

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-522824

(P2011-522824A)

(43) 公表日 平成23年8月4日 (2011. 8. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
C 0 7 K 14/58 (2006.01)	C 0 7 K 14/58 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2011-512608 (P2011-512608)	(71) 出願人	501083115
(86) (22) 出願日	平成21年6月3日 (2009.6.3)		メイヨ・ファウンデーション・フォー・メ
(85) 翻訳文提出日	平成23年1月25日 (2011.1.25)		ディカル・エデュケーション・アンド・リ
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/046095		サーチ
(87) 国際公開番号	W02009/149161		アメリカ合衆国、ミネソタ州 5 5 9 0 5
(87) 国際公開日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		、ロチェスター、ファースト・ストリート
(31) 優先権主張番号	61/059, 576		・サウスウエスト 2 0 0
(32) 優先日	平成20年6月6日 (2008.6.6)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラナトリウム利尿ポリペプチドおよび心臓リモデリングを阻害するための方法

(57) 【要約】

CNPのアミノ酸配列およびDNPのC末端配列を含むキメラポリペプチドに関連する物質および方法を開示する。これらのポリペプチドは、ナトリウム排泄増加性および利尿性であり、GFRを増加させ、心臓の負荷を軽減し、レニンを阻害し、BNPと比べると降圧性が低い。また、これらのポリペプチドは心臓線維芽細胞増殖も抑制する。

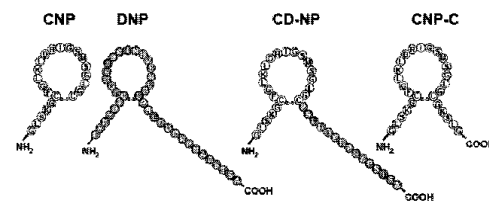
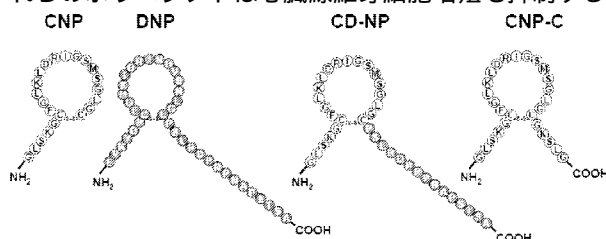


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

心臓リモデリングの軽減を必要とすると確認された対象において心臓リモデリングを軽減させるための方法であって、該方法が、薬学的に許容される担体と該対象の尿中の環状3'5'グアノシンーリン酸(cGMP)レベルおよび血漿中の環状3'5'グアノシンーリン酸(cGMP)レベルを上昇させることができるポリペプチドとを含む組成物を該対象に投与する段階を含み、該組成物が、心臓リモデリングの1つまたは複数のパラメーターのレベルを、該組成物を投与する前の該1つまたは複数のパラメーターのレベルと比べて少なくとも10%変化させるのに有効な量で投与され、該1つまたは複数のパラメーターが、心臓負荷の軽減、糸球体濾過率の上昇、アルドステロンレベルの低下、血漿レニン活性の低下、アンジオテンシンIIレベルの低下、心臓線維芽細胞増殖の低減、左室重量の減少、左室肥大の軽減、心室線維化の軽減、駆出率の上昇、左室収縮終期径の減少、肺毛細血管楔入圧の低下、右心房圧の低下、および平均動脈圧の低下からなる群より選択される、方法。

10

【請求項 2】

ポリペプチドがナトリウム利尿ポリペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

ナトリウム利尿ポリペプチドが、(a)第1のナトリウム利尿ポリペプチドの環構造または該第1のナトリウム利尿ポリペプチドの該環構造の変異体、および(b)第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来するアミノ酸配列または該第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来する該アミノ酸配列の変異体を含むキメラナトリウム利尿ポリペプチドである、請求項2記載の方法。

20

【請求項 4】

ナトリウム利尿ポリペプチドが、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列を含むが、SEQ ID NO:3に示す配列と比べて1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換を有する、請求項2記載の方法。

【請求項 5】

ポリペプチドが、NPR-B受容体およびNRP-A受容体に結合することができる、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

ポリペプチドが、対象への投与後少なくとも15分の消失半減期を有する、請求項1記載の方法。

30

【請求項 7】

組成物を持続静脈内注入として投与する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

1~7日間持続静脈内注入を施す段階を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

持続静脈内注入として組成物を1~7日間投与する段階、および続いて、該組成物を5~30日間皮下投与する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

約0.1ngポリペプチド/kg体重/分~約30ngポリペプチド/kg体重/分の用量で持続静脈内注入として組成物を投与する段階、および続いて、約10ngポリペプチド/kg体重/日~約30ngポリペプチド/kg体重/日の用量で該組成物を皮下投与する段階を含む、請求項1記載の方法。

40

【請求項 11】

約0.1ngポリペプチド/kg体重/分~約30ngポリペプチド/kg体重/分の用量で持続静脈内注入として組成物を約3時間~約7日間投与する段階、および続いて、約10ngポリペプチド/kg体重/日~約30ngポリペプチド/kg体重/日の用量で該組成物を約5~約30日間皮下投与する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

対象が、急性心不全または急性心筋梗塞に罹患していると確認されている、請求項1記

50

載の方法。

【請求項 1 3】

再灌流の時点もしくはそれに近い時点に開始する持続静脈内注入を施す段階を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 1 4】

組成物が、再灌流開始後約3時間目から投与される、請求項12記載の方法。

【請求項 1 5】

組成物が、再灌流後約3時間目～約12時間目に投与される、請求項12記載の方法。

【請求項 1 6】

約1ngポリペプチド/kg体重/分～約30ngポリペプチド/kg体重/分の用量で組成物を投与する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 7】

対象の心臓リモデリングの1つまたは複数のパラメーターのレベルをモニターする段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 8】

薬学的に許容される担体と対象の尿中cGMPレベルおよび血漿中cGMPレベルを上昇させることができるポリペプチドとを含む組成物であって、該組成物が、心臓リモデリングの軽減を必要とすると確認された対象に投与された場合に心臓リモデリングの軽減をもたらし、心臓リモデリングの軽減または抑制が、心臓負荷の軽減、糸球体濾過率の上昇、アルドステロンレベルの低下、血漿レニン活性の低下、アンジオテンシンIIレベルの低下、心臓線維芽細胞増殖の低減、左室重量の減少、左室肥大の軽減、心室線維化の軽減、駆出率の上昇、左室収縮終期径の減少、肺毛細血管楔入圧の低下、右心房圧の低下、および平均動脈圧の低下からなる群より選択される1つまたは複数のパラメーターのレベルの変化によって示され、該1つまたは複数のパラメーターのレベルが、投与する前の該1つまたは複数のパラメーターのレベルと比べて少なくとも10%変化している、組成物。

【請求項 1 9】

ポリペプチドがナトリウム利尿ポリペプチドである、請求項18記載の組成物。

【請求項 2 0】

ナトリウム利尿ポリペプチドが、(a)第1のナトリウム利尿ポリペプチドの環構造または該第1のナトリウム利尿ポリペプチドの該環構造の変異体、および(b)第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来するアミノ酸配列または該第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来する該アミノ酸配列の変異体を含むキメラナトリウム利尿ポリペプチドである、請求項19記載の組成物。

【請求項 2 1】

ナトリウム利尿ポリペプチドが、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列を含むが、SEQ ID NO:3に示す配列と比べて1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換を有する、請求項19記載の組成物。

【請求項 2 2】

ポリペプチドが、NPR-B受容体およびNRP-A受容体に結合することができる、請求項18記載の組成物。

【請求項 2 3】

ポリペプチドが、対象への投与後少なくとも15分の消失半減期を有する、請求項18記載の組成物。

【請求項 2 4】

ナトリウム利尿ポリペプチドが、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列に対して91～98%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項18記載の組成物。

【請求項 2 5】

ナトリウム利尿ポリペプチドが、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含むが、SEQ ID NO:3に示す配列と比べて1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換を有する、請求項18記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

対象が、急性心不全または急性心筋梗塞に罹患していると確認されている、請求項18記載の組成物。

【請求項 27】

薬学的担体が生理食塩水または糖液である、請求項18記載の組成物。

【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、2008年6月6日に提出された米国特許仮出願第61/059,576号の優先権の恩典を主張するものである。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所(National Institutes of Health)によって授与された助成金番号HL76611-03およびHL36634-20のもとで、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本書類は、ナトリウム利尿ペプチドを含む組成物、ならびに心臓リモデリングを防止、軽減、および/または抑制するため、ならびに心筋梗塞(MI)後の虚血傷害を防止、軽減、および/または抑制するためにナトリウム利尿ペプチドを使用するための方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

ナトリウム利尿ペプチドファミリーには、心臓ホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、およびマンバ(Dendroaspis)ナトリウム利尿ペプチド(DNP)が含まれ、これらはいずれも、十分に特徴付けられている粒子性グアニリルシクラーゼ受容体(すなわち、ANPおよびBNPに対してはNPR-A;CNPに対してはNPR-B)およびセカンドメッセンジャーである環状3'5'グアノシン-リン酸(cGMP)を介して機能する(Kuhn (2003) Circ Res93:700-709 (非特許文献1); Tawaragi et al. (1991) Biochem Biophys Res Commun 175:645-651 (非特許文献2); およびKomatsu et al. (1991) Endocrinology 129:1104-1106 (非特許文献3))。CNPは、有益な血管特性および抗増殖特性を有する。腎臓の作用が不足している間、CNPはANPおよびBNPよりも降圧性が低い、静脈拡張の寄与により、心臓の負荷を軽減する。DNPは、著しく降圧性である、強力なナトリウム排泄増加性かつ利尿性のペプチドである。CNPおよびDNPは、別々のグアニリルシクラーゼ受容体を介して機能する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Kuhn (2003) Circ Res93:700-709

【非特許文献2】Tawaragi et al. (1991) Biochem Biophys Res Commun 175:645-651

【非特許文献3】Komatsu et al. (1991) Endocrinology 129:1104-1106

【発明の概要】

【0006】

概要

本書類は、キメラペプチド組成物の同定および2つの異なるナトリウム利尿ペプチドの有益な特性を組み合わせる方法に部分的に基づく。本明細書において説明するように、CN

(GLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC; SEQ ID NO:1)

とDNP

DNPのアミノ酸(AA)15個の直鎖状C末端

(PSLRDPRPNAPSTSA; SEQ ID NO:2)

との融合により、インビボでナトリウム排泄増加性かつ利尿性であり、GFRを増大させ、心臓の負荷を軽減し、レニンを阻害し、降圧特性が最小限である合成キメラペプチド(CD-NP)がもたらされる。さらに、心臓線維芽細胞(CF)におけるインビトロ研究によって実証されたように、CD-NPはcGMP活性化特性および抗増殖特性を有する。さらに、他のナトリウム利尿ポリペプチドおよびキメラポリペプチドを本開示に従って使用することもできる。本明細書において開示する知見は、天然のナトリウム利尿ペプチドに付随する特性よりも好ましい可能性がある特性を有し、かつ、急性心不全(AHF)、急性心筋梗塞(AMI)、再灌流傷害、虚血傷害、および心臓リモデリングなどの心腎疾患状態を治療するために潜在的に有益な有効性および安全性を有する治療用ペプチドを作り出すための、ナトリウム利尿ペプチド薬物の発見および開発における革新的な設計戦略を進歩させるものである。

10

【0007】

1つの局面において、本書類は、それを必要とすると確認された対象において心臓リモデリングを軽減させるための方法の特徴とし、この方法は、薬学的に許容される担体ならびに対象の尿中cGMPレベルおよび血漿中cGMPレベルを上昇させることができるポリペプチドを含む組成物を対象に投与する段階を含み、この組成物は、心臓リモデリングの1つまたは複数のパラメーターのレベルを、この組成物を投与する前の1つまたは複数のパラメーターのレベルと比べて少なくとも10%変化させるのに有効な量で投与され、これら1つまたは複数のパラメーターは、心臓負荷の軽減、糸球体濾過率の上昇、アルドステロンレベルの低下、血漿レニン活性の低下、アンジオテンシンIIレベルの低下、心臓線維芽細胞増殖の低減、左室重量の減少、左室肥大の軽減、心室線維化の軽減、駆出率の上昇、左室収縮終期径の減少、肺毛細血管楔入圧の低下、右心房圧の低下、および平均動脈圧の低下からなる群より選択される。

20

【0008】

ポリペプチドはナトリウム利尿ポリペプチドでよい。ナトリウム利尿ポリペプチドは、(a)第1のナトリウム利尿ポリペプチドの環構造または第1のナトリウム利尿ポリペプチドの環構造の変異体、および(b)第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来するアミノ酸配列または第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来するアミノ酸配列の変異体を含むキメラナトリウム利尿ポリペプチドでよい。ナトリウム利尿ポリペプチドは、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列を含んでよいが、SEQ ID NO:3に示す配列と比べて1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換を有してよい。このポリペプチドは、NPR-B受容体およびNRP-A受容体に結合することができる。このポリペプチドは、対象への投与後少なくとも15分の消失半減期を有し得る。

30

【0009】

方法は、持続静脈内注入(例えば、1~7日間)として組成物を投与する段階を含んでよい。方法は、持続静脈内注入として組成物を1~7日間投与する段階、および続いて、組成物を5~30日間皮下投与する段階を含んでよい。方法は、約0.1ngポリペプチド/kg体重/分~約30ngポリペプチド/kg体重/分の用量で持続静脈内注入として組成物を投与する段階、および続いて、約10ngポリペプチド/kg体重/日~約30ngポリペプチド/kg体重/日の用量で組成物を皮下投与する段階を含んでよい。方法は、約0.1ngポリペプチド/kg体重/分~約30ngポリペプチド/kg体重/分の用量で持続静脈内注入として組成物を約3時間~約7日間投与する段階、および続いて、約10ngポリペプチド/kg体重/日~約30ngポリペプチド/kg体重/日の用量で組成物を約5~約30日間皮下投与する段階を含んでよい。

40

【0010】

対象は、急性心不全または急性心筋梗塞に罹患していると確認され得る。方法は、再灌

50

流の時点もしくはそれに近い時点、または再灌流開始後約3時間目から持続静脈内注入を施す段階を含んでよい。組成物は、再灌流後約3時間目～約12時間目に投与され得る。方法は、約1ngポリペプチド/kg体重/分～約30ngポリペプチド/kg体重/分(例えば、約10ngポリペプチド/kg体重/分、約12.5ngポリペプチド/kg体重/分、約15ngポリペプチド/kg体重/分、約17.5ngポリペプチド/kg体重/分、または約20ngポリペプチド/kg体重/分)の用量で組成物を投与する段階を含んでよい。方法は、対象の心臓リモデリングの1つまたは複数のパラメーターのレベルをモニターする段階をさらに含んでもよい。

【0011】

別の局面において、本書類は、薬学的に許容される担体ならびに対象の尿中cGMPレベルおよび血漿中cGMPレベルを上昇させることができるポリペプチドを含む組成物を特徴とし、この組成物は、それを必要とすると確認された対象に投与された場合、心臓リモデリングの軽減をもたらし、心臓リモデリングの軽減または抑制は、心臓負荷の軽減、糸球体濾過率の上昇、アルドステロンレベルの低下、血漿レニン活性の低下、アンジオテンシンIIレベルの低下、心臓線維芽細胞増殖の低減、左室重量の減少、左室肥大の軽減、心室線維化の軽減、駆出率の上昇、左室収縮終期径の減少、肺毛細血管楔入圧の低下、右心房圧の低下、および平均動脈圧の低下からなる群より選択される1つまたは複数のパラメーターのレベルの変化によって示され、これら1つまたは複数のパラメーターのレベルは、投与する前の1つまたは複数のパラメーターのレベルと比べて少なくとも10%変化している。

【0012】

ポリペプチドはナトリウム利尿ポリペプチドでよい。ナトリウム利尿ポリペプチドは、(a)第1のナトリウム利尿ポリペプチドの環構造または第1のナトリウム利尿ポリペプチドの環構造の変異体、および(b)第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来するアミノ酸配列または第2のナトリウム利尿ポリペプチドに由来するアミノ酸配列の変異体を含むキメラナトリウム利尿ポリペプチドでよい。ナトリウム利尿ポリペプチドは、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列を含んでよいが、SEQ ID NO:3に示す配列と比べて1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換を有してよい。ポリペプチドは、NPR-B受容体およびNRP-A受容体に結合することができる。このポリペプチドは、対象への投与後少なくとも15分の消失半減期を有し得る。ナトリウム利尿ポリペプチドは、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列に対して91～98%同一であるアミノ酸配列を含んでよい。ナトリウム利尿ポリペプチドは、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含んでよいが、SEQ ID NO:3に示す配列と比べて1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換を有してよい。対象は、急性心不全または急性心筋梗塞に罹患していると確認され得る。薬学的担体は通常の生理食塩水または糖液でよい。

