Anne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/053631

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SHIMOAKA TAKASHI ET AL: "Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1 MAR 2002,, vol. 277, no. 9, 1 March 2002 (2002-03-01) , pages 7493-7500, XP002527434, DOI: 10.1074/JBC.M108653200 abstract</p> <p>-----</p>	1-18
A	<p>ELLSWORTH J L ET AL: "Fibroblast growth factor-18 is a trophic factor for mature chondrocytes and their progenitors", OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 10, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 308-320, XP002374609, ISSN: 1063-4584, DOI: 10.1053/JOCA.2002.0514 abstract</p> <p>-----</p>	1-18
X,P	<p>LOHMANDER L STEFAN ET AL: "Intraarticular sprifermin (recombinant human fibroblast growth factor 18) in knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.", July 2014 (2014-07), ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY (HOBOKEN, N.J.) JUL 2014, VOL. 66, NR. 7, PAGE(S) 1820 - 1831, XP002734752, ISSN: 2326-5205 the whole document</p> <p>-----</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/053631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008023063 A2	28-02-2008	AR 062522 A1	12-11-2008
		AU 2007287510 A1	28-02-2008
		CA 2658511 A1	28-02-2008
		EA 200970224 A1	28-08-2009
		EP 2054050 A2	06-05-2009
		HR P20120643 T1	31-08-2012
		IL 197169 A	29-08-2013
		JP 2010501531 A	21-01-2010
		JP 2014088429 A	15-05-2014
		KR 20090051100 A	20-05-2009
		US 2010016223 A1	21-01-2010
		WO 2008023063 A2	28-02-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 0 7 K 14/50 (2006.01) C 0 7 K 14/50 Z N A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(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, マイセンバーク 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

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA22 DB54 DB59 MA17 MA66 NA05
 NA14 ZA96 ZC75
 4C206 AA01 AA02 FA31 KA01 MA01 MA02 MA04 MA72 MA86 NA05
 NA14 ZA96 ZC75
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA01 EA20 EA28 FA72 FA74