

(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2012-510518

(P2012-510518A)

(43) 公表日 平成24年5月10日(2012.5.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/22 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/24 Z N A	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 7/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/10	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/16	
<b>A 6 1 P 9/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00	
<b>A 6 1 P 9/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-539635 (P2011-539635)	(71) 出願人	509175403
(86) (22) 出願日	平成21年12月1日 (2009.12.1)		アイロンウッド ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月19日 (2011.7.19)		Ironwood Pharmaceuticals, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/066227		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O 2 1 4 1, ケンブリッジ, ベント ストリート 3 2 0
(87) 国際公開番号	W02010/065524	(71) 出願人	511133059
(87) 国際公開日	平成22年6月10日 (2010.6.10)		ザ ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル
(31) 優先権主張番号	61/119, 262		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チャペル ヒル バイナム ホール 3 0 8
(32) 優先日	平成20年12月2日 (2008.12.2)		キャンパス ボックス 4 1 0 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液貯留障害を処置するための方法および組成物

(57) 【要約】

本明細書には、グアニリンファミリーペプチドのB異性体を使って体液貯留障害を処置する方法が記載されている。UgnBは、A異性体 (UgnA) と比較して、そのナトリウム利尿活性において通常のシグモイド用量応答関係を示す。さらに、UgnAとは異なり、UgnBはGC-C受容体を弱くしか活性化しない。したがって、本明細書に記載のグアニリンファミリーペプチドの精製されたB異性体を含む組成物または該B異性体を含有する混合物を含む組成物は、体液貯留障害の処置に有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

グアニリンファミリーペプチドのB異性体であるペプチドを含む組成物の有効量を投与する段階を含み、該B異性体ペプチドと該ペプチドのA型とが天然には存在しない比で該組成物中に存在する、対象における体液貯留を特徴とする障害を処置するための方法。

## 【請求項 2】

前記グアニリンファミリーペプチドがウログアニリン (Ugn) ペプチドまたはグアニリン (Gn) ペプチドである、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

UgnのB異性体 (UgnB) を含む組成物の有効量を投与する段階を含み、該UgnBとUgnのA型 (UgnA) とが天然には存在しない比で該組成物中に存在する、請求項2記載の方法。

## 【請求項 4】

前記組成物が9:1より大きいUgnB対UgnAの比を含む、請求項3記載の方法。

## 【請求項 5】

前記組成物が99:1より大きいUgnB対UgnAの比を含む、請求項4記載の方法。

## 【請求項 6】

前記組成物がUgnAを含まない、請求項5記載の方法。

## 【請求項 7】

UgnAへの変換速度を低下させるように前記UgnBが修飾されている、請求項3記載の方法。

## 【請求項 8】

GnのB異性体 (GnB) を含む組成物の有効量を投与する段階を含み、該GnBとGnのA型 (GnA) とが天然には存在しない比で該組成物中に存在する、請求項2記載の方法。

## 【請求項 9】

前記組成物が9:1より大きいGnB対GnAの比を含む、請求項8記載の方法。

## 【請求項 10】

前記組成物が99:1より大きいGnB対GnAの比を含む、請求項9記載の方法。

## 【請求項 11】

前記組成物がGnAを含まない、請求項10記載の方法。

## 【請求項 12】

GnAへの変換速度を低下させるように前記GnBが修飾されている、請求項8記載の方法。

## 【請求項 13】

前記ペプチドがアミノ酸配列

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Glu-Xaa<sub>4</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Ala-Cys-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Cys-Xaa<sub>10</sub>-

Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub> (SEQ ID NO:2)

を有し、

Xaa<sub>1</sub>は、Gly、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Phe、Trp、Tyrであるか、または存在せず；

Xaa<sub>2</sub>は、Asp、Glu、Gly、His、Asn、Ser、Gln、Thrであるか、または存在せず；

Xaa<sub>3</sub>は、Thr、Glu、Asp、またはSerであり；

Xaa<sub>4</sub>は、IleまたはLeuであり；

Xaa<sub>5</sub>は、Val、Ile、Ala、またはLeuであり；

Xaa<sub>6</sub>は、Asn、Tyr、Phe、またはGlnであり；

Xaa<sub>7</sub>は、Val、Ile、Ala、Leu、またはProであり；

Xaa<sub>8</sub>は、Ala、Ser、またはThrであり；

Xaa<sub>9</sub>は、GlyまたはAlaであり；

Xaa<sub>10</sub>は、Leu、Ile、Phe、Trp、またはTyrであり；

Xaa<sub>11</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ

10

20

30

40

50

Xaa<sub>12</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項1記載の方法。

【請求項14】

Xaa<sub>1</sub>が、Gly、Asn、Pro、Gln、Ser、Thrであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>2</sub>が、Asp、Glu、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>3</sub>が、Thr、Glu、またはAspであり；  
 Xaa<sub>4</sub>が、IleまたはLeuであり；  
 Xaa<sub>5</sub>が、Val、Ile、またはAlaであり；  
 Xaa<sub>6</sub>が、Asn、Tyr、またはPheであり；  
 Xaa<sub>7</sub>が、Val、Ile、またはAlaであり；  
 Xaa<sub>8</sub>が、AlaまたはThrであり；  
 Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；  
 Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；  
 Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ  
 Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項13記載の方法。

【請求項15】

Xaa<sub>1</sub>が、Pro、Serであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>2</sub>が、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>3</sub>が、Thrであり；  
 Xaa<sub>4</sub>が、Ileであり；  
 Xaa<sub>5</sub>が、Alaであり；  
 Xaa<sub>6</sub>が、TyrまたはPheであり；  
 Xaa<sub>7</sub>が、Alaであり；  
 Xaa<sub>8</sub>が、AlaまたはThrであり；  
 Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；  
 Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；  
 Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ  
 Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項14記載の方法。

【請求項16】

Xaa<sub>1</sub>が、Pro、Serであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>2</sub>が、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>3</sub>が、Thrであり；  
 Xaa<sub>4</sub>が、Ileであり；  
 Xaa<sub>5</sub>が、Alaであり；  
 Xaa<sub>6</sub>が、TyrまたはPheであり；  
 Xaa<sub>7</sub>が、Alaであり；  
 Xaa<sub>8</sub>が、AlaまたはThrであり；  
 Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；  
 Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；  
 Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在せず；かつ  
 Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在しない、請求項15記載の方法。

【請求項17】

Xaa<sub>1</sub>が、Gly、Asn、Gln、Thrであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>2</sub>が、Asp、Gluであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>3</sub>が、GluまたはAspであり；

- Xaa<sub>4</sub>が、Leuであり；  
 Xaa<sub>5</sub>が、ValまたはIleであり；  
 Xaa<sub>6</sub>が、Asnであり；  
 Xaa<sub>7</sub>が、ValまたはIleであり；  
 Xaa<sub>8</sub>が、Thrであり；  
 Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；  
 Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；  
 Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ  
 Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項14記載の方法。 10
- 【請求項18】  
 Xaa<sub>1</sub>が、Gly、Asn、Gln、Thrであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>2</sub>が、Asp、Gluであるか、または存在せず；  
 Xaa<sub>3</sub>が、GluまたはAspであり；  
 Xaa<sub>4</sub>が、Leuであり；  
 Xaa<sub>5</sub>が、ValまたはIleであり；  
 Xaa<sub>6</sub>が、Asnであり；  
 Xaa<sub>7</sub>が、ValまたはIleであり；  
 Xaa<sub>8</sub>が、Thrであり；  
 Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；  
 Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；  
 Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在せず；かつ  
 Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在しない、請求項17記載の方法。 20
- 【請求項19】  
 前記ペプチドがSEQ ID NO:5の配列を含む、請求項18記載の方法。
- 【請求項20】  
 前記ペプチドがSEQ ID NO:5の配列からなる、請求項19記載の方法。
- 【請求項21】 30  
 前記ペプチドがSEQ ID NO:7の配列を含む、請求項18記載の方法。
- 【請求項22】  
 前記ペプチドがSEQ ID NO:7の配列からなる、請求項21記載の方法。
- 【請求項23】  
 カルボキシ末端アミノ酸がD-アミノ酸およびL-アミノ酸から選択される、請求項13～22のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項24】  
 カルボキシ末端アミノ酸がアミド化されている、請求項13～22のいずれか一項記載の方法。 40
- 【請求項25】 40  
 前記体液貯留障害が、腎臓疾患、心臓疾患、肝臓疾患、および高血圧からなる群より選択される、請求項1～24のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項26】  
 前記体液貯留障害が、心不全、高血圧、塩依存型の高血圧、肝性浮腫、肝硬変、急性腎不全、腎機能不全、ネフローゼ性浮腫、糸球体腎炎、腎盂腎炎、腎不全、慢性腎不全、腎炎、ネフローゼ、高窒素血症、尿毒症、免疫腎疾患、急性腎炎症候群、急速進行性腎炎症候群、ネフローゼ症候群、ベルジェ病、慢性腎炎/タンパク尿症候群、尿細管間質疾患、腎毒性障害、腎梗塞、アテローム塞栓性腎疾患、腎皮質壊死、悪性腎血管硬化症、腎静脈血栓症、腎尿細管性アシドーシス、腎性糖尿、腎性尿崩症、パーター症候群、リドル症候群、多発性嚢胞腎、腎髄質嚢胞症、髄質海綿腎、遺伝性腎炎、および爪膝蓋骨症候群から 50

選択される、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

前記体液貯留障害が心不全である、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

前記心不全がうっ血性心不全または急性心不全である、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

前記体液貯留障害が多発性嚢胞腎である、請求項26記載の方法。

【請求項 30】

前記多発性嚢胞腎が常染色体優性多発性嚢胞腎または劣性の常染色体劣性多発性嚢胞腎である、請求項29記載の方法。

10

【請求項 31】

ナトリウム利尿および/または利尿を増加させる、請求項1～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項 32】

前記ペプチドの前記有効量が、塩平衡、体液平衡、または塩平衡と体液平衡の両方に影響を及ぼす一つまたは複数の追加の薬物と組み合わせて投与される、請求項1～31のいずれか一項記載の方法。

【請求項 33】

一つまたは複数の他の薬物が利尿薬を含む、請求項32記載の方法。

【請求項 34】

利尿薬が、炭酸脱水酵素阻害剤、チアジド様利尿薬、ループ利尿薬または強力利尿薬、およびカリウム保持性利尿薬からなる群より選択される、請求項33記載の方法。

20

【請求項 35】

利尿薬が、フロセミド、ブメタジン (bumetadine)、トルセミド、ヒドロクロロチアジド、トリアムテリン (triamterine)、インダパミド、エトクリン酸 (ethacrynic acid)、スピロラクトン、およびメトラゾンからなる群より選択される、請求項34記載の方法。

【請求項 36】

グアニリンファミリーペプチドのB異性体であるペプチドを含む組成物であって、該B異性体ペプチドと該ペプチドのA型とが天然には存在しない比で該組成物中に存在し、ただし、該ペプチドが

30

NDDCELCVNVACTGCL, PGTCEICAYAACTGCL,

NDDCELCVNVACTGCLKK, ADDCELCVNVACTGCL,

NDDCELCANVACTGCL, NDDCELCVNAACTGCL, NDDCELCVNVACAGCL,

NDDCELCVNVACTACL,

NDDCELCAYAACTGCL,および NDDCELCVNPACTGCL

ではない、組成物。

【請求項 37】

前記グアニリンファミリーペプチドがウログアニリン (Ugn) ペプチドまたはグアニリン (Gn) ペプチドである、請求項36記載の組成物。

40

【請求項 38】

UgnのB異性体 (UgnB) を含み、該UgnBとUgnのA型 (UgnA) とが天然には存在しない比で前記組成物中に存在する、請求項37記載の組成物。

【請求項 39】

9:1より大きいUgnB対UgnAの比を含む、請求項38記載の組成物。

【請求項 40】

99:1より大きいUgnB対UgnAの比を含む、請求項39記載の組成物。

【請求項 41】

50

UgnAを含まない、請求項40記載の組成物。

【請求項 4 2】

UgnAへの変換速度を低下させるように前記UgnBが修飾されている、請求項38記載の組成物。

【請求項 4 3】

GnのB異性体（GnB）を含み、該GnBとGnのA型（GnA）とは天然には存在しない比で前記組成物中に存在する、請求項42記載の組成物。

【請求項 4 4】

9:1より大きいGnB対GnAの比を含む、請求項43記載の組成物。

【請求項 4 5】

99:1より大きいGnB対GnAの比を含む、請求項46記載の組成物。

【請求項 4 6】

GnAを含まない、請求項45記載の組成物。

【請求項 4 7】

GnAへの変換速度を低下させるように前記GnBが修飾されている、請求項43記載の組成物。

【請求項 4 8】

前記ペプチドが

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Glu-Xaa<sub>4</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Ala-Cys-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Cys-Xaa<sub>10</sub>-  
Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub> (SEQ ID NO:2)

のアミノ酸配列を有し、

Xaa<sub>1</sub>は、Gly、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Phe、Trp、Tyrであるか、または存在せず；

