

(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2014-533672

(P2014-533672A)

(43) 公表日 平成26年12月15日 (2014. 12. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/04 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/00 (2006. 01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 17/00 (2006. 01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 5/00 (2006. 01)	A 6 1 P 17/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-541698 (P2014-541698)	(71) 出願人	514122410
(86) (22) 出願日	平成24年11月16日 (2012. 11. 16)		アドレノメト アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月15日 (2014. 7. 15)		ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1 ヘニッヒ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/072933		スドルフ, ノイエンドルフシュトラッセ
(87) 国際公開番号	W02013/072514		1 9 アー
(87) 国際公開日	平成25年5月23日 (2013. 5. 23)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	11189452.3		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成23年11月16日 (2011. 11. 16)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	12160015.9	(74) 代理人	100087871
(32) 優先日	平成24年3月16日 (2012. 3. 16)		弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 慢性又は急性疾患に罹患している患者の体液平衡を調整するための抗アドレノメデュリン (ADM) 抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場

(57) 【要約】

慢性急性疾患又は急性病態に罹患している患者、特に、ICU（集中治療室）にある患者は、体液恒常性障害を患っている。そのような患者の体液平衡を調整する及び／又は体液平衡を改善するための薬剤を提供することが、本開示の対象である。本開示の対象は、慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の体液平衡を調整するための抗アドレノメデュリン (ADM) 抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。本開示の対象は、慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の体液平衡を調整するための方法である。本開示の対象は、患者の慢性の治療法、急性疾患又は急性病態における使用に向けた、体液平衡の調整のための、抗アドレノメデュリンADM抗体、抗ADM非Ig足場又は抗アドレノメデュリン抗体フラグメントである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、体液平衡の調整のための、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項 2】

前記患者が、体液平衡を調整することを必要としている患者である、請求項 1 に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

10

【請求項 3】

前記抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場が、非中和抗ADM抗体、非中和抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非中和抗ADM非Ig足場である、請求項 1 又は 2 に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項 4】

前記患者の水腫を予防又は軽減するための、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

20

【請求項 5】

前記抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場が、単一特異性である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項 6】

前記抗体、フラグメント又は足場が、ADMに対して少なくとも 10^{-7} M の結合親和性を示すことを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

30

【請求項 7】

前記抗体、フラグメント、又は足場が、ADM結合タンパク質 1（補体因子 H）ではない、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項 8】

前記抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場が、成熟ヒトADMの aa 1 - 42 から成る配列：

40

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVA

（配列番号：24）

の中の好ましくは少なくとも 4 個又は少なくとも 5 個のアミノ酸から成る領域に結合する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項 9】

前記抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場が、成熟ヒトADMの aa 1 - 21 から成る配列：

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC

50

(配列番号：23)

の中の少なくとも4個又は5個のアミノ酸から成る領域に結合する、請求項1～8のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン (ADM) 抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項10】

前記抗体、フラグメント又は足場が、成熟ヒトADMのN末端端部、つまり、第1アミノ酸を含むエピトープを認識及び結合し、且つ、前記抗体、フラグメント又は足場が、N末端伸長アドレノメデュリンにも、N末端修飾アドレノメデュリンにも、N末端分解アドレノメデュリンにも結合しない、請求項1～9のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン (ADM) 抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

10

【請求項11】

前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期 ($t_{1/2}$ 半減滞留時間) を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体、ADM安定化抗体フラグメント又はADM安定化非Ig足場である、請求項1～10のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン (ADM) 抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

20

【請求項12】

前記抗体又はフラグメントが、循環ADMの生理活性を80%以下、好ましくは50%以下しか阻害しない、請求項1～11のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン (ADM) 抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項13】

前記疾患が、SIRS、敗血症、糖尿病、癌、心不全、ショック及び腎機能障害を含んで成る群から選択される、請求項1～12のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン (ADM) 抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

30

【請求項14】

前記抗体又はフラグメントが、ADM又はADMに結合するその抗体フラグメントに結合する抗体又はフラグメントであって、前記重鎖が配列：

配列番号：1

GYTFSRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFY

を含んで成り、そして、前記軽鎖が配列：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHPYT

を含んで成る、請求項1～13のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の

40

50

治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（A D M）抗体又はアドレノメデュリンに結合する抗 A D M 抗体フラグメント。

【請求項 1 5】

前記抗体又はフラグメントが、以下の配列を含んで成る、請求項 1 4 に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、ヒトの単一特異的な抗アドレノメデュリン（A D M）抗体又はアドレノメデュリンに結合する抗 A D M 抗体フラグメント：

配列番号：7（A M－V H－C）

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFQKATITADTSSNTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

10

配列番号：8（A M－V H 1）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

配列番号：9（A M－V H 2－E 4 0）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

配列番号：1 0（A M－V H 3－T 2 6－E 5 5）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

20

配列番号：1 1（A M－V H 4－T 2 6－E 4 0－E 5 5）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

配列番号：1 2（A M－V L－C）

DVLLSQTPSLPVLSDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

配列番号：1 3（A M－V L 1）

DVVMQTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号：1 4（A M－V L 2－E 4 0）

DVVMQTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

【請求項 1 6】

前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期（ $t_{1/2}$ 半減滞留時間）を少なくとも 1 0 %、好ましくは少なくとも 5 0 %、より好ましくは $> 5 0 \%$ 、最も好ましくは $> 1 0 0 \%$ 延長し、且つ、A D M の生理活性を 8 0 % 以下、好ましくは 5 0 % 以下しか阻害しない調節抗体、調節フラグメント又は調節足場である、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（A D M）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗 A D M 抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗 A D M 非 I g 足場。

40

【請求項 1 7】

前記抗体、抗体フラグメント又は非 I g 足場が、A D M の C 末端部分、つまり、A D M の a a 4 3－5 2（配列番号：2 5）：

PRSKISPQGY-NH2

50

(配列番号：25)

に結合しないことを特徴とする、請求項1～16のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

【請求項18】

カテコールアミン及び／又は静脈内に投与される輸液と組み合わせて使用される、請求項1～17のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

10

【請求項19】

ADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分と組み合わせて使用される、請求項1～17のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場、或いは請求項18に記載の組み合わせ。

【請求項20】

前記治療法が、前記急性疾患又は急性病態に対する一次治療方法でないことを特徴とする、請求項1～19のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、体液平衡の調整のための、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場。

20

【請求項21】

請求項1～20のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場を含んで成る医薬製剤。

【請求項22】

前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項21に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場を含んで成る医薬製剤。

30

【請求項23】

前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項21に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場を含んで成る医薬製剤。

【請求項24】

前記医薬製剤は、全身的に体液平衡を調整するために患者に投与されるが、但し、該患者が体液平衡を調整する必要があることを条件とする、請求項21～23のいずれか1項に記載の、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場を含んで成る医薬製剤。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の対象は、慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の体液平衡を調整するための抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗アドレノメデュリン非Ig足場である。

【0002】

50

本発明の対象は、慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の体液平衡を調整するための方法である。

【背景技術】

【0003】

アドレノメデュリン (ADM) というペプチドは、1993年に (itamura, K., et al., "Adrenomedullin: A Novel Hypotensive Peptide Isolated From Human Pheochromocytoma", Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 192 (2), pp. 553-560 (1993)) に、52個のアミノ酸を含んで成る新規降圧ペプチドとして最初に記載されたが、それは、ヒト褐色細胞腫から単離されていた；配列番号：21。同年に、185個のアミノ酸を含んで成る前駆体ペプチドをコードするcDNA、及び前駆体ペプチドの完全アミノ酸配列もまた記載された。とりわけ、N末端で21個のアミノ酸から成るシグナル配列を含んで成る前駆体ペプチドは、「プレプロアドレノメデュリン」(プレプロADM) と呼ばれる。当該記載において、指定されるすべてのアミノ酸位置は、通常、185個のアミノ酸を含んで成るプレプロADMに関連している。ペプチドアドレノメデュリン (ADM) は、プレプロADMの52個のアミノ酸を含んで成るペプチド (配列番号21) であり、且つ、95～146アミノ酸を含んで成るペプチドであって、そしてそれは、タンパク質分解的開裂によってプレプロADMから形成される。これまで、プレプロADMの開裂で形成されるペプチド断片の実質的にほんのいくつかの断片、特に生理学的に活性なペプチドアドレノメデュリン (ADM) 「PAMP」、つまり、プレプロADM内のシグナルペプチドの第21アミノ酸の次にくる20個のアミノ酸 (第22～41) を含んで成るペプチドが、詳細に調査されてきた。1993年のADMの発見と特徴づけは、活性の徹底した研究、そして、公表の殺到を引き起こし、最近、その結果が様々な総説にまとめられていて、当該記載との関連において、特にADMに充てられている「Peptides」誌のある号に存在する論文、特に (Editorial, Takahashi, K., "Adrenomedullin: from a pheochromocytoma to the eyes", Peptides, Vol. 22, p. 1691 (2001)) 及び (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", Peptides, Vol. 22, pp. 1693-1711 (2001)) で言及されている。対象は、(Hinson, et al., "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide", Endocrine Reviews, Vol. 21(2), pp. 138-167 (2000)) の中で更に総説されている。これまでの科学研究では、とりわけ、ADMが多機能性調節ペプチドと見なすこともできる。それは、グリシンによって伸長された不活性型で血液循環中に放出される (Kitamura, K., et al., "The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma", Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 244(2), pp. 551-555 (1998)、要約のみ)。ADMに特異的であり、且つ、ADMの効果をおそらく同様に調節する結合タンパク質 (Pio, R., et al., "Complement Factor H is a Serum-binding Protein for adrenomedullin, and the Resulting Complex Modulates the Bioactivities of Both Partners", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276(15), pp. 12292-12300 (2001)) も存在する。これまでの調査で最も重要なことであるADM並びにPAMPのそれらの生理作用は、血圧に影響を及ぼす効果であった。

【0004】

したがって、ADMは有効な血管拡張薬であり、これにより、降圧効果をADMのC末端部分の特定のペプチドセグメントと関連づけることが可能である。さらに、プレプロADMから形成される先に触れた更に生理学的に活性なペプチドPAMPが、たとえそれがADMのものと異なる作用機序を有するようでも、降圧効果を同様に示すことがわかった (上記の総説に加えて、(Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", Peptides, Vol. 22, pp. 1693-1711 (2001)) 及び (Hinson, et al., "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Pep

tide", Endocrine Reviews, Vol. 21(2), pp. 138-167 (2000)) 同様に (Kuwasako, K., et al., "Purification and characterization of PAMP-12 (PAMP-20) in porcine adrenal medulla as a major endogenous biologically active peptide", FEBS Lett, Vol. 414(1), pp. 105-110 (1997)、要約のみ)、(Kuwasaki, K., et al., "Increased plasma proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in patients with essential hypertension", Ann. Clin. Biochem., Vol. 36 (Pt. 5), pp. 622-628 (1999)) 又は (Tsuruda, T., et al., "Secretion of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide from cultured neonatal rat cardiac cells", Life Sci., Vol. 69(2), pp. 239-245 (2001)、要約のみ)、並びに E P - A 2 0 6 2 2 4 5 8) を参照のこと)。さらに、血液循環及び他の生体液体中で計測できる A D M の濃度が、多くの病理学的な状態で、健康対照者に見られる濃度を有意に上回ることがわかった。これにより、鬱血性心不全、心筋梗塞、腎臓病、高血圧疾患、糖尿病に罹患している患者、ショックの急性期、並びに敗血症及び敗血症性ショックにおける A D M レベルは、様々な程度ではあるが、有意に高い。P A M P 濃度はまた、前述の病理学的な状態のいくつかで増強されるが、血漿レベルは A D M に対して低い ((Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", Peptides, Vol. 22, pp. 1693-1711 (2001)); page 1702))。異常に高い濃度の A D M が敗血症において観察されることがあり、そして、最も高い濃度が敗血症性ショックで観察されることがさらに知られている (Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", Peptides, Vol. 22, pp. 1693-1711 (2001)) 及び (Hirata, et al., "Increased Circulating Adrenomedullin, a Novel Vasodilatory Peptide, in Sepsis", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 81(4), pp. 1449-1453 (1996))、(Ehlenz, K., et al., "High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: Correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin", Exp Clin Endocrinol Diabetes, Vol. 105, pp. 156-162 (1997))、(Tomoda, Y., et al., "Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells", Peptides, Vol. 22, pp. 1783-1794 (2001))、(Ueda, S., et al., "Increased Plasma Levels of Adrenomedullin in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome", Am. J. Respir. Crit. Care Med., Vol. 160, pp. 132-136 (1999)) 並びに (Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", Peptides, Vol. 22, pp. 1835-1840 (2001)) を参照のこと)。

【0005】

更に、診断目的、特に敗血症診断、心臓診断、及び癌診断の範囲内で生体液体中のアドレノメデュリンの免疫反応性を同定する方法が、当該技術分野で知られている。本発明によれば、完全なプレプロアドレノメデュリンのアミノ酸 (第 45 ~ 92) を含むプロアドレノメデュリンの中間領域部分ペプチドが、特に、m i d - p r o A D M (W O 2 0 0 4 / 0 9 0 5 4 6) の配列を特異的に認識する少なくとも 1 つの標識抗体を扱う免疫学的アッセイを用いて計測される。

【0006】

W O - A 1 2 0 0 4 / 0 9 7 4 2 3 は、心臓血管疾患の診断、予後診断、及び治療のためのアドレノメデュリンに対する抗体の使用を記載している。A D M 受容体のブロックによる疾患の治療もまた、当該技術分野で記載されており (例えば、W O - A 1 2 0 0 6 / 0 2 7 1 4 7、P C T / E P 2 0 0 5 / 0 1 2 8 4 4)、前述の疾患は、敗血症、敗血症性ショック、心血管疾患、感染症、皮膚病学的疾患、内分泌学的疾患、代謝性疾患、胃腸病学的疾患、癌、炎症、血液学的病、呼吸器疾患、筋骨格疾患 (muscle skeleton diseases)、神経学的疾患、泌尿器科学的疾患であり得る。

【0007】

敗血症の早期に関して、A D M が心臓機能、並びに肝臓、脾臓、腎臓、及び小腸におけ

る血液供給を改善することが報告されている。A D M中和抗体は、敗血症早期の間の先に言及した効果を中和する (Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", Peptides, Vol. 22, pp. 1835-1840 (2001))。

【0008】

敗血症後期、つまり、敗血症の低心拍出量相では、A D Mは、敗血症性ショックの患者の死亡に大きく関連するリスク因子を構成する (Schutz et al., "Circulating Precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis", Endothelium, 14:345-351, (2007))。例えば、非常に後期の敗血症における、重症患者の診療及び治療のための方法、及び重症患者の治療用薬剤の調製のための血管収縮活性を有するエンドセリン及びエンドセリン作動物質の使用は、WO-A 1 2 0 0 7 / 0 6 2 6 7 6に記載された。エンドセリン及び／又はエンドセリン作動物質に代わる、又はそれと組み合わせた、アドレノメデュリン拮抗物質、すなわち、例えば、その関連受容体をブロックングすることによって、アドレノメデュリンの血管拡張作用を妨げる若しくは減弱する分子、又はアドレノメデュリンのその受容体への結合を妨げる物質 (例えば、アドレノメデュリンに結合して、その受容体結合部位を妨げる抗体などの特異的な結合物質; 「免疫学的中和」) の使用について、WO-A 1 2 0 0 7 / 0 6 2 6 7 6に更に記載された。そのような使用、又は後に続ける若しくは先行する別々の使用を含めた併用が、特定の症例において、例えば、治療学的な達成を改善するか又は望ましくない生理的ストレス若しくは副作用を回避するのに望ましいことであると記載された。これにより、中和A D M抗体が敗血症の後期における敗血症の治療に使用されることが報告されている。

【0009】

当該技術分野において、敗血症及び敗血症性ショックの治療のためのA D M結合タンパク質1と組み合わせたA D Mの投与が記載されている。A D M及びA D M結合タンパク質1を用いた敗血症動物の治療が、敗血症後期への移行を予防すると考えられている。生きている生物体において、A D M結合タンパク質 (補体因子H) が前述の生物体の血液循環中に高濃度で存在していることに留意しなければならない (Pio et al.: Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an Adrenomedullin binding Protein present in Human Plasma; Microscopy Res. and Technique, 55:23-27 (2002) and Martinez et al.; Mapping of the Adrenomedullin-Binding domains in Human Complement factor H; Hypertens Res Vol. 26, Suppl (2003), S56-59)。

【0010】

本発明によれば、前記A D M結合タンパク質1はまた、A D M結合タンパク質1 (補体因子H) とも呼ばれる。

【0011】

慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者、特にI C U (集中治療室) の患者は、体液恒常性障害を患う可能性もある。これは、腎不全や死亡などの重篤な有害事象を引き起こす可能性がある。

【0012】

そのような患者の体液平衡を調整する及び／又は体液平衡を改善するための薬剤を提供することが、本発明の対象であった。

【発明の概要】

【0013】

本発明の説明

本発明の文脈の中での「体液平衡の調整」という表現は、慢性若しくは急性基礎疾患又は急性基礎病態に起因する患者の体液平衡の明白な一平衡障害—のあらゆる矯正に向けられる。前述の矯正は、前述の患者における正常血圧の回復の利益になる。当業者は、一般に、血圧、並びに高血圧及び低血圧が患者の体液平衡と密接に関連していることを十分に認識している。体液平衡とは、代謝過程が機能できるようにする体内への体液の流入量と排出量の平衡である。脱水状態は、体液喪失の結果としての1%以上の体重減少と規定さ

れる。体液平衡と水分補給状態を評価するための3つの要素は：臨床的評価、つまり、体重と尿排出量；体液平衡チャートの検討及び血液化学の検討である。当業者にとって、このすべてが十分に周知である（Alison Shepherd, Nursing Times 19.07.11/Vol 107 No 28, p 12-16）。

【0014】

そのため、一実施形態において、そのような患者の体液平衡の調整及び／又は体液平衡の改善を必要としている人とは、体液喪失の結果として1%以上の体重減少がある人である。体液平衡は、Scales and Pilsworth (2008) Nursing Standard 22:47, 50-57に従って評価され得る。例えば、正常な尿排出量は、1時間あたり0.5～2ml/kg体重の範囲内にある。正常な腎臓機能を有する患者の最低限の許容尿排出量は、1時間あたり0.5ml/kgである。これらのすべての基準値が、患者が体液平衡の調整及び／又は体液平衡の改善を必要としているかどうか評価するのに使用され得る。

10

【0015】

明細書中を通して、本発明による「抗体」、「抗体フラグメント」又は「非Ig足場」は、ADMに結合することができ、これにより、ADMに対して向けられ、したがって、「抗ADM抗体」、「抗ADM抗体フラグメント」、又は「抗ADM非Ig足場」と呼ぶことができる。

【0016】

本発明の別の実施形態において、本発明による抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、循環ADMに結合でき、これにより、それらは循環ADMに対する。

20

【0017】

本発明の別の実施形態において、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、その抗ADM抗体フラグメント又はADM非Ig足場は、静脈内に投与される輸液と組み合わせて使用されるべきであり、前述の組み合わせは、体液平衡の調整のための、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けたものである。

【0018】

本発明の別の実施形態において、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、その抗ADM抗体フラグメント又はADM非Ig足場は、昇圧薬、例えば、カテコールアミンと組み合わせて使用されるべきであり、前述の組み合わせは、体液平衡の調整のための、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けたものである。

30

【0019】

本発明の対象は、慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の体液平衡を調整するための抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

【0020】

本発明の対象は、慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の体液平衡を調整するための方法である。本発明によると、前述の患者とは、体液平衡を調整する必要がある患者である。

【0021】

本発明の対象は、体液平衡の調整のための、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

40

【0022】

抗アドレノメデュリン（ADM）抗体とは、ADMに特異的に結合する抗体であり、抗アドレノメデュリン抗体フラグメントとは、抗ADM抗体のフラグメントであって、前述のフラグメントはADMに特異的に結合する。抗ADM非Ig足場とは、ADMに特異的に結合する非Ig足場である。

【0023】

ADMへの特異的な結合は同様に、他の抗原への結合も容認する。これは、この特異性

50

が、その抗体がそれに対して作製された他のポリペプチドと交差反応し得ることを排除しないであろうことを意味している。

【0024】

体液恒常性障害の状態にある患者には、特にICU環境における、標準的な看護手段として静脈内に投与される輸液が与えられ得る。しかしながら、例えば、水腫（肢端浮腫）の発生のように起こりかねない合併症を理由に、付加的な輸液投与を低減又は回避することが望ましい。水腫とは、身体組織内の体液によって引き起こされる腫脹を意味する。それは足や脚に起こるが、全身に関わることがあり、そして、例えば、肺、心臓、目などの臓器に関わることがある。

【0025】

そのため、抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、患者が輸液投与を必要としている時点で投与され得る。本発明によると、前述の患者は、体液平衡を調整することを必要としている患者である。

【0026】

そのため、本発明の対象はまた、これだけに限定されるものではないが、水腫の予防又は軽減を含めた体液平衡の調整のための、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

【0027】

抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場はまた、患者が体液恒常性障害のいずれかの兆候を示す前に予防的に投与されてもよい。これは、患者が、体液恒常性障害の問題が予想され得る、例えば髄膜炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、敗血症のような重症感染症；糖尿病、癌、例えば心不全、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症のような急性若しくは慢性血管疾患のような他の疾患；敗血症ショックのようなショック及び例えば腎機能障害、肝機能障害のような臓器機能障害、熱傷、外科手術、外傷、中毒、化学療法による損傷を例えば含めた、慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している場合であろう。敗血症及び敗血症ショック、すなわち、敗血症の後期の間の死亡リスクを低減するための本発明による抗体、フラグメント又は足場が、特に有効である。

【0028】

SIRS、敗血症、重症敗血症、敗血症性ショックに関する以下の臨床基準が、規定される。

1) 以下の症状の少なくとも2つを特徴とする宿主全身性炎症反応（SIRS）

- ・患者は低血圧を呈する（平均動脈圧が $<65\text{ mmHg}$ ）
- ・ $>4\text{ mmol/L}$ になる高い血清乳酸レベル
- ・血糖 $>7.7\text{ mmol/L}$ （糖尿病の不存在において）
- ・中心静脈圧が $8\sim12\text{ mmHg}$ の範囲内でない
- ・尿排出量が $<0.5\text{ mL x kg}^{-1}\text{ x 時間}^{-1}$ である
- ・中心静脈（上大静脈）酸素飽和が $<70\%$ 又は混合静脈で $<65\%$ である
- ・心拍数が >90 拍動/分である。
- ・体温 $<36^{\circ}\text{C}$ 又は $>38^{\circ}\text{C}$
- ・呼吸数 >20 /分
- ・白血球数 <4 又は $>12\text{ x }10^9/\text{L}$ （白血球）； $>10\%$ の未熟好中球

【0029】

2) 敗血症

1) で触れた症状の少なくとも2つに続いて、更に新たな感染の臨床的な疑いが見られる：

- ・咳/痰/胸痛
- ・腹痛/膨満/下痢
- ・血流感染（line infection）
- ・心内膜炎

10

20

30

40

50

- ・排尿障害
- ・頸部硬直に伴う頭痛
- ・蜂巣炎／損傷／関節感染
- ・いずれかの感染に関して陽性の微生物学

【0030】

3) 重症敗血症

敗血症が患者に現れていることを条件に、更にいずれかの臓器機能障害の臨床的な疑いが見られる：

- ・最高血圧 < 90 ／平均； < 65 mmHG
- ・ラクタート > 2 mmol / L
- ・ビリルビン > 34 μ mol / L
- ・尿排出量2時間で < 0.5 mL / kg / h
- ・クレアチニン > 177 μ mol / L
- ・血小板 $< 100 \times 10^9$ / L
- ・ O_2 が与えられた場合を除いて $SpO_2 > 90\%$

10

【0031】

4) 敗血症性ショック

3) で触れたような末端臓器機能障害のうちの少なくとも1つの兆候が現れている。治療に応答しない、静脈内輸液投与だけでは低血圧から患者の血圧を維持するのに不十分である難治性の低血圧が存在するのであれば、敗血症性ショックが示され、本発明による抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場の投与もまた提供する。

20

【0032】

そのため、急性疾患又は急性病態は、これだけに限定されるものではないが、例えば髄膜炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、又は敗血症のような重症感染症；糖尿病、癌、例えば心不全、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症のような急性若しくは慢性血管疾患のような他の疾患；例えば敗血症ショックのようなショック、及び、例えば腎機能障害、肝機能障害のような臓器機能障害、熱傷、外科手術、外傷、中毒、化学療法によって引き起こされた損傷を含んで成る群から選択される。敗血症及び敗血症ショック、すなわち、敗血症の後期の間の死亡リスクを低減するための本発明による抗体、フラグメント又は足場が、特に有効である。

30

【0033】

本発明の一実施形態において、患者は、SIRS、重症感染症、敗血症、例えば敗血症ショックのようなショックに罹患していない。前述の重症感染症とは、例えば、髄膜炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、敗血症、重症敗血症、及び、例えば敗血症ショックのようなショックを意味する。これに関して、重症敗血症は、前述の患者に敗血症が現れており、さらに、以下のいずれかの臓器機能障害に関する臨床的な疑いが存在していることを特徴とする：

- ・最高血圧 < 90 ／平均； < 65 mmHG
- ・乳酸 > 2 mmol / L
- ・ビリルビン > 34 μ mol / L
- ・尿排出量2時間で < 0.5 mL / kg / h
- ・クレアチニン > 177 μ mol / L
- ・血小板 $< 100 \times 10^9$ / L
- ・ O_2 が与えられた場合を除いて $SpO_2 > 90\%$

