

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6830458号
(P6830458)

(45) 発行日 令和3年2月17日 (2021.2.17)

(24) 登録日 令和3年1月28日 (2021.1.28)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D

請求項の数 5 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2018-78209 (P2018-78209)	(73) 特許権者	503469393
(22) 出願日	平成30年4月16日 (2018.4.16)		イエール ユニバーシティ
(62) 分割の表示	特願2015-523178 (P2015-523178) の分割		アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー ヘブン トウ ホイットニー アベニュー
原出願日	平成25年7月16日 (2013.7.16)		
(65) 公開番号	特開2018-138572 (P2018-138572A)	(74) 代理人	100102978
(43) 公開日	平成30年9月6日 (2018.9.6)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成30年5月10日 (2018.5.10)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/671,826		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成24年7月16日 (2012.7.16)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	61/750,916	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成25年1月10日 (2013.1.10)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患および障害を検出、治療、および予防するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レナラーゼポリペプチドフラグメントまたはレナラーゼポリペプチドによって治療される対象における腎臓の疾患もしくは障害または高血圧を検出する方法であって、

a. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを決定する工程、および

b. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを比較対照と比較する工程を含み、比較対照のレナラーゼのレベルと比較した対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルの低下が、対象が腎臓の疾患もしくは障害または高血圧を有することを示す、方法。

【請求項 2】

生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、該生物学的サンプルにおけるレナラーゼmRNAのレベル、該生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドのレベル、および該生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの酵素活性からなる群より選択される少なくとも1つを測定することによって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

比較対照が、陽性対照、陰性対照、歴史的対照、歴史的規準、または前記生物学的サンプルにおける参照分子のレベルからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

疾患または障害が、腎臓の疾患または障害である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載

10

20

の方法。

【請求項5】

腎臓の疾患または障害が、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、および腎尿細管アポトーシスからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項4に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年7月16日に提出された米国仮出願第61/671,826号、2013年1月10日に提出された米国仮出願第61/750,916号、および2013年4月19日に提出された米国仮出願第61/813,778号に対する優先権を主張するものであって、その出願のすべては参照により本明細書においてそれらの全体として本明細書によって組み入れられる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究または開発に関する記載

本発明は、アメリカ国立衛生研究所（NIH）によって与えられた助成金第RC1DK086465号、第RC1DK086402号、第R01DK065172号、および第R01DK081037号の下で政府支援によりなされた。政府は、本発明においてある一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

虚血性急性腎損傷（AKI）は、腎尿細管の死および全身性炎症をもたらす破壊的な臨床的合併症である。腎機能障害を有する患者は、上昇した血漿カテコールアミンレベルを有する。高血圧を引き起こすことに加えて、カテコールアミンは、敗血症および多臓器機能障害において炎症反応を生じさせる。

【0004】

レナラーゼ（renalase）は、腎近位尿細管によって合成されかつ分泌される、38kDaのフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）依存性アミンオキシダーゼである（Xu et al., 2005, J Clin Invest 115: 1275-1280（非特許文献1））。レナラーゼは、齧歯類およびヒトにおいて、循環カテコールアミンを分解しかつ全身血圧を調節する（Desir, 2012, Pediatr Nephrol 27: 719-725（非特許文献2））。慢性腎機能障害または末期の腎機能不全を有する患者において、血漿カテコールアミンおよび全身血圧は上昇している（Schlaidt, 2009, J Am Soc Nephrol 20: 933-939（非特許文献3））。最近の研究によれば、慢性腎機能不全を有する患者におけるレナラーゼ欠損は、血漿カテコールアミンレベルおよび全身血圧の増加につながることが示唆されている（Desir, 2012, Pediatr Nephrol 27: 719-725（非特許文献2）；Desir, 2009, Kidney Int 76: 366-370（非特許文献4）；Desir, 2011, Curr Opin Nephrol Hypertens 20: 31-36（非特許文献5）；Li et al., 2008, Circulation 117: 1277-1282（非特許文献6））。

【0005】

血圧を調節することに加えて、レナラーゼは、カテコールアミンを代謝することによって炎症性組織損傷を防御し得る。カテコールアミンは、白血球αアドレナリン作動性受容体の活性化を介して、敗血症および多臓器機能障害において炎症を直接引き起こす（Grisanti et al., 2011, J Pharmacol Exp Ther 338: 648-657（非特許文献7）；Miksa et al., 2009, PLoS One 4: e5504（非特許文献8））。実際に、慢性腎機能不全を有する患者は、罹患率および死亡率の増加に直接寄与する炎症のマーカーの増加を示す（Kaysen and Eiserich, 2003, Semin Dial 16: 438-446（非特許文献9））。マウスにおいて、レナラーゼ欠損は心IR損傷の悪化をもたらし、かつ外因性レナラーゼ投与は心筋壊死を低下させた（Wu et al., 2011, Kidney Int 79: 853-860（非特許文献10））。

【0006】

虚血性急性腎損傷は、腎臓、肝臓、心臓、または大動脈に伴う大きな外科的処置に供さ

10

20

30

40

50

れる患者にとっての大きな問題である (Chertow et al., 2005, J Am Soc Nephrol 16: 3365-3370 (非特許文献11))。腎虚血再灌流 (IR) 損傷は、心臓、肝胆道、または大動脈の大きな外科手術の後に50%を超えるAKIの発生率を有する、臨床性AKIの高頻度の原因である (Bove et al., 2004, J Cardiothorac Vasc Anesth 18: 442-445 (非特許文献12)) ; Elapavaluru and Kellum, 2007, Acta Clin Belg Suppl 326-331 (非特許文献13))。さらに、虚血性AKIは、多臓器機能障害、全身性炎症、敗血症、および死を高頻度に合併する (Jones and Lee, 2008, Best Pract Res Clin Anaesthesiol 22: 193-208 (非特許文献14))。残念ながら、周術期環境におけるAKIを予防または治療すると証明された療法はない (Jo et al., 2007, Clin J Am Soc Nephrol 2: 356-365 (非特許文献15))。

【0007】

10

ゆえに、AKIなどの腎損傷の治療および予防のための組成物および方法の必要性が当技術分野において存在する。本発明は、当技術分野におけるこの満たされていない必要性に対処するものである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】 Xu et al., 2005, J Clin Invest 115: 1275-1280

【非特許文献2】 Desir, 2012, Pediatr Nephrol 27: 719-725

【非特許文献3】 Schlaich, 2009, J Am Soc Nephrol 20: 933-939

【非特許文献4】 Desir, 2009, Kidney Int 76: 366-370

20

【非特許文献5】 Desir, 2011, Curr Opin Nephrol Hypertens 20: 31-36

【非特許文献6】 Li et al., 2008, Circulation 117: 1277-1282

【非特許文献7】 Grisanti et al., 2011, J Pharmacol Exp Ther 338: 648-657

【非特許文献8】 Miksa et al., 2009, PLoS One 4: e5504

【非特許文献9】 Kaysen and Eiserich, 2003, Semin Dial 16: 438-446

【非特許文献10】 Wu et al., 2011, Kidney Int 79: 853-860

【非特許文献11】 Chertow et al., 2005, J Am Soc Nephrol 16: 3365-3370

【非特許文献12】 Bove et al., 2004, J Cardiothorac Vasc Anesth 18: 442-445

【非特許文献13】 Elapavaluru and Kellum, 2007, Acta Clin Belg Suppl 326-331

【非特許文献14】 Jones and Lee, 2008, Best Pract Res Clin Anaesthesiol 22: 193-208

30

【非特許文献15】 Jo et al., 2007, Clin J Am Soc Nephrol 2: 356-365

【発明の概要】

【0009】

本発明は、心臓および腎臓の疾患または障害などの疾患および障害の治療または予防に有用である、レナラーゼおよびそのフラグメントに関する。ゆえに、本発明は、レナラーゼまたはそのフラグメントを含む組成物、ならびに疾患および障害を治療および予防するための方法に関する。一態様において、本発明は、少なくとも1種の作用物質を含む組成物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象における腎臓の疾患または障害を治療する方法であり、ここで該少なくとも1種の作用物質は、レナラーゼポリペプチド、レナラーゼポリペプチドフラグメント、およびレナラーゼ活性化剤からなる群より選択される少なくとも1種である。いくつかの態様において、レナラーゼポリペプチドは、組換えレナラーゼポリペプチドである。一態様において、レナラーゼポリペプチドは、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む。別の態様において、レナラーゼポリペプチドは、SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含む。一態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む。別の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む。別の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、少なくとも1種の作用物質は1回投与される。他の態様において、少なくとも1種の作用物質は繰り返し投与される。種々の態様において、少なくとも1種の作用物質は

40

50

、局部的に、領域的に、または全身的に投与される。種々の態様において、レナラーゼ活性化剤は、レナラーゼ発現の活性化剤、レナラーゼ活性の活性化剤、またはそれらの組み合わせである。種々の態様において、腎臓の疾患または障害は、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、腎尿細管アポトーシス、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である。種々の態様において、レナラーゼ活性化剤は、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体 (peptidomimetic)、および小分子化学物質からなる群より選択される少なくとも1種である。いくつかの態様において、対象はヒトである。

【0010】

一態様において、本発明は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むレナラーゼポリペプチドフラグメントを含む組成物である。別の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含むレナラーゼポリペプチドフラグメントを含む組成物である。別の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含むレナラーゼポリペプチドフラグメントである。

【0011】

別の態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを決定する工程、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを比較対照と比較する工程、および対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、比較対照のレナラーゼのレベルと比較したときに低下している場合、対象を、腎臓の疾患または障害を有すると診断する工程を含む、その必要がある対象における腎臓の疾患または障害を診断する方法である。いくつかの態様において、該方法は、腎臓の疾患または障害を有すると診断された対象を治療する工程をさらに含む。いくつかの態様において、生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼmRNAのレベルを測定することによって決定される。他の態様において、生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドのレベルを測定することによって決定される。いくつかの態様において、生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの酵素活性を測定することによって決定される。種々の態様において、比較対照は、陽性対照、陰性対照、歴史的対照、歴史的規準、または生物学的サンプルにおける参照分子のレベルからなる群より選択される少なくとも1種である。種々の態様において、腎臓の疾患または障害は、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、腎尿細管アポトーシス、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である。いくつかの態様において、対象はヒトである。

【0012】

一態様において、本発明は、少なくとも1種の作用物質を含む組成物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象における心臓の疾患または障害を治療する方法であり、ここで該少なくとも1種の作用物質は、レナラーゼポリペプチド、レナラーゼポリペプチドフラグメント、およびレナラーゼ活性化剤からなる群より選択される少なくとも1種である。いくつかの態様において、レナラーゼポリペプチドは、組換えレナラーゼポリペプチドである。一態様において、レナラーゼポリペプチドは、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む。別の態様において、レナラーゼポリペプチドは、SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含む。一態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む。別の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む。別の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、少なくとも1種の作用物質は1回投与される。他の態様において、少なくとも1種の作用物質は繰り返し投与される。種々の態様において、少なくとも1種の作用物質は、局部的に、領域的に、または全身的に投与される。種々の態様において、レナラーゼ活性化剤は、レナラーゼ発現の活性化剤、レナラーゼ活性の活性化剤、またはそれらの組み合わせである。種々の態様において、心臓の疾患または障害は、心筋壊死、鬱血性心不全、心虚血損傷、心再

10

20

30

40

50

灌流損傷、心虚血再灌流損傷、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である。種々の態様において、レナラーゼ活性化剤は、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、および小分子化学物質からなる群より選択される少なくとも1種である。いくつかの態様において、対象はヒトである。

【0013】

別の態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを決定する工程、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを比較対照と比較する工程、および対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、比較対照のレナラーゼのレベルと比較したときに低下している場合、対象を、心臓の疾患または障害を有すると診断する工程を含む、その必要がある対象における心臓の疾患または障害を診断する方法である。いくつかの態様において、該方法は、心臓の疾患または障害を有すると診断された対象を治療する工程をさらに含む。いくつかの態様において、生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼmRNAのレベルを測定することによって決定される。他の態様において、生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドのレベルを測定することによって決定される。いくつかの態様において、生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの酵素活性を測定することによって決定される。種々の態様において、比較対照は、陽性対照、陰性対照、歴史的対照、歴史的規準、または生物学的サンプルにおける参照分子のレベルからなる群より選択される少なくとも1種である。種々の態様において、心臓の疾患または障害は、心筋壊死、鬱血性心不全、心虚血損傷、心再灌流損傷、心虚血再灌流損傷、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である。いくつかの態様において、対象はヒトである。

【0014】

一態様において、本発明は、少なくとも1種の作用物質を含む組成物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象における癌を治療する方法であり、ここで該少なくとも1種の作用物質はレナラーゼ阻害剤である。いくつかの態様において、少なくとも1種の作用物質は1回投与される。他の態様において、少なくとも1種の作用物質は繰り返し投与される。種々の態様において、少なくとも1種の作用物質は、局所的に、領域的に、または全身的に投与される。いくつかの態様において、レナラーゼ阻害剤は、レナラーゼ発現の阻害剤、レナラーゼ活性の阻害剤、またはそれらの組み合わせである。種々の態様において、レナラーゼ阻害剤は、抗体、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、および小分子化学物質からなる群より選択される少なくとも1種である。一態様において、レナラーゼ阻害剤は、レナラーゼに特異的に結合する抗体である。種々の態様において、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体、抗体フラグメント、一本鎖抗体(scFv)、重鎖抗体、合成抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体からなる群より選択される少なくとも1種である。いくつかの態様において、対象はヒトである。

[本発明1001]

少なくとも1種の作用物質を含む組成物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象における腎臓の疾患または障害を治療する方法であって、該少なくとも1種の作用物質が、レナラーゼポリペプチド、レナラーゼポリペプチドフラグメント、およびレナラーゼ活性化剤からなる群より選択される少なくとも1種である、方法。

[本発明1002]

レナラーゼポリペプチドが組換えレナラーゼポリペプチドである、本発明1001の方法。

[本発明1003]

レナラーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1004]

レナラーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1005]

レナラーゼポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1006]

レナラーゼポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1007]

レナラーゼポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1008]

少なくとも1種の作用物質が1回投与される、本発明1001の方法。

10

[本発明1009]

少なくとも1種の作用物質が繰り返し投与される、本発明1001の方法。

[本発明1010]

少なくとも1種の作用物質が、局部的に、領域的に、または全身的に投与される、本発明1001の方法。

[本発明1011]

レナラーゼ活性化剤が、レナラーゼ発現の活性化剤、レナラーゼ活性の活性化剤、またはそれらの組み合わせである、本発明1001の方法。

[本発明1012]

レナラーゼ活性化剤が、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体 (peptidomimetic)、および小分子化学物質からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1001の方法。

20

[本発明1013]

腎臓の疾患または障害が、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、腎尿細管アポトーシス、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1001の方法。

[本発明1014]

対象がヒトである、本発明1001の方法。

[本発明1015]

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むレナラーゼポリペプチドフラグメントを含む、組成物。

30

[本発明1016]

SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含むレナラーゼポリペプチドフラグメントを含む、組成物。

[本発明1017]

SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含むレナラーゼポリペプチドフラグメントを含む、組成物。

[本発明1018]

a. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを決定する工程、

b. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを比較対照と比較する工程、
および

40

c. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、比較対照のレナラーゼのレベルと比較したときに低下している場合、対象を、腎臓の疾患または障害を有すると診断する工程

を含む、その必要がある対象における腎臓の疾患または障害を診断する方法。

[本発明1019]

腎臓の疾患または障害を有すると診断された対象を治療するさらなる工程を含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、該生物学的サンプルにおけるレナラ

50

ーゼmRNAのレベルを測定することによって決定される、本発明1018の方法。

[本発明1021]

生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、該生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドのレベルを測定することによって決定される、本発明1018の方法。

[本発明1022]

生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、該生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの酵素活性を測定することによって決定される、本発明1018の方法。

[本発明1023]

比較対照が、陽性対照、陰性対照、歴史的対照、歴史的規準、または前記生物学的サンプルにおける参照分子のレベルからなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1018の方法。

10

[本発明1024]

腎臓の疾患または障害が、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、腎尿細管アポトーシス、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1018の方法。

[本発明1025]

対象がヒトである、本発明1018の方法。

[本発明1026]

少なくとも1種の作用物質を含む組成物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象における心臓の疾患または障害を治療する方法であって、該少なくとも1種の作用物質が、レナラーゼポリペプチド、レナラーゼポリペプチドフラグメント、およびレナラーゼ活性化剤からなる群より選択される少なくとも1種である、方法。

20

[本発明1027]

レナラーゼポリペプチドが組換えレナラーゼポリペプチドである、本発明1026の方法。

[本発明1028]

レナラーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む、本発明1026の方法。

[本発明1029]

レナラーゼポリペプチドがSEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含む、本発明1026の方法。

[本発明1030]

レナラーゼポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む、本発明1026の方法。

30

[本発明1031]

レナラーゼポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む、本発明1026の方法。

[本発明1032]

レナラーゼポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む、本発明1026の方法。

[本発明1033]

少なくとも1種の作用物質が1回投与される、本発明1026の方法。

[本発明1034]

少なくとも1種の作用物質が繰り返し投与される、本発明1026の方法。

40

[本発明1035]

少なくとも1種の作用物質が、局部的に、領域的に、または全身的に投与される、本発明1026の方法。

[本発明1036]

レナラーゼ活性化剤が、レナラーゼ発現の活性化剤、レナラーゼ活性の活性化剤、またはそれらの組み合わせである、本発明1026の方法。

[本発明1037]

心臓の疾患または障害が、心筋壊死、鬱血性心不全、心虚血損傷、心再灌流損傷、心虚血再灌流損傷、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明102

50

6の方法。

[本発明1038]

レナラーゼ活性化剤が、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、および小分子化学物質からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1026の方法。

[本発明1039]

対象がヒトである、本発明1026の方法。

[本発明1040]

- a. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを決定する工程、
- b. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを比較対照と比較する工程、

および

c. 対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、比較対照のレナラーゼのレベルと比較したときに低下している場合、対象を、心臓の疾患または障害を有すると診断する工程

を含む、その必要がある対象における心臓の疾患または障害を診断する方法。

[本発明1041]

心臓の疾患または障害を有すると診断された対象を治療するさらなる工程を含む、本発明1040の方法。

[本発明1042]

生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、該生物学的サンプルにおけるレナラーゼmRNAのレベルを測定することによって決定される、本発明1040の方法。

[本発明1043]

生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、該生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドのレベルを測定することによって決定される、本発明1040の方法。

[本発明1044]

生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、該生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの酵素活性を測定することによって決定される、本発明1040の方法。

[本発明1045]

比較対照が、陽性対照、陰性対照、歴史的対照、歴史的規準、または前記生物学的サンプルにおける参照分子のレベルからなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1040の方法。

[本発明1046]

心臓の疾患または障害が、心筋壊死、鬱血性心不全、心虚血損傷、心再灌流損傷、心虚血再灌流損傷、および高血圧からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1040の方法。

[本発明1047]

対象がヒトである、本発明1040の方法。

[本発明1048]

少なくとも1種の作用物質を含む組成物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象における癌を治療する方法であって、該少なくとも1種の作用物質がレナラーゼ阻害剤である、方法。

[本発明1049]

少なくとも1種の作用物質が1回投与される、本発明1048の方法。

[本発明1050]

少なくとも1種の作用物質が繰り返し投与される、本発明1048の方法。

[本発明1051]

少なくとも1種の作用物質が、局所的に、領域的に、または全身的に投与される、本発明1048の方法。

[本発明1052]

レナラーゼ阻害剤が、レナラーゼ発現の阻害剤、レナラーゼ活性の阻害剤、またはそれらの組み合わせである、本発明1048の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1053]

レナラーゼ阻害剤が、抗体、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、および小分子化学物質からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1048の方法。

[本発明1054]

レナラーゼ阻害剤が、レナラーゼに特異的に結合する抗体である、本発明1048の方法。

[本発明1055]

抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体、抗体フラグメント、一本鎖抗体 (scFv)、重鎖抗体、合成抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体からなる群より選択される少なくとも1種である、本発明1054の方法。

[本発明1056]

対象がヒトである、本発明1048の方法。

【図面の簡単な説明】

【0015】

本発明の好ましい態様についての以下の詳細な説明は、添付の図面と合わせて読んだ場合によりよく理解されるであろう。本発明を例証する目的のために、図面には現在好ましいとされる態様が示されている。しかしながら、本発明は、図面に示された態様の正確な編成および手段に限定されないことが理解されるべきである。

【0016】

【図1】図1Aおよび1Bを含む図1は、レナラーゼが近位尿細管と共局在することを示す一連の画像である。ブタ腎臓切片を、レナラーゼ抗体とメガリン抗体（近位尿細管マーカー図1A）またはE-カドヘリン（遠位尿細管マーカー図1B）のいずれかとで共染色した。レナラーゼは、近位尿細管でのみ発現することが観察された。3回の実験の代表的なものである。画像を、メガリン共染色に対して100倍、およびE-カドヘリン共染色に対して40倍拡大した。

【図2】図2は、マウスにおける血漿ノルエピネフリンレベルを示すグラフである。血漿ノルエピネフリンレベルを、シャム手術または腎虚血/再灌流 (IR) 損傷に供されたマウスにおいて測定した (N=3~5/群)。血漿ノルエピネフリン濃度は、レナラーゼ野生型 (WT) マウスにおいて腎IRの24時間後に有意に増加し、この増加は、レナラーゼ欠損 (KO) マウスにおいてさらに高かった。* シャム群に対して、 $P<0.05$ 。# WT IR群に対して、 $P<0.05$ 。

【図3A】図3Aおよび3Bを含む図3は、マウスにおける血漿および腎臓でのレナラーゼレベルを示す一連の画像およびグラフである。図3A：シャム手術マウス、ならびに30分間の腎虚血および5時間または24時間の再灌流に供されたマウスにおける (N=4~5/群) 血漿レナラーゼタンパク質に対する、代表的な免疫プロット (上端) およびバンド強度の定量化 (下端)。腎IR後の血漿レナラーゼの有意な低下に留意されたい。データは平均±SEMとして提示されている。* シャム群に対して、 $P<0.05$ 。

【図3B】図3Aおよび3Bを含む図3は、マウスにおける血漿および腎臓でのレナラーゼレベルを示す一連の画像およびグラフである。図3B：レナラーゼWTまたはレナラーゼKOマウスにおける腎臓レナラーゼmRNAに対する、代表的な画像 (上端) およびGAPDHで正規化したバンド強度の定量化 (下端)。マウスを、シャム手術、または30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供した (N=4/群)。GAPDH mRNAは、内部ローディング対照としての役割を果たした。血漿レナラーゼの有意な減少と合致して、腎臓レナラーゼmRNAの発現は、腎IRの24時間後に有意に低減した。データは平均±SEMとして提示されている。* シャム群に対して、 $P<0.05$ 。

【図4A】図4A~4Dを含む図4は、レナラーゼが、マウスにおいて虚血性AKIをモジュレートすることを実証する一連のグラフである。シャム外科手術、または腎虚血および再灌流 (IR) に供されたマウスからの血漿クレアチニンレベル。図4A：レナラーゼ野生型 (WT) またはレナラーゼ欠損 (KO) マウスを、20分間の腎虚血 (中程度の虚血) または30分間の腎虚血 (重度の虚血) および24時間の再灌流に供した (N=4~6/群)。レナラーゼ欠損は、マウスにおいて腎IR損傷を悪化させた。* シャム外科手術に供されたビヒクル処理マウ

10

20

30

40

50

スに対して、 $P<0.05$ 。# 腎IRに供されたビヒクル処理WTマウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。

【図4B】図4A～4Dを含む図4は、レナラーゼが、マウスにおいて虚血性AKIをモジュレートすることを実証する一連のグラフである。シャム外科手術、または腎虚血および再灌流（IR）に供されたマウスからの血漿クレアチニンレベル。図4B：レナラーゼWTマウスを、シャム外科手術または30分間の腎IRに供した。腎IRに供されるマウスに対して、ヒト組換えレナラーゼまたはビヒクル（生理食塩水）を腎虚血の10分前に注射した。組換えヒトレナラーゼは、レナラーゼWTマウスにおいて有意な腎防御をもたらした（ $N=4\sim6$ /群）。* シャム外科手術に供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ 。# 腎IRに供されたビヒクル処理WTマウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。

10

【図4C】図4A～4Dを含む図4は、レナラーゼが、マウスにおいて虚血性AKIをモジュレートすることを実証する一連のグラフである。シャム外科手術、または腎虚血および再灌流（IR）に供されたマウスからの血漿クレアチニンレベル。図4C：虚血前または虚血後のヒト組換えレナラーゼは、マウスにおいてIR後の腎機能をレスキューする（ $N=4\sim6$ /群）。腎虚血の完了の30分後に与えられたヒト組換え体は、IR損傷を防御した。* シャム外科手術に供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ 。# 腎IRに供されたビヒクル処理WTマウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。

【図4D】図4A～4Dを含む図4は、レナラーゼが、マウスにおいて虚血性AKIをモジュレートすることを実証する一連のグラフである。シャム外科手術、または腎虚血および再灌流（IR）に供されたマウスからの血漿クレアチニンレベル。図4D：フェントラミン（5mg/kg、選択的 α アドレナリン作動性受容体アンタゴニスト）は、30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたレナラーゼ野生型（WT）およびレナラーゼ欠損（KO）マウスの両方を防御した（ $N=4$ ）。* シャム外科手術に供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ 。# 腎IRに供されたビヒクル処理WTマウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。

20

【図5A】図5Aおよび5Bを含む図5は、レナラーゼが、IR後の腎尿細管壊死をモジュレートすることを実証する一連の画像およびグラフである。図5A：20分間または30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたレナラーゼ野生型（WT）またはレナラーゼ欠損（KO）マウスの腎臓切片のヘマトキシリンおよびエオシン染色（倍率200倍）についての代表的な顕微鏡写真。一部のレナラーゼWTマウスを、腎虚血の10分前に1.5mg/kgのヒト組換えレナラーゼで前処理した。写真は3～5回の独立した実験の代表的なものである。レナラーゼKOマウスは、IR後により悪い腎尿細管壊死を有したこと、および組換えレナラーゼは、レナラーゼWTマウスにおいて壊死に対する有意な腎尿細管防御を提供したことが示されている。

30

【図5B】図5Aおよび5Bを含む図5は、レナラーゼが、IR後の腎尿細管壊死をモジュレートすることを実証する一連の画像およびグラフである。図5B：腎IRに供されたマウスに対するJablonski尺度による腎損傷スコア（ $N=4$ 、ヘマトキシリンおよびエオシン染色からの採点、尺度0～4）の概要。レナラーゼKOマウスは、IR後により悪い腎尿細管壊死を有したこと、および組換えレナラーゼは、レナラーゼWTマウスにおいて壊死に対する有意な腎尿細管防御を提供したことが示されている。* 20分間の腎IRに供されたWTマウスに対して、 $P<0.05$ 。# 30分間の腎IRに供されたビヒクル処理WTマウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。

40

【図6A】図6Aおよび6Bを含む図6は、外因性組換えヒトレナラーゼが、IR後のマウスにおいて腎尿細管アポトーシスを低下させることを示す画像およびグラフである。図6A：シャム手術、または30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたマウスの腎臓切片のTUNEL染色（アポトーシス核を表す、倍率100倍）についての代表的な顕微鏡写真。マウスを、腎虚血の10分前に生理食塩水ビヒクルまたは1.5mg/kgのヒト組換えレナラーゼで前処理した。写真は4回の独立した実験の代表的なものである。組換えレナラーゼ処理は、腎IR損傷後のマウスにおいて腎尿細管アポトーシスを有意に減少させた。