Xaa<sub>2</sub>は、Asp、Glu、Gly、His、Asn、Ser、Gln、Thrであるか、または存在せず；

Xaa<sub>3</sub>は、Thr、Glu、Asp、またはSerであり；

Xaa<sub>4</sub>は、IleまたはLeuであり；

Xaa<sub>5</sub>は、Val、Ile、Ala、またはLeuであり；

Xaa<sub>6</sub>は、Asn、Tyr、Phe、またはGlnであり；

Xaa<sub>7</sub>は、Val、Ile、Ala、Leu、またはProであり；

Xaa<sub>8</sub>は、Ala、Ser、またはThrであり；

Xaa<sub>9</sub>は、GlyまたはAlaであり；

Xaa<sub>10</sub>は、Leu、Ile、Phe、Trp、またはTyrであり；

Xaa<sub>11</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ

Xaa<sub>12</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項36記載の組成物。

【請求項 4 9】

Xaa<sub>1</sub>が、Gly、Asn、Pro、Gln、Ser、Thrであるか、または存在せず；

Xaa<sub>2</sub>が、Asp、Glu、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず；

Xaa<sub>3</sub>が、Thr、Glu、またはAspであり；

Xaa<sub>4</sub>が、IleまたはLeuであり；

Xaa<sub>5</sub>が、Val、Ile、またはAlaであり；

Xaa<sub>6</sub>が、Asn、Tyr、またはPheであり；

Xaa<sub>7</sub>が、Val、Ile、またはAlaであり；

Xaa<sub>8</sub>が、AlaまたはThrであり；

Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；

Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；

Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ

10

20

30

40

50

Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項48記載の組成物。

【請求項50】

Xaa<sub>1</sub>が、Pro、Serであるか、または存在せず；

Xaa<sub>2</sub>が、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず；

Xaa<sub>3</sub>が、Thrであり；

Xaa<sub>4</sub>が、Ileであり；

Xaa<sub>5</sub>が、Alaであり；

Xaa<sub>6</sub>が、TyrまたはPheであり；

Xaa<sub>7</sub>が、Alaであり；

Xaa<sub>8</sub>が、AlaまたはThrであり；

Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；

Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；

Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ

Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項49記載の組成物。

【請求項51】

Xaa<sub>1</sub>が、Pro、Serであるか、または存在せず；

Xaa<sub>2</sub>が、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず；

Xaa<sub>3</sub>が、Thrであり；

Xaa<sub>4</sub>が、Ileであり；

Xaa<sub>5</sub>が、Alaであり；

Xaa<sub>6</sub>が、TyrまたはPheであり；

Xaa<sub>7</sub>が、Alaであり；

Xaa<sub>8</sub>が、AlaまたはThrであり；

Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；

Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；

Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在せず；かつ

Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在しない、請求項50記載の組成物。

【請求項52】

Xaa<sub>1</sub>が、Gly、Asn、Gln、Thrであるか、または存在せず；

Xaa<sub>2</sub>が、Asp、Gluであるか、または存在せず；

Xaa<sub>3</sub>が、GluまたはAspであり；

Xaa<sub>4</sub>が、Leuであり；

Xaa<sub>5</sub>が、ValまたはIleであり；

Xaa<sub>6</sub>が、Asnであり；

Xaa<sub>7</sub>が、ValまたはIleであり；

Xaa<sub>8</sub>が、Thrであり；

Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；

Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；

Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつ

Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない、請求項49記載の組成物。

【請求項53】

Xaa<sub>1</sub>が、Gly、Asn、Gln、Thrであるか、または存在せず；

Xaa<sub>2</sub>が、Asp、Gluであるか、または存在せず；

Xaa<sub>3</sub>が、GluまたはAspであり；

10

20

30

40

50

Xaa<sub>4</sub>が、Leuであり；

Xaa<sub>5</sub>が、ValまたはIleであり；

Xaa<sub>6</sub>が、Asnであり；

Xaa<sub>7</sub>が、ValまたはIleであり；

Xaa<sub>8</sub>が、Thrであり；

Xaa<sub>9</sub>が、Glyであり；

Xaa<sub>10</sub>が、Leu、Phe、またはTyrであり；

Xaa<sub>11</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在せず；かつ

Xaa<sub>12</sub>が、Arg、Lys、Ala、Val、Leu、Ileであるか、または存在しない、請求項52記載の組成物。

10

【請求項54】

前記ペプチドがSEQ ID NO:7の配列を含む、請求項53記載の組成物。

【請求項55】

前記ペプチドがSEQ ID NO:7の配列からなる、請求項53記載の組成物。

【請求項56】

カルボキシ末端アミノ酸がD-アミノ酸およびL-アミノ酸から選択される、請求項36～55のいずれか一項記載の組成物。

【請求項57】

カルボキシ末端アミノ酸がアミド化されている、請求項36～55のいずれか一項記載の組成物。

20

【請求項58】

UgnAに対する比が55:45より高いUgnBを含み、製剤中で48時間後に該UgnBの50%未満がUgnAに変換されるように製剤化されている、組成物。

【請求項59】

凍結乾燥されている、請求項36～58のいずれか記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

ウログアニリン（Ugn）とグアニリン（Gn）は、それぞれ腸管の腸クロム親和性細胞および杯細胞によって産生される、密接に関連するペプチドである。どちらのペプチドも、腸内の体液および電解質バランスのキー調節因子であるグアニル酸シクラーゼC（GC-C）受容体に結合する。腸管上皮表面の頂端膜上に位置するGC-Cは、刺激を受けると、腸管上皮サイクリックGMP（cGMP）の増加を引き起こす。cGMPのこの増加は、CFTRクロライドチャンネルを介した塩化物イオンおよび炭酸水素イオンの外向きフラックスを刺激し、ナトリウム水素カチオン交換輸送体（NHE）によるナトリウム再吸収を阻害する。GC-Cは、分泌性下痢の一形態の原因物質であるSTa、STa（h）、およびSTa（p）など、細菌が産生する熱安定毒素によっても活性化される。

30

【0002】

UgnとGnは、その腸管を介した応答だけでなく、血漿中を循環して腎臓からのナトリウム利尿応答も誘発する。どちらのペプチドも、腸からのナトリウム吸収を遅延し、腎臓によるナトリウム排泄を増加することによって、食塩摂取量の急激な増加を緩衝する、容量調節因子であるとされている。

40

【0003】

UgnとGnは、それぞれ、UgnAおよびUgnBまたはGnAおよびGnBと呼ばれる、コンフォメーションが異なる二つの立体異性体として存在する。UgnとGnはどちらも、そのカルボキシ末端が、A異性体とB異性体の間の相互変換速度を調節しているようである。ラット、マウス、およびオポッサムUgnの立体異性体は、37℃では毎秒1～2サイクルの速度で、自発的に相互変換する。これに対して、ヒトUgn（huUgn）の立体異性体は、37℃で、それぞれ約2日間の半減期を持つ。ヒトUgnアイソフォームの増加した安定性は、Aコンフォメーション

50

ンとBコンフォメーションの間の遷移を立体的に妨害する付加的なC末端ロイシン残基と相関している。この相対的安定性ゆえに、huUgnAとhuUgnBは、HPLCで分離して、活性を独立して調べることができる。そのような研究において、培養GC-C発現細胞に適用した場合、huUgnAが、 $10^{-7}$ M程度のEC<sub>50</sub>で、ロバストなcGMP応答を誘発するのに対して、huUgnBの力価は100分の1を超える。ヒトの血漿および尿ではどちらの形態のUgnも同定されているが、所与のUgnBが生物学的活性を見かけ上欠いていることから、このトポアイソマーの潜在的な生理学的意義は、長い間、顧みられることがなかった。

【発明の概要】

【0004】

ある局面において、本発明は、グアニリンファミリーペプチドのB異性体を含む薬学的組成物を特徴とする。ある態様では、グアニリンファミリーペプチドが、ウログアニリン(Ugn)ペプチドまたはグアニリン(Gn)ペプチドのB異性体である。もう一つの態様では、グアニリンファミリーペプチドが、UgnBまたはGnBである。もう一つの態様において、グアニリンファミリーペプチドは、UgnB:UgnAの比が55:45~100:0(例えばUgnB:UgnAの比が55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、99:1、またはそれ以上)であるUgnB(例えばhuUgnB)である。もう一つの態様において、グアニリンファミリーペプチドは、GnB:GnAの比が55:45~100:0(例えばGnB:GnAの比が55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、99:1、またはそれ以上)であるGnB(例えばhuGnB)である。もう一つの態様では、グアニリンファミリーペプチドのB異性体は、該ペプチドのA型に対し天然には存在しない比であり、ただし、該B異性体は

NDDCELCVNVACTGCL, PGTCEICAYAACTGCL,

NDDCELCANVACTGCL, NDDCELCVNAACTGCL, NDDCELCVNVACAGCL,

NDDCELCVNVACTACL, NDDCELCAYAACTGCL, およびNDDCELCVNPACTGCL

(SEQ ID NO : 8-17)

ではない。ある態様では、薬学的組成物が凍結乾燥される。

【0005】

本発明は、UgnAへのUgnBの変換速度を低下させるように修飾されたUgnB(例えばhuUgnB)を含む薬学的組成物も特徴とする。本発明は、GnAへのGnBの変換速度を低下させるように修飾されたGnB(例えばhuGnB)を含む薬学的組成物も特徴とする。

【0006】

本発明は、UgnB(例えばhuUgnB)のみを含むか、またはUgnAと共に天然には存在しない比(例えば55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、99:1、またはそれ以上のUgnB:UgnAの比)で存在するUgnB(例えばhuUgnB)を含む、組成物の有効量を投与することによって、対象における体液貯留を特徴とする障害を処置するための方法の特徴とする。本発明は、GnAの非存在下でGnB(例えばhuGnB)を含むか、GnAと共に天然には存在しない比(例えば55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、99:1、またはそれ以上のGnB:GnAの比)で存在するGnB(例えばhuGnB)を含む組成物の有効量を投与することによって、対象における体液貯留を特徴とする障害を処置するための方法の特徴とする。

【0007】

所望であれば、UgnAへの変換速度を低下させるように、UgnBを修飾することができる。また、UgnAが組成物中に存在する場合は、UgnBへの変換を防止するために、UgnAを修飾することもできる。UgnBは、SEQ ID NO:5に記載のアミノ酸配列を有することができる。SEQ ID NO:5によってコードされるUgnBは、保存的アミノ酸または非天然アミノ酸を含むアミノ酸置換を含有することができる。ペプチドは、例えば、次の配列を有することができる。

。

Asn Asp Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala

Cys Thr Gly Cys Leu (SEQ ID NO:7)

【 0 0 0 8 】

同様に、所望であれば、GnAへの変換速度を低下させるように、GnBを修飾することができる。また、GnAが組成物中に存在する場合は、GnBへの変換を防止するために、GnAを修飾することもできる。GnBは、SEQ ID NO:6に記載のアミノ酸配列を有することができる。SEQ ID NO:6によってコードされるGnBは、保存的アミノ酸または非天然アミノ酸を含むアミノ酸置換を含有することができる。

【 0 0 0 9 】

本明細書において記載するペプチドおよび薬学的組成物は、例えば腎臓疾患、心臓疾患、肝臓疾患、または高血圧を含む体液貯留障害を予防または処置するために使用することができる。グアニリンファミリーペプチドのB異性体は、単独で投与するか、塩平衡、体液平衡、または塩平衡と体液平衡の両方に影響を及ぼす一つまたは複数の追加薬剤と組み合わせ投与することができる。そのような薬剤には、利尿薬（例えば炭酸脱水酵素阻害剤、チアジド様利尿薬、ループ利尿薬または強力利尿薬、およびカリウム保持性利尿薬；具体的薬物には、フロセミド、ブメタジン（bumetadine）、トルセミド、ヒドロクロロチアジド、トリアムテリン（triamterine）、インダパミド、エトクリン酸（ethacrynic acid）、スピロラクトン、およびメトラゾン）が含まれる。

【 0 0 1 0 】

本明細書で用いるグアニリンファミリーペプチドは、四つのシステインが特徴的なパターン

(Cys-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-

Xaa-Cys (SEQ ID NO:1))

で配置されている、天然または非天然アミノ酸配列を有するペプチドである。ある態様では、グアニリンファミリーペプチドが二つのジスルフィド結合（SEQ ID NO:1の第1Cysと第3Cysの間に一つと、SEQ ID NO:1の第2Cysと第4Cysの間に一つ）を含有する。ある態様では、A型のグアニリンファミリーペプチドがグアニル酸シクラーゼC受容体に結合して、それを活性化する。グアニリンファミリーペプチドには、なかんずく、グアニリン、ウログアニリン、リンホグアニリン（lymphoguanin）、およびレノグアニリン（renoguanin）ペプチドが含まれる。ある態様では、グアニリンファミリーペプチドに、グアニリンペプチドおよびウログアニリンペプチドが含まれる。さらなる一態様では、グアニリンファミリーペプチドに、哺乳動物のグアニリンペプチドおよびウログアニリンペプチドが含まれる。もう一つの態様では、グアニリンファミリーペプチドが、配列

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Glu-Xaa<sub>4</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Ala-Cys-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Cys-Xaa<sub>10</sub>-

Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub> (SEQ ID NO:2)

を含み、ここで、Xaa<sub>1</sub>は、Gly、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Phe、Trp、Tyrであるか、存在せず；Xaa<sub>2</sub>は、Asp、Glu、Gly、His、Asn、Ser、Gln、Thrであるか、または存在せず；Xaa<sub>3</sub>は、Thr、Glu、Asp、またはSerであり；Xaa<sub>4</sub>は、IleまたはLeuであり；Xaa<sub>5</sub>は、Val、Ile、Ala、またはLeuであり；Xaa<sub>6</sub>は、Asn、Tyr、Phe、またはGlnであり；Xaa<sub>7</sub>は、Val、Ile、Ala、Leu、またはProであり；Xaa<sub>8</sub>は、Ala、Ser、またはThrであり；Xaa<sub>9</sub>は、GlyまたはAlaであり；Xaa<sub>10</sub>は、Leu、Ile、Phe、Trp、またはTyrであり；Xaa<sub>11</sub>はArg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず；かつXaa<sub>12</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない。

【 0 0 1 1 】

「ウログアニリンB」または「UgnB」は、次の配列を有するポリペプチドを意味する：

10

20

30

40

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Glu-Leu-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Asn-Xaa<sub>6</sub>-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-  
Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub> (SEQ ID NO:3)

ここで、Xaa<sub>1</sub>は、Gly、Asn、Gln、Thrであるか、または存在せず;Xaa<sub>2</sub>は、Asp、Gluであるか、または存在せず;Xaa<sub>3</sub>は、GluまたはAspであり;Xaa<sub>5</sub>は、ValまたはIleであり;Xaa<sub>6</sub>はValまたはIleであり;Xaa<sub>7</sub>は、Leu、Phe、またはTyrであり;Xaa<sub>8</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず;かつXaa<sub>9</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない。カルボキシ末端アミノ酸は、それがXaa<sub>7</sub>、Xaa<sub>8</sub>、またはXaa<sub>9</sub>のいずれであっても、D-アミノ酸またはL-アミノ酸であることができ、アミド化されていてもよい。 10

【0012】

「グアニリンB」または「GnB」は、次の配列を有するポリペプチドを意味する:

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-Ala-Ala-Cys-Xaa<sub>3</sub>-Gly-Cys-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-  
Xaa<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 4)

ここで、Xaa<sub>1</sub>は、Pro、Serであるか、または存在せず;Xaa<sub>2</sub>は、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず;Xaa<sub>3</sub>は、TyrまたはPheであり;Xaa<sub>4</sub>は、AlaまたはThrであり;Xaa<sub>5</sub>は、Leu、Phe、またはTyrであり;Xaa<sub>6</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず;かつXaa<sub>6</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない。カルボキシ末端アミノ酸は、それがXaa<sub>5</sub>またはXaa<sub>6</sub>のどちらであっても、D-アミノ酸またはL-アミノ酸であることができ、アミド化されていてもよい。 20

【0013】

本明細書で用いるグアニリンファミリーペプチドの「A型」および「B型」を図1に示す。具体的には、グアニリンファミリーペプチドの「A型」は、ペプチドのN末端を左後方に延ばし、ペプチドのC末端を右前方に延ばした状態で見たとときに、四つのアミノ酸によって二つの中央システイン間に形成される中央ループを、四つのシステインによって規定される面の上方に有する形態である。グアニリンファミリーペプチドの「B型」は、ペプチドのN末端を左後方に延ばし、ペプチドのC末端を右前方に延ばした状態で見たとときに、四つのアミノ酸によって二つの中央システイン間に形成される中央ループを、四つのシステインによって規定される面の下方に有する形態である。 30

