

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年1月4日(04.01.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/005133 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 38/16 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/024150

(22) 国際出願日: 2023年6月29日(29.06.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2022-105696 2022年6月30日(30.06.2022) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 株式会社ステムリム(STEMRIM INC.) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7-15 彩都バイオインキュベータ3階 Osaka (JP).

(72) 発明者: 玉井 克人(TAMAI, Katsuto); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 新保 敬史(SHIMBO, Takashi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 石橋 恭太(ISHIBASHI, Kyota); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

Osaka (JP). 山崎 尊彦(YAMAZAKI, Takehiko); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7-15 彩都バイオインキュベータ3階 株式会社ステムリム内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外(YAMAO, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 大阪梅田ツインタワーズ・ノース青山特許事務所 Osaka (JP).

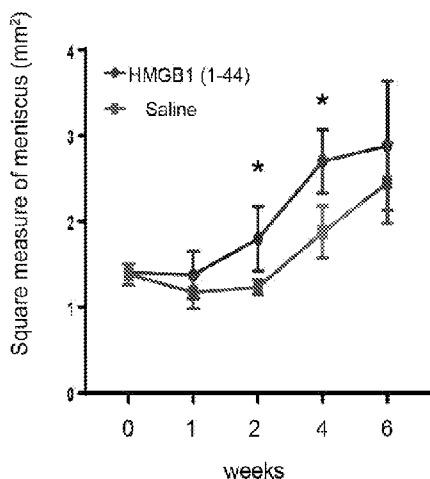
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR MENISCUS

(54) 発明の名称: 半月板の治療薬

[図4]



(57) Abstract: Provided are: a pharmaceutical composition for treating damage to the white-white zone or red-white zone of the meniscus, said composition containing an HMGB1 fragment peptide containing an amino acid sequence delimited by SEQ ID NO 1, or a variant thereof; and a pharmaceutical composition for treating a meniscus excision site, said composition containing an HMGB1 fragment peptide containing an amino acid sequence delimited by SEQ ID NO 1, or a variant thereof.

(57) 要約: 配列番号: 1 に記載のアミノ酸配列を含む HMGB1 断片ペプチドまたはその変異体を含む、半月板における white-white zone または red-white zone の損傷を治療するための医薬組成物、ならびに配列番号: 1 に記載のアミノ酸配列を含む HMGB1 断片ペプチドまたはその変異体を含む、半月板の切除部位を治療するための医薬組成物が提供される。

[続葉有]

TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：半月板の治療薬

技術分野

[0001] 本発明は、High mobility group box 1 (HMG B 1) タンパク質の断片ペプチドを含む、半月板の治療のための医薬組成物に関する。詳細には、本発明の医薬組成物は、半月板を再生することにより治療効果を発揮する。

背景技術

[0002] 半月板は膝関節内にあり、関節に加わる体重の負荷を分散させる機能と、関節の適合性を保つ機能を有している。半月板の損傷は、半月板に何らかの力が加わることにより生じる変形、断裂および欠損などを包含する。半月板損傷の原因としては、スポーツなどのケガから生じる場合と、加齢により傷みやすくなっている半月板に外力が加わって生じる場合などが挙げられる。

[0003] 半月板が損傷すると、痛みを感じ、正常な歩行や運動も妨げられる。半月板の損傷は、変形性関節症も引き起こす。半月板損傷の治療は、ヒアルロン酸の関節内注射、安静、リハビリテーションなどの保存療法、および半月板切除術や縫合術などの手術療法がある。

[0004] 半月板の治療を促進するために、滑膜液間葉系幹細胞 (MSC) や多血小板血漿などのいくつかの補完療法が用いられている (非特許文献 1、非特許文献 2)。しかし、これらの補完的な治療法はいずれも半月板の再生に十分ではない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Sekiya I., et al., 2019 Nov, Cell Transplant., 28(11), 1445-1454

非特許文献2: Griffin J. W., et al., 2015 May, Clin. Orthop. Relat. Res., 473(5), 1665-1672

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 半月板のなかでも血流が乏しい *red-white zone* または血流がない *white-white zone* における損傷の場合は、保存療法や縫合術によっては治癒が望めないことがある。そのような場合は切除術が適用となるが、切除によって失った部位を再生することができない。この切除術によって失った部位を再生することができれば、非常に有益である。また、保存療法や縫合術を行う場合であっても、損傷した半月板を再生することができれば、治癒を促進することができる。

以上より、損傷、欠損または切除した半月板を治療する薬剤、特に *red-white zone* および *white-white zone* を再生するための新たな薬剤が必要とされている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、特定のアミノ酸配列を有する HMGB1 断片ペプチドが、半月板欠損モデル動物において、半月板の *red-white zone* や *white-white zone* を再生できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、以下を提供する：

[1] 以下の (a) から (c) のいずれかに記載の物質を含む、半月板の *red-white zone* または *white-white zone* を再生するための医薬組成物：

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含む HMGB1 断片ペプチド；

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

〔２〕全身投与される〔１〕記載の医薬組成物。

〔３〕以下の（ａ）から（ｃ）のいずれかに記載の物質を含む、半月板の切除部位を治療するための医薬組成物：

（ａ）配列番号：１に記載のアミノ酸配列を含むHMGB１断片ペプチド；

（ｂ）配列番号：１に記載のアミノ酸配列において１個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または