【0013】

他に規定されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が関連する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において説明するものと同様または等価な方法および物質が本発明を实践するために使用され得るが、適切な方法および物質は後述する。本明細書において言及される刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はすべて、その全体が参照により組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先される。さらに、物質、方法、および実施例は、例示にすぎず、限定することを意図しない。

【0014】

本発明の1つまたは複数の態様の詳細は、添付図面および下記の説明において示す。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

(図1) CNP(SEQ ID NO:1)、DNP(SEQ ID NO:17)、アミノ酸37個のキメラナトリウム利尿ペプチドであるCD-NP(SEQ ID NO:3)、およびCNP-Cと呼ばれるアミノ酸27個の「形質転換」CNP(SEQ ID NO:4)のアミノ酸配列および構造を示す図である。

(図2) 正常なイヌ(n=6)のナトリウム尿排泄(UNaV; 図2A)および尿量(UV; 図2B)に対

10

20

30

40

50

するDNPのC末端の効果の例を示す一組のグラフである。データは平均値 \pm SEとして表している。C末端:42ng/kg/分のC末端を静脈内注入。 * ベースラインに対して $P<0.05$ 。

(図3) 正常なイヌ($n=6$)の平均動脈圧(MAP;図3A)、右心房圧(RAP;図3B)および肺毛細管圧(PCWP;図3C)に対するCD-NPの効果の例を示す一連のグラフである。データは平均値 \pm SEとして表している。CD-NP 10:10ng/kg/分の用量のCD-NP;CD-NP 50:50ng/kg/分の用量のCD-NP;CD-NP 100:100ng/kg/分の用量のCD-NP。 * ベースラインに対して $P<0.05$ 。

(図4) 正常なイヌ($n=6$)のナトリウム尿排泄(UNaV;図4A)、尿量(UV;図4B)、および糸球体濾過率(GFR;図4C)に対するCD-NPの効果の例を示す一連のグラフである。データは平均値 \pm SEとして表している。CD-NP 10:10ng/kg/分の用量のCD-NP;CD-NP 50:50ng/kg/分の用量のCD-NP;CD-NP 100:100ng/kg/分の用量のCD-NP。 * ベースラインに対して $P<0.05$ 。

(図5) 正常なイヌ($n=6$)の近位ナトリウム再吸収率(PFRNa;図5A)および遠位ナトリウム再吸収率(DFRNa;図5B)に対するCD-NPの効果の例を示す一組のグラフである。データは平均値 \pm SEとして表している。CD-NP 10:10ng/kg/分の用量のCD-NP;CD-NP 50:50ng/kg/分の用量のCD-NP;CD-NP 100:100ng/kg/分の用量のCD-NP。 * ベースラインに対して $P<0.05$ 。

(図6) 正常なイヌの2群(各群 $n=6$)における2種類の用量のCD-NPおよび等モル用量のヒトBNPの効果の例を示す一組のグラフである。図6Aは平均動脈圧(MAP)に対するCD-NPの効果を示し、図6Bは糸球体濾過率(GFR)に対するCD-NPの効果を示す。黒い棒:CD-NP;白い棒:BNP。データは平均値 \pm SEとして表している。CD-NP 10:10ng/kg/分の用量のCD-NP、または他の群では等モル用量のBNP;CD-NP 50:50ng/kg/分の用量のCD-NP、または他の群では等モル用量のBNP。 * ベースラインに対して $P<0.05$ 。 † 群間の $P<0.05$ 。

(図7) ヒトCFにおけるCD-NPの効果の例を示す一組のグラフである。図7Aは、ヒトCFにおけるcGMP生成に対するCD-NPの効果を示す。データは平均値 \pm SEとして表している。 * 未処理に対して $P<0.05$; ** CP-NP 10^{-11} Mに対して $P<0.05$; $^{+}$ CD-NP 10^{-8} Mに対して $P<0.05$ 。図7Bは、ヒトCFにおけるCD-NPの抗増殖作用の例を示し、比色法によって測定したBrdU取込みを光学密度単位でプロットしている。対照:未処理のヒト心臓線維芽細胞;カルジオトロフィン-1:カルジオトロフィン-1による線維芽細胞の増殖;カルジオトロフィン-1+CD-NP:カルジオトロフィン-1に添加されたCD-NPは線維芽細胞を刺激した。データは平均値 \pm SEとして表している。 * 対照に対して $P<0.05$ 。

(図8) 1つの状態における心筋梗塞(MI)後3週目のラットの左室(LV)重量を示すグラフである。MI:未処置;MI+CDNP:MI後2週間、 1.7×10^{-7} g/kg/分のCD-NPで処置。

(図9) 図9Aは、図に示したようにCD-NPまたはCNPで処置したイヌの血漿中cGMPレベル(左のパネル)、尿中cGMP排泄(中央のパネル)、およびcGMPの正味の腎臓生成量(右のパネル)を示す一連のグラフである。値は平均値 \pm SEMである(CD-NPの場合 $n=9 \sim 10$;CNPの場合 $n=7 \sim 9$)。注入前に対する群内比較(平均値 \pm SEM、 * $P<0.05$ 、 † $P<0.01$)および群間比較($P<0.001$)

を行った。時間はクリアランス中央値(mid-clearance)を示す。図9Bは、図に示したようにCD-NPまたはCNPで処置したイヌの尿量(左のパネル)および尿中ナトリウム排泄(右のパネル)を示す一組のグラフである。値は平均値 \pm SEMである。注入前に対する群内比較(平均値 \pm SEM、 * $P<0.05$ 、 † $P<0.01$)および群間比較($P<0.05$, $P<0.001$)

を行った(CD-NPの場合 $n=10$;CNPの場合 $n=7$)。時間はクリアランス中央値を示す。

(図10) 図10A~10Dは、図に示したようにCD-NPまたはプラセボで処置したヒトにおける血漿中cGMP(図10A)、尿中cGMP排泄(図10B)、ナトリウム排泄増加応答(図10C)、および血圧応答(図10D)を示すグラフである。注入前に対する群内比較(平均値 \pm SEM、 * $P<0.05$ 、 † $P<0.01$)および群間比較($P=0.01$)

を行った。図10Eは、単離されたイヌ糸球体における、NPR-Aアンタゴニスト(1μ M)の不在下または存在下でのCD-NPに対するcGMP応答を示すグラフである。 * ブランクに対して $P<0.05$ 、 † ブランクに対して $P<0.0001$ 。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0016】

詳細な説明

化合物

本書類は、それを必要とする対象においてcGMPレベルを上昇させ、かつ心臓リモデリングを軽減させるために使用され得るナトリウム排泄増加性の化合物および組成物を提供する。本明細書において説明するように、これらの化合物は、NPR-A受容体および/またはNPR-B受容体、場合によってはNPR-C受容体に結合することができる。さらに、これらの化合物は、天然NPよりも長い、対象への投与後の消失半減期を有し得る。いくつかの態様において、本明細書において提供されるこれらの化合物は、ポリペプチドでよい。

10

【0017】

例えば、本書類では、AHF、AMI、再灌流傷害、虚血傷害、および心臓リモデリングを抑制または軽減できる例示的な単離されたナトリウム利尿ポリペプチドを説明する。いくつかの態様において、ナトリウム利尿ペプチドは、特にAMIおよび/またはAHF後の心臓リモデリングおよび虚血傷害を治療、抑制、および/または防止するために使用され得る。本明細書において使用される場合、「ナトリウム利尿ポリペプチド」または「NP」という用語は、天然(天然に存在する、野生型の)NP(例えば、ANP、BNP、CNP、DNP、およびウロジラチン)、天然NPの1つまたは複数の部分、天然NPの変異体、あるいは天然NP、天然NPの部分、または天然NPもしくは天然NPの部分の変異体のキメラを含む。いくつかの態様において、NPは、成熟型の天然NPの部分のみを含む。CNPおよびDNPに由来するアミノ酸配列を含むNPが特に有用であり得るが、他の天然NPおよびキメラNPも本明細書において企図される。

20

【0018】

CNPは、ANPおよびBNPと構造的相同性を共有するが遺伝的には異なる、アミノ酸22個のペプチドである。また、ANPまたはBNPとは違って、CNPはC末端アミノ酸の伸長を欠いており、このことによってナトリウム利尿特性の不足をある程度説明することができる(Clavelle et al. (1993) Am Heart J 1104-1106; およびHunt et al. (1994) J Clin Endocrinol Metab 78:1428-1435)。CNPは、主として、内皮細胞由来のペプチドである(Stingo et al. (1992) Am Heart J H1318-1321; Ogawa et al. (1992) Hypertension 19:809-813; Doi et al. (2001) Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:930-936; Naruko et al. (2005) Arteriosclerosis 181:241-250; Horio et al. (2003) Endocrinology 144:2279-2284; Langenickel et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:4735-4740; およびScotland et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:14452-14457)。単離された静脈輪(venous ring)および動脈輪(arterial ring)において、CNPは静脈中のNPR-B受容体を活性化するのに対し、ANPおよびBNPは動脈と静脈の両方のNPR-A受容体に結合する。これは、ANPおよびBNPと比べてCNPの降圧作用が小さいことと一致している(Wei et al. (1993) Am J Physiol 264:H71-73; Igaki et al. (1998) Hypertens Res 21:7-13; およびLa Villa et al. (1998) Clin Sci (Lond) 95:595-602)。

30

【0019】

静脈拡張特性のほかに、CNPは、CFにおいてANPおよびBNPと比べて強力な抗増殖特性およびコラーゲン抑制特性を有する(Horio et al., 前記)。例えば、AMIに罹患したげっ歯動物において14日間CNPを持続注入すると、心室拡張、心臓線維化、および心筋細胞肥大が著しく減弱することが研究により示されている(Soeki et al. (2005) J Am Coll Cardiol 45:608-616)。CNPの長期注入は、降圧作用をもたらさなかった。

40

【0020】

ANPおよびBNPとは対照的に、CNPはヒトに注入された場合、顕著なナトリウム排泄増加作用および利尿作用を示さない。このことは、魅力的な静脈拡張特性および抗線維化特性はあるものの、AHFのようなナトリウムおよび水を保持する症候群においては有用性を欠くことの説明になり得る(Igaki et al., 前記; およびLa Villa et al., 前記)。

【0021】

50

DNPは、グリーンマンバから最初に単離された。DNPはインビボで強力なナトリウム排泄増加性および利尿性を示し、心臓負荷軽減作用を有するが、顕著な降圧特性を有する(Schweitz et al. (1992) J Biol Chem 267:13928-13932; Lisy et al. (1999) Kidney Int 56:502-508; およびLisy et al. (2001) Hypertension 37:1089-1094)。DNPは、ANPおよびBNPと同様に、NPR-A受容体を介して機能し、ANPが飽和すると、培養されたヒト内皮細胞におけるDNPのcGMP活性化作用は著しく減弱する。実際、ナトリウム利尿および血圧低下を含むDNPのインビボ作用は、NPR-A活性化と一致しており、このような効果はANPおよびBNPの特性を良く模倣しているがCNPの特性は模倣していない。実際、DNPの方が、ANPおよびBNPと比べてヒト心筋中のNPR-A受容体に対する親和性が高いことが示されている(Singh et al. (2006) Circ Res 99:183-190)。

10

【 0 0 2 2 】

DNPは、15個のアミノ酸(AA)からなる、公知のナトリウム利尿ペプチドの中で最も長いC末端を有する。これに対して、ANPのC末端はアミノ酸5個、BNPのC末端はアミノ酸6個であり、CNPはC末端が無い。DNPの長いC末端は、中性エンドペプチダーゼ(NEP)による分解に対してDNPを著しく耐性にし、したがって、その強力なナトリウム排泄増加作用および利尿作用に寄与し得る(Chen et al. (2002) J Am Coll Cardiol 40:1186-1191)。さらに、CNPがC末端を欠くことは、3種の公知の内因性ナトリウム利尿ペプチドの中でCNPがNEP分解に最も影響されやすいという観察結果の説明になり得る。また、NEPは腎臓で最も高発現されるため、C末端を欠くことはCNPの腎臓での作用の説明にもなり得る(KennyおよびStephenson (1988) FEBS Lett 232:1-8)。

20

【 0 0 2 3 】

ウロジラチンは、強力なナトリウム排泄増加活性および利尿活性を有する、NPR-A受容体のANP様アゴニストである。ウロジラチンは腎臓に局在し、ANPと同じ前駆物質から差別的に加工され、尿中に分泌される。ウロジラチンのアミノ酸32個の配列は、ANPのアミノ酸28個の配列全体を含み、N末端にアミノ酸4個の伸長部を有する。

【 0 0 2 4 】

「心臓リモデリング」という用語は、MI、AHF、または他の病態に伴って発生し得る、心臓に対する作用を意味する。これらには、例えば、心臓拡張、筋細胞肥大、および心臓線維化(cardiofibrosis)(すなわち、間質線維芽細胞の増殖)が含まれる。本明細書において提供されるNPは、AMIまたはAHFと共に発生する心臓リモデリングを抑制または予防することができる。いくつかの態様において、心臓リモデリングの軽減を示すパラメーターには次の内の1つまたは複数が含まれ得る:心臓負荷の軽減(すなわち、心臓の減圧)、糸球体濾過率(GFR)の上昇、血漿レニン活性(PRA)の低下、アンジオテンシンIIレベルの低下、心臓線維芽細胞増殖の低減、左室(LV)肥大の軽減、LV重量の減少(線維化および肥大の軽減を示す)、肺毛細血管楔入圧(PWCP;左心房圧の間接的測定)の低下、右心房圧の低下、平均動脈圧の低下、アルドステロンレベルの低下(抗線維化作用を示す)、心室線維化の軽減、駆出率の上昇、およびLV収縮終期径の減少。NPが心臓リモデリングを抑制または軽減できるかどうかを判定するために、例えば、当技術分野において公知の方法および/または本明細書において説明する方法を用いて、(例えば、NPで処置する前または後に)1つまたは複数のこれらのパラメーターを評価することができる。

30

40

【 0 0 2 5 】

AMIおよびAHFなどの病態は、心臓損傷だけでなく腎臓損傷も招き得る。いくつかの態様において、本明細書において提供されるNPはまた、AMIおよびAHFの後の損傷から腎臓を保護することもできる。腎臓保護を示すパラメーターには、例えば、近位ナトリウム再吸収率(PFRNa)の減少、遠位ナトリウム再吸収率(DFRNa)の減少、尿中ナトリウム排泄(UNaV)の増加、および尿量(UV)の増加が含まれる。これらのパラメーターの内の任意の1つまたは複数を(例えば、NPを投与する前または後に)評価して、NPが腎臓保護効果を有するかどうかを判定することができる。これらのパラメーターを評価するための方法は当技術分野において公知であり、また、本明細書においても説明する。

【 0 0 2 6 】

50

「単離されたポリペプチド」という用語は、(1)自然界に存在するタンパク質を伴っていないか、(2)同じ供給源に由来する他のタンパク質を含んでいないか(例えば、ヒトタンパク質を含んでいないか)、(3)異なる種に由来する細胞によって発現されるか、または(4)自然界に存在しない、ポリペプチドを意味する。本明細書において提供される単離されたポリペプチドは、典型的には、10個またはそれ以上(例えば、12個もしくはそれ以上、15個もしくはそれ以上、または20個もしくはそれ以上)のアミノ酸残基を含む。単離されたポリペプチドは、例えば、合成のDNAもしくはRNA、またはそれらの何らかの組合せを含むDNAまたはRNAによってコードされてよい。

【 0 0 2 7 】

キメラNPは、2つまたはそれ以上の個別のNPに由来するアミノ酸配列を含み得る。いくつかの態様において、キメラポリペプチドは、CNPおよびDNPに由来するアミノ酸配列を含んでよい。さらに、場合によっては、キメラNPは、別のNPに由来する1つまたは複数のアミノ酸セグメントと組み合わせて、環構造体およびシステイン結合(例えば、ANP、BNP、CNP、またはDNPの環構造体およびシステイン結合)を含んでよい。例えば、キメラCD-NPは、CNPのアミノ酸22個の配列全体

10

(GLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC; SEQ ID NO:1)

およびDNPのC末端のアミノ酸15個

(PSLRDPRPNAPSTSA; SEQ ID NO:2)

20

を含んでよく、したがって、

SEQ ID NO:3 (GLSKGCFGLKLDRIKMSGLGCPSLRDP RPNAPSTSA)

に示すアミノ酸配列を有し得る。いくつかの態様において、キメラNPは、CNPおよびウロジラチンに由来するアミノ酸配列を含んでよい。例えば、キメラCU-NP は、ウロジラチンのN末端のアミノ酸10個

(TAPRSLRRSS; SEQ ID NO:6)

およびC末端のアミノ酸5個(NSFRY; SEQ ID NO:7)と組み合わせて、CNPの環構造体およびジスルフィド結合

30

(CFGLKLDRIKMSGLGC; SEQ ID NO:5)