【0014】

「ヒトUgn」または「huUgn」は、次の配列を有するタンパク質を意味する。

Asn Asp Asp Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu (SEQ ID NO:5)

「ヒトUgnA」または「huUgnA」は、huUgnのAアイソフォームを意味し、「ヒトUgnB」または「huUgnB」は、Bアイソフォームを意味する。AアイソフォームとBアイソフォームの構造を、図1に図示する。

【0015】

「ヒトGn」または「huGn」は、次の配列を有するタンパク質を意味する。

Pro Gly Thr Cys Glu Ile Cys Ala Tyr Ala Ala Cys Thr Gly Cys (SEQ ID NO:6)

「ヒトGnA」または「huGnA」は、huGnのAアイソフォームを意味し、「ヒトGnB」または「huGnB」は、Bアイソフォームを意味する。

【0016】

用語「UgnB」および「GnB」には、それぞれhuUgnBまたはhuGnB中の任意のアミノ酸残基の任意の保存的置換も含まれる。保存的アミノ酸置換では、あるアミノ酸が、類似の作用を有するアミノ酸、またはよく似た電荷、極性もしくは疎水性を持つアミノ酸に改変されることになる。天然アミノ酸置換のうち、一般に保存的であると見なされているのは、以 50

下である。

置換されるアミノ酸	記号	以下のいずれかによる置換
アラニン	Ala	Gly, Ser
アルギニン	Arg	Lys, His
アスパラギン	Asn	Asp, Glu, Gln,
アスパラギン酸	Asp	Asn, Glu, Gln
グルタミン	Gln	Asn, Glu, Asp
グルタミン酸	Glu	Asp, Asn, Gln
グリシン	Gly	Ala
ヒスチジン	His	Lys, Arg
イソロイシン	Ile	Val, Leu, Met
ロイシン	Leu	Val, Ile, Met
リジン	Lys	Arg, His
メチオニン	Met	Ile, Leu, Val
フェニルアラニン	Phe	Tyr, His, Trp
プロリン	Pro	
セリン	Ser	Thr, Ala
スレオニン	Thr	Ser, Met, Val
トリプトファン	Trp	Phe, Tyr
チロシン	Tyr	Phe, His
バリン	Val	Leu, Ile, Met

10

20

さらにまた、用語huUgnBには、非天然アミノ酸による保存的置換も含まれる。

【 0 0 1 7 】

UgnBおよびGnBは、追加のN末端および/またはC末端アミノ酸も含むことができる。ある態様では、さらに1、2、3、4、5、6、7もしくは8個またはそれ以上の追加N末端アミノ酸を、UgnBまたはGnBに含めることができる。もう一つの態様では、さらに1、2、3、4、5、6、7もしくは8個またはそれ以上の追加C末端アミノ酸を、UgnBまたはGnBに含めることができる。さらなる一態様では、さらに1、2、3、4、5、6、7もしくは8個またはそれ以上の追加N末端アミノ酸と、さらに1、2、3、4、5、6、7もしくは8個またはそれ以上の追加C末端アミノ酸とを、UgnBまたはGnBに含めることができる。

30

【 0 0 1 8 】

いずれの場合も、用語「UgnB」および「GnB」は、ヒトウログアニリンのB異性体の安定な活性（「huUgnB活性」）を有するタンパク質だけを包含するものとする。この異性体の図を図1に示す。そのような活性には、有意なナトリウム利尿活性、およびヒトUgnAと比較して弱いGC-C活性が含まれる。ナトリウム利尿活性は、本明細書において説明するとおり、腎ナトリウム排泄の測定によって決定することができる。有意なナトリウム利尿活性は、例えば1nmol、3nmol、5nmol、7nmol、9nmol、15nmolまたはそれ以上を上回るUgnBまたはGnBの用量での、統計的に有意なナトリウム排泄の誘導を特徴とする。GC-C活性は、本明細書において説明するとおり、GC-Cを発現するT84細胞株におけるサイクリックGMP合成を測定することによって決定することができる。弱いGC-C活性とは、本明細書に記載のGC-C活性アッセイにおいて、等量のUgnAまたはGnAと比較して、20%、10%、5%、1%、0.5%、またはそれ未満の活性を有するUgnBまたはGnBと特徴づけられる。安定な活性は、少なくとも4、5、6、8、12、24時間、2日、4日、1週間、またはそれ以上の期間、溶液状態で生理的条件下にあるときに、A異性体とB異性体の間の相互変換が50%未満であることを特徴とする。

40

50

## 【0019】

「変換速度を低下させるように修飾された」とは、特定のGnまたはUgn配列の野生型と比較したときに、AアイソフォームとBアイソフォームの間の相互変換を減少させるようにGnまたはUgnが修飾されていることを意味する。

## 【0020】

「タンパク質」または「ポリペプチド」または「ペプチド」は、本明細書において説明するとおり、天然または非天然のポリペプチドまたはペプチドの全部または一部を構成する、2個より多い天然または非天然アミノ酸の任意の鎖を意味し、翻訳後修飾（例えば糖鎖付加またはリン酸化）は問わない。

## 【0021】

本明細書で用いる天然アミノ酸は、別段の注記がない限り、L-立体配置を有する天然の-アミノ酸、例えば天然真核生物タンパク質中に通常見いだされるものである。非天然アミノ酸とは、真核生物タンパク質中に通常は見いだされないアミノ酸、例えばL-立体配置を有する天然-アミノ酸のエピマー、つまり天然でないD-立体配置を有するアミノ酸；またはその(D,L)-異性体混合物；またはそのようなアミノ酸のホモログ、例えば-アミノ酸、 $\alpha$ -二置換アミノ酸、またはアミノ酸側鎖がメチレン基1個分または2個分短縮されているか、最大10炭素原子まで延長されている-アミノ酸、例えば線状の鎖中に5個から10個まで（10個を含む）炭素原子を持つ-アミノアルカン酸、無置換または置換芳香族（-アリールまたは-アリール低級アルキル）、例えば置換フェニルアラニンまたはフェニルグリシンを指す。

## 【0022】

本発明は、本明細書において開示するペプチドの修飾体も提供する。そのような修飾体は線状または環状であることができ、非天然アミノ酸を有するペプチドを含む。修飾体には、本明細書において開示するペプチドが、置換、化学的、酵素的、または他の適切な手段により、もう一つの原子または部分（もう一つのペプチドまたはタンパク質を含む）で非共有結合的にまたは共有結合的に修飾されている分子も含まれる。前記部分は、それが非天然アミノ酸であるという点で、または一つもしくはそれ以上の天然アミノ酸が別の天然または非天然アミノ酸で置き換えられているという点で、本明細書に記載のペプチドにとって「外来性」であることができる。もう一つのペプチドまたはタンパク質に共有結合された本明細書に記載のペプチドまたは修飾体を含むコンジュゲートも本明細書に包含される。他の部分への結合は、リンカーまたはスペーサー、例えばアミノ酸リンカーまたはペプチドリナーを含んでもよい。修飾体には、例えば一つ、一部または全部の潜在的反応性基、例えばアミノ、カルボキシ、スルフヒドリル、またはヒドロキシル基が、保護された形態にあるペプチドも含まれる。

## 【0023】

本明細書に記載のペプチドを修飾する原子または部分は、分析目的に役立つことができ、例えばペプチドの検出を容易にするか、ペプチドの製造または精製に有利であるか、ペプチドの関連する性質を改善することができる。そのような性質には、ナトリウム利尿活性の誘導、またはインピボ投与への適合性、例えば溶解性または酵素分解に対する安定性が含まれる。修飾体には、本明細書に記載のペプチドともう一つの化学部分との共有結合または凝集によるコンジュゲートであって、誘導体化されていないペプチドと本質的に同じ活性を示すもの、および本明細書に記載のアミノ酸のいずれかの三次元構造に似るよう形作られた「ペプチドミメティック小分子」が含まれる。そのようなミメティックの例に、レトロ-インベルソ（retro-inverso）ペプチドがある（Chorev et al., Acc. Chem. Res. 26:266-273, 1993）。公知の医薬活性化合物に対してミメティックを設計することは、「リード」化合物に基づいて薬物を設計するための公知のアプローチである。これは、例えば「元の」活性化合物が合成困難であるか、合成に多大な費用を要する場合、またはそれが特定の投与様式にとって適切でない場合などに望ましいだろう。

## 【0024】

上記の一般的定義に含まれる修飾体のさらなる例には、次に挙げるものが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0025】

(I) ジスルフィド橋、チオエーテル橋を有する化合物、またはラクタムなどの環状ペプチドまたは修飾体。通例、ジスルフィド結合を含有する環状修飾体は、L-システインであってもD-システインであってもよい二つまたはそれ以上のシステインを含有するであろう。そのような修飾体では、システインの代わりに、ペニシラミン(  $\beta$ -ジメチルシステイン)を使用することができる。チオエーテル橋を含有するペプチドは、例えば遊離のシステイン残基を一端に有し、かつ他端にプロモ含有ビルディングブロック(例えばプロモ酢酸)を有する出発物質から得ることができる。環化は、システインの側鎖の選択的脱保護により、固相上で行うことができる。環状ラクタムは、例えばグルタミン酸の  $\gamma$ -カルボキシ基とリジンの  $\epsilon$ -アミノ基との間に形成することができる。グルタミン酸の代わりに、アスパラギン酸を使用することができる。リジンの代わりに、オルニチンまたはジアミノ酪酸を使用してもよい。また、C末端にあるアスパラギン酸またはグルタミン酸の側鎖とN末端アミノ酸の  $\epsilon$ -アミノ基との間でラクタムを作ることにも可能である。このアプローチは、 $\epsilon$ -アミノ酸(例えば  $\epsilon$ -アラニン)にも拡張することができる。あるいは、N末端またはC末端のグルタミン残基を、側鎖窒素原子間のアルケニル(alkenyl)鎖でつなぐこともできる(Phelan et al., J. Amer. Chem. Soc. 119:455-460, 1997)。

10

## 【0026】

(II) 置換によって修飾されている本明細書において開示するペプチド。一例として、一つまたは複数(例えば一つまたは二つ)のアミノ酸を、別の天然または非天然アミノ酸、例えばそれぞれのD-アナログ、またはミメティックで置き換える。例えば、PheまたはTyrを含有するペプチドでは、PheまたはTyrを別のビルディングブロック、例えば別のタンパク質構成アミノ酸または構造上関連するアナログで置き換えることができる。特定の修飾は、ペプチドのコンフォメーションが維持されるようなものである。例えば、アミノ酸を、 $\beta$ -二置換アミノ酸残基(例えば  $\beta$ -アミノイソ酪酸、1-アミノ-シクロプロパン-1-カルボン酸、1-アミノ-シクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-シクロヘキサン-1-カルボン酸、4-アミノピペリジン-4-カルボン酸、および1-アミノ-シクロヘプタン-1-カルボン酸)で置き換えることができる。

20

## 【0027】

(III) 酵素、蛍光マーカー、化学発光マーカー、金属キレート、常磁性粒子、ビオチンなどで検出可能に標識された本明細書に記載のペプチド。そのような修飾体では、ペプチドがコンジュゲーションパートナーに直接結合されるか、スペーサーまたはリンカー基、例えば(ペプチド性)親水性スペーサーを介して結合される。コンジュゲートはN末端またはC末端アミノ酸に結合すると有利である。例えばビオチンは、セリン残基またはテトラマーSer-Gly-Ser-Glyを介して、本明細書に開示するペプチドのN末端に結合することができる。

30

## 【0028】

(IV) 潜在的に反応性である側基に、一つまたは複数の保護基、例えばアセチルなどのアミノ保護基、またはカルボキシ保護基を有する本明細書に記載のペプチド。例えば、本発明の化合物のC末端カルボキシ基は、カルボキサミド官能基の形で存在することができる。適切な保護基は、当技術分野において公知である。そのような基は、例えばタンパク質分解に対する化合物の安定性を強化するために導入することができる。

40

## 【0029】

(V) いくつかの態様では、通常はジスルフィド結合を形成する1対または複数対のCys残基対の一方または両方のメンバーを、ホモシステイン、ペニシラミン、3-メルカプトプロリン(Kolodziej et al., 1996 Int J Pept Protein Res 48:274);  $\beta$ -ジメチルシステイン(Hunt et al., 1993 Int J Pept Protein Res 42:249)またはジアミノプロピオン酸(Smith et al., 1978 J Med Chem 21:117)で置き換えて、通常はジスルフィド結合の位置に代替的分子内架橋を形成させることができる。また、一つまたは複数のジスルフィド結合を、代替的共有結合架橋、例えばアミド結合( $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ または $-\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{O})\text{CH}_2-$ )、エステル結合、チオエステル結合、ラクタム橋、カルバモイル結合、尿

50

素結合、チオ尿素結合、リン酸エステル結合、アルキル結合 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ )、アルケニル結合 ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ )、エーテル結合 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ または $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ )、チオエーテル結合 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2-$ または $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ )、アミン結合 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2-$ または $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ )またはチオアミド結合 ( $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{S})\text{HNHCH}_2-$ または $-\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{S})\text{CH}_2-$ )で置き換えることもできる。例えば、Ledu et al. (Proc Nat'l Acad. Sci. 100:11263, 2003)は、ラクタム架橋およびアミド架橋を作るための方法を記載している。Schafmeister et al. (J. Am. Chem. Soc. 122:5891, 2000)は、安定な炭化水素架橋を記載している。

#### 【0030】

ヒスチジル残基は、一般に、pH5.5~7.0におけるジエチルプロカルボネート (diethylprocarbonate) との反応によって修飾される。なぜなら、この薬剤は、ヒスチジル側鎖に比較的特異的だからである。パラ-プロモフェナシルプロミドも有用であり、反応はpH6.0の0.1Mカコジル酸ナトリウム中で行うことができる。

10

#### 【0031】

リジニル残基およびアミノ末端残基は、無水コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤による修飾には、リジニル残基の電荷を反転させる効果がある。

-アミノ含有残基を修飾するための他の適切な試薬には、ピコリンイミド酸メチルなどのイミドエステル;ピリドキサルリン酸;ピリドキサル;クロロポロヒドリド;トリニトロベンゼンスルホン酸;0-メチルイソ尿素 (0-methylisourea);2,4-ペンタンジオン;およびグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応が含まれる。