（ｃ）配列番号：１に記載のアミノ酸配列と約８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

〔４〕切除部位がred-white zoneまたはwhite-white zoneである、〔３〕記載の医薬組成物。

〔５〕全身投与される〔３〕または〔４〕記載の医薬組成物。

〔０００９〕 本発明は、さらに以下を提供する：

〔６〕以下の（ａ）から（ｃ）のいずれかに記載の物質を対象に投与することを含む、該対象における半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneを再生するための方法：

（ａ）配列番号：１に記載のアミノ酸配列を含むHMGB１断片ペプチド；

（ｂ）配列番号：１に記載のアミノ酸配列において１個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または

（ｃ）配列番号：１に記載のアミノ酸配列と約８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

〔７〕該投与が全身投与である〔６〕記載の方法。

〔８〕以下の（ａ）から（ｃ）のいずれかに記載の物質を対象に投与することを含む、該対象における半月板の切除部位を治療するための方法：

（ａ）配列番号：１に記載のアミノ酸配列を含むHMGB１断片ペプチド

;

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；
または

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[9] 切除部位がred-white zoneまたはwhite-white zoneである、[8] 記載の方法。

[10] 該投与が全身投与である[8] または[9] 記載の方法。

[0010] 本発明は、さらに以下を提供する：

[11] 半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneの再生に用いるための、以下の(a) から(c) のいずれかに記載の物質：

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含むHMGB1断片ペプチド；

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；
または

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[12] 全身投与される[11] 記載の物質。

[13] 半月板の切除部位の治療に用いるための、以下の(a) から(c) のいずれかに記載の物質：

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含むHMGB1断片ペプチド；

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；
または

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[14] 切除部位がred-white zoneまたはwhite-white zoneである、[13] 記載の物質。

[15] 全身投与される[13] または[14] 記載の物質。

[0011] 本発明は、さらに以下を提供する：

[16] 半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneを再生するための薬剤の製造における、以下の(a) から(c) のいずれかに記載の物質の使用：

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含むHMGB1断片ペプチド；

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[17] 該薬剤が全身投与されるものである[16] 記載の使用。

[18] 半月板の切除部位を治療するための薬剤の製造における、以下の(a) から(c) のいずれかに記載の物質の使用：

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含むHMGB1断片ペプチド；

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[19] 切除部位がred-white zoneまたはwhite-white zoneである、[18] 記載の使用。

[20] 該薬剤が全身投与されるものである[18] または[19] 記載の使用。

発明の効果

[0012] 本願のペプチドを含む医薬組成物は、自然には再生し得ない半月板の red-white zone および white-white zone を再生・治療することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] 図1は、動物実験の手順を示すスキームである。

[図2] 図2は、サフラニン-O染色にて半月板の再生を調べた結果を示す組織標本である。

[図3] 図3は、再生された半月板の写真である。

[図4] 図4は、半月板再生面積の経時的変化を示すグラフである。丸が HMGB1 投与群、四角が生理食塩水投与群を示す。

[図5] 図5は、生理食塩水（左シャーレ）または HMGB1（1-44）（右シャーレ）を投与した半月板部分切除マウスの循環細胞のコロニー形成線維芽細胞（CFU-F）アッセイの結果を示す。棒グラフは、生理食塩水投与群と HMGB1（1-44）投与群のコロニー数の比較を示す。

[図6] 図6は、パラバイオシスモデルを用いた実験の概要を示す。

[図7] 図7は、再生された半月板のテキサスレッド染色像および明視野像を示す。

[図8] 図8は、半月板の外側領域と内側領域での再生を、tdTomato の赤色蛍光を用いて調べた結果を示す顕微鏡像である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、第1の態様において、

以下の（a）から（c）のいずれかに記載の物質：

（a）配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む HMGB1 断片ペプチド；

（b）配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のA

ミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；
または

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド

を含む、半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneを再生するための医薬組成物を提供する。

[0015] 半月板の外側（関節包側）の血管領域はred-red zone、半月板の内側（顆間側）の無血行野はwhite-white zone、その間はred-white zoneと分類されている。red-red zoneには血流があるため損傷を受けても治癒が期待される。しかしred-white zoneは血流が乏しく、white-white zoneには血流がないため、これらの領域は、損傷を受けた場合に治癒が期待できない。したがって、半月板のこれらの部分が欠損したままだと、痛みが持続する、歩行や運動に支障が出る等の不都合を生じ、患者のQOLが低下する。

[0016] 半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneを再生するとは、損傷したこれらの領域を元通りに再生することだけでなく、これらの領域を部分的に再生することも包含する。また、再生するとは、線維芽細胞、軟骨様細胞（すばわち、サフラニン-O染色陽性細胞）を含む正常半月板細胞が誘導され、半月板組織（線維軟骨組織ともいう）が形成されることをいう。このような再生によって、痛み、歩行・運動困難などの半月板損傷に伴う症状をなくす、あるいは軽減することができる。したがって、上記の本発明の医薬組成物を、半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneにおける損傷を治療するために用いてもよい。

[0017] 半月板損傷とは、半月板の断裂、欠損および変形を包含する。

[0018] 本発明における半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneの再生は、HMGB1断片ペプチドの作用に基づく

