

(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
2013年10月31日(31.10.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/161895 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/062105
- (22) 国際出願日: 2013年4月24日(24.04.2013)
- (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 2012-100444 2012年4月25日(25.04.2012) JP
- (71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 若林 なおみ(WAKABAYASHI, Naomi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町6丁目4番3号 アスピオファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 山木 明(YAMAKI, Akira); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町6丁目4番3号 アスピオファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 杉山 真佐子(SUGIYAMA, Masako); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町6丁目4番3号 アスピオファーマ株式会社内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 石橋 公樹, 外(ISHIBASHI Koki et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内 Tokyo (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシニア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

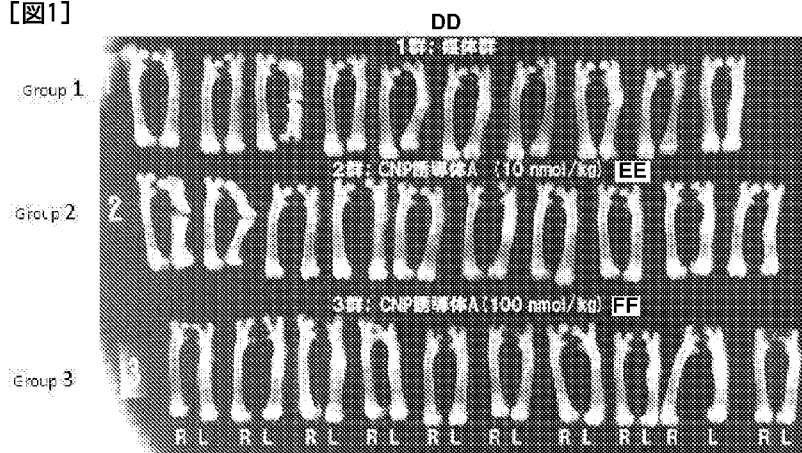
添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: BONE REPAIR PROMOTER

(54) 発明の名称: 骨修復促進剤

[図1]



DD Group 1: medium group
 EE Group 2: CNP derivative A (10 nmol/kg)
 FF Group 3: CNP derivative A (100 nmol/kg)

(57) Abstract: The present invention provides a bone repair promoter containing as an active ingredient at least one type of B-type natriuretic peptide receptor agonist.

(57) 要約: 本発明は、少なくとも一種類のB型ナトリウム利尿ペプチド受容体アゴニストを有効成分として含有する骨修復促進剤、を提供するものである。

WO 2013/161895 A1

- 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 : 骨修復促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）またはCNP誘導体に代表されるナトリウム利尿ペプチド受容体NPR-Bアゴニストを有効成分として含有する骨修復促進剤に関する。

背景技術

[0002] 骨格系とは、骨組織や軟骨組織からなり、筋とともに身体各部の運動を担うほか、頭蓋や脊柱においては、その内部に中枢神経組織や内臓の一部を入れることで外部からの物理的なストレスから保護する役目を担っている。加えて骨格系はカルシウムやリンなどの重要な貯蔵庫であり、骨の内部は血液細胞の産生場として機能している。人の骨格系は約200の骨から形成されており、その形や性質によりいくつかの種類に分類される。長骨または管状骨といわれる骨の中には、上腕骨や大腿骨が含まれ、長い管状の骨幹の両端に膨らんだ骨端があることを特徴としている。表面から見ると長骨は緻密な骨（緻密質）から出来ているように見えるが、その内部は疎な構造物（海綿質）になっていて、骨髓が入っている。骨端の表層は緻密質につづく薄い皮質で、内部は薄い骨質が交差した海綿質からなる。

[0003] 一般的に、長骨に、強い外力等により骨組織が損傷を受けた場合、あるいは、治療上の都合により骨切断処置を施した場合などでも、生体はそれに反応して元の形状と強度を有する骨へと修復するように機能すると考えられている。その際、多くの細胞や液性因子により高度に制御された複雑な生体反応が関わっていると考えられている。

[0004] 現在、骨折の治療は外科的に行われているが、治療期間中、長期間、患部を固定しなければならないなど患者への負担が大きい。不十分な修復による再骨折や異常な骨形成などのリスクもある。重度の損傷や骨粗鬆症・加齢に伴う骨の脆弱化などの背景を伴う症例では、治療がさらに長期化する可能性

が高い。従って、骨修復を促進し、その期間を短縮することや修復後の骨の形状と強度を正常に回復させることが骨修復促進剤には求められる。しかしながら、これらを達成できる薬剤として現在実用に至っているものはない。骨折の治癒過程は、炎症期、修復期、リモデリング期の3段階が少しずつ重なりあいながら進行する（非特許文献1）。まず、骨折の直後（炎症期）には、損傷を受けた軟部組織や骨のかけらや内出血した血液などが免疫細胞によって取り除かれる。免疫細胞の活動と血流量の増加によって、骨折部位の周囲は腫れて圧痛を生じる。患部の血腫形成に伴う炎症反応により未分化間葉系細胞が局所に誘導され、この細胞が次の修復期に重要な役割を果たす骨芽細胞や破骨細胞などの骨形成細胞や軟骨細胞へと分化する。

[0005] 修復期は骨折から数日のうちに始まり、数週間から数カ月を要し、修復された新しい骨（外仮骨）がこの時期に形成される。骨折間隙の血腫が除去され、肉芽組織となり軟仮骨が形成され、これが次第に硬仮骨に置き換わっていく過程（内軟骨性骨化）と骨膜に存在する骨形成細胞により新生骨が形成される過程（骨膜下骨化）が並行して進行する。この仮骨の形成とその後のより強固な構造への置き換えの過程では、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞など多彩な細胞がお互いに活性を制御しあうことが知られている。これらの細胞は、炎症期に損傷部位へと誘導された多分化能を持った未分化間葉系細胞から分化していると考えられる。この未分化間葉系細胞は骨や軟骨の細胞、脂肪細胞、筋細胞及び線維芽細胞などの共通の前駆細胞であると考えられており、それぞれ組織特異的な転写調節因子によって制御されており（非特許文献2）、骨折部位においても、複数の転写調節因子が関与しているものと予想される。

[0006] リモデリング期では、骨が元の正常な状態に修復されるが、それには何カ月間もの長い期間を要する。この過程では、密度の低い外仮骨が少しずつ再吸収されて、正常な骨に置き換わり、最終的に正常な形や強度が回復する。つまり、骨修復は骨癒合をもって完成されるのではなく、骨癒合した後の骨折部形状および骨質復元、すなわち仮骨リモデリングの進行が骨折部の力学

的な回復には重要である。

[0007] 一方で、生体の成長における骨成長の過程においても、骨の形成が行われるが、これは骨修復の過程とは異なった生理現象である。長骨の成長では、骨端部において軟骨組織の形成と骨への置き換わりが繰り返されることで骨が伸長していく。骨幹と骨端の間には成長板軟骨（骨端軟骨）があり、軟骨細胞の分化段階に応じて、関節軟骨面から骨幹部に向って静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞の3層に区分できる。長骨は関節側に存在する前駆細胞から静止軟骨細胞へ分化していく付加成長と、増殖軟骨細胞が増殖しながら成長する間質成長の2つの方式で伸長する。増殖軟骨細胞はある一定の部位で一斉に肥大化して肥大軟骨細胞となり、肥大軟骨細胞周囲の軟骨基質には基質小胞が出現し、この小胞が軟骨の石灰化の起点となる。石灰化した軟骨基質は消化・吸収される。その際、軟骨と骨の境界部では、肥大軟骨細胞を収めた軟骨小腔に血管が侵入するとともに、軟骨を破壊・吸収する破軟骨細胞がその部分に現れて、石灰化した軟骨基質を吸収し、肥大軟骨細胞自身もMMP-3やMMP-13などのマトリックスメタロプロテアーゼを分泌して軟骨基質を分解する。破軟骨細胞の出現にやや遅れて軟骨基質内に骨芽細胞が侵入し、一次骨梁を形成する。このように、血管と破軟骨細胞の軟骨小腔への侵入、石灰化軟骨基質の分解、消失した軟骨基質の間隙への骨芽細胞による骨基質の添加が連続して進行し、骨端において軟骨が増えて、それが骨に置き換わることで長管は伸長する。この骨成長の舞台である成長板は、成熟すると骨化して消失する（非特許文献3）。

[0008] C型ナトリウム利尿ペプチド（C-Type Natriuretic Peptide: CNP）は、軟骨細胞に作用して骨成長において重要な役割を担うペプチドホルモンである（非特許文献4、非特許文献5など）。ナトリウム利尿ペプチドとは、グアニレートサイクレーズを含むナトリウム利尿ペプチド受容体に特異的に結合して、グアニレートサイクレーズを活性化させ、細胞内cGMPレベルを調整することで様々な生理活性を発現する一連のペプチドホルモンの総称である。哺乳類においては主に、心房性ナトリウム利

尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide: ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(Brain Natriuretic Peptide: BNP)及びCNPの3種類が知られている。ANPとBNPはNPR-A(Natriuretic Peptide Receptor-A、別称:GC-A)のアゴニストであり、主に体液量を調整する役割を担っており、既に心不全の治療薬として臨床応用されている。

[0009] CNPは、1990年に最初に脳内より発見され、当初は脳神経ペプチドとして機能していると考えられたが、その後に末梢にも存在することが明らかになった。初期の基礎的な研究では、軟骨組織以外にも、骨芽細胞における発現や骨吸収に対する作用が報告されている(非特許文献6、非特許文献7)。生体におけるCNPの生理的作用としては、これまでの研究により、CNPノックアウトマウスが著しい骨格異常を主体とする成長遅延を呈し、このフェノタイプが、軟骨特異的CNPトランスジェニックマウスと交配させることでレスキューされたこと(非特許文献4)、全身または軟骨特異的CNPのトランスジェニックマウスまたは正常マウスに対するCNP-22の持続静脈内投与により、成長板軟骨の増殖を促進することで骨伸長を促進すること(非特許文献5、非特許文献8)、などが報告されており、骨成長における軟骨形成、特に成長板軟骨において非常に重要な役割を果たすことが確認されている