20

#### 【0032】

アルギニル残基は、一つまたはいくつかの従来の試薬 (例えばフェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン、およびニンヒドリン) との反応によって修飾される。グアニジン官能基は $\text{pK}_a$ が高いので、アルギニン残基を修飾するには、反応をアルカリ条件下で行う必要がある。さらにまた、これらの試薬は、アルギニンだけでなくリジンの -アミノ基とも反応しうる。

#### 【0033】

カルボキシル側鎖基 (アスパルチルまたはグルタミル) は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミド) や1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドなどのカルボジイミド ( $\text{R}'-\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{R}'$ ) との反応によって選択的に修飾される。アスパルチル残基およびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によって、アスパラギニル残基およびグルタミニル残基に変換することもできる。

30

#### 【0034】

グルタミニル残基およびアスパラギニル残基は、対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基にしばしば脱アミド化される。あるいは、これらの残基は温和な酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基は、どちらの形態でも、本発明の範囲に含まれる。

#### 【0035】

ポリペプチドまたはその修飾体は、もう一つのタンパク質またはペプチドに、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合ポリペプチドなどとして融合するか、または結合することができる。他のよく使用される融合ポリペプチドには、マルトース-結合タンパク質、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) プロテインA、ポリヒスチジン、およびセルロース結合タンパク質などがあるが、これらに限定されるわけではない。

40

#### 【0036】

ペプチドの「ペプチドミメティック小分子」とは、ペプチドそのものと実質的に同じUg nB活性またはGnB活性を示す小分子を意味する。

#### 【0037】

「実質的に純粋なポリペプチド」とは、そのポリペプチドに天然に付随している成分から分離されているポリペプチドまたはペプチドである。通例、ポリペプチドは、そのポリペプチドに天然に結合しているタンパク質および天然有機分子を、重量で少なくとも60%含有しないのであれば、実質的に純粋である。さらなる態様では、ポリペプチドが、重量

50

で、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、そしてさらなる一態様では、少なくとも99%純粋なUgnBまたはGnBポリペプチドである。実質的に純粋なUgnBまたはGnBポリペプチドは、例えば、天然源から（例えば腸クロム親和性細胞から）の抽出によって、またはUgnBもしくはGnBをコードする組換え核酸の発現によって、またはポリペプチドを化学合成することによって得ることができる。純度は、任意の適切な方法で、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析を使って測定することができる。さらに、UgnBまたはGnBを、例えば本明細書に記載するようにHPLCによって、それぞれUgnAまたはGnA異性体から分離することができる。

【0038】

10

タンパク質は、天然状態でそのタンパク質に付随する不純物から分離されているのであれば、天然に結合している成分を実質的に含まない。例えば、化学的に合成されるか、その天然の由来源である細胞とは異なる細胞系において産生されたタンパク質は、そのタンパク質に天然に結合する成分を実質的に含まないであろう。したがって、実質的に純粋なポリペプチドには、大腸菌（*E. coli*）または他の原核生物中で合成された真核生物由来のものが含まれる。

【0039】

「処置する」とは、体液貯留を特徴とする障害を処置または予防するために、薬学的組成物を投与または処方することを意味する。

【0040】

20

「対象」とは、任意の動物（例えばヒト）を意味する。本明細書に記載の方法、組成物およびキットを使って処置することができる他の動物には、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウサギ、ハムスター、サル、モルモット、ラット、マウス、トカゲ、ヘビ、ヒツジ、ウシ、魚、および鳥が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】類似する量のhuUgnAおよびhuUgnBを含有する較正用サンプルのLC-MS分析を表すグラフである。破線はUV吸光度プロファイルであり、実線は、フルMSスキャンからの抽出イオンクロマトグラム（ $m/z$  1667-1669）である。正イオンモードにおいて、huUgnの $m/z$ 比は1667.6である。どちらの線についても、早く溶出する方のピークがhuUgnA、遅く溶出する方のピークがhuUgnBである。UV検出器の方がMS検出器よりわずかに上流にあるので、これら2本の線には約0.8分のオフセットがある。どちらの線も本質的に同じhuUgnA:huUgnBピーク比を有することに留意されたい。図1の挿入図は、huUgnAとhuUgnBのコンフォメーションを表す概略図である。

30

【図2】図2Aは、huUgnAおよびhuUgnBの存在下での、ペプチド濃度の関数としての、T84細胞におけるcGMP応答を表すグラフである。各データポイントは、huUgnA（中実の記号）を使った9回の実験およびhuUgnB（中空の記号）を使った3回の実験についての平均値（±標準誤差）を表す。曲線は、huUgnAについては $1.8 \times 10^{-7} M$ の $EC_{50}$ 、huUgnBについては $1.5 \times 10^{-5} M$ の $EC_{50}$ を使うと、 $\log$ （アゴニスト）対用量の等式（方法の項参照）に適合する。

図2Bは、T84細胞に対するhuUgnAおよびhuUgnBの刺激効果を表すグラフである。各棒は、（左から右に）対照培地、25nM huUgnA、180nM huUgnB、または前記二つのペプチドの組合せで処置した細胞におけるサイクリックGMPレベル（平均±sem, n=3）を表す。図2Cは、huUgnAおよびhuUgnBのどちらか一方で処置した細胞における、時間の関数としての、「UgnA様」活性の量を表すグラフである。A異性体およびB異性体（それぞれ中実および中空の丸）は、インビトロでゆっくり相互変換する。ペプチドを、1mMクエン酸緩衝液（pH4）中、50 で、0、24、または48時間インキュベートした。次に、サンプルをバイオアッセイ培地に希釈し、pHを7.0に調節し、T84細胞バイオアッセイにおいて活性を測定した。huUgnA標準曲線と同じアッセイで作成し、この標準曲線での内挿によって、サイクリックGMP応答を「UgnA様」ペプチドの回収量に変換した。

40

【図3】図3Aは、huUgnA（中実の記号）またはhuUgnB（中空の記号）のどちらか一方で処

50

置された動物における、時間の関数としての、「UgnA様」活性の尿中排泄を表すグラフである。水平線で示す期間、麻酔下のラットにhuUgnを注入した。ペプチドの注入前、注入中および注入後に、14区間連続する各20分間のクリアランス期間にわたって継続的に尿を採取した。各クリアランス期間中に取得された尿のサンプルを、T84細胞バイオアッセイにおける活性について評価した。次に、その結果得られたサイクリックGMP応答を、huUgnA標準曲線（図1Aと同様に構築したもの）での内挿によって、「UgnA様」ペプチドの見掛けの回収量に変換した。各サンプル中の活性が確実にこのアッセイを飽和させないようにするために、適切な希釈液を選んだ。図3Aの挿入図は、拡大したY軸上に再プロットしたhuUgnBデータを表すグラフである。huUgnB注入後に観察される低レベルの活性は、非常に高いレベルのhuUgnBに対する弱い応答を表す可能性が最も高い。黒と白の矢じりはLC-MS分析のために選んだ時点を示している。図3Bは、表示のUgnで処置した動物における、「UgnA様」活性の総尿中排泄量を表すグラフである。図3Aで図解したものと同一、独立したいくつかの実験を、各異性体について行った。各実験において、尿中に回収された活性を、クリアランス期間3~8にわたって合計して総回収量とし、各異性体についての平均総回収量をバーで表す（huUgnAが中実、huUgnBが中空、平均±sem、n=6）。

【図4】図4Aおよび図4Bは、huUgnのA型またはB型のどちらか一方を注入した後に得られた尿のフルMSスキャンからの抽出イオンクロマトグラム（m/z 1667-1669）である。図4Aは、収集期間5（図3Aにおいて黒い矢じりで示した期間）中にhuUgnA注入動物から採取された尿サンプルのLC-MS分析を表す。突出したピークのLC保持時間（10.61分）はhuUgnAの保持時間と一致し、一方、マイナーピークのLC保持時間（10.95分）はhuUgnBの保持時間と一致する。図4Bは、収集期間5（図3Aにおいて白い矢じりで示した期間）中にhuUgnB注入動物から採取された尿サンプルのLC-MS分析を表す。突出したピークのLC保持時間（10.99分）はhuUgnBの保持時間と一致し、一方、マイナーピークのLC保持時間（10.63分）はhuUgnAの保持時間と一致する。

【図5】huUgnA（中実の四角形、左カラム）またはhuUgnB（中実の丸、右カラム）を表示した量（nmol/kg BW）で注入中の、ナトリウム排泄（UNaV、nEq/分/gKW）の時間経過を表す一連のグラフである。ペプチドを0.6mlの等張食塩水に入れて、水平線で表示した期間中に60分かけて注入した。対照群（中空の三角形）のラットには、注入期間中、等張食塩水だけを与えた。値は、20分間のクリアランス期間のそれぞれについての平均±semである。ANOVA検定と事後比較により、huUgnAでは、25nmol/kgにのみ、注入期間（ $p < 0.05$ ）および注入後期間（ $p < 0.001$ ）に有意な増加が示された。huUgnBは、18、35、70、および140nmol/kg後の注入後期間に、有意なナトリウム利尿応答を生成した（いずれも $p < 0.001$ ）。

【図6】図6Aは、注入した用量の関数としてプロットした、huUgnBの注入中および注入後の3時間にわたる正味の累積ナトリウム排泄量（総ペプチド刺激アウトプット-対応する対照アウトプット）を表すグラフである。最初の1時間に、9、18、35、70、および140nmol/kgの量でペプチドを注入して、各データポイントを得た。対照値を0nmol/kgとして示す。曲線を、logアゴニスト-応答曲線に当てはめると、曲線は19nmol/kgのED<sub>50</sub>を示す。図6Bは、huUgnA（中空の記号）またはST-コア（中実の記号）の注入中および注入後の3時間にわたる累積ナトリウム排泄量を表すグラフである。huUgnAは12、25、50、100、および200nmol/kgの量で注入した。ST-コアは17、32、66、133、および266nmol/kgの量で注入した。曲線を三次スプラインアルゴリズムによって当てはめた。

【図7】静脈内ペプチド注入中および注入後の3時間にわたる正味の累積ナトリウム排泄量（総ペプチド刺激アウトプット-対応する対照アウトプット）を表すグラフである。最初の1時間に、ペプチドを次の量および組合せで注入した：A25 = huUgnA 25nmol/kg；B35 = huUgnB 35nmol/kg；A100 + B35 = huUgnB 35nmol/kgと組み合わせたhuUgnA 100nmol/kg；A25 + B35 = huUgnB 35nmol/kgと組み合わせたhuUgnA 25nmol/kg。A25 + B35に対するナトリウム利尿応答は、A25またはB35のみによって惹起されるナトリウム利尿と異ならなかった。A100 + B35に対する応答はA100に対する応答と異ならなかったが、B35のみに対する応答よりは有意に少なかった（\*  $p < 0.05$ ）。

10

20

30

40

50

【図8】 huUgnA (中実の四角形、左カラム) または huUgnB (中実の丸、右カラム) を、表示した量 (nmol/kg BW) で注入中の、カリウム排泄 (UKV、nEq/分/gKW) の時間経過を表す一連のグラフである。ペプチドを0.6mlの等張食塩水に入れて、水平線で表示した期間中に60分かけて注入した。対照群 (中空の三角形) のラットには、注入期間中、等張食塩水だけを与えた。値は、20分間のクリアランス期間のそれぞれについての平均 ± sem である。ANOVA検定と事後比較により、140nmol/kg huUgnB後の注入後期間にのみ有意な増加 ( $p < 0.05$ ) が示された。

【発明を実施するための形態】

【0042】

発明の詳細な説明

本明細書には、グアニリンファミリーペプチドのB異性体を使って体液貯留障害を処置する方法を記載する。UgnBは、A異性体 (UgnA) と比較して、そのナトリウム利尿活性において通常のシグモイド用量応答関係を示す。さらに、UgnAとは異なり、UgnBはGC-C受容体を弱くしか活性化しない。したがって、本明細書に記載のグアニリンファミリーペプチドの精製されたB異性体を含む組成物または該B異性体を含む混合物を含む組成物は、体液貯留障害の処置に有用である。

【0043】

グアニリンファミリーペプチド

Ugnおよびグアニリン (Gn) は、二つのジスルフィド結合 (一つのジスルフィド結合は、グアニリンファミリーペプチドコアモチーフ (SEQ ID NO:1) の第1および第3システイン間にあり、もう一つのジスルフィド結合は、グアニリンファミリーペプチドコアモチーフの第2および第4システイン間にある) によって作られる独特な環構造を共通点とする13~16アミノ酸のペプチドである。例えば、huUgn (SEQ ID NO:5) では、環構造が、位置4と12および位置7と15にあるシステイン間のジスルフィド結合によって形成される。中央ループ (例えばhuUgnにおいてアミノ酸8~11によって形成されるもの) は、架橋された四つのシステインによって形成される面の上または下のどちらか一方に位置することができ、コンフォメーションの異なるAトポ異性体とBトポ異性体の二つが生じる。これらの異性体の構造を図1に図示する。

【0044】

このタイプの異性は、哺乳動物ペプチドではユニークであり、ラット、マウス、およびオポッサムでは、GnおよびUgnの二つのコンフォメーション間の相互変換が、37°Cおよび中性pHにおいて、毎秒1~2サイクルの速度で起こる。ヒトGnの構造および相互変換速度はそのラット対応物に似るが、ヒトUgnは追加のロイシン残基を有し、それが、C末端を延長し、AコンフォメーションとBコンフォメーションの間の遷移を立体的に妨害して、各形態の半減期を37°Cで約2日にまで増加させている。この相対的安定性ゆえに、ヒトのUgnAとUgnBは、HPLCで分離して、活性を独立して調べることができる。そのような研究において、培養GC-C発現細胞に適用した場合、UgnAが $10^{-7}$ M程度の $EC_{50}$ でロバスタな応答を誘発するのに対し、UgnBの力価は100分の1未満である。

【0045】

本発明は、グアニリンファミリーペプチドのB異性体の投与を特徴とする。このグアニリンファミリーペプチドは、精製ヒトウログアニリンB (huUgnB) であるか、またはB-アイソフォームを安定化するように修飾されたhuUgnBまたは他のグアニリンファミリーペプチドであってよい。

【0046】

グアニリンファミリーペプチドは、四つのシステインが特徴的なパターン (Cys-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Cys (SEQ ID NO:1))

で配置されている、天然または非天然アミノ酸配列を有するペプチドであり、グアニリンファミリーペプチドは、例えば次の配列を含有することができる:

10

20

30

40

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Glu-Xaa<sub>4</sub>-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Ala-Cys-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Cys-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub> (SEQ ID NO:2)