40

【0034】

別の実施形態において、前述の急性疾患又は急性病態は、敗血症でもなく、重症敗血症でもなく、SIRSでもなく、ショックでもなく、敗血症ショックでもない。

【0035】

別の実施形態において、前述の急性疾患又は急性病態は、敗血症ではない。

【0036】

50

別の実施形態において、前述の急性疾患又は急性病態は、髄膜炎、糖尿病、癌、例えば、心不全、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症のような急性及び慢性血管疾患；例えば、敗血症性ショックのようなショック、並びに、例えば、腎機能障害、肝機能障害のような臓器機能障害、熱傷、外科手術、外傷、中毒、化学療法で引き起こされた損傷を含んで成る群から選択される。

【0037】

体液平衡／輸液療法

例えば、ICU内の状況にある、急性期病院の状況において、一般的に体液平衡は、これが患者の実際の水分補給状態に対する特定の情報、ひいては、腎臓及び心血管機能に関する特定の情報を提供するので、臨床スタッフによって慎重に観察される。

10

【0038】

しかしながら、急性の体液喪失が体液獲得より大きいのであれば、患者は負の体液平衡にあると見なされる。この場合、体液の減少を補うために、生理液が、医師によって静脈内に投与されることが多い。

【0039】

対照的に、体液獲得が体液喪失より大きい正の体液平衡では、腎臓又は心臓系のいずれかに関する問題に対する情報が与えられ得る。

【0040】

これは、例えば、SIRS、敗血症、重症敗血症及び敗血症ショックを患っている状況において、同様に血圧が低く（一般的に低血圧とも呼ばれる）、そして、腎臓の濾過速度が低下するであろうし、そのため、体液再吸収の低下と尿排出量の低下を引き起こすことを意味する。

20

【0041】

「輸液療法」という用語は、一般に、治療又は予防対策としての患者への輸液（例えば、生理食塩液溶液又は注射用水（WFI）など）の治療的投与を意味する。それは、静脈内、腹腔内、骨内、皮下及び経口経路を介して投与できる。

【0042】

輸液療法は、基礎疾患又は病態に起因する体液の喪失があるか又は体液の喪失のリスクがあるかのいずれかのときに適応される。体液喪失の重症度及びそれが失われたコンパートメントは、体液の選択とそれが投与される必要があるスピードに影響を及ぼす。輸液療法が治療として行われるなら、その後、基礎疾患又は病態を診断し、そして、治療する必要がある。輸液療法は、低血圧、血液量減少、代謝異常、酸素運搬の減少、SIRS、敗血症、重症敗血症、ショック、及び敗血症ショックの場合に日常的に適応される。

30

【0043】

しかしながら、抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント、又は抗ADM非Ig足場である、本発明によって提供される薬剤が、体液平衡を調整する目的のために使用されることを意図しているだけであり、そのため、慢性若しくは急性疾患又は病態自体に対する一次治療のいずれかの方法に使用されることは意図していないと強調されなければならない。これは、本発明が、例えば、髄膜炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、又は敗血症若しくは重症敗血症；糖尿病、癌、例えば心不全、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症のような急性若しくは慢性血管疾患のような他の疾患；例えば敗血症ショックのようなショック、及び、例えば、腎機能障害、肝機能障害のような臓器機能障害、熱傷、外科手術、外傷、中毒、又は化学療法によって誘発された損傷を回復又は治癒する治療法を提供しないことを意味する。

40

【0044】

そのため、抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場の体液調整効果は、前述の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の一次療法を支援している。例えば、髄膜炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、敗血症又は同様のもののような重症感染症様の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の場合には、一次療法は、例えば、抗生物質の投与であるだろう。抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は

50

、体液平衡を調整し、且つ、例えば、抗生物質の投与が効果を発揮するまで前述の患者の危篤状態の悪化を予防する助けとなるであろう。先に触れた抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場が予防的方法又は治療学的方法において投与され得る場合、これは、前述の患者に体液恒常性障害の問題が存在しているとき、体液恒常性障害の問題を予防するためか又は体液恒常性障害を軽減するためであることを意味する。水腫は、体液恒常性障害の問題という用語に含まれている。

【0045】

本発明によると、患者は、例えば、癌、又は糖尿病など、原発性又は基礎疾患としての慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している可能性があることは強調されなければならない。しかしながら、それらの原発性又は基礎疾患は、一見して、本発明による治療的療法の標的ではない。対照的に、本発明による治療的療法は唯一、診断されるか、又は輸液療法を適応される急性症状に対して向けられる。

【0046】

そのため、本発明は、癌、糖尿病、髄膜炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、敗血症又は同様のものの一次療法のために提供されるのではなく、急性疾患又は急性病態に金する体液恒常性障害に罹患し、そのため、輸液投与が必要である患者の治療法のために提供される。

【0047】

本発明の一実施形態において、抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、静脈内に投与される輸液と組み合わせて使用されるべきであって、前述の組み合わせは、前述の患者の体液平衡の調整のための、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けたものである。

【0048】

本発明の一実施形態において、体液平衡の調整を必要としている慢性若しくは急性疾患又は病態に罹患している前述の患者は、前述の患者に静脈内輸液を投与する必要性を特徴とする。本発明の別の実施形態において、体液平衡の調整を必要としている慢性若しくは急性疾患又は病態に罹患している前述の患者は、前述の患者が水腫に罹患するリスク又は前述の患者における水腫の存在を特徴とする。

【0049】

そのため、特定の一実施形態における本発明の対象は、静脈内輸液を必要としている患者の治療法における使用に向けた、又は水腫に罹患するリスクを有する患者若しくは前述の患者における水腫の存在を特徴とする患者の治療法における使用に向けた抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

【0050】

本発明の別の実施形態において、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、昇圧薬、例えば、カテコールアミンと組み合わせて使用されるべきであって、前述の組み合わせは、体液平衡の調整のための、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けたものである。

【0051】

本発明の一実施形態において、体液平衡の調整を必要としている慢性若しくは急性疾患又は病態に罹患している前述の患者は、前述の患者に昇圧薬、例えば、カテコールアミンを投与する必要性を特徴とする。

【0052】

そのため、特定の一実施形態における本発明の対象は、昇圧薬、例えば、カテコールアミン治療を必要としている患者の治療法における使用に向けた抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

【0053】

体液平衡の改善を必要としている患者は、毛細血管漏出を特徴とすることができ、且つ、1時間あたり $< \text{ } = 0.5 \sim 1 \text{ cc/kg}$ の尿排出量を有し得る。

10

20

30

40

50

【0054】

さらに、本発明の一実施形態において、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、単一特異的である。

【0055】

単一特異的な抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、単一特異的な抗アドレノメデュリン抗体フラグメント、又は単一特異的な抗ADM非Ig足場は、前述の抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場が標的ADM中の少なくとも5個のアミノ酸を包含している1つの特定領域に結合することを意味している。単一特異的な抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、単一特異的な抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は単一特異的な抗ADM非Ig足場は、すべて同じ抗原に親和性がある抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

10

【0056】

特別な好ましい実施形態において、本発明は、単一特異性抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、単一特異性抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は単一特異性抗ADM非Ig足場を提供するが、前述の抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場が、標的ADM内に少なくとも4個のアミノ酸を包含する1つの特定の領域に結合することを特徴とする。

【0057】

別の特別な実施形態において、抗ADM抗体又はADMに結合する抗体フラグメントは、単一特異性抗体である。単一特異性とは、前述の抗体、抗体フラグメントが標的ADM内に好ましくは少なくとも4個又は少なくとも5個のアミノ酸を包含する1つの特定の領域に結合することを意味する。単一特異的抗体又はフラグメントは、そのすべてが同じ抗原に親和性を有する抗体又はフラグメントである。モノクローナル抗体は、単一特異的であるが、単一特異的な抗体はまた、一般的な生殖細胞からそれらが作製されるのとは別の手段でも作製され得る。

20

【0058】

本発明による抗体又はフラグメントは、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされた1若しくは複数のポリペプチドを含んで成るタンパク質である。認識される免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 α （IgA）、 γ （IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、 δ （IgD）、 ϵ （IgE）、及び μ （IgM）定常領域遺伝子が含まれると共に多数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。完全長の免疫グロブリン軽鎖は、一般的に約25Kd又は長さが214個のアミノ酸である。完全長の免疫グロブリン重鎖は、一般的に約50Kd又は長さが446個のアミノ酸である。軽鎖は、NH₂末端で可変領域遺伝子（長さが約110個のアミノ酸）及びCOOH末端で κ 又は λ 定常域遺伝子によってコード化される。重鎖は同様に、可変領域遺伝子（長さが約116個のアミノ酸）及び他の定常域遺伝子の1つによってコードされる。

30

【0059】

抗体の基本構造単位は、一般に、それぞれの対が1つの軽鎖と1の重鎖とを有する免疫グロブリン鎖の2つの同一の対から成る四量体である。それぞれの対において、軽鎖及び重鎖可変領域は、抗体に結合して、定常領域がエフェクター機能を媒介する。免疫グロブリンはまた、例えばFv、Fab、（Fab'）2のみならず、二機能性ハイブリッド抗体、及び一本鎖、（例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883, 1988; Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2nd ed., 1984; Hunkapiller and Hood, Nature 323:15-16, 1986）を含む他のさまざまな形態で存在する。免疫グロブリン軽鎖又は重鎖可変領域には、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる3つの超可変領域が介在するフレームワーク領域が含まれる（Sequences of Proteins of Immunological Interest, E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, 1983を参照のこと）。先に述べたように、CDRは、抗原のエピトープに対する結合に主に関与する。免疫複合体とは、抗体、例えばモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体若しくはヒト抗体、又は抗原に特異的に結合する機能的な抗体フラグメントである

40

50

。

【0060】

キメラ抗体は、典型的に遺伝子操作によって、異なる種に属する免疫グロブリン可変領域及び定常領域からその軽鎖及び重鎖遺伝子が構築されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体からの遺伝子の可変領域セグメントを、 κ 及び $\gamma 1$ 又は $\gamma 3$ のようなヒト定常領域セグメントに結合させることができる。一つの例において、このように治療的キメラ抗体は、マウス抗体からの可変又は抗原結合ドメイン及びヒト抗体からの定常又はエフェクタードメインとで構成されるが、他の哺乳類種も用いることができ、又は可変領域は分子技術によって産生することができる。キメラ抗体を作製する方法は、当技術分野において周知である、例えば米国特許第5,807,715号を参照のこと。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域とヒト以外の（マウス、ラット、又は合成）免疫グロブリンからの一つ又はそれ以上のCDRとを含む免疫グロブリンである。CDRを提供するヒト以外の免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワーク領域を提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。一つの態様において、ヒト化免疫グロブリンにおける全てのCDRは、ドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域が存在する必要はないが、存在すれば、それらは、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一でなければならない、すなわち約95%又はそれ以上のような、少なくとも約85~90%同一でなければならない。したがって、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、おそらくCDRを除いて、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖とヒト化重鎖免疫グロブリンとを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリン又は抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから得られるアミノ酸による限定数の置換を有してもよい。ヒト化又は他のモノクローナル抗体は、抗原結合又は他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさないさらなる保存的アミノ酸置換を有することができる。例としての保存的置換は、gly、ala；val、ile、leu；asp、glu；asn、gln；ser、thr；lys、arg；及びphe、tyrのような置換である。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作によって構築することができる（例えば米国特許第5,585,089号を参照のこと）。ヒト化抗体は、軽鎖及び重鎖遺伝子がヒト起源である抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で既知の方法によって作成することができる。ヒト抗体は、対象となる抗体を分泌するヒトB細胞を不死化することによって作製することができる。不死化は、例えばEBV感染によって、又はヒトB細胞を骨髓腫もしくはハイブリドーマ細胞に融合させて、トリオーマ細胞を産生することによって行うことができる。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイ法によっても産生することができる（例えば、Dowerら、PCT公開公報第91/17271号；McCaffertyら、PCT公開公報第92/001047号；及びWinter、PCT公開公報第92/20791号を参照のこと）、又はヒトの組み合わせモノクローナル抗体ライブラリから選択することができる（Morphosysのウェブサイトを参照のこと）。ヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック動物を用いても調製することができる（Lonbergら、PCT公開公報第93/12227号；及びKucherlapati、PCT公開公報第91/10741号を参照のこと）。

【0061】

よって、抗ADM抗体は、当該技術分野で知られている形式を有し得る。例は、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体である。好ましい実施形態において、本発明による抗体は、例えばIgGのような、遺伝子組み換えにより作製された抗体、典型的な完全長の免疫グロブリン、或いは、例えば、化学的に結合した抗体（フラグメント抗原結合）のような少なくとも重鎖及び／又は軽鎖のF可変ドメインを含んで成る抗体フラグメントであって、これだけに限定されるものではないが、Fab低分子化抗体を含んで成るFabフラグメント、一本鎖Fab抗体、エピトープタグを有する一価のFab抗体、例えばFab-V5Sx2；CH3ドメインで二量化された二価のFab（ミニ抗体）；例えば、異種のドメインの補助による、例えば、dHLXド

10

20

30

40

50

メインの二量体化による、多量体化によって形成された、二価の F a b 又は多価性 F a b、例えば、F a b - d H L X - F S x 2 ; F (a b ')₂ フラグメント、s c F v フラグメント、多量体化した多価／多特異的 s c F v フラグメント、二価及び／又は二重特異性ダイアボディ、B I T E (登録商標) (二重特異性 T 細胞結合体 (engager))、三機能性抗体、多価抗体、例えば、G とは別のクラスからのもの；単一ドメイン抗体、例えば、ラクダ科の動物又は魚類の免疫グロブリン由来のナノボディ、並びに多数のその他のものを含めた抗体フラグメントである。

【0062】

抗 A D M 抗体に加えて、他の生体高分子足場は、標的分子を複合体化することが当該技術分野で周知であり、高度に標的特異的な生体高分子の作製に使用された。例は、アプタマー、シュピーゲルマー、アンチカリン及びコノトキシンである。抗体の形式の例示に関しては、図 1 a、1 b、及び 1 c を参照のこと。

【0063】

好ましい実施形態において、A D M 抗体の形式は、F v フラグメント、s c F v フラグメント、F a b フラグメント、s c F a b フラグメント、F (a b)₂ フラグメント、及び s c F v - F c 融合タンパク質を含んで成る群から選択される。別の好ましい実施形態において、抗体の形式は、s c F a b フラグメント、F a b フラグメント、s c F v フラグメント、及び生物学的利用能を最適化されたそのコンジュゲート、例えばペグ化フラグメントなどを含んで成る群から選択される。最も好ましい形式の 1 つは、s c F a b 形式である。

【0064】

非 I g 足場は、タンパク質足場であってもよく、それらはリガンド又は抗原に結合できるので抗体模倣体として使用できる。非 I g 足場は、テトラネクチンベースの非 I g 足場 (例えば、U S 2 0 1 0 / 0 0 2 8 9 9 5 に記載)、フィブロネクチン足場 (例えば、E P 1 2 6 6 0 2 5 に記載)；リポカリンベースの足場 (例えば、W O 2 0 1 1 / 1 5 4 4 2 0 に記載)；ユビキチン足場 (例えば、W O 2 0 1 1 / 0 7 3 2 1 4 に記載)、トランスフェリン足場 (例えば、U S 2 0 0 4 / 0 0 2 3 3 3 4 に記載)、プロテイン A 足場 (例えば、E P 2 2 3 1 8 6 0 に記載)、アンキリン反復ベースの足場 (例えば、W O 2 0 1 0 / 0 6 0 7 4 8 に記載)、マイクロタンパク質、好ましくはシステインノットを形成するマイクロタンパク質) 足場 (例えば、E P 2 3 1 4 3 0 8 に記載)、F y n S H 3 ドメインベースの足場 (例えば、W O 2 0 1 1 / 0 2 3 6 8 5 に記載)、E G F R - A ドメインベースの足場 (例えば、W O 2 0 0 5 / 0 4 0 2 2 9 に記載) 及び K u n i t z ドメインベースの足場 (例えば、E P 1 9 4 1 8 6 7 に記載) を含んで成る群から選択され得る。

【0065】

本発明の一実施形態において、本発明による抗体は、以下のように作成される。

【0066】

B a l b / c マウスは、0 及び 1 4 日目に 1 0 0 μ g の A D M ペプチド - B S A コンジュゲート (1 0 0 μ l の完全フロイントアジュバント中に乳化させた) で、そして、2 1 及び 2 8 日目に 5 0 μ g (1 0 0 μ l の不完全フロイントアジュバント中) で免疫された。融合実験が行われる 3 日前に、動物には、1 回の腹腔内及び 1 回の静脈内注射として与えられる、1 0 0 μ l の生理食塩液中に溶解させた 5 0 μ g の前記コンジュゲートを与えた。

【0067】

免疫されたマウスからの脾細胞及び骨髓腫細胞株 S P 2 / 0 の細胞が、5 0 % のポリエチレングリコール 1 m l を用いて 3 7 ° C にて 3 0 秒間、融合された。洗浄後に、その細胞を 9 6 ウェル細胞培養プレート内に播種した。ハイブリッドクローンは、H A T 培地 [2 0 % のウシ胎仔血清及び H A T サプリメントを補った R P M I 1 6 4 0 培地] 中で培養することによって選択された。2 週間後に、H A T 培地が、3 回の継代の間、H T 培地に置き換えられ、それに続いて、正常細胞培地に戻される。

【0068】

細胞培養上清は、融合3週間後に、まず抗原特異的なIgG抗体についてスクリーニングされた。陽性の試験された微量の培養物を、繁殖のために24ウェルプレートに移した。再テストした後に、選択された培養物は、クローン化され、限界希釈を使用することで再度クローン化され、そして、アイソタイプが決定された (Lane, R.D. (1985). A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 81: 223-228; Ziegler, B. et al.(1996) Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies, *Horm. Metab. Res.* 28: 11-15もまた参照のこと)。

10

【0069】

抗体は、以下の手順に従ってファージディスプレイを用いて作製され得る：投薬を受けていないヒト抗体遺伝子ライブラリHAL7/8が、アドレノメデュリンペプチドに対する、遺伝子組み換え一本鎖F可変ドメイン (scFv) の分離に使用される。抗体遺伝子ライブラリーは、2個の異なったスパーサーを介してアドレノメデュリンペプチド配列に連結されたビオチンタグを含むペプチドの使用を含むパンニングストラテジーを用いてスクリーニングされた。非特異性結合抗原とストレプトアビジン結合抗原とを使用したパンニング段階の混合が、非特異的バインダーのバックグラウンドを最小にするのに使用された。パンニングの第三段階からの溶解ファージが、モノクローナルscFv発現性E. コリ (E. coli) 株の作製に使用された。これらのクローン株の培養からの上清が、抗原ELISA試験にそのまま使用された (Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rulker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schutte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dubel, S., 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *Journal of Biotechnology* 152, 159-170; Schutte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dubel, S., 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 4, e6625もまた参照のこと)。

20

30

【0070】

マウス抗体のヒト化は、以下の手順に従って行われ得る：マウス起源の抗体のヒト化のために、抗体の配列が、相補性決定領域 (CDR) を有するフレームワーク領域 (FR) と抗原との構造的相互作用に関して分析される。構造モデリングに基づいて、ヒト起源の適当なFRを選択し、そして、マウスCDR配列がヒトFRに移植される。構造的相互作用を取り戻すためにCDR又はFRのアミノ酸配列のバリエーションが導入でき、そしてそれは、FR配列に関する種の切り替えによって無効になった。この構造的相互作用の回復は、ファージディスプレイライブラリーを使用したランダムアプローチによって、又は分子モデリングによって導かれる方向性を持ったアプローチにより達成され得る (Almagro JC, Fransson J., 2008. Humanization of antibodies. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:1619-33)。

40

【0071】

好ましい実施形態において、ADM抗体の形式は、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、F(ab)₂フラグメント、及びscFv-Fc融合タンパク質を含んで成る群から選択される。別の好ましい実施形態において、抗体の形式は、scFabフラグメント、Fabフラグメント、scFvフラグメント、及び生物学的利用能を最適化されたそのコンジュゲート、例えばペグ化フラグメントなどを含んで成る群から選択される。最も好ましい形式の1つは、scFab形式である。

【0072】

50

別の好ましい実施形態において、抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント、又は抗ADM非Ig足場は、完全長の抗体、抗体フラグメント、又は非Ig足場である。

【0073】

好ましい実施形態において、抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、ADMに含まれ、長さが少なくとも5個のアミノ酸から成るエピートープを対象にし、且つ、結合できる。

【0074】

より好ましい実施形態において、抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、ADMに含まれ、長さが少なくとも4個のアミノ酸から成るエピートープを対象にし、且つ、結合できる。

【0075】

本発明の特定の一実施形態において、抗アドレノメデュリン(ADM)抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場は、患者の急性疾患又は急性病態の治療法又は予防に使用するために提供され、前述の抗体、フラグメント又は足場が、ADM結合タンパク質1(補体因子H)でないことを特徴とする。

【0076】

本発明の特定の一実施形態において、抗アドレノメデュリン(ADM)抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場は、患者の急性疾患又は急性病態の治療法に使用するために提供され、前述の抗体、抗体フラグメント又は非Ig足場が、成熟ヒトADMのaa1-42の配列中の好ましくは少なくとも4個又は少なくとも5個のアミノ酸から成る領域に結合することを特徴とする：

配列番号：24

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVA

本発明の特定の一実施形態において、抗アドレノメデュリン(ADM)抗体、アドレノメデュリンに結合する抗ADM抗体フラグメント又はアドレノメデュリンに結合する抗ADM非Ig足場は、患者の急性疾患又は急性病態の治療法に使用するために提供され、前述の抗体、フラグメント又は足場が、成熟ヒトADMのaa1-21の配列中の好ましくは少なくとも4個又は少なくとも5個のアミノ酸から成る領域に結合することを特徴とする：

配列番号：23

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC

本発明の好ましい実施形態において、前述の抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、アドレノメデュリンのN末端部(aa1-21)に位置している、好ましくは少なくとも4個又は少なくとも5個のアミノ酸から成るADMの領域に結合する(図2を参照のこと)。

【0077】

好ましい実施形態において、抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗アドレノメデュリン非Ig足場は、ADM、好ましくはヒトADMに含まれ、長さが少なくとも5個のアミノ酸から成るエピートープを対象にし、且つ、結合できる。

【0078】

より好ましい実施形態において、抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗アドレノメデュリン非Ig足場は、ADM、好ましくはヒトADMに含まれ、長さが少なくとも4個のアミノ酸から成るエピートープを対象にし、且つ、結合できる。

【0079】

別の好ましい実施形態において、前述の抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、アドレノメデュリンのN末端部(aa1)を認識

10

20

30

40

50

し、結合する。N末端端部とは、アミノ酸1、すなわち、配列番号21又は23の「Y」；が抗体結合に必須であることを意味する。抗体、フラグメント又は足場は、N末端伸長及びN末端改変アドレノメデュリンにも、N末端分解アドレノメデュリンにも結合しないであろう。

【0080】

本発明による別の特定の実施形態において、本明細書中に提供された抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、ADMのC末端部分、すなわち、ADMのaa43-52（配列番号25）に結合しない。

PRSKI SPQGY-NH2

（配列番号：25）

10

【0081】

1つの特定の実施形態において、本発明による抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場を使用することが好ましく、前述のアドレノメデュリン抗体、前述のアドレノメデュリン抗体フラグメント又は非Ig足場が、血清、血液、血漿中でのアドレノメデュリンの半減期（ $t_{1/2}$ ；半減滞留時間（half retention time））を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体、アドレノメデュリン安定化抗体フラグメント又はアドレノメデュリン安定化非Ig足場である。

【0082】

ADMの半減期（半減滞留時間）は、ADMの定量化のための免疫学的アッセイを使用して、それぞれADM安定化抗体、アドレノメデュリン安定化抗体フラグメント又はアドレノメデュリン安定化非Ig足場の不存在及び存在下、ヒト血漿中で決定され得る。

20

【0083】

以下のステップが行われ得る：

－ADMは、ADM安定化抗体、それぞれアドレノメデュリン安定化抗体フラグメント又はアドレノメデュリン安定化非Ig足場の不存在及び存在下、ヒトクエン酸血漿中に希釈され、そして、24℃にてインキュベートされ、

－選択された時点（例えば、24時間以内）でアリコートが採取され、そして、ADMの分解は、-20℃にて冷凍することによって、前述のアリコート中で止められ、

－選択されたアッセイが安定化抗体によって影響を受けないのであれば、ADMの量が、hADM免疫学的アッセイによってそのまま測定されるか、あるいは、アリコートは、（HClのような）変性剤で処理されてもよくて、（例えば、遠心分離による）サンプルのクリーニング後に、pHが中和されることができ、そして、ADM免疫学的アッセイによってADMが定量化されるか、あるいは、非免疫学的アッセイ技術（例えば、r pH PLC）がADM定量化のために使用でき、

30

－ADMの半減期が、それぞれADM安定化抗体、アドレノメデュリン安定化抗体フラグメント又はアドレノメデュリン安定化非Ig足場の不存在及び存在下でインキュベートされたADMに関して計算され、

－ADM安定化抗体、アドレノメデュリン安定化抗体フラグメント又はアドレノメデュリン安定化非Ig足場の不存在でインキュベートされたADMと比較して、安定化ADMに関して向上した半減期が計算される。

40

【0084】

ADMの半減期の二倍の延長は、100%の半減期の向上である。

【0085】

半減期（半減滞留時間）は、特定の液体又は血液中で特定の化学物質又は薬物の濃度がそのベースライン濃度の半分まで落ちるのに必要な期間と規定される。

【0086】

血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期（半減滞留時間）の測定に使用され得るアッセイは、実施例3に記載されている。

【0087】

50

一部の疾患に関して、ADMを阻害することが、ある程度有益である可能性がある。しかしながら、特定の量のADMがいくつかの生理機能に必要な場合に、ADMが完全に中和されるのであれば、それはまた有害でもあるであろう。多くの報告では、ADMの投与が特定の疾患において有益であり得ると強調された。それとは対照的に、他の報告において、ADMは、ある病態で投与された場合に、生命を脅かすものであると報告された。