[0010] CNPトランスジェニックマウスでは、長骨の長軸方向の過成長に伴い体長が長くなる。このマウスでは、成長板の組織化学的解析により、1)増殖軟骨細胞層及び肥大軟骨細胞層の伸長により成長板が厚くなる、2)増殖軟骨細胞層の細胞外マトリクスが増大する、3)成熟した肥大軟骨細胞の大きさが増大することが確認されている。これらの事実に加えて、同マウスの成長板にある肥大軟骨細胞層において、BrdU染色で示される軟骨細胞の増殖には明らかな変化が観察されなかったことから、CNPは成長板の軟骨細胞の分化あるいは増殖に寄与するというよりは、成長板の各分化段階における軟骨細胞の分化形質の発現を促進していると考えられている(非特許文献

8)。

[0011] このような知見から、CNPは発生又は成長過程における軟骨形成不全を改善する効果が期待されており、軟骨無形成症をはじめとした低身長症の治療薬としての臨床応用の可能性が期待されている（非特許文献9）。また、非特許文献10において、CNPによる関節軟骨に含まれる軟骨細胞の分化制御について報告されている。

このように、CNPの骨・軟骨への作用として知られていることは、骨成長における成長板や関節軟骨に関連した軟骨形成の制御に関するものであり、骨成長とは異なる過程を経る骨折や骨切断の治療における骨修復過程に対する作用に関しては未だ報告はない。

[0012] これまでにいくつかの液性因子について、骨修復への応用に関する各種の検討がなされている。例えば、骨形態形成因子(BMP)や塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)など細胞成長因子の局所投与による骨修復促進を目指した研究が盛んに行われているが、bFGFは、仮骨を増大する作用があり、臨床試験において骨折部位局所に直接投与することで治療期間が短縮されることが報告されているが（非特許文献11）、動物実験では、骨密度や力学強度に影響はないことが確認されており、骨癒合を直接的には促進しないと考えられている。また、骨芽細胞を活性化させる作用が知られている甲状腺ホルモン(PTH)の低用量を、全身に間歇的に投与すると、仮骨の骨密度や力学強度を有意に増加させることが報告されているが、PTHには破骨細胞の活性化を誘導する作用が知られており、症状を悪化させる可能性も指摘されている（非特許文献12）。また、骨肉種の発生などの副作用発生の可能性も危惧される（非特許文献13）。このように、骨修復において十分な作用効果を示す骨修復促進薬は実用に至っておらず、新たな薬剤の発見・開発が望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0013] 非特許文献1: Schindeler Aら著、Semin Cell Dev Biol. (2008年)、19巻、5

号、459-466頁

非特許文献2 : Ohishi Mら著、J Cell Biochem. (2010年、109巻、2号、277-282. 頁

非特許文献3 : Emons Jら著、Horm Res Paediatr. (2011年) 、75巻、6号、383-91頁

非特許文献4 : Chusho Hら著、 Proc Nat Acad Sci. (2001年)、98巻、7号、4016-4021頁

非特許文献5 : Yasoda Aら著、Nat Med. (2004年)、10巻、1号、80-86頁

非特許文献6 : Suda Mら著、Biochem Biophys Res Commun. (1996年)、223巻、1号、1-6頁

非特許文献7 : Holiday LSら著、J Biol Chem. (1995年)、270巻、32号、18983-18989頁

非特許文献8 : Kake Tら著、Am J Physiol Endocrinol Metab. (2009年)、297巻、6号、E1339- E1348頁

非特許文献9 : Yasoda Aら著、Endocrinology (2009年)、150巻、7号、3138-3144頁

非特許文献10 : STEPHEN DWら著、Tissue Engineering: Part A (2008年)、14巻、3号、441- 448頁

非特許文献11 : Kawaguchi Hら著、J Bone Miner Res. (2010年)、25巻、12号、2735-2743頁

非特許文献12 : Horwitz MJ,ら著、J Bone Miner Res. (2011年)、26巻、9号、2287-2297頁

非特許文献13 : Vahle JLら著、Toxicol Pathol. (2002年)、30巻、12号、312-321頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、骨折の治癒に代表される骨修復機構に対して促進的に作用する医薬品を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者等は、骨折の治癒過程における骨修復を促進する薬剤について鋭意検討した結果、骨折モデルラットに対して、CNP誘導体の反復皮下投与により、薬剤非投与群よりも早い時点で骨折部位の力学的強度が骨折前の状態にまで回復していたこと等を見出し、これらの知見に基づきさらに研究を重ね、本発明を完成するに至った。

[0016] 本発明は、以下の発明を提供するものである。

(1) 少なくとも一種類のナトリウム利尿ペプチド受容体NPR-Bアゴニストを有効成分として含有する骨修復促進剤、を提供する。

(2) NPR-Bアゴニストが、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、その活性断片、それらの変異体、それらの誘導体又はそれらの修飾体、或いは、抗ナトリウム利尿ペプチド受容体NPR-B抗体である、(1)の骨修復促進剤。

(3) NPR-Bアゴニストが、hCNP-22(配列番号1)、hCNP6-22(配列番号1のアミノ酸番号6乃至22)又はhCNP-53(配列番号2)、それらの変異体、それらの誘導体又はそれらの修飾体であることを特徴とする(1)に記載の骨修復促進剤。

(4) NPR-Bアゴニストが、hCNP-22またはhCNP6-22の誘導体又は修飾体であることを特徴とする(1)に記載の骨修復促進剤。

(5) 誘導体が、免疫グロブリンFc部由来のペプチド、血清アルブミン及びグレリンのC末端側部分ペプチド、から選択される少なくとも一つの付加ペプチドが、hCNP-22またはhCNP6-22のN末端、C末端またはその両方に結合したものであることを特徴とする(2)乃至(4)記載の骨修復促進剤。

(6) 誘導体が、配列番号2のN末端から連続する1個以上30個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、又は、配列番号6至15から選択されるいずれかである(5)記載の骨修復促進剤。

(7) 修飾体が、PEGまたはその類縁物質等の親水性ポリマーが、hC

NP-22、hCNP6-22、またはhCNP-53のN末端、C末端またはその両方に結合したものであることを特徴とする(2)乃至(4)記載の骨修復促進剤。

(8) NPR-Bアゴニストが、配列番号2、配列番号2のアミノ酸番号18乃至53、配列番号13及び配列番号15の何れかのアミノ酸配列からなるペプチドである(1)の骨修復促進剤。

(9) 骨損傷部における骨修復までの期間が短縮されることを特徴とする(1)乃至(8)の何れかに記載の骨修復促進剤。

(10) 骨の修復後の骨強度及び／または骨組織の連続性が非骨折対応箇所と同等のレベルに回復することを特徴とする(1)乃至(8)の何れかに記載の骨修復促進剤。

(11) 骨修復における仮骨の形成段階において投与され、仮骨形成の後期又は完了後には投与を中止されることによって骨修復の促進が達成されることを特徴とする、(1)乃至(8)の何れかに記載の骨修復促進剤。

(12) 骨折の治療のために用いられることを特徴とする(1)乃至(11)の何れかに記載の骨修復促進剤。

[0017] さらに、本発明は、上記(1)乃至(12)の何れかの骨修復促進剤を用いた骨修復の促進方法、当該骨修復促進剤の有効成分として使用されるNPR-Bアゴニスト、又はその使用、即ち以下の発明を提供する。

(13) NPR-Bアゴニストの有効量を、骨修復を必要とする対象に投与することを含む、骨修復を促進する方法。

(14) NPR-Bアゴニストの有効量を、骨折患者に投与することを含む、骨折を治療する方法。

(15) 骨の修復を必要とする対象に対して骨修復を促進するために使用される、NPR-Bアゴニスト。

(16) 骨折患者に対して骨折を治療するために使用される、(15)に記載のNPR-Bアゴニスト。

発明の効果

[0018] 本発明のNPR-Bアゴニストは、骨折の治癒過程の骨修復を促進させることで、骨折治療の期間を短縮させる効果がある。さらに、修復後の骨強度を骨折前と同レベルまで復旧させることにより、治療予後が改善され、再骨折のリスク等も少ない。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、ラット骨折モデルにおける、薬剤投与8週間後の大腿骨の軟X線像である。上段 (Group 1) は対照群、中段 (Group 2) はCNP誘導体A 10 nmol/kg投与群、下段 (Group 3) はCNP誘導体A 100 nmol/kg投与群である。各個体の左右の大腿骨を、RLの順に左から並べて1群につき10匹分を表示した。Rは無処置の右足、Lは骨折術を施した左足の大腿骨である。

[0020] [図2]図2は、ラット閉鎖性大腿骨骨折モデルにおける、骨折処置4週間後の大腿骨の強度を示すグラフである。斜線のバーは、媒体投与群、黒色のバーはCNP誘導体A投与群であり、Rは無処置の右大腿骨、Lは骨折処置を施した左大腿骨である。また縦軸は、骨の剛性 (N × mm/deg)を表す。

[0021] [図3]図3は、図2に示された骨強度の測定値の分布を表すヒストグラムである。3Aは、無処置の右大腿骨、3Bは骨折処置を施した左大腿骨の結果である。斜線のバーは、媒体投与群、黒色のバーはCNP誘導体投与群である。横軸は剛性 (N × mm/deg) のレベル、縦軸は各剛性レベルに帰属する例数を示す。

[0022] [図4]図4は、ラット閉鎖性大腿骨骨折モデルにおける、骨折処置一週間後の、大腿骨の各遺伝子 (4A : sox9遺伝子、4B : 2型コラーゲン遺伝子、4C : 10型コラーゲン遺伝子) の発現レベルを示すグラフである。斜線のバーは媒体投与群、黒色のバーはCNP誘導体A投与群であり、ShamはSham処置をしたラット、骨折は骨折処置をしたラットの、それぞれ左大腿骨の結果を示す。縦軸は、ユビキチンCのmRNAの発現レベルで補正した、各遺伝子のmRNA発現レベルを示す。

[0023] [図5]図5は、ラット閉鎖性大腿骨骨折モデルにおける、各種NPR-Bアゴ

ニストの効果（5 A：血中cGMPレベル、5 B：骨折処置した左大腿骨の骨折部の仮骨径、5 C：骨折処置した大腿骨における10型コラーゲン遺伝子発現量）を示す。全てのグラフにおいて、斜線のバーは媒体投与群、黒色のバーはNPR-Bアゴニスト投与群（左から、CNP誘導体A、hCNP-53、CNP誘導体C、CNP誘導体D）を示す。