。本発明において、HMGB1断片ペプチドは、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含むHMGB1タンパク質の一部からなるペプチドおよびその変異体を包含する。以下において、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含むペプチドを「HMGB1ペプチド」といい、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるHMGB1断片ペプチドを「HMGB1（1-44）」と略称することがある。

[0019] HMGB1ペプチドおよびその変異体、又はHMGB1（1-44）およびその変異体を公知の方法を用いて得ることができる。例えば、HMGB1ペプチドおよびその変異体又はHMGB1（1-44）およびその変異体をコードするポリヌクレオチドを適当な発現系に組み込んで遺伝子組換え体（*recombinant*）として得てもよく、あるいは人工的に合成（例えば化学合成）してもよい。

[0020] HMGB1ペプチド又はHMGB1（1-44）の変異体は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸残基が改変（置換、欠失、挿入若しくは付加）されたアミノ酸配列を含むペプチドであって、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含むHMGB1断片ペプチドと機能的に同等なペプチドである。

[0021] HMGB1ペプチド又はHMGB1（1-44）の変異体の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない：

i) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個（例えば1個～10個、1個～9個、1個～8個、1個～7個、1個～6個、1個～5個、1個～4個、1個～3個、または1個若しくは2個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；

ii) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個（例えば1個～10個、1個～9個、1個～8個、1個～7個、1個～6個、1個～5個、1個～4個、1個～3個、または1個若しくは2個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチド；

iii) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列と約80%以上、例えば約8

５％以上、約９０％以上、約９１％以上、約９２％以上、約９３％以上、約９４％以上、約９５％以上、約９６％以上、約９７％以上または約９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド；

i v) 配列番号：１に記載のアミノ酸配列と約８０％以上、例えば約８５％以上、約９０％以上、約９１％以上、約９２％以上、約９３％以上、約９４％以上、約９５％以上、約９６％以上、約９７％以上または約９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるペプチド。

[0022] 本発明の医薬組成物において、HMGB１ペプチド又はHMGB１（１－４４）を用いてもよく、HMGB１ペプチド又はHMGB１（１－４４）の変異体を用いてもよく、あるいはこれらを組み合わせて用いてもよい。本発明の医薬組成物において、HMGB１ペプチド若しくはその変異体又はHMGB１（１－４４）若しくはその変異体を分泌する細胞、該ペプチド若しくはその変異体をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドが挿入されたベクター、該ベクターを含む細胞を用いてもよい。

[0023] 通常は、本発明の医薬組成物は、有効量のHMGB１断片ペプチドまたはその変異体を含有する。有効量とは、半月板のred-white zoneまたはwhite-white zoneを再生するとは、損傷したこれらの領域を元通りに再生することができる量、あるいはこれらの領域を部分的に再生することができる量をいう。例えば、有効量は、元の半月板にまで再生することを１００％の再生とした場合に、３０％以上の、好ましくは５０％以上、より好ましくは９０％以上の再生をもたらす量であってもよい。また例えば、有効量は、痛み、歩行・運動困難などの半月板損傷に伴う症状をなくす、あるいは軽減する量であってもよい。半月板の再生については、公知の方法、例えばMRI撮影や超音波エコーなどを用いて確認することができる。

[0024] 本発明の医薬組成物を投与する対象としては、特に制限はなく、哺乳類、鳥類、魚類等が挙げられる。哺乳類としては、ヒト又は非ヒト動物が挙げられ、例えば、ヒト、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、ハムスタ

一、モルモット、ウマ、ヒツジ、クジラなどが例示できるが、これらに限定されるものではない。本明細書において、「対象」という用語は、「患者」、「個体」および「動物」と互換的に用いられる。

[0025] 本明細書において、「医薬組成物」という用語は、「医薬」、「薬剤」または「薬学的組成物」と互換的に用いられる。

[0026] 本発明の医薬組成物の投与部位は膝関節（例えば半月板もしくはその近傍）であってもよく、膝関節とは異なる部位であってもよい。いかなる部位に投与されても、本発明の医薬組成物は、その効果を発揮することができる。

[0027] 本発明の医薬組成物の投与方法としては、経口投与または非経口投与が挙げられる。非経口投与方法としては、血管内投与（動脈内投与、静脈内投与等）、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明の医薬組成物を、注射により、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより、全身的または局部的（例えば、皮下、皮内、皮膚表面、鼻腔粘膜、口腔内および消化管粘膜、膣・子宮内粘膜、または損傷部位など）に投与してもよい。

[0028] また、患者の年齢、症状により適宜投与方法および投与量を選択することができる。本発明の医薬組成物を投与する場合、例えば、一回の投与につき、HMGB1断片ペプチドまたはその変異体を、患者体重1kgあたり約0.0000001mgから約1000mgの範囲で投与してもよい。例えば、患者体重1kgあたり約0.00001から約100000mgの範囲で投与してもよい。本願のペプチドを分泌する細胞や該ペプチドをコードするポリヌクレオチドが挿入された遺伝子治療用ベクターを含む医薬組成物を投与する場合も、該ペプチドの量が上記範囲内となるように投与することができる。しかしながら、本発明の医薬組成物の投与量はこれらの量に限定されるものではない。

[0029] 本願の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science,

l a t e s t e d i t i o n , M a r k P u b l i s h i n g C o m p a n y , E a s t o n , U . S . A) 、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体や添加剤が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類、精製水、生理食塩水、グリセリン等を挙げることができる。