【図6B】図6Aおよび6Bを含む図6は、外因性組換えヒトレナラーゼが、IR後のマウスに

50

において腎尿細管アポトーシスを低下させることを示す画像およびグラフである。図6B：腎IR後のマウスの腎臓における、100倍視野あたりのアポトーシス細胞の定量化。^{*} 腎IRに供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。組換えレナラーゼ処理は、腎IR損傷後のマウスにおいて腎尿細管アポトーシスを有意に減少させた。

【図7A】図7A～7Dを含む図7は、外因性組換えヒトレナラーゼが、IR後のマウスにおいて腎臓の好中球浸潤を低下させることを実証する一連の画像およびグラフである。図7Aおよび7C：シャム手術、または30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたマウスの腎臓切片の好中球浸潤（倍率200倍）またはマクロファージ（F4/80染色、倍率400倍）に対する免疫組織化学についての代表的な顕微鏡写真。マウスを、腎虚血の10分前に生理食塩水ビヒクルまたは1.5mg/kgのヒト組換えレナラーゼで前処理した。写真は3～5回の独立した実験の代表的なものである。組換えレナラーゼ処理は、腎IR損傷後のマウスにおいて腎臓の好中球ならびにマクロファージの浸潤を有意に低下させた。

10

【図7B】図7A～7Dを含む図7は、外因性組換えヒトレナラーゼが、IR後のマウスにおいて腎臓の好中球浸潤を低下させることを実証する一連の画像およびグラフである。図7Bおよび7D：腎IR後のマウスの腎臓における、浸潤した好中球（200倍視野あたり）およびマクロファージ（400倍視野あたり）の定量化。^{*} シャム手術群に対して、 $P<0.05$ 。[#] 腎IRに供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。組換えレナラーゼ処理は、腎IR損傷後のマウスにおいて腎臓の好中球ならびにマクロファージの浸潤を有意に低下させた。

【図7C】図7A～7Dを含む図7は、外因性組換えヒトレナラーゼが、IR後のマウスにおいて腎臓の好中球浸潤を低下させることを実証する一連の画像およびグラフである。図7Aおよび7C：シャム手術、または30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたマウスの腎臓切片の好中球浸潤（倍率200倍）またはマクロファージ（F4/80染色、倍率400倍）に対する免疫組織化学についての代表的な顕微鏡写真。マウスを、腎虚血の10分前に生理食塩水ビヒクルまたは1.5mg/kgのヒト組換えレナラーゼで前処理した。写真は3～5回の独立した実験の代表的なものである。組換えレナラーゼ処理は、腎IR損傷後のマウスにおいて腎臓の好中球ならびにマクロファージの浸潤を有意に低下させた。

20

【図7D】図7A～7Dを含む図7は、外因性組換えヒトレナラーゼが、IR後のマウスにおいて腎臓の好中球浸潤を低下させることを実証する一連の画像およびグラフである。図7Bおよび7D：腎IR後のマウスの腎臓における、浸潤した好中球（200倍視野あたり）およびマクロファージ（400倍視野あたり）の定量化。^{*} シャム手術群に対して、 $P<0.05$ 。[#] 腎IRに供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。組換えレナラーゼ処理は、腎IR損傷後のマウスにおいて腎臓の好中球ならびにマクロファージの浸潤を有意に低下させた。

30

【図8A】図8Aおよび8Bを含む図8は、レナラーゼ欠損が、IR後の腎臓において炎症誘発性の遺伝子発現を増加させることを実証する一連の画像およびグラフである。図8A：GAPDH、TNF- α 、ICAM-1、MCP-1、およびMIP-2のRT-PCRについての代表的なゲル画像。レナラーゼ欠損マウスは、腎IRに供されたレナラーゼWTマウスと比較して、検討したTNF- α 、MCP-1、およびMIP-2 mRNAの発現の有意な増加を有した。

【図8B】図8Aおよび8Bを含む図8は、レナラーゼ欠損が、IR後の腎臓において炎症誘発性の遺伝子発現を増加させることを実証する一連の画像およびグラフである。図8B：腎IRに供されたマウスの腎臓からの、炎症誘発性マーカーのTNF- α 、ICAM-1、MCP-1、およびMIP-2についての、GAPDHに対して正規化された相対的バンド強度の密度測定による定量化（ $N=4\sim5$ /群）。レナラーゼ欠損マウスは、腎IRに供されたレナラーゼWTマウスと比較して、検討したTNF- α 、MCP-1、およびMIP-2 mRNAの発現の有意な増加を有した。^{*} シャム手術マウスに対して、 $P<0.05$ 。[#] 腎IRに供されたレナラーゼWTマウスに対して、 $P<0.05$ 。エラーバーは1 SEMを表す。

40

【図9】図9は、腎損傷スコア（ $KO=56.62\pm7.38\%$ 、 $n=6$ 対 $WT=17.07\pm4.03$ 、 $n=5$ ； $p<0.0002$ ）がそうであるように、シスプラチンでの処理の3日後に、血漿クレアチニンが、WTと比較してレナラーゼKOマウスにおいて有意により高かったことを示す一連のグラフお

50

よび画像である (1.82 0.56 対 0.71 0.02mg/dl、n=6、P=0.021)。アポトーシス (TUNEL染色の2倍増加、 $p<0.005$) およびマクロファージ浸潤 (F4/80染色の35%増加、 $p<0.05$) の程度。これらのデータは、レナラーゼが、アポトーシス促進を減少させかつ生存促進性シグナルを増加させることによって、シスプラチンによるAKIを防御することを示している。レナラーゼは、シスプラチンによるAKIに対する有用な治療選択肢を提供し得る。

【図10】図10は、レナラーゼペプチドが虚血性AKIを防御することを示すグラフである。表示されたレナラーゼペプチドでの前処理の有無での、30分間の腎虚血に供されたWTマウスにおける、24時間の時点での血漿クレアチニンの変化。

【図11】図11A～11Dを含む図11は、レナラーゼが、シスプラチン毒性からHK-2細胞を防御し、アポトーシスを阻害し、かつBcl-2発現を上方調節することを示す一連の画像およびグラフである。図11A：レナラーゼの有無でのシスプラチンで24時間処理されたHK-2細胞、ウェスタンブロットによって測定されたレナラーゼ発現；図11B：レナラーゼは、WST-1によって測定される細胞生存を向上させる；図11C：レナラーゼの有無でのシスプラチンで24時間処理されたHK-2細胞、ウェスタンブロットによって測定されかつ密度測定によって定量化されたカスパーゼ (右のパネル)；図11D：図11Cにあるように、ウェスタンによって測定されたBcl-2。

【図12】図12A～12Eを含む図12は、レナラーゼが、Bcl-2を上方調節し、PI3K/AKT、ERK、p38を活性化し、かつJNKを阻害することを示す一連の画像およびグラフである。ウェスタンブロット解析；p-は、リン酸化され、活性化されたタンパク質を表す；GAPDHローディング対照に対して正規化されたシグナル、次いで、時間0からのタンパク質リン酸化の変化 (増加=活性化、減少=阻害) が算出されている。図12A：レナラーゼと24時間インキュベートしたHK-2およびHUVEC細胞；図12B：レナラーゼによる、AKTおよびMAPKシグナル伝達の時間経過についてのウェスタンブロット、レナラーゼとともに表示された時間インキュベートしたHK-2細胞；4c～dにおけるベースラインと比べた変化は有意である ($p<0.05$)；図12C：AKT (T308)、AKT (5473)、およびERKの活性化；図12D：JNKの阻害；図12E：シスプラチンの存在下でのレナラーゼによるp38の著しいかつ持続的な (60分間) 上方調節、時間経過に対するウェスタンブロット、REN=レナラーゼ、CP=シスプラチン。

【図13】図13は、レナラーゼペプチドのアミノ酸配列の一覧である。

【図14】図14A～14Cを含む図14は、レナラーゼペプチドの血行力学的効果を実証する実験の結果を描いている。麻酔した野生型マウスにおける、RP-220の1回の静脈内注射；BPは継続的に記録されている；RP-220は時間0で与えられている；各データの点は、6匹の動物における、表示された時点で収集された収縮期または拡張期のBP値の平均を表す；Kruskal-Wallis検定は統計的有意性を明らかにし、Mann-Whitney検定は一对比較に用いられた；*は $P<0.05$ を表す (図14A)。RP-H220を注射する点を除いては14Aにあるように、血圧に有意な変化なし (図14B)。野生型マウスにおける心拍数に対するRP-220 (四角) およびRP-H220 (ひし形) の1回の静脈内注射の効果 (図14C)。RP H220、RP A220、RP 224、RP 220スクランブル型、RP 128、およびRP 19は、BPに対して効果を有しなかった。

【図15】図15は、レナラーゼの実用モデルを描いた略図である。レナラーゼは、膜受容体に結合して、細胞生存に影響を及ぼす細胞シグナル伝達経路を活性化する。組換えレナラーゼまたはRP 220の血行力学的効果は、細胞シグナル伝達を活性化する同じ受容体によって、または異なる受容体によって仲介され得る。

【図16】図16は、急性腎虚血が、血液、血清、血漿、および尿でのレナラーゼレベルの減少として検出され得る、レナラーゼの腎臓内分泌の減少をもたらすことを実証する実験の結果を描いている。

【図17】図17A～17Dを含む図17は、レナラーゼ欠損が、シスプラチンによるAKIを増悪させることを実証する実験の結果を描いている。シスプラチンの投与の3日後の、WTおよびレナラーゼKOマウスにおける血漿クレアチニンレベル；n=6、*： $P<0.05$ (図17A)。シスプラチンで処理したWTマウスの腎臓切片のヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 染色についての代表的な顕微鏡写真。 (図17B、左のパネル)。シスプラチンで処理したレ

10

20

30

40

50

ナラーゼK0マウス由来の腎臓のH&E染色についての代表的な顕微鏡写真（図17B、中央のパネル）。腎臓損傷スコア、 $n=6$ 、*： $P<0.05$ （図17B、右のパネル）。シスプラチンで処理したWTマウスの腎臓切片のTUNEL染色についての代表的な顕微鏡写真； $n=6$ （図17C、左のパネル）。シスプラチンで処理したレナラーゼK0マウス由来の腎臓のTUNEL染色についての代表的な顕微鏡写真、 $n=6$ （図17C、中央のパネル）。40倍視野あたりのアポトーシス核の数、 $n=6$ 、*： $P<0.05$ （図17C、右のパネル）。シスプラチンで処理したWTマウスの腎臓切片のマクロファージ（F4/80）染色についての代表的な顕微鏡写真； $n=5$ （図17D、左のパネル）。シスプラチンで処理したレナラーゼK0マウス由来の腎臓のマクロファージ（F4/80）染色についての代表的な顕微鏡写真、 $n=5$ （図17D、中央のパネル）。100倍視野あたりのマクロファージの数、 $n=5$ 、*： $P<0.05$ （図17D、右のパネル）。

【図18】図18A～18Dを含む図18は、組換えレナラーゼが、オキシダントおよびシスプラチン仲介性損傷からHK-2細胞を防御することを実証する実験の結果を描いている。レナラーゼの有無での、2mM H_2O_2 で表示された時間処理したHK-2細胞；LDH：乳酸デヒドロゲナーゼ； $n=8$ 、*：対照 対 レナラーゼに対して、 $P<0.05$ ；#：対照 対 H_2O_2 に対して、 $P<0.05$ （図18A）。レナラーゼの有無での、20 μ Mのシスプラチンで24時間処理したHK-2細胞（図18B）。WST-1法によって測定された細胞生存； $n=6$ 、*： $P<0.05$ （図18B、左のパネル）。ウェスタンブロットによって測定されたレナラーゼ発現；代表的なブロットが示される、 $n=3$ （図18B、右のパネル）。18Bにあるように処理したHK-2細胞（図18C）；ウェスタンブロットによって測定されたカスパーゼ活性化（図18C）。密度測定による定量化、 $n=3$ ；*： $P<0.05$ （図18C、右のパネル）。18Bにあるように処理したHK-2細胞（図18D）。ウェスタンブロットによって測定されたBcl-2発現（図18D、左のパネル）。密度測定による定量化、 $n=3$ ；*： $P<0.05$ （図18D、右のパネル）。

【図19】図19A～19Fを含む図19は、レナラーゼの防御効果が、その酵素活性とは無関係であることを実証する実験の結果を描いている。レナラーゼアイソフォームRen1～7；1～10で番号付けされたエクソン；RP-224：Ren1またはRen2のレナラーゼペプチドのアミノ酸224～233；RP-220：アミノ酸220～239；RP-H220：ヒスチジンタグ付けされたRP-220；RP-Scr220：スクランブル型RP-220（図19A）。抗レナラーゼモノクローナル抗体で24時間処理した培養下のCCL-119細胞；WST-1法によって測定された細胞生存； $n=3$ 、*： $P<0.05$ （図19B）。レナラーゼペプチドの有無での、2mM H_2O_2 で表示された時間処理したHK-2細胞；LDH：乳酸デヒドロゲナーゼ； $n=6$ 、*：対照 対 レナラーゼペプチドに対して、 $P<0.05$ （図19C）。組換えレナラーゼおよびレナラーゼペプチドの有無での、20 μ Mのシスプラチンで24時間処理したHK-2細胞、*：対照 対 レナラーゼペプチドに対して、 $P<0.05$ （図19D）。シャム外科手術、または腎臓の虚血および再灌流（IR）に供されたマウスからの血漿クレアチニンレベル；レナラーゼWTマウスを、シャム外科手術または30分間の腎IRに供した。腎IRに供されるマウスに対して、RP-H220またはビヒクル（生理食塩水）を腎虚血の10分前に注射した。RP-H220は、レナラーゼWTマウスにおいて有意な腎防御をもたらした（ $N=4\sim6$ /群）。*：シャム外科手術に供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ ；#：腎IRに供されたビヒクル処理WTマウスに対して、 $P<0.05$ （図19E）。レナラーゼペプチドはNADHを酸化しない；37°Cにおける、25mM Tris、pH7.5、5mM NaCl、および150 μ M NADH中の組換えレナラーゼまたはペプチド；*： $P<0.05$ （図19F）。

【図20】図20A～20Cを含む図20は、MAPK活性化が、レナラーゼペプチドの防御効果に必須であることを実証する実験の結果を描いている。レナラーゼおよびレナラーゼペプチドによるMAPKシグナル伝達。ウェスタンブロット解析；ERK：細胞外シグナル制御キナーゼ1および2；JNK：c-Jun N末端キナーゼ；AKT：プロテインキナーゼB；p-は、リン酸化され、活性化されたタンパク質を表す；代表的なブロット、 $n=3$ （図20A）。レナラーゼはAKTを活性化する（図20B）。ウェスタンブロット解析；p-は、リン酸化され、活性化されたタンパク質を表す；代表的なブロット、 $n=3$ （図20B、左のパネル）。GAPDHローディング対照に対して正規化されたシグナル； $n=3$ 、ERK、p38、およびAKT（T308）に対して1～60分、ならびにAKT（S473）に対してのみ30分の時点における、統計的に有意な（ $P<0.05$ ）ベースラインと比べた変化（図20B、右のパネル）。ERKまたはAKT阻害は、RP-H220の防御

10

20

30

40

50

効果を無効にする（図20C）。シャム外科手術、または腎臓の虚血および再灌流（IR）に供されたマウスからの血漿クレアチニンレベル；レナラーゼWTマウスを、シャム外科手術または30分間の腎IRに供した。腎IRに供されるマウスに対して、RP-H220またはビヒクル（生理食塩水）を腎虚血の10分前に注射した。一部の動物を、ERK阻害剤のPD98059またはPI3K/AKT阻害剤のウォルトマニン（wortmanin）のいずれかで前処理した。（N=6～8/群）。*：シャム外科手術に供されたビヒクル処理マウスに対して、 $P<0.05$ ；#：腎IRに供されたビヒクル処理WTマウスに対して、 $P<0.05$ （図20C）。

【図21】図21は、血圧に対するRP-220注射の効果を検討する実験の結果を描いている。麻酔した野生型マウスにおける、RP-220（ $n=3$ ）または緩衝液（ $n=2$ ）の1回の皮下注射；BP圧は継続的に記録されている；RP-220は時間0で与えられている；各データの点は平均圧を表す；平均の標準誤差が示されている。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

詳細な説明

本発明は、レナラーゼおよびそのフラグメントが、心臓および腎臓の疾患または障害などの疾患または障害の治療または予防に有用であるという発見に関する。ゆえに、本発明は、レナラーゼまたはそのフラグメントを含む組成物、ならびに心臓および腎臓の疾患または障害を含めた疾患および障害の治療および予防するための方法に関する。いくつかの態様において、本発明の組成物および方法を用いて治療されるまたは予防される腎臓損傷は、虚血/再灌流（IR）によって引き起こされたAKIである。

20

【0018】

一態様において、本発明のレナラーゼは、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。別の態様において、本発明のレナラーゼは、SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。いくつかの態様において、本発明のレナラーゼは、SEQ ID NO: 9またはSEQ ID NO: 10のアミノ酸配列の少なくとも一部を含むレナラーゼフラグメントである。いくつかの態様において、レナラーゼフラグメントは、そのAKI防御活性を保持するが、検出可能なNADHオキシダーゼ活性を呈しないペプチドである。いくつかの態様において、レナラーゼフラグメントは、その防御活性を保持するが、検出可能なアミノオキシダーゼ活性を呈しないペプチドである。特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含むペプチドである。

30

【0019】

本発明の組成物および方法は、組換えレナラーゼまたはそのフラグメントを含む。本発明の組成物および方法には、心筋壊死、心不全、鬱血性心不全、心虚血損傷、心再灌流損傷、心虚血再灌流損傷、中毒性心臓損傷、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎臓損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、腎尿細管アポトーシス、虚血性脳損傷、再灌流脳損傷、虚血再灌流脳損傷、中毒性脳損傷、虚血性肝臓損傷、再灌流肝臓損傷、虚血再灌流肝臓損傷、中毒性肝臓損傷、および高血圧を治療または予防するための組成物および方法が含まれる。いくつかの態様において、本発明の組成物および方法は、血圧を制御するまたは維持するのに有用である。いくつかの態様において、本発明の組成物および方法は、非限定的な例として、不安症、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、および注意欠陥多動性障害（ADHD）など、交感神経系の疾患および障害を治療または予防するのに有用である。

40

【0020】

別の態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを査定することによって、対象の腎臓の疾患または障害を診断する方法である。一態様において、比較物（comparator）と比較したレナラーゼのレベルの変化（すなわち、増加または減少）は、腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害の診断のための、ならびに腎臓または心臓の疾患または障害の治療をモニターするためのマーカーである。

50

【0021】

定義

別様に定義されていない限り、本明細書において用いられるすべての技術的および科学的な用語は、本発明が関連する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本発明の試験のための実践には、本明細書において記載されるものと同様または同等の任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい材料および方法が本明細書において記載される。本発明の記載および主張において、以下の専門用語が用いられる。

【0022】

本明細書において記載される専門用語は、特定の態様を記載することのみを目的とするものであり、限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。

10

【0023】

「a」および「an」という冠詞は、冠詞の1つのまたは1つを上回る（すなわち、少なくとも1つの）文法上の対象物を指すために本明細書において用いられる。例として、「要素（an element）」は、1つの要素または1つを上回る要素を意味する。

【0024】

量、時間的継続期間などの測定可能な値を指す場合に本明細書において用いられる「約」は、指定された値からの±40%もしくは±20%もしくは±10%、±5%、±1%、または±0.1%の非限定的な変動を、そのような変動は適切であるとして包含することを意味する。

20

【0025】

「異常な」という用語は、生物、組織、細胞、またはそれらの構成成分との関連で用いられる場合、「正常な」（予測される）それぞれの特徴を呈するそうした生物、組織、細胞、またはそれらの構成成分とは、少なくとも1つの観察可能なまたは検出可能な特徴（例えば、年齢、処理、時刻等）が異なるそうした生物、組織、細胞、またはそれらの構成成分を指す。一方の細胞または組織のタイプについて正常であるまたは予測される特徴は、異なる細胞または組織のタイプにとって異常であり得る。

【0026】

本明細書において使用するとき、疾患を「緩和する」または「治療する」ことは、疾患または障害の少なくとも1つの兆候または症状の頻度または重症度を低下させることを意味する。

30

【0027】

本明細書において使用するとき、「変更」、「欠陥」、「変動」、または「変異」という用語は、遺伝子がコードするポリペプチドの機能、活性、発現（転写または翻訳）、または立体構造に影響を及ぼす、細胞内の遺伝子における変異を指す。本発明によって包含される変異は、コードされたタンパク質の発現の完全な非存在を含めた、コードされたポリペプチドの機能、活性、発現、または立体構造の増強または崩壊をもたらす、細胞内の遺伝子の任意の変異であってよく、かつ例えばミスセンス変異およびナンセンス変異、挿入、欠失、フレームシフト、および未成熟終結を含んでよい。そのように限定されることなく、本発明によって包含される変異は、mRNAのスプライシングを変更させ（スプライス部位変異）、またはリーディングフレームにおけるシフト（フレームシフト）を引き起こし得る。

40

【0028】

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗原上の特異的エピトープに特異的に結合し得る免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来する無傷の免疫グロブリンであってよく、かつ無傷の免疫グロブリンの免疫反応性部分であってよい。本発明における抗体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体（「イントラボディ」）、Fv、FabおよびF(ab)₂、ならびに一本鎖抗体（scFv）、ラクダ科抗体などの重鎖抗体、合成抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体を含めた多様な形態で存在し得る（Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manu

50

al, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426)。

【0029】

本明細書において用いられる「抗体重鎖」とは、それらの天然に存在する立体構造状のすべての抗体分子に存在している2種のタイプのポリペプチド鎖のうちのより大きいほうを指す。

【0030】

本明細書において用いられる「抗体軽鎖」とは、それらの天然に存在する立体構造状のすべての抗体分子に存在している2種のタイプのポリペプチド鎖のうちのより小さいほうを指す。κおよびλ軽鎖とは、2種の主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

10

【0031】

本明細書において用いられる「合成抗体」という用語は、例えば本明細書において記載されるバクテリオファージによって発現される抗体など、組換えDNA技術を用いて産出される抗体を意味する。該用語は、抗体をコードするDNA分子の合成によって産出されている抗体であって、DNA分子が、抗体タンパク質または該抗体を指定するアミノ酸配列を発現させ、該DNAまたはアミノ酸配列が、利用可能でありかつ当技術分野において周知であるDNAまたはアミノ酸配列合成技術を用いて獲得される、抗体を意味するとも解釈されるべきである。

【0032】

20

本明細書において使用するとき、「免疫アッセイ」とは、標的分子に特異的に結合して、標的分子を検出しかつ定量化し得る抗体を用いる任意の結合アッセイを指す。

【0033】

抗体に関して本明細書において用いられる「特異的に結合する」という用語は、サンプル中の特異的抗原を認識するが、他の分子を実質的に認識しないまたは結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種由来の抗原に特異的に結合する抗体は、1つまたは複数の種由来のその抗原にも結合し得る。しかし、そのような異種間反応性それ自体は、特異的であるとしての抗体の分類を変更しない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原の異なる対立形質にも結合し得る。しかしながら、そのような交差反応性それ自体は、特異的であるとしての抗体の分類を変更しない。ある場合には、「特異的結合」または「特異的に結合すること」という用語を、抗体、タンパク質、またはペプチドと第二の化学種との相互作用に関して用いて、該相互作用が化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存すること、例えば抗体は一般的にタンパク質よりもむしろ特異的タンパク質構造を認識しかつ結合することを意味し得る。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識された「A」および該抗体を含有している反応において、エピトープA（または遊離した、標識されていないA）を含有している分子の存在は、該抗体に結合される標識されたAの量を低下させると考えられる。

30

【0034】

「アプリーケーター」という用語は、該用語が本明細書において用いられるとき、本発明の組成物を対象に投与するための、皮下注射器、ピペット、イオン導入装置、パッチ等を含むがそれらに限定されない任意の装置を意味する。

40

【0035】

本明細書において使用するとき、「マーカー」または「バイオマーカー」という用語は、本発明に従って、例えば心臓または腎臓の疾患または障害の存在および/または重症度を判定するのに有用であるパラメーターを含むことを意味する。非限定的な例として、「マーカー」または「バイオマーカー」は、レナラーゼのレベルおよび/または活性である。

【0036】

患者由来のサンプルにおけるマーカーのレベルが、参照対象由来のサンプルにおけるレベルと、マーカーを査定するために採用されるアッセイの標準誤差を上回る量、好ましく

50

は少なくとも10%、より好ましくは25%、50%、75%、または100%異なる場合、マーカーまたはバイオマーカーのレベルは、参照サンプルにおけるマーカーまたはバイオマーカーのレベルとは「有意に」異なる。

【0037】

本明細書において用いられる「癌」とは、細胞の異常な増殖または分裂を指す。一般的に、癌細胞の増殖および/または寿命は、その周囲の正常な細胞および組織のものを上回り、かつそれとは調和しない。癌は、良性、前悪性、または悪性であり得る。癌は、口腔（例えば、口、舌、咽頭等）、消化器系（例えば、食道、胃、小腸、結腸、直腸、肝臓、胆管、胆嚢、膵臓等）、呼吸器系（例えば、喉頭、肺、気管支等）、骨、関節、皮膚（例えば、基底細胞、扁平上皮細胞、髄膜腫等）、乳房、生殖系（例えば、子宮、卵巣、前立腺、精巣等）、泌尿器系（例えば、膀胱、腎臓、尿管等）、目、神経系（例えば、脳等）、内分泌系（例えば、甲状腺等）、および造血系（例えば、リンパ腫、骨髄腫、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病等）を含めた多様な細胞および組織で生じる。

10

【0038】

本明細書において用いられる「コード配列」という用語は、転写されかつ/または翻訳されて、mRNAおよび/もしくはポリペプチド、またはそれらのフラグメントを生成し得る、核酸もしくはその相補体、またはそれらの一部の配列を意味する。コード配列は、ゲノムDNAまたは未成熟一次RNA転写物におけるエクソンを含み、それは細胞の生化学的機構によって一緒に接続されて成熟mRNAを提供する。アンチセンス鎖はそのような核酸の相補体であり、コード配列はそこから推測され得る。対照的に、本明細書において用いられる「非コード配列」という用語は、インビボでアミノ酸に翻訳されない、またはそこではtRNAがアミノ酸を置くように相互作用しないもしくはアミノ酸を置こうと試みない、核酸もしくはその相補体、またはそれらの一部の配列を意味する。非コード配列は、ゲノムDNAまたは未成熟一次RNA転写物におけるイントロン配列、およびプロモーター、エンハンサー、サイレンサーなどの遺伝子関連配列の両方を含む。

20

【0039】

本明細書において使用するとき、「相補的な」または「相補性」という用語は、塩基対合則によって関連付けられたポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）に関して用いられる。例えば、「A-G-T」という配列は、「T-C-A」という配列に相補的である。相補性は、核酸の塩基の一部のみが塩基対合則に従って一致している「部分的」であってよい。または、核酸間の「完全な」もしくは「全体的な」相補性が存在し得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して重大な影響を有する。これは、増幅反応において、ならびに核酸間の結合に依存する検出法においてとくに重要である。

30

【0040】

「疾患」とは、動物が恒常性を維持できず、かつ疾患が改善されない場合には動物の健康は損なわれ続ける動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」とは、動物は恒常性を維持できるが、動物の健康状態は、障害の非存在下でそれがあるであろう状態よりも望ましくない健康状態である。治療を受けないまま放置されても、障害は、必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。

40

【0041】

本明細書において用いられる「有効量」とは、治療上または予防上の有益性を提供する量を意味する。

【0042】

「コードしている」とは、ヌクレオチドの規定配列（すなわち、rRNA、tRNA、およびmRNA）またはアミノ酸の規定配列のいずれかを有する、生物学的過程における他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型としての役割を果たす遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの特異的配列の固有の特性、ならびにそこから生じる生物学的特性を指す。ゆえに、細胞または他の生物学的システムにおいて、その遺伝