[0024] 図5 Aにおいて、縦軸は血中cGMP濃度を示す。図5 Bにおいて、縦軸は仮骨の直径（mm）を示す。図5 Cにおいて、縦軸はユビキチンCのmRNA発現レベルで補正した10型コラーゲン遺伝子のmRNA発現レベルを示す。

発明を実施するための形態

[0025] 本発明において、「ナトリウム利尿ペプチド受容体NPR-Bアゴニスト」とは、B型ナトリウム利尿ペプチド受容体（Natriuretic Peptide Receptor-B、別称：Guanylate Cyclase B（GC-B）、「NPR-B」と表記する場合もある）に結合し、そのグアニレートシクラーゼを活性化する作用（以下、「NPR-Bアゴニスト活性」）を有する物質、を意味し、単に「NPR-Bアゴニスト」と表記される場合もある。代表的なNPR-Bアゴニストとしては、例えば、C型ナトリウム利尿ペプチド（C-Type Natriuretic Peptide：CNP）が挙げられる。本発明のNPR-Bアゴニストは、NPR-Bアゴニスト活性を有する物質であれば特に限定されず、CNP、その活性断片及びそれらの変異体、それらの誘導体並びにそれらの修飾体などを用いることができる。また、CNPとは構造上の共通性を有しないペプチドや低分子化合物であっても、NPR-Bアゴニスト活性を有するものであれば、本発明のアゴニストに包含される。

[0026] 本発明におけるCNPとしては、22個のアミノ酸よりなるヒト由来CNP-22（hCNP-22：GLSKGCFGLK LDRIGSMSGLGC：配列番号1、ブタ及びラット等哺乳類では共通のアミノ酸配列を有する）、ヒト由来CNP-53（hCNP-53、アミノ酸配列：DLRVD

TKSRA AWARLLQEHP NARKYKGANK KGLSKG
CFGL KLDRIGSMMSG LGC : 配列番号2)、ニワトリ由来C
NP-22 (GLSRSCFGVK LDRIGSMMSG LGC : 配列番号
3)、カエル由来CNP-22 (GYSRGCFGVK LDRIGAFSG
LGC : 配列番号4) など、が挙げられる。

[0027] 各種のCNPにおいて、配列中に含まれる2つのC残基間のジスルフィド結合により形成されるリング構造（例えば、hCNP-22では、配列番号1の6位Cと22位Cの間でジスルフィド結合しリング構造を形成）がNPR-B受容体への結合と活性発現に重要と考えられている（Furuya, M. et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), 183, No 3, p.964-969, Silver, MA,, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* (2006), 15, p14-21, Calderone, A. *Minerva Endocrinol.*(2004), 29, p.113-127)。Furuyaらの報告によれば、リング構造のみからなるペプチドであるCNP6-22（配列番号1のアミノ酸番号6乃至22からなるペプチド）やリング構造のN末端とC末端に夫々ANPのリング構造のN末端側、C末端側の配列を付加しても、hCNP-22とほぼ同程度のNPR-Bアゴニスト活性を示すこと、hCNP-22の9位Lと10位Kに変異を有するペプチドでは活性が減弱するが、それ以外の部位（例えば、16位S、17位M）に変異を有するペプチドやANPの10乃至12位のアミノ酸配列を対応するhCNP-22の配列であるL-K-L（配列番号1の9位乃至11位）に置換したペプチドは、hCNP-22とほぼ同程度のNPR-Bアゴニスト活性を示すこと、などが報告されている。これらの知見から、NPR-Bアゴニスト活性に重要なリング構造のアミノ酸配列は、CFGLKLDRIG-Xaa1-Xaa2-SGLGC（ここで、Xaa1は、SまたはA、Xaa2はM、FまたはEを示す：配列番号5）であり、この配列を「リング構造配列」という。

[0028] 本発明において、生物活性を有するペプチド又はタンパク質の「活性断片」とは、当該ペプチド又はタンパク質の生物活性に関連する部位からなり、且つ、当該ペプチド又はタンパク質の有する生物活性の少なくとも一部を保持するもの、を意味する。本発明におけるCNPの活性断片として、配列番号1乃至4の何れかのアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列からなり、且つ、NPR-Bアゴニスト活性を有するペプチドを用いることができる。そのような活性断片としては、上述のリング構造配列（配列番号5のアミノ酸配列）からなるペプチドを挙げることができ、その具体例としては、hCNP6-22、配列番号1、3又は4のアミノ酸配列の1位乃至5位において、1位を含む連続するアミノ酸が一部又は全て欠損したペプチド、配列番号2のアミノ酸配列の1位乃至31位において、1位を含む連続するアミノ酸が一部又は全て欠損したペプチド、などが挙げられるが、これに限定されず、リング構造配列を有し、NPR-Bアゴニスト活性を有するものは、本発明のCNPの活性断片として採用することができる。

[0029] 本発明のNPR-Bアゴニストとしては、上述した活性断片そのものを採用することもでき、また、活性断片のN末端、C末端又はその両方に1乃至複数のアミノ酸が付加したようなペプチド（活性断片の誘導体）であっても、所望のアゴニスト活性を保持する限り、採用することができる。このようなペプチドとしては、hCNP6-22のN末端、C末端及びその両方に、ANPのC末端、及びN末端に由来する配列を付加したペプチド（Furuya, M. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992), 183, No 3, p.964-969)などを挙げることができる。

[0030] 本発明において、生物活性を有するペプチド又はタンパク質の「変異体」とは、当該ペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列の一箇所から数箇所において、一つから数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は、付加（以下、「置換等」という）されたものであって、且つ、当該ペプチド又はタンパク質の有する生物活性の少なくとも一部を保持するもの、を意味する。「数

箇所」とは、通常3箇所、好ましくは2箇所である。「数個」とは、通常10個、好ましくは5個、より好ましくは3個、さらに好ましくは2個である。複数箇所で置換等される場合には、置換、欠失、挿入及び付加の何れか一つであっても良く、二つ以上が組み合わせられていても良い。また、置換等されるアミノ酸は、天然に存在するアミノ酸であってもよく、そのアシル化体等の修飾物であってもよく、人工的に合成されたアミノ酸類似体であってもよい。また、置換等される部位は、元となるペプチド又はタンパク質の活性の一部が保持される限り、どの部位を選択してもよいが、当該元ペプチド又はタンパク質の活性部位又は受容体結合部位、以外の箇所が置換等されたものが好ましい。

[0031] 例えばCNPの変異体としては、NPR-Bアゴニスト活性が保持される限り、所望の部位において置換等されたものが採用できるが、好ましくは、上述したリング構造配列が保持され、それ以外の部位で置換等されたペプチドを挙げることができる。具体的なCNPの変異体としては、NPR-Bアゴニスト活性を有する限り、配列番号1乃至4に記載のアミノ酸配列中の所望の1つから複数の箇所において1から数個のアミノ酸が置換等されていてもよいが、好ましくは、配列番号1乃至4の何れかに記載のアミノ酸配列中の配列番号5に表示されたアミノ酸以外のアミノ酸において1箇所～数箇所の一つ～数個のアミノ酸が置換等されたものであり、より好ましくは配列番号1、3又は4に記載のアミノ酸配列の1乃至5位の何れか1箇所～数箇所の一つから数個のアミノ酸が置換等されたもの、または、配列番号2に記載のアミノ酸配列の1乃至31位の何れか1箇所～数箇所の一つから数個のアミノ酸が置換等されたものである。

[0032] 本発明のNPR-Bアゴニストとしては、上述した変異体そのものを採用することもでき、またそのN末端、C末端又はその両方に1乃至複数のアミノ酸が付加したようなペプチド（変異体の誘導体）であっても、所望のアゴニスト活性を保持する限り、採用することができる。

[0033] CNPの変異体の具体例としては、hCNP-22の17位と18位に変

異を有するペプチドがhCNP-22と同一のNPR-Bアゴニスト活性を有すること、そのような変異体のリング構造部分のN末端とC末端をANP由来の配列におきかえた変異体の誘導体でもhCNP-22の活性の90%程度のNPR-Bアゴニスト活性を示すこと、9位から11位の何れか一箇所に変異を有するペプチドがhCNP-22の50%以上のNPR-Bアゴニスト活性を示すこと、10位と11位の両方に変異を有するペプチドがhCNP-22の40%以上のNPR-Bアゴニスト活性を有することなどが報告されている(Furuya, M. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992), 183, No 3, p.964-969)。また、別の文献では、hCNP-22の各種変異体が、NPR-Bアゴニスト活性を保持することや、その中にはさらに、CNPの分解酵素である中性エンドペプチダーゼ(NEP)による切断への耐性を有することなどが記載されている(WO2009/067639号パンフレット)。

[0034] 本発明において、生物活性を有するペプチド又はタンパク質の「誘導体」とは、当該ペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列を含み、さらに別のペプチド又はタンパク質が付加された融合ペプチドであり、且つ、当該生理活性ペプチド又はタンパク質の有する生物活性の少なくとも一部を保持する融合ペプチドを意味する。このような生物活性(本発明においては、NPR-Bに結合し、そのグアニレートシクラーゼを活性化する作用)の少なくとも一部を有する融合ペプチドを、生理活性ペプチドの誘導体ともいう。本発明の誘導体において、元となる生理活性ペプチド又はタンパク質の、C末端又はN末端の一方に付加ペプチドが融合されていてもよく、C末端及びN末端の両方に付加ペプチドが融合されたものであっても良い。付加されるペプチドとしては、特に限定されないが、そのペプチド自身が生理活性を有さないものが好ましい。また、付加ペプチドは直接結合していてもよく、1から数個のアミノ酸からなるリンカー配列を介して結合していても良い。リンカー配列としては、様々なものが知られているが、G、S等を多く含むものが良く使用される。そのような付加ペプチドとしては、免疫グロブリン(好ましく

は I g G) の F c 部位、血清アルブミン、グレリンの C 末端側部分配列などを挙げる事ができる。本発明の NPR-B アゴニストとして用いられる誘導体としては、CNP (好ましくは hCNP-22 又は hCNP-53) の誘導体、CNP の活性断片 (好ましくは、hCNP6-22) の誘導体などを例示することができ、好ましくは hCNP-22 の誘導体または hCNP6-22 の誘導体である。