[0030] 本発明は、第2の態様において、

以下の（a）から（c）のいずれかに記載の物質：

（a）配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含むHMGB1断片ペプチド；

（b）配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または

（c）配列番号：1に記載のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド

を含む、半月板の切除部位を治療するための医薬組成物を提供する。

[0031] 上述のごとく、red-white zoneまたはwhite-white zoneにおける損傷であって、保存療法や縫合術によっては治癒が望めない場合は切除術が適用となる。切除術を行った後に切除部位を再生することができれば、患者にとって非常に有益である。本発明の第2の態様の医薬組成物は、切除術によって切除されたred-white zoneま

たはwhite-white zoneの部位を再生するものであってもよい。このような再生によって、当該切除部位が治療される。

[0032] 本発明の第2の態様の医薬組成物による半月板の切除部位の再生は、元通りに再生するものであってもよく、部分的に再生するものであってもよい。再生は、元の半月板にまで再生することを100%の再生とした場合に、30%以上の、好ましくは50%以上、より好ましくは90%以上の再生をもたらす量であってもよい。

[0033] 本発明の第2の態様の医薬組成物による半月板の切除部位の治療は、痛み、歩行・運動困難などの半月板損傷に伴う症状をなくす、あるいは軽減するものであってもよい。

[0034] 第1の態様の医薬組成物に関する他の説明は、第2の態様の医薬組成物についてもあてはまる。

[0035] さらに態様において、本発明は、上記の方法、物質および使用を提供する。第1の態様の医薬組成物および第2の態様の医薬組成物に関する説明は、該方法、物質および使用についてもあてはまる。

[0036] なお、本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。本願は、2022年6月30日出願の日本国特許出願第2022-105696号に対して優先権を主張するものであり、該日本国特許出願の全内容を、参照により本明細書に組み入れられる。本明細書中の用語は、医学、薬学、生物学、生化学、化学等の分野において通常に理解されている意味に解される。

[0037] 本発明は、下記の実施例によってさらに例示されるが、それらに限定されるものではない。

[0038] 実験で使用了材料および方法は以下のとおりであった。

[0039] 倫理声明

すべての動物は、大阪大学大学院医学研究科動物委員会の承認されたガイドラインに従って取り扱われた。プロトコルは、大阪大学大学院医学研究科の動物委員会によって承認された。

[0040] マウス

すべての実験用マウスは、12時間の明暗サイクルでケージに収容された。飼料と水は自由に摂取可能とした。C57BL/6Jマウスは、クレア Japan（東京、日本）から購入した。すべてのPDGFR α 陽性（P α ）細胞が核内でGFP蛍光を発するPDGFR α /H2B-GFPノックイン（P α -GFPKI）マウス（Hamilton TG, Mol Cell Biol. 2003）、P α -Cre（JAX、013148）およびROSAtdTomato（JAX、007909）マウスは、Jackson Laboratory（Bar Harbour, ME, USA）から入手した。

[0041] 半月板部分切除モデルマウスの作製

1.5–2.0%（v/v）のイソフルラン吸入麻酔下で、半月板部分切除する側（右膝前側）の下肢の剃毛を行い、右膝前側の皮膚に縦切開を行った。次に、関節包の前内側を切離し、膝蓋骨を外側に脱臼させた後、顕微手術技術を用いて内側半月板の前方半分（前節、中節）を内側側副靭帯レベルで切除した。その後、関節包を8-0バイクリルで縫合し、皮膚を5-0バイクリルで縫合した。術後、マウスはケージの中を自由に歩行させた。手術の精度と再現性を確保するために、すべての手順は実体顕微鏡（Zeiss Stemi 2000C、ドイツ）下で実施された。

[0042] HMGB1（1–44）

ヒト由来のHMGB1タンパク質（配列番号：2）のアミノ酸残基1–44（配列番号：1）からなるペプチドを、PolyPeptide Laboratories（サンディエゴ）に委託して化学合成した。

[0043] パラバイオーシスマウスモデル

パラバイオーシスマウスモデルは、以前に説明されたように生成された（Duyverman MA. et al., Nat. Protoc., 7(4):763–770, 2012）。野生型マウス（C57/BL6）とPa-Cre;ROSAtdTomatoマウスを並体結合した。胴体を、対応する側面で肘頭から膝関節まで縫合した。実験開

始前に、ペアを上記の通常の飼育条件下で4週間以上ケージに個別に保管した。

[0044] 組織学的検査

半月板部分切除の1、2、4、または6週間後にマウスを安楽死させた（1群あたりマウス6匹）。組織を4%パラホルムアルデヒドで1日間固定し、0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液で14日間脱灰した後、パラフィンワックスに包埋した。サンプルを矢状面で6 μ mに切断し、サフラニンOとファストグリーンで染色した（参考文献）。組織学的スライスの顕微鏡評価は、オリンパスBX 53顕微鏡（オリンパス、東京、日本）下で実施した。

[0045] 肉眼観察

内側半月板を、脛骨プラトーから注意深く分離した。巨視的画像は、ライカM 205 F顕微鏡（ライカ社、ハイデルベルク、ドイツ）を使用して撮影した後、Fijiを使用して内側半月板の面積の定量化を実施した（Ozeki N. et al., Arthritis Rheum., 65(11):2876-2886, 2013 Nov.）。