50

子に対応するmRNAの転写および翻訳によりタンパク質が生成される場合、遺伝子はタンパク質をコードする。mRNA配列と同一でありかつ通常配列表に提供されるヌクレオチド配列であるコード鎖、および遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として用いられる非コード鎖の両方とも、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると言われ得る。

【0043】

本明細書において使用するとき、核酸に適用される「フラグメント」という用語は、より大きな核酸の部分配列を指す。核酸の「フラグメント」は、長さが少なくとも約15ヌクレオチド；例えば、少なくとも約50ヌクレオチド～約100ヌクレオチド；少なくとも約100～約500ヌクレオチド；少なくとも約500～約1000ヌクレオチド；少なくとも約1000ヌクレオチド～約1500ヌクレオチド；約1500ヌクレオチド～約2500ヌクレオチド；または約2500ヌクレオチド（およびその間の任意の整数値）であってよい。本明細書において使用するとき、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに適用される「フラグメント」という用語は、より大きなタンパク質またはペプチドの部分配列を指す。タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの「フラグメント」は、長さが少なくとも約5アミノ酸；例えば、長さが少なくとも約10アミノ酸；長さが少なくとも約20アミノ酸；長さが少なくとも約50アミノ酸；長さが少なくとも約100アミノ酸；長さが少なくとも約200アミノ酸；または長さが少なくとも約300アミノ酸（およびその間の任意の整数値）であってよい。

【0044】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA（例えば、mRNA）の生成に必要なコード配列を含む核酸（例えば、DNA）配列を指す。ポリペプチドは、全長コード配列によって、または全長もしくはフラグメントの所望の活性もしくは機能的特性（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル変換、免疫原性等）が保持される限りはコード配列の任意の部分によってコードされ得る。該用語は、構造遺伝子のコード領域、ならびにいずれかの末端で約2kbまたはそれを上回る距離にわたる、5'および3'末端の両方でコード領域に隣接して位置する配列も包含し、それによって、遺伝子は、全長mRNAと該遺伝子の転写特性に影響を与える5'調節配列との長さに相当する。コード領域の5'に位置しかつmRNA上に存在している配列は、5'非翻訳配列と称される。5'非翻訳配列は、通常、調節配列を含む。コード領域の3'または下流に位置しかつmRNA上に存在している配列は、3'非翻訳配列と称される。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNA形態およびゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはゲノムクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と呼ばれる非コード配列で中断されたコード領域を含有する。イントロンとは、核RNA（hnRNA）に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンは、エンハンサーなどの調節エレメントを含有し得る。イントロンは、核転写産物（nuclear transcript）または一次転写産物から除去されまたは「切り出され」、したがって、イントロンは、メッセンジャーRNA（mRNA）転写産物には存在しない。mRNAは、翻訳の間、新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列または順番を指定する機能を果たす。

【0045】

「相同な」とは、2種のポリペプチド間または2種の核酸分子間の配列類似性または配列同一性を指す。2種の比較される配列の両方における1つの場所が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットによって占有されている場合、例えば2種のDNA分子のそれぞれにおける1つの場所がアデニンによって占有されている場合には、該分子はその場所において相同である。2種の配列間の相同性のパーセントは、比較された場所の数で割った、2種の配列によって共有される一致したまたは相同な場所の数の関数 $\times 100$ である。例えば、2種の配列における10個のうちの6個の場所が一致しているまたは相同である場合には、該2種の配列は60%相同である。例として、ATTGCCおよびTATGGCというDNA配列は、50%相同性を共有する。一般的に、最大の相同性を与えるように2種の配列を並べた場合に比較を行う。

【0046】

「教材」には、その用語が本明細書において用いられるとき、本明細書において記述さ

れる種々の疾患または障害を同定するまたは緩和するまたは治療するためのキットにおける、本発明の核酸、ペプチド、ポリペプチド、および/または化合物の有用性を伝えるために用いられ得る刊行物、記録、図表、または他の任意の表現媒体が含まれる。任意でまたは代わりに、教材には、対象の細胞または組織における疾患または障害を同定するまたは緩和する1つまたは複数の方法が記載されていてよい。キットの教材は、例えば、本発明の核酸、ポリペプチド、および/もしくは化合物を含有している容器に貼られていてよく、または核酸、ポリペプチド、および/もしくは化合物を含有している容器とともに出荷されてよい。代わりに、教材は、受容者が教材および化合物を協調的に用いることを意図して、容器とは別個に出荷されてよい。

【0047】

「単離された」とは、天然状態から変更されたまたは取り出されたことを意味する。例えば、生きた動物に天然に存在している核酸またはポリペプチドは「単離されて」いないが、その天然状態の共存している物質から部分的にまたは完全に分離された同じ核酸またはポリペプチドは「単離されて」いる。単離された核酸もしくはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在し得、または例えば宿主細胞などの非自然環境に存在し得る。

【0048】

「単離された核酸」とは、天然に存在する状態でそれに近接する配列から分離されている核酸セグメントまたはフラグメント、例えば、通常フラグメントに隣接している配列、例えばフラグメントが天然に存在するゲノムにおいてそれに隣接している配列、から取り出されているDNAフラグメントを指す。該用語は、核酸、例えばRNAもしくはDNAに天然に伴う他の構成成分から、または細胞内でそれに天然に伴うタンパク質から実質的に精製されている核酸にも適用される。したがって、該用語には、例えば、ベクター内、自己複製するプラスミドもしくはウイルス内、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA内に組み入れられている組換えDNA、あるいは他の配列から独立している別個の分子として（例えば、PCRまたは制限酵素消化によって生成されたcDNAまたはゲノムフラグメントもしくはcDNAフラグメントとして）存在する組換えDNAが含まれる。それには、さらなるポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含まれる。

【0049】

「標識」という用語は、本明細書において用いられる場合、プローブに直接的または間接的に接合されて「標識された」プローブを産出する、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体によって検出可能であり得（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合には、検出可能である基質化合物もしくは組成物の化学的変更を触媒し得る（例えば、アビジン-ビオチン）。ある場合には、プライマーを標識して、PCR産物を検出することができる。

【0050】

本明細書において用いられる「モジュレートする」という用語は、治療もしくは化合物の非存在下での対象におけるmRNA、ポリペプチド、もしくは応答の活性および/もしくはレベルと比較した、ならびに/またはその他の点では同一であるが治療を受けていない対象におけるmRNA、ポリペプチド、もしくは応答の活性および/もしくはレベルと比較した、対象におけるmRNA、ポリペプチド、もしくは応答の活性および/もしくはレベルの検出可能な増加または減少を仲介することを意味する。該用語は、自然のシグナルまたは応答を活性化すること、阻害すること、および/または別様に影響を及ぼすこと、それによって、対象、好ましくはヒトにおける有益な治療応答を仲介することを包含する。

【0051】

本明細書において用いられる「変異」は、参照配列（好ましくは天然に存在する正常なまたは「野生型」の配列）と比べた核酸またはポリペプチド配列における変化を指し、転座、欠失、挿入、および置換/点変異を含む。本明細書において用いられる「変異体」とは、変異を含む核酸またはタンパク質のいずれかを指す。

【0052】

「核酸」は、ポリヌクレオチドを指し、ポリリボヌクレオチドおよびポリデオキシリボ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを含む。本発明に従った核酸には、ピリミジン塩基およびプリン塩基、好ましくはそれぞれシトシン、チミン、およびウラシル、ならびにアデニンおよびグアニンの任意のポリマーまたはオリゴマーが含まれてよい。（すべての目的のためにその全体として本明細書に組み入れられる、Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry, 793-800 (Worth Pub. 1982) を参照されたい。）実際に、本発明は、任意のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはペプチド核酸構成成分、およびこれらの塩基のメチル化、ヒドロキシメチル化、またはグリコシル化形態など、それらの任意の化学的変種を企図する。ポリマーまたはオリゴマーは、組成が不均一もしくは均一であり得、かつ天然に存在する供給源から単離され得るまたは人工的もしくは合成的に生成され得る。加えて、核酸は、DNAもしくはRNA、またはそれらの混合物であり得、かつ永久的にまたは過渡的に、ホモ二重鎖、ヘテロ二重鎖、およびハイブリッド状態を含めた、一本鎖または二本鎖の形態で存在し得る。

10

【0053】

「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」とは、長さが少なくとも2ヌクレオチド、好ましくは少なくとも8、15、または25ヌクレオチドに及ぶ核酸であるが、最大50、100、1000、もしくは5000ヌクレオチド長に至る可能性があり、またはポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする化合物であり得る。ポリヌクレオチドには、天然供給源から単離され得る、組換えにより生成され得る、または人工的に合成され得る、デオキシリボ核酸（DNA）もしくはリボ核酸（RNA）、またはそれらの模倣体の配列が含まれる。本発明のポリヌクレオチドのさらなる例は、ペプチド核酸（PNA）であってよい。（参照によりその全体として本明細書によって組み入れられる、米国特許第6,156,501号を参照されたい。）本発明は、ある特定のtRNA分子において同定されておりかつ三重らせんで存在すると仮定されているHoogsteen型塩基対合など、非伝統的な塩基対合がある状況も包含する。「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、本開示において互換可能に用いられる。本明細書において、ヌクレオチド配列がDNA配列（例えば、A、T、G、およびC）によって表される場合、これには、「U」が「T」に取って代わる、対応するRNA配列（例えば、A、U、G、C）も含まれることが理解されるであろう。

20

【0054】

「患者」、「対象」、「個体」等の用語は、本明細書において互換可能に用いられ、本明細書において記載される方法に従った、インビトロまたはインサイチューにかかわらない、任意の動物またはその細胞を指す。ある特定の非限定的な態様において、患者、対象、または個体はヒトである。

30

【0055】

本明細書において使用するとき、「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）という用語は、クローニングまたは精製なしで、ゲノムDNAの混合物における標的配列のセグメントの濃度を増加させるための、K. B. Mullis（参照により本明細書によって組み入れられる、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、および第4,965,188号）の方法を指す。標的配列を増幅するためのこの過程は、所望の標的配列を含有しているDNA混合物に大過剰の2種のオリゴヌクレオチドプライマーを導入し、その後続くDNAポリメラーゼの存在下での正確な順序の熱サイクルからなる。2種のプライマーは、二本鎖標的配列のそれらのそれぞれの鎖に相補的である。増幅を達成するために、混合物を変性させ、次いでプライマーを標的分子内のそれらの相補的配列にアニールさせる。アニールした後、プライマーをポリメラーゼで伸長させて、相補鎖の新しいペアを形成する。変性、プライマーのアニール、およびポリメラーゼ伸長の工程を何度も繰り返して（すなわち、変性、アニール、および伸長が1回の「サイクル」を構成し、多数の「サイクル」が存在し得る）、所望の標的配列の高濃度の増幅セグメントを獲得することができる。所望の標的配列の増幅セグメントの長さは、プライマーの互いに対する相対的位置によって決定され、したがって、この長さは制御可能なパラメーターである。該過程の繰り返しの局面により、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」（以下、「PCR」）と称される。標的配列の所望の増幅セグメントは、混合物において優勢な配列（濃度の観点から）になるため、それらは「PC

40

50

R増幅された」と言われる。本明細書において使用するとき、「PCR産物」、「PCRフラグメント」、「増幅産物」、または「アンプリコン」という用語は、変性、アニーリング、および伸長というPCR工程の2回またはそれを上回る回数のサイクルが完了した後に、結果として生じた化合物の混合物を指す。これらの用語は、1種または複数種の標的配列の1つまたは複数のセグメントが増幅されている場合を包含する。

【0056】

本明細書において使用するとき、「プローブ」という用語は、精製された制限消化物にあるような天然に存在するかどうか、または合成的に、組換えにより、もしくはPCR増幅によって生成されるかどうかにかかわらず、関心対象の別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を指す。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、および単離において有用である。

10

【0057】

本明細書において使用するとき、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は互換可能に用いられ、ペプチド結合によって共有結合で連結されたアミノ酸残基から構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2個のアミノ酸を含有していなければならない。タンパク質配列またはペプチド配列を含み得るアミノ酸の最大数に制限は設けられていない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって互いに接続された2個またはそれを上回る個数のアミノ酸を含む、任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書において使用するとき、該用語は、当技術分野において例えばペプチド、オリゴペプチド、およびオリゴマーとも一般に称される短い鎖、ならびに当技術分野においてタンパク質と一般的に称され、それには多くのタイプが存在するより長い鎖の両方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、中でもとりわけ、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドの変種、改変されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

20

【0058】

本明細書において使用するとき、「ポリヌクレオチド」は、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方の、cDNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、アンチセンスRNA、リボザイム、ゲノムDNA、合形成態、および混合ポリマーを含み、化学的または生化学的に改変されて、非天然のもしくは誘導体化された、合成の、または半合成のヌクレオチド塩基を含有し得る。また、1個もしくは複数個のヌクレオチドの欠失、挿入、置換を含むがそれらに限定されない、野生型もしくは合成の遺伝子の変更、または他のポリヌクレオチド配列への融合も企図される。

30

【0059】

疾患または障害を「予防する」ことは、該用語が本明細書において用いられるとき、対象によって経験されている疾患または障害の少なくとも1つの兆候または症状の重症度または頻度を低下させることを意味する。

【0060】

40

本明細書において用いられる「サンプル」または「生物学的サンプル」とは、対象から単離された生物学的物質を意味する。生物学的サンプルは、対象における生理学的または病理学的な過程のmRNA、ポリペプチド、または他のマーカーを検出するのに適した任意の生物学的物質を含有し得、かつ個体から得られた流体、組織、細胞性および/または非細胞性の物質を含み得る。

【0061】

本明細書において使用するとき、「実質的に精製された」とは、他の構成成分を本質的に含んでいないことを指す。例えば、実質的に精製されたポリペプチドとは、その天然に存在する状態において通常それに伴う他の構成成分から分離されているポリペプチドである。

50

【0062】

本明細書において使用するとき、「療法」または「療法レジメン」という用語は、障害または疾患の状態を予防する、緩和する、または変更するために取られるそうした活動、例えば、薬理的、外科的、食事による、および/または他の技術を用いて、疾患または障害の少なくとも1つの兆候または症状を低下させるまたは取り除くことを意図する治療のコースを指す。療法レジメンは、所定の投薬量の1種または複数種の化合物または外科手術を含み得る。療法はほとんどの場合に有益であり、障害または疾患の状態の少なくとも1つの兆候または症状を低下させるまたは取り除くが、ある場合には、療法の効果は非所望の効果または副作用を有する。療法の効果は、対象の生理学的状態、例えば年齢、性、遺伝的特徴、重量、他の病状等によっても影響を受ける。

10

【0063】

「治療有効量」という用語は、研究者、獣医、医師、または他の臨床医によって求められている、組織、システム、または対象の生物学的または医学的な応答を引き出すと考えられる対象化合物の量を指す。「治療有効量」という用語には、投与された場合、治療を受けている障害または疾患の兆候または症状のうちの1つまたは複数の発症を予防するまたはある程度緩和するのに十分である化合物のその量が含まれる。治療有効量は、化合物、疾患およびその重症度、ならびに治療を受けるべき対象の年齢、重量等に応じて変動する。

【0064】

疾患または障害を「治療する」ことは、該用語が本明細書において用いられるとき、対象によって経験される疾患または障害の少なくとも1つの兆候または症状の頻度または重症度を低下させることを意味する。

20

【0065】

本明細書において使用するとき、「野生型」という用語は、天然に存在する供給源から単離された遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子とは、集団内で最も高頻度に観察され、ゆえに任意に該遺伝子の「正常な」または「野生型」形態に指定される (designed) ものである。対照的に、「改変された」または「変異体」という用語は、野生型の遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、配列および/または機能的特性の改変 (すなわち、変更された特徴) を呈する遺伝子または遺伝子産物を指す。天然に存在する変異体が単離され得ることが知られており、これらは、野生型の遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、それらが (変更された核酸配列を含めて) 変更された特徴を有するという事実によって同定される。

30

【0066】

値域：本開示を通して、本発明の種々の局面を値域形式で提示することができる。値域形式での記載は、単に利便性および簡潔性のためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、値域の記載は、すべての考えられる部分値域、ならびにその値域内の個々の数値を具体的に開示していると見なされるべきである。例えば、1~6などの値域の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分値域、ならびにその値域内の個々の数字、例えば1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6を具体的に開示していると見なされるべきである。このことは、値域の幅にかかわらず適用される。

40

【0067】

説明

いくつかの態様において、本発明の組成物および方法は、心臓または腎臓の疾患または障害の治療または予防における使用のためのレナラーゼまたはそのフラグメントを含む。いくつかの態様において、本発明のレナラーゼは、SEQ ID NO: 9またはSEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。いくつかの態様において、本発明のレナラーゼは、SEQ ID NO: 9またはSEQ ID NO: 10のアミノ酸配列の少なくとも一部を含むレナラーゼフラグメントである。いくつかの態様において、レナラーゼフラグメントは、その防御活性を保持するが、検出可能なNADHオキシダーゼ活性を呈しないペプチドである。いくつ

50

かの態様において、レナラーゼフラグメントは、その防御活性を保持するが、検出可能なアミノキシダーゼ活性を呈しないペプチドである。特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列からなるペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼフラグメントは、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列からなるペプチドである。

【0068】

本発明の組成物および方法は、組換えレナラーゼまたはそのフラグメントを含む。本発明の組成物および方法には、レナラーゼの活性またはレベルの増加が望ましい障害および疾患を治療または予防するための組成物および方法が含まれる。種々の態様において、本発明の組成物および方法を用いて治療され得るまたは予防され得る、レナラーゼの活性またはレベルの増加が望ましい障害および疾患には、AKI、心筋壊死、心不全、鬱血性心不全、心虚血損傷、心再灌流損傷、心虚血再灌流損傷、中毒性心損傷、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、腎尿細管アポトーシス、虚血性脳損傷、再灌流脳損傷、虚血再灌流脳損傷、中毒性脳損傷、虚血性肝損傷、再灌流肝損傷、虚血再灌流肝損傷、中毒性肝損傷、および高血圧が含まれる。いくつかの態様において、本発明の組成物および方法は、血圧を制御するまたは維持するのに有用である。いくつかの態様において、本発明の組成物および方法は、非限定的な例として、不安症、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、および注意欠陥多動性障害（ADHD）など、交感神経系の疾患および障害を治療または予防するのに有用である。

【0069】

別の態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを査定することによって、対象の腎臓の疾患または障害を診断する方法である。一態様において、比較物と比較したレナラーゼのレベルの変化（すなわち、増加または減少）は、腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害の診断のための、ならびに腎臓または心臓の疾患または障害の治療をモニターするためのマーカーである。

【0070】

治療および予防の組成物および方法

種々の態様において、本発明は、レナラーゼ活性化剤組成物、およびその必要がある対象、組織、または臓器におけるレナラーゼまたはそのフラグメントのレベルまたは活性を増加させる方法を含む。種々の態様において、本発明のレナラーゼ活性化剤組成物および治療の方法は、レナラーゼポリペプチドの量、レナラーゼmRNAの量、レナラーゼ酵素活性の量、レナラーゼ基質結合活性の量、またはそれらの組み合わせを増加させる。種々の態様において、レナラーゼの増加が治療成果を向上させ得る疾患および障害には、AKI、心筋壊死、心不全、鬱血性心不全、心虚血損傷、心再灌流損傷、心虚血再灌流損傷、中毒性心損傷、腎虚血損傷、腎再灌流損傷、腎虚血再灌流損傷、中毒性腎損傷、腎尿細管壊死、腎尿細管炎症、腎尿細管アポトーシス、虚血性脳損傷、再灌流脳損傷、虚血再灌流脳損傷、中毒性脳損傷、虚血性肝損傷、再灌流肝損傷、虚血再灌流肝損傷、中毒性肝損傷、および高血圧が含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、本発明の組成物および方法は、血圧を制御するまたは維持するのに有用である。いくつかの態様において、本発明の組成物および方法は、非限定的な例として、不安症、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、および注意欠陥多動性障害（ADHD）など、交感神経系の疾患および障害を治療または予防するのに有用である。

【0071】

本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼのレベルの増加には、転写、翻訳、またはその両方を含めた、レナラーゼ発現の増加が含まれることは当業者によって理解されるであろう。当業者であれば、本発明の教示がいったん与えられれば、レナ

ーゼのレベルの増加には、レナラーゼ活性（例えば、酵素活性、基質結合活性等）の増加が含まれることも解するであろう。ゆえに、レナラーゼのレベルまたは活性を増加させることには、レナラーゼポリペプチドの量を増加させること、およびレナラーゼをコードする核酸の転写、翻訳、またはその両方を増加させることが含まれるが、それらに限定されるわけではなく、かつそれには、レナラーゼポリペプチドの任意の活性を増加させることも同様に含まれる。本発明のレナラーゼ活性化剤組成物および方法は、レナラーゼを選択的に活性化し得る、またはレナラーゼおよび別の分子の両方を活性化し得る。

【0072】

ゆえに、本発明は、疾患もしくは障害、またはその関連した兆候、症状、もしくは病理の治療または予防のための、その必要がある対象への治療有効量のレナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、活性レナラーゼポリペプチドフラグメント（すなわち、レナラーゼペプチド）、またはレナラーゼの発現もしくは活性の活性化剤の投与による、疾患または障害の予防および治療に関する。いくつかの態様において、レナラーゼポリペプチドは、SEQ ID NO: 9またはSEQ ID NO: 10のアミノ酸を含む。いくつかの態様において、本発明のレナラーゼは、SEQ ID NO: 9またはSEQ ID NO: 10のアミノ酸配列の少なくとも一部を含むレナラーゼポリペプチドフラグメントである。いくつかの態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、その防御活性を保持するが、検出可能なNADHオキシダーゼ活性を呈しないペプチドである。いくつかの態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、その防御活性を保持するが、検出可能なアミンオキシダーゼ活性を呈しないペプチドである。特定の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含むペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列からなるペプチドである。別の特定の態様において、レナラーゼポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列からなるペプチドである。

【0073】

レナラーゼのレベルの増加には、レナラーゼまたはそのフラグメントの量の増加（例えば、レナラーゼまたはそのフラグメントの投与による、レナラーゼタンパク質発現を増加させることによる等）が包含されることは当業者によって理解される。加えて、当業者であれば、レナラーゼのレベルの増加には、レナラーゼ活性の増加が含まれることを解するであろう。ゆえに、レナラーゼのレベルまたは活性を増加させることには、レナラーゼまたはそのフラグメントの投与、ならびにレナラーゼをコードする核酸の転写、翻訳、またはその両方を増加させることが含まれ、かつそれには、レナラーゼの任意の活性を増加させることも同様に含まれる。

【0074】

レナラーゼのレベルまたは活性の増加を、本明細書において開示されるもの、ならびに当技術分野において周知の方法または将来開発される方法を含めた、多種多様な方法を用いて査定することができる。つまり、ルーチン的に仕事をする人であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼのレベルまたは活性の増加は、対象から得られた生物学的サンプルにおける、レナラーゼをコードする核酸（例えば、mRNA）のレベル、レナラーゼポリペプチドのレベル、および/またはレナラーゼ活性のレベルを査定する方法を用いて容易に査定され得ることを解するであろう。

【0075】

当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、本発明は、レナラーゼのレベルまたは活性の減衰に伴う疾患または障害に対して、全体的（例えば、全身的）または部分的（例えば、局所的、組織、臓器）に治療を受けているまたは治療を受けるであろう対象において有用であることを理解するであろう。当業者であれば、本明細書におい

て提供される本教示に基づき、本明細書において記載される組成物および方法によって治療可能な疾患および障害には、レナラーゼの増加がプラスの治療成果を促進すると考えられる任意の疾患または障害が包含されることを解するであろう。

【0076】

当業者であれば、レナラーゼを直接活性化することに加えて、それ自体がレナラーゼの量または活性を減衰させる分子の量または活性を減衰させることは、レナラーゼの量または活性を増加させる役割を果たし得ることに気づくであろう。ゆえに、レナラーゼ活性化剤は、化学物質、タンパク質、ペプチド模倣体、抗体、リボザイム、およびアンチセンス核酸分子を含んでよいが、それらに限定されると解釈されるべきではない。当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼ活性化剤には、レナラーゼのレベル、酵素活性、または基質結合活性を増加させる化学物質が包含されることを容易に解するであろう。加えて、レナラーゼ活性化剤には、化学の技術分野における当業者に周知であるように、化学的に改変された化合物および誘導体が包含される。

10

【0077】

本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼのレベルの増加には、転写、翻訳、またはその両方を含めた、レナラーゼ発現の増加が包含されることは当業者によって理解されるであろう。当業者であれば、本発明の教示がいったん与えられれば、レナラーゼのレベルの増加には、レナラーゼ活性（例えば、酵素活性、基質結合活性等）の増加が含まれることも解するであろう。ゆえに、レナラーゼのレベルまたは活性を増加させることには、レナラーゼポリペプチドの量を増加させること、レナラーゼをコードする核酸の転写、翻訳、またはその両方を増加させることが含まれるが、それらに限定されるわけではなく、かつそれには、レナラーゼポリペプチドの任意の活性を増加させることも同様に含まれる。本発明のレナラーゼ活性化剤組成物および方法は、レナラーゼを選択的に活性化し得る、またはレナラーゼおよび別の分子の両方を活性化し得る。ゆえに、本発明は、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、活性レナラーゼポリペプチドフラグメント、またはレナラーゼの発現もしくは活性の活性化剤の投与に関する。

20

【0078】

さらに、当業者であれば、本開示および本明細書において例示される方法を備えた場合、レナラーゼ活性化剤には、本明細書において詳細に記載されかつ/または当技術分野において公知のレナラーゼの活性化についての生理学的結果など、薬理学の技術分野における周知の基準によって同定され得る、将来発見されるような活性化剤が含まれることを解するであろう。したがって、本発明は、本明細書において例示されるまたは開示される任意の特定のレナラーゼ活性化剤に決して限定されず、むしろ本発明は、当技術分野において公知であるおよび将来発見される、ルーチンの仕事をする人によって有用であると理解されるであろうそうした活性化剤を包含する。

30

【0079】

レナラーゼ活性化剤を同定するおよび生成するさらなる方法は、当業者に周知であり、天然に存在する供給源（例えば、ストレプトマイセス（*Streptomyces*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、スチロテラ・アウランチウム（*Stylorella aurantium*）等）から活性化剤を獲得することを含むが、それに限定されるわけではない。代わりに、レナラーゼ活性化剤を化学的に合成することができる。さらに、ルーチンの仕事をする人であれば、本明細書において提供される本教示に基づき、レナラーゼ活性化剤を組換え生物から獲得し得ることを解するであろう。レナラーゼ活性化剤を化学的に合成するための、およびそれらを天然供給源から獲得するための組成物および方法は、当技術分野において周知でありかつ当技術分野において記載されている。

40

【0080】

当業者であれば、活性化剤を、小分子化学物質、タンパク質、タンパク質をコードする核酸構築物、またはそれらの組み合わせとして投与し得ることを解するであろう。タンパク質またはタンパク質をコードする核酸構築物を細胞または組織に投与するための、多数のベクターならびに他の組成物および方法が周知である。したがって、本発明は、レナラ

50

ーゼ活性化剤であるタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を投与する方法を含む。(Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)。