を含んでよく、したがって、配列

TAPRSLRRSSCFGLKLDRIKMSGLGCNSFRY (SEQ ID NO:8)

を有し得る。

【 0 0 2 8 】

場合によっては、キメラNPは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:8に対する変異(例えば、置換、付加、または欠失)を1つまたは複数の位置(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の位置)に含んでよい。変異NP、例えば、天然NPアミノ酸配列と比べて1つまたは複数のアミノ酸置換を有するものは、本明細書において説明するようにして調製および改変することができる。一部の態様において、アミノ酸置換は、(a)置換領域のペプチド骨格の構造、(b)標的部位の分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさ高さの維持に対する影響があまり異なる置換を選択することによって行うことができる。例えば、天然に存在する残基は側鎖の特性に基づいて次のグループに分けることができる:(1)疎水性アミノ酸(ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン);(2)中性親水性アミノ酸(システイン、セリン、およびトレオニン);(3)酸性アミノ酸(アスパラギン酸およびグルタミン酸);(4)塩基性アミノ酸(アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、およびアルギニン);(5)鎖の向きに影響するアミノ酸(グリシンおよびプロリン);ならびに(6)芳香族アミノ酸(トリプトファン、チ

40

50

ロシン、およびフェニルアラニン)。これらのグループ内で行われる置換は、保存的置換とみなすことができる。有用な置換の非限定的な例には、非限定的に、バリンによるアラニンの、リジンによるアルギニンの、グルタミンによるアスパラギンの、グルタミン酸によるアスパラギン酸の、セリンによるシステインの、アスパラギンによるグルタミンの、アスパラギン酸によるグルタミン酸の、プロリンによるグリシンの、アルギニンによるヒスチジンの、ロイシンによるイソロイシンの、イソロイシンによるロイシンの、アルギニンによるリジンの、ロイシンによるメチオニンの、ロイシンによるフェニルアラニンの、グリシンによるプロリンの、トレオニンによるセリンの、セリンによるトレオニンの、チロシンによるトリプトファンの、フェニルアラニンによるチロシンの、および/またはロイシンによるバリンの置換が含まれる。

10

【 0 0 2 9 】

変異CD-NPの非限定的な例には以下のものが含まれる。

PLSKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSTSA (SEQ ID NO:9),

GISKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSTSA (SEQ ID NO:10),

GLSKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSTTA (SEQ ID NO:11),

GLSKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSTSV (SEQ ID NO:12),

GLTKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSTSA (SEQ ID NO:13),

GLSRGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSTSA (SEQ ID NO:14),

20

GLSKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSSSA (SEQ ID NO:15), および

GLSKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPTSTA (SEQ ID NO:16)

【 0 0 3 0 】

CD-NP内の任意の位置で行うことができる保存的置換のその他の例を表1に示す。

【 0 0 3 1 】

(表1) 保存的アミノ酸置換の例

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

30

40

【 0 0 3 2 】

50

いくつかの態様において、NPは、1つまたは複数の非保存的置換を含んでよい。非保存的置換は、典型的には、前述したクラスの内の1つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを伴う。このような作製は、大量のこのような化合物またはこのような化合物の代替の態様を提供するために望ましい場合がある。アミノ酸変化により機能的ポリペプチドが生じるかどうかは、そのペプチド変異体の特異的活性を分析することによって容易に決定することができる。

【0033】

保存的置換および/または非保存的置換(例えば、SEQ ID NO:3に対する)を有する変異NP、ならびにSEQ ID NO:3の断片、SEQ ID NO:3の変異体の断片、およびSEQ ID NO:3、SEQ ID NO:3の変異体もしくは断片、またはSEQ ID NO:3の変異体の断片を含むポリペプチドを、本明細書において説明するものを含む任意の適切なアッセイ法によって、生物活性についてスクリーニングすることができる。例えば、本明細書において説明するNPの活性は、本明細書の実施例1および3で説明するようにして、CFによって生成されるcGMPレベルに対するその影響を測定することによって、またはCFの増殖を抑制するその能力を試験することによって、インビトロで評価することができる。また、NPの活性は、例えば、MI誘発後の動物における肺毛細血管楔入圧、右心房圧、平均動脈圧、尿ナトリウム排泄、尿量、近位および遠位のナトリウム再吸収率、血漿レニン活性、血漿中cGMPレベルおよび尿中cGMPレベル、糸球体濾過率、ならびに左室重量などの因子に対するその影響を試験することによって、インビボで評価することもできる。このようなアッセイ法は、例えば、本明細書の実施例1、2、および4において説明する。

【0034】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるNPは、システイン残基間のジスルフィド結合のために、環状であり得る(例えば、図1に示すCD-NP構造を参照されたい)。いくつかの態様において、システイン残基上のスルフヒドリル基は、代替の基(例えば、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)で置換されてよい。スルフヒドリル基を $-\text{CH}_2-$ 基で置換するために、例えば、 $-\text{アミノ酪酸}$ でシステイン残基を置換することができる。このような環状の類似ポリペプチドは、例えば、LeblおよびHrubyの方法論に従って(Tetrahedron Lett., 1984, 25:2067)、または米国特許第4,161,521号に開示する手順を用いることによって、作製することができる。

【0035】

さらに、セリンまたはトレオニンのOHをアスパラギン酸またはグルタミン酸のカルボキシル基と反応させて $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2-$ 構造を有する橋を生じさせることによって、エステル架橋またはアミド架橋を形成させることができる。同様に、リジンの側鎖をアスパラギン酸またはグルタミン酸と反応させて $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH})_4-$ 構造を有する橋を生じさせることによって、アミドを得ることができる。これらの架橋を合成するための方法は当技術分野において公知である(例えば、Schiller et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 127:558およびSchiller et al. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25:171を参照されたい)。他の架橋形成アミノ酸残基および反応は、例えば、米国特許第4,935,492号において提供されている。アミノ酸残基を結合するための非ペプチジル結合を含むペプチド類似体の調製もまた、当技術分野において公知である。例えば、Spatola et al. (1986) Life Sci. 38:1243; Spatola (1983) Vega Data 1(3); Morley (1980) Trends Pharm. Sci. 463-468; Hudson et al. (1979) Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177; Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acid Peptides and Proteins, B. Weinstein編, Marcel Dekker, New York, p. 267(1983); Hann (1982) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:307; Almquist et al. (1980) J. Med. Chem. 23:1392; Jennings-White et al. (1982) Tetrahedron Lett. 23:2533; 欧州特許出願EP 45665; Holladay et al. (1983) Tetrahedron Lett. 24:4401;およびHruby (1982) Life Sci. 31:189を参照されたい。

【0036】

いくつかの態様において、NPは、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列を含んでよいが、特定の数のアミノ酸置換を有してもよい。例えば、NPは、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有

してよく、1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸置換を有してよい。このようなアミノ酸配列の例には、非限定的に、SEQ ID NO:9~16に示すものが含まれる。

【0037】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるNPは、参照NP配列(例えば、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、またはSEQ ID NO:3)のある領域に対する配列同一性が少なくとも85%(例えば、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、97.5%、98%、98.5%、99.0%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、または100%)であるアミノ酸配列を有してよい。配列同一性パーセントは、アラインされたアミノ酸配列中で一致した位置の数を決定し、一致した位置の数をアラインされたアミノ酸の総数で割り、100を掛けることによって算出される。一致した位置とは、アラインされたアミノ酸配列の同じ位置に同一のアミノ酸が存在する位置を意味する。配列同一性パーセントは、任意の核酸配列に関して決定することもできる。

10

【0038】

配列同一性パーセントは、BLASTNバージョン2.0.14およびBLASTPバージョン2.0.14を含むスタンドアロン型のBLASTZのBLAST 2 Sequences (BL2seq)プログラムを用いて、標的核酸配列または標的アミノ酸配列を同定済みの核酸配列またはアミノ酸配列と比較することによって決定される。このスタンドアロン型のBLASTZは、Fish & Richardsonのウェブサイト(fr.com/blast)または米国政府の国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)ウェブサイト(ncbi.nlm.nih.gov)のWorld Wide Webにおいて得ることができる。BL2seqプログラムの使用法を説明する指示は、BLASTZに

20

【0039】

BL2seqは、BLASTNアルゴリズムまたはBLASTPアルゴリズムのいずれかを用いて、2つの配列間の比較を行う。BLASTNは核酸配列を比較するために使用されるのに対し、BLASTPはアミノ酸配列を比較するために使用される。2つの核酸配列を比較する場合、オプションは以下のように設定される:-iは、比較しようとする第1の核酸配列を含むファイル(例えば、C:%seq1.txt)に設定され;-jは、比較しようとする第2の核酸配列を含むファイル(例えば、C:%seq2.txt)に設定され;-pはblastnに設定され;-oは任意の所望のファイル名に設定され(例えば、C:%output.txt);-qは-1に設定され;-rは2に設定され、他のすべてのオプションはデフォルト設定のままにする。次のコマンドにより、2つの配列間の比較を含む出力ファイルが生じる:C:%BL2seq-i c:%seq1.txt -j c:%seq2.txt -p blastn -o c:%output.txt -q -1 -r 2。標的配列が同定済み配列の任意の部分との相同性を有する場合、指定された出力ファイルは、アラインされた配列としてそれらの相同領域を提示すると考えられる。標的配列が同定済み配列の任意の部分との相同性を有さない場合、指定された出力ファイルは、アラインされた配列を提示しないと考えられる。

30

【0040】

アラインされた後で、同定済み配列に由来する配列とのアライメント中で提示され、任意の一致した位置から始まり他の任意の一致した位置で終わる、標的配列に由来する連続したヌクレオチドの数を数えることによって、長さを測定する。一致した位置は、標的配列と同定済み配列の両方において同一のヌクレオチドが提示される任意の位置である。ギャップはヌクレオチドではないため、標的配列中で提示されるギャップは計数されない。同様に、標的配列ヌクレオチドは計数されるが同定済み配列に由来するヌクレオチドは計数されないため、同定済み配列中で提示されるギャップも、計数されない。

40

【0041】

特定の長さにおける同一性パーセントは、その長さにおける一致した位置の数を計数し、その数を長さで割り、続いて、得られた値に100を掛けることによって決定される。例えば、(1)30アミノ酸長である標的配列をSEQ ID NO:3に示す配列と比較し、(2)BL2seqプログラムにより、SEQ ID NO:3に示す配列のある領域とアラインされた標的配列由来のアミノ酸27個が提示され、このアミノ酸27個の領域の最初のアミノ酸および最後のアミノ酸が一致し、かつ(3)このアラインされたアミノ酸27個における一致数が25である場合、ア

50

ミノ酸30個の標的配列は27個の長さを含み、この長さにおける同一性パーセントは92.6(すなわち、 $25 \div 27 \times 100 = 92.6$)である。

【0042】

同定済み配列とアラインする単一の標的アミノ酸配列または標的核酸配列内の異なる領域は、独自の同一性パーセントをそれぞれ有し得ることが理解されるであろう。同一性パーセントの値は、一番近い小数点以下1桁の値(tenth)に四捨五入されることに留意されたい。例えば、78.11、78.12、78.13、および78.14は、78.1に切り下げられ、78.15、78.16、78.17、78.18、および78.19は、78.2に切り上げられる。また、長さの値が常に整数であることにも留意されたい。

【0043】

単離されたポリペプチドは、固相合成を含む任意の適切な方法を用いて作製することができ、手作業の技術または自動化技術を用いて作製することができる(例えば、Applied Biosystems (Foster City, CA)社製のPeptide SynthesizerまたはBiosearch Inc. (San Rafael, CA)社製の自動ペプチド合成機を使用)。システイン残基間のジスルフィド結合は、例えば、米国特許第4,757,048号において教示されているように、KCNを用いた直鎖状ポリペプチドの緩和な酸化によって導入することができる。また、NPは後述するように組み換えによって作製することもできる。

【0044】

ポリペプチドのカルボキシル基の塩は、そのペプチドを1当量または複数当量(one or more equivalents)の所望の塩基、例えば、金属水酸化物塩基(例えば、水酸化ナトリウム)、金属炭酸塩塩基もしくは金属重炭酸塩塩基(例えば、炭酸ナトリウムもしくは重炭酸ナトリウム)、またはアミン塩基(例えば、トリエチルアミンおよびトリエタノールアミンなど)と接触させることによって調製することができる。ポリペプチドの酸付加塩は、そのポリペプチドを1当量または複数当量の無機酸または有機酸(例えば、塩酸)と接触させることによって調製することができる。

【0045】

ポリペプチドのカルボキシル基のエステルは、カルボン酸または前駆体をエステルに変換するための任意の適切な手段(例えば、当技術分野において公知の手段)を用いて調製することができる。例えば、本発明のポリペプチドのエステルを調製するための1つの方法は、メリフィールド合成技術を用いる場合、樹脂に応じて塩基性条件下または酸性条件下のいずれかで、完成されたポリペプチドを所望のアルコールの存在下で樹脂から切断するものである。その際、樹脂から離す際に、遊離酸を単離せずに、このポリペプチドのC末端を直接エステル化することができる。

【0046】

ポリペプチドのアミドは、カルボン酸基または前駆体をアミドに変換するための技術(例えば、当技術分野において公知の技術)を用いて調製することができる。C末端カルボキシル基においてアミド形成させるための1つの方法は、適切なアミンを用いて固体支持体からポリペプチドを切断するか、またはアルコールの存在下で切断して、エステルを生じさせ、続いて、所望のアミンとのアミノリシスを起こさせることを含む。

【0047】

ポリペプチドのアミノ基のN-アシル誘導体は、N-アシルで保護されたアミノ酸を最後の縮合のために使用することによって、または保護もしくは非保護のペプチドをアシル化することによって調製することができる。O-アシル誘導体は、例えば、遊離のヒドロキシペプチドまたはペプチド樹脂をアシル化することによって調製することができる。いずれのアシル化も、ハロゲン化アシル、無水物、およびアシルイミダゾールなどの標準的なアシル化試薬を用いて実施することができる。所望の場合は、N-アシル化およびO-アシル化の両方を一緒に実施してもよい。

【0048】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるNPは、天然NPの半減期と比べて長い半減期を有し得る。例えば、CNPの半減期は短い(約1分半)のに対し、哺乳動物への投

10

20

30

40

50

与後のCD-NPの消失半減期は約18.5分である(例えば、Lee et al. BMC Pharmacol. (2007) 7(補遺1):P38; および Lee et al. J. Cardiac Failure (2007) 13(6 補遺):S144を参照されたい)。したがって、本明細書において提供されるNPは、例えばCNPのような天然NPと比べて、少なくとも2倍(例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、または少なくとも10倍)長い半減期を有し得る。いくつかの態様において、NPは、少なくとも約10分(例えば、少なくとも約10分、少なくとも約12分、少なくとも約15分、少なくとも約17分、少なくとも約18分、または少なくとも約20分)の消失半減期を有し得る。

【0049】

本明細書において提供されるNPは、天然NPが機能する際に介する1つまたは複数のグアニリルシクラーゼ受容体を介して機能し得る。例えば、いくつかの態様において、本明細書において提供されるNPは、ANPおよびBNPが機能する際に介するNPR-A受容体に結合し、それを介して機能し得る。一部の態様において、NPは、ANPおよびBNPがするように、NPR-A受容体に結合し、それを介して機能し得る。一部の態様において、本明細書において提供されるNPは、CNPが機能する際に介するNPR-B受容体を介して機能し得る。一部の態様において、本明細書において提供されるNPは、NPR-C受容体に結合し、それを介して機能し得る。さらに、一部の態様において、本明細書において提供されるNP(例えば、CD-NPのようなキメラNP)は、例えば、NPR-AおよびNPR-Bを含む複数のグアニリルシクラーゼ受容体に結合し、それを介して機能し得る。どの受容体が個々のNPの機能に参与しているかを評価するための方法は当技術分野において公知であり、本明細書の実施例5で説明するものが含まれる。

10

20

【0050】

本明細書において提供される化合物(例えば、単離されたNP)は、例えばAMIまたはAHFの後に起こるような心臓リモデリングを抑制または軽減することができる。心臓リモデリングを抑制できる化合物は、後述するように、抑制または軽減された心臓リモデリングを示す1つまたは複数のパラメーターを少なくとも10%変化させ得るものである。特定の化合物がそのような特性を有するかどうかを判定するために、本明細書において説明するものを含む当技術分野に周知であるアッセイ法を実施することができる。変異NPである化合物は、典型的には、対応する野生型NPの生物活性の、または、当のNPがキメラNP(例えば、CD-NP)である場合、その中に含まれるNP構成要素の野生型配列を含む対応するキメラNPの生物活性の少なくとも約10%(例えば、少なくとも約10%、15%、20%、25%、33%、40%、50%、60%、67%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、または100%を超える)の生物活性を有する。