[0035] CNP の誘導体の具体例としては、例えば、米国特許公開 US 2010-305031 号公報に開示された各種の CNP 誘導体 (当該米国特許公開公報における配列番号 109、110、124 から 130、157 及び 158) などを挙げる事ができる。ここでは、ANP、CNP、モチリンなどの生理活性ペプチドに、グレリンの C 末端側に由来する部分配列を付加した誘導体において、元ペプチドの生理活性を保持したまま、血中滞留性が改善されたことが報告されている。この報告では、CNP の N 末端又は C 末端の何れか一方及びそれらの両方にグレリンの C 末端に由来する Wk-Xl-Y-Zm-Wn (ここで、W は Lys、Arg 等の塩基性アミノ酸、Y は Asp、Glu 等の酸性アミノ酸、X と Z は同一でも、異なってもよく、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸を除くどのようなアミノ酸であっても良い。K 及び n は互いに独立して、1 又は 2 の整数を示し、l 及び m は、互いに独立して 0、1 又は 2 の自然数を示す。このような配列として、好ましくは、RKESKK、RKDSKK、RKSEKK、RKSDKK 等が挙げられる) を含むペプチドを付加した多様な誘導体のいずれにおいても、NPR-B アゴニスト活性が保持され、その血中半減期が延長された。当該公報の記載は、全て本明細書の記載に含まれるものである。

[0036] また、CNP またはその活性断片の誘導体として、hCNP-22 の C 末端に ANP の C 末端部分が付加したペプチドや、hCNP6-22 の N 末端及び C 末端に ANP の N 末端部分及び C 末端部分が付加したペプチド (CNP 活性断片の誘導体) においても、hCNP-22 と同程度の NPR-B アゴニスト活性が保持されていた (Furuya, M. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992), 183, No

3, p. 964-969)。さらに、別の文献において、hCNP-22及びhCNP-53の各種誘導体が、NPR-Bアゴニスト活性を保持することや、その中の複数の誘導体がさらにNEP分解耐性を有することなどが記載されている(WO2009/067639号パンフレット)。この国際特許公開公報に記載された誘導体の中でも本明細書においてCNP誘導体Dと定義される配列番号15のアミノ酸配列からなる誘導体の軟骨無形成症モデルマウスに対する薬理効果が報告されている(Florence L., et al, Am. J. Hum. Genet. (2012), 91(6), pp1108-1114: 本文: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000292971200537X>: Supplement: : <http://download.cell.com/AJHG/mmc/journals/0002-9297/PIIS000292971200537X.mmc1.pdf>)。

[0037] さらにまた、本発明のCNP-22の誘導体としては、CNP-53のアミノ酸配列(配列番号2)において、N末端から連続する1個以上30個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなるペプチドを挙げることができる。このような誘導体として、好ましくは、hCNP-53(配列番号2)のN末端から連続する10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、、20、21、22、23、24又は25個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなるペプチドであり、より好ましくは、hCNP-53のN末端から連続する17個のアミノ酸が欠失したhCNP-36(配列番号2のアミノ酸番号18~53のアミノ酸配列からなるペプチド、CNP誘導体C)である。)

[0038] これらの様々なCNP誘導体及びCNP活性断片の誘導体は、本発明のNPR-Bアゴニストとして好ましく利用することができる。より好ましくは、配列番号2において、N末端から1個以上30個以下(好ましくは25個以下、さらに好ましくは20個以下)の連続するアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなる誘導体、又は、配列番号6乃至15から選択されるいずれかの誘導体であり、さらに好ましくはCNP誘導体A(配列番号13)、CNP誘導体C(配列番号2のアミノ酸番号18乃至53)、又は、CNP誘導体

D（配列番号15）である。

[0039] 本発明において、生物活性を有するペプチド又はタンパク質の「修飾体」とは、当該ペプチド又はタンパク質に含まれるアミノ酸の1箇所から数箇所が、別の化学物質との化学反応により修飾されたもので、且つ、当該ペプチド又はタンパク質の有する生物活性の少なくとも一部を保持するもの、を意味する。修飾を受ける部位は、元となるペプチド又はタンパク質の活性を保持する限り、いずれの部位を選択してもよい。例えばポリマーのようなある程度大きな化学物質を付加する修飾では、ペプチド又はタンパク質の活性部位、又は、受容体結合部位以外の箇所において修飾されることが好ましい。また、分解酵素による切断を防止するための修飾の場合、当該切断を受ける箇所が修飾されるのが好ましい。

[0040] 例えば、CNPの修飾体は、NPR-Bアゴニスト活性を有する限り、配列番号1乃至4の何れかのアミノ酸配列中の所望の1つから複数の箇所において修飾されていても良いが、好ましくは、配列番号1乃至4の何れかのアミノ酸配列中の配列番号5に表示されたアミノ酸以外のアミノ酸において1箇所から数箇所修飾されたものであり、より好ましくは配列番号1、3又は4のアミノ酸配列の1乃至5位の何れか1箇所～数箇所修飾されたものである。また、NEPによる切断への耐性を付与する修飾の場合は、各種CNPペプチドに含まれる、リング構造において配列番号5の1位Cと2位Fの間で切断されることが知られている為、この結合を修飾することもできる。さらに、上述したCNPの活性断片、変異体及びそれらの誘導体の修飾体も本発明に含まれる。このような各種修飾体もNPR-Bアゴニスト活性を保持する限り、本発明に用いることができる。

[0041] 化学修飾の方法としては、様々な方法が知られているが、例えばポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）など製薬技術において利用される（薬理上用いられる）高分子ポリマーを付加する方法や、K残基等の側鎖のアミノ基にリンカーとなる化合物を付加させ、それを介して別のタンパク質等（例えば血清アルブミン）と結合させる方法などが知

られているが、これらに限定されず、様々な方法を採用することができる。

[0042] このようなCNP、その活性断片、その変異体及びそれらの誘導体の修飾体の具体例としては、例えばWO2009/067639号パンフレットにおいて、hCNP-22及びhCNP-53にPEG等の各種親水性ポリマーを結合させた修飾体や、hCNP-22においてNEPによる切断部位であるCys6-Phe7のペプチド結合が-CH₂-NH-や-C(=O)-N(R)- (Rは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基などの低級アルキル基) などの偽ペプチド結合に置換された修飾体の複数が、NPR-Bアゴニスト活性を保持し、また、その多くがhCNP-22よりも改善された血中滞留性を有することが開示されている。また、様々な生理活性ペプチドの修飾体の製造方法については、例えば、米国特許公開US2009-0175821号などを参考に、適宜作製することができる。

[0043] CNPとNPR-B受容体との結合は、リング構造が重要であるため、特に末端部に別の配列又は物質が結合した誘導体や修飾体は、その付加ペプチドや修飾物がリング構造に影響を与えることが少なく、NPR-B受容体との結合を阻害することなくNPR-Bアゴニスト活性を保持することが十分に期待される。このことは、上述の多くの文献により実証されている。

[0044] 上記のCNP、その活性断片、それらの変異体、それらの誘導体及びそれらの修飾体は、天然の細胞又は組織から採取されたものでもよく、遺伝子工学的、細胞工学的な手法を用いて生産したものであってもよく、化学合成されたものであってもよく、さらにはそれらを酵素処理や化学処理してアミノ酸残基を修飾又はアミノ酸配列の一部を除去したものであってもよい。このような物質は、本明細書の記載、引用文献を参考に、常法に従って適宜製造する事ができる。

[0045] ある物質が、NPR-Bアゴニスト活性を有するか否かについては、当業者であれば従来知られている方法により容易に測定することができる。具体的には、NPR-B (Suga S., et al., Endocrinolo

gy (1992), 130(1), p. 229-239) を強制発現させた培養細胞に物質を添加し、細胞内 cGMP レベルを測定することで可能である。NPR-B アゴニスト活性の一部が保持されるとは、同一の試験系を用いて、NPR-B アゴニスト物質と CNP とを並べて NPR-B アゴニスト活性を測定した場合に、cGMP 上昇活性のピークが、少なくとも CNP が示す cGMP 上昇活性ピークの 10% 以上を保持することを意味するが、好ましくは 30% 以上を保持することであり、より好ましくは 50% 以上を保持することであり、さらに好ましくは 70% 以上を保持することを意味する。また、ピークにおいて活性の上昇が大きくなっても、生体に投与した場合の活性持続時間・血中滞留性において良好な結果を示すものは、本発明に用いることができる。

[0046] また、このような評価系に対して、低分子の化合物を添加し、cGMP 産生能が向上するような化合物であれば、ナトリウム利尿ペプチドと共通する構造を有しないもの（例えば、低分子化合物）であっても、NPR-B アゴニストとして、本発明に用いることができる。

[0047] さらに、NPR-B のリガンド結合部位を含むタンパク質を抗原として用い、動物を免疫して作製された抗体について、上述の方法で NPR-B アゴニスト活性を有するものを選別することは、本技術分野の通常の知識により実施することができる。このようにして作製される、NPR-B アゴニスト活性を有する抗 NPR-B 抗体も、本発明の NPR-B アゴニストとして利用することができる。また、このように使用される抗体は、免疫原動物が産生する抗体、キメラ抗体、CDR 移植抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体など、公知の様々な形態で作製することができる。またそれら抗体に基づき作製された、Fab、scFv などの抗体断片を利用することもできる。

[0048] 本発明の NPR-B アゴニストとして好ましいものは、CNP、そのリング構造配列を有する活性断片、若しくは、そのリング構造配列以外において置換等された変異体、それらの誘導體又は修飾体であり、より好ましくは hCNP-22、hCNP-53、hCNP6-22、それらの誘導體又はそ

これらの修飾体であり、さらにより好ましくは、hCNP-53、CNP誘導体A (CNP (1-22) Ghrelin (12-28, E17D) : 配列番号13)、CNP誘導体B (CNP (1-22) Ghrelin (12-28) : 配列番号8)、CNP誘導体C (配列番号2のアミノ酸番号18乃至53)、CNP誘導体D (配列番号15) 及びそれらの部分ペプチドなどがあげられる。

[0049] 上述したようなNPR-Bアゴニストは、骨修復促進剤の有効成分として用いられる。「骨修復促進剤」とは、骨折、骨切り手術、骨延長手術、骨移植手術などにおいて損傷した骨組織の修復過程を加速あるいは促進する作用を有する薬剤を意味する。これらの作用によって骨組織の修復までの期間を短縮し、あるいは修復後の骨強度を骨折前のレベルまで回復させることにより再骨折のリスクを回避することが可能であり、対象患者の負担を軽減することができる。