[0046] 統計分析

値は平均±標準偏差として表される。2つのグループ間のデータは、ウィルコクソンの符号付き順位検定を使用して比較した。多重比較分析では、分散分析（ANOVA）と事後分析としてのTukey検定を実行した。データの入力と計算は、JMP Proソフトウェアバージョン13（SAS Institute Inc., 米国ノースカロライナ州ケアリー）で実行した。0.05未満のp値は統計的に有意であると見なした。

実施例 1

[0047] マウスの半月板損傷に対するHMGB1（1-44）投与の治療可能性を調べた。生理食塩水（100 μ l）またはHMGB1（1-44）（生理食塩水100 μ l中5 mg/kg）を、半月板部分切除後当日から5日間連続して静脈内投与した。実験手順を図1に示す。

[0048] 組織学的観察結果を図2に示す。生理食塩水投与群では術後1週間で半月

板の欠損部位に線維性瘢痕組織のみが観察され、術後2、4、6週間目ではほとんど変化はなかった。サフラニン-O染色陽性細胞はほとんど存在しなかった。再生された半月板の表面は細線維化または分裂が認められた。対照的に、HMGB1 (1-44) 投与群では、術後2週間目で軟骨様細胞（すなわち、サフラニン-O染色陽性細胞）の再生が有意に誘導された。さらに、サフラニン-O陽性半月板細胞の面積は徐々に大きくなり、再生された半月板の表面はより平滑であった。術後4週間目および6週間目での再生半月板の細胞の形態は、正常な半月板細胞と同様にサフラニン-O染色陽性細胞で囲まれていた。

[0049] 肉眼分析は、生理食塩水投与群では、再生領域が徐々に拡大することが示された。術後6週間目で、ほぼ再生された半月板は、両方の群で正常な半月板と同様のC字型の組織を示した（図3）。しかし、HMGB1 (1-44) 投与群では、術後2週間目と4週間目で、再生面積は生理食塩水群よりも有意に大きかった（図3、図4）。これらの結果は、HMGB1 (1-44) の全身投与が、瘢痕の軽減および自然には発生しない機能的な半月板の治癒を促進することを明確に示している。

実施例 2

[0050] 次に、HMGB1 (1-44) の全身投与により、骨髓由来PDGFR α 陽性幹細胞（P α Lin⁺細胞）が末梢循環を介して半月板切除部分に動員されることを確認するために、生理食塩水またはHMGB1 (1-44) を投与した半月板部分切除マウスの循環細胞のコロニー形成線維芽細胞（CFU-F）アッセイを評価した。半月板部分切除術とHMGB1 (1-44) 投与により、コロニー数が有意に増加した（図5）。

[0051] 次に、野生型（WT）マウスとP α -Cre; RosatdTomatoマウスを用いたパラバイオシスモデルを確立して、損傷部位へのP α Lin⁺細胞の動員の有無を調べた。WTマウス側の膝に半月板部分切除を行い、生理食塩水またはHMGB1 (1-44) をP α -Cre; RosatdTomatoマウス側の尾静脈から投与した（図6）。生理食塩水投与群では

、欠損部位で全身的に動員された P α L i n + 細胞の寄与はほとんどなかった。対照的に、H M G B 1 (1 - 4 4) 投与群では、欠損部位の外側領域と内側領域の両方に P α L i n + 細胞の動員が有意に誘導された (図 7、図 8)。これらの結果から、H M G B 1 (1 - 4 4) の全身投与により、P α L i n + 細胞が損傷した半月板に動員されて、半月板を再生させると考えられた。

産業上の利用可能性

[0052] 本発明は、医薬品、医学研究、薬学研究などの分野において利用可能である。

配列表フリーテキスト

[0053] 配列番号：1 は、ヒト H M G B 1 タンパク質のアミノ酸残基 1 - 4 4 からなるペプチドのアミノ酸配列を示す。

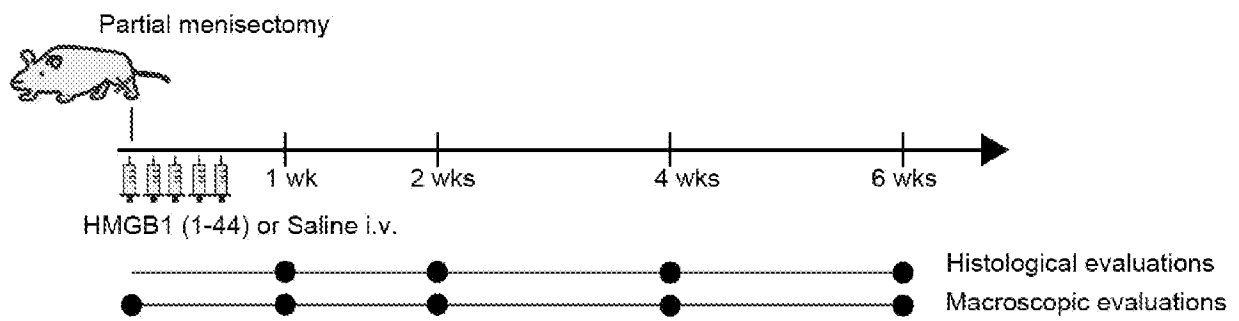
配列番号：2 は、ヒト H M G B 1 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号：3 は、ヒト H M G B 1 タンパク質をコードする核酸の塩基配列を示す。