【0081】

当業者であれば、それ自体がレナラーゼの量または活性を減衰させる分子の量または活性を減衰させることは、レナラーゼの量または活性を増加させる役割を果たし得ることに気づくであろう。アンチセンスオリゴヌクレオチドとは、mRNA分子のある部分に相補的であるDNAまたはRNA分子である。細胞内に存在している場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、既存のmRNA分子にハイブリダイズし、かつ遺伝子産物への翻訳を阻害する。細胞内でアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現させる方法がそうであるように(Inoue、米国特許第5,190,931号)、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子の発現を阻害することは、当技術分野において周知である(Marcus-Sekura, 1988, Anal. Biochem. 172: 289)。本発明の方法は、レナラーゼの量または活性の減少を引き起こす分子の量を減衰させ、それによってレナラーゼの量または活性を増加させるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を含む。当業者に周知の方法によって合成されかつ細胞に提供されるアンチセンスオリゴヌクレオチドが、本発明において企図される。例として、約10～約100ヌクレオチド長、より好ましくは約15～約50ヌクレオチド長であるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドを合成することができる。改変されていないアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して生物学的活性を向上させる、改変されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成がそうであるように(Tullis, 1991、米国特許第5,023,243号)、核酸分子の合成は当技術分野において周知である。

【0082】

同様に、遺伝子のプロモーターまたは他の調節エレメントへのアンチセンス分子のハイブリダイゼーション、それによって該遺伝子の転写に影響を及ぼすこと、によって、遺伝子の発現は阻害され得る。関心対象の遺伝子と相互作用するプロモーターまたは他の調節エレメントの同定のための方法は、当技術分野において周知であり、かつ酵母ツーハイブリッドシステムのような方法を含む(Bartel and Fields, eds., The Yeast Two Hybrid System, Oxford University Press, Cary, N.C.)。

【0083】

代わりに、レナラーゼのレベルまたは活性を減衰させるタンパク質を発現する遺伝子の阻害は、リボザイムの使用により達成され得る。遺伝子発現を阻害するためにリボザイムを用いることは、当業者に周知である(例えば、Cech et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 17479; Hampel et al., 1989, Biochemistry 28: 4929; Altman et al., 米国特許第5,168,053号を参照されたい)。リボザイムとは、他の一本鎖RNA分子を切断し得る能力を有する触媒RNA分子である。リボザイムは配列特異的であることが知られており、したがって、特異的ヌクレオチド配列を認識するように改変され得(Cech, 1988, J. Amer. Med. Assn. 260: 3030)、特異的mRNA分子の選択的切断が可能となる。当業者であれば、本開示および本明細書に組み入れられる参考文献を提供されれば、分子のヌクレオチド配列を考慮して、過度の実験なしでアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを合成することができるであろう。

【0084】

当業者であれば、レナラーゼ活性化剤、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、または活性レナラーゼポリペプチドフラグメントを、単独でまたはそれらの任意の組み合わせで投与し得ることを解するであろう。当業者であれば、投与は、急性(例えば、1日、1週間、または1ヶ月間などの短い期間にわたる)または慢性(例えば、数ヶ月間もしくは1年間またはそれを上回る期間などの長い期間にわたる)であってよいことも解するであろう。さらに、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、または活性レナラーゼポリペプチドフラグメントを、それらを同時に、互いの前および/または後に投与し得るという点において時間的な意味で、単独でまたはそれらの任意の

組み合わせで投与することができる。当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、または活性レナラーゼポリペプチドフラグメントを用いて治療結果を達成し得ること、および活性化剤を単独で、または別のレナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、活性レナラーゼポリペプチドフラグメント、もしくはレナラーゼ活性化剤との任意の組み合わせで用いて治療結果を達成し得ることを解するであろう。

【0085】

本明細書において詳述される方法を含めた本開示が与えられた場合、本発明が、いったん確立された疾患または障害の治療に限定されないことは当業者によって解されるであろう。とくに、疾患または障害の症状は、対象に損害が及ぶほどまで現れている必要はなく、実際に、疾患または障害は、治療が施される前に対象において検出される必要はない。つまり、本発明が有益性を提供し得る前に、疾患または障害からの重大な病理が生じる必要はない。したがって、本発明は、本明細書においてより十分に記載されるように、本明細書における他の箇所で記述されるレナラーゼ分子（例えば、ポリペプチド、ペプチド等）またはレナラーゼ活性化剤を、疾患または障害の発生前に対象に投与することができ、それによって疾患または障害が発症するのを予防するという点において、対象における疾患および障害を予防するための方法を含む。

10

【0086】

当業者であれば、本明細書における本開示が与えられた場合、対象における疾患または障害の予防には、疾患または障害に対する予防手段として、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、活性レナラーゼポリペプチドフラグメント、またはレナラーゼ活性化剤を対象に投与することが包含されることを解するであろう。

20

【0087】

本明細書における他の箇所でより十分に記述されるように、レナラーゼのレベルまたは活性を増加させる方法は、レナラーゼ活性を増加させるだけでなく、レナラーゼをコードする核酸の発現も増加させるための幅広い大量の技術を包含する。加えて、本明細書における他の箇所で開示されるように、当業者であれば、本明細書において提供される本教示がいったん与えられれば、本発明には、レナラーゼの発現および/または活性の増加が、疾患または障害を調整する、治療する、または予防する、多種多様な疾患または障害を予防する方法が包含されることを理解するであろう。さらに、本発明は、将来発見されるそのような疾患または障害の治療または予防を包含する。

30

【0088】

本発明は、本発明の方法を実践する、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、活性レナラーゼポリペプチドフラグメント、またはレナラーゼ活性化剤の投与を包含し、当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、適切なレナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、活性レナラーゼポリペプチドフラグメント、またはレナラーゼ活性化剤の対象への製剤化の仕方および投与の仕方を理解するであろう。しかしながら、本発明は、投与または治療レジメンの任意の特定の方法に限定されるわけではない。このことは、当技術分野において認められている虚血再灌流損傷のモデルを用いた実践化を含めた、本明細書において提供される本開示を備えれば、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、活性レナラーゼポリペプチドフラグメント、またはレナラーゼ活性化剤を投与する方法は、薬理学の技術分野における当業者によって決定され得ることが当業者によって解されるであろう場合にとりわけ当てはまる。

40

【0089】

本明細書において使用するとき、「薬学的に許容される担体」という用語は、それとともに適切なレナラーゼモジュレーターを組み合わせ得、かつ組み合わせた後に、その適切なレナラーゼモジュレーターを対象に投与するために用いられ得る化学的組成物を意味する。

【0090】

50

診断の方法

いくつかの態様において、比較物と比較したレナラーゼのレベルの変化（すなわち、増加または減少）を、腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害の診断のための、ならびに腎臓または心臓の疾患または障害の治療をモニターするためのマーカーとして本発明の方法に用いる。

【0091】

一態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを査定することによって、対象の腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害を診断する方法である。一態様において、対象の生物学的サンプルは体液である。レナラーゼのレベルを査定し得る体液の非限定的な例には、血液、血清、血漿、および尿が含まれるが、それらに限定されるわけではない。種々の態様において、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを、比較物におけるレナラーゼのレベルと比較する。比較物の非限定的な例には、陰性対照、陽性対照、対象の予測される正常バックグラウンド値、対象の歴史的な正常バックグラウンド値、対象がその一員である集団の予測される正常バックグラウンド値、または対象がその一員である集団の歴史的な正常バックグラウンド値が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0092】

別の態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを査定することによって、対象の腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害の進行をモニターする方法である。一態様において、対象の生物学的サンプルは体液である。レナラーゼのレベルを査定し得る体液の非限定的な例には、血液、血清、血漿、および尿が含まれるが、それらに限定されるわけではない。種々の態様において、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを、比較物におけるレナラーゼのレベルと比較する。比較物の非限定的な例には、陰性対照、陽性対照、対象の予測される正常バックグラウンド値、対象の歴史的な正常バックグラウンド値、対象がその一員である集団の予測される正常バックグラウンド値、または対象がその一員である集団の歴史的な正常バックグラウンド値が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0093】

さらなる態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを査定することによって、対象の腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害の重症度を査定する方法である。一態様において、対象の生物学的サンプルは体液である。レナラーゼのレベルを査定し得る体液の非限定的な例には、血液、血清、血漿、および尿が含まれるが、それらに限定されるわけではない。種々の態様において、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを、比較物におけるレナラーゼのレベルと比較する。比較物の非限定的な例には、陰性対照、陽性対照、対象の予測される正常バックグラウンド値、対象の歴史的な正常バックグラウンド値、対象がその一員である集団の予測される正常バックグラウンド値、または対象がその一員である集団の歴史的な正常バックグラウンド値が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0094】

別の態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを査定することによって、対象の腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害を治療する治療レジメンを選択する方法である。一態様において、対象の生物学的サンプルは体液である。レナラーゼのレベルを査定し得る体液の非限定的な例には、血液、血清、血漿、および尿が含まれるが、それらに限定されるわけではない。種々の態様において、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを、比較物におけるレナラーゼのレベルと比較する。比較物の非限定的な例には、陰性対照、陽性対照、対象の予測される正常バックグラウンド値、対象の歴史的な正常バックグラウンド値、対象がその一員である集団の予測される正常バックグラウンド値、または対象がその一員である集団の歴史的な正常バックグラウンド値が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0095】

50

別の態様において、本発明は、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを査定することによって、対象の腎臓の疾患もしくは障害、または心臓の疾患もしくは障害の治療の効果をモニターする方法である。一態様において、対象の生物学的サンプルは体液である。レナラーゼのレベルを査定し得る体液の非限定的な例には、血液、血清、血漿、および尿が含まれるが、それらに限定されるわけではない。種々の態様において、対象の生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを、比較物におけるレナラーゼのレベルと比較する。比較物の非限定的な例には、陰性対照、陽性対照、対象の予測される正常バックグラウンド値、対象の歴史的な正常バックグラウンド値、対象がその一員である集団の予測される正常バックグラウンド値、または対象がその一員である集団の歴史的な正常バックグラウンド値が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0096】

種々の態様において、対象はヒト対象であり、かつ任意の人種、性別、および年齢のものであってよい。代表的な対象には、IR損傷などの腎臓または心臓の損傷を経験したことがあると疑われる人、IR損傷などの腎臓または心臓の損傷を経験したことがあると診断された人、IR損傷などの腎臓または心臓の損傷に関連した疾患または障害を有すると診断された人、およびIR損傷などの腎臓または心臓の損傷に関連した疾患または障害を発症する危険性がある人が含まれる。

【0097】

本明細書において記載される本発明の方法から得られる情報を、単独で、または対象からのもしくは対象から得られた生物学的サンプルからの他の情報（例えば、病態、病歴、バイタルサイン、血液化学等）と組み合わせて用いることができる。

20

【0098】

本発明の診断方法において、対象から得られた生物学的サンプルを、その中に含有されているレナラーゼのレベルについて査定する。一態様において、生物学的サンプルは、本明細書において記載される方法において有用なレナラーゼポリペプチドの少なくともフラグメントを含有しているサンプルである。

【0099】

本発明の方法の他の種々の態様において、比較対照と比較したときに、レナラーゼのレベルが少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%低下している場合、レナラーゼのレベルは低下していると判定される。種々の態様において、レナラーゼのレベルの低下は、疾患または障害の指標である。

30

【0100】

本発明の方法の他の種々の態様において、比較対照と比較したときに、レナラーゼのレベルが少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%増加している場合、レナラーゼのレベルは増加していると判定される。種々の態様において、レナラーゼのレベルの増加は、疾患または障害の指標である。

【0101】

本発明の方法において、対象由来の生物学的サンプルを、患者から得られた生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルに対して査定する。生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの量、生物学的サンプルにおけるレナラーゼmRNAの量、生物学的サンプルにおけるレナラーゼ酵素活性の量、またはそれらの組み合わせを査定することによって、生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルを決定することができる。

40

【0102】

本発明の方法の種々の態様において、患者から得られた生物学的サンプルにおけるレナラーゼレベルを測定する方法には、免疫クロマトグラフィーアッセイ、免疫ドットアッセイ、Luminexアッセイ、ELISAアッセイ、ELISPOTアッセイ、タンパク質マイクロアレイアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、質量分光光度アッセイ、放射免疫アッセイ（RIA）、放射免疫拡散アッセイ、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析アッセイ、オク

50

タロニー免疫拡散アッセイ、逆相タンパク質マイクロアレイ、ロケット免疫電気泳動アッセイ、免疫組織染色アッセイ、免疫沈降アッセイ、補体結合 (complement fixation) アッセイ、FACS、酵素－基質結合アッセイ、酵素アッセイ、クロモフォア、フルオロフォア、または放射性基質などの検出可能な分子を採用する酵素アッセイ、そのような基質を採用する基質結合アッセイ、そのような基質を採用する基質置換アッセイ、およびタンパク質チップアッセイが含まれるが、それらに限定されるわけではない (2007, Van Emon, Immunoassay and Other Bioanalytical Techniques, CRC Press; 2005, Wild, Immunoassay Handbook, Gulf Professional Publishing; 1996, Diamandis and Christopoulos, Immunoassay, Academic Press; 2005, Joos, Microarrays in Clinical Diagnosis, Humana Press; 2005, Hamdan and Righetti, Proteomics Today, John Wiley and Sons; 2007も参照されたい)。

10

【0103】

治療用阻害剤組成物および方法

種々の態様において、本発明は、レナラーゼの活性またはレベルの減衰が所望される疾患または障害を治療または予防するレナラーゼ阻害剤組成物および方法を含む。本発明の組成物および方法で治療され得るまたは予防され得る、レナラーゼの活性またはレベルの減衰が所望される疾患または障害の非限定的な一例には、癌が含まれる。種々の態様において、本発明の治療または予防のレナラーゼ阻害剤組成物および方法は、レナラーゼポリペプチドの量、レナラーゼmRNAの量、レナラーゼ酵素活性の量、レナラーゼ基質結合活性の量、またはそれらの組み合わせを減衰させる。

20

【0104】

本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼのレベルの減少には、転写、翻訳、またはその両方を含めた、レナラーゼ発現の減少が含まれることは当業者によって理解されるであろう。当業者であれば、本発明の教示がいったん与えられれば、レナラーゼのレベルの減少には、レナラーゼ活性 (例えば、酵素活性、基質結合活性等) の減少が含まれることも解するであろう。ゆえに、レナラーゼのレベルまたは活性を減少させることには、レナラーゼをコードする核酸の転写、翻訳、またはその両方を減少させることが含まれるが、それらに限定されるわけではなく、かつそれには、レナラーゼポリペプチドの任意の活性を減少させることも同様に含まれる。本発明のレナラーゼ阻害剤組成物および方法は、レナラーゼを選択的に阻害し得る、またはレナラーゼおよび別の分子の両方を阻害し得る。

30

【0105】

レナラーゼの阻害を、本明細書において開示されるもの、ならびに当技術分野において周知のまたは将来開発される方法を含めた、多種多様な方法を用いて査定することができる。つまり、ルーチン的に仕事をする人であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼのレベルまたは活性の減少は、レナラーゼをコードする核酸 (例えば、mRNA) のレベル、生物学的サンプル中に存在しているレナラーゼポリペプチドのレベル、レナラーゼ活性 (例えば、酵素活性、基質結合活性等) のレベル、またはそれらの組み合わせを査定する方法を用いて容易に査定され得ることを解するであろう。

40

【0106】

当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、本発明は、対象が他の医薬または療法でも治療を受けているかどうかにかかわらず、その必要がある対象における治療または予防に有用であることを理解するであろう。さらに、当業者であれば、本明細書において提供される本教示に基づき、本明細書において記載される組成物および方法によって治療可能な疾患または障害には、レナラーゼが役割を担い、かつレナラーゼのレベルまたは活性の減衰がプラスの治療成果を促進すると考えられる任意の疾患または障害が含まれることをさらに解するであろう。

【0107】

レナラーゼのレベルまたは活性 (例えば、酵素活性、基質結合活性等) を減少させる、本発明のレナラーゼ阻害剤組成物および方法は、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプ

50

チド模倣体、抗体、リボザイム、小分子化学物質、アンチセンス核酸分子（例えば、siRNA、miRNA等）、またはそれらの組み合わせを含んでよいが、それらに限定されると解釈されるべきではない。当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼ阻害剤組成物には、レナラーゼのレベルまたは活性を減少させる化学物質が包含されることを容易に解するであろう。加えて、レナラーゼ阻害剤組成物には、化学の技術分野における当業者に周知であるように、化学的に改変された化合物および誘導体が包含される。

【0108】

レナラーゼのレベルまたは活性（例えば、酵素活性、基質結合活性等）を減少させる、本発明のレナラーゼ阻害剤組成物および方法には抗体が含まれる。本発明の抗体には、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体（「イントラボディ」）、Fv、FabおよびF(ab)₂、一本鎖抗体（scFv）、重鎖抗体（ラクダ科抗体など）、合成抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体を含めた多様な形態の抗体が含まれる。一態様において、本発明の抗体は、レナラーゼに特異的に結合する抗体である。

10

【0109】

さらに、当業者であれば、本開示および本明細書において例示される方法を備えた場合、レナラーゼ阻害剤組成物には、本明細書において詳細に記載されかつ/または当技術分野において公知のレナラーゼの阻害についての生理学的結果など、薬理学の技術分野における周知の基準によって同定され得る、将来発見されるような阻害剤が含まれることを解するであろう。したがって、本発明は、本明細書において例示されるまたは開示される任意の特定のレナラーゼ阻害剤組成物に決して限定されず、むしろ本発明は、当技術分野において公知であるおよび将来発見される、ルーチンの仕事をする人によって有用であると理解されるであろうそうした阻害剤組成物を包含する。

20

【0110】

レナラーゼ阻害剤組成物を同定するおよび生成するさらなる方法は、当業者に周知であり、天然に存在する供給源（例えば、ストレプトマイセス属、シュードモナス属、スチロテラ・アウランチュム等）から阻害剤を獲得することを含むがそれに限定されるわけではない。代わりに、レナラーゼ阻害剤を化学的に合成することができる。さらに、ルーチンの仕事をする人であれば、本明細書において提供される本教示に基づき、レナラーゼ阻害剤組成物を組換え生物から獲得し得ることを解するであろう。レナラーゼ阻害剤を化学的に合成するための、およびそれらを天然供給源から獲得するための組成物および方法は、当技術分野において周知でありかつ当技術分野において記載されている。

30

【0111】

当業者であれば、阻害剤を、小分子化学物質、タンパク質、抗体、タンパク質をコードする核酸構築物、アンチセンス核酸、アンチセンス核酸をコードする核酸構築物、またはそれらの組み合わせとして投与し得ることを解するであろう。タンパク質またはタンパク質をコードする核酸構築物を細胞または組織に投与するための、多数のベクターならびに他の組成物および方法が周知である。したがって、本発明は、レナラーゼの阻害剤であるタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を投与する方法を含む。（Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York）。

40

【0112】

当業者であれば、それ自体がレナラーゼの量または活性を増加させる分子の量または活性を減衰させることは、本発明の組成物および方法において、レナラーゼの量または活性を減少させる役割を果たし得ることに気づくであろう。

【0113】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとは、RNA分子のある部分に相補的であるDNAまたはRNA分子である。細胞内に存在している場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、既存のRNA分子にハイブリダイズし、かつ遺伝子産物への翻訳を阻害する。細胞内でアンチセンス

50

オリゴヌクレオチドを発現させる方法がそうであるように（Inoue、米国特許第5,190,931号）、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子の発現を阻害することは、当技術分野において周知である（Marcus-Sekura, 1988, Anal. Biochem. 172: 289）。本発明の方法は、レナラーゼの量を減衰させ、またはレナラーゼの量もしくは活性の増加を引き起こす分子の量を減衰させ、それによってレナラーゼの量または活性を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を含む。

【0114】

当業者に周知の方法によって合成されかつ細胞に提供されるアンチセンスオリゴヌクレオチドが、本発明において企図される。例として、約10～約100ヌクレオチド長、より好ましくは約15～約50ヌクレオチド長であるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドを合成することができる。改変されていないアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して生物学的活性を向上させる、改変されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成がそうであるように（Tullis, 1991、米国特許第5,023,243号）、核酸分子の合成は当技術分野において周知である。

【0115】

同様に、遺伝子のプロモーターまたは他の調節エレメントへのアンチセンス分子のハイブリダイゼーション、それによって該遺伝子の転写に影響を及ぼすこと、によって、遺伝子の発現は阻害され得る。関心対象の遺伝子と相互作用するプロモーターまたは他の調節エレメントの同定のための方法は、当技術分野において周知であり、かつ酵母ツーハイブリッドシステムのような方法を含む（Bartel and Fields, eds., The Yeast Two Hybrid System, Oxford University Press, Cary, N.C.）。

【0116】

代わりに、レナラーゼを発現する遺伝子、またはレナラーゼのレベルもしくは活性を増加させるタンパク質を発現する遺伝子の阻害は、リボザイムの使用により達成され得る。遺伝子発現を阻害するためにリボザイムを用いることは、当業者に周知である（例えば、Cech et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 17479; Hampel et al., 1989, Biochemistry 28: 4929; Altman et al., 米国特許第5,168,053号）。リボザイムとは、他の一本鎖RNA分子を切断し得る能力を有する触媒RNA分子である。リボザイムは配列特異的であることが知られており、したがって、特異的ヌクレオチド配列を認識するように改変され得（Cech, 1988, J. Amer. Med. Assn. 260: 3030）、特異的mRNA分子の選択的切断が可能となる。当業者であれば、本開示および本明細書に組み入れられる参考文献を提供されれば、分子のヌクレオチド配列を考慮して、過度の実験なしでアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを合成することができるであろう。

【0117】

当業者であれば、レナラーゼの阻害剤を、急性的に（例えば、1日、1週間、または1ヶ月間などの短い期間にわたる）または慢性的に（例えば、数ヶ月間もしくは1年間またはそれを上回る期間などの長い期間にわたる）投与し得ることを解するであろう。当業者であれば、レナラーゼの阻害剤を、単独でまたは他の作用物質との任意の組み合わせで投与し得ることを解するであろう。さらに、レナラーゼ阻害剤を、それらを同時期にまたは互いの前および/もしくは後に投与し得るという点において時間的な意味で、単独でまたは任意の組み合わせで投与することができる。当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、レナラーゼ阻害剤組成物を用いて、その必要がある対象における疾患または障害を治療または予防し得ること、および阻害剤組成物を単独でまたは別の阻害剤との任意の組み合わせで用いて、治療結果を達成し得ることを解するであろう。

【0118】

種々の態様において、本明細書において記載される本発明のレナラーゼの阻害剤のいずれかを、単独で、または癌に関連する他の分子の他の阻害剤と組み合わせて投与することができる。

【0119】

本明細書において詳述される方法を含めた本開示が与えられた場合、本発明が、すでに

10

20

30

40

50

確立された疾患または障害の治療に限定されないことは当業者によって解されるであろう。とくに、疾患または障害は、対象に損害が及ぶほどまで現れている必要はなく、実際に、疾患または障害は、治療が施される前に対象において検出される必要はない。つまり、本発明が有益性を提供し得る前に、重大な疾患または障害が生じる必要はない。したがって、本発明は、本明細書における他の箇所で前に記述されているように、レナラーゼ阻害剤組成物を、疾患または障害の発生前に対象に投与することができ、それによって疾患または障害が発症するのを予防するという点において、対象における疾患または障害を予防するための方法を含む。本明細書において記載される予防方法には、疾患または障害の再発の予防のための、寛解期にある対象の治療も含まれる。

【0120】

10

当業者であれば、本明細書における本開示が与えられた場合、疾患または障害の予防には、疾患または障害に対する予防手段として、レナラーゼ阻害剤組成物を対象に投与することが包含されることを解するであろう。本明細書における他の箇所でより十分に記述されるように、レナラーゼのレベルまたは活性を減少させる方法は、レナラーゼ活性を減少させるだけでなく、転写の減少、翻訳の減少、またはその両方を含めた、レナラーゼをコードする核酸の発現も減少させるための幅広い大量の技術を包含する。

【0121】

加えて、本明細書における他の箇所で開示されるように、当業者であれば、本明細書において提供される本教示がいったん与えられれば、本発明には、レナラーゼの発現および/または活性の減少が、疾患、障害、または病理を調整する、治療する、または予防する、多種多様な疾患、障害、および病理を予防する方法が包含されることを理解するであろう。疾患がレナラーゼのレベルまたは活性に関係するかどうかを査定するための方法は、当技術分野において公知である。さらに、本発明は、将来発見されるそのような疾患の治療または予防を包含する。

20

【0122】

本発明は、本発明の方法を実践する、レナラーゼの阻害剤の投与を包含し、当業者であれば、本明細書において提供される本開示に基づき、適切なレナラーゼ阻害剤の対象への製剤化の仕方および投与の仕方を理解するであろう。しかしながら、本発明は、投与または治療レジメンの任意の特定の方法に限定されるわけではない。

【0123】

30

キット

本発明は、また、本発明の方法において有用なキットに関する。そのようなキットは、例えばレナラーゼ活性化剤、レナラーゼ阻害剤、レナラーゼポリペプチドまたはレナラーゼ核酸を定量的に解析するための物質、レナラーゼポリペプチドまたはレナラーゼ核酸の活性を査定するための物質、および教材を含めた、本明細書における他の箇所で記載される方法のいずれかにおいて有用な構成成分の種々の組み合わせを含む。例えば、一態様において、キットは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼ核酸の定量化に有用な構成成分を含む。別の態様において、キットは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの定量化に有用な構成成分を含む。さらなる態様において、キットは、生物学的サンプルにおけるレナラーゼポリペプチドの活性（例えば、酵素活性、基質結合活性等）の査定に有用な構成成分を含む。

40

【0124】

さらなる態様において、キットは、その必要がある対象に施された治療の有効性をモニターするためのアッセイの構成成分を含み、教材、および対象から得られた生物学的サンプルにおけるレナラーゼのレベルが、治療が施された間または後にモジュレートされるかどうかを判定するための構成成分を含有する。種々の態様において、対象から得られた生物学的サンプルにおいてレナラーゼのレベルがモジュレートされるかどうかを判定するために、レナラーゼのレベルを、陽性対照、陰性対照、歴史的対照、歴史的規準、または生物学的サンプルにおける別の参照分子のレベルなど、キットに含有された少なくとも1種の比較対照のレベルと比較する。ある特定の態様において、レナラーゼと参照分子との比

50

率を決定して、治療のモニタリングの助けとする。

【0125】

薬学的組成物および投与

ここで記載されるように、レナラーゼポリペプチド、レナラーゼポリペプチドフラグメント、レナラーゼのレベルもしくは活性の活性化剤、またはレナラーゼのレベルもしくは活性の阻害剤を含む組成物を製剤化しかつ対象に投与することができる。非限定的な例として、ここで記載されるように、疾患または障害の治療および/または予防のための、レナラーゼポリペプチド、組換えレナラーゼポリペプチド、および活性レナラーゼポリペプチドフラグメントを含めた、有用なレナラーゼ活性体 (active) または活性化剤として同定された組成物を製剤化しかつ対象に投与することができる。より非限定的な例として、ここで記載されるように、疾患または障害の治療および/または予防のための、化学物質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、抗体、リボザイム、小分子化学物質、アンチセンス核酸分子 (例えば、siRNA、miRNA等) を含めた、有用なレナラーゼ阻害剤として同定された組成物を製剤化しかつ対象に投与することができる。

10

【0126】

本発明は、本明細書において開示される、疾患または障害の治療または予防に有用な組成物を活性成分として含む薬学的組成物の調製および使用を包含する。そのような薬学的組成物は、対象への投与に適した形態で活性成分単独からなっており、あるいは薬学的組成物は、活性成分、および1種もしくは複数種の薬学的に許容される担体、1種もしくは複数種のさらなる成分、またはこれらのいくつかの組み合わせを含んでよい。当技術分野において周知であるように、活性成分は、生理学的に許容される陽イオンまたは陰イオンとの組み合わせでなど、生理学的に許容されるエステルまたは塩の形態で薬学的組成物中に存在してよい。種々の態様において、活性成分は、本明細書における他の箇所で記載されるレナラーゼポリペプチド、レナラーゼポリペプチドフラグメント、レナラーゼのレベルもしくは活性の活性化剤、レナラーゼのレベルもしくは活性の阻害剤、またはそれらの組み合わせである。