【0088】

特定の実施形態において、前述の抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、非中和抗体、フラグメント又は非Ig足場である。中和抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、ADMの生理活性をほぼ100%まで、少なくとも90%超まで、好ましくは少なくとも95%超まで阻害する。

10

【0089】

対照的に、非中和抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、ADMの生理活性を100%未満、好ましくは95%未満まで、好ましくは90%未満まで、より好ましくは80%未満まで、そして、より一層好ましくは50%未満まで阻害する。これは、中和抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場が結合したADMの残存する生理活性が、0%超、好ましくは5%超、好ましくは10%超、より好ましくは20%超、より好ましくは50%超であることを意味している。

【0090】

これに関連して、「非中和抗ADM活性」を有する抗体、抗体フラグメント、非Ig足場である（単数若しくは複数の）分子は、分かりやすくするために、本明細書中では「非中和」抗ADM抗体、抗体フラグメント、又は非Ig足場と総称され、例えば、ADMの生理活性を80%未満までしか妨げない前記分子は、以下のとおり規定される：

20

－ADMに結合する単数若しくは複数の分子であって、そしてそれは、CRLR（カルシトニン受容体様受容体）及びRAMP3（受容体活性修飾タンパク質3）から構成された機能性ヒト遺伝子組み換えADM受容体を発現する真核細胞株の培養物に添加したとき、並行して添加したヒト合成ADMペプチドの作用を通じて細胞株によって産生されるcAMPの量を低減する分子であって、前述の添加したヒト合成ADMが、分析すべき中和抗体の不存在下におけるcAMP合成の半値最大刺激をもたらす量で添加されることを特徴とし、分析すべきADMに結合する（単数若しくは複数の）非中和分子が、分析すべき中和抗体を用いて得られるcAMP合成の最大低減を得るのに必要である量より10倍多い量で加えられたときであっても、ADMに結合する（単数若しくは複数の）前述の分子によるcAMPの低減が、80%以下の程度までしか起こらないことを特徴とする。

30

【0091】

同じ定義は、他の範囲；95%、90%、50%など、に適用される。

【0092】

本発明による特定の実施形態において、抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場が使用されるが、前述の抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメントは、ADMの生理活性を（基礎値の）80%未満、好ましくは50%未満までしか阻害しない。これは、それぞれ80%以下又は50%以下の循環ADMしか阻害しないという意味である。

40

【0093】

ADMの生理活性の前述の限定された阻害が、抗体、フラグメント又は足場の過剰な濃度（ADMとの関連で抗体、フラグメント又は足場の過剰を意味する）でさえ起こることは理解される。前述の限定された阻害は、ADMバインダー自体の固有特性である。これは、前述の抗体、フラグメント又は足場が、それぞれ80%又は50%の最大阻害を有することを意味する。好ましい実施形態において、前述の抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、ADMの生理活性を少なくとも5%までしか阻害しないであろう。

【0094】

50

上記は、それぞれ約20%若しくは50%又は95%も残存ADM生理活性が依然として存在していることを意味する。

【0095】

これにより、本発明によれば、提供した抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント、及び抗ADM非Ig足場は、それぞれの循環ADM生理活性を中和しない。

【0096】

生理活性は、物質が、その相互作用後に、インビボ (in vivo) 又はインビトロ (in vitro) で (例えば、アッセイで) 生物、組織若しくは臓器又は機能単位に呈する効果と規定される。ADM生理活性の場合には、これは、ヒト組換え型アドレノメデュリン受容体cAMP機能アッセイにおけるADMの効果であり得る。これにより、本発明によれば、生理活性は、アドレノメデュリン受容体cAMP機能アッセイによって規定される。以下のステップが、そうしたアッセイにおけるADMの生理活性を測定するために行われ得る：

—用量反応曲線が、ADMを用いて前述のヒト組換え型アドレノメデュリン受容体cAMP機能アッセイで作成される。

—半最大 (half-maximal) cAMP刺激のADM濃度が計算され得る。

—一定の半最大cAMPを刺激ADM濃度にて、用量反応曲線 (最大100 µg/mlの終濃度) が、それぞれADM安定化抗体、アドレノメデュリン安定化抗体フラグメント又はアドレノメデュリン安定化非Ig足場によって作成される。

【0097】

前述のADMバイオアッセイにおける50%の最大障害は、前述の抗ADM抗体、それぞれ前述の抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は前述の抗アドレノメデュリン非Ig足場が、生理活性を基礎値の50%まで障害することを意味する。前述のADMバイオアッセイにおける80%の最大障害は、それぞれ前述の抗ADM抗体、前述の抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は前述の抗アドレノメデュリン非Ig足場が、ADMの生理活性を80%まで障害することを意味する。これは、80%以下しかADM生理活性を妨げないという意味である。これは、約20%の残存ADM生理活性が依然として存在しているという意味である。

【0098】

しかしながら、本明細書によると及び先の文脈において、本明細書中に開示している抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント、及び抗ADM非Ig足場に関連する「ADMの生理活性を障害する」という表現は、最大でADM生理活性が100%~20%残存するちょっとしたADM生理活性の低減、好ましくは、循環ADM生理活性の低減、好ましくはADM生理活性が100%~50%残存するADM生理活性の低減と理解されるべきであるが；どんな場合でも、先に詳しく述べたように測定できるADM生理活性が存在する。

【0099】

ADMの生理活性は、実施例2に従ってヒト組換え型アドレノメデュリン受容体cAMP機能アッセイ (アドレノメデュリン・バイオアッセイ) で測定され得る。

【0100】

好ましい実施形態において、調節抗ADM抗体、調節抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は調節抗アドレノメデュリン非Ig足場は、体液平衡を調製するため、患者の急性疾患又は急性病態の治療法に使用される。

【0101】

そのような調節抗ADM抗体、調節抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は調節抗アドレノメデュリン非Ig足場は、敗血症の治療で特に有用であり得る。調節抗ADM抗体、調節抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は調節抗アドレノメデュリン非Ig足場は、敗血症早期においてADMの生理活性を亢進するので、そして、敗血症後期におけるADMの損傷効果を軽減する。

【0102】

「調節」抗体、調節アドレノメデュリン抗体フラグメント又は調節アドレノメデュリン

10

20

30

40

50

非 I g 足場は、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期（ $t_{1/2}$ 半減滞留時間）を少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは > 50 %、最も好ましくは > 100 % 延長し、且つ、ADM の生理活性を 80 % 未満、好ましくは 50 % 未満しか妨げない抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非 I g 足場である。半減期及び生理活性の阻害に関連するこれらの値は、これらの値を測定するための前述のアッセイ及び定義との関連で理解されなければならない。

【0103】

ADM 生理活性の阻害が、80 % 以下、すなわち、20 % の残存 ADM 生理活性を意味すると強調されなければならない。同じことが、50 % 未満までの ADM 生理活性の阻害、すなわち、残存する 50 % の ADM 生理活性にも当てはまる。

【0104】

こうした調節抗 ADM 抗体、調節抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は調節抗アドレノメデュリン非 I g 足場は、投与の投薬を容易にする利点を提供する。アドレノメデュリン生理活性の部分的阻害又は部分的低減と生体内の半減期の延長（アドレノメデュリン生理活性の増強）との組み合わせは、抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗アドレノメデュリン非 I g 足場の投薬の有益な簡便さにつながる。内因性アドレノメデュリン過剰（最大刺激、敗血症後期、ショック、低心拍出量相）の状況で、活性低下効果は、抗体、フラグメント又は足場の強い影響であり、アドレノメデュリンの（マイナス）効果を限定する。低い又は正常な内因性アドレノメデュリン濃度の場合には、抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗 ADM 非 I g 足場の生物学的効果は、（部分的に阻害による）低減又はアドレノメデュリン半減期を延長することによる増強の組み合わせである。半減期の効果が阻害効果より強ければ、内因性アドレノメデュリンの正味の生物学的活性は、敗血症早期（低アドレノメデュリン、高心拍出量相）において有益に増強される。これにより、非中和、且つ、調節抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗アドレノメデュリン非 I g 足場は、特定の生理学的範囲内に ADM の生理活性を保つための ADM 生理活性緩衝物質のように作用する。

【0105】

これにより、両方の敗血症期（早期及び後期）は、調節効果が生じた場合に、過剰な抗 ADM 抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗 ADM 非 I g 足場治療から利益を得るので、例えば、敗血症における抗 ADM 抗体／フラグメント／足場の投薬は、過剰濃度から選択され得る。過剰量とは：抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗 ADM 非 I g 足場の濃度が、例えば、敗血症、の後期（ショック）中の内因性アドレノメデュリンより高いことを意味している。これは、敗血症における調節抗 ADM 抗体、調節抗 ADM 抗体フラグメント又は調節抗 ADM 足場の場合に、投薬が以下のとおりであり得ることを意味する：

【0106】

敗血症性ショックにおける、アドレノメデュリンの濃度は、 $226 \pm 66 \text{ fmol/ml}$ であり（Nishio et al., "Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock.", Crit Care Med. 1997, 25(6):953-7）、抗体、フラグメント又は足場の等モル濃度は、 $42.5 \mu\text{g/l}$ 血液、つまり（6 l の血液量／80 kg 体重に基づいて） $3.2 \mu\text{g/kg}$ 体重である。過剰量とは、少なくとも（平均）敗血症性ショックアドレノメデュリン濃度の二倍、つまり、少なくとも $> 3 \mu\text{g}$ の抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント、又は抗 ADM 非 I g 足場／kg 体重、好ましくは、少なくとも $6.4 \mu\text{g}$ の抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗 ADM 非 I g 足場／kg 体重を意味する。好まれるのは $> 10 \mu\text{g/kg}$ 、より好まれるのは $> 20 \mu\text{g/kg}$ 、最も好まれるのは $> 100 \mu\text{g}$ の抗アドレノメデュリン抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗 ADM 非 I g 足場／kg 体重である。これはまた、敗血症性ショック以外の重篤な急性病態に適用され得る。

【0107】

本発明の特定の実施形態において、抗ADM抗体は、モノクローナル抗体であるか、又はその抗ADM抗体フラグメントである。本発明の一実施形態において、抗ADM抗体又は抗ADM抗体フラグメントは、ヒト抗体若しくはヒト化抗体であるか、又はそれらから誘導される。具体的な一実施形態において、1若しくは複数の（マウス）CDRが、ヒト抗体若しくは抗体フラグメント内にグラフトされる。

【0108】

一態様において、本発明の対象は、ADMに結合するヒトCDRグラフト抗体又はその抗体フラグメントであって、前記ヒトCDRグラフト抗体又はその抗体フラグメントが、以下の：

配列番号：1

GYTFSTRYW

配列番号：2

ILPGSGST

及び／又は

配列番号：3

TEGYEYDGFY

を含む抗体重鎖（H鎖）を含んで成り、及び／又は以下の抗体軽鎖（L鎖）：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

及び／又は

配列番号：6

FQGSHIPYT

をさらに含んで成ることを特徴とする。

【0109】

本発明の具体的な一実施形態において、本発明の対象は、ADMに結合するヒトモノクローナル抗体又はADMに結合するその抗体フラグメントであって、その重鎖が、以下の：

配列番号：1

GYTFSTRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFY

を含んで成る群から選択された少なくとも1つのCDRを含むことを特徴とし、且つ、その軽鎖が、以下の：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHIPYT

を含んで成る群から選択された少なくとも1つのCDRを含むことを特徴とする。

【0110】

本発明のより具体的な実施形態、本発明の対象は、ADMに結合するヒトモノクローナル抗体又はADMに結合するその抗体フラグメントであって、その重鎖が、以下の配列：

配列番号：1

GYTFSTRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFY

を含んで成ることを特徴とし、且つ、その軽鎖が、以下の配列：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHPYT

を含んで成ることを特徴とする。

【0111】

非常に具体的な実施形態において、抗ADM抗体は：配列番号7、8、9、10、11、12、13及び14を含んで成る群から選択された配列を有する。

【0112】

本発明による抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、親和定数が 10^{-7} M超であり、好まれるのは 10^{-8} Mであり、好まれる親和性は 10^{-9} M超であり、最も好まれるのは 10^{-10} M超であるような、ヒトADMに対する親和性を呈する。当業者は、高い用量の化合物を適用することによって低い親和性を補うと判断されることは知っているので、この測定が、本発明の範囲外につながることはないであろう。親和定数は、実施例1に記載の方法に従って測定され得る。

【0113】

好ましい実施形態において、抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、前述の慢性若しくは急性疾患又は患者の急性病態の間の死亡リスクを低減するために使用される。

【0114】

本発明による慢性若しくは急性疾患又は急性病態は、例えば、髄膜炎、全身性炎症反応症候群（SIRS）、敗血症のような重症感染症；糖尿病、癌のような他の疾患、例えば、心不全、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症のような急性若しくは慢性の血管疾患；例えば、敗血症性ショックのようなショック、並びに、例えば、腎機能障害、肝機能障害のような臓器機能障害、又は毛細血管漏出、外傷、中毒、外科手術、を含んで成る群から選択される疾患又は病態であり得る。本発明の抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、敗血症及び敗血症性ショック、すなわち、敗血症後期の間の死亡リスクを低減するために特に有効である。

【0115】

ここで、患者が先の段落で概説したように、原発性又は基礎疾患として慢性若しくは急性疾患又は病態に罹患している可能性はあるが；しかしながら、本発明による抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、前述の疾患の一次療法を意図しておらず、輸液の投与を必要としている患者の体液平衡の調整を意図しており、そのためむしろ、原発性疾患に伴う急性疾患又は急性病態と見なされ得ることをは強調されなければならない。そのうえ、述の輸液投与の前必要性は、原発性の基礎疾患に関連し得るが、これは本発明の範囲内に必須ではない。

【0116】

そのため、一実施形態において、抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、本発明による患者の急性疾患又は急性病態の治療法において使用されるが、前述の患者がICUの患者であることを特徴とする。別の実施形態において、抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場は、本発明による患者の急性疾患の治療法において使用されるが、前述の患者が重症であることを特徴とする。重症とは、患者が死亡の可能性のある又はそれが差し迫っている疾患

10

20

30

40

50

又は健康状態にあることを意味する。

【0117】

本発明の対象は、本発明による患者の急性疾患の治療法における使用に向けた更なる抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場であって、前述の抗体又はフラグメントが、ADM結合タンパク質との組み合わせで使用されるべきであることを特徴とする。ADM結合タンパク質もまた、前述の患者の血液循環中に普通に存在している。

【0118】

ADM結合タンパク質という用語はまた、ADM結合タンパク質1（補体因子H）も意味することを強調しなければならないが、しかしながら、前記ADM結合タンパク質1は、本発明によるような非中和の調節抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント、又は抗ADM非Ig足場でない。

【0119】

本発明の対象は、本発明による患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた更なる抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場であって、前述の抗体、フラグメント、足場は、更なる有効成分と組み合わせて使用されるべきである。

【0120】

本発明の対象はまた、一次薬剤と組み合わせて使用されるべき抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場でもあって、前述の組み合わせは、患者の急性疾患又は急性病態の治療法において、前述の患者の体液平衡を調整するための使用に向けたものである。

【0121】

一次薬剤は、前述の疾患又は病態の主原因に対して作用する薬剤を意味する。前述の一次薬剤は、感染症の場合には抗生物質であり得る。

【0122】

前述の主原因は、原発性の基礎疾患又は病態に関連しており、患者の体液恒常性障害に関連する急性疾患又は急性病態に関連しておらず、それに向けて、本明細書中に提供される体液平衡を調整する治療法が意図されていると強調されなければならない。

【0123】

先に触れた組み合わせに関する特定の実施形態において、前述の組み合わせは、昇圧薬、例えば、カテコールアミンと組み合わせて使用されるべきであって、前述の更なる組み合わせは、患者の急性疾患又は病態の治療法において、体液平衡を調整するために使用するものである。

【0124】

本発明の一実施形態において、体液平衡を調整する必要がある慢性若しくは急性疾患又は慢性病態に罹患している前述の患者は、その患者が昇圧薬の投与、例えばカテコールアミンを投与する必要性を特徴とする。

【0125】

前述の患者が、癌又は糖尿病などの慢性若しくは急性疾患又は慢性病態に罹患しており、そのためこれが原発性又は基礎疾患と見なされ得るが、しかし加えて、前述の患者は、例えば、SIRS、敗血症、重症敗血症、又はショック若しくは敗血症ショックなどの急性疾患又は急性病態に起因し得る体液平衡の急性の調整を必要としている状態にもあることは強調されなければならない。

【0126】

これにより、具体的な一実施形態における本発明の対象は、昇圧薬の治療、例えば、カテコールアミン治療、を必要としている患者の治療法における使用に向けたADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分と組み合わせて使用されるべき抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

10

20

30

40

50

【0127】

先に触れた組み合わせの具体的な実施形態において、前述の組み合わせは、静脈内に投与される輸液と組み合わせ使用されるべきであって、前述の組み合わせは、体液平衡を調整するために、患者の急性疾患又は病態の治療法における使用に向けたものである。

【0128】

本発明の一実施形態において、体液平衡を調整する必要がある慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している前述の患者は、その患者が静脈内輸液を受ける必要性を特徴とする。

【0129】

これにより、具体的な一実施形態における本発明の対象は、静脈内輸液を必要としている患者の治療法における使用に向けたADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分と組み合わせた、抗アドレノメデュリン（ADM）抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。

10

【0130】

前述の抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場、或いはADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分とそれらの組み合わせは、体液平衡を調整するために、患者の急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、昇圧薬、例えば、カテコールアミンと組み合わせ、及び／又は静脈内に投与される輸液と組み合わせ使用され得る。

【0131】

本発明の対象はまた、TNF- α 抗体と組み合わせ使用されるべき、本発明による抗ADM抗体、抗アドレノメデュリン抗体フラグメント又は抗ADM非Ig足場である。TNF- α 抗体は、患者の治療向けに市販されている。

20

【0132】

本発明の対象は、本発明による抗ADM抗体、抗ADM抗体フラグメント、又は抗ADM足場を含んで成る更なる医薬製剤である。

【0133】

本発明の対象は、本発明による更なる医薬製剤であって、前述の医薬製剤は、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である。

【0134】

前述の医薬製剤は、筋肉内に投与され得る。前述の医薬製剤は、血管内に投与され得る。前述の医薬製剤は、輸液を介して投与され得る。

30

【0135】

本発明による医薬製剤が、体液平衡を調整するために、筋肉内に、血管内に、又は輸液を介して患者に投与され得る場合、前述の患者に体液平衡を調整する必要があることを条件とすることは強調されなければならない。

【0136】

そのため、本発明の別の実施形態において、本発明による医薬製剤は、体液平衡を調整するために患者に投与されなければならないが、但し、前述の患者に体液平衡を調整する必要があることを条件とする。

40

【0137】

本発明の文脈の中での「体液平衡の調整」という表現は、慢性若しくは急性基礎疾患又は急性基礎病態に起因する患者の体液平衡の明白な一平衡障害のあらゆる矯正に向けられる。前述の矯正は、前述の患者における正常血圧の回復の利益になる。当業者は、一般に、血圧、並びに高血圧及び低血圧が患者の体液平衡と密接に関連していることを十分に認識している。体液平衡とは、代謝過程が機能できるようにする体内への体液の流入量と排出量の平衡である。脱水状態は、体液喪失の結果としての1%以上の体重減少と規定される。体液平衡と水分補給状態を評価するための3つの要素は：臨床的評価、つまり、体重と尿排出量；体液平衡チャートの検討及び血液化学の検討である。当業者にとって、このすべてが十分に周知である（Alison Shepherd, Nursing Times 19.07.11/Vol 107 No 2

50

8, p 12-16)。

【0138】

そのため、一実施形態において、そのような患者の体液平衡の調整及び／又は体液平衡の改善を必要としている人とは、体液喪失の結果として1%以上の体重減少がある人である。体液平衡は、Scales and Pilsworth (2008) Nursing Standard 22:47, 50-57に従って評価され得る。例えば、正常な尿排出量は、1時間あたり0.5～2 ml/kg体重の範囲内にある。正常な腎臓機能を有する患者の最低限の許容尿排出量は、1時間あたり0.5 ml/kgである。これらのすべての基準値が、患者が体液平衡の調整及び／又は体液平衡の改善を必要としているかどうか評価するのに使用され得る。

【0139】

別の実施形態において、本発明の対象は、本発明による更なる医薬製剤であって、前述の医薬製剤が、使用前に再構成される乾燥状態にあることを特徴とする。

【0140】

別の実施形態において、本発明の対象は、本発明による更なる医薬製剤であって、前述の医薬製剤が凍結乾燥状態にあることを特徴とする。

【0141】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0142】

1. 体液平衡の調整のための、患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けアドレノメデュリン (ADM) 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0143】

2. 前記抗体の形式が、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、(Fab)₂フラグメント及びscFv-Fc融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項1に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0144】

3. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端部 (aa1-21) に結合する、請求項1又は2に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0145】

4. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端部 (aa1) を認識又は結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0146】

5. 前記抗体又はフラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンのt_{1/2}半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体又はADM安定化抗体フラグメントである、請求項1～4のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0147】

6. 前記抗体又はフラグメントが、ADMの生理活性を80%未満まで、好ましくは50%未満まで妨げる、請求項1～5のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0148】

7. 前記疾患が、敗血症、糖尿病、癌、心不全、ショック、及び腎機能障害を含んで成る群から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0149】

8. 前記患者がICUの患者である、請求項1～7のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラ

10

20

30

40

50

グメント。

【0150】

9. 前記抗体又はフラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長し、且つ、ADMの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げる調節抗体又はフラグメントである、請求項1～7のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0151】

10. 請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメントを含んで成る医薬製剤。 10

【0152】

11. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項10に記載の医薬製剤。

【0153】

12. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項10に記載の医薬製剤。

【0154】

13. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項10～11のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0155】

14. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項10～11のいずれか1項に記載の医薬製剤。 20

【0156】

15. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項14に記載の医薬製剤。

【0157】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0158】

1. 体液平衡の調整のための、患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用向けアドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。 30

【0159】

2. 前記ADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場が、非中和ADM抗体、非中和アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非中和ADM非Ig足場である、請求項1に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0160】

3. 前記患者の水肿を予防するか又は低減するための、請求項1又は2に記載の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用向けアドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0161】

4. 前記抗体の形式が、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、(Fab)₂フラグメント及びscFv-Fc融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。 40

【0162】

5. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端部（aa1-21）に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0163】

6. 前記抗体、フラグメント又は足場が、アドレノメデュリンのN末端部（aa 50

1) を認識又は結合する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

【0164】

7. 前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 50%、より好ましくは > 50%、最も好ましくは > 100% 延長する A D M 安定化抗体、A D M 安定化抗体フラグメント又は A D M 安定化非 I g 足場である、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

【0165】

8. 前記抗体又はフラグメントが、A D M の生理活性を 80% 未満まで、好ましくは 50% 未満まで妨げる、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

10

【0166】

9. 前記疾患が、S I R S、敗血症、糖尿病、癌、心不全、ショック、及び腎機能障害を含んで成る群から選択される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向け A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

【0167】

10. 前記抗体又はフラグメントが、A D M 又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメントであり、前記重鎖が以下の配列：

20

配列番号：1

GYTFSTRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFYD

を含んで成り、且つ、前記軽鎖が以下の配列：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHIPYT

を含んで成る、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

30

【0168】

11. 前記抗体又はフラグメントが、以下の配列を含んで成る群から選択される配列を含んで成る、請求項 10 に記載の A D M 又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメント：

【0169】

40

配列番号：7 (A M - V H - C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPBGHLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0170】

配列番号：8 (A M - V H 1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0171】

50

配列番号：9 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0172】

配列番号：10 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0173】

配列番号：11 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0174】

配列番号：12 (AM-VL-C)

DVLLSQTPSLPVSIGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLGVIYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

【0175】

配列番号：13 (AM-VL1)

DVVMQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVIYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0176】

配列番号：14 (AM-VL2-E40)

DVVMQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVIYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0177】

12. 前記患者がICUの患者である、請求項1～9のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0178】

13. 前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期 ($t_{1/2}$ 半減滞留時間) を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長し、且つ、ADMの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げる調節抗体、フラグメント又は足場である、請求項1～12のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0179】

14. カテコールアミン及び／又は静脈内に投与される輸液と組み合わせて使用される、請求項1～13のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0180】

15. ADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分と組み合わせて使用される、請求項1～13のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用に向けたADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場、或いは請求項12に記載の組み合わせ。

【0181】

10

20

30

40

50

16. 請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体、フラグメント又は足場を含んで成る医薬製剤。

【0182】

17. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項16に記載の医薬製剤。

【0183】

18. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項16に記載の医薬製剤。

【0184】

19. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項16～17のいずれか1項に記載の医薬製剤。

10

【0185】

20. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項16～17のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0186】

21. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項20に記載の医薬製剤。

【0187】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0188】

1. 血液循環の安定化のための、患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けアドレノメデュリン（ADM）抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

20

【0189】

2. 前記抗体又はフラグメントが、前記患者のカテコールアミン要求量を低減する、請求項1に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0190】

3. 前記抗体の形式が、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、(Fab)₂フラグメント及びscFv-Fc融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項1又は2に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0191】

4. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末部分（aa1-21）に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

30

【0192】

5. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端端部（aa1）を認識又は結合する、請求項1～4のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0193】

6. 前記抗体又はフラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体である、請求項1～5のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

40

【0194】

7. 前記抗体又はフラグメントが、ADMの生理活性を80%未満まで、好ましくは50%未満まで妨げる、請求項1～6のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0195】

8. 前記抗体又はフラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長し、且つ、ADMの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げる調節ADM抗体又は調節アドレノメデュリン抗体フラグメン

50

トである、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0196】

9. 前記疾患が、敗血症、糖尿病、癌、例えば心不全のような急性若しくは慢性血管疾患、例えば敗血症性ショックのようなショック、及び、例えば腎機能障害のような臓器機能障害を含んで成る群から選択される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向け A D M 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0197】