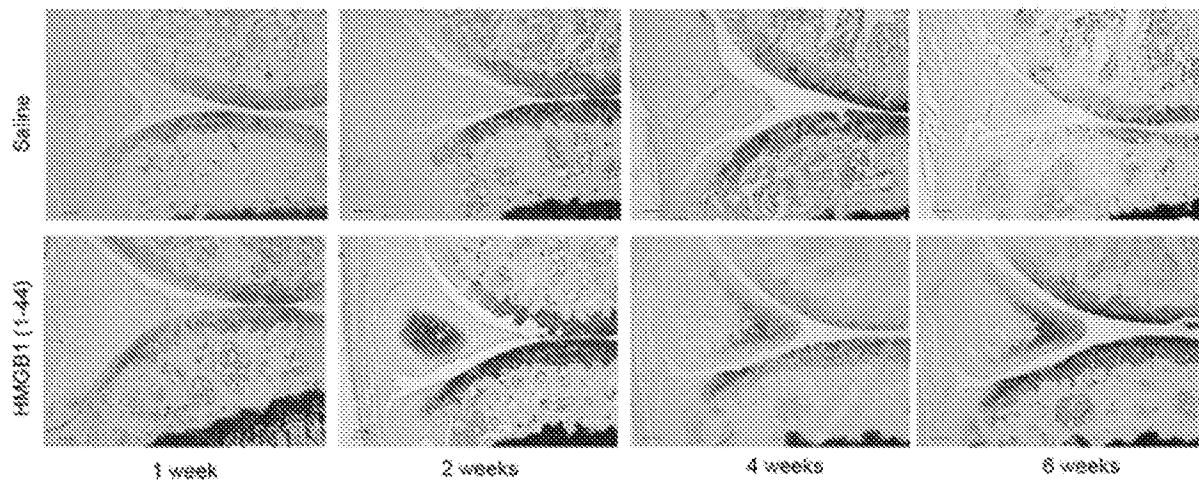
請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）から（c）のいずれかに記載の物質を含む、半月板の `red-white zone` または `white-white zone` を再生するための医薬組成物：
- （a）配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含む H M G B 1 断片ペプチド；
- （b）配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において 1 個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または
- （c）配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。
- [請求項2] 全身投与される請求項 1 記載の医薬組成物。
- [請求項3] 以下の（a）から（c）のいずれかに記載の物質を含む、半月板の切除部位を治療するための医薬組成物：
- （a）配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を含む H M G B 1 断片ペプチド；
- （b）配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において 1 個または複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；または
- （c）配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と約 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。
- [請求項4] 切除部位が `red-white zone` または `white-white zone` である、請求項 3 記載の医薬組成物。
- [請求項5] 全身投与される請求項 3 または 4 記載の医薬組成物。

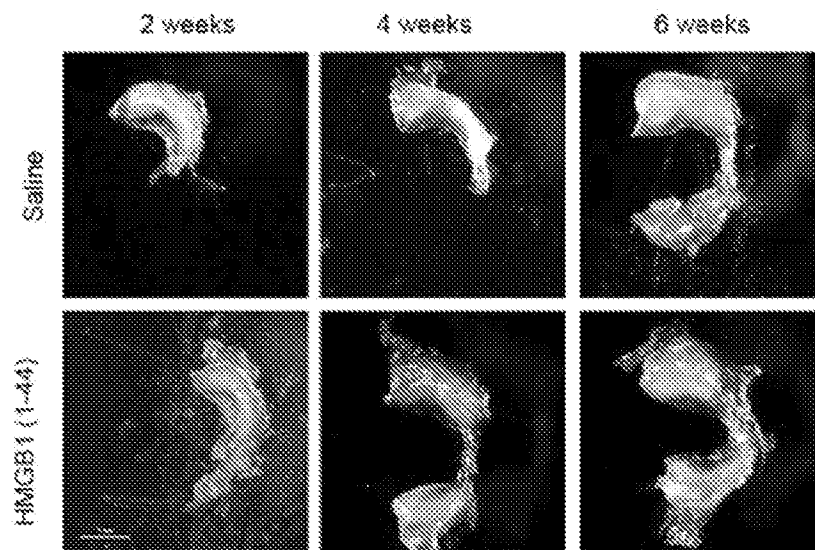
[図1]



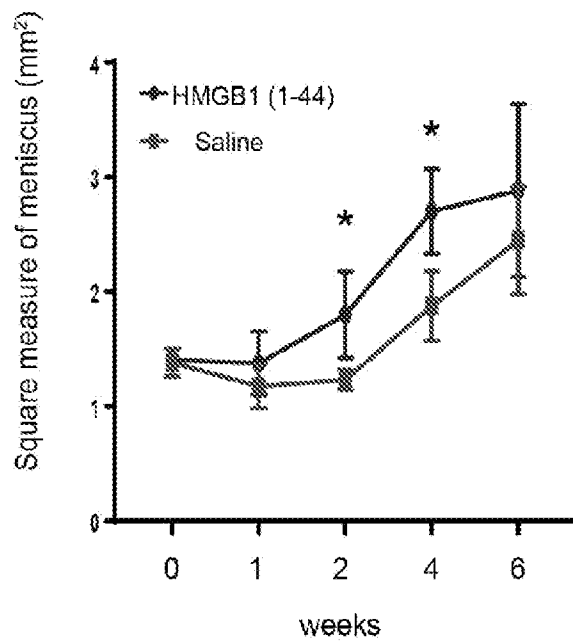
[図2]