20

【0127】

本明細書において使用するとき、「薬学的に許容される担体」という用語は、それとともにその適切なレナラーゼモジュレーターを組み合わせ得、かつ組み合わせた後に、その適切なレナラーゼモジュレーター (例えば、活性化剤、阻害剤等) を対象に投与するために用いられ得る化学的組成物を意味する。

30

【0128】

本発明を実践するのに有用な薬学的組成物を投与して、約0.1ng/kg/日~100mg/kg/日の用量、またはそれを上回る用量を送達し得る。

【0129】

種々の態様において、本発明の方法において有用な薬学的組成物を、例として、固体またはエアロゾルを含めた経口製剤、吸入製剤の状態、および局所製剤または他の同様の製剤によってなど、全身的に、非経口的に、または局所的に投与してよい。適切な治療用組成物に加えて、そのような薬学的組成物は、薬物投与を増進しかつ容易にすることが知られる薬学的に許容される担体および他の成分を含有してよい。本発明の方法に従って、ナノ粒子、リポソーム、再封赤血球 (resealed erythrocyte)、および免疫学に基づくシステムなど、他の考えられる製剤を用いて、その適切なモジュレーターを投与してもよい。

40

【0130】

本明細書において使用するとき、「生理学的に許容される」エステルまたは塩という用語は、組成物が投与されるべき対象に有害でない、薬学的組成物の他の任意の成分と適合する活性成分のエステルまたは塩の形態を意味する。

【0131】

本明細書において記載される薬学的組成物の製剤を、薬理学の技術分野において公知の任意の方法または今後開発される任意の方法によって調製してよい。一般的に、そのよう

50

な調製法は、活性成分を担体または1種もしくは複数種の他の補助的成分と関連づける工程、次いで、必要であればまたは望ましい場合には、産物を所望の単回または複数回の用量単位に形成するまたはパッケージする工程を含む。

【0132】

本明細書において提供される薬学的組成物の記載は、ヒトへの医療用 (ethical) 投与に適している薬学的組成物に主に向けられているが、そのような組成物は、一般的にすべての種類の動物への投与に適していることが当業者によって理解されるであろう。組成物を種々の動物への投与に適したものにするための、ヒトへの投与に適した薬学的組成物の改変は十分に理解されており、かつ通常の技能を有する獣医学薬理学者であれば、あるとしても単に通常の実験を用いるだけで、そのような改変を設計しかつ実施することができる。

10

【0133】

本発明の方法において有用である薬学的組成物を、経口、直腸、腔内、非経口、局所、肺内、鼻腔内、口腔、静脈内、経皮、皮下、筋肉内、眼内 (ophthalmic)、髄腔内、および他の公知の投与経路に適した製剤で調製する、パッケージする、または販売することができる。他の企図される製剤には、活性成分を含有している投影ナノ粒子 (projected nanoparticle)、リポソーム調製物、再封赤血球、および免疫学に基づく製剤が含まれる。

【0134】

本発明の薬学的組成物を、1つの単回単位用量としてまたは複数の単回単位用量として、大量に調製する、パッケージする、または販売することができる。本明細書において使用するとき、「単位用量」とは、所定量の活性成分を含む、薬学的組成物の個別の量である。活性成分の量は、一般的に、対象に投与される活性成分の投薬量に等しく、または例えばそのような投薬量の2分の1もしくは3分の1など、そのような投薬量の好都合な分割に等しい。

20

【0135】

本発明の薬学的組成物における活性成分、薬学的に許容される担体、および任意のさらなる成分の相対量は、治療される対象の固有性、サイズ、および状態に応じて、さらに組成物が投与されるべき経路に応じて変動する。例として、組成物は、0.1%~100% (w/w) の活性成分を含んでよい。

【0136】

活性成分に加えて、本発明の薬学的組成物は、1種または複数種のさらなる薬学的に活性な作用物質をさらに含んでよい。

30

【0137】

本発明の薬学的組成物の制御放出性または持続放出性の製剤を、従来の技術を用いて作製してよい。

【0138】

経口投与に適した本発明の薬学的組成物の製剤を、それぞれが所定量の活性成分を含有している、錠剤、ハードカプセルもしくはソフトカプセル、カシェー剤、トローチ、またはロゼンジ剤を含むがそれらに限定されない、個別固体の用量単位の形態で調製する、パッケージする、または販売することができる。経口投与に適した他の製剤には、粉末化製剤もしくは顆粒製剤、水性もしくは油性の懸濁液、水性もしくは油性の溶液、または乳濁液が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0139】

薬学的組成物の製造に用いられる薬学的に許容される賦形剤には、不活性希釈剤、造粒剤および崩壊剤、結合剤、ならびに平滑剤が含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の分散剤には、ジャガイモデンプンおよびデンプングリコール酸ナトリウム (sodium starch glycolate) が含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の表面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウムが含まれるが、それに限定されるわけではない。公知の希釈剤には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、微結晶セルロース、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、およびリン酸ナトリウムが含まれるが、それら

50

に限定されるわけではない。公知の造粒剤および崩壊剤には、コーンスターチおよびアルギン酸が含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の結合剤には、ゼラチン、アカシア、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、およびヒドロキシプロピルメチルセルロースが含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の平滑剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、シリカ、およびタルクが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0140】

本発明の薬学的組成物の液体製剤を、液体形態、または使用前の水または別の適当なビヒクルによる再構成を意図した乾燥生成物の形態のいずれかで調製し、パッケージし、かつ販売してよい。

10

【0141】

液体懸濁液を、水性または油性のビヒクル中での活性成分の懸濁を達成する従来の方法を用いて調製してよい。水性ビヒクルには、例えば水および等張生理食塩水が含まれる。油性ビヒクルには、例えばアーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、またはヤシ油などの植物油、分画植物油、および流動パラフィン (liquid paraffin) などの鉱油が含まれる。液体懸濁液は、懸濁化剤、分散剤または湿潤剤、乳化剤、粘滑剤、保存剤、緩衝液、塩、香味剤、着色剤、および甘味剤を含むがそれらに限定されない、1種または複数種のさらなる成分をさらに含んでよい。油性懸濁液は、増粘剤をさらに含んでよい。

20

【0142】

公知の懸濁化剤には、ソルビトールシロップ、水素化食用脂、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、アカシアゴム、ならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、およびヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の分散剤または湿潤剤には、レシチンなどの天然に存在するリン脂質、アルキレンオキシドと、脂肪酸との、長鎖脂肪酸アルコールとの、脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステルとの、または脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来する部分エステルとの縮合生成物 (例えば、それぞれ、ポリオキシエチレンステアレート、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート) が含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の乳化剤には、レシチンおよびアカシアが含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の保存剤には、メチル-、エチル-、またはn-プロピル-パラ-ヒドロキシベンゾエート、アスコルビン酸、およびソルビン酸が含まれるが、それらに限定されるわけではない。公知の甘味剤には、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、スクロース、およびサッカリンが含まれる。公知の増粘剤には、例えば蜜蝋、固形パラフィン (hard paraffin)、およびセチルアルコールが含まれる。

30

【0143】

水性または油性の溶媒中の活性成分の液体溶液を、液体懸濁液と実質的に同じ様式で調製してよく、主な違いは、活性成分を溶媒中に懸濁するというよりもむしろ溶解させることである。本発明の薬学的組成物の液体溶液は、液体懸濁液に関して記載されている構成成分のそれぞれを含んでよく、懸濁化剤は、必ずしも溶媒中での活性成分の溶解の助けとはならないであろうことが理解される。水性溶媒には、例えば水および等張生理食塩水が含まれる。油性溶媒には、例えばアーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、またはヤシ油などの植物油、分画植物油、および流動パラフィンなどの鉱油が含まれる。

40

【0144】

本発明の薬学的調製物の粉末化製剤または顆粒製剤を、公知の方法を用いて調製してよい。そのような製剤を、対象に直接投与してよく、例えば、錠剤を形成するために、カプセルを充填するために、またはそこへの水性もしくは油性のビヒクルの添加によって水性もしくは油性の懸濁液もしくは溶液を調製するために用いてよい。これらの製剤のそれぞ

50

れは、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤、および保存剤のうちの1種または複数種をさらに含んでよい。これらの製剤には、充填剤、および甘味剤、香味剤、または着色剤などのさらなる賦形剤も含まれてよい。

【0145】

本発明の薬学的組成物を、水中油型乳濁液または油中水型乳濁液の形態でも調製する、パッケージする、または販売することができる。油性相は、オリーブ油もしくはラッカセイ油などの植物油、流動パラフィンなどの鉱油、またはこれらの組み合わせであってよい。そのような組成物は、アカシアゴムまたはトラガカントゴムなどの天然に存在するゴム、大豆またはレシチンのリン脂質など天然に存在するリン脂質、ソルビタンモノオレエートなど、脂肪酸とヘキシトール無水物との組み合わせに由来するエステルまたは部分エステル、およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートなど、そのような部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物など、1種または複数種の乳化剤をさらに含んでよい。これらの乳濁液は、例えば甘味剤または香味剤を含めた、さらなる成分も含有してよい。

10

【0146】

化学的組成物で物質を含浸させるまたは被覆するための方法は、当技術分野において公知であり、表面上に化学的組成物を堆積させるまたは結合させる方法、物質の合成中に物質の構造内に化学的組成物を組み入れる方法（すなわち、生理学的に分解可能な物質を用いてなど）、および後続の乾燥の有無にかかわらず、吸水性物質内に水性または油性の溶液または懸濁液を吸収させる方法を含むが、それらに限定されるわけではない。

20

【0147】

本明細書において使用するとき、薬学的組成物の「非経口投与」には、対象の組織に物理的に切れ目を入れることを特徴とする投与、および組織における切れ目を介した薬学的組成物の投与の任意の経路が含まれる。ゆえに、非経口投与には、組成物の注射による、外科的切開を介した組成物の適用による、組織を貫通した非外科的創傷を介した組成物の適用による等の薬学的組成物の投与が含まれるが、それらに限定されるわけではない。とくに、非経口投与は、皮膚、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、嚢内への注射、および腎臓透析による注入技術を含むが、それらに限定されないことが企図される。

【0148】

非経口投与に適した薬学的組成物の製剤は、滅菌水または滅菌等張生理食塩水などの薬学的に許容される担体と組み合わせた活性成分を含む。そのような製剤を、ボーラス投与または継続投与に適した形態で調製する、パッケージする、または販売することができる。注射可能な製剤を、アンプル中にまたは保存剤を含有している複数回用量容器中になど、単位剤形で調製する、パッケージする、または販売することができる。非経口投与のための製剤には、油性または水性のビヒクル中の懸濁液、溶液、乳濁液、ペースト、および埋め込み可能な持続放出性または生分解性の製剤が含まれるが、それらに限定されるわけではない。そのような製剤は、懸濁化剤、安定剤、または分散剤を含むがそれらに限定されない1種または複数種のさらなる成分をさらに含んでよい。非経口投与のための製剤の一態様において、活性成分を、再構成組成物の非経口投与の前の、適当なビヒクル（例えば、発熱物質を含んでいない滅菌水）による再構成のための乾燥（すなわち、粉末または顆粒）形態で提供する。

30

40

【0149】

薬学的組成物を、滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁液または溶液の形態で調製する、パッケージする、または販売することができる。この懸濁液または溶液は、公知の技法に従って製剤化されてよく、かつ活性成分に加えて、本明細書において記載される分散剤、湿潤剤、または懸濁化剤などのさらなる成分を含んでよい。そのような滅菌した注射可能な製剤を、例えば、水または1,3-ブタンジオールなどの非経口的に許容される非毒性の希釈剤または溶媒を用いて調製してよい。他の許容される希釈剤および溶媒には、リンガー液、等張塩化ナトリウム溶液、および合成モノグリセリドまたはジグリセリドなどの固定油が含まれるが、それらに限定されるわけではない。有用である他の非経口的に投

50

与可能な製剤には、微結晶形態で、リポソーム調製物中に、または生分解性ポリマーシステムの構成成分として活性成分を含むものが含まれる。持続放出または埋め込みのための組成物は、乳濁液、イオン交換樹脂、やや難溶性のポリマー、またはやや難溶性の塩など、薬学的に許容されるポリマー物質または疎水性物質を含んでよい。

【0150】

局所投与に適した製剤には、塗布薬、ローション、水中油型または油中水型の乳濁液、例えばクリーム、軟膏、またはペースト、および溶液または懸濁液など、液体または半液体の調製物が含まれるが、それらに限定されるわけではない。活性成分の濃度は、溶媒中の活性成分の溶解限度と同じくらい高くてもよいが、局所的に投与可能な製剤は、例えば約1%～約10% (w/w) の活性成分を含んでよい。局所投与のための製剤は、本明細書において記載されるさらなる成分のうちの1種または複数種をさらに含んでよい。

10

【0151】

本発明の薬学的組成物を、口腔を介した肺内投与に適した製剤で調製する、パッケージする、または販売することができる。そのような製剤は、活性成分を含みかつ約0.5～約7ナノメートル、好ましくは約1～約6ナノメートルの値域の直径を有する乾燥粒子を含んでよい。そのような組成物は、好都合には、推進剤の流れがそこへ向かって粉末を分散させ得る乾燥粉末貯蔵庫を含む装置を用いた、または低沸点の推進剤中に溶解したもしくは懸濁した活性成分を密封容器中に含む装置など、自己推進式の溶媒/粉末分散容器を用いた投与のための乾燥粉末の形態にある。好ましくは、そのような粉末は、重量による粒子の少なくとも98%が0.5ナノメートルを上回る直径を有し、かつ数による粒子の少なくとも95%が7ナノメートル未満の直径を有する粒子を含む。より好ましくは、重量による粒子の少なくとも95%は1ナノメートルを上回る直径を有し、かつ数による粒子の少なくとも90%は6ナノメートル未満の直径を有する。乾燥粉末組成物は、好ましくは糖類などの固体微粉末希釈剤を含み、かつ好都合には単位用量形態で提供される。

20

【0152】

低沸点の推進剤には、一般的に、大気圧下で65°Fを下回る沸点を有する液体推進剤が含まれる。一般的に、推進剤は組成物の50～99.9% (w/w) を構成してよく、かつ活性成分は組成物の0.1～20% (w/w) を構成してよい。推進剤は、液体の非イオン性もしくは固体の陰イオン性の界面活性剤、または固体の希釈剤（好ましくは、活性成分を含む粒子と同じ桁の粒子サイズを有する）など、さらなる成分をさらに含んでよい。

30

【0153】

肺内送達のために製剤化された本発明の薬学的組成物は、溶液または懸濁液の液滴の形態でも活性成分を提供し得る。そのような製剤を、活性成分を含む、任意で滅菌の、水性または希アルコール性の溶液または懸濁液として調製する、パッケージする、または販売することができ、かつ任意の噴霧化または微粒化の装置を用いて好都合に投与することができる。そのような製剤は、サッカリンナトリウムなどの香味剤、揮発性油、緩衝剤、表面活性剤、またはメチルヒドロキシベンゾエートなどの保存剤を含むがそれらに限定されない、1種または複数種のさらなる成分をさらに含んでよい。この投与経路によって提供される液滴は、好ましくは約0.1～約200ナノメートルの値域の平均直径を有する。肺内送達に有用であるとして本明細書において記載される製剤は、本発明の薬学的組成物の鼻腔内送達にも有用である。鼻腔内投与に適した別の製剤は、活性成分を含みかつ約0.2～500マイクロメートルの平均粒子を有する粗粉末である。

40

【0154】

そのような製剤は、嗅ぎタバコを吸う様式で、すなわち鼻孔近くに保持された粉末の容器からの鼻道を介した急速吸入によって投与される。経鼻投与に適した製剤は、例えばわずか約0.1% (w/w) から最高100% (w/w) もの活性成分を含んでよく、かつ本明細書において記載されるさらなる成分のうちの1種または複数種をさらに含んでよい。

【0155】

本発明の薬学的組成物を、口腔投与に適した製剤で調製する、パッケージする、または販売することができる。そのような製剤は、例えば、従来の方法を用いて作製される錠剤

50

またはロゼンジ剤の形態であってよく、かつ例えば、0.1～20% (w/w) の活性成分、経口で溶解可能なまたは分解可能な組成物を含む残部 (balance)、および任意で、本明細書において記載されるさらなる成分のうちの1種または複数種を含有してよい。代わりに、口腔投与に適した製剤は、活性成分を含む粉末またはエアロゾル化もしくは微粒化された溶液もしくは懸濁液を含んでよい。そのような粉末化またはエアロゾル化された製剤は、分散した場合、好ましくは約0.1～約200ナノメートルの値域の平均粒子または液滴サイズを有し、かつ本明細書において記載されるさらなる成分のうちの1種または複数種をさらに含んでよい。

【0156】

本発明の薬学的組成物を、眼内投与に適した製剤で調製する、パッケージする、または販売することができる。そのような製剤は、例えば、水性または油性の液体担体中に活性成分の0.1～1.0% (w/w) の溶液または懸濁液を含む、例えば点眼薬の形態であってよい。そのような点眼薬は、緩衝剤、塩、または本明細書において記載されるさらなる成分のうちの1種もしくは複数種の他のものをさらに含んでよい。有用である他の眼内に投与可能な製剤には、微結晶形態でまたはリポソーム調製物中に活性成分を含むものが含まれる。

10

【0157】

本明細書において使用するとき、「さらなる成分」には、以下のうちの1種または複数種が含まれるが、それらに限定されるわけではない：賦形剤；表面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒剤および崩壊剤；結合剤；平滑剤；甘味剤；香味剤；着色剤；保存剤；ゼラチンなどの生理学的に分解可能な組成物；水性のビヒクルおよび溶媒；油性のビヒクルおよび溶媒；懸濁化剤；分散剤または湿潤剤；乳化剤、粘滑剤；緩衝剤；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；酸化防止剤；抗生物質；抗真菌剤；安定剤；ならびに薬学的に許容されるポリマー物質または疎水性物質。本発明の薬学的組成物中に含まれ得る他の「さらなる成分」は、当技術分野において公知であり、かつ例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa.に記載されている。

20

【0158】

動物、好ましくはヒトに投与され得る、本発明の化合物の典型的な投薬量は、動物の体重の1kgあたり約0.01mg～約1000mgの量に及ぶ。投与される正確な投薬量は、治療を受けている動物のタイプおよび疾患または障害のタイプ、動物の年齢、ならびに投与の経路を含むがそれらに限定されないいくつかの要因に応じて変動する。好ましくは、化合物の投薬量は、動物の体重の1kgあたり約1mg～約100mgまで変動する。化合物を、毎日数回の頻度で動物に投与することができ、あるいはそれを、1日1回、1週間に1回、2週間おきに1回、1ヶ月に1回、または数ヶ月おきに1回もしくはさらに1年に1回もしくはそれ未満などのさらにより低頻度で投与することができる。投薬の頻度は、当業者に容易に明らかであり、かつ治療を受けている疾患または障害のタイプおよび重症度、動物のタイプおよび年齢など、しかしながらそれらに限定されないいくつかの要因に依存する。

30

【実施例】

【0159】

実験例

本発明は、以下の実験例に関してさらに詳細に記載される。これらの実施例は、単なる例証を目的とするものであり、別様に指定されない限り、限定することを意図するものではない。ゆえに、本発明は、以下の実施例に限定されると決して解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書において提供される本教示の結果として明白となるありとあらゆる変形形を包含すると解釈されるべきである。

40

【0160】

さらに記載することなく、当業者であれば、前述の記載および以下の例証的な実施例を用いて、本発明を行いかつ利用し得、かつ主張される方法を実践し得ると考えられる。したがって、以下の作業実施例は、本発明の好ましい態様を具体的に指し示すものであり、

50

本開示の残りの部分を何らかの形で限定するものとして解釈されるべきではない。

【0161】

実施例1：レナラーゼは、マウスにおいて虚血性急性腎損傷を防御する

レナラーゼは、循環カテコールアミンを分解しかつ心筋壊死を低下させる、腎近位尿管により分泌されるアミノキシダーゼである。本明細書において提示されるデータは、レナラーゼが腎臓の虚血および再灌流による損傷を防御することを実証している。本明細書において示されるように、レナラーゼは、腎近位尿管で選択的に発現するが、腎遠位尿管では発現しない。腎虚血再灌流損傷に供されたマウスは、シャム手術マウスと比較して、有意に低下した腎臓および血漿でのレナラーゼレベルを有した。これと合致して、マウスの血漿ノルエピネフリンレベルは、腎虚血再灌流損傷の後に有意に増加した。さらに、腎臓の虚血および再灌流に供されたレナラーゼ欠損マウスは、レナラーゼ野生型マウスと比較してより高い血漿カテコールアミンレベルとともに、悪化した腎尿管の炎症、壊死、およびアポトーシスを有した。組換えヒトレナラーゼの投与は、腎尿管の壊死、炎症、およびアポトーシスを低下させることによって、レナラーゼ野生型マウスにおいて、血漿カテコールアミンレベルを低下させかつ虚血性急性腎損傷を改善させた。まとめると、本データは、レナラーゼが、腎尿管の壊死、アポトーシス、および炎症を低下させることによって、虚血性急性腎損傷を防御することを示している。組換えレナラーゼ療法は、急性腎損傷の予防および治療のための新規な治療的アプローチを提供する。加えて、血漿レナラーゼは虚血性急性腎損傷の後に減少するため、血漿レナラーゼレベルは、急性腎損傷の検出のための新規なかつ高感度のバイオマーカーとしての役割を果たす。

【0162】

本明細書において記載されるように、実験を行って、マウスにおいて虚血性AKIがレナラーゼ欠損につながるかどうか、およびレナラーゼ欠損が虚血性AKIを直接悪化させるかどうかを査定した。ゆえに、実験を実施して、1) 虚血性AKIが、腎臓および血漿でのレナラーゼレベルの低下につながるかどうか、2) 虚血性AKIにより誘導されたレナラーゼ欠損が、血漿カテコールアミン（ノルエピネフリン）レベルの上昇につながるかどうか、3) レナラーゼ欠損マウスが、腎IR損傷の増加を呈するかどうか、ならびに4) 組換えヒトレナラーゼの外因性投与が、マウスにおいて虚血性AKIを直接防御するかどうかを試験した。

【0163】

虚血性AKIは、炎症誘発性白血球の腎臓内動員および全身性炎症を合併する（Okusa, 2010, Contrib Nephrol 165: 153-158）。最近の研究によれば、腎IRは、単一臓器疾患ではなく、肝臓、腸、および肺を含めた、複数の腎臓外臓器に関与することが実証されている（Paladino et al., 2009, Microvasc Res 77: 8-12; Park et al., 2011, Lab Invest 91: 63-84）。虚血性AKI後の腎尿管細胞死のメカニズムを詳述する多くの進歩が遂げられてきたが、虚血性AKI後の腎臓および全身の炎症を指揮する誘因は依然として不明である。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、虚血性AKIの腎臓外の影響は、AKIを有する患者における不相応に高い死亡率を説明し得る。したがって、AKIからのこれらの全身性の腎臓外合併症を予防する手法は、患者のケアおよび生存の向上に大きく寄与すると考えられる。

【0164】

本明細書において記載されるように、虚血性AKI後の腎尿管細胞死および腎機能の急激な低下は、結果として生じた血漿ノルエピネフリンの増加とともに、腎臓および血漿でのレナラーゼレベルの劇的な低下につながった。これらの知見は、腎近位尿管が循環レナラーゼの主要な供給源であるという説明と合致する。さらに、本データは、分泌されたレナラーゼは血漿中で急速に分解され、正常な血漿レナラーゼレベルを維持するためには、腎臓による一定の新しいレナラーゼの合成および放出が生じなければならないことを示唆している。さらに、腎臓および血漿でのレナラーゼレベルは、マウスにおいて虚血性AKI後に急速に減少したため、尿および血漿でのレナラーゼも、虚血性AKIの早期検出のための新規なかつ高感度のバイオマーカーとしての役割を果たし得る。

【0165】

腎IR損傷に対する組換えレナラーゼの強力な防御効果が本明細書において記載されているように、組換えレナラーゼ療法は、AKIの予防および治療のための新規な治療用ツールを提供する。具体的には、外因性組換えレナラーゼは、腎尿細管壊死を低減させた（Jablonski腎損傷スコア）。さらに、組換えレナラーゼ処理したマウス腎臓において、腎IR後の炎症誘発性好中球およびマクロファージの腎臓への流入の低下および腎尿細管アポトーシスの低下が実証された。これらのデータは、ヒト組換えレナラーゼの外因性投与が、腎細胞損傷の3つすべての経路（壊死、アポトーシス、および炎症）を標的とすることによって、虚血性AKIに対する強力な腎防御を提供するという説明と合致する。

【0166】

組換えレナラーゼ（1.5mg/kg）は、本明細書において記載される虚血性AKIモデル（30分間の温虚血）の重症度による可能性が最も高い、有意ではあるが部分的な腎防御（クレアチニンは、約2.4mg/dLから1.4mg/dLに減少した）を提供した。30分間の腎虚血は、虚血中に、レナラーゼ処理ではレスキューされ得ない重大な腎尿細管壊死を引き起こしていると考えられる。レナラーゼは、用量依存的な防御を提供せず、かつ4.5mg/kgで防御のいくらかの逆転があったことも観察された。レナラーゼは用量依存的な全身血圧の低下を引き起こすため、高用量（4.5mg/kg）は腎防御の増加を提供し得ない可能性がある（Xu et al., 2005, J Clin Invest 115: 1275-1280）。以前の研究によれば、4mg/kg用量でのレナラーゼは、平均動脈圧を約40%低下させることが示された（Xu et al., 2005, J Clin Invest 115: 1275-1280）。この観察結果は、全身血圧の低下が、高用量の組換えレナラーゼの腎防御効果を打ち消している可能性があるという説明と合致する。

【0167】

組換えレナラーゼ療法は、腎虚血の30分後に投与された場合にも、部分的に防御的であった。したがって、組換えレナラーゼ療法は、虚血性AKIの危険性がある患者の多様な群に対して有効であり得る。多くの外科的処置で腎虚血が予想され得るが、相当数の患者は、腎虚血損傷がすでに生じた後に病院を訪れる。すべての虚血性AKIを事前に予想し得るとは限らないため、AKIに対する虚血後療法は、橋渡しのなれば臨床的な意義を増加させると考えられる。しかしながら、腎虚血の10分前および再灌流の30分後に投与されたレナラーゼの有効性に有意な差異が認められた。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、これは、30分間の腎温虚血後に生じる早期再灌流損傷の重症度が原因であり得る。組換えレナラーゼは、再灌流後の30分間の間に生じる重大な腎損傷に対抗するために循環中に存在しているに違いないと思われる。

【0168】

本明細書において記載されるように、腎IR損傷後、血漿ノルエピネフリンレベルの増加は、レナラーゼWTマウスと比較してレナラーゼKOマウスにおいてより大きかった。Wuらも、エピネフリン、ドーパミン、およびノルエピネフリンを含めたカテコールアミンの血漿レベルが、レナラーゼKOマウスにおいて増加することを実証している（Wu et al., 2011, Kidney Int 79: 853-860）。本明細書において記載される調査において、レナラーゼKOマウスは、腎IR後に腎尿細管損傷の増加を患うことも示された。さらに、レナラーゼ欠損マウスにおいて、腎IR後に、TNF- α 、MCP-1、およびMIP-2の増加が実証された。とくに、MIP-2は、炎症および免疫調節に関与するケモカインであり、かつ好中球走化性の強力な調節因子である（Lemay et al., 2000, Transplantation 69: 959-963）。本明細書において記載される知見と合致して、レナラーゼKOマウスは、IRによる心筋壊死を悪化させた（Wu et al., 2011, Kidney Int 79: 853-860）。まとめると、レナラーゼ欠損は、虚血性臓器損傷を悪化させるように思われ、かつより高い血漿カテコールアミンレベルをもたらす。