10. 請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の抗体を含んで成る医薬製剤。

10

【0198】

11. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項 10 に記載の医薬製剤。

【0199】

12. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項 10 に記載の医薬製剤。

【0200】

13. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項 10～11 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【0201】

14. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項 10～11 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

20

【0202】

15. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項 14 に記載の医薬製剤。

【0203】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0204】

1. 血液循環の安定化のための、患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用向けアドレノメデュリン（A D M）抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

【0205】

2. 前記抗体、フラグメント又は足場が、前記患者の昇圧薬の要求量、例えばカテコールアミン要求量を低減する、請求項 1 に記載の A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

30

【0206】

3. 前記 A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場が、非中和 A D M 抗体、非中和アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非中和 A D M 非 I g 足場である、請求項 1 又は 2 に記載の A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

【0207】

4. 前記抗体の形式が、F v フラグメント、s c F v フラグメント、F a b フラグメント、s c F a b フラグメント、(F a b)₂ フラグメント及び s c F v - F c 融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

40

【0208】

5. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンの N 末端部（a a 1 - 2 1）に結合する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は A D M 非 I g 足場。

【0209】

6. 前記抗体、フラグメント又は足場が、アドレノメデュリンの N 末端部（a a 1）を認識又は結合する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の A D M 抗体、アドレノメ

50

デュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0210】

7. 前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体、フラグメント又は足場である、請求項1～6のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0211】

8. 前記抗体、フラグメント又は足場が、ADMの生理活性を80%未満まで、好ましくは50%未満まで妨げる、請求項1～7のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

10

【0212】

9. 前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長し、且つ、ADMの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げる調節ADM抗体、調節アドレノメデュリン抗体フラグメント又は足場である、請求項1～8のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0213】

10. 前記抗体又はフラグメントが、ADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメントであり、前記重鎖が以下の配列：

20

配列番号：1

GYTFSTRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFY

を含んで成り、且つ、前記軽鎖が以下の配列：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHPYT

を含んで成る、請求項1～9のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

30

【0214】

11. 前記抗体又はフラグメントが、以下の配列を含んで成る群から選択される配列を含んで成る、請求項10に記載のADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメント：

40

【0215】

配列番号：7 (AM-VH-C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0216】

配列番号：8 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

50

【0217】

配列番号：9 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0218】

配列番号：10 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

10

【0219】

配列番号：11 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0220】

配列番号：12 (AM-VL-C)

DVLLSQTPSLPVLGQDQATISCRSSQSIIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

20

【0221】

配列番号：13 (AM-VL1)

DVVMQSPSLPVLGQDQATISCRSSQSIIVYSNGNTYLEWYFQRPQSPRRLLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0222】

配列番号：14 (AM-VL2-E40)

DVVMQSPSLPVLGQDQATISCRSSQSIIVYSNGNTYLEWYFQRPQSPRRLLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

【0223】

12. 前記疾患が、SIRS、敗血症、糖尿病、癌、例えば心不全のような急性若しくは慢性血管疾患、例えば敗血症性ショックのようなショック、及び、例えば腎機能障害のような臓器機能障害を含んで成る群から選択される、請求項1～11のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0224】

13. カテコールアミン及び／又は静脈内に投与される輸液と組み合わせて使用される、請求項1～12のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

40

【0225】

14. ADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分と組み合わせて使用される、請求項1～13のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用に向けたADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場、或いは請求項10に記載の組み合わせ。

【0226】

15. 請求項1～14のいずれか1項に記載の抗体、フラグメント又は非Ig足場を含んで成る医薬製剤。

【0227】

16. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請

50

求項 15 に記載の医薬製剤。

【0228】

17. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項 15 に記載の医薬製剤。

【0229】

18. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項 15 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【0230】

19. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項 14 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の医薬製剤。

【0231】

20. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項 16 に記載の医薬製剤。

【0232】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0233】

1. 慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメントであって、前記抗体又は前記フラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは $> 50 %$ 、最も好ましくは $> 100 %$ 延長する ADM 安定化抗体又はフラグメントであることを特徴とし、及び／又は前記抗体が、ADM の生理活性を 80 % 未満、好ましくは 50 % 未満まで妨げることを特徴とする、アドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0234】

2. 慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメントであって、前記抗体又は前記フラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは $> 50 %$ 、最も好ましくは $> 100 %$ 延長する調節 ADM 抗体又はフラグメントであり、且つ、ADM の生理活性を 80 % 未満、好ましくは 50 % 未満まで妨げることを特徴とする、アドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0235】

3. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンの N 末部分 (aa 1 - 21) に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0236】

4. 請求項 3 に記載の前記抗体又は前記フラグメントが、アドレノメデュリンの N 末端端部に結合する、慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0237】

5. 前記抗体又は前記フラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは $> 50 %$ 、最も好ましくは $> 100 %$ 延長する ADM 安定化抗体又はフラグメントである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0238】

6. 前記抗体又は前記フラグメントが、ADM の生理活性を 80 % 未満まで、好ましくは 50 % 未満まで妨げる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0239】

7. 前記疾患が、SIRS、敗血症、敗血症性ショック、糖尿病、癌、心不全、シ

10

20

30

40

50

ショック、臓器不全、腎機能障害、急性体液恒常性障害、及び低血圧を含んで成る群から選択される、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0240】

8. 前記疾患が、敗血症性ショック又は敗血症である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0241】

9. 前記抗体又はフラグメントが、前記患者の体液平衡を調整する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

10

【0242】

10. 前記抗体又はフラグメントが臓器機能障害又は臓器不全の予防に使用される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0243】

11. 前記抗体又はフラグメントが、腎機能障害又は腎不全の予防に使用される、請求項 10 に記載の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0244】

20

12. 前記抗体又はフラグメントが、血液循環の安定化に使用される、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療における使用向けアドレノメデュリン (ADM) 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0245】

13. 前記抗体又はフラグメントが、前記患者のカテコールアミン要求量を低減する、請求項 12 に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療における使用向け ADM 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0246】

14. 前記患者の死亡リスクの低減のための、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療における使用向け ADM 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

30

【0247】

15. 前記抗体又はフラグメントが、少なくとも $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で投与され得る、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療における使用向け ADM 抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0248】

16. 請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の抗体又はフラグメントを含んで成る医薬組成物。

【0249】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

40

【0250】

1. アドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は ADM 非 Ig 足場であって、前記抗体、前記フラグメント又は足場が、非中和抗体であることを特徴とするもの。

【0251】

2. アドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は ADM 非 Ig 足場であって、前記抗体、前記フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期 ($t_{1/2}$ 半減滞留時間) を少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 50%、より好ましくは $>50\%$ 、最も好ましくは $>100\%$ 延長する ADM 安定化抗体、フラグメント又は足場であることを特徴とし、及び／又は前記抗体、フラグメント

50

又は足場が、ADMの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げることを特徴とする、アドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0252】

3. アドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場であって、前記抗体又は前記フラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期 ($t_{1/2}$ 半減滞留時間) を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長する調節ADM抗体、フラグメント又は足場であり、且つ、ADMの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げることを特徴とする、アドレノメデュリン抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

10

【0253】

4. 前記抗体、フラグメント又は足場が、アドレノメデュリンのN末部分 (aa1-21) に結合する、請求項1又は2に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0254】

5. 請求項3に記載の前記抗体、前記フラグメント又は足場が、アドレノメデュリンのN末端端部に結合する、アドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0255】

6. 前記抗体、前記フラグメント又は前記足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体又はフラグメントである、請求項1～4のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

20

【0256】

7. 活性な医薬物質としての使用に向けた、請求項1～6のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0257】

8. 前記疾患又は病態が、例えば、髄膜炎、全身的炎症反応症候群 (SIRS)、敗血症のような重症感染症；糖尿病、癌のような他の疾患、例えば、心不全、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症のような急性若しくは慢性血管疾患；例えば、敗血症性ショックのようなショック、並びに、例えば、腎機能障害、肝機能障害のような臓器機能障害、熱傷、外科手術、外傷を含んで成る群から選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

30

【0258】

9. 前記疾患が、敗血症性ショック又は敗血症である、請求項1～8のいずれか1項に記載の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0259】

10. 前記抗体又はフラグメントが、ADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメントであり、前記重鎖が以下の配列：

40

配列番号：1

GYTFSTRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFY

の少なくとも1つを含んで成り、及び／又は前記軽鎖が以下の配列：

配列番号：4

50

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHIPYT

の少なくとも1つを含んで成る、請求項1～9のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0260】

11. 前記抗体又はフラグメントが、以下の配列を含んで成る群から選択される配列を含んで成る、請求項10に記載のADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメント：

10

【0261】

配列番号：7 (AM-VH-C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPQHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0262】

配列番号：8 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

20

【0263】

配列番号：9 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0264】

配列番号：10 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

30

【0265】

配列番号：11 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0266】

配列番号：12 (AM-VL-C)

DVLLSQTPSLPVSIGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLGVIYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

40

【0267】

配列番号：13 (AM-VL1)

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVIYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0268】

配列番号：14 (AM-VL2-E40)

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVIYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ

50

SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

【0269】

12. 慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の体液平衡を調整するための、請求項1～11のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0270】

13. 慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の臓器機能障害又は臓器不全を予防又は軽減するための、請求項1～11のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0271】

14. 前記臓器が、腎臓又は肝臓である、請求項13に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0272】

15. 慢性若しくは急性疾患又は急性病態に罹患している患者の血液循環の安定化のための、請求項1～14のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0273】

16. 前記抗体又はフラグメントが、前記患者のカテコールアミン要求量を低減する、請求項15に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0274】

17. 昇圧薬、例えば、カテコールアミンと組み合わせて使用される、請求項1～16のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0275】

18. 静脈内輸液投与と組み合わせて使用される、請求項1～17のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0276】

19. TNF- α 抗体と組み合わせて使用される、請求項1～18のいずれか1項に記載のアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0277】

20. 前記抗体又はフラグメントが、少なくとも3 μ g/kg体重の用量で投与され得る、請求項1～19のいずれか1項に記載のそれを必要としている患者の治療における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非Ig足場。

【0278】

21. 請求項1～20のいずれか1項に記載の抗体、フラグメント又は足場を含んで成る医薬組成物。

【0279】

22. 慢性若しくは急性疾患又は慢性の病態の治療における使用に向けた、請求項1～20のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非Ig足場。

【0280】

23. 前記疾患が敗血症である、請求項22に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非Ig足場。

【0281】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0282】

1. 患者の重篤な慢性又は急性疾患の治療法における使用に向けた、前記患者の死

10

20

30

40

50

亡リスクの低減のためのアドレノメデュリン（ADM）抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0283】

2. 前記抗体の形式が、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、(Fab)₂フラグメント及びscFv-Fc融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項1に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0284】

3. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端部（aa1-21）に結合する、請求項1又は2に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

10

【0285】

4. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端部（aa1）を認識又は結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0286】

5. 前記抗体又はフラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンのt_{1/2}半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体又はフラグメントである、請求項1～4のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

20

【0287】

6. 前記抗体又はフラグメントが、ADMの生理活性を80%未満まで、好ましくは50%未満まで妨げる、請求項1～5のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0288】

7. 前記疾患が、敗血症、糖尿病、癌、心不全、ショック、及び腎機能障害を含んで成る群から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0289】

8. 前記患者がICUの患者である、請求項1～7のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

30

【0290】

9. 前記死亡リスクが、有害事象を予防することによって低減される、請求項1～8のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメントであって、後者が、SIRS、敗血症、敗血症性ショック、臓器不全、腎不全、体液恒常性障害、及び低血圧を含んで成る群から選択されるADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0291】

10. 請求項1～8のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患の治療における使用のためのADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメントであって、斯かる抗体又はフラグメントが、ADM結合タンパク質との組み合わせで使用される、ADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

40

【0292】

11. 請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメントを含んで成る医薬製剤。

【0293】

12. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項11に記載の医薬製剤。

50

【0294】

13. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項11に記載の医薬製剤。

【0295】

14. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項11～12のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0296】

15. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項11～12のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0297】

16. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項15に記載の医薬製剤。

10

【0298】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0299】

1. 患者の重篤な慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、前記患者の死亡リスクの低減のためのアドレノメデュリン（ADM）抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場であって、前記抗体、フラグメント又は足場が、非中和ADM抗体、非中和アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非中和ADM非Ig足場であることを特徴とするもの。

【0300】

2. 前記抗体の形式が、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、(Fab)₂フラグメント及びscFv-Fc融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項1に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

20

【0301】

3. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端部（aa1-21）に結合する、請求項1又は2に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0302】

4. 前記抗体、フラグメント又は足場が、アドレノメデュリンのN末端部（aa1）を認識又は結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

30

【0303】

5. 前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンのt_{1/2}半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体、フラグメント又は足場である、請求項1～4のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0304】

6. 前記抗体、フラグメント又は足場が、ADMの生理活性を80%未満まで、好ましくは50%未満まで妨げる、請求項1～5のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

40

【0305】

7. 前記疾患が、例えば、髄膜炎、全身的炎症反応症候群（SIRS）、敗血症のような重症感染症；糖尿病、癌のような他の疾患、例えば、心不全、心筋梗塞、脳卒中、アテローム性動脈硬化症のような急性若しくは慢性血管疾患；例えば、敗血症性ショックのようなショック、並びに、例えば、腎機能障害、肝機能障害のような臓器機能障害、熱傷、外科手術、外傷を含んで成る群から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療における使用向けアドレノメデュリン抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0306】

50

8. 請求項1～7のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場であって、前記疾患が、SIRS、重症感染症、敗血症、例えば、敗血症性ショックのようなショックを含んで成る群から選択されることを特徴とするADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0307】

9. 前記患者が、ICUの患者である、請求項1～8のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けたADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0308】

10. 前記死亡リスクが、有害事象を予防することによって低減される、請求項1～9のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場であって、後者が、SIRS、敗血症、例えば敗血症性ショックのようなショック、例えば急性心不全、心筋梗塞、脳卒中のような急性若しくは慢性血管疾患、例えば腎不全、肝不全のような臓器不全、体液恒常性障害、並びに低血圧を含んで成る群から選択されるADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0309】

11. 前記抗体又はフラグメントが、ADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメントであり、前記重鎖が以下の配列：

配列番号：1

GYTFSRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFY

を含んで成り、且つ、前記軽鎖が以下の配列：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHIPYT

を含んで成る、請求項1～9のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0310】

12. 前記抗体又はフラグメントが、以下の配列を含んで成る群から選択される配列を含んで成る、請求項10に記載のADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメント：

【0311】

配列番号：7 (AM-VH-C)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0312】

配列番号：8 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0313】

10

20

30

40

50

配列番号：9 (A M - V H 2 - E 4 0)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0314】

配列番号：10 (A M - V H 3 - T 2 6 - E 5 5)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0315】

配列番号：11 (A M - V H 4 - T 2 6 - E 4 0 - E 5 5)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0316】

配列番号：12 (A M - V L - C)

DVLLSQTPSLPVSIGDQATISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLGVIYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

【0317】

配列番号：13 (A M - V L 1)

DVVMQTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVIYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0318】

配列番号：14 (A M - V L 2 - E 4 0)

DVVMQTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVIYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0319】

13. 昇圧薬、例えば、カテコールアミン及び／又は静脈内に投与される輸液と組み合わせて使用される、請求項1～12のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0320】

14. ADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分と組み合わせて使用される、請求項1～13のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用に向けたADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場、或いは請求項10に記載の組み合わせ。

【0321】

15. 請求項1～14のいずれか1項に記載の抗体、フラグメント又は足場を含んで成る医薬製剤。

【0322】

16. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項15に記載の医薬製剤。

【0323】

17. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項15に記載の医薬製剤。

【0324】

18. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項15～16のいずれか1項に記載の医薬製剤。

10

20

30

40

50

【0325】

19. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項15～16のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0326】

20. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項19に記載の医薬製剤。

【0327】

21. ADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場であって、前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリン、好ましくはヒトADM、のN末端部（aa1-21）に結合することを特徴とするもの。

【0328】

22. 前記抗体、フラグメント又は足場が、アドレノメデュリンのN末端端部（aa1）を認識又は結合する、請求項12に記載の抗体、フラグメント又は足場。

【0329】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0330】

1. 臓器機能障害又は臓器不全の予防のための、患者の慢性若しくは急性疾患の治療法における使用向けアドレノメデュリン（ADM）抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0331】

2. 前記臓器は腎臓である、請求項1に記載の慢性若しくは急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0332】

3. 前記抗体の形式が、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、scFabフラグメント、（Fab）₂フラグメント及びscFv-Fc融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項1に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0333】

4. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末部分（aa1-21）に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0334】

5. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端端部（aa1）を認識又は結合する、請求項1～4のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0335】

6. 前記抗体又は前記フラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンのt_{1/2}半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体又はフラグメントである、請求項1～5のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0336】

7. 前記抗体が、ADMの生理活性を80%未満まで、好ましくは50%未満まで妨げる、請求項1～6のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0337】

8. 前記疾患が、敗血症、糖尿病、癌、心不全、及びショックを含んで成る群から選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患の治療法における使用向けADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0338】

9. 前記患者がICUの患者である、請求項1～8のいずれか1項に記載の患者の

10

20

30

40

50

慢性又は急性疾患の治療法における使用向けA D M抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0339】

10. 前記抗体又はフラグメントが、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長し、且つ、A D Mの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げる調節抗体又はフラグメントである、請求項1～9のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けA D M抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0340】

11. 請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメントを含んで成る医薬製剤。

【0341】

12. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項11に記載の医薬製剤。

【0342】

13. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項11に記載の医薬製剤。

【0343】

14. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項11～12のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0344】

15. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項11～12のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0345】

16. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項15に記載の医薬製剤。

【0346】

本発明の範囲内の更なる実施形態は、以下に示される：

【0347】

1. 患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けた、前記患者臓器機能障害の予防若しくは軽減、又は臓器不全の予防のためのアドレノメデュリン(A D M)抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はA D M非I g足場。

【0348】

2. 前記臓器が、腎臓又は肝臓である、請求項1に記載の慢性若しくは急性疾患又は急性疾患の治療法における使用向けA D M抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はA D M非I g足場。

【0349】

3. 前記A D M抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はA D M非I g足場が、非中和A D M抗体、非中和アドレノメデュリン抗体フラグメント又は非中和A D M非I g足場である、請求項1又は2に記載のA D M抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はA D M非I g足場。

【0350】

4. 前記抗体の形式が、F vフラグメント、s c F vフラグメント、F a bフラグメント、s c F a bフラグメント、(F a b)₂フラグメント及びs c F v－F c融合タンパク質を含んで成る群から選択される、請求項1又は3に記載のA D M抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はA D M非I g足場。

【0351】

5. 前記抗体又はフラグメントが、アドレノメデュリンのN末端部(a a 1－2 1)に結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載のA D M抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はA D M非I g足場。

【0352】

6. 前記抗体、フラグメント又は足場が、アドレノメデュリンのN末端端部（aa 1）を認識又は結合する、請求項1～5のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0353】

7. 前記抗体、前記フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの $t_{1/2}$ 半減滞留時間を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長するADM安定化抗体、フラグメント又は足場である、請求項1～6のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0354】

8. 前記抗体、フラグメント又は足場が、ADMの生理活性を80%未満まで、好ましくは50%未満まで妨げる、請求項1～7のいずれか1項に記載のADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0355】

9. 前記疾患が、敗血症、糖尿病、癌、心不全、及びショックを含んで成る群から選択される、請求項1～8のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0356】

10. 前記抗体又はフラグメントが、ADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメントであり、前記重鎖が以下の配列：

配列番号：1

GYTFSTRYW

配列番号：2

ILPGSGST

配列番号：3

TEGYEYDGFY

を含んで成り、且つ、前記軽鎖が以下の配列：

配列番号：4

QSIVYSNGNTY

配列番号：5

RVS

配列番号：6

FQGSHPYT

を含んで成る、請求項1～9のいずれか1項に記載のADM抗体又はアドレノメデュリン抗体フラグメント。

【0357】

11. 前記抗体又はフラグメントが、以下の配列を含んで成る群から選択される配列を含んで成る、請求項10に記載のADM又はその抗体フラグメントに結合するヒトモノクローナル抗体又はフラグメント：

【0358】

配列番号：7（AM-VH-C）

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGLGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

【0359】

配列番号：8（AM-VH1）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

10

20

30

40

50

【0360】

配列番号：9 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0361】

配列番号：10 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

10

【0362】

配列番号：11 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0363】

配列番号：12 (AM-VL-C)

DVLLSQTPSLPVSIGDQATISCRSSQSIIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPRDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

20

【0364】

配列番号：13 (AM-VL1)

DVVMQTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPRDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0365】

配列番号：14 (AM-VL2-E40)

DVVMQTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPRDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLVGYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

【0366】

12. 前記抗体、フラグメント又は足場が、血清、血液、血漿中のアドレノメデュリンの半減期 ($t_{1/2}$ 半減滞留時間) を少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは>50%、最も好ましくは>100%延長し、且つ、ADMの生理活性を80%未満、好ましくは50%未満まで妨げる調節抗体、フラグメント又は足場である、請求項1～11のいずれか1項に記載の患者の慢性又は急性疾患の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

【0367】

13. 昇圧薬、例えばカテコールアミン及び／又は静脈内に投与される輸液と組み合わせて使用される、請求項1～12のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用向けADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場。

40

【0368】

14. ADM結合タンパク質及び／又は更なる有効成分と組み合わせて使用される、請求項1～13のいずれか1項に記載の患者の慢性若しくは急性疾患又は急性病態の治療法における使用に向けたADM抗体、アドレノメデュリン抗体フラグメント又はADM非Ig足場、或いは請求項13に記載の組み合わせ。

【0369】

15. 請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメントを含んで成る医薬製剤。

50

【0370】

16. 前記医薬製剤が、溶液であり、好ましくはすぐに使用できる溶液である、請求項14に記載の医薬製剤。

【0371】

17. 前記医薬製剤が、凍結乾燥状態にある、請求項14に記載の医薬製剤。

【0372】

18. 前記医薬製剤が、筋肉内に投与される、請求項14～15のいずれか1項に記載の医薬製剤。

【0373】

19. 前記医薬製剤が、血管内に投与される、請求項14～15のいずれか1項に記載の医薬製剤。 10

【0374】

20. 前記医薬製剤が、輸液を介して投与される、請求項18に記載の医薬製剤。

【図面の簡単な説明】

【0375】

【図1a】抗体形式の例示－Fv及びscFv－バリエーション。

【図1b】抗体様式の例示－ヘテロログス融合抗体及び二機能性抗体。

【図1c】抗体様式の例示－二価抗体及び二重特異性抗体。

【図2】hADM1-52（配列番号21）、mADM1-50（配列番号22）、ヒトADM（配列番号23）のaa1-21、ヒトADM（配列番号24）のaa1-42、ヒトADM（配列番号25）のaa43-52、ヒトADM（配列番号26）のaa1-14、ヒトADM（配列番号27）のaa1-10、ヒトADM（配列番号28）のaa1-6、ヒト成熟ヒトADM（配列番号29）のaa1-32、成熟マウスADM（配列番号30）のaa1-40、成熟マウスADM（配列番号31）のaa1-31。 20

【図3a】ヒトADMの用量反応曲線。最大cAMP刺激を100%活性化に調整した。

【図3b】5.63nMのhADMの存在下でのヒトADM22-52（ADM受容体拮抗物質）の用量／阻害曲線。

【図3c】5.63nMのhADMの存在下でのCT-Hの用量／阻害曲線。

【図3d】5.63nMのhADMの存在下でのMR-Hの用量／阻害曲線。

【図3e】5.63nMのhADMの存在下でのNT-Hの用量／阻害曲線。 30

【図3f】マウスADMの用量反応曲線。最大cAMP刺激を100%活性化に調整した。

【図3g】0.67nMのmADMの存在下でのヒトADM22-52（ADM受容体拮抗物質）の用量／阻害曲線。

【図3h】0.67nMのmADMの存在下でのCT-Mの用量／阻害曲線。

【図3i】0.67nMのmADMの存在下でのMR-Mの用量／阻害曲線。

【図3j】0.67nMのmADMの存在下でのNT-Mの用量／阻害曲線。

【図3k】F(ab)₂NT-M及びFabNT-MによるADMの阻害を示す。

【図3l】F(ab)₂NT-M及びFabNT-MによるADMの阻害を示す。

【図4】この図面は、典型的なhADM用量／シグナル曲線、及び100μg/mLの抗体NT-Hの存在下でのhADM用量シグナル曲線を示す。 40

【図5】この図面は、NT-H抗体の不存在及び存在下でのヒト血漿（クエン酸）中のhADMの安定性を示す。

【図6】相同ヒトフレームワーク配列を用いたFabのアラインメント。

【図7】この図面は、NT-Mを用いた早期及び後期治療のためのノルアドレナリン要求量を示す。

【図8】この図面は、NT-Mを用いた早期及び後期治療後の尿産生量を示す。

【図9】この図面は、NT-Mを用いた早期及び後期治療後の体液平衡を示す。

【図10】電気泳動の移動度シフトアッセイ（EMSA）によって分析したB細胞内の核内因子κ軽鎖遺伝子エンハンサ（NFκB）の肝臓組織活性化。#は、ビヒクルに対して 50

$p < 0.001$ であることを示す。

【図11】経時的な血清クレアチニンの推移。平均 $\pm$ SEMを示す。

【図12】経時的な血中尿素窒素（BUN）の推移。平均 $\pm$ SEMを示す。

【図13】経時的な内因性クレアチニンクリアランスの推移。平均 $\pm$ SEMを示す。

【図14】経時的な Na^+ の微量な分泌の推移。平均 $\pm$ SEMを示す。

【図15】抽出総腎臓タンパク質に対する実測角化細胞由来ケモカイン（KC）レベル。白色のボックスプロットは、ビヒクルで得た結果を示し、灰色のボックスプロットは、NT-Mでの治療後に得た結果を示す。