ここで、Xaa<sub>1</sub>は、Gly、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Phe、Trp、Tyrであるか、または存在せず;Xaa<sub>2</sub>は、Asp、Glu、Gly、His、Asn、Ser、Gln、Thrであるか、または存在せず;Xaa<sub>3</sub>は、Thr、Glu、Asp、またはSerであり;Xaa<sub>4</sub>は、IleまたはLeuであり;Xaa<sub>5</sub>は、Val、Ile、Ala、またはLeuであり;Xaa<sub>6</sub>は、Asn、Tyr、Phe、またはGlnであり;Xaa<sub>7</sub>は、Val、Ile、Ala、Leu、またはProであり;Xaa<sub>8</sub>は、Ala、Ser、またはThrであり;Xaa<sub>9</sub>は、GlyまたはAlaであり;Xaa<sub>10</sub>は、Leu、Ile、Phe、Trp、またはTyrであり;Xaa<sub>11</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず;かつXaa<sub>12</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない。

【 0 0 4 7 】

グアニリンファミリーペプチドのA型は、グアニル酸シクラーゼC受容体 (GC-C受容体) に結合し、それを活性化することができる。グアニリンファミリーペプチドには、グアニリン (Gn)、ウログアニリン (Ugn)、リンホグアニリン、およびレノグアニリンペプチドが含まれる。

【 0 0 4 8 】

Ugnは、配列:

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Glu-Leu-Cys-Xaa<sub>5</sub>-Asn-Xaa<sub>6</sub>-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub> (SEQ ID NO:3)

を有することができ、ここで、Xaa<sub>1</sub>は、Gly、Asn、Gln、Thrであるか、または存在せず;Xaa<sub>2</sub>は、Asp、Gluであるか、または存在せず;Xaa<sub>3</sub>は、GluまたはAspであり;Xaa<sub>5</sub>は、ValまたはIleであり;Xaa<sub>6</sub>は、ValまたはIleであり;Xaa<sub>7</sub>は、Leu、Phe、またはTyrであり;Xaa<sub>8</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず;かつXaa<sub>9</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない。カルボキシ末端アミノ酸は、それがXaa<sub>7</sub>、Xaa<sub>8</sub>、またはXaa<sub>9</sub>のいずれであっても、D-アミノ酸またはL-アミノ酸であることができ、アミド化されていてもよい。

【 0 0 4 9 】

huUgnは、配列:

Asn Asp Asp Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr

Gly Cys Leu (SEQ ID NO:5)

を有する。

【 0 0 5 0 】

グアニリンは、配列:

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-Ala-Ala-Cys-Xaa<sub>3</sub>-Gly-Cys-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 4)

を有することができ、ここで、Xaa<sub>1</sub>は、Pro、Serであるか、または存在せず;Xaa<sub>2</sub>は、Gly、His、Asn、Serであるか、または存在せず;Xaa<sub>2</sub>は、TyrまたはPheであり;Xaa<sub>3</sub>は、AlaまたはThrであり;Xaa<sub>4</sub>は、Leu、Phe、またはTyrであり;Xaa<sub>5</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在せず;かつXaa<sub>6</sub>は、Arg、Lys、Ala、Leu、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Phe、Trp、Tyr、Asp、Glu、Gln、Asnであるか、または存在しない。カルボキシ末端アミノ酸は、それがXaa<sub>5</sub>またはXaa<sub>6</sub>のどちらであっても、D-アミノ酸またはL-アミノ酸であることができ、アミド化されていてもよい。

【 0 0 5 1 】

huGnは、配列:

Pro Gly Thr Cys Glu Ile Cys Ala Tyr Ala Ala Cys Thr Gly

Cys (SEQ ID NO:6)

を有する。

【0052】

UgnおよびGnのさらなる配列は、PCT出願公開番号WO2007/101158に記載されており、この文献は参照によりその全てが本明細書に組み込まれる。

【0053】

適応

本発明の方法および組成物は、異常な体液および/または塩貯留を特徴とする障害を処置するのに有用である。そのような障害の例は、腎臓疾患または腎機能障害（慢性糸球体腎炎および慢性腎不全を含む）、心臓疾患または心不全（うっ血性心臓疾患が引き起こす浮腫を含む）、肝臓疾患（肝硬変を含む）、および高血圧である。本発明の方法および組成物は、利尿性薬物の恩典を受けるであろうが、従来の利尿薬には反応しない患者の処置にも有用である。

10

【0054】

ある態様では、本発明の方法および組成物が、心不全、高血圧、塩依存型の高血圧、肝性浮腫、肝硬変、急性腎不全、腎機能不全、ネフローゼ性浮腫、糸球体腎炎、腎盂腎炎、腎不全、慢性腎不全、腎炎、ネフローゼ、高窒素血症、尿毒症、免疫腎疾患、急性腎炎症候群、急速進行性腎炎症候群、ネフローゼ症候群、ベルジェ病、慢性腎炎/タンパク尿症候群、尿細管間質疾患、腎毒性障害、腎梗塞、アテローム塞栓性腎疾患、腎皮質壊死、悪性腎血管硬化症、腎静脈血栓症、腎尿細管性アシドーシス、腎性糖尿、腎性尿崩症、パーター症候群、リドル症候群、多発性嚢胞腎、腎髄質嚢胞症、髄質海綿腎、遺伝性腎炎、および爪膝蓋骨症候群から選択される体液貯留障害の処置に有用である。さらなる一態様では、体液貯留障害が心不全である。さらにもう一つの態様では、心不全がうっ血性心不全、急性心不全または急性うっ血性心不全である。さらには、心不全が急性非代償性うっ血性心不全である。もう一つの態様では、体液貯留障害が多発性嚢胞腎である。さらなる一態様では、多発性嚢胞腎が常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）または劣性常染色体劣性多発性嚢胞腎（ARPKD）である。もう一つの態様では、本発明の方法および組成物が、ナトリウム利尿および/または利尿を増加させる。

20

30

【0055】

製剤

本発明は、実質的に純粋なUgnBの投与、またはUgnAとの非天然混合物に製剤化されたUgnBの投与を特徴とする。例えば、そのような混合物におけるUgnB対UgnAの比は、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5、99:1、またはそれ以上であってよい。

【0056】

本発明のペプチドは、他の薬理作用物質と共に製剤化（またはそれら他の薬理作用物質と一緒に投与）することができる。そのような作用物質には、炭酸脱水酵素阻害剤、チアジドおよびチアジド様利尿薬、ループ（または強力）利尿薬、およびカリウム保持性利尿薬を含む一般的な種類の利尿薬が含まれる。そのような利尿薬の具体例には、フロセミド、ブメタジン、トルセミド、ヒドロクロチアジド、トリアムテリン、インダパミド、エトクリン酸、スピロラク톤、およびメトラゾンなどがあるが、これらに限定するわけではない。

40

【0057】

本明細書において記載する組成物および方法は、例えば限定するわけではないが、次に挙げるものを含む抗高血圧剤またはナトリウム利尿剤との併用療法に使用することができる：

(1) 利尿薬、例えば、クロルタリドン、クロロチアジド（chlorthiazide）、ジクロロフェンアミド、ヒドロフルメチアジド、インダパミド、ポリチアジド、およびヒドロクロ

50

ロチアジドを含むチアジド類;ループ利尿薬、例えばブメタニド、エタクリン酸、フロセミド、およびトルセミド;カリウム保持性利尿剤、例えばアミロライド、およびトリアムテレン;炭酸脱水酵素阻害剤、浸透圧剤(例えばグリセリン)およびアルドステロンアンタゴニスト、例えばスピロノラクトン、エピレノン(epirenone)など;

(2) -アドレナリン遮断薬、例えばアセプトロール、アテノロール、ベタキシロール、ベバントロール、ピソプロロール、ボピンドロール、カルテオロール、カルベジロール、セリプロロール、エスモロール、インデノロール、メタプロロール(metaprolol)、ナドロール、ネビボロール、ペンプトロール、ピンドロール、プロプラノロール、ソタロール、テルタトロール、チリソロール、およびチモロールなど;

(3) カルシウムチャンネル遮断薬、例えばアムロジピン、アラニジピン、アゼルニジピン、バルニジピン、ベニジピン、ベプリジル、シナルジピン(cinaldipine)、クレビジピン、ジルチアゼム、エホニジピン、フェロジピン、ガロバミル、イスラジピン、ラシジピン、レミルジピン、レルカニジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニルバジピン、ニモデピン(nimodepine)、ニソルジピン、ニトレンジピン、マニジピン、プラニジピン、およびベラパミルなど;

(4) アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、例えばベナゼプリル;カプトプリル;セラナプリル(ceranapril);シラザプリル;デラプリル;エナラプリル;エナロプリル(enalapril);フォシノプリル;イミダプリル;リシノプリル;ロシノプリル(losinopril);モエキシプリル;キナプリル;キナプリラート;ラミプリル;ペリンドプリル;ペリンドロプリル(perindropril);クアニプリル(quanipril);スピラプリル;テノカプリル(tenocapril);トランドラプリル、およびゾフェノプリルなど;

(5) 中性エンドペプチダーゼ阻害剤、例えばオマパトリラート、カドキサトリル(cadexatril)およびエカドトリル、フォシドトリル(fosidotril)、サムパトリラート(sampatrilat)、AVE7688、ER4030など;

(6) エンドセリンアンタゴニスト、例えばテゾセンタン、A308165、およびYM62899など;

(7) 血管拡張薬、例えばヒドララジン、クロニジン、ミノキシジル、およびニコチルアルコールなど;

(8) アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、例えばアプロサルタン(aprosartan)、カンデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、オルメサルタン、プラトサルタン、タソサルタン、テルミサルタン、バルサルタン、およびEXP-3137、F16828K、およびRNH6270など;

(9) / アドレナリン遮断薬、例えばニブラジロール、アロチノロールおよびアモスラロールなど;

(10) 1遮断薬、例えばテラゾシン、ウラピジル、プラゾシン、タムスロシン、ブナゾシン、トリマゾシン、ドキサゾシン、ナフトピジル、インドラミン、WHP164、およびXEN010など;

(11) 2アゴニスト、例えばロフェキシジン、チアメニジン(tiamenidine)、モクソニジン、リルメニジンおよびグアノベンズ(guanobenz)など;

(12) アルドステロン阻害剤など;

(13) アンジオポエチン-2-結合剤、例えばW003/030833に開示されているもの;および

(14) A型およびB型ナトリウム利尿ペプチド、例えばネシリチド(Natreacor)、A型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)、ウロジラチン(Ularitide)など。

【0058】

#### 投薬量

本発明のペプチドの投薬量は、次に挙げるものを含むいくつかの因子に依存する:投与方法、処置すべき疾患、疾患の重症度、その疾患を処置することが目的か、それとも予防することが目的か、処置される人の年齢、体重、および健康状態。また、特定患者に関する薬理ゲノミクス(ある治療薬の薬物動態、薬力学または効力プロファイルに対する遺伝

10

20

30

40

50

子型の影響)情報も、使用される投薬量に影響を及ぼしうる。

【0059】

本発明のペプチドは、1日あたり10 $\mu$ g~500mgの投薬量でヒトに投与することができる。さらなる一態様では、1日あたり100 $\mu$ g~100mgのペプチドを投与することができる。さらにもう一つの態様では、1日あたり500 $\mu$ g~10mgのペプチドを投与することができる。

【0060】

本発明のペプチドを使った連日の投薬は必要なくてもよい。治療レジメンは薬物が投薬されないサイクルを必要としてもよく、急性炎症期間中は、必要に応じて随時、治療を施すこともできる。

【0061】

投与

本発明による治療は単独で行うか、他の治療と一緒に行うことができ、在宅で施行することも、医院、診療所、病院の外来患者部門、または病院で施行することもできる。医師が治療の効果を綿密に観察して任意の必要な調節を加えることができるように、処置を病院で開始してもよいし、処置を外来患者ベースで開始してもよい。治療の継続期間は処置される疾患または障害のタイプ、患者の年齢および体調、その患者の疾患の段階およびタイプ、ならびにその処置に対して患者がどのように反応するかに依存する。

【0062】

ある局面において、本発明は、グアニリンファミリーペプチドのB異性体の非経口投与を特徴とする。さらなる一態様では、ペプチドを、静脈内投与、筋肉内投与または皮下投与することができる。さらにもう一つの態様では、ペプチドを静脈内投与することができる。さまざまな態様のための他の投与経路には、局所外用、経皮投与、経頭蓋投与、経鼻投与、および他の形態の全身性投与(例えば吸入、直腸、口腔粘膜、膣、腹腔内、関節内、眼、耳、または経口投与)などがあるが、これらに限るわけではない。本明細書で用いる「全身性投与」は、あらゆる非皮膚投与経路を指し、具体的には、局所外用および経皮投与経路を除外する。

【0063】

実験結果

huUgnAおよびBの特徴および安定性

本発明者らは、LC-MSを使って、市販されているhuUgnAおよびBの初期アイデンティティおよび純度(94%)を確証し、-80 $^{\circ}$ Cにおける貯蔵中には、一方のアイソフォームから他方のアイソフォームへの変換が起こらないことを定期的に検証した。本発明者らは、GC-Cを発現するT84細胞株におけるサイクリックGMP合成を、Aアイソフォームが活性化できるのに対して、Bアイソフォームの力価は100分の1未満であることも確認した(図2A)。さらにまた、huUgnAおよびBの同時適用によって惹起されるT84細胞応答は、huUgnAのみによって惹起されるものと相違しなかったことから(図2B)、huUgnBに対するごくわずかな反応は、GC-C受容体における何らかのアンタゴニスト性を反映しているのではなく、もともと低いそのアゴニスト活性を反映していることが示された。

【0064】

-80 $^{\circ}$ Cにおける個々の異性体の長期安定性とは対照的に、どちらか一方のペプチドをpH4および50 $^{\circ}$ Cでインキュベートすると、A型とB型の混合物への平衡化が容易に起こる(図2C)。しかし、先の研究において詳細に記録されているように、インビトロでは、有意な異性化に何時間も必要である。何らかのまだ同定されていない過程がインビボにおいて異性体のより迅速な相互変換を触媒しているという可能性を検討するために、本発明者らは、huUgnAまたはBを麻酔下のラットに静脈内注入し、T84バイオアッセイとLC-MS分析の両方を使って、どの形態のペプチドが尿中に排泄されるかを特定した。huUgnAを注入したところ、有意な量のGC-C刺激活性が、注入の開始から20分以内に尿中に出現し、注入の終了時までピークに達し、注入の終了後は1時間以内にベースラインに戻った(図3A、黒い記号)。6回の独立したhuUgnA注入実験では同等レベルの尿中活性が回収された(図3B、黒いバー)。次に、本発明者らは、ペプチド排泄がそのピークにあるとき(図3Aにおいて黒