[0050] 本発明の医薬組成物が適用される対象は、頭蓋骨等の骨膜下骨化のみにより形成された骨以外の骨において骨組織が損傷を受けた患者であれば特に限定されず、対象となる骨であれば、どの部位における損傷であっても適用することができるが、好ましくは頭部（眼窩骨、頬骨、下顎骨）、体幹部（肋骨、骨盤骨、頸椎、胸椎、腰椎、仙骨、尾骨）、上肢（肩甲骨、鎖骨、上腕骨、肘、橈骨、尺骨、舟状骨、有鉤骨、中手骨、指節骨）、下肢（股関節、大腿骨、脛骨、腓骨、足関節、踵骨、舟状骨、中足骨）、より好ましく大腿骨、上腕骨、肋骨である。また、骨組織の損傷の形態は特に限定されず、例えば、骨切り術や骨延長手術において切断された骨の癒合、骨折（骨の断裂、ひび、粉碎骨折、複雑骨折など）の治療などを挙げることができる。

[0051] 本発明の医薬組成物の有効成分として用い得る物質は、上述したNPR-Bアゴニストの薬学的に許容される塩であってもよい。すなわち、本発明においては、上述したNPR-Bアゴニストの、無機酸、例えば塩酸、硫酸、リン酸、又は有機酸、例えばギ酸、酢酸、酪酸、コハク酸、クエン酸等の酸付加塩を、有効成分として使用することもできる。あるいは、本発明におい

ては、上述した物質の、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩、有機塩基による塩の形態を有効成分として使用することもできる。また、本発明に係る医薬組成物は、その有効成分に係る物質の遊離形としても、又はその薬学上に許容し得る塩であってもよい。

本発明の医薬組成物は、NPR-Bアゴニストまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含み、さらに通常の製剤化の際に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤、希釈剤などを用いて調製される。製剤用の担体や賦形剤としては、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげることができる。

[0052] 経口投与のための固体組成物としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などが用いられる。このような固体組成物においては、少なくともひとつの有効成分が少なくともひとつの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は、常法にしたがって不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤を含んでいてもよい。錠剤又は丸剤は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣や胃溶性又は腸溶性物質のフィルムで被覆してもよいし、2つ以上の層で被覆してもよい。さらに、ゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。

[0053] 経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤などを含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールなどを含んでいてもよい。この組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤などを含んでいてもよい。

[0054] 非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤が含まれる。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、注射用水及び注射用生理食塩液が含まれる。非水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（登録商標）などが含まれる。このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、乳糖）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでいてもよい。これらは、例えば、精密ろ過膜によるろ過滅菌、高圧蒸気滅菌のような加熱滅菌、あるいは、殺菌剤の配合などの通常の滅菌方法によって無菌化することが可能である。注射剤は溶液製剤であっても、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することが出来る。

[0055] 本発明の医薬組成物は、医薬に一般に使用されている投与方法、例えば、経口投与方法、又は、経粘膜投与、静脈内投与、筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法によって投与するのが好ましい。有効成分がNPR-Bアゴニスト抗体である場合には通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

[0056] 有効成分がペプチド性物質の場合、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分であるペプチドをリボゾーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻内、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は坐剤、点鼻スプレー、吸入薬、舌下錠といった形態で個体に投与することができる。

[0057] 本発明に係る医薬組成物の有効成分として用い得る物質の投与量は、疾患の種類、個体（患者）の年齢、体重、症状の程度及び投与経路などによっても異なるが、一般的に1日当りの投与量の上限としては、例えば約100mg/kg以下であり、好ましくは約50mg/kg以下であり、さらに好ま

しくは5 mg/kg以下である。また、一日あたりの投与量の下限としては、例えば約0.005 μg/kg以上であり、好ましくは0.025 μg/kg以上であり、より好ましくは、0.1 μg/kg以上である。

本発明のCNPの投与量は、対象個体の体重、適応疾患、症状などにより異なるが、局所投与では組織レベルで10⁻¹⁵Mから10⁻⁶M程度であり、好ましくは10⁻¹²Mから10⁻⁸M程度である。全身投与では0.01 μg/headから10000 μg/head程度であり、好ましくは1 μg/headから5000 μg/headである。

[0058] 本発明の骨修復促進剤は、骨の修復段階において、少なくとも仮骨形成が十分に進行するまで投与され、その後は投与を中止することによって、十分な骨折修復の促進又は骨折の治療効果が得られる。本発明は、そのような治療方法や当該方法で投与されることを特徴とする骨修復促進剤等を提供する。NPR-Bアゴニストは、骨の修復過程において、少なくとも仮骨の形成を促進することによって、損傷した骨の修復を促進することがわかっている。この過程において、NPR-Bアゴニストは、骨損傷部位における軟骨細胞の肥大化を抑制し、軟骨細胞の増殖段階を維持することで、軟骨細胞数を増加させ、そこから産生される軟骨基質の量が増加することで、仮骨の形成が促進されるものと考えられる。このメカニズムの観点から、本発明のNPR-Bアゴニストは、骨損傷の治療開始から仮骨が十分に形成された時期まで投与されることで十分な骨修復促進効果が達成できるものと考えられ、十分に仮骨が形成された段階では当該薬剤の投与を中止しても良いものと考えられる。骨損傷部位における仮骨の形成時期は、骨損傷の部位、損傷の状態、患者の治癒能力等に依存して変動するが、仮骨の形成状況は患部のX線画像から判断することができるため、定期的に患部のX線画像を観察してモニタリングし、投与の中止時期を判断することが好ましい。

[0059] 本発明の医薬組成物は、他の骨形成促進剤、骨吸収抑制剤または骨折治療剤と併用してもよい。このような併用相手の薬剤としては、例えばビスフォスフォネート製剤、BMP製剤、PTH製剤、bFGF製剤、抗RANKL

抗体製剤などを挙げるができるが、これに限定されるものではない。

また、本発明の治療剤を遺伝子治療に用いる場合にはウイルスベクター、好ましくはレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、更に好ましくはアデノウイルスベクター、又は化学合成リポソーム、ウイルスエンベロープ、若しくはウイルスエンベロープと合成リポソームの複合体等公知の遺伝子治療に適した媒体に、宿主細胞内で機能するようなプロモーター配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター(CMV promoter)等、の下流に、NPR-Bアゴニストペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸を組み込んだものを用いることができる。CNPをコードする遺伝子としては、配列番号1乃至5の何れかのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子を用いればよい。具体的な遺伝子治療の方法については、実験医学、12巻、303頁、1994年に記載の方法又はそれに引用されている文献の方法等を用いればよい。

実施例

[0060] 以下に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

[0061] 実施例1：ラット大腿骨骨折モデル試験

[方法] 6週齢の雌性SD系(Crl:CD) IGSラット左大腿骨の骨幹部に外科的に骨折モデルを作製した。動物にバルビタール系麻酔薬(ソムノペンチル(R), 共立製薬(株))を腹腔内に投与して麻酔を行なった。補助麻酔として、イソフルラン(エスカイン,マイラン製薬(株))吸入麻酔を行った。膝関節上方の皮膚を切開して大腿直筋と外側広筋の間を剥離し、大腿骨を露出した。大腿骨骨幹部の中央部からおよそ0.5mm遠位部で、ボーンカッター(長田機器(株))で骨幹部を横断面で完全に切断した。その後、左大腿骨の大転子と大腿骨頸の間から21Gの注射針を骨髓内に挿入し、筋肉および皮膚を2から3針縫合した。術後の化膿予防として、抗生物質として注射用ペニシリンGカリウム(明治製菓(株))を投与し、皮膚の縫合部位にはポビドンヨード(イソジン(R),明治製菓(株))で消毒した。被験物質としてCNP誘導体A(配列番号13:米国特許公開US2010-305031号

公報の配列番号157、当該公報に記載の方法により製造)を用い、10または100nmol/kgを一日一回8週間の間反復皮下投与した。対照群には媒体を投与した。投与終了翌日に左右の大腿骨および脛骨を摘出した。摘出した骨は骨長、骨折部位のカルスの大きさを測定し、左右大腿骨は軟X線撮影を行い骨折部位の治癒状況を判定した。その後、骨強度測定装置MZ-500S((株)マルトー)及び骨強度検査システムCTRwinVer.1.21((株)システムサプライ)を用いて3点曲げ強度試験を行った。測定終了後の骨は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、病理標本を作製して観察した。投薬は予備動物を加えた1群14匹で実施し、2,4,6週間投与後に1例ずつを経過観察用にサンプリングしたほか、偽関節様の症状を呈した対照群の1例を評価から除外し、最終的に1群10匹として結果を評価した。

[0062] [結果]

図1に大腿骨の軟X線像を示した。CNP誘導体Aの投与により骨折線の残存は減少傾向を示し、皮質骨の連続性は亢進する傾向が観察された。表1に骨強度試験結果を示した。左大腿骨の骨折部位の破断エネルギーはCNP誘導体Aの用量相関的に増加し、左/右大腿骨の比率では媒体投与群の0.45に比し、100nmol/kg投与群で0.90まで回復し、最大荷重(左/右大腿骨の比率)は媒体投与群では0.66と半分程度の回復であったのに対して、10nmol/kg投与群の2群では0.86、100nmol/kg投与群の3群では1.03と用量相関性に増加した。破断力、破断変形についても、被験物質投与群で高い値を示した。

各検体の大腿骨の組織結果を表2に示した。左大腿骨の骨折部位のカルス部分では100nmol/kg投与群で連続性が向上し、軟骨細胞も減少していた。一方、皮質骨領域では10nmol/kg投与群で連続性がやや亢進していた。高用量群では、その他に軟骨の減少、破骨細胞の減少、結合組織の減少を認めた。本試験で、骨折8週間後に採取した個体の組織像では、仮骨形成が終焉していたため、リモデリング(骨緻密期)以降に該当すると考

えられた。この条件において、CNP誘導体Aの100nmol/kg投与群で、対照群と比較して軟骨形成のグレードの低下傾向、および仮骨の骨化のグレードの上昇傾向がみられ、内軟骨性骨化を促進している可能性が示唆された。これらの結果からCNP誘導体Aの投与により、骨切断部分の修復が促進したと考えられた。

[0063] CNP誘導体A 8週間投与終了時での骨強度試験結果

(平均値±標準偏差、N=10)