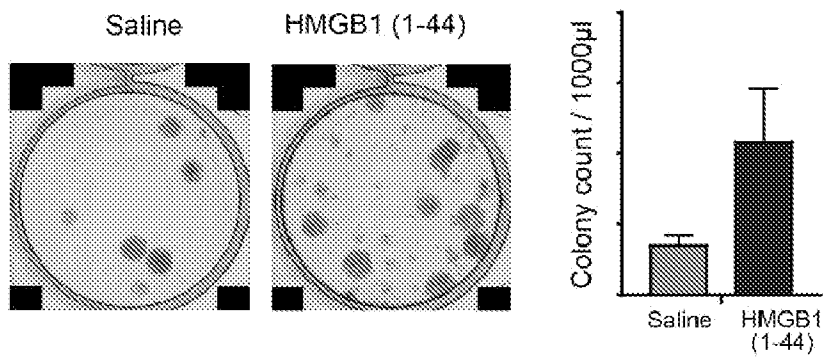
[図3]



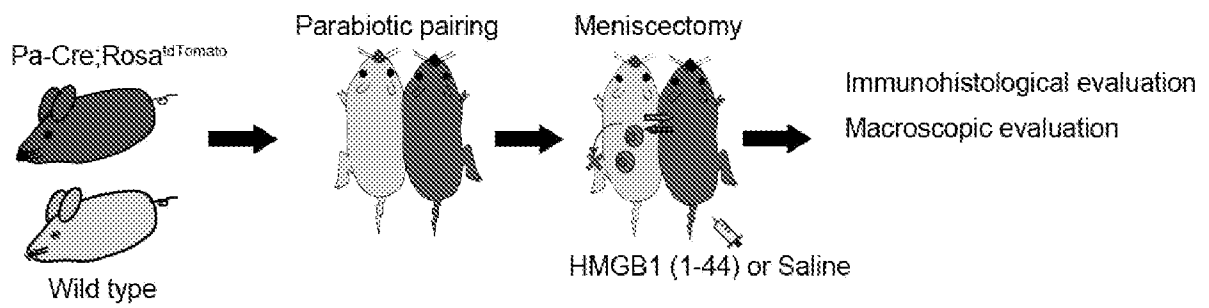
[図4]



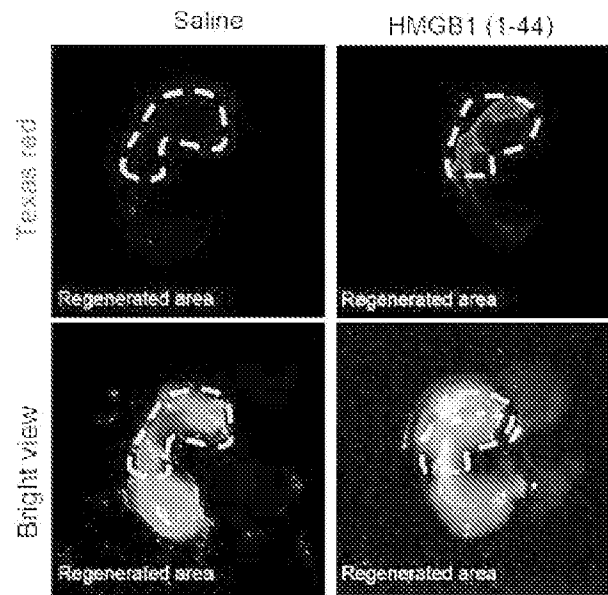
[図5]



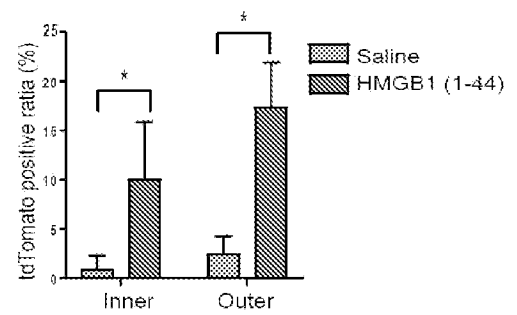
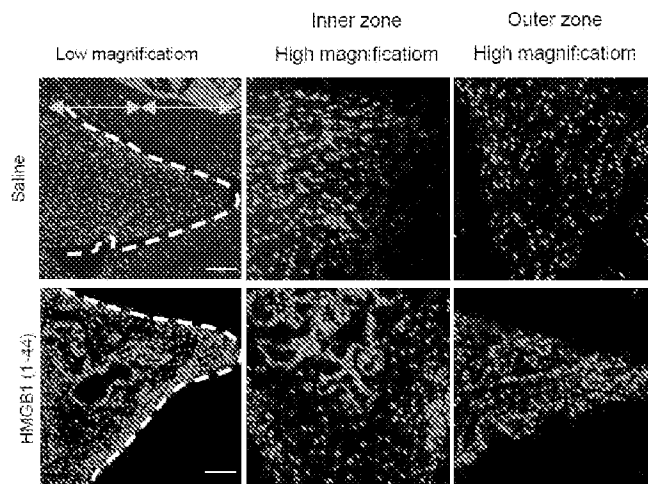
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/024150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A61K 38/16**(2006.01)i; **A61P 19/04**(2006.01)i; **C07K 14/47**(2006.01)i