10

20

30

40

50

い矢じりで記したとき)に採取した尿のLC-MS分析を行い、明確に識別できるhuUgnAシグナルを、かるうじて検出できるhuUgnBシグナルと共に観察したことから(図4A)、動物内での異性化は本質的に起こっていなかったことが示された。

【0065】

対照的に、huUgnBを動物に注入した場合は、ごくわずかなGC-C刺激活性が尿中に回収された(図3A、白い記号、および図3B、白いバー、 $n=6$ ;図3Aにおける小さな応答を挿入図に拡大表示している)。挿入図で観察される低レベルの活性は、huUgnB濃度応答曲線(図2A)および腎臓が持つ周知の濃縮効果(本発明者らの研究では、これが、Ugnの尿対血漿比を $>500:1$ にした)から予想されるように、非常に高いレベルのhuUgnBに対する弱い応答を表す可能性が最も高い。この解釈は、対応するLC-MS分析(この分析では、明確に識別できるhuUgnBシグナルが、かるうじて検出できるhuUgnAシグナルと共に示された(図4B))によって裏付けられた。

10

【0066】

次に、本発明者らは、ほぼ等量のAペプチドとBペプチドを含有する対照サンプルを使って、LC-MS手法を較正した(図1)。これら二つの異性体は、抽出イオンクロマトグラムにおいて同じ効率で検出されたことから、図4Aおよび図4Bにおけるピーク面積は、尿中に存在する各異性体の相対量の正確な評価を与えることが立証された。総合すると、これらの結果は、注入されたhuUgnAおよびhuUgnBが、インビボでそれぞれのアイデンティティとユニークな性質を保ち、急性動物試験における使用にとっては十分に安定であることを示している。

20

【0067】

腎ナトリウム排泄に対するhuUgnBおよびhuUgnAの効果

図5に、麻酔下の動物へのiv注入前、注入中および注入後の、尿中ナトリウム排泄に対する二つのhuUgn異性体の効果を、時間の関数として図解する。huUgnAの効果は左側のパネルに示し、huUgnBの効果は右側に示す。顕著な用量依存的ナトリウム利尿応答が観察されたのに対して、時間対照(食塩水注入)動物は、比較的安定したベースラインレベルのナトリウム排泄を示した。対照動物における小さな増加は、小さいが一貫した血圧の降下と並行して起こった。

【0068】

興味深いことに、huUgnAおよびBはどちらもナトリウム利尿をもたらしたが、応答の用量依存性は極めて異なっていた。huUgnBについての用量-応答関係(右側のパネル)は、用量が増加するとナトリウム利尿も増加して、通常の関係であるようだったが、huUgnAに対する応答は、最大応答が $25\text{nmol/kg}$ という比較的低い用量で起こり、用量が増加するにつれて低下したという点で普通ではなかった。これをより定量的に調べるために、本発明者らは(方法の項で説明するとおり)各異性体の各用量によって惹起される累積ナトリウム排泄量を特定した。これら正味の排泄値を分析したところ、huUgnBは、 $9\text{nmol}$ を上回る全ての用量で有意なナトリウム利尿をもたらし、その結果得られる曲線は $\log(\text{アゴニスト})$ 対応答の等式によく当てはまって(方法参照; $p < 0.02$ )、 $\text{ED}_{50}$ は約 $20\text{nmol UgnB/kg BW}$ だった(図6A)。対照的に、huUgnAは、 $25\text{nmol/kg}$ に単一の有効用量を持つ釣鐘状の用量-応答関係をもたらした(図6B、中空の記号)。huUgnAの用量は、これより低くても、高

30

40

【0069】

これら二つのペプチド間における際立った類似性の一つは、惹起される応答の比較的長い潜時(約50分)および長い持続時間であり、270分の観察期間の終了時でもまだ、顕著なナトリウム利尿を認めることができた。これらの応答の鈍さは、腎臓へのペプチド送達速度が予想外に遅いということでは説明することができない。というのも、ペプチドが惹起するナトリウム利尿の大半は、注入されたペプチドが動物から排泄されたと後に起こったことは、図5を図3Aと比較すれば明らかだからである。

50

## 【 0 0 7 0 】

マウスもhuUgnBに対してナトリウム利尿応答を示す。

## 【 0 0 7 1 】

huUgnAに対するナトリウム利尿用量-応答はST-コアによって模倣される

huUgnAに関する通常でないナトリウム利尿用量-応答関係は予想外だった。以前の研究では、Gn/Ugnファミリーのいかなるペプチドに対しても、この種の応答は報告されていなかったからである。この点を考慮して、大腸菌が産生する熱安定性エントロトキシンのフラグメントであるST-コアを使って、前記注入プロトコールを繰り返した。この細菌ペプチドは、UgnAの構造的および機能的アナログであり、T84細胞におけるサイクリックGMP刺激に関して、UgnAの約10分の1のEC<sub>50</sub>を持つ。これらの相対的力価が腎臓にも及ぶとすれば、ST-コアの効果は、huUgnAの効果と比較して、類似するが、わずかに左方移動するはずである。図6Bは、ST-コア（中実の記号）によって惹起される正味のナトリウム排泄応答を、huUgnA（中空の記号）によって惹起されるものと比較している。全体的な応答パターンの類似性は際立っているが、驚いたことに、ST-コアはhuUgnAよりも有効性の低いナトリウム利尿因子であるらしく、ST-コアによって誘発される最大ナトリウム利尿はわずかに少なく、応答は右方移動した。

10

## 【 0 0 7 2 】

huUgnAおよびhuUgnBに対する応答は相加的でない

AおよびB異性体で得られる応答プロファイルの独特な性質を考えると、同時に適用した場合にこれら二つのペプチドがどのように相互作用するかを決定することは興味深いことだった。これを調べるために、動物に、35nmol/kgのhuUgnBと25または100nmol/kgのhuUgnAとを含む混合ペプチド溶液を注入した。こうして、有効用量のhuUgnBを、等力価のhuUgnA（25nmol/kg）または非有効過最大容量のhuUgnA（100nmol/kg）と組み合わせた。これら同時注入プロトコールの結果を図7に示す。興味深いことに、混合された最大容量のhuUgnAおよびBは相加的応答をもたらさなかった。さらにまた、35nmolのhuUgnBに対する正常なナトリウム利尿応答は、100nmolという過最大用量のhuUgnAと組み合わせると、ほとんど完全に抑制されたことから、高濃度のこれら二つのペプチド間における深い生理的相互作用が示された。

20

## 【 0 0 7 3 】

他の生理学的パラメータに対するhuUgnBおよびhuUgnAの効果

30

血圧、腎血流量およびGFR

血圧は、全ての動物において、時間が経つにつれてわずかに低下したが、どの群でも100mmHg未満には下がらなかった（表1）。注入前期間、注入期間、または注入後期間中に、対照群および実験群における平均動脈圧間に有意差はなかった（表1）。

## 【 0 0 7 4 】

対照ラットでは、腎血流量（RBF）が、注入前期間は2.6 + 0.4ml/分/g KWで、また注入後期間は2.5 + 0.5ml/分/g KWで安定していた（n = 4）。huUgnAおよびB注入ラットにおけるRBFは、注入前期間は対照群と相違しなかったが、1kgあたり25nmolのUgnA後（2.7 + 0.3から3.2 + 0.1ml/分/g KWへ、p < 0.001、n = 4）および35nmolのhuUgnB後（2.5 + 0.1から3.0 + 0.4へ、p < 0.001、n = 4）は、RBFの小さいが有意な増加が起こった。これらの変化は、血管抵抗の小さな有意でない低下と一致した。GFRは、全ての群で安定していた（表1）。

40

## 【 0 0 7 5 】

【表1】

UNaV nEq/min/g KW	時間			濾過量に対するFENa%			n
	1	2	3	1	2	3	
	注入前	注入中	注入後	注入前	注入中	注入後	
時間対照	84±18	119±17	188±28	0.09±0.02	0.12±0.02	0.22±0.03	10
huUgnA 12	85±20	118.1±25	222±33	0.08±0.02	0.10±0.02	0.17±0.02	8
huUgnA 25	93±7	291.7±77*	664±75***	0.09±0.01	0.27±0.08*	0.68±0.08***	8
huUgnA 50	73±10	117.5±22	342±63*	0.06±0.01	0.10±0.01	0.28±0.05	14
huUgnA 100	66±9	130.8±32	328±80	0.06±0.01	0.12±0.03	0.27±0.06	5
huUgnA 200	67±1	120.6±18	342±51	0.06±0.01	0.11±0.02	0.29±0.03	3
huUgnB 9	67±17	134.6±53	195±37.	0.05±0.01	0.09±0.02	0.21±0.04	4
huUgnB 18	83±19	155.2±34	538±81***	0.07±0.01	0.12±0.03	0.42±0.08	10
huUgnB 35	132±40	229.4±47	729±73***	0.12±0.02	0.27±0.07	0.62±0.10***	10
huUgnB 70	87±31	285.7±165	696±151***	0.08±0.03	0.24±0.14	0.52±0.10*	8
huUgnB 140	103±8	212.1±67	906±170***	0.08±0.01	0.18±0.05	0.65±0.11**	3
UKV nEq/min/g KW				濾過量に対するFEK%			
時間対照	640±69	1096±64	1088±66	22.7±2.3	32.9±2.4	36.6±2.3	10
huUgnA 12	709±74	1097±54	1299±51	18.8±2.3	29.8±3.6	34.9±2.7	8
huUgnA 25	780±69	1292±80	1309±68	25.6±2.4	40.7±3.5	46.5±3.8	8
huUgnA 50	722±52	988±66	1180±57	20.8±2.1	32.0±2.7	36.3±3.6	14
huUgnA 100	602±51	878±60	970±72	19.3±2.5	28.0±3.5	29.9±2.9	5
huUgnA 200	860±118	1203±161	1380±73	27.7±5.9	40.8±7.7	57.5±6.7***	3
huUgnB 9	655±79	840±83	943±82	23.4±6.0	30.6±6.1	34.8±3.1	4
huUgnB 18	592±71	860±72	1014±79	20.0±2.3	29.6±3.2	39.2±2.6	10
huUgnB 35	729±79	837±84	998±85	25.7±2.4	32.6±3.7	38.9±3.0	10
huUgnB 70	791±265	1297±209	1491±183*	20.4±5.5	37.7±9.8	47.1±5.6	8
huUgnB 140	770±78	1086±124	1396±89	28.3±0.9	49.2±3.6	58.4±3.5**	3

10

20

30

40

ペプチド注入前の60分間（注入前）、huUgnAまたはhuUgnB注入中の60分間（注入中）、およびペプチド注入後の90分間（注入後）における、ナトリウムおよびカリウム排泄の平均値±SEM。注入されたペプチドの用量をnmol数で示す。各列内の実験値を、時間対照群における対応する値に対して、ANOVAおよび選ばれた多重比較についてはボンフェローニ法によって検定した。

\* = p < 0.05、\*\* = p < 0.01、\*\*\* = p < 0.005

【0076】

利尿

本プロトコルの最初の1時間に尿流量のわずかな増加が全ての群で起こった（表2）。例えば、対照ラットでは、尿流量が、注入前期間の2.1±0.2から注入期間中の2.6±0.2 μl/分/g KWへとわずかに増加した（表2）。しかし、全ての実験群がこれと同じパターンを示し、それらの間に統計的有意差はなかった。同様に、全てのペプチド注入ラットにおいて、尿流量は、ペプチド注入中、試験した全ての用量において、対照群と相違しなかった。しかし、注入後期間における尿流量は、huUgnAおよびBのいくつかの用量において対照群より有意に高く、それは用量-応答曲線の上端において最も顕著だった（表2）。

【0077】

【表2】

BP mmHg	V $\mu$ /min/g KW						GFR $\mu$ /min/g KW			n
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	注入前	注入中	注入後	注入前	注入中	注入後	注入前	注入中	注入後	
時間対照	123 $\pm$ 3	114 $\pm$ 3	109 $\pm$ 5	2.12 $\pm$ 0.17	2.60 $\pm$ 0.18	2.77 $\pm$ 0.23	814 $\pm$ 77	882 $\pm$ 71	901 $\pm$ 69	10
huUgnA 12	121 $\pm$ 4	110 $\pm$ 4	104 $\pm$ 3	2.07 $\pm$ 0.23	2.34 $\pm$ 0.14	2.73 $\pm$ 0.14	895 $\pm$ 51	869 $\pm$ 64	923 $\pm$ 66	8
huUgnA 25	119 $\pm$ 3	111 $\pm$ 4	105 $\pm$ 4	2.13 $\pm$ 0.17	2.98 $\pm$ 0.28	3.53 $\pm$ 0.25*	820 $\pm$ 40	886 $\pm$ 66	823 $\pm$ 49	8
huUgnA 50	117 $\pm$ 3	106 $\pm$ 3	101 $\pm$ 3	2.01 $\pm$ 0.13	2.32 $\pm$ 0.16	3.07 $\pm$ 0.20	858 $\pm$ 52	817 $\pm$ 53	869 $\pm$ 49	14
huUgnA 100	121 $\pm$ 4	115 $\pm$ 3	109 $\pm$ 4	1.76 $\pm$ 0.22	2.48 $\pm$ 0.26	2.67 $\pm$ 0.23	807 $\pm$ 62	858 $\pm$ 55	906 $\pm$ 38	5
huUgnA 200	121 $\pm$ 7	113 $\pm$ 5	112 $\pm$ 4	2.14 $\pm$ 0.39	2.84 $\pm$ 0.40	4.12 $\pm$ 0.35**	857 $\pm$ 43	827 $\pm$ 61	849 $\pm$ 24	3
huUgnB 9	115 $\pm$ 5	108 $\pm$ 6	107 $\pm$ 5	1.84 $\pm$ 0.28	2.22 $\pm$ 0.19	2.55 $\pm$ 0.18	921 $\pm$ 57	918 $\pm$ 66	947 $\pm$ 60	4
huUgnB 18	124 $\pm$ 2	117 $\pm$ 3	113 $\pm$ 3	1.79 $\pm$ 0.14	2.40 $\pm$ 0.15	3.11 $\pm$ 0.32	890 $\pm$ 55	936 $\pm$ 76	877 $\pm$ 80	10
huUgnB 35	118 $\pm$ 3	108 $\pm$ 4	107 $\pm$ 3	2.38 $\pm$ 0.25	2.53 $\pm$ 0.16	3.84 $\pm$ 0.27***	866 $\pm$ 64	830 $\pm$ 48	870 $\pm$ 53	10
huUgnB 70	119 $\pm$ 3	107 $\pm$ 5	107 $\pm$ 4	2.04 $\pm$ 0.20	3.11 $\pm$ 0.71	3.92 $\pm$ 0.5*	883 $\pm$ 95	867 $\pm$ 86	876 $\pm$ 26	8
huUgnB 140	123 $\pm$ 5	119 $\pm$ 5	117 $\pm$ 5	2.24 $\pm$ 0.14	2.71 $\pm$ 0.40	4.50 $\pm$ 0.80**	858 $\pm$ 86	788 $\pm$ 67	924 $\pm$ 46	3