30

【0051】

核酸、ベクター、および宿主細胞

本書類はまた、ポリペプチド(例えば、NP)をコードする例示的な核酸、ならびにその核酸を含む発現ベクター、ならびに核酸および/または発現ベクターを含む宿主細胞を説明する。本明細書において使用される場合、「核酸」という用語は、RNAおよびDNAの両方を意味し、cDNA、ゲノムDNA、および合成(例えば化学合成)DNAを含む。核酸分子は、二本鎖または一本鎖(すなわち、センス一本鎖もしくはアンチセンス一本鎖)でよい。核酸には、例えば、NP、変異NP、および本明細書において提供されるキメラNPをコードするcDNAが含まれる。

40

【0052】

「単離された核酸」とは、脊椎動物ゲノム中の核酸の片側または両側に通常隣接する核酸を含む、脊椎動物ゲノム中に存在する他の核酸分子から分離された核酸である。また、核酸に関して本明細書において使用される「単離された」という用語は、天然に存在しない任意の核酸配列も含む。このような天然に存在しない配列は天然には存在せず、天然に存在するゲノム中のすぐ近くの連続配列を有さないためである。

【0053】

単離された核酸は、例えば、DNA分子でよく、ただし、天然に存在するゲノムにおいて

50

は通常そのDNA分子のすぐ近くに隣接して存在する核酸配列の内の1つが除去されているか、または存在しないことを条件とする。したがって、単離された核酸には、他の配列、ならびにベクター、自律複製プラスミド、ウイルス(例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、もしくはヘルペスウイルス)中に、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中に組み込まれているDNAから独立した、単独の分子(例えば、化学合成された核酸、またはPCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって作製されたcDNA断片もしくはゲノムDNA断片)として存在するDNA分子が含まれるがそれに限定されるわけではない。さらに、単離された核酸には、ハイブリッド核酸または融合核酸の一部であるDNA分子のような操作された核酸が含まれ得る。例えば、cDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリー、またはゲノムDNA制限消化物を含むゲル切片内の数百～数百万の他の核酸に混ざって存在する核酸は、単離された核酸とみなされない。「単離されたCD-NP核酸」は、例えば、CD-NPの少なくとも一部分をコードする9個もしくはそれ以上(例えば、15個もしくはそれ以上、21個もしくはそれ以上、36個もしくはそれ以上、または45個もしくはそれ以上の)連続的なヌクレオチド塩基を含むRNA分子もしくはDNA分子、またはそれらに相補的なRNAもしくはDNAでよい。

10

20

30

40

50

【0054】

また、NPをコードする核酸分子(例えば、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、およびSEQ ID NO:3に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子)にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズできる核酸分子も、本明細書において提供される。「選択的にハイブリダイズする」という用語は、非特異的な核酸への検出可能な結合の認識できる量を最小限にするハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で検出可能かつ特異的に結合することを意味する。例えば、高ストリンジェンシー条件は、選択的ハイブリダイゼーション条件を実現するために使用され得る。中程度およびストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、当技術分野において周知であるものが含まれる。例えば、Sambrook et al. (1989)のセクション9.47～9.51を参照されたい。本明細書において使用される場合、ストリンジェントな条件とは、(1)0.1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を含む0.015M NaCl/0.0015Mクエン酸ナトリウム(SSC)、50 のような低イオン強度および高温を洗浄のために使用するか、または(2)ハイブリダイゼーションの間にホルムアミドのような変性剤、例えば、50%ホルムアミドおよび0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール(Ficoll)/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5、750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウムを含む)を42 で使用するものである。あるいは、50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%リン酸ナトリウム、5×デンハート溶液、超音波処理したサケ精子DNA(50 µg/ml)、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、および10%硫酸デキストラン、42 を、0.2×SSCおよび0.1%SDS中、42 での洗浄と共に使用することができる。

【0055】

単離された核酸分子は、非限定的に、一般的な分子クローニング技術および化学的核酸合成技術を含む標準的な技術を用いて作製することができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)技術を用いて、本明細書において提供されるNP(例えば、CD-NPまたは変異CD-NP)をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を得ることができる。PCRとは、標的核酸を酵素的に増幅させる手順または技術を指す。典型的には、関心対象の領域の両端またはそれを上回る部分からの配列情報が、増幅しようとする鋳型の反対側の鎖と配列が同一であるオリゴヌクレオチドプライマーを設計するために使用される。PCRは、全ゲノムDNAまたは全細胞RNAに由来する配列を含む、DNAならびにRNA由来の特異的配列を増幅するために使用され得る。プライマーは、典型的には14～40ヌクレオチド長であるが、10ヌクレオチド長～数百ヌクレオチド長に及んでもよい。一般的なPCR技術は、例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual, DieffenbachおよびDveksler編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載されている。RNAを鋳型供給源として使用する場合、逆転写酵素を用いて相補的DNA(cDNA)鎖を合成することができる。リガーゼ連鎖反応、鎖置換増

幅法、自己持続配列複製法、または核酸配列に基づいた増幅法もまた、単離された核酸を得るために使用することができる。例えば、Lewis (1992) Genetic Engineering News 12:1; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878; および Weiss (1991) Science 254:1292を参照されたい。

【0056】

また、単離された核酸は、単一の核酸分子(例えば、ホスホルアミダイト技術を用いた3'~5'方向の自動DNA合成による)またはひと続きのオリゴヌクレオチドのいずれかとして化学合成することができる。例えば、オリゴヌクレオチドペアをアニールした際に二重鎖が形成されるように、相補的な短いセグメント(例えば、約15ヌクレオチド)を各ペアが含む、所望の配列を含む長いオリゴヌクレオチド(例えば、>100ヌクレオチド)の1つまたは複数のペアを合成することができる。DNAポリメラーゼは、オリゴヌクレオチドを伸長させるために使用され、オリゴヌクレオチドペア当たり1つの二本鎖核酸分子を生じ、次いでこれをベクターに連結することができる。

【0057】

単離された核酸(例えば、変異NPをコードする核酸)はまた、変異誘発によって得ることもできる。例えば、PCRによるオリゴヌクレオチド指定変異誘発および部位特異的変異誘発を含む標準的な技術によって、参照配列を変異させることができる。Short Protocols in Molecular Biology, 8章, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, Ausubel et al. 編 1992を参照されたい。変異NPの非限定的な例が本明細書において提供される。

【0058】

本書類はまた、ANP、BNP、CNP、DNP、またはそれらのキメラもしくは変異体以外のNPをコードする例示的な核酸分子も説明する。NPをコードする核酸分子またはその核酸相補物を得ることができるヌクレオチド配列供給源には、当技術分野において公知の方法によってcDNAを得ることができる爬虫類(例えばヘビ)または哺乳動物(例えば、ヒト、ラット、マウス、イヌ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、もしくはネコ)の細胞供給源を含む任意の真核生物供給源に由来する全RNAまたはポリA+ RNAが含まれる。本明細書において提供される核酸分子の他の供給源には、上記に例示した哺乳動物供給源を含む任意の真核細胞供給源に由来するゲノムライブラリーが含まれる。

【0059】

天然NPをコードする核酸分子は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989)によって説明されているようにして、標準的な方法によって同定および単離することができる。例えば、逆転写酵素PCR(RT-PCR)を用いて、関心対象のRNA配列を含む単離されたRNA(例えば、ヒト組織から単離された全RNA)からNP cDNAを単離およびクローン化することができる。NP cDNAを同定、単離、およびクローン化するための他のアプローチには、例えば、cDNAライブラリーのスクリーニングが含まれる。

【0060】

本明細書において説明するもののような核酸を含むベクターもまた、提供される。「ベクター」は、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどのレプリコンであり、挿入されたセグメントの複製をもたらすように別のDNAセグメントを挿入することができる。「発現ベクター」は、1つまたは複数の発現制御配列を含むベクターであり、「発現制御配列」は、別のDNA配列の転写および/または翻訳を制御および調節するDNA配列である。

【0061】

本明細書において提供される発現ベクターにおいて、核酸(例えば、CD-NPのようなNPをコードする核酸)は、1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結されてよい。本明細書において使用される場合、「機能的に連結された」とは、発現制御配列が関心対象のコード配列の発現を効果的に制御するように遺伝子構築物中に組み込まれることを意味する。発現制御配列の例には、プロモーター、エンハンサー、および転写終結領域が含まれる。プロモーターは、転写が開始する位置の上流の(一般に、RNAポリメラーゼIIの開始部位の

近くの)典型的には100~500ヌクレオチド以内にある、DNA分子のある領域から構成される発現制御配列である。コード配列をプロモーターの制御下に置くために、ポリペプチドの翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位をプロモーターから1~約50の間の個数のヌクレオチド分だけ下流に位置付けることが必要である。エンハンサーは、時間、位置、およびレベルの点で発現特異性を提供する。プロモーターとは違って、エンハンサーは、転写部位から様々な距離の位置に配置されても機能し得る。また、エンハンサーは、転写開始部位の下流に配置されてもよい。RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAへと転写することができ、次いでこのmRNAが、コード配列にコードされたタンパク質に翻訳され得る場合、コード配列は、細胞において発現制御配列に「機能的に連結され」かつその「制御下」にある。したがって、発現ベクターは、抗体ならびに他の多価性分子を作製するのに有用であり得る。

10

【0062】

適切な発現ベクターには、プラスミド、ならびに、例えば、バクテリオファージ、バキュロウイルス、タバコモザイクウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスに由来するウイルスベクターが含まれるが、それらに限定されるわけではない。多数のベクターおよび発現系が、Novagen (Madison, WI)、Clontech (Palo Alto, CA)、Stratagene (La Jolla, CA)、およびInvitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA)などの会社から市販されている。

【0063】

発現ベクターは、発現された核酸配列の後続の操作(例えば、精製または位置確認)を容易にするために設計されたタグ配列を含んでよい。緑色蛍光タンパク質(GFP)配列、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)配列、ポリヒスチジン配列、c-myc配列、ヘマグルチニン配列、またはFlag(商標)タグ(Kodak, New Haven, CT)配列などのタグ配列は、典型的には、コードされたポリペプチドとの融合物として発現される。このようなタグは、カルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかを含む、ポリペプチド内部の任意の場所に挿入され得る。

20

【0064】

また、ベクターを含む宿主細胞も提供される。「宿主細胞」という用語は、組換え発現ベクターを導入できる原核細胞および真核細胞を含むと意図される。本明細書において使用される場合、「形質転換された」および「トランスフェクトされた」とは、いくつかの技術の内の1つによる細胞中への核酸分子(例えばベクター)の導入を包含する。特定の技術に限定されるわけではないが、いくつかのこれらの技術は当技術分野において十分に確立されている。例えば、エレクトロポレーションまたは塩化カルシウムを媒介とした形質転換によって、原核細胞を核酸で形質転換することができる。例えば、リン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストランを媒介としたトランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、またはマイクロインジェクションを含む技術によって、哺乳動物細胞に核酸をトランスフェクトすることができる。宿主細胞を形質転換およびトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版), Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)において見出され、形質転換および/またはトランスフェクションのための試薬は市販されている(例えば、LIPOFECTIN(登録商標)(Invitrogen); FUGENE(登録商標)(Roche, Indianapolis, IN); および SUPERFECT(登録商標)(Qiagen, Valencia, CA))。

30

40

【0065】

組成物

本明細書において説明する化合物(例えば、CD-NPのようなキメラNPおよび変異NP)、または本明細書において説明するポリペプチドをコードする核酸は、対象(例えば、AMIまたはAHFに罹患しているか、またはそのリスクがある対象)に投与するための組成物中に組み込むことができる。治療的組成物を製剤化し、続いて投与するための方法は当業者に周知である。典型的には、投与量は、その化合物に対する対象の応答性に依存し、治療過程は

50

数日間～数ヶ月間、または適切な応答に達するまで続く。当業者は、最適投与量、投与方法、および反復回数をごく普通に決定する。最適投与量は、抗体の相対的力価に応じて変化し得、一般に、インビトロおよび/またはインビボの動物モデルにおいて効果的であると判明したEC₅₀に基づいて推定され得る。これらの化合物(例えばNP)および本明細書において提供される核酸を含む組成物は、毎日1回もしくはそれ以上の回数、毎週、毎月、もしくはさらに少ない頻度で与えてよく、または、一定期間(例えば、数時間、数日間、もしくは数週間)に渡って継続的に投与することもできる。本明細書において説明されるように、例えば、NPまたはNPを含む組成物は、再灌流の時点もしくはそれに近い時点に、少なくとも約0.01ng NP/kg体重～約100mg NP/kg体重の用量で投与してよく、または、再灌流の時点もしくはそれに近い時点に開始し、1日～7日間継続する注入として(例えば、約0.01ng NP/kg/分～約0.5 μg NP/kg/分の用量で)連続的に投与してよい。

10

【0066】

NPおよび核酸は、他の分子、分子構造体、または化合物の混合物、例えば、リボソーム、受容体、もしくは細胞を標的とする分子、または摂取、分布、および/もしくは吸収を助けるための経口製剤、外用製剤、もしくは他の製剤などと混合されるか、カプセル化されるか、コンジュゲートされるか、または別の方法で結合されてよい。

【0067】

いくつかの態様において、組成物は、本明細書において提供されるNPを薬学的に許容される担体と組み合わせて含んでよい。薬学的に許容される担体には、例えば、薬学的に許容される溶剤、懸濁化剤、または対象に抗体を送達するための他の任意の薬理学的に不活性なビヒクルが含まれる。薬学的に許容される担体は、液体または固体でよく、所与の薬学的組成物の1つまたは複数の治療用化合物および他の任意の成分と組み合わせられた場合に、所望の体積、堅さ、ならびに他の関係する輸送特性および化学特性を提供するように考慮して計画した投与様式と共に選択することができる。典型的な薬学的に許容される担体には、非限定的に次のものが含まれる：水；生理食塩水溶液；結合剤(例えば、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)；賦形剤(例えば、ラクトースもしくはデキストロースおよび他の糖、ゼラチン、または硫酸カルシウム)；滑沢剤(例えば、デンプン、ポリエチレングリコール、または酢酸ナトリウム)；崩壊剤(例えば、デンプンまたはグリコール酸デンプンナトリウム)；ならびに湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)。

20

30

【0068】

本明細書において説明する分子を含む薬学的組成物は、局所治療または全身治療が望ましいかどうかに応じて、いくつかの方法によって投与することができる。投与は、例えば、非経口(例えば、皮下注射、くも膜下腔内注射、脳室内注射、筋肉内注射、もしくは腹腔内注射、または静脈内(i.v.)点滴による)；経口；局所(例えば、経皮、舌下、眼、もしくは鼻腔内)；もしくは肺(例えば、散剤もしくはエアロゾルの吸入もしくは吹入による)でよく、または、このような方法の組合せによって行ってもよい。投与は、速くてもよく(例えば注射による)、またはある期間に渡って行ってもよい(例えば、緩徐な注入もしくは徐放製剤の投与)。

【0069】

非経口投与、くも膜下腔内投与、または脳室内投与のための組成物および製剤には、無菌水性液剤(例えば、無菌生理食塩水)が含まれ、これらはまた、緩衝剤、希釈剤ならびに他の適切な添加剤(例えば、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬学的に許容される担体)も含んでよい。

40

【0070】

経口投与用の組成物および製剤には、例えば、散剤もしくは顆粒剤、水もしくは非水系媒体に溶かした懸濁剤もしくは液剤、カプセル剤、サシェ、または錠剤が含まれる。このような組成物はまた、増粘剤、矯味剤、希釈剤、乳化剤、分散剤、または結合剤も組み込んでよい。

【0071】

50

局所投与用の製剤には、例えば、アルコールのような一般的溶媒に溶かした無菌および非滅菌の水性液剤、非水系液剤、または液状もしくは固形の油性基剤に溶かした液剤が含まれる。このような液剤はまた、緩衝剤、希釈剤、および他の適切な添加剤も含んでよい。局所投与用の薬学的組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、点滴剤、坐剤、スプレー剤、液剤、および散剤が含まれ得る。従来の薬学的担体、水性基剤、粉末基剤、または油性基剤、および増粘剤などが有用であり得る。

【0072】

薬学的組成物には、液剤、乳剤、水性懸濁剤、およびリボソーム含有製剤が含まれるが、それらに限定されるわけではない。これらの組成物は、例えば、前もって形成された液剤、自己乳化性の固形物、および自己乳化性の半固形物を含む様々な化合物から作製することができる。エマルジョン製剤は、製剤化が容易であり、可溶化、吸収、および生物学的利用能が有効であるため、治療的組成物を経口送達するために特に有用である。リボソームは、特異性および作用持続を与えるため、薬物送達の観点から特に有用であり得る。