[0064] [表1]

群	部位	Stiffness ($\Delta 70\%$ -20%)	破断力	破断変形	破断球片 [*]	最大荷重
		[N/mm]	[N]	[mm]	[N, mm]	[N]
1群 媒体群	右大腿骨	180.77 ± 26.12	85.82 ± 9.84	1.04 ± 0.13	57.58 ± 13.78	95.02 ± 8.43
	左大腿骨	122.49 ± 56.80	58.14 ± 20.70	0.80 ± 0.35	25.37 ± 12.41	61.71 ± 22.76
	左/右比	0.70 ± 0.35	0.89 ± 0.26	0.78 ± 0.39	0.45 ± 0.21	0.66 ± 0.29
2群 10 nmol/kg	右大腿骨	187.11 ± 32.84	89.22 ± 6.58	0.99 ± 0.15	59.55 ± 12.33	95.08 ± 5.29
	左大腿骨	138.36 ± 89.14	72.05 ± 30.40	1.15 ± 0.58	45.91 ± 26.15	81.98 ± 34.64
	左/右比	0.75 ± 0.48	0.80 ± 0.33	1.15 ± 0.57	0.75 ± 0.33	0.86 ± 0.35
3群 100 nmol/kg	右大腿骨	200.84 ± 43.22	77.75 ± 10.46	1.01 ± 0.17	60.82 ± 13.73	86.89 ± 10.96
	左大腿骨	162.09 ± 105.67	80.02 ± 15.97	1.04 ± 0.45	53.90 ± 24.24	87.59 ± 19.00
	左/右比	0.85 ± 0.64	1.06 ± 0.33	1.02 ± 0.38	0.90 ± 0.36	1.03 ± 0.28

[0065] CNP誘導体A 8週間投与終了時での大腿骨骨折部位の組織観察結果 (平均値±標準偏差、N=10)

[0066] [表2]

群	検体数	左大腿骨							
		カルス			皮質骨・骨髄領域				
		量	連続性	軟骨	連続性	海綿骨	軟骨	破骨細胞	結合組織
1群 媒体群	10	2.3 ± 1.3	2.6 ± 2.3	1.5 ± 2.2	2.6 ± 2.3	3.0 ± 1.9	1.6 ± 2.4	0.7 ± 1.3	0.7 ± 1.6
2群 10 nmol/kg	10	2.1 ± 1.0	3.2 ± 2.1	1.5 ± 2.0	3.1 ± 2.1	2.9 ± 1.7	0.9 ± 1.7	0.6 ± 1.1	0.7 ± 1.6
3群 100 nmol/kg	10	2.3 ± 1.2	3.7 ± 1.1	0.4 ± 0.7	2.7 ± 1.8	3.0 ± 1.1	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

グレード: 0 認めない, 1 ごく僅か, 2 少ない, 3 普通 やや多い, 4 多い, 5 非常に多い

[0067] 実施例2: ラット閉鎖性大腿骨骨折モデルにおけるCNP誘導体Aの骨折治癒促進作用の検討

[方法]

10週齢雄性Wistarラット（日本チャールズ・リバー株式会社）をイソフルラン吸入（導入5%、維持2%）により麻酔し、仰臥位に保定した。バリカンで左膝周辺部の毛を剃り、ヒビテンで消毒した。左膝の皮膚を膝蓋骨上部で約2cm切開した。関節包を膝蓋骨の外側端に沿って約5mm切開した後、膝蓋骨を滑車溝から内側に脱臼せしめた。滑車溝の中央部に22G注射針を髓腔内まで挿入し、引き抜いた。その穴に、予め3.2mm荷きり断した直径1mmのキルシュナー鋼線（瑞穂医科工業株式会社）を、大腿骨の髓腔内に完全に挿入した。関節包と皮膚の切開部を、ナイロン縫合糸（アルフレッサファーマ）で縫合した。アインホーン型の骨折作製装置（特注品）に左後肢を固定し、所定の位置から錘を落下して大腿骨に力学的負荷を加えることで骨折を作製した。動物用CT（Lct-200、日立アロカメディカル株式会社）を用いて、後肢のX線画像を撮影し、大腿骨の中央付近で横骨折が出来ていることを確認した。感染予防のため、注射用ペニシリンGカリウム（Meiji Seika ファルマ）を筋肉内に投与した。CNP誘導体Aを0.42mg/kg/日の用量で、手術1日後から7日間、1日1回皮下に投与した。対照群には媒体を投与した。骨折作製から4週間後に、動物にイソフルラン吸入麻酔を行い、仰臥位に保定して、放血させ、安楽死せしめた。左右の大腿骨を摘出して生理食塩液に浸し、冷凍庫で凍結保存した。後日融解し、骨強度計（MZ-500S、株式会社マルトー）を用いてねじり試験を実施し、大腿骨の強度を測定した。各群12例で実施した。

[0068] [結果]

図2に、大腿骨の強度を測定した結果を記した。骨折作製から4週間後において、媒体投与群では無処置の右大腿骨と比べて、骨折させた左大腿骨の骨強度は有意に低く、まだ骨折が治癒していないと考えられた。一方で、CNP誘導体Aを投与した群では、無処置の右大腿骨の強度と骨折を作製した左大腿骨の強度がほぼ等しかったことから、骨折が治癒したと考えられた。

図3に、骨強度の測定値の分布をヒストグラムで表した。無処置の右大腿骨

において、測定値の9割以上が $3 \text{ N} \times \text{mm} / \text{deg}$ 以上の値を示したため、これを治癒判断の基準値とした。骨折を作製した左大腿骨において、その値以上の値を示した骨が摘出された個体数は、媒体投与群では12個体中4個体(33%)であり、CNP誘導体A投与群では、12個体中10個体(83%)であり、CNP誘導体Aは骨折の治癒率を著しく向上した。閉鎖性大腿骨骨折モデルにおいて、CNP誘導体Aを骨折後1週間投与することによって、骨折治癒が促進されることを見出した。

[0069] 実施例3：ラット閉鎖性大腿骨骨折モデルにおける、CNP誘導体Aの軟骨関連マーカー遺伝子発現への影響

[方法]

実施例2の方法に従って、ラット閉鎖性骨折モデルを作製した。Sham群の動物は、大腿骨へピンを挿入するのみとし、骨折は作製しなかった。CNP誘導体Aの投与液を0.5 mg/kg/日相当の投与量になる様に調製し、浸透圧ポンプ(model 2001, Alzet)に充填し、動物の頸背部の皮下に埋め込み、1週間持続皮下投与した。対照群には媒体を持続皮下投与した。骨折作製の7日後に、動物をイソフルラン吸入麻酔し、仰臥位に保定して開腹し、放血により安楽死せしめた。左大腿骨を摘出し、RNAlater(Life Technologies Corporation)に浸した。1日以上RNAlater中で冷蔵保存した大腿骨から骨幹部あるいは仮骨部の一部を切り出し、QIAzol(QIAGEN)を添加して、タングステンビーズで破碎した。RNeasy Mini Kit(QIAGEN)により、total RNAを抽出し、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit(Life Technologies Corporation)で1st strand cDNA合成を行った。TaqMan Gene Expression Master Mix(Life Technologies Corporation)により、real-time PCR法で遺伝子発現レベルを測定した。測定値は、ubiquitin-Cの遺伝子発現レベルで標準化した。各群12例で実施した。

[0070] [結果]

図4に、閉鎖性骨折ラットへCNP誘導体Aを7日間投与したときの、仮骨における軟骨関連マーカーの遺伝子発現レベルを示した。Sox9は、未分化間葉系細胞が軟骨細胞へ分化するのに必要な転写因子であるが、骨折を作製すると遺伝子発現量が3.7倍に上昇し、CNP誘導体Aを投与しても高い値が維持された。また、分化した軟骨細胞が特異的に産生する2型コラーゲンの遺伝子発現は、sham群の骨折していない骨ではほとんどが見られなかったが、骨折を作製すると顕著に亢進し、CNP誘導体Aを投与しても高い値が認められた。さらに分化が進むと軟骨細胞は肥大化し、続いて骨化が生じる。肥大軟骨細胞が特異的に産生する10型コラーゲンの遺伝子発現は、Sham群の骨折していない骨ではほとんど見られなかったが、骨折を作製すると顕著に亢進し、CNP誘導体Aを投与すると有意に抑制された。すなわちCNP誘導体Aは、その投与により、軟骨細胞のマーカーである2型コラーゲン遺伝子の骨折部位における発現亢進を抑制せずに、肥大軟骨細胞のマーカーである10型コラーゲン遺伝子の骨折部位での発現亢進を抑制したことから、軟骨細胞の肥大化を抑制することで、軟骨の初期分化や増殖を維持していることが示唆され、それによって仮骨を増加させると考えられた。

[0071] 実施例4：ラット閉鎖性大腿骨骨折モデルにおける、NPR-Bアゴニストの仮骨形成促進作用の検討

[方法]

実施例2の方法に従って、ラット閉鎖性骨折モデルを作製した。様々なNPR-Bアゴニスト（CNP誘導体A、hCNP-53（配列番号2）、CNP誘導体C（CNP-36、配列番号2のアミノ酸番号18～53）、CNP誘導体D（Pro-Gly-CNP37、配列番号15））を用いて、0.5 mg/kg/日相当の投与量になる様に投与液を調製し、浸透圧ポンプ（Model 2001, Alzet）に充填した。伏臥位に保定した動物の頸背部の皮下に、浸透圧ポンプを埋め込み、1週間持続皮下投与した。対照群には媒体を投与した。骨折作製の7日後に、動物をイソフルラン吸入麻酔

し、仰臥位に保定して開腹し、腹部大動脈から採血した。血液にEDTA Naを添加した後、遠心し、血漿を分離し、凍結保存した。後日、血漿中のcGMP濃度をキット（YSI-7702、ヤマサ醤油）を用いてRIA法で測定した。採血後の動物は、放血により安楽死させた後、左大腿骨を摘出し、仮骨の矢状面と冠状面の最大径をそれぞれ測定し、平均値を仮骨径とした。実施例3の方法に従って、仮骨部の10型コラーゲン遺伝子発現レベルを測定した。各群12例で実施した。

[0072] [結果]