10

ペプチド注入前の60分間（注入前）、huUgnAまたはhuUgnB注入中の60分間（注入中）、およびペプチド注入後の90分間（注入後）における、平均動脈血圧（BP）、1分あたりの尿流量（V）、および1分あたりの糸球体濾過率（GFR）の平均値 $\pm$ SEM。注入されたペプチドの用量をnmol数で示す。各群の動物数を括弧内に示す。各カラム内の実験値を、時間対照群における対応する値に対して、ANOVAにより、選ばれた多重比較についてはボンフェローニ法を使って検定した。

20

\* =  $p < 0.05$ 、\*\* =  $p < 0.01$ 、\*\*\* =  $p < 0.005$

## 【0078】

## カリウム利尿

huUgnAおよびBのカリウム利尿効果を表1および図8に要約するが、それらは、これらのペプチドのナトリウム利尿効果よりもはるかに弱い。実際、最高用量のhuUgnAは応答を惹起する傾向があったものの（ $p > 0.05$ ）、試験したどの用量でも、huUgnAの注入中または注入後に、UKVの統計的に有意な増加は観察されなかった。huUgnBの場合は、70nmol/kg用量だけが、注入後期間に起こる一貫したUKVの増加をもたらした。FEKは、注入後期間に対照レベルより増加したが、それは最高用量のhuUgnAおよびBの後にのみ起こった。（同ペプチドのナトリウム利尿効果と比較して）カリウム利尿に関するこの右方移動した用量依存性から、利尿効果およびカリウム利尿効果は、ナトリウム利尿応答を誘発する受容体とは異なる受容体によって媒介されるという可能性が考えられる。

30

## 【実施例】

## 【0079】

## 実験方法

実験は、Charles River Breeding Laboratories（ノースカロライナ州ローリー）から入手した139匹の雄Sprague Dawleyラットで行った。動物は、水と標準ラット飼料を自由摂取させ、12時間の明/暗周期で維持した。全ての実験手法は、ノースカロライナ大学チャペルヒル校にある施設内動物実験委員会によって承認され、NIHの実験動物の管理と使用に関する指針に従って行われた。

40

## 【0080】

## ラットの準備

ラットは、クリアランス実験に先だてて絶食させず、体重は試験時点で250~340gの範囲だった。ペントバルビタールナトリウム（55mg/kg BW）の腹腔内注射によって麻酔を誘導し、間欠的静脈内補充によって手術面（surgical plane）に維持した。サーボ制御式加温手術台で核心体温を37℃に維持した。動物は気管中に挿入されたPE240カニニューレを通して自発呼吸した。FITC標識イヌリン（0.4% W/V、Sigma、ミズーリ州セントルイス）を含有する等張食塩水の静脈内注入用のPE50カニニューレ管と、2本のPE10カニニューレ（一方は補充麻酔薬用、他方はペプチド注入用（実験プロトコルの項で後述する））とを使っ

50

て頸静脈にカテーテルを挿入した。正中腹部切開によって尿管を露出し、各腎臓から約1cmの位置に、PE10管を使って、カニューレを挿入した。尿を20分間ずつ収集し、体積を重量で見積もった。動脈血圧の連続測定と、各尿収集の中間点で採取される間欠的血液サンプル(50 µl)用に、PE50管を使って大腿動脈にカニューレを挿入した。

#### 【0081】

イヌリンクリアランスを測定するために、全てのラットに、FITC標識イヌリンを含有する等張食塩水の持続的静脈内注入(10 µl/分/100g BW)を与えた。コンジュゲートしていないFITCラベルと小さいイヌリンポリマーを、等張食塩水に対する終夜透析(SpectraPor 6透析膜、1kDaカットオフ限界、Sectrum Laboratories、カリフォルニア州ランチョドミンゴ)によって、イヌリン溶液から除去した。各実験前に、溶解していない微粒子を、0.2 µMフィルター(Steriflip、Millipore Inc.、マサチューセッツ州ビルリカ)を通した濾過によって溶液から除去した。少なくとも1時間は平衡化の時間をとってから尿収集を開始し、その時点で、血漿イヌリン濃度は $30 \pm 3$  µg/mlという平均値で安定化していた。この手法により、腎機能が塩および水制限に対するホメオスタシス応答と合致する水欠乏状態がもたらされた。

10

#### 【0082】

動脈血圧は、心血管アナライザー(Model 50110、Stoelting Instruments、イリノイ州ウッドデール)に接続された圧変換器で測定した。一部のラットでは、左腎動脈に配置して血流モニターに接続した流量プローブ(モデル1PRBプローブおよびモデルT420モニター、Transonic Systems Inc.、ニューヨーク州イサカ)を使って左腎血流量を測定した。動脈圧、心拍数、および腎血流量は、Open Layersデータ収集ソフトウェア(Dtx\_Ez、Data Translation Inc.、マサチューセッツ州マールバロ)を使ってWindowsベースのパーソナルコンピュータで表示および保存するために、A/D変換器(Keithley instruments、オハイオ州クリーブランド、OH Model KUSB 3100)でデジタル化した。血漿および尿中のナトリウムとカリウムの濃度は、炎光光度法(Model 943、Instrumentation Laboratory Co.、マサチューセッツ州レキシントン)によって測定した。糸球体濾過率(GFR)は、FITC標識イヌリンの腎クリアランス率として測定した。

20

#### 【0083】

##### 実験プロトコール

術後平衡化(約60分)および各20分で3回の対照クリアランス期間の後、huUgnAまたはBを10 µl/分の流量で60分間にわたって頸静脈中に注入し、次に実験の残りの期間中は等張食塩水に戻した。huUgnAの注入用量は、合計38匹のラットで12、25、50、100、または200 nmol/kg BW、huUgnBの用量は35匹のラットで9、18、35、70、および140 nmol/kg BWだった。UgnAミメティックである大腸菌STh(ST-コア)は、32匹のラットからなる第3の群に、17、32、66、133、および266 nmol/kgの用量で注入した。これらの注入に対する腎排泄応答は、ゆっくり発生し、長時間持続したので、クリアランス期間はペプチド注入の終了後、2~3時間継続した。この長時間にわたる時間経過により、プロトコールは、各ラットで1ペプチドの1用量に制限された。ラット10匹の対照群にはペプチド注入の代わりに10 µl/分の等張食塩水を与えたが、その他の点は、実験群と同じように処置した。

30

#### 【0084】

huUgnAとBの混合注入の効果を、35 nmol/kgのhuUgnBを25 nmol/kg(n=5)または100 nmol/kg(n=5)のhuUgnAと一緒に与えた二つのラット群で調べた。それ以外の点では、実験プロトコールを、個別のペプチド注入の場合と同じにした。

40

#### 【0085】

##### 使用したペプチド

huUgnAおよびhuUgnBは、供給業者(Bachem Americas Inc.、カリフォルニア州トランス)から入手した。ST-コアは、Ironwood Pharmaceuticals Inc(マサチューセッツ州ケンブリッジ)によって提供された。これらのペプチドを、0.1% BSAを含有する滅菌食塩水に、1 µg/µlの濃度で溶解した。これは、huUgnAの場合は500 pmol/ml、huUgnBの場合は350 pmol/ml、ST-コアの場合は670 pmol/mlに相当した。これらの溶液を等分して-80 °Cで保存

50

した後、動物に注入する直前に融解し、0.6mlの等張食塩水中に希釈して所望する濃度を得た。

#### 【0086】

##### イヌリンアッセイ

このアッセイは、LorenzおよびGruensteinによって記載された方法に基づいた。尿サンプルをHEPES緩衝食塩水で希釈（尿流量に基づいて3、5、10、または20倍）して、pHを中和すると共に、FITC発光の強度を検出器レンジ内にした。少量（3~5 $\mu$ l）の希釈尿サンプルおよび無希釈血漿サンプルを、一定内径のキャピラリーチューブ（10 $\mu$ l Microcapチューブ、Drummond Scientific Company、ペンシルベニア州ブルームオール）に吸い込み、両端を水飽和鉱油で密封した。Metamorphイメージングソフトウェア（Molecular Devices、カリフォルニア州サンニェール）によって制御されるCCDカメラ（Orca II、Hamamatsu Inc.、ニュージャージー州ブリッジウォーター）を装着した落射蛍光顕微鏡（Axiovert S100TV、Carl Zeiss Inc.、ニューヨーク州ソーンウッド）を使って各サンプルを倍率10倍で撮像することによりFITC発光強度を測定した。蛍光強度は、尿および血漿についてそれぞれ25または500msecの露光中に、各サンプルの一貫した中央領域から得られる平均ピクセル強度として測定した。バックグラウンド強度は、イヌリン注入の開始前に同じラットから収集した膀胱尿および尾静脈血漿を使って、同じ方法で測定した。血漿および尿サンプル中のイヌリン濃度は、各実験で使用した注入溶液から作成した標準曲線から算出した。各アッセイにおいて、蛍光強度とイヌリン濃度の間には高度に有意な線形関係が得られた（16の代表的アッセイに関して、 $r^2 = 0.993$ 、 $p < 0.001$ ）。

10

20

#### 【0087】

##### Ugnアッセイ

##### Ugn異性体のHPLC分析およびマスマスペクトロメトリー

huUgnAおよびB異性体の完全性と純度を、液体クロマトグラフィー/マスマスペクトロメトリー（LC-MS）分析によって確認した。二つのUgn異性体は逆相HPLCカラムで異なる保持時間を有する（図1、破線；huUgnAはhuUgnBの約0.35分前に溶出する）。分離は、Acquity UP LCシステムを使用し、98%バッファーA（0.1%ギ酸）、2%バッファーB（85:10:5アセトニトリル/イソプロピルアルコール/5mM NH<sub>4</sub>OAc pH5.8）で平衡化したThermo Fisher Scientific Inc（マサチューセッツ州ウォルサム）のHypersil Gold AQ 2.1 $\times$ 50mmカラムにおいて0.4ml/分の流量で行った。同じバッファーで2.5分間の洗浄後に、25分間で2%バッファーBから80%バッファーBへの直線的勾配でペプチドを溶出し、1分間保持してから、カラムを洗浄するために2分間で90%Bまで増加させ、次に3分間で2%バッファーBに戻した。

30

#### 【0088】

ペプチド質量は、正イオンモードで稼働するエレクトロスプレーイオン化（ESI）源を装備したMicromass Q-Tof II装置を使って決定した。m/z100~1800の質量範囲でスキャンするように装置をプログラムした。分子量予測およびデータ解析は、MassLynxバージョン4.0ソフトウェアで行った。20 $\mu$ lの尿を、いかなるサンプル調製も行わずに、Q-Tof IIと直列に接続されたAcquity UPLCシステムを使って直接注入した。対照実験では、huUgnA標準物質とhuUgnB標準物質について同等な回収率が得られたので（図1、破線（抽出クロマトグラム）内のピーク面積を、実線（UV吸光度）内のそれと比較されたい）、iv注入後の尿におけるペプチド回収率の定量的比較にLC-MS技法を使用することの妥当性が立証された。

40

#### 【0089】

##### huUgnA様活性のバイオアッセイ

注入したペプチド溶液および実験中に収集された尿におけるhuUgnA様生物活性の濃度は、以前記載されたように、T84細胞ベースのバイオアッセイを使って測定した。T84細胞は、Ugn、GnおよびSTコアペプチドなどのGC-C受容体アゴニストに応答してサイクリックGMP産生量を増加させる結腸癌細胞株である。T84細胞を12穴培養クラスターでほぼコンフルエントに成長させた後、未知サンプルまたは標準濃度のhuUgnAと共にインキュベートした

50

。標準物質または尿サンプルをバイオアッセイ培地（1mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、0.03mMフェノールレッド、137mM NaCl、5.4mM KCl、0.25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.3mM CaCl<sub>2</sub>、1.0mM MgSO<sub>4</sub>、4.2mM NaHCO<sub>3</sub>、10mM HEPPES、pH7.0に緩衝化したもの）に希釈し、フェノールレッド指示薬色素を指針として、必要であればpHを7.0に調節した。UGnに対するT84細胞の応答は著しくpH依存的であることが確立されているので、このpH調節は必要である。サイクリックGMPの分解を防止するために、広スペクトルホスホジエステラーゼ阻害剤（イソブチルメチルキサンチン）を含めた。30分後に、細胞を溶解し、サイクリックGMPレベルをラジオイムノアッセイ（Biomedical Technologies Inc、マサチューセッツ州ストートン）によって測定した。標準物質および未知サンプルを3重にアッセイした。未知サンプルによって誘導される増加したサイクリックGMPレベルを、huUgnA標準溶液から作成した標準曲線への内挿によってhuUgnA濃度に変換し、1ウェルあたりのμmol Ugn様活性（平均±sem）として報告する。標準物質によって惹起される応答を、後述するlog（アゴニスト）対応答の等式を使って当てはめた。

10

【0090】

データ解析

ナトリウム排泄率およびカリウム排泄率は、絶対値（UNaVおよびUKV）として表すか、濾過負荷量で割って分画排泄率（FENaおよびFEK）とする。糸球体濾過率（GFR）はイヌリンクリアランスに等しいと見なした。ペプチド注入に対する正味のナトリウム利尿応答は、各ラットにおける注入中および注入後収集期間の総Na排泄量を、対照群から得た対応する平均値を差し引いた後に合計することによって評価した。こうして得た累積正味排泄量は、注入された各用量のペプチドに対するナトリウム利尿応答の尺度になる。両方の腎臓から得た結果を各ラットについて平均してから、群平均±semを算出した。

20

【0091】

群比較は、ペプチド用量を列変数（column variable）として使用する一元配置分散分析（ANOVA）で行った。選ばれた多重比較についてボンフェローニ法による事後検定が容易になるように、列をさらに、注入前、注入中および注入後サブグループに分割した。行変数（row variable）は、各ラットについて各クリアランス期間から得られる個々の測定値とした。注入前、注入中および注入後期間における対照値を、ペプチド注入ラットから得られた対応する値と比較することにより、応答を統計的有意性について検定した。各実験群には、huUgnA、huUgnB、またはST-コアの五つの異なる用量を含めた。したがって、各群の各測定変数について15の比較が必要だった。