10

【0073】

本明細書において提供される組成物は、薬学的に許容される任意の塩、エステル、もしくはそのようなエステルの塩、または、対象に投与された際に、適切な化合物(例えばNP)の生物学的に活性な代謝産物もしくはその残留物(residue)を(直接的もしくは間接的に)提供できる他の任意の化合物を含んでよい。したがって、本書類は、例えば、NPの薬学的に許容される塩、プロドラッグ、およびそのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、ならびに他の生物学的同等物を説明する。プロドラッグとは、不活性型で調製され、内因性酵素または他の化学物質および/もしくは条件の作用によって、身体またはその細胞の内部で活性型(すなわち薬物)に変換される治療物質である。「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書において提供される方法において有用であるNPの生理学的に許容される塩および薬学的に許容される塩(すなわち、望まれない毒物学的影響を与えずに、親NPの望ましい生物活性を保持する塩)を意味する。薬学的に許容される塩の例には、陽イオン(例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、またはスベルミンのようなポリアミン)と共に形成される塩;無機酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、または硝酸)と共に形成される酸付加塩;有機酸(例えば、酢酸、クエン酸、シュウ酸、パルミチン酸、またはフマル酸)と共に形成される塩;および基本的な陰イオン(例えば、臭素、ヨウ素、または塩素)と共に形成される塩が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

20

30

【0074】

組成物はさらに、薬学的組成物中に慣例的に存在する他の補助成分も含んでよい。したがって、組成物はまた、適合性のある薬学的に活性な物質、例えば、鎮痒剤、収斂剤、局所麻酔剤、もしくは抗炎症剤、または組成物の様々な剤形を物理的に調製する際に有用なさらなる物質、例えば、色素、矯味剤、保存剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定化剤も含んでよい。さらに、組成物は、補助剤、例えば滑沢剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝剤、着色剤、矯味剤、浸透促進剤、および芳香物質と混合することもできる。しかしながら、添加された際、このような物質は、組成物内の他の成分の生物活性に過度に干渉すべきではない。

40

【0075】

本明細書において開示する薬学的製剤は、単位剤形で便宜的に提供することができ、製薬業界において周知である従来技術に従って調製することができる。このような技術には、活性成分(すなわち抗体)を所望の薬学的担体と結合させる段階を含む。典型的には、製剤は、活性成分を液状担体もしくは微粉碎した固形担体または両方と均一かつ密接に結合させ、次いで、必要な場合には、製品を成形することによって調製することができる。製剤は所望の場合は滅菌してよいが、ただし、滅菌方法が製剤中に含まれる分子の有効性を妨げないことを条件とする。

【0076】

心臓リモデリングを軽減または抑制するための方法

本書類はまた、例えば、AHFおよびAMIを治療するため、ならびに心臓リモデリングを抑

50

制または軽減するための、本明細書において開示する化合物(例えばNP)の使用も提供する。したがって、本明細書において提供される化合物および核酸分子は、例えばMI後に起こり得る心臓リモデリングを軽減または抑制するために、哺乳動物(例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物)に投与することができる。いくつかの態様において、本明細書において使用される「投与する」という用語は、心臓リモデリングを軽減または抑制するために、哺乳動物が使用するための化合物または組成物を処方することを含む。いくつかの態様において、例えば、本明細書において提供されるNP または組成物は、AMIに罹患したと診断された哺乳動物に投与することができる。組成物またはNPは、選択された作用物質、疾患、および予防または治療を実現しようとするのかどうかを非限定的に含む様々な因子に応じて、任意の適切な用量で投与することができる。投与は全身的または局所的でよい。

10

【0077】

いくつかの態様において、NPまたはNPを含む組成物は、少なくとも約0.01ng NP/kg体重～約100mg NP/kg体重(例えば、約10ng NP/kg体重～約50mg NP/kg体重、約20ng NP/kg体重～約10mg NP/kg体重、約0.1ng NP/kg体重～約20ng NP/kg体重、約3ng NP/kg体重～約10ng NP/kg体重、または約50ng NP/kg体重～約100 μg/kg体重)の用量で投与され得るが、他の投与量もまた、有益な結果をもたらし得る。場合によっては、CD-NPまたはその変異体などのNPを含む組成物は、再灌流の時点もしくはそれに近い時点(すなわち、閉鎖されていた動脈が開かれる時点)に開始し、1～7日間(例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日)継続する持続静脈内注入として投与することができる。このような組成物は、例えば、約0.1ng NP/kg/分～約500ng NP/kg/分(例えば、約0.5ng NP/kg/分、約1ng NP/kg/分、約2ng NP/kg/分、約3ng NP/kg/分、約5ng NP/kg/分、約7.5ng NP/kg/分、約10ng NP/kg/分、約12.5ng NP/kg/分、約15ng NP/kg/分、約20ng NP/kg/分、約25ng NP/kg/分、約30ng NP/kg/分、約50ng NP/kg/分、約100ng NP/kg/分、または約300ng NP/kg/分)の用量で投与され得る。いくつかの態様において、NPを含む組成物は、再灌流前(例えば、再灌流より約1時間前)に、1回もしくは複数回の個別投与として、または再灌流より約1時間前に開始する持続注入として、投与され得る。例えば、組成物は、再灌流より約1時間、約45分、約30分、または約15分前から投与され得る。場合によっては、本明細書において提供されるNPを含む組成物は、再灌流後(例えば、再灌流から約10時間以内)に投与され得、1回もしくは複数回の個別投与として、または再灌流から約10時間以内に開始する持続注入として、投与され得る。例えば、組成物は、再灌流後約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、または約10時間目に投与され得る。

20

30

【0078】

いくつかの態様において、NPまたはNPを含む組成物は、第1の期間、第1の経路によって(例えば静脈内に)投与してよく、次いで、第2の期間、別の経路によって(例えば皮下に)投与してよい。例えば、NPを含む組成物は、約0.1ng NP/kg/分～約300ng NP/kg/分(例えば、約1ng NP/kg/分～約15ng NP/kg/分、約3ng NP/kg/分～約10ng NP/kg/分、または約10ng NP/kg/分～約30ng NP/kg/分)の用量で1～7日間(例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日)、哺乳動物(例えばヒト)に静脈内投与してよく、続いて、約10ng NP/kg/日～約100ng NP/kg/日(例えば、約10ng NP/kg/日、約20ng NP/kg/日、約25ng NP/kg/日、約30ng NP/kg/日、約50ng NP/kg/日、または約100ng NP/kg/日)の用量で5～30日間(例えば、7日、10日、14日、18日、21日、24日、または27日)、哺乳動物に皮下投与してよい。

40

【0079】

本明細書において提供される方法は、有効量のNP(例えば、キメラNPもしくは変異NP)もしくはNPをコードする核酸、またはこのような分子を含む有効量の組成物を哺乳動物に投与する段階を含んでよい。本明細書において使用される場合、用語「有効量」とは、哺乳動物レシピエントにおける心臓リモデリングの軽減および/または腎臓保護を示す1つまたは複数の(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個)のパラメーターを少なくとも10%(例えば、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%)変化させるのに十分である

50

分子または組成物の量である。例えば、本明細書において提供されるNPの有効量は、駆出率、GFR、UNaV、もしくはUVを少なくとも10%増加させることができるか、かつ/またはPRA、LV重量、CF増殖、PWCP、RAP、MAP、アルドステロンレベル、LV肥大、心室線維化、LV収縮終期径、PFRNa、もしくはDFRNaを少なくとも10%低減させることができるか、かつ/または心臓の負荷軽減をもたらす得る量である。いくつかの態様において、方法は、心臓リモデリングの軽減および/または腎臓保護を示す1つまたは複数のパラメーターを少なくとも50%変化させるのに十分である量のNPまたは組成物を哺乳動物に投与する段階を含んでよい。

【0080】

いくつかの態様において、例えば、本明細書において提供されるNPの「有効量」は、NP投与前またはNP投与無しの哺乳動物におけるパラメーターのレベル(例えば、以前のMI発症の際に観察されたパラメーターのレベル)と比べて、少なくとも10%、処置を受けた哺乳動物のPRAおよびMAPを減少させGFRおよびUVを増加させる量でよい。このようなパラメーターは、例えば、以下の実施例に説明する方法を用いて測定することができる。

【0081】

本発明を以下の実施例においてさらに説明するが、これらの実施例は特許請求の範囲に記載する本発明の範囲を限定しない。

【実施例】

【0082】

実施例1 材料および方法

ポリペプチド合成:DNPおよびCNPの公知の配列に基づいて2種のペプチドを合成した。最初に、DNPのアミノ酸15個の直鎖状C末端配列

(PSLRDPRPNAPSTSA; SEQ ID NO:2; 図1)

を合成した。このペプチドを「C末端」と名付けた。二番目に、CNP(SEQ ID NO:1; 図1)とDNPのC末端のキメラを合成した

(GLSKGCFGLKLDRI GMSGLGCPSLRDPRPNAPSTSA; SEQ ID NO:3)

。アミノ酸37個からなるキメラペプチドを「CD-NP」と名付けた。これら2種のペプチドは、Mayo Protein Core FacilityのABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems, Foster City, CA)により、N-Fmoc-L-アミノ酸付きプレロード型Wang樹脂(SynPep, Dublin, CA)上で固相方法を用いて合成した。樹脂に結合されたペプチドへの各アミノ酸の結合は、1-メチル-2-ピロリジノン(NMP)中で40分間実施した。NMPに溶かしたHOBT/DCC溶液中で各Fmocアミノ酸を30分間活性化させた。Fmoc保護基の脱保護は、次の活性化アミノ酸を結合する20分前に、NMP中20%ピペリジンをを用いて実施した。続いて、室温で2時間、82.5%トリフルオロ酢酸(TFA)/5%水/5%チオアニソール/2.5%エタンジチオール/5%フェノールの混合物で処理することにより、ペプチドを脱保護し、樹脂から取り除いた。50mlの冷メチルト-ブチルエーテル中に3回沈殿させることによって各ペプチドを洗浄し、0.1% TFA/水および10~70% Bの勾配を50分に渡って用いて、Jupiter C18 カラム(Phenomenex, Torrance, CA)を用いた逆相HPLCによって精製した。

【0083】

各ペプチドのアイデンティティは、Perkin/Elmer Sciex API 165 Mass Spectrometer (PE Biosystems, Foster City, CA)を用いたエレクトロスプレーイオン化法(ESI)質量解析によって確認した。CD-NP中のジスルフィド架橋は、50mM重炭酸アンモニウム(pH8.5)緩衝液中で一晩空気酸化させることにより形成させた。

【0084】

正常なイヌにおけるC末端およびCD-NPのインビボでの統合的な生物学的作用:麻酔した正常イヌの別々の5群において実験を実施した。調査はすべて、米国生理学会(American Physiological Society)の指針に従い、Mayo Clinicの実験動物委員会(Mayo Clinic Animal Care and Use Committee)による認可を受けた。

【0085】

実験前日の夕方に、腎尿細管区域の機能を評価するために炭酸リチウム300mgを経口投与し、次いで、動物を一晩絶食させた。急性実験当日に、ペントバルビタールナトリウム(30mg/kg)を静脈内投与して、すべてのイヌに麻酔をかけた。イヌに機械的に4L/分の補充酸素を供給した(Harvard人工呼吸器、Harvard Apparatus, Millis, MA)。左側腹部を切開し、左の腎臓を露出させた。定期的に尿を採取するために尿管にカニユーレを挿入し、校正済みの電磁流量計プローブを左腎動脈の近くに留置し、腎血流量(RBF)をモニターするための流量計(FM 5010モデル、King, NC)に連結した。最後に、右大腿静脈に2つのポリエチレンカテーテル(PE-240)を挿入した。一方はイヌリン注入用であり、他方はC末端注入用であった。直接、動脈血圧を測定し、動脈血を試料採取するために、右大腿動脈にカニユーレを挿入した。CD-NPまたはBNPを与えられた群の心充満圧を測定するため、および心拍出量を測定するために、スワングアンツカテーテル(Edwards, Mountain View, CA)を右内頸静脈中に挿入した。

10

【0086】

外科的準備の完了後、初回用量(priming dose)のイヌリン(ICN Biomedicals, Cleveland, OH)を注射し、続いて、1ml/分で常時注入した。介入をせずに60分間、これらのイヌを平衡状態(equilibrate)にさせた。平衡期間後、30分間のベースラインクリアランス(ベースライン)を実施した。これに、15分間の導入(lead-in)期間が続いた。この期間中に、第1群(n=6)では42ng/kg/分でのC末端静脈内注入を開始し、その後、2回目の30分間のクリアランス(C末端)期間を設けた。1ml/分で生理食塩水を静脈内投与した時間対照(time control)(n=6)を実施して、CD-NP群の対照として使用した。各クリアランスの間に、腎臓の血行力学的応答および排出応答を記録した。第3の群では、3種類の濃度(10ng/kg/分、50ng/kg/分、および100ng/kg/分)のCD-NPを30分間注入し、各用量について15分間の導入期間を伴った。第4群(n=6)および第5群(n=6)には、等モル濃度の10ng/kg/分および50ng/kg/分のCD-NPまたはBNPをそれぞれ与えた。

20

【0087】

リチウムを含む血漿電解質および尿電解質を、フレイム放射分光光度計(IL943, Flame Photometer, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA)によって測定した。血漿および尿中のイヌリン濃度はアントロン法によって測定し、GFRはイヌリンのクリアランスに基づいて測定した。リチウムクリアランス技術を用いてPFRNaおよびDFRNaを推定した。PFRNaは次の式によって算出した： $[1 - (\text{リチウムクリアランス} / \text{GFR})] \times 100$ 。DFRNaは次の式によって算出した： $[(\text{リチウムクリアランス} - \text{ナトリウムクリアランス}) / \text{リチウムクリアランス}] \times 100$ 。血漿中cGMPおよび尿中cGMPならびに血漿レニン活性(PRA)は、以前に説明されているようにして、市販のラジオイムノアッセイ法によって測定した。

30

【0088】

ヒト心臓線維芽細胞におけるCD-NP cGMP生成および細胞増殖の抑制に関するインビトロ研究：以前に説明されている(Tsuruda et al. (2002) Circ Res 91:1127-1134)方法に従って、ヒトCF(ScienCell, San Diego, CA)を用いて研究を実施した。第1代～第4代の細胞のみを実験に使用した。細胞をCD-NP(10^{-11} ～ 10^{-6} M)に15分間曝露して、cGMP活性化を判定した。これらの試料は、競合RIA cGMPキット(Perkin-Elmer, Boston, MA)を用いて分析した。手短に言うと、試料および標準物質を抗ヒトcGMPポリクローナル抗体および 125 I抗原と共に18時間インキュベートした。環状GMPアッセイ用緩衝液を試料に添加し、それらを2500rpmで20分間遠心分離した。遊離画分を吸引して除き、結合画分を計数し濃度を決定した。pmol/mlとして値を表す。ANPとも、BNPとも、CNPとも、ETとも交差反応性は無く、cAMP、GMP、GDP、ATP、GTPとの交差反応性は0.001%未満であった。

40

【0089】

CF増殖研究のために、第1代～第4代細胞の70～80%コンフルエントな細胞を 10^{-8} Mカルジオトロフィン-1で24時間処理して細胞増殖を誘導した。カルジオトロフィン-1で刺激したCFに濃度 10^{-8} MのCD-NPを添加して、細胞増殖に対するその効果を測定した。未処理の線維芽細胞を対照として処理した。比色プロモデオキシウリジン(BrdU)細胞増殖ELISA (Roc

50

he, Indianapolis, IN)を指示されている通り実施した。手短に言えば、CO₂ 37 インキュベーター中で2時間、BrdUでCFを標識した。抗BrdUを添加し、室温で90分間、反応させた。抗BrdUを除去し、洗浄溶液でCFを3回洗浄した。比色基質溶液を添加し、30分間発色させた。370nmでの吸光度をSpectraMax分光光度計(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で測定した。

【0090】

統計学的解析:定量調査の結果を平均値±標準誤差として表す。2つのクリアランスを比較する場合、スチューデントのt検定を用いて一群内での統計学的比較を実施し、複数のクリアランスを比較する場合、反復測定ANOVAとそれに続く事後のダネット検定を使用した。群間の統計学的比較は、二元配置ANOVAとそれに続くボンフェローニの事後検定を用いて実施した。P値<0.05の場合に統計的有意性を認めた。

10

【0091】

実施例2 DNPのC末端およびCD-NPのインビボ作用

DNPの中心の環構造を欠くDNPのC末端はナトリウム排泄増加性および利尿性であった(図2)。近位ナトリウム再吸収率(PFRNa)の低下が観察されたように、ナトリウム排泄増加作用は、腎臓ネフロンの近位区域に局在しており、このことから、ネフロンのこの部分がこの小型ペプチドの腎臓作用に寄与していることが示唆された(表2)。糸球体濾過率(GFR)、腎血流量(RBF)、または尿中cGMP排泄に注目すべき変化はなかった。重要なことには、C末端群のように、同様に1ml/分で生理食塩水を与えられた時間対照群では、腎臓機能のパラメーターは変化しなかった。