【図16】抽出総肝臓タンパク質に対する実測角化細胞由来ケモカイン（KC）レベル。白色のボックスプロットは、ビヒクルで得た結果を示し、灰色のボックスプロットは、NT-Mでの治療後に得た結果を示す。

10

【図17】血漿IL-6レベル。白色のボックスプロットは、ビヒクルで得た結果を示し、灰色のボックスプロットは、NT-Mでの治療後に得た結果を示す。

【図18】血漿IL-10レベル。白色のボックスプロットは、ビヒクルで得た結果を示し、灰色のボックスプロットは、NT-Mでの治療後に得た結果を示す。

【図19】血漿角化細胞由来ケモカイン（KC）レベル。白色のボックスプロットは、ビヒクルで得た結果を示し、灰色のボックスプロットは、NT-Mでの治療後に得た結果を示す。

【図20】血漿単球走化性因子（MCP-1）レベル。白色のボックスプロットは、ビヒクルで得た結果を示し、灰色のボックスプロットは、NT-Mでの治療後に得た結果を示す。

20

【図21】血漿TNF- α レベル。白色のボックスプロットは、ビヒクルで得た結果を示し、灰色のボックスプロットは、NT-Mでの治療後に得た結果を示す。

【図22】経時的な血中尿素窒素（BUN）の推移。平均 $\pm$ SEMを示す。

【図23】経時的な血清クレアチニンの推移。平均 $\pm$ SEMを示す。

【図24】経時的な内因性クレアチニンクリアランスの推移。平均 $\pm$ SEMを示す。

【実施例】

【0376】

本発明による実施例部分の抗体、抗体フラグメント、及び非Ig足場が、ADMに結合しており、これにより、抗ADM非抗体／抗体フラグメント／Ig足場とみなされるはずであることを強調すべきである。

30

【0377】

実施例1

抗体の作製とそれらの親和定数の測定

いくつかのヒト及びマウスの抗体を作り出し、そして、それらの親和定数を測定した（表1及び2を参照のこと）。

【0378】

免疫化のためのペプチド／コンジュゲート：

そのペプチドのウシ血清アルブミン（BSA）へのコンジュゲーションのための（選択されたADM配列内にシステインが存在していなければ）追加のN末端システイン残基を伴う、免疫化のためのペプチドを合成した、表1を参照のこと、（JPT Technologies, Berlin, Germany）。そのペプチドを、Sulfolinkカップリングゲル（Perbio-science, Bonn, Germany）を使用することによってBSAに共有結合により連結した。カップリング手順を、Perbioのマニュアルに従って実施した。

40

【0379】

以下の方法に従って、マウス抗体は作り出した：

Balb/cマウスを、0日目と14日目に100 μ gのペプチド-BSA-コンジュゲート（100 μ lの完全フロイントアジュバント中に乳化させた）を用いて、そして、21日目と28日目に（100 μ lの不完全フロイントアジュバント中の）50 μ gを用いて免疫した。融合実験を実施する3日前に、動物に、1回の腹腔内注射及び1回の静脈

50

内注射として投与される、100 μ l の生理食塩水中に溶解した50 μ g の前記コンジュゲートを与えた。

【0380】

免疫されたマウスからの脾細胞及び骨髓腫細胞株SP2/0の細胞を、50%のポリエチレングリコール1mlを用いて37℃にて30秒間、融合させた。洗浄後に、その細胞を96ウェル細胞培養プレート内に播種した。ハイブリッドクローンを、HAT培地[20%のウシ胎仔血清及びHATサブプリメントを補ったRPMI1640培地]中で培養することによって選択した。2週間後に、3回の継代の間に、HAT培地をHT培地に置き換え、それに続いて、正常細胞培地に戻した。

【0381】

10

細胞培養上清を、融合3週間後に、まず抗原特異的なIgG抗体についてスクリーニングした。陽性の試験された微量の培養物を、繁殖のために24ウェルプレートに移した。再テストした後に、選択された培養物を、クローン化し、限界希釈を使用することで再度クローン化し、そして、アイソタイプを決定した(Lane, R.D. (1985). A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. J. Immunol. Meth. 81: 223-228; Ziegler, B. et al. (1996) Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies, Horm. Metab. Res. 28: 11-15もまた参照のこと)。

20

【0382】

マウスモノクローナル抗体の製造：

抗体を、標準的な抗体製造法(Marx et al, Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997)によって作製し、そして、プロテインAを介して精製した。抗体純度は、SDSゲル電気泳動分析に基づき、>95%であった。

【0383】

ヒト抗体

ヒト抗体を、以下の手順に従ってファージディスプレイによって作製した：

投薬を受けていないヒト抗体遺伝子ライブラリHAL7/8を、アドレノメデュリンペプチドに対する、遺伝子組み換え一本鎖F可変ドメイン(scFv)の分離に使用する。抗体遺伝子ライブラリーを、2個の異なったスペーサーを介してアドレノメデュリンペプチド配列に連結されたビオチンタグを含むペプチドの使用を含むパンニングストラテジーを用いてスクリーニングした。非特異性結合抗原とストレプトアビジン結合抗原とを使用したパンニング段階の混合を、非特異的バインダーのバックグラウンドを最小にするのに使用した。パンニングの第三段階からの溶解ファージを、モノクローナルscFv発現性E. コリ(E. coli)株の作製に使用した。これらのクローン株の培養からの上清を、抗原ELISA試験にそのまま使用した(Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rulker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schutte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dubel, S., 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. Journal of Biotechnology 152, 159-170; Schutte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dubel, S., 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of Aspergillus fumigatus. PLoS One 4, e6625もまた参照のこと)。

30

40

【0384】

陽性クローンを、抗原に対する陽性ELISAシグナル及びストレプトアビジンコートしたマイクロタイタープレートに対する陰性シグナルに基づいて選択した。更なる特徴づけのために、scFvオープンリーディングフレームを、発現プラスミドpOPE107(Hust et al., J. Biotechn. 2011)内にクローン化し、固定した金属イオン親和性クロ

50

マトグラフィーによって培養上清から捕獲し、そして、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【0385】

親和定数

アドレノメデュリンに対する抗体の親和性を測定するために、固定化抗体へのアドレノメデュリンの結合に関する動態を、Biacore2000システム（GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany）を使用した無標識表面プラズモン共鳴法によって測定した。抗体の可逆的固定化を、製造業者の取扱説明書に従って高密度でCM5センサー表面に共有結合させた抗マウスFc抗体を使用して実施した（マウス抗体捕獲キット；GE Healthcare）（Lorenz et al., “ Functional Antibodies Targeting IsaA of Staphylococcus aureus Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy ” ; Antimicrob Agents Chemother. 2011 January; 55(1): 165-173）。

10

【0386】

モノクローナル抗体を、それぞれ、以下に示したヒト及びマウスのADMのADM領域に対して産生させた。以下の表は、更なる実験において使用される、得られた抗体の一群を表している。選択は、標的領域に基づいた：

【0387】

表1：

【0388】

【表1】

20

配列番号	抗原／免疫原	ADM 領域	記号表示	親和定数 Kd (M)
配列番号：15	YRQSMNFGQLRSFGCRFGTC	1-21	NT-H	5.9×10^{-9}
配列番号：16	CTVQKLAHQIYQ	21-32	MR-H	2×10^{-9}
配列番号：17	CAPRSKISPQGY-NH2	C-42-52	CT-H	1.1×10^{-9}
配列番号：18	YRQSMNQGSRSNGCRFGTC	1-19	NT-M	3.9×10^{-9}
配列番号：19	CTFQKLAHQIYQ	19-31	MR-M	4.5×10^{-10}
配列番号：20	CAPRNKISPQGY-NH2	C-40-50	CT-M	9×10^{-9}

30

【0389】

表2：

【0390】

【表 2】

標的	起源	クローン番号	親和性 (M)	最大阻害率バイオ アッセイ (%) (実施例 2 を参照)
NT-M	マウス	ADM/63	5.8×10^{-9}	45
	マウス	ADM/364	2.2×10^{-8}	48
	マウス	ADM/365	3.0×10^{-8}	
	マウス	ADM/366	1.7×10^{-8}	
	マウス	ADM/367	1.3×10^{-8}	
	マウス	ADM/368	1.9×10^{-8}	
	マウス	ADM/369	2.0×10^{-8}	
	マウス	ADM/370	1.6×10^{-8}	
	マウス	ADM/371	2.0×10^{-8}	
	マウス	ADM/372	2.5×10^{-8}	
	マウス	ADM/373	1.8×10^{-8}	
	マウス	ADM/377	1.5×10^{-8}	
	マウス	ADM/378	2.2×10^{-8}	
	マウス	ADM/379	1.6×10^{-8}	
	マウス	ADM/380	1.8×10^{-8}	
	マウス	ADM/381	2.4×10^{-8}	
	マウス	ADM/382	1.6×10^{-8}	
	マウス	ADM/383	1.8×10^{-8}	
	マウス	ADM/384	1.7×10^{-8}	
	マウス	ADM/385	1.7×10^{-8}	
	マウス	ADM/403	1.2×10^{-8}	
	マウス	ADM/395	1.2×10^{-8}	
	マウス	ADM/396	3.0×10^{-8}	
	マウス	ADM/397	1.5×10^{-8}	
MR-M	マウス	ADM/38	4.5×10^{-10}	68
MR-M	マウス	ADM/39	5.9×10^{-9}	72
CT-M	マウス	ADM/65	9.0×10^{-9}	100
CT-M	マウス	ADM/66	1.6×10^{-8}	100
NT-H	マウス	ADM/33	5.9×10^{-8}	38
NT-H	マウス	ADM/34	1.6×10^{-8}	22
MR-H	マウス	ADM/41	1.2×10^{-8}	67
MR-H	マウス	ADM/42	$< 1 \times 10^{-8}$	
MR-H	マウス	ADM/43	2.0×10^{-9}	73
MR-H	マウス	ADM/44	$< 1 \times 10^{-8}$	
CT-H	マウス	ADM/15	$< 1 \times 10^{-8}$	
CT-H	マウス	ADM/16	1.1×10^{-9}	100
CT-H	マウス	ADM/17	3.7×10^{-9}	100
CT-H	マウス	ADM/18	$< 1 \times 10^{-8}$	
hADM	ファージディスプレイ	ADM/A7	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/B7	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/C7	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/G3	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/B6	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/B11	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/D8	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/D11	$< 1 \times 10^{-8}$	
	ファージディスプレイ	ADM/G12	$< 1 \times 10^{-8}$	

【0391】

酵素分解による抗体フラグメントの作製：

F a b 及び F (a b)₂ フラグメントの作製を、マウス完全長抗体 N T - M の酵素分解によっておこなった。抗体 N T - M を、a) ペプシンベースの F (a b)₂ 調製キット (Pierce44988) 及び b) パパインベースの F a b 調製キット (Pierce44985) を使用して消化した。フラグメント化手順を、供給業者によって提供された取扱説明書に従って実施した。消化は、F (a b)₂ フラグメント化の場合、37℃にて8時間実施した。F a b フ

ラグメント化消化を、それぞれ16時間実施した。

【0392】

Fab作製及び精製の手順：

固定化パバインを、0.5mlの消化バッファーで樹脂を洗浄し、そして、5000xgにて1分間、カラムを遠心分離することによって平衡化した。そのバッファーをその後、捨てた。脱塩カラムを、保管溶液を除去し、消化バッファーでそれを洗浄し、その都度その後に1000xgにて2分間それを遠心分離することによって調製した。0.5mlの調製IgGサンプルを、平衡化した固定化パバインの入ったスピンカラムチューブに加えた。消化反応のインキュベーション時間は、37℃の卓上ロッカーにより16時間おこなった。カラムを、5000xgにて1分間遠心分離して、固定化パバインと消化産物を分離した。その後、樹脂を、0.5mlのPBSで洗浄し、そして、5000xgにて1分間遠心分離した。洗浄画分を、総サンプル体積が1.0mlである消化抗体に加えた。NAb Protein A Columnを、室温にてPBS及びIgG溶出バッファーで平衡化した。カラムを、1分間遠心分離して、保管溶液（0.02%のアジ化ナトリウム含有）を除去し、2mlのPBSを加えることによって平衡化し、1分間再び遠心分離し、そして流し出して捨てた。サンプルは、カラムに適用し、転倒によって再懸濁させた。インキュベーションを、転倒混合しながら室温にて10分間おこなった。カラムを1分間遠心分離して、Fabフラグメントが流れ出るのを防いだ。（引用文献：Coulter, A. and Harris, R. (1983). J. Immunol. Meth. 59, 199-203.; Lindner I. et al. (2010) {alpha} 2-Macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding {beta} -catenin signaling. Cancer Res. 70, 277-87.; Kaufmann B. et al. (2010) Neutralization of West Nile virus by cross-linking of its surface proteins with Fab fragments of the human monoclonal antibody CR4354. PNAS. 107, 18950-5.; Chen X. et al. (2010) Requirement of open headpiece conformation for activation of leukocyte integrin $\alpha x \beta 2$. PNAS. 107, 14727-32.; Uysal H. et al. (2009) Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. J. Exp. Med. 206, 449-62.; Thomas G. M. et al. (2009) Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. J. Exp. Med. 206, 1913-27.; Kong F. et al. (2009) Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. J. Cell Biol. 185, 1275-84)。

【0393】

F(ab')₂作製及び精製の手順：

固定化ペプシンを、0.5mlの消化バッファーで樹脂を洗浄し、そして、5000xgにて1分間、カラムを遠心分離することによって平衡化した。そのバッファーをその後、捨てた。脱塩カラムを、保管溶液を除去し、消化バッファーでそれを洗浄し、その都度その後に1000xgにて2分間それを遠心分離することによって調製した。0.5mlの調製IgGサンプルを、平衡化した固定化ペプシンの入ったスピンカラムチューブに加えた。消化反応のインキュベーション時間は、37℃の卓上ロッカーにより16時間おこなった。カラムを、5000xgにて1分間遠心分離して、固定化パバインと消化産物を分離した。その後、樹脂を、0.5mlのPBSで洗浄し、そして、5000xgにて1分間遠心分離した。洗浄画分を、総サンプル体積が1.0mlである消化抗体に加えた。NAb Protein A Columnを、室温にてPBS及びIgG溶出バッファーで平衡化した。カラムを、1分間遠心分離して、保管溶液（0.02%のアジ化ナトリウム含有）を除去し、2mlのPBSを加えることによって平衡化し、1分間再び遠心分離し、そして流し出して捨てた。サンプルは、カラムに適用し、転倒によって再懸濁させた。インキュベーションを、転倒混合しながら室温にて10分間おこなった。カラムを1分間遠心分離して、Fabフラグメントが流れ出るのを防いだ。（引用文献：Mariani, M., et al. (1991). A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab')₂ suitable for clinical use from mouse IgG1. Mol. Immunol. 28: 69-77.; Beale, D. (1987). Molecular fragmentation:

Some applications in immunology. *Exp Comp Immunol* 11:287-96.; Ellerson, J.R., et al. (1972). A fragment corresponding to the CH2 region of immunoglobulin G (IgG) with complement fixing activity. *FEBS Letters* 24(3):318-22.; Kerbel, R.S. and Elliot, B.E. (1983). Detection of Fc receptors. *Meth Enzymol* 93:113-147.; Kulka rni, P.N., et al. (1985). Conjugation of methotrexate to IgG antibodies and their F(ab')₂ fragments and the effect of conjugated methotrexate on tumor growth in vivo. *Cancer Immunol Immunotherapy* 19:211-4.; Lamoyi, E. (1986). Preparation of F(ab')₂ Fragments from mouse IgG of various subclasses. *Meth Enzymol* 121:652-663.; Parham, P., et al. (1982). Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens. *J Immunol Meth* 53:133-73.; Raychaudhuri, G., et al. (1985). Human IgG1 and its Fc fragment bind with different affinities to the Fc receptors on the human U937, HL-60 and ML-1 cell lines. *Mol Immunol* 22(9):1009-19.; Rousseaux, J., et al. (1980). The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin. *Mol Immunol* 17:469-82.; Rousseaux, J., et al. (1983). Optimal condition for the preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J Immunol Meth* 64:141-6.; Wilson, K.M., et al. (1991). Rapid whole blood assay for HIV-1 seropositivity using an Fab-peptide conjugate. *J Immunol Meth* 138:111-9)。

【0394】

N T-H抗体フラグメントのヒト化

抗体フラグメントを、C D R グラフト法 (Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525) によってヒト化した。

【0395】

以下のステップをおこない、ヒト化配列を得た：

全RNA抽出：全RNAを、Qiagenキットを使用してN T-Hハイブリドーマから抽出した。

【0396】

第一段階のR T-P C R：QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCR Kit（Cat No.210210）を使用した。R T-P C Rを、重鎖及び軽鎖に特異的なプライマーセットを用いて実施した。それぞれのRNAのサンプルに関して、可変領域のリーダー配列を網羅した縮重順方向プライマー混合物を使用して、12種類の個別の重鎖及び11種類の軽鎖のR T-P C R反応を設定した。逆方向プライマーは、重鎖及び軽鎖の定常領域に位置している。プライマー内には制限部位を設計しなかった。

【0397】

反応物の準備：5 x QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCRバッファー5.0 μl、d N T P M i x（それぞれのd N T P 10 mMを含んでいる）0.8 μl、プライマーセット0.5 μl、QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCR Enzyme Mix0.8 μl、鋳型RNA2.0 μl、無RNAse不加水20.0 μlまで、全容積20.0 μl。

P C R条件：逆転写：50℃、30分；最初のP C R活性化：95℃、15分間。

サイクル：94℃、25秒間；54℃、30秒間；72℃、30秒間を20サイクル；最終伸長：72℃、10分間。

【0398】

第二段階の準ネスト化P C R：第一段階反応からのR T-P C R産物を第二段階のP C Rで更に増幅した。12種類の個別の重鎖及び11種類の軽鎖のR T-P C R反応を、抗体可変領域に対して特異的な準ネスト化プライマーセットを使用して準備した。

半応物の準備：2 x P C Rミックス10 μl；プライマーセット2 μl；第一段階のP C R産物8 μl；全容積20 μl；Hybridoma Antibody Cloning Report。

【0399】

PCR条件：95℃にて5分間の最初の変性；95℃にて25秒間、57℃にて30秒間、68℃にて30秒間を25サイクル；最終伸長を68℃にて10分間。

PCRが終わった後に、PCR反応サンプルをアガロースゲルで泳動して、増幅したDNAフラグメントを可視化する。ネスト化RT-PCRによって増幅した15個超のクローンDNAフラグメントの配列決定後に、数個のマウス抗体重鎖及び軽鎖を、クローン化した、正しいように思われる。タンパク質配列アラインメント及びCDR分析で、1本の重鎖と1本の軽鎖を同定する。相同ヒトフレームワーク配列とのアラインメント後に、得られた可変重鎖のヒト化配列は、次のものであった：図6を参照のこと（可変重鎖内の26、40、及び55位のアミノ酸及び可変軽鎖内の40位のアミノ酸が結合特性に重要なので、それらはマウス起源に先祖返りし得る。得られた候補を以下に示す）（Padlan, E. A. (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol. Immunol. 28, 489-498.; Harris, L. and Bajorath, J. (1995) Profiles for the analysis of immunoglobulin sequences: Comparison of V gene subgroups. Protein Sci. 4, 306-310)

10

【0400】

抗体フラグメント配列に対する注釈（配列番号7～14）：ボールド体及び下線は、年代順に配置されたCDR1、2、3であり；斜体は、定常領域であり；ヒンジ部は、ボールド体文字で、そして、ヒスチジンタグは、ボールド体とイタリック体で強調表示され；フレームワーク点突然変異は、灰色の文字背景である。

20

【0401】

配列番号：7（AM-VH-C）

QVQLQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0402】

配列番号：8（AM-VH1）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

30

【0403】

配列番号：9（AM-VH2-E40）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0404】

配列番号：10（AM-VH3-T26-E55）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

40

【0405】

配列番号：11（AM-VH4-T26-E40-E55）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHHH

【0406】

配列番号：12（AM-VL-C）

DVLLSQTPSLPVSIGDQATISCRSSQSIYVSYNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSQVDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLVYYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

50

【0407】

配列番号：13 (AM-VL1)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLNWFQQRPQGSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDVGVIYCFQGSHPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0408】

配列番号：14 (AM-VL2-E40)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWFQQRPQGSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDVGVIYCFQGSHPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【0409】

実施例2

抗ADM生理活性に対する選択抗ADM抗体の効果

ADM生理活性に対する選択ADM抗体の効果を、ヒト組換え型アドレノメデュリン受容体cAMP機能アッセイ(Adrenomedullin Bioassay)で試験した。

ヒト組換え型アドレノメデュリン受容体cAMP機能性アッセイ(Adrenomedullin Bioassay)におけるヒト又はマウスアドレノメデュリン標的抗体の試験

【0410】

材料：

細胞株：CHO-K1

受容体：アドレノメデュリン(CRLR+RAMP3)

受容体の細胞株受入番号：CRLR：U17473；RAMP3：AJ001016

試験に先立ち、抗生物質不含培地で培養した、ヒト組換え型アドレノメズリン受容体を発現するCHO-K1細胞(FAST-027C)を、PBS-EDTA(5mMのEDTA)でのゆるやかなフラッシングによって剥がし、遠心分離によって回収し、そして、アッセイバッファー(KRH：5mMのKCl、1.25mMのMgSO₄、124mMのNaCl、25mMのHEPES、13.3mMのグルコース、1.25mMのKH₂PO₄、1.45mMのCaCl₂、0.5g/lのBSA)中に再懸濁した。

【0411】

用量反応曲線を、標準作動物質(hADM又はmADM)と平行して実施した。

拮抗物質試験(96ウェル)：

拮抗物質試験のために、6μlの標準作動物質(ヒト(5.63nM)又はマウス(0.67nM)アドレノメデュリン)を、異なった拮抗物質希釈率にて6μlの試験サンプル；又は6μlのバッファーと混合した。室温にて60分間のインキュベーション後に、12μlの細胞(2,500細胞/ウェル)を加えた。そのプレートを室温にて30分間インキュベートした。溶解バッファー添加後に、製造業者の明細書に従って、Cis-Bio International製のHTRFキット(cat n°62AM2 PEB)を用いて、Delta Fのパーセンテージを推測する。hADM22-52を、標準拮抗物質として使用した。

【0412】

抗体を試験するcAMP-HTRFアッセイ

抗h-ADM抗体(NT-H、MR-H、CT-H)を、以下の最終抗体濃度：100μg/ml、20μg/ml、4μg/ml、0.8μg/ml、0.16μg/mlにて、5.63nMのヒトADM1-52の存在下、ヒト組換え型アドレノメズリン受容体(FAST-027C)cAMP機能性アッセイにて拮抗物質活性についてした。

抗m-ADM抗体(NT-M、MR-M、CT-M)を、以下の最終抗体濃度：100μg/ml、20μg/ml、4μg/ml、0.8μg/ml、0.16μg/mlにて、0.67nMのマウスADM1-50の存在下、ヒト組換え型アドレノメズリン受容体(FAST-027C)cAMP機能性アッセイにて拮抗物質活性についてした。データを、相対的阻害対拮抗物質濃度でプロットした(図3a~3lを参照のこと)。個々の抗体による最大阻害を、表3中に示す。

20

30

40

50

【0413】

表3：

【0414】

【表3】

抗体	ADM生理活性の最大阻害 (ADMバイオアッセイ) (%)
NT-H	38
MR-H	73
CT-H	100
NT-M FAB	26
NT-M FAB2	28
NT-M	45
MR-M	66
CT-M	100
非特異的マウス Ig G	0

10

【0415】

実施例3

20

抗ADM抗体によるhADMの安定化に関するデータ

ヒトADM抗体によるヒトADMの安定化効果を、hADM免疫学的アッセイを使用して試験した。

【0416】

ヒトアドレノメデュリンの定量化のための免疫学的アッセイ

使用される技術は、アクリジニウムエステル標識化に基づいたサンドイッチコートチューブ発光イムノアッセイであった。

【0417】

標識化合物（トレーサー）：100 μg（100 μl）のCT-H（PBS、pH 7.4中に1 mg/ml、AdrenoMed AG Germany）を、10 μlのアクリジニウムNHSEステル（アセトニトリル中に1 mg/ml、InVent GmbH, Germany）（EP 0353971）と混合し、そして、室温にて20分間インキュベートした。標識したCT-Hを、Bio-Sil（登録商標）SEC 400-5（Bio-Rad Laboratories, Inc., USA）によるゲル濾過HPLCによって精製した。精製したCT-Hを、（300 mmol/Lのリン酸カリウム、100 mmol/LのNaCl、10 mmol/LのNa-EDTA、5 g/Lのウシ血清アルブミン、pH 7.0）中に希釈した。終濃度は、200 μLあたり約800,000相対光度単位（RLU）の標識化合物（約20 ng 標識抗体）であった。アクリジニウムエステル化学発光を、AutoLumat LB953（Berthold Technologies GmbH&Co. KG）を使用して計測した。

30

【0418】

固相：ポリスチレンチューブ（Greiner Bio-1 International AG, Austria）を、MR-H（AdrenoMed AG, Germany）（1.5 μgのMR-H/0.3 mL、100 mmol/LのNaCl、50 mmol/LのTRIS/HCl、pH 7.8）でコートした（室温にて18時間）。5%のウシ血清アルブミンでブロッキングした後に、そのチューブをPBS、pH 7.4で洗浄し、そして、真空乾燥した。

40

【0419】

校正：

250 mmol/LのNaCl、2 g/LのTriton X-100、50 g/Lのウシ血清アルブミン、20 タブ/Lのプロテアーゼインヒビターカクテル（Roche Diagnostics AG, Switzerland）中のhADM（BACHEM AG, Switzerland）の希釈物を使用して