【0169】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書において記載される知見は、組換えレナラーゼの腎防御効果が、少なくとも部分的に、血漿および組織のカテコールアミンの代謝の増加によるものであるという説明と合致する。組換えレナラー

ゼ仲介性腎防御は、血漿カテコールアミンレベルの有意な低下ももたらしたことが本明細書において示されている。虚血性AKI後のカテコールアミンレベルの増加は、腎血流量を減少させることによって、ならびに腎尿細管および免疫細胞への直接的影響によって、腎損傷を悪化させ得る。カテコールアミンは、敗血症および全身性炎症反応症候群において組織および臓器の損傷を促進することに関係している (Miksa et al., 2009, PLoS One 4: e5504; Wang et al., 2000, Biochim Biophys Acta 1535: 36-44)。例えば、消化管由来のノルエピネフリンは、敗血症において肝損傷および全身性炎症を引き起こすことに関係している (Koo et al., 2000, Int J Mol Med 5: 457-465; Yang et al., 2000, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279: G1274-G1281; Zhou et al., 2004, Biochim Biophys Acta 1689: 212-218)。以前の研究によれば、腸由来のノルエピネフリンは、肝臓クッパー細胞の $\alpha 2$ アドレナリン受容体を活性化して、TNF- α の産出および放出を増加させることが示されている (Miksa et al., 2009, PLoS One 4: e5504; Yang et al., 2000, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279: G1274-G1281; Yang et al., 2001, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281: G1014-G1021; Zhou et al., 2001, Biochim Biophys Acta 1537: 49-57)。敗血症ラットにおいて、 $\alpha 2$ アドレナリン作動性受容体は、クッパー細胞で上方調節されて、炎症反応および臓器損傷を促す (Miksa et al., 2009, PLoS One 4: e5504)。さらに、 $\alpha 1$ アドレナリン作動性受容体は、ヒト単球およびマクロファージにおいて、炎症誘発性サイトカインのLPS仲介性誘導を増加させる (Grisanti et al., 2011, J Pharmacol Exp Ther 338: 648-657)。したがって、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ のアドレナリン作動性受容体の両方とも、増加した循環カテコールアミンの炎症誘発効果に関係している。虚血性AKIに対する α アドレナリン作動性受容体の病因的役割を支持して、 α アドレナリン作動性受容体の遮断は、レナラーゼWTならびにレナラーゼKOマウスにおいて、有意な腎防御を提供することが見出された。

【0170】

本実施例の方法および材料をここに記載する。

【0171】

組換えヒトレナラーゼの合成

記載されているように (Desir et al, 2012, J. of the Am. Heart Assn, 1(4): e002634)、ヒト組換えレナラーゼを合成した。

【0172】

腎虚血/再灌流 (IR) 損傷のマウスモデル

記載されているように (Kim et al., 2009, Kidney Int 75: 809-823; Kim et al., 2010, Am J Physiol Renal Physiol 299(2): F347-58)、C57BL/6バックグラウンドでの成体オスのレナラーゼ欠損 (KO) マウス (Wu et al., 2011, Kidney Int 79: 853-860) を腎虚血/再灌流 (IR) に供した。レナラーゼKOまたは野生型 (WT) マウス (Harlan Labs, Indianapolis, INからのC57BL/6) を、シャム手術、または20分間 (中程度) もしくは30分間 (重度) の腎虚血および24時間の再灌流に供した。組換えヒトレナラーゼの腎防御効果を試験するために、30分間の腎虚血の10分前に、マウスを生理食塩水 (ビヒクル) または組換えレナラーゼ (0.5、1.5、または4.5mg/kg、皮下 (s.c.)) で前処理した。腎虚血の完了後のレナラーゼ処理も腎防御を提供するかどうかを試験した。マウスの別個のコホートを、虚血腎の再灌流の30分または60分後に、生理食塩水またはレナラーゼ (1.5mg/kg、s.c.) で処理した。 α 受容体の遮断が、ヒト組換えレナラーゼ投与の腎防御効果を模倣するかどうかを試験するために、フェントラミン (α 受容体アンタゴニスト、5mg/kg、腹腔内 (i.p.)) を腎虚血の15分前に一部のマウスに与えた。

【0173】

腎機能の測定

血漿クレアチニンを、メーカーの指示に従って、酵素的creatinine reagentキット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で、記載されているように (Slot, 1965, J Clin Lab Invest 17: 381-387) 測定した。

【0174】

血漿ノルエピネフリンの測定

シャム手術または腎IRに供されたマウスにおける血漿ノルエピネフリンを、メーカーの指示に従って、商業的ELISAキットで測定した (Rocky Mountain Diagnostics, Colorado Springs, CO)。

【0175】

壊死、アポトーシス、および好中球浸潤の組織学的検出

Jablonskiら (1983, Transplantation 35: 198-204) によって概説されているように、および以前の研究 (Lee et al., 2004, J Am Soc Nephrol 15: 102-111; Lee et al., 2004, Am J Physiol Renal Physiol 286: F298-F306) に記載されているように、近位尿管に対する壊死性損傷についての確立された評価尺度 (0~4、腎損傷スコア) を、IRにより誘導されたダメージの病理組織学的な査定に用いた。アポトーシスを、メーカーによって提供された指示書に従って、市販のin situ cell death detection kit (Roche, Indianapolis, IN) を用いて、記載されているように (Park et al., 2011, Lab Invest 91: 63-84)、腎IR後にTUNEL染色で検出した。以前に記載されているように (Park et al., 2011, Lab Invest 91: 63-84)、腎臓の好中球およびマクロファージの浸潤を、IRの24時間後に免疫組織化学により査定した。腎臓に浸潤している好中球およびマクロファージを、皮髄境界部における5~7枚の無作為に選出された200倍 (好中球) または400倍 (マクロファージ) の顕微鏡画像視野で定量化し、かつ結果を200~400倍視野あたりで計数された好中球として表現した。

【0176】

マウスレナラーゼに対する逆転写ポリメラーゼ連鎖反応および免疫ブロット解析

記載されているように (Kim et al., 2010, Am J Nephrol 31: 353-362)、マウスレナラーゼをコードするmRNAをRT-PCRで測定した。等しいRNA投入量を制御するために、GAPDH mRNAも測定した。加えて、以前に記載されているように (Kim et al., 2010, Am J Nephrol 31: 353-362)、レナラーゼ (Abcam, Cambridge, MA) および β -アクチン (内部タンパク質のローディング対照、Sigma) についての免疫ブロット解析のために、マウス腎皮質も回収した。

【0177】

腸IR後の炎症誘発性mRNA発現の測定

IL-17A、細胞間接着分子1 (ICAM-1)、単球走化性タンパク質1 (monocyte chemoattractive protein 1) (MCP-1)、マクロファージ炎症性タンパク質2 (MIP-2)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、およびIL-6 (肝臓および腎臓のみ) を含めた、炎症のマーカーをコードするmRNAを測定することによって、マウスにおける腎IR後の腎炎をさらに判定した。記載されているように (Park et al., 2011, Lab Invest 91: 63-84)、RT-PCRを実施した。

【0178】

ブタ腎臓における、内在性レナラーゼとE-カドヘリンまたはメガリンとの免疫共局在

ヒトレナラーゼ配列に対して、レナラーゼ抗体を合成した。ブタ腎臓において、レナラーゼ免疫組織化学を実施した。ブタ腎臓薄片を固定し、透過処理し、かつ抗レナラーゼ28-4 (レナラーゼペプチド

EAGTKIDVPWAGQYITSNPC (SEQ ID NO: 1)

に対して産生させた) および抗E-カドヘリン (BD Biosciences) または抗メガリンの一次抗体とともに2時間インキュベートした。次いで、二次抗体 (レナラーゼを検出するためのAlexa488-ヤギ抗ウサギ) およびAlexa555-ヤギ抗マウス (Molecular Probes、E-カドヘリンまたはメガリンを検出するための) を適用した。スライドを蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Inc.) で画像取得し、かつSPOTカメラソフトウェア (Diagnostic Instruments, Inc.) を用いて撮影した。

【0179】

統計解析

2群間の平均を比較する場合にはスチューデントt検定を用いて、または多群間を比較す

10

20

30

40

50

る場合には一元配置ANOVA+Tukey事後多重比較検定を用いて、データを解析した。異なるマウス系統または処理群に対するシャム手術または腎IR損傷の影響を試験するためには、二元配置ANOVA+Bonferroni事後検定を用いた。腎損傷スコアの通常値を、Mann-Whitneyノンパラメトリック検定によって解析した。すべての場合において、 <0.05 の確率統計をとって、有意性を表した。本書を通して、すべてのデータは平均 $\pm$ SEMとして表現されている。

【0180】

本実施例の結果をここに記載する。

【0181】

レナラーゼは、腎近位尿細管で選択的に発現する

10

図1Aは、メガリン（腎近位尿細管に対するマーカー）またはレナラーゼに対する抗体とインキュベートしたブタ腎臓組織についての免疫共局在解析を示している。レナラーゼおよびメガリン染色は完全に重なり合い、レナラーゼが腎近位尿細管で発現していることを表している。レナラーゼおよびE-カドヘリン（腎遠位尿細管に対するマーカー）に関する免疫共局在調査も実施した（図1B）。メガリンとは異なり、ブタ腎臓において、E-カドヘリンはレナラーゼと共局在しない。これらのデータは、腎近位尿細管におけるレナラーゼの選択的発現を表している。レナラーゼ抗体は、マウス近位尿細管におけるレナラーゼも検出した。

【0182】

マウスにおける、シャム手術または腎IR後の血漿ノルエピネフリンレベル

20

血漿ノルエピネフリン濃度は、レナラーゼWTマウスにおいて、腎IRの24時間後に増加した（シャム手術レナラーゼWTマウスと比較して >2 倍、 $N=3\sim5$ 、図2）。血漿ノルエピネフリン濃度の増加は、腎IR後のレナラーゼ欠損マウスにおいてさらに高かった（シャム手術レナラーゼKOマウスと比較して >5 倍）。

【0183】

腎IR後の血漿および腎臓でのレナラーゼ発現

血漿レナラーゼに対する免疫プロットにより、腎IRの5時間および24時間後の血漿レナラーゼの有意な低下が明らかとなった（図3A、 $n=4\sim5$ ）。この血漿レナラーゼの減少と合致して、腎臓レナラーゼmRNAの発現は、腎IRの24時間後に有意に低減した（図3B、 $n=4$ ）。

30

【0184】

レナラーゼ欠損マウスは、腎IR後に虚血性AKIの増加を有する

ベースラインの血漿クレアチニン値は、シャム手術（麻酔、開腹術、右腎摘出術、および回復）に供されたレナラーゼWTとレナラーゼKOとの間で同程度であった（図4A）。血漿クレアチニンは、シャム手術マウスと比較して、中程度（20分間）または重度（30分間）の腎IRに供されたレナラーゼWTおよびレナラーゼKOマウスにおいて有意に増加した（図4A、 $n=4\sim6$ ）。しかしながら、レナラーゼKOマウスは、中程度および重度の腎IR損傷の後の両方で、レナラーゼWTマウスと比較して、より高い血漿クレアチニンレベルによって表される腎損傷の有意な増加を有した。

【0185】

40

外因性ヒト組換えレナラーゼ投与の腎防御効果

外因性ヒト組換えレナラーゼでの前処理は、腎IR損傷を防御する。血漿クレアチニンは、シャム手術マウスと比較して、30分間の腎IRに供されたビヒクル（生理食塩水）処理マウスにおいて有意に増加した（図4B、 $n=4\sim6$ ）。ヒト組換えレナラーゼでの前処理（腎虚血の10分前に0.5、1.5、または4.5mg/kg s.c.）は、マウスにおいて血漿クレアチニンの増加を有意に低減させた。しかしながら、より高用量のヒト組換えレナラーゼ（4.5mg/kg）は、1.5mg/kgの組換えレナラーゼ用量と比較した場合、腎防御の低下を提供した。外因性レナラーゼ（1.5mg/kg）は、その腎防御効果と合致して、腎IR損傷に供されたマウスにおいて血漿ノルエピネフリンレベルを減少させた（ビヒクル注射したマウス血漿ノルエピネフリン $=2.4\pm0.13$ ng/mL、 $n=4$ 対 レナラーゼ注射したマウス血漿ノルエピネフリン

50

=1.6±0.2ng/mL、N=4、P<0.05)。

【0186】

(腎虚血完了後の)腎再灌流後の組換えレナラーゼ処理は、腎IR損傷を防御した。図4Cは、再灌流の30分後に与えられた組換えレナラーゼ(1.5mg/kg)が、腎IR損傷に対して防御的であったことを示している(n=4~6)。60分後の組換えレナラーゼの投与は、IR損傷に対する腎防御を提供しなかった。

【0187】

αアドレナリン作動性受容体遮断の腎防御効果

αアドレナリン作動性受容体の遮断は、ヒト組換えレナラーゼ投与の腎防御効果を模倣する。フェントラミン(非特異的ではあるが選択的なαアドレナリン作動性受容体アンタゴニスト、5mg/kg、i.p.)は、30分間の腎IR損傷に供されたレナラーゼWTマウスにおいて有意な腎防御をもたらした(図4D)。さらに、フェントラミンは、30分間の腎IR損傷からレナラーゼKOマウスも防御した(図4D)。

【0188】

レナラーゼは、IR後の腎尿細管壊死をモジュレートする

中程度の腎IR損傷(20分間の腎虚血)に供されたレナラーゼ欠損マウスは、レナラーゼWTマウスと比較して、腎臓の組織学的損傷の悪化を高めた(尿細管壊死の増加、鬱血の増加を有するタンパク性円柱、図5A、上端のパネル、4~6回の実験の代表的なもの)。対照的にかつ血漿クレアチニンのデータと合致して、ヒト組換えレナラーゼ(1.5mg/kg)で処理されたレナラーゼWTマウスは、ビヒクル処理レナラーゼWTマウスと比較して、劇的に低下した損傷を有した(図5A、下端のパネル)。Jablonski尺度(Jablonski et al., 1983, Transplantation 35: 198-204)の腎損傷スコア(尺度:0~4)を用いて、腎IRの24時間後に腎尿細管壊死を採点した(図5B、N=4~6)。中程度の腎IR損傷(20分間の腎虚血)に供されたレナラーゼKOマウスは、20分間の腎IR損傷に供されたレナラーゼWTマウスとは異なり、重度の急性尿細管壊死(>3の腎損傷スコアを有する)を示した。対照的に、ヒト組換えレナラーゼで処理されたレナラーゼWTマウスは、30分間の腎IR損傷に供されたビヒクル処理レナラーゼWTマウスと比較して、有意により低い腎損傷スコアを有した。

【0189】

外因性レナラーゼは、IR後の腎臓のアポトーシス、好中球浸潤、およびマクロファージ浸潤を減少させる

TUNEL染色は、優勢な近位尿細管細胞アポトーシスとともに、腎IRに供されたマウスの腎臓においてアポトーシス腎細胞を検出した(図6A、倍率100倍、4回の実験の代表的なもの)。シャム手術マウスの腎臓とは異なり、30分間の腎虚血および24時間の再灌流は、ビヒクル(生理食塩水)処理マウスの腎臓において重度のアポトーシスをもたらした(図6A)。腎虚血の10分前に与えられた組換えレナラーゼ(1.5mg/kg、s.c.)は、腎臓におけるアポトーシスTUNEL陽性細胞の数を有意に低下させた(図6B、N=4)。

【0190】

図7Aは、30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたマウス、またはシャム手術に供されたマウス由来の腎臓の好中球免疫組織化学の代表的な画像(倍率200倍、4回の実験の代表的なもの)を示している。生理食塩水で処理されかつ24時間の腎IRに供されたマウスの腎臓では、有意な好中球浸潤があった。シャム手術マウスでは、腎臓における好中球を検出することはできなかった。腎虚血前にレナラーゼで処理されたマウスは、IR後に腎臓に浸潤している好中球の数の有意な低下を有した(図7B、N=4)。図7Cは、30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたマウス、またはシャム手術に供されたマウス由来の腎臓のマクロファージ(F4/80)免疫組織化学の代表的な画像(倍率400倍、3~4回の実験の代表的なもの)を示している。生理食塩水で処理されかつ24時間の腎IRに供されたマウスの腎臓では、有意に増加したマクロファージ浸潤(茶色の染色)があった。腎虚血前に組換えレナラーゼで処理されたマウスは、IR後に腎臓に浸潤しているマクロファージの数の有意な低下を有した(図7D)。

【0191】

レナラーゼ欠損は、IR後の腎臓における炎症誘発性遺伝子の発現を増加させる

腎IRの24時間後の腎臓における炎症誘発性サイトカインmRNA (TNF- α 、ICAM-1、MCP-1、およびMIP-2) の発現を、RT-PCRで測定した (プライマー配列は表1に列挙されている)。レナラーゼWTマウスは、シャム手術レナラーゼWTマウスと比較して、検討したすべての炎症誘発性mRNAの発現を有意に増加させた (図8)。さらに、レナラーゼ欠損マウスは、レナラーゼWTマウスと比較して、ICAM-1発現のいかなる変化もなく、TNF- α 、MCP-1、およびMIP-2のさらにより大きな増加を有した。

【0192】

(表1) マウスに対する、公開されたGenBank配列に基づく、cDNAを増幅するために用いられたプライマー

プライマー	アクセッション 番号	配列(センス/アンチセンス)	SEQ ID NO	産物の サイズ(bp)	サイクル 数	アニーリング 温度(°C)
TNF- α	X02611	5'-TACTGAACCTCGGGGTGATTGGTCC-3'	(SEQ ID NO: 11)	290	24	65
		5'-CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC-3'	(SEQ ID NO: 12)			
ICAM-1	X52264	5'-TGTTTCCTGCCTCTGAAGC-3'	(SEQ ID NO: 13)	409	21	60
		5'-CTTCGTTTGTGATCCTCCG-3'	(SEQ ID NO: 14)			
MCP-1	NM_011333	5'-ACCTGCTGCTACTCATTCAC-3'	(SEQ ID NO: 15)	312	22	60
		5'-TTGAGGTGGTTGTGGAAAAG-3'	(SEQ ID NO: 16)			
MIP-2	X53798	5'-CCAAGGGTTGACTTCAAGAAC-3'	(SEQ ID NO: 17)	282	22	60
		5'-AGCGAGGCACATCAGGTACG-3'	(SEQ ID NO: 18)			
レナラーゼ	NC_000085.6	5'-TGACCTTGTCATCCTACCA-3'	(SEQ ID NO: 19)	295	28	65
		5'-AACTCCAAATGGGACAGTGG-3'	(SEQ ID NO: 20)			
GAPDH	M32599	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	(SEQ ID NO: 21)	450	15	65
		5'-CACCACCCTGTGTGTAGCC-3'	(SEQ ID NO: 22)			

【0193】

実施例2: AKIおよび急性細胞損傷におけるレナラーゼおよびレナラーゼペプチドの防御効果

レナラーゼポリペプチドおよびペプチドの配列

RP 224 – CVSIDNKKRNI (SEQ ID NO: 2)

RP 220 – CIRFVSIDNKKRNIESSEIG (SEQ ID NO: 3)

RP H220 – HHHHHHCIRFVSIDNKKRNIESSEIG (SEQ ID NO: 4)

RP A220 – IRFVSIDNAAANIESSEIG (SEQ ID NO: 5)

RP 220 SCRAMBLED – CSKRIFKVISSIEDNNERG (SEQ ID NO: 6)

RP 128 – FRHRVTQINLRDDKWEVSKQ (SEQ ID NO: 7)

RP 19 – LLRRQTSGPLYLAVWDKAED (SEQ ID NO: 8)

【0194】

レナラーゼ (NP_001026879.2) –

MAQVLIVGAGMTGSLCAALLRRQTSGLYLA VWDKAEDSGGRMTTACSPH
 NPQCTADLGAQYITCTPHYAKKHQRFYDELLAYGVLRPLSSPIEGMVMKEGD
 CNFVAPQGISSIIKHYLKESGAEVYFRHRVTQINLRDDKWEVSKQTGSPEQFD
 LIVLTMPVPEILQLQGDITTLISECQRQQL EAVSYSSRYALGLFYEAGTKIDVP
 WAGQYITSNPCIRFVSIDNKKRNIESSEIGPSLVIHTTVPFVGTYLEHSIEDVQEL
 VFQQLENILPGLPQPIATKCQKWRHSQVTNAAANCPGQMTLHHKPFLACGGD
 GFTQSNFDGCITSALCVLEALKNYI (SEQ ID NO: 9)

10

【0195】

レナラーゼ (NP_060833.1) -

MAQVLIVGAGMTGSLCAALLRRQTSGLYLA VWDKAEDSGGRMTTACSPH
 NPQCTADLGAQYITCTPHYAKKHQRFYDELLAYGVLRPLSSPIEGMVMKEGD
 CNFVAPQGISSIIKHYLKESGAEVYFRHRVTQINLRDDKWEVSKQTGSPEQFD
 LIVLTMPVPEILQLQGDITTLISECQRQQL EAVSYSSRYALGLFYEAGTKIDVP
 WAGQYITSNPCIRFVSIDNKKRNIESSEIGPSLVIHTTVPFVGTYLEHSIEDVQEL
 VFQQLENILPGLPQPIATKCQKWRHSQVPSAGVILGCAKSPWMMMAIGFPI
 (SEQ ID NO: 10)

20

【0196】

虚血性および中毒性AKIにおける組換えレナラーゼの防御効果

実験を実施して、マウスにおいて虚血性AKIがレナラーゼ欠損につながるかどうか、およびレナラーゼ欠損が虚血性AKIを直接悪化させるかどうかを査定した。ゆえに、実験を実施して、1) 虚血性AKIが、腎臓および血漿でのレナラーゼレベルの低下につながるかどうか、2) 虚血性AKIにより誘導されたレナラーゼ欠損が、血漿カテコールアミン（ノルエピネフリン）レベルの上昇につながるかどうか、3) レナラーゼ欠損マウスが、腎IR損傷の増加を呈するかどうか、ならびに4) 組換えヒトレナラーゼの外因性投与が、マウスにおいて虚血性AKIを直接防御するかどうかを試験した。

30

【0197】

本明細書において記載される調査において、組換えヒトレナラーゼの投与は、腎尿細管の壊死、炎症、およびアポトーシスを低下させることによって、レナラーゼ野生型マウスにおいて、血漿カテコールアミンレベルを低下させかつ虚血性急性腎損傷を改善させることが見出された。まとめると、これらのデータは、レナラーゼが、腎尿細管の壊死、アポトーシス、および炎症を低下させることによって、虚血性急性腎損傷を防御する役割を果たすことを示している。

【0198】

レナラーゼは、マウスにおいてシスプラチン仲介性AKIを防御する

40

シスプラチン誘導性AKIを治療することにおける組換えレナラーゼの有効性を検証し、かつその防護作用を仲介するメカニズムを査定した。シスプラチン (20mg/kg) を、WTまたはレナラーゼKOマウスのいずれかに腹腔内注射によって投与した。マウスを3日後に屠殺した。BUNおよびクレアチニン測定のために血液を回収し、かつ組織学的検討、免疫蛍光法 (IF)、およびウェスタンブロット (WB) のために腎臓を採取した。調査動物の同定に対してマスク化された1人の腎臓病理学者が、それぞれの腎臓標本を審査した。尿細管壊死の存在について、病理学的特質を通常の評定尺度 (0~4; 0=なし; 1=<25%; 2=26~50%; 3=51~75%; 4=76~100%) を用いて採点した。腎皮質および腎髄質の形態計測を、ポイントカウント技術を用いて実施した。損傷した尿細管に位置するポイントを計数し、かつ計数された全ポイントについてのパーセンテージとして病変領域のパーセンテ

50

ージを算出した。

【0199】

図9に示されるように、腎損傷スコア ($KO=56.62\pm7.38\%$ 、 $n=6$ 対 $WT=17.07\pm4.03$ 、 $n=5$; $p<0.0002$)、アポトーシスの程度 (TUNEL染色の2倍増加、 $p<0.005$)、およびマクロファージ浸潤 (F4/80染色の35%増加、 $p<0.05$) がそうであるように、シスプラチンでの処理の3日後に、血漿クレアチニンは、WTと比較して、レナラーゼKOマウスにおいて有意により高かった (1.82 ± 0.56 対 $0.71\pm0.02\text{mg/dl}$ 、 $n=6$ 、 $P=0.021$)。これらのデータは、レナラーゼが、アポトーシス促進性シグナルを減少させかつ生存促進性シグナルを増加させることによって、シスプラチンによるAKIを防御することを示している。ゆえに、レナラーゼは、シスプラチンによるAKIの治療に有用な化合物である。

10

【0200】

レナラーゼは、AKIに対する防御において直接的な細胞効果を有する

シスプラチン処理したHK-2細胞への外因性レナラーゼの添加は、カスパーゼ3活性化を阻害し、かつBcl-2発現および細胞生存を増加させ、レナラーゼのインビボにおける防御効果が、循環カテコールアミンの低下によってのみ仲介され得るわけではないことを示唆した。レナラーゼの結晶構造の検討および抗ペプチドモノクローナル抗体を用いたインビトロ調査は、高度に保存されたレナラーゼペプチド (RP H220、26アミノ酸 (aa)) の同定につながり、それは、マウスにおいて検出可能なNADHオキシダーゼ活性またはアミノオキシダーゼ活性を有しないが、虚血 (30分前に100 μg を皮下に与えた) およびシスプラチン仲介性AKIを防御した (HPLCによって測定されたクレアチニン: シャム; 0.05 ± 0.002 、シスプラチン; 0.177 ± 0.02 、シスプラチン+RP H220; 0.085 ± 0.007 、 $n=3$ 、 $p=0.012$) (図10)。より短いが関連するペプチド (RP 220、20aa) は効果がより少なく、一方で試験した最も短い関連ペプチド (RP 224、10aa) は防御的ではなかった。ゆえに、RP H220およびRP 220は、AKIの予防および治療に有用な化合物である。

20

【0201】

レナラーゼおよびRP H220は、シスプラチン仲介性およびオキシダント仲介性損傷からヒト近位尿細管 (HK-2) 細胞を防御する

培養ヒト近位尿細管上皮 (HK-2) 細胞において、組換えレナラーゼ (10 $\mu\text{g/ml}$) は、 H_2O_2 による壊死に供されたビヒクル処理HK-2細胞 ($\text{LDH}=47\pm3\%$ 、 $N=3$ 、 $p<0.01$) と比較して、2mM H_2O_2 で誘導される壊死を有意に低下させた (6時間の時点で放出されたLDH= $28\pm2\%$ 、 $N=3$)。同様の結果がRP H220に関して得られた。

30

【0202】

培養HK-2細胞を、組換えレナラーゼの有無で、20 μM のシスプラチンと24時間インキュベートした。レナラーゼ発現をウェスタンブロットによって検討し、かつ細胞生存率 (ミトコンドリア完全性) を、代謝的に活性がありかつ生存能力がある細胞のミトコンドリアデヒドロゲナーゼによってホルマザンに切断されるテトラゾリウム塩であるWST-1を用いて分光光度的に決定した (420~480nm) (Boehringer Mannheim, Germany)。図11Aに示されるように、シスプラチンに24時間曝露されたHK2細胞は、レナラーゼ発現の著しい低下を示した。組換えレナラーゼの添加は、細胞のレナラーゼ発現を回復させただけでなく、シスプラチン毒性に対する有意な防御を提供もし、細胞生存率を約50%増加もさせ (図11B)、カスパーゼ-3活性化を減少もさせ (図11C)、かつBcl-2発現を増加もさせた (図11D)。同様の結果がRP H220に関して得られた。