20

【0092】

図3は、CD-NP注入に対するインビボ応答を示す。3種の用量のCD-NPのいずれによっても、肺毛細血管楔入圧(PCWP)が低下したのに対し、右心房圧(RAP)を低下させたのは2種の用量であった。これらの心臓負荷軽減応答は、高用量のCD-NP注入の実施中でさえ、平均動脈圧(MAP)の最小限の低下を伴った。CD-NPによる強力なナトリウム排泄増加応答および利尿応答もまた、正常なイヌで観察された(図4)。具体的には、中用量のCD-NPと高用量のCD-NPの両方とも、ナトリウム尿排泄(UNaV)および尿量(UV)を増加させた(図4)。高用量のCD-NPを注入している間にMAPがわずかに減少したものの、GFRは上昇した。

【0093】

中用量のCD-NPを注入している間にPFRNaが減少したように、ナトリウム排泄増加および利尿は、ナトリウムの近位尿細管再吸収の減少を伴った。さらに、中用量のCD-NPおよび高用量のCD-NPを注入している間に遠位ナトリウム再吸収率(DFRNa)の減少が観察されたことから、CD-NPはまた末端ネフロンにおける活性にも関与していることが示唆された(図5)。CD-NP注入の中止後、これらの腎臓パラメーターはベースラインレベルに戻った。これらの作用はまた、低用量および中用量のCD-NPを注入している間に血漿レニン活性(PRA)が抑制されることにも関連していた(表3)。注入の中止後、PRAはベースラインレベルに戻った。中用量および高用量のCD-NPにより、血漿中cGMPおよび尿中cGMPは増加した(表3)。

30

【0094】

等モル用量のBNPを与えた群ではGRFは上昇しなかったのとは対照的に、50ng/kg/分の用量のCD-NPによってGFRは有意に上昇した(図6)。重要なことには、この用量のCD-NPは、BNPよりも降圧性の低い作用を伴っていた。

40

【0095】

(表2) C末端の注入に対する腎臓の血行力学的応答および排泄応答

	ベースライン	C末端
GFR (ml/分)	34 ± 6	44 ± 6
RBF (ml/分)	213 ± 19	198 ± 27
PFRNa (%)	77.9 ± 2.7	71.0 ± 2.6*
DFRNa (%)	98.7 ± 0.3	97.8 ± 0.5
UcGMPV (pmol/分)	1674 ± 213	2275 ± 231

10

データは平均値 ± SEとして表している；C末端、DNPのC末端を42ng/kg/分で注入(n=6)；GRF、糸球体濾過率；RBF、腎血流量；PFRNa、近位ナトリウム再吸収率；DFRNa、遠位ナトリウム再吸収率；UcGMPV、尿中cGMP排泄；*ベースラインに対してP<0.05。

【 0 0 9 6 】

(表3) 正常個体におけるCD-NP注入に対する神経液性応答

	ベースライン	CD-NP 10	CD-NP 50	CD-NP 100	回復時
PcGMP (pmol/ml)	9.4 ± 1.2	14.6 ± 1.6	30.3 ± 2.1*	50.1 ± 2.1*	32.7 ± 6.7*
UcGMPV (pmol/分)	1648 ± 151	2133 ± 234	4566 ± 621*	9999 ± 1590*	6661 ± 734*
PRA (ng/ml/時)	8.2 ± 0.8	5.3 ± 1.1*	3.9 ± 0.7*	6.3 ± 1.1	9.0 ± 1.8

20

データは平均値 ± SEとして表している。CD-NP 10、CD-NPを10ng/kg/分で注入；CD-NP 50、CD-NPを50ng/kg/分で注入；CD-NP 100、CD-NPを100ng/kg/分で注入(高用量でn=6である以外はn=8)；PcGMP、血漿中cGMP；UcGMPV、尿中cGMP排泄；PRA、血漿レニン活性；*ベースラインに対してP<0.05。

【 0 0 9 7 】

30

実施例3 心臓線維芽細胞におけるCD-NPを介したcGMP生成および増殖抑制

培養ヒトCFにおけるインビトロ研究により、CD-NPが用量依存的にcGMPを活性化することが実証された(図7A)。さらに、CNP、BNP、およびDNPと比べた場合、CD-NPと共に生成されるcGMPは、CNPの場合に類似しており、 10^{-6} MのDNPおよびBNPよりも有意に($p<0.05$)多かった。次いで、CD-NPが抗増殖作用を有するかどうかを判定するために、線維化を促進し肥大させるサイトカインであるカルジオトロフィン-1を用いて実験を実施した。このサイトカインは、CFの著しく強力な活性化因子であり、AMIおよび心不全などの状態で活性化される(Jougasaki et al. (2000) Circulation 101:14-17; Talwar et al. (2002) Clin Sci (Lond) 102:9-14; および Tsuruda et al. (2002) Circ Res 90:128-134)。DNA合成および細胞増殖の指標としてのBrdU取込みに基づいて評価したところ、CD-NPは、カルジオ

40

【 0 0 9 8 】

実施例4 MI後のラットのLV重量に対するCD-NPの効果を評価するためのインビボ研究

左冠動脈前下行枝結紮によってウィスターラット(150~250g)に心筋梗塞(MI)を起こし、浸透圧ミニポンプ(Alzet Osmoticポンプモデル2ML2)を各ラットの背中の皮下空間に挿入した。 1.7×10^{-7} g/kg/分の用量で2週間、CD-NPを皮下投与した。急性実験前かつMI後3週目に、心エコー図によってLV重量を評価した。CD-NPで処置した場合、MIから3週後のLV重量は、対照のMI-未処置群と比べて少なくなっていた(図8)。具体的には、MI群のLV重量は 1.351 ± 0.03764 (N=10)であったのに対し、MI+CD-NP群のLV重量は 1.150 ± 0.03651 (N=6; $p=0.0031$)であった。

50

【 0 0 9 9 】

実施例5 CD-NPおよびCNP-Cのインビボ作用

国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針(National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)に従って、雄の雑種犬(n=25)において動物研究を実施した。実験前日の夕方、水は自由に取らせつつ各イヌを絶食させ、翌日、腎尿細管機能を評価するために炭酸リチウム300mgを経口的に与えた。ペントバルビタールナトリウム(誘導時6~20mg/kg(静注)、維持時5~15mg/kg/h(静注))およびフェンタニル(0.04~0.12mg/kg(静注)、維持時0.04~0.18mg/kg/h)でイヌに麻酔をかけ、挿管し、5L/分のO₂(一回換気量15mL/kg、12サイクル/分)を機械的に供給した(Harvard Apparatus, Holliston, MA)。血圧をモニターするため、および血液試料を採取するために大腿動脈にカニューレを挿入し、イヌリンおよび生理食塩水を注入するために大腿静脈にカニューレを挿入した。ペプチド注入のために伏在静脈にカニューレを挿入した。血行動態をモニターするために、バルーンを先端に付けた熱希釈カテーテル(Edwards Lifesciences, Irvine, CA)を用いる一方で、側腹部切開によって左腎臓を露出させ、定期的に尿を採取するために尿管にカニューレを挿入した。腎血流量を測定するために、電磁流量計プローブを腎動脈に留置した(Burnett et al. (1984) Am J Physiol 247:F863-866)。イヌリンクリアランスに基づいてGFRを測定するために、体重に応じて調整したイヌリンボラスを与え、続いて、40~60mg/dLの血漿中レベルを実現するために注入(1mL/分)した(Burnett et al. (1984) 前記; Chen et al. (2005) Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288:R1093-1097; およびMargulies et al. (1991) J Clin Invest 88:1636-1642)。

10

20

【 0 1 0 0 】

60分間の平衡期間の後に、30分間の注入前クリアランスを行った(obtained)。これに続いて、CD-NP(50ng/kg/分)(静注)(n=10)または等モル濃度のCNP(n=9)を75分間持続注入した。持続注入期間は、15分間の導入および30分間クリアランス2回、それに続く30分間のウォッシュアウトおよび注入後クリアランスからなった。さらに3匹のイヌにおいて、デオキタンパク質CNP-C(50ng/kg/分)を75分間持続静脈注入して試験した。3回の30分間クリアランス(注入前、30分間注入時、および60分間注入時)に関するデータを報告する。

【 0 1 0 1 】

血漿中cGMPレベルおよび尿中cGMPレベルをラジオイムノアッセイによって測定した(RIA; Steiner et al. (1972) J Biol Chem 247:1106-1113)。血漿レニン活性(Haber et al. (1969) J Clin Endocrinol Metab 29:1349-1355)、アンジオテンシンII(Luchner et al. (1996) Hypertension 28:472-477)、およびアルドステロン(SanchoおよびHaber (1978) J Clin Endocrinol Metab 47:391-396)を定量した。尿細管によるナトリウム処理(handling of sodium)を評価するために、フレイム放射分光測光法(モデル357、Instrumentation Laboratory, Wilmington, MA)によって血漿中リチウムレベルおよび尿中リチウムレベルを測定した(Steiner et al.、上記)。

30

【 0 1 0 2 】

単離した系球体におけるcGMP活性化を評価するために、ペントバルビタールナトリウムでイヌ(n=3)を安楽死させ、腎臓を直ちに採取し、以前に説明されているようにして(Supaporn et al. (1996) Kidney Int 50:1718-1725)系球体を単離した。この方法は、Chaumet-Riffaud et al. ((1981) Am J Physiol 241:F517-524)の方法に基づき、少し改良したものであった。試験ペプチドに対するcGMP応答を定量するために、一定量の系球体(300 μ L、クレブス緩衝液に懸濁)を、最終体積500 μ L、イソブチルメチル-キサンチン(0.3mM)の存在下で、CD-NPまたはCNP(最終濃度 10^{-5} M)と共に37℃で10分間(最初の10分間のブレインキュベーションに続く)インキュベートした。対照は、クレブス緩衝液に懸濁した系球体の代わりにクレブス緩衝液を使用した点を除いては、同じ組成からなった。氷冷トリクロロ酢酸(TCA、最終濃度6.6%)300 μ Lを添加して反応を終結させ、インキュベート物を遠心分離した。800 μ Lの上清アリコートにcGMPアッセイ法のためにエーテルで抽出し(Steiner et al.、前記; およびSupaporn et al.、前記)、残存する上清を1N NaOHで中和し、タンパク質アッセイ法(BCAタンパク質アッセイ法、Pierce Biotechnology, Rockford, IL)で

40

50

分析した。NPR-AアンタゴニストA71915 10 (最終濃度1 μ M)で前処理した単離系球体を用いて、上記の手順を繰り返した。タンパク質レベルに関して結果を補正した。結果はfmol/ μ gで表している。

【0103】

CD-NP(Clinalfa, Laufelfingen, Switzerland)およびCNP(Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA)(図1)を生理食塩水に溶解した。静脈内投与したCD-NP(50.0ng/kg/分または13.35pmol/kg/分)を、75分持続注入した等モル用量のCNP(29.3ng/kg/分)と比べて試験した。デコイタンパク質のCNP-Cは、特別注文して(custom)合成した(図1)。

【0104】

これらのインビボ研究により、CD-NPによるナトリウム利尿ペプチドセカンドメッセンジャーcGMPの著しい活性化が実証された。これは、CNPに対する応答とは明確に異なる、血漿および尿中への排泄、ならびに腎臓それ自体による正味の腎臓生成の大幅な増加によって明らかにされた(図9A)。近位ナトリウム再吸収率および遠位ナトリウム再吸収率の減少によって実証されるように(表4)近位尿細管および遠位尿細管の両方に局在した多量のナトリウム利尿、および上昇したGFRは、CD-NPの場合は観察されたがCNPの場合は観察されなかった(図9B)。平均動脈圧の有意な変化はどちらの群でも検出されなかった(表5)。右心房圧および肺毛細血管楔入圧は、CD-NPの場合減少したが、CNPの場合は減少しなかった(表5)。CD-NPによってPRAレベルおよびアンジオテンシンII(ANGII)レベルが有意に抑制されたのに対し、CNP群での変化は統計的有意性には達しなかった(表6)。したがって、DNPのC末端を成熟CNPに融合することにより、CNPは動脈圧を低下させずにレニン-アンジオテンシン系(RAS)を抑制する腎臓作用性の心臓負荷軽減ペプチドに形質転換された。

【0105】

DNPのC末端がインビボでの腎臓調節作用およびRAS調節作用のための厳密な条件であるかどうかを判定するために、CNPの空いたC末端位置へのCNPのN末端アミノ酸配列の融合物を含む形質転換CNPを設計した。CNP-Cと呼ばれるこのポリペプチドは、アミノ酸22個の完全長CNPおよびCNP C末端に融合された重複するN末端アミノ酸5個からなった(GLSKGCFGLKLDRI GMSGLGCGKSLG; SEQ ID NO:4)

。このポリペプチドを注入しても、血漿中cGMP、尿中cGMP排泄、利尿、ナトリウム利尿、GFR、PRA、およびANG IIのいずれにも有意な変化はまったく起こらなかった。肺毛細血管楔入圧($4.3 \pm 0.8 \sim 3.4 \pm 0.8$ mmHg)および平均動脈圧($132 \pm 6 \sim 128 \pm 5$ mmHg)は、注入60分の時点でベースラインに対して最小限低下した($P < 0.05$)。したがって、CNP-Cは腎臓機能を増強もせず、RASを抑制もしなかったため、DNPのC末端は、CNPを腎臓作用性かつRAS調節性のペプチドに形質転換させるために特異的である。これらのデータから、CNPと非CNPペプチド配列との融合を含み得る、実行可能な将来のCNP形質転換に対する洞察が得られる。

【0106】

NPR-B受容体は腎臓中に存在するが、系球体濾過率またはナトリウム排泄を媒介する作用とは関連付けられていない。むしろ、ナトリウム利尿ペプチドに関連したこのような腎臓作用は、NPR-A受容体に関係があるとされている。系球体をイヌから単離し、CNPに融合されたDNPのN末端が、NPR-Aアンタゴニストを用いて薬理的拮抗作用によって抑止され得る系球体中のcGMPを独自に活性化するかを検討して、CD-NPの腎臓作用が、ANP、BNP、およびDNPの受容体であるNPR-Aを伴うかどうかを判定した。単離したイヌ系球体において、CD-NP(10^{-5} M)は、対照プラセボよりもcGMP活性化の程度が大きかった。等モル濃度(10^{-5} M)において、CD-NPはCNPよりもcGMP活性化の程度が大きかった(図10E)。NPR-Aアンタゴニスト(Sanchoおよび Haber, 前記)(1 μ M)によって前処理すると、cGMP応答が減弱したことから、腎臓中のCD-NPもNPR-A活性化を伴うことが実証された。

【0107】

実施例6 ヒト臨床試験の結果

CD-NPの安全性が確認されたイヌおよびげっ歯動物における毒性学研究に続いて、ヒト

10

20

30

40

50

を対象とする最初の臨床試験を正常ヒトボランティアにおいて行った。

【0108】

試験プロトコール:該当する場合、ヘルシンキ宣言(Declaration of Helsinki)およびその改正案、食品医薬品局(U.S. Food and Drug Administration)の医薬品の臨床試験の実施に関する基準の原則(Principles of Good Clinical Practice)、ならびに規制調和国際会議(International Conference on Harmonization)ガイドラインに従って、CD-NPに関するヒト臨床試験を実施した。臨床試験は、次の2段階からなった:非盲検逐次用量漸増試験(ステージ1)およびランダム化二重盲検プラセボ(PLB)対照試験(ステージ2)。ステージ1のために、それぞれ被験者4名からなる3つのコホートを用量漸増試験(4時間に渡って10ng/kg/分、17.5ng/kg/分、または25ng/kg/分を静脈注入)に登録した。ステージ2のために、被験者10名を二重盲検試験(CD-NP対プラセボ(PLB)は6:4)でランダム化し、4時間静脈注入してCD-NPおよびPLBの最大耐量(MTD、ステージ1で決定したようにする)を評価した。

10

【0109】

主な選択基準には次のものが含まれた:1)健常な男性、閉経後の女性、または外科的に不妊化された18~60歳の女性;2)18~34kg/m²の範囲内のBMI;3)効果的にコミュニケーションできること;4)顕著な疾患は無く、異常な臨床検査値(laboratory)も無いこと;5)正常な12リード心電図;6)過去6ヶ月間に喫煙していないことが明確にされた非喫煙者であること;および7)試験の性質およびリスクを十分に知らされ、試験投薬を受ける前に書面によるインフォームドコンセントを提出していること。