30

【0092】

全てのグラフ化および統計的検定は、Prism 5.01グラフ化および解析プログラム（Graphpad Software、カリフォルニア州サンディエゴ）で行った。huUgnAおよびST-コアが惹起する正味のナトリウム排泄に関する用量-応答曲線は、スプラインアルゴリズムを使って当てはめた。huUgnBが惹起する正味のナトリウム排泄およびT84細胞バイオアッセイ応答に関する用量-応答曲線については、log（アゴニスト）対応答の等式：

$$(\text{各用量における応答}) = (\text{対照応答}) + \left( (\text{最大応答} - \text{対照応答}) / [1 + 10^{-(\log(\text{ED}_{50}) - \log(\text{用量}_{\text{Ugn}}))}] \right)$$

を使って、当てはめた。

40

【0093】

他の態様

本明細書に記載の上記の方法および組成物のさまざまな変更態様および変形は、本発明の範囲および要旨から逸脱することなく、当業者には明白であるだろう。本発明を具体的な望ましい態様に関して説明したが、本願に係る発明は、そのような具体的態様に不当に限定されるべきではないと理解すべきである。実際、記載した本発明実施様式のさまざまな変更態様であって、医学、免疫学、薬学、内分泌学、または関連分野の当業者にとって自明であるものは、本発明の範囲に含まれるものとする。

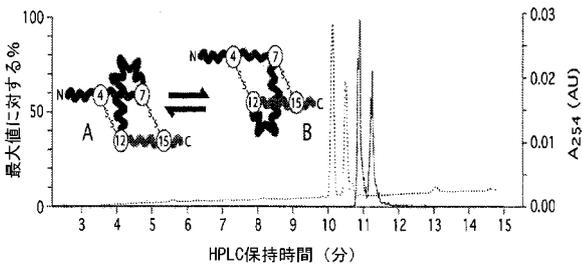
【0094】

本明細書で言及した刊行物は全て、個々の独立した刊行物が具体的かつ個別に参照によ

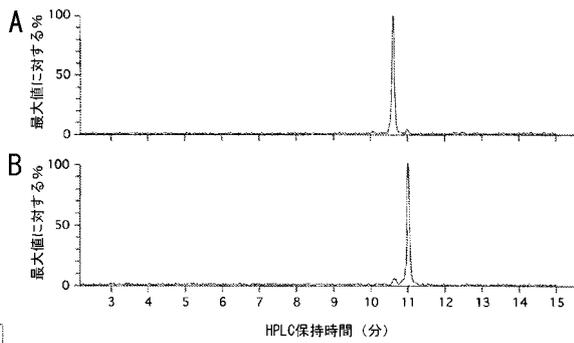
50

り本明細書に組み入れられた場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

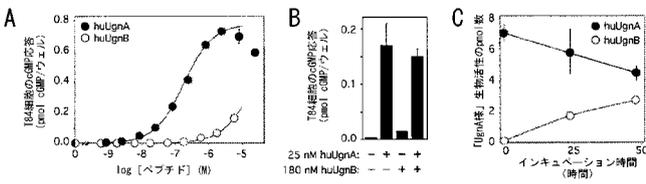
【 図 1 】



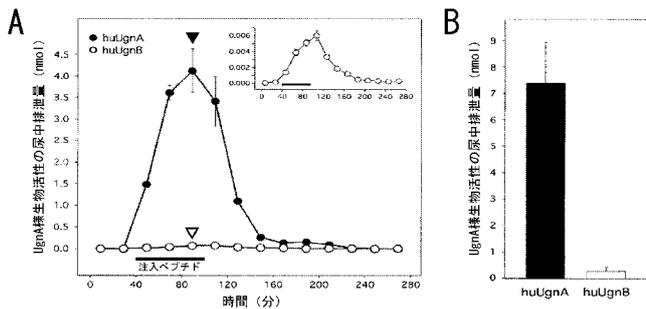
【 図 4 】



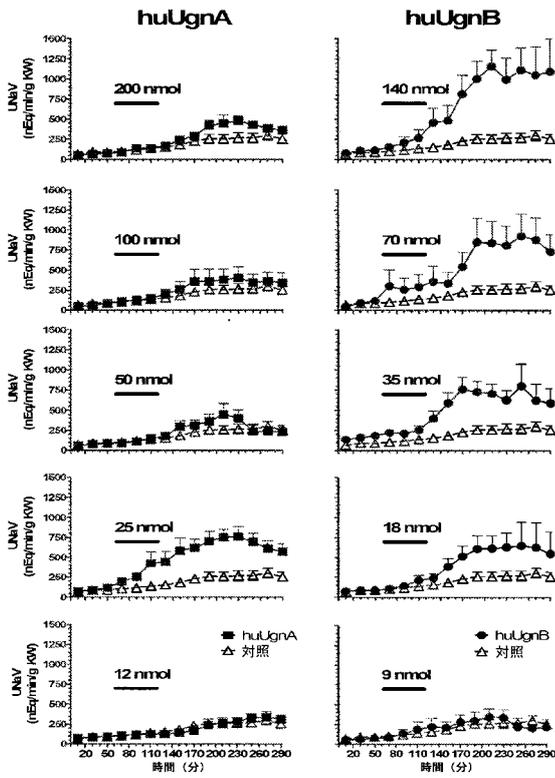
【 図 2 】



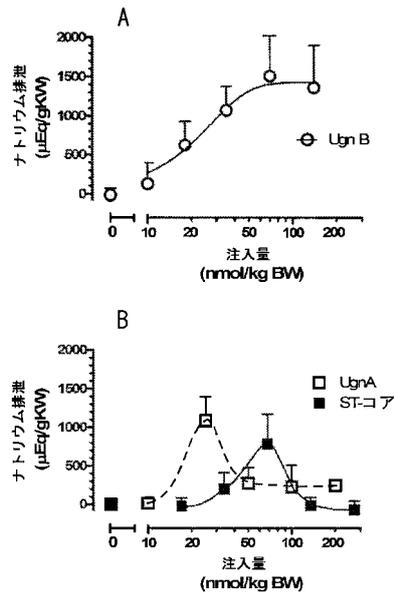
【 図 3 】



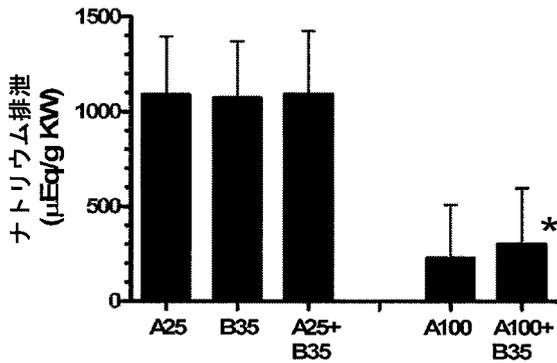
【 図 5 】



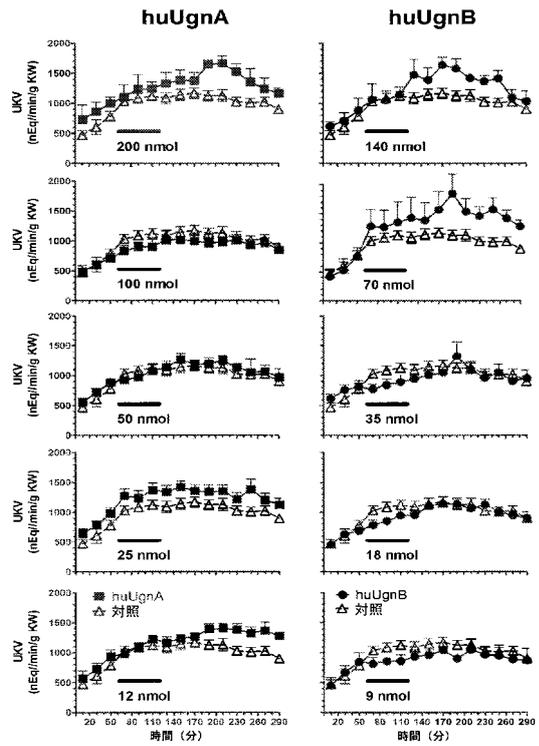
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【手続補正書】

【提出日】平成23年8月4日(2011.8.4)

【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】

2012510518000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/66227
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/00 (2010.01) USPC - 530/326 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)- A61K 38/00 (2010.01) USPC - 530/326 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8)- C07K 5/00; C07K 7/00; C07K 16/00; C07K 17/00 (2010.01) USPC - 514/9, 514/13 (search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google/Scholar: Guanylin, uroguanylin, renoguanylin, lymphoguanylin, stereoisomer, isomer, topological, topoisomer, fluid retention, edema, B isomer, isomer B, UgnB, GnB. GenCore 6.3: SEQ ID NO:5		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2008/0221022 A1 (Goy et al.) 11 September 2008 (11.09.2008); SEQ ID NO:2, para [0096], [0099], [0103], [0110]	1-7, 13-14, 17-20, 23-24
Y	Nakazato et al. Identification of biologically active and inactive human uroguanylins in plasma and urine and their increases in renal insufficiency. BBRC 1996, 220:586-593; page 586, para 1; page 587, para 2; page 588, para 1	1-7, 13-14, 17-20, 23-24
Y	Sindic et al. Guanylin and uroguanylin regulate electrolyte transport in isolated human cortical collecting ducts. Kidney International 2005, 67:1420-1427; Abstract; page 1426, para 2	1-7, 13-14, 17-20, 23-24
Y	Chino et al. Topological isomers of human uroguanylin: interconversion between biologically active and inactive isomers. FEBS Lett 1998, 421:27-31; Figure 2; page 29, para 2; page 30, para 1	4-6
Y	Schulz et al. Carboxy-terminal extension stabilizes the topological stereoisomers of guanylin. J. Peptide Res. 1998, 52:518-525; Abstract; page 521, para 2	7, 23-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 May 2010 (21.05.2010)		Date of mailing of the international search report <b>09 JUL 2010</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/66227

**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.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 25-35, 59  
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:

Group I: claims 1-24, drawn to a method comprising administering a composition comprising a peptide, wherein said peptide is the B isomer of a guanylin family peptide, wherein said B isomer peptide is present in said composition at a non-naturally occurring ratio with the A form of said peptide. The first invention encompasses an uroguanylin peptide comprising SEQ ID NO:5. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional uroguanylin or guanylin of specific amino acid sequences to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected uroguanylin or guanylin of the specific amino acid sequence(s).  
[NOTE: Claims 8-12, 15-16, 21-22 were excluded from Group I, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

-----Please see Supplemental Sheet-----

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1-7, 13-14, 17-20, 23-24, restricted to uroguanylin of SEQ ID NO:5

**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

International application No.

PCT/US 09/66227

\*\*\*\*\* SupplementalBox \*\*\*\*\*

## Continuation of Box III:

Group II+, claims 36-58, drawn to a composition comprising a peptide, wherein said peptide is the B isomer of a guanylin family peptide, wherein said B isomer peptide is present in said composition at a non-naturally occurring ratio with the A form of said peptide. The first invention encompasses an uroguanylin peptide comprising SEQ ID NO:5. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional uroguanylin or guanylin of specific amino acid sequences to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected uroguanylin or guanylin of the specific amino acid sequence(s).

The inventions listed as Groups I+ through II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups II+ does not include the inventive concept of administering a composition comprising a peptide, wherein said peptide is the B isomer of a guanylin family peptide, wherein said B isomer peptide is present in said composition at a non-naturally occurring ratio with the A form of said peptide, as required by Group I+.

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of a composition comprising a peptide, wherein said peptide is the B isomer of a guanylin family peptide, wherein said B isomer peptide is present in said composition at a non-naturally occurring ratio with the A form of said peptide. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, a paper titled "Topological isomers of human uroguanylin: interconversion between biologically active and inactive isomers" by Chino, et al. (FEBS Letters 1998, 421:27-31) discloses said composition (pg 28, "Fig. 2. Separation of the isolated compounds I and II of human uroguanylin (1:1 mixture) on RP-HPLC under isocratic conditions," wherein the second peak comprises compound II, i.e. uroguanylin B; pg 29, col 2, "3.2. Stability of compounds I and II of human uroguanylin Compounds I and II have distinctly different retention times on RP-HPLC at 40C, and thus could be separately isolated at purities greater than 99%"; pg 30, col 1, "In 50 mM NH4OAc buffer at pH 7.7, both compounds were generally more stable (slower conversion) than in acidic milieu.") As said composition was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Groups I+ and II+ is the specific amino acid sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because US 2008/0221022 A1 to Goy, et al. (11 September 2008), in the context of prouroguanylin, and synthetic analogs or proteolytic cleavage products derived from it, as therapeutic agents for diseases involving salt (title), discloses the claimed SEQ ID NO:5 (Goy, et al., SEQ ID NO 2). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is administering a composition comprising a peptide, wherein said peptide is the B isomer of a guanylin family peptide, wherein said B isomer peptide is present in said composition at a non-naturally occurring ratio with the A form of said peptide. However, this shared technical feature is obvious over prior art. Specifically, a paper titled "Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C" by SINDIC et al. (Kidney International 2005, 68: 1008-1017) discloses that "Electrolyte and water homeostasis mostly depend on differentially regulated intestinal and renal transport. Guanylin and uroguanylin were proposed as first hormones linking intestinal with renal electrolyte and water transport, which is disturbed in pathophysiology. Guanylate cyclase C is the intestinal receptor for these peptides, but in guanylate cyclase C-deficient mice renal effects are retained" (Abstract), and further discloses that "These results suggest the existence of two signalling pathways for guanylin peptides in principal cells of mouse CCD. One pathway is cGMP- and PKG-dependent but not mediated by guanylate cyclase C, the second involves PLA2 and arachidonic acid. The first pathway most likely leads to an activation of the basolateral K+-conductance while the latter probably results in decreased activity of ROMK channels in the luminal membrane" (Abstract). Thus, one of ordinary skill in the art would have been motivated to administer a purified isomer of a guanylin family peptide, with the aim of targeting ROMK channels in the luminal membrane. As said method was obvious at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/12	
<b>C 0 7 K 14/46 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/46	

(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, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, PE, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. WINDOWS

- (74) 代理人 100102978  
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
- (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 カリー マーク ジー .  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 スターリング ホール アベニュー 1 8
- (72) 発明者 ゴイ マイケル エフ .  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チャペル ヒル ディクシー ドライブ 1 4 2
- (72) 発明者 ケスラー マルコ エム .  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ダンバーズ コリンズ ストリート 3 5 # 1 3
- (72) 発明者 モス ニコラス ジー .  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 カーボロ クウェイル ロースト ドライブ 1 0 4
- (72) 発明者 ソリンガ ロバート マーセル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ レイトン ストリート 1 アパートメン

ト 303

(72)発明者 ジマー ダニエル ピー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル ブロードウェイ 435 ユニット 2

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA18 CA59 DB02 NA14 ZA362 ZA422

ZA752 ZA812

4H045 AA10 BA10 CA40 EA25 EA26 FA74