50

、アッセイを校正した。

【0420】

hADM免疫アッセイ：

標識CT-H ($200\mu\text{l}$)を加えた後に、 $50\mu\text{l}$ のサンプル(又は校正物質)をコートチューブ内にピペットで計り入れ、そのチューブを 4°C にて4時間インキュベートした。非結合トレーサーを、洗浄液(20mM のPBS、 $\text{pH}7.4$ 、 0.1% のTriton X-100)で5回(各 1ml)洗浄することによって除去した。

【0421】

チューブに結合した化学発光を、LB953を使用して計測した。

【0422】

図4は、典型的なhADM用量/シグナル曲線、及び $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体NT-Hの存在下でのhADM用量シグナル曲線を示す。NT-Hは、記載したhADM免疫学的アッセイに影響しなかった。

【0423】

ヒトアドレノメデュリンの安定性：

ヒトADMを、ヒトクエン酸血漿中に希釈し(終濃度 10nM)、 24°C にてインキュベートした。選択した時点にて、 -20°C にて冷凍することによって、hADMの分解を止めた。インキュベーションを、NT-H($100\mu\text{g}/\text{mL}$)の不存在及び存在下で実施した。残存しているhADMを、先に記載したhADM免疫学的アッセイを使用して定量化した。

【0424】

図5は、NT-H抗体の不存在と存在下、ヒト血漿(クエン酸)中でのhADMの安定性を示している。hADMだけの半減期は、 7.8h であり、そして、NT-Hの存在下で、半減期は 18.3h であった(2.3 倍高い安定性)。

【0425】

実施例4

敗血症の死亡率(早期処置)

動物モデル

$12\sim15$ 週齢の雄C57B1/6マウス(Charles River Laboratories, Germany)を試験に使用した。腹膜炎を、軽いイソフルラン麻酔下で外科的に引き起こした。切開を、腹腔の左上象限(盲腸の正常な位置)に作った。盲腸を露出させ、そして、きつい結紮を小腸の付着点の遠位に縫合して盲腸の周りに配置した。 24 ゲージの針で1カ所の刺創を盲腸に作り、そして、少量の盲腸内容物をその損傷から絞り出した。盲腸を腹腔内に戻し、そして、腹壁切除部位を閉じた。最後に、動物を、食物と水が自由摂取できるケージに戻した。 $500\mu\text{l}$ の生理的食塩水を、水分補給として皮下に与えた。

化合物(NT-M、MR-M、CT-M)の適用と投薬量

マウスを、CLP直後に処置した(早期治療)。CLPとは、盲腸結紮及び穿刺(CLP)の略語である。

【0426】

調査群

3つの化合物を、ビヒクルに対して、及び対照化合物処置に対して試験した。各群には、BUN(血清血中尿素窒素試験)測定のために1日後の採血のための5匹のマウスを含む。各群あたり更なる10匹のマウスを、4日間の期間にわたって経過観察した。

群 処置($10\mu\text{l}/\text{g}$ 体重) 投与量/経過観察：

- 1 NT-M、 $0.2\text{mg}/\text{mL}$ 4日間にわたり生存
- 2 MR-M、 $0.2\text{mg}/\text{mL}$ 4日間にわたり生存
- 3 CT-M、 $0.2\text{mg}/\text{mL}$ 4日間にわたり生存
- 4 非特異的マウスIgG、 $0.2\text{mg}/\text{mL}$ 4日間にわたり生存
- 5 対照-PBS、 $10\mu\text{l}/\text{g}$ 体重 4日間にわたり生存

【0427】

臨床化学

腎機能に関する血中尿素窒素（BUN）濃度を、ベースラインとCLP後1日目に計測した。血液サンプルを、軽いエーテル麻酔下で毛細管を用いて海綿静脈洞から採取した。測定を、AU 400 Olympus Multianalyserを使用して実施した。4日死亡率を、表4中に示した。平均BUN濃度を、表5中に示した。

【0428】

表4：

【0429】

【表4】

10

4日死亡率	生存率 (%)
PBS	0
非特異的マウス IgG	0
CT-M	10
MR-M	30
NT-M	70

【0430】

表5：

20

【0431】

【表5】

5匹の動物の平均値	CLP前のBUN (mM)	BUN1日目 (mM)
PBS	8.0	23.2
非特異的マウス IgG	7.9	15.5
CT-M	7.8	13.5
MR-M	8.1	24.9
NT-M	8.8	8.2

30

【0432】

NT-M抗体が死亡率を大きく低減したことが、表4からわかる。4日後に、NT-M抗体で処置したマウスの70%が生き残った。4日後、MR-M抗体で処置した場合には、30%の動物が生き残り、そして、CT-M抗体で処置した場合には、10%の動物が生き残った。それとは対照的に、非特異的マウスIgGで処置した場合には、すべてのマウスが4日後に死亡した。同じ結果を、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）をマウスに投与した対照群で得た。

【0433】

血中尿素窒素又はBUN試験は、腎臓機能を計測するため、腎臓病を診断する助けにするため、及び急性若しくは慢性の腎機能障害若しくは不全症の患者を観察するために使用される。S-BUN Testの結果は、NT-M抗体が腎臓を保護するのに最も効果的であることを明らかにした。

40

【0434】

敗血症の死亡率（後期処置）

動物モデル

12～15週齢の雄C57Bl/6マウス（Charles River Laboratories, Germany）を試験に使用した。腹膜炎を、軽いイソフルラン麻酔下で外科的に引き起こした。切開を、腹腔の左上象限（盲腸の正常な位置）に作った。盲腸を露出させ、そして、きつい結紮を小腸の付着点の遠位に縫合して盲腸の周りに配置した。24ゲージの針で1カ所の刺創

50

を盲腸に作り、そして、少量の盲腸内容物をその損傷から絞り出した。盲腸を腹腔内に戻し、そして、腹壁切除部位を閉じた。最後に、動物を、食物と水が自由摂取できるケージに戻した。500 μ l の生理的食塩水を、水分補給として皮下に与えた。

【0435】

化合物 (NT-M、MR-M、CT-M) の適用と投薬量

マウスを、CLP直後に処置した (早期治療)。CLPとは、盲腸結紮及び穿刺 (CLP) の略語である。

化合物 (NT-M FAB2) の適用と投薬量

NT-M FAB2を、ビヒクルに対して、及び対照化合物処置に対して試験した。処置を、敗血症の完全な発生後、すなわち、CLPの6時間後に実施した (後期処置)。各群には、4匹のマウスが含まれ、4日間の期間にわたって経過観察した。

10

群 処置 (10 μ l / g 体重) 投与量 / 経過観察：

【0436】

調査群

1 NT-M、FAB2 0.2 mg / ml 4日間にわたり生存

2 対照：非特異的マウス IgG、0.2 mg / ml 4日間にわたり生存

3 ビヒクル：-PBS 10 μ l / g 体重 4日間にわたり生存

【0437】

表6：

【0438】

【表6】

20

4日死亡率	生存率 (%)
PBS	0
非特異的マウス IgG	0
NT-M FAB2	75

【0439】

NT-M FAB2抗体が死亡率を大きく低減したことが、表6からわかる。4日後に、NT-M FAB2抗体で処置したマウスの75%が生き残った。それとは対照的に、非特異的マウス IgGで処置した場合には、すべてのマウスが4日後に死亡した。同じ結果を、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) をマウスに投与した対照群で得た。

30

【0440】

実施例5

抗生物質処置及びカテコールアミンによる血液循環安定化、並びに体液平衡の調整に対するCLP動物における抗ADM抗体の増分による効果。

動物モデル

この試験では、雄C57B1/6マウス (8~12週、22~30g) を利用した。盲腸結紮及び穿刺 (CLP) によって引き起こした複数菌による敗血症を、敗血症性ショックを試験するためにモデルとして使用した ((Albuszies G, et al: Effect of increased cardiac output on hepatic and intestinal microcirculatory blood flow, oxygenation, and metabolism in hyperdynamic murine septic shock. Crit Care Med 2005;33:2332-8), (Albuszies G, et al: The effect of iNOS deletion on hepatic gluconeogenesis in hyperdynamic murine septic shock. Intensive Care Med 2007;33:1094-101), (Barth E, et al: Role of iNOS in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. Crit Care Med 2006;34:307-13), (Baumgart K, et al: Effect of SOD-1 over-expression on myocardial function during resuscitated murine septic shock. Intensive Care Med 2009;35:344

40

50

-9),

(Baumgart K, et al: Cardiac and metabolic effects of hypothermia and inhaled H₂S in anesthetized and ventilated mice. Crit Care Med 2010;38:588-95), (Simkova V, et al: The effect of SOD-1 over-expression on hepatic gluconeogenesis and whole-body glucose oxidation during resuscitated, normotensive murine septic shock. Shock 2008;30:578-84), (Wagner F, et al.: Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. Shock, im Druck), (Wagner F, et al: Effects of intravenous H₂S after murine blunt chest trauma: a prospective, randomized controlled trial. Crit Care 2011, submittes for publication))。

10

【0441】

計量後に、マウスを、120 μ g/gのケタミン、1.25 μ g/gのミダゾラム、及び0.25 μ g/gのフェナタニルの腹腔内注射によって麻酔した。外科手順の間、体温を37~38℃に保った。1cmの正中線開腹をおこない、盲腸に近づいた。次に、盲腸を、基部近くで3-0の絹糸により結紮し、そして、18ゲージ針で一カ所だけ穿刺した。盲腸を戻し、そして、切開を再び閉じた(4-0糸)。体液の手術中の損失を補うために、鎮痛剤として1 μ g/gのブプレノルフィンを含む0.5mlの乳酸リンゲル液を、背部の真皮に皮下注射した。抗生作用のために、マウスには、下肢から皮下に30 μ g/gのセフトリアキソン及び30 μ g/gのクリンダマイシンを与えた。CLPの外科手術後に、動物を、水と食物が自由摂取できる適度に加温した環境内で飼育した。液体要求量の埋め合わせを、イソフルランによる短期間麻酔後に、8時間サイクルで適用される4 μ g/gのグルコース及び1 μ g/gのブプレノルフィンを含む0.5mlの乳酸リンゲル液の背部皮下注射によって確保した。加えて、抗生作用を、下肢からの30 μ g/gのセフトリアキソン及び30 μ g/gのクリンダマイシンの皮下注射で維持した。

20

【0442】

試験物質の投薬

早期処置

CLPの外科手術及び切開の縫合直後、試験物質抗体NT-Mを、体重1kgあたり2mgの用量の陰茎静脈への注射により、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に500 μ g/mlの濃度で適用した(投与体積88~120 μ l)(5匹の動物)。

30

【0443】

後期処置

完全な敗血症発生後に、すなわち、CLPの外科手術の15.5時間後に、動物を先に記載のとおり麻酔し、そして、NT-Mを、体重1kgあたり2mgの用量の陰茎静脈への注射により、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に500 μ g/mlの濃度で適用した(投与体積88~120 μ l)(3匹の動物)。

【0444】

対照群(6匹の動物)には、CLPの外科手術直後の抗体(4 μ l/g、88~120 μ l)なしに、対応する量のビヒクルPBS溶液を与えた。

【0445】

調査群と実験設定

集中治療観察下におけるマウス敗血症性ショックモデル:

3、5、及び6匹の動物がいる3つの群を観察した。群1(5匹の動物)には、抗体NT-Mを、CLPの15.5時間後に与え、群2には、CLPの外科手術直後に、抗体NT-Mを与え、そして、群3には、対応する量のPBSを与えた(4 μ l/g)。(複数菌による敗血症を発現させるように)CLP後の16時間のインキュベーション後、実験を、集中医療治療レジメンに匹敵する観察及び介入をしながら続けた。そのため、動物の計量後に、CLP外科手術の部分に記載したように麻酔した(後期処置動物を除いて、処置前に麻酔した)。体温を、実験の残りの期間、37~38℃に維持した。気管開口及び挿管後に、呼吸を実験動物用肺人工呼吸器Flexivent(登録商標)(Emka Technologies,

40

FiO₂ 0,5, PEEP 10 H₂O, VT 8 μl/g, I:E 1:1,5, AF 70-140 温度による) によって観察し、そして補助した。

【0446】

麻酔を、0.3 μg/g x h のケタミン及び30 μg/g x h のフェンタニルの連続点滴を用いてカニユーレを挿入した右外頸静脈を介して実験の間、維持した。さらに、右総頸大動脈に、心拍数と平均動脈圧 (MAP) の連続監視のためにカニユーレを挿入した。平均動脈圧を、コロイド (80 μL/g x h、Hex t e n d (登録商標)) の、そして、必要であるなら、昇圧薬としてコロイド中に溶解したノルアドレナリンの静脈内 (頸静脈) 注射によって MAP > 65 mmHg に維持した。血液サンプル (120 μl) を、クレアチニンの測定のために、カニユーレを挿入した頸動脈を介して0時間と4時間に採取した。膀胱に穴をあけ、そして、尿を膀胱カテーテルを介して採取した。実験は、6時間後に終わらせるか、又は MAP > 65 mmHg (頸静脈) が昇圧剤の投薬で維持できない場合には、それで終わらせた。

【0447】

計測したパラメーター

以下のパラメーターを計測し、そして、分析した：ノルアドレナリンの総消費 (μg NA/g)、ノルアドレナリンの消費速度 (μg NA/g/h)、実験中に採取した尿の全容積、実験終了時のクレアチニン濃度 (μg/mL) 及び平均クレアチニークリアランス (μL/分)。

【0448】

表7：

【0449】

【表7】

	ノルアドレナリンの総消費量 (μg NA/g) (平均)	ノルアドレナリンの消費速度 (μg NA/g/h) (平均)
対照 (マウス I g G) (N=6)	0.17 μg/g	0.032 μg/h/g
NT-M (N=5) 早期処置	0.07 μg/g	0.012 μg/h/g
相対変化 (早期処置、改善)	59% (59%)	62.5% (62.5%)
NT-M (N=3) 後期処置	0.04 μg/g	0.0075 μg/h/g
相対変化 (後期処置、改善)	76.5% (76.5%)	76.5% (76.5%)

【0450】

カテコールアミン要求量を、対照群として合計6匹のマウスへの非特異的マウス I g G、CLP (早期処置) 直後の5匹のマウスから成る群へのNTマウス抗体又はCLP (後期処置) の15.5時間後の3匹のマウスから成る群へのNTマウス抗体のいずれかの投与後に計測した。カテコールアミン要求量の低減は、血液循環の安定化の尺度である。これにより、データは、ADM抗体、特にNT-M抗体は、血液循環のかかなりの安定化、そして、カテコールアミン要求量のかかなりの低減につながることを示している。血液循環の安定化効果を、早期処置 (CLP直後) と完全な敗血症発生後の処置 (後期処置) で示した (図7を参照のこと)。

【0451】

体液平衡の調整

蘇生法の早期でも4日間にわたる累積的なものでも、より有益な体液平衡は、敗血症性ショックの高い死亡リスクに関係している。体液平衡の制御は、敗血症に罹患している患者の疾患の経過に最も重要な点である (s. Boyd et al, 2011)。重大な疾患の患者の体

液平衡の制御は、集中治療薬の大きな課題として残っている。表 8 から分かるように、NT-M 抗体での CLP（実験手順は「動物モデル」を参照のこと）後のマウスの処置は、排出される尿の全容積の増加につながる。分泌された尿は、無処置マウスと比較して NT-M-処置動物では約 3 倍高かった。有益な処置効果は、早期処置及び後期処置で与えられた。体液平衡も同様に、早期処置でも後期処置でも、約 20～30% 改善した。これにより、データは、ADM 抗体の使用、特に NT-ADM 抗体の使用は、患者の体液平衡を調整するのに好ましいことを示している（表 8 並びに図 8 及び 9 を参照のこと）。

【0452】

表 8

【0453】

【表 8】

	尿 平均容積／g 体重	体液平衡 平均容積／g 体重
対照（マウス I g G）（N=6）	0.042 ml/g	0.23 ml/g
NT-M 早期（N=5）	0.12 ml	0.18 ml/g
相対変化 早期処置	+ 186%	-21.7%%
NT-M 後期（N=3）	0.125 ml	0.16 ml/g
相対変化 後期処置	+ 198%	-30.5%

【0454】

腎臓機能の改善

急性腎不全症だけに罹患している患者の間の 45 パーセントの死亡率と比較して、急性腎不全と敗血症の組み合わせは、70 パーセントの死亡率に関連している（Schrier and Wang, “Mechanisms of Disease Acute Renal Failure and Sepsis”; The New England Journal of Medicine; 351:159-69; 2004）。クレアチニン濃度とクレアチニークリアランスは、腎臓の機能（機能障害）を観察するための標準的な検査室パラメーターである（Jacob, “Acute Renal Failure”, Indian J. Anaesth.; 47 (5): 367-372; 2003）。先に記載した動物実験（早期処置）からのクレアチニン及びクレアチニークリアランスデータを表 9 に示す。

【0455】

表 9

腎臓機能：

【0456】

【表 9】

	クレアチニン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	平均クレアチニークリアランス ($\mu\text{L}/\text{分}$)
対照マウス I g G (MW)	2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	174 $\mu\text{L}/\text{min}$
NT-M (MW)	1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	373 $\mu\text{L}/\text{min}$
相対変化（改善）	-42% (42%)	+114% (114%)

【0457】

対照敗血症動物との比較において、クレアチニン濃度は 42% 下がり、そして、クレアチニークリアランスは、NT-M 処置の結果として 100% 超改善した（表 9）。データは、ADM 抗体、特に NT-M の投与が腎臓機能の改善につながることを示している。

【0458】

肝臓の炎症状態の改善

対照及び早期処置動物の肝臓組織を、ホモジナイズし、そして、溶解バッファー中で溶解した。細胞抽出物の調製のために、細胞を、再懸濁し、氷上で溶解し、そして、遠心分離した。上清（タンパク質抽出物）を -80°C にて保存した。B細胞の核内因子 κ 軽鎖遺伝子エンハンサー（NF- κ B）の活性化を、電気泳動の移動度シフトアッセイ（EMSA）1, 2を使用して先に記載のとおり測定した。細胞抽出物（ $10\mu\text{g}$ ）を、ポリデオキシイノシンデオキシシチジル酸（ポリ-dI-dC）及びNF κ B（HIV κ B部位）（5'GGATCCCTCAACAGAGGGGACCTTTC CGAGGCCA-3'）を含む ^{32}P 標識した二本鎖オリゴヌクレオチド（Biomers, Ulm, Germany）と一緒に氷上でインキュベートした。複合体を、未変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し、乾燥させ、そして、X線フィルムに感光させた。蛍光物質画像装置とイメージアナライザソフトウェア（AIDA Image Analyzer; Raytest）を使用して、デンストメトリーによって放射能標識したNF- κ Bを定量化した。個々のゲルの比較のために、それぞれのバンドの強度を、外科機器の使用及びCLPを受けなかった同時に泳動した対照動物のものに関連させる。そのため、EMSAデータを、対照値に対する倍数増加として表す。統計：すべてのデータは、2つの群の相違を、対応のないサンプルのマンホイットニー順位和検定で分析したとの別段の明記がない限り、中央値（範囲）として示される。結果：NT-Mで処置した動物は、ビヒクル動物（2.92（2.50~3.81））（ $p<0.001$ ）と比較して、有意に減弱した肝臓組織NF- κ B活性化（2.27（1.97~2.53））を示した（図10を参照のこと）。

【0459】

引用文献：

1. Wagner F, Wagner K, Weber S, Stahl B, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Asfar P, Calzia E, Senftleben U, Gebhard F, Georgieff M, Radermacher P, Hysa V: Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. Shock 2011;35(4):396-402

2. Wagner F, Scheuerle A, Weber S, Stahl B, McCook O, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Thomas J, Asfar P, Szabo C, Moller P, Gebhard F, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Wagner K: Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. J Trauma 2011;71(6):1659-67

【0460】

実施例6

抗体NT-Mの生体内における副作用測定

12~15週齢の雄C57Bl/6マウス（Charles River Laboratories, Germany）を試験に使用した。6匹のマウスを、NT-Mの用量（ $10\mu\text{l/g}$ 体重）、 0.2mg/ml で処置した。対照として、6匹のマウスを、PBS（ $10\mu\text{l/g}$ の体重）で処置した。生存と身体的状態を14日間観察した。死亡率は、両群において0であり、NT-Mと対照群の間に身体的状態の相違点はなかった。

【0461】

実施例7

ゲンタマイシン誘発性腎毒性

非敗血症性急性腎臓傷害モデルを確立し、そしてそれは、ゲンタマイシンによって誘発される腎毒性を利用する（Chiu PJS. Models used to assess renal functions. Drug Develop Res 32:247-255, 1994.）。このモデルを、抗アドレノメデュリン抗体を用いた処置が腎臓機能を改善するかどうかをアッセイするのに使用した。

実験を、以下のとおり実施した：

【0462】

【表 10】

ラットにおけるゲンタマイシン誘発性腎毒性に対するNT-Mの効果						
調査設計：						
	試験		Conc	投薬量		ラット ^d
群	物品	経路	mg/ml	ml/kg	mg/kg	(雄)
1	ゲンタマイシン ^a +ビヒクル ^b	IV			NA x 4 ^c	8
2	ゲンタマイシン ^a +NT-M	IV			X 4 ^c	8

^aゲンタマイシン120mg/kgを筋肉内に、7日間（0～6日目）。
^bビヒクル：0日目にゲンタマイシンの5分前に静脈内に注射し（i. v.）、続いて、2、4及び6日目に注射する。
^c4mg/kgのNT-Mを、0日目にゲンタマイシンの5分前に静脈内に注射し（i. v.）、続いて、2、4及び6日目に2mg/kgをi. v. に注射した。
^d血漿サンプルを、EDTAチューブ内に採取した（1及び3日目の試験及び対照物品の前：100μl；7日目：120μl）。氷上での24時間の採尿は、0日目、続いて、2及び6日目のゲンタマイシン後：1、3、及び7日目の採血の後に開始する。

【0463】

体重250±20gの8匹の雄Sprague-Dawleyラットから成る群を用いた。動物を、連続した7日間、120mg/kgのi. m. にてゲンタマイシンで刺激した（群1及び2）。試験化合物（抗アドレノメデュリン抗体NT-M）及びビヒクル（リン酸緩衝生理食塩水）を、0日目、続いて、2、4及び6日目のゲンタマイシンの5分前に静脈内注射した。体重及び臨床徴候を毎日観察した。氷上への24時間の尿採取を、0、2及び6日目に実施した。尿標本を、Na⁺、K⁺、及びクレアチニンの濃度についてアッセイした。臨床化学のための血液サンプルを、1日目（ゲンタマイシンの前）、3日目（ゲンタマイシンの前）、及び7日目に採取した。血清電解質（Na⁺及びK⁺）、クレアチニン、及びBUNは、腎臓機能を観察する主要な分析物である。血漿サンプルを、EDTAチューブ内に採取した（1及び3：100μl、7日目：120μl）。クレアチニークリアランスを計算した。尿量、尿の電解質、及びクレアチニンを、動物体重100gあたりの排出された量として表した。すべての動物を7日目に屠殺した。腎臓を計量した。

【0464】

採尿：動物を、0日目、2日目、及び6日目に尿を24時間採取する個別のケージに入れた。尿量、尿のNa⁺、K⁺、及びクレアチニンを計測した。

【0465】

内因性クレアチニークリアランスを、以下のとおり計算した：

$$CCr \text{ (ml/24 h)} = [UCr \text{ (mg/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}] / SCr \text{ (mg/ml)}$$

【0466】

24時間のナトリウム（Na⁺）の尿排泄を、以下のとおり計算した：

$$UNaV \text{ (}\mu\text{Eq/24 h)} = UNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}$$

24時間のNAG及びNGALの尿排泄を、同様に計算した。

【0467】

Na⁺（FENa）の分画排泄率又は最終的な尿中に排出された濾過ナトリウムのパーセンテージは、尿細管Na⁺再吸収作用の尺度である。それを以下のとおり計算した：

$$FENa \text{ (%) } = 100 \times [UNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}] / PNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times CCr \text{ (ml/24 h)}$$

)

【0468】

抗アドレノメデュリン抗体を用いた処置は、ビヒクルと比較した場合、7日目の腎臓機能のいくつかの尺度を改善した：血清クレアチニン 1.01 mg/dL (NT-M) 対 1.55 mg/dL (ビヒクル) (図11)、BUN 32.08 mg/dL (NT-M) 対 52.41 mg/dL (ビヒクル) (図12)、内因性クレアチニークリアランス 934.43 mL/24h (NT-M) 対 613.34 mL/24h (ビヒクル) (図13)、 Na^+ の分画分泌 0.98% (NT-M) 対 1.75% (ビヒクル) (図14)。

【0469】

実施例8

先に記載したマウスCLPモデルにおいて、腎臓機能に関するいくつかのパラメーターに対する抗アドレノメデュリン抗体NT-Mでの処置の効果を調査した。

10

【0470】

NT-Mは、それぞれ3倍及び2倍高い利尿及びクレアチニークリアランスを引き起こし、実験終了時に低いクレアチニン、尿素、及びNGAL血中濃度をもたらした(表1を参照のこと)。そのうえ、腎臓内の角化細胞由来ケモカイン(KC)濃度が、NT-Mでの処置によって有意に低減された(図15)。

【0471】

表10：ビヒクル ($n=11$) 及びNT-M処置 ($n=9$) 動物の腎臓機能に関するパラメーター。血中濃度を、実験の終わりに採取したサンプルで計測した。NGAL=好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン。すべてのデータが中央値(四分位数)である。

20

【0472】

【表11】

	ビヒクル	NT-M	p 値
尿排出量 [$\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	4.4 (3.5;16.5)	15.2 (13.9;22.5)	0.033
クレアチニークリアランス [$\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$]	197 (110;301)	400 (316;509)	0.006
クレアチニン [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	1.83 (1.52;3.04)	1.28 (1.20;1.52)	0.010
尿素 [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	378 (268;513)	175 (101;184)	0.004
NGAL [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	16 (15;20)	11 (10;13)	0.008