FI: A61K38/16; A61P19/04; C07K14/47 ZNA

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)

A61K38/16; A61P19/04; C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/085506 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 30 April 2020 (2020-04-30) claim 1, SEQ ID NO: 1, paragraphs [0005], [0010], examples	1-5
Y	JP 6994729 B1 (MEIS TECH CO LTD) 10 February 2022 (2022-02-10) claims 1-2, paragraph [0052], tests 3-4	1-5
Y	XU, H. et al. A novel bio-active microsphere for meniscus regeneration via inducing cell migration and chondrocyte differentiation. Bio-Design and Manufacturing. 2021, vol. 4, pp. 203-221 abstract, p. 213, left column, 2nd paragraph to p. 215, right column, 1st paragraph, p. 216, right column, 1st paragraph, fig. 10	1-5
A	US 2009/0060971 A1 (MCKAY, William F.) 05 March 2009 (2009-03-05) claims 4, 10	1-5
A	WO 2019/156137 A1 (STEMRIM INC.) 15 August 2019 (2019-08-15) claim 1, SEQ ID NO: 1	1-5
A	WO 2014/065347 A1 (GENOMIX CO., LTD.) 01 May 2014 (2014-05-01) claims 1-3, SEQ ID NO: 3	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

05 September 2023

Date of mailing of the international search report

19 September 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/024150

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	石橋恭太ほか, 半月板損傷に対する再生誘導医薬HMG B 1 ペプチドの静脈内投与の治療効果, 日本整形外科学会雑誌, 15 September 2022, vol. 96, no. 8, 1-7-38, p. S1595 entire text, (ISHIBASHI, Kyota et al. The Journal of Japanese Orthopaedic Surgical Society.), non-official translation (The therapeutic effect of intravenous administration of regeneration-inducing HMGB1 peptide drug on meniscal damage)	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/024150

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“In the form of an Annex C/ST.25 text file” above should be understood as “in ST. 26 format”.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/024150

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/085506	A1	30 April 2020	US 2021/0386823 A1 claim 1, SEQ ID NO: 1, paragraphs [0009], [0024], examples EP 3865179 A1 KR 10-2021-0082478 A CN 113423466 A	
JP	6994729	B1	10 February 2022	WO 2022/180661 A1 claims 1-2, paragraph [0052], tests 3-4	
US	2009/0060971	A1	05 March 2009	(Family: none)	
WO	2019/156137	A1	15 August 2019	US 2021/0024594 A1 claim 1, SEQ ID NO: 1 EP 3750553 A1	
WO	2014/065347	A1	01 May 2014	US 2015/0273017 A1 claims 1-3, SEQ ID NO: 3 EP 2913058 A1 CN 104884076 A KR 10-2015-0103660 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 38/16(2006.01)i; A61P 19/04(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i FI: A61K38/16; A61P19/04; C07K14/47 ZNA		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K38/16; A61P19/04; C07K14/47		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2020/085506 A1 (国立大学法人大阪大学) 30.04.2020 (2020-04-30) 請求項1, 配列番号: 1, [0005], [0010] 実施例	1-5
Y	JP 6994729 B1 (株式会社Meis Technology) 10.02.2022 (2022-02-10) 請求項1-2, [0052], 試験3-4	1-5
Y	XU H. et al., A novel bio-active microsphere for meniscus regeneration via inducing cell migration and chondrocyte differentiation, Bio-Design and Manufacturing, 2021, Vol.4, p.203-221 要約, 第213頁左欄第2段落~第215頁右欄第1段落, 第216頁右欄第1段落, Fig. 10	1-5
A	US 2009/0060971 A1 (MCKAY, William F.) 05.03.2009 (2009-03-05) Claims 4,10	1-5
A	WO 2019/156137 A1 (株式会社ステムリム) 15.08.2019 (2019-08-15) 請求項1, 配列番号: 1	1-5
A	WO 2014/065347 A1 (株式会社ジェノミックス) 01.05.2014 (2014-05-01) 請求項1-3, 配列番号: 3	1-5
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.09.2023		国際調査報告の発送日 19.09.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 伊藤 良子 4U 3644 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	石橋恭太ほか, 半月板損傷に対する再生誘導医薬HMG B 1 ペプチドの静脈内投与の 治療効果, 日本整形外科学会雑誌, 2022.09.15, Vol.96, No.8, 1-7-38, p.S1595 全文	1-5

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/024150

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2020/085506	A1	30.04.2020	US 2021/0386823 A1 Claim 1, SEQ ID NO: 1, [0009], [0024], Examples EP 3865179 A1 KR 10-2021-0082478 A CN 113423466 A	
JP	6994729	B1	10.02.2022	WO 2022/180661 A1 請求項 1 - 2, [0052], 試験 3 - 4	
US	2009/0060971	A1	05.03.2009	(ファミリーなし)	
WO	2019/156137	A1	15.08.2019	US 2021/0024594 A1 Claim 1, SEQ ID NO: 1 EP 3750553 A1	
WO	2014/065347	A1	01.05.2014	US 2015/0273017 A1 Claims 1-3, SEQ ID NO: 3 EP 2913058 A1 CN 104884076 A KR 10-2015-0103660 A	