図5に、被験物質を7日間投与した後に臓器採取した時の血中cGMP濃度（5A）、仮骨径（5B）、仮骨における10型コラーゲンの遺伝子発現レベル（5C）を示した。各種NPR-Bアゴニストの投与によって血中cGMP濃度の上昇程度にはばらつきは見られたものの、媒体群と比べてすべての群で有意に濃度濃度は高値であった。NPR-Bアゴニストが生体内で受容体に作用し、血中cGMPが上昇したと考えられた。

骨折を作製し左大腿骨に生じた仮骨の最大径は、媒体群と比べてCNP誘導体A、hCNP-53、CNP誘導体C、CNP誘導体D群では有意に仮骨の径が大きかった。これにより、NPR-Bアゴニストは骨折後の仮骨形成を促進する作用を有することが示された。さらに、図5Cに示されるように仮骨における10型コラーゲンの遺伝子発現量は、媒体群と比べてCNP誘導体C及びCNP誘導体D群では有意に抑制され、CNP誘導体A及びhCNP-53群では抑制される傾向が見られた。

[0073] 10型コラーゲン遺伝子は、肥大軟骨細胞のマーカーとして知られており、実施例3において、CNP誘導体Aが骨折部位における軟骨細胞の肥大化を抑制していることが示されている。5Cで示された結果は、CNP誘導体Aのみならず、様々なNPR-Bアゴニストが肥大軟骨の生成を抑制する作用を有することが示された。そして、このことから、図5Bに示されたNPR-Bアゴニストの仮骨形成促進作用は、軟骨の最終的な分化を抑制し、分裂期を維持することで生じると考えられた。

以上の結果から、N P R - B アゴニストは、骨折後の仮骨形成を促進することにより、骨折治癒を促進する作用を有することが示された。さらに、実施例 2 の結果を合わせて考えると、骨折治癒の初期の仮骨形成が十分に進行するまで N P R - B アゴニストを投与することにより、仮骨形成を促進し、十分に仮骨が形成された段階で投与を中止しても、十分な骨折治癒（または骨修復）の促進効果が得られるものと考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] 少なくとも一種類のナトリウム利尿ペプチド受容体NPR-Bアゴニストを有効成分として含有する骨修復促進剤。
- [請求項2] NPR-Bアゴニストが、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、その活性断片、それらの変異体、それらの誘導体又はそれらの修飾体、或いは、抗ナトリウム利尿ペプチド受容体NPR-B抗体である、請求項1の骨修復促進剤。
- [請求項3] NPR-Bアゴニストが、hCNP-22(配列番号1)、hCNP6-22(配列番号1のアミノ酸番号6乃至22)又はhCNP-53(配列番号2)、それらの変異体、それらの誘導体又はそれらの修飾体であることを特徴とする請求項1記載の骨修復促進剤。
- [請求項4] NPR-Bアゴニストが、hCNP-22またはhCNP6-22の誘導体又は修飾体であることを特徴とする請求項1記載の骨修復促進剤。
- [請求項5] 誘導体が、免疫グロブリンFc部由来のペプチド、血清アルブミン及びグレリンのC末端側部分ペプチド、から選択される少なくとも一つの付加ペプチドが、hCNP-22またはhCNP6-22のN末端、C末端またはその両方に結合したものであることを特徴とする請求項2乃至4のいずれか一つに記載の骨修復促進剤。
- [請求項6] 誘導体が、配列番号2のN末端から連続する1個以上30個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、又は、配列番号6乃至15から選択されるいずれかのアミノ酸配列からなるものであることを特徴とする請求項5記載の骨修復促進剤。

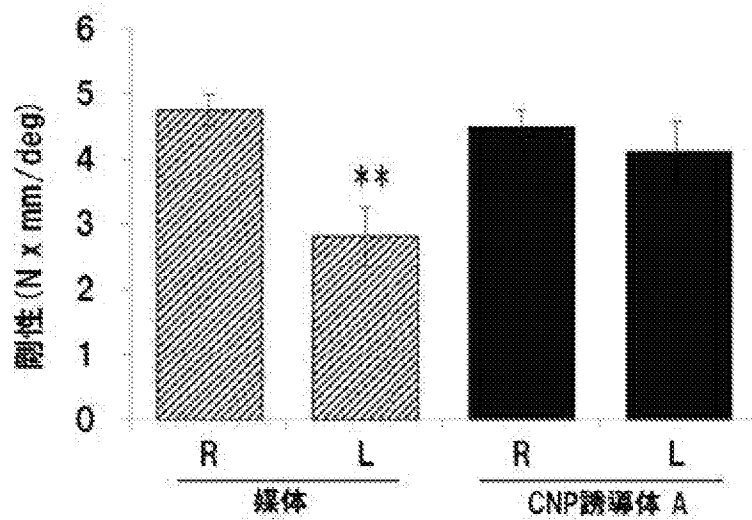
- [請求項7] 修飾体が、PEGまたはその類縁物質親水性ポリマーが、hCNP-22、hCNP6-22、またはhCNP-53のN末端、C末端またはその両方に結合したものであることを特徴とする請求項2乃至4のいずれか一つに記載の骨修復促進剤。
- [請求項8] NPR-Bアゴニストが、配列番号2、配列番号2のアミノ酸番号18乃至53、配列番号13及び配列番号15の何れかのアミノ酸配列からなるペプチドである請求項1の骨修復促進剤。
- [請求項9] 骨損傷部における骨組織の修復までの期間が短縮されることを特徴とする請求項1乃至8の何れかに記載の骨修復促進剤。
- [請求項10] 骨の修復後の骨強度及び／または骨組織の連続性が非骨折対応箇所と同等のレベルに回復することを特徴とする請求項1乃至8の何れかに記載の骨修復促進剤。
- [請求項11] 骨修復における仮骨の形成段階において投与され、仮骨形成の後期又は完了後には投与を中止されることによって骨修復の促進が達成されることを特徴とする、請求項1乃至8の何れかに記載の骨修復促進剤。
- [請求項12] 骨折の治療のために用いられることを特徴とする請求項1乃至11の何れかに記載の骨修復促進剤。
- [請求項13] NPR-Bアゴニストの有効量を、骨修復を必要とする対象に投与することを含み、骨修復を促進する方法。

- [請求項14] NPR-Bアゴニストの有効量を、骨折患者に投与することを含む、骨折を治療する方法。
- [請求項15] 骨の修復を必要とする対象に対して骨修復を促進するために使用される、NPR-Bアゴニスト。
- [請求項16] 骨折患者に対して骨折を治療するために使用される、請求項15に記載のNPR-Bアゴニスト。

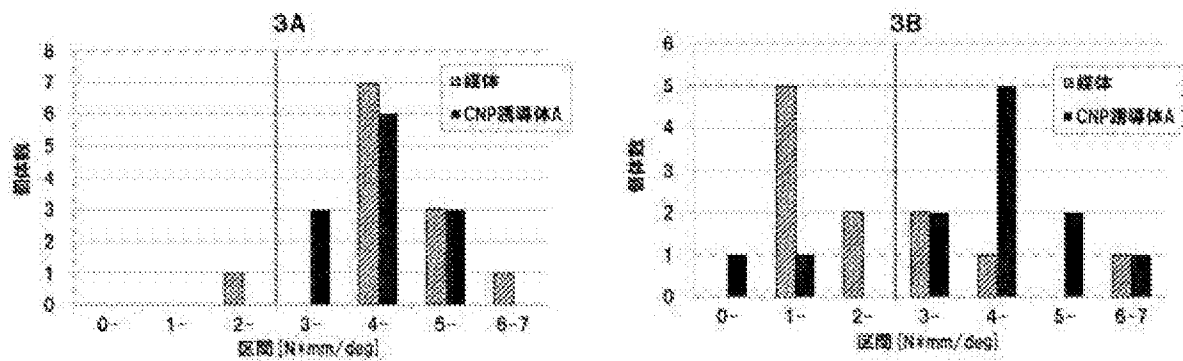
[図1]



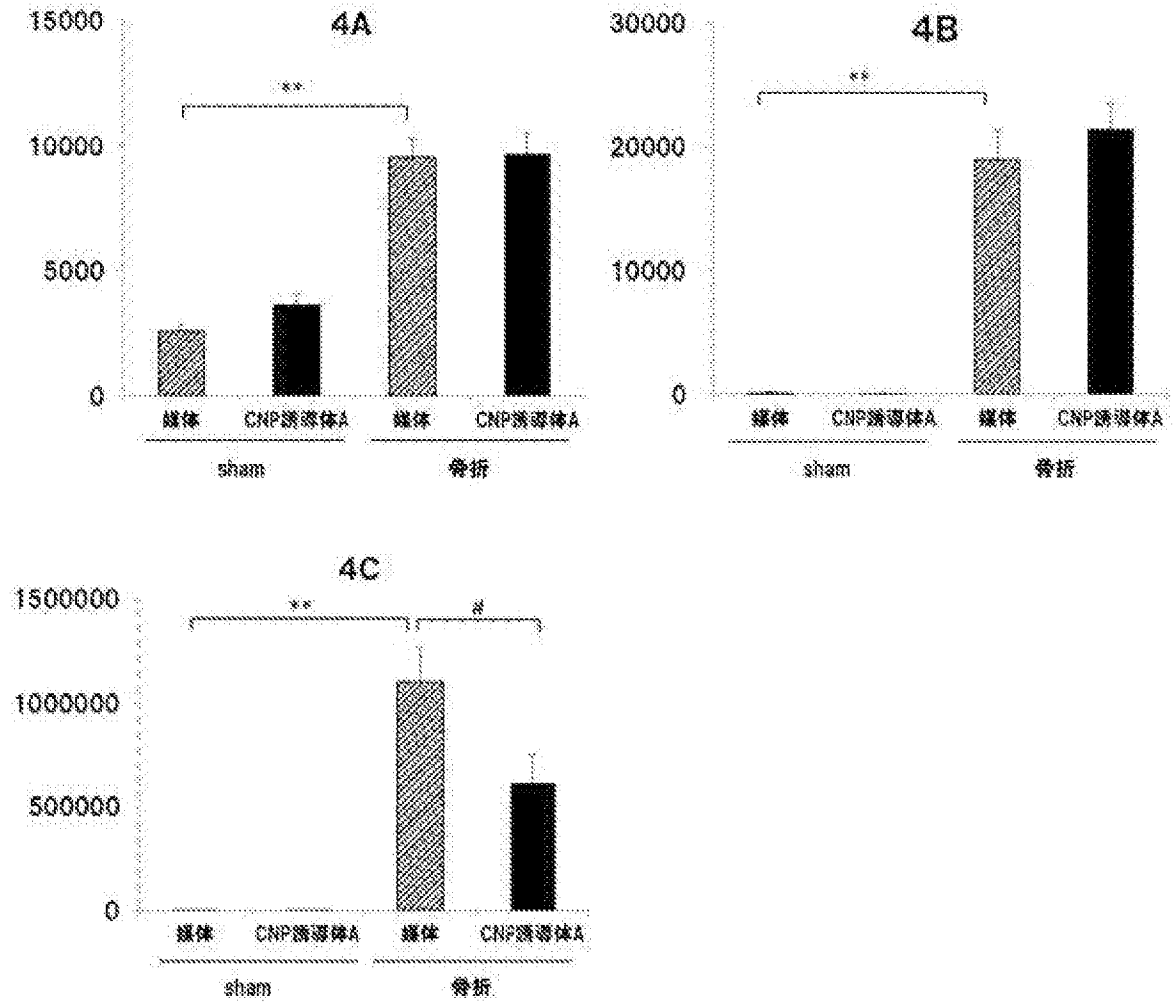
[図2]