30

【0473】

実験を以下のとおり実施した：

クレアチニン、尿素、及び好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)

血中NGAL濃度を、市販のELISA(マウスNGAL、RUO 042, BioPorto Diagnostics A/S, Denmark, Gentofte)を使用して計測した。尿素とクレアチニン濃度を、内部標準として $^2\text{H}_3$ -クレアチニン(CDN isotopes, Pointe-Claire, QU, Canada)及びメチル尿素(FlukaChemikalien, Buchs, Switzerland)を使用した、キャピラリーカラム(Optima-5MS, Macherey-Nagel, Duren, Germany)ガスクロマトグラフィー/質量分析システム(Agilent 5890/5970, Boblingen, Germany)で計測した。アセトニトリルでの除タンパク、遠心分離、及び乾燥するまで蒸発乾固させた後に、上清を、ギ酸中で再構成し、そして、弱陰イオン交換カラム(WCX、Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)で抽出した。アセトニトリルに加えて、N、O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロ酢酸アミド及びN-(tert-ブチルジメチルシリル)-N-メチルトリフルオロアセトアミドは、それぞれ尿素tert-ブチルジメチルシリル-及びクレアチニートリメチルシリル誘導体の形成を可能にする。イオンm/z 231と245、及びm/z 329と332を、それぞれ尿素とクレアチニン分析物、及び内部標準に関して観察した。尿排出量、並びに血漿及び尿クレアチニン濃度から、クレアチニークリアランスを、標準式を使用し

40

50

て計算した。

【0474】

サンプル調製

−80℃にて保存した腎臓を、PBS中、ホモジナイザにより粉碎し、そして、全細胞溶解液（100mMのTris pH7、6；500mMのNaCl；6mMのEDTA；6mMのEGTA；1%のTriton-X-100；0、5%のNP 40；10%のグリセロール；プロテアーゼ阻害剤（β-グリセロールリン酸 2mM；DTT 4mM；ロイペプチン（Leupeptine）20μM；オルトバナジウム酸ナトリウム 0、2mM）の2倍濃縮バッファーで溶解し、それに続いて遠心分離した。全細胞溶解液を、上清から得；細胞レムナントから成るペレットを捨てた。タンパク質量を、市販のタンパク質分析（Bio-Rad, Hercules, CA）を用いて決定し、そして、最終的なタンパク質濃度が4μg/lになるように光度測定を調整した。多重分析やEMSA分析のサンプルを、EMSAバッファー（10mMのHepes；50mMのKCl、10%のグリセロール；0、1mMのEDTA；1mMのDTT）で1：1に希釈し、イムノプロットのためのサンプルを、2倍のサンプルバッファー（2%のSDS；125mMのTris-HCl（25℃にてpH6、8）；10%のグリセロール；50mMのDTT；0、01%のプロモフェノールブルー）で1：1に希釈した。

【0475】

角化細胞由来ケモカイン（KC）濃度のレベルを、マウスマルチプレックスサイトカインキット（Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA）を使用して測定し、そのアッセイを、製造業者の取扱説明書を用いてBio-plex懸濁液アレイシステムを使用して実施した（Wagner F, Wagner K, Weber S, Stahl B, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Asfar P, Calzia E, Senftleben U, Gebhard F, Georgieff M, Radermacher P, Hysa V. Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H2S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. Shock 2011;35:396-402; and Wagner F, Scheuerle A, Weber S, Stahl B, McCook O, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Thomas J, Asfar P, Szabo C, Moller P, Gebhard F, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Wagner K. Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na2S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. J Trauma 2011;71:1659-1667もまた参照のこと）。要するに、適当なサイトカイン標準とサンプルを、フィルタープレートに加えた。サンプルを、蛍光標識マイクロビーズに化学的に取り付けた抗体と一緒にインキュベートした。その後、あらかじめ混合しておいた検出抗体を、各ウェルに加え、それに続いて、ストレプトアビジン-フィコエリトリンを加えた。次に、ビーズを再懸濁し、そして、サイトカイン反応混合物を、Bio-Plexタンパク質配列リーダーを使用して定量化した。データを、自動処理させ、組換サイトカイン標準から作成される検量線を使用してBio-Plex Manager Software 4.1によって分析した。アッセイの検出限界を下回るレベルを、統計的な目的のためにゼロに設定した。

【0476】

実施例9

先に記載したマウスCLPモデルにおいて、肝臓に対する抗アドレノメデュリン抗体NT-Mを用いた処置の効果を調査した。

【0477】

NT-Mは、肝臓における角化細胞由来ケモカイン（KC）濃度の有意な低下を引き起こした（図16）。

【0478】

角化細胞由来ケモカイン（KC）の計測を、実施例8（腎臓）と同様におこなった。

【0479】

実施例10

先に記載したマウスCLPモデルにおいて、血液循環（血漿）中の数種類のサイトカイン及びケモキネシンに対する、抗アドレノメデュリン抗体NT-Mを用いた処置の効果を

調査した。

【0480】

サイトカイン及びケモカイン濃度

腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン (IL)-6、単球走化性タンパク質 (MCP)-1、及び角化細胞由来ケモカイン (KC) 濃度の血漿レベルを、マウスマルチプレックスサイトカインキット (Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA) を使用して測定し、そのアッセイを、製造業者の取扱説明書を用いてBio-plex懸濁液アレイシステムを使用して実施した (Wagner F, Wagner K, Weber S, Stahl B, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Asfar P, Calzia E, Senftleben U, Gebhard F, Georgieff M, Radermacher P, Hysa V. Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. Shock 2011;35:396-402; and Wagner F, Scheuerle A, Weber S, Stahl B, McCook O, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Thomas J, Asfar P, Szabo C, Moller P, Gebhard F, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Wagner K. Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. J Trauma 2011;71:1659-1667もまた参照のこと)。要するに、適当なサイトカイン標準とサンプルを、フィルタープレートに加えた。サンプルを、蛍光標識マイクロビーズに化学的に取り付けた抗体と一緒にインキュベートした。その後、あらかじめ混合しておいた検出抗体を、各ウェルに加え、それに続いて、ストレプトアビジン-フィコエリトリンを加えた。次に、ビーズを再懸濁し、そして、サイトカイン反応混合物を、Bio-Plexタンパク質配列リーダーを使用して定量化した。データを、自動処理させ、組換サイトカイン標準から作成される検量線を使用してBio-Plex Manager Software 4.1によって分析した。アッセイの検出限界を下回るレベルを、統計的な目的のためにゼロに設定した。

【0481】

腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン (IL)-6 及び IL-10、単球走化性タンパク質 (MCP)-1、及び角化細胞由来ケモカイン (KC) の血漿レベル及び腎臓組織中濃度を、1つの単一サンプルからいくつかのパラメーターを得ることができる、市販の「マルチプレックスサイトカインキット」 (Bio-Plex Pro Precision Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA) を使用して測定した。そのアッセイの個々の操作ステップを、製造業者の取扱説明書を用いてBio-plex懸濁液アレイシステムを使用して実施した (Wagner F, Wagner K, Weber S, Stahl B, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Asfar P, Calzia E, Senftleben U, Gebhard F, Georgieff M, Radermacher P, Hysa V. Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H₂S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. Shock 2011;35:396-402; and Wagner F, Scheuerle A, Weber S, Stahl B, McCook O, Knoferl MW, Huber-Lang M, Seitz DH, Thomas J, Asfar P, Szabo C, Moller P, Gebhard F, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Wagner K. Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. J Trauma 2011;71:1659-1667もまた参照のこと)。

【0482】

要するに、蛍光標識したマイクロスフェア (「ビーズ」) を、96ウェルプレートに加え、続いて、2回の洗浄ステップをおこない、内部標準を加え、そして、血漿及び腎臓ホモジネートサンプルを加えた。その後のインキュベーションの間、単一のサイトカインが、リスチレンビーズに取り付けられた抗体に結合している。単一のサイトカインの検出のためのサイトカイン特異的ビオチン標識抗体の添加、そして、追加のインキュベーション時間後に、それに続いて、フィコエリトリン標識ストレプトアビジンを加えた。追加のインキュベーション時間の後に、次に、ビーズを再懸濁し、そして、プレートは特殊なフローサイトメータ (Bio-Plex suspension array system, Bio-Rad, Hercules, CA) で計測することもできた。データを、自動処理させ、組換サイトカイン標準から作成される検量線を使用してBio-Plex Manager Software 4.1によって分析した。血漿レベルに関して、

濃度を、 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ として示し、腎臓ホモジネートの濃度は、適切なタンパク質濃度に変換し、 $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ タンパク質として示した。

【0483】

NT-Mは、IL-6（図17）、IL-10（図18）、角化細胞由来ケモカイン（KC）（図19）、単球走化性因子（MCP-1）（図20）、TNF- α （図21）の血漿中濃度の有意な低下を引き起こした。

【0484】

実施例11

虚血／再灌流誘発性急性腎傷害

急性腎傷害が虚血／再灌流によって引き起こされる他の非敗血症性急性腎臓傷害モデルを確立した（Nakamoto M, Shapiro JI, Shanley PF, Chan L, and Schrier RW. In vitro and in vivo protective effect of atriopeptin III on ischemic acute renal failure. J Clin Invest 80:698-705, 1987., Chintala MS, Bernardino V, and Chiu PJS. Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation following ischemia-reperfusion in anesthetized rats. J Pharmacol Exp Ther 271:1203-1208, 1994）。このモデルを使用して、抗アドレノメデュリン抗体を用いた処置が腎臓機能を改善できるかどうか評価した。

【0485】

実験を以下のとおり実施した：

【0486】

【表12】

ラットの虚血／再灌流誘発性急性腎傷害に対するNT-Mの効果

調査設計：

群	試験物品	経路	Conc mg/ml	投薬量 ml/kg	mg/kg	ラット (雄)
1	I-R + ビヒクル ^a	IV		5	NA x 3	8
2	I-R + NT-M	IV		5	x 3 ^b	8

^a ビヒクル；0日目の再灌流の5分前に静脈内に注射し（i. v.）、続いて1及び2日目に注射した。

^b $4 \text{ mg} / \text{kg}$ のNT-Mを、0日目に再灌流の5分前に静脈内に注射し（i. v.）、続いて、それぞれ1及び2日目に $2 \text{ mg} / \text{kg}$ をi. v.に注射した。

^c -1、0、1、及び2日目に採尿、それぞれ0、1、2、及び3日目の血液化学及び尿検査に用いる。血漿サンプルを、EDTAチューブ内に採取した（0日目（外科手術の直前）、1、2日目： $100 \mu\text{L}$ 、ビヒクル又はTAの前；3日目： $120 \mu\text{L}$ ）。

臨床的知見：外科手術前、外科手術後、及び処置を通して毎日。

【0487】

体重 $250 \sim 280 \text{ g}$ の8匹の雄Sprague-Dawleyラットから成る群を使用した。動物は、12時間の光／暗サイクルの中、蒸留水の自由摂取させながら標準的な食餌を与えて飼育した。動物には、外科手術（0日目）の30分前に水分補給した（0.9%のNaCl及び5%のデキストロース／1：1、 $10 \text{ mL} / \text{kg}$ をp. o.）。ラットを、ペントバルビタール（ $50 \text{ mg} / \text{kg}$ 、i. p.）で麻酔した。腹腔を正中切開部から露出し、続いて、ヘパリン（ $100 \text{ U} / \text{kg}$ 、i. v.）を静脈内投与し、そして、両方の腎動脈を、血管鉗子を使用して45分咬合した。腎クリップの除去直後に、腎臓を更に1分間観察して、血液再灌流を示す色の変化を確実にする。試験化合物（NT-M）及びビヒクル（リン酸緩衝生理食塩水）を、再灌流の5分前に静脈内に注射し、続いて、1及び2日目に連日注射した。

【0488】

採尿：氷上への24時間の採尿を、-1日目の虚血／再灌流前（-24 h～0 h）、及

び再灌流後0日目（0～24h）、1日目（24～48h）及び2日目（48～72h）に開始した。

【0489】

採血：0.4mlの血液を、血漿クレアチニン／Na⁺／K⁺、及びBUNの測定のために、0h（IRI外科手術前）、24h（ビヒクル又はTAの前）、48h（ビヒクル又はTAの前）、及び72hに尾静脈を通してEDTAチューブ内に採取した；2mlの血液を、大静脈の末梢を通して採取した。

【0490】

動物を、-1日目（-24h～0h）、0日目の再灌流後の0日目（0～24h）、1日目（24～48h）、及び2日目（48～72h）に尿を24時間採取する個別のケージに入れた。尿量、尿のNa⁺、K⁺、及びクレアチニンを計測した。

10

【0491】

クレアチニークリアランス（CCr）を、以下のとおり計算した：

$$CCr \text{ (ml/24 h)} = [UCr \text{ (mg/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}] / PCr \text{ (mg/ml)}$$

24時間のナトリウム（Na⁺）の尿排泄を、以下のとおり計算した：

$$UNaV \text{ (}\mu\text{Eq/24 h)} = UNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}$$

Na⁺（FENa）の分画排泄率、又は最終的な尿中に排出された濾過ナトリウムのパーセンテージは、尿細管Na⁺再吸収作用の尺度である。それを以下のとおり計算した：

$$FENa \text{ (}\%) = 100 \times [UNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times V \text{ (ml/24 h)}] / PNa \text{ (}\mu\text{Eq/ml)} \times CCr \text{ (ml/24 h)}$$

)

20

【0492】

抗アドレノメデュリン抗体を用いた処置は、腎臓機能のいくつかの尺度を改善した：

血中尿素窒素（BUN）は、ビヒクル群において強い増大を示し（0h：17.49mg/dL、24h：98.85mg/dL、48h：109.84mg/dL、72h：91.88mg/dL）、そして、NT-M処置ではあまりはっきりしなかった（0h：16.33mg/dL、24h：84.2mg/dL、48h：82.61mg/dL、72h：64.54mg/dL）（図22）。

【0493】

血清クレアチニンも同様に発症した：ビヒクル群（0h：0.61mg/dL、24h：3.3mg/dL、48h：3.16mg/dL、72h：2.31mg/dL）、NT-M群（0h：0.59mg/dL、24h：2.96mg/dL、48h：2.31mg/dL、72h：1.8mg/dL）（図23）。

30

【0494】

内因性クレアチニークリアランスは、1日目に大幅に低下し、その後改善したが、NT-M群ではビヒクル群の低下よりも優れていた。ビヒクル群：（0h：65.17mL/h、24h：3.5mL/h、48h：12.61mL/h、72h：20.88mL/h）、NT-M群：（0h：70.11mL/h、24h：5.84mL/h、48h：21.23mL/h、72h：26.61mL/h）（図24）。

【図 2】

Fig. 2:

配列番号21

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-NH₂

配列番号22

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMAPRNKISPQGY-NH₂

配列番号23

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC

配列番号24

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVA

配列番号25

PRSKISPQGY-NH₂

配列番号26

YRQSMNMFQGLRSF

配列番号27

YRQSMNMFQG

配列番号28

YRQSMN

配列番号29

YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQ

配列番号30

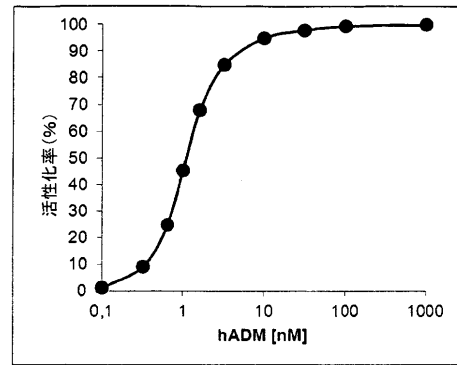
YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMA

配列番号31

YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQL

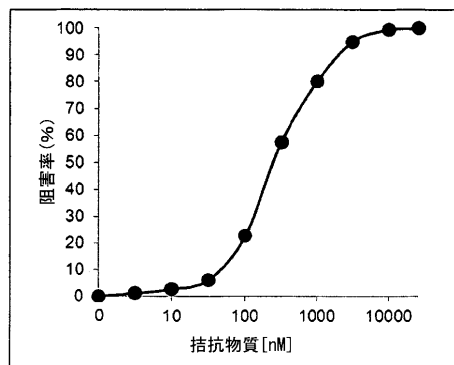
【図 3 a】

Fig. 3 a:



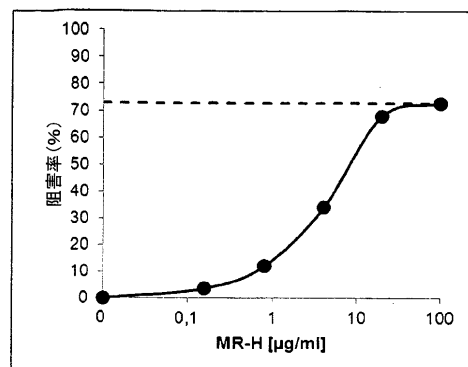
【図 3 b】

Fig. 3 b:



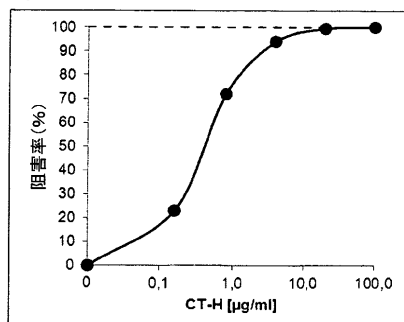
【図 3 d】

Fig. 3 d:

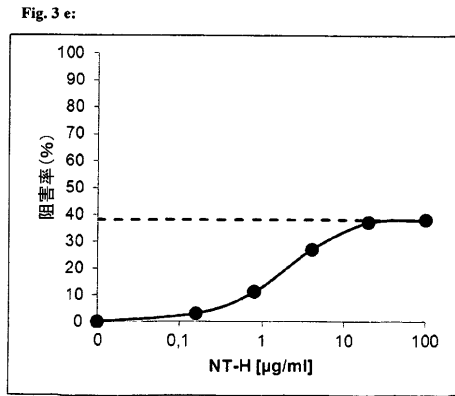


【図 3 c】

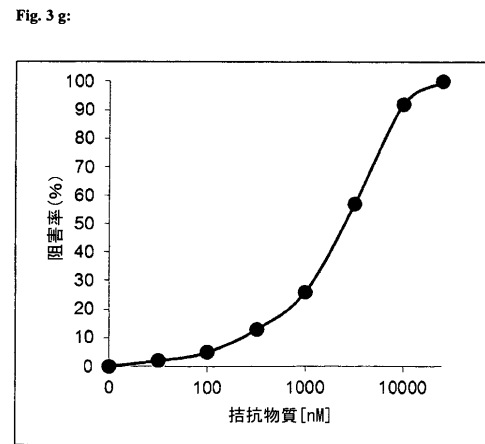
Fig. 3 c:



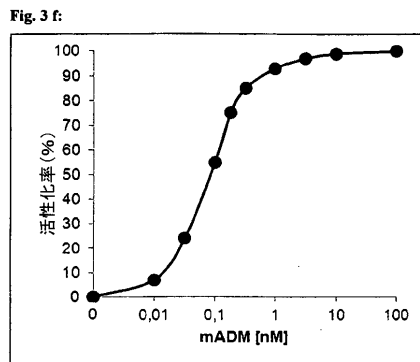
【図 3 e】



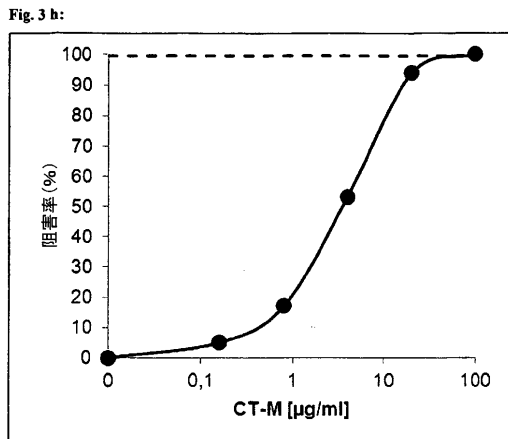
【図 3 g】



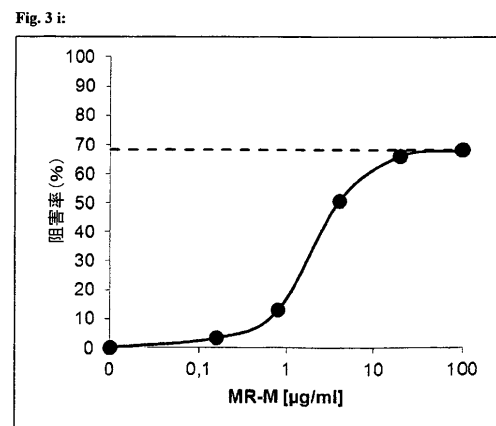
【図 3 f】



【図 3 h】

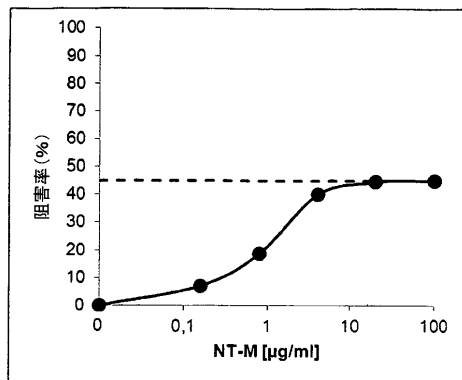


【図 3 i】



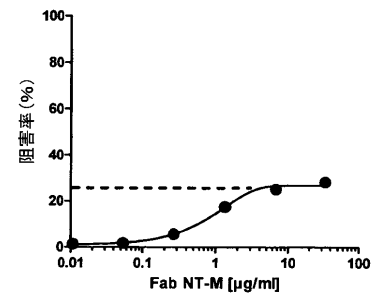
【図 3 j】

Fig. 3 j:



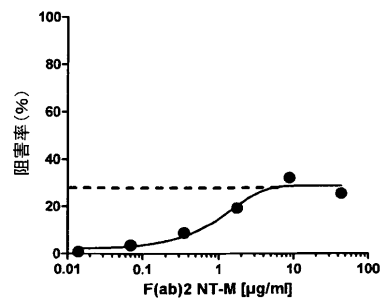
【図 3 l】

Fig. 3 l:



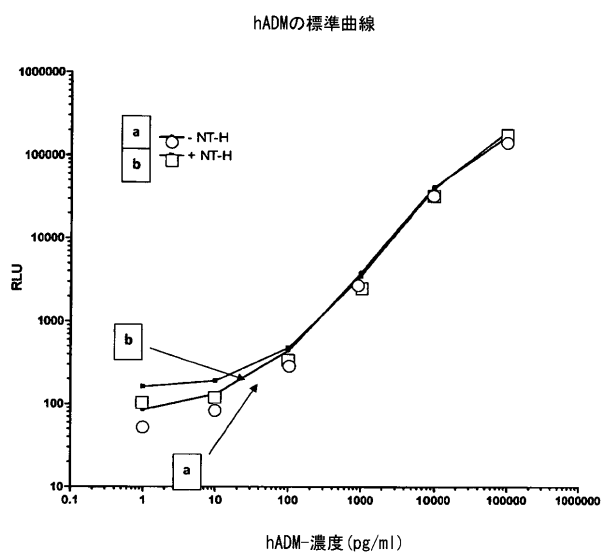
【図 3 k】

Fig. 3 k:



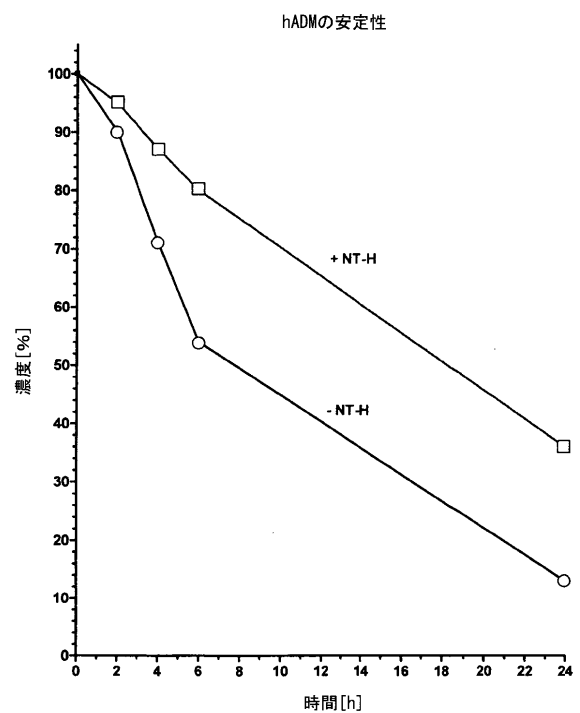
【図 4】

Fig. 4:



【図 5】

Fig. 5:



【图 7】

*****; ****; ****; *****; * **** * *, **, * **; *****; *, *, * *, **, * **, * **, *

, ***** * , *****; ***** ****; *****; , * * *, * *****; *****

Box plot showing the concentration of 17β-estradiol (E2) in water (μg · h⁻¹) for three groups: ビヒクル (white box), ADM早期 (horizontal lines box), and ADM後期 (diagonal lines box). The y-axis ranges from 0.00 to 0.07. The ADM早期 group shows the highest median concentration, followed by ADM後期, and then ビヒクル.

Group	Median (μg · h ⁻¹)	Q1 (μg · h ⁻¹)	Q3 (μg · h ⁻¹)	Min (μg · h ⁻¹)	Max (μg · h ⁻¹)
ビヒクル	~0.018	~0.015	~0.033	~0.014	~0.068
ADM早期	~0.010	~0.008	~0.012	~0.006	~0.014
ADM後期	~0.008	~0.007	~0.009	~0.006	~0.010

Figure 1 is a box plot showing the distribution of the logarithm of the number of bacteria per gram of soil ($\lg \text{CFU/g}$) for three groups: Control (white box), ADM Early (horizontal lines), and ADM Late (diagonal lines). The y-axis ranges from 0 to 4. The Control group has a median around 1.5, ADM Early around 2.5, and ADM Late around 3.5.