40

【0203】

PI3K/AKTおよびMAPK経路を介したレナラーゼおよびRP 220シグナル

RP H220は、検出可能なオキシダーゼ活性も全身血圧に対する有意な効果も有せず、それにもかかわらずマウスにおいて虚血性および中毒性AKIを防御するため、レナラーゼの防御効果が直接的な細胞効果によって部分的に仲介されるかどうかを査定した。予備の結果によれば、レナラーゼは、HK-2およびヒト静脈内皮細胞 (HUVEC) においてBcl-2発現を24時間の時点で上方調節し (図12A)、かつAKTを活性化することにより (15分間の時点で約45倍) PI3K/AKT経路を介しておよびERKを活性化することにより (15分間の時点で約35

50

倍) MAPK経路を介してシグナルを伝達し、かつJNKを下方調節する(JNK-p54/p46リン酸化の約95%減少)ことが示されている(図12B、12C、および12D)。シスプラチンで処理された細胞において、レナラーゼは、AKT(示さず)およびp38(図12E)の著しいかつ持続的な活性化を引き起こした。同様の結果がRP H220に関して得られたが、スクランブル型RP H220に関しては得られなかった。AKTは、いくつかのアポトーシス刺激に対して増殖因子により細胞生存を促進することが示されており、かつBcl-2上方調節は必須のメカニズムとして同定されている。

【0204】

RenPep1の血行力学的効果

全身血圧に対する7種の異なるレナラーゼペプチド(図13)の効果を検討し、RP 220の静脈内投与(IV)および皮下投与の両方とも、全身血圧に対して著しいかつ持続的な効果を有することが見出された(図14A)。試験した他のペプチドのいずれも、BPに対していかなる測定可能な効果も有しなかったため、効果はRP 220に特異的であった。

【0205】

レナラーゼは、受容体仲介性メカニズムによりその生理学的効果を仲介する(図15を参照されたい)。レナラーゼペプチドのRP 220およびRP H220は、虚血性および中毒性AKIを治療および予防するのに有用な化合物である。RP 220は強力な降圧剤であり、かつ高血圧、および鬱血性心不全などの他の心血管病態を治療および予防するのに有用である。

【0206】

実施例3：急性腎虚血は、尿中レナラーゼ分泌を減少させる

急性腎虚血が、血液、血清、血漿、および尿におけるレナラーゼレベルの減少として検出され得る、レナラーゼの腎臓内分泌の減少をもたらすことを実証する実験を行った(図16)。

【0207】

実施例4：レナラーゼは血圧を下げ、かつカテコールアミン代謝から独立している受容体仲介性メカニズムを介して急性腎損傷を防御する

本明細書において記載されるデータは、レナラーゼ、およびアミノオキシダーゼ活性を欠いているレナラーゼペプチドがAKTおよびMAPK経路を介してシグナルを伝達すること、ならびに該ペプチドが組換えレナラーゼの細胞防御的および血行力学的な作用を十分に模倣することを実証している。

【0208】

大腸菌(E Coli)内でGST融合タンパク質として合成された組換えレナラーゼタンパク質は、アミノオキシダーゼ活性を有すること、ならびにエピネフリン、ノルエピネフリン、およびドーパミンをインビトロで代謝することが示されている。組換えレナラーゼタンパク質は、齧歯類に注射した場合に、血圧の著しい減少を引き起こした(Xu et al., 2005, J Clin Invest 115: 1275-1280)。その後、組換えレナラーゼは十分な活性のためにNAD(P)Hを必要とすること、およびエピネフリン(レナラーゼの好ましい基質)代謝の速度はNADHの存在下で18倍増加することが示された。

【0209】

推定上のアミノオキシダーゼドメインの大部分を欠いているレナラーゼアイソフォーム3~7は、アイソフォーム1および2よりも有意に短く、かつオキシダーゼ活性を有する可能性は低い。RP-220は、最初の4個のエクソンを欠いている最も短いアイソフォーム7を含めて、すべてのレナラーゼアイソフォームにおいて保存されている。アイソフォーム1およびRP-220は、PI3KおよびMAPK経路を介して急速にシグナルを伝達して、AKT、ERK、およびp38を活性化するが、これは、それらが両方とも、特異的細胞表面受容体に結合することによって作用するという説明と合致する。AKTおよびERKの活性化は、一般的に、虚血性AKIにおいて防御的である(Arany and Safirstein, 2003, Semin Nephrol 23: 460-464)。AKTおよびERKの両方の薬理的阻害は、虚血性AKIに対するRP-220の防御効果を無効にし、これは、虚血性損傷におけるそれらの防御的役割を裏付けた。

【0210】

虚血性心損傷および虚血性AKIの場合のように、レナラーゼ欠損はシスプラチンによるAKIを増悪させる。レナラーゼおよびRP-H220は、シスプラチンによるAKIを防御する。この意味では、レナラーゼおよびそれに由来するペプチドは、ストレス下での細胞死につながる経路を阻止する全般的な生存因子として作用する。それらの経路の中での主たるものは、MAPKおよびAKTである (Safirstein, 2004, Int Suppl: S62-66; Arany and Safirstein, 2003, Semin Nephrol 23: 460-464)。ERKおよびJNKの活性化間のバランスを、ERKおよびAKTのより大きな活性化へ移行することによって、細胞は、オキシダント、つまり有害な曝露に抵抗し得る (Arany et al., 2004, Kidney Int. 65: 1231-1239; Arany et al., 2004, American Journal of Physiology: Renal Physiology 287: F543-549; Pabla and Dong, 2008, Kidney Int 73: 994-1007)。シスプラチン誘導性の細胞死は、マウス近位尿細管細胞において、EGFR/Src/ERKシグナル伝達依存的である。レナラーゼおよびその由来活性ペプチドは、ストレス下での増殖および生存とより古典的に関連する他のペプチドにかなり類似した手法でこれらの経路に関わる。

【0211】

RP-H220は、虚血性AKIに対して、RP-220よりもより効果的であった。HK-2細胞において該2種のペプチドのシグナル伝達パターンに差異は検出されなかったものの、AKTおよびMAPKシグナル伝達の全体的パターンにわずかな差異が存在する可能性があり、これが、虚血性AKIにおけるRP-H220のより大きな有効性の主な原因である。RP-220およびRP-H220の防御効果の差異についての代替的なかつおそらくより可能性が高い説明は、それらの血行力学的効果における著しい差異である。RP-220は血圧を低下させ、一方でRP-H220は低下させない。RP-220によって誘導された血圧低下は、腎血流量を落としかつその細胞防御効果を部分的に弱めると考えられる。

【0212】

本明細書において記載されるように、RP-220およびRP-H220は両方とも細胞防御的であるが、RP-220のみが血圧を減少させる。これらの観察結果は、該2種のペプチドが、異なるシグナル伝達パターンを有する1種のレナラーゼ受容体に結合し得るという説明と合致する。代わりに、それらは、異なるが関連する2種の受容体に結合し得る。急速な血圧の降下は、RP-220が末梢血管拡張を引き起こすことを示唆している。D1様受容体の薬理学的阻害は、RP-220に対する血圧低下応答に効果を有せず、ドーパミン受容体は、RP-220の血行力学的効果を仲介する役割を担わないという説明と合致する。

【0213】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書において記載される結果は、RP-220が、以前に特徴付けされたG共役受容体タンパク質 (GPCR)、受容体グアニリルシクラーゼ (RGC)、またはオーファンGPCRおよびオーファンRCGのうちの1種と相互作用することによって血圧を減少させるという説明と合致する。

【0214】

本明細書において記載されることは、その細胞防御的および血行力学的な効果を仲介するレナラーゼ分子の必須の領域を実証している。さらに、これら2つの効果を切り離し得ることが示されている。最後に、レナラーゼは、中毒性および虚血性の損傷を防御すること、ならびにそのアミノキシダーゼ特性によってではなく、むしろ、細胞生存を促進する様式で細胞内シグナル伝達を活性化するまだ同定されていない受容体とのその相互作用によって血圧を下げることを示されている。

【0215】

本実施例で用いられた方法および材料をここに記載する。

【0216】

組換えヒトレナラーゼおよびレナラーゼペプチドの合成および解析

記載されているように (Desir et al., 2012, J Am Heart Assoc. 1: e002634)、ヒト組換えレナラーゼを合成した。レナラーゼペプチドをアミノ末端でアセチル化し、かつ98%均一性まで精製した (United Peptides, Herndon, VA)。以前に記載されているように (Desir et al., 2012, J Am Heart Assoc. 1: e002634)、レナラーゼの酵素活性を測定

した。レナラーゼペプチドRP-220 (hレナラーゼ1のアミノ酸220~239) (Desir et al., 2012, J Am Heart Assoc. 1: e002634) に対して産出された抗レナラーゼモノクローナル抗体を用いて、レナラーゼ発現を検出した。

【0217】

シスプラチンAKIのマウスモデル

シスプラチン (15~20mg/kg) を、WTまたはレナラーゼKOマウスのいずれかに、短時間のイソフルラン麻酔下で腹腔内注射 (IP) によって投与した。動物を3日後に屠殺した。BUNおよびクレアチニン測定のために血液を回収し、かつ組織学的検討、免疫蛍光法 (IF)、およびウェスタンブロット (WB) のために腎臓を採取した。調査動物の同定に対してマスク化された1人の腎臓病理学者が、それぞれの腎臓標本を審査した。尿細管壊死の存在について、病理学的特質を通常の評定尺度 (0~4; 0=なし; 1=<25%; 2=26~50%; 3=51~75%; 4=76~100%) を用いて採点した。腎皮質および腎髄質の形態計測を、ポイントカウント技術を用いて実施した。損傷した尿細管に位置するポイントを計数し、かつ計数された全ポイントについてのパーセンテージとして病変領域のパーセンテージを算出した。

10

【0218】

腎虚血再灌流 (IR) 損傷のマウスモデル

動物実験委員会 (animal care and use committee) による承認後、以前に記載されているように (Lee et al., 2004, American journal of physiology. Renal physiology 286: F298-306)、成体オスC57BL/6 (Harlan Labs, Indianapolis, IN) を、シャム手術に、または30分間の腎虚血、それに続く24時間の再灌流に供した。レナラーゼペプチド (RP-220、RP-H220、およびRP-224) の腎防御効果を試験するために、腎虚血の10~30分前に、マウスを生理食塩水 (ビヒクル) またはレナラーゼペプチド (100 µg皮下) で前処理した。

20

【0219】

シスプラチンおよび過酸化水素の毒性のインビトロモデル

ATTC (Manassas, VA, USA) から得たHK2細胞 (ヒト近位尿細管株) を、グルタミン、10% FBS、および抗生物質を補充したDMEM/F12中で培養し、かつ5% CO2中37℃で維持した。細胞をレナラーゼの存在下または非存在下でシスプラチン (20 µM) に24時間曝露し、かつ細胞生存率をWST1法 (Roche Applied Science, Germany) によって査定した。次いで、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル (Roche Applied Science, Germany) を補充したRIPA緩衝液 (20mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、1mM Na2EDTA、1mM EGTA、1% NP-40、1% デオキシコール酸ナトリウム、2.5mM ピロリン酸ナトリウム、1mM β-グリセロホスフェート、1mM Na3VO4、1 µg/ml ロイペプチン) 中に細胞を採取した。タンパク質をSDS-PAGEによって分離し、以下の抗体: 抗レナラーゼモノクローナル (Desir et al., 2012, J Am Heart Assoc. 1: e002634; Lee et al., 2013, J Am Soc Nephrol 24: 445-455); 抗カスパーゼ3 (Cell Signaling Technology, MA, USA); および抗Bcl2 (Thermo Scientific, USA) を用いてウェスタンブロットを行った。HK-2細胞 (ATCC, Manassas, VA) における壊死性損傷を2mM H₂O₂ への2~8時間の曝露で誘導し、細胞培養培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を、記載されているように (Lee and Emala, 2002, American journal of physiology. Renal physiology 282: F844-852)、商業的LDHアッセイキット (Promega, Madison, WI) を用いて測定した。

30

40

【0220】

腎機能の測定

イソフルランで麻酔されたマウスから、心穿刺を介してヘパリン化シリンジ内に血液を回収し、その後、遠心分離して血漿を分離した。BUNおよびクレアチニンの測定のために、サンプルをYale O'Brien Kidney Centerに提出した。血漿クレアチニンを、メーカーの指示に従って酵素的creatinine reagentキット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) によって、またはHPLCによって測定した。これらのクレアチニン測定の方法は、Jaffe法に関して生じることが知られている、マウス血漿色原体 (chromagen) からの干渉を大

50

幅に解消する。

【0221】

血圧測定

以前に記載されているように (Desir et al., 2012, J Am Heart Assoc. 1: e002634)、麻酔されたマウスにおいて、収縮期および拡張期の圧力および心拍数を測定した。

【0222】

アポトーシスおよびマクロファージ浸潤の組織学的検出

腎臓のアポトーシスを、WTおよびKOマウスにおいて、メーカーによって提供された指示書に従って、市販のin situ apoptosis kit (EMD Millipore, MA, US) を用いて、記載されているようにTUNEL染色で検出した。腎臓のマクロファージ浸潤を、シスプラチンでの処理またはレナラーゼ処理の72時間後に、抗F4/80 (AbCAM, MA, US) 染色を用いて免疫組織化学により査定した。一次抗体を1:80希釈した。その後、それをHRP接合ラットIgGで検出し、DABで位置を突き止め、DABで対比染色し、かつ樹脂性封入溶剤で封入した。腎臓のTUNEL染色およびマクロファージ浸潤を、皮髄境界部における5枚の無作為に選出された顕微鏡画像視野で定量化した。

10

【0223】

統計解析

適切な場合に、Kruskal-Wallisの順位による一元配置分散分析を用いて、統計的有意性を評価した。Kruskal-Wallis検定により統計的有意性が明らかとなった場合、Mann-Whitney検定を一对比較に用いた。すべてのデータは平均±SEMであり、 $P < 0.05$ の値を統計的に有意な差異として認めた。GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) を用いて、統計解析を行った。

20

【0224】

本実施例の結果をここに記載する。

【0225】

組換えレナラーゼは、オキシダントおよびシスプラチンによる損傷からHK-2細胞を防御する

レナラーゼ欠損は、虚血性AKIを増悪させることが以前に示されている (Lee et al., 2013, J Am Soc Nephrol 24: 445-455)。本調査において、レナラーゼ欠損が、シスプラチンによる中毒性AKI (Safirstein, 2004, Int Suppl: S62-66) を同様に悪化させるかどうかを査定した。シスプラチン (20mg/kg、腹腔内注射による) での処理の3日後、血漿クレアチニンは、WTマウスと比較して、レナラーゼKOマウスにおいて有意により高かった (1.82 ± 0.56 対 0.71 ± 0.02 mg/dl, $n=6$, $P=0.021$) (図17A)。レナラーゼ欠損マウスは、レナラーゼWTマウスと比較して、より悪い組織学的腎損傷を発症させた (図17B)。レナラーゼKOマウスは、WTマウスと比較して、より重度な急性尿細管壊死を示した (損傷スコア = : KO = $56.62 \pm 7.38\%$, $n=6$, WT = 17.07 ± 4.03 , $n=5$; $P=0.0002$)。アポトーシス腎細胞の数 (赤みを帯びた染色) は、WTマウスと比較して、シスプラチン処理したKOマウスにおいて2倍増加した (図17C)。同様に、腎臓のマクロファージ浸潤は、WTマウスと比較して、KOマウスにおいて有意に増加した (茶色の染色) (図17D)。レナラーゼによる腎防御のメカニズムを解明するために、組換えレナラーゼが培養下の細胞を防御し得るかどうかを査定した。HK-2細胞において、組換えレナラーゼは、ビヒクル処理したHK-2細胞と比較して、2mM H_2O_2 で誘導される壊死を有意に低下させた (図18A)。シスプラチンに24時間曝露されたHK-2細胞は、細胞生存率の減少 (図18B、左のパネル) およびレナラーゼ発現の減少 (図18B、右のパネル) を示し、それらの両方とも、外因性レナラーゼの添加によって逆転した。レナラーゼ処理は、カスパーゼ-3活性化を阻害し (図18C)、かつBcl-2発現を増加させた (図18D)。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、これらのインビトロの細胞データは、レナラーゼのインビボにおける防御効果が、循環カテコールアミンの低下によってのみ仲介され得るわけではないという説明と合致する。

30

40

【0226】

50

細胞および臓器の損傷に対するレナラーゼの防御は、その酵素的機能とは無関係である

ヒト組織のPCR (Hennebry, 2010, Mol Psychiatry 15: 234-236) および遺伝子シーケンシングデータ (GENBANK) によって立証されているように、選択的スプライシング (alternative splicing) を受けて少なくとも6種のアイソフォーム (レナラーゼ1~7) を生じる単一レナラーゼ遺伝子 (10個のエクソン) が存在する (図19A)。エクソン6のカルボキシ末端側半分は、これまでのところ検出されている、スプライシングを受けたすべてのアイソフォームに存在している。レナラーゼの結晶構造の検討により、レナラーゼペプチド220および224 (RP-220およびRP-224、図19A) は、タンパク質の外部表面上に位置することが示されている (Milani et al., 2011, J Mol Biol 411: 463-473)。RP-220に対して産生されたモノクローナル抗体は、レナラーゼのアミノキシダーゼ活性を変更しなかったが、一方で該抗体は、CCL-119細胞 (急性リンパ芽球性白血病細胞株、ATCC) に対して細胞毒性があった (図19B)。これらの知見は、エピトープが該抗体に接近可能であり、かつ該タンパク質の外部表面上に位置することを示している。アミノキシダーゼ活性の変更の非存在下での該抗体の細胞毒性効果により、該抗体は、レナラーゼと推定上の結合パートナー、おそらく膜受容体との相互作用を妨げることによって、細胞生存を減少させ得ることも示唆された。

10

【0227】

これらの知見は、RP-220がレナラーゼとその同種受容体との間の接触点となり得るという説明と合致する。ゆえに、RP-220、RP-H220、およびRP-224が、インビトロでレナラーゼの細胞防御作用を模倣するかどうかを試験した。2mM H_2O_2 とインキュベートしたHK-2細胞では、RP-220およびRP-H220の両方とも、2時間および4時間の時点で、ビヒクル処理細胞と比較して壊死を有意に低下させた (図19C)。RP-224も2時間の時点では防御的であったが、4時間の時点では防御的ではなかった。同様の結果が、シスプラチンに24時間曝露されたHK-2に関して得られ、図19Dに示されるように、レナラーゼ、RP-224、RP-220、およびRP-H220は、HK-2細胞の生存を向上させた。

20

【0228】

組換えレナラーゼは、アポトーシス、壊死、および炎症を低下させることによって、虚血性AKIからマウスを防御することが以前に示された (Lee et al., 2013, J Am Soc Nephrol 24: 445-455)。30分間の腎虚血、それに続く24時間の再灌流に供されたWTマウスにおいて、レナラーゼペプチドの有効性を試験した。虚血の30分前に投与されたRP-220およびRP-H220は、腎損傷を低下させた (図19E)。RP-H220はRP-220よりも効果的であったが、一方でRP-224は効果がなかった。これらのペプチドのいずれもいかなる検出可能なアミノキシダーゼ活性またはNADHオキシダーゼ活性も有しておらず (図19F)、レナラーゼのインビトロの細胞防御作用が、カテコールアミンを代謝し得るその能力とは無関係であることを示唆した。

30

【0229】

レナラーゼペプチドの防御効果に必須のAKTおよびMAPK活性化

検出可能なアミノキシダーゼ活性を有しないレナラーゼペプチドが、AKIからマウスを防御することにおいて、組換えレナラーゼと同等に有効であるという知見は、カテコールアミン代謝に関係しないメカニズムの探索につながった。マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナル変換経路は、ホルモン、サイトカイン、および増殖因子を含めた種々のシグナルに対する細胞応答を協調させ (Kyriakis et al., 2012, Physiological Reviews 92: 689-737)、かつ実験的AKIの発症および重症度をモジュレートする (Bonventre and Yang, 2011, The Journal of Clinical Investigation 121: 4210-4221)。したがって、レナラーゼおよび関連ペプチドが、プロテインキナーゼB (AKT) およびMAPKを介してシグナルを伝達するかどうか、ならびにそのようなシグナル伝達が、AKIに対するそれらの防御作用に必須であることを査定した。培養下のHK-2細胞への組換えレナラーゼの添加は、細胞外シグナル制御キナーゼ1および2 (ERK) ならびにp38 MAPKのリン酸化の急速かつ一時的な増加を引き起こした (図20A、左のパネル)。同様に、RP220は、ERK、p38 (図20A、右のパネル)、およびプロテインキナーゼB (AKT) (図20B、左のパネル

40

50

）の急速かつ一時的なリン酸化を誘導した。リン酸化の増加は、RP-H220を添加した1分以内に検出可能であり、60分以内にベースラインへ戻った（図20B、右のパネル）。JNKリン酸化は60分の時点で減少した。同様の結果がRP-220に関して得られた。対照調査において、RP-220のスクランブル版であるRP-Scr220は、AKTおよびMAPKシグナル伝達を活性化しなかった。ERKおよびAKTシグナル伝達の化学的阻害を採用して、これらの分子が、AKIにおけるRP-H220の防御効果の重要な仲介因子であるかどうかを試験した。本明細書における他の箇所で示されるように、RP-H220は、WTマウスにおいて腎虚血性損傷を改善させた。MEK1阻害剤の2'-アミノ3'メトキシフラボン（PD98059）は、該ペプチドの防御作用を完全に無効にした（図20C）。同様の結果が、ウォルトマニンによるPI3K/AKT阻害に関して得られた（図20C）。対照調査において、ペプチドなしで、PD98059またはウォルトマニン単独での前処理は、虚血性WTマウスにおけるAKIの重症度に対して効果を有しなかった（図20C）。これらの結果は、虚血性AKIにおけるレナラーゼの防御効果が、少なくとも部分的に、ERK1/2およびPI3K/AKTシグナル伝達を通して仲介されるという説明と合致する。

10

【0230】

レナラーゼペプチドの血行力学的効果

図19Eに示されるように、RP-H220は、虚血性AKIを防御することにおいて、RP-220よりも効果的であった。2種のペプチド間にMAPKシグナル伝達パターンの差異は検出されなかったため、該ペプチドが全身血行力学に差異的に影響を及ぼすかどうかを査定した。血圧および心拍数に対する2種のペプチドの効果を、麻酔したWTマウスにおいて検討した。図14Aに示されるように、RP-220の1回の静脈内注射は、30秒以内にかつ最大2時間の血圧の強い降下を引き起こした。RP-220の皮下投与も、血圧の降下の出現において30～60分遅れて血圧を減少させた（図21）。著しく対照的に、RP-H220の静脈内注射も皮下注射も、血圧にいかなる効果も有しなかった（図14B）。心拍数は、RP-220処理マウスにおいて5%増加したが、RP-H220投与に関しては変化しなかった（図14C）。RP-241 H220と同様に、RP-224およびRP-Scr220は、血圧および心拍数に対して効果を有しなかった。フェノルドパムによるドーパミン1/5（D1様）受容体の活性化は、レナラーゼの遺伝子およびタンパク質の発現を上方調節することが報告されている（Wang et al., 2012, Hypertension 60）。RP-220の血圧低下効果がD1様受容体を通して仲介されるかどうかを試験するために、D1受容体遮断薬のSCH23390の効果を、WTマウスにおいて判定した。SCH23390での前処理は、RP-220の血圧低下効果を弱めなかった（15分の時点での平均血圧減少：RP-220およびRP-220+ SCH23390について、それぞれ 11.9 ± 0.9 および 10.5 ± 0.9 mmHg, $n=4$, $P=NS$ ）。これらのデータは、RP-220の血圧低下効果がD1様受容体を通して仲介されるわけではないことを示唆している。

20

30

【0231】

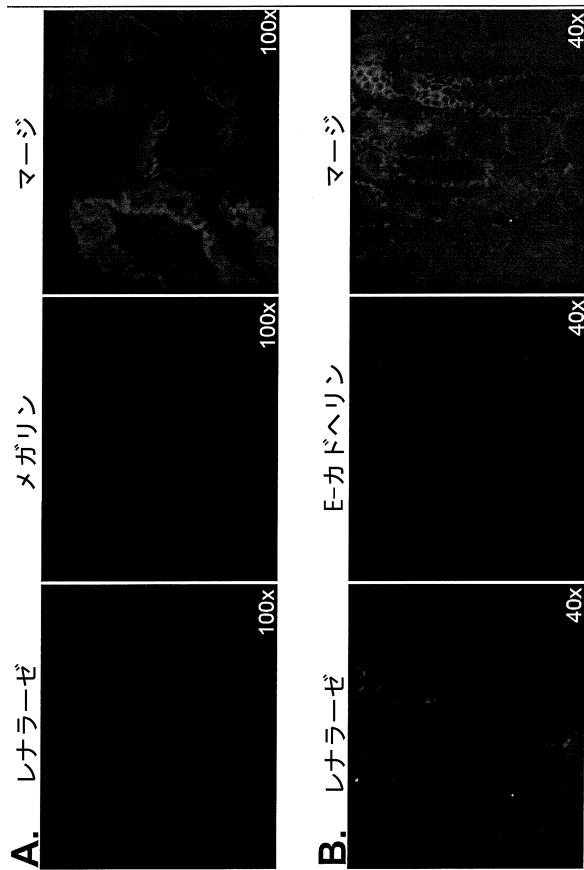
本明細書において引用されるありとあらゆる特許、特許出願、および刊行物の開示は、参照により本明細書においてそれらの全体として本明細書によって組み入れられる。

【0232】

本発明は具体的な態様を参照して開示されているが、本発明の他の態様および変形が、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、他の当業者によって修正され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、すべてのそのような態様および同等の変形を含むと解釈されることを意図する。