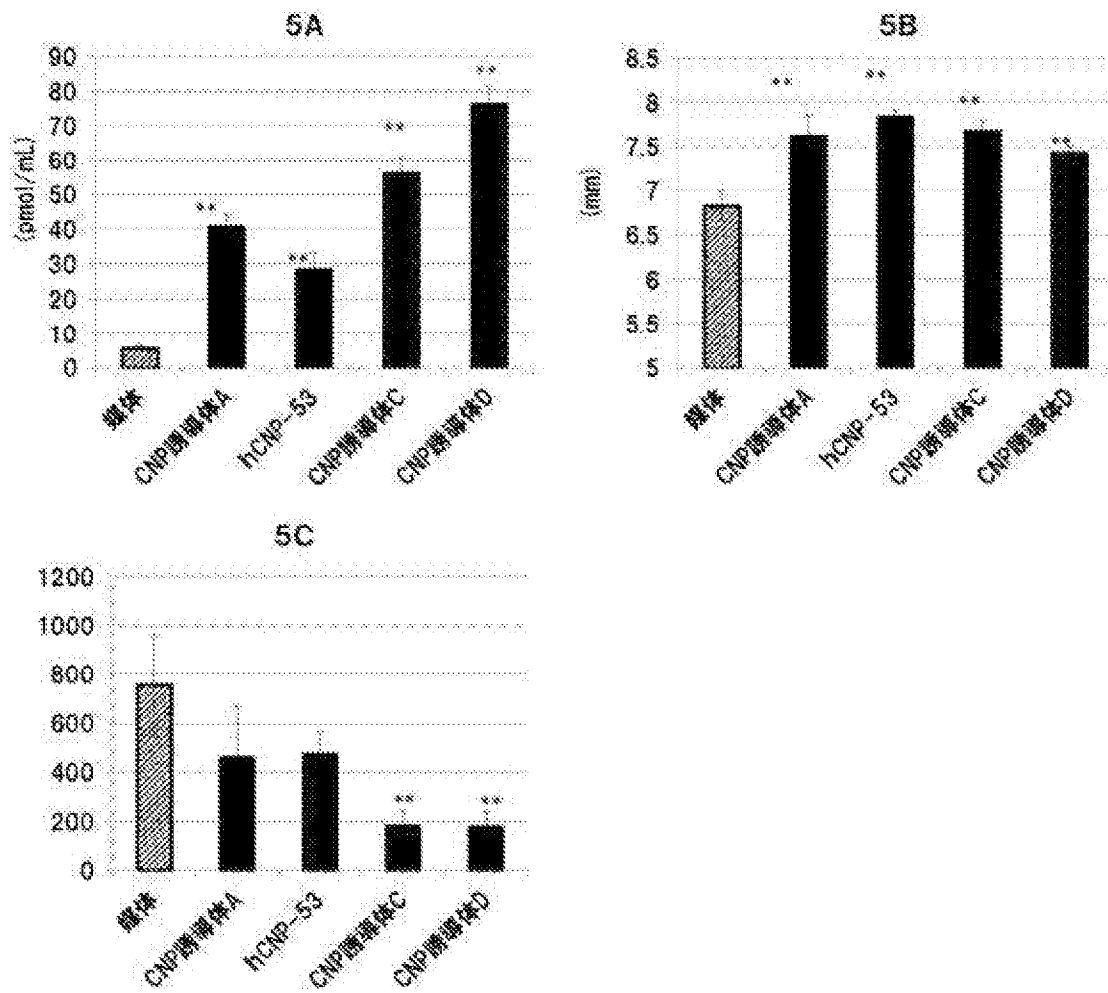
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i

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)

A61K45/00, A61K38/00, A61K39/395, A61K47/34, A61K47/48, A61P19/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Kazumasa NAKAO et al., "Nai Nankotsusei Kotsuka ni Okeru CNP/GC-B-kei no Seirigaku-teki Igi -Nankotsu Tokuiteki Knockout Mouse no Kaiseki-", Folia endocrinologica Japonica, 01 April 2012 (01.04.2012), vol.88, no.1, page 239, column 'Y3-1', entire text	15,16 1-12
X Y	Masashi MUKOYAMA et al., "Natrium Rinyo Peptide-kei no Seikatsu Shukanbyo Kanren Jin Oyobi Kotsu Shikkan ni Okeru Byotai Seiriteki Igi to sono Tansakuteki Rinsho Oyo", Heisei 19 Nendo Josei Kenkyu Hokokusho II, 2009.03, pages 187 to 197, entire text, particularly, summary, page 193, left column '3.4', page 194, right column, line 18 to page 195, right column, line 2	15,16 1-12

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
11 June, 2013 (11.06.13)

Date of mailing of the international search report
25 June, 2013 (25.06.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062105

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	A.Yasoda et al.: "Systemic Administration of C-type Natriuretic Peptide as a Novel Therapeutic Strategy for Skeletal Dysplasias" Endocrinology, 2009.07, vol.150, no.7, pp.3138-3144, entire text, particularly, abstract, page 3138, right column, lines 4 to 16, page 3141, left column, line 3 to page 3142, left column, line 6	15,16 1-12
Y	Hideyuki TANABE et al., "Kotsu Keisei to Kotsu Shufuku", Regenerative Medicine, 2006, vol.5, no.4, pages 34 to 40, entire text, particularly, page 37, left column, line 2 to middle column, line 5, page 37, right column, line 30 to page 38, left column, line 8, page 38, middle column, lines 2 to 21	1-12
X Y	US 2010/0305031 A1 (Naomi Wakabayashi), 02 December 2010 (02.12.2010), entire text; particularly, abstract; paragraphs [0027] to [0029], [0395]; sequence listing & EP 2277890 A1 & WO 2009/142307 A1	15,16 5,6,9-12
X Y	JP 2011-504506 A1 (BioMarin Pharmaceutical Inc.), 10 February 2011 (10.02.2011), entire text; particularly, claims; paragraphs [0006], [0010], [0016] & US 2010/0331256 A1 & EP 2217620 A & WO 2009/067639 A2	15,16 7,9-12
P,X	Eri KONDO et al., "Mouse Kossetsu Chiyu ni Okeru C-gata Natrium Rinyo Peptide (CNP) no Yakuwari", Dai 26 Kai The Japanese Society of Cartilage Metabolism Program Shorokushu, 01 March 2013 (01.03.2013), page 104, entire text	1-12,15,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062105

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13, 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 1 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/34(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i

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))
 Int.Cl. A61K45/00, A61K38/00, A61K39/395, A61K47/34, A61K47/48, A61P19/00

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 1971-2013年
 日本国実用新案登録公報 1996-2013年
 日本国登録実用新案公報 1994-2013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)
 CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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
X	中尾一祐ら： 「内軟骨性骨化におけるCNP/GC-B系の生理学的意義－軟骨特異的ノックアウトマウスの解析－」 日本内分泌学会雑誌，2012.04.01，vol.88，no.1，p.239， 「Y3-1」欄全文	15, 16
Y		1-12

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。

<p>* 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</p>	<p>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矛盾するものではなく、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</p>
---	---

国際調査を完了した日 11.06.2013	国際調査報告の発送日 25.06.2013
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小堀 麻子	4C	5277
	電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

C (続き) . 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
X Y	向山政志ら： 「ナトリウム利尿ペプチド系の生活習慣病関連腎および骨疾患における病態生理的意義とその探索的臨床応用」 平成 19 年度助成研究報告書 II, 2009.03, pp.187-197 全文、特に、概要、第 193 頁左「3.4」欄、第 194 頁右欄第 18 行－ 第 195 頁右欄第 2 行	15, 16 1-12
X Y	A.Yasoda et al. : “Systemic Administration of C-type Natriuretic Peptide as a Novel Therapeutic Strategy for Skeletal Dysplasias” Endocrinology, 2009.07, vol.150, no.7, pp.3138-3144 全文、特に、要旨、第 3138 頁右欄第 4-16 行、第 3141 頁左欄第 3 行－第 3142 頁左欄第 6 行	15, 16 1-12
Y	田辺英幸ら： 「骨形成と骨修復」 再生医療, 2006, vol.5, no.4, pp.34-40 全文、特に、第 37 頁左欄第 2 行－中欄第 5 行、第 37 頁右欄第 30 行 －第 38 頁左欄第 8 行、第 38 頁中欄第 2-21 行	1-12
X Y	US 2010/0305031 A1 (Naomi Wakabayashi) 2010.12.02 全文、特に、要約、段落 [0027] - [0029]、[0395]、 配列表 & EP 2277890 A1 & WO 2009/142307 A1	15, 16 5, 6, 9-12
X Y	JP 2011-504506 A1 (バイオマリン ファーマシューティカル イン コーポレイテッド) 2011.02.10 全文、特に、特許請求の範囲、段落 [0006]、[0010]、[0 016] & US 2010/0331256 A1 & EP 2217620 A & WO 2009/067639 A2	15, 16 7, 9-12
P, X	近藤絵里ら： 「マウス骨折治癒における C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) の役割」 第 26 回日本軟骨代謝学会 プログラム・抄録集, 2013.03.01, p.104 全文	1-12, 15, 16

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 13, 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項1は手術又は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。