【 図 1 1 】

Box plot showing the concentration of Bifidobacterium in milk (m/g) for three groups: Bifidobacterium (ビヒクル), ADM early (ADM早期), and ADM late (ADM後期). The y-axis ranges from 0.00 to 0.35 m/g. The Bifidobacterium group has a median around 0.26 m/g. The ADM early group has a median around 0.18 m/g. The ADM late group has a median around 0.16 m/g. The ADM late group is represented by a hatched box.

Group	Min	Q1	Median	Q3	Max
ビヒクル	0.00	0.00	0.26	0.28	0.32
ADM早期	0.09	0.14	0.18	0.21	0.23
ADM後期	0.10	0.14	0.16	0.22	0.23

血清クレアチニン(mg/dL)

☐ ビヒクル
N=8、0日目に
1. 333mL/kg、
2、4、6日目に
0. 666mL/kg

☐ NT-M
N=8、0日目に
4mg/kg、
2、4、6日目
に2mg/kg

【 図 1 2 】

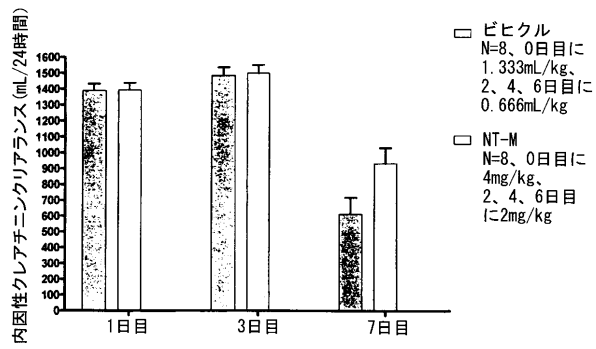
Figure 1 is a box plot showing the increase in fold change of gene expression relative to natural conditions for two groups: Bihikuru (a) and ADM early stage (b). The y-axis represents the fold increase, ranging from 1.5 to 4.0. The Bihikuru group (a) shows a higher median fold increase (approximately 3.2) compared to the ADM early stage group (b), which has a median fold increase of approximately 2.3. A '#' symbol is placed above the ADM box, indicating a significant difference between the two groups.

BUN (mg/dL)

- ☐ ビビクル
N=8、0日目に
1. 333mL/kg、
2、4、6日目に
0.666mL/kg
- ☐ NT-M
N=8、0日目に
4mg/kg、
2、4、6日
目に2mg/kg

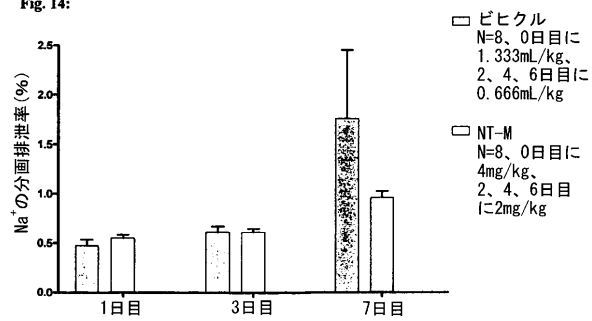
【図 13】

Fig. 13:



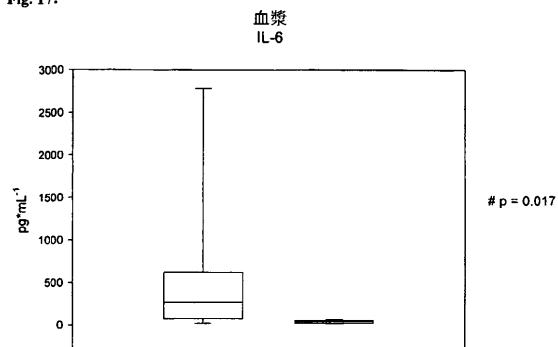
【図 14】

Fig. 14:



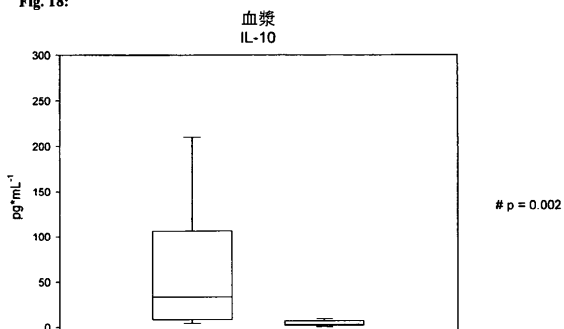
【図 17】

Fig. 17:



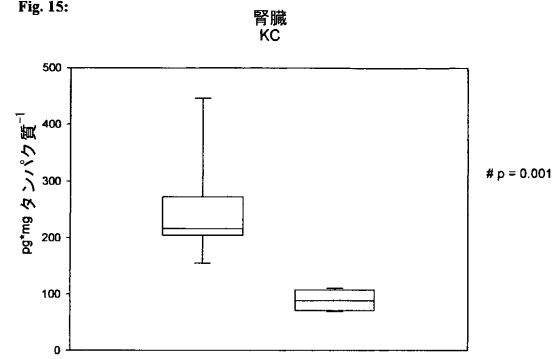
【図 18】

Fig. 18:



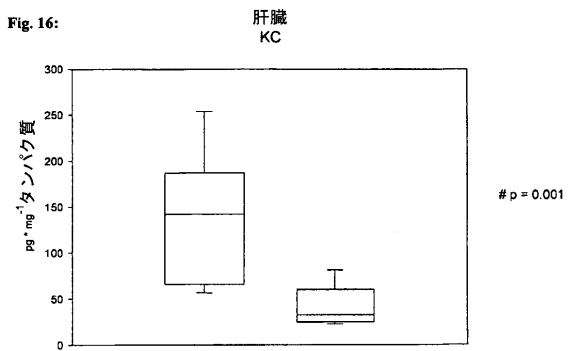
【図 15】

Fig. 15:



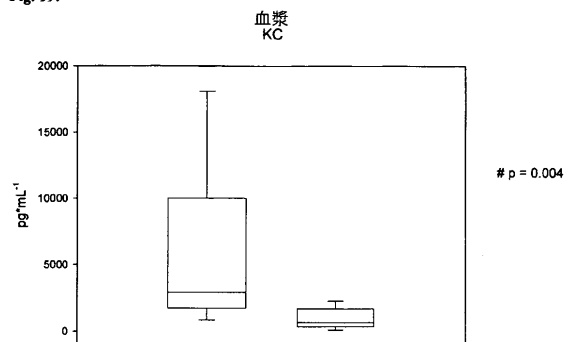
【図 16】

Fig. 16:



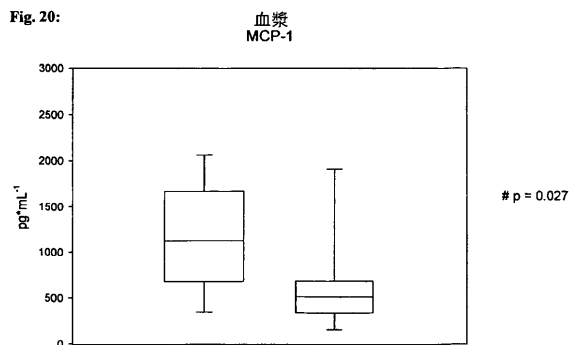
【図 19】

Fig. 19:

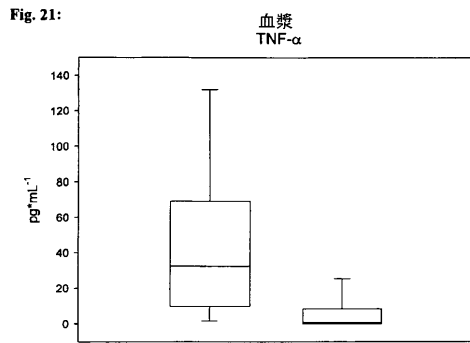


【図 20】

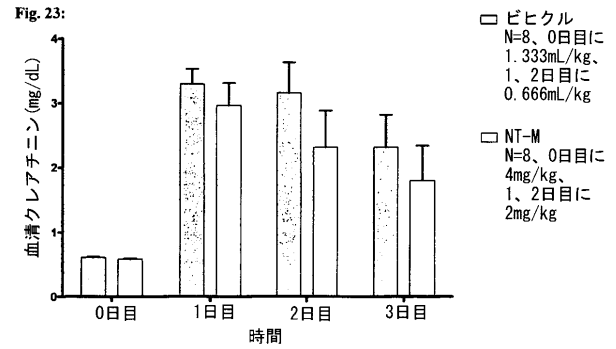
Fig. 20:



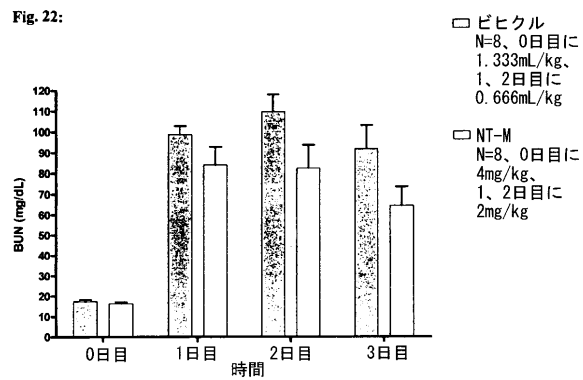
【図 2 1】



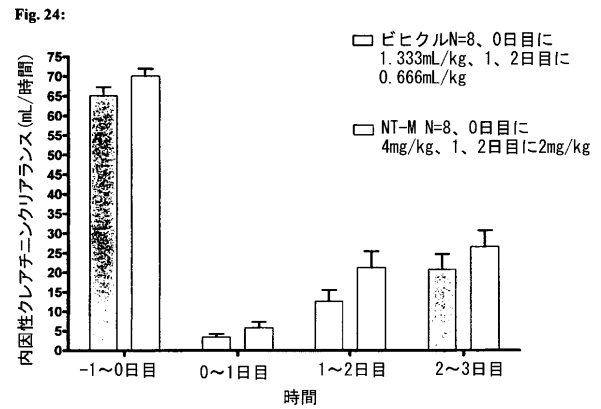
【図 2 3】



【図 2 2】

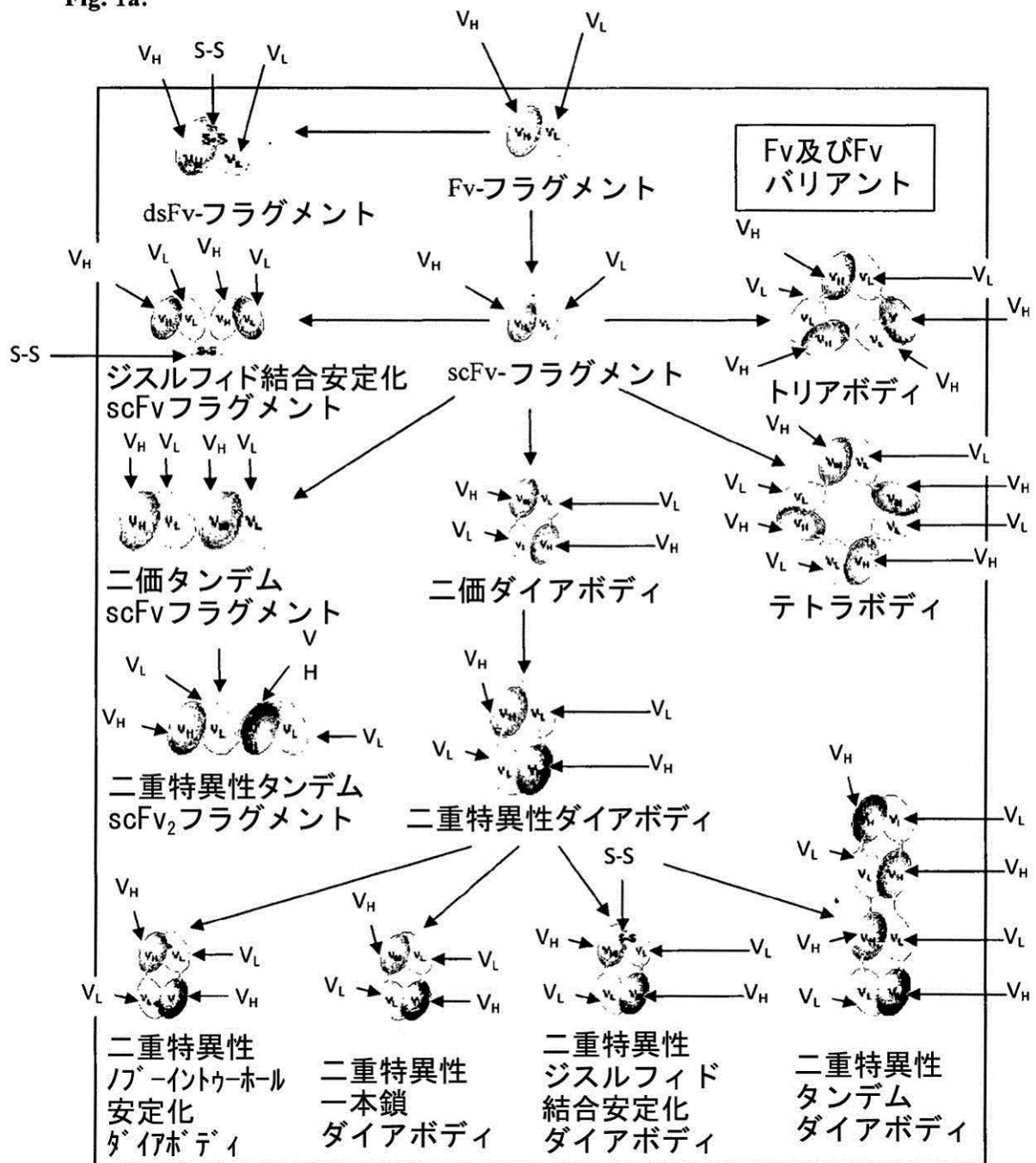


【図 2 4】



【図 1 a】

Fig. 1a:



【図 1 b】

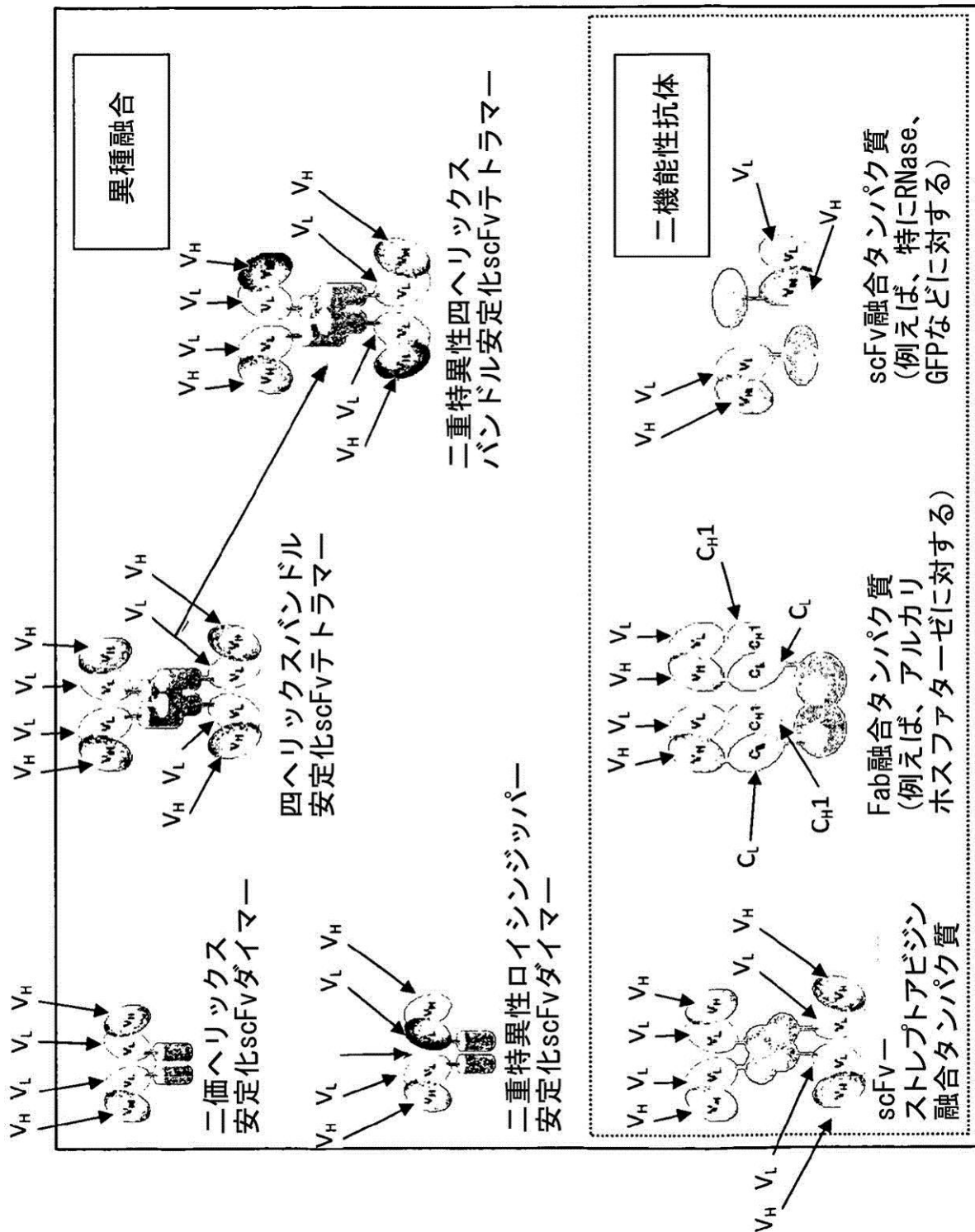
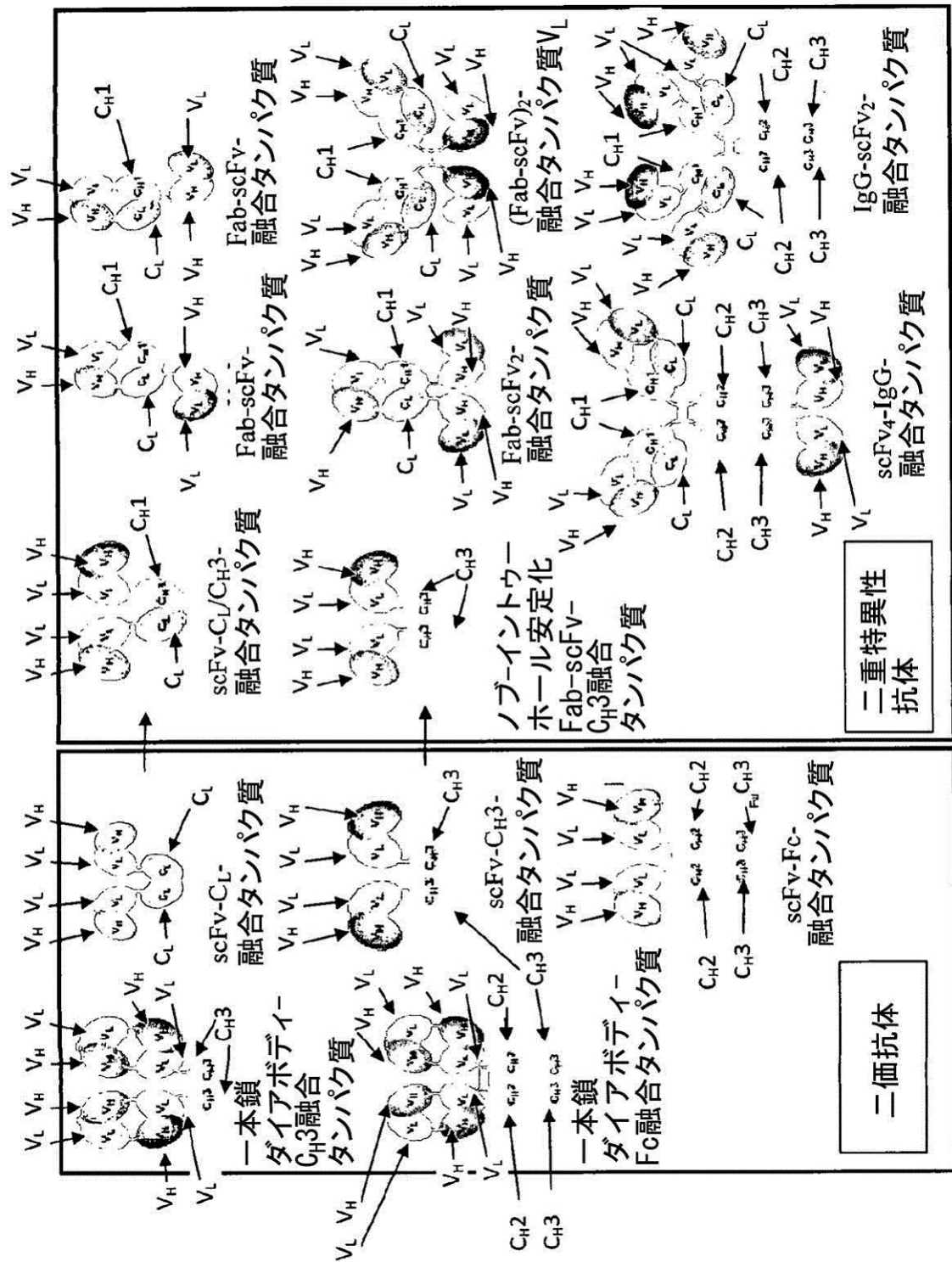


Fig. 1c:



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/072933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/26 A61K39/395 A61P31/00 A61P9/00 A61P13/12
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)

C07K 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PING W ET AL: "The Pivotal role of adrenomedullin in producing hyperdynamic circulation during early stage of sepsis", ARCHIVES OF SURGERY, AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, CHICAGO, IL, US, vol. 133, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 1298-1304, XP002599345, ISSN: 0004-0010 whole document, especially the Abstract; page 1299, paragraph 3; Figures 3-4 ----- -/--	1-24

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 February 2013

Date of mailing of the international search report

22/02/2013

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

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/072933

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUC QUYEN CHU ET AL: "The calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist CGRP8-37 blocks vasodilatation in inflamed rat skin: involvement of adrenomedullin in addition to CGRP", NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 310, no. 2-3, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 169-172, XP55051751, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/S0304-3940(01)02132-2 whole document, especially the Abstract; Figures 3B and 3C	1-24
X	----- OUAFIK L'HOUCINE ET AL: "Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY; [10640], AMERICAN SOCIETY FOR INVESTIGATIVE PATHOLOGY, US, vol. 160, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 1279-1292, XP002421261, ISSN: 0002-9440 whole document, especially the Abstract, page 1291, lines 11-13; Table 2; Figures 9 and 10B	13
X	----- MARTINEZ A ET AL: "IS ADRENOMEDULLIN A CAUSAL AGENT IN SOME CASES OF TYPE 2 DIABETES?", PEPTIDES, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 20, no. 12, 1 December 1999 (1999-12-01), pages 1471-1478, XP000982202, ISSN: 0196-9781, DOI: 10.1016/S0196-9781(99)00158-8 whole document, especially the Abstract; section 3.4; Figure 4	13
A	----- KONDOH T ET AL: "Pre-treatment of adrenomedullin suppresses cerebral edema caused by transient focal cerebral ischemia in rats detected by magnetic resonance imaging", BRAIN RESEARCH BULLETIN, ELSEVIER SCIENCE LTD, OXFORD, GB, vol. 84, no. 1, 15 January 2011 (2011-01-15), pages 69-74, XP027567825, ISSN: 0361-9230 [retrieved on 2010-12-21] whole document, especially the Abstract; Figures 1, 2 and 4; Section 5	1-24
	----- -/--	

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/072933

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PING WANG: "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", PEPTIDES, vol. 22, no. 11, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 1835-1840, XP055022163, ISSN: 0196-9781, DOI: 10.1016/S0196-9781(01)00534-4 cited in the application the whole document -----	1-24
A	MEGHAN M. TAYLOR ET AL: "Adrenomedullin and the integrative physiology of fluid and electrolyte balance", MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE, vol. 57, no. 2, 15 April 2002 (2002-04-15), pages 105-109, XP055027930, ISSN: 1059-910X, DOI: 10.1002/jemt.10055 the whole document -----	1-24
A	WILLIS K. SAMSON: "ADRENOMEDULLIN AND THE CONTROL OF FLUID AND ELECTROLYTE HOMEOSTASIS", ANNUAL REVIEW OF PHYSIOLOGY, vol. 61, no. 1, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 363-389, XP055027948, ISSN: 0066-4278, DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.363 whole document, especially pages 371-381 -----	1-24
A	W. K. SAMSON ET AL: "Adrenomedullin Inhibits Salt Appetite", ENDOCRINOLOGY, vol. 138, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 613-616, XP055027949, ISSN: 0013-7227, DOI: 10.1210/en.138.2.613 whole document, especially the Abstract -----	1-24
A	MEGHAN TAYLOR ET AL: "Ribozyme compromise of adrenomedullin mRNA reveals a physiological role in the regulation of water intake.", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY, vol. 282, no. 6, 1 June 2002 (2002-06-01), pages R1739-R1745, XP055027965, ISSN: 0363-6119, DOI: 10.1152/ajpregu.00696.2001 whole document, especially the Abstract -----	1-24

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 13/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
		A 6 1 P 43/00	1 2 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, 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

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 アンドレアス ベルクマン
ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 5 ベルリン, アム ローゼナンガー 7 8

Fターム(参考) 4C084 AA19 MA17 MA66 NA14 ZA012 ZA362 ZA512 ZA592 ZA662 ZA812
ZA892 ZA942 ZA962 ZB112 ZB262 ZB352 ZC022 ZC212 ZC751
4C085 AA13 AA14 DD63 DD88 EE01 GG02