【0110】

主な除外基準には次のものが含まれた:1)CD-NPまたはその構成要素、ネシリチド、他のナトリウム利尿ペプチド、または関連化合物に対する過敏性またはアレルギーが公知であること;2)妊娠中または母乳による育児中であった女性;3)治験責任医師の意見で、血液(hematologic)、心血管、肺、腎臓、胃腸管、肝臓、もしくは中枢神経の系に障害を生じさせ得る任意の疾患もしくは状態(医学的もしくは外科的);あるいは試験薬の吸収、分布、代謝、もしくは排出に干渉し得るか、または被験者をリスクの増大した状態に置くと考えられる他の状態;4)臨床的に有意であるとみなされた異常な臨床検査値の存在;5)B型肝炎(HbsAg、B型肝炎表面抗原)、C型肝炎(抗HCV、C型肝炎抗体)、またはHIV(抗HIV1/2)に関するスクリーニングが陽性;6)試験登録より前の30日の期間内に臨床試験用医薬品を与えられていた場合;6)試験に関連した任意の治療薬の初回用量を投与する前の1週間または5半減期以内に任意の薬物療法を受けた場合。この除外は、肝臓薬物代謝を誘導または阻害することが公知である任意の薬物の場合、4週間まで延長した。非ステロイド系抗炎症薬、スルホンアミド、プロベネシド、または腎臓もしくは尿細管の機能を変化させることが公知である他の薬物の使用は、試験に関連した任意の治療薬の初回投与前の少なくとも5半減期の間、特に禁止した;7)用量投与前の48時間以内、または患者期間中の任意の時点のアルコール摂取;8)エタノール、コカイン、テトラヒドロカンナビノール(THC)、バルビツレート、アンフェタミン、ベンゾジアゼピン、およびオピエートを含む、尿中薬物スクリーニングが陽性;9)アルコール中毒、違法薬物使用、顕著な精神的疾患、任意のオピオイドに対する身体的依存の経歴(過去2年以内)、または薬物乱用もしくは薬物依存の任意の経歴;10)献血に問題があった経歴;ならびに11)登録前の45日以内に血液または血液製剤用に献血した場合。

20

30

40

【0111】

データ解析:腎臓データ、神経液データ、および血行力学的データを平均値±SEMとして表す。ペプチド注入開始後16~45分のクリアランスおよび46~75分のクリアランスをそれぞれ「30分」および「60分」と示す。各群内で、ペプチド注入30分および60分の時点、ならびに注入後のパラメーターを、適用可能な場合、反復測定一元配置分散分析(ANOVA)とそれに続く事後のダネット多重比較検定によって、注入前の値と比較した(Chen et al., 前記;およびCataliotti et al. (2004) Circulation 109:1680-1685)。群間比較は二元配置ANOVAとそれに続くボンフェローニの事後検定によって行った(Chen et al., 前記;およびCataliotti et al., 前記)。統計的有意性はP<0.05と定めた。イヌデータの統計解析の

50

ために、GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA)を使用した。ヒトを対象とする最初の臨床試験に関する統計解析はStatistical Analysis Software (バージョン9)を用いて実施した。臨床試験のランダム化二重盲検段階におけるCD-NP群およびプラセボ(PLB)群の腎臓データ、血行力学的データ、および神経液データを解析した。表7に示すように、パラメトリック検定およびノンパラメトリック検定によって、群内比較(注入終了時点とベースラインを比較)および群間比較(ベースライン時点および注入終了時点)の両方を行った。

【0112】

結果:最大耐量を決定した後、CD-NP(17.5ng/kg/分)を4時間投与し、プラセボと比較した。CD-NPによって血漿中cGMP、尿中cGMP排泄、および尿ナトリウム排泄は増加した(図10A~10Cおよび表7)。CD-NP群の尿量は、ベースライン($1.1 \pm 0.2 \sim 2.3 \pm 0.4$ mL/分; PLB $1.3 \pm 0.2 \sim 1.6 \pm 0.4$ mL/分)と比べて増加した。平均動脈圧(図10D)およびGFRは群間で差がなかった。CD-NPは、 21.9 ± 2.7 ng/dLから 9.5 ± 3.2 ng/dLに血漿アルドステロンを抑制した($P < 0.001$)。

10

【0113】

これらのデータから、静脈拡張薬CNPが、血圧に最小限の影響しか与えない、腎臓を増強し、RASを抑制し、心臓の負荷を軽減するペプチドに形質転換され得、AHFにおいて有用となり得る魅力的な次世代治療薬となることが実証された。また、これらの試験によって、次の2つの原理も提供される:(1)DNPのC末端以外のアミノ酸配列(すなわち、CNPのN末端)の融合物は効果を持たなかったため、CNPの空いたC末端へのC末端アミノ酸配列の付加が特殊であるに違いないこと;および(2)DNPのC末端の付加により、NPR-Bの活性化因子を超えるものにCNPは形質転換され、このポリペプチドは腎臓中のNPR-Aを活性化したこと。さらに、これらのデータは、動物およびインビボでの調査からヒトを対象とする最初の試験まで及び、CD-NPが、ヒトにおいてcGMP経路を活性化し、ナトリウム排泄を促進し、アルドステロンを抑制し、内因性の天然ペプチドCNPと比べて最小限しか血圧に影響を与えないという概念が確立された。

20

【0114】

また、この試験から、CNPとは異なってナトリウム排泄増加性かつアルドステロン抑制性であり、CNPと同様に、心臓の負荷を軽減しつつ降圧特性が最小限である潜在的治療用ペプチドにCNPを形質転換させ得ることが示される。CNPのN末端を有するデコイの使用は、将来のキメラ設計に洞察を与え、腎臓においてNPR-A活性化作用(agonism)をもたらす、CNPのC末端を増強する際の特異性を強調する。要約すれば、アミノ酸22個の完全長ペプチドCNPにDNPのC末端を融合すると、CNPは、心腎疾患症候群の治療物質に関連する、心臓の負荷を軽減し、レニンを阻害し、腎臓を増強するデザイナーペプチドに形質転換される。

30

【0115】

(表4) CD-NPまたはCNPの静脈内注入に対する腎臓の血行力学的応答および排泄応答

	注入前	30分間 注入時	60分間 注入時	注入後
CD-NP 群 (n = 9 - 10)				
GFR, mL/min	36.8±1.7 [†]	47.5±3.2 [†]	50.6±3.3 [†]	53.3±3.5 [†]
RBF, mL/min	228.5±29.2	243.8±27.8	265.3±27.1	260.9±32.8
RVR, x10 ⁻³ mmHg·L ⁻¹ ·min	0.76±0.14	0.71±0.11	0.63±0.10	0.71±0.15
PFR _{Na} , %	75±2	63±2 ^{†‡}	57±3 [†]	69±3
DFR _{Na} , %	98±0.2	92±3 ^{†‡}	92±1 ^{†‡}	96±0.5
CNP 群 (n = 7- 8)				
GFR, mL/min	52.2±5.3	52.7±6.7	49.5±4.2	48.8±5.6
RBF, mL/min	273.4±25.5	294.2±30.8	277.8±29.2	272.0±24.5
RVR, x10 ⁻³ mmHg·L ⁻¹ ·min	0.49±0.07	0.47±0.06	0.49±0.06	0.49±0.06
PFR _{Na} , %	80±3	73±2	72±1	73±2
DFR _{Na} , %	98±0.6	97±0.4	97±0.9	97±0.8

平均値 ± SEM。注入前(pre-I)に対する群内比較(平均値 ± SE、[†] P<0.01)および群間比較([‡] P<0.05、^{||} P<0.001)。GFR、糸球体濾過率;RVR、腎血管抵抗;I、注入;PFR_{Na}、近位Na⁺再吸収率;DFR_{Na}、遠位Na⁺再吸収率。

【 0 1 1 6 】

(表5) CD-NPまたはCNPの静脈内注入に対する心血管の血行力学的応答

	注入前	30分間 注入時	60分間 注入時	注入後	
CD-NP 群 (n = 9 - 10)					
MAP, mmHg	127±4	124±5	122±6	126±7	
PCWP, mmHg	5.2±0.5	3.5±0.9*	2.6±0.5 ^{†§}	3.7±0.5 [‡]	
RAP, mmHg	1.8±0.4	1.1±0.4 [†]	0.9±0.5 ^{†§}	1.3±0.5 [§]	10
PAP, mmHg	11.7±0.6	10.3±0.4* [‡]	10.5±0.6 [‡]	11.3±0.7 [‡]	
CO, L/min	3.7±0.3	3.4±0.4	3.0±0.3 [†]	2.6±0.3 [†]	
SVR, mmHgL ⁻¹ •min	36.3±4.2	39.8±4.7	44.2±5.4*	52.4±4.8 [†]	
PVR, mmHgL ⁻¹ •min	1.7±0.2	2.0±0.2	2.7±0.3 [†]	3.0±0.3 [†]	
CNP 群 (n = 7 - 9)					20
MAP, mmHg	123±4	127±4	128±4	128±4	
PCWP, mmHg	5.0±0.5	4.6±0.5	5.6±0.7	6.4±0.8*	
RAP, mmHg	2.6±0.3	2.5±0.3	2.9±0.3	3.5±0.5 [†]	
PAP, mmHg	13.1±0.8	12.8±0.8	13.2±0.7	13.9±0.7	
CO, L/min	3.8±0.3	3.3±0.3	2.8±0.3 [†]	2.6±0.1 [†]	30
SVR, mmHgL ⁻¹ •min	33.8±2.9	39.9±2.7	46.9±2.7 [†]	48.7±2.5 [†]	
PVR, mmHgL ⁻¹ •min	1.8±0.2	1.9±0.2	2.1±0.3	2.2±0.4	

値は平均値 ± SEMである。注入前 (pre-I) に対する群内比較 (平均値 ± S.E.M.、*P<0.05、[†]P<0.01) および群間比較 ([§]P<0.01)。I、注入; MAP、平均動脈圧; PAP、肺動脈圧; PCWP、肺毛細血管楔入圧; RAP、右心房圧; CO、心拍出量; SVR、全身血管抵抗; PVR、肺血管抵抗。

【 0 1 1 7 】

(表6) CD-NPまたはCNPの静脈内注入に対するホルモン応答

	注入前	30分間 注入時	60分間 注入時	注入後
CD-NP 群 (n = 10)				
PRA, ng/ml/hr	6.1±1.4	1.8±0.7 [†]	1.1±0.4 [†]	7.0±1.6
ANG II, pg/mL	16.6±3.0	7.5±1.8 [†]	4.4±0.7 [†]	14.7±2.8
アルドステロン, ng/dL	21.6±5.0	18.2±5.5	14.3±4.7	18.6±6.4
CNP 群 (n = 9)				
PRA, ng/ml/hr	2.9±1.4	1.9±0.6	2.5±0.7	3.2±1.0
ANG II, pg/mL	11.7±4.7	7.5±1.4	10.4±2.8	14.4±5.0
アルドステロン, ng/dL	15.1±4.2	21.1±3.8	21.4±3.7	22.0±4.2

値は平均値 ± SEMである。注入前(pre-I)に対する群内比較(平均値 ± SEM、[†] P<0.01)および群間比較([‡] P<0.05、[§] P<0.01、^{||} P<0.001)。PRA、血漿レニン活性;ANG II、アンジオテンシンII。

【 0 1 1 8 】

(表7) CD-NPのヒト臨床試験データに基づく統計学的解析 投与群間の測定変数の比較

10

20

測定変数	クラス変数	使用数 (n_used)	ミス数 (n_miss)	平均値	sd	中央値	最小値	最大値	平均値に対する 95%CI	順位和
血漿中cGMP (ベースライン)	群=CD-NP	6	0	1.40	0.36	1.450	0.80	1.80	(1.02, 1.78)	0.914
血漿中cGMP (ベースライン)	群=プラセボ	4	0	1.65	0.73	1.450	1.00	2.70	(0.49, 2.81)	
血漿中cGMP (投与時)	群=CD-NP	6	0	7.18	2.73	8.100	3.50	10.10	(4.32, 10.05)	0.010
血漿中cGMP (投与時)	群=プラセボ	4	0	1.73	0.59	1.450	1.40	2.60	(0.79, 2.66)	
尿中cGMP (ベースライン)	群=CD-NP	6	0	449.14	167.22	445.005	194.27	656.36	(273.66, 624.61)	0.610
尿中cGMP (ベースライン)	群=プラセボ	4	0	420.42	90.14	399.550	346.42	536.16	(277.16, 563.68)	
尿中cGMP (投与時)	群=CD-NP	6	0	857.61	283.85	778.580	563.38	1210.8 ₅	(559.75, 1155.47)	0.010
尿中cGMP (投与時)	群=プラセボ	4	0	270.85	81.86	287.735	165.71	342.21	(140.74, 400.95)	
Na排泄 (ベースライン)	群=CD-NP	6	0	0.05	0.01	0.055	0.03	0.07	(0.04, 0.07)	0.762
Na排泄 (ベースライン)	群=プラセボ	4	0	0.05	0.01	0.050	0.04	0.07	(0.03, 0.07)	
Na排泄 (投与時)	群=CD-NP	6	0	0.11	0.02	0.105	0.09	0.15	(0.09, 0.13)	0.010
Na排泄 (投与時)	群=プラセボ	4	0	0.05	0.02	0.045	0.03	0.07	(0.02, 0.07)	

10

20

30

40

測定変数	クラス変数	使用数	ミス数	平均値	sd	中央値	最小値	最大値	平均値に対する 95%CI	順位和
尿流速 (ベーススライン)	群=CD-NP	6	0	1.10	0.39	1.210	0.43	1.48	(0.69, 1.51)	0.762
尿流速 (ベーススライン)	群=プラセボ	4	0	1.25	0.34	1.210	0.90	1.69	(0.72, 1.79)	
尿流速 (投与時)	群=CD-NP	6	0	2.32	0.90	1.900	1.60	3.60	(1.37, 3.27)	0.476
尿流速 (投与時)	群=プラセボ	4	0	1.58	0.77	1.665	0.69	2.29	(0.35, 2.81)	
GFR (ベーススライン)	群=CD-NP	6	0	81.78	16.73	74.765	68.55	113.40	(64.22, 99.33)	0.762
GFR (ベーススライン)	群=プラセボ	4	0	76.47	7.12	75.125	70.35	85.27	(65.16, 87.78)	
GFR (投与時)	群=CD-NP	6	0	84.13	18.94	76.450	71.60	121.13	(64.25, 104.01)	0.762
GFR (投与時)	群=プラセボ	4	0	77.29	6.44	76.770	70.35	85.27	(67.06, 87.52)	
MAP (ベーススライン)	群=CD-NP	6	0	85.38	5.37	84.950	78.45	94.08	(79.74, 91.01)	0.610
MAP (ベーススライン)	群=プラセボ	4	0	86.78	2.71	85.563	85.15	90.83	(82.47, 91.08)	
MAP (投与時)	群=CD-NP	6	0	81.67	7.45	82.270	69.00	90.94	(73.85, 89.49)	0.762
MAP (投与時)	群=プラセボ	4	0	83.88	6.31	83.993	76.26	91.26	(73.85, 93.9)	
起立性収縮期BP (ベーススライン) 時間0	群=CD-NP	6	0	116.17	9.39	113.000	105.00	130.00	(106.31, 126.02)	0.914

測定変数	クラス変数	使用数	ミス数	平均値	sd	中央値	最小値	最大値	平均値に対する 95%CI	順位和
起立性収縮期BP (ベースライン)時間0	群=プラセボ	4	0	114.50	4.04	115.500	109.00	118.00	(108.08, 120.92)	
起立性収縮期BP (ベースライン)時間4	群=CD-NP	6	0	110.17	10.38	108.500	97.00	129.00	(99.27, 121.06)	0.352
起立性収縮期BP (ベースライン)時間4	群=プラセボ	4	0	116.00	6.32	117.000	108.00	122.00	(105.95, 126.05)	
起立性弛緩期BP (ベースライン)時間0	群=CD-NP	6	0	69.00	9.53	66.500	59.00	85.00	(59, 79)	0.914
起立性弛緩期BP (ベースライン)時間0	群=プラセボ	4	0	66.75	3.86	66.000	63.00	72.00	(60.61, 72.89)	
起立性弛緩期BP (ベースライン)時間4	群=CD-NP	6	0	61.83	6.31	60.500	57.00	74.00	(55.22, 68.45)	0.610
起立性弛緩期BP (ベースライン)時間4	群=プラセボ	4	0	62.75	7.93	64.000	52.00	71.00	(50.14, 75.36)	
起立性収縮期BP (1分) 時間0	群=CD-NP	6	0	113.83	12.19	117.500	97.00	126.00	(101.04, 126.62)	0.914
起立性収縮期BP (1分) 時間0	群=プラセボ	4	0	115.75	13.84	122.500	95.00	123.00	(93.75, 137.75)	