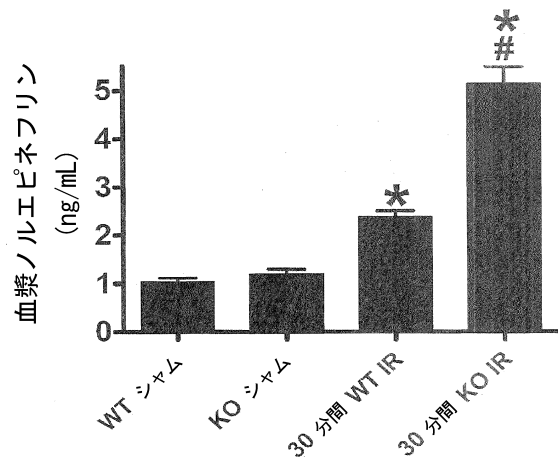
40

【図 1】

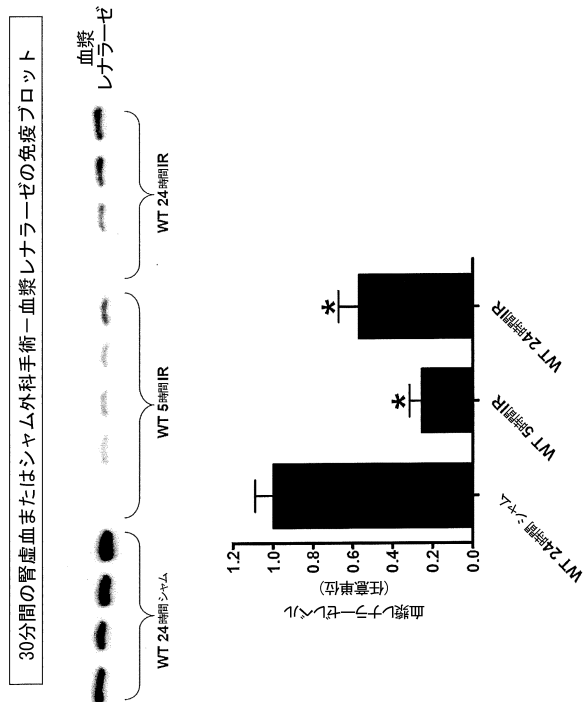


【図 2】

30分間の腎虚血またはシャム外科手術および24時間の再灌流

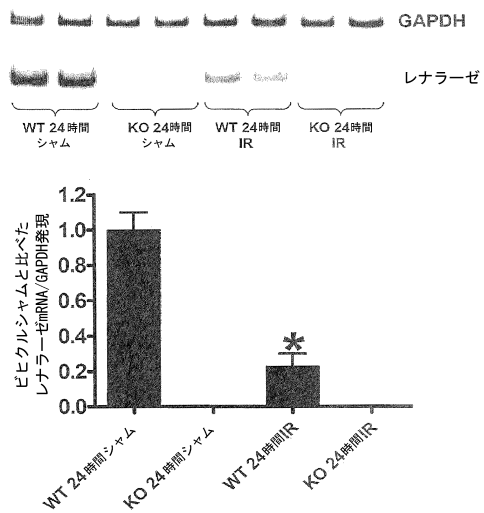


【図 3 A】

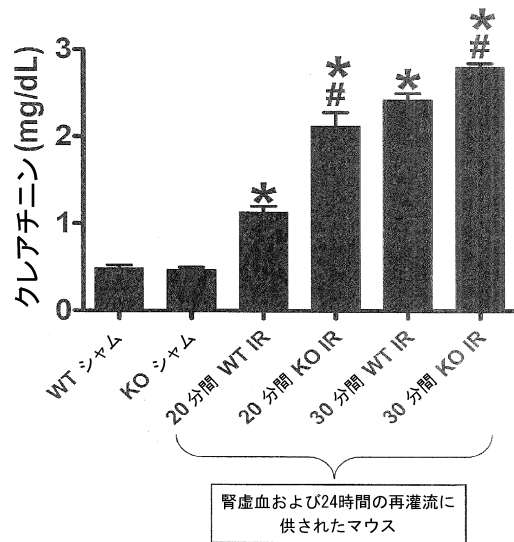


【図 3 B】

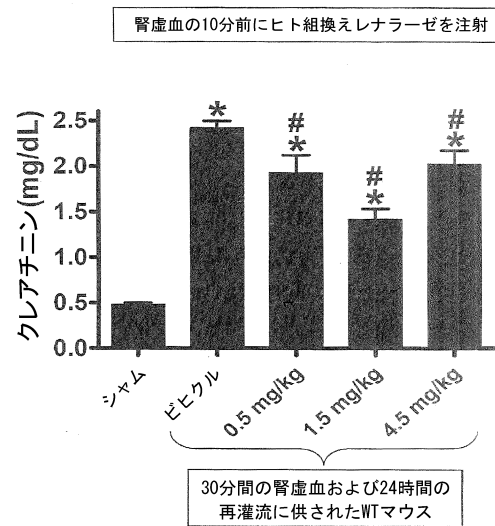
30分間の腎虚血またはシャム外科手術-腎臓レナラーゼmRNAの発現



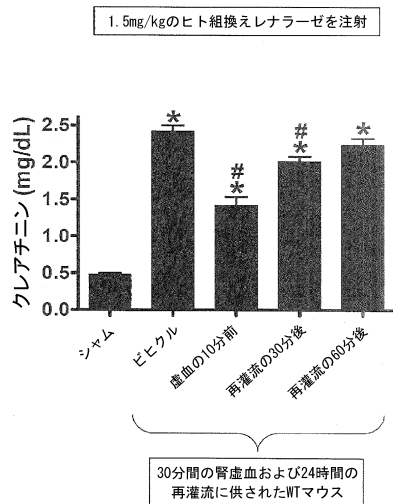
【図 4 A】



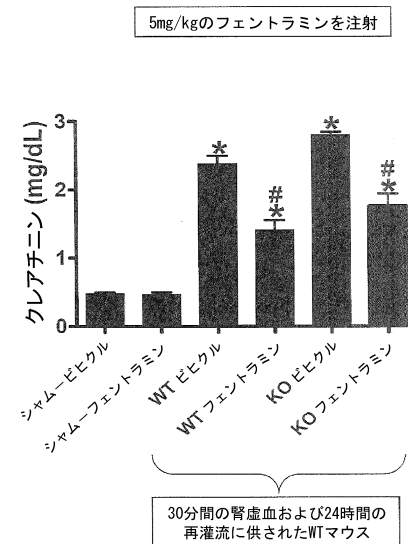
【図 4 B】



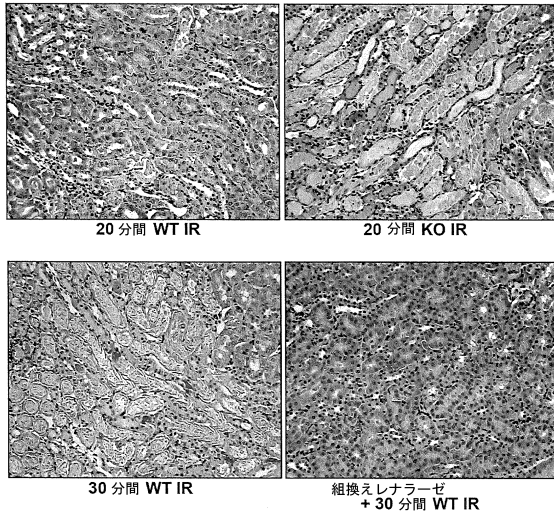
【図 4 C】



【図 4 D】



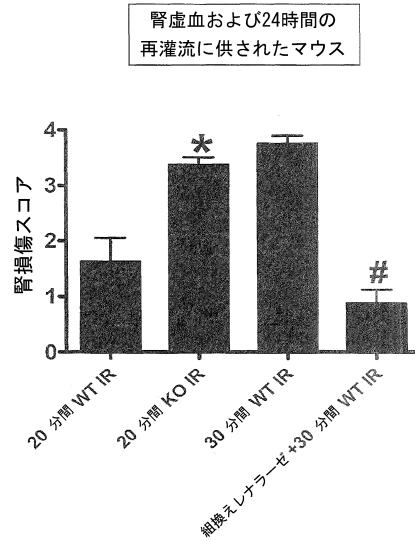
【図 5 A】



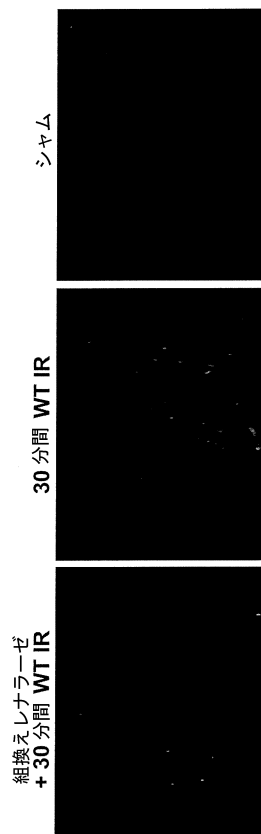
腎虚血および24時間の
再灌流に供されたマウス

H&E (200X)

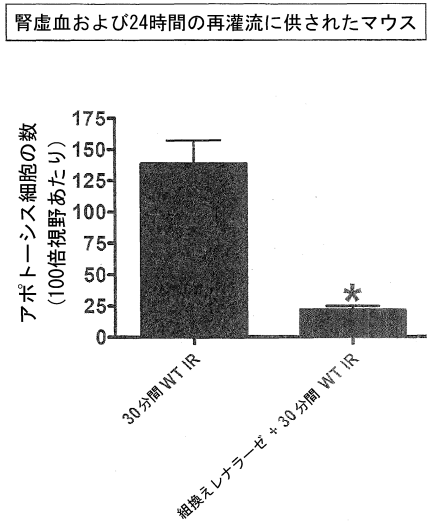
【図 5 B】



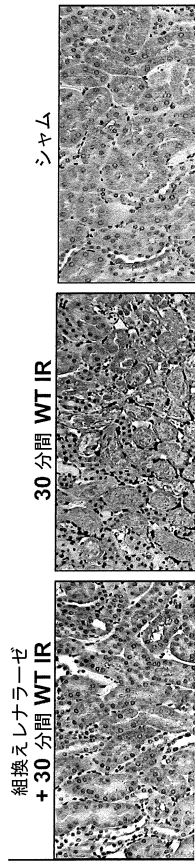
【図 6 A】



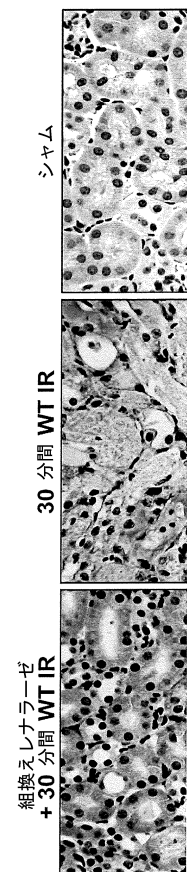
【図 6 B】



【図 7 A】

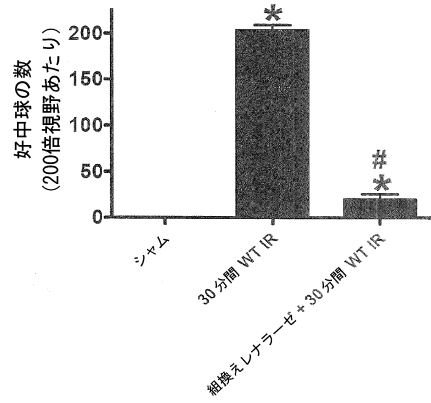


【図 7 C】



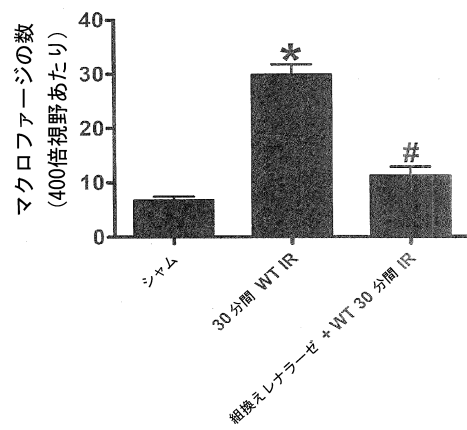
【図 7 B】

腎虚血および24時間の再灌流に供されたマウス

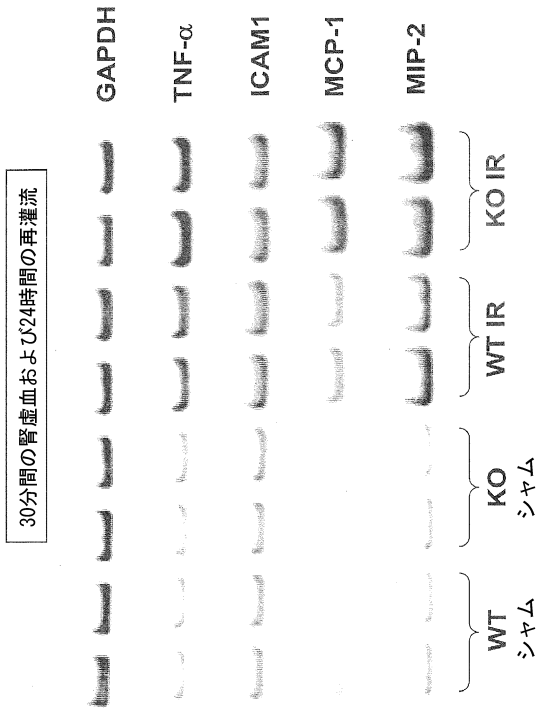


【図 7 D】

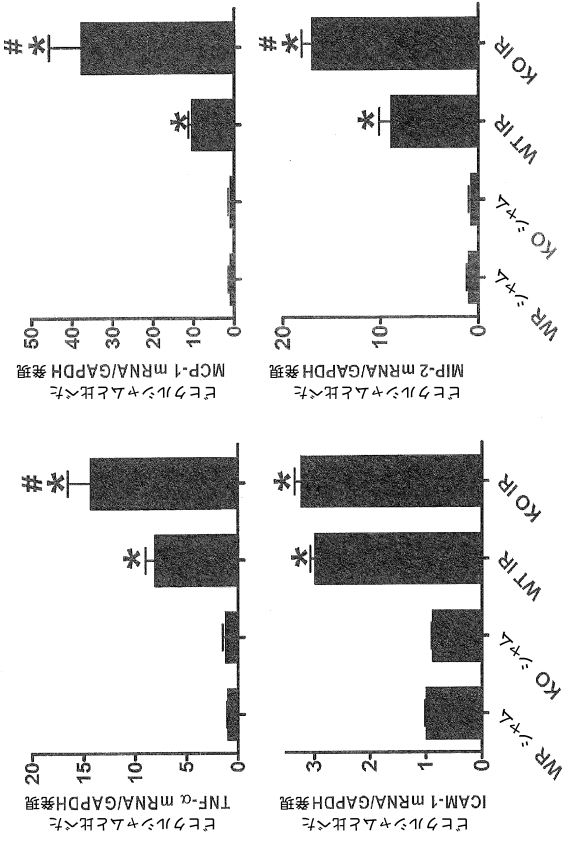
30分間の腎虚血および24時間の再灌流に供されたマウス



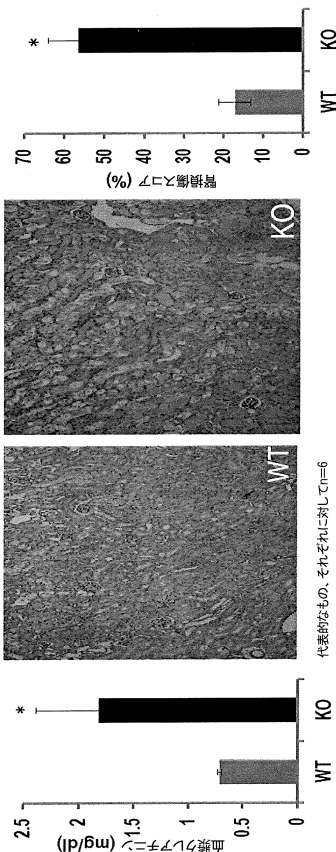
【図 8 A】



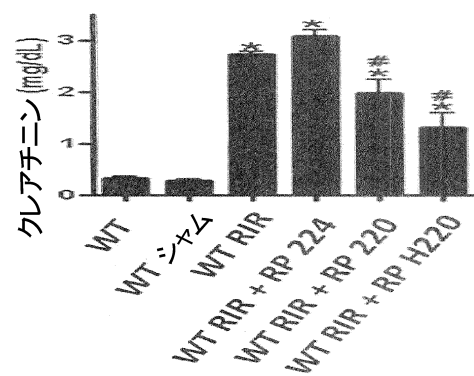
【図 8 B】



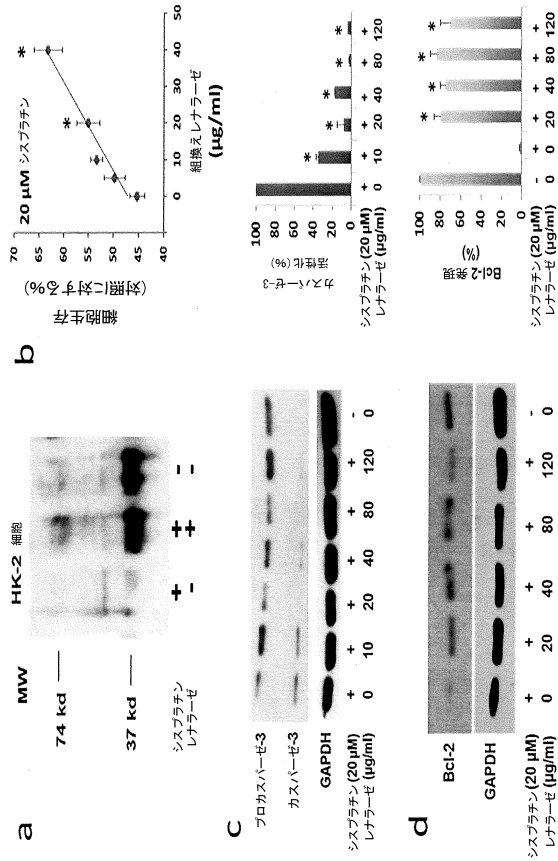
【図 9】



【図 10】



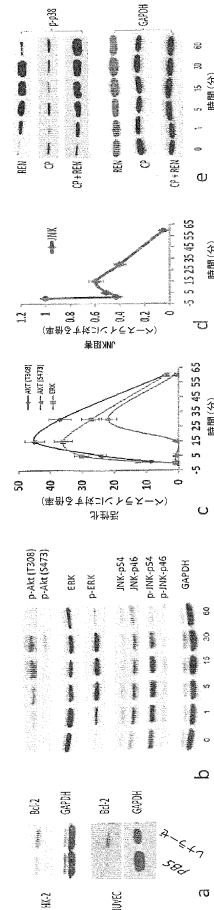
【図 1 1】



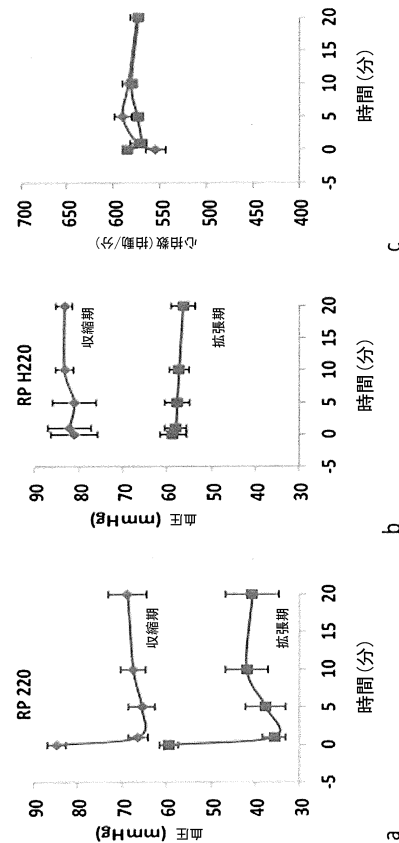
【図 1 3】

RP 224 C-VSIDNKKRNI
 RP 220 CIRFVSIDNKKRNIESSEIG
 RP H220 HHHHHHCIRFVSIDNKKRNIESSEIG
 RP A220 IRFVSIDNAAANIESSEIG
 RP 220 スクランブル型 CSKRIFKVISSIEDNNERG
 RP 128 FRHRVTQINLRDDKWEVSKQ
 RP 19 LLRRQTSGPLYLAVWDKAED

【図 1 2】

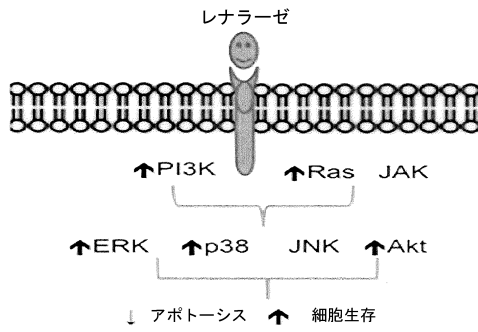


【図 1 4】



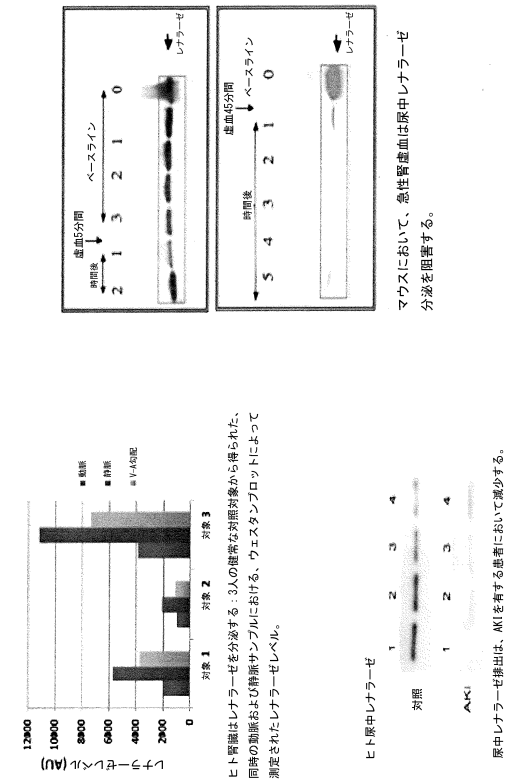
【図 15】

レナラーゼシグナル伝達経路

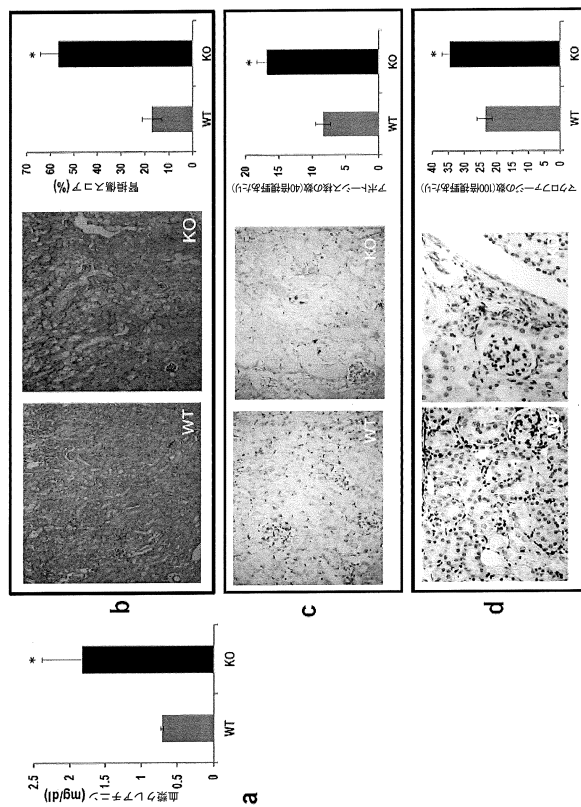


【図 16】

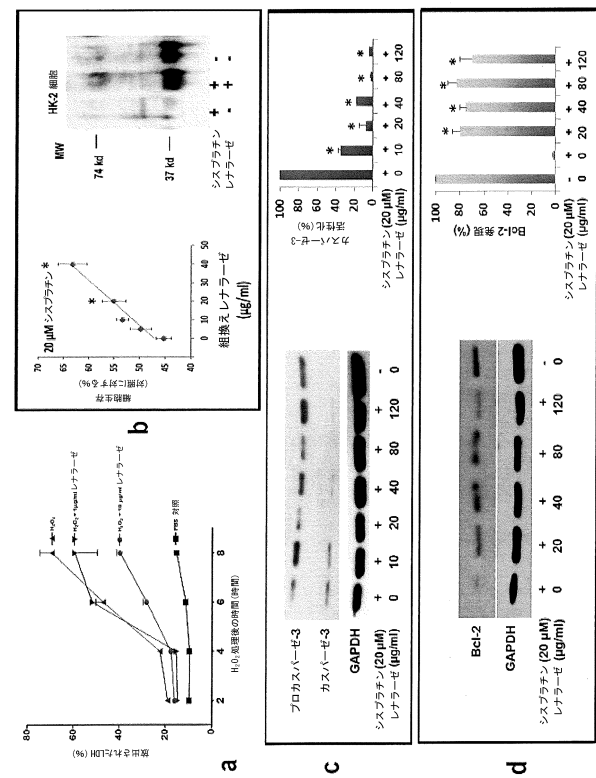
急性腎虚血は尿中レナラーゼ分泌を減少させる



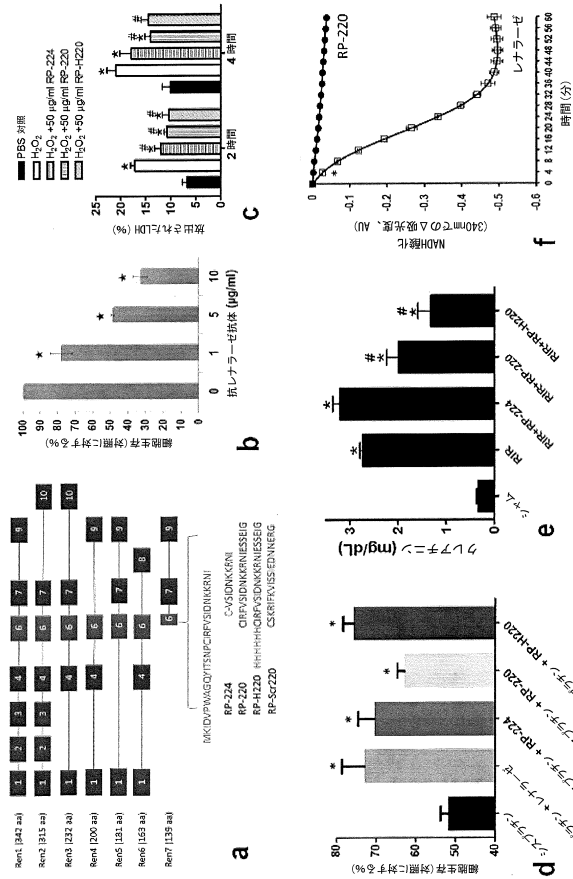
【図 17】



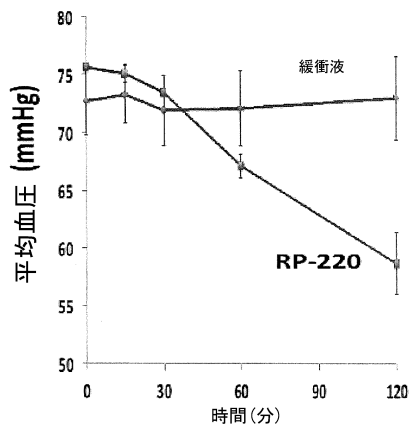
【図 18】



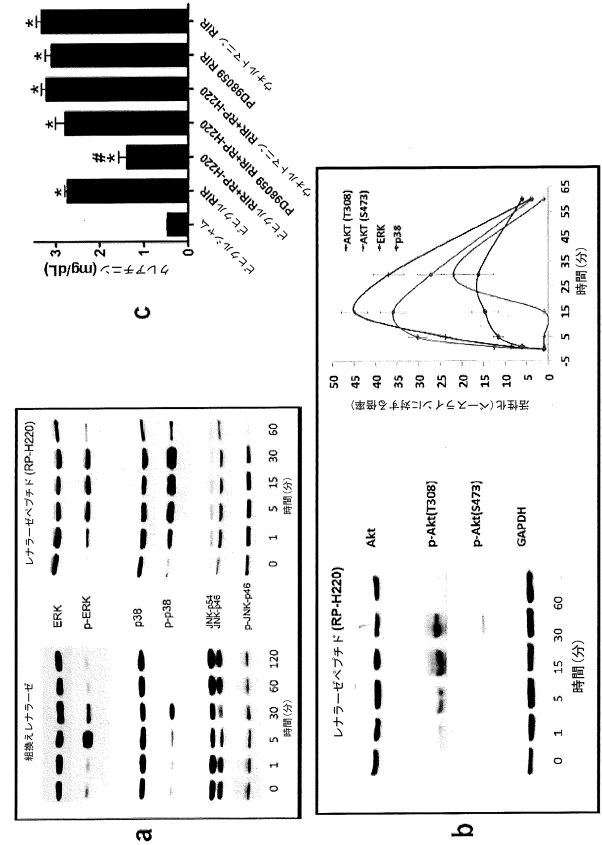
【図 19】



【図 2 1】



【図 20】



【配列表】

0006830458000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/813,778

(32)優先日 平成25年4月19日(2013.4.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 デジール デイリー

アメリカ合衆国 コネチカット州 ウッドブリッジ ザック ヒル ドライブ 11

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 J Clin Invest, 2005年, Vol.115, No.5, p.1275-1280

Exp Ther Med, 2012年 6月, Vol.4, No.3, p.493-496

PLoS One, 2011年, Vol.6, No.1, e14633

Pediatr Nephrol, 2012年 3月, Vol.27, p.719-725

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00

G01N 33/53

A61K 38/00