10

20

30

40

測定変数	クラス変数	使用数	ミス数	平均値	sd	中央値	最小値	最大値	平均値に対する 95%CI	順位和
起立性収縮期BP (1分) 時間4	群=CD-NP	6	0	108.17	8.01	107.000	98.00	118.00	(99.76, 116.57)	0.066
起立性収縮期BP (1分) 時間4	群=プラセボ	4	0	119.75	9.98	118.500	109.00	133.00	(103.89, 135.61)	
起立性弛緩期BP (1分) 時間0	群=CD-NP	6	0	68.00	9.74	64.500	58.00	82.00	(57.78, 78.22)	0.476
起立性弛緩期BP (1分) 時間0	群=プラセボ	4	0	70.50	2.38	70.500	68.00	73.00	(66.72, 74.28)	
起立性弛緩期BP (1分) 時間4	群=CD-NP	6	0	63.83	6.85	63.000	57.00	74.00	(56.64, 71.02)	0.914
起立性弛緩期BP (1分) 時間4	群=プラセボ	4	0	63.75	7.41	63.000	56.00	73.00	(51.97, 75.53)	
起立性収縮期BP (3分) 時間0	群=CD-NP	6	0	114.17	15.37	109.500	100.00	142.00	(98.04, 130.29)	0.476
起立性収縮期BP (3分) 時間0	群=プラセボ	4	0	119.25	10.24	118.500	110.00	130.00	(102.97, 135.53)	
起立性収縮期BP (3分) 時間4	群=CD-NP	6	0	108.17	19.08	101.000	91.00	135.00	(88.14, 128.19)	0.610
起立性収縮期BP (3分) 時間4	群=プラセボ	4	0	114.75	16.28	115.500	96.00	132.00	(88.88, 140.62)	

10

20

30

40

測定変数	クラス変数	使用数	ミス数	平均値	sd	中央値	最小値	最大値	平均値に対する 95%CI	順位和
起立性弛緩期BP(3分)時間0	群=CD-NP	6	0	66.50	8.69	62.500	58.00	78.00	(57.38, 75.62)	0.476
起立性弛緩期BP(3分)時間0	群=プラセボ	4	0	72.25	1.71	72.500	70.00	74.00	(69.54, 74.96)	
起立性弛緩期BP(3分)時間4	群=CD-NP	6	0	61.00	11.15	62.000	44.00	78.00	(49.3, 72.7)	0.762
起立性弛緩期BP(3分)時間4	群=プラセボ	4	0	66.50	11.45	68.500	53.00	76.00	(48.31, 84.69)	
血漿中アンギオテンシンII (注入前)	群=CD-NP	6	0	29.17	5.19	29.500	20.00	35.00	(23.72, 34.62)	0.114
血漿中アンギオテンシンII (注入前)	群=プラセボ	4	0	23.25	2.22	23.000	21.00	26.00	(19.73, 26.77)	
血漿中アンギオテンシンII (注入終了時)	群=CD-NP	6	0	23.00	3.52	23.000	18.00	29.00	(19.3, 26.7)	0.476
血漿中アンギオテンシンII (注入終了時)	群=プラセボ	4	0	19.75	8.18	19.500	10.00	30.00	(6.75, 32.75)	
アルドステロン(注入前)	群=CD-NP	6	0	21.93	2.73	20.800	19.30	25.50	(19.07, 24.79)	0.352
アルドステロン(注入前)	群=プラセボ	4	0	20.33	4.16	18.800	17.30	26.40	(13.71, 26.94)	

10

20

30

40

測定変数	クラス変数	使用数	ミス数	平均値	sd	中央値	最小値	最大値	平均値に対する 95%CI	順位和
アルドステロン(注入終了時)	群=CD-NP	6	0	9.50	3.16	8.400	6.20	14.90	(6.19, 12.81)	0.114
アルドステロン(注入終了時)	群=プラセボ	4	0	13.55	4.46	13.100	9.00	19.00	(6.46, 20.64)	

10

20

30

40

50

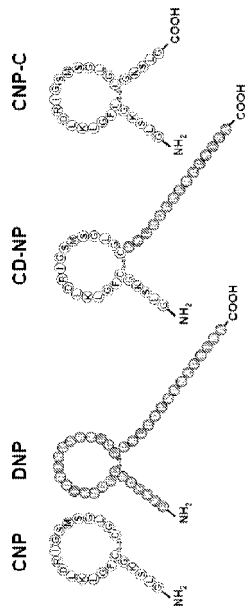
【 0 1 1 9 】

他の態様

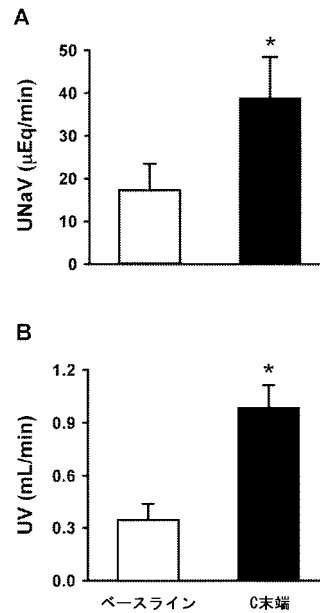
本発明をその詳細な説明と共に説明してきたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定められる本発明の範囲を例示することを意図し、限定することを意図しないこ

とを理解すべきである。他の局面、利点、および変更は、以下の特許請求の範囲に含まれる。

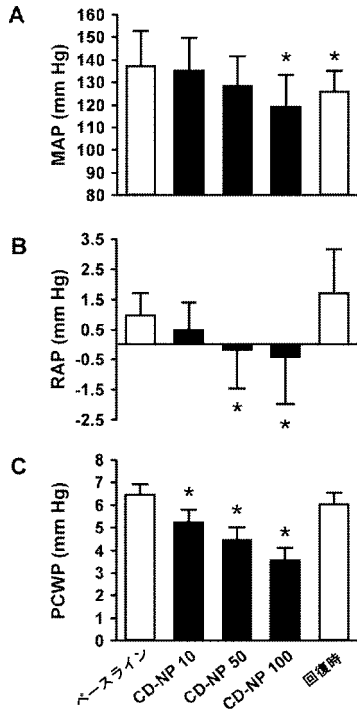
【図 1】



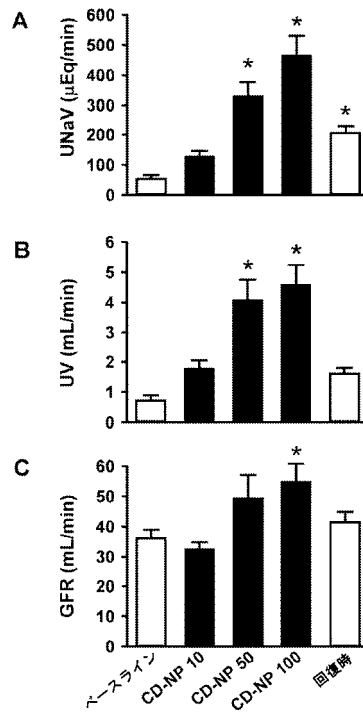
【図 2】



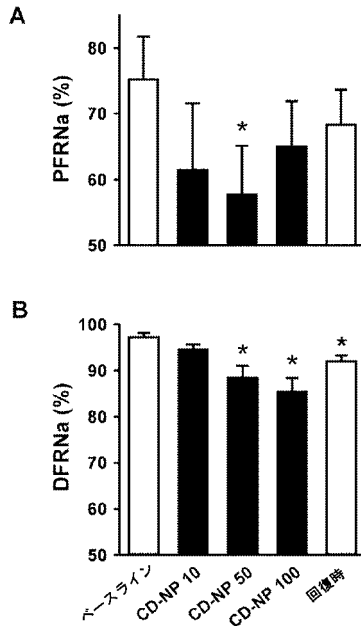
【図 3】



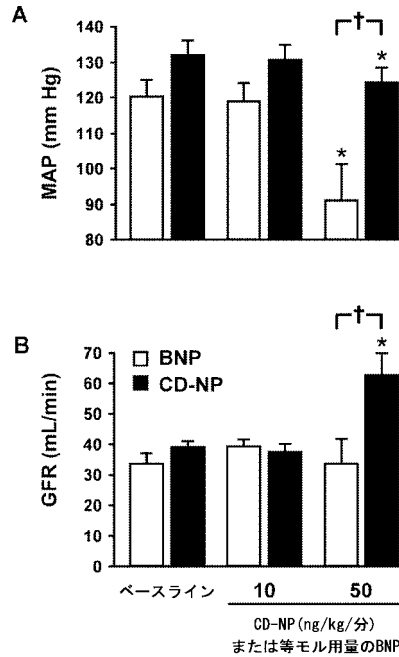
【図 4】



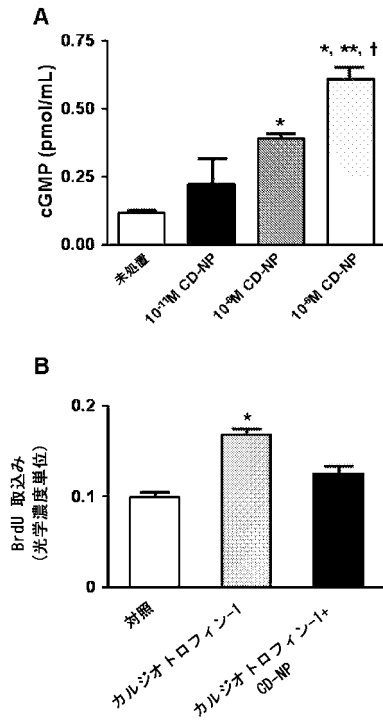
【図 5】



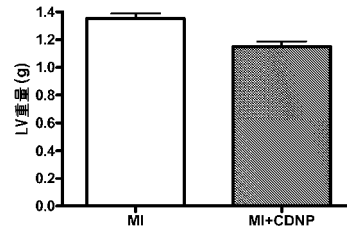
【図 6】



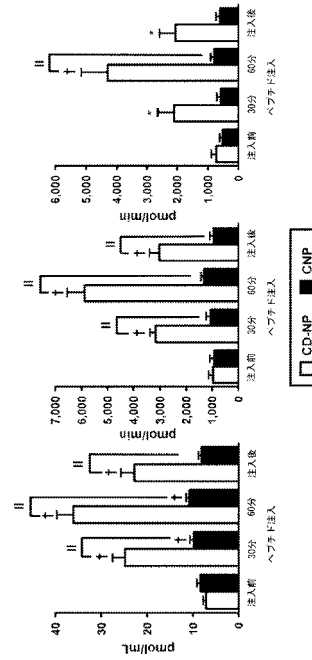
【図 7】



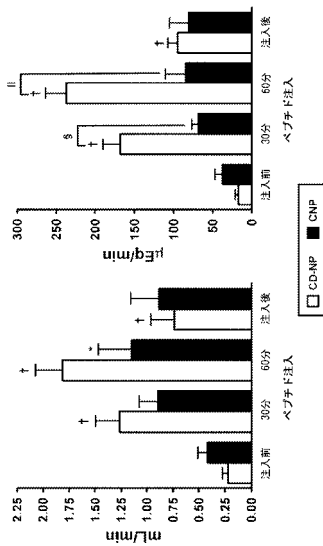
【図 8】



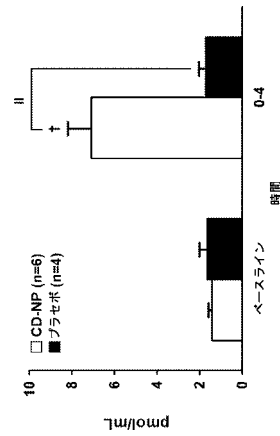
【図 9 A】



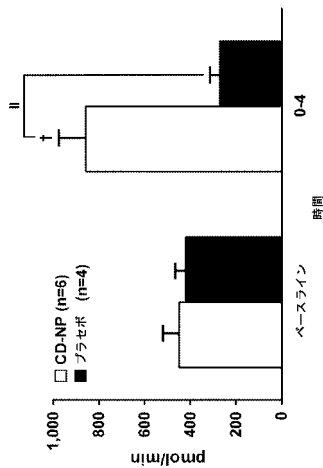
【図 9 B】



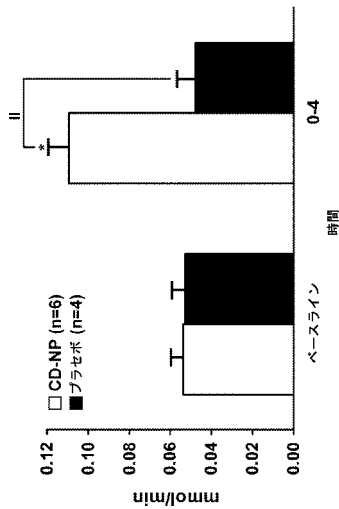
【図 10 A】



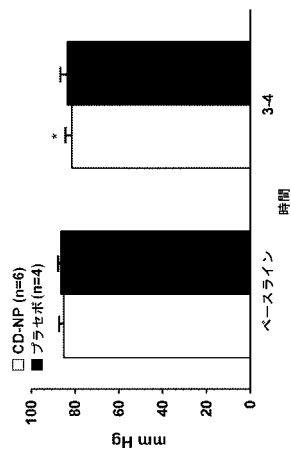
【図 10B】



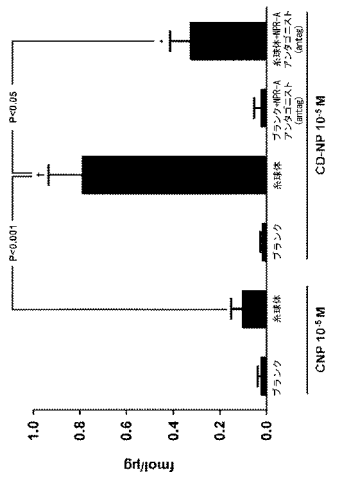
【図 10C】



【図 10D】



【図 10E】



【手続補正書】

【提出日】平成23年2月7日(2011.2.7)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表



【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2011522824000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2009/046095
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 38/12(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K 38/12, A61P 9/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched N/A		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) KOMPASS(KIPO net), Google Patent, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0082219 A1(BURNETT, J.C., ET AL.) 27 JUNE 2002 See abstract, [0012], [0119], [0188], SEQ ID NO 2 and claims	19-21,24-25
A	US 2006/0025367 A1(SIMARI, R.D.) 02 FEBRUARY 2006 See abstract and claims	19-21,24-25
A	US 2006/0019890 A1(KAPOUN, A.M., ET AL.) 26 JANUARY 2006 See abstract and claims	19-21,24-25
A	WO 2007/035600 A2(MAYO FOUNDATION FOR EDUCATION AND RESEARCH) 29 MARCH 2007 See abstract and claims	19-21,24-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 09 APRIL 2010 (09.04.2010)		Date of mailing of the international search report 12 APRIL 2010 (12.04.2010)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer PARK, JEONG UNG Telephone No. 82-42-481-8131 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/046095**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/046095

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 1-17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-17 pertain to methods for treatment of the human by therapy, as well as diagnostic method, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 18,22-23,26-27
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 18, 22-23 and 26-27 are too broad to make meaningful search possible.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/046095

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002-0082219 A1	27.06.2002	AT 353916 T	15.03.2007
		AU 2433901 A	25.06.2001
		AU 2001-24339 A1	25.06.2001
		CA 2395585 A1	21.06.2001
		DE 60033431 D1	29.03.2007
		DE 60033431 T2	29.11.2007
		DK 1242452 T3	11.06.2007
		EP 1242452 A2	25.09.2002
		EP 1242452 B1	14.02.2007
		ES 2282160 T3	16.10.2007
		JP 2003-517005 T	20.05.2003
		JP 2003-517005 A	20.05.2003
		PT 1242452 E	31.05.2007
		US 2005-0059600 A1	17.03.2005
		US 2003-0069186 A1	10.04.2003
		US 06407211 B1	18.06.2002
		US 06818619 B2	16.11.2004
		US 07384917 B2	10.06.2008
		WO 01-44284 A3	31.01.2002
		WO 2001-044284 A2	21.06.2001
		WO 2001-044284 A3	21.06.2001
US 2006-0025367 A1	02.02.2006	AU 5043900 A	12.12.2000
		WO 00-71576 A2	30.11.2000
		WO 00-71576 A3	25.01.2001
US 2006-019890 A1	26.01.2006	None	
WO 2007-035600 A2	29.03.2007	US 2009-0069243 A1	12.03.2009
		WO 2007-035600 A3	29.03.2007
		WO 2007-035600 A3	29.01.2009

フロントページの続き

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

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(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 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(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 バーネット ジョン シー .

アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター フォックス ヒル プレイス サウスウエスト 1
0 8 8

(72)発明者 チェン ホーン エイチ .

アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター フォックス ヒル プレイス サウスウエスト 1
2 0 5

(72)発明者 リジー オンドレイ

アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター マナー パーク ドライブ ノースウエスト 4 6
2 2

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA02 BA08 BA19 CA59 DB02 NA14 ZA36 ZA361

ZA362 ZA40 ZA401 ZA402

4H045 BA19 DA32 EA